

文章编号: 1000-5013(2012)01-0051-04

# 富士苹果中多酚氧化酶活性的 中心必需基团与抑制动力学

彭益强, 邓峰, 刘宇, 刘鹏

(华侨大学 工业生物技术福建省高等学校重点实验室, 福建 厦门 361021)

**摘要:** 以源于苹果的多酚氧化酶(PPO)为对象,选取溴乙酸、乙酰丙酮、N-溴代琥珀酰亚胺、1,4-二硫代苏糖醇和对氯汞苯甲酸等具有相对专一性的氨基酸基团修饰剂,研究 PPO 的酶活性中心必需基团,并确定乙醇对 PPO 的抑制动力学特性. 结果表明:富士苹果中的 PPO 蛋白结构中酶活性中心必需基团有组氨酸的咪唑基、精氨酸的胍基与色氨酸残基. 抑制动力学实验表明:乙醇通过与 PPO 酶活中心基团的结合抑制 PPO 酶活性,其对 PPO 的半抑制浓度( $IC_{50}$ )为  $0.14 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,抑制类型为可逆的竞争性抑制.

**关键词:** 多酚氧化酶; 酶活性中心; 必需基团; 可逆抑制

**中图分类号:** S 661.6; Q 946.5

**文献标志码:** A

多酚氧化酶(Polyphenol Oxidase, PPO)是一类从细菌、植物到高等动物都广泛存在的一类含铜蛋白. 它能催化单酚、二元酚和多元酚到联苯酚的羟基化及羟基酚到醌的脱氢反应,而醌在植物体内能发生自身聚合或与细胞内的氨基酸和蛋白质发生反应,产生黑色或褐色的聚合物. 这种褐色聚合物是果蔬等在加工过程中产生酶促褐变的主要原因<sup>[1-3]</sup>,PPO 与底物接触发生作用,从而使果蔬中的蛋白质的结构、营养特征发生改变而降低营养价值<sup>[4]</sup>. 因此,果蔬加工过程中的保鲜始终是食品加工行业重要的研究内容. 在果蔬加工过程中,底物与氧影响无法避免,因此抑制 PPO 的活性就成为加工过程中控制酶促褐变的极其重要方法<sup>[5]</sup>. PPO 的氧化反应特性与其酶活性中心结构及抑制特性有密切关系. PPO 酶学特性与抑制动力学的研究已有相关报道<sup>[1,6-8]</sup>,但有关酶活性中心结构与抑制特性的研究尚未见报道. 本文探讨苹果中多酚氧化酶(PPO)的酶活性中心必需基团与抑制作用.

## 1 实验方法

### 1.1 材料与试剂

完整无损伤富士苹果一个. 溴乙酸(BrAc),乙酰丙酮(Hacac),N-溴代琥珀酰亚胺(NBS),1,4-二硫代苏糖醇(DTT),对氯汞苯甲酸(pCMB),乙醇,柠檬酸,三氯乙酸,丙酮,硫酸铵,邻苯二酚;磷酸盐缓冲液(由  $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{KH}_2\text{PO}_4$  配制),磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(由  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  柠檬酸配制),NaAc-HAc 缓冲液(由  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{HCOONa}$ ,  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{HCOOH}$  配制).

### 1.2 苹果 PPO 酶液制备与纯化

将洗净的富士苹果于  $4^\circ\text{C}$  下保温,去皮后称取  $80 \text{ g}$  的果肉,加入  $200 \text{ mL}$  预冷丙酮,用高速组织捣碎机匀浆  $2 \text{ min}$  并用布氏漏斗抽滤;滤饼用  $80 \text{ mL}$  冷冻丙酮再次提取抽滤,称得  $3.45 \text{ g}$  的白色粉末. 将白色粉末冷冻真空干燥  $24 \text{ h}$ ,可得 PPO 丙酮粉. 称取  $0.5 \text{ g}$  的 PPO 丙酮粉置于  $500 \text{ mL}$  烧杯中,加入  $4^\circ\text{C}$ ,  $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{pH}=6.8$  的预冷磷酸盐缓冲溶液  $250 \text{ mL}$  搅拌  $20 \text{ min}$ ,于  $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  下离心

收稿日期: 2011-06-22

通信作者: 彭益强(1973-),男,副教授,主要从事酶的工程应用与酶学的研究. E-mail:pyqiang@hqu.edu.cn.

