

Study on Polyphenol Oxidase (PPO) Activity and Total Phenol Content of *Docynia indica*

Lijuan Fan^{1,2}, Bingbing Zhang², Xiaobo Qin^{1,3,4*}

¹Sichuan Natural Resource Institute, Chengdu Sichuan

²Key Laboratory of Bio-Resources and Eco-Environment of Ministry of Education, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu Sichuan

³Medical School (Nursing School), Chengdu University, Chengdu Sichuan

⁴Key Laboratory of Coarse Cereal Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Chengdu University, Chengdu Sichuan

Email: *qxb_2003@163.com

Received: Dec. 28th, 2018; accepted: Jan. 10th, 2019; published: Jan. 17th, 2019

Abstract

Using the twigs and petioles of *Docynia indica* as test materials, polyphenol oxidase (PPO), total phenol content, and their change pattern were analyzed. The results showed that, the suitable pH value for determining *Docynia indica* PPO activity was 7.0; the optimal substrate was oxophenic acid with the concentration of 0.15 mol·L⁻¹; the optimum temperature was 25°C. *Docynia indica* PPO enzyme activity at the flowering and fruiting stage was higher than preflowering stage. The value of *Docynia indica* total phenol content was minimum in April, May and September in a year.

Keywords

Docynia indica, Polyphenol Oxidase Activity, Total Phenol Content

民族资源柃木多酚氧化酶活性与总酚含量研究

樊莉娟^{1,2}, 张冰冰², 秦小波^{1,3,4*}

¹四川省自然资源科学研究院, 四川 成都

²四川大学生命科学学院, 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 四川 成都

³成都大学医学院(护理学院), 四川 成都

⁴成都大学农业农村部杂粮加工重点实验室, 四川 成都

Email: *qxb_2003@163.com

收稿日期: 2018年12月28日; 录用日期: 2019年1月10日; 发布日期: 2019年1月17日

*通讯作者。

摘要

采用药食两用植物柃衣嫩枝和叶柄为供试材料, 分析植株全年总酚含量和多酚氧化酶(PPO)活性及其变化规律。结果表明, pH 7.0为柃衣植株多酚氧化酶活性的最适值; 最佳底物为邻苯二酚, 且浓度为 $0.15 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 最佳温度为 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。柃衣植株总酚含量在每年的4月、5月、9月最低, 在花果期柃衣植株多酚氧化酶活性明显高于花前期。

关键词

柃衣, 多酚氧化酶活性, 总酚含量

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

柃衣(*Docynia indica* (Wall.) Dcne.)是蔷薇科 Rosacea 苹果亚科 Pomoideae 柃衣属 *Docynia* Dcne.的植物[1], 在我国西南少数民族地区及东南亚地区, 常作为药食两用的植物资源, 其茎叶、果实入药, 具有消炎、接骨、舒经活血、舒肝止痛、消暑消毒等功效[2]。目前“柃衣”的利用主要局限于川滇少数民族地区, 因其果实营养丰富主要作为野生水果食用, 也有部分开发成果脯、果醋、果酒等, 其嫩茎尖是傣族日常采集的野生蔬菜之一。柃衣全年生长, 叶四季可采, 因此极具开发潜力。

柃衣, 常绿乔木, 高5~10 m小枝粗壮, 幼时有黄白色绒毛, 渐脱落, 红褐色或紫褐色。叶片披针形或卵状披针形, 长5~8 cm, 宽2~3 cm, 顶端急尖或渐尖, 基部阔楔形或近圆形, 全缘或稍有浅钝锯齿, 下面密生黄白色绒毛; 叶柄长约1 cm, 密生绒毛。花3~5朵丛生于小枝顶端; 花梗短粗或近于无梗, 果实伸长, 密生绒毛; 花白色, 直径2.5~8 cm; 萼筒钟状, 外面密生黄白色绒毛; 梨果较大, 卵形或矩圆形, 直径2~3 cm, 萼裂片宿存; 果柄较长[1]。其生长于野沟边、溪旁或灌丛中, 是我国特有的民族药食两用植物之一, 在西南地区多地均有分布; 是西南民族地区一带常见的野生植物果实。因为其有着健胃消食和行气散淤的效果, 当地人经常当山植来食用。目前, 国内外对该植物的研究和报道很少。

