

# 没食子酸对 $\alpha$ -淀粉酶和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用及机理

沈荷玉, 李梦阳, 敖婧芳, 王 军, 徐怀德, 罗安伟\*  
(西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100)

**摘要:** 从抑制率、抑制动力学、紫外光谱、荧光光谱、圆二色谱及分子模拟方面研究没食子酸对 $\alpha$ -淀粉酶和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用和机理。结果表明, 没食子酸对 $\alpha$ -淀粉酶和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶有良好的抑制效果, 半数抑制浓度分别为 $(0.72 \pm 0.01)$  mmol/L和 $(0.59 \pm 0.02)$  mmol/L, 以非竞争方式抑制 $\alpha$ -淀粉酶, 以混合竞争方式抑制 $\alpha$ -葡萄糖苷酶。紫外光谱和荧光猝灭实验的结果表明, 没食子酸通过改变 $\alpha$ -淀粉酶和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶芳香族氨基酸残基周围的微环境, 从而静态猝灭酶的荧光特性。圆二色谱分析表明, 没食子酸能减少 $\alpha$ -淀粉酶和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的 $\alpha$ -螺旋结构含量, 增加 $\beta$ -折叠、 $\beta$ -转角和无规卷曲结构含量, 从而改变酶构象。分子对接结果显示没食子酸与 $\alpha$ -淀粉酶和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的结合主要是通过氢键和疏水相互作用。

**关键词:**  $\alpha$ -淀粉酶;  $\alpha$ -葡萄糖苷酶; 抑制作用; 光谱; 分子对接

## Inhibitory Effect and Mechanism of Gallic Acid on $\alpha$ -Amylase and $\alpha$ -Glucosidase Activities

SHEN Heyu, LI Mengyang, AO Jingfang, WANG Jun, XU Huaide, LUO Anwei\*  
(College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

**Abstract:** In this study, the inhibitory effect and mechanism of gallic acid on  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase were investigated in terms of inhibitory rates, inhibition kinetics, ultraviolet (UV) spectra, fluorescence spectra, circular dichroism (CD) spectra, and molecular simulation. The results showed that gallic acid had a good inhibitory effect on  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase, with half maximum inhibitory concentrations ( $IC_{50}$ ) of  $(0.72 \pm 0.01)$  and  $(0.59 \pm 0.02)$  mmol/L, respectively, and inhibited  $\alpha$ -amylase in a non-competitive manner and  $\alpha$ -glucosidase in a mixed competitive-non-competitive manner. The results of UV spectroscopy and fluorescence quenching indicated that gallic acid statically quenched the fluorescence of the enzymes by altering the microenvironment around their aromatic amino acid residues. CD spectroscopy showed that gallic acid reduced the  $\alpha$ -helix content and increased the  $\beta$ -sheet,  $\beta$ -turn and random coil contents of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase, thus leading to changes in the enzymes' conformation. The molecular docking results showed that gallic acid bound to  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase mainly through hydrogen bonds and hydrophobic interactions.

**Keywords:**  $\alpha$ -amylase;  $\alpha$ -glucosidase; inhibition; spectroscopy; molecular docking

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230116-132

中图分类号: TS201.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2023)22-0031-08

引文格式:

沈荷玉, 李梦阳, 敖婧芳, 等. 没食子酸对 $\alpha$ -淀粉酶和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用及机理[J]. 食品科学, 2023, 44(22): 31-38.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230116-132. <http://www.spkx.net.cn>

SHEN Heyu, LI Mengyang, AO Jingfang, et al. Inhibitory effect and mechanism of gallic acid on  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase activities[J]. Food Science, 2023, 44(22): 31-38. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230116-132. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2023-01-16

基金项目: “十三五”国家重点研发计划重点专项(2019YFD1002404)

第一作者简介: 沈荷玉(1998—)(ORCID: 0000-0002-9510-0869), 女, 硕士研究生, 研究方向为果蔬贮藏与加工。

E-mail: heyushen0727@163.com

\*通信作者简介: 罗安伟(1971—)(ORCID: 0000-0001-9505-0729), 男, 副教授, 博士, 研究方向为果蔬贮藏与加工。

E-mail: luowanwei@nwsuaf.edu.cn

2型糖尿病 (diabetes mellitus type 2, T2DM) 是由机体细胞对胰岛素正常作用抵抗引起, 被公认为世界上最严重的公共卫生问题之一<sup>[1]</sup>。T2DM有多种症状, 如高血糖、尿频、口渴和体质量减轻, 影响人体健康和生活方式, 导致严重发病和过早死亡。近年来, 特别是发达国家, 患有T2DM的年轻人越来越多。2019年, 根据全球疾病负担研究, 有4.51亿18岁以上的成年人患有糖尿病<sup>[2]</sup>。有报告预测, 到2030年, T2DM的全球患病率将达到每10万人有7 079人患病<sup>[3]</sup>。目前, 有研究表明 $\alpha$ -淀粉酶和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶是T2DM的治疗靶点<sup>[4]</sup>。 $\alpha$ -淀粉酶和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂可以通过阻碍膳食碳水化合物的消化, 将餐后血糖水平维持在正常水平。近年来, 基于 $\alpha$ -淀粉酶和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抗高血糖药物已被开发出来, 如阿卡波糖、伏格列糖和米格列醇<sup>[5]</sup>。然而, 这些抑制剂有各种副作用, 如腹泻、胀气、肝病和腹部痉挛<sup>[6]</sup>。因此, 从自然资源中寻找新的 $\alpha$ -淀粉酶和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂是当前食品和药品领域的一个重要新方向。

