

植物中多酚氧化酶的特征^{*}

雷东锋 冯 怡 蒋大宗

西安交通大学生命科学与技术学院, 西安 710049

摘要 多酚氧化酶(简称 PPO)是核基因编码的专一性质体铜金属酶, 由于它的酶促褐变往往导致一些植物经济价值的下降, 且与植物对病害、伤害和虫害的防御等生理功能息息相关, 因而一直成为人们研究的热点. 文中对近年来 PPO 研究进行了总结、分析和讨论, 包括其分子生物学特征, 基因表达及活性酶的形成, 酶的潜伏性, 有关催化机理, 在环保和医药上的应用等, 提出了一些新概念, 建立了相应的理论, 指出了 PPO 研究的热点领域, 并展望未来的研究领域.

关键词 多酚氧化酶(PPO) 铜金属酶 潜伏酶 酶促褐变 植物抗性 生物合成

多酚氧化酶(polyphenol oxidase, 简称 PPO EC1. 14. 18. 1)是植物体中广泛分布的核基因编码的质体铜金属酶. 由于与植物的酶促褐变密切相关, 并会降低植物的经济价值, 因此 PPO 的研究一直比较活跃, 其研究大多集中在植物中有经济价值的部分以及经济价值丧失有关的过程中^[1~11]. 近年来, PPO 研究的主要成果可以概括为以下几个方面: PPO 的克隆^[10, 11], PPO 的生化特征及其活性控制^[12~15], 潜伏 PPO 的诱导和活化^[16, 17], PPO 的生理功能^[18~20], PPO 的催化机制^[21, 22]以及 PPO 的应用^[23~25]等方面, 本文在回顾和总结近年来 PPO 研究主要成果的基础上, 指出了 PPO 最新的研究热点, 建立了一些有肯定性的理论, 并对其未来的研究进行展望.

1 多酚氧化酶的分子生物学研究

1.1 植物中 PPO 基因的克隆及多基因家族

许多植物如中国木瓜、荔枝、茶树、甘薯^[26]、西红柿、蚕豆、马铃薯、葡萄、菠菜、美洲商陆、苹果、甘蔗、烟草、杏、梨、桃、日本枇杷、中国等的一些 PPO 基因都已被克隆; 近年来, 又从

甘薯^[27]、杂交杨(Hybrid Poplar)、香蕉^[28]、菠萝^[29]、咖啡^[30]等植物中克隆了一些新的 PPO 基因. 从已经克隆的 PPO 基因来看, 它们绝大多数属于多基因家族. 如西红柿的第 8 号染色体上就含有 7 个 PPO 基因^[31]; 马铃薯中也至少有 6 个不同的 PPO 基因^[32, 33]; 在扁豆中, 存在 3 个 PPO cDNA 克隆^[34]; 小麦中有 2 个 PPO 基因^[35]; 香蕉中也至少存在 4 个 PPO 基因^[28]. 但是, 并非所有植物 PPO 基因都属于多基因家族, 葡萄藤中就仅发现 1 个 PPO 基因^[36]. 目前已经在香蕉中获得了含有内含子的 PPO 基因克隆^[28], 改变了人们曾普遍认为 PPO 基因中没有内含子的观点. 尽管目前还没有 PPO 沉默基因的报道, 但从理论上, 由于内含子的存在, PPO 基因具有因含有插入序列而导致沉默的可能, 从而难以获得全部 cDNA 克隆, 因此 PPO 的多拷贝基因的数量可能比所获得的克隆数量稍多.

1.2 PPO 基因表达的时空差异性

不同植物的 PPO 基因具有不同的表达模式, 在同一植物体内也存在着不同的信号传导途径和反式作用因子来开启不同的 PPO 基因, 使 PPO 家族中的基因在不同条件下选择性地表达, 在植物的不同

2003-06-17 收稿, 2003-11-24 收修改稿

^{*} 西安交通大学博士后基金资助(项目编号: BH2002006)

组织, 不同器官或同一器官的不同发育阶段, PPO 基因家族中的基因开启和关闭以及表达量都存在差异^[37, 38], 表现出不同的时空表达模式^[39]. 不仅如此, 不同 PPO 基因所形成的同工酶由于其不同的生化特性和体内功能而呈现出发育上的特异性^[40]. PPO 基因家族成员表达的这些时空差异性和多样性是 PPO 基因表达的显著特征, 它保证了植物对发育过程中各种因子做出反应^[39], 也保证了 PPO 在细胞生命活动中充当各自不同的作用, 以满足植物体复杂、多变的生理活动.

1.3 PPO 的分子结构

PPO 基因在细胞质中合成含有转运肽的前体肽, 分子质量一般为 60~75 ku, 随后前体肽被转运肽转运至质体的内囊体膜上, 并被分解成分子质量约为 45~69 ku 的成熟肽. PPO 前体肽由 N 端延伸区、催化单元和 C 端延伸区组成, 其中 N 端的转运肽负责前体肽向叶绿体中的运输, 而催化单元则包括两个含铜的高度保守区 CuA 和 CuB. 对多种植物 PPO 的序列^[29, 41] 分析后可以看到, 各种植物 PPO 序列的两个铜保守区有着高度的同源性, 这是维持 PPO 活性中心所必需的.

