

烟草中多酚氧化酶的特征分析及应用展望

雷东锋^{1,2}, 冯怡², 梅建生², 宋威²

(1 陕西省烟草研究所, 西安 710068; 2 西安交通大学生命科学与技术学院)

摘要: 烟草中多酚氧化酶 (PPO) 介导的褐变会影响烟叶和烟丝的色泽和内在质量, 因此对其特性的研究, 以及活性的控制成为多年来的研究热点。笔者从 PPO 生物发生模型, 分子结构, 生物化学和光谱学特征及其与植物抗病和机械损伤的关系, 多酚氧化酶的抑制, 多酚氧化酶的应用等方面, 对近几年来烟草中 PPO 研究的最新成果进行了回顾和总结, 对一些有争议的问题进行了探讨, 并对未来 PPO 研究的方向和领域进行了展望。

关键词: 烟草; 多酚氧化酶; 特征分析; 应用展望

中图分类号 S572.01 文献标识码 A 文章编号: 1007-5119 (2003) 02-0001-04

烟叶中的多酚氧化酶 (polyphenol oxidase, PPO), 在烟叶的生长、初烤、复烤以及卷烟工业中烟丝的卷接和包装甚至贮藏过程中都具有很重要的作用, 因为它不仅会影响烟叶和烟丝的色泽, 更影响其内在质量。PPO 是一种铜离子结合酶, 在组织发育过程中形成, 并贮存于叶绿体中^[1], 当细胞膜的完整性被破坏时, 酚类物质与叶绿体中的 PPO 结合生成 σ -醌。这些高度活泼的醌与其它醌、氨基酸以及蛋白质聚合生成色素物质, 使得烟叶或烟丝的质量下降。对于烟草中 PPO 的抑制效应, 国内外已经做了大量研究, 国内的研究多集中在对烟草中 PPO 的生化特性^[2]、分子结构、基因结构等方面。笔者对烟草中 PPO 的研究成果进行了回顾和总结, 对研究中有争议的地方进行了探讨, 并对未来 PPO 的研究前景进行了展望。

1 植物中 PPO 的生物发生模型

人们在研究了葡萄藤中的多酚氧化酶后建立了其生物发生模型 (如图 1 所示)。模型中前体蛋白的 N 端和 C 端肽键断裂形成成熟蛋白。氨基酸序列的 N 端, 含有一个亲水性强的区域, 这一区域具有质体转运肽的特性, 其中包括一个约由 30 个氨

基酸残基组成的区域, 保守性不强; 其后是类囊体转运区, 这一区域大约由 14 个氨基酸残基组成, 具有较高的同源性, 保守性也较强。多酚氧化酶前体蛋白受核基因控制, 在细胞质中合成, 并定位在叶绿体或其它质体中, 其进入叶绿体类囊体腔的过程分以下两步进行: 首先 67 kD 的前体蛋白进入基质, 这是一个需要 ATP 水解提供能量和一定浓度 Cu^{2+} 参与的过程。在此期间, 前体蛋白由基质羧肽酶加工成 62 kD 的中间产物, 其次, 中间产物由基质转移到腔内, 同时中间产物被加工成成熟肽, 这一过程需要光。从发表的几种植物 PPO 基因的氨基酸序列可以看出, 虽然它们在 N 端和 C 端明显缺少同源性, 却存在 2 个含铜的高度保守区 CuA 和 CuB, 而且都具有很高的同源性。这主要是由于多酚氧化酶是一类铜结合酶, 铜是维持其活性的保证, 并且无论是同种或不同种植物的 PPO, Cu^{2+} 与酶的结合位点, 都是在 His 残基附近。

通过对葡萄、菜豆、番茄、苹果、马铃薯、美洲商陆、桃、枇杷、温伯树等植物中 PPO 保守区 CuA 的 38 个氨基酸的同源性进行比较, 发现 CuA 的共有序列的模式如图 2 所示。对 CuB 的 52 个氨基酸进行序列比较, 发现其共有序列的模式如图 3 所示。