没食子酸是自然界中广泛分布于植物性食物和药食同源中草药中的一种多酚类有机化合物, 例如柑橘<sup>[7]</sup>、葡萄<sup>[8]</sup>、茶叶<sup>[9]</sup>和百合<sup>[10]</sup>中。没食子酸有良好的抗氧化、抗癌、降糖、降脂、抗菌、抗病毒和抗炎等作用<sup>[11]</sup>。目前有研究发现没食子酸对 $\alpha$ -淀粉酶和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶有良好的抑制效果, 但没有深入研究其具体的抑制机制<sup>[12]</sup>。因此本实验将从酶动力学、紫外光谱、荧光猝灭、圆二色谱 (circular dichroism, CD) 以及分子模拟这些方面研究没食子酸对 $\alpha$ -淀粉酶和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制机理, 以期为提高富含没食子酸的植物性食物和药食同源的中草药资源利用提供新思路, 为开发含有没食子酸的降血糖药物或保健食品提供有益参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

没食子酸 (纯度 $\geq 98\%$ )、阿卡波糖 (纯度 $\geq 98\%$ )、来源于芽孢杆菌的 $\alpha$ -淀粉酶 (50 U/mg, 生物技术级)、来源于酿酒酵母的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶 (50 U/mg, 生物技术级) 上海源叶生物科技有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 仪器与设备

DK-98-II A电热恒温水浴锅 天津市泰斯科仪器有限公司; Spark酶标仪 帝肯奥地利有限责任公司; UV-722紫外-可见分光光度计 上海佑科仪器仪表有限公司; F-7000荧光分光光度计 日立科学仪器 (北京) 有限公司; Chirascan V100圆二色光谱仪 英国应用光物理公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 $\alpha$ -淀粉酶和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性测定

$\alpha$ -淀粉酶抑制活性测定参考Shen Heyu等<sup>[13]</sup>方法, 在0.1 mol/L pH值为7.0磷酸钾缓冲液的酶活力测定系统中进行。向试管中分别加入50  $\mu$ L质量浓度为25、50、100、300、600、900  $\mu$ g/mL的没食子酸溶液, 再分别加入1 mL 0.4 g/L的淀粉溶液, 37  $^{\circ}$ C温育5 min后加入50  $\mu$ L 0.01 mg/mL的 $\alpha$ -淀粉酶溶液。37  $^{\circ}$ C反应7.5 min后, 加入1 mL的0.01 mol/L碘液进行检测, 用紫外-可见分光光度计在波长660 nm处测定吸光度。

$\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性测定参考Shen Heyu等<sup>[13]</sup>方法, 在0.1 mol/L pH 6.8的磷酸钾缓冲液的酶活力测定系统中进行。在96孔板中加入100  $\mu$ L的0.2 U/mL  $\alpha$ -葡萄糖苷酶溶液以及100  $\mu$ L不同质量浓度 (25、50、100、300、600、900  $\mu$ g/mL) 的待测样品, 37  $^{\circ}$ C孵育10 min后, 加入50  $\mu$ L 2.5 mmol/L的4-硝基苯基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷 (4-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside, PNPG) 溶液, 37  $^{\circ}$ C孵育10 min后于波长405 nm处测定吸光度。

实验均重复3次, 以阿卡波糖为阳性对照。用SPSS软件拟合计算样品对酶的半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>)。按式 (1) 计算没食子酸对 $\alpha$ -淀粉酶和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制率:

$$\text{酶抑制率}/\% = 100 - \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{背景}}}{A_{\text{空白}} - A_{\text{缓冲液}}} \times 100 \quad (1)$$

式中:  $A_{\text{样品}}$  为加入待测样品和酶反应后的吸光度;  $A_{\text{背景}}$  为只加样品不加酶反应后的吸光度;  $A_{\text{空白}}$  为不加样品只加酶反应后的吸光度;  $A_{\text{缓冲液}}$  为只加磷酸钾缓冲液的吸光度。

#### 1.3.2 酶促反应动力学分析

酶促反应动力学的测定参考Zhao Xiaohui等<sup>[14]</sup>方法。取100  $\mu$ L不同质量浓度的没食子酸溶液 (0、0.3、0.9 mg/mL) 于试管中, 固定 $\alpha$ -淀粉酶溶液质量浓度 (0.01 mg/mL) 和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶溶液 (0.2 U/mL), 改变底物质量浓度, 即淀粉溶液质量浓度 (0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 g/L) 和PNPG溶液浓度 (1、1.5、2、2.5、3、3.5 mmol/L), 充分反应后测定混合溶液的吸光度以得到不同底物质量浓度的酶促反应速率。以酶的反应速率和底物质量浓度的倒数作Lineweaver-Burk双倒数曲线图, 分析抑制剂对酶的抑制类型。

#### 1.3.3 紫外光谱测定

分别移取3.0 mL 0.06 mg/mL的 $\alpha$ -淀粉酶溶液和0.5 U/mL  $\alpha$ -葡萄糖苷酶溶液于石英比色皿中, 扫描240~310 nm的吸收光谱<sup>[15]</sup>。扫描完毕后, 用微量进样器分别加入300  $\mu$ L不同质量浓度 (0、0.2、0.4、0.6、0.8 mg/mL) 样品溶液到含有酶液的比色皿中, 混匀, 放置3~5 min后扫描吸收光谱。以不加酶液组作为对照观察样品是否存在干扰。

1.3.4 荧光光谱测定

0.1 mL不同质量浓度的样品（0、10、50、100、150、200 μg/mL）分别和0.05 mL 0.01 mg/mL α-淀粉酶溶液、0.1 mL 0.2 U/mL α-葡萄糖苷酶溶液迅速混匀后，测定其荧光强度。激发波长为280 nm，发射波长为300~400 nm，狭缝宽度为5 nm荧光猝灭类型由Stern-Volmer方程确定<sup>[16]</sup>。

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad (2)$$

式中： $F_0$ 和 $F$ 分别为未加入样品和加入样品的荧光强度； $K_q$ 和 $K_{sv}$ 分别为生物分子猝灭常数 and Stern-Volmer猝灭常数； $\tau_0$ 为荧光团的生命周期（无猝灭剂）； $[Q]$ 为样品的质量浓度。