基金项目: 中央高校基本科研业务费专业资金项目(10HZR12)

10 min,上清液过滤即为苹果 PPO 粗酶液.量取 200 mL 的 PPO 粗酶液,加入 45.2 g 硫酸铵粉末至 40% 饱和,于 4 ℃ 下放置 12 h,15 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min;收集沉淀,用 4 ℃,pH=6.8 的 0.05 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸盐缓冲液充分溶解并透析多次,于 8 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min,可得 PPO 纯化液,使其在 4 ℃ 下保存待用.

### 1.3 PPO 酶活性中心必需基团的测定

在 2 mL 修饰体系中,取一定量的酶与不同浓度化学修饰剂于 36 ℃ 下水浴反应 5 min;取 0.5 mL 修饰后的酶液加入 2 mL 已预热的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(pH=6.4)及 0.5 mL,0.2 mol·L<sup>-1</sup> 邻苯二酚的测酶活体系中;反应 2 min 后,加入 1 mL,0.5 mol·L<sup>-1</sup> 的三氯乙酸终止反应,测定酶活.

### 1.4 PPO 酶活力测定

在 3 mL 的反应液(含 0.2 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸盐缓冲液,0.1 mol·L<sup>-1</sup> 的邻苯二酚及初酶液 0.2 mL)中,于 30 ℃,420 nm 处连续跟踪酶反应过程中的吸光值变化,通过酶活计算公式计算即可得到多酚氧化酶的酶活.酶活力单位(kat)定义:在最适条件下,1 s 能使 1 mol 底物转化的酶量.

### 1.5 PPO 抑制动力学

取不同浓度的乙醇加入 0.05 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸缓冲液(pH=6.4)中,在 36 ℃ 下与一定酶液量反应,再转入正常的测活体系反应 2 min,加入三氯乙酸终止反应,测定酶活,作相对酶活与乙醇关系图,判断乙醇是否有抑制作用.固定底物邻苯二酚浓度,在不同浓度乙醇抑制剂下,改变酶的加入量,测定不同酶量与酶活力的关系,判断其为可逆抑制还是不可逆抑制.在正常的测活体系中,固定酶的浓度,改变底物的浓度,测定不同浓度乙醇对酶活力的影响,做 Lineweaver-Burk 双倒数图,判断其抑制类型<sup>[9]</sup>.

## 2 结果与讨论

### 2.1 苹果 PPO 提取与纯化

采用丙酮粉法提取苹果 PPO,获得粗酶液,由 40% 硫酸铵饱和分离后测得单位体积蛋白量与 PPO 酶活,获得纯化倍数为 1.7 倍的较纯的 PPO 酶液.

### 2.2 苹果 PPO 酶活性必需基团的化学修饰

选取溴乙酸(BrAc),乙酰丙酮(Hacac),N-溴代琥珀酰亚胺(NBS),1,4-二硫代苏糖醇(DTT),对氯汞苯甲酸(pCMB)等对 PPO 进行分子修饰<sup>[1,7]</sup>;然后,根据酶活力的变化确定酶活性必需基团<sup>[10]</sup>.BrAc 在偏酸性条件下主要作用于组氨酸(His)的咪唑基;Hacac 能特异地与精氨酸(Arg)上的胍基反应;N-溴代琥珀西(NBS)在酸性条件下能较专一地修饰色氨酸(Trp)残基;DTT 是蛋白质分子中二硫键专一性修饰剂之一;pCMB 常用于蛋白质分子中巯基修饰,在酸性条件下可以专一地修饰巯基.

