

肉桂醛对酪氨酸酶的竞争性抑制及相互作用机制

李金颖¹, 刘梦月¹, 李文琦¹, 刘正午¹, 何锋¹, 梁东武^{1,2*}

(1. 广西大学轻工与食品工程学院, 广西南宁 530004)

(2. 广西大学广西清洁化制浆造纸与污染控制重点实验室, 广西南宁 530004)

摘要: 酪氨酸酶 (Tyrosinase, TYR) 是食品酶促褐变过程中的关键限速酶, 开发来源天然且机制明确的酪氨酸酶抑制剂对食品保鲜具有重要意义。为了明确肉桂醛 (Cinnamaldehyde, CA) 对酪氨酸酶的抑制作用及分子机制, 本研究以左旋多巴 (L-3,4-Dihydroxyphenylalanine, L-DOPA) 为底物开展分析。采用酶活测定、抑制动力学、荧光光谱分析、热力学分析、分子对接及 Cu^{2+} 干预实验, 分析肉桂醛对酪氨酸酶活性、结合行为和构象变化的影响。肉桂醛对酪氨酸酶活性具有浓度依赖性抑制作用, 半抑制浓度 (IC_{50}) 为 0.37 mg mL^{-1} , 抑制常数为 $20.02 \text{ mmol L}^{-1}$, 抑制类型为可逆竞争性抑制。荧光分析表明, 肉桂醛通过静态猝灭方式与酪氨酸酶形成稳定复合物, 并改变 Tyr 和 Trp 残基周围微环境; 热力学分析表明, 疏水作用可能是肉桂醛与酪氨酸酶结合的主要驱动力; 分子对接模拟显示, 肉桂醛可进入或靠近酪氨酸酶活性空腔, 并与 His263、Phe264、Val283 等残基发生相互作用。 Cu^{2+} 干预实验显示, 随着外源 Cu^{2+} 摩尔浓度升高, 肉桂醛对酪氨酸酶的抑制率由 55.91% 降至约 16.00%。肉桂醛可通过竞争性干扰底物结合, 并改变 Tyr 和 Trp 残基周围微环境, 从而降低酪氨酸酶活性; Cu^{2+} 干预实验提示, 该作用可能与酪氨酸酶活性中心附近的铜相关过程有关。该研究可为肉桂醛作为天然抗褐变活性因子的开发提供理论依据。

关键词: 肉桂醛; 酪氨酸酶; 酶促褐变; 竞争性抑制; 荧光猝灭; 分子对接

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2027.8.1021

Competitive Inhibition of Tyrosinase by Cinnamaldehyde and Its Interaction Mechanism

LI Jinying¹, LIU Mengyue¹, LI Wenqi¹, LIU Zhengwu¹, HE Feng¹, LIANG Dongwu^{1,2*}

(1.School of Light Industry and Food Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China) (2.Guangxi Key Laboratory of Clean Pulp & Papermaking and Pollution Control, Guangxi University, Nanning 530004, China)

Abstract: Tyrosinase (TYR) is a key rate-limiting enzyme involved in enzymatic browning in foods, and natural TYR inhibitors with clear mechanisms are important for food preservation. To clarify the inhibitory effect and molecular mechanism of cinnamaldehyde (CA) against TYR, L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) was used as the substrate in this study. Enzyme activity assay, inhibition kinetics, fluorescence spectroscopic analysis, thermodynamic analysis, molecular docking, and Cu^{2+} intervention experiments were performed to evaluate the effects of CA on TYR activity, binding behavior, and conformational changes. CA inhibited TYR activity in a concentration-dependent manner, with an IC_{50} value of 0.37 mg mL^{-1} and an inhibition constant K_i of $20.02 \text{ mmol L}^{-1}$. The inhibition type was identified as reversible competitive inhibition. Fluorescence analysis showed that a stable CA-TYR complex was formed mainly through static quenching, accompanied by changes in the microenvironment around Tyr and Trp residues. Thermodynamic analysis indicated that hydrophobic interaction might be the main driving force for cinnamaldehyde-tyrosinase binding. Molecular docking simulation suggested that cinnamaldehyde could enter or approach the active cavity of tyrosinase and interact with residues including His263, Phe264, and Val283. Cu^{2+} intervention experiments showed that, with increasing external Cu^{2+} molar concentration, the inhibition rate of CA against TYR decreased from 55.91% to approximately 16.00%. CA could reduce TYR activity by competitively interfering with substrate binding and altering the microenvironment around Tyr and Trp residues. The Cu^{2+} intervention results further suggested that this inhibitory effect might be associated with copper-related processes near the active center of TYR. This study provides a theoretical basis for the development of CA as a natural antibrowning active compound.

Key Words: cinnamaldehyde; tyrosinase; enzymatic browning; competitive inhibition; fluorescence quenching; molecular docking

收稿日期: 2026-07-08; 修回日期: 2026-08-16; 接受日期: 2026-08-18

基金项目: 广西重点研发计划项目 (桂科 AB24010329)

作者简介: 李金颖 (2002-), 女, 硕士, 研究方向: 食品冷冻保鲜包装、天然活性物质开发, E-mail: 3526798936@qq.com

通讯作者: 梁东武 (1981-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 食品加工及储藏保鲜新材料与技术, E-mail: liangdongwu@gxu.edu.cn

多酚氧化酶 (Polyphenol Oxidase, PPO) 是食品酶促褐变过程中的重要氧化酶类, 主要催化酚类底物氧化生成醌类物质, 并进一步聚合形成褐色色素^[1]。酪氨酸酶 (Tyrosinase, TYR) 是一类含铜金属酶, 广泛存在于植物、动物和微生物中, 在黑色素合成和食品酶促褐变过程中发挥关键作用^[2]。在食品体系中, 果蔬等组织受到机械损伤或贮藏环境变化后, 细胞结构被破坏, 酚类底物与酪氨酸酶接触并被催化氧化生成醌类物质, 随后进一步聚合形成褐色色素^[3], 导致产品色泽劣变、营养价值下降和商品价值降低^[4,5]。已有研究表明, 酪氨酸酶或多酚氧化酶活性升高是鲜切果蔬褐变加剧的重要原因之一, 控制酪氨酸酶活性可有效延缓褐变进程。因此, 开发安全、高效、来源天然的酪氨酸酶抑制剂, 是食品保鲜和抗褐变调控领域的重要研究方向^[6,7]。

目前曲酸、熊果苷、对苯二酚及部分酚类化合物等已被用于酪氨酸酶抑制剂研究, 但部分抑制剂在稳定性、安全性或实际应用方面仍存在一定局限^[8]。因此, 具有天然来源、多重生物活性且作用机制明确的小分子化合物受到关注^[9]。肉桂醛 (Cinnamaldehyde, CA) 是肉桂精油中的主要活性成分, 具有明确的小分子结构和较好的脂溶性, 且已有研究报道其具有抑菌、抗氧化和酪氨酸酶抑制活性^[10]。与单一抑酶剂相比, 肉桂醛的潜在优势在于其可能同时参与微生物控制、氧化调节和酶促褐变抑制等过程。然而, 肉桂醛具有挥发性和特征性气味, 其实际应用仍受食品基质、剂量和感官接受度限制。因此, 有必要在体外模式酶体系中进一步明确其与酪氨酸酶的相互作用方式及抑制机制, 为后续食品体系应用评价提供依据。