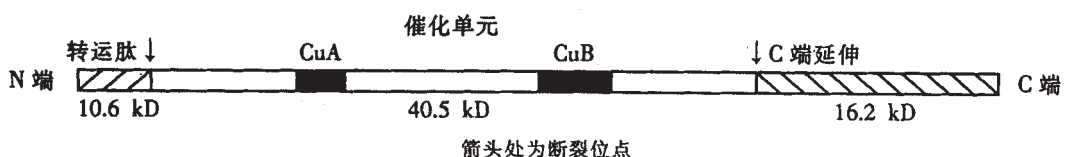


图 1 植物中 PPO 的生物发生模型

雷东锋, 博士后, 主要从事植物分子生物学和生物医学工程方面的研究。

收稿日期: 2003-01-07

```

HNSWLFPPFHRYYLYFYEKILGKLIINDPTFALPFWNW 1
F L W PFR AS DFS M YGAY 2
D F BNT L 3
A P 4
    
```

从 2 到 4 表示出现的频率由高到低

图 2 PPO 的 CuA 保守区共有序列模式

2 烟草中 PPO 的生化特征及光谱学特征

2.1 烟草中 PPO 的底物专一性

Wim Broothaerts 等研究了烟草栽培品种 Samsun 中的 PPO 对底物 4-愈创木酚的催化特征, 在 pH6.0、50 mmol/L 磷酸钠溶液中测得其 K_m 值为 4.3。随着底物浓度的增加, 酶活性增加严格遵循 Michaelis-Menten 方程, 达到最大反应速度一半时其底物浓度 K_m' 为 4.3。底物浓度由 0 增加到 40 mmol/L 时, PPO 活性随底物浓度的增加而增大, 未表现出底物抑制效应^[3]。烟草中 PPO 活性可被 SDS 所抑制^[4], 尤其在酸性条件下, 抑制效果更为明显。雷东锋等以 pH6.8、50 mmol/L KH_2PO_4 -NaOH 的缓冲液提取叶片, 在 20 000 g 条件下离心 20 min, pH6.8、8 °C、50 mmol/L KH_2PO_4 -NaOH 缓冲液条件下, 以邻苯二酚和焦菟酚为底物, 测得其 K_m 值为 4.7 和 5.0。

2.2 烟草中 PPO 的光谱学特征

有研究者使用丙酮酚、硫酸铵沉淀, 用 DEAE-SephadexA-50 柱, CM-Sephadex C-50 柱, Sephadex G-75 柱依次进行柱层析, 然后进行 MALDI-TOF-

MS 分析, 荧光分析, 电子顺磁共振 (EPR) 分析, 发现烟草中的 PPO 根据在 Sephadex A-50 柱中的洗脱顺序可分为 PPO I 和 PPO II 两种, 其中 PPO II 为主要成分, 其含量是 PPO I 的 10 倍。MALDI-TOF-MS 波谱测定 PPO I 分子量为 35 700 D, PPO I 和 PPO II 最适温度都为 40 °C^[5], 与雷东锋等所测定的 NC89 中 PPO 的最适温度为 37 °C 相接近。但据雷东锋等的研究, 在 40 °C 条件下, PPO 活性呈现下降的趋势, 这应该有两方面的原因, 一是 pH 原因, 另一个是烟草品种的原因。PPO I 的最适底物为邻苯二酚, 与雷东锋等的研究结果一致。最大发射波长为 339 nm, 与游离色氨酸的 355 nm 的最大吸收峰发生了 16 nm 的蓝移。酶活性中心具有反铁磁性的铜离子, 缺少电子顺磁共振信号说明其属于 3 型铜离子, 缺少 1 型和 2 型铜离子。PPO I 的最大激发波长为 283 nm。PPO I 以邻苯二酚为底物, K_m 为 6.8, 最适 pH 为 7, 而 PPO II 的最适 pH 则是 6。在中性条件下, PPO II 的活性中心有一对反铁磁性的铜离子, 由酚中的氧连接。当 pH 较低时, 酚中的氧结合力下降, 两个水分子替代了酚中的氧桥, 于是 PPO II 的吸收光谱随之发生变化。而当 pH 达到 8.5~9.0 时, PPO II 即可形成一个新的活化位点, 这时苯酚中的氧桥被破坏, 其中羟基与一个铜原子结合, 而另外一个铜原子依然与酚中的氧结合, 在 pH3.0 至 pH9.0 时, PPO II 以该种结构存在而且比较稳定, 但当 pH 达到 10 时, 这种结构就被破坏了。

