

麦谷蛋白和麦醇溶蛋白抑制 α -淀粉酶活性的动力学研究

陈旭^{1,2}, 黄淑娟¹, 曾焱¹, 邹水洋^{1,2}, 朱杰^{1,2}, 李琳^{1,2*}

(¹东莞理工学院化学工程与能源技术学院 食品营养健康工程与智能化加工研究中心 广东东莞 523808

²东莞理工学院 中国轻工业健康食品开发与营养调控重点实验室 广东东莞 523808)

摘要 为了探讨麦谷蛋白和麦醇溶蛋白对猪胰 α -淀粉酶 (PPA) 的抑制动力学特征。通过测定半抑制浓度 (IC_{50}), 结合 Dixon 方程和 Cornish-Bowden 方程, 探究麦谷蛋白和麦醇溶蛋白对 PPA 的抑制类型及抑制机理。结果表明, 麦谷蛋白对 PPA 的抑制作用属于混合型竞争性抑制, 麦醇溶蛋白对 PPA 的抑制作用属于竞争性抑制。麦谷蛋白和麦醇溶蛋白的竞争性抑制常数 (K_{ic}) 分别为 (20.533 ± 3.582) , (49.619 ± 5.949) mg/mL, 麦谷蛋白的反竞争性抑制常数 (K_{im}) 为 (49.358 ± 9.779) mg/mL。麦谷蛋白和麦醇溶蛋白的 IC_{50} 值分别为 (14.014 ± 1.089) , (33.193 ± 0.621) mg/mL。对于麦谷蛋白而言, K_{ic} 比 K_{im} 小, 表明麦谷蛋白与游离 PPA 的结合要比与淀粉和 PPA 形成的中间产物的结合更紧密。麦谷蛋白较麦醇溶蛋白对 PPA 抑制作用更强。总之, 麦谷蛋白和麦醇溶蛋白均可以抑制淀粉酶的活性, 从而延缓淀粉类食品的消化。研究结果将丰富典型蛋白质组分调控食物淀粉消化的机理, 为碳水化合物限制饮食体系低 GI 食品的开发提供理论指导。

关键词 麦谷蛋白; 麦醇溶蛋白; α -淀粉酶; 酶抑制作用

文章编号 1009-7848(2022)01-0039-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.01.005

近几十年, 全球患糖尿病的人数增长速度加快。根据最新一项流行病学调查结果显示, 中国大陆糖尿病患者总数估计为 1.298 亿, 中国成人糖尿病患病率高达 12.8%, 中国成人糖尿病前期比例高达 35.2%^[1]。在多相、多组分和多尺度同时存在的复杂食品体系中, 食物组分之间的相互作用机制与糖尿病患者的糖代谢和血糖应答水平有着密不可分的关系。快消化淀粉含量在很大程度上决定餐后血糖应答, 含有较高抗性淀粉或慢消化淀粉的食物属低血糖生成指数 (GI) 食品, 可保证人体的餐后血糖稳定, 改善餐后血糖负荷, 增加人体对胰岛素的敏感性。食物组分间的相互作用及其对淀粉消化性的影响已成为国际食品科学界的研究热点。

淀粉与蛋白质是食物体系中的两大典型组分。基于淀粉和蛋白混合体系, 国内外学者研究表明内源蛋白质和外源蛋白质均会对淀粉的消化酶解特性产生影响^[2-3]。内源蛋白影响淀粉的消化, 主

要归因于内源蛋白可以附着在淀粉颗粒表面或者镶嵌在淀粉之中, 阻碍淀粉酶对淀粉的酶解作用从而降低淀粉的消化率和预期血糖生成指数^[4-6]。此外, 淀粉-蛋白质的相互作用会导致血糖反应速率和淀粉消化率降低^[7-8]。内源蛋白质可能阻碍酶在淀粉颗粒表面的催化活性^[9]。外源蛋白对淀粉的体外消化性也有很大影响: 外源蛋白在淀粉颗粒表面形成吸附或者包埋, 进而降低酶对淀粉的接触和酶解^[10-12]; 蛋白与淀粉非共价结合降低了淀粉的消化性^[13-14]; 蛋白以非催化的方式与淀粉酶分子结合, 抑制了酶对淀粉的催化酶解能力^[15]。

Aravind 等^[16]研究淀粉体外消化水解率的影响因素, 即意大利面中硬质小麦淀粉和蛋白组成。研究表明, 面筋蛋白、麦谷蛋白和高分子质量的麦谷蛋白亚基使面团更难被 α -淀粉酶酶解, 归因于三者使面团的结构更加致密强劲。与之形成对比的是, 麦醇溶蛋白和低分子质量的麦谷蛋白亚基则使面团更容易被 α -淀粉酶水解, 归因于其通过二硫键的作用可以削弱面团的网络结构, 使面团的结构更加疏松。前期的抑制动力学研究表明, 小麦面筋蛋白对猪胰 α -淀粉酶 (Porcine pancreatic α -amylase, PPA) 存在较强的抑制作用, 且属于混合型竞争性抑制^[15]。面筋蛋白中有两个重要组分, 分别为麦谷蛋白 (Glutenin, Glu) (30%~40%) 和麦醇

收稿日期: 2021-01-12

基金项目: “十三五”国家重点研发计划重点专项 (2016YFD0400205); 广东省自然科学基金面上项目 (2020A1515011341)

作者简介: 陈旭 (1988—), 女, 博士, 讲师

通信作者: 李琳 E-mail: lilin@dgut.edu.cn

溶蛋白(Gliadin, Gli)(40%~50%)^[7]。面筋蛋白的混合型竞争性抑制作用可能归因于其中的不同蛋白组分,然而其对淀粉酶的抑制机制尚待明确。基于此,本文通过半抑制浓度(IC₅₀)来研究面筋蛋白中麦谷蛋白和麦醇溶蛋白对PPA的抑制活性。结合Dixon方程和Cornish-Bowden方程探究其抑制类型及抑制机理。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

