

## 红茶和绿茶多酚与猪胰腺 - 淀粉酶的荧光猝灭反应

林锋<sup>1</sup> 姚江武<sup>2\*</sup> 陶涛<sup>3</sup>

(1. 福建医科大学口腔医学院修复科 福建 福州 350004;

2. 厦门市口腔医院; 3. 厦门大学生命科学院生物医学科学系)

**[摘要]** 目的:本研究旨在用红茶和绿茶的茶多酚(tea polyphenols, TP)猝灭猪胰腺 - 淀粉酶(porcine pancreatic - amylase, PPA)的蛋白质内源性荧光。方法:通过获得的荧光光谱,计算 Stern - Volmer猝灭常数( $K_{SV}$ )、双分子猝灭常数( $k_q$ )、表观静态猝灭常数( $K_{app}$ )、动态猝灭常数( $K_D$ )和静态猝灭常数( $K_S$ )。统计采用  $t$  检验,检验水平  $\alpha = 0.05$ 。结果:结合和猝灭反应明显受到 PPA 结构的影响。通过 Stern - Volmer 荧光猝灭图显示的特征,证实 TP 与 PPA 之间发生的荧光猝灭为静态猝灭和动态猝灭。比较动、静态猝灭常数( $K_D$  与  $K_S$ )之间的差异具有统计学意义( $P < 0.05$ );双分子猝灭常数( $k_q$ )大于双分子扩散限制性猝灭常数( $1 \times 10^{10} \cdot M^{-1} \cdot s^{-1}$ );表明红茶和绿茶的 TP 与 PPA 的反应是以形成基态复合物的静态猝灭为主。伴随红茶和绿茶溶液滴定的浓度增加,PPA 荧光发射波长( $\lambda_{em}$ )发生红移,红茶猝灭时荧光发射波长由 384 nm 红移至 404 nm,绿茶组则由 384 nm 红移至 402 nm。红茶和绿茶 TP 的猝灭效果相同。结论:实验数据提示:TP 与 PPA 的反应确引起了 PPA 的分子构象发生改变,TP 与 PPA 的反应驱动力源自氢键结合、静电引力和疏水性反应。

**[关键词]** 茶多酚 - 淀粉酶 荧光 猝灭

**[中图分类号]** R783.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671—7651(2009)02—0156—05

**Interaction of Black Tea and Green Tea Polyphenols with Porcine Pancreatic - amylase by Fluorescence Quenching.** LIN Feng, YAO Jiang - wu, TAO Tao. Department of Prosthodontics, School of Stomatology Fujian Medical University, Fuzhou 350004

**[Abstract]** **Objective:** To study the binding of black tea and green tea polyphenols to porcine pancreatic - amylase (PPA) by fluorescence quenching of protein intrinsic fluorescence. **Methods:** From the fluorescence spectra obtained, the Stern - Volmer ( $K_{SV}$ ), the bimolecular quenching ( $k_q$ ), the apparent static ( $K_{app}$ ), the dynamic quenching ( $K_D$ ) and the static quenching constants ( $K_S$ ) were calculated. The quenching data was analyzed with  $t$ -test ( $\alpha = 0.05$ ). **Results:** The structure of PPA was revealed to significantly affect the binding/quenching process. From the characteristic feature of the Stern - Volmer plots, the dynamic and the static quenching were decided between tea polyphenols (TP) and PPA. There were significant differences between the dynamic quenching ( $K_D$ ) and the static quenching constants ( $K_S$ ) ( $P < 0.05$ ), and the value of the bimolecular quenching ( $k_q$ ) was larger than that of the bimolecular diffusion - controlled quenching constant ( $1 \times 10^{10} M^{-1} \cdot s^{-1}$ ), which indicated that the static quenching with the ground - state complex formation was the dominant reaction between TP (black tea and green tea) and PPA. In the titration with black tea and green tea solution, there was a small  $\lambda_{em}$  shift to higher wavelengths (a red shift from 384 to 404 nm for black tea and 384 to 402 nm for green tea) with increasing TP concentration. There were the same effect of fluorescence quenching with the black tea and green tea TP. **Conclusion:** The data suggested that the reaction between TP and PPA did change molecular conformation of PPA and that the hydrogen bonding, electrostatic and hydrophobic interaction were equally important driving forces for TP - PPA association.

