



# 苦瓜子蛋白的体外抗氧化活性研究

张泽生, 张兰平, 郭红莲

(天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

**摘要:** 测定了苦瓜子蛋白提取过程中不同提取物的体外抗氧化活性, 从而获得不同目标活性的蛋白组分. 结果表明, 90%饱和度的硫酸铵沉淀蛋白的柱纯化组分抗氧化活性较强, 30%的次之, 60%的最弱, 三种饱和度硫酸铵沉淀纯化得到的苦瓜子蛋白在不同抗氧化体系中存在抗氧化活性差异.

**关键词:** 苦瓜子蛋白; 抗氧化; 柱纯化; SDS-PAGE 电泳

**中图分类号:** TS20      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1672-6510 (2007) 02-0006-03

## Study on Proteins from *Momordica charantia* Seeds for Vitro Antioxidative Properties

ZHANG Ze-sheng, ZHANG Lan-ping, GUO Hong-lian

(College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** The test studied on the vitro antioxidative activities of proteins extracted from *Momordica charantia*.L seeds. The results indicated that three proteins extracted by saturated ammonium sulphate had the different antioxidative activities in three anti-oxidation systems. As a whole, protein precipitations by 90% saturated ammonium sulphate have the stronger activities, while which by 60% saturated ammonium sulphate have the weakest activities.

**Keywords:** *Momordica charantia* seed protein; antioxidative; column chromatography; SDS-PAGE electrophoresis

苦瓜(*Momordica charantia* L.)是葫芦科(*Cucurbitaceae*)苦瓜属植物, 又称癞葡萄和锦荔枝, 属蔓性一年生蔬菜. 苦瓜不但营养价值高, 一直以来受到人们喜爱, 近年来对苦瓜子活性成分的生理作用的研究也受到国内外广大学者的关注. 研究发现, 苦瓜子中多种活性物质具有降血糖<sup>[1]</sup>、降血脂<sup>[2]</sup>、抗肿瘤<sup>[3]</sup>以及抗病毒<sup>[4]</sup>等功效, 但是有关苦瓜子蛋白抗氧化研究的报道相对较少, 本文对苦瓜子蛋白在两种抗氧化体系中的抗氧化作用进行了测定.

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

青皮苦瓜子 (河南新乡市华盛种业有限公司提供): 剥除外壳, 磨粉, 过 40 目筛, 冷丙酮脱脂, 风干成干粉, 密封保存于 4℃ 备用.

氯化亚铁、水杨酸、硫酸亚铁等; 三吡啶三吡嗪 (tripyridyl-triazine, TPTZ); 丙烯酰胺; N, N-甲叉双丙烯酰胺; 三羟甲基氨基甲烷(Tris); 巯基乙醇; 中分子质量标准蛋白(14.4~97.4 ku); 巯基乙醇; 十二烷基磺酸钠(SDS); 葡聚糖凝胶 Sephadex G-100.

### 1.2 仪 器

SS230-A 多功能食物搅拌机; 818 型台面式 pH/ISE 测试仪; 高速组织切割机; MR 23i 冷冻离心机; 8~144 ku 透析袋; 冷冻干燥机; Bio-Rad 层析系统; 岛津 1240 型紫外可见分光光度计.

### 1.3 实 验 方 法

#### 1.3.1 苦瓜子蛋白的提取纯化

脱脂苦瓜子粉加入 15 倍的提取缓冲液 (缓冲液为 pH 7.5, 50 mmol/L 的 PBS), 低温浸泡 12 h, 植物组织匀浆机匀浆 1 min, 磁力搅拌器中速搅拌 4 h, 4℃ 离心, 转速为 10 000 r/min, 离心时间为 20 min, 去沉淀,

得粗提液. 低温条件下粗提液缓慢加入硫酸铵粉末逐级沉淀并离心分别得到 30%、60%、90%饱和度的硫酸铵沉淀物. 三种样品分别溶于尽量少的提取缓冲液中, 于 4℃ 置于透析袋中对蒸馏水透析 48 h, 聚乙二醇包埋透析袋进行浓缩, 浓缩物冷冻干燥成干粉备用.

