

文章编号: 1008-3464 (2008) 04-0412-05

柿叶提取物对马铃薯多酚氧化酶的抑制作用

林敏^{1,2}, 邱凌¹, 钟雪¹, 石艳¹, 陈清西¹

(1 厦门大学 生命科学学院, 福建 厦门 361005; 2 龙岩学院 生命科学学院, 福建 龙岩 364000)

摘要: 多酚氧化酶 (PPO) 是生物体内黑色素合成的关键酶。研究了甜柿叶乙醇提取物、涩柿叶乙醇提取物、甜柿叶水提取物、涩柿叶水提取物对马铃薯多酚氧化酶活性的抑制作用。结果表明, 上述 4 种柿叶提取物对马铃薯多酚氧化酶具有明显的抑制作用, 使该酶活力下降 50% 所需的浓度 (IC_{50}) 分别为 0.21、0.26、0.37、0.45 mg/mL。乙醇提取物较水提取物的作用效果更强, 甜柿叶提取物的抑制作用比涩柿叶提取物的强, 4 种柿叶提取物对酶的抑制作用均为非竞争性可逆抑制, 其抑制常数 ($K_i = K_{is}$) 分别为 0.18、0.23、0.34、0.45 mg/mL。

关键词: 马铃薯; 多酚氧化酶; 柿叶提取物; 抑制作用; 动力学

中图分类号: Q 356.1 **文献标识码:** A

Inhibitory effect of extract of persimmon leaf on potato polyphenol oxidase (PPO)

LIN Min^{1,2}, QIU Ling¹, ZHONG Xue¹, SHI Yan¹, CHEN Qing-xi¹

(1 School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

2 School of Life Sciences, Longyan University, Longyan 364000, China)

Abstract: Polyphenol oxidase (PPO) is a key enzyme in pigment biosynthesis of organisms. The inhibitory effects on the activity of potato PPO by ethanol extract of sweet persimmon leaf, ethanol extract of astringent persimmon leaf, water extract of sweet persimmon leaf and water extract of astringent persimmon leaf were compared. The results showed that extract of persimmon leaf could obviously inhibit the activity of potato PPO. The inhibitors concentration leading to 50% (IC_{50}) of the enzyme activity lost were 0.21, 0.26, 0.37, 0.45 mg/mL, respectively. The inhibition strength of ethanol extract was stronger than that of water extract, and extract of sweet persimmon leaf is stronger than that of extract of astringent persimmon leaf. Kinetic analyses showed that the inhibition mechanism of all four extracts was noncompetitive inhibition, and the inhibition constants ($K_i = K_{is}$) were 0.18, 0.23, 0.34, 0.45 mg/mL, respectively.

Key words: potato; polyphenol oxidase; extract of persimmon leaf; inhibitory effect; kinetics

多酚氧化酶 (PPO) 又称为酪氨酸酶, 是广泛存在于植物体中的一种含铜的金属氧化酶, 是生物体内黑色素合成的关键酶。它能催化邻位二羟基苯丙氨酸 (L-多巴, L-DOPA) 氧化成多巴醌, 进而

收稿日期: 2007-11-07; 修回日期: 2007-12-28。

基金项目: 国家自然科学基金 (30570408); 福建省重点科技项目 (2007N0051); 化学生物学福建省重点实验室开发课题基金。

作者简介: 林敏 (1968-), 女, 福建龙岩人, 龙岩学院讲师, 硕士。

通讯作者: 陈清西, 教授, 博士生导师; E-mail: chenqx@xmu.edu.cn。

继续反应生成一系列引起褐变的色素类物质^[1]。该酶与果蔬的褐变有密切关系^[2,3]。1988年, Akiu等^[4]从杜鹃花科植物熊果的叶中分离到一种具有脱色作用的单体物质熊果苷(arbutin)。自此从植物中分离天然酪氨酸酶抑制剂引起了人们的兴趣。Kubo等^[5]从漆树科腰果、马钱科醉鱼草、菊科和棕榈科^[6]等植物中分离出几种酪氨酸酶抑制剂。尚靖等^[7]研究了7种常用增白中药对酪氨酸酶的抑制作用, 王建华等^[8]测定了芦荟、熟地黄、当归、玉竹、白茅根等20味中药乙醇提取物对酪氨酸酶的抑制活性。这些研究证实了许多中药对酪氨酸酶有抑制作用。雷铁池等^[9]的研究结果显示, 白术、白僵蚕、藁本、白芷、白附子、沙苑子、苦参、六月雪、柿叶、柴胡、香附11味中药乙醇提取物对酪氨酸酶活性和黑色素生成量呈剂量依赖性抑制。

