

# 柚皮素与 $\alpha$ -淀粉酶相互作用的研究

李琼<sup>1</sup>, 陈磊<sup>2</sup>, 韦庆益<sup>2</sup>, 袁尔东<sup>2</sup>, 宁正祥<sup>2</sup>

(1. 华南理工大学化学与化工学院, 广东广州 510641) (2. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510641)

**摘要:** 本文研究了柚皮素与  $\alpha$ -淀粉酶的相互作用。柚皮素与  $\alpha$ -淀粉酶反应形成复合物, 从而对  $\alpha$ -淀粉酶的催化活性、荧光特性以及柚皮素的抗氧化活性产生相应的影响。采用酶动力学方法和荧光光谱法研究了柚皮素对  $\alpha$ -淀粉酶的抑制作用。在 pH 6.8、37 °C 条件下反应 20 min, 柚皮素 (1 mg/mL, 0.05 mL) 对  $\alpha$ -淀粉酶 (0.33 U/mL, 0.2 mL) 催化活性的抑制率达到 36.6%。该抑制作用是以非竞争性方式进行。柚皮素对  $\alpha$ -淀粉酶的内源性荧光产生有规律的猝灭作用, 其方式以静态猝灭为主。二者主要通过疏水作用力发生结合反应形成复合物, 有 1 个结合位点, 表观结合常数约  $10^5$  L/mol。另一方面, 由于与  $\alpha$ -淀粉酶发生复合反应, 柚皮素的还原力和抗亚油酸氧化的活性也有一定程度的降低, 而可能导致其生物活性发生改变。

**关键词:** 柚皮素,  $\alpha$ -淀粉酶, 荧光, 抗氧化

**文章编号:** 1673-9078(2014)2-58-61

## Interaction of Naringenin and $\alpha$ -Amylase

LI Qiong<sup>1</sup>, CHEN Lei<sup>2</sup>, WEI Qing-yi<sup>2</sup>, YUAN Er-dong<sup>2</sup>, NING Zheng-xiang<sup>2</sup>

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)

(2. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)

**Abstract:** The complex formed by naringenin and  $\alpha$ -amylase resulted in the decreased antioxidant activity of naringenin and catalytic activity of enzyme, as well as efficient quenching of the intrinsic fluorescence of  $\alpha$ -amylase. The inhibitory effect of naringenin on  $\alpha$ -amylase was studied by enzymatic kinetics and fluorescence spectroscopy.  $\alpha$ -Amylase (0.33 U/mL, 0.2 mL) was treated by naringenin (1 mg/mL, 0.05 mL) under pH 6.8, 37 °C for 20 min, the inhibition rate reached 36.6%. The mechanism of inhibition effect was noncompetitive inhibition. The regular quenching of intrinsic fluorescence of  $\alpha$ -amylase was induced by naringenin as a quencher in physiological condition, and the majority was static quenching. Naringenin binded with  $\alpha$ -amylase to form a new complex was using hydrophobic interaction. An  $\alpha$ -amylase molecule provided one binding site for a naringenin molecule, with the apparent binding constant  $K_b$  around  $10^5$  L·mol<sup>-1</sup>. The total antioxidant activity in linoleic acid emulsion and reducing power of naringenin were also inhibited by  $\alpha$ -amylase, which might lead to the change of biological activity of naringenin.

**Key words:** naringenin;  $\alpha$ -amylase; fluorescence; antioxidant

类黄酮可通过氢键、疏水键等的作用与蛋白质发生反应<sup>[1]</sup>, 其分子中大量的酚羟基可与蛋白质主链上的肽基以及侧链上的羟基、氨基和羧基等基团结合, 而可能引起其分子结构和生理功能的变化。当类黄酮与酶蛋白发生作用时, 则可能导致酶活性及类黄酮抗氧化活性发生变化<sup>[2-3]</sup>。当类黄酮结合到酶的活性部位时表现为竞争性抑制, 结合到非活性部位时则为非

收稿日期: 2013-10-30

基金项目: 国家自然科学基金项目 (21002034); 华南理工大学中央高校基本科研业务费项目 (2013ZZ0080); 华南理工大学广东省绿色精细化学产品工程技术研究中心研究基金资助课题