**[Key words]** Tea polyphenols - amylase Fluorescence Quenching

茶是大众喜爱的饮料,西方人嗜好红茶,约占全球茶消费总量的 78%,亚洲人爱喝绿茶,约占全球

茶消费总量的 20%<sup>[1]</sup>。茶的有效成分为茶多酚(tea polyphenol, TP),占茶叶干重的 13% ~ 30%,是黄烷醇结构的低聚物所构成的混合物。茶多酚的生物作用包括抑制消化酶,降低食物的营养价值,具有收敛性(干燥、皱缩感),并影响味觉<sup>[2]</sup>。 - 淀粉酶是水

作者简介 林锋(1975~),男,福建人,主治医师,硕士,主要从事口腔色彩学研究。

\*通讯作者 姚江武, Dentyjw@126.com

解淀粉和糖原酶类的总称,因其能将淀粉水解,增进胃肠消化功能,而被广泛研究。人唾液 - 淀粉酶 (human salivary - amylases, HSA)在唾液蛋白质中占有很大的比重 (~30%),饮茶时,口腔分泌唾液蛋白质 (主要是富脯蛋白和富组蛋白)大量增加,其生理机制是其迅速与 TP发生高度亲合反应,以缓解 TP对于 HSA的抑制作用,达到保护消化酶,增进胃肠消化功能的目的<sup>[3]</sup>。然而,大量饮茶,使口腔分泌的唾液蛋白质不足以中和 TP,大量的 TP和 TP-蛋白质复合物则覆盖于口腔黏膜表面,产生干燥和皱缩感。HSA在失去保护后,与 TP发生分子水平上的反应的研究报道罕见。由于 HSA的来源较困难,而猪胰腺 - 淀粉酶 (porcine pancreatic - amylase, PPA)来源丰富,且与 HSA的蛋白质一、二、三级结构具有高度同源性,所以众多学者以 PPA替代 HSA作为蛋白质模型<sup>[4]</sup>。本研究采用红茶和绿茶 TP作为 PPA的荧光猝灭剂,以考察 TP猝灭 PPA的效果,以便在分子水平阐述 TP与 PPA的结合和反应的机制,为解释 TP对口腔收敛性感觉和猝灭 - 淀粉酶的生理意义奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器及试剂

1.1.1 仪器 荧光分光光度计 (VARIAN, CARY Eclipse, 美国)、VB-7型 pH值计 (美国丹佛)、AR-2140分析天平 (美国奥豪斯)、Millipore Direct-Q3超纯水器 (法国 Millipore公司)。

1.1.2 试剂 龙井绿茶 (大龙发工贸有限公司,浙江杭州)、立顿红茶 (联合利华食品有限公司,广州)、猪胰腺 - 淀粉酶 (绿茵生物试剂玻仪有限公司,厦门)、98%茶多酚 (泽郎医药科技有限公司,南京)、Folin-Ciocalteu试剂盒 (sigma)、超纯水。

### 1.2 实验方法

1.2.1 茶溶液的制备和茶多酚含量表征 在 20 环境下称取以上两种磨碎茶样各 1.5 g,分别在 225 mL超纯水中煮沸,维持沸水浴 45 min,每隔 10 min摇瓶 1次。静置待冷却后用 Whatman #1滤纸 (孔径 11 μm)过滤。超纯水洗涤残渣,滤液合并于 250 mL容量瓶中,加水定容至 250 mL。3种茶的多酚含量表征后 (方法见后),分别用超纯水分别稀释成不同浓度梯度的茶溶液 (0.080、0.159、0.266、0.319、0.398、0.531、0.797、1.275、1.594 mmol/L),作为荧光猝灭剂。采用福林法表征茶多酚含量。

1.2.2 PPA溶液的制备和活性测定 在 20 环境下,用分析天平准确称取 PPA粉末 0.432 g,溶解

于 100 mL的 Milli-Q超纯水中,再加超纯水稀释定容至 1000 mL。用 0.1 mol/L 盐酸或氢氧化钠溶液准确调节 pH值至 6.9。采用碘显示法测定酶的活性。

### 1.2.3 荧光猝灭

1.2.3.1 线性范围内的 PPA浓度 在 20 和 pH = 6.9的条件下,将 PPA溶液用去离子水稀释 4 ~ 200倍,形成不同浓度 (18.00、14.40、12.00、9.00、8.00、7.20、3.60、2.40、1.80、1.20、0.90、0.72、0.45、0.36 μmol/L)。记录激发波长 ( $\lambda_{ex}$ ) = 295 nm和发射波长 ( $\lambda_{em}$ ) = 300 ~ 550 nm波长范围内的荧光光谱,绘制浓度与其相应荧光强度的函数关系图,在线性范围内确定产生最大荧光强度的 PPA浓度。以此浓度作为 PPA荧光猝灭剂浓度。

