

# 白芸豆中 $\alpha$ -淀粉酶抑制剂的提取纯化及活性测定条件优化

钟颖颖, 何绮怡, 冯俊超, 朱秋雁, 张春国, 赵肃清

(广东工业大学轻工化工学院, 广东广州 510006)

**摘要:** 为开发一种简单、有效、低成本的  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂 ( $\alpha$ -AI) 提取纯化工艺及探索其活性测试最佳条件, 本研究以白芸豆为原料, 采用水提法从中提取  $\alpha$ -AI。首先对 3,5-二硝基水杨酸 (DNS) 微孔法测定  $\alpha$ -AI 活性的条件进行了研究; 随后在单因素基础上, 通过正交试验确定了  $\alpha$ -AI 提取的最佳工艺条件, 并通过酸沉-醇沉、超滤和透析对其进行了纯化。结果表明, DNS 微孔法测定  $\alpha$ -AI 活性的最佳条件为: 测定波长为 482 nm、DNS 用量为 80  $\mu$ L、反应时间为 15 min、静置时间为 10 min;  $\alpha$ -AI 提取的最优工艺为: 提取温度为 45  $^{\circ}$ C、提取时间为 2.5 h、提取 pH 为 6.6、液料比为 7.5; 经纯化后得到了较纯的、活性较高的  $\alpha$ -AI, 其  $IC_{50}$  为  $0.89 \pm 0.04$  mg/mL, 提取率为  $(1.92 \pm 0.23)$  %。该提取纯化工艺可为  $\alpha$ -AI 的低成本工业化生产提供一定的指导意义。

**关键词:** 白芸豆;  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂; 提取; 纯化; 3,5-二硝基水杨酸微孔法

文章编号: 1673-9078(2019)08-254-260

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.8.036

## Extraction and Purification and Activity Determination Conditions

### Optimization of $\alpha$ -Amylase Inhibitor in White Kidney Bean

ZHONG Ying-ying, HE Qi-yi, FENG Jun-chao, ZHU Qiu-yan, ZHANG Chun-guo, ZHAO Su-qing

(School of Chemical Engineering and Light Industry, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China)

**Abstract:** In order to develop a simple, effective and low-cost extraction and purification process of  $\alpha$ -amylase inhibitor ( $\alpha$ -AI) and explore the optimal conditions for its activity test, white kidney beans were used as raw materials to extract  $\alpha$ -AI by water extraction in this study. After studying the conditions for the determination of  $\alpha$ -AI activity by 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) micropore method, the optimal process conditions for  $\alpha$ -AI extraction were determined by orthogonal test on the basis of single factor and the  $\alpha$ -AI crude extract was purified by acid precipitation-alcohol precipitation, ultrafiltration and dialysis. The results indicated that the optimal conditions for the determination of  $\alpha$ -AI activity were: determination wavelength of 482 nm, DNS dosage of 80  $\mu$ L, reaction time of 15 min, and the rest time was 10 min. And the optimum process for  $\alpha$ -AI extraction were: Extraction temperature of 45  $^{\circ}$ C, extraction time of 2.5 h, extraction pH of 6.6 and the liquid-solid ratio was 7.5. Moreover, the  $\alpha$ -AI with high purity and activity was obtained after purification, which with an  $IC_{50}$  of  $0.89 \pm 0.04$  mg/mL and a yield of  $1.92 \pm 0.23$ %. The extraction and purification process may be can provide some guiding significance for the low-cost industrial production of  $\alpha$ -AI.

**Key words:** white kidney bean;  $\alpha$ -amylase inhibitor; extraction; purification; 3,5-dinitrosalicylic acid micropore method

白芸豆生物学名多花菜豆<sup>[1]</sup>, 其营养价值丰富, 据分析每 100 g 白芸豆中含 20.0~23.1 g 蛋白质, 1.3~2.1 g 脂肪, 37.6~56.9 g 碳水化合物, 1520 mg 钾、193.5 mg 镁、0.8 mg 钠、120~160 mg 钙、7.3~10 mg 铁、1.56 mg VB1, 1.02 mg VB2, 0.24 mg 胡萝卜素、410 mg 磷等<sup>[2,3]</sup>。同时其含有较多的生理活性物

收稿日期: 2019-03-12

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (S2013030013338)

作者简介: 钟颖颖 (1995-), 女, 研究生, 研究方向: 生物制药

通讯作者: 赵肃清 (1969-), 男, 教授, 博导, 研究方向: 天然产物分离提取, 生物制药及免疫分析

质, 如过氧化物酶、黄酮类物质、 $\alpha$ -淀粉酶抑制剂 ( $\alpha$ -AI)、胰蛋白酶抑制剂 (TI)、植物凝集素 (PHA) 等, 其中  $\alpha$ -AI 是一种能特异性抑制人体唾液和肠道内  $\alpha$ -淀粉酶活力的蛋白质, 分子量为 30.0~36.0 ku<sup>[1,2,4]</sup>, 等电点在 4.0~5.2<sup>[4]</sup>; 其不仅具有减肥和降低血糖水平的功效, 而且通过胃肠道排出体外, 对大脑不产生刺激, 因此具有高度生物安全性。

