李顺峰, 陈云莉, 兰雪怡, 等. 对羟基苯甲酸对 β-葡萄糖苷酶的激活效应及其互作关系 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(4): 89−96. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025020266

LI Shunfeng, CHEN Yunli, LAN Xueyi, et al. Effect of p-Hydroxybenzoic Acid on the Activation of β-Glucosidase Activity and Their Interaction[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(4): 89−96. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025020266

· 研究与探讨 ·

# 对羟基苯甲酸对 β-葡萄糖苷酶的激活效应及其互作关系

李顺峰[1], 陈云莉[2], 兰雪怡[2], 冯路瑶[2], 王安建[1], 王小媛[2,3], 张丽华[2,3,*]

（1.河南省农业科学院农产品加工研究中心, 河南郑州 450002;
2.郑州轻工业大学食品与生物工程学院, 河南郑州 450001;
3.冷链食品加工与安全控制教育部重点实验室, 郑州轻工业大学, 河南郑州 450001）

**摘　要:** 为探究酚酸对 β-葡萄糖苷酶活性的影响，通过圆二色谱、分子对接等方法，分析了不同质量浓度（0~0.5 g/L）对羟基苯甲酸（p-hydroxybenzoic acid，PHBA）对 β-葡萄糖苷酶的激活机制，重点研究了酶动力学和分子相互作用。结果表明，PHBA 显著提高了 β-葡萄糖苷酶的活性，且呈浓度依赖性模式。二级结构分析发现，在 0.5 g/L 的 PHBA 作用下，与对照组相比，α-螺旋含量显著降低了 52.14%（$P$<0.05），而 β-折叠、β-转角和无规则卷曲结构分别增加了 90.20%、27.24% 和 50.56%，表明 β-葡萄糖苷酶的活性位点可能位于 α-螺旋内。荧光猝灭结果表明，PHBA 与 β-葡萄糖苷酶可能有 1 个或者 1 类结合位点，二者结合是自发的。分子相互作用力显示，氢键、范德华力以及疏水相互作用是稳定 PHBA-β-葡萄糖苷酶复合物的主要作用力。分子动力学模拟进一步验证了 PHBA-β-葡萄糖苷酶复合物在 100 ns 轨迹中的结构稳定性（RMSD<0.4 nm），证实了 PHBA 作为 β-葡萄糖苷酶激活剂的潜力，为富含酚酸的果蔬发酵产品中 β-葡萄糖苷酶活性提升及功能性成分开发提供了理论依据。

**关键词:** 对羟基苯甲酸, β-葡萄糖苷酶, 圆二色谱, 荧光猝灭, 分子对接
**中图分类号:** TS201.2　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)04−0089−08
**DOI:** 10.13386/j.issn1002-0306.2025020266　　本文网刊:

# Effect of p-Hydroxybenzoic Acid on the Activation of β-Glucosidase Activity and Their Interaction

**LI Shunfeng[1], CHEN Yunli[2], LAN Xueyi[2], FENG Luyao[2], WANG Anjian[1], WANG Xiaoyuan[2,3], ZHANG Lihua[2,3,*]**

（1.Research Center of Agro-products Processing Science and Technology, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China;
2.College of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;
3.Key Laboratory of Cold Chain Food Processing and Safety Control, Ministry of Education, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China）

**Abstract:** To investigate the effect of phenolic acids on the activity of β-glucosidase, this study systematically evaluated the activation mechanism of p-hydroxybenzoic acid (PHBA) at varying concentrations (0~0.5 g/L) through circular dichroism spectroscopy and molecular docking, with a focus on enzyme conformational dynamics and molecular interactions. The results showed that PHBA significantly enhanced β-glucosidase activity in a concentration-dependent manner. Secondary structural analysis revealed that the content of α-helix significantly decreased by 52.14% ($P$<0.05), while β-sheet, β-turn,

**收稿日期:** 2025−03−03
**基金项目:** 河南省重点研发专项项目（231111112500, 241111111800）; 郑州轻工业大学基础研究基金资助项目（23XJCYJ018）。
**作者简介:** 李顺峰（1982−）, 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 农产品保鲜与加工, E-mail: lishunfeng2000@163.com。
*** 通信作者:** 张丽华（1982−）, 女, 博士, 教授, 研究方向: 果蔬加工与安全控制, E-mail: zhanglihua82828@163.com。

and random coil structures increased by 90.20%, 27.24%, and 50.56%, respectively, at 0.5 g/L PHBA compared to the control group. These structural shifts suggestted that the enzyme's active site might reside within α-helix regions. Fluorescence quenching assays confirmed spontaneous binding between PHBA and β-glucosidase, with one or one class of binding sites identified. Molecular interaction analyses revealed that hydrogen bonding, van der Waals forces, and hydrophobic interactions predominantly stabilized the PHBA-enzyme complex. Molecular dynamics simulations further validated the structural stability of the PHBA-β-glucosidase complex over 100 ns trajectories (RMSD<0.4 nm), confirming PHBA as a potent β-glucosidase activator. This study elucidates the molecular basis of PHBA-driven enzyme activation and provides a theoretical foundation for enhancing β-glucosidase activity in phenolic acid-rich fermented fruit and vegetable products.

**Key words**: p-hydroxybenzoic acid; β-glucosidase; circular dichroism; fluorescence quenching; molecular docking

β-葡萄糖苷酶是一种在植物、酵母和细菌体内广泛存在的纤维素水解酶[1−2]。研究表明,产 β-葡萄糖苷酶的乳酸菌可将糖苷结合态多酚转为游离态多酚,增强多酚的生物利用度,进而增强食品的营养价值和功能特性[3−4]。Peng 等[5] 采用康普茶和低聚果糖发酵豆浆,发现异黄酮含量与 β-葡萄糖苷酶活性呈正相关,且 β-葡萄糖苷酶活性与发酵豆浆的风味也有一定相关性。这表明激活 β-葡萄糖苷酶的活性可提高酚类物质的水解率,对富含酚酸的果蔬发酵产品抗氧化性的提高及香气成分的改善具有积极作用。因此,寻找天然高效的酚酸类化合物作为 β-葡萄糖苷酶促进剂具有重要意义。

酚酸类物质(如对羟基苯甲酸,PHBA)作为果蔬中的天然成分,可能通过分子互作影响相关酶的构象与活性。田野等[6] 研究发现,阿魏酸、对香豆酸、水杨酸可提高木聚糖酶活力,但单宁酸会抑制其活性。此外,相关研究表明苹果[7]、柑橘[8] 和胡萝卜[9] 等果蔬中普遍存在 PHBA,且具有良好的抗菌、抗氧化、抗癌和抗炎等多种功能[10−12]。例如,黄小兰等[8] 研究发现经 PHBA 处理后的柑橘果实中多酚氧化酶、过氧化物酶等酶活性均升高,对采后柑橘炭疽病病原菌有较强的抗菌作用。沈荷玉等[13] 研究表明,没食子酸对 α-淀粉酶和 α-葡萄糖苷酶具有良好的抑制效果。尽管酚酸类物质与果蔬中多种酶活性关系已有相关报道,但 PHBA 与 β-葡萄糖苷酶之间的作用关系尚缺乏深入研究。

