

砂仁提取物对蘑菇酪氨酸酶活力的抑制效应

唐建阳¹, 苏明星¹, 刘凤娇², 黄素芳¹, 胡泳华², 陈清西^{2*}

(1. 福建省农业科学研究所, 农业生物资源研究所, 福建 福州 350003; 2. 厦门大学 生命科学学院,

滨海湿地生态系统教育部重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要: 酪氨酸酶(EC 1.14.18.1)是生物体合成色素的主要酶。以地道阳春砂仁(*Amomum*)果实为材料,经过超声提取、萃取、树脂 AB-8 分离纯化,得到对蘑菇酪氨酸酶活力有显著抑制作用的砂仁 30%(体积分数)乙醇提取物。研究该提取物对蘑菇酪氨酸酶的效应,结果表明,砂仁果实乙醇提取物对蘑菇酪氨酸酶的单酚酶活力和二酚酶活力都有明显的抑制作用。对单酚酶的作用,当质量浓度达到 10.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,可使单酚酶的稳定态活性酶活力下降 40%,迟滞时间延长了 3.12 倍;对二酚酶活力的抑制作用也呈现浓度依赖性关系,其半抑制率浓度(IC_{50})为 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$,抑制作用属于可逆效应,抑制类型为混合型,抑制常数 K_i 和 K_{is} 分别为 41.85 和 98.51 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。这些数据为新型的酪氨酸酶的开发和寻找新型的食品保鲜剂和杀虫剂提供基础。

关键词: 砂仁;酪氨酸酶;单酚酶;二酚酶;抑制作用

中图分类号:Q 356.1

文献标志码:A

文章编号:0438-0479(2012)02-0258-05

酪氨酸酶(EC 1.14.18.1, Tyrosinase)又称为多酚氧化酶、儿茶酚氧化酶等^[1],它是生物体合成黑色素的关键酶和限速酶,在合成过程的多个反应步骤中起关键作用。该酶广泛存在于动物、植物、微生物及人体中^[2-6]。酪氨酸酶具有独特的双重催化功能,首先催化 L-酪氨酸(L-Tyr)羟基化形成 L-多巴(L-DOPA),再氧化 L-DOPA 形成多巴醌,多巴醌经一系列的酶促和非酶促反应后,形成由 5,6-二羟吲哚和 5,6-二羟吲哚-2-羧酸单元构成的异聚体——黑色素^[7]。酪氨酸酶是果蔬摘采后加工和贮藏过程中发生褐变的关键因素。因此,寻求高效、安全、天然的酪氨酸酶抑制剂具有重要的应用前景,多年来一直受到国内外的关注。其研究涉及生物、医学、农学、化学、药学等多个学科和领域^[8-9]。砂仁(*Amomum*)是姜科植物,始载于《药性论》名缩砂密,是四大南药之一,以广东省阳春县产的阳春砂最著名,称为地道南药砂仁^[10]。临床多用于湿浊中阻、脘脾不饥、脾胃虚寒、呕吐泄泻、妊娠恶阻、胎动不安等症。在天然植物的酪氨酸酶活力抑制剂筛选中,发现从砂仁果实可以提取到酪氨酸酶活力抑制剂。本文报道砂仁果实中蘑菇酪氨酸酶活力抑制剂的分离提取

方法及作用机理与动力学,该研究对砂仁的酪氨酸酶活力抑制剂开发应用具有重要的应用前景。

1 材料与方法

1.1 材料

砂仁果实样品取自福建长泰山重砂仁生产基地;酪氨酸酶为 SIGMA 化学公司的蘑菇酪氨酸酶;二甲亚砜(DMSO)、L-Tyr 和 L-DOPA 购自 SIGMA 化学公司;其他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