1.2.3.2 茶溶液荧光效应 评估红茶和绿茶溶液是否具有荧光效应。方法是提取 3 mL不同浓度的绿茶和红茶溶液,以上述波长检测是否有荧光峰值出现。

1.2.3.3 PPA荧光猝灭 选取线性浓度范围内的 PPA溶液做荧光猝灭实验。在 20 温度下,吸取 PPA溶液 3 mL于测量池内,分别向其中滴加不同浓度的绿茶和红茶溶液 0.25 mL,40 s后以上述波长检测 PPA的相对荧光强度。每次测量重复 3次,计算其均数和标准差。以相对荧光强度为纵坐标,发射波长 ( $\lambda_{em}$ )为横坐标,绘制相对荧光强度/发射波长的函数关系图。

1.2.3.4 荧光猝灭原理 荧光猝灭过程通常可分为动态猝灭和静态猝灭。动态猝灭是猝灭剂和荧光物质间相互碰撞作用引起的。碰撞引起的荧光猝灭符合 Stern-Volmer方程<sup>[5]</sup>: (1)  $F_0/F = 1 + K_{SV}[Q]$  =  $1 + k_q \tau_0 [Q]$ 。静态猝灭是猝灭剂和荧光物质间相互作用,形成基态的猝灭剂-荧光团复合物的过程。同一种猝灭剂可以同时产生动态猝灭和静态猝灭,此时 Stern-Volmer图向上弯曲,凹面朝向 y轴,猝灭过程遵循改良的 Stern-Volmer方程<sup>[5]</sup>: (2)  $F_0/F = (1 + K_D [Q]) (1 + K_S [Q])$ ; (3)  $F_0/F = 1 + (K_D + K_S) [Q] + K_D K_S [Q]^2$ ; 令: (4)  $K_{app} = (K_D + K_S) + K_D K_S [Q]$ ; 则: (5)  $F_0/F = 1 + K_{app} [Q]$ 。

(1) ~ (5)式中,  $F_0$  与  $F$  分别是添加猝灭剂 (TP)前后荧光物质 (PPA)的荧光强度值,  $[Q]$  是猝灭剂的浓度,  $K_{SV}$  为 Stern-Volmer猝灭常数,  $k_q$  为双分子猝灭常数,  $\tau_0$  为不存在猝灭剂时荧光物质的平均寿命,  $K_S$  是静态猝灭常数,  $K_D$  是动态猝灭常数,  $K_{app}$  为表观猝灭常数。用  $K_{app}$  对  $[Q]$  作图,可以得到

截距为  $I = K_D + K_S$  和斜率为  $S = K_D K_S$  的一条直线, 则: (6)  $K_S^2 - K_S I + S = 0$ , 解此方程, 即可求出  $K_S$ , 进而求出  $K_D$ 。

1.3 统计学分析 应用 SAS 统计分析软件 8.0 (SAS Institute Inc, Cary, NC) 对不同种类的茶溶液所导致的 PPA 荧光猝灭程度的差异进行两两之间的比较 ( $t$  检验,  $\alpha = 0.05$ )。

2 结果

2.1 茶多酚含量和 PPA 的活性 由吸光度/茶多酚浓度的标准曲线 (图略) 得出两种茶叶所含茶多酚的重量百分比: 红茶 15.60%, 绿茶 14.25%。PPA 的活性为 2.696 U/mg

2.2 线性范围内的 PPA 浓度 由 PPA 浓度与相对荧光强度的函数关系图 (图略) 可见, PPA 浓度在其稀释倍数为 4~30 倍时荧光强度呈线性, 且在稀释 30 倍时的 PPA 浓度 ( $2.4 \times 10^{-6}$  mol/L) 具有最佳的荧光发射强度, 故本实验选取该浓度作为 PPA 荧光猝灭浓度。

2.3 PPA 荧光猝灭结果

2.3.1 茶溶液的荧光检测 在  $\lambda_{em} = 300 \sim 550$  nm 范围内未发现发射的荧光光谱。说明两种茶溶液在此荧光检测条件下不会对 PPA 的荧光光谱产生干扰效应。

