

## 乳酸菌代谢物中黄嘌呤氧化酶抑制剂的筛选

崔方超<sup>1</sup>, 韩瑜娟<sup>1</sup>, 李婷婷<sup>2\*</sup>, 赵贵琴<sup>1</sup>, 励建荣<sup>1\*</sup>, 林洪<sup>3</sup>, 劳敏军<sup>4</sup>,  
于建洋<sup>5</sup>, 郭晓华<sup>6</sup>, 王轰<sup>7</sup>

(<sup>1</sup>渤海大学食品科学与工程学院 生鲜农产品贮藏加工及安全控制技术国家地方联合工程研究中心 辽宁锦州 121013

<sup>2</sup>大连民族大学生命科学学院 辽宁大连 116600

<sup>3</sup>中国海洋大学食品科学与工程学院 山东青岛 266100

<sup>4</sup>浙江兴业集团有限公司 浙江舟山 316022

<sup>5</sup>荣成泰祥食品股份有限公司 山东荣成 264300

<sup>6</sup>山东美佳食品股份有限公司 山东日照 276800

<sup>7</sup>蓬莱京鲁渔业有限公司 山东烟台 264000)

**摘要** 乳酸菌及其代谢产物以其天然、良好的抗菌活性以及安全、可靠等优点被广泛使用。目前从乳酸菌代谢物中筛选黄嘌呤氧化酶(XOD)抑制剂鲜有报道。本文将分子对接技术与高效液相色谱(HPLC)技术结合,筛选乳酸菌代谢产物中的XOD抑制剂。试验结果表明:选取的5株乳酸菌的代谢产物均对XOD有较强地抑制作用;上清液中有有机酸类物质抑制了XOD活性。使用分子对接技术将代谢物中的有机酸类物质与XOD进行对接,并选择其中4种验证其对XOD的抑制作用。结果显示:二氢咖啡酸(DHCA)、16-羟基十六烷酸、十二烷二酸(DDA)、4-十二烷基苯磺酸对XOD有不同程度的抑制作用,其中16-羟基十六烷酸表现出较强的XOD抑制效果。

**关键词** 乳酸菌;黄嘌呤氧化酶;分子对接;抑制剂

文章编号 1009-7848(2022)08-0011-11 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2022.08.002

随着我国经济水平的飞速发展,国民饮食结构发生了显著变化,其中以高能量、高嘌呤类食物摄入显著增加为特征。在人体内的代谢途径中,嘌呤类物质在黄嘌呤氧化酶(Xanthine oxidase, XOD)的催化作用下最终转化为尿酸。XOD活性过高或患有代谢系统疾病会使尿酸大量累积,进而引发运动功能受损、高尿酸血症和痛风,长期高尿酸血症还可诱发高血压、糖尿病、冠心病、肾衰竭等疾病<sup>[1]</sup>。随着高尿酸血症和痛风病发病率呈逐年增加且年轻化的趋势,高尿酸血症成为继“三高”之后的第4个危险因素<sup>[2]</sup>。

目前,对痛风的治疗主要从两方面入手:一方面是抑制尿酸的生成,另一方面是促进尿酸的排泄。抑制尿酸生成是通过抑制腺苷脱氨酶

(Adenosine Deaminase, ADA)和XOD的活性达成,它们是催化并调控尿酸生成的关键酶。促进尿酸排泄是通过调控尿酸转运蛋白的表达来完成,抑制其在肾脏的重吸收,减少尿酸在血液中的积累,降低血清尿酸水平<sup>[3]</sup>。其中对XOD的抑制研究较多,在临床治疗中,别嘌呤醇、非布司他等已被广泛用于痛风、高尿酸血症等的治疗,然而这些药物具有较大的副作用,如引起患者肝功能损害,出现头痛、胃肠道疾病以及腹泻等不良症状<sup>[4]</sup>。关于植物活性物质抑制XOD、降低尿酸含量的研究主要集中在多酚、黄酮和皂苷类物质。多酚类物质如葛根素<sup>[5]</sup>、山奈酚(木犀草素)<sup>[6]</sup>、芥子酸<sup>[7]</sup>、阿魏酸<sup>[7]</sup>、丁香酸<sup>[7]</sup>、绿原酸<sup>[8]</sup>、咖啡酸<sup>[9]</sup>等都具有明显XOD抑制性。黄酮类物质如槲皮素<sup>[10]</sup>、黄芩苷<sup>[11]</sup>也具有相同功效。皂苷类物质如穿山甲总皂苷<sup>[12]</sup>,是从药材穿山甲中提取的可抑制XOD的活性成分。

由于活性肽具有分子质量小,容易被人体吸收等优点,近些年作为抑制剂成为新的研究热点。Li等<sup>[13]</sup>以核桃蛋白衍生肽为研究对象,对其体外XOD抑制活性及其机制进行研究,结果表明:含

收稿日期: 2021-08-07

基金项目: “十三五”国家重点研发计划蓝色粮仓科技创新  
重点专项(2019YFD0901702)

作者简介: 崔方超(1989—),男,博士,讲师

通信作者: 李婷婷 E-mail: tingting780612@163.com

励建荣 E-mail: lijr6491@163.com

色氨酸 (Trp) 的核桃蛋白源肽能有效抑制 XOD, Trp 数量的增加可显著提高肽的 XOD 抑制活性, 且含 Trp 的肽具有很好的抗氧化活性。He 等<sup>[14]</sup>从金枪鱼蛋白水解物中分离出 13 种二肽和三肽, 采用高效液相色谱法验证了它们的 XOD 抑制活性, 结果表明: 含苯丙氨酸(Phe)的肽比含 Trp 的肽具有更高的 XOD 抑制活性, 其中 Phe-His 的 XOD 抑制活性最高。赵谋明等<sup>[15]</sup>通过酶解金枪鱼制备 XOD 抑制肽, 得到 XOD 抑制率为 30.96% 的金枪鱼酶解物。邹琳<sup>[16]</sup>从鲑鱼酶解物中分离得到具有 XOD 抑制作用的五肽, 人工合成此五肽证实其具有较强的 XOD 抑制活性, 分子对接结果显示其能够进入 XOD 中含 Mo 原子的活性中心, 并通过氢键、疏水相互作用及范德华力等与活性中心周围的氨基酸残基产生相互作用, 与黄嘌呤之间存在竞争性抑制作用。

