

3-羟基-4-甲氧基肉桂酸抑制酪氨酸酶催化反应的 动力学研究

龚盛昭^{1, 2}, 陈庆生², 徐梦漪¹, 冯爱娟¹

(1. 广东轻工职业技术学院轻化工程系, 广东广州 510300)

(2. 广州环亚化妆品科技有限公司研究院, 广东广州 510663)

摘要: 在 30 °C, pH=6.8 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲体系中, 采用酶动力学方法研究了 3-羟基-4-甲氧基肉桂酸对酪氨酸酶单酚酶和二酚酶活力的影响和抑制动力学。实验结果表明, 3-羟基-4-甲氧基肉桂酸对酪氨酸酶单酚酶和二酚酶活性均有良好的抑制作用。对单酚酶和二酚酶活力的相对抑制率达到 50% 的 3-羟基-4-甲氧基肉桂酸浓度 (IC_{50}) 约分别为 0.13 mmol/L 和 0.39 mmol/L, 比熊果苷抑制二酚酶活性的 IC_{50} 值 5.3 mmol/L 小得多。3-羟基-4-甲氧基肉桂酸能明显延长单酚酶的迟滞时间, 0.2 mmol/L 3-羟基-4-甲氧基肉桂酸能使迟滞时间由 1.1 min 延长至 4.3 min。对二酚酶的抑制作用表现为可逆效应, 说明其是通过抑制酶活力而导致催化效率的降低, 而不是通过减少有效的酶量导致酶活力的下降。Lineweaver-Burk 图显示 3-羟基-4-甲氧基肉桂酸对二酚酶的抑制作用表现为竞争性抑制, 最大反应速率 (v_m) 为 64.5 $\mu\text{mol}/\text{min}$, 抑制常数 (K_i) 为 0.11 mmol/L。

关键词: 酪氨酸酶; 3-羟基-4-甲氧基肉桂酸; 抑制作用; 动力学; 单酚酶; 二酚酶

文章编号: 1673-9078(2015)4-192-196

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.4.031

Kinetics Governing the Inhibitory Effect of 3-hydroxy-4-methoxycinnamic Acid on Tyrosinase-catalyzed Reactions

GONG Sheng-zhao^{1,2}, CHEN Qing-sheng², XU Meng-yi¹, FENG Ai-juan¹

(1. Department of Chemical Engineer, Guangdong Industry Technical College, Guangzhou 510300, China)

(2. Research Institute, Huanya Cosmetic Technology Co., Ltd, Guangzhou 510663, China)

Abstract: The kinetics governing the inhibitory effect of 3-hydroxy-4-methoxycinnamic acid on the activities of monophenolase and diphenolase in tyrosinase were studied using an enzymological kinetic analysis method, in a $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ buffer system (pH = 6.8) at 30 °C. The 3-hydroxy-4-methoxycinnamic acid was observed to efficiently inhibit tyrosinase monophenolase and diphenolase activities. Approximately 0.13 mmol/L and 0.39 mmol/L 3-hydroxy-4-methoxycinnamic acid caused a 50% rate inhibition (IC_{50}) in monophenolase and diphenolase activities, respectively; these values were much lower than that of arbutin ($\text{IC}_{50} = 5.3$ mmol/L for diphenolase activity). The presence of 3-hydroxy-4-methoxycinnamic acid also prolonged the lag period of monophenolase; the presence of 0.20 mmol/L 3-hydroxy-4-methoxycinnamic acid resulted in a lag period of 4.3 min, compared to the 1.1 min lag period of monophenolase in the absence of 3-hydroxy-4-methoxycinnamic acid. The inhibition of diphenolase by 3-hydroxy-4-methoxycinnamic acid appeared to be reversible. This indicated that the inhibitor suppresses the enzyme activity, resulting in a reduction in catalysis efficiency, as opposed to removing the effective enzyme, which leads to a reduction in enzyme activity. The Lineweaver-Burk plot demonstrated the competitive inhibition of tyrosinase by 3-hydroxy-4-methoxycinnamic acid, with a maximum reaction rate (v_m) and inhibition constant (K_i) of 64.5 $\mu\text{mol}/\text{min}$ and 0.11 mmol/L, respectively.

