

Cl⁻和柑橘黄酮对胰淀粉酶活性和淀粉消化的影响

邓祥宜, 李炜玮, 徐耀, 胡澳, 鲍晓龙, 李琳
(武汉设计工程学院食品与生物科技学院 武汉 430205)

摘要 为揭示 Cl⁻及柑橘黄酮对胰淀粉酶活性和淀粉体外消化的影响,通过 DNS 法研究 Cl⁻对胰淀粉酶酶学性质的影响,在有(或无)Cl⁻基础上研究柑橘黄酮对胰淀粉酶活性及淀粉消化的影响,并通过荧光光谱法研究 Cl⁻及柑橘黄酮与胰淀粉酶的作用机制。结果表明:Cl⁻是胰淀粉酶的激活剂,并且激活呈现剂量效应,10 mmol/L Cl⁻(相当于食盐摄入量 4.5 g/d)能充分激活胰淀粉酶;Cl⁻能提高胰淀粉酶的最适温度(由 37 ℃提升至 47 ℃)和热稳定性(失活温度由 47 ℃提升至 57 ℃),改变胰淀粉酶的最适 pH(由 pH 6 变为 pH 7),而不改变其 pH 稳定性;无 Cl⁻时,高质量浓度的黄酮对胰淀粉酶具有抑制作用,抑制率最高为 17.1%,然而 10 mmol/L Cl⁻能解除这种抑制作用;10 mmol/L Cl⁻能大幅提高淀粉消化速率,终质量浓度 0.056 mg/mL 的柑橘黄酮不影响淀粉消化。荧光光谱试验结果表明:柑橘黄酮与胰淀粉酶结合使胰淀粉酶的荧光特性发生静态猝灭,10 mmol/L Cl⁻基本不影响柑橘黄酮和胰淀粉酶作用后的荧光光谱。本研究结果可为淀粉体外消化试验及柑橘黄酮功能食品的开发提供参考。

关键词 Cl⁻; 柑橘黄酮; 胰淀粉酶; 淀粉消化; 荧光光谱

文章编号 1009-7848(2022)05-0054-08 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.05.007

柑橘皮渣是柑橘加工的副产物,约占全果的 40%~50%^[1],含有较多的黄酮类化合物。黄酮具有降血糖^[2-3]、降血脂^[4]、抑菌^[5]、抗氧化^[6-7]、抗炎等功效,在食品、化妆品、医药工业都有很高的应用价值。很多研究表明,多酚类化合物(包括黄酮类)对蛋白酶^[8]、淀粉酶^[9]、脂肪酶^[10-11]等消化酶活性有抑制作用。通过抑制淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶的活力来降低淀粉消化速率是多酚类化合物降低餐后血糖的机理之一^[12,12]。然而,前期试验发现,柑橘黄酮(用 0.05 mmol/L NaOH 溶解后 HCl 调 pH 值至 8.0)对胰淀粉酶有激活作用,且与黄酮加入量呈正相关,而醇溶的柑橘黄酮(减压蒸馏去除酒精)无明显激活作用,推测激活作用可能与黄酮溶解方法有关。考虑到 Cl⁻对唾液淀粉酶有激活作用^[13],推测 NaCl 可能对胰淀粉酶有激活作用。

为弄清 Cl⁻和柑橘黄酮对胰淀粉酶活性的影响,本试验研究 Cl⁻对胰淀粉酶酶学性质的影响;

在有(或无)Cl⁻基础上研究柑橘黄酮对胰淀粉酶活性及淀粉消化的影响;通过荧光光谱法研究 Cl⁻和柑橘黄酮与胰淀粉酶的作用机制,以期在柑橘黄酮在保健品中的应用提供一定参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

柑橘黄酮(黄酮含量 $\geq 60\%$),西安森再生物工程有限公司;猪胰 α -淀粉酶(12 U/mg)和柚皮苷($\geq 95\%$),上海源叶生物科技有限公司;其它试剂均为国产分析纯级。

RF-6000 荧光分光光度计,日本岛津公司;FA2104B 型电子天平,上海越平科学仪器有限公司;HH-6 型数显水浴锅,江苏国华电器有限公司;UV2150 紫外-可见分光光度计,尤尼柯(上海)仪器有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 胰淀粉酶酶促反应速度(酶活力)的测定方法 采用 DNS 法制作麦芽糖标曲^[14]。以麦芽糖含量 x (mg) 为横坐标,以吸光值 y (OD_{540nm}) 为纵坐标,绘制标准曲线,所得回归方程为 $y=0.8067x-0.029$, $R^2=0.9996$ 。

胰淀粉酶酶促反应速度按以下方法测定^[15]:以 2% 可溶性淀粉为底物,在一定温度、一定 pH

收稿日期: 2021-05-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(31871530);湖北省教育厅科学研究项目(B2017368);湖北省科技创新团队计划项目(T201534);国家级大学生创新创业项目(201914035001)

