

青柿子提取物抑制消化酶活性与降血糖效应

刘婧, 任维维, 屈佳林, 李珉梦, 刘小娟, 段旭昌*

(西北农林科技大学食品科学与工程学院 陕西杨凌 712100)

摘要 为探究青柿子提取物对人唾液 α -淀粉酶(HSA)、猪胰腺 α -淀粉酶(PPA)、 α -葡萄糖苷酶(α -Glu)的抑制作用及餐后血糖变化,以青柿子为原料,采用超声辅助丙酮萃取和大孔树脂纯化法制备青柿子提取物,通过酶活性抑制率分析、酶动力学分析和酶荧光猝灭试验研究青柿子提取物体外抑制酶的效果及机制;通过小鼠实验验证青柿子提取物对餐后血糖水平的控制作用。结果表明:青柿子提取物抑制 HSA、PPA、 α -Glu 活性,抑制类型均为混合性抑制,半抑制浓度值(IC_{50})分别为 (16.18 ± 0.17) , (13.57 ± 0.30) , $(3.22 \pm 0.03) \mu\text{g/mL}$;HSA、PPA、 α -Glu 酶与青柿子提取物均有 1 个结合位点,说明青柿子提取物作用于 HSA、PPA、 α -Glu 酶的荧光发色基团,自发形成复合物,引起 HSA、PPA、 α -Glu 酶发色基团周围微环境的改变和酶内源性荧光淬灭,从而抑制酶活性。动物实验表明青柿子提取物可明显降低小鼠餐后血糖水平,提示青柿子提取物通过抑制淀粉酶和葡萄糖苷酶活性来降低餐后血糖水平。

关键词 青柿子提取物; α -淀粉酶; α -葡萄糖苷酶; 酶活性机制; 餐后血糖

文章编号 1009-7848(2024)05-0264-16 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.05.022

柿子(*Diospyros kaki* Thunb.)是柿科柿属柿子树的果实,为世界五大水果之一,具有很高的营养价值和保健功效^[1]。柿子资源丰富,高达 1 000 多种,其中多数为中国特有品种,产量高达 393 万 t,约占全球总量的 73%^[2-5]。青柿子是未成熟的柿子果实,含有丰富的生物活性物质,如单宁酸、黄酮、多糖等。柿子在生长过程中会产生大量的落果,青柿子资源丰富,然而利用率很低,造成严重的资源浪费^[5-6]。青柿子中单宁含量高达 2%~3%,是迄今为止已知的含单宁类物质较高的水果之一^[7]。研究发现,青柿子提取物中的单宁可以通过抑制淀粉的消化率来降低餐后血糖水平^[8-9]。

糖尿病是一种由多病因引起的以慢性高血糖为特征的代谢性疾病,由于胰岛素抵抗,糖尿病患者通常具有较高的空腹血糖值和胰岛素水平,并伴有慢性炎症^[10]。根据国际糖尿病联合会(IDF)的数据,2019 年约有 4.63 亿成年人患有糖尿病,预计 2045 年将达到 6.93 亿人^[11]。餐后淀粉类化合物的水解是血糖升高的主要途径, α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶是位于小肠肠道细胞膜上用于消化降解淀粉类化合物的关键酶。研究表明, α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶对淀粉类食物代谢和维持正常生理

功能起着至关重要的作用,抑制 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶活性可降低淀粉类化合物的消化率,从而达到降低血糖的作用,已成为人们研究和治疗糖尿病的重要作用靶点^[12-15]。这种治疗手段成本低,操作便利,毒副作用小,被认为是一种高效的糖尿病治疗方式^[16-18]。

目前,寻找一种活性高、来源于天然植物的消化酶抑制剂对治疗糖尿病具有重要意义。青柿子提取物中含有大量的生物活性成分亟待研究。到目前为止,青柿子提取物对淀粉消化酶的体外抑制作用及降血糖效果研究甚少。为了探索青柿子提取物降血糖效果,本文研究青柿子提取物对人唾液 α -淀粉酶(Human salivary α -amylase, HSA)、猪胰腺 α -淀粉酶(Porcine pancreatic α -amylase, PPA)、 α -葡萄糖苷酶(α -Glucosidase, α -Glu)的活性抑制作用和餐后血糖水平变化,旨在初步阐明青柿子提取物的降血糖作用机制,为提高青柿子落果的开发价值,促进青柿子资源的充分利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料、实验动物与试剂

青柿子,于 2020 年 8 月 12 日采摘于国家柿种质资源圃(陕西杨凌),品种为金瓶柿,花期为 5 月中旬。选用 8 周的健康 C57BL/6 雄性小鼠(等

收稿日期: 2023-05-08

第一作者: 刘婧,女,硕士生

通信作者: 段旭昌 E-mail: duanxc1965@163.com

级:SPF)40只,体质量为(22±3)g,购自成都达硕实验动物有限公司(许可证号:SCXK(川)2020-030)。动物实验遵守了相关的伦理法规,所有的实验都是按照中国动物实验委员会(动物实验伦理委员会)进行的。芦丁标准品,上海蓝季科技发展有限公司;香兰素(香草醛),成都市科龙化工试剂厂;没食子酸、儿茶素、 α -Glu(来源于酵母,65 ku)、对硝基苯酚(*p*-Nitrophenol, PNP)、3,5-二硝基水杨酸(3,5-Dinitrosalicylic acid, DNS),北京索莱宝科技有限公司;对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷(*p*-Nitrophenyl- α -D-glucopyranoside, PNPG)、阿卡波糖、PPA(51~54 ku)、HSA(Type XIII-A, 55 ku)、二水槲皮素、常春藤皂苷元、熊果酸,上海源叶生物科技有限公司;淀粉,广东光华科技股份有限公司;标准品的纯度均为色谱纯级,纯度 $\geq 98\%$ 。

1.2 仪器与设备

Spark型酶标仪,奥地利 Tecan Austria GmbH;LS55荧光分光光度计,美国PE公司;LGJ-10C冷冻干燥机,四环福瑞科仪科技发展(北京)有限公司;UV2300 II双光束紫外-可见分光光度计,上海天美科学仪器有限公司;R205旋转蒸发器,上海申生科技有限公司;SHB-III循环水式多用真空泵,郑州长城科工贸有限公司;LC-30A+TripleTOF5600+高分辨离子淌度液质联用仪,新加坡AB SCIEX公司;GA-3血糖仪,三诺生物传感股份有限公司。

1.3 方法

1.3.1 青柿子提取物的制备 将青柿子清洗,去蒂、去核后,切成5 mm薄厚均匀的果片。在-80℃下预冻24 h,置于真空冷冻干燥箱进行干燥24 h,然后用多功能粉碎机粉碎成青柿子粉末。按料液比1:100加80%丙酮,于50℃超声提取30 min后抽滤,滤渣以同样方式重复提取2次,合并滤液,在50℃、0.09 MPa下蒸发浓缩至黏稠状,得青柿子粗提物。然后粗提物再通过经乙醇和酸碱预活化后的HPD-500型大孔树脂进行吸附纯化,上样体积为1/3柱体积,上样流速为0.8~1.0 mL/min,上样完保持2 h,用蒸馏水洗脱至无色并检测不出还原糖,然后再用100%甲醇以2.0 mL/min洗脱,收集甲醇洗脱液,直至流出液不含多酚、黄酮

类物质(FeCl_3 检测法),然后将甲醇洗脱液在50℃、0.09 MPa下蒸发浓缩成黏稠状,冷冻干燥即得青柿子提取物,用于后续试验。参照《水果、蔬菜及其制品中单宁含量的测定 分光光度法》(NY/T1600-2008)中的方法测定提取物总酚含量,参照何肖等^[19]的方法测定提取物的缩合单宁含量,参考秦晶晶等^[20]的方法测定提取物的黄酮含量。

1.3.2 青柿子提取物成分的分析 青柿子提取物成分的分析采用HRLC-ESI-MS/MS法鉴定。将青柿子提取物(100 μg)溶解在100 μL 的色谱级甲醇中,过0.22 μm 滤膜去除杂质。色谱条件:XSelect HSST3反相C18色谱柱(150 mm×2.1 mm, 2.5 μm);柱温40℃;流动相A:0.1%甲酸-水,流动相B:0.1%甲酸-乙腈;流速0.3 mL/min;进样量10 μL 。梯度洗脱条件:0~3 min,15% B;3~8 min,15%~20% B;8~10 min,20%~25% B,10~30 min,25%~35% B;30~34 min,35%~70% B;34~44 min,70% B;44~47 min,70%~20% B;47~52 min,20%~15% B;52~57 min,15% B。

质谱条件如下:离子化方式:电喷雾离子源(ESI);扫描模式:负离子模式;离子源温度(TST):550℃;离子喷雾电压(ISVF):4 500 V;所充气体均为氮气(高纯99.99%),其中气帘气流(CUR)压力:241 kPa;雾化气(GS1)压力:345 kPa;辅助加热气(脱溶剂气,GS2)压力:345 kPa;碰撞能量(CE): ± 35 eV;碰撞能分散度(CES):15 eV;一级质谱为全扫描采集模式,扫描范围:100~2 000 m/z ;二级质谱为IDA(信息关联)自动扫描采集模式,扫描范围:50~2 000 m/z ;专用高通量操作软件:Analyst TF 1.7.1kit,检测数据库:中药天然产物库。

1.3.3 青柿子提取物对消化酶抑制率试验

1.3.3.1 青柿子提取物对HSA、PPA抑制率的测定 加样方法见表1。青柿子提取物、HSA、PPA和0.5%可溶性淀粉均用10 mmol/L PBS(pH=6.8)配制。将不同质量浓度青柿子提取物溶液(1, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 80, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)分别与5 U/mL HSA(PPA)混匀,于37℃预孵育10 min,再加入0.5%可溶性淀粉,混匀,在37℃反应15 min,最后加入DNS试剂终止反应,于沸水浴5 min,冰水快速冷却至室温,移取120 μL 于96孔板中,于波长

