

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2017.01696

抗豆象绿豆胰蛋白酶抑制剂活性及理化性质

樊艳平¹ 张耀文² 赵雪英² 张仙红^{1,*}

¹山西农业大学农学院, 山西太谷 030801; ²山西省农业科学院作物科学研究所, 山西太原 030000

摘要: 以4个抗豆象绿豆品种B18、B20、B24和A22为试材, 以感虫绿豆品种晋绿1号为对照, 研究了不同绿豆中胰蛋白酶抑制剂活性及其在高温、酸碱及超声波下绿豆的胰蛋白酶抑制剂稳定性。结果表明, 4个抗豆象绿豆品种胰蛋白酶抑制剂活性均显著高于对照感虫品种, 且均与对照在0.01水平差异极显著, 其中B18活性最高, 高达70.2 TI U g⁻¹, B20和A22活性次之, B24活性最差, 但仍高达55.2 TI U g⁻¹。4个抗豆象绿豆品种在不同温度、不同pH和不同振幅超声波下, 残余活性均比对照高, 且残余活性均随温度升高、温浴时间延长而降低, pH在2~12之间, 随pH值的升高, 残余活性均呈现先升高后降低的趋势, 且pH值为6~8之间残余活性最高, 残余活性也随超声波辐射强度升高、时间延长而降低, 且4个抗虫品种中B18的耐高温性、耐酸碱性和耐辐射性最强, B20次之, B24的耐高温性、耐酸碱性最差, A22耐辐射性最差, 说明在不同温度、pH和超声波处理后, B18、B20是抗豆象绿豆胰蛋白酶抑制剂残余活性保存最高的2个品种, 应用价值较大。

关键词: 抗豆象绿豆; 胰蛋白酶抑制剂; 活性; 温度; pH; 超声波

Activity and Physico Chemical Properties of Trypsin Inhibitor in Bruchid-Resistant Mung Bean

FAN Yan-Ping¹, ZHANG Yao-Wen², ZHAO Xue-Ying², and ZHANG Xian-Hong^{1,*}

¹College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China; ²Institute of Crop Science, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030000, China

Abstract: Taking bruchid-resistant mung bean lines including B18, B20, B24, and A22 as experimental materials, a susceptible variety mung bean Jinlyu 1 as control, the activity of trypsin inhibitor and the stability of mung bean trypsin inhibitor under high temperature, pH and ultrasonic were measured. The trypsin inhibitor activities of four bruchid-resistant mung bean lines were significantly higher than those of control (Jinlyu 1). There were significant differences of trypsin inhibitor activity between four bruchid-resistant mung bean lines and the control at the 1% probability level. Among them, B18 had the highest activity (70.2 TI U g⁻¹), following by B20 and A22, and B24 had the lowest one (55.2 TI U g⁻¹). When treated with temperature, pH and amplitude of ultrasonic, the residual activities of trypsin inhibitor from the four bruchid-resistant mung bean lines were higher than those of control. The residual activities decreased with the increase of temperature and time of warm bath, which enhanced initially and then weakened when pH value was elevating between 2–12, with the highest when pH ranged from six to eight. The residual activities also reduced with the increasing ultrasonic intensity and treatment time. Among the four tested lines, B18 had the highest tolerance to high temperature, high acid and alkali stress, and ultrasonic intensity; B20 had the moderate tolerance, B24 had the lowest tolerance to high temperature, acid and alkali stress, while A22 had the lowest tolerance to ultrasonic treatment. We concluded that among four lines, B18 and B20 have the highest residual activity of bruchid-resistant mung bean trypsin inhibitor under temperature, pH and ultrasonic treatments, being of higher value of its application.

Keywords: Bruchid-resistant mung bean; Trypsin inhibitor; Activity; Temperature; pH; Ultrasonic

胰蛋白酶抑制剂(trypsin inhibitor, TI)普遍存在 于种子和块茎等植物的储藏器官中, 在豆类作物种

本研究由国家现代农业产业技术体系建设专项(GARS-08-G11)资助。

The study was supported by the China Agriculture Research System (GARS-08-G11).

* 通讯作者(Corresponding author): 张仙红, E-mail: zxh6288@sina.com

第一作者联系方式: E-mail: ndxxx@126.com, Tel: 13485360715

Received(收稿日期): 2016-12-18; Accepted(接受日期): 2017-07-23; Published online(网络出版日期): 2017-08-10.

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20170810.1616.008.html>

子中含量较高^[1-3]。它能在生物体内与胰蛋白酶结合形成一类不可逆的无酶活性的复合物, 从而抑制生物对蛋白质的消化、吸收和利用。胰蛋白酶抑制剂作为一种抗营养因子, 可与昆虫肠道中的胰蛋白酶结合形成稳定的复合物而影响昆虫对食物的消化和吸收; 同时, 胰蛋白酶抑制剂与胰蛋白酶形成的复合物还可能作为一个负反馈信号抑制昆虫的取食, 这种双重效应有效地降低了害虫对食物蛋白的消化利用^[4-7]。此外, 胰蛋白酶抑制剂还具有抗病毒、抗癌的作用, 据报道, 自豆类中提取的 Kunitz 型和 Bowman-Birk 型胰蛋白酶抑制剂可抑制 HIV-1 病毒增殖的反转录酶的活性, 从而抑制 HIV-1 病毒的增殖^[8]; 自蚕豆中提取的 Bowman-Birk 型胰蛋白酶抑制剂, 不仅可以抑制 HIV-1 反转录酶活性, 同时具有通过诱导染色质凝聚和细胞凋亡而抑制 HepG2 肝肿瘤细胞增殖的能力^[9]。此外, 大豆的 Bowman-Birk 型胰蛋白酶抑制剂对卵巢癌、宫颈癌及肠癌等多种肿瘤表现明显的抗癌活性^[10-12]; 北海道黑豆的 Bowman-Birk 型胰蛋白酶抑制剂对乳房癌细胞增殖有明显的抑制^[13]; 莢麦胰蛋白酶抑制剂可通过诱导实体癌细胞凋亡发挥抗癌作用^[14-16]。因此, 目前胰蛋白酶抑制剂被广泛应用于医药、农业、食品和生物工程等领域^[17-19]。

