

曲酸提取工艺优化及其对酪氨酸酶抑制作用的分子机制

Optimization of the extraction process and molecular mechanism of inhibition on tyrosinase of kojic acid

方婧杰^{1,2,3,4} 陈 建^{1,3} 陈雅娟^{1,3} 梁 盈^{1,3}

FANG Jingjie^{1,2,3,4} CHEN Jian^{1,3} CHEN Yajuan^{1,3} LIANG Ying^{1,3}

(1. 中南林业科技大学稻谷及副产物深加工国家工程研究中心, 湖南 长沙 410004;
2. 长沙商贸旅游职业技术学院, 湖南 长沙 410016; 3. 中南林业科技大学食品科学与工程学院,
湖南 长沙 410004; 4. 中南林业科技大学生命科学与技术学院, 湖南 长沙 410004)

(1. National Engineering Research Center for Deep Processing of Rice and By-products, Central South University of Forestry and Technology, Changsha, Hunan 410004, China; 2. Changsha Commerce and Tourism College, Changsha, Hunan 410016, China; 3. College of Food Science and Engineering, Central South University of Forestry and Technology, Changsha, Hunan 410004, China; 4. College of Life Science and Technology, Central South University of Forestry and Technology, Changsha, Hunan 410004, China)

摘要:目的: 开发新型、高效、安全、精准的酪氨酸酶抑制剂。方法: 采用正交试验对曲酸提取工艺条件进行优化, 通过酶动力学研究曲酸对酪氨酸酶的抑制作用, 并借助分子对接技术分析其与不同来源酪氨酸酶的作用机理。结果: 曲酸提取最优工艺条件为活性炭用量 5%, 脱色温度 75 °C, pH 2.0, 脱色时间 50 min, 此时曲酸纯度为 97.85%; 曲酸对酪氨酸酶单酚酶及双酚酶的 IC₅₀ 分别为 13.33, 53.32 μg/mL; 曲酸与蘑菇、小鼠、猩猩及人酪氨酸酶的 XP 对接得分分别为 -7.515, -5.011, -5.537, -3.638, MM-GBSA 结果分别为 94.47, -110.80, -1.17, 6.45 kJ/mol。结论: 最优工艺条件下可显著提高曲酸的纯度, 曲酸对酪氨酸酶为竞争性抑制作用, 不同来源酪氨酸酶与曲酸结合形成不同类型的非共价键, 即抑制剂与不同种类酪氨酸的结合稳定性存在差异。

关键词: 曲酸; 酪氨酸酶; 抑制作用; 分子对接

Abstract: Objective: This study aimed to develop new, efficient, safe and precise tyrosinase inhibitors. **Methods:** The orthogonal test was used to optimize the extraction conditions of kojic acid. The inhibitory effect of kojic acid on tyrosinase was studied by

enzyme kinetics, and the mechanism of its interaction with tyrosinase from different sources was analyzed by molecular docking technology. **Results:** The optimum process conditions for extracting kojic acid were as follows: activated carbon content of 5%, decolorization temperature of 75 °C, pH 2.0, decolorization time of 50 min, and the purity of kojic acid was 97.85%. the IC₅₀ of kojic acid on tyrosinase monophenolase and tyrosinase bisphenolase were 13.33 and 53.32 μg/mL, respectively. The XP docking scores of kojic acid with mushroom, mouse, gorilla, and human tyrosinase were -7.515, -5.011, -5.537, and -3.638, respectively. The results of MM-GBSA were 94.47, -110.80, -1.17 and 6.45 kJ/mol, respectively. **Conclusion:** Under the control of the optimal process conditions, the purity of kojic acid can be significantly improved. Kojic acid has a competitive inhibitory effect on tyrosinase. Tyrosinase from different sources combines with kojic acid to form different types of non-covalent bonds, the binding stability of the inhibitor and different tyrosines is different.

Keywords: kojic acid; tyrosinase; inhibitory effect; molecular docking

基金项目: 湖南省教育厅科学研究项目(编号: 21C1615); 湖南省科技创新领军人才(编号: 2022RC3056)

作者简介: 方婧杰, 女, 中南林业科技大学在读博士研究生。

通信作者: 梁盈(1981—), 女, 中南林业科技大学教授, 博士生导师, 博士。E-mail: liangying498@163.com

收稿日期: 2023-09-22 **改回日期:** 2023-11-26

酪氨酸酶(tyrosinase, TYR), 又名多酚氧化酶、儿茶酚氧化酶等, 是含双核铜离子的金属氧化还原酶, 在生物体内可羟基化 L-酪氨酸和 3,4-二羟基苯丙氨酸为左旋多巴和多巴醌, 进而生成黑色素^[1]。在食品加工和贮藏过程中, 由酪氨酸酶引发的酶促褐变对鲜切的山药、藕等食

品的感官品质有较大的负面影响^[2-3],同时人体内酪氨酸酶活性升高,也会使黑色素合成增多,色素沉着,导致色斑及黑色素瘤形成^[4]。因此,使用有效的酪氨酸酶抑制剂是控制食品酶促褐变、减少皮肤色素沉积,达到美白的重要手段之一。目前在已报道的天然或化学合成来源的酪氨酸酶抑制剂中,曲酸及其衍生物对酪氨酸酶活性的抑制一直备受关注^[5]。虽然曲酸存在不稳定、易分解、副作用等问题,但其在化妆品中质量分数 $\leq 1\%$ 对消费者是安全的^[6]。如在化妆品中添加 0.5% 左右的曲酸就能有效解决色素沉着的问题^[7];添加 0.3% 的曲酸在保持鲜切山药片色泽及抑制多酚氧化酶活性方面的效果优于 1% 柠檬酸^[8]。为进一步提高曲酸产量,国内外学者在曲酸发酵生产工艺优化方面进行了大量研究,以提高曲酸的生产效率,降低生产成本^[9-10]。

近年来,曲酸对酶促褐变抑制作用的研究较多,但有关曲酸抑制酪氨酸酶动力学、曲酸与酪氨酸酶相互作用的结构信息及作用机制的系统研究较少。不同来源如蘑菇酪氨酸酶和人酪氨酸酶在抑制剂的选择性和功效上存在显著差异^[11],因此以不同来源酪氨酸酶为靶点分析曲酸对其抑制机理,将提供更精准的酪氨酸酶活性抑制干预手段^[12],对进一步寻找高效、精准的酪氨酸酶抑制剂并明确其抑制机理具有重要意义。研究拟选择米曲霉(*Aspergillus oryzae*)为发酵菌种,采用液态发酵,通过正交试验优化浓缩结晶法提取曲酸的脱色工艺,分离提取出曲酸,以蘑菇、小鼠、猩猩及人酪氨酸酶为靶点,通过动力学分析其对酪氨酸酶的抑制与互作机理,并结合分子对接模拟进行验证,以期开发新型、高效、安全、精准的酪氨酸酶抑制剂提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