540 nm 处测定吸光值。以阿卡波糖(20,40,60,100,200,300,400,500,600 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 为阳性对照。试验重复 3 次,按公式(1)计算 HSA、PPA 的抑制

率及 IC_{50} 值^[21],计算出样品的抑制率之后,使用 Graphpad prism 软件(LOGIT 法,版本 9.0.0)计算青柿子提取物对酶的半数抑制浓度。

表 1 青柿子提取物对 HSA、PPA 活性抑制测定的加样表(μL)

Table 1 The sample addition table for HSA and PPA activity inhibition assay of the immature persimmon extracts (μL)

试剂	样品组	样品背景组	空白对照组	空白对照背景组
青柿子提取物	60	60	-	-
HSA/PPA	60	-	60	-
PBS	-	60	60	120
37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min				
0.5%可溶性淀粉	120	120	120	120
37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min				
DNS	240	240	240	240

注:“-”表示不加试剂。

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

式中, A_1 ——样品组吸光值; A_2 ——样品背景组吸光值; A_3 ——空白组吸光值; A_4 ——空白背景组吸光值。

1.3.3.2 青柿子提取物对 α -Glu 抑制率试验 青柿子提取物、 α -Glu 酶、PNPG 均用 10 mmol/L PBS (pH=6.8) 配制,加样方法见表 2。分别将不同质量

浓度青柿子提取物溶液 (1,5,10,15,25,40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 与 1 U/mL α -Glu 混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 预孵育 10 min,再加入 5 mmol/L PNPG 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 开始反应 30 min,最后加入 1 mol/L Na_2CO_3 终止反应。静置 2 min 后,于波长 405 nm 处测定其吸光值。以阿卡波糖 (0.1,0.2,0.3,0.5,1,1.5,2,3,5,10,20,40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 为阳性对照。试验重复 3 次,按公式(1)计算 α -Glu 的抑制率及 IC_{50} 值^[22-23]。

表 2 青柿子提取物对 α -Glu 活性抑制测定的加样表(μL)

Table 2 The sample addition table for α -Glu activity inhibition assay of the immature persimmon extracts (μL)

试剂	样品组	样品背景组	空白对照组	空白对照背景组
青柿子提取物	50	50	-	-
α -Glu	50	-	50	-
PBS	-	50	50	100
37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min				
PNPG	50	50	50	50
37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min				
Na_2CO_3	200	200	200	200

静置 2 min 后,移取 100 μL 于 96 孔板,在波长 405 nm 处测吸光值

注:“-”表示不加试剂。

1.3.4 青柿子提取物对 HSA、PPA 和 α -Glu 的抑制动力学分析 使用米氏方程 (Michaelis-Menton) 和 LineweaverBurk 方程确定青柿子提取物对 HSA、PPA 和 α -Glu 的抑制方式^[24],固定 HSA、PPA (5 U/mL) 和 α -Glu (1 U/mL) 酶含量不变,选取不

同的可溶性底物淀粉质量浓度 (1,2,3,4,5 mg/mL) 和底物 PNPG 浓度 (1,2,3,4,5 mmol/L),在添加或不添加青柿子提取物的情况下,按照表 1 和表 2 中样品组的加样方法测定酶促反应速度(v)。以底物添加量 S 的倒数 ($1/S$) 为横坐标,酶促反应

速率的倒数 ($1/v$) 为纵坐标, 作 Lineweaver-Burk 双倒数曲线图, 再通过式 (2)~(5) 计算抑制动力学常数。

动力学方程为:

$$v = \frac{v_m[S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S] \left(1 + \frac{[I]}{K_{is}}\right)} \quad (2)$$

其双倒数方程为:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_m} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_m} \left(1 + \frac{[I]}{K_{is}}\right) \quad (3)$$

以 $1/v$ 对 $1/[S]$ 作图, 直线斜率为:

$$\text{斜率} = \frac{K_m}{v_m} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) = \frac{K_m}{v_m} + \frac{K_m[I]}{v_m K_i} \quad (4)$$

以斜率对 $[I]$ 作图, 其横轴截距为 $-K_i$, 纵轴截距为 K_m/v_m ;

$$\text{截距} = \frac{1}{v_m} \left(1 + \frac{[I]}{K_{is}}\right) = \frac{1}{v_m} + \frac{[I]}{v_m K_{is}} \quad (5)$$

式中, v ——初始速率, $\text{mg/mL} \cdot \text{h}$ ($\text{mmol/L} \cdot \text{h}$); v_m ——最大初始反应速率, $\text{mg/mL} \cdot \text{h}$ ($\text{mmol/L} \cdot \text{h}$); S ——底物添加量, mg/mL (mmol/L); I ——抑制剂质量浓度, $\mu\text{g/mL}$; K_m ——米氏常数, mg/mL (mmol/L); K_i ——竞争抑制常数, mg/mL (mmol/L); K_{is} ——非竞争抑制常数, mg/mL (mmol/L)。

以截距对 $[I]$ 作图, 其横轴截距为 $-K_{is}$, 纵轴截距为 $1/v_m$ 。

根据酶促反应的动力学方程和最大反应速率 v_{\max} 、米氏常数 K_m 、抑制常数 K_i 、 K_{is} 判断提取物对各酶的抑制类型^[25-26]。

1.3.5 青柿子提取物对 HSA、PPA 和 α -Glu 消化酶的荧光猝灭分析 移取 2 mL HSA (10 U/mL) 或 PPA (12 U/mL) 或 α -Glu (2 U/mL) 于 1 cm 荧光比色皿中, 分别加入不同体积的 100 $\mu\text{g/mL}$ 青柿子提取物溶液, 混匀, 静置反应 5 min。其中, HSA 中加入的青柿子提取物体积为 0, 10, 20, 30, 60, 100, 200, 300, 400 μL ; PPA 中加入的青柿子提取物体积为 0, 20, 40, 80, 120, 200, 300, 400, 500 μL ; α -Glu 中加入的青柿子提取物体积为 0, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100 μL 。分别得到 HSA、PPA、 α -Glu 与青柿子提取物的混合反应体系, 用荧光分光光度计, 设置激发波长为 290 nm, 激发和发射光的狭缝宽度均为 5.0 nm, 扫描速度为 1 200

nm/min, 在 300~500 nm 的测定各酶反应体系的荧光发射光谱和光谱强度, 利用 Stern-Volmer 方程计算淬灭常数 K_{sv} , 以单酶为对照, 测定不同温度下青柿子提取物与酶的相互作用。

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}[Q] = 1 + K_q \tau_0 [Q] \quad (6)$$

式中, F_0 ——青柿子提取物与酶作用前的荧光强度; F ——青柿子提取物与酶作用后的荧光强度; K_{sv} ——淬灭常数; $[Q]$ ——青柿子提取物质量 (即淬灭剂) 质量浓度, $\mu\text{g/mL}$; K_q ——双分子淬灭速率常数; τ_0 ——不含淬灭剂时荧光分子的平均寿命, 生物大分子 $\tau_0 \approx 10^{-8}$ s。

静态猝灭函数公式:

$$\ln \left(\frac{F_0 - F}{F} \right) = \lg K_a + n \lg [Q] \quad (7)$$

式中, K_a ——静态结合常数; n ——结合位点数。

以 $\ln[(F_0 - F)/F]$ 对 $\lg[Q]$ 作图, 直线斜率为 n , 纵轴截距为 $\lg K_a$, 得到青柿子提取物与 α -Glu 互作的 n 和 K_a 。

青柿子提取物与 HSA、PPA 的主要作用力类型可以通过 van't-Hoff 方程进行判断, 公式如下:

$$\Delta H = \frac{\ln \left(\frac{K_{a2}}{K_{a1}} \right) \times R}{\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}} \quad (8)$$

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (9)$$

由公式 (10) 计算吉布斯自由能变 (ΔG), 通过 ΔG 判断反应能否自发进行。

$$\Delta G = -RT \ln K_a \quad (10)$$

式中, K_{a1} ——温度 T_1 下的结合常数; K_{a2} ——温度 T_2 下的结合常数; R ——理想气体常数 ($\approx 8.314 \text{ KJ} \cdot \text{mol}^{-1}$); T ——温度 (298 K 或 310 K); ΔH ——焓变, KJ/mol ; ΔS ——熵变, $\text{J/mol} \cdot \text{K}$ 。

1.3.6 青柿子提取物与 HSA、PPA 和 α -Glu 酶作用形态的原子力显微镜 (AFM) 观察 分别移取 20 μL HSA (12 U/mL)、PPA (24 U/mL)、 α -Glu (2 U/mL) 酶溶液于离心管中, 加入 20 μL 500 $\mu\text{g/mL}$ 青柿子提取物溶液, 混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min, 吸取 5 μL 均匀平铺于新鲜剥离的云母片表面, 将云母片移至洁净环境中常温常压干燥 10 h, 置于原子

力显微镜下采用轻敲模式观察酶与青柿子提取物的微观形貌,并以酶液作对照,拍摄尺寸选择 $2\ \mu\text{m}\times 2\ \mu\text{m}$,使用Nanoscope 5.30分析软件处理图像,以分析青柿子提取物与HSA、PPA和 α -Glu酶作用情况。

1.3.7 青柿子提取物对小鼠餐后血糖的影响 将C57BL/6雄性小鼠适应性饲养1周,按照体质量状况随机分为空白组(10 mmol/L PBS, pH 6.8)、阳性对照组(淀粉+阿卡波糖)、阴性对照组(淀粉)和实验组(淀粉+青柿子提取物),每组各8只。其中,淀粉剂量为2 g/kg,青柿子提取物含量为150 mg/kg,阿卡波糖含量为50 mg/kg。实验前小鼠禁食不禁水,禁食13 h后分别测体质量并通过尾尖静脉采血测定空腹血糖值,再按分组情况依次进行灌胃,各分组小鼠分别在给药后0,15,30,60,90,120 min尾部采血,用血糖仪测定各时间点的血糖值。同时,考虑灌胃样品的顺序问题。采用梯形法计算AUC值,用于分析青柿子提取物对小鼠餐后血浆葡萄糖水平的变化影响^[27]。

