

复合酶提取石榴幼果总黄酮工艺优化 及其抑制 α -葡萄糖苷酶活性

王占一¹, 廖成斌¹, 公金艳¹, 张卓¹, 汤锐睿¹, 戴博²
(1. 枣庄学院食品科学与制药工程学院, 山东枣庄 277160;
2. 空军总医院药学部, 北京 100142)

摘要: 优化复合酶(纤维素酶-果胶酶-木瓜蛋白酶)提取石榴幼果总黄酮的工艺, 并测定其抑制 α -葡萄糖苷酶活性。以总黄酮得率为评价指标, 在单因素实验基础上, D-最优混料设计优化复合酶配比, 正交试验设计对料液比、介质 pH、酶解温度、酶解时间进行优化, 并以 PNPG 为底物测定总黄酮对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性。结果显示: 复合酶最优配比为: 纤维素酶 44.2%、果胶酶 31.6%、木瓜蛋白酶 24.2%, 最佳提取条件为: 料液比 1: 18 (g/mL)、介质 pH 5.0、酶解温度 50 °C、酶解时间 4.0 h, 总黄酮得率为 3.38%, 其浓度为 1.5 mg/mL 时, 对 α -葡萄糖苷酶抑制率达到 63.9%, 抑制作用的 IC₅₀ 为 1.059 mg/mL, 在浓度 0.15~1.5 mg/mL 范围内, 石榴幼果总黄酮浓度与其对 α -葡萄糖苷酶抑制效果之间呈现一定的正相关关系, 其抑制机理属于可逆性抑制和非竞争性抑制。该方法可为石榴幼果总黄酮的提取和应用提供一定的科学依据。

关键词: 石榴幼果, 总黄酮, 复合酶法, D-最优混料设计, 抑制 α -葡萄糖苷酶活性

Complex Enzymatic Extraction of Total Flavonoids from Pomegranate Fruitlets and Their Anti- α -Glucosidase Activity

WANG Zhan-yi¹, LIAO Cheng-bin¹, GONG Jin-yan¹, ZHANG Zhuo¹, TANG Rui-rui¹, DAI Bo²

(1. College of Food Science and Pharmaceutical Engineering, Zaozhuang University, Zaozhuang 277160, China;
2. Department of Pharmacy, Air Force General Hospital, PLA, Beijing 100142, China)

Abstract: To optimize the complex enzymatic (cellulose-pectinase-papain) extraction of total flavonoids from pomegranate fruitlets and to determine its anti- α -glucosidase activity. with the yield of total flavonoids as an evaluation index, D-optimal mixture design was applied to optimize the complex enzymatio, and orthogonal experimental design was adopted in the optimization of solid/liquid ratio, medium pH, enzymatic hydrolysis temperature and enzymatic hydrolysis time based on the single factor test, then the anti- α -glucosidase activity was determined with PNPG as substrate. The results showed that optimal ratio of enzyme was determined to be 44.2% for cellulose, 31.6% for pectinase and 24.2% for papain, to obtain a 3.38% of total flavonoids yield, the optimal conditions were determined to be 1: 18 (g/mL) for solid/liquid ratio, 5.0 for medium pH, 50 °C for enzymatic hydrolysis temperature and 4.0 h for enzymatic hydrolysis time, the substrate inhibition rate reached 63.9% on α -glucosidase and the inhibitory effect of IC₅₀ was 1.059 mg/mL at the centration was 1.5 mg/mL. There was a dose-response relationship between the total flavonoids and anti-a-glucosidase activity in the range of 0.15~1.5 mg/mL of concentration, the inhibition mechanism was reversible inhibition and non competitive inhibition. This method can provide ascientific basis for the extraction and application of total flavonoids from pomegranate fruitlets.

Key words: pomegranate fruitlet; total flavonoids; complex enzymatic extraction method; D-optimal mixture design; anti-a-glucosidase activity

中图分类号: TS255.1 文献标识码: B 文章编号: 1002-0306(2019)09-0178-07

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2019.09.031

引文格式: 王占一, 廖成斌, 公金艳, 等. 复合酶提取石榴幼果总黄酮工艺优化及其抑制 α -葡萄糖苷酶活性[J]. 食品工业科技, 2019, 40(9): 178-183, 188.

石榴(*Punica granatum* L.)是石榴科石榴属多年生木本植物, 全球各地区均有广泛分布^[1]。石榴作为

收稿日期: 2018-09-13

作者简介: 王占一(1980-), 男, 硕士, 副教授, 主要从事天然药物活性成分提取与分离方面的研究, E-mail: zhiyiwang@126.com。

基金项目: 2015 年度国家星火计划项目(2015GA740027); 山东省自然科学基金(ZR2018LH020); 山东省重点研发计划项目(2016GSF202010); 山东省高等学校科技计划项目(J18KA305)。

一种常见的果树,结果率高,尤其在成年树上,结果过多,养分供不应求,不仅影响果实的正常发育,形成许多小果、次果,还会削弱树势,易受冻害和感染病害,并使翌年减产造成小年。因此,除了由于果树本身的调节能力,使发育不良的花和幼果自然脱落外,还需摘除多余的花或幼果,才能满足生产上的要求^[2]。疏果下树的“石榴幼果”经常作为废物被丢弃,造成资源浪费。近年来,大量研究证明黄酮类成分广泛存在于植物幼果中,而且含量极其丰富,例如椴柑幼果^[3]、桑葚幼果^[4]、蜜棣幼果^[5]等。而石榴幼果中是否含有黄酮类成分,国内外鲜有文献报道。高文秀等^[6-7]研究发现,采用复合酶法提取植物中黄酮类成分,具有提取效率高、条件温和、操作简单、环境友好等诸多优点。但是,有关复合酶法提取石榴幼果中黄酮类成分领域的研究,国内还未见文献报道。