作者简介: 李琼 (1968-), 女, 博士, 高级实验师, 主要从事天然产物研究。

通讯作者: 袁尔东 (1975-), 女, 博士, 副教授, 主要从事食品化学及天然产物研究。

竞争性抑制。这种抑制作用与类黄酮分子结构和浓度、酶蛋白的氨基酸组成以及底物种类等密切相关。低浓度类黄酮对酶活性无明显影响; 但高浓度的类黄酮可与酶发生强烈的多点交联, 而明显抑制酶活性。同时, 作用时间、温度、pH、金属离子、有机试剂等多种因素都可能影响到类黄酮与酶蛋白的结合。

研究表明, 很多类黄酮对机体内多种酶都具有抑制作用<sup>[4-6]</sup>, 如酪氨酸酶、醛糖还原酶、羧酸酯酶等, 这种对酶的抑制作用被认为是体现类黄酮生理活性的重要作用机制之一。 $\alpha$ -淀粉酶是淀粉消化过程中的一种关键酶, 抑制其活性有助于有效控制餐后血糖的升高<sup>[7-8]</sup>, 是延缓糖尿病发生和发展的有效措施。研究显示, 许多黄酮类化合物可抑制  $\alpha$ -淀粉酶活性, 从而起到抑制高血糖和控制糖尿病发展的作用<sup>[9-10]</sup>。柚皮素 (Naringenin) 是一种重要的黄酮类化合物, 广泛存在

于水果、蔬菜中,具有抗氧化、抗菌、降血脂、抗肿瘤、抗动脉硬化等多种生物活性<sup>[1-12]</sup>。本文对柚皮素与 $\alpha$ -淀粉酶的相互作用特性展开研究,采用酶动力学法研究柚皮素对 $\alpha$ -淀粉酶的抑制作用及相关动力学,通过荧光光谱法分析二者结合作用的强度、类型及机制,并测定柚皮素抗氧化活性的变化情况等,以期为其在食品、保健食品和医药领域的有效应用提供有益的参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

#### 1.1.1 材料

$\alpha$ -淀粉酶(来自于猪胰腺, pig pancreatic  $\alpha$ -amylase, PPA), Sigma 公司;柚皮素(98%),陕西慧科植物开发有限公司。所有水溶液均用去离子水、0.2 mol/L pH 6.8 的磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)配制。

#### 1.1.2 仪器

pHS-3B 雷磁精密 pH 计,日本岛津;UV-240 紫外-可见分光光度计,北京普析通用仪器公司;Hitachi F-7000 荧光分光光度计,日本岛津公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 柚皮素对 PPA 活性的抑制作用及其催化动力学研究

##### 1.2.1.1 柚皮素对 PPA 活性的抑制作用

分别取浓度为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL 的柚皮素溶液 0.05 mL(溶于 DMSO)与 0.2 mL PPA 溶液(0.33 U/mL,溶于 pH 6.8 磷酸盐缓冲液)混匀在 37 °C 水浴反应 20 min。对照组溶液则以 0.05 mL DMSO 与 0.2 mL PPA 溶液进行反应。在反应液中加入 1 mL 1% 可溶性淀粉溶液,继续水浴 10 min 后,加入 1 mL DNS 显色剂,混匀,置于沸水浴中 5 min。然后,冷却至室温,定容至 25 mL,540 nm 下测定吸光值。根据下式计算柚皮素对 PPA 活性的抑制率:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{\Delta A_{\text{对照}} - \Delta A_{\text{样品}}}{\Delta A_{\text{对照}}} \times 100\%$$

注:  $\Delta A_{\text{对照}} = A_{\text{对照}} - A_{\text{对照空白}}$ ,  $\Delta A_{\text{样品}} = A_{\text{样品}} - A_{\text{样品空白}}$

##### 1.2.1.2 柚皮素对 PPA 活性抑制类型的判断

采用 Lineweaver-Burk 曲线作图法判断柚皮素对 PPA 的抑制类型。固定 PPA 溶液浓度,分别改变可溶性淀粉浓度(0.25%、0.5%、0.75%、1%)及柚皮素溶液浓度(0、0.02、0.04 mg/mL),以  $1/v$  对  $1/[S]$  作图,得到 Lineweaver-Burk 曲线图。