1.4 数据处理

采用Origin 8.0和SPSS 22.0软件进行数据处理和分析,所有结果均表示为平均值 \pm 标准差。通过单因素方差分析和Dunnett's *t*检验分析组间差异, $P<0.05$ 认为具有显著差异。

2 结果与分析

2.1 青柿子提取物的分离结果

500 g新鲜青柿子果片经冻干、超声辅助丙酮提取、树脂纯化后得到5.24 g冻干粉,得率为1.05%。提取物总酚含量为(581.79 \pm 15.45)mg/g,提取物缩合单宁含量为(692.32 \pm 2.08)mg/g,提取物总黄酮含量为(24.18 \pm 1.78)mg/g。

2.2 青柿子提取物的定性鉴定

青柿子提取物的化学成分采用HPLC-ESI-MS/MS法鉴定结果见表3。由表3可知,青柿子提取物中共鉴定出34种物质,其中酚酸类4种,黄酮类物质18种(异黄酮12种,黄烷酮1种,黄烷醇类4种,查尔酮1种),三萜类12种。主要的酚类成分为没食子酸、鞣花酸、二氢杨梅素、芦丁、山奈酚-3-*O*-龙胆二糖苷、槲皮素-3-*O*-葡萄糖苷、金丝桃苷、紫云英苷、矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷、

木犀草苷、异荭草素、二水槲皮素、儿茶素、表儿茶素、商陆皂苷甲、积雪草酸、常春藤皂苷元、科罗索酸、刺囊酸、甘草次酸、齐墩果酸、熊果酸、白桦脂酸等。

2.3 青柿子提取物对HSA、PPA和 α -Glu活性抑制率试验结果分析

青柿子提取物对HSA、PPA和 α -Glu活性抑制率试验结果见图1。由图1可知,青柿子提取物对HSA、PPA和 α -Glu活性均表现出明显抑制作用,在确定的质量浓度范围内,抑制率与质量浓度之间具有显著的量-效关系。由图1a可知,青柿子提取物对HSA酶活性的抑制率高达(98.63 \pm 0.47)%,且强于对照组阿卡波糖。当提取物质量浓度超过80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 程度后,随提取物质量浓度的增大,酶活性抑制率基本保持不变,这是因为提取物质量浓度达某一程度后,HSA酶的抑制达到饱和状态^[28]。青柿子提取物对HSA酶活性的半抑制浓度(IC_{50})为(16.18 \pm 0.17) $\mu\text{g}/\text{mL}$,阿卡波糖阳性对照对HSA酶活性的半抑制浓度(IC_{50})为(126.20 \pm 0.61) $\mu\text{g}/\text{mL}$,远低于阿卡波糖,说明青柿子提取物对HSA酶活性的抑制效果要远高于阿卡波糖。

由图1b可知,青柿子提取物质量浓度在0~60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内,随提取物质量浓度的增大对PPA酶活性抑制率增大;当提取物质量浓度达60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,对PPA酶活性抑制率最高,达(73.12 \pm 0.11)%;当提取物质量浓度大于60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,对PPA酶活性抑制率随提取物质量浓度增加反而稍由下降;当提取物质量浓度达到150,200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,抑制率分别下降至(72.72 \pm 0.95)%, (72.19 \pm 1.00)%。青柿子提取物对PPA酶活性的半抑制浓度(IC_{50})为(13.57 \pm 0.30) $\mu\text{g}/\text{mL}$,阿卡波糖阳性对照对PPA酶活性的半抑制浓度(IC_{50})为(180.58 \pm 10.51) $\mu\text{g}/\text{mL}$,远低于对照,说明青柿子提取物对PPA酶活性的抑制效果要远高于阿卡波糖。

由图1c可知,当青柿子提取物质量浓度低于25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,对 α -Glu酶活性的抑制率随提取物质量浓度的增加而增加,当提取物质量浓度超过25 $\mu\text{g}/\text{mL}$,对 α -Glu酶活性抑制率随提取物质量浓度的增加趋于稳定,当提取物质量浓度为40 $\mu\text{g}/\text{mL}$,对 α -Glu酶活性的抑制率最高,为(89.19 \pm 0.04)%,相当于阳性对照阿卡波糖质量浓度为

表3 青柿子提取物化学成分鉴定结果

Table 3 The compounds identification result of the immature persimmon extracts							
序号	保留时间/ min	预期质合比/ m·z ⁻¹	检测质合比/ m·z ⁻¹	二级质谱/m·z ⁻¹	分子式	化合物名称	检测面积/ mAU·min
酚酸类	1	169.0143	169.0143	125.0261, 169.0152	C ₇ H ₆ O ₅	没食子酸	21 972
	2	300.9990	300.9988	201.0184, 255.2342, 299.9942	C ₁₄ H ₁₀ O ₈	鞣花酸	314
	3	293.2486	293.2477	185.1229	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	6-姜辣素	336
	4	321.2071	321.2085	96.9611	C ₁₉ H ₃₀ O ₄	8-姜酚	1 014
异黄酮类	5	255.0663	255.0663	213.0553, 255.0653	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	二氢大豆苷元	235
	6	319.0459	319.0460	193.0127	C ₁₅ H ₁₂ O ₈	二氢杨梅素	352
	7	609.1461	609.1459	300.0271, 301.0343	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	芦丁	476
	8	609.1461	609.1459	300.0271, 301.0343	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	山奈酚-3-O-龙胆二糖苷	476
	9	463.0882	463.0878	300.0281, 301.0347, 463.0878	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	槲皮素-3-O-葡萄糖苷	6 501
	10	463.0882	463.0878	300.0281, 301.0347, 463.0878	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	金丝桃苷	6 501
	11	669.1672	669.1675	479.1233, 623.1168	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	沙苑子苷	819
	12	447.0933	447.0926	227.0347, 255.0295, 284.0325	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	紫云英苷	2 757
	13	447.0933	447.0926	284.0325, 285.0401	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	矢车菊素-3-O-葡萄糖苷	2 757
	14	447.0933	447.0926	284.0325, 285.0401	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	木犀草苷	2 757
	15	447.0933	447.0926	284.0325, 285.0401	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	异荭草素	2 757
	16	301.0354	301.0351	149.0244	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	二水槲皮素	336
黄烷酮类	17	255.0663	255.0663	145.0640, 171.0434, 213.0553	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	乔松素	235
黄烷醇类	18	577.1352	577.1354	125.0238, 289.0699, 407.0750	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	原花青素 B2	3 791
	19	305.0667	305.0669	125.0248, 137.0272, 305.0645	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	没食子儿茶素	1 483
	20	289.0718	289.0722	109.0303, 123.0456, 245.0827	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	儿茶素	16 130
	21	289.0718	289.0722	123.0456, 245.0827, 289.1000	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	表儿茶素	16 130
查尔酮类	22	435.1297	435.1294	167.0340, 273.0771, 435.1348	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₀	根皮苷	223
三萜类	23	487.3065	487.3057	None	C ₂₉ H ₄₄ O ₆	远志酸	3 372
	24	515.3014	515.3006	407.2930, 453.3046, 497.2934	C ₃₀ H ₄₄ O ₇	灵芝酸 A	393
	25	825.4278	825.4270	826.4302	C ₄₂ H ₆₆ O ₁₆	商陆皂苷甲	44
	26	487.3429	487.3418	399.3260, 425.3482, 472.3328	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	积雪草酸	593
	27	471.3480	471.3471	453.3436	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	常春藤皂苷元	2 123
	28	471.3480	471.3471	453.3436	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	科罗素酸	2 123
	29	471.3480	471.3471	453.3436	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	刺囊酸	2 123
	30	469.3323	469.3306	409.3124, 425.3394	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	甘草次酸	538
	31	453.3374	453.3356	None	C ₃₀ H ₄₆ O ₃	路路通酸	261
	32	455.3531	455.3521	None	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	齐墩果酸	1 582
	33	455.3531	455.3521	None	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	熊果酸	1 582
	34	455.3531	455.3521	455.4	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	白桦脂酸	1 582

注:None表示没有二级质谱离子碎片峰。

2 $\mu\text{g/mL}$ 时对 $\alpha\text{-Glu}$ 酶活性的抑制率 ($89.17 \pm 0.47\%$)。青柿子提取物对 $\alpha\text{-Glu}$ 酶活性的半抑制浓度 (IC_{50}) 为 $(3.22 \pm 0.03) \mu\text{g/mL}$, 阿卡波糖阳性对照对 $\alpha\text{-Glu}$ 酶活性的半抑制浓度 (IC_{50}) 为 $(0.29 \pm 0.00) \mu\text{g/mL}$, 远远高于对照, 说明青柿子提取物对

$\alpha\text{-Glu}$ 抑制效果远低于阿卡波糖。

综上所述, 青柿子提取物对 HSA、PPA 酶活性抑制较强, 而对 $\alpha\text{-Glu}$ 酶抑制作用较弱, 这跟前人对其它植物多酚研究结果相似^[29]。

