

分类号\_\_\_\_\_

密级\_\_\_\_\_

U D C\_\_\_\_\_

编号\_\_\_\_\_

厦 门 大 学

博 士 后 研 究 工 作 报 告

酪氨酸酶特异抑制剂的筛选及作用机理研究

胡泳华

工作完成日期：2016.06.10

报告提交日期：2016.06.15

厦门大学

2016年6月

酪氨酸酶特异抑制剂的筛选及作用机理研究

**Investigations on screening specific tyrosinase inhibitors and  
their inhibitory effects**

博 士 后 姓 名：胡泳华

流动站（一级学科）名称：生态学

专 业（二级学科）名称：污染生态学

研究工作起始时间 2014 年 9 月

研究工作期满时间 2016 年 6 月

厦 门 大 学

2016 年 6 月

# 厦门大学博士后研究工作报告 著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用博士后研究工作报告的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交该报告的纸质版和电子版,有权将该报告用于非赢利目的的少量复制并允许该报告进入学校图书馆被查阅,有权将该报告的内容编入有关数据库进行检索,有权将博士后研究工作报告的标题和摘要汇编出版。保密的博士后研究工作报告在解密后适用本规定。

本研究报告属于: 1、保密 ( ), 2、不保密 (✓)

纸本在 年解密后适用本授权书;

电子版在 年解密后适用本授权书。

(请在以上相应括号内打“√”)

作者签名: 日期: 年 月 日

导师签名: 日期: 年 月 日

## 内 容 摘 要

酪氨酸酶 (EC 1.14.18.1) 是一种含铜的氧化还原酶, 广泛分布于微生物、动植物及人体中, 是生物体生命活动的关键酶。它具有独特的双重催化功能, 可以使 L-酪氨酸酶羟基化形成 L-3,4-二羟基苯丙氨酸 (L-DOPA), 再催化 L-DOPA 形成多巴醌, 多巴醌经过一系列的聚合反应后形成黑色素。酪氨酸酶在生物体中具有重要的生理功能, 参与形成黑色素以保护皮肤和眼睛低于紫外线的辐射, 参与昆虫的蜕皮及果蔬的褐变等。一旦酪氨酸酶异常表达, 会引起黑色素沉积和果蔬褐变以影响其美观, 因此酪氨酸酶抑制剂的研究引起了广泛的关注。

本文从化学合成、商品化合物以及抗生素三种途径中筛选酪氨酸酶抑制剂, 系统地研究了合成的 1,2,4-三唑衍生物、肉桂酸衍生物以及青霉素、头孢噻肟和阿莫西林三种抗生素对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用及机理。合成了 4-氨基-3-胍基-5-巯基-1,2,4-三唑-2,3-二羟基苯甲醛席夫碱 (Y1) 和 4-氨基-3-胍基-5-巯基-1,2,4-三唑-4-甲氧基苯甲醛席夫碱 (Y2), 并进行了质谱及氢谱的结构鉴定。4-氨基-3-胍基-5-巯基-1,2,4-三唑-2,3-二羟基苯甲醛席夫碱和 4-氨基-3-胍基-5-巯基-1,2,4-三唑-4-甲氧基苯甲醛席夫碱对蘑菇酪氨酸酶二酚酶的半抑制率 ( $IC_{50}$ ) 分别为 80.21 和 75.23  $\mu\text{mol/L}$ 。4-氨基-3-胍基-5-巯基-1,2,4-三唑-2,3-二羟基苯甲醛席夫碱对酪氨酸酶的抑制作用表现为混合型, 抑制常数  $K_I$  和  $K_{IS}$  分别为 61.69 和 612.80  $\mu\text{mol/L}$ 。4-氨基-3-胍基-5-巯基-1,2,4-三唑-4-甲氧基苯甲醛席夫碱对酪氨酸酶的抑制作用表现为反竞争型, 抑制常数  $K_{IS}$  为 18.83  $\mu\text{mol/L}$ 。

