

北蕉葉酪胺酸酶與 *p*-cresol 之動力學分析

吳鴻程¹ 張麗珍² 張瓊文¹ 邱致廣¹ 馮惠萍¹ 晏文潔¹ 林怡伶³ 朱惠鈴^{1*}

¹嘉南藥理科技大學食品科技系

²嘉南藥理科技大學藥學系

³嘉南藥理科技大學化粧品應用與管理系

摘要

本研究擬以北蕉(*Giant Cavendishii*, AAA)葉所含酪胺酸酶為材料，探討其與單酚類基質 *p*-cresol 作用產生遲滯期(lag phase)之動力學關係。北蕉葉之粗抽液經硫酸銨分劃後進行動力學分析，發現影響遲滯期主要因素有酵素與基質濃度、pH 值、添加微量雙酚以及基質配位基之位置特異性；在酵素濃度高、基質濃度低時會使遲滯期時間縮短；於 pH 5.5 時之遲滯期最短；添加微量雙酚也會造成遲滯期縮短之現象，以 *p*-cresol 為基質時分別添加 L-DOPA (L-dihydroxyphenylalanin)、catechol 獲得 K_{act} (雙酚活化常數)分別為 4.45 μ M、1.74 μ M；得知雙酚不同也會影響遲滯期長短，而且 L-DOPA 雙酚活化單酚酶能力低於 catechol；另外基質取代基位置差異亦會影響遲滯期長短，使用 *ortho*-、*meta*-、*para*- 等不同氬取代位置 *cholrophenol* 當基質時，發現遲滯期時間由短至長順序為 *p*-、*o*-、*m*-，同時發現香蕉葉酪胺酸酶可作用具有毒性的氬酚化合物。經由本研究可了解農業廢棄物香蕉葉中所含的酪胺酸酶作用 *p*-cresol 的遲滯期與動力學機制並得知其對單酚基質具有廣特異性，期待將這些特性應用於工業合成及廢水處理。

關鍵詞：酪胺酸酶、北蕉葉、遲滯期、*p*-cresol

*通訊作者：嘉南藥理科技大學食品科技系

Tel: +886-6-2664911 Ext3213

Fax: +886-6-2667321

E-mail: chuhey@mail.chna.edu.tw

前言

酪胺酸酶(Tyrosinase；monophenol，dihydroxy-L-phenylalanine: oxidoreductase，EC 1.14.18.1)活性中心包含銅離子，酪胺酸酶分布很廣由植物、黴菌、動物甚至於人類都有此酵素存在(1,2)。酪胺酸酶為雙功能酵素催化下列兩種反應：(一)單酚(monophenol)基質經由酵素經化作用(hydroxylation)形成雙酚(diphenol)，此反應主要是由單酚酶(monophenolase)催化，並且常有遲滯期(lag phase)出現(3)。(二)由上述反應所產生雙酚(diphenol)經由雙酚酶(diphenolase)作用轉變成醌類(o-quinone)，而雙酚酶與單酚酶最大差異在於雙酚酶不會有遲滯期產生，所以會快速產生醌類，再形成多巴醌(dopachrome)經聚合反應而形成黑色素。酪胺酸酶在食品、工業及醫療方面頗具潛力；在食

品與茶葉、咖啡以及發酵飲料的風味有關(4,5)；在醫療上可以合成 L-DOPA 治療 Parkinson's disease(6,7)；在工業上可合成聚合物或酚類樹脂及應用於工業廢水之處理(8,9)。而這些應用多與酪胺酸酶之單酚作用有關，而近年來有關於酪胺酸酶單酚酶文獻卻相當稀少，且幾乎完全以 sigma 公司出產之洋菇酪胺酸酶進行研究，目前僅有文獻使用與茄子與椶櫚果經部份純化酪胺酸酶做遲滯期動力學及影響因子探討(3,10)，尚未有相關文獻對香蕉葉之酪胺酸酶進行動力學以及影響因子探討；香蕉為南台灣主要農產品，基於材料取得容易且香蕉葉為農業廢棄物，卻富含高活性且穩定之酪胺酸酶(11)，本研究擬由香蕉葉中萃取酪胺酸酶並發現酵素濃度與 pH 值、單酚基質濃度、基質取代基之位