1.3.5 三维荧光光谱

在发射波长为200~600 nm，激发波长为200~540 nm，测定在没食子酸存在下α-淀粉酶和α-葡萄糖苷酶的三维荧光光谱，其他参数与1.3.4节所述相同。

1.3.6 CD光谱测定

CD光谱条件：扫描范围200~250 nm，样品溶液（0.1 mg/mL）与α-淀粉酶溶液（2 mg/mL）和α-葡萄糖苷酶溶液（2 mg/mL）分别按不同体积比（1:0、4:1、2:1、1:1）添加于1.0 mm石英比色皿中<sup>[17]</sup>。以磷酸缓冲液和抑制剂作为空白，扣除反应体系中的空白圆二信号。根据CD光谱数据，通过CDNN软件计算二级结构含量，分析样品与消化酶反应前后二级结构变化。

1.3.7 分子对接分析

采用分子对接技术评价没食子酸与α-淀粉酶、α-葡萄糖苷酶之间潜在的结合构象。α-淀粉酶（PDB ID: 1UA7）和α-葡萄糖苷酶（PDB ID: 3A4A）的晶体结构从蛋白质数据库（<http://www.rcsb.org/pdb>）中获得。采用AutoDock 4.2软件对α-淀粉酶和α-葡萄糖苷酶进行结构预处理，包括去除所有水分子和配体，并加入氢原子和气相电荷。使用ChemBioDraw程序构建设没食子酸的3D结构。采用MM2方法将分子能量最小化，并将参数Minimum RMS Gradient设置为0.01。配体结构的处理采用ADT，生成pdbqt文件进行对接。最后通过Vina程序进行分子对接，选择没食子酸与α-淀粉酶和α-葡萄糖苷酶结合能最低的结合模式进行分析。

1.4 数据统计与分析

上述所有实验均重复3次，数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用Origin 2018软件绘图，使用SPSS软件进行数据处理和分析。

2 结果与分析

2.1 没食子酸对α-淀粉酶和α-葡萄糖苷酶的抑制作用

如图1所示，随着没食子酸质量浓度的增加，对α-淀

粉酶和α-葡萄糖苷酶的抑制作用显著增强，这表明没食子酸对酶活性的抑制作用具有显著的剂量依赖性。IC<sub>50</sub>为酶活力损失50%时所加入的抑制剂浓度<sup>[18]</sup>，可以比较没食子酸和阿卡波糖（阳性对照物）对酶的抑制效果。没食子酸和阿卡波糖（阳性对照物）对α-淀粉酶的IC<sub>50</sub>分别为（0.72±0.01）mmol/L和（0.31±0.02）mmol/L，对α-葡萄糖苷酶的IC<sub>50</sub>分别为（0.59±0.02）mmol/L和（0.08±0.01）mmol/L。虽然与阿卡波糖相比，没食子酸对α-淀粉酶和α-葡萄糖苷酶的抑制效果略低，但依旧有良好的抑制效果。因此，没食子酸是潜在的α-淀粉酶和α-葡萄糖苷酶抑制剂。

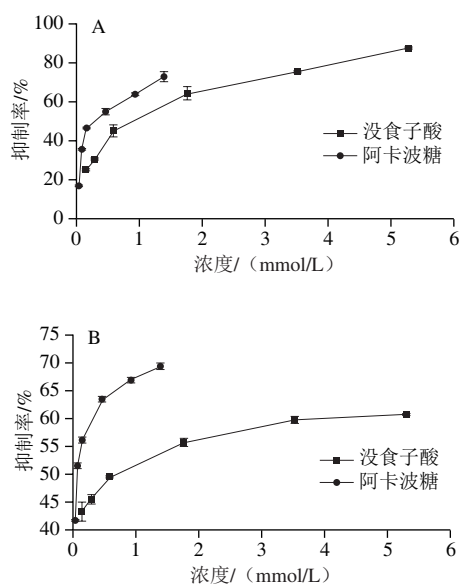


图1 没食子酸对α-淀粉酶(A)和α-葡萄糖苷酶(B)的抑制活性  
Fig. 1 Inhibitory effect of gallic acid on α-amylase (A) and α-glucosidase (B) activities

2.2 酶促反应动力学分析

如图2A所示，不同底物质量浓度所对应直线相交且交点在横坐标轴上，与纵坐标截距变大，可知 $K_m$ 值不变，而 $V_{max}$ 呈下降趋势，表明没食子酸以非竞争方式抑制α-淀粉酶<sup>[19]</sup>。因此推断没食子酸与α-淀粉酶活性中心以外的氨基酸残基进行结合，底物质量浓度不影响没食子酸对α-淀粉酶的抑制作用<sup>[20]</sup>。如图2B所示，不同底物质量浓度所对应直线相交在第2象限，与纵坐标截距变大，与横坐标截距变小，可知 $K_m$ 值增大，而 $V_{max}$ 呈下降趋势，表明没食子酸以混合竞争方式抑制α-葡萄糖苷酶，能与底物竞争α-葡萄糖苷酶的活性中心结合位点<sup>[21]</sup>。这与阿卡波糖对α-淀粉酶和α-葡萄糖苷酶抑制作用类型分别为混合竞争性抑制和竞争性抑制<sup>[22-23]</sup>不同，可能是抑制剂在化学结构上的差异导致抑制效果和类型不同，具体原因仍需进一步研究。

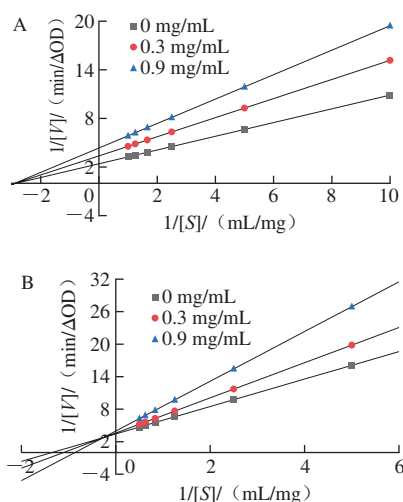


图2 没食子酸对 $\alpha$ -淀粉酶 (A) 和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶 (B) 的双倒数曲线  
Fig. 2 Lineweaver-Burk plots for the inhibition of gallic acid against  $\alpha$ -amylase (A) and  $\alpha$ -glucosidase (B)