玉米淀粉(食用级),杭州普罗星淀粉有限公司;无水乙醇、氢氧化钠、盐酸、碳酸钠,天津大茂化学试剂厂;PAHBAH、PBS缓冲液、面筋蛋白、麦醇溶蛋白、猪胰 α -淀粉酶,美国Sigma-Aldrich公司($\geq 1\ 000$ units/mg);其它试剂均为国产分析纯级。

1.2 设备与仪器

恒温水浴锅(HH-6型),江苏环宇科学仪器厂;立式电热恒温鼓风干燥箱(DHG-9420A型),上海齐欣科学仪器有限公司;电子分析天平(FA2204型),常州市衡正电子仪器有限公司;台式高速离心机(TG20-WSI),湘麓离心机仪器有限公司;磁力加热搅拌器(Hei-Tec),德国Heidolph公司;超声波清洗器(WD-9415B型),上海齐欣科学仪器有限公司;紫外分光光度计(UV-3200),深圳市科力易翔仪器设备有限公司;水分测定仪(MA35),赛多利斯仪器系统有限公司。

1.3 方法

1.3.1 面筋蛋白中麦谷蛋白的分离 称取100 g面筋蛋白置于1 L烧杯中,加入300 mL蒸馏水溶解,搅拌混匀后加入 α -淀粉酶溶液(Dry protein basis, 1%),在60℃条件下水浴恒温反应1.5 h,酶解反应结束后冷却至室温。酶解液在4 000 r/min条件下离心20 min以沉降蛋白质,除去上层水液。重复3次离心,即可基本除去全部淀粉。取出沉降蛋白质,在低温条件下干燥后保存。称量已除淀粉的面筋蛋白100 g于1 L烧杯中,加入体积比为115:25的乙醇和异丙醇的混合溶液600 mL。用磁力加热搅拌器在60℃条件下搅拌4 h后,用离心机在5 000 r/min转速下离心20 min。取上清液旋转蒸发浓缩后,在30℃环境下干燥,完成后

称量并保存。再用蒸馏水反复洗涤溶液沉淀后,进行冷冻干燥,完成后称量并保存^[8]。

1.3.2 麦谷蛋白和麦醇溶蛋白对PPA半抑制浓度(IC₅₀)的测定 将20 mL PBS缓冲液加入到50 mL带盖离心管中,再加入准确称量的玉米淀粉,使溶液质量浓度为1 mg/mL,随后分别加入准确称取的麦谷蛋白/麦醇溶蛋白,淀粉和麦谷蛋白的质量比分别设定为:1:2.5,1:5,1:10,1:15和1:20。用涡旋机混匀后放入烧杯中100℃水浴,让淀粉糊化30 min后取出,在室温冷却后置于37℃恒温水浴中进行磁力搅拌。准确移取1 mL PPA(3 U/mL)到离心管中,充分涡旋,置于37℃恒温水浴中进行酶解反应并准确计时。分别于4, 8, 12 min后,移取300 μ L酶解液到1.2 mL 0.3 mol/L的Na₂CO₃溶液中并充分涡旋混匀以终止酶解反应。在4 000 \times g条件下将酶解液离心10 min,得到上清液。

上清液中的还原糖含量通过PAHBAH的方法来测定。PAHBAH显色剂的配制方法如下:首先用5 mL 0.5 mol/L的HCl溶液溶解250 mg PAHBAH,继续添加45 mL 0.5 mol/L NaOH溶液,以保证PAHBAH能够完全溶解,显色剂需要现配现用。100 μ L不同时间点的酶解液与1 mL的PAHBAH试剂混合,置于100℃水浴加热5 min,经冷却后在410 nm波长处测定吸光度。采用麦芽糖溶液(0.01~0.9 mm, 100 μ L)来绘制标准曲线,以100 μ L去离子水作为对照。利用麦芽糖标准曲线将吸光度值转换为还原糖浓度。

初始反应速度(v)由反应溶液中还原糖浓度与时间曲线的斜率决定,PPA的抑制率 $I(\%)$ 按照公式(1)计算。

$$I = [1 - (\frac{v}{v_0})] \times 100 \quad (1)$$

式中, v 和 v_0 ——存在和不存在蛋白质时的初始反应速度(mg/mL·min)。

绘制抑制率与抑制剂浓度的比值曲线。

$$I = I_{\max} (1 - \frac{IC_{50}}{[I] + IC_{50}}) \quad (2)$$

式中, I ——抑制剂质量浓度(mg/mL); I_{\max} ——最大抑制百分比(%)。

运用SPSS采用非线性回归方法拟合计算式

(2), 计算 IC_{50} , 设置不同浓度条件下蛋白的抑制率为响应频率, 蛋白浓度为协变量^[9]。

1.3.3 麦谷蛋白和麦醇溶蛋白的 PPA 抑制动力学试验 麦谷蛋白/麦醇溶蛋白的 PPA 抑制动力学试验是通过设计不同浓度底物 (煮熟的玉米淀粉) 在不同浓度麦谷蛋白/麦醇溶蛋白中存在的情况下进行的。将 10 mL PBS 缓冲液 (pH 7.2) 加入到 50 mL 带盖离心管中, 再准确称取适量的玉米淀粉和麦谷蛋白/麦醇溶蛋白加入离心管中, 得到一系列的麦谷蛋白/麦醇溶蛋白溶液 (2.5~20 mg/mL) 和玉米淀粉溶液 (2.5~20 mg/mL)。待充分涡旋混匀后置于 100 °C 的水浴锅中恒温水浴蒸煮糊化 30 min, 取出后在 37 °C 水浴中以 160 r/min 进行磁力搅拌。加入 1 mL PPA (3 U/mL), 充分涡旋, 在恒定温度 (37 °C) 水浴中进行酶解反应, 并准确计时。分别于 4, 8, 12 min 后, 移取 300 μ L 的混合酶解液加入到装有 1.2 mL 0.3 mol/L 的 Na_2CO_3 的离心管中, 充分涡旋混匀以终止酶解反应。5 000 \times g 离心 10 min 以得到上清液。上清液中的还原糖含量用 PAHBAH 的方法测定, 参照 1.3.2 节的方法。