Key words: tyrosinase; 3-hydroxy-4-methoxycinnamic acid; inhibitory effect; kinetics; monophenolase; diphenolase

收稿日期: 2014-08-15

基金项目: 广东省高等职业院校珠江学者岗位计划资助项目(2013); 广东省高等学校高层次人才项目(gdqy201302); 广州市科技计划项目(2014J4100002); 佛山市禅城区科技计划项目(2011A1044)

作者简介: 龚盛昭(1970-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 天然产物研究与开发

酪氨酸酶(Tyrosinase)又称多酚氧化酶, 广泛存在于植物、动物、真菌和细菌中, 是生物体合成黑色素的關鍵酶^[1-2], 与黄褐斑、黑色素异常增多、白癜风等色素沉着性疾病密切相关, 也是昆虫变态发育和免疫中的重要酶, 在食品酶促褐变反应中起重要作用, 在医学、农业抗虫、食品保鲜及化妆品方面具有重要

的应用价值, 所以现在越来越受到人们的关注。

酪氨酸酶是一种含铜的金属酶, 每一个亚基含两个金属铜离子, 两个铜离子分别与蛋白质分子中组氨酸结合, 另有一个内源桥基将两个铜离子联系在一起, 构成酪氨酸酶催化氧化反应活性中心^[3] (见图1)。

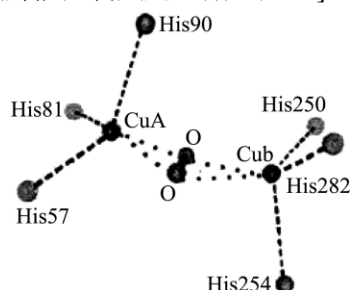
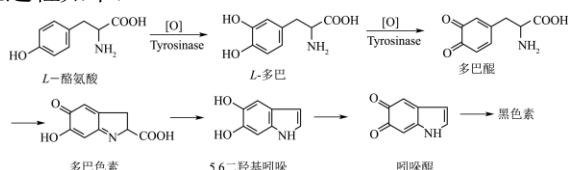


图1 酪氨酸酶活性中心的双核铜中心结构

Fig.1 Structure of the binuclear copper center in the active site of tyrosinase

在有氧条件下, 酪氨酸酶能够催化氧化单酚化合物成二酚化合物 (单酚酶活性), 并把二酚化合物氧化成醌 (二酚酶活性)^[4-6], 进一步氧化而成黑色素, 反应过程如下:



果蔬和植物来源的食品、饮料发生褐变和虾类黑变病等就是由于酚类被酪氨酸酶的酶促氧化, 造成基本氨基酸的破坏, 食物的消化性和营养价值被破坏, 并形成有毒化合物, 严重影响食品的营养、风味及外观品质。酪氨酸酶抑制剂的作用就是通过抑制酪氨酸酶的活性, 阻断酪氨酸向黑色素转化。随着人们对食品质量要求的不断提高和对食品安全的日益重视, 酪氨酸酶抑制剂在食品保鲜方面将具有良好的应用前景。特别是岭南佳果荔枝等水果的保鲜一直是困扰荔枝保藏的一个难点, 从酪氨酸酶抑制的角度进行果蔬的保鲜研究将有望使荔枝等水果的保鲜取得突破, 开发高效能的酪氨酸酶抑制剂在食品工业领域有重要意义。近年来, 国内外学者致力于寻找特异、高效的酪氨酸酶抑制剂, 其来源主要集中在天然产物提取和化学合成两个方面。当前, 从天然产物中提取的酪氨酸酶抑制剂因其安全性而倍受青睐, 已成为研发的主流。

