

## 4- 卤代苯甲酸对马铃薯多酚氧化酶的抑制效应

林 敏<sup>1,2</sup>, 邱 凌<sup>1</sup>, 周盛梅<sup>3</sup>, 钟 雪<sup>1</sup>, 王 勤<sup>1</sup>, 陈清西<sup>1,\*</sup>

(1. 厦门大学生命科学学院, 教育部细胞生物学与肿瘤细胞工程重点实验室, 福建 厦门 361005;  
2. 龙岩学院生命科学学院 福建 龙岩 364000; 3. 嘉兴学院化学与生物工程学院 浙江 嘉兴 314000)

**摘 要:** 马铃薯在储存和加工过程中易褐变, 本实验研究了 3 种 4- 卤代苯甲酸(4- 氟代苯甲酸、4- 氯代苯甲酸、4- 溴代苯甲酸)对褐变中的关键酶 - - 多酚氧化酶活性的抑制作用。实验表明, 4- 氟代苯甲酸、4- 氯代苯甲酸、4- 溴代苯甲酸对该酶均有明显的抑制作用, 测得使该酶活力下降 50% 所需的抑制剂浓度( $IC_{50}$ )分别为 0.635、0.370、0.300mmol/L。抑制动力学实验表明这三种 4- 卤代苯甲酸对该酶均表现为可逆的非竞争性抑制作用, 其抑制常数分别为 0.632、0.365、0.303mmol/L。随着卤族元素分子量的增大, 对酶的空间位阻增强, 导致抑制效率的显著增强。

**关键词:** 马铃薯; 多酚氧化酶; 4- 卤代苯甲酸; 抑制作用; 动力学

### Inhibitory Effects of 4-Halobenzoic Acids on Potato PPO Activity

LIN Min<sup>1,2</sup>, QIU Ling<sup>1</sup>, ZHOU Sheng-mei<sup>3</sup>, ZHONG Xue<sup>1</sup>, WANG Qin<sup>1</sup>, CHEN Qing-xi<sup>1,\*</sup>

(1. School of Life Science, Xiamen University, Key Laboratory for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, Ministry of Education, Xiamen 361005, China ; 2. School of Life Science, Longyan University, Longyan 364000, China ;  
3. College of Biology and Chemical Engineering, Jiaying University, Jiaying 314000, China)

**Abstract :** In order to prevent potato from generating brownness during preservation and processing, the effects of 4-halobenzoic acids (4-fluorobenzoic acid, 4-chlorobenzoic acid, 4-bromobenzoic acid) on the inhibitory effects on the activity of potato polyphenol oxidase (PPO), the key enzyme to browning, have been studied. The results showed that 4-halobenzoic acids can strongly inhibit the activity of potato PPO to lose 50%, the values of  $IC_{50}$ , the concentrations of these three inhibitors which lead the activity of potato PPO are determined to be 0.635, 0.370 and 0.300 mmol/L, respectively. Kinetic analyses showed that the inhibition mechanism of all three 4-halobenzoic acids are reversible and belong to be noncompetitive inhibition, with the inhibition constants ( $K_i=K_{is}$ ) determined as: 0.632, 0.365 and 0.303 mmol/L, respectively. For these three inhibitors, the inhibition potency is in the following order: 4-bromobenzoic acid > 4-chlorobenzoic acid > 4-fluorobenzoic acid. This indicated that the inhibitory efficiency on the enzyme is affected by the block of space of the substituted groups.