运用 Dixon 方程和 Cornish-Bowden 方程来分析阐释蛋白质对 PPA 的抑制机理和抑制类型。以时间为横坐标, 还原糖含量为纵坐标得到的图像的斜率为初始反应速率 (v)。

为了描述蛋白质对 α -淀粉酶的抑制机理, 采用 Dixon 方程分析初始反应速度 (v) 与抑制剂浓度 (i) 的关系。以还原糖含量为纵坐标, 时间为横坐标做图, 通过斜率可以得到初始反应速率 (v)。通过 Dixon 方程计算 K_{ic} 和 K_{iu} 。

混合型抑制的 Dixon 方程如式 (3)。

$$v = \frac{V_{\max} a}{K_m \left(1 + \frac{i}{K_{ic}}\right) + a \left(1 + \frac{i}{K_{iu}}\right)} \quad (3)$$

式中, V_{\max} ——最大初始速度 (mg/mL·min); a ——淀粉质量浓度 (mg/mL); K_m ——米氏常数; i ——抑制剂质量浓度 (mg/mL); v ——初始反应速度 (mg/mL·min)。

对 Dixon 方程两边同时取倒数得式 (4), 通过多个淀粉浓度, 可以推导出 $K_{ic} = -i$, 即 K_{ic} 为不同淀粉底物浓度所对应的各条曲线的交点的横坐标绝对值。

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m + a}{V_{\max} a} + \frac{i \left(\frac{K_m}{K_{ic}} + \frac{a}{K_{iu}} \right)}{V_{\max} a} \quad (4)$$

通过多个淀粉浓度值绘制 a/v 与 i 的关系来建立 Cornish-Bowden 图。

混合型抑制的 Cornish-Bowden 方程如式 (5)。

$$\frac{v}{a} = \frac{V_{\max}}{K_m \left(1 + \frac{i}{K_{ic}}\right) + a \left(1 + \frac{i}{K_{iu}}\right)} \quad (5)$$

将方程两边同时取倒数如式 (6), Cornish-Bowden 方程可以绘制成以 i 为横坐标, a/v 为纵坐标的线性图。使用上述计算方法, 可以得出方程的 $K_{iu} = -i$, 式中 K_{iu} 于不同淀粉底物浓度所对应的各条曲线的交点的横坐标绝对值。

$$\frac{v}{a} = \frac{K_m}{V_{\max}} \left(1 + \frac{i}{K_{ic}}\right) + \frac{a}{V_{\max}} \left(1 + \frac{i}{K_{iu}}\right) \quad (6)$$

2 结果与分析

2.1 麦醇溶蛋白和麦谷蛋白对 PPA 的抑制作用

麦醇溶蛋白对 PPA 抑制作用曲线如图 1(a, c, e) 所示。添加不同质量浓度的麦醇溶蛋白的体系与未添加蛋白的相对比, 都可以降低淀粉酶的初始反应速率。同时, 随着麦醇溶蛋白质量浓度的增加, 淀粉酶的初始反应速率逐渐降低, 抑制作用逐渐增强。不同质量比 (1:2.5, 1:5, 1:10, 1:15 和 1:20) 的麦醇溶蛋白对 PPA 的抑制率分别为: 6.31% \pm 1.96%, 17.65% \pm 1.05%, 27.89% \pm 2.46%, 28.69% \pm 0.978% 和 39.04% \pm 0.811%。通过 SPSS 软件进行回归得到麦醇溶蛋白的 IC_{50} 为 (33.193 \pm 0.621) mg/mL。

麦谷蛋白对 PPA 抑制作用曲线如图 1(b, d, f) 所示。与麦醇溶蛋白出现相似的趋势, 添加了不同质量浓度的麦谷蛋白的体系与未添加蛋白的相对比, 均可以降低淀粉酶的初始反应速率。同时随着麦谷蛋白质量浓度的增加, 淀粉酶的初始反应速率逐渐降低, 抑制作用逐渐增强。淀粉和麦谷蛋白在不同质量比 (1:2.5, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20) 条件下的抑制率分别为: 22.69% \pm 2.15%, 25.54% \pm 2.35%, 40.80% \pm 4.31%, 52.64% \pm 1.35% 和 59.12% \pm 0.186%。通过 SPSS 软件进行回归得到麦谷的

