

分光光度法对马铃薯中酪氨酸酶活性的测定

王宁芳 (青海师范大学, 青海西宁 810008)

摘要 [目的] 研究酪氨酸酶的活性, 为防止马铃薯及其他含酪氨酸酶的水果和蔬菜等发生褐变提供参考。[方法] 以马铃薯为原料, 利用分光光度法测定酪氨酸酶的活性; 为确定提取酪氨酸酶的适宜条件, 测定不同温度和不同 pH 值对酶活性影响。[结果] 结果显示, 多巴溶液的吸光光谱最大吸收峰 λ_{max} 为 480 nm, 随着时间的增大吸光度变化趋于稳定。以此建立动力学曲线, 由曲线的斜率可计算出酪氨酸酶的活性, 并由试验得出酪氨酸酶的活性受温度和溶液的 pH 值影响较大。因此, 提取和测定酪氨酸酶的活性时的适宜条件为: 可见波长 λ_{max} 为 480 nm, 温度控制在 30 ℃, pH 值 6.5。[结论] 为保障酪氨酸酶的活性, 在提取和测定时应选择适宜的条件。

关键词 马铃薯; 分光光度法; 酪氨酸酶; 活性; 温度; pH 值

中图分类号 S 532 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)19-08821-02

Determination of the Tyrosinase Activity in Potato with Spectrophotometric Method

WANG Ning-fang (Qinghai Normal University, Xining, Qinghai 810008)

Abstract [Objective] The reference for the prevention of the browning of the potato and other fruits/vegetables containing tyrosinase was provide through the study on the activity of tyrosinase. [Method] The potato being taken as experimental raw material, the activity of tyrosinase in it was determined with the spectrophotometric method and the effect of different temperatures and different pH values on the activity of tyrosinase was experimented in order to ensure the appropriate extraction condition of tyrosinase. [Results] The results of 1 showed that the maximum absorption peak of the Dopa solution to spectra was 480 nm and its change gradually stabilized with the time-increasing. Based on that a kinetic curve could be established and the activity of tyrosinase could be calculated through the slope of the curve. The experimental result also indicated the impact of the temperature and 1 of pH value of solution on the activity of tyrosinase was great. Therefore, the appropriate conditions of the extraction and determination of the activity of tyrosinase was the visible wavelength max, 480 nm; the temperature, 30 ℃; and the pH value, 6.5. [Conclusion] In order to protect the activity of tyrosinase, the suitable condition extraction and determination of the activity of tyrosinase should be chosen in actual operation.

Key words Potato; Spectrophotometry; Tyrosinase; Activity; Temperature; pH value

酪氨酸酶是一种含铜的金属酶, 普遍存在于哺乳动物、植物和微生物中, 主要参与生物体内黑色素和其他多酚类物质的形成。该酶能催化单酚类物质生成 σ -二酚(单酚酶活性), 并进一步转化成 σ -醌(二酚酶活性), 生成的这些醌类物质易于多聚化, 并与细胞内蛋白作用, 生成黑色或棕色的色素沉淀。这种褐色反应导致了水果和蔬菜变味以及营养物质的丧失^[1]。马铃薯中富含酪氨酸酶, 笔者以马铃薯为原料, 从中提取和测试酪氨酸酶, 并利用分光光度法测定和分析其活性。

1 材料与方法

1.1 材料 植物材料: 市售马铃薯。仪器: 721 分光光度计(上海第三分析仪器厂); 离心机; 恒温水浴(辽阳恒温仪器厂); 秒表; 电子天平。药品: 二羟基苯丙氨酸(多巴); 磷酸氢二钠; 盐酸。

1.2 方法

1.2.1 溶液的配制^[2]。0.10 mol/L 缓冲溶液(pH 值 7.2): 50 ml 0.20 mol/L Na_2HPO_4 + 20 ml 0.1 mol/L HCl, 定容至 200 ml; 0.10 mol/L 缓冲溶液(pH 值 6.0): 50 ml 0.20 mol/L Na_2HPO_4 + 9 ml 0.1 mol/L HCl, 定容至 200 ml; 0.010 mol/L 多巴(二羟基苯丙氨酸)溶液: 称取 0.195 g 多巴, 用 pH 值 6.0 的磷酸缓冲溶液溶解并定容至 100 ml。

