

黑芝麻多酚氧化酶的重组表达及其酶学特性

叶彩燕^{1,2}, 刘光², 杜念², 张瑞芬², 刘磊², 贾栩超², 张名位^{1,2}

1 华南农业大学 食品学院, 广东 广州 510640

2 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所 农业农村部功能食品重点实验室/广东省农产品加工重点实验室, 广东 广州 510610

叶彩燕, 刘光, 杜念, 等. 黑芝麻多酚氧化酶的重组表达及其酶学特性. 生物工程学报, 2021, 37(12): 4395-4405.

Ye CY, Liu G, Du N, et al. Recombinant expression of black sesame polyphenol oxidase and its enzymatic properties. Chin J Biotech, 2021, 37(12): 4395-4405.

摘要: 为明确黑芝麻多酚氧化酶的酶学性质, 利用大肠杆菌 *Escherichia coli* 原核表达了黑芝麻多酚氧化酶 (Black sesame polyphenol oxidase, BsPPO)。将合成的基因构建至 pMAL-c5x 载体, 并在大肠杆菌中进行表达, 对重组蛋白进行分离纯化及融合标签切除, 获得的 BsPPO 蛋白用于酶学性质探究。结果表明, 合成的 *Bsppo* 基因 1 752 bp, 编码 585 个氨基酸, 理论蛋白分子量为 65.3 kDa; 构建的 pMAL-c5x-*Bsppo* 重组质粒在大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21(DE3) 中可溶表达了 MBP-BsPPO 蛋白; 酶切去除 MBP 融合标签后对 BsPPO 进行了酶学性质研究, 结果表明 BsPPO 的最适温度和 pH 分别为 25 °C 和 4.0, 在低温和弱酸性环境中较好的稳定性。短时间低强度的光照和 Cu^{2+} 可激活 BsPPO 的活性, Zn^{2+} 和 Ca^{2+} 能抑制其活性。BsPPO 可催化单酚、二酚以及三酚类化合物, 对 L-酪氨酸以及香草酸表现出较高的催化活性, 此外 BsPPO 还对黑芝麻中含有的 2-甲氧基肉桂酸、喹啉 3-羧酸和根皮素表现出良好的催化活性。研究结果为黑芝麻多酚氧化酶酶学特性的明确奠定了理论基础。

关键词: 黑芝麻多酚氧化酶, 大肠杆菌, 原核表达, 亲和纯化, 酶学性质

Received: March 7, 2021; **Accepted:** May 24, 2021

Supported by: Guangdong Special Support Program, China (No. 2019BT02N112), Discipline Team Building Projects of Guangdong Academy of Agricultural Sciences in the 14th Five-Year Period, China (No. 202108TD), the Special Fund for Scientific Innovation Strategy-Construction of High Level Academy of Agriculture Science, China (Nos. R2018PY-JC002, R2017YJ-YB2006, R2018QD-081).

Corresponding authors: Xuchao Jia. Tel: +86-20-87237376; E-mail: jiaxuchao@gdaas.cn

Mingwei Zhang. Tel: +86-20-87236227; E-mail: mwzhh@vip.tom.com

广东特支计划项目 (No. 2019BT02N112), 广东省农业科学院十四五学科团队建设项目 (No. 202108TD), 科技创新战略专项资金-高水平农科院建设 (Nos. R2018PY-JC002, R2017YJ-YB2006, R2018QD-081) 资助。

网络出版时间: 2021-06-04

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.q.20210603.1423.002.html>

Recombinant expression of black sesame polyphenol oxidase and its enzymatic properties

Caiyan Ye^{1,2}, Guang Liu², Nian Du², Ruifen Zhang², Lei Liu², Xuchao Jia², and Mingwei Zhang^{1,2}

1 College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510640, Guangdong, China

2 Key Laboratory of Functional Foods, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangdong Key Laboratory of Agricultural Products Processing, Sericultural & Agri-Food Research Institute Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510610, Guangdong, China

Abstract: To investigate the enzyme properties of the black sesame polyphenol oxidase (BsPPO), a synthesized *Bsppo* gene was cloned into the vector pMAL-c5x and expressed in *E. coli*. Subsequently, the MBP fusion label in the recombinant protein was removed by protease digestion after affinity purification. The synthesized *Bsppo* gene contained 1 752 bp which encodes 585 amino acids with a deduced molecular weight of 65.3 kDa. Transformation of the recombinant vector into *E. coli* BL21(DE3) resulted in soluble expression of the fusion protein MBP-BsPPO. The enzymatic properties of the recombinant BsPPO was investigated after MBP fusion tag excision followed by affinity purification. The results demonstrated that the optimal temperature and pH for BsPPO was 25°C and 4.0, respectively. BsPPO exhibited a good stability under low temperature and acidic environment. Low-intensity short-term light exposure increased the activity of BsPPO. Cu²⁺ could improve the activity of BsPPO while Zn²⁺ and Ca²⁺ showed the opposite effect. BsPPO could catalyze the oxidation of monophenols, diphenols, and triphenols, and exhibited good catalytic activity on l-tyrosine and vanillic acid. Moreover, BsPPO exhibited high catalytic activity on black sesame metabolites, including 2-methoxy cinnamic acid, indole-3-carboxylic acid and phloretin. These results may serve as a basis for further characterization of BsPPO.

