

## 2 种食品添加剂对酪氨酸酶的抑制作用

赵美娟<sup>1</sup>, 王芳<sup>2,3</sup>, 姜泽东<sup>1,3</sup>, 王力<sup>1,3\*</sup>, 倪辉<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>集美大学海洋食品与生物工程学院 福建厦门 361021

<sup>2</sup>泉州师范学院海洋与食品学院 福建泉州 362000

<sup>3</sup>福建省食品微生物与酶工程重点实验室 福建厦门 361021

**摘要** 通过酶动力学研究探索 2 种食品添加剂(没食子酸丙酯和 *L*-抗坏血酸棕榈酸酯)对酪氨酸酶的抑制作用,并借助分子对接技术探究二者与酪氨酸酶间的结合方式。结果表明:没食子酸丙酯对酪氨酸酶是可逆混合型抑制,其  $IC_{50}=(18.036 \pm 0.823)$ mmol/L;*L*-抗坏血酸棕榈酸酯为可逆反竞争性抑制,其  $IC_{50}=(2.806 \pm 0.082)$ mmol/L。分子对接结果表明,2 种食品添加剂与酪氨酸酶间主要以氢键、范德华力相互作用。本试验拓展了酪氨酸酶抑制剂的研究方向,并为食品添加剂在酶抑制剂领域的应用提供参考。

**关键词** 食品添加剂;酪氨酸酶抑制剂;酶动力学;分子对接

**文章编号** 1009-7848(2022)11-0021-08 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.11.003

食品添加剂是一类对人体无害或危害性极低的天然或人工合成物质,一般用于改善食品品质<sup>[1]</sup>。作为食品添加剂的化合物大多具有丰富的官能团,这些官能团决定了化合物所具有的多种独特功能<sup>[2]</sup>,尤其是抗氧化剂。抗氧化剂在食品中的应用是通过延缓食品的氧化,来延长食品保质期。目前,抗氧化剂不再单一地用于食品加工,已逐渐延伸至生物医学领域,有研究表明抗氧化剂具有抑菌<sup>[3]</sup>、抗癌<sup>[4]</sup>、治疗心血管疾病<sup>[5]</sup>等作用。

没食子酸丙酯是联合国粮食及农业组织(FAO)和世界卫生组织(WHO)承认并允许添加到食品中的合成食品抗氧化剂之一<sup>[6]</sup>,主要用于防止油炸食品、油脂、果蔬、罐头等<sup>[7]</sup>食品氧化。同时,没食子酸丙酯还具有许多药理学功能,比如在抑制酶活性<sup>[8]</sup>、抗血小板凝集<sup>[9]</sup>、保护受损心肌<sup>[10]</sup>、促进血栓溶解<sup>[11]</sup>、抗炎<sup>[12]</sup>、护肝<sup>[13]</sup>及诱导肝癌细胞凋亡<sup>[14]</sup>等过程中发挥着重要作用。*L*-抗坏血酸棕榈酸酯是世界卫生组织公认的一种安全、营养、高效的食品添加剂<sup>[15]</sup>,也是目前我国唯一一种婴幼儿食品中允许添加的抗氧化剂<sup>[16]</sup>,不仅作为抗氧化剂被广泛应用,还在抗癌<sup>[17]</sup>、抗肿瘤<sup>[18]</sup>等领域发挥重要

作用。

酪氨酸酶(EC1.14.18.1, Tyrosinase)也被称为多酚氧化酶(PPO)<sup>[19]</sup>,是一种结构复杂的含铜多功能氧化还原酶<sup>[20]</sup>,其生物活性依赖于活性中心的铜离子<sup>[21]</sup>。酪氨酸酶是黑色素形成过程中的关键限速酶<sup>[22]</sup>,其异常表达会导致黑色素过度沉积,从而引起色斑等由色素沉着引发的皮肤问题<sup>[23]</sup>、果蔬<sup>[24]</sup>及水产品<sup>[25]</sup>的褐变问题,同时黑色素的产生还会提高昆虫的防御机制<sup>[26]</sup>。酪氨酸酶抑制剂能够降低酪氨酸酶的活性,进而阻碍黑色素的合成。酪氨酸酶抑制剂在医疗药物、美白化妆品、食品保鲜及杀虫剂的研制等方面具有良好的应用前景。然而,目前少有食品添加剂抑制酪氨酸酶活性的研究。本文以酶动力学研究没食子酸丙酯和 *L*-抗坏血酸棕榈酸酯对酪氨酸酶的抑制作用,以分子对接技术研究其抑制机理,旨在拓展食品添加剂的功能性研究提供理论参考,也为酪氨酸酶抑制剂提供新的研究方向。

### 1 材料与amp;方法

#### 1.1 仪器与试剂

双胞蘑菇酪氨酸酶(EC 1.14.18.1),美国 Sigma-Aldrich 公司;*L*-3,4-二羟基苯丙氨酸(*L*-DOPA),上海宝曼生物科技有限公司;二甲基亚砜(DMSO)、无水碳酸钠( $Na_2CO_3$ )、磷酸氢二钠( $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ )、磷酸二氢钠( $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ ),

