

· 综 述 ·

α -淀粉酶检测方法及其应用

张娜英, 杨广宇*

上海交通大学生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室, 上海 200240

张娜英, 杨广宇. α -淀粉酶检测方法及其应用[J]. 生物工程学报, 2023, 39(3): 898-911.

ZHANG Naying, YANG Guangyu. α -amylase detection methods and applications[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 898-911.

摘 要: α -淀粉酶是一种内切糖苷水解酶, 可以水解淀粉等多聚糖内部的 α -1,4-糖苷键, 生成低聚糖、糊精、麦芽三糖、麦芽糖和少量葡萄糖。由于 α -淀粉酶在食品、人体健康监测和制药方面的重要作用, 其活性检测广泛应用于工业生产菌株的选育、临床疾病的诊断、糖尿病药物的开发和食品质量的控制中。近年来, 随着检测技术的发展, 许多更加快速、灵敏的 α -淀粉酶检测方法被开发出来。本文综述了近年来 α -淀粉酶的检测方法和应用研究进展, 分类介绍其检测原理和优缺点, 并对未来 α -淀粉酶检测方法提出展望, 以期为 α -淀粉酶检测方法的开发和应用提供参考。

关键词: α -淀粉酶; 检测方法; 应用

α -amylase detection methods and applications

ZHANG Naying, YANG Guangyu*

State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract: α -amylase is an endonucleoside hydrolase that hydrolyzes the α -1,4-glycosidic bonds inside polysaccharides, such as starch, to generate oligosaccharides, dextrins, maltotriose, maltose and a small amount of glucose. Due to the importance of α -amylase in food industry, human health monitoring and pharmaceuticals, detection of its activity is widely required in the breeding of α -amylase producing strains, *in vitro* diagnosis, development of diabetes drugs, and

资助项目: 国家重点研发计划(2018YFE0200501, 2020YFA0907900); 国家自然科学基金(32030063); 天津市合成生物技术创新能力提升行动; 上海交通大学特区计划(21TQ1400210)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFE0200501, 2020YFA0907900), the National Natural Science Foundation of China (32030063), the Tianjin Synthetic Biotechnology Innovation Capability Improvement Action, and the Shanghai Pilot Program for Basic Research-Shanghai Jiao Tong University (21TQ1400210).

*Corresponding author. E-mail: yanggy@sjtu.edu.cn

Received: 2022-06-21; Accepted: 2022-09-14

the control of food quality. In recent years, many new α -amylase detection methods have been developed with improved speed and sensitivity. This review summarized recent processes in the development and applications of new α -amylase detection methods. The major principle of these detection methods were introduced, and their advantages and disadvantages were compared to facilitate future development and applications of α -amylase detection methods.

Keywords: α -amylase; detection methods; applications

α -淀粉酶(EC 3.2.1.1)是一种内切糖苷酶,广泛存在于动物、植物和微生物,是一种具有广泛底物选择性和产物特异性的酶,能够水解淀粉等多聚糖内部的 α -1,4-糖苷键生成糊精、低聚糖、麦芽三糖、麦芽糖和少量葡萄糖,但是无法水解末端葡萄糖和支链 α -1,6-糖苷键^[1]。 α -淀粉酶是最重要的工业酶之一,广泛应用于淀粉加工业、发酵业、洗涤业、纺织业、食品业等,约占全球酶制剂市场的 30%,仅次于蛋白酶^[2]。其中微生物来源的 α -淀粉酶因其稳定性高、易遗传操作、可大规模培养、生产成本低等优点而用于工业生产中^[3]。人类也有 2 种 α -淀粉酶,一种由胰腺产生,另外一种由唾液产生,主要存在于唾液、尿液和血液等体液中,被用作医学诊断和治疗的生物标志物^[4-5]。

α -淀粉酶的活性检测在工业酶开发、临床诊断、食品质量评估等领域有重要的应用。在工业生产菌株的选育上,需要评估 α -淀粉酶生产菌株的生产能力、酶活、热稳定性等指标^[6-8]。在临床疾病的诊断上, α -淀粉酶的检测主要用于识别与胰腺和唾液腺相关的一些疾病状况,如人血清和尿液中 α -淀粉酶活性的测定被广泛用于临床实验室诊断胰腺疾病,唾液 α -淀粉酶活性则与压力和焦虑有关^[4,9-10]。据报道,抑制 α -淀粉酶活性可减少 II 型糖尿病的发生,是治疗糖尿病的重要药物靶点^[11]。此外, α -淀粉酶的检测在食品质量的把控上尤为重要, α -淀粉酶活性的高低对淀粉类食品的最终质量产生巨大影响^[12]。

由于 α -淀粉酶的检测在工业研究和临床诊

断等领域内的重要性,人们已经开发了许多方法来测量其酶活性。据不完全统计,目前用于测定 α -淀粉酶的方法有 200 多种,常用的传统检测方法有基于淀粉分解中的淀粉溶液的粘度降低、淀粉悬浮液的浊度降低和碘-淀粉显色法以及 Bernfeld 的还原糖法等^[13-15],但是,这些基于分光光度测定的方法都有一些缺点,比如涉及多个步骤、耗时耗力,反应不是化学计量,受葡萄糖干扰,反应体积比较大,对样品和试剂的需求量较大,通量低,无法实时监测等缺点,适合要求不太严格和精细的活性分析。为了满足临床检测和药物开发等领域内的新需求,开发新的 α -淀粉酶的活性检测方法,提升其检测速度和灵敏度一直是个重要的课题。本文将主要介绍近 5 年来 α -淀粉酶检测方法的应用和最新进展,分类介绍这些方法的检测原理和优缺点。

1 α -淀粉酶检测的应用进展

1.1 工业菌株选育和工业酶的研究

α -淀粉酶的活性测量在 α -淀粉酶工业生产菌株的选育和工业酶的研究方面有重要作用。不同工业应用领域需要具有不同特性的 α -淀粉酶工业生产菌株。在淀粉转化中,淀粉的液化和糖化需要在高温下进行,需要热稳定的 α -淀粉酶参与反应,解淀粉芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌均是热稳定的 α -淀粉酶的广泛生产者,其中地衣芽孢杆菌和嗜热脂肪芽孢杆菌是淀粉加工工业中的优势菌株^[16]。真菌 α -淀粉酶具有相似的温和反应条件,

最适反应温度为 50–55 °C, 最适 pH 为 5.0–5.5, 安全性高, 一般用于食品工业生产中^[17]。目前, 通过基因工程和定向进化对工业菌株和工业酶的研究作出了重大贡献, 例如, 为提高 α -淀粉酶产量和活性, 利用基因工程, 选择高效的 α -淀粉酶基因和宿主来生产淀粉酶, 将含有感兴趣基因的合适载体插入高效细菌中, 以获得高产的重组 α -淀粉酶生产菌株^[18], 但是在后续筛选庞大的突变体时往往受到高通量限制。基于碘-淀粉显色和还原糖法的筛选比如平板筛选和 96 孔板筛选都存在速度慢、效率低的问题。基于荧光激活微液滴分选 (fluorescence-activated droplet sorting, FADS) 技术的酶活性筛选是近年来出现的一种高通量筛选方法^[19–20], 利用荧光信号偶联策略与基于液滴的微流控筛选技术结合可以极大缩短筛选时间。例如 BODIPY-淀粉荧光法为工业上高通量筛选 α -淀粉酶突变菌株提供了可行性^[8]。