益生菌不仅能够促进人体健康, 而且能改善食品属性, 被越来越多地应用于食品工业。陈沈梁等<sup>[17]</sup>从泡菜中分离得到 56 株乳酸菌, 研究其对嘌呤核苷的降解能力, 最终筛选到 1 株具有高效降解嘌呤核苷的乳酸菌, 进一步的试验证明此菌株为短乳杆菌, 具有耐胆盐、耐酸以及耐受饱腹人工胃肠液的能力, 这为进一步研发功能性乳酸菌食品提供了理论依据。邓英等<sup>[18]</sup>用短乳杆菌 DM9218 干预高果糖饮食诱导的高尿酸血症小鼠, 结果表明: 短乳杆菌 DM9218 一方面可以通过改善肠屏障功能, 降低内毒素水平, 从而缓解 XOD 的表达及活性, 另一方面由“肝-肠循环”直接降解肌苷, 从而影响血清尿酸水平。牛春华等<sup>[19]</sup>从 5 株植物乳杆菌中筛选出 1 株 UA149, 具有较强的嘌呤核苷降解能力, 能够显著降低高尿酸血症模型大鼠血尿酸水平, 降低血清 XOD 活性, 同时降低白三烯、血栓素和炎症因子水平, 可应用于高尿酸血症的预防和辅助治疗。

目前研究较多的是益生菌自身对高尿酸血症的影响, 而对益生菌代谢产物的研究相对较少。本文将研究乳酸菌代谢产物对 XOD 的抑制作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

乳酸菌 NRRLB-14768、IMAU 4005、NCL

13、SC 3-2-1、DLL-500 均为实验室自主分离鉴定的乳酸菌菌株。

MRS 肉汤、黄嘌呤氧化酶、黄嘌呤标准品, 北京索莱宝科技有限公司; 甲醇(色谱纯级), 上海麦克林生化科技有限公司; 冰乙酸(色谱纯级)、十二烷二酸, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 四丁基氢氧化铵离子对试剂(色谱纯级), 上海迈瑞尔公司; 二氢咖啡酸, 北京天威泰达科技有限公司; 4-十二烷基苯磺酸, 上海贤鼎生物科技有限公司; 16-羟基棕榈酸, 北京格瑞通达科技有限公司; 其它试剂(均为分析纯级)购自北京索莱宝科技有限公司。

### 1.2 仪器与设备

LDZX-75KBS 立式高压蒸汽灭菌器, 上海申安医疗器械厂; SW-CJ-2FD 超净工作台, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; THZ-D 台式恒温振荡器, 太仓市实验设备厂; Multifuge X1R 高速冷冻离心机, 赛默飞世尔(中国)有限公司; LC-2030 高效液相色谱仪岛津, 日本岛津公司; MS105DU 电子分析天平, 瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司; DK-8D 电热恒温水槽, 上海-恒科学仪器有限公司; imark 酶标仪, 美国 BIO-RAD; 分子模拟软件 Discovery Studio (DS)2017 R2 Client, 美国 Accelrys 公司。

### 1.3 试验方法

1.3.1 菌种活化 取-80℃冰箱保存的菌种, 以 2% 接种量接种于 10 mL MRS 肉汤培养基中, 37℃ 培养 16 h 左右。以 2% 接种量依次传代, 取第 2 代培养液 1 mL 于 50 mL 培养基中扩大培养。

1.3.2 乳酸菌代谢产物的获得 取第 3 代培养液 30 mL 于离心管中, 4 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 经细菌过滤器(0.22 μm)过滤, 所得无菌滤液即为乳酸菌的代谢产物<sup>[20]</sup>, 将无菌滤液在 95℃ 高温条件下灭酶 10 min 备用。

1.3.3 乳酸菌代谢产物抑制 XOD 效果验证 参考宋敏杰<sup>[21]</sup>的方法稍作修改, 准确称取 0.0100 g 黄嘌呤标准品用超纯水溶解, 并用 1 mol/L 的 NaOH 助溶, 用 50 mL 的容量瓶定容, 配制成质量浓度为 200 μg/mL 的标准溶液备用。随后所需溶液均用超纯水进行稀释, 所有待测样品过 0.22 μm 滤膜, 在特定的色谱条件下进行嘌呤含量的测定, 从而确

定代谢产物对 XOD 抑制效果。

色谱条件: 色谱柱 Agilent ZORBAX Eclipse C18 Plus(4.6 mm×250 mm × 5 μm); 流速 0.5 mL/min; 柱温 40 °C; 进样量 10.0 μL; 检测波长 254 nm。将超纯水、冰乙酸、四丁基氢氧化铵按体积比 997:1.5:1.5 混合作为流动相 C, 再与甲醇(流动相 B)按 95:5 混合作为最终流动相。

试验设计如下: 空白组为黄嘌呤(880 μL)+磷酸盐缓冲液(120 μL); 对照组为黄嘌呤(880 μL)+磷酸盐缓冲液(40 μL)+XOD(80 μL); 试验组: 黄嘌呤(880 μL)+无菌滤液(40 μL)+XOD(80 μL)。试验所用黄嘌呤质量浓度均为 50 μg/mL, XOD 为 0.1 U/mL, XOD 作用时间为 30 min, 反应温度为 35 °C, 反应结束后, 需将反应管放在 95 °C 水浴灭酶 10 min, 灭酶后用高效液相色谱法检测体系中黄嘌呤的含量。为排除空白培养基的影响, 将无菌滤液换成等量的培养基进行验证。

1.3.4 乳酸菌代谢物成分的搜集 通过对在线数据库 PubChem (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 以及已经出版的文献进行检索, 对无菌滤液中的化学成分进行收集、整理。对搜集的化学物质进行优化, 包括 2D 结构转化为 3D 结构, 加氢、能量最小化以及添加 HRRMM 力场, 建立无菌滤液所含成分 3D 结构的化合物库。

### 1.3.5 抑制剂特性研究

1.3.5.1 pH 值排除试验 由于乳酸菌发酵会产生大量的乳酸、乙酸等酸类物质, 从而使上清液的 pH 降低, 为排除 pH 值对 XOD 活性的影响, 对上清液的 pH 值进行检测。

1.3.5.2 有机酸排除试验 为确定有机酸是否为抑制 XOD 的活性物质, 将乳酸菌上清液使用 1 mol/L NaOH 调节 pH 为 7, 采用高效液相色谱法测定中和后的乳酸菌上清液对黄嘌呤氧化酶的抑制作用<sup>[22]</sup>。

1.3.6 分子对接 分子对接可以通过研究分子间相互作用从而预测分子间的结合方式, 因而被广泛地应用于分析小分子配体与蛋白相互作用的结合机制以及进行抑制剂的筛选。参考 Li 等<sup>[23]</sup>的方法, 进行适当调整。从 RCSB 蛋白质数据库(<http://www.rcsb.org/pdb>)选择 XOD 的 3D 结构(PDB ID: 3NVY), 去水加氢, 修复不完整残基, 删除配体, 准

