

云南莴笋尖酪氨酸酶分离纯化及酶学性质

廖海君, 李蕊伽, 陶敏, 白亚娟, 唐菁, 唐云明*

(西南大学生命科学学院, 重庆市甘薯工程研究中心, 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆 400715)

摘要: 为获得更多成本廉价且易得的酪氨酸酶来源, 为云南莴笋尖酪氨酸酶抑制剂的研究提供参考, 选取云南莴笋尖为实验材料, 通过匀浆、缓冲液抽提、硫酸铵分级沉淀、DEAE-Sephrose离子交换层析和Superdex-200凝胶过滤层析等方法纯化, 获得电泳纯的酪氨酸酶, 并对纯化后的酪氨酸酶进行部分酶学性质研究。结果表明, 云南莴笋尖中酪氨酸酶的比活力为20.62 U/mg, 分子质量约为995.40 kD, 亚基分子质量约为65.23 kD。最适反应温度和最适反应pH值分别为60 ℃和8.0, 在pH 6.0~8.0及20~40 ℃范围内较稳定。最适条件下, 以左旋多巴为底物的 K_m 值为1.567 mmol/L, v_{max} 为0.037 6 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{L})$ 。乙醇、异丙醇、正丁醇对该酶活性有不同程度的抑制作用; 甲醇、 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Ag^+ 、 Cd^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Ca^{2+} 对该酶活性有不同程度的激活作用, Co^{2+} 、 Mn^{2+} 对该酶具有显著的激活作用, 低浓度的 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、草酸、抗坏血酸对该酶有激活作用, 高浓度时有抑制作用。尿素、EDTA、 Li^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 对该酶活性影响较小。

关键词: 云南莴笋尖; 酪氨酸酶; 分离纯化; 酶学性质

Isolation, Purification and Partial Characterization of Tyrosinase from Yunnan-Grown Lettuce Tip

LIAO Haijun, LI Ruijia, TAO Min, BAI Yajuan, TANG Jing, TANG Yunming*

(Key Laboratory of Eco-Environments in Three Gorges Reservoir Region, Ministry of Education,

Chongqing Sweet Potato Engineering Research Center, School of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: To find a new cheap and easily available source of tyrosinase and to provide an experimental basis for further research on inhibitors of tyrosinase from lettuce tip, electrophoretically pure tyrosinase was obtained from Yunnan-grown lettuce tip through consecutive homogenization, buffer extraction, ammonium sulfate fractionation, DEAE-Sephrose fast flow chromatography and Superdex-200 prep grade chromatography. The results showed that the specificity activity of the purified enzyme was 20.62 U/mg. The relative molecular weight of the tyrosinase was approximately 995.40 kD, in which the subunit molecular mass was roughly 65.23 kD. The enzymatic properties showed that the optimum temperature and pH for the tyrosinase were 60 ℃ and 8.0, respectively. The enzyme was stable in the pH range of 6.0–8.0 and in the temperature range of 20–40 ℃. Its apparent K_m and v_{max} were 1.567 mmol/L and 0.037 6 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{L})$, respectively. The tyrosinase activity was slightly affected by EDTA, urea, K^+ , Mg^{2+} and Li^+ . The enzyme activity could be inhibited by ethanol, isopropanol, *n*-butanol, but activated by methanol, Co^{2+} , Mn^{2+} , Pb^{2+} , Ag^+ , Cd^{2+} , Ba^{2+} , and Ca^{2+} , and it could be obviously activated by Co^{2+} , Mn^{2+} . Ascorbic acid, Zn^{2+} , Cu^{2+} , and oxalic acid enhanced the enzyme activity at low concentrations but inhibited it at high concentrations.

Key words: Yunnan-grown lettuce tip; tyrosinase; isolation and purification; enzymatic properties

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201708006

中图分类号: Q946.5

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2017) 08-0030-07

引文格式:

廖海君, 李蕊伽, 陶敏, 等. 云南莴笋尖酪氨酸酶分离纯化及酶学性质[J]. 食品科学, 2017, 38(8): 30-36. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201708006. <http://www.spkx.net.cn>

LIAO Haijun, LI Ruijia, TAO Min, et al. Isolation, purification and partial characterization of tyrosinase from Yunnan-grown lettuce tip[J]. Food Science, 2017, 38(8): 30-36. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201708006. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2016-06-02

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项 (XDJK2016C110)

