

根皮苷及苹果幼果多酚对酪氨酸酶活性的抑制作用

刘东茹¹, 任亚梅¹, 伯继芳¹, 胡馨木¹, 任小林²

(1. 西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西杨凌 712100)

(2. 西北农林科技大学园艺学院, 陕西杨凌 712100)

摘要: 为比较苹果幼果多酚及其主要组分根皮苷作为酪氨酸酶抑制剂的潜质, 本文以曲酸为阳性对照, 分析并比较了三者对酪氨酸酶的抑制效果及抑制动力学。结果表明, 根皮苷、苹果幼果多酚和曲酸均能有效抑制酪氨酸酶单酚酶及二酚酶活性, 三者抑酶效果的强弱顺序为曲酸>苹果幼果多酚>根皮苷, 对单酚酶活性的 IC_{50} 分别为 55.80、54.30 和 23.81 $\mu\text{g/mL}$, 对二酚酶活性的 IC_{50} 分别为 75.30、56.15 和 23.45 $\mu\text{g/mL}$; 根皮苷浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 时为竞争型抑制, 低于 200 $\mu\text{g/mL}$ 时为混合型抑制, 苹果幼果多酚为非竞争型抑制, 曲酸为混合型抑制。因此, 抑制剂的组成成分和浓度均能影响其抑酶效果和抑酶机理, 三种抑制剂均可通过抑制酪氨酸羟化生成多巴及抑制多巴氧化成多巴醌来减少黑色素的合成, 苹果幼果多酚对酪氨酸酶活性的抑制效果优于根皮苷, 且含量丰富, 价格便宜, 更适合作为酪氨酸酶抑制剂, 有望开发应用于美白产品中。

关键词: 酪氨酸酶; 根皮苷; 苹果幼果多酚; 抑制作用; 动力学

文章编号: 1673-9078(2019)08-107-113

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.8.017

Inhibitory Effect of Phlorizin and Young Apple Polyphenols on Tyrosinase Activity

LIU Dong-ru¹, REN Ya-mei¹, BO Ji-fang¹, HU Xin-mu¹, REN Xiao-lin²

(1. College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

(2. College of Horticulture, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: To compare the potential of young apple polyphenols and phlorizin as tyrosinase inhibitors, the inhibitory effect and kinetics of phlorizin, young apple polyphenols and kojic acid on tyrosinase activity were analyzed and compared by spectrophotometry, in which kojic acid was used as a positive control. Results: phlorizin, young apple polyphenols and kojic acid could effectively inhibit tyrosinase activity. The order of their inhibitory effects was kojic acid>young apple polyphenols>phloridin, and their IC_{50} for monophenolase activity was 55.80, 54.30 and 23.81 $\mu\text{g/mL}$, respectively, and their IC_{50} for diphenolase activity was 75.30, 56.15 and 23.45 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The phlorizin showed mixed inhibition at a concentration lower than 200 $\mu\text{g/mL}$ and competitive inhibition at a concentration of 200 $\mu\text{g/mL}$, the young apple polyphenols showed non-competitive inhibition and the kojic acid showed mixed inhibition. In summary, the inhibitory effect and inhibitory mechanism of the inhibitor is not only related to its composition, but also related to its concentration. All three inhibitors can reduce the synthesis of melanin by inhibiting the hydroxylation of tyrosine to dopa and the oxidation of dopa to dopaquinone and dopachrome. Compared with phlorizin, young apple polyphenols is more suitable as tyrosinase inhibitors and has great potential for application in whitening products because of its better inhibitory effect, cheaper price and richer content.

Key words: tyrosinase; phlorizin; young apple polyphenols; inhibitory effect; kinetics

苹果多酚是苹果中多元酚类物质的总称, 包括黄酮醇类、黄烷醇类、二氢查耳酮类、羟基肉桂酸等物质^[1]。根皮苷是苹果中的特征酚类物质, 是苹果多酚发挥抗氧化、抗炎、抗紫外线、抑菌等多种生物活性

收稿日期: 2019-03-13

基金项目: 国家苹果产业技术体系 (CARS-27)

作者简介: 刘东茹 (1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 农产品加工及贮藏

通讯作者: 任亚梅 (1970-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品科学

的主要贡献者之一^[2-5]。苹果多酚在幼果中的含量高于成熟果, 苹果疏果过程中会产生大量废弃幼果, 可作为提取苹果多酚和根皮苷的良好来源^[6]。目前关于根皮苷和苹果幼果多酚的研究主要集中在其“内服”功效, 如降血糖、抑制癌细胞增殖、预防糖尿病等, 鲜有对其“外用”潜质, 如作为护肤品功能成分等鲜有研究^[7]。