绿豆胰蛋白酶抑制剂的研究始于 20 世纪 60 年代^[20-21], 属 Bowman-Birk 类抑制剂, 其 2 个活性中心 Lys 和 Arg 可分别抑制胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的活性^[22], 因此被认为是自然界里胰蛋白酶最有效的抑制剂之一^[23]。目前, 许多学者已对绿豆胰蛋白酶抑制剂分离纯化技术进行了研究^[24-28], 其 LysGP33 活性片段抑制人结肠癌 SW480 细胞的迁移^[29]及对 Kexin 和 Furin 蛋白前体加工酶的抑制活性也得到了证实^[23], 此外, 绿豆胰蛋白酶抑制剂对人肺腺癌 A549 细胞增殖和细胞凋亡也有明显抑制作用^[30], 但对其生物学活性研究较少。抗虫害是胰蛋白酶抑制剂具有的生物功能之一, 那么抗虫绿豆中胰蛋白酶抑制剂活性会不会高于感虫品种, 其活性是否稳定? 目前这方面的研究还未见报道。为此本试验以 4 个不同的抗虫绿豆为材料, 进行了绿豆品种中胰蛋白酶抑制剂活性测定及在高温、酸碱及超声波作用下其稳定性研究, 旨在为抗虫绿豆资源的开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试绿豆

选用高抗豆象绿豆品系 A22、B18、B20 和 B24

及普通绿豆品种晋绿 1 号, 以普通绿豆晋绿 1 号为对照, 均由山西省农业科学院作物科学研究所提供。

1.2 供试试剂及仪器

胰蛋白酶购自 Sigma 公司; 苯甲酰-DL-精氨酸-对硝基酰胺盐(BAPNA)、盐酸、Tris 碱为分析纯乙酸。

粉碎机购自北京科技有限公司; 恒温水浴锅购自北京永光明医疗仪器厂; 离心机购自美国 Sigma 公司; 天平购自北京赛多利斯仪器系统有限公司; 酶标仪购自美国 DANAHER 公司; 摆床购自上海长城生化厂; 超声波处理器购自美国 Branson 公司; 移液枪购自德国 Eppendorf 公司。

1.3 胰蛋白酶抑制剂的提取

用多功能食品粉碎机粉碎绿豆并通过孔径 140 μm 筛, 称取过筛样品 20 g 溶于 20 mL 蒸馏水, 于 4

振荡过夜, 振荡速度为 180 r min^{-1} , 以 2000 $\times g$ 离心 15 min, 将所得沉淀(i)再次溶于等量蒸馏水重复以上操作, 合并 2 次上清液为(I), 用磁力搅拌器缓慢搅拌, 缓慢加入研细的无水 CaCl_2 , 使 CaCl_2 最终浓度达到 0.0375 mol L^{-1} , 蛋白质形成较大颗粒沉淀后立即停止搅拌, 静置 20 min, 5000 $\times g$ 离心 15 min, 得到上清液(II)和沉淀(ii)。将沉淀(ii)用蒸馏水复溶、二次提取后, 同样以 5000 $\times g$ 离心 15 min, 得到上清液(III)和沉淀(iii)。重复以上操作得到上清液(IV)和沉淀(iv), 合并上清液备用。

1.4 胰蛋白酶抑制剂活性的测定

取上述提取液 0.1 mL 加 5 mg mL^{-1} 胰蛋白酶溶液 0.1 mL 与 0.05 mol L^{-1} Tris-HCl 缓冲液(pH 8.1) 0.6 mL, 混匀后置 37 水浴 10 min, 加底物 BNPNA 1.0 mL, 于 37 水浴 10 min, 最后加 30% 乙酸 0.5 mL 终止反应, 410 nm 测吸光度, 计算抑制剂的活性^[31]。

在上述反应条件下抑制 1 mg (1 250) 胰蛋白酶活性所需要的抑制剂量为 1 个抑制剂活性单位(TI U)。

1.5 温度对胰蛋白酶抑制剂活性的影响

取 0.5 mL 提取液置带螺旋盖的菌种冷冻管中, 加入 0.5 mL 蒸馏水, 拧紧盖子, 分别在 40 、60 、80 、100 恒温水浴处理 30 min 和 60 min, 取出后立即置冰上冷却 15 min, 终止反应后离心, 取上清液按前述方法计算抑制剂的残余活性。

1.6 pH 对胰蛋白酶抑制剂活性的影响

取 0.05 mol L^{-1} pH 2、pH 4、pH 6、pH 8、pH 10、pH 12 的缓冲液 0.5 mL 分别于离心管(其中 pH 2 和 pH 4 为柠檬酸缓冲液, pH 6、pH 8、pH 10 和 pH 12

为 Tris-HCl 缓冲液), 再分别加 0.5 mL 提取液于每种缓冲液, 混匀后 37 静置 8 h。取上清液按前述方法计算抑制剂的残余活性。

1.7 超声波对胰蛋白酶抑制剂活性的影响

用吸管吸取 5 mL 待测液放入一个特殊的玻璃容器中(能通过循环冷水保持周围温度在 25 ± 3 , 减少对 TI 的热效应), 把玻璃容器放进超声波处理器, 使锥形探头伸进样品溶液中。以振幅 25%、35%、45%、55% 和 65% 分别处理 5、10、15 和 20 min 来检测超声波处理下抑制剂的残余活性^[32]。

1.8 数据分析

试验中胰蛋白酶抑制剂活性测定 3 次重复, 以其平均值±标准差来表示。采用 Microsoft Excel 处理数据, 用 SPS 16.0 软件统计和分析数据。

2 结果与分析

2.1 不同抗豆象绿豆品种胰蛋白酶抑制剂活性比较

由表 1 可知, 4 个抗豆象绿豆品种胰蛋白酶抑制剂活性均显著高于对照, 且与对照在 0.01 水平差异极显著, 4 个抗虫品种间 B18 分别与 A22、B20 和 B24 在 0.01 水平差异极显著, B20 和 B24 在 0.01 水平差异极显著, 其中 B18 活性最高, 达 70.2 TI U g^{-1} , 为对照的 1.65 倍, B20 和 A22 次之, 分别达 62.5 TI U g^{-1} 和 60.1 TI U g^{-1} , 分别是对照的 1.47 倍和 1.41 倍, B24 活性最低, 为 55.2 TI U g^{-1} , 仍为对照的 1.30 倍, 4 个抗虫品种间胰蛋白酶抑制剂活性差异较大, 高低相差 1.27 倍。

