

马铃薯胰凝乳蛋白酶抑制剂活力的测定

曾凡逵¹, 周添红¹, 康克归², 刘刚¹

(1. 中国科学院兰州化学物理研究所, 环境材料与生态化学研究发展中心, 甘肃兰州 730000)

(2. 甘肃薯界淀粉有限公司, 甘肃定西 730510)

摘要: 胰凝乳蛋白酶抑制剂的活力测定对于马铃薯块茎蛋白研究非常重要, 特别是对于马铃薯蛋白的分离纯化, 本文将详细阐述马铃薯胰凝乳蛋白酶抑制剂的活力测定方法。本文所描述的方法是以酪蛋白为底物, 在 275 nm 检测波长下采用分光光度法, 在存在和不存在抑制剂的情况下, 用一定量胰凝乳蛋白酶水解酪蛋白, 测定酪蛋白分解产物的生成量。检测结果表明, 从马铃薯块茎中提取的粗蛋白溶液其胰凝乳蛋白酶抑制剂活力为 98.31 CUI/mg, 按另外一种表达方式 82.11 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 即每毫克胰凝乳蛋白酶抑制剂能抑制 82.11 μg 胰凝乳蛋白酶。理论上, 每 100 g 马铃薯块茎所含的胰凝乳蛋白酶抑制剂能抑制 147.43 mg 胰凝乳蛋白酶的活力。该方法不仅适用于马铃薯胰凝乳蛋白酶抑制剂的活力测定, 对其他所有来源的胰凝乳蛋白酶抑制剂活力测定同样适用。

关键词: 马铃薯; 胰凝乳蛋白酶抑制剂; 活力测定; 酪蛋白

文章编号: 1673-9078(2015)2-274-279

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.2.043

Determination of Potato Chymotrypsin Inhibitor Activity

ZENG Fan-kui¹, ZHOU Tian-hong¹, KANG Ke-gui², LIU Gang¹

(1. Research & Development Center for Eco-material and Eco-chemistry, Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China) (2. ansu Shujie Starch Limited Company, Dingxi 730510, China)

Abstract: Determination of chymotrypsin inhibitor activity is very important for the study of proteins in potato tubers, particularly for protein separation and purification. In this study, a method to evaluate the activity of a potato-derived chymotrypsin inhibitor was explored. This method was based on the spectrophotometric determination (275 nm) of the hydrolysis products of casein that were produced by a specific concentration of chymotrypsin, in the presence or absence of the inhibitor. The results showed that the chymotrypsin inhibitor activity of a crude protein solution extracted from potato tubers was 98.31 CUI/mg (82.11 $\mu\text{g}/\text{mg}$). In other words, each milligram of chymotrypsin inhibitor inhibited 82.11 μg chymotrypsin. Theoretically, the chymotrypsin inhibitor content in 100 g potato tubers can inhibit the activity of 147.43 mg chymotrypsin. Thus, this method is suitable to determine the activity of chymotrypsin inhibitors from potatoes and other sources.

Key words: potato; chymotrypsin inhibitor; activity determination; casein

南非刺桐 (*Erythrina caffra*), 大豆 (*Glycine max*), 棉豆 (*Phaseolus lunatus*), 花生 (*Arachis hypogaea*), 硬皮豆 (*Macrotyloma axillare*), 豇豆 (*Vigna unguiculata*), 马铃薯 (*Solanum tuberosum*), 印度黑绿豆 (*black gram*), 鹰嘴豆 (*chick pea*), 木豆 (*pigeon pea*), 菜豆 (*Phaseolus vulgaris*), 四棱豆 (*Psophocarpus tetragonolobus*), 蚕豆 (*Vicia faba*), 班巴拉花生 (*Vigna subterranea*), 赤小豆 (*Vigna umbellata*) 等植物中都含有丰富的胰凝乳蛋白酶抑制剂^[1]。

马铃薯块茎中含有 0.6%~2.1% (湿基) 蛋白, 其

收稿日期: 2014-07-01

基金项目: 国家马铃薯产业技术体系专项 (nycytx-15); 国家自然科学基金青年科学基金项目 (31301532); 中国科学院“西部之光”人才培养计划项目 (科发人字[2013]165号)

