

荞麦蜂花粉多酚对 α -淀粉酶的抑制作用

胡童霞,张楠,朱鑫丽,曾彬,吴帆,李红亮*

中国计量大学生命科学学院,杭州 310018

摘要:蜂花粉多酚是一类能够有效降低血糖的天然物质。 α -淀粉酶是高等生物体内血糖控制的关键酶,抑制其活性有助于控制餐后血糖。为探究蜂花粉多酚抑制 α -淀粉酶发挥降糖活性的机制,本文以荞麦蜂花粉多酚(buckwheat bee pollen polyphenol, BBPP)为对象,采用比色法、荧光分光光度法研究 BBPP 对 α -淀粉酶活性影响及其抑制机理。结果表明, BBPP 能对 α -淀粉酶产生较强的抑制作用,半抑制浓度(IC_{50})为 2.00 ± 0.06 mg/mL,抑制类型为可逆性混合型抑制。高温、强碱、光照以及高浓度氧化剂与还原剂等处理,均能降低 BBPP 对 α -淀粉酶的抑制作用。在 273~298 K 和 298~310 K 时其结合过程分别为动态猝灭和静态猝灭。随着 BBPP 浓度增加, α -淀粉酶荧光最大发射波长产生蓝移,表明 α -淀粉酶构象改变,疏水性增加。本研究发现荞麦蜂花粉多酚对 α -淀粉酶具有较强抑制作用,对荞麦蜂花粉多酚的临床开发利用具有重要的理论参考价值。

关键词:荞麦蜂花粉多酚; α -淀粉酶;光谱分析;抑制作用

中图分类号:TS201.2

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2024)6-0930-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2024.6.002

Inhibition effect of buckwheat bee pollen polyphenols on α -amylase

HU Tong-xia, ZHANG Nan, ZHU Xin-li, ZENG Bin, WU Fan, LI Hong-liang*

College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China

Abstract: Bee pollen polyphenols are a class of natural substances that can effectively lower blood sugar. α -Amylase is a key enzyme for blood glucose control in higher organisms, and inhibiting its activity can help control postprandial blood glucose. In this study, buckwheat bee pollen polyphenol (BBPP) was used as the sample to investigate the inhibition effect of BBPP on the activity of α -amylase by UV-vis and fluorescence spectrometry. The results showed that BBPP had a strong inhibitory effect on α -amylase, with a half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of 2.00 ± 0.06 mg/mL, and a reversible mixed inhibition type. Moreover, all the treatments including high temperature, strong alkali, light and high concentration of oxidants and reducing agents could decrease the inhibition effect of BBPP on α -amylase. At the temperature of 273-298 K and 298-310 K, the binding process was dynamic quenching and static quenching, respectively. As the concentration of BBPP increased, the maximum emission wavelength of α -amylase fluorescence had a blue shift, indicating that the conformation of α -amylase altered and the hydrophobicity increased. In conclusion, BBPP has a strong inhibitory effect on α -amylase, which has important theoretical reference value for clinical development and utilization of buckwheat bee pollen polyphenol.

Key words: buckwheat bee pollen polyphenol; α -amylase; spectroscopic analysis; inhibition effect

蜂花粉(bee pollen)是蜜蜂工蜂采集植物花粉后用唾液和花蜜混合形成的颗粒状物质^[1]。蜂花粉营养丰富,具有“全能营养库”之称,是一种优质的天然营养保健品。研究表明,蜂花粉在降糖减脂、增强免疫力、抑制前列腺疾病、防癌抗癌等方面都发挥着重要作用^[2],如油菜蜂花粉^[3]具有体外降血糖

的作用,山茶蜂花粉^[4]对糖尿病模型的小鼠具有降血糖作用;蜂花粉提取物还可抑制良性前列腺增生小鼠的前列腺增生^[5]。蜂花粉多肽可提高免疫低下小鼠体液免疫作用和细胞免疫功能^[6]。蜂花粉的功能与其含有的多种生物活性成分有关,如多酚、黄酮、多糖、多肽等,其中多酚类化合物是蜂花粉最重要的活性成分之一。

多酚类化合物主要包括花色苷、黄酮、黄酮醇、酚酸、单宁等物质,具有临床应用前景,其中最重要

收稿日期:2023-11-10

接受日期:2024-04-12

基金项目:浙江省“三农九方”科技协作计划“揭榜挂帅”项目(2023SNJF053);国家自然科学基金(32170531)

*通信作者 E-mail: hlli@cjlu.edu.cn

的应用之一就是开发辅助降血糖的功能食品。有许多报道发现植物多酚可以降低糖尿病小鼠的血糖,如槐花多酚^[7]、野生蓝果忍冬多酚^[8]、蓝莓叶多酚^[9]等,它们通过抑制血糖代谢中的关键酶来达到降低血糖的作用。多酚作为蜂花粉中的重要活性成分同样具有降血糖活性,其中的黄酮类物质可通过抑制血糖控制的各种关键酶类,如 α -淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶等酶的催化活性来产生降糖效果。