作者简介: 邓祥宜(1984—),男,硕士,副教授
E-mail: dxiangyi@126.com

值(0.05 mol/L 磷酸缓冲液)条件下反应 10 min, 采用 DNS 法测定酶促反应产生的麦芽糖的量, 计算酶促反应速度, 用来表征酶活大小。

1.2.2 Cl⁻对胰淀粉酶活力影响的测定方法 取 4 支离心管, 以蒸馏水为对照, 在 Na⁺浓度相同的条件下, 比较 Cl⁻、SO₄²⁻、NO₃⁻对胰淀粉酶活力的影响。同时, 研究不同浓度 Cl⁻对胰淀粉酶活力的影响。酶活测定方法参照 1.2.1 节, 试验设 3 组平行, 结果用“平均值±标准差”表示。

1.2.3 Cl⁻对胰淀粉酶酶学性质影响的测定方法 研究 10 mmol/L Cl⁻对胰淀粉酶最适温度、最适 pH 值、热稳定性(不同温度下处理 30 min)和 pH 稳定性的影响(不同 pH 值下 4 °C 过夜)。另外, 在测定热处理(不同温度下处理 30 min)后的胰淀粉酶活力时, 研究 10 mmol/L Cl⁻能否恢复(或激活)热处理失活的胰淀粉酶。通过绘制双倒数曲线, 测定添加 10 mmol/L Cl⁻对胰淀粉酶 K_m 、 V_{max} 和 K_{cat} 的影响。试验以不加 Cl⁻为对照, 至少重复 3 次。

1.2.4 Cl⁻和柑橘黄酮对胰淀粉酶活力影响的测定方法 研究不同添加量(0.0, 0.1, 0.3, 1.0 mg)的柑橘黄酮对胰淀粉酶活力的影响; 另外, 在各梯度中添加 10 mmol/L Cl⁻, 研究 Cl⁻存在时柑橘黄酮对胰淀粉酶活力的影响, 试验设 3 组平行, 结果用“平均值±标准差”表示。

1.2.5 Cl⁻和柑橘黄酮对淀粉体外消化的影响 采用体外模拟消化的方法研究 Cl⁻和柑橘黄酮对淀粉消化的影响, 试验方法参考文献[16]。柑橘黄酮终质量浓度和 Cl⁻终浓度根据推算的浓度确定, 共 4 种处理, 每种处理重复测定 4 次, 结果以“平均值±标准差”表示。

黄酮终质量浓度的推算方法如下: 按照成人每次服用 140 mg 柑橘黄酮、食物消化体系(含消化液)按 2.5 L 计, 黄酮终质量浓度约 0.056 mg/mL。Cl⁻终浓度推算方法如下: 10 mmol/L Cl⁻相当于每顿从食物中摄入 1.5 g NaCl, 每日约 4.5 g, 与我国居民膳食指南提倡的每人每日食盐量(6 g)接近。

1.2.6 Cl⁻和柑橘黄酮对胰淀粉酶荧光光谱的影响

1.2.6.1 柑橘黄酮与胰淀粉酶相互作用的测定^[17-18]

将胰淀粉酶(终质量浓度 0.15 mg/mL)与柑橘黄酮溶液(终质量浓度 0~0.0134 mg/mL)混合, 分别

在 20 °C(293 K)和 35 °C(308 K)恒温水浴锅中反应 10 min, 用荧光分光光度计(激发光波长 280 nm)以 200 nm/min 的速度扫描发射光谱(300~420 nm), 狭缝宽 5 nm。每个梯度设置 3 组平行, 结果用平均值表示。进一步分析柑橘黄酮(质量浓度以柚皮苷计)对胰淀粉酶的荧光猝灭机理, 并计算结合常数 K_A 和结合点数 n 。

1.2.6.2 Cl⁻与胰淀粉酶相互作用的测定 取一定量的胰淀粉酶(测定体系中胰淀粉酶的终质量浓度 0.15 mg/mL)和不同浓度的 Cl⁻, 参考 1.2.6.1 节中的方法进行发射光谱扫描。

1.2.6.3 Cl⁻对柑橘黄酮和胰淀粉酶相互作用的影响 取胰淀粉酶(终质量浓度 0.15 mg/mL)、Cl⁻(终浓度 10 mmol/L)和不同质量浓度的柑橘黄酮, 参考 1.2.6.1 节中的方法进行发射光谱扫描。

2 试验结果和分析

2.1 Cl⁻对胰淀粉酶活力的影响

阴离子种类和 Cl⁻浓度对胰淀粉酶酶活的影响见图 1。对照组(水)中酶促反应速度为 2.36 mg/h, 加入 SO₄²⁻、NO₃⁻对酶活影响不大, 加入 Cl⁻后酶促反应速度增加到 12.35 mg/h, 激活效应明显(图 1a)。Cl⁻对淀粉酶的激活具有浓度效应, 0~10 mmol/L(酶促反应体系终浓度)时激活倍数迅速增加; 10 mmol/L 以上, 激活倍数基本保持不变(图 1b), 将 10 mmol/L 作为后续的试验浓度。

2.2 Cl⁻对胰淀粉酶酶学性质的影响

Cl⁻对胰淀粉酶酶学性质的影响见图 2。无 Cl⁻时, 胰淀粉酶的最适温度是 37 °C(图 2a)、最适 pH 值为 6(图 2b); 37 °C 以上处理 30 min 导致胰淀粉酶活力逐渐下降, 47 °C 时, 酶已基本失活(图 2c), 胰淀粉酶的 pH 稳定范围为 6~10(图 2e)。添加 10 mmol/L Cl⁻后, 胰淀粉酶的最适温度提高到 47 °C(图 2a)、最适 pH 值变为 7(图 2b); 热稳定性增强, 42 °C 以上处理 30 min 导致胰淀粉酶活力逐渐下降, 57 °C 时基本失活(图 2c), pH 值稳定性不变, 为 6~10(图 2e)。此外, 试验发现 Cl⁻不能恢复热失活(47 °C 以上)淀粉酶的活性(图 2d)。