柃衣是研究柃衣属系统发育不可缺少的珍贵材料。该种群分布区域相对较少, 且野生资源在逐渐减少, 需要着重加强保护。同时, 因其具有市场开发价值, 需要通过扩大种群数量来加强人工栽培繁殖与保护, 故进行无性繁殖是唯一的途径。无性繁殖材料中多酚氧化酶(PPO)活性及总酚含量是影响成活的关键[3] [4] [5]。多酚氧化酶(PPO)活性和总酚含量的变化与植物生长时期密切相关[6] [7] [8] [9]。通过研究柃衣多酚氧化酶活性和总酚含量及其变化规律, 可指导用于无性繁殖的取材, 提高繁殖成活率, 扩大种群数量, 保护该种群。同时, 也为以后柃衣的研究及培育提供一定参考基础。

2. 材料与方法

2.1. 材料

以柃衣嫩枝和叶柄为材料, 测定一年内每个月柃衣的多酚氧化酶(PPO)活性和总酚含量动态变化情况。

2.2. 多酚氧化酶活性测定

2.2.1. 酶液提取制备

取柞衣嫩枝的一段茎 2.0 g 绞碎, 加入少许石英砂和 0.02 g PVP 粉, 然后加入 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 10 mL, 在冰浴上混合均匀, 10,000 rpm 离心 20 分钟, 将上清液倒入 25 mL 容量瓶, 沉淀后用 5 mL 磷酸缓冲液再提取 1 次, 上清液并入容量瓶, 定容备用。

2.2.2. 酶活性分析与酶活力计算

取 0.2 mL 酶液于试管中, 加入 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 3 mL 混匀, 放置于 25°C 水浴中 10 分钟, 再加入 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 邻苯二酚 0.5 mL, 立即于 470 nm 波长测定 OD 值, 以 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 作为对照, 每 30 秒读数 1 次, 测定分析 5 次。酶活力是以每分钟 (min) 每克 (g) 鲜样材料光密度增加 0.01 为 1 个酶活性单位 (U), 计算公式为: $U = \Delta OD / 0.01 \times t \times W$ 其中, W 为材料的鲜重。

2.2.3. 最佳分析测定条件筛选

设计不同 pH 值 (分别为 5.0、6.0、7.0、8.0) 的缓冲液提取多酚氧化酶 (PPO), 用邻苯二酚 ($0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 测定分析其活性。缓冲液 pH 值设置为横坐标, 酶活力设置为纵坐标, 形成 pH 与酶活力的变化曲线, 分析其最适 pH 值。

设计与制备浓度梯度为 $0.02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $0.06 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $0.12 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $0.15 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $0.18 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $0.22 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的邻苯二酚溶液和浓度均为 $0.02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $0.06 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $0.12 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $0.15 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $0.18 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的肉桂酸溶液、阿魏酸溶液, 依据酶活性分析系统, 测定分析不同底物与浓度对多酚氧化酶活性的影响, 分析其最适底物与浓度。

设置酶活力反应体系分别在 15°C , 25°C , 35°C , 45°C , 55°C , 65°C , 75°C 恒温环境下反应 10 分钟, 测定分析不同温度条件对多酚氧化酶 (PPO) 活性的影响, 筛选出最适处理温度。

2.3. 柞衣总酚含量测定

福林酚试剂配制和标准曲线的制作参见汪家政等[10]方法。

2.3.1. 福林酚试剂配制

向准备好的 1 000 mL 回流装置中加入钼酸钠 12.5 g, 钨酸钠 50 g, 蒸馏水 350 mL, 37% 的浓盐酸 50 mL, 85% 的浓磷酸 25 mL, 混匀充分, 以小火焰回流 10 小时, 再加入一水合硫酸锂 87.3 g, 蒸馏水 25 mL, 溴水 2 滴 (瓶底可见溴滴 1~2 滴), 接着拿下瓶盖让其继续沸腾 15 分钟, 以使溴水完全挥发, 冷却后溶液显黄色, 稀释至 500 mL, 并过滤, 然后将滤液倒入棕色试剂瓶保存待用。用时以标准 NaOH 溶液滴定, 酚酞作为指示剂, 当溶液的颜色由红变成紫红、紫灰, 而后突然变成墨绿时即为终点, 接着加水约 1 倍稀释, 作为使用液。

