

# 柑橘黄酮对胰蛋白酶活性的抑制及作用机制初探

李继伟\*, 柯 奥, 李炜玮, 邱士文, 颜 靖

武汉设计工程学院食品与生物科技学院, 武汉 430205

**摘要:**研究柑橘黄酮对胰蛋白酶催化活性、酶促反应动力学参数的影响,并通过荧光光谱法研究柑橘黄酮与胰蛋白酶的结合机制。结果表明,柑橘黄酮对胰蛋白酶具有明显的抑制作用,且呈现浓度效应,37 °C时,0.66 mg/mL的柑橘黄酮对胰蛋白酶的抑制率为29.9%,柑橘黄酮对胰蛋白酶的抑制属于竞争性抑制和非竞争性抑制混合抑制类型。荧光光谱实验结果表明,柑橘黄酮(柚皮苷)使胰蛋白酶的内在荧光发生猝灭,猝灭类型为静态猝灭,293 K下,二者的结合常数 $K_a$ 为 $1.1 \times 10^6$  L/mol,结合位点数 $n$ 为1.34,热力学参数显示两者结合的作用力主要为氢键和范德华力。

**关键词:**柑橘黄酮;胰蛋白酶;酶学性质;荧光光谱

中图分类号:TS209;R932

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2021)10-1735-06

DOI:10.16333/j.1001-6880.2021.10.014

## Inhibitory effect of citrus flavonoids on trypsin activity and preliminary study on its mechanism

LI Ji-wei\*, KE Ao, LI Wei-wei, QIU Shi-wen, YAN Jing

College of Food & Biological Science and Technology, Wuhan Institute of Design and Sciences, Wuhan 430205, China

**Abstract:** The effects of citrus flavonoids on the catalytic activity and kinetic parameters of trypsin were studied. The results showed that citrus flavonoids had obvious inhibitory effect on trypsin, and the inhibition showed concentration effect. At 37 °C, the inhibitory rate of 0.66 mg/mL citrus flavonoids against trypsin was 29.9%. The inhibition belonged to the mixed inhibition type of competitive and non-competitive inhibition. The fluorescence spectra showed that citrus flavone (naringin) quenched the endogenous fluorescence of trypsin in a static quenching mode. At room temperature (293 K), the binding constant  $K_a$  was  $1.1 \times 10^6$  L/mol, and the number of binding sites  $n$  was 1.34. The thermodynamic parameters showed that hydrogen bond and van der Waals force played a dominant role in the interaction between trypsin and citrus flavonoids.

**Key words:** citrus flavonoids; trypsin; enzymatic properties; fluorescence spectrum

柑橘皮渣是柑橘加工的主要副产物,约占全果的30%~50%<sup>[1]</sup>,常被用来制成饲料或直接丢弃。皮渣中富含膳食纤维、黄酮类化合物等功能成分,对其进行开发利用有利于提高企业效益和保护环境<sup>[2,3]</sup>。

胰蛋白酶是一种人和动物体内重要的消化酶,能激活其他消化酶原,在新陈代谢过程中发挥着重要的作用<sup>[4]</sup>。同时,多种疾病(胰腺炎、肺气肿、脑水肿、癌症等)的发生均与胰蛋白酶的过量分泌有关,临床上

常使用胰蛋白酶抑制剂类药物来进行治疗<sup>[5-7]</sup>。

研究表明,一些植物多酚类化合物对胰蛋白酶表现出一定的抑制作用,如紫甘薯花色苷对胰蛋白酶的催化活性表现出明显的抑制作用,使胰蛋白酶内源荧光发生静态猝灭,且二者之间通过氢键和范德华力相互作用<sup>[8]</sup>;槲皮素、芦丁、橙皮素、芸香叶苷、漆黄素等均具有不同程度的胰蛋白酶抑制作用<sup>[4,9]</sup>;雪菊中一种黄酮类化合物可以抑制胰蛋白酶的活性,减轻小鼠酒精性急性胰腺炎的损伤<sup>[10]</sup>。柑橘黄酮提取物作为常见的保健品功能成分,其对胰蛋白酶活性的影响尚不清楚,本文以Na-苯甲酰-DL-精氨酸-对硝基酰胺盐酸盐(*N*- $\alpha$ -benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride, BAPNA)为底物,研究了柑橘黄酮对胰蛋白酶活性的影响及其抑制类

