

张静, 焦洁帆, 云少君, 等. 原花青素和原儿茶酸对淀粉消化酶的联合抑制作用 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(20): 105–113. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023120084

ZHANG Jing, JIAO Jiefan, YUN Shaojun, et al. Combined Inhibitory Effects of Procyanidins and Protocatechuic Acid on Starch Digestive Enzymes[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(20): 105–113. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023120084

· 研究与探讨 ·

原花青素和原儿茶酸对淀粉消化酶的联合抑制作用

张 静¹, 焦洁帆², 云少君², 冯翠萍², 程菲儿^{2,*}

(1. 山西省卫生健康委监督检查中心, 山西太原 030045;

2. 山西农业大学食品科学与工程学院, 山西太谷 030801)

摘 要: 淀粉是人体获取能量主要来源, 原花青素 (Procyanidin, PC) 和原儿茶酸 (protocatechuic acid, PCA) 等天然产物能够控制淀粉的消化, 从而达到降低餐后血糖的效果。本文通过抑制率测定、Lineweaver-Burk 双倒数图法、紫外光谱、荧光淬灭、等效线图解法和傅里叶红外光谱研究了 PC 和 PCA 对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制效果。结果表明: PC 对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶抑制的 IC_{50} 值分别为 0.0524 和 0.0106 mg/mL, PCA 分别为 1.9426 和 1.0667 mg/mL, PCA 表现出更好的抑制能力; Lineweaver-Burk 双倒数图法表明 PC 和 PCA 对 α -淀粉酶的抑制为混合型抑制, 对 α -葡萄糖苷酶的抑制分别为非竞争性抑制和竞争性抑制。与 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的结合主要依靠疏水键和氢键, 通过改变酶氨基酸残基微环境, 进一步改变酶结构。复配比例为 1:21 时对 α -葡萄糖苷酶的抑制效果最优, 1:37 时对 α -淀粉酶的抑制效果最优。两物质复配比例为 1:21 时 CI 小于 1, 对 α -葡萄糖苷酶表现出协同抑制作用; 复配比例为 1:37 时 CI 小于 1, 对 α -淀粉酶表现出协同抑制作用。本研究揭示了 PC 和 PCA 复合使用对淀粉消化酶的抑制作用机制, 为开发天然降糖膳食补充剂作为健康食品辅料或药物开发提供一定理论基础。

关键词: 原花青素, 原儿茶酸, α -淀粉酶, α -葡萄糖苷酶, 抑制作用

中图分类号: TS231

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)20-0105-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023120084



本文网刊:

Combined Inhibitory Effects of Procyanidins and Protocatechuic Acid on Starch Digestive Enzymes

ZHANG Jing¹, JIAO Jiefan², YUN Shaojun², FENG Cuiping², CHENG Feier^{2,*}

(1. Shanxi Provincial Health Commission Supervision and Inspection Center, Taiyuan 030045, China;

2. College of Food Science and Technology, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

Abstract: Starch is the main source of energy for the human body. Natural products such as procyanidin (PC) and protocatechuic acid (PCA) can reduce postprandial blood sugar by controlling the digestion of starch. The inhibition effects of PC and PCA on α -amylase and α -glucosidase were studied using inhibition rate determination, Lineweaver-Burk double reciprocal diagram, ultraviolet spectroscopy, fluorescence quenching, equivalent mapping, and Fourier transform infrared spectroscopy. The results showed that the IC_{50} values of PC for α -amylase and α -glucosidase inhibition were 0.0524 and 0.0106 mg/mL, respectively, and those of PCA were 1.9426 and 1.0667 mg/mL respectively, which showed that PCA had better inhibition ability. The Lineweaver-Burk double reciprocal diagram showed that the inhibition of PC and PCA on α -amylase was a mixed inhibition, and the inhibition on α -glucosidase was non-competitive inhibition and competitive inhibition, respectively. The Binding of PC and PCA with α -amylase and α -glucosidase mainly depended on hydrophobic

收稿日期: 2023-12-11

基金项目: 山西省基础研究计划项目 (202203021212448)。

作者简介: 张静 (1981-), 女, 硕士, 研究方向: 食品安全标准, E-mail: 214581940@qq.com。

* 通信作者: 程菲儿 (1990-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品加工与安全, E-mail: chengfeierm@163.com。

and hydrogen bonds, and further altered the enzyme structure by changing the microenvironment of amino acid residues. The inhibitory effects on α -glucosidase were the best when the ratio of PC and PCA was 1:21, and the inhibitory effects on α -amylase were optimal at 1:37. When the ratio of PC and PCA was 1:21, CI was less than 1, which showed a synergistic inhibitory effect on α -glucosidase. When the compounding ratio was 1:37, CI was less than 1, which showed a synergistic inhibitory effect on α -amylase. This study revealed the inhibitory mechanism of the combined use of PC and PCA on starch-digesting enzymes and would provide a theoretical basis for the development of natural hypoglycemic dietary supplements as health food excipients or drugs.

Key words: procyanidins; procecatechuic acid; α -amylase; α -glucosidase; inhibition

随着居民膳食消费水平的提升,膳食结构也进一步升级,居民饮食更加多样化^[1]。膳食结构的不合理会导致各种慢性病的发生,而餐后血糖水平的管理对于降低胰岛素的损伤、保持人体健康具有重要作用。淀粉类食物作为主食,其消化代谢是机体获取能量的重要途径,其消化速率影响着餐后血糖水平。淀粉的消化过程分为三个阶段:酶向淀粉扩散,酶向淀粉吸附(即形成酶-淀粉复合物)和淀粉水解^[2]。淀粉首先被唾液淀粉酶部分水解,然后被胰腺 α -淀粉酶水解为麦芽糖和麦芽三糖,接着在肠细胞刷状缘的表面膜上被 α -葡萄糖苷酶水解为葡萄糖,通过葡萄糖转运蛋白进入血液,被运送到目标器官供身体吸收^[3]。 α -淀粉酶水解糖链中的 α -D-(1-4)-糖苷键从而产生麦芽糖、麦芽糖三糖、麦芽糖四糖、麦芽糖糊精和葡萄糖, α -葡萄糖苷酶催化双糖水解为单糖^[4]。在淀粉的整个消化过程中, α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶发挥着关键的作用。因此,对上述两种淀粉消化酶的活性进行抑制,能够降低淀粉的消化速率和生物体对葡萄糖的利用度,进而减缓餐后血糖的上升速度,餐后血糖升高异常会导致机体乏力、眩晕,长期会导致心脑血管疾病的患病率增加^[5]。

目前临床上降血糖常用的药物是阿卡波糖,作为一种复合低聚糖,阿卡波糖具有与寡糖类似的结构,这种结构使得其能与寡糖共同争夺位点,并能与部分淀粉消化酶发生可逆性结合,使十二指肠和空肠上部的单糖吸收缓慢,从而起到降低血糖的作用^[6]。但这种药物通常会引起胃肠道反应,与某些药物共同服用时,还可能存在药物间相互作用,引起血糖紊乱^[3]。因此,基于天然产物开发的抑制剂则更加安全。