Keywords: black sesame polyphenol oxidase, *Escherichia coli*, prokaryotic expression, affinity purification, enzymatic properties

黑芝麻中的黑色素是其特征性的活性物质,具有多种良好的生理活性,如抗氧化、保肝护肾、调节脂代谢、防肿瘤等^[1-4]。黑色素的这些生理活性与黑色素的化学结构密切相关,然而由于植物黑色素的结构复杂性,经典的基于化学降解和波谱手段的表征技术难以解析黑芝麻黑色素的化学结构^[5],制约了黑芝麻黑色素构效关系的深入研究。从黑色素的生物合成途径入手解析黑芝麻黑色素的结构有望为黑芝麻黑色素结构表征提供新的研究思路,但这有赖于黑芝麻黑色素合成的关键酶及其酶学特性的明确。

多酚氧化酶 (Polyphenoloxidase, PPO) 是一种广泛存在于植物、真菌、细菌和动物中含铜质体的金属酶,是催化形成黑色素的关键酶类。根据催化底物不同, PPO 可以分为单酚氧化酶、儿茶

酚氧化酶和漆酶。当存在分子氧时, PPO 催化酚类物质氧化生成高亲电性邻苯醌类化合物,后者再以非酶聚合的方式形成黑色素高聚物^[6]。前人对黑芝麻黑色素生物合成的相关基因进行了系列研究, Wei 等通过全基因组关联分析发现,黑白芝麻品系之间的 SiPPO (SIN_1016759) 基因存在大量的非同义突变,该基因编码的多酚氧化酶与植物黑色素合成有关^[7]; Wang 等和 Wei 等此后两次通过白芝麻和黑芝麻杂交构建的 RIL 群体进行 QTL 定位,在控制种皮颜色的主效 QTL 位点中都找到了 PPO 基因,说明 PPO 基因是控制芝麻种皮颜色的重要候选基因^[8-9]。Dossou 等比较了黑白两种芝麻种子发育的早期阶段差异表达基因,并发现黑芝麻种子黑色素开始累积的阶段伴随着多酚氧化酶 SIN_1016759/PPO 的高

表达^[10]。上述研究表明黑芝麻多酚氧化酶是黑色素合成的关键酶。

然而,目前关于黑芝麻黑色素多酚氧化酶的研究相对较少,现有研究主要是对其基因进行了克隆,明确了BsPPO的基因序列。而黑芝麻多酚氧化酶的转录表达、酶学特性及其在黑色素合成过程中的影响未见报道。基于此,本研究利用大肠杆菌*Escherichia coli*原核表达体系重组表达了黑芝麻多酚氧化酶,优化重组蛋白表达条件,分离纯化后对重组黑芝麻多酚氧化酶的酶学性质进行探究。研究结果将有助于明确黑芝麻多酚氧化酶的酶学特性,为黑芝麻多酚氧化酶的相关研究奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

pMAL-c5x质粒购自美国NEB公司,表达菌株*E. coli* BL21(DE3)购于广州英赞生物科技有限公司,黑芝麻多酚氧化酶基因合成由广州英赞生物科技有限公司完成。

氨苄青霉素(Ampicillin, Amp)、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(Isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG)均从上海源叶生物科技有限公司购买。Factor Xa因子蛋白酶购自美国NEB公司。L-酪氨酸(L-tyrosine)、香草酸(Vanillic acid)等标准品均购自阿拉丁和麦克林试剂官网。L-半胱氨酸(L-cysteine)、EDTA等试剂均为分析纯,购自天津市大茂化学试剂厂。

1.2 主要仪器与设备

美国Bio-Rad蛋白电泳仪,美国GE蛋白纯化仪,美国BioTek酶标仪,美国Beckman Coulter离心机,北京凯奥NanoVue plus型微量紫外分光光度计,浙江托普云农GTOP-310Y型智能光照培养箱。

1.3 方法

1.3.1 重组表达载体的构建

从NCBI上获得了黑芝麻多酚氧化酶全长基因(GenBank登录号:105176877)序列信息,通过密码子优化,得到适用于异源表达系统的黑芝麻多酚氧化酶基因序列,全长1 752 bp,编码585个氨基酸。利用全基因合成技术,制备得到了分别带有上、下游酶切位点*Nde* I和*Eco*R I的截短黑芝麻多酚氧化酶基因片段,并连接至pMAL-c5x载体上,构建得到了pMAL-c5x-Bsppo重组表达质粒。

1.3.2 重组BsPPO的诱导表达和可溶性分析

测序无误后的重组质粒转化至*E. coli* BL21(DE3)感受态细胞中,并涂布至含Amp(终浓度100 μ g/mL)的LB固体平板培养基上。37 $^{\circ}$ C恒温培养过夜后,挑取平板上形态饱满的单克隆菌落接种于60 mL含有100 μ g/mL氨苄青霉素的LB液体培养基中,37 $^{\circ}$ C、200 r/min培养10–12 h。按照1:100的比例将菌液转接到2个新的1 L含有100 μ g/mL氨苄青霉素的LB液体培养基中扩大培养,37 $^{\circ}$ C、200 r/min条件下培养至菌液 OD_{600} 值为0.6–0.8时,将菌液冷却至18 $^{\circ}$ C,加入IPTG至终浓度为0.1 mmol/L,18 $^{\circ}$ C诱导表达16 h,以不加诱导剂组为对照。

取5 mL诱导表达后的菌液在12 000 r/min条件下离心1 min,弃去上清,向离心收集的菌体中加入20 mmol/L Tris-HCl缓冲液(含0.5 mol/L NaCl, pH 7.4),冰浴条件下超声破碎细胞,超声功率120 W,占空比0.3:0.5,超声时间15 min。菌液破碎后在4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min离心5 min,取上清液样品。收集诱导前菌液、诱导后菌液和破碎后的上清液进行重组蛋白的可溶性分析。蛋白的重组表达和可溶性分析采用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)鉴定。

1.3.3 重组 BsPPO 的分离纯化

将诱导收集的菌体按照每克菌体加入 5 mL 缓冲液 A (20 mmol/L Tris, 0.5 mol/L NaCl, pH 7.4) 重悬, 按照 1.3.2 方法冰浴超声至菌液澄清, 菌体破碎后, 4 °C、16 000 r/min 离心 15 min, 并进一步使用 0.22 μm 滤膜对上清液进行过滤。

过滤后的上清液载入 MBP 亲和层析柱中, 用缓冲液 A 洗脱未与柱子结合的蛋白, 随后使用洗脱缓冲液 B (20 mmol/L Tris, 0.5 mol/L NaCl, 10 mmol/L 麦芽糖, pH 7.4) 进行 10% 梯度洗脱, 洗脱体积为 12 倍柱体积; 后用比例为 100% 的洗脱缓冲液 B 洗脱 5 倍柱体积。洗脱速度 3 mL/min, 按紫外吸收峰收集样品, 将样品进行 SDS-PAGE 分析, 并用微量紫外分光光度计测定蛋白浓度。