Gerdemann 等在成熟的儿茶酚氧化酶和章鱼血蓝蛋白 3D 结构的基础上, 建立了红芋中潜伏儿茶酚氧化酶前体肽的立体结构模型^[42, 43]. 在红芋 PPO cDNA 克隆的 C 末端延伸肽上存在 3 个组氨酸残基和起阻断作用的亮氨酸 (Leu439), 它们可能导致对活性中心的屏蔽作用, 使前体肽不具酶活性而以潜伏形式存在. 但是, 在成熟的儿茶酚氧化酶中, 由于延伸肽被切断, 解除了其对活性中心的屏蔽作用, 使得成熟肽具有酶活性. 在该晶体结构模型中, 成熟肽的晶体结构和延伸肽之间存在大约 35 个氨基酸残基的区域 (342~374), 它们的功能尚不清楚, 但是这个区域增加了儿茶酚氧化酶立体结构的可塑性, 可能在没有断裂的情况下解除延伸肽对活性中心的屏蔽, 起到活化前体肽的作用.

2 植物中 PPO 的生化特征及生理功能

2.1 植物中 PPO 的生化特征及活性控制

目前, 对经济植物 PPO 的生化特征的研究仍十分活跃^[44~49]. 主要包括分子量、一定底物下的最

适 pH 值和最适温度、热稳定性、底物及底物专一性、活性影响因素、 K_m 值、 K_i 值及抑制剂的抑制情况等. 总览现有的研究成果, 植物 PPO 的分子质量一般在 40~45 或 60 ku, 也有报道指出有的 PPO 的同工酶分子质量为 70 ku; 最适 pH 在 4.5~8 之间, 且大多呈现酸性; 最适温度一般为 30℃, 或者 25℃^[12, 13]. 可以认为, 不同植物的 PPO 以及同一植物基因家族中不同 PPO 基因的表达产物, 它们的生化特征会有所不同. 不仅如此, 采用一系列色谱分离技术从一些植物中分离出的 PPOI, PPOII 两种组分的生化特征或含量也存在差异, 比如三叶胶树中 PPOI 和 PPOII 的等电点、最适 pH 值和最适温度虽然相同但分子质量却分别为 32 和 34 ku^[50]; 烟草中的 PPOI 以邻苯二酚为底物, 最适 pH 为 7, 而 PPOII 的最适 pH 则是 6, 且 PPOI 含量为 PPOII 的 10 倍^[51].

从现有的 PPO 活性控制的手段来看, 可将其分为化学抑制, 物理控制和分子生物学方法 3 种. 化学抑制一般采用化学抑制剂或者植物激素^[49, 52, 53], 常规的抑制剂包括铜试剂、硫脲、EDTA、巯基乙醇、亚硫酸钠、柠檬酸等, 适宜浓度下, 一般都具有较好的抑制效果. 此外为了更加有效地控制 PPO 活性, 人们还从植物中寻找一些具有抑制效应的天然物质如: 果仁糖^[54]、皂角苷和三萜系配糖^[55]、谷胱甘肽^[5]、环庚三烯酚酮的类似物、含羞草酸^[56]、内源抗氧化剂^[14]、 β -环式糊精^[15, 57]、L-抗坏血酸-2-三磷酸盐^[13]、山梨酸、安息香酸、苯乙烯酸^[57]、金针菇提取物^[58] 等等, 这些天然抑制物在达到较好抑制效果的同时, 还避免了化学试剂所引起的污染. 此外, 人们还试图合成一些 PPO 竞争性抑制剂来专一性地控制 PPO 活性, 如: 4-羟基苯甲酸酯^[56]. 物理控制 (如改变贮藏环境中的气体成分^[48]、热处理、高压灭菌、辐射、超声处理等) 与化学抑制手段相比, 专一性比较差, 但是由于其可以避免化学抑制物带来的污染, 因此往往作为一种辅助手段和化学抑制结合使用^[59, 60]. 分子生物学方法一般包括反义 RNA 抑制^[61] 和转基因抑制等, 如 Bachem 等利用转基因技术阻碍了 PPO 基因的表达并获得了 PPO 活性较低的土豆品种^[62]; Coetzer 在土豆中使用正义和反义 RNA 技术成功地降低了 PPO 活性, 控制了褐变^[61]. 但由于 PPO 涉及植物

的抗病和抗虫等生理活动, 利用反义 RNA 技术虽然降低了 PPO 活性, 也增加了该种植株对病害和虫害的敏感性^[63], 因此, 有潜力的方法仍应该是继续发展分子技术来控制 PPO 活性^[64]. 此外, 还有一些特殊情况, 比如: 叠氮化合物对 Cu 酶一般具有抑制效应, 但是, 叠氮化物却可以诱导烟草 PPO II 中的 Cu 生成过氧化氢酶-PPO II 复合物活性中心中 Cu 的存在形式—— $\text{CuO}_2^{2-} \text{Cu}$, 从而活化烟草中的 PPO II^[65]. 因此, 选用抑制剂应具有针对性, 并建立在充分的实验基础上.

