

文章编号:1001-6880(2017)8-1368-06

川贝母内生真菌抑制酪氨酸酶活性的研究

苏天骄,吴超,刘琼,肖人峰,潘峰,吴卫*

四川农业大学农学院,成都 611130

摘要:本研究通过测定分离自川贝母、瓦布贝母、甘肃贝母和暗紫贝母新鲜鳞茎的15株内生真菌无菌发酵液对酪氨酸酶活性的抑制率,初步评价其次生代谢物的美白活性;并以维生素C作为阳性对照,对抑制能力较强内生真菌发酵产物的石油醚(30~60℃)、乙酸乙酯和正丁醇萃取物的酪氨酸酶活性抑制率进行研究。结果表明,分离自瓦布贝母的内生真菌WBS020、1WBY2和7WBY2的无菌发酵液抑制酪氨酸酶活性的能力显著高于其它菌株,且高温处理后可保持一定稳定性。试验还发现,上述三株菌的乙酸乙酯和正丁醇萃取物对酪氨酸酶的抑制能力显著高于其石油醚萃取物;WBS020的正丁醇萃取物,1WBY2和7WBY2的乙酸乙酯萃取物都表现较强的抑制活性。除此之外,在质量浓度为8 mg/mL时,阳性对照维生素C的抑制能力显著强于其他萃取物,但1WBY2和7WBY2菌株乙酸乙酯萃取物对酪氨酸酶活性的抑制率也可达 $90.86\% \pm 0.81\%$ 和 $88.92\% \pm 7.13\%$,极显著高于其它两种萃取物。说明瓦布贝母内生真菌次生代谢物中存在着美白活性成分,具有潜在的开发利用价值。

关键词:川贝母;内生真菌;酪氨酸酶;美白活性**中图分类号:**Q93**文献标识码:**A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2017.8.019

Tyrosinase Inhibition Activity of the Fermented Product of Endophytic Fungi Isolated from *Fritillariae Cirrhosae Bulbus*

SU Tian-jiao, WU Chao, LIU Qiong, XIAO Ren-feng, PAN Feng, WU Wei*

Agronomy College, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China

Abstract: In order to evaluate the whitening activities of secondary metabolic products from endophytic fungi derived from *Fritillaria cirrhosa*, *F. unibracteata* var. *wabuensis*, *F. przewalskii* and *F. unibracteata*, the inhibitory activity of the fungi against tyrosinase were measured. In addition, the crude extracts of 3 fungi screened from 15 endophytic fungi according to inhibitory activities were obtained using petroleum ether (30-60℃), ethyl acetate and n-butanol. Vc was used as the positive control. The results showed that the inhibition abilities of strain WBS020, 1WBY2 and 7WBY2 against tyrosinase were significantly higher than other stains, and maintained stable after heat treatment. The ethyl acetate and n-butanol extracts of WBS020, 1WBY2 and 7WBY2 displayed a significantly higher inhibition activity against tyrosinase than the petroleum ether. And the n-butanol fraction from strain WBS020 showed the strongest activity, while ethyl acetate fractions from 1WBY2 and 7WBY2 showed the strongest activities. In addition, the inhibition rates of Vc was significantly higher than these of other extracts, but the ethyl acetate extracts from strain 1WBY2 and 7WBY2 still reach to $90.86\% \pm 0.81\%$ and $88.92\% \pm 7.13\%$ at 8 mg/mL, respectively. The results showed that there were whitening active ingredients in secondary metabolites of endophytic fungi from *Fritillaria unibracteata* var. *wabuensis*, which had potential exploitation and utilization values.

Key words: *Fritillariae Cirrhosae Bulbus*; endophytic fungi; tyrosinase; whitening activates

黑色素的数目和分布是决定人类皮肤颜色的关键因素^[1]。在黑色素合成过程中,主要是由酪氨酸酶、TYRP-1 和 TYRP-2 三种物质起决定性作用^[2]。

收稿日期:2017-04-26

接受日期:2017-06-05

基金项目:高等学校博士学科点专项科研基金(20115103110009)

*通信作者 E-mail:ewuwei@scau.edu.cn

酪氨酸酶普遍存在于动植物、微生物和人体中,是一种多酚氧化酶,作为黑色素生物合成初期的限速酶对黑色素积累至关重要^[3]。过量的黑色素积累不仅会引起各类色素性皮肤疾病的发生,还对果蔬褐变和昆虫伤口的愈合有一定的影响^[4]。酪氨酸酶活性抑制能力的大小是目前评价天然成分美白功效的标准之一。