**Key words:** potato; polyphenol oxidase; 4-halobenzoic acids; inhibitory effect; kinetics

中图分类号: Q356.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)05-0056-04

多酚氧化酶(PPO, EC.1.10.3.1)是一类广泛分布于生物体内能催化多酚类氧化成醌类的铜结合酶<sup>[1]</sup>。新鲜果蔬在加工贮藏等过程中发生的酶促褐变, 主要是由于果蔬中所含有的 PPO 的作用<sup>[2-3]</sup>。PPO 定位于叶绿体的类囊体和其它质体的基质中, 而它的酚类底物在液泡中, 因此正常情况下它们是空间隔离的, 当植物组织受损, 这种空间隔离被打破, PPO 与底物接触, 发生作用, 单酚羟化为双酚, 二酚酶氧化双酚为醌, 醌自发聚合且

和细胞内蛋白质的一些氨基酸基团发生反应, 产生黑色和褐色物质, 从而导致组织酶促褐变。褐变不但会降低产品的感官、味道, 而且因为醌类物质会与蛋白质的一些侧链基团(如 -SH, -NH<sub>2</sub>)结合使蛋白质的结构、营养特征发生改变而降低营养价值<sup>[4]</sup>。酶促褐变需要三个条件: 酶、底物和空气中的氧, 控制三个条件中的任意一个因素或几个因素便能够达到控制果蔬酶促褐变发生的目的。在加工等生产实践中, 底物和氧一般不

收稿日期: 2007-05-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(30570408); 福建省重点科技项目(2007N0051)

作者简介: 林敏 (1968-), 女, 讲师, 在职硕士研究生, 研究方向为食品化学。E-mail: minlinca@hotmail.com

\* 通讯作者: 陈清西 (1959-), 男, 教授, 博士, 研究方向为分子酶学。E-mail: chenqx@xmu.edu.cn

容易除去,在这种情况下抑制导致酶促褐变的多酚氧化酶的活性成为加工过程中控制酶促褐变的极其重要的方法。

抑制剂的结构是影响其抑制效果的重要原因,例如对一系列直链4-烷基取代苯甲醛衍生物抑制蘑菇酪氨酸酶的研究表明,随着碳链长度的增加,这些化合物的抑制能力随之增大<sup>[5]</sup>;对一系列苯甲酸的烷基取代物对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用的研究,发现对位取代的甲基苯甲酸抑制作用最强,间位次之,邻位最弱;且随着对烷基苯甲酸碳链长度的增加,抑制作用逐渐增强<sup>[6]</sup>。本实验以马铃薯PPO为对象,研究三种4-卤代苯甲酸对该酶的影响及抑制机理,探讨这三种抑制剂结构与抑制效果的关系,为寻找具有高效、低毒或无毒的防褐变的化学物质奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

马铃薯(闽薯一号) 福建省龙岩市农科所。

### 1.2 试剂

L-多巴(L-DOPA) Aldrich化学公司;4-氟代苯甲酸、4-氯代苯甲酸、4-溴代苯甲酸 Sigma公司;其他试剂为国产分析纯试剂,水为去离子重蒸水。

### 1.3 仪器

BS210S电子分析天平 Sartorius公司产品;DS-1型高速组织捣碎机 上海标本模型厂;3K15冷冻离心机 Sigma公司;冰箱;UV-650型紫外可见分光光度计 Beckman公司;JB-2型磁力搅拌机 常州国华电器有限公司。

### 1.4 方法

#### 1.4.1 马铃薯PPO的分离纯化

马铃薯洗净、去皮、切块后,加入0.05mol/L磷酸盐缓冲液(PBS, pH6.8, W/V=1:1)用高速组织捣碎机匀浆,布氏漏斗抽滤,滤液即为马铃薯多酚氧化酶(PPO)粗酶液。往制得的粗酶液里缓慢均匀地加入硫酸铵粉末至40%饱和度,于4℃下静置沉淀3h,在4℃、15000r/min离心30min收集沉淀。沉淀用0.05mol/L、pH6.8的PBS缓冲溶液溶解,透析,再次于4℃、15000r/min离心20min除去沉淀,获得上清液经Sephadex G-100层析(2.5cm × 60cm),用0.05mol/L、pH6.8的PBS缓冲溶液洗脱,流速为18ml/h,用自动部分收集器收集,每管3ml,测PPO活性后,将 $A_{475nm}$ 值大于0.1的酶液合并起来待用。