胰淀粉酶双倒数曲线见图 2f。无 Cl⁻时, V_{max} 为 0.29 μmol/min, K_m 值为 0.14 mg/mL, K_{cat} 值为 4.65×10^7 /min; 添加 10 mmol/L Cl⁻后, V_{max} (1.83

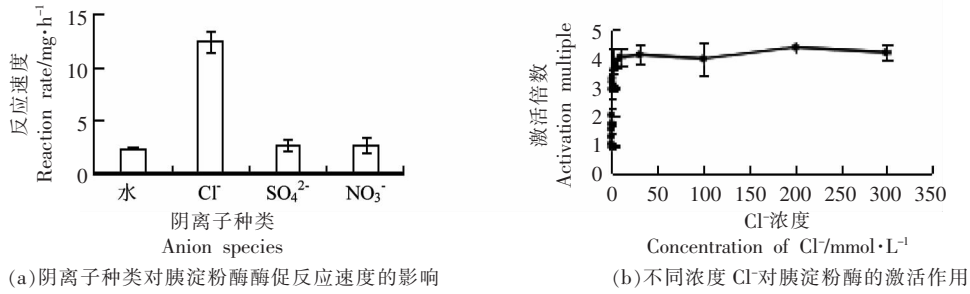


图1 不同阴离子对胰淀粉酶酶促反应速度的影响

Fig.1 Effects of different anions on the enzymatic reaction rate of pancreatic amylase

$\mu\text{mol}/\text{min}$) 和 K_{cat} 值 ($2.96 \times 10^8/\text{min}$) 增加了 6.3 倍, 说明 Cl^- 的激活效应明显, 而 K_{m} 值增加了 14.3 倍 ($2.00 \text{ mg}/\text{mL}$), 这可能不是酶和底物亲和力下降

