

# Study of Tyrosinase Inhibition Activities of Nacre Soluble Proteins

Zhuo Cheng, Chunping Liu, Yanbin Lu\*

Institute of Seafood, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou Zhejiang  
Email: [luyanbin@zjgsu.edu.cn](mailto:luyanbin@zjgsu.edu.cn)

Received: Nov. 18<sup>th</sup>, 2017; accepted: Dec. 1<sup>st</sup>, 2017; published: Dec. 8<sup>th</sup>, 2017

---

## Abstract

Nacre proteins were evaluated for their inhibition on tyrosinase. The results showed that it had good inhibition on tyrosinase. It also demonstrated that nacre proteins can significantly extend the lag time of the reaction, which was catalyzed by monophenolase of tyrosinase. The effect of nacre proteins on the diphenolase of tyrosinase is reversible inhibition of competitive inhibition.

## Keywords

*Pinctada fucata*, Soluble Proteins, Tyrosinase Inhibition Activity, Mechanism

---

# 珍珠层可溶性蛋白对酪氨酸酶的作用机理研究

程卓, 刘春平, 卢延斌\*

浙江工商大学海洋食品研究院, 浙江 杭州  
Email: [luyanbin@zjgsu.edu.cn](mailto:luyanbin@zjgsu.edu.cn)

收稿日期: 2017年11月18日; 录用日期: 2017年12月1日; 发布日期: 2017年12月8日

---

## 摘要

研究了珍珠层可溶性蛋白对酪氨酸酶的抑制作用、抑制类型及抑制机理。实验结果表明, 该蛋白对酪氨酸酶有良好的抑制效果, 且样品浓度与酶活力之间存在剂量依赖关系。珍珠层可溶性蛋白能显著延长酪氨酸酶单酚酶催化反应的迟滞时间; 对二酚酶的抑制类型为可逆抑制, 抑制机理是竞争性抑制。

---

\*通讯作者。

## 关键词

珍珠, 可溶性蛋白, 酪氨酸酶抑制作用, 机理

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

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

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



Open Access

## 1. 引言

酪氨酸酶又称为多酚氧化酶, 广泛存在于自然界的动植物及微生物中[1] [2]。它是生物体合成黑色素过程中不可缺少的一种酶, 有氧情况下可以催化酪氨酸羟化成邻二羟基苯丙氨酸即 L-多巴(单酚酶活性), 并将 L-多巴氧化成多巴醌(二酚酶活性), 多巴醌再经过环化、脱羧、聚合等一系列非酶促反应后形成黑色素[3]。在人体中, 酪氨酸酶常常引起雀斑、黄褐斑、老年斑等黑色素过度沉积症以及色素代谢障碍、恶性黑色素肿瘤等疾病[4], 在农产品中, 也常导致蔬菜、水果等产生酶促褐变从而影响其经济价值[5]。

化学合成的酪氨酸酶抑制剂主要有含汞化合物及氢醌等[6], 然而含汞化合物的致毒性[7]和氢醌的致敏作用[8], 使其在化妆品领域的应用受到限制[9]。氢醌的替代品主要为曲酸与熊果苷等, 但研究发现, 频繁地使用熊果苷会导致皮肤出现永久性不可逆白斑, 而曲酸具有细胞毒性作用, 并会增加卵巢细胞染色体变异的概率[10] [11]。因此, 寻找安全可靠无毒副作用的天然酪氨酸酶抑制剂成为了近年来研究的热点。珍珠粉及珍珠层粉自古以来就被奉为美白圣品, 本研究以珍珠层可溶性蛋白提取物作为效应物, 研究其对蘑菇酪氨酸酶活力的抑制作用, 并通过抑制动力学参数确定了珍珠层可溶性蛋白对酪氨酸酶活力的抑制机理和抑制类型, 为其在化妆品、保健食品等行业的应用提供理论依据。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 材料与试剂