作者简介: 廖海君 (1989—), 女, 硕士研究生, 主要从事蛋白质与酶工程研究。E-mail: heking_liao@126.com

*通信作者: 唐云明 (1960—), 男, 教授, 博士, 主要从事蛋白质与酶工程研究。E-mail: tbright@swu.edu.cn

酪氨酸酶 (tyrosinase, TYR) 又名陈干酪酶素、多酚氧化酶、儿茶酚氧化酶等, 是一种含铜氧化还原酶, 广泛存在于动植物、微生物和哺乳动物中^[1-2], 是多巴和黑色素合成的关键酶, TYR是二价铜离子与酶蛋白相互结合的金属酶, 兼有氧化和加氧酶两种功能^[3], 其双重功能可增强生物体表面机械强度, 并在外来物入侵时获得免疫反应过程中有重要意义^[4]。TYR对底物(羧酸及其衍生物、苯胺及其衍生物、酚类及其衍生物及其他非酚类等)都具有较强的催化降解能力^[5], 近年来, TYR被广泛用于食品加工、医学、美容、生物传感器、环境保护、染料脱色等方面的研究^[6-7]。因此, 对获得低成本、来源广泛的TYR及其相关性质的研究具有重要的经济 and 理论意义。目前, TYR的制备主要来源于真菌、细菌等, 而从植物中提取制备TYR的报道较少^[2,8], 云南莴笋尖具有耐热、耐寒适应性强、抗病虫害等优点, 相比以微生物为实验材料来源, 云南莴笋尖具有取材便捷、实验周期短等优势。本实验以廉价易得的云南莴笋尖为实验材料对TYR进行分离纯化并研究其部分酶学性质, 旨在为TYR的来源提供新途径, 为其应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜云南莴笋尖购买于重庆市北碚区永辉超市。

十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 标准品、凝胶层析分子质量标准品美国GE Healthcare公司; 聚乙烯吡咯烷酮 (polyvinyl pyrrolidone, PVPP)、左旋多巴 (levodopa, L-DOPA)、牛血清白蛋白 美国Sigma公司; 考马斯亮蓝R-250 美国Bio-Rad公司; 丙烯酰胺、甲叉-双丙烯酰胺 瑞士Fluka公司; 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

精密电子天平 瑞士Mettler Toledo公司; GL-21M高速冷冻离心机 长沙湘仪仪器有限公司; Milli-Q plus超纯水仪 美国Millipore公司; UV-2550型分光光度计、蛋白核酸定量仪 日本岛津公司; AKTA prime plus蛋白纯化系统、DEAE-Sepharose离子交换层析柱、Superdex-200凝胶过滤层析柱 美国GE公司; MC4L冷冻干燥机 德国Uni Equip公司; 垂直板电泳槽和电泳仪 美国Bio-Rad公司。

1.3 方法

1.3.1 TYR活力测定

参考Dalfard等^[8-10]的方法略做修改。反应体系

(3.1 mL) 包括2.9 mL含有底物 (2 mmol/L L-DOPA) 的0.05 mol/L pH 8.0的Tris-HCl缓冲溶液、0.2 mL酶液。30 °C条件下, 在3 min内测定OD_{475 nm}的变化值, 以未加酶液为空白对照。酶活力单位定义为: 每分钟转化1 μmol的底物所需酶量为一个酶活力单位 (U)。

1.3.2 蛋白质质量浓度的测定

采用考马斯亮蓝染料法 (Bradford法) 和紫外分光光度法计算蛋白质质量浓度^[11], 用牛血清白蛋白做标准曲线, 所得方程为: $y = 2.4171x - 0.0019$, $R^2 = 0.9995$ 。

1.3.3 TYR粗酶液制备

取新鲜干净的云南莴笋尖, 切碎后称取100 g, 按1:3 (g/mL) 加入预冷0.05 mol/L pH 7.5的Tris-HCl缓冲液和2.00 g PVPP进行匀浆, 4 °C静置3 h, 纱布过滤后, 将滤液在12 000 r/min离心30 min, 收集上清液即为TYR的粗酶液。

1.3.4 硫酸铵分级沉淀

向粗酶液中加入硫酸铵粉末至25%的饱和度, 4 °C静置3 h, 在12 000 r/min离心30 min, 弃沉淀收集上清液; 再向上清液中加入硫酸铵至60%的饱和度, 在4 °C静置3 h后, 12 000 r/min离心30 min, 去上清液收集沉淀。将沉淀完全溶解于10 mL 0.05 mol/L、pH 7.3的Tris-HCl缓冲液中, 于4 °C透析24 h后, 3 000 r/min离心10 min, 收集上清液, 即为TYR的初酶液。

