

银耳多糖对淀粉消化酶的抑制作用及其机理研究

杜沁岭, 杨芳, 徐文, 缪婷, 曹俊杰, 贾冬英

Inhibitory Effect of *Tremella fuciformis* Polysaccharide on Starch Digestive Enzymes and Its Action Mechanism

DU Qinling, YANG Fang, XU Wen, MIAO Ting, CAO Junjie, and JIA Dongying

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021060084>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

糙米多酚对淀粉消化酶的抑制作用及机理

Inhibition and Mechanism of Brown Rice Polyphenols on Starch Digestive Enzymes

食品工业科技. 2019, 40(19): 104-109,116

黑木耳多糖对胰脂肪酶活性的抑制作用

Inhibitory effect of *Auricularia auricula* polysaccharides on pancreatic lipase activity

食品工业科技. 2017(22): 56-60

芫花素对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用

Inhibitory Effect of Genkwanin on α -Glucosidase

食品工业科技. 2021, 42(15): 43-47

地参结合酚提取物对 α -葡萄糖苷酶和胰脂肪酶的抑制作用

Inhibitory Effects of Bound Phenolic Extracts from *Lycopus lucidus* Turcz. on α -glucosidase and Pancreatic Lipase

食品工业科技. 2018, 39(23): 111-116

玉蜀黍不同部位提取物对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶抑制作用

Inhibitory Effects of Extracts from Different Parts of Maize on α -Glucosidase and α -Amylase

食品工业科技. 2021, 42(1): 15-21,27

对羟基肉桂酸乙酯对胰脂肪酶的抑制作用及机理

Inhibitory Effect and Mechanism of Ethyl *p*-hydroxycinnamate on Pancreatic Lipase

食品工业科技. 2021, 42(9): 94-99



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

杜沁岭, 杨芳, 徐文, 等. 银耳多糖对淀粉消化酶的抑制作用及其机理研究 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(2): 120–125. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021060084

DU Qinling, YANG Fang, XU Wen, et al. Inhibitory Effect of *Tremella fuciformis* Polysaccharide on Starch Digestive Enzymes and Its Action Mechanism[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(2): 120–125. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021060084

银耳多糖对淀粉消化酶的抑制作用 及其机理研究

杜沁岭¹, 杨芳^{1,2}, 徐文¹, 缪婷³, 曹俊杰¹, 贾冬英^{1,*}

(1. 四川大学轻工科学与工程学院, 四川成都 610065;

2. 百事食品(中国)有限公司, 上海 200023;

3. 成都巨龙生物科技股份有限公司, 四川成都 611131)

摘要:目的: 研究银耳多糖对胰 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制作用及机制。方法: 以干银耳为原料, 分别采用碱法提取、酶法脱蛋白和柱层析分离, 得到总糖含量为 92.45% 的银耳多糖 (*Tremella fuciformis* polysaccharide, TP), 采用可见分光光度法分析了 TP 对胰 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制作用, 采用荧光光谱法和圆二色谱法表征了 TP 对该两种酶结构的影响。结果: TP 能抑制该两种酶的活性, 其对胰 α -淀粉酶的抑制作用明显高于 α -葡萄糖苷酶, 对该两种酶的半抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 7.6835 和 16.9306 mg/mL。TP 通过与该两种淀粉消化酶发生相互作用抑制其活性。TP 与胰 α -淀粉酶相互作用明显, 可静态猝灭此酶, 改变其二级结构; TP 与 α -葡萄糖苷酶相互作用微弱, 不能改变其二级结构。结论: TP 通过与淀粉消化酶发生相互作用抑制其活性。

关键词: 银耳多糖, 胰 α -淀粉酶, α -葡萄糖苷酶, 抑制作用, 机理

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)02-0120-06

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021060084

本文网刊:



Inhibitory Effect of *Tremella fuciformis* Polysaccharide on Starch Digestive Enzymes and Its Action Mechanism

DU Qinling¹, YANG Fang^{1,2}, XU Wen¹, MIAO Ting³, CAO Junjie¹, JIA Dongying^{1,*}

(1. College of Biomass Science & Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China;

