

# 马铃薯中酪氨酸酶的提取及其活性的研究

李好样 吕海燕 董金龙<sup>①</sup>

(太原师范学院化学系 太原市黄陵路 19 号 030031)

**摘 要** 采用缓冲溶液法提取马铃薯中的酪氨酸酶,以邻苯二酚溶液为底物,测定了不同体积的酶的活性,研究了在不同 pH 值、温度 and 无机盐的条件下对酶活性的影响,确定了酶活性的最适温度为 40℃ 和最适 pH 值为 6.78。

**关键词** 酪氨酸酶,活性,提取。

**中图分类号**: O561.3; O657.32

**文献标识码**: A

**文章编号**: 1004-8138(2008)06-1040-04

## 1 前言

酪氨酸酶又称多酚氧化酶,是由二价铜离子与酶蛋白结合的金属酶,是生物体中参与黑色素合成的关键酶<sup>[1,2]</sup>。酪氨酸酶广泛存在于动物、植物、微生物体内<sup>[3]</sup>。在不同的生物体内酪氨酸酶具有各异但却都有很重要的功能。近年来,除对该酶进行结构功能的基础研究外,由于色素障碍性疾病、恶性黑色素瘤、白化病和老年性痴呆的发生与治疗,均与酪氨酸酶直接相关,国内外对该酶的研究主要集中在医药方面<sup>[4,5]</sup>。本文研究了用比色法测定酶活性<sup>[6]</sup>以及对酶活性的影响。

## 2 实验部分

### 2.1 主要仪器和试剂

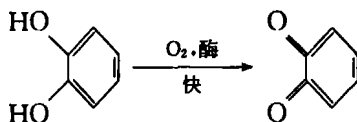
**仪器**: Unico7202B 可见分光光度计(尤尼柯仪器有限公司), Cary 300 UV-Visible Spectrophotometer (美国 Varian 公司), TG-16B 离心机(上海器械十厂)。

**试剂**: 磷酸氢二钠,磷酸二氢钠,邻苯二酚,固体  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , 以上试剂均为分析纯。

### 2.2 实验原理

酪氨酸酶可用比色法测定。由于邻苯二酚在酶和氧的条件下转变成邻苯醌的速率很快,故可测定邻苯二酚转变成邻苯醌的速率而测定酶的活性。(可用吸光度对时间作图,从所得的直线斜率求酶的活性)

发生了如下的反应:



酶的活性计算:

<sup>①</sup> 联系人,电话:(0351)2275129; E-mail: dongjinlong2k@yahoo.com.cn

作者简介:李好样(1965—),女,山西省运城市人,副教授,从事有机化学教育和科研工作。

收稿日期:2008-04-01;接受日期:2008-06-18

一般定义在优化的条件下(pH、离子强度等),25℃时在1min内转化1 $\mu$ mol底物所需要的量为酶的活性单位。通过下式可计算出所用的酶的活性:

$$\alpha = \Delta A / ktV \times 10^6$$

式中: $\alpha$ ——所用溶液的酶的活性, $\Delta A$ ——最大吸收处吸光度的变化, $t$ ——时间, $k$ ——邻苯二酚的摩尔吸收系数, $V$ ——加入的酶体积。

进而计算处所用原料中的酶的活性:

$$A = \alpha V_0 / m$$

式中: $A$ ——原料中酶的活性, $V_0$ ——原料所得的酶溶液的总体积, $m$ ——原料总质量。

### 2.3 酶的提取<sup>[7]</sup>

在研钵中放入10g切碎了土豆,加入7.5mL pH=7.2的磷酸缓冲溶液,用力挤压。用两层纱布滤出提取液,立即离心分离(约3000rpm,5min),倾出上层清液保存于冰浴或冰箱中。提取液为棕色,在放置过程中不断变黑<sup>[8]</sup>。

### 2.4 邻苯醌溶液的吸收光谱

取0.5mL土豆提取液,加入4mL pH=6.0的缓冲溶液,再加入0.5mL邻苯二酚溶液,摇匀,反应约10min后,使用1cm比色池于扫描分光光度计上,进行重复扫描,可获得邻苯醌溶液的吸光度达到最大值0.624时,最大吸收波长为411nm。

