

3,4-二羟基靛苯对蘑菇酪氨酸酶的抑酶和抑菌作用

陈祥仁, 朱斌琳, 张春乐, 陈清西, 王勤*

(厦门大学 生命科学学院, 化学生物学福建省重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要: 研究 3,4-二羟基靛苯对酪氨酸酶的抑制作用和对几种微生物的效应. 结果表明: 3,4-二羟基靛苯对蘑菇酪氨酸酶活力有明显的抑制作用, 其效应除了对稳态酶活力有较强的抑制作用外, 对酶促反应的迟滞时间也有延长作用. $10.0 \mu\text{mol/L}$ 的 3,4-二羟基靛苯可使稳态酶活力下降 53.5%, 并使迟滞时间从 18 s 延长到 225 s. 3,4-二羟基靛苯对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌 3 种细菌和真菌白色假丝酵母均有明显的抑制作用, 其对细菌的最小抑菌浓度 (MIC) 和最小杀菌浓度 (MBC) 均分别为 500 和 $1000 \mu\text{g/mL}$, 对白色假丝酵母的 MIC 和 MBC 分别为 1000 和 $2000 \mu\text{g/mL}$. 本研究为 3,4-二羟基靛苯在酪氨酸酶抑制剂中的应用提供实验理论依据.

关键词: 3,4-二羟基靛苯; 蘑菇酪氨酸酶; 细菌; 真菌; 抑制作用

中图分类号: Q 356.1

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2008)05-0714-04

酪氨酸酶 (EC 1.14.18.1) 是生物体合成黑色素的关键酶, 在生物体内, 酪氨酸酶的作用是先先将酪氨酸羟化, 产生邻位二羟基苯丙氨酸 (*L*-多巴), 然后再将 *L*-多巴氧化成多巴醌, 进而生成一系列引起褐化的色素类物质^[1]. 它与色素障碍性疾病及色素异常沉积有关^[2], 也是引起果蔬发生酶促褐变的主要因素^[3], 同时, 影响着昆虫的免疫系统及生长^[4]. 由于它存在广泛, 其抑制剂在医疗、美白、保鲜、杀虫方面均有很好的应用前景^[5]. 自然界的有害细菌、真菌和病毒等微生物是引起人类感染、诱发疾病的主要原因. 另外, 微生物感染也是导致果蔬腐烂变质的主要原因. 其中, 引起果蔬腐败的微生物主要有细菌、杆菌、霉菌和酵母菌等. 因此, 抗菌剂的研究也一直得到人们的关注. 随着人们生活水平的提高, 物质的丰富, 对抗菌剂的要求也越来越高, 与人接触最密切的抗菌剂包括: 有机小分子抗菌剂和天然生物提取的抗菌剂^[6].

我们曾经报道了肉桂酸类的衍生物^[7]、水杨酸^[8]、羟基苯甲酸^[9]对酪氨酸酶的抑制作用及其对微生物的效应. 作为该课题的系列研究, 本文报道 3,4-二羟基靛苯对酪氨酸酶的抑制作用及其对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌白色假丝酵母的抑制效应, 旨在为开发出同时具有酪氨酸酶抑制活性和抗菌效应的高效抑制剂提供理论基础.

1 材料与方法

1.1 材料

3,4-二羟基靛苯、蘑菇酪氨酸酶及二甲亚砜 (DMSO) 为 Sigma 化学公司产品; *L*-酪氨酸 (*L*-Tyr) 为 Aldrich 化学公司产品; *L*-3,4-二羟基苯氨酸 (*L*-DOPA) 为 Aldrich 化学公司产品; 其它试剂均为国产分析纯. 大肠杆菌 (*E. coli* CMCC (B) 44103)、枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis* CMCC (B) 26003)、金黄色葡萄球菌 (*St. aureus* CMCC (B) 26003)、白色假丝酵母 (*C. albicans* ATCC10231) 均由厦门大学生命科学学院微生物教研室提供. 使用的蒸馏水为重蒸水. 吸光度测定仪为 UV-6000 分光光度计.