2. PepsiCo Foods (China) Co., Ltd., Shanghai 200023, China;

3. Chengdu Julong Biotechnology Co., Ltd., Chengdu 611131, China)

Abstract: Objective: To investigate the inhibitory effect of *Tremella fuciformis* polysaccharide (TP) on pancreatic α -amylase and α -glucosidase and its action mechanism. Methods: TP with a total sugar content of 92.45% was obtained by alkaline extraction from dried *Tremella fuciformis*, enzymatic deproteinization and column chromatography separation in turn. The inhibitory effect of TP on pancreatic α -amylase and α -glucosidase was measured by visible spectrophotometry, and its action on the structures of these two enzymes was characterized by fluorescence spectrometry and circular dichroism. Results: TP could inhibit the activities of these two enzymes, and its inhibition on pancreatic α -amylase was significantly higher than that on α -glucosidase, and its half inhibitory concentrations (IC_{50}) on these two enzymes were 7.6835 and 16.9306 mg/mL, respectively. TP inhibited the activity of the enzymes by interacting with them. TP interacted strongly with pancreatic α -amylase. It could statically quench pancreatic α -amylase and change its secondary structure. However, TP interacted weakly with α -glucosidase and could not change its secondary structure. Conclusion: TP inhibited the activity of starch-digestive enzymes by interacting with them.

Key words: *Tremella fuciformis* polysaccharide; pancreatic α -amylase; α -glucosidase; inhibition; mechanism

收稿日期: 2021-06-10

基金项目: 四川省科技成果转化示范项目 (2019KJT0097, 2019ZHC0076)。

作者简介: 杜沁岭 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品功能因子研究, E-mail: luckydql@163.com。

* 通信作者: 贾冬英 (1965-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品营养与健康, E-mail: dyjia999@163.com。

多糖是银耳的主要活性成分, 占其干重的 60%~70%, 具有抗衰老^[1]、降血糖^[2]、降血脂^[3]、调节免疫^[4]等作用, 在食品和医药领域显示出良好的应用前景^[5]。小肠内淀粉的消化是在两种淀粉消化酶, 即 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的催化下逐步水解成葡萄糖的过程, 其中前者可催化淀粉水解成麦芽糖、 α -极限糊精和少量葡萄糖, 是淀粉水解的先决条件; 后者可将麦芽糖和 α -极限糊精进一步水解成为葡萄糖, 是控制葡萄糖释放的关键酶^[6]。因此, 抑制淀粉消化酶就能减少食物中淀粉的消化, 延缓餐后血糖的升高。研究表明, 活性多糖可通过抑制 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的活性降低淀粉消化速率^[7-8]。

动物实验研究结果显示, 银耳多糖 (*Tremella fuciformis* polysaccharide, TP) 具有降血糖作用。Cho 等^[9]研究表明银耳胞外多糖可显著降低小鼠的血糖水平, 提高其口服葡萄糖耐量, 激活 PPAR- γ 的表达; 银耳胞外多糖可能通过调节 PPAR- γ -介导的脂质代谢发挥明显的降血糖和增强胰岛素敏感性的作用。田春雨等^[10]研究了银耳多糖对链脲佐菌素诱导的 2 型糖尿病大鼠空腹血糖的影响, 发现该多糖可明显降低糖尿病大鼠的血糖水平, 并能缓解糖尿病所引起的多食、多尿、体重减轻等症状。然而, 目前有关银耳多糖的降血糖作用机制尚不明确, 并且关于其延缓淀粉体外消化的研究也鲜见报道。基于此, 本文中研究了银耳多糖对胰 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的体外抑制作用, 分析了其对该两种酶结构的影响和可能的抑制作用机理。研究结果既可丰富银耳多糖的降血糖作用理论, 还能为其精细化利用提供有价值的参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

干银耳 福建古田袋料栽培银耳, 市售; 葡萄糖系列标准品 (分子量范围 2.5~5348 kDa) 色谱纯, 美国 Sigma 公司; 牛血清蛋白 上海阿拉丁试剂有限公司; 瓜尔胶 山东广浦生物科技有限公司; 猪胰 α -淀粉酶 (>10 U/mg)、 α -葡萄糖苷酶 (50 U/mg) 上海源叶生物科技有限公司; DEAE 纤维素-52、对硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷 (PNPG) 北京索莱宝科技公司; 其它化学试剂 均为国产分析纯。

UV6000PC 型紫外可见分光光度计 上海元析仪器有限公司; ZWY-100H 恒温培养振荡器 上海智城分析仪器制造有限公司; Synergy H1 型全功能微孔板检测仪 美国 Biotek 公司; F-7000 荧光分光光度计 日立高新技术公司; J-1500-150 型圆二色光谱仪 日本 JASCO 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 银耳多糖的制备 参考并适当修改 Lu 等^[11]报道的碱法提取银耳多糖。将 1.0 g 干银耳放入 80 mL 的去离子水中, 于室温下浸泡 20 min 后打浆, 用 0.1 mol/L NaOH 溶液调整其 pH 至 12.0, 50 ℃