米曲霉孢子粉:长沙泰思德生物科技有限公司;

脱色活性炭:湖南德班活性炭有限公司;

L-多巴:上海阿拉丁生化科技有限公司;

马铃薯:市售;

琼脂粉:合肥兰杰柯科技有限公司;

酵母膏:北京奥博星生物技术有限责任公司;

酪氨酸酶、曲酸:美国 Sigma-Aldrich 公司;

L-酪氨酸、葡萄糖、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、浓盐酸、硫酸镁、氯化钾、氯化钠、无水乙醇、氯化铁、氢氧化钠、酒石酸钾钠、3,5-二硝基水杨酸、苯酚:分析纯,中国医药集团有限公司;

强酸性阳离子交换树脂:732 型,中国医药集团有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

全自动蒸汽立式高压灭菌锅: MJ-54A 型,施都凯仪

器设备(上海)有限公司;

旋转蒸发仪: RV10/HB10 型,德国 IKA 集团;

恒温振荡器: IS-RDD3 型,美国精骐公司;

高速冷冻离心机: TGL20MW 型,湖南赫西仪器装备有限公司;

紫外可见分光光度计: UV8100A 型,北京莱伯泰科仪器有限公司;

循环水式多用真空泵: SHB-IIIIS 型,郑州长城科工贸有限公司;

电子分析天平: FB224 型,上海舜宇恒平科学仪器有限公司;

酸度计(pH 计): PHS-3C 型,上海仪电科学仪器股份有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 米曲霉培养纯化

(1) PDA 斜面培养基配制: 马铃薯 200 g 切小块,加入 1 000 mL 纯水,加热至沸腾,维持 20 min。趁热用纱布过滤,滤液用蒸馏水补足至 1 000 mL,加入葡萄糖 20 g,琼脂粉 15 g,小火加热并不断搅拌,直至琼脂完全溶解。培养基用漏斗分装入试管,自然 pH,121 °C 灭菌 30 min,制成斜面。

(2) 接种及纯化培养: 将米曲霉孢子粉按 1 g/支接入 PDA 斜面,30 °C 培养 72 h。选取生长旺盛无污染的斜面,刮取米曲霉菌体,用无菌水配制成米曲霉悬液,采取划线方式接入新的 PDA 斜面,30 °C 培养 72 h。纯化出无污染的米曲霉菌株。

1.2.2 米曲霉的液体发酵培养

(1) 液体发酵培养基配制: 按每瓶(约 100 mL)葡萄糖 10 g,酵母膏 0.25 g,磷酸二氢钾 0.1 g,硫酸镁 0.025 g,氯化钾 0.025 g,蒸馏水 100 mL,添加 6% 无水乙醇,pH 6.0,121 °C 灭菌 30 min。

(2) 接种及发酵培养: 从纯化后的米曲霉菌株斜面上刮取米曲霉菌体,用无菌水配制成米曲霉悬液,按 2 mL/瓶接种量接入液体发酵培养基中。于恒温振荡器上 30 °C、200 r/min 连续发酵培养 7 d。

1.2.3 发酵液预处理 发酵液抽滤,除去米曲霉菌体,纯水过 732 型阳离子交换柱,蠕动泵将发酵液泵入交换柱,流速 4.5 mL/min;交换带接近交换柱底部时,停止加液;用蒸馏水洗出柱内残留曲酸;交换柱中流出液体与 1% 的 FeCl₃-HCl 溶液(显色剂)显色时,开始收集洗脱液;当无显色反应时停止收集;树脂于 2 mol/L 盐酸中浸泡 1 h,洗出液 pH>4,交换柱再生,可重复使用,得到预处理后的发酵液。

1.2.4 发酵液中曲酸浓度及残糖量检测

(1) 发酵液中曲酸浓度: 配制质量浓度梯度为 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 mg/mL 的曲酸标准溶液,取

1 mL 不同质量浓度曲酸标准溶液,用蒸馏水补足至 10 mL,加入 1% 的 $\text{FeCl}_3\text{-HCl}$ 溶液(显色剂)2 mL,生成紫红色物质,以空白调零,测定 500 nm 处吸光度。取预处理后的发酵液,稀释至适当倍数后取 1 mL,用蒸馏水补足至 10 mL,加入 1% 的 $\text{FeCl}_3\text{-HCl}$ 溶液(显色剂)2 mL,生成紫红色物质,测定 500 nm 处吸光度。根据曲酸标准曲线($y=0.7524x$, $R^2=0.9995$)计算出发酵液中的曲酸浓度。

(2) DNS 法测定残糖量:分别取 1 mg/mL 的葡萄糖标准溶液 0,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 mL 于比色管中,用蒸馏水补足至 1 mL,准确加入 3 mL DNS,沸水浴 5 min,流水冷却,用蒸馏水补足至 15 mL,测定 520 nm 处吸光度。发酵液稀释一定倍数后,取 1 mL 于比色管中,加入 3 mL DNS,沸水浴 5 min,流水冷却,用蒸馏水补足至 15 mL,测定 520 nm 处吸光度。根据葡萄糖标准曲线($y=0.9226x$, $R^2=0.9990$)计算出发酵液中葡萄糖浓度。

1.2.5 发酵液中曲酸的提取 低温高速离心去除发酵产生的蛋白酶(2 °C, 8 000 r/min 离心 30 min),取上清液,70 °C 旋转蒸发浓缩至糖浆黏稠,用丙酮从残糖中反复多次抽提曲酸,70 °C 浓缩丙酮至少量晶体出现,于 2 °C 完全析出晶体后过滤,得曲酸粗结晶,冷冻干燥。75 °C 水溶解曲酸粗晶体,制成 100 g/L 曲酸溶液,测定溶液的 $\text{OD}_{560\text{ nm}}$ 。

1.2.6 单因素试验 固定活性炭添加量为曲酸含量的 5%,脱色温度 70 °C,自然 pH,脱色时间 30 min。分别考察活性炭添加量(1%,3%,5%,7%,9%)、发酵液 pH(1.0,2.0,3.0,4.0,5.0)、脱色时间(20,30,40,50,60 min)及脱色温度(60,65,70,75,80 °C)对曲酸脱色效果的影响。

1.2.7 正交试验 在单因素试验基础上,以活性炭添加量、发酵液 pH、脱色温度和脱色时间为影响因素,以曲酸的脱色率和得率为指标(两个指标采用加权评分,权重系数各为 0.5)优化曲酸的脱色工艺条件。

1.2.8 曲酸的脱色率及得率计算 按式(1)~式(3)分别计算曲酸的脱色率、得率和纯度。

$$D = \frac{\text{OD}_1 - \text{OD}_2}{\text{OD}_1} \times 100\%, \quad (1)$$

$$R = \frac{M_1}{M_2} \times 100\%, \quad (2)$$

$$P = \frac{M_1}{M_3} \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

D ——曲酸脱色率,%;

