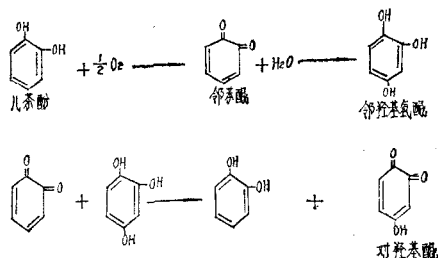


# 儿茶酚氧化酶的酶学特性

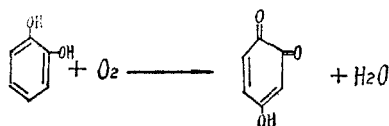
华南工学院 袁振远 杨李益

## (一) 前言

儿茶酚氧化酶又称为酪氨酸酶、多酚氧化酶、苯酚酶、甲酚酶。可见它并不具有特殊的专一性，由于在研究该酶时首先使用酪氨酸为底物，所以第一个普通名就是酪氨酸酶<sup>[1]</sup>，在国际酶学委员会的酶分类与命名方案中<sup>[2]</sup>，推荐名为儿茶酚氧化酶，编号为1、10、3.1，表明该酶属于六大类酶中的第一大类（氧化还原酶），第十亚类（以二酚及相关的物质为氢的受体），第三小类（以分子氧为氢的受体，即该酶只有在游离氧分子存在下才能作用）。苹果、马铃薯、甘薯的切口、摘下的蘑菇、离开汁液的豆腐乳、经揉捻后的茶叶，当它们暴露于空气中时便逐渐褐变，颜色从褐到黑逐步加深，这是由于其中存在儿茶酚氧化酶催化各种酚类（儿茶酚、单宁酸、酪氨酸等）氧化成醌，再经聚合成黑色素所致。当儿茶酚氧化酶作用于儿茶酚时，其反应过程如下：



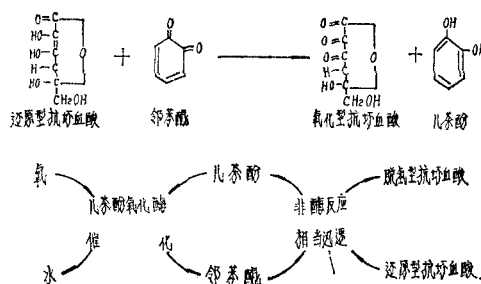
所产生的儿茶酚又重复第一步反应，所以反应的总结果可以用如下方程式表示之：



儿茶酚氧化酶催化一元酚（例如苯酚及酪氨酸）的速度比催化二元酚（例如儿茶酚）的速度慢，而且酪氨酸的溶解度很低，因此

在测此酶的活力时，常以儿茶酚为底物，而不用苯酚和酪氨酸为底物。

当酶作用于儿茶酚时，如果溶液存在有抗坏血酸，其反应和氧化还原系统可表示为：



抗坏血酸是一种理想的还原剂，因为它能立即被邻苯醌所氧化，而不直接与儿茶酚氧化酶作用，从抗坏血酸的消耗量可以直接算出儿茶酚的量，每消耗一克分子的抗坏血酸就相当于儿茶酚一克分子，亦即相当于 $\frac{1}{2}$ 克分子的氧，每分钟能使底物消耗10微升氧的酶量为一个活力单位。

测定儿茶酚氧化酶活力最准确而简便的方法是采用华氏气体微量呼吸检压仪，其原理是将酶与底物（儿茶酚）置于气体呼吸仪中反应，系统空间的氧被消耗，从检压计通空气的一侧检压液下降的高度算出氧的消耗量<sup>[3]</sup>。

食品褐变与儿茶酚氧化酶的作用直接有关，测定儿茶酚氧化酶的动力学特性对制定食品的加工与保藏工艺有很重要的意义，作者就温度、PH、底物浓度、抑制剂等对儿茶酚氧化酶活力的效应，进行了一些试验，供食品业同行参考。

## (二) 反应速度

### 一、材料与方法

#### 1. 酶液的制备 取新鲜洗净的马铃薯

沥干水分后去皮，按常法测定其水分含量，准确称取去皮马铃薯 20 克，加入少许海砂及 pH5.0 的醋酸—醋酸钠缓冲液，研磨成浆，再加入上述缓冲液 60 毫升，浸泡 30 分钟，充分搅匀后过滤于 100 毫升容量瓶中，用上述缓冲液定容至标线，即为酶液。