下提取 4 h, 过滤后以 8000 r/min 离心 15 min, 收集上清液。在 25 mL 上清液中加入 3% (w/v) 木瓜蛋白酶, 混匀后以 1 mol/L HCl 调节其 pH 至 6.5, 于 55 ℃ 下酶解 2 h, 沸水浴 10 min, 冷却至室温后于 8000 r/min 离心 20 min, 将所得上清液依次进行透析、浓缩、醇沉和真空干燥, 得到脱蛋白银耳多糖。将其配制成浓度为 5 mg/mL 溶液, 取 10 mL 上样, 采用 DEAE-52 柱层析对其进行纯化, 先用去离子水洗脱, 然后依次以 0.1、0.2、0.3、0.4 mol/L 的 NaCl 溶液洗脱, 收集峰面积最大的洗脱液, 将其合并后依次进行透析、真空浓缩、冷冻干燥, 得到白色絮状的纯化银耳多糖 (TP)。经测定, TP 总糖含量为 92.45%, 蛋白质含量为 0.22%。

1.2.2 TP 对胰 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶抑制作用的测定 适当修改 Ademiluyi 等^[12]的方法测定 TP 对 α -淀粉酶活性的抑制作用。移取不同浓度 TP 溶液 (1、2、4、6、8 和 10 mg/mL) 100 μ L, 加入 1% (w/v) 马铃薯淀粉溶液 100 μ L, 于 25 ℃ 孵育 10 min 后加入 0.5 mg/mL 胰 α -淀粉酶溶液 100 μ L, 继续孵育 10 min, 振荡后加入 3,5-二硝基水杨酸试剂 200 μ L, 沸水浴 5 min, 冷却至室温后加入去离子水 2 mL, 混匀后测定反应液在 540 nm 处的吸光度。以阿卡波糖为阳性对照。按照以下公式计算样品对胰 α -淀粉酶的抑制率。

将 Li 等^[13]的方法适当修改后测定 TP 对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制作用。移取不同浓度 TP 溶液 (1、2、4、6、8 和 10 mg/mL) 40 μ L, 加入 0.1 U/L α -葡萄糖苷酶溶液 40 μ L, 混匀后于 37 ℃ 孵育 5 min, 加入 5 mmol/L PNPG 溶液 20 μ L, 混匀后继续孵育 30 min, 加入 0.2 mol/L 碳酸钠溶液 50 μ L, 混匀后室温孵育 5 min, 测定反应液在 405 nm 处的吸光度。以阿卡波糖为阳性对照。按照以下公式计算样品对 α -葡萄糖苷酶的抑制率。

样品对该两种酶的抑制率计算公式如下:

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

式中: A_1 为样品组吸光度; A_2 为样品背景组吸光度 (以等体积 0.1 mol/L、pH6.9 磷酸盐缓冲液 PBS 替代酶液); A_3 为对照组吸光度 (以等体积 PBS 替代样品液); A_4 为对照背景组吸光度 (以等体积 PBS 替代样品和酶液)。

1.2.3 TP 对胰 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的荧光猝灭作用及其结合位点测定 参考并适当修改的 Jin 等^[14]报道的方法测定 TP 对胰 α -淀粉酶荧光猝灭作用。以 20 mmol/L PBS (pH6.9) 配制浓度为 1 mg/mL 的 α -淀粉酶溶液, 使用 0.2 μ m 水系滤膜过滤后取 3 份 2 mL 酶液, 分别将其与 8 mL 不同浓度 TP 溶液 (2、4 和 8 mg/mL) 混匀, 得到混合液 1。

参考并适当修改的 Wang 等^[7]报道的方法测定

TP 对 α -葡萄糖苷酶荧光猝灭作用。以 20 mmol/L PBS(pH6.9)配制浓度为 0.75 U/mL 的 α -葡萄糖苷酶溶液,将 3 份 1.5 mL 酶液分别与 1.5 mL 不同浓度 TP 溶液(2、4 和 8 mg/mL)混匀后于 30 °C 下孵育 10 min,得到混合液 2。

设置激发波长为 280 nm,激发和发射狭缝宽度为 5 nm,分别记录上述 2 种混合液在 300~400 nm 范围的荧光光谱。

TP 与酶之间的猝灭效率符合 Stern-Volmer 方程^[15]:

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

式中: F_0 和 F 分别为酶与 TP 作用前后的荧光强度; $[Q]$ 为 TP 浓度(mol/L); K_{sv} 为动态猝灭常数; K_q 为双分子猝灭过程速率常数; τ_0 为无猝灭剂荧光物质的平均寿命,约为 10^{-8} s。

TP 与酶之间的结合位点数(n)通过以下公式计算:

$$\lg\left[\left(\frac{F_0}{F}\right) - 1\right] = \lg(K_a) + n\lg(C) \quad \text{式(3)}$$

式中: F_0 和 F 分别为酶与 TP 作用前后的荧光强度; K_a 为结合常数; n 为结合位点数; C 为 TP 浓度。

根据方程以 $\lg\left[\left(\frac{F_0}{F}\right) - 1\right]$ 对 $\lg(C)$ 作图,得出的斜率即为结合位点数 n 。

1.2.4 TP 对胰 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶二级结构的影响 参考并适当修改 Wang 等^[7]报道的方法。分别吸取 100 μ L 的 5 mg/mL 胰 α -淀粉酶和 1.4 U/mL α -葡萄糖苷酶溶液,加入 100 μ L 不同浓度 TP 溶液(2、4 和 8 mg/mL),混匀后于 37 °C 孵育 15 min,得到待测样品。采用圆二色光谱仪在 190~250 nm 范围内对待测样品进行扫描,横坐标为波长(nm),纵坐标为圆二色性(mdeg),绘制色谱图谱,并计算两种酶的二级结构含量变化。

1.3 数据处理

实验结果以($\bar{x} \pm s$)表示。采用 SPSS23.0 软件对数据进行显著性分析($P < 0.05$),采用 CDPro 软件处理圆二色谱数据,利用 Origin 2017 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 TP 对胰 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制作用

小肠中淀粉的消化先经由胰 α -淀粉酶将其水解为麦芽糖、 α -极限糊精和少量葡萄糖,然后麦芽糖和 α -极限糊精进一步被小肠细胞分泌的 α -葡萄糖苷酶水解成为葡萄糖。因此,胰 α -淀粉酶是淀粉消化的先行条件,其活性高低可影响淀粉消化反应进程。阿卡波糖等 α -葡萄糖苷酶抑制剂是临床用于辅助治疗糖尿病的一种有效药物,可通过减少小肠对消化产物葡萄糖的释放来降低患者的餐后血糖水平^[16]。

TP 对胰 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制作用

如图 1 所示。可以看出,随着 TP 浓度升高,其对该两种淀粉消化酶的抑制作用逐渐增大,尤其是对胰 α -淀粉酶活性的抑制作用呈现出明显的剂量依赖关系。该结果与麦麸多糖^[17]和番荔枝多糖^[18]对胰 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制作用相似。本实验中提取的银耳多糖主要由甘露糖、岩藻糖、阿拉伯糖、木糖等单糖构成,并且其阿拉伯糖和木糖含量丰富,该两种单糖可较好抑制 α -葡萄糖苷酶活性^[19]。

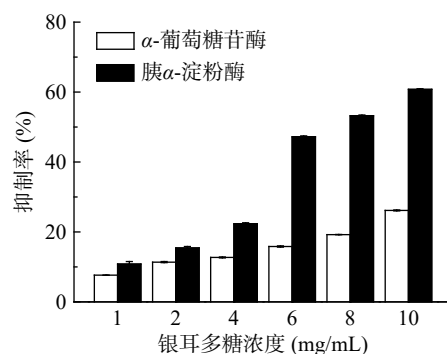


图 1 TP 对胰 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制作用

Fig.1 Inhibitory effect of TP on pancreatic α -amylase and α -glucosidase

将 TP 浓度与其对胰 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶抑制率进行拟合,得到拟合方程,计算其 50% 抑制作用浓度(IC_{50}),结果见表 1。可以看出,TP 对胰 α -淀粉酶的 IC_{50} 为 7.6835 mg/mL,略高于阿卡波糖(5.1870 mg/mL),但明显低于桑葚多糖^[20](>19.31 mg/mL);对 α -葡萄糖苷酶的 IC_{50} 为 16.9306 mg/mL,显著($P < 0.05$)高于阿卡波糖(0.2 μ g/mL)。这说明 TP 是良好的胰 α -淀粉酶抑制剂,其对胰 α -淀粉酶的抑制作用明显强于 α -葡萄糖苷酶。阿卡波糖对 α -葡萄糖苷酶抑制率显著($P < 0.05$)高于 TP,这可能与二者对该酶的结合位点不同有关。 α -葡萄糖苷酶上具有与寡糖及双糖相结合的位点,阿卡波糖结构类似于寡糖,因此可竞争性地与 α -葡萄糖苷酶上的结合位点结合而抑制其活性,是一种特异性葡萄糖苷酶抑制剂^[21]。TP 是一种多糖组分,其对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用位点不同于阿卡波糖。有关 TP 与该酶的具体结合位点还有待于进一步探讨。