备分子对接。

XOD 的 X 射线晶体结构表明, 它有两个对称相关的结构域单体, 是以同型二聚体形式表示的氧化还原酶, 每个单体都包含一个 C-末端的钼(Mo)结构域, 包括 4 个氧化还原中心、1 个中心黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)辅因子和 1 个具有两个铁硫中心的 N-端结构域。XOD 含有两个分离的底物结合位点, Mo 中心和 FAD 中心。黄嘌呤的氧化发生在 Mo 中心, 底物氧的还原发生在 FAD 中心, 转移电子产生超氧阴离子(O<sup>2-</sup>)或过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)自由基<sup>[11]</sup>。

3NVY 是牛乳中的 XOD 与槲皮素相结合的复合晶体结构, 张岑等<sup>[24]</sup>研究发现, 槲皮素通过占据底物黄嘌呤进入 XOD 活性中心的通道, 抑制了 XOD 对黄嘌呤的催化, 从而减少了尿酸的生成。在本次分子对接过程中选择槲皮素所在位置作为结合位点, 即活性位点 AC5。该结合位点共有 18 个氨基酸残基结合位点: Phe1150、Ser1008、Ala1079、Arg880、Thr1010、Phe1009、Phe914、Ser876、Leu1014、Leu873、Leu648、Val1011、Phe649、Phe1013、Lys771、Pro1076、Glu802、Ala1078 在该结合位点处能与这些氨基酸残基结合, 则有抑制 XOD 的可能性。

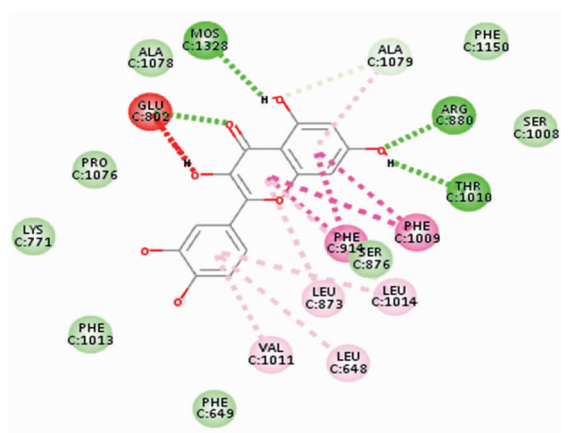


图 1 XOD 与槲皮素结合活性位点 2D 示意图

Fig.1 2D schematic diagram of XOD binding active site with quercetin

将得到的 XOD 晶体结构导入分子模拟软件 DS 中, 并对其进行分子对接前的去水、加氢等一系列准备操作。从 NCBI 数据库中收集酸类代谢

产物的3D结构,并将3D结构作为配体,进行能量最小化,并建立分子库。

以3NVY作为受体蛋白,以乳酸菌代谢物为配体,以原配体结合作用位点(X:36.3141,Y:11.793,Z:17.8448)为对接中心,以15为对接半径,采用配体对接工具栏的半柔性对接,并且设置参数为刚性优化、快速筛选,其余设置为默认值进行分子对接。按打分将筛选出的乳酸菌代谢产物进行下一步操作。

**1.3.7 黄嘌呤氧化酶抑制效果验证** 对比已经研究出的具有XOD抑制活性的物质所具有的结构,并结合分子对接的打分,选出打分较高的物质通过高效液相色谱法进行活性验证,以黄嘌呤转化量反映酶活性变化,通过梯度浓度反应探索抑制率与抑制剂之间的关系。用880 μL黄嘌呤(50 μg/mL)与80 μL XOD(0.1 U/mL)反应作为对照,在反应体系中分别加入0.1,0.2,0.3,0.4,0.5,0.6,0.7 mg/mL的标准品40 μL,根据加入标准品后对整个反应体系中黄嘌呤转化量的影响确定其抑制作用。整个反应体系在35℃下反应30 min,随后在95℃条件下水浴10 min进行灭酶。用1.3.3节的色谱条件进行等度洗脱检测。抑制率计算公式为:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{\text{试验组} - \text{对照组}}{\text{空白组} - \text{对照组}} \times 100$$

**1.3.8 数据处理** 使用Excel 2010及OriginPro 8.5对试验中的数据进行整理分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 乳酸菌代谢物对XOD抑制效果验证

由图2可知,在设定的液相条件下,黄嘌呤的出峰时间为6.596 min,其峰面积为3 294 685;在相同条件下加入80 μL XOD后黄嘌呤的峰面积明显减小(峰面积为1 821 383),说明在该反应条件下XOD具有良好的酶活,能够催化黄嘌呤。在相同反应体系中分别加入40 μL NRRLB-14769、IMAU 4008、DLL-500、NCL 13、SC 3-2-1 5株乳酸菌的代谢产物后黄嘌呤的峰面积分别为3 222 677,3 099 157,3 096 238,2 415 234,2 161 694,可以看出5株乳酸菌的代谢产物均对XOD具有明显的抑制作用,且抑制效果大小为

NRRLB-14769>IMAU 4008>DLL-500>NCL 13>SC 3-2-1,其中菌株NRRLB-14769、IMAU 4008和DLL-500的代谢产物对XOD的抑制效果较强。由此可以得出不同乳酸菌代谢物对XOD抑制性有显著差异,可能是不同的乳酸菌所产生的代谢物质及其含量不同影响对XOD的抑制率。

从图3中可以看出,与不加XOD组相比,加入XOD组黄嘌呤的含量显著减少。加入空白培养基的试验组与对照组相比,黄嘌呤的含量没有明显变化,说明空白培养基不含有抑制XOD的活性成分,从而说明是乳酸菌代谢产物抑制了XOD活性。

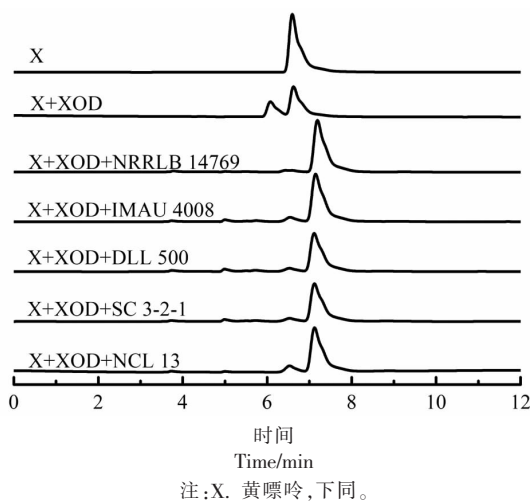
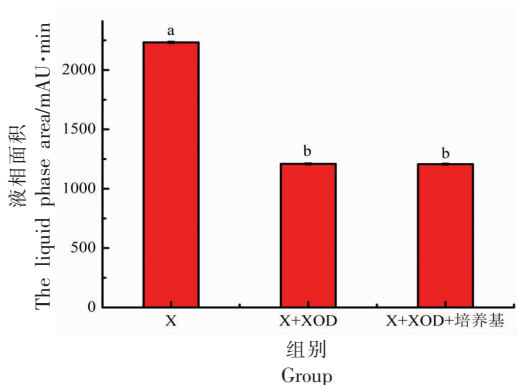