收稿日期:2021-11-07

基金项目:国家自然科学基金项目(21871110);福建省自然科学基金项目(2020J01674)

第一作者:赵美娟,女,硕士

通信作者:王力 E-mail: wanglimerry@jmu.edu.cn

西陇化工股份有限公司;没食子酸丙酯、*L*-抗坏血酸棕榈酸酯,上海陆广生物科技有限公司。

BioTek Epoch 全波长酶标仪,美国伯腾仪器有限公司;FiveEasy Plus 电子酸度计,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;KQ2100E 型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;DHG-9037A 电热恒温鼓风干燥箱,上海精宏实验设备有限公司;RO5 多点磁力搅拌器,艾卡(广州)仪器设备有限公司;BSA124S 电子天平,赛多利斯(上海)贸易有限公司;HWS-24 电热恒温水浴锅,上海一恒科学仪器有限公司。

## 1.2 方法

1.2.1 酪氨酸酶活性的测定 参考文献[27-28]稍作修改,酪氨酸酶活性的测定方法如下:将底物 *L*-DOPA 溶解于 50 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液(pH=6.8)中,置于 30 °C 的恒温水浴锅内预热 30 min;随后,以  $V_{\text{效应物溶液}}:V_{\text{底物溶液}}:V_{\text{酪氨酸酶溶液}}=7:196:7$ ,依次将上述溶液加入 96 孔板,快速混合均匀,30 °C 恒温反应 30 min;最后,使用酶标仪测定波长 475 nm 处的吸光度值<sup>[29]</sup>。每组样品设置 5 组平行试验。

### 1.2.2 酶动力学

1.2.2.1 抑制效果 按照 2.1 节的方法,以没食子酸丙酯和 *L*-抗坏血酸棕榈酸酯为效应物,每种效应物设定 11~14 个系列梯度浓度;固定底物和酶溶液浓度( $C_S=0.5$  mmol/L,  $C_E=500$  U/mL)。以未添加效应物的试验组为空白对照组,按照下列公式计算相对剩余酶活性。

$$\text{相对剩余酶活性}(\%) = \frac{A_b - A_s}{A_b} \times 100$$

式中,  $A_b$ ——空白组测得吸光度值;  $A_s$ ——样品组测得吸光度值。

相对剩余酶活性降至 50% 时效应物的浓度即为  $IC_{50}$  值,以  $IC_{50}$  值表示效应物对酪氨酸酶的抑制效果。

1.2.2.2 抑制机理 没食子酸丙酯和 *L*-抗坏血酸棕榈酸酯对蘑菇酪氨酸酶的抑制机理基于 1.2.1 节的酶活性测定体系。在反应体系中,固定底物浓度及添加量,酪氨酸酶浓度分别设定为 100, 200, 300, 400 U/mL 和 500 U/mL,测定不同效应物浓度下整个反应体系在波长 475 nm 处的吸光度值。将

酶促反应速率作为酶活性的函数绘制图,根据得到的抑制曲线图判断效应物对蘑菇酪氨酸酶的抑制机理。

1.2.2.3 抑制类型 基于 1.2.1 节酶活性测定体系,以没食子酸丙酯和 *L*-抗坏血酸棕榈酸酯为待测效应物,设置底物梯度浓度为 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 mmol/L,酪氨酸酶浓度为 500 U/mL,底物 *L*-DOPA 的浓度为 0.5 mmol/L。测定不同效应物浓度下整个反应体系在波长 475 nm 处的吸光度值。效应物对蘑菇酪氨酸酶的抑制类型通过 Lineweaver-Burk 作图法绘制抑制类型图进行分析,而后抑制常数  $K_I$ 、 $K_{IS}$  通过二次作 Dixon 图得到。

1.2.3 分子对接 酪氨酸酶是一种结构复杂的氧化还原酶,目前,酪氨酸酶的主要来源为双孢蘑菇。双孢蘑菇酪氨酸酶与人类酪氨酸酶具有很高的相似性和同源性,广泛用于筛选酪氨酸酶抑制剂和黑色素生成研究、酶催化反应和酶抑制剂的结构研究的模型系统<sup>[30]</sup>。分子对接能够初步模拟效应物与酪氨酸酶之间的结合作用,为进一步探索二者间的作用机制提供依据。双孢蘑菇酪氨酸酶晶体结构(PDB:2Y9X)为所需酶蛋白分子,它的氨基酸序列以及空间三维结构可以从 UniProt 数据库(<http://www.uniprot.org/>)检索获得<sup>[31]</sup>,ZINC 小分子数据库(<http://zinc.docking.org/>)检索下载没食子酸丙酯和 *L*-抗坏血酸棕榈酸酯的三维结构作为虚拟对接配体。使用 MOE 软件将酶蛋白分子和效应物分子进行 3D 质子化和能量最小化操作,将处理后的文件保存以备后续操作。