表 1 不同抗豆象绿豆品种胰蛋白酶抑制剂活性比较

Table 1 TI activity of different bruchid-resistant mung bean varieties

绿豆品种 Mung bean variety	TI 活性 TI activity (TI U g^{-1})	与对照比值 Ratio to CK
对照 Control	42.6 ± 0.964 De	1.00
A22	60.1 ± 1.997 Bc	1.41
B18	70.2 ± 1.374 Aa	1.65
B20	62.5 ± 0.656 Bb	1.47
B24	55.2 ± 0.721 Cd	1.30
均值 Mean	58.12	
变幅 Range	41.5~71.4	
变异系数 CV	0.164	

同一列数据后不同大小写字母分别表示在 0.01 或 0.05 水平上差异显著。

Values followed by different letters are significantly different at the 0.01 (capital letter) or 0.05 (small letter) probability levels.
CV: coefficient of variation.

2.2 温度对抗豆象绿豆胰蛋白酶抑制剂活性的影响

由表 2 可知, 不同温度不同温浴时间对各供试绿豆胰蛋白酶抑制剂活性的影响不同, 参试品种的抗豆象绿豆胰蛋白酶抑制剂残余活性有随温度升高、温浴时间延长而降低的趋势, 在 40 时, 分别温浴 30 min、60 min 各绿豆胰蛋白酶抑制剂残余活性均在 90% 以上, 说明低温下温浴时间对残余活性的影响很小, 但随温度升高, 温浴时间延长, 各绿豆品种活性均降低, 而 B18、B20 在 100 温浴 60 min 残余活性仍比对照分别高 21.0% 和 14.7%, B24 活性最低, 仅比对照高 7.5%。在各温度处理下, 抗虫绿豆 B18 和 B20 的胰蛋白酶抑制剂均有较高的残余活性, 且均与对照差异显著, 说明 B18 的耐高温性最强, B20 次之, B24 最差。各绿豆品种在各温度处理下变异系数在 0.035~0.082 之间, 其中 100 下温浴 30 min 变异系数要比其他各处理均大, 说明温度为 100 温浴 30 min 对各绿豆品种活性的影响较大。同时对测定结果作均数间的多重比较(表 3)表明, 在各温度处理下, 4 个抗虫品种 TI 活性均值均高于对照, 且 4 个抗虫品种之间及与对照之间均在 0.01 水平差异极显著, B18 的 TI 活性均值明显高于其他 3 个抗虫品种。而不同温浴时间、不同温度处理下 TI 活性均值也均在 0.01 水平差异极显著, 且温浴 30 min 比温浴 60 min TI 活性的均值要高, 40 的温度处理比其他温度处理 TI 活性的均值也高一些, 说明较短的温浴时间和低温对 TI 活性的影响较小, 相反较长的温浴时间和高温对 TI 活性的影响较大。

2.3 pH 对抗豆象绿豆胰蛋白酶抑制剂活性的影响

表 4 表明, 在 pH 2~12 范围内, 参试品种的抗豆象绿豆胰蛋白酶抑制剂残余活性随 pH 值的升高, 呈现先升高后降低的趋势, 在各 pH 处理下, 4 个抗虫品种中 B18 和 B20 均有较高的残余活性, 且均与对照差异显著, 当 pH 为 2 时, 分别比对照高 27.0% 和 17.4%, 此外, B18 在 pH 为 12 时残余活性为对照的 2.81 倍, 说明 B18 耐酸碱性均很强, B20 次之, B24 最差。当 pH 值为 6~8 时, 对供试各绿豆胰蛋白酶抑制剂活性影响较小。供试各绿豆品种在 pH 12 下变异系数比其他各处理均大, 说明偏碱性环境对各绿豆品种胰蛋白酶抑制剂活性的影响较大。对测定结果作均数间的多重比较(表 5)表明, 在各 pH 处理下, 4 个抗虫品种 TI 活性均值均高于对照, 且 4 个抗虫

表 2 温度对抗豆象绿豆胰蛋白酶抑制剂活性的影响
Table 2 Effect of temperature on TI activity in bruchid-resistant mung bean

温浴时间 Warm bath time	绿豆品种 Mung bean variety	残余活性 Residual activity (%)			
		40°C	60°C	80°C	100°C
30 min	对照 Control	90.3±0.721 d	85.5±0.854 d	78.7±0.656 c	70.5±0.819 e
	A22	91.8±0.721 c	87.5±0.721 c	83.6±0.625 b	80.5±0.854 c
	B18	98.7±0.819 a	95.8±0.721 a	90.6±0.854 a	88.5±0.625 a
	B20	95.5±0.819 b	92.7±0.755 b	89.5±1.054 a	85.2±0.964 b
	B24	90.6±0.819 cd	86.7±0.985 cd	79.5±1.000 c	76.5±0.954 d
	均值 Mean	93.38	89.64	84.38	80.24
	变幅 Range	89.5~99.6	84.6~96.6	78.0~91.5	69.8~89.2
	变异系数 CV	0.037	0.046	0.061	0.082
60 min	对照 Control	90.0±1.389 c	81.4±0.656 c	72.4±0.800 e	65.2±0.721 d
	A22	90.5±0.819 c	82.6±0.721 c	80.8±0.656 c	73.5±0.721 b
	B18	97.5±0.721 a	92.3±0.721 a	88.6±0.819 a	78.9±0.794 a
	B20	94.3±0.794 b	90.5±0.854 b	85.7±0.854 b	74.8±0.954 b
	B24	90.0±0.900 c	82.3±1.345 c	75.8±1.100 d	70.1±1.513 c
	均值 Mean	92.46	85.82	80.66	72.5
	变幅 Range	89.1~98.1	80.8~92.9	71.6~89.3	64.6~79.5
	变异系数 CV	0.035	0.056	0.078	0.067

同一列数据后不同字母表示在 0.05 水平上差异显著。

Values followed by different letters are significantly different at the 0.05 probability level. CV: coefficient of variation.