图2 不同乳酸菌代谢产物对XOD的抑制作用  
Fig.2 Inhibitory effect of different metabolites of lactic acid bacteria on XOD



注:不同小写字母表示显著性差异( $P < 0.05$ )。

图3 培养基对XOD的抑制效果

Fig.3 Inhibitory effect of culture medium on XOD

## 2.2 乳酸菌中代谢产物成分收集

通过文献收集、整理、分析,共得到乳酸菌的代谢产物76种(见表1)。目前,乳酸菌及其代谢产物在食品行业有广泛的应用,如发酵乳制品、肉制品、泡菜、酒类饮料等,是生产中非常重要的发

酵剂和风味物质。乳酸菌发酵代谢的最终产物包括多种酸类物质(乳酸、乙酸、甲酸)和乙醇等<sup>[25]</sup>,具体成分因菌种不同有较大差异,本文主要研究乳酸菌的胞外代谢物。从表1中可以看出,乳酸菌代谢物除有机酸外,还含有一些氨基酸、嘌呤和嘧

表1 乳酸菌代谢产物

Table 1 *Lactobacillus* metabolites

序号	名称	参考文献	序号	名称	参考文献
1	甲酸	[25]	39	B族维生素	[29]
2	乙酸	[25]	40	延胡索酸	[25]
3	乙醇	[25]	41	苹果酸	[25]
4	琥珀酸	[25]	42	$\alpha$ -酮戊二酸	[25]
5	芥酸酰胺	[26]	43	鸟嘌呤	[26]
6	过氧化氢	[27]	44	腺嘌呤	[26]
7	细菌素	[27]	45	胞嘧啶	[26]
8	双乙酰(丁二酮)	[27]	46	反式-3-吡啶丙烯酸	[26]
9	丙酸	[27]	47	吡啶-3-丙烯酸	[26]
10	$\gamma$ -氨基丁酸	[28]	48	缬草脯氨酸	[26]
11	乳酸	[25]	49	鸟苷一磷酸	[26]
12	甜菜碱	[26]	50	聚乙二醇	[26]
13	胞外多糖	[29]	51	亮氨酸脯氨酸	[26]
14	乙酰胆碱	[26]	52	腺苷	[26]
15	烟酸	[26]	53	腺苷3'5'-环一磷酸	[26]
16	2,4-二甲基苯甲醛	[26]	54	三苯基膦氧化物	[26]
17	邻苯三酚	[26]	55	邻苯二甲酸二异丁酯	[26]
18	苯乳酸	[27]	56	肉豆蔻基硫酸盐	[26]
19	柠檬酸	[26]	57	L-焦谷氨酸	[26]
20	曲酸	[26]	58	DL-赖氨酸	[26]
21	对香豆酸	[26]	59	吡啶甲酸	[26]
22	邻香豆酸	[26]	60	D-(+)-焦谷氨酸	[26]
23	3,5-二-叔丁基-4-羟基苯甲醛	[26]	61	L-谷氨酸	[26]
24	2,6-二-叔丁基-1,4-苯醌	[26]	62	亮氨酸	[26]
25	吡啶-3-丙烯酸	[26]	63	L-苯丙氨酸	[26]
26	N,N'-二环己基脒	[26]	64	脯氨酸	[26]
27	2,5-二叔丁基对苯二酚	[26]	65	L-正亮氨酸	[26]
28	3,4-二羟基苯基丙酸	[26]	66	异亮氨酸	[26]
29	邻苯二甲酸二丁酯	[26]	67	腺苷5'-一磷酸	[26]
30	吡啶-3-乳酸	[26]	68	十二甲基环己烷	[26]
31	邻苯二甲酸单(2-乙基己基)酯	[26]	69	DL-色氨酸	[26]
32	十二烷二酸	[26]	70	十二烷基硫酸盐	[26]
33	16-羟基十六烷酸	[26]	71	(15Z)-9,12,13,-三羟基-15-十八碳烯酸	[26]
34	别嘌呤醇	[26]	72	L-赖氨酸	[26]
35	4-十二烷基苯磺酸	[26]	73	DL-正亮氨酸	[26]
36	次黄嘌呤	[26]	74	腺苷二磷酸	[26]
37	黄嘌呤	[26]	75	油酸酰胺	[26]
38	二苯甲酮	[26]	76	环(苯丙氨酸-脯氨酸)	[26]

啉类物质为乳酸菌生长所需要的物质,另外甜菜碱、对香豆酸、别嘌呤醇是经研究证明具有 XOD 抑制活性。

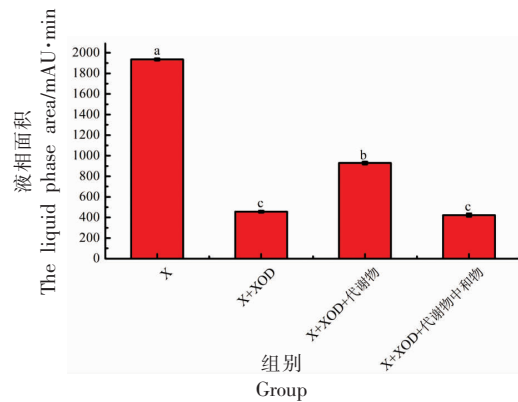
### 2.3 抑制剂特性研究

乳酸菌代谢会产生大量的酸性物质,使上清液呈现酸性环境,为排除 pH 值对 XOD 活性的影响,对上清液的 pH 值进行了检测,结果显示上清液的 pH 值为 4.20~4.9,有文献<sup>[30]</sup>表明,在此 pH 值条件下,XOD 的活性不受影响,说明导致 XOD 活性降低的物质来源于乳酸菌代谢产物。使用氢氧化钠溶液将上清液的 pH 值调至中性,研究上清液对 XOD 的抑制作用。从图 4 可以看出中和后的上清液对 XOD 没有抑制作用,而没有中和的上清液对 XOD 具有明显的抑制作用,判断对 XOD 产生抑制作用的是有机酸类物质。

