

# 油茶壳提取物对酪氨酸酶的抑制机理

王璐馨, 沈建福\*

浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 浙江 杭州

收稿日期: 2022年4月8日; 录用日期: 2022年5月6日; 发布日期: 2022年5月17日

## 摘要

目的: 探究油茶壳提取物对酪氨酸酶的抑制作用, 判断其抑制类型, 初步探究其抑制机理, 并对其活性成分进行测定。方法: 分别以L-酪氨酸与L-多巴(L-DOPA)为底物, 测定油茶壳提取物对酪氨酸酶单酚酶活性与二酚酶活性的抑制效果, Lineweaver-Burk双倒数作图法探究其抑制机理, 并测定油茶壳提取物中的总多酚和黄酮含量。结果: 油茶壳提取物对酪氨酸酶单酚酶和二酚酶的 $IC_{50}$ 分别为0.0711 mg/mL、0.2199 mg/mL, 对酶-底物络合物抑制常数 $K_{IS}$ 为10.7487 mg/mL。油茶壳提取物中总多酚含量为 $30.22\% \pm 1.02\%$ , 黄酮含量为 $13.52\% \pm 0.24\%$ 。结论: 油茶壳提取物对酪氨酸酶单酚酶与二酚酶均具有较好抑制效果, 总多酚、黄酮可能是油茶壳提取物发挥抑制酪氨酸酶活性作用的主要物质。

## 关键词

油茶壳, 抑制, 机理, 酪氨酸酶

# Inhibitory Mechanism of *Camellia oleifera* Shell Extract on Tyrosinase

Luxin Wang, Jianfu Shen\*

College of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou Zhejiang

Received: Apr. 8<sup>th</sup>, 2022; accepted: May 6<sup>th</sup>, 2022; published: May 17<sup>th</sup>, 2022

## Abstract

**Objective:** To explore the inhibitory effect of *Camellia oleifera* shell extract on tyrosinase, to determine the type of inhibition, to preliminarily explore the inhibition mechanism, and to determine its active components. **Method:** Using L-tyrosine and L-DOPA as substrates, respectively, the inhibitory effects of *Camellia oleifera* shell extract on tyrosinase monophenolase activity and diphenolase activity were determined. The Lineweaver-Burk double-reciprocal plot method was used to explore the inhibition mechanism, and the contents of total polyphenols and flavonoids in *Camellia oleifera*

shell extract were determined. Results: The  $IC_{50}$  of *Camellia oleifera* shell extract for tyrosinase monophenolase and diphenolase were 0.0711 mg/mL and 0.2199 mg/mL, respectively, and the  $K_{IS}$  for enzyme-substrate complex was 10.7487 mg/mL. The total polyphenol content in *Camellia oleifera* shell extract was  $30.22\% \pm 1.02\%$ , and the flavonoid content was  $13.52\% \pm 0.24\%$ . Conclusion: *Camellia oleifera* shell extract has a good inhibitory effect on tyrosinase monophenolase and diphenolase. Total polyphenols and flavonoids may be the main substances of *Camellia oleifera* shell extract that inhibit tyrosinase activity.

## Keywords

*Camellia oleifera*, Inhibition, Mechanism, Tyrosinase

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

酪氨酸酶(tyrosinase, EC1.14.18.1)是一种含铜的金属氧化还原酶[1], 广泛分布于动植物、微生物及人体中, 具有单酚酶和二酚酶活性[2], 其活性中心的双核铜离子在酶催化中起重要作用, 是黑色素生成的关键酶, 抑制其活性可有效阻止黑色素的生成[3]。近年来, 酪氨酸酶抑制剂的开发取得明显进展, 美白类产品日趋活跃[4] [5]。虽已多种酪氨酸酶抑制剂作为美白剂, 投入大批量生产, 但仍具有某些缺点[6] [7]。而天然提取物具有多种生物活性、且毒性低, 因此已成为国内外开发美白化妆品的研究热点[8] [9] [10]。

油茶(*Camellia oleifera* Abel)为山茶科山茶属木本植物, 为常绿小乔木, 耐贫瘠、适生范围广, 被誉为“瘠土明珠”, 又因其种子可榨油供食用, 故名“油茶”, 是我国重要的木本油料作物, 与油橄榄、椰子、油棕并称为世界四大木本油料作物[11] [12] [13]。

虽然我国油茶资源丰富、市场潜力大, 但是油茶壳等加工副产物利用率低, 高附加值产品少, 尚未得到高效利用[14] [15]。目前, 关于油茶壳提取物对酪氨酸酶活抑制的研究较少。基于此, 本研究以油茶壳提取物为研究对象, 探究油茶壳提取物对酪氨酸酶的抑制作用机理, 为油茶壳的高值化利用提供新思路, 促进油茶产业的发展。

## 2. 材料试剂与仪器

### 2.1. 实验材料

油茶壳: 产自浙江衢州, 2020年11月采购。

油茶壳提取物: 实验室自制。

### 2.2. 实验试剂

酪氨酸酶(25 KU)、曲酸、L-酪氨酸: 上海麦克林生化科技有限公司; PBS: 白鲨生物科技有限公司; L-DOPA: 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 无水乙醇、碳酸钠、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠: 均为分析纯, 国药集团化学试剂有限公司。