$\alpha$ -甲基肉桂酸、 $\alpha$ -氰基肉桂酸、3-甲氧基肉桂酸、4-甲氧基肉桂酸、4-氯肉桂酸、4-乙氧基肉桂酸、4-硝基肉桂酸、青霉素、头孢噻肟和阿莫西林对蘑菇酪氨酸酶单酚酶和二酚酶均有抑制作用, 其对单酚酶的半抑制率 ( $IC_{50}$ ) 分别为 2.00、5.20、2.80、0.50、0.48、0.98、0.52、19.40、3.20 和 12.38 mmol/L, 对二酚酶的半抑制率 ( $IC_{50}$ ) 分别为 0.71、3.95、0.82、0.30、0.24、0.25、0.32、11.00、0.14 和 9.00 mmol/L。 $\alpha$ -甲基肉桂酸、4-乙氧基肉桂酸、4-硝基肉桂酸、青霉素、头孢噻肟和阿莫西林对蘑菇酪氨酸酶二酚酶的抑制作用表现为混合型抑制, 抑制常数  $K_I$  分别为 0.51、0.22、0.21、13.46、0.14 和 8.30 mmol/L,  $K_{IS}$  分别为 1.73、0.45、1.19、17.26、0.36 和 44.79 mmol/L。3-甲氧基肉桂酸、4-甲氧基肉桂酸和

4-氯肉桂酸对蘑菇酪氨酸酶二酚酶的抑制作用表现为非竞争型抑制,抑制常数分别为 0.89、0.33 和 0.23 mmol/L。 $\alpha$ -氰基肉桂酸对蘑菇酪氨酸酶二酚酶的抑制作用表现为竞争型抑制,抑制常数  $K_I$  为 2.27 mmol/L。而  $\alpha$ -乙酰氨基肉桂酸和 2-甲氧基肉桂酸在测定范围内均为能达到对酶的半抑制。

我们进一步采用紫外可见光谱、荧光猝灭、铜离子相互作用和计算机模拟分子对接技术探讨这些化合物对酪氨酸酶的抑制机理。MOE 模拟的结果显示除了 4-乙氧基肉桂酸、4-硝基肉桂酸和阿莫西林,其它的化合物均不与酶活性中心的铜离子直接作用,只与活性中心的氨基酸残基相互作用从而降低酶的催化活力。同时还能够与 L-DOPA 氧化产物结合,形成无色复合物,造成黑色素产量的降低,从而表现出抑制酶活性的现象。荧光猝灭的结果也显示了这些化合物除了 4-硝基肉桂酸之外均不能引起峰位及峰形的变化,说明结合后酶的构象并未完全发生改变。

综上,通过本课题的研究,发现合成的物质对酪氨酸酶的抑制效果最好,而商品化合物中 4-氯肉桂酸具有很好的抑制酪氨酸酶作用。该研究为酪氨酸酶抑制剂开发及应用提供了坚实的理论基础,同时也拓宽了传统抗生素的应用。

**关键词:** 酪氨酸酶; 抑制机理; 1,2,4-三唑衍生物; 肉桂酸衍生物; 抗生素

## Abstract

Tyrosinase (EC 1.14.18.1), a copper containing enzyme, is widely distributed in microorganisms, animals, plants and human beings. Tyrosinase has unique dual catalytic function, which can hydroxylate L-tyrosine into L-DOPA, catalytic L-DOPA into dopamine quinone, and then after a series of polymerization to form melanin. Tyrosinase has important physiological function in the organism, which participate in the formation of melanin to protect the skin and eyes under UV radiation, participate in insect molting and browning of fruit and vegetables. Once the abnormal expression of tyrosinase happens, it will cause melanin deposition and fruit browning to influence its appearance. Hence, tyrosinase inhibitors have caused wide attention.

The inhibitory mechanism of 1,2,4-triazole derivatives, cinnamic acid derivatives and antibiotics on mushroom tyrosinase were systematically studied. 4-Amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazole-2,3-dihydroxy benzaldehyde schiff base (Y1) and 4-amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazole-4-methoxy benzaldehyde schiff base (Y2) were synthesised. The experimental methods of LC-MS and  $^1\text{H}$  NMR were used to identify its molecular structures. For diphenolase activity of mushroom tyrosinase, the inhibitor concentrations of leading to 50% activity lost ( $IC_{50}$ ) of them were 80.21 and 75.23  $\mu\text{mol/L}$ . Y1 was a mixed type inhibitor with the value of  $K_I$  and  $K_{IS}$  were 61.69 and 612.80  $\mu\text{mol/L}$ . Y2 displayed a uncompetitive mechanism, the inhibition constant was determined to be 18.83  $\mu\text{mol/L}$ .