酪氨酸酶是一种结构复杂的含铜金属氧化酶, 广泛存在于微生物、动植物以及人体中, 与动物体黑色

素的合成和果蔬的褐变密切相关,可通过抑制其活性达到美白褪黑和保鲜果蔬的目的^[9-11]。酪氨酸酶的活性受多种因素调控,抑制剂是其活力的重要调控方式之一^[12,13]。根据抑制剂和酪氨酸酶的结合强度及结合方式,可将其分为可逆型抑制剂和不可逆型抑制剂,研究报道酪氨酸酶抑制剂均为可逆型抑制剂,但不同抑制剂对酪氨酸酶的抑制机理不同^[14-16]。

根皮苷及苹果幼果多酚的多种生物活性为二者作为护肤品功能性成分提供了可能性,但二者在应用上各有利弊,如根皮苷性质稳定但价格较贵,苹果幼果多酚方便易得却成分复杂,且目前未见关于二者对酪氨酸酶活性的抑制作用的对比研究。本文以传统美白剂曲酸^[17]作对照,首次比较根皮苷、苹果幼果多酚和曲酸分别对酪氨酸酶单酚酶和二酚酶的抑制率及抑制动力学,从而明确三者对酪氨酸酶的抑制效果和机理,为开发新型、安全、质优的天然酪氨酸酶抑制剂提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

苹果幼果多酚(纯度≥75%),西安汇林生物科技有限公司;根皮苷(纯度≥99%),上海阿拉丁生化科技股份有限公司;L-酪氨酸(L-Tyr)、L-多巴(L-DOPA),上海源叶生物科技有限公司;曲酸、酪氨酸酶(25 kU),美国 Sigma 公司。

1.2 仪器

使用仪器为 Infinite M200 pro Nano Quant 多功能酶标仪,奥地利 Tecan 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 根皮苷及苹果幼果多酚对酪氨酸酶活性抑制效果测定

参照 Ortiz-Ruiz 的方法稍作修改^[18],分别以 L-tyr 和 L-DOPA 为单酚酶和二酚酶催化底物,向 96 孔板中依次加入 20 μL L-Tyr 或 L-DOPA、20 μL 不同浓度的抑制剂(0、25、50、100、200 μg/mL)和 140 μL PBS (pH 6.8),保温 10 min 后加入 20 μL 预热过的酪氨酸酶启动反应。设置酶标仪温度为 37 °C,475 nm 下每隔 30 s 测定一次吸光值。按照公式(1)计算抑制剂对酪氨酸酶单酚酶和二酚酶活性的抑制率。由于 L-Tyr 的酶促反应具有延滞效应,因此计算单酚酶活性抑制率时ΔA 为反应体系在 5~10 min 内吸光值的变化量,计算二酚酶活性抑制率时ΔA 为反应体系在 0~3 min

内吸光值的变化量。

$$\text{抑制率}(\%) = \left[1 - \frac{\Delta A_1 - \Delta A_2}{\Delta A_3 - \Delta A_4} \right] \times 100\% \quad (1)$$

其中:ΔA₁:样品+酶+底物+PBS 反应体系吸光值变化量;ΔA₂:样品+酶+PBS 反应体系吸光值变化量;ΔA₃:酶+样品+PBS 反应体系吸光值变化量;ΔA₄:酶+PBS 反应体系吸光值变化量。

1.3.2 根皮苷及苹果幼果多酚对酪氨酸酶抑制机理研究

试验方法及样品浓度参照 1.3.1,测定不同浓度抑制剂对不同浓度 L-DOPA (0.25、0.5、1、1.5、2 mM) 的酶促反应速率的影响。根据 Lineweaver-Burk 双倒数作图法和二次作图法,计算出酶抑制动力学参数,得出抑制剂对酪氨酸酶二酚酶活性的抑制类型和抑制机理。

1.3.3 数据统计分析

试验所得数据为 3 次平行试验平均值,采用 Excel 和 Origin 软件分析数据和作图。

2 结果与分析

2.1 根皮苷及苹果幼果多酚对酪氨酸酶单酚酶活性的影响

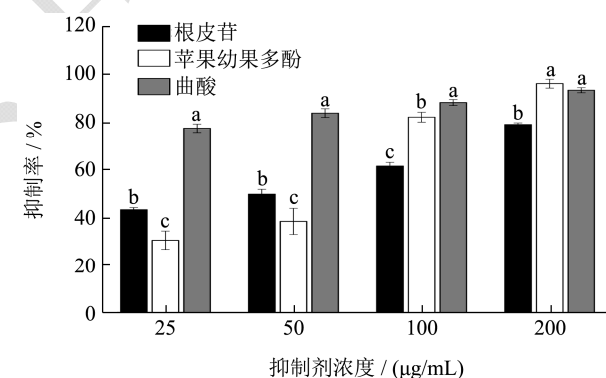


图 1 不同抑制剂对酪氨酸酶单酚酶活性的抑制率

Fig.1 Inhibition rate of monophenolase activity by different inhibitors

注:同一浓度字母不同表示差异显著($p < 0.05$),图 2 同。

酪氨酸酶具有双重催化作用,它首先羟化酪氨酸生成多巴(单酚酶活性),多巴进一步氧化得多巴醌和多巴色素(二酚酶活性),进而形成一系列引起褐化的色素类物质^[19,20]。图 1 可知,三种抑制剂均浓度依赖性抑制单酚酶活性,当浓度从 25 μg/mL 增大到 200 μg/mL 时,根皮苷、苹果幼果多酚和曲酸的抑制率分别从 43.43%、30.59%和 77.67%增加到 79.32%、96.41%和 93.68%。三者的 IC₅₀ 分别为 55.80、54.30 和 23.81 μg/mL,苹果幼果多酚浓度达到 200 μg/mL 时可完全