3-羟基-4-甲氧基肉桂酸 (3-hydroxy-4-methoxy cinnamic acid, 简称HMCA) 俗名为异阿魏酸, 存在于升麻、半边莲等植物中^[7-8]。本文以HMCA作为效应物, 研究其对酪氨酸酶催化反应的影响及抑制作用动力学, 得到有关动力学参数, 能为酪氨酸酶抑制剂的分子设计和抑制剂的实际应用提供理论依据, 为新型

高效酪氨酸酶抑制剂的开发提供新的途径。

1 实验方法

1.1 材料和仪器

酪氨酸酶为Sigma化学公司的蘑菇酪氨酸酶, 比活力为3320 U/mg。3,4-二羟基苯氨酸 (L-DOPA)、L-酪氨酸为Sigma化学公司生产的分析纯试剂。HMCA由广东省药检所提供。二甲亚砜 (DMSO)、磷酸氢二钠和磷酸二氢钠为国产分析纯试剂。使用的蒸馏水为去离子重蒸水。仪器为6010型紫外可见分光光度计 (惠普-上海)。

1.2 酶活力测定和抑制率的计算方法

酪氨酸酶活力的测定是基于L-酪氨酸和L-DOPA的酶催化氧化产物-多巴色素 (dopachrome) 在475 nm波长处有最大吸收。酪氨酸酶反应活性 (ACT) 定义: 以每分钟多巴色素在475 nm波长的吸光度 (OD₄₇₅) 增加0.001为一个酶活力单位, 即1 U/min。因此, 通过测定酶催化反应体系的OD₄₇₅ 随时间的增长直线, 从直线斜率即可求得酶活力。

单酚酶活力的测定: 以1.5 mmol/L酪氨酸为底物。先将1.5 mL 5 mmol/L酪氨酸 (溶于pH=6.8的磷酸盐缓冲溶液) 溶液置于比色杯中, 加入3.1 mL pH=6.8的磷酸盐缓冲溶液, 在30 °C恒温水浴中恒温10 min, 加入0.2 mL含不同浓度的HMCA (溶于DMSO溶液中) 和0.2 mL 0.5 g/L酪氨酸酶水溶液, 测定OD₄₇₅。此测活体系中, 酶的终质量浓度为20 mg/L。

二酚酶活力的测定: 以1.0 mmol/L L-DOPA为底物。先将1.0 mL 5 mmol/L L-DOPA (溶于pH=6.8的磷酸盐缓冲溶液) 置于比色杯中, 加入3.6 mL pH=6.8的磷酸盐缓冲溶液, 在30 °C恒温水浴中恒温10 min, 加入0.2 mL含不同浓度的HMCA (溶于DMSO溶液中) 和0.2 mL 0.15 g/L酪氨酸酶水溶液, 测定OD₄₇₅。此测活体系中, 酶的终质量浓度为6 mg/L。

根据酶反应活性的定义, 在一定的抑制剂浓度下, 酶反应活性表示为ACT_i, 在没有抑制剂时酶反应活性表示为ACT₀, 则HMCA对酶的相对抑制率 (I) 可以定义为式 (1):

$$I = \left(1 - \frac{ACT_i}{ACT_0}\right) \times 100\% = \left(1 - \frac{OD_1 - OD_3}{OD_2 - OD_4}\right) \times 100\% \quad (1)$$

式中: OD₁是指含有底物、酪氨酸酶、HMCA的测活体系的吸光度值; OD₂是指含有底物、酪氨酸酶, 但不含HMCA的测活体系的吸光度值; OD₃是指含有底物、HMCA, 但不含酪氨酸酶的测活体系的吸光度值; OD₄是指含有底物, 但不含