基于此,本文通过圆二色谱及分子对接等技术,深入分析了 PHBA 与 β-葡萄糖苷酶之间的相互作用,揭示其作用机制,以期为果蔬中的 PHBA 和 β-葡萄糖苷酶的生物利用及优化果蔬资源转化效率提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

对羟基苯甲酸(纯度≥98%)、对硝基苯基-β-D-吡喃木糖苷(p-NPG,纯度≥98%) 上海源叶生物科技有限公司;β-葡萄糖苷酶(300 U/g,纯度≥98%) 江苏锐阳生物科技有限公司;柠檬酸、磷酸氢二钠 分析纯 天津市科密欧化学试剂有限公司;其他分析纯试剂购于天津达茂有限公司。

BPH-9272 精密恒温培养箱 上海一恒科学仪器有限公司;Tecan Spark 20M 多功能微孔板读数仪 瑞士 Tecan 公司;JascoJ-815 圆二色谱仪 美国 Jasco 公司;NANO-ZS90 马尔文激光粒度仪 英国 Malvern 有限公司;F-7000 荧光分光光度计 北京日立科学仪器有限公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 样品制备 将 β-葡萄糖苷酶(50 mg/mL)溶解于 pH6.0 的 0.1 mol/L 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液中。然后,将 β-葡萄糖苷酶酶液(8 mL)注入离心管中,分别添加 PHBA,得到 PHBA 质量浓度为 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 g/L 的混合体系,以未添加 PHBA 的 β-葡萄糖苷酶酶液作为对照组,待 PHBA 完全溶于酶液后进行测定。

1.2.2 不同质量浓度 PHBA 对 β-葡萄糖苷酶催化活性的影响 酶活力测定参考丁小娟[14] 的 p-NPG 方法。将 1.2.1 制备的添加不同质量浓度 PHBA 的 β-葡萄糖苷酶酶液取出 1.4 mL,与 20 mmol/L 的 p-NPG 溶液分别于 37 ℃ 下进行 10 min 预热;接着向酶液中加入 0.4 mL 的 p-NPG 溶液,继续保温 10 min;最后,将 4 mL $Na_2CO_3$(1 mol/L)溶液注入混合液中,并在室温条件下搅拌均匀,然后静置 3 min,于 400 nm 处测定吸光度值。酶活性定义为每毫升粗酶液在 37 ℃、pH6.0 条件下,每分钟分解 p-NPG 产生 1 μmol p-NP 的活力。计算在不同质量浓度 PHBA 条件下,β-葡萄糖苷酶的相对酶活,以 100% 表示反应的最高酶活。

1.2.3 β-葡萄糖苷酶的动力学分析 参考江桂兰等[15] 的方法,将底物 p-NPG 的浓度设定为 20 mmol/L,然后添加不同质量浓度 PHBA(0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 g/L)与不同质量浓度的 β-葡萄糖苷酶(5、10、20、40、50 U/mL)反应。通过绘图分析 PHBA 对 β-葡萄糖苷酶的激活效应。其中,横纵坐标分别代表 β-葡萄糖苷酶浓度(U/mL)和反应初速度 V($\Delta OD_{400\ nm}$/min)。

在 β-葡萄糖苷酶浓度为 50 U/mL 条件下,向反应体系中添加不同质量浓度 PHBA(0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 g/L)和不同浓度的底物 p-NPG(5、10、15、20 mmol/L)进行充分反应。通过 Lineweaver-Burk

方程，计算 PHBA 激活 β-葡萄糖苷酶的动力学参数：

$$\frac{1}{V}=\frac{K_m}{V_{max}}\frac{1}{[S]}+\frac{1}{V_{max}}$$　　式（1）

式中，V：底物 p-NPG 在不同质量浓度下的初始反应速率（$\Delta OD_{400\ nm}$/min）；$K_m$：米氏常数；$V_{max}$：最大反应速率（$\Delta OD_{400\ nm}$/min）；[S]：底物 p-NPG 的浓度（mmol/L）。

1.2.4　PHBA 与 β-葡萄糖苷酶相互作用的粒径电位分析　取 1.2.1 制备的样品液，使用马尔文激光粒度仪测定其粒径及 Zeta 电位。

1.2.5　圆二色谱（CD）　利用 CD 光谱测定 β-葡萄糖苷酶的 α-螺旋、β-折叠和无规则卷曲的含量，从而获得添加不同质量浓度 PHBA 前后 β-葡萄糖苷酶的二级结构。在室温（20±1 ℃）环境下对样品进行圆二色谱测定，其中缓冲溶液作为空白。在 1 mm 长的光程范围内，使用石英比色皿对样品进行扫描，在 185~290 nm 远紫外波段以 200 nm/min 的速度进行 CD 光谱的扫描，其中光谱间距为 1 nm。CD 数据用平均残差椭圆率 [θ] 表示，单位为度（$cm^2$/dmol）。利用软件 CDNN 分析添加不同质量浓度 PHBA 前后 β-葡萄糖苷酶的二级结构[16]。

1.2.6　荧光光谱　使用荧光分光光度计进行荧光光谱的测定（室温：20±1 ℃），PHBA 最终浓度分别是 0.66、1.31、1.97、3.29 mmol/L，参考 Sun 等[17] 报道的方法设置参数，其中激发波长为 280 nm，发射波长范围为 290~500 nm，狭缝均为 5 nm，扫描速度为 1200 nm/s。用于溶解 β-葡萄糖苷酶的缓冲液作为空白。利用 Stern-Volmer 方程判断 PHBA 与 β-葡萄糖苷酶的猝灭机理[18]：

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

式中，$F_0$ 和 F：β-葡萄糖苷酶的荧光强度和 β-葡萄糖苷酶加入不同质量浓度的 PHBA 后的荧光强度；$K_q$：速率常数 [L/(mol·s)]；[Q]：PHBA 浓度（mmol/L）；$K_{SV}$：猝灭常数（L/mol）；$\tau_0$：不存在 PHBA 时 β-葡萄糖苷酶的平均荧光寿命（通常 $\tau_0=10^{-8}$ s）。