收稿日期:2021-03-12 接受日期:2021-07-07

基金项目:国家自然科学基金面上项目(31871530);湖北省教育厅科学研究项目(B2017368);国家级大学生创新创业项目(201914035001)

\* 通信作者 E-mail:lijwei1205@163.com

型,并通过荧光光谱法研究了柑橘黄酮与胰蛋白酶的作用机制,以期为柑橘黄酮特膳食品、保健食品的开发利用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

柑橘黄酮(黄酮含量 $\geq 60\%$ ),西安森冉生物工程有限公司;牛胰蛋白酶( $> 180$  U/mg),上海金穗生物科技有限公司;柚皮苷( $\geq 95\%$ )和 Na-苯甲酰-DL-精氨酸-对硝基酰胺盐酸盐(BAPNA,  $\geq 98\%$ , HPLC),上海源叶生物科技有限公司。对硝基苯胺等其他试剂均为国产分析纯。

RF-6000 荧光分光光度计,日本岛津公司;EL104 型分析天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;HH-S2 型恒温水浴锅,上海晖创化学仪器有限公司;722 型分光光度计,上海精密科学仪器有限公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 胰蛋白酶酶活的测定方法

##### 1.2.1.1 最佳吸收波长的选择

为了减少反应体系背景(黄酮)对酶促反应产物吸光值测定的干扰,分别对酶促反应体系中的反应产物( $5 \mu\text{g/mL}$  对硝基苯胺)和背景( $0.66 \text{ mg/mL}$  的黄酮和  $0.5 \text{ mg/mL}$  的 BAPNA 底物)进行波长扫描,并通过产物和背景吸光度的比值来确定最适的产物测定波长。

##### 1.2.1.2 胰蛋白酶活力的测定

对硝基苯胺(产物)标曲的测定:分别取  $50 \mu\text{g/mL}$  对硝基苯胺  $0.2$ 、 $0.4$ 、 $0.6$ 、 $0.8$ 、 $1.0$ 、 $1.2$ 、 $1.4 \text{ mL}$  于 8 个比色管中,加入  $0.05 \text{ mol/L}$  pH 8.0 的磷酸缓冲液(PB)至  $2.8 \text{ mL}$ ,于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  处理  $5 \text{ min}$ ,立即加入  $33\%$  的醋酸  $0.5 \text{ mL}$ ,摇匀,以空白管做参比测定  $420 \text{ nm}$  下的吸光值。获得对硝基苯胺标曲  $y = 0.0165x - 0.0118$ ,  $R^2 = 0.9999$ ,式中  $y$  为  $A_{420}$ ,  $x$  为反应体系中对硝基苯胺的质量( $\mu\text{g}$ )。

蛋白酶活力的测定<sup>[5,11,12]</sup>:以 BAPNA 为底物,取  $0.4 \text{ mL}$  PB(pH 8.0)和  $0.4 \text{ mL}$  胰蛋白酶( $0.5 \text{ mg/mL}$ ),再加入  $2 \text{ mL}$   $0.5 \text{ mg/mL}$  的 BAPNA 溶液(pH 8.0 的 PB 配制),在  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  下反应  $5 \text{ min}$  后,加入  $33\%$  醋酸溶液  $0.5 \text{ mL}$  终止反应,测定  $420 \text{ nm}$  下的吸光值,根据公式(1)计算酶促反应速度  $v$  ( $\mu\text{g}/\text{min}$ )。

