

王鑫, 王峙力, 谢静南, 等. 甜玉米芯多糖对 α -淀粉酶抑制作用研究 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(10): 48–54. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020080294

WANG Xin, WANG Zhili, XIE Jingnan, et al. Inhibition of Polysaccharide on α -Amylase from Sweet Corn cob[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(10): 48–54. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020080294

· 研究与探讨 ·

甜玉米芯多糖对 α -淀粉酶抑制作用研究

王鑫^{1,2}, 王峙力¹, 谢静南¹, 韩 焱¹, 张 凯³, 马永强^{1,*}

(1. 黑龙江省谷物食品与谷物资源综合加工重点实验室, 哈尔滨商业大学

食品工程学院, 黑龙江哈尔滨 150076;

2. 黑龙江省林业科学研究院, 黑龙江哈尔滨 150081;

3. 哈尔滨工业大学生命科学与技术学院, 黑龙江哈尔滨 150080)

摘要: 探究甜玉米芯多糖对 α -淀粉酶的抑制作用及抑制类型, 在此基础上, 考察其对鼠源 α -淀粉酶的抑制作用。实验通过热水浸提及柱层析等方法, 分离纯化甜玉米芯多糖组分 SCP50, 采用体外酶抑制动力学及动物实验相结合的方法, 探究甜玉米芯多糖对鼠源小肠 α -淀粉酶的抑制作用。结果表明甜玉米芯多糖组分 SCP50 对 α -淀粉酶的抑制作用是一种可逆性竞争性抑制, 能快速降低 α -淀粉酶酶促反应速度, K_m 值为 0.669, V_{max} 为 0.1437 mol/L·min⁻¹; 在鼠源肠酶抑制试验中, SCP50 对正常大鼠小肠分离的 α -淀粉酶表现出抑制作用, IC_{50} 为 27.263 mg/mL, 呈现剂量依赖。综上所述, 甜玉米芯多糖组分 SCP50 可能通过抑制体内 α -淀粉酶活性, 延缓小肠对葡萄糖的吸收, 具有潜在的抗糖尿病作用。

关键词: 甜玉米芯多糖, α -淀粉酶, 抑制动力学

中图分类号: TS210.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2021)10-0048-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2020080294

Inhibition of Polysaccharide on α -Amylase from Sweet Corn cob

WANG Xin^{1,2}, WANG Zhili¹, XIE Jingnan¹, HAN Ye¹, ZHANG Kai³, MA Yongqiang^{1,*}

(1. Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Cereal and Comprehensive Processing of Cereal Resources, School of Food Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China;

2. Heilongjiang Academy of Forestry, Harbin 150081, China;

3. School of Life Science and Technology, Harbin Institute of Technology, Harbin 150080, China)

Abstract: Objective to explore the inhibitory effect and type of sweet corn cob polysaccharide on α -amylase, and on this basis, to investigate its inhibitory effect on mouse α -amylase. SCP50, a component of sweet corn cob polysaccharide, was isolated and purified by hot water extraction and column chromatography. The inhibitory effect of SCP50 on α -amylase from rat small intestine was investigated by enzyme inhibition kinetics *in vitro* and animal experiments. The results showed that the inhibition of SCP50 on α -amylase was reversible competitive inhibition, and the competition mode was high activity competition, which could rapidly reduce the reaction speed of α -amylase, K_m was 0.669, V_{max} was 0.1437 mol/L·min⁻¹. In the rat intestinal enzyme inhibition test, SCP50 showed inhibitory effect on α -amylase isolated from small intestine of normal rats, IC_{50} 263 mg/mL in a dose-dependent manner. In conclusion, SCP50, a component of sweet corn cob polysaccharide, may have potential antidiabetic effect by inhibiting α -amylase activity and delaying glucose absorption in small intestine.

Key words: sweet corn cob polysaccharide; α -amylase; inhibition kinetics

甜玉米芯是甜玉米(*Zea mays* L.)一种常见的副产物, 含有丰富的纤维素, 是一种可回收利用的生物

资源^[1]。但由于利用程度较低, 大多数被废弃焚烧处理, 造成资源浪费^[2]。甜玉米芯多糖(Sweet corn cob

收稿日期: 2020-08-31

基金项目: 哈尔滨商业大学青年人才项目: 2019CX31。

作者简介: 王鑫(1984-), 女, 博士, 高级工程师, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: wangxinfood@163.com。

* 通信作者: 马永强(1963-), 男, 硕士, 教授, 研究方向: 食品化学, E-mail: qymal26@163.com。

polysaccharide, SCP)是甜玉米芯中的一种具有多种生物活性的重要物质,其被证明具有降低血糖、改善造血功能等作用,具有一定的研究价值^[2]。目前环境保护及推动农业健康发展是广受关注的议题^[3],因此探讨如何有效利用农业副产物具有一定研究价值。

如今,糖尿病普遍存在于中老年人群,威胁着人们的健康,中国糖尿病患者数量每年都在增加^[4]。现阶段对于糖尿病的治疗方法中,减少小肠对葡萄糖吸收、控制餐后血糖水平是有效的途径^[5]。 α -淀粉酶在消化途径中发挥重要作用,可将食物中的碳水化合物转化为葡萄糖,经小肠进入血液而升高血糖,一些已投入使用的抗糖药物,如阿卡波糖、米格列醇等,通过抑制 α -淀粉酶等肠酶的活性,来控制糖尿病患者饭后的血糖含量^[6]。