采用双对数方程计算 PHBA 与 β-葡萄糖苷酶之间的 $K_a$ 和 n 值[19]：

$$\lg\frac{F_0-F}{F}=\lg K_a+n\lg[Q]$$　　式（3）

式中，$K_a$：结合常数（L/mol）；n：结合位点数。

PHBA 与 β-葡萄糖苷酶结合过程中，存在相互作用力，可通过焓变（ΔH）、熵变（ΔS）、自由能（ΔG）的变化表示，具体根据以下公式计算[20]：

$$\Delta G=-RT\ln K_a$$　　式（4）

$$\Delta G=\Delta H-T\Delta S$$　　式（5）

式中，ΔG：结合自由能变化（kJ/mol）；$K_a$：在相应温度 T 下的结合常数（L/mol）；ΔH：结合焓变（kJ/mol）；T：反应的绝对温度（K）；ΔS：结合熵变 [J/(mol·K)]；R：气体常数 [8.314 J/(mol·K)]。

1.2.7　分子对接　β-葡萄糖苷酶（PDB ID：1uok-modified）的晶体结构从 RCSB 数据库下载，对羟基苯甲酸（CID：135）的结构从 PubChem 数据库下载。使用 AutoDock Tools 对 β-葡萄糖苷酶和对羟基苯甲酸模型进行加氢处理，利用 AutoDock vina 确定分子的最优对接位置，并通过 PyMOL 工具对所得模型进行视觉呈现与分析，Discovery Studio 2019 Client 软件获取对接模型 2D 图。

1.2.8　分子动力学（molecular dynamics，MD）模拟　采用 GROMACS（2020.6_GPU）进行分子动力学模拟，力场选择 Amber99SB-ILDN 分子力场，使用 TIP3P 水模型在立方体水箱中对结构进行溶剂化，并添加反离子以中和净电荷。溶质分子与箱边界保持 1.0 nm 的距离。使用共轭梯度法与最陡下降法进行能量最小化，然后分两个阶段进行平衡。最初，2 ns NVT 运行稳定温度，然后进行 2 ns NPT 模拟以平衡压力，保持恒定的原子数、温度和压力。动力学仿真在 NPT 规范集合中运行，温度与压力分别设置为 310 K 和 1 bar。使用 Xmgrace 对蛋白质的均方根偏差（RMSD）、均方根波动（RMSF）、回转半径（Rg）和表面溶剂可及面积（SASA）及氢键（Hydrogen bond）进行分析。

### 1.3　数据处理

使用 SPSS 25.0 软件进行方差分析（ANOVA），每组实验均重复三次，数据以平均值±标准误差表示；利用 Origin 2021 软件绘图。

## 2　结果与分析

### 2.1　不同质量浓度 PHBA 对 β-葡萄糖苷酶催化活性的影响

激活剂与酶的结合通常是以非共价键实现的，由于这些键较弱，因此激活剂与酶的结合通常是可逆的，这使得激活剂能够在需要时迅速与酶结合或解离，调节酶的活性[21]。为分析 PHBA 对 β-葡萄糖苷酶催化活性的影响，对不同质量浓度 PHBA 下 β-葡

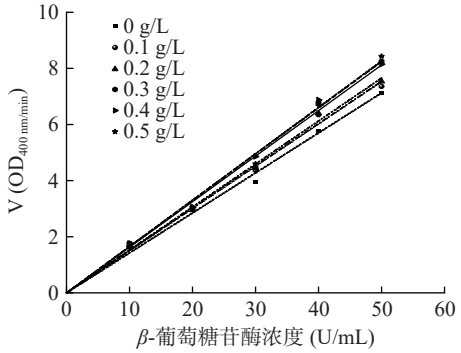



图 1　不同质量浓度 PHBA 对 β-葡萄糖苷酶的催化活性

Fig.1　Catalytic activity of different mass concentrations of PHBA on β-glucosidase

葡糖苷酶的反应速率与 β-葡萄糖苷酶浓度关系进行了图形绘制。由图 1 可知，所有曲线拟合后均经过坐标(0, 0)，且曲线的斜率随着 PHBA 浓度的升高而逐渐增大，表明 PHBA 通过非共价键相互作用增强 β-葡萄糖苷酶活性达到激活效果，属于可逆激活。

### 2.2 β-葡萄糖苷酶动力学分析

为进一步探究 PHBA 浓度对 β-葡萄糖苷酶动力学的影响，分析了 Lineweaver-Burk 双倒数图。如图 2 所示，所有曲线的斜率和纵坐标截距均不相同。随着 PHBA 浓度的增大，酶活性位点的构象发生变化，导致底物与酶的亲和力降低，从而需要更高的底物浓度才能达到半饱和状态，呈现出 $K_m$ 值增大现象。同时，PHBA 可能与底物竞争结合酶的活性位点，这种竞争性结合可能导致底物与酶的结合效率降低，进而增加 $K_m$。PHBA 作为激活剂，可能通过改变酶的构象或直接参与催化过程，提高酶的催化效率，从而增加最大反应速率 $V_{max}$。此外，PHBA 可能结合酶的多个激活位点，每个位点的结合都可能独立地增强酶活性，导致 $V_{max}$ 随 PHBA 浓度增加而增大[22]。

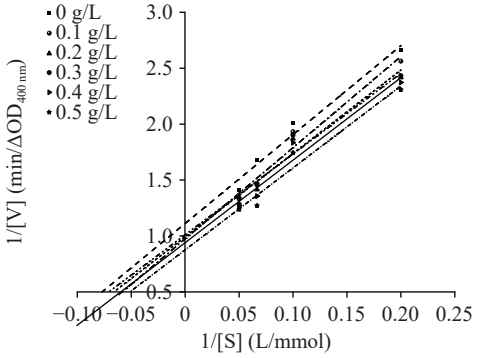



图 2 不同质量浓度 PHBA 下 β-葡萄糖苷酶的 Linewear-Burk 双倒数图

Fig.2 Linewear-Burk double reciprocal diagram of β-glucosidase at different mass concentrations of PHBA

### 2.3 PHBA 与 β-葡萄糖苷酶相互作用的粒径电位分析

由图 3 可知，随着 PHBA 浓度的增加，溶液体系的粒径逐渐上升。当 PHBA 浓度为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 g/L 时，体系的粒径大小显著高于对照组，其中添加 0.5 g/L PHBA 后，体系的粒径最大(461.57 nm)。粒径增大可能是 PHBA 与 β-葡萄糖苷酶发生相互作用，产生了新的复合物所致[23]，或者是由于 PHBA 与 β-葡萄糖苷酶之间的疏水作用、静电作用和范德华力等相互作用使蛋白质分子聚集，进而导致粒径增加[24]。而和对照组相比，添加 PHBA 后，体系的电位无明显差异。粒径增大而电位不变，可能表明尽管颗粒的大小发生了变化，但颗粒表面的电荷特性和电荷分布仍然保持稳定。这种变化可能是具有较大粒径的 PHBA-β-葡萄糖苷酶复合物具有与 β-葡萄糖苷酶相似的表面电荷[25]。

