

# 基于动力学分析 $\beta$ -伴大豆球蛋白和大豆球蛋白抑制淀粉酶活性机制

罗明昌<sup>1</sup>, 张昱格<sup>2</sup>, 朱宝燕<sup>1</sup>, 张福荣<sup>1</sup>, 陈旭<sup>2\*</sup>

(1. 东莞东美食品有限公司, 东莞 523279; 2. 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, 中国轻工业健康食品开发与营养调控重点实验室, 东莞 523808)

**摘要:** **目的** 探讨  $\beta$ -伴大豆球蛋白( $\beta$ -conglycinin, 7S)和大豆球蛋白(glycinin, 11S)对猪胰  $\alpha$ -淀粉酶(porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase, PPA)的抑制动力学特征。**方法** 通过测定半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration,  $IC_{50}$ ), 结合 Cornish-Bowden 方程和 Dixon 方程, 对 7S 和 11S 对 PPA 的抑制类型及抑制作用进行阐述。**结果** 7S 对 PPA 的抑制作用属于混合型竞争性抑制, 而 11S 对 PPA 抑制作用主要是竞争性抑制。7S 和 11S 的竞争性抑制常数(competitive inhibition constants,  $K_{ic}$ )分别为 3.958 mg/mL 和 37.083 mg/mL, 7S 的反竞争性抑制常数(uncompetitive inhibition constants,  $K_{iu}$ )为 37.394 mg/mL。7S 的  $IC_{50}$  值为 49.771 mg/mL。7S 的  $K_{ic}$  比  $K_{iu}$  小, 这说明 7S 与游离的猪胰  $\alpha$ -淀粉酶结合更密切, 而与淀粉和 PPA 形成的中间产物结合较为疏松。**结论** 7S 和 11S 均通过抑制淀粉酶的活性来达到延缓淀粉类食品消化的目的, 而且 7S 对猪胰  $\alpha$ -淀粉酶抑制作用更强。

**关键词:**  $\beta$ -伴大豆球蛋白; 大豆球蛋白; 猪胰  $\alpha$ -淀粉酶; 抑制动力学

## Mechanism of inhibitory on porcine pancreatic $\alpha$ -amylase activity by $\beta$ -conglycinin and glycinin based on kinetic analysis

LUO Ming-Chang<sup>1</sup>, ZHANG Yu-Ge<sup>2</sup>, ZHU Bao-Yan<sup>1</sup>, ZHANG Fu-Rong<sup>1</sup>, CHEN Xu<sup>2\*</sup>

(1. Dongguan Dongmei Food Co., Ltd., Dongguan 523279, China; 2. Key Laboratory of Healthy Food Development and Nutrition Regulation of China National Light Industry, Engineering Research Center of Health Food Design & Nutrition Regulation, School of Chemical Engineering and Energy Technology, Dongguan University of Technology, Dongguan 523808, China)

**ABSTRACT: Objective** To investigate the inhibitory kinetic characteristics of porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase (PPA) by  $\beta$ -conglycinin (7S) and glycinin (11S). **Methods** The inhibitory types and effects of 7S and 11S on PPA were described by measuring the half maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) and combining with Cornish-Bowden equation and Dixon equation. **Results** The inhibitory effect of 7S on PPA belonged to mixed competitive inhibition, while the inhibitory effect of 11S on PPA was mainly competitive inhibition. The competitive inhibition constants

**基金项目:** 广东省自然科学基金面上项目(2020A1515011341)、东莞理工学院高层次人才(创新团队)科研启动项目(KCYCXPT2017007)、广东省创新强校工程创新团队项目(2021KCXTD035)、2021年东莞市社会科技发展重点项目(20211800904672)

**Fund:** Supported by the Guangdong Natural Science Foundation of China (2020A1515011341), the Institute of Science and Technology Innovation of Dongguan University of Technology (KCYCXPT2017007), the Foundation for Innovation Team in Higher Education of Guangdong, China (2021KCXTD035), and the Dongguan Social Science and Technology Development Key Project in 2021 (20211800904672)

\*通信作者: 陈旭, 博士, 主要研究方向为功能碳水化合物和食品组分互作。E-mail: chenxu@dgut.edu.cn

\*Corresponding author: CHEN Xu, Ph.D, School of Chemical Engineering and Energy Technology, Dongguan University of Technology, Dongguan 523808, China. E-mail: chenxu@dgut.edu.cn

( $K_{ic}$ ) of 7S and 11S were 3.958 mg/mL and 37.083 mg/mL, respectively, and the uncompetitive inhibition constants ( $K_{iu}$ ) of 7S was 37.394 mg/mL. The  $IC_{50}$  value of 7S was 49.771 mg/mL. The  $K_{ic}$  of 7S was smaller than that of  $K_{iu}$ , which indicated that 7S bound more closely to free porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase, but loosely bound to the intermediates formed by starch and PPA. **Conclusion** Both 7S and 11S achieve the purpose of delaying the digestion of starchy foods by inhibiting the activity of amylase, and 7S has a stronger inhibitory effect on porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase.