OD_1 、 OD_2 ——脱色前、后粗曲酸溶液所测的 $\text{OD}_{560\text{ nm}}$;

R ——曲酸得率,%;

M_1 ——曲酸质量,g;

M_2 ——发酵液中曲酸质量,g;

P ——曲酸纯度,%;

M_3 ——粗曲酸质量,g。

1.2.9 曲酸对酪氨酸酶的抑制作用

(1) PBS 溶液配制:800 mL 超纯水中依次加入 KH_2PO_4 0.27 g, Na_2HPO_4 1.42 g, NaCl 8 g, KCl 0.2 g, 搅拌溶解,用 HCl 调节 pH 至 7.2~7.4,定容到 1 000 mL,121 °C 灭菌 30 min,冷却待用。

(2) 酶溶液配制:用 PBS 溶液配制成 2.5×10^3 U/mL 的酪氨酸酶溶液,米曲霉发酵液提取得到的曲酸用 PBS 溶液配制成质量浓度梯度为 0,20,40,60,80,100,120,140,160,180,200 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液。

(3) 曲酸对酪氨酸酶单酚酶的抑制作用:以 L -酪氨酸为底物,将 0.3 mL 不同质量浓度的曲酸与 0.3 mL 酪氨酸酶溶液于 30 °C 预混合 10 min,加入 3.4 mL 浓度为 2 mmol/L 的 L -酪氨酸,立即放入紫外分光光度计内,测定 317,475 nm 处吸光度,每 30 s 读一次,计时 10 min。

(4) 曲酸对酪氨酸酶双酚酶的抑制作用:以 L -DOPA 为底物,将 0.3 mL 不同质量浓度的曲酸与 0.3 mL 酪氨酸酶溶液于 25 °C 预混合 10 min,加入 3.4 mL 浓度为 0.5 mmol/L 的 L -DOPA,立即放入紫外分光光度计内,测定 475 nm 处吸光度,每 30 s 读一次,计时 10 min。

1.2.10 曲酸对酪氨酸酶的抑制动力学分析 酪氨酸酶经单酚酶和双酚酶两步将多酚氧化并最终生成黑色素物质,单酚酶氧化过程也会进入双酚酶氧化过程,参考 Xie 等^[13]的方法,采用 Lineweaver-Burk 双倒数法分析酶动力学曲线^[14],并使用米氏方程[式(4)]计算曲酸对酪氨酸酶抑制作用的 K_m 值和 $V_{\max}$ 。

$$V = V_{\max} \times [S] / (K_m + [S]), \quad (4)$$

式中:

V ——酶促反应速率, $\mu\text{mol/min}$;

$V_{\max}$ ——最大酶促反应速率, $\mu\text{mol/min}$;

$[S]$ ——底物浓度,mmol/L;

K_m ——米氏常数。

1.2.11 分子对接模拟 从 RCSB PDB 数据库直接获取蘑菇酪氨酸酶晶体结构(PDB ID: 2Y9X),同时获得小鼠酪氨酸酶对应的晶体结构(PDB ID: 3NTM)、猩猩和人酪氨酸酶对应的晶体结构(PDB ID: 3NQ5)^[15],使用 Swissmodel 软件基于小鼠、猩猩和人对应的 PDB 晶体进行同源建模^[16]。对获得的蛋白质晶体采用薛定谔软件的 Protein Preparation Wizard 模块分别进行 Protein preprocess, Regenerate states of native ligand, H-bond assignment optimization, Protein energy minimization 和 Remove waters 的处理^[17]。对化合物曲酸的 2D sdf 结构文件,采用薛定谔中 LigPrep 模块进行处理并生成其所有 3D 手性构象^[18]。采用薛定谔中的 SiteMap 模块预测最佳的结合位点,然后采用 Receptor Grid Generation 模块,设置最合适的 Enclosing box 将预测出来的结合位点完美包裹,并在此基础上获取酪氨酸酶蛋白的活性位点^[19]。将处理好的配体化合物曲酸与酪氨酸酶蛋白的活性位点

进行分子对接(采用最高精度 XP 对接),并进行 MM-GBSA 计算分析。

1.2.12 数据处理 所有试验均重复 3 次;分别采用 SPSS 8.0 分析处理数据, GraphPad Prism 8.0 和 OriginPro 8.5 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 发酵液中曲酸含量及残糖量

通过计算得出发酵液中曲酸量为 4.012 g,残糖量为 86.664 g,表明发酵液中有大量的残糖,而曲酸易溶于丙酮,葡萄糖极难溶,后续曲酸的提取可采用丙酮进行抽提萃取再结晶。

2.2 发酵液中曲酸的提取

2.2.1 单因素试验 由图 1(a)可知,活性炭添加量对曲酸的脱色率和得率影响显著,随着活性炭添加量的增加,曲酸脱色率从 46.56% 提高到 76.67%,得率从 78.65% 降低至 51.88%。当活性炭添加量>5%时,曲酸得率明显降低。因此,选择最佳的活性炭添加量为 5%。

由图 1(b)可知,曲酸的脱色率随脱色温度的增加呈

升高趋势,在 80 ℃时达到最大值 75.81%,75 ℃时脱色率为 75.62%,接近最大值。曲酸得率随脱色温度的升高而下降,从 60 ℃时的 82.56% 降至 80 ℃时的 69.96%。活性炭主要通过其疏松多孔结构带来的吸附作用进行脱色,温度升高,色素分子的扩散速度加快,活性炭的吸附作用增强。温度进一步增加时,分子会从活性炭表面脱离,形成动态平衡,使得脱色率不再明显增加。75 ℃曲酸得率接近 70 ℃的,但脱色率差异显著,故选取最佳的脱色温度为 75 ℃。

由图 1(c)可知,随着发酵液 pH 值的增加,曲酸的脱色率呈先上升后下降趋势,说明 pH 过低或过高均不利于活性炭脱色,可能是由于 pH 影响了色素分子的电学结构。但 pH 对曲酸的得率影响较小,故选取最佳的脱色 pH 为 3.0。

活性炭吸附色素会被溶液的黏度阻碍,从而需要一定时间才能充分吸附。由图 1(d)可知,随着脱色时间的延长,脱色率逐渐增加,在 40 min 时达到最大值,此后略有下降。但曲酸得率却处于下降趋势,故选择最佳的脱色时间为 40 min。