1.3.5 DEAE-Sepharose离子交换层析

用0.05 mol/L pH 7.3的Tris-HCl缓冲液平衡DEAE-Sepharose离子交换层析柱 (26 mm×15 cm) 12 h, 取10 mL初酶液上样, 线性洗脱溶液为0~0.5 mol/L NaCl (0.05 mol/L pH 7.3 Tris-HCl缓冲液配制)。洗脱流速为0.5 mL/min, 每管收集体积为5 mL, 测定各收集管TYR活力和蛋白质质量浓度。收集有较高酶活力管中的酶液, 透析浓缩后进行凝胶层析。

1.3.6 Superdex-200凝胶过滤层析

用0.05 mol/L pH 6.0的磷酸缓冲液平衡Superdex-200凝胶过滤层析柱 (16 mm×60 cm) 10 h后, 取1.3.5节所得酶液5 mL上样, 用0.05 mol/L pH 6.0的磷酸缓冲液进行洗脱, 流速为0.3 mL/min, 每管收集3 mL。测定各管收集液中漆酶的酶活性和蛋白质质量浓度, 收集酶活力较高的酶液。在4 °C条件下用去离子水透析12 h, 冷冻干燥后于-20 °C条件下贮存备用。

1.3.7 TYR纯度鉴定及分子质量的测定

采用SDS-PAGE对1.3.6节所得最高管酶活力的TYR进行纯度鉴定, SDS-PAGE浓缩胶和分离胶的质量分数分别

为5%、12%，上样量为15 μL 。经SDS-PAGE和凝胶过滤层析分别对TYR的亚基分子质量和全分子质量进行测定^[12]。

1.3.8 TYR酶学性质测定

1.3.8.1 TYR最适反应pH值与pH值稳定性

在pH 4.0~9.0条件下测定TYR活力，以测定酶活力最高值为100%，计算不同pH值条件下的相对酶活力，确定该酶的最适反应pH值。将200 μL 酶液与等体积的pH 3.0~9.0缓冲液混合均匀后置于4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下，静置3 h，测定不同pH值条件下的TYR活力，以等体积的酶液与蒸馏水混匀为空白对照，在同等条件下所测酶活力值为100%，并计算不同pH值条件下的相对酶活力，以研究TYR的pH值稳定性。

1.3.8.2 TYR最适反应温度与热稳定性

在不同的温度梯度（25~85 $^{\circ}\text{C}$ ，梯度为5 $^{\circ}\text{C}$ ）、pH 8.0条件下测定TYR活力，以酶活力最高值为100%，计算不同温度的相对酶活力，确定TYR最适反应温度。将酶液置于不同温度（20~60 $^{\circ}\text{C}$ ，梯度为5 $^{\circ}\text{C}$ ），每30 min测定一次酶活力，以不保温酶液测定的酶活力为100%，计算不同时间和温度条件下TYR的相对酶活力，研究该TYR的热稳定性。

1.3.8.3 不同化合物对TYR活力影响

将不同浓度（5~25 mmol/L）的尿素、EDTA、草酸、抗坏血酸与200 μL 酶液等体积混匀置于4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下，静置30 min，测定不同浓度不同化合物的TYR活力，以同等条件下，与200 μL 酶液等体积混匀的蒸馏水测定的酶活力为100%，计算TYR在不同浓度不同化合物条件下的相对酶活力。

1.3.8.4 不同有机溶剂对TYR活力影响

将不同体积分数（10%~50%）的甲醇、乙醇、异丙醇、正丁醇与200 μL TYR液等体积混合。于4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下静置30 min，相同条件下测定不同有机醇类物质在不同浓度条件下的TYR活力，相同条件下，以200 μL 酶液与等体积蒸馏水混匀所测的酶活力为100%，计算在不同体积分数不同有机溶剂下TYR的相对酶活力。

1.3.8.5 不同金属离子对TYR活力的影响

将不同浓度（10~50 mmol/L）的不同金属离子与200 μL 酶液等体积混匀，于4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下静置30 min，测定酶活力，在同等条件下，以200 μL 酶液与等体积蒸馏水混匀后所测酶活力值为100%，计算在不同浓度条件下不同金属离子中TYR的相对酶活力。

1.3.8.6 TYR米氏常数（ K_m ）和最大反应速率（ v_{max} ）的测定

配制不同浓度的L-DOPA（0.1~1 mmol/L），在

60 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 8.0条件下测定TYR活力，采用双倒数作图法（Lineweaver-Burk法）^[13]，求出TYR的 K_m 和 v_{max} 值。