**KEY WORDS:**  $\beta$ -conglycinin; glycinin; porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase; inhibition kinetics

## 0 引言

血糖生成指数(glycemic index, GI)是用来反映人体摄入食物后所引起的血糖升高程度的指标, 高 GI 食物的过量摄入会增加代谢综合症发生的风险, 包括肥胖、心血管疾病、II 型糖尿病<sup>[1]</sup>。低 GI 食物可以改善代谢<sup>[2]</sup>, 将葡萄糖缓慢地释放到血液中, 促使血糖和胰岛素的含量缓慢升高, 以减缓消化和吸收速度, 从而减弱机体对胰岛素的响应程度, 有助于血糖稳定<sup>[3]</sup>。将富含碳水化合物的食物按照 GI 高低可以分为三类: 低 GI 食品,  $GI \leq 55$ ; 中 GI 食品,  $55 < GI \leq 70$ ; 高 GI 食品,  $GI > 70$ 。淀粉的消化速率对食品的 GI 值有影响<sup>[4]</sup>, 其中慢消化淀粉和抗性淀粉含量高的食品属于低 GI 食品。

淀粉类食品是常见的碳水化合物<sup>[5]</sup>, 淀粉与蛋白质作为食物体系中的两大典型组分, 二者的相互作用能够降低淀粉消化率<sup>[6]</sup>。通过食用蛋白质含量较高的淀粉类主食可对淀粉消化性的调节起到重要作用, 从而有效减少肥胖症和 II 型糖尿病的发病风险<sup>[7-10]</sup>。研究表明, 内源蛋白和外源蛋白均会对淀粉的消化酶解特性产生影响。外源蛋白对淀粉的体外消化性影响主要体现在: (1)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<sup>[11-13]</sup>; (2)蛋白与淀粉非共价结合降低了淀粉的消化性<sup>[14-15]</sup>; (3)蛋白以非催化的方式与淀粉酶分子结合, 抑制酶对淀粉的催化酶解能力<sup>[16]</sup>。蛋白质的种类<sup>[5]</sup>、含量<sup>[17]</sup>及聚合度<sup>[18]</sup>等都会对淀粉消化产生影响。

前期研究表明, 大豆蛋白对猪胰  $\alpha$ -淀粉酶(porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase, PPA)存在抑制作用<sup>[19]</sup>。大豆蛋白的抑制作用可能归因于其中的不同蛋白组分, 但其对 PPA 的抑制机制尚待明确。因此本研究选用  $\beta$ -伴大豆球蛋白( $\beta$ -conglycinin, 7S)和大豆球蛋白(glycinin, 11S)为原料, 通过测定半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration,  $IC_{50}$ )来研究 7S 和 11S 对 PPA 的抑制活性, 结合 Cornish-Bowden 方程和 Dixon 方程探究其分子抑制机制以及抑制类型, 为食品典型蛋白组分调控淀粉消化机制和含蛋白质类的低 GI 碳水化合物饮食提供理论指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

马铃薯淀粉(食品级, 杭州普罗星淀粉有限公司); 大豆分离蛋白(食品级, 润赢生物科技有限公司); 无水乙醇、氢氧化钠、盐酸、碳酸钠、麦芽糖(分析纯, 天津大茂化学试剂厂); 4-羟基苯甲酰肼(4-hydroxybenzoyl hydrazine, PAHBAH)、磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)(分析纯)、猪胰  $\alpha$ -淀粉酶(10 U/mg)(美国 Sigma-Aldrich 公司)。

### 1.2 仪器与设备

MR Hei-Tec 磁力加热搅拌器(德国 HEIDOLPH 公司); DHG-9070A 电热恒温鼓风干燥箱(上海齐欣科学仪器有限公司); FA2104 电子天平(上海民桥精密科学仪器有限公司); MX-S 赛洛捷克混匀仪(美国 SCIOGEX 公司); 752N 紫外分光光度计(上海仪电分析仪器有限公司); TG20-WSI 离心机(湘麓离心机仪器有限公司); DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(上海予华仪器设备有限公司); WD-9415B 型超声波清洗器(上海齐欣科学仪器有限公司); MA35 水分测定仪(赛多利斯仪器系统有限公司)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 7S 和 11S 的分离纯化

将大豆蛋白用 15 倍体积去离子水完全溶解, 用浓度为 2 mol/L 的 NaOH 溶液将 pH 调节至 7.5, 调节转速为 5000 r/min(此后离心操作转速不改变), 离心 30 min。取上清液加  $NaCO_3$  至 0.98 g/L, 用浓度为 2 mol/L 的 HCl 将 pH 调至 6.4, 在 4 °C 冰箱中过夜。保持 4 °C, 离心 15 min, 沉淀物为 11S。取上清液加 NaCl 调节浓度为 0.25 mol/L, 控制其 pH 为 5.0, 离心 30 min, 上清液用 2 倍冷冻的去离子水稀释, 使 pH 降至 4.8, 离心 30 min, 得到的沉淀即为 7S<sup>[20]</sup>。

#### 1.3.2 7S 和 11S 的电泳分析

参考王金梅<sup>[20]</sup>方法进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)实验, 向 50  $\mu$ L 蛋白样品(1%, w:V)中加入 12.5  $\mu$ L 样品缓冲液, 上样前加热至 100 °C, 煮沸 5 min。分离胶浓度为 10%, 浓缩胶浓度为 5%, 上样量为 10  $\mu$ L, 在恒流下进行电泳操作, 在浓缩胶中样品电流

为 40 mA, 而进入分离胶后电流则需调为 80 mA。采用 0.5%考马斯亮蓝进行染色 1 h, 之后用甲醇乙酸脱色液(甲醇:乙酸:水=1:1:8, V:V:V)进行脱色。

### 1.3.3 7S 和 11S 对 $\alpha$ -淀粉酶的 $IC_{50}$ 测定

准确称量马铃薯淀粉加入到 20 mL PBS 缓冲液中, 使其溶液浓度为 20 mg/mL, 随后分别加入准确称量的 7S/11S, 其质量浓度分别为 2.5、5.0、10.0、20.0、40.0、80.0 mg/mL。涡旋混匀后, 置于 100 °C 水浴中蒸煮 30 min, 随后经冷却放置于 37 °C 恒温水浴中进行磁力搅拌。准确移取 0.5 mL PPA (2 U/mL) 加到离心管中, 充分涡旋, 置于 37 °C 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  $\mu$ L 的混合酶解液到 1.2 mL 0.5 mol/L 的  $Na_2CO_3$  中充分涡旋混匀, 终止酶解反应。得到的样品均在 4000 g 的条件下离心 10 min 得到上清液。上清液中的还原糖含量参考文献[21]的方法来进行测定。同时, 利用麦芽糖标准曲线将吸光度值转换为还原糖浓度。

