

# 维生素 C 对嗜酸乳杆菌 GIM1.208 $\beta$ -葡萄糖苷酶激活效应及分子互作关系

江桂兰, 王翼, 丁筑红\*, 李彬彬

贵州大学酿酒与食品工程学院 国家林业和草原局刺梨工程技术研究中心 贵州省刺梨研究院,  
贵州 贵阳 550025

江桂兰, 王翼, 丁筑红, 李彬彬. 维生素 C 对嗜酸乳杆菌 GIM1.208  $\beta$ -葡萄糖苷酶激活效应及分子互作关系[J]. 微生物学通报, 2023, 50(12): 5392-5403.

JIANG Guilan, WANG Yi, DING Zhuhong, LI Binbin. Effect of vitamin C on the activation of  $\beta$ -glucosidase in *Lactobacillus acidophilus* GIM1.208 and the interaction between them[J]. Microbiology China, 2023, 50(12): 5392-5403.

**摘要:** 【背景】研究发现维生素 C (vitamin C, VC)对嗜酸乳杆菌 GIM1.208  $\beta$ -葡萄糖苷酶 ( $\beta$ -glucosidase, BGL)具有明显激活作用。【目的】探究 VC 对 BGL 的影响特性以及二者互作关系。【方法】通过对硝基苯酚法、电化学法、Zeta 电位法及核磁共振氢谱法研究 VC 对 BGL 的活性影响及互作特性。【结果】VC 对 BGL 催化底物活性具有明显促效作用,  $K_m=1.167$  mmol/L,  $V_{max}$  随着 VC 浓度增大而增大; VC 浓度为 3.5%时酶活性达到最高; 在 VC 浓度为 3.5%、温度低于 30 °C时, 酶活性受温度影响较小, VC 对 BGL 具有良好的稳定作用, 相对酶活保持在 90%以上。VC 与 BGL 结合, 两者存在弱静电作用且两者的相互作用使得 VC 的电氧化反应变得更加容易, 同时推测 VC 分子中乙二醇支链片段与 BGL 之间存在氢键作用。【结论】VC 对 BGL 具有明显激活作用, 试验探究了两者作用力类型及作用位点, 为 BGL 应用及天然酶激活剂的高效利用提供设计理论参考。**关键词:**  $\beta$ -葡萄糖苷酶; 维生素 C; 酶活性; 相互作用; 动力学参数; 嗜酸乳杆菌 GIM1.208

资助项目: 国家自然科学基金(32160532)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32160532).

\*Corresponding author. E-mail: gzdxzdh@163.com

Received: 2023-04-20; Accepted: 2023-06-29; Published online: 2023-08-08

## Effect of vitamin C on the activation of $\beta$ -glucosidase in *Lactobacillus acidophilus* GIM1.208 and the interaction between them

JIANG Guilan, WANG Yi, DING Zhuhong\*, LI Binbin

Guizhou Rosa Roxburghii Research Institute, Engineering Technology Research Center for Rosa Roxburghii of National Forestry and Grassland Administration, School of Liquor and Food Engineering, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou, China

**Abstract:** [Background] A preliminary study showed that vitamin C (VC) had a significant activation effect on the  $\beta$ -glucosidase (BGL) from *Lactobacillus acidophilus* GIM1.208. [Objective] To explore the effect of VC on BGL and the interaction between VC and BGL. [Methods] The 4-nitrophenol method, electrochemistry, Zeta potential, and nuclear magnetic resonance were employed to study the effect of VC on BGL activity and the interaction characteristics. [Results] VC exerted a significant effect on the catalytic activity of BGL, with  $K_m=1.167$  mmol/L, and the  $V_{max}$  increased with the increase in VC concentration. BGL presented the highest activity when the VC concentration was 3.5%. At the VC concentration of 3.5% and a temperature below 30 °C, the BGL activity was barely affected by temperature, and VC had a good stabilizing effect on BGL, which showed the relative activity above 90%. VC can bind to BGL, and the weak electrostatic interaction between VC and BGL facilitated the electrooxidation of VC. We hypothesized that there was a hydrogen bond between the ethylene glycol branch chain in VC molecule and BGL. [Conclusion] VC can activate BGL. We studied the type and site of interaction between VC and BGL, aiming to provide a theoretical reference for the application of BGL and the efficient utilization of natural enzyme activators.

**Keywords:**  $\beta$ -glucosidase; vitamin C; enzyme activity; interaction; kinetic parameters; *Lactobacillus acidophilus* GIM1.208

维生素 C (vitamin C, VC), 也称为抗坏血酸, 具有抗氧化、抗肿瘤、抗衰老和抗炎作用<sup>[1]</sup>, 被广泛用作抗氧化剂<sup>[2]</sup>。VC 作为果蔬原料中重要的维生素, 可与酶蛋白分子以非共价键作用影响酶的活性中心, 改变酶的催化活性<sup>[3-4]</sup>, 使其在生物转化及酶工程领域中具有较大的应用价值。目前关于 VC 与其他物质(如血清蛋白<sup>[5]</sup>、多酚氧化酶<sup>[6]</sup>)间相互作用的研究逐渐受到学者们的关注, 旨在进一步提升其应用价值。

$\beta$ -葡萄糖苷酶( $\beta$ -glucosidase, EC3.2.1.21,

BGL)又被称作  $\beta$ -葡萄糖苷水解酶, 可水解末端、非还原性的羟基- $\beta$ -葡萄糖苷或芳香基- $\beta$ -葡萄糖苷<sup>[7]</sup>, 参与糖代谢、降解纤维素和转化黄酮糖苷等, 被广泛应用于酒精生产、食品、医疗和化学工业等领域<sup>[8-11]</sup>。目前国内的  $\beta$ -葡萄糖苷酶制剂多通过发酵方式获取, 但这种方式生产的酶活性较低<sup>[12-13]</sup>。为了解决这些问题, 研究人员常通过诱变育种<sup>[14]</sup>、基因改造<sup>[15]</sup>等方式提高产酶量和酶活性, 但这些手段较复杂、成本高, 制约了技术的应用推广。

前期研究发现, 益生菌嗜酸乳杆菌

GIM1.208 产 BGL 具有良好的应用特性<sup>[16]</sup>, 果蔬原料天然活性组分 VC 对其活性具有明显激活作用, 然而 VC 与嗜酸乳杆菌 GIM1.208 来源 BGL 相互作用的研究较少。因此, 本研究通过对硝基苯酚法、电化学法、Zeta 电位法及核磁共振氢谱法研究, 探究 VC 与 BGL 相互作用的特性、相互作用的主要作用力类型、结合部位及氧化还原性质等, 揭示 VC 与 BGL 作用关系, 以期为食品中 VC 和 BGL 的生物利用以及促进食品资源生物转化提供理论参考。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