#### 1.2.2 柚皮素对 PPA 荧光特性的影响

在 5 mL PPA 溶液(0.656 U/mL,溶于 pH 6.8 磷酸盐缓冲液)中加入不同浓度柚皮素溶液,分别置于 25、35、45 °C 恒温水浴 30 min,以等量 PBS 作为空白参比,激发波长为 278 nm,扫描 290~450 nm 波长范围的荧光发射光谱变化<sup>[13]</sup>。

#### 1.2.3 PPA 对柚皮素抗氧化活性的影响

亚油酸体系中抗氧化活性的检测:称取亚油酸 0.6 g、吐温-20 0.5 g 溶于 150 mL PBS 缓冲液(pH 6.8, 0.2 mol/L),超声乳化 20 min,得到亚油酸乳化液。取 2.5 mL 亚油酸乳化液与 5 mL 20 mM AAPH 混合均匀,加入抗氧化剂,37 °C 恒温水浴 70 min。取出上述反应液 0.1 mL 于具塞试管中,加入 4.7 mL 乙醇(75%)、0.1 mL 硫氰酸铵(30%)和 0.1 mL  $\text{FeCl}_2$ (20 mM,溶于 3.5% HCl 中),混匀,在 500 nm 处测定吸光值。

还原力的检测:取 2.5 mL PBS 缓冲液(0.2 mol/L, pH 6.6)和 2.5 mL 1%  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  溶液,加入抗氧化剂,50 °C 保温 20 min。迅速冷却,加入 2.5 mL 10% 三氯化铁溶液,3000 r/min 离心 10 min。取上清液 2.5 mL,加入 4 mL 蒸馏水、1 mL 0.1% 三氯化铁溶液,充分混匀,静置 10 min 后,在 700 nm 下测定其吸光度。

PPA 对柚皮素抗氧化活性抑制率的计算:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}}}{A_{\text{对照}}} \times 100\%$$

## 2 结果与讨论

### 2.1 柚皮素对 PPA 活性抑制作用及其催化动力学

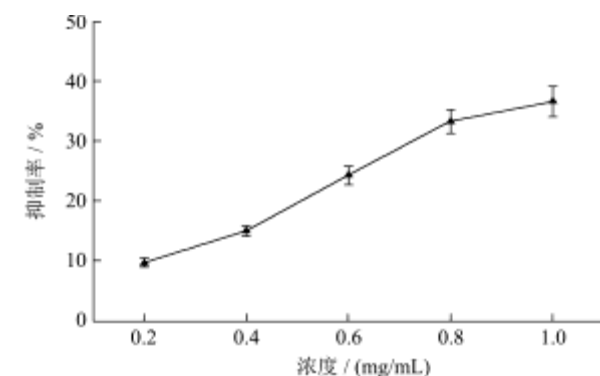


图 1 柚皮素对 PPA 的抑制作用

Fig.1 Inhibition curve of different naringenin concentrations to PPA

柚皮素可与 PPA 发生一定的反应,而导致 PPA 催化活力的下降(图 1)。随着柚皮素浓度的增大,其对 PPA 活性的抑制作用也越明显。当柚皮素的浓度为

1 mg/mL 时, 其对 PPA 活性的抑制率达到 36.6%。

对柚皮素抑制 PPA 作用进行酶动力学分析, 图 2 所示为其 Lineweaver-Burk 曲线。当柚皮素浓度增加时, 其对 PPA 抑制作用的表观  $K_m$  值不变,  $V_{max}$  变小。说明, 柚皮素对 PPA 的抑制类型属于非竞争性抑制, 柚皮素与 PPA 活性中心以外的必需基团结合, 其抑制作用程度取决于柚皮素的浓度。