α -淀粉酶(α -amylase)是控制血糖的一个关键酶,通过作用于淀粉内部的 α -1,4-糖苷键将淀粉转化为麦芽糖和葡萄糖^[10],使餐后血糖水平迅速升高。通过抑制 α -淀粉酶活性降低淀粉消化率,能够延迟淀粉消化,抑制肠道对葡萄糖的吸收,有效调节体内血糖水平,从而缓解糖尿病症状^[11]。因此,以 α -淀粉酶作为2型糖尿病的治疗靶点已产生了多种应用于临床的降糖药物,如阿卡波糖、伏格列糖、米格列醇等。然而,这些药物均存在一定的副作用,所以亟需从天然产物中开发天然降糖药物。为了更加明确天然产物如蜂花粉总多酚在天然降糖药开发的可行性,需要深入研究蜂花粉多酚对糖代谢酶类的抑制作用和分子机制。

作为重要的粮食作物,荞麦被报道具有降血糖的作用^[12],而荞麦花粉多糖也被证实具有降血糖活性^[13],但多酚作为荞麦花粉的主要活性物质,其降糖作用尚未被研究。鉴于此,本研究以荞麦花粉多酚(buckwheat bee pollen polyphenols, BBPP)为研究对象,从酶动力学、荧光光谱和紫外光谱三方面研究其对 α -淀粉酶抑制作用及机制,并探讨了高温、强碱、光照以及高浓度氧化剂与还原剂处理对BBPP抑制 α -淀粉酶活性作用的影响。本实验可对荞麦花粉综合利用和 α -淀粉酶抑制剂的天然降糖药物及复方开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

荞麦花粉,杭州天厨蜜源保健品有限公司提供; α -淀粉酶(批号:C13328293,上海麦克林生化科技有限公司生物);福林酚试剂(批号:J904BA0056)、氢氧化钠(98%,批号:2900B541)、磷酸缓冲液(PBS)(批号:JC23FC0551)均购自生工生物公司(上海)股份有限公司;浓盐酸(AR,国药集团试剂有限公司);30%过氧化氢(AR,批号:No. 20210701,上海凌峰化学试剂有限公司);DNS试剂(批号:RH457063)、可溶性淀粉(AR,批号:

RH307531)、石油醚(AR,批号:RH276192)、正丁醇(AR,批号:RH276211)均购自上海易恩化学技术有限公司;亚硫酸钠(AR,批号:H2124456,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);无水碳酸钠(AR,批号:20220722)、无水乙醇(AR,批号:20230910)、二氯甲烷(AR,批号2011年5月29日)(杭州高品精细化工有限公司);实验用水为超纯水。

1.2 仪器与设备

RF-5301PC 荧光分光光度计、UV-1800 紫外可见分光光度计(日本岛津公司);FlexA-200 酶标仪和 MK-20 干式恒温器(杭州奥盛仪器有限公司);Rotavapor R-210 旋转蒸发仪(瑞士布奇公司);KQ-250DB 数控超声提取仪(昆山市超声仪器有限公司);Freezone -80 °C 冷冻干燥机(美国 LABCONCO 冷冻干燥机公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 荞麦花粉多酚的提取、测定及分析

BBPP 提取参照 Xu 等^[14]的方法并稍作改变,具体方法为:称取 100 g 粉碎荞麦花粉样品,按料液比 1:10 (g/mL)加入 75% 乙醇水溶液于 50 °C 超声提取 1 h,重复三次,将合并的提取液用 10 kDa 的 PES 超滤膜减压过滤,最后将其浓缩成糊状并冻干获得荞麦花粉多酚提取物(BBPP)备用。

BBPP 含量按福林酚比色法测定,以没食子酸为标准品测定吸光度绘制标准曲线,得到拟合方程为 $y = 0.1145x + 0.0325$, $R^2 = 0.999$,测得以没食子酸计的 BBPP 含量为 88.52 mg/g。

1.3.2 荞麦花粉多酚对 α -淀粉酶活性抑制

α -淀粉酶活性测定方法及计算方法参考 Pan 等^[9]的方法并稍作修改。将 BBPP 和阿卡波糖分别用 PBS 配置成梯度质量浓度为 0.4、0.8、1.2、1.6、2.0、2.4、2.8、3.2、3.6、4.0 mg/mL 的标准溶液,再配置浓度为 5 U/mL 的 α -淀粉酶溶液和 1% 的淀粉液。实验组中分别加入 50 μ L 的 α -淀粉酶溶液和 BBPP 溶液;样品对照组中以 PBS 缓冲液代替 BBPP 溶液;空白对照组以 PBS 缓冲液代替 α -淀粉酶溶液;溶剂对照组则加入 100 μ L 的 PBS 缓冲液。将以上四组溶液均置于 37 °C 水浴中保温 10 min,之后再各自加入 100 μ L 的 1% 淀粉液,再次 37 °C 保温 10 min,最后加入 400 μ L 的 DNS 溶液,100 °C 水浴 10 min,冷却后加入 1 mL 的超纯水于 540 nm 下测定吸光度。以阿卡波糖代替样品作为阳性对照组进行测定,通过公式(1)计算抑制率(R),根据抑制率

