

# 对醛基苯甲酸对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用

黄 浩, 宋康康, 邱龙新, 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:** 酪氨酸酶是一种同时具有单酚酶和二酚酶活力的酶. 对醛基苯甲酸 (ABA) 对蘑菇酪氨酸酶活力的影响研究结果表明: ABA 只对蘑菇酪氨酸酶的二酚酶活性有抑制作用, 而对单酚酶没抑制作用. ABA 对二酚酶的抑制作用显示浓度关系, 测定导致酶活力下降 50% 的抑制剂浓度 ( $IC_{50}$ ) 为 0.98 mmol/L. ABA 对二酚酶的效应为可逆的非竞争性的抑制, 抑制常数  $K_i$  为 0.94 mmol/L. 本文得到的结果与苯甲酸和苯甲醛的效应进行了比较.

**关键词:** 酪氨酸酶; 对醛基苯甲酸; 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 (2005) 04-0566-03

酪氨酸酶 (EC 1.14.18.1) 又称多酚氧化酶, 它具有二酚酶和单酚酶活力, 是广泛存在于动植物体和人体内的参与合成色素的关键酶<sup>[1-3]</sup>. 它能将酪氨酸羟化, 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, 对酪氨酸酶抑制剂的研究已引起国内外的重视, 例如有人应用 4-己基间苯二酚来保护对虾在储存过程中发生褐变, 认为它既有效且安全, 对人体没有毒害的副作用<sup>[4]</sup>. 前文我们报导了苯甲醛、苯甲酸对蘑菇酪氨酸酶活力影响, 研究抑制作用机理, 阐明酶的抑制剂在保鲜中的应用<sup>[5,6]</sup>. 本文以对醛基苯甲酸为效应物, 研究对蘑菇酪氨酸酶活力的影响, 探讨对酶的抑制作用机理, 以期对酪氨酸酶抑制剂的分子设计改造, 寻找更有效的该酶抑制剂奠定理论依据.

## 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; 对醛基苯甲酸 (ABA) 和二甲基亚砜 (DMSO) 均为 Sigma 化学公司产品; L-酪氨酸 (Tyr), L-3,4-二羟基苯丙氨酸 (L-DOPA) 为 Aldrich 化学公司产品. 其它试剂为国产分析纯试剂, 使用的蒸馏水为去离子重蒸水.

### 1.2 方法

酪氨酸酶的酶活力测定<sup>[7]</sup>: 先加入 0.1 mL 含不同浓度的 ABA (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 0.1 mL 酪氨酸酶水溶液, 即刻充分混匀, 在 30 °C 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. 测定单酚酶活力所用的底物为 0.5 mmol/L Tyr, 酶的终浓度为 33.3 mg/mL; 二酚酶所用底物为 0.5 mmol/L L-DOPA, 酶的终浓度为 6.67 μg/mL. 所用 DMSO 终浓度均为 3.33%. 测定仪器为 UV-650 分光光度计. ABA 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.

## 2 实验结果

### 2.1 ABA 对蘑菇酪氨酸酶二酚酶活力的影响

以 L-多巴为底物, 测定酶的二酚酶活性, 图 1 为 ABA 对酪氨酸酶的二酚酶活力的抑制曲线, 随着抑制剂浓度的增大, 酶活力呈指数的下降, 导致酶活力下降一半所需的抑制剂浓度 ( $IC_{50}$ ) 为 0.98 mmol/L.

### 2.2 ABA 对蘑菇酪氨酸酶的抑制机理

在测活体系中, 固定底物 (L-DOPA) 浓度为 0.5 mmol/L, 加入不同浓度的 ABA, 改变加入的蘑菇酪氨酸酶的量, 测定酶催化 L-DOPA 氧化的活力. 图 2 表示酶经 ABA 作用后的剩余酶活力与加入的酶量间的关系, 酶活力对酶量作图得到一组通过原点的直线, 随着效应物浓度的增大, 直线的斜率降低. 说明 ABA 对酶的抑制作用属于可逆过程, ABA 是通过抑制酶活力而

收稿日期: 2004-05-09

基金项目: 福建省科技攻关课题 (2004N002), 福建省自然科学基金项目 (B0410003) 资助

作者简介: 黄浩 (1980 - ), 男, 硕士研究生.

