

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 21620131152545

UDC\_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

橄榄多酚氧化酶酶学性质及基因克隆表达  
研究

Characterization and cloning and expression of Polyphenol  
Oxidase (PPO) from *Canarium album*

王会芳

指导教师姓名: 王勤 副教授

专 业 名 称: 细胞生物学

论文提交日期: 2016 年 4 月 20 日

论文答辩时间: 2016 年 5 月 14 日

学位授予日期: 2016 年 月 日

答辩委员会主席: 陈清西 教授

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2016 年 5 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

2016年 月 日



## 目 录

缩略语中英文对照.....	1
中文摘要.....	2
英文摘要.....	3
1 前 言.....	4
1.1 橄榄和橄榄产业的概况.....	4
1.2 多酚氧化酶的研究概况.....	5
1.2.1 多酚氧化酶的酶学特性.....	5
1.2.2 多酚氧化酶的定位分布与存在形式.....	7
1.2.3 多酚氧化酶的生理功能.....	8
1.2.4 多酚氧化酶与果蔬褐变.....	9
1.2.5 多酚氧化酶抑制剂的研究概况.....	10
1.3 多酚氧化酶的分子生物学研究.....	11
1.4 多酚氧化酶重组蛋白的体外表达.....	12
1.5 橄榄多酚氧化酶的研究意义与研究内容.....	13
2 材料试剂与仪器.....	15
2.1 材料与试剂.....	15
2.2 仪器.....	16
3 实验方法.....	17
3.1 橄榄多酚氧化酶的提取与纯化.....	17
3.2 蛋白质浓度测定.....	17
3.3 多酚氧化酶的酶活力测定.....	17
3.4 酶催化反应的最适温度和热稳定性的测定.....	17
3.5 酶催化反应的最适 pH 和酸碱稳定性的测定.....	18
3.6 酶的底物专一性及米氏常数 ( $K_m$ ) 的测定.....	18
3.7 修饰剂对酶活力的影响.....	18
3.8 金属离子对酶活力的影响.....	19

<b>3.9 抑制剂对酶的抑制作用机理判断</b> .....	19
<b>3.10 抑制剂在橄榄保鲜中的作用</b> .....	19
<b>3.11 橄榄 PPO 的克隆及原核表达</b> .....	19
3.11.1 橄榄总 RNA 的提取及质量检测 .....	19
3.11.2 橄榄 cDNA 的合成 .....	20
3.11.3 PCR 产物 DNA 片段的回收纯化 .....	20
3.11.4 PPO 编码序列的克隆 .....	20
3.11.5 目的 DNA 片段的连接转化 .....	21
3.11.6 重组子的筛选鉴定 .....	21
3.11.7 橄榄 PPO 基因序列的生物信息学分析 .....	21
3.11.8 橄榄 PPO 表达载体的构建 .....	22
3.11.9 目标蛋白在 E.coli BL 21(DE3)中的诱导表达 .....	22
3.11.10 橄榄多酚氧化酶的纯化 .....	23
<b>4 实验结果与分析</b> .....	24
<b>4.1 橄榄 PPO 的部分纯化和性质研究</b> .....	24
4.1.1 橄榄 PPO 的部分分离纯化 .....	24
4.1.2 橄榄 PPO 催化 L-DOPA 氧化的最适温度测定 .....	24
4.1.3 橄榄 PPO 的热稳定性 .....	25
4.1.4 橄榄 PPO 催化 L-DOPA 氧化的最适 pH 测定 .....	26
4.1.5 PPO 催化 L-DOPA 氧化的 pH 稳定性 .....	26
4.1.6 PPO 催化 L-DOPA 和邻苯二酚氧化的米氏常数 $K_m$ 的测定 .....	27
<b>4.2 橄榄 PPO 的化学修饰</b> .....	28
4.2.1 DTT 对橄榄 PPO 的化学修饰 .....	28
4.2.2 乙酰丙酮对橄榄 PPO 的化学修饰 .....	28
4.2.3 醋酸酐对橄榄 PPO 的化学修饰 .....	28
4.2.4 PMSF 对橄榄 PPO 的化学修饰 .....	29
<b>4.3 金属离子对橄榄 PPO 的影响</b> .....	30
4.3.1 $Cl^-$ 、 $NO_3^-$ 和 $SO_4^{2-}$ 三种阴离子对橄榄 PPO 的影响 .....	30
4.3.2 对橄榄 PPO 作用不明显和微弱抑制的金属离子 .....	31