2. 底物配制 准确称取儿茶酚 0.22 克，加水溶解，然后定容至 100 毫升，即为 0.02M 的儿茶酚溶液。

3. 试剂配制 pH5.0 醋酸—醋酸钠缓冲溶液：称取  $\text{NaAC} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  4 克，冰乙酸 2.5 克，溶解后定容至 200 毫升即成。

10%NaOH 溶液：称取固体 NaOH 10 克溶解后定容至 100 毫升即成。

4. 试验步骤<sup>[5]</sup> 采用上海科技大学产的 SKW-2 型华勃氏呼吸仪测定，具体操作步骤如下：

(1) 将检压管和反应瓶洗净烘干，注布氏检压液于管内，装上旋扭，并将检压管固定在金属板上。

(2) 加 2 毫升酶液于反应瓶主室，1 毫升儿茶酚液于反应瓶侧室，0.1 毫升 NaOH 液于中心杯中，另用煮沸三分钟的失活酶液代替上述酶液作对照。

(3) 用真空脂密封各活动部件，以橡皮筋将反应瓶和检压管固定为一体。

(4) 开三通，调检压液于 210 毫米处，关闭三通，调检压液于 150 毫米参比点处，静止两分钟，若闭端液柱不下降，即证明系统不漏气，反之要采用相应措施，直至不漏气为止。

(5) 开三通，调检压液于 210 毫米处，放进预先调好温度的恒温水浴中预热 15 分钟，检查确证系统不漏气后，将酶和儿茶酚液混合一起反应，分别记下反应 3、5、8、15、20、25 分钟时开端液柱下降的高度，并计算其耗氧量。

试验温度采取 22°C (文献<sup>[1]</sup>记载反应最适温度为 22°C)。

## 二、试验结果

试验结果如表 1 和图 1 所示

表 1 儿茶酚氧化酶反应速度与时间的关系

反应时间 (分钟)	3	5	8	15	20	25
耗 $\text{O}_2$ 量 (微升)	27.5	37.4	44.8	45.9	48.1	47.9

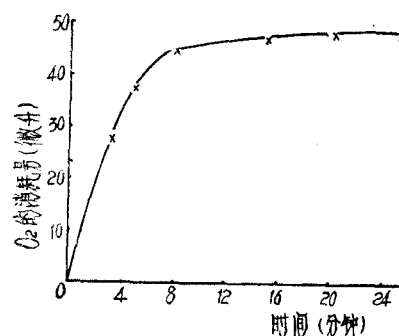


图 1 酶反应速度与时间的关系

## 三、考察

儿茶酚氧化酶的反应速度是相当快的，在 5 分钟内反应速度直线上升，其后反应速度变慢，因此在以后各项试验中均以反应 5 分钟时的耗氧量来表示酶的活力。

### (三) 温度效应

#### 一、材料与方法

1. 酶液制备与底物配制 同上。

2. 试验步骤同上，反应 5 分钟记下开端液柱的读数并计算酶活力。

试验温度为 10、15、20、25、30、35、40、45°C。

## 二、试验结果

马铃薯的儿茶酚氧化酶在不同温度下的活力如表 2 和图 2 所示：

表 2 温度对酶活力的效应

温 度(°C)	10	15	20	25	30	35	40	45
耗氧量(微升)	28.6	43.2	36.3	29.2	21.1	10.0	4.1	0.7

## 三、考察

试验结果表明，儿茶酚氧化酶对温度是敏感的，作用的最适温度是 15°C，当温度达

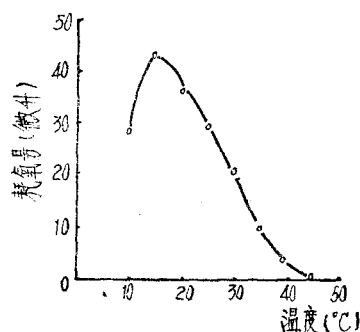


图2 温度效应

到 45°C 时就几乎完全失活, 本文以后试验采用的温度定为 15°C。

#### (四)pH 效应

##### 一、材料与方法

1. 酶液的制备方法与上述相同, 但 pH5.0 的醋酸缓冲液则分别用下列 PH 值的缓冲液代替。

2. 各种 pH 值缓冲液的配制

(1)pH2.0 缓冲液 取 1M HCl 2 毫升加水定容至 200 毫升。

(2)pH3.0 缓冲液 0.2M 甘氨酸 50 毫升与 0.2M HCl 11.4 毫升加水混合定容 200 毫升。

(3)pH4.0 缓冲液 0.6 克 NaAC 与冰乙酸 2 克混合加水溶解定容至 200 毫升。

(4)pH6.0 缓冲液 称 1.76 克  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  和 5.5 克  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  用水溶解后定容 200 毫升。