与多酚浓度和阿卡波糖浓度关系拟合曲线并计算半抑制浓度 IC_{50} 值。

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

式中, A_1 为实验组吸光度; A_2 为样品对照组吸光度; A_3 为空白对照组吸光度; A_4 为溶剂对照组吸光度。

1.3.3 荞麦蜂花粉多酚对 α -淀粉酶抑制类型判断

固定淀粉液质量浓度为 1%, 分别测定不同质量浓度 BBPP 溶液(1、2、3 mg/mL)在加入不同质量浓度(0、1、2、3、4、5 U/mL) α -淀粉酶溶液后的反应速率, 以实验组体系进行反应测定吸光度。以反应速率(V)为纵坐标, 以酶浓度为横坐标绘制曲线, 从而分析 BBPP 对 α -淀粉酶的抑制作用是否可逆。固定 α -淀粉酶质量浓度为 5 U/mL, 分别测定不同质量浓度 BBPP(1、2、3、4 mg/mL)在加入不同浓度底物后的反应速率, 按实验组体系进行反应。以底物浓度的倒数($1/S$)为横坐标, 以反应速率的倒数($1/V$)为纵坐标, 绘制 Lineweaver-Burk 双倒数曲线, 以此判断 BBPP 对 α -淀粉酶的抑制类型。

1.3.4 荞麦蜂花粉多酚稳定性研究

1.3.4.1 pH 对 BBPP 抑制 α -淀粉酶活性的影响

配置不同 pH(1、3、5、7、9、11、13)的 PBS 缓冲液, 将 BBPP 溶解于其中保持 48 h。48 h 后将不同 pH 溶解的样品溶液 pH 值调回 6.9~7.1, 浓度为 1 mg/mL, 按照“1.3.2”测定抑制率。

1.3.4.2 温度对 BBPP 抑制 α -淀粉酶的影响

将 1 mg/mL 和 2 mg/mL 的 BBPP 溶液分别置于不同温度(30、40、50、60、70、80、90、100 $^{\circ}C$)下处理 1 h, 待其冷却至室温后按“1.3.2”测定抑制率。

1.3.4.3 氧化剂和还原剂对 BBPP 抑制 α -淀粉酶的影响

分别在质量浓度为 2 mg/mL BBPP 溶液中加入体积浓度为 0、0.5、1、1.5、2% 的氧化剂 H_2O_2 溶液和还原剂 Na_2SO_3 溶液, 得到终浓度为 1 mg/mL 的处理样品液, 放置 48 h 后按“1.3.2”测定抑制率。

1.3.4.4 储存环境对 BBPP 抑制 α -淀粉酶的影响

将梯度质量浓度 BBPP 溶液(1、2、3、4、5 mg/mL)分别置于室外光照、室内避光、低温避光、紫外光照环境下处理 5 d 后与现测现配组按“1.3.2”测定抑制率。

1.3.5 荞麦蜂花粉多酚与 α -淀粉酶相互作用的荧光光谱与同步荧光光谱分析

参考 Zhang 等^[15]的方法并加以改进。将质量

浓度为 1 $\mu g/mL$ 的 BBPP 溶液分次加入至 α -淀粉酶工作液中, 以 PBS 溶液补充体积。分别在不同温度下(273、298、310 K)下混匀反应 3 min, 设置仪器的激发波长为 280 nm, 发射波长扫描范围 300~500 nm, 狭缝宽度为 10 nm 进行荧光发射光谱扫描。

改变荧光光谱仪的激发波长与发射波长之间的波长差($\Delta\lambda$)分别为 15 nm 和 60 nm, 进行同步荧光光谱, 其余测定条件同荧光发射光谱条件一致。

一些分子间的作用可以导致荧光猝灭, 降低荧光强度, 可以采用 Stern-Volmer 方程研究荧光猝灭机制。曲线斜率即为猝灭常数(K_{sv}), 根据式(2)计算双分子碰撞猝灭常数(K_q), 其中 τ_0 为生物分子的荧光寿命(1×10^{-8})。

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

式中 F_0 为不加多酚时 α -淀粉酶溶液的荧光强度; F 为加入多酚后 α -淀粉酶溶液的荧光强度; τ_0 为生物分子的荧光寿命(1×10^{-8}); Q 为蜂花粉多酚提取物的浓度。

1.3.6 数据处理

实验设置三个平行, 采用 GraphPad 8 进行绘图, 结果以平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 单因素方差分析采用 LSD(最小显著性差异)检验, $P < 0.05$ 时被认为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 荞麦蜂花粉多酚对 α -淀粉酶活性抑制

BBPP 与阿卡波糖对 α -淀粉酶的抑制作用随着浓度增大而增大(见图 1), 最大可达 85%, 表明其抑制作用与活性成分含量有关。经 LC-MS 验证, 其主要组成成分为槲皮素、山柰酚、木犀草素等黄酮类物质。BBPP 和阿卡波糖对 α -淀粉酶的半数抑制率