酪氨酸酶、HMCA 的测活体系的吸光度值。

对单酚酶和二酚酶的相对抑制率分别用 I_M 、 I_D 表示。

2 结果与讨论

2.1 HMCA 对酪氨酸酶单酚酶活力的影响

迟滞效应是酪氨酸酶催化氧化 L-酪氨酸的典型特征，迟滞时间 (Lag time) 的长短取决于反应溶液中酶和底物的浓度。另外，加入过渡金属离子或者二酚化合物可缩短甚至消除迟滞效应，但加入一些诸如环庚三烯酚酮等化合物却延长迟滞时间^[9]。为了考察 HMCA 浓度 (c_1) 对迟滞时间的影响，固定酶质量浓度为 20 mg/L，L-酪氨酸的浓度为 1.5 mmol/L，测定不同浓度的 HMCA 对酪氨酸酶单酚酶抑制作用的进程曲线，如图 2 所示。

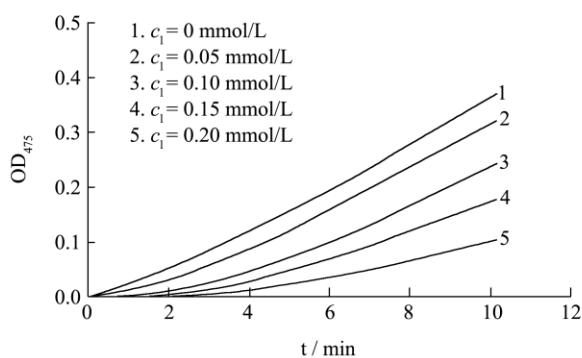


图 2 HMCA 对酪氨酸酶单酚酶抑制作用的进程曲线

Fig.2 Progress curves depicting the HMCA-mediated inhibition of monophenolase

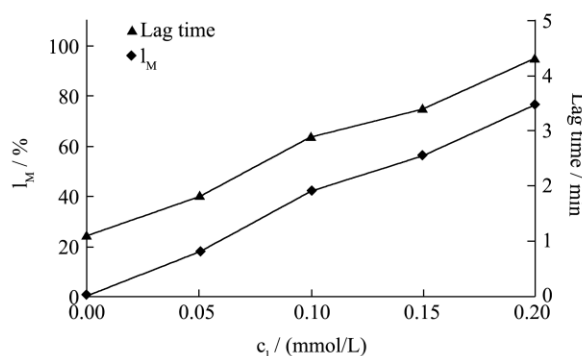


图 3 HMCA 浓度对单酚酶的抑制率的影响

Fig.3 The effect of varying HMCA concentrations on the monophenolase inhibition rate

图 2 结果表明，HMCA 能延长酶反应的迟滞时间 (曲线的直线部分交于横轴的值)，并随着 HMCA 浓度的增大而延长。在相同反应时间下，反应液的吸光度随着 HMCA 浓度的增大而有所下降，说明 HMCA 对酪氨酸酶的单酚酶活性有抑制作用。图 3 显示

HMCA 对酪氨酸酶催化酪氨酸的迟滞时间和对单酚酶的相对抑制率 (I_M) 的影响。由图 2 可知，随着抑制剂浓度的增大，酶反应的迟滞时间呈上升趋势，没有抑制剂存在时，酶反应的迟滞时间为 1.1 min，当 HMCA 浓度为 0.20 mmol/L 时，迟滞时间延长到 4.3 min，迟滞时间增大近 4 倍。图 3 表明，HMCA 对单酚酶的相对抑制率则随着 HMCA 浓度的增大而增大，导致单酚酶相对抑制率达到 50% 的 HMCA 浓度 (IC_{50}) 约为 0.13 mmol/L。

2.2 HMCA 对酪氨酸酶二酚酶活力的影响

固定酶质量浓度为 6 mg/L，L-DOPA 的浓度为 1 mmol/L，测定不同浓度的 HMCA 对酪氨酸酶二酚酶抑制作用的进程曲线，如图 4 所示。图 5 为 HMCA 浓度对二酚酶的相对抑制率 (I_D) 的影响曲线。