内生真菌是指殖于宿主组织内部却不使其产生任何病理变化的真菌^[5]。有研究表明,药用植物内生真菌既可产生与宿主相同的活性成分^[6],也可产生许多新型的化合物^[7]。目前,大多数对内生真菌次生代谢物活性的研究集中于抗氧化、抗菌及抗肿瘤方面,对美白活性的研究鲜有报道。有研究发现,分离自清香木茎皮部内生真菌 PZ-6-2 的发酵液对酪氨酸酶活性的抑制率可达到 70%^[8]。川贝母为常用名贵中药,系百合科植物川贝母 (*F. cirrhosa* D. Don)、暗紫贝母 (*F. unibracteata* Hsiao et K. C. Hsia)、甘肃贝母 (*F. przewalskii* Maxim.) 或梭砂贝母 (*F. delavayi* Franch.)、太白贝母 (*F. taipaiensis* P.) 或瓦布贝母 (*F. unibracteata* Hsiao et K. C. Hsiavar. *wabuensis* (S. Y. Tang et S. C. Yue) Z. D. Liu, S. Wang et S. C. Chen) 的干燥鳞茎,具有清热润肺、化痰止咳等多种药理活性^[9]。已经在中药材川贝母各种基源植物中筛选到具有产生抑菌^[10]、抗氧化^[11]等活性物质能力的内生真菌,但是否存在具有产生抑制酪氨酸酶活性物质的川贝母内生真菌我们未曾可知。

本研究采用课题组前期分离来自川贝母、瓦布贝母、甘肃贝母和暗紫贝母新鲜鳞茎的 15 株内生真菌为研究对象,比较在一定条件下不同处理的无菌发酵原液对酪氨酸酶活性的抑制情况,筛选出抑制活性较高的内生真菌,进行发酵培养,通过不同的有机溶剂萃取,对各萃取物抑制酪氨酸酶活性进行研究,为中药材川贝母各种基源植物内生真菌资源及其作为天然美白剂的开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 内生真菌材料

课题组前期分离自暗紫贝母 (*Fritillaria unibracteata*) 新鲜鳞茎 A6、A11; 分离自甘肃贝母 (*Fritillaria przewalskii*) 新鲜鳞茎 G4、G12; 分离自川贝母 (*Fritillaria cirrhosa*) 新鲜鳞茎 CBY4、CBY7、CBY13; 分离自瓦布贝母 (*Fritillaria unibracteata* var. *wabuensis*) 新鲜鳞茎 WBS001、WBS020、1WBY2、3WBY2、3WBY3、4WBY1、6WBY3、7WBY2。

1.1.2 药品试剂

酪氨酸酶 (Tyrosinase, Tyr), 25 kU, 来自 Sigma 公司; L-多巴, 来自 VETEC; PBS 缓冲液 (pH7.2 ~ 7.4), 来自北京索莱宝科技有限公司; 维生素 C、无

水葡萄糖、琼脂粉、石油醚 (30 ~ 60 °C)、乙酸乙酯、正丁醇等药品和有机试剂均为国产分析纯。

1.1.3 设备仪器

SHP-160 型智能生化培养箱, 来自 SANFA; TS-2102 型恒温双层振荡培养箱, 来自常州国宇仪器制造有限公司; MLS-3780 全自动压力蒸汽灭菌锅, 来自 SANYO; JJ124BC 型电子分析天平, 精度 0.0001 g, 来自 G&G; SW-CJ-2FD 型超净无菌工作台, 来自苏净安泰空气技术有限公司; 酶标仪, 来自 Thermo Scientific, NH, USA。

1.2 内生真菌培养发酵与提取液的制备

1.2.1 内生真菌的纯化

用接种针刮取事先分离保存在 4 °C 冰箱内生真菌的菌丝于新鲜的马铃薯葡萄糖固体培养基 (PDA) 上, 28 °C 培养直至长满整个培养皿后, 用打孔器打取菌饼置于新的 PDA 平板中央, 在 28 °C 恒温培养箱活化 3 d。