### 2.3. 实验仪器

DFT-250 手提式高速万能粉碎机: 温岭林大机械有限公司; 40 方孔试验标准筛(0.425 mm 筛孔): 上

虞市康南仪器厂; KQ-300DB 型数控超声波清洗器: 昆山超声仪器有限公司; RE-52AA 旋转蒸发器: 上海亚荣生化仪器厂; LGJ 真空冷冻干燥机: 北京松源华兴科技发展有限公司; BS 25 S 电子天平: 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司; HH-S 数显恒温水浴锅: 常州翔天实验仪器厂; Bio Tek 酶标仪: 美国伯腾仪器有限公司; WH-861 涡旋仪: 太仓市华利达实验设备有限公司。

### 3. 方法

#### 3.1. 油茶壳提取物的制备

参考姜天甲等[16]的方法并加以改动, 准确称取粉碎过筛的油茶壳 20.0 g (精确到 0.1 mg), 按照 1:15 (g/mL)的料液比, 加入 300 mL 60%体积分数的乙醇溶液, 于 60℃下超声提取 3 h, 所得溶液经过 4000 r/min 离心 20 min, 取上清液过滤, 减压旋蒸除去乙醇, 真空冷冻干燥 48 h 后, 得到油茶壳提取物粉末。用时超声溶解至所需浓度溶液。

#### 3.2. 油茶壳提取物对酪氨酸酶单酚酶的抑制作用

参考陈艳梅[17]的方法, 以 L-酪氨酸为底物, 以曲酸为阳性对照, 测定油茶壳提取物对酪氨酸酶单酚酶的抑制作用。反应体系(700  $\mu$ L)包含 200  $\mu$ L 待测液、200  $\mu$ L 0.01 mol/L PBS 缓冲液(pH = 6.80)、100  $\mu$ L 100 U/mL 酪氨酸酶溶液和 200  $\mu$ L 0.5 mg/mL L-酪氨酸溶液。以 37℃恒温条件下单位时间内 475 nm 下吸光值 A<sub>475</sub> 的变化作为单酚酶活性, 横轴截距即为单酚酶迟滞时间。以样品浓度(mg/mL)为横坐标, 抑制率(%)为纵坐标, 绘制曲线, 测定酪氨酸酶单酚酶活力抑制率 50%时的样品浓度 IC<sub>50</sub> 值。

#### 3.3. 油茶壳提取物对酪氨酸酶二酚酶的抑制作用

##### 3.3.1. 油茶壳提取物对二酚酶活性的抑制效果

参考 T/SHRH 015-2018 的方法加以改动, 以 L-DOPA 为底物, 以曲酸为阳性对照, 测定油茶壳提取物对酪氨酸酶二酚酶活性的抑制效果。反应体系(700  $\mu$ L)包含 200  $\mu$ L 待测液、200  $\mu$ L 0.01 mol/L PBS 缓冲液(pH = 6.80)、100  $\mu$ L 100 U/mL 酪氨酸酶溶液和 200  $\mu$ L 1 mg/mL L-DOPA 溶液。以 37℃恒温条件下单位时间内 475 nm 下吸光值的变化作为二酚酶活性。以样品浓度(mg/mL)为横坐标, 抑制率(%)为纵坐标, 绘制曲线, 测定酪氨酸酶二酚酶活力抑制率 50%时的样品浓度 IC<sub>50</sub> 值。

##### 3.3.2. 油茶壳提取物对二酚酶的抑制类型

参考朱绮琴等[18]的方法加以改动, 在 700  $\mu$ L 的反应体系中, 固定底物 L-DOPA 浓度为 1 mg/mL, 改变加入的酪氨酸酶量(50 U/mL、75 U/mL、100 U/mL、125 U/mL、150 U/mL 和 175 U/mL), 测定不同浓度油茶壳提取物(0 mg/mL、0.1 mg/mL、0.2 mg/mL、0.3 mg/mL、0.4 mg/mL 和 0.5 mg/mL)对二酚酶活力的影响, 以酶浓度(mg/mL)为横坐标, 以反应速率为纵坐标, 作图。

##### 3.3.3. 油茶壳提取物对二酚酶的抑制机理及抑制常数的测定

参考 Cui 等[19]的方法在 700  $\mu$ L 的反应体系中, 固定酪氨酸酶浓度为 100 U/mL, 改变底物 L-DOPA 的浓度(0.167 mg/mL、0.2 mg/mL、0.25 mg/mL、0.333 mg/mL、0.5 mg/mL 和 1.0 mg/mL(分别为 6、5、4、3、2 和 1 的倒数)), 测定不同浓度油茶壳提取物(0 mg/mL、0.05 mg/mL、0.1 mg/mL、0.2 mg/mL、0.3 mg/mL、0.4 mg/mL、0.5 mg/mL 和 0.6 mg/mL)对二酚酶活力的影响, 以 Lineweaver-Burk 双倒数作图, 以底物浓度的倒数(1/[S])为横坐标, 反应速率的倒数(1/v)为纵坐标, 探究油茶壳提取物对二酚酶的抑制机理。通过直线的斜率和纵轴截距对抑制剂浓度二次作图, 可计算出抑制剂对游离酶抑制常数 K<sub>i</sub> 和对酶-底物络合物抑制常数 K<sub>is</sub>。