1.2.1 样品制备

砂仁果实样品研磨,过 100 目大小的筛,称取粉末,按 1:10(质量比,下同)加入为 80%(体积分数,下同)的乙醇溶液超声 2 次,每次 30 min,冷却后过滤,残渣加入相应比例乙醇溶液继续超声,过滤,合并滤液。根据极性大小,依次用石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇萃取浓缩后的乙醇提取物,减压回收溶剂,得到膏状提取物,用少量双蒸水溶解, -80 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻后,进行冷冻干燥,得到粉末状固体,称取收集,备用。正丁醇相样品加入双蒸水溶解,大孔树脂 AB-8 经预处理后,将双蒸水溶解的样品小心上柱,用乙醇-ddH₂O 进行不同浓度梯度逐级洗脱,洗脱梯度为 ddH₂O、30%乙醇、60%乙醇、100%乙醇,分段收集样品。减压蒸发

收稿日期:2011-07-20

基金项目:福建省发改委项目(闽发改高技(2009)608号);福建省科技公益专项(2009R10037-2, 2009R10037-3);福建省科技平台项目(2008Y2003)

* 通信作者:chenqx@xmu.edu.cn

除去溶剂,得到膏状提取物,用少量双蒸水溶解, -80°C 冷冻后,进行冷冻干燥,得到粉末状固体,称取收集,备用. 分离提取的流程总结如图 1 所示.

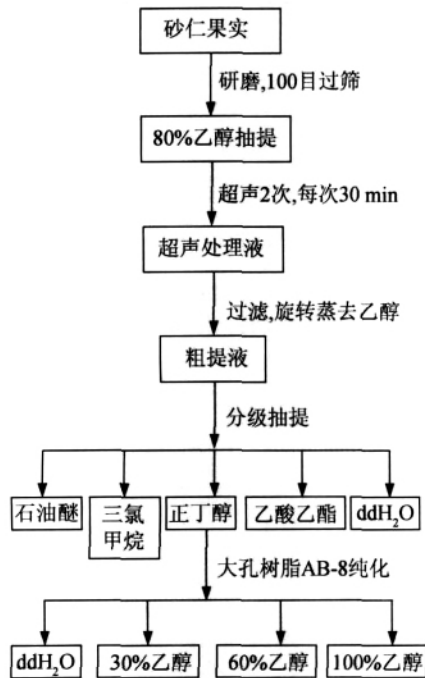


图 1 砂仁活性物质分离纯化的总流程图
Fig. 1 Isolation and purification of *Amomum*

1. 2. 2 酶活力测定

参考文献[11]方法,在磷酸缓冲液(pH 6.8)中,测定单酚酶活力所用的底物为 0.5 mmol/L *L*-Tyr,二酚酶以 0.5 mmol/L 的 *L*-DOPA 为底物,酶的终质量浓度为 33.3 mg/mL, 30°C 下测定波长为 475 nm 的光密度值(OD)随时间的增长直线,从斜率计算酶的活力,产物的消光系数以 $3700\text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ 计算^[12].

1. 2. 3 效应物对酶活力的影响

参考文献[13]方法,先加入 0.1 mL 含不同浓度的效应物于比色杯中,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 恒温条件下检测波长为 475 nm 的 OD 随时间的增长直线,从直线的斜率计算出酶的活力. 抑制作用机理是通过 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.

2 结果

2. 1 砂仁活性物质的分离纯化

砂仁粉末以固液比 1:10 的比例进行 80%乙醇萃取,超声 30 min,共萃取 2 次. 根据极性大小,依次用 1/3 体积的石油醚、三氯甲烷、正丁醇、乙酸乙酯萃取浓缩后的乙醇提取物 3~5 次,分别收集后进行冷冻干燥,得到石油醚相、三氯甲烷相、正丁醇相、乙酸乙酯相和水相提取物. 各相提取物分别进行酪氨酸酶抑制活性检测,发现正丁醇相提取物的抑制效果最佳.

