

## 多光谱结合分子对接分析表儿茶素与酸性磷酸酶的相互作用

李颖畅<sup>1</sup>, 李园园<sup>1</sup>, 董高缘<sup>1</sup>, 仪淑敏<sup>1</sup>, 励建荣<sup>1\*</sup>, 杨青<sup>2</sup>, 位正鹏<sup>2</sup>, 王明丽<sup>3</sup>, 付运红<sup>3</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>荣成泰祥食品股份有限公司 农业农村部冷冻调理海洋食品加工重点实验室 山东荣成 264309  
<sup>3</sup>蓬莱京鲁渔业有限公司 山东烟台 265601)

**摘要** 酸性磷酸酶是风味物质(肌苷酸)降解的一种关键酶,抑制该酶对保持贮藏过程中水产品的风味非常重要。采用紫外-可见吸收光谱、荧光光谱、圆二色光谱和分子对接等方法研究表儿茶素与酸性磷酸酶的相互作用,结果表明:表儿茶素能有效抑制酸性磷酸酶的活性,IC<sub>50</sub>值为0.184 mmol/L,其抑制类型为混合型抑制。当表儿茶素浓度为0.1 mmol/L时,抑制常数(K<sub>i</sub>)为1.025 mmol/L。表儿茶素可使酸性磷酸酶发生动态荧光猝灭。在298 K下,酸性磷酸酶的结合常数(K<sub>a</sub>)为1.455×10<sup>5</sup> L/mol,酸性磷酸酶与表儿茶素之间的主要相互作用力是氢键和范德华力。表儿茶素使酸性磷酸酶的二级结构发生改变,使其α-螺旋增加,而β折角、β-转角和无规则卷曲减少。研究结果为贮藏过程中抑制水产品中肌苷酸的降解提供了新思路。

**关键词** 酸性磷酸酶;表儿茶素;抑制机制;相互作用;荧光光谱法

**文章编号** 1009-7848(2023)08-0032-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.08.004

酸性磷酸酶(Acid phosphatase, ACP)是风味物质肌苷酸(Inosinic acid, IMP)降解的关键酶。此外,酸性磷酸酶也是一类巯基酶,在酸性条件下水解磷酸单酯,释放磷酸根离子<sup>[1]</sup>。截止目前,ACP的研究主要集中在从不同类型的水产品中分离和纯化及其特性研究方面。Zhu等<sup>[2]</sup>通过阴离子交换色谱法、凝胶过滤色谱法和高效液相色谱法从海参中分离并纯化出ACP,ACP在pH 4.0和50℃时表现出最适活性。Siddiqua等<sup>[3]</sup>从罗湖鱼肝脏中分离出ACP的最适pH值和温度是pH 5.0和40℃,且酒石酸竞争性地抑制其活性。IMP被ACP水解时可产生次黄嘌呤核苷(HxR)和次黄嘌呤(Hx)。当产生Hx时,水产品具有不良的气味,导致鱼类的食用价值降低<sup>[4]</sup>。因此,通过控制水产品中ACP的活性来抑制IMP的降解至关重要。通常情况下,金属离子、金属化合物和有机化合物对ACP有不同程度的抑制作用。Zhu等<sup>[2]</sup>利用金属离子抑制海参的ACP活性,发现Zn<sup>2+</sup>和Cu<sup>2+</sup>对ACP活性有强烈的抑制作用,此外重金属离子Hg<sup>2+</sup>、

Pb<sup>2+</sup>、Ag<sup>2+</sup>和Cd<sup>2+</sup>对ACP也有抑制作用,其中Hg<sup>2+</sup>的抑制效应最强。此外,Moradi等<sup>[5]</sup>采用TiO<sub>2</sub>纳米颗粒以非竞争性抑制的形式抑制马铃薯中的ACP活性。化学方法虽抑制ACP的活性,但对人类健康有一定危害。研究人员开始专注于利用天然活性物质抑制ACP的活性。然而,天然多酚与ACP的相互作用机制尚不清楚。

表儿茶素(Epicatechin, EC)是从茶叶中提取的水溶性的天然酚类物质。目前,对EC的研究主要集中在食品中的抗氧化性和其对营养成分的影响方面。Yuan等<sup>[6]</sup>发现在鲱鱼油中加入EC,可有效延缓鲱鱼油的脂质氧化。李云龙等<sup>[7]</sup>研究了EC对牛肉汤中营养成分的变化,结果表明:在牛肉汤中加入EC,显著降低了牛肉汤中总糖和蛋氨酸含量,并提高了固形物和不饱和脂肪酸的含量。丁小倩<sup>[8]</sup>研究表明EC能有效抑制高温炭烤过程中杂环胺的形成,有效保留了烤羊肉独特的风味和质地。在酶学方面,EC鲜有报道。Kim等<sup>[9]</sup>从华松植物中提取的表儿茶素衍生物能竞争性抑制乙酰胆碱酯酶的活性。然而,表儿茶素对ACP的抑制作用未见报道,可通过光谱法和分子对接方法研究EC与ACP之间的抑制和相互作用机制。同时,用光谱法可以测定猝灭类型、结合参数和热力学参数以及ACP二级结构的变化。分子对接可进一步

收稿日期: 2022-08-28

基金项目: “十三五”国家重点研发计划项目  
(2018YFD0901004)

第一作者: 李颖畅,女,博士,教授

通信作者: 励建荣 E-mail: lijr6491@163.com

研究表儿茶素与 ACP 相互作用。此研究为控制贮藏期间水产品中 IMP 的降解提供了新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

海鲈鱼,辽宁省锦州市水产市场;ATP,从海鲈鱼肝脏中分离;表儿茶素(>97%),上海阿拉丁科技有限公司;乙酸钠、对硝基苯磷酸二钠(P-NPP)和 1-苯胺基-8-萘磺酸(ANS>(>98%)),上海麦克林科技有限公司。