$$v = \frac{(A + 0.0118) \times n}{T \times 0.0165} \quad (1)$$

式中  $v$  表示酶促反应速度  $\mu\text{g}/\text{min}$ ,  $A$  表示  $\text{OD}_{420}$

下测定的吸光值,  $T$  表示反应时间  $5 \text{ min}$ ,  $n$  表示稀释倍数。

#### 1.2.2 不同温度下柑橘黄酮对胰蛋白酶抑制作用的研究

参考文献方法<sup>[13]</sup>并适当修改,设定不同温度( $27$ 、 $37$  和  $47 \text{ }^\circ\text{C}$ ),按“1.2.1.2”蛋白酶活性测定体系研究不同浓度的柑橘黄酮溶液( $0.05$ 、 $0.08$ 、 $0.18$ 、 $0.33$ 、 $0.66 \text{ mg/mL}$ )对胰蛋白酶的抑制作用,经酶促反应后,测定  $420 \text{ nm}$  下的吸光值:试验组( $A_1$ )为  $0.4 \text{ mL}$  柑橘黄酮溶液 +  $0.4 \text{ mL}$  胰蛋白酶 +  $2 \text{ mL}$  BAPNA;空白对照组( $A_2$ )为  $0.4 \text{ mL}$  PB +  $0.4 \text{ mL}$  胰蛋白酶 +  $2 \text{ mL}$  BAPNA;试验组背景( $A_3$ )为  $0.4 \text{ mL}$  柑橘黄酮溶液 +  $0.4 \text{ mL}$  PB +  $2 \text{ mL}$  BAPNA;对照组背景( $A_4$ )为  $0.8 \text{ mL}$  PB +  $2 \text{ mL}$  BAPNA。实验重复 3 次,结果用“平均值  $\pm$  标准差”表示。

根据公式(2)计算柑橘黄酮对胰蛋白酶活性的抑制率。

$$\text{抑制率} = \left(1 - \frac{A_1 - A_3}{A_2 - A_4}\right) \times 100\% \quad (2)$$

#### 1.2.3 柑橘黄酮对胰蛋白酶抑制类型的研究<sup>[14,15]</sup>

可逆/不可逆抑制的判断:保持“1.2.1.2”蛋白酶活性测定体系中的底物 BAPNA 浓度( $0.5 \text{ mg/mL}$ )不变,在不同黄酮浓度( $0$ 、 $0.33$ 、 $0.66 \text{ mg/mL}$ )下,改变胰蛋白酶的浓度( $0.125$ 、 $0.25$ 、 $0.75$ 、 $1.25 \text{ mg/mL}$ ),测定酶促反应速度,判断柑橘黄酮对胰蛋白酶是否为可逆抑制。实验重复 3 次,结果取平均值。

可逆抑制类型的判断:保持“1.2.1.2”蛋白酶活性测定体系中的胰蛋白酶浓度不变( $0.5 \text{ mg/mL}$ ),固定柑橘黄酮浓度分别为  $0$ 、 $0.33$ 、 $0.66 \text{ mg/mL}$ ,改变底物 BAPNA 终浓度( $0 \sim 0.64 \text{ mg/mL}$ ),测定酶促反应速度,绘制双倒数曲线,计算  $V_{\max}$  和  $K_m$  值,判断可逆抑制的类型。实验重复 3 次,结果取平均值。

#### 1.2.4 柑橘黄酮与胰蛋白酶结合机制的分析

##### 1.2.4.1 柑橘黄酮对胰蛋白酶荧光的猝灭和机理分析

取胰蛋白酶(体系终浓度  $0.15 \text{ mg/mL}$ )和不同浓度的柑橘黄酮(或柚皮苷)溶液混匀,分别于  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $293 \text{ K}$ )和  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $308 \text{ K}$ )孵育  $10 \text{ min}$ ,置于荧光分光光度计中进行发射光谱扫描,参数设置为激发光波长  $280 \text{ nm}$ ,发射光波长范围  $300 \sim 420 \text{ nm}$ ,扫描速度  $200 \text{ nm}/\text{min}$ ,狭缝宽  $5 \text{ nm}$ 。每组实验设置 3 个平行,结果取平均值。

荧光猝灭是由于荧光物质分子与其他小分子相互作用而引起的荧光强度降低的现象,猝灭机理包括动态猝灭和静态猝灭,都可以用 Stern-Volmer 方程(公式(3))描述<sup>[16]</sup>,以柚皮苷浓度 $[Q]$ 为横坐标,加入柚皮苷前后胰蛋白酶荧光强度的比值 $F_0/F$ 为纵坐标作图,根据公式(4)和(5)计算 Stern-Volmer 猝灭常数 $K_{sv}$ 和表观猝灭常数 $K_q$ ,分析柑橘黄酮(柚皮苷)对胰蛋白酶的荧光猝灭机理<sup>[16]</sup>,式中 $\tau_0$ 为生物分子的荧光寿命 $10^{-8}$ s。