### 1.3.4 7S 和 11S 抑制 $\alpha$ -淀粉酶动力学实验

以不同浓度的蒸煮马铃薯淀粉为底物, 在不同浓度的大豆球蛋白共存的条件下进行设计 7S 和 11S 抑制  $\alpha$ -淀粉酶动力学实验。将 5 mL PBS 缓冲液(pH=7.2)加入到带盖离心管中, 再准确称取适量的马铃薯淀粉和 7S/11S 加入离心管中, 得到一系列的马铃薯淀粉溶液(5、10、20、30、40 mg/mL)和蛋白溶液(2.5、5.0、10.0、15.0、20.0 mg/mL)。待充分涡旋混匀后放于 100 °C 的水浴锅中恒温水浴蒸煮糊化 30 min, 取出后放在 37 °C 水浴中以 180 r/min 进行磁力搅拌。加入 0.5 mL PPA (2 U/mL)充分涡旋后, 在 37 °C 恒定水浴中进行酶解反应, 于 4、8、12 min 后, 移取 300  $\mu$ L 的混合酶解液与 1.2 mL 0.5 mol/L 的  $Na_2CO_3$  进行涡旋混匀以终止酶解反应。得到的样品均在 4000 g 的条件下离心 10 min 得到上清液。上清液中的还原糖含量参考文献[21]的方法测定, 参照方法 1.3.3。

运用 Dixon 方程和 Cornish-Bowden 方程来分析阐释蛋白质对 PPA 的抑制机制和抑制类型。为了描述 7S 和 11S 对 PPA 的抑制机制, 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, 时间为横坐标进行作图, 通过斜率可以得到初始反应速率( $v$ )。通过 Dixon 方程来计算竞争性抑制常数( $K_{ic}$ )和反竞争性抑制常数( $K_{iu}$ )。

混合型抑制的 Dixon 方程见公式(1)。

$$v = \frac{v_{\max}}{K_m(1 + \frac{i}{K_{ic}}) + a(1 + \frac{i}{K_{iu}})} \quad (1)$$

其中  $v_{\max}$  是最大初始速度, mg/(mL·min);  $a$  是淀粉浓度, mg/mL;  $K_m$  是米氏常数; 抑制剂浓度用  $i$  表示, mg/mL; 初始反应速度用  $v$  表示, mg/(mL·min)。

方程两边同时取倒数得到公式(2), Dixon 方程可以表示为  $1/v$  对  $i$  的线性图。通过包括 2 个或更多的淀粉浓度, 可

以推导出上述两个方程的  $K_{ic}=-i$ , 即  $K_{ic}$  等于不同淀粉底物浓度条件下所对应的各条曲线的交点的横坐标绝对值。

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m + a}{v_{\max}a} + \frac{i(\frac{K_m}{K_{ic}} + \frac{a}{K_{iu}})}{v_{\max}a} \quad (2)$$

通过在多个淀粉浓度值下绘制  $a/v$  与  $i$  的关系来建立一个 Cornish-Bowden 图。混合型抑制的 Cornish-Bowden 方程见公式(3)。

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

将方程两边进行倒数如公式(4),  $a/v$  对  $i$  的线性图对应反应 Cornish-Bowden 方程。使用如上所示的相同计算方法, 可以得出方程的  $K_{iu}=-i$ , 其中  $K_{iu}$  于不同淀粉底物浓度条件下所对应的各条曲线的交点的横坐标绝对值。

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

### 1.3.5 统计分析

所有数据至少 3 次重复, 并采用统计分析软件 SPSS 进行方差分析和显著性分析, 数据显著性差异  $P<0.05$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 7S 和 11S 的分子量比较

7S 和 11S 的 SDS-PAGE 凝胶电泳图如图 1 所示。通过与图 1 中 Marker 对比, 7S(伴球蛋白) 3 个亚基的位置在泳带中清晰可见, 3 种亚基的分子量分别为:  $\alpha'$ -(76 kDa),  $\alpha$ -(72 kDa)和  $\beta$ -(52 kDa~54 kDa)<sup>[22]</sup>。所以, 70 kDa 与 100 kDa 之间产生的 2 个条带分别是  $\alpha'$ 和  $\alpha$  亚基; 54 kDa 与 55 kDa 之间产生的条带是  $\beta$  亚基。与 Marker 对比可知, 可以定位 11S(大豆球蛋白)的酸性亚基和碱性亚基在泳带中的大致位置, 酸性亚基的分子量在 37~42 kDa, 碱性亚基的分子量在 17~20 kDa<sup>[23]</sup>。所以, 35 kDa 与 40 kDa 之间产生的条带是酸性亚基, 15 kDa 与 25 kDa 之间产生的条带是碱性亚基。由此可以验证 2 种蛋白分离纯化纯度较高, 且 11S 较 7S 的分子量更大。

