



马铃薯酪氨酸酶评价美白产品测定体系的建立

陈 芬

(武汉职业技术学院 生物工程学院,湖北 武汉 430074)

摘 要:从马铃薯中提取酪氨酸酶,以儿茶酚为底物,研究酪氨酸酶的动力学性质,用正交实验建立和优化一种酪氨酸酶活性抑制的测定体系,用此体系测定6种美白产品对酪氨酸酶活性的抑制率。结果表明,酪氨酸酶促反应产物的最大吸收波长为410nm,动力学参数为 K_m 为0.486 mmol/L, V_{max} 为9.17 U/min,测定美白产品对酪氨酸酶抑制作用的最佳实验条件为:底物为0.3mL,酶为0.3mL,样品为1.5mL。用此体系测定8种美白产品对酪氨酸酶抑制率分别达到32.5%、36.7%、34.5%、31.0%、32.6%、28.6%、38.2%、35.6%。为美白产品功效提供了一种客观评价体系。

关键词:酪氨酸酶;美白产品;抑制率;动力学参数;测定体系

中图分类号: TQ658.2

文献标识码: A

文章编号: 1671-931X (2020) 02-0116-04

酪氨酸酶又称多酚氧化酶,是由 Cu^{2+} 与酶蛋白结合的金属酶。酪氨酸酶是引起果蔬酶促褐变的主要因素,也是生物体合成黑色素的关键酶。其过程是黑素细胞中的酪氨酸在酪氨酸酶的作用下生成多巴、多巴醌最终形成黑色素^[1-4]。目前市场上销售的美白产品大多是以抑制酪氨酸酶达到美白作用,故对酪氨酸酶抑制作用的强弱是评价产品美白功效的主要指标^[2-10]。但如何用科学实验的方法评价美白产品的报道较少。本研究建立一种对美白产品的测定体系,为产品的美白功效提供简单有效的评价方法。

一、材料与方法

(一)材料与试剂

儿茶酚(邻-苯二酚)、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、硫酸铵、乙醇。以上试剂均为国产分析纯;实验用水为超滤纯水。市售新鲜马铃薯。美白产品为:1、2、3号样品是由武汉恒成医药有限公司自主研制产品,4、5、6、7、8号样品是市售的各种品牌的美白类

产品,均有批准文号,都在有效期内。

(二)主要仪器与设备

UVI1000 紫外可见分光光度计(上海天美科学仪器有限公司);FK-A 组织捣碎机(北京中仪友信有限公司);电热恒温水浴锅(天津市中环试验电炉有限公司);LXJ.IIB 离心机(上海安亭科学仪器厂);用磁力搅拌器;秒表;电子天平及实验室常见与玻璃仪器。

(三)方法

1.试剂

0.2 mol/L pH6.8 磷酸盐缓冲液(PBS)、50 mmol/L 儿茶酚(底物)溶液(用PBS配制)

2. 美白产品的处理

称取各美白产品1.0g,溶解于10mL50%的乙醇中,用0.45 μ m的膜过滤,滤液用于测定。

市售美白产品乳剂较多,都可用本法进行处理。

3. 酪氨酸酶液的制备

(1)浸提:称取新鲜去皮切碎马铃薯100 g(于0℃冷冻过夜),与-20℃下预冷的乙醇100 mL一起

收稿日期:2019-12-05

基金项目:湖北省高等学校优秀中青年科技创新团队计划项目“有机废弃物生物处理与资源化利用技术”(项目编号:T201535)。

作者简介:陈芬(1966-),女,湖北崇阳人,武汉职业技术学院副教授,研究方向:生物化学与技术、生物分离与纯化技术教学与研究。

放入组织捣碎机匀浆 1 min, 得乙醇匀浆混合液, 抽滤后马铃薯碎末用冰乙醇洗 2 到 3 遍, 直至其成为白色碎末, 按 1:1(W/V) 的比例加入预冷至 0℃ 的 PBS 100 ml, 用磁力搅拌器搅拌 30 min, 在 4000 r/min 下冷冻离心 30 min, 取上清液。