置特異性以及添加微量雙酚都會影響香蕉葉酪胺酸酶之遲滯期以及活性;期待了解香蕉葉單酚作用機制,並希望做為香蕉葉酪胺酸酶在工業或醫學上應用之參考。

材料與方法

藥品與材料

磷酸鉀、p-cresol、catechol 購自於日本,關東化學公司; L-DOPA (L-dihydroxy phenylalanine) 購自於美國 Acrose 公司。硫酸銨、2-chlorophenol (2-CP)、3-CP、4-CP 購自於德國 Merck 公司。其他藥品均為試藥級。本實驗使用北蕉葉(*Giant Cavendishii*, AAA),採自於屏東九如台灣香蕉研究所,採集香蕉葉後經液態氮處理後保存於-80 度冰箱中待用。

酪胺酸酶酵素液之製備:

取香蕉葉液態氮粉末加入 5 倍體積之 25mM 磷酸鉀緩衝液(含 0.1% Triton X-100) pH 6.8, 使用均質機均質 5min 後以細網過濾之,取濾液用高速離心機離心(10000rpm, 30min, 4°C)並取上清液,即為"粗抽液"。再經由 30-75%硫酸銨分劃後(11),經離心(10000rpm, 20min, 4°C)可得沉澱物用少量 25mM 磷酸鉀緩衝液 pH6.8 再溶解,至於透析膜以 25mM 磷酸鉀緩衝液 pH6.8 透析,經透析後,以冷凍乾燥凍乾後為北蕉酪胺酸酶酵素粉末,存於-80 °C 待用。使用時溶於 25mM 磷酸鉀緩衝液 pH6.8 為酪胺酸酶酵素液,以 Lowry 方法測定蛋白質含量及酪胺酸酶酵素活性。

酪胺酸酶酵素活性測定法

以分光光度計測定 o-dopachrome 於固定時間 475 nm 吸光值變化。取 酪胺酸酶 0.1ml (0.02mg / ml) 再與 0.9ml 由 25 mM 磷酸緩衝液 (pH 6.8) 新鮮配製的酚類基質作用混合均勻後,測量酵素性褐變中間產物 o-dopachrome,此物質最大吸收光於波長 475 nm,測 A475 變化(11,12,13)。

lag phase 影響因素之測定

(a)pH 對 lag phase 的影響

酚類基質 p-cresol 溶於 0.2M 之不同 pH 5.5、

6.8、7.5、8.5 (醋酸鈉、磷酸鉀以及 Tris) 緩衝液中,然後取不同 pH 之基質 0.9ml 再加入 0.1ml 酪胺酸酶(0.02 mg / ml)酵素液混合均勻,進行酪胺酸酶之單酚酶遲滯期測定。

(b)基質濃度對 lag phase 的影響

以 25 mM 磷酸鉀緩衝液 pH 6.8 將 p-cresol 配製成不同濃度,然後分別取各種不同濃度基質 0.9ml 再加入 0.1ml (0.02 mg/ml)酵素液混合均勻,進行酪胺酸酶遲滯期測定。

(c)微量雙酚對 lag phase 的影響

取 0.1ml (0.02 mg / ml)酵素液加入 0.88 ml 酚類基質(溶於 25mM 磷酸鉀緩衝液 pH6.8)以及 0.02ml 不同濃度之雙酚化合物(溶於 25mM 磷酸鉀緩衝液 pH6.8 內混合均勻,進行酪胺酸酶遲滯期測定。