已有研究对肉桂精油及肉桂醛的酪氨酸酶抑制活性进行了报道。Chang 等^[11]研究了桂皮精油的化学组成及其对蘑菇酪氨酸酶的抑制活性, 并对 Trans-cinnamaldehyde 的抑制类型和抑制常数进行了分析; 路露等^[12]比较了肉桂精油和肉桂醛的抑菌、抗氧化及酪氨酸酶抑制活性, 表明肉桂醛对酪氨酸酶具有抑制潜力。上述研究为肉桂醛作为天然酪氨酸酶抑制剂候选物提供了基础, 但已有报道多侧重于酶活评价、抑制类型或生物活性比较, 对肉桂醛与酪氨酸酶结合过程中荧光猝灭类型、芳香族氨基酸残基微环境变化、结合热力学特征以及外源 Cu^{2+} 干预下抑制效果变化的系统关联分析仍有进一步补充空间。但是, 目前关于肉桂醛抑制酪氨酸酶的研究多集中于酶活性评价, 对其抑制类型、结合行为及构象影响的系统阐释仍相对不足^[13]。特别是肉桂醛是否通过可逆竞争性方式作用于酪氨酸酶, 是否能够改变酶蛋白中芳香族氨基酸残基周围微环境, 以及其抑制作用是否与酪氨酸酶含铜活性中心相关, 仍需进一步明确^[14]。酪氨酸酶活性中心含有双核铜结构, 外源 Cu^{2+} 对抑制剂作用效果的影响可为判断其是否干扰铜相关催化过程提供间接依据。基于此, 本研究以 L-多巴 (L-3,4-Dihydroxyphenylalanine, L-DOPA) 为底物, 结合酶活抑制、抑制动力学、荧光光谱、同步荧光、三维荧光、热力学分析、分子对接及 Cu^{2+} 干预实验, 系统解析肉桂醛对酪氨酸酶的抑制作用及分子机制, 以期天然酪氨酸酶抑制剂的开发及食品酶促褐变控制提供理论依据^[15]。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

肉桂醛 (Cinnamaldehyde, CA, 纯度 $\geq 98\%$)、L-多巴 (L-3,4-Dihydroxyphenylalanine, L-DOPA, 纯度 $\geq 99\%$), 上海麦克林生化科技有限公司; 酪氨酸酶 (tyrosinase, TYR, 酶活力 $\geq 500 \text{ U/mg}$), 北京索莱宝科技有限公司; 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO, 分析纯), 天津市致远化学试剂有限公司; 磷酸盐缓冲液, 广州和为医药科技有限公司; 曲酸, 上海麦克林生化科技有限公司。实验用水为去离子水。

1.2 仪器与设备

Infinite E Plex 多功能酶标仪, 帝肯奥地利有限公司; HH-8 恒温水浴锅, 上海力辰邦西仪器科技有限公司; F-4500 荧光分光光度计, 日立高新技术公司; ME204E 电子天平, 梅特勒-托利多仪器有限公司; PHS-3C pH 计, 上海仪电科学仪器股份有限公司。

1.3 肉桂醛对酪氨酸酶抑制活性的测定

参考 Matsuura 等^[16]的方法略作改动, 以 L-DOPA 为底物测定酪氨酸酶活性。肉桂醛用 DMSO 溶解后, 肉桂醛与曲酸质量浓度梯度均设为 0、0.10、0.20、0.40、0.80、1.60 和 3.20 mg mL^{-1} 。以 0.02 mol L^{-1} 、pH 值 7.00 的磷酸盐缓冲液稀释至所需质量浓度, 并保证各反应体系中 DMSO 含量一致。反应体系中加入 2.80 mL L-DOPA 溶液,

其摩尔浓度为 0.50 mmol L^{-1} , 于 30°C 水浴预热 10 min 后, 加入 0.10 mL 肉桂醛溶液和 0.10 mL 酪氨酸酶溶液, 其中酪氨酸酶质量浓度为 0.20 mg mL^{-1} , 混匀后立即在 475 nm 处连续测定吸光度变化。以反应初始线性阶段的斜率表示酪氨酸酶催化反应速率。以 DMSO 处理组为阴性对照, 曲酸为阳性对照, 计算肉桂醛对酪氨酸酶的相对残留活性和半抑制浓度 (IC_{50})。肉桂醛的抑制效果用相对残留活性 (R) 来表示^[17], 具体如下:

$$R = \frac{A}{A_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

R ——相对残留活性, %;

A ——肉桂醛处理组在 475 nm 下初始线性阶段吸光度变化斜率;

A_0 ——空白对照组初始线性阶段吸光度变化斜率。

肉桂醛的抑制率用 I 表示, 具体如下:

$$I = \left(1 - \frac{V_i}{V_0}\right) \times 100\% \quad (2)$$

式中:

I ——抑制率, %;

V_i ——抑制剂处理组初始反应速率;

V_0 ——对照组初始反应速率。

1.4 酶抑制动力学分析

通过改变酪氨酸酶浓度并固定 L-DOPA 浓度, 分析肉桂醛对酪氨酸酶抑制作用的可逆性。分别在不同肉桂醛浓度下测定酪氨酸酶催化 L-DOPA 氧化的初始反应速率, 以酪氨酸酶质量浓度为横坐标、反应速率为纵坐标作图, 根据直线交点和斜率变化判断肉桂醛对酪氨酸酶的抑制是否可逆。

采用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法分析肉桂醛对酪氨酸酶的抑制类型。固定酪氨酸酶质量浓度, 改变 L-DOPA 质量浓度, 在不同肉桂醛质量浓度下测定初始反应速率, 以 $1/[S]$ 为横坐标、 $1/V$ 为纵坐标作图, 判断肉桂醛的抑制类型, 并根据二次作图计算抑制常数 K_i 。

1.5 荧光猝灭与结合参数分析

根据 Yu 等^[18]的方法进行实验并略作改动。取 2.00 mL 酪氨酸酶溶液 (0.20 mg mL^{-1}), 分别加入不同质量浓度肉桂醛, 混匀后静置 3 min , 在 298 、 304 和 310 K 条件下测定荧光光谱, 该酪氨酸酶质量浓度下荧光信号较稳定, 未出现明显信号饱和, 可满足后续荧光猝灭分析需要。激发波长设为 280 nm , 激发和发射狭缝宽度均为 5 nm , 扫描范围为 $290 \sim 450 \text{ nm}$, 扫描速率为 1200 nm min^{-1} 。

根据 Stern-Volmer 方程计算猝灭常数 K_{SV} 和猝灭速率常数 K_q , 并判断肉桂醛对酪氨酸酶的荧光猝灭类型。当猝灭类型为静态猝灭时, 采用双对数方程计算肉桂醛与酪氨酸酶的表现结合常数 K_a 和结合位点数 n 。进一步根据 van't Hoff^[19]方程计算焓变 (ΔH°)、熵变 (ΔS°) 和吉布斯自由能变 (ΔG°), 分析肉桂醛与酪氨酸酶结合的主要作用力。 ΔH° 、 ΔS° 和 ΔG° 的计算公式如下:

$$\ln \frac{K_{a2}}{K_{a1}} = -\ln \frac{K_{a2}}{K_{a1}} = \frac{\Delta H^\circ}{R} \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right) \quad (3)$$

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_a = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (4)$$

式中:

K_{a1} 和 K_{a2} ——温度 T_1 和 T_2 下肉桂醛与酪氨酸酶的表现结合常数, L mol^{-1} ;

ΔH° ——焓变, kJ mol^{-1} ;

R ——气体常数, $8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$;

T ——热力学温度, K;

ΔG° ——吉布斯自由能变, kJ mol^{-1} ;

ΔS° ——熵变, $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ 。

1.6 同步荧光与三维荧光分析

根据 Chen 等^[19]的方法进行实验, 分别设定激发波长与发射波长间隔 $\Delta\lambda$ 为 15 nm 和 60 nm, 在 240~340 nm 范围内扫描, 激发和发射狭缝宽度均为 5 nm, 其余条件同 1.5 节实验。通过比较不同肉桂醛质量浓度下 Tyr 和 Trp 残基的峰位和荧光强度变化, 分析肉桂醛对酪氨酸酶芳香族氨基酸残基微环境的影响。

采用 Chen 等^[20]的方法, 采用三维荧光光谱进一步分析肉桂醛对酪氨酸酶构象的影响。激发波长范围为 220~340 nm, 发射波长范围为 240~400 nm, 波长间隔为 2 nm, 激发和发射狭缝宽度均为 5 nm, 扫描速率为 $1\ 200\ \text{nm min}^{-1}$ 。通过比较酪氨酸酶和肉桂醛-酪氨酸酶体系中特征峰位置及强度变化, 分析肉桂醛对酪氨酸酶构象的影响。