近年来  $\alpha$ -AI 成为研究热点。Zhang 等<sup>[5]</sup>, 迟永楠等<sup>[6]</sup>对白芸豆中  $\alpha$ -AI 的提取工艺进行了研究; MA<sup>[7]</sup>等研究结果表明白芸豆中  $\alpha$ -AI 能有效降低食物中的血糖指数, MA 等<sup>[8]</sup>的研究表明长期服用白芸豆  $\alpha$ -AI

能降低 Wistar 大鼠的血糖水平; WU 等<sup>[9]</sup>评价了白芸豆  $\alpha$ -AI 的口服毒性,结果表明大鼠口服白芸豆  $\alpha$ -AI 28 天期间无任何不良反应;刘蕊莉等<sup>[10]</sup>的实验研究显示服用白芸豆  $\alpha$ -AI 90 天可显著降低人的体重、BMI、LDL-C、TC、TG 和粪便脂肪率,并且无任何不适感。由于  $\alpha$ -AI 有着较好的安全性和高效性,国外已经对其进行了工业化生产和应用,目前国外已上市产品主要有 Pharmachem 公司的 Phase 2、Indena 公司的 Beanblock、Prostar 公司的 Lean Image Carb Blocker, Nutricepts 公司的 Alpha Trim 胶囊, Nature's Sunshine 公司的 Carbo-Grabber 等,而相比较而言,国内还鲜有白芸豆  $\alpha$ -AI 相关产品的报道,这可能是由于白芸豆提取物中其他物质会影响  $\alpha$ -AI 的生理效能的缘故,比如植物凝集素(PHA)和胰蛋白酶抑制剂(TI)的存在会降低  $\alpha$ -AI 的生物安全性及抑制效果<sup>[1]</sup>,从而限制了其实际应用。因此开发一种能尽可能提纯  $\alpha$ -AI 的方法迫在眉睫。目前常采用的提纯方法有色谱法<sup>[11]</sup>、醇沉-多次柱层析-盐析-透析法<sup>[12]</sup>、超临界 CO<sub>2</sub> 萃取法<sup>[13]</sup>等,这些方法虽得到了较好的提纯效果,但有些需要用到昂贵的仪器,有些工艺复杂。因此需要开发一种简单、方便、高效、而且成本低的  $\alpha$ -AI 提纯方法。

现有常用于测定  $\alpha$ -AI 活性的方法是 DNS (3,5-二硝基水杨酸) 比色法,其通常是采用试管作为反应容器(溶液体积通常为 10、25 和 50 mL),分光光度计(测定样品数少)作为检测仪器进行测定的,这在工艺优化中势必会耗费大量的时间和试剂用量,并且在操作上不够简便。已有文献<sup>[14,15]</sup>报道将微孔法结合传统的 DNS 法来测定还原糖含量可以简化操作并且大大降低其检测时间和试剂用量,因此我们可考虑将其应用在  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂活性检测上。此外,采用 DNS 法进行  $\alpha$ -AI 活性测定时,不同文献所给出的测定条件存在很大的差异,这可能是由于 DNS 的配制方法不同等影响了最佳测定条件的选定,所以在进行活性测定之前,需要确定最佳测定条件,以使实验结果更具准确性和可比性。

为开发一种简单、有效、低成本的  $\alpha$ -AI 提取纯化工艺,本研究在单因素分析基础上通过正交试验确定了白芸豆中  $\alpha$ -AI 提取的最佳工艺条件,并通过酸沉-醇沉、超滤和透析对其进行分离纯化;此外为了降低活性测定时间、试剂用量以及确定活性测试的最佳条件,我们用微孔法代替比色法进行测定<sup>[14,15]</sup>,以为其工业化生产和应用提供一定的指导意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

白芸豆,赣州市九鲤湖食品有限公司;3,5-二硝基水杨酸,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;BCA 蛋白定量试剂盒,北京百诺威生物科技有限公司;可溶性淀粉,上海麦克林生化科技有限公司;麦芽糖、 $\alpha$ -淀粉酶(猪胰腺来源),昆明皇宝商贸有限公司;50 ku、10 ku 超滤管,北京莱科百奥生物技术有限公司;14 ku、35 ku 透析袋,广州市酷泰贸易有限公司;SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒,北京博奥森生物技术有限公司;氯化钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、无水乙醇、氢氧化钠、盐酸,天津大茂试剂厂,均为分析纯。

### 1.2 实验仪器

AUY220 电子天平,日本岛津(Shimadzu)公司;RHP-600 高速多功能粉碎机,浙江荣浩工贸有限公司;TECAN Infinite 200 多功能酶标仪,TECAN 奥地利公司;PCE-3000 烘箱,上海索谱仪器有限公司;美菱/BCD-200MCX 冰箱,合肥美菱股份有限公司;PHS-3B 雷磁 pH 计,上海精密科学仪器有限公司;EYELA/OSB-2100 油浴锅,上海爱朗仪器有限公司;CJ78-1 磁力搅拌器,金坛市大地自动化仪器厂;TGL-16M 台式高速冷冻离心机,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;C21-WH2016 美的电磁炉,广州美其实验设备科技有限公司;DYY-6C 型电泳仪,北京市六一仪器厂;LGJ-12 真空冷冻干燥机,北京松源华兴科技发展有限公司。