### 1.2 仪器与设备

MS105DU 电子分析天平,METTLER TOLEDO 公司;UV-2550 紫外-可见分光光度计,岛津仪器有限公司;HH-6 恒温水浴锅,上海博讯医疗生物仪器股份有限公司;Fluoromax-4NiR 荧光分光光度计,法国 HORIBA 公司;Circular plus 圆二色光谱仪,英国应用物理公司。

### 1.3 方法

1.3.1 样品处理 取新鲜的海鲈鱼鱼肝提取酸性磷酸酶,将酸性磷酸酶(蛋白含量 0.7 mg/mL,酶活 60.95 U/mL)与不同浓度的表儿茶素充分混匀,最终体系的蛋白质量浓度为 0.28 g/mL。

1.3.2 酶活性和动力学分析 根据 Siddiqua 等<sup>[3]</sup>的苯磷酸钠法测定 ACP 酶活性,并作适当修改。ACP 溶液(30  $\mu$ L)和不同浓度的 EC 溶液混合均匀,在 37  $^{\circ}$ C 的水浴中与醋酸钠缓冲液混合 30 min,然后加入终止液和显色液,混匀静置 10 min,并在 520 nm 处测量吸光度。对照组不含 EC 溶液,酶活定义为 100%,用式(1)计算相对酶活性。

$$\text{相对酶活}(\%) = \text{OD}_1 / \text{OD}_2 \times 100 \quad (1)$$

式中, $\text{OD}_1$ ——含有 EC 的 ACP 吸光度; $\text{OD}_2$ ——不含有 EC 的 ACP 吸光度。

采用线性拟合计算出 EC 抑制 ACP 酶活一半时的浓度( $\text{IC}_{50}$ )。

可逆性抑制测定采用酶抑制动力学方法,底物(P-NPP)浓度 10 mmol/L,改变 EC 浓度,测定反应体系中酶促反应速率随 EC 变化趋势,作 ACP 酶浓度和酶促反应速率曲线,若各组曲线过原点,则可以判断为可逆抑制。

根据 Lineweaver-Burk 方法测出米氏常数  $K_m$  (mmol/L)、最大速率  $V_{\max}$  (mmol/L) 和抑制常数  $K_i$

(mmol/L)<sup>[10]</sup>。以底物浓度的倒数为横坐标,酶促反应速率的倒数为纵坐标,绘出 Lineweaver-Burk 双倒数图,由此计算出抑制动力学常数,Line weaver-Burk 方程见式(2)~(4)。

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \left[ 1 + \frac{[I]}{K_i} \right] \quad (2)$$

$$\text{Slope} = \frac{K_m}{V_{\max}} \quad (3)$$

$$\text{Intercept} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{[I]}{V_{\max} K_i} \quad (4)$$

式中, $V$ ——反应速率,mmol/L;Slope——斜率;Intercept——截距;[I]——EC 浓度,mmol/L;[S]——底物浓度,mmol/L。

1.3.3 紫外光谱测定方法 参考 Farajzadeh-Dehkordi 等<sup>[11]</sup>方法,ACP 的蛋白质含量为 0.7 mg/mL。不同浓度的 EC(0,0.1,0.2,0.3,0.4 mmol/L 和 0.5 mmol/L,1 mL)与等体积纯化后的 ACP 混合。在相同的处理条件下,ACP 与 EC(0 mmol/L)作为对照。从光谱中减去 EC 的背景。

1.3.4 荧光光谱测定方法 ACP 内源荧光光谱参考 Gong 等<sup>[12]</sup>的方法进行测定。ACP 的同步荧光参考 Mohammadi 等<sup>[13]</sup>的方法进行测定。利用 Stern-Volmer 方程(5)计算猝灭常数的变化,判断 EC 对 ACP 的荧光猝灭类型;采用双对数方程(6)计算 EC 与 ACP 相互作用的结合常数  $K_a$  和结合位点数  $n$ ;使用热力学方程(7)和(8)分别计算 EC 与 ACP 相互作用的热力学参数(自由能变  $\Delta G$ ,焓变  $\Delta H$  和熵变  $\Delta S$ )。

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}[Q] = 1 + K_q \tau_0 [Q] \quad (5)$$

$$\lg \left[ \frac{F_0 - F}{F} \right] = \lg K_a + n \lg [Q] \quad (6)$$

$$\ln K_a = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (7)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (8)$$

式中, $F_0$ ——对照组的荧光强度; $F$ ——EC 浓度为  $Q$  时 ACP 的荧光强度;[Q]——EC 的浓度,mmol/L; $K_{sv}$ ——动态猝灭常数,可由  $F_0/F$  对 [Q] 的斜率求得,  $10^4$  L/mol; $K_q$  为猝灭速率常数,  $10^{12}$  L/(mol·s); $K_a$ ——结合常数,  $10^5$  L/mol; $\tau_0$ ——猝灭剂不存在时生物大分子的平均荧光寿命,约  $10^{-8}$  s; $n$ ——结合个数,个; $\Delta H$ ——焓变,kJ/mol;R——

理想气体常数,  $8.314 \text{ J}/(\text{mol} \cdot \text{K})$ ;  $\Delta G$ ——吉布斯自由能,  $\text{kJ}/\text{mol}$ ;  $\Delta S$ ——熵变,  $\text{kJ}/(\text{mol} \cdot \text{K})$ 。

1.3.5 圆二色谱测定方法 参考 Zhu 等<sup>[14]</sup>方法, 通过圆二色谱测定 EC 处理后的 ACP 的二级结构变化。EC 处理后的 ACP 的蛋白质量浓度为  $0.5 \text{ mg}/\text{mL}$ 。狭缝宽均为  $1 \text{ nm}$ , 在  $60 \text{ nm}/\text{min}$  扫描速度的条件下, 测定  $190\sim 260 \text{ nm}$  波长范围内不同浓度 EC 处理后 ACP 圆二色谱, 并计算 ACP 与 EC 结合前后的二级结构的含量, 重复扫描 3 次。