4.3.3 对橄榄 PPO 产生激活作用的金属离子 .....	32
<b>4.4 半胱氨酸席夫碱化合物对橄榄 PPO 的抑制效应 .....</b>	<b>33</b>
4.4.1 苯甲醛半胱氨酸席夫碱对橄榄 PPO 的作用 .....	33
4.4.2 2-羟基苯甲醛半胱氨酸席夫碱对橄榄 PPO 的作用 .....	35
4.4.3 3-羟基苯甲醛半胱氨酸席夫碱对橄榄 PPO 的作用 .....	37
4.4.4 4-羟基苯甲醛半胱氨酸席夫碱对橄榄 PPO 的作用 .....	40
4.4.5 2,3-二羟基苯甲醛半胱氨酸席夫碱对橄榄 PPO 的作用 .....	42
4.4.6 3-甲氧基-4-羟基苯甲醛半胱氨酸席夫碱对橄榄 PPO 的作用 .....	44
4.4.7 3-羟基-4-甲氧基苯甲醛半胱氨酸席夫碱对橄榄 PPO 的作用 .....	46
4.4.8 对乙氧基苯甲醛半胱氨酸席夫碱对橄榄 PPO 的作用 .....	48
4.4.9 3-氟苯甲醛半胱氨酸席夫碱对橄榄 PPO 的作用 .....	50
4.4.10 对甲基苯甲醛半胱氨酸席夫碱对橄榄 PPO 的作用 .....	52
4.4.11 3,4,5-三甲氧基苯甲醛半胱氨酸席夫碱对橄榄 PPO 的作用 .....	53
<b>4.5 苯甲醛半胱氨酸席夫碱类化合物在橄榄保鲜中的作用 .....</b>	<b>54</b>
<b>4.6 橄榄 PPO 基因的克隆 .....</b>	<b>55</b>
4.6.1 橄榄总 RNA 的提取结果 .....	55
4.6.2 橄榄 PPO 基因编码区的克隆 .....	55
4.6.3 橄榄 PPO 基因序列分析 .....	58
4.6.4 PPO 氨基酸序列相关性质的预测与分析 .....	58
4.6.5 橄榄 PPO 蛋白质信号肽的预测和分析 .....	60
4.6.6 橄榄 PPO 蛋白磷酸化位点预测 .....	61
4.6.7 橄榄 PPO 蛋白质三维结构预测 .....	61
<b>4.7 橄榄 PPO 基因的表达研究 .....</b>	<b>62</b>
4.7.1 橄榄 PPO 表达载体构建与原核表达 .....	62
4.7.2 橄榄 PPO 的纯化 .....	64
<b>5 讨论与结论 .....</b>	<b>65</b>
5.1 橄榄 PPO 的分离纯化和性质的研究 .....	65
5.2 橄榄 PPO 的化学修饰 .....	65
5.3 金属离子对橄榄 PPO 的影响 .....	65

5.4 橄榄 PPO 抑制剂的筛选.....	65
5.5 苯甲醛半胱氨酸席夫碱类化合物在橄榄保鲜中的作用.....	66
5.6 橄榄 PPO 基因的克隆表达与纯化.....	66
6 展 望.....	67
参 考 文 献.....	68
致 谢.....	74

厦门大学博硕士论文摘要库

## CONTENT

<b>Abbreviations</b> .....	1
<b>Chinese Abstract</b> .....	2
<b>English Abstract</b> .....	3
<b>1 Introduction</b> .....	4
<b>1.1 The general introduction of <i>Canarium album</i></b> .....	4
<b>1.2 The review of the study on PPO</b> .....	5
1.2.1 Enzymatic properties of PPO .....	5
1.2.2 Orientation and existence form of PPO .....	7
1.2.3 The physiological functions of PPO .....	8
1.2.4 PPO and plant browning .....	9
1.2.5 The review of the Inhibitor of PPO.....	10
<b>1.3 Molecular biology of PPO</b> .....	11
<b>1.4 The in vitro expression of PPO</b> .....	12
<b>1.5 Significance and Content of the study on PPO from <i>Canarium album</i></b> ....	13
<b>2 Material reagent and instrument</b> .....	15
<b>2.1 Material and reagent</b> .....	15
<b>2.2 Instrument</b> .....	16
<b>3 The experimental method</b> .....	17
<b>3.1 Isolation and Purification of PPO from <i>Canarium album</i></b> .....	17
<b>3.2 Assay of protein concentration</b> .....	17
<b>3.3 Assay of PPO activity from <i>Canarium album</i></b> .....	17
<b>3.4 Effect of the temperatrue on PPO from <i>Canarium album</i></b> .....	17
<b>3.5 Effect of the pH on PPO from <i>Canarium album</i></b> .....	18
<b>3.6 Determination of the Km of PPO on L-DOPA and catechol</b> .....	18
<b>3.7 The chemical modification of PPO from <i>Canarium album</i></b> .....	18
<b>3.8 Effect of metallic ions on PPO</b> .....	19