的表现, 而是因为淀粉是大分子, 扩散能力差, 酶被激活后需要更高浓度的底物才能满足酶工作的需要。

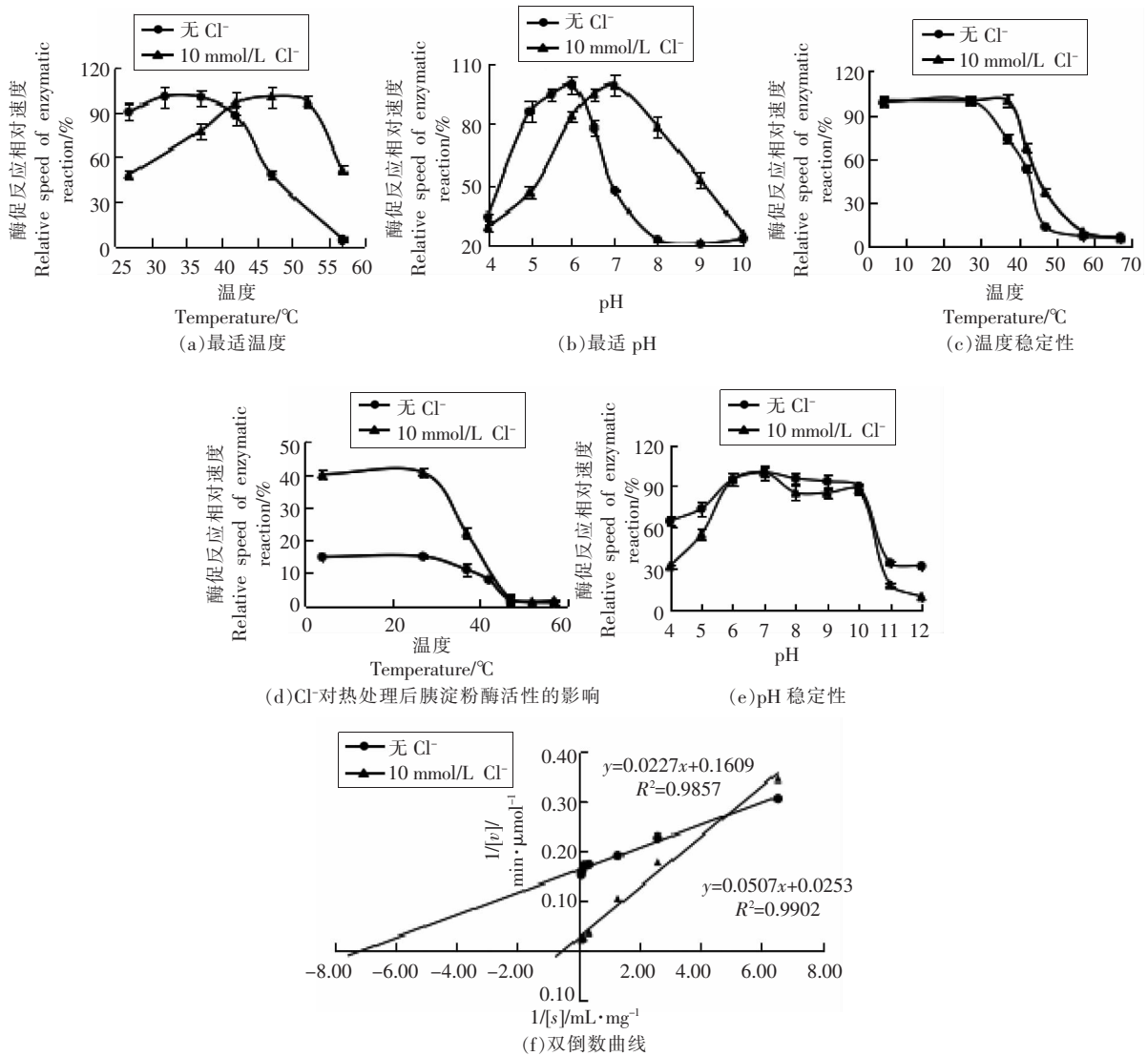


图2 Cl^- 对胰淀粉酶酶学性质的影响

Fig.2 Effects of Cl^- on enzymatic properties of pancreatic amylase

2.3 Cl⁻和柑橘黄酮对胰淀粉酶活力的影响

Cl⁻及柑橘黄酮对胰淀粉酶酶促反应速度的影响见图 3。无 Cl⁻时,反应体系中添加 0.1 mg 黄酮的酶促反应速度(28.35 mg/h)与对照(25.16 mg/h)相近,黄酮添加量 0.3~1.0 mg 时,酶促反应速度稍有下降(20.86 mg/h),抑制率最高为 17.1%。添加 10 mmol/L Cl⁻时,酶促反应速度随着黄酮含量的增加变化不大,均呈现较高的水平(各梯度均高于无 Cl⁻时,激活明显),即高浓度黄酮(0.3~1.0 mg)对胰淀粉酶没有明显抑制作用。因此,单独加 Cl⁻对胰淀粉酶起激活作用,单独添加高质量浓度黄酮对胰淀粉酶有抑制作用,同时添加 Cl⁻和柑橘黄酮时,柑橘黄酮基本不影响 Cl⁻发挥激活作用。

2.4 Cl⁻和柑橘黄酮对淀粉消化的影响

Cl⁻和柑橘黄酮对胰淀粉酶体外消化的影响见图 4。无 Cl⁻时,淀粉消化产生的还原糖的量呈线性增加;添加 10 mmol/L Cl⁻后,淀粉消化速度大幅增加,20 min 内消化了大部分的淀粉;添加终质量浓度 0.056 mg/mL 柑橘黄酮,基本不影响淀粉的消化规律,这与 2.3 节中酶活研究结果一致。

2.5 Cl⁻和柑橘黄酮对胰淀粉酶荧光光谱的影响

2.5.1 柑橘黄酮对胰淀粉酶荧光光谱的影响 柑橘黄酮对胰淀粉酶荧光的猝灭呈现剂量效应(见图 5),质量浓度越高猝灭作用越强。同时,荧光光谱峰由 337 nm 红移至 344 nm,说明两者发生了相互作用,导致胰淀粉酶色氨酸残基的荧光光谱发生了变化^[19]。以柑橘黄酮的主要成分柚皮苷^[20]代替柑橘黄酮提取物研究胰淀粉酶荧光光谱特性(数据未展示),两者结果高度吻合,说明柑橘黄酮提取物中与胰淀粉酶发生相互作用的成分是柚皮苷等主要成分。

2.5.2 柑橘黄酮和胰淀粉酶相互作用的荧光猝灭机理和结合常数 柑橘黄酮对胰淀粉酶荧光猝灭的 Stern-Volmer 曲线^[21]见图 6。20 °C(293 K)和 35 °C(308 K)下,柑橘黄酮对胰淀粉酶的表现猝灭常数 K_q 分别为 13.02×10^{12} L/(molos)和 11.29×10^{12} L/(molos),远高于不同猝灭剂与酶分子的最大扩散碰撞常数 2.0×10^{10} L/(molos)^[15];同时,猝灭常数 K_{sv} 由 20 °C 下的 13.02×10^4 L/mol 降低到 35 °C 下的 11.29×10^4 L/mol,说明柑橘黄酮不是通过分子动态碰撞导致胰淀粉酶荧光发生动态猝灭,而是通过

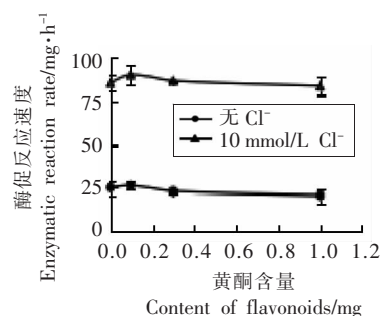


图 3 Cl⁻及柑橘黄酮对胰淀粉酶酶促反应速度的影响

Fig.3 Effects of Cl⁻ and citrus flavonoids on the enzymatic reaction rate of pancreatic amylase