#### 1.4.2 PPO的酶活力测定

PPO的酶活力测定参考文献[7]:先加入0.1ml含不同浓度的抑制剂(溶于DMSO溶液)于比色杯中,再加入2.8ml预先在30℃恒温水浴中保温的底物溶液,然后加入0.1ml酶液,迅速充分混匀,在30℃恒温条件下测

定波长为475nm的光密度值,产物的消光系数按3700 L/mol·cm计算<sup>[8]</sup>,从光密度值与时间的直线斜率计算出酶的活力。底物为0.5mmol/L DOPA,所用DMSO终浓度均为3.33%,并用对照扣除DMSO本底的影响。抑制剂对酶的抑制作用机理的判断实验参考文献[9]方法,测定在含不同浓度的效应物的测活体系中,酶量与反应速度间的关系,通过作图判断是否抑制作用是可逆反应。抑制剂对酶的抑制作用的机理是通过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<sup>[10-11]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 马铃薯PPO的纯化

以马铃薯为提酶原料,经0.05mol/L磷酸盐缓冲液(PBS, pH6.8)抽提、硫酸铵沉淀、Sephadex G-100凝胶过滤柱层析等步骤进行纯化,获得比活力为79.83U/mg,纯化倍数为16.19的马铃薯PPO制剂。

### 2.2 4-卤代苯甲酸对马铃薯多酚氧化酶活力的影响

以三种4-卤代苯甲酸作为效应物,研究其对马铃薯PPO催化L-DOPA氧化的酶活力的影响,结果表明4-卤代苯甲酸对酶活力有显著的抑制作用。图1为三种4-卤代苯甲酸对马铃薯PPO活力的抑制曲线,可见随着抑制剂浓度的增大,酶活力呈指数下降。当4-氟代苯甲酸浓度在0.4mmol/L内,酶活力下降较为显著,达40%,浓度在0.4~1.0mmol/L,酶活力下降较缓慢,仅下降20%左右。当4-氯代苯甲酸浓度在0.4mmol/L内,酶活力下降更为显著,达50%,浓度在0.4~1.0mmol/L,酶活力下降较缓慢,仅下降10%左右。当4-溴代苯甲酸浓度在0.4mmol/L内,酶活力下降最为显著,大约达到60%,浓度在0.4~1.0mmol/L,酶活力下降较缓慢,仅

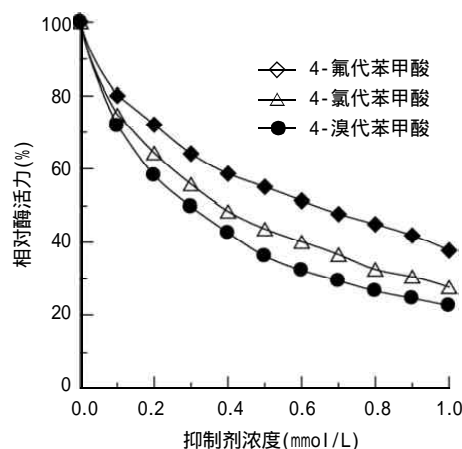


图1 苯甲酸4-卤代物对马铃薯PPO活力的影响

Fig.1 Effects of 4-halobenzoic acids on diphenolase activity of potato PPO

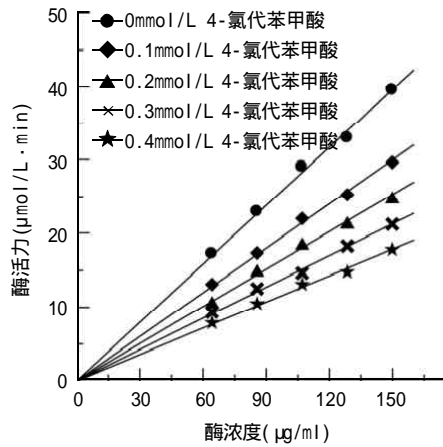


图2 4-氯代苯甲酸对马铃薯PPO抑制机理的判断

Fig.2 Inhibitory mechanism of 4-chlorobenzoic acid on potato PPO

下降20%左右。测定导致酶活力下降一半所需的抑制剂4-氯代苯甲酸、4-氯代苯甲酸、4-溴代苯甲酸浓度( $IC_{50}$ )分别为0.635、0.370、0.300mmol/L, 4-溴代苯甲酸对马铃薯PPO的抑制作用最强, 4-氯代苯甲酸次之, 4-氟代苯甲酸最弱。