(2) 盐析: 在收集到的上清液内缓慢加入硫酸铵, 使其饱和度达到 50%, 0℃ 盐析沉淀过夜。在 4000r/min 下冷冻离心 10min, 收集沉淀。

(3) 透析: 将沉淀用少量预冷至 0℃ 的 PBS 溶解, 过滤, 将滤液装入处理好的透析袋中, 将另一端也密封后, 置于 0.02mol/LpH6.8 的 PBS 内, 0℃, 透析 48h, 期间至少更换透析液 5 次。

(4) 保存: 将透析后的滤液过 0.45μm 膜, 用 PBS 定容至 100ml 容量瓶中, 保存于冰浴或冰箱中备用。

4. 底物吸收光谱测定及酶促反应产物吸收光谱的测定

取 5 ml 儿茶酚(底物)溶液, 使用 1cm 比色皿于分光光度计上在 300–600nm 的区间进行重复扫描, 可获得儿茶酚的吸收光谱。

取 0.5 ml 酪氨酸酶液, 加 3.5ml PBS; 加 1.0ml 儿茶酚溶液, 摇匀。30℃ 反应约 10 min 后, 使用 1cm 比色皿于分光光度计上在 300–600nm 的区间进行重复扫描, 可获得酶促反应产物的吸收光谱。

5. 酶活力计算与测定方法

酶活力计算方法: 定义在最适条件(pH6.8、30℃)下, 在规定的反应体系(5ml 反应体系)中, 吸光度每分钟增加 0.001 为 1 个酶活力单位(U)。

$$\alpha = \Delta A / t$$

式中 α —5ml 反应体系所加酶的活力, U; ΔA —最大吸收长吸光度的变化; t —时间, min。

由于反应体系的吸光度与酶活力成正比, 本研究以吸光度代替酶活力进行计算。

酶活力的测定方法: 取 0.5ml 酪氨酸酶液于 10 ml 比色管中, 加入 3.5 ml PBS, 30℃ 温育 10min, 再加入 1.0 ml 儿茶酚溶液, 混匀, 同时开始计时, 用分光光度计在 410 nm 处测定吸光度。开始 6 min 内每分钟读 1 个数, 以后隔 2 min 读 1 个数, 直至吸光度变化不大为止。以时间为横坐标, 以吸光度为纵坐标作图, 计算酶活力。

6. 酶氨酸酶动力学参数的确定

取定量的酪氨酸酶液和不同浓度的儿茶酚溶液, 在 pH6.8 和 30℃ 下反应, 在一段时间内在 410nm 处测吸光度, 以时间为横坐标, 以吸光度为纵坐标作图, 得到吸光度随时间变化情况图, 绘制 Lineweaver-Burk 双倒数曲线, 得到酪氨酸酶的动力学参数。