### 3.4. 油茶壳提取物总多酚含量的测定

参照 T/AHFIA 005-2018 的方法加以改动, 采用 Folin-Ciocalteu 法, 以没食子酸为标准品, 测定油茶壳提取物中的总多酚含量。

### 3.5. 油茶壳提取物黄酮含量的测定

参照 SZDB/Z 339-2019 的方法加以改动, 采用  $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$  比色法测定油茶壳提取物中的黄酮含量。

### 3.6. 统计学方法

各试验重复 3 次, 数值均以  $\bar{X} \pm \text{SD}$  表示; 采用 Excel 2016 进行数据处理; 采用 SPSS 25.0 软件 Pearson 相关性分析统计检验, \*\*表示相关性极显著 ( $p < 0.01$ ), 差异具有统计学意义; 采用 Origin 2018 软件进行绘图。

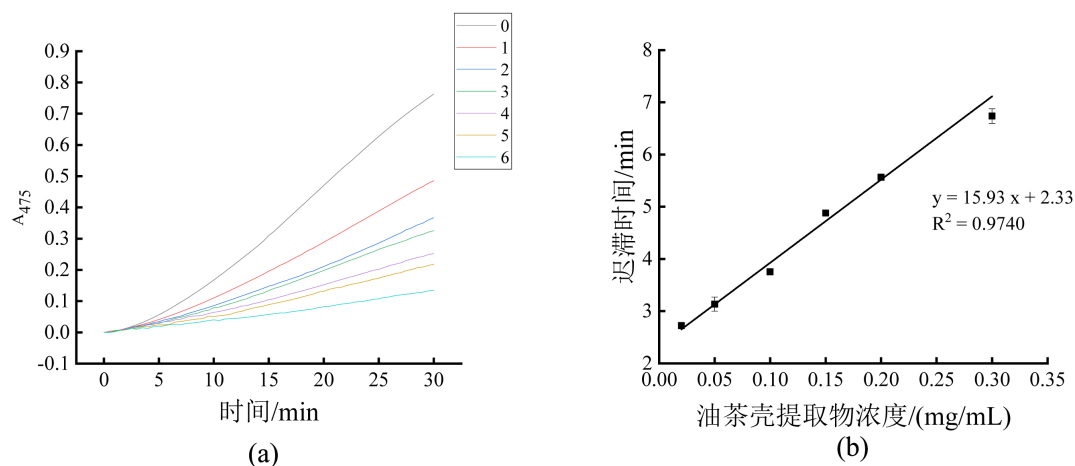
## 4. 结果

### 4.1. 油茶壳提取物对单酚酶抑制作用

在 700  $\mu\text{L}$  反应体系中, 以 L-酪氨酸为底物, 以曲酸为阳性对照, 探究油茶壳提取物对酪氨酸酶单酚酶的抑制作用。

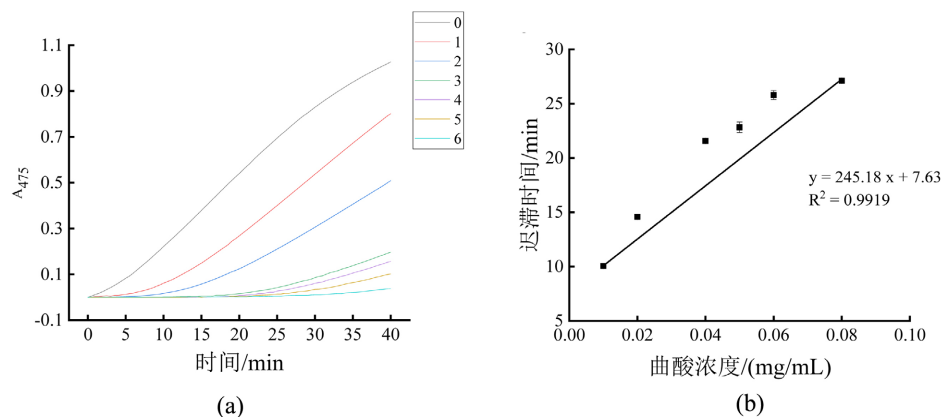
油茶壳提取物对单酚酶的抑制作用如图 1 所示。图 1(a) 显示随着油茶壳提取物浓度逐渐增加, 曲线变化趋势明显变缓, 表明单酚酶活性逐渐降低, 酶活抑制率逐渐增大。图 1(b) 显示油茶壳提取物浓度对酪氨酸酶单酚酶迟滞时间的影响, 可以看到在 0.02 mg/mL 至 0.30 mg/mL 的范围内, 迟滞时间与抑制剂浓度呈现良好的线性关系, 拟合的回归方程为  $y = 15.93x + 2.33$  ( $R^2 = 0.9740$ )。这表明油茶壳提取物对单酚酶的抑制作用主要是通过降低酶活和增加酶的迟滞时间两种方式来抑制酶促反应。