### 2.3 4-卤代苯甲酸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, 固定底物(L-DOPA)浓度为0.5mmol/L, 分别加入不同浓度的各种4-卤代苯甲酸, 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4-氯代苯甲酸的测活体系中酶的剩余活力与加入酶量的关系, 酶活力对酶量作图为一组通过原点的直线。从图2中可以看出, 随着4-氯代苯甲酸浓度的增大, 直线的斜率降低, 说明4-氯代苯甲酸对马铃薯多酚氧化酶的抑制作用属于可逆过程。以同样方法得出4-氯代苯甲酸和4-溴代苯甲酸对马铃薯多酚氧化酶的抑制作用也属于可逆过程。可见本实验所用的这三种4-卤代苯甲酸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。

### 2.4 4-卤代苯甲酸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4-氯代苯甲酸的测活体系中, 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4-氯代苯甲酸作为PPO多酚氧化酶抑制剂, 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, 说明4-氯代苯甲酸与酶分子的结合与底物分子与酶的结合是独立的, 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4-氯代苯甲酸和4-溴代苯甲酸对马铃薯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 $1/V_m$ 对抑制剂浓度作图为一组通过原点的直线(图3内插图), 从直线的斜率可以求得抑制常数。抑制剂4-氯代苯甲酸、4-氯代苯甲酸、4-溴代苯甲酸对马铃薯PPO的抑制常数( $K_i=K_{is}$ )分别为0.632、0.365、0.303mmol/L。

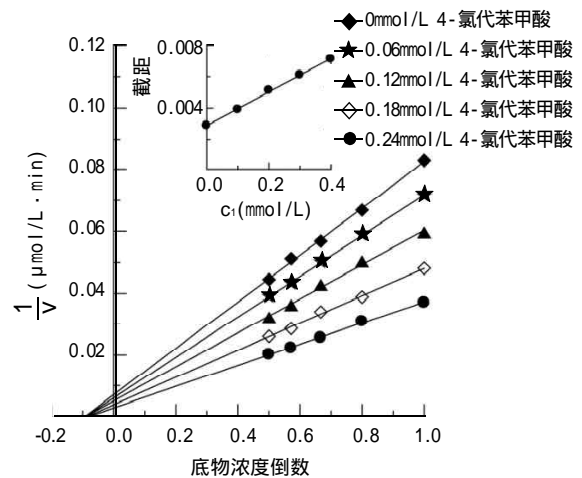


图3 4-氯代苯甲酸对马铃薯PPO抑制类型和抑制常数的测定。

Fig.3 Determination of inhibitory type and inhibition constant of 4-chlorobenzoic acid on potato PPO

## 3 讨论

有文献报道, 用丙酮沉淀法可以有效地分离提取PPO<sup>[12]</sup>。本实验发现用PBS缓冲液提取马铃薯PPO还比丙酮法更有效, 经几步分离纯化, 可得到比活力为79.83U/mg, 纯化倍数为16.19的马铃薯PPO酶制剂。