1.3.6 分子对接测定方法 ACP 的晶体结构从 PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org/pdb>) 下载, 利用 PyMol 软件对 ACP 进行去亚基、去水和删除小分子配体等操作, 并保存成 pdb 格式; 从 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获取 EC 的 2D 结构, 并保存成 pdb 格式。最后使用 Discovery Studio 2017 R2 Client 软件进行分子对接并处理对接结果。

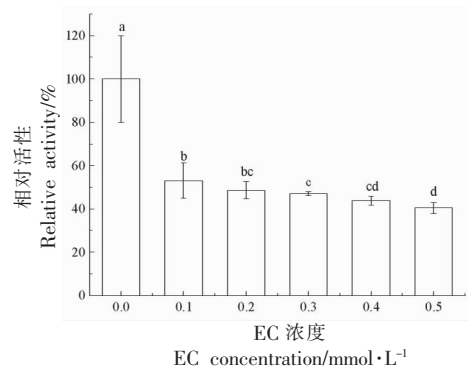
#### 1.4 数据分析

采用 Origin 2019 和 SPSS 26.0 作图并进行方差分析,  $P < 0.05$  为差异显著。

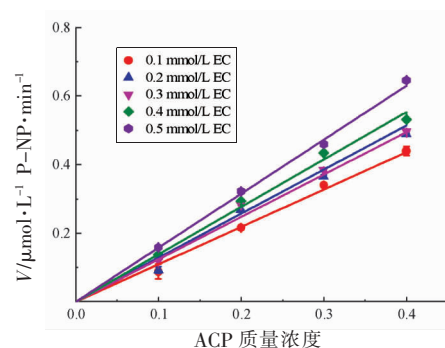
## 2 结果与分析

### 2.1 酶活性和动力学分析

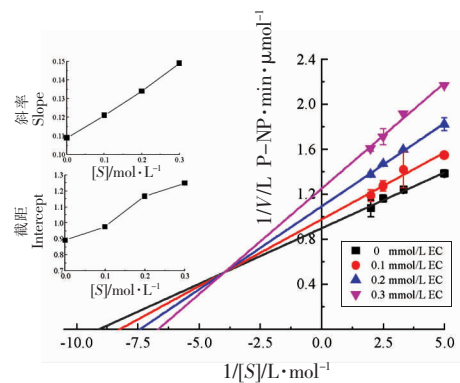
随着 EC 浓度的升高, ACP 的相对酶活性显著性下降 (图 1a)。EC 浓度为  $0.1 \text{ mmol}/\text{L}$  时, ACP 的相对酶活是  $52.96\%$ , 而 EC 浓度为  $0.5 \text{ mmol}/\text{L}$  时, ACP 的相对酶活为  $40.48\%$  (图 1a), 经过线性拟合 EC 抑制 ACP 的  $\text{IC}_{50}$  为  $0.184 \text{ mmol}/\text{L}$ , 表明 EC 能抑制 ACP 的酶活性, 并且 ACP 酶活性具有 EC 浓度依赖性。随着 ACP 质量浓度升高, 改变 EC 的浓度, 所有直线均经过原点, 表明 EC 抑制 ACP 具有可逆性 (图 1b)。可逆性抑制分为竞争性抑制、非竞争性抑制、反竞争性抑制和混合型抑制<sup>[15]</sup>。横坐标的交点代表  $1/K_m$ , 纵坐标的交点



(a) ACP 相对酶活



(b) EC 可逆抑制 ACP



(c) EC 抑制 ACP 类型

注: c 图插图由上至下依次为斜率和截距。

图 1 EC 与 ACP 相互作用机理

Fig.1 Interaction mechanism of EC and ACP

表 1 ACP 与 EC 相互作用时米氏常数和最大反应速率

Table 1 Michaelis-Menten constant and maximum reaction velocity of ACP interaction with EC

多酚	浓度/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	Lineweaver-Burke 方程	$K_m/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	$V_{\text{max}}/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	$K_i/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	$R^2$
EC	0.1	$1/V=0.118/[S]+0.975$	0.121	1.025	1.025	0.957
	0.2	$1/V=0.147/[S]+1.167$	0.134	0.916	1.197	0.995
	0.3	$1/V=0.187/[S]+1.250$	0.149	0.800	1.200	0.985

代表  $1/V$ , 动力学参数见表 1。随着 EC 浓度增大,  $K_m$  逐渐增大,  $V_{max}$  逐渐降低, 交点位于第 2 象限, 表明 EC 抑制 ACP 为混合型抑制(图 1c), 抑制常数  $K_i$  逐渐增大, 表明随着 ACP 质量浓度的增加, EC 抑制 ACP 能力逐渐增大。混合型抑制特点是酶、底物和抑制剂三者反应没有先后顺序, 也有可能酶与底物、抑制剂的结合同时发生。本研究结果与 Srivastava 等<sup>[6]</sup>的结果一致, 氟化物对 ACP 抑制类型也是混合型抑制。

## 2.2 ACP 紫外光谱的变化

EC 对 ACP 紫外吸收光谱的影响如图 2, 未加 EC 时, ACP 在 280 nm 处有一个强的吸收峰, 这主要是由 ACP 的酪氨酸 (Tyrosine, Tyr) 和色氨酸 (Tryptophan, Trp) 残基的苯环  $\pi-\pi^*$  跃迁产生的<sup>[7]</sup>。随着 EC 浓度增大, ACP 紫外吸收逐渐增加; 说明加入 EC 后, ACP 中的 Tyr 和 Trp 残基暴露于水相中, 形成 EC-ACP 复合物, 导致 ACP 共轭体系增大, 最终引起 ACP 紫外吸收增强。Moradi 等<sup>[8]</sup>研究表明腐胺的加入使 ACP 在波长 280 nm 处的紫外吸收增强, 与本研究结果一致。