合并收集重组目的蛋白, 3 000×g 用超滤管浓缩目的蛋白, 并用 0.22 μm 滤膜过滤。使用 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4) 预平衡的脱盐柱处理。将脱盐后的蛋白样品取样进行 SDS-PAGE 分析。

1.3.4 MBP 融合标签的去除

使用 Xa 因子蛋白酶对重组黑芝麻多酚氧化酶蛋白进行 MBP 融合标签切除。将纯化后的重组蛋白加入到酶切缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, 2 mmol/L CaCl₂, pH 7.4) 中, 按照黑芝麻多酚氧化酶融合蛋白与 Xa 因子蛋白酶质量比为 20 : 1 (说明书条件), 25 °C 酶切 4 h, 将酶切后样品进行 MBP 柱层析纯化, 收集洗脱组分进行 SDS-PAGE 分析, 合并收集去除 MBP 标签的重组蛋白。

1.3.5 重组 BsPPO 的酶活测定

取 50 mmol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH 6.5) 130 μL 于 96 孔板中, 加入 50 μL 邻苯二酚 (0.2 mol/L), 30 °C 孵育 5 min 后加入 10 μL 酶液, 混匀后立即在 410 nm 下测定吸光值, 每隔 30 s 测定吸光值变化, 并以最初的直线段的斜率来计算酶活。在该条件下, 每分钟吸光值增加 0.001 的酶量定义

为一个酶活力单位 (1 U)。

1.3.6 重组 BsPPO 的酶学特性研究

以邻苯二酚为底物, 测定重组黑芝麻多酚氧化酶的酶学特性, 包括最适反应温度和温度稳定性, 最适反应 pH 和 pH 稳定性。

将重组黑芝麻多酚氧化酶加入到磷酸缓冲液 (pH 6.5) 中, 在不同温度 (15–75 °C) 条件下测定酶活, 确定最适反应温度; 将重组蛋白置于不同温度 (15–75 °C) 孵育 0.5 h 后, 在最适条件下测定其残留酶活性, 得到酶的温度稳定性。选择柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 (50 mmol/L, pH 3.0–5.5)、磷酸盐缓冲液 (50 mmol/L, pH 5.5–7.0) 于 37 °C 探究酶的最适反应 pH; 将重组蛋白置于不同 pH 缓冲液 (pH 3.0–7.0) 中孵育 1 h 后, 按 1.3.5 的方法测定其残留的酶活性, 得到酶的 pH 稳定性。

1.3.7 重组 BsPPO 的底物特异性分析

选用 6 种不同的底物 (L-酪氨酸、香草酸、邻苯二酚、4-甲基儿茶酚、儿茶素、焦性没食子酸) 进行酶的动力学实验, 探究重组黑芝麻多酚氧化酶的底物特异性。酶活力测定方法按照 1.3.5 方法执行, 只改变波长为每种物质的最大吸收波长。测定不同底物在不同浓度下的 PPO 活性, 做双倒数曲线, 根据 Lineweaver-Burk 方程计算酶的动力学参数 K_m 以及 V_{max} 。

此外, 还选取松柏醛、橙皮苷、根皮素、吡啶-3-羧酸、2-甲氧基肉桂酸等 5 种黑白芝麻差异代谢酚类物质为底物^[11], 探究 BsPPO 对它们的催化活性。将每种底物配置成 5 mmol/L 浓度, 酶活力测定方法按照 1.3.5 所述, 以邻苯二酚为底物时的酶活为 100%。

1.3.8 抑制剂对重组 BsPPO 活性的影响

测定 L-半胱氨酸、EDTA、柠檬酸、抗坏血酸对重组黑芝麻 PPO 的抑制作用。利用柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 (pH 4.0) 溶解抑制剂, 配制成含不同浓度 (1、5、10 mmol/L) 抑制剂的反应体系。按上述酶活性的测定方法测定 PPO 残余酶活力。用

最大酶活力与残余酶活力差值比最大酶活力表示抑制剂对 PPO 活性的抑制作用。

1.3.9 光照和金属离子对 BsPPO 活性的影响

测定光照时间和光照强度对重组 BsPPO 活性的影响。将 BsPPO 置于智能光照培养箱中 (光照等级 0–10 级, 光照度 0–8 000 lx), 于 25 °C、10 级光照条件下, 分别照射 0、20、40、60、120、150、180 min, 按 1.3.5 方法测定酶活, 探究光照时间对 BsPPO 酶活性的影响。将 BsPPO 置于智能光照培养箱中, 培养箱温度 25 °C, 在 0 级、1 级、3 级、6 级、10 级光照强度下分别照射 3 h, 然后按上述方法测定酶活, 探究光照强度对 BsPPO 酶活性的影响。

测定 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 对 BsPPO 酶活性的影响。利用柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 (pH 4.0) 溶解抑制剂, 配制成含不同浓度 (1、5、10 mmol/L) $ZnCl_2$ 、 $CaCl_2$ 、 $CuSO_4$ 的反应体系。按上述酶活性的测定方法测定 PPO 残余酶活力。

1.3.10 统计学分析

所有数据均为 3 次试验的平均值, 使用 SPSS 25.0 进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 重组蛋白的表达与可溶性分析

重组 MBP-BsPPO 可溶性结果如图 1 所示。条带 1–3 分别为诱导前全菌蛋白、诱导后全菌蛋白和重组菌破碎后上清蛋白。比较条带 1 和条带 2 可得, 电泳图上约 110 kDa 位置出现了明显的蛋白表达条带, 表明加入诱导剂 IPTG 成功诱导了重组蛋白的表达。表达的重组 BsPPO 理论蛋白质分子质量约为 65 kDa, 表达过程中 N-末端带有 MBP 融合标签, 其分子量为 42.9 kDa, 因此, 重组表达的 MBP-BsPPO 理论分子量约为 108 kDa, 这与电泳图谱上蛋白条带表观分子量相符。此外, 比较条带 2 与条带 3 可知, 破碎上清液有目的蛋白且其蛋白浓度与条带 2 中目的蛋白浓度相当, 说明重组 MBP-BsPPO 呈现可溶表达。