糖尿病、高血脂、高血糖等疾病都可以使用 α -淀粉酶抑制剂来治疗^[7],现阶段的糖尿病患者大多数长期依赖于胰岛素或口服药物来维持血糖水平^[8],所以寻找无副作用的天然降糖药物就是目前研究的重要方向^[9]。多糖是一种大分子碳水化合物,具有 α -淀粉酶抑制效果的多糖类物质有很多种,如石莼多糖^[10]等,但关于甜玉米芯多糖对 α -淀粉酶活性的影响尚未受到关注。

目前关于多糖对 α -淀粉酶抑制作用的研究主要集中于抑制类型和竞争方式的研究,而对鼠源小肠酶体外实验的研究相对较少。本研究针对甜玉米芯多糖组分 SCP50 对 α -淀粉酶的抑制作用及抑制类型进行探讨,并在此基础上,评价其对大鼠肠源 α -淀粉酶活性的影响,以全面探讨 SCP50 对肠内碳水化合物消化吸收的影响,及其应用于抗糖尿病保健食品、药品领域的潜力,为之后的动物实验和寻找 α -淀粉酶体内抑制作用机制提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

雄性 Wista 大鼠 体质量为(200±5)g,在长春亿斯实验动物中心购买,生产许可编号:Scxk(Ji)-2011-0004,合格证编号:201500010264,动物饲料由长春亿斯实验动物中心提供;所有实验均按照实验动物的保护和使用指南进行,并经黑龙江省疾病控制和预防中心的动物护理委员会批准。甜玉米芯 昊伟农业有限公司;链脲佐菌素(streptozotocin, STZ) 美国 Sigma 公司;可溶性淀粉 上海和氏璧化工有限公司; α -淀粉酶 美国 Sigma-Aldrich 公司;叠氮化钠、氯化钠 天津致远化学试剂有限公司;磷酸氢二钠、磷酸二氢钠 天津科密欧化学试剂有限公司;3,5-二硝基水杨酸 纯度>98,国药集团化学试剂有限公司;KI 天津市光复科技发展责任有限公司;其他试剂 均为国产分析纯。

FW177 型中草药粉碎机 天津市泰斯特仪器有限公司;EMS-9A 型加热磁力搅拌器 天津市欧诺仪器仪表有限公司;EV241 型旋转蒸发仪 北京莱伯

泰科仪器股份有限公司;UV 5500PC 型紫外可见分光光度计 上海元析仪器有限公司;ALC-1100.2 型电子分析天平 北京赛多利斯仪器系统有限公司;HH-4 型数显恒温水浴锅 国华电器有限公司;电热恒温鼓风干燥箱 上海一恒科技有限公司;SMP6 型酶标仪 SoftMax Pro 6 Software。

1.2 实验方法

1.2.1 甜玉米芯粗多糖的提取工艺流程 甜玉米芯→干燥粉碎→过筛→脱脂→浸提→离心取上清液→脱蛋白→浓缩→脱色→醇沉(体积分数 50% 酒精)→DEAE 52 纤维素柱层析→葡聚糖凝胶 G-100 柱层析纯化→冷冻干燥→SCP50

将甜玉米芯去除杂质后干燥粉碎过 80 目筛,得到甜玉米芯粉,加入正己烷试剂,按照质量体积比为 3:25 g/mL 对其进行脱脂,离心弃上清液,然后称取残渣热水浸提:按料水比 1:20 g/mL 加水,100 ℃ 提取 3 h,4000 r/min 离心 10 min 后收集上清液,对其脱蛋白(Sevage 法)、脱色^[11](D301R 大孔弱碱性阴树脂法)后加入 50% 的乙醇醇沉 12 h,除去上清液并冷冻干燥得到的醇沉物,得甜玉米芯多糖粉末 SCP^[11] 备用。

1.2.2 甜玉米芯多糖组分分离纯化 称取 1.00 g SCP 溶解于 5.00 mL 蒸馏水中,使用纤维素柱层析 DEAE-52 分离^[12]、葡聚糖凝胶柱层析 Sephadex-G100 纯化^[13],全部以蒸馏水为洗脱剂,流速为 1 mL/min,5.00 mL/管收集,通过苯酚-硫酸法^[14] 隔管跟踪检测多糖含量,分别以洗脱液管数和吸光度值为横纵坐标绘制多糖洗脱曲线。根据洗脱曲线,将有效峰值的管进行合并收集,浓缩、冻干后得到甜玉米芯多糖 SCP50。