嗜酸乳杆菌 GIM1.208  $\beta$ -葡萄糖苷酶由本课题组前期纯化保存<sup>[17]</sup>。

**BGL 粗酶液:** 将嗜酸乳杆菌菌粉(广东省微生物菌种保藏中心)接种在 MRS 肉汤培养基<sup>[18]</sup>, 充分摇匀, 在 37 °C 培养箱中静置培养 48 h, 传代 3–4 次, 取培养液在 8 000 r/min、4 °C 离心 10 min, 上清液即为粗酶液, 活性为 (1.7±0.2) U/mL。

对硝基苯酚(4-nitrophenol, p-NP)、柠檬酸、磷酸氢二钠, 天津市科密欧化学试剂有限公司; 4-硝基苯基- $\beta$ -D-葡萄糖苷(4-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside, p-NPG), Sigma 公司; VC、氯化钠, 国药集团化学试剂有限公司, 重水、氯化铝, 上海麦克林生化科技股份有限公司; 三羟甲基氨基甲烷(Tris), 阿拉丁试剂(上海)有限公司; MRS 肉汤培养基, 上海博微生物科技有限公司。

生化培养箱, 上海博迅实业有限公司医疗设备厂; 紫外-可见分光光度计, 上海仪器分析仪器有限公司; 台式高速冷冻离心机, 长沙迈佳森仪器设备有限公司; 电化学工作站, 上海辰华仪器有限公司; Zeta 电位及粒径分析仪,

贝克曼库尔特公司; 核磁共振波谱仪, 电子株式会社。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 不同反应条件对 VC 激活 BGL 活性的影响

##### 1) 不同浓度 VC 对 BGL 催化活性的影响

取 5 mL 粗酶液于离心管中, 向粗酶液中添加 0.025 g VC, 得到 VC 浓度为 0.5% 的混合体系。以相同的方法配制 VC 浓度分别为 0.0%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、3.5%、4.0%、4.5%、5.0%、5.5% 和 6.0% 的混合体系。待 VC 完全溶于粗酶液后测定其酶活, 以催化反应体系最高酶活为 100%, 计算相对酶活。酶活力测定参考丁小娟<sup>[18]</sup>的对硝基苯酚法: 取 0.1 mL 粗酶液, 加入 0.9 mL 0.2 mol/L 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(pH 5.0), 于 37 °C 预热 10 min; 加入 1 mL 同样已预热 10 min 的 3 mmol/L p-NPG 溶液; 保温计时 10 min 后加入 1 mL 1 mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液, 室温放置 3 min, 在 400 nm 处测定吸光度值 A。在 37 °C、pH 5.0 条件下, 以每分钟酶解 p-NPG 产生 1  $\mu$ mol p-NP 所需酶量为 1 个酶活单位(U)。

##### 2) 不同温度条件下 VC 对 BGL 催化活性的影响

取 6 份 5 mL 粗酶液于离心管中, 分别添加 0.175 g VC, 待 VC 完全溶于粗酶液后分别在 4、10、20、30、40 和 50 °C 条件下保存 30 min 后测定其酶活, 重复 3 次试验并做空白对照。以所测得的最高酶活为 100%, 计算相对酶活。

##### 3) 反应时间对 VC 激活 BGL 活性作用

取 5 份 5 mL 粗酶液于离心管中, 分别添加 0.175 g VC, 得到 VC 浓度为 3.5% 的混合体系, 待 VC 完全溶于粗酶液, 在 10 °C 条件下分别放置 30、60、90、120 和 150 min 后测定 BGL 的酶活, 重复 3 次试验并做空白对照。以所测得的最高酶活为 100%, 计算相对酶活。

### 1.2.2 VC 对 BGL 催化底物反应动力学参数的影响

取 5 mL 粗酶液于离心管中, 向粗酶液中添加 0.025 g VC, 得到 VC 浓度为 0.5% 的混合体系。以相同的方法, 配制 VC 浓度分别为 0.0%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0% 和 3.5% 的混合体系, 待 VC 完全溶于粗酶液后在 4 °C 放置 30 min, 测定不同底物浓度(p-NPG: 0.5–5.0 mmol/L)下 BGL 的酶活性, 利用 Lineweaver-Burk 双倒数曲线作图法计算  $K_m$  和  $V_{max}$  值。比较添加 VC 前后 BGL 动力学参数的变化。

### 1.2.3 VC 与 BGL 相互作用的电化学分析

采用循环伏安法参考马慧婷<sup>[19]</sup>的方法并作修改。电极预处理方法: 将电极用 0.3  $\mu\text{m}$  和 0.05  $\mu\text{m}$  的  $\text{Al}_2\text{O}_3$  粉末打磨并抛光至镜面, 然后依次用清水、乙醇和超纯水中超声(300 W, 5 min)清洗后于 pH 7.4 的 Tris-NaCl 缓冲溶液中活化。测试范围为 -0.4–1.6 V, 扫描速度为 50 mV/s。实验温度为室温, 试验过程中所用溶剂在使用前通高纯氮气 15 min, 去除溶剂中溶解氧。

VC 样品: 先称取 0.017 6 g 的 VC 放置于 10 mL 容量瓶中, 用 pH 7.4 的 Tris-NaCl 缓冲溶液溶解并定容, 再逐步稀释到浓度为  $0.6 \times 10^{-4}$ 、 $1.2 \times 10^{-4}$ 、 $2.4 \times 10^{-4}$ 、 $4.8 \times 10^{-4}$ 、 $9.6 \times 10^{-4}$  和  $19.2 \times 10^{-4}$  mol/L 的 VC 溶液。根据 VC 溶液浓度从小到大进行循环伏安测试。

VC-BGL 混合样品: 称取 0.008 5 g VC 用 Tris-NaCl 缓冲液溶解并定容至 25 mL。取一定量纯化的 BGL 于 5 mL 容量瓶中, 再逐步稀释到浓度为  $0.00 \times 10^{-8}$ 、 $6.25 \times 10^{-9}$ 、 $1.25 \times 10^{-8}$ 、 $2.50 \times 10^{-8}$ 、 $5.00 \times 10^{-8}$  和  $10.00 \times 10^{-8}$  mol/L 的 BGL 溶液, 取 2 mL 加入等量的 VC 溶液, 定容。根据 BGL 溶液浓度由小到大进行循环伏安测试。

### 1.2.4 VC 与 BGL 相互作用的 Zeta 电位分析

参考路艳芳<sup>[20]</sup>的方法并作修改, 取 300  $\mu\text{L}$

浓度为  $1 \times 10^{-5}$  mol/L 纯化的 BGL 溶液, 加入 pH 7.4 的 Tris-NaCl 缓冲溶液定容至 3 mL, 加入 20 mg VC, 摇匀待 VC 溶解后室温反应 2 h; 以未添加 VC 为对照。取上述样品液 200  $\mu\text{L}$ , 加入 800  $\mu\text{L}$  超纯水后超声 5 min, 用移液枪样品溶液缓慢加入 U 型反应池里, 保证中间无气泡, 测定其 Zeta 电位。