1.2 方法

1.2.1 酪氨酸酶活力的测定

参考文献[10]方法, 以 0.5 mmol/L *L*-Tyr 为底物, 在 $3 \text{ mL } 0.05 \text{ mol/L}$ 磷酸缓冲液 (pH 6.8) 的测活体系中, 先加入 0.1 mL 含不同浓度的抑制剂 (溶于 DMSO 溶液) 于比色杯中, 再加进 2.8 mL 预先在 30°C 恒温水浴保温的底物溶液, 然后加入蘑菇酪氨酸酶水溶液, 立刻混匀, 在 30°C 恒温条件下测定波长为 475 nm 的光密度值随时间的增长直线, 消光系数按 $3700 (\text{mol/L} \cdot \text{cm}^{-1})$ 计算. DMSO 终浓度为 3.33%.

1.2.2 MIC 和 MBC/MFC 的测定

最低抑菌浓度 (MIC) 和最低杀菌浓度 (MBC) 的测定: 采用微量液体稀释法^[11], 在无菌的条件下, 用接种环取 2~3 个生长良好的菌落加入到 10 mL LB 培养基 (真菌用马铃薯糖 PDA 培养基) 中备用, 菌液浓

收稿日期: 2007-10-22

基金项目: 国家自然科学基金 (30570408), 福建省高等学校新世纪优秀人才支持计划项目, 福建省高校创新团队培养计划资助

* 通讯作者: qwang@xmu.edu.cn

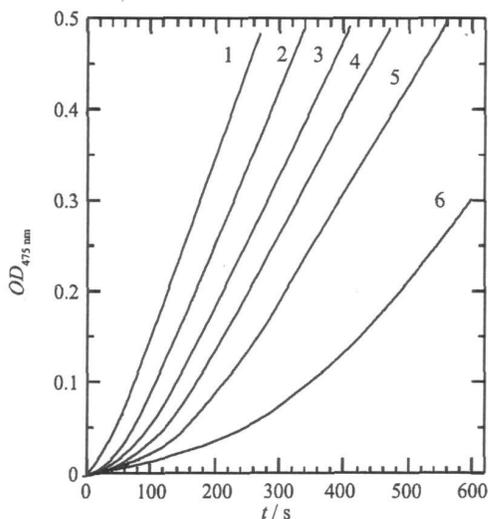


图1 3,4-二羟基苯腈对酪氨酸酶单酚酶抑制作用的进程曲线

曲线1~6: 3,4-二羟基苯腈的浓度分别为: 0、2.5、5、6.5、7.5和10 $\mu\text{mol/L}$

Fig.1 Progress curves for the inhibition on monophenolase of mushroom tyrosinase by 3,4-dihydroxybenzonnitrile

度约为 $1.0 \times 10^5/\text{mL}$. 取紫外线灭菌后的96孔板一块,每孔加150 μL LB液体培养基(真菌用马铃薯糖PDA培养基),再加40 μL 菌液,然后每孔加10 μL 药液,样品终浓度分别为31.25、62.50、125.00、250.00、500.00、1000.00、2000.00 $\mu\text{g/mL}$,每一浓度作3复孔,对照组3复孔各加50 μL 菌液.细菌37 $^{\circ}\text{C}$ 培养18~24 h(真菌28 $^{\circ}\text{C}$ 培养48~72 h),以浑浊度为标准肉眼观察无菌生长的药液浓度即为最低抑菌浓度(MIC),接着细菌继续培养18~24 h,真菌继续培养48~72 h,无菌生长的药液浓度即为最低杀菌浓度(MBC/MFC).

1.2.3 3,4-二羟基苯腈对微生物生长曲线影响的测定

制备浓度约为 $1.0 \times 10^6/\text{mL}$ 的菌液.取75%浸泡过的96孔板紫外灭菌,每孔加20 μL 菌液,然后加170 μL 无菌液体培养基,阳性对照加180 μL .阴性对照不加药液,其他的按方法1.2.2测得的结果为参考,取1/2 MIC, MIC, MBC的浓度,在每孔内加10 μL 药液,对照组和每一浓度样品组各作3个复孔.然后定期取样用无菌水稀释至适当浓度,涂布,进行平板计数.总时间取微生物的一个生长周期,细菌取24 h,真菌取48 h.