抑制单酚酶活性，作用效果与曲酸相当，因此初步推断苹果幼果多酚比根皮苷更具有作为酪氨酸酶抑制剂的潜质。

2.2 根皮苷及苹果幼果多酚对酪氨酸酶二酚酶活性的影响

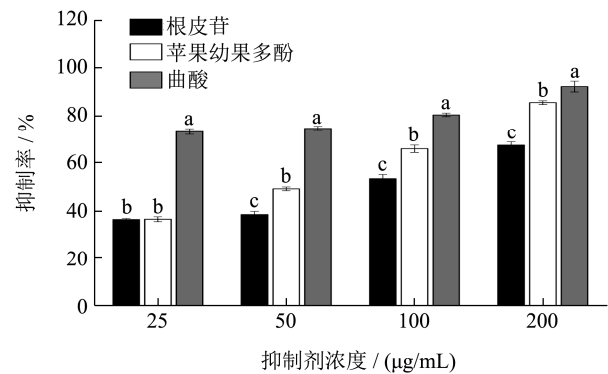


图 2 不同抑制剂对酪氨酸酶二酚酶活性的抑制率

Fig.2 Inhibition rate of diphenolase activity in different inhibitors

图 2 可知，根皮苷、苹果幼果多酚和曲酸均浓度依赖性抑制二酚酶活性，当抑制剂浓度从 25 µg/mL 增大到 200 µg/mL 时，三者对二酚酶活性的抑制率分别从 36.56%、36.68%和 73.49%增加到 67.68%、85.81%和 92.62%。三者的 IC₅₀ 分别为 75.30、56.15 和 23.45 µg/mL，达到相同的抑制率所需根皮苷的量是苹果幼果多酚的 1.34 倍，苹果幼果多酚对二酚酶的抑制效果显著优于根皮苷。分析原因是苹果幼果多酚中含有多种酪氨酸酶活性抑制成分，多种抑制剂的复合作用效果较单独根皮苷的作用效果更为显著^[21]；再就是苹果幼果多酚比根皮苷具有更好的活性氧清除能力，有助于其酪氨酸酶抑制活性^[22]。

综合 2.1 可知，各浓度下根皮苷和曲酸对单酚酶活性的抑制效果均优于其在相同浓度下对二酚酶的抑制效果，但苹果幼果多酚浓度为 25 µg/mL 和 50 µg/mL 时，其对单酚酶的抑制效果低于在该浓度下对二酚酶的抑制效果，浓度为 100 µg/mL 和 200 µg/mL 时则相

反。原因是苹果幼果多酚具有很好的抗氧化活性，低浓度下有助于减少多巴向多巴醌的氧化，但随着体系中苹果幼果多酚浓度的升高，反应溶液 pH 增大，导致其抗氧化能力下降，从而在高浓度下对二酚酶的抑制效果不如对单酚酶的抑制效果^[22]。

2.3 根皮苷及苹果幼果多酚对酪氨酸酶活性的抑制动力学

2.3.1 根皮苷对酪氨酸酶二酚酶活性的抑制动力学

Lineweaver-Burk 双倒数图法可得到一系列相交的直线，结合二次作图法，可求出酪氨酸酶氧化 L-DOPA 的米氏常数 K_m （表观米氏常数 K_{mapp} ）、最大速度 V_m （表观最大反应速率 V_{mapp} ）及抑制常数 K_I 等动力学参数，从而可判断抑制剂对酪氨酸酶二酚酶活性的抑制类型，并据此分析其可能的抑制机理^[23,24]。

由图 3、图 4 和表 1 可知，当根皮苷浓度小于 200 µg/mL 时，在 Lineweaver-Burk 双倒数图中得到相交于第二象限的一组直线，且 $K_I < K_{IS}$ ，随着根皮苷浓度增大， V_m 减小， K_m 增大，符合混合型抑制类型的特征^[25]；根皮苷浓度为 200 µg/mL 时，得到相交于 Y 轴的两条直线，随着根皮苷浓度增大， V_m 不变， K_m 逐渐增大，符合竞争性抑制类型的特征^[26]。