2.3.2. 标准曲线的制作

将 20 mg 邻苯二酚, 溶于 100 mL 70% 的丙酮中, 配制成浓度为 $0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液, 取蒸馏水 2 mL 稀释 1 倍, 用作对照溶液。接着取刻度试管 7 支, 分别移入 0.05 mL、0.10 mL、0.15 mL、0.20 mL、0.25 mL、0.30 mL、0.35 mL 的对照溶液到试管里, 再以 70% 的丙酮补足容积到 1 mL; 再另外取试管 1 支, 移入 70% 的丙酮 1 mL 作为对照。然后分别移入福林酚试剂 5 mL, 混匀后静置 3 分钟, 再加入 20% 的碳酸钠溶液 2 mL, 混匀后静置 1 小时, 以蒸馏水定容至 25 mL, 在 760 nm 波长上测定分析吸光值。邻苯二酚含量设置为横坐标, 吸收值设置为纵坐标, 绘制形成标准曲线。线性回归方程为: $Y = 0.0816X + 0.0094$, $R^2 = 0.9994$, 以邻苯二酚含量表示试验样品的总酚物质含量。

2.3.3. 样品溶液准备

采取嫩枝的茎段，自然阴干，粉碎后过 2 毫米的筛子，称量 5 g 样品，倒入有塞子的锥形瓶里，加 70% 的丙酮 100 mL，于 80℃ 水浴里加热 3 小时，冷却并过滤，再将滤液定容到 100 mL。

2.3.4. 样品溶液测定

取样品溶液 1 mL 加入到 25 mL 容量瓶中，以 70% 的丙酮定容。接着从定容后的容量瓶中取样液 1 mL 加入到刻度试管里，再加入福林酚试剂 5 mL，混匀后静置 3 分钟，再加入 10% 的碳酸钠溶液 5 mL，混匀后遮光静置 1 小时，以蒸馏水定容至 25 mL；然后另外取试管 1 支，移入 70% 的丙酮 1 mL 作为对照，在 760 nm 波长上测定分析吸光值。

2.3.5. 分析结果与计算

1 g 样品的总酚含量(%) = $(a \times v_1 \times v_3) / (v_2 \times w) \times 10^{-6} \times 100$ ，式中： a 为样液中总酚的含量($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)， v_1 为样品粉末定容后的体积(mL)， v_2 为测定时量取的滤液体积(mL)， v_3 为将 v_2 滤液定容后的体积(mL)， w 为称样量(g)。

3. 结果与分析

3.1. 多酚氧化酶(PPO)活性与 pH 值变化的关系

移衣多酚氧化酶(PPO)在不同的 pH 值情况下，它的活性也不相同(图 1)。当 pH 值为 5.0 时，多酚氧化酶活性最小，随 pH 值的升高，活性也增加；当 pH 值达 7.0 时，酶活力单位最大，当 pH 值达 8.0 时，酶活力又降低。设置的 pH 梯度里，实验测定结果显示，当磷酸缓冲液 pH 值为 7.0 时，移衣多酚氧化酶活性最大。因此，可认为 pH 值 7.0 是移衣多酚氧化酶活性的实验最适 pH 值。

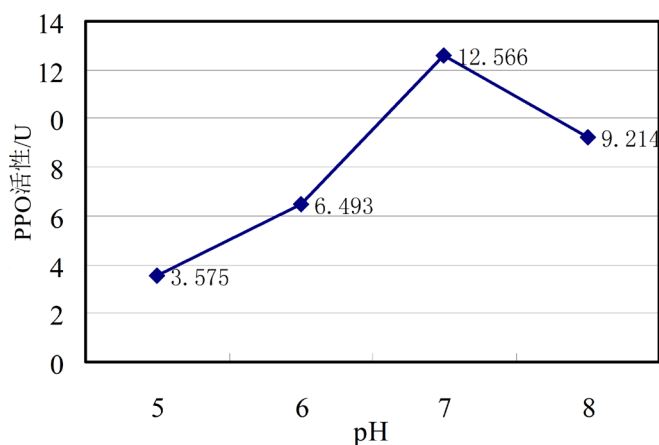


Figure 1. Effect of pH value on PPO activity of tender branches of *Docynia indica*
图 1. pH 值对移衣嫩枝 PPO 活性影响

3.2. 不同底物及浓度与多酚氧化酶活性的关系

实验筛选设置的肉桂酸、阿魏酸和邻苯二酚作为底物时，实验明显显示以邻苯二酚作底物，移衣多酚氧化酶(PPO)活性最高。故，以邻苯二酚作为实验的最适底物，同时设置邻苯二酚的浓度梯度开展进一步的实验分析。首先，随邻苯二酚浓度的升高，移衣 PPO 活性也增加，但当浓度超过 $0.15 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，PPO 活性又开始逐渐降低。因此，整个实验分析揭示，筛选发现 $0.15 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的邻苯二酚为实验的最佳底物(图 2)。