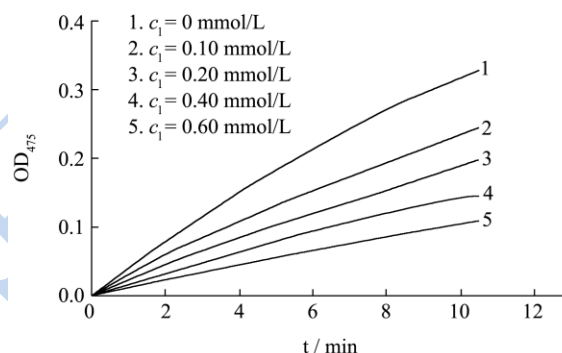


图 4 HMCA 对酪氨酸酶二酚酶抑制作用的进程曲线

Fig.4 Progress curves depicting the HMCA-mediated inhibition of diphenolase

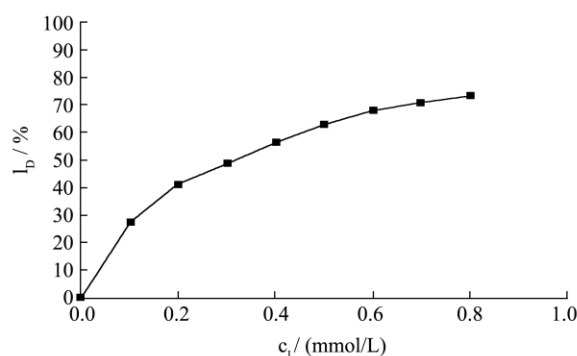


图 5 HMCA 浓度对单酚酶的抑制率的影响

Fig.5 The effect of varying HMCA concentrations on the diphenolase inhibition rate

由图 4 可知，酪氨酸酶催化氧化 L-DOPA (二酚酶) 不存在迟滞效应。在同一反应时间下，随着 HMCA 浓度的增大，反应液的吸光度不断下降，即二酚酶催化氧化 L-DOPA 的速率不断降低，说明 HMCA 具有抑制二酚酶活性的能力。由图 5 可知，随着 HMCA 浓度的增大，对二酚酶的相对抑制率升高，导致二酚

酶相对抑制率达到 50% 的 HMCA 浓度 (IC_{50}) 约为 0.39 mmol/L。

2.3 HMCA 对酪氨酸酶的抑制效应

在固定底物 (L-DOPA) 浓度的测活体系中, 加入不同浓度 HMCA, 改变加入的酶量, 测定不同浓度的 HMCA 对酪氨酸酶催化 L-DOPA 氧化活力的影响。图 6 为经 HMCA 作用后酪氨酸酶的剩余活力 (Activity) 与加入的酶量 (ρ_E) 之间的关系。酶活力对酶量作图得到一组通过原点的直线, 随着加入的 HMCA 浓度的增大, 直线的斜率逐渐下降, 说明 HMCA 对酪氨酸酶的抑制作用属于可逆过程。也就是说 HMCA 是通过与酶分子发生某种可逆作用, 形成可解离的复合物, 从而抑制酪氨酸酶二酚酶活力, 导致酶催化活力降低, 而不是通过减少有效的酶量导致酶活力的下降。这可能与酶的结构有关, 在酪氨酸酶的活性中心含有 2 个 Cu^{2+} 活性中心, 抑制剂中氧原子可以在酶的活性中心通过静电力与其紧密结合, 而靠近活性中心有一个狭长的由疏水性氨基酸残基组成的沟, 此沟使得抑制剂与 Cu^{2+} 具有更强的亲和力, 二者形成一个可逆的非共价复合体。