左旋多巴(L-DOPA)、L-酪氨酸、曲酸、熊果苷购于阿拉丁试剂公司; 酪氨酸酶购于美国 Worthington 公司; FEP101-896 酶标板购于广州洁特生物过滤制品公司; 磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )等试剂购于杭州汇普化工有限公司; 珍珠层粉购于浙江长生鸟珍珠生物科技有限公司。珍珠层可溶性蛋白的制备: 称取 100 g 珍珠层粉末置于 1000 mL 烧杯中, 加入 600 mL 超纯水, 调节溶液 pH 值为 9, 25°C 恒温搅拌提取 15 h (搅拌速度设为 150 r/min)。过滤, 弃去残渣, 滤液在室温下离心(6000 r/min 离心 15 min), 取上清, 调节上清溶液的 pH 值为中性, 真空冷冻干燥(于 1.3~13 帕的真空度、-10°C~-50°C 的温度下冷冻干燥 48~60 小时), 得到珍珠层可溶性蛋白提取物[12]。

### 2.2. 仪器

Milli-Q 超纯水装置, 美国 MILLIPORE 公司; PB-10 pH 计, 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司; Evolution 60S 紫外可见分光光度计, 美国 Thermo Fisher 公司; iMARK 酶标仪, 美国 Bio-Rad 公司。

### 2.3. 实验方法

#### 2.3.1. 珍珠层可溶性蛋白质对酪氨酸酶抑制率的测定

参考蘑菇酪氨酸酶多巴速率氧化法[13] [14], 用酶联免疫检测仪测定酶催化产物在 490 nm 处的吸光

度值。反应体系总体积为 200  $\mu\text{L}$ ，按照表 1 设计的加样量在 96 孔酶标板中依次加入不同体积的待测样品液，酪氨酸酶水溶液，磷酸盐缓冲液，混合均匀并于室温放置 10 分钟，分别加入 80  $\mu\text{L}$  的底物溶液，反应 10 分钟后，用酶标仪测量 490 nm 波长处的吸光值，以曲酸、熊果苷作为对照品，实验重复三次。各样品液对酪氨酸酶活力的抑制率( $I$ )可由下式算得： $I = [(A_1 - A_0)/A_1] \times 100\%$ 。式中： $A_1$ ：含有底物、酶液时体系的吸光值； $A_0$ ：含有底物、酶液、样品液时体系的吸光值。

### 2.3.2. 珍珠层可溶性蛋白质对酪氨酸酶的抑制可逆性

根据酶抑制动力学方法，固定底物 L-DOPA 的浓度，改变珍珠层可溶性蛋白溶液的浓度，测定反应体系中酶促反应速度随酪氨酸酶浓度的变化趋势，并绘制出两者间的关系曲线，根据该关系曲线判断珍珠层可溶性蛋白对酪氨酸酶活力抑制作用的可逆性：若得到的一组通过原点的直线，则为可逆抑制；若得到一组平行的直线，则为不可逆抑制[15]。

### 2.3.3. 珍珠层可溶性蛋白质对酪氨酸酶的抑制类型

根据酶抑制动力学方法，固定反应体系中的酶浓度，改变珍珠层可溶性蛋白溶液的浓度，测定反应体系中酶促反应速度随底物浓度的变化趋势。以反应初速度的倒数为纵坐标，底物浓度的倒数为横坐标绘制 Lineweaver-Burk 双倒数曲线。若所得的直线与坐标轴的交点在 Y 轴，说明该抑制剂的抑制类型是典型的竞争型抑制，若所得的直线与坐标轴的交点在 X 轴负半轴，说明抑制类型是非竞争型，若得到一组相交于第二或第四象限的直线，则为典型的混合型抑制，若得到一组互相平行的直线，则为反竞争型抑制[16]。