近年来,随着世界人口老龄化,糖尿病逐渐成为一种严重影响人类健康的常见病、多发病。因而,积极寻找糖尿病治疗药物早已成为该领域的研究热点^[8-9]。在临床上, α -葡萄糖苷酶活性抑制剂发挥着重要作用,一直作为一线药物来应用,防止餐后高血糖的发生。植物中黄酮类成分具有显著抑制 α -葡萄糖苷酶活性,国内学者在这方面的研究较多,例如陈浙江等^[10]对41味中药进行体外抑制 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶活性研究,马锦锦等^[11]考察了葛根异黄酮类化合物对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用及构效关系,均取得了较好的阳性结果。因此,本研究以鲁南地区产石榴幼果为试验材料,纤维素酶、果胶酶和木瓜蛋白酶作为复合酶组成,通过D-最优混料设计中的单纯形质心设计结合正交试验法,优化复合酶提取石榴幼果总黄酮的最佳工艺条件,并对提取产物进行抑制 α -葡萄糖苷酶活性的初步研究,为石榴资源的进一步开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

石榴幼果 采自鲁南地区峄城“万亩石榴园”核心产区,经枣庄学院李思健副教授鉴定为正品石榴科石榴(*Punica granatum* L.)的幼果,石榴幼果材料在50℃条件下干燥72h,粉碎,过24目筛,备用;芦丁对照品(含量>98%,批号:100080-201602)、阿卡波糖对照品(含量>99%,批号:100808-201203) 中国食品药品检定研究院;纤维素酶(酶活 ≥ 20000 U/g)、果胶酶(酶活 ≥ 50000 U/g)、木瓜蛋白酶(酶活 ≥ 200000 U/g) 国药集团化学试剂有限公司; α -葡萄糖苷酶(酶活约为25000 U/g) 西安沃尔森生物技术有限公司;D101大孔吸附树脂 上海源叶生物科技有限公司;4-硝基苯-a-D-吡喃葡萄糖苷(PNPG)、对硝基苯酚(PNP)、无水乙醇、硝酸铝、氢氧化钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、碳酸钠等 天津市大茂化学试剂厂;蒸馏水 枣庄学院生物学省级实验教学示范中心提供。

SYNERGYH1型全功能酶标仪 美国柏腾仪器有限公司;759型紫外-可见分光光度计 上海奥谱

勒仪器有限公司;BP211DAG电子天平 德国Satorius公司;FW135型多功能粉碎机 天津泰斯特仪器有限公司;HH-4型数显恒温水浴锅 巩义予华仪器有限责任公司;RE-2000A型旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂;SHB-B95A型循环水式多用真空泵 郑州长城科工贸有限公司;PHS-3C型数显酸度计 杭州奥龙仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 石榴幼果中总黄酮的提取和纯化方法 精密称取石榴幼果粉末5.0g,置于250mL干燥锥形瓶中,按照试验设计,加入一定配比的复合酶(纤维素酶-果胶酶-木瓜蛋白酶)至一定的加酶量,再加入一定pH的磷酸盐缓冲液至一定的料液比例,用保鲜膜封住瓶口。于一定温度的水浴锅中,不停搅拌,酶解反应至一定的时间。反应结束后,立即在沸水中灭酶10min,抽滤,滤液定容至100mL(如果滤液超过100mL,用旋转蒸发器减压浓缩至90mL,再定容)。取滤液适量用D-101大孔吸附树脂静态吸附,75%乙醇洗脱后,用0.45 μ m微孔滤膜过滤,减压蒸干后得到石榴幼果总黄酮固形物,称重,备用。

1.2.2 单因素实验 单因素实验中,复合酶选用等比例混合酶(纤维素酶-果胶酶-木瓜蛋白酶=1:1:1)^[6-7],其他固定不变的条件为:加酶量为3.0%(质量分数)、料液比1:15、介质pH4.5、酶解温度50℃、酶解时间4.0h。考察加酶量(1.0%、2.0%、3.0%、4.0%、5.0%)、料液比(1:9、1:12、1:15、1:18、1:21 g/mL)、介质pH(3.5、4.0、4.5、5.0、5.5)、酶解温度(30、40、50、60、70℃)和酶解时间(2.0、3.0、4.0、5.0、6.0h)对石榴幼果总黄酮提取效果的影响。

1.2.3 D-最优混料设计优化复合酶配比 在单因素实验基础上,采用D-混料设计中的单纯型质心设计^[12-13],优化3种酶(纤维素酶-果胶酶-木瓜蛋白酶)的最佳比例。D-最优混料设计试验中,设定加酶量3.0%、料液比1:15、介质pH4.5、酶解温度50℃,酶解时间4.0h。

1.2.4 正交试验设计优化 分析D-最优混料试验设计结果,结合单因素实验结果,以料液比(A)、介质pH(B)、酶解温度(C)和酶解时间(D)作为自变量,进行正交试验设计,优化复合酶提取石榴幼果总黄酮的最佳提取工艺条件^[14-15]。正交试验设计中,设定复合酶组成为D-最优混料设计试验结果所得到的数值,加酶量为3.0%。正交试验因素水平见表1。

