

酪氨酸酶催化氧化羟基吡啶类化合物的反应研究^{*}

徐 迪, 马 林, 张 凌, 庞朝乐, 古练权
(中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 研究酪氨酸酶催化 2,3-二羟基吡啶氧化反应条件, 结果表明该催化反应的最适 pH 值为 8.5, 最适温度是 45 °C, K_m 值为 0.322 mmol/L, 并发现当酶量较低时, 该催化反应存在一个延迟期。研究还表明酪氨酸酶不能催化 2-羟基吡啶和 4-羟基吡啶的氧化反应。根据实验结果, 探讨了酪氨酸酶催化 2,3-二羟基吡啶氧化反应的机制。

关键词: 酪氨酸酶; 2,3-二羟基吡啶; 2-羟基吡啶; 4-羟基吡啶

中图分类号: O643.32 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2002) 06-0033-03

酪氨酸酶又称多酚氧化酶, 儿茶酚氧化酶 (Ec. 1.14.18.1), 它广泛存在于红薯、香蕉、蘑菇、马铃薯及人体等动植物和微生物中。在动植物体内, 多酚氧化酶对酪氨酸和其他酚类化合物的代谢以及黑色素的合成起重要的调控作用^[1]。酪氨酸酶催化 2 个不同的反应: 单酚羟基化形成邻二酚 (单酚氧化酶活性) 和邻苯二酚氧化成邻醌 (二酚氧化酶活性), 在反应中都有氧分子的直接参与^[2]。

在多年来酪氨酸酶催化反应的研究中, 酪氨酸酶所催化的底物一直是多巴、酪氨酸、邻苯二酚、儿茶素类以及对位取代酚, 很少有酪氨酸酶催化其它底物氧化的报道^[3]。羟基吡啶类化合物从结构上、性质上 (芳香性) 与酚类化合物相似, 而且 Driscoll 等在研究抗癌活性物质时认为, 3-羟基-4(1H)-吡啶酮与 3-羟基-2(1H)-吡啶酮具有抗癌活性, 可能是它们在体内的作用机制与儿茶酚类化合物类似, 先经生物氧化成邻醌, 再进行亲核加成反应^[4,5]。为了扩展酪氨酸酶催化反应的底物类型和研究羟基吡啶类化合物的生物氧化机制, 采用 2-羟基吡啶, 4-羟基吡啶以及 2,3-二羟基吡啶作为底物, 对酪氨酸酶催化这些底物的反应进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材 料

酪氨酸酶 (6 050 unit/mg) 购于 Sigma 试剂公司, 2-羟基吡啶、4-羟基吡啶、2,3-二羟基吡啶为 Sigma 公司分析纯试剂; 磷酸氢二钾、磷酸二氢钾

等为市售分析纯试剂。

1.2 方 法

在磷酸缓冲液中, 采用酶活力的相对值测定。分别以 2-羟基吡啶、4-羟基吡啶和 2,3-二羟基吡啶为底物, 用岛津 UV 2501 紫外光谱仪测定各种物质在最大吸收峰处吸光度 (A) 随时间的增加值^[5]。

2 结 果

2.1 2,3-二羟基吡啶的最适 pH 的测定

在含有 0.1 mL 的 30 mmol/L 的 2,3-二羟基吡啶, 0.1 mL (0.1 mg/mL) 的酶液, 2.8 mL 一定 pH 值的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液体系中, 每隔 5 min 进行波长扫描 1 次, 发现在 518.5 nm 处吸收峰随时间延长而增高, 因此吸收峰 518.5 nm 是 2,3-二羟基吡啶氧化产物的特征吸收峰。

在含有 0.1 mL 的 30 mmol/L 的 2,3-二羟基吡啶, 0.1 mL (0.1 mg/mL) 的酶液, 2.8 mL 不同 pH 值 (5.0~9.0) 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液体系中, 30 °C 下, 于特征波长 518.5 nm 下进行时间扫描, 测定酶催化反应速度, 结果如图 1 所示。