2 实验结果

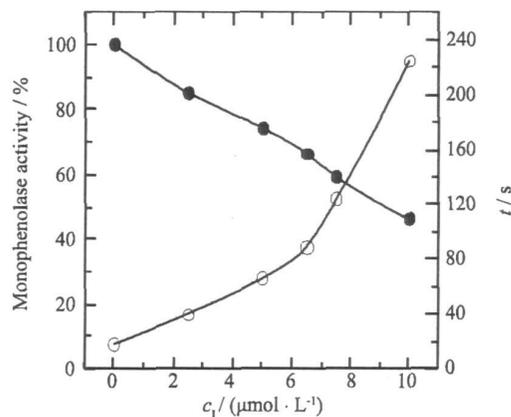


图2 3,4-二羟基苯腈对酪氨酸酶单酚酶稳态酶活力(1)和迟滞时间(2)的影响

Fig.2 Effect of 3,4-dihydroxybenzonnitrile on the steady-state activity (1) and the lag time (2) of monophenolase of mushroom tyrosinase

2.1 3,4-二羟基苯腈对蘑菇酪氨酸酶作用L-Tyr进程曲线的影响

以L-Tyr为底物,探讨3,4-二羟基苯腈对蘑菇酪氨酸酶催化反应的动力学曲线影响.单酚酶的催化反应开始时,产物的形成量缓慢地上升,到一定时间后呈直线上升,反应体系达到恒定的斜率,说明已达到稳态(图1曲线1).直线部分外推得到横轴的截距为迟滞时间,直线部分的斜率就是酪氨酸酶单酚酶的稳态反应速度.改变效应物的浓度,便可以得到一组反应曲线,从中可以看出效应物对单酚酶的作用效果,结果见图1.

2.2 3,4-二羟基苯腈对蘑菇酪氨酸酶单酚酶的效应

以1 mmol/L L-Tyr为底物,测定不同浓度3,4-二羟基苯腈对酶促反应的迟滞时间和稳态的酶活力,结果(图2)表明,3,4-二羟基苯腈既可以延长酪氨酸酶单酚酶反应的迟滞时间,也可以降低酶的稳态活力.随着抑制剂浓度的增大,酶反应的迟滞时间呈指数上升趋势,没有抑制剂存在时,酶反应的迟滞时间为18 s,当3,4-二羟基苯腈浓度为10 $\mu\text{mol/L}$ 时,迟滞时间延长到225 s,迟滞时间增大12.5倍.稳态的酶活力则随着3,4-二羟基苯腈浓度的增大迅速下降,当浓度达10 $\mu\text{mol/L}$ 时,可使酶活力下降53.5%.测定3,4-二羟基苯腈对蘑菇酪氨酸酶单酚酶活力下降50%的抑制剂浓度(IC_{50})为9.2 $\mu\text{mol/L}$.

2.3 3,4-二羟基苯腈对几种微生物的效应

选取大肠杆菌(*E. coli*)、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)及白色假丝酵母(*C.*

albicans) 作为代表菌属, 研究 3, 4-二羟基氰苯对它们生长的抑制作用. 实验结果表明, 3, 4-二羟基氰苯对 3 种细菌具有相同的抑制作用, 其最低抑菌浓度和最低杀菌浓度都分别为 500 和 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 3, 4-二羟基氰苯对真菌白色假丝酵母的抑制作用较弱, 其最低抑菌浓度和最低杀菌浓度分别为 1 000 和 2 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (表 1).

表 1 3, 4-二羟基氰苯的 MIC 和 MBC/MFC

Tab. 1 The MIC and MBC/MFC of 3, 4-

dihydroxybenzoinitrile ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

菌名	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>St. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
MIC	500	500	500	1000
MBC	1000	1000	1000	2000

2.4 3, 4-二羟基氰苯对大肠杆菌生长曲线的影响

图 3 是 3, 4-二羟基氰苯对大肠杆菌的抗菌作用, 以培养时间为横坐标, 单位体积菌数的对数值为纵坐标作图. 当 3, 4-二羟基氰苯浓度为 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 2 h 内将大肠杆菌抑制到 $10^3/\text{mL}$, 而在 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度时, 2 h 内可以将大肠杆菌抑制到 $10/\text{mL}$, 并且持续到 9 h.

2.5 抑制剂对白色假丝酵母生长曲线的影响

图 4 是 3, 4-二羟基氰苯对白色假丝酵母菌的抗菌作用. 当 3, 4-二羟基氰苯为 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 2 h 内将白色假丝酵母菌抑制到 $10^2/\text{mL}$, 当浓度为 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 2 h 内可以将白色假丝酵母菌抑制到 $10/\text{mL}$ 左右, 并持续 5 h.