同时导入处理后的酶蛋白分子以及配体小分子,在酶蛋白活性口袋附近选择对接位点,用 Simulations-Dock 程序进行分子对接,设定分子对接模拟参数,使用 London dG 评分函数(单位为 kcal/mol)计算结合自由能,评分函数越低则结合越稳定<sup>[32-33]</sup>。使用三维可视化 PyMOL 软件分析处理配体化合物与酶蛋白分子结合的最佳构象,突出显示配体化合物和酶蛋白分子间的结合方式、作用氨基酸残基。

1.2.4 数据处理 本试验图像绘制依托于 Origin Pro 8.5,通过 SPSS Statistics 17.0 进行试验数据分析。分子对接结果由过 Molecular Operating

Environment (MOE 2008.10) 计算得到, 得到对接结果用 PyMol 2.2.0 进行可视化分析。所有数据值均表示为平均值 $\pm$ 标准误差。

## 2 结果与讨论

### 2.1 没食子酸丙酯和 *L*-抗坏血酸棕榈酸酯对酪氨酸酶的抑制效果

以没食子酸丙酯和 *L*-抗坏血酸棕榈酸酯这 2

种食品添加剂作为效应物, 研究二者对蘑菇酪氨酸酶的抑制效果。以效应物浓度为  $x$  轴, 相对剩余酶活性为  $y$  轴, 绘制抑制效果图如图 1 所示。没食子酸丙酯的  $IC_{50}$  值为  $(18.036 \pm 0.823)$  mmol/L, *L*-抗坏血酸棕榈酸酯的  $IC_{50}$  值为  $(2.806 \pm 0.082)$  mmol/L。由两者的  $IC_{50}$  值可知, *L*-抗坏血酸棕榈酸酯的抑制效果优于没食子酸丙酯, 并且优于标准酪氨酸酶抑制剂熊果苷 ( $IC_{50} = 5.3 \sim 8.4$  mmol/L)<sup>[34]</sup>。

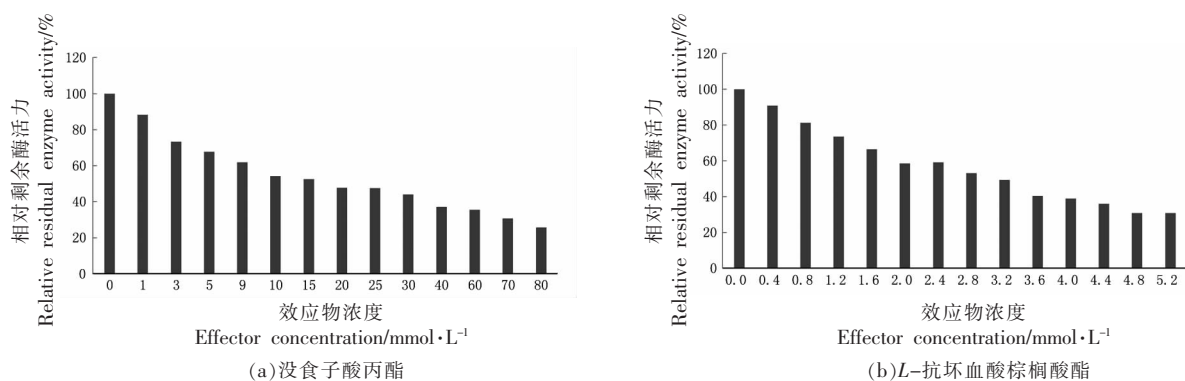


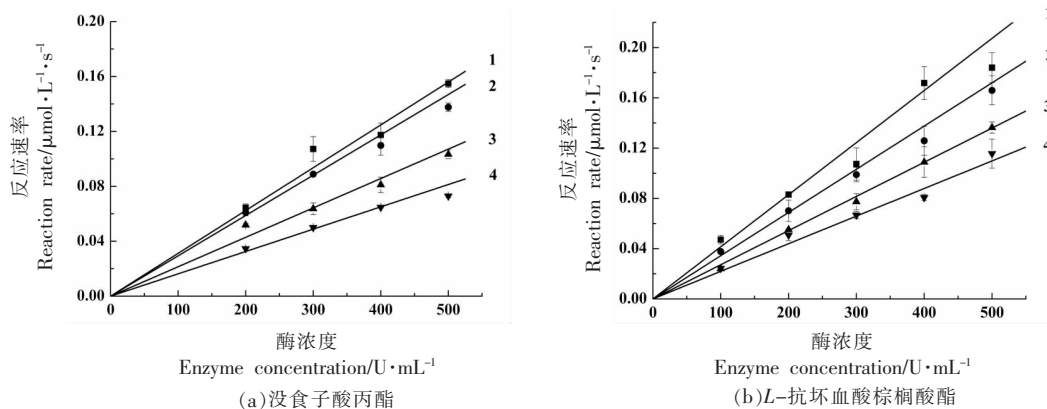
图 1 2 种食品添加剂对酪氨酸酶的抑制效果

Fig.1 Inhibitory effects of two food additives on the tyrosinase

### 2.2 没食子酸丙酯和 *L*-抗坏血酸棕榈酸酯对酪氨酸酶的抑制机理

没食子酸丙酯和 *L*-抗坏血酸棕榈酸酯这 2 种食品添加剂对蘑菇酪氨酸酶的抑制机理图如图 2 所示。图中 4 条直线分别对应效应物 4 个不同

浓度下的作用曲线, 图中的抑制曲线均交于原点, 随着效应物浓度的增大, 添加剂与酪氨酸酶的反应速率逐渐减小, 说明没食子酸丙酯和 *L*-抗坏血酸棕榈酸酯对酪氨酸酶的抑制均是可逆的, 酪氨酸酶与这 2 种添加剂间以非共价键相连。