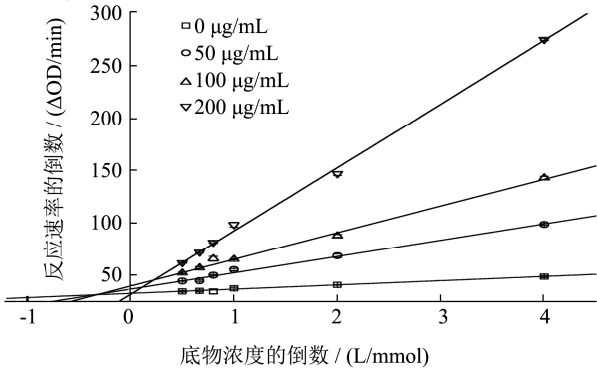


图 3 根皮苷对二酚酶抑制作用的 Lineweaver-Burk 曲线

Fig.3 Lineweaver-Burk curve for inhibition of phloridzin on diphenolase

表 1 根皮苷对酪氨酸酶二酚酶抑制动力学参数

Table 1 Kinetic parameters of diphenolase inhibited by phlorizin

样品浓度/(µg/mL)	米氏方程	R ²	K _m /(K _{mapp})	V _m /V _{mapp}	K _I	K _{IS}
0	1/V=4.034/[S]+33.250	0.984	0.121	0.030		
50	1/V=15.585/[S]+37.301	0.993	0.418	0.027	20.023	13.750
100	1/V=25.511/[S]+40.251	0.993	0.634	0.025		
200	1/V=60.589/[S]+32.338	0.998	1.874	0.031	13.805	

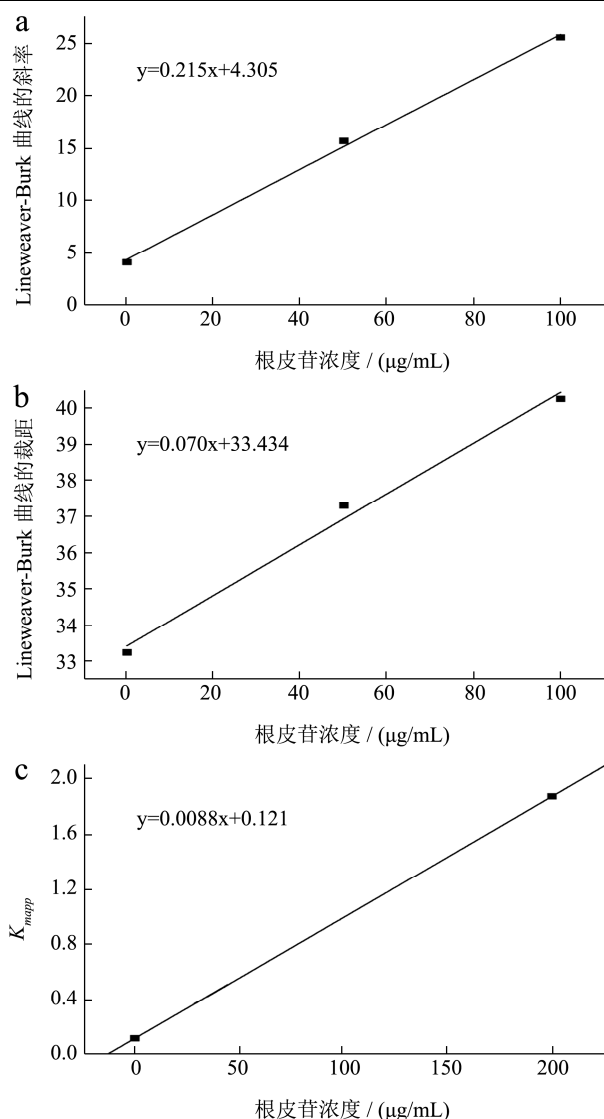


图4 抑制剂浓度对双倒数作图的斜率及纵轴截距及 K_{mapp} 的影响

Fig.4 Effect of inhibitor concentration on the slope, the vertical axis intercept and K_{mapp} of the Lineweaver-Burk curve

注: a 中: 斜率= K_S/V_mK_I , 纵轴截距= K_S/V_m ; b 中: 斜率= $1/V_mK_{IS}$; c 中: 斜率= K_m/K_I , 横轴截距= $-K_I$ 。

推测原因是根皮苷不仅具有与 L-DOPA 相似的结构, 同时可通过与酶-底物络合物结合生成无活性的复合物, 从而降低产物的转化速率, 兼有竞争性和非竞争性抑制作用, 低浓度时两种抑制方式同时存在, 表现为混合型抑制, 高浓度时根皮苷与酪氨酸酶的亲和力增强, 以竞争性抑制作用占主导^[18]。另外, 由抑制剂浓度增加而造成的反应环境 pH 等的变化, 也会对酪氨酸酶稳定性及抑制剂的抑酶效果造成影响^[12]。由此推测, 抑制剂的作用效果不仅与其结构有关, 亦受其作用浓度及作用环境影响, 因此在将根皮苷应用于护肤品时, 需考虑护肤品基础环境对其抑制作用的影响, 从而达到最佳作用效果。