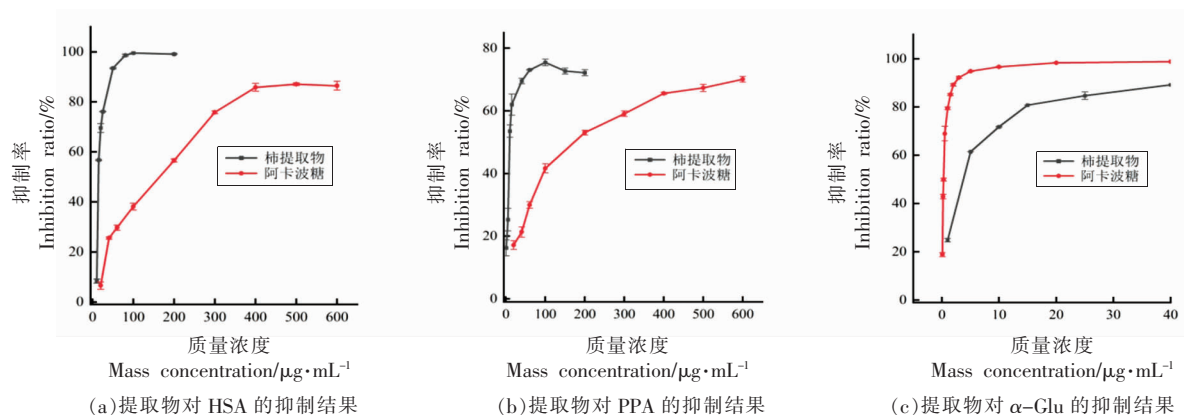


图1 青柿子提取物对 HSA(a)、PPA(b)、 $\alpha\text{-Glu}$ (c)活性的抑制

Fig.1 The inhibition of the persimmon extracts on HSA (a), PPA (b), $\alpha\text{-Glu}$ (c) enzymatic activity

2.4 青柿子提取物对 HSA、PPA 和 $\alpha\text{-Glu}$ 抑制类型的分析

酶促反应的抑制类型分为不可逆性抑制和可逆性抑制, 而可逆性抑制又分为竞争性抑制、非竞争性抑制、及反竞争性抑制 3 种类型。随着抑制剂质量浓度的增加, 竞争性抑制剂的酶促反应动力学的 K_m 值增大, v_{max} 值不变, 非竞争性抑制剂的酶促反应动力学 K_m 值不变, v_{max} 值降低, 反竞争性抑制剂的酶促反应动力学 K_m 减小, v_{max} 降低, 据此可以推断抑制剂的抑制类型。青柿子提取物对 HSA、PPA 和 $\alpha\text{-Glu}$ 酶促反应动力学试验结果见图 2 和表 4。

由图 2a 和表 4 可知, 当没有青柿子提取物存在时, HSA 酶促反应的 K_m 是 34.5592 mg/mL , v_{max} 是 $25.1889 \text{ mg/mL}\cdot\text{h}$, 当青柿子提取物质量浓度为 $20 \mu\text{g/mL}$, 其酶促反应的 K_m 下降至 $15.0179 \text{ mg}\cdot\text{mL}$, v_{max} 下降至 $7.7700 \text{ mg/mL}\cdot\text{h}$, 当青柿子提取物质量浓度增加为 $30 \mu\text{g/mL}$, 其酶促反应的 K_m 进一步下降至 11.1734 mg/mL , v_{max} 进一步下降至 $5.1308 \text{ mg/mL}\cdot\text{h}$ 。不同青柿子提取物质量浓度下的 HSA 酶促反应 Lineweaver-Burk 方程曲线相交于第 3 象限, 且随着青柿子提取物质量浓度的增大, 酶促反应的 K_m 和 v_{max} 均减小, 经计算青柿子

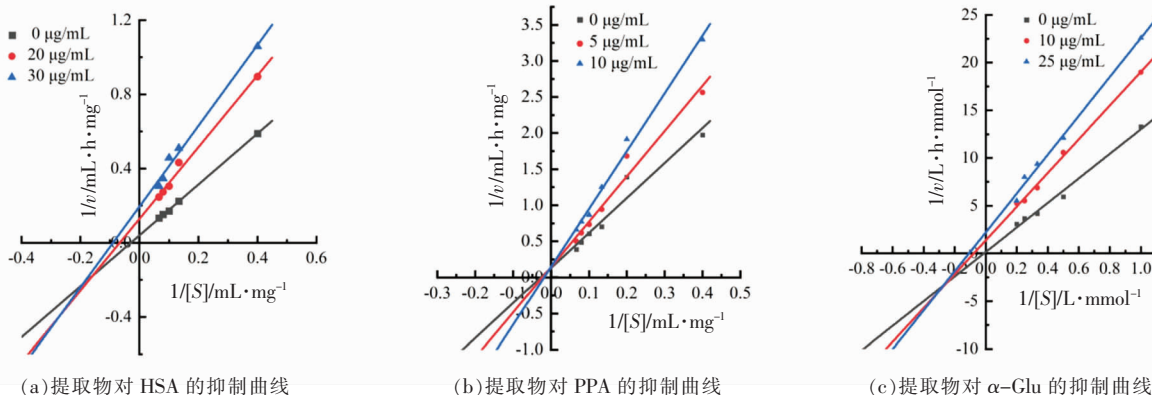
提取物与 HSA 酶的结合常数 K_i 为 51.0037 mg/mL , 而青柿子提取物、底物与酶的结合常数 K_{is} 为 7.1765 mg/mL , $K_i > K_m > K_{is}$, 表明青柿子提取物与 HSA 结合能力 < 酶与底物结合能力 < 提取物-酶-底物结合能力, 是酶与底物先结合后再与抑制结合, 形成更稳定的淀粉-HSA-青柿子提取物复合物, 抑制了酶复合物的解离, 从而抑制了 HSA 酶活性, 说明柿子提取物对 HSA 酶的抑制类型为可逆的反竞争性混合抑制^[30]。

由图 2b 和表 4 知, 当无青柿子提取物存在时, 其 PPA 酶促反应的 K_m 是 36.5618 mg/mL , v_{max} 是 $7.5415 \text{ mg/mL}\cdot\text{h}$; 当青柿子提取物质量浓度为 $5 \mu\text{g/mL}$, 其酶促反应的 K_m 增大至 42.9952 mg/mL , v_{max} 下降至 $6.8446 \text{ mg/mL}\cdot\text{h}$; 当青柿子提取物质量浓度增加为 $10 \mu\text{g/mL}$, 其酶促反应的 K_m 进一步增加至 53.4297 mg/mL , v_{max} 进一步下降至 $6.6756 \text{ mg/mL}\cdot\text{h}$ 。不同青柿子提取物质量浓度下的 PPA 酶促反应的 Lineweaver-Burk 方程曲线相交于第 2 象限, 且随着青柿子提取物质量浓度的增大, 酶促反应的 K_m 增大, v_{max} 减小, 青柿子提取物对 PPA 酶的结合常数 K_i 为 15.1608 mg/mL , 而青柿子提取物、底物与酶的结合常数 K_{is} 为 78.9412 mg/mL , $K_i < K_m < K_{is}$, 表明青柿子提取物与

PPA 结合能力>酶与底物结合能力>提取物-酶-底物结合能力,是提取物先与酶稳定的结合,再与淀粉形成不稳定的提取物-PPA-淀粉复合物,抑制了酶与底物的结合,从而抑制了 PPA 酶活性,说明柿子提取物对 PPA 酶的抑制类型为可逆的竞争性混合抑制^[30]。

由图 2c 和表 5 知,当没有青柿子提取物存在时,其 α -Glu 酶促反应的 K_m 是 89.2580 mmol/L, v_{max} 是 6.9348 mmol/L·h; 当青柿子提取物质量浓度为 10 μ g/mL, 其酶促反应的 K_m 降至 12.9988 mmol/L, v_{max} 降至 0.7352 mmol/L·h; 当青柿子提取物质量浓度增加为 25 μ g/mL, 其酶促反应的 K_m 进一步降至 9.2739 mmol/L, v_{max} 进一步降至 0.4550

mmol/L·h, 不同青柿子提取物质量浓度下的 α -Glu 酶促反应的 Lineweaver-Burk 方程曲线相交于第 3 象限,且随着青柿子提取物质量浓度的增大,酶促反应的 K_m 减小, v_{max} 减小, 青柿子提取物对 PPA 酶的结合常数 K_i 为 46.6804 mmol/L, 而青柿子提取物、底物与酶的结合常数 K_{is} 为 3.7441mmol/L, $K_m > K_i > K_{is}$, 表明底物与 α -Glu 酶结合能力<提取物与酶结合能力<提取物、底物与酶复合物的结合能力,是提取物先于酶结合,再与底物结合形成更稳定的青柿子提取物-PPA-底物复合物,抑制了酶复合物的解离^[30],从而抑制了 α -Glu 酶活性,说明柿子提取物对 α -Glu 酶的抑制类型为可逆的竞争性混合抑制。



(a)提取物对 HSA 的抑制曲线 (b)提取物对 PPA 的抑制曲线 (c)提取物对 α -Glu 的抑制曲线

图 2 不同质量浓度青柿子提取物对 HSA(a)、PPA(b)、 α -Glu(c)酶促反应 Lineweaver-Burk 方程的影响

Fig.2 Effects of the different mass concentration immature persimmon extracts on HSA (a), PPA (b), α -Glu (c) enzymatic reaction Lineweaver -Burk equation

表 4 青柿子提取物对 HSA、PPA 酶促反应动力学常数的影响

Table 4 Effects of immature persimmon extracts on kinetic constants of HSA, PPA enzymatic reaction

青柿子提取物 质量浓度/ μ g·mL ⁻¹	酶	线性拟合方程		R^2	$v_{max}/$ mg·mL ⁻¹ ·h ⁻¹	$K_m/mg \cdot mL^{-1}$	$K_i/mg \cdot mL^{-1}$	$K_{is}/mg \cdot mL^{-1}$
		斜率	截距					
0	HSA	1.3720	0.0397	0.9996	25.1889	34.5592	51.0037	7.1765
20		1.9328	0.1287	0.9909	7.7700	15.0179		
30		2.1777	0.1949	0.9880	5.1308	11.1734		
0	PPA	4.8481	0.1326	0.9587	7.5415	36.5618	15.1608	78.9412
5		6.2816	0.1461	0.9802	6.8446	42.9952		
10		8.0132	0.1498	0.9577	6.6756	53.4927		

表 5 青柿子提取物对 α -Glu 酶促反应动力学常数的影响

Table 5 Effects of immature persimmon extracts on kinetic constants of α -Glu enzymatic reaction