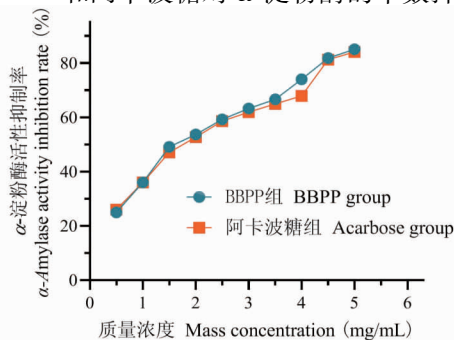


图 1 BBPP 和阿卡波糖对 α -淀粉酶活性的抑制作用

Fig. 1 Inhibition effect of BBPP and acarbose on the α -amylase activity

(IC_{50}) 分别为 2.00 ± 0.06 mg/mL 和 2.04 ± 0.04 mg/mL, 两 IC_{50} 值接近。Liang 等^[16] 发现小米多酚对 α -淀粉酶的抑制率随着浓度增加而增加, 经纯化后的小米多酚对 α -淀粉酶的半数抑制率为 2.49 ± 0.98 mg/mL, 与本实验结果类似。

2.2 荞麦花粉多酚对 α -淀粉酶抑制作用机理

为了分析 BBPP 对 α -淀粉酶抑制作用的可逆性, 分别构建了不同浓度 BBPP 的反应速率 (V) 与 α -淀粉酶浓度的曲线图。四条拟合曲线均交于原点 (见图 2A), 随着 BBPP 浓度逐渐增加, 直线斜率逐渐下降, 说明 BBPP 能够有效降低 α -淀粉酶催化底物淀粉生成还原糖的速率, 但不能使 α -淀粉酶完全失活, 因此推测 BBPP 对 α -淀粉酶是可逆性抑制。这与

茶花粉提取物对淀粉酶抑制作用研究^[17] 结果一致。

根据 Lineweaver-Burk 曲线方程作图, 得到了一组交于第二象限的直线 (见图 2B), 随着 BBPP 的增加, 直线斜率逐渐增加, 随着样品浓度增大, K_m 不断增大, V_{max} 不断减小, 所以推测 BBPP 对 α -淀粉酶的抑制类型属于混合型抑制。根据表 1 可知, K_I 和 K_{IS} 的值分别为 9.618 和 103.329, 结合常数 $K_I < K_{IS}$, 说明 BBPP 与 α -淀粉酶的结合比与酶-底物复合物结合更紧密, 同时也说明 BBPP 对 α -淀粉酶的抑制类型是以竞争型为主导的竞争型-非竞争型混合型抑制。Ma 等^[7] 研究槐花醇提取物对 α -淀粉酶的抑制类型发现, 加入高浓度槐花醇提取物抑制后的抑制类型也为竞争型与非竞争型混合抑制。

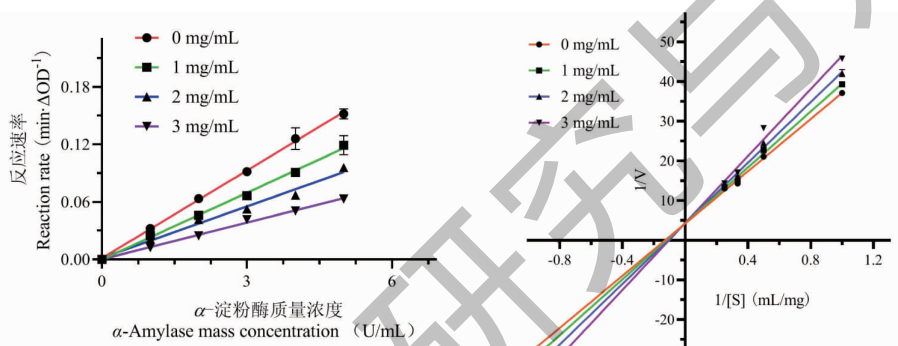


图 2 BBPP 对 α -淀粉酶的抑制动力学

Fig. 2 Inhibition kinetics of α -amylase by BBPP

注: (A) BBPP 对 α -淀粉酶的抑制类型; (B) 可逆抑制 Lineweaver-Burk 曲线。Note: (A) The inhibition type of α -amylase by BBPP; (B) Lineweaver-Burk curve with reversible suppression.

表 1 BBPP 对 α -淀粉酶活性抑制的动力学参数

Table 1 Inhibition kinetics parameters of BBPP on activity of α -amylase.

BBPP (mg/mL)	动力学参数 Kinetic parameter				IC_{50} (mg/mL)	抑制机制 Inhibition mechanism	抑制类型 Inhibition type
	K_m	V_{max}	K_I	K_{IS}			
0	7.795	0.237					
1	8.285	0.235	9.618	103.329	2.00 ± 0.06	可逆	混合型
2	8.941	0.234					
3	9.685	0.23					

2.3 不同条件处理对荞麦花粉抑制 α -淀粉酶的影响

pH 对 BBPP 抑制 α -淀粉酶的抑制活性影响较大 (见图 3A)。当 BBPP 处于酸性环境下抑制率高, 在 pH 为 1~7 时抑制率上升, pH = 7 时抑制率最高为 37.768%, 随后呈现下降的趋势, 在 pH 为 13 时平均抑制率为 1.999%。这说明经碱性条件处理后 BBPP 结构可能发生改变, 影响其对 α -淀粉酶的抑

制作用。pH 对多酚结构和功能影响的研究已有报道, Yuan^[18] 用水浸提取得到苹果渣多酚, 发现 pH 对苹果多酚的总酚含量和抗氧化能力的影响显著, 中性和偏酸性的环境下苹果多酚更稳定。人体胃环境的 pH 值低于 2, 肠道环境的 pH 在 7.5 左右, 因此 BBPP 在此环境下可以保持较好的活性。