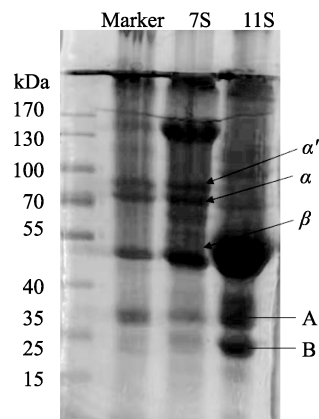
### 2.2 7S 对 PPA 的 $IC_{50}$ 结果分析

7S 对 PPA 抑制作用曲线如图 2 所示。与空白对照体系相比较, 不同质量浓度的 7S 都在一定程度上降低了 PPA 的初始反应速率。7S 质量浓度越高, PPA 的初始反应速率越小, 这表明抑制作用受 7S 质量浓度影响, 且逐渐增强, 相同质量浓度的淀粉在不同质量浓度的蛋白抑制剂下的抑制率随着蛋白质量浓度的增加而增加。马铃薯淀粉在不同质量浓度 7S 下对应的抑制率分别为: 4.81%、0.29%、9.21%、29.45%、50.74%和 57.72%。通过 SPSS 软件计算得到 7S 的  $IC_{50}$  为 49.771 mg/mL。与 7S 相比, 11S 对 PPA

的抑制作用相对较弱。可能归因于 11S 和 7S 具有不同的氨基酸组成、亚基组成和空间结构。11S 由分子量较大的疏水性聚合体组成其表面疏水性指数显著高于 7S, 导致 11S 在 PBS 缓冲液中的溶解度低于 7S, 而未能与  $\alpha$ -淀粉酶彻底反应。

### 2.3 7S 对 PPA 的抑制动力学结果分析

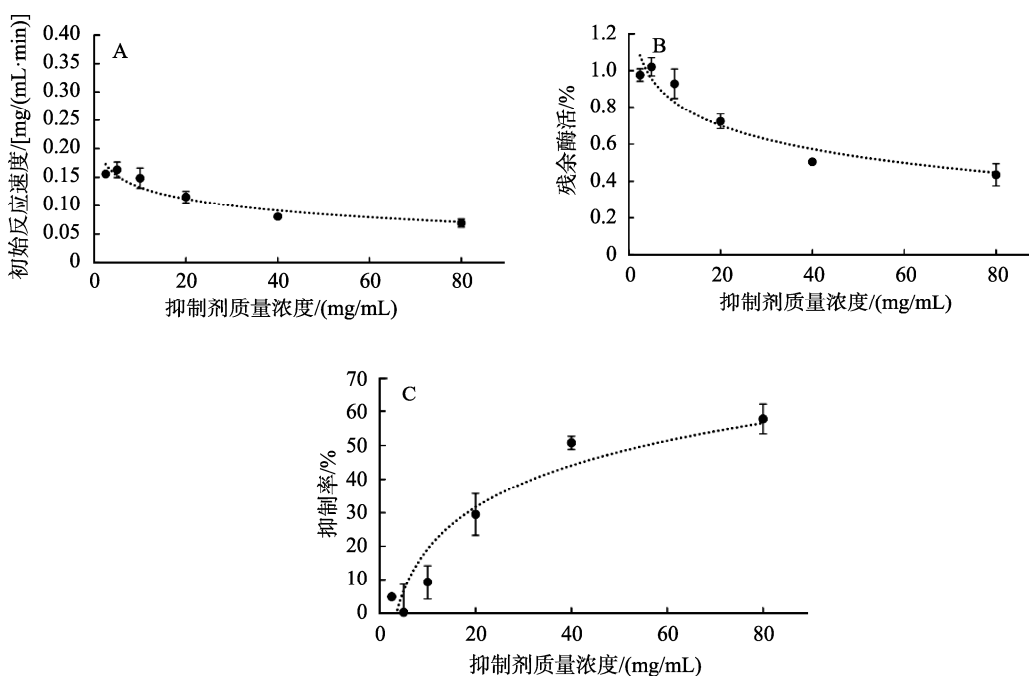
7S 和 11S 对 PPA 抑制作用的反应曲线如图 3 和图 4 所示。由图 3 和图 4 可知, 在蛋白质质量浓度相同的体系中, 体系的反应速率受淀粉质量浓度的影响, 且质量浓度越高作用越强。与空白组对照, 所设置浓度下的 7S 和 11S 都会导致淀粉酶的初始反应速率降低, 这就表明这 2 种蛋白质能够降低 PPA 对淀粉的酶解速率。另外随着蛋白质质量浓度逐渐增加, 淀粉酶对淀粉的初始反应速率逐渐降低, 这种现象表明蛋白对 PPA 的抑制作用在逐渐增强。



注:  $\alpha$ :  $\alpha$  亚基;  $\alpha'$ :  $\alpha'$  亚基;  $\beta$ :  $\beta$  亚基; A: 酸性亚基; B: 碱性亚基。

图 1 7S 和 11S 的 SDS-PAGE 图谱

Fig.1 SDS-PAGE of 7S and 11S



注: 实验数据表明 11S 对 PPA 的抑制很弱, 故未对  $IC_{50}$  进行拟合计算。A: 特定浓度马铃薯淀粉在不同质量浓度的 7S 下的初始反应速率; B: PPA 在不同质量浓度的 7S 下的残留活性曲线; C: 在不同质量浓度的 7S 下相同浓度的淀粉对 PPA 下的抑制率。

图 2 7S 对 PPA 抑制作用曲线

Fig.2 7S inhibitory effects curve on PPA

不同质量浓度的淀粉在不同质量浓度蛋白条件下的反应初始速率如图 5 所示。7S 和 11S 对 PPA 抑制的 Dixon 方程和 Cornish-Bowden 方程如图 6 和 7 所示。7S 和 11S 对 PPA 抑制的 Dixon 方程和 Cornish-Bowden 方程动力学特征值如表 1 所示。

在图 6 和图 7 的 Dixon 方程和 Cornish-Bowden 方程所做的图中, 7S 都有明显的交点, 说明 7S 对 PPA 的抑制作用是包含竞争性抑制作用和反竞争性抑制作用的混合型竞争性抑制。经计算得到 7S 的  $K_{ic}$  为 3.958 mg/mL, 其  $K_{iu}$