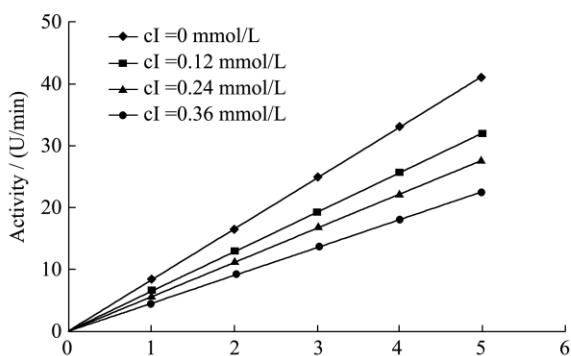


图 6 不同 HMCA 浓度下酪氨酸酶活力和酶量的关系

Fig.6 The effect of different HMCA concentrations on tyrosinase activity

2.4 HMCA 抑制酪氨酸酶的动力学

酶抑制动力学参数, 包括表观米氏常数 (K_m)、最大反应速度 (v_m) 和抑制常数 (K_i) 可通过 Lineweaver-Burk 双倒数方程作图获得^[10]。本实验在测活体系中, 固定酶的质量浓度为 6 mg/L, 改变底物 (L-DOPA) 浓度 (c_S), 测定不同抑制剂浓度下的反应初始速率 (v)。以反应速度 (v) 的倒数对底物浓度 (c_S) 的倒数作图得到 Lineweaver-Burk 双倒数图, 见图 7 所示。

由图 7 可知, Lineweaver-Burk 双倒数作图为相交于纵轴的一点的一组直线。随着 HMCA 浓度的增大,

直线纵轴截距基本不变, 但直线斜率不断增大。这说明随着 HMCA 浓度的增大, 不会导致酶促反应的最大反应速度 (v_m) 发生变化, 仅使米氏常数 (K_m) 变大, 表明 HMCA 对酪氨酸酶的抑制类型为竞争性抑制。由于 HMCA 与酪氨酸底物的结构高度相似, 因此可以推断, HMCA 是通过与酪氨酸酶活性中心的可逆性结合, 降低了酪氨酸底物与酶活性中心结合的几率, 从而起到抑制酶活性的作用。根据图 7 可得到米氏方程、 K_m 和 v_m , 见表 1 所示。

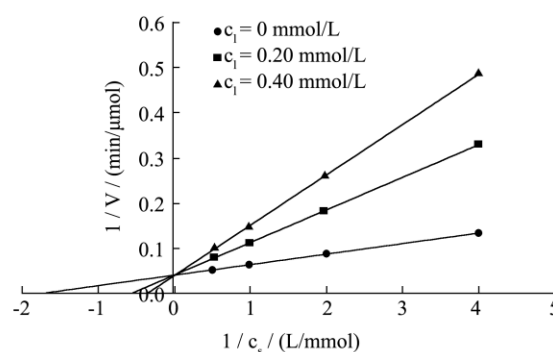


图 7 3-羟基-4-甲氧基肉桂酸对二酚酶抑制作用的 Lineweaver-Burk 曲线

Fig.7 Lineweaver-Burk plots indicating the inhibition of diphenolase by HMCA

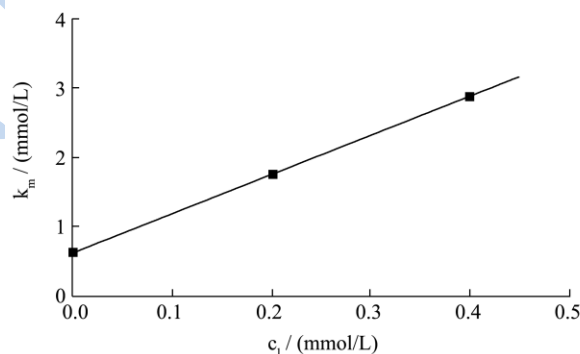


图 8 3-羟基-4-甲氧基肉桂酸浓度对米氏常数的影响

Fig.8 The effect of varying HMCA concentrations on the Michaelis constant

表 1 HMCA 对酪氨酸酶二酚酶的抑制动力学参数

Table 1 Kinetic parameters of the inhibition of diphenolase by HMCA

c_i / (mmol/L)	Michaelis-Menten equation	K_m / (mmol/L)	v_m / ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	K_i / (mmol/L)
0	$1/v = 0.023/c_S + 0.039$	0.59		
0.20	$1/v = 0.071/c_S + 0.040$	1.79	64.5	0.11
0.40	$1/v = 0.111/c_S + 0.039$	2.84		

