

瓠瓜膜蛋白酶抑制剂的提取

马 勇, 王国洋, 张丽娜

(渤海大学化学化工与食品安全学院, 辽宁锦州 121000)

摘要: 采用水提法从瓠瓜中提取胰蛋白酶抑制剂, 以瓠瓜提取液对胰蛋白酶的抑制率为指标, 研究了提取温度、液料比、提取时间、pH 四个主要影响因素, 优化选出最佳提取方案。从瓠瓜中提取胰蛋白酶抑制剂的最佳条件为: 温度 70℃、pH = 8、液料比 4:1 (mL/g)、提取时间 1h。

关键词: 瓠瓜, 胰蛋白酶抑制剂, 提取

Extraction of trypsin inhibitor in gourd

MA Yong, WANG Guo-yang, ZHANG Li-na

(College of Biotech and Food Science, Bohai University, Jinzhou 121000, China)

Abstract: The trypsin inhibitor in gourd was obtained by a water-extracting method. The extraction temperature, liquid/material ratio, extraction time and pH value were considered as four important factors to determine the optimal extraction factors, with the inhibition of gourd extracts on trypsin as the reference. The optimal extraction conditions were proved to be with liquid/material ratio (mL/g) 4:1, extraction time 1 hour at 70℃ and pH = 8.

Key words: gourd; trypsin inhibitor; extraction

中图分类号: TS201.2⁺5

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2011)11-0299-03

胰蛋白酶抑制剂 (trypsin inhibitor, TI) 是一种重要的生化药物和生化试剂, 广泛存在于动、植物和微生物中, 泛指具有胰蛋白酶抑制作用的多肽或蛋白质, 能与相应的蛋白水解酶形成一定的动态平衡, 调节生物体内许多重要的生命活动^[1-2]。根据其来源不同可分为多种, 如从牛肺或牛胰中提取的抑肽酶 (aprotinin)、从人尿中提取的人尿胰蛋白酶抑制剂 (urinary trypsin inhibitor, UTI)、从大豆中提取的大豆胰蛋白酶抑制剂 (soybean trypsin inhibitor, SBTI) 等。食物中的植物胰蛋白酶抑制剂如果没有被除去或抑制, 它在体内能与小肠液中胰蛋白酶、糜蛋白酶结合, 生成无活性复合物, 消耗和降解胰蛋白酶, 导致肠道对蛋白质消化、吸收及利用能力下降, 导致胰腺肿大和体内氨基酸代谢失调等疾病。但也有报导大豆中微量胰蛋白酶抑制剂对于糖尿病治疗、调节胰岛素失调有一定效果^[3-4]。瓠瓜为葫芦科葫芦属植物瓠瓜的果实, 具有清热利水、止渴、解毒功效, 适应于治疗水肿腹胀、烦热口渴、肺炎、肠炎、糖尿病等症。瓠瓜含有蛋白质及多种微量元素, 有助于增强机体免疫功能。同时, 瓠瓜中含有丰富的维生素 C, 能促进抗体的合成, 提高机体抗病毒能力。瓠瓜中存在胰蛋白酶抑制剂, 对胰蛋白酶有抑制作用, 从而具有降血糖的效果。本实验通过单因素实验和正交实验确定胰蛋白酶抑制剂活性成分的最佳提取条件。对瓠瓜蛋白酶抑制剂的深入研究和

应用具有推动作用。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

胰蛋白酶 北京奥博星生物技术责任有限公司; BAPNA sigma; 二甲亚砜 国药集团化学试剂有限公司; 3-羟甲基-氨基甲烷、无水氯化钙、盐酸、三氯乙酸、氢氧化钠 国产分析纯; 新鲜瓠瓜 锦州闾山产。

UV-1900 双光束紫外分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司; RE52-86A 旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; PB-10 酸度计 北京赛多利斯仪器系统有限公司; HH-501 超级恒温水浴 金坛市科析仪器有限公司; FA2004 电子分析天平 上海恒平科学仪器有限公司; TD5A-WS 型离心机 长沙湘仪离心机仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 测定方法 以瓠瓜提取液对胰蛋白酶的抑制率为指标, 研究瓠瓜中胰蛋白酶抑制剂的最佳提取条件。瓠瓜中胰蛋白酶抑制剂对胰蛋白酶的抑制率测定^[5], 采用 BAPNA 法。取 1mL 样品提取液, 加 1mL 蒸馏水, 加入 5mL BAPNA 溶液, 于 37℃ 恒温 10min 后, 立即加入 1mL 30% 三氯乙酸终止反应, 在 410nm 波长处测定吸光度^[6]。从而计算出抑制率。抑制率公式:

$$\eta(\%) = \frac{A_0 - (A_1 - A_b)}{A_0} \times 100\%$$

式中: η - 样品提取液对胰蛋白酶的抑制率; A_0 - 胰蛋白酶溶液的吸光度; A_1 - 样品溶液的吸光度; A_b - 样品溶液对照空白的吸光度。

收稿日期: 2010-12-06

作者简介: 马勇 (1960-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品检验与食品开发。

1.2.2 提取工艺 瓠瓜经去皮捣碎后,得到瓠瓜样品,取20g处理后的瓠瓜样品,按一定的液料比,加入蒸馏水,在一定的温度下提取一段时间后,对提取液进行抽滤,减压浓缩到一定体积($\leq 50^{\circ}\text{C}$),3500r/min离心15min,定容至刻度,即得样品待测液,按1.2.1的方法进行测定。

2 结果与讨论

2.1 单因素实验

2.1.1 温度对抑制率的影响 取20g样品加150mL蒸馏水,调节pH=7,分别在50、60、70、80、90、100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中提取1h,抽滤,减压浓缩($\leq 50^{\circ}\text{C}$)到20mL,离心,测定抑制率。

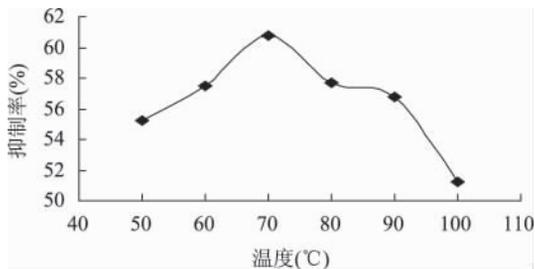


图1 温度对抑制率的影响

由图1结果可以看出,随着温度的升高,抑制率有增大的趋势,当温度达到70 $^{\circ}\text{C}$ 时抑制率最大;之后,温度继续升高,抑制率则有所下降。这可能是由于温度过高影响了瓠瓜胰蛋白酶抑制剂的活性。因此,提取温度在70 $^{\circ}\text{C}$ 左右为宜。

2.1.2 pH对抑制率的影响 取20g样品加150mL蒸馏水,分别调pH为3、5、7、9和11,在70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中提取1h,抽滤,减压浓缩($\leq 50^{\circ}\text{C}$)到20mL,离心,测定抑制率。

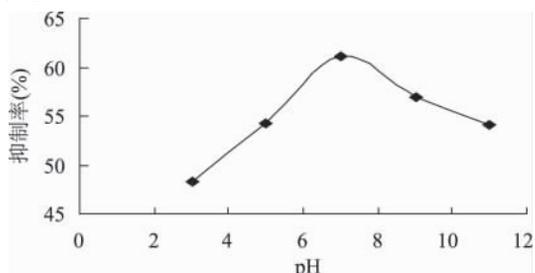


图2 pH对抑制率的影响

由图2结果可以看出,在pH小于7时,随pH的增大抑制率逐渐增大;在pH达到7后随pH的增大,抑制率开始降低。说明在中性条件下瓠瓜胰蛋白酶抑制剂抑制效果最好。

2.1.3 液料比对抑制率的影响 取20g样品分别加40、80、120、160、200mL蒸馏水,调节pH=7,在70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中提取1h,抽滤,减压浓缩($\leq 50^{\circ}\text{C}$)到20mL,离心,测定抑制率。

由图3结果可以看出,随着液料比的增大,抑制率增大,在液料比达到6:1后,抑制率不再增大。说明瓠瓜胰蛋白酶抑制剂已经充分溶解到水溶液中。

2.1.4 提取时间对抑制率的影响 取20g样品加120mL蒸馏水,调节pH=7,在70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中分别提取0.5、1、2、3、4h,抽滤,减压浓缩($\leq 50^{\circ}\text{C}$)到20mL,离心,测定抑制率。