### 2.3 没食子酸对 $\alpha$ -淀粉酶和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶紫外光谱的影响

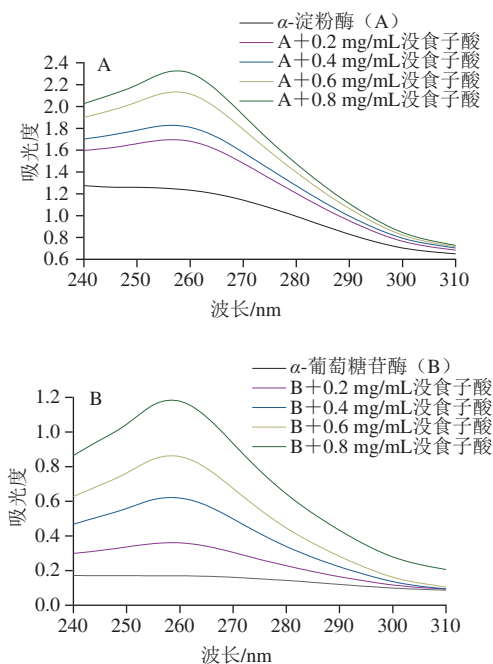


图3 没食子酸质量浓度对 $\alpha$ -淀粉酶 (A) 和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶 (B) 紫外光谱的影响

Fig. 3 Effects of different concentrations of gallic acid on UV spectra of  $\alpha$ -amylase (A) and  $\alpha$ -glucosidase (B)

紫外光谱可以观察蛋白质与配体相互作用过程中蛋白质构象变化<sup>[18]</sup>。如图3所示,  $\alpha$ -淀粉酶和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶在270 nm附近有一个特征峰, 主要是由于色氨酸 (tryptophan, Trp)、酪氨酸 (tyrosine, Tyr) 和苯丙氨酸 (phenylalanine, Phe) 等芳香族氨基酸残基的存在引起<sup>[24]</sup>。如图3所示, 随着没食子酸质量浓度的增加, 特征峰的位置没有明显移动, 但 $\alpha$ -淀粉酶和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的吸

收峰强度大大增加。吸收峰强度变化具有浓度依赖性, 与Avwioroko等<sup>[25]</sup>研究的紫草种子提取物与 $\alpha$ -淀粉酶结合的紫外光谱图结果相似。该现象表明 $\alpha$ -淀粉酶/ $\alpha$ -葡萄糖苷酶-没食子酸复合物的形成可能有利于分子间和分子内聚集, 破坏了芳香族氨基酸残基的微环境空间结构, 导致酶的构象变化和疏水基团的暴露。

### 2.4 没食子酸对 $\alpha$ -淀粉酶和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的荧光猝灭效应

荧光猝灭效应分析可用于观察没食子酸与 $\alpha$ -淀粉酶和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶分子间结合的相互作用<sup>[26]</sup>。由于Trp、Tyr和Phe等芳香族氨基酸存在,  $\alpha$ -淀粉酶和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶具有内源性荧光, 荧光的强度和位置与这些芳香族氨基酸残基所处的微环境密切相关<sup>[27]</sup>。如图4所示,  $\alpha$ -淀粉酶和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶分别在343 nm和336 nm波长处出现最大荧光峰。随着没食子酸质量浓度的增加, 酶的荧光强度逐渐下降。此外,  $\alpha$ -淀粉酶的最大荧光发射波长位置发生轻微蓝移, 而 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的最大荧光发射波长发生红移。结果表明没食子酸能够通过与酶的相互作用强烈地猝灭 $\alpha$ -淀粉酶和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的固有荧光, 氨基酸残基的微环境发生了变化。这与Haguet等<sup>[28]</sup>研究的5种提取物配方对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的荧光光谱影响结果相似, 阿卡波糖对酶荧光强度的影响也有相似趋势, 但效果并不明显。Stern-Volmer图可用于计算生物分子猝灭常数 ( $K_q$ ), 该参数与猝灭机制密切相关。没食子酸与 $\alpha$ -淀粉酶、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的猝灭反应的 $K_q$ 值分别为 $1.08 \times 10^{11} \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$ 和 $1.21 \times 10^{11} \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$ , 均大于最大散射碰撞猝灭常数 $2 \times 10^{10} \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$ <sup>[21]</sup>。因此, 没食子酸对 $\alpha$ -淀粉酶、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的荧光猝灭过程为静态荧光猝灭<sup>[29]</sup>。

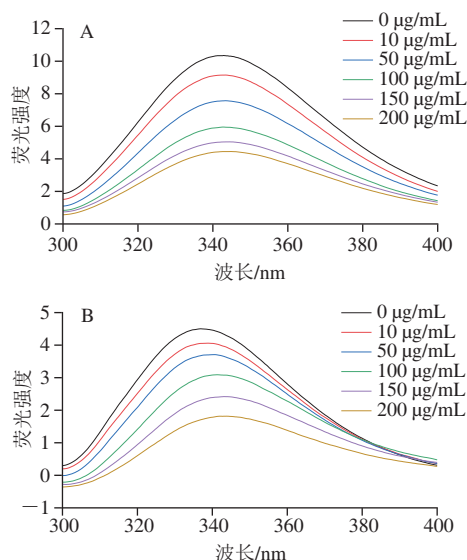


图4 没食子酸质量浓度对 $\alpha$ -淀粉酶 (A) 和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶 (B) 荧光光谱的影响

Fig. 4 Effects of different concentrations of gallic acid on fluorescence spectra of  $\alpha$ -amylase (A) and  $\alpha$ -glucosidase (B)