作者简介: 曾凡逵 (1980-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向为马铃薯加工

通讯作者: 刘刚 (1962-), 男, 博士, 研究员, 研究方向为马铃薯加工

中蛋白酶抑制剂大约占一半^[2], 其分子量介于 5~25 kDa^[3]。在马铃薯块茎中, 蛋白酶抑制剂的作用是作为贮存蛋白和调节内源蛋白酶的活性。另外, 蛋白酶抑制剂对草食性昆虫和致植物病的真菌也具有活性^[4-5]。创伤和水分胁迫可以促使马铃薯块茎分泌蛋白酶抑制剂^[6]。胰凝乳蛋白酶 (EC 3.421.1), 又叫糜蛋白酶, 是一种典型的丝氨酸蛋白酶, 脊椎动物的消化酶。和胰蛋白酶抑制剂类似, 胰凝乳蛋白酶抑制剂也能降低蛋白质在肠道内的降解, 导致氨基酸和肽的生成受到影响, 从而影响生物的正常代谢。胰凝乳蛋白酶对抑制剂非常敏感, 但胰凝乳蛋白酶抑制剂具有热不稳定性^[1]。因此, 有必要确保马铃薯浓缩蛋白应用于食品工业的时候, 应将蛋白酶抑制剂进行灭活。也正是由于这个原因, 马铃薯浓缩蛋白没有在食品工业中得到很好的应用。

Kakade 等^[7]报道了大豆胰凝乳蛋白酶抑制剂活力

的测定方法,其原理是以酪蛋白为底物,在添加和不添加胰凝乳蛋白酶抑制剂的情况下对比分析胰蛋白酶分解酪蛋白生成的产物在波长为 275 nm 的吸光值。前期我们课题组对马铃薯蛋白酶抑制剂的分离进行了相关报道^[8-10],本文将详细阐述马铃薯胰凝乳蛋白酶抑制剂的活力测定方法。文献检索结果表明,目前还没有专门针对马铃薯胰凝乳蛋白酶抑制剂活力测定方法的相关报道。研究其分析检测方法对马铃薯蛋白研究具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料

α -糜蛋白酶来源于牛胰腺(α -Chymotrypsin from bovine pancreas)(货号: C4129-250MG),酪蛋白来源于牛奶(Casein from bovine milk)(货号: C5890-500G),西格玛奥德里奇公司;三氯乙酸,二水氯化钙,上海山浦化工有限公司;无水乙酸钠,西安化学试剂厂;十水合四硼酸钠,亚硫酸氢钠,氢氧化钠,四川西陇化工有限公司;硼酸,天津市丰越化学品有限公司;盐酸,甘肃和顺化工有限责任公司;冰醋酸,利安隆博华(天津)医药化学有限公司。

1.1.2 仪器

DGG-9240B型电热恒温鼓风干燥箱,上海森信实验仪器有限公司;84-1A型六位磁力搅拌器,上海司乐仪器有限公司;不锈钢电热蒸馏水器,上海三申医疗器械有限公司;UV765紫外可见分光光度计,上海精密科学仪器;SK-1快速混匀器,金坛市城东新瑞仪器厂;2004-21(501)型超级恒温水浴,常州国华电器有限公司;SS260-A型多功能食物搅拌器,佛山市沃尔姆斯电器有限公司;TDL-40B型离心机,TGL-20B型高速离心机,上海安亭科学仪器厂;雷磁 PHS-3C 型 pH 计,上海仪电科学仪器股份有限公司;FA2004N 电子天平,上海菁海仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 溶液配制

1.2.1.1 硼酸盐缓冲液(0.1 M, pH 7.6): 贮存液 A: 0.2 M 硼酸溶液(12.4 g 硼酸溶于 1 L 蒸馏水);贮存液 B: 0.05 M 四硼酸钠(19.05 g 四硼酸钠溶于 1 L 水)。50 mL 贮存液 A 添加 2 mL 贮存液 B,用蒸馏水定容到 200 mL,测 pH 值应为 7.6。

1.2.1.2 1M NaOH 溶液: 溶解 4 g NaOH 到 100 mL 蒸馏水。

1.2.1.3 酪蛋白溶液: 称 1 g 酪蛋白用 10 mL 1 M 的 NaOH 溶液磁力搅拌,溶解后添加 40 mL 0.1 M 的硼酸缓冲液(pH 7.6),然后缓慢添加 1M 的 HCl 溶液,将 pH 值调至 7.6,再用 0.1 M 的硼酸缓冲液(pH 7.6)定容到 100 mL。