表 3 对不同绿豆品种和不同温度处理下 TI 活性作均数间的多重比较
Table 3 Multiple comparisons of TI activity in different mung bean varieties and different temperatures

品种 Variety	TI 活性均值 TI activity mean value	时间 Time (min)	TI 活性均值 TI activity mean value	温度 Temperature (°C)	TI 活性均值 TI activity mean value
对照 Control	79.2500 Ee	30	86.9100 Aa	40	92.9200 Aa
A22	83.8500 Cc	60	82.8450 Bb	60	87.7300 Bb
B18	91.3625 Aa			80	82.5200 Cc
B20	88.4875 Bb			100	76.3400 Dd
B24	81.4375 Dd				

同一列数据后不同大小写字母分别表示在 0.01 或 0.05 水平上差异显著。

Values followed by different letters are significantly different at the 0.01 (capital letter) or 0.05 (small letter) probability levels.

表 4 pH 对抗豆象绿豆胰蛋白酶抑制剂活性的影响
Table 4 Effect of pH on TI activity in bruchid-resistant mung bean

绿豆品种 Mung bean variety	残余活性 Residual activity (%)					
	pH 2	pH 4	pH 6	pH 8	pH 10	pH 12
对照 Control	70.5±0.954 d	75.8±0.872 d	88.2±0.781 e	86.5±0.819 c	70.7±0.964 d	25.1±0.819 e
A22	77.5±0.819 c	85.5±0.656 b	92.6±0.917 c	93.1±0.700 b	75.0±1.082 c	62.4±0.872 c
B18	89.5±0.819 a	92.2±0.985 a	97.5±0.985 a	95.8±0.781 a	80.4±0.900 a	70.6±0.800 a
B20	82.8±0.854 b	91.5±1.572 a	94.8±0.854 b	92.2±1.100 b	78.2±0.819 b	68.5±0.794 b
B24	70.9±1.308 d	80.5±1.153 c	90.2±1.249 d	86.5±0.755 c	68.2±0.700 e	60.0±1.044 d
均值 Mean	78.24	85.10	92.66	90.82	74.50	57.32
变幅 Range	69.9~90.4	74.8~93.3	87.7~98.3	85.8~96.3	69.6~81.3	24.4~71.4
变异系数 CV	0.096	0.078	0.038	0.043	0.064	0.299

同一列数据后不同字母表示在 0.05 水平上差异显著。

Values followed by different letters are significantly different at the 0.05 probability level. CV: coefficient of variation.

表 5 对不同绿豆品种和不同 pH 处理下 TI 活性作均数间的多重比较

Tab 5 Multiple comparisons of TI activity in different mung bean varieties and different pH values

品种 Variety	TI 活性均值		TI 活性均值 value
	TI activity mean value	pH	
对照 Control	69.4667 Ee	2	78.2400 Dd
A22	81.0167 Cc	4	85.1000 Cc
B18	87.6667 Aa	6	92.6600 Aa
B20	84.6667 Bb	8	90.8200 Bb
B24	76.0500 Dd	10	74.5000 Ee
		12	57.3200 Ff

同一列数据后不同大小写字母分别表示在 0.01 或 0.05 水平上差异显著。

Values followed by different letters are significantly different at the 0.01 (capital letter) or 0.05 (small letter) probability levels.

品种之间及与对照之间均在 0.01 水平差异极显著, B18 的 TI 活性均值明显高于其他 3 个抗虫品种。而不同 pH 处理之间 TI 活性均值也均在 0.01 水平差异极显著, 且 pH 6 的处理比其他 pH 处理下 TI 活性均值要高一些, 而 pH 12 处理下的 TI 活性均值最低, 也说明偏中性的 pH 环境对 TI 活性的影响较小, 而偏碱性的 pH 环境对 TI 活性的影响较大。

2.4 超声波钝化对抗豆象绿豆胰蛋白酶抑制剂活性的影响

由表 6 可知, 不同振幅不同处理时间的超声波对各供试绿豆胰蛋白酶抑制剂活性的影响不同。参试品种的抗豆象绿豆胰蛋白酶抑制剂残余活性有随超声波辐射强度升高、时间延长而降低的趋势, 在较低振幅短时间处理下, 4 个抗虫品种均保持较高的残余活性, 说明低振幅对活性的影响较小, 但随振幅增加、处理时间延长, 残余活性均有所降低, 各绿豆品种在各振幅处理下变异系数在 0.035~0.133 之间, 其中 65% 的振幅下处理 20 min 变异系数均大于其他各处理, 说明较高的振幅处理下, 时间越长对各绿豆品种胰蛋白酶抑制剂活性的影响越大, 但 B18、B20 在 65% 的振幅下处理 20 min, 残余活性仍比对照分别高 48.4% 和 30.2%。在各振幅处理下, B18 和 B20 均有较高的残余活性, 且均与对照有显著差异, 说明 B18 的耐辐射性最强, B20 次之, A22 最差。同时对测定结果作均数间的多重比较(表 7)表明, 在各振幅处理下, 4 个抗虫品种 TI 活性均值均高于对照, 且 4 个抗虫品种之间以及与对照之间均在 0.01 水平差异极显著, B18 的 TI 活性均值明显高于其他 3 个抗虫品种。而不同振幅、不同辐射时间下 TI 活性

均值也均在 $\alpha=0.01$ 水平差异极显著, 且 5 min 的辐射时间比其他辐射时间 TI 活性均值要高一些, 及 25% 的振幅处理要比其他振幅处理的 TI 活性均值高一些, 说明较短的辐射时间和低振幅对 TI 活性的影响较小, 相反较长的辐射时间和高振幅对 TI 活性的影响较大。

从表 1、表 2、表 4 和表 6 的分析可知, 参试品种在不同温度、pH 和超声波处理后, B18、B20 是抗豆象绿豆胰蛋白酶抑制剂活性保存最高的 2 个品种, 可见抗虫品种 B18 胰蛋白酶抑制剂的耐高温性、耐酸碱性和耐辐射性均最强, B20 次之, B24 的耐高温性、耐酸碱性最差, A22 耐辐射性最差, 说明 B18、B20 是生产 TI 的潜在原料, 即 B18、B20 中的 TI 实际应用价值更大。