(5)pH7.0 缓冲液 8.7 克  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  和 2.4 克  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  混合溶解并定容至 200 毫升。

(6)pH8.0 缓冲液 13.6 克  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  和 0.33 克  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  混合用水溶解后定容为 200 毫升。

(7)pH9.0 缓冲液 0.2M 甘氨酸 50 毫升和 0.2M NaOH 8.8 毫升混合后以水定容至 200 毫升。

(8)pH10.0 缓冲液 0.2M 甘氨酸 50 毫升与 0.2M NaOH 32 毫升混合后定容 200 毫升。

(9)pH11.0 缓冲液 15N 氨水 103 毫升溶于 100 毫升水中, 再加入 1.5 克  $\text{NH}_4\text{Cl}$  以水定容至 250 毫升。

3. 底物配制 同上

4. 10% NaOH 溶液配制 同上

5. 试验步骤 如上述方法操作, 在 15°C 温度下反应 5 分钟。

#### 二、试验结果

试验结果如表 3 和图 3 所示。

表3 PH 对酶活力的效应

PH	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0	11.0
耗氧量 (微升)	0	2.1	31.0	66.1	63.4	45.2	36.0	20.8	9.1	3.0

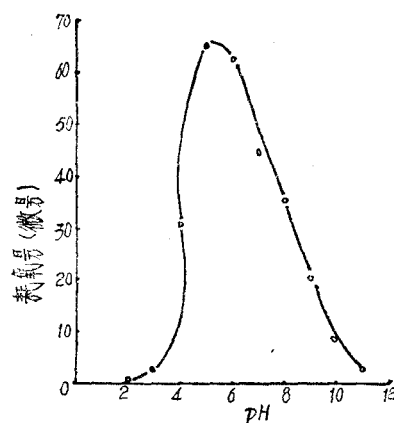


图3 pH 效应

#### 三、考察

pH 在 4.5 到 6.0 的范围内对儿茶酚氧化酶的活力无多大影响, 但在 pH 为 4.5 以下的酸性环境或 pH6.0 以上的碱性环境中, 儿茶酚氧化酶的活力随着 pH 的改变而急剧下降, 当 pH 高达 11.0 或低达 2.0 时, 酶便几乎完全失活, 酸对酶活力的影响更为显著, 酶作用的最适 pH 是 5.0。

#### (五)底物浓度对酶活力的效应

##### 一、材料与方法

1. 酶液制备 配制方法如上。

2. 底物配制 准确称取儿茶酚固体, 分别配制 0.001, 0.002, 0.005, 0.010, 0.015, 0.030, 0.050M 的儿茶酚溶液。

3. 试验步骤 按上述试验步骤,在15°C, pH5.0 下测定不同浓度时的反应速度,反应速度以每分钟吸收氧气的微升数表示。

## 二、试验结果

试验结果如表 4 和图 4 所示。

表 4 底物浓度对酶活力的效应

[底物(儿茶酚)](M)	0	0.001	0.002	0.005	0.01	0.015	0.030	0.05
反应速度(微升 O <sub>2</sub> /分)	0	1.7	2.4	3.2	3.7	3.9	4.1	4.1

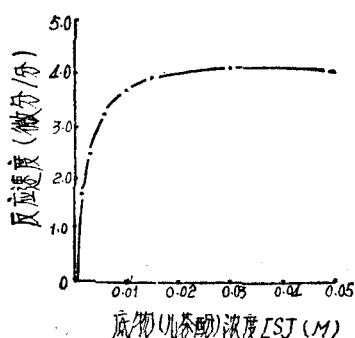


图 4 底物浓度效应

## 三、考察

按动力学规律,在酶浓度和其它条件一定下,较低底物浓度范围内,增加底物浓度,反应速度也随着增加,但底物浓度升高到一定程度后,反应速度就不再提高,对马铃薯的儿茶酚氧化酶来说,当儿茶酚的浓度达到 0.030M 时,酶反应速度就不再有显著提高。