結果與討論

本研究採用酪胺酸酶(tyrosinase)活性測定方式,主要利用單酚化合物會先被酪胺酸酶經 hydroxylation 反應將單酚形成雙酚化合物,然後再氧化形成 o-quinone 再轉變為 o-dopachrome,以測定 o-dopachrome 之產量,以 280nm 可測得 o-quinone 變化,應為最適測定波長,但因香蕉葉內含有大量色素再加上酚類化合物苯環結構會造成在 280nm 產生高吸光值干擾;所以採用波長 475nm 之測定法來測定 o-dopachrome 之產量(11,12,13)。因單酚作用形成 o-dopachrome 會出現最初會有一段無法偵測到任何產物時間(0-4 分鐘),而將此間段稱之為"lag phase"(遲滯期)(圖 1),經過此段期間反應曲線出現具有斜率的線性部分可快速產生產物(5-10 分鐘),而此階段的變化值稱之為"steady state rate",大部分酵素以此來表示為酵素活性,但本研究主要探討遲滯期變化所以依照 Orenes-Pinero (2005) 以遲滯期來代表單酚酶活性(10)。

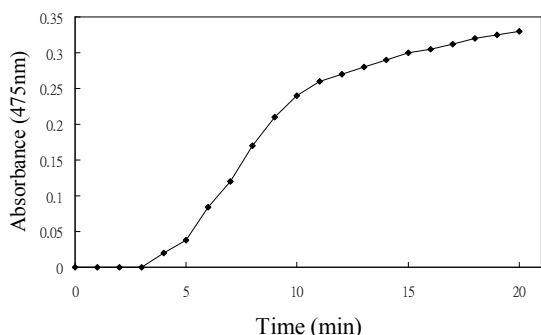


圖 1. 香蕉葉酪胺酸酶與基質(*p*-cresol) 之動力學反應

以單酚基質 *p*-cresol 與北蕉葉酪胺酸酶作用，探討遲滯期變化，發現酪胺酸酶遲滯期的長短會受下列幾個因素影響。

(1)基質濃度對遲滯期的影響：因基質溶解度不同，配製不同濃度 *p*-cresol (0 - 10mM)，以遲滯期為橫軸與基質濃度為縱軸作圖，結果如圖 2，得知北蕉葉酪胺酸酶對 *p*-cresol 基質的反應為基質濃度越高反而遲滯期越長。在椶櫚果中酪胺酸酶也有類似的現象，作者推測於反應中單酚基質濃度增加時會促進酪胺酸酶產生高比例 Emet (dead-end enzyme complex form) (10)，使得酵素活性大為下降，由此可知進行酪胺酸酶單酚酶活性時與一般酵素活性測定不同，一般酵素與高濃度基質反應速率越快，但欲偵測單酚酶活性不宜使用高濃度基質，否則基質濃度越高，遲滯期就越長，反而因遲滯期太長不易偵測酪胺酸酶單酚酶活性。

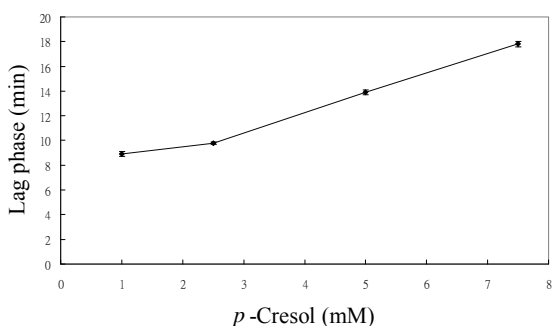


圖 2. 基質濃度對香蕉葉酪胺酸酶遲滯期的影響

(2)酪胺酸酶濃度對遲滯期的影響：改變不同酵素濃度測定單酚酶遲滯期，並以遲滯期時間對酵素濃度作圖，結果如圖 3 所示，當酵素濃度越高遲滯期

就越短。Orenes-Pinero 提出不同酪胺酸酶酵素來源含 Eoxy (active form) 的比例大約為 2-30% (10)，所以當酵素濃度越高時，相對的具高活性 Eoxy 比例就越高，所以遲滯期會減短。