### 1.3 $\alpha$ -AI 活性测定最佳条件的确定

取 20  $\mu$ L 麦芽糖标准溶液(1 mg/mL)于 96 孔板中,随后加入 80  $\mu$ L DNS 溶液(参照文献<sup>[12]</sup>配制),摇匀后置于沸水中煮沸 15 min,迅速冰水冷却后加入 200  $\mu$ L 去离子水稀释(总体积为 300  $\mu$ L),静置 10 min,置于酶标仪中震荡 10 s 后于 450~600 nm<sup>[12]</sup>波长范围进行连续扫描(以去离子水代替麦芽糖标准溶液做试剂空白,每孔重复 3 次),以 OD 值(扣除试剂空白)为纵坐标,波长为横坐标作图,选择最大 OD 值所对应波长作为最佳测定波长。

按照上述方法,在最佳测定波长下分别考察 DNS 用量(20、40、60、80、100  $\mu$ L)、显色反应时间(5、10、15、20、25 min)和静置时间(10、20、30、40、50 min)对  $\alpha$ -AI 活性测定结果的影响。

### 1.4 $\alpha$ -AI 的最佳提取工艺的确定

### 1.4.1 $\alpha$ -AI 提取

首先将市场上购买的白芸豆经粉碎机粉碎后过 80 目筛, 置于 35 °C 烘箱中干燥 12 h, 然后称取 5 g 的豆粉, 按一定料液比加入去离子水, 在恒定 pH、恒定温度下提取一定时间后于 4 °C、10000 r/min 条件下离心 20 min, 合并上清液 (2 次) 后用 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤即得  $\alpha$ -AI 粗提液。

在  $\alpha$ -AI 提取单因素优化条件的实验中, 固定料液比 (1:7.5, g/mL), 提取时间 (2.5 h), 提取温度 (45 °C), 考察提取 pH (4.0、5.0、6.0、7.2 (去离子水)、8.0、9.0、10.0) 对  $\alpha$ -AI 活性的影响; 固定料液比 (1:7.5, g/mL), 提取时间 (2.5 h), 提取 pH (6.6), 考察提取温度 (室温, 40、50、60、70 °C) 对  $\alpha$ -AI 活性的影响; 固定料液比 (1:7.5, g/mL), 提取温度 (45 °C), 提取 pH (6.6), 考察提取时间 (1、2、3、4、5 h) 对  $\alpha$ -AI 活性的影响; 固定提取时间 (2.5 h), 提取 pH (6.6), 提取温度 (45 °C), 考察料液比 (1:5、1:10、1:15、1:20、1:25) 对  $\alpha$ -AI 活性的影响。然后在单因素实验的基础上, 选取适宜参数范围, 以  $\alpha$ -AI 活性和蛋白质含量 (用 BCA 蛋白定量试剂盒进行测定) 为双指标, 进行  $L_9(3^4)$  正交实验, 并对正交实验结果进行验证。

### 1.4.2 $\alpha$ -AI 活性的测定

参照 Dehghan Hossein 等<sup>[14]</sup>的方法测定  $\alpha$ -AI 活性, 并做少许改动。首先往 96 孔板中分别加入 10  $\mu$ L 的  $\alpha$ -淀粉酶溶液 (15 U/mL)、10  $\mu$ L 不同浓度的  $\alpha$ -AI 和 20  $\mu$ L PBS (0.1 M, pH 6.9), 然后置于多功能酶标仪中 37 °C 孵育 10 min (环形摇震 30 s), 取出, 每孔加入 20  $\mu$ L 1% 可溶性淀粉溶液, 置于多功能酶标仪中 37 °C 精确反应 5 min (环形摇震 30 s), 取出, 每孔加入 80  $\mu$ L DNS 溶液, 摇匀后于沸水浴中加热 15 min, 冰水迅速冷却后每孔加入 160  $\mu$ L 去离子水, 静置 10 min, 置于多功能酶标仪中在 482 nm 波长下测定 OD 值。在实验过程中, 另外设置空白组、空白对照组、和抑制对照组, 空白组中不添加样品, 空白对照组中不加  $\alpha$ -淀粉酶液和样品, 抑制对照组中不加  $\alpha$ -淀粉酶液, 体积不足处均以 PBS 补足。 $\alpha$ -AI 的抑制率通过以下公式计算:

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

式中:  $A_1$ 、 $A_2$ 、 $A_3$  和  $A_4$  分别为 482 nm 下空白组、空白对照组、实验组和抑制对照组的 OD 值。

通过对  $\alpha$ -AI 浓度和抑制率进行曲线拟合, 可得  $\alpha$ -AI 对  $\alpha$ -淀粉酶的半数抑制浓度  $IC_{50}$ 。