青柿子提取物 质量浓度/ μ g·mL ⁻¹	酶	线性拟合方程		R^2	$v_{max}/$ mmol·L ⁻¹ ·h ⁻¹	$K_m/$ mmol·L ⁻¹	$K_i/$ mmol·L ⁻¹	$K_{is}/$ mmol·L ⁻¹
		斜率	截距					
0	α -Glu	12.8710	0.1442	0.9888	6.9348	89.2580	46.6804	3.7441
10		17.6810	1.3602	0.9961	0.7352	12.9988		
25		20.3830	2.1979	0.9927	0.4550	9.2739		

2.5 青柿子提取物对 HSA、PPA 和 α -Glu 酶的荧光淬灭试验结果分析

蛋白质的荧光主要来自色氨酸残基,因此酶分子中色氨酸残基的荧光强度及其变化能够直接反映出蛋白质空间结构的变化^[31],通过测定酶在抑制剂作用下的荧光变化可以了解抑制剂对酶结构的影响。

图 3、4 和表 6 是青柿子提取物对 HSA、PPA 和 α -Glu 荧光光谱的影响及动力学试验结果。由图 3 可知,随着青柿子提取物质量浓度的增大,HSA、PPA 和 α -Glu 酶的荧光强度均降低,且最大发光波峰产生微弱红移,表明随青柿子提取物可引起这 3 种酶的疏水键断裂,导致酶分子中色氨酸等非极性氨基酸残基逐渐暴露于极性环境中,发生了分子空间结构的变化,从而使酶的内源性荧光被淬灭^[15]。

通过青柿子提取物对 HSA、PPA 和 α -Glu 荧光淬灭的 Stern Volmer 动力学方程分析,可深入阐明淬灭机制。图 4 中的 a、b、c 图分别显示了青柿子提取物对 HSA、PPA 和 α -Glu 荧光淬灭的 Stern Volmer 动力学方程的影响。由图 4a 可知青柿子提取物对 HSA 酶的荧光淬灭 Stern Volmer 方程曲线并非线性,而是凹面弯曲向 y 轴,满足二次函数关系,表明青柿子提取物对 HSA 的淬灭既有动态淬灭也有静态淬灭^[25]。图 4b、4c 分别是青柿子提取物对 PPA、 α -Glu 酶的荧光淬灭 Stern Volmer 方程曲线,均为满足一次函数关系的线性

直线,表明青柿子提取物对 PPA、 α -Glu 酶的荧光淬灭只有一种动态淬灭类型^[25]。

由表 6 的动力学试验结果可知,在青柿子提取物与 HSA 酶反应体系中,温度由 298 K 变为 310 K 时,荧光淬灭常数 K_{sv} 由 1.653×10^2 L/g 升至 1.920×10^2 L/g,荧光淬灭速率常数 K_q 由 1.653×10^{10} L/g 升至 1.920×10^{10} L/g,结合位点 n 由 1.0624 升高 1.0717,静态结合常数 K_a 由 1.000×10^2 L/g 升至 1.087×10^2 L/g,结合常数 K 由 79.5 L/g 升至 81.5 L/g,表明青柿子提取物对 HSA 酶的荧光淬灭以动态淬灭为主^[32],即以分子间碰撞为主,说明温度对青柿子提取物与 HSA 酶分子之间的作用亲和力有一定增强效果^[33],且不存在距离作用^[25],而且结合位点 n 大于 1,表明提取物与酶的作用存在 1 个以上相对独立的结合位点。

同样,在青柿子提取物与 PPA 酶反应体系中,温度由 298 K 变为 310 K 时,荧光淬灭常数 K_{sv} 由 1.019×10^2 L/g 升至 1.463×10^2 L/g,荧光淬灭速率常数 K_q 由 1.019×10^{10} L/g 升至 1.463×10^{10} L/g,结合位点 n 由 1.0346 降低至 0.9476,静态结合常数 K_a 由 0.869×10^2 L/g 升至 1.051×10^2 L/g,结合常数 K 由 55.7 L/g 降至 48.2 L/g,表明青柿子提取物对 PPA 酶的荧光淬灭也是以动态淬灭为主^[32],即以分子间碰撞为主,温度对青柿子提取物与 PPA 酶分子之间的作用亲和力有一定减效作用^[33],存在距离作用^[25],而且结合位点 n 小于 1,表明提取物与酶的作用存在不足 1 个相对独立的结合位点。

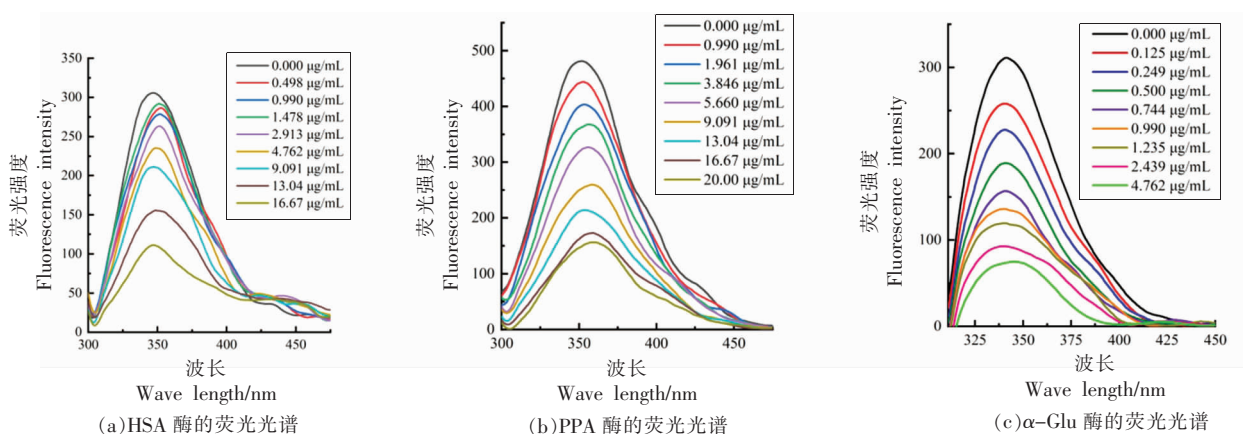


图 3 不同质量浓度青柿子提取物对 HSA(a)、PPA(b)、 α -Glu(c) 荧光发光光谱的影响

Fig.3 Effects of different mass concentration of the immature persimmon extracts on HSA (a)、PPA (b)、 α -Glu (c) fluorescence spectrum

在青柿子提取物与 α -Glu 酶反应体系中, 温度由 298 K 变为 310 K 时, 荧光淬灭常数 K_{sv} 由 12.772×10^2 L/g 降至 9.913×10^2 L/g, 荧光淬灭速率常数 K_q 由 12.772×10^{10} L/g 降至 9.913×10^{10} L/g, 结合位点 n 由 0.8940 降低至 0.8155, 静态结合常数 K_a 由 12.832×10^2 L/g 降至 12.534×10^2 L/g, 结合常数 K 由 749.8 L/g 升至 773.0 L/g, 表明青柿子提取

物对 α -Glu 酶的荧光淬灭是以静态淬灭为主^[34], 即以分子结合方式为主, 温度对青柿子提取物与 α -Glu 酶分子之间的作用亲和力有一定减效作用^[33], 且存在距离作用^[25], 而且结合位点 n 小于 1, 表明提取物与酶的作用存在不足 1 个相对独立的结合位点。

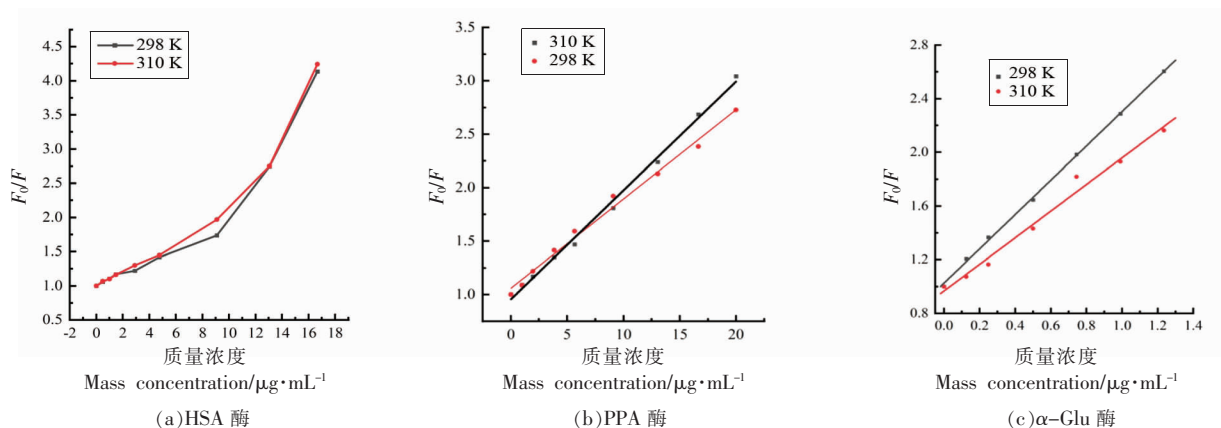


图 4 在 298 K 和 310 K 下青柿子提取物对 HSA(a)、PPA(b)、 α -Glu(c) 荧光淬灭 Stern Volmer 曲线

Fig.4 The Stern Volmer fluorescence quenching curve of persimmon extracts on HSA (a), PPA (b), α -Glu(c) at 298 K and 310 K

表 6 不同温度青柿子提取物与 HSA、PPA、 α -Glu 酶作用的动力学特征常数试验结果

Table 6 The characteristic constants test results of interaction between the immature persimmon extracts and HSA, PPA, α -Glu at different temperatures

淬灭剂	酶	pH 值	T/K	$K_{sv}/$	$K_q/$	R^2	n	$K_a/$	R^2	$K/L \cdot g^{-1}$
				$\times 10^2 L \cdot g^{-1}$	$\times 10^{10} L \cdot g^{-1} \cdot s^{-1}$			$\times 10^2 L \cdot g^{-1}$		
青 柿 子 提 取 物	HSA	6.8	298	1.653	1.653	0.9055	1.0624	1.000	0.9571	79.5
			310	1.920	1.920	0.9257	1.0717	1.087	0.9740	81.5
	PPA		298	1.019	1.019	0.9959	1.0346	0.869	0.9967	55.7
			310	1.463	1.463	0.9907	0.9476	1.051	0.9901	48.2
	α -Glu		298	12.772	12.772	0.9990	0.8940	12.832	0.9977	749.8
			310	9.913	9.913	0.9853	0.8155	12.534	0.9397	773.0