2.2 植物中 PPO 可能的生理功能

一般认为, PPO 在植物抗病中起着重要作用, 有 4 个方面的间接证据支持这种观点: (1) PPO 氧化生成的 *o*-醌次级产物形成的黑色素集结, 形成可以阻碍感染的痂^[66]; (2) *o*-醌与植物蛋白键合可以降低亲核氨基酸的营养价值^[67]; (3) *o*-醌类物质具有抑制细菌繁殖的作用^[68]; (4) PPO 的活性在不相容反应中增加^[36]. 虽然有许多报道认为当植物受到伤害、病害和虫害时 PPO 活性增加, 但 PPO 如何在伤害和病害诱导中起作用及其防御机制还都不清楚, 因此, 要弄清 PPO 在抗性过程中的具体生理功能, 必须先搞清楚植物对病虫害及机械伤害的防御机制, 含有抗性基因的转基因植物是未来研究 PPO 的防御机制比较理想的材料. 同时, 人们还发现了 PPO 的一些其他功能, 如在马齿苋属植物和红色甜菜植物中, 酪氨酸酶参与 β -花青素的生物合成; 黄色金鱼草花中的查耳酮专一性 PPO 则参与橙酮的合成^[69]. PPO 还可作为一种氧化还原酶在光合作用中调节叶绿体中有害的光氧化反应速度并参与其电子传递^[70, 71]和叶绿体内的能量转换. 此外, PPO 还与植物的生长发育过程(如根的形成)以及乙烯的形成有一定联系^[72].

3 植物中多酚氧化酶的诱导和潜伏性

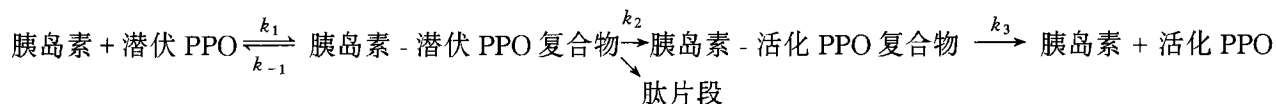
3.1 多酚氧化酶的诱导

PPO 在植物中以潜伏形式存在, 与叶绿体膜紧密结合. 潜伏形式的 PPO 通常在成熟、衰老或胁迫条件下, 由于膜受到伤害而活化, 并导致 PPO 活性增加.

就形成方式而言, 可将 PPO 分为组成型 PPO 和诱导型 PPO, 组成型 PPO 在植物细胞内本身就存在而无需靠诱导形成^[29, 73], 而诱导型 PPO 则是经过某些诱导因素诱导才能形成的, 这些诱导因素包括外界病原物感染、植食性昆虫、伤害、化学刺激, 甚至周围受伤害和虫害的植物所释放的物质^[74, 75]等. 诱导因素可通过激活 PPO 基因使其表达, 从而促进 PPO 从头进行合成, 也可通过改善 PPO 原有活性^[37], 或活化潜伏 PPO 的方式使植物体内 PPO 的活性或者表达量显著提高. PPO 可按被诱导 PPO 的分布范围将其诱导形式分为系统性诱导和局部性诱导. 前者指诱导后的 PPO 可以分布在直接受诱导部位以外的部位, 如西红柿中的 PPO 在受到伤害诱导后, 7 个 PPO 基因中一个基因的启动子的顺式作用元件对伤害的信号作出反应, 从而系统地产生出 PPO^[30, 37, 73]. 而后者指诱导的 PPO 仅在受诱导部位出现, 如咖啡豆中的 PPO 在受到伤害后, 只在受伤部位枝条的叶子上诱导形成, 在其他枝条的叶子中则不诱导形成有活性的 PPO. 一般情况下, 诱导型 PPO 充当防御性抗营养蛋白的功能, 而组成型 PPO 具有防御昆虫进攻的作用^[76].

3.2 潜伏酶的活化

植物中的 PPO 潜伏酶可以因盐处理、伤害、酸碱刺激或尿素、脂肪酸、去垢剂^[77]、蛋白酶、胰岛素^[40, 78]、胰液素^[3]和酸性 pH^[79]等刺激而活化. 这些因素一般是通过增溶作用, 同工酶的互变, 修饰作用如分子间二硫桥的作用, 糖基化作用和酚类配糖物的结合^[80, 81], 以及酶抑制剂复合物的分离和酶蛋白的水解^[30]等来使酶构象发生变化从而活化潜伏的 PPO. 几乎所有活化因素对 PPO 的活化都是采用不同的方法通过解除对活化中心的屏蔽来实现的, 而红薯中建立起来的 PPO 前体肽的立体结构模型似乎可以解释 PPO 的活化机制. 在该模型中, 红薯 PPO 前体肽 C 末端存在着约 32 个氨基酸残基的延伸区域, 它屏蔽 PPO 的活性中心, 是酶保持潜伏性的重要原因. 胰岛素、胰液素、蛋白酶水解通过分解掉 PPO C 末端的延伸区域, 解除其对活性中心的屏蔽作用, 并最终活化潜伏酶. 胰岛素水解活化潜伏 PPO 的动力学机制^[3]如下式所示, 胰岛素与潜伏酶结合生成中间产物并释放小肽, 最终使潜伏酶变为活性酶.