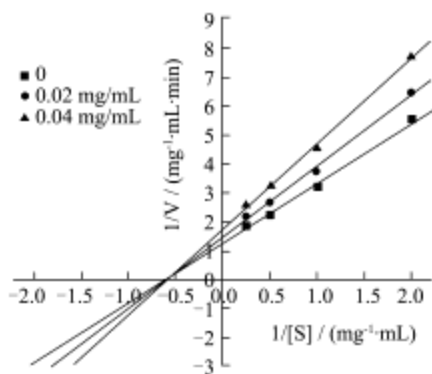


图 2 不同浓度柚皮素对 PPA 抑制作用的 Lineweaver-Burk 曲线

Fig.2 Lineweaver-Burk plots for inhibition reaction of naringenin to PPA

## 2.2 柚皮素对 PPA 荧光特性的影响

### 2.2.1 柚皮素对 PPA 的荧光猝灭作用及机制

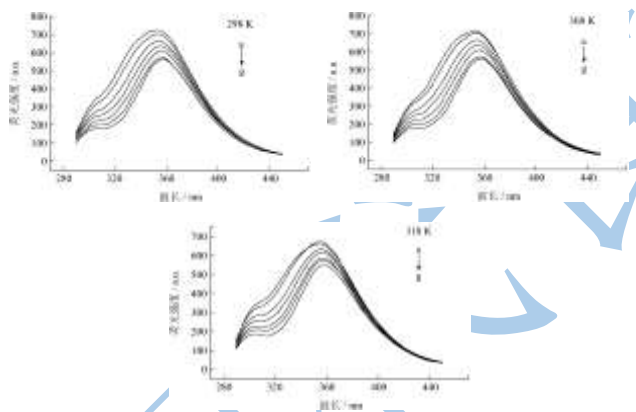


图 3 不同温度下柚皮素对 PPA 的荧光猝灭光谱

Fig.3 Fluorescence spectra of naringenin flavonoid binding PPA at different temperature

注: 曲线 a→g 表示柚皮素浓度分别为: 0、5、10、15、20、25、30  $\mu\text{mol/L}$ 。

如图 3 所示, 在测定波长范围内, 随着柚皮素浓度的逐渐增大, PPA 内源荧光强度呈规律性降低, 而峰形及峰位置基本不变。因此, 柚皮素与 PPA 之间发生了反应, 导致酶蛋白中由色氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸等残基所产生的内源荧光强度发生有规律的猝灭。

荧光猝灭作用包括有动态猝灭和静态猝灭两种方式, 可通过 Stern-Volmer 方程判断来判断荧光猝灭方式:

$$F_0/F = K_{sv}[Q] + 1 = K_q \cdot \tau_0 [Q] + 1$$

注:  $F_0$  和  $F$  分别为不存在和存在猝灭剂时荧光物质的荧光强度;  $K_{sv}$  和  $K_q$  分别为 Stern-Volme 动态猝灭常数 and 由扩散过程控制的双分子动态荧光猝灭常数;  $[Q]$  为猝灭剂浓度;  $\tau_0$  为没有猝灭剂存在下荧光分子的寿命, 其中  $\alpha$ -淀粉酶的荧光寿命为 2.97 ns<sup>[14]</sup>。

动态猝灭由于与扩散有关, 随着温度升高其猝灭常数增加。而对于静态猝灭, 温度的升高可能导致配合物稳定性下降, 因此静态猝灭常数降低。如表 1 所示, 柚皮素对 PPA 的荧光猝灭常数  $K_q$  值, 远大于各类猝灭剂对生物大分子的最大动态猝灭常数  $2 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 。同时, 随着反应的温度升高,  $K_q$  值逐渐减小。说明, 柚皮素对 PPA 的荧光猝灭以静态猝灭过程为主, 二者结合形成了复合物。

表 1 不同温度下柚皮素对 PPA 荧光猝灭作用的相关参数

温度 /K	$K_q / [10^{12} \text{ L} / (\text{mol} \cdot \text{s})]$	$K_b / [10^5 \text{ L} / \text{mol}]$	n	$\Delta H / (\text{kJ} / \text{mol})$	$\Delta S / [\text{J} / (\text{mol} \cdot \text{K})]$
298	3.23	0.74	1.19		
308	2.99	1.71	1.27	55.06	182.55
318	2.63	2.98	1.34		