3 讨论

据报道, TI 含量与植物品种、生理状态及受病虫侵害程度有一定关系^[33], 我国不同产地的 26 个绿豆品种 TI 活性为 29.0~53.5 TI U g⁻¹^[34]。本试验表明, 4 个抗虫绿豆胰蛋白酶抑制剂活性均显著高于感虫品种及江均平的报道结果。研究表明, TI 对丝氨酸蛋白酶具有广谱的抑制作用, 可与胰蛋白酶和胰凝乳酶等消化酶结合而使其失活, 从而治疗由于消化酶过多而对胰腺造成损伤的胰腺炎^[35]; 此外, 绿豆胰蛋白酶抑制剂可有效抵制人肺腺癌 A549 细胞增殖和细胞凋亡^[30], 其 LysGP33 活性片段能够有效抑制人结肠癌 SW480 细胞的迁移^[29], 抗虫绿豆 B18 和 B20 中 TI 含量均较高, 因此绿豆 B18、B20 有望作为生产 TI 的潜在原料而用于治疗人类疾病。

试验表明, 供试抗虫绿豆 B18、B20 的 TI 活性在 100 加热 30 min 后残余活性可高达 85.2%~88.5%, 而黑豆的 TI 活性在同等加热时间内 90° 时则完全失活^[25], 大豆的 TI 活性在温度高于 80° 活性也急剧下降^[36], 可见抗虫绿豆 B18、B20 较黑豆、大豆的 TI 活性具有很强的耐热性, 这对于抗虫绿豆 B18、B20 的 TI 的开发利用具有非常重要的意义。

据邵彪等^[25]报道, 黑豆 TI 经 pH 2~12 处理 1 h, 活性残存率均在 80% 以上; 大豆 TI 活性在 pH 2~11 条件下保存 30 min, 其活性基本没有明显的变化^[36]; 苦荞种子在 pH 2~6 的不同缓冲溶液中放置 1 h 后, 其抑制活性可保留 80% 左右, 在 pH 12 条件下, 抑制活性只保留约 30%^[26], 本研究中 4 个抗豆象绿豆在 pH 2~12 下保存 8 h 均有较高的残余活性, 可见抗虫

表 6 超声波钝化对抗豆象绿豆胰蛋白酶抑制剂活性的影响
Table 6 Effect of ultrasonic inactivation on TI activity in bruchid-resistant mung bean

处理时间 Treatment time	绿豆品种 Mung bean variety	残余活性 Residual activity (%)				
		25%振幅 25% amplitude	35%振幅 35% amplitude	45%振幅 45% amplitude	55%振幅 55% amplitude	65%振幅 65% amplitude
5 min	对照 Control	90.0±1.082 d	84.4±0.700 e	80.5±0.985 d	78.7±0.755 e	70.9±1.473 d
	A22	91.0±1.453 cd	86.5±0.656 d	83.5±0.954 c	81.4±0.964 d	78.9±0.794 c
	B18	98.2±1.136 a	95.6±0.985 a	92.4±0.954 a	90.3±0.917 a	87.4±1.308 a
	B20	95.0±1.345 b	92.8±0.964 b	90.4±0.985 b	88.2±1.044 b	80.0±1.300 c
	B24	92.3±0.900 c	90.5±0.819 c	88.8±0.819 b	85.9±1.136 c	83.5±1.039 b
	均值 Mean	93.30	89.96	87.12	84.90	80.14
	变幅 Range	89.1~99.5	83.9~96.7	79.4~93.5	77.9~91.1	69.2~86.5
	变异系数 CV	0.035	0.048	0.053	0.053	0.072
10 min	对照 Control	85.2±0.917 e	80.2±0.985 d	76.5±0.819 d	66.8±0.819 d	60.2±0.854 e
	A22	87.6±0.985 d	84.3±0.781 c	80.4±0.900 c	70.5±0.964 c	65.4±1.136 d
	B18	95.4±1.212 a	91.0±0.781 a	89.5±1.136 a	82.6±0.900 a	78.9±0.954 a
	B20	93.4±0.900 b	87.4±0.954 b	80.6±1.082 c	76.5±0.900 b	72.4±0.954 b
	B24	91.5±1.127 c	85.4±1.127 c	86.6±0.700 b	75.2±1.386 b	69.9±0.872 c
	均值 Mean	90.62	85.66	82.72	74.32	69.36
	变幅 Range	84.4~96.8	79.1~91.5	75.8~90.3	65.9~83.5	59.4~79.5
	变异系数 CV	0.044	0.044	0.059	0.076	0.095
15 min	对照 Control	80.5±0.900 d	78.7±0.854 c	72.4±0.721 d	62.5±0.819 d	50.6±0.656 e
	A22	83.8±0.889 c	80.7±0.985 b	73.8±1.127 cd	65.5±1.127 c	58.2±0.917 d
	B18	92.3±1.082 a	86.8±1.054 a	81.4±1.039 a	75.5±0.954 a	68.8±0.872 a
	B20	91.5±0.819 ab	82.5±0.985 b	75.4±0.721 bc	68.2±0.819 b	62.5±0.900 b
	B24	89.9±0.954 b	81.0±1.345 b	75.9±1.539 b	66.8±0.819 bc	60.5±0.819 c
	均值 Mean	87.60	81.94	75.78	67.70	60.12
	变幅 Range	79.6~93.5	77.8~87.8	71.6~82.6	61.8~76.6	49.9~69.4
	变异系数 CV	0.056	0.036	0.044	0.067	0.103
20 min	对照 Control	78.4±0.985 d	74.7±0.854 c	60.8±1.808 d	58.5±0.625 b	40.3±0.854 e
	A22	81.0±0.781 c	75.5±1.212 c	63.8±0.800 c	55.2±1.136 c	47.5±1.039 d
	B18	90.0±1.300 a	82.7±1.212 a	75.5±0.656 a	62.9±1.229 a	59.8±0.819 a
	B20	88.2±0.964 ab	78.0±1.375 b	71.5±0.819 b	58.5±0.755 b	52.5±0.900 b
	B24	87.4±0.954 b	75.8±0.800 c	65.2±0.854 c	61.5±1.127 a	50.2±1.100 c
	均值 Mean	85.00	77.34	67.36	59.32	50.06
	变幅 Range	77.6~91.5	73.9~83.8	58.9~76.2	57.8~63.8	39.5~60.5
	变异系数 CV	0.056	0.041	0.083	0.049	0.133

同一列数据后不同字母表示在 0.05 水平上差异显著。

Values followed by different letters are significantly different at the 0.05 probability level. CV: coefficient of variation.