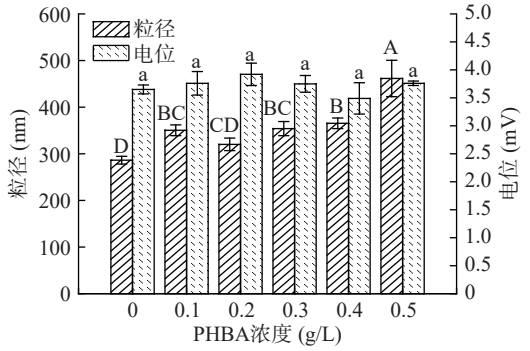



图 3 不同质量浓度 PHBA 与 β-葡萄糖苷酶相互作用的粒径及电位结果

Fig.3 Particle size potential results of the interaction between different mass concentrations of PHBA and β-glucosidase

注：大写字母和小写字母分别表示不同样品之间粒径和电位的显著性差异($P$<0.05)。

### 2.4 圆二色谱（CD）

圆二色谱检测揭示了 PHBA 与 β-葡萄糖苷酶相互作用对酶二级结构组成的影响。图 4 表明，当 PHBA 的质量浓度在 β-葡萄糖苷酶体系内发生改变，圆二色谱的光谱信号也随之变化，其特征是正负峰的吸收强度逐渐降低。图 5 通过 CDNN 技术揭示了 β-葡萄糖苷酶与 PHBA 作用前后的二级结构含

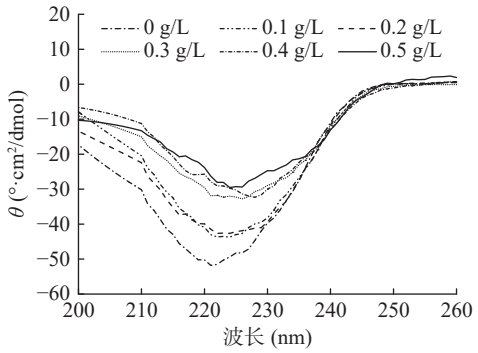



图 4 不同质量浓度下 PHBA 对 β-葡萄糖苷酶圆二色谱的影响

Fig.4 Effect of PHBA on β-glucosidase circular dichroism chromatography at different mass concentrations

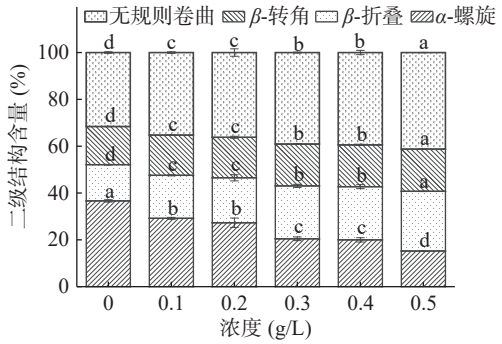



图 5 不同质量浓度下 PHBA 对 β-葡萄糖苷酶二级结构的影响

Fig.5 Effect of PHBA on the secondary structure of β-glucosidase at different mass concentrations

注：小写字母表示不同样品之间同一二级结构类型的显著性差异($P$<0.05)。

量变化。与未添加 PHBA 的对照组相比，当添加不同质量浓度的 PHBA 时，α-螺旋含量呈显著下降趋势（$P<0.05$）。同时，β-折叠、β-转角和无规则卷曲的含量增大，且随着浓度的增加，含量变化更加显著，表明 PHBA 与 β-葡萄糖苷酶发生了相互作用。相较于对照组（PHBA：0 g/L），当加入 0.5 g/L 的 PHBA 时，β-折叠、β-转角和无规则卷曲的含量分别提升了 90.20%、27.24%、50.56%，α-螺旋含量降低了 52.14%，这表明 α-螺旋区域可能是 β-葡萄糖苷酶的活性位点。PHBA 的引入导致 β-葡萄糖苷酶构象的改变，这可能会促进酶活性中心与底物的结合，提升酶的催化效率[25]。

## 2.5　荧光光谱

2.5.1　PHBA 对 β-葡萄糖苷酶的荧光猝灭效应　酶蛋白分子的主要荧光发色团是酪氨酸（Try）和色氨酸（Trp），通过监测这些氨基酸的内源荧光变化，可探究 PHBA 与 β-葡萄糖苷酶的结合作用[26]。在 350 nm 波长处，β-葡萄糖苷酶显示出最强的荧光发射峰。在固定 β-葡萄糖苷酶浓度的情况下，PHBA 浓度在 0~0.5 g/L 范围内时，PHBA 浓度的增大，对 β-葡萄糖苷酶的最大荧光峰形和位置没有显著影响，荧光强度却随 PHBA 浓度的提升呈现有规律的下降，且 PHBA 浓度越高，其荧光强度降低程度越大（图 6）。这表明 PHBA 与 β-葡萄糖苷酶之间存在相互作用，且 PHBA 对 β-葡萄糖苷酶的荧光产生了特异性的猝灭效应。pH6.0 条件下，当 PHBA 浓度为 0.5 g/L 时，其在 298、304、310 K 下对 β-葡萄糖苷酶的荧光猝灭率分别为：87.05%、84.93%、82.75%，这表明 PHBA 与 β-葡萄糖苷酶荧光发色团结合，从而有效地猝灭了酶的内源荧光，进而影响氨基酸残基的局部环境[13]。

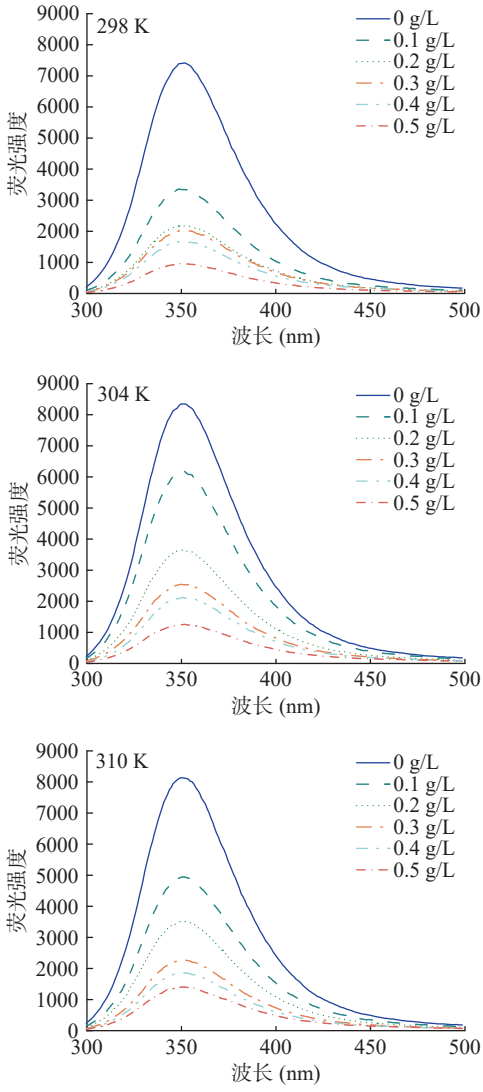



图 6　不同温度不同质量浓度 PHBA 下 β-葡萄糖苷酶的荧光光谱

Fig.6　Fluorescence spectra of β-glucosidase at different temperatures and different mass concentrations of PHBA