7. 酪氨酸酶抑制效果实验条件的探索

试验不同的样品量, 不同的酶量, 不同的底物量对酪氨酸酶的抑制效果, 找出最佳的组合条件。

8. 不同的美白产品美白效果鉴定方法的建立

通过美白产品对抑制酪氨酸酶效果实验条件的探索, 建立美白效果的评价方法。

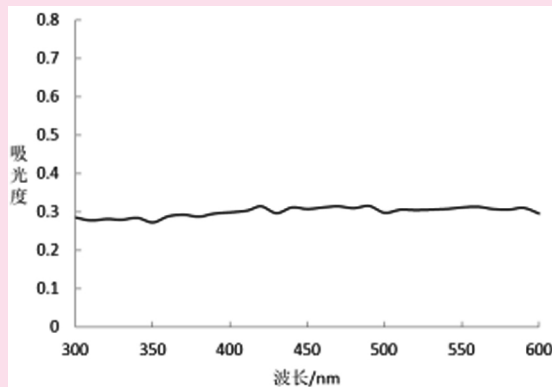


图1 底物(儿茶酚)的吸收光谱图

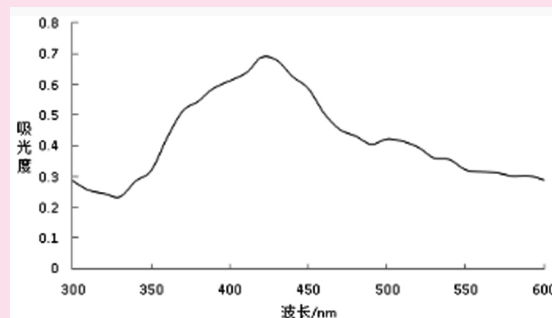


图2 酪氨酸酶促反应产物的吸收光谱图

二、结果与讨论

(一) 底物的吸收光谱图及酪氨酸酶促反应产物的吸收光谱

从图中可以看出, 底物儿茶酚在 300–600nm 无吸收峰, 而酪氨酸酶促反应产物有吸收峰, 且最大吸收波长为 410nm。

(一) 酪氨酸酶动力学参数的确定

取 0.5ml 酪氨酸酶液于 8 个 10ml 比色管中, 分别加入 4.4、4.2、4.0、3.7、3.5、3.3、3.0、2.5 ml PBS, 再

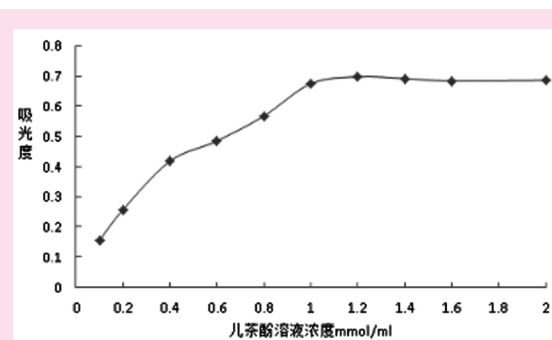


图3 底物浓度对酶活力的影响

加入 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、2.0ml 儿茶酚溶液,混匀,同时开始计时,分别 30℃水浴中反应 10min,用分光光度计在 410 nm 处测定吸光度。

由图可以看出,酶促反应基本遵循米氏(Michaelis-Menten)动力学方程,当底物的量较小时,吸光度比较小,此时酶活力比较低,是因为儿茶酚量小,转变为邻苯醌的量也小,随着底物浓度升高,吸光度也增加。在底物浓度较低的阶段,吸光度几乎是呈直线上升,呈现一级反应特征,随后上升得

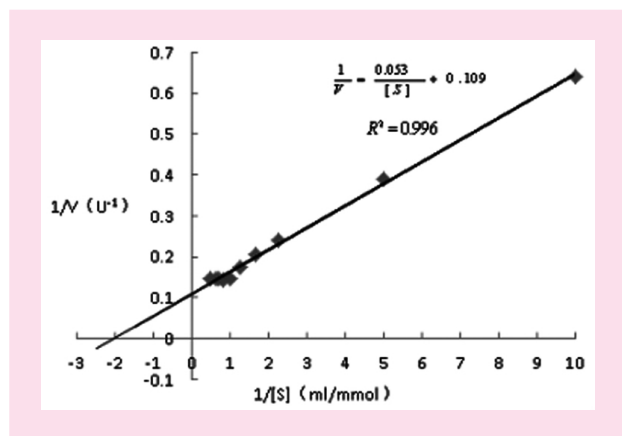


图4 Lineweaver-Burk 双倒数曲线图

表1 酪氨酸酶的动力学参数

t/min	Vmax/U·min ⁻¹	Km/mmol·L ⁻¹	$\frac{1}{v} \sim \frac{1}{[S]}$ 的 R ²
10	9.17	0.486	0.996