### 1.5 $\alpha$ -AI 的纯化

有研究表明  $\alpha$ -AI 在其等电点附近基本不沉降, 这可能是因为其较高的碳水化合物含量 (11.8%) 使其具备良好的亲水性<sup>[16]</sup>, 而影响  $\alpha$ -AI 活性的 PHA 和 TI 这两种主要蛋白质在 pH 为 3.6 时会发生显著的沉降<sup>[1]</sup>, 因此参照文献<sup>[1]</sup>首先对白芸豆粗提液进行如下处理: 首先用 1 mol/L HCl 将粗提液调至 pH 3.6, 沉降 1 h, 离心 (10000 r/min, 20 min, 4 °C) 收集上清液; 用 1 mol/L NaOH 将上清液调至 pH 6.6 后用无水乙醇将上清液中乙醇浓度调至 70% (V/V), 搅拌 2 h, 离心 (10000 r/min, 20 min, 4 °C) 收集沉淀物; 将沉淀物置于通风橱中挥发除去残留乙醇, 用适量 PBS (pH 6.9) 溶解得到初步纯化的  $\alpha$ -AI。然后将初步纯化的  $\alpha$ -AI 溶液用截留分子量为 50 ku 的超滤管超滤, 滤出液再用截留分子量为 30 ku 的超滤管超滤 (4 °C, 6400 r/min, 15 min, 超滤循环 7 次)。最后将截留液适当稀释后置于双层透析袋 (内层 35 ku, 外层 14 ku) 中透析 3 天得终纯化的  $\alpha$ -AI。在纯化过程中通过还原态电泳 (SDS-PAGE)、 $\alpha$ -AI 抑制活性及提取率追踪纯化效果。 $\alpha$ -AI 提取率计算公式如下:

$$\text{提取率}(\%) = \frac{M_1}{M_2} \times 100\%$$

式中:  $M_1$  为提取所得的  $\alpha$ -AI 质量 (干基), g;  $M_2$  为白芸豆粉质量 (干基), g。

### 1.6 数据分析

文中所有的数据均为三次平行试验所得, 并以均值  $\pm$  标准差的形式给出, 采用 Excel 和 Origin 8.5 软件进行数据处理及图片绘制。

## 2 结果与分析

### 2.1 $\alpha$ -AI 活性测定条件优化结果与分析

DNS 微孔法测定  $\alpha$ -AI 活性的操作条件优化结果如图 1 所示, A 图为麦芽糖溶液-DNS 体系吸收光谱图; B、C、D 图分别为 DNS 用量、反应时间和静置时间对体系 OD 值的影响结果。从 A 图可知随着测定波长的增大, 体系的 OD 值先增大后减小, 在 482 nm 处达到最大吸收值, 因此选择 482 nm 作为最佳测定波长; 从 B、C 图可得体系在 482 nm 下的 OD 值随着 DNS 用量、反应时间的增加呈现先增大后减小趋势, 分别在 DNS 用量为 80  $\mu$ L、反应时间为 15 min 处达到最大值, 所以选取 DNS 的最佳用量为 80  $\mu$ L, 反应最

佳时间为 15 min。而从 D 图可以得到随着静置时间的增加,体系在 482 nm 下的 OD 值基本不变,这表明静置时间对体系 OD 值的测定基本没有影响,考虑到时间成本,因此选择静置时间为 10 min。所以最终选定的  $\alpha$ -AI 活性测定最佳条件为:测定波长为 482 nm、DNS 用量为 80  $\mu$ L、反应时间为 15 min、静置时间为 10 min。

## 2.2 单因素试验结果与分析

$\alpha$ -AI 提取工艺优化的单因素试验结果如图 2 所示, A、B、C、D 图分别为提取 pH、提取温度、提取时间和料液比对提取所得  $\alpha$ -AI 活性的影响结果。从 A 图可得随着提取 pH 的增大,  $\alpha$ -AI 的抑制活性呈现快增快降趋势,这可能是由于过酸过碱均会使  $\alpha$ -AI 迅速变性,(pH 4 除外,这可能是由于在该 pH 下影响  $\alpha$ -AI 活性的两种主要蛋白 PHA 和 TI 发生一定的沉降,而  $\alpha$ -AI 基本不沉降,从而使得上清液中  $\alpha$ -AI 的比例增加所致),在 pH 7.2 (去离子水)处,  $\alpha$ -AI 活性最好,抑制率达到  $(49.97 \pm 0.69)\%$ 。从 B 图可得,随着提取温度的升高,  $\alpha$ -AI 活性呈现先增大后急剧下降趋势,在 40  $^{\circ}$ C 时,抑制率达到最大值  $(45.42 \pm 0.27)\%$ ,当提取温度超过 50  $^{\circ}$ C 后,  $\alpha$ -AI 抑制率随温度升高急剧降低,这说明适当的提高温度有利于  $\alpha$ -AI 的提取,但过高的温度可能会导致  $\alpha$ -AI 变性析出,从而降低其活性。C 图的结果表明,  $\alpha$ -AI 的抑制活性随提取时间的延长,呈现先上升后下降趋势,在提取时间为 3 h 时,提取所得的  $\alpha$ -AI 活性最好,这是由于随着时间的延长,  $\alpha$ -AI 的溶出量逐渐增多,在溶出物中的比例增大,但溶出达到平衡后,继续延长提取时间可能会使其他难溶出的杂质也一并溶出,从而导致溶出物中  $\alpha$ -AI 比例降低,所测活性也随之降低。D 图结果表明,随着料液比的增大,  $\alpha$ -AI 的抑制活性呈现先增大后减小趋势,在料液比 1:10 处活性最好,这是由于料液比的增大有利于白芸豆中  $\alpha$ -AI 的溶出,当溶出达到平衡时,继续增加料液比,使得  $\alpha$ -AI 在水提液中浓度被稀释,从而导致提取液  $\alpha$ -AI 活性降低。