表 1 TP 对胰 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶半数抑制作用浓度(IC_{50})

Table 1 Half maximal inhibition concentrations of TP on pancreatic α -amylase and α -glucosidase (IC_{50})

样品	IC_{50} (mg/mL)	
	胰α-淀粉酶	α-葡萄糖苷酶
TP	7.6835	16.9306
阿卡波糖	5.1870	0.0002

综上所述,TP 可抑制胰 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的活性,并且其对前者的抑制作用明显强于后者,这样就能有效抑制淀粉消化的起始速率。

2.2 TP 对胰 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的荧光猝灭作用

色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸的存在赋予淀粉消化酶内源荧光性,其中色氨酸与酪氨酸残基在 280 nm 波长时被激发,并且这两种残基所处的微环境还会影响其产生的荧光强度与位置^[22]。

不同浓度 TP 对胰 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶内源荧光强度的影响如图 2 所示。在发射波长为 300~400 nm 时,胰 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶均具有较强的荧光强度,最大发射峰在 340 nm 附近。随着 TP 浓度增大,该两种酶的荧光强度逐渐降低,其中胰 α -淀粉酶的变化更为显著,且发生红移,这与曾傲琼^[23]关于条斑紫菜多糖的研究结果一致。说明胰 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的荧光主要源于其中的色氨酸和酪氨酸残基,TP 可与胰 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的色氨酸和酪氨酸残基发生静电引力或氢键作用,改变胰 α -淀粉酶的结构,导致其活性降低,但其对 α -葡萄糖苷酶的作用则较微弱^[24]。TP 与胰 α -淀粉酶的相互作用引起酶中色氨酸或酪氨酸残基的极性变化,微环境由亲水性变为疏水性,导致荧光氨基酸残基发生去折叠和荧光猝灭^[25]。此外,随着 TP 浓度增加,胰 α -淀粉酶的荧光曲线发生了红移,说明 TP 对该酶的构象中其它部分也产生了影响。

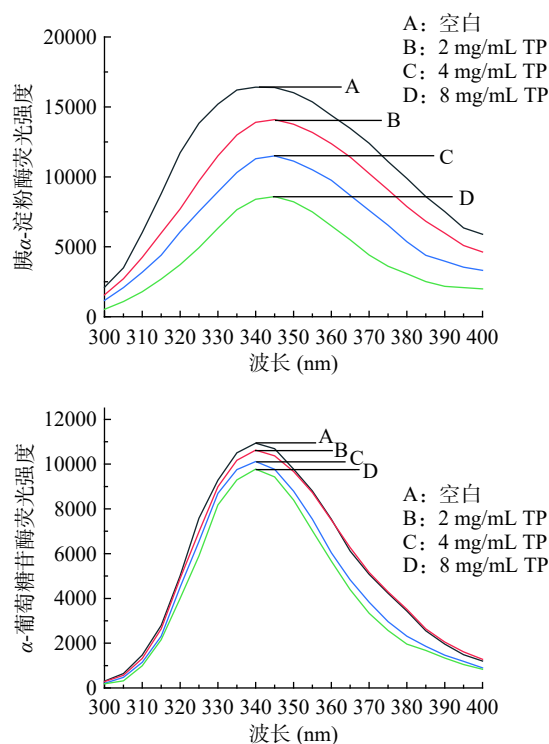


图 2 TP 对胰 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的荧光猝灭作用
Fig.2 Fluorescence quenching effects of TP on pancreatic α -amylase and α -glucosidase