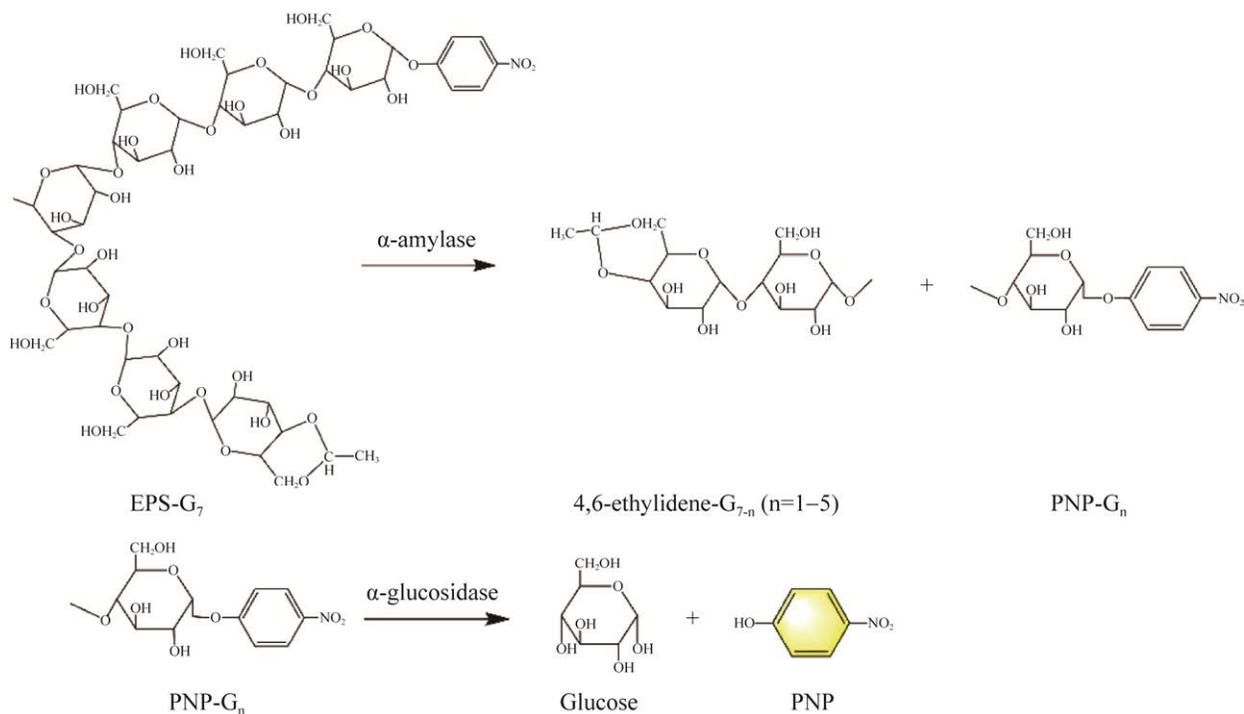
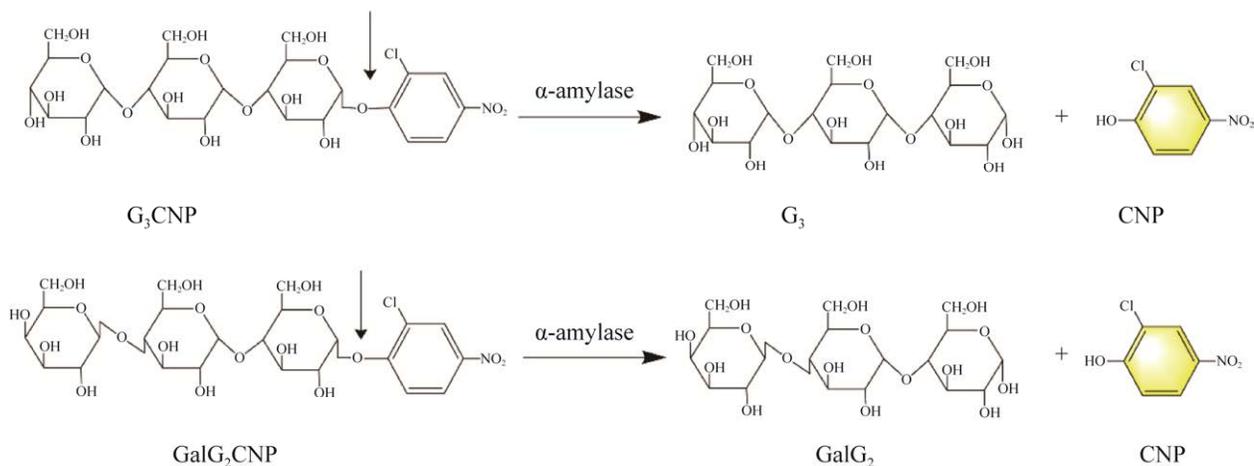
1.2 临床疾病的诊断

在临床疾病的诊断中, 人体液中 α -淀粉酶活性变化是某些疾病的重要指标。血清 α -淀粉酶尤其是胰腺淀粉酶的活性, 对胰腺疾病的准确诊断具有重要意义。血清和尿液中的 α -淀粉酶活性升高可提示腮腺炎、胰腺炎的存在和胰腺阻塞。 α -淀粉酶活性降低可见于肝炎、肝硬化、肝癌、妊娠毒血症、慢性胰腺炎、急性酒精中毒等^[21–22]。急性有机磷农药中毒 (acute organophosphorus pesticide poisoning, AOPP) 是急诊科最常见的危重症之一, 血清 α -淀粉酶水平与 AOPP 的严重程度和预后密切相关^[23]。唾液 α -淀粉酶 (salivary α -amylase, sAA) 已被用作影响交感神经系统病理的生物标志物^[24], 如压力、焦虑、抑郁和口腔疾病^[9, 25]。最近, 有研究表明 sAA 活性变化可能与视网膜疾病有关^[26]。利用发色基团共价连接的麦芽低聚糖作为 α -淀粉酶活性检测的底物已经

被广泛应用于临床诊断领域^[27–29]。在这类方法中, 尽管已经由需要辅助酶的 4,6-亚乙基-4-硝基苯基-麦芽七糖苷 (ethylidene-4-nitrophenyl- α -D-maltoheptaoside, EPS-G₇) 底物发展到不用辅助酶可直接监测水解释放出发色基团的 2-氯-4-硝基苯-麦芽三糖苷 (2-chloro-4-nitrophenylmaltotrioxide, G₃CNP) 和 2-氯-4-硝基苯-半乳糖麦芽糖苷 (2-chloro-4-nitrophenyl-4-O-beta-D-galactopyranosylmaltoside, GalG₂CNP) (图 1 和图 2), 但是吸光度受到 pH、温度和蛋白质浓度的影响, 检测需要额外的仪器来读取信号强度, 限制了现场诊断的使用。由于 α -淀粉酶检测在临床诊断和药物开发方面的重要性和普遍性, 因此, 迫切需要开发一种便携式、快速、经济和高效率的 α -淀粉酶即时检测方法。 α -淀粉酶检测的简便性, 对诊断 α -淀粉酶相关疾病具有重要意义。

1.3 糖尿病药物的开发

糖尿病是全球最普遍的代谢性疾病之一, 由血液中葡萄糖含量过高引起的慢性疾病, 其中 II 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 占糖尿病的 90% 以上, 属于非胰岛素依赖型糖尿病^[30–31]。T2DM 通常以餐后高血糖为特征, 治疗 T2DM 的一种方法是降低餐后血糖水平。人在摄取含淀粉食物时, 淀粉消化的第一阶段涉及由唾液和胰腺 α -淀粉酶催化的水解, 主要产生麦芽糖、麦芽三糖和 α -极限糊精, 这些化合物被体内其他酶进一步水解生成葡萄糖进入血液, 导致餐后血糖浓度升高^[32], α -淀粉酶在淀粉类食物转化为葡萄糖的过程中起到重要促进作用。抑制 α -淀粉酶活性可以延长淀粉类食物的整体消化时间, 降低葡萄糖的生成速率, 从而减缓血糖升高。抑制 α -淀粉酶活性可减少 T2DM 的发生, 是治疗糖尿病和开发新药的重要药物靶点。目前阿卡波糖是最广泛的 α -淀粉酶抑制剂药物, 但这种药物的使用与一系列慢性并发症有关^[33], 因此寻找其

图1 EPS-G₇的水解机制^[27]Figure 1 Hydrolysis mechanism of EPS-G₇^[27].图2 CNP-G₃和GalG₂CNP的水解机制^[28-29]Figure 2 Hydrolysis mechanism of CNP-G₃ and GalG₂CNP^[28-29].