## 3. 结果与分析

### 3.1. 珍珠层可溶性蛋白质对酪氨酸酶单酚酶活力的影响

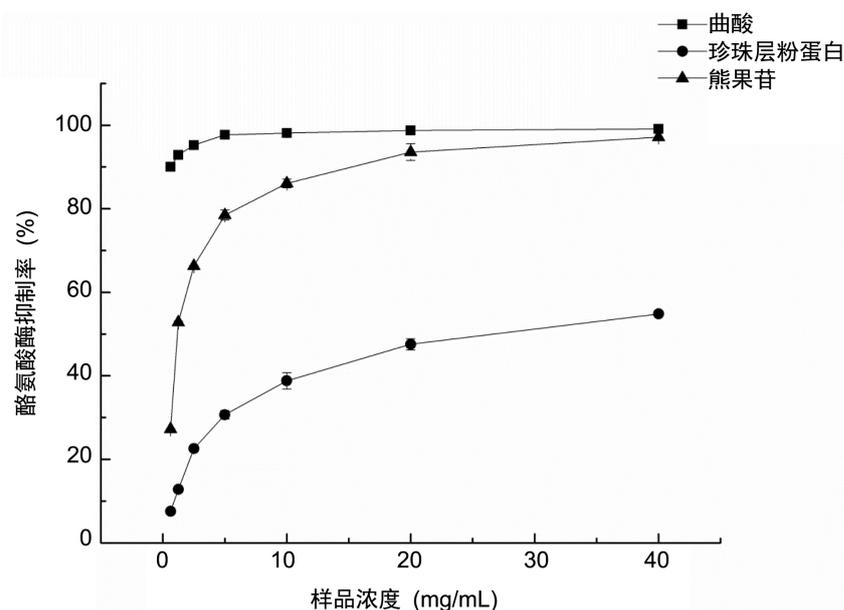
以 L-酪氨酸为底物，在反应体系中分别加入一定量母液浓度为 100 mg/mL 的珍珠层可溶性蛋白质溶液、曲酸溶液及熊果苷溶液，测定它们对酪氨酸酶单酚酶活力的抑制率，实验结果如图 1 所示。可以看出，三者均能抑制蘑菇酪氨酸酶单酚酶的活力，其作用强度从大到小依次为：曲酸、熊果苷、珍珠层可溶性蛋白。样品终浓度呈 0.625、1.25、2.5、5、10、20、40 mg/mL 梯度分布，随着珍珠层可溶性蛋白溶液浓度的增加，它对单酚酶活力的抑制能力就越强。当珍珠层蛋白溶液的浓度小于 0.625 mg/mL 时对酶活力的抑制率较低，不到 10%；当珍珠层蛋白溶液的浓度为 1.25~20 mg/mL 之间时对酶活力的抑制率显著增加，在浓度为 20 mg/mL 时抑制率达到了 47.55%；当珍珠层蛋白溶液的浓度大于 20 mg/mL 后对酶活力的抑制率增加趋势变缓慢，样品浓度为 40 mg/mL 时对酶活的抑制率是 54.80%。珍珠层蛋白溶液的浓度与酶活力抑制率之间存在剂量依赖关系，对其进行回归拟合，得到回归方程为  $Y = 11.719 \ln(x) + 11.816$ ， $R^2 = 0.9974$ ，从方程可以得到，珍珠层可溶性蛋白溶液导致酪氨酸酶单酚酶活力下降 50% 的浓度( $IC_{50}$  值)

**Table 1.** Composition of reagent

**表 1.** 反应体系组成

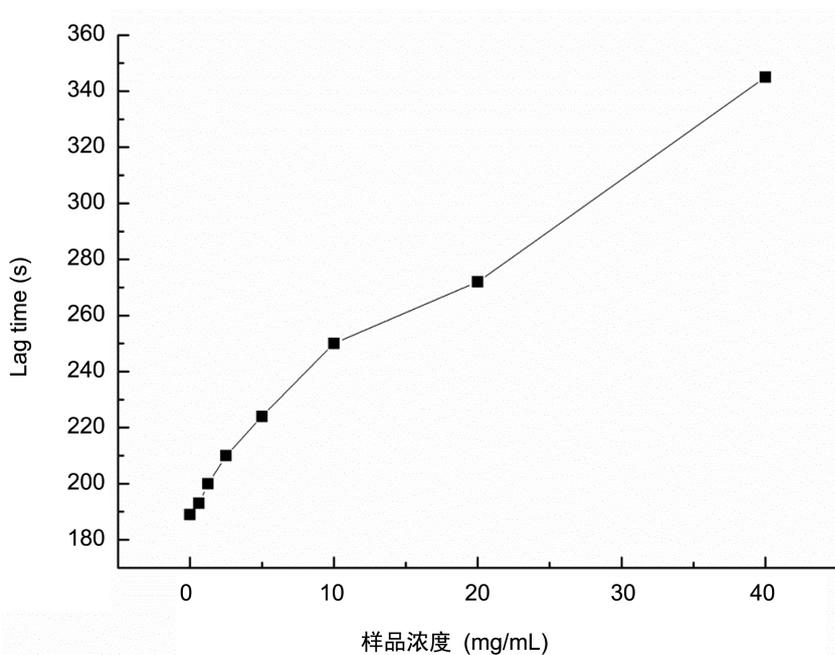
反应液组成	1	2	3	4	5	6	7	8
样品液( $\mu\text{L}$ )	0	1.25	2.5	5	10	20	40	80
酪氨酸酶水溶液( $\mu\text{L}$ )	10	10	10	10	10	10	10	10
磷酸盐缓冲液( $\mu\text{L}$ )	110	108.75	107.5	105	100	90	70	30
充分混匀静置 10 min								
底物溶液( $\mu\text{L}$ )	80	80	80	80	80	80	80	80