<b>3.9 Study on the inhibition mechanism of PPO</b> .....	19
<b>3.10 The role of inhibitors in the preservation of <i>Canarium album</i></b> .....	19
<b>3.11 The cloning and prokaryotic expression of PPO</b> .....	19
3.11.1 Total RNA extraction and quality detection of PPO.....	19
3.11.2 The synthesis of the first chain of cDNA of PPO .....	20
3.11.3 The recycling and purification of PCR products.....	20
3.11.4 The cloning of coding sequence of PPO Gene .....	20
3.11.5 The connection of DNA fragments .....	21
3.11.6 Restructing of screening.....	21
3.11.7 Bioinformatic analysis of PPO gene .....	21
3.11.8 Construction of expression vector of PPO .....	22
3.11.9 Expression of PPO .....	22
3.11.10 The purification of PPO .....	23
<b>4 The experimental results and analysis</b> .....	24
<b>4.1 Isolation and purification and some Characteristic of PPO from <i>Canarium album</i></b> .....	24
4.1.1 Partial purification of PPO.....	24
4.1.2 The optimum temperatrue of PPO .....	24
4.1.3 The thermal stability of PPO.....	25
4.1.4 The optimum pH of PPO .....	26
4.1.5 The pH stability of PPO .....	26
4.1.6 Determination of the $K_m$ of PPO on L-DOPA and catechol.....	27
<b>4.2 The chemical modification of PPO</b> .....	28
4.2.1 The chemical modification PPO by DTT .....	28
4.2.2 The chemical modification PPO by AA.....	28
4.2.3 The chemical modification PPO by acetic anhydride.....	28
4.2.4 The chemical modification PPO by PMSF.....	29
<b>4.3 Effect of Metallic Ions on PPO from <i>Canarium album</i></b> .....	30
4.3.1 Effect of three anions on the activity of PPO .....	30

4.3.2	Some metal ions have no or few effect on PPO.....	31
4.3.3	Activated effect of some metal ions on PPO.....	32
<b>4.4</b>	<b>Screening of the Inhibitors on PPO from <i>Canarium album</i>.....</b>	<b>33</b>
4.4.1	Effect of benzaldehyde cysteine schiff base on the activity of PPO from <i>Canarium album</i> .....	33
4.4.2	Effect of 2-hydroxy benzaldehyde cysteine schiff base on the activity of PPO from <i>Canarium album</i> .....	35
4.4.3	Effect of 3-hydroxy benzaldehyde cysteine schiff base on the activity of PPO from <i>Canarium album</i> .....	37
4.4.4	Effect of 4-hydroxy benzaldehyde cysteine schiff base on the activity of PPO from <i>Canarium album</i> .....	40
4.4.5	Effect of 2,3-dihydroxy benzaldehyde cysteine schiff base on the activity of PPO from <i>Canarium album</i> .....	42
4.4.6	Effect of 3-methoxybenzoic-4-hydroxy benzaldehyde cysteine schiff base on the activity of PPO from <i>Canarium album</i> .....	44
4.4.7	Effect of 3- hydroxy-4-methoxybenzoic benzaldehyde cysteine schiff base on the activity of PPO from <i>Canarium album</i> .....	46
4.4.8	Effect of ethoxy benzaldehyde cysteine schiff base on the activity of PPO from <i>Canarium album</i> .....	48
4.4.9	Effect of 3-fluoro benzaldehyde cysteine schiff base on the activity of PPO from <i>Canarium album</i> .....	50
4.4.10	Effect of p-methyl benzaldehyde cysteine schiff base on the activity of PPO from <i>Canarium album</i> .....	52
4.4.11	Effect of 3,4,5-trimethoxy benzaldehyde cysteine schiff base on the activity of PPO from <i>Canarium album</i> .....	53
<b>4.5</b>	<b>The role of inhibitors in the preservation of <i>Canarium album</i>.....</b>	<b>54</b>
<b>4.6</b>	<b>The cloning of PPO gene from <i>Canarium album</i>.....</b>	<b>55</b>
4.6.1	The results of RNA extraction .....	55
4.6.2	The cloning of coding sequence of PPO Gene .....	55
4.6.3	Gene sequence analysis of PPO from <i>Canarium album</i> .....	58