3 烟草中多酚氧化酶与植物抗病的关系

3.1 PPO 与植物抗性的关系

多酚氧化酶能将酚类物质氧化成对病原物有毒的醌类物质, 因而该酶常被看作植物抗病性的生化指标。病原物侵入植物寄主后, PPO 活性升高, 但寄主植物的抗病性不同, 其 PPO 活性的变化也不同。在病原物与寄主的相互作用中, PPO 活性增加, 很可能是固有酚酶溶解性增加或从束缚状态释放出来的结果。

PPO 在植物体内以可溶性形式、膜结合形式或两种形

HNI VH KWTGLA	—	DKPSEDMGNFYTAGRDP	IFFC	HANVDRMWN	I	WKT	IGG	葡萄				
HAPVHLWTGD	—	NTQPNFEDMGNFYSAGRDF	IFFA	HHSNDRMWS	I	WKT	LGG	菜豆				
HTPVEIWTGDKP	—	RQKNGEDMGNFYSAGLDP	IFYCH	HANVDRMWN	NEW	KLFGG		番茄				
HAPVHTWTGD	—	NTQTNIEDMGIFYSAARDP	IFYSH	SNVDRWLWY	I	WKT	LGG	苹果 (1)				
HPTVHIWTGDSPPR	—	KNGENMGNFYSAGLDP	IFYCH	HANVDRMW	DEW	KLIGG		马铃薯				
HGPVHVWTGD	—	PNQPNLEDMGTFYSAARVP	IFYA	HHAIVDRMWA	I	WNALGN		美洲商陆				
HAPVHLWTGD	—	NTQPNFEDMGNFYSAGRDP	IFFA	HHSNDRMWS	I	WKT	LGG	苹果 (2)				
HGSVHLWTGD	—	NTQPNFEDMGNFYSAGRDP	VFYA	HHSNDRMWS	I	WRTLGG		J. pear				
HGPVHLWTGD	—	NTQPNLEDMGNFYSAARDP	IFFS	HHSNDRMWS	I	WKT	LGG	peach				
HGPVHLWTGD	—	NTQPNFEDMGNFYSAGRDP	VFVA	HHSNDRMWS	I	WKT	LGG	lafrance				
HGPVHLWTGD	—	NTQPNFEDMGNFYSAGRDP	VFYA	HHSNDRMWN	I	WKT	LGG	J. loquat				
HGPVHLWTGD	—	NTQPNFEDMGNFYSAGRDP	VFVA	HHSNDRMWS	I	WKT	LGG	C. quince				
H—VH—WTGD	—	Q—N—EDWG—FYSA—DP—F—	HH—	NVDRMW—	W—	—GG		共有序列模式				
E	L	D	P	N	T	V	F	I	W	L	N	
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

有背影者为共有序列, 标 * 者为一个氨基酸残基有例外

图 3 12 种植物 CuB 保守区相似性比较

式并存在于细胞中。就其活力而言,有组成型和诱导型 PPO。所谓组成型 PPO,是指它不是靠诱导形成,而是植物细胞内本身就存在的。而诱导型 PPO,则是经过诱导因素诱导后所生成的 PPO,这些诱导因素包括外界病原物感染、食草类昆虫进攻、机械损伤^[6]等。烟草感染马铃薯 Y 病毒脉坏死株系 (PVY^N) 后,敏感烟草内的 PPO 活性升高,而抗性烟草的 PPO 活性降低,但其活性值均高于敏感烟草的健康植株,敏感烟草从接种 PVY^N 后第 8 天起出现 2 条新的 PPO 同工酶谱带,而且随着病害程度的加重,其强度增加,抗性烟草则没有新的 PPO 同工酶谱带出现。未接种的情况下,抗性烟草体内的 PPO 活性明显高于敏感烟草,PPO 同工酶谱带数比敏感烟草多 1 条。据此结果可以认为,PPO 可以作为烟草抗脉坏死病育种的一个生化指标^[7]。PPO 活性的增强,是病原体诱导作用的结果,而烟草本身所具有的相对稳定和高活性的 PPO 才是烟草抗 PVY^N 所必需的。烟草中 PPO 甚至可被周围栽培植物修剪后所形成的挥发性茉莉酮酸酯所诱导而活性增加,从而大大降低蚜虫和毛虫对烟草的危害^[8]。