2.3.2 茶多酚对 PPA 的荧光猝灭 图 1 最顶端为 PPA 的荧光曲线, 接下来的曲线为逐步增加 TP 浓度后 PPA 的荧光猝灭曲线。随着 TP 浓度的逐渐加大, PPA 的相对荧光强度呈逐渐减小趋势, 表明 PPA 内源性荧光不同程度的被茶多酚所猝灭。相同条件 (温度、浓度和 pH) 下, 无论是红茶 TP 还是绿茶 TP 对 PPA 的猝灭过程, 均造成荧光曲线峰值的波长位置发生红移, 两者的最大红移量分别为 20 nm (从 384~404 nm) 和 18 nm (从 384~402 nm)。表明该荧光猝灭条件下, PPA 的构象发生改变<sup>[5]</sup>。

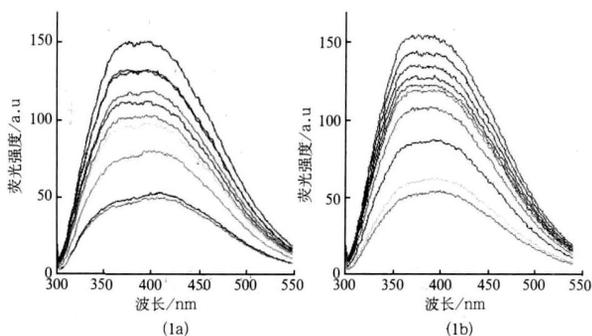


图 1 红茶 (A) 和绿茶 (B) 与 PPA 的荧光猝灭图

Fig. 1 The fluorescence quenching plots of PPA with the black tea (A) and green tea (B)

根据公式 (1), 以  $F_0/F$  对浓度  $[Q]$  作图, 得到 Stern - Volmer 图 (图 2), 当  $[Q]$  加大时, 曲线呈现背离 X - 轴。红茶和绿茶猝灭剂相关回归直线方程分别为:  $F_0/F = 0.862 + 1.535 [Q]$  和  $F_0/F = 0.930 + 1.078 [Q]$ 。由于直线的斜率为  $K_{sv}$ , 故红茶和绿茶 Stern - Volmer 猝灭常数  $K_{sv}$  分别为  $(1.452 \pm 0.087) \times 10^3$  mol/L 和  $(1.026 \pm 0.049) \times 10^3$  mol/L。由于已知生物大分子的荧光平均寿命  $\tau_0$  约为  $10^{-8}$  s, 进而计算出红茶和绿茶相应的  $k_q$  值分别为  $(1.452 \pm 0.087) \times 10^{11}$  mol/L · s<sup>-1</sup> 和  $1.026 \pm 0.049 \times 10^{11}$  · M<sup>-1</sup> · s<sup>-1</sup>。

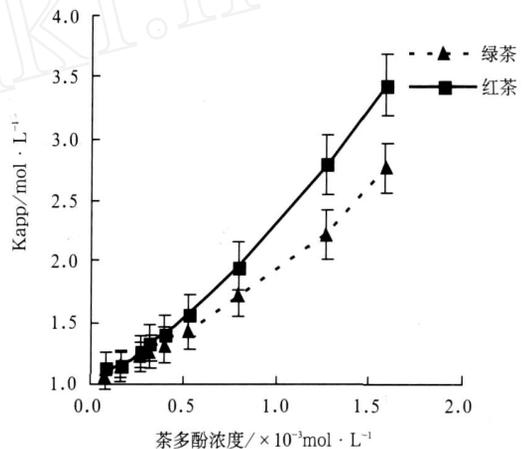


图 2 红茶和绿茶与 PPA 荧光猝灭的 Stern - Volmer 图

Fig. 2 The fluorescence quenching Stern - Volmer plot of PPA with the black tea and green tea