天然产物中的多酚类、黄酮类和磷脂酸类已被证明能够抑制上述两种淀粉消化酶的活性,因此在降低血糖方面发挥着重要作用,如多酚类物质可以抑制口腔及肠道中 α -淀粉酶的活性,通过降低餐后血糖浓度发挥降血糖等功能^[7-8]。原花青素(Procyanidin, PC)作为一种由黄烷醇聚合而成的多酚类物质^[9],其分布广泛,存在于许多植物的一些部位中,例如植物的叶、花瓣中。研究表明蔓越莓、葡萄籽、高粱等植物中 PC 对于 α -淀粉酶的活性均有一定的抑制作用^[10-11]。此外,多酚类聚合物、黄酮类化合物、多糖化合物以及生物活性肽亦被证明能够作为 α -葡萄

糖苷酶抑制剂(AGI)的天然物质^[12-13]。原儿茶酸(Procatechuic acid, PCA)即 3,4-二羟基苯甲酸,是一种酚酸物质,天然存在于许多蔬菜、水果以及某些植物的叶中,是许多中药的有效活性成分,具有抗氧化、抗肿瘤和神经保护作用^[7]。但上述两种物质对淀粉消化酶的联合抑制作用尚未见报道。

基于此,本研究通过抑制率测定、Lineweaver-Burk 双倒数图法、紫外光谱、荧光淬灭、等效线图法和傅里叶红外光谱等研究 PC 和 PCA 对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的联合抑制作用,为天然降糖膳食补充剂开发提供一定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

PC、PCA、 α -淀粉酶(50 U/mg)、4-硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷(PNPG)、 α -葡萄糖苷酶(250 U/9.5 mg)、阿卡波糖 上海源叶生物科技有限公司;玉米淀粉 佛山市海天调味食品股份有限公司;3,5-二硝基水杨酸、酒石酸钾钠、亚硫酸钠、苯酚、碳酸钠、磷酸盐缓冲液、乙醇 国产分析纯。

Cary 60 紫外可见分光光度计 安捷伦科技有限公司;EX10202 电子分析天平 奥豪斯仪器有限公司;HH-B8 数显恒温水浴锅 上海辰邦西仪器科技有限公司;BRUKER TENSOR27 傅里叶红外光谱仪、Varioskan Flash 全波长扫描式多功能读数仪 赛默飞世尔科技公司。

1.2 实验方法

1.2.1 PC 和 PCA 对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶抑制效果测定 在测定样品对消化酶的抑制率时,通过预实验,确定了溶剂和浓度梯度的范围选择。 α -葡萄糖苷酶抑制活性测定按照曹俊伟^[14]方法稍作改变。将 PC、PCA 和阿卡波糖浓度配制为 0.03125、0.0625、0.125、0.25、0.5 mg/mL,在 405 nm 处测定其吸光度。

α -淀粉酶抑制活性测定参考黄克愁等^[15]的方法,并做适当修改。将 PC、PCA 和阿卡波糖浓度配制为 0.05、0.1、0.2、0.4、0.8 mg/mL。使用酶标仪于 540 nm 处测定吸光值。实验分组为样品组即添加淀粉消化酶,对照组即向抑制剂中添加 PBS 缓冲液。空白组及其对照组向其中加入蒸馏水而不是 PC 和 PCA。用阿卡波糖作为参照分析。

$$\text{酶抑制率(\%)} = \left[1 - \frac{(A_1 - A_2)}{(A_3 - A_4)} \right] \times 100 \quad \text{式 (1)}$$

其中: A_1 、 A_2 、 A_3 、 A_4 分别为样品组、样品对照组、空白组和空白对照组的吸光度值。

1.2.2 PC 和 PCA 对 α -葡萄糖苷酶抑制动力学 将 PC 和 PCA 均配制成浓度为 0、0.2、0.4、0.6、0.8 mg/mL 的溶液, α -葡萄糖苷酶溶液设置为 0.1、0.2、0.3、0.4 U/mL。在 405 nm 波长下测吸光值, 通过葡萄糖标准曲线算出反应的速率, 对反应速率与 α -葡萄糖苷酶浓度的关系进行分析。

将 pNPG 配制成 1、1.5、2、2.5、3 mg/mL, 计算不同底物浓度和不同浓度 PC 与 PCA 下的酶促反应速率。使用 Lineweaver-Burk 方程确定 PC 和 PCA 对 α -葡萄糖苷酶的抑制方式。

1.2.3 PC 和 PCA 对 α -淀粉酶抑制动力学 将 PC 和 PCA 均配制成浓度为 0、0.2、0.4、0.6、0.8 mg/mL 的溶液, α -淀粉酶溶液设置为 0.5、1、1.5、2 U/mL。按上述方法来测 540 nm 的吸光值, 根据麦芽糖标准曲线来算速率。根据 Lineweaver-Burk 双倒数曲线图, 分析确定 PC 与 PCA 对 α -淀粉酶的抑制类型。

Lineweaver-Burk 方程:

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]} \quad \text{式 (2)}$$

其中, $[S]$ 指淀粉浓度(mg/mL); V 指反应速率(mol/mL $\cdot$ s $^{-1}$); $1/[S]$ 当作坐标横轴, $1/V$ 为坐标纵轴, 即可做出 Lineweaver-Burk 双倒数图。不同抑制剂浓度下的双倒数直线得出斜率和截距, 竞争抑制常数 K_i 可根据斜率和 $[I]$ 作图得到, 非竞争性抑制常数 K_{is} 由截距和 $[I]$ 作图得出。公式如下:

$$\text{斜率} = \frac{K_m}{V_{\max}} + \frac{K_m [I]}{V_{\max} K_i} \quad \text{式 (3)}$$

$$\text{截距} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{[I]}{V_{\max} K_{is}} \quad \text{式 (4)}$$

竞争性抑制公式:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad \text{式 (5)}$$

非竞争性抑制公式:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_{is}} \right) \quad \text{式 (6)}$$

其中, V 指速率; $V_{\max}$ 为最大反应速率(mol/mL $\cdot$ s $^{-1}$); $[S]$ 指底物浓度(mg/mL); $[I]$ 为 PC 及 PCA 浓度(mg/mL); K_m 为米氏常数, K_i 和 K_{is} 分别为抑制剂与酶和酶-底物复合物结合的平衡常数。

1.2.4 PC 和 PCA 对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的紫外光谱分析 将 1 mL α -淀粉酶溶液(7 U/mL)、 α -葡萄糖苷酶浓度(0.1 U/mL)分别与 100 μ L 不同浓度 0.6、0.4、0.2、0.1、0.08 mg/mL 的 PC 溶液和不同浓