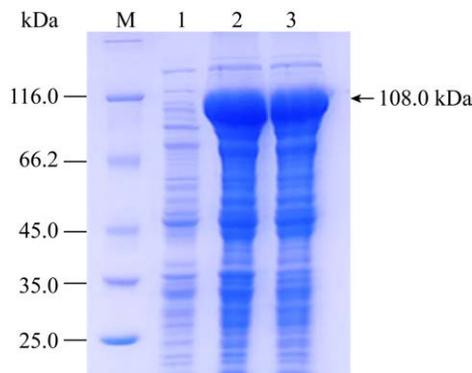


图 1 重组 MBP-BsPPO 的表达和可溶性分析

Fig. 1 Expression and solubility analysis of the recombinant BsPPO by SDS-PAGE. M: protein marker; lane 1: recombinant bacteria before inducing; lane 2: recombinant bacteria after inducing; lane 3: supernatant of recombinant bacteria lysate.

2.2 重组蛋白的分离纯化和去标签处理

重组的黑芝麻多酚氧化酶蛋白带有 MBP 融合标签, 采用 MBP 亲和层析对其进行分离纯化。由图 2 可知, 当用含麦芽糖的洗脱液进行洗脱时, 目的蛋白逐渐被洗脱下来, 说明使用 MBP 亲和层析能够对 MBP-BsPPO 分离纯化。使用 Xa 因子蛋白酶进行切标签处理, 在芝麻多酚氧化酶融合蛋白与 Xa 因子蛋白酶质量比为 1 : 20 (说明书条件), 将酶切样品于 25 °C 酶切 4 h 后进行 SDS-PAGE 分析, 电泳结果如图 2 泳道 8 和 9 所

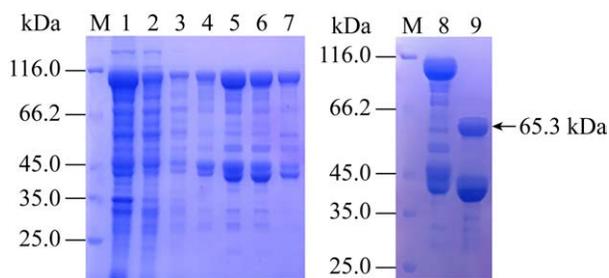


图 2 重组 MBP-BsPPO 亲和纯化及标签切除分析

Fig. 2 Affinity purification of MBP-BsPPO and its MBP-tag excision. M: protein marker; lane 1: total protein; lane 2: supernatant; lane 3: flowthrough; lane 4–7: protein eluted by 10% buffer B; lane 8: recombinant protein before MBP-tag excision; lane 9: recombinant protein after MBP-tag excision.

示, 重组蛋白被完全酶切, 且酶切后两个蛋白分子量均与理论分子量相符, 酶切后样品为含有黑芝麻多酚氧化酶和 MBP 蛋白的复合蛋白样品, 可进行下一步 MBP 柱层析纯化。进一步 MBP 纯化后, 结果如图 3 所示, 发现经过酶切后重组蛋白分子量显著降低, 目的蛋白在凝胶上呈单条带迁移, 其表观分子质量约为 60.0 kDa, 这与黑芝麻多酚氧化酶理论蛋白质分子量 65.0 kDa 接近。因此, 通过酶切纯化后获得了纯度较高的重组黑芝麻多酚氧化酶, 可用于后续的酶学测定。

2.3 重组 BsPPO 的酶学特性研究

以邻苯二酚为底物, 探究了黑芝麻多酚氧化酶的酶学特性, 测定了酶的最适反应温度、温度稳定性、最适反应 pH 和 pH 稳定性, 结果如图 4 所示。BsPPO 最适反应温度为 25 °C (图 4A), 20 °C 时稳定性最高 (图 4B), 而在 75 °C 孵育 30 min 后, 只保留了最大酶活力的 14%, 说明 BsPPO 在高温下不稳定。由图 4C 可见, 酶的最适反应 pH 为 4.0, 说明 BsPPO 更适合在酸性环境中发挥催化活性。重组 BsPPO 在 pH 5.0 条件下最稳定, 相反, 在 pH 7.0 条件下孵育 1 h 后, 其残留酶活力不足最大酶活力的 4%, 说明 BsPPO 在中性环境下稳定性不佳。

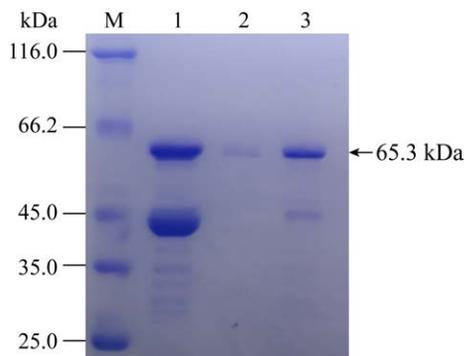


图 3 MBP-BsPPO 蛋白的亲和纯化制备

Fig. 3 Affinity purification of MBP-BsPPO. M: protein marker; lane 1–3: collected recombinant BsPPO purified after affinity chromatography by using MBP column.

2.4 重组 BsPPO 的底物特异性分析

选择 6 种苯环羟基取代不同的酚类作为底物, 进行酶的动力学实验。以 6 种物质作为 BsPPO 的底物时, 其反应规律都符合米氏方程, 依据双倒数曲线得到重组 BsPPO 对 6 种不同底物的动力学参数 K_m 和 V_{max} , 结果见表 1。可见, BsPPO 具有类似于漆酶的催化特性, 可以广泛催化单羟基酚 (L-酪氨酸、香草酸)、二羟基酚 (儿茶酚、4-甲基儿茶酚和儿茶素)、三羟基酚 (焦性没食子酸)。测试底物中, L-酪氨酸的 K_m 值最小, 证明 BsPPO 与 L-酪氨酸的亲合力最强, 其次为香草酸和儿茶素。本研究还测定了重组 BsPPO 对黑白芝麻中的 5 种差异代谢物的催化活性。结果如表 2 所示, 在 5 mmol/L 底物浓度下, 根皮素、吲哚-3-羧酸以及 2-甲氧基肉桂酸都能被 BsPPO 催化发生褐变反应 (在氧气存在的条件下, 酚类物质被多酚氧化酶催化生成褐色聚合物), 且褐变程度均高于底物邻苯二酚, 而松柏醛和橙皮苷则不能被重组 BsPPO 催化产生褐变。