2.3.2 苹果幼果多酚对酪氨酸酶二酚酶的抑制

动力学

图 5、图 6 及表 2 可知, Lineweaver-Burk 双倒数作图得到一组相交于横轴上一点的直线, 随着苹果幼果多酚浓度增大, K_m 不变, V_m 减小, 符合非竞争性抑制类型的特征^[24]。

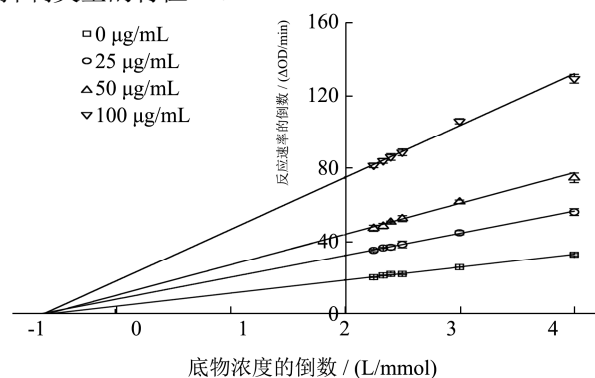


图5 苹果幼果多酚抑制二酚酶的 Lineweaver-Burk 曲线

Fig.5 Lineweaver-Burk curve for inhibition of young apple polyphenols on diphenolase

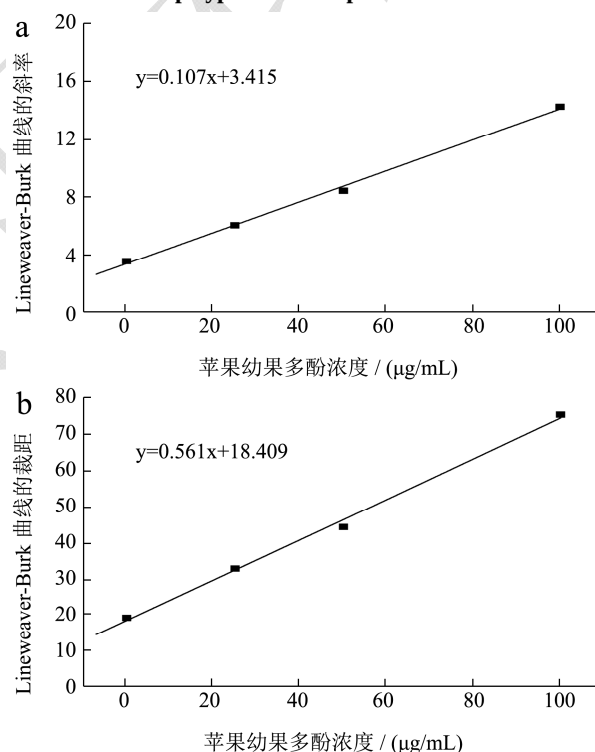


图6 抑制剂浓度对双倒数作图的斜率及纵轴截距的影响

Fig.6 Effect of inhibitor concentration on the slope and the vertical axis intercept of the Lineweaver-Burk curve

虽然根皮苷是苹果幼果中酚类物质的一种, 但二者对酪氨酸酶二酚酶的抑制类型不同, 可能是苹果幼果多酚中含有的各种酚类物质对酪氨酸酶的亲和力不同, 对酪氨酸酶的抑制作用亦不同, 因此复合作用效果与单独根皮苷的作用效果存在差异^[27-30]。这与王庆华等的研究结果一致, 其在对荔枝壳提取物的研究中发现, 荔枝壳提取物对酪氨酸酶的抑制动力学不属于

单一抑制剂类型，而是多种抑制成分共同作用的结果^[31]。另外，本实验室前期研究发现，根皮苷及苹果幼果多酚在抑制 L-Tyr 及 L-DOPA 酶促氧化的同时，其自身均在酪氨酸酶的催化下产生了黄色素，且二者所产生的黄色素的氧化能力不同；罗耀红也表明：苹果多酚在漆酶催化下产生的黄色素对·OH 和 DPPH· 自由基均有较好的清除作用^[32]，这可能是根皮苷和苹果幼果多酚抑酶机理不同的原因。本文同时研究了曲酸对酪氨酸酶二酚酶的抑制动力学，通过对比可更好地分析根皮苷及苹果幼果多酚可能的抑酶机理，结果见图 7、图 8 及表 3。