### 1.2.5 VC 与 BGL 相互作用的核磁共振氢谱分析

参考文献[21-22]的方法并作修改, 反应体系总体积为 600  $\mu\text{L}$ , 分别准确称取 VC 30 mg 于 5 支 5 mm 核磁管中, 向各核磁管中加入 400  $\mu\text{L}$  重水, 以及  $0$ 、 $1.25 \times 10^{-6}$ 、 $0.25 \times 10^{-5}$ 、 $0.50 \times 10^{-5}$  和  $1.00 \times 10^{-5}$  mol/L 纯化的 BGL 溶液 200  $\mu\text{L}$ 。0 mol/L 的 BGL 溶液以 200  $\mu\text{L}$  Tris-NaCl 缓冲溶液代替。 $^1\text{H}$  的测定频率为 400.13 MHz。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同浓度 VC 对 BGL 活性的影响

VC 浓度对 GIM1.208 BGL 活性的影响如图 1 所示, 结果表明, VC 显著提高了 BGL 的活性( $P < 0.05$ ), 当 VC 浓度在 0.0%–3.5% 范围内时, BGL 酶活性随其浓度增加而增大, 并在浓度为 3.5% 时达到最高; 当浓度大于 3.5% 时, BGL 酶活性开始缓慢降低, VC 对 BGL 的激活作用随着 VC 浓度的增加呈先增强后减弱的趋势。

### 2.2 不同温度条件 VC 对 BGL 活性的影响

以 VC 浓度 3.5% 为处理组, 不添加 VC 为空白组, 在不同温度条件下, GIM1.208 的 BGL 相对活性如图 2 所示。当与 VC 作用时, 在 30 °C 较低温度范围内, BGL 相对活性较为稳定, 相对酶活保持在 90% 以上( $P > 0.05$ )。但当温度高于 30 °C 时, VC 对 BGL 的作用受温度影响较大( $P < 0.05$ ), 相对酶活从 94.58% 下降到 65.64%。

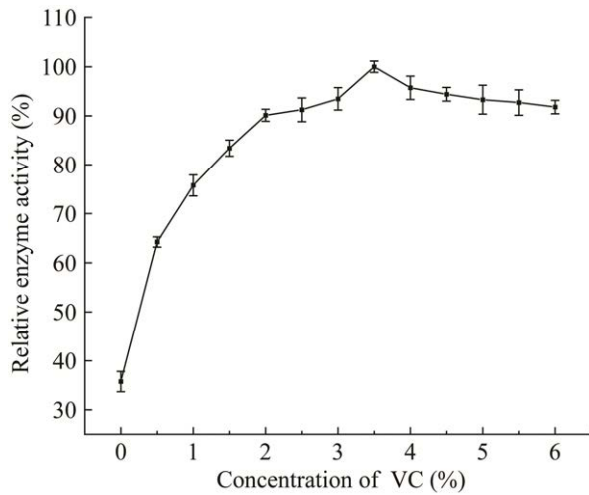


图1 VC浓度对BGL活性的影响

Figure 1 The effect of VC concentration on BGL activity.

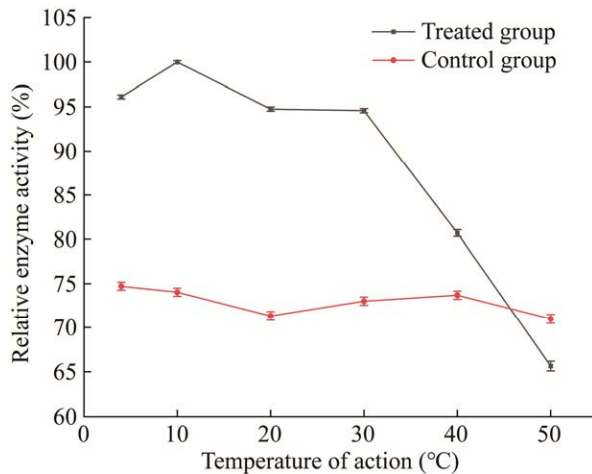


图2 不同温度条件VC对BGL活性的影响

Figure 2 The effect of VC under different temperature conditions on the activity of BGL.

对比空白组, 虽然在不同温度条件下酶活稳定, 但相对活性大体上比处理组低。

### 2.3 VC对BGL活性稳定性的影响

在10°C、VC浓度为3.5%及不添加VC处理条件下, GIM1.208 BGL的相对活性如图3所示。在不同作用时间下, 空白组酶活比处理组低, 且随时间变化波动小, 维持在80%左右;

当添加VC时, 作用时间对BGL活性虽然有影响, 但当作用时间为150 min时, 反应体系的相对酶活力依然在90%以上, 可见VC对BGL不仅具有激活作用, 且具有良好的稳定作用。

### 2.4 VC对BGL催化动力学参数的影响特征

以p-NPG为底物, 不同浓度VC对GIM1.208 BGL反应动力学的影响如图4所示。

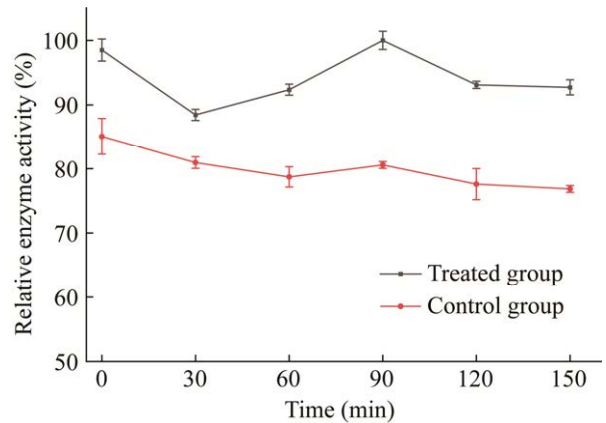


图3 反应时间对BGL与VC相互作用的影响

Figure 3 Effect of reaction time on the interaction between BGL and VC.

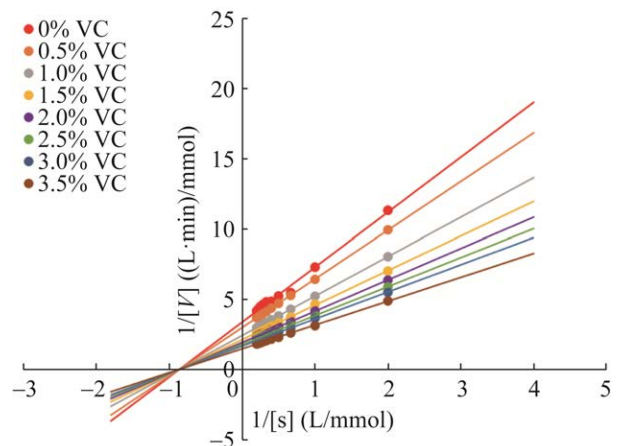


图4 不同VC浓度下BGL以p-NPG为底物的Lineweaver-Burk双倒数关系图

Figure 4 Lineweaver-Burk reciprocal relationship of BGL with p-NPG as substrate under different levels of VC.