IC_{50} 为 $(14.014 \pm 1.089) \text{mg/mL}$ 。与麦醇溶蛋白相比, 麦谷蛋白对 PPA 表现出更强的抑制作用。

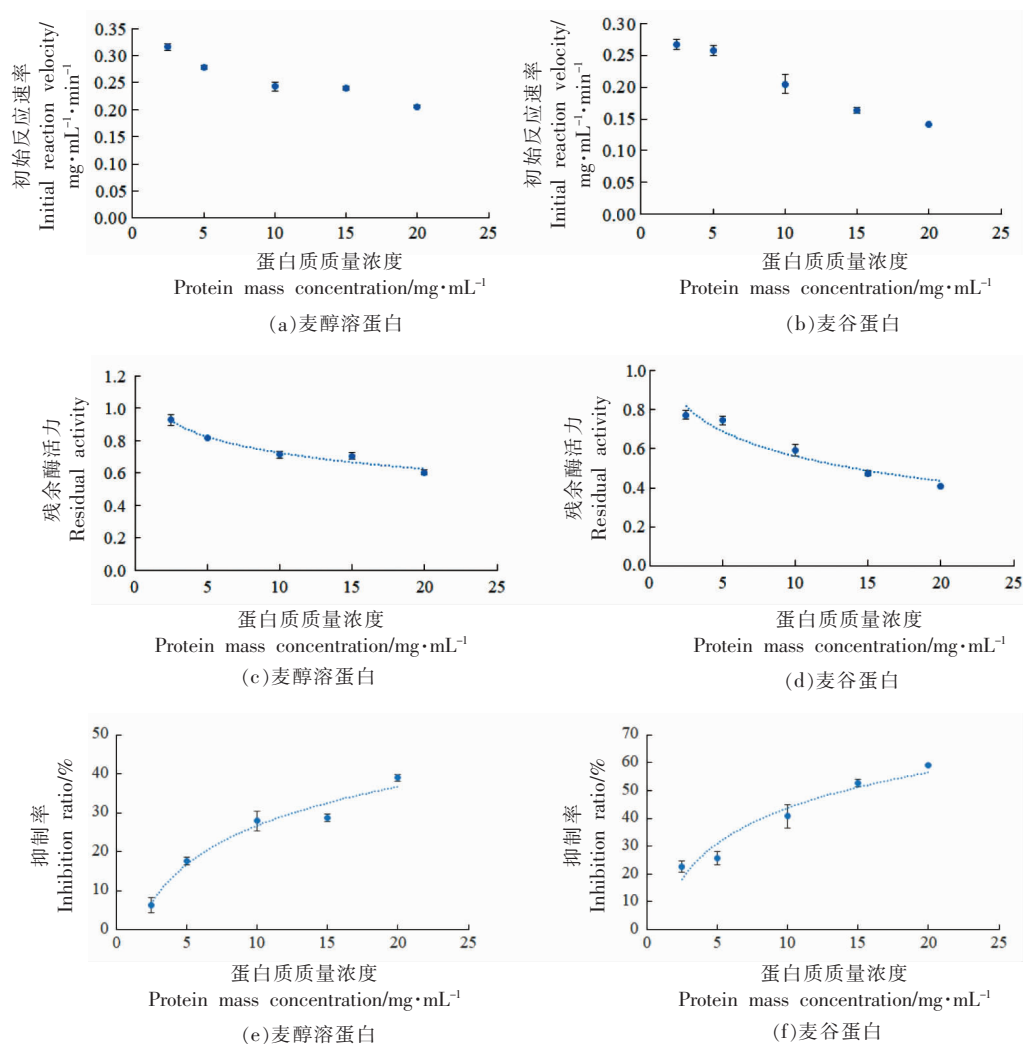


图 1 特定浓度淀粉在不同质量浓度的蛋白抑制剂下的初始反应速率(a,b); α -淀粉酶在不同质量浓度的蛋白抑制剂下的残留活性曲线(c,d);在不同质量浓度的蛋白抑制剂下相同浓度的淀粉对 α -淀粉酶下的抑制率(e,f)

Fig.1 Initial reaction velocity of corn starch with a given concentration at different mass concentrations of protein inhibitors (a, b); Residual activity curves of PPA at different mass concentrations of protein inhibitors (c, d); Inhibition of PPA on starch at different mass concentrations of protein inhibitors (e, f)

2.2 α -淀粉酶抑制动力学分析

麦谷蛋白和麦醇溶蛋白对 PPA 抑制作用的反应曲线如图 2 和图 3 所示。在蛋白质质量浓度一定的条件下,增加底物淀粉的浓度,体系的反应速率也随之增加。与不含蛋白的体系相比,添加了不同质量浓度的麦谷蛋白和麦醇溶蛋白均可造成 PPA 初始反应速率降低,即降低 PPA 对淀粉的酶解速率。此外,淀粉酶对淀粉的初始反应速率随着

添加麦谷蛋白和麦醇溶蛋白质量浓度增加而逐渐降低,表明抑制作用在逐渐增强。

不同质量浓度的淀粉在不同蛋白浓度条件下的反应初始速率如图 4 所示。麦谷蛋白和麦醇溶蛋白对 PPA 抑制的 Dixon 方程和 Cornish-Bowden 方程如图 5 和 6 所示。麦谷蛋白和麦醇溶蛋白对 PPA 抑制的 Dixon 方程和 Cornish-Bowden 方程特征值如表 1 所示。

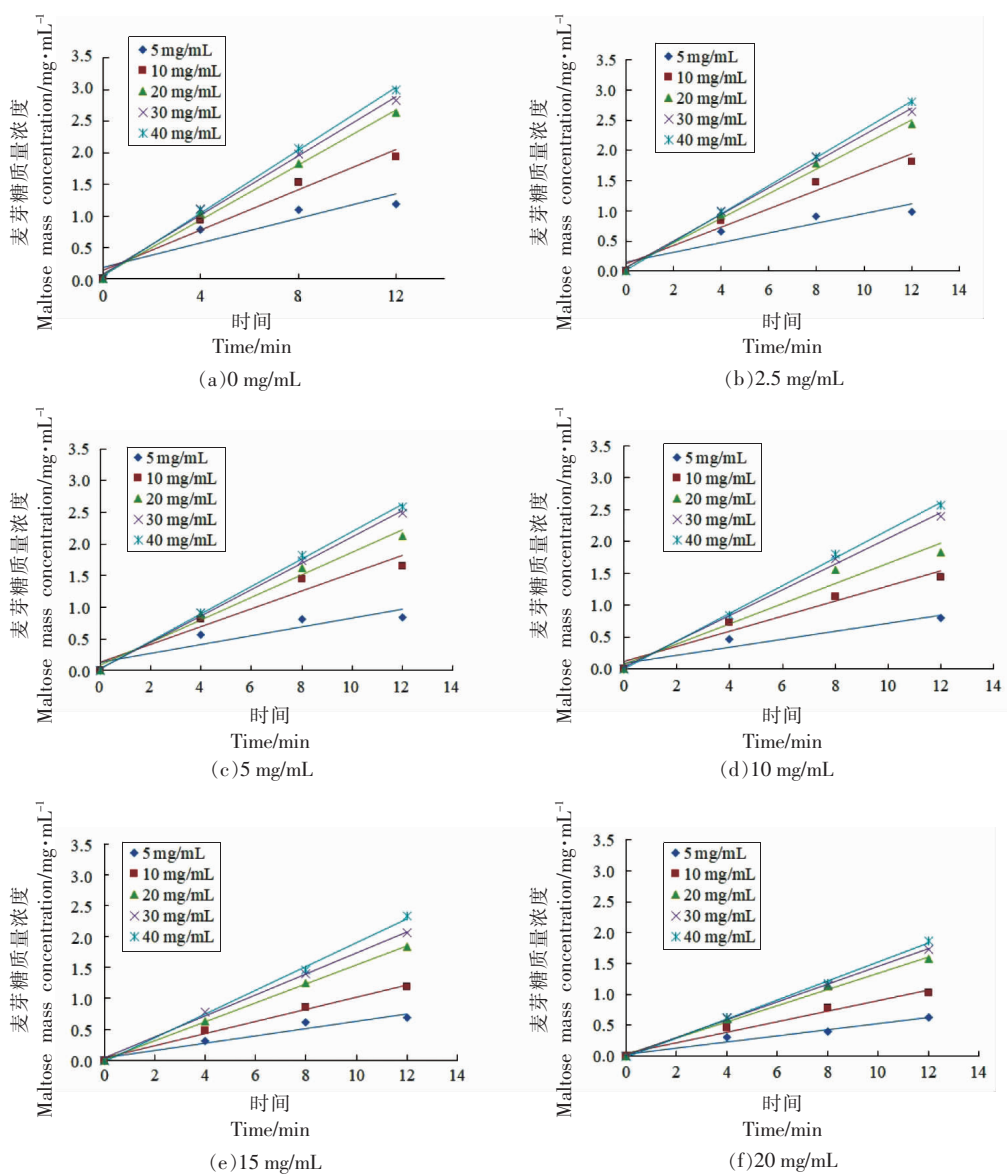
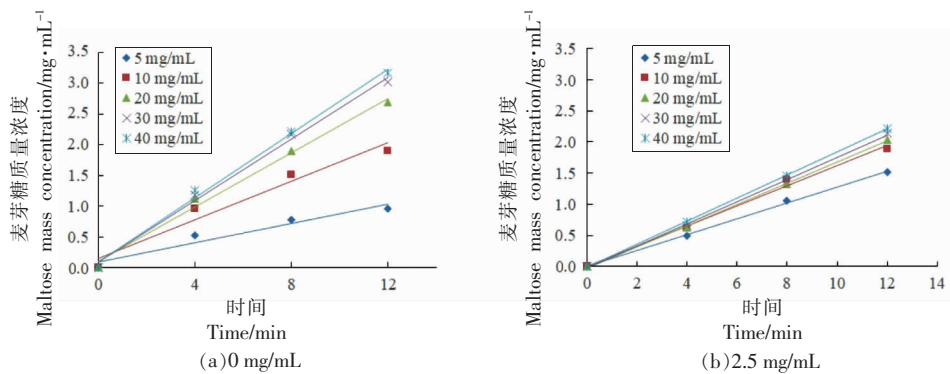