度 0.2、0.15、0.1、0.08、0.05 mg/mL PCA 溶液混匀进行反应, 在 200~800 nm 范围内进行紫外吸收光谱扫描。

1.2.5 PC 和 PCA 对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的荧光光谱测定 在 500 μ L 的 α -淀粉酶(7 U/mL)的溶液中加入 50 μ L 不同浓度 0.6、0.4、0.2、0.1、0.08、0 mg/mL 的原花青素溶液和不同浓度 0.2、0.15、0.1、0.08、0.05、0 mg/mL 原儿茶酸溶液, 根据 0 浓度的混合溶液分析研究, 在电脑上设置发射波长 290 nm, 激发波长 270 nm, 波长范围在 290~500 nm 内对其扫描。

荧光猝灭常数表示为 K_{sv} , 可由 Stern-Volmer 方程计算得出, 以此判定 PC、PCA 对酶的淬灭机理, 公式如下:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad \text{式 (7)}$$

式中, F_0 和 F 分别为 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶在不添加或添加 PC 和 PCA 时的荧光强度; $[Q]$ 为两种抑制剂的浓度(mg/mL); τ_0 为荧光团的平均寿命; K_q 为猝灭速率常数; K_{sv} 为猝灭常数。

1.2.6 PC 和 PCA 对淀粉消化酶的联合抑制作用 参照林海生等^[13]的方法。测定对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的 IC_{50} 值。通过原花青素和原儿茶酸单独抑制效率测定计算出对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的 IC_{50} 值。根据两种物质的 IC_{50} 值进行复配。对于 α -葡萄糖苷酶抑制率的测定, 将原花青素、原儿茶酸配制成 0.03125、0.0625、0.125、0.25、0.5 mg/mL 溶液; 对于 α -淀粉酶抑制率的测定, 将原花青素、原儿茶酸配制成 0.05、0.1、0.2、0.4、0.8 mg/mL 溶液, 参照 1.2.1 的方法进行联合抑制试验, 通过 Chou-Talalay 药物联合指数 CI 进行评价。通过 CI 值的数值大小, 可以定量判断药物间相互作用的强度以及性质 ($CI > 1$ 为拮抗作用, $CI = 1$ 为相加作用, $0.7 < CI < 1$ 为轻微协同作用, $0.3 < CI < 0.7$ 为协同作用, $CI < 0.3$ 为强协同作用), CI 公式如下:

$$CI = \frac{(D)_1}{(D_x)_1} + \frac{(D)_2}{(D_x)_2} \quad \text{式 (8)}$$

其中, $(D)_1$ 和 $(D)_2$ 是复配系统中产生一定抑制水平的抑制剂的剂量(mol/L); $(D_x)_1$ 和 $(D_x)_2$ 是添加单个物质导致相同抑制水平的剂量(mol/L)。

1.2.7 PC 和 PCA 对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的傅里叶红外光谱的影响 向 100 μ L 0.6 mg/mL 的 PC 与 0.2 mg/mL PCA 溶液分别加入 1 mL 0.1 U/mL 的 α -葡萄糖苷酶溶液; 向 100 μ L 0.6 mg/mL 的 PC 与 0.2 mg/mL PCA 溶液分别加入 1 mL 7 U/mL 的 α -淀粉酶溶液。取适量干燥的溴化钾, 钨光灯下在玛瑙研钵中研磨至细粉直到看不见晶体为止, 取适量的粉末用压片机压成透明均匀薄片, 滴入 1 滴待测样液, 进行红外光谱全波段扫描(400~4000 cm^{-1}), 得

到 PC 对 α -淀粉酶的红外光谱图。与上述方法相同得到 PC 对 α -葡萄糖苷酶、PCA 对 α -淀粉酶、PCA 对 α -葡萄糖苷酶的红外光谱图。

1.3 数据处理

实验重复三次。使用 Origin 2022、GraphPad Prism 5 软件绘图,使用 SPSS 27 软件进行数据分析,实验结果表示为平均值 $\pm$ 标准偏差, $P<0.05$ 被认为是显著差异。

2 结果与分析

2.1 PC 和 PCA 对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶抑制效果测定

以阿卡波糖为阳性对照,不同浓度梯度的 PC 和 PCA 对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的抑制能力如图 1 所示。由图 1 可知,PC 对淀粉消化酶的抑制效果最强,PCA 相较于其他两种物质对两种酶的抑制作用最小。PC 和 PCA 均随着浓度的增加而对淀粉消化酶的抑制作用增强,这说明 PC 和 PCA 对酶活性的抑制表现出剂量依赖性。 IC_{50} 值可以量化 PC 和 PCA 对淀粉消化酶的抑制能力。运用 GraphPad Prism 5 软件,以 $\lg C$ 为横坐标,抑制率为纵坐标作图,得到不同抑制剂对两种酶的 IC_{50} 。通过计算作图进行线性拟合,由图 1A 可知 PC 与 PCA 对 α -葡萄糖苷酶的 IC_{50} 值分别为 0.0106 和 1.0667 mg/mL;由图 1B 可知,PC 和 PCA 对 α -淀粉酶的 IC_{50} 值分别为 0.0524 和 1.9426 mg/mL。

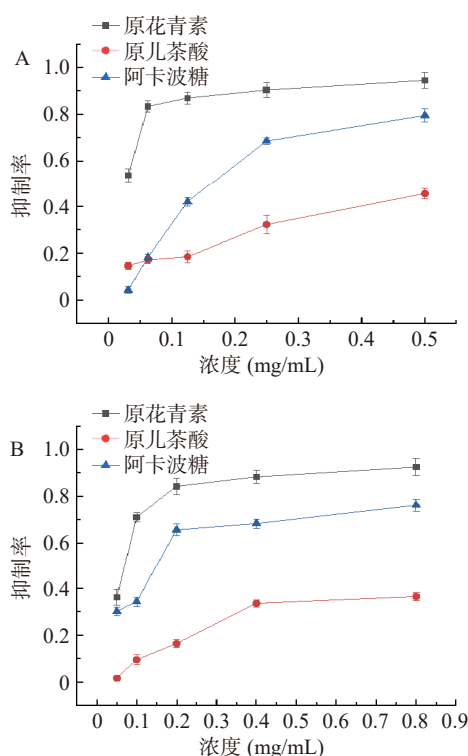


图 1 PC 和 PCA 对淀粉消化酶的抑制能力

Fig.1 Inhibitory capacity of PC and PCA on starch digestive enzymes

注: A. PC 与 PCA 对 α -葡萄糖苷酶抑制率; B. PC 和 PCA 对 α -淀粉酶抑制率。

2.2 PC 和 PCA 对 α -葡萄糖苷酶的抑制类型

抑制剂可根据与酶结合位点的方式将其分成可逆性和不可逆性两种。测定不同浓度下的酶活力,以 α -葡萄糖苷酶浓度为横坐标,反应速率为纵坐标,从图 2A 和图 2B 可以看出 PC 和 PCA 的不同浓度均过原点,随着抑制剂浓度的增加,其斜率逐渐减小,说明两种物质均为可逆性抑制剂。