### 2.4 有机酸类物质 XOD 分子对接结果

已经判断出上清液中的有机酸类物质抑制了 XOD 活性,将表 1 中的有机酸与 XOD 进行分子对接,并且选择打分较高的几个物质进行验证。从表中可以看出 3,4-二羟基苯基丙酸(Dihydrogen caffeic acid, DHCA)、16-羟基十六烷酸、十二烷二酸(Dodecanedioic acid, DDA)、4-十二烷基苯磺酸这 4 种物质与 XOD 分子对接打分较高,处于前列。

化合物需要与 XOD 结合后,才能产生正向或反向的作用,基于此分析 DHCA、16-羟基十六烷酸、DDA、4-十二烷基苯磺酸等化合物在分子对接



注:不同小写字母表示显著性差异( $P<0.05$ )。

图 4 pH 值对 XOD 活性的影响

Fig.4 Effect of pH value on XOD activity

过程中与 XOD 的结合形式。图 5 为 4 种化合物与 XOD 结合后的 2D 可视化分析图。

图 5a 为 DHCA 和 XOD 的相互作用模式图,其中 DHCA 与 XOD 的氨基酸残基 Ser876、Val1011、Ala1079 以及 XOD 中心 Mos1328 之间形成氢键相互作用,并与 Val1011 之间形成疏水相互作用。图 5b 为 4-十二烷基苯磺酸与 XOD 相互作用模式图,其中 4-十二烷基苯磺酸与 XOD 的氨基酸残基 Lys771 之间形成氢键相互作用,与 Leu1014、Ser876 之间形成疏水相互作用。图 5c 为 16-羟基十六烷酸与 XOD 的相互作用模式图,其中 16-羟基十六烷酸与 XOD 的氨基酸残基 Arg880 之间形成氢键相互作用。图 5d 为 DDA 与 XOD 的相互作用模式图,其中 DDA 与 XOD 的氨

表 2 分子对接结果

Table 2 The results of molecular docking

序号	名称	分值	序号	名称	分值
1	4-十二烷基苯磺酸	137.92	14	烟酸	70.17
2	16-羟基十六烷酸	132.90	15	邻苯三酚	69.42
3	十二烷二酸	103.75	16	琥珀酸	65.99
4	3,4-二羟基苯基丙酸	100.80	17	邻苯二甲酸二丁酯	65.78
5	2,5-二叔丁基对苯二酚	99.79	18	苹果酸	65.69
6	邻苯二甲酸单(2-乙基己基)酯	98.94	19	$\gamma$ -氨基丁酸	65.24
7	曲酸	79.33	20	乳酸	55.29
8	吡啶-3-丙烯酸	78.70	21	丙酸	49.00
9	吡啶-3-乳酸	75.36	22	乙酸	45.75
10	苯乳酸	74.71	23	延胡索酸	43.97
11	吡啶甲酸	74.71	24	柠檬酸	43.67
12	$\alpha$ -酮戊二酸	72.66	25	甲酸	0.00
13	对香豆酸	71.41			

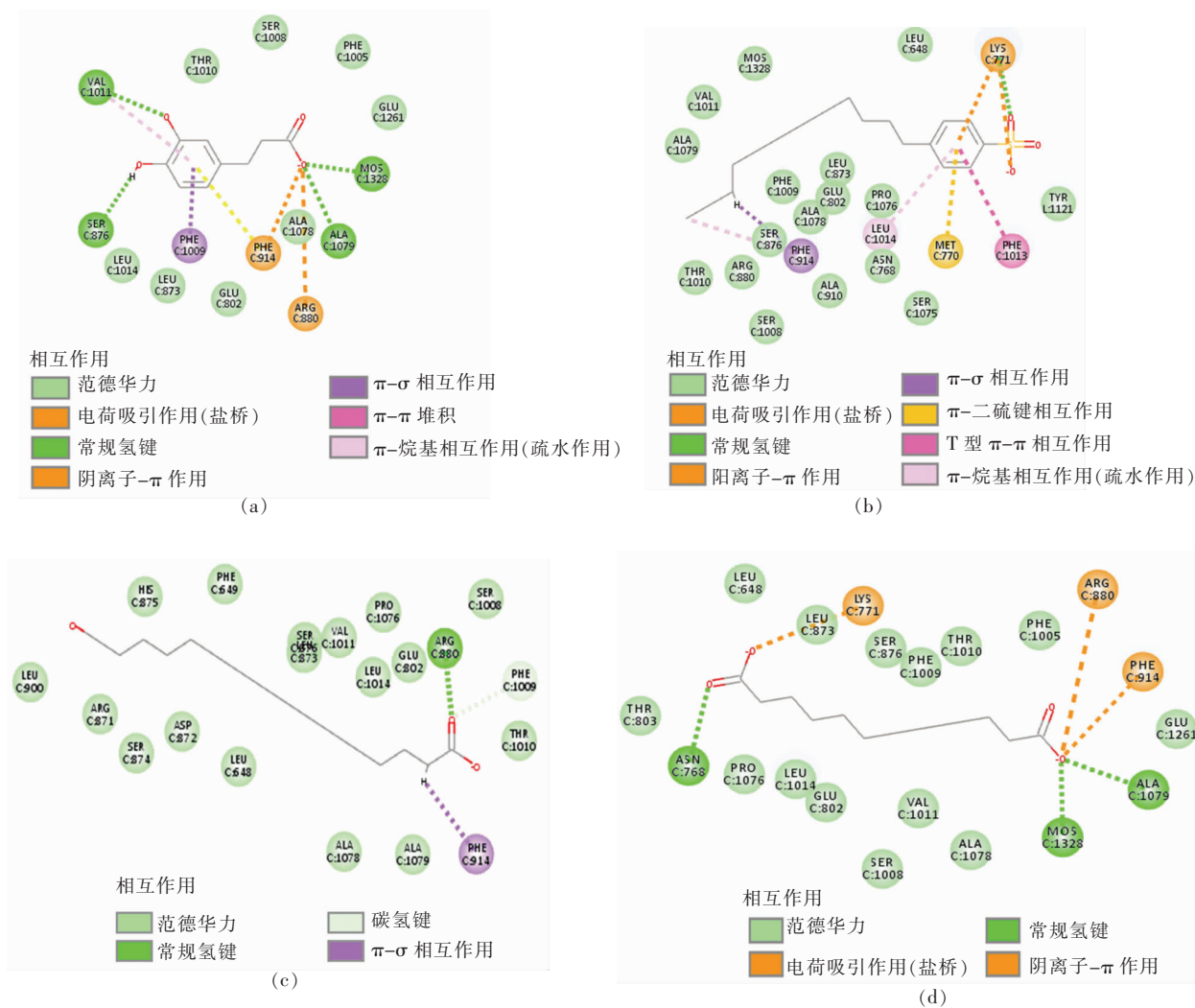


图 5 二氢咖啡酸-XOD(a)、4-十二烷基苯磺酸-XOD(b)、16-羟基十六烷酸-XOD(c)和十二烷二酸-XOD(d)Mo 中心结合位点 2D 模式图

Fig.5 2D pattern diagram of Mo binding sites of DHCA -XOD (a), 4- dodecyl benzene sulfonic acid-XOD (b), 16-hydroxyhexadecanoic acid-XOD (c) and DDA-XOD (d)