\*通讯作者: chenqx@jingxian.xmu.edu.cn

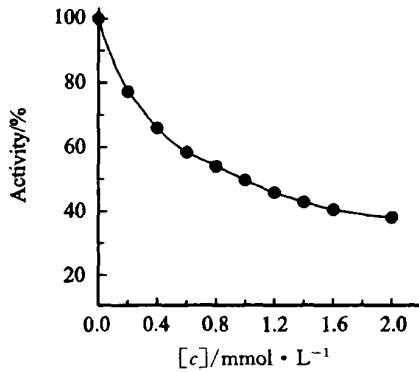


图 1 对醛基苯甲酸对酪氨酸酶二酚酶活力的影响  
Fig 1 Effect of *p*-aldehydobenzoic acid on the diphenolase activity of mushroom tyrosinase

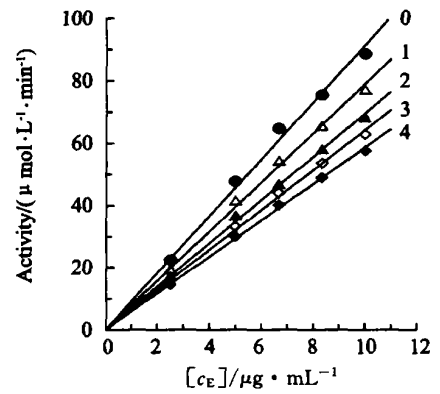


图 2 对醛基苯甲酸对酪氨酸酶抑制机理的判断  
直线 0~4 ABA 浓度分别为: 0, 0.1, 0.2, 0.3 和 0.4 mmol/L

Fig 2 Detemination of the inhibitory mechanism of *p*-aldehydobenzoic acid on mushroom tyrosinase

导致催化效率的降低,而不是通过降低有效的酶量导致活力的下降.

### 2.3 ABA 对酪氨酸酶二酚酶的抑制类型及抑制常数的测定

在测活体系中,固定酶的浓度,改变 L-DOPA 浓度,测定不同浓度抑制剂对酶活力的影响,以 Lineweaver-Burk 双倒数作图 (图 3),得到一组横轴截距不变的直线,说明 ABA 作为酪氨酸酶抑制剂,不影响米氏常数 ( $K_m$ ),但可以使反应的最大反应速度 ( $V_{max}$ ) 下降,其抑制类型为非竞争性抑制类型,它与酶的结合不受到底物的影响. ABA 能与游离酶 (E) 结合而生成酶抑制剂络合物 (EI),也能与酶底物络合物 (ES) 结合,从而成为不能生成产物的酶底物抑制剂三元络合物 (ESI),进而产生对酶的抑制. 以不同浓度 ABA 下

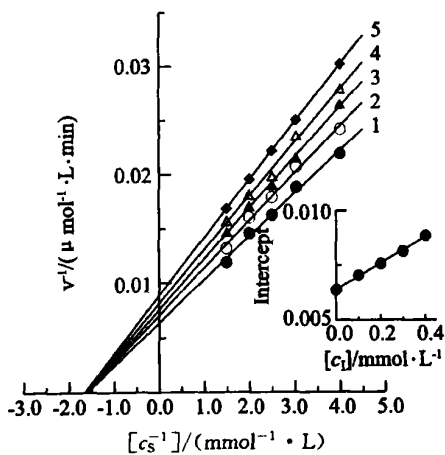


图 3 ABA 对酪氨酸酶的抑制类型和常数测定  
直线 1~5 ABA 浓度分别为: 0, 0.1, 0.2, 0.3 和 0.4 mmol/L

Fig 3 Detemination of the inhibitory type and inhibition constant of *p*-aldehydobenzoic acid on mushroom tyrosinase

测定的  $1/V_m$  对抑制剂浓度作图 (图 3 内插图) 为一条直线,从直线的斜率可以求得抑制常数 ( $K_i$ ) 为 0.94 mmol/L.

### 2.4 ABA 对蘑菇酪氨酸酶单酚酶活力的影响

以 ABA 为效应物,研究其对酪氨酸酶单酚氧化酶活力的影响,结果见图 4. 该图表明酶反应的迟滞时间 (曲线的直线部分交于横轴的值) 随着抑制剂浓度的增大基本没发生变化,稳态的酶活力 (直线部分的斜率) 也没有随着抑制剂浓度的增大显著的下降,这说明 ABA 对酪氨酸酶的单酚酶活性基本没有抑制作用.

## 3 讨论

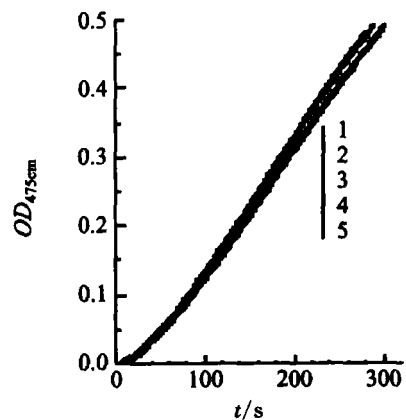


图 4 ABA 对酪氨酸酶单酚酶抑制作用的进程曲线  
曲线 1~5 ABA 的浓度分别为: 0, 0.1, 0.2, 0.3 和 0.4 mmol/L

Fig 4 Progress curves for the inhibition of monophenolase of mushroom tyrosinase by *p*-aldehydobenzoic acid