三维荧光光谱用于观察没食子酸对 $\alpha$ -淀粉酶、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的荧光猝灭效应,如图5A、C所示, $\alpha$ -淀粉酶、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的荧光光谱图有3个特征峰,分别为Rayleigh散射峰(峰a)和光谱特征峰(峰1和峰2)。峰1表示酶中Tyr和Trp残基涉及 $\pi \rightarrow \pi^*$ 转变的光谱特征<sup>[30]</sup>,峰2表示多肽主链C=O涉及 $n \rightarrow \pi^*$ 转变的荧光光谱特征<sup>[31]</sup>。如图5B、D所示,加入没食子酸后,峰1和峰2峰强度明显降低。图5D中 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的三维荧光光谱中峰2甚至消失。峰的变化表明没食子酸通过形成没食子酸-酶复合物影响 $\alpha$ -淀粉酶和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶多肽链的微环境,也就是说,没食子酸倾向于通过诱导疏水基团和侧链的折叠提供疏水区域,从而导致酶的构象转化。

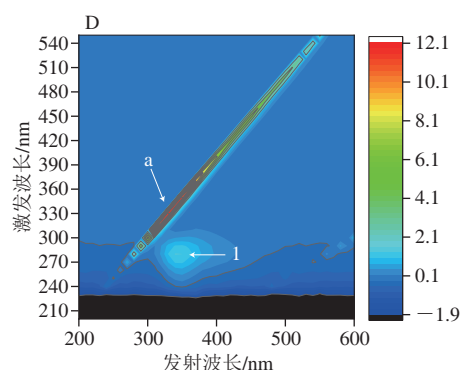
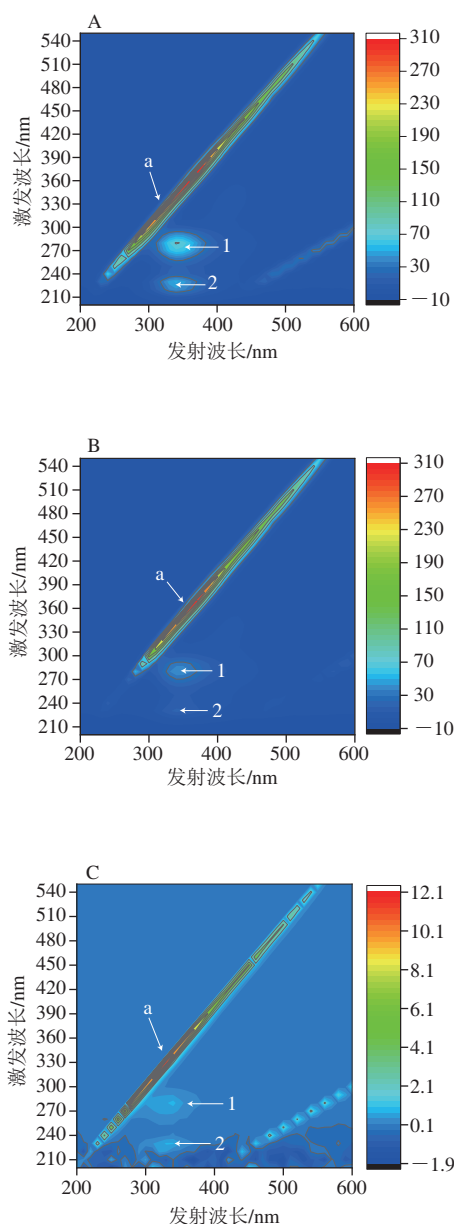


图5  $\alpha$ -淀粉酶、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶(A、C)和没食子酸存在下 $\alpha$ -淀粉酶和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶(B、D)的三维荧光光谱图  
Fig. 5 3D fluorescence spectra of  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase in the absence (A, C) and presence (B, D) of gallic acid

### 2.5 没食子酸对 $\alpha$ -淀粉酶和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶二级结构的影响

如图6所示,在208 nm和226 nm波长处的负峰分布在 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁和 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁中,分别表征 $\alpha$ -螺旋和 $\beta$ -折叠<sup>[32]</sup>。与游离的 $\alpha$ -淀粉酶和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶CD光谱相比,没食子酸的加入降低了酶在208 nm和226 nm波长处的负峰强度。结果表明,没食子酸可以显著影响 $\alpha$ -淀粉酶和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的二级结构。由表1可知,随着没食子酸含量的增加, $\alpha$ -淀粉酶中 $\alpha$ -螺旋结构含量(25.10%~19.70%)减少,而 $\beta$ -折叠结构含量(22.60%~28.00%)、 $\beta$ -转角结构含量(18.20%~19.80%)和无规卷曲结构含量(40.20%~44.80%)增加; $\alpha$ -葡萄糖苷酶中 $\alpha$ -螺旋结构含量(43.40%~27.00%)减少, $\beta$ -折叠结构(12.70%~21.30%)、 $\beta$ -转角结构(15.20%~18.10%)和无规卷曲结构含量(25.80%~36.90%)增加。因此,加入没食子酸可以破坏 $\alpha$ -淀粉酶和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的二级结构,从而降低酶结构的稳定性,抑制 $\alpha$ -淀粉酶和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性。

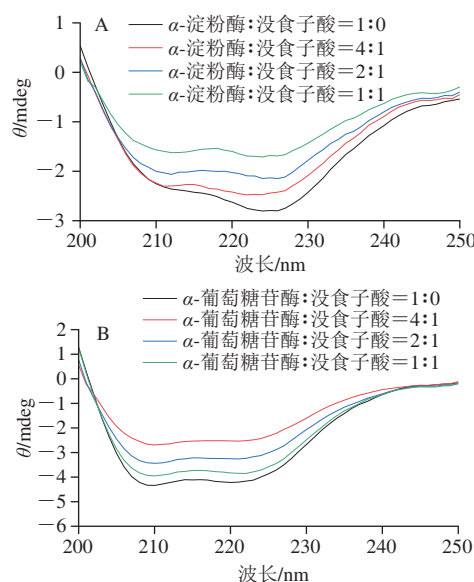


图6 没食子酸对 $\alpha$ -淀粉酶(A)和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶(B) CD光谱的影响  
Fig. 6 Effect of gallic acid on CD spectra of  $\alpha$ -amylase (A) and  $\alpha$ -glucosidase (B)