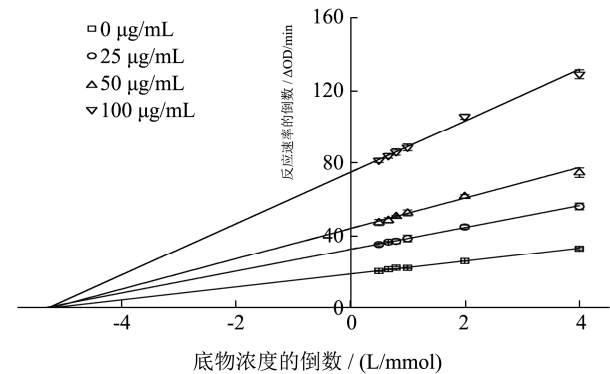


图 7 曲酸对二酚酶抑制作用的 Lineweaver-Burk 曲线

Fig.7 Lineweaver-Burk curve for inhibition of kojic acid on diphenolase

表 2 苹果幼果多酚对酪氨酸酶二酚酶抑制动力学参数

Table 2 Kinetic parameters of diphenolase inhibited by young apple polyphenols

样品浓度/(μg/mL)	米氏方程	R ²	K _m	V _m /V _{mapp}	K _I
0	1/V=3.585/[S]+19.141	0.996	0.187	0.052	31.916
25	1/V=6.063/[S]+32.830	0.990	0.185	0.030	
50	1/V=8.429/[S]+44.411	0.981	0.190	0.023	
100	1/V=12.233/[S]+75.450	0.987	0.188	0.013	

表 3 曲酸对酪氨酸酶二酚酶抑制动力学参数

Table 3 Kinetic parameters of diphenolase inhibited by kojic acid

样品浓度/(μg/mL)	米氏方程	R ²	K _m /K _{mapp}	V _m /V _{mapp}	K _I	K _{IS}
0	1/V=4.500/[S]+33.286	0.950	0.135	0.030	5.792	13.291
6.25	1/V=16.154/[S]+61.531	0.956	0.263	0.016		
12.5	1/V=21.749/[S]+76.510	0.968	0.284	0.013		
25	1/V=31.980/[S]+104.429	0.975	0.306	0.010		
50	1/V=63.156/[S]+181.818	0.993	0.347	0.006		

图 7、图 8 和表 3 可知，曲酸的抑制作用符合混合型抑制类型的特征，与黄璜的研究结果一致^[33]。曲酸对酪氨酸酶的抑制作用与根皮苷及苹果幼果多酚的抑制作用既有相似之处，但亦有所不同。分析原因是：曲酸与根皮苷等酚类物质一样，具有与底物相似的结构，但曲酸不仅能抑制黑色素的合成，还能漂白已形成的黑斑，因此表现为混合型抑制；根皮苷和苹果幼

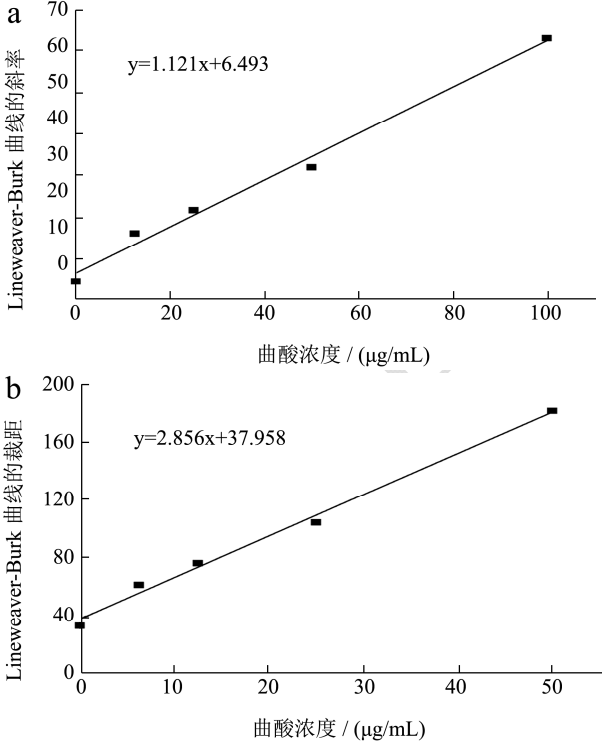


图 8 抑制剂浓度对双倒数作图的斜率及纵轴截距的影响

Fig.8 Effect of inhibitor concentration on the slope and the vertical axis intercept of the Lineweaver-Burk curve

注：a 中：斜率= $K_S/V_m K_I$ ，纵轴截距= K_S/V_m ；b 中：斜率= $1/V_m K_{IS}$ 。

果多酚则不具有此特性^[34]，根皮苷及苹果幼果多酚可被酪氨酸酶氧化生成黄色素，该黄色素具有抗氧化活性，对抑制剂的抑酶效果具有协同促进作用^[25]；该黄色素亦改变了反应环境的 pH 值，从而对抑酶效果产生影响。因此在实际应用中需根据作用目的和作用环境的不同，结合不同抑制剂的特点，选择合适的酪氨酸酶抑制剂。