1.7 分子对接

酪氨酸酶的蛋白质结构(PDB ID:2y9w)是从 PDB 数据库(<https://www.rcsb.org/>)中检索获得。首先采用 PyMOL 软件对受体蛋白进行预处理, 去除水分子及与对接无关的配体分子, 并保留与活性中心构象相关的关键结构信息。随后采用 AutoDock Tools 1.5.6 软件对酪氨酸酶添加氢原子和电荷, 并将处理后的受体蛋白保存为 pdbqt 格式。肉桂醛的分子结构从 PubChem 数据库下载, 以 sdf 格式保存后, 采用 PyMOL 软件转换为 pdb 格式。随后采用 AutoDock Tools 1.5.6 软件对肉桂醛添加氢原子和电荷, 并定义可旋转键, 将处理后的配体分子保存为 pdbqt 格式。使用 AutoDock Vina 1.1.2 软件进行分子对接。根据酪氨酸酶预测结合位点设置对接盒参数, 对接盒中心坐标设为 $x=26.90$ 、 $y=47.94$ 、 $z=34.35$, 网格点数设为 $40\times40\times40$, 网格间距为 0.375 Å, 对应对接盒尺寸约为 $15.00\ \text{Å}\times15.00\ \text{Å}\times15.00\ \text{Å}$ 。对接完成后, 选择结合自由能最低的构象作为代表性结合构象, 并采用 PyMOL 和 LigPlot 对肉桂醛与酪氨酸酶的相互作用模式进行可视化分析。

1.8 Cu^{2+} 对肉桂醛抑制酪氨酸酶活性影响的测定

以 L-DOPA 为底物, 反应体系及测定条件参照 1.3 节进行。根据肉桂醛对酪氨酸酶的浓度依赖性抑制曲线, $0.20\ \text{mg mL}^{-1}$ 肉桂醛可产生一定抑制效果, 且未使酪氨酸酶活性降至过低水平, 便于观察外源 Cu^{2+} 干预后抑制率的变化, 因此肉桂醛质量浓度确定为 $0.20\ \text{mg mL}^{-1}$, Cu^{2+} 以 CuSO_4 溶液形式加入, 摩尔浓度分别设为 0.05、0.10 和 $0.20\ \text{mmol L}^{-1}$ 。实验设置 DMSO 对照组、肉桂醛单独处理组、 Cu^{2+} 单独处理组及肉桂醛- Cu^{2+} 复合处理组, 各反应体系中 DMSO 含量保持一致。

各组溶液混匀后于 $30\ ^\circ\text{C}$ 预热 10 min, 加入酪氨酸酶溶液启动反应, 立即在 475 nm 处连续测定吸光度变化。为排除 L-DOPA 自氧化及 Cu^{2+} 可能引起的非酶促氧化干扰, 同时设置不加酪氨酸酶的无酶背景组, 并在数据处理中扣除相应背景值。以反应初始线性阶段吸光度变化斜率表示初始反应速率, 根据式 (2) 计算不同处理组对酪氨酸酶的抑制率。

1.9 数据处理与统计分析

所有实验至少重复 3 次, 结果以平均值 $\pm$ 标准差表示。采用 Origin 软件进行数据处理和作图。采用 SPSS 软件进行单因素方差分析, 使用 Tukey HSD 法进行多重比较, $P<0.05$ 表示差异显著。

2 结果与讨论

2.1 肉桂醛对酪氨酸酶的浓度依赖性抑制作用

半抑制浓度 (IC_{50}) 是评价酶抑制剂活性强弱的重要指标。本研究以 L-DOPA 为底物、曲酸为阳性对照, 测定不同浓度肉桂醛对酪氨酸酶活性的影响, 结果见图 1。随着肉桂醛浓度升高, 酪氨酸酶相对活性整体降低, 说明肉桂醛对酪氨酸酶具有浓度依赖性抑制作用。当肉桂醛质量浓度继续升高后, 酪氨酸酶相对活性下降幅度逐渐

减小,提示其抑制效果趋于平缓。由图1计算,肉桂醛的 IC_{50} 为 0.37 mg mL^{-1} ,略高于曲酸的 0.30 mg mL^{-1} ,说明肉桂醛的抑制能力弱于曲酸,以曲酸为参照,肉桂醛的 IC_{50} 约高23.33%,但仍表现出明显的酪氨酸酶抑制活性。已有研究也报道了肉桂精油及肉桂醛对蘑菇酪氨酸酶的抑制活性,但不同研究中的 IC_{50} 数值可能受酶来源、底物类型、反应条件和抑制率计算方式影响^[11,12],因而不宜直接简单比较。本节结果表明肉桂醛在蘑菇酪氨酸酶-L-DOPA体系中具有一定抑制活性,可为后续抑制动力学和荧光光谱分析提供基础。

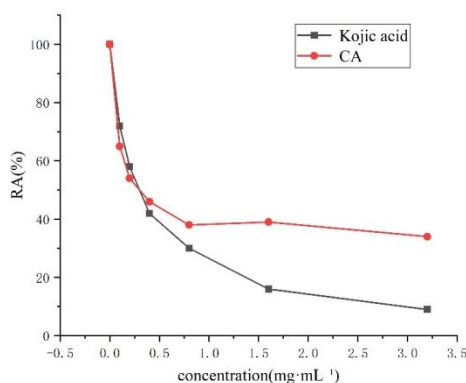


图1 曲酸和肉桂醛对酪氨酸酶活性的浓度依赖性抑制作用

Fig.1 Concentration-dependent inhibitory effects of kojic acid and CA on TYR activity

2.2 肉桂醛对酪氨酸酶的可逆竞争性抑制作用

为明确肉桂醛对酪氨酸酶的抑制方式,首先通过可逆性分析解释不同肉桂醛质量浓度下酪氨酸酶浓度与初始反应速率之间的关系。由图2数据可以看出,各处理组拟合直线基本经过原点,且斜率随肉桂醛质量浓度的增加而降低,说明肉桂醛的加入降低了单位酶量对应的催化反应速率,但未使酪氨酸酶发生明显不可逆失活。肉桂醛对酪氨酸酶的抑制作用主要表现为可逆抑制,可能通过与酪氨酸酶发生可逆结合而降低其催化效率。已有研究报道肉桂醛及其衍生物可对蘑菇酪氨酸酶产生可逆抑制作用,该结果与相关动力学报道相互印证,但具体抑制强度和作用方式仍可能受底物类型、酶来源及反应条件影响^[21-23]。

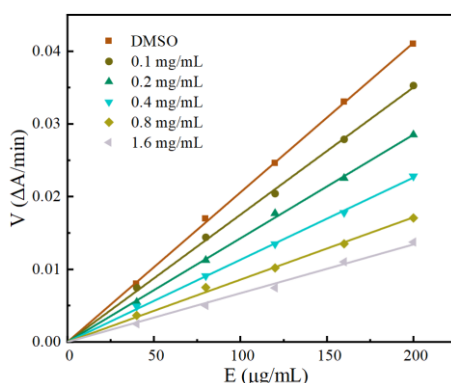


图2 不同肉桂醛质量浓度下酪氨酸酶质量浓度与初始反应速率的关系

Fig.2 Relationship between TYR mass concentration and initial reaction rate at different CA mass concentrations

在图2基础上,采用Lineweaver-Burk双倒数作图法分析肉桂醛的抑制类型,该方法已被广泛用于天然小分子对酪氨酸酶抑制类型及抑制常数的分析^[18]。竞争性抑制剂的Lineweaver-Burk曲线通常表现为各拟合直线在纵轴附近相交,即最大反应速率 V_{max} 基本不变,而米氏常数 K_m 随抑制剂浓度升高而增大。由图3A可知,不同肉桂醛摩尔浓度下所得拟合直线在纵轴附近相交,随着肉桂醛浓度的增加,这组直线的纵轴截距保持不变,而横轴截距逐渐增加。这表明肉桂醛属于竞争性抑制剂,即肉桂醛可能直接与底物竞争结合酪氨酸酶的活性中心,阻碍了酶与底物的结合。