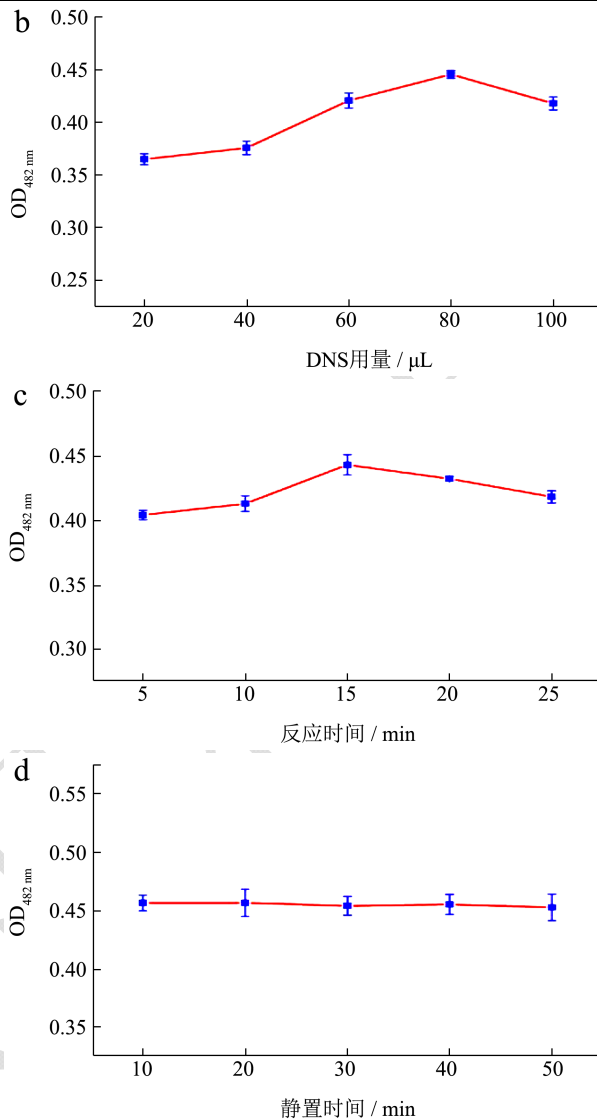
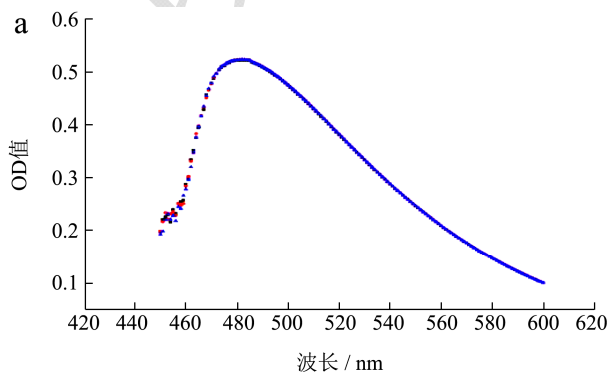


图 1  $\alpha$ -AI 活性测定条件优化结果

Fig.1 The optimization result of  $\alpha$ -AI activity determination condition

## 2.3 正交试验结果与分析

表 1 正交实验的因素和水平

Table 1 The factors and levels of orthogonal test

水平	因素			
	A 提取温度/ $^{\circ}$ C	B 提取时间/h	C 提取 pH	D 料液比/(g/mL)
1	35	2.5	6.6	1:7.5
2	40	3	7.2	1:10
3	45	3.5	7.8	1:12.5

根据单因素试验结果,选取合适的参数范围,以提取 pH、提取温度、提取时间和料液比作为变量因子,以  $\alpha$ -AI 活性和蛋白质含量作为评价提取工艺的双指标,按表 1 所设计的因素水平进行正交实验,实验结果及分析如表 2、表 3 所示。对于实验结果而言,所

测的  $IC_{50}$  (半数抑制浓度) 越小说明提取所得的  $\alpha$ -AI 活性越好, 而蛋白质含量越高则代表提取物中  $\alpha$ -AI 的含量可能越高 (白芸豆中  $\alpha$ -AI、PHA、TI 的含量分别为 1.80%~2.20%、0.18%、0.72%~0.88%<sup>[1]</sup>)。由表 3 可知对于不同的指标而言, 不同因素的影响程度是不一样的。从极差 R 可得对于  $\alpha$ -AI 活性这一指标, 影响因素主次依次为提取 pH、料液比、提取时间、提取温度; 而对于蛋白质含量这一指标, 影响因素主次依次为提取时间、料液比、提取温度、提取 pH。从 K 值可得对  $\alpha$ -AI 活性这一指标, 最优方案为提取温度为 35 °C、提取时间为 3 h、提取 pH 为 6.6、料液比为 1:12.5; 而对于蛋白质含量这一指标, 最优方案为提取温度为 45 °C、提取时间为 2.5 h、提取 pH 为 6.6、料液比为 1:7.5。

表 2 正交实验方案及和结果

**Table 2 Orthogonal test scheme and results**

试验号	A	B	C	D	$IC_{50}/(mg/mL)$	蛋白含量/%
1	1	1	1	1	12.23±0.31	46.80±4.11
2	1	2	2	2	16.20±0.09	27.08±6.02
3	1	3	3	3	18.01±0.12	20.88±5.31
4	2	1	2	3	14.67±0.19	33.58±7.08
5	2	2	3	1	19.82±0.17	36.96±6.43
6	2	3	1	2	20.68±0.24	28.80±8.20
7	3	1	3	2	20.82±0.28	48.74±3.89
8	3	2	1	3	11.19±0.14	28.92±7.45
9	3	3	2	1	19.09±0.06	40.94±2.97