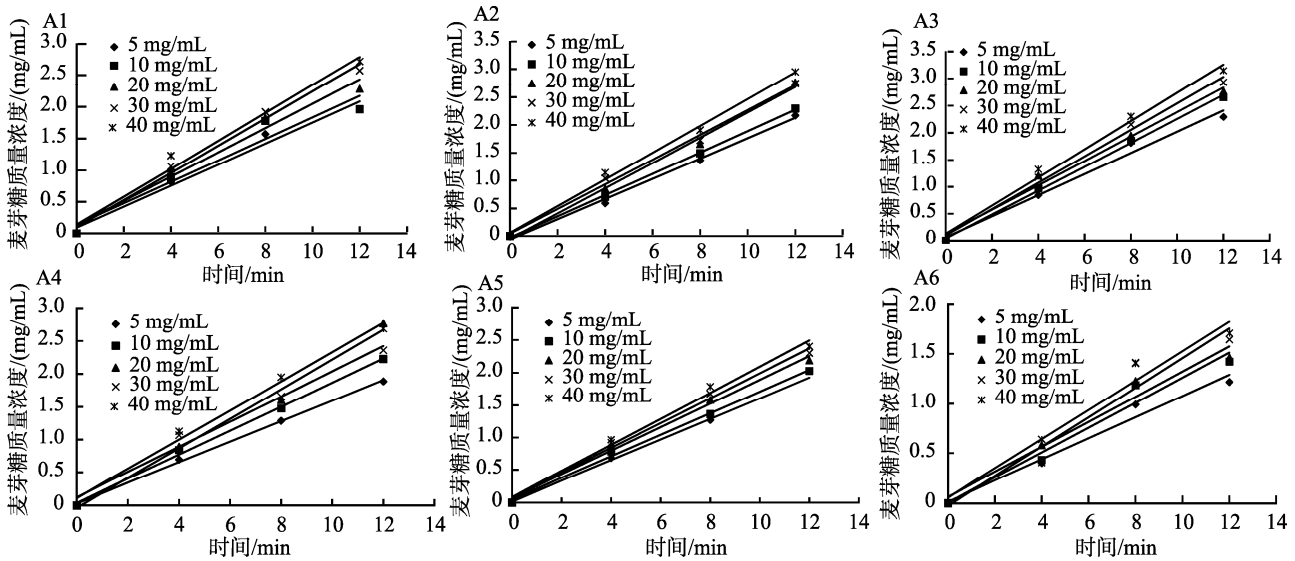
为 37.393 mg/mL(表 1)。7S 的  $K_{ic}$  小于  $K_{iu}$ , 表明 7S 能够与游离的  $\alpha$ -淀粉酶的结合更严密, 相比之下, 7S 与淀粉和 PPA 所形成的中间产物的结合则较弱<sup>[24-25]</sup>。

11S 的 Dixon 方程图中交点清晰可见, 而 Cornish-Bowden 方程所做的图中则是近乎平行的直线。分析得知, 11S 的抑制作用类型属于竞争性抑制。经计算得到 11S 的  $K_{ic}$  为 37.083 mg/mL,  $K_{iu}$  较大(表 1 中未列出)表明它与游离的 PPA 的连接更紧密, 与马铃薯淀粉形成相互竞争的关系<sup>[24-25]</sup>。

7S 是大豆蛋白的重要组成部分, 占大豆蛋白质含量的

三分之一。其主要成分包含  $\alpha'$ 、 $\alpha$  和  $\beta$  3 种亚基, 通过疏水键和氢键连接这 3 种亚基, 进而结合成三聚体<sup>[26]</sup>。11S 是种单一蛋白质, 占大豆蛋白总量 25%~35%<sup>[27]</sup>。11S 是 1 种亚基由无数个多肽构成拥有特定主体结构的多聚体蛋白分子。它的空间结构是通过二硫键结合 6 个酸性亚基和 6 个碱性亚基形成 2 个六边形环状结构。11S 中蛋氨酸含量低, 而赖氨酸含量高。由分子量结果可知, 7S 较 11S 分子量较低。7S 经

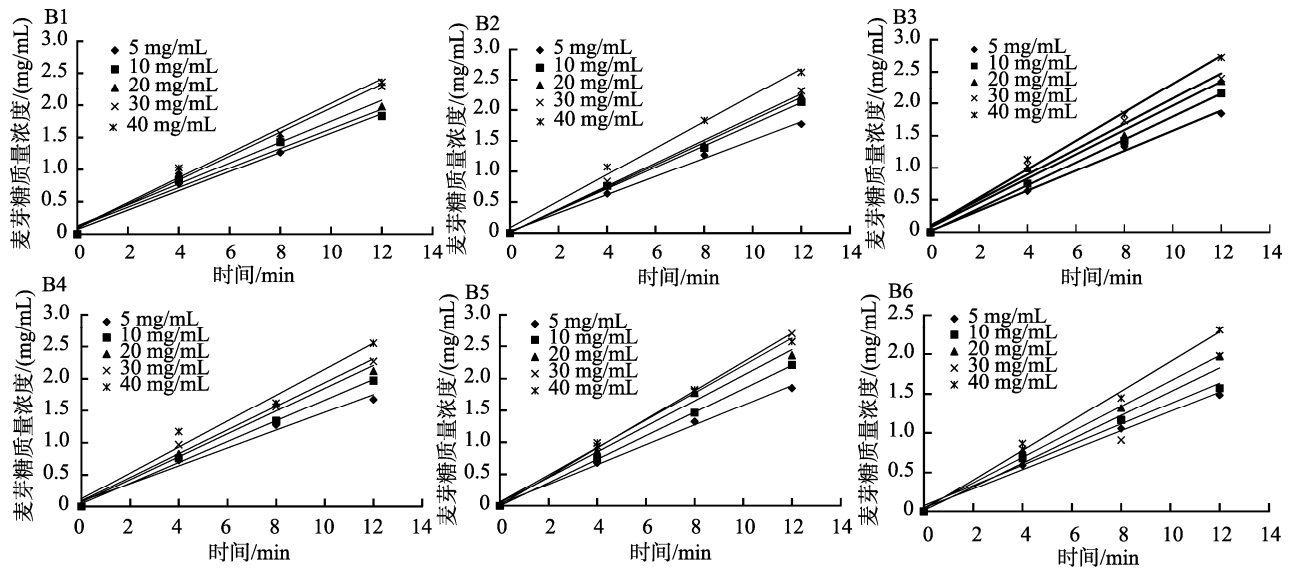
煮沸后, 蛋白分子展开, 因各种分子间作用力即氢键、静电引力、二硫键、疏水作用等形成网络状结构, 形成具有一定孔洞结构的凝胶<sup>[28-29]</sup>。煮沸之后的 7S 结构变得松散因而其内部的疏水性基团便暴露出来, 从而增加了与 PPA 相互作用的几率。而 11S 在煮沸过程中, 由于其疏水性, 变性后依然不易溶于水<sup>[30]</sup>。因此, 煮沸之后变性的 7S 更易与 PPA 结合, 即 7S 较 11S 对 PPA 的抑制作用更强。