4.6.4 Amino acid sequence prediction and analysis of related properties of PPO from <i>Canarium album</i> .....	58
4.6.5 Forecast and analysis of protein signal peptide of PPO .....	60
4.6.6 The predication of phosphorylation sites PPO.....	61
4.6.7 Three-dimensional structure prediction of PPO.....	61
<b>4.7 The study of expression of PPO gene.....</b>	<b>62</b>
4.7.1 The expression of PPO gene .....	62
4.7.2 The purification of PPO from <i>Canarium album</i> .....	64
<b>5 Discussion and conclusion.....</b>	<b>65</b>
5.1 Isolation and purification and some Characteristic of PPO from <i>Canarium album</i> .....	65
5.2 The chemical modification of PPO from <i>Canarium album</i> .....	65
5.3 Effect of Metallic Ions on PPO from <i>Canarium album</i> .....	65
5.4 Screening of the Inhibitors on PPO from <i>Canarium album</i> .....	65
5.5 The role of inhibitors in the preservation of <i>Canarium album</i> .....	66
5.6 The expression and purification of PPO .....	66
<b>6 Prospectives .....</b>	<b>67</b>
<b>References.....</b>	<b>68</b>
<b>Acknowledgements .....</b>	<b>74</b>

## 缩略语中英文对照

英文简称	英文全称	中文全称
DMSO	dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
DTT	Dithiothreitol	二硫苏糖醇
$IC_{50}$	50% inhibiting concentration	半抑制浓度
$K_m$	Michaelis-Menten constant	米氏常数
L-DOPA	L-3,4-dihydroxyphenylalanine	L-3,4-二羟基苯丙氨酸
PBS	phosphate buffer	磷酸缓冲液
PMSF	phenylmethanesulfonyl fluoride	苯甲基磺酰氟
PPO	polyphenol oxidase	多酚氧化酶
SDS	sodium dodecyl sulfonate	十二烷基磺酸钠
TEMED	tetramethylethylenediamine	四甲基乙二胺
TG	triglyceride	甘油三酯
$V_m$	maximum velocity	最大反应速率

## 摘要

多酚氧化酶 (EC.1.14.18.1) 广泛存在于动物、植物和微生物体内, 是一种由核基因编码的含铜金属酶。它是果蔬储藏和加工过程中酶促褐变的重要酶类, 能够催化酚类物质的氧化。

以橄榄 (长营) 为原料提取多酚氧化酶进行了分离纯化, 得到比活力为 1834 U/mg 的多酚氧化酶粗酶液。研究橄榄多酚氧化酶的理化性质, 酶的 pH 和最适温度分别为 6.0 和 30℃, 酶在低于 60℃和在 pH 4.0~8.0 范围内较稳定; 在 30℃、pH 6.0 条件下, 多酚氧化酶催化 L-DOPA 氧化反应的  $K_m$  为 3.884 mmol/L。

测定了几种修饰剂对橄榄多酚氧化酶的修饰作用, 结果表明二硫键、精氨酸残基、赖氨酸残基和丝氨酸残基对多酚氧化酶具有修饰作用。

金属离子  $K^+$ 、 $Li^+$ 、 $Mg^{2+}$ 和  $Ba^{2+}$ 对多酚氧化酶活力没有影响,  $Zn^{2+}$ 、 $Al^{3+}$ 、 $Mn^{2+}$ 和  $Cu^{2+}$ 对酶有激活作用。

从苯甲醛半胱氨酸席夫碱及其衍生物中筛选多酚氧化酶抑制剂, 探讨各种效应物抑制剂对橄榄多酚氧化酶活性的影响。研究发现苯甲醛半胱氨酸席夫碱及其衍生物的结构与它们抑制作用的强弱与抑制类型相关。选取 4-羟基苯甲醛半胱氨酸席夫碱为代表化合物, 研究了其在橄榄保鲜方面的作用, 4-羟基苯甲醛半胱氨酸席夫碱类化合物对橄榄具有良好的防褐变作用和抗菌活性。