在 36 ℃ 下,BrAc 和 pCMB 在 pH=5.8 的 NaAc-HAc 缓冲液,以及 Hacac,NBS 和 DTT 分别在 pH=9.0 的 Tris-HCl 缓冲液,pH=5.4 的 NaAc-HAc 缓冲液和 pH=8.0 的 Tris-HCL 缓冲液中与酶作用.在正常体系中测定酶的剩余活力,其酶活变化( $\Delta z$ )与抑制剂浓度(C)关系曲线如图 1 所示.

从图 1(a),(b)中可见:酶被 BrAc,Hacac 修饰之后,其活性下降至剩余酶活力的 20%~30%.说明,His 的咪唑基和 Arg 上的胍基对 PPO 酶活力有影响,咪唑基与胍基是酶活性必需基团,但不位于酶活性中心催化部位.根据氨基酸特性分类可知,组氨酸与精氨酸均属于带正电荷的极性氨基酸,而 PPO 作用底物邻苯二酚的羟基解离后带负电荷.因此,推测组氨酸与精氨酸应位于酶活性中心的底物结合部位,修饰剂通过影响其与底物的结合来影响酶活力大小.

从图 1(c)可见:酶被 NBS 修饰后,其酶活力迅速下降,当 NBS 浓度达到 0.14 mmol·L<sup>-1</sup> 时酶几乎全部失活,说明 Trp 残基对酶活性的影响程度更大.因此,Trp 残基是反应所必需的基团,且位于酶活性中心催化部位,对酶催化过程有直接作用.

从图 1(d)可见:随着 DDT 的浓度增加,酶活性呈线下降的趋势,说明由巯基形成的二硫键是 PPO 催化反应所必需的一种构象.从图 1(e)可见:不论修饰剂的浓度如何,PPO 酶活基本不受影响,这说明游离的巯基不是 PPO 酶活性中心所必需的基团.

综合以上结果可知:在 PPO 酶蛋白中,由巯基形成的二硫键在酶活性中心结构起到稳定作用,但巯基本身不是以游离态存在,也未参与 PPO 酶氧化反应过程,故不是 PPO 的酶活性中心.