1.2.1.4 含 0.08 M $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 的 0.001 M 盐酸溶液: 取 0.09 mL 浓盐酸(37%, m/V)加 900 mL 蒸馏水,再加 11.76 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,然后加蒸馏水定容到 1 L。

1.2.1.5 胰凝乳蛋白酶溶液(40 $\mu\text{g/mL}$): 称 4 μg 胰凝乳蛋白酶,用含 0.08 M $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 的 0.001 M HCl 100 mL 溶解。

1.2.1.6 三氯乙酸(TCA)试剂: 称 18 g 三氯乙酸和 18.0 g 无水乙酸钠。加 200 mL 冰乙酸,用蒸馏水定容到 1 L。

1.2.2 蛋白酶抑制剂的提取

取一个马铃薯洗净去皮切成小块,称 100 g 薯块,用大约 100 mL 0.1 M 硼酸盐缓冲液(pH 7.6,含 2 mM 亚硫酸氢钠作为护色液)按物料比 1:1 进行打浆,4 层纱布过滤后再用大约 100 mL 相同缓冲液冲洗滤渣。将滤液 8000 r/min 离心 30 min 分离淀粉,上清液(210 mL)即为含马铃薯蛋白酶抑制剂的粗蛋白溶液。

1.2.3 粗蛋白含量测定

根据 GB/T 5511-2008 采用凯氏定氮法进行测定,氮换算成蛋白的系数为 6.25。

1.2.4 标准曲线制作

1.2.4.1 分别移取胰凝乳蛋白酶贮存液 0.2 mL、0.4 mL、0.6 mL、0.8 mL 和 1.0 mL 到 5 根不同的 15 mL 带盖塑料离心管,再分别添加含有 0.08 M Ca^{2+} 的 0.001 M HCl 0.8 mL、0.6 mL、0.4 mL、0.2 mL 和 0 mL 将体积补足到 1 mL。另取 5 根离心管按相同的比例添加胰凝乳蛋白酶贮存液和盐酸溶液作为空白对照。

1.2.4.2 每一根离心管中分别添加 1 mL 0.1 M 的硼酸缓冲液(pH 7.6),然后将离心管放入 37 °C 的恒温水浴中保温 10 min。在作为空白的 5 根离心管中分别添加 6 mL 三氯乙酸试剂,所有 10 根离心管中分别添加 2 mL 预热到 37 °C 的酪蛋白溶液。

1.2.4.3 将 10 根离心管中的样品用漩涡混匀器快速混匀后在 37 °C 条件下准确保持 10 min,然后向 5 根没有添加 TCA 试剂的离心管中分别添加 6 mL TCA 试剂终止反应。

1.2.4.4 将 10 根离心管在室温中放置至少 30 min,然后 4000 r/min 离心 10 min(或过滤),以空白样品为对照测量其他样品在 275 nm 的吸光度。

1.2.4.5 一个胰凝乳蛋白酶的活力单位(CU)定义为在 37 °C 条件下,10 mL 反应体系中酶解 10 min 后在 275

nm 的吸光值增加 0.01。

1.2.5 温度对胰凝乳蛋白酶抑制剂活力的影响

分别取稀释 10 倍的蛋白酶抑制剂样品溶液 0.2 mL 放入 8 根 15 mL 塑料离心管中 (4 根离心管为空白对照组), 然后分别添加 0.8 mL 硼酸盐缓冲液将体积补足到 1.0 mL, 置于 37 °C 水浴中 10 min。空白对照组添加 6 mL 三氯乙酸终止液, 然后在所有离心管中分别添加 1 mL 胰凝乳蛋白酶贮存液。分别取一根样品管和一根空白管置于 23.5 °C (室温)、30 °C、37 °C 和 45 °C 恒温水浴中准确放置 10 min。样品组反应 10 min 后添加 6 mL 终止液, 实验重复 3 次。将所有离心管在室温中放置至少 30 min, 然后 4000 RPM 离心 10 min, 以对应的空白样品为对照测量对应样品在 275 nm 的吸光度, 以温度为横坐标胰凝乳蛋白酶活力为纵坐标绘制曲线。