The inhibitory effects of  $\alpha$ -methylcinnamic acid,  $\alpha$ -cyanocinnamic acid, 3-methoxycinnamic acid, 4-methoxycinnamic acid, 4-chlorocinnamic acid, 4-ethoxycinnamic acid, 4-nitrocinnamic acid, penicillin, cefotaxime and amoxicillin were investigated. For monophenolase activity, the  $IC_{50}$  of them were 2.00, 5.20, 2.80, 0.50, 0.48, 0.98, 0.52, 19.40, 3.20 and 12.38  $\text{mmol/L}$ , respectively. For diphenolase activity, the  $IC_{50}$  of them were 0.71, 3.95, 0.82, 0.30, 0.24, 0.25, 0.32, 11.00, 0.14 and 9.00  $\text{mmol/L}$ , respectively.  $\alpha$ -Methylcinnamic acid, 4-ethoxycinnamic acid, 4-nitrocinnamic acid, penicillin, cefotaxime and amoxicillin were mixed-type

inhibitors, the value of  $K_I$  were 0.51, 0.22, 0.21, 13.46, 0.14 and 8.30 mmol/L, the value of  $K_{IS}$  were 1.73, 0.45, 1.19, 17.26, 0.36 and 44.79 mmol/L, respectively. 3-Methoxycinnamic acid, 4-methoxycinnamic acid and 4-chlorocinnamic acid displayed a noncompetitive inhibitory type, the inhibition constant were determined to be 0.89, 0.33 and 0.23 mmol/L, respectively.  $\alpha$ -Cyanocinnamic acid was displayed a competitive inhibitory type with  $K_I$  value was 2.27 mmol/L. Then  $\alpha$ -acetamidocinnamic acid and 2-methoxycinnamic acid were unable to achieve half of enzyme inhibition within the range of measurement.

The molecular inhibition mechanisms of tyrosinase by these compounds were investigated by UV-scanning study, fluorescence quenching, copper interaction and molecular docking as well. MOE simulation results showed that these compounds reduced the activity of enzyme not directly interact with copper ions, only interact with amino acid residues of active sites besides 4-ethoxycinnamic acid, 4-nitrocinnamic acid and amoxicillin. Moreover, these compounds can combine with the products of L-DOPA oxidation and form a colorless compound which reduces the melanin production, so as to show the inhibition of enzyme activity. Fluorescence quenching results showed that these compounds were not caused the change of peak position and peak shape except 4-nitrocinnamic acid, which indicated that the enzyme conformation has not completely changed after the combination.

In conclusion, the synthesised compound showed strong inhibition and the commodity compound of 4-chlorocinnamic acid has strong antityrosinase. The research provides a theoretical foundation of the application of tyrosinase inhibitors, and also broaden the application of traditional antibiotics.

**Key words:** tyrosinase; inhibitory mechanism; 1,2,4- triazole derivaties; cinnamic acid derivatives; antibiotic

## 主要缩略词表

英文简称	英文全称	中文全称
DMSO	dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
$IC_{50}$	50% inhibiting concentration	半抑制浓度
$K_m$	Michaelis-menten constant	米氏常数
L-DOPA	L-3,4-dihydroxyphenylalanine	L-3,4-二羟基苯丙氨酸
L-Tyr	L-tyrosine	L-酪氨酸
MOE	molecular operating environment	药物研发可视化仿真环境
PBS	phosphate buffer	磷酸缓冲液
PPO	polyphenol oxidase	多酚氧化酶
$V_m$	maximum velocity	最大反应速率



## 目 次

1 引 言 .....	1
1.1 本课题的研究背景 .....	1
1.1.1 酪氨酸酶简介 .....	1
1.1.1.1 酪氨酸酶的结构 .....	1
1.1.1.2 酪氨酸酶的催化机理 .....	2
1.1.1.3 酪氨酸酶的应用 .....	3
1.1.2 酪氨酸酶抑制剂的研究概况 .....	4
1.1.2.1 在食品保鲜领域的应用 .....	5
1.1.2.2 在医疗美容领域的应用 .....	6
1.1.2.3 在农业害虫防治领域的应用 .....	6
1.1.2.4 在生物抗菌领域的应用 .....	7
1.1.3 三唑化合物 .....	8
1.1.4 肉桂酸 .....	9
1.1.5 抗生素 .....	9
1.2 本课题的研究意义及研究内容 .....	10
2 实验材料、仪器与方法 .....	12
2.1 实验试剂 .....	12
2.2 实验仪器 .....	13
2.3 实验方法 .....	14
2.3.1 三唑衍生物的合成 .....	14
2.3.2 化合物的结构鉴定 .....	14
2.3.2.1 质谱分析 .....	14
2.3.2.2 核磁分析 .....	14
2.3.3 效应物对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用 .....	15
2.3.3.1 效应物对蘑菇酪氨酸酶单酚酶的影响 .....	15
2.3.3.2 效应物对蘑菇酪氨酸酶二酚酶的影响 .....	15
2.3.3.3 效应物对蘑菇酪氨酸酶二酚酶的抑制机理判断 .....	15
2.3.3.4 效应物对蘑菇酪氨酸酶二酚酶的抑制类型判断 .....	15