从图 1 可以看到, 酪氨酸酶催化 2,3-二羟基吡啶的最适 pH 值是 8.5。根据文献报道, 酪氨酸酶催化各种酚类化合物的最适 pH 大多为 6.5 左右, 但是 2,3-二羟基吡啶分子中含有 1 个氮原子, 具有一定的碱性, 而且整个分子可能存在烯醇式-酮式的相互转化, 因此最适 pH 值在碱性的 8.5。

^{*} 收稿日期: 2002-06-13

基金项目: 国家自然科学基金项目资助项目 (20074042, 20032021)

作者简介: 徐迪 (1977 年生), 女, 博士研究生; 通讯联系人: 古练权; Email: cedc42@zsu.edu.cn; 张凌为四川大学生命科学学院

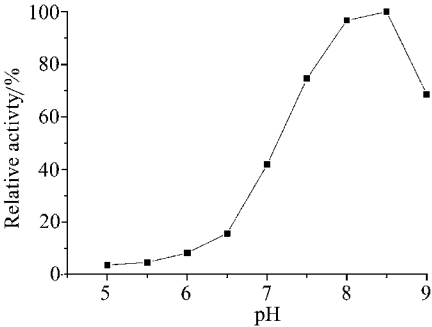


图 1 pH 值对酶催化活力的影响

Fig 1 pH optima for oxidation of 2,3-dihydroxypyridine catalyzed by mushroom tyrosinase

2.2 2,3-二羟基吡啶的最适温度的测定

在含有 0.1 mL 的 30 mmol/L 的 2,3-二羟基吡啶, 0.1 mL 的酶液 (0.1 mg/mL), 2.8 mL pH 8.5 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液体系中, 在不同的温度下 (20~50 °C), 于特征波长 518.5 nm 下进行时间扫描, 测定酶催化反应速度, 所得结果如图 2 所示。

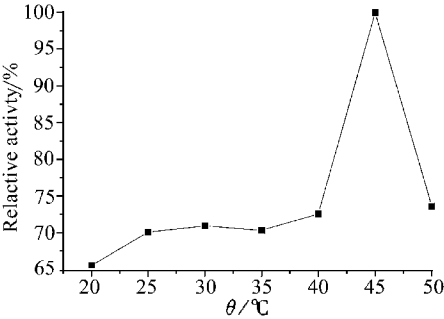


图 2 温度对酶催化活力的影响

Fig 2 Temperature optima for oxidation of 2,3-dihydroxypyridine catalyzed by mushroom tyrosinase

从图 2 可以看出, 酪氨酸酶催化 2,3-二羟基吡啶的最适温度是 45 °C。根据文献报道, 酪氨酸酶的最适温度有 2 个, 1 个是 20 °C, 另 1 个是 40 °C。而从图上可以看到 30 °C 和 45 °C 的酶相对活力较高, 特别是 45 °C 酶的活力比其他的温度要高很多。

2.3 2,3-二羟基吡啶的 K_m 值测定

对于一个酶反应来说, K_m 值是酶学研究的一个重要数据, 它反映了酶与底物的亲和力大小, 由于 2,3-二羟基吡啶是酪氨酸酶的一个新底物, 本文对其 K_m 值进行了测定。在加入 0.1 mL 酪氨酸酶的 pH 8.5 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液体系下, 加入一系列不等量底物, 在 518.5 nm 下进行时间扫描, 测定酶催化反应速度, 得到一系列吸光度值, 米氏方程换算后, 作图得斜率, 即为 K_m 值 (图 3)。

