

没食子酸衍生物对蘑菇酪氨酸酶的抑制机理

林 敏,何 群,邱 凌,郑国兴,陈清西*

(厦门大学生命科学学院 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室,福建 厦门 361005)

摘要: 蘑菇褐变过程主要是由于其酪氨酸酶的催化作用引起的,寻找该酶抑制剂在食品保鲜和储藏中的应用具有重要的意义.作者在实验中,发现没食子酸十二烷基酯和没食子酸香叶酯对蘑菇酪氨酸酶有较强的抑制作用,测定它们抑制蘑菇酪氨酸酶二酚酶的酶活力下降 50% 的抑制剂浓度 (IC_{50}) 分别为 1.55 和 0.25 mmol/L. 显示没食子酸香叶酯的抑制作用强度是没食子酸十二烷基酯的 6 倍.研究了这两种抑制剂对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用动力学,结果表明:没食子酸十二烷基酯和没食子酸香叶酯对酶的抑制作用均表现为可逆反应,前者为反竞争性,其抑制常数 K_{is} 为 0.636 mmol/L;而后者为混合型,抑制常数 K_i 和 K_{is} 分别为 0.133 和 0.453 mmol/L.

关键词: 酪氨酸酶;没食子酸衍生物;抑制作用;动力学

中图分类号: Q 356.1

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2006)04-0567-03

酪氨酸酶(EC. 1. 14. 18. 1)广泛存在于动植物体和人体内,在动植物体酶促褐变、体内色素合成的过程中起了关键的作用^[1,2]. 它具有单酚酶和二酚酶活力,能将酪氨酸羟化,产生邻位二羟基苯丙氨酸(L-多巴)(单酚酶活性),然后再将多巴氧化成多巴醌(二酚酶活性),进而生成一系列引起褐化的色素物.因此,目前国内外已研究了大量的化学物质对酪氨酸酶的抑制作用,以期寻找高效的抑制剂来用作食品加工中的保鲜剂,化妆品添加剂等.没食子酸酯类是没食子酸的重要衍生物之一,能用于治疗心脑血管疾病,可以消除机体内的氧自由基,可以作抗菌剂、食品稳定剂、新型感光材料中的添加剂,广泛应用于化工、轻工、食品、医药等产品中^[3],没食子酸十二烷基酯是目前被批准用于食品添加剂的 3 种没食子酸酯类之一^[4].我们研究发现没食子酸十二烷基酯对酪氨酸酶有抑制作用,本文报道它们的抑制作用机理、抑制动力学的研究,以期寻找更有效的酪氨酸酶抑制剂.

1 材料与方法

1.1 材料

酪氨酸酶为 Sigma 化学公司的蘑菇酪氨酸酶,比活力为 6 680 U/mg. 没食子酸十二烷基酯、二甲亚砜

(DMSO)、L-3,4-二羟基苯氨酸(DOPA)为 Aldrich 化学公司产品.其它试剂为国产分析纯试剂.蒸馏水为去离子重蒸水.

1.2 方法

酪氨酸酶的酶活力测定参考文献[5]: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℃ 恒温水浴中保温的底物溶液,然后加入 0.1 mL 酪氨酸酶水溶液,迅速充分混匀,在 30℃ 恒温条件下测定波长为 475 nm 的光密度值,由其随时间的增长直线的斜率计算出酶的活力.测定二酚酶所用底物为 0.5 mmol/L DOPA,酶的终浓度为 6.67 μ g/mL,所用 DMSO 终浓度均为 3.33%,并用对照扣除 DMSO 本底的影响.测定仪器为 DU 650 分光光度计.抑制剂对酶的抑制作用的机理是通过 Lineweaver-Burk 双倒数作图,比较酶催化反应的动力学参数,包括表观米氏常数(K_m)和最大反应速度(V_m)的变化来判断的^[6,7].