2.3.3.5 采用 MOE 模拟效应物与蘑菇酪氨酸酶的分子对接 .....	16
2.3.3.6 效应物对蘑菇酪氨酸酶二酚酶催化 L-DOPA 氧化反应光谱的影响 .....	16
2.3.3.7 效应物对高碘酸钠氧化 L-DOPA 反应光谱的影响.....	16
2.3.3.8 荧光猝灭法研究效应物对蘑菇酪氨酸酶的作用机理 .....	16
2.3.3.9 效应物与铜离子的相互作用 .....	16
3 实验结果 .....	17
3.1 1,2,4-三唑衍生物 .....	17
3.1.1 1,2,4-三唑衍生物的合成及结构鉴定 .....	17
3.1.1.1 4-氨基-3-胍基-5-巯基-1,2,4-三唑-2,3-二羟基苯甲醛席夫碱的结构鉴定 .....	17
3.1.1.2 4-氨基-3-胍基-5-巯基-1,2,4-三唑-4-甲氧基苯甲醛席夫碱的结构鉴定 .....	18
3.1.2 1,2,4-三唑衍生物对蘑菇酪氨酸酶二酚酶的抑制作用 .....	19
3.1.3 1,2,4-三唑衍生物对蘑菇酪氨酸酶二酚酶的抑制机理 .....	20
3.1.4 1,2,4-三唑衍生物对蘑菇酪氨酸酶二酚酶的抑制类型 .....	21
3.1.5 1,2,4-三唑衍生物与蘑菇酪氨酸酶 PPO3 模型的分子对接模拟 .....	22
3.1.6 1,2,4-三唑衍生物对酪氨酸酶催化 L-DOPA 氧化反应光谱的影响.....	24
3.1.7 荧光猝灭法研究 1,2,4-三唑衍生物对蘑菇酪氨酸酶的作用机理.....	25
3.2 肉桂酸衍生物.....	27
3.2.1 $\alpha$ -取代肉桂酸对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用 .....	28
3.2.1.1 $\alpha$ -取代肉桂酸对蘑菇酪氨酸酶单酚酶的抑制作用 .....	28
3.2.1.2 $\alpha$ -取代肉桂酸对蘑菇酪氨酸酶二酚酶的抑制作用 .....	30
3.2.1.3 $\alpha$ -取代肉桂酸对蘑菇酪氨酸酶二酚酶的抑制机理 .....	31
3.2.1.4 $\alpha$ -取代肉桂酸对蘑菇酪氨酸酶二酚酶的抑制类型 .....	31
3.2.1.5 $\alpha$ -取代肉桂酸与蘑菇酪氨酸酶 PPO3 模型的分子对接模拟.....	33
3.2.1.6 $\alpha$ -取代肉桂酸对酪氨酸酶催化 L-DOPA 氧化反应光谱的影响 ...	34
3.2.1.7 $\alpha$ -取代肉桂酸对高碘酸钠氧化 L-DOPA 反应光谱的影响.....	35
3.2.1.8 荧光猝灭法研究 $\alpha$ -取代肉桂酸对蘑菇酪氨酸酶的作用机理 .....	37
3.2.2 甲氧基肉桂酸对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用 .....	39