曲酸对单酚酶的抑制作用如图 2 所示, 可以看到 0.08 mg/mL 的曲酸作用下的酶促反应曲线趋于水平, 对单酚酶的迟滞时间已达  $27.11 \pm 0.02$  min, 证明曲酸可以显著增加酪氨酸酶单酚酶的迟滞时间。



注: 图(a)为不同浓度油茶壳提取物对酶促反应吸光值的影响, 曲线 0~6 依次代表油茶壳提取物浓度为 0 mg/mL、0.02 mg/mL、0.05 mg/mL、0.10 mg/mL、0.15 mg/mL、0.20 mg/mL 和 0.30 mg/mL; 图(b)为不同浓度油茶壳提取物对单酚酶迟滞时间的影响。

**Figure 1.** Inhibitory effect of *Camellia oleifera* shell extract on monophenolase  
**图 1.** 油茶壳提取物对单酚酶抑制作用

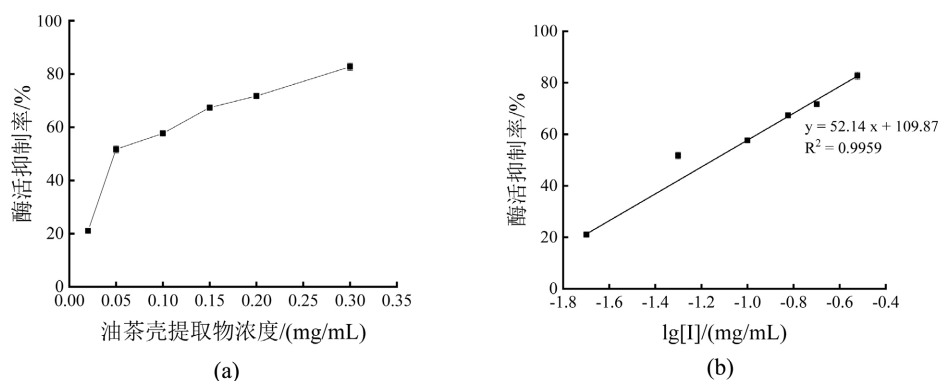


注: 图(a)为不同浓度曲酸溶液对酶促反应吸光值的影响, 曲线 0~6 依次代表曲酸浓度为 0 mg/mL、0.01 mg/mL、0.02 mg/mL、0.04 mg/mL、0.05 mg/mL、0.06 mg/mL 和 0.08 mg/mL; 图(b)为不同浓度曲酸对单酚酶迟滞时间的影响。

**Figure 2.** Inhibitory effect of kojic acid on monophenolase

**图 2.** 曲酸对单酚酶抑制作用

表示油茶壳提取物对单酚酶活力抑制效果如图 3 所示。由图 3(a)可知, 0.02 mg/mL 油茶壳提取物对酪氨酸酶单酚酶活力抑制率达  $21.05\% \pm 0.25\%$ , 0.10 mg/mL 油茶壳提取物对其抑制率已达  $57.66\% \pm 0.23\%$ 。由图 3(b)可知, 抑制曲线  $y = 52.14x + 109.87$  ( $y$  为酶活抑制率, 单位为%;  $x$  为以 10 为底、油茶壳提取物浓度的对数值  $\lg [I]$ , 单位为 mg/mL;  $R^2 = 0.9959$ ), 由该抑制曲线计算出油茶壳提取物对酪氨酸酶单酚酶的  $IC_{50}$  为 0.0711 mg/mL, 说明油茶壳提取物对酪氨酸酶单酚酶具有较好的抑制效果。