3 讨论

我们曾经报导了熊果甙^[12]和对氰基苯酚^[10]对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用. 熊果甙和对氰基苯酚与本文研究的 3, 4-二羟基氰苯具有类似的化学结构, 即都有一个苯酚结构, 熊果甙不同的是糖苷基取代了对氰基苯酚的氰基, 而 3, 4-二羟基氰苯则比对氰基苯酚在 3 位上多了一个羟基. 比较 3 种化合物对蘑菇酪氨酸酶单酚酶活力的抑制作用的结果表明, 对氰基苯酚和 3, 4-二羟基氰苯使活力下降 50% 的抑制剂浓度 (IC_{50}) 分别为 0.22 mmol/L 和 9.2 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 而熊果甙对单酚酶稳态酶活力的影响不显著, 三者均能显著延长迟滞时间. 研究这 3 种化合物对酪氨酸酶二酚酶的影响, 测定酶活力下降 50% 的对氰基苯酚和 3, 4-二羟基氰苯的浓度 (IC_{50}) 分别为 0.80 mmol/L 和 13.5 $\mu\text{mol}/\text{L}$,

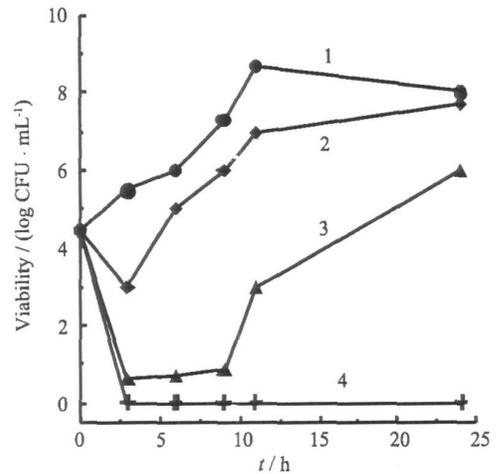


图 3 3, 4-二羟基氰苯对大肠杆菌的抗菌作用
曲线 1~ 4 的抑制剂浓度分别为 0、250、500 和 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Fig. 3 Antibacterial effect on *E. coli* of 3, 4-dihydroxybenzoinitrile

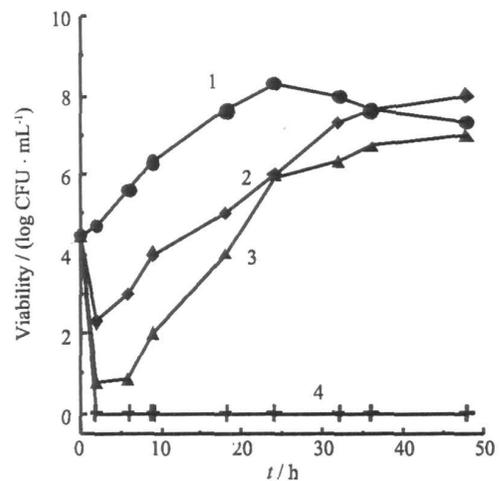


图 4 3, 4-二羟基氰苯对白色假丝酵母的抗菌作用
曲线 1~ 4 的抑制剂浓度分别为 0、500、1 000 和 2 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Fig. 4 Antibacterial effect on *C. albicans* of 3, 4-dihydroxybenzoinitrile

而熊果甙的 IC_{50} 为 5.3 mmol/L. 由 IC_{50} 值可以看出, 3, 4-二羟基氰苯对单酚酶及二酚酶的抑制效应均明显优于对氰基苯酚, 而对氰基苯酚的抑制效应则优于熊果甙. 说明 3-位的羟基的存在能提高对氰基苯酚对酶的抑制作用. 而苯酚的对位是氰基时对酶的抑制作用大大高于对位是糖苷基. 进一步研究它们的抑制类型发现, 熊果甙和对氰基苯酚对二酚酶的抑制类型均为竞争型抑制, 而 3, 4-二羟基氰苯是非竞争型抑制剂^[13]. 这表明, 苯酚的对位取代基是氰基还是糖苷基只会对抑制活性高低有影响, 对抑制类型没有影响. 而