2.3 TP 对胰 α -淀粉酶的荧光猝灭类型

荧光猝灭作用可分为动态猝灭和静态猝灭,其中动态猝灭是由于酶与猝灭剂因热运动相互碰撞而引起。假定 TP 对胰 α -淀粉酶的荧光猝灭作用为动

态猝灭,其猝灭常数 K_{sv} 为 5.3094×10^{10} L/mol,双分子猝灭过程速率常数 K_q 为 5.3094×10^{18} L/mol·s,远大于最大碰撞猝灭常数 2.0×10^{10} L/mol·s。因此,TP 对胰 α -淀粉酶的荧光猝灭为静态猝灭,由此可推断 TP 与胰 α -淀粉酶可能通过静电引力或氢键等非共价键产生相互作用并形成复合物,这可能与 TP 提高粘度、延缓或减少胰 α -淀粉酶与底物淀粉的接触有关。

2.4 TP 与胰 α -淀粉酶结合位点数

静态猝灭是猝灭剂与荧光物质发生相互作用、形成基态的猝灭剂-荧光物质复合物的过程。通过公式计算出 TP 与胰 α -淀粉酶结合位点数 $n=1.2334$,接近 1,表明 TP 与胰 α -淀粉酶存在 1 个结合位点。由于胰 α -淀粉酶分子中具有 ASP197、GLU233 和 ASP300 多个重要活性位点^[26],因此关于二者具体结合位点尚待进一步研究。

2.5 TP 对胰 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶二级结构的影响

圆二色光谱是一种可定量的光谱技术,能灵敏反映蛋白质二级结构的变化,已被广泛用于蛋白质的构象研究^[27]。不同浓度 TP 对胰 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶二级结构的影响如图 3 所示。可以看出,TP 可导致两种消化酶的圆二色谱峰高和峰形发生变化。其中,胰 α -淀粉酶组在 200 nm 处峰形明显高于空白组,在 215 nm 处峰形则明显低于空白组,而 α -葡萄糖苷酶组峰形与空白组相比变化则不明显。随着 TP 浓度的增加,该两种酶在 215 nm 处的圆二信

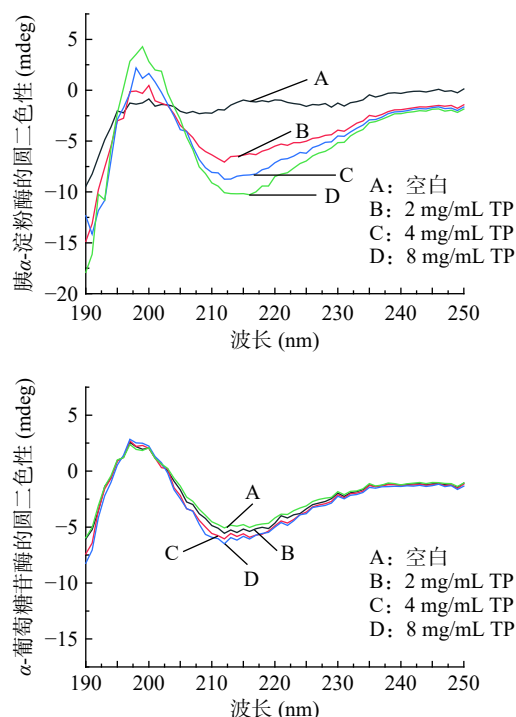


图 3 TP 与胰 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶相互作用的圆二色谱图

Fig.3 Circular dichroism spectra of interactions between TP and pancreatic α -amylase and α -glucosidase

号强度增大,胰 α -淀粉酶组变化明显,说明TP的添加对胰 α -淀粉酶的二级结构产生了影响,而对 α -葡萄糖苷酶二级结构影响不明显。

胰 α -淀粉酶由496个氨基酸残基、1个钙离子、1个氯离子和3个水分子组成^[28],其中100~168号氨基酸组成了8个 α -螺旋和8个 β -折叠交替出现的 $(\beta/\alpha)_8$ 的结构模体,且该酶的活性中心位于 α -螺旋结构中^[29]。采用CDPro软件处理数据,通过SELCON3算法得到该酶的 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规则卷曲结构的相对含量,结果见表2。可以看出,随TP浓度升高,胰 α -淀粉酶中的 α -螺旋和 β -折叠比例增加, β -转角和无规则卷曲比例减少。 α -螺旋比例逐渐增大,不利于酶活性中心形成,从而限制酶与底物的结合,使其进一步失去活性。这与条斑紫菜多糖^[23]对胰 α -淀粉酶二级结构影响的研究结果一致。 α -螺旋和 β -折叠中含有大量氢键,二者共同维持蛋白质二级结构的刚性。TP导致胰 α -淀粉酶中的 β -折叠增多,从而增强酶的刚性^[30]。此外, β -转角和无规则卷曲比例减少则表明酶的柔性减弱。