1.2.2 种子液的制备

在活化后的菌株生长边缘用打孔器打取菌饼, 接种到装有马铃薯葡萄糖培养液 (PDB) 的三角瓶 (100 mL/250 mL) 中, 每瓶接种 1 块菌饼, 置于 28 °C, 150 rpm 条件下培养 3 d, 得到种子液。

1.2.3 发酵液的制备和处理

将各内生真菌种子液按 10 % 的接种量分别接种到装有 PDB 的三角瓶 (200 mL/500 mL) 中, 在 28 °C, 150 rpm 恒温摇床内发酵 7 d, 发酵液用 8 层纱布过滤得到发酵滤液。每种内生真菌的发酵滤液分两种方式处理。A 处理: 121 °C 高温灭菌 20 min; B 处理, 8000 rpm 离心直到无沉淀, 取上清液过 0.45 μm 的微孔滤膜于试管中。将两种方法处理后的发酵滤液分别进行酪氨酸酶活性抑制实验。

1.2.4 发酵液各提取物制备

按照 1.2.3 条件下扩大发酵, 8 层纱布过滤后, 依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇按体积 1:1 进行萃取, 每种有机溶剂反复萃取直到萃取相无色, 合并相同有机相萃取液, 得到石油醚相、乙酸乙酯相和正丁醇相。分别蒸发至干, 4 °C 保存备用。测定时, 用甲醇复溶配置成不同浓度的溶液。

1.3 抑制酪氨酸酶活性测定

具体操作参照文献^[11], 并切合实际稍作修改。称取 0.075 g L-多巴, 用 PBS 缓冲液定容到 100 mL 容量瓶中, 配制成 3.8 mmol/L L-多巴的溶液, 现配现用; 称取 0.00125 g 酪氨酸酶, 用蒸馏水溶解在 5

mL容量瓶中,配制成0.25 mg/mL酪氨酸酶溶液,迅速插入冰盒;将维生素C配制成为将1.2.4中两种方法处理过15株内生真菌的发酵滤液分装在5mL试管中备用。阳性对照为不同浓度的维生素C。加样如表1所示,向96孔板中加入L-多巴、PBS磷酸盐缓冲液、样品/维生素C,最后加入酪氨酸酶并立

即置于酶标仪中,37℃恒温反应10 min,在475 nm处测定吸光度值,每个样品进行三次重复。内生真菌发酵滤液及各萃取物对酪氨酸酶的抑制率计算公式:

$$\text{抑制率} = [(A-B)-(C-D)]/(A-B) \times 100\%$$

表1 酪氨酸酶活性抑制试验设计

Table 1 The design of inhibition experiment of tyrosinase activity

体系组分 Component systems	A	B	C	D
PBS	100	150	50	100
L-多巴 L-Dopa	50	50	50	50
酪氨酸酶 Tyrosinase	50	-	50	-
样品/维生素C Samples/vitamin C	-	-	50	50

注:A代表未加受试液完全反应的值;B代表未加样品/维生素C和酪氨酸酶,排除PBS缓冲液和L-多巴影响的值;C代表加酶和样品/对照品的值;D代表不加酶的值。

Note: A represented the value of the no-complete reaction of the test solution; B represented the value of not adding sample or vitamin C and tyrosinase, excluding the impact of PBS buffer and L-dopa values; C represented the values of adding tyrosinase and samples or vitamin C; D represented the value without tyrosinase.

1.4 数据分析

试验所得数据通过SPSS 21.0进行差异显著性分析,利用Origin 8.0和Excel绘制折线图。

2 结果与讨论

2.1 内生真菌发酵液抑制酪氨酸酶活性结果

将来自中药材川贝母不同基源植物的15株内生真菌进行摇瓶发酵培养,两种处理后的发酵液抑制酪氨酸酶活性抑制率结果如表2所示。经0.45 μm微孔滤膜处理的15种内生真菌发酵液和高温处理的14种内生真菌发酵液均具有一定抑制酪氨酸酶活性的能力,不同内生真菌发酵液对酪氨酸酶活性抑制程度有一定的差异。其中,分离自瓦