2 结果

2.1 没食子酸衍生物对蘑菇酪氨酸酶二酚酶活力的影响

分别以没食子酸十二烷基酯(简写 LG)和没食子酸香叶酯(简写 GG)为效应物,测定它们对蘑菇酪氨酸酶催化底物 DOPA 氧化反应的酶活力的影响,酶的剩余活力与抑制剂的浓度的依赖关系结果见图 1.随着抑制剂浓度的增大,酶活力呈指数下降.使该酶活力下降一半所需的抑制剂浓度(IC_{50})分别为 1.55 和 0.25 mmol/L. GG 对酶的抑制能力是 LG 的 6 倍.

收稿日期:2005-10-09

基金项目:国家自然科学基金(30570408),福建省重点科技项目(2004N002)资助

作者简介:林敏(1968-),女,在职硕士研究生.现在龙岩学院生物科学与工程系工作.

*通讯作者:chenqx @jingxian. xmu. edu. cn

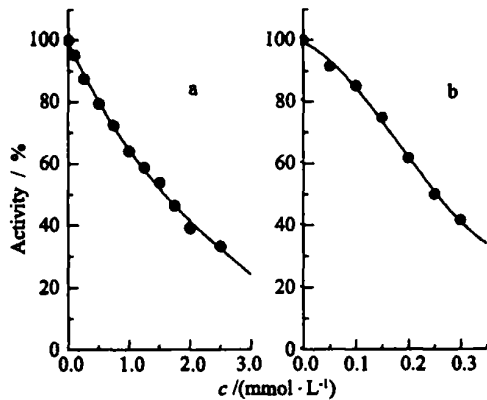


图1 LG(a)和GG(b)对蘑菇酪氨酸酶活力的影响
Fig.1 Effect of LG(a) and GG(b) on the activity of mushroom tyrosinase

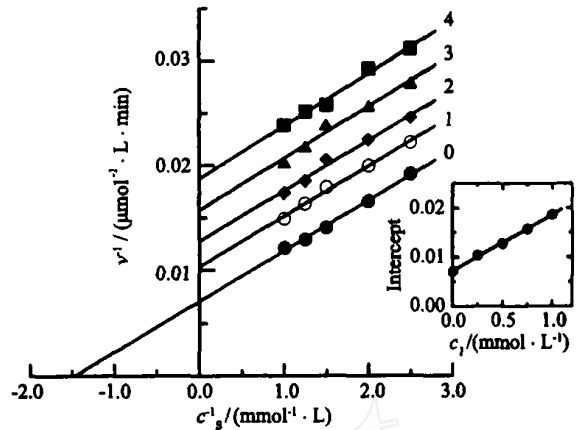


图3 LG对酪氨酸酶抑制类型和抑制常数的测定
Fig.3 Determination of the inhibitory type and inhibition constant of LG on tyrosinase

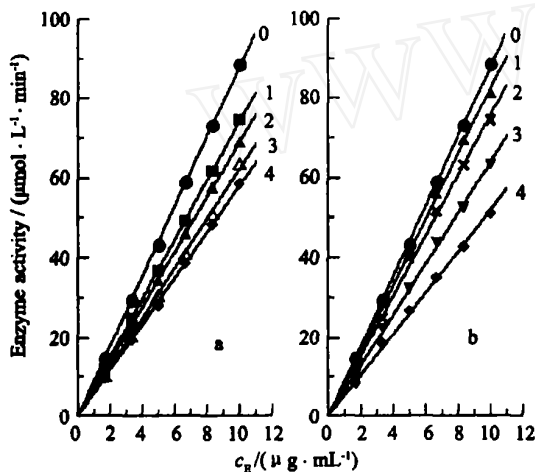


图2 LG(a)和GG(b)对蘑菇酪氨酸酶抑制作用机理的判断
a: 直线0~4 LG浓度分别为:0、0.25、0.50、0.75和1.00 mmol/L;b: 直线0~4 GG浓度分别为:0、50、100、150和200 μmol/L