表 1 苯甲酸、苯甲醛和对醛基苯甲酸对蘑菇酪氨酸酶二酚酶的抑制效应比较

Tab 1 Comparison of the inhibitory effects of benzoic acid, benzaldehyde, *p*-aldehydobenzoic acid on the diphenolase of mushroom tyrosinase

常数	苯甲酸	苯甲醛	对醛基苯甲酸
$I_{C_{50}}$	1.00 mmol/L	0.80 mmol/L	0.98 mmol/L
抑制作用	可逆抑制	可逆抑制	可逆抑制
抑制类型	非竞争性	非竞争性	非竞争性
$K_i$	0.95 mmol/L	0.80 mmol/L	0.94 mmol/L

本文采用 ABA 作为效应物,我们还曾报道过化学结构与此相类似的其它效应物(苯甲醛和苯甲酸<sup>[5,6]</sup>)对蘑菇酪氨酸酶活性的影响,它们的动力学参数总结于表 1.从表 1 可以看出,苯甲酸、苯甲醛和 ABA 导致酶活力下降 50% 所需的抑制剂浓度 ( $I_{C_{50}}$ ) 3 种效应物分别为 1.00 mmol/L, 0.80 mmol/L 和 0.98 mmol/L. 它们三者的分子结构相似,三者都包含一个苯环的结构,苯甲酸和苯甲醛的差别只是苯环上连接的基团分别是羧基和醛基,ABA 在结构上相当于将苯甲酸和苯甲醛中的羧基和醛基呈对位同时连接在一个苯环上.三者同表现为非竞争性的抑制类型,表明它们都是与活性中心外的结合位点结合,而通过产生酶底物抑制剂三元络合物 (ESI) 而产生抑制作用的. ABA 对蘑菇酪氨酸酶的单酚酶活力没有抑制,而苯甲酸<sup>[6]</sup>能使蘑菇单酚酶的迟滞时间延长和稳态活力下降,苯甲醛<sup>[5]</sup>的作用只能使稳态活力下降,但对于单酚酶的

迟滞时间没有任何的影响.可见,上述的三种效应物的苯环取代羧基和醛基及在对位取代两个基团,它们对酪氨酸酶单酚酶的效应机理完全不同,显示构效关系,有关它们的构效关系机理有待进一步探讨.

## 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] Sanchez-Ferrer A, Rodriguez-Lopez J N, Garcia-Canovas F, et al Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism [J]. BBA Protein and Molecular Enzymology, 1995, 1247: 1-11.
- [3] Mosher D B, Pathak M A, Fitzpatrick T B. Vitiligo, etiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment Dermatology in General Medicine [M]. New York: McGraw-Hill, 1983. 205-225.
- [4] Frankos V H, Schmitt D F, Haws L C, et al Generally recognized as safe (GRAS) evaluation of 4-hexylresorcinol for use as processing aid for prevention of melanosis in shrimp [J]. Regul Toxicol Pharmacol, 1991, 14: 202-212.
- [5] 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.
- [6] 刘晓丹,黄璜,陈清西.苯甲酸对蘑菇酪氨酸酶抑制作用机理的研究[J].厦门大学学报(自然科学版),2003,42(1):102-106.
- [7] Chen Q X, Song K K, Wang Q, et al Inhibitory effects of mushroom tyrosinase by some alkylbenzaldehydes [J]. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2003, 18(6): 491-496.

## The Inhibitory Effect on Mushroom Tyrosinase by *p*-Aldehydobenzoic Acid

HUANG Hao, SONG Kang-kang, Q U Long-xin, CHEN Q ing-xi\*

(Key Laboratory of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** Tyrosinase (1.14.18.1) is an enzyme that contains monophenolase activity and diphenolase activity. In this paper, *p*-aldehydobenzoic acid is discovered to inhibit the *o*-diphenolase activity, but not have any effects on monophenolase activity. The lag time of the enzyme for oxidation of L-tyrosine does not extended and the steady-state rate of monophenolase does not decrease with the increase of concentration of *p*-aldehydobenzoic acid. The inhibition kinetics and mechanism of the diphenolase activity of the enzyme by *p*-aldehydobenzoic acid have been studied. The results show that the inhibition of *p*-aldehydobenzoic acid on the diphenolase activity is a reversible reaction with remaining enzyme activity. The inhibitor's concentration leading to 50% ( $I_{C_{50}}$ ) activity lost is estimated to be 0.98 mmol/L. The inhibition kinetics analyzed by Lineweaver-Burk plots shows that *p*-aldehydobenzoic acid is a non-competitive inhibitor for the oxidation of L-DOPA, and its inhibition constant is 0.94 mmol/L. Compared with benzoic acid and benzaldehyde, *p*-aldehydobenzoic acid has the potentiality to be a pesticide which can inhibit the enzyme activity of tyrosinase in some pest.

**Key words:** tyrosinase; *p*-aldehydobenzoic acid; inhibition; kinetics