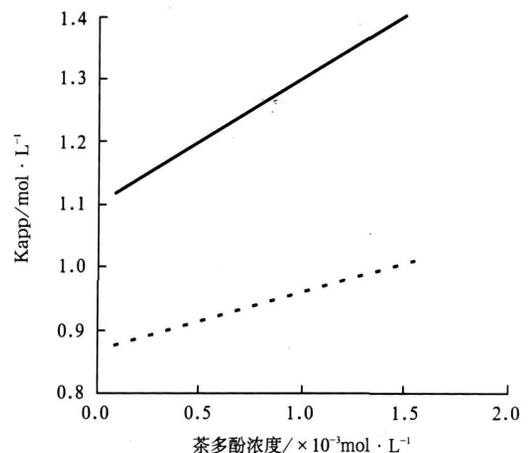


图 3 表观静态猝灭常数与茶多酚浓度的相关回归图

Fig. 3 The plot of correlation between  $K_{app}$  and  $[Q]$

随着  $[Q]$  加大, 两条近似的直线向上弯曲, 凹面朝向 y - 轴, 表明猝灭剂同时产生动态猝灭和静态猝灭<sup>[5]</sup>。猝灭过程遵循改良的 Stern - Volmer 方程, 用  $K_{app}$  对  $[Q]$  作图 (图 3), 得到红茶和绿茶猝灭剂相关回归直线方程分别为:  $K_{app} = 1.103 + 0.200 [Q]$  和  $K_{app} = 0.870 + 0.091 [Q]$ , 通过公式 (6), 将重复 3 次实验数据连续求解, 得到  $K_S$  和  $K_D$ 。由于  $k_q$  大于双

分子扩散限制性常数  $1 \times 10^{10} \text{ mol/L} \cdot \text{s}^{-1}$  一个数量级,以及 PPA 的特征荧光峰波长位置发生明显红移,这些都是 TP 和 PPA 发生反应并生成复合物的标志,表明该实验的反应体系是以形成基态复合物的静态猝灭为主,动态猝灭为辅的猝灭反应<sup>[5]</sup>,故将求解的大值赋予红茶和绿茶的  $K_S$ ,小值赋予红茶和绿茶的  $K_D$ 。

表 1 红茶和绿茶多酚猝灭 PPA 荧光的  $K_S$  和  $K_D$  的均值

Table 1 The mean value of  $K_S$  and  $K_D$  by fluorescence quenching PPA with the black tea and green tea TP  $10^{-3} \text{ mol/L}$ ,  $\bar{x} \pm s$

茶类型	$K_S$	$K_D$
红茶	0.843 $\pm$ 0.131	0.316 $\pm$ 0.138
绿茶	0.872 $\pm$ 0.091	0.066 $\pm$ 0.047

对红茶和绿茶的  $K_S$  和  $K_D$  均数进行两两比较 ( $t$  检验,表 1),结果表明红茶和绿茶的  $K_S$ 、 $K_D$  均数之间的差异不具有统计学意义;同品牌茶的  $K_S$  与  $K_D$  均数之间的差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

3.1 PPA 与 HSA 的比较 昆虫和哺乳类的  $\alpha$ -淀粉酶均由 3 个结构域组成:催化中心 A 域,3 个  $\alpha$ -折叠和 3 个  $\alpha$ -螺旋组成的 B 域和 C 端域。 $\text{Ca}^{2+}$  是维持  $\alpha$ -淀粉酶的球形蛋白质结构必需的,而  $\text{Cl}^-$  起激活酶的作用。A 域和 B 域中有 3 个非常重要的结合位点:活化结合位点、 $\text{Ca}^{2+}$  结合位点和  $\text{Cl}^-$  结合位点。PPA 有 5 个携带催化基团的右旋葡萄糖结合位点,位于结合中心 (-3) 与 (-2) 之间, HSA 则有 6 个右旋葡萄糖结合位点<sup>[6]</sup>。在 HSA 和 PPA 蛋白质序列中至少包含 6 个结合中心 (-4、-3、-2、-1、+1、+2)。PPA 与 HSA 的糖苷键裂隙均位于结合中心 (-1) 与 (+1) 之间<sup>[7]</sup>,但是,有实验证实 PPA 和 HSA 活性中心与作用物的结合方式有差异,原因是由于 HSA 与 PPA 的蛋白质一级结构和晶体结构不同所造成的。PPA 位于结合中心 (-3) 附近的氨基酸 163 是缬氨酸,而 HSA 则是丝氨酸<sup>[8]</sup>。

与蛋白质的荧光猝灭有关的残基是色氨酸 (tryptophan, Trp)、酪氨酸 (tyrosine, Tyr) 和苯丙氨酸 (phenylalanine, Phe)。Phe 残基不产生荧光,一般情况下被折叠于肽链之中,因而它没有与猝灭剂结合的位点,但 Phe 吸收光能后,处于激发状态,并将能量传递给 Tyr,同时, Tyr 也能够将能量以电子跃迁的形式传递给 Trp。因此,蛋白质的内源性荧光主要是由 Trp 产生的。PPA 的蛋白质序列中含 19 个 Trp, 19 个 Tyr 和 23 个 Phe, HSA 的蛋白质序列中含 18 个 Trp, 20 Tyr 和 28 个 Phe。这种蛋白质结构