正丁醇相提取物经过大孔树脂 AB-8 分离,依次用 ddH₂O、30%乙醇、60%乙醇和 100%乙醇作梯度洗脱,减压回收溶剂,用少量 ddH₂O 溶解,冷冻干燥. 收集各个成分,分析各种洗脱成分对酪氨酸酶活力的抑制效应. 结果表明,正丁醇相提取物经大孔树脂 AB-8 分离,采用 30%乙醇洗脱得到的成分对酪氨酸酶活力的抑制效果最好. 以此提取物为对象,深入研究其对酪氨酸酶活力的抑制作用机理及其动力学.

2. 2 砂仁提取物对酪氨酸酶单酚酶活力的影响

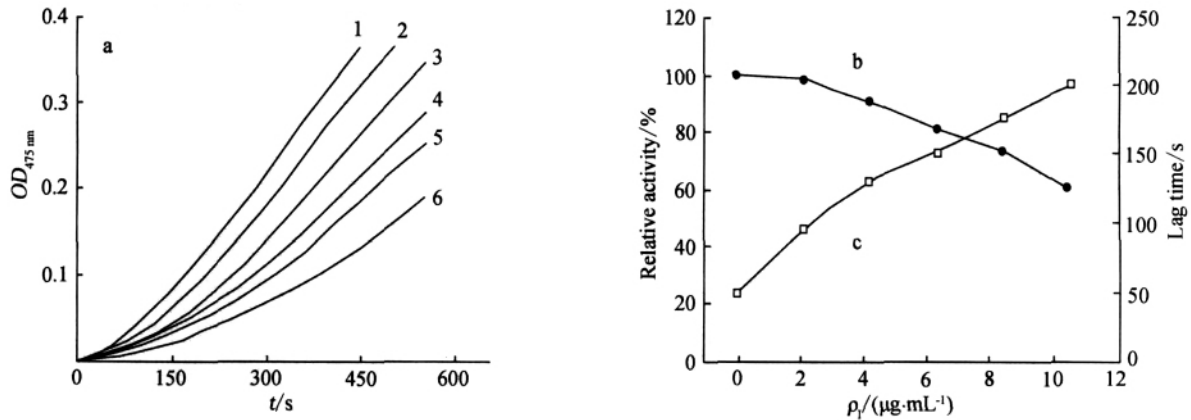
以砂仁 30%乙醇洗脱物为效应物,测定酪氨酸酶单酚酶催化反应的动力学曲线(图 2a). 以酶相对稳态活力和迟滞时间对效应物浓度作图,分别得到图 2b、c. 由此可知,随着效应物的浓度增大,相对稳态酶活力明显下降,迟滞时间也显著增加,说明效应物是通过抑制稳态酶活力和延长迟滞时间而达到抑制酪氨酸酶单酚酶活力的作用. 当效应物浓度达到 $10.5\ \mu\text{g}/\text{mL}$,单酚酶活力下降到 59.95%,迟滞时间从 49 s 延长到 202 s,延长了 3.12 倍.

2. 3 砂仁提取物对酪氨酸酶二酚酶活力的影响

测定砂仁提取物对酪氨酸酶催化 *L*-DOPA 的影响. 反应体系中加入不同浓度的效应物,研究酶的剩余活力与效应物的浓度依赖关系. 二酚酶催化底物反应的进程直线斜率均发生明显的降低,说明该效应物对酪氨酸酶的二酚酶活力有抑制作用. 由图 3 可知,当效应物质量浓度仅为 $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,酪氨酸酶二酚酶活力就下降 60%. 酶活力下降到 50%效应物的半抑制浓度(IC_{50})为 $64\ \mu\text{g}/\text{mL}$.

2. 4 砂仁提取物对酪氨酸酶二酚酶活力抑制作用的测定

在测活体系中,固定底物(*L*-DOPA)浓度为 0.5 mmol/L,加入不同浓度的砂仁提取物,改变加入的酪氨酸酶的酶量,测定酶催化 *L*-DOPA 的氧化活力. 酶活力与酶量关系作图得到一组通过原点的直线,随着



a 中曲线 1~6 表示砂仁提取物质量浓度分别为:0,2.1,4.2,6.3,8.4 和 10.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$;
b 线表示稳定态的相对活力与效应物浓度的关系;c 线表示迟滞时间与效应物浓度的关系.