1.2.6 时间对胰凝乳蛋白酶抑制剂活力的影响

分别取稀释 10 倍的蛋白酶抑制剂样品溶液 0.2 mL 放入 8 根 15 mL 塑料离心管中 (4 根离心管为空白对照组), 然后分别添加 0.8 mL 硼酸盐缓冲液将体积补足到 1.0 mL, 置于 37 °C 水浴中 10 min。空白对照组添加 6 mL 三氯乙酸终止液, 然后在所有离心管中分别添加 1 mL 胰凝乳蛋白酶贮存液。将所有离心管置于 37 °C 恒温水浴中进行反应, 一根样品管对应一根空白管分别准确反应 5 min、10 min、15 min 和 20 min。样品组反应后添加 6 mL 终止液, 将所有离心管在室温中放置至少 30 min, 然后 4000 r/min 离心 10 min, 以对应的空白样品为对照测量对应样品在 275 nm 的吸光度, 以反应时间为横坐标胰凝乳蛋白酶活力为纵坐标绘制曲线。

1.2.7 蛋白酶抑制剂活力的测定

1.2.7.1 分别取稀释 10 倍以后的蛋白酶抑制剂样品溶液 0.2 mL、0.3 mL 和 0.4 mL 放入 3 个不同的 15 mL 塑料离心管中, 然后分别添加 0.8 mL、0.7 mL 和 0.6 mL 硼酸盐缓冲液将体积补足到 1.0 mL。实验重复 3 次。另外取 3 根离心管按相同比例添加蛋白酶抑制剂样品溶液和硼酸缓冲液, 作空白对照。在离心管中分别添加 1 mL 胰凝乳蛋白酶贮存液然后置于 37 °C 恒温水浴中准确放置 10 min。

1.2.7.2 在 3 根空白对照离心管中添加 6 mL 三氯乙酸, 然后在其余离心管中分别添加 2 mL 预热到 37 °C 的酪蛋白溶液。在 37 °C 恒温水浴中酶解 10 min 后, 往没有添加 TCA 试剂的离心管中分别添加 6 mL 的三氯乙酸终止反应。

1.2.7.3 将所有离心管在室温中放置至少 30 min, 然后 4000 r/min 离心 10 min, 以对应的空白样品为对照

测量其他样品在 275 nm 的吸光度。

1.2.7.4 胰凝乳蛋白酶抑制剂的活力被定义为被抑制的胰凝乳蛋白酶单位 (chymotrypsin units inhibited, CUI), 结果可以表示为 CUI/mg 蛋白或者 CUI/g 样品。如果用 CUI/mg 蛋白来作为蛋白酶抑制剂的活力单位, 待测样品的蛋白含量可以通过 Lowry 法来进行测定 (本实验采用凯氏定氮法)。胰蛋白酶抑制剂活力的实际值可以通过不同体积的样品溶液来进行测定, 然后推算出当样品溶液的体积为零时蛋白酶抑制剂的活力 (结果为零的话, 说明检测比较准)。

2 结果与讨论

2.1 标准曲线

图 1 为胰凝乳蛋白酶分解酪蛋白生成产物的全长扫描图谱, 从图中可以看出胰凝乳蛋白酶分解酪蛋白的产物最大吸收波长为 275 nm。反应体系中酪蛋白的添加量均为 2 mL (0.02 g), 反应在 37 °C 下进行, 10 min 后, 275 nm 波长的吸光值随着酶的添加量增加而增加, 说明胰凝乳蛋白酶水解酪蛋白的产物相应增加。