比较平缓,最后几乎不变,呈现零级反应特征。用双倒数法作图,可测出酪氨酸酶对儿茶酚催化反应的动力学参数即米氏常数 Km 值和最大速率 Vmax。

从双倒数曲线图可以得出酪氨酸酶的动力学参数如下表。

(三)酪氨酸酶抑制效果实验条件的探索

1. 酪氨酸酶活性抑制的测定体系设计

5ml 反应体系,测定 A、B、C 值,以下列公式计算酪氨酸酶的抑制率:

$$\text{抑制率}\% = [A - (B - C)] / A \times 100$$

空白: X mlPBS + X ml 酶液(灭活) + X ml 底物

A 值: X mlPBS + X ml 酶液 + X ml 底物 30℃温育 10min,用分光光度计测定 410nm 处的吸光度。

B 值: X mlPBS + X ml 酶液 + X ml 样品 + X ml 底物 30℃温育 10min,用分光光度计测定 410nm 处的吸光度。

C 值: X mlPBS + X ml 酶液(灭活) + X ml 样品 + X ml 底物 30℃温育 10min,用分光光度计测定 410nm 处的吸光度。

说明:酶液是酪氨酸酶,底物是儿茶酚溶液,样

品是美白产品即酪氨酸酶抑制剂。

2. 单因素实验

表2 底物浓度对抑制效果的影响

序号	底物/mL	抑制率/%
1	0.1	32.8
2	0.2	32.1
3	0.3	26.5

(1) 底物浓度对抑制效果的影响

实验条件: 5mL 反应体系中,酶量 0.3ml,样品量 1.5ml,在 30℃反应 10min。

较低的底物浓度,抑制效果比较好,但底物浓度太低,吸光度太小,测定不准确。

表3 酶浓度对抑制效果的影响

序号	酶/mL	抑制率/%
1	0.1	35.8
2	0.3	31.5
3	0.5	21.3

(2) 酶量对抑制率的影响

实验条件: 5mL 反应体系中,底物量 0.3ml,样品量 1.5ml,在 30℃反应 10min。

酶量越大,抑制效果越差。

表4 样品量对抑制效果的影响

序号	样品/mL	抑制率/%
1	1.0	16.8
2	1.5	30.5
3	2.0	32.5

(3) 样品量对抑制率的影响

实验条件: 5mL 反应体系中,底物量 0.3ml,酶量 0.3ml,在 30℃反应 10min。

表5 抑制效果影响因素正交实验设计表

序号	样品/mL	抑制率/%
1	1.0	16.8
2	1.5	30.5
3	2.0	32.5

样品量越大,抑制效果越好。但样品量过大,溶液混浊,不易过滤。

3. 正交实验设计

综上所述,根据确定的几个影响因素进行了正交实验设计。

从正交表中的极差数据分析中可以看出抑制效果影响最大的因素是样品量(因素 C),其次是酶量(因素 B)、底物量(因素 A),从极差(R)数据分析可知最佳的组合条件为 A2B2C2,即底物为 0.3mL,酶为 0.3mL,样品为 1.5mL,此时抑制效果最佳,达到

32.5%。

在最佳抑制效果条件下,重复上述实验,数据如表6所示。

(四)不同的产品美白效果测定方法

根据对酪氨酸酶抑制效果实验条件的探索,建立对产品美白效果评判的测定方法。

根据此方法,对6种美白产品进行检测,结果如下:

检测表明武汉恒成医药有限公司生产的美白产

表6 正交实验及实验结果

实验号	A	B	C	抑制率(%)
	1	2	3	
1	1(0.1)	1(0.1)	1(0.1)	11.4
2	1(0.1)	2(0.3)	3(2.0)	31.6
3	1(0.1)	3(0.5)	2(1.5)	24.4
4	2(0.3)	1(0.1)	3(2.0)	28.0
5	2(0.3)	2(0.3)	2(1.5)	32.5
6	2(0.3)	3(0.5)	1(0.1)	23.0
7	3(0.5)	1(0.1)	2(1.5)	31.6
8	3(0.5)	2(0.3)	1(0.1)	24.9
9	3(0.5)	3(0.5)	3(2.0)	25.8
	67.4	67.9	59.3	
	85.5	89.0	88.5	
	85	80.3	88.1	
	18.1	21.1	29.2	