温度对 BBPP 抑制 α -淀粉酶活性影响显著 (见图 3B)。在测试的温度范围内, 40 °C 时抑制率最

高,当温度逐渐上升后 BBPP 对 α -淀粉酶抑制率逐渐下降,在 80 $^{\circ}\text{C}$ 时 1 mg/mL 和 2 mg/mL 的 BBPP 溶液抑制活性相较于 40 $^{\circ}\text{C}$ 分别下降了 11.051% 和 10.244%,这说明 BBPP 中的活性成分会受到高温影响,从而导致抑制率大大降低。Gao 等^[19] 在研究温度对黑果腺肋花楸多酚功能影响时,发现当温度低于 50 $^{\circ}\text{C}$ 时多酚颜色变化小,保留率高,当温度高于 50 $^{\circ}\text{C}$ 时多酚颜色明显变浅,多酚类物质降解、化学结构遭到破坏,保留率显著降低。所以,推测可能由于高温会破坏多酚结构,从而导致在高温环境下 BBPP 对 α -淀粉酶抑制率显著降低。

BBPP 对 α -淀粉酶的抑制率随着 H_2O_2 或 Na_2SO_3 的浓度增加而逐渐降低(见图 3C),但 H_2O_2 对 BBPP 抑制 α -淀粉酶的影响明显大于 Na_2SO_3 ,在 0.5% 的 H_2O_2 处理后 BBPP 对 α -淀粉酶抑制率相较于 0.5% 的 Na_2SO_3 处理后 BBPP 对 α -淀粉酶低约 23.8%。关于氧化剂对多酚功能影响的研究较多,Fan 等^[20] 研究赤霞珠葡萄籽多酚的稳定性时发现低浓度的 H_2O_2 对多酚的影响不大, Na_2SO_3 对其的影响更为明显;Zhou^[21] 在研究不同处理对乙醇萃取荞麦多酚稳定性时发现 Na_2SO_3 对 BBPP 的影响较小。这就说明不同植物源的多酚成分存在差异,氧

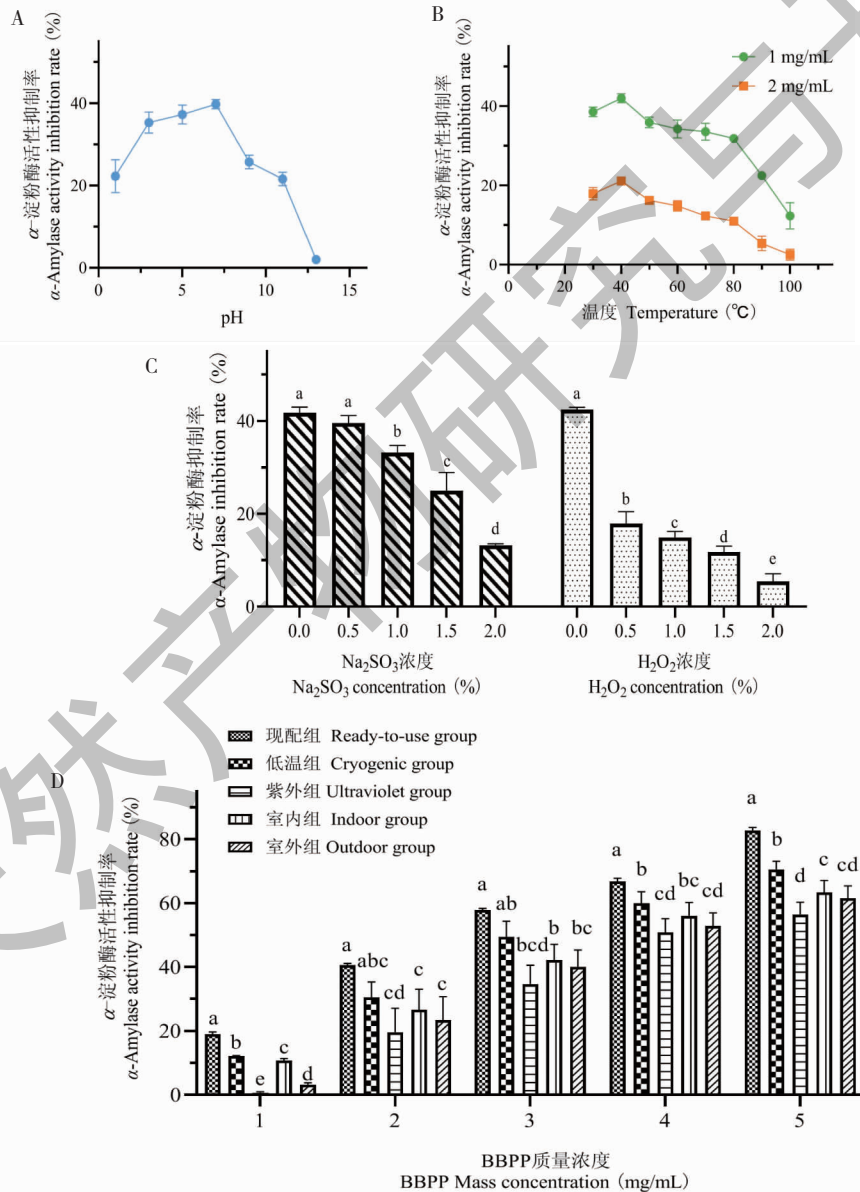


图 3 不同处理对 BBPP 抑制 α -淀粉活性的影响

Fig. 3 Effect of different treatments on the inhibition effect of BBPP on the activity of α -amylase

注:不同小写字母代表显著性差异($P < 0.05$)。Note: Different lowercase letters represent significant differences ($P < 0.05$).