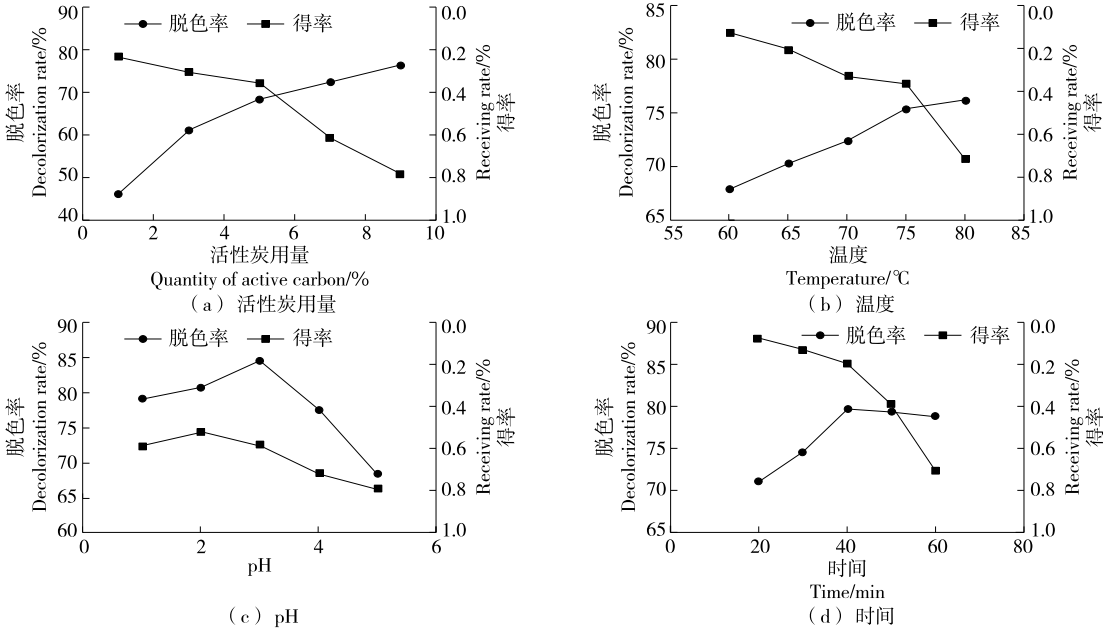


图 1 曲酸脱色效果的单因素试验

Figure 1 Single factor test on decolorization effect of kojic acid

2.2.2 正交试验 在单因素基础上,以脱色温度、活性炭添加量、发酵液 pH 和脱色时间为因素,以曲酸的脱色率和得率为指标进行四因素三水平正交试验。试验因素水平见表 1,试验设计及结果见表 2。

由表 2 可知,各因素主次顺序为 B>C>A>D,即活性炭添加量对曲酸脱色效果的影响最大,而脱色时间对曲酸脱色效果的影响最小。脱色的最优组合为 A₂B₃C₁D₃,即活性炭添加量为 7%,脱色温度为 75 ℃,pH 为 2.0,脱色

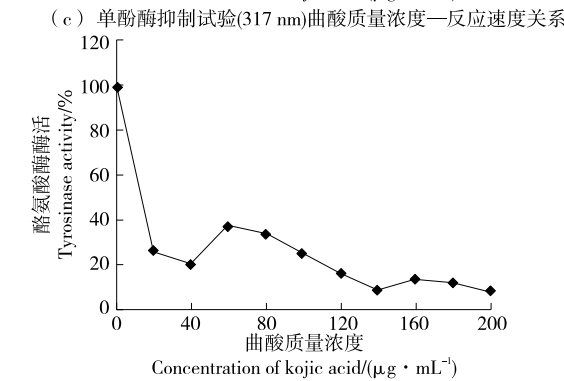
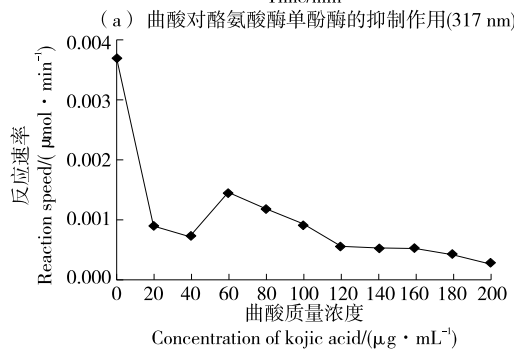
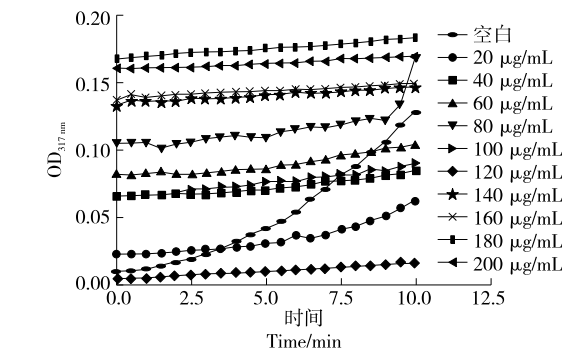
表 1 正交因素水平表

Table 1 Orthogonal factor level table

水平	A 脱色温度/℃	B 活性炭添加量/%	C pH 值	D 脱色时间/min
1	70	3	2.0	30
2	75	5	3.0	40
3	80	7	4.0	50

表 2 正交试验设计及结果
Table 2 The results and range analysis of the orthogonal $L_9(3^4)$ test

试验号	A	B	C	D	脱色率/%	曲酸得率/%	综合得分
1	1	1	1	1	54.67	93.46	81.17
2	1	2	2	2	44.86	96.97	77.06
3	1	3	3	3	61.95	96.40	87.08
4	2	1	2	3	59.94	95.34	85.32
5	2	2	3	1	61.93	95.44	86.57
6	2	3	1	2	81.24	96.97	99.01
7	3	1	3	2	44.12	94.93	75.56
8	3	2	1	3	76.84	95.98	95.85
9	3	3	2	1	82.88	94.95	98.96
k_1	81.77	80.68	92.01	88.90			
k_2	90.30	86.49	87.11	83.88			
k_3	90.12	95.02	83.07	89.42			
R	8.53	14.34	8.94	5.54			



(e) 单酚酶抑制试验(317 nm)曲酸质量浓度—酶活关系

(f) 单酚酶抑制试验(475 nm)曲酸质量浓度—酶活关系

时间为 50 min。综合单因素试验结果,调整最优组合为活性炭添加量为 5%,脱色温度为 75 ℃,pH 为 2.0,脱色时间为 50 min。

2.2.3 验证实验 根据正交试验所得最优条件进行验证实验,得到曲酸脱色率为 81.23%,得率为 96.65%,纯度为 97.85%,与正交试验结果相近,说明该最佳工艺条件稳定。

2.3 曲酸对酪氨酸酶的抑制作用

2.3.1 对酪氨酸酶单酚酶活性的抑制作用 由图 2 可知,相比空白对照,20 μg/mL 的曲酸溶液对酪氨酸酶单酚酶产生了抑制作用,随着曲酸质量浓度的增加,酶促反应速度明显下降,40,60,80,100 μg/mL 的曲酸溶液产生了几近一致的抑制效果,200 μg/mL 的曲酸溶液抑制作用达到最大值。曲酸对酪氨酸酶单酚酶活性在 317 nm 下的 IC_{50} 为 13.33 μg/mL。相比空白对照,20,40,60,80,