2.5 抑制剂对重组 BsPPO 的影响

测定了氯化锌、L-半胱氨酸、EDTA、柠檬酸、抗坏血酸对重组 BsPPO 的抑制作用, 结果如表 3 所示。对 BsPPO 有较强抑制作用的是 EDTA、L-半胱氨酸, 当 EDTA 和 L-半胱氨酸浓度为 10 mmol/L 时, 其对 BsPPO 的抑制率分别达到了 92% 和 89%。在柠檬酸和抗坏血酸的浓度为 10 mmol/L 的条件下, 对重组 BsPPO 抑制率分别为 72%、39%, 柠檬酸和抗坏血酸对 BsPPO 的抑制率随着自身浓度的增大而增大, 且柠檬酸的抑制能力大于抗坏血酸。

2.6 光照和金属离子对 BsPPO 活性的影响

测定不同浓度的金属离子 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 对重组 BsPPO 的影响, 结果如表 4 所示, Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 对重组 BsPPO 具有抑制作用, 并在 1–10 mmol/L 范围内成浓度依赖性, 其中 Ca^{2+} 的抑制效果显著高于 Zn^{2+} , 当浓度为 5 mmol/L 时, 其抑制率达到

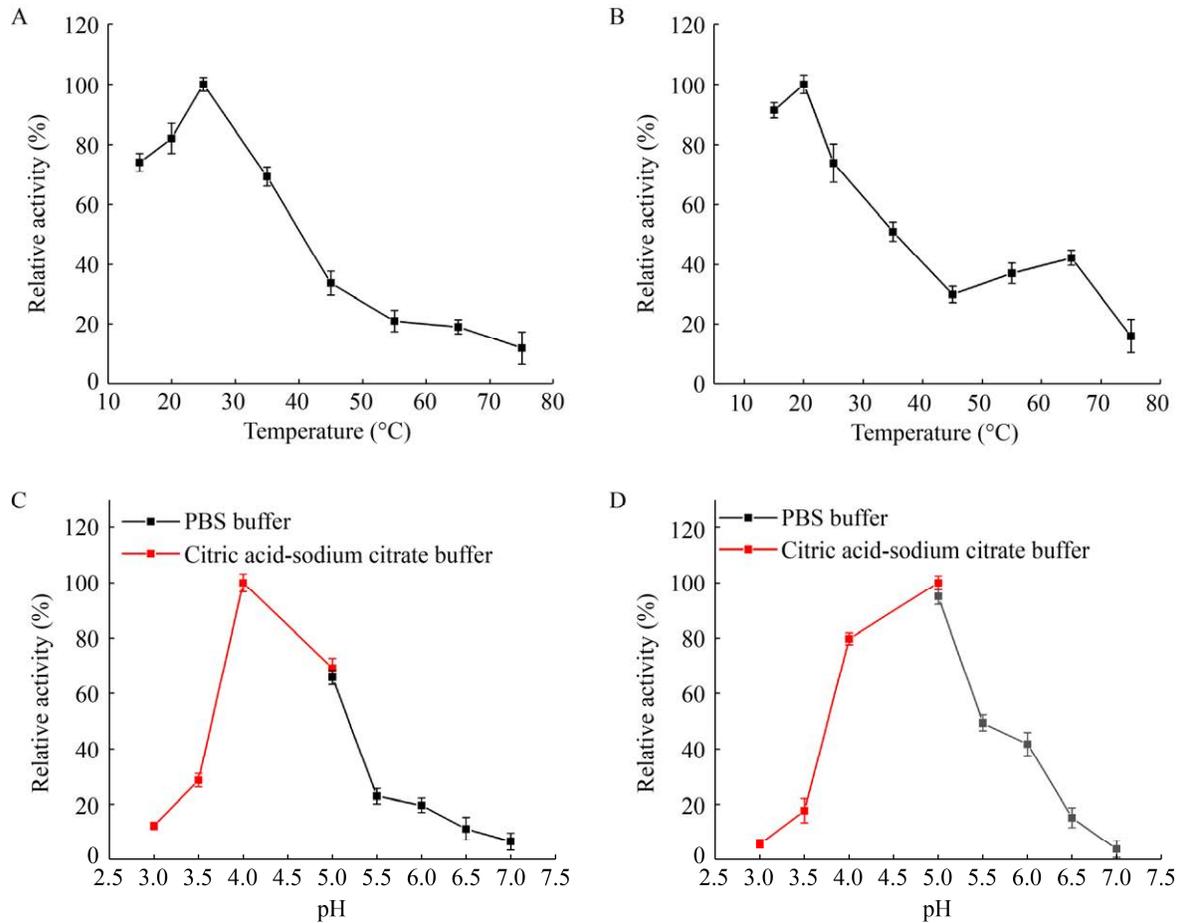


图 4 重组 BsPPO 的酶学性质测定

Fig. 4 Enzymatic properties of the recombinant BsPPO. (A) Activity of BsPPO measured from 15 to 75 °C, with activity at 25 °C normalized to 100%. (B) Thermal stability of BsPPO which was incubated in 50 mmol/L citric acid-sodium citrate buffer (pH 4.0) at different temperatures (15–75 °C) for 0.5 h. (C) Activity of BsPPO measured at different pH values (pH 3.0–7.0), with activity at pH 4.0 normalized to 100%. (D) The pH stability of BsPPO which was incubated at 4 °C for 1 h in 50 mmol/L citric acid-sodium citrate buffer (pH 3.0–5.5), and 50 mmol/L PBS buffer (pH 5.5–7.0).

