

曲酸与阿魏酸对酪氨酸酶的抑制作用研究

金一琼, 陈周谭, 赖富饶, Anupam Giri, 吴晖

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 本实验采用 Lineweaver-Burk 双倒数法探讨了曲酸与阿魏酸对蘑菇酪氨酸酶催化 L-DOPA 氧化的抑制作用并推测其抑制机理。通过对曲酸与阿魏酸的 IC_{50} 与抑制常数 K_i 的测定可知, 曲酸对酪氨酸酶的抑制作用明显高于阿魏酸。分别采用分光光度法和 ImageJ 图像分析与处理软件定量地测定曲酸与阿魏酸对虾血淋巴和苹果褐变的抑制作用。曲酸对虾血淋巴褐变的抑制作用优于阿魏酸; 对于苹果褐变, 阿魏酸的抑制作用则高于曲酸。

关键词: 曲酸; 阿魏酸; 酪氨酸酶; 抑制作用; 褐变

文章编号: 1673-9078(2012)4-378-381

Evaluation and Applications of Inhibitory Effects of Kojic acid and Ferulic acid on Tyrosinase

JIN Yi-qiong, CHEN Zhou-tan, LAI Fu-rao, GIRI Anupam, WU Hui

(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Lineweaver-Burk Plot was adopted to investigate the inhibitory effects of kojic acid and ferulic acid on the oxidation of L-DOPA catalyzed by mushroom tyrosinase. The potential mechanism of their inhibitory effects was estimated based on the results obtained from Lineweaver-Burk Plot. The IC_{50} and inhibitory constant (K_i) indicated that the inhibitory effect of kojic acid was considerably higher than that of ferulic acid. In addition, spectrophotography and ImageJ were employed to analyze their preventive effects on browning of shrimp hemolymph and apple slices, respectively. Kojic acid possessed better preventive activity towards browning of shrimp hemolymph; while ferulic acid was more effective than kojic acid in terms of sliced apple browning.

Key words: Kojic acid; ferulic acid; tyrosinase; inhibition activity; browning

酪氨酸酶(EC 1.14.18.1)是一种含铜的多功能酶,广泛分布于动植物中^[1]。酪氨酸酶能够羟化单元酚类物质生成邻二酚类物质(单酚酶活性),也可以继续氧化邻二酚类物质形成邻醌(二酚酶活性),见图1。由酪氨酸酶催化 L-酪氨酸氧化形成黑色素的反应是引起皮肤色素沉积、果蔬和鱼虾褐变的主要原因^[2-4]。所以寻找一种有效的酪氨酸酶抑制剂在食品工业的应用方面具有实际的应用意义,有利于果蔬与海鲜类产品的保藏。曲酸与阿魏酸都属于酚类物质,其中曲酸对酶促褐变抑制作用的报道已经非常普遍^[5,6],但是曲酸对酪氨酸酶的抑制作用及其应用的详细研究文章甚少。相较之下,阿魏酸对酪氨酸酶的抑制作用已有研究者对其进行研究和探讨^[7-9],但阿魏酸在果蔬与海鲜类保藏方面的实际应用则未见报道。本实验采用 Lineweaver-Burk 双倒数法得出曲酸与阿魏酸对蘑菇酪氨酸酶的抑制动力学参数并比较两者对虾血淋巴中酪氨酸酶同工酶及苹果酶促褐变的实际抑制效果的有

收稿日期: 2012-01-10

基金项目: 教育部新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-06-0746)

效性。

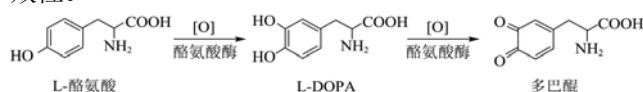


图1 L-酪氨酸与 L-DOPA 在酪氨酸酶作用下的反应

Fig.1 Reactions of L-tyrosine and L-DOPA under catalysis of tyrosinase

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

苹果和新鲜活虾采购于广州好当家超级市场。

曲酸($\geq 99\%$), 上海阿拉丁试剂有限公司; 阿魏酸($>98.0\%$), 上海梯希爱化成工业发展有限公司; 蘑菇酪氨酸酶(≥ 1000 unit/mg), 美国 Sigma-Aldrich 公司; L-多巴(99%), 上海源聚生物科技有限公司; L-脯氨酸(99%), 上海阿拉丁试剂有限公司; 邻苯二酚(化学纯), 上海润捷试剂有限公司; 肝素钠(150 unit/mg), 上海源聚生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