分别取三种样品溶于 pH 7.5, 50 mmol/L 的磷酸盐缓冲液(PBS)中制成 1 mg/mL 的粗蛋白溶液, 离心除去不溶物后, 清液上 Sephadex G-100 柱(10 mm×250 mm), 用 pH 7.5, 50 mmol/L 的 PBS 缓冲液平衡洗脱, 分管收集, 流速控制在 2 mL/3 min, 每管收集 2 mL, 检测波长为 280 nm.

### 1.3.2 蛋白质的分子质量测定<sup>[5]</sup>

收集经 Sephadex G-100 柱纯化后的苦瓜子蛋白质样品峰, 制成一定浓度, 用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)法测定蛋白质的分子质量.

### 1.3.3 体外抗氧化实验

#### 1.3.3.1 清除羟自由基的测定<sup>[6,7]</sup>

(1) 基本原理: 参考 Fenton 反应体系模型, 利用  $H_2O_2$  与  $Fe^{2+}$  混合产生  $\cdot OH$ , 但由于  $\cdot OH$  具有很高的反应活性, 存活时间短, 若在体系中加入水杨酸, 就能有效地捕捉  $\cdot OH$ , 并产生有色产物. 该产物在波长 510 nm 处有强吸收, 若在反应体系中加入具有清除  $\cdot OH$  功能的被测物, 便会与水杨酸竞争  $\cdot OH$ , 而使有色产物生成量减少.

(2) 测定步骤: 采用固定反应时间法, 在相同体积的反应体系(6 mmol/L  $H_2O_2$  2 mL、6 mmol/L  $Fe^{2+}$  2 mL、6 mmol/L 水杨酸溶液 2 mL)中加入一系列不同浓度的提取物, 便会与水杨酸竞争  $\cdot OH$ , 而使有色产物生成量减少. 在相同体积的反应体系, 以蒸馏水为参比, 与试剂空白液比较, 在 510 nm 处测量各浓度下的吸光度, 便能测定被测物对  $\cdot OH$  的清除作用, 其清除率计算公式为

$$\text{清除率} = \frac{A_1 - A_x}{A_1} \times 100\%$$

式中:  $A_1$ ——空白对照液的吸光度;

$A_x$ ——加入提取液后的吸光度.

#### 1.3.3.2 总抗氧化能力的测定(TAC)的测定<sup>[8]</sup>

(1) 基本原理: 采用铁离子还原法(FRAP法), 原理为  $Fe^{3+}$ -三吡啶三吡嗪(TPTZ)可被样品中还原物质还原为  $Fe^{2+}$  而呈现出蓝色, 并在 593 nm 处具有最大光吸收, 根据吸光度大小计算样品抗氧化活性的强弱.

(2) 测定步骤: 取一定量的样品液, 加入 3.6 mL 工作液(由 0.3 mol/L 醋酸盐缓冲液 25 mL, 10 mmol/L TPTZ 溶液 2.5 mL, 20 mmol/L  $FeCl_3$  溶液 25 mL 组成),

混匀后于 37℃ 反应 10 min, 在 593 nm 处测定吸光度, 以 1.0 mmol/L  $FeSO_4$  为标准, 样品抗氧化活性(FRAP Value)以达到同样吸光度所需的  $FeSO_4$  的量表示, 同时以 L-抗坏血酸 (100  $\mu g/mL$ ) 作阳性对照.

以上实验均作 3 个平行实验, 结果取其平均值.

## 2 结果与分析

### 2.1 苦瓜子蛋白的凝胶柱层析分离

经 Sephadex G-100 柱纯化后, 苦瓜子蛋白粗提取物得到 3 个峰, 如图 1 所示; 30%硫酸铵沉淀物得到两个峰, 如图 2 所示, 记为  $I_3$ ,  $II_3$ ; 60%硫酸铵沉淀物得到一个峰, 如图 3 所示, 记为  $I_6$ ; 90%硫酸铵沉淀物得到两个峰, 如图 4 所示, 记为  $I_9$ ,  $II_9$ .