由图 3 看出, 酪氨酸酶催化 2,3-二羟基吡啶的 K_m 值为 0.322 mmol/L。

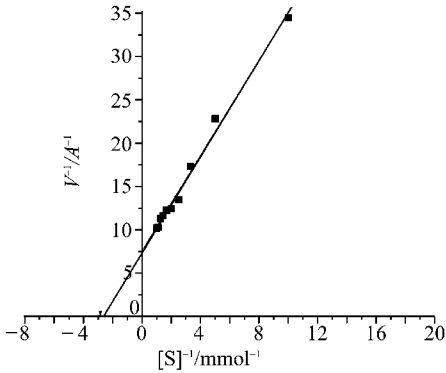


图 3 2,3-二羟基吡啶的 Lineweaver-Burk 图

Fig 3 Lineweaver-Burk plots for the oxidation of 2,3-dihydroxypyridine catalyzed by mushroom tyrosinase

2.4 酪氨酸酶量对 2,3-二羟基吡啶氧化反应的影响

在 3 mL 磷酸缓冲液体系中, 含有 0.1 mL 的 30 mmol/L 的 2,3-二羟基吡啶, 加入一系列稀释过 5 倍的酶液后, 在特征波长 518.5 nm 下进行时间扫描, 所得结果如图 4 所示。

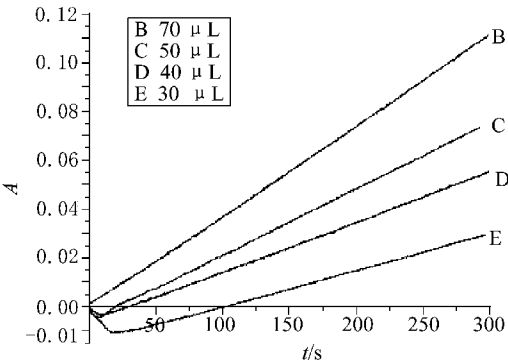


图 4 加酶量对催化反应的影响

Fig 4 Time course for the oxidation of 2,3-dihydroxypyridine catalyzed by mushroom tyrosinase

由图 4 可以看出, 随着酶量的减小, 明显出现了一个延迟期。根据有关文献报道^[9], 酪氨酸酶催化单酚化合物时, 在反应开始阶段有一个延迟期 (或迟滞期), 而在催化邻二酚时却没有。所以可认为 2,3-二羟基吡啶被酪氨酸酶催化氧化时, 可能是以类似单酚的形式参与反应的。

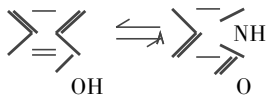
2.5 酪氨酸酶催化 2-羟基吡啶和 4-羟基吡啶

在酪氨酸酶对 2-羟基吡啶和 4-羟基吡啶的羟基化和氧化实验中, 发现改变缓冲液的 pH 值, 增加底物和酶的用量等对酶催化反应均没有影响。因为酪氨酸酶催化单酚化合物的氧化过程一般存在延迟期现象, 增大酶的用量或加入微量的邻苯二酚会减小延迟期。所以在反应体系中加入微量的邻苯二酚

溶液, 但是仍然对反应没有影响。由此表明酪氨酸酶不能催化2-羟基吡啶和4-羟基吡啶的氧化。

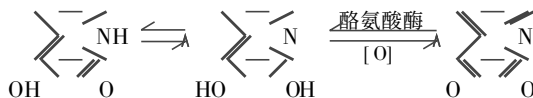
3 讨 论

本实验研究了酪氨酸酶催化羟基吡啶类化合物的氧化反应, 酪氨酸酶可以催化2,3-二羟基吡啶的氧化反应, 但不能催化2-羟基吡啶和4-羟基吡啶的氧化。从2-羟基吡啶和4-羟基吡啶的分子结构上看, 它们与苯酚的结构相似, 酪氨酸酶不能催化它们, 可能是因为吡啶环上氮原子的作用。由于它们的结构与苯酚相似, 有可能是酶的抑制剂, 为此以2-羟基吡啶和4-羟基吡啶作为抑制剂对酪氨酸酶催化邻苯二酚的氧化进行了研究, 结果发现2-羟基吡啶和4-羟基吡啶也不能抑制酪氨酸酶催化邻苯二酚氧化, 说明2-羟基吡啶和4-羟基吡啶不能与酶的活性中心结合。根据这些实验现象, 认为2-羟基吡啶和4-羟基吡啶之所以不能被酪氨酸酶氧化是因为在水溶液中, 2-羟基吡啶和4-羟基吡啶中的羟基与吡啶环发生酮式-烯醇式互变异构, 而且主要以酮式结构存在, 这种酮式结构不能有效地与酶分子活性中心的铜原子结合, 加上氮原子的吸电子作用, 使得酪氨酸酶活性中心中的羟基不能加成到它们的邻位形成二羟基吡啶。