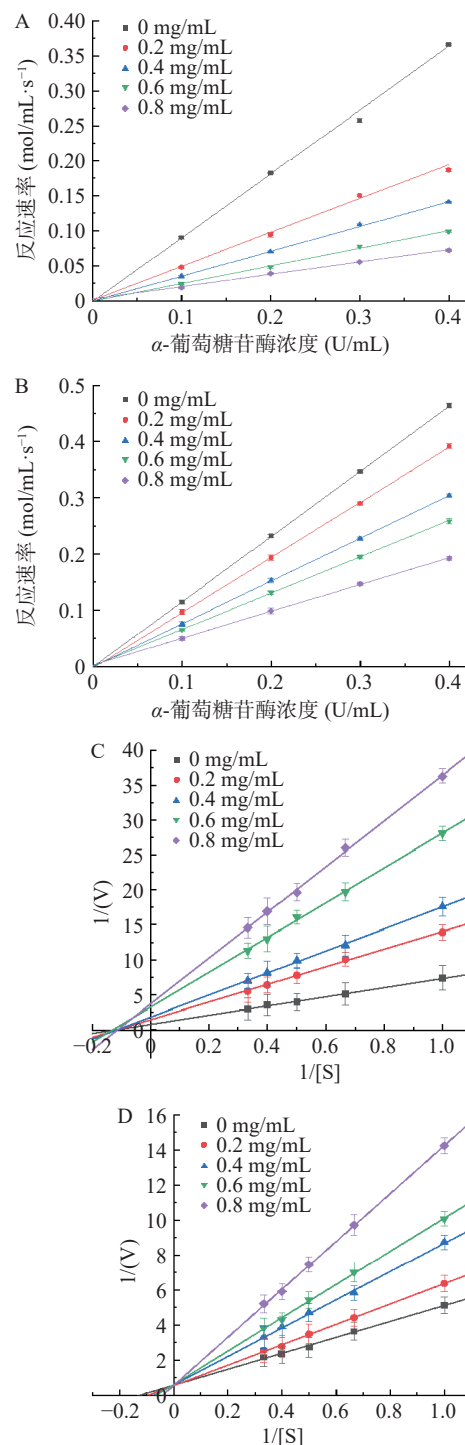


图 2 PC 和 PCA 对 α -葡萄糖苷酶的抑制类型

Fig.2 Types of α -glucosidase inhibition by PC and PCA

注: A. PC 对 α -葡萄糖苷酶的可逆抑制作用; B. PCA 对 α -葡萄糖苷酶抑制的可逆性; C. PC 对 α -葡萄糖苷酶的抑制曲线; D. PCA 对 α -葡萄糖苷酶的抑制曲线。

为了进一步了解抑制剂对淀粉消化酶的抑制机理, $1/[S]$ 作为坐标的横轴, $1/v$ 作为坐标的纵轴, 得出的 Lineweaver-Burk 图中直线的斜率表示为 $K_m/V_{\max}$ 。直线与 y 轴的交点即为 $1/V_{\max}$ 。由图 2 中可以看出 PC 和 PCA 不同浓度下曲线的分布情况, 由此确定出两种不同抑制剂对 α -葡萄糖苷酶的抑制类型。根据图 2C 可知, PC 不同浓度的直线均相交于 x 负半轴一点, K_m 值不随 PC 浓度的改变而改变, 直线与 y 轴的交点值即截距增加能够知道最大反应速率 $V_{\max}$ 减小。由此可知 PC 对 α -葡萄糖苷酶的抑制类型为非竞争性抑制。根据图 2D 可知, 不同浓度 PCA 的直线均与 y 轴相交于一点也就是 $V_{\max}$ 保持不变, 其斜率随着不同浓度 PCA 的增大而增大即 $K_m/V_{\max}$ 增大, 分析出 K_m 值增大。可以看出 PCA 对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用类型属于竞争性抑制。

2.3 PC 和 PCA 对 α -淀粉酶的抑制类型

图 3A 和图 3B 是以酶促反应速率为纵坐标对 α -淀粉酶的浓度做出的图, 不同浓度下的 PC 和 PCA 经拟合的直线均过原点, 且随着两种物质浓度的增加, 直线斜率逐渐下降, 由此说明 PC 对 α -淀粉酶的抑制作用也是可逆性的。根据图 3C 和图 3D

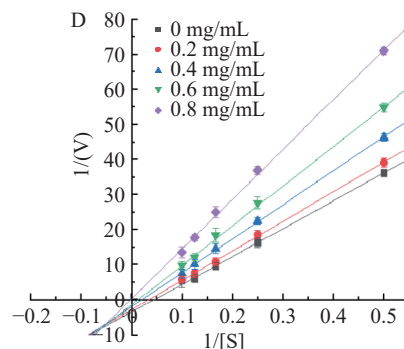
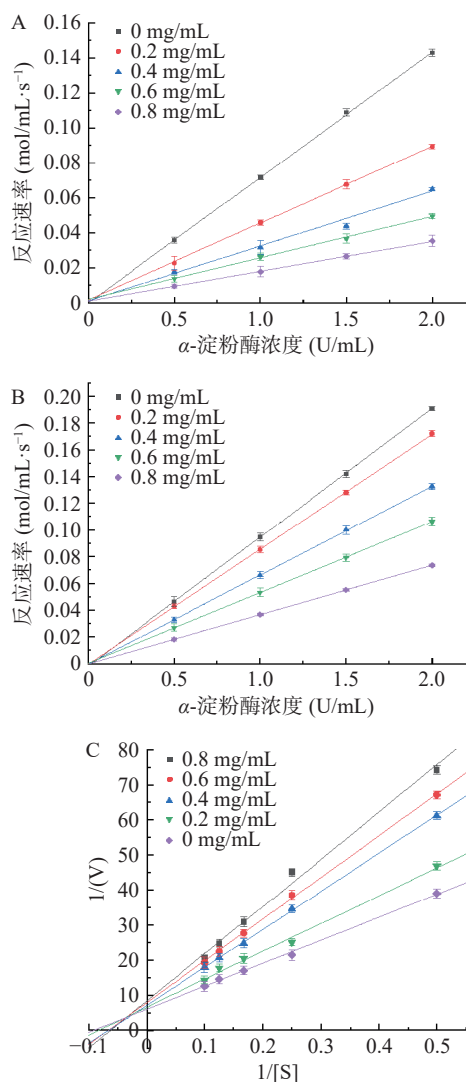


图 3 PC 和 PCA 对 α -淀粉酶的抑制类型

Fig.3 Types of α -amylase inhibition by PC and PCA

注: A. PC 对 α -淀粉酶的可逆抑制作用; B. PCA 对 α -淀粉酶抑制的可逆性; C. PC 对 α -淀粉酶的抑制曲线; D. PCA 对 α -淀粉酶的抑制曲线。