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad (3)$$

$$K_{sv} = \left( \frac{F_0}{F} - 1 \right) / [Q] \quad (4)$$

$$K_q = K_{sv} / \tau_0 \quad (5)$$

#### 1.2.4.2 结合常数和结合位点数分析

根据公式(6),以 $\lg[Q]$ 为横坐标, $\lg[(F_0-F)/F]$ 为纵坐标作图,计算 293 K(20 °C)和 308 K(35 °C)下柑橘黄酮与胰蛋白酶的结合常数 $K_a$ 和结合位点数 $n$ <sup>[16]</sup>。式中, $F_0$ 和 $F$ 分别为加入柚皮苷前后的荧光强度, $[Q]$ 为柚皮苷浓度。

$$\lg \frac{F_0 - F}{F} = \lg K_a + n \lg [Q] \quad (6)$$

#### 1.2.4.3 热力学参数和作用力分析

根据公式(7)-(9)计算 20 °C(293 K)和 35 °C(308 K)下柑橘黄酮与胰蛋白酶相互作用的热力学参数:焓变 $\Delta H$ 、吉布斯自由能变 $\Delta G$ 和熵变 $\Delta S$ ,分析二者之间相互作用力的类型<sup>[17]</sup>。

$$\Delta H = \frac{\ln \frac{K_{a2}}{K_{a1}}}{\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}} \times R \quad (7)$$

$$\Delta G = -RT \ln K_a \quad (8)$$

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T} \quad (9)$$

式中, $R$ 为气体常数(8.314 J/(mol·K)), $K_{a1}$ 和 $K_{a2}$ 分别为开尔文温度 $T_1$ 和 $T_2$ 对应的结合常数。

## 2 结果与分析

### 2.1 最佳吸收波长的确定

波长扫描结果见图1。产物、背景(底物+黄酮)在400 nm以下均有非常强的吸收,干扰大不能用于定量;400 nm以上时,随着波长的增加,产物吸光值持续下降,但背景(底物+黄酮)吸光值下降更快,产物吸光值与背景吸光值之比持续上升并在420~440 nm之间处于较高水平;为降低背景干扰

并兼顾产物测定灵敏度,选用420 nm作为产物测定的波长,该波长下背景吸光值较常用波长410 nm<sup>[5]</sup>减少了60.3%,产物吸光值与背景吸光值之比为410 nm时的1.75倍,极大地减少了反应体系的干扰。

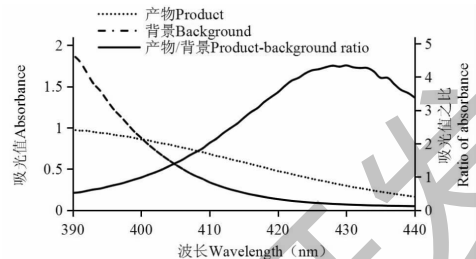


图1 最佳吸收波长的扫描

Fig. 1 Scanning for optimum absorption wavelength

### 2.2 不同温度下黄酮对胰蛋白酶抑制作用的影响

不同温度下黄酮对胰蛋白酶抑制作用的影响见图2。各温度下,柑橘黄酮对胰蛋白酶活性的抑制作用均呈现浓度效应;同一黄酮浓度下,酶促反应温度越低,抑制率越高,27 °C时,0.66 mg/mL 黄酮对0.5 mg/mL 胰蛋白酶的抑制率最高达50.7%,高于37 °C的29.9%和47 °C的18.0%。

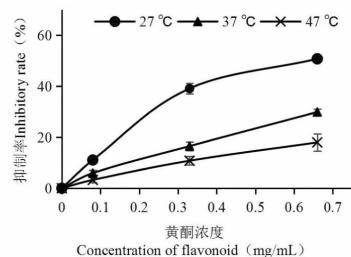


图2 不同温度下柑橘黄酮对胰蛋白酶的抑制作用

Fig. 2 Inhibitory effect of citrus flavonoids on trypsin at different temperatures