### 2.5 酶活性的测定

取2.5mL上述提取液用pH=7.2的磷酸缓冲溶液稀释至10mL比色管中,摇匀。取0.1mL稀释过的提取液于10mL比色管中,加入2.9mL pH=6.0的缓冲溶液,再加入2mL邻苯二酚溶液,同时开始计时,用分光光度计在411nm处测定吸光度。开始6min内每分钟读1个数,以后隔2min读1个数,直至吸光度变化不大为止。

取0.2mL,0.3mL,0.4mL已稀释过的提取液重复上述实验。[注意总体积为5mL,每次换溶液洗比色皿只能倒很少量溶液洗1次。]

以吸光度对时间作图,从直线斜率求出酶的活性<sup>[9]</sup>。

### 2.6 不同pH值对酶活性的影响

取2.5mL上述提取液用pH=7.2的磷酸缓冲溶液稀释至10mL比色管中,摇匀。取0.2mL稀释过的提取液于10mL比色管中,分别加入2.8mL pH=6.0、6.32、6.78、7.2、7.5的缓冲溶液,再加入2mL邻苯二酚溶液,同时开始计时,用分光光度计在411nm处测定吸光度。开始6min内每分钟读1个数,以后隔2min读1个数,直至吸光度变化不大为止。

### 2.7 温度对酶活性的影响

取2.5mL上述提取液用pH=7.2的磷酸缓冲溶液稀释至10mL比色管中,摇匀。取0.4mL稀释过的提取液于10mL比色管中,加入2.6mL pH=6.0的缓冲溶液,分别在10℃、20℃、30℃、40℃、50℃、60℃、70℃的水浴中及沸水浴预热10min左右,再加入2mL邻苯二酚溶液,同时开始计时,用分光光度计在411nm处测定吸光度。开始6min内每分钟读1个数,以后隔2min读1个数,直至吸光度变化不大为止。

### 2.8 无机盐对酶活性的影响

取0.4mL稀释过的提取液于10mL比色管中,加入2.6mL pH=6.0的缓冲溶液,加少量固体配成Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>溶液观察现象。

3 结果与讨论

3.1 酶活性的测定

以吸光度对时间作图,由直线部分得出邻苯二酚的转化速率,即为酶的活性。依次得出不同体积提取液的活性,如表 1 所示。

表 1 酶的活性计算

已稀释的提取液体积 (mL)	活性 ( $\Delta A/\text{min}$ )	原提取液活性 (U/mL)	原料活性 (U/g)
0.10	0.053	341.7	$3.075 \times 10^2$
0.20	0.098	314.7	$2.832 \times 10^2$
0.30	0.130	279.5	$2.515 \times 10^2$
0.40	0.152	244.2	$2.198 \times 10^2$

由表 1 可以看出随着加入提取液体积的增大(即酶的浓度增大),酶的活性增大,但计算出原料中的酶的活性却减少了。

3.2 不同 pH 值对酶活性的影响

酶是一种生物活性物质,调节 pH 值能有效地改变酶的活性。

以吸光度对时间作图,由直线的斜率得出邻苯二酚的转化速率即为酶的活性,结果如图 1 所示:

以酶的活性为纵坐标,pH 为横坐标作图,如图 1 所示可看出不同 pH 值对酶活性的影响情况。

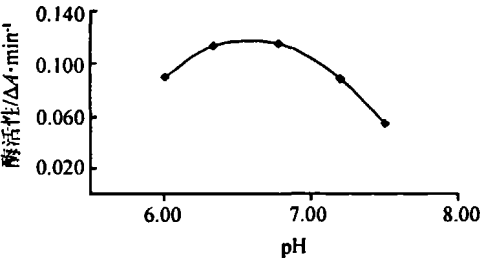


图 1 pH 值对酶活性的影响

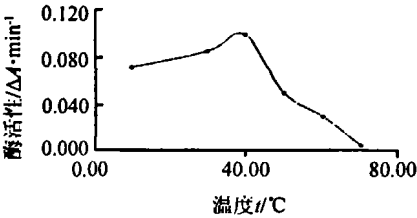


图 2 温度对酶活性的影响

由图 1 可看出,酪氨酸酶的活性达最佳的 pH 值为 6.78。pH 值为 6.32—7.2 时酪氨酸酶的活性较高,pH 值小于 6.0 时活性很低,而 pH 值大于 6.78 后活性又缓慢降低。

