

六大茶类抑制 α -淀粉酶和胰蛋白酶的效果比较

周阳¹, 袁长彬², 龚志华^{1,3*}, 袁冬寅¹, 林玲¹, 彭影琦¹, 肖文军^{1,3}

(1.湖南农业大学茶学教育部重点实验室, 湖南 长沙 410128; 2.湖南省郴州市农业委员会, 湖南 郴州 423000;
3.国家植物功能成分利用工程技术研究中心, 湖南 长沙 410128)

摘要:以碧香早的一芽二叶为原料, 分别加工成绿茶、黄茶、白茶、乌龙茶、黑茶、红茶六大茶类, 以蒸青固样制成固定样(对照), 通过单因素试验筛选 α -淀粉酶和胰蛋白酶的最优反应体系, 在最优酶促反应下比较各大茶类对 α -淀粉酶和胰蛋白酶的抑制效果。结果表明: 通过单因素试验筛选 α -淀粉酶的最适反应浓度为 18 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 最适反应时间为 20 min, 底物、酶、抑制剂的最适添加顺序为先将 α -淀粉酶与茶汤置于试管中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴锅中预热 5 min, 再加入可溶性淀粉反应; 胰蛋白酶的最适反应浓度为 0.252 mg/mL , 最适反应时间为 15 min, 底物、酶、抑制剂的最适添加顺序为先将胰蛋白酶与茶汤置于试管中, 在 40 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴锅中预热 5 min, 再加入干酪素反应; 不同茶类在相同茶汤质量浓度下的抑制效果不同, 且在一定范围内均随茶汤质量浓度的增加, 对 α -淀粉酶、胰蛋白酶的抑制效果增强; 在最优酶促反应条件下, 对照、绿茶、黄茶、白茶、乌龙茶、黑茶、红茶对 α -淀粉酶的抑制率依次为 74.1%、74.5%、71.4%、70.4%、70.3%、64.1%、57.3%, 其中, 绿茶对 α -淀粉酶的抑制效果最好, 固定样与绿茶、白茶与乌龙茶之间差异不明显, 白茶与黄茶、黄茶与乌龙茶之间差异显著($P < 0.05$), 其他茶类之间差异极显著($P < 0.01$); 对照、绿茶、黄茶、白茶、乌龙茶、黑茶、红茶对胰蛋白酶的抑制率分别为 86.12%、85.35%、73.11%、68.76%、82.41%、64.76%、56.13%, 其中, 固定样与绿茶抑制效果较好, 两处理的差异不明显, 其他茶类之间差异达极显著水平($P < 0.01$)。

关键词: 茶; α -淀粉酶; 胰蛋白酶; 抑制率

中图分类号: S571.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2018)01-0051-05

Comparison of inhibitory effects of six kinds of tea on α -amylase and trypsin

ZHOU Yang¹, YUAN Changbin², GONG Zhihua^{1,3*}, YUAN Donyin¹,

LIN Ling¹, PENG Yingqi¹, XIAO Wenjun^{1,3}

(1.Key Laboratory of Tea Science of Ministry of Education, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China; Chenzhou Agriculture Committee of Hunan, Chenzhou, Hunan 423000, China; 3.National Research Center of Engineering Technology for Utilization of Botanical Functional Ingredients, Changsha, Hunan 410128, China)

Abstract: A bud with two leaves of Bixiangzao tea variety in spring as raw material and was separately processed into six categories of tea(green tea, yellow tea, white tea, oolong, brick tea and black tea), the samples fixed by steaming pattern as control to study the inhibitory effects of different kinds of tea on α -amylase and trypsin under the optimal enzymatic reaction conditions (the optimal enzymatic reaction conditions for α -amylase were that 18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ α -amylase and tea infusion were put into test tube and preheat in 37 $^{\circ}\text{C}$ water bath for 5 min, and then adding soluble starch to react for 20 min, the optimal enzymatic reaction conditions for trypsin were that 0.252 mg/mL trypsin and tea infusion were put into test tube and preheat in 40 $^{\circ}\text{C}$ water bath for 5 min, and then adding casein to react for 15 min). The results showed that with the same concentration of tea infusion, the inhibitory effects of different tea on α -amylase and trypsin