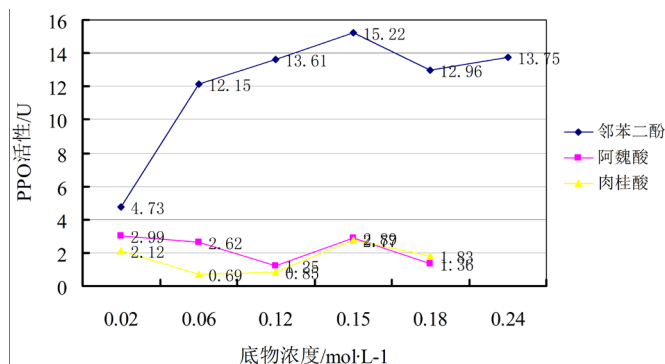


Figure 2. Effects of substrates and concentrations on PPO activity of *Docynia indica*
图 2. 不同底物及浓度对柃衣 PPO 活性的影响

3.3. 温度与多酚氧化酶活性的关系

温度实验, 设置在 15℃~75℃温度区间内分析。温度达到 25℃时, 柃衣多酚氧化酶(PPO)活性最大; 温度高于 25℃时, PPO 活性开始逐渐降低, 随着温度升高到 75℃时, PPO 也基本丧失活性(图 3)。因此, 25℃是柃衣 PPO 活性在实验中的最适温度。

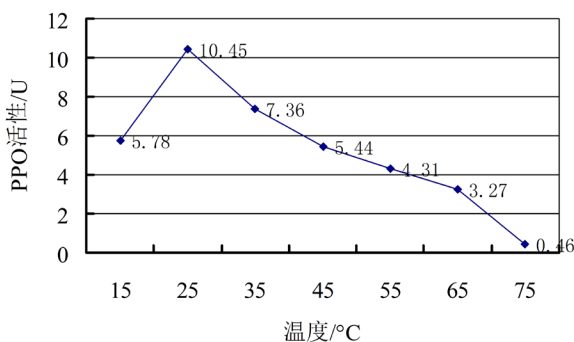


Figure 3. Effect of temperature on PPO activity of *Docynia indica*
图 3. 温度对柃衣 PPO 活性的影响

3.4. 酶活性和总酚含量的动态变化

3.4.1. 多酚氧化酶活性月动态变化

针对柃衣新鲜材料, 每月进行多酚氧化酶(PPO)活性分析测定, 统计分析每月动态变化规律(图 4)。实验分析显示, 12月是 PPO 活性最低的月份, 其次为 1月、2月和 10月; 酶活性较高的月份是 4月、7月、8月和 9月, 而且 9月是 PPO 活性最高的月份。12月、1月和 2月是冬季时节, 植物生长缓慢, 酶活性较低, 变化也不明显; 2~4月, 6~9月, 酶活性逐渐升高, 可能是因为植物处于生长季节, 体内的多酚氧化酶表现的较为活跃, 活性显著高于休眠时节。

3.4.2. 总酚含量的动态变化

针对柃衣的总酚含量, 实验设置每月进行测定, 统计分析它的动态变化。采用福林酚试剂法, 依据标准曲线与总酚含量计算公式分析出不同月份的柃衣茎段样品的总酚含量, 绘制变化曲线, 如图 5 所示。实验分析显示, 总酚含量最低的是 4月, 其次为 3月和 9月, 含量最高的月份为 6月, 其次为 1月、7月、8月和 11月。4月和 9月分别为春初生长和秋末减缓的季节, 而生长旺盛的 6~8月以及步入休眠期的 11月、12月和 1月总酚含量均较高, 揭示柃衣生长中的总酚含量与物候期有较为密切的关系。