1.2.2 酪氨酸酶的提取^[3]。称取去皮切碎土豆 16 g(于 -20 ℃ 冷冻过夜), 按 1:1(W/V) 的比例加入 pH 值 6.0 的磷酸盐缓冲溶液 100 ml, 用组织捣碎机制成匀浆, 转速 4 000 r/min 下离心 10 min, 吸取上清溶液保存于冰浴或冰箱中。

1.2.3 酶的活性测定。测定酶在不同波长下的吸光度, 取

1.4 ml 已稀释过的马铃薯提取液, 加 2.6 ml pH 值 6.0 的缓冲液; 加 2 ml 多巴溶液, 摇匀。反应约 10 min 后, 使用 1 cm 比色池于扫描分光光度计上进行重复扫描, 即可获得多巴红的吸收光谱(可从混合开始以时间间隔为 1 min 进行连续扫描, 即可观察到吸光度随时间增加的现象)。从而得出 $\lambda_{\text{max}} = 480 \text{ nm}$ 。

1.2.4 测定提取液在不同时间下的吸光度。取 0.1 ml 稀释过的提取液于 10 ml 比色管中, 加入 2.9 ml pH 值 6.0 的磷酸缓冲溶液, 再加入 2 ml 多巴溶液, 同时开始计时, 用分光光度计在 480 nm 处测定吸光度。开始 6 min 内每分钟读 1 个数, 以后隔 2 min 读 1 个数, 直至吸光度变化不大为止。取 0.2、0.3、0.4 ml 已稀释过的提取液作平行试验。

2 结果与分析

稀释后的提取液在不同时间下的吸光度见表 1。以吸光度为纵坐标, 时间为横坐标绘图 1。

表 1 不同体积提取液在不同时间下的吸光度

Table 1 The absorbency of different volume of extract at different time

时间 Time	0.1 ml 吸光度 0.1 ml absor- bency	0.2 ml 吸光度 0.2 ml absor- bency	0.3 ml 吸光度 0.3 ml absor- bency	0.4 ml 吸光度 0.4 ml absor- bency
1	0.24	0.31	0.44	0.55
2	0.36	0.51	0.74	0.91
3	0.48	0.72	0.95	1.16
4	0.58	0.83	1.12	1.28
5	0.67	0.95	1.22	1.34
6	0.73	1.04	1.28	1.34
8	0.85	1.16	1.32	1.33
10	0.93	1.23	1.31	1.32
12	0.99	1.25	1.30	1.31
14	1.04	1.25	1.28	1.29
16	1.08	1.25	1.28	1.29
18	1.10	1.24	1.29	1.27
20	1.12	1.23	1.26	1.26

作者简介 王宁芳(1964-), 女, 陕西西华县人, 副教授, 从事有机合成及分析化学方面的研究。

收稿日期 2009-04-28

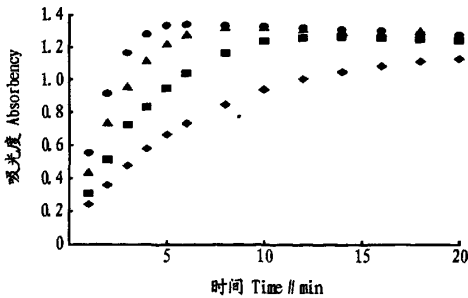


图1 吸光度随时间变化情况

Fig.1 The change situations of absorbency with the time

2.1 酶的动力学方程 分析图1可知,样品的吸光度在前6

min 的变化基本趋于直线,作直线方程为: $y_1 = 0.11t + 0.13$, $y_2 = 0.21t + 0.11$, $y_3 = 0.30t + 0.13$, $y_4 = 0.36t + 0.19$;4 条直线的斜率依次为 $k_1 = 0.11$, $k_2 = 0.21$, $k_3 = 0.30$, $k_4 = 0.36$ 。由直线斜率,便可求得酶的活性。

2.2 酶的活性计算 由式 $a = k / (10^{-6} / \varepsilon \times V \times 2.5 \times 0.1)^{[2]}$ 和 $A = aV_0 / m^{[2]}$,可计算出提取液和原料中酪氨酸酶的活性(其中 k 为斜率, V 为提取液体积, $V_0 = 6 \text{ ml}$, $m = 16 \text{ g}$),结果见表2。