3.2.2.1 甲氧基肉桂酸对蘑菇酪氨酸酶单酚酶的抑制作用 .....	39
3.2.2.2 甲氧基肉桂酸对蘑菇酪氨酸酶二酚酶的抑制作用 .....	39
3.2.2.3 甲氧基肉桂酸对蘑菇酪氨酸酶二酚酶的抑制机理 .....	40
3.2.2.4 甲氧基肉桂酸对蘑菇酪氨酸酶二酚酶的抑制类型 .....	41
3.2.2.5 甲氧基肉桂酸与蘑菇酪氨酸酶 PPO3 模型的分子对接模拟 .....	42
3.2.2.6 甲氧基肉桂酸对酪氨酸酶催化 L-DOPA 氧化反应光谱的影响 ..	43
3.2.2.7 甲氧基肉桂酸对高碘酸钠氧化 L-DOPA 反应光谱的影响 .....	44
3.2.3 4-取代肉桂酸对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用 .....	45
3.2.3.1 4-取代肉桂酸对蘑菇酪氨酸酶单酚酶的抑制作用 .....	45
3.2.3.2 4-取代肉桂酸对蘑菇酪氨酸酶二酚酶的抑制作用 .....	46
3.2.3.3 4-取代肉桂酸对蘑菇酪氨酸酶二酚酶的抑制机理 .....	47
3.2.3.4 4-取代肉桂酸对蘑菇酪氨酸酶二酚酶的抑制类型 .....	48
3.2.3.5 4-取代肉桂酸与蘑菇酪氨酸酶 PPO3 模型的分子对接模拟 .....	50
3.2.3.6 4-取代肉桂酸对酪氨酸酶催化 L-Tyr 氧化反应光谱的影响 .....	52
3.2.3.7 4-取代肉桂酸对酪氨酸酶催化 L-DOPA 氧化反应光谱的影响 ...	53
3.2.3.8 4-取代肉桂酸对高碘酸钠氧化 L-DOPA 反应光谱的影响 .....	54
3.2.3.9 荧光猝灭法研究 4-取代肉桂酸对蘑菇酪氨酸酶的作用机理 .....	55
3.2.3.10 4-取代肉桂酸与铜离子的相互作用 .....	56
3.3 抗生素 .....	58
3.3.1 抗生素对蘑菇酪氨酸酶单酚酶的抑制作用 .....	58
3.3.2 抗生素对蘑菇酪氨酸酶二酚酶的抑制作用 .....	59
3.3.3 抗生素对蘑菇酪氨酸酶二酚酶的抑制机理 .....	60
3.3.4 抗生素对蘑菇酪氨酸酶二酚酶的抑制类型 .....	61
3.3.5 抗生素与蘑菇酪氨酸酶 PPO3 模型的分子对接模拟 .....	63
3.3.6 抗生素对酪氨酸酶催化 L-DOPA 氧化反应光谱的影响 .....	65
3.3.7 荧光猝灭法研究抗生素对蘑菇酪氨酸酶的作用机理 .....	66
4 讨 论 .....	68
4.1 1,2,4-三唑衍生物对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用机理研究 .....	68
4.2 肉桂酸衍生物对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用研究 .....	69
4.3 抗生素对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用研究 .....	70

结 论.....	72
参 考 文 献.....	74
致 谢.....	86
博士生期间发表的学术论文.....	87
博士后期间发表的学术论文.....	89
个 人 简 历.....	90

厦门大学博硕士论文摘要库

# 1 引言

## 1.1 本课题的研究背景

### 1.1.1 酪氨酸酶简介

酪氨酸酶 (EC 1.14.18.1, tyrosinase) 是一种含铜氧化酶, 早在 1895 年, 人们注意到蘑菇在采摘后由白色慢慢变成红色而后逐渐变成黑色, 之后发现引起这种变化是由于蘑菇中酪氨酸酶的作用结果。酪氨酸酶广泛分布于微生物、动植物及人体中<sup>[1, 2]</sup>, 它具有独特的双重催化功能, 可以使 L-酪氨酸羟基化形成 L-3,4-二羟基苯丙氨酸 (L-DOPA), 再催化 L-DOPA 形成多巴醌, 多巴醌经过一系列的酶促和非酶促反应后聚合成黑色素<sup>[3, 4]</sup>。

酪氨酸酶在生物体中具有重要的生理功能, 在节肢动物中, 酪氨酸酶参与了防御反应和伤口愈合等重要生理过程<sup>[5, 6]</sup>; 在微生物中, 酪氨酸酶主要防止紫外线对 DNA 的损伤<sup>[7]</sup>; 在植物中, 酪氨酸酶参与果蔬的褐变等<sup>[8, 9]</sup>; 在人体中, 参与形成黑色素以保护皮肤和眼睛抵御紫外线的辐射<sup>[10, 11]</sup>。由于酪氨酸酶的生物学特性, 其在多个领域得到了很好的运用。在有机合成中, 可以利用其选择性羟基化催化生成活泼的中间体以合成新的化合物<sup>[12]</sup>; 同时酪氨酸酶在污水处理中也起到了一定的作用<sup>[13, 14]</sup>。因此多年来, 酪氨酸酶一直倍受关注, 其研究涉及生物、医学、农学、化学和药学等多个学科和领域。