随着 VC 浓度增大, GIM1.208 BGL 的  $K_m$  保持稳定不变, 为 1.167 mmol/L; 不同浓度 VC 条件下 GIM1.208 BGL 的  $V_{max}$  分别为 0.298、0.336、0.415、0.474、0.523、0.565、0.604 和 0.686 mmol/(L·min),  $V_{max}$  随着 VC 浓度增大而增大, 所有曲线都交于横轴一点, 说明 VC 为激活剂。

## 2.5 VC 与 BGL 相互作用的电化学分析结果

VC 具有较好的电化学活性, 利用电化学方法来分析 VC 的电氧化行为有利于揭示两者互作机制<sup>[23]</sup>。pH 7.4 缓冲溶液可以模拟人体的生理环境, 为体内研究提供有价值的参考<sup>[24]</sup>。本试验采用不同浓度 VC 在 Tris-NaCl 缓冲液中的循环伏安曲线如图 5 所示。从图 5 可知, 当扫描范围为 -0.4~1.0 V 时, VC 在 0.0~0.6 V 范围内出现一个比较明显的氧化峰, 无还原峰, 说明 VC 在缓冲液中的电氧化过程是一个完全不可逆的过程。

VC 与 GIM1.208 BGL 混合体系在 Tris-NaCl 缓冲溶液中的循环伏安曲线如图 6 所示。由图 6 可见, VC 同样呈现一个氧化峰, 而且随着反应

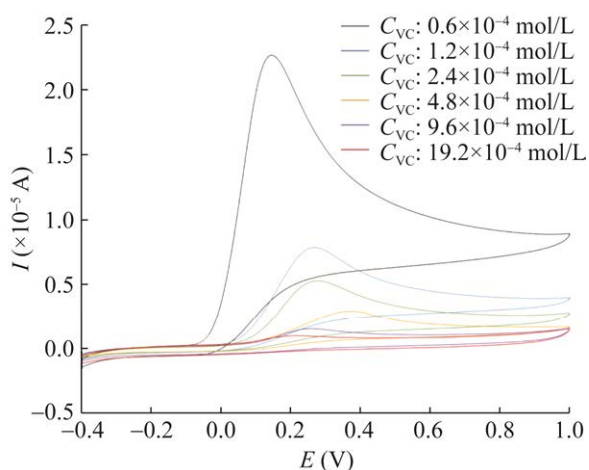


图 5 Tris-NaCl 缓冲液中不同浓度 VC 的循环伏安曲线

Figure 5 Cyclic voltammograms of different concentrations of VC in Tris-NaCl buffers.

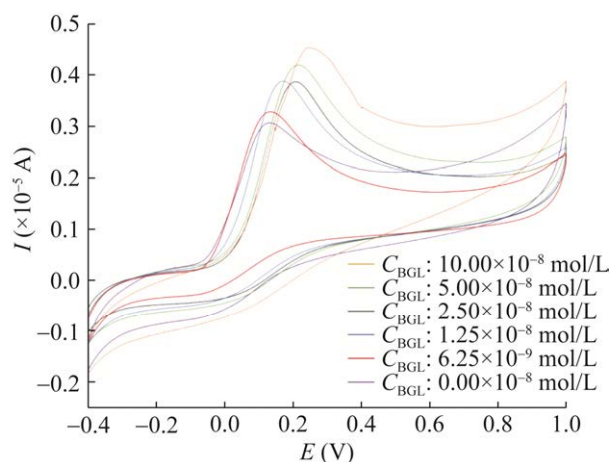


图 6 Tris-NaCl 缓冲液中 VC 与不同浓度 BGL 作用的循环伏安曲线

Figure 6 Cyclic voltammograms of the interaction between VC and different concentrations of BGL in Tris-NaCl buffers.

体系 BGL 浓度的增加, 氧化峰电流下降, 氧化峰电位向低电位移动, 表明 VC 与 BGL 在 Tris-NaCl 缓冲液中存在相互作用, 并且这种相互作用使得 VC 的电氧化反应变得更加容易。

## 2.6 VC 对 BGL Zeta 电位的影响

Zeta 电位是带电颗粒表面剪切层的电位, 可用于分析物质间的静电相互作用<sup>[25]</sup>。进一步考察 VC 与 GIM1.208 BGL 相互作用特点, 由混合体系的 Zeta 电位图(图 7)可知, BGL 的 Zeta 电位为负值, 说明 BGL 表面带负电荷<sup>[26]</sup>; 当加入 VC 后, 混合体系的 Zeta 电位从 -2.09 增加到 1.46, Zeta 电位的绝对值降低, 表明 VC 使 BGL 的电荷发生了变化, VC 与 BGL 之间存在弱的静电作用<sup>[27]</sup>。

## 2.7 VC 与 BGL 相互作用的核磁共振氢谱

通过  $^1\text{H}$  NMR 谱中 H 原子化学位移变化分析受体与配体分子相互作用的影响, 以及相互作用的关键基团和部位<sup>[28]</sup>。VC  $^1\text{H}$  NMR 谱如图 8 所示, 采用  $^1\text{H}$  NMR 技术并结合文献<sup>[29]</sup>对 VC 的  $^1\text{H}$  NMR 峰进行归属,  $\delta$ 3.50、 $\delta$ 3.52、 $\delta$ 3.83