2 结果与分析

2.1 云南莴笋尖TYR分离纯化

经DEAE-Sephrose离子交换层析后的TYR结果如图1所示，该酶的酶活力峰主要集中在36~55管，其中42管酶活力峰最高。离子交换层析所得酶液，经Superdex-200凝胶过滤层析（图2），结果表明酶活力峰主要集中在18~28管，其中22管酶活力峰最高。收集第22管附近各管的酶液，进行SDS-PAGE，结果显示单一条带（图3），表明该TYR分离纯化已达电泳纯。后续研究均以该酶液为材料进行。云南莴笋尖TYR纯化结果如表1所示：最终得到TYR的回收率为9.56%，纯化倍数为10.91倍，比活力20.62 U/mg。

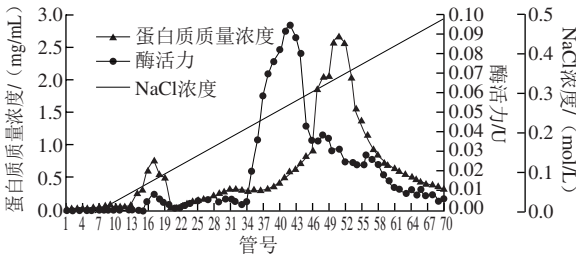


图1 云南莴笋尖TYR的DEAE-Sephrose离子交换层析
Fig. 1 DEAE-Sephrose fast flow chromatography of tyrosinase from Yunnan-grown lettuce tip

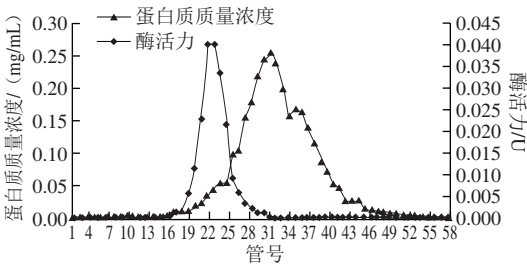


图2 云南莴笋尖TYR Superdex-200凝胶过滤层析
Fig. 2 Superdex-200 prep grade chromatography of tyrosinase from Yunnan-grown lettuce tip

表1 云南莴笋尖TYR分离纯化结果
Table 1 Summary of the purification steps of tyrosinase from Yunnan-grown lettuce tip

纯化步骤	总酶活力/U	总蛋白质量/mg	比活力/(U/mg)	回收率/%	纯化倍数
粗酶液	101.32	53.52	1.89	100	1.00
硫酸铵分级沉淀后透析	73.07	18.82	3.88	72.11	2.05
DEAE-Sephrose层析	47.71	5.24	9.10	47.09	4.81
Superdex-200层析	9.69	0.47	20.62	9.56	10.91

2.2 云南莴笋尖TYR分子质量的测定结果

SDS-PAGE测得云南莴笋尖TYR的亚基分子质量约为65.23 kD, 经过Superdex-200凝胶过滤层析测得其全酶分子质量为995.40 kD (图4), 由此可推测云南莴笋尖TYR由15个相同亚基构成。

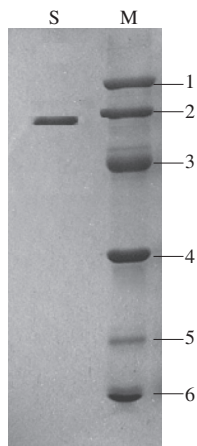


Fig. 3 SDS-PAGE of tyrosinase purified from Yunnan-grown lettuce tip

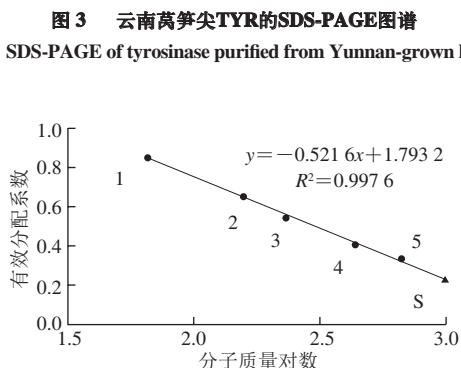


Fig. 4 Molecular weight estimation of tyrosinase from Yunnan-grown lettuce tip by Superdex-200 prep grade chromatography