#### 1.1.1.1 酪氨酸酶的结构

酪氨酸酶是一种膜结合蛋白, 具有很高的疏水性。据报道, 酪氨酸酶的总体结构可以分为三个结构域: 核心结构域、N 端结构域和 C 端结构域<sup>[15]</sup>。其中核心结构域是催化中心, 包括两个铜离子和 6 个高度保守的组氨酸残基<sup>[16]</sup>; N 端结构域为转运肽, 与酶的运输相关<sup>[17]</sup>; C 端结构域与酶蛋白的活化相关<sup>[18]</sup>。而在 2006 年酪氨酸酶与分子伴侣 ORF378 复合体的立体结构被首次获得, 该结构揭示出酪氨酸酶的核心部分是由 4 个  $\alpha$ -螺旋组成, 而构成活性中心的 6 个组氨酸残基除了 His<sub>54</sub> 外, 均位于这 4 个  $\alpha$ -螺旋上, 同时在活性中心的疏水性氨基酸残基组成了一个疏水腔, 提供了底物与酶的特异性结合位点, 双核铜离子位于疏水腔的最深处<sup>[19]</sup>。

根据酪氨酸酶活性中心特异性结合位点的两个金属离子的光谱学特性, 有报道认为其与儿茶酚氧化酶和血蓝蛋白同属于 III 型铜金属蛋白家族, 即活性中

心的两个铜离子通过氮原子分别与三个组氨酸残基相连，形成四面体结构。CuA 活性中心分别与 His<sub>38</sub>、His<sub>54</sub> 和 His<sub>63</sub> 形成配位键，CuB 分别与 His<sub>190</sub>、His<sub>194</sub> 和 His<sub>216</sub> 形成配位键，两个铜离子之间还有一个内源桥<sup>[20]</sup>。除了 His<sub>54</sub>，铜离子的 His 配体均来自于螺旋  $\alpha_2$ 、 $\alpha_3$ 、 $\alpha_6$  和  $\alpha_7$ ，由于 His<sub>54</sub> 没有与硫原子形成类似于儿茶酚氧化酶活性中心的硫醚键，所以 His<sub>54</sub> 易变动，而导致 CuA 比 CuB 易于变动，CuA 则决定了酶特异的底物选择性<sup>[19]</sup>。根据铜离子结合氧原子数的不同而产生三种形态的酪氨酸酶：氧化态 (E<sub>oxy</sub>，又称氧-铜离子态)，还原态 (E<sub>met</sub>，又称铜离子态) 和脱氧态 (E<sub>deoxy</sub>，又称亚铜离子态)<sup>[15, 21]</sup>。三种酶形态可以通过释放和结合氧气进行相互可逆的转化，它们的存在和相互转化是酪氨酸酶形成独特双重催化功能的基础，在最终形成黑色素的过程中发挥重要作用<sup>[22, 23]</sup>。

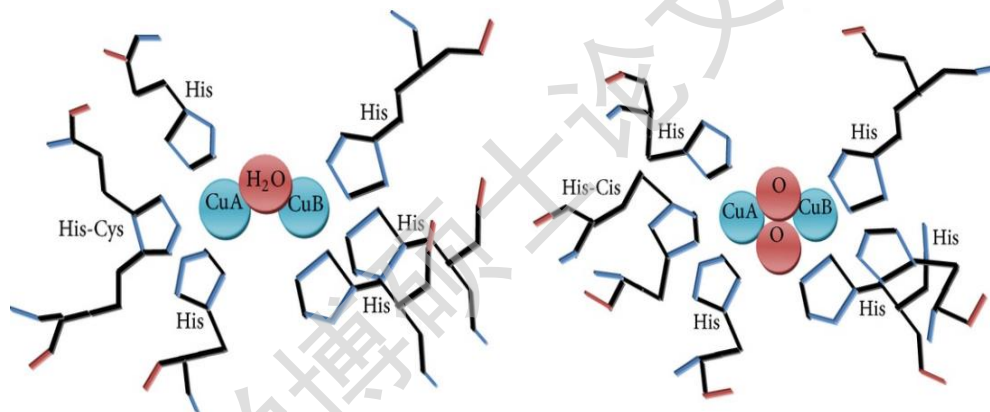


图 I 酪氨酸酶活性中心的双核铜结构<sup>[1]</sup>

Fig. I The structure of the active center containing Cu of tyrosinase.