注: A1: 7S 蛋白质质量浓度为 1.0 mg/mL; A2: 7S 蛋白质质量浓度为 2.5 mg/mL; A3: 7S 蛋白质质量浓度为 3.5 mg/mL; A4: 7S 蛋白质质量浓度为 10 mg/mL; A5: 7S 蛋白质质量浓度为 15 mg/mL; A6: 7S 蛋白质质量浓度为 20 mg/mL。

图3 不同质量浓度的 7S 对 PPA 抑制作用曲线

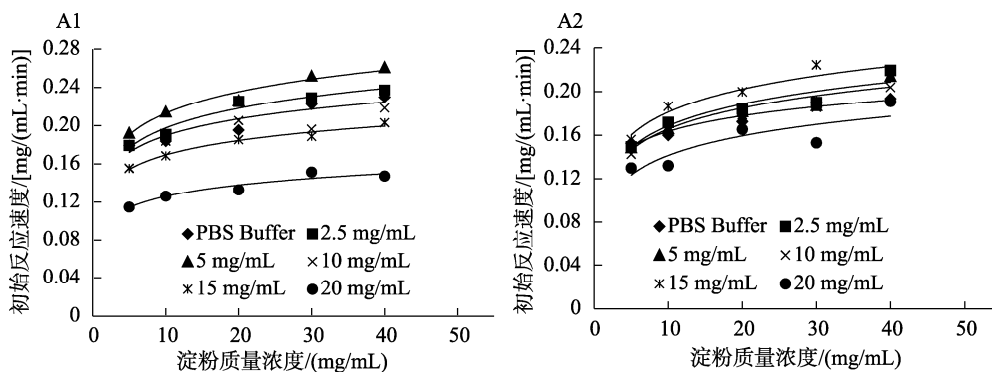
Fig.3 Inhibition curves of PPA by different mass concentrations of 7S



注: B1: 11S 蛋白质质量浓度为 1.0 mg/mL; B2: 11S 蛋白质质量浓度为 2.5 mg/mL; B3: 11S 蛋白质质量浓度为 3.5 mg/mL; B4: 11S 蛋白质质量浓度为 10 mg/mL; B5: 11S 蛋白质质量浓度为 15 mg/mL; B6: 11S 蛋白质质量浓度为 20 mg/mL。

图4 不同质量浓度的 11S 对 PPA 抑制作用曲线

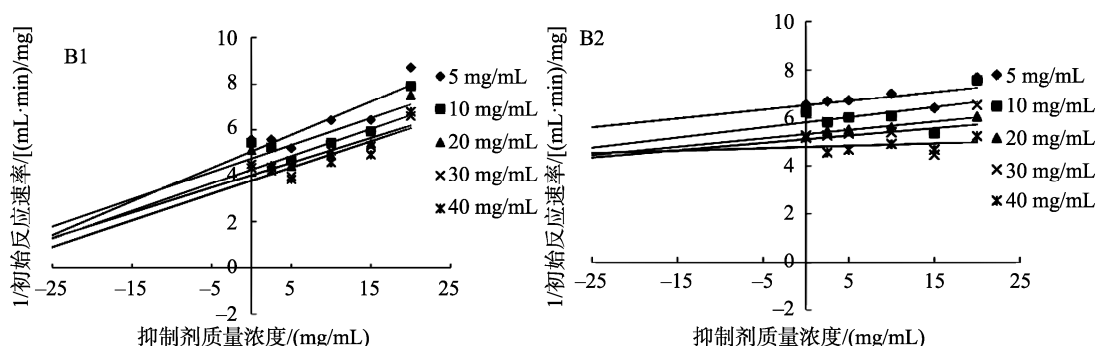
Fig.4 Inhibition curves of PPA by different mass concentrations of 11S