were quite different but were all raised with the increase of the tea mass concentration within a certain range. Under the optimal reaction conditions, the inhibitory rate on α -amylase of control group, green tea, yellow tea, white tea, oolong, brick tea and black tea were 74.1%, 74.5%, 71.4%, 70.4%, 70.3%, 64.1% and 57.3% respectively, showing that the green tea's inhibitory effect on α -amylase was the best, and there were no significant differences between control group and green tea, white tea and oolong, but remarkable differences between white tea and yellow tea, yellow tea and oolong ($P < 0.05$) and significant differences among the other kinds of tea ($P < 0.01$). While for trypsin, the inhibitory rates of control group, green tea, yellow tea, white tea, oolong, brick tea and black tea were 86.12%, 85.35%, 73.11%, 68.76%, 82.41%, 64.76% and 56.13% respectively, among which the control group and green tea showed fairly good inhibitory effects and there were significant differences ($P < 0.01$) among the other categories of tea.

Keywords: tea; α -amylase; trypsin; inhibition rate

茶多酚具有降血糖、血脂的作用^[1-3]。 α -淀粉酶是淀粉内切酶，胰蛋白酶是一种蛋白质水解酶，两者均与机体糖脂代谢密切相关^[4]。茶汤中的活性成分可通过抑制 α -淀粉酶和胰蛋白酶的活性来降低体内糖脂类物质的转化、积累及含量水平^[5]。由于茶叶原料、品种、嫩度、加工工艺、生产季节、肥水管理技术等不同，导致加工成的茶产品的品质成分及含量存在差异^[6-9]。本研究中，采用同一原料加工成六大茶类，研究其对 α -淀粉酶和胰蛋白酶的抑制效果，现将结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

2016年5月采用湖南农业大学长安实践教学基地茶园碧香的早一芽二叶为原料，参照文献^[10-11]的方法将原料加工成绿茶、黄茶、黑茶、乌龙茶、白茶、红茶6大茶类；用蒸青固样法^[12]将原料制成固定样，以固定样为对照。

主要试剂： α -淀粉酶(4 000 U/g)，上海瑞永生物科技有限公司产品；胰蛋白酶(批号为20160216，50 000 U/g)，国药集团化学试剂有限公司产品；3,5-二硝基水杨酸、四水酒石酸钾钠、三氯乙酸(TCA)、福林酚试剂、碳酸钠、可溶性淀粉、干酪素等，均为分析纯。

主要仪器：精密电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司产品)；pH S22C型pH计(上海雷磁仪器厂产品)；HH数显恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司产品)；UV-2550型紫外分光光度计(日本岛津公司产品)；SY-2000型旋转蒸发器(上海荣亚

生化仪器厂产品)。

1.2 方法

1.2.1 茶汤制备

参照 GB/T8312—2013 的方法，分别准确称各类茶的粉碎样 3 g 于三角瓶中，加 450 mL 沸水，在沸水浴中浸提 45 min，每隔 10 min 摇 1 次，过滤，洗涤残渣，合并滤液，加水定容至 500 mL，摇匀，于旋转蒸发器中浓缩至 50 mL，冷藏，备用。

1.2.2 α -淀粉酶酶促反应条件优化

1.2.2.1 酶质量浓度筛选

将 0.1 mL 质量浓度分别为 6、10、14、18、22、26、30 $\mu\text{g/mL}$ 的 α -淀粉酶溶液移入试管中，水浴调温至 37 $^{\circ}\text{C}$ ，加入已预热到 37 $^{\circ}\text{C}$ 的底物 1% 淀粉溶液 0.2 mL，酶促反应 30 min，加入 0.5 mL DNS 溶液终止反应，测吸光值，选择最佳酶质量浓度。

1.2.2.2 酶促反应时间筛选

取 5 支试管，分别加入 1.2.2.1 中所得最佳质量浓度的 α -淀粉酶溶液 0.1 mL，1% 淀粉 0.2 mL，测定不同反应时间(5、10、15、20、25 min) 下还原性糖生成量的吸光值，确定 α -淀粉酶酶促最适反应时间。

1.2.2.3 底物、酶、抑制剂添加顺序筛选

采用 1.2.2.2 中所确定的最适反应时间，将 1% 可溶性淀粉 0.2 mL 与 1.2.2.1 中所确定的 α -淀粉酶 0.1 mL、2 mg/mL 茶汤 0.1 mL 按如下 3 种顺序添加：① 3 种物质先各自在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴锅中预热 5 min，再一起加入试管中反应；② 先将可溶性淀粉与茶汤置于试管中，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴锅中预热 5 min，再加入 α -淀粉酶反应；③ 先将 α -淀粉酶与茶汤置于试