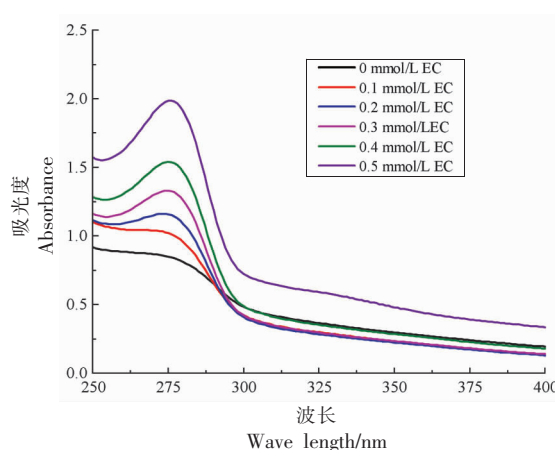


图 2 ACP 与 EC 相互作用的紫外吸收光谱图

Fig.2 UV-vis absorption spectra of ACP interaction with EC

## 2.3 荧光光谱结果

2.3.1 内源荧光结果 由图 3 可知, 未加 EC 时, ACP 在 350 nm 处有一处强荧光发射峰。随着 EC 浓度的增加, ACP 荧光强度下降, 说明 EC 使 ACP 的内源荧光发生猝灭。另外, 升高温度, ACP 内源荧光强度呈下降趋势, 说明温度使 ACP 与 EC 发

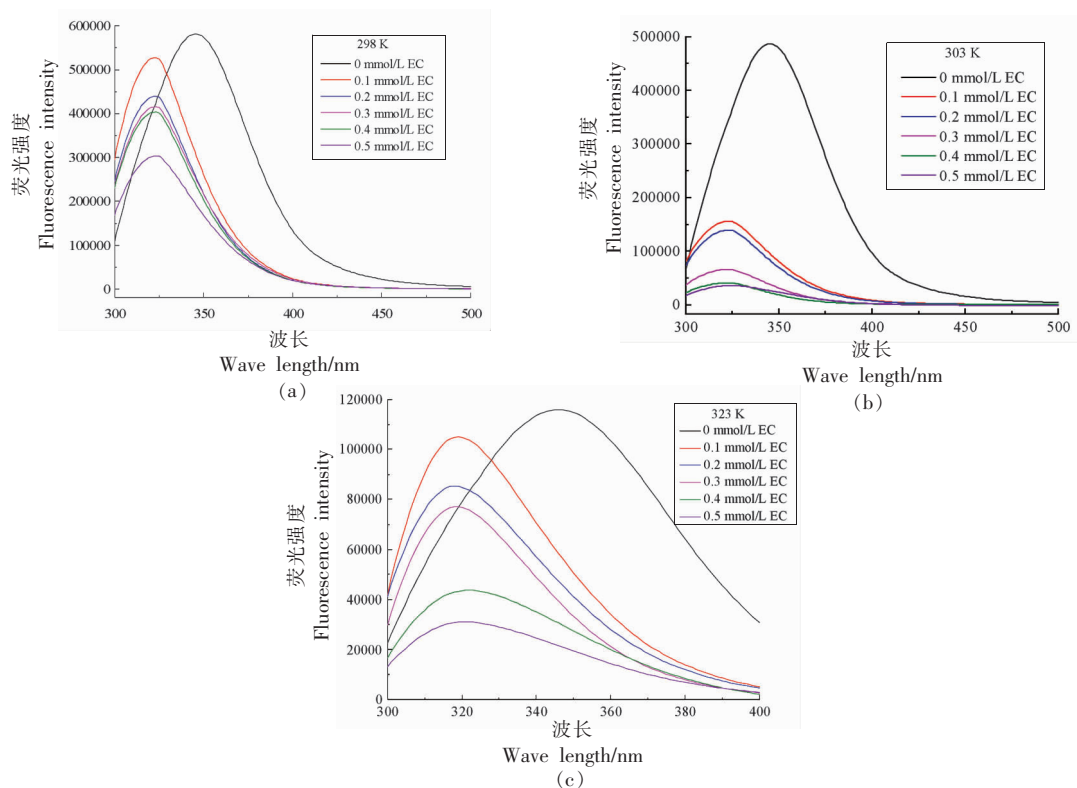


图 3 298 K(a)、303 K(b)和 323 K(c)时 ACP 与 EC 相互作用的荧光光谱

Fig.3 Fluorescence spectra of ACP and EC interaction at 298 K(a), 303 K(b) and 323 K(c)

生碰撞频率增强,相互作用更明显。姚文俊<sup>[9]</sup>的研究表明在牛乳 $\beta$ -乳球蛋白中加入4种儿茶素【EC、表没食子儿茶素(Epigallocatechin, EGC)、儿茶素没食子酸酯(Epicatechingallate, ECG)、表没食子儿茶素没食子酸酯(Epigallocatechingallate, EGCG)】后,牛乳 $\beta$ -乳球蛋白的内源荧光强度均降低,且最大荧光发射峰均发生红移,表明Trp残基环境发生改变,Trp残基转移到更亲水环境。图3a~3c表明随着EC浓度的增大,ACP的最大荧光发射峰发生明显蓝移,说明EC可以使ACP的Trp或Trp残基周围的极性降低,疏水性增强,进一步表明ACP的Trp或Trp残基微环境变的更趋向于疏水。此研究结果与姚文俊结果不一致,是由于ACP与牛乳 $\beta$ -乳球蛋白结构存在差异。Moradi等<sup>[18]</sup>研究表明尸胺能使ACP发生荧光猝灭,发生蓝移现象。本文的研究结果与Moradi等<sup>[18]</sup>研究结果相一致。