以橄榄为材料, 提取 RNA, 应用反转录 PCR 的方法克隆得到橄榄 PPO 基因并进行原核表达。利用生物信息学的方法, 对橄榄的多酚氧化酶基因及其蛋白进行分析。基因开放阅读框全长 1821 bp, 没有内含子, 编码的 PPO 属于亲水性蛋白, 没有跨膜结构, 含有 606 个氨基酸, 分子量约为 68.4 Kd, 理论等电点为 8.14, 是酪氨酸酶基因家族蛋白。另外, 成功构建原核表达载体 pET28a-PPO, 并转化 *E.coli* BL21。SDS-PAGE 电泳显示, 表达出一条约 70 Kd 的特异性蛋白条带, 且蛋白分子量的大小与预期的基本一致。

关键词: 橄榄; 多酚氧化酶; 抑制作用; 基因克隆; 基因表达

## Abstract

Polyphenol oxidase is widely distributed in animals, plants and microorganisms. It's a copper-containing enzyme which has complex structures. Polyphenol oxidase play an important role during the process of enzymatic browning in vegetable and fruit, for the reason that it can catalyze the melanin synthesis.

In this paper, we purified the PPO from *Canarium album* and studied some chemical and physical properties of this enzyme. Optimum pH and optimum temperature were determined to be 6.0 and 30°C respectively. The enzyme activity was very stable at the pH ranging from 4.0~8.0 and under 60°C.  $K_m$  was determined to be 3.884 mmol/L at pH 6.0 and 30°C.

We studied the effects of some metal ions on the PPO for the oxidation of L-DOPA. The results showed that  $K^+$ ,  $Li^+$ ,  $Mg^{2+}$  and  $Ba^{2+}$  had no effect on the activity of PPO,  $Zn^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Mn^{2+}$  and  $Cu^{2+}$  can activated the activity of PPO.

We studied Benzaldehyde cysteine schiff base and benzaldehyde cysteine Schiff base family compounds in order to screen the inhibitors of PPO. The results showed that all of the tested compounds had various effects on PPO from the *Canarium album*. The structures of these compounds were the foundation of inhibit mechanism and inhibit ability. We select 4-hydroxy benzaldehyde cysteine in its role of the preservation on *Canarium album*. The results showed that it has good anti-browning and antibacterial activity.

The RNA of the *Canarium album* was extracted and the first cDNA encoding PPO was cloned. The opening reading frame of PPO was 1821 bp and encoding 606 amino acids. Bioinformatics analysis showed that PPO from *Canarium album* had a 68.4 Kd molecular weight and 8.14 PI value, which belonged to hydrophilic protein but no signal peptide found. In addition, the prokaryotic expression vector pET28a-PPO was constructed and transformed to E.coli BL21(DE3). SDS-PAGE electrophoresis results showed a 70 Kd specific protein bands with the expected size.

**KEYWORDS:** *Canarium album*; Polyphenol oxidase; Inhibition; Gene cloning; Gene expression

# 1 前言

## 1.1 橄榄和橄榄产业的概况

橄榄是著名的热带、亚热带特产果树，如图 1。橄榄分为木犀科和橄榄科两类，木犀科橄榄又称油橄榄，是唇形目木樨科木樨榄属，果实主要用来生产橄榄油，主要产于地中海地区。橄榄科橄榄是无患子目橄榄科橄榄属，果实主要用来鲜食或后续加工，主要产于中国南部地区。我国的橄榄主要产区是福建省和广东省，次要产区是重庆市和四川省，此外海南省、云南省、广西省、浙江省和台湾省也有少量种植<sup>[1]</sup>。福建省是我国橄榄的传统产区，盛产檀香、长营、黄大、惠圆、自来圆等 28 个橄榄品种<sup>[2-4]</sup>，素有“橄榄之乡”的美誉，橄榄种植面积达二十多万亩，采摘面积达五万多亩，但橄榄产量两万多吨，平均亩产不足四百千克。与龙眼、柑桔、琵琶相比，差距仍非常大。橄榄拥有两千多年的栽培历史，经过长期的自然和人工选择栽培，遗传资源众多。橄榄树根深叶茂，不仅可以防风降噪，且有利于保护水土，在园林绿化中应用前景广<sup>[5]</sup>。



图 1 橄榄植物图。

Fig.1 *Canarium album* (Lour) Raeusch.