3.2 生物杀灭剂对烟草中酚类物质代谢的影响

PPO 是一种发病相关蛋白,也是一种蛋白酶抑制剂,对食草昆虫和病原物的进攻具有保护作用。尽管如此,烟草在整个生长过程中一直面临着各种疾病的挑战,在这种情况下,喷施各种杀菌物质便成为预防病害的手段之一。因此,无论喷施何种病毒抑制剂,都不应当对 PPO 的防御机能有所影响。有研究报道,过量施用咖本达因 (carbendazim) 会导致酚类物质的积累,从而影响烟草中酚类物质的正常代谢,进而降低烟草对病原物进攻的防御能力。烟草中酚类的代谢受多酚氧化酶调节,在生物和非生物条件胁迫时,PPO 增加并同时催化叶子中的酚类化合物形成有毒物质——醌,进而促进植物与病原体相互作用早期中活性氧的生成,活性氧通过增加水杨酸的含量,进而使植物获得系统性抗性,从而在植物早期的防御反应中起着重要的作用。但施用咖本达因却同时明显降低甚至抑制了烟草中 PPO 的活性^[9],从而降低了烟草对病原体感染的抗性。因此在烟草病虫害防治过程中,是否对 PPO 造成伤害也是应该慎重考虑的因素之一。

4 烟草中 PPO 的抑制

为了控制和抑制烟草 PPO 引起的褐变,人们已

采取了许多办法,大体可分为抑制剂抑制、反义 RNA 抑制^[10]和转基因抑制三种途径。采用的常规抑制剂有铜试剂、硫脲、EDTA、巯基乙醇、亚硫酸氢钠和柠檬酸等,在相同浓度下铜试剂的抑制效果最强,其次是 EDTA、巯基乙醇和硫脲^[11,12]。还有采用亚硫酸盐、环庚三烯酚酮来抑制 PPO 的^[13]。随着 PPO 研究的深入,利用反义 RNA 技术反向表达多酚氧化酶基因,修饰转基因植株中多酚氧化酶的表达,进而控制酶促褐变,已经成为多酚氧化酶研究的崭新领域。Coetzer 等^[10]利用 CaMV 35 S 启动子构建了西红柿 PPO 反义基因并将其转移到马铃薯中,西红柿 PPO 的 RNA 在反义方向和有义方向的表达出现了共抑制现象,从而大大降低了马铃薯中 PPO 的活性并抑制了褐变反应的发生。因此现在最有潜力防止 PPO 介导褐变的有效办法就是获得低表达 PPO 的转基因烟草。有的学者已经以 CaMV 35 S 作为启动子构建了 PPO 转基因片断,来转化生成 PPO 表达较低的转基因烟草。但同时必须注意,PPO 担负着重要的生理功能,如何在维持 PPO 较低水平表达的同时,又不影响其对烟草整个生理活动的保护,是需要注意的重要问题。

5 烟草中多酚氧化酶的应用及展望

用固定化多酚氧化酶制成生物传感器,利用其与底物的专一性制成高灵敏度的生物电极来进行微量物质的检测是目前研究较多的领域之一。有研究者研制成多酚氧化酶固定化酶柱,与氧电极检测器组合连用,则可检测水中 20 mg/L 含量的酚类物质,并可利用其从工业废水中除去酚类物质,达到治理三废的目的。也有研究者利用掺杂有铱的电极做成的生物传感器来定量检测邻苯二酚和其它酚类物质^[14],这种方法有望应用于临床和医学等领域。还有研究者采用类似方法,用蘑菇中的 PPO 制成生物传感器定量检测龙胆酸,该方法在 -0.150 V 下,其灵敏度可以达到 $(6.1 \pm 0.1) \times 10^4 \text{ NAM}^{-1}$,且在 $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 浓度范围内,具有很好的线性响应关系,最低检测极限可达到 $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ ^[15]。除此之外,利用 PPO 的底物专一性来去除有害的底物成为另一个崭新的应用领域。美国国家科学基金会提供了大量资金,组织力量,积极开展含酚废水研究,拟用固定化多酚氧化酶,从工业废水中除去酚类。目前,在法国固定化多酚氧化酶的应用形式有酶布、酶片和酶颗粒,而国内则多以尼龙为载体、戊二醛为

交联剂,采用共价交联的办法,对烟草多酚氧化酶进行分离纯化,用获得的结晶制备尼龙固定化多酚氧化酶^[6]。可以看到利用 PPO 制成的生物传感器和固定化酶在医药和环境保护上,将具有很好的应用前景,这都为进一步深入研究烟草中的 PPO 并迅速将其应用到全新领域开拓了新的思路。