表2 TP对胰 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶二级结构的影响
Table 2 Effects of TP on the secondary structures of pancreatic α -amylase and α -glucosidase

淀粉消化酶	TP浓度 (mg/mL)	α -螺旋 (%)	β -折叠 (%)	β -转角 (%)	无规则卷曲 (%)
胰 α -淀粉酶	0	18.3	11.5	25.4	42.7
	2	26.1	10.3	24.1	40.0
	4	27.7	19.5	22.9	33.3
	8	33.8	19.5	20.4	27.1
α -葡萄糖苷酶	0	25.7	26.4	21.6	28.5
	2	25.8	25.9	21.3	28.0
	4	26.1	25.4	20.6	28.1
	8	26.0	25.4	20.2	28.4

由表2可知,加入TP后 α -葡萄糖苷酶的各构象比例变化很小,说明TP对该酶构象影响不大。由此推测,TP与 α -葡萄糖苷酶的相互作用微弱,对其二级结构影响极小。

3 结论

TP能够抑制胰 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的活性,且其对前者的抑制作用显著强于后者。TP与胰 α -淀粉酶的结合位点数为1,二者之间发生了静态猝灭作用,这种猝灭作用改变了胰 α -淀粉酶的二级结构,使其刚性增强、柔性减弱,结构变得更为紧密,影响了酶活性中心的形成,从而抑制了该酶的活性。TP与 α -葡萄糖苷酶之间发生了微弱的相互作用,这种作用对该酶的二级结构影响甚微。TP可通过抑制淀粉消化酶的活性影响淀粉的消化,延缓葡萄糖的释放。本研究结果可为银耳多糖在降血糖保健食品和药品中的应用提供理论依据。

参考文献

[1] WEN L R, GAO Q, MA C W, et al. Effect of polysaccharides from *Tremella fuciformis* on UV-induced photoaging[J]. *Journal of*

Function Foods, 2016, 20: 400–410.

[2] KIHOTO T, TSUJIMURA Y, SAKUSHIMA M, et al. Polysaccharides in fungi. XXXIII. Hypoglycemic activity of an acidic polysaccharide (AC) from *Tremella fuciformis*[J]. *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 1994, 114(5): 308–315.

[3] CHEUNG P C K. The hypocholesterolemic effect of two edible mushrooms: *Auricularia auricula* (tree-ear) and *Tremella fuciformis*(white jelly-leaf) in hypercholesterolemic rats[J]. *Nutrition Research*, 1996, 16(10): 1721–1725.

[4] ZHOU Y, CHEN X, YI R, et al. Immunomodulatory effect of *Tremella* polysaccharides against cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice[J]. *Molecules*, 2018, 23(2): 239.

[5] ZHANG Y K, ZHANG Q, LU J, et al. Physicochemical properties of *Tremella fuciformis* polysaccharide and its interactions with myofibrillar protein[J]. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 2017(11): 18–25.

[6] QUEZADA C R, ROBAYO T C C, AO Z H, et al. Lumianl substrate “brake” on mucosal maltase-glycoamylase activity regulates total rate of starch digestion to glucose[J]. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 2007, 45(1): 32–43.

[7] WANG L, CHEN C, ZHANG B, et al. Structural characterization of a novel acidic polysaccharide from *Rosa roxburghii* Tratt fruit and its α -glucosidase inhibitory activity[J]. *Food & Function*, 2018, 9: 3974–3985.

[8] ZHANG C, LI J, HU C, et al. Antihyperglycaemic and organic protective effects on pancreas, liver and kidney by polysaccharides from *Hericium erinaceus* SG-02 in streptozotocin-induced diabetic mice[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 10847.

[9] CHO E J, HWANG H J, KIM S W, et al. Hypoglycemic effects of exopolysaccharides produced by mycelial cultures of two different mushrooms *Tremella fuciformis* and *Phellinus baumii* in ob/ob mice[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 75(6): 1257–1265.

[10] 田春雨, 薄海美, 李继安. 银耳多糖对实验性2型糖尿病大鼠血糖及血脂的影响[J]. *辽宁中医杂志*, 2011, 38(5): 986–987.

[11] TIAN C Y, BO H M, LI J A. The influence of *Tremella* polysaccharide on blood glucose and serum lipoprotein in experimental type 2 diabetic rats[J]. *Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2011, 38(5): 986–987.