表1 正交试验设计因素水平表

Table 1 Vairbles and levels of orthogonal experimental design

水平	因素			
	A 料液比 (g/mL)	B 介质 pH	C 酶解温度 (℃)	D 酶解时间 (h)
1	1:12	4.0	40	3.0
2	1:15	4.5	50	4.0
3	1:18	5.0	60	5.0

1.2.5 黄酮含量的测定 标准曲线的制定:参照文献^[16]的方法,略有改动。精密称取芦丁对照品

10.0 mg,用75%乙醇溶解并定容至50 mL容量瓶中,即得200 $\mu\text{g/mL}$ 的芦丁对照品溶液。依次稀释成100、50、25、12.5、6.25、0 $\mu\text{g/mL}$,加入5% NaNO_2 、10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 和4% NaOH 溶液,静置20 min,在510 nm波长处测定吸光度,以吸光度(A)对浓度(C)绘制标准曲线,得回归方程 $A = 0.008C - 0.0017$ ($r = 0.9995$),在0~200 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好。

准确称取精制后的石榴幼果总黄酮5.0 mg,用75%乙醇定容至25 mL,作为样品溶液,测定A值,计算样品中总黄酮得率及纯度。

$$\text{得率}(\%) = \frac{\text{样品中总黄酮含量}}{\text{石榴幼果重量}} \times 100 \quad \text{式(1)}$$

$$\text{纯度}(\%) = \frac{\text{样品中总黄酮含量}}{\text{石榴幼果总黄酮固形物重量}} \times 100 \quad \text{式(2)}$$

1.2.6 石榴幼果总黄酮抑制 α -葡萄糖苷酶活性

1.2.6.1 PNP(P-Nitrophenol,对硝基酚)标准曲线的绘制 参考文献[17]试验方法,略有改动。用PBS缓冲液(pH6.8)配制PNP母液,并依次稀释成2.4、1.2、0.6、0.3、0.15、0 mmol/L浓度梯度的标准溶液。取上述标准溶液各1.0 mL,加入1 mol/L的 Na_2CO_3 溶液1.0 mL,混匀后静置1 min,用酶标仪在405 nm波长下测定吸光度。以吸光度(A)对浓度(C)绘制标准曲线。求得回归方程为: $A = 0.3426C - 0.0015$ ($r = 0.9994$, $n = 6$),线性范围为:0~1.2 mmol/L。

1.2.6.2 抑制率的测定 参考文献[18]试验方法,略有改动。在96孔板中加样,将试验分成5组($n = 3$):样品组:依次加入160 μL PBS缓冲液(pH6.8),20 μL α -葡萄糖苷酶溶液(6 U/mL)和20 μL 样品溶液,37 $^\circ\text{C}$ 恒温15 min,加入40 μL PNP(P-Nitrophenyl- α -D-glucopyranoside,4-硝基苯- α -D-吡喃葡萄糖苷)溶液(4.8 mmol/L),37 $^\circ\text{C}$ 恒温30 min,加入80 μL Na_2CO_3 溶液(1.5 mol/L)中止反应,在405 nm波长下,应用酶标仪测定吸光度。样品空白组:以PBS缓冲液代替酶液,其它试剂同样品组。阴性对照组:以PBS缓冲液代替样品溶液,其它试剂同样品组。空白组:以PBS缓冲液代替酶液和样品溶液,其它试剂同样品组。阿卡波糖组:以与样品溶液相同浓度梯度的阿卡波糖代替样品溶液,其它试剂同样品组。根据公式(3)计算石榴幼果总黄酮对 α -葡萄糖苷酶的抑制率,并计算抑制剂对底物的 IC_{50} 值。

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{(A_3 - A_4) - (A_1 - A_2)}{(A_3 - A_4)} \times 100 \quad \text{式(3)}$$

式中: A_1 、 A_2 、 A_3 和 A_4 分别为样品组、样品空白组、阴性对照组和空白组的吸光度。

1.2.6.3 酶抑制动力学分析 大量预实验得知,反应体系 α -葡萄糖苷酶反应初速率维持时间 ≥ 32 min。固定样品溶液浓度(1.50 mg/mL)和底物PNPG浓度(4.8 mmol/L), α -葡萄糖苷酶浓度依次设定为2、4、6、8、10 U/mL,分为2组进行试验,一组加入石榴幼果总黄酮5 mL,另一组以PBS溶液代替石榴幼果总黄酮,作为阴性对照,分别测定两组反应初速率

(V)^[19-21]。以加入反应体系前的 α -葡萄糖苷酶浓度为横坐标,初速率为纵坐标作图,确定石榴幼果总黄酮对 α -葡萄糖苷酶的抑制是否属于可逆性抑制类型。

分别以浓度递增的PNPG(1.6、3.2、4.8、6.4、8.0 mmol/L)为底物,加入不同浓度(0.3、0.6、0.9、1.2、1.5 mg/mL)的石榴幼果总黄酮,分别测定其在25 min时的吸光度。以加入反应体系前底物PNPG浓度的倒数($1/[S]$)为横坐标,反应速率的倒数($1/V$)为纵坐标作图,确定石榴幼果总黄酮对 α -葡萄糖苷酶抑制反应的类型^[19]。

1.3 数据分析

D-最优混料设计采用Design-Expert 8.0.5 统计分析软件,图形制作采用Excel和OriginPro 8.0 数据处理软件($n = 3$)。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