参 考 文 献

- [1] C W G Van Gelder, Flurkey W H, Wichers H J. Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry*, 1997, 45: 1309~1323.
- [2] 雷东锋, 杨水云, 龚勇, 等. 烟叶中多酚氧化酶特性. *西北大学学报*, 2000, 30(4): 74~77.
- [3] Broothaerts W, McPherson J, Li Baochun, et al. Fast apple (*malus×domestica*) and tobacco (*Nicotiana tobacum*) leaf polyphenol oxidase activity assay for screening transgenic plants. *J Agric Food Chem*, 2001, 49: 5924~5928.
- [4] Jimenez M, García-Carmona F. The effect of sodium dodecyl sulphate on polyphenol oxidase. *Phytochemistry*, 1996, 42: 1503~1509.
- [5] Shi Chunhua, Dai Ya, Xie Bingle, et al. The purification and spectral properties of polyphenol oxidase I from *Nicotiana tobacum*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2002, 19: 381a~381h.
- [6] Thipyapong P, Steffens J C. Differential response of the polyphenol oxidase F promoter to injuries and wound signals. *Plant Physiology*, 1997, 115: 409~418.
- [7] 文才艺, 吴元华, 张艳红. 烟草感染马铃薯 Y 病毒脉坏死株系后 PPO 活性及其同工酶变化的研究. *华中农业大学学报*, 2000, 19(4):328~330.
- [8] Karban R, Baldwin I T, Baxter K J, et al. Communication between plants; Induced resistance in wild tobacco plants following clipping of neighbouring sagebrush. *Oecologia(Berlin)*, 2000, 125(1): 66~71.
- [9] Garcia P C, Rivero R M, López-Lefebvre L R, et al. Direct action of the biocide carbendazim on phenolic metabolism in tobacco plants. *J Agric Food Chem*, 2001, 49: 131~137.
- [10] Coetzer, Chris, Dennis Corsini, et al. Control of enzymatic browning in potato (*Solanum tuberosum* L.) by sense and antisense RNA from tomato polyphenol oxidase(PPO). *J Agric Food Chem*, 49(2): 652~657.
- [11] 雷东锋, 马长德, 莫晓燕, 等. 烟叶中 PPO 的抑制效应. *西北农林科技大学学报*, 2002, 30(增刊): 130~133.
- [12] 雷东锋, 马长德, 莫晓燕, 等. 几种抑制剂对烟叶 PPO 活性的影响. *农业生物技术学报*, 2002, 10(3): 67~68.
- [13] Sojo M M, Nuñez-Delicado E, Garfía-Carmona F, et al. Partial purification of a banana polyphenol oxidase using Triton X-114 and PEG 8000 for removal of polyphenols. *J Agric Food Chem*, 1998, 46: 4924~4930.
- [14] Rubianes M D, Rivas G A. Amperometric biosensor forphenols and catechols based on iridium-polyphenol oxidase-modified carbon paste. *Electroanalysis*, 2000, 12(14): 1159~1162.
- [15] Pedano M L, Rivas G A. Amperometric biosensor for the quantification of gentisic acid using polyphenol oxidase modified carbon paste electrode. *Talanta*, 2000, 53(3): 489~495.
- [16] 林健巧, 王炜军, 穆虹, 等. 烟草多酚氧化酶的分离与固定化技术研究. *中国生物化学与分子生物学报*, 1999, 15(4): 663~666.

Characterization and prospect of application of polyphenol oxidase in tobacco plants

LEI Dong-feng^{1,2}, FENG Yi², MEI Jian-sheng², SONG Wei²

(¹ Tobacco Institute of Shaanxi Province, Xi'an 710068; ² School of Life Science and Technology of Xi'an Jiaotong University)

Abstract: Browning reaction mediated by polyphenol oxidase (PPO) in tobacco can form unpleasant color, which is harmful to tobacco leaf quality. So many researches on the properties and activity control of PPO have been carried out. The recent research achievements about tobacco PPO with respect to its biological development model, molecular structure, biochemical and spectral properties, the relations between PPO and plant resistance to pathogen and wounding, and activity control of PPO are reviewed in this paper. In addition, the future work and application of tobacco PPO are discussed and forecasted.

Key words: Tobacco ; Polyphenol oxidase; Characterization; Prospect of application

(责任编辑 徐秀红)