橄榄的营养较丰富，果肉富含维生素 C 与钙质，并且含有 17 种人体所需氨基酸。橄榄果实中含有非常丰富的膳食纤维，且含量明显高于番木瓜、西番莲以及柑橘等水果，可以作为一种重要的膳食纤维补给来源<sup>[6]</sup>。橄榄果具有较高的保健作用和药用价值，除用于鲜食外，还可制成饮料和蜜饯。鲜食有去脂减肥、开胃健脾、润喉、解毒、生津等功效，是筵席和节日的常备佳果。目前橄榄的加工

产品主要有橄榄蜜饯、咸橄榄等传统加工产品，以及橄榄茶、橄榄汁、橄榄咀嚼片<sup>[7]</sup>、橄榄口服液等新型加工产品。橄榄鲜果非常畅销，要延长果实的供应期必须做好贮藏保鲜工作。但橄榄果实采摘后非常容易发生褐变、失水皱缩，这不仅会导致橄榄自然损耗，降低它的食用和商品价值，且橄榄果呼吸强度的增加，会干扰其正常的生理代谢过程，使果实的抗病性能和耐藏性能降低，缩短果实的贮藏期<sup>[8]</sup>。因此对于包括橄榄在内的很多果蔬，防止储藏加工过程中的褐变一直是一个非常重要的研究领域。而导致橄榄酶促褐变的一种重要催化酶类就是多酚氧化酶<sup>[9,10]</sup>。

## 1.2 多酚氧化酶的研究概况

### 1.2.1 多酚氧化酶的酶学特性

多酚氧化酶 (Polyphenol Oxidase, 简称 PPO, EC.1.14.18.1) 广泛存在于动物、植物和微生物体内,甚至在土壤中腐烂的植物残渣上都可以检测到多酚氧化酶的活性,它是最早被研究的几种酶类之一。它是自然界存在较普遍的氧化还原酶,是一种由核基因编码的含铜金属酶,它能够催化酚类物质的氧化。1938年 Keilin D.和 Mann G.对蘑菇多酚氧化酶的提取和纯化进行了研究,得到多酚氧化酶并将这类酶称为多酚氧化酶。多酚氧化酶又称酪氨酸酶,儿茶酚氧化酶,苯酚酶,邻苯二酚氧化还原酶,是六大类酶中的第一大类氧化还原酶。多酚氧化酶在微生物、动物中具有单酚氧化能力时,能够催化酪氨酸将其羟基化,产生邻位二羟基苯丙氨酸 (L-DOPA),继续将多巴氧化成多巴醌<sup>[11,12]</sup>,进而生成一系列能够引起褐变的色素类物质<sup>[13-15]</sup>,这两个阶段的氧化都需要分子氧的参与<sup>[16]</sup>。

研究多酚氧化酶的催化活性中心发现,大多数 PPO 的活性中心存在两个富含组氨酸残基的铜结合区,每个  $\text{Cu}^{2+}$  与 3 个组氨酸残基中的  $\text{N}_\epsilon$  形成配位键。配位键中两个为赤道面配位键,一个为相对较弱的轴向配位键,共同形成具有特定三维结构的活性中心。两个  $\text{Cu}^{2+}$  以赤道面与不同数目的氧原子配位结合从而形成电子通路<sup>[17,18]</sup>。因为  $\text{Cu}^{2+}$  结合氧原子个数的不同,多酚氧化酶在催化反应过程中存在以下三种类型:与一对外来氧原子连接的二价铜离子的氧化态酶( $\text{E}_{\text{oxy}}$ )、与一个外来氧原子连接铜离子的还原态酶( $\text{E}_{\text{met}}$ )、两个不与任何氧原子连接的相互分离的一价铜离子的脱氧态酶( $\text{E}_{\text{deoxy}}$ )<sup>[18,19]</sup>。氧化态酶( $\text{E}_{\text{oxy}}$ )具有单酚酶活性和双酚酶活性;还原态酶( $\text{E}_{\text{met}}$ )没有单酚酶活性,仅具有双酚酶活性;脱氧态酶( $\text{E}_{\text{deoxy}}$ )



Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.