他替代药物预防和治疗 T2DM 至关重要。研究天然化合物的 α -淀粉酶抑制作用被认为是糖尿病药物开发的有效途径,对寻找临床有效的 α -淀粉酶抑制剂以改善 T2DM 具有重要意义。已有

多种天然植物化合物显示出对 α -淀粉酶活性的抑制^[11]。传统方法从复杂的天然产物系统中筛选活性化合物需要分离单个成分以进行后续酶活研究,这通常是低通量和耗时的。因此,特别有

必要开发一种 α -淀粉酶检测的新方法, 以实现快速有效地从复杂的天然产物体系中筛选活性化化合物。

1.4 食品质量评估

淀粉是 α -淀粉酶作用的天然底物, 淀粉类食品的质量会受到 α -淀粉酶活性的影响。面粉中的 α -淀粉酶活性对烘焙产品的质量有重要影响, 例如适量的 α -淀粉酶可以提高面包的弹性和新鲜度, 延长保质期^[34]。若 α -淀粉酶活性过高会导致面团混合和发酵过程中淀粉降解, 面团变得粘稠, 降低面包质量; 相反, α -淀粉酶活性不足会导致面包干燥粗糙, 影响面包口感的同时缩短保质期^[12,35]。在鸡蛋杀菌中, 为了评估液体全蛋巴氏杀菌过程的效率, α -淀粉酶活性已经成为其杀菌效果的验证方法^[36]。晚熟 α -淀粉酶 (late maturity α -amylase, LMA) 被认为是谷物缺陷的结果, 受 LMA 影响的小麦的高等电点的 α -淀粉酶水平异常高, 从而降低谷物质量和价值, 有研究证实了 LMA 含量与酶活性之间存在较高的相关性。因此, α -淀粉酶活力大小可作为评估小麦等谷物质量的方法^[37-38]。 α -淀粉酶是水稻整个生长和生命周期的关键酶, 水稻发育成熟的保守调节剂^[39]。检测 α -淀粉酶的方法有很多, 但这些方法通常很繁琐, 因此, 如果可以改进 α -淀粉酶检测方法使其变得简便, 例如 pH 试纸条, 可以促进具有潜在稳健发芽的水稻种子的识别和检测, 从而作为生物标志物用于农作者播种前进行分析和选择的手段, 对农业领域的发展也有一定意义。

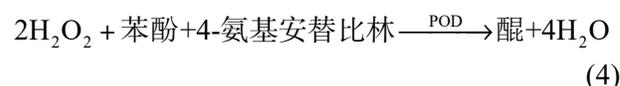
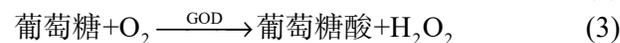
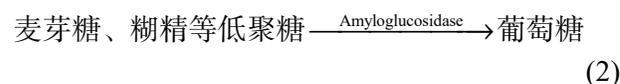
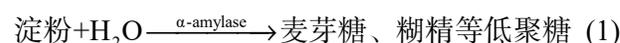
2 α -淀粉酶检测方法

近年来, 由于 α -淀粉酶在临床诊断、药物开发等方面的新用途, 人们研发了一些更加快速灵敏的新方法。例如紫外光谱法中的级联酶法、荧光光谱法和生物传感法等, 传统根据底物、产物和反应原理的分类方法已经不能满足方法学

的分类要求, 接下来按照仪器分析的方法学原理围绕近年来 α -淀粉酶检测方法的最新进展进行介绍。

2.1 紫外光谱法-级联酶法

葡萄糖氧化酶/过氧化物酶 (glucose oxidase/ peroxidase, GOD/POD) 法^[40] 被用于测量谷物产品中的总淀粉含量和血清 α -淀粉酶活性。在 α -淀粉酶作用下淀粉被分解为麦芽低聚糖, 淀粉葡萄糖苷酶可以对产生的麦芽低聚糖进一步水解产生大量葡萄糖, 这些葡萄糖与 GOD 反应产生葡萄糖酸和过氧化氢 (H_2O_2), 过氧化氢又可以与苯酚、4-氨基安替比林在 POD 催化下产生红色的醌, 颜色深浅与葡萄糖的量成正比^[40]。由于 GOD 对葡萄糖的高度特异性, 因此测量结果准确性很高, 对谷物或血清这些复杂样品中淀粉或淀粉酶的定量也具有很高的准确性。但由于反应中需要添加高纯度的酶制剂, 使得其检测成本较高。GOD/POD 法的反应过程如下:



最近, 一项研究表明, GOD 可以直接与麦芽糖反应, 由此建立了一种基于麦芽糖与 GOD 反应的简单、快速的 α -淀粉酶分析新方法^[41]。该方法省略了淀粉糖苷酶将麦芽低聚糖分解为葡萄糖的步骤, 大大降低了检测成本和复杂性。与最常用的测定 α -淀粉酶活性的 3,5-二硝基水杨酸 (3,5-dinitrosalicylic acid, DNS) 方法比较, 该方法具有更高的灵敏度, 大约比 DNS 法高 4 倍, 这使得新方法对于测定植物提取物的抗淀粉酶活性更加精确和灵敏。在评估阿卡波糖对 α -淀粉酶的抑制作用时也显示出更高的线性相关度。

由于报道显示 GOD 对葡萄糖的高度特异性, 许多研究人员质疑该酶与 α -淀粉酶产物麦芽糖的相互作用, 关于 GOD 与麦芽糖相互作用的担忧限制了 GOD 方法在评估 α -淀粉酶活性中的广泛使用, 该作者在后续研究中确认 GOD 与麦芽糖的相互作用并排除了麦芽糖被 GOD 水解成葡萄糖的怀疑^[42]。与其他方法相比, 新发展的 GOD 方法是一种容易进行动力学研究和高通量筛选的方法, 这种特殊的检测方法可以作为一个平台, 在更短的时间内轻松地筛选大量的 α -淀粉酶抑制剂。然而, 该方法在评估 α -淀粉酶活性的准确性方面仍然存疑。此外, 多酚对 GOD 和 POD 的抑制以及对 H_2O_2 的还原也是需要考虑的关键问题。

2.2 荧光光谱法

荧光法是近年来检测 α -淀粉酶最常用的方法之一, 本文主要介绍 3 种不同类型的荧光检测法。

荧光底物氟硼二吡咯染料-淀粉(BODIPY-淀粉), 由淀粉分子和荧光团共价连接形成。在没有淀粉酶存在时, 荧光基团由于相互距离很近而出现荧光淬灭效果, 但当 α -淀粉酶将淀粉底物水解成较小的碎片时, 荧光团的荧光被释放出来, 而荧光信号的强弱与酶活成正比(图 3)^[8]。基于液滴的微流控筛选技术, 与传统平板和 96 孔板筛选技术相比, 筛选速度高达 10^8 突变体/d^[43], 这吸引越来越多的研究者将酶活测定与