荧光静态猝灭中, 荧光分子与猝灭剂分子相结合时, 其表观结合常数  $K_b$  与结合位点数  $n$  符合方程:

$$\text{Log}[(F_0 - F)/F] = \text{log}K_b + n \text{log}[Q]$$

在不同温度下, 以  $\text{log}[(F_0 - F)/F]$  对  $\text{log}[Q]$  作图, 其直线截距和斜率分别为柚皮素与 PPA 分子间的结合常数的对数值  $\text{log}K_b$  及结合位点数  $n$ 。如表 1 所示, 柚皮素和 PPA 分子间的结合位点数接近于 1, 因此二者之间仅有一个结合位点。同时, 其表观结合常数  $K_b$  值已达到了  $10^5$  数量级, 说明二者间的结合作用较强。

### 2.2.2 柚皮素与 PPA 间的作用力类型

小分子与生物大分子之间可通过范德华力、静电引力、氢键、和疏水作用力等相互作用<sup>[15]</sup>。通过柚皮素和 PPA 相互作用过程中的焓变 ( $\Delta H$ ) 和熵变 ( $\Delta S$ ) 可确定两者间主要作用力类型。当反应温度变化不大时, 焓变 ( $\Delta H$ ) 可看作是一个常数。根据 van't Hoff 方程作图, 焓变和熵变可分别由方程拟合直线的斜率和截距求得:

$$\ln K_b = -(1/T)(\Delta H/R) + (\Delta S/R)$$

注:  $K_b$  为不同温度下荧光物质与猝灭剂之间的结合常数;  $R$  为大气常数  $8.31 \text{ J} / (\text{mol} \cdot \text{K})$ ;  $T$  为反应温度。

当  $\Delta H > 0$ 、 $\Delta S > 0$  时, 为疏水作用力; 当  $\Delta H < 0$ 、 $\Delta S < 0$  时, 为氢键和范德华力; 当  $\Delta H \approx 0$ 、 $\Delta S > 0$  时,



则为静电引力<sup>[3]</sup>。不同温度下柚皮素与PPA相互作用过程中,其热力学焓变 $\Delta H > 0$ 、熵变 $\Delta S > 0$ (表1)。因此,柚皮素与PPA之间的主要作用力为疏水作用力。但氢键的作用仍不可忽视,因为整个试验过程是在水溶液环境下进行的,而且柚皮素和PPA的分子结构上均含有羟基基团。

### 2.3 PPA对柚皮素抗亚油酸氧化活性的影响

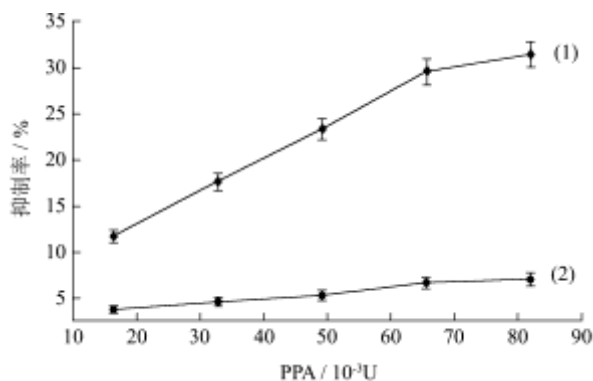


图4 PPA对柚皮素的抗氧化活性的影响

#### Fig. 4 Inhibition of antioxidant activity of naringenin by PPA

注: (1) 在亚油酸体系中抗氧化活性, 柚皮素 (0.2 mL 0.1 mg/mL) + PPA, 37 °C 反应 10 min; (2) 还原力, 柚皮素 (100 μL 0.05 mg/mL) + PPA, 37 °C 反应 10 min。

如图4所示,柚皮素与PPA间的结合反应,也对柚皮素的还原力以及在亚油酸体系中的抗氧化活性都产生了一定程度的抑制作用,并呈现了明显的剂量-效应关系。黄酮类化合物的抗氧化性能是其很多生物活性发挥的基础,因此其抗氧化活性的变化很可能也会影响其生物活性的发挥。可见,柚皮素与PPA间的复合反应,还可能影响到其生物活性的发挥。