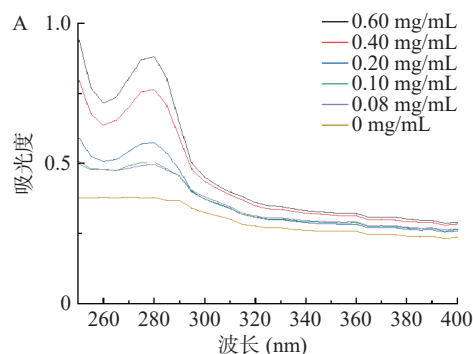
可知, PC 和 PCA 的双倒数曲线分别相交于第二象限和第三象限, 随着两种抑制剂浓度的增加, K_m 值与 $V_{\max}$ 均随之改变, 说明符合竞争性和非竞争性结合的混合性抑制。

PC 对 α -葡萄糖苷酶的抑制类型为非竞争性抑制, 分析其抑制方式为 PC 与 pNPG 之间不存在竞争关系, 能够结合酶的非活性中心位点。PCA 对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用类型属于竞争性抑制, 其与酶的结合部位和底物与酶的复合物结合部位相似, 因此与底物共同竞争酶的活性位点。PC 和 PCA 对 α -淀粉酶符合混合性抑制, 其抑制剂的结构与底物结构具有一定的相似性, 既可以竞争底物与 α -淀粉酶的活性位点形成复合产物, 从而降低了酶的活性; 也可以与酶的非活性位点结合, 同样能够降低酶的活性, 从而抑制 α -淀粉酶与底物淀粉结合生成葡萄糖^[6]。

2.4 PC 和 PCA 对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的紫外光谱分析

通过观察紫外光谱可以有效地分析抑制剂与酶的活性位点相互作用的过程, 了解酶的结构如何发生变化^[17]。如图 4 所示, PC 和 PCA 对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的最大吸收峰随着抑制剂浓度的增大发生明显的蓝移现象。且随着两种抑制剂物质浓度的增加, 两种淀粉消化酶的吸收峰强度增大。

研究分析紫外光谱表明吸收峰强度具有一定的依赖性, 由于氨基酸残基色氨酸(Trp)和酪氨酸(Tyr)的存在, α -淀粉酶在 280 nm 附近有一个紫外吸收



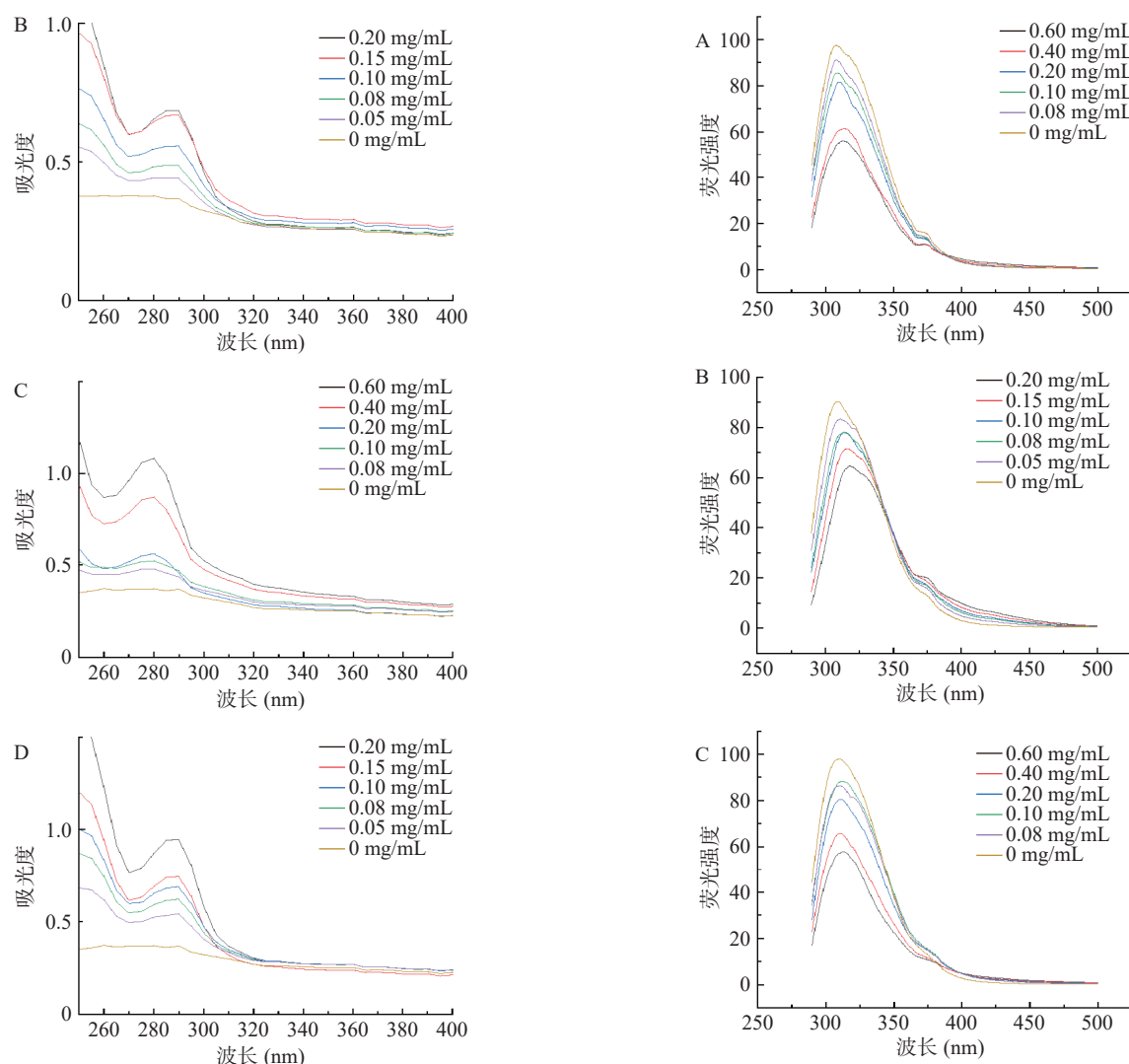


图4 PC和PCA对淀粉消化酶的紫外分光光谱

Fig.4 Ultraviolet absorption spectra of starch-digestive enzymes by procyanidins and PCA

A. PC作用 α -葡萄糖苷酶的紫外吸收光谱; B. PCA作用 α -葡萄糖苷酶的紫外吸收光谱; C. PC作用 α -淀粉酶的紫外吸收光谱; D. PCA作用 α -淀粉酶的紫外吸收光谱。

峰,这主要是 α -淀粉酶的B吸收带中C=O键的 π - π^* 跃迁引起的^[18]。有研究表明,抑制剂与 α -淀粉酶发生相互作用,改变了 α -淀粉酶氨基酸残基所处的微环境,从而使其肽链延长,氨基酸残基暴露,亲水性增强,引起吸收波长和吸收强度发生变化^[19],改变了氨基酸残基周围的微环境,致使酶的构象发生变化^[20-23]。

2.5 PC和PCA对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶荧光淬灭作用

α -葡萄糖苷酶或者 α -淀粉酶中色氨酸残基的变化可通过荧光强度和最大发射波长的变化进行分析。淀粉消化酶的构象可以在激发波长270 nm下检测,进而反映两种抑制剂在不同浓度下对酶荧光强度的淬灭作用^[24]。