微流控技术结合。近年来, 越来越多的研究利用基于 BODIPY-淀粉荧光法的微流控对 α -淀粉酶突变株进行超高通量筛选, 例如, 在基于酶活性的真菌高通量分选上, 黑曲霉的 10^4 克隆突变文库在短短 90 min 内单轮微流控筛选后, α -淀粉酶活性富集了 196 倍, 极大地提高了工业菌株的筛选效率^[44]。利用基于液滴的微流控平台对生长耦合进化后的地衣芽孢杆菌单细胞进行分离, 获得了 α -淀粉酶产量提高 67% 的克隆, 证明生长耦合进化与高通量筛选相结合是增强 α -淀粉酶生产的有效策略^[8]。由于高灵敏度、特异性以及操作的简便性, 这种荧光法测量试剂盒已经商业化。广泛应用在淀粉食品中微量 α -淀粉酶的检测和基于液滴的 α -淀粉酶高通量筛选的研究上^[45-47]。

目前包括检测试剂盒在内的现有方法存在成本高、需要借助工具酶或竞争性底物抑制剂的间接检测的问题。因此, 它们不适用于体液中 α -淀粉酶的低活性和无损检测。快速、高灵敏度直接测定人体液中的 α -淀粉酶仍然具有挑战性。基于饱和碘-淀粉(starch-iodine complex, SI)络合物与荧光素钠之间关系的荧光光谱法。首先, 饱和的 SI 复合物与荧光素钠反应, 形成淀粉-碘-荧光素钠复合物(starch-iodine-sodium fluorescein complex, SIF)。SIF 的形成导致荧光发射强度的降低。当 α -淀粉酶通过酶解淀粉来分解 SIF 时, 荧光发射强度增加, 根据荧光

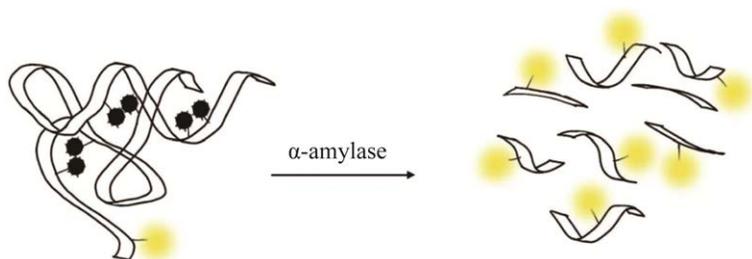


图 3 BODIPY-淀粉的水解示意图^[8]

Figure 3 Schematic illustration of the hydrolysis of BODIPY-starch^[8].

强度确定 α -淀粉酶的活性(图 4)^[48]。从制备底物到酶促水解完成仅需 9–10 min, 可测量低至 0.18 U/L 水平的 α -淀粉酶, 同时在测量血液样本中 α -淀粉酶时, 血液中常见的葡萄糖、尿素等物质对该方法没有干扰。该法简单、灵敏和快速, 是一种测定人血清样品中 α -淀粉酶活性的新荧光法。

第 3 种荧光法是基于四苯乙烯(tetraphenylethylene, TPE)与麦芽三糖共价连接的荧光探针构建了 α -淀粉酶活性检测的传感系统。麦芽三糖是 α -淀粉酶和水溶性底物, 与 TPE

共价连接形成荧光探针, 赋予其优异的水溶性, 在 α -淀粉酶作用下, 麦芽三糖单元与 TPE 之间的化学键会被催化水解, 释放出溶解性差的 TPE 残基会快速聚集, 发出强烈的绿色荧光(图 5), 荧光强度与酶活性成线性关系^[49]。在这种新型荧光法中, 其检测限低至 0.14 U/L, 线性范围为 0–45.5 U/L, 检测时间缩短至 3 min。该法无延迟效应, 无需工具酶, 为临床诊断中 α -淀粉酶的检测提供了一种简单、灵敏、快速的方法, 该方法所用的荧光探针对 α -淀粉酶具有高度选择性。目前已应用于患者体液中 α -淀粉酶

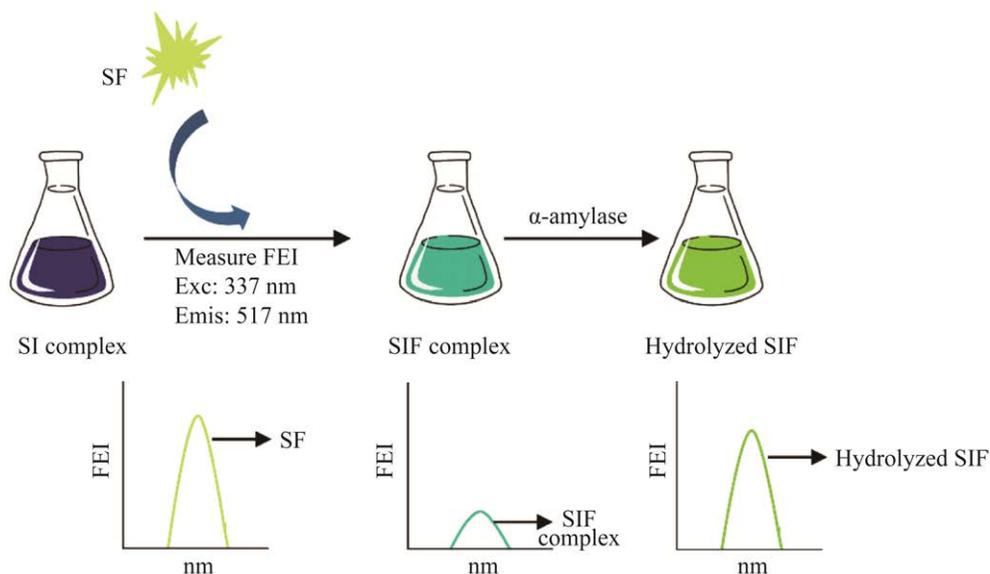


图 4 α -淀粉酶活性检测方法的示意图^[48]

Figure 4 Schematic illustration of α -amylase activity detection method^[48]. SF: Sodium fluorescein; SI: Starch-iodine complex; SIF: Starch-iodine-sodium fluorescein complex; FEI: Fluorescence emission intensity.

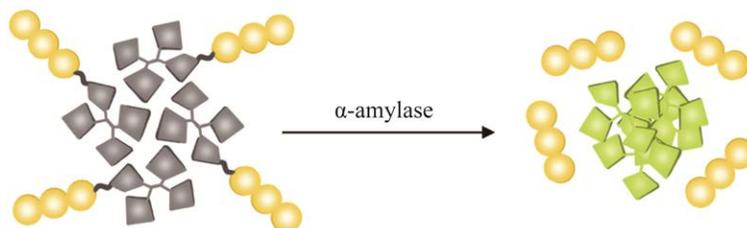


图 5 α -淀粉酶水解机制示意图^[49]

Figure 5 Schematic illustration of the sensing mechanism of probes in α -amylase activity detection^[49].