1.2.3 SCP50 对 α -淀粉酶活性抑制作用 根据邵元元、董丽娟^[15-16] 的方法并稍作修改,如表 1 所示,将 SCP50 配制浓度分别为 2、4、6、8、10 mg/mL,取 0.3 mL 的 α -淀粉酶溶液与 SCP50 均匀混合 37 ℃ 水浴预热 5 min,同时加入已预温的 1% 淀粉溶液(PBS 配制)0.3 mL,在 37 ℃ 水浴下反应一定时间,立即加入 0.5 mL DNS 溶液显色,在沸水中水浴 5 min,冷却后经蒸馏水稀释至 10 mL,在 540 nm 处测定吸光值(A_3)。用阿卡波糖(2、4、6、8、10 mg/mL)做阳性对照组,蒸馏水替代抑制剂及磷酸盐缓冲溶液(67 mmol/L pH 6.8)替代 α -淀粉酶(A_2)做空白对照物;磷酸盐缓冲溶液替代 α -淀粉酶(A_4)做背景对照

表 1 α -淀粉酶活性抑制体系
Table 1 Inhibition system of α -amylase activity

组别	0.3 mL酶液	抑制剂	0.3 mL淀粉溶液	0.5 mL DNS溶液
A ₁	√	—	√	√
A ₂	—	—	√	√
A ₃	√	SCP50/阿卡波糖	√	√
A ₄	—	SCP50/阿卡波糖	√	√

组;以蒸馏水替代抑制剂(A_1)做空白组。抑制率的计算见式(1)。做三次平行实验,根据抑制率算得 IC_{50} 。

$$\text{抑制率} = (\%) \left(1 - \frac{A_3 - A_4}{A_1 - A_2} \right) \times 100 \quad \text{式 (1)}$$

1.2.4 SCP50 对 α -淀粉酶活性抑制动力学研究

1.2.4.1 确定 α -淀粉酶最适酶浓度和作用时间 使用 Bernfeld 法测定^[17],用磷酸盐缓冲液(67 mmol/L pH 6.8)配制 1% 的淀粉底物,以 2 mL 67 mmol/L pH 6.8 磷酸盐缓冲液做空白,取不同浓度的 α -淀粉酶溶液(0.4、0.8、1.2、1.6、2 U/mL)作对照。在 37 °C 下预热 0.3 mL 的 α -淀粉酶 5 min,加入预温后的 1% 淀粉溶液 0.3 mL,在酶促反应开始后,准确计时,每过 1 min 添加 0.5 mL DNS 终止剂终止反应,沸水浴 5 min 后,冷却稀释定容至 10 mL,在 540 nm 下测定吸光光度值,共计 10 min。空白对照以 0.3 mL 磷酸盐缓冲溶液代替酶液,通过作图筛选出 α -淀粉酶的最适酶量以及反应时间。

1.2.4.2 SCP50 对 α -淀粉酶抑制类型研究 按照上述 1.2.3 中实验方法进行操作,在空白管中使用 0.3 mL 缓冲液代替 α -淀粉酶液,分别于 540 nm 处测定 0、1 mg/mL 浓度的甜玉米芯多糖 SCP50 时的吸光值,三组平行实验。将酶浓度与反应速率作为横纵坐标作图,根据反应速率直线是否过原点,确定 SCP50 对 α -淀粉酶的抑制类型^[16]。

1.2.4.3 SCP50 对 α -淀粉酶竞争方式研究 分别配制 1、0.05%、0.025%、0.0125%、0.00625% 淀粉溶液,按照 1.2.3 的试验方法进行操作,分别在 540 nm 下测定有无甜玉米芯多糖 SCP50 时吸光值,三组平行实验。采用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法, X 轴为底物浓度的倒数, Y 轴为酶促反应速度的倒数,绘出 SCP50 对 α -淀粉酶的抑制曲线并明确其竞争方式,按式(2)~(4)计算。

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_i} \right) \quad \text{式 (2)}$$

$$\text{斜率} = \frac{K_m}{V_{\max}} + \frac{K_m [I]}{V_{\max} K_i} \quad \text{式 (3)}$$

$$\text{截距} = \frac{1}{V_{\max}^{\text{app}}} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{1}{\alpha K_i V_{\max}} [I] \quad \text{式 (4)}$$

式中: K_i —抑制常数; K_m —米氏常数; v —反应速度; $[I]$ —抑制剂浓度; $[S]$ —底物浓度; α —表观系数。

1.2.5 SCP50 对大鼠肠源 α -淀粉酶的抑制作用

1.2.5.1 大鼠小肠酶液的提取和活力测定 将一只正常大鼠麻醉猝死,立即取出小肠,流水洗净内容物后,加入 4 °C 预冷后的 PBS 溶液,质量体积比为 1:3,匀浆后,4000 r/min 离心 20 min,收集上清液分装备用^[18],贮存于-20 °C。根据 α -淀粉酶水解淀粉为还原糖,参照 DNS(3,5-二硝基水杨酸)比色法^[19],取 0.3 mL 小肠酶液 37 °C 预热 5 min,加入已预温的淀粉溶液 0.3 mL 在 37 °C 下反应一定的时间,加入 0.5 mL DNS 溶液终止反应,沸水浴 5 min 后,取出冷却,蒸馏水稀释定容至 10 mL,以蒸馏水代替小肠酶液作为空白,540 nm 下测定吸光值,按式(5)~(6)计算。将在 37 °C, pH 6.8 条件下,1 L 溶液中 1 min 生成 1 μ mol 葡萄糖定义为 1 个酶活力单位。