布贝母内生真菌WBS020、1WBY2和7WBY2的经微孔滤膜处理发酵液对酪氨酸酶的抑制率都在75%以上,显著高于其它菌株;9株内生真菌发酵液在两种处理下抑制酪氨酸酶活性结果没有显著差异,表明其发酵液中具有抑制酪氨酸酶活性的化合物热稳定性相对较好;5株内生真菌在121℃高温处理下的发酵液对酪氨酸酶活性的抑制率显著低于微孔滤膜处理,6WBY3菌株发酵液在高温处理下完全丧失活性,分析其原因可能是由于高温条件下具有抑制活性的化合物分解;有趣的是,高温处理后的3WBY2的发酵液显著高于滤膜处理,可能是在温度升高的过程中产生了新的物质。

表2 内生真菌发酵液抑制酪氨酸酶活性结果

Table 2 The tyrosinase inhibition activity of fermented liquid of endophytic fungi

编号 No.	内生真菌 Endophytic fungi	抑制率 Inhibition ratio (%)	
		样品A Sample A	样品B Sample B
1	A6	59.56 ± 0.40 ^a	54.99 ± 0.25 ^a
2	A11	26.73 ± 2.30 ^a	28.43 ± 1.56 ^a
3	G4	6.77 ± 4.81 ^b	36.38 ± 2.57 ^a
4	G12	57.19 ± 0.36 ^a	60.07 ± 0.21 ^a
5	CBY4	50.25 ± 2.55 ^a	54.31 ± 0.64 ^a
6	CBY7	43.49 ± 4.25 ^b	65.82 ± 4.84 ^a

编号 No.	内生真菌 Endophytic fungi	抑制率 Inhibition ratio (%)	
		样品 A Sample A	样品 B Sample B
7	CBY13	11.17 ± 1.56 ^b	59.05 ± 0.80 ^a
8	WBS001	64.97 ± 2.65 ^a	68.87 ± 0.20 ^a
9	WBS020	74.45 ± 0.76 ^a	79.86 ± 0.50 * a
10	1WBY2	79.36 ± 0.49 ^a	87.48 ± 1.30 ** a
11	3WBY2	65.48 ± 0.50 ^a	37.73 ± 0.72 ^b
12	3WBY3	73.43 ± 1.31 ^a	70.05 ± 1.16 ^a
13	4WBY1	24.37 ± 0.12 ^b	43.15 ± 1.13 ^a
14	6WBY3	-0.68 ± 3.84 ^b	26.57 ± 0.96 ^a
15	7WBY2	88.66 ± 0.78 ^a	87.31 ± 1.05 ** a

注:样品 A 代表在 121 ℃ 高温处理 20 min 的发酵液;样品 B 代表用 0.45 μm 微孔滤膜过滤的发酵液;** 表示在同一个处理条件下与其它样品呈极显著差异, $P < 0.01$; * 表示在同一个处理条件下与其它样品呈显著差异, $P < 0.05$; 相同字母表示不同处理条件下同一个样品无显著差异;不同字母表示不同处理条件下同一个样品有显著差异。

Note: Sample A represented a fermentation broth treated at 121 °C for 20 minutes; Sample B represented a fermentation broth filtered with a 0.45 μm microporous membrane. ** indicated that there was significant difference from other samples, $P < 0.01$; * indicated significant difference with other samples under the same treatment conditions, $P < 0.05$. The same letters indicated the same sample were not significantly different; different letters indicated that different treatment conditions with the same sample results were significantly different.

2.2 发酵液不同萃取物抑制酪氨酸酶活性结果

2.2.1 7WBY2 菌株不同萃取物酪氨酸酶活性测定

如图 1 所示,7WBY2 菌株发酵液的不同萃取物均具有一定的抑制酪氨酸酶活性的能力。在 4 mg/mL 质量浓度下,7WBY2 菌株发酵液的乙酸乙酯萃取物抑制酪氨酸酶活性的能力极显著和显著强于其正丁醇、石油醚萃取物;在 2 mg/mL 质量浓度下,正丁醇萃取物抑制酪氨酸酶活性显著高于其它萃取物。由表 3 可知,在一定质量浓度范围内,7WBY2 菌株发酵液的不同萃取物和阳性对照维生素 C 对酪氨酸酶活性的抑制效果呈线性相关,均随浓度的增大而升高;三种萃取物的回归方程的 R^2 均大于 0.9,证明方程的拟合度很高。依据所得线性方程计算各萃取物的 IC_{50} 值可知,7WBY2 发酵液的乙酸乙酯萃取物 < 正丁醇萃取物 < 石油醚萃取物; IC_{50} 值越小,萃取物对酪氨酸酶活性抑制效果越好,乙酸乙酯萃取物抑制酪氨酸酶活性能力最强, IC_{50} 为 3.6992 mg/mL, 低于阳性对照维生素 C ($IC_{50} = 0.4586$