Fig.2 Determination of the inhibitory mechanism of LG (a) and GG (b) on mushroom tyrosinase

2.2 没食子酸衍生物对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用表现为可逆效应

在含不同浓度的效应物 LG 和 GG 的测活体系中,固定底物 DOPA 浓度为 0.5 mmol/L,测定不同酶量的反应初速度.图 2 分别表示酶在含 LG 和 GG 的测活体系中酶的剩余活力与加入的酶量的关系,酶活力对酶量作图为一组通过原点的直线,两个图中的 0 线均代表无效应物时的酶活力,随着效应物浓度的增大,直线的斜率降低.说明 LG 和 GG 对酶的抑制作用均属于可逆过程,随着抑制剂浓度的增大,催化效率降低显著,这说明这两种效应物和酶的结合导致酶活力受抑制,并不导致酶的分子构象的永久变化而失活.

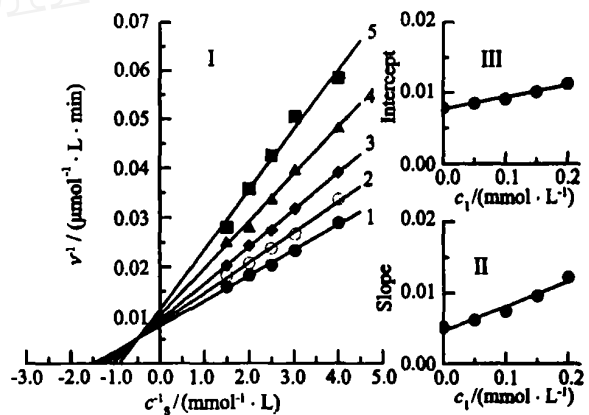


图4 GG对酪氨酸酶抑制类型和抑制常数的测定
直线1~5的抑制剂浓度分别为:0、0.05、0.10、0.15和0.20 μmol/L

Fig.4 Determination of the inhibitory type and inhibition constant of GG on tyrosinase

2.3 LG对酪氨酸酶的抑制机理

在含不同浓度 LG 的测活体系中,测定酶催化不同浓度的 DOPA 氧化反应的初速度,以 Lineweaver-Burk 双倒数作图,得到一组斜率不变、纵轴截距增大的平行的直线(图 3),说明米氏常数 (K_m) 和最大反应速度 (V_m) 值均随着 LG 浓度的增大而减小, LG 既影响 K_m , 也影响 V_m , 其抑制机理表现为反竞争性抑制类型.以不同浓度下测定的 $1/V_m$ 对抑制剂浓度作图为一组通过原点的直线,从直线的斜率可以求得抑制常数 (K_{is}) 为 0.636 mmol/L.

2.4 GG对酪氨酸酶的抑制机理

在含不同浓度 GG 的测活体系中,改变底物浓度,测定酶促反应的初速度,以 $1/v \sim 1/[S]$ 作图结果见图 4,斜率和截距都因 GG 浓度的变化而改变,米氏常数 (K_m) 随着 GG 浓度的增大而增大,最大反应速度

(V_m)随着 GG 浓度的增大而下降,其抑制机理表现为混合型.以斜率和纵轴截距分别再对 GG 浓度作图(图 4-II,图 4-III)为直线,求得 GG 对游离酶的抑制常数(K_i)和对酶底物络合物的抑制常数(K_{is})分别为 0.133 和 0.453 mmol/L. GG 对游离酶的抑制作用强度是对酶底物络合物抑制作用强度的 3 倍.