2.3 云南莴笋尖的部分酶学性质

2.3.1 TYR最适反应pH值与pH值稳定性

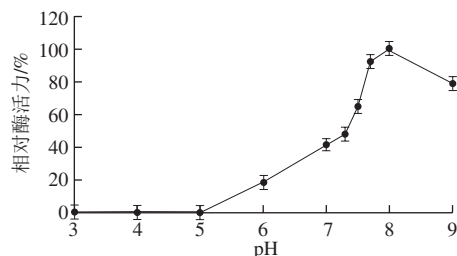


Fig. 5 Effect of pH on the activity of tyrosinase from Yunnan-grown lettuce tip

云南莴笋尖TYR有最大酶活力时的pH值为8.0, 因此pH 8.0为该酶的最适反应pH值 (图5), 在pH 3.0~5.0范围内, 该酶无酶活性, 当pH值在7.0~8.0范围内时, TYR具有较高的酶活力。

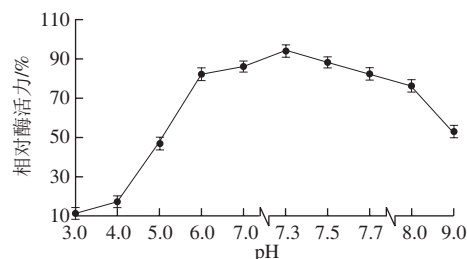


Fig. 6 pH stability of tyrosinase from Yunnan-grown lettuce tip

由图6可知, TYR在pH 7.0~7.5条件下孵育3 h后, 其剩余相对酶活力保持80%以上, pH 7.3时剩余相对酶活力最大, 当pH值大于7.3时, 其剩余相对酶活力开始下降。

2.3.2 TYR最适反应温度与热稳定性

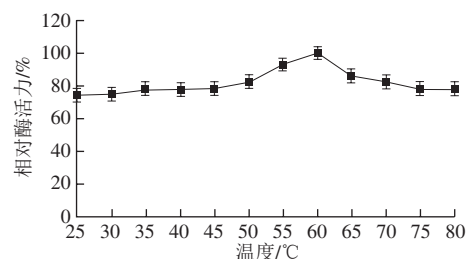


Fig. 7 Effect of temperature on activity of tyrosinase from Yunnan-grown lettuce tip

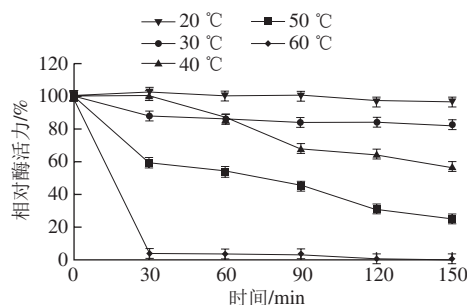


Fig. 8 Thermal stability of tyrosinase from Yunnan-grown lettuce tip

云南莴笋尖TYR的最适反应温度为60℃ (图7)。由图8可知, TYR在不同的温度条件下孵育150 min后, 在30℃时, 其剩余相对酶活力仍保持在85%以上, 50℃后相对酶活力开始逐渐降低。当温度大于60℃时, 30 min后其相对酶活力为零, 即TYR活力完全丧失。

2.3.3 不同化合物对TYR活力影响

由图9可知, EDTA、尿素对TYR的作用不明显; 草

酸和抗坏血酸在浓度为5 mmol/L对该酶有激活作用,其浓度大于该浓度值时,二者对该酶均表现出抑制作用,其中草酸在10 mmol/L时对该酶活性几乎完全抑制,抗坏血酸在20 mmol/L时对该酶活性已完全抑制。

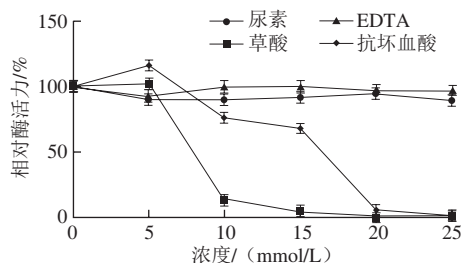


图9 不同化合物对云南莴笋尖TYR活力的影响

Fig. 9 Effect of various compounds on activity of tyrosinase from Yunnan-grown lettuce tip

2.3.4 不同有机溶剂对TYR活力影响

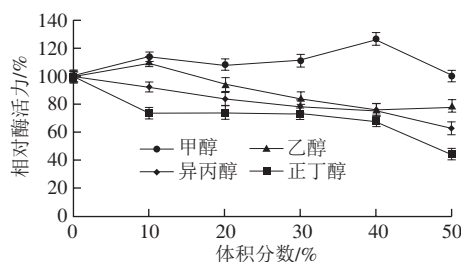


图10 不同有机溶剂醇类物质对云南莴笋尖TYR活力影响

Fig. 10 Effect of various alcohols on the activity of tyrosinase from Yunnan-grown lettuce tip