图 2 砂仁提取物对酪氨酸酶单酚酶活力的抑制效应

Fig. 2 Inhibitory effects of the extract of *Amomum* on the monophenolase activity of tyrosinase

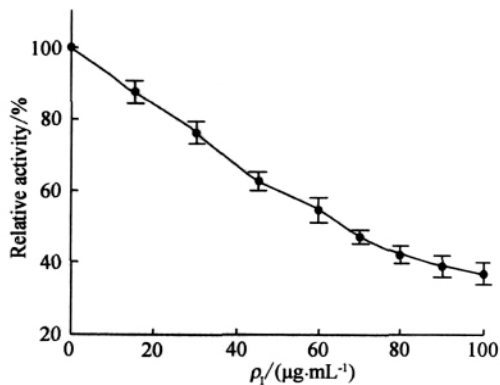
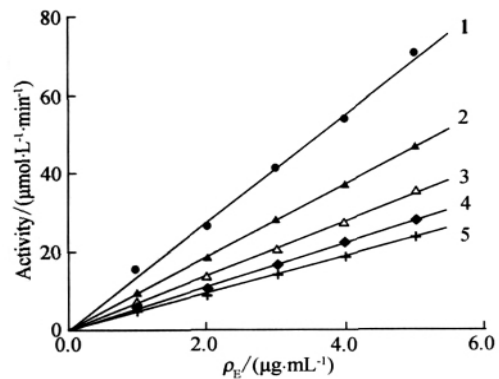


图 3 砂仁提取物对酪氨酸酶的二酚酶活力影响的浓度效应
Fig. 3 Effect of extract of *Amomum* on the diphenolase activity of tyrosinase

效应物浓度的增大,直线斜率降低,说明了效应物对酪氨酸酶活力的抑制作用属于可逆过程.也就是说增加效应物的浓度将导致酶活力下降是由于酶活力受到抑制,催化效率降低,而不是通过减少有效酶量引起酶活力下降,结果见图 4.

2.5 砂仁提取物对酪氨酸酶二酚酶活力的抑制作用类型

在测活体系中,固定加入的酶量,改变底物 *L*-DOPA 的浓度,测定酶在含不同浓度效应物的测活中的反应初速度(v_0).以酶反应的初速度对底物浓度作图为一组双曲线,说明酶促反应遵循米氏(Michaelis-Menten)动力学方程.以 Lineweaver-Burk 双倒数作图(图 5),得到一组相交于第二象限的直线,横轴截距和纵轴截距都因为效应物浓度的变化而改变,米氏常数(K_m)随效应物浓度的增大而变大,酶促反应的



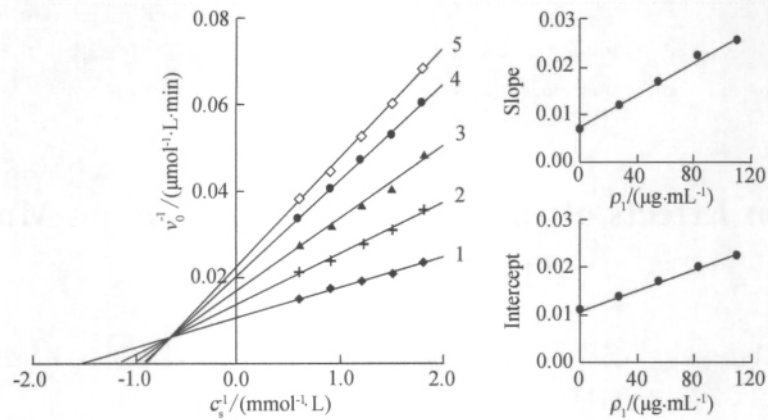
直线 1~5 表示砂仁提取物的质量浓度分别为:
0,27.5,55.0,82.5 和 110.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