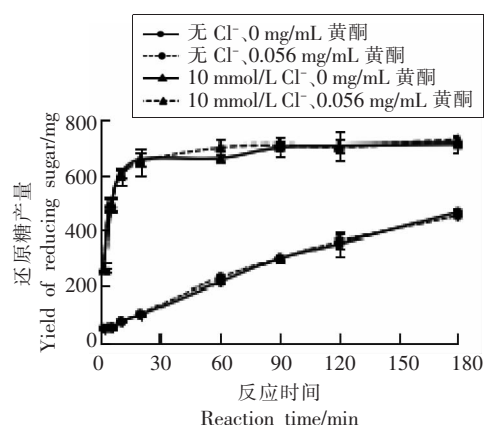
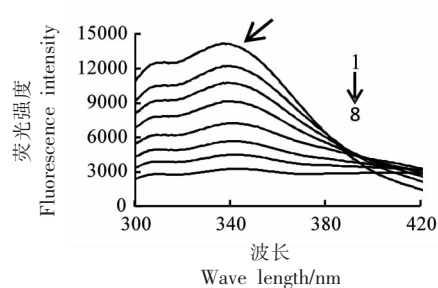


图 4 Cl⁻和柑橘黄酮对胰淀粉酶体外消化的影响

Fig.4 Effects of Cl⁻ and citrus flavonoids on the digestion of pancreatic amylase *in vitro*



注:1~8 中,柑橘黄酮的添加量依次为 0,0.0013,0.0027,0.0040,0.0060,0.0080,0.0107,0.0134 mg/mL。

图 5 柑橘黄酮对胰淀粉酶荧光光谱的影响

Fig.5 Effects of citrus flavonoids on the fluorescence spectra of pancreatic amylase

结合导致了静态猝灭^[18,22]。以 $\lg[Q]$ 为自变量、 $\lg[(F_0-F)/F]$ 为因变量进行一元线性回归,计算得到 35 °C(308 K) 下的两者结合常数 K_A 为 6.2×10^5 L/mol,结合位点数 n 为 1.2,即柑橘黄酮与胰淀粉酶

只有一个结合位点。

2.5.3 Cl⁻对胰淀粉酶荧光光谱的影响 Cl⁻对胰淀粉酶荧光光谱的影响见图7, 添加10 mmol/L Cl⁻后,胰淀粉酶的荧光强度与对照无明显差异(20℃);随着Cl⁻浓度的增加,荧光强度虽有所降低,但是变化幅度较小;当添加300 mmol/L和570 mmol/L Cl⁻时,荧光强度降低较明显,试验中发现高浓度Cl⁻的反应体系中出现了微量絮状沉淀,这可能是由于盐溶液会对蛋白质的电荷及表面水化特性产生影响,造成少量酶蛋白析出(盐析)而降低蛋白浓度,从而降低了蛋白质的荧光强度。35℃时呈现类似的规律(数据未展示)。

2.5.4 普通膳食中Cl⁻对柑橘黄酮和胰淀粉酶作用的荧光光谱的影响 普通饮食后消化液中的Cl⁻(10 mmol/L,按推荐食盐摄入量4.5 g/d计算)对柑橘黄酮和胰淀粉酶作用后荧光光谱的影响见图8。体系中柑橘黄酮质量浓度越高,胰淀粉酶的荧光强度越低,猝灭效果与2.5.1节中结果一致;柑橘黄酮质量浓度相同时,添加10 mmol/L Cl⁻对胰淀粉酶的荧光光谱没有明显影响,与2.5.3节结果一致。以柚皮苷代替柑橘黄酮混合物测定其对胰淀粉酶的荧光猝灭规律,结果高度吻合,10 mmol/L Cl⁻也不影响柚皮苷对胰淀粉酶的荧光猝灭效应(图9)。

综上,柑橘黄酮混合物对胰淀粉酶荧光的猝灭效应明显,其影响规律与柚皮苷(柑橘黄酮主要

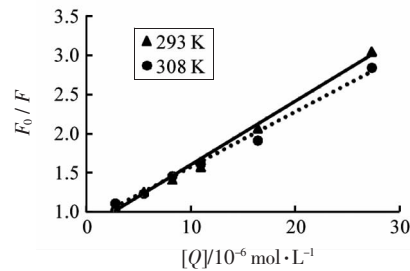
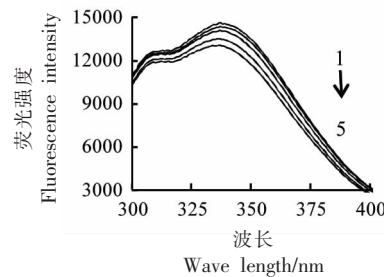


图6 柑橘黄酮对胰淀粉酶荧光猝灭 Stern-Volmer 曲线

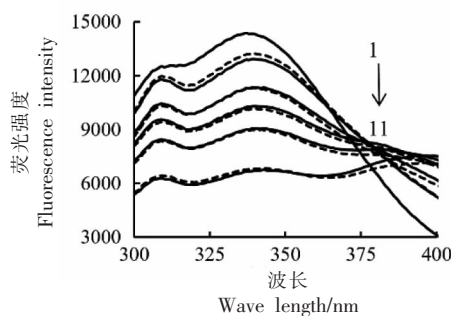
Fig.6 Stern-Volmer curve of pancreatic amylase fluorescence quenching by citrus flavonoids