SDS 有可能通过改变屏蔽区域的位置解除屏蔽作用, 从而使得底物可以靠近活化中心来活化植物中潜伏形式的 PPO^[42]. pH 对酶的活化现象也早已被人们所认知. 一般认为 pH 值对 PPO 的活化也是通过改变酶的构象实现的, 这是因为 pH 改变时, PPO 蛋白的电泳迁移率和蛋白质的 Stokes 半径发生了变化, 从而暗示了 pH 可能通过改变 PPO 构象活化 PPO. 此外, pH 可以影响潜伏 PPO 活化动力学特征的研究也为 pH 改变潜伏 PPO 构象变化从而活化潜伏 PPO 提供了间接证据^[82], 但是, 却一直没有获得 pH 影响 PPO 构象的直接证据. 最近有人采用了一系列色谱技术成功地从烟草中分离出了 PPO I 和 PPO II, 观察了不同 pH 值下 PPO II 的 FT-IR 光谱, FSD (Fourier self-deconvolution) 和二阶导数光谱(second-derivative spectrums)这 3 种光谱学的特征变化, 发现在 pH=10 时比 pH=3 时 β -转角的比例和无规则卷(random coil)的比例有所增加而 α 螺旋和反平行 β 折叠(anti-parallel β -sheet)的比例却有所减小^[83], 这为 pH 可以影响 PPO 的二级结构从而在活化中起作用提供了直接证据. 西红柿中的 PPO 在受到伤害诱导后, 7 个 PPO 基因中一个基因的启动子的顺式作用元件对伤害的信号作出反应, 从而系统地产生出 PPO, 这表明伤害可以使植物 PPO 基因从头开始合成新的 PPO 酶, 从而增加 PPO 活性^[30, 37, 73], 但是伤害情况下 PPO 活性的增加既有 PPO 从头合成而引起活性增加的可能, 也有通过原有潜伏 PPO 活化而导致酶活性增加的可能, 还可能两者兼而有之, 这似乎要取决于不同的植物以及受伤害的类型^[76]. 但是由于伤害是 PPO 活性增加的间接原因, 还没有获得它通过改变 PPO 构象而活化潜伏 PPO 的直接证据.

纯化过程对 PPO 活化的作用也引起了人们的注意. 一方面, 人们发现随着纯化的进行, 酶活性逐渐增加, 潜伏酶逐渐被活化^[84], 而另一方面, 也有人注意到 PPO 的潜伏程度随着其纯度的增加而增加^[82]. 这其实并不矛盾, 由于潜伏形式的 PPO 容易被活化, 因此在提取过程中, 随着潜伏酶被活化, 有活性的酶和新活化的酶共同存在从而表现为

PPO 活性逐渐增强, 这是人们以前的普遍认识. 但是, 随着纯度的增加, 一旦潜伏形式的 PPO 与具有活性的 PPO 被分开, 以及活化因素的干扰被排除, 经过纯化的潜伏形式的酶随着纯化程度的提高就逐渐表现出较明显的潜伏酶的特点, 且潜伏性也逐渐增强, 而不呈现潜伏酶逐渐活化的现象.

3.3 潜伏酶的动力学特征

由于植物中潜伏 PPO 往往和具有活性的组成型 PPO 共同存在, 且提取过程往往会使潜伏形式的酶活化, 所以潜伏酶的动力学特征长期未被较深入地研究. 最近 Chazarra 采用一系列色谱技术获得了高度纯化的潜伏形式的 PPO, 研究了不同纯化程度下, 潜伏 PPO 动力学特征以及 pH 和 SDS 两种活化因素的影响. 研究发现在不同纯化程度下, PPO 的动力学行为、潜伏酶的滞后时间均有所变化. PPO 粗提液的催化反应不具有迟滞效应, 反应速度与底物浓度呈双曲线关系, 底物对迟滞效应的影响不明显, 随着纯化程度的提高, 反应速度与底物浓度之间的关系则逐渐呈现 S 型曲线, PPO 酶逐渐表现出了越来越明显的迟滞效应, 底物对迟滞性的影响也越来越敏感. 在初步纯化的酶液中, 底物浓度较小时, PPO 不表现出迟滞效应, 而在高度纯化的酶液中, 在较低底物浓度下 PPO 也会表现出较为明显的迟滞效应, 同时, 一定范围内, 高度纯化的潜伏酶对底物的亲和力会随着底物浓度的增加而增加, 底物可以诱导潜伏酶发生缓慢的异构化作用, 而向催化活性更高的形式转变, 呈现出底物对潜伏酶的正协同性^[82].

pH 和 SDS 都可以使酶的存在形式朝着活性高、与底物亲和性强的方向转化. 在一定浓度范围内, 随着 pH 的增加, 酶的潜伏效应逐渐明显, 不仅如此, 底物所诱导的酶的构象转变, 对 pH 也很敏感, 一定范围内, H^+ 离子的增加可以促进酶的异构化, 并促进其向与底物亲和力增强的形式转变, H^+ 也许是作为特殊类型的变构受动器(effector), 它往往会导致变构酶一些调节特性如酶对变构受动器的敏感性和对变构耦联剂诱导下的动力学协同性的敏感