UV-2550 紫外可见分光光度计, 日本岛津公司;

ImageJ 图像处理与分析软件, 美国国立卫生研究院。

1.3 实验方法

1.3.1 曲酸与阿魏酸对蘑菇酪氨酸酶 (M-PPO) 抑制的 IC₅₀ 测定^[10,11]

采用 DMSO 作为溶剂配制不同浓度的曲酸(阿魏酸)溶液; 将 L-多巴用 pH 6.8 的 50 mM 磷酸缓冲液 (PBS) 配成 0.5 mM 溶液作为反应底物; M-PPO 用上述 PBS 配制成 0.2 mg/mL 的酶液。向比色皿中依次加入 0.1 mL 抑制物溶液、2.8 mL 的 L-多巴溶液和 0.1 mL M-PPO 溶液, 混合后立即置于紫外分光光度仪中测定并记录其在 475 nm 下 1 min 内的吸收值变化(反应与测定都在 30 °C 下进行)。

1.3.2 曲酸与阿魏酸对 M-PPO 的抑制动力学

参考 Xie^[12] 的实验方法, 做少许修改。采用 Lineweaver-Burk 双倒数法制得酶动力学曲线, 决定曲酸和阿魏酸对酪氨酸酶抑制作用类型。用米氏公式 $V = V_{max} * [S] / (K_m + [S])$ 得出 K_m 和 V_{max} , 再根据双倒数图计算出表观米氏常数 K_{mapp} , 代入 $K_{mapp} = K_m(1 + [I]/K_i)$ 得到抑制物的 K_i 。

1.3.3 曲酸与阿魏酸对虾血淋巴褐变的抑制作用^[13]

于虾第一对腹足部位用装有 1 mg/mL 肝素钠的 5 mL 注射器抽取虾血淋巴, 并与肝素钠以 1:1 的比例混合均匀, 冰浴。实验量取 0.1 mL 的 500 mM 邻苯二酚作为底物, 加入 0.1 mL 500 mM 的 L-脯氨酸、2.7 mL PBS (50 mM, pH 6.8)、0.1 mL 上述虾血淋巴以及 0.1 mL 5 mM 的曲酸(阿魏酸)溶液。室温测量反应体系反应 30 min 时在 530 nm 下的吸收值 (A_{530})。空白组为不加曲酸(阿魏酸)的实验组。曲酸与阿魏酸对虾血淋巴褐变抑制作用的计算公式为: 抑制率 = $[100 - (A * 100) / B] \%$, 其中 A = 测试溶液的 A_{530} , B = 空白组的 A_{530} 。

1.3.4 曲酸与阿魏酸对苹果褐变的抑制作用^[14,15]

将苹果均匀切片, 浸于 50 mM 邻苯二酚溶液中 10 s 后迅速取出、甩去表面溶液、再浸泡于 5 mM 的曲酸(阿魏酸)溶液中 15 min, 取出沥干, 置室温保存 30 min。采用 ImageJ 图像处理与分析软件分析苹果褐变的灰度值。

2 结果与分析

2.1 曲酸与阿魏酸对 M-PPO 的抑制作用

2.1.1 曲酸与阿魏酸对 M-PPO 抑制的 IC₅₀

由图 2 可知, 曲酸与阿魏酸在一定程度上能够抑制 M-PPO 活性, 并呈剂量依赖关系。曲酸与阿魏酸对 M-PPO 抑制的 IC₅₀ 分别为 0.711 mM 和 327.768 mM, 见表 1。根据两者 IC₅₀ 的比较可以看出曲酸对