2.1.1 加酶量 由图1可知,加酶量在1.0%~3.0%范围内,随着加酶量的增大,石榴幼果总黄酮得率逐渐提高。当加酶量超过3.0%后,继续增大加酶量,总黄酮得率不再发生明显变化,考虑生产成本问题,确定加酶量为3.0%左右。

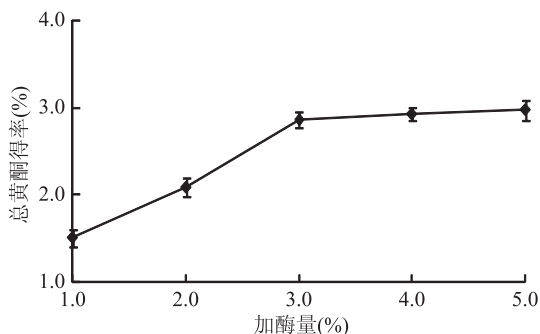


图1 加酶量对石榴幼果总黄酮得率的影响

Fig.1 Effect of enzyme dosage on the yield of total flavonoids

2.1.2 料液比 由图2可知,料液比1:15左右,石榴幼果总黄酮得率最高,继续增大料液比,总黄酮得率反而略有降低,原因是溶剂量过大,在后续处理中,有效成分会有损失,因此,确定料液比为1:15左右。

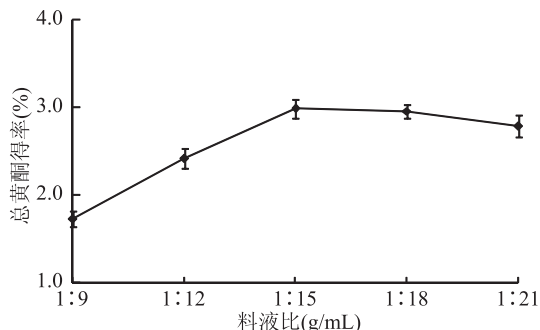


图2 料液比对石榴幼果总黄酮得率的影响

Fig.2 Effect of solid/liquid ratio on the yield of total flavonoids

2.1.3 介质pH 由图3可知,随着介质pH的升高,

石榴幼果总黄酮得率逐渐提高,当介质 pH 为 4.5 时,总黄酮得率达到最大值。介质 pH 超过 4.5 后,总黄酮得率呈下降趋势。原因是复合酶只有在最佳 pH 条件下,才能发挥最佳效应,因此确定介质 pH4.5 左右。

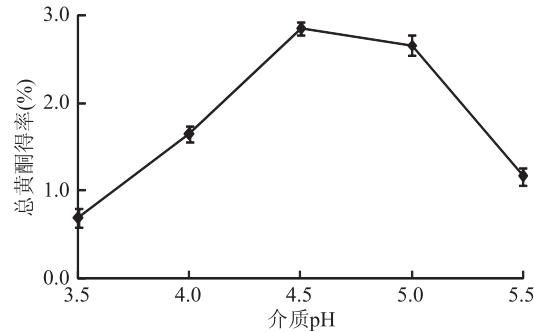


图3 介质 pH 对石榴幼果总黄酮得率的影响
Fig.3 Effect of medium pH on the yield of total flavonoids

2.1.4 酶解温度 由图 4 可知,酶解温度为 50 ℃ 时,总黄酮得率达到最大值。低于或者高于 50 ℃,总黄酮得率相对较低。原因是复合酶只有在最佳酶解温度下,才能发挥最佳效应,因此酶解温度应控制在 50 ℃ 左右。

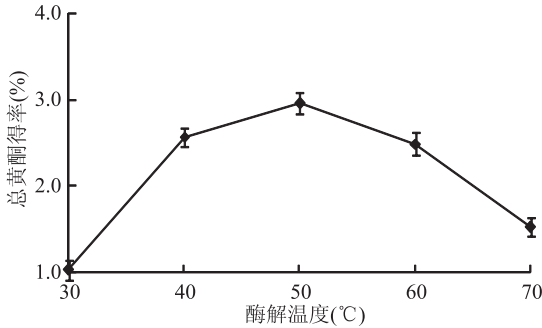


图4 酶解温度对石榴幼果总黄酮得率的影响
Fig.4 Effect of enzyme hydrolysis temperature on the yield of total flavonoids

2.1.5 酶解时间 由图 5 可知,酶解时间在 2.0~4.0 h 之间时,随着酶解时间的延长,石榴幼果总黄酮得率不断提高,超过 4.0 h 后,继续延长酶解时间,总黄酮得率升高趋势不明显,考虑到实际生产问题,控制酶解时间为 4.0 h 左右。

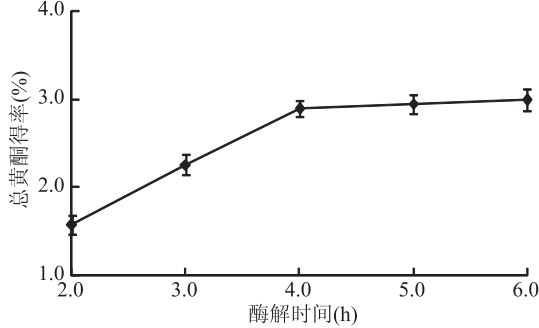


图5 酶解时间对石榴幼果总黄酮得率的影响
Fig.5 Effect of enzyme hydrolysis time on the yield of total flavonoids

2.2 D-最优混料设计

采用 Design- Expert 8.0.5 软件给定的试验方案安排实验,优化复合酶中纤维素酶(X_1)、果胶酶(X_2)和木瓜蛋白酶(X_3)的最优配比,以石榴幼果总黄酮得率(Y)作为预测响应值,每个试验号平行试验 3 次,取平均值作为试验结果,试验方案及结果见表 2,因素方差分析结果见表 3。