3 结论

本文以曲酸为阳性对照,比较了根皮苷和苹果幼果多酚对酪氨酸酶单酚酶及二酚酶活性的抑制作用,首次得出三者对酪氨酸酶活性的抑制强弱顺序为曲酸>苹果幼果多酚>根皮苷;其中,根皮苷、曲酸及低浓度的苹果幼果多酚主要通过抑制酪氨酸羟化生成多巴来减少黑色素的合成,而高浓度的苹果幼果多酚主要通过抑制多巴氧化成多巴醌和多巴色素来减少黑色素的合成;苹果幼果多酚为非竞争型抑制剂,曲酸为混合型抑制剂,根皮苷浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 时为竞争性抑制剂,小于 200 $\mu\text{g/mL}$ 时为混合型抑制剂。本文研究了根皮苷及苹果幼果多酚对酪氨酸酶的抑制机理,同时也表明苹果幼果多酚由于其价格低廉、含量丰富等优点,更适于作为酪氨酸酶抑制剂,为开发可作为美白化妆品功能成分及果蔬保鲜剂的新型酪氨酸酶抑制剂提供了理论支撑。

参考文献

- [1] Ran J, Sun H, Zhu M, et al. Development and validation of a reversed-phase HPLC method for the quantitative determination of ten polyphenols extracted from apple peel [J]. Journal of Aoac International, 2016, 99(2): 481-488
- [2] Tian J, Wu X, Zhang M, et al. Comparative study on the effects of apple peel polyphenols and apple flesh polyphenols on cardiovascular risk factors in mice [J]. Clinical & Experimental Hypertension, 2017, 40(10): 1-8
- [3] Zeng B, Su M, Chen Q, et al. Antioxidant and hepatoprotective activities of polysaccharides from *Anoectochilus roxburghii* [J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 153: 391-398
- [4] 霍彦雄,任亚梅,袁春龙,等.根皮苷豆蔻酸酯的抗氧化活性[J].食品科学,2017,38(9):119-125
HUO Yan-xiong, REN Ya-mei, YUAN Chun-long, et al. Antioxidant activities of *Phloridzin myristate* [J]. Food Science, 2017, 38(9): 119-125
- [5] Xiao Z, Zhang Y, Chen X, et al. Extraction, identification, and antioxidant and anticancer tests of seven dihydrochalcones from *malus* 'red splendor' fruit [J]. Food Chemistry, 2017, 231: 324-331
- [6] Sun L, Guo Y, Fu C, et al. Simultaneous separation and purification of total polyphenols, chlorogenic acid and phlorizin from thinned young apples [J]. Food Chemistry, 2013, 136(2): 1022-1029
- [7] 谭颍,周志钦.根皮苷研究进展[J].食品与发酵工业,2013, 39(8):182-186
- [8] TAN Ju, ZHOU Zhi-qin. Research progress of phlorizin [J]. Food and fermentation Industries, 2013, 39(8): 182-186
- [8] 潘越,冯志勇,陈辉,等.食用菌黑色素代谢的研究进展[J].生物学杂志,2014,31(1):68-70,74
- [9] PAN Yue, FENG Zhi-yong, CHEN Hui, et al. Advances in research on the melanin metabolism of edible fungi [J]. Journal of Biology, 2014, 31(1): 68-70, 74
- [9] Jimenezcervantes C, Garciaborron J C, Valverde P, et al. Tyrosinase isoenzymes in mammalian melanocytes: Biochemical characterization of two melanosomal tyrosinases from B16 mouse melanoma [J]. Febs Journal, 2010, 217(2): 549-556
- [10] Tief K, Hahne M, Schmidt A, et al. Tyrosinase, the key enzyme in melanin synthesis, is expressed in murine brain [J]. Febs Journal, 2010, 241(1): 12-16
- [11] Niu C, Aisa H A. Upregulation of melanogenesis and tyrosinase activity: Potential agents for vitiligo [J]. Molecules, 2017, 22(8): 1303-1030
- [12] 陈清西.酶学及其研究技术[M].厦门:厦门大学出版社, 2010,99-145
CHEN Qing-xi. Enzymology and Its Research Techniques [M]. Xiamen: Xiamen University Press. 2010, 99-145
- [13] 李瑜,杨国浩,詹丽娟,等.双孢菇中多酚氧化酶活性的影响因素[J].食品科学,2011,32(18):319-322
- [13] LI Yu, YANG Guo-hao, ZHAN LI-juan, et al. Affecting factors of polyphenol oxidase activity in *Agaricus bisporus* [J]. Food Science, 2011, 32(18): 319-322
- [14] Mei-Zhen L, Wei-Ming C, Chong O Y, et al. Antityrosinase mechanism of omeprazole and its application on the preservation of fresh-cut Fuji apple [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 117: 538-545
- [15] 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(自然版),2016,55(5):760-768
HU Yong-hua, JIA Yu-long, CHEN Qing-xi. Research progress in the application of tyrosinase Inhibitor [J]. Journal of Xiamen University (Natural Edition), 2016, 55(5): 760-768
- [16] Cui Y, Liang G, Hu Y H, et al. Alpha-substituted derivatives of cinnamaldehyde as tyrosinase inhibitors: Inhibitory mechanism and molecular analysis [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2015, 63(2): 716-722
- [17] Mohamad R, Mohamed M S, Suhaili N, et al. Kojic acid: Applications and development of fermentation process for production [J]. Biotechnology & Molecular Biology Reviews,