图5A和图5B表示在不同浓度下的PC以及PCA对 α -葡萄糖苷酶的荧光淬灭图。可以看出 α -葡萄糖苷酶的荧光强度有依赖性,随着抑制剂浓度的

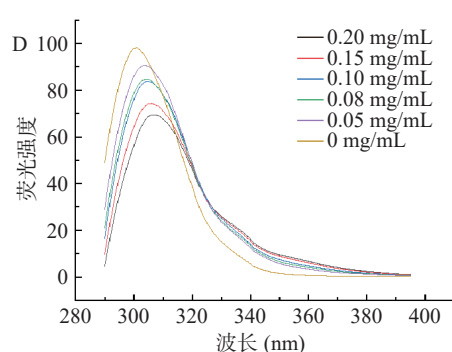


图5 PC和PCA对淀粉消化酶的荧光淬灭

Fig.5 Fluorescence spectra of PC and PCA on starch digestive enzymes

注: A. PC对 α -葡萄糖苷酶的荧光光谱; B. PCA对 α -葡萄糖苷酶的荧光光谱; C. PC对 α -淀粉酶的荧光光谱; D. PCA对 α -淀粉酶的荧光光谱。

增加,荧光强度随之降低,且最大荧光波长发生了明显的红移。图5C和图5D表示在不同浓度下的PC和PCA对 α -淀粉酶的荧光淬灭图,同样可以看出其浓度增加,荧光强度随之降低,最大荧光波长同样表现出了明显的红移。荧光光谱说明PC和PCA与酶结合能够淬灭淀粉消化酶的荧光,进一步证明其结合部位上色氨酸残基的环境发生了变化^[25-26]。两

种抑制剂通过氢键及疏水作用力对淀粉消化酶发生相互作用^[27]。

2.6 PC 和 PCA 对淀粉消化酶的联合抑制作用

根据图 6A 可知,不同比例的 PC 和 PCA 的联合使用对 α -葡萄糖苷酶的抑制效果均要强于阿卡波糖的抑制效果。根据单个物质的 IC_{50} 值确定原花青

素和原儿茶酸对 α -葡萄糖苷酶的联合抑制比例为 1:100;对 α -淀粉酶的联合抑制比例为 1:37。两种浓度为 1:21 联合作用时的抑制效果要比单个物质的抑制效果较好。根据图 6B 可知,在 PC 和 PCA 物质浓度比为 1:37 时对 α -淀粉酶的抑制效果强于阿卡波糖。

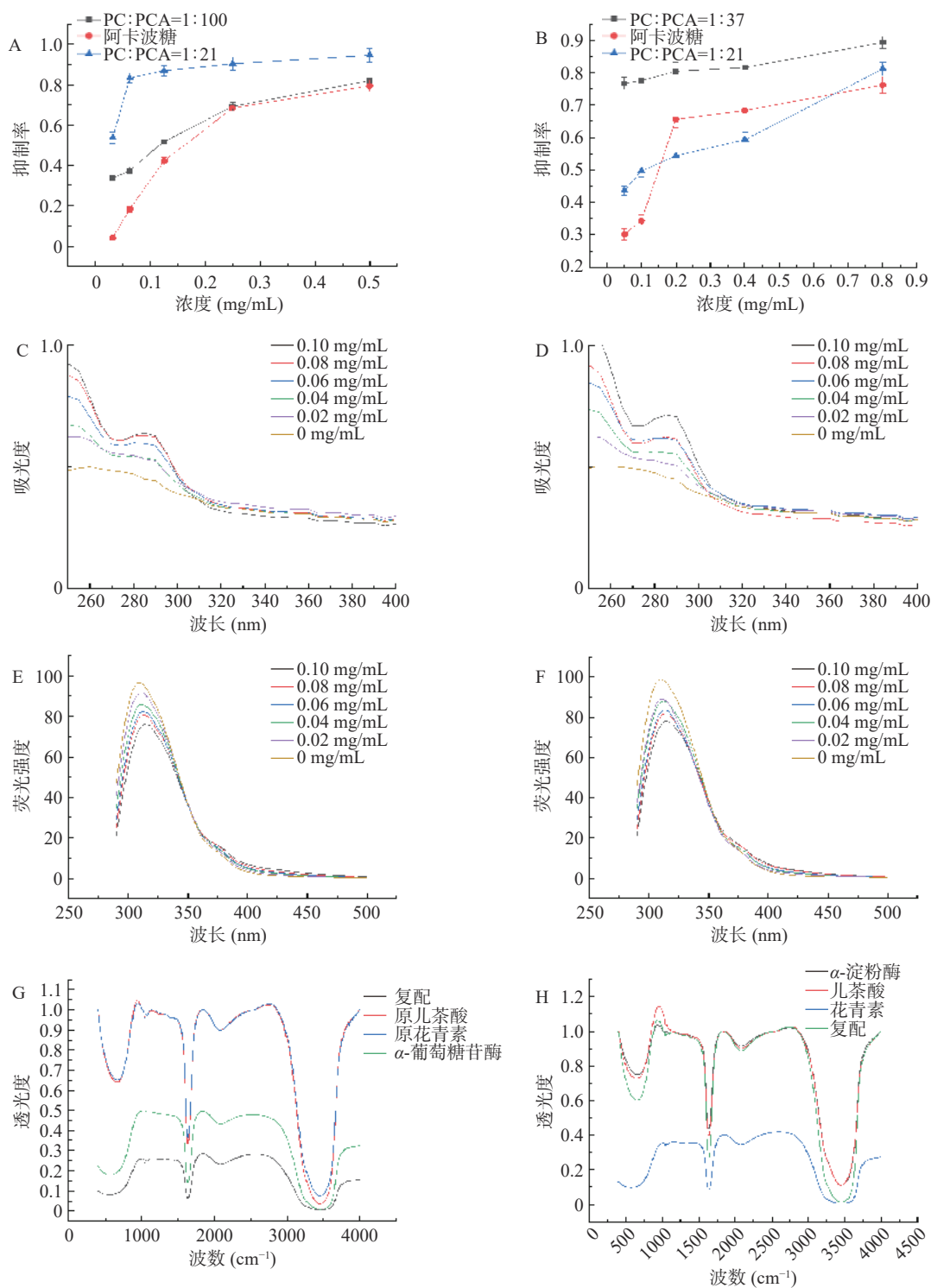


图 6 PC 和 PCA 联合作用研究

Fig.6 Inhibitory effect of procyanidins and PCA on starch digestive enzymes

注: A. PC 与 PCA 联合对 α -葡萄糖苷酶的抑制曲线; B. PC 与 PCA 联合作用对 α -淀粉酶的抑制曲线; C. PC 与 PCA 联合对 α -葡萄糖苷酶的紫外吸收光谱研究; D. PC 与 PCA 联合对 α -淀粉酶的紫外吸收光谱; E. PC 与 PCA 联合对 α -葡萄糖苷酶的荧光光谱; F. PC 和 PCA 联合作用下 α -淀粉酶的荧光光谱; G. PC 与 PCA 联合对 α -葡萄糖苷酶的红外光谱; H. PC 与 PCA 联合对 α -淀粉酶的红外光谱。