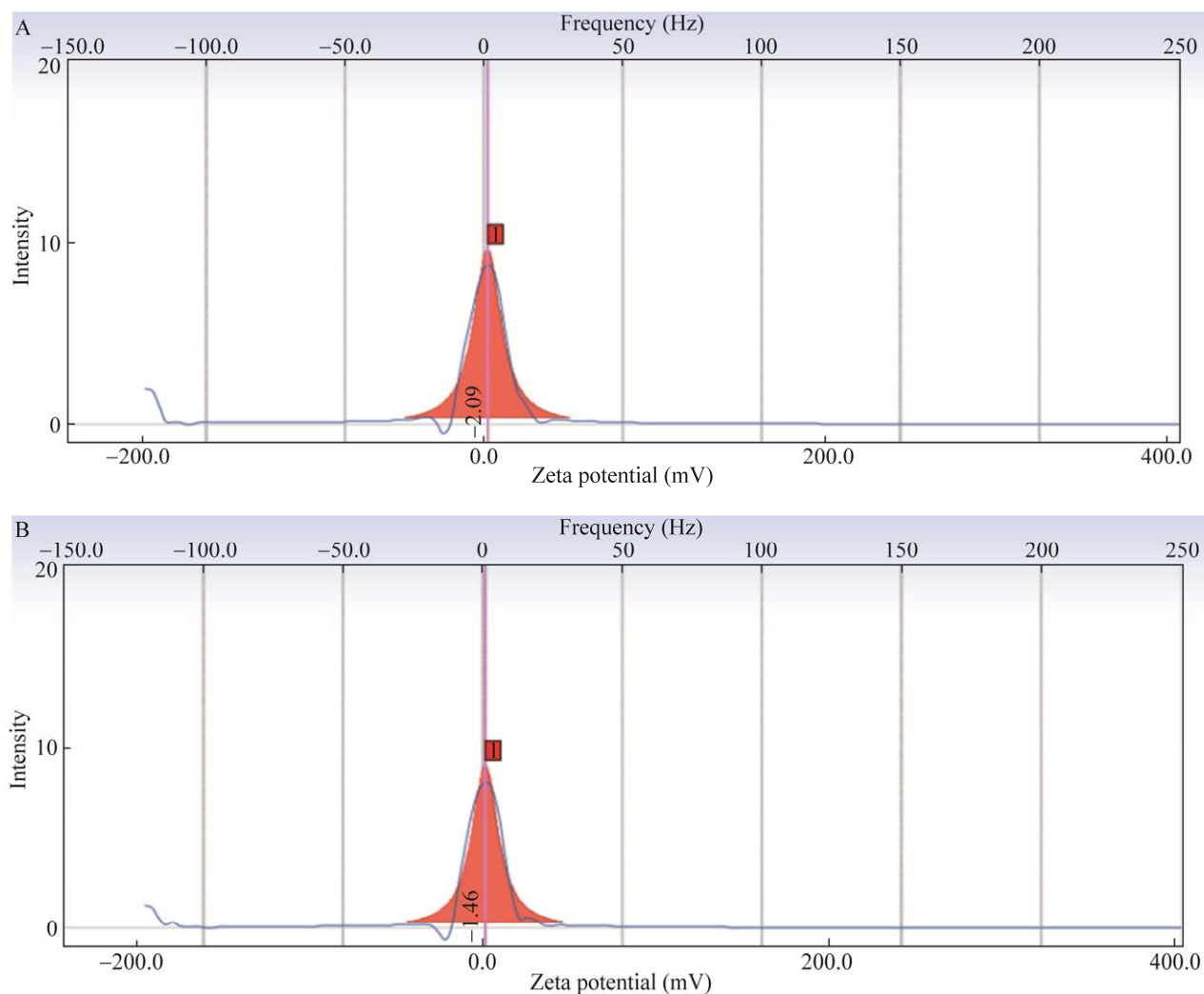


图 7 BGL (A)及 VC 与 BGL 混合体系(B)的 Zeta 电位图

Figure 7 Zeta potential diagram of BGL (A) and (B) in the mixed system of VC and BGL.

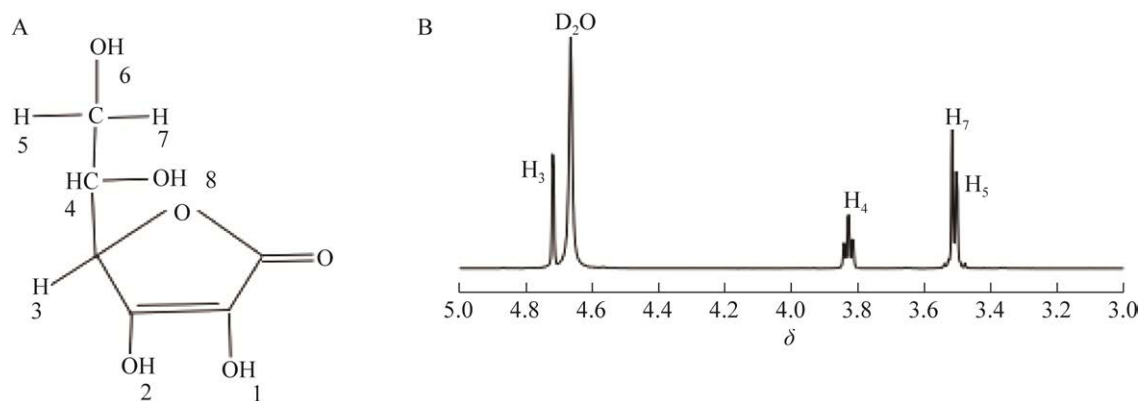


图 8 VC 的结构式(A)、<sup>1</sup>H NMR 谱及各 H 原子归属(B)

Figure 8 Structural formula (A), <sup>1</sup>H NMR spectrum and H atom assignment of VC (B).

和  $\delta 4.72$  分别为 5、7、4 和 3 位上甲基氢原子信号,  $\delta 4.67$  为  $D_2O$  的响应信号。

不同浓度 GIM1.208 BGL 与 VC 作用的  $^1H$  NMR 谱见图 9。可以看出, 不同浓度 BGL 中, VC 分子 H 原子化学位移均有不同程度的改变, 可见 BGL 改变了 VC 附近电子云分布及与其相关联的磁屏蔽系数, 表明二者存在相互作用关系<sup>[30-31]</sup>。

### 3 讨论与结论

由于 BGL 在工业、农业和医药等行业中发挥着重要作用, 如何通过低成本、简单易操作、安全的方法提高酶活性一直广受关注。VC 是一种多羟基的  $\gamma$ -内酯环生物活性物质, 在机体还原性体系维系方面发挥极其重要的作用<sup>[19]</sup>, 近年来已有研究发现 VC 是一种对酶活性具有重要意义的效应物<sup>[3]</sup>。有研究<sup>[32]</sup>发现, VC 对尖孢镰刀菌(*Fusarium axysporum*) Sch1.BGL 的活力有

显著提高作用, 但当浓度大于 0.08% 时酶活力下降, 激活作用随其浓度的增加呈先增强后减弱趋势; 李蕊伽<sup>[33]</sup>研究发现随着 VC 浓度的增大, 其对芦荟叶皮的 BGL 激活作用逐渐增强至稳定。可见, VC 对不同来源 BGL 作用存在差异, 对嗜酸乳杆菌 BGL 表现出高浓度激活效应特点, 当 VC 浓度在 0–3.5% 范围时, BGL 酶活性随其浓度增加而增大, 并在浓度为 3.5% 时达到最高。

VC 对酶的作用差异与不同作用机制相关, Wen 等<sup>[4]</sup>研究结果表明酪氨酸酶在小于  $7.5 \mu\text{mol/L}$  的 VC 中被轻微激活, 然后随着 VC 浓度增加而逐渐失活, 直到 VC 浓度为  $40 \mu\text{mol/L}$  时酪氨酸酶完全失活, 低浓度活化机制是 VC 能与酶的底物结合位点结合, 提高底物结合亲和力, 而高浓度时表现抑制作用是由于 VC 可以螯合酪氨酸酶活性中心的铜离子, 并通过疏水相互作用与周围的氨基酸残基相互作用。然而万正洋等<sup>[34]</sup>研究

