苯甲酸衍生物对马铃薯多酚氧化酶的抑制作用

黄 浩[1],林 敏[2],邱龙新[2],石 艳[1],陈清西[1]*
(1. 厦门大学生命科学学院 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室,福建 厦门 361005;
2. 龙岩学院生物科学与工程系,福建 龙岩 364000)

摘要: 研究马铃薯的 PPO 理化性质,为研究其抑制剂的作用条件奠定基础. 该酶作用的最适条件是 30 ℃,pH 6.0;酶在低于 50 ℃和在 pH 5.15～8.75 内稳定;在 pH 6.8,30 ℃下,酶催化 *L*-DOPA 氧化反应的 K_m 和 V_m 分别为 7.24 mmol/L 和 617.0 μmol/(L·min). 3-甲氧基-2-羟基苯甲酸、4-甲氧基-2-羟基苯甲酸、5-甲氧基-2-羟基苯甲酸、4-甲氧基-3-羟基苯甲酸和 3-甲氧基-4-羟基苯甲酸等对马铃薯 PPO 均有明显的抑制作用,其半抑制率(IC_{50})分别为 1.78、0.28、0.53、0.14 和 2.49 mmol/L. 抑制效应均为可逆竞争性,抑制常数分别为 1.56、0.24、0.46、0.12 和 2.37 mmol/L.

关键词: 马铃薯;多酚氧化酶;苯甲酸衍生物;抑制类型
中图分类号: Q 356.1 **文献标识码**: A **文章编号**: 0438-0479(2006)04-0563-04

多酚氧化酶(EC. 1.14.18.1,简称 PPO)在动植物体酶促褐变、体内色素合成的过程中起了关键的作用,它更是果蔬酶促褐变过程中起重要作用的一种酶[1,2]. 它能将酪氨酸羟化成邻位二羟基苯丙氨酸(*L*-多巴),进一步将多巴氧化成多巴醌,经过一系列的反应而生成引起褐化的色素物质. 褐变问题一直是很多果蔬收获后保藏、加工等过程导致质量下降,经济价值降低的一个非常重要的问题,因此研究防止褐变的多酚氧化酶抑制剂是解决这一问题的一种重要途径. 我们分离提取马铃薯 PPO,研究其部分理化性质及几种苯甲酸酚类衍生物对该酶的影响及抑制机理,为寻找有效的防止褐变化学物质奠定基础.

1 材料与方法

1.1 材 料

马铃薯(无花种)由福建农林大学薯类研究室提供. *L*-多巴(*L*-DOPA)为 Aldrich 公司产品;3-甲氧基-2-羟基苯甲酸,4-甲氧基-2-羟基苯甲酸,5-甲氧基-2-羟基苯甲酸,4-甲氧基-3-羟基苯甲酸,3-甲氧基-4-羟基苯甲酸为 Sigma 公司产品;其它试剂为国产分析纯,使用的蒸馏水为去离子重蒸水.

1.2 方 法

(1) 马铃薯 PPO 的分离纯化

马铃薯洗净、去皮、切块后,加入预冷丙酮用高速组织捣碎机匀浆,然后用布氏漏斗抽滤,滤饼再用冷冻丙酮多次抽提至无色,继续抽干至无丙酮味,即制得马铃薯丙酮干粉,置于冰箱中保存. 使用时将马铃薯丙酮粉以 1◇8(质量浓度)的比例溶于 0.2 mol/L 磷酸缓冲溶液(pH 6.8),搅拌 10 min,在 4 ℃下 15 000 r/min 离心 15 min,收集上清液. 在上清液追加硫酸铵粉末至 40 %饱和度盐析,于 4 ℃下放置 10 h,17 000 r/min 离心收集沉淀. 沉淀用 0.2 mol/L 磷酸缓冲溶液(pH 6.8)溶解,透析后经 Sephadex G-100 柱层析(2.5 cm ×60 cm)进一步纯化,采用 0.2 mol/L 磷酸缓冲溶液(pH 6.8)洗脱,流速为 18 mL/h,分管收集,每管 3 mL,收集酶活力峰.