对于竞争性抑制,其动力学方程如下:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \left(1 + \frac{c_i}{K_I} \right) \frac{1}{c_s} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (5)$$

式中:

V ——初始反应速率, $\Delta A \cdot \min^{-1}$;

c_s ——底物浓度, mmol L^{-1} ;

c_i ——抑制剂浓度, mmol L^{-1} ;

K_m ——米氏常数, mmol L^{-1} ;

$V_{\max}$ ——最大反应速率, $\Delta A \cdot \min^{-1}$;

K_I ——抑制常数, mmol L^{-1} 。

由式(5)可知, Lineweaver-Burk 曲线斜率 a 与抑制剂肉桂醛摩尔浓度 c_i 之间的关系为:

$$a = \frac{K_m}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max} K_I} c_i \quad (6)$$

式中:

a ——Lineweaver-Burk 双倒数曲线斜率; 其余符号含义同式(5)。

对 Lineweaver-Burk 曲线斜率与肉桂醛浓度进行二次作图, 结果见图 3B。斜率与肉桂醛浓度之间呈线性关系, 拟合决定系数为 $R^2=0.88$, 说明该动力学数据可用于竞争性抑制模型下抑制常数的计算。根据式(6)计算得到肉桂醛的抑制常数 K_I 为 $20.02 \text{ mmol L}^{-1}$ 。IC₅₀ 用于表征特定实验条件下抑制剂使酶活性降低 50% 所需的质量浓度, 而 K_I 为动力学分析得到的抑制常数, 计算时采用抑制剂摩尔浓度表示。二者含义和计算方法不同, 因此本文分别采用 mg mL^{-1} 和 mmol L^{-1} 表示。已有研究报道, 肉桂醛及其衍生物可对蘑菇酪氨酸酶产生竞争性或混合型抑制作用, 具体抑制类型与取代基结构、底物种类及反应体系有关。本文结果表明, 在蘑菇酪氨酸酶-L-DOPA 体系中, 肉桂醛主要表现为可逆竞争性抑制, 为后续分析其酪氨酸酶的结合行为和活性空腔相互作用提供了动力学依据^[21,22]。

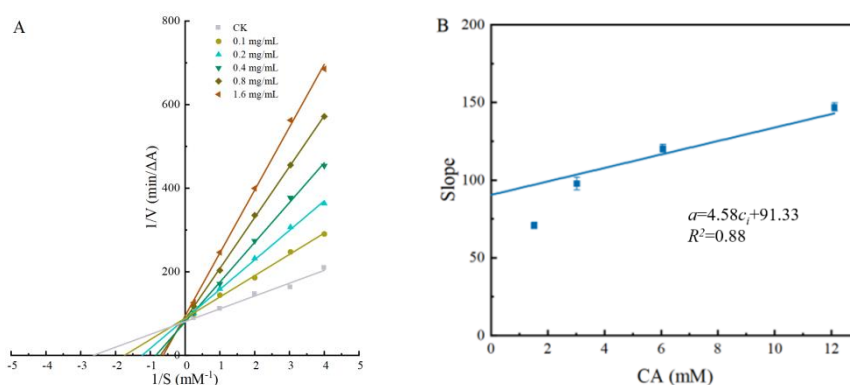


图 3 (A) 不同浓度肉桂醛对酪氨酸酶抑制的 Lineweaver-Burk 双倒数曲线; (B) Lineweaver-Burk 双倒数曲线斜率与肉桂醛摩尔浓度的关系

Fig.3 (A) Lineweaver-Burk double reciprocal curve of TYR inhibition by different concentrations of CA; (B) relationship between the slope of Lineweaver-Burk plots and cinnamaldehyde molar concentration

2.3 肉桂醛对酪氨酸酶内源荧光的猝灭作用及结合行为

酪氨酸酶分子中 Trp 和 Tyr 等芳香族氨基酸残基可产生内源荧光, 其荧光强度和最大发射波长对周围微环境变化较为敏感^[23]。因此, 稳态荧光光谱常用于分析小分子与蛋白质之间的相互作用^[24]。本研究在 298、304 和 310 K 条件下测定不同肉桂醛摩尔浓度对酪氨酸酶内源荧光的影响, 结果见图 4。

由图 4 可知, 酪氨酸酶在 336 nm 附近出现明显荧光发射峰, 而肉桂醛单独溶液的荧光信号较弱, 对酪氨酸酶荧光测定干扰较小。随着肉桂醛摩尔浓度升高, 酪氨酸酶的荧光强度逐渐降低, 说明肉桂醛可猝灭酪氨酸酶的内源荧光, 二者之间发生了相互作用。同时, 酪氨酸酶的最大发射波长由 338.60 nm 红移至 342.80 nm, 说明肉桂

醛的加入改变了酪氨酸酶中芳香族氨基酸残基周围的微环境，可能使相关区域极性增加或疏水性降低，表明肉桂醛与酪氨酸酶结合后可能诱导酶蛋白构象发生变化。已有关于天然小分子抑制酪氨酸酶的研究也表明，抑制剂与酪氨酸酶结合后常伴随 Trp 或 Tyr 残基荧光强度降低和峰位变化，但具体变化方向与幅度会受到结合位置、分子结构及蛋白构象响应差异的影响。因此，图 4 结果可作为肉桂醛与酪氨酸酶发生相互作用的光谱结果，但仍需结合 Stern-Volmer 分析进一步判断其猝灭类型。

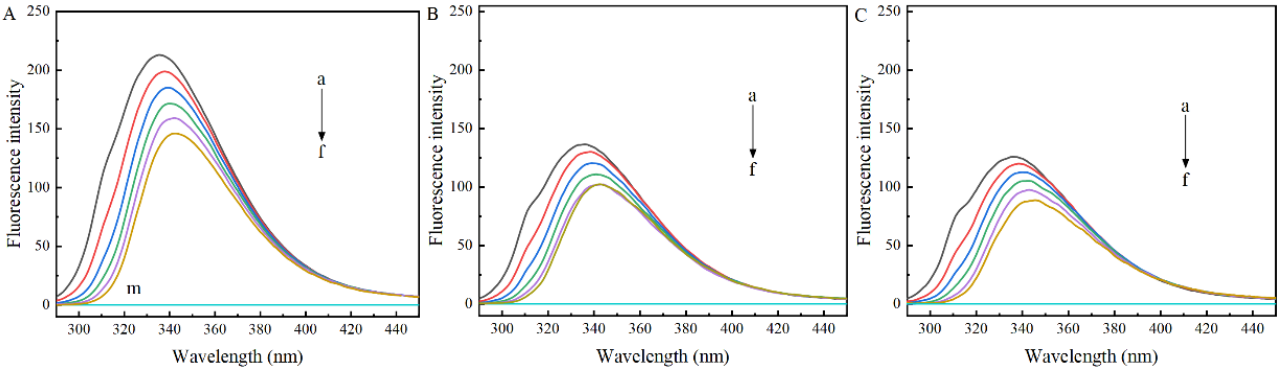


图 4 不同温度下肉桂醛对酪氨酸酶内源荧光的猝灭作用

Fig.4 Fluorescence quenching of intrinsic TYR fluorescence by CA at different temperatures

注：A：298 K；B：304 K；C：310 K。曲线 a~f 分别表示肉桂醛摩尔浓度为 0、0.06、0.12、0.18、0.24 和 0.30 mmol L⁻¹。

为进一步判断肉桂醛对酪氨酸酶的荧光猝灭类型，采用 Stern-Volmer 方程^[25]对不同温度下的荧光数据进行分析，结果见图 5。

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 c_q = 1 + K_{SV} c_q \tag{7}$$