成相应的醌(dopaminequinone-H⁺)的过程中同时促进 SAL 被共氧化成为 SAL-o-quinone. 而 SAL 还可以反过来再促进 PPO 催化多巴胺氧化成其相应的醌(dopaminequinone). 因此可以认为这是一种新的动力学协作机制: 在 PPO 催化一个多酚类底物(如 salsolinol)生成相应醌类物质的同时, 若向体系中加入另外一种酚类物质, 如多巴胺, 该酚类物质不作为竞争性抑制剂出现, 反而可促进 PPO 催化原酚类物质(如 salsolinol)氧化为其相应的醌并出现了相互促进氧化作用的现象, 这种互相促进氧化作用的机制我们将其称作“动力学协作”机制. 香蕉的果肉在后衰期, 酚类物质 SAL (salsolinol)的含量增加, 可是 PPO 的含量和酚类物质多巴胺的含量却下降, 果肉褐变反应的发生正是在 PPO 含量较低的情况下通过这种共氧化及协作机制使 SAL 和多巴胺共氧化成其相应醌并形成色素的同时, 降低了多巴胺的含量. “动力学协作”机制催化模式如图 3 所示, PPO 通过 E_{met} , E_{deoxy} , E_{oxy} 3 种形式的相互转化, 实现了 D 氧化生成 DQ 和 SAL 氧化生成 SAL-Q 两个过程的相互促进作用. 如图 3, 步骤 1 和步骤 3 是 D 转化成 DQ 的过程, 步骤 2 和 4 是 SAL 转化成 SAL-Q 的过程. E_{oxy} 和 E_{met} 两种酶形式可以与二元酚结合, 并催化 D 氧化成 DQ 和 SAL 氧化成 SAL-Q, E_{deoxy} 可以与氧气结合, 变为氧化态 E_{oxy} . 其中 E_{met} 为活性酶的中间态, E_{deoxy} 为酶的去氧化态, E_{oxy} 为酶的氧化态.

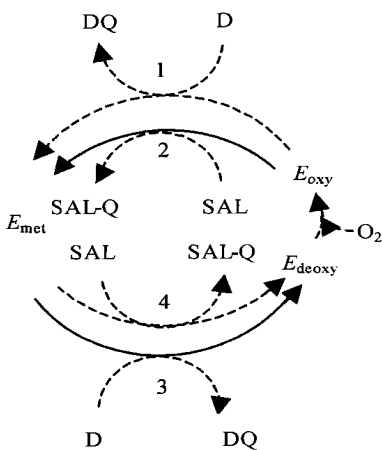


图 3 动力学协作机制催化模式图^[90]

D, 多巴胺; DQ, 多巴胺醌; SAL, salsolinol 酚; SAL-Q, SAL 醌; E_{met} 催化多巴胺为其相应醌的酶形式; E_{deoxy} 为去氧化形式的酶; E_{oxy} 为氧化形式的酶

5 展望

用 PPO 活性控制抑制酶促褐变提高植物经济价值是人们长期关注的问题. 化学抑制手段和物理控制手段虽然能够在一定程度上控制 PPO 活性, 但都具有一定的局限性, 随着 PPO 研究的不断深入, 利用反义 RNA 技术和转基因技术修饰和控制转基因植株中多酚氧化酶基因的表达, 从而控制酶促褐变, 成为多酚氧化酶活性控制的新手段. PPO 基因定位的理论研究, 可为构建重组基因, 控制 PPO 活性以及揭示 PPO 基因表达规律和生理功能提供必要的依据. 关于 PPO 基因的染色体定位研究刚刚开始, 只有小麦的 PPO 基因在小麦作物的研究中被定位于 2A 染色体的长臂上^[91], 而硬质小麦的一些调节 PPO 活性的基因也被定位于 2A 染色体上^[92]. 因此 PPO 基因和调节 PPO 活性的基因在染色体上的定位研究将是 PPO 未来研究的重要领域.

此外, 在进行 PPO 理论研究的同时, PPO 的应用研究也异常活跃. 用真菌生产的漆酶在工业中可用于去木质化、乙醇的生产、药物分析、氧化烯烃、葡萄酒的净化以及生物除污等方面; 在环保方面还可用于合成染料和造纸厂排出物的去色处理以及除草剂的分解等^[19], 而高等植物中的 PPO 的应用主要是各种高灵敏度的生物传感器的研制和开发, 如有人使用蘑菇中 PPO 制成的生物传感器定量地检测龙胆酸^[93]; 而利用掺杂有铱的电极做成的生物传感器^[94] 不仅在环境检测领域, 更有望在临床、医学检测领域得到广泛应用. 高等植物中 PPO 的应用范围还非常有限, 因此 PPO 未来的应用研究可进一步拓展高等植物中 PPO 的应用范围.

参 考 文 献

- 1 Chevalier T, et al. Molecular cloning and characterization of apricot fruit polyphenol oxidase. *Plant Physiol* 1999, 119: 1261
- 2 Rocha A M C N, et al. Characterization of polyphenoloxidase (PPO) extracted from 'Jonagored' apple. *Food Control* 2001, 12: 85
- 3 Laveda F, et al. Proteolytic activation of latent peach PPO. Characterization of monophenolase activity. *J Agric Food Chem*, 2001, 49: 1003
- 4 Dincer B, et al. Characterization of polyphenoloxidase from medlar fruits (*Mespilus germanica* L., *Rosaceae*). *Food Chemistry*, 2002, 77: 1
- 5 Jiang Y M, et al. Inhibition of polyphenol oxidase and the browning