注: A1 为不同质量浓度的淀粉在不同蛋白质质量浓度 7S 下的反应初始速度; A2 为不同质量浓度的淀粉在不同蛋白质质量浓度 11S 下的反应初始速度。

图 5 不同浓度的淀粉在不同蛋白质质量浓度下的反应初始速度

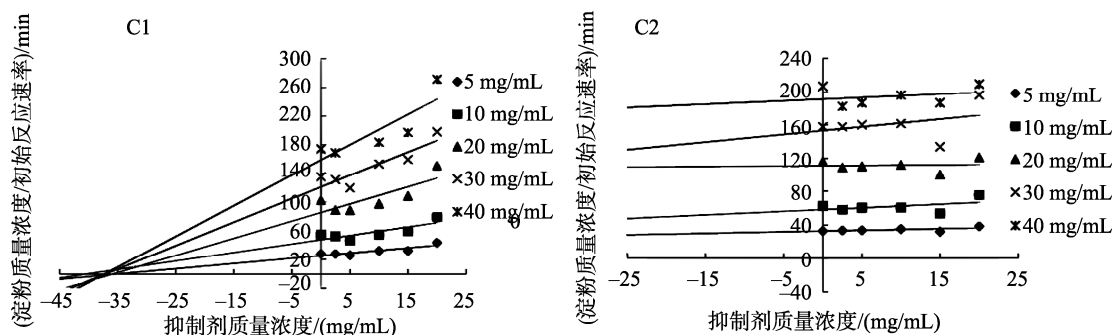
Fig.5 Start reaction velocity at different starch mass concentrations in the absence or presence of 7S (A1) and 11S (A2)



注: B1 为 7S 对 PPA 抑制 Dixon 方程; B2 为 11S 对 PPA 抑制 Dixon 方程。

图 6 7S 和 11S 对 PPA 抑制 Dixon 方程

Fig.6 Dixon (insets) curves for PPA inhibition by 7S (B1) and 11S (B2)



注: C1 为 7S 对 PPA 抑制 Cornish-Bowden 方程; C2 为 11S 对 PPA 抑制 Cornish-Bowden 方程。

图 7 7S 和 11S 对 PPA 抑制 Cornish-Bowden 方程

Fig.7 Cornish-Bowden (insets) curves for PPA inhibition by 7S (C1) and 11S (C2)

表 1 7S 和 11S 对 PPA 抑制的 Dixon 方程和 Cornish-Bowden 方程动力学特征值

Table 1 Kinetic characteristic values from Dixon and Cornish-Bowden equation for PPA inhibition by 7S and 11S

蛋白质	抑制类型	$K_{ic}/(\text{mg/mL})$	$K_{iu}/(\text{mg/mL})$	$1/K_{ic}/(\text{mL/mg})$	$1/K_{iu}/(\text{mL/mg})$	$IC_{50}/(\text{mg/mL})$
7S	混合型竞争性抑制	3.958	37.393	0.259	0.027	49.771
11S	竞争性抑制	37.083	NA	0.027	0.012	NA

注: NA 表示不适用。

7S 与 PPA 结合, 会抑制马铃薯淀粉与 PPA 的相互作用, 从而对酶解反应产生竞争性抑制; 同时, 7S 还可以与淀粉与 PPA 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。在混合型竞争抑制模型中, 而不管马铃薯淀粉是否与 PPA 结合, 7S 均会与 PPA 结合。

在本实验中, 7S 对 PPA 的抑制作用可能存在以下几种抑制机制。首先, 7S 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 7S 中含有的羟基结合<sup>[31]</sup>。7S 中的 C=O 双键能够与 PPA 苯环通过电子云离域的方式增强共轭作用, 可能改变 PPA 的构象, 使 PPA 中的活性位点不能结合马铃薯淀粉。因此, 7S 对 PPA 构成竞争性抑制作用。其次, 推测 PPA 中还可能存在二级碳水化合物结合位点, 这些非活性位点与活性位点相距较远, 并会进一步与 7S 结合。已有文献证实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<sup>[32]</sup>。当 7S 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。当马铃薯淀粉与 PPA 相互结合后, 可能会改变 PPA 的空间构象, 因此形成的 PPA 与马铃薯淀粉复合物会更易于与 7S 的某些部位结合。