### 2.3.2 同步荧光结果 同步荧光主要用于分析蛋

白质氨基酸残基变化, $\Delta\lambda=15$  nm 和  $\Delta\lambda=60$  nm 时,同步荧光光谱分别显示蛋白质中Tyr和Trp残基的特征信息<sup>[18]</sup>。由图4可知,随着EC浓度的增加,Tyr和Trp的荧光均呈现降低趋势,此结果进一步说明EC使ACP荧光发生猝灭。从荧光降低程度来看,Tyr荧光降低更明显,说明EC使ACP发生猝灭的结合位点在Tyr残基附近,这一结果与分子对接结果一致,ACP的Tyr与EC以氢键方式结合。刘欣<sup>[20]</sup>在牛血清蛋白(Bovine serum albumin, BSA)中加入儿茶素类物质后,BSA的荧光强度降低,且最大发射荧光峰发生红移现象,表明儿茶素类物质均能使BSA的氨基酸残基极性增大,疏水性减弱。未加EC时,ACP中Tyr和Trp残基的最大特征吸收峰在305 nm和348 nm左右。随着EC的加入,Tyr和Trp残基荧光吸收峰发生蓝移现象,说明EC使ACP的Tyr和Trp残基周围的极性降低,疏水性增强。同步荧光结果基本与内源结果保持一致。

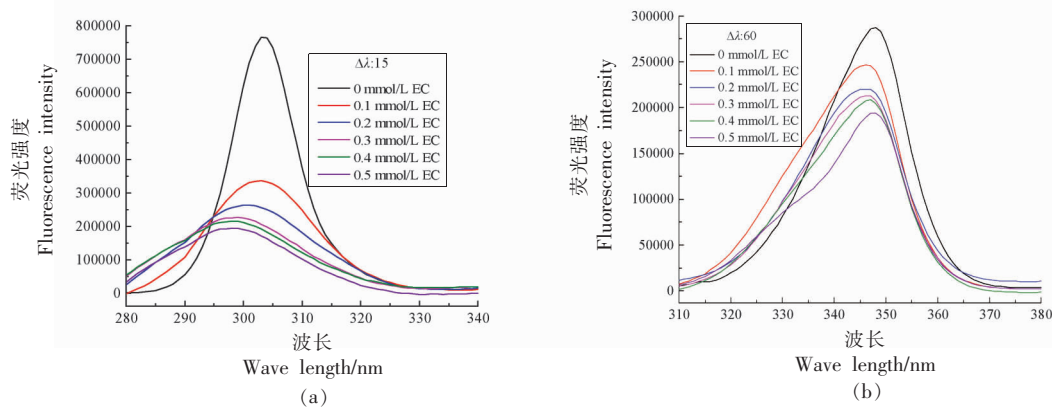


图4 298 K时ACP与EC相互作用的同步荧光光谱

Fig.4 Synchronous fluorescence spectra of ACP and EC interaction at 298 K

2.3.3 荧光猝灭和结合参数结果 298,303 K和323 K时,ACP与EC相互作用的Stern-Volmer拟合结果见图5a。由图5可知, $F_0/F$ 和 $[Q]$ 之间存在良好的线性关系,由表2可知,随着温度的升高,EC与ACP相互作用的 $K_{sv}$ 值从 $0.036 \times 10^4$  L/mol增大到 $1.662 \times 10^4$  L/mol,不同温度下,EC和ACP相互作用的 $K_q$ 值均远大于最大动态猝灭速率 $2.0 \times 10^{10}$  L/(mol·s)<sup>[21]</sup>,结果说明EC与ACP形成了大分子复合物,且这是一个动态猝灭过程。298,303 K和323 K时,EC与ACP相互作用的双对数

结果见图5b。EC与ACP相互作用的 $K_a$ 和 $n$ 值见表2。由表2可知,随着温度的升高,EC与ACP相互作用的 $K_a$ 值从 $1.455 \times 10^5$  L/mol增大到 $2.882 \times 10^5$  L/mol,说明EC与ACP相互作用的荧光猝灭类型均以动态猝灭为主,进一步说明EC能与ACP形成稳定的复合物。不同温度条件下,儿茶素类物质与BSA相互作用的 $n$ 值均接近1,表明儿茶素类物质在BSA上结合位点都是一个<sup>[20]</sup>。从表2可知,EC和ACP的结合比例接近1:1,说明EC在ACP上的结合位点是一个。

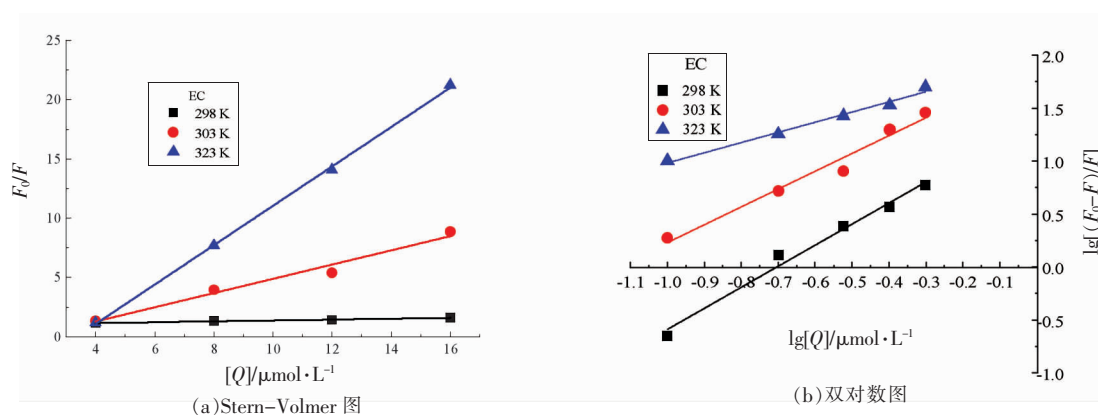


图 5 不同温度下 ACP 与 EC 相互作用时的 Stern-Volmer 图和双对数图

Fig.5 Stern-Volmer and double logarithmic plot of interaction between ACP and EC at different temperature