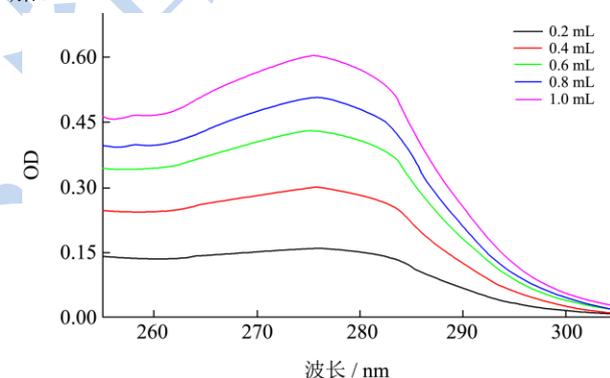


图 1 酪蛋白的分解产物吸收曲线

Fig.1 Absorption profiles of the hydrolysis products of casein

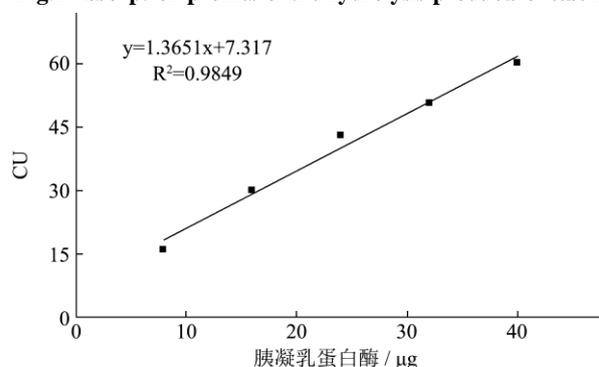


图 2 胰凝乳蛋白酶抑制剂活力测定标准曲线

Fig.2 Calibration curve for chymotrypsin inhibitor activity

根据胰凝乳蛋白酶活力单位的定义, 吸光值乘以 100 即为胰凝乳蛋白酶活力单位 (Chymotrypsin unit,

CU)。0.2 mL、0.4 mL、0.6 mL、0.8 mL 和 1.0 mL 胰凝乳蛋白酶溶液所含的胰凝乳蛋白酶分别为 8 μg、16 μg、24 μg、32 μg 和 40 μg，以胰凝乳蛋白酶的量 (μg) 为横坐标，胰凝乳蛋白酶活力 (CU) 为纵坐标绘制标准曲线，如图 2 所示，两者具有较好的线性相关性 ($R^2=0.9849$)。当体系中添加胰凝乳蛋白酶抑制剂的时候，部分胰蛋白酶的活力会被抑制，导致酪蛋白的分解产物生成量减少，测得的吸光值同样会降低，根据这一原理可以对胰凝乳蛋白酶抑制剂的活力进行测定。

2.2 反应温度和时间对胰凝乳蛋白酶抑制剂活力的影响

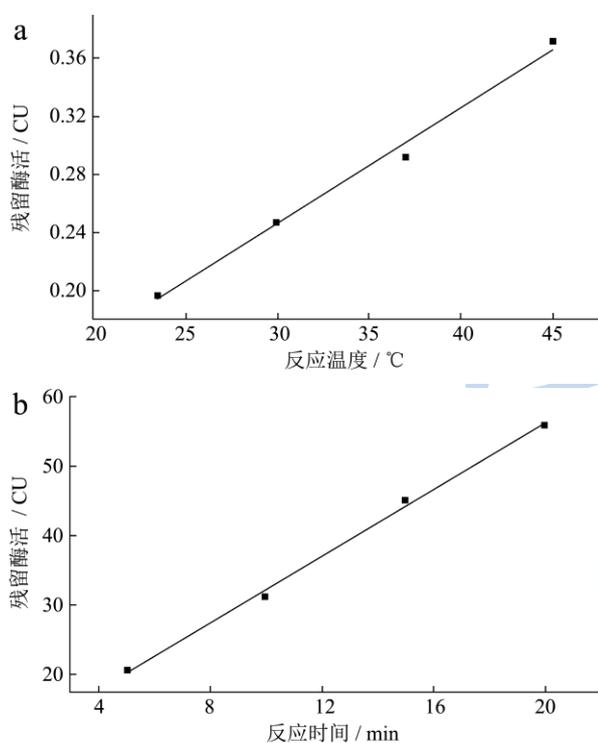


图3 反应温度 (a) 和反应时间 (b) 对胰凝乳蛋白酶抑制剂活力的影响

Fig.3 Effect of reaction temperature (a) and reaction time (b) on the activity of the chymotrypsin inhibitor

反应温度和反应时间对胰凝乳蛋白酶抑制剂活力的影响如图 3 所示。随着反应温度升高 (图 3a)，胰凝乳蛋白酶水解酪蛋白的生成产物增加，残留胰凝乳蛋白酶的活力与反应温度呈线性关系 (R^2 为 0.9914)，考虑到胰凝乳蛋白酶抑制剂在制药行业中的应用，选择 37 °C 作为胰凝乳蛋白酶抑制剂活力测定温度最为合适。由图 3b 可知，尽管反应体系中有蛋白酶抑制剂存在，随着反应时间增加，胰凝乳蛋白酶水解酪蛋白生成产物的量增加。忽略反应时间，OD₂₇₅ 值换算成