表 1 重组 BsPPO 催化不同酚类底物的动力学参数

Table 1 Kinetic parameters of different substrates of recombinant BsPPO

Phenol type	Index	K_m (mmol/L)	V_{max} ($\Delta OD/min$)	V_{max}/K_m
Monophenols	L-tyrosine	0.41 ± 0.02^c	5.24 ± 0.28^{bc}	12.79 ± 0.35^a
	Vanillic acid	1.92 ± 0.06^c	5.47 ± 0.24^{bc}	2.85 ± 0.06^c
Diphenols	Catechol	26.87 ± 3.05^a	6.78 ± 1.27^{ab}	0.252 ± 0.08^d
	4-methylcatechol	29.98 ± 2.18^a	6.01 ± 0.78^{abc}	0.20 ± 0.04^d
	Catechin	2.07 ± 0.12^c	7.64 ± 0.54^a	3.69 ± 0.47^b
Triphenols	Pyrogalllic acid	22.81 ± 2.04^b	4.81 ± 0.35^c	0.21 ± 0.03^d

Note: the different letters in the same column indicate significant difference ($P < 0.05$).

表 2 重组 BsPPO 对黑白芝麻差异代谢产物的催化活性研究

Table 2 Catalytic activity of recombinant BsPPO for differential metabolites of black and white sesame

Index	Concentration (mmol/L)	Relative activity (%)
Catechol	5	100
Coniferyl aldehyde	5	—
Hesperidin	5	—
Phloretin	5	118.18±5.23
Indole-3-carboxylic acid	5	142.86±2.68
2-methoxycinnamic acid	5	281.35±7.66

Note: — no PPO activity was detected.

表 3 抑制剂对重组 BsPPO 酶活性的影响

Table 3 Effect of inhibitors on the activity of recombinant BsPPO

Inhibitors	Concentration (mmol/L)	Inhibition rate (%)
L-cysteine	1	—
	5	3.26±0.42
	10	89.34±5.31
EDTA	1	—
	5	13.93±1.24
	10	92.62±3.68
Citric acid	1	18.85±1.36
	5	36.88±2.52
	10	72.13±4.21
Ascorbic acid	1	9.02±0.37
	5	30.33±1.47
	10	38.52±3.29

Note: — no inhibitory effect was detected.

表 4 金属离子对重组 BsPPO 酶活性的影响

Table 4 Effect of metal ions on the activity of recombinant BsPPO

Metallic salts	Concentration (mmol/L)	Relative activity (%)
Zinc chloride	1	80.38±4.56
	5	73.77±4.35
	10	40.16±2.53
Calcium chloride	1	5.60±0.13
	5	—
	10	—
Copper sulfate	1	105±2.89
	5	125±5.62
	10	250±8.75

Note: — no PPO activity was detected.

100%，而 Zn^{2+} 的抑制率只有 26%。 Cu^{2+} 对重组 BsPPO 的活性具有促进作用，且在 1–10 mmol/L 浓度范围内随浓度的增大其促进作用增强。

固定光照强度为最大光照强度 (8 000 lx)，分别测定了 BsPPO 在光照处理不同时间后的活性。结果如图 5A 所示，在 10 级光照强度 (8 000 lx) 条件下，随着光照时间的延长，BsPPO 活性呈现先上升后下降的趋势。在光照 120 min 后，相对酶活性达到最高值 350%。图 5B 显示了在不同光

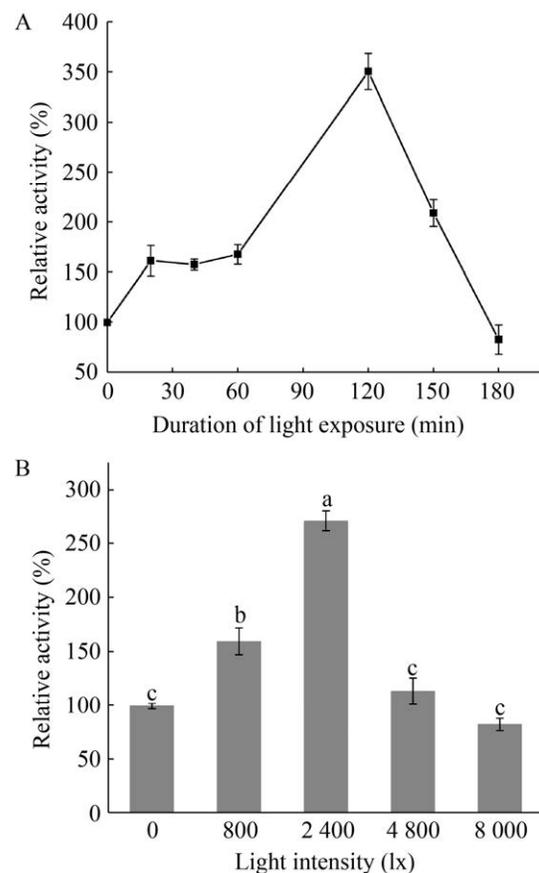


图 5 光照时间和光照强度对重组 BsPPO 酶活性的影响
Fig. 5 Effects of light exposure time and light intensity on BsPPO activity. (A) Changes in the activity of BsPPO after exposure to maximum intensity light (8 000 lx) for 0, 20, 40, 60, 120, 150, 180 min, with activity at 0 min normalized to 100%. (B) Changes in the activity of BsPPO which was incubated under five different levels of light intensity (0 to 8 000 lx) for 3 h, with activity under 0 lx normalized to 100%. Different letters indicate significant differences between means at $P < 0.05$.

照强度下分别照射 3 h 的 BsPPO 酶活变化,可见,随着光照强度的增大,酶活呈现先增大后减小的趋势,当照射强度为 3 级 (2 400 lx) 时达到最大值。

3 讨论

大肠杆菌表达系统主要由宿主菌、表达载体和外源基因构成。pET 载体表达系统是目前克隆表达重组蛋白最强大的系统^[12]。目前已有不少学者在 pET 系统中成功表达了多酚氧化酶、漆酶和酪氨酸酶等^[13-15]。原核表达的多酚氧化酶容易形成包涵体,通常没有活性或者活性很低^[16]。此外,原核表达系统缺乏翻译后加工过程,表达的蛋白并未去除转运肽或者未经正确折叠形成活性结构,也会导致酶活性较低^[17]。本研究采用原核表达重组菌株 *E. coli* BL21(DE3) 在终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG 诱导下,进行较长时间的低温诱导 (18 °C 诱导培养 16 h),给予目的蛋白较为充足的时间进行缓慢合成,利于蛋白的正确折叠加工,表达出可溶的具有生物活性的重组 PPO 蛋白。