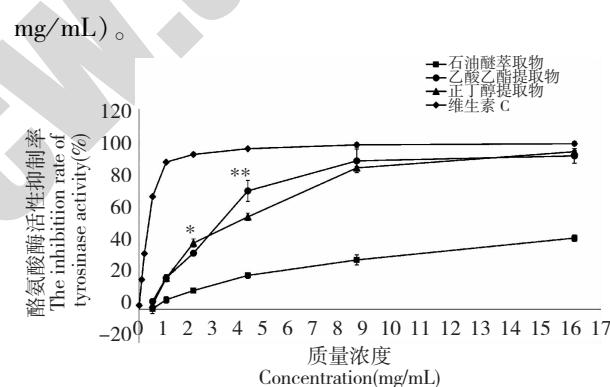


图 1 7WBY2 发酵液不同萃取物及维生素 C 对酪氨酸酶的抑制活性

Fig. 1 The tyrosinase inhibition activities of different extracts of fermented liquid of 7WBY2 and Vitamin C

注: ** 代表在同浓度下与其他萃取物极显著差异, $P < 0.01$; * 代表在同浓度下与其他萃取物显著差异, $P < 0.05$

Note: Compared with other extracts, ** represented extremely significant differences, $P < 0.01$; * represented significant differences in the same concentrations, $P < 0.05$

表 2 内生真菌发酵液不同萃取物及维生素 C 对酪氨酸酶抑制的 IC_{50}

Table 2 IC_{50} of different extracts of fermented liquid and Vitamin C on tyrosinase inhibition activities

名称 Name	回归方程 Regression equation	IC_{50} (mg/mL)
7WBY2 石油醚萃取物	$y = 2.5744x + 4.7288, R^2 = 0.926$	17.5851
7WBY2 乙酸乙酯萃取物	$y = 11.048x + 9.1312, R^2 = 0.9023$	3.6992

名称 Name	回归方程 Regression equation	IC_{50} (mg/mL)
7WBY2 正丁醇萃取物	$y = 10.092x + 8.8929, R^2 = 0.9266$	4.0732
1WBY2 石油醚萃取物	$y = 2.2023x + 0.5197, R^2 = 0.911$	22.4675
1WBY2 乙酸乙酯萃取物	$y = 10.028x + 18.153, R^2 = 0.8967$	3.1758
1WBY2 正丁醇萃取物	$y = 7.3067x + 6.707, R^2 = 0.9601$	5.9251
WBS020 乙酸乙酯萃取物	$y = 4.6133x + 6.8915, R^2 = 0.9274$	9.3443
WBS020 正丁醇萃取物	$y = 9.9761x + 7.3457, R^2 = 0.9773$	4.2756
维生素 C	$y = 84.845x + 11.092, R^2 = 0.9244$	0.4586

2.2.2 1WBY2 菌株不同萃取物酪氨酸酶活性测定

如图 2 所示, 在酪氨酸酶活性抑制试验中, 1WBY2 的石油醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取物与阳性对照维生素 C 相比, 对酪氨酸酶活性均有一定的抑制作用, 其中, 乙酸乙酯萃取物除在 0.5 mg/mL 浓度以外, 在其他各个浓度对酪氨酸酶活性抑制能力均极显著高于其他两种萃取物。除此之外, 由表 3 可知, 各个萃取物的抑制能力随着其浓度的增加而上升, 当浓度为 8 mg/mL 时, 乙酸乙酯萃取物和正丁醇萃取物抑制酪氨酸酶活性为 $90.86\% \pm 0.81\%$ 和 $62.72\% \pm 0.55\%$, 而石油醚萃取物活性仅有 $24.84\% \pm 1.27\%$; 阳性对照维生素 C 在浓度为 1 mg/mL 时的抑制活性就达到 $88.18\% \pm 1.12\%$ 。综上可知, 内生真菌 1WBY2 的发酵液乙酸乙酯和正丁醇萃取物抑制能力较强, IC_{50} 分别为 3.1758 mg/mL