为 26.01 mg/mL。相较于空白组的酶反应体系,珍珠层可溶性蛋白质对酪氨酸酶单酚酶活力表现出明显的抑制效果,并且显著延长了酪氨酸酶单酚酶的迟滞时间(见图 2):当测活体系中不含珍珠层可溶性蛋白质时,酶反应的迟滞时间为 189 秒,在 40 mg/mL 的效应物浓度下其迟滞时间增大到 345 秒,延长了将近 1.8 倍。



**Figure 1.** Inhibitory effects of nacre proteins on the monophenolase of mushroom tyrosinase

**图 1.** 珍珠层可溶性蛋白质对酪氨酸酶单酚酶活力的作用



**Figure 2.** Effects of nacre proteins on the lag time of monophenolase of mushroom tyrosinase

**图 2.** 珍珠层可溶性蛋白质对酪氨酸酶单酚酶迟滞时间的影响

### 3.2. 珍珠层可溶性蛋白质对酪氨酸酶二酚酶活力的影响

以 L-多巴为底物, 在反应体系中加入一定量母液浓度为 100 mg/mL 的珍珠层可溶性蛋白质溶液、曲酸溶液及熊果苷溶液, 测定它们对酪氨酸酶二酚酶活力的抑制率, 实验结果如图 3 所示。结果表明, 珍珠层可溶性蛋白质对酪氨酸酶二酚酶活力的抑制作用比曲酸弱, 比熊果苷强。随着珍珠层可溶性蛋白质溶液浓度的增加, 其抑制效果就越明显。当珍珠层蛋白溶液的浓度小于 0.625 mg/mL 时测得的抑制率较低, 不到 20%; 当珍珠层蛋白溶液的浓度为 1.25~20 mg/mL 之间时对酶活力的抑制率显著增加, 当浓度为 20 mg/mL 时抑制率为 52.84%; 当珍珠层蛋白溶液的浓度大于 20 mg/mL 后对酶活力的抑制率增加趋势变缓慢, 当浓度为 40 mg/mL 时对酶活的抑制率为 58.75%。珍珠层蛋白溶液的浓度与酶活力抑制率之间存在剂量依赖关系, 对其进行回归拟合, 得到回归方程为  $Y = 9.1121\ln(x) + 25.544$ ,  $R^2 = 0.9936$ , 从方程可以得到, 珍珠层可溶性蛋白质溶液导致酪氨酸酶二酚酶活力下降 50% 的浓度(IC<sub>50</sub> 值)为 14.64 mg/mL。可以看出, 曲酸对酪氨酸酶单酚酶及二酚酶的活力都具有很强的抑制作用。而  $\alpha$ -熊果苷对单酚酶活力有强有力的抑制作用, 对二酚酶活力几乎没有抑制作用(实验中未检测到 IC<sub>50</sub> 值), 这与刘有停等[17]研究得出的结果相符合。珍珠层可溶性蛋白质溶液对单酚酶及二酚酶活力均有抑制作用, 且对二酚酶酶活力的作用效果稍强于单酚酶。

### 3.3. 珍珠层可溶性蛋白质对酪氨酸酶二酚酶的可逆性分析

在珍珠层可溶性蛋白质作用下, 以酶促反应的初速度与添加的酶量作图得到了一组经原点的直线, 如图 4 所示。改变反应体系中酪氨酸酶的终浓度为 25、50、75、100、125 U/mL, 分别测定珍珠层可溶性蛋白质终浓度为 0、5、10、15、20 mg/mL 时体系中酪氨酸酶的酶活力。图中随着珍珠层可溶性蛋白质浓度不断增加, 直线斜率逐渐降低, 说明珍珠层可溶性蛋白质抑制酪氨酸酶二酚酶的活力是以增加效应物的浓度而不是减少有效酶量起作用[18]。因此, 珍珠层可溶性蛋白质对酪氨酸酶的抑制属于可逆型抑制。