图 2 麦谷蛋白对 PPA 抑制作用曲线

Fig.2 The inhibitory effect of glutenin from wheat on PPA



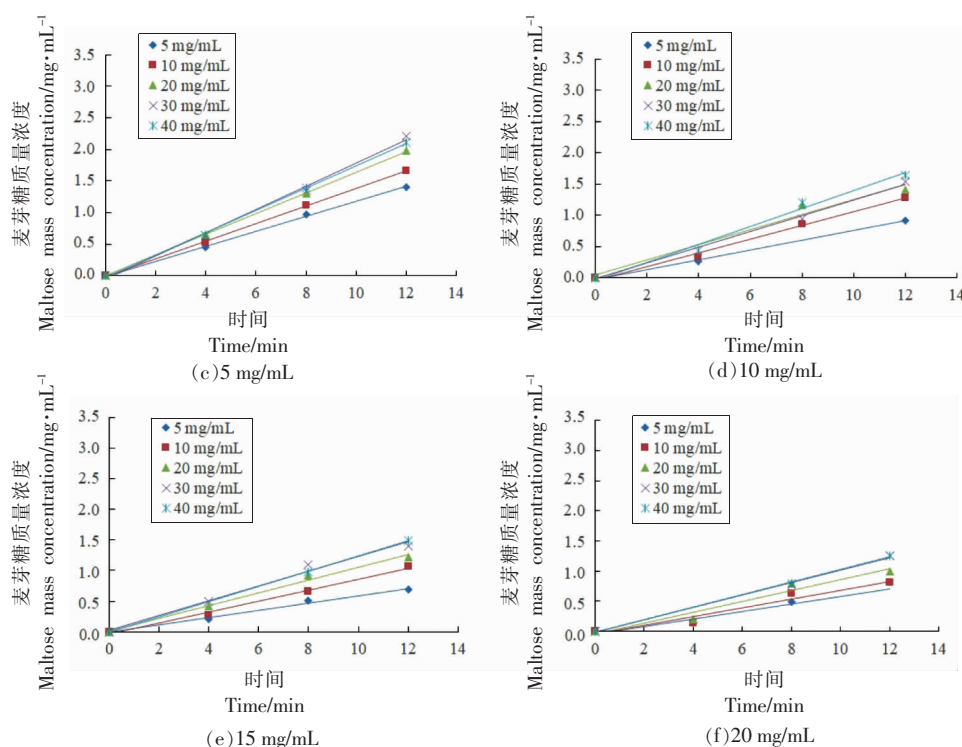


图3 麦醇溶蛋白对PPA抑制作用曲线

Fig.3 The inhibitory effect of gliadin from wheat on PPA

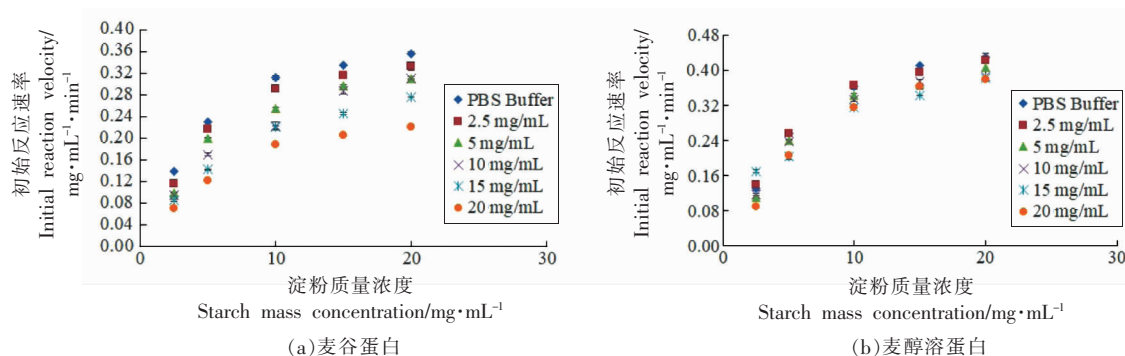


图4 不同质量浓度的淀粉在不同质量浓度的麦谷蛋白(a)和麦醇溶蛋白(b)下的初始反应速率

Fig.4 Initial reaction velocity of starch with different mass concentrations in glutenin (a) and gliadin from wheat (b) with different mass concentrations