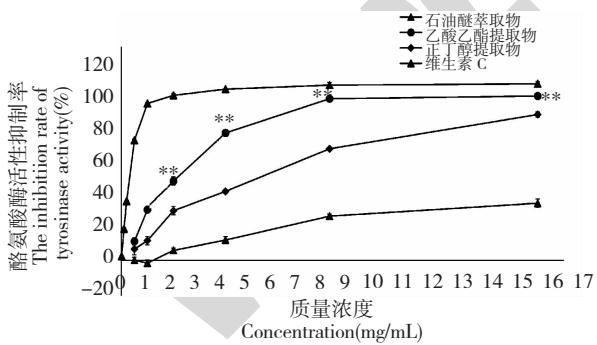


图 2 1WBY2 发酵液不同萃取物及维生素 C 对酪氨酸酶的抑制活性

Fig. 2 The tyrosinase inhibition activities of different extracts of fermented liquid of 1WBY2 and Vitamin C
注: ** 代表在同浓度下与其他萃取物极显著差异, $P < 0.01$; * 代表在同浓度下与其他萃取物显著差异, $P < 0.05$ 。

Note: Compared with other extracts, ** represented extremely significant differences, $P < 0.01$; * represented significant differences in the same concentrations, $P < 0.05$

和 5.9251 mg/mL , 抑制活性略低于阳性对照维生素 C。

2.2.3 WBS020 菌株不同萃取物酪氨酸酶活性测定

图 3 显示, 瓦布贝母内生真菌 WBS020 发酵液的 3 个萃取物中, 当浓度在 8 mg/mL 时, 正丁醇部位抑制酪氨酸酶活性的能力 ($83.70\% \pm 0.40\%$) 最强, 乙酸乙酯萃取物次之 ($55.56\% \pm 0.26\%$)。在质量浓度范围 $0 \sim 16\text{ mg/mL}$ 时, 石油醚萃取物基本无抑制酪氨酸酶活性的能力, 其他萃取物随着质量浓度的增加几乎是呈线性增加, 回归方程如表 3 所示。正丁醇萃取物和乙酸乙酯萃取物抑制酪氨酸酶活性的能力与其浓度呈线性关系 ($R^2 = 0.9773, R^2 = 0.9274$)。在 0.5 mg/mL 浓度下, 正丁醇萃取物的抑制酪氨酸酶活性的能力显著高于同浓度其他萃

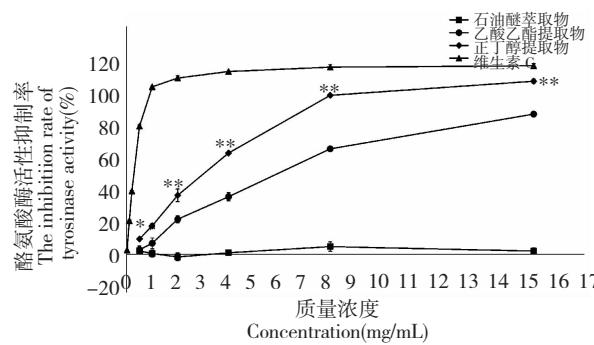


图 3 WBS020 发酵液不同萃取物及维生素 C 对酪氨酸酶的抑制活性

Fig. 3 The tyrosinase inhibition activities of different extracts of fermented liquid of WBS020 and Vitamin C
注: ** 代表在同浓度下与其他萃取物极显著差异, $P < 0.01$; * 代表在同浓度下与其他萃取物显著差异, $P < 0.05$ 。

Note: Compared with other extracts, ** represented extremely significant differences, $P < 0.01$; * represented significant differences in the same concentrations, $P < 0.05$

取物;在2、4、8和16 mg/mL浓度下,极显著高于同浓度其他萃取物;IC₅₀为4.2756 mg/mL,低于阳性对照维生素C。

3 结论

川贝母、瓦布贝母、甘肃贝母和暗紫贝母均为中药材川贝母的基源植物。本试验首先分别对分离自它们新鲜鳞茎的15株内生真菌的发酵液进行抑制酪氨酸酶活性能力的研究,发现3株分离自瓦布贝母的内生真菌WBS020、1WBY2和7WBY2的发酵液均有较高的抑制酪氨酸酶活性,并能够在高温处理下保持一定的稳定性。其中,1WBY2和7WBY2菌株发酵液对酪氨酸酶活性的抑制率为87.48%±1.30%和87.31%±1.05%,极显著高于其它菌株发酵液。我们对这3株发酵液表现较高抑制能力的内生真菌的发酵产物进行不同极性成分的抑制酪氨酸酶活性能力的研究。结果表明,3株内生真菌发酵液的正丁醇和乙酸乙酯萃取物均具有一定抑制酪氨酸酶活性的能力,但是均低于阳性对照维生素C;它们的石油醚萃取物表现出较弱甚至丧失抑制能力,我们可以推断发酵液中具有抑制酪氨酸酶活性的成分大多是强极性的物质。