表 7 对不同绿豆品种和不同振幅处理下 TI 活性作均数间的多重比较
Table 7 Multiple comparisons of TI activity in different mung bean varieties and different amplitudes

品种 Variety	TI 活性均值 TI activity mean value	时间 Time (min)	TI 活性均值 TI activity mean value	振幅 Amplitude (%)		TI 活性均值 TI activity mean value
				Amplitude (%)	TI activity mean value	
对照 Control	72.5800 Ee	5	87.0840 Aa	25	89.1300 Aa	
A22	74.6850 Dd	10	80.5360 Bb	35	83.7250 Bb	
B18	83.8500 Aa	15	74.6280 Cc	45	78.2450 Cc	
B20	79.2750 Bb	20	67.8160 Dd	55	71.5600 Dd	
B24	78.1900 Cc			65	64.9200 Ee	

同一列数据后不同大小写字母分别表示在 0.01 或 0.05 水平上差异显著。

Values followed by different letters are significantly different at the 0.01 (capital letter) or 0.05 (small letter) probability level.

绿豆均具有较高的 pH 耐受性, 且耐酸性要强于耐碱性。据报道, TI 作为一种抗营养因子, 可与昆虫肠道中的胰蛋白酶结合形成稳定的复合物而影响昆虫对食物的消化和吸收^[4-7], 可见抗虫绿豆中 TI 可适用于肠中不同 pH 的害虫的防治, 同时也可与不同酸碱性农药混合使用来控制害虫的为害。

超声波辐射对胰蛋白酶抑制剂活性影响的研究较少, Kunitz 型大豆胰蛋白酶抑制剂(KSTI)在 65%振幅下随处理时间增加残余活性均快速下降^[37], 苦荞麦的 TI 活性随超声波辐射强度升高、时间延长呈现降低的趋势^[26], 和本研究的结果基本一致, 但 4 个抗虫品种在 65%振幅下处理 20 min 残余活性均高于大豆和苦荞麦。

研究表明, TI 与内源抗虫物质协调作用可增加植物的抗虫性。目前, 至少有 15 种不同来源的 TI 基因转入不同植物, 获得具有不同抗性的转基因植株, 如 Hilder 等^[38]将豇豆 TI 基因转入烟草中, 获得了高抗棉铃虫、粘虫的转基因植株; 大麦、南瓜、马铃薯、番茄等 TI 基因转入烟草中获得抗棉铃虫的转基因烟草; 利用大豆 Kunitz 型 TI 基因也获得抗棉铃虫的转基因烟草、棉花、马铃薯等^[39]。绿豆 B18、B20 种子中不仅 TI 活性高, 且耐高温、耐酸碱和耐辐射, 因此如何科学使用抗虫绿豆 B18、B20 的 TI 基因需进一步深入研究。

4 结论

4 个抗豆象绿豆品种胰蛋白酶抑制剂活性均显著高于对照感虫品种, 且在不同温度、pH 和超声波处理后, 残余活性也均比对照感虫品种高, 其中, 抗虫绿豆 B18 胰蛋白酶抑制剂活性最高且耐高温性、耐酸碱性和耐辐射性均最强, B20 次之, 可见绿豆 B18、B20 有望作为 TI 的潜在原料用于培育抗虫的转基因植株和治疗人类疾病。

References

- [1] 廖海, 杜林方, 周嘉裕. 植物中蛋白类蛋白酶抑制剂的研究进展. 天然产物研究与开发, 2002, 14(1): 80–84
Liao H, Du L F, Zhou J Y. Research progress of protein protease inhibitors in plants. *Nat Prod Res Dev*, 2002, 14(1): 80–84 (in Chinese)
- [2] 万善霞, 王婉婉, 滑静, 张淑平. 胰蛋白酶抑制剂在不同领域的研究概况. 北京农学院学报, 2003, 18: 152–155
Wan S X, Wang W W, Hua J, Zhang S P. Research status of trypsin inhibitor in different fields. *J Beijing Agric Coll*, 2003, 18: 152–155 (in Chinese with English abstract)
- [3] 罗玉娇, 李滨, 舒衡平, 蒋立平. Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂的研究进展. 中国生化药物杂志, 2012, 33: 316–319
Luo Y J, Li B, Shu H P, Jiang L P. Research advances in Kunitz trypsin inhibitor. *Chin J Biochem Pharm*, 2012, 33: 316–319 (in Chinese)
- [4] 吴国昭, 朱克岩, 曾任森. 大豆胰蛋白酶抑制剂对斜纹夜蛾生长发育的影响. 生态环境学报, 2013, 22: 1335–1340
Wu G Z, Zhu K Y, Zeng R S. Effect of soybean trypsin inhibitor on the growth and development of *Spodoptera litura*. *Ecol Environ Sci*, 2013, 22: 1335–1340 (in Chinese)
- [5] 王荣春, 孙建华, 何述栋, 马莺. 胰蛋白酶抑制剂的结构与功能研究进展. 食品科学, 2013, 34(9): 364–368
Wang R C, Sun J H, He S D, Ma Y. Recent advance in research on the structure and function of trypsin inhibitor. *Food Sci*, 2013, 34(9): 364–368 (in Chinese with English abstract)
- [6] Oliveira A S, Miglioli L, Aquino R O, Ribeiro J K C, Macedo L L P, Andrade L B, Bemquerer M P, Santos E A, Kiyota S, Sales M P. Purification and characterization of a trypsin-papain inhibitor from *Pithecellobium dulosum* seeds and its vitro effects towards digestive enzymes from insect pest. *Plant Physiol Biochem*, 2007, 45: 858–865
- [7] 刘大伟, 陈立杰, 段玉玺. 灰皮支黑豆胰蛋白酶抑制剂基因的克隆及其在胞囊线虫胁迫下的表达分析. 河南农业科学, 2016, 39(4): 94–97
Liu D W, Chen L J, Duan Y X. Cloning of soybean Kunitz trypsin inhibitor gene from huipizhiheidou and expression analysis in soybean infected by *Heterodera glycines*. *J Henan Agric Sci*, 2016, 39(4): 94–97 (in Chinese with English abstract)
- [8] Ye X Y, Ng T B, Rao P F. A Bowman-Birk-type trypsin-chymotrypsin inhibitor from broad beans. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 289: 91–96
- [9] Evandro F F, Wong J H, Ng T B. Thermostable Kunitz trypsin inhibitor with cytokine inducing, antitumor and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from Korean large black soybeans. *J Biosci Bioeng*, 2010, 109: 211–217
- [10] 王长良, 张永忠, 孙志刚. Bowman-Birk 型大豆胰蛋白酶抑制剂研究进展. 大豆科学, 2007, 26: 757–761
Wang C L, Zhang Y Z, Sun Z G. Progress on the research of Bowman-Birk soybean trypsin inhibitor. *Soybean Sci*, 2007, 26: 757–761 (in Chinese with English abstract)
- [11] Kobayashi H, Suzuki M, Kanayama N, Terao T. A soybean Kunitz trypsin inhibitor suppresses ovarian cancer cell invasion by blocking urokinase upregulation. *Clin Exp Metastas*, 2004, 21: 159–166
- [12] 张少娟, 薛晓鸥, 刘同祥, 艾浩, 牛建昭. 大豆胰蛋白酶抑制剂对人宫颈癌 HeLa 细胞增殖的影响. 辽宁医学院学报, 2008, 29: 106–109
Zhang S J, Xue X O, Liu T X, Ai H, Niu J Z. The effect of soybean trypsin inhibitor on proliferation of human HeLa cells. *J Liaoning Med Univ*, 2008, 29: 106–109 (in Chinese with English abstract)
- [13] Ho V S M, Ng T B. A Bowman-Birk trypsin inhibitor with anti-proliferative activity from Hokkaido large black soybeans. *J Pept Sci*, 2008, 14: 278–282
- [14] 吴燕子. 重组荞麦胰蛋白酶抑制剂对乳腺癌细胞 MCF-7 作用的研究. 山西大学硕士学位论文, 山西太原, 2015
Wu Y Z. Study on Effects of Recombinant Buckwheat Trypsin