从麦谷蛋白的 Dixon 方程和 Cornish-Bowden 方程可以看出有明显的交点,这就表明,麦谷蛋白对 PPA 的抑制既有竞争性抑制又有反竞争性抑制,即其类型属于混合型竞争性抑制。经计算得到麦谷蛋白的竞争性抑制常数(K_{ic})为 (20.533 ± 3.582) mg/mL,其反竞争性抑制常数(K_m)为 (49.358 ± 9.779) mg/mL(表 1)。对于麦谷蛋白而言,竞争性抑制常数比反竞争性抑制常数小,表明相对于它

与游离 PPA 的结合,它与淀粉和 PPA 形成的中间产物的结合要更为紧密^[20-21]。

从麦醇溶蛋白的 Dixon 方程图中可以看到有明显的交点,而 Cornish-Bowden 方程则是显示相互平行的直线。因此表明,麦醇溶蛋白对 PPA 的抑制作用类型属于竞争性抑制。经过公式计算得到麦醇溶蛋白的竞争性抑制常数(K_{ic})为 (49.619 ± 5.949) mg/mL(表 1)。

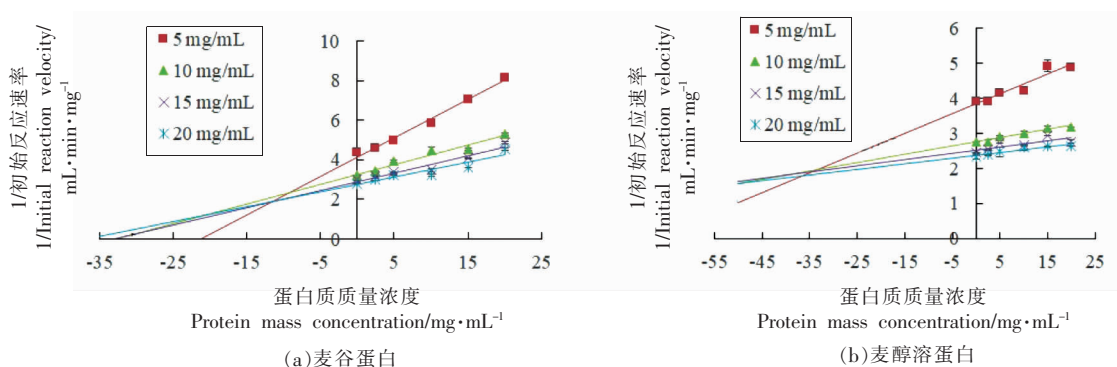


图 5 麦谷蛋白(a)和麦醇溶蛋白(b)对 PPA 抑制 Dixon 方程

Fig.5 Dixon (insets) curves for PPA inhibition by glutenin (a) and gliadin from wheat (b)

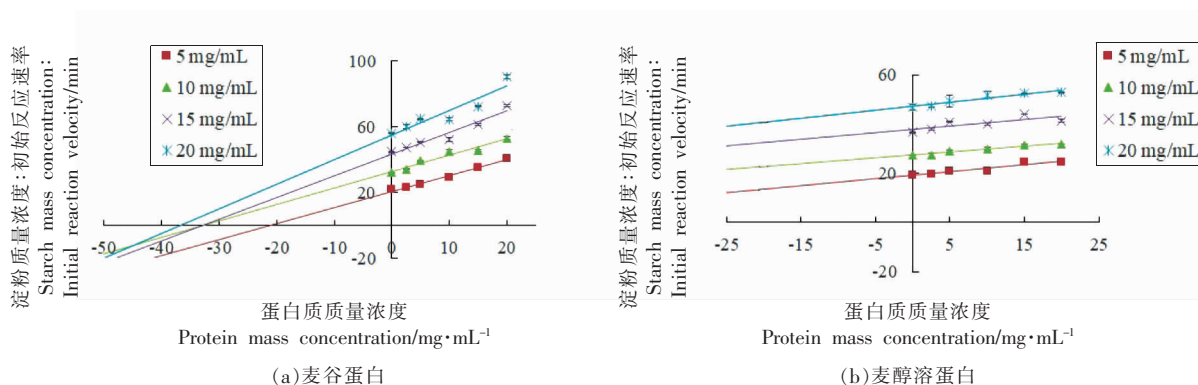


图 6 麦谷蛋白(a)和麦醇溶蛋白(b)对 PPA 抑制 Cornish-Bowden 方程

Fig.6 Cornish-Bowden (insets) curves for PPA inhibition by glutenin (a) and gliadin from wheat (b)

表 1 麦谷蛋白和麦醇溶蛋白对 PPA 抑制的 Dixon 方程和 Cornish-Bowden 方程特征值
Table 1 Characteristic value of Dixon and Cornish-Bowden equations for PPA inhibition by glutenin and gliadin from wheat

蛋白质	抑制类型	$K_{iv}/\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	$K_{ii}/\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	$1/K_{iv}/\text{mL}\cdot\text{mg}^{-1}$	$1/K_{ii}/\text{mL}\cdot\text{mg}^{-1}$	$IC_{50}/\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$
麦谷蛋白	混合型竞争性抑制	20.533 ± 3.582^b	49.358 ± 9.779	0.049 ± 0.009^a	0.021 ± 0.004	14.014 ± 1.089^b
麦醇溶蛋白	竞争性抑制	49.619 ± 5.949^a	-	0.020 ± 0.002^b	-	33.193 ± 0.621^a

注:采用 SPSS Statistics 26.0 进行 Duncan's least significant test 方法分析,同列不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