基 酸 残 基 Asn768、Ala179 以 及 XOD 中 心 Mos1328 之 间 形 成 氢 键 相 互 作 用。以 上 小 分 子 与 黄 嘌 呤 氧 化 酶 之 间 形 成 的 化 学 键 有 助 于 小 分 子 发 挥 作 用,从 而 对 酶 产 生 一 定 的 促 进 或 抑 制 作 用。

## 2.5 黄嘌呤氧化酶抑制效果的验证

从图 6 中可以看出,16-羟基十六烷酸和 DHCA 对 XOD 的抑制率都是呈先上升后下降的趋势,其中 16-羟基十六烷酸在质量浓度为 0.4 mg/mL 时达到最大抑制率(90%),DHCA 在质量浓度为 0.5 mg/mL 左右时达到最大抑制率(约为 67%)。16-羟基十六烷酸又称 16-羟基棕榈酸,在

此处表现出很强的 XOD 抑制能力,这可能与棕榈酸具有抗氧化性<sup>[31]</sup>相关,16-羟基十六烷酸作为棕榈酸的衍生物可能也具有抗氧化活性。DHCA 表现出良好的 XOD 抑制作用,同样与其很强的抗氧化能力有关。据报道,酚类化合物具有减少自由基形成的特性,其中咖啡酸对氧自由基的生成具有良好的抑制作用,具有较强的 DPPH 自由基清除能力,并且咖啡酸能在一定程度上抑制 XOD 活性<sup>[9,32]</sup>。从图 6 中可以看出十二烷二酸和 4-十二烷基苯磺酸对 XOD 的抑制作用呈现剂量依赖性,随着抑制剂质量浓度的升高,抑制率也在增加,十二

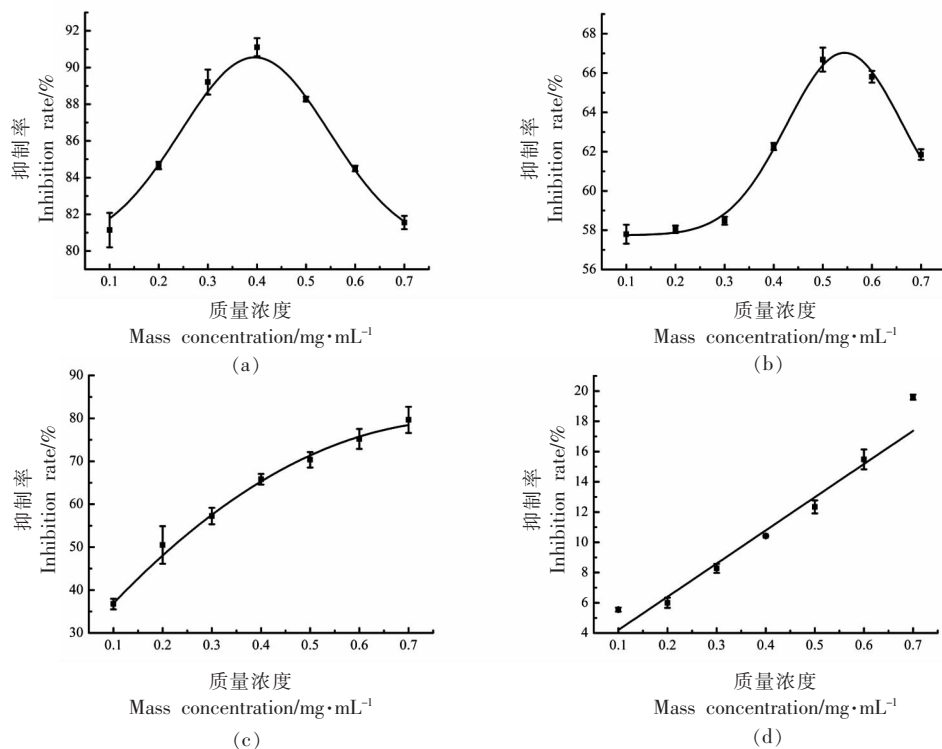


图6 16-羟基十六烷酸(a)、DHCA(b)、DDA(c)、4-十二烷基苯磺酸(d)的抑制曲线

Fig.6 Inhibition curve of 16-hydroxyhexadecanoic acid (a), hydrocaffeic acid (b), dodecanedioic acid (c) and 4-dodecylbenzenesulfonic acid (d)

烷二酸的抑制率最终会趋于平缓,而4-十二烷基苯磺酸的抑制率缓慢上升。

### 3 总结

本文选取实验室保藏的5株乳酸菌,对菌株上清液XOD抑制性进行验证。结果显示,5株菌上清液对XOD均具有良好的抑制效果并且抑制能力大小为:NRRLB-14769>IMAU 4008>DLL-500>NCL 13>SC 3-2-1。进一步试验证明上清液中的有机酸类物质抑制了XOD,利用Discovery Studio 2017 R2 Client将有机酸类代谢产物与XOD的晶体结构进行对接。根据分子对接的结果,选择了DHCA、16-羟基十六烷酸、十二烷二酸、4-十二烷基苯磺酸4种物质对XOD的抑制效果进行了验证,结果表明这4种物质都对XOD具有不同程度的抑制作用,其中16-羟基十六烷酸表现出良好的XOD抑制作用。

### 4 展望

乳酸菌能够改善宿主肠道菌群平衡并有效增

强食用者身体健康水平,具有改善便秘、缓解腹泻、抗肿瘤、保护口腔健康等重要身体功能,而其代谢物数以百计,其中许多生物活性物质能够提高产品的功能特性,后续试验中将对乳酸菌代谢物进行深入的研究,期望找到能够用于食品中的黄嘌呤氧化酶抑制剂。