的改变导致了极性的轻微改变<sup>[9]</sup>。尽管如此,由于 PPA 和 HSA 的 Trp、Tyr、Phe 的含量接近,用 PPA 替代 HSA 作为蛋白质模型,研究其内源性荧光猝灭还是非常理想的。由于 HSA 的来源较困难,而 PPA 来源丰富,且与 HSA 的蛋白质的一、二、三级结构具有高度同源性,所以众多学者以 PPA 替代 HSA 作为蛋白质模型<sup>[4]</sup>。

3.2 TP 含量的比较 茶的有效成分为 TP, TP 是茶叶中三十多种多酚类物质的总称,包括儿茶酚、黄酮类、花青素、茶单宁等四大类物质。而在 TP 总量中,儿茶酚约占 70%。儿茶酚 (catechins, C) 主要分为四类:表没食子儿茶酚没食子酸酯 (epigallocatechin-3-gallate, EGCG)、表没食子儿茶酸酯 (epigallocatechin, EGC)、表儿茶酚没食子酸酯 (epicatechin-3-gallate, ECG)、表儿茶酚 (epicatechin, EC)。Lunder<sup>[10]</sup> 检出红茶多酚重量百分比为 21.37%,其中儿茶酚 EGCG、EGC、ECG、EC 分别为 10.55%、2.35%、2.75%、0.63%。Rawel<sup>[11]</sup> 检出绿茶多酚重量百分比为 17.30%,其中儿茶酚 EGCG、EGC、ECG、EC 分别为 6.80%、2.20%、1.60%、0.72%。本实验检出红茶和绿茶多酚的重量百分比分别为 15.60% 和 14.25%,与上述两位作者的结果相比,得出的 TP 重量百分比比较低,究其原因可能与茶的品种和提纯方法不同有关。

3.3 TP 猝灭 PPA 内源性荧光的机制 本实验证实,红茶和绿茶的 TP 导致了 PPA 蛋白质发生了荧光猝灭,其过程为动态猝灭和静态猝灭。红茶引起的动态猝灭反应强度 ( $K_D$ ) 大于绿茶,但静态猝灭反应强度 ( $K_S$ ) 一致。无论红茶还是绿茶 TP 引起的静态猝灭反应强度都大于动态。由此可见 TP 作为猝灭剂引发 PPA 蛋白质内源性荧光猝灭的机制主要是形成了基态复合物,而在高浓度的猝灭剂作用下,同时也伴随有动态猝灭过程。

TP-PPA 结合并形成基态复合物的驱动力来源于:1) PPA 蛋白质为多畴结构特性,结构域形成的小空穴和裂隙非常适合匹配小分子的儿茶酚<sup>[12]</sup>; 2) X 线晶体学数据显示,TP 的羟基能与氨基酸活性中心的裂隙结合<sup>[13]</sup>; 3) TP 属于极性分子,结构中含有大量的自由羟基 (OH) 和羧基 (COOH),能够通过氢键和静电结合与 PPA 发生特异性和强烈的反应; 4) EGCG、EGC、ECG、EC 所具有的没食子酸芳香环能够为分别位于 (-3)/(-2)、(-1)/(+1)、(-1)/(+2) 的 Trp59、Tyr62、Tyr151 残基提供堆积反应的条件<sup>[14,15]</sup>; 5) PPA 蛋白质中 Trp 和 Tyr 残基的

最大值与其所处微生态环境的极性有关,最大发射波长红移,表明 Trp 和 Tyr 残基所处微生态环境的极性增加,疏水性减小,提示淀粉酶内部的疏水腔结构有所瓦解,肽链的伸展程度有所增加,从而推断 PPA 的构象发生了一定程度的变化,隐藏在  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠等蛋白质二级结构中的 Trp、Tyr 和 Phe 被暴露更多,从而加剧了猝灭过程<sup>[5]</sup>。6) 静态猝灭反应是在 TP 低浓度下发生的,此时, Trp 和 Tyr 残基所处环境的极性和疏水性基本不变,在本实验设计的 pH 值与 PPA 的等电点 PI(为等电点) = 6.9 相同,疏水性反应参与了静态荧光猝灭,但不是主要反应。当 TP 浓度达到一定程度时,残基所处微生态环境的极性改变,静态荧光猝灭过渡到动态荧光猝灭,此时的疏水性反应便成为了 TP 与 PPA 之间相互作用的主要反应<sup>[16]</sup>。