管中,在 37 °C 的水浴锅中预热 5 min,再加入可溶性淀粉反应。比较 3 种方式的抑制率,选出最佳的添加顺序。

1.2.2.4 最优酶促反应条件下不同茶类对 α -淀粉酶的抑制效果比较

采用 1.2.2.3 中所确定的添加顺序,在试管中加入 1.2.2.1 中所确定的 α -淀粉酶 0.1 mL 与质量浓度为 5、10、15、20、25、30、35、40 mg/mL 的茶汤 0.1 mL,摇匀,在 37 °C 水浴锅中预热 5 min,再加入底物 1% 可溶性淀粉 0.2 mL,反应 1.2.2.2 中所确定的时间后立即加 DNS 溶液 0.5 mL,沸水浴 5 min,冷却,稀释。背景对照为底物溶液与抑制剂,空白对照为已煮沸的酶液,测吸光度值,反应体系如表 1。活性抑制率的计算公式为:

$$\text{抑制率} = (1 - A/A') \times 100\% \quad (1)$$

$$A = A_3 - A_4, A' = A_1 - A_2 \quad (2)$$

式中, A_1 、 A_2 、 A_3 、 A_4 分别为 540 nm 处的无抑制组、空白组、加抑制组和背景对照组的吸光度值; A 值均为 660 nm 处的吸光度值。

表1 茶汤抑制 α -淀粉酶活性试验体系中各物质的体积

组别	淀粉	α -淀粉酶	茶汤	DNS	水
无抑制剂组	0.2	0.1	0.0	0.5	9.2
空白组	0.2	0.0	0.0	0.5	9.3
加抑制剂组	0.2	0.1	0.1	0.5	9.1
背景对照组	0.2	0.0	0.1	0.5	9.2

1.2.3 胰蛋白酶酶促反应条件筛选

1.2.3.1 酶最适质量浓度的筛选

取质量浓度为 0.042、0.084、0.126、0.168、0.21、0.252、0.294 mg/mL 的胰蛋白酶溶液 0.25 mL,分别置于 7 支试管中,于 40 °C 水浴锅中,加入已预热至相同温度的底物 1% 干酪素 0.4 mL,混匀,于 40 °C 水浴锅中反应 10 min 后,立即加入 10% TCA 溶液 2 mL,终止反应;取出试管离心,然后取 1 mL 上清液,分别移入 7 支试管中,加入 0.4 mol/L 碳酸钠溶液 5 mL 和 1:3 稀释的福林酚试剂 1 mL,摇匀,水浴锅 40 °C 中保温 20 min,冷却,660 nm 比色,测定吸光度值,选择最适酶质量浓度。

1.2.3.2 酶促最适反应时间的筛选

取 6 支试管,分别加入 1.2.3.1 所确定的质量浓度的胰蛋白酶溶液 0.25 mL,测定不同反应时间(5、10、15、20、25、30 min)内 1% 干酪素 0.4 mL 与胰蛋白酶反应后的吸光度值,筛选最适酶促反应时间。

1.2.3.3 底物、酶、抑制剂添加顺序筛选

采用 1.2.3.2 所确定的反应时间,将 1% 干酪素 0.4 mL、1.2.3.1 中所确定的胰蛋白酶 0.25 mL、2 mg/mL 茶汤 0.25 mL 按如下 3 种顺序添加:① 3 种物质先于 40 °C 的水浴锅中预热 5 min,再一起加入试管中反应;② 将干酪素与茶汤置于试管中,在 40 °C 的水浴锅中预热 5 min,再加入胰蛋白酶反应;③ 将胰蛋白酶与茶汤置于试管中,在 40 °C 的水浴锅中预热 5 min,再加入干酪素反应。比较 3 种方式的抑制率,选择最佳添加顺序。