- 2010, 2: 24-37
- [18] Ortiz-Ruiz C V, Berna J, Garcia-Molina M D M, et al. Identification of p-hydroxybenzyl alcohol, tyrosol, phloretin and its derivate phloridzin as tyrosinase substrates [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2015, 23(13): 3738-3746
- [19] Lin Y F, Hu Y H, Lin H T, et al. Inhibitory effects of propyl gallate on tyrosinase and its application in controlling pericarp browning of harvested longan fruits [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2013, 61(11): 2889-2895
- [20] Li B, He X L, Zhao Y P, et al. Tyrosinase-related protein 1, (TYRP1) gene polymorphism and skin differential expression related to coat color in mongolian horse [J]. Livestock Science, 2014, 167(1): 58-64
- [21] Hseu Y C, Cheng K C, Lin Y C, et al. Synergistic effects of linderanolide B combined with arbutin, PTU or kojic acid on tyrosinase inhibition [J]. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2015, 16(12): 1-7
- [22] Yan W, Mi-Mi H, Ying S, et al. Synergistic promotion on tyrosinase inhibition by antioxidants [J]. Molecules, 2018, 23(1): 106-118
- [23] Guo N, Wang C, Shang C, et al. Integrated study of the mechanism of tyrosinase inhibition by baicalein using kinetic, multispectroscopic and computational simulation analyses [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 118: 57-68
- [24] Yue L M, Lee J, Zhi-Rong Lü, et al. Effect of Cd²⁺ on tyrosinase: Integration of inhibition kinetics with computational simulation [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 94: 836-844
- [25] Hu Y H, Zhuang J X, Yu F, et al. Inhibitory effects of cefotaxime on the activity of mushroom tyrosinase [J]. Journal of Bioscience & Bioengineering, 2016, 121(4): 385-389
- [26] Si H, Wang X, Li L, et al. Inhibitory effects of 4-chlorocinnamaldehyde on the activity of mushroom tyrosinase [J]. Medicinal Chemistry Research, 2017, 26(7): 1377-1381
- [27] Chai W M, Lin M Z, Feng H L, et al. Proanthocyanidins purified from fruit pericarp of *Clausena lansium* (Lour.) Skeels as efficient tyrosinase inhibitors: structure evaluation, inhibitory activity and molecular mechanism [J]. Food & Function, 2017, 8(3): 1043
- [28] Freitas M M D, Fontes P R, Souza P M, et al. Extracts of *Morus nigra* L. leaves standardized in chlorogenic acid, rutin and isoquercitrin: tyrosinase inhibition and cytotoxicity [J]. Plos One, 2016, 11(9): e0163130
- [29] Li H R, Habasi M, Xie L Z, et al. Effect of chlorogenic acid on melanogenesis of B₁₆ melanoma cells [J]. Molecules, 2014, 19(9): 12940-12948
- [30] Hwang J M, Kuo H C, Lin C T, et al. Inhibitory effect of liposome-encapsulated anthocyanin on melanogenesis in human melanocytes [J]. Pharmaceutical Biology, 2013, 51(8): 941-947
- [31] 王庆华, 邓志刚, 刘山, 等. 荔枝壳提取物对酪氨酸酶的抑制作用 [J]. 日用化学工业, 2010, 40(1): 31-34
- WANG Qing-hua, DENG Zhi-gang, LIU Shan, et al. Inhibitory mechanism of extracts from litchi shell on mushroom tyrosinase [J]. China Surfactant Detergent & Cosmetics, 2010, 40(1): 31-34
- [32] 罗耀红. 漆酶对苹果多酚的酶促氧化及其产物分析 [D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2008
- LUO Yao-hong. Study on laccase catalyzed oxidation of phenolic compounds from apple and the characterization of its end products [D]. Xianyang: Northwest A&F University, 2008
- [33] 黄璜, 宋康康, 陈清西. 曲酸作为化妆品添加剂的增白作用机理研究 [J]. 厦门大学学报 (自然科学版), 2003, 42(5): 652-656
- HUANG Huang, SONG Kang-kang, CHEN Qing-xi. Studies on whitening effect of kojic acid as cosmetic additive [J]. Journal of Xiamen University (Natural Edition), 2003, 42(5): 652-656
- [34] Meng W, Zhang C, Xiao D. The effect of different activated carbon and bleaching temperature on kojic acid bleaching [J]. Lecture Notes in Electrical Engineering, 2015, 333: 325-333