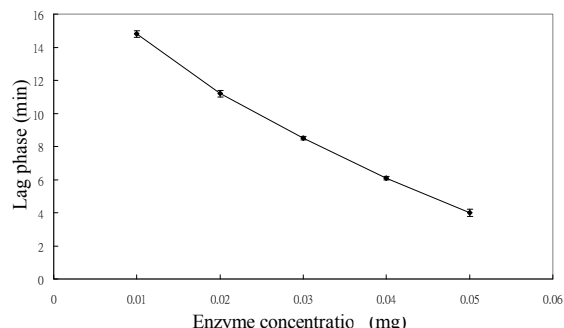


圖 3. 酵素濃度對香蕉葉酪胺酸酶遲滯期的影響

(3)pH 對遲滯期的影響：將基質 *p*-cresol 分別溶於 5.5、6.0、6.8 以及 7.5 緩衝液，以遲滯期時間對 pH 作圖，結果如圖 4，得知以 *p*-cresol 為單酚基質時，在 pH 5.5 時其遲滯期最短，此現象與茄子酪胺酸酶(3)有類似的情況；得知 *p*-cresol 單酚基質中，在 pH 偏鹼時，雖然遲滯期不是最短，但 Steady-state rate 都較高(data not shown)；由上述實驗結果，我們推測在酸或鹼環境下，酵素活性部位可能出現去質子化 / 質子化(deprotonation / protonation)現象，造成酵素構形改變，更容易與單酚基質上的 -OH 基相結合，使得單酚容易產生羥化反應，造成遲滯期縮短。

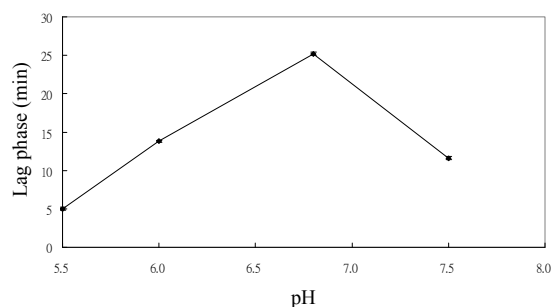


圖 4. pH 對香蕉葉酪胺酸酶遲滯期的影響

(4)微量雙酚對遲滯期的影響：有文獻提出添加還原劑或者加入雙酚當共基質(cosubstrates)可減短遲滯期時間；於單酚基質 *p*-cresol 分別加入兩種不同雙酚 L-DOPA、catechol，得知添加雙酚濃度越高，

遲滯期越短。以 Carmona 提出方程式可得到 Kact 值(雙酚活化常數) (3):

$1/l = 1/L + 1/L * [o\text{-diphenol}] / Kact$ 此方程式中 l 表示有 o-diphenol 存在之遲滯期, L 表示缺乏 o-diphenol 存在時遲滯期, Kact 表示雙酚活化常數; Kact 值越小, 表示雙酚催化單酚酶化的能力越佳。以遲滯期時間倒數與雙酚濃度作圖, 結果如圖 5, 所得到的直線利用外插法延伸交至 X 軸上所得的值即 X 截距即為 "-Kact", 利用線性方程式 ($Y = 0.0072X + 0.0321$; $Y = 0.035X + 0.0609$) 求得 X 截距, 得知以 L-DOPA 及 catechol 當雙酚催化劑時 Kact 值分別為 4.45 及 1.74 μ M 可知雙酚催化單酚酶化的能力 catechol 大於 L-DOPA。