2.6 青柿子提取物与 HSA、PPA 和 α -Glu 酶作用的热力学试验结果分析

青柿子提取物与 HSA、PPA 和 α -Glu 酶作用的热力学试验结果见表 7。由表 7 可知, 青柿子提取物与 HSA 酶作用时的 ΔH 是 5.173 kJ/mol, ΔS 是 55.665 J/K \cdot mol, 298 K 时的 ΔG 是 -11.415 kJ/mol, 310 K 时 ΔG 是 -12.083 kJ/mol, ΔH 、 ΔS 均大于 0, ΔG 小于 0, 可知青柿子提取物与 HSA 酶之间的作用是一种自发的吸热反应过程, 疏水作用

力是驱动青柿子提取物与 HSA 酶结合的主要动力^[35]。

同样, 青柿子提取物与 PPA 酶作用时的 ΔH 是 12.188 kJ/mol, ΔS 是 78.017 J/K \cdot mol, 298 K 时的 ΔG 是 -11.061 kJ/mol, 310 K 时 ΔG 是 -11.997 kJ/mol, ΔH 、 ΔS 均大于 0, ΔG 小于 0, 可知青柿子提取物与 PPA 酶之间的作用也是一种自发的吸热反应过程, 疏水作用力也是驱动青柿子提取物与 PPA 酶结合的主要动力^[35]。

青柿子提取物与 α -Glu 酶作用时的 ΔH 是 -1.503 kJ/mol , ΔS 是 $54.460 \text{ J/K}\cdot\text{mol}$, 298 K 时的 ΔG 是 -17.732 kJ/mol , 310 K 时 ΔG 是 -18.386 kJ/mol , ΔH 小于 0, ΔS 大于 0, ΔG 小于 0, 可知青柿子提取物与 α -Glu 酶之间的作用是一种自发的

放热反应过程, 疏水作用力和特异性静电引力是驱动青柿子提取物与 α -Glu 酶结合的动力, 温度升高不利于二者结合, 这与酶的荧光淬灭分析结果相一致^[36]。

表 7 不同温度下青柿子提取物与 HSA、PPA、 α -Glu 酶作用的热力学试验结果

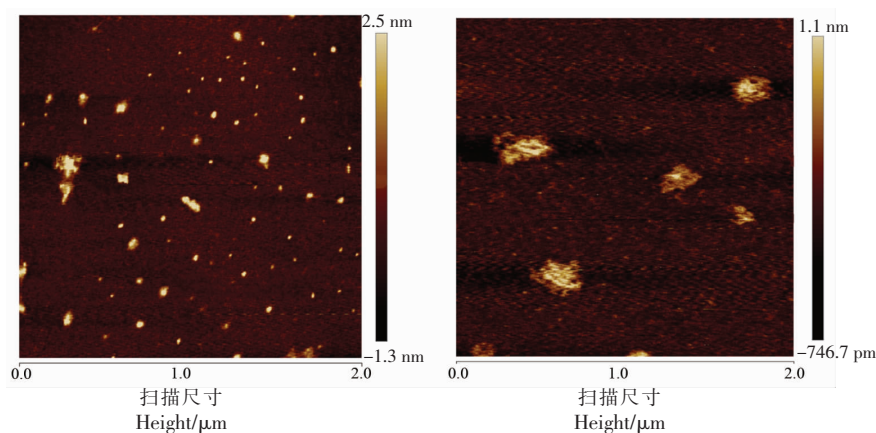
Table 7 The thermodynamics test results of interaction between the immature persimmon extracts and HSA, PPA, α -Glu enzyme at different temperatures

淬灭剂	酶来源	T/K	$\Delta H/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta S/\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$	$\Delta G/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
青柿子提取物	HSA	298	5.173	55.665	-11.415
		310			-12.083
	PPA	298	12.188	78.017	-11.061
		310			-11.997
	α -Glu	298	-1.503	54.460	-17.732
		310			-18.386

2.7 青柿子提取物与 HSA、PPA 和 α -Glu 酶作用的形态分析

青柿子提取物与 HSA、PPA 和 α -Glu 酶作用形态的原子力显微镜图像见图 5。由图 5 可知, 在无青柿子提取物存在时, HSA、PPA、 α -Glu 酶在溶液中都是处于均匀的分散状态, 当在酶溶液中加入青柿子提取物时, 酶就会和青柿子提取物进行结合, 形成明显的聚集形态。从图像上分析可知, HSA 酶在溶液中是均匀分散的不规则形状小颗粒, 当加入 $500 \mu\text{g/mL}$ 青柿子提取物溶液后, 复合物分子整体呈现较不规则的片状分布, 表明 HSA 溶液中加入 $500 \mu\text{g/mL}$ 青柿子提取物时发生了类球状聚集。PPA 酶在溶液中是均匀分散的不规则

球状, 当加入 $200 \mu\text{g/mL}$ 青柿子提取物后, 复合物分子不断聚集最终形成大小不一的合球体或橄榄球状。 α -Glu 酶在溶液中是均匀分散的较规则的球状小颗粒, 当加入 $500 \mu\text{g/mL}$ 青柿子提取物后, 复合物分子整体分布参差不齐, 发生了明显的类片状聚集。综上所述, 当反应体系不存在抑制剂时, 单酶分子分布较均匀, 体积较小, 当加入一定质量浓度的抑制剂后, 复合物分子聚集体的体积明显较单酶的大, 团聚性增强。聚合现象多是由于蛋白酶之间、蛋白酶与抑制剂之间及蛋白酶-抑制剂-蛋白酶之间的相互作用改变了酶周围微环境, 导致平衡状态被打破^[37], 从而降低酶的反应活力^[38]。



(a) HSA 的原子力显微镜图像

(b) HSA 与青柿子提取物的原子力显微镜图像

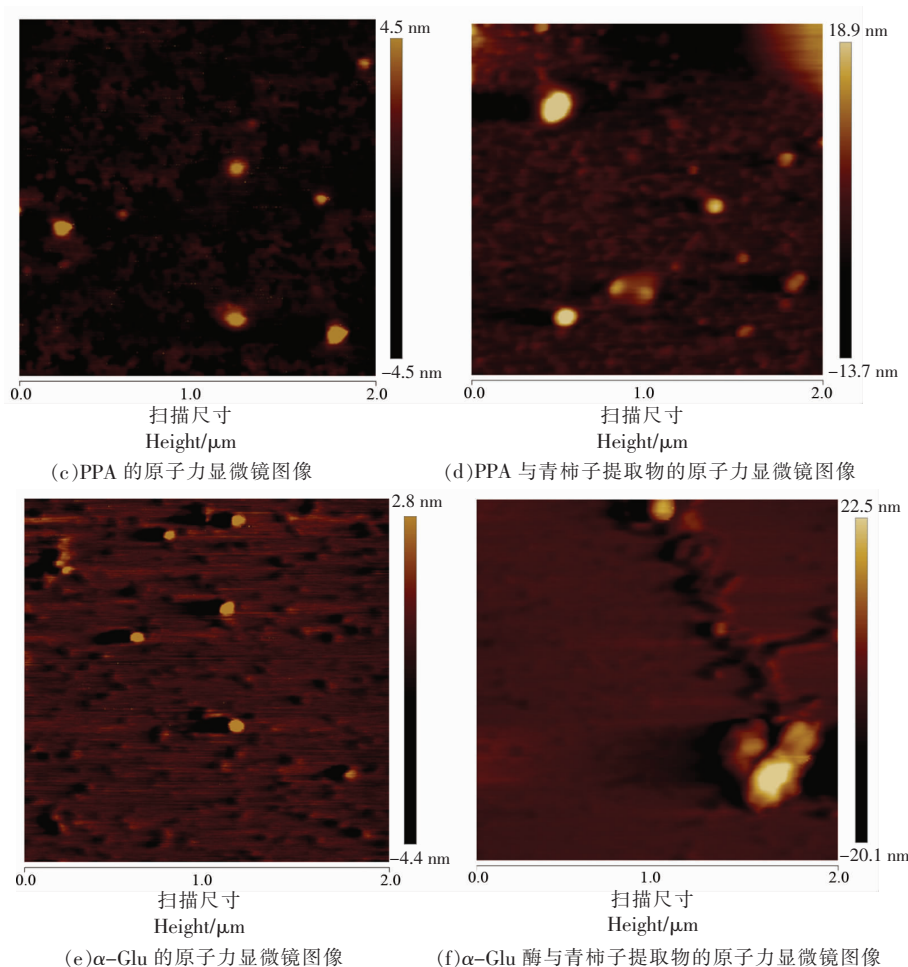


图 5 HSA(a)、PPA(c)和 α -Glu(e)以及提取物-HSA(b)、提取物-PPA(d)和提取物- α -Glu(f)的 AFM 图像

Fig.5 AFM images of HSA (a), PPA (c) and α -Glu (e) and extract-HSA (b), extract-PPA (d) and extract- α -Glu (f)

2.8 青柿子提取物对小鼠餐后血糖影响试验结果分析

从图 6 可知, 无论先灌胃青柿子提取物后灌胃淀粉和先灌胃淀粉后青柿子提取物, 所有组别小鼠在 120 min 内血糖值均呈现先上升再下降最后趋于平稳的状态, 且试验均在 15 min 时血糖值达到最大值。对于先灌胃青柿子提取物后灌胃淀粉试验, 淀粉对照组、阿卡波糖组、青柿子提取物组的最高血糖值分别是 (14.28 ± 1.05) , (10.86 ± 1.30) , (10.22 ± 2.00) mmol/L, 阿卡波糖组、青柿子提取物组最大血糖值比淀粉对照组也分别降低了 23.95% 和 28.43%, 阿卡波糖组、青柿子提取物组的最高血糖水平比淀粉对照组也均有显著降低 ($P < 0.05$), 然而青柿子提取物组与阿卡波糖组之间血糖水平减低差异性也不显著 ($P < 0.05$); 在 2 h