1.2.3.4 最优酶促反应条件下的不同茶类对胰蛋白酶的抑制效果比较

采用 1.2.3.3 所确定的添加顺序,在试管中加入 1.2.3.1 中选的胰蛋白酶 0.25 mL 与质量浓度为 10、12、14、16、18、20、22 mg/mL 茶汤 0.25 mL,混匀,40 °C 水浴锅中预热 5 min,再加入底物 1% 干酪素 0.4 mL,反应 1.2.3.2 所确定的时间,立即加入 10% TCA 溶液 2 mL,终止反应;离心,取上清液,加 0.4 mol/L 碳酸钠 5 mL 和 1:3 稀释福林酚试剂 1 mL,40 °C 水浴锅保温 20 min,冷却,测吸光度值。反应体系如表 2。背景对照为底物溶液与抑制剂,空白组为失活的酶液。抑制率的计算方法同 1.2.2.4。

表2 茶汤抑制胰蛋白酶活性试验体系中各物质的体积

组别	酪蛋白	胰蛋白酶	茶汤	TCA	水
无抑制剂组	0.4	0.25	0.00	2	4.35
空白组	0.4	0.00	0.00	2	4.60
加抑制剂组	0.4	0.25	0.25	2	4.10
背景对照组	0.4	0.00	0.25	2	4.35

1.2.4 茶多酚含量测定

参照 GB/T8313—2008 中的方法测定茶多酚含量。

2 结果与分析

2.1 最适酶反应条件的筛选结果

通过单因素试验筛选, α -淀粉酶的最适反应浓度为 18 $\mu\text{g/mL}$, 最适反应时间为 20 min, 底物、酶、抑制剂的最适添加顺序为先将 α -淀粉酶与茶汤置于试管中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴锅中预热 5 min, 再加入可溶性淀粉反应, 胰蛋白酶的最适反应浓度为 0.252 mg/mL, 最适反应时间为 15 min, 底物、酶、抑制剂的最适添加顺序为先将胰蛋白酶与茶汤置于试管中, 在 40 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴锅中预热 5 min, 再加入干酪素反应。

2.2 六大茶类对 α -淀粉酶的抑制效果比较

在最适 α -淀粉酶反应条件下, 不同茶类的不同

质量浓度的茶汤对 α -淀粉酶均有一定的抑制效果。在一定范围内随茶汤浓度增加而抑制效果增强; 不同茶类在相同茶汤质量浓度下对 α -淀粉酶的抑制效果(表 3)不同。固定样的抑制效果最好, 其次为绿茶, 红茶的抑制率最低; 在茶汤浓度为 35 mg/mL 时, 各大茶类对胰蛋白酶的抑制率达最大, 因此, 选择茶汤浓度为 35 mg/mL 时各大茶类的抑制率作差异显著性分析。结果表明, 固定样与绿茶之间、白茶与乌龙茶之间差异不明显, 白茶与黄茶之间、黄茶与乌龙茶之间差异显著($P < 0.05$), 其他茶类之间差异极显著($P < 0.01$)。不同茶类对 α -淀粉酶的抑制效果为不发酵茶(绿茶)最好, 其次为半发酵茶(乌龙茶), 全发酵茶(红茶)相对较差。

表3 不同浓度下各茶类对 α -淀粉酶的抑制率

茶类	抑制率/%						
	5 mg/mL	10 mg/mL	15 mg/mL	20 mg/mL	25 mg/mL	30 mg/mL	35 mg/mL
固定样	27.42	40.15	54.52	61.25	72.35	73.73	74.14aA
绿茶	25.16	36.43	47.31	59.73	69.46	72.92	74.51aA
黄茶	11.84	19.34	35.71	52.12	65.43	69.13	71.45bB
白茶	22.24	32.34	47.72	61.52	67.23	70.71	70.43cB
乌龙茶	15.32	29.46	43.34	54.24	63.71	67.61	70.32cB
黑茶	8.43	17.14	36.32	50.71	57.82	62.35	64.17dC
红茶	6.73	22.92	38.53	46.53	53.94	55.56	57.32eD

同列不同大、小写字母表示差异达 0.01、0.05 水平。

2.3 六大茶类对胰蛋白酶的抑制效果比较

不同茶类的不同质量浓度茶汤对胰蛋白酶具有较为明显的抑制作用。在一定质量浓度范围内, 随茶汤质量浓度的增加而抑制效果增强; 不同茶类在相同茶汤质量浓度下对胰蛋白酶的抑制效果(表 4)不同。在茶汤浓度为 35 mg/mL 时, 各大茶类对