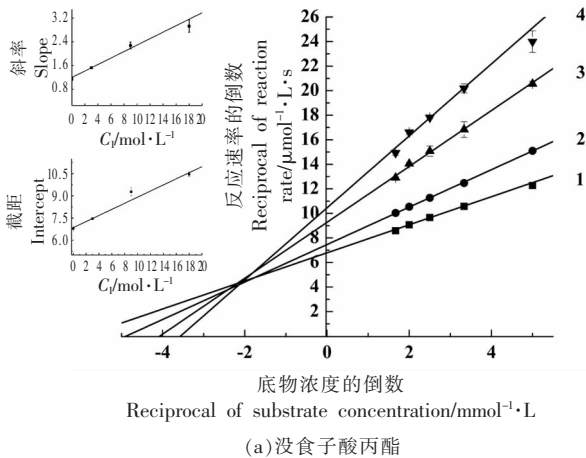
注: 图(a)中直线 1~4 浓度分别为 0, 3, 9 mmol/L 和 18 mmol/L; 图(b)中直线 1~4 浓度分别为 0, 0.4, 0.8 mmol/L 和 2 mmol/L。

图 2 没食子酸丙酯和 *L*-抗坏血酸棕榈酸酯对酪氨酸酶的抑制机理

Fig.2 Mechanism of tyrosinase inhibition by propyl gallate and *L*-ascorbyl palmitate

### 2.3 没食子酸丙酯和 *L*-抗坏血酸棕榈酸酯对酪氨酸酶的抑制类型

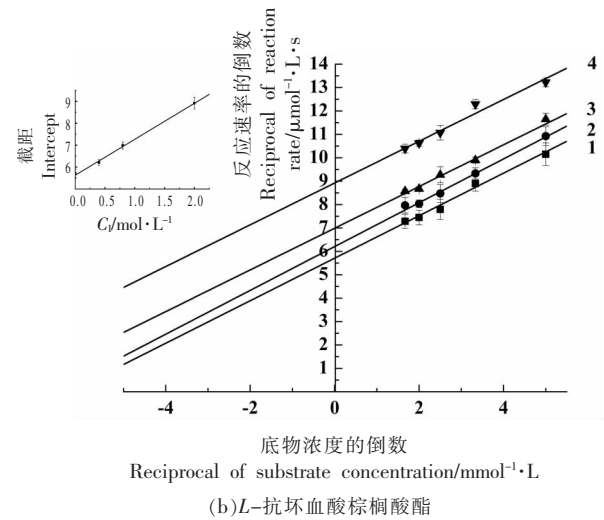
以没食子酸丙酯和 *L*-抗坏血酸棕榈酸酯为效应物,固定酶浓度,改变底物浓度,研究二者对蘑菇酪氨酸酶的抑制类型,结果如图3所示。图3a为没食子酸丙酯对酪氨酸酶的抑制类型图,图中直线1~4分别代表没食子酸丙酯4个浓度下的抑制曲线,图中显示4条直线的交点位于第2象限,计算得到抑制常数  $K_i=10.929$  mmol/L,  $K_{is}=33.187$  mmol/L,  $K_{is}>K_i$ ,与文献[35]报道相符,说明没食子酸丙酯对酪氨酸酶是混合型抑制,没食子酸丙酯既可与游离酶结合,还可与酶-底物复合物结合。



(a) 没食子酸丙酯

最大反应速率( $V_{max}$ )随着没食子酸丙酯浓度的增加而逐渐降低,米氏常数( $K_m$ )则呈现增长趋势。

图3b是 *L*-抗坏血酸棕榈酸酯对酪氨酸酶的抑制类型图,图中直线1~4几乎平行,随着 *L*-抗坏血酸棕榈酸酯浓度增大, $y$ 轴截距( $1/V_{max}$ )与  $x$ 轴截距( $1/K_m$ )同时逐渐增大,说明 *L*-抗坏血酸棕榈酸酯对酪氨酸酶的抑制类型是反竞争性抑制, *L*-抗坏血酸棕榈酸酯不能与游离酶结合,可以与酶-底物络合物结合,然而,酶-底物络合物无法形成产物,降低了酶的催化活性。通过计算得出 *L*-抗坏血酸棕榈酸酯的抑制常数  $K_{is}=3.423$  mmol/L。



(b) *L*-抗坏血酸棕榈酸酯

注:图(a)中直线1~4浓度分别为0,3,9 mmol/L和18 mmol/L;图(b)中直线1~4浓度分别为0,0.4,0.8 mmol/L和2 mmol/L。