表7 最佳条件稳定性实验

序号	样品/mL	抑制率/%
1	1.0	16.8
2	1.5	30.5
3	2.0	32.5

表8 美白产品抑制酪氨酸酶效果的测定方法

试剂	空白管	标准对照管(A)	样品管(B)	样品管(C)
PBS/ml	4.6	4.6	2.9	2.9
酶液/ml		0.3	0.3	
酶液(灭活)/ml	0.3			0.3
样品/ml			1.5	1.5
底物/ml	0.3	0.3	0.3	0.3

表9 各种美白产品对酪氨酸酶的抑制率

样品	1	2	3	4	5	6	7	8
样品	32.5	36.7	34.5	31.0	32.6	28.6	38.2	35.6

品与市售的产品对酪氨酸酶的抑制效果比较接近。

三、结论

本文从马铃薯中提取酪氨酸酶,测定了酪氨酸酶促反应产物的最大吸收波长为410nm,酪促反应的动力学参数为 K_m 为0.486 mmol/L, V_{max} 为9.17 U/min,得到了美白产品对酪氨酸酶抑制效果的最佳实验条件为:底物为0.3mL,酶为0.3mL,样品为1.5mL,据此建立了美白产品对酪氨酸酶抑制效果的测定体系,并测定了6种美白产品对酪氨酸酶抑制

率,分别是32.5%、33.7%、34.5%、31.0%、32.6%、35.6%。本方法操作简单、快捷、费用低,结果可用具体数据表示,据此可以判断产品的美白效果,为评价产品功效提供了一种客观的量化指标。

参考文献:

- [1] 胡泳华,贾玉龙,陈清西.酪氨酸酶抑制剂的应用研究进展[J].厦门大学学报(自然科学版),2016,(5):760-766.
- [2] 柴晶党,周盛民,张革,等.熟地黄提取物对酪氨酸酶抑制作用的研究[J].江西科技师范大学学报,2018,(6):70-74.

- [3] 孙蓓,李满,卢永波.影响皮肤黑素沉着的美白制剂及其作用机制研究进展[J].中国美容医学,2015,(22):82-85.
- [4] ITOS,WAKAMATSU K.A convenient screening method to differentiate phenolic skin whitening tyrosinase inhibitors from leukoderma ~inducing phenols [J].J Dermatol Sci,2015,(1):18-24.
- [5] 王宁芳.酪氨酸酶的提取及其催化活性研究[J].安徽农业科学,2009,(20):9315-9316.
- [6] 敖新宇,刘守庆,陈玉惠.石榴皮中有效成分的提取及增白效果的研究[J].安徽农业科学,2012,(10):6183-6185.
- [7] 王一帆,赖家珍,龙晓英,等.中药美白基质及功效评价进展[J].广东药学院学报,2014,(4):525-529.
- [8] LIN R D,CHEN M C,LIU Y L,et al.New whitening constituents from taiwan-native *Pyracantha koidzumii*: structures and tyrosinase inhibitory analysis in human epidermal melanocytes [J].Int J Mol Sci,2015,(12):28598-28613.
- [9] 刘杰超,焦中高,张春岭,等.苹果多酚提取物对酪氨酸酶的抑制作用[J].日用化学工业,2013,(6):414-417.
- [10] 樊倩,韦庆益,袁尔东,等.植物中酪氨酸酶的筛选及不同抑制剂对其活性的影响[J].食品工业科技,2012,(10):91-93.

[责任编辑:高小娥]

Establishment of a Determination System for the Evaluation of Whitening Products of Potato Tyrosinase

CHEN Fen

(School of Biological Engineering, Wuhan Polytechnic, Wuhan 430074, China)

Abstract: Vocational training has three characteristics: pertinence, flexibility and practicality. There are some problems that need to be improved in the promotion of vocational training in our government departments, vocational colleges, private vocational training institutions and enterprises. Vocational colleges for development. In order to improve the quality of vocational training, we should adhere to the three basic principles of employment oriented, skill based and quality-oriented, properly handle the relationship between vocational training and vocational skill training, school system education and vocational skill evaluation, and formulate the occupation standard of vocational training teachers to be sure, we should establish a system of evaluation, trial teaching, rewards and punishments, part-time teacher training, and a qualified team of vocational training teachers.

Keywords: vocational colleges; vocational training; training teachers