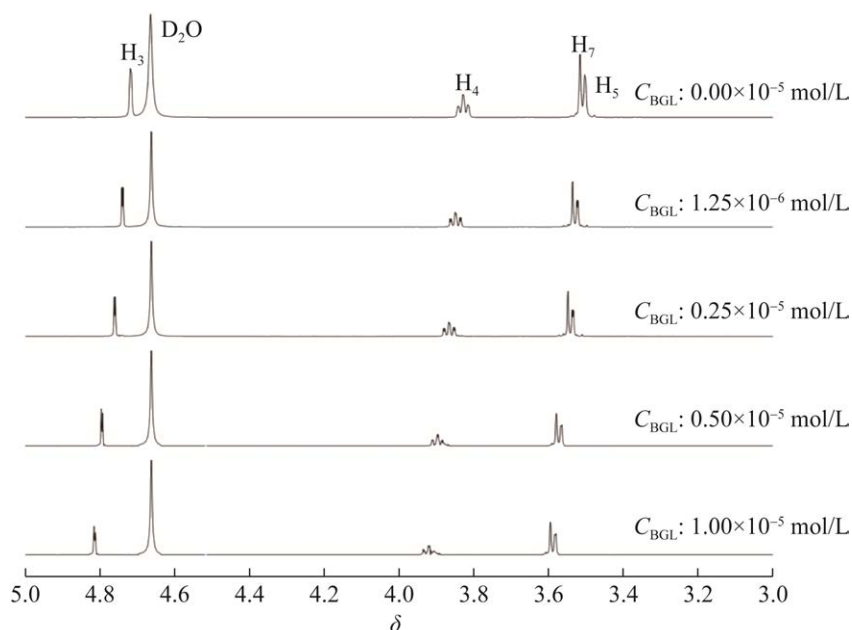


图 9 VC 与不同浓度 BGL 混合体系的核磁共振氢谱

Figure 9 Nuclear magnetic resonance hydrogen spectra of the mixed system of VC and BGL with different concentrations.



结果显示抗坏血酸浓度越高,对木瓜蛋白酶激活作用越明显,激活机制是由于 VC 的加入引起了蛋白活性中心结构的变化,从而使酶更有利于发挥催化作用。

本文研究结果显示空白组 GIM1.208 BGL 在 4–50 °C 酶活稳定,处理组当温度高于 30 °C 时,酶活性快速下降,但空白组相对酶活性大体上比处理组低。大多数 BGL 最适反应温度为 40–110 °C<sup>[35]</sup>,有研究表明 VC 受温度影响大<sup>[36]</sup>。根据以上结果分析推测 BGL 在与 VC 结合后,其分子内部有部分作用力会丢失,导致天然构象的稳定性降低,当温度升高时 VC 被氧化,BGL 结构也发生变化,从而降低了酶活性<sup>[34]</sup>。然而 GIM1.208 BGL 在较低温度 10 °C 和 VC 浓度为 3.5% 保存 150 min 时,反应体系的相对酶活力依然在 90% 以上,可见 VC 对 BGL 不仅具有激活作用,且具有良好的稳定作用。

有研究<sup>[37]</sup>发现 VC 对酵母蔗糖酶存在激活作用,且随着抗坏血酸浓度的增加,酵母蔗糖酶  $K_m$  保持不变, $V_{max}$  逐渐增大,并通过动力学分析推断抗坏血酸是直接与酵母蔗糖酶作用来提高酶活性。在本研究的酶动力学研究中, $V_{max}$  随着 VC 浓度增加而增大, $K_m=1.167$  mmol/L,并保持稳定不变,说明 VC 未与底物作用,而是直接与 BGL 结合从而加速催化反应的。VC 与 BGL 相互作用具体涉及的作用力及作用位点则需要通过其他方法进一步确定。分子间相互作用研究方法很多,包括荧光光谱法、圆二色谱法、原子力显微镜法、电化学法、核磁共振氢谱法等<sup>[3,18]</sup>。

由于 VC 具有很强的还原性,极易被氧化剂及光、热破坏,使能被应用检测的方法受到限制<sup>[38]</sup>。但 VC 具有较好的电化学活性,利用电化学方法来分析 VC 的电氧化行为有利于揭

示两者互作机制<sup>[23]</sup>。循环伏安测试结果表明 VC 在 Tris-NaCl 缓冲液中的电氧化过程是一个完全不可逆的过程,VC 与 BGL 在 Tris-NaCl 缓冲液中存在弱相互作用,且这种相互作用使得 VC 的电氧化反应变得更加容易。Zeta 电位结果印证了电化学结果,VC 使 BGL 的电荷发生了变化,VC 与 BGL 之间存在弱的静电作用<sup>[27]</sup>。

核磁共振氢谱技术可以根据化学移位、弛豫速率、谱峰强度和偶合常数等参数测定分子间相互作用的结构特征、结合的强度及机制。本研究中随着 BGL 浓度的增大,VC 分子乙二醇支链片段上 H 原子信号峰均向左移动,即向低场移动,VC 分子结构中含有负电性的氧原子,因此推测 VC 分子与 BGL 之间存在氢键作用,作用结合部位是 VC 分子中乙二醇支链片段<sup>[19,29]</sup>,使 VC 乙二醇支链片段上的 H<sub>3</sub>、H<sub>4</sub>、H<sub>5</sub> 和 H<sub>7</sub> 与溶剂之间的氢键数目减少,H 原子周围电子云密度下降,去屏蔽效应增大,其化学位移向低场方向移动<sup>[29]</sup>。李丽纳<sup>[21]</sup>利用核磁共振氢谱法研究 VC 与烟酰胺之间相互作用,发现它们作用的主要位点是烟酰胺的酰胺基或吡啶环中的氮原子与 VC 内酯环中烯二醇羟基上的氢原子形成了氢键。可见,抗坏血酸与不同物质相互作用具有不同的特点,其作用机制也不相同。

本文分析了 VC 对嗜酸乳杆菌 GIM1.208 BGL 活性的影响特征,初步探究了两者间的相互作用关系。结果表明 VC 对 BGL 具有良好的激活作用及稳定作用。VC 与 BGL 存在弱静电作用,可能涉及氢键作用,且 VC 分子作用部位为乙二醇支链片段。本文丰富了 VC 与 BGL 相互作用关系理论研究成果,同时为  $\beta$ -葡萄糖苷酶的高效应用以及维生素 C 系列衍生物激活剂的设计开发提供了思路。