表 2 不同温度下 ACP 与 EC 相互作用的结合参数和热力学参数

Table 2 Combined and thermodynamic parameters of the ACP interaction with EC at different temperature

名称	温度/K	$K_s/10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$	$K_d/10^{12} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	$R^2$	$K_d/10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$	$n$	$\Delta H/\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	$\Delta S/\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$	$\Delta G/\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$
EC	298	$0.036 \pm 0.004$	0.036	0.971	1.455	1.38	-12.441	-0.055	-3.463
	303	$0.600 \pm 0.066$	0.600	0.976	2.817	1.28			-4.864
	323	$1.662 \pm 0.030$	1.662	0.999	2.882	0.95			-5.215

2.3.4 热力学参数的结果 ACP 与 EC 相互作用的  $\Delta G$ 、 $\Delta H$  和  $\Delta S$  见表 2。由表 2 可知,不同温度条件下,EC 与 ACP 相互作用过程中的  $\Delta G$  为负值,说明 EC 和 ACP 的结合过程是自发进行的。EC 相互作用的  $\Delta S$  和  $\Delta H$  值分别为  $-0.055 \text{ J}/(\text{mol} \cdot \text{K})$  和  $-12.441 \text{ kJ}/\text{mol}$ ,说明 EC 与 ACP 相互作用过程中的主要作用力均为氢键和范德华力<sup>[22]</sup>。此结果与 Song 等<sup>[21]</sup>研究的多酚与蛋白相互作用的主要作用力结果一致。

## 2.4 圆二色谱结果

圆二色谱主要反映蛋白质的二级结构。 $\alpha$ -螺

旋在波长 208 nm 和 222 nm 处有两个负的最小吸收峰,在 191~193 nm 处有一个正的最大吸收峰,而  $\beta$ -折叠在波长 215 nm 处有一个负的最小吸收峰,在波长 195 nm 处有一个正的最大吸收峰,无规则卷曲在波长 200 nm 左右有一个最大吸收峰<sup>[23]</sup>。圆二色谱结果如表 3,未加 EC 时,ACP 的  $\alpha$ -螺旋含量 37.8%, $\beta$ -折叠含量 7.9%, $\beta$ -转角含量 15.9%,无规则卷曲含量 31.1%;与对照相比,加入 EC 后(0.1~0.4 mmol/L), $\alpha$ -螺旋含量升高, $\beta$ -折叠、 $\beta$ -转角、无规则卷曲含量降低,表明 EC 能使 ACP 二级结构更趋于紧密稳定状态,EC 浓度为

表 3 pH 5.0、298 K 下 ACP 与 EC 相互作用的二级结构含量

Table 3 The contents of secondary structures of ACP with EC at pH 5.0, 298 K

组别	浓度/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	$\alpha$ -螺旋/%	$\beta$ -折叠/%	$\beta$ -转角/%	无规则卷曲/%
对照	0.0	37.8	7.9	15.9	31.1
EC	0.1	39.3	7.6	15.7	30.0
	0.2	40.7	7.4	15.5	29.3
	0.3	39.2	7.6	15.7	30.1
	0.4	42.0	7.2	15.2	28.6
	0.5	39.0	7.9	15.6	31.5

0.5 mmol/L,  $\alpha$ -螺旋含量升高,  $\beta$ -折叠、 $\beta$ -转角、无规则卷曲含量变化不大。姚文俊<sup>[9]</sup>的研究表明 EC 能使牛乳  $\beta$ -乳球蛋白二级结构发生改变,  $\alpha$ -螺旋含量降低,  $\beta$ -转角含量升高, 而本结果与其研究结果不一致, 可能是由于 ACP 与牛乳  $\beta$ -乳球蛋白二者蛋白结构存在差异所致。

## 2.5 分子对接结果

分子对接结果见图 6。图 6b 中可以看出 ACP 与 EC 相互作用的主要氨基酸为 Tyr、精氨酸 (Arginine, Arg)、苏氨酸 (Threonine, Thr)、甘氨酸 (Glycine, Gly) 和甲硫氨酸 (Methionine, Met)

等。从 6c 中可以看出 EC 与 ACP 相互作用中形成 5 个氢键 (O-H-X), 形成氢键氨基酸主要有 Tyr、Thr、Met、Arg 和 Gly。氢键的键长分别为 2.63, 2.43, 2.68, 1.93 Å 和 2.03 Å; 图 6d 表示形成氢键的区域, 其中从 ACP 到 EC, 氢键分布不均匀, 说明还有其它作用力维持二者相互作用。同时还有部分氨基酸如 Arg、Gly 和谷氨酰胺 (Glutamine, Gln) 等形成范德华力。此结果和 Moradi 等<sup>[17]</sup>研究结果保持一致, 表明在尸胺与 ACP 相互结合过程中其主要作用力是氢键和范德华力。