注:1~5中,Cl⁻浓度分别为0,10,100,300,570 mmol/L。

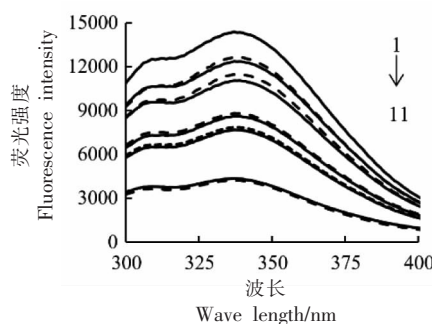
图7 20℃时Cl⁻对胰淀粉酶荧光光谱的影响曲线 Fig.7 Effects of Cl⁻ on fluorescence spectra of pancreatic amylase at 20℃

成分之一)一致,普通饮食后消化液中的Cl⁻(10 mmol/L)对柑橘黄酮(柚皮苷)和胰淀粉酶作用后荧光光谱没有明显影响。



注:虚线为无Cl⁻对照,实线为10 mmol/L Cl⁻;1~11中,柑橘黄酮终质量浓度依次是:0,0.0017,0.0017,0.0034,0.0034,0.0051,0.0051,0.0068,0.0068,0.0102,0.0102 mg/mL。

图8 Cl⁻和柑橘黄酮对胰淀粉酶荧光光谱的影响 Fig.8 Effects of Cl⁻ and citrus flavonoids on fluorescence spectra of pancreatic amylase



注:虚线为无Cl⁻对照,实线为10 mmol/L Cl⁻;1~11中,柚皮苷终浓度(mg/mL)依次是:0,0.0014,0.0014,0.0028,0.0028,0.0059,0.0059,0.0080,0.0080,0.0160,0.0160。

图9 Cl⁻和柚皮苷对胰淀粉酶荧光光谱的影响 Fig.9 Effects of Cl⁻ and naringin on fluorescence spectra of pancreatic amylase

3 结论和讨论

本试验结果表明,Cl⁻是猪胰淀粉酶的激活剂,由于猪胰淀粉酶与人胰淀粉酶的同源性很高,其作用规律可类推到人胰淀粉酶。消化液中 10 mmol/L Cl⁻相当于每餐从食物中摄入 1.5 g NaCl (每日约 4.5 g),接近我国居民膳食指南提倡的每人每日食盐量(6 g),说明日常食盐摄入量能保证胰淀粉酶的激活。Cl⁻能提高胰淀粉酶的最适温度(由 37 ℃提升至 47 ℃)和热稳定性(失活温度由 47 ℃提升至 57 ℃),然而 Cl⁻不能让热处理失活的胰淀粉酶恢复活性;Cl⁻虽能改变胰淀粉酶的最适 pH(由 6 变为 7),但会不改变其 pH 值稳定性。10 mmol/L Cl⁻虽能极大地提高胰淀粉酶的 V_{\max} 和 K_{cat} 值(6.3 倍),但 K_m 值也增加了 14.3 倍,这可能是因为酶被激活后需要更高浓度的底物才能满足酶工作的需要(底物淀粉是大分子,扩散能力差),不代表酶和底物亲和力下降。无 Cl⁻时,低质量浓度柑橘黄酮对胰淀粉酶酶活的影响不大,而高质量浓度的黄酮对胰淀粉酶具有一定的抑制作用(抑制率最高为 17.1%);添加 10 mmol/L Cl⁻,胰淀粉酶被激活后,能解除高质量浓度黄酮的抑制作用。正常膳食中的 Cl⁻(10 mmol/L)能大幅提高淀粉消化速率,终质量浓度 0.056 mg/mL 的柑橘黄酮基本不影响淀粉消化速率。综上可以初步得出,服用柑橘黄酮类保健品不会影响胰淀粉酶对普通膳食中淀粉的消化。

人胃中会分泌胃酸,按照餐后 pH 为 3~4 计算,若不考虑食物中的 Cl⁻,消化液中 Cl⁻浓度约 0.1~1 mmol/L,不足以完全激活胰淀粉酶(激活倍数为 1.5~3.3 倍,见图 1b),需要从膳食中补充食盐方能完全激活胰淀粉酶。这也可作为高血糖人群的日常饮食提供参考,如将淀粉类食物与含 NaCl 的食物间隔一段时间食用,或者清淡饮食再在餐后 2 h 饮用少量淡盐水补充盐分等。

荧光光谱常用来研究小分子与蛋白质的相互作用^[17-18,23]。蛋白质荧光主要来自色氨酸,研究表明 α -淀粉酶中至少含有 16 个色氨酸残基,因此可以用荧光光谱的变化来表征其结构的变化^[15,22]。本试验发现,柑橘黄酮(柚皮苷)能静态猝灭胰淀粉酶的自发荧光,且两者有 1 个结合位点;Cl⁻对胰淀粉酶的荧光光谱影响较小,且 10 mmol/L 的 Cl⁻