综上所述,瓦布贝母内生真菌WBS020、1WBY2和7WBY2的乙酸乙酯和正丁醇萃取物具有一定的抑制酪氨酸酶活性的能力。课题组前期研究表明,7WBY2、WBS020菌株的发酵液及各萃取物具有较强的抗氧化活性,其次生代谢物中含有酚类、黄酮类、皂苷化合物,也有研究证明这些类成分与抑制酪氨酸酶活性之间有着正向的关系^[13-15],进一步通过HPLC及GC-MS等手段,初步鉴定到没食子酸,芦丁,根皮苷等物质^[11]。但具体是哪种成分具有抑制酪氨酸酶活性能力,还值得我们接下来继续研究探索。本试验结果对内生真菌次生代谢物的美白成分活性的研究提供了参考,为今后进一步开发利用奠定了基础。

参考文献

- Yamaguchi Y, Brenner M, Hearing VJ. The regulation of skin pigmentation. *J Biol Chem*, 2007, 282:27557.
- Costin GE, Hearing VJ. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *Faseb J*, 2007, 21:976-994.
- Kanteev M, Goldfeder M, Fishman A. Structure-function correlations in tyrosinases. *Protein Sci*, 2015, 24:1360-1369.
- Li H, Kim J, Hahn HG, et al. KHG26792 inhibits melanin synthesis in Mel-Ab cells and a skin equivalent model. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2014, 18:249-254.
- Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanea*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*, 1993, 260:214.
- Tan RX, Zou WX. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat Prod Rep*, 2001, 18(4):448.
- Silva GBPGD, Silvino KF, Bezerra JDP, et al. Antimicrobial activity of *Phoma* sp. URM 7221: An endophyte from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). *Afr J Microbiol Res*, 2017, 11(1):1-7.
- Li HW(李洪文), Nie QH(聂奇华), Li HF(李光富), et al. The effect of endophytes from *Pistacia weinmannifolia* j. Poisson ex Franch on tyrosinase activity. *Chin J Ethnomed Ethnopharm*(中国民族民间医药), 2016, 2:18.
- Gao JJ(高俊杰), Yuan XF(袁小凤), Liu WH(刘文洪), et al. Isolation and screening of endophytic fungi from *Fritillaria thunbergii* and preliminary study on *Aspergillus* sp. BJ7. *Chin J Tradit Med Sci Technol*(中国中医药科技), 2012, 19:140-142.
- Chen Q(陈鹊), Pan F(潘峰), Wu W(吴卫). Study on the metabolites produced by an alkaloid-producing endophytic fungus strain A1 from *Fritillaria unibracteata*. Beijing: Science Paper Online, 2014.
- Feng P, Su TJ, Cai SM, et al. Fungal endophyte-derived *Fritillaria unibracteata* var. *wabuensis*: diversity, antioxidant capacities in vitro and relations to phenolic, flavonoid or saponin compounds. *Sci Rep*, 2017, 7:42008.
- Si YX, Ji S, Fang NY, et al. Effects of piperonylic acid on tyrosinase: Mixed-type inhibition kinetics and computational simulations. *Proc Biochem*, 2013, 48:1706-1714.
- Wang Y, Curtislong MJ, Lee BW, et al. Inhibition of tyrosinase activity by polyphenol compounds from *Flemingia philippinensis* roots. *Bio Med Chem*, 2014, 22:1115-1120.
- Taherkhani N, Gheibi N. Inhibitory effects of quercetin and kaempferol as two propolis derived flavonoids on tyrosinase enzyme. *Biotech Health Sci*, 2014, 2:e22242.
- Zhao ZM(赵志敏), Nan YP(南艳平), Tang QT(唐青涛), et al. Anti-inflammatory activity and inhibitory activity on tyrosinase of Soapnut Saponin from *Sapindus mukorossi* Gaertn. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2014, 7:1592-1595.