- control of litchi fruit by glutathione and citric acid. *Food Chemistry*, 1998, 62(1): 49
- 6 Paul B, et al. Purification and characterization of a polyphenol oxidase from the seeds of field bean (*Dolichos lablab*). *J Agric Food Chem*, 2000, 48: 3839
 - 7 Yang C P, et al. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from Banana (*Musa sapientum* L.) Peel. *J Agric Food Chem*, 2001, 49: 1446
 - 8 Ding C K, et al. Inhibition of loquat enzymatic browning by sulfhydryl compounds. *Food Chemistry*, 2002, 76: 213
 - 9 Ho K-K. Characterization of polyphenol oxidase from aerial roots of an orchid, Aranda 'Christine 130'. *Plant Physiol Biochem*, 1999, 37 (11): 841
 - 10 Sanchez-Amat A, et al. Molecular cloning and functional characterization of a unique multipotent polyphenol oxidase from *Marinomonas mediterranea*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001, 1547: 104
 - 11 Gooding P S, et al. Molecular cloning and characterisation of banana fruit polyphenol oxidase. *Planta*, 213(5), 2001, 748
 - 12 Kavrayan D, et al. Partial purification and characterization of polyphenoloxidase from peppermint (*Mentha piperita*). *Food Chemistry*, 2001, 74: 147
 - 13 Duangmal K, et al. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. *Romano*). *Food Chemistry*, 1999, 64: 351
 - 14 Mdluli K M, et al. Enzymatic browning in manula fruit I: Effect of endogenous antioxidants on manula fruit polyphenol oxidase. *Journal of Food Biochemistry*, 2003, 27(1): 67
 - 15 Gacche R N, et al. Kinetics of inhibition of polyphenol oxidase mediated browning in apple juice by beta-cyclodextrin and L-ascorbate-2-triphosphate. *Journal of Enzyme Inhibition and Medical Chemistry*, 2003, 18(1): 1
 - 16 Dhankher Om Parkash, et al. Non-systemic induction of polyphenol oxidase in pea and chickpea after wounding. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2003, 9(1): 125
 - 17 Shi C H, et al. The mechanism of azide activation of polyphenol oxidase II from tobacco. *Acta Biochemica Polonica*, 2002, 49 (4): 1029
 - 18 Christina B, et al. Induction of defence responses against *Erwinia* soft rot by an endogenous pectate lyase in potatoes. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2002, 60: 91
 - 19 Mayera A M, et al. Laccase: New functions for an old enzyme. *Phytochemistry*, 2002, 60: 551
 - 20 Esteban-Carrasco A, et al. Oxidation of phenolic compounds from *Aloe barbadensis* by peroxidase activity: Possible involvement in defence reactions. *Plant Physiol Biochem*, 2001, 39: 521
 - 21 María José Peñalver, et al. Mechanistic implications of variable stoichiometries of oxygen consumption during tyrosinase catalyzed oxidation of monophenols and o-diphenols. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, 1597: 140
 - 22 Fenoll L G, et al. Kinetic characterisation of the reaction mechanism of mushroom tyrosinase on tyramine/ dopamine and L-tyrosine methyl ester/ L-dopa methyl ester. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2002, 34: 1594
 - 23 Vieira L C, et al. Sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) tissue as a biocatalyst in a paraffin/ graphite biosensor for hydrazine determination in boiler feed water. *Analytical Letters*, 2002, 35(14): 2221
 - 24 Vieira I C, et al. Determination of paracetamol in pharmaceutical products using a carbon paste biosensor modified with crude extract of zucchini (*Cucurbita pepo*). *Quimica Nova*, 2003, 26(1): 39
 - 25 Xue H, et al. *In situ* electropolymerized polyaniline-polyacrylonitrile composite film for the construction of a polyphenol oxidase based biosensor. *Journal of Applied Electrochemistry*, 2002, 32 (11): 1265
 - 26 陈桂信, 等. 园艺植物多酚氧化酶的分子生物学研究进展. *江西农业大学学报 (自然科学版)*, 2003, 25(1): 107
 - 27 赵东, 等. 茶树多酚氧化酶基因的克隆及其序列比较. *茶叶科学*, 2001, 21(2): 94
 - 28 Gooding P S, et al. Molecular cloning and characterization of banana fruit polyphenol oxidase. *Planta*, 2001, 213: 748
 - 29 Bucheli S, et al. Polyphenol oxidase is induced by chilling and wounding in pineapple. *Australian Journal of Plant Physiology*, 2001, 28(3): 181
 - 30 Mazzafera P, et al. Characterization of polyphenol oxidase in coffee. *Phytochemistry*, 2000, 55: 285
 - 31 Newman S M, et al. Organization of the tomato polyphenol oxidase gene family. *Plant Mol Biol*, 1993, 21: 1035
 - 32 Hunt M D, et al. cDNA cloning and expression of potato polyphenol oxidase. *Plant Mol Biol*, 1993, 21: 59
 - 33 Thygesen P W, et al. Polyphenol oxidase in potato. A multigene family that exhibits differential expression patterns. *Plant Physiology*, 1995, 109: 525
 - 34 Cary J W, et al. Cloning and characterization of cDNAs coding for Vicia faba polyphenol oxidase. *Plant Mol Biol*, 1995, 20: 245
 - 35 Anderson J V, et al. Purification and analysis of wheat grain polyphenol oxidase (PPO) protein. *Cereal Chem*, 2003, 80(2): 135
 - 36 许传俊, 等. 植物多酚氧化酶的研究进展. *生命科学研究*, 2002, 6(1)Suppl: 45
 - 37 Thipyapong P, et al. Tomato polyphenol oxidase. Differential response of the polyphenol oxidase F promoter to injuries and wound signals. *Plant Physiology*, 1997, 115: 409
 - 38 Shahar T, et al. The tomato 66. 3-kD polyphenoloxidase gene: Molecular identification and developmental expression. *The Plant Cell*, 1992, 4(2): 135
 - 39 Kim J Y, et al. Two polyphenol oxidases are differentially expressed during vegetative and reproductive development and in response to