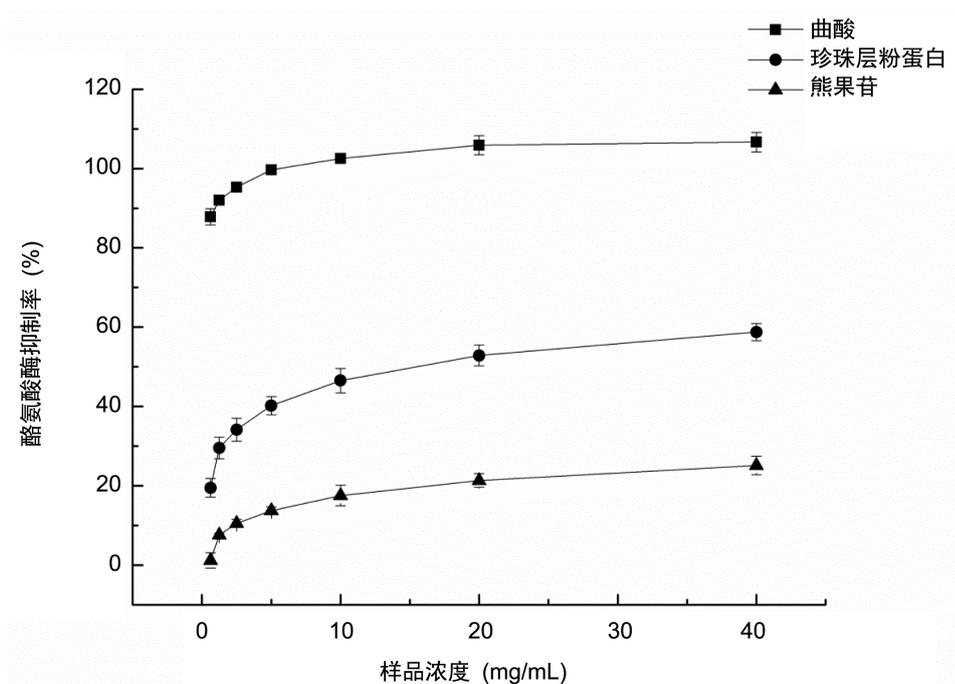
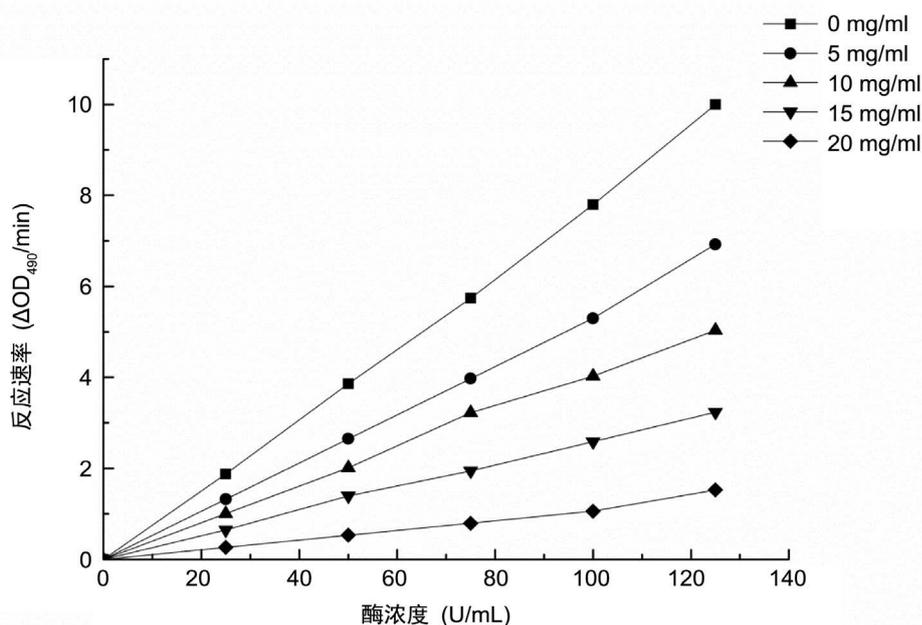