图 4 砂仁提取物对酪氨酸酶二酚酶活力的抑制机理的测定
Fig. 4 Determination of the inhibitory mechanism of the *Amomum* extract on the diphenolase activity of tyrosinase

最大速度(V_m)则随效应物浓度的增大而下降,其抑制类型属于混合型.二次作图,以双倒数的斜率和纵轴截距对所含的效应物浓度作图,求出效应物对游离酶抑制常数(K_I)为 41.85 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和对酶-底物络合物抑制常数(K_{IS})为 98.51 $\mu\text{g}/\text{mL}$, K_{IS} 值是 K_I 值的 2.35 倍.

3 讨论

天然提取酶抑制剂是传统的手段,丰富多彩的物种资源为研究提供了大量的试验材料.因此从天然产物提取活性产物成为酪氨酸酶抑制剂筛选的另一研究热点^[14-15].研究表明,这类抑制剂主要是通过酪氨酸酶结合形成稳定的复合物而抑制酪氨酸酶的催化



直线 1~5 的抑制剂质量浓度分别为: 0, 27.5, 55.0, 82.5 和 110.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

图 5 砂仁提取物对酪氨酸酶二酚酶活力抑制作用的 Lineweaver-Burk 作图

Fig. 5 Lineweaver-Burk plots for inhibition of the *Amomum* extract on the diphenolase activity of tyrosinase activity

活性。目前,尚未查到砂仁提取物对酪氨酸酶活力抑制作用的有关报道,本文研究了砂仁具有很好的抗酪氨酸酶活性,这为砂仁的新功效的研究奠定了基础。

鉴于砂仁中的组分主要为极性和非极性化合物,我们采用不同的萃取液根据砂仁组分的极性不同进行分级萃取,主要得到了石油醚相(得率 1.96%)、三氯甲烷相(得率 0.175%)、乙酸乙酯相(得率 0.338%)、正丁醇相(得率 0.674%)和 ddH₂O 相(得率 3.12%)提取物,其中正丁醇相对酪氨酸酶抑制效果最好,证明正丁醇相所含有的酪氨酸酶抑制剂的成分具有很好的抑制效应。接着我们采用大孔树脂 AB-8 继续纯化分离正丁醇相提取物,而 30%乙醇洗脱条件下所得的组分的酪氨酸酶活力抑制效果最好,证明了大孔树脂 AB-8 对正丁醇提取物起到了进一步的分离作用。随着效应物浓度的增大,相对稳态酶活力明显下降,迟滞时间也显著增加,说明效应物对酪氨酸酶单酚酶活力有一定抑制作用。当效应物浓度达到 10.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,单酚酶活力下降到 59.95%,迟滞时间延迟了 3.12 倍。而效应物对二酚酶活力的 IC_{50} 为 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$,研究发现效应物对酪氨酸酶的抑制机理为混合 I 型, K_{is} 是 K_i 的 2.35 倍。抑制剂的抑制常数 K_i 值小于 K_{is} 值,表明抑制剂与游离酶(E)的结合比与酶底物络合物(ES)的结合更牢固。

参考文献:

- [1] Sanchez Ferrer A, Rodriguez Lopez J N, Garcia Canovas F, et al. Tyrosinase; a comprehensive review of its mechanism[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1247(1): 1-11.
- [2] Katz E, Thompson C J, Hopwood D A. Cloning and expression of the tyrosinase gene from *Streptomyces antibioticus* in *Streptomyces lividans* [J]. *J Gen Microbiol*, 1983, 129(9): 2703-2714.

oticus in *Streptomyces lividans* [J]. *J Gen Microbiol*, 1983, 129(9): 2703-2714.