2.5.2　PHBA 对 β-葡萄糖苷酶的荧光猝灭机制　从图 7 可以看出，Stern-Volmer 方程在三种不同温度下都表现出较好的线性关系。其中，当温度为 310 K 时，Stern-Volmer 方程为 $Y=1.6224X+0.4$，$R^2=0.9914$，其线性关系最好，且 $R^2$ 接近于 1，表明 β-葡萄糖苷酶与 PHBA 的相互作用中，仅存在 1 种猝灭过程发生。随着温度升高，$K_{sv}$ 值呈下降趋势；同时，速率常数 $K_q$ 显著高于 $2.0\times10^{10}$ L/(mol·s)，即生物大分子与猝灭剂之间的扩散碰撞速率[27]，这表明该猝灭作用可能源于 PHBA 与 β-葡萄糖苷酶形成的稳定复合物，从而引发静态猝灭。

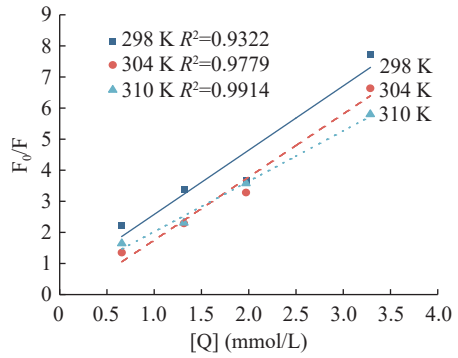



图 7　不同温度下的 Stern-Volmer 图

Fig.7　Stern-Volmer plot at different temperatures

2.5.3　PHBA 与 β-葡萄糖苷酶的结合常数与结合位点数　根据 lg[Q] 与 lg[($F_0$-F)/F] 的关系，计算三个温度下的 $K_a$ 和 n 值，结果如图 8 和表 1 所示。在

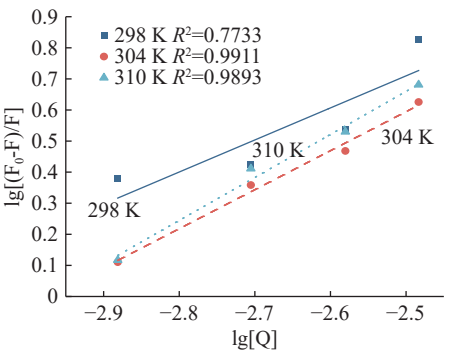



图 8　不同温度下的双对数图

Fig.8　Double-log plot at different temperatures

298、304、310 K 条件下，结合常数 $K_a$ 分别为 0.19×$10^4$、0.54×$10^4$、1.31×$10^4$ L/mol。数据显示，化合物与蛋白质的结合位点受温度影响较小，表明 PHBA 与 β-葡萄糖苷酶二者间具有显著的结合作用[18]。在研究的温度区间内，随温度的上升，$K_a$ 值呈增加趋势，表明复合物的稳定性随着温度升高而增强。在所测试温度下，结合位点数 n 值都约为 1，表明 PHBA 在 β-葡萄糖苷酶上仅占据 1 个或者 1 类结合位点[27]。

表 1 不同温度对结合常数 $K_a$、结合位点 n 以及热力学参数的影响

Table 1 Effects of different temperature on binding constant $K_a$, binding site n and thermodynamic parameters

| T(K) | $K_a$(L/mol) | n | ΔH(kJ/mol) | ΔG(kJ/mol) | ΔS[J/(mol·K)] |
|---|---|---|---|---|---|
| 298 | 0.19×$10^4$ | 1.03 | | −18.75 | |
| 304 | 0.54×$10^4$ | 1.26 | 0.49 | −21.72 | 128.54 |
| 310 | 1.31×$10^4$ | 1.38 | | −24.43 | |

2.5.4 PHBA 与 β-葡萄糖苷酶结合的相互作用力

小分子与蛋白质分子之间的作用力类型主要包括范德华力、氢键、疏水相互作用等。由表 1 知，结合自由能ΔG<0 时，表明 PHBA 与 β-葡萄糖苷酶的结合是一个自发过程；焓变ΔH>0，熵变ΔS>0，这表明结合反应是吸热的，并且主要的相互影响力是疏水作用力。然而，鉴于 β-葡萄糖苷酶结构的复杂性以及 PHBA 分子内部的多酚羟基，能够较容易地与 β-葡萄糖苷酶之间形成氢键，且羟基数目与氢键作用力的大小密切相关[28]。

## 2.6 分子对接

分子对接为评价 PHBA 与 β-葡萄糖苷酶的结合机制提供了重要支持，可呈现二者间相互作用的可视化效果[18]。利用 AutoDock vina 对 PHBA 和 β-葡萄糖苷酶的分子对接结构进行表征，通过选取二者最佳结合区域，得到结合自由能为-24.43 kJ/mol(T=310 K)，结合能越低意味着二者结合越稳定[29−30]。

图 9(a)呈现了 PHBA 与 β-葡萄糖苷酶分子对接的局部放大图，从图中可以观察到存在三个氢键与 β-葡萄糖苷酶的两个氨基酸残基(HIS533、ILE460)相连。为了更加清晰明确二者结合之间存在的相互作用力，利用 Discovery Studio 2019 Client 软件获取了 AutoDock vina 分子对接结果的 2D 图，图 9(b)展示了 PHBA 与 β-葡萄糖苷酶结合之间的相互作用力，图中显示了 9 个关键氨基酸残基(A：HIS-533、ILE-460、ILE-532、TYR-463、TYR-462、LYS-349、LYS-457、LYS-466 和 ASP-458)关键氨基酸残基参与了与 β-葡萄糖苷酶之间的相互作用，这些氨基酸可能是 PHBA 与 β-葡萄糖苷酶结合的潜在作用位点。其中，HIS-533 苯环支链端的氢原子和氧原子均与 PHBA 苯环上的羟基形成了氢键，ILE-460 和 TYR-463 也通过氢键与 PHBA 结合。与 3D 局部放大图不同，2D 图形成了 TYR-463 氢键，这可能是由于不同软件采用的算法不同造成的差异。同时，TYR-463 还通过芳香族 pi-pi 堆叠与 PHBA 形成疏水相互作用，可能因为多酚的芳香族碳与疏水残基侧链中的脂肪酸或芳香族碳之间的空间距离允许疏水相互作用的发生[31]。此外，PHBA 还与 β-葡萄糖苷酶的 ILE-532、TYR-462、LYS-349、LYS-457、LYS-466 和 ASP-458 形成范德华力。因此，PHBA 与 β-葡萄糖苷酶结合形成复合物时，主要作用力是氢键、疏水相互作用与范德华力，与热力学分析结果相符。这些作用力对维持复合物结构的稳定性起到一定作用。