式中：

- F_0 ——未添加肉桂醛时酪氨酸酶的荧光强度；
- F ——添加肉桂醛后酪氨酸酶的荧光强度；
- K_q ——荧光猝灭速率常数，L mol⁻¹ s⁻¹；
- τ_0 ——无猝灭剂时生物大分子的荧光平均寿命，通常取 1.00×10⁻⁸ s；
- c_q ——猝灭剂摩尔浓度，mol L⁻¹；
- K_{SV} ——动态猝灭常数，L mol⁻¹。

由图 5 可知，在所测摩尔浓度范围内， F_0/F 与肉桂醛摩尔浓度呈良好的线性关系，说明肉桂醛对酪氨酸酶的荧光猝灭过程较为单一。根据 Stern-Volmer 方程计算得出，肉桂醛在 298、304 和 310 K 下的 K_{SV} 分别为 1.63×10³、1.53×10³ 和 1.48×10³ L mol⁻¹。随着温度升高， K_{SV} 逐渐降低，说明升温不利于肉桂醛-酪氨酸酶复合物的稳定存在。此外，计算得到的 K_q 达到 10¹¹ L mol⁻¹ s⁻¹ 数量级，高于生物大分子最大动态碰撞猝灭常数 2.0×10¹⁰ L mol⁻¹ s⁻¹。上述结果表明，肉桂醛对酪氨酸酶的荧光猝灭主要属于静态猝灭^[26]，即肉桂醛可与酪氨酸酶形成稳定的基态复合物^[27]。

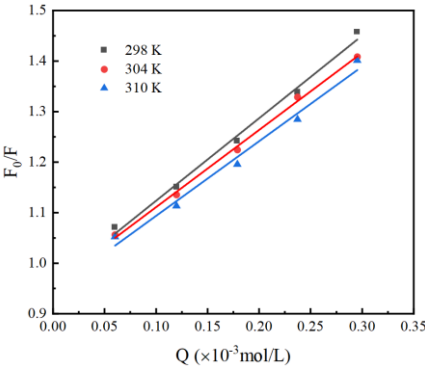


图 5 不同温度下肉桂醛对酪氨酸酶的 Stern-Volmer 图

Fig.5 Stern-Volmer plots for fluorescence quenching of TYR by CA at different temperatures.

在确认肉桂醛对酪氨酸酶的猝灭类型为静态猝灭后,进一步采用双对数方程计算肉桂醛与酪氨酸酶的表现结合常数 K_a 和结合位点数 n :

$$\log \left[\frac{F_0 - F}{F} \right] = n \log c_q + \log K_a \quad (8)$$

式中:

F_0 ——未添加肉桂醛时酪氨酸酶的荧光强度;

F ——添加肉桂醛后酪氨酸酶的荧光强度;

c_q ——猝灭剂肉桂醛的摩尔浓度, mol L^{-1} ;

K_a ——肉桂醛与酪氨酸酶的表现结合常数, L mol^{-1} ;

n ——结合位点数。

采集 298、304 和 310 K 反应条件下荧光光谱图中峰值处的荧光强度数据,并根据式(8)进行双对数线性拟合,结果见表 1。由表 1 可知, n 均接近 1,说明二者之间可能存在一个或一类主要结合位点^[28]。随着温度由 298 K 升高至 310 K, K_a 由 $4.54 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ 增大至 $8.22 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$,说明适当升温有利于肉桂醛与酪氨酸酶的结合。结合 Stern-Volmer 分析结果可知,肉桂醛能够与酪氨酸酶形成稳定复合物,并改变酪氨酸酶芳香族氨基酸残基周围微环境,为其抑制酪氨酸酶活性提供了光谱学证据。

2.4 肉桂醛对酪氨酸酶结合的热力学分析

为进一步明确肉桂醛与酪氨酸酶结合过程中的主要作用力,根据不同温度下肉桂醛与酪氨酸酶的表现结合常数 K_a 计算热力学参数,结果见表 1。小分子与蛋白质之间的相互作用主要包括疏水作用、氢键、范德华力和静电作用等^[29]。热力学参数中, ΔG° 可用于判断结合过程的自发性,而 ΔH° 、 ΔS° 的变化可用于推测结合过程中的主要作用力^[30]。

由表 1 可知,肉桂醛与酪氨酸酶结合过程中的 ΔG° 均小于 0,说明二者的结合反应可自发进行。随着温度由 298 K 升高至 310 K, ΔG° 由 $-20.86 \text{ kJ mol}^{-1}$ 降至 $-23.23 \text{ kJ mol}^{-1}$,绝对值总体增大,说明升温在一定程度上有利于肉桂醛与酪氨酸酶的结合。与此同时,肉桂醛-酪氨酸酶体系的 ΔH° 和 ΔS° 均大于 0,表明该结合过程具有吸热和熵增特征,说明疏水作用可能是肉桂醛与酪氨酸酶结合的主要驱动力^[31]。

表 1 不同温度下肉桂醛与酪氨酸酶结合参数及热力学参数

Table 1 Binding and Thermodynamic Parameters for the Interaction Between Cinnamaldehyde and Tyrosinase at Different Temperatures

Temperature/K	$K_a/(\text{10}^3 \text{ L mol}^{-1})$	n	R^2	$\Delta H^\circ/(\text{KJ mol}^{-1})$	$\Delta G^\circ/(\text{KJ mol}^{-1})$	$\Delta S^\circ/(\text{J mol}^{-1} \text{ K}^{-1})$
298	4.54	1.16	0.996 6	37.94	-20.86	197.33
304	7.95	1.26	0.998 8	37.94	-22.70	199.47
310	8.22	1.28	0.992 7	37.94	-23.23	197.33

注: K_a 为表现结合常数; n 为结合位点数; R^2 为式(8)双对数线性拟合的相关系数。

结合荧光猝灭结果可知,肉桂醛可与酪氨酸酶发生相互作用,并改变芳香族氨基酸残基周围微环境;热力学分析进一步提示,二者结合可能主要受疏水作用驱动。该结果与分子对接模拟中肉桂醛可能进入或靠近酪氨酸酶活性空腔,并与 Phe264、Val283 等疏水性残基发生相互作用的结果具有一定对应关系。

2.5 肉桂醛对酪氨酸酶芳香族残基微环境及构象的影响

同步荧光光谱可用于反映蛋白质中 Tyr 和 Trp 残基周围微环境的变化。当 $\Delta\lambda=15 \text{ nm}$ 时,光谱主要反映 Tyr 残基的信息;当 $\Delta\lambda=60 \text{ nm}$ 时,光谱主要反映 Trp 残基的信息。为进一步分析肉桂醛结合对酪氨酸酶构象的影响,本研究测定不同肉桂醛摩尔浓度下酪氨酸酶的同步荧光光谱,结果见图 6。

由图 6A 可知,随着 CA 摩尔浓度升高,酪氨酸酶中 Tyr 残基对应的荧光强度逐渐降低,最大荧光峰由 292.00 nm 红移至 294.00 nm,这一结果说明,肉桂醛与酪氨酸酶相互作用后,Tyr 残基周围微环境发生变化,可能表现为极性增加或疏水性降低。由图 6B 可知,Trp 残基对应的荧光强度也随肉桂醛摩尔浓度升高而降低,最大

荧光峰由 278.00 nm 蓝移至 274.00 nm。Trp 残基附近微环境同样受到肉桂醛结合影响,但其峰位变化方向与 Tyr 残基不同。Tyr 和 Trp 残基响应差异说明肉桂醛对酪氨酸酶构象的影响可能具有局部选择性,而不是对整个蛋白结构产生均一扰动。