胰蛋白酶活力 ($\times 100$) 以后与反应时间呈线性相关 (R^2 为 0.9958)。胰凝乳蛋白酶抑制剂的活力需要根据胰凝乳蛋白酶的活力来进行计算，反应时间不同，计算结果不一样，因此将反应时间统一为 10 min。

2.3 样品测定结果

凯氏定氮法测得马铃薯粗蛋白溶液的蛋白含量为 0.855% (氮换算成蛋白的系数为 6.25)，添加稀释 10 倍以后的胰蛋白酶抑制剂溶液 0.2、0.3 和 0.4 mL 相当于添加的蛋白量为 0.17、0.26 和 0.34 mg。表 1 中，样品 1、2 和 3 分别为马铃薯粗提液稀释 10 倍后添加 0.2 mL、0.3 mL 和 0.4 mL，实验分别重复了 3 次，结果以平均数±标准差表示。从表 1 可以看出三个浓度梯度测得的马铃薯胰凝乳蛋白酶抑制剂的活力分别为 96.73 ± 2.80 、 95.83 ± 3.49 和 95.12 ± 2.22 CUI/mg。

胰蛋白酶抑制剂的活力测定通常采用合成底物，Na α - 苯甲酰-D,L-精氨酸-4-硝基苯胺盐酸盐 (Na-Benzoyl-D, L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride)，大豆胰蛋白酶抑制剂活力测定报道最多。同胰蛋白酶抑制剂活力测定一样，胰凝乳蛋白酶抑制剂活力检测过程发现当反应体系中抑制剂的添加增加时，检测结果显示抑制剂的活力越低。从表 1 最后两栏可以看出，随着抑制剂添加量的增加，抑制剂活力呈降低趋势，这一结果同 Kakade 等^[7]报道的大豆胰凝乳蛋白酶抑制剂活力测定结果一致。

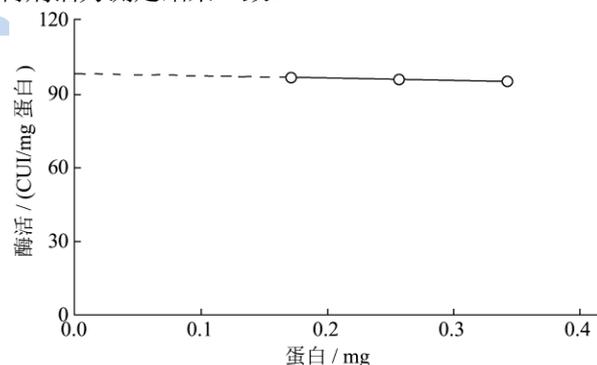


图4 马铃薯粗提物胰凝乳蛋白酶抑制剂的活力图

Fig.4 Chymotrypsin inhibitor activity of crude potato extract

Kakade 等指出胰凝乳蛋白酶抑制剂的“真实”活力 (“True” chymotrypsin inhibitor activity) 不能简单地将几个不同梯度添加量胰凝乳蛋白酶抑制剂所得结果进行平均，而应该采用最小二乘法将结果进行线性拟合 (和标准曲线制作一致)，然后采用截距作为最终结果。按照这样的计算方法，图 4 的截距为 98.31。因此，马铃薯胰凝乳蛋白酶抑制剂的“真实”活力应当为 98.31 CUI/mg 蛋白。表 3 还对马铃薯胰凝乳蛋白酶抑制剂的活力进行了换算，三个不同梯度马铃薯粗提

液的胰凝乳蛋白酶抑制剂的活力分别为 77.71 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 、74.77 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 和 73.11 $\mu\text{g}/\text{mg}$ ，采用相同的方法得出“真实”酶活为 82.11 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。还可以进一步计算得出，本次试验所采用的 100 g 马铃薯块茎中所含有的胰凝乳蛋白酶抑制剂能抑制 147.43 mg 胰凝乳蛋白酶的活力。这里阐述的分光光度法不仅适合于马铃薯胰凝乳蛋白酶抑制剂的活力测定，对其他所有来源的胰凝乳蛋白酶抑制剂活力测定同样适用。