注: 图(a)为油茶壳提取物浓度对酶活抑制作用; 图(b)为抑制剂浓度取对数后, 对酶活抑制作用曲线。

**Figure 3.** Inhibitory effect of *Camellia oleifera* shell extract on monophenolase activity

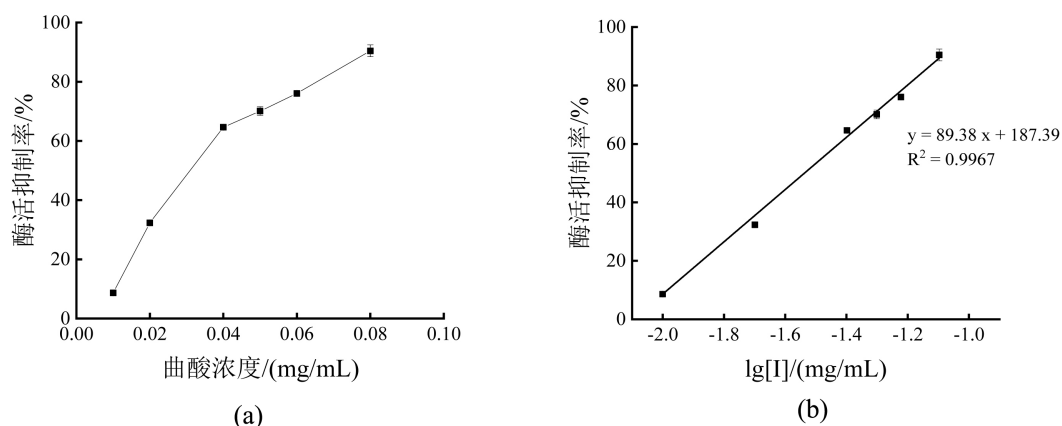
**图 3.** 油茶壳提取物对单酚酶活力的抑制效果

图 4 表示曲酸对单酚酶活力抑制效果。根据曲酸对单酚酶的抑制曲线  $y = 89.38x + 187.39$  ( $y$  为酶活抑制率, 单位为%;  $x$  为以 10 为底、曲酸浓度的对数  $\lg [I]$ , 单位为 mg/mL;  $R^2 = 0.9967$ ), 计算出曲酸对酪氨酸酶单酚酶的  $IC_{50}$  为 0.0290 mg/mL, 说明曲酸对酪氨酸酶单酚酶具有很强的抑制作用。

## 4.2. 油茶壳提取物对二酚酶抑制作用

### 4.2.1. 油茶壳提取物对二酚酶的 $IC_{50}$

在 700  $\mu$ L 反应体系中, 以 L-DOPA 为底物, 以曲酸为阳性对照, 探究油茶壳提取物对酪氨酸酶二酚酶的抑制作用。

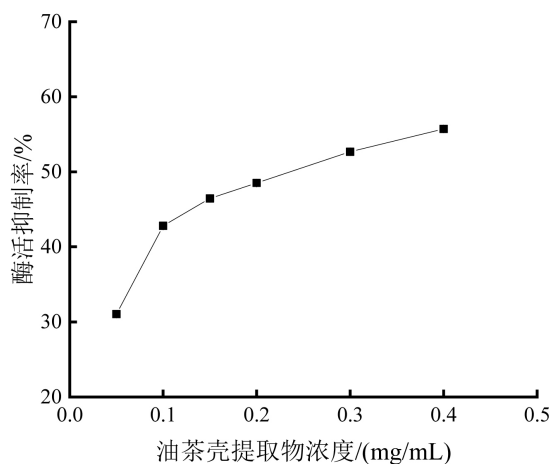


注: 图(a)为曲酸浓度对酶活抑制作用; 图(b)为抑制剂浓度取对数后, 对酶活抑制作用曲线。

**Figure 4.** Inhibitory effect of kojic acid on monophenolase activity

**图 4.** 曲酸对单酚酶活力的抑制效果

油茶壳提取物对酪氨酸酶二酚酶的抑制作用见图 5。由图可知, 0.05 mg/mL 油茶壳提取物对酪氨酸酶二酚酶活力抑制率达  $31.03\% \pm 0.26\%$ , 0.10 mg/mL 油茶壳提取物对其抑制率已达  $42.80\% \pm 0.34\%$ , 浓度为 0.30 mg/mL 时, 抑制率为  $52.67\% \pm 0.50\%$ 。进一步绘制油茶壳提取物对二酚酶的抑制曲线为  $y = 27.41x + 68.03$  ( $y$  为酶活抑制率, 单位为%;  $x$  为以 10 为底、油茶壳浓度的对数值  $\lg [I]$ , 单位为 mg/mL;  $R^2 = 0.9738$ ), 由该抑制曲线计算出油茶壳提取物对酪氨酸酶二酚酶的  $IC_{50}$  为 0.2199 mg/mL, 说明油茶壳提取物对酪氨酸酶二酚酶同样具有较好抑制作用。



**Figure 5.** Inhibitory effect of *Camellia oleifera* shell extract on diphenolase

**图 5.** 油茶壳提取物对二酚酶的抑制作用

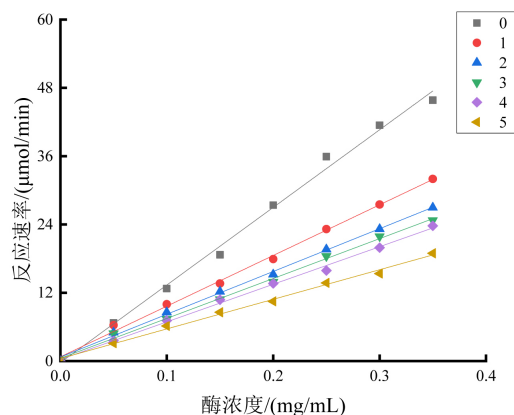
#### 4.2.2. 油茶壳提取物对二酚酶的抑制类型

在 700  $\mu$ L 的反应体系中, 固定底物 L-DOPA 浓度为 1 mg/mL, 依次改变油茶壳提取物的浓度, 测定不同酪氨酸酶浓度下其二酚酶活力, 绘制酶浓度(mg/mL)与反应速率的曲线图。实验结果如图 6 所示, 得到一组斜率不同、均过原点的直线, 因此判断油茶壳提取物对酪氨酸酶二酚酶的抑制类型为可逆抑制。