$$C = \frac{(A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}})}{(A_{\text{校准}} - A_{\text{空白}})} \times 5.55 \quad \text{式 (5)}$$

$$\text{酶活力} = \frac{C \times 2 \times 1000}{20} \quad \text{式 (6)}$$

式中: C —葡萄糖浓度, mmol/L; 5.55—校准浓度。

1.2.5.2 SCP50 对 α -淀粉酶的抑制作用鉴别试验 根据尚禹东^[18]参考文献中的实验方法略作修改,如表 2 所示,取上述小肠酶液 0.35 mL,放入 37 °C 的 Krebs-Henseleit 缓冲液中,阴性对照组,加入 2.5 mL、Krebs-Henseleit 缓冲液配制的 2% 淀粉溶液以及 2.5 mL 的 Krebs-Henseleit 缓冲液,不加小肠酶液及降糖药物,其他各组同时加入小肠酶液和 2.5 mL 的 Krebs-Henseleit 缓冲液配制的 2% 淀粉液,分别在实验对照组中加入 2.5 mL 甜玉米芯多糖 SCP50 样品高(10 g/L)、中(5 g/L)、低(2.5 g/L);用相同体积的阿卡波糖(5 g/L)替代 SCP50 溶液作为阳性对照组;用同体积 Krebs-Henseleit 缓冲液代替甜玉米芯多糖 SCP50 溶液作为正常对照组,每组 3 管平行进行测定。

37 °C 下水浴振荡 1 h 后取混悬液 0.5 mL,加入 0.1 mL、0.02 mol/L I_2 -KI 溶液,淀粉在 I_2 -KI 存在的条件下会呈现特征性的蓝色,620 nm 下测其吸光度值,加入 2.5 mL 2% 淀粉溶液和 0.1 mL、0.02 mol/L

表 2 分组及给药

Table 2 Grouping and administration

组别	缓冲液 (mL)	淀粉溶液 (mL)	小肠酶液	降糖药物
阴性对照组	2.5	2.5	—	—
正常对照组	—	2.5	√	Krebs-Henseleit 缓冲液
阳性对照组	—	2.5	√	2.5 mL 阿卡波糖(5 g/L)
SCP50 高剂量组	—	2.5	√	2.5 mL SCP50 (10 g/L)
SCP50 中剂量组	—	2.5	√	2.5 mL SCP50 (5 g/L)
SCP50 低剂量组	—	2.5	√	2.5 mL SCP50 (2.5 g/L)

I₂-KI 溶液作为空白,计算反应液中 SCP50 对 α-淀粉酶的抑制率,如公式(7)。通过正常对照组和阴性对照组 A 值的对比,确定在无任何 SCP50 的干预情况下,反应前和反应后淀粉的水解程度。在加入 SCP50 后,分别通过与正常对照组和阴性对照组的比较,判断甜玉米芯多糖 SCP50 对其活性的抑制效果。

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{[(A_{\text{阴性}} - A) - (A_{\text{阴性}} - A_{\text{样品}})]}{(A_{\text{阴性}} - A_{\text{空白}})} \times 100$$

式 (7)

1.2.5.3 SCP50 及阳性药物抑制作用的量效曲线 用 0.1 mol/L、pH 6.8 的 PBS 溶液配制成 20.0000、10.0000、5.0000、2.5000、1.2500、0.6250 及 0.3125 g/L 共 7 个浓度梯度 SCP50 溶液;用 PBS 配制 1、1×10⁻¹、1×10⁻²、1×10⁻³、1×10⁻⁴、1×10⁻⁵、1×10⁻⁶、g/L 7 个浓度梯度阿卡波糖溶液,各 5 mL。在药物浓度对数值及抑制率的横纵坐标轴中求出直线方程并计算 IC₅₀。

绘制阳性药对 α-淀粉酶的抑制曲线以及测定 IC₅₀:如表 3 所示,向 48 孔板中加入 0.3 mL、0.5% 淀粉溶液(PBS 配制),0.4 mL 的 PBS 溶液,在除阴性组外,加入 0.3 mL 小肠酶液在正常对照组和不同浓度的阳性药物组中;阴性组用等体积的 PBS 代替。每个浓度三孔平行进行实验,在 37 ℃ 下反应 20 min,冰水浴冷却 10 min,再加 0.2 mL 浓度为 0.4 mmol/L 的 I₂-KI 溶液显色,620 nm 下测吸光度值,3 管平行测定^[20]。

表 3 分组及添加量
Table 3 Grouping and addition

组别	0.5 %淀粉溶液 (mL)	PBS溶液 (mL)	小肠酶液 (mL)	0.4 mmol/L I ₂ -KI 溶液(mL)
阴性对照组	0.3	0.4	—	0.2
正常对照组	0.3	0.4	0.3	0.2
阳性药物组	0.3	0.4	0.3	0.2

绘制 SCP50 对 α-淀粉酶的抑制曲线以及测定 IC₅₀:按上述实验方法操作,使用 SCP50 替代阳性药,计算反应液中 SCP50 对 α-淀粉酶的抑制率,绘制抑制曲线并计算出 IC₅₀ 的数值。