### 1.1.1.2 酪氨酸酶的催化机理

酪氨酸酶具有单酚酶和二酚酶两种酶活性：作为单酚酶羟基化单酚生成邻二酚；作为二酚酶氧化邻二酚生成醌，而这两步反应均需要氧分子的参与。酪氨酸酶通过三种形态的变化发挥双重催化反应的模型如图 II 所示<sup>[24, 25]</sup>：E<sub>oxy</sub> 可与二酚或单酚底物结合，在单酚酶活力中，从 E<sub>oxy</sub> 作为开始，单酚底物 (M) 最初与 E<sub>oxy</sub> 的一个铜离子轴向配位结合，形成 E<sub>oxy</sub>M 复合物，然后通过双吡啶的媒介发生重排而使单酚被铜离子连接的过氧化物羟基化，形成 E<sub>met</sub>D 复合物。E<sub>met</sub>D 分解产生一个游离的醌 (Q)，H<sub>2</sub>O，同时生成 E<sub>deoxy</sub>，E<sub>deoxy</sub> 又能与氧结合最终回到循环起始的 E<sub>oxy</sub>，从而完成了催化单酚的循环。在二酚酶活力中，还是

以  $E_{oxy}$  作为开始,  $E_{oxy}$  和双酚底物 (D) 结合而产生  $E_{oxy}D$  复合物,  $E_{oxy}D$  氧化双酚转变为  $E_{met}$  并产生醌 (Q),  $E_{met}$  能将另一分子的双酚 (D) 转化成为醌 (Q), 与此同时, 酶形式转变为  $E_{deoxy}$ , 后者可以与氧结合又回到循环的第一步  $E_{oxy}$ , 从而完成催化两个双酚的二酚循环。从反应模型中可发现除了一个催化单酚的循环和一个催化双酚的循环, 另外还有一条死循环途径 (Dead end pathway), 这是由于  $E_{met}$  形式的酶同时可以与单酚和二酚底物结合, 但与单酚底物是可逆结合, 无法参与正常产物的生成, 并不能循环催化。这会导致行使单酚酶活力时, 在达到羟化作用的最大速率前出现的一段特有的迟滞期。一旦这一可逆结合达到平衡, 迟滞期结束, 反应速率可以达到最大。