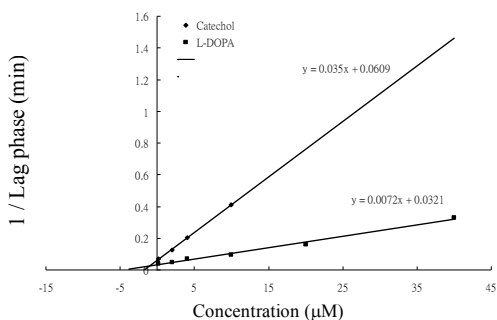


圖 5. 微量雙酚對香蕉葉酪胺酸酶遲滯期的影響及雙酚催化活性的評估

(5)單酚取代基位置對遲滯期的影響:分別使用不同取代基位置的單酚, 由表一比較 *ortho*-chlorophenol (2-CP)、*meta*-chlorophenol (3CP)、*para*-chlorophenol (4-CP) 及 *para*-cresol 這些單酚基質發現遲滯期時間長短與 steady-state 反應速率的結果相似, 遲滯期由短至長的順序為 *p*-cresol < *p*-chlorophenol < *o*-chlorophenol < *m*-chlorophenol ; 由上敘的結果推論取代基位置對遲滯期有很大的影響。發現單酚化合物中取代基接於 *ortho*-、*meta*-位置時, 遲滯期會延長, 可能是酪胺酸酶作用單酚經酶化作用轉變成雙酚時, 接於 *ortho*-、*meta*-位置取代基會造成酵素進行酶化的立體障礙, 使酵素不易將-OH 基接至單酚的 *ortho*-位置, 所以造成遲滯期延長; 在 *para*-位置則不易形成立體障礙形成 *o*-quinone, 使遲滯期較短。由表一可知北蕉酪胺酸酶可作用多種的酚類化合物其基質特異性很廣。Hakki 等人(14) 利用

香蕉皮組織中酪胺酸酶固定於玻璃碳電極, 製成生物感應器可偵測酚類化合物, 可測量飲料中的總多酚類含量不受酒精及糖份的干擾, 另 Lidiane 等人 (15)也利用香蕉果實中酪胺酸酶製成電化學生物感應器可以偵測腎上腺素濃度應用於醫療上。

表一. 不同單酚類取代基團對香蕉葉酪胺酸酶遲滯期的影響

Substrate	Structure	Lag phase (min)
<i>p</i> -Cresol		9
<i>p</i> -Chlorophenol		10
<i>m</i> -Chlorophenol		78
<i>o</i> -Chlorophenol		43

結論

由上述實驗結果得知, 北蕉酪胺酸酶作用單酚基質所產生的遲滯期會受到基質與酵素濃度、pH 值及微量雙酚等因素的影響, 同時也明瞭北蕉酪胺酸酶有作用多種酚類基質特性, 其基質特異性很廣, 在紡織或造紙等工業排放廢水中含多量的酚類, 可由農業廢棄物香蕉葉得到大量高活性且高穩定性的酪胺酸酶, 可轉換工業廢水中酚類減少環境污染或用來製作酚類的生物感應器應用於食品或醫療上。

