

小麦籽粒多酚氧化酶提取方法的比较研究

常成 李保云 尤明山 李卫华 刘广田

(中国农业大学 农学与生物技术学院, 北京 100094)

摘要 采用3种不同方法提取21个小麦品种籽粒的多酚氧化酶(PPO),以综合研究不同的提取方法与其活性的关系,结果显示:在3种提取方法中,用十二烷基硫酸钠(SDS)提取全麦粉 PPO 的活性平均值和变异系数最高,分别为 57.2 U/(g·min)和 77.7%;而用磷酸盐提取全麦粉 PPO 活性平均值为 19.6 U/(g·min),变异系数为 59.6%,低于前者。用磷酸盐提取完整籽粒的 PPO 活性平均值及变异系数最低,分别为 5.1 U/(g·min)和 16.7%。简单相关分析结果表明,分别用磷酸盐和 SDS 提取全麦粉 PPO 活性的相关性最好,相关系数达 0.954;其次是磷酸盐提取的完整籽粒和 SDS 提取全麦粉的 PPO 活性的相关性,其相关系数为 0.925;最小的是用磷酸盐分别提取完整籽粒和全麦粉 PPO 活性的相关性,相关系数为 0.877。相关性均达极显著水平。同时研究了磷酸盐和 SDS 分别提取 PPO 活性的时间特性,结果表明:对于 PPO 活性差异较大的品种,其活性曲线的差别也较大;对于同一品种,这2种方法提取的 PPO 活性面积(活性曲线下包含的面积)也差异明显。上述说明磷酸盐缓冲液中加入 SDS 可有效地改善 PPO 的提取效果;不同品种、不同的提取方法,PPO 的活性曲线也有明显差异。

关键词 普通小麦;多酚氧化酶 PPO;提取方法;活性曲线

中图分类号 S 512.103

文章编号 1007-4333(2005)05-0040-04

文献标识码 A

Comparing activity of polyphenol oxidase by three extraction methods in wheat kernel

Chang Cheng, Li Baoyun, You Mingshan, Li Weihua, Liu Guangtian

(College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 10094, China)

Abstract Polyphenol oxidase (PPO) is one of the major factors which influence the quality of wheat flour and related products. It's very essential to understand PPO characters in improving appearance of noodle and steam bread. In this study, three methods were used to extract PPO from 21 wheat varieties and their activity were measured. The results indicated that PPO extracted from whole kernel meal by SDS (method 3) had highest activity, being up to 1.4 - 3.9 folds of that extracted by phosphate (method 2). The PPO extracted from intact grain by phosphate (method 1) had lowest activity 5.3 - 42.1 times lower than that extracted by method 3. The values of PPO activity measured by the three methods were significantly related with each other. The results of time course showed that activity curve of high PPO variety was different from that of low PPO variety. Even for a variety, method 2 and 3 gave different PPO activity areas. It is suggested that SDS could improve PPO extraction and its activity measurement.

Key words common wheat; PPO activity; extraction methods; activity curve

小麦籽粒中多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)主要分布于麸皮中,面粉中含量较少,但其催化酚类物质氧化生成黑色的醌,严重降低面粉及其制品的色泽,是导致鲜面条、馒头、饺子等蒸煮类食

品表面发生褐变的重要因素,可解释面条白度 55%~70%的变异^[1]。PPO 在植物体中以活性态和潜伏态方式存在,发生抗逆反应时,PPO 活性显著升高,其重要原因就是潜伏态 PPO 转化成活性态,从

收稿日期:2005-01-04

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30270823,30471076);国家高技术发展研究规划资助项目(2001AA241031)

作者简介:常成,博士研究生;李保云,副教授,通讯作者,主要从事小麦品质改良研究,Tel:010-62732922;E-mail:changtgw@163.com

而增强了 PPO 活性^[2-3]。Aravind 等的研究表明,在成熟小麦籽粒中,大量的 PPO 与质体膜结合而转入较为稳定的“潜伏”状态,用磷酸盐缓冲液提取潜伏态 PPO 的效果较差;但在缓冲液中加入阴离子去污剂 SDS(十二烷基硫酸钠)可显著提高小麦籽粒 PPO 的提取效率,激活“潜伏”状态的 PPO^[4],有利于测定低 PPO 活性的小麦品种。

目前有多种方法提取小麦 PPO,如磷酸盐提取完整籽粒法、提取全麦粉法和提取面粉法等^[4-6],但对 SDS 提取小麦籽粒 PPO 以及对这些方法的综合比较研究还较少,在国内尚未见报道。笔者研究不同的 PPO 提取方法与其活性的关系,以进一步认识小麦 PPO 的特性,特别是对小麦籽粒中“潜伏态”PPO 的研究,有利于深入理解蒸煮类食品持续褐变的原因,为低 PPO 活性小麦品种的选育提供参考。