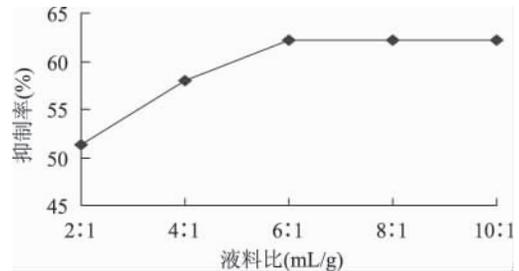


图3 液料比对抑制率的影响

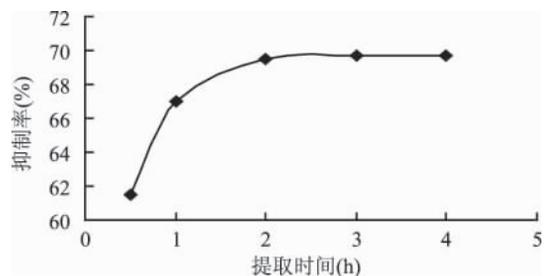


图4 提取时间对抑制率的影响

由图4结果可以看出,随着提取时间的延长,抑制率不断增大,提取1h后抑制率变化幅度减小,提取2h后抑制率不再增大。说明2h可以将瓠瓜胰蛋白酶抑制剂基本提取完全。考虑到实验条件及成本等问题,采取的提取时间为1h。

2.2 正交实验

在单因素实验的基础上,选用 $L_9(3^3)$ 正交实验进行优化,以此确定瓠瓜胰蛋白酶抑制剂的最佳提取条件,见表2(正交因素水平见表1)。

表1 正交因素水平

水平	因素		
	A 温度($^{\circ}\text{C}$)	B pH	C 液料比(mL/g)
1	65	6	4:1
2	70	7	5:1
3	75	8	6:1

表2 正交实验方案及结果

实验号	A	B	C	抑制率(%)
1	1	1	1	59.85
2	1	2	2	64.59
3	1	3	3	70.63
4	2	1	3	58.48
5	2	2	1	64.12
6	2	3	2	74.04
7	3	1	2	52.53
8	3	2	3	68.28
9	3	3	1	74.58
K_1	195.07	170.86	198.55	
K_2	196.64	196.99	191.16	
K_3	195.39	219.25	197.39	
k_1	65.023	56.953	66.183	
k_2	65.546	65.663	63.72	
k_3	65.13	73.083	65.796	
R	0.523	16.13	2.46	

分析结果表明:三种考察因素对胰蛋白酶抑制剂抑制率的影响顺序为 $B > C > A$,即pH对实验结果影响最大,液料比的影响次之,提取温度的影响稍小。由K值可以得出影响因素最佳组合为(下转第304页)

另外,本研究所用的神经网络系统目前只能以单一输出值(肽比例或感官值)为目标进行优化,虽然以肽比例为目标输出值优化得到的工艺条件,与以感官值时酶解液为目标输出值优化得到的工艺条件有一定差异,但是验证实验结果均符合其相应目标值的精确度要求($\pm 5\%$)。但是在实际应用中,我们期望得到的牡蛎酶解液不仅有高比例的肽,还要具有良好的鲜味感官值。因此在上述验证实验中,除了验证神经网络拟定的相应目标值外,还对酶解液的另一个指标(感官值或肽比例)进行了分析。分析结果显示,以肽比例为目标输出值的优化工艺条件获得的酶解液的感官值为6.07分,此结果表明,该酶解液除了含高比例肽(78.35%)外,还具有良好的鲜味。与正交优化工艺获得的酶解液相比(酶解液的肽比例和感官值分别为75.37%和5.51分,见表2)神经网络优化工艺得到的酶解液中的肽比例和感官值分别高出4%和10.2%。该结果表明,以肽比例输出值为神经网络优化目标可以获得理想的呈味肽牡蛎酶解液,因此该神经网络模型可以应用于牡蛎呈味肽酶解工艺条件的优化。另一方面,以感官值为目标输出值的优化工艺条件获得的酶解液虽然具有较高的感官值,但是其肽比例仅为51.8%,与期望值有较大差距。由此可见,以感官值输出值为神经网络优化目标不易获得理想的优化工艺条件。从总体上来看,虽然以肽比例为目标输出值可以有效地优化出酶解工艺条件,但是从实际应用上来看,如果能以肽比例和感官值这两个指标同时作为目标输出值优化酶解工艺条件,那么所建立神经网络模型将更为科学,更具广阔的实用性。

参考文献

[1] 从爽.面向 MATLAB 工具箱的神经网络理论与应用[M].