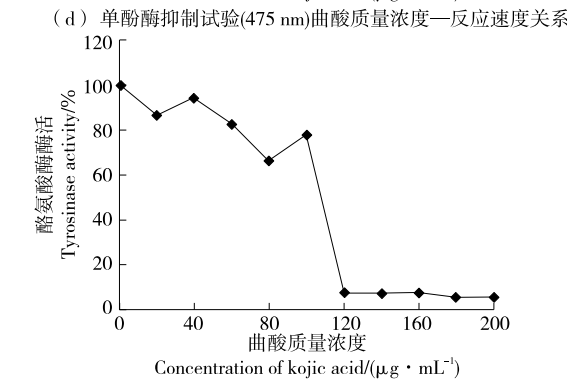
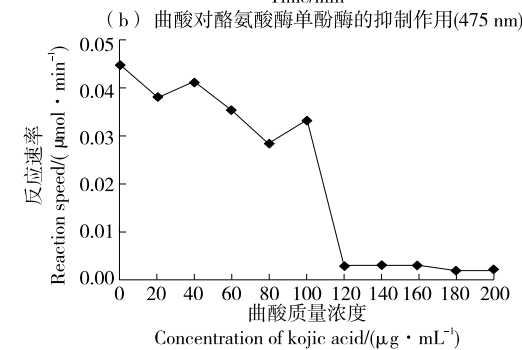
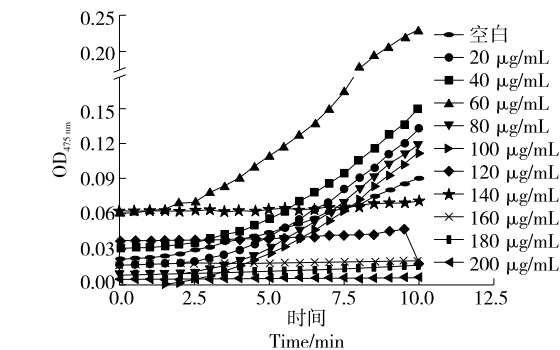


图 2 曲酸对酪氨酸酶单酚酶的抑制作用

Figure 2 Inhibitory effects of kojic acid on tyrosinase monophenolase

100 $\mu\text{g/mL}$ 的曲酸溶液抑制效果微弱,这是因为以 *L*-酪氨酸为底物,在 317 nm 下测定的是单酚酶抑制活性,475 nm 下为酪氨酸酶进一步氧化底物的双酚酶活性,所以浓度较低的曲酸溶液在抑制单酚酶活性后,曲酸-酪氨酸酶复合物可能发生了变化,导致在后续的抑制作用中失效。而高浓度的曲酸溶液,由于变化较小,如 120 $\mu\text{g/mL}$ 时的抑制作用明显,在 200 $\mu\text{g/mL}$ 时达到最

大。曲酸对酪氨酸酶单酚酶活性在 475 nm 下的 IC_{50} 为 107.59 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.3.2 对酪氨酸酶双酚酶活性的抑制作用 由图 3 可知,相比空白对照,20 $\mu\text{g/mL}$ 的曲酸溶液对酪氨酸酶双酚酶活性产生了明显的抑制作用,且随着曲酸质量浓度的增加,抑制作用显著增强,在 200 $\mu\text{g/mL}$ 时达到最大。曲酸对酪氨酸酶双酚酶活性的 IC_{50} 为 53.32 $\mu\text{g/mL}$ 。