活性的检测,而且对食品和制药行业也具有推广价值。

荧光法最大的特点是高灵敏度和高特异性,响应时间短,操作简便快速,它的灵敏度是紫外可见或红外光谱的1 000倍^[50]。适用于自动化高通量测定。但是,荧光法无法直接定义酶活性,需要已知酶活性标准化,受反应溶液中其他物质的影响空白背景值可能会偏大。

2.3 在线毛细管电泳法

目前市售的糖尿病药物如阿卡波糖、米格列醇等的药效会受到有害副作用的困扰。相反,一些存在于各种水果、蔬菜和蘑菇中的天然化合物,包括类黄酮、酚酸、单宁、脂肪酸、皂苷和蛋白质等,表现出对 α -淀粉酶显著的抑制作用且没有副作用^[51]。由于大量新候选药物的出现,为了加快整个筛选过程,更具创新的检测技术正在被开发。毛细管电泳(capillary electrophoresis, CE)具有快速分离样品、自动化以及与各种光学、电化学或质谱检测方法相结合的特点。在线CE检测中,酶促反应的孵育、反应产物的分离和检测被整合到单一的全自动分析中。在 α -淀粉酶抑制剂筛选中,酶反应可能发生在引入过程中,底物在毛细管中降解,难以准确评估 α -淀粉酶的抑制效应。2018年开发了一种在线毛细管电泳方法来监测抑制剂对 α -淀粉酶的抑制作用^[52]。在之前的基础上,作者改变了配置,使用反向模式毛细管将样品引入毛细管的检测器末端,将每种反应成分单独引入毛细管,在毛细管中通过扩散混合试剂,从而改善了峰形并将包括调节毛细管在内的分析时间从17 min缩短到5 min。应用该方法测试了黄酮类标准品及其混合物的抑制作用,该方法为筛选 α -淀粉酶抑制剂提供了一种更快、更经济的选择。

2.4 高效液相色谱-光二极管阵列检测器-质谱法

目前,高效液相色谱结合生化检测已用于复杂系统中活性成分的快速分析。借助一种新型的在线检测系统,可以大大加快从天然产物中筛选抑制剂的速度。通过将高效液相色谱-质谱(high performance liquid chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS)与生化检测方法相结合,可以同时识别天然复合物中的成分、量化其活性并研究其构效关系^[53]。在此基础上,建立了一种双在线检测系统,用于快速筛选 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制剂,通过体外酶测定和荧光淬灭验证了其抑制作用^[54]。HPLC-DAD-MSⁿ-FLD在线系统由2部分组成:高效液相色谱-光二极管阵列检测器-质谱(high performance liquid chromatography-photo diode array detector-mass spectrometry, HPLC-DAD-MS)和酶结合的荧光检测(fluorescence detection, FLD),样品溶液由自动进样器注入并由HPLC柱分离。将淋洗液由DAD记录以显示HPLC色谱图,然后分流,一个泵入质谱仪以进行结构鉴定,另一个泵入反应线圈与酶溶液反应并由荧光检测器检测,酶结合谱的基线信号基于一定浓度的酶溶液的荧光信号。当活性化合物对 α -淀粉酶有抑制作用时,荧光强度会降低并形成负峰。新开发的在线系统应用于梅花(*Prunus mume*, PM)中活性成分的分析。对PM的HPLC色谱图、总离子图和酶结合活性谱进行了分析,总分析时间为115 min,从PM中分离鉴定出28种化合物。

利用双在线系统方法,尝试在不需要底物存在的情况下筛选酶抑制剂。研究表明,在没有酶底物的情况下直接检测酶荧光信号的变化,从而快速筛选天然产物中的酶抑制剂。体外酶活性和荧光实验也证明了在线系统的可靠性。但是该法局限于 α -淀粉酶抑制剂的筛选应用,不具

有通用性,且使用的多种庞大仪器及实验的复杂性对该法的应用推广造成了一定的限制。

2.5 等温定量热法

等温滴定热法(isothermal titration calorimetry, ITC)是研究分子相互作用的常用技术。在最佳条件下,大多数热力学反应参数可以通过 ITC 确定,ITC 的另一个应用领域是通过测量与反应速率成正比的热变化来确定酶-底物反应的动力学常数。此前以不溶性淀粉-染料交联物为底物的研究是直接染料-淀粉悬浮液进行酶活分析,最近的一项研究表明,在对染料-淀粉(淀粉天青)进行煮沸的预处理后,其酶解速度比未处理的有所增加。人唾液 α -淀粉酶和猪胰腺 α -淀粉酶催化水解预煮底物的初始速率分别是未经处理底物水解的 600 倍和 140 倍,大大提高了染料-淀粉底物测定 α -淀粉酶活性的灵敏度^[55]。利用 ITC 实验比较天然淀粉和淀粉天青的水解动力学参数 K_m 和 V_{max} ,结果表明天然淀粉与淀粉天青没有明显的不同,但在淀粉天青水解过程中观察到底物抑制现象。该研究提出了一种新的 α -淀粉酶检测方法,即该方法以煮沸的不溶性淀粉天青为底物可以显著提高检测灵敏度,结合 ITC 可以研究 α -淀粉酶对不同底物的催化性质。在研究阿卡波糖对唾液 α -淀粉酶催化不同底物(GalG₂CNP、麦芽七糖和淀粉)的水解抑制作用时,利用 3 种方法(ITC、分光光度法和 HPLC)研究酶活催化反应,但在这 3 种方法中,只有 ITC 适合直接测量反应速率^[56]。

ITC 作为一种较新的酶活性测定方法,通过测量热变化来确定酶-底物反应的动力学常数,适用于快速测定米氏常数用于筛选最适底物和抑制剂,为研究 α -淀粉酶催化动力学提供了一种新的方法。ITC 与生化方法结合的 α -淀粉酶活性检测方法广泛应用于糖尿病的药物开发。

2.6 电化学分析法

由于 α -淀粉酶是诊断多种胰腺疾病和用作影响交感神经系统病理的生物标志物,与压力和口腔疾病相关,因此开发一种便携式检测装置是非常必要的。以电化学传感器为基础的电化学分析法,是利用 α -淀粉酶分解淀粉的生化反应所产生的或消耗的物质,通过电化学装置转换成电信号,使电信号(电压、电流等)与 α -淀粉酶活性产生偶联,进而测定 α -淀粉酶的活性^[57-60]。

将酶活性转化成电流,并利用丝网印刷碳电极(screen-printed carbon electrodes, SPCE)进行电流检测,可以开发为检测人类唾液样本中的唾液 α -淀粉酶(sAA)生物传感器。首先是淀粉被 sAA 水解生成麦芽糖,然后生成的还原糖在第二反应中促进 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 转化为 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$,其电流信号与 sAA 水平成正比^[57]。该方法以人唾液 α -淀粉酶为样本,准确度在 90%和 97%之间,是一种简单、廉价、便携、可靠的快速即时检测(point-of-care testing, POCT)工具。另一种以水银温度计为设计灵感的测试条,基于水解产物还原糖的还原能力产生的电位差而开发出来,可在 2 min 内对人唾液样本中的 sAA 进行定量分析^[60]。最后一种是将酶活性转化为电阻的电化学分析法,这是一种用于血清 α -淀粉酶浓度即时检测的生物传感器,该生物传感器由覆盖有淀粉包覆金纳米颗粒(starch-coated gold nanoparticles, SAuNPs)的导电聚苯胺-祖母绿盐(poly-aniline-emeraldine-salt, PANI-ES)薄膜的玻璃基底组成。在生物传感器中加入不同剂量的 α -淀粉酶可以选择性地消耗稳定在 SAuNPs 上的淀粉,从而改变传感器的电阻。电阻的变化与缓冲液中 α -淀粉酶的浓度几乎呈线性相关^[58]。该生物传感器能够灵敏地检测血清中的 α -淀粉酶(25-100 U/L),响应时间约为 60 s。可与传统临床批准的方法相媲美。