图3 没食子酸丙酯和 *L*-抗坏血酸棕榈酸酯对酪氨酸酶抑制类型及抑制常数

Fig.3 Inhibitory type and inhibition constant of propyl gallate and *L*-ascorbyl palmitate on tyrosinase

### 2.4 分子对接结果

没食子酸丙酯是一种常见的抗氧化剂,含有3个酚羟基,同时具有C=O不饱和键,以化学结构式而言,没食子酸丙酯容易与其它化合物形成氢键。没食子酸丙酯与酪氨酸酶分子对接结果如图4所示。图4a显示,没食子酸丙酯成功嵌入酪氨酸酶的活性口袋,由图4c可知,疏水氨基酸Phe90、Phe264、Met280、Val283和Phe292构成酪氨酸酶的活性口袋。图4b和c显示没食子酸丙酯与酪氨酸酶蛋白活性口袋周围的His259形成氢键,氢键是没食子酸丙酯与酪氨酸酶之间的主要作用力。同时,没食子酸丙酯结构中的芳烃与His259还形

成金属接触(Metal contact)作用,增加二者的结合力。此外,没食子酸丙酯与酪氨酸酶活性中心间还存在范德华力,参与的氨基酸包括极性氨基酸Cys83、Thr84、Asn260、Gly281,碱性氨基酸His85、His94、His259、His263,酸性氨基酸Glu256。范德华力的强弱与分子极性及其分子间静电效应成正比相关,参与作用的极性氨基酸越多,分子极性越大;带电氨基酸越多,分子间静电效应越强,则分子间的范德华力越强。因此,氢键和范德华力是没食子酸丙酯与酪氨酸酶之间的主要作用力,分子对接结果从侧面印证两者之间以非共价键结合,没食子酸丙酯是酪氨酸酶的可逆性抑制剂。

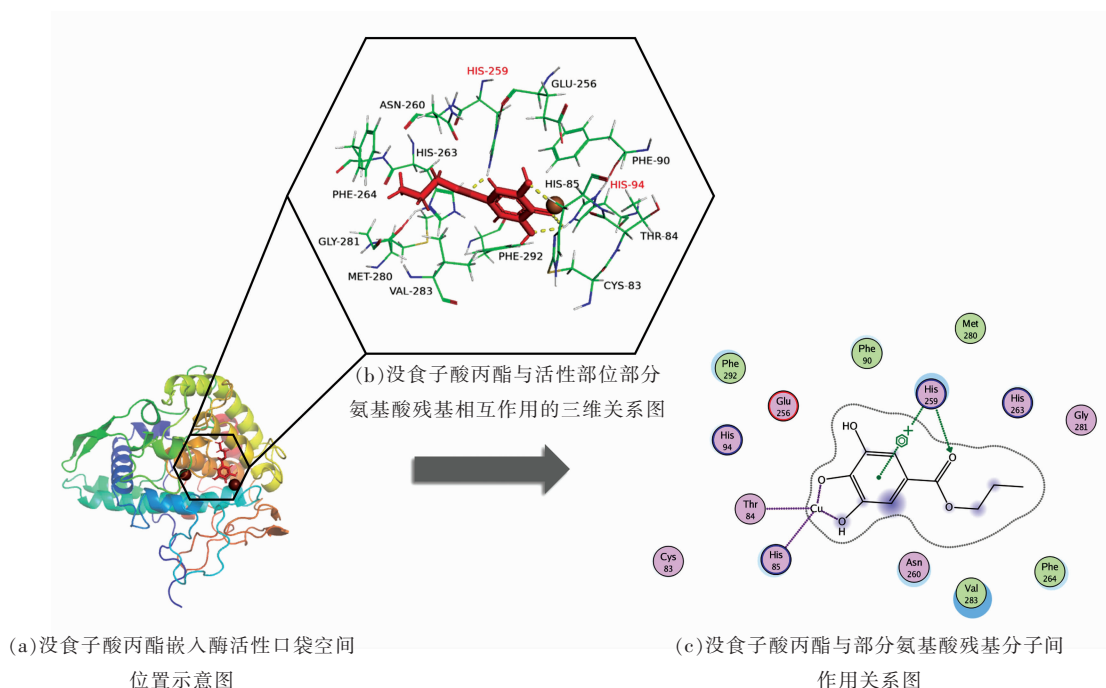


图 4 没食子酸丙酯与酪氨酸酶活性口袋的氨基酸残基相互作用

Fig.4 Interaction of propyl gallate and amino acid residues in the activity pocket of tyrosinase

*L*-抗坏血酸棕榈酸酯与酪氨酸酶的分子对接结果如图 5 所示, 图 5a 中, *L*-抗坏血酸棕榈酸酯带有酚羟基的一端基本完全嵌入酪氨酸酶的活性

口袋中。图 5b 和 c 显示, *L*-抗坏血酸棕榈酸酯与酪氨酸酶活性口袋周围的氨基酸残基 His61、His244、Glu256 形成 3 个氢键, 与 Cys83、Thr84、