基本不影响柑橘黄酮(柚皮苷)对胰淀粉酶的荧光猝灭作用。

10 mmol/L 的 Cl⁻能显著激活胰淀粉酶(K_{cat} 值增加到 6.3 倍),推测其对胰淀粉酶的结构产生了重大影响。然而,Cl⁻对胰淀粉酶的荧光光谱几乎无影响,这说明 Cl⁻与胰淀粉酶的作用与胰淀粉酶的色氨酸残基无关,作用位点应该是其它残基。后续可通过圆二色谱、X-晶体衍射、核磁共振等方法进一步研究 Cl⁻对胰淀粉酶结构的影响,分析 Cl⁻激活胰淀粉酶的机制。

由于日常摄入的食盐可以完全激活胰淀粉酶,正常人肠道中的胰淀粉酶会以激活状态进行工作,在研究淀粉类食物体外消化特性时,应注意添加 Cl⁻,保证体外试验中胰淀粉酶也处于激活状态。

参 考 文 献

- [1] 孙海燕. 柑橘类膳食纤维的制备及其性能研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(4): 318-321, 329.
SUN H Y. Preparation and performance characterization of citrus dietary fiber[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(4): 318-321, 329.
- [2] SHEN W, XU Y, LU Y H. Inhibitory effects of citrus flavonoids on starch digestion and antihyperglycemic effects in HepG2 cells[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60: 9609-9619.
- [3] 李萌萌, 吕长鑫, 芦宇, 等. 纤维素酶辅助提取红树莓籽黄酮及其对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的抑制作用[J]. 中国食品学报, 2017, 17(11): 99-107.
LI M M, LÜ C X, LU Y, et al. Inhibitory activities on α -glucosidase and α -amylase of flavonoids cellulase-assisted extracts from red raspberry seed[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2017, 17(11): 99-107.
- [4] 王远, 郑雯, 蔡珺珺, 等. 辣木叶黄酮结构分析及其对胰脂肪酶的抑制作用 [J]. 食品科学, 2018, 39(2): 31-37.
WANG Y, ZHENG W, CAI J J, et al. Structural analysis and anti-pancreatic lipase activity of flavonoids from *Moringa oleifera* Lam. leaves[J]. Food Science, 2018, 39(2): 31-37.
- [5] 柯春林, 任茂生, 王娣, 等. 黄酮化合物抗菌机理

- 的研究进展[J]. 食品工业科技, 2015, 36(2): 388-391.
- KE C L, REN M S, WANG D, et al. Research progress on the antibacterial mechanism of flavonoids [J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(2): 388-391.
- [6] 勾洵, 黄思莹, 姚雪梅, 等. 马齿苋总黄酮对 $A\beta_{25-35}$ 阿尔茨海默症小鼠学习记忆功能的影响 [J]. 天然产物研究与开发, 2017(11): 1846-1850.
- GOU X, HUANG S Y, YAO X M, et al. Effects of total flavone in *Portulacaoleracea* L. on learning and memory of Alzheimer's disease mice caused by $A\beta_{25-35}$ [J]. Natural Product Research and Development, 2017(11): 1846-1850.
- [7] 王飞霞, 杨晓华, 张华峰, 等. 3种豆芽中异黄酮、多酚的体外抗氧化活性及其对果蝇 SOD、GSH-Px 活力的影响[J]. 中国食品学报, 2018, 18(11): 57-64.
- WANG F X, YANG X H, ZHANG H F, et al. *In vitro* antioxidant capacities of isoflavones and polyphenols in three bean sprouts and their effects on activities of SOD and GSH-Px in *Drosophila melanogaster* [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2018, 18(11): 57-64.
- [8] 梁会丽. 黄酮类化合物与胃蛋白酶的相互作用及其对酶活性影响的研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2014.
- LIANG H L. Studies on the interaction between pepsin and flavonoids and their effects on enzyme activity[D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2014.
- [9] 罗芳. 柑橘黄酮与 α -淀粉酶、淀粉的相互作用研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2017.
- LUO F. Investigation of the interaction of citrus flavonoids with α -amylase and starch[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2017.
- [10] ZHANG X, JIA Y J, MA Y L, et al. Phenolic composition, antioxidant properties, and inhibition toward digestive enzymes with molecular docking analysis of different fractions from *Prinsepia utilis* Royle fruits [J]. Molecules, 2018, 23: 3373.
- [11] ZHANG C T, MA Y L, GAO F D, et al. The free, esterified, and insoluble-bound phenolic profiles of *Rhus chinensis* Mill. fruits and their pancreatic lipase inhibitory activities with molecular docking analysis [J]. Journal of Functional Foods, 2018, 40: 729-735.
- [12] 谢星, 涂宗财, 王辉, 等. 野生和种植藜蒿不同部位提取物的抗氧化活性和酶抑制活性[J]. 中国食品学报, 2020, 20(3): 58-65.
- XIE X, TU Z C, WANG H, et al. Antioxidant and enzyme inhibitory activities of extracts from various parts of wild and cultivated *Artemisia selengensis* Turcz [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(3): 58-65.
- [13] 陈建澍, 郑兰娟, 梅建凤, 等. 新琼寡糖对唾液淀粉酶活性的影响[J]. 食品科技, 2013, 38(8): 71-74.
- CHEN J S, ZHENG L J, MEI J F, et al. Effect of neoagaro-oligosaccharide on activity of salivary amylase [J]. Food Science and Technology, 2013, 38(8): 71-74.
- [14] 李继伟, 龚伟发, 穆素芬, 等. 微波辅助提取绿茶多糖条件的响应面优化[J]. 应用化工, 2016, 45(11): 2009-2012.
- LI J W, GONG W F, MU S F, et al. Optimization of polysaccharides extraction conditions from green tea by microwave assisted extraction method through response surface analysis [J]. Applied Chemical Industry, 2016, 45(11): 2009-2012.
- [15] 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 -amylase [J]. Food Science, 2020, 41(3): 12-17.
- [16] 李琳, 张小康, 周子政, 等. 白萝卜不溶性膳食纤维提取方法的比较及其对饼干消化的影响[J]. 农产品加工, 2020(14): 38-41.
- LI L, ZHANG X K, ZHOU Z Z, et al. Comparison of extraction methods for insoluble dietary fiber of white radish and the effect of IDF on biscuits digestion [J]. Farm Products Processing, 2020(14): 38-41.
- [17] 刘硕, 王萌, 朱少华, 等. 紫甘薯花色素与胰蛋白酶相互作用特性[J]. 食品科学, 2014, 35(23): 232-237.
- LIU S, WANG M, ZHU S H, et al. Interaction between purple sweet potato anthocyanins and trypsin [J]. Food Science, 2014, 35(23): 232-237.
- [18] 张静, 米佳, 禄璐, 等. 黑果枸杞花色苷提取物对胰脂肪酶活性的影响[J]. 食品科学, 2020, 41(5): 8-14.
- ZHANG J, MI J, LU L, et al. Effect of anthocyanins extract from *Lycium ruthenicum* Murr. fruit on pancreatic lipase activity [J]. Food Science, 2020,