的血糖 AUC 值分别是 (1054.95 ± 76.84) , (899.40 ± 103.01) , (912.30 ± 81.94) mmol/L, 阿卡波糖组、青柿子提取物组比淀粉对照组的血糖 AUC 值分别下降了 14.74% 和 13.52%。对于先灌胃淀粉后灌胃青柿子提取物试验组, 淀粉对照组、阿卡波糖组、青柿子提取物组的最高血糖值分别是 (13.56 ± 0.88) , (11.18 ± 0.88) , (10.10 ± 0.57) mmol/L, 阿卡波糖组的最大血糖值比淀粉对照组降低了 17.55%, 青柿子提取物组降低了 25.52%, 阿卡波糖组、青柿子提取物组的最高血糖水平比淀粉对照组均有显著降低 ($P < 0.05$), 而青柿子提取物组与阿卡波糖组之间血糖水平减低差异性不显著 ($P < 0.05$); 在 2 h 内的血糖 AUC 值分别是 (1020.00 ± 66.33) , (899.85 ± 41.59) , (859.05 ± 36.54) mmol/L, 阿卡波糖组、青柿子提取物组比淀粉对照组的血糖 AUC 值

分别下降了 11.78% 和 15.78%。表明青柿子提取物对小鼠餐后血糖升高有一定抑制效果,其效果与阳性对照阿卡波糖的效果相当,且无论在餐前和餐后灌胃青柿子提取物,青柿子提取物对小鼠餐后血糖升高均有抑制作用。通过独立样本 *t* 检验,

不同灌胃顺序对小鼠血糖水平的降低不存在显著差异性 ($P > 0.05$),因而,无论先灌胃淀粉后青柿子提取物还是先灌胃青柿子提取物后淀粉,对小鼠的血糖水平影响不显著。

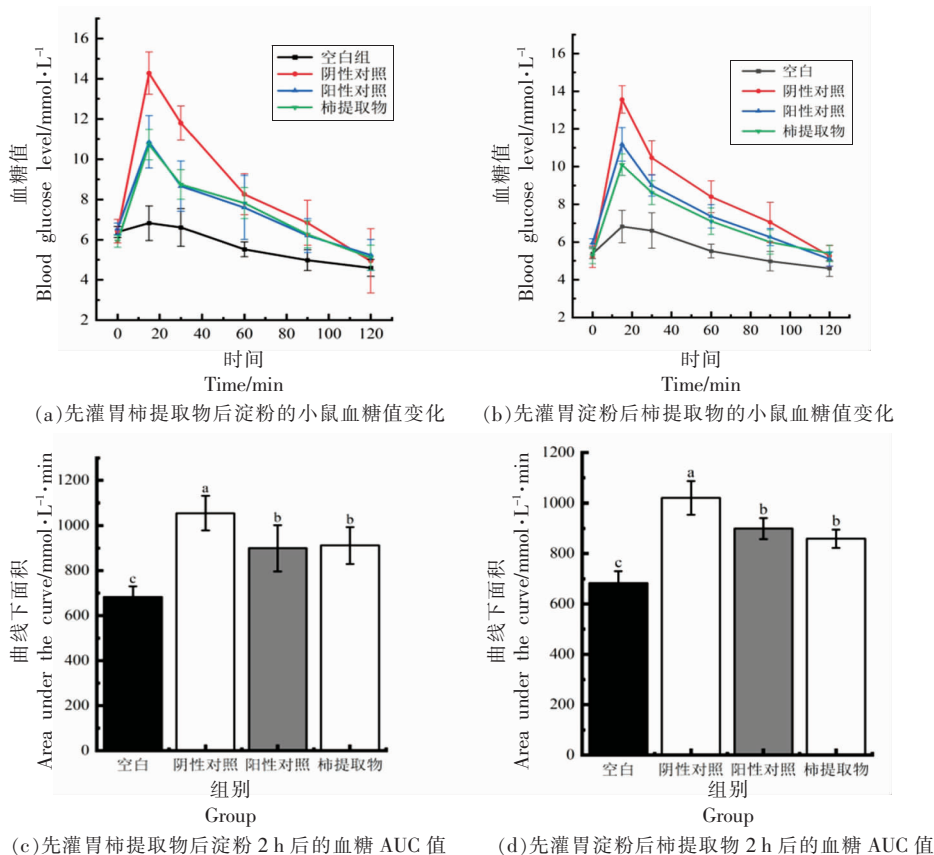


图 6 青柿子提取物对小鼠餐后血糖的影响

Fig.6 Effects of the immature persimmon extracts on postprandial blood glucose in mice

3 结论

1) 青柿子的冻干物经超声波丙酮提取和大孔树脂纯化处理,提取物得率可达 1.05%,提取物中的总酚、缩合单宁、总黄酮含量分别为 581.79 g GAE/kg, 692.32 g CE/kg, 24.18 RE/kg, 最少含 4 种酚酸、12 种异黄酮、1 种黄烷酮、4 种黄烷醇、1 种查尔酮、12 种三萜等 34 种组分。

2) 青柿子提取物对 HSA 酶活性的抑制率高达 98.63%,对 PPA 酶活性抑制率高达 73.12%,对 α -Glu 酶活性的抑制率高达 89.19%。青柿子提取物对 HSA、PPA、 α -Glu 酶的活性半抑制浓度值分别是 16.18, 13.57, 3.22 μ g/mL。通过酶动力学分析知,青柿子提取物对 HSA 酶是可逆的反竞争性抑

制,对 PPA、 α -Glu 酶是可逆的竞争性混合抑制。

3) 青柿子提取物与 HSA 酶之间有一个结合位点,能自发的吸热通过疏水作用力驱动,发生分子碰撞,形成提取物包裹 HSA 酶的不规则聚集体,从而导致酶的色氨酸发色残基发生空间结构变化,引起酶的动态为主的荧光猝灭,降低酶的活性。青柿子提取物与 PPA、 α -Glu 酶之间也都有一个结合位点,能自发的通过疏水作用力和特异性静电引力驱动,使酶分子与提取物之间发生分子聚合,PPA 酶吸收热量, α -Glu 酶放出热量,形成提取物包裹 PPA、 α -Glu 酶的不规则球形聚集体,从而导致酶的色氨酸发色残基发生空间结构变化,引起酶的静态荧光猝灭,降低了酶的活性。

4) 动物餐后血糖实验结果表明,青柿子提取物无论在餐前和餐后灌胃青柿子提取物,对小鼠餐后最大血糖值和血糖升高均有明显降低效果,其效果与阳性对阿卡波糖的效果相当,能改善小鼠的淀粉耐量,降低淀粉负荷后血糖水平。

5) 青柿子提取物降血糖的机理可能是通过抑制了唾液淀粉酶、胰液淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶活性从而降低了淀粉的消化和葡萄糖的吸收。

参 考 文 献

- [1] 任维维, 吴焯婷, 梁宗瑶, 等. 青柿子提取物的抗氧化, 抑菌, 抑癌活性研究[J]. 中国食品学报, 2021, 21(17): 29-38.
REN W W, WU Y T, LIANG Z Y, et al. Research on antioxidative, antibacterial and anticancer activity of the immature persimmon extracts[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(17): 29-38.
- [2] KONG X R, ZHU Z Y, ZHANG X J, et al. Effects of *Cordyceps* polysaccharides on pasting properties and *in vitro* starch digestibility of wheat starch[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 102: 105604.
- [3] ZHOU C, MAO K M, LI J, et al. Antioxidant and α -glucosidase inhibitory capacity of nonextractable polyphenols in Mopan persimmon[J]. Food Science & Nutrition, 2020, 8(10): 5729-5737.
- [4] GONZÁLEZ C M, LLORCA E, QUILES A, et al. An *in vitro* digestion study of tannins and antioxidant activity affected by drying 'Rojo Brillante' persimmon[J]. LWT, 2022, 155: 112961.
- [5] ZHOU Z D, HUANG Y, LIANG J T, et al. Extraction, purification and anti-radiation activity of persimmon tannin from *Diospyros kaki* L.f.[J]. Journal of Environmental Radioactivity, 2016, 162: 182-188.
- [6] 陆笛, 黄思婕, 龙明华, 等. '恭城月柿'不同生育期果实和叶片单宁组分含量的变化[J]. 广西植物, 2020, 40(5): 735-743.
LU D, HUANG S J, LONG M H, et al. Changes of tannin component content in persimmon fruits and leaves at different growth and development periods[J]. Guihaia, 2020, 40(5): 735-743.
- [7] AN X W, FENG R F, YANG J, et al. Tannin extraction and changes in content during the maturation of Mopan persimmon fruits[J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2021, 15(5): 3985-3993.
- [8] LI K K, YAO F, DU J, et al. Persimmon tannin decreased the glycemic response through decreasing the digestibility of starch and inhibiting α -amylase, α -glucosidase, and intestinal glucose uptake[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(7): 1629-1637.
- [9] TESSMER M A, BESADA C, HERNANDO I, et al. Microstructural changes while persimmon fruits mature and ripen. Comparison between astringent and non-astringent cultivars[J]. Postharvest Biology and Technology, 2016, 120: 52-60.
- [10] MANUKUMAR H M, KUMAR J S, CHANDRASHEKAR B, et al. Evidences for diabetes and insulin mimetic activity of medicinal plants; Present status and future prospects[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2016, 57(12): 2712-2729.
- [11] SAEEDI P, PETERSOHN I, SALPEA P, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition[J]. Diabetes Research and Clinical Practice, 2019, 157: 107843.
- [12] YAN J K, ZHANG G W, PAN J H, et al. α -Glucosidase inhibition by luteolin: Kinetics, interaction and molecular docking[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2014, 64: 213-223.
- [13] 乔锦莉, 张妍, 刘佩, 等. 野生蓝果忍冬多酚鉴定及其抗氧化、降血糖活性[J]. 食品科学, 2021, 42(11): 47-55.
QIAO J L, ZHANG Y, LIU P, et al. Polyphenol composition and antioxidant and hypoglycemic activities in wild blue honeysuckle fruit[J]. Food Science, 2021, 42(11): 47-55.
- [14] 姚芬. 柿单宁对淀粉消化特性的影响及其机制研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2017.
YAO F. Study on the effects of persimmon tannin on starch digestibility and its mechanism[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2017.
- [15] SUN L, WARREN F J, GIDLEY M J, et al. Mechanism of binding interactions between young apple polyphenols and porcine pancreatic α -amylase[J]. Food Chemistry, 2019, 283: 468-474.