近几年对于柿叶的研究主要集中在成分及药用分析, 很少涉及酶学领域, 柿叶提取物对植物PPO的抑制作用的报道甚少, 特别是酶的抑制作用动力学的研究几乎还是空白。我国柿子品种繁多, 据不完全统计约有800多种, 可分为甜柿和涩柿两大类, 甜柿类柿果着色后即可直接食用, 涩柿类需经脱涩后方可食用^[10]。柿叶中的主要有效活性成分是黄酮类, 柿叶有止血、抗菌、解热、降脂降压、抗氧化、抗癌变和抗诱变、美容等作用^[11]。在筛选植物体的多酚氧化酶抑制剂的实验中, 笔者发现从柿子叶中可以提取多酚氧化酶抑制剂。本研究采用50%乙醇提取法及水提取法分别提取甜柿叶和涩柿叶的PPO抑制剂, 并比较这四种提取物对马铃薯PPO的抑制效应, 为柿叶在医药、美容、食品保鲜等方面的应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

马铃薯(闽薯一号)由福建省龙岩市农科所提供, 甜柿叶和涩柿叶由福建省龙岩市龙门镇果农提供。马铃薯的多酚氧化酶(PPO)的纯化参照文献[12]的方法, 获得比活力为79.83 U/mg的酶制剂; L-多巴(L-DOPA)为Aldrich化学公司产品; 其他试剂为国产分析纯试剂; 使用的蒸馏水为去离子重蒸水。

1.2 方法

1.2.1 柿叶多酚氧化酶抑制剂的提取 参照黄酮类化合物的提取方法^[13]。柿叶在80~85℃的烘箱中烘3~4 h后, 用粉碎机加工成粉末。取柿叶粉末20 g, 加200 mL蒸馏水和200 mL乙醇(水提取物仅加400 mL蒸馏水)于大锥形瓶中, 搅拌均匀, 置于超声波清洗器中, 50℃下超声波萃取1.5 h, 用布氏漏斗抽滤得滤液, 用旋转蒸发器蒸发除去乙醇及大部分水分得浓缩液, 用冷冻干燥器干燥成粉末。取冻干粉配成15 mg/mL溶液, 15 000 r/m离心10 min, 除去沉淀备用。

1.2.2 PPO动力学研究方法 PPO酶活力测定参考文献[14]。在3.0 mL 0.2 mol/L磷酸缓冲液(pH 6.8)的反应体系中, 以0.5 mmol/L-DOPA为底物, 于30℃恒温水浴中预热10 min, 加入0.1 mL多酚氧化酶溶液(0.226 mg/mL酶蛋白), 立即混匀, 30℃恒温条件下测定波长为475 nm处光密度值随时间延长而增加的直线的斜率, 求出酶活力, 产物的消光系数按 $\epsilon = 3700(\text{mol/L} \cdot \text{cm})^{-1}$ 计算^[15]。在测活体系中加入不同浓度的效应物, 测定产物随底物浓度变化的曲线。抑制剂对酶的抑制作用的机理是通过Lineweaver-Burk双倒数作图, 通过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。

2 结果与分析

2.1 柿叶提取物对马铃薯多酚氧化酶活力的影响

以甜柿叶50%乙醇提取物和水提取物, 涩柿叶50%乙醇提取物和水提取物4种物质作为效应物, 研究它们对马铃薯PPO催化L-DOPA氧化的酶活力的影响, 结果表明, 4种柿叶提取物对酶活力均有明显的抑制作用, 随提取物浓度的增大, 酶活力呈指数下降(图1)。甜柿叶50%乙醇提取物浓度在0.2 mg/mL内, 酶活力下降最为显著, 达50%以上, 浓度在0.2~0.5 mg/mL, 酶活力下降较缓慢, 仅下降15%左右; 甜柿叶水提取物浓度在0.2 mg/mL内, 酶活力下降较为显著, 大约下降

33%，浓度在 0.2~0.5 mg/mL，酶活力下降较缓慢，大约下降 28%。涩柿叶 50%乙醇提取物浓度在 0.2 mg/mL 内，酶活力下降较为显著，达 45%左右，浓度在 0.25~0.5 mg/mL，酶活力下降较缓慢，仅下降 10%左右；涩柿叶水提取物浓度在 0.2 mg/mL 内，酶活力下降较为显著，大约下降 30%，浓度在 0.3~0.5 mg/mL，酶活力下降较缓慢，仅下降 22%左右。上述 4 种提取物导致酶活力下降一半所需的抑制剂浓度 (IC_{50}) 分别为 0.21、0.26、0.37、0.45 mg/mL，可见，柿叶 50%乙醇提取物的抑制作用比水提取物的更强，甜柿叶提取物的抑制作用比涩柿叶提取物的强。