从本实验结果推断,红茶和绿茶的 TP 同样也能导致 HSA 发生了荧光猝灭,产生基态 TP-HSA 复合物。特别是在口腔中的 TP 浓度特别高的情况下,复合物覆盖于口腔黏膜表面,造成强烈的干燥和皱缩感;覆盖于牙齿表面形成色素生物膜,影响美观。TP-HSA 复合物大量生成使口腔唾液的润滑性降低。TP 抑制 HSA 的活性生理和病理意义有待于今后加以研究。

#### 参考文献

- [1] Khan N, Mukhtar H. Tea polyphenols for health promotion [J]. Life Sci, 2007, 81(7): 519-533
- [2] Prinz JF, Lucas FW. Saliva tannin interactions [J]. J Oral Rehabil, 2000, 27(11): 991-994
- [3] He Q, Lv Y, Yao K. Effects of tea polyphenols on the activities of  $\alpha$ -amylase, pepsin, trypsin and lipase [J]. Food Chemistry, 2007, 101(3): 1178-1182
- [4] Canuel C, Badre S, Groenzin H, et al. Diffusional fluorescence quenching of aromatic hydrocarbons [J]. Appl Spectrosc, 2003, 57(5): 538-544
- [5] Lakowicz JR. Principles of fluorescence spectroscopy [M]. 3rd ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006, 284

- [6] Yoon SH, Robyt JF. Study of the inhibition of four  $\alpha$ -amylases by acarbose and its 4 M -  $\alpha$ -maltohexaosyl and 4 M -  $\alpha$ -maltododecaosyl analogues [J]. Carbohydr Res, 2003, 338(19): 1969-1980
- [7] Brayer GD, Sidhu G, Maunus R, et al. Subsite mapping of the human pancreatic  $\alpha$ -amylase active site through structural, kinetic, and mutagenesis techniques [J]. Biochemistry, 2000, 39(16): 4778-4791
- [8] Gilles C, Astier JP, Marchis-Mouren G, et al. Crystal structure of pig pancreatic  $\alpha$ -amylase isoenzyme II, in complex with the carbohydrate inhibitor acarbose [J]. Eur J Biochem, 1996, 238(2): 561-569
- [9] Kandra L, Gyenat G. Examination of the active sites of human salivary  $\alpha$ -amylase (HSA) [J]. Carbohydr Res, 2000, 329(3): 579-585
- [10] Lunder TV. Tea [M]. 1rd ed. Nestec Ltd. Technical Assistance, Nestle Research Centre, Vevey, 1988, 42
- [11] Rawel HM, Frey SK, Meidner K, et al. Determining the binding affinities of phenolic compounds to proteins by quenching of the intrinsic tryptophan fluorescence [J]. Mol Nutr Food Res, 2006, 50(8): 705-713
- [12] Soares S, Mateus N, De Freitas V. Interaction of different polyphenols with bovine serum albumin (BSA) and human salivary  $\alpha$ -amylase (HSA) by fluorescence quenching [J]. J Agric Food Chem, 2007, 55(16): 6726-6735
- [13] Moynihan P, Lingstrom P, Rugg-Gunn AJ, et al. The role of dietary control, in: O. Fejerskov, E. Kidd (Eds.), Dental Caries: The Disease and its Clinical Management [M]. Blackwell Munksgaard, Oxford, 2003, 222-244
- [14] Ramasubbu N, Ragunath C, Mishra PJ, et al. Human salivary  $\alpha$ -amylase Trp58 situated at subsite -2 is critical for enzyme activity [J]. Eur J Biochem, 2004, 271(12): 2517-2529
- [15] Mishra PJ, Ragunath C, Ramasubbu N. The mechanism of salivary amylase hydrolysis: role of residues at subsite S2' [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 292(2): 468-473
- [16] Chitpan M, Wang X, Ho C, et al. Monitoring the binding processes of black tea theanubigin to the bovine serum albumin surface using quartz crystal microbalance with dissipation monitoring [J]. J Agric Food Chem, 2007, 55(25): 10110-10116

[收稿日期: 2009-01-17]

(本文编辑 李四群)