- [16] ZHANG B W, LI X, SUN W L, et al. Dietary flavonoids and acarbose synergistically inhibit α -glucosidase and lower postprandial blood glucose [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(38): 8319–8330.
- [17] 赵二劳, 赵三虎, 范建凤, 等. 天然产物中活性成分对 α -淀粉酶抑制作用研究进展[J]. *食品研究与开发*, 2020, 41(19): 199–203.
ZHAO E L, ZHAO S H, FAN J F, et al. Research progress on the inhibition of α -amylase by active ingredients in natural products[J]. *Food Research and Development*, 2020, 41(19): 199–203.
- [18] SUN L J, MIAO M. Dietary polyphenols modulate starch digestion and glycaemic level: A review[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2020, 60(4): 541–555.
- [19] 何肖, 王文凯, 马明波, 等. 香草醛盐酸法定量薯蓣色素提取液中的缩合单宁[J]. *现代纺织技术*, 2014, 22(6): 5–8.
HE X, WANG W K, MA M B, et al. Quantification of condensed tannin in *Dioscorea cirrhosa* lour pigment extracting solution with vanillin-hydrochloric acid method[J]. *Advanced Textile Technology*, 2014, 22(6): 5–8.
- [20] 秦晶晶, 钱慧琴, 赵媛, 等. 柿叶总黄酮提取工艺优化及其抗氧化活性[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(13): 32–38, 45.
QIN J J, QIAN H Q, ZHAO Y, et al. Optimization of the extraction technology of total flavonoids and *in vitro* antioxidant activity of extract from persimmon leaves[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(13): 32–38, 45.
- [21] 李云姣, 李琪, 杜佳峰, 等. 水果酵素体外抗氧化及抑制 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶活性的研究[J]. *中国食品学报*, 2019, 19(4): 79–84.
LI Y J, LI Q, DU J F, et al. Antioxidant activity and inhibitory effects on α -amylase and α -glucosidase of fermented fruit juice *in vitro*[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2019, 19(4): 79–84.
- [22] 卫强, 徐飞. 红叶李花中总黄酮提取工艺及抑制 α -葡萄糖苷酶活性研究[J]. *核农学报*, 2016, 30(12): 2391–2401.
WEI Q, XU F. Extraction process of flavonoids from the flower of purple-leaf plum and α -glucosidase inhibition activities[J]. *Journal of Nuclear Agriculture Sciences*, 2016, 30(12): 2391–2401.
- [23] 王占一, 张立华, 王玉海, 等. 超声波辅助纤维素酶提取石榴幼果多酚及其抑制 α -葡萄糖苷酶活性[J]. *食品科学*, 2017, 38(18): 214–221.
WANG Z Y, ZHANG L H, WANG Y H, et al. Optimization of ultrasonic-assisted cellulase-based extraction and anti- α -glucosidase activity of polyphenols from pomegranate fruitlets[J]. *Food Science*, 2017, 38(18): 214–221.
- [24] SUN L J, WANG Y Y, MIAO M. Inhibition of α -amylase by polyphenolic compounds: Substrate digestion, binding interactions and nutritional intervention[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2020, 104: 190–207.
- [25] SOARES S, MATEUS N, DE FREITAS V. Interaction of different polyphenols with bovine serum albumin (BSA) and human salivary α -amylase (HSA) by fluorescence quenching[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(16): 6726–6735.
- [26] CAI X, YU J N, XU L M, et al. The mechanism study in the interactions of sorghum procyanidins trimer with porcine pancreatic α -amylase[J]. *Food Chemistry*, 2015, 174: 291–298.
- [27] TIAN J L, SI X, WANG Y H, et al. Bioactive flavonoids from *Rubus corchorifolius* inhibit α -glucosidase and α -amylase to improve postprandial hyperglycemia[J]. *Food Chemistry*, 2021, 341: 128149.
- [28] SUN L J, WARREN F J, NETZEL G, et al. 3'-Galloyl substitution plays an important role in association of catechins and theaflavins with porcine pancreatic α -amylase: The kinetics of inhibition of α -amylase by tea polyphenols[J]. *Journal of Functional Foods*, 2016, 26: 144–156.
- [29] XU J, CAO J Q, YUE J J, et al. New triterpenoids from acorns of *Quercus liaotungensis* and their inhibitory activity against α -glucosidase, α -amylase and protein-tyrosine phosphatase 1B[J]. *Journal of Functional Foods*, 2018, 41: 232–239.
- [30] DIXON M. The determination of enzyme inhibitor constants [J]. *Biochemical Journal*, 1953, 55(1): 170.
- [31] 王静, 刁翠茹, 王华丽, 等. 鼠尾草酸对 α -淀粉酶的抑制作用[J]. *食品科学*, 2020, 41(3): 12–17.
WANG J, DIAO C R, WANG H L, et al. Inhibitory mechanism of carnosic acid on α -amy-

- lase[J]. Food Science, 2020, 41(3): 12–17.
- [32] HAN Q Y, LIU F, HAO Y L, et al. Characterization of membrane-bound polyphenol oxidase from Granny Smith apple (*Malus × domestica* Borkh.)[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 158: 977–984.
- [33] 任顺成, 万毅, 李林政, 等. 栀子黄对淀粉消化酶的抑制动力学及相互作用研究[J]. 中国食品学报, 2021, 21(9): 38–47.
- REN S C, WAN Y, LI L Z, et al. Studies on the inhibition kinetics and interaction mechanism of gardenia yellow on starch digestive enzyme[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(9): 38–47.
- [34] 朱林卉, 唐初, 杨光忠, 等. 齐墩果酸衍生物与查耳酮的缀合物和 α -葡萄糖苷酶的相互作用研究[J]. 华中师范大学学报(自然科学版), 2013, 47(2): 204–208, 217.
- ZHU L H, TANG C, YANG G Z, et al. Study on the interaction of oleanolic acid derivatives with chalcone conjugates and α -glucosidase[J]. Journal of Central China Normal University: Natural Science Edition, 2013, 47(2): 204–208, 217.
- [35] PAUL B K, GHOSH N, MUKHERJEE S. Binding interaction of a prospective chemotherapeutic antibacterial drug with β -lactoglobulin: Results and challenges[J]. Langmuir, 2014, 30(20): 5921–5929.
- [36] 严晓琳, 袁培耘, 李欣, 等. 灯盏花乙素与 α -葡萄糖苷酶相互作用的研究[J]. 贵州师范大学学报(自然科学版), 2013, 31(5): 79–83.
- YAN X L, YUAN P Y, LI X, et al. Investigation of interaction between scutellarin and α -glucosidase[J]. Journal of Guizhou Normal University: Natural Sciences, 2013, 31(5): 79–83.
- [37] GAO W H, LI N, CHEN Y W, et al. Study of interaction between syringin and human serum albumin by multi-spectroscopic method and atomic force microscopy[J]. Journal of Molecular Structure, 2010, 983(1/2/3): 133–140.
- [38] 严尚隆, 潘创, 杨贤庆, 等. 长松藻多糖降解, 结构表征及降血糖活性测定[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(18): 119–126.
- YAN S L, PAN C, YANG X Q, et al. Degradation, structural characterization and hypoglycemic activity of polysaccharides from *Codium cylindricum* [J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(18): 119–126.

Inhibition Activity of Immature Persimmon Extract on Digestive Enzymes and Research on Hypoglycemic Effect

Liu Jing, Ren Weiwei, Qu Jialin, Li Minmeng, Liu Xiaojuan, Duan Xuchang*
(College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi)

Abstract In order to explore the inhibitory effects of immature persimmon extract on human salivary α -amylase (HSA), porcine pancreatic α -amylase (PPA), α -glucosidase (α -Glu) and changes in postprandial blood glucose immature persimmon extract on mouse, the immature persimmon extracts was prepared by ultrasound-assisted acetone extraction and macroporous resins purification using immature persimmon as raw material. The *in vitro* enzyme inhibition effect and mechanism of action of immature persimmon extract were analyzed by enzyme activity inhibition rate, enzyme kinetics and enzyme fluorescence quenching assay, and finally the control effect of immature persimmon extract on postprandial blood glucose level was verified by animal test. The results showed that immature persimmon extracts inhibited the activities of HSA, PPA and α -Glu, and the types of inhibition were all mixed, with half-inhibitory concentration values (IC_{50}) of (16.18 \pm 0.17), (13.57 \pm 0.30) μ g/mL and (3.22 \pm 0.03) μ g/mL, respectively. There was all one binding site between the three enzymes and the extracts, indicating that the interaction of immature persimmon extract with the fluorescent chromophores of HSA, PPA and α -Glu spontaneously forms a complex that causes alteration of the microenvironment around the chromophores of HSA, PPA and α -Glu and quenching of the endogenous fluorescence of the enzymes, thus the enzymatic activity was inhibited. Animal experiments revealed that immature persimmon extract significantly reduced postprandial blood glucose levels in mice indicated immature persimmon extract could reduce postprandial blood glucose level by inhibiting HSA, PPA and α -Glu activities.

Keywords immature persimmon extract; α -amylase; α -glucosidase; enzyme activity mechanism; postprandial blood sugar