表1 没食子酸对 $\alpha$ -淀粉酶和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶二级结构的影响  
Table 1 Effect of gallic acid on the secondary structure contents of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase

酶	体积比	$\alpha$ -螺旋/%	$\beta$ -折叠/%	$\beta$ -转角/%	无规卷曲/%
$\alpha$ -淀粉酶	1:0	25.10	22.60	18.20	40.20
	4:1	24.10	23.40	18.50	40.50
	2:1	22.30	25.20	19.00	42.10
	1:1	19.70	28.10	19.80 <td 44.80	
$\alpha$ -葡萄糖苷酶	1:0	43.40	12.70	15.20	25.80
	4:1	39.50	14.20	15.80	28.10
	1:1	27.00	21.30	18.10	36.90

## 2.6 分子对接分析结果

分子对接技术是一种可视化小分子配体与大分子受体相互作用, 确定配体可能的结合位点和空间构象的有效方法<sup>[33]</sup>。分子对接结果表明, 没食子酸与 $\alpha$ -淀粉酶、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶相互作用, 最低结合能分别为 $-5.9$  kcal/mol和 $-6.5$  kcal/mol。结合能为负值表明 $\alpha$ -淀粉酶、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶可能与没食子酸形成复合物。在分子对接中, 没食子酸定位在 $\alpha$ -淀粉酶、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性位点附近。如图7A和图8A所示, 没食子酸与 $\alpha$ -淀粉酶结合时, 主要被Trp58、Tyr62、Gln63、His102、Leu141、Leu142、Leu144、Arg174、Ala177、Asp176、Glu208、His268、Asp269等氨基酸残基所包围。Trp58、Trp59和Tyr62为 $\alpha$ -淀粉酶中催化活性中心的关键残基, 没食子酸通过疏水相互作用与Trp58和Tyr62残基周围的疏水腔结合, 进而影响其微环境的极性<sup>[34]</sup>。Meidinna等<sup>[35]</sup>报道了阳性对照物阿卡波糖与 $\alpha$ -淀粉酶结合位点氨基酸残基Trp59相互作用形成氢键, 从而以混合竞争性的方式抑制 $\alpha$ -淀粉酶活性。而没食子酸与 $\alpha$ -淀粉酶活性结合位点以外的氨基酸残基Lys156、Asn317、Glu422、His423之间形成4个氢键, 与抑制动力学结果一致, 说明没食子酸以非竞争方式抑制 $\alpha$ -淀粉酶活性。如图7B和图8B所示, 没食子酸与 $\alpha$ -葡萄糖苷酶结合时, 主要被Lys156、Asn235、Ser236、Thr237、Phe314、Asn317、Ile419、Glu422、His423、Glu429、Lys432、Phe433等氨基酸残基所包围, 且与氨基酸残基Lys156、Asn317、Glu422、His423、Glu429之间形成5个氢键。Askarzadeh等<sup>[36]</sup>也利用分子对接技术将阿卡波糖放入 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的活性中心, 结果显示阿卡波糖与氨基酸残基Asn241和Arg312形成氢键。没食子酸的苯环上含有3个羟基, 苯环上的电子离域作用促使酚羟基发生离子化, 易与酶的结合形成氢键, 氢键的形成可以增强 $\alpha$ -淀粉酶、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶和配体分子结合的稳定性<sup>[29]</sup>。以上结果表明, 氢键和疏水作用是没食子酸与 $\alpha$ -淀粉酶、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶之间重要相互作用, 可以改变酶的空间结构, 对其抑制活性有重要影响。

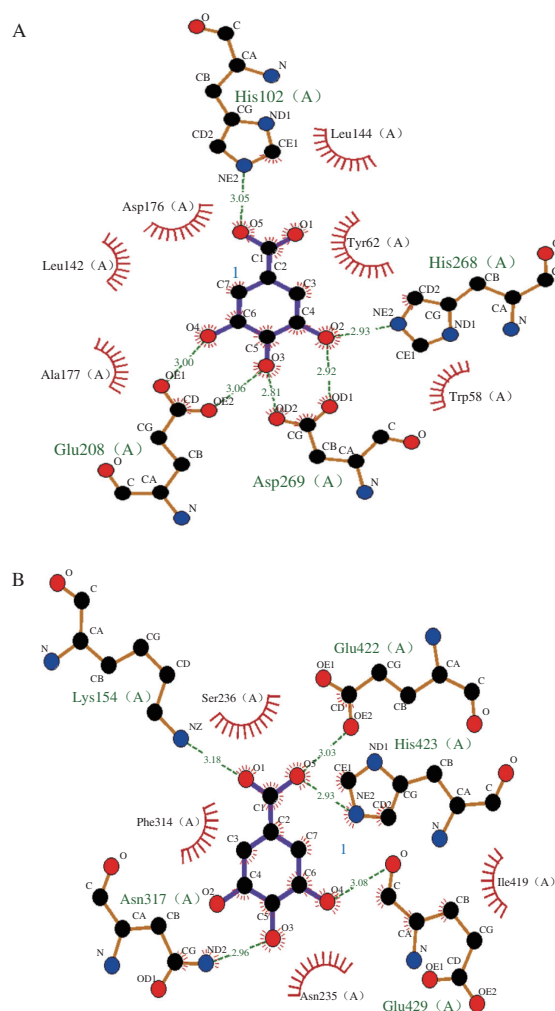


图7 没食子酸与 $\alpha$ -淀粉酶 (A) 和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶 (B) 的分子对接2D图  
Fig. 7 2D Molecular docking model of gallic acid with  $\alpha$ -amylase (A) or  $\alpha$ -glucosidase (B)