根据图 6C~图 6D 所示, PC 和 PCA 联合作用对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的最大吸收峰值随着抑制剂浓度的增大发生明显的蓝移现象, 且随着两种复配抑制剂物质浓度的增加, 对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的吸光度增大。通过测量联合物质的荧光强度来分析两种物质联合作用下在不同浓度下对酶荧光强度的淬灭作用。由紫外光谱分析可知复配抑制剂与两种淀粉消化酶之间相互作用, 推测两种淀粉消化酶的肽键基团发生了跃迁, 致使酶的构象发生变化^[28-31]。

图 6E 表示在不同浓度下的 PC 和 PCA 联合作用对 α -葡萄糖苷酶的荧光光谱图。随着复合抑制剂浓度的增加, 荧光强度随之降低, 说明荧光光谱发生明显的淬灭现象。且最大荧光波长发生了明显的红移, α -葡萄糖苷酶的荧光强度呈一定的依赖性。图 6F 表示在不同浓度下的 PC 和 PCA 联合作用对 α -淀粉酶的荧光光谱图。随着抑制剂浓度的增加, 荧光强度同样随之降低, 最大荧光波长也发生了明显的红移。荧光光谱说明两种物质联合作用使得 α -葡萄糖苷酶与 α -淀粉酶上的疏水键断裂, 使氨基酸残基暴露出来, 导致酶的结构发生变化^[28]。

由图 6G~图 6H 可以看出第一个吸收峰波长范围为 1500~2000 cm^{-1} , 该范围主要存在 C=N 键, C=O 键等。第二个吸收峰波长范围为 2500~4000 cm^{-1} , 该区域通常称为“氢键区”。由红外光谱分析推测 PC 与 PCA 以及联合物质对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶主要作用于 C=N 键, C=O 键等。在 3400 nm 处的吸收峰的宽度改变推测抑制剂使酶的结构发生了变化^[32]。

2.7 PC 和 PCA 对淀粉消化酶的联合抑制作用评价

由 2.6 可知 PC:PCA=1:100 时, α -葡萄糖苷酶的 IC_{50} 值为 0.097 mg/mL, PC:PCA=1:21 时, IC_{50} 值为 0.00099 mg/mL; PC:PCA=1:37 时, α -淀粉酶的 IC_{50} 值为 0.00012 mg/mL, PC:PCA=1:21 时值为 0.10686 mg/mL。

根据药物联合指数公式求得 PC 与 PCA 浓度之比为 1:100 时 CI 为 9.242, 1:21 时 CI 为 0.094; PC 与 PCA 浓度之比为 1:37 时 CI 为 0.002, 1:21 时 CI 为 2.094。

由 2.1 和 2.6 得出不同抑制剂对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的 IC_{50} 值见于上表 1。比较 IC_{50} 值可知, PC:PCA=1:21 时的抑制效果要比单个物质的抑制效果较好; PC:PCA=1:37 时的抑制效果强于单个物质的抑制效果。分析可能是 1:21 比值下两种物质联合作用更利于与 α -葡萄糖苷酶上的氨基酸残基结合, 提高了抑制剂与酶复合物的稳定性。PC 与 PCA 浓度之比为 1:37 时 CI 小于 1, 对 α -淀粉酶表现出协同抑制作用; 两物质浓度之比为 1:21 时 CI 大于 1, 对 α -淀粉酶表现出拮抗作用。

表 1 不同抑制剂对淀粉消化酶的 IC_{50} 值

Table 1 IC_{50} values of different inhibitors on starch-digesting enzymes

样品	α -葡萄糖苷酶 IC_{50} (mg/mL)	样品	α -淀粉酶 IC_{50} (mg/mL)
PC	0.0106	PC	0.0524
PCA	1.0667	PCA	1.9426
PC:PCA=1:100	0.097	PC:PCA=1:37	0.00012
PC:PCA=1:21	0.00099	PC:PCA=1:21	0.10686

3 结论

本文主要分析 PC 和 PCA 对淀粉消化酶的联合作用, 通过联合抑制实验可知, 联合作用的抑制效果优于单个物质。复配比例为 1:21 时对 α -葡萄糖苷酶的抑制效果最优; 1:37 时对 α -淀粉酶的抑制效果最优。两物质复配比例为 1:21 时 CI 小于 1, 对 α -葡萄糖苷酶表现出协同抑制作用; 复配比例为 1:37 时 CI 小于 1, 对 α -淀粉酶表现出协同抑制作用。结果为此两种物质联合使用的效果提供了理论依据, 为开发天然降糖膳食补充剂提供了新思路。

© The Author(s) 2024. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] CHEN J G, WU S F, ZHANG Q F, et al. α -glucosidase inhibitory effect of anthocyanins from Cinnamomum camphora fruit: Inhibition kinetics and mechanistic insights through in vitro and in silico studies[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 143(9): 696-703.
- [2] 蒋晴怡. 苦荞中淀粉-槲皮素低消化体形成机制的研究[D]. 上海: 上海应用技术大学, 2021. [JIANG YQ. Study on the formation mechanism of low digestibility of starch quercetin in tartary buckwheat[D]. Shanghai: Shanghai Institute of Technology, 2021.]
- [3] SUN L J, MIAO M. Dietary polyphenols modulate starch digestion and glycaemic level: A review[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2022, 60(4): 541-555.
- [4] 杨继晨. 黄酮类化合物对 α -淀粉酶/ α -葡萄糖苷酶的抑制机制及其构效关系研究[D]. 天津: 天津大学, 2021. [YANG J C. Study on the inhibitory mechanism of flavonoids on α -amylase/ α -glucosidase and its structure-activity relationship[D]. Tianjin: Tianjin University, 2021.]
- [5] TAN Y, CHANG S K, ZHANG Y. Comparison of α -amylase, α -glucosidase and lipase inhibitory activity of the phenolic substances in two black legumes of different genera[J]. Food Chemistry, 2017, 214: 259-268.
- [6] HE Xiaofeng, ZHANG Xuke, GENG Changan, et al. Tsaokopyranols A-M, 2, 6-epoxydiarylheptanoids from Amomum tsao-ko and their α -glucosidase inhibitory activity[J]. Bioorganic Chemistry, 2020, 96: 103638.
- [7] WANG Shujun, LI Caili, COPELAND L, et al. Starch retrogradation: A comprehensive review[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2015, 14(5).
- [8] 马艳丽, 让一峰, 赵伟, 等. 白芸豆 α -淀粉酶抑制剂对 α -淀