4种不同醇类物质对TYR活力的影响下,体积分数为30%~40%的甲醇对该酶表现出激活作用,乙醇、异丙醇、正丁醇对该酶具有不同程度抑制作用,其中正丁醇抑制作用较明显(图10)。

2.3.5 不同金属离子对TYR活力的影响

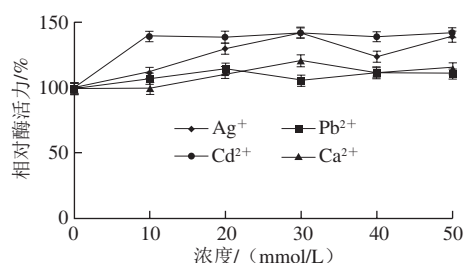
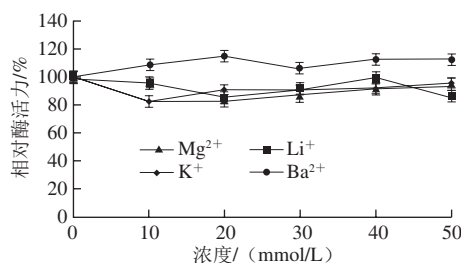


图11 不同金属离子对云南莴笋尖TYR活力的影响

Fig. 11 Effect of various metal ions on the activity of tyrosinase from Yunnan-grown lettuce tip

不同金属离子在不同浓度条件下,对TYR酶活性有不同的作用(图11), Co^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Ag^{+} 、 Cd^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Ca^{2+} 对该酶均有激活作用,其中 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 对该酶具有显著激活作用且随着离子浓度增高而增大, Ag^{+} 、 Ba^{2+} 、 Ca^{2+} 对该酶激活作用不明显,随离子浓度的增大, Cd^{2+} 对TYR激活作用几乎保持稳定; Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 对该酶活性影响为:低浓度的离子浓度有激活作用,高离子浓度表现出抑制作用; K^{+} 、 Mg^{2+} 、 Li^{+} 对该酶活性影响不明显。

2.3.6 TYR的 K_m 和 v_{\max} 测定结果

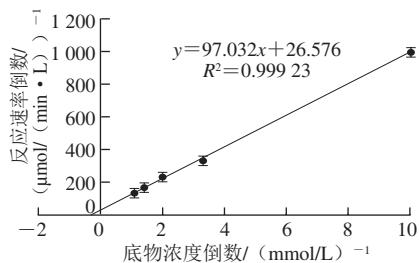


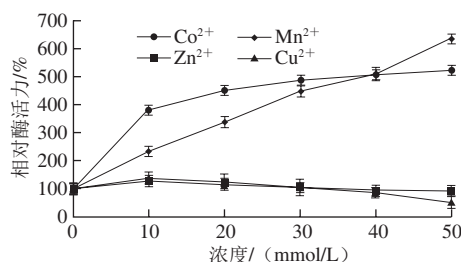
图12 双倒数法测定云南莴笋尖TYR的 K_m

Fig. 12 K_m determination of tyrosinase from Yunnan-grown lettuce tip by Lineweaver-Burk plot

在pH 8.0、60℃条件下,以不同浓度的L-DOPA为TYR的反应底物,测定其与该TYR反应速率,采用Lineweaver-Burk法得到反应速率倒数与底物浓度倒数的关系曲线图(图12),计算得到该TYR对L-DOPA的 K_m 值为1.567 mmol/L, v_{\max} 为0.037 6 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{L})$ 。

3 讨论

本实验以云南莴笋尖为材料分离纯化的TYR的酶学性质、金属离子及化合物等对该酶的作用与其他报道不尽相同^[14]。经分离纯化后的TYR,其回收率为9.56%,低于蕹菜叶^[15](11.33%),和海洋放线菌^[16](9.9%)相近,高于米曲霉^[4](0.7%)。云南莴笋尖中的色素在波长475 nm处也有吸光度,在计算蛋白质的量时,使数值增大,从而使TYR纯化倍数、回收率偏低,进而对TYR的



纯化过程造成影响^[17]。因此,如何有效去除色素是以绿色植物叶为材料提取TYR亟待解决的问题。

该TYR的最适反应温度和最适反应pH值分别为60℃、8.0,高于黑木耳(40℃,pH 7.0)^[9]、双孢蘑菇(30℃,pH 6.5)^[18]、南美对虾(40℃,pH 6.0)^[19]、蕹菜叶(45℃,pH 7.5)^[15]。其中,最适pH值与海洋放线菌(pH 8.0)相同^[16]。