(2) PPO 活力分析

a) PPO 活力测定:参考文献[3]方法,在磷酸缓冲溶液(pH 6.8)中,以 0.5 mmol/L *L*-DOPA 为底物,30 ℃下测定波长为 475 nm 的光密度值(OD_{475})随时间的增长直线,从斜率计算酶的活力,产物的消光系数按 3 700 L/(mol·cm)计算[4]. 酶活力单位(U)定义为每分钟催化 *L*-DOPA 氧化产生 1 μmol 的产物的酶量. 蛋白质浓度测定采用 Folin 酚方法.

b) 效应物对酶活力的影响:参考文献[4],将效应物溶于二甲亚砜(DMSO)溶液中,取 0.1 mL 含不同浓度的抑制剂于测活体系中,检测酶的剩余活力,对照组加入相同量的 DMSO 以排除其影响. 抑制作用类型通过 Lineweaver-Burk 双倒数作图,比较酶催化反应的动力学参数,包括表观米氏常数(K_m)和最大反应速度(V_m)的变化来判断.

收稿日期: 2005-07-18
基金项目: 国家自然科学基金(30570408),福建省科技攻关课题(2004N002)资助
作者简介: 黄浩(1980-),男,硕士研究生.
*通讯作者: chenqx@jingxian.xmu.edu.cn

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2 实验结果

2.1 马铃薯 PPO 的初步纯化

马铃薯 PPO 粗酶液经过 Sephadex G-100 凝胶过滤的纯化图谱见图 1. 酶活力峰先被洗出,与杂蛋白峰可以很好分开. 得到比活力为 747 U/mg,纯化倍数为 10.1 的马铃薯 PPO.

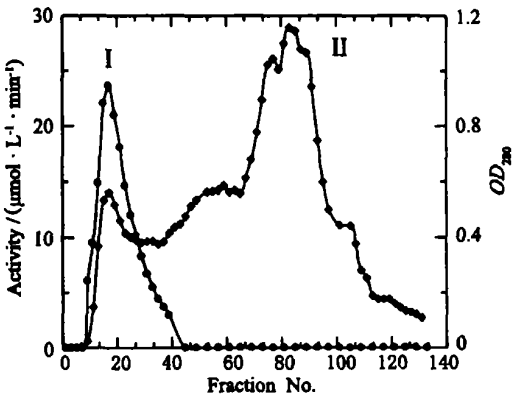

图 1 马铃薯 PPO 经 Sephadex G-100 柱层析图谱
I,II 分别代表酶活力和蛋白浓度

Fig. 1 Purification chromatography of potato PPO on Shephadex G-100

2.2 酶催化 *L*-DOPA 氧化反应的动力学参数

在 pH 6.8,37 ℃的测活体系下,改变底物浓度,测得酶促反应速度,发现两者呈典型双曲线的关系,以 Lineweaver-Burk 双倒数作图(图略),求得 K_m 为 7.24 mmol/L、V_m 为 617.0 μmol/(L · min).

2.3 温度对酶的影响和酶的温度稳定性

研究温度对酶催化 *L*-DOPA 氧化活力的影响,结果(图 2-I)表明酶的最适温度在 25～30 ℃区间. 酶的热稳定性研究结果见图 2-II,表明酶在 50 ℃下热处理 30 min 后,活力基本不变. 当热处理的温度在 50 ℃以上,随着处理温度的升高,酶活力呈快速下降直至完全丧失. 这说明酶在 50 ℃以上较不稳定.

2.4 pH 对酶的影响和酶的 pH 稳定性

在 30 ℃的测活体系中,研究 pH 值对酶催化 *L*-DOPA 氧化反应的影响. 结果(图 3-I)表明,酶促反应最适 pH 范围较宽,在 pH 5.15～8.09 区域酶活力维持在较高的平台,最适 pH 为 6.0,pH 低于 5.15 和高于 8.09 酶活力较低. 研究酶的 pH 稳定性,将酶液于不同 pH 缓冲液中 4 ℃下处理 30 min,然后取出 100 μL 处理的酶液在 30 ℃pH 6.8 下检测酶的剩余活力. 结果(图 3-II)表明马铃薯 PPO 在 pH 5.15～8.75 区域范围较为稳定.