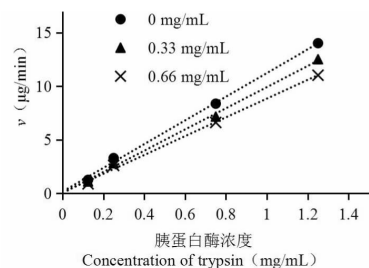


图3 柑橘黄酮对胰蛋白酶的 reversible 抑制作用

Fig. 3 Reversible inhibition of citrus flavonoids against trypsin

### 2.3 柑橘黄酮对胰蛋白酶抑制类型的研究结果

由图3可知,随着黄酮浓度的增加,直线斜率降低,而非向右平移,所以柑橘黄酮对胰蛋白酶的抑制作用是可逆的。可逆抑制类型的进一步分析结果见

表 1 和图 4。随着柑橘黄酮浓度的增加,  $K_m$  值增加明显,  $V_{max}$  值有所降低, 所以柑橘黄酮对胰蛋白酶的抑制属于竞争性抑制和非竞争性抑制混合抑制类型, 可能更接近竞争性抑制类型。

## 2.4 柑橘黄酮与胰蛋白酶的结合机制(荧光光谱法)

### 2.4.1 柑橘黄酮对胰蛋白酶荧光的猝灭作用

柑橘黄酮对胰蛋白酶荧光光谱的影响见图 5。随着柑橘黄酮添加量的增加, 胰蛋白酶的荧光强度

表 1 柑橘黄酮对胰蛋白酶抑制的  $V_{max}$  和  $K_m$

Table 1  $V_{max}$  and  $K_m$  values of trypsin inhibited by citrus flavonoids

黄酮浓度 Concentration of flavonoid (mg/mL)	$V_{max}$ $\mu\text{g}/(\text{mL} \cdot \text{min})$	$K_m$ (mg/mL)
0	17.79	0.44
0.33	17.51	0.47
0.66	15.48	0.57

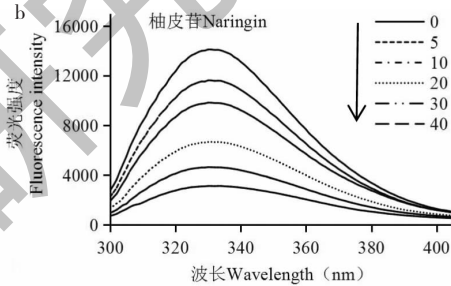
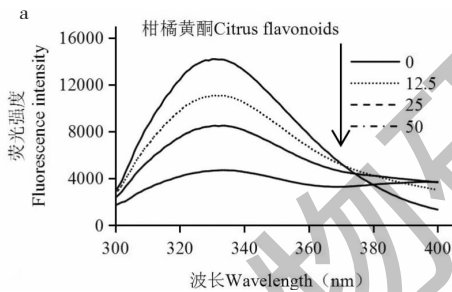


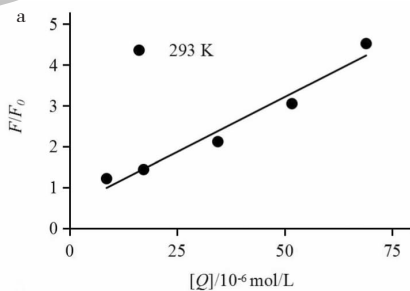
图 5 柑橘黄酮和柚皮苷对胰蛋白酶荧光光谱的影响

Fig. 5 Effect of citrus flavonoids and naringin on the fluorescence spectra of trypsin

注: 柑橘黄酮和柚皮苷的浓度单位均为 mg/L。Note: The concentration unit of citrus flavone and naringin is mg/L.