2.7 免疫传感法

血清包括唾液 α -淀粉酶(human salivary amylase, HSA, 55%–60%来自唾液腺)和胰腺 α -淀粉酶(human pancreas amylase, HPA, 45%来自胰腺)。血清和尿液中总 α -淀粉酶浓度的变化与某些疾病直接相关。HPA 与胰腺疾病和糖尿病相关,而 HSA 则与慢性酒精中毒、腮腺炎相关^[61]。因为 2 种亚型的 α -淀粉酶提供了不同的疾病信息,因此区分 HSA 和 HPA 并对其分别检测对诊断和治疗的精准性是非常重要的。

基于石英晶体微天平(quartz-crystal microbalance, QCM)的免疫传感器,可以区分体液 α -淀粉酶的 2 种亚型,用于唾液 α -淀粉酶(HSA)的定量^[61]。一种名为光化学固定化技术(photochemical immobilization technique, PIT)的非传统功能化方法,基于适当的紫外线激活能够垂直定向固定抗体,露出结合位点,使其有效结合目标分析物。QCM 通过管路控制不同的溶液流动到流体室中的晶体的敏感金表面,抗 HSA 抗体固定在金敏感表面上,并通过测量由于抗原(HSA)结合而产生的频率变化来直接定量 HAS。此外,为了将基于 QCM 的免疫传感器应用到更广泛的临床分析领域,通过采用简单的压载程序来放大信号,可以极大地提高该装置的灵敏度和检出限(limit of detection, LOD),其检测限为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (77 U/L)。通过 phadebas 试验等标准实验室方法对该方案进行验证,证明了所提出的免疫传感器的可靠性,它可以应用于生理水平高于 20 U/L 的体液(如血清和尿液)中的淀粉酶浓度。QCM 是一种易于使用和可靠的 α -淀粉酶检测设备,克服了其他方法如 phadebas 法缺乏选择性的缺陷。

2.8 纸基传感法

近年来,开发了一种基于黏度变化的传感器用于测量 α -淀粉酶活性的方法^[62]。该传感器基

于将淀粉溶液的黏度变化转化为 pH 试纸条上水扩散长度的差异,可以通过测量支链淀粉溶液在不同浓度酶存在下的黏度变化来定量检测 α -淀粉酶活性,将酶和淀粉混合物溶液滴在聚氯乙烯(polyvinyl chloride, PVC)板上并在室温下保持 5 min。最后,将 pH 试纸条放置在水溶液的顶部,5 min 后,观察 pH 试纸条上溶液扩散情况,并使用智能手机对结果进行成像。因为纸上有很多微米级的孔,这允许通过毛细管作用输送水,由于 pH 试纸价格低廉还可以监测实验过程中的 pH 变化,以避免实验条件的变化,从而确保实验的准确性。这种基于黏度法的传感器具有非常高的灵敏度,LOD 约为 0.017 U/mL,在胰蛋白酶、黄嘌呤氧化酶、胆固醇氧化酶、脲酶、过氧化物酶、 β -葡萄糖苷酶、透明质酸酶和脂肪酶等酶的存在下测试纸基传感器的特异性,与空白组(仅支链淀粉溶液)相比,水印扩散率未观察到明显区别。这些发现表明,基于黏度变化的纸基传感法对 α -淀粉酶检测具有良好的特异性。

近年来用于 α -淀粉酶检测的生物传感法越来越多,除了上面已经介绍的几种方法外,还有基于液滴的一次性传感器贴片等也是一种简单、快速、廉价、便携和可靠的 POCT 工具^[59],可用于人唾液和血清中 α -淀粉酶的即时检测,有助于胰腺炎、癌症、腮腺炎、应激和抑郁症的诊断。但传感器的设计制作比较麻烦,难以实现商业化。

3 总结与展望

本文主要介绍了近五年 α -淀粉酶的检测方法及其应用进展。近年来 α -淀粉酶的检测方法的创新点主要是将不同检测仪器与生化检测方法结合的使用。这些方法在速度、灵敏度、方便性和安全性等方面取得了一定进步。表 1 中简要总结了本文讨论的方法。

表 1 α -淀粉酶检测方法的概述Table 1 Overview of α -amylase detection methods

Classification	Assay	Linear range/LOD	Features/Applications	References
Ultraviolet spectroscopy method	Maltose concentration	The sensitivity is 4 times higher than DNS	Enzyme activity kinetics, high throughput detection	[41]
Fluorescent spectrometry methods	Fluorescence intensity	0.18 U/L 0–45.5 U/L, 0.14 U/L	Combining microfluidic screening up to 10^8 clones/day Clinical diagnosis	[8] [48] [49]
Online CE			The analysis time was reduced from 17 to 5 min	[52]
HPLC-DAD-MS ⁿ -FLD	Fluorescence intensity		High throughput screening inhibitors	[54]
ITC	Heat change		Enzyme activity kinetics	[55-56]
Electrochemical method	Electrical signals	25–100 U/L	Portable, clinical diagnosis	[57-60]
Immune sensing method	Frequency signal	77 U/L	Portable, distinguish subtypes of HSA and HPA	[61]
Paper based sensing method	Viscosity	17 U/L	Portable, clinical diagnosis	[62]

总体而言，虽然有很多方法用于 α -淀粉酶的测量，但发展各种更加简便、通用的方法一直是科学家们所持续追求的目标。尽管近年来 α -淀粉酶检测在技术上已经进行了很多改进，但是其根本原理没有实质性的改变，后续的工作重点将在于开发出更加灵敏的底物和更加通用的方法，用于测量来自各种来源的 α -淀粉酶的活性，以满足不同领域的应用要求。

REFERENCES

- [1] FAROOQ MA, ALI S, HASSAN A, TAHIR HM, MUMTAZ S, MUMTAZ S. Biosynthesis and industrial applications of α -amylase: a review[J]. Archives of Microbiology, 2021, 203(4): 1281-1292.
- [2] WU XR, WANG YX, TONG BD, CHEN XH, CHEN JH. Purification and biochemical characterization of a thermostable and acid-stable alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* B4-423[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 109: 329-337.
- [3] SINDHU R, BINOD P, MADHAVAN A, BEEVI US, MATHEW AK, ABRAHAM A, PANDEY A, KUMAR V. Molecular improvements in microbial α -amylases for enhanced stability and catalytic efficiency[J]. Bioresource Technology, 2017, 245: 1740-1748.
- [4] ALI ND, NATER UM. Salivary alpha-amylase as a biomarker of stress in behavioral medicine[J]. International Journal of Behavioral Medicine, 2020, 27(3): 337-342.
- [5] MOJBAFAN M, AFSARTALA Z, AMOLI MM, MAHMOUDI M, YAGHMAEI P, LARIJANI B, EBRAHIM-HABIBI A. Liver alpha-amylase gene expression as an early obesity biomarker[J]. Pharmacological Reports, 2017, 69(2): 229-234.
- [6] SHEN PL, NIU DD, LIU XL, TIAN KM, PERMAUL K, SINGH S, MCHUNU NP, WANG ZX. High-efficiency chromosomal integrative amplification strategy for overexpressing α -amylase in *Bacillus licheniformis*[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2022, 49(3): kuac009.
- [7] ALEEM B, RASHID MH, ZEB N, SAQIB A, IHSAN A, IQBAL M, ALI H. Random mutagenesis of super Koji (*Aspergillus oryzae*): improvement in production and thermal stability of α -amylases for maltose syrup production[J]. BMC Microbiology, 2018, 18(1): 200.
- [8] ZHANG GQ, CHEN YK, LI QH, ZHOU JW, LI JH, DU GC. Growth-coupled evolution and high-throughput screening assisted rapid enhancement for amylase-producing *Bacillus licheniformis*[J]. Bioresource Technology, 2021, 337: 125467.
- [9] CHOJNOWSKA S, PTASZYŃSKA-SAROSIEK I, KĘPKA A, KNAŚ M, WASZKIEWICZ N. Salivary biomarkers of stress, anxiety and depression[J].