表2 D-最优混料设计方案与试验结果
Table 2 Arrangement and corresponding results of D-optimal mixture design

试验号	X_1	X_2	X_3	Y (%)
1	0	0	1	1.68
2	1	0	0	2.21
3	0	1	0	1.95
4	1/3	1/3	1/3	3.08
5	1/2	0	1/2	2.74
6	2/3	1/6	1/6	3.01
7	1/2	1/2	0	2.82
8	0	1/2	1/2	2.02
9	1/2	1/2	0	3.05
10	0	0	1	1.97
11	1/6	2/3	1/6	2.93
12	1	0	0	2.32
13	0	1	0	1.99
14	1/6	1/6	2/3	2.65

表3 D-最优混料设计方差分析结果
Table 3 Results of variance analysis for D-optimal mixture design

来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值
模型	2.97	5	0.60	26.08	0.0002
线性混合	0.60	2	0.30	15.66	0.0026
X_1X_2	0.92	1	0.92	48.17	0.0002
X_1X_3	0.39	1	0.39	20.35	0.0028
X_2X_3	0.023	1	0.023	1.19	0.3115
残差	0.028	8	0.0035		
失拟项	0.058	4	0.015	1.02	0.4722
误差项	0.075	4	0.019		
总离差	3.11	13			

对表 2 中的数据进行回归拟合,得到石榴幼果总黄酮得率(Y)的回归方程为:

$$Y = 2.25X_1 + 2.00X_2 + 1.83X_3 + 3.30X_1X_2 + 2.73X_1X_3 + 0.66X_2X_3$$
式(4)

由表 3 可以看出,整个模型($p = 0.0002$)达到极显著水平,失拟项($p = 0.4722 > 0.05$)不显著,复相关系数 $R^2 = 0.9572$,调整决定系数 $R^2_{Adj} = 0.9205$,表示可以应用此数学模型解释 92.05% 的变异性。变动系数 $CV = 5.61\%$,数值较小,说明回归模型可信度高,因此,可以用该模型对复合酶配比进行优化。

图 6 为 3 个自变量之间交互影响的响应面图和等高线图,响应面图开口向下,说明石榴幼果总黄酮得率的最大响应值存在于曲面上,能够得到 3 种酶最佳配比值。纤维素酶(X_1)和果胶酶(X_2)、纤维素

酶(X_1)和木瓜蛋白酶(X_3)之间交互作用极显著($p < 0.01$)。从回归方程一次项系数可以看出,3种酶对于石榴幼果总黄酮得率的影响先后顺序为: $X_1 > X_2 > X_3$,而这种影响直接体现在复合酶最优配比上。

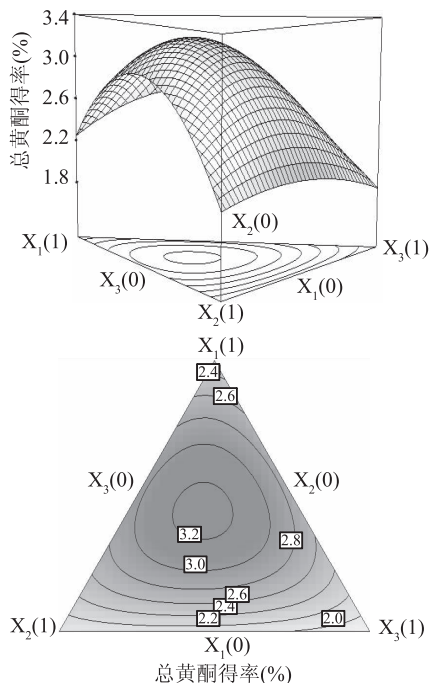


图6 复合酶比对总黄酮得率的三角曲面图与等高线图
Fig.6 Triangular surface and contour plot for complex enzyme ratio on the yield of total flavonoids

通过统计分析得到复合酶最优配比为:纤维素酶 44.2%、果胶酶 31.6%、木瓜蛋白酶 24.2%。在上述最优复合酶配比条件下进行 3 次平行验证试验,得到石榴幼果总黄酮平均得率为 $3.19\% \pm 0.01\%$,与模型预测值 3.25% 较为接近,说明应用 D-最优混料试验设计得到的复合酶最优配比是可信、可靠的。

2.3 正交试验设计

在单因素实验和 D-最优混料试验设计试验基础上,固定加酶量为 3.0%,选择料液比(A)、介质 pH(B)、酶解温度(C)和酶解时间(D)为考察因素,采用正交设计安排试验,试验安排及结果见表 4,方差分析结果见表 5。

方差分析表明,影响石榴幼果总黄酮得率的因素主次顺序为酶解温度(C) > 酶解时间(D) > 介质 pH(B) > 料液比(A),C 具有极显著性,而 A、B 和 D 无显著性影响,得出最佳提取工艺为 $A_3B_3C_2D_2$ 。即:料液比 1:18,介质 pH5.0,酶解温度 50℃,酶解时间 4.0 h。

2.4 最佳工艺条件的验证

称取 3 份干燥石榴幼果粉末各 5 g,按照最优混合酶比例以及优化工艺提取,总黄酮得率平均值为 $3.38\% \pm 0.015\%$,RSD 为 0.444%,表明提取工艺稳定可靠。