云南茼蒿尖TYR亚基分子质量为65.23 kD,高于香樟果实^[14](43 kD),低于曲霉菌^[20](140 kD),与人体^[21](60.40 kD)相近。物种的生存环境、长期分离进化及种属差异等原因可能导致TYR分子质量不同^[22]。

实验中的13种金属离子对该TYR活力有不同程度的影响,其中 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Ag^{+} 、 Cd^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Ca^{2+} 对该酶均有激活作用,且 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 随着离子浓度的增大,其对该酶的激活作用越明显,可能是因为参与该TYR酶原的激活过程或促进该酶活性中心与底物的亲和力^[23]。低浓度的 Zn^{2+} 和 Cu^{2+} 表现为激活作用,高浓度表现为抑制作用,与杨进孙等^[24]报道的 Cu^{2+} 的作用相同, K^{+} 、 Mg^{2+} 、 Li^{+} 对该酶活性影响不明显。不同金属离子对该TYR活力存在的不同影响,其具体作用机制尚待进一步研究。

酪氨酸酶的抑制特征为可逆抑制^[25-26],由于分子多样性,其抑制机理复杂,一种抑制剂可能同时具有几种抑制机理;同种抑制剂在不同底物作用下,其抑制机理也不同。邱龙新^[27]和宋康康^[28]等分别研究了鞣酸和熊果甙对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用,结果表明,鞣酸和熊果甙均为酪氨酸酶二酚酶的可逆性竞争型抑制剂,其抑制剂机理分别为:鞣酸组成中的没食子酸与酶底物分子结构类似,而熊果甙自身为酶底物类似物,两者竞争性的与酶活性中心结合,从而抑制酶活力。陆珊等^[29]研究曲酸对马铃薯酪氨酸酶的抑制作用,结果表明,在酪氨酸酶催化L-酪氨酸羟基化过程中,曲酸可以延长单酚酶的迟滞时间病可降低反应速率。王勤等^[30]研究对氨基苯酚对蘑菇酪氨酸酶的作用,结果显示,对氨基苯酚对蘑菇酪氨酸酶为可逆性抑制。本实验中,抗坏血酸和EDTA为TYR的抑制剂,前者在浓度为25 mmol/L时对该酶的活性表现为完全抑制,而EDTA对该酶活性的抑制作用不明显。尿素对该酶活性无影响,草酸在浓度为10 mmol/L时对该酶活性完全抑制,表明草酸是TYR的一种抑制剂。4种有机溶剂中乙醇、异丙醇、正丁醇均对该酶有抑制作用,其可能是有机溶剂破坏TYR的表面的水化层,降低环境中的极性,破坏维持酶结构的二级键,使酶构象发生改变。

目前,TYR的研究主要集中在医药、化妆品领域及食品应用领域,本实验从云南茼蒿尖中分离纯化的TYR,为其在理化性质,食品加工储存及其他方面的应用提供更多的参考。

参考文献:

- [1] LEZZI C, BLEVE G, SPAGNOLO S, et al. Production of recombinant *Agaricus bisporus* tyrosinase in *Saccharomyces cerevisiae* cells[J]. Journal of Industrial Microbiology, 2012, 39(12): 1875-1880. DOI:10.1007/s10295-012-1192-z.
- [2] 王春丽, 柳伟. 酪氨酸酶的研究进展[J]. 生物加工过程, 2014(4): 94-100. DOI:10.3969/j.issn.1672-3678.2014.04.018.
- [3] 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.
- [4] GASPARETTI C, FACCIO G, ARVAS M, et al. Discovery of a new tyrosinase-like enzyme family lacking a C-terminally processed domain: production and characterization of an *Aspergillus oryzae* catechol oxidase[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 86(1): 213-226. DOI:10.1007/s00253-009-2258-3.
- [5] 姜焕, 钟平方, 蔡强, 等. 酪氨酸酶的分离纯化及催化邻苯二酚动力学分析[C]//杭州: 第二届环境污染防治应用技术交流会, 2010.
- [6] WASTENSSON G, HAGBERG S, ANDERSSON E, et al. Parkinson's disease in diphenyl-exposed workers—a causal association?[J]. Parkinsonism and Related Disorders, 2006, 12(1): 29-34. DOI:10.1016/j.parkreldis.2005.06.010.
- [7] 欧志敏, 王普, 王鸿, 等. 酪氨酸酶的应用研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2005(S1): 163-169. DOI:10.3969/j.issn.1007-7723.2005.02.076.
- [8] DALFALD A B, KHAJEH K, SOUDI M R, et al. Isolation and biochemical characterization of laccase and tyrosinase activities in a novel melanogenic soil bacterium[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2005, 39(7): 1409-1416. DOI:10.1016/j.enzmictec.2006.03.029.
- [9] 邹宇, 马堃, 胡文忠, 等. 黑木耳酪氨酸酶的分离纯化与酶学性质研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(23): 177-180.
- [10] 曾亮, 吴靓靓, 官兴丽, 等. 儿茶素对马铃薯酪氨酸酶的抑制作用[J]. 食品科学, 2010, 31(23): 310-313.
- [11] 王学奎. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006: 190-192.
- [12] 陈雅惠. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京: 北京大学出版社, 2005: 164-172.
- [13] 陈钧辉, 陶力, 朱婉华, 等. 生物化学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 92-93.
- [14] 张晓晴, 蔡宇杰, 廖祥儒, 等. 香樟(*Cinnamomum camphora*)果实酪氨酸酶的分离纯化及特性分析[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(15): 6167-6170. DOI:10.3969/j.issn.0517-6611.2008.15.011.
- [15] 孙才云, 方玲, 万骥, 等. 蕹菜叶酪氨酸酶的分离纯化与部分性质[J]. 食品科学, 2015, 36(15): 167-172. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201515031.
- [16] ROY S, DAS I, MUNJAL M, et al. Isolation and characterization of tyrosinase produced by marine actinobacteria and its application in the removal of phenol from aqueous environment[J]. Frontiers of Biology, 2014, 9(4): 306-316. DOI:10.1007/s11515-014-1324-0.
- [17] 李新荣, 汪洛, 韩红. 植物酪氨酸酶分离纯化过程中色素的去除[J]. 生物化学与生物物理进展, 1999, 6(2): 149-151. DOI:10.3321/j.issn.1000-3282.1992.02.005.
- [18] 蒋萌蒙, 田呈瑞, 王向军. 双孢蘑菇中酪氨酸酶的特性[J]. 江苏农业学报, 2008, 24(2): 194-198. DOI:10.3969/j.issn.1000-4440.2008.02.017.
- [19] 吕艳芳, 魏春娇, 王娇, 等. 南美白对虾酚氧化酶的提取及生化特性[J]. 食品科学, 2014, 35(7): 113-117. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201407023.
- [20] INAMDAR S, JOSHI S, BAPAT V, et al. Purification and characterization of RNA allied extracellular tyrosinase from *Aspergillus* species[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 172(3): 1183-1193. DOI:10.1007/s12010-013-0555-x.

- [21] GIEBEL L B, STRUNK K M, SPRITZ R A. Organization and nucleotide sequences of the human tyrosinase gene and a truncated tyrosinase-related segment[J]. Genomics, 1991, 9(3): 435-445. DOI:10.1016/0888-7543(91)90409-8.
- [22] 樊廷俊, 任秉新, 樊现远, 等. 甲壳动物酚氧化酶分子结构与生物化学性质的研究进展[J]. 山东大学学报(理学版), 2012, 47(1): 1-7.
- [23] 樊廷俊, 汪小锋. 中国对虾(*Penaeus chinensis*)酚氧化酶的分离纯化及其部分生物化学性质[J]. 生物化学与生物物理学报: 英文版, 2002, 34(5): 589-594.
- [24] 杨进孙, 周书林. 金属离子对不同螺龄湖北钉螺酚氧化酶活性的影响[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2014, 25(3): 246-248. DOI:10.11853/j.issn.1003.4692.2014.03.014.
- [25] 叶丽, 刘亚青, 巨修练. 酪氨酸酶抑制剂的研究进展[J]. 化学与生物工程, 2013, 30(8): 14-20. DOI:10.3969/j.issn.1672-5425.2013.08.004.
- [26] 李航, 赵国华, 阚建全, 等. 天然产物对酪氨酸酶的抑制及抑制机理的研究进展[J]. 日用化学工业, 2003, 33(6): 383-386. DOI:10.3969/j.issn.1001-1803.2003.06.012.
- [27] 邱龙新, 黄浩, 陈清西. 鞣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), 2005, 44(6): 839-842. DOI:10.3321/j.issn:0438-0479.2005.06.023.
- [28] 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. DOI:10.3321/j.issn:0438-0479.2003.06.024.
- [29] 陆珊, 胡源, 刘鑫, 等. 曲酸对马铃薯酪氨酸酶的抑制作用研究[J]. 化学研究与应用, 2005, 17(6): 729-732. DOI:10.3969/j.issn.1004-1656.2005.06.006.
- [30] 王勤, 邱凌, 宋康康, 等. 对氨基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. DOI:10.3321/j.issn:0438-0479.2004.04.032.