Figure 3. Inhibitory effects of nacre proteins on the diphenolase of mushroom tyrosinase

图 3. 珍珠层可溶性蛋白质对酪氨酸酶二酚酶活力的作用



**Figure 4.** Relationship of the initial reaction rate with the enzyme concentrations under different concentrations of nacre proteins

**图 4.** 不同浓度珍珠层可溶性蛋白质作用下酶反应初速度与酶浓度的关系

### 3.4. 珍珠层可溶性蛋白质对酪氨酸酶二酚酶的抑制动力学

在 200  $\mu\text{L}$  的反应体系中, 固定酶的浓度, 改变底物 L-多巴的浓度, 以酶促反应的初速度与底物浓度之间的关系作图可得到一组双曲线(图略), 这说明在酪氨酸酶的作用下, L-多巴的氧化反应遵循 Michaelis-Menten 动力学方程, 再以 L-多巴浓度的倒数和反应初速度的倒数作 Lineweaver-Burk 双倒数图, 结果如图 5 所示。由图可得, 随着珍珠层可溶性蛋白质溶液浓度的增大, 纵轴截距不变, 斜率增大, 即最大反应初速度( $V_{\max}$ )并不受抑制剂浓度的影响, 米氏常数  $K_m$  值与抑制剂浓度呈正相关, 表明抑制剂浓度增大时, 酶对底物的亲和力在不断下降, 抑制剂的存在阻碍了底物和酶的结合, 增加底物或者增加抑制剂浓度均可干扰对方与酶的结合。由此可判定珍珠层蛋白溶液对酪氨酸酶的抑制作用表现为竞争型抑制。它只能与游离酶(E)结合而不能与酶-底物配合物(ES)结合[19]。其竞争型抑制的动力学方程表示如下:

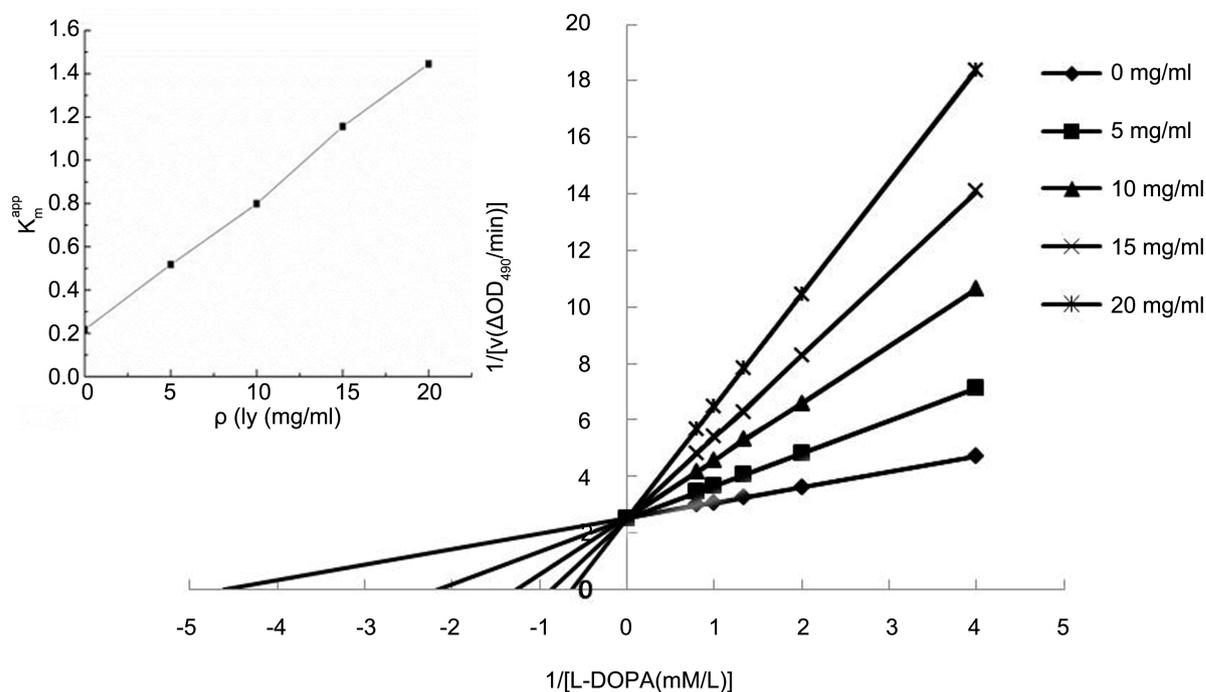
$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \left( \frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{V_{\max}} \quad (1)$$