按照催化底物的不同,多酚氧化酶可以被分为单酚氧化酶、儿茶酚氧化酶和漆酶。为了全面评价多酚氧化酶的催化特性和底物特异性,本研究选择了单羟基酚 (L-酪氨酸、香草酸)、二羟基酚 (邻苯二酚、4-甲基儿茶酚、儿茶素)、三羟基酚 (焦性没食子酸) 用于评价重组 BsPPO 的底物特异性,结果表明,黑芝麻多酚氧化酶兼具甲酚氧化酶和儿茶酚氧化酶活性。前人研究表明苹果、鳄梨、蘑菇、马铃薯等植物的 PPO 也都同时表现出单酚酶与二酚酶的活性^[18-21]。通过对比不同底物的催化活性数据发现黑芝麻多酚氧化酶的最适底物为 L-酪氨酸,其次是香草酸。Pellosi 等^[22]研究表明酪氨酸等可能为黑色素的合成前体,Panzella 等^[23]研究也发现黑色素的合成前体可能具有 3-甲氧基-4-羟基取代苯环的结构特征。本研究表明黑芝麻多酚氧化酶对酪氨酸、香草酸 (3-甲氧基-4-羟基苯甲酸) 的催化活性显著高于其他酚类,这与

前人关于黑色素合成前体结构特征的推测较为契合。本文还对黑白芝麻中的差异代谢物进行了酶催化研究,发现根皮素、吲哚-3-羧酸以及 2-甲氧基肉桂酸 3 种物质都能够被催化,但其是否是黑芝麻黑色素的合成底物还有待进一步研究明确。

本研究探究了重组黑芝麻多酚氧化酶的酶学性质,发现该酶是酸性酶,最适反应 pH 为 4.0,在低于 pH 4.0 及高于 pH 5.5 的条件下,酶活以及稳定性急剧下降,这可能是由于 pH 环境的改变会引起多酚氧化酶活性部位的质子异变基团的电离变化,从而破坏了活性位点的最适环境。低强度和短时间的光照能够促进 BsPPO 的活性,光照时间太长或强度太大都将对 BsPPO 的催化效果产生抑制作用。这可能是由于酶促蛋白具有结合外源发色团的能力,能迅速与周围光中的激发态物种反应,形成交联体或聚集体等从而改变酶蛋白的性质^[24]。此外,长时间或高强度的光照,产生的光热效应会使酶蛋白的空间结构发生改变如使二硫键断裂等,进而造成酶活下降^[25]。选取的金属离子中 Zn^{2+} 和 Ca^{2+} 对 BsPPO 具有抑制作用。 Zn^{2+} 具有络合能力,能与酚类底物如儿茶酚、绿原酸等产生络合反应,生成的无色产物进一步阻碍酚酶的催化作用^[26]。 Ca^{2+} 对 BsPPO 的抑制可能是其与氨基酸生成不可溶物质,或与 PPO 活性中心的 Cu^{2+} 产生竞争从而抑制酶活^[27]。 Cu^{2+} 是多酚氧化酶的辅基,其对 BsPPO 表现出激活作用,作用机制可能是通过稳定酶蛋白的活性构象或作为连接酶与底物的桥梁从而促进酶促反应^[28]。

本研究评价了还原剂 (L-半胱氨酸)、螯合剂 (EDTA)、有机酸 (柠檬酸、抗坏血酸) 对重组 BsPPO 的抑制作用。结果表明在浓度为 10 mmol/L 时,EDTA 表现出了最强的重组 BsPPO 抑制活性,而抗坏血酸的抑制效果总体上最弱。EDTA 作为螯合剂可螯合 PPO 活性中心的铜离子从而抑制其酶活^[29]。巯基化合物半胱氨酸的抗褐变作用主要是通过替代 PPO 活性中心中的组氨酸残基,以及

与邻醌结构生成稳定的无色物质^[30]。有机酸如柠檬酸、抗坏血酸等的抑制机理主要是降低体系的pH、络合金属离子,钝化酶活^[31]。

本研究对黑芝麻多酚氧化酶进行了重组制备和性质研究,首次明确了黑芝麻多酚氧化酶的酶学特性及催化特性,研究结果将推进对黑芝麻多酚氧化酶的认知,为黑芝麻多酚氧化酶的相关研究提供理论支撑。