#### 4.2.3. 油茶壳提取物对二酚酶的抑制机理

在确定油茶壳提取物对二酚酶的抑制类型为可逆抑制的基础上, 进一步探究抑制机理。在 700  $\mu$ L 的

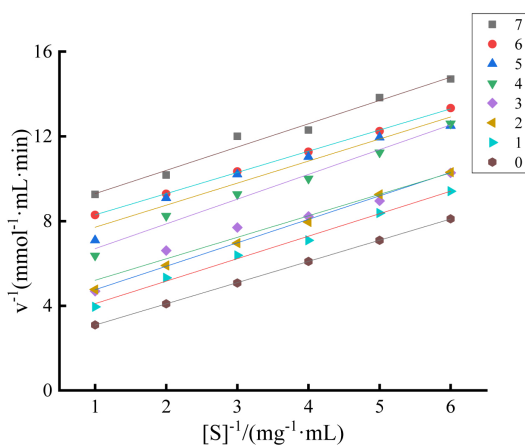
反应体系中, 固定酪氨酸酶浓度为 100 U/mL, 改变底物 L-DOPA 的浓度, 测定不同浓度油茶壳提取物对二酚酶活力的影响, 采用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法, 以底物浓度的倒数( $1/[S]$ )为横坐标, 反应速率的倒数( $1/v$ )为纵坐标, 探究油茶壳提取物对二酚酶的抑制机理。



注: 直线 0~5 依次代表油茶壳提取物浓度为 0 mg/mL、0.1 mg/mL、0.2 mg/mL、0.3 mg/mL、0.4 mg/mL 和 0.5 mg/mL。

**Figure 6.** Type of inhibition of diphenolase by *Camellia oleifera* shell extract  
**图 6.** 油茶壳提取物对二酚酶的抑制类型

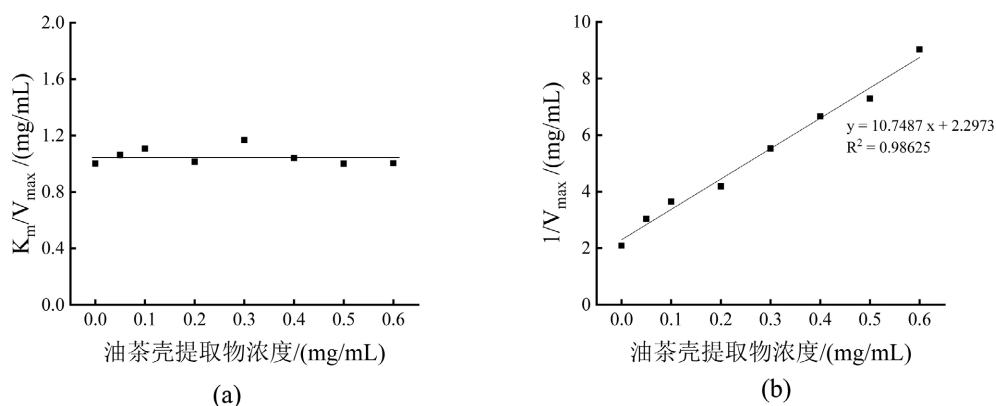
油茶壳提取物对二酚酶的抑制机理如图 7 所示, 不同浓度的抑制剂作用下, 得到一组平行直线, 这表明油茶壳提取物对酪氨酸酶二酚酶的抑制作用为反竞争性抑制, 只能作用于酶-底物络合物, 不能作用于游离酶, 油茶壳提取物同时影响米氏常数  $K_m$  与最大反应速度  $V_{max}$ 。



注: 直线 0~7 依次代表油茶壳浓度为 0 mg/mL、0.05 mg/mL、0.1 mg/mL、0.2 mg/mL、0.3 mg/mL、0.4 mg/mL、0.5 mg/mL 和 0.6 mg/mL。

**Figure 7.** Inhibitory mechanism of *Camellia oleifera* shell extract on diphenolase  
**图 7.** 油茶壳提取物对二酚酶的抑制机理

以油茶壳提取物浓度为  $x$  轴, 分别以直线的斜率和纵轴截距为  $y$  轴, 作图。实验结果如图 8 所示。由图 8(a), 不同油茶壳提取物作用下, 直线斜率相对稳定, 表明油茶壳提取物不能作用于游离酶, 因此油茶壳提取物对游离酶结合常数  $K_i$  为零。由图 8(b), 得到曲线方程为  $y = 10.7487x + 2.2973$  ( $R^2 = 0.98625$ ), 求得油茶壳提取物对酶-底物络合物抑制常数  $K_{IS}$  为 10.7487 mg/mL。



注: 图(a)为油茶壳提取物对二酚酶的  $K_I$ ; 图(b)为油茶壳提取物对二酚酶的  $K_{IS}$ 。

**Figure 8.** Inhibition constant of *Camellia oleifera* shell extract on diphenolase

**图 8.** 油茶壳提取物对二酚酶的抑制常数

油茶壳提取物与曲酸对酪氨酸酶的抑制效果汇总至表 1, 由表可得, 油茶壳提取物与曲酸均为良好的酪氨酸酶抑制剂, 油茶壳提取物对酪氨酸酶的抑制机理为反竞争性可逆抑制, 曲酸为混合型可逆抑制。