### 2.4.2 荧光猝灭机理的分析和结合常数的计算

柑橘黄酮是混合物, 由“2.4.1”可知, 其与柚皮苷(柑橘黄酮主要成分之一)对胰蛋白酶的荧光猝灭规律高度一致。为了更清晰地揭示柑橘黄酮与胰蛋白酶的相互作用规律, 故选用代表性成分柚皮苷



(纯度  $\geq 95\%$ ) 进行后续分析。经绘制 Stern-Volmer 曲线<sup>[20]</sup>, 计算得出柚皮苷对胰蛋白酶荧光猝灭的各种参数(见图 6 和表 2)。柚皮苷对胰蛋白酶的表观猝灭常数  $K_q$  为  $5.38 \times 10^{12} \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$  (293 K)、 $4.4 \times 10^{12} \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$  (308K) 远大于各种猝灭剂对生

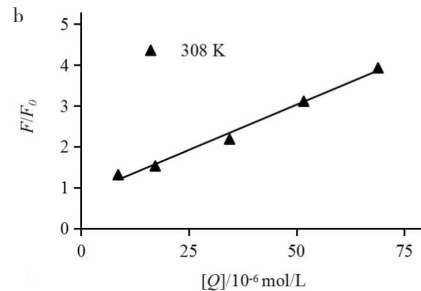


图 6 柚皮苷对胰蛋白酶荧光猝灭 Stern-Volmer 曲线

Fig. 6 Stern-Volmer curves of fluorescence quenching of trypsin by naringin

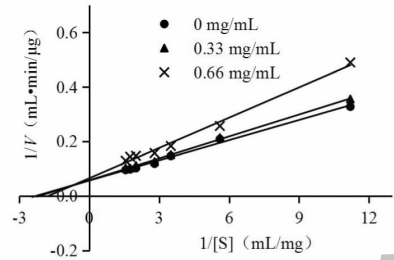


图 4 柑橘黄酮对胰蛋白酶的双倒数曲线

Fig. 4 Lineweaver-Burk curve of trypsin in the presence of citrus flavonoids

不断减弱, 即发生了荧光猝灭; 同时, 最大吸收峰发生了微弱的红移, 由 331 nm 移至 340 nm, 说明柑橘黄酮与胰蛋白酶的色氨酸残基发生了相互作用<sup>[18]</sup>。以柚皮苷(柑橘黄酮主要成分之一<sup>[19]</sup>)代替柑橘黄酮提取物进行实验, 其对胰蛋白酶荧光光谱影响的规律与柑橘黄酮提取物一致, 说明柑橘黄酮提取物对胰蛋白酶的荧光猝灭是柚皮苷等黄酮类化合物在起作用。

物大分子的最大扩散碰撞常数  $2.0 \times 10^{10} \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$  [16]。此外,  $K_{sv}$  分别为  $5.38 \times 10^4 \text{ L}/\text{mol}$  (293 K) 和  $4.4 \times 10^4 \text{ L}/\text{mol}$  (308 K), 猝灭常数随着温度的升高

而降低, 因此推断柚皮苷对胰蛋白酶的猝灭不是由于分子扩散发生动态碰撞而引起的猝灭, 而是二者结合引起的静态猝灭 [8]。

表 2 柚皮苷对胰蛋白酶的荧光参数

Table 2 Fluorescence parameters of trypsin in presence of naringin

$T(\text{K})$	$K_q$ ( $10^{12} \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$ )	$K_{sv}$ ( $10^4 \text{ L}/\text{mol}$ )	$K_a$ ( $10^5 \text{ L}/\text{mol}$ )	$n$
293	5.38	5.38	11.00	1.34
308	4.4	4.4	1.04	1.10

以  $\lg[(F_0 - F)/F]$  对  $\lg[Q]$  作线性拟合, 结果见图 7 和表 2。308 K 下, 柚皮苷与胰蛋白酶的结合常数  $K_{a1}$  为  $1.04 \times 10^5 \text{ L}/\text{mol}$ , 结合位点数  $n$  为 1.10,

293K 下,  $K_{a2}$  为  $1.10 \times 10^6 \text{ L}/\text{mol}$ , 结合位点数  $n$  为 1.34, 即有一个结合位点。