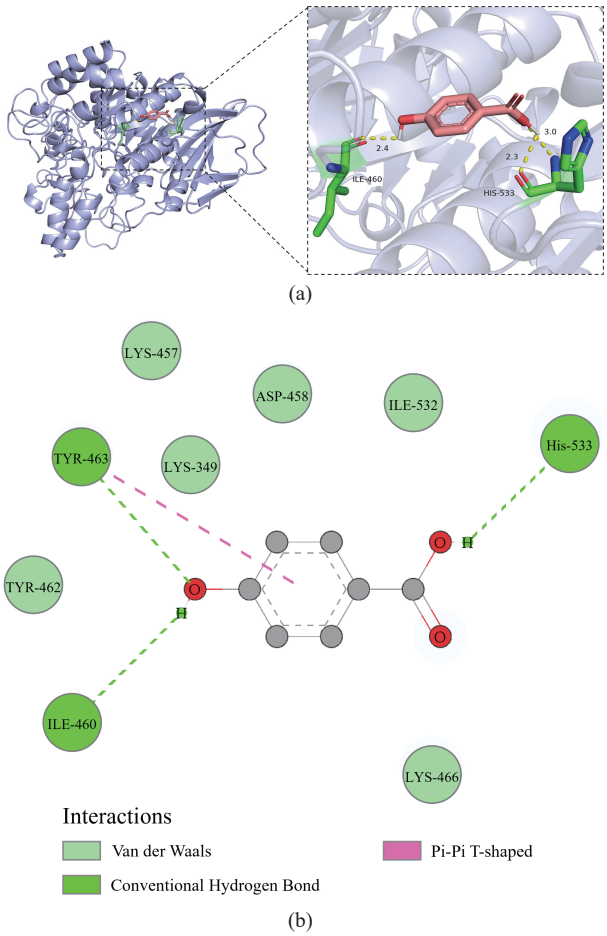



图 9 PHBA 与 β-葡萄糖苷酶的最佳分子对接结果

Fig.9 Molecular docking results of PHBA and β-glucosidase

注：(a)PHBA 与 β-葡萄糖苷酶的最佳对接可视化及局部放大结果；(b)PHBA 与 β-葡萄糖苷酶的最佳分子对接 2D 放大图。

## 2.7 PHBA 与 β-葡萄糖苷酶的分子动力学模拟

为进一步验证 PHBA 与 β-葡萄糖苷酶构成的复合物间的结合稳定性，对小分子 PHBA 和 β-葡萄糖苷酶复合物进行了分子动力学模拟。如图 10(a)所示，激活剂 PHBA 与 β-葡萄糖苷酶体系的 RMSD 值在 MD 模拟的前期(0~60 ns)波动较大，在 60 ns 后基本达到稳定状态。模拟过程中，RMSD 保持相对稳定，表明小分子 PHBA 与 β-葡萄糖苷酶的结合是稳定的[32]。RMSF 体现了局部氨基酸残基的结构波动，RMSF 值越大，残基越灵活。图 10(b)显示了

