

小黃瓜多元酚氧化 之純化與其特性探討

盧俊傑、陳鴻章, 顏裕鴻

E-mail: 8515726@mail.dyu.edu.tw

摘要

本研究使用 0.1 M, pH 5.0 之 $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 緩衝液當萃取液, 從小黃瓜中萃取出多元酚氧化酵素 (EC 1.14.18.1) 之粗酵素液後, 再以硫酸銨沉澱 (取 20-80% 分劃) 及 DEAE Sepharose CL-6B 離子交換層析加以純化。經此純化後之酵素液其比活性增加 124.9 倍, 而回收率為 71.4%。純化之酵素進行膠體過濾層析及 SDS-PAGE 電泳分析後, 可得單一蛋白質帶, 所測分子量分別為 148 KDa 及 76 KDa; 表示此酵素應為具同樣單體之雙體結構。對此酵素進行各項特性探討, 發現其最適作用溫度為 40, 最適作用 pH 值為 7; 在溫度 50 下作用 10 min, 或在 pH 4-8 下作用 1 小時仍相當安定 (> 80 % 最大活性); 而在受質特異性方面以五倍子酚為反應最快, 其次為 4- 甲基兒茶酚及兒茶酚。此結果顯示小黃瓜多元酚氧化酵素對具鄰 - 雙羥基結構之受質較具親和性。此外小黃瓜多元酚氧化酵素能被還原劑及與銅離子作用之試劑所抑制。添加 L- 抗壞血酸、氰化鉀、蘇胱甘?或焦亞硫酸鈉 10.0 mM 對此酵素活性具有 100% 的抑制效果。小黃瓜多元酚氧化酵素作用於 4- 甲基兒茶酚、兒茶酚、五倍子酚等受質依照 Lineweaver-Burk 圖可求取其 V_{\max} 值分別為 76.92 OD/min.mL、36.40 OD/min.mL、227.2 OD/min.mL、及 K_m 值分別為 1.15 mM、2.076 mM、6.52 mM。此結果顯示 4- 甲基兒茶酚對於酵素之親和性是三種受質中最好的。當以 4- 甲基兒茶酚為受質時焦亞硫酸鈉、氰化鉀對小黃瓜多元酚氧化酵素則呈現不競爭性抑制作用其抑制常數分別為 $k_i=0.0177$ mM 及 $k_i=0.0218$ mM, 另外 L- 抗壞血酸則呈現競爭性抑制作用其抑制常數為 $k_i=0.0153$ mM。當以兒茶酚為受質時焦亞硫酸鈉、氰化鉀對小黃瓜多元酚氧化酵素仍呈現不競爭性抑制作用其抑制常數分別為 $k_i=0.0833$ mM 及 $k_i=0.0820$ mM, 另外 L- 抗壞血酸則呈現非競爭性抑制作用其抑制常數為 $k_i=0.0659$ mM。最後以五倍子酚為受質時 L- 抗壞血酸、氰化鉀對小黃瓜多元酚氧化酵素則呈現非競爭性抑制作用其抑制常數分別為 $k_i=0.1840$ mM 及 $k_i=0.010$ mM, 另外焦亞硫酸鈉則呈現競爭性抑制作用其抑制常數為 $k_i=0.2380$ mM。由本研究結果發現 L- 抗壞血酸, L- 半胱胺酸, 焦亞硫酸鈉, 氰化鉀, 蘇胱甘等可有效抑制小黃瓜多元酚氧化酵素。雖然氰化鉀具最佳抑制效果但卻具急毒性。另外 L- 抗壞血酸及 L- 半胱胺酸均具極佳抑制效果且本身亦不具毒性, 故在小黃瓜褐變之抑制上可加以選用。

關鍵詞: 酵素性褐變; 褐色素

目錄

0

參考文獻

0