$$K_m^{app} = \frac{K_m [I]}{K_i} + K_m \quad (2)$$

其中  $V_{\max}$  表示最大催化反应速率,  $v$  为酶促反应速率, 用  $\Delta\text{OD}_{490}/\text{min}$  表示,  $K_i$ 、 $K_m$  和  $K_m^{app}$  分别表示抑制常数、米氏常数和表观米氏常数,  $[I]$  和  $[S]$  分别为体系中珍珠层可溶性蛋白和底物 L-多巴的浓度。根据方程 2 作  $K_m^{app}$  与珍珠层可溶性蛋白浓度  $[I]$  关系图(插图), 图中表现出了良好的线性关系, 表明珍珠层可溶性蛋白质在酪氨酸酶上只有一个或一种单独的抑制位点, 拟合直线, 得到直线斜率为珍珠层可溶性蛋白对二酚酶的抑制常数( $K_i$ )为 3.360 mg/mL (表 2)。

## 4. 结论

本实验研究了珍珠层可溶性蛋白质溶液对酪氨酸酶单酚酶和二酚酶酶活力的抑制效果, 对珍珠层可



**Figure 5.** Lineweaver-Burk plots for inhibition effect of nacre proteins on mushroom tyrosinase for the catalysis of L-DOPA  
**图 5.** 珍珠层可溶性蛋白质对酪氨酸酶抑制作用的 Lineweaver-Burk 双倒数图

**Table 2.** Kinetics parameters of nacre proteins on the mushroom tyrosinase inhibition

**表 2.** 珍珠层可溶性蛋白质对酶活力作用的抑制动力学参数

参数	参数值及抑制类型
$IC_{50}^a/(mg \cdot mL^{-1})$	26.01
$IC_{50}^b/(mg \cdot mL^{-1})$	14.64
$V_{max}/(U \cdot min^{-1})$	0.40
抑制类型	可逆抑制
抑制机理	竞争型抑制
$K_m/(mg \cdot mL^{-1})$	0.21
$K_i/(mg \cdot mL^{-1})$	3.360

注: <sup>a</sup>表示酪氨酸酶单酚酶半抑制浓度; <sup>b</sup>表示酪氨酸酶二酚酶半抑制浓度。

溶性蛋白质对酪氨酸酶二酚酶的抑制类型及抑制机理做出了判断,并测得珍珠层可溶性蛋白质对酪氨酸酶二酚酶作用的米氏常数和抑制常数。珍珠层可溶性蛋白质溶液对酪氨酸酶单酚酶和二酚酶的酶活力都有良好的抑制效果,且样品浓度与酶活力之间存在剂量依赖关系,对两者的半抑制浓度分别为 26.01 mg/mL 和 14.64 mg/mL。珍珠层可溶性蛋白质溶液能显著延长酪氨酸酶单酚酶催化反应的迟滞时间,空白组反应体系的迟滞时间为 189 秒,在 40 mg/mL 的效应物浓度下其迟滞时间增大到 345 秒,延长了将近 1.8 倍。珍珠层可溶性蛋白质对酪氨酸酶二酚酶的作用类型为可逆抑制,机理为竞争型抑制,米氏常数  $K_m$  和抑制常数分别为 0.21 mg/mL 和 3.360 mg/mL。实验结果表明,珍珠层可溶性蛋白质是一种颇具市场潜力的酪氨酸酶抑制剂,可以作为生物活性成分添加至美白化妆品中,具有非常广阔的应用前景及市场价值。