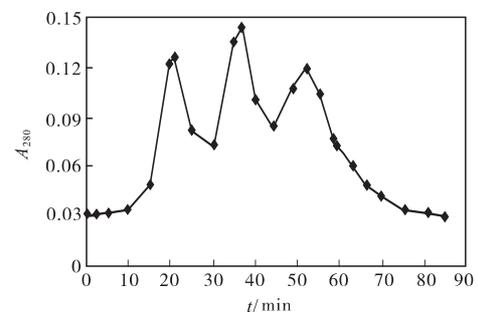


图 1 苦瓜子蛋白粗提物的 Sephadex G-100 柱纯化  
Fig.1 Column chromatography of bitter melon protein extract crude

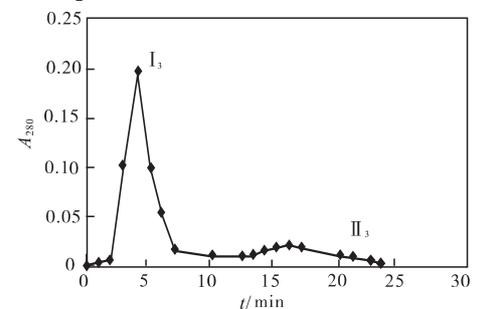


图 2 30%硫酸铵沉淀物的 Sephadex G-100 柱纯化  
Fig.2 Column chromatography of 30% saturated ammonium sulphate precipitate

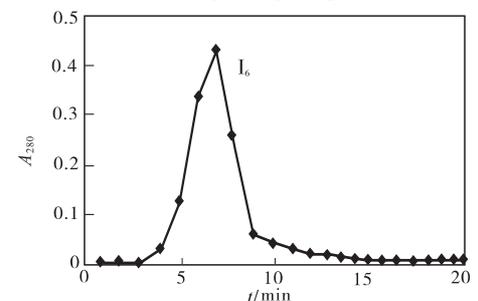


图 3 60%硫酸铵沉淀物的 Sephadex G-100 柱纯化  
Fig.3 Column chromatography of 60% saturated ammonium sulphate precipitate

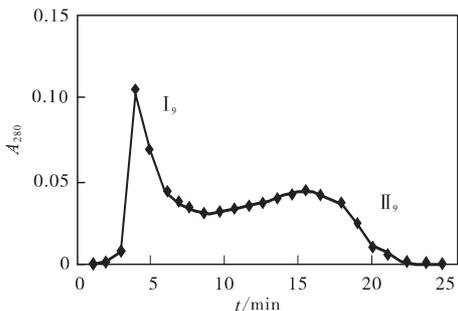
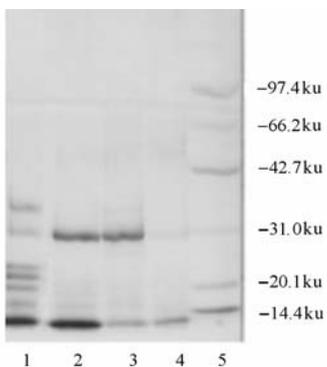


图4 90%硫酸铵沉淀物的 Sephadex G-100 柱纯化  
Fig.4 Column chromatography of 90% saturated ammonium sulphate precipitate

收集峰 I<sub>3</sub>、I<sub>6</sub>、I<sub>9</sub> 的纯化物浓缩至一定浓度进行下一步的分子质量检测 and 活性实验。

### 2.2 蛋白质分子质量鉴定

SDS-PAGE 电泳检测蛋白质分子质量的结果见图 5。由图 5 可以看出, 苦瓜子粗提物中蛋白质比较多、比较杂, 而经过不同饱和度硫酸铵沉淀得到的蛋白质组分较少。组分 I<sub>3</sub>、I<sub>6</sub>、I<sub>9</sub> 均含有分子质量小于 14.4 ku 的蛋白组分, 而且组分 I<sub>9</sub> 组分单一, 也为分子质量小于 14.4 ku 的组分, 另外, 组分 I<sub>3</sub> 和 I<sub>6</sub> 还含有分子质量为 30 ku 的蛋白组分。