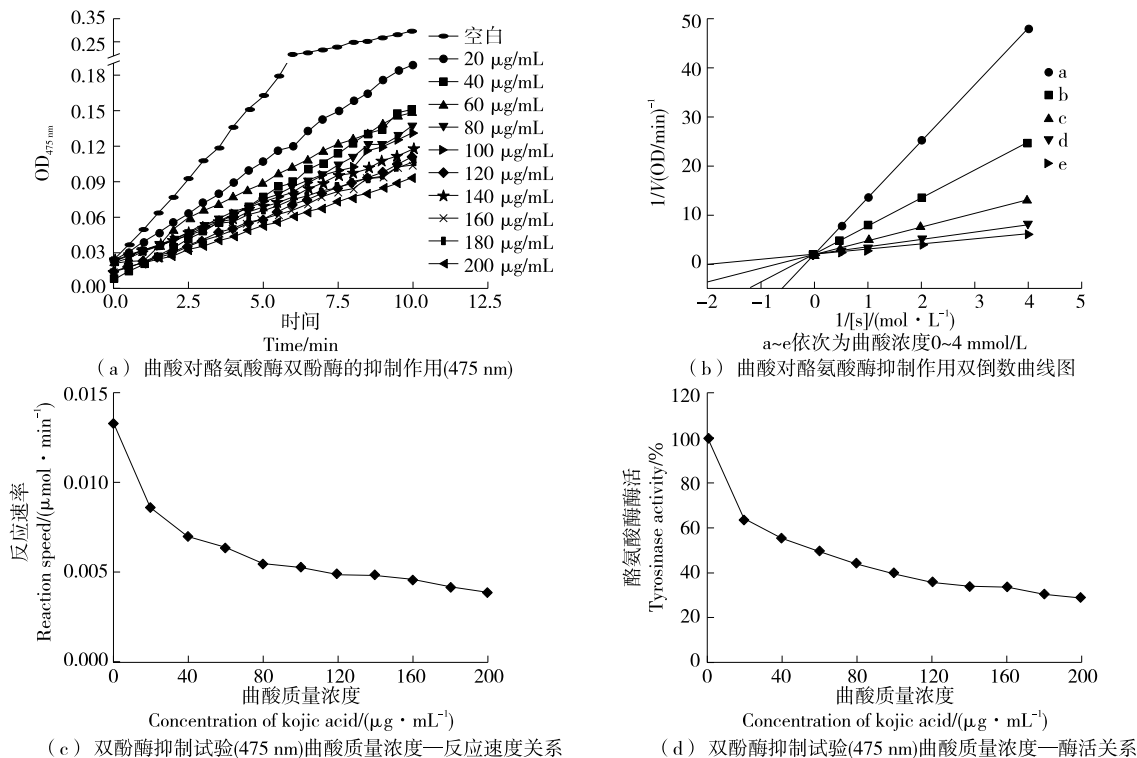


图 3 曲酸对酪氨酸酶双酚酶的抑制作用

Figure 3 Inhibitory effects of kojic acid on tyrosinase bisphenol enzyme

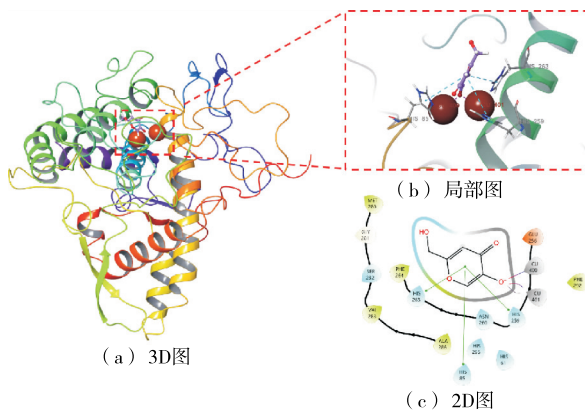
2.4 曲酸对酪氨酸酶的抑制动力学分析

根据 Lineweaver-Burk 双倒数曲线可以确定曲酸对酪氨酸酶的抑制作用类型为竞争性抑制(图 3),说明曲酸是与底物竞争性地与酪氨酸酶的活性中心结合进而抑制酪氨酸酶活性。根据米氏方程计算出相关的抑制动力学参数,其中,酪氨酸酶催化 *L*-DOPA 的双酚酶活性的 K_m 为 0.143 mmol/L,酪氨酸酶被 *L*-DOPA 饱和时达到的 $V_{\max}$ 为 524 U/mL。

2.5 曲酸与酪氨酸酶相互作用的分子对接模拟分析

2.5.1 与蘑菇酪氨酸酶相互作用的分子对接模拟分析

由图 4 可知,曲酸与蘑菇酪氨酸酶之间的结合位点主要为酪氨酸酶的 HIS 263、HIS 85、HIS 259 等氨基酸残基,曲酸深入到蘑菇酪氨酸酶活性口袋内部,蘑菇酪氨酸酶的 PHE 264、ALA 286 等对曲酸形成疏水作用。该配体与残基 HIS 263、HIS 85、HIS 259 各形成一个 π - π 键,与 Cu 400 形成一个盐桥,与 Cu 401 形成一个盐桥和



蓝色代表 π - π 键,红色表示盐桥

图 4 曲酸与蘑菇酪氨酸酶的分子对接位点及其相互作用

Figure 4 The molecular docking position and interactions between kojic acid and mushroom tyrosinase

一个金属离子键。

2.5.2 与小鼠酪氨酸酶相互作用的分子对接模拟分析

由图 5 可知,曲酸与小鼠酪氨酸酶之间的结合位点主要为酪氨酸酶的 PHE 347、ASN 342、ASN 337 等氨基酸残基,曲酸结合到小鼠酪氨酸酶活性口袋的表面,小鼠酪氨酸酶的 PHE 347、ALA 348、PHE 338、ALA 336 等对曲酸形成疏水作用力。该配体与残基 PHE 347、ASN 342、ASN 337 各形成一个氢键,与残基 SER 349 形成两个氢键。

2.5.3 与猩猩酪氨酸酶相互作用的分子对接模拟分析

由图 6 可知,曲酸与猩猩酪氨酸酶之间的结合位点主要为酪氨酸酶的 HIS 367,曲酸深入到猩猩酪氨酸酶活

性口袋内部,猩猩酪氨酸酶的 VAL 377、ILE 368 等对曲酸形成疏水作用力。该配体与残基 HIS 367 形成一个 π - π 键,与 Cu 1、Cu 2 各形成一个盐桥。

2.5.4 与人酪氨酸酶相互作用的分子对接模拟分析 由图 7 可知,曲酸与人酪氨酸酶之间的结合位点主要为酪氨酸酶的 SER 375、SER 380,曲酸深入到人酪氨酸酶活性口袋内部,人酪氨酸酶的 VAL 377、MET 374、PHE 207、HIS 367 等对曲酸形成疏水作用力。该配体与残基 SER 375、SER 380 各形成一个氢键,与残基 HIS 367 形成一个 π - π 键,与 Cu 2 形成一个金属离子键。

由表 3 可知,曲酸与蘑菇、小鼠、猩猩、人酪氨酸酶的对接得分分别为-7.515, -5.011, -5.537, -3.638,表明

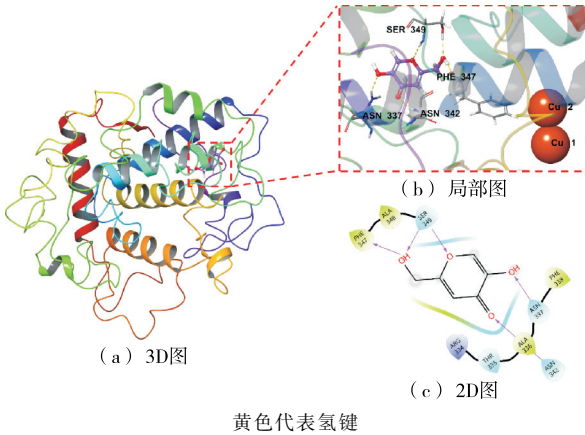


图 5 曲酸与小鼠酪氨酸酶的分子对接位点及其相互作用

Figure 5 The molecular docking position and interactions between kojic acid and mouse tyrosinase

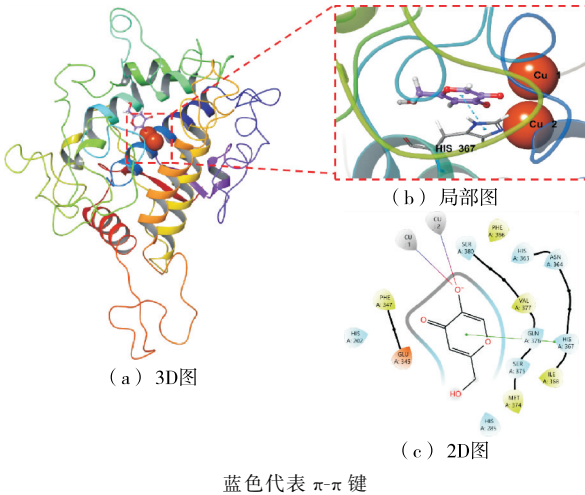


图 6 曲酸与猩猩酪氨酸酶的分子对接位点及其相互作用

Figure 6 The molecular docking position and interactions between kojic acid and western lowland gorilla tyrosinase

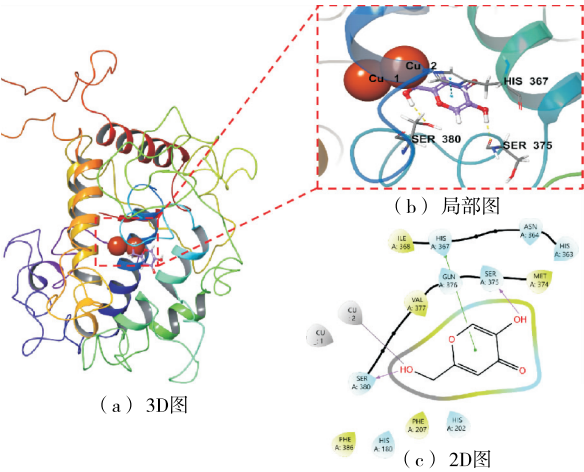


图 7 曲酸与人酪氨酸酶的分子对接位点及其相互作用

Figure 7 The molecular docking position and interactions between human tyrosinase and Kojic acid