2.3 提取酪氨酸酶适宜条件的确定 为确定提取酪氨酸酶的合适温度,进行了酶活性测定(图2)^[4]。结果表明,该酶的适宜温度为 30°C 。当小于 30°C 时,酶的活性升高相对缓慢;而高于 30°C 时,酶的活性逐渐开始失去;达到 70°C 时,

表2 提取液和原料中酶的活性数据

Table 2 The data of enzyme activity in the extract and materials

已稀释过的提取液体积/ml	提取液中平均酶活性 $\times 10^6 \text{ A}/(\text{ml} \cdot \varepsilon)$	提取液中酶活性 $\times 10^6 \text{ A}/(\text{ml} \cdot \varepsilon)$	原料中酶活性 $\times 10^6 \text{ A}/(\text{g} \cdot \varepsilon)$	原料中酶活性// $\times 10^6 \text{ A}/(\text{g} \cdot \varepsilon)$ Average enzyme activity in the materials
Volume of diluted extract	Enzyme activity in the extract	Average enzyme activity in the extract	Enzyme activity in the materials	
0.10	4.40	4.05	1.65	1.52
0.20	4.20		1.58	
0.30	4.00		1.50	
0.40	3.60		1.35	

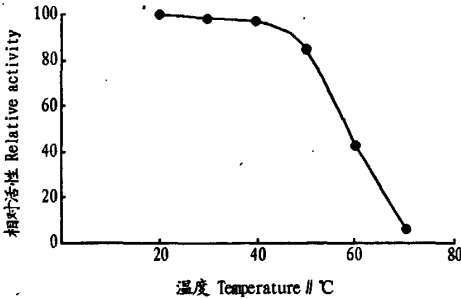


图2 温度对酶活性的影响

Fig.2 The effects of temperature on the enzyme activity

酶的活性基本失去。同时,为确定酪氨酸酶的适宜 pH 值,也进行了不同 pH 值下酶活性测定(图3)^[4]。结果表明,酪氨酸酶的活性在接近中性(pH 值 6.5)时最高,而在偏酸或偏碱的环境中,酶的活性均有显著下降。

3 结论

采用分光光度法测定马铃薯的中酪氨酸酶,快捷、简便、效果佳,能有效地得出酪氨酸酶的活性。通过试验可知,酪氨酸酶的活性随温度和溶液酸碱性的变化而变化,因此在测定马铃薯中的酪氨酸酶时,应选择的最佳条件为:可见波长 $\lambda_{\text{max}} = 480 \text{ nm}$,控温在 30°C ,pH 值 6.5,这样才能保障马铃薯中酪氨酸酶的活性最佳。另外,酪氨酸酶的活性也受金属离

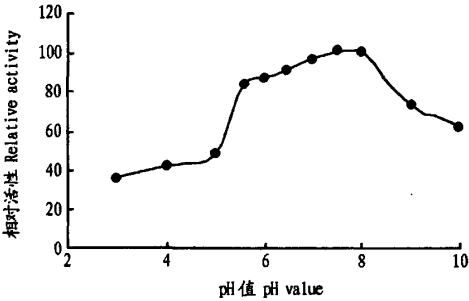


图3 pH 值对酶活性的影响

Fig.3 The effects of pH value on the enzyme activity

子的影响^[5],因此,在试验及生产生活中,也要避免和减少金属离子的干扰。

参考文献

[1] 胡源,刘克武,喻东,等.马铃薯酪氨酸酶的性质[J].化学研究与应用,2005,17(1):36-57.
[2] 周锦兰,张开诚.实验化学[M].武汉:华中科技大学出版社,2006:310-311.
[3] 沈钧,何莉萍,张瑞斌.甘草提取物对酪氨酸酶活性的抑制作用[J].中国临床药理学与治疗学,2006,11(8):940-942.
[4] 徐鹏,付绍平,王伟,等.马铃薯酪氨酸酶体外筛选美白剂测定体系的建立[J].日用化学工业,2007,37(6):385-387.
[5] 陈丽凤,吴可克,王舫,等.无机阳离子对酪氨酸酶活性的上调作用[J].大连轻工业学院学报,2000,19(3):176-177.