1.3 统计学处理

采用 DPS 软件进行处理。所有数据均用平均值±标准偏差表示,采用单因素方差分析进行统计分析,采用 Origin 8.5 完成图表。

2 结果与分析

2.1 甜玉米芯多糖分离纯化

2.1.1 甜玉米芯多糖 DEAE-52 柱层析纯化 如图 1,甜玉米芯多糖经过以蒸馏水为洗脱剂的 DEAE-52 的柱层析后,得到了一个峰型显著的主峰,还有若干个峰型较小,不利于收集,所以收集经过蒸馏水洗脱后的多糖,仅得到一种非极性多糖,即中性糖。根据上述分析,甜玉米芯多糖经过以蒸馏水为洗脱剂

的 DEAE-52 的柱层析后合并主峰第 20 管至 34 管可以得到均一组分的甜玉米芯多糖,备用。

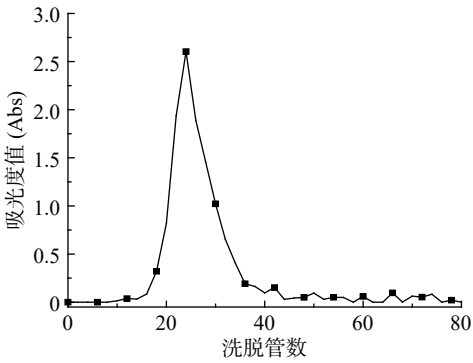


图 1 甜玉米芯多糖 DEAE-52 色谱柱蒸馏水洗脱曲线
Fig.1 DEAE-52 distilled water column elution curve of sweet corn cob polysaccharides

2.1.2 甜玉米芯多糖葡聚糖凝胶 G-100 凝胶柱层析纯化 根据图 2 可知,在第 28 管至第 38 管范围内出现了一个峰型显著且较为对称的峰,甜玉米芯多糖组分经过以蒸馏水为洗脱剂的 DEAE-52 过柱后,再经过 G-100 凝胶柱层析后,可得到均一的中性糖。合并第 28 管至第 38 管中的甜玉米芯多糖组分,备用,命名为 SCP50。

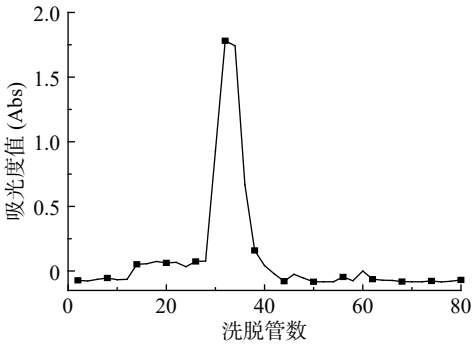


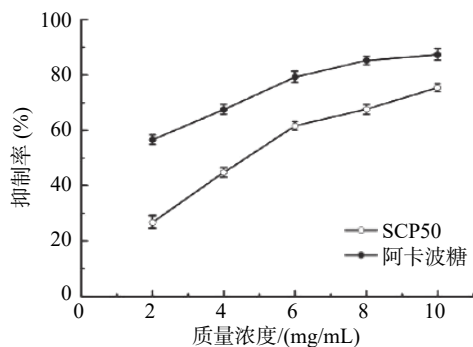
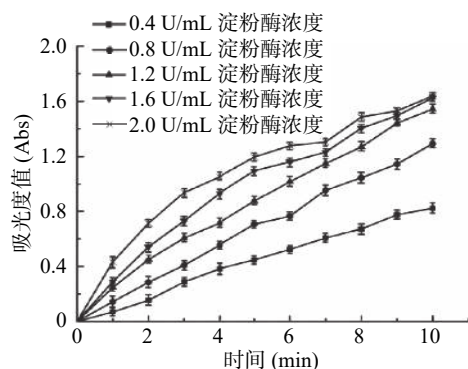
图 2 SCP50 组分 Sephadex G-100 凝胶柱洗脱曲线
Fig.2 Elution curves of SCP50 by Sephadex G-100 gel column

2.2 SCP50 对 α-淀粉酶活性抑制分析

如图 3 所示,当 SCP50 的浓度为 2 mg/mL 时,SCP 50 的抑制率达到了 26.67%±1.67%,当浓度增大到 10 mg/mL 时,抑制率达到了 75.44%±1.94%。其 IC₅₀ 为 5.129±0.34 mg/mL。虽然甜玉米芯多糖 SCP50 与阳性药阿卡波糖的抑制率相比有一定差距,但 SCP50 对 α-淀粉酶还是具有一定的抑制效果。黄绍华^[21]等报道的山药多糖和曾傲琼^[22]等人报道的条斑紫菜多糖与本实验结果相似,均对 α-淀粉酶产生剂量依赖的抑制作用。

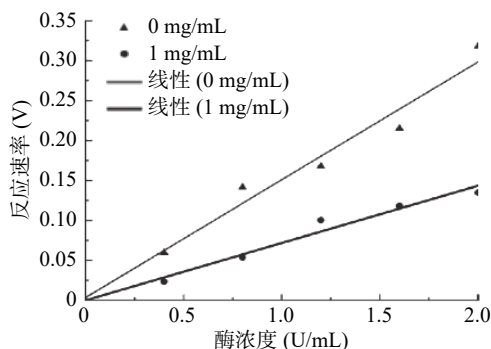
2.3 甜玉米芯多糖 SCP50 对 α-淀粉酶活性抑制动力学

2.3.1 α-淀粉酶最适酶浓度和反应时间的分析 如图 4 所示,不同浓度 α-淀粉酶在 10 min 内反应速率与酶浓度之间存在线性关系,确定适合的酶量是研究动力学的关键步骤^[23]。从图中可以明显看出,反应 6 min 之前线性关系较良好,酶浓度为 0.4、0.8、1.2 U/mL