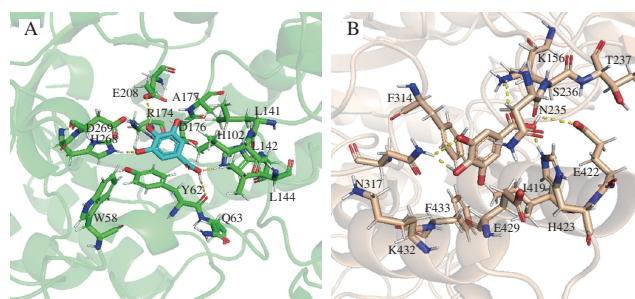


图8 没食子酸与 $\alpha$ -淀粉酶 (A) 和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶 (B) 的分子对接3D图  
Fig. 8 3D Molecular docking model of gallic acid with  $\alpha$ -amylase (A) or  $\alpha$ -glucosidase (B)

## 3 结论

本研究探讨了没食子酸对 $\alpha$ -淀粉酶和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用, 并采用抑制动力学、紫外光谱法、荧光光谱法、CD光谱法和分子对接分析研究了没食子酸和2种

酶之间的相互作用机理。没食子酸对 $\alpha$ -淀粉酶和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶有良好的抑制作用,且抑制作用都具有明显的浓度依赖性。酶促反应动力学结果显示,没食子酸分别以非竞争性抑制方式和混合竞争性抑制方式与 $\alpha$ -淀粉酶和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性位点相互作用。紫外光谱分析结果表明,没食子酸的加入导致酶的构象变化和疏水基团的暴露。荧光谱图结果显示,没食子酸以静态猝灭的方式强烈猝灭酶的内源性荧光,改变了氨基酸残基Trp和Tyr所处的微环境。CD光谱分析表明,没食子酸显著改变酶的二级结构,从而导致酶构象发生变化。同时,采用分子对接的方式模拟没食子酸与 $\alpha$ -淀粉酶和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的结合,没食子酸通过与周围氨基酸残基相互作用,导致酶的构象发生紊乱,从而降低 $\alpha$ -淀粉酶和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的催化活性。综上所述,没食子酸可以良好抑制 $\alpha$ -淀粉酶和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的活性,有效减缓碳水化合物消化,降低血糖水平。该研究为没食子酸在 $\alpha$ -淀粉酶和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂领域的深层次研发利用提供一定参考。

#### 参考文献:

- [1] ZHANG H, XU C, TIAN Q H, et al. Screening and characterization of aldose reductase inhibitors from traditional Chinese medicine based on ultrafiltration-liquid chromatography mass spectrometry and *in silico* molecular docking[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2021, 264: 113282. DOI:10.1016/j.jep.2020.113282.
- [2] KHAN M A B, HASHIM M J, KING J K, et al. Epidemiology of type 2 diabetes-global burden of disease and forecasted trends[J]. Journal of Epidemiology and Global Health, 2019, 10(1): 107. DOI:10.2991/jegh.k.191028.001.
- [3] GOODALL R, ALAZAWI A, HUGHES W, et al. Trends in type 2 diabetes mellitus disease burden in European Union countries between 1990 and 2019[J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 15356. DOI:10.1038/s41598-021-94807-z.
- [4] LIU D, CAO X Y, KONG Y C, et al. Inhibitory mechanism of sinensetin on  $\alpha$ -glucosidase and non-enzymatic glycation: insights from spectroscopy and molecular docking analyses[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 166: 259-267. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2020.10.174.
- [5] ZHAO X H, TAO J H, ZHANG T, et al. Resveratrolside alleviates postprandial hyperglycemia in diabetic mice by competitively inhibiting  $\alpha$ -glucosidase[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(10): 2886-2893. DOI:10.1021/acs.jafc.9b00455.
- [6] HE X F, ZHANG X K, GENG C G, et al. Tsaokopyranols A-M, 2,6-epoxydiarylheptanoids from *Amomum tsaoko* and their  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity[J]. Bioorganic Chemistry, 2020, 96: 103638. DOI:10.1016/j.bioorg.2020.103638.
- [7] 徐程楠, 王天玉, 姚周麟, 等. 柑橘果实中酚酸类化合物研究进展[J]. 浙江柑橘, 2022, 39(1): 2-7. DOI:10.13906/j.cnki.zjgj.1009-0584.2022.01.001.
- [8] 于群. 芦笋多酚结合热加工抑制酪氨酸酶活性的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2021. DOI:10.27169/d.cnki.gwqgu.2021.000083.
- [9] 辜文彦, 余函霖, 严小凤, 等. 茶叶中没食子酸在医学应用中的研究进展[J]. 玉林师范学院学报, 2020, 41(3): 80-85. DOI:10.13792/j.cnki.cn45-1300/z.2020.03.014.
- [10] 何丹, 张海潮, 李世慧, 等. 百合化学成分、药理作用及质量标志物的预测分析[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(12): 205-212; 303. DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2022.12.043.
- [11] 史海燕, 郝艳丽. 没食子酸生物活性研究进展[J]. 吉林医药学院学报, 2020, 41(2): 146-149. DOI:10.13845/j.cnki.issn1673-2995.2020.02.027.
- [12] ALEIXANDRE A, GIL J V, SINEIRO J, et al. Understanding phenolic acids inhibition of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase and influence of reaction conditions[J]. Food Chemistry, 2022, 372: 131231. DOI:10.1016/j.foodchem.2021.131231.
- [13] SHEN H Y, WANG J, AO J F, et al. Structure-activity relationships and the underlying mechanism of  $\alpha$ -amylase inhibition by hyperoside and quercetin: multi-spectroscopy and molecular docking analyses[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2023, 285: 121797. DOI:10.1016/j.saa.2022.121797.
- [14] ZHAO X H, TAO J H, ZHANG T, et al. Resveratrolside alleviates postprandial hyperglycemia in diabetic mice by competitively inhibiting  $\alpha$ -glucosidase[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(10): 2886-2893. DOI:10.1021/acs.jafc.9b00455.
- [15] LÜ Y F, LIANG Q Q, LI Y, et al. Study of the binding mechanism between hydroxytyrosol and bovine serum albumin using multispectral and molecular docking[J]. Food Hydrocolloids, 2022, 122: 107072. DOI:10.1016/j.foodhyd.2021.107072.
- [16] ZHENG Y X, TIAN J H, YANG W H, et al. Inhibition mechanism of ferulic acid against  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase[J]. Food Chemistry, 2020, 317: 126346. DOI:10.1016/j.foodchem.2020.126346.
- [17] SONG X, NI M T, ZHANG Y, et al. Comparing the inhibitory abilities of epigallocatechin-3-gallate and gallic acid against tyrosinase and their combined effects with kojic acid[J]. Food Chemistry, 2021, 349: 129172. DOI:10.1016/j.foodchem.2021.129172.
- [18] SHEN H Y, WANG J, AO J F, et al. The inhibitory mechanism of pentacyclic triterpenoid acids on pancreatic lipase and cholesterol esterase[J]. Food Bioscience, 2023, 51: 102341. DOI:10.1016/J.FBIO.2022.102341.
- [19] 段思宇, 陈庚, 高青青, 等. 雪胆多酚的稳定性及其对 $\alpha$ -淀粉酶的抑制作用[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(9): 167-171. DOI:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.09.030.
- [20] 蓝小河, 吴雪辉, 陈嘉慧, 等. 金花茶叶皂苷对 $\alpha$ -淀粉酶抑制机制及效果[J]. 食品工业, 2022, 43(8): 188-191.
- [21] SHEN H Y, WANG J, AO J F, et al. Inhibitory kinetics and mechanism of active compounds in green walnut husk against  $\alpha$ -glucosidase: spectroscopy and molecular docking analyses[J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 172: 114179. DOI:10.1016/j.lwt.2022.114179.
- [22] 袁向华, 周艳玲, 勾洵, 等. 阿卡波糖对胰 $\alpha$ -淀粉酶的抑制动力学研究[J]. 世界科技研究与发展, 2016, 38(1): 117-121. DOI:10.16507/j.issn.1006-6055.2016.01.026.
- [23] 任春萍. 抗糖尿病药物的临床应用分析与药学研究[J]. 中国医药指南, 2015, 13(21): 298-299. DOI:10.15912/j.cnki.gocm.2015.21.228.
- [24] LI X, CAI J J, YU J L, et al. Inhibition of *in vitro* enzymatic starch digestion by coffee extract[J]. Food Chemistry, 2021, 358: 129837. DOI:10.1016/j.foodchem.2021.129837.
- [25] AVWIOROKO O J, ANIGBORO A A, ATANU F O, et al. Investigation of the binding interaction of  $\alpha$ -amylase with *Chrysophyllum albidum* seed extract and its silver nanoparticles: a multi-spectroscopic approach[J]. Chemical Data Collections, 2020, 29: 100517. DOI:10.1016/j.cdc.2020.100517.
- [26] HAN L, FANG C, ZHU R X, et al. Inhibitory effect of phloretin on  $\alpha$ -glucosidase: kinetics, interaction mechanism and molecular