2.2 柿叶提取物对马铃薯多酚氧化酶的抑制作用表现为可逆效应

在测活体系中，固定 L-DOPA 浓度为 0.5 mmol/L，分别加入不同浓度的甜柿叶 50%乙醇提取物，改变加入的酶量，测定酶催化 L-DOPA 氧化的活力。图 2 表示马铃薯多酚氧化酶在含不同浓度甜柿叶 50%乙醇提取物的测活体系中酶的剩余活力与加酶量的关系，酶活力对酶量作图为一组通过原点的直线。可见，随着提取物浓度的增大，直线的斜率降低，说明甜柿叶 50%乙醇提取物对马铃薯多酚氧化酶的抑制作用属于可逆过程。以同样方法测得涩柿叶 50%乙醇提取物、甜柿叶水提取物和涩柿叶水提取物对马铃薯多酚氧化酶的抑制作用，也属于可逆过程（结果略）。可见 4 种柿叶提取物都是通过抑制酶活力而导致催化效率的降低，而不是通过降低有效的酶量导致活力的下降。

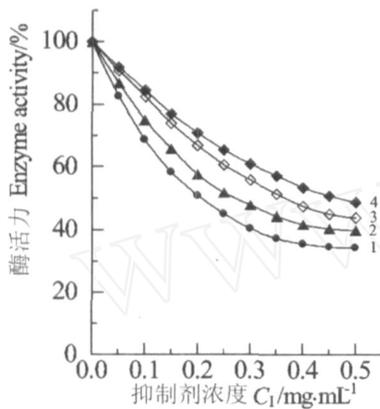


图 1 柿叶提取物对马铃薯 PPO 活力的影响

Fig 1 Effects of extract of persimmon leaf on the activity of potato PPO

1. 甜柿叶 50%乙醇提取物；2. 甜柿叶水提取物；
3. 涩柿叶 50%乙醇提取物；4. 涩柿叶水提取物

1. 50% ethanol extract of sweet persimmon leaf; 2. Water extract of sweet persimmon leaf; 3. 50% ethanol extract of astringent persimmon leaf; 4. Water extract of astringent persimmon leaf

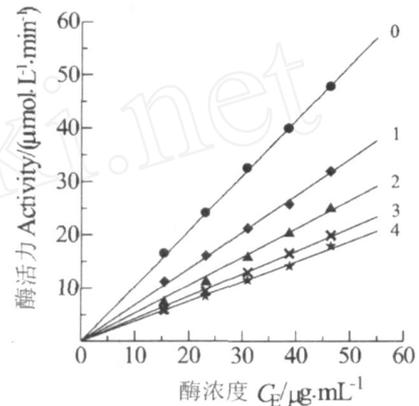


图 2 甜柿叶 50%乙醇提取物对马铃薯 PPO 抑制作用机理的判断

Fig 2 Inhibitory mechanism of extract of persimmon leaf on potato PPO

直线 0~4 抑制剂浓度分别为 0、0.05、0.10、0.20、

The concentration of inhibitor for curves 0~4 were 0, 0.05, 0.10, 0.20, 0.30 mg/mL, respectively

2.3 柿叶提取物对马铃薯多酚氧化酶抑制类型的判断和抑制常数的测定

在含不同浓度甜柿叶 50%乙醇提取物的测活体系中，测定酶催化不同浓度的 L-DOPA 氧化反应的初速度，以 Lineweaver-Burk 双倒数作图，得到一组横轴截距不变的直线（图 3），说明甜柿叶 50%乙醇提取物作为 PPO 抑制剂，不影响米氏常数 (K_m)，只使最大反应速度 (V_m) 减小，其抑制类型为非竞争性，抑制剂不改变酶对底物的亲和力，抑制剂可以同时与游离酶 (E) 和结合酶 (ES) 结合，且结合常数相同。以同样方法测得抑制剂涩柿叶 50%乙醇提取物、甜柿叶水提取物和涩柿叶水提取物对马铃薯 PPO 的抑制作用类型亦为非竞争性。以不同浓度抑制剂下测定的直线在纵轴的截距 ($1/V_m$) 对抑制剂浓度作图为一组直线（图 3 内插图），从直线的斜率可以求得抑制常数。甜柿叶 50%乙醇提取物、涩柿叶 50%乙醇提取物、甜柿叶水提取物和涩柿叶水提取物对马铃薯 PPO 的抑制常数 ($K_i = K_{is}$) 分别为 0.18、0.23、0.34、0.45 mg/mL。