值得注意的是，这里用到的仅仅是马铃薯蛋白粗提液，样品中除了胰凝乳蛋白酶抑制剂，还有其他类型的蛋白酶抑制剂（如胰蛋白酶抑制剂），另外还含有大约 40% 的 patatin 蛋白和 10% 的高分子量马铃薯蛋白，这些蛋白都不具有胰凝乳蛋白酶抑制活力。将马铃薯胰凝乳蛋白酶抑制剂从粗蛋白中分离纯化出来以后，活力会提高。

Pouvreau 等^[11]对马铃薯块茎中各蛋白组分进行了分离纯化，并采用 Ala-Ala-Pro-Phe-pNa 作为底物对分离的各蛋白组分的胰凝乳蛋白酶抑制剂的活力进行了测定，活力最高为 12.2 mg/g（低于本次实验测定结果）。作者没有详细描述测定方法，采用的缓冲液为 Tis-HCl（7.8），没有提到反应温度和反应时间，检测结果的差异最大可能性是所采用的底物不一致。

胰凝乳蛋白酶抑制剂的活力测定对于马铃薯蛋白的研究具有重要意义，特别是对于马铃薯蛋白的分离纯化。马铃薯蛋白中含有大约 50% 的蛋白酶抑制剂，其中大部分属于丝氨酸蛋白酶抑制剂。近年来的研究结果表明，马铃薯蛋白酶抑制剂具有很多潜在的应用价值，例如用于减肥、预防和治疗血栓性疾病和癌症

等，在食品和制药工业中具有广阔的应用前景。马铃薯蛋白酶抑制剂可提高血浆中胆囊收缩素的含量，胆囊收缩素能延缓胃的排空，控制人体血糖浓度，通过饱腹感减少食物的摄入而达到减肥效果^[12]；马铃薯蛋白酶抑制剂可预防太阳光紫外线对人体皮肤的伤害，可用于研制新型护肤品^[13]；粪便中的蛋白酶含量过高会引起肛周炎，马铃薯蛋白酶抑制剂可有效抑制人体粪便中蛋白酶的活性，因此可通过外敷马铃薯蛋白酶抑制剂来预防和治疗蛋白酶引起的肛周炎^[14]。此外，马铃薯羧肽酶抑制剂具有抗血栓活性与抗肿瘤作用；Kim 等还报道了 Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂具有抗白色念珠菌、金黄色葡萄球菌、李斯特菌和大肠杆菌等人类和植物病原微生物的活性，因此可用于开发新型抗感染剂或农药^[2]。

3 结论

以酪蛋白为底物采用分光光度法能有效测定马铃薯块茎中的胰凝乳蛋白酶抑制剂的活力，检测波长为 275 nm，反应温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ ，反应时间为 10 min。酪蛋白相对于其他底物价格低廉，分光光度计为一般分析实验室常规设备，因此更有利于该方法的推广应用。从马铃薯块茎中提取的粗蛋白溶液其胰凝乳蛋白酶抑制剂活力为 98.31 CUI/mg（82.11 $\mu\text{g}/\text{mg}$ ），理论上每 100 g 马铃薯块茎中所含的胰凝乳蛋白酶抑制剂能抑制 147.43 mg 胰凝乳蛋白酶的活力。该方法不仅适合于马铃薯胰凝乳蛋白酶抑制剂的活力测定，对其他所有来源的胰凝乳蛋白酶抑制剂活力测定同样适用。

表 1 胰凝乳蛋白酶抑制剂活力测定结果

Table 1 Measurement of chymotrypsin inhibitor activity

样品	蛋白含量 /mg	残留酶活 /CU ^a	被抑制酶活 /CU ^b	残留的活性胰 蛋白酶/ μg^c	被抑制的胰蛋 白酶/ μg^d	胰凝乳蛋白酶抑制剂活力	
						(CUI/mg 蛋白)	(mg 蛋白酶/mg 蛋白)
1	0.17	43.78 \pm 1.62	16.54 \pm 0.41	26.71 \pm 0.91	13.29 \pm 0.48	96.73 \pm 2.80	0.08 \pm 0.00
2	0.26	35.74 \pm 1.14	24.58 \pm 0.93	20.82 \pm 0.83	19.18 \pm 0.56	95.83 \pm 3.49	0.07 \pm 0.00
3	0.34	27.79 \pm 0.77	32.53 \pm 1.28	15.00 \pm 0.51	25.00 \pm 0.85	95.12 \pm 2.22	0.07 \pm 0.00