REFERENCES

- [1] 单良, 徐利萍, 金青哲, 等. 黑芝麻黑色素的稳定性及自由基清除活性. 安徽农业科学, 2008, 36(26): 11527-11531, 11541.
Shan L, Xu LP, Jin QZ, et al. Stability and free radical scavenging activities of black sesame melanin. J Anhui Agric Sci, 2008, 36(26): 11527-11531, 11541 (in Chinese).
- [2] 刘晓芳, 徐利, 刘娜, 等. 黑芝麻和黑豆色素提取物对急性肝损伤的保护作用. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(5): 68-70.
Liu XF, Xu L, Liu N, et al. Protective effects of pigment extracts of black sesame and black bean on acute liver injury. China J Exp Tradit Med Formulae, 2008, 14(5): 68-70 (in Chinese).
- [3] Xu J, Chen SB, Hu QH. Antioxidant activity of brown pigment and extracts from black sesame seed (*Sesamum indicum* L.). Food Chem, 2005, 91(1): 79-83.
- [4] Panzella L, Eidenberger T, Napolitano A. Anti-amyloid aggregation activity of black sesame pigment: toward a novel Alzheimer's disease preventive agent. Molecules, 2018, 23(3): E676.
- [5] 魏国华, 许新德, 缪飞, 等. 黑色素的合成、鉴定及应用现状. 中国食品添加剂, 2011(3): 170-173.
Wei GH, Xu XD, Miao F, et al. The method of synthesis and identification of melanin, and its usage. China Food Addit, 2011(3): 170-173 (in Chinese).
- [6] McEvily AJ, Iyengar R, Otwell WS. Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. Crit Rev Food Sci Nutr, 1992, 32(3): 253-273.
- [7] Wei X, Liu K, Zhang Y, et al. Genetic discovery for oil production and quality in sesame. Nat Commun, 2015, 6: 8609.
- [8] Wang L, Xia Q, Zhang Y, et al. Updated sesame genome assembly and fine mapping of plant height and seed coat color QTLs using a new high-density genetic map. BMC Genomics, 2016, 17: 31.
- [9] Wei X, Zhu X, Yu J, et al. Identification of sesame genomic variations from genome comparison of landrace and variety. Front Plant Sci, 2016, 7: 1169.
- [10] Wang LH, Dossou SSK, Wei X, et al. Transcriptome dynamics during black and white sesame (*Sesamum indicum* L.) seed development and identification of candidate genes associated with black pigmentation. Genes, 2020, 11(12): 1399.
- [11] Wang DD, Zhang LX, Huang XR, et al. Identification of nutritional components in black sesame determined by widely targeted metabolomics and traditional Chinese medicines. Molecules, 2018, 23(5): E1180.
- [12] 杨昭. 香蕉多酚氧化酶的基因克隆及原核表达[D]. 海口: 海南大学, 2014.
Yang Z. Gene cloning and prokaryotic expression of banana polyphenol oxidase[D]. Haikou: Hainan University, 2014 (in Chinese).
- [13] 李桂琴, 李会宣, 许冬倩, 等. 鸭梨多酚氧化酶基因 CDS 区的克隆及表达. 果树学报, 2008, 25(4): 577-580.
Li GQ, Li HX, Xu DQ, et al. Cloning and expression of polyphenol oxidase gene of CDS from Yali pear. J Fruit Sci, 2008, 25(4): 577-580 (in Chinese).
- [14] Chen GH, Chen WM, Huang YC, et al. Expression of recombinant mature human tyrosinase from *Escherichia coli* and exhibition of its activity without phosphorylation or glycosylation. J Agric Food Chem, 2012, 60(11): 2838-2843.
- [15] 邓东灵, 孔庆涛, 张媛媛, 等. 新生隐球菌漆酶的原核表达. 中国真菌学杂志, 2018, 13(4): 208-212.
Deng DL, Kong QT, Zhang YY, et al. Prokaryotic expression of *Cryptococcus neoformans* laccase. Chin J Mycol, 2018, 13(4): 208-212 (in Chinese).
- [16] 李旭全. 果蝇原多酚氧化酶原核表达及其活性检测研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2011.
Li XQ. Recombinant expression and enzyme activity analysis of the prophenoloxidases of

- Drosophila melanogaster*[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2011 (in Chinese).
- [17] 甘玉迪. 茶树 *CsPPO* 基因内源表达及外源原核表达分析[D]. 南京: 南京农业大学, 2018.
Gan YD. Expression analysis and *in vitro* prokaryotic expression of *Camellia sinensis CsPPO*[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [18] Espin JC, Morales M, Varon R, et al. A continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of apple polyphenol oxidase. *Anal Biochem*, 1995, 231(1): 237-246.
- [19] Kahn V, Pomerantz SH. Monophenolase activity of avocado polyphenol oxidase. *Phytochemistry*, 1980, 19(3): 379-385.
- [20] Saboury AA, Zolghadri S, Haghbeen K, et al. The inhibitory effect of benzenethiol on the cresolase and catecholase activities of mushroom tyrosinase. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2006, 21(6): 711-717.
- [21] Sanchez-Ferrer A, Laveda F, Garcia-Carmona F. Substrate-dependent activation of latent potato leaf polyphenol oxidase by anionic surfactants. *J Agric Food Chem*, 1993, 41(10): 1583-1586.
- [22] Pellosi MC, Suzukawa AA, Scalfi AC, et al. Effects of the melanin precursor 5,6-dihydroxy-indole-2-carboxylic acid (DHICA) on DNA damage and repair in the presence of reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys*, 2014, 557: 55-64.
- [23] Panzella L, Eidenberger T, Napolitano A, et al. Black sesame pigment: DPPH assay-guided purification, antioxidant/antinitrosating properties, and identification of a degradative structural marker. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(36): 8895-8901.
- [24] Davies MJ. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 305(3): 761-770.
- [25] Davies MJ, Truscott RJ. Photo-oxidation of proteins and its role in cataractogenesis. *J Photochem Photobiol B*, 2001, 63(1/2/3): 114-125.
- [26] 侯金铎, 白宝兰. 以基质络合法防止果蔬酶促褐变的研究. *食品科学*, 1991, 12(5): 6-11.
Hou JD, Bai BL. Research on preventing enzymatic browning of fruits and vegetables by matrix complexation. *Food Sci*, 1991, 12(5): 6-11 (in Chinese).
- [27] 宁正祥, 赵谋明. 食品生物化学. 广州: 华南理工大学出版社, 2000: 297-298.
Ning ZX, Zhao MM. *Food Biochemistry*. Guangzhou: South China University of Technology Press, 2000: 297-298 (in Chinese).
- [28] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学. 北京: 高等教育出版社, 2003.
Wang JY, Zhu SG, Xu CF. *Biochemistry*. Beijing: Higher Education Press, 2003 (in Chinese).
- [29] 魏送送. 混浊梨汁酶促褐变机理及控制技术研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2014.
Wei SS. Study on enzymatic browning mechanism and preventional technologies of pear cloudy juice[D]. Xi'an: Shaanxi University of Science & Technology, 2014 (in Chinese).
- [30] 邱龙新, 黄浩, 陈清西. 半胱氨酸对马铃薯多酚氧化酶的抑制作用. *食品科学*, 2006, 27(4): 37-40.
Qiu LX, Huang H, Chen QX. Inhibitory effect on potato polyphenol oxidase activity by L-cysteine. *Food Sci*, 2006, 27(4): 37-40 (in Chinese).
- [31] 周磊. 有机酸结合物理方法钝化多酚氧化酶机理及其应用[D]. 南昌: 南昌大学, 2018.
Zhou L. The inactivation mechanism of organic acid combined with physical methods on polyphenoloxidase and its application[D]. Nanchang: Nanchang University, 2018 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)