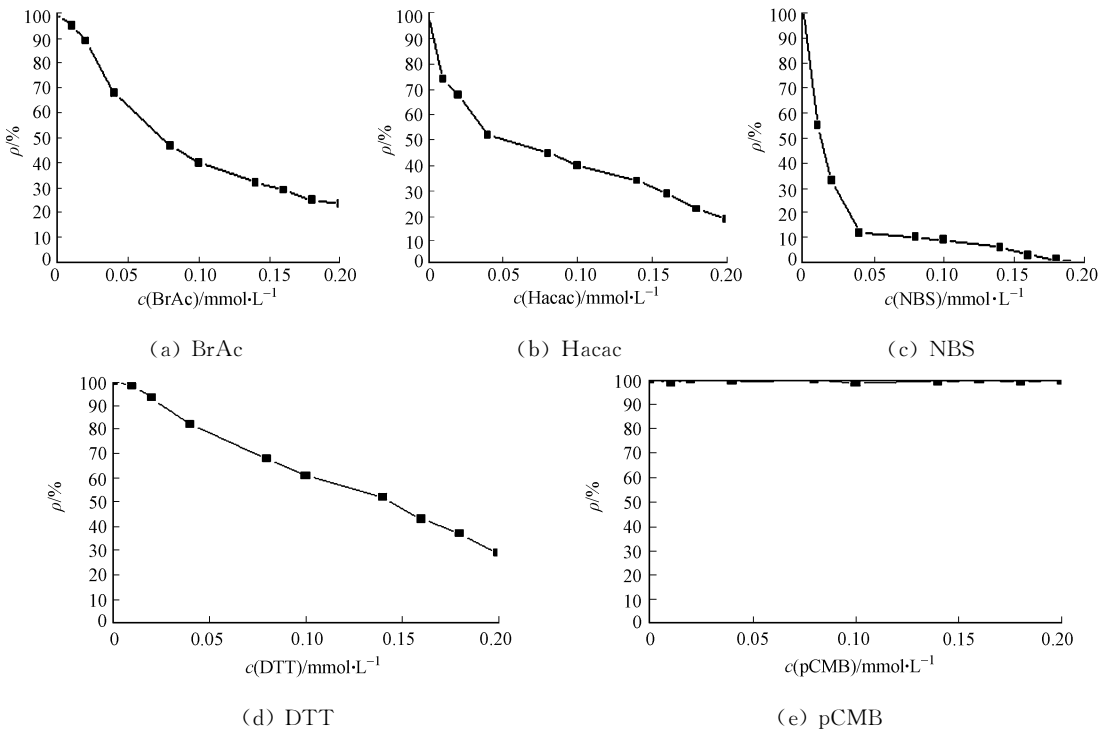


图 1 不同修饰剂对 PPO 酶的化学抑制作用

Fig. 1 Inhibition of different chemical modifying agents to PPO

2.3 乙醇对苹果 PPO 抑制机理研究

取不同浓度的乙醇加入  $0.05\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{pH}=6.4$  的磷酸缓冲液中, 在  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  下与酶液反应, 转入正常的测活体系反应  $2\text{ min}$  后, 终止反应测定酶活. 酶活变化与抑制剂浓度关系曲线如图 2 所示. 从图 2 可知: 随着乙醇浓度的增大, 酶活力逐渐下降, 乙醇对酶活产生抑制作用, 半抑制浓度 (酶活下降一半时的抑制剂浓度)  $\text{IC}_{50}$  为  $0.14\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ .

在测酶活体系中, 固定底物邻苯二酚的浓度为  $10\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 在各个不同浓度乙醇条件下, 改变酶的加入量, 测定不同浓度乙醇对苹果 PPO 酶反应速度的影响, 如图 3 所示. 从图 3 可知: 随着抑制剂浓度的增大, 直线的斜率降低. 由动力学规律推知, 乙醇对 PPO 抑制类型为可逆抑制作用. 导致酶活力的下降的原因是抑制剂浓度的增加, 而不是通过减少有效酶量.

在正常的测活体系中, 固定酶的浓度, 改变底物的浓度, 测定不同浓度乙醇对酶反应速度影响, 并做双倒数曲线, 得共交于纵轴一点的一系列直线, 如图 4 所示. 根据酶抑制动力学规律, 可推知乙醇对苹果 PPO 的抑制类型为可逆竞争性抑制. 由此说明, 乙醇对 PPO 的抑制是通过与底物竞争酶活性中心基团的方式进行. 这是因为乙醇分子中的羟基与 PPO 作用底物邻苯二酚分子中的羟基有类似的化学特性, 从而在与酶的结合过程中, 易与底物竞争酶活性中心产生竞争性抑制.

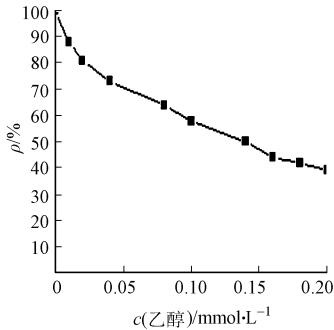


图 2 酶活变化与乙醇关系  
Fig. 2 Relationship between PPO activity and ethanol

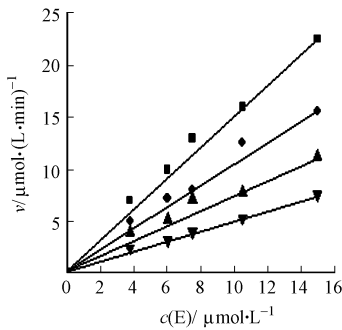


图 3 反应速度与酶量关系  
Fig. 3 Relationship between reaction velocity and enzyme amount

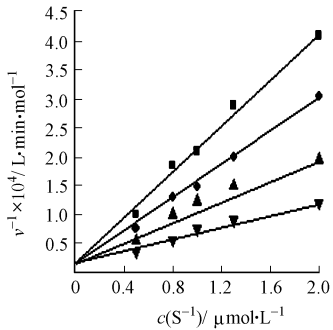


图 4 可逆抑制类型判断  
Fig. 4 Judgment of reversible inhibition mode

### 3 结论

1) 根据不同化学修饰剂对苹果中的 PPO 进行修饰反应后酶活力变化的结果,依据酶活变化与功能域之间关系规律,判断 His 的咪唑基、Arg 的胍基与 Trp 残基均是酶活力的必需基团,二硫键的结构对维持酶活性中心结构稳定有贡献,但游离的巯基不是 PPO 的必需基团。