化剂和还原剂对它们的影响不同。

现配现测组的 BBPP 对 α -淀粉酶抑制率最高 (见图 3D)。对比室外光照组和室内避光组相同浓度下对酶的抑制率可知, BBPP 在光照和温度较高时不稳定;对比室内避光组与低温避光组抑制率可知 BBPP 在低温环境下更加稳定,这是因为光照可能使多酚中不饱和键发生反应而降解,导致其对 α -淀粉酶抑制率降低^[22]。通过 SPSS 分析可知,在 BBPP 质量浓度为 1 mg/mL 时,五组处理后的 BBPP 对 α -淀粉酶的抑制均具有显著性差异。综上荞麦蜂花粉的储存应在低温避光环境下,此时荞麦蜂花粉中的活性成分多酚更加稳定。

2.4 荞麦蜂花粉多酚与 α -淀粉酶相互作用荧光光谱与同步荧光光谱分析

2.4.1 荞麦蜂花粉多酚与 α -淀粉酶相互作用荧光光谱

通过荧光光谱分析 BBPP 与 α -淀粉酶之间的相互作用, α -淀粉酶抑制的最大荧光吸收峰发生蓝移 (见图 4),说明 BBPP 与 α -淀粉酶相互作用改变了酶的构象,其作用位点所处微环境极性改变,从而使酶的催化活性降低。为验证环境极性变化对 α -淀粉酶活性影响,测试 5 种不同极性溶剂下 2 mg/mL 阿卡波糖对 α -淀粉酶的影响 (见图 5),不同溶剂对阿卡波糖抑制 α -淀粉酶活性的效果并不相同,其中无水乙醇抑制率最高,石油醚最低,表明溶剂极性确实会影响酶活性。Su 等^[23]等研究发现喜树碱对胰 α -淀粉酶具有较强的抑制作用,随着喜树碱浓度的增加,胰 α -淀粉酶的最大发射波长发生蓝移,与本实验结果类似。

2.4.2 荞麦蜂花粉多酚与 α -淀粉酶相互作用同步荧光光谱分析

同步荧光光谱可以提供 $\Delta\lambda = 15$ nm (Tyr, 酪氨

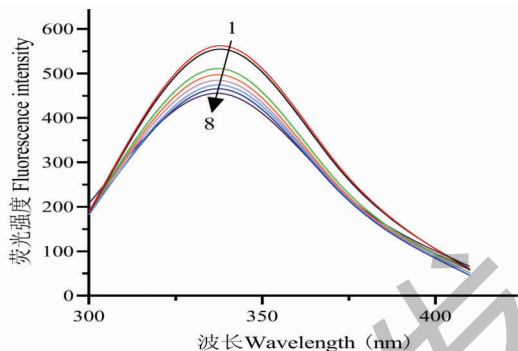


图 4 BBPP 与 α -淀粉酶相互作用荧光光谱

Fig. 4 Fluorescence spectra of BBPP interacted with α -amylase

注:曲线 1~8 显示 BBPP 质量浓度分别为 0、0.67、1.33、2、2.67、3.33、4、4.67 $\mu\text{g/mL}$ 。Note: Curves 1-8 show that the BBPP concentrations are 0, 0.67, 1.33, 2, 2.67, 3.33, 4, and 4.67 $\mu\text{g/mL}$, respectively.

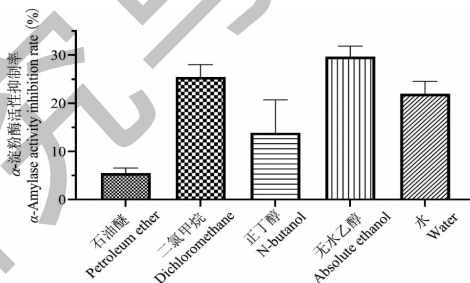


图 5 不同溶剂对阿卡波糖抑制 α -淀粉酶活性的影响

Fig. 5 Effect of different solvents on α -amylase activity inhibited by acarbose

酸残基)或 $\Delta\lambda = 60$ nm (Trp, 色氨酸残基)的荧光信息。BBPP 与 α -淀粉酶相互作用体系中, Trp 残基的最大发射峰基本保持不变 (见图 6B), 而 Tyr 残基的最大发射峰略有蓝移 (见图 6A), 表明 BBPP 的加入导致 α -淀粉酶的构象发生变化, 酪氨酸残基所处环