- Journal of Clinical Medicine, 2021, 10(3): 517.
- [10] ISMAIL OZ, BHAYANA V. Lipase or amylase for the diagnosis of acute pancreatitis?[J]. Clinical Biochemistry, 2017, 50(18): 1275-1280.
- [11] SALES PM, SOUZA PM, SIMEONI LA, SILVEIRA D. α -amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source[J]. Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences: a Publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe Canadienne Des Sciences Pharmaceutiques, 2012, 15(1): 141-183.
- [12] FALLAHI P, HABTE-TSION HM, ROSSI W. Depolymerizing enzymes in human food[A]// Enzymes in Human and Animal Nutrition[M]. Amsterdam: Elsevier, 2018: 211-237.
- [13] GONZÁLEZ CF, FARIÑA JI, FIGUEROA LIC. A critical assessment of a viscometric assay for measuring *Saccharomycopsis fibuligera* α -amylase activity on gelatinised cassava starch[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2002, 30(2): 169-175.
- [14] LIU TT, SONG LX, WANG HY, HUANG DJ. A high-throughput assay for quantification of starch hydrolase inhibition based on turbidity measurement[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(18): 9756-9762.
- [15] XIAO ZZ, STORMS R, TSANG A. A quantitative starch-iodine method for measuring alpha-amylase and glucoamylase activities[J]. Analytical Biochemistry, 2006, 351(1): 146-148.
- [16] JUJJAVARAPU SE, DHAGAT S. Evolutionary trends in industrial production of α -amylase[J]. Recent Patents on Biotechnology, 2019, 13(1): 4-18.
- [17] WANG YC, ZHAO N, MA JW, LIU J, YAN QJ, JIANG ZQ. High-level expression of a novel α -amylase from *Thermomyces dupontii* in *Pichia pastoris* and its application in maltose syrup production[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 127: 683-692.
- [18] MOVAHEDPOUR A, ASADI M, KHATAMI SH, TAHERI-ANGANEH M, ADELIPOUR M, SHABANINEJAD Z, AHMADI N, IRAJIE C, MOUSAVI P. A brief overview on the application and sources of α -amylase and expression hosts properties in order to production of recombinant α -amylase[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2022, 69(2): 650-659.
- [19] WANG BL, GHADERI A, ZHOU H, AGRESTI J, WEITZ DA, FINK GR, STEPHANOPOULOS G. Microfluidic high-throughput culturing of single cells for selection based on extracellular metabolite production or consumption[J]. Nature Biotechnology, 2014, 32(5): 473-478.
- [20] AGRESTI JJ, ANTIPOV E, ABATE AR, AHN K, ROWAT AC, BARET JC, MARQUEZ M, KLIBANOV AM, GRIFFITHS AD, WEITZ DA. Ultrahigh-throughput screening in drop-based microfluidics for directed evolution[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(9): 4004-4009.
- [21] OLESEN SS, KRARUP H, POULSEN JL, CHRISTENSEN JH, SHEEL ARG, SUTTON R, GREENHALF W, HALLORAN C, DREWES AM. Pancreas-specific plasma amylase for assessment and diagnosis of chronic pancreatitis: new insights on an old topic[J]. United European Gastroenterology Journal, 2019, 7(7): 955-964.
- [22] AL-BAHRANI AZ, AMMORI BJ. Clinical laboratory assessment of acute pancreatitis[J]. Clinica Chimica Acta, 2005, 362(1/2): 26-48.
- [23] ZOBEIRI M. Serum amylase as a prognostic marker of organophosphate poisoning[J]. Journal of Injury & Violence Research, 2021, 13(2): 117-120.
- [24] NATER UM, ROHLEDER N. Salivary alpha-amylase as a non-invasive biomarker for the sympathetic nervous system: current state of research[J]. Psychoneuroendocrinology, 2009, 34(4): 486-496.
- [25] HARIRIAN H, BERTEL K, LAKY M, RAUSCH WD, BÖTTCHER M, MATEJKA M, ANDRUKHOV O, RAUSCH-FAN X. Salivary and serum chromogranin A and α -amylase in periodontal health and disease[J]. Journal of Periodontology, 2012, 83(10): 1314-1321.
- [26] ABDELHAKIM AH, LEDESMA-GIL G, YANNUZZI LA. Salivary alpha-amylase levels may correlate with central serous chorioretinopathy activity[J]. Retina: Philadelphia, Pa, 2021, 41(10): 2007-2008.
- [27] LORENTZ K. Routine α -amylase assay using protected 4-nitrophenyl-1,4- α -D-maltoheptaoside and a novel α -glucosidase[J]. Clinical Chemistry, 2000, 46(5): 644-649.
- [28] GELLA FJ, GUBERN G, VIDAL R, CANALIAS F. Determination of total and pancreatic alpha-amylase in human serum with 2-chloro-4-nitrophenyl-alpha-D-maltotrioside as substrate[J]. Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry, 1997, 259(1/2): 147-160.
- [29] MORISHITA Y, IINUMA Y, NAKASHIMA N,