M-PPO 的抑制作用大大高于阿魏酸。

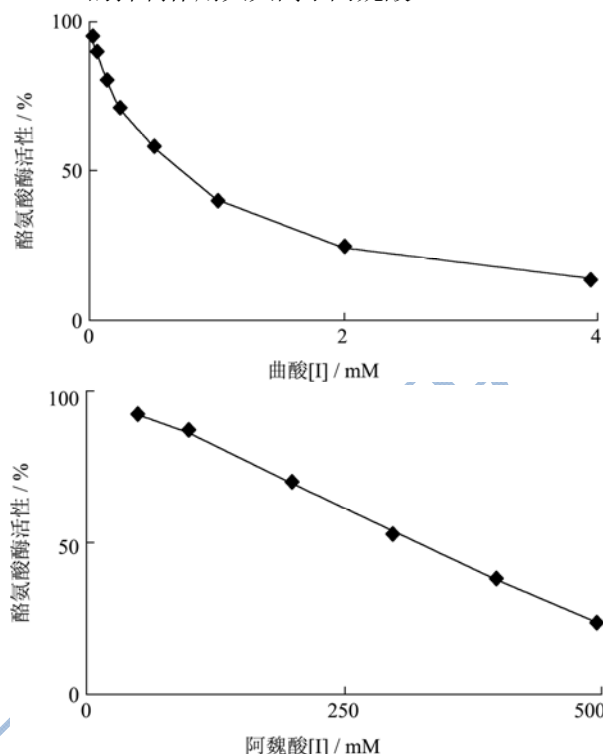


图 2 不同浓度曲酸及阿魏酸对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用

Fig.2 Tyrosinase-inhibitory effects of kojic acid and ferulic acid under different concentrations

2.1.2 曲酸与阿魏酸对 M-PPO 的抑制动力学参数

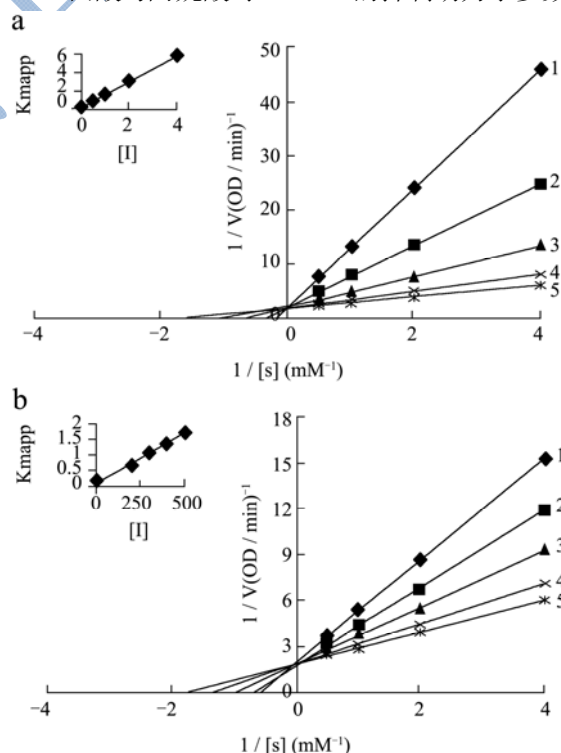


图 3 曲酸(a)及阿魏酸(b)对 M-PPO 抑制作用的双倒数曲线

Fig.3 Lineweaver-Burk plots for inhibitory effects of kojic acid (a) and ferulic acid (b) on M-PPO

注: (a)与(b)中直线 1~5 依次为 4 mM、2 mM、1 mM、0.5

mM 和 0 mM 曲酸或阿魏酸所对应的双倒数图。

本实验将一个酶活单位 (U) 定义为: 在 30 °C 条件下使反应溶液在 475 nm 处的吸收值增加 0.001 的酶量。在给定的条件下, 由 M-PPO 催化的 L-DOPA 氧化反应遵循米氏反应动力学。根据米氏方程 $V=V_{max}*[S]/(K_m+[S])$ 计算得出: M-PPO 催化 L-DOPA 氧化反应的米氏常数 K_m 为 0.145 mM, 酶被底物饱和时的反应速度 V_{max} 为 524 U/min, 见表 1。由不同浓度曲酸 (阿魏酸) 所对应曲线的表观米氏常数 (K_{mapp}) 对曲酸 (阿魏酸) 浓度作图并根据 $K_{mapp}=K_m(1+[I]/K_i)$ 计算得出曲酸 (阿魏酸) 的抑制常数 K_i , 见表 1。 K_i 值代表抑制物达到抑制作用的浓度。曲酸的 K_i 值为 0.104 mM, 远远小于阿魏酸的 45.31 mM。由此可见, 曲酸对 M-PPO 的抑制作用大大强于阿魏酸, 与 IC_{50} 值的结论相符。

表 1 曲酸及阿魏酸对 M-PPO 抑制作用的动力学参数

Table 1 Kinetic parameters of kojic acid and ferulic acid inhibition on M-PPO

项目	曲酸	阿魏酸
IC_{50}/mM	0.711	327.768
K_m/mM	0.145	0.145
$V_{max}/(U/min)$	524	524
抑制类型	竞争性	竞争性
K_i/mM	0.104	45.31