- docking[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 95: 520-527. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2016.11.089.
- [27] DAI T T, LI T, HE X H, et al. Analysis of inhibitory interaction between epigallocatechin gallate and alpha-glucosidase: a spectroscopy and molecular simulation study[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2020, 230: 118023. DOI:10.1016/j.saa.2019.118023.
- [28] HAGUET Q, LE JOUBIUX F, CHAVANELLE V, et al. Inhibitory potential of  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase, and pancreatic lipase by a formulation of five plant extracts: TOTUM-63[J]. International Journal of Molecular Science, 2023, 24: 3652. DOI:10.3390/ijms24043652.
- [29] 王静, 刁翠茹, 王华丽, 等. 鼠尾草酸对 $\alpha$ -淀粉酶的抑制作用[J]. 食品科学, 2020, 41(3): 12-17. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181211-137.
- [30] CHEN Y Y, LIU Y, LI X X, et al. Lignin interacting with  $\alpha$ -glucosidase and its inhibitory effect on the enzymatic activity[J]. Food Biophysics, 2015, 10(3): 264-272. DOI:10.1007/s11483-014-9383-y.
- [31] WANG M T, CHEN J C, YE X Q, et al. *In vitro* inhibitory effects of Chinese bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) leaves proanthocyanidins on pancreatic  $\alpha$ -amylase and their interaction[J]. Bioorganic Chemistry, 2020, 101: 104029. DOI:10.1016/j.bioorg.2020.104029.
- [32] YIN L, FU S S, WU R J, et al. A neutral polysaccharide from green tea: structure, effect on  $\alpha$ -amylase activity and hydrolysis property[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2020, 687: 108369. DOI:10.1016/j.abb.2020.108369.
- [33] ZHAO J J, WANG Z T, KARRAR E, et al. Inhibition mechanism of berberine on  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase *in vitro*[J]. Starch-Stärke, 2022, 74(3/4): 2100231. DOI:10.1002/star.202100231.
- [34] 刘华, 李仕祥, 钟业俊, 等. 大黄酸对 $\alpha$ -淀粉酶的抑制机理分析及分子模拟[J]. 现代食品科技, 2015, 31(2): 47-51. DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.2.009.
- [35] MEIDINNA H N, FATCHIYAH F. The potential role of rosmarinic acid and sinensetin as  $\alpha$ -amylase inhibitor: *in silico* study[J]. The Journal of Pure and Applied Chemistry Research, 2019, 8(1): 73-79. DOI:10.21776/ub.jpacr.2019.008.001.460.
- [36] ASKARZADEH M, AZIZIAN H, ADIB M, et al. Design, synthesis, *in vitro*  $\alpha$ -glucosidase inhibition, docking, and molecular dynamics of new phthalimide-benzenesulfonamide hybrids for targeting type 2 diabetes[J]. Scientific Reports, 2022, 12(1): 10569. DOI:10.1038/s41598-022-14896-2.