2.3 抑制机理

抑制剂与酶结合,会抑制底物与酶的相互作用,从而对酶解反应产生竞争性抑制;抑制剂只能和底物与酶相互作用产生的中间产物结合形成三元复合物,从而形成反竞争性抑制。在混合型竞争性抑制模型中,无论淀粉是否与酶结合,抑制剂都会与酶结合。

在本试验中,蛋白质对 PPA 的抑制作用可能存在以下几种抑制机理。首先,蛋白质可能通过非

共价作用力,包括氢键、共轭作用和疏水作用力等与 PPA 发生相互作用。PPA 的活性位点 (Asp197, Glu233 和 Asp300) 可能会通过氢键能与蛋白质中含有的羟基结合^[9]。蛋白中的 C=O 双键能够通过电子云的离域来与苯环形成 π - π 共轭增强共轭作用,可能改变酶的构象,使酶中的活性位点不能结合淀粉。因此,蛋白质对 PPA 构成竞争性抑制作用。其次,推测酶中还可能还存在二级碳水化合物结合位点(非活性位点),这些非活性位

点远离,并会进一步与蛋白质结合。已被证实这两个非活性结合位点具有特殊的功能,能够加强酶对淀粉的水解^[22]。当蛋白质发生变性之后可能与这些非活性位点结合,协同阻碍酶对淀粉的水解。再次,从反竞争性抑制的角度考虑,当淀粉与PPA相互结合后,可能会改变酶的空间构象,因此形成的淀粉酶-淀粉复合物会更易于与蛋白质的某些部位结合。

麦谷蛋白是由多个亚基通过二硫键相互结合而组成的非均质大分子聚合物,亚基包括高分子质量和低分子质量麦谷蛋白亚基,分子质量较大,约在十万到数百万之间^[23]。而麦醇溶蛋白是一种单体蛋白,分子质量较小,约在30~80 ku之间,分子间的相互作用力也较小,分子内通过氢键、疏水键和二硫键相互连接,形成比较紧凑的三维结构,没有亚基结构和肽链间二硫键^[24]。麦谷蛋白经蒸煮后,蛋白分子展开,因各种分子间作用力即氢键、静电引力、二硫键、疏水作用等形成网络状结构,形成具有一定孔洞结构的凝胶^[25-26]。蒸煮之后的麦谷蛋白结构变得松散,因而其内部的疏水性基团便暴露出来,从而增加了与猪胰 α -淀粉酶相互作用的几率。而麦醇溶蛋白在蒸煮过程中,由于其热凝固性,变性后依然不易溶于水^[27]。因此,蒸煮之后变性的麦谷蛋白更易与 α -淀粉酶结合,即麦谷蛋白较麦醇溶蛋白对 α -淀粉酶的抑制作用更强。

3 结论

本研究采用Dixon方程和Cornish-Bowden方程来探讨麦谷蛋白和麦醇溶蛋白对PPA的抑制动力学。研究表明,麦谷蛋白对PPA的抑制作用类型是混合型竞争性抑制,包括竞争性抑制和反竞争性抑制。麦谷蛋白与游离的PPA的结合相对于蛋白质与淀粉和PPA形成的中间产物的结合更加紧密。麦醇溶蛋白对PPA的抑制作用属于竞争性抑制。麦谷蛋白和麦醇溶蛋白均可以抑制PPA的活性,延缓淀粉的消化,且麦谷蛋白的抑制作用更强。这些研究结果对于碳水化合物限制饮食体系低GI食品开发和以蛋白质为基础的功能食品的探究具有重要的实用价值。

参 考 文 献

- [1] LI Y, TENG D, SHI X, et al. Prevalence of diabetes recorded in mainland China using 2018 diagnostic criteria from the American Diabetes Association: National cross sectional study[J]. *BMJ*, 2020, doi.org/10.1136/bmj.m997.
- [2] 崔亚楠, 张晖, 齐希光, 等. 脱脂脱蛋白对黑麦粉理化特性及体外消化特性的影响[J]. *食品与生物技术学报*, 2019, 38(5): 37-43.
CUI Y N, ZHANG H, QI X G, et al. Physicochemical properties, *in vitro* starch digestibility of rye as affected by defatted and deproteinized treatment[J]. *Journal of Food and Biotechnology*, 2019, 38(5): 37-43.
- [3] 杨翠红. 乳清分离蛋白对淀粉消化特性的影响及其作用机制研究[D]. 无锡: 江南大学, 2019.
YANG C H. Study on the influence of whey protein isolate on the digestibility of starch and its mechanism[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2019.
- [4] CHEN X, HE X, FU X, et al. *In vitro* digestion and physicochemical properties of wheat starch/flour modified by heat-moisture treatment[J]. *Journal of Cereal Science*, 2015, 63: 109-115.
- [5] WANG S, LUO H, ZHANG J, et al. Alkali-induced changes in functional properties and *in vitro* digestibility of wheat starch: The role of surface proteins and lipids[J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(16): 3636-3643.
- [6] CORNISH-BOWDEN A, EISENTHAL R. Statistical considerations in the estimation of enzyme kinetic parameters by the direct linear plot and other methods[J]. *Biochemical Journal*, 1974, 139(3): 721-730.
- [7] JENKINS D J A, THORNE M J, WOLEVER T M S, et al. The effect of starch-protein interaction in wheat on the glycemic response and rate of *in vitro* digestion[J]. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1987, 45(5): 946-951.
- [8] ROONEY L W, PFLUGFELDER R L. Factors affecting starch digestibility with special emphasis on sorghum and corn[J]. *Journal of Animal Science*, 1986, 63(5): 1607-1623.
- [9] HU P, FAN X, LIN L, et al. Effects of surface proteins and lipids on molecular structure, thermal