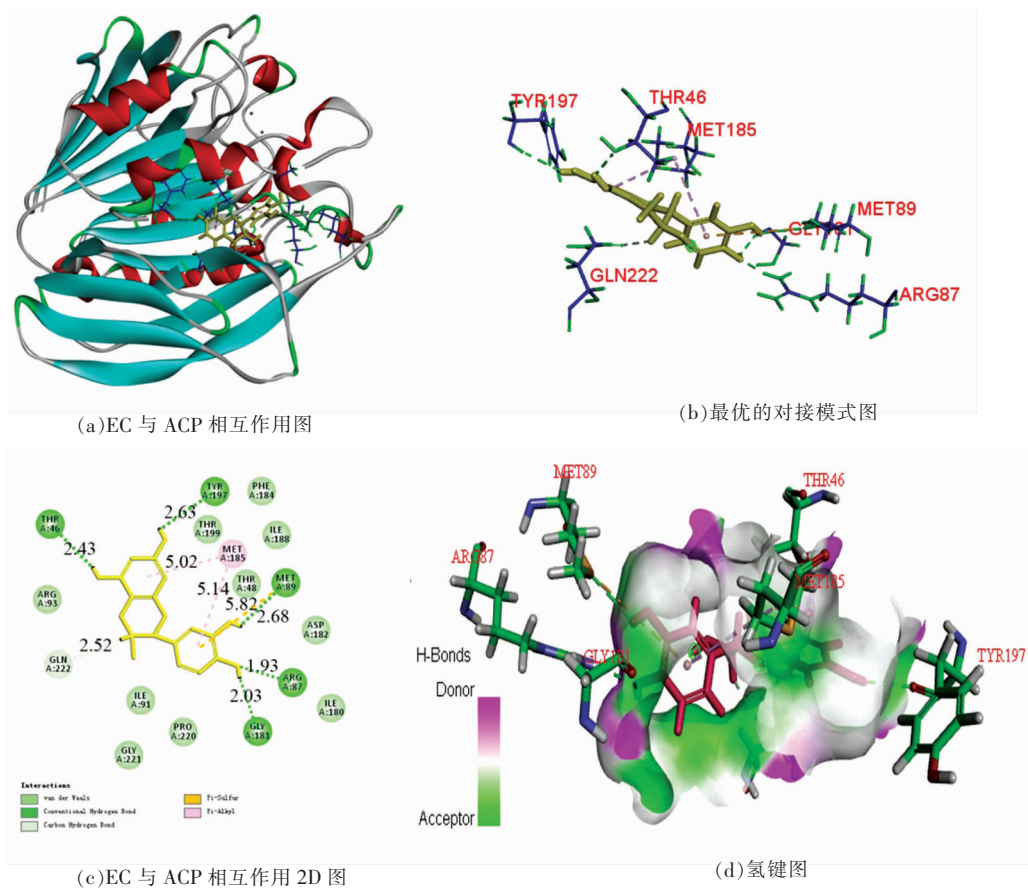


图 6 EC 与 ACP 相互作用分子对接图

Fig.6 Molecular docking diagram of ACP and EC

## 3 结论

采用光谱法和分子对接研究了表儿茶素和酸性磷酸酶的相互作用机理。表儿茶素能抑制酸性磷酸酶的活性, 其抑制类型为混合型抑制。表儿茶素浓度为 0.1 mmol/L 时, 抑制常数 ( $K_i$ ) 为 1.025

mmol/L,  $IC_{50}$  值为 0.184 mmol/L。紫外光谱表明表儿茶素使酸性磷酸酶特征吸收峰强度发生改变。荧光光谱表明表儿茶素能使酸性磷酸酶发生荧光猝灭, 猝灭类型是动态猝灭。在 298 K 下, 酸性磷酸酶的结合常数 ( $K_a$ ) 为  $1.455 \times 10^5$  L/mol, 且只有

一个结合位点。酸性磷酸酶与表儿茶素的主要相互作用力是氢键和范德华力。同步荧光光谱会改变酸性磷酸酶 Tyr 或 Trp 残基的微环境,并导致 Tyr 和 Trp 的荧光发生猝灭,且 Tyr 的荧光猝灭程度大于 Trp。圆二色光谱表明表儿茶素使酸性磷酸酶的二级结构发生改变,使其  $\alpha$ -螺旋增加,而  $\beta$  折叠、 $\beta$ -转角和无规则卷曲减少。

### 参 考 文 献

- [1] 王彩霞, 刘茹, 刘友明, 等. 淡水鱼肌肉中酸性磷酸酶的酶学特性[J]. 华中农业大学学报, 2010, 29(4): 518-521.  
WANG C X, LIU, R, LIU Y M, et al. Enzymatic characteristics of acid phosphatase in muscle of freshwater fish[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2010, 29(4): 518-521.
- [2] ZHU B W, YU J W, ZHANG Z S, et al. Purification and partial characterization of an acid phosphatase from the body wall of sea cucumber *Stichopus japonicus*[J]. Process Biochemistry, 2009, 44(8): 875-879.
- [3] SIDDIQUA A, SAEED A, NAZ R, et al. Purification and biochemical properties of acid phosphatase from rohu fish liver[J]. International Journal of Agriculture & Biology, 2012, 14: 223-228.
- [4] ÖZOGUL Y, ÖZOGUL F, KULEY E, et al. Biochemical, sensory and microbiological attributes of wild turbot (*Scophthalmus maximus*), from the Black Sea, during chilled storage [J]. Food Chemistry, 2006, 99(4): 752-758.
- [5] MORADI S, SHAREGHI B, SABOURY A A, et al. Molecular aspects of the interaction of acid phosphatase with TiO<sub>2</sub> nanoparticles: Kinetic and multispectroscopic studies [J]. Journal of Molecular Structure, 2021, 1245: 131268.
- [6] YUAN Y, PAN B Y, NIU X Y, et al. Impacts of epicatechin on the formation of advanced lipid oxidation end products (ALEs) in a fish oil oxidation model[J]. LWT-Food Science and Technology, 2019, 111: 582-587.
- [7] 李云龙, 赵月亮, 范大明, 等. 表儿茶素对牛肉汤营养成分和风味的影响[J]. 食品科学, 2021, 42(16): 125-132.  
LI Y L, ZHAO Y L, FAN D M, et al. Effect of epicatechin on the nutrient content and volatile flavor compounds of beef soup during stewing[J]. Food Science, 2021, 42(16): 125-132.
- [8] 丁晓倩. 多酚对羊肉炭烤过程杂环胺形成的抑制作用[D]. 北京: 中国农业科学院, 2021.  
DING X Q. Inhibitory effect of polyphenols on the formation of heterocyclic amines during lamb charcoal roasting[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences Thesis, 2021.
- [9] KIM J H, LEE S H, LEE H W, et al. (-)-Epicatechin derivate from *Orostachys japonicus* as potential inhibitor of the human butyrylcholinesterase[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 91: 1033-1039.
- [10] SOUZA P M, ALIAKBARIAN B, FILHO E X, et al. Kinetic and thermodynamic studies of a novel acid protease from *Aspergillus foetidus*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 81: 17-21.
- [11] FARAJZADEH -DEHKORDI N, FARHADIAN S, ZAHRAEI Z, et al. Interaction of reactive Red195 with human serum albumin: Determination of the binding mechanism and binding site by spectroscopic and molecular modeling methods [J]. Journal of Molecular Liquids, 2021, 327: 114835.
- [12] GONG S X, YANG C Y, ZHANG J H, et al. Study on the interaction mechanism of purple potato anthocyanins with casein and whey protein[J]. Food Hydrocolloids, 2021, 111: 106223.
- [13] MOHAMMADI F, MOEENI M. Analysis of binding interaction of genistein and kaempferol with bovine  $\alpha$ -lactalbumin[J]. Journal of Functional Foods, 2015, 12: 458-467.
- [14] ZHU L, SONG X B, PAN F, et al. Interaction mechanism of kafirin with ferulic acid and tetramethylpyrazine: Multiple spectroscopic and molecular modeling studies [J]. Food Chemistry, 2021, 363: 130298.
- [15] CORNISH-BOWDEN A. A simple graphical method for determining the inhibition constants of mixed, uncompetitive and non-competitive inhibitors[J]. Biochemical Journal, 1974, 137(1): 143-144.
- [16] SRIVASTAVA P K, ANAND A. The inhibitory effect of metals and other ions on acid phosphatase activity from *Vigna aconitifolia* seeds[J]. Prep Biochem-Biotechnol, 2015, 45(1): 33-41.