2.5 石榴幼果总黄酮抑制 α -葡萄糖苷酶活性

应用公式(2)计算得出纯化后的石榴幼果总黄

表4 正交试验方案与结果
Table 4 Arrangement and corresponding results of orthogonal experimental design

试验号	A	B	C	D	得率(%)
1	1	1	1	1	1.98
2	1	2	2	2	3.36
3	1	3	3	3	2.81
4	2	1	2	3	3.18
5	2	2	3	1	2.56
6	2	3	1	2	2.37
7	3	1	3	2	2.86
8	3	2	1	3	2.34
9	3	3	2	1	3.19
k_1	2.72	2.67	2.23	2.58	
k_2	2.70	2.75	3.24	2.86	
k_3	2.80	2.79	2.74	2.78	
R	0.10	0.12	1.01	0.28	

表5 正交试验方差分析结果
Table 5 Results of variance analysis for orthogonal experimental design

方差来源	平方和	自由度	F	p
A	0.015	2	1.000	>0.05
B	0.021	2	1.400	>0.05
C	1.540	2	102.667	<0.01
D	0.130	2	8.667	>0.05
误差	0.015	2	1.000	

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.000, F_{0.01}(2,2) = 99.000$ 。

酮固体物质纯度约为 66.5%,通过含量换算,将该纯化物质依次配制成浓度为 0.15、0.3、0.6、0.9、1.2、1.5、1.8、2.1 mg/mL 的石榴幼果总黄酮样品溶液,用于抑制 α -葡萄糖苷酶活性测定,以阿卡波糖作为阳性对照。以加入反应体系前抑制剂的浓度为横坐标,对应的抑制率为纵坐标,绘制抑制曲线,见图 7。

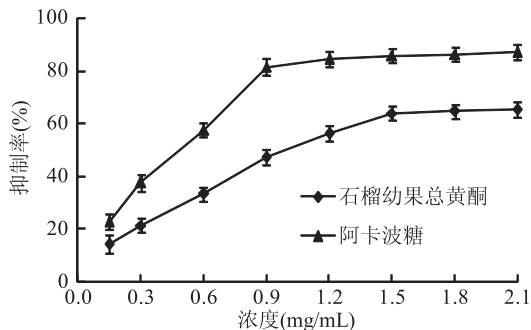


图7 石榴幼果总黄酮对 α -葡萄糖苷酶抑制作用浓度效应曲线

Fig.7 Concentration-effect curve about anti- α -glucosidase activity of total flavonoids

由图 7 可知,在 0.15~1.5 mg/mL 范围内,随着浓度的增加,石榴幼果总黄酮对 α -葡萄糖苷酶的抑制率明显增加,当浓度达为 1.5 mg/mL 时,抑制率达到 63.9%。石榴幼果总黄酮浓度与对 α -葡萄糖苷酶的抑制率之间存在着正相关性,拟合方程为 $y =$

37.41x + 10.40, 决定系数 $R^2 = 0.989$ 。通过拟合方程算出石榴幼果总黄酮对 PNPG 抑制作用的 $IC_{50} = 1.059 \text{ mg/mL}$ ^[22]。同理, 阿卡波糖对 PNPG 抑制作用的 $IC_{50} = 0.490 \text{ mg/mL}$, 石榴幼果总黄酮对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性低于阿卡波糖。

图 8 和图 9 为酶抑制动力学曲线。由图 8 可知, 加入石榴幼果总黄酮组与其阴性对照组, 所得到的两条酶浓度-反应初速率曲线均近似通过了原点, 说明石榴幼果总黄酮对 α -葡萄糖苷酶的抑制类型属于可逆性抑制。由图 9 可知, 石榴幼果总黄酮抑制 α -葡萄糖苷酶的 Lineweaver-Burk 曲线, 不同浓度各组均在 X 轴负半轴几乎交于一点, 说明底物浓度升高不能降低石榴幼果总黄酮的抑制活性, 具备非竞争性抑制作用特点^[23]。以 PNPG 为底物测定天然产物抑制 α -葡萄糖苷酶活性的大小是目前最常用的 α -葡萄糖苷酶抑制剂筛选方法。在判断酶抑制类型时, Lineweaver-Burk 双倒数作图分析是一种非常有效的方法, 作图后如果得到一组相较于 Y 轴的直线, 则为竞争性抑制, 如果得到一组相交于 X 轴的直线, 则为竞争性抑制, 如果得到一组平行的直线, 则为反竞争性抑制, 如果得到一组相交于第二或第三象限的直线, 则为混合型抑制^[24-25]。石榴幼果中总黄酮对 α -葡萄糖苷酶抑制作用的 Lineweaver-Burk 双倒数作图交于 X 轴负半轴, 属于非竞争性抑制。