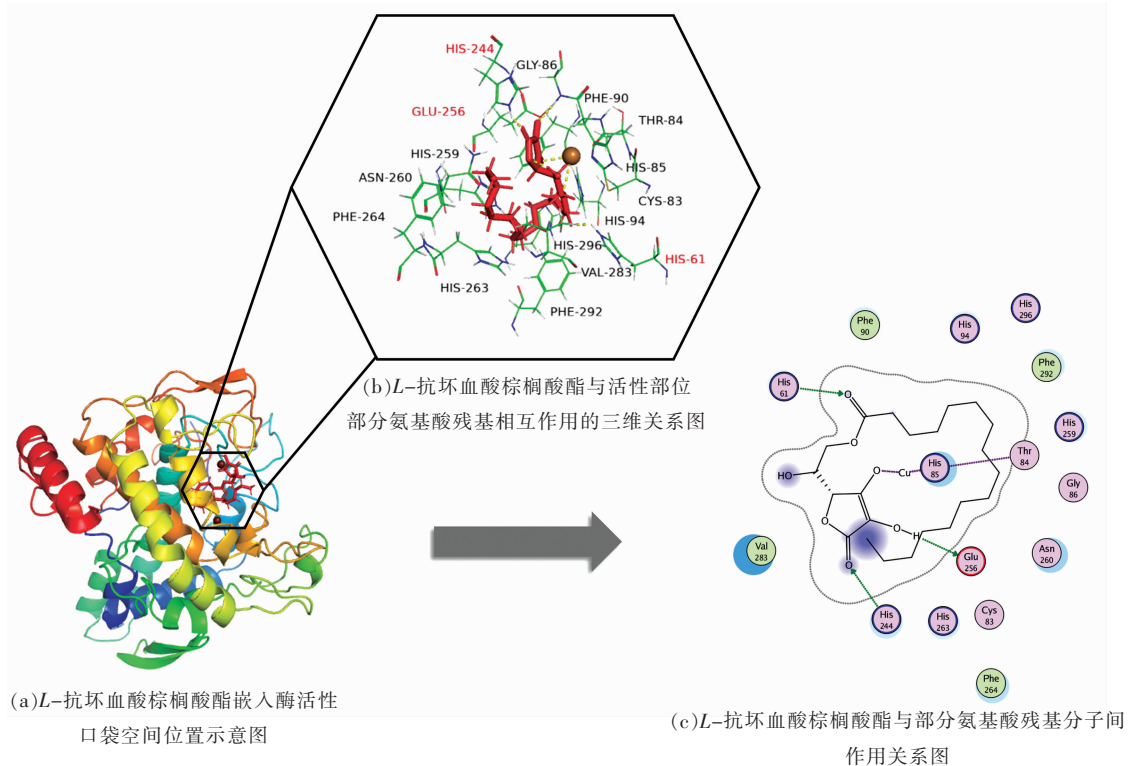


图 5 *L*-抗坏血酸棕榈酸酯与酪氨酸酶活性口袋的氨基酸残基相互作用

Fig.5 Interaction of *L*-ascorbyl palmitate and amino acid residues in the pocket of tyrosinase activity

His85、Gly86、Phe90、His94、His259、Asn260、His263、Phe264、Val283、Phe292、His296 之间以范德华力相互作用, 疏水氨基酸 Phe90、Phe264、Val283、Phe292 与酪氨酸酶活性口袋的形成相关。

综上所述,*L*-抗坏血酸棕榈酸酯与酪氨酸酶活性中心形成的氢键数量多于没食子酸丙酯, 并且 *L*-抗坏血酸棕榈酸酯与酪氨酸酶活性口袋形成范德华力的氨基酸残基中极性氨基酸与带电氨基酸所占比例偏高,*L*-抗坏血酸棕榈酸酯与酪氨酸酶间的范德华力更强。因此,*L*-抗坏血酸棕榈酸酯与酪氨酸酶结合更稳定, 对酪氨酸酶的抑制效果更显著。

### 3 结论

没食子酸丙酯  $[\text{IC}_{50}=(18.036\pm 0.823)\text{mmol/L}]$  和 *L*-抗坏血酸棕榈酸酯  $[\text{IC}_{50}=(2.806\pm 0.082)\text{mmol/L}]$  对酪氨酸酶均展现出抑制效果, 其中没食子酸丙酯是可逆混合型抑制,*L*-抗坏血酸棕榈酸酯是可逆反竞争性抑制。分子对接结果显示, 氢键和范德华力是 2 种食品添加剂与酪氨酸酶之间的主要作用力, 进一步印证二者对酪氨酸酶的抑制是可逆的。此试验不仅拓宽了食品添加剂的应用, 同时为酪氨酸酶抑制剂的研究提供理论基础及新的研究方向。