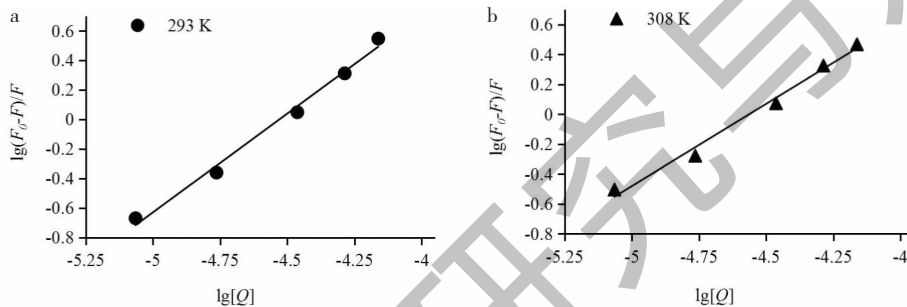


图 7  $\lg(F_0 - F)/F$  与  $\lg[Q]$  的关系图

Fig. 7 Plot of  $\lg(F_0 - F)/F$  vs  $\lg[Q]$

#### 2.4.3 热力学参数和作用力类型分析

柚皮苷与胰蛋白酶相互作用的热力学参数和作用力类型分析结果见表 3。根据文献 [17, 21, 22], 当  $\Delta G < 0, \Delta S \geq 0, \Delta H > 0$  时, 作用力主要为疏水作用力; 当  $\Delta G < 0, \Delta S < 0, \Delta H < 0$  时, 作用力主要为氢键和

范德华力; 当  $\Delta G < 0, \Delta S > 0, \Delta H < 0$  时, 作用力主要为静电作用。由表 3 可知, 柚皮苷与胰蛋白酶作用的热力学参数  $\Delta G < 0, \Delta S < 0, \Delta H < 0$ , 推断二者之间主要是氢键和范德华力在起作用。

表 3 不同温度下柚皮苷对胰蛋白酶作用的热力学分析

Table 3 Thermodynamic analysis of the effect of naringin on trypsin at different temperatures

$T$ (K)	$\Delta H$ (kJ/mol)	$\Delta S$ (J/(mol · K))	$\Delta G$ (kJ/mol)
293	-120.20	-294.22	-34.00
308	-120.20	-294.22	-29.58

### 3 讨论与结论

本实验结果表明, 柑橘黄酮对胰蛋白酶活性具有抑制作用, 且黄酮浓度越高, 抑制效果越强; 37 °C 时, 0.66 mg/mL 黄酮对 0.5 mg/mL 胰蛋白酶的抑制率为 29.9%。柑橘黄酮对胰蛋白酶的抑制为可逆抑制, 属于竞争性抑制和非竞争性抑制混合抑制类型, 而且竞争性抑制占主要地位。

荧光光谱常用来研究小分子与蛋白质的相互作用 [16, 17, 23]。本实验发现, 柑橘黄酮(柚皮苷)能减弱胰蛋白酶的荧光光谱强度, 荧光峰发生红移, 表现为静态猝灭, 且结合常数及结合位点数分析 [16] 发现柚皮苷与胰蛋白酶有 1 个结合位点, 结合的主要作用力是氢键和范德华力。实验中还发现, 柚皮苷与胰蛋白酶的结合常数  $K_a$  随温度升高而降低, 20 °C

(293 K)为  $1.10 \times 10^6$  L/mol, 35 °C (308 K)为  $1.04 \times 10^5$  L/mol, 反映在低温下两者结合更强, 这与不同温度下柑橘黄酮对胰蛋白酶的抑制率吻合: 在 27 °C 下 0.66 mg/mL 柑橘黄酮对胰蛋白酶的抑制率为 50.7%, 高于 37 °C 时的 29.9% 和 47 °C 时的 18.0%。