3.3 温度对酶活性的影响

不适宜的温度会破坏活性部位三维结构的完整性,而它又是保持酶活力的关键,因此温度是影响酶活性的一个重要因素。分别在不同温度测定酶的活性,结果如图 2 所示:

以酶的活性为纵坐标,温度为横坐标作图,如图 2 所示,可看出不同温度对酶活性的影响情况。

由图 2 可看出,酪氨酸酶的最适温度为 40℃。随着温度的升高,酪氨酸酶的活性不断提高,达到最大值后,酶的活性又逐渐降低。当温度达到 70℃,可近似地认为酶已没有活性,即酶失活。因此,调节温度特别是低温条件能有效地抑制酶的活性。

3.4 无机盐对酶活性的影响

一些无机盐会抑制酶的活性,在提取液中加入  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ,测酶的活性结果如表 2 所示。

表 2 无机盐对酶活性的影响

已稀释过的提取液体积(mL)	加入 Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 的情况	活性(ΔA/min)
0.4	加入	-0.001
0.4	不加	0.152

由表 2 可知:在加入无机盐 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 后酶的活性失去,且不可恢复,是永久性失活。

参考文献

[1] 胡源,刘克武,喻东,刘鑫,黄新河,唐成康,姜骅,季雯娟. 马铃薯酪氨酸酶的性质[J]. 化学研究与应用,2005,17(1):55—57.

[2] 柳荣,刘祥云,张云贵,李天俊. 酪氨酸酶的基础研究及其在生化教学中的应用[J]. 天津农学院学报,1994,1(1—2):56—60.

[3] Sánchez F,Rodríguez López JN,García Cánovas F. Tyrosinase: A Comprehensive Review of it Smecha2nism[J]. *Biochim. Biophys. Acta*,1995,1247:1—11.

[4] 薛超彬,陈清西,王勤. 菜青虫不同虫态及虫龄的多酚氧化酶性质比较[J]. 昆虫学报,2004,47(3):305—309.

[5] 潘兴华. 黑素细胞及黑素的生成与调节[J]. 生理科学进展,1998,29(2):179—181.

[6] 孟雅,李刚,崔焱,张龙. 马铃薯多酚氧化酶的提取纯化条件对其活性影响的研究[J]. 化学与生物工程,2006,23(10):77—78.

[7] 李立祥,吴红梅. 提取方法对茶多酚氧化酶活性的影响[J]. 中国茶叶加工,2001,(4):26—31.

[8] 李敏,刘磊,郭玉蓉,陈德蓉,李永才. 马铃薯多酚氧化酶的特性研究[J]. 甘肃农业大学学报,2005,40(2):21—24.

[9] 宋康康,邱凌,黄璜. 熊果甙作为化妆品添加剂对酪氨酸酶抑制作用[J]. 厦门大学学报:自然科学版,2003,42(6):91—94.

The Study of Extraction and the Activity of Tyrosinase from Potato

LI Hao-Yang LU Hai-Yan DONG Jin-Long

(Department of Chemistry, Taiyuan Normal University,Taiyuan 030031,P. R. China)

**Abstract** The potato tyrosinase was extracted by buffer solution, and the enzyme activity to catechol as substrate was studied. The effects of pH temperature and the inorganic salt on the impact of the activity were studied. The optimum temperature of 40℃ and pH of 6.78 were obtained.

**Key words** Tyrosinase, Activity, Extract.

这真是令人啼笑皆非——重大发明创造被视为“旧货”！  
欢迎作者将被退稿佳作，再投本刊

在 20 世纪的科技成就中,激光可算是重大发明创造之一。第一台激光器是 1960 年由美国物理学家梅曼(见《邮票上的科学家——佼佼者之路》中之 M4)研制出来的。然而《物理评论快报》却拒绝刊登梅曼的论文,理由是:这是微波激射物理学方面的文章,对快速出版物不再有价值。这真是令人啼笑皆非!

接着,梅曼将论文寄到了英国《自然》杂志,这篇 300 字的简短文章立即被接受。发表后引起全世界轰动。后来,梅曼被列入了美国发明家名人堂。

为了吸取历史教训,本刊收到的论文,即使其观点与审稿人有尖锐的意见冲突,只要是言之有理,也给予发表。因为“仁者见之谓之仁,智者见之谓之智”(《周易·系辞上》),不同人从不同角度看问题,难免不同。我们欢迎作者将被退稿佳作,再投本刊。

《光谱实验室》编辑部