## REFERENCES

- [1] HEMILÄ H, de MAN AME. Vitamin C and COVID-19[J]. *Frontiers in Medicine*, 2021, 7: 559811.
- [2] CARITÁ AC, FONSECA-SANTOS B, DANIELA SHULTZ J, MICHNIAK-KOHN B, CHORILLI M, LEONARDI GR. Vitamin C: one compound, several uses. Advances for delivery, efficiency and stability[J]. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2020, 24: 102117.
- [3] RAESSI-BABAHEYDARI E, FARHADIAN S, SHAREGHI B. Comparative studies on the interaction of ascorbic acid with gastric enzyme using multispectroscopic and docking methods[J]. *Journal of Molecular Structure*, 2021, 1245: 131270.
- [4] WEN YT, LIANG YQ, CHAI WM, WEI QM, YU ZY, WANG LJ. Effect of ascorbic acid on tyrosinase and its anti-browning activity in fresh-cut Fuji apple[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2021, 45(12): e13995.
- [5] CHANPHAI P, TAJMIR-RIAAHI HA. Conjugation of vitamin C with serum proteins: a potential application for vitamin delivery[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 137: 966-972.
- [6] 周宇芳, 胡建坤, 郝云彬, 相兴伟, 杨会成, 郑斌, 肖金星. 4-HR 与抗坏血酸对中华管鞭虾多酚氧化酶的抑制动力学模拟分析[J]. *食品科学*, 2019, 40(4): 69-74.
- ZHOU YF, HU JK, HAO YB, XIANG XW, YANG HC, ZHENG B, XIAO JX. Kinetic analysis of the inhibitory effect of 4-hexylresorcinol and ascorbic acid on polyphenoloxidase from *Solenocera crassicornis*[J]. *Food Science*, 2019, 40(4): 69-74 (in Chinese).
- [7] KARAMI F, GHORBANI M, SADEGHI MAHOONAK A, KHODARAHMI R. Fast, inexpensive purification of  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus niger* and improved catalytic/physicochemical properties upon the enzyme immobilization: possible broad prospects for industrial applications[J]. *LWT*, 2020, 118: 108770.
- [8] ABDULLAH R, NAZIR CHUDHARY S, KALEEM A, IQTEDAR M, NISAR K, IFTIKHAR T, SALEEM F. Enhanced production of  $\beta$ -glucosidase by locally isolated fungal strain employing submerged fermentation[J]. *Bioscience Journal*, 2019, 35(5): 1552-1559.
- [9] LI C, XU TY, LIU XW, WANG XH, XIA T. The expression of  $\beta$ -glucosidase during natto fermentation increased the active isoflavone content[J]. *Food Bioscience*, 2021, 43: 101286.
- [10] de OVALLE S, BRENA B, GONZÁLEZ-POMBO P. Influence of beta glucosidases from native yeast on the aroma of Muscat and Tannat wines[J]. *Food Chemistry*, 2021, 346: 128899.
- [11] SRIVASTAVA N, RATHOUR R, JHA S, PANDEY K, SRIVASTAVA M, THAKUR VK, SENGAR RS, GUPTA VK, MAZUMDER PB, KHAN AF, MISHRA PK. Microbial beta glucosidase enzymes: recent advances in biomass conversion for biofuels application[J]. *Biomolecules*, 2019, 9(6): 220.
- [12] 刘文静. 产  $\beta$ -葡萄糖苷酶菌株的筛选、诱变选育及产酶条件优化[D]. 南阳: 南阳师范学院硕士学位论文, 2020.
- LIU WJ. Screening of  $\beta$ -glucosidase-producing strains, mutation breeding and optimization of enzyme-producing conditions[D]. Nanyang: Master's Thesis of Nanyang Normal University, 2020 (in Chinese).
- [13] 荆丰雪, 钟斌, 万娅琼, 樊洪泓, 程江华, 徐雅莞. 微生物源  $\beta$ -葡萄糖苷酶在发酵食品中的应用[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(24): 8041-8049.
- JING FX, ZHONG B, WAN YQ, FAN HH, CHENG JH, XU YY. Application of microbial  $\beta$ -glucosidase in fermented food[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2022, 13(24): 8041-8049 (in Chinese).
- [14] QIAN YC, ZHONG LX, HOU YH, QU YB, ZHONG YH. Characterization and strain improvement of a hypercellulytic variant, *Trichoderma reesei* SN1, by genetic engineering for optimized cellulase production in biomass conversion improvement[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1349.
- [15] VERVOORT Y, HERRERA-MALAVAR B, MERTENS S, GUADALUPE MEDINA V, DUITAMA J, MICHIELS L, DERDELINCKX G, VOORDECKERS K, VERSTREPEN KJ. Characterization of the recombinant *Brettanomyces anomalus*  $\beta$ -glucosidase and its potential for bioflavouring[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2016, 121(3): 721-733.
- [16] 余奕宏, 顾苑婷, 丁筑红, 陈思奇, 宋煜婷, 王翼.  $\beta$ -葡萄糖苷酶生物转化刺梨槲皮素糖苷的工艺优化[J]. *食品科学技术学报*, 2020, 38(5): 109-118.
- YU YH, GU YT, DING ZH, CHEN SQ, SONG YT, WANG Y. Optimization on biotransformation of quercetin glycosides in *Rosa roxburghii* by  $\beta$ -glucosidase[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2020, 38(5): 109-118 (in Chinese).
- [17] 余奕宏, 丁小娟, 丁筑红, 宋煜婷, 王翼. 嗜酸乳杆菌 GIM1.208  $\beta$ -葡萄糖苷酶的异源表达、纯化及酶学性质研究[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2021, 48(1):