- wounding in the Fuji apple. *Plant Science* 2001, 161: 1145
- 40 Seo Jeong Hak, et al. Changes of phenolic compounds and occurrence of skin browning and characterization of partially purified polyphenol oxidase in oriental pear fruits. *Journal of the Korean Society for Horticultural Science*, 2001, 42(2): 184
- 41 Miyoshi Hanuta, et al. Immunological and molecular comparison of polyphenol oxidase in Rosaceae fruit trees. *Phytochemistry*, 1999, 50: 1021
- 42 Gerdemann C, et al. Comparative modeling of the latent form of a plant catechol oxidase using a molluscan hemocyanin structure. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2002, 89: 155
- 43 Gerdemann C, et al. Isozymes of *Ipomoea batatas* catechol oxidase differ in catalase-like activity. *Biochimica et Biophysica Acta* 2001, 1548: 94
- 44 Pruidze G N, et al. Multiple forms of phenol oxidase from Kolkhida tea leaves (*Camelia Sinensis* L.) and *Myaelia Sterilia* IBR 35219/2 and their role in tea production. *Food Research International*, 2003, 36: 587
- 45 Paranjpe P S, et al. Characterization of tyrosinase and accompanying laccase from *Amorphophallus campanulatus*. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 2003, 40(1): 40
- 46 Nagai T, et al. Polyphenol oxidase from bean sprouts (*Glycine max* L.). *Journal of Food Science*, 2003, 68(1): 16
- 47 Tsay Jyh-Shyan, et al. Changes of polyphenol oxidase activity, ethylene and carbon dioxide production in flush during withering and shaking process of Paochung tea. *Journal of the Chinese Society for Horticultural Science*, 2002, 48 (3): 227
- 48 Jiang A L, et al. Effects of controlled atmospheres with high-O₂ or high-CO₂ concentrations on postharvest physiology and storability of "Napoleon" sweet cherry. *Acta Botanica Sinica* 2002, 44(8): 925
- 49 Pesis E, et al. Ethylene involvement in chilling injury symptoms of avocado during cold storage. *Postharvest Biology and Technology*, 2002, 24: 171
- 50 Witisuwannakul D, et al. Polyphenol oxidases from latex of *Hevea brasiliensis*: Purification and characterization. *Phytochemistry*, 2002, 61: 115
- 51 Shi C H, et al. The purification and spectral properties of polyphenol oxidase I from *Nicotiana glauca*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2002, 19: 381a
- 52 雷东锋, 等. 烟叶中PPO的抑制效应. *西北农林科技大学学报*. 2002, 30(增刊): 130
- 53 雷东锋, 等. 几种抑制剂对烟叶PPO活性的影响. *农业生物技术学报*. 2002, 10(3): 67
- 54 Demir Y, et al. Effects of NaCl and praline on polyphenol oxidase activity in bean seedlings. *Biologia Plantarum (Prague)*, 2001, 44 (4): 607
- 55 Akhov L S, et al. The influence of saponins on polyphenol oxidase activity. *Ukrayins'kyi Botanichnyi Zhurnal*, 2001, 58(2): 206
- 56 Pérez-Gilabert M, et al. Partial purification, characterization, and histochemical localization of fully latent desert truffle (*Terfezia Claveryi* Chatin) polyphenol oxidase. *J Agric Food Chem*, 2001, 49: 1922
- 57 Özoğlu H, et al. Inhibition of enzymic browning in cloudy apple juice with selected antibrowning agents. *Food Control*, 2002, 23: 213
- 58 Jang M S, et al. Inhibitory effects of 'enokitake' mushroom extracts on polyphenol oxidase and prevention of apple browning. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie-Food Science and Technology*, 2002, 35 (8): 697
- 59 雷东锋, 等. 烟草中多酚氧化酶的生理、生化特征及其活性控制的研究. *西安交通大学学报*. 2003, 37(12): 1316
- 60 雷东锋, 等. 烟叶中多酚氧化酶特性. *西北大学学报*, 2000, 30 (4): 74
- 61 Coetzer, et al. Control of enzymatic browning in potato (*Solanum tuberosum* L.) by sense and antisense RNA from tomato polyphenol oxidase. Polyphenol oxidase (PPO). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49(2): 652
- 62 Bachem C W B, et al. Antisense expression of polyphenol oxidase genes inhibits enzymatic browning in potato tubers. *Bio/Technology*, 1994, 12: 1101
- 63 Thomas-Berberan F A, et al. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *J Sci Food Agric* 2001, 81: 853
- 64 Yemenicioğlu A, et al. Consistency of polyphenol oxidase (PPO) thermostability in ripening apricots (*Prunus armeniaca* L.): Evidence for the presence of the most stable PPO forming and destabilizing mechanisms in apricots. *J Agric Food Chem*, 2003, 51: 2371
- 65 Shi C H, et al. The mechanism of azide activation of polyphenol oxidase II from tobacco. *Acta Biochimica Polonica*, 2002, 49: 1029
- 66 Zawistowski J, et al. Polyphenol oxidase. In: *Oxidative Enzymes in Foods*. London: Elsevier Science Publishers 1991. 217~273
- 67 Duffey S, et al. Enzymatic antinutritive defenses of the tomato plant against insects. In: *Naturally Occurring Pest Bioregulators*. Washington: American Chemical Society, 1991. 166~197
- 68 Mayer A M, et al. Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry*, 1979, 18: 193
- 69 Strack D, et al. Bifunctional polyphenol oxidases: Novel functions in plant pigment biosynthesis. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2001, 40(20): 3791
- 70 Vaughn K C, et al. Polyphenol oxidase: The chloroplast oxidase with no established function. *Physiol Plant*, 1988, 72: 659
- 71 Vaughn K C, et al. Tentoxin stops the processing of polyphenol oxidase into an active protein. *Physiol Plant*, 1984, 60: 257
- 72 彭世清. 植物多酚氧化酶的研究进展. *热带农业科学*, 2000, 3 (85): 61
- 73 Haruta, et al. Polyphenol oxidase and herbivore defense in trembling aspen (*Populus tremuloides*). *Physiologia Plantarum*, 2001, 112