表 3 曲酸与不同来源酪氨酸酶的分子对接 XP 得分、MM-GBSA 值及非共价键类型

Table 3 XP Gscore, MM-GBSA dG Bind and Non-covalent bond type of molecular docking between kojic acid and tyrosinase from different sources

目标物	XP 得分	MM-GBSAdG Bind/ (kJ · mol ⁻¹)	非共价键
蘑菇酪氨酸酶	-7.515	94.47	π - π 键、盐桥、金属离子键、疏水作用
小鼠酪氨酸酶	-5.011	-110.80	氢键、疏水作用
猩猩酪氨酸酶	-5.537	-1.17	π - π 键、盐桥、疏水作用
人酪氨酸酶	-3.638	6.45	氢键、 π - π 键、金属离子键、疏水作用

曲酸与不同来源酪氨酸酶的结合性能依次为蘑菇源>猩猩源>小鼠源>人源^[20-21]。对比分析 MM-GBSA dG Bind 结果,曲酸与蘑菇、小鼠、猩猩、人酪氨酸酶的结合自由能分别为 94.47, -110.80, -1.17, 6.45 kJ/mol, 表明曲酸与不同来源酪氨酸酶的结合稳定性依次为小鼠源>猩猩源>人源>蘑菇源^[20-21];且曲酸与酪氨酸酶之间形成的非共价键类型较多,以氢键、 π - π 键、盐桥、金属离子键以及疏水作用等为主,特别是与小鼠酪氨酸酶可形成 3 个氢键。相关研究^[22-23]表明,氢键数量越多,越有助于提高复合物的稳定性,进而抑制酪氨酸酶与底物的结合。

综上,曲酸能与不同来源酪氨酸酶活性中心口袋表面结合或者进入到活性中心口袋内部,与酪氨酸酶的氨基酸残基发生非共价结合,从而改变酪氨酸酶活性中心的构象,引起酪氨酸酶三级结构的改变,影响底物与酶活性中心的结合。同时也可推测出曲酸与不同来源酪氨酸酶活性中心的结合存在差异,即曲酸对不同来源的酪氨酸酶存在不同的抑制作用。因此,对不同酪氨酸酶抑制剂进行筛选开发时,应充分考虑抑制剂对不同来源的酪氨酸酶存在不同的抑制效果,如对果蔬保鲜适用的酪氨酸酶抑制剂不一定适用于美白产品的开发,应根据应用方向的不同选择不同来源的酪氨酸酶进行有针对性的研究。

3 结论

研究使用丙酮反复抽提浓缩发酵液,再结晶制得粗曲酸。结果表明,曲酸的最佳脱色工艺为活性炭添加量 5%,脱色温度 75℃,发酵液 pH 2.0,脱色时间 50 min,此时曲酸纯度为 97.85%。经 Lineweaver-Burk 双倒数作图分析得出曲酸是酪氨酸酶的竞争性抑制剂,结合分子对接模拟,表明曲酸可与不同来源的酪氨酸酶双铜活性中心直接结合,并与酪氨酸酶形成不同类型的非共价键,从而改变酪氨酸酶的空间结构并阻碍其与底物结合。同时,分子内氢键也可因分子平面性的增强而增加酶的抑制活性。因此,在筛选新型酪氨酸酶抑制剂时应充分考虑酪氨酸酶抑制剂的来源,从而有针对性地筛选出高效、安全、精准的酪氨酸酶抑制剂,进而获得酪氨酸酶抑制剂在食品保鲜、美容保健、病虫害防治等方面的良好应用效果。但抑制剂对不同来源酪氨酸酶的抑制效果差异的具体作用机制尚不清楚,后续可通过分子动力学模拟进一步深入研究。

参考文献

- [1] OBAID R J, MUGHAL E U, NAEEM N, et al. Natural and synthetic flavonoid derivatives as new potential tyrosinase inhibitors: A systematic review [J]. Royal Soc Chemistry Advances, 2021, 11 (36): 22 159-22 198.
- [2] 张芳, 王梦茹, 贾玉, 等. 曲酸真空浸渍处理对鲜切马铃薯冷藏期褐变及相关生理代谢的影响 [J]. 保鲜与加工, 2021, 21(1): 12-18.
- [3] ZHANG F, WANG M R, JIA Y, et al. Effect of vacuum impregnation with kojic acid addition on browning and the related physiological metabolism of fresh-cut potato during cold storage [J]. Storage and Process, 2021, 21(1): 12-18.
- [4] 蒋利亚. 不同浓度的曲酸溶液对藕带褐变的抑制及抗菌作用 [J]. 广东化工, 2021, 48(19): 38-40.
- [5] JIANG L Y. Inhibition and antibacterial effect of kojic acid solution with different concentrations on browning of lotus root belt [J]. Guangdong Chemical Industry, 2021, 48(19): 38-40.
- [6] FANG X H, JIANG L, ZHANG Z Z, et al. Design, synthesis and computational studies of N-(substituted-phenyl)-4-(4-phenyl-1-piperazinyl) butanamides as potent anti-melanogenic and tyrosinase inhibitors [J]. Journal of Molecular Structure, 2020, 1 210: 127969.
- [7] MASUM M N, YAMAUCHI K, MITSUNAGA T. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources as skin-lightening agents [J]. Reviews in Agricultural Science, 2019, 7: 41-58.
- [8] 刘敏, 黄湘鹭, 邢书霞. 化妆品中曲酸的安全性评价进展 [J]. 香料香精化妆品, 2023(3): 7-9, 35.
- [9] LIU M, HUANG X L, XING S X. Progress on safety evaluation of kojic acid in cosmetics [J]. Flavour Fragrance Cosmetics, 2023(3): 7-9, 35.
- [10] 蒋利亚. 曲酸及其衍生物在美容和药物制剂中的应用 [J]. 广东化工, 2021, 48(20): 124-126.
- [11] JIANG L Y. Application of kojic acid and its derivatives in cosmetic and pharmaceutical preparation [J]. Guangdong Chemical Industry, 2021, 48(20): 124-126.
- [12] SANADI R, DESHMUKH R. The effect of vitamin C on melanin pigmentation: A systematic review [J]. Journal of Oral and Maxillofacial Pathology, 2020, 24(2): 374-382.
- [13] 张阳阳, 姜兴旭. 响应面法优化米曲霉 Co-26 产曲酸发酵工艺参数研究 [J]. 发酵科技通讯, 2020, 49(2): 76-84.
- [14] ZHANG Y Y, JIANG X X. Optimization of fermentation parameters of kojic acid from *Aspergillus oryzae* Co-26 by response surface methodology [J]. Bulletin of Fermentation Science and Technology, 2020, 49(2): 76-84.
- [15] 高紫君. 米曲霉高产曲酸的诱变筛选及提取工艺研究 [D]. 天津: 天津科技大学, 2021: 32-38.
- [16] GAO Z J. Mutation breeding and extraction process of strain with high yield of kojic acid by *Aspergillus oryzae* [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2021: 32-38.
- [17] SRIVASTAVA J, MAL J, VERMA M, et al. Mini-review on Inhibitors of Human Tyrosinase [C]// The Conference BioSangam 2022, Emerging Trends in Biotechnology. Prayagraj, India: Vishnu Agarwal, Rupika Sinha, Joyabrata Mal, 2022: 96-105.
- [18] PENG Z, WANG G, ZENG H, et al. A systematic review of synthetic tyrosinase inhibitors and their structure-activity