- 88-99.  
YU YH, DING XJ, DING ZH, SONG YT, WANG Y. Heterologous expression, purification and enzymatic properties of *Lactobacillus acidophilus* GIM1.208  $\beta$ -glucosidase[J]. China Industrial Economics, 2021, 48(1): 88-99 (in Chinese).
- [18] 丁小娟. 嗜酸乳杆菌  $\beta$ -葡萄糖苷酶及其与槲皮素糖苷底物作用研究[D]. 贵阳: 贵州大学硕士学位论文, 2019.  
DING XJ. Study on  $\beta$ -glucosidase of *Lactobacillus acidophilus* and its interaction with quercetin glycoside substrate[D]. Guiyang: Master's Thesis of Guizhou University, 2019 (in Chinese).
- [19] 马慧婷. 抗坏血酸与几种生物活性物质的相互作用研究[D]. 郑州: 河南大学硕士学位论文, 2017.  
MA HT. Study on the interactions of ascorbic acid with several bioactive substances[D]. Zhengzhou: Master's Thesis of Henan University, 2017 (in Chinese).
- [20] 路艳芳. 表面化学性质调控的纳米金与牛血清蛋白相互作用的研究[D]. 新乡: 河南师范大学硕士学位论文, 2017.  
LU YF. Gold nanoparticles surface chemical determines the interaction with protein[D]. Xinxiang: Master's Thesis of Henan Normal University, 2017 (in Chinese).
- [21] 李丽纳. 烟酰胺与几种药物的相互作用研究[D]. 郑州: 河南大学硕士学位论文, 2016.  
LI LN. Study on the interactions of nicotinamide with several drugs[D]. Zhengzhou: Master's Thesis of Henan University, 2016 (in Chinese).
- [22] 陈瑶. 人血清白蛋白与配体之间相互作用的核磁共振研究[D]. 武汉: 中国科学院研究生院(武汉物理与数学研究所)硕士学位论文, 2016.  
CHEN Y. NMR based study of the interaction between human serum albumin and ligands[D]. Wuhan: Master's Thesis of Wuhan Institute of Physics and Mathematics, Chinese Academy of Science, 2016 (in Chinese).
- [23] 张萍, 彭鹏, 候兵兵, 马慧婷, 翟翠萍. 葡萄糖、肌醇与抗坏血酸的相互作用研究[J]. 化学通报, 2018, 81(3): 258-266, 262.  
ZHANG P, PENG P, HOU BB, MA HT, ZHAI CP. Studies on the interactions of glucose and inositol with ascorbic acid[J]. Chemistry, 2018, 81(3): 258-266, 262 (in Chinese).
- [24] 候兵兵, 彭鹏, 张萍, 马慧婷, 翟翠萍. 抗坏血酸与腺嘌呤和尿嘧啶的相互作用研究[J]. 化学研究与应, 2018, 30(5): 711-718.  
HOU BB, PENG P, ZHANG P, MA HT, ZHAI CP. Study on the interactions of ascorbic acid with adenine and uracil respectively[J]. Chemical Research and Application, 2018, 30(5): 711-718 (in Chinese).
- [25] SHI XD, YIN JY, CUI SW, WANG Q, WANG SY, NIE SP. Comparative study on glucomannans with different structural characteristics: functional properties and intestinal production of short chain fatty acids[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 164: 826-835.
- [26] ZHANG J, WANG J, ZHAO YX, LI J, LIU YM. Study on the interaction between calcium ions and alkaline protease of bacillus[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 124: 121-130.
- [27] SINGH G, KANG TS. Ionic liquid surfactant mediated structural transitions and self-assembly of bovine serum albumin in aqueous media: effect of functionalization of ionic liquid surfactants[J]. The Journal of Physical Chemistry B, 2015, 119(33): 10573-10585.
- [28] HOSSEINI SMH, EMAM-DJOMEH Z, SABATINO P, van der MEEREN P. Nano complexes arising from protein-polysaccharide electrostatic interaction as a promising carrier for nutraceutical compounds[J]. Food Hydrocolloids, 2015, 50: 16-26.
- [29] 李磊, 刘雪峰, 阮小云, 赵英杰. <sup>1</sup>HNMR 研究苯甲酸钠、维生素 C 及葡萄糖与蛋白质的结合部位[J]. 化学与生物工程, 2011, 28(5): 63-66.  
LI L, LIU XF, RUAN XY, ZHAO YJ. Study on interacting segments of sodium benzoate, vitamin C and glucose with proteins by <sup>1</sup>HNMR[J]. Chemistry & Bioengineering, 2011, 28(5): 63-66 (in Chinese).
- [30] 许慧芳, 叶锦珠, 吴霞晖, 林庚蓉, 张美玲. 盐酸安非他酮与牛血清白蛋白相互作用的 NMR 研究[J]. 分析测试学报, 2014, 33(1): 45-50.  
XU HF, YE JZ, WU XH, LIN GR, ZHANG ML. Nuclear magnetic resonance study on interaction between bupropion and bovine serum albumin[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2014, 33(1): 45-50 (in Chinese).
- [31] LIU Y, CHEN MM, LUO ZP, LIN JJ, SONG L. Investigation on the site-selective binding of bovine serum albumin by erlotinib hydrochloride[J]. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2013, 31(10): 1160-1174.
- [32] 车建美, 肖荣凤, 蓝江林, 朱育菁, 刘波. 尖孢镰刀菌  $\beta$ -D-葡萄糖苷酶产酶条件的初步研究[C]//福建莆田: 2008 年福建省科协第八届学术年会农业分会场, 2008.

- CHE JM, XIAO RF, LAN JL, ZHU YJ, LIU B. Preliminary study on the conditions of  $\beta$ -D-glucosidase production in *Fusarium oxysporum*[C]//Putian, Fujian: 2008 Agricultural Branch of the 8th Academic Annual Meeting of Fujian Association for Science and Technology, 2008 (in Chinese).
- [33] 李蕊伽. 芦荟叶皮  $\beta$ -葡萄糖苷酶的分离纯化及酶学性质和功能基团研究[D]. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 2017.
- LI RJ. Isolation, purification, enzymatic properties and functional groups of  $\beta$ -glucosidase from *Aloe* leaf skin[D]. Chongqing: Master's Thesis of Southwest University, 2017 (in Chinese).
- [34] 万正洋, 黄业传, 彭春雷, 李宁, 程雨珊, 陈丹, 张克媛, 程佳琪. 分子动力学模拟抗坏血酸对木瓜蛋白酶活性的影响[J]. 肉类研究, 2023, 37(1): 1-6.
- WAN ZY, HUANG YC, PENG CL, LI N, CHENG YS, CHEN D, ZHANG KY, CHENG JQ. Molecular dynamics simulation of the effect of ascorbic acid on the protease activity of papain[J]. Meat Research, 2023, 37(1): 1-6 (in Chinese).
- [35] 张玉香. 哈氏噬纤维菌  $\beta$ -葡萄糖苷酶 CHU<sub>3</sub>577 的性质研究[D]. 济南: 山东大学硕士学位论文, 2017.
- ZHANG YX. Study on the properties of  $\beta$ -glucosidase CHU<sub>3</sub>577 from *Phaeocystis harzianum*[D]. Jinan: Master's Thesis of Shandong University, 2017 (in Chinese).
- [36] 刘奕博, 任国谱. 抗坏血酸及抗坏血酸棕榈酸酯的稳定性研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(23): 303-305, 329.
- LIU YB, REN GP. Study on stability of ascorbic acid and ascorbyl palmitate[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(23): 303-305, 329 (in Chinese).
- [37] 范业鹏, 杜鹏, 吴衍昌, 姜玉梅, 杨歌德, 王淑娟. 抗坏血酸对酵母蔗糖酶的激活动力学研究[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 1999, 15(1): 98-101.
- FAN YP, DU P, WU YC, JIANG YM, YANG GD, WANG SJ. The kinetics of activation of yeast invertase by ascorbic acid[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 1999, 15(1): 98-101 (in Chinese).
- [38] GÉRARD V, AY E, GRAFF B, MORLET-SAVARY F, GALOPIN C, MUTILANGI W, LALEVÉE J. Ascorbic acid derivatives as potential substitutes for ascorbic acid to reduce color degradation of drinks containing ascorbic acid and anthocyanins from natural extracts[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(43): 12061-12071.