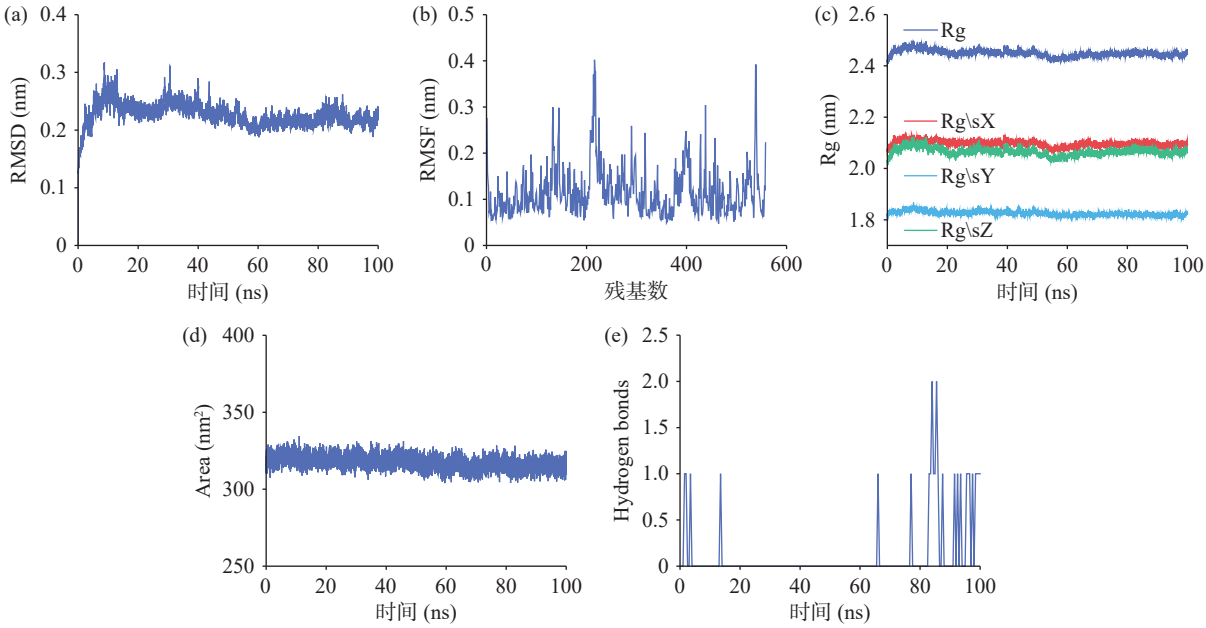



图 10　PHBA 与 β-葡萄糖苷酶的动力学模拟结果

Fig.10　MD simulation results of PHBA and β-glucosidase

RMSF 值主要在 0.2 范围内波动，表明二者结合稳定。回转半径(Rg)可评价蛋白质结构变化，Rg 值波动越小，表明蛋白质结构越稳定，反之蛋白质结构越松散。在 100 ns MD 模拟过程中，激活剂 PHBA 与 β-葡萄糖苷酶复合物体系的 Rg 值波动较小，在 0~60 ns 时，PHBA 对 β-葡萄糖苷酶的 Rg 值在 2.39~2.49 nm 波动(图 10(c))，表明 PHBA 能显著改变 β-葡萄糖苷酶的结构，导致其蛋白质结构整体致密度降低，空间结构变松散，从而造成稳定性减弱；而在 60 ns 后，PHBA 对 β-葡萄糖苷酶的 Rg 值下降，稳定在 2.44 nm。表面溶剂可及面积(SASA)可用于评估氨基酸残基对溶剂的暴露程度，预测 PHBA 和 β-葡萄糖苷酶结合过程中构象变化的程度，并反映蛋白质的溶剂可及性。如图 10(d)所示，激活剂 PHBA 与 β-葡萄糖苷酶体系的 SASA 在模拟初期呈现一定范围内的波动，而在 60 ns 后有轻微下降趋势，表明非极性基团之间的疏水相互作用逐渐增加，进而导致复合物结构趋于更加稳定和紧凑的状态。由图 10(e)可知，PHBA 与 β-葡萄糖苷酶之间可形成的氢键数在 0~2 间，表明氢键对二者的结合有一定作用。

## 3　结论

本文通过圆二色谱和分子对接等技术，研究了 PHBA 对 β-葡萄糖苷酶的激活效应。研究发现，PHBA 能够有效提升 β-葡萄糖苷酶的催化活性，且酶活性随着 PHBA 浓度的增加而升高。PHBA 与 β-葡萄糖苷酶存在内源荧光淬灭，并属于静态猝灭，结合产生 PHBA-β-葡萄糖苷酶复合物。热力学分析表明 β-葡萄糖苷酶的活性位点可能位于 α-螺旋内，二者的结合是自发的，有一个或者一类结合位点。分子对接结果推断出 PHBA 的激活机制主要是通过氢键与 β-葡萄糖苷酶催化活性位点的氨基酸残基和距活性位点一定距离的其他一些氨基酸残基结合，从而构成稳定的复合物。在 MD 模拟中发现，激活剂的加入能够提升 β-葡萄糖苷酶的稳定性，提高其致密度，使其更易被激活。本研究为富含酚酸的果蔬功能性成分产品的开发提供了理论依据和思路。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

## 参考文献

[1] YANG W, SU Y, WANG R, et al. Microbial production and applications of β-glucosidase-A review[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 256: 127915.

[2] MÓL P C G, JÚNIOR J C Q, VERÍSSIMO L A A, et al. β-glucosidase: An overview on immobilization and some aspects of structure, function, applications and cost[J]. Process Biochemistry, 2023, 130: 26−39.

[3] ZHANG J, XIA N, TENG J, et al. Effect of lactic acid bacteria fermentation on extractable and non-extractable polyphenols of soybean milk: Influence of β-glucosidase and okara[J]. Food Bioscience, 2023, 56: 103326.

[4] 林登蕃, 郑志豪, 周映君, 等. 植物基食品中多酚的生物转化及生物活性研究进展[J]. 食品科学, 2024, 45(14): 319−327. [LIN D F, ZHANG Z H, ZHOU Y J, et al. Biotransformation and biological activity of polyphenols in plant-based foods[J]. Food Science, 2024, 45(14): 319−327.]

[5] PENG X, YANG S, LIU Y, et al. Application of kombucha combined with fructo-oligosaccharides in soy milk: Colony composition, antioxidant capacity, and flavor relationship[J]. Food Bioscience, 2023, 53: 102527.

[6] 田野, 欧仕益. 几种酚酸对木聚糖酶活力的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2012, 31(1): 96−100. [TIAN Y, OU S Y. Influence of phenolic acids on activity of Xylanase[J]. Journal of Food and Biotechnology, 2012, 31(1): 96−100.]

[7] 张群林, AUNG MYINT, 刘丽娟, 等. 化学发光法检测苹果汁中的对羟基苯甲酸[J]. 中国科学技术大学学报, 2006(4): 426−431. [ZHANG Q L, AUNG M, LIU L J, et al. Chemilumines-