1 材料与方方法

1.1 试验材料

21 份 PPO 活性变异广泛的主推或地方小麦品种,2003—2004 年度种植于中国农业大学昌平实验站,常规田间管理,收获的籽粒室温贮藏 3 个月用于本试验。

1.2 PPO 提取与活性测定

全麦粉的制备 以自然含水量籽粒,经装有 0.5 mm 孔筛的旋风磨(瑞典 Tecator 公司)磨制,尔后立即进行试验或 -20℃ 密封保存。

SDS/磷酸盐提取 PPO 磷酸盐提取完整籽粒 PPO 参照文献^[5-6],略有改进。选取 3 粒已称重的饱满小麦籽粒于 1.5 mL 离心管中,加 800 μ L 磷酸盐提取液(0.05 mol/L Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 , 5 g/L PVPP, pH 6.5),4℃ 振荡提取 24 h。上清液即为粗酶液,用于活性测定或 -20℃ 保存(方法 1)。

提取全麦粉 PPO,提取液为磷酸盐,同上。准确称取 0.100 g 全麦粉于干净的 1.5 mL 离心管中,加 800 μ L 提取液。室温下振荡提取 45 min,然后 12 000 r/min 离心 15 min,上清液即为粗酶液,用于活性测定或 -20℃ 保存(方法 2)。

SDS 提取全麦粉 PPO 参照文献^[4-6],略有修改。在上述磷酸盐提取液中加入 0.05 mol/L SDS,其他步骤同上(方法 3)。

PPO 活性测定 PPO 活性测定参照文献^[4-6],略有修改,采用酶标仪法(ZS-3 板式酶标仪)测定。每 g 试验材料每 min 吸光度上升 0.001,则定

义为 1 个酶活单位[U/(g·min)]。

1.3 比较 SDS 和磷酸盐提取 PPO 活性的时间特性 分别在 10、20、30、40、50、60、70、90、120、150 和 180 min 反应时间内测定方法 2 和 3 所提取 PPO 活性的变化,以研究其活性的时间特性。

上述所有活性测定均 2 次重复,取其平均值。

2 结果与分析

2.1 不同提取方法 PPO 活性比较

综合研究 3 种不同提取方法得到的 PPO 活性,结果表明:SDS 提取全麦粉 PPO 的活性最高(方法 3),其平均值是磷酸盐提取(方法 2)的 2.9 倍;而磷酸盐提取完整籽粒 PPO 活性最低(方法 1),方法 3 提取的 PPO 活性是其 11.2 倍,如表 1。从表 1 还可看出,从全麦粉中提取 PPO 活性要明显高于从完整小麦籽粒中提取的,且提取时间远小于后者。说明

表 1 不同提取方法全麦粉 PPO 活性比较

Table 1 PPO activities measured with different methods
U/(g·min)

品种 序号	品种 名称	方法 1		方法 2		方法 3
		PPO 活 性/ M3/ M1		PPO 活 性/ M3/ M2		PPO 活 性/ M3/ M1
1	京 9428	0.7	42.1	18.0	1.6	29.5
2	扬麦 158	14.4	7.6	34.0	3.2	109.0
3	扬麦 5 号	2.0	10.3	15.0	1.4	20.5
4	农大 152	17.7	7.5	33.5	3.9	132.0
5	钱尼	9.2	7.9	23.0	3.2	72.5
6	京 771	3.1	14.5	14.0	3.2	45.0
7	皖麦 19	3.7	5.3	11.0	1.8	19.5
8	扬麦 9 号	3.5	7.1	11.0	2.3	25.0
9	中优 9507	5.1	18.9	24.5	3.9	96.5
10	宁麦 9 号	1.2	27.9	13.0	2.6	33.5
11	太原 3403	6.9	13.0	26.5	3.4	90.0
12	济南 17	1.0	35.0	13.0	2.7	35.0
13	山 935031	1.3	26.9	11.0	3.2	35.0
14	改约瑞	0.8	12.5	3.5	2.9	10.0
15	9114	1.1	26.8	10.0	3.0	29.5
16	塔春 2 号	7.5	12.8	32.0	3.0	96.0
17	8612	6.8	13.1	36.5	2.4	89.0
18	加尔折达 43	0.9	25.0	9.0	2.5	22.5
19	燕京白芒白	18.4	9.2	49.0	3.5	170.0
20	ZM2855	1.6	14.7	11.0	2.1	23.5
21	中国春	0.9	20.0	13.0	1.4	18.0
平均		5.13	11.2	19.6	2.9	57.2