3 讨论

前文报道没食子酸作为酪氨酸酶抑制剂,使该酶活力下降一半所需的抑制剂浓度(IC_{50})为 4.5 mmol/L.由于它极易被氧化,无法测定它对酪氨酸酶的抑制作用类型^[8].没食子酸十二烷基酯(LG)和没食子酸香叶酯(GG)对酶的抑制作用均表现为可逆反应,两种效应物和酶的结合导致酶活力受抑制,并不导致酶的分子构象的永久变化而失活.LG 和 GG 在分子结构上很相似,都含有一个没食子酸根即 3,4,5-三羟基苯甲酸根,差异在于 GG 碳链较短,却含两个烯键,LG 碳链较长,含有十二个烷基.从实验结果来看,作为酪氨酸酶抑制剂,烯键对酶的抑制作用较明显,可能是因为烯键的还原性较强.虽然它们都是由没食子酸衍生而来的酯类,但是对酪氨酸酶的抑制作用类型显然不同.LG 表现为反竞争性抑制类型,它只与酶-底物络合物(ES)结合,而不与游离酶结合,使反应平衡趋向于 ES 的形成,故 LG 的存在反而增加了 E 与 S 的亲合力.而 GG 表现为混合型抑制类型,与其香叶酯上的烯键和侧链有密切关系.香叶醇是被广泛应用的食物添加剂之一^[8],由于 GG 对酪氨酸酶有较强的抑制作用,可考

虑作为食品抗氧化剂及食品保鲜剂,但其安全性还有待细胞实验进一步研究.

参考文献:

- [1] 赵会全,刘望夷.酪氨酸酶的分子生物学研究进展[J].国外医学分子生物学分册,1999,13(6):273-292.
- [2] Sánchez-Ferrer A, Rodríguez-López J N, García-Cánovas F, et al. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism[J]. BBA-protein and Molecular Enzymology, 1995, 1247:1-11.
- [3] 孟庆民,张爱黎.用十二烷基苯磺酸催化合成没食子酸正戊酯[J].当代化工,2002,31(3):136-138.
- [4] Aruoma O I, Murcia A, Butler J, et al. Evaluation of the antioxidant and prooxidant actions of gallic acid and its derivatives[J]. J. Agric. Food Chem., 1993, 41: 1880-1885.
- [5] Chen Q X, Song K K, Wang Q, et al. Inhibitory effects of mushroom tyrosinase by some alkylbenzaldehydes[J]. J. Enzy. Inhib. Med. Chem., 2003, 18(6):491-496.
- [6] 黄璜,刘晓丹,陈清西.苯甲醛族化合物对蘑菇酪氨酸酶抑制作用的研究[J].厦门大学学报:自然科学版,2003,42(1):98-101.
- [7] 柯莉娜,王勤,陈清西.联苯基甲醛与联苯基甲酸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(2):249-252.
- [8] Kubo I, Chen Q X, Nihei K. Molecular design of anti-browning agents: antioxidative tyrosinase inhibitors[J]. Food Chem., 2003, 81:241-247.

Inhibitory Mechanism of Gallate Derivatives on Mushroom Tyrosinase

LIN Min, HE Qun, QIU Ling, ZHENG Guo-xing, CHEN Qing-xi*

(Key Laboratory of the Ministry of the Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering,

School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Mushroom browning process is mainly caused by the effect of tyrosinase. It is of significant to search tyrosinase inhibitors for the application on food anti-browning and storage. In the present work, we found that lauryl gallate(LG) and geranyl gallate(GG) have strong inhibitory effect on mushroom tyrosinase. The inhibitor concentrations leading to 50% (IC_{50}) of the enzyme activity lost were estimated to be 0.25 mmol/L and 1.55 mmol/L for them, respectively. The inhibitory potency of GG is as about six times as high as that of LG. Inhibitory kinetics of the enzyme by LG and GG was showed to be reversible reaction with remaining enzyme activity. LG was determined to be an uncompetitive inhibitor of the enzyme with the inhibition constant (K_{is}) of 0.636 mmol/L; while GG belongs to be a mixed type inhibitor with the inhibition constants K_i of 0.133 mmol/L and K_{is} of 0.453 mmol/L.

Key words: mushroom tyrosinase; gallate derivatives; inhibitory mechanism; kinetics