### 3 结论

本文对柚皮素与PPA的相互作用进行了研究。结果显示,柚皮素可在一定程度上抑制PPA的催化活性,该抑制作用以非竞争性的方式进行。柚皮素可使PPA内源性荧光发生有规律的猝灭,其猝灭方式以静态猝灭为主。二者主要通过疏水作用力、经1个位点发生结合反应,形成复合物。同时,由于与 $\alpha$ -淀粉酶发生复合反应,柚皮素的抗亚油酸氧化的活性也有明显降低,而可能导致其生物活性发生改变。

#### 参考文献

[1] Xiao J, Cao H, Wang Y, et al. Glycosylation of dietary flavonoids decreases the affinities for plasma protein [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57: 6642-6648

[2] Jung U J, Lee, M-K, Park Y B, et al. Effect of citrus flavonoids on lipid metabolism and glucose-regulating enzyme mRNA levels in type-2 diabetic mice [J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2006, 38: 1134-1145

[3] Rohn S, Rawel H M, Kroll J. Antioxidant activity of protein-bound quercetin [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52: 4725-4729

[4] 傅博强,李欢,王小如,等.甘草黄酮类化合物对酪氨酸酶单酚酶的抑制[J].天然产物研究与开发,2005,17(4):391-39

Fu B, Li H, Wang X, et al. Inhibitory effects of several licorice flavonoids on the monophenolase activity of tyrosinase [J]. Natural Product Research and Development, 2005, 17(4): 391-39

[5] Wirasathien L, Pengsupap T, Suttisri R, et al. Inhibitors of aldose reductase and advanced glycation end-products formation from the leaves of *Stelechocarpus cauliflorus* R E Fr. [J]. Phytomedicine, 2007, 14: 546-550

[6] Djeridane A, Brunel J M, Vidal N, et al. Inhibition of porcine liver carboxylesterase by a new flavone glucoside isolated from *Deverra scoparia* [J]. Chemo-Biological Interactions, 2008, 172: 22-26

[7] Dong H-Q, Li M, Zhu F, et al. Inhibitory potential of trilobatin from *Lithocarpus polystachyus* Rehd against  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase linked to type 2 diabetes [J]. Food Chemistry, 2012, 130: 261-266

[8] Gunawan-Puteri M D, Kato E, Kawabata J.  $\alpha$ -Amylase inhibitors from an Indonesian medicinal herb, *Phyllanthus urinaria* [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2012, 92: 606-609

[9] Piparo, E L, Scheib H, Frei N, et al. Flavonoids for controlling starch digestion: structural requirements for inhibiting human  $\alpha$ -amylase [J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2008, 51: 3555-3561

[10] Li Y, Gao F, Shan F, et al. Study on the Interaction between 3 flavonoid compounds and  $\alpha$ -amylase by fluorescence spectroscopy and enzymatic kinetics [J]. Journal of Food Science, 2009, 74: C199-C203

[11] Sabarinathan D, Mahalakshmi P, Vanisree A J. Naringenin, a flavanone inhibits the proliferation of cerebrally implanted C6 glioma cells in rats [J]. Chemo-Biological Interactions, 2011, 189: 26-36

[12] Qin L, Jin L, Lu L, et al. Naringenin reduces lung metastasis in a breast cancer resection model [J]. Protein & Cell, 2011, 2: 507-516

- [13] 武小芬,马美湖,蔡朝霞,等. 荧光光谱法研究核黄素与核黄素结合蛋白的相互作用[J]. 光谱学与光谱分析, 2012, 32(3): 719-722
- Wu X, Ma M, Cai C, et al. Investigation of interaction between riboflavin and riboflavin binding protein by fluorescence spectroscopy [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2012, 32(3): 719-722
- [14] Prendergast F G, Lu J, Callahan P J. Oxygen quenching of sensitized terbium luminescence in complexes of terbium with small organic ligands and proteins [J]. Journal of Biological Chemistry, 1983, 258: 4075-4078
- [15] 郁彩虹,张耀东,张琦,等. 分子对接和荧光光谱法研究槲皮素与 $\beta$ -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, Zhang Y, Zhang Q, et al. Study on the interaction of quercetin with  $\beta$ -glucosidase by fluorescence spectroscopy and molecular docking [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2011, 31(8): 2151-2155