2) 根据基团修饰后对酶活不同程度影响,进一步推测 His 与 Arg 位于酶活性中心的底物结合部位,而 Trp 残基位于酶催化部位,直接参与酶的催化过程,对酶活的影响最大。

3) 一定浓度的乙醇对 PPO 酶活有抑制作用且为可逆的竞争性抑制。

研究结果对苹果等果蔬的深加工过程中保鲜技术开发与抑制剂的设计及应用,提供了酶蛋白结构信息与动力学作用规律参考。

#### 参考文献:

- [1] XIAO Hou-rong, YANG Hong, CAI Jing-min, et al. Purification and characterization of polyphenol oxidase from apple[J]. Journal of Biology, 2009, 26(3): 41-45.
- [2] SANCHEZ F A, RODRIGUEZ L J N, GARCIA C F, et al. Tyrosinase: A comprehensive review of its mechanism[J]. BBA Protein and Molecular Enzymology, 1995, 124(7): 1-11.
- [3] CHEN Qing-xi, SONG Kang-kang, Wang Qin, et al. Inhibitory effects of mushroom tyrosinase by some alkyl benzaldehydes[J]. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2003, 18(6): 491-496.
- [4] 林敏, 邱凌, 周盛梅, 等. 4-卤代苯甲酸对马铃薯多酚氧化酶的抑制效应[J]. 食品科学, 2008, 29(5): 56-59.
- [5] HUANG Xiao-hong, CHEN Qing-xi, WANG Qin, et al. Inhibition of the activity of mushroom tyrosinase by alkyl benzoic acids[J]. Food Chemistry, 2006, 94: 1-6.
- [6] 宋莲军, 唐贵芳, 赵秋艳, 等. 富士苹果多酚氧化酶的提取及特性的研究[J]. 浙江农业科学, 2009, 16(4): 789-793.
- [7] 赵淑娟, 王坤波, 傅冬和, 等. 茶多酚氧化酶酶学性质研究[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2008, 34(1): 84-86.
- [8] 林敏, 邱凌, 钟雪, 等. 柿叶提取物对马铃薯多酚氧化酶的抑制作用[J]. 广西农业生物科学, 2008, 24(4): 412-416.
- [9] LIN Jian-cheng, CHEN Qing-xi, XIE Xiao-lan, et al. Irreversible kinetics of  $\beta$ -N-acetyl-D-glucosaminidase from prawn (*Penaeus vannamei*) inactivated by mercuric ion[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2006, 339(1): 30-36.
- [10] 石艳, 刘炜风, 陈清西. 菜青虫 N-乙酰-D-氨基葡萄糖苷酶活性必需基团的研究[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2006, 45(6): 851-854.

## Researches on Essential Groups of Enzyme Active Site and Inhibition Kinetics of Polyphenol Oxidase from Fuji Apple

PENG Yi-qiang, DENG Feng, LIU Yu, LIU Peng

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Fujian Province University, Huaqiao University, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** In this paper, chemical modifying agents, such as BrAC, Hacac, NBS, DTT and pCMB, which were relative specific to amino acid groups, were selected to study the essential groups of polyphenol oxidase (PPO) active site and the inhibition kinetics of ethanol to PPO. The result showed that the essential groups of PPO active site, which came from Fuji apple, composed of imidazole of His, guanidinium of Arg and Trp residue. Inhibition kinetics experiment revealed that the ethanol could inhibited PPO activity by combining with the groups from enzyme active site. The  $IC_{50}$  was  $0.14 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  and the inhibition mode was reversible competitive inhibition.

**Keywords:** polyphenol oxidase; enzyme active site; essential group; reversible inhibition

(责任编辑: 陈志贤 英文审校: 刘源岗)