图 3 中不同浓度的曲酸 (阿魏酸) 所对应的曲线交于 1/V 轴的同一点, 故判断曲酸与阿魏酸在此酶促反应中属于竞争性抑制物。曲酸与阿魏酸在 M-PPO 催化 L-DOPA 氧化的反应中表现为竞争性抑制, 说明曲酸与阿魏酸只是与游离的酶结合, 而不是与酶-底物复合物结合。因此, 曲酸与阿魏酸可能是通过与底物 L-DOPA 竞争结合酪氨酸酶活性位点的铜原子来实现其对酪氨酸酶催化 L-DOPA 氧化反应的抑制作用。

2.2 曲酸与阿魏酸对虾血淋巴褐变的抑制作用

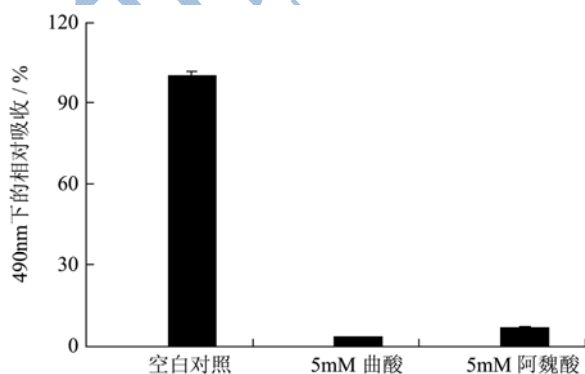


图 4 曲酸与阿魏酸对虾血淋巴褐变的抑制作用

Fig.4 Inhibitory effects of kojic acid and ferulic acid on shrimp hemolymph browning

空白对照组采用 DMSO 溶剂代替曲酸 (阿魏酸) 溶液, 并以它反应后的吸光值作为 100% 酶活所能达到的反应程度, 所以将空白对照组在 490 nm 下的吸光值所对应的酶活视为 100%。由图 4 可知, 5 mM 的曲酸与阿魏酸都可有效地抑制虾血淋巴褐变, 曲酸与阿魏酸将虾血淋巴中酪氨酸酶酶活分别抑制至 2.80% 和 5.97%。两者相比, 在对虾血淋巴褐变的抑制方面, 相同浓度的曲酸优于阿魏酸。

2.3 曲酸与阿魏酸对苹果褐变的抑制作用

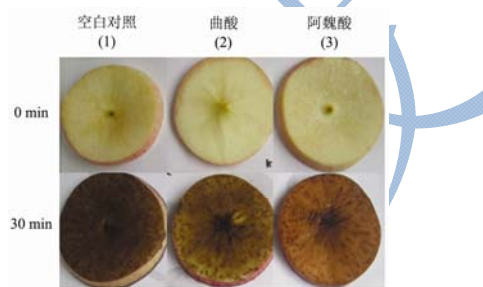


图 5 曲酸和阿魏酸处理对苹果褐变抑制作用

Fig.5 Inhibitory effects of kojic acid and ferulic acid on sliced apple browning

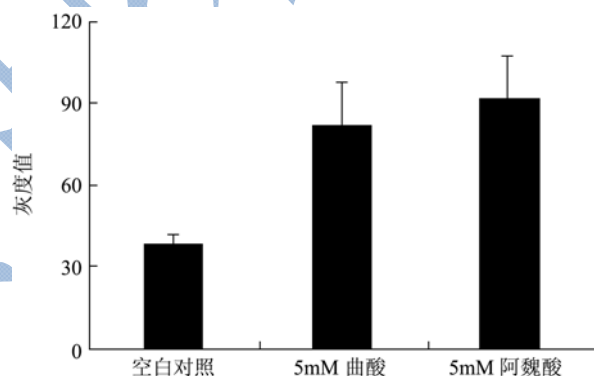


图 6 曲酸和阿魏酸处理对苹果褐变抑制作用的灰度值比较

Fig.6 Comparison of gray values of apple slices treated by kojic acid and ferulic acid