cent detection of p-hydroxybenzoic acid in apple juice[J]. Journal of University of Science and Technology of China, 2006(4): 426−431. ]
[ 8 ] 黄小兰, 盖智星, 王日葵, 等. 对羟基苯甲酸处理对采后柑橘炭疽病的抑制及机理研究[J]. 食品与机械, 2016, 32(9): 121−125, 208. [ HUANG X L, GE Z X, WANG R K, et al. Mechanism and inhibitory effect of p-hydroxybenzoic acid on anthracnose in postharvest citrus[J]. Food & Machinery, 2016, 32(9): 121−125, 208. ]
[ 9 ] PIRJO M, JARKKO H. Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2007, 20: 152−160.
[ 10 ] 张丽华, 查蒙蒙, 李顺峰, 等. 益生菌发酵果蔬汁研究进展[J]. 轻工学报, 2021, 36(4): 29−36. [ ZHANG L H, ZHA M M, LI S F, et al. Research progress on probiotic fermentation of fruit and vegetable juice[J]. Journal of Light Industry, 2021, 36(4): 29−36. ]
[ 11 ] 曹卓松, 孙飞龙, 唐薇, 等. 绿咖啡豆绿原酸的体外抗氧化性活性测定[J]. 包装与食品机械, 2020, 38(2): 28−31. [ CAO Z S, SUN F L, TANG W, et al. determination of antioxidant activity of chlorogenic acid in green coffee bean *in vitro*[J]. Packaging and Food Machinery, 2020, 38(2): 28−31. ]
[ 12 ] 孙逊, 李菲, 张雨, 等. 发酵果蔬汁的发酵方式、生物活性及品质改善研究进展[J]. 食品工业科技, 2023, 44(19): 471−480. [ SUN X, LI F, ZHANG Y, et al. Research progress on fermentation strategies, biological activities and quality improvements of fermented fruit and vegetable juices[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(19): 471−480. ]
[ 13 ] 沈荷玉, 李梦阳, 敖婧芳, 等. 没食子酸对 *α*-淀粉酶和 *α*-葡萄糖苷酶的抑制作用及机理[J]. 食品科学, 2023, 44(22): 31−38. [ SHEN H Y, LI M Y, AO J F, et al. Inhibitory effect and mechanism of gallic acid on *α*-amylase and *α*-glucosidase activities[J]. Food Science, 2023, 44(22): 31−38. ]
[ 14 ] 丁小娟. 嗜酸乳杆菌 *β*-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, 2019. [ DING X J. Study of *Lactobacillus acidophilus β*-glucosidase and its interaction with quercetin glycosidase substrate[D]. Guiyang: Guizhou University, 2019. ]
[ 15 ] 江桂兰, 王翼, 丁筑红, 等. 维生素 C 对嗜酸乳杆菌 GIM1.208 *β*-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 G L, WANG Y, DING Z H, et al. Effect of vitamin C on the activation of *β*-glucosidase in *Lactobacillus acidophilus* GIM1.208 and the interaction between them[J]. Microbiology China, 2023, 50(12): 5392−5403. ]
[ 16 ] SUBHEDAR P B, GOGATE P R. Enhancing the activity of cellulase enzyme using ultrasonic irradiations[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2014, 101: 108−114.
[ 17 ] SUN Y, ZENG L, XUE Y, et al. Effects of power ultrasound on the activity and structure of *β*-D-glucosidase with potentially aroma-enhancing capability[J]. Food Science & Nutrition, 2019, 7(6): 2043−2049.
[ 18 ] 侯倩宜, 董壮壮, 原红霞, 等. 多光谱法、分子对接模拟和生物膜干涉研究槲皮素与小窝蛋白-1 的相互作用[J]. 光谱学与光谱分析, 2023, 43(3): 890−896. [ HOU Q Y, DONG Z Z, YUAN H X, et al. A study of the mechanism of binding between quercetin and CAV-1 based on molecular simulation, bio-layer interferometry and multi-spectroscopy methods[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2023, 43(3): 890−896. ]
[ 19 ] 吕航, 可钦, 檀德宏, 等. 大蒜硫醚对葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的抑制作用[J]. 中国食品学报, 2022, 22(6): 133−141. [ LÜ H, KE Q, TAN D H, et al. Inhibitory action of garlic thioether on glucose-6-phosphate dehydrogenase[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2022, 22(6): 133−141. ]
[ 20 ] 耿子蔚, 丁玉婕, 童群义. 不同茶汤与乳清蛋白相互作用的研究[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(4): 230−236. [ GENG Z W, DING Y J, TONG Q Y, et al. Study on the interaction between different tea soups and whey protein[J]. Food and fermentation industries, 2023, 49(4): 230−236. ]
[ 21 ] 曹宇凡, 黄伟, 陈取明, 等. 茶黄素-3, 3'-双没食子酸酯对 *α*-葡萄糖苷酶的抑制机制[J]. 食品科学, 2024, 45(21): 104−111. [ CAO Y F, HUANG W, CHEN Q M, et al. Inhibitory mechanism of theaflavin-3, 3'-digallate on *α*-Glucosidase[J]. Food Science, 2024, 45(21): 104−111. ]
[ 22 ] CAJNKO M M, OBLAK J, GRILC M, et al. Enzymatic bioconversion process of lignin: Mechanisms, reactions and kinetics[J]. Bioresource Technology, 2021, 340: 125655.
[ 23 ] 郭东起, 殷秀秀, 程焕, 等. 甘草多糖与酪蛋白的相互作用及乳化性能[J]. 中国食品学报, 2023, 23(12): 12−19. [ GOU D Q, YIN X X, CHENG H, et al. The interaction mechanism and emulsifying properties of glycyrrhiza polysaccharide and casein[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2023, 23(12): 12−19. ]
[ 24 ] YANG R, LIU Y, GAO Y, et al. Ferritin glycosylated by chitosan as a novel EGCG nano-carrier: Structure, stability, and absorption analysis[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 105(P1): 252−261.
[ 25 ] 郝雪娇. 热加工下 *β*-乳球蛋白与多酚相互作用对多酚生物利用性的影响机制研究[D]. 无锡: 江南大学, 2023. [ QIE X J. Effect mechanism of *β*-lactoglobulin and polyphenol interaction on the bioavailability of polyphenol under thermal treatment[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2023. ]
[ 26 ] 江桂兰, 余奕宏, 丁筑红, 等. 维生素 C 对嗜酸乳杆菌 GIM1.208*β*-葡萄糖苷酶活性的影响及其相互作用[J]. 分析试验室, 2024, 43(8): 1079−1087. [ JIANG G L, YU Y H, GONG Z H, et al. Effect of vitamin C on *β*-glucosidase activity of *Lactobacillus acidophilus* GIM1.208 and their interaction[J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2024, 43(8): 1079−1087. ]
[ 27 ] 倪丹, 蒋新元, 唐玉莲, 等. 鞣花酸抑制酪氨酸酶的动力学、荧光光谱分析及分子对接[J]. 食品科学, 2024, 45(2): 104−112. [ NI D, JIANG X Y, TANG Y L, et al. Kinetic, fluorescence spectroscopy and molecular docking studies of tyrosinase inhibition by ellagic acid[J]. Food Science, 2024, 45(2): 104−112. ]
[ 28 ] 郁彩虹, 张耀东, 高裙裙, 等. 分子对接和荧光光谱法研究槲皮素与 *β*-葡萄糖苷酶的相互作用[J]. 光谱学与光谱分析, 2011, 31(8): 2151−2155. [ YU C H, ZHANG Y D, GAO Q Q, et al. Study on the interaction of quercetin with *β*-Glucosidase by fluorescence spectroscopy and molecular docking[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2011, 31(8): 2151−2155. ]
[ 29 ] 史明威, 张梦玥, 初鸿, 等. 绿原酸对 *α*-淀粉酶的抑制作用及其分子对接模拟[J]. 食品科学技术学报, 2023, 41(4): 135−143. [ SHI M W, ZHANG M Y, CHU H, et al. Inhibition of chlorogenic acid on *α*-amylase and its molecular docking simulation[J]. Journal of Food Science and Technology, 2023, 41(4): 135−143. ]
[ 30 ] HU Y, XU S, ZHU X, et al. Study on the interaction between methyl violet and bovine serum albumin by spectral analyses[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2009, 74(2): 526−531.
[ 31 ] 翟晓宇, 董文江, 于鑫欣, 等. 不同 pH 值环境下 *β*-乳球蛋白与咖啡中 3 种主要多酚之间的相互作用[J]. 食品科学, 2024, 45(19): 26−40. [ ZHAI X Y, DONG W J, YU X X, et al. The Interaction between *β*-lactoglobulin and three main polyphenols in coffee under different pH environments[J]. Food Science: 1−20. ]
[ 32 ] 李姿, 彭亦瑾, 姚瑶, 等. 对香豆酸、曲酸和绿原酸对苹果不同形态多酚氧化酶的抑制作用研究[J]. 食品工业科技, 2025, 46(19): 20−33]. [ LI Z, PENG Y J, YAO Y, et al. Studies of inhibitory effects p-coumaric acid, kojic acid and chlorogenic acid on different forms of polyphenol oxidase from apple[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(19): 20−33. ]