注：^a根据胰蛋白酶活力单位的定义，残留酶活= $\text{OD}_{275\text{nm}} \times 100$ ；^b1 mL 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 胰凝乳蛋白酶的活力为 60.32 CU，被抑制的酶活= $60.32 - \text{残留酶活}$ ；^c根据标准曲线计算；^d蛋白含量-残留的活性胰蛋白酶。

参考文献

- [1] HARINDER P S, MAKKAR P, SIDDHURAJU, et al. Plant secondary metabolites, in WALKER J M (Eds.), methods in molecular biologyTM [M]. Totowa: Humana Press, 2007
- [2] KÄRENLAMI S O, WHITE P J. Potato proteins, lipids, and minerals, in: SINGH J & KAUR L (Eds.), advances in potato chemistry and technology [M]. Oxford: Elsevier, 2009
- [3] BAUW G, NIELSEN H V, EMMERSEN J, et al. Patatins, kunitz protease inhibitors and other major proteins in tuber of potato cv [J]. Kuras. FEBS Journal, 2006, 273(15): 3569-3584
- [4] BAYÉS A, DE LA VEGA M R, VENDRELL J, et al. Response of the digestive system of Helicoverpa zea to ingestion of potato carboxypeptidase inhibitor and characterization of an uninhibited carboxypeptidase B [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2006, 36(8):

- 654-664
- [5] HERMOSA M R, TURRÀ D, FOGLIANO V, et al. Identification and characterization of potato protease inhibitors able to inhibit pathogenicity and growth of botrytis cinerea [J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2006, 68(4-6): 138-148
- [6] LEDOIGT G, GRIFFAUT B, DEBITON E, et al. Analysis of secreted protease inhibitors after water stress in potato tubers [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2006, 38(3-5): 268-271
- [7] KAKADE M L, SWENSON D H, LIENER I E. Note on the determination of chymotrypsin and chymotrypsin inhibitor activity using casein [J]. *Analytical Biochemistry* 1970, 33(2): 255-258
- [8] ZENG FK, LIU H, MA PJ, et al. Recovery of native protein from potato root water by expanded bed adsorption with Amberlite Xad7hp [J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2013, 18(5): 981-988
- [9] 曾凡逵,刘刚.马铃薯蛋白的分离及氨基酸组成分析[J].*食品科学*,2014,35(9):53-56
ZENG Fan-kui, LIU Gang. Isolation and amino acid analysis of potato protein [J]. *Food Science*, 2014, 35(9): 53-56
- [10] 曾凡逵,周添红.马铃薯能生食吗?[J].*中国马铃薯*,2013, 27(6):374-378
ZENG Fan-kui, ZHOU Tian-hong. Can potato be eaten raw? [J]. *Chinese Potato Journal*, 2013, 27(6): 374-378
- [11] POUVREAU L, GRUPPEN H, PIERSMA SR. et al. Relative abundance and inhibitory distribution of protease inhibitors in potato juice from cv. elkana [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001, 49(6): 2864-2874
- [12] HU J, EDMONDSON B, RADOSEVICH J. Potato proteinase inhibitor ii exhibits activity in elevating fasting plasma cholecystokinin concentrations: USA, US20060204567 [P], 2006.9.14[2014.6.28]. <http://www.google.co.jp/patents/US20060204567?h=zh-CN&cl=en>
- [13] HUANG C, MA W Y, RYAN C A, et al. Proteinase inhibitors I and II from potatoes specifically block UV-induced activator protein-1 activation through a pathway that is independent of extracellular signal-regulated kinases, c-Jun n-terminal kinases, and P38 kinase [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(22): 11957-11962
- [14] RUSELER-VAN EMBDEN J G H, VAN LIESHOUT L M C, SMITS S A, et al. Potato tuber proteins efficiently inhibit human faecal proteolytic activity: implications for treatment of perianal dermatitis [J]. *European Journal of Clinical Investigation*, 2004, 34(4): 303-311