- 粉酶抑制特性的研究[J]. 食品工业科技, 2017, 38(12): 109–112.
- [8] MA Yanli, RANG Yifeng, ZHAO Wei, et al. Study on the inhibitory properties of α -amylase inhibitor from white kidney beans[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(12): 109–112.]
- [9] GU L, KELM M, HAMMERSTONE J F, et al. Fractionation of polymeric procyanidins from lowbush blueberry and quantification of procyanidins in selected foods with an optimized normal-phase HPLC-MS fluorescent detection method[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(17): 4852–4860.
- [10] BARRETT A, NDOU T, HUGHEY C A, et al. Inhibition of α -amylase and glucoamylase by tannins extracted from cocoa, pomegranates, cranberries, and grapes[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(7): 1477–1486.
- [11] 刘睿, 潘思轶, 刘亮, 等. 高粱 PC 对 α -淀粉酶活力抑制动力学的研究[J]. 食品科学, 2005(9): 171–174. [LIU Rui, PAN Siyi, LIU Liang, et al. Research of inhibition kinetics for activity of α -amylase by SPC[J]. Food Science, 2005(9): 171–174.]
- [12] 金斐, 朱丽云, 高永生, 等. 植物源活性成分降血糖作用及其机理研究进展[J]. 食品科学, 2021, 42(21): 322–330. [JIN Fei, ZHU Liyun, GAO Yongsheng, et al. Progress in research on the hypoglycemic effect and mechanism of plant-derived active ingredients[J]. Food Science, 2021, 42(21): 322–330.]
- [13] 林海生, 廖津, 秦小明, 等. 华贵栉孔扇贝闭壳肌酶解物的辅助降血糖功能活性评价[J]. 上海海洋大学学报, 2023, 32(4): 865–873. [LIN Haisheng, LIAO Jin, QIN Xiaoming, et al. Evaluation on the auxiliary hypoglycemic function of enzymatic hydrolysate from Chlamys farreri adductor muscle[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2023, 32(4): 865–873.]
- [14] 曹俊伟. 没食子酸酯基多酚对淀粉消化酶的抑制作用[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2021. [Cao Junwei. The inhibitory effects of galloyl-based polyphenols on the enzymes for starch digestion[D]. Xianyang: Northwest A&F University, 2021.]
- [15] 黄克愁, 黄澳, 黄奕瑜, 等. 糙米多酚对淀粉消化酶的抑制作用及机理[J]. 食品工业科技, 2019, 40(19): 104–109, 116. [HUANG Kechou, HUANG Ao, HUANG Yiyu, et al. Inhibition and mechanism of brown rice polyphenols on starch digestive enzymes[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(19): 104–109, 116.]
- [16] 周一鸣, 马思佳, 蒋晴怡, 等. 苦荞中芦丁和槲皮素对淀粉消化酶的抑制能力[J]. 食品科学, 2022, 43(18): 30–37. [ZHOU Yiming, MA Sijia, JIANG Qingyi, et al. Inhibition of starch-digesting enzymes by rutin and quercetin in tartary buckwheat[J]. Food Science, 2022, 43(18): 30–37.]
- [17] SHEN Heyu, WANG Jun, AO Jingfang, et al. The inhibitory mechanism of pentacyclic triterpenoid acids on pancreatic lipase and cholesterol esterase[J]. Food Bioscience, 2023, 51: 102341.
- [18] 赵一灵. 不同黄酮类化合物对 α -淀粉酶的抑制作用机制及蒲公英果冻的开发[D]. 南昌: 南昌大学, 2022. [ZHAO Y L. The inhibition mechanism of different flavonoids on α -amylase and the development of dandelion jelly[D]. Nanchang: Nanchang University, 2022.]
- [19] HUI X D, WU GHAN D, et al. The effects of bioactive compounds from blueberry and blackcurrant powders on the inhibitory activities of oat bran pastes against α -amylase and α -glucosidase linked to type 2 diabetes[J]. Food Research International, 2020, 138: 109756.
- [20] 袁向华, 周艳玲, 勾洵, 等. 阿卡波糖对胰 α -淀粉酶的抑制动力学研究[J]. 世界科技研究与发展, 2016(1): 117–121. [YUAN Xianghua, ZHOU Yanling, et al. Researches on inhibition kinetics of pancreatic α -amylase by acarbose[J]. World Sci-Tech R&D, 2016(1): 117–121.]
- [21] OBOH G, ADEMOSUN A O, AYENI P O, et al. Comparative effect of quercetin and rutin on α -amylase, α -glucosidase, and some pro-oxidant-induced lipid peroxidation in rat pancreas[J]. Comp Clin Pathol, 2014, 24: 1103–1110.
- [22] ULUSOY H G, SANLIER N. A minireview of quercetin: From its metabolism to possible mechanisms of its biological activities[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2019, 60: 3290–3303.
- [23] LIM J, FERRUZZI M G, HAMAKER B R. Structural requirements of flavonoids for the selective inhibition of α -amylase versus α -glucosidase[J]. Food Chem, 2022, 370: 130981.
- [24] ZHU H, LIU S, YAO L, et al. Free and bound phenolics of buckwheat varieties: HPLC characterization, antioxidant activity, and inhibitory potency towards α -glucosidase with molecular docking analysis[J]. Antioxidants, 2019, 8: 606.
- [25] ZHANG H L, WU Q X, QIN X M. Camellia nitidissima Chi flower extracts inhibit α -amylase and α -glucosidase: *In vitro* by analysis of optimization of addition methods, inhibitory kinetics and mechanisms[J]. Process Biochemistry, 2019, 86: 177–185.
- [26] ZHAO J, HUANG L, SUN C, et al. Studies on the structure-activity relationship and interaction mechanism of flavonoids and xanthine oxidase through enzyme kinetics, spectroscopy methods and molecular simulations[J]. Food Chem, 2020, 323: 126807.
- [27] SKRT M, BENEDIK E, PODLIPNIK C, et al. Interactions of different polyphenols with bovine serum albumin using fluorescence quenching and molecular docking[J]. Food Chem, 2012, 135: 2418–2424.
- [28] JOYE I J, DAVIDOV-PARDO G, LUDESCHER R D, et al. Fluorescence quenching study of resveratrol binding to zein and gliadin: Towards a more rational approach to resveratrol encapsulation using water-insoluble proteins[J]. Food Chem, 2015, 185: 261–267.
- [29] ZHENG Y, TIAN J, YANG W, et al. Inhibition mechanism of ferulic acid against α -amylase and α -glucosidase[J]. Food Chem, 2020, 317: 126346.
- [30] KAYUKAWA C T M, DE O M A S, KASPCHAK E, et al. Effect of tannic acid on the structure and activity of Kluyveromyces lactis β -galactosidase[J]. Food Chem, 2019, 275: 346–353.
- [31] YUKSEL Z, AVCI E, ERDEM Y K. Characterization of binding interactions between green tea flavanoids and milk proteins[J]. Food Chem, 2010, 121: 450–456.
- [32] ZHANG J, DING W, TANG Z, et al. Identification of the effective α -amylase inhibitors from *Dalbergia odorifera*: Virtual screening, spectroscopy, molecular docking, and molecular dynamic simulation[J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2022, 280: 121448.