- properties, and enzymatic hydrolysis of rice starch[J]. Food Science and Technology, 2018, 38(1): 84-90.
- [10] CHEN X, HE X, ZHANG B, et al. Structure, physicochemical and *in vitro* digestion properties of ternary blends containing swollen maize starch, maize oil and zein protein[J]. Food Hydrocolloids, 2018, 76: 88-95.
- [11] CHEN X, HE X W, ZHANG B, et al. Effects of adding corn oil and soy protein to corn starch on the physicochemical and digestive properties of the starch[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 104: 481-486.
- [12] XU H, ZHANG G. Slow digestion property of microencapsulated normal corn starch[J]. Journal of Cereal Science, 2014, 60(1): 99-104.
- [13] YANG C, ZHONG F, GOFF H D, et al. Study on starch-protein interactions and their effects on physicochemical and digestible properties of the blends[J]. Food Chemistry, 2019, 280: 51-58.
- [14] SUN Q, XIONG C S L. Functional and pasting properties of pea starch and peanut protein isolate blends[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 101: 1134-1139.
- [15] CHEN X, HE X, ZHANG B, et al. Wheat gluten protein inhibits α -amylase activity more strongly than a soy protein isolate based on kinetic analysis [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 129: 433-441.
- [16] ARAVIND N, SISSONS M, FELLOWS C. Can variation in durum wheat pasta protein and starch composition affect *in vitro* starch hydrolysis?[J]. Food Chemistry, 2011, 124(3): 816-821.
- [17] WANG P, JIN Z, XU X. Physicochemical alterations of wheat gluten proteins upon dough formation and frozen storage - A review from gluten, glutenin and gliadin perspectives[J]. Trends in Food Science & Technology, 2015, 46(2): 189-198.
- [18] 郭嘉. 谷朊粉中麦谷蛋白和麦醇溶蛋白的分离及应用研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2011.
- GUO J. Study on extraction and application of glutenin and gliadin from wheat gluten[D]. Zhengzhou: Henan University of Technology, 2011.
- [19] 陈旭. 蛋白质和脂质对淀粉消化特性的影响机理研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2017.
- CHEN X. Mechanism for the digestion properties of starch influenced by lipid and protein[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2017.
- [20] NARITA Y, INOUE K. Inhibitory effects of chlorogenic acids from green coffee beans and cinnamate derivatives on the activity of porcine pancreas α -amylase isozyme I[J]. Food Chemistry, 2011, 127(4): 1532-1539.
- [21] YUSAKU N. Kinetic analysis and mechanism on the inhibition of chlorogenic acid and its components against porcine pancreas alpha-amylase isozymes I and II[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 19(57): 9218-9225.
- [22] DHITAL S, GIDLEY M J, WARREN F J. Inhibition of α -amylase activity by cellulose: Kinetic analysis and nutritional implications[J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 123: 305-312.
- [23] 刘娟. 菊粉对面团品质的影响及与蛋白质组分的相互作用机制[D]. 洛阳: 河南科技大学, 2016.
- LIU J. Effect of inulin on dough quality and its interaction with protein components[D]. Luoyang: Henan University of Science and Technology, 2016.
- [24] 王亚平, 安艳霞. 小麦面筋蛋白组成、结构和功能特性[J]. 粮食与油脂, 2011(1): 1-4.
- WANG Y P, AN Y X. The composition, structure and functional properties of wheat gluten protein[J]. Grain and Oil, 2011(1): 1-4.
- [25] 郭蔚波, 赵燕, 徐明生, 等. 不同处理方式下蛋白质结构变化与体外消化性关系研究进展[J]. 食品科学, 2019, 40(1): 327-333.
- GUO W B, ZHAO Y, XU M S, et al. Recent progress in understanding the relationship between protein structure change and *in vitro* digestibility after different treatments[J]. Food Science, 2019, 40(1): 327-333.
- [26] 陶汝青, 夏宁, 滕建文. 热处理对大豆分离蛋白结构和凝胶性的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(9): 60-66.
- TAO R Q, XIA N, TENG J W. Effect of heat treatment on the secondary structure and gel property of soybean protein isolate[J]. Food Science, 2018, 39(9): 60-66.
- [27] 王瑞红, 孙小红, 王莺颖, 等. 大豆蛋白和小麦蛋白结构与功能对比研究[J]. 粮食加工, 2016, 41(3): 32-36.

WANG R H, SUN X H, WANG Y Y, et al. Review on the difference of structure and function be-

tween soy protein and wheat protein[J]. Grain Processing, 2016, 41(3): 32-36.

Study of Inhibitory Kinetics of Glutenin and Gliadin from Wheat on α -Amylase Activity

Chen Xu^{1,2}, Huang Shujuan¹, Zeng Yan¹, Zou Shuiyang^{1,2}, Zhu Jie^{1,2}, Li Lin^{1,2*}

(¹Engineering Research Center of Health Food Design & Nutrition Regulation, School of Chemical Engineering and Energy Technology, Dongguan University of Technology, Dongguan 523808, Guangdong

²Key Laboratory of Healthy Food Development and Nutrition Regulation of China National Light Industry, Dongguan University of Technology, Dongguan 523808, Guangdong)

Abstract The objective of this study was to investigate the porcine pancreatic α -amylase (PPA) inhibitory activity of glutenin and gliadin. The half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) was determined, and the kinetics of inhibition were investigated using Dixon and Cornish-Bowden plots. The results showed glutenin was mixed inhibitors with competitive and uncompetitive inhibitory impacts on α -amylase, while gliadin showed competitive inhibitory effects on α -amylase. The competitive inhibition constants (K_{ic}) of glutenin and gliadin were (20.533±3.582), (49.619±5.949) mg/mL, respectively, and the uncompetitive inhibition constants (K_{iu}) of glutenin was (49.358±9.779) mg/mL. The IC_{50} values of glutenin and gliadin were (14.014±1.089) mg/mL and (33.193±0.621) mg/mL, respectively. For glutenin, the lower K_{ic} vs. K_{iu} suggested that glutenin bound more tightly to free PPA than the PPA-starch complex. Compared with gliadin, glutenin displayed a stronger inhibitory effect on α -amylase. These results indicated that glutenin and gliadin may delay the digestion of starchy foods by inhibiting starch hydrolytic enzymes. And these results will enrich the mechanism of protein regulation of starch digestion. The findings are also of important practical value for the development of carbohydrate-restricted diet and protein-based functional foods.

Keywords glutenin; gliadin; pancreatic α -amylase; enzyme inhibition