### (六) Km 值的测定

#### 一、材料与方方法

1. 酶液的制备 与反应速度试验所述相同。

2. 底物的配制 分别称取儿茶酚、苯酚和焦性没食子酸,配成下列三种不同的浓度系列:

(1) 儿茶酚溶液: 0.002M, 0.0025M, 0.004M, 0.005M, 0.01M;

(2) 苯酚溶液: 0.02M, 0.025M, 0.04M, 0.05M, 0.1M;

(3) 焦性没食子酸溶液: 0.02M, 0.025M,

0.04M, 0.05M, 0.1M。

3. 试验步骤 按前面所述试验步骤在 15°C, PH5.0 条件下反应 5 分钟,测定耗氧量(微升),以底物浓度 [S] 为横坐标,  $\frac{[S]}{V}$  为纵坐标作图求得马铃薯儿茶酚氧化酶对上述

表 5 儿茶酚氧化酶对三种底物的 Km 值

底物名称	底物浓度 [S] (M)	反应速度 V (耗氧微升/分)	$\frac{[S]}{V}$	Km 值 (M)
儿茶酚	0.002	2.29	$0.83 \times 10^{-3}$	$1.40 \times 10^{-3}$
	0.0025	2.60	$0.96 \times 10^{-3}$	
	0.004	2.96	$1.35 \times 10^{-3}$	
	0.005	3.26	$1.53 \times 10^{-3}$	
	0.01	3.59	$2.79 \times 10^{-3}$	
焦性没食子酸	0.02	1.67	$1.20 \times 10^{-2}$	$3.5 \times 10^{-2}$
	0.025	1.73	$1.44 \times 10^{-2}$	
	0.04	2.56	$1.56 \times 10^{-2}$	
	0.05	2.63	$1.90 \times 10^{-2}$	
	0.1	2.93	$2.96 \times 10^{-2}$	
苯酚	0.02	1.14	$1.71 \times 10^{-2}$	$4.3 \times 10^{-2}$
	0.025	1.27	$1.96 \times 10^{-2}$	
	0.04	1.60	$2.5 \times 10^{-2}$	
	0.05	1.87	$2.67 \times 10^{-2}$	
	0.1	2.50	$4.04 \times 10^{-2}$	