參考文獻

1. Sánchez-Ferrer A., Rodríguez-López J.N., García-Cánovas F., García-Carmona F. (1995),

- Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta* 1247, 1-11.
2. Olivares C., Solano F.(2009), New insights into the active site structure and catalytic mechanism of tyrosinase and its related proteins. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2009 Dec;22(6):750-60.
 3. Pérez-Gilabert M., and García Carmona F. (2000), Characterization of catecholase and cresolase activities of eggplant polyphenol oxidase. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48, 695-700.3.
 4. Seo S.Y., Sharma V.K., Sharma N. (2003), Mushroom tyrosinase: recent prospects. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, 2837-2853.
 5. López-Nicolás JM, Pérez-López AJ, Carbonell-Barrachina A, García-Carmona F. (2007) Kinetic study of the activation of banana juice enzymatic browning by the addition of maltosyl-beta-cyclodextrin. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55, 9655-9662.
 6. Min K., Park D.H., Yoo Y.J. (2010), Electroenzymatic synthesis of L-DOPA. *Journal of Biotechnology*. 2010; 146:40-44.
 7. Krishnaveni R., Rathod V., Thakur M.S., Neelgund Y.F. (2009), Transformation of L-tyrosine to L-dopa by a novel fungus, *Acremonium rutilum*, under submerged fermentation. *Current Microbiology* 58: 122 -128.
 8. Loncar N., and Vujcic Z. (2011), Tentacle carrier for immobilization of potato phenoloxidase and its application for halogenophenols removal from aqueous solutions. *Journal of Hazard Material*, 196:73-78.
 9. Kameda E, Langone M.A., Coelho M.A. (2006), Tyrosinase extract from *Agaricus bisporus* mushroom and its in natura tissue for specific phenol removal. *Environmental Technology*. 11: 1209-1215.
 10. Orenes-pinero E., García-Carmona F, and Sánchez-Ferrer A. (2005), A kinetic study of p-cresol oxidation by quince fruit polyphenol oxidase. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 1196-1200.
 11. Chu. H. L., Yeh D. B. and Shaw J. F. (1993), The Biochemical properties of polyphenol oxidase from banana leaf. *Botanical Bulletin Academia Sinica*. 34: 169-174.
 12. Chu H. L., B.S. Wang, and P.D. Duh. (2009), Effects of selected organo-sulphur compounds on melanin formation, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57, 7072-7077.
 13. Duh P.D., Chen Z.T., Lee S.W., Lin T.P., Wang Y.T., Yen W.J., Kuo L.F., Chu H.L. (2012), Antiproliferative Activity and Apoptosis Induction of *Eucalyptus Citriodora* Resin and Its Major Bioactive Compound in Melanoma B16F10 Cells. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 60:7866-72.
 14. Ozcan H.M., Sagiroglu A.(2010), A novel amperometric biosensor based on banana peel (*Musa cavendish*) tissue homogenate for determination of phenolic compounds. *Artificial Cell Blood Substitutes and Biotechnology*, 38: 208-214.
 15. Mataveli L.R., de Jesus Antunes N., Brigagão M.R., de Magalhães C.S., Wisniewski C., Luccas P.O. (2010) Evaluation of a simple and low cost potentiometric biosensor for pharmaceutical and in vivo adrenaline determination. *Biosensors and Bioelectronics*, 26 : 798-802.

A kinetic analysis of *p*-cresol oxidation by banana leaf tyrosinase

Horng Cherng Wu¹ Li Chen Cheng² Lee Wen Chang¹ Chih Kwang Chiu¹
Heuy Ping Feng¹ Wen Jye Yen¹ Yi Ling Lin³ Heuy Ling Chu^{1*}

¹Department of Food Science and Technology,

²Department of Pharmacy,

³Department of Cosmetic Science,

Chia-Nan University of Pharmacy and Science, Tainan, Taiwan 71710, R.O.C.

Abstract

This kinetic analysis of *p*-cresol by tyrosinase was investigated in this study. The tyrosinase used in this study was extracted from the leaf of banana (*Giant Cavendishii*, AAA) and partially purification by ammonium sulfate fractionation. The activity was determined by a lag period, that duration depended on the monophenol and its concentration, as well as enzyme concentration, pH, and the presence of catalytic amounts of diphenol. Moreover, the lag phase decreased with increasing diphenol concentration, it was possible to evaluate K_{act} , the activation diphenol constant, which showed a value of 4.45 μ M toward L-DOPA and 1.74 μ M for catechol. Substitution of chlorine at different position of phenol was exhibited different hydroxylation rate with an order of *para*>*ortho*>*meta*. The results from this study indicates that banana leaf tyrosinase exhibit wide substrate specificity toward monophenol, making its potential in medical and industry.

Key words: tyrosinase, banana leaf, lag phase, *p*-cresol

*Correspondence: Department of Food Science and Technology, Chia-Nan University of Pharmacy and Science, Tainan, Taiwan 71710, R.O.C.

Tel: +886-6-2664911 Ext3213

Fax: +886-6-2667321

E-mail: chuheuy@mail.chna.edu.tw