图3 SCP50对 α -淀粉酶活性的抑制曲线Fig.3 The activity inhibition curve of SCP50 on α -amylase图4 不同浓度 α -淀粉酶反应动力学进程曲线Fig.4 Reaction kinetics curves in different concentrations of α -amylase

三条动力学的线性关系良好, 综上试验数据可看出, 为保证反应进程中按照初始速度进行, 选择最适酶量为 1.2 U, 反应时间为 5 min 为宜^[24]。这与杨小倩^[25]等报道玉蜀黍不同部位提取物对 α -淀粉酶抑制作用得到的最佳反应时间为 10 min 不同, 可能是由于二者的抑制剂不一样导致结果不一样, 具体的原因需要更深层的探究。

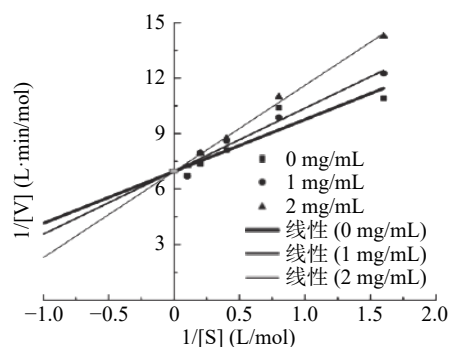
2.3.2 甜玉米芯多糖对 α -淀粉酶抑制类型 由图 5 可知, 在反应过程中没有甜玉米芯多糖 SCP50 的存在时, 反应速率是一条经过原点的直线^[23], 在原反应体系中加入酶抑制剂甜玉米芯多糖后, 反应速度随着酶量多少及加入抑制剂后的变化由图可知, 加入甜玉米芯多糖 SCP50 后得到的反应速率直线通过原点, 且斜率低于无抑制剂的曲线。由此可以得出甜玉米

图5 SCP50对 α -淀粉酶抑制作用类型Fig.5 The inhibition type of SCP50 on α -amylase

芯多糖 SCP50 对 α -淀粉酶抑制类型属于可逆抑制类型^[15]。这是由于 SCP50 与底物共同竞争同一位置, 使得 SCP50 与 α -淀粉酶结合, 且 α -淀粉酶不再与底物结合, 从而降低反应速度, 且产物形成可逆。

2.3.3 甜玉米芯多糖 SCP50 对 α -淀粉酶竞争方式

根据 Lineweaver-Burk 方法绘制双倒数曲线^[26], 由图 6 可知, 三条直线在允许误差范围内均交于 Y 轴, 通过 $y_2 \text{ mg/mL} = 4.66x_2 \text{ mg/mL} + 6.958$ 可以得出, α -淀粉酶的 K_m 值为 0.669, $V_{\max}$ 为 $0.1437 \text{ mol/L} \cdot \text{min}^{-1}$ 。随着加入 SCP50 质量浓度的增加, 双倒数直线与横坐标的截距变小, 与纵坐标的截距不变, 可知 $K_{m2} \text{ mg/mL} > K_{m1} \text{ mg/mL}$, 且 $V_{\max}$ 不变, 甜玉米芯多糖与底物结构相似, 酶的活性中心由二者共同竞争, 故 SCP50 是一种竞争可逆性的 α -淀粉酶抑制剂。这与高粱原花青素^[27]和山药多糖^[21]对 α -淀粉酶活性的竞争方式相似, 与甜叶菊毛状根绿原酸类化合物^[28]及黑果腺肋花楸多酚^[29]对 α -淀粉酶活性的竞争方式不同, 底物和抑制剂与酶的结合既无互相排斥, 也无互相促进, 即底物、抑制可同时独立地与酶结合, 属于非竞争性抑制。

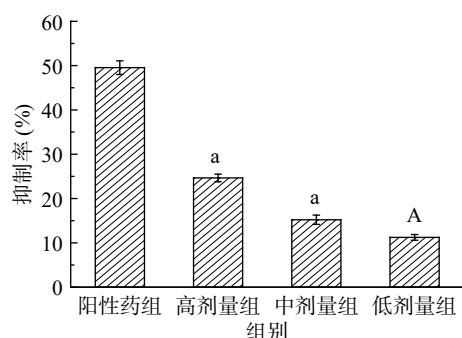
图6 不同 SCP50 浓度下反应的 $1/[S]$ 和 $1/[V]$ 双倒数曲线Fig.6 The $1/[S]$ and $1/V$ double bottom graph under different concentration of SCP50 reaction