(上接第300页)

$A_2B_3C_1$ 即提取温度为 70°C , pH 为 8, 液料体积比为 4:1。当提取时间为 1h 时, $A_2B_3C_1$ 组合的抑制率为 76.45%。

3 结论

3.1 从瓠瓜中提取胰蛋白酶抑制剂的最佳条件为:温度为 70°C , pH 为 8, 液料比为 4:1, 提取时间 1h。

3.2 瓠瓜中的胰蛋白酶抑制剂比较耐高温,在 70°C 后抑制率开始下降,但仍具有较高的抑制率,在 100°C 时仍有活性,具有较好的热稳定性^[7-9]。

参考文献

[1] 曾仲奎, 谢文胜, 鲍锦库, 等. 水稻巯基蛋白酶抑制剂的分离纯化及其性质研究[J]. 生物化学杂志, 1996, 12(6): 703-708.

[2] Maya j et al. Complete amino acid sequences of two inhibitors from buckwheat seed [J]. Phytochemistry, 1997, 43: 327-331.

[3] Kennedy Ann R. The Evidence for Soybean Products as

合肥: 中国科学技术大学出版社, 2003: 3-4.

[2] Torrecilla J S, Otero L, Sanz P D. A neural network approach for thermal/pressure food processing [J]. Journal of Food Engineering, 2004, 62(1): 89-95.

[3] Adam Bucinski, Magdalena Karamac, Ryszard Amarowicz. Modeling the tryptic hydrolysis of pea proteins using an artificial neural network [J]. LWT-Food Science and Technology, 2008, 41(5): 942-945.

[4] Du C J, Sun D W. Learning techniques used in computer vision for food quality evaluation: A review [J]. Journal of Food Engineering, 2006, 72(1): 39-55.

[5] Geeraerd A H, Herremans C H, Ludikhuyze L R. Evaluation of model parameter accuracy by using joint confidence regions: Application to low complexity neural networks to describe enzyme inactivation [J]. Mathematics and Computers in Simulation, 1998, 48(1): 53-64.

[6] Chen C R, Ramaswamy H S. Modeling and optimization of variable retort temperature (VRT) thermal processing using coupled neural networks and genetic algorithms [J]. Journal of Food Engineering, 2002, 53(3): 209-220.

[7] 邵伟, 耿颖丽, 宋丽燕. 酵母呈味核苷酸酶法提取工艺的神经网络分析[J]. 中国酿造, 2009(5): 59-61.

[8] 舒服华, 肖伯慈. 基于遗传神经网络的水解米渣制备小肽工艺优化[J]. 饲料广角, 2007(12): 32-36.

[9] 李琳, 赵谋明. 鳕鱼蛋白酶解液清除自由基的研究[J]. 水产科学, 2005, 24(10): 80-85.

[10] 宁正祥. 食品成分分析手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998: 72-74.

[11] 任国谱, 李忠海, 彭美纯, 等. 奶粉中低聚肽质量浓度测定方法[J]. 中国乳品工业, 2007, 35(10): 47-50.

[12] 刘亚秀. 人工神经网络在肽的定量构效关系研究中的应用[J]. 科技资讯, 2006, 28: 12-13.

Cancer Preventive Agents [J]. The Journal of Nutrition, 1995, 125: 733-743.

[4] Messina M, Ende JW. The role of soy in preventing and treating chronic disease [J]. The Journal of Nutrition, 1995, 125: 567-569.

[5] 杜旭东, 刘同祥, 张宗申, 等. 超声波法提取大黄胰蛋白酶抑制剂[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(3): 525-527.

[6] 燕方龙, 华蕾. 大豆制品中胰蛋白酶抑制剂的抑制活性测定[J]. 理化检验-化学分册, 2007, 43(3): 226-228.

[7] 范汉东, 郭建军, 杨一兵, 等. 掌叶半夏胰蛋白酶抑制剂的分离纯化及其性质[J]. 武汉大学学报, 2010, 56(5): 586.

[8] 邓乐, 熊志冬, 李鹏高, 等. 甘薯可溶性蛋白 sporamin 胰蛋白酶抑制剂活性的两种测定方法比较及温度对其活性的影响[J]. 食品科技, 2009, 34(8): 255-256.

[9] 田欣, 李晨, 李玉英, 等. 野生型和突变型荞麦蛋白酶抑制剂的活性比较及抗肿瘤功能分析[J]. 生物化学与生物物理进展, 2010, 37(6): 656.