### 3 结 论

本研究采用 Dixon 方程和 Cornish-Bowden 方程来探讨 7S 和 11S 对 PPA 的抑制动力学。研究表明, 7S 对 PPA 的抑制类型为混合竞争抑制, 包括竞争抑制和反竞争抑制。7S 与游离的 PPA 的结合比蛋白质与淀粉和 PPA 形成的中间产物的结合作用更强。而 11S 对 PPA 的抑制作用属于竞争性抑制。7S 和 11S 均可以抑制 PPA 的活性, 延缓淀粉的消化, 且 7S 呈现出对 PPA 的更强的抑制作用。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] DA SLI, LAMBRECHT DC, DE SBC, *et al.* Rice and common bean blends: Effect of cooking on *in vitro* starch digestibility and phenolics profile [J]. Food Chem, 2021, 340: 127908.
- [2] NASEER B, NAIK HB, HUSSAIN SZ, *et al.* Effect of carboxymethyl cellulose and baking conditions on *in vitro* starch digestibility and physico-textural characteristics of low glycemic index gluten-free rice cookies [Z]. 2021.
- [3] Jenkins DJA, Kendall CWC, Augustin LSA, *et al.* Glycemic index: Overview of implications in health and disease [J]. Am J Clin Nutr, 2002, 76(1): 266S-273S.
- [4] CHI CD, LI XX, HUANG SX, *et al.* Basic principles in starch multi-scale structuration to mitigate digestibility: A review [J]. Trends Food Sci Technol, 2021. DOI: 10.1016/j.tifs.2021.01.024
- [5] LU XX, CHANG RR, LU H, *et al.* Effect of amino acids composing rice protein on rice starch digestibility [J]. LWT, 2021, 146: 111417.
- [6] CHEN X, ZHANG YG, ZHAO HB, *et al.* Effects of heat moisture treatment on the structural, physicochemical and digestibility properties of potato starch-soybean peptide complexes [Z]. 2021.
- [7] SIMONATO B, CURIONI A, PASINI G. Digestibility of pasta made with three wheattypes: A preliminary study [J]. Food Chem, 2015, 174: 219–225.
- [8] VUJIC L, CEPO DV, SEBECLC B, *et al.* Effect of pseudocereals, legumes and inulin addition on selected nutritional properties and glycaemic index of whole grain wheat based biscuits [J]. J Food Nutr Res, 2014, 53(2): 152–161.
- [9] KIM HJ, PETRIE JR, MOTOI L, *et al.* Effect of structural and physicochemical characteristics of the protein matrix in pasta on *in vitro* starch digestibility [J]. Food Biophys, 2008, 3(2): 229–234.
- [10] VAL RG, AGN SMB, NICOLAS M, *et al.* Enrichment of pasta with faba bean does not impact glycemic or insulin response but can enhance satiety feeling and digestive comfort when dried at very high temperature [J]. Food Funct, 2015, 6(9): 2996–3005.
- [11] 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 Hydrocol, 2017, DOI: 10.1016/j.foodhyd.2017.04.025
- [12] CHEN X, HE XW, 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]. Int J Biol Macromol, 2017, 104: 481–486.
- [13] XU H, ZHANG G. Slow digestion property of microencapsulated normal corn starch [J]. J Cere Sci, 2014, 60(1): 99–104.
- [14] CUI HY, ZHONG F, DOUGLAS GH, *et al.* Study on starch-protein interactions and their effects on physicochemical and digestible properties of the blends [J]. Food Chem, 2019, DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.12.028
- [15] SUN Q, XIONG CS. Functional and pasting properties of pea starch and peanut protein isolate blends [J]. Carbohydr Polymers, 2014, 101: 1134–1139.
- [16] CHEN X, HE X, ZHANG B, *et al.* Wheat gluten protein inhibits  $\alpha$ -amylase activity more strongly than a soy protein isolate based on kinetic analysis [J]. Int J Biol Macromol, 2019, 129: 433–441.
- [17] ZHOU XL, YU WW, LI C. Protein content correlates with the *in vitro* starch digestibility of raw barley flour [Z]. 2021.
- [18] LIU FY, YANG Z, GUO XN, *et al.* Influence of protein type, content and polymerization on *in vitro* starch digestibility of sorghum noodles [J]. Food Res Int, 2021, 142: 110199.
- [19] CHEN X, LUO JW, FU LL, *et al.* Structural, physicochemical, and digestibility properties of starch-soybean peptide complex subjected to heat moisture treatment [J]. Food Chem, 2019, 297: 124957.
- [20] 王金梅. 大豆蛋白热聚集行为及界面, 乳化性质研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2012.  
WANG JM. Thermally aggregation behaviors, interfacial and emulsifying properties of soy protein [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2012.
- [21] 刘殷. 烟草中水溶性糖的测定的研究[J]. 科技风, 2014, (15): 52.  
LIU Y. Study on the determination of water soluble sugar in tobacco [J]. Technol Wind, 2014, (15): 52.
- [22] 余少璟. 大豆 7S 球蛋白亚基的分离纯化[D]. 杨凌: 西北农林科技大学,

- 2017.
- YU SJ. Isolation and purification of soybean 7S globulin subunit [D]. Yangling: Northwest Agriculture & Forestry University, 2017.
- [23] 韩雅君. 大豆分离蛋白的组分分离技术研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2004.
- HAN YJ. The study of industrial technology of preparing 7s-rich and 11s-rich soybean protein isolate [D]. Beijing: China Agricultural University, 2004.
- [24] NARITA Y, INOUE K. Kinetic analysis and mechanism on the inhibition of chlorogenic acid and its components against porcine pancreas  $\alpha$ -amylase isozymes I and II [J]. J Agric Food Chem, 2009, 57(19): 9218–9225.
- [25] NARITA Y, INOUE K. Inhibitory effects of chlorogenic acids from green coffee beans and cinnamate derivatives on the activity of porcine pancreas  $\alpha$ -amylase isozyme I [J]. Food Chem, 2011, 127(4): 1532–1539.
- [26] DANJI, FUKUSHIMA. Recent progress of soybean protein foods: Chemistry, technology, and nutrition [J]. Food Rev Int, 1991, 7(3): 323–351.
- [27] 朱建华, 杨晓泉, 陈刚. 大豆 7S 球蛋白和 11S 球蛋白的研究[J]. 粮油加工与食品机械, 2003, (8): 37–39.
- ZHU JH, YANG XQ, CHEN G. Study of soybean 7S globulin and 11S globulin [J]. Cere Oils Process Food Mach, 2003, (8): 37–39.
- [28] 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 WB, ZHAO Y, XU MS, *et al.* Recent progress in understanding the relationship between protein structure change and *in vitro* digestibility after different treatments [J]. Food Sci, 2019, 40(1): 327–333.
- [29] 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 RQ, XIA N, TENG JW. Effect of heat treatment on the secondary structure and gel property of soybean protein isolate [J]. Food Sci, 2018, 39(9): 60–66.
- [30] 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 RH, SUN XH, WANG YY, *et al.* Review on the difference of structure and function between soy protein and wheat protein [J]. Grain Process, 2016, 41(3): 32–36.
- [31] 陈旭. 蛋白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.
- [32] DHITAL S, GIDLEY MJ, WARREN FJ. Inhibition of  $\alpha$ -amylase activity by cellulose: Kinetic analysis and nutritional implications [J]. Carbohydr Polym, 2015, 123: 305–312.

(责任编辑: 韩晓红 张晓寒)

### 作者简介



罗明昌, 高级工程师, 主要研究方向为变性淀粉及其食品生产工艺。

E-mail: dglmc@126.com



陈旭, 博士, 主要研究方向为功能碳水化合物和食品组分互作。

E-mail: chenxu@dgut.edu.cn