注:M3/M1 为方法 3 与方法 1 PPO 活性的比值,M3/M2 为方法 3 与方法 2 PPO 活性的比值。

加入 SDS 后, PPO 的提取效率显著提高; 和完整籽粒相比, 全麦粉更有利于 PPO 的提取。

本研究又用 SDS 重新提取方法 2 剩余沉淀的 PPO, 结果说明: 在高 PPO 活性小麦品种中, SDS 提取剩余沉淀物 PPO 活性也显著高于方法 2 所提取的活性; 而对于较低 PPO 活性的品种, 两者差异不大(数据未列出)。说明用磷酸盐提取全麦粉 PPO 后仍有部分残留而无法提出, 对于高 PPO 活性的小麦品种, 这种残留的 PPO 活性更高。

由表 2 可知, 方法 3 提取 PPO 活性的变异系数最大, 其次是方法 2, 最小的是方法 1。这 3 种方法提取的 21 个小麦品种籽粒 PPO 活性差异均达极显著水平。相比而言, 用方法 3 提取更能反应小麦品种间 PPO 活性的变异。

表 2 3 种方法提取 PPO 活性的变异

U/ (g·min)				
方法	均值	活性范围	变异系数/ %	F 测验
方法 1	5.1	0.7~18.4	16.7	17.94**
方法 2	19.6	3.5~49.0	59.6	59.01**
方法 3	57.2	10.0~170.0	77.7	34.80**

注: **表示在 0.01 上的显著水平。

2.2 3 种方法提取 PPO 活性的相关性

对 3 种方法提取的 PPO 活性进行简单相关性分析, 结果表明: 3 种不同方法提取的 PPO 活性的相关性很好(表 3), 均达到极显著正相关; 其中方法 2 提取的 PPO 活性与方法 3 提取的相关性最好 ($r=0.954^{**}$), 其次是方法 1 与方法 3 的相关性 (0.925^{**}), 最低的是方法 2 和 3 (0.877^{**}); 结果与 Aravind 的研究一致^[4]。3 种方法提取的 PPO 活性具有较好的平行性和相关性。

表 3 不同方法提取的 PPO 活性的相关性

	方法 1	方法 2	方法 3
方法 1			
方法 2	0.877**		
方法 3	0.925**	0.954**	-

注: **表示 0.01 的显著水平。

2.3 SDS 与磷酸盐提取的全麦粉 PPO 的活性变化及时间特性

本研究结果说明, 不同方法提取的 PPO 活性变化曲线差异较大(图 1、2), 对于高 PPO 活性品种(如农大 38)来说, 方法 3 提取的 PPO 活性面积(在特定时间内曲线下包含的面积^[7])显著高于方法 2 提取的 PPO 活性面积(指图 1 活性曲线下包含的面积)。在 10~40 min 反应时间内, 方法 3 提取的农大 38 PPO 活性急剧上升, 并达到最高峰(图 1), 而后又显著下降, 在 180 min 时趋于稳定; 然而, 用方法 2 提取的 PPO 的活性, 10~40 min 反应时间内活性即达最高峰, 而后一直保持稳定状态。

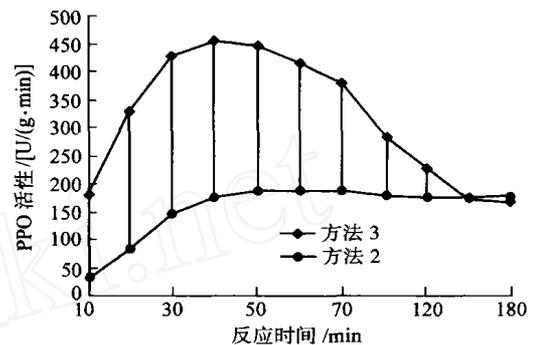


图 1 SDS/磷酸盐提取农大 38 PPO 活性曲线

Fig. 1 The activity curve of Nongda 38 PPO

对于低 PPO 活性小麦品种(如扬麦 5 号), 其活性曲线在 10~150 min 时间内平稳上升并达最高峰, 150~180 min 时保持稳定水平, 其达到活性峰值的时间明显长于农大 38; 且方法 3 提取其 PPO 活性面积小于方法 2(图 2 的阴影区域反映了活性面积差值), 与农大 38 正相反。上述表明对于高、低 PPO 活性的小麦品种, 其 PPO 反应时间特性是不同的; 不同方法提取的 PPO 的特性也是有差异的。