2.4 SCP50 对 α -淀粉酶的抑制作用

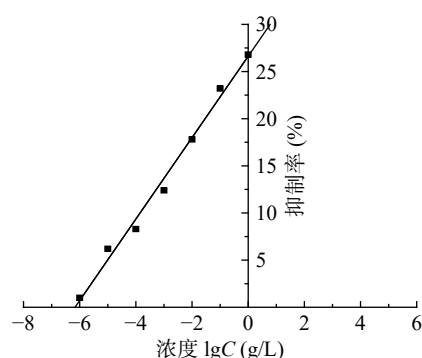
2.4.1 SCP50 对大鼠小肠内 α -淀粉酶抑制作用测定的结果 通过实验测得大鼠小肠酶活力值为 71.3 ± 1.32 酶活单位; 由图 7 可知, 阳性药对其抑制率为 $49.54\% \pm 1.93\%$, 且抑制效果较 SCP50 各剂量组效果明显, 其中甜玉米芯多糖 SCP50 高、中剂量组抑制率与阳性药组抑制率相比显著降低 ($P < 0.05$), 抑制率为 $24.65\% \pm 1.34\%$ 和 $15.21\% \pm 1.43\%$, SCP50 低剂量组与阳性药组相比高度显著降低 ($P < 0.001$), 抑制率为 $11.23\% \pm 0.56\%$, 且呈现明显的量效关系。

2.4.2 SCP50 及阳性药物抑制作用的量效曲线

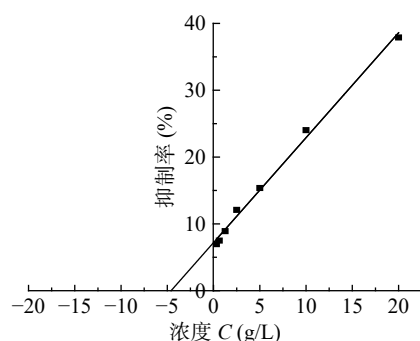
2.4.2.1 阳性药(阿卡波糖)对小肠内 α -淀粉酶的抑制曲线 图 8 为阳性药对 α -淀粉酶的抑制曲线, 淀粉酶的抑制率方程为: $y = 4.318x + 26.625$, $R^2 = 0.9905$, IC_{50} 为 5.413 mg/mL 。通过对于测定结果的分析, 阿卡波糖浓度越高剂量越大对小肠 α -淀粉酶抑制作用也就越强。

图 7 正常大鼠小肠内 α -淀粉酶抑制测定Fig.7 Determination of α -amylase inhibition in small intestine of normal rats

注: 与阴性组相比 A: $P<0.001$; a: $P<0.05$ 。

图 8 不同浓度阳性药对 α -淀粉酶的抑制率Fig.8 Inhibition rate of α -amylase under different concentration of positive medicine

2.4.2.2 SCP50 对小肠内 α -淀粉酶抑制曲线 由图 9 可知 SCP50 对 α -淀粉酶的抑制率方程: $y=1.5697x+7.059$, $R^2=0.9949$, IC_{50} 为 27.263 mg/mL。通过测定结果, 得出 SCP50 对小肠 α -淀粉酶具有剂量依赖的抑制作用, 因而能够减少餐后血糖的上升, 使血糖吸收平缓, 降低空腹血糖。李兰等^[30]报道绿茶提取物的降血糖研究, 温正辉等^[31]报道蒲桃不同部位对 α -淀粉酶抑制作用与本实验结果相似。

图 9 不同浓度 SCP50 对 α -淀粉酶的抑制率Fig.9 Inhibition rate of α -amylase under different concentration of SCP50

3 结论

活性物质对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制作用的检测经常使用动物源肠酶。甜玉米芯是一种常见的农业副产物, 实验探究其中分离纯化的多糖组

分 SCP50 对 α -淀粉酶的抑制效果、抑制类型, 并进一步探究了甜玉米芯多糖 SCP50 对鼠源 α -淀粉酶的抑制作用。

实验结果表明: 甜玉米芯多糖组分 SCP50 对 α -淀粉酶是一种可逆性竞争性抑制, 抑制作用明显, 可快速降低 α -淀粉酶酶促反应速度, K_m 值为 0.669, V_{max} 为 0.1437 mol/L·min⁻¹; 在鼠源肠酶抑制试验中, SCP50 可以抑制正常大鼠离体小肠内的 α -淀粉酶, IC_{50} 为 27.263 mg/mL, 结果呈剂量依赖。结果提示甜玉米芯多糖组分 SCP50 具有潜在的抗糖尿病作用, 研究为农业副产物的高值利用提供可能途径。