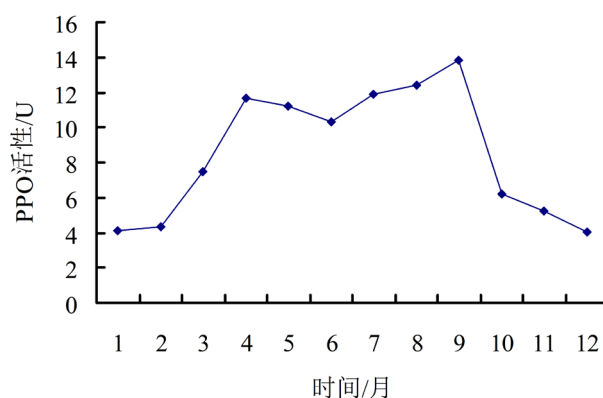


Figure 4. Dynamic changes of PPO activity in *Docynia indica*

图 4. 移衣植株 PPO 活性动态变化

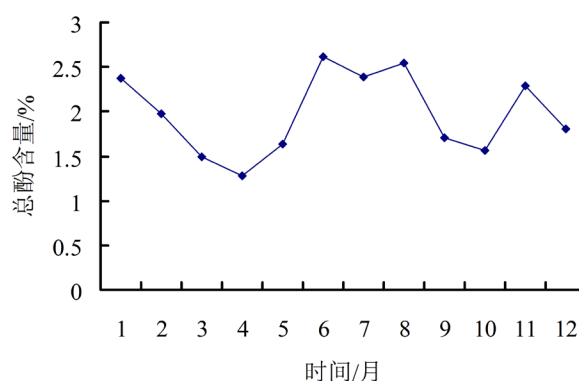


Figure 5. Monthly dynamic change of total phenol content in *Docynia indica*

图 5. 移衣植株总酚含量月动态变化

4. 讨论

与已经报道的一些植物相比[4] [6] [7] [8], 其 PPO 活性存在一定差异, 表明各植物的 PPO 变化有自身特有的规律。磷酸缓冲液 pH 值对移衣 PPO 活性具有明显影响, 在酸性条件下, 随 pH 值升高, PPO 活性显著增强, 当 pH 值为 7 时, PPO 活性最高, pH 值超过 7 为碱性, 随 pH 值增大, PPO 活性开始下降, 则可认为在测定移衣 PPO 活性的最适 pH 值为 7.0。其次, 阿魏酸、邻苯二酚和肉桂酸 3 种底物中, 以邻苯二酚效果最好, 但其浓度对移衣 PPO 活性有显著影响, 试验筛选出 $0.15 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 邻苯二酚为最佳底物及浓度。再次, 测试温度对移衣 PPO 活性影响极显著, 在 $15^{\circ}\text{C}\sim 75^{\circ}\text{C}$ 温度范围内, 当温度为 25°C 时, 移衣 PPO 活性最高, 超过 25°C 时其 PPO 活性逐渐降低, 当温度达到 75°C 时, 其活性基本失活; 故认为测定移衣 PPO 活性最佳温度为 25°C 。最后, 移衣 PPO 活性, 在生长期明显高于休眠期。移衣枝条体内总酚含量在每年的 4 月、5 月、9 月 3 个时段最低, 为无性繁殖取材最佳时间。

总之, 移衣多酚氧化酶活性及性质与其他植物较为接近, 属于正常情况, 但酶活性在时间上变化较为滞后[3], 从而导致移衣在开花及果实发育与成熟等阶段相对与其他常见植物品种较为延后。因此, 本研究对以后移衣的研究及培育有重要的指导意义。

基金项目

四川省科技计划项目(2018NZ0091)、四川省级公益性科研院所基本科研业务费项目、农业农村部杂粮加工重点实验室开放基金资助(No. 2018CC12)共同资助。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编委会. 中国植物志[M]. 第 36 卷. 北京: 科学出版社, 1974.
- [2] 钱信忠. 中国本草彩色图鉴草药篇[M]. 第四卷. 北京: 人民卫生出版社, 2003.
- [3] 宋立江, 狄莹, 石碧. 植物多酚研究与利用的意义及发展趋势[J]. 化学进展, 2000, 12(2): 161-170.
- [4] 胡青霞. 石榴果皮中多酚氧化酶测定最佳试验条件的确定[J]. 河南农业科学, 2007(2): 81-83.
- [5] 高畅, 程大海, 高欣, 赵尔丰. 蓝莓果渣提取物总酚含量及抗氧化活性研究[J]. 植物研究, 2010, 30(2): 253-256.
- [6] 张国庆, 董明, 李娜, 俞雅琼, 王旭. 宣木瓜多酚氧化酶酶学特性与抑制剂研究[J]. 食品科学, 2011, 32(10): 288-291.
- [7] 王俊, 马玉心, 贾文庆, 崔大练, 王日昕. 九个牡丹品种总酚含量及其多酚氧化酶活性的变化[J]. 北方园艺, 2010(6): 118-120.
- [8] 纪淑娟, 尹竞男, 李家政. 蜜柚多酚氧化酶的酶学特性与活性测定研究[J]. 北方园艺, 2010(6): 171-174.
- [9] 胡君萍, 杨建华, 王新玲, 木艾塔尔·努尔麦麦提, 热娜·卡斯木. 新疆沙枣果实不同部位总酚的含量测定[J]. 食品科学, 2010, 31(6): 220-222.
- [10] 汪家政, 范明, 主编. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000.

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2168-5665, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: br@hanspub.org