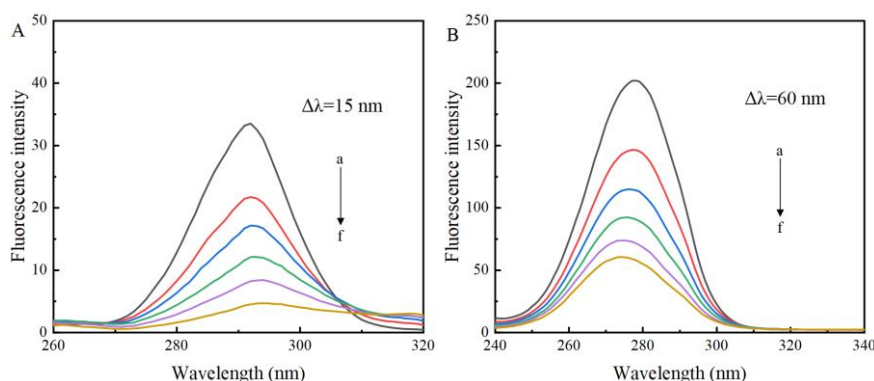


图 6 肉桂醛对酪氨酸酶同步荧光光谱的影响

Fig.6 Effect of CA on synchronous fluorescence spectra of TYR

为进一步比较 Tyr 和 Trp 残基在肉桂醛猝灭酪氨酸酶过程中的响应差异,计算同步荧光猝灭比率 (R), 公式为:

$$R = \left(1 - \frac{F}{F_0} \right) \times 100\% \quad (9)$$

式中:

R ——同步荧光猝灭比率, %;

F_0 ——未添加肉桂醛时酪氨酸酶的荧光强度;

F ——添加肉桂醛后酪氨酸酶的荧光强度。

由图 7 可知,随着肉桂醛摩尔浓度升高, Tyr 和 Trp 残基对应的 R 值均逐渐增大,说明肉桂醛对二者的荧光猝灭作用均呈浓度依赖性增强。其中, Tyr 残基对应的 R 值始终高于 Trp 残基,表明肉桂醛对 Tyr 残基荧光的猝灭作用更明显,结合后续分子对接模拟中肉桂醛可能与 His263、Phe264、Val283 等活性空腔附近残基发生相互作用,肉桂醛与酪氨酸酶的结合可能导致活性空腔附近芳香族残基微环境发生改变。

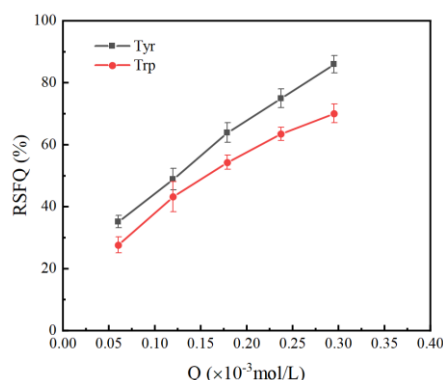


图 7 肉桂醛对酪氨酸酶中 Tyr 和 Trp 残基同步荧光猝灭比率的影响

Fig.7 Effects of CA on the synchronous fluorescence quenching ratio of Tyr and Trp residues in TYR

三维荧光光谱能够进一步反映蛋白质荧光峰位置、强度及构象变化。由图 8 和表 2 可知,与单独酪氨酸酶相比,肉桂醛-酪氨酸酶体系中峰 1 和峰 2 的荧光强度均明显降低,并伴随峰位红移。其中,峰 1 主要反映 Tyr 和 Trp 残基的微环境变化,峰 2 与多肽骨架相关结构有关。肉桂醛加入后,峰 1 的荧光强度由 171.50 降至 102.30,峰 2 的荧光强度由 151.70 降至 89.70,说明肉桂醛与酪氨酸酶结合后不仅改变了芳香族氨基酸残基微环境,还可能影响多肽骨架相关构象。该结果与内源荧光猝灭和同步荧光结果相对应,说明肉桂醛可诱导酪氨酸酶构象扰动,

从而影响其催化活性。

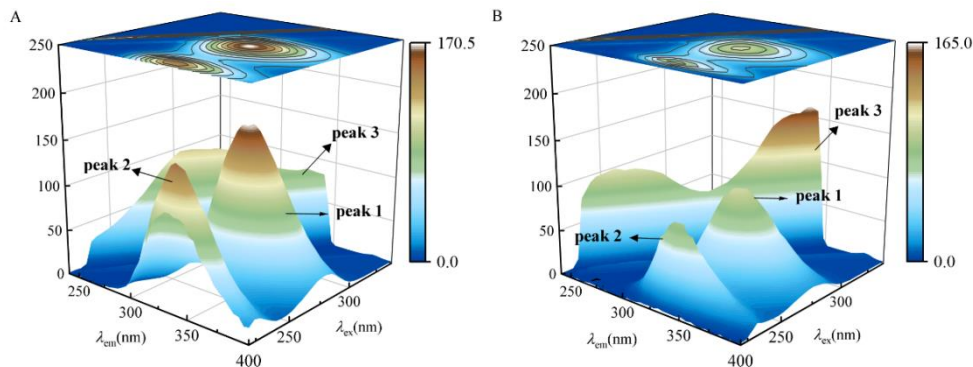


图 8 肉桂醛与酪氨酸酶的三维荧光光谱图 (A. 酪氨酸酶; B. 肉桂醛-酪氨酸酶)

Fig.8 Three-dimensional fluorescence spectra of CA and TYR (A. TYR; B. CA-TYR)

表 2 酪氨酸酶和肉桂醛-酪氨酸酶体系的三维荧光光谱参数

Table 2 Three-dimensional fluorescence spectral parameters of TYR and the CA-TYR system

Reaction system	Peak 1E _x /E _m /nm	Fluorescence Intensity	Peak 2 E _x /E _m /nm	FluorescenceIntensity
酪氨酸酶	278/336	171.50	228/332	151.70
酪氨酸酶-肉桂醛	276/340	102.30	232/340	89.70

2.6 肉桂醛与酪氨酸酶相互作用的分子对接模拟分析

为从分子水平解释肉桂醛对酪氨酸酶的竞争性抑制行为，本研究采用分子对接分析肉桂醛与酪氨酸酶的结合模式^[32]，结果见表 3 和图 9。肉桂醛与酪氨酸酶的预测结合自由能为-5.0 kcal mol⁻¹，说明二者之间具有一定结合稳定性。肉桂醛可能进入或靠近酪氨酸酶活性空腔，并与 Asn260、His263、Phe264、Met280、Gly281、Ser282 和 Val283 等残基发生相互作用。其中，Phe264、Met280 和 Val283 等疏水性残基可能参与肉桂醛与酪氨酸酶之间的疏水相互作用；His263 位于酪氨酸酶活性空腔附近，可能与底物结合区域或活性中心构象维持有关。该模拟结果与热力学分析中“疏水作用可能是肉桂醛-酪氨酸酶结合主要驱动力”的推断具有一定对应关系。

从结合位置来看，肉桂醛靠近酪氨酸酶活性空腔，可能对底物 L-DOPA 进入活性区域或与酶形成有效结合产生空间干扰。这与 Lineweaver-Burk 动力学分析中肉桂醛表现为竞争性抑制的结果相互补充，说明肉桂醛降低酪氨酸酶活性可能与其干扰底物结合过程有关。

表 3 肉桂醛与酪氨酸酶分子对接模拟参数

Table 3 Molecular Docking Simulation Parameters of Cinnamaldehyde with Tyrosinase

Ligand	Receptor	PubChem CID	Molecular formula	Binding energy/(kcal mol ⁻¹)	Main interacting residues
Cinnamaldehyde	Tyrosinase	637 511	C ₉ H ₈ O	-5.00	Asn260, His263, Phe264, Met280, Gly281, Ser282, Val283

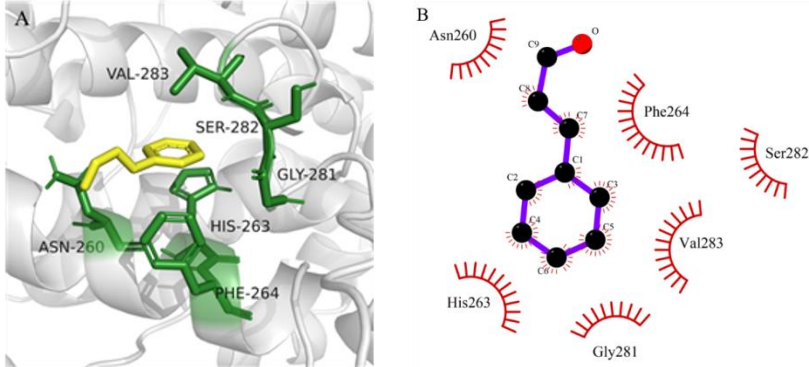


图 9 肉桂醛与酪氨酸酶分子对接模拟的预测结合构象 3D 视图 (A) 和 2D 视图 (B)