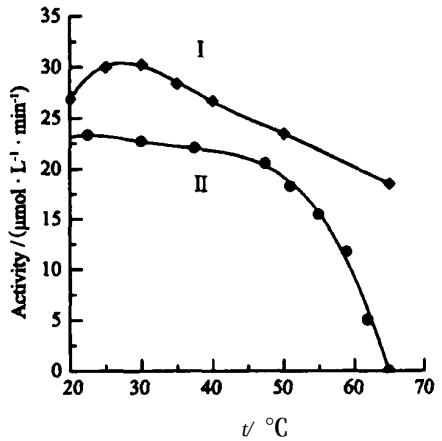

图 2 温度的效应(I)和酶的热稳定性(II)

Fig. 2 Effect of temperature on the enzyme activity (I) and its stability (I)

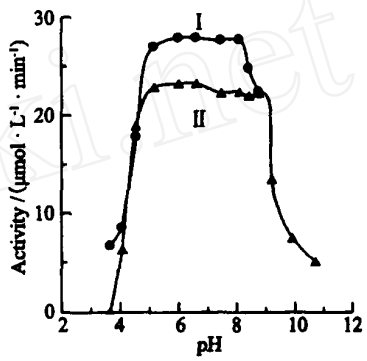

图 3 pH 的效应(I)和酶的酸碱稳定性(II)

Fig. 3 Effect of pH on the enzyme activity and its pH stability

2.5 苯甲酸衍生物对马铃薯 PPO 活力的影响

选取了 3-甲氧基-2-羟基苯甲酸(a),4-甲氧基-2-羟基苯甲酸(b),5-甲氧基-2-羟基苯甲酸(c),4-甲氧基-3-羟基苯甲酸(d),和 3-甲氧基-4-羟基苯甲酸(e)等 5 种效应物,研究它们对马铃薯 PPO 催化 *L*-DOPA 氧化的影响. 图 4 为试验的苯甲酸衍生物对马铃薯 PPO 活力的抑制曲线,随着效应物的浓度增大,酶活力呈指数下降. 测得效应物 a～e 的 IC_{50}(导致酶活力下降一半所需的抑制剂浓度)分别为:1.78、0.28、0.53、0.14 和 2.49 mmol/L. 在试验的 5 种苯甲酸衍生物中,4-甲氧基-3-羟基苯甲酸(d)的抑制作用最强,而 3-甲氧基-4-羟基苯甲酸(e)最弱.

2.6 苯甲酸衍生物对马铃薯 PPO 抑制机理

研究苯甲酸衍生物对马铃薯 PPO 的抑制作用机理,在含 0.5 mmol/L 底物及不同浓度的效应物的测活体系中,分析加入的酶量与其活力的关系,来判断效应物的抑制效应. 结果(图略)显示酶活力对酶量作图

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

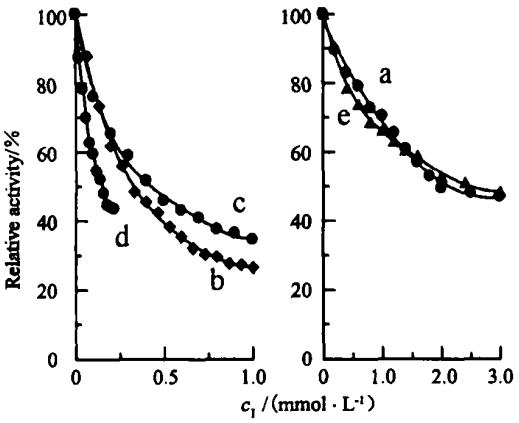

图 4　苯甲酸衍生物对马铃薯 PPO 活力的影响
a～e 分别为 3-甲氧基-2-羟基苯甲酸, 4-甲氧基-2-羟基苯甲酸, 5-甲氧基-2-羟基苯甲酸, 4-甲氧基-3-羟基苯甲酸和 3-甲氧基-4-羟基苯甲酸