### 参 考 文 献

- [1] 李昕卓, 郑丽丽, 艾冰凌, 等. 黄嘌呤氧化酶多酚抑制剂的筛选及其作用机制[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(9): 12-19, 97.  
LI X Z, ZHENG L L, AI B L, et al. The inhibitory kinetics and mechanism of xanthine oxidase by screened polyphenols[J]. Food Research and Development, 2020, 41(9): 12-19, 97.
- [2] 劳文艳, 赵健, 郭豫, 等. 辣木叶等配方提取物对酵母膏诱导小鼠高尿酸血症的影响[J]. 北京联合大学学报, 2020, 34(3): 83-88.  
LAO W Y, ZHAO J, GUO Y, et al. The effect of moringa leaf formula extracts on yeast extract-in-



- duced hyperuricemia mice[J]. Journal of Beijing Union University, 2020, 34(3): 83-88.
- [3] 蒋林宏, 杨锡洪, 谢静雯, 等. 降尿酸天然生物活性物质作用机制研究进展[J]. 食品与机械, 2020, 36(8): 210-216.
- JIANG L H, YANG X H, XIE J W, et al. Research progress on the mechanism of uric acid-lowering natural bioactive compounds[J]. Food & Machinery, 2020, 36(8): 210-216.
- [4] 洪岩, 张越. 非布司他、苯溴马隆、别嘌醇治疗高尿酸血症的安全性和有效性比较[J]. 四川解剖学杂志, 2020, 28(1): 96-98.
- HONG Y, ZHANG Y. Comparison of the safety and efficacy of febuxostat, benzbromarone and allopurinol in the treatment of hyperuricemia[J]. Sichuan Journal of Anatomy, 2020, 28(1): 96-98.
- [5] 夏建丽, 侯万超, 李赛男, 等. 葛根中黄嘌呤氧化酶抑制剂的筛选分离及质谱分析[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(12): 39-42.
- XIA J L, HOU W C, LI S N, et al. Screening, isolation and mass spectrometry analysis of xanthine oxidase inhibitors from *Pueraria lobata*[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2019, 30(12): 39-42.
- [6] WANG Y J, ZHANG G W, PAN J H, et al. Novel insights into the inhibitory mechanism of kaempferol on xanthine oxidase[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(2): 526-534.
- [7] 杨清韵. 薏苡仁麸皮游离型多酚分离纯化、结构鉴定及抗氧化作用机制研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2017.
- YANG Q Y. Separation, purification and identification of free phenolics in adlay bran phenolic extract and the mechanisms underlying its antioxidant activities[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2017.
- [8] 金伟丽. 菝葜中黄嘌呤氧化酶抑制剂的筛选、结构鉴定及其抑制机理初探[D]. 南昌: 江西农业大学, 2018.
- JIN W L. The screening, structural identification and inhibition mechanism research of xanthine oxidase in *Smilax china* L.[D]. Nanchang: Jiangxi Agricultural University, 2018.
- [9] WAN Y, WANG F, ZOU B, et al. Molecular mechanism underlying the ability of caffeic acid to decrease uric acid levels in hyperuricemia rats[J]. Journal of Functional Foods, 2019, 57(6): 150-156.
- [10] SHI Y L. Effects of quercetin on uric acid metabolism[D]. Leeds: University of Leeds, 2015.
- [11] ZENG N, ZHANG G, HU X, et al. Inhibition mechanism of baicalein and baicalin on xanthine oxidase and their synergistic effect with allopurinol[J]. Journal of Functional Foods, 2018, 50(11): 172-182.
- [12] 周琦, 张翀, 于栋华, 等. 穿山龙总皂苷对高尿酸血症的降尿酸及细胞抗炎作用研究[J]. 中华中医药杂志, 2013(5): 1444-1448.
- ZHOU Q, ZHANG C, YU D H, et al. Study on uric acid reducing effect of total saponins from rhizoma *Dioscoreae nipponicae* in treating hyperuricemia and *in vitro* study of its anti-inflammatory effect[J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2013(5): 1444-1448.
- [13] LI Q Y, SHI C C, WANG M, et al. Tryptophan residue enhances *in vitro* walnut protein-derived peptides exerting xanthine oxidase inhibition and antioxidant activities[J]. Journal of Functional Foods, 2019, 53(2): 276-285.
- [14] HE W W, SUO G W, SUN D X, et al. *In vivo* anti-hyperuricemic and xanthine oxidase inhibitory properties of tuna protein hydrolysates and its isolated fractions[J]. Food Chemistry, 2018, 272(30): 453-461.
- [15] 赵谋明, 徐巨才, 刘洋, 等. 秋刀鱼制备黄嘌呤氧化酶抑制肽的工艺优化[J]. 农业工程学报, 2015, 31(14): 291-297.
- ZHAO M M, XU J C, LIU Y, et al. Technology optimization on preparation of XOD inhibition peptide from saury[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2015, 31(14): 291-297.
- [16] 邹琳. 鲣鱼黄嘌呤氧化酶抑制肽的酶解制备及功能活性评价[D]. 杭州: 浙江大学, 2019.
- ZOU L. Enzymatic preparation and functional evaluation of xanthine oxidase inhibitory peptides from skipjack tuna[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2019.
- [17] 陈沈梁, 张越恺, 李晨欣, 等. 高效降解嘌呤核苷乳酸菌的筛选、鉴定及特性研究[J]. 发酵科技通讯, 2020, 50(1): 44-49.
- CHEN S L, ZHANG Y K, LI C X, et al. Screening, identification and characterisations of a lactic