Fig.9 Predicted binding conformation of cinnamaldehyde with tyrosinase based on molecular docking simulation; 3D view (A) and 2D view (B)

2.7 Cu²⁺干预对肉桂醛抑制酪氨酸酶活性的影响

酪氨酸酶属于含铜金属酶，其活性中心铜离子参与底物结合和催化氧化过程。为进一步分析肉桂醛对酪氨酸酶的抑制作用是否与铜相关催化过程有关，本研究设置外源 Cu²⁺干预实验，考察不同 Cu²⁺摩尔浓度下肉桂醛对酪氨酸酶活性的抑制效果，结果见图 10。所有数据均扣除了无酶体系中 L-DOPA 自氧化背景，以降低非酶促氧化对结果的干扰。

由图 10A 可知，肉桂醛单独处理组对酪氨酸酶的抑制率为 55.91%，随着外源 Cu²⁺摩尔浓度由 0.05 mmol L⁻¹ 增加至 0.20 mmol L⁻¹，肉桂醛-Cu²⁺复合处理组的抑制率逐渐降低，分别降至约 44.0%、29.0%和 16.0%，表明外源 Cu²⁺的加入可部分削弱肉桂醛对酪氨酸酶的抑制作用。该结果表明，肉桂醛的抑制效应可能与酪氨酸酶活性中心附近的铜相关催化过程有关。由图 10B 可知，Cu²⁺单独处理组的抑制率为负值，说明在本实验体系中外源 Cu²⁺并未抑制 L-DOPA 的氧化反应，反而可能促进氧化产物生成。该现象可能与 Cu²⁺参与 L-DOPA 非酶促氧化、改变反应体系氧化还原状态，或影响显色产物形成有关。

综合来看，外源 Cu²⁺能够部分逆转肉桂醛对酪氨酸酶的抑制效果，说明肉桂醛的抑制作用可能与酪氨酸酶含铜活性中心或底物氧化过程相关，但肉桂醛是否直接螯合铜离子仍需进一步验证。

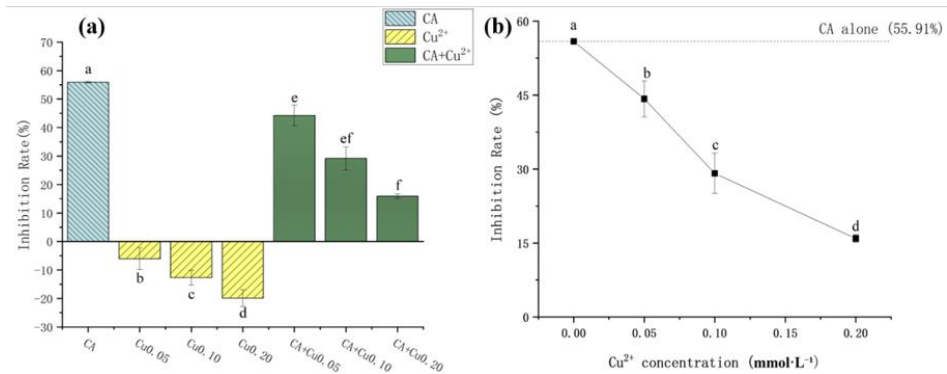


图 10 Cu²⁺对肉桂醛抑制酪氨酸酶活性的影响

Fig.10 Effect of Cu²⁺ on the inhibitory activity of CA against TYR

注：（a）不同浓度 Cu²⁺对肉桂醛抑制酪氨酸酶活性的影响；（b）肉桂醛、Cu²⁺及其复合处理对酪氨酸酶抑制率的影响。图中不同小写字母为显著性差异分析标记。本研究采用单因素方差分析（ANOVA），并通过 Tukey HSD 法进行多重比较。不同小写字母表示处理组间差异显著（ $P < 0.05$ ）；具有相同字母或共享字母的处理组之间差异不显著（ $P \geq 0.05$ ）。

2.8 肉桂醛抑制酪氨酸酶的作用机制解析

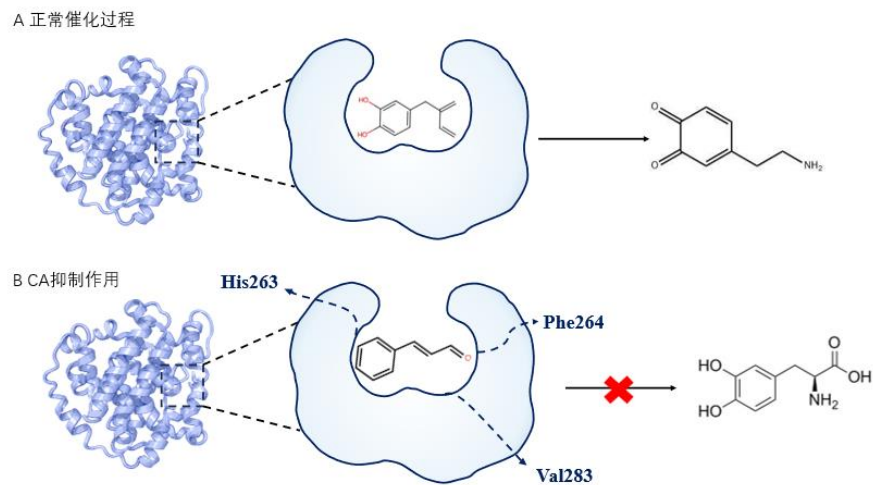


图 11 肉桂醛抑制酪氨酸酶活性的可能作用机制

Fig.11 Proposed mechanism for the inhibition of TYR activity by CA

综合酶活测定、抑制动力学、荧光光谱分析、热力学分析、分子对接模拟及 Cu^{2+} 干预实验结果, 肉桂醛对酪氨酸酶的可能抑制机制如图 11 所示。肉桂醛对酪氨酸酶的抑制可能主要与底物结合竞争和芳香族氨基酸残基微环境改变有关。动力学分析显示, 肉桂醛属于可逆竞争性抑制剂, 提示其可能干扰 L-DOPA 与酪氨酸酶的有效结合; 荧光光谱结果显示, 肉桂醛可改变 Tyr 和 Trp 残基周围微环境, 提示其结合过程可能伴随酪氨酸酶局部构象变化; 分子对接模拟提示, 肉桂醛可能进入或靠近酪氨酸酶活性空腔, 并与 His263、Phe264、Val283 等残基发生相互作用。 Cu^{2+} 干预实验显示外源 Cu^{2+} 可削弱肉桂醛的抑制效果, 但该结果只是说明肉桂醛抑制作用可能与酪氨酸酶活性中心附近铜相关过程有关^[33], 不能证明肉桂醛直接作用于铜离子或改变双核铜结构。因此, 本文提出的作用机制主要基于蘑菇酪氨酸酶体外模式酶体系, 其中 Cu^{2+} 干预结果仅作为铜相关过程可能参与的间接证据, 相关结论仍需在真实食品体系中进一步验证。