以直线斜率对 HMCA 浓度进行二次作图, 见图 8 所示。根据图 8, 由直线在纵轴上的截距除以直线的斜率可以计算出竞争性抑制剂对游离酶的抑制常数 (K_i)

为0.11 mmol/L, 见表1所示。

4 结论

HMCA 对酪氨酸酶的单酚酶的抑制效应主要表现于酶催化反应的迟滞时间有明显的延长, 对二酚酶的抑制作用表现为竞争性抑制类型, 抑制常数 (K_I) 为 0.11 mmol/L, 对单酚酶和二酚酶的相对抑制率达到 50% 的 HMCA 浓度 (IC_{50}) 分别为 0.11 mmol/L 为 0.39 mmol/L, 比目前通常使用的熊果苷的二酚酶 IC_{50} 值 (5.3 mmol/L) 低得多, 是一种有市场潜力的酪氨酸酶抑制剂。

参考文献

- [1] Fenoll L G, Penalver J N, Rodriguez-lopez J N, et al. Tyrosinase kinetics: discrimination between two models to explain the oxidation mechanism of monophenol and diphenol substrates [J]. The International J of Biochem & Biology, 2004, 36(2): 235-246
- [2] Kubo I, Chen Q X, Nihei K I, et al. Molecular design of antibrowning agents: antioxidative tyrosinase inhibitors [J]. Food Chemistry, 2003, 81(2): 241-247
- [3] 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
LI Na, LU Xiao-xiang. Research progress in tyrosinase inhibitor [J]. Science and Technology of Food Industry, 2010, 31(7): 406-409
- [4] Osvaldo Z, Antonella B, Patrizia C, et al. Truffle-thio-flavours reversibly inhibit truffle tyrosinase [J]. FEMS Microbiology Letters, 2003, 220(1): 81-88
- [5] Gong S Z, Cheng J, Yang Z R. Inhibitory effect of eeric Acid on oxidation of L-DOPA catalyzed by mushroom tyrosinase [J]. Chinese J. of Chem. Engineering, 2005, 13(6): 771-775
- [6] 金一琼, 陈周谭, 赖富饶, 等. 曲酸与阿魏酸对酪氨酸酶的抑制作用研究 [J]. 现代食品科技, 2012, 28(4): 378-381
JIN Yiqiong, CHEN Zhou-tan, LAI Fu-rao, et al. Evaluation and applications of inhibitory effects of kojic acid and ferulic acid on tyrosinase [J]. Modern Food Science and Technology, 2012, 28(4): 378-381
- [7] 郭珉, 李珠华, 张志勤. RP-HPLC法同时测定复方升麻颗粒中异阿魏酸 葛根素和芍药苷 [J]. 中成药, 2012, 34(6): 1081-1084
GUO Min, LI Zhu-hua, ZHANG Zhi-qin. Simultaneous determination of isoferulic acid, puerarin and paeoniflorin in Compound Shengma Granule by RP-HPLC [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2012, 34(6): 1081-1084
- [8] 李颖, 勾建刚, 周蓬. 正交试验法优化半边莲中异阿魏酸的提取工艺 [J]. 药学研究, 2013, 32(1): 14-16
LI Ying, GOU Jian-gang, ZHOU Peng. Optimization of extraction process of isoferulic acid in Lobelia chinensis with orthogonal design [J]. Journal of Pharmaceutical Research, 2013, 32(1): 14-16
- [9] Sanchez F A, Rodriguez L J N, Garcia C F, et al. A comprehensive review of its mechanism [J]. Biochem Biophys Acta, 1995, 1247(1): 1-11
- [10] Chen Q X, Song K K, Wang Q, et al. Inhibitory effects on mushroom tyrosinase by some alkylbenzaldehydes [J]. J of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2003, 18(6): 491-496