- MAJIMA K, MIZUGUCHI K, KAWAMURA Y. Total and pancreatic amylase measured with 2-chloro-4-nitrophenyl-4-O- β -D-galactopyranosylmaltoside[J]. *Clinical Chemistry*, 2000, 46(7): 928-933.
- [30] KAUR N, KUMAR V, NAYAK SK, WADHWA P, KAUR P, SAHU SK. Alpha-amylase as molecular target for treatment of diabetes mellitus: a comprehensive review[J]. *Chemical Biology & Drug Design*, 2021, 98(4): 539-560.
- [31] NEELAND IJ, PATEL KV. Diabetes[A]//Biomarkers in Cardiovascular Disease[M]. Amsterdam: Elsevier, 2019: 41-51.
- [32] PATEL H, ROYALL PG, GAISFORD S, WILLIAMS GR, EDWARDS CH, WARREN FJ, FLANAGAN BM, ELLIS PR, BUTTERWORTH PJ. Structural and enzyme kinetic studies of retrograded starch: inhibition of α -amylase and consequences for intestinal digestion of starch[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 164: 154-161.
- [33] OBOH G, OGUNSUYI OB, OGUNBADEJO MD, ADEFEGHA SA. Influence of gallic acid on α -amylase and α -glucosidase inhibitory properties of acarbose[J]. *Journal of Food and Drug Analysis*, 2016, 24(3): 627-634.
- [34] ZHANG L, LI ZK, QIAO Y, ZHANG YJ, ZHENG WW, ZHAO YQ, HUANG Y, CUI ZL. Improvement of the quality and shelf life of wheat bread by a maltohexaose producing α -amylase[J]. *Journal of Cereal Science*, 2019, 87: 165-171.
- [35] MANGAN D, SZAFRANSKA A, MCKIE V, MCCLEARY BV. Investigation into the use of the amylase SD assay of milled wheat extracts as a predictor of baked bread quality[J]. *Journal of Cereal Science*, 2016, 70: 240-246.
- [36] da SILVA GR, MENEZES LDM, LANZA IP, de OLIVEIRA DD, SILVA CA, KLEIN RWT, de ASSIS DCS, de VASCONCELOS CANÇADO S. Evaluation of the alpha-amylase activity as an indicator of pasteurization efficiency and microbiological quality of liquid whole eggs[J]. *Poultry Science*, 2017, 96(9): 3375-3381.
- [37] NEOH GKS, TAO KY, DIETERS MJ, FOX GP, GILBERT RG. Late-maturity α -amylase (LMA) testing and its methodological challenges[J]. *LWT*, 2021, 151: 112232.
- [38] RAL JP, WHAN A, LARROQUE O, LEYNE E, PRITCHARD J, DIELEN AS, HOWITT CA, MORELL MK, NEWBERRY M. Engineering high α -amylase levels in wheat grain lowers falling number but improves baking properties[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2016, 14(1): 364-376.
- [39] DAMARIS RN, LIN ZY, YANG PF, HE DL. The rice alpha-amylase, conserved regulator of seed maturation and germination[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(2): 450.
- [40] MCCLEARY BV, GIBSON TS, MUGFORD DC, LUKOW O, JACKSON DS, RABE E, PATEL N, WILLIAMS PC, GELROTH J, CAMIRE ME, CHIBBAR RN, INGELIN M, NIEMANN C, GRANT LA, PETERSON DM, CORKE H, SANDERS P, MUIR J, CHOCT M, SCHMIDT J, et al. Measurement of total starch in cereal products by amyloglucosidase- α -amylase method: collaborative study[J]. *Journal of Aoac International*, 1997, 80(3): 571-579.
- [41] VISVANATHAN R, JAYATHILAKE C, LIYANAGE R. A simple microplate-based method for the determination of α -amylase activity using the glucose assay kit (GOD method)[J]. *Food Chemistry*, 2016, 211: 853-859.
- [42] VISVANATHAN R, JAYATHILAKE C, LIYANAGE R, SIVAKANESAN R. Applicability and reliability of the glucose oxidase method in assessing α -amylase activity[J]. *Food Chemistry*, 2019, 275: 265-272.
- [43] WEN N, ZHAO Z, FAN BY, CHEN DY, MEN D, WANG JB, CHEN J. Development of droplet microfluidics enabling high-throughput single-cell analysis[J]. *Molecules: Basel, Switzerland*, 2016, 21(7): 881.
- [44] BENEYTON T, WIJAYA IPM, POSTROS P, NAJAH M, LEBLOND P, COUVENT A, MAYOT E, GRIFFITHS AD, DREVELLE A. High-throughput screening of filamentous fungi using nanoliter-range droplet-based microfluidics[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 27223.
- [45] SJOSTROM SL, BAI YP, HUANG MT, LIU ZH, NIELSEN J, JOENSSON HN, ANDERSSON SVAHN H. High-throughput screening for industrial enzyme production hosts by droplet microfluidics[J]. *Lab on a Chip*, 2014, 14(4): 806-813.
- [46] HUANG MT, BAI YP, SJOSTROM SL, HALLSTRÖM BM, LIU ZH, PETRANOVIC D, UHLÉN M, JOENSSON HN, ANDERSSON-SVAHN H, NIELSEN J. Microfluidic screening and whole-genome sequencing identifies mutations associated with improved protein secretion by yeast[J]. *Proceedings of*

- the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(34): E4689-E4696.
- [47] KOYAMA K, HIRAO T, TORIBA A, HAYAKAWA K. An analytical method for measuring α -amylase activity in starch-containing foods[J]. Biomedical Chromatography, 2013, 27(5): 583-588.
- [48] ZAFER JB, DEDE S, KARAKUŞ E. α -amylase assay with starch-iodine-sodium fluorescein-based fluorometric method in human serum samples[J]. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2021, 51(6): 599-606.
- [49] SHI J, DENG QC, LI Y, ZHENG MM, CHAI ZF, WAN CY, ZHENG Z, LI L, HUANG FH, TANG B. A rapid and ultrasensitive tetraphenylethylene-based probe with aggregation-induced emission for direct detection of α -amylase in human body fluids[J]. Analytical Chemistry, 2018, 90(22): 13775-13782.
- [50] GOMES AJ, LUNARDI CN, ROCHA FS, PATIENCE GS. Experimental methods in chemical engineering: fluorescence emission spectroscopy[J]. The Canadian Journal of Chemical Engineering, 2019, 97(8): 2168-2175.
- [51] PAPOUTSIS K, ZHANG JY, BOWYER MC, BRUNTON N, GIBNEY ER, LYNG J. Fruit, vegetables, and mushrooms for the preparation of extracts with α -amylase and α -glucosidase inhibition properties: a review[J]. Food Chemistry, 2021, 338: 128119.
- [52] HODEK O, KRÍŽEK T, COUFAL P, RYŠLAVÁ H. Online screening of α -amylase inhibitors by capillary electrophoresis[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2018, 410(17): 4213-4218.
- [53] LIU MX, DONG J, LIN ZT, NIU YY, ZHANG XT, JIANG HX, GUO N, LI W, WANG H, CHEN SZ. Rapid screening of transferrin-binders in the flowers of *Bauhinia blakeana* Dunn by on-line high-performance liquid chromatography-diode-array detector-electrospray ionization-ion-trap-time-of-flight-mass spectrometry-transferrin-fluorescence detection system[J]. Journal of Chromatography A, 2016, 1450: 17-28.
- [54] NAN XK, JIA WJ, ZHANG YK, WANG H, LIN ZT, CHEN SZ. An on-line detection system for screening small molecule inhibitors of α -amylase and α -glucosidase in *Prunus mume*[J]. Journal of Chromatography A, 2022, 1663: 462754.
- [55] LEHOCZKI G, KANDRA L, GYÉMÁNT G. The use of starch azure for measurement of alpha-amylase activity[J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 183: 263-266.
- [56] LEHOCZKI G, SZABÓ K, TAKÁCS I, KANDRA L, GYÉMÁNT G. Simple ITC method for activity and inhibition studies on human salivary α -amylase[J]. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2016, 31(6): 1648-1653.
- [57] GARCIA PT, GUIMARÃES LN, DIAS AA, ULHOA CJ, COLTRO WKT. Amperometric detection of salivary α -amylase on screen-printed carbon electrodes as a simple and inexpensive alternative for point-of-care testing[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2018, 258: 342-348.
- [58] MANDAL N, BHATTACHARJEE M, CHATTOPADHYAY A, BANDYOPADHYAY D. Point-of-care-testing of α -amylase activity in human blood serum[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2019, 124/125: 75-81.
- [59] BHATTACHARJEE M, MIDDYA S, ESCOBEDO P, CHAUDHURI J, BANDYOPADHYAY D, DAHIYA R. Microdroplet based disposable sensor patch for detection of α -amylase in human blood serum[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2020, 165: 112333.
- [60] SUN M, MA B, YUAN S, XIN LF, ZHAO C, LIU H. Mercury thermometer-inspired test strip for concentration cell-based potentiometric detection of salivary α -amylase[J]. Analytica Chimica Acta, 2022, 1206: 339770.
- [61] della VENTURA B, SAKAČ N, FUNARI R, VELOTTA R. Flexible immunosensor for the detection of salivary α -amylase in body fluids[J]. Talanta, 2017, 174: 52-58.
- [62] ZHAO M, LUO LM, GUO YX, ZHAO BL, CHEN XF, SHI XG, KHAN M, LIN JM, HU QZ. Viscosity-based flow sensor on paper for quantitative and label-free detection of α -amylase and its inhibitor[J]. ACS Sensors, 2022, 7(2): 593-600.

(本文责编 郝丽芳)