### 参 考 文 献

- [1] 姜晓庆. DTPA 衍生物-Eu 配合物在分析与检测食品添加剂中的应用[D]. 沈阳: 辽宁大学, 2019.  
JIANG X Q. Application of DTPA-derivatives-Eu complexes in the analysis and detection of food additives[D]. Shenyang: Liaoning University, 2019.
- [2] 郑新宇. 食品添加剂改性 SnO<sub>2</sub> 基钙钛矿太阳能电池及光电性能研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2020.  
ZHENG X Y. Study on the photoelectric properties of food additive modified SnO<sub>2</sub>-based perovskite solar cells[D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2020.
- [3] PRZEKWAS J, WIKTORCZYK N, BUDZYŃSKA A, et al. Ascorbic acid changes growth of food-borne pathogens in the early stage of biofilm formation[J]. Microorganisms, 2020, 8(4): 553.
- [4] SONG X Y, LUO Y H, MA L J, et al. Recent trends and advances in the epidemiology, synergism, and delivery system of lycopene as an anti-cancer agent[J]. Seminars in Cancer Biology, 2021, 73: 331-346.
- [5] OMENN G S, GOODMAN G E, THORNQUIST M D, et al. Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease[J]. The New England Journal of Medicine, 1996, 2(18): 1150-1155.
- [6] 李爽. 六元瓜环固载 Keggin 型杂多酸合成没食子酸丙酯[D]. 贵阳: 贵州大学, 2020.  
LI S. Synthesis of propyl gallate catalyzed by keggins heteropolyacid supported on cucurbit [6]urils [D]. Guiyang: Guizhou University, 2020.
- [7] 聂光军. 有机相生物催化酯转换合成没食子酸丙酯的研究[D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2012.  
NIE G Y. Study on biocatalytic synthesis of propyl gallate by transesterification in organic medium[D]. Hefei: University of Science and Technology of China, 2012.
- [8] SMITH J B, DANGELMAIER C, MAUCO G. Measurement of arachidonic acid liberation in thrombin-stimulated human platelets. Use of agents that inhibit both the cyclooxygenase and lipoxygenase enzymes[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism, 1985, 835(2): 344-351.
- [9] 娄兴维. 高水溶性没食子酸丙酯的制备及特性研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2020.  
LOU X W. Preparation and characterization of highly water-soluble propyl gallate [D]. Guiyang: Guizhou University, 2020.
- [10] DU C K, ZHAN D Y, MORIMOTO S. *In vivo* effects of propyl gallate, a novel Ca<sup>2+</sup> sensitizer, in a mouse model of dilated cardiomyopathy caused by cardiac troponin T mutation[J]. Life Sciences, 2014, 109(1): 15-19.
- [11] JUNG H J, LIM C J. The antiangiogenic and antinociceptive activities of n-propyl gallate [J]. Phytotherapy Research, 2011, 25(10): 1570-1573.
- [12] JUNG H J, KIM S J, JEON W K, et al. Anti-inflammatory activity of n-propyl gallate through down-regulation of NF-κB and JNK pathways[J]. Inflammation, 2011, 34(5): 352-361.
- [13] WU T W, FUNG K P, ZENG L H, et al. Propyl