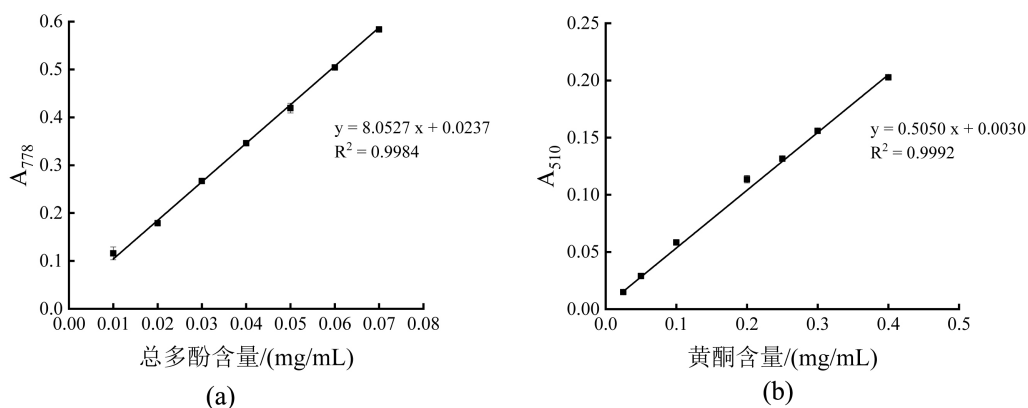
**Table 1.** Inhibitory effect of different inhibitors on tyrosinase

**表 1.** 不同抑制剂对酪氨酸酶的抑制效果

样品	单酚酶 $IC_{50}$ / (mg/mL)	二酚酶 $IC_{50}$ / (mg/mL)	抑制类型	抑制机理	$K_I$ / (mg/mL)	$K_{IS}$ / (mg/mL)
油茶壳提取物	0.0711	0.2199	可逆抑制	反竞争性	0	10.7487
曲酸	0.0290	0.0898	可逆抑制[20]	混合型	1.8474	14.2110

### 4.3. 油茶壳提取物总多酚含量

采用 Folin-Ciocalteu 法测定油茶壳提取物中总多酚含量, 以没食子酸计。图 9(a)为总多酚标准曲线, 拟合的回归方程为  $y = 8.0527x + 0.0237$  ( $R^2 = 0.9984$ )。根据总多酚标准曲线, 计算油茶壳提取物中总多酚含量为  $30.22\% \pm 1.02\%$ 。



注: 图(a)为总多酚标准曲线(以没食子酸计); 图(b)为黄酮标准曲线(以芦丁计)。

**Figure 9.** Standard curves of total polyphenols and flavonoids

**图 9.** 总多酚、黄酮标准曲线



#### 4.4. 油茶壳提取物黄酮含量

采用  $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$  法测定油茶壳提取物中黄酮含量, 以芦丁计。图 9(b)为黄酮标准曲线, 拟合的回归方程为  $y = 0.5050x + 0.0030$  ( $R^2 = 0.9992$ )。根据黄酮标准曲线, 计算油茶壳提取物中黄酮含量为  $13.52\% \pm 0.24\%$ 。

采用 Pearson 相关性分析统计检验, 油茶壳提取物对酪氨酸酶活性抑制率与其活性成分的相关性分析结果如表 2 所示, 油茶壳提取物对酪氨酸酶活抑制率与其总多酚、黄酮含量的相关性系数分别为 0.850 和 0.756, 表明总多酚、黄酮可能是油茶壳提取物发挥抑制酪氨酸酶活力作用的主要物质。

**Table 2.** Correlation analysis of *Camellia oleifera* shell extract tyrosinase activity inhibition rate with active ingredients  
**表 2.** 油茶壳提取物酶活抑制率与活性成分的相关性分析

	酶活抑制率	总多酚含量	黄酮含量
酶活抑制率	1	0.850**	0.756**
总多酚含量	0.850**	1	0.811**
黄酮含量	0.756**	0.811**	1

注: \*\*表示相关性极显著( $p < 0.01$ )。

## 5. 结论

本研究以油茶壳提取物为研究对象, 探究油茶壳提取物对酪氨酸酶单酚酶和二酚酶活性的影响。实验结果表明油茶壳提取物对酪氨酸酶单酚酶与二酚酶均具有较好抑制效果, 对单酚酶主要是通过降低酶活和增加酶的迟滞时间两种方式来抑制酶促反应, 对二酚酶的抑制作用为反竞争性可逆抑制, 总多酚、黄酮可能是油茶壳提取物发挥抑制酪氨酸酶活性作用的主要物质。本研究为油茶壳提取物作为天然产物来源的酪氨酸酶抑制剂的开发利用提供了研究思路和理论依据。