本实验选用的三种4-卤代苯甲酸结构相似, 只是在对位的取代基团为不同卤素(-F、-Cl、-Br)。苯甲酸对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用<sup>[10]</sup>并不很强,  $IC_{50}$ 的值为1.00mmol/L, 而4-氯代苯甲酸、4-氯代苯甲酸、4-溴代苯甲酸对蘑菇酪氨酸酶<sup>[11]</sup>的抑制作用比苯甲酸强4~5倍。本实验研究的这三种卤代苯甲酸对马铃薯PPO的抑制强度大小依次为: 4-氯代苯甲酸 < 4-氯代苯甲酸 < 4-溴代苯甲酸, 说明随着卤族元素分子量的增大, 对酶的空间位阻增强, 其抑制效率也就增强, 显示不同卤素在对位取代处提供电子能力的差异, 会导致对PPO抑制作用的改变。这三种卤代苯甲酸对马铃薯PPO的抑制作用机理和抑制类型与文献<sup>[11]</sup>报道的对蘑菇酪氨酸酶二酚酶的抑制作用类似。它们的抑制作用均表现为可逆反应, 抑制剂与酶的结合导致酶活力受抑制, 并不导致酶的分子构象的永久变化而失活。

研究的三种4-卤代苯甲酸对两种酶的抑制类型均表

现为非竞争性抑制, Walker 和 Wilson<sup>[13]</sup>认为酪氨酸酶存在两个不同的结合位点, 一个是酶的结合位点, 另一个是抑制剂的结合位点, 邻近酶的结合位点。由本实验的结果可推测 4- 卤代苯甲酸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。同一类抑制剂对两种来源不同的酶具有相同的抑制类型, 表明这两种酶具有相似的与抑制剂结合的基团, 在结构上有一定的相似性。

三种 4- 卤代苯甲酸对马铃薯 PPO 均有明显的抑制作用, 对这些抑制剂的构效关系的研究, 可以为合成有效的 PPO 化学抑制剂提供理论依据, 但它们能否直接应用于食品果蔬保鲜中, 其安全性及可行性如何, 还有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] MAYER A M, HAREL E. Polyphenol oxidases in plants recent progress [J]. *Phytochem*, 1979, 18: 193-215.
- [2] 韩涛, 李丽萍. 果蔬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] SANCHEZ-FERRER A, RODRIGUEZ-LOPEZ J N, GARCIA-CANOVAS F, et al. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism [J]. *Biochem Biophys Acta*, 1995, 1247: 1-11.
- [4] MATHEIS G, WHITAKER J R. Modification of proteins by polyphenol oxidase and peroxidase and their products[J]. *J Food Biochem*, 1984 (8): 137-162.
- [5] CHEN Q X, SONG K K, WANG Q, et al. Inhibitory effects of mushroom tyrosinase by some alkylbenzaldehydes[J]. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2003, 18(6): 491-496.
- [6] HUANG X H, CHEN Q X, WANG Q, et al. Inhibition of the activity of mushroom tyrosinase by alkylbenzoic acids[J]. *Food Chem*, 2006, 94: 1-6.
- [7] 黄璜, 刘晓丹, 陈清西. 苯甲醛族化合物对蘑菇酪氨酸酶抑制作用的研究[J]. *厦门大学学报: 自然科学版*, 2003, 42(1): 98-101.
- [8] 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.
- [9] CHEN Q X, SONG K K, QIU L, et al. Inhibition effects on mushroom tyrosinase by p-alkoxybenzoic acids [J]. *Food Chem*, 2005, 91: 269-274.
- [10] 刘晓丹, 黄璜, 陈清西. 苯甲酸对蘑菇酪氨酸酶抑制作用机理的研究[J]. *厦门大学学报: 自然科学版*, 2003, 42(1): 102-106.
- [11] WANG Q, SHI Y, SONG K K, et al. Inhibitory effects of 4-Halobenzoic acids on the diphenolase and monophenolase activity of mushroom tyrosinase[J]. *The Protein Journal*, 2004, 23(5): 303-308.
- [12] 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[J]. *食品科学*, 2006, 27(4): 37-40.
- [13] WALKER J R L, WILSON E L. Studies on the enzymatic browning of apples. Inhibition of apple-diphenol oxidase by phenolic acids[J]. *J Sci Food Agric*, 1975, 26: 1825-1831.