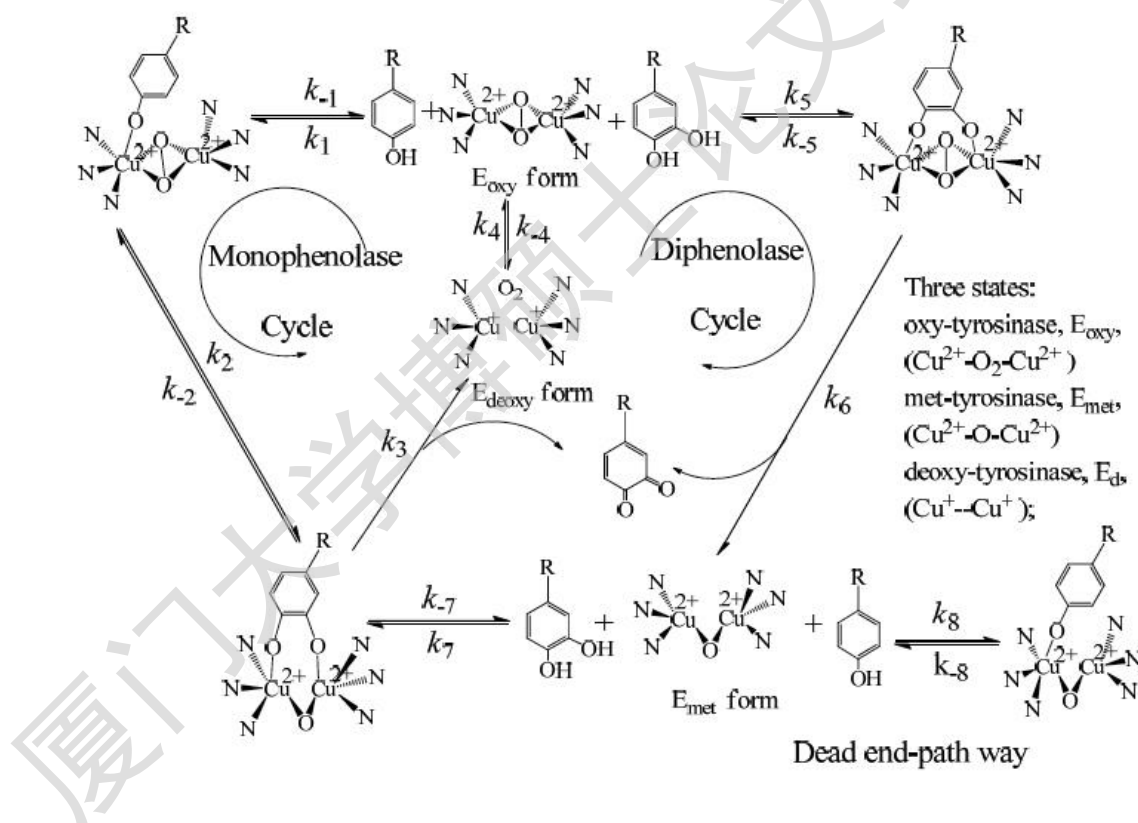


图 II 酪氨酸酶的反应机理示意图。

Fig.II The reaction mechanism of tyrosinase.

### 1.1.1.3 酪氨酸酶的应用

酪氨酸酶是生物体合成黑色素的关键酶, 酪氨酸酶活性与黑色素合成量呈正相关关系, 它不仅决定了黑色素合成的速率, 还是黑色素细胞分化成熟的特征性标志。而黑色素的合成是一个复杂的酶催化和非酶催化过程, 大体可以分

为两个阶段，第一阶段由酪氨酸酶催化酪氨酸羟化形成 L-3,4-二羟基苯丙氨酸 (L-DOPA)，并进一步将 L-DOPA 氧化生成多巴醌，这两步均为酪氨酸酶催化，显示了其独特的双重催化功能。第二阶段是以多巴醌为原料，通过两种不同的途径分别生成真黑素和褪黑素。(1) 真黑素：多巴醌经一系列的多聚化反应生成无色的多巴色素，多巴色素进一步被多巴醌氧化，并经异构、脱羧生成 5,6-二羟基吲哚，然后进一步由酪氨酸酶催化氧化为真黑素的前体吲哚-5,6-醌，进而生成真黑素。(2) 褪黑素：多巴醌与半胱氨酸反应生成 5-Cys-多巴及 5-Cys-多巴醌，然后成环、脱羧变成苯胍噻嗪的衍生物，最后形成褪黑素<sup>[26, 27]</sup>。在第二阶段的反应中，大部分是自发的，只有少数需要由酪氨酸酶、异构酶或金属离子催化，因此，第一阶段的反应为黑色素生成的限速反应。现在已在白癜风病人血液中发现有抗黑素细胞抗体或抗白癜风抗体，这种抗体与表皮底部的基底细胞之间的黑素细胞结合后影响了形成黑素细胞的酪氨酸酶的作用，而使黑素细胞减少，皮肤变白色<sup>[28]</sup>。而某些中药如消白灵片<sup>[29]</sup>、驱虫斑鸠菊<sup>[30]</sup>等在体外可直接激活酪氨酸酶活性，对白癜风有很好的治疗效果。

在果蔬加工贮藏过程中，经常会发生褐变等现象，这些现象许多都是由酶促反应产生的，而引起酶促褐变主要是酪氨酸酶的作用。酶促褐变具有正反两方面的作用：一方面，为了增加色调，比如在红茶的制作、葡萄干的晒制以及啤酒的生产中有意地加入酪氨酸酶促使其发生酶促褐变；而另一方面，在香蕉、荔枝以及苹果等果蔬采后贮藏过程中，应该减少酪氨酸酶的作用以防止酶促褐变的发生。

酪氨酸酶可以催化酚类物质形成醌类化合物，而醌类化合物在水溶液中经过一系列的反应及聚合形成不溶于水的大分子物质而沉淀，因此，可以利用微生物中酪氨酸酶来降解酚类废物以及处理含酚类物质的废水<sup>[31]</sup>。

生物传感器由于具有准确、微量、快速、简便、灵敏、选择性好等优点，易于实现自动化和在线监测。利用酪氨酸酶作为活性物质，Everett 等<sup>[32]</sup>通过将酪氨酸酶固定在电极上，能够测定多种污染物，如胍、莠去津、氯酚、氨基甲酸盐、有机磷农药等。酪氨酸酶在无水或含微量水(<1%) 的有机溶剂中，酶的稳定性显著增加，催化性能显著提高。

### 1.1.2 酪氨酸酶抑制剂的研究概况

目前国内外对酪氨酸酶的研究涉及到医疗美容、果蔬保鲜、病虫害防治等



Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.