- [3] 彭方, 王伟. 高产黑色素微生物资源的研究[J]. *氨基酸和生物资源*, 1996, 18(4): 1-4.
- [4] 杨舒黎, 舒文, 毛华明, 等. 云南地区乌骨绵羊黑色素的初步研究[J]. *畜牧与兽医*, 2006, 38(3): 17-20.
- [5] Van Gelder C W, Flurkey W H, Wichers H J. Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases [J]. *Phytochemistry*, 1997, 45(7): 1309-1323.
- [6] 鲜军舫, 王振常. 眼色素膜黑色素瘤的 CT 与 MRI 研究[J]. *中华放射学杂志*, 1998, 32(3): 158-161.
- [7] Ito S, Wakamatsu K, Ozeki H. Chemical analysis of melanins and its application to the study of the regulation of melanogenesis[J]. *Pigment Cell Research*, 2000, 13: 103-109.
- [8] 李国荣, 张士瑾, 李红岩, 等. 酚氧化酶研究概况 I——特性, 功能, 分布和在胚胎发育中的变化[J]. *海洋科学*, 2003, 27(4): 4-8.
- [9] Rees J L. The genetics of sun sensitivity in humans[J]. *Am J Hum Genet*, 2004, 75(5): 739-751.
- [10] 张丽霞, 彭建, 明马洁, 等. 砂仁种质资源研究概况[J]. *时珍国医国药*, 2009, 20(4): 788-789.
- [11] 邱凌, 陈清西. 仙蜜果花中酪氨酸酶抑制剂提取的探讨[J]. *厦门大学学报: 自然科学版*, 2004, 43(Sup.): 5-7.
- [12] 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): 274-282.
- [13] Zhang J P, Chen Q X, Song K K, et al. Inhibitory effects of salicylic acid family compounds on the diphenolase activity of mushroom tyrosinase [J]. *Food Chemistry*, 2006, 95(4): 579-584.
- [14] Chen Q X, Han P, Chen C Q, et al. Inhibitory effects of 4-chlorosalicylic acid on mushroom tyrosinase and its antimicrobial activities[J]. *Food Chemistry*, 2008, 107(2):

- 797-803. activity of mushroom tyrosinase [J]. Protein Journal, 2004, 23(5): 303-308.
- [15] Wang Q, Shi Y, Song K K, et al. Inhibitory effects of 4-halorenzoic acids on the diphenolase and monophenolase

Inhibition Effects of the Extract of *Amomum* on Mushroom Tyrosinase Activity

TANG Jian-yang¹, SU Ming-xing¹, LIU Feng-jiao², HUANG Su-fang¹,
HU Yong-hua², CHEN Qing-xi^{2*}

(1. Agricultural Bioresource Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China;

2. Key Laboratory of the Ministry of Education for Coastal and Wetland Ecosystems, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Tyrosinase (EC 1.14.18.1) is a key enzyme in pigment biosynthesis of organisms. The 30% ethanol extract from *Amomum* which has significant inhibition on mushroom tyrosinase activity was purified by ultrasonic extracting, organic solution extracting, resin AB-8 chromatography. In the present paper, the effects of extract on the activity of mushroom tyrosinase were studied. The results showed that the extract could inhibit both monophenolase activity and diphenolase activity of the enzyme. For the monophenolase activity, the extract lengthened the lag time and decreased the steady-state activity. When the inhibitor concentration reached 10.5 $\mu\text{g/mL}$, the steady-state activity decreased 40%, the lag time lengthened 3.12 times. For the diphenolase activity, it also showed that concentration-dependent relationship. The IC_{50} value was estimated to be 64 $\mu\text{g/mL}$. The kinetic analysis showed that the inhibition of the extract on the diphenolase activity of the enzyme was reversible and belonged to mix-type, and the inhibition constants (K_i and K_{is}) were determined to be 41.85 and 98.51 $\mu\text{g/mL}$. All of these data may provide the basis for developing novel tyrosinase activity inhibitors and searching for new potent food preservatives or insecticides.

Key words: *Amomum*; tyrosinase; monophenolase; diphenolase; inhibition