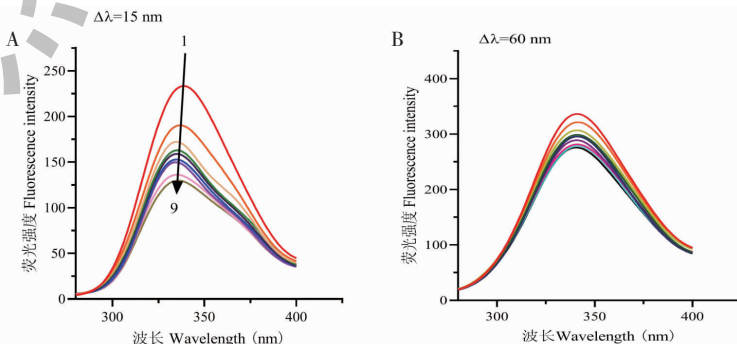


图 6 BBPP 对 α -淀粉酶同步荧光光谱

Fig. 6 Synchronous fluorescence spectra of BBPP for α -amylase

注:曲线 1~9 显示 BBPP 质量浓度分别为 0、0.67、1.33、2、2.67、3.33、4、4.67、5.33 $\mu\text{g/mL}$ 。Note: Curves 1-9 show BBPP mass concentrations of 0, 0.67, 1.33, 2, 2.67, 3.33, 4, 4.67, 5.33 $\mu\text{g/mL}$.

境的疏水性增加,蛋白质进一步折叠,腔内疏水性环境极性增大。这些结果表明 BBPP 改变了 α -淀粉酶周围氨基酸残基的微环境,这可能是 α -淀粉酶活性降低的原因之一。

2.5 荞麦蜂花粉多酚与 α -淀粉酶相互作用荧光猝灭机制分析

根据 Stern-Volmer 方程式研究 BBPP 与 α -淀粉酶作用的具体的荧光猝灭机制,计算出不同温度下的动态猝灭常数(K_{sv})和猝灭速率常数(K_q)。由表 2 可知在 273 ~ 298 K 时, K_{sv} 值随着温度增加而减小,表明该过程为静态猝灭机制;在 298 ~ 310 K 时,

K_{sv} 值随着温度增加而增大,表明该过程为动态猝灭机制。当 BBPP 与 α -淀粉酶的荧光猝灭为静态猝灭时,其结合常数(K_a)和结合位点(n)可用式(3)计算。以 $\log[(F_0-F)/F]$ 对 $\log[Q]$ 作图,绘制双对数曲线(见图 7),结合图表可得出 BBPP 与酶结合的表现结合常数 K_a (见表 2),在 273 K ~ 298 K 时, K_a 值随着温度增加而减小;在 298 K ~ 310 K 时, K_a 值随着温度增加而增大,且三个温度下多酚与酶的结合位点数 n 值均约等于 1,说明 BBPP 与 α -淀粉酶只有一个或 1 类结合位点,说明 BBPP 与 α -淀粉酶相互作用时以 1:1 结合。

表 2 荞麦蜂花粉多酚与 α -淀粉酶相互作用的荧光参数

Table 2 Fluorescence parameters of buckwheat bee pollen polyphenol interacted with α -amylase

温度 Temperature (K)	K_{sv} (g/mL)	K_q (μ g/mL)	K_a (mg/mL)	n
273	0.109 10	1.091×10^7	0.263 7	0.552 6
298	0.050 41	5.041×10^6	0.055 8	1.021 0
310	0.107 60	1.076×10^7	0.218 6	0.661 5

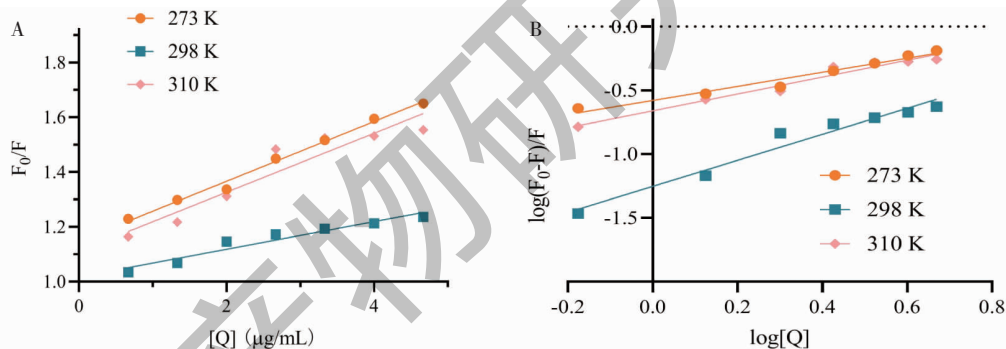


图 7 不同温度下 BBPP 猝灭 α -淀粉酶的 Stern-Volmer 图 (A) 和双倒数图 (B)

Fig. 7 Stern-Volmer diagram (A) and double reciprocal diagram (B) of BBPP quenching α -amylase at different temperatures

3 结论

本实验利用多种光谱分析和抑制动力学研究了 BBPP 对 α -淀粉酶抑制机制。结果表明, BBPP 对 α -淀粉酶表现为较强且可逆的混合型竞争抑制作用,且对其抑制效率存在剂量依赖性, IC_{50} 为 2.00 ± 0.06 mg/mL。不同条件处理对 BBPP 稳定性分析发现,高温、强碱、光照以及高浓度氧化剂与还原剂等处理,均能降低 BBPP 对 α -淀粉酶的抑制作用。荧光光谱猝灭分析表明, BBPP 在 273 ~ 298 K 时存在静态猝灭作用,在 298 ~ 310 K 时存在动态猝灭作用,两者作用时只有一个结合位点。同步荧光光谱表明 BBPP 导致 α -淀粉酶酪氨酸残基所处环境的折叠改变,疏水性增加。本文着重于研究 BBPP 作为