- 41(5): 8-14.
- [19] SU J H, WANG H X, MA C Y, et al. Hypocholesterolaemic mechanism of bitter melon aqueous extracts via inhibition of pancreatic cholesterol esterase and reduction of cholesterol micellar solubility [J]. *International Journal of Food Sciences & Nutrition*, 2016, 67(1): 20-28.
- [20] KHAN M K, HUMA Z E, DANGLES O. A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols [J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2014, 33(1): 85-104.
- [21] SINGHA ROY A, GHOSH P, DASGUPTA S. Glycation of human serum albumin alters its binding efficacy towards the dietary polyphenols: A comparative approach [J]. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2016, 34(9): 1911-1918.
- [22] 姚林锋, 何强. 单宁酸与胰 α -淀粉酶作用特性研究 [J]. *食品工业科技*, 2014, 35(3): 63-66.
- YAO L F, HE Q. Interaction between tannic acid and pancreatic α -amylase [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2014, 35(3): 63-66.
- [23] 陶慧林, 刘峥, 王松梅, 等. 荧光光谱法对邻香草醛缩精氨酸席夫碱与胰蛋白酶相互作用的研究及其应用 [J]. *理化检验 (化学分册)*, 2010, 46(11): 1269-1272.
- TAO H L, LIU Z, WANG S M, et al. Fluorespectrometric study on the interaction of the condensate of o-vanillin and arginine schiff base with trypsin and its analytical application [J]. *Physical Testing and Chemical Analysis (Part B: Chemical Analysis)*, 2010, 46(11): 1269-1272.

Effects of Cl⁻ and Citrus Flavonoids on Pancreatic Amylase Activity and Starch Digestion

Deng Xiangyi, Li Weiwei, Xu Yao, Hu Ao, Bao Xiaolong, Li Lin

(College of Food & Biological Science and Technology, Wuhan Institute of Design and Sciences, Wuhan 430205)

Abstract In order to investigate the effects of Cl⁻ and citrus flavonoids on pancreatic amylase activity and starch digestion *in vitro*, the effect of Cl⁻ on the enzymatic properties of pancreatic amylase was studied by DNS method, and the effects of citrus flavonoids on pancreatic amylase activity and starch digestion were studied with or without Cl⁻, and the interaction mechanism of Cl⁻ and citrus flavonoids with pancreatic amylase was studied by fluorescence spectrometry. The results showed that Cl⁻ was an activator of pancreatic amylase, and the activation showed a dose-dependent effect. 10 mmol/L Cl⁻ (equivalent to the salt intake of 4.5 g/d) could fully activate pancreatic amylase. Cl⁻ could increase the optimum temperature (from 37 °C to 47 °C) and thermal stability (inactivation temperature increased from 47 °C to 57 °C), and change the optimal pH (from 6 to 7) of pancreatic amylase without changing its pH stability. In the absence of Cl⁻, high concentration of flavonoids had inhibitory effect on pancreatic amylase, with the highest inhibition rate 17.1%, but 10 mmol/L Cl⁻ could relieve the inhibition. 10 mmol/L Cl⁻ could significantly increase the starch digestion rate, and citrus flavonoids of final mass concentration 0.056 mg/mL had no effect on starch digestion. The results of fluorescence spectrum experiment showed that the fluorescence of pancreatic amylase was statically quenched by binding citrus flavonoids, and 10 mmol/L Cl⁻ had no effect on the fluorescence spectrum of pancreatic amylase interaction with citrus flavonoids. The results of this study can provide reference for starch digestion *in vitro* and the development of citrus flavonoid functional food.

Keywords Cl⁻; citrus flavonoids; pancreatic amylase; starch digestion; fluorescence spectrum