- gallate as a hepatoprotector *in vitro* and *in vivo*[J]. *Biochemical Pharmacology*, 1994, 48(2): 419-422.
- [14] WEI P L, HUANG C Y, CHANG Y J, et al. Propyl gallate inhibits hepatocellular carcinoma cell growth through the induction of ROS and the activation of autophagy[J]. *PLoS One*, 2019, 14(1): 1-18.
- [15] 张润润, 石玉刚, 黄欣莹, 等. 化学与生物法制备抗坏血酸棕榈酸酯及其食品应用研究进展[J]. *中国粮油学报*, 2018, 33(7): 130-137.
- ZHANG R R, SHI Y G, HUANG X Y, et al. Chemical and enzyme-catalyzed synthesis and application of *L*-ascorbyl palmitate[J]. *Journal of the Chinese cereals and oils association*, 2018, 33(7): 130-137.
- [16] 孟校宇. *L*-抗坏血酸棕榈酸酯对油脂结晶网络的影响及其应用[D]. 无锡: 江南大学, 2020.
- MENG X Y. The effect of *L*-ascorbyl palmitate on the fats crystalline network: Mechanism and application[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2020.
- [17] KAGEYAMA K, ONOYAMA Y, KIMURA M, et al. Enhanced inhibition of DNA synthesis and release of membrane phospholipids in tumour cells treated with a combination of acylated ascorbate and hyperthermia[J]. *International Journal of Hyperthermia*, 2009, 7(1): 85-91.
- [18] ZHOU M, LI X, LI Y, et al. Ascorbyl palmitate-incorporated paclitaxel-loaded composite nanoparticles for synergistic anti-tumoral therapy[J]. *Drug Delivery*, 2017, 24(1): 1230-1242.
- [19] KIM Y J, UYAMA H. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: Structure, inhibition mechanism and perspective for the future[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 2005, 62(15): 1707-1723.
- [20] SHENG Z J, GE S Y, XU X M, et al. Design, synthesis and evaluation of cinnamic acid ester derivatives as mushroom tyrosinase inhibitors[J]. *Medchemcomm*, 2018, 9(5): 853-861.
- [21] ZHAO M J, CHEN X S, CHI G X, et al. Research progress on the inhibition of enzymes by polyoxometalates [J]. *Inorganic Chemistry Frontiers*, 2020, 7(22): 4320-4332.
- [22] FANG Y, CHEN Y, FENG G, et al. Benzyl benzoates: New phlorizin analogs as mushroom tyrosinase inhibitors[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2011, 19(3): 1167-1171.
- [23] SLOMINSKI A, TOBIN D J, SHIBAHARA S, et al. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation[J]. *Physiological Reviews*, 2004, 84(4): 1155-1228.
- [24] YORUK R, MARSHALL M R. Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: A review[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2003, 27(5): 361-422.
- [25] ALPARSLAN Y, YAPICI H H, METIN C, et al. Quality assessment of shrimps preserved with orange leaf essential oil incorporated gelatin [J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2016, 72: 457-466.
- [26] SUGUMARAN M. Molecular mechanisms for cuticular sclerotization[J]. *Advances in Insect Physiology*, 1988, 21: 179-231.
- [27] CHEN Q X, SONG K K, LING Q, et al. Inhibitory effects on mushroom tyrosinase by *p*-alkoxybenzoic acids[J]. *Food Chemistry*, 2005, 91(2): 269-274.
- [28] JONES K, HUGHES J, HONG M, et al. Modulation of melanogenesis by aloesin: A competitive inhibitor of tyrosinase[J]. *Pigment Cell Research*, 2002, 15(5): 335-340.
- [29] 邢蕊. 多酸型酪氨酸酶抑制剂的功能性研究[D]. 厦门: 集美大学, 2016.
- XING R. Functionality study of polyoxometalates as tyrosinase inhibitor [D]. Xiamen: Jimei University, 2016.
- [30] ZOLGHADRI S, BAHRAMI A, HASSAN KHAN M T, et al. A comprehensive review on tyrosinase inhibitors[J]. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2019, 34(1): 279-309.
- [31] ISMAYA W T, ROZEBOOM H J, WEIJN A, et al. Crystal structure of *Agaricus bisporus* mushroom tyrosinase: Identity of the tetramer subunits and interaction with tropolone [J]. *Biochemistry*, 2011, 50(24): 5477-5486.
- [32] YANG Y F, SUN X, NI H, et al. Identification and characterization of the tyrosinase inhibitory activity of caffeine from camellia pollen[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(46): 12741-12751.
- [33] MUHAMMAD A, MOHAMMED K K, UZMA S, et al. Synthesis, *in vitro*  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity, and *in silico* study of (*E*)-thiosemicarbazones

- and (*E*)-2-(2-(arylmethylene)hydrazinyl)-4-arylthiazole derivatives[J]. *Molecular Diversity*, 2018, 22: 841-861.
- [34] 郑阿萍. 过渡金属取代的多酸盐对酪氨酸酶的抑制机理研究[D]. 厦门: 集美大学, 2014.
- ZHENG A P. Inhibition mechanism of transition metals-substituted polyoxometalates on tyrosinase[D]. Xiamen: Jimei University, 2014.
- [35] 龚仁敏. 酶可逆抑制作用中线性混合型抑制的动力学[J]. 安徽师范大学学报(自然科学版), 1998, 21(1): 46-49.
- GONG R M. The linear-mixed inhibition kinetics among reversible inhibition to enzyme[J]. *Journal of Anhui Normal University (Natural Science)*, 1998, 21(1): 46-49.

## The Inhibitory Effects of Two Food Additives on Tyrosinase

Zhao Meijuan<sup>1</sup>, Wang Fang<sup>2,3</sup>, Jiang Zedong<sup>1,3</sup>, Wang Li<sup>1,3\*</sup>, Ni Hui<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup>College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, Fujian)

(<sup>2</sup>College of Oceanology and Food Science, Quanzhou Normal University, Quanzhou 362000, Fujian)

(<sup>3</sup>Fujian Key Laboratory of Food Microbiology and Enzyme Engineering, Xiamen 361021, Fujian)

**Abstract** The inhibitory effects of two food additives (propyl gallate and *L*-ascorbyl palmitate) on tyrosinase was explored through enzyme kinetics research, and the relationship between the two food additives and tyrosinase was explored by molecular docking technology. The results showed that propyl gallate was a reversible mixed inhibitor of tyrosinase, the  $IC_{50}$  values of propyl gallate was  $(18.036 \pm 0.823)$  mmol/L, and *L*-ascorbyl palmitate was a reversible anticompetitive inhibitor with  $IC_{50} = (2.806 \pm 0.082)$  mmol/L. The results of molecular docking showed that the interaction between the two food additives and tyrosinase was mainly through hydrogen bonds and van der Waals forces. This experiment expanded the research direction of tyrosinase inhibitors and provided a theoretical basis for the application of food additives in the field of enzyme inhibitors.

**Keywords** food additives; tyrosinase inhibitor; enzyme kinetics; molecular docking