胰蛋白酶的抑制率达最大, 因此, 选择茶汤浓度为 35 mg/mL 时各大茶类的抑制率作差异显著性分析。结果表明, 固定样与绿茶的抑制效果差异不明显, 其他茶类间的抑制效果差异极显著($P < 0.01$)。其抑制效果为不发酵茶(绿茶)最好, 其次为半发酵茶(乌龙茶), 全发酵茶(红茶)相对较差。

表4 不同浓度下各茶类对胰蛋白酶的抑制率

茶类	抑制率/%						
	5 mg/mL	10 mg/mL	15 mg/mL	20 mg/mL	25 mg/mL	30 mg/mL	35 mg/mL
固定样	54.23	61.03	70.22	78.21	83.39	85.25	86.12aA
绿茶	48.10	55.40	62.60	73.75	79.91	84.20	85.35aA
乌龙茶	42.84	50.84	59.74	66.35	74.52	79.32	82.41bB
黄茶	30.73	38.28	47.18	56.27	65.73	70.18	73.11cC
白茶	29.48	37.86	46.23	54.79	61.80	66.47	68.76dD
黑茶	35.62	44.87	52.50	56.75	61.38	63.37	64.76eE
红茶	19.33	26.67	36.75	44.31	49.46	53.96	56.13fF

同列不同大、小写字母表示差异达 0.01、0.05 水平。

2.4 茶多酚含量的检测结果

各大茶类中茶多酚含量的检测结果表明, 固定样、绿茶、黄茶、黑茶、乌龙茶、白茶和红茶的茶多酚含量分别为 28.35%、26.23%、26.09%、24.92%、23.15%、22.95%和 10.20%。

3 结论与讨论

本研究结果表明, 相同原料不同加工工艺的各大茶类中多酚类物质的含量不同。六大茶类对 α -淀粉酶和胰蛋白酶均有抑制效果, 效果最好的为不发酵茶(绿茶), 其次为半发酵茶(乌龙茶), 全发酵茶(红茶)的效果相对较差。六大茶类对 α -淀粉酶和胰蛋白酶的抑制效果趋势与其茶多酚含量水平趋势基本一致, 表明茶多酚可能是各茶样抑制 α -淀粉酶和胰蛋白酶的主要功能物质, 茶样中的茶多酚含量越高, 对这 2 种酶的抑制效果越强, 其机理需进一步研究。

参考文献:

- [1] 马森, 陈培珍, 游玉琼, 等. 武夷岩茶降血糖作用的研究[J]. 南平师专学报, 2007, 26(4): 24-26. DOI: 10.3969/j.issn.1674-2109.2007.04.007.
- [2] 吴朝比. 黑茶降血脂功效评价及其对模型大鼠蛋白质差异表达的影响[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2012.
- [3] 刘月冉, 耿越. 植物多糖降血糖作用机制研究[J]. 食品与药品, 2012, 14(1): 64-67.
- [4] 张冬英, 邵宛芳, 刘仲华, 等. 普洱茶功能成分单体降糖降脂作用研究[J]. 茶叶科学, 2009, 29(1): 41-46.
- [5] 秦昱, 邵元元, 熊硕, 等. 没食子酸对猪胰 α -淀粉酶和蛋白酶的抑制作用[J]. 食品科学, 2015, 36(3): 41-45. DOI: 10.7506/spkx1002-6630-201503008.
- [6] 薛晨. 原料级别和贮藏时间对普洱茶品质及其生物活性影响的研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2013.
- [7] 方世辉, 张秀云, 夏涛, 等. 茶树品种、加工工艺、季节对乌龙茶品质影响的研究[J]. 茶叶科学, 2002, 22(2): 135-139. DOI: 10.3969/j.issn.1000-369X.2002.02.009.
- [8] 金珊, 余有本, 张秀云, 等. 设施栽培对绿茶品质的影响[J]. 中国农学通报, 2009, 25(15): 261-267.
- [9] 杨伟丽, 肖文军, 邓克尼. 加工工艺对不同茶类主要生化成分的影响[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2001(5): 384-386.
- [10] 施兆鹏. 茶叶加工学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2016.
- [11] 夏涛. 制茶学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2014.
- [12] 龚志华, 肖文军, 蔡利娅, 等. 茶叶固样方法研究[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2006, 32(1): 45-48. DOI: 10.3321/j.issn: 1007-1032.2006.01.012.

责任编辑: 尹小红
英文编辑: 梁和