- [17] MORADI S, SHAREGHI B, SABOURY A A, et al. The influence of cadaverine on the structure, stability, and activity of acid phosphatase[J]. *Journal of Molecular Structure*, 2022, 1247: 131372.
- [18] MORADI S, SHAREGHI B, SABOURY A, et al. Investigation on the interaction of acid phosphatase with putrescine using docking, simulations methods and multispectroscopic techniques [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 150: 90–101.
- [19] 姚文俊. 四种儿茶素与牛乳 $\beta$ -乳球蛋白共价物的研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2019.  
YAO W J. Study on the covalents of four catechins and milk  $\beta$ -lactoglobulin [D]. Nanchang: Nanchang University, 2019.
- [20] 刘欣. 几种黄酮类药物小分子与牛血清白蛋白相互作用的研究[D]. 长沙: 中南大学, 2010.  
LIU X. Study on the interaction between small molecules of several flavonoids and bovine [D]. Changsha: Central South University, 2010.
- [21] SONG X, HU X, ZHANG Y, et al. Inhibitory mechanism of epicatechingallate on tyrosinase: Inhibitory interaction, conformational change and computational simulation[J]. *Food & Function*, 2020, 11(6): 4892–4902.
- [22] ROSS P D, SUBRAMANIAN S. Thermodynamics of protein association reactions: Forces contributing to stability[J]. *Biochemistry*, 1981, 20: 3096–3102.
- [23] CORRÊA D H A, RAMOS C H I. The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function[J]. *African Journal of Biochemistry Research*, 2009, 3(5): 164–173.

## Analysis of the Interaction between Epicatechin and Acid Phosphatase by Multi-spectroscopies and Molecular Docking

Li Yingchang<sup>1</sup>, Li Yuanyuan<sup>1</sup>, Dong Gaoyuan<sup>1</sup>, Yi Shumin<sup>1</sup>, Li Jianrong<sup>1\*</sup>, Yang Qing<sup>2</sup>,  
Wei Zhengpeng<sup>2</sup>, Wang Mingli<sup>3</sup>, Fu Yunhong<sup>3</sup>

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

<sup>2</sup>Taixiang Group, Rongcheng Taixiang Food Products Co. Ltd., Key Laboratory of Frozen Prepared Marine Foods Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Rongcheng 264309, Shandong

<sup>3</sup>Penglai Jinglu Fishery Co. Ltd., Yantai 265601, Shandong)

**Abstract** Acid phosphatase (ACP) is a key enzyme involved in the degradation of flavorful substances inosinic acid (IMP). Therefore, inhibition of ACP is very important to maintain the flavor of aquatic products during storage. This study investigated the interaction and inhibitory mechanisms of epicatechin (EC) on ACP by UV-Vis absorption spectroscopy, fluorescence spectroscopy, circular dichroism and molecular docking. The results showed that EC could effectively inhibit ACP activity, and the  $IC_{50}$  value was 0.184 mmol/L. It was reversible inhibitor of ACP, and the inhibition mechanism was the un-competitive type by kinetic analysis. The inhibition constant ( $K_i$ ) was 1.025 mmol/L when the concentration of EC was 0.1 mmol/L. The fluorescence of ACP was quenched by the interaction with EC and the quenching mode was dynamic quenching. The binding constant ( $K_a$ ) of ACP was  $1.455 \times 10^5$  L/mol after adding EC at 298 K. The interaction of ACP with EC was driven by hydrogen bonds and van der Waals forces. EC altered the secondary structure of ACP, resulting in an increase in  $\alpha$ -helix and a decrease in  $\beta$ -folding,  $\beta$ -turning and random coil. This study provides a new idea to inhibit the degradation of IMP in aquatic products during storage.

**Keywords** acid phosphatase; epicatechin; inhibitory mechanism; interaction; fluorescence spectrometry