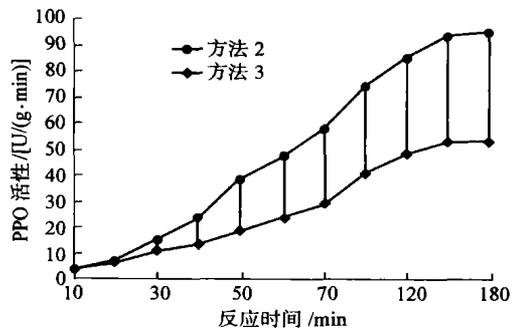


图 2 SDS/磷酸盐提取的扬麦 5 号 PPO 活性曲线

Fig. 2 The activity curve of Yangmai 5 PPO

3 讨论

Aravind 等认为成熟小麦籽粒中, SDS 可显著提高籽粒 PPO 的提取量和活性^[4]。本文结果表明高 PPO 活性的小麦品种其潜伏态的 PPO 活性也相应较高;低 PPO 活性的品种,其活性态和潜伏态 PPO 活性差异不大。在面团形成过程中,潜伏态的 PPO 会慢慢转化成活性态并长时间影响面团及其制品的色泽^[4,8],因此研究潜伏态的 PPO 特性显得较为重要。

比较了 3 种 PPO 的提取方法,结果表明:不同方法对 PPO 提取量及活性的影响是巨大的,但不同方法提取的 PPO 活性间存在较高的相关性,因此可以根据具体情况决定采用何种提取方法。方法 1 不破坏小麦籽粒,利于早代选择,但其提取时间较长,6 h 提取的 PPO 活性仍很低(数据未列出),原因可能是种皮致密的结构阻碍了 PPO 的释放,不利于提取,同时其活性的测定还受籽粒大小的影响。在磷酸盐缓冲液中加入 0.05 mol/L 的 SDS 可明显提高全麦粉 PPO 的提取量,对于活性很低的品种(如改约瑞、加尔折达 43 等)测定有利,且提取时间较短,所需的样品量也较少,可用于早代选择^[9]。仅仅用磷酸盐或其他缓冲液如 MOPS[3-(N-吗啉代)丙磺酸]、柠檬酸盐等,无法完全提取小麦籽粒中的 PPO^[4],这将会影响对其活性特点的研究。相比而言,用 SDS 则能较彻底提取籽粒中的 PPO,利于研究“潜伏态”PPO 对面团色泽的持续影响。高低活性不同的品种(农大 38 和扬麦 5 号)其活性曲线差异较大;即使同一品种,不同方法提取的 PPO 活性曲线也不同;同一品种、相同提取方法,在不同的反应条件下,其 PPO 特性也表现出较大的差异。这些不仅反映了小麦 PPO 活性大小的差异,更说明籽粒

中 PPO 复杂的特性,值得进一步研究。在小麦 PPO 性状早代筛选时,严格确定合适的 PPO 提取方法、活性测定条件是有必要的。

参 考 文 献

- [1] 王凤乐,商鸿生,李振歧. 中国小麦条锈生理小种同工酶分析[J]. 植物病理学报,1994,25(2):101-105
- [2] Demeke T, Morris C F. Wheat polyphenol oxidase: distribution and genetic mapping in three inbred line populations[J]. Crop Sci, 2001, 41:1750-1757
- [3] Ferret A S, Bru R, Carmona F G. Novel procedure for extraction of a latent grape polyphenol oxidase using temperature-induced phase separation in triton x-114 [J]. J Plant Physiol, 1989, 91:1481-1487
- [4] Aravind K, Jukanti P L, Brukner J. Extraction and activation of wheat polyphenol oxidase by detergent: Biochemistry and applications [J]. Cereal chem, 2003, 80(6):712-716
- [5] Aderson J V, Morris C F. An improved whole-seed assay for screening wheat germplasm for polyphenol oxidase activity [J]. Crop Sci, 2001, 41:1697-1705
- [6] Kruger J E, Matsuo R R, Pretson K. A comparison of method for prediction of noodle colour [J]. Canadian Journal of plant science, 1992, 72:1021-1029
- [7] Csala M V. Methodology and mechanism of the phenol reaction in cereals[J]. Proc Int seed test Assoc, 1972, 37(3):915-921
- [8] Aderson J V, Morris C F. Purification and analysis of wheat grain polyphenol oxidase (PPO) protein [J]. Cereal Chem, 2003, 80(2):135-143
- [9] Okot-Kotber M A, Liavoga A, Yong K J. Activity and inhibition of polyphenol oxidase in extracts of bran and other milling fractions from a variety of wheat cultivars [J]. Cereal Chem, 2001, 78:514-520