为确定最优的提取方案, 综合考虑两指标。从表 3 分析可得, 对于因素 A (提取温度), 其对  $\alpha$ -AI 活性和蛋白质含量的影响均属于次要因素, 对蛋白质含量的影响大于对  $\alpha$ -AI 活性的影响, 且在  $A_1$  和  $A_3$  水平下  $\alpha$ -AI 活性的差别不大, 所以选择水平  $A_3$  作为优方案; 对于因素 B (提取时间), 其对  $\alpha$ -AI 活性的影响属于次要因素, 而对蛋白质含量的影响属于最主要因素, 又因水平  $B_1$  和  $B_2$  对  $\alpha$ -AI 活性的影响基本无差别, 所以选择水平  $B_1$  作为优方案; 对于因素 C (提取 pH), 其对  $\alpha$ -AI 活性的影响是最主要因素, 而对蛋白质含量的影响是最次要因素, 且水平  $C_1$  和  $C_3$  对蛋白质含量的影响差别不大, 而在  $C_1$  水平下, 抑制活性达到最佳, 所以选择水平  $C_1$  作为优方案; 对于因素 D (料液比), 其对  $\alpha$ -AI 活性和蛋白质含量的影响均属于次主要因素, 其中对蛋白质含量的影响随液料比增大显著下降, 而对抑制活性的影响在水平  $D_1$  和  $D_3$  差别不大, 所以综合考虑, 选择水平  $D_1$  作为优方案。综上所述, 最优

提取工艺选择为  $A_3B_1C_1D_1$ , 即提取温度为 45 °C, 提取时间为 2.5 h, 提取 pH 为 6.6, 液料比为 7.5。经测定, 在该条件下粗提物的  $IC_{50}$  值为  $11.02\pm 0.12$  mg/mL; 蛋白质含量为  $58.79\%\pm 2.81\%$ , 均优于正交实验结果。

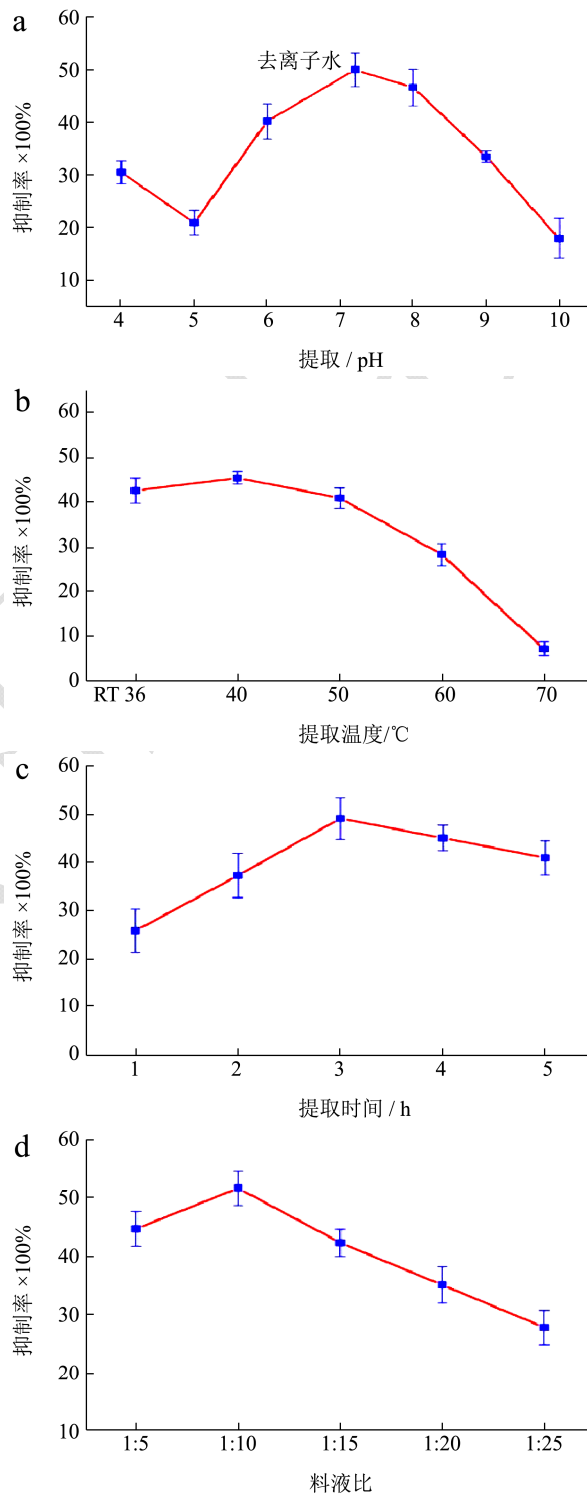


图 2 单因素试验优化结果

Fig.2 The optimization result of single factor test

表 3 正交实验结果分析

**Table 3 Analysis of orthogonal test results**

指标	项目	A	B	C	D
IC <sub>50</sub> /(mg/mL)	K <sub>1</sub>	46.44	47.72	44.09	51.14
	K <sub>2</sub>	55.17	47.21	49.96	57.69
	K <sub>3</sub>	51.10	57.78	58.65	43.87
	极差 R	8.73	10.58	14.56	13.82
	因素主→次	C D B A			
	优方案	A <sub>1</sub> B <sub>2</sub> C <sub>1</sub> D <sub>3</sub>			
蛋白含量/%	K <sub>1</sub>	108.77	153.12	118.52	138.70
	K <sub>2</sub>	99.33	92.96	101.59	114.62
	K <sub>3</sub>	128.59	90.62	116.58	83.37
	极差 R	29.26	62.50	16.92	55.32
	因素主→次	B D A C			
	优方案	A <sub>3</sub> B <sub>1</sub> C <sub>1</sub> D <sub>1</sub>			