[12] LU A X, YU M E, SHEN M, et al. Preparation of the *Auricularia auricular* polysaccharides simulated hydrolysates and their hypoglycaemic effect[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 106: 1139–1145.

[13] ADEMILUYIA O, OBOH G. Soybean phenolic-rich extracts inhibit key enzymes linked to type 2 diabetes (α -amylase and α -glucosidase) and hypertension (angiotensin I converting enzyme) *in vitro*[J]. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 2013, 65(3): 305–309.

[14] LI D Q, ZHAO J, XIE J, et al. A novel sample preparation and on-line HPLC-DAD-MS/MS-BCD analysis for rapid screening and characterization of specific enzyme inhibitors in herbal extracts: Case study of α -glucosidase[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2014, 88: 130–135.

- [14] JIN W P, WANG Z F, PENG D F, et al. Effect of pulsed electric field on assembly structure of α -amylase and pectin electrostatic complexes[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 101: 105547.
- [15] KANDAGAL P B, ASHOKA S, SEETHARAMAPPA J, et al. Study of the interaction of an anticancer drug with human and bovine serum albumin: Spectroscopic approach[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006, 41: 393–399.
- [16] CHIASSEON J L, JOSSE R G, GOMIS R, et al. Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: The STOP-NIDDM randomized trial[J]. *The Lancet*, 2002, 359(9323): 2072–2077.
- [17] LV Q Q, CAO J J, LIU R, et al. Structural characterization, α -amylase and α -glucosidase inhibitory activities of polysaccharides from wheat bran[J]. *Food Chemistry*, 2020, 341: 128218.
- [18] GU S S, SUN H Q, ZHANG X L, et al. Structural characterization and inhibitions on α -glucosidase and α -amylase of alkali-extracted water-soluble polysaccharide from *Annona squamosa* residue[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 166: 730–740.
- [19] WANG P, HOU C, ZHAO X, et al. Molecular characterization of water-extractable arabinoxylan from wheat bran and its effect on the heat-induced polymerization of gluten and steamed bread quality[J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 87: 570–581.
- [20] ZHANG J Q, CHAO L, QIANG H, et al. Comparative study on the physicochemical properties and bioactivities of polysaccharide fractions extracted from Fructus Mori at different temperatures[J]. *Food & Function*, 2019, 10: 584–588.
- [21] 李雅珊. 靛玉红类 α -葡萄糖苷酶抑制剂的活性与机理研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2016. [LI Y S. Study on α -glucosidase inhibitory activity and mechanism of indirubin derivatives[D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2016.]
- [22] MARK J W, JAMES M H, ANTHONY T M, et al. Streptavidin cooperative allostereism upon binding biotin observed by differential changes in intrinsic fluorescence[J]. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 2019, 17: 127–131.
- [23] 曾傲琼. 条斑紫菜多糖抑制 α -淀粉酶特性与降血糖作用[D]. 无锡: 江南大学, 2018. [ZENG A Q. Study on the inhibiting characteristics and hypoglycemic effect of *Porphyra yezoensis* polysaccharide on α -amylase[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2018.]
- [24] HUANG Y M, WU P, YING J, et al. Mechanistic study on inhibition of porcine pancreatic α -amylase using the flavonoids from dandelion[J]. *Food Chemistry*, 2021, 344: 128610.
- [25] XU D, WANG Q, ZHANG W, et al. Inhibitory activities of caffeoylquinic acid derivatives from *Ilex kudingcha* C. J. Tseng on α -glucosidase from *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(14): 3694–3704.
- [26] BRAYER G D, SIDHU G, MAURUS R, et al. Subsite mapping of the human pancreatic α -amylase active site through structural, kinetic, and mutagenesis techniques[J]. *Biochemistry*, 2000, 39(16): 4778–4791.
- [27] KEIDERLING T A. Protein and peptide secondary structure and conformational determination with vibrational circular dichroism[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2002, 6(5): 682–688.
- [28] LARSON S B, GREENWOOD A, CASCIO D, et al. Refined molecular structure of pig pancreatic α -amylase at 2.1 Å resolution[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1994, 235(5): 1560–1584.
- [29] QIAN M, HASER R, PAYAN F. Structure and molecular model refinement of pig pancreatic α -amylase at 2.1 Å resolution[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1993, 231(3): 785–799.
- [30] FAN M C, LIAN W J, LI T T, et al. Characterization of promising natural blue pigment from *Vaccinium bracteatum* Thunb. leaves: Insights of the stability and the inhibition of α -amylase[J]. *Food Chemistry*, 2020, 326: 126962.