3 结论

本研究以商品化蘑菇酪氨酸酶为模式酶, 以 L-DOPA 为底物, 采用酶活测定、抑制动力学、荧光光谱分析、热力学分析、分子对接模拟及 Cu^{2+} 干预实验, 分析了肉桂醛对酪氨酸酶的抑制作用及其可能机制。结果表明, 肉桂醛在该体外酶促反应体系中对酪氨酸酶具有浓度依赖性抑制作用, 其半抑制浓度 (IC_{50}) 为 0.37 mg mL^{-1} , 为可逆竞争性抑制, 抑制常数 K_i 为 $20.02 \text{ mmol L}^{-1}$ 。荧光光谱分析表明, 肉桂醛可猝灭酪氨酸酶内源荧光, 并改变 Tyr 和 Trp 残基周围微环境; 热力学分析说明疏水作用可能是肉桂醛与酪氨酸酶结合的主要驱动力。分子对接模拟进一步说明, 肉桂醛可能进入或靠近酪氨酸酶活性空腔, 并与 His263、Phe264、Val283 等残基发生相互作用。 Cu^{2+} 干预实验表明, 外源 Cu^{2+} 可削弱肉桂醛对酪氨酸酶的抑制效果, 该作用可能与酪氨酸酶活性中心附近的铜相关过程有关, 但不能证明肉桂醛直接作用于铜离子。综上, 肉桂醛对酪氨酸酶的抑制可能主要与底物结合竞争及芳香族氨基酸残基微环境改变有关。本研究可为肉桂醛作为天然酪氨酸酶抑制剂候选物的机制提供参考, 但其在果蔬 PPO 体系及真实食品中的抗褐变效果、适宜剂量和贮藏稳定性仍需进一步验证。

参考文献

- [1] 李彩云, 李洁, 严守雷, 等. 果蔬酶促褐变机理的研究进展[J]. 食品科学, 2021, 42(9): 283-292.
- [2] 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.
- [3] 王斌, 林薇, 袁晓. 鲜切果蔬褐变机理及防控技术研究进展[J]. 食品科学, 2025, 46(7): 367-384.
- [4] 陈维宁, 李旋, 王文月, 等. 桃酶促褐变机理与调控技术研究进展[J]. 食品科学, 2024, 45(7): 290-298.
- [5] MOON K M, KWON E B, LEE B, et al. Recent Trends in Controlling the Enzymatic Browning of Fruit and Vegetable Products [J]. Molecules, 2020, 25(12): 2754.
- [6] HAMDAN N, LEE C H, WONG S L, et al. Prevention of Enzymatic Browning by Natural Extracts and Genome-Editing: A Review on Recent Progress [J]. Molecules, 2022, 27(3): 1101.
- [7] YADAV A, SALAR R K. Tyrosinase inhibitors: Molecular mechanisms, therapeutic potentials, and translational applications in dermatology and beyond [J]. Next Nanotechnology, 2026, 9: 100452.
- [8] 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 and Food Chemistry, 2015, 63(2): 716-722.
- [9] YIN L, DAI Y, CHEN H, et al. Cinnamaldehyde Resist Salmonella Typhimurium Adhesion by Inhibiting Type I Fimbriae [J]. Molecules, 2022, 27(22): 7753.
- [10] 崔沂. 肉桂醛及其衍生物对酪氨酸酶抑制作用及生物学效应研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2016.
- [11] CHANG C T, CHANG W L, HSU J C, et al. Chemical Composition and Tyrosinase Inhibitory Activity of Cinnamomum Cassia Essential Oil [J]. Botanical Studies, 2013, 54(1): 1-7.
- [12] 路露, 束成杰, 葛翎, 等. 肉桂精油和肉桂醛的抑菌、抗氧化和酪氨酸酶抑制活性研究[J]. 林产化学与工业, 2022, 42(3): 105-110.
- [13] 管晓, 杨城, 刘静, 等. 槲皮素对酪氨酸酶的抑制作用与分子机理[J]. 现代食品科技, 2015, 31(8): 71-76.
- [14] MARTINS L S, LAMEIRA J, KRUGER H G, et al. Evaluating the Performance of a Non-Bonded Cu^{2+} Model Including Jahn-Teller Effect into the Binding of Tyrosinase Inhibitors [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(13): 4783.

- [15] CABEZUDO I, AYELEN RAMALLO I, ALONSO V L, et al. Effect directed synthesis of a new tyrosinase inhibitor with anti-browning activity [J]. Food Chemistry, 2021, 341: 128232.
- [16] MATSUURA R, UKEDA H, SAWAMURA M. Tyrosinase Inhibitory Activity of Citrus Essential Oils [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(6): 2309-2313.
- [17] TIAN X, RAO L, ZHAO L, et al. Multispectroscopic and computational simulation insights into the inhibition mechanism of epigallocatechin-3-gallate on polyphenol oxidase [J]. Food Chemistry, 2022, 393: 133415.
- [18] YU S, HE M, ZHAI Y, et al. Inhibitory activity and mechanism of trilobatin on tyrosinase: kinetics, interaction mechanism and molecular docking [J]. Food & Function, 2021, 12(6): 2569-2579.
- [19] CHEN J, ZHANG Z, LI H, et al. Exploring the effect of a series of flavonoids on tyrosinase using integrated enzyme kinetics, multispectroscopic, and molecular modelling analyses [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 252: 126451.
- [20] CHEN Q, SHANG C, HAN M, et al. Inhibitory mechanism of scutellarein on tyrosinase by kinetics, spectroscopy and molecular simulation [J]. Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2023, 296: 122644.
- [21] ZHU Y J, ZHOU H T, HU Y H, et al. Antityrosinase and antimicrobial activities of 2-phenylethanol, 2-phenylacetaldehyde and 2-phenylacetic acid [J]. Food Chemistry, 2011, 124(1): 298-302.
- [22] NIHEI K I, KUBO I. Tyrosinase Inhibition by 4-Substituted Benzaldehydes with Electron-Withdrawing Groups [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2020, 191(4): 1711-1716.
- [23] YIN Z H, LI Y F, GAN H X, et al. Synergistic effects and antityrosinase mechanism of four plant polyphenols from Morus and Hulless Barley [J]. Food Chemistry, 2022, 374: 131716.
- [24] PENG Z, WANG G, HE Y, et al. Tyrosinase inhibitory mechanism and anti-browning properties of novel kojic acid derivatives bearing aromatic aldehyde moiety [J]. Current Research in Food Science, 2023, 6: 100421.
- [25] MAHDVAI A, MOHAMMADSADEGHI N, MOHAMMADI F, et al. Evaluation of inhibitory effects of some novel phenolic derivatives on the mushroom tyrosinase activity: Insights from spectroscopic analyses, molecular docking and in vitro assays [J]. Food Chemistry, 2022, 387: 132938.
- [26] CHEN J, LI Q, YE Y, et al. Phloretin as both a substrate and inhibitor of tyrosinase: Inhibitory activity and mechanism [J]. Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2020, 226: 117642.
- [27] XIE D, FU W, YUAN T, et al. 6'-O-Caffeoylarbutin from Quezui Tea: A Highly Effective and Safe Tyrosinase Inhibitor [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(2): 972.
- [28] TANG H, CUI F, LI H, et al. Understanding the inhibitory mechanism of tea polyphenols against tyrosinase using fluorescence spectroscopy, cyclic voltammetry, oximetry, and molecular simulations [J]. RSC Advances, 2018, 8(15): 8310-8318.
- [29] RAHMAN A J, KAUR L, PATHAK M, et al. Spectroscopic studies of binding interactions of 2-chloroethylphenyl sulphide with bovine serum albumin [J]. Journal of Molecular Liquids, 2021, 340: 117144.
- [30] ROSS P D, SUBRAMANIAN S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability [J]. Biochemistry (Easton), 1981, 20(11): 3096-3102.
- [31] HUANG J, LI M, HAN C, et al. Structural and mechanistic insights into the anti-tyrosinase, anti-melanogenesis, and anti-browning effect of proanthocyanidins from seed coats of *Acer truncatum* Bunge [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025, 284(Pt 2): 138246.
- [32] FENG Y X, WANG Z C, CHEN J X, et al. Separation, identification, and molecular docking of tyrosinase inhibitory peptides from the hydrolysates of defatted walnut (*Juglans regia* L.) meal [J]. Food Chemistry, 2021, 353: 129471.
- [33] CUI Y, HU YH, YU F, ZHENG J, et al. Inhibition kinetics and molecular simulation of p-substituted cinnamic acid derivatives on tyrosinase [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 95: 1289-1297.