$$\text{依米氏方程 } V = \frac{V[S]}{K_m + [S]}$$

$$\text{取其倒数得 } \frac{1}{V} = \frac{K_m + [S]}{V[S]}$$

$$\text{两边乘以 } [S] \quad \frac{[S]}{V} = \frac{K_m + [S]}{V}$$

$$\text{即 } \frac{[S]}{V} = \frac{[S]}{V} + \frac{K_m}{V}$$

按此即作得图-5

三种底物的  $K_m$  值。

## 二、试验结果

试验结果如表 5 和图 5 所示。

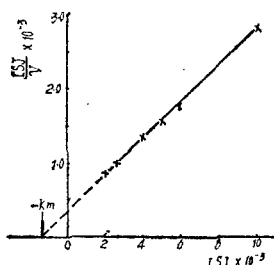


图 5 作用于儿茶酚时的  $k_m$  值

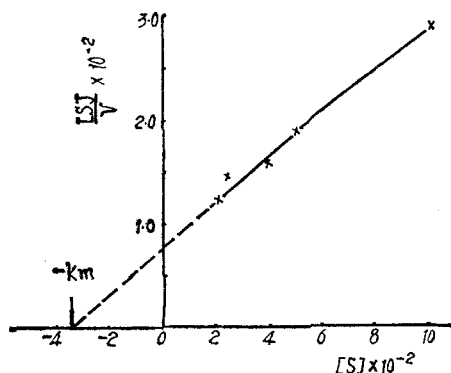


图 5 作用于焦性没食子酸时的  $k_m$  值

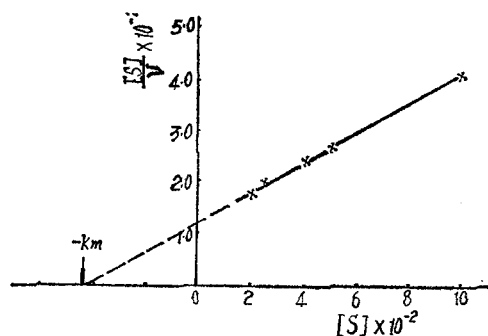


图 5 作用于苯酚时的  $k_m$  值

## 三、考察

米氏常数  $K_m$  为酶  $[E]$  与底物  $[S]$  所生成的中间产物  $[ES]$  的解离常数，即

$$K_m = \frac{[E][S]}{[ES]}$$

$K_m$  值愈小， $[ES]$  解离愈少，也即酶与底物的亲和力愈大，愈易结合，反之， $K_m$  值越大，表示酶与底物亲和力愈小，愈难结合，从本实验结果可知，当酶作用于儿茶酚

时其  $K_m$  值较作用于一元酚（苯酚）及三元酚（焦性没食子酸）时的  $K_m$  值小，表示儿茶酚氧化酶虽然可催化各种酚类的氧化，但与儿茶酚反应最易，速度最快，故其推荐名为儿茶酚氧化酶。

## （六）乙二胺四乙酸钠对酶活力的效应

### 一、材料与方法

切取马铃薯 20 克共五分，分别置于 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5% 的乙二胺四乙酸钠溶液中浸泡 1 小时，沥干水分，然后以前述方法制成酶液，分别放入呼吸仪中与儿茶酚溶液反应 10 分钟，测定其耗氧量（微升）。

### 二、试验结果

试验结果如图 6 和表 6 所示。

表 6 乙二胺四乙酸钠的效应

〔乙二胺四乙酸钠〕(%)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
耗氧量(微升)	64.6	47.7	33.8	13.7	5.1	0

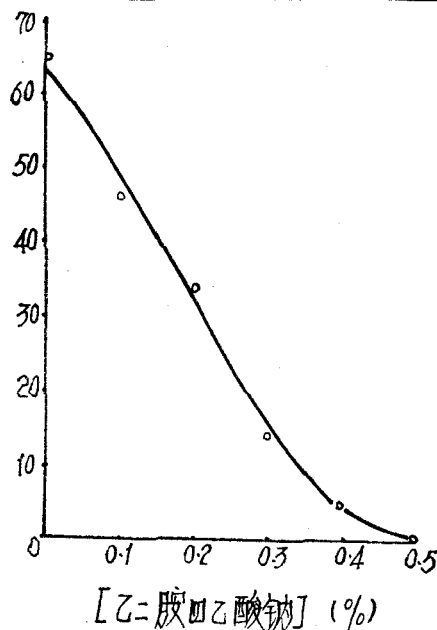


图 6 乙二胺四乙酸钠效应

### 三、考察

实验结果表明，乙二胺四乙酸钠对儿茶酚氧化酶的活力有显著的抑制作用，随着乙二胺四乙酸钠浓度的增加，酶活力逐步下

降，当乙二胺四乙酸钠的浓度达到 0.5% 时，酶的活力便完全丧失。

#### (八) 亚硫酸氢钠对酶活力的效应

##### 一、材料与方法

如上述方法制备酶液，但乙二胺四乙酸钠溶液依次用 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8% 的亚硫酸氢钠溶液代替。同上述方法和步骤一样测定氧的消耗量。