当对苯酚的 3 位被羟基取代后, 不仅抑制活性受到了大大提高, 抑制类型也由竞争型抑制变为非竞争型抑制。

测定 3, 4-二羟基苯对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和白色假丝酵母菌的抗菌作用, 实验结果表明, 其对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌的 MIC 和 MBC 都为 500 和 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 对白色假丝酵母菌的 MIC 和 MBC 则为 1 000 和 2 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。当其处于 MBC 或者 MFC 浓度时, 均能在 2 h 之内杀灭微生物, 表明 3, 4-二羟基苯具有明显的抑制细菌和真菌的作用, 而且抗菌谱较广, 它们的抗菌机理可能是通过作用于微生物的细胞膜而达到抗菌效应。因此, 3, 4-二羟基苯是一种极具开发潜力的同时具有酪氨酸酶抑制活性和抗菌效应的高效抑制剂。

参考文献:

[1] Sánchez-Ferrer A, Rodríguez-López J N, García-Cnovas F, et al. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism[J]. BBA-protein and Molecular Enzymology, 1995, 1247: 1- 11.

[2] 潘兴华. 黑素细胞及黑素的生成与调节[J]. 生理科学进展, 1998, 29(2): 179- 181.

[3] Jimenez M, Chazarra S, Escribano J, et al. Competitive inhibition of mushroom tyrosinase by 4-substituted benzaldehydes[J]. J Agric Food Chem, 2001, 49(8): 4060- 4063.

[4] 孟凤霞, 高希武, 张岚, 等. 昆虫酪氨酸酶的研究进展[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2004, 15(6): 496- 499.

[5] 陈清西, 林建峰, 宋康康. 酪氨酸酶抑制剂的研究进展[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2007, 46(2): 272- 282.

[6] 肖丽平, 李临生. 抗菌防腐剂() 抗菌防腐剂的历史定义与分类[J]. 日用化学工业, 2002, 32(2): 78- 81.

[7] 张春乐, 宋康康, 陈祥仁, 等. 肉桂酸及其衍生物的抑菌活性研究[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2006, 45(sup): 14- 17.

[8] 郑国兴, 张春乐, 黄浩, 等. 水杨酸的抑酶与抑菌作用[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2006, 45(sup): 19- 22.

[9] 张丽娟, 张春乐, 宋康康, 等. 3-羟基苯甲酸对酪氨酸酶的抑制作用和抑菌作用[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2006, 45(5): 705- 708.

[10] 王勤, 邱凌, 宋康康, 等. 对苯酚对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2004, 43(4): 568- 571.

[11] 李明, 潘小玲, 王莉莉, 等. 人子宫黏液抗菌多肽的分离和鉴定[J]. 中华医学杂志, 2005, 85(16): 1109- 1112.

[12] 宋康康, 邱凌, 黄璜, 等. 熊果甙作为化妆品添加剂对酪氨酸酶抑制作用[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2003, 42(6): 791- 794.

[13] Xie J J, Song K K, Qiu L, et al. Inhibitory effects of substrate analogues on enzyme activity and substrate specificities of mushroom tyrosinase[J]. Food Chemistry, 2007, 103: 1075- 1079.

Effects of 3, 4-Dihydroxybenzotrile on Mushroom Tyrosinase and Some Microbe

CHEN Xiang-ren, ZHU Bin-lin, ZHANG Chun-le,
CHEN Qing-xi, WANG Qin*

(School of Life Sciences, Key Laboratory for Chemical Biology of Fujian Province,
Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: The inhibitory effects of 3, 4-dihydroxybenzotrile on the activity of mushroom tyrosinase and antibacterial activities against some bacteria and fungi were studied. 3, 4-Dihydroxybenzotrile was found to inhibit the monophenolase activity of mushroom tyrosinase. The lag time of the enzyme for oxidation of *L*-tyrosine extended and the steady-state rate of monophenolase decreased. When the concentration of 3, 4-dihydroxybenzotrile reached 10.0 $\mu\text{mol}/\text{L}$, the steady-state rate of the enzyme dropped by 53.5% of the total activity, and the lag time extended from 18 sec to 225 sec. The inhibition of 3, 4-dihydroxybenzotrile on some bacteria such as *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus* and fungi such as *C. albicans* was studied. The values of MIC and MBC of 3, 4-dihydroxybenzotrile to *E. coli*, *B. subtilis*, *St. aureus* were determined to be 500 and 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively, and the values of MIC and MBC to *C. albicans* were 1 000 and 2 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. This study gave experimental and theoretical support for 3, 4-dihydroxybenzotrile used as inhibitor of tyrosinase and antimicrobial agent.

Key words: 3, 4-dihydroxybenzotrile; mushroom tyrosinase; bacterium; fungi; inhibition; antimicrobial effects