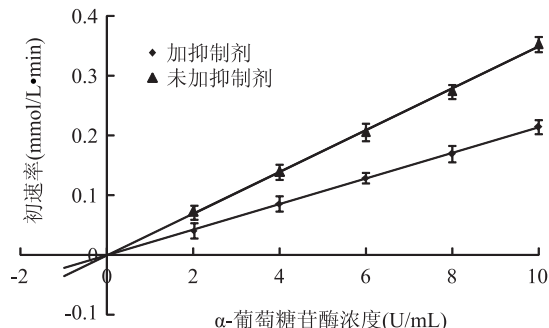


图 8 酶浓度-反应初速率曲线

Fig.8 Enzyme concentrate-initial reaction rate curve

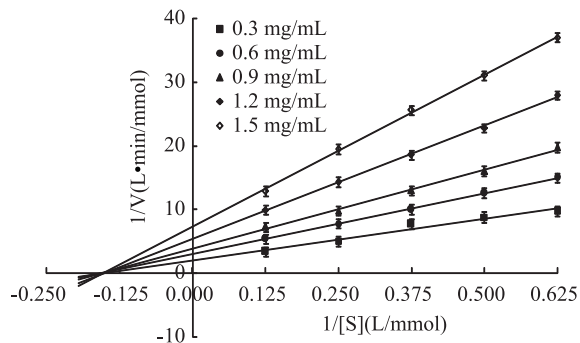


图 9 石榴幼果总黄酮的 Lineweaver-Burk 曲线

Fig.9 Lineweaver-Burk curve of total flavonoids

3 结论

本试验将 D-最优混料设计应用于复合酶(纤维素酶-果胶酶-木瓜蛋白酶)的比例优化, 得到纤维素酶 44.2%、果胶酶 31.6%、木瓜蛋白酶 24.2% 的复合酶, 进而得到石榴幼果总黄酮的最佳提取条件为: 料

液比 1: 18 (g/mL)、介质 pH5.0、酶解温度 50 ℃、酶解时间 4.0 h, 石榴幼果总黄酮得率为 3.38%, 其浓度为 1.5 mg/mL 时, 对 α -葡萄糖苷酶抑制率达到 63.9%, 总黄酮与其对 α -葡萄糖苷酶抑制效果之间呈现一定的正相关关系, 其抑制机理属于可逆性抑制和非竞争性抑制。现有临床应用的 α -葡萄糖苷酶抑制剂降血糖作用机制表明, 抑制剂往往是通过在小肠中和 α -葡萄糖苷酶底物竞争性地结合到催化活性位点, 来达到减少底物的分解以降低血糖的目的, 其作用机制是明显的竞争性抑制。但是, 这种抑制往往受到底物浓度的影响, 如果存在高浓度的底物时, 这种抑制作用非常弱, 甚至达不到抑制的效果, 因此, 应用这类竞争性抑制剂控制餐后血糖时, 还要严格控制饮食的摄糖量^[18]。而石榴幼果中总黄酮对于底物的抑制, 属于非竞争性抑制类型, 底物浓度升高不能降低石榴幼果总黄酮的抑制活性, 抑制作用与其自身浓度有关, 而与底物浓度关系较小。治疗糖尿病时, 可以通过增大自身剂量来增强抑制效果。石榴幼果总黄酮具有作为新一代 α -葡萄糖苷酶抑制剂的潜在开发价值, 后续研究可以追踪相应的活性单体成分, 并对其抑制机理作进一步深入研究。

参考文献

- [1] 汪小飞, 周耘峰, 黄埔, 等. 石榴品种数量分类研究[J]. 中国农业科学, 2010, 52(5): 1093-1098.
- [2] 吕春茂, 杨国放, 蔡英时, 等. 不同修剪和疏果措施对番石榴产量及果实品质的影响[J]. 北方果树, 2007, 29(3): 6-7.
- [3] 张文娟, 潘灵刚, 王亚军, 等. 微波辅助提取桉桉幼果总黄酮工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(5): 223-226.
- [4] 王振江, 罗国庆, 唐翠明, 等. 桑椹成熟过程中酚类物质、总黄酮及花色素含量的动态变化[J]. 热带作物学报, 2011, 32(9): 1658-1660.
- [5] 马英丽, 赵桦, 闫蕊, 等. 蜜桔叶、花及果实中总黄酮含量积累动态研究[J]. 天然产物研究与开发, 2016, 28(10): 1572-1575.
- [6] 高文秀, 祝波, 王亚红. 酶解法协同超声波法提取山楂叶总黄酮的工艺条件优化[J]. 食品工业科技, 2014, 35(2): 252-254.
- [7] 耿敬章. 柳叶腊梅叶总黄酮超声波协同复合酶提取及抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(21): 124-129.
- [8] 李斌, 范源, 李鑫. 基于 PI3K/Akt 信号通路的中药治疗 2 型糖尿病胰岛素抵抗研究进展[J]. 中成药, 2017, 39(1): 151-154.
- [9] 叶晓平, 宋纯清, 袁萍, 等. 糖尿病常用中药中常见成分的 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶活性抑制作用[J]. 中国天然药物, 2010, 8(5): 349-352.
- [10] 陈浙江, 袁萍, 叶晓平, 等. 治疗糖尿病常用中药对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的抑制活性研究[J]. 中成药, 2008, 30(11): 1661-1664.
- [11] 马锦锦, 林娟娜, 魏崧丞, 等. 葛根异黄酮类化合物对

(下转第 188 页)

参考文献

- [1] 葛文成. 紫甘薯高产栽培技术[J]. 蔬菜, 2011(10): 9-10.
- [2] 肖海峻, 施鹏飞, 杨新建, 等. 甘薯紫色素及提取技术研究进展[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(19): 137-140.
- [3] 胡林子, 马永全, 于新. 紫甘薯色素抗菌与抗氧化作用研究进展[J]. 食品工业科技, 2011, 32(2): 389-392.
- [4] 肖素荣, 李京东. 新型天然色素-紫甘薯色素[J]. 中国食物与营养, 2009(6): 29-31.
- [5] Khoo, Azlan, Tang, et al. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits[J]. Taylor & Francis, 2017, 61(1): 1-21.
- [6] 陈娟, 唐建, 宋锐, 等. 紫甘薯新品种内渝紫2号[J]. 中国蔬菜, 2017(3): 101-102.
- [7] 余燕影, 王杉, 曹树稳, 等. 川山紫薯色素提取分离及主要组成成分分析[J]. 食品科学, 2004(11): 167-170.
- [8] 胡梦琳, 杨甲甲, 代涛, 等. 紫薯色素两种提取方法的对比研究[J]. 食品科学, 2011, 32(6): 247-249.
- [9] 咎立峰, 李丹花, 殷春燕, 等. 大孔吸附树脂分离纯化紫甘薯色素的动力学分析[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(10): 199-202.
- [10] 洪镭, 刘亚鸥. 紫甘薯研究综述[J]. 吉林农业, 2010(6): 140.