参考文献

- [1] 陈家明, 余稳稳, 吴晖, 等. 玉米芯的营养成分分析[J]. 现代食品科技, 2012, 28(9): 1073-1075.
- [2] 覃树林, 王新明, 孙保剑, 等. 玉米芯综合利用研究进展[J]. 氨基酸和生物资源, 2014, 36(2): 23-27.
- [3] 吴宪玲, 侯晓玉, 王笑可, 等. 玉米芯的综合利用研究现状[J]. 农业科技与装备, 2019(6): 59-60.
- [4] Umpierrez Guillermo E, Bailey Timothy S, Garcia Danielle, et al. Improving postprandial hyperglycemia in patients with type 2 diabetes already on basal insulin therapy: Review of current strategies[J]. Journal of diabetes, 2018, 10(2): 18-21.
- [5] Abunab Hamzeh, Dator Wireen L, Hawamdeh Sana. Effect of olive leaf extract on glucose levels in diabetes-induced rats: A systematic review and meta-analysis[J]. Journal of diabetes, 2017, 9(10): 11-16.
- [6] Dong-Hyun Jung, Dong-Ho Seo, Ye-Jin Kim, et al. The presence of resistant starch-degrading amylases in *Bifidobacterium adolescentis* of the human gut[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020: 161.
- [7] 王文蒙. α -淀粉酶抑制剂的提取、分离及性质研究[D]. 天津: 天津商业大学, 2010.
- [8] Tahrani A A, Piya M K, Kennedy A, et al. Glycaemic control in type 2 diabetes: Targets and new therapies[J]. Pharmacology & Therapeutics, 2010, 125(2): 328-361.
- [9] 张云林. 龙须菜多糖的制备及降血糖活性研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2016.
- [10] BelHadj, Hentati, Elfeki, et al. Inhibitory activities of *Ula lactuca* polysaccharides on digestive enzymes related to diabetes and obesity[J]. Archives Of Physiology And Biochemistry, 2013, 119(2): 7-14.
- [11] Ma Y Q, X Wang, S H Gao, et al. Optimized enzyme-assisted microwave extraction and potential inhibitory action against α -glucosidase of polysaccharides from sweet corncocks[J]. Phyton-International Journal of Experimental Botany, 2016, 85: 79-86.
- [12] 马永强, 王鑫, 高爽, 等. 甜玉米芯多糖提取及抗凝血活性初探[J]. 食品工业科技, 2016, 37(21): 114-118, 188.
- [13] 黄越燕, 王露露, 季慧. 植物多糖纯化分离方法研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(3): 671-674.
- [14] 张媛媛, 张彬. 苯酚-硫酸法与蒽酮-硫酸法测定绿茶茶多糖的比较研究[J]. 食品科学, 2016, 37(4): 158-163.

- [15] 邵元元. 五倍子没食子酸高效制备及其对 α -淀粉酶的抑制作用 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2014.
- [16] 董丽娟, 张燕平. 羊栖菜中 α -淀粉酶抑制剂的提取及研究 [J]. 食品科技, 2015, 40(4): 322-325.
- [17] 张永军. 茶叶浸提物对功能性酶活性和二级结构的影响研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2010.
- [18] 尚禹东. α -糖苷酶抑制剂—银杏叶提取物的药效学研究 [D]. 长春: 长春中医药大学, 2010.
- [19] Ali H, Houghton P J, Soumyanath A. α -Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2006, 107(3): 449-455.
- [20] 刘玉田. 小球藻中 α -葡萄糖苷酶抑制成分的分离纯化及酶动力学研究 [D]. 上海: 上海师范大学, 2019.
- [21] 黄绍华, 胡晓波, 王震宙. 山药多糖对 α -淀粉酶活力的抑制作用 [J]. 食品工业科技, 2006(9): 94-95.
- [22] 曾傲琼, 让一峰, 杨瑞金, 等. 条斑紫菜多糖对 α -淀粉酶的抑制效果 [J]. 中国生物制品学杂志, 2019, 32(4): 396-402.
- [23] Chen H Q, Yuan F, Wang S Z, et al. Near-infrared to nearinfrared upconverting $\text{NaYF}_4: \text{Yb}^{3+}, \text{Tm}^{3+}$ nanoparticles-aptamer-Aunanorods light resonance energy transfer system for the detection of mercuric (II) ions in solution [Z]. *Analyst* 2013, 138: 2392-2397.
- [24] 姜丽丽, 张中民, 陈道玉, 等. 白藜芦醇对 α -葡萄糖苷酶的抑制动力学及抑制机制 [J]. 食品科学, 2019, 40(11): 70-74.
- [25] 杨小倩, 孙佳明, 吴楠, 等. 玉蜀黍不同部位提取物对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶抑制作用 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(1): 15-21, 27.
- [26] Marl D, Linde D, Lobato M F. Purification and biochemical characterization of an α -glucosidase from *xanthophyllomyces dendrorhus* [J]. *Yeast*, 2006(23): 117-125.
- [27] 王斯慧, 黄琬凌, 陈庆松, 等. 芦丁、槲皮素对 α -淀粉酶抑制活性研究 [J]. 食品与发酵科技, 2012, 48(3): 34-37.
- [28] 卢桃, 尹忠平, 彭大勇, 等. 甜叶菊毛状根绿原酸类化合物对 α -淀粉酶的抑制作用 [J]. 食品工业科技, 2017, 38(8): 161-166.
- [29] 徐艳阳, 仇洋, 王君旻, 等. 黑果腺肋花楸多酚的抑菌效果及对 α -淀粉酶活性的抑制作用 [J]. 食品科学, 2018, 39(19): 51-57.
- [30] 李兰. 绿茶提取物的降血糖研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2014.
- [31] 温正辉, 凌梅娣, 余思萍, 等. 蒲桃不同药用部位乙醇提取物对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶活性的抑制作用研究 [J]. 中国药房, 2019, 30(23): 3246-3251.