- acid bacterium with high ability of purine nucleoside decomposing[J]. *Bulletin of Fermentation Science and Technology*, 2020, 50(1): 44-49.
- [18] 邓英, 何春阳, 唐艳, 等. 短乳杆菌 DM9218 对高果糖饮食诱导的小鼠高尿酸血症的缓解作用及机制研究[J]. *中国微生态学杂志*, 2017, 29(12): 1387-1390.
- DENG Y, HE C Y, TANG Y, et al. The effect of *Lactobacillus brevis* DM9218 in relieving high fructose diet-induced hyperuricemia and the possible mechanisms [J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2017, 29(12): 1387-1390.
- [19] 牛春华, 肖茹雪, 赵子健, 等. 植物乳杆菌 UA149 的降尿酸作用[J]. *现代食品科技*, 2020, 36(2): 1-6, 217.
- NIU C H, XIAO R X, ZHAO Z J, et al. Serum uric acid lowering effect of *Lactobacillus plantarum* UA149 on hyperuricemic rats[J]. *Modern Food Science & Technology*, 2020, 36(2): 1-6, 217.
- [20] 吴燕, 伏二伟, 桑学财, 等. 传统浆水中乳酸菌的筛选及抑菌性能分析[J]. *食品研究与开发*, 2019, 40(22): 42-48.
- WU Y, FU E W, SANG X C, et al. Isolation of lactic acid bacteria in Jiangshui celery and analysis of antimicrobial properties [J]. *Food Research and Development*, 2019, 40(22): 42-48.
- [21] 宋敏杰. 基于配体垂钓筛选蓝点马鲛鱼肉蛋白中的黄嘌呤氧化酶抑制肽[D]. 锦州: 渤海大学, 2020.
- SONG M J. Screening of xanthine oxidase inhibitor peptides from *Scomberomorus niphonius* protein based on ligand fishing[D]. Jinzhou: Bohai University, 2020.
- [22] 杨雨江, 王军, 孙铭韩, 等. 肉牛阴道乳酸菌功能性评价[J]. *中国兽医杂志*, 2017, 11(53): 44-47.
- YANG Y J, WANG J, SUN M H, et al. Evaluation of probiotic properties of lactic acid bacteria from vaginas of beef cow[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2017, 11(53): 44-47.
- [23] LI Y J, KANG X Y, LI Q Y, et al. Anti-hyperuricemic peptides derived from bonito hydrolysates based on *in vivo* hyperuricemic model and *in vitro* xanthine oxidase inhibitory activity [J]. *Peptides*, 2018, 107(9): 45-53.
- [24] 张岑, 张国文. 光谱学结合分子模拟技术研究槲皮素对黄嘌呤氧化酶的抑制作用[J]. *光谱学与光谱分析*, 2016, 36(10): 349-350.
- ZHANG C, ZHANG G W. Study on the inhibition of quercetin on XOD using multi-spectroscopic and molecular modeling approaches[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2016, 36(10): 349-350.
- [25] 林美君. 四种乳酸菌中央碳代谢的通量差异特性研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2020.
- LIN M J. Characteristics of central carbon metabolic flux on four kinds of lactic acid bacteria [D]. Harbin: Harbin University of Commerce, 2020.
- [26] 董杰, 刘鹭, 甲承立, 等. 乳酸菌代谢物中二肽基肽酶-4 抑制剂的分离纯化及鉴定[J]. *食品科学*, 2020, 41(8): 116-122.
- DONG J, LIU L, JIA C L, et al. Isolation, purification and identification of dipeptidyl peptidase-4 inhibitor from lactic acid bacterial metabolite [J]. *Food Science*, 2020, 41(8): 116-122.
- [27] 宋继宏, 王记成, 其木格苏都, 等. 乳酸菌及其代谢产物在乳制品保鲜中的应用[J]. *中国乳品工业*, 2014, 42(8): 37-41.
- SONG J H, WANG J C, QIMUGESUDU, et al. Application of lactic acid bacteria and their metabolites in dairy products preservation[J]. *China Dairy Industry*, 2014, 42(8): 37-41.
- [28] 张珍, 李波清. 乳酸菌主要代谢产物及其作用研究进展[J]. *滨州医学院学报*, 2012, 35(4): 274-276.
- ZHANG Z, LI B Q. Research progress on main metabolites of lactic acid bacteria and their functions [J]. *Journal of Binzhou Medical University*, 2012, 35(4): 274-276.
- [29] JIANG Y Y, YANG Z N. A functional and genetic overview of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum*[J]. *Journal of Functional Foods*, 2018, 47(8): 229-240.
- [30] 孙艳, 王静, 杨海麟, 等. 细菌黄嘌呤氧化酶的稳定性[J]. *生物加工过程*, 2009, 7(2): 53-56.
- SUN Y, WANG J, YANG H L, et al. Stability of xanthine oxidase from arthrobacter[J]. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2009, 7(2): 53-56.
- [31] GHALLAB D S, MOHYELDIN M M, SHAWKY E, et al. Chemical profiling of Egyptian propolis and determination of its xanthine oxidase inhibitory properties using UPLC-MS/MS and chemometrics[J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2021, 136(1): 110298.
- [32] NILE S H, KEUM Y S, NILE A S, et al. Potential cow milk xanthine oxidase inhibitory and antiox-

inant activity of selected phenolic acid derivatives[J]. 2017, 32(1): e22005.  
Journal of Biochemical and Molecular Toxicology,

### Screening of Xanthine Oxidase Inhibitors from Lactic Acid Bacteria Metabolites

Cui Fangchao<sup>1</sup>, Han Yujuan<sup>1</sup>, Li Tingting<sup>2\*</sup>, Zhao Guiqin<sup>1</sup>, Li Jianrong<sup>1\*</sup>, Lin Hong<sup>3</sup>, Lao Minjun<sup>4</sup>,  
Yu Jianyang<sup>5</sup>, Guo Xiaohua<sup>6</sup>, Wang Hong<sup>7</sup>

*(<sup>1</sup>National & Local Joint Engineering Research Center of Storage, Processing and Safety Control Technology  
for Fresh Agricultural and Aquatic Products, College of Food Science and Engineering, Bohai University,  
Jinzhou 121013, Liaoning*

*<sup>2</sup>College of Life Science, Dalian Minzu University, Dalian 116600, Liaoning*

*<sup>3</sup>College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266100, Shandong*

*<sup>4</sup>The Zhejiang Xingye Group Limited, Zhoushan 316022, Zhejiang*

*<sup>5</sup>Rongcheng Taixiang Food Co. Ltd., Rongcheng 264300, Shandong*

*<sup>6</sup>Shandong Meijia Group Co. Ltd., Rizhao 276800, Shandong*

*<sup>7</sup>Penglai Jinglu Fishery Co. Ltd., Yantai 264000, Shandong*

**Abstract** Lactic acid bacteria and their metabolites are widely used because of their natural, good antibacterial activity and safety. However, there are few reports on screening xanthine oxidase (XOD) inhibitors from the metabolites of lactic acid bacteria. In this paper, molecular docking technology and high performance liquid chromatography (HPLC) technology were combined to screen XOD inhibitors in metabolites of lactic acid bacteria. The results showed that the metabolites of five strains of lactic acid bacteria had strong inhibitory effect on XOD. Further experiments showed that the organic acids in the supernatant inhibited XOD. Molecular docking technology was used to dock the organic acids in the metabolites with XOD, and four of them were selected to verify their inhibitory effect on XOD. The results showed that dihydrocaffeic acid (DHCA), 16-hydroxyhexadecanoic acid and dodecanedioic acid (DDA) and 4-dodecylbenzenesulfonic acid had different degrees of inhibition on XOD, and 16-hydroxyhexadecanoic acid showed a strong inhibition effect on XOD.

**Keywords** lactic acid bacteria; xanthine oxidase (XOD); molecular docking; inhibitor