酪氨酸酶催化2,3-二羟基吡啶出现了延迟期, 据报道酪氨酸酶催化单酚时也有延迟期, 而邻二酚却没有, 所以推测2,3-二羟基吡啶被酪氨酸酶催化氧化时, 它是以类似单酚——3-羟基-2-吡啶酮形式参与的反应。在反应过程中, 3-羟基-2-吡啶酮分子与酶活性部位结合后, 在酶分子的作用下, 转变为

2,3-二羟基吡啶。这种结构上的变化速度较慢, 导致形成产物吡啶二酮的速度降低。



以上研究表明虽然羟基吡啶类化合物从结构上与酚类化合物相似, 但因为在它们酶液中的存在形式不同, 也导致了酪氨酸酶催化酚类和羟基吡啶类化合物结果的不同。酪氨酸酶可以催化2,3-二羟基吡啶氧化反应, 为3-羟基-4-(1H)-吡啶酮与3-羟基-2-(1H)-吡啶酮类化合物抗癌活性的研究提供理论和实验上的参考。

参考文献:

- [1] MAYER A M. Polyphenol oxidases in plants, recent progress [J]. *Phyto Chem*, 1987, 26: 11—20.
- [2] EICKEN C, KREBS B, SACCHETTINI J C. Catechol oxidase—structure and activity [J]. *Curr Opin Struc Biol*, 1999, 9: 677—683.
- [3] Western Regional Research Center. Chemistry, biochemistry and dietary role of potato polyphenols [J]. *J Agric Food Chem*, 1997, 45: 1523—1540.
- [4] HWANG D R, PROCTER G R, DRISCOLL J S. Pyridones as potential antitumor agents. II [J]. *J Pharm Sci*, 1980, 69(9): 1074—1076.
- [5] LIN A J, DRISCOLL J S. Catecholamine analogs as potential antitumor agents. II [J]. *J Pharm Sci*, 1981, 70(7): 806—808.
- [6] WALSH C. Enzymatic reaction mechanisms [M]. San Francisco: W H Free Man, 1979: 461—463.
- [7] RAFT Z, ALEXANDER M. Regioselective oxidation of phenols catalyzed by polyphenol oxidase in chloroform [J]. *J Am Chem Soc*, 1985, 107: 5448.

The Oxidation of Hydroxypyridine Compounds Catalyzed by Mushroom Tyrosinase

XU Di, MA Lin, ZHANG Ling, PANG Chao le, GU Lian quan

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen (Zhongshan) University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The oxidation of 2-hydroxypyridine, 4-hydroxypyridine and 2,3-dihydroxypyridine catalyzed by mushroom tyrosinase were studied. The results show that tyrosinase can't catalyze the oxidation of 2-hydroxypyridine and 4-hydroxypyridine, but can catalyze the oxidation of 2,3-dihydroxypyridine. Tyrosinase's pH optimum for the oxidation of 2,3-dihydroxypyridine was determined as 8.5, and its temperature optimum was 45 °C. The kinetic parameter of mushroom tyrosinase toward 2,3-dihydroxypyridine ($K_m = 0.322 \text{ mmol/L}$) was evaluated. There was a lag period, which was resulted from isomerism of enol and ketone. Tyrosinase can't catalyze 2-hydroxypyridine, 4-hydroxypyridine because these compounds exist as ketone structures in enzymic solution.

Key words: tyrosinase; 2-hydroxypyridine; 4-hydroxypyridine; 2,3-dihydroxypyridine