本研究揭示了柑橘黄酮对胰蛋白酶的抑制作用、抑制类型和结合机制, 可为胰蛋白酶过量分泌相关疾病的特膳食品、保健食品开发作参考, 以减缓疾病的发生和辅助治疗。

## 参考文献

- Li JW, Ren X, Li Y, et al. Study on flavonoids extraction from citrus peels by alkaline method assisted by SDS and microwave treatment[J]. Appl Chem Ind(应用化工), 2017, 46: 1709-1712.
- Kong YC. Study on the interaction mechanism between three citrus flavonoids and digestive enzymes[D]. Shenyang: Liaoning University(辽宁大学), 2020.
- Jiao HB, Liu MD, Guo ZR, et al. Process study on surfactant-assisted extraction of flavonoids from Mashui orange peels[J]. Food Ferment Technol(食品与发酵科技), 2018, 54(5):4-7.
- Xu M. Study on the stability of flavonoids from tartary buckwheat and the interaction with trypsin[D]. Taiyuan: Shanxi University(山西大学), 2013.
- Lu Y. Trypsin inhibitor and its influence on immunological enhancement of mulberry in mice[D]. Zhenjiang: Jiangsu University(江苏大学), 2016.
- Liu TX. Screening of herba proteinase inhibitor and its effect/mechanism of ALI prevention & treatment. [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine(北京中医药大学), 2007.
- He Y. The study of recognition between bovine trypsin and flavonoid drugs[D]. Shenyang: Shenyang Normal University(沈阳师范大学), 2017.
- Liu S, Wang M, Zhu SH, et al. Interaction between purple sweet potato anthocyanins and trypsin[J]. Food Sci(食品科学), 2014, 35(23):232-237.
- Guo JL, Lin H, Fan YY, et al. Establishment of an enzyme reactor for screening trypsin inhibitors[J]. Chin J Med Chem(中国药物化学杂志), 2019, 29:440-447.
- Yao LB, Xia Q, Du D. Protective effect of a dihydroflavonol glycoside from *Coreopsis tinctoria* Nutt. in mouse model of alcoholic acute pancreatitis[J]. J Sichuan Univ; Med Sci(四川大学学报:医学版), 2019, 50:533-539.
- Mustafa MH, Soleimani-Zad S, Sheikh-Zeinoddin M. Characterization of a trypsin-like protease 1 produced by a probiotic *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* PTCC 1896 from skimmed milk based medium[J]. LWT-Food Sci Technol, 2020, 119:108818.
- Somorin O, Tokura S, Nishi N, et al. The action of trypsin on synthetic chromogenic arginine substrates[J]. J Biochem, 1979, 85(1):157-162.
- Zhou LQ, Xiong Y, Chen JL, et al. Study on the chemical constituents from the aerial parts of *Blumea balsamifera* DC. and their antioxidant and tyrosinase inhibitory activities[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2021, 33: 1112-1120.
- Khan MY, Kumar V. Mechanism & inhibition kinetics of bioassay-guided fractions of Indian medicinal plants and foods as ACE inhibitors[J]. J Tradit Complement Med, 2019, 9(1):73-84.
- He BQ, Zhang YY, Zhuang YH, et al.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory activity of the extracts from *Tadehagi triquetrum*[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2020, 32:2026-2030.
- Zhang J, Mi J, Lu L, et al. Effect of anthocyanins extract from *Lycium ruthenicum* Murr. fruit on pancreatic lipase activity[J]. Food Sci(食品科学), 2020, 41(5):8-14.
- Guo QY, Liu M, Zhao YN, et al. Spectroscopic and cytotoxicity study on the influence of (-)-epigallocatechin-3-gallate on the interaction of daunorubicin with human serum albumin[J]. Spectrosc Spect Anal(光谱学与光谱分析), 2020, 40: 1821-1827.
- Su JH, Wang HX, Ma CY, et al. Hypocholesterolaemic mechanism of bitter melon aqueous extracts via inhibition of pancreatic cholesterol esterase and reduction of cholesterol micellar solubility[J]. Int J Food Sci Nutr, 2016, 67(1):20-28.
- Khan MK, Huma ZE, Dangles O. A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols[J]. J Food Compos Anal, 2014, 33(1):85-104.
- Singha Roy A, Ghost P, Dasgupta S. Glycation of human serum albumin alters its binding efficacy towards the dietary polyphenols: a comparative approach[J]. J Biomol Struct Dyn, 2016, 34:1911-1918.
- Zhao WQ, Yang LQ, Du ZY, et al. Thermodynamic study on the interaction of silver nanowires with bovine serum albumin[J]. Jining Med Univ(济宁医学院学报), 2019, 42:244-248.
- Ross PD, Subramanian S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability[J]. Biochemistry, 1981, 20:3096-3102.
- Wang J, Diao CR, Wang HL, et al. Inhibitory mechanism of carnosic acid on  $\alpha$ -amylase[J]. Food Sci(食品科学), 2020, 41(3):12-17.