缓解餐后血糖升高的降糖活性成分对 α -淀粉酶的抑制作用的研究,后续将研究 BBPP 对糖尿病模型动物体内降血糖的功能,分析和评价其作为降血糖药物研发的可行性。

参考文献

- 1 State Administration for Market Regulation, Standardization administration of the People's Republic of China. Bee pollen (蜂花粉): GB/T 30359-2021 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2021: 1.
- 2 Tuoheti T, Rasheed HA, Meng L, et al. High hydrostatic pressure enhances the anti-proliferative properties of lotus bee pollen on the human prostate cancer PC-3 cells via increased

- metabolites[J]. J Ethnopharmacol,2020,261:113057.
- 3 Sun Y, Guo QX, Tong QY. Study on hypoglycemic activities of flavonoids of *Brassica napus* L. bee pollen *in vitro*[J]. Sci Technol Food Ind(食品工业科技),2015,36:122-126.
 - 4 Liu W, Fu ZM, Yang WC, et al. The hypoglycemic effects of *Camellia* bee pollen polysaccharide on diabetic mice molded by alloxan[J]. J Bee(蜜蜂杂志),2009,29:4-6.
 - 5 Dare ZM, Rao J, Xu DP. Anti-prostatic hyperplasia activity and ingredient of rape bee pollen[J]. J Food Biotechnol(食品与生物技术学报),2018,37:38-43.
 - 6 Sun PL, Zhang YM, He RJ, et al. Study on separation, purification and immune activity of peptide from bee pollen[J]. Food Sci(食品科学),2008,29:450-452.
 - 7 Ma LH, Yu MM. Effect on hypoglycemic of Flos Sophorae polyphenols[J]. Food Sci Technol(食品科技),2019,44:211-215.
 - 8 Qiao JL, Zhang Y, Liu P, et al. Polyphenol composition and antioxidant and hypoglycemic activities in wild blue honey-suckle fruit[J]. Food Sci(食品科学),2021,42:47-55.
 - 9 Pan Y, Liu X L, Wang Y, et al. Inhibitory effect of polyphenols from blueberry leaves on the activity of α -amylase and α -glucosidase *in vitro*[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2022,34:579-587.
 - 10 Tan Y, Chang SKC, 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 Chem,2017,214:259-268.
 - 11 Tian JL, Si X, Wang YH, et al. Bioactive flavonoids from *Rubus corchorifolius* inhibit α -glucosidase and α -amylase to improve postprandial hyperglycemia [J]. Food Chem, 2021, 341:128-149.
 - 12 Kreft M. Buckwheat phenolic metabolites in health and disease[J]. Nutr Res Rev,2016,29:30-39.
 - 13 Qian MH, Dare ZM, Xu DP. Separation of polysaccharide A from buckwheat bee pollen and its hypoglycemic activity[J]. J Food Biotechnol(食品与生物技术学报),2019,38:80-85.
 - 14 Xu Y, Cao X, Zhao H, et al. Impact of *Camellia japonica* bee pollen polyphenols on hyperuricemia and gut microbiota in potassium oxonate-induced mice [J]. Nutrients, 2021, 13:2665.
 - 15 Zhang HT, Dong WJ, Chen N, et al. Inhibition effect and molecular mechanism of tea polyphenols on the α -amylase[J]. Sci Technol Food Ind(食品工业科技),2022,43:90-96.
 - 16 Liang K, Yan QZ, Wang XW, et al. Study on the bioactivity of millet polyphenols *in vitro* [J]. Chin Condiment(中国调味品),2022,47:26-31.
 - 17 Dong YT. The inhibitory effects on pancreatic lipase and α -amylase of *Camellia* pollen extracts[D]. Xiamen:Jimei University(集美大学),2014.
 - 18 Yuan XY. Effects of pH and light on the stability of apple polyphenols[J]. Modern Agric Sci Technol,2014:297-299.
 - 19 Gao NX, Li B, Du SS, et al. Stability of polyphenols from *Aronia melanocarpa* fruits[J]. Food Sci(食品科学),2016,37:20-24.
 - 20 Fan LJ, Wang ZP, Song AK, et al. Study on the stability and bioactivity of polyphenols from *Cabernet sauvignon* grape seeds *in vitro*[J]. Sci Technol Food Ind(食品工业科技),2023,44:107-115.
 - 21 Zhou YH. Ultrasonic extraction and stability of polyphenols from buckwheat[J]. Food Sci Technol(食品科技),2021,46:188-194.
 - 22 Li QC, Cai WW, Li N, et al. Optimization on extraction process of *Lentinus edodes* polyphenols by response surface methodology and its stability[J]. Food Sci Technol(食品科技),2022,47:230-237.
 - 23 Su B, Jia X, Leng XL, et al. The partial influence of camptothecin on α -amylase[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2007,19:452-454.