##### 二、试验结果

实验结果如表 7 和图 7 所示。

表 7

亚硫酸氢钠(%)	0	0.2	0.4	0.6	0.8
耗氧量(微升)	65.3	60.5	28.0	7.7	0

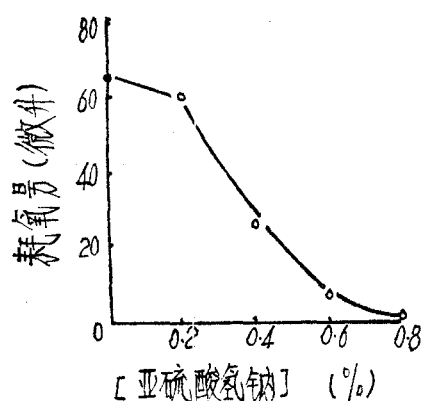


图 7 亚硫酸氢钠效应

##### 三、考察

结果表明，亚硫酸氢钠能抑制儿茶酚氧化酶的活力，随着亚硫酸氢钠的浓度增加，酶活力逐步减弱，当亚硫酸氢钠的浓度达到 0.8% 时，酶便完全失活。

##### (十) 摘要

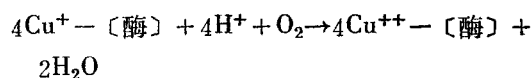
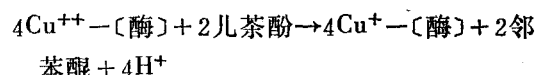
1. 儿茶酚氧化酶是在食品褐变中起主要作用的酶，它催化各种酚类氧化为醌类，再聚合成黑色素。儿茶酚氧化酶与酚类广泛存在于植物中，当植物细胞处于完整状态时，酚和醌之间保持着动态平衡，当细胞壁被破坏之后，空气的氧大量侵入，造成醌的形成和反应之间的不平衡，于是造成醌的大量积

累，从而聚合成黑色素，这就是果蔬加工过程中酶的褐变机理。

根据酶动力学原理， $K_m$  值代表酶与底物结合中间产物  $[ES]$  的解离常数， $K_m$  值越小， $[ES]$  解离越弱，也即底物  $[S]$  与酶  $[E]$  的亲合力越大，酶反应速度就越快；反之， $K_m$  值越大，底物与酶的亲合力就越小，酶反应速度就越慢，酶与不同的底物作用时所表现的  $K_m$  值有所不同，比较同一种酶作用不同的底物的  $K_m$  值，就可以知道该酶的相对专一性，根据本实验的结果，儿茶酚氧化酶虽然对儿茶酚、焦性没食子酸、苯酚的氧化都起催化作用，但对儿茶酚反应的  $K_m$  值最小，因此在测定该酶活力时应以儿茶酚为底物，儿茶酚氧化酶也由此而得到命名。

2. 儿茶酚酶和其他酶一样，对热是敏感的，据文献〔1〕介绍其作用的最适温度是  $22^{\circ}\text{C}$ 。本文以马铃薯的儿茶酚氧化酶为研究对象，其最适温度是  $15^{\circ}\text{C}$ ，在测定酶活力时可采用  $15\sim 22^{\circ}\text{C}$  的范围，当温度高于  $45^{\circ}\text{C}$  时即失活，干燥果蔬时为了防止褐变而将果蔬进行热烫处理，其目的就在于破坏儿茶酚氧化酶。

3. 儿茶酚氧化酶是一种含铜蛋白质，其作用机制在于铜的氧化还原作用



在 pH 低于 2 的酸性环境下，酶中的铜被解离出来与酶分子脱离，使酶失活，酸渍食物之所以不会褐变就是这个道理。

在 pH 高于 11 的碱性环境中，儿茶酚氧化酶也失去活性，这是因为其中的酶蛋白与铜脱离，成为不溶性的氢氧化铜所致。

乙二胺四乙酸钠是金属离子的螯合剂，当它与儿茶酚氧化酶接触时，迅速把铜从酶分子中螯合出来，使酶因失 (下接 12 页)

表2 12种栽培食用菌子实体氨基酸分析结果

(单位: mg/100mg 样品)