- Inhibitor in Breast Cancer Cell Lines MCF-7. MS Thesis of Shanxi University, Taiyuan, China, 2015 (in Chinese with English abstract)
- [15] 白崇智, 李玉英, 李芳, 张政, 王转花. 重组荞麦胰蛋白酶抑制剂诱导肝癌细胞 H22 凋亡的作用及其机制. 细胞生物学杂志, 2009, 31: 79–83
Bai C Z, Li Y Y, Li F, Zhang Z, Wang Z H. Effect of recombinant buckwheat trypsin inhibitor on apoptosis of hepatocellular carcinoma cell line H22 and its mechanism. *Chin J Cell Biol*, 2009, 31: 79–83 (in Chinese)
- [16] 李娇, 崔晓东, 马晓丽, 王转花. 重组荞麦胰蛋白酶抑制剂延长 *C. elegans* 寿命的作用机制. 中国生物化学与分子生物学报, 2016, 32: 1112–1120
Li J, Cui X D, Ma X L, Wang Z H. Mechanism underlying longevity induced by rBTI in *Caenorhabditis elegans*. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2016, 32: 1112–1120 (in Chinese with English abstract)
- [17] Sagili R R, Pankiw T, Zhu-Salzman K. Effects of soybean trypsin inhibitor on hypopharyngeal gland protein content, total midgut protease activity and survival of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *J Insect Physiol*, 2005, 51: 953–957
- [18] Zeng R S, Su Y J, Ye M, Xie L J, Chen M, Song Y Y. Plant induced defense and biochemical mechanisms. *J South China Agric Univ*, 2008, 29: 1–6
- [19] Zeng R S, Niu G, Wen Z, Schuler M A, Berenbaum M R. Allelochemical induction of cytochrome P450 monooxygenases and amelioration of xenobiotic toxicity in *Helicoverpa zea*. *J Chem Ecol*, 2007, 33: 449–461
- [20] 戚正武, 任梅轩, 屈贤铭, 罗珊珊, 周元聪, 王克夷, 曹天钦. 绿豆胰蛋白酶抑制剂化学与物化特征及其与活力的关系. 中国生理科学会学术会议论文集, 北京, 1964. pp 43–44
Qi Z W, Ren M X, Qu X M, Luo S S, Zhou Y C, Wang K Y, Cao T Q. Characterization of chemical and physicochemical properties of mung bean trypsin inhibitor and its relationship with viability. In: Proceedings of the Chinese Society of Physiological Sciences, Beijing, China, 1964. pp 43–44 (in Chinese)
- [21] 屈贤铭, 罗珊珊, 任梅轩, 戚正武, 曹天钦. 绿豆胰蛋白酶抑制剂的研究: II. 抑制剂 A、B 组份的关系及其化学结构的特征. 生物化学与生物物理学报, 1964, 4: 588–597
Qu X M, Luo S S, Ren M X, Qi Z W, Cao T Q. Studies on inhibitors of mung bean trypsin: II. The relationship between inhibitors, A, B components and their chemical structure characteristics. *Acta Biochim Biophys Sin*, 1964, 4: 588–597 (in Chinese)
- [22] 谭复隆, 戚正武. 绿豆胰蛋白酶抑制剂两活性区域的拆分. 生理科学, 1982, 2(5): 13
Tan F L, Qi Z W. Resolution of two active region of mung bean trypsin inhibitor. *Physiol Sci*, 1982, 2(5): 13 (in Chinese)
- [23] 曲梅, 韩锦铂, 孟延发. 绿豆胰蛋白酶抑制剂对蛋白质前体加工酶的抑制活性. 第二军医大学学报, 2006, 27: 258–262
Qu M, Han J B, Meng Y F. Inhibitory activity of mung bean trypsin inhibitor on protein precursor processing enzymes. *Acad J Second Mil Med Univ*, 2006, 27: 258–262 (in Chinese with English abstract)
- [24] 赵现明. 豆类胰蛋白酶抑制剂的提取分离及纯化. 哈尔滨工业大学硕士学位论文, 黑龙江哈尔滨, 2013
Zhao X M. Extraction, Isolation and Purification of Trypsin Inhibitors from Leguminosae. MS Thesis of Harbin Institute of Technology, Harbin, China, 2013 (in Chinese with English abstract)
- [25] 邵彪, 汪少芸, 饶平凡. 黑豆胰蛋白酶抑制剂的纯化及性质研究. 中国食品学报, 2010, 10(6): 47–53
Shao B, Wang S Y, Rao P F. Studies on Purification and characterization of trypsin inhibitor from black soybean. *Chin J Food Sci*, 2010, 10(6): 47–53 (in Chinese with English abstract)
- [26] 阮景军. 苦荞麦胰蛋白酶抑制剂的分离纯化、基因克隆表达及其抗病虫害研究. 四川农业大学博士学位论文, 四川成都, 2011
Ruan J J. Study on Isolation, Purification, Gene Cloning and Expression of Trypsin Inhibitor of Tartary Buckwheat and Resistance to Diseases and Insect Pest. PhD Dissertation of Sichuan Agricultural University, Chengdu, China, 2011 (in Chinese with English abstract)
- [27] 王静, 朱庆华, 陈杰. 紫花芸豆胰蛋白酶抑制剂的分离纯化及降糖作用研究. 临床合理用药杂志, 2015, 8(9): 126–127
Wang J, Zhu Q H, Chen J. Purification and partial characterization of trypsin inhibitor from *Phaseolus vulgaris*. *J Clinic Ration Use Drugs*, 2015, 8(9): 126–127 (in Chinese)
- [28] 阮景军, 唐自钟, 陈惠, 程剑平. 核桃胰蛋白酶抑制剂的纯化及抑制植物病原真菌研究. 西南农业学报, 2016, 29: 826–830
Ruan J J, Tang Z Z, Chen H, Cheng J P. Purification of trypsin inhibitor from walnut and its inhibition on plant pathogenic fungi. *Southwest China J Agric Sci*, 2016, 29: 826–830 (in Chinese with English abstract)
- [29] 赵亚蕊, 李宗伟, 赵超, 付荣, 王兴华, 李卓玉. 重组绿豆胰蛋白酶抑制剂片段对肠癌细胞 SW480 迁移的影响. 山西大学学报, 2012, 35: 126–129
Zhao Y R, Li Z W, Zhao C, Fu R, Wang X H, Li Z Y. Effect of recombinant mung bean trypsin inhibitor fragment on the migration of SW480 in human colon cancer cells. *J Shanxi Univ*, 2012, 35: 126–129 (in Chinese)
- [30] 王莎莎, 马岳, 李玉银, 罗深恒, 刁爱坡, 龙民慧. 绿豆胰蛋白酶抑制剂 BBI 诱导肺腺癌 A549 细胞凋亡. 华南师范大学学报, 2013, 45(3): 91–94
Wang S S, Ma Y, Li Y Y, Luo S H, Diao A P, Long M H. Apoptosis of lung adenocarcinoma A549 cells induced by mung bean trypsin inhibitor BBI. *J South China Norm Univ*, 2013, 45(3): 91–94 (in Chinese)
- [31] Godbole S, Krishna T, Bhatia C. Purification and characterization of protease inhibitors from pigeon pea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp) seeds. *J Sci Food Agric*, 1994, 64: 87–93
- [32] Huang H, Kwok K C, Liang H H. Inhibitory activity and conformation changes of soybean trypsin inhibitors induced by ultrasound. *Ultrason Sonochem*, 2008, 15: 724–730
- [33] El-Shamei Z, Wu J W, Haard N F. Influence of wound injury on accumulation of proteinase inhibitors in leaf and stem tissues of two processing tomato cultivars. *J Food Biochem*, 1996, 20(5): 155–171
- [34] 江均平, 李春红, 张涛, 云冬梅, 杨雪丰. 绿豆胰蛋白酶抑制剂的含量、多型性及稳定性. 食品科学, 2013, 34(11): 32–35
Jiang J P, Li C H, Zhang T, Yun D M, Yang X F. Activity, Polymorphism and stability of trypsin inhibitor from mung Beans. *Food Sci*, 2013, 34(11): 32–35 (in Chinese with English abstract)