Fig. 4　Effects of some benzoic acid derivatives on potato PPO

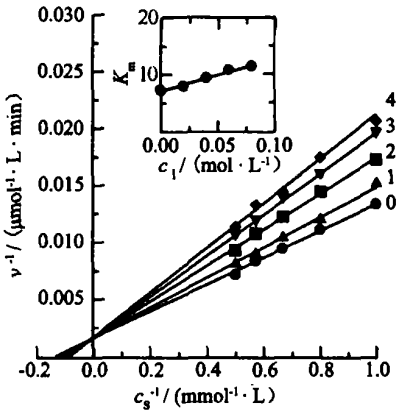

图 5　4-甲氧基-3-羟基苯甲酸对该酶的抑制作用
直线 0～4 浓度分别为:0、0.02、0.04、0.06 和 0.08 mmol/L

Fig. 5　Inhibitory type and inhibition constant of 3-hydroxy-4-methoxybenzoic acid on potato PPO

为一组通过原点的直线,随着效应物浓度的增大直线斜率降低,其抑制作用为可逆反应过程. 因为不可逆的抑制作用将得到一组平行线.

2.7　苯甲酸衍生物对马铃薯 PPO 抑制类型的判断和抑制常数的测定

分别测定试验的 5 种苯甲酸衍生物对马铃薯 PPO 的抑制作用类型,在测活体系中,固定酶的浓度,改变底物 *L*-DOPA 浓度,测定不同浓度效应物下的酶促反应初速度. 以 Lineweaver-Burk 双倒数作图法判断抑制作用类型. 图 5 代表 4-甲氧基-3-羟基苯甲酸(d)对酶的抑制作用类型的 Lineweaver- Burk 双倒数图,得到一组纵轴截距不变的直线,说明化合物(d)对酶的抑制作用是竞争性类型,它能使米氏常数(K_m)增大,但对最大反应速度(V_m)没有影响,它们与酶的结合受到底物的影响,并与底物竞争酶的活性部位. 以表观的 K_m 对效应物浓度作图,为直线(图 5 内插图),求得抑制常数 K_I 为 0.12 mmol/L. 其它 4 种苯甲酸衍生物(a,b,c,e)对该酶的抑制作用也表现为竞争性类型,测定它们抑制常数分别为 1.56、0.24、0.46 和 2.37 mmol/L.

3　讨　论

部分纯化马铃薯 PPO 的最适温度,温度稳定性以及 pH 稳定性与胡源[5]等报道的基本一致. 已报道的马铃薯 PPO 最适 pH 因品种来源不同而有所差异[6]. 所报道的马铃薯 PPO 的 K_m 也因品种不同及测活的温度和 pH 等条件不同而有所差异. 部分纯化出的马铃薯 PPO 与已报道的其它品种该酶具有相似性.

实验所用的 5 种苯甲酸衍生物的化学结构基本相似,差异在于苯环上连接有一个羟基和一个甲氧基的位置不同. 实验结果表明 5 种苯甲酸衍生物均是马铃薯 PPO 的可逆竞争性抑制剂,它们可以通过与底物竞争酶的结合部位而抑制酶的有效催化,它们不会与酶产生 ESI 三元络合物. 很有可能是因为它们与底物的结构相似,而且它们均在苯环上连接有一个游离的羟基和一个能提供游离氢原子的羧基,所以能够有效地与活性中心结合,从而能够有效与底物竞争活性中心. 高兴祥等[7]报道 5-甲氧基-2-羟基苯甲酸(c)对甜菜夜蛾多酚氧化酶也是可逆的竞争型抑制剂,并且,5-甲氧基-2-羟基苯甲酸(c)的抑制能力大于 3-甲氧基-4-羟基苯甲酸(e).