- (4): 552
- 74 Karban R, et al. Communication between plants: Induced resistance in wild tobacco plants following clipping of neighbouring sagebrush. *Oecologia*(Berlin), 2000, 125(1): 66
- 75 Karban R, et al. Herbivore damage to sagebrush induces resistance in wild tobacco: Evidence for eavesdropping between plants. *OIKOS*, 2003, 100: 325
- 76 Constabel C P, et al. A survey of wound-and methyl jasmonate-induced leaf polyphenol oxidase in crop plants. *Phytochemistry*, 1998, 47(4): 507
- 77 Estrella Núñ Ez-Delgado et al. Partial purification of latent persimmon fruit polyphenol oxidase. *J Agric Food Chem*, 2003, 51: 2058
- 78 Perez-Gilbert M, et al. Partial purification, characterization, and histochemical localization of fully latent desert truffle (*Terfezia clavayi*, Chatin) polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49(4): 1922
- 79 Steffens J C, et al. Recent Advances in Phytochemistry, Genetic Engineering of Plant Secondary Metabolism. New York: Plenum Press, 1994, 28: 275
- 80 Chevalier T, et al. Molecular cloning and characterization of grape berry polyphenol oxidase. *Plant Mol Biol*, 1994, 26: 495
- 81 Cantos E, et al. Effect of wounding on phenolic enzymes in six minimally processed lettuce cultivars upon storage. *J Agric Food Chem*, 2001, 49: 322
- 82 Chazarra S, et al. Hysteresis and positive cooperativity of iceberg lettuce polyphenol oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, 289: 769
- 83 Shi C H, et al. The FT-IR spectrometric analysis of the changes of polyphenol oxidase II secondary structure. *Journal of Molecular Structure*, 2003, 644: 139
- 84 Golbeck J H, et al. Spinach thylakoid polyphenol oxidase: isolation, activation and properties of the native chloroplast enzyme. *Plant Physiol*, 1981, 67: 977
- 85 Richard F C, et al. Oxidation of chlorogenic acid, catechins and 4-methylcatechol in model solutions by apple polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1992, 40: 2114
- 86 Valero E, et al. A kinetic study of irreversible enzyme inhibition by an inhibitor that is rendered unstable by enzymic catalysis. *Biochemistry Journal*, 1991, 277: 869
- 87 Lerch K. Molecular and active site structure of tyrosinase. *Life Chemistry Report*, 1987, 5: 221
- 88 Martinez J, et al. Comparative studies of tyrosinase from different sources: Relation between halide inhibition and the enzyme active site. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1986, 83B: 633
- 89 Chazarra S, et al. Kinetic study of the suicide inactivation of latent polyphenoloxidase from iceberg lettuce (*Lactuca sativa*) induced by 4-tert-butylcatechol in the presence of SDS. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1997, 1339: 297
- 90 Sojo M M, et al. Oxidation of salsolinol by banana pulp polyphenol oxidase and its kinetic synergism with dopamine. *J Agric Food Chem*, 2000, 48: 5543
- 91 Simeone R, et al. Genetic mapping of polyphenol oxidase in tetraploid wheat. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 2002, 7: 763
- 92 Jimenez M, et al. Chromosome location of genes affecting polyphenol oxidase activity in seeds of common and durum wheat. *Plant Breed*, 1999, 118: 395
- 93 Pedano M L, et al. Amperometric biosensor for the quantification of gentisic acid using polyphenol oxidase modified carbon paste electrode. *Talanta*, 2000, 53(3): 489
- 94 Rubianes M D, et al. Amperometric biosensor for phenols and catechols based on iridium-polyphenol oxidase-modified carbon paste. *Electroanalysis*, 2000, 12(14): 1159