- relationship[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2022, 62(15): 4 053-4 094.
- [13] XIE L, CHEN Q, HUANG H, et al. Inhibitory effects of cupferron on the monophenolase and diphenolase activity of mushroom tyrosinase[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2003, 35: 1 658-1 666.
- [14] 孔令悦, 向华, 唐克华, 等. 白及多糖脂质体的制备及对酪氨酸酶活性的影响[J]. 食品与机械, 2020, 36(5): 160-163, 174.
- KONG L Y, XIANG H, TANG K H, et al. Preparation of polysaccharide liposomes from *Betula striata* and their effects on tyrosinase activity [J]. Food & Machinery, 2020, 36(5): 160-163, 174.
- [15] 余雨婷, 张彦, 张迎, 等. 基于分子对接探究紫苏粗提物对代谢综合征相关酶的抑制作用[J]. 食品与机械, 2022, 38(4): 183-188.
- YU Y T, ZHANG Y, ZHANG Y, et al. Explore the inhibitory effect of *Perilla* crude extract on metabolic syndrome-related enzymes based on molecular docking[J]. Food & Machinery, 2022, 38(4): 183-188.
- [16] 彭知云. 新型多功能酪氨酸酶抑制剂的构建与机制研究及在食品保鲜中的应用[D]. 上海: 上海海洋大学, 2022: 117-138.
- PENG Z Y. The construction and mechanism study of novel multifunctional tyrosinase inhibitors and their application in food preservation [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2022: 117-138.
- [17] 李晓芳. 酪氨酸酶与抑制剂作用机制的分子模拟及光谱学研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2022: 36-49.
- LI X F. Mechanism study on the interaction between tyrosinase and inhibitor by molecular simulation and spectroscopy [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2022: 36-49.
- [18] LI J, FENG L, LIU L, et al. Recent advances in the design and discovery of synthetic tyrosinase inhibitors[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2021, 224: 113744.
- [19] HASHIM F J, VICHITPHAN S, HAN J, et al. Alternative approach for specific tyrosinase inhibitor screening: Uncompetitive inhibition of tyrosinase by *Moringa oleifera* [J]. Molecules, 2021, 26(15): 4 576.
- [20] MANN T, GERWAT W, BATZER J, et al. Inhibition of Human tyrosinase requires molecular motifs distinctively different from mushroom tyrosinase [J]. Journal of Investigative Dermatology, 2018, 138(7): 1 601-1 608.
- [21] HALDYS K, LATAJKA R. Thiosemicarbazones with tyrosinase inhibitory activity[J]. Med Chem Comm, 2019, 10(3): 378-389.
- [22] LAVANYA G, MAGESH C J, VENKATAPATHY K, et al. Design, synthesis, spectral characterization and molecular docking studies of novel pyranoquinolinyl dihydropyridine carboxylates as potential antibacterial agents including *Vibrio cholerae* with minimal cytotoxicity towards fibroblast cell line (L-929) [J]. Bioorganic Chemistry, 2021, 107: 104582.
- [23] ASHOORIHA M A, KHOSHNEVISZADEH M, KHOSHNEVISZADEH M L, et al. Kojic acid natural product conjugates as mushroom tyrosinase inhibitors [J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2020, 201: 112480.
- (上接第8页)
- [25] SHI Y, LI X, HUANG A. A metabolomics-based approach investigates volatile flavor formation and characteristic compounds of the Dahe black pig dry-cured ham [J]. Meat Science, 2019, 158: 107904.
- [26] SHAHIDI F, ZHONG Y. Lipid oxidation and improving the oxidative stability[J]. Chem Soc Rev, 2010, 39(11): 4 067-4 079.
- [27] SIDIRA M, KANDYLIS P, KANELAKI M, et al. Effect of immobilized *Lactobacillus casei* on the evolution of flavor compounds in probiotic dry-fermented sausages during ripening[J]. Meat Science, 2015, 100: 41-51.
- [28] BIANCHI F, CANTONI C, CARERI M, et al. Characterization of the aromatic profile for the authentication and differentiation of typical Italian dry-sausages[J]. Talanta, 2007, 72(4): 1 552-1 563.
- [29] GRILO F S, WANG S C. Walnut (*Juglans regia* L.) volatile compounds indicate kernel and oil oxidation[J]. Foods, 2021, 10(2): 329.
- [30] 朱萌. 脂肪酸对速酿鱼露香气形成的影响[D]. 武汉: 湖北工业大学, 2020: 47-48.
- ZHU M. Effect of fatty acids on formation of aroma of fish sauce during fast fermentation [D]. Wuhan: Hubei University of Technology, 2020: 47-48.
- [31] WANG J, LI X, WU Y, et al. HS-SPME/GC-MS reveals the season effects on volatile compounds of green tea in high-latitude region [J]. Foods, 2022, 11(19): 3 016.
- [32] VAN GEMERT L J. Odour thresholds: Compilations of odour threshold values in air, water and other media: Second edition[M]. Netherlands: Oliemans Punter & Partners BV, 2011: 1-536.
- [33] 李莉峰, 时月, 李婷, 等. 促生菌剂处理对网纹甜瓜风味的影响[J]. 食品工业科技, 2022, 43(19): 108-116.
- LI L F, SHI Y, LI T, et al. Effect of growth promoting agents on flavor of netted melon [J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(19): 108-116.
- [34] FAN W, QIAN M C. Characterization of aroma compounds of chinese "Wuliangye" and "Jiannanchun" liquors by aroma extract dilution analysis[J]. J Agric Food Chem, 2006, 54(7): 2 695-2 704.
- [35] 唐柯, 张小倩, 李记明, 等. 威代尔冰葡萄酒发酵过程中香气动态变化规律[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(1): 62-70.
- TANG K, ZHANG X Q, LI J M, et al. Dynamic changes of aroma during Vidal ice wine fermentation [J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(1): 62-70.