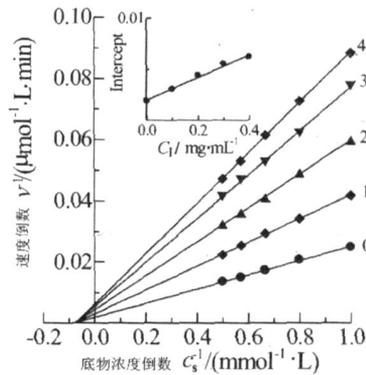


图 3 甜柿叶 50%乙醇提取物对马铃薯 PPO 抑制类型的判断和抑制常数的测定

Fig 3 Determination of the inhibitory type and inhibition constant of 50% ethanol extract of sweet persimmon leaf on mushroom tyrosinase

直线 0~4 抑制剂浓度分别为 0.0、0.1、0.2、0.3、0.4 mg/mL

The concentration of inhibitor for curves 0~4 were 0.0、0.1、0.2、0.3、0.4 mg/mL, respectively

3 讨论

柿叶中的主要有效活性成分是黄酮类, 已从柿叶中鉴定出黄茛甙、异槲皮素、山奈酚、3'-D-木糖甙等十多种黄酮类成分^[16]。An 等^[17]发现, 柿叶提取物能抑制葡萄糖苷转化酶和酪氨酸酶活性, 从而抑制葡萄糖和酪氨酸的氧化分解。Han 等^[18]研究发现, 柿叶黄酮具有明显的清除自由基效应, 能明显抑制人中性粒细胞中过氧化物的产生。动物药理实验表明, 用柿叶提取液和柿叶茶喂养高血脂大鼠后, 都可以降低其血清脂质过氧化物 (LPO) 含量并提高红细胞超氧化物歧化酶 (SOD) 活性, 说明柿叶提取液和柿叶茶有一定的清除氧自由基的抗氧化作用^[19]。近年研究表明, 黄酮类化合物具有多酚结构, 能够提供活泼的质子, 可与自由基结合成较稳定的产物, 因而有较强的抗氧化作用^[20]。

柿叶提取物的提取方法参照黄酮类化合物的, 用两种提取方法分别提取两种柿叶提取物。比较这四种提取物对马铃薯 PPO 的抑制效应, 结果表明, 四种柿叶提取物均有显著的抑制作用, 柿叶 50% 乙醇提取物的抑制作用比水提取物的更强, 甜柿叶提取物的抑制作用比涩柿叶提取物的强。四种柿叶提取物对马铃薯 PPO 的抑制类型均表现为非竞争性可逆抑制, 推测柿叶提取物活性成分是结合在酶的活性部位以外的区域, 通过原子的空间排列位阻或改变蛋白质的空间结构阻止底物与酶的结合。黄酮类化合物是色原酮或色原烷的衍生物, 是以 C₆-C₃-C₆ 结构为基本母核的天然产物, 即两个苯环通过三个碳原子结合而成。多羟基黄酮化合物是植物界分布最为广泛的黄酮类化合物^[21], 黄酮类 B 环上的羟基的数目和相互位置是其抑制的决定因素, 一般羟基越多其抑制作用越强, 羟基邻位比间位更利于抑制作用^[22]。

经过对柿叶提取物抑制 PPO 作用的动力学研究后, 认为其机理与抗氧化活性作用机理相关, 柿叶提取物抑制 PPO 活性的机制可能是: (1) 在 PPO 催化作用产生褐变的过程中, 氧既是引发剂又是反应物, 因此柿叶提取物对氧自由基的清除作用既阻断了反应的引发, 也削弱了 PPO 的供氧作用, 从而使氧化反应的强度减弱, 即削弱了 PPO 的作用; (2) 柿叶提取物作为强抗氧化剂可拮抗氧对 PPO 的激活; (3) 柿叶提取物结构中的还原性羟基具有孤对电子, 可与 PPO 分子中的 Cu²⁺ 络合, 从而影响酶的活性。

虽然有些化合物对 PPO 具有很强的抑制作用, 但由于它们潜在的毒性和水不溶性 [只能溶于二甲亚砜 (DMSO)] 而限制其实际应用, 而以植物来源的黄酮类物质作为 PPO 抑制剂, 可安全地应用于皮肤增白、色素障碍性疾病防治、食品果蔬保鲜等方面。通过对植物来源的 PPO 抑制剂的筛选及其有效成分构效关系的研究, 寻找高效抑制 PPO 活性的母核结构, 在此基础上对其结构进行改造, 可为设计新型高效、无毒副作用的 PPO 抑制剂奠定基础。