本文报道 5 种苯甲酸衍生物对马铃薯 PPO 抑制效果强度依次为 4-甲氧基-3-羟基苯甲酸(d) > 4-甲氧基-2-羟基苯甲酸(b) > 5-甲氧基-2-羟基苯甲酸(c) > 3-甲氧基-2-羟基苯甲酸(a) > 3-甲氧基-4-羟基苯甲酸(e). 效应物(d)的抑制作用最强,而效应物(e)最弱,它们强度相差近 20 倍. 这表明甲氧基与羧基呈对位排列(效应物 d 和 b)同甲氧基与羧基呈间位排列(效应物 c、a 和 e)相比更有利于形成能与底物竞争酶活性部位的结构. 这可能是因为与羧基呈对位排列的甲氧基能作为电子供体促使羧基形成有利于与酶活性部位结合的电子云排布. 对蘑菇酪氨酸酶的研究也表明苯甲酸因为对位连接有甲氧基将导致 IC_{50} 显著降低,从而提高它对酶抑制能力[8].

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

参考文献:

[1] Sanchez-Ferrer A, Rodriguez-Lopez J N, Garcia-Canovas F, et al. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism [J]. BBA-protein and Molecular Enzymology, 1995, 1247: 1 - 11.

[2] 韩涛, 李丽萍. 果蔬的多酚氧化酶的抑制及褐变的防治因素[J]. 北京农学院学报, 1999, 14(4): 88 - 93.

[3] 黄璜, 刘晓丹, 陈清西. 苯甲醛族化合物抑制蘑菇酪氨酸酶活力的研究[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2003, 42(1): 98 - 101.

[4] Chen Q X, Song K K, Wang Q, et al. Inhibitory effects of mushroom tyrosinase by some alkylbenzaldehydes[J]. J. Enzy. Inhib. Med. Chem., 2003, 18(6): 491 - 496.

[5] 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): 55 - 57.

[6] 刘光东, 吴少雄. 马铃薯多酚氧化酶反应动力学及抑制机理的研究[J]. 郧阳师范高等专科学校学报, 2001, 21(6): 39 - 42.

[7] 高兴祥, 罗万春, 于天丛, 等. 几种苯甲酸类化合物对甜菜夜蛾多酚氧化酶活性的影响[J]. 农药学学报, 2001, 6(1): 26 - 30.

[8] Chen Q X, Song K K, Qiu L, et al. Inhibitory effects on mushroom tyrosinase by *p*-alkoxybenzoic acids[J]. Food Chem., 2005, 91: 269 - 274.

The Inhibitory Effect on Potato PPO by Benzoic Acid Derivatives

HUANG Hao[1], LIN Ming[2], QIU Long-xin[2], SHI Yan[1], CHEN Qing-xi[1]*

(1. Key Laboratory of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China;
2. Department of Bioscience and Engineering, Longyan University, Longyan 364000, China)

Abstract: Polyphenol oxidase (PPO, EC. 1. 14. 18. 1) is an enzyme that is very important in the browning of fruit and vegetable. Browning of potato in the process of storage and process usually is caused by the effect of PPO itself. In this paper, we partly purified the PPO from potato and studied some physical and chemical characters of this enzyme. Optimum temperature and pH were determined to be 30 ℃ and 6.0, respectively. The Michaelis-Menten constant (K_m) and the maximal velocity (V_m) were determined to be 7.24 mmol/L and 617.0 μmol/(L · min) at 30 ℃ and pH = 6.8. The enzyme activity was stable at the pH ranging from 5.15～8.75 and at 50 ℃. The inhibitory effects of 2-hydroxy-3-methoxybenzoic acid, 4-methoxysalicylic acid, 5-methoxysalicylic acid, 3-hydroxy-4-methoxybenzoic acid, and 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid on potato PPO have been studied. The inhibitor's concentration leading to 50 % activity lost (IC_{50}) of them were determined to be 1.78, 0.28, 0.53, 0.14 and 2.49 mmol/L, respectively. The inhibition of these benzoic acid derivatives on the enzyme belongs to reversible and competitive type on the enzyme. The inhibition constant (K_I) was determined to be 1.56, 0.24, 0.46, 0.12 and 2.37 mmol/L, respectively.

Key words: potato; polyphenol oxidase; benzoic acid derivatives; inhibition

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net