## 基金项目

国家自然科学基金(2016C37013)。

## 参考文献

- [1] Himalini, S., Uma Maheshwari Nallal, V., Razia, M., Chinnapan, S., Chandrasekaran, M., Ranganathan, V., *et al.* (2022) Antimicrobial, Anti-Melanogenesis and Anti-Tyrosinase Potential of Myco-Synthesized Silver Nanoparticles on Human Skin Melanoma SK-MEL-3 Cells. *Journal of King Saud University-Science*, **34**, Article ID: 101882. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.101882>
- [2] Ic, A., Iar, A., Vla, B. and Furlan, R.L.E. (2020) Effect Directed Synthesis of a New Tyrosinase Inhibitor with Anti-Browning Activity. *Food Chemistry*, **341**, Article ID: 128232. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128232>
- [3] Carcelli, M., Rogolino, D., Bartoli, J., Pala, N., Compari, C., Ronda, N., *et al.* (2020) Hydroxyphenyl Thiosemicarbazones as Inhibitors of Mushroom Tyrosinase and Antibrowning Agents. *Food Chemistry*, **303**, Article ID: 125310. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125310>
- [4] Xu, H., Li, X., Xin, X., Mo, L., Zou, Y., Zhao, G., *et al.* (2021) Antityrosinase Mechanism and Antimelanogenic Effect of Arbutin Esters Synthesis Catalyzed by Whole-Cell Biocatalyst. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **69**, 4243-4252. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c07379>
- [5] 黄浩, 周秀玲, 吕美云. 还原性谷胱甘肽、抗坏血酸对酪氨酸酶的抑制作用[J]. *中国生化药物杂志*, 2009, 30(2): 95-98+102.
- [6] Ravetti, S., Clemente, C., Brignone, S., Hergert, L., Allemandi, D. and Palma, S. (2019) Ascorbic Acid in Skin Health. *Cosmetics*, **6**, Article No. 58. <https://doi.org/10.3390/cosmetics6040058>
- [7] Rho, H.-S., Lee, C.-S., Ahn, S.-M., Hong, Y.-D., Shin, S.-S., Park, Y.-H., *et al.* (2011) Studies on Tyrosinase Inhibito-

- ry and Antioxidant Activities of Benzoic Acid Derivatives Containing Kojic Acid Moiety. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, **32**, 4411-4414. <https://doi.org/10.5012/bkcs.2011.32.12.4411>
- [8] Rainer, B., Revoltella, S., Mayr, F., Moessler, J., Scafari, V., Kohl, R., *et al.* (2019) From Bench to Counter: Discovery and Validation of a Peony Extract as Tyrosinase Inhibiting Cosmeceutical. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **184**, Article ID: 111738. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111738>
- [9] Kim, J.H., Jang, D.H., Lee, K.W., Kim, K.D., Shah, A.B., Zhumanova, K., *et al.* (2020) Tyrosinase Inhibition and Kinetic Details of Puerol A Having But-2-Enolide Structure from *Amorpha fruticosa*. *Molecules*, **25**, Article No. 2344. <https://doi.org/10.3390/molecules25102344>
- [10] 孙玉洁. 香水莲花美白保湿作用研究[D]: [硕士学位论文]. 杭州: 浙江大学, 2016.
- [11] Luan, F., Zeng, J., Yang, Y., He, X., Wang, B., Gao, Y., *et al.* (2020) Recent advances in *Camellia oleifera* Abel: A Review of Nutritional Constituents, Biofunctional Properties, and Potential Industrial Applications. *Journal of Functional Foods*, **75**, Article ID: 104242. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104242>
- [12] Chaydarreh, K.C., Lin, X., Guan, L., Yun, H., Gu, J. and Hu, C. (2021) Utilization of Tea Oil *Camellia oleifera* Abel.) Shells as Alternative Raw Materials for Manufacturing Particleboard. *Industrial Crops and Products*, **161**, Article ID: 113221. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.113221>
- [13] Yang, Z., Fu, L. and Fan, F. (2019) Thermal Characteristics and Kinetics of Waste *Camellia oleifera* Shells by TG-GC/MS. *ACS Omega*, **4**, 10370-10375. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b01013>
- [14] Yeh, W., Ko, J., Huang, W., Cheng, W. and Yang, H. (2020) Crude Extract of *Camellia oleifera* Pomace Ameliorates the Progression of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease via Decreasing Fat Accumulation, Insulin Resistance and Inflammation. *British Journal of Nutrition*, **123**, 508-515. <https://doi.org/10.1017/S0007114519003027>
- [15] Zhu, J., Zhu, Y., Jiang, F., Xu, Y., Ouyang, J. and Yu, S. (2013) An Integrated Process to Produce Ethanol, Vanillin, and Xylooligosaccharides from *Camellia oleifera* Shell. *Carbohydrate Research*, **382**, 52-57. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2013.10.007>
- [16] 姜天甲. 油茶籽壳活性物质的提取及抗氧化、抑制脂肪酸合酶机理初探[D]: [硕士学位论文]. 杭州: 浙江大学, 2007.
- [17] 陈艳梅. 酪氨酸酶新型抑制剂曲酸衍生物的合成及其抑制黑色素形成的作用机理[D]: [硕士学位论文]. 厦门: 厦门大学, 2019.
- [18] 朱绮琴, 钟山. 酪氨酸酶催化多巴的米氏常数测定[J]. 化学通报, 1987(5): 49-52.
- [19] Cui, Y., Liang, G., Hu, Y., Shi, Y., Cai, Y.-X., Gao, H.-J., *et al.* (2015) Alpha-Substituted Derivatives of Cinnamaldehyde as Tyrosinase Inhibitors: Inhibitory Mechanism and Molecular Analysis. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, **63**, 716-722. <https://doi.org/10.1021/jf505469k>
- [20] 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.