参考文献:

- [1] XIEL P, CHEN Q X, HUANG, H, et al. Inhibitory effects of some flavonoids on the activity of mushroom tyrosinase [J]. *Biochemistry (Moscow)*, 2003, 68 (4): 487-491.
- [2] KUBO I, KINST-HORI I, ISHIGURO K, et al. Flavonols from *Heterotheca inuloides*. Tyrosinase inhibitory activity and structural criteria [J]. *Bioorg Med Chem*, 2000, 8, 1585-1591.
- [3] FRIEDMAN M. Food browning and its prevention: an overview [J]. *J Agric Food Chem*, 1996, 44 (3): 631-653.
- [4] AKIU S, SUZUKI Y, FIJINUMA Y, et al. Inhibitory effect of arbutin on melanogenesis: biochemical study in cultured B16 melanoma cells and effect on the UV-induced pigmentation in human skin [J]. *Proc Jpn Soc Dermatol*, 1988, 12: 138-139.
- [5] KUBO I, KINST-HORI I, YOKAKAWA Y. Tyrosinase inhibitors from *Anacardium occidentale* fruits [J]. *J Nat Prod*, 1994, 57: 545-551.
- [6] KUBO I, YOKAKAWA Y, KINST-HORI I. Tyrosinase inhibitors from bolivian medicinal plants [J]. *J Nat Prod*, 1995, 58: 739-743.
- [7] 尚靖, 敖秉臣, 刘文丽, 等. 七种增白中药在体外对酪氨酸酶的影响 [J]. *中国药学杂志*, 1995, 30 (11): 653-655.
- [8] 王建华, 雷帆, 崔景荣. 20种中药对酪氨酸酶抑制作用的研究 [J]. *中国药学杂志*, 2000, 35 (1): 232-234.
- [9] 雷铁池, 朱文元, 夏明玉, 等. 中药对黑素生物合成影响研究 [J]. *中草药*, 1999, 30 (5): 336-338.
- [10] 马兰花. 柿子药用成分分析及研究 [J]. *山西林业*, 2001 (5): 29-30.
- [11] 林娇芬, 林河通, 谢联辉, 等. 柿叶的化学成分、药理作用、临床应用及开发利用 [J]. *食品与发酵工业*, 2005, 31 (7): 90-96.
- [12] 黄浩, 林敏, 邱龙新, 等. 苯甲酸衍生物对马铃薯多酚氧化酶的抑制作用 [J]. *厦门大学学报: 自然科学版*, 2006, 45 (4): 563-566.
- [13] 高梦祥, 赵喜红. 柿叶黄酮类物质的提取工艺研究 [J]. *陕西农业科学*, 2005 (3): 41-43.
- [14] CHEN Q X, KUBO I. Kinetics of mushroom tyrosinase inhibition by quercetin [J]. *Agriculture. Food Chemistry*, 2002, 50: 4108-4112.
- [15] JIMENEZ M, CHAZARRA S, ESCRIBANO J, et al. Competitive inhibition of mushroom tyrosinase by 4-substituted benzaldehydes [J]. *J Agric Food Chem*, 2001, 49 (8): 4060-4063.
- [16] 郭玫, 董晓萍, 徐文萍. 柿叶的研究概况 [J]. *甘肃中医学院学报*, 2000, 7 (17): 78-82.
- [17] AN B J, BAE M J, CHOI H J, et al. Isolation of polyphenol compounds from the leaves of Korean persimmon (*Diospyru kaki* L. Folium) [J]. *Agriculture Chemistry and Biotechnology*, 2002, 45 (4): 212-217.
- [18] HAN J, KANG S, CHOUE R, et al. Free radical scavenging effect of *Diospyru kaki* *Laminaria japonica* and *Undaria pinnatifida* [J]. *Fitoterapia*, 2002, 73 (7~8): 710-712.
- [19] 杨联河, 张艳丽, 朱涵. 柿果、柿叶的抗衰老研究 [J]. *河南职工医学院学报*, 2003, 15 (3): 43-44.
- [20] 曹彤, 褚树成, 何艳贞. 柿叶抗氧化作用的研究 [J]. *中国食品添加剂*, 1996, (4): 4-6.
- [21] 邹先伟, 蒋至胜. 植物源酪氨酸酶抑制剂研究进展 [J]. *中草药*, 2004, 35 (6): 702-706.
- [22] 陈清西, 林建峰, 宋康康. 酪氨酸酶抑制剂研究进展 [J]. *厦门大学学报: 自然科学版*, 2007, 46 (2): 274-282.

(责任编辑 裴润梅)