(上接第183页)

- α -葡萄糖苷酶的抑制作用及构效关系[J]. 中成药, 2015, 37(5): 858-862.
- [12] 邹宇, 胡力明, 胡文忠, 等. D-最优混料设计优化菊花枸杞饮料配方及其抗氧化活性的研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(14): 241-244.
- [13] 罗鹏, 周金玲, 陈国刚, 等. 基于混料设计试验优化包埋打瓜子油中不饱和脂肪酸的复合壁材[J]. 粮食与油脂, 2015, 28(10): 25-27.
- [14] 邓思节, 汉斯·格里格森正交试验法优化屈曲花总黄酮的超声波辅助提取工艺[J]. 食品工业科技, 2016, 37(3): 275-278.
- [15] 吴清韩, 李云, 刘志聪, 等. 凤凰单丛茶叶籽果皮和种皮总黄酮提取工艺的优化[J]. 食品工业科技, 2018, 39(5): 166-170.
- [16] 何月秋, 付涛, 李文, 等. 明日叶总黄酮超声提取工艺优化及其 DPPH 清除能力[J]. 中成药, 2016, 38(12): 2703-2706.
- [17] 易醒, 桂菲菲, 尹红梅, 等. 泽泻对鼠源 α -葡萄糖苷酶的抑制作用[J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(12): 1644-1648.
- [18] 张红城, 孙庆中, 王光新, 等. 蜂胶乙醇提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用[J]. 食品科学, 2011, 32(5): 108-110.
- [19] 刘富月, 王晓东, 李守鹏, 等. 不同品种生姜提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40

- [11] 潘颖, 代刚, 王晓云, 等. 紫甘薯红色素及淀粉一体化提取方法研究[J]. 云南化工, 2017, 44(4): 41-43.
- [12] 张明, 王燕. 紫甘薯酒发酵工艺研究[J]. 酿酒科技, 2011, 206(8): 53-56.
- [13] 洪秀景. 紫甘薯酒发酵工艺研究[D]. 成都: 四川农业大学, 2013.
- [14] 张杨波, 李蕾, 李霞, 等. α -淀粉酶酶解紫甘薯糖化效果及色素提取的研究[J]. 中国酿造, 2016, 35(4): 145-148.
- [15] 刘艳杰, 张健, 宋晓秋. 大孔树脂纯化紫薯花色苷的研究[J]. 上海应用技术学院学报(自然科学版), 2012, 12(1): 13-17.
- [16] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. GB/T5009.48-2003 蒸馏酒与配制酒卫生标准的分析方法[S]. 2003.
- [17] 王蓬际. 氮源及无机盐对酒精发酵的影响[J]. 酿酒, 2005(4): 31-33.
- [18] 武运, 杨海燕, 冯馨, 等. 库尔勒香梨果酒酿造工艺研究[J]. 食品工业科技, 2008(12): 148-149, 152.
- [19] 柯善恢, 伍时华, 张健, 等. 氮源对酿酒酵母 GJ2008 不同糖浓度甘蔗汁酒精分批发酵的影响[J]. 中国酿造, 2016, 35(5): 31-36.
- [20] 刘兴艳. 低 pH 对酿酒酵母酒精发酵的影响及酵母应答胁迫机制初探[D]. 北京: 中国农业大学, 2015.
- [21] 钟坤, 谭德冠, 孙雪飘, 等. 木薯淀粉生料发酵生产酒精研究[J]. 中国农学通报, 2014, 30(6): 119-123.

(12): 6-9.

- [20] Jin F W, Yuan Y L, Fu D S. Antioxidant activities, α -glucosidase inhibitory *in vitro* and effects of *Lysimachia paridiformis* Franch. var. *stenophylla* Franch. on alloxan-induced diabetic mice *in vivo* [J]. Journal of Medicinal Plants Research, 2012, 6(14): 2793-2800.
- [21] Cheng N, Yi W B, Wang Q Q, et al. Synthesis and α -glucosidase inhibitory activity of chrysin, diosmetin, apigenin, and luteolin derivatives [J]. Chinese Chemical Letters, 2014, 25(7): 1094-1098.
- [22] 康文艺, 张丽, 宋艳丽. 茜草抑制 α -葡萄糖苷酶活性成分研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(9): 1104-1107.
- [23] 罗晶洁, 王尉, 曹学丽. 桑叶多糖的分离纯化及对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性[J]. 食品科学, 2011, 32(3): 112-116.
- [24] 蔡建秀, 顾雅青, 黄晓冬, 等. 桐花树叶乙酸乙酯部位提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性作用[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(24): 1-6.
- [25] Zhu F, ASADA T, SATO A, et al. Rosmarinic acid extract for antioxidant antiallergic, and α -glucosidase inhibitory activities, isolated by supramolecular technique and solvent extraction from *Perilla* leaves [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(4): 885-892.