品 种	基 质	氨 基 酸																			必需氨基酸量	必需氨基酸%
		天门冬氨酸	苏氨酸	丝氨酸	谷氨酸	甘氨酸	丙氨酸	缬氨酸	蛋氨酸	异亮氨酸	亮氨酸	酪氨酸	苯丙氨酸	赖氨酸	组氨酸	精氨酸	脯氨酸	氨基酸总量				
草 菇	稻 草	2.39	1.23	1.22	4.56	1.11	1.48	1.45	0.25	9.97	1.68	1.02	1.27	1.63	0.55	1.82	0.86	22.99	8.48	36.88		
	麦 秸	2.46	1.38	1.28	4.68	1.18	1.76	1.67	0.32	1.08	1.68	0.96	1.01	1.70	0.57	1.54	1.04	24.31	8.84	36.36		
侧 耳	棉籽壳	1.86	0.78	0.84	2.40	0.76	0.93	1.30	0.42	0.60	1.02	0.55	0.98	0.98	0.39	1.01	0.57	15.39	6.08	40.02		
	棉籽壳	2.01	0.83	0.92	2.83	0.78	1.00	1.65*	0.42	0.61	1.06	0.54	0.61	1.00	0.40	0.97	0.51	16.14	6.18	38.28		
高温侧耳	棉籽壳	1.54	0.88	0.86	3.48	0.77	1.27	1.38	0.33	0.77	1.30	0.56	0.85	0.95	0.41	1.13	0.83	17.31	6.46	37.32		
凤 尾 菇	棉籽壳	1.54	0.88	0.86	3.48	0.77	1.27	1.38	0.33	0.77	1.30	0.56	0.85	0.95	0.41	1.13	0.83	17.31	6.46	37.32		
玉 蕈	棉籽壳	1.88	0.91	0.93	3.08	0.88	1.14	1.72	0.55	0.69	1.16	0.68	1.18	1.00	0.45	1.30	0.71	18.26	7.21	39.48		
构 菌	棉籽壳	1.25	0.70	0.72	2.49	0.68	0.99	1.61**		0.57	1.00	0.45	0.59	0.95	0.42	0.48	0.54	13.44	5.42	40.32		
香 菇	棉籽壳	1.24	0.70	0.74	3.72	0.60	0.76	1.58	0.34	0.40	0.73	0.43	0.61	0.92	0.28	0.64	0.38	13.67	4.88	35.69		
光帽黄伞	棉籽壳	1.79	0.94	0.88	2.87	0.84	1.08	1.31	0.30	0.73	1.09	0.50	0.80	0.64	0.41	0.84	0.76	15.78	5.81	36.81		
双孢蘑菇	粪 草	2.83	1.43	1.28	6.33	1.19	2.31	1.59	0.31	1.06	1.72	0.80	0.99	1.48	0.60	2.04	1.71	27.67	8.58	31.00		
黑 木 耳	柞 木	0.96	0.55	0.49	1.09	0.44	0.77	0.73	0.14	0.38	0.72	0.36	0.47	0.46	0.26	0.43	0.39	8.64	3.45	39.93		
	棉籽皮	1.16	0.71	0.60	1.49	0.53	0.94	0.81	0.21	0.43	0.81	0.42	0.57	0.57	0.35	0.71	0.38	10.69	4.11	38.44		
毛 木 耳	杨 木	0.77	0.47	0.36	0.93	0.37	0.55	0.80	0.04	0.30	0.53	0.32	0.45	0.46	0.21	0.41	0.26	7.23	3.05	42.18		
	棉籽壳	1.06	0.63	0.54	1.34	0.50	0.77	1.03	0.13	0.38	0.72	0.37	0.48	0.62	0.27	0.60	0.45	9.89	3.99	40.34		
猴 头	酒 糟	3.17	1.36	1.19	8.58	1.36	2.17	2.22	0.78	1.07	2.11	0.93	1.36	2.12	0.83	1.61	1.14	32.10	11.12	34.64		
	棉籽壳	2.13	0.94	0.81	4.40	0.86	1.64	2.01**		0.72	1.43	0.59	0.87	1.29	0.52	1.05	0.43	19.69	7.26	36.87		

注: \*含部分胱氨酸

\*\*含少量蛋氨酸

(上接9页) 去铜而丧失活性。

亚硫酸氢钠(或二氧化硫)是还原剂,它使儿茶酚氧化酶的二价铜还原为一价铜,使酶失活,因此也是儿茶酚氧化酶的抑制剂,在果蔬加工中,把果蔬先在亚硫酸氢钠溶液中进行短时间热烫,其目的是破坏儿茶酚氧化酶,使果蔬在加工过程中不致褐变。

4. 本实验表明,儿茶酚氧化酶作用的PH范围较宽,在pH4.5~7.0的环境下,酶活力没有多大变化,最适pH为5.0,在测定儿茶酚氧化酶时可采用pH5.0的缓冲液。

5. 测定儿茶酚氧化酶的活力可采用华勃

氏呼吸仪,底物以儿茶酚尤其方便,按本法测定酶活力的高低反映出食品褐变的速度,可供果蔬加工过程中检测防止褐变工艺的有效程度。

## 参 考 文 献

- (1) B.Sumner ana K.Myrbach: The Enzymes (1955)
- (2) Dixan, webb: Enzymes(1979)
- (3) Metetzier: Biochemistry, the chemical reaction of Living cells(1977)
- (4) A.E 齐齐巴宾: 有机化学基本原理(1958)
- (5) 袁振远、杨李益: 儿茶酚氧化酶的测定 (食品科学, 1982年第10期)