- [35] 赵琳琳. 大豆胰蛋白酶抑制因子对小鼠胰腺结构功能及基因表达的影响. 吉林农业大学硕士学位论文, 吉林长春, 2014
Zhao L L. The Effect of Soybean Trypsin Inhibitor on Structure and Function and Gene Expression Profile in Pancreas of Mice. MS Thesis of Jilin Agricultural University, Changchun, China, 2014 (in Chinese with English abstract)
- [36] 张宾. 大豆胰蛋白酶抑制剂的制备、理化性质和抗黄曲霉作用. 中国海洋大学博士学位论文, 山东青岛, 2010
Zhang B. Preparation, Purification and Properties of Soybean Trypsin Inhibitor with Anti-*Aspergillus flavus* Activity. PhD Dissertation of Ocean University of China, Qingdao, China, 2010 (in Chinese with English abstract)
- [37] 黄惠华, 梁汉华, 郭乾初. 超声波对大豆胰蛋白酶抑制剂活性及二级结构的影响. 食品科学, 2004, 25(3): 29–33
Huang H H, Liang H H, Guo Q C. Different effects of ultrasound on two types of soybean trypsin inhibitors in activity and structures. *Food Sci*, 2004, 25(3): 29–33 (in Chinese with English abstract)
- [38] Hilder V A, Gatehouse A M R, Sheerman S E, Barker R F, Boulter D. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature*, 1987, 300: 160–163
- [39] 柳武革, 薛庆中. 蛋白酶抑制剂及其在抗虫基因工程中的应用. 生物技术通报, 2000, (1): 20–25
Liu W G, Xue Q Z. Proteinase inhibitors and their application in insect-resistant gene engineering. *Biotechnol Inform*, 2000, (1): 20–25 (in Chinese with English abstract)