## 基金项目

浙江省公益性科技计划项目(2016C32059)及国家国际合作港澳台专项(2015DFT30060)。

## 参考文献 (References)

- [1] 邹先伟, 蒋志胜. 植物源酪氨酸酶抑制剂研究进展[J]. 中草药, 2004, 35(6): 702-705.
- [2] 陈清西, 林建峰, 宋康康. 酪氨酸酶抑制剂的研究进展[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2007, 46(2): 274-282.
- [3] Wang, S.D., Luo, W.C., Xu, S.J., *et al.* (2005) Inhibitory Effects of 4-Dodecylresorcinol on the Phenoloxidase of the Diamondback Moth *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera Plutellidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **82**, 52-58. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2004.12.005>
- [4] Prezioso, J.A., Epperly, M.W., Wang, N., *et al.* (1992) Effects of Tyrosinase Activity on the Cytotoxicity of 4-S-Cysteaminyphenol and N-Acetyl-4-S-cysteaminyphenol in Melanoma Cells. *Cancer Letters*, **63**, 73-79. [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(92\)90092-A](https://doi.org/10.1016/0304-3835(92)90092-A)
- [5] 石嘉怿. 青梅花提取物的酪氨酸酶抑制作用及机理研究[J]. 食品工业科技, 2011(10): 205-207.
- [6] 熊雄, 单连海. 天然植物酪氨酸酶活性抑制剂研究进展[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(13): 3777-3777.
- [7] Gholamhoseinian, A. and Razmi, Z. (2012) Screening the Methanolic Extracts of Some Plants for Tyrosinase Inhibitory Activity. *Toxicological & Environmental Chemistry*, **94**, 310-318. <https://doi.org/10.1080/02772248.2011.644794>
- [8] Park, S.H., Oh, T.H., Kim, S.S., *et al.* (2012) Constituents with Tyrosinase Inhibitory Activities from Branches of *Ficus erecta* var. *sieboldii* King. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **27**, 390-394. <https://doi.org/10.3109/14756366.2011.593033>
- [9] 万玉萍, 孙灿, 王建华, 等. 1997~2007 云南省市售护肤类化妆品中氢醌, 苯酚监督及检测结果分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(8): 1599-1600.
- [10] 杨艳伟, 朱英. 化妆品中常用的美白祛斑成分及其检测方法研究进展[J]. 环境与健康杂志, 2010(8): 745-748.
- [11] Germanas, J.P., Wang, S., Miner, A., *et al.* (2007) Discovery of Small-Molecule Inhibitors of Tyrosinase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **17**, 6871-6875. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.10.014>
- [12] Jang, M.S., Park, H.Y. and Nam, K.H. (2014) Whitening Effects of 4-Hydroxyphenethyl Alcohol Isolated from Water Boiled with *Hizikia fusiformis*. *Food Science and Biotechnology*, **23**, 555-560. <https://doi.org/10.1007/s10068-014-0076-6>
- [13] Chen, Q.X. and Kubo, I. (2002) Kinetics of Mushroom Tyrosinase Inhibition by Quercetin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 4108-4112. <https://doi.org/10.1021/jf011378z>
- [14] Chen, Y.R., Chiou, R.Y.Y., Lin, T.Y., *et al.* (2009) Identification of an Alkylhydroquinone from *Rhus succedanea* as an Inhibitor of Tyrosinase and Melanogenesis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, 2200-2205. <https://doi.org/10.1021/jf802617a>
- [15] Shi, Y., Chen, Q.X., Wang, Q., *et al.* (2005) Inhibitory Effects of Cinnamic Acid and Its Derivatives on the Diphenolase Activity of Mushroom (*Agaricus bisporus*) Tyrosinase. *Food Chemistry*, **92**, 707-712. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.08.031>
- [16] Robert, C., Rouch, C. and Cadet, F. (1997) Inhibition of Palmito (*Acanthophoenix rubra*) Polyphenol Oxidase by Carboxylic Acids. *Food Chemistry*, **59**, 355-360. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(96\)00179-3](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(96)00179-3)
- [17] 刘有停.  $\alpha$ -熊果苷美白动力学机制及其配伍性和稳定性的研究[D]: [硕士学位论文]. 北京: 北京化工大学, 2012.
- [18] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002.
- [19] 张麦茹, 樊金玲, 朱文学, 等. 胀果甘草提取物对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用[J]. 应用化学, 2012, 29(8): 898-905.

**知网检索的两种方式：**

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>  
下拉列表框选择：[ISSN]，输入期刊 ISSN：2327-0810，即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>  
左侧“国际文献总库”进入，输入文章标题，即可查询

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：[amb@hanspub.org](mailto:amb@hanspub.org)