### 2.4 α-AI 纯化结果与分析

经过最优提取工艺提取，酸沉-醇沉、超滤、透析所得的 α-AI 电泳图分别如图 4 中 a、b、c、d 图所示。a 图结果显示白芸豆水提液中共分离出 5 条主要的蛋白亚基条带，这与訾艳<sup>[2]</sup>制备的白芸豆清蛋白的电泳图相似，其中分子量在 35 ku 附近的条带颜色最深，这与多数文献中报道的白芸豆中 α-AI 的分子量在 30.0~36.0 ku 之间相符，因此该条带很有可能就是 α-AI。从 b 图可以看出，经过酸沉-醇沉后，所得沉淀物中分子量大于 40 ku 的条带明显减少，而在 35 ku 附近的条带却变得更加明显，从表 4 得该沉淀物的 IC<sub>50</sub> 为 7.16±0.06 mg/mL，高于水提液的 IC<sub>50</sub> (11.02±0.12 mg/mL)，这表明经过酸沉-醇沉后，α-AI 达到了一定的纯化效果。c 图结果表明超滤能除去醇沉所得沉淀物中分子量在 55 ku 附近的条带和大部分 25 ku 附近的条带，从表 4 得超滤所得 α-AI 的 IC<sub>50</sub> 为 2.78±0.08 mg/mL，这表明经过超滤 α-AI 得到了进一步纯化，同时也进一步证明 35 ku 附近的蛋白条带即为 α-AI。d 图结果表明透析能够除去分子量大于 35 ku 的蛋白条带，从而得到较纯的 α-AI，经测定得终纯化 α-AI 的 IC<sub>50</sub> 为 0.89±0.04 mg/mL，相比于粗提物，抑制活性提高了 12.38 倍，提取率为 (1.92±0.23) %，这与王文蒙<sup>[11]</sup>采用色谱法提纯所得 α-AI 的活性 (IC<sub>50</sub> 为 0.60 mg/mL) 和提取率 (1.84%) 相近。此外在相同条件下测定了终纯化 α-AI 的抑制率 (88.97±2.14) %，发现其与文献<sup>[12]</sup>所得结果 (抑制率为 90.4%) 相近，但提取率相比文献<sup>[12]</sup> (0.12%) 提高了 16 倍。因此相比于色谱法及其他方法，本方法更为简单、方

便、高效、而且成本低，不需要用到任何昂贵的仪器，因此适合于大多普通实验室进行研究，同时也可作为 α-AI 的低成本工业化生产提供一定的指导意义。

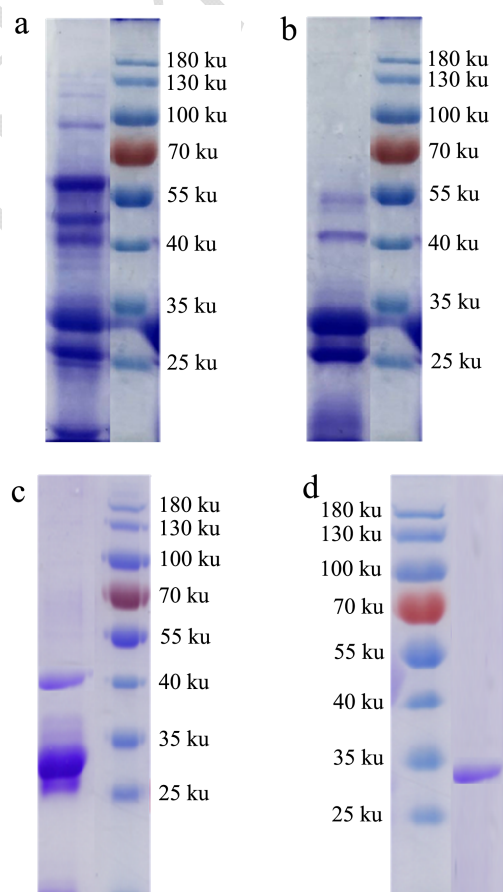


图 3 α-AI 纯化结果电泳图

Fig.3 α-AI purification result electropherogram

注：a：水提液；b：酸沉-醇沉后 α-AI；c：超滤后 α-AI；d：透析后 α-AI。

表4 白芸豆  $\alpha$ -AI 纯化过程中各步骤的  $\alpha$ -AI 活性 ( $IC_{50}$ 值) 及提取率

Table 4 Activities ( $IC_{50}$ ) and extraction rates of  $\alpha$ -AI in each step during the purification process of white kidney bean  $\alpha$ -AI

纯化工艺	$IC_{50}/(mg/mL)$	提取率/%
水提液	11.02±0.12	25.77±0.37
酸沉-醇沉后 $\alpha$ -AI	7.16±0.06	16.26±0.84
超滤后 $\alpha$ -AI	2.78±0.08	6.47±0.52
透析后 $\alpha$ -AI	0.89±0.04	1.92±0.23