图 5 为苹果褐变的实验结果, 由图 5 可以用肉眼定性地判断曲酸与阿魏酸对苹果切片表面褐变的抑制作用。因实验事先将苹果片浸入邻苯二酚溶液中大量增加酶促褐变反应的底物, 故此实验反应速度很快, 褐变颜色深。采用 ImageJ 图像处理与分析软件对苹果褐变的灰度值进行分析。苹果褐变程度与灰度值成反比, 褐变越严重, 灰度值越低。图 6 为 ImageJ 的分析结果, 从图 6 可以看出曲酸与阿魏酸对苹果褐变具有较明显的抑制作用, 阿魏酸溶液在抑制作用上略微优于具有相同浓度的曲酸, 但两者的差别并不显著。

3 结论

3.1 由 Lineweaver-Burk 双倒数法结果可知, 曲酸与阿魏酸对酪氨酸酶的抑制作用为竞争性抑制, 并推测

其抑制作用的机理为与底物 L-DOPA 竞争结合酪氨酸酶活性位点的铜原子,从而抑制 L-DOPA 的氧化反应。本实验的结果证明了曲酸与阿魏酸能有效地抑制酪氨酸酶的活力。在 M-PPO 对 L-DOPA 的氧化和虾血淋巴褐变的实验中,曲酸的抑制作用优于阿魏酸;在苹果褐变的实验中,阿魏酸则表现出更高的抑制作用。

3.2 对于酪氨酸酶抑制剂在食品和化妆品中的应用,抑制剂的安全性是首要考虑的因素。曲酸是微生物好氧发酵产生的一种有机酸,安全无毒。随着对阿魏酸药化作用的不断研究,其安全性也逐渐得到证实。因此,曲酸与阿魏酸在食品工业上具有很大的应用前景。

参考文献:

- [1] SONG Kang-Kang, HUANG Hao, HAN Peng, et al. Inhibitory effects of cis- and trans- isomer of 3,5-dihydroxystilbene on the activity of mushroom tyrosinase [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 342(4): 1147-1151
- [2] 李娜,鲁晓翔.酪氨酸酶抑制剂的研究进展[J].*食品工业科技*,2010,31(7):406-409
- [3] LIU Jinbing, CAO Rihui, YI Wei, et al. A class of potent tyrosinase inhibitors: Alkylidenethiosemicarbazide compounds [J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2009, 44: 1773-1778
- [4] 陈康玉,彭珩,何翠萍,等.南美白对虾虾头内源酶的分离纯化[J].*现代食品科技*,2010,26(6):573-576.
- [5] 赵新河,李枚秋,钟秋平.曲酸及其衍生物的研究进展[J].*中国酿造*,2007,10:4-7
- [6] 朱秀容,康建平.曲酸的生产现状及其在食品与日化工业的应用[J].*四川食品与发酵*,2002,38(1):26-29
- [7] 闫军,李昌生,陈声利,等.咖啡酸、阿魏酸和香草酸对酪氨酸酶活性的影响[J].*中国临床药理学与治疗学*,2004,9(3):337-339
- [8] 张延萍,周冬菊,王新胜.川芎中阿魏酸效应组分抑制酪氨酸酶活性的研究[J].*中国医院药学杂志*,2010,30(13):1111-1113
- [9] GONG Shengzhao, CHENG Jiang, YANG Zhuoru. Inhibitory effect of ferulic acid on oxidation of L-DOPA catalyzed by mushroom tyrosinase [J]. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 2005, 13(6): 771-775
- [10] CHEN Qingxi, KUBO Isao. Kinetics of mushroom tyrosinase inhibition by quercetin [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50: 4108-4112
- [11] 刘锦梅,王艳丽,潘维.4 种茶叶醇提物对酪氨酸酶的抑制作用[J].*现代食品科技*,2009,25(6):610-611
- [12] XIE Liping, CHEN Qingxi, HUANG Huang, et al. Inhibitory effects of cupferron on the monophenolase and diphenolase activity of mushroom tyrosinase [J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2003, 35: 1658-1666
- [13] ANGEL B E, FERNAND F, IKUO H, et al. Effects of ergothioneine from mushrooms (*Flammulina velutipes*) on melanosis and lipid oxidation of kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58: 2577-2585
- [14] JANG Ji-Hyun, MOON Kwang-Deog, CHOI So-Young, et al. Enzymatic browning inhibition of simultaneous treatment of ultrasound and ascorbic acid on various apple cultivars [R]. Chicago: Institute of Food Technologists, 2010
- [15] SON S M, MOON K D, LEE C Y. Inhibitory effects of various antibrowning agents on apple alices [J]. *Food Chemistry*, 2001,73: 23-30