1. 粗提物; 2. 组分 I<sub>3</sub>; 3. 组分 I<sub>6</sub>;  
4. 组分 I<sub>9</sub>; 5. 标准蛋白

图5 检测蛋白质的分子质量 SDS-PAGE 电泳  
Fig.5 Detection of molecular weight by SDS-PAGE electrophoresis

### 2.3 样品的体外抗氧化活性比较与分析

#### 2.3.1 样品清除羟自由基的能力

样品对羟自由基清除率的影响见图 6。由图 6 可以看出, 三种组分的清除羟自由基的能力相差不多, 质量浓度小于 1 mg/mL 时, I<sub>3</sub> 的抗氧化作用最强, 但是随着质量浓度的增大, I<sub>9</sub> 的作用效果与 I<sub>3</sub> 持平, I<sub>6</sub> 的羟自由基清除能力最低。三个样品的羟自由基清除能

力均随质量浓度的增大而增大, 比相同浓度的抗坏血酸稍差。

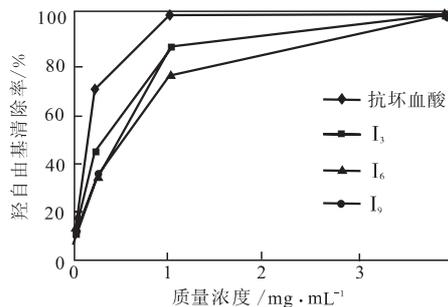


图6 样品对羟自由基清除率的影响  
Fig.6 Influence on HO· scavenging by samples of different concentration

#### 2.3.2 样品总抗氧化能力

样品总抗氧化能力的测定结果见图 7。由图 7 可以看出, 三个样品均具有一定的总抗氧化能力, 质量浓度小于 0.7 mg/mL 时, I<sub>9</sub> 的总抗氧化能力强于相同浓度的抗坏血酸, 但大于这个浓度时, 随质量浓度升高而总抗氧化能力增强的趋势减弱, 作用能力低于相同浓度的抗坏血酸, 与 I<sub>3</sub> 和 I<sub>6</sub> 相比, 它的总抗氧化能力最强, I<sub>6</sub> 的最弱。总体上, 各个样品的总抗氧化能力随着浓度的增大而增大, 作用能力与相同浓度的抗坏血酸相比稍差。

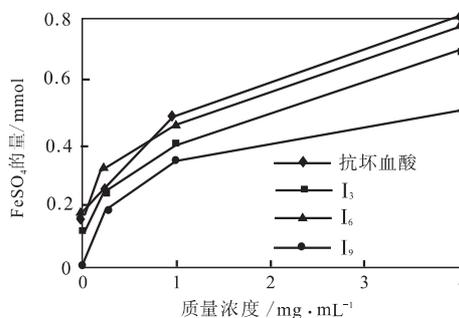


图7 样品对总抗氧化能力的影响

Fig.7 Influence on total antioxidant activity by samples of different concentration

## 3 结论

(1) 通过 Sephadex G-100 凝胶柱层析后, 苦瓜子蛋白粗提物可得到 3 个峰, 30%、60%、90% 三种饱和度的硫酸铵沉淀苦瓜子蛋白分别得到 2、1、2 个峰, 分别记为峰 I<sub>3</sub>、I<sub>6</sub>、I<sub>9</sub>、I<sub>3</sub>、I<sub>6</sub>、I<sub>9</sub>。峰 I<sub>3</sub>、I<sub>6</sub>、I<sub>9</sub> 经 SDS-PAGE 电泳实验表明均含有分子质量小于 14.4ku 的蛋白组分, 峰 I<sub>3</sub> 和 I<sub>6</sub> 还含有分子质量为 30 ku 的蛋白组分。

(下转第 15 页)