### 3 结论

本研究首先通过对 DNS 微孔法测定  $\alpha$ -AI 活性的测定波长、显色剂用量、显色反应时间及静置时间等条件进行研究, 确定了  $\alpha$ -AI 活性测定的最佳条件为: 测定波长为 482 nm、DNS 用量为 80  $\mu$ L、反应时间为 15 min、静置时间为 10 min。随后在单因素试验结果的基础上, 以  $\alpha$ -AI 活性和蛋白质含量为双评估指标, 进行  $L_9(3^4)$  正交试验确定了白芸豆  $\alpha$ -AI 提取的最优提取工艺为: 提取温度为 45  $^{\circ}$ C, 提取时间为 2.5 h; 提取 pH 为 6.6, 液料比为 7.5。最后通过酸沉-醇沉、超滤和透析得到了较纯的  $\alpha$ -AI, 经测定其  $IC_{50}$  为 0.89±0.04 mg/mL, 提取率为(1.92±0.23)%, 这与王文蒙<sup>[11]</sup>采用色谱法制备的  $\alpha$ -AI 活性( $IC_{50}$  为 0.60 mg/mL) 和提取率(1.84%)相近, 比文献<sup>[12]</sup>中  $\alpha$ -AI 的提取率(0.12%)提高了 16 倍。因此相比于色谱法及其他方法, 本方法更为简单、方便、高效、而且成本低, 不需要用到任何昂贵的仪器, 因此适合于大多普通实验室进行研究, 同时也可作为  $\alpha$ -AI 的低成本工业化生产提供一定的指导意义。

### 参考文献

- [1] 让一峰. 白芸豆  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂的制备及其在低 GI 方便粥中的应用[D]. 无锡: 江南大学, 2016  
RANG Yi-feng. Preparation of white kidney bean  $\alpha$ -amylase inhibitor and its application in low GI convenient porridge [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2016
- [2] 訾艳. 白芸豆中活性蛋白及多肽的制备与研究[D]. 太原: 山西大学, 2015  
ZI Yan. Study on preparation and research of active proteins and polypeptides in white kidney beans [D]. Tai Yuan: Shanxi University, 2015
- [3] 王国英, 李国庆, 袁东征. 白芸豆的营养价值与药用价值[J]. 蔬菜科技, 2016, 6: 4  
WANG Guo-ying, LI Guo-qing, YUAN Dong-zheng. Nutritional value and medicinal value of white kidney beans

- [J]. Vegetable Technology, 2016, 6: 4
- [4] YANG Ma-yun, ZHANG Xi-qin, MA-Yue, et al. Purification and partial characterization of a glycoprotein alpha-amylase inhibitor from white kidney bean (*Phaseolus vulgaris*. L) [J]. Journal of Food Biochemistry, 2008, 32(1): 72-84
- [5] ZHANG Xiao-qi, YANG Ming-yan, MA Yu, et al. Isolation and activity of an alpha-amylase inhibitor from white kidney beans [J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2007, 42 (12): 1282-1287
- [6] 迟永楠, 孙艳, 钟毓, 等. 白芸豆中  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂的提取及其性能研究[J]. 食品科技, 2017, 42(12): 225-230  
CHI Yong-nan, SUN Yan, ZHONG Yu, et al. Preparation and property of  $\alpha$ -amylase inhibitor from white kidney beans [J]. Food Technology, 2017, 42 (12): 225-230
- [7] MA Yan-li, RANG Yi-feng, YANG Rui-jin, et al. Effect of white kidney bean extracts on estimated glycemic index of different kinds of porridge [J]. Food Science and Technology, 2018, 96: 576-582
- [8] MA Tormo, I Gil-exojo, AR Tejada, et al. Hypoglycaemic and anorexigenic activities of an alpha-amylase inhibitor from white kidney beans (*Phaseolus Vulgaris*) in wistar rats [J]. British Journal of Nutrition, 2004, 92 (5): 785-790
- [9] WU Cheng-tian, CHIU Chen-yuan, HUANG Chun-fa, et al. Genotoxicity and 28-day oral toxicity studies of a functional food mixture containing maltodextrin, white kidney bean extract, mulberry leaf extract, and niacin-bound chromium complex [J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2018, 92: 67-74
- [10] 刘蕊莉, 刘娟, 余孝云. 白芸豆组合物对体质量管理的功效探究[J]. 中医学报, 2017, 32(4): 673-676  
LIU Rui-li, LIU Juan, YU Xiao-yun. Exploration the effect of white kidney bean composition on the weight management [J]. Journal of Traditional Chinese Medicine, 2017, 32 (4): 673-676
- [11] 王文蒙.  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂的提取、分离及性质研究[D]. 天津: 天津商业大学, 2010.  
WANG Wen-meng. Study on Isolation and Purification of  $\alpha$ -amylase inhibitors and its characteristics [D]. Tian Jin: Tianjin University of Commerce, 2010
- [12] 赵蓉. 白芸豆中减肥药物  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂的提纯及其性质研究[D]. 西安: 西北大学, 2010  
ZHAO Rong. Study on purification and characterization of  $\alpha$ -amylase inhibitors for weight loss drugs in white kidney bean [D]. Xi an: Northwest University, 2010

(下转第 225 页)