

南瓜粉的功能研究

李筱泉, 何群, 练惠辉, 王勤*

(厦门大学生命科学学院, 教育部细胞生物学与肿瘤细胞工程重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要: 本实验用中性蛋白酶酶解制得的南瓜粉, 通过测定该南瓜粉对 ACE 和 ALP 活力的影响, 研究了南瓜粉对血管紧张素转化酶(angiotension converting enzyme ACE)和碱性磷酸酶(alkaline phosphatase ALP)活性的影响, 考察其降血压作用及潜在的抗肿瘤作用; 同时提取并初步纯化南瓜多糖, 通过 fenton 反应产生羟基自由基($\cdot\text{OH}$), 测定南瓜粉清除 $\cdot\text{OH}$ 能力, 以及通过 FRAP 法测定其总还原能力, 利用纸层析法分析南瓜多糖的单糖组成。结果表明, 该南瓜粉对 ACE 和 ALP 均有抑制作用, 具有一定的降血压作用和潜在的抗肿瘤作用; 南瓜多糖是由半乳糖、葡萄糖、阿拉伯糖和鼠李糖四种单糖组成, 具有良好的抗氧化活性。

关键词: 南瓜; ACE; ALP; 多糖; 抗氧化

Study on Functional Properties of Pumpkin Powder

LI Xiao-quan, HE Qun, LIAN Hui-hui, Wang Qin*

(Key Laboratory of Cell Biology and Tumor Cell Engineering, Ministry of Education, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Pumpkin powder was produced by using neutral proteinase to hydrolyze pumpkin pulp and then freeze-drying, and pumpkin polysaccharides were extracted. In order to understand the hypotensive effect and potential anti tumor effect of the pumpkin powder, its effects on the activities of ACE (angiotensin converting enzyme) and ALP (alkaline phosphatase) were investigated. The scavenging effect of the pumpkin powder was determined on hydroxyl radical ($\cdot\text{H}$), which is produced by Feton reaction, and its total reducing power was determined by FRAP method. The monosaccharide composition of the pumpkin polysaccharides was analyzed by paper chromatography method. The results showed that the pumpkin powder can inhibit the activities of ACE and ALP and has hypotensive effect and potential anti tumor effect. The pumpkin polysaccharides have antioxidant activity, which are composed of galactose, glucose, arabinose and rhamnose.

Key words: pumpkin; ACE; ALP; polysaccharides; antioxidant activity

中图分类号: Q 356.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)10-0055-04

南瓜(pumpkin) 营养丰富, 药用价值高, 具有降血糖、降血脂、预防心血管病、防癌抗癌、解毒驱虫、延缓衰老、减肥等多种保健功效^[1], 并且其产量高, 价格低。利用蛋白酶将大分子的蛋白质分解成分子量较小的肽, 有利于人体吸收, 并具有蛋白所没有的生理活性, 提高了其营养价值。利用中性蛋白酶生产南瓜粉, 条件温和, 生产工艺简单, 成本低, 适合进行大规模生产。南瓜粉的降血糖和降血脂作用已被研究证实^[2-3], 但其降血压、抗氧化和抗肿瘤等作用, 亟待理论研究的支撑。本实验对实验室自制的南瓜粉进行成分分析; 研究南瓜粉对 ACE 和 ALP 活性的影响, 考察其降血压

作用及潜在的抗肿瘤作用; 研究南瓜粉有效成分南瓜多糖的抗氧化作用及单糖组成。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

秘本南瓜 厦大菜市场; 灵芝粉、莲子粉 中食肽灵公司。

中性蛋白酶 无锡酶制剂厂; 血管紧张素转化酶(ACE) 实验室自制; 碱性磷酸酶(ALP)、马尿酸组氨酰亮氨酸(HHL) Sigma公司; TPTZ Fluka公司; 其他化学试剂均为国产分析纯。

收稿日期: 2007-08-08

基金项目: 福建省自然科学基金项目(B0510001)

作者简介: 李筱泉 (1951-), 男, 助理实验师, 研究方向为生物化学。E-mail: li0033@sina.com

* 通讯作者: 王勤(1969-), 女, 副教授, 博士, 研究方向为生物化学。E-mail: qwang@xmu.edu.cn

1.2 仪器与设备

752型紫外-可见分光光度计 上海光谱仪器有限公司; 722型光栅分光光度计 厦门分析仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 南瓜粉的制备

所用南瓜品种为秘本南瓜, 将南瓜洗净, 去皮, 去籽, 称重, 加入 0.1mol/L pH6.6 磷酸缓冲液(料液比为 1:2), 匀浆。加入 0.4mg/g 的中性蛋白酶(即向每 10g 南瓜制成的南瓜浆中加入 4mg 的中性蛋白酶), 50℃ 水浴 3h, 100℃ 沸水浴 10min 灭活蛋白酶, 5000r/m 离心 20min, 取上清液。上清液冷冻干燥即得南瓜粉。

1.3.2 南瓜多糖的制备

将南瓜切碎, 加入 6 倍南瓜质量的 H₂O 匀浆, 80℃ 热水浸提 6h, 纱布过滤, 减压浓缩, 以 1:4 加入 Sevag 试剂(氯仿:正丁醇=4:1)进行脱蛋白, 1%活性炭室温脱色 20min, 过滤, 上清液对蒸馏水透析 24h, 95% 乙醇沉淀 2 次, 沉淀相继用丙酮、乙醚洗涤, 冷冻干燥, 得到南瓜粗多糖。

1.3.3 灵芝多糖和莲子多糖的制备

向灵芝粉和莲子粉中加入 20 倍的 H₂O, 100℃ 沸水浸提 6h, 减压浓缩, Sevag 试剂脱蛋白, 活性炭脱色, 上清液对蒸馏水透析, 乙醇沉淀 2 次, 沉淀相继用丙酮、乙醚洗涤, 冷冻干燥, 得到灵芝多糖和莲子多糖。

1.3.4 成分分析

粗蛋白含量测定: 采用 GB/T5009.5 - 85 凯氏定氮法; 粗脂肪测定: 采用 GB/T5009.6 - 85 索氏抽提法; 水分含量测定采用 GB/T5009.3 - 85 干燥法; 灰分测定: 采用 GB/T5009.4 - 85; 总糖测定: 采用 DNS 法的方法。

1.3.5 血管紧张素转化酶活性测定

参考文献[4]做一定的调整, 50μl 6mmol/L HHL、50μl 不同浓度以 0.1mol/L pH 8.3 硼酸缓冲液(含 0.3mol/L NaCl)溶解的效应物和 50μl ACE 酶液(实验室自提)混合后, 37℃ 水浴反应 30min, 加入 30μl 1mol/L NaOH 终止反应。再加入 1.2ml 乙酸乙酯, 混匀, 离心(3000r/min, 10min)。取 0.8ml 上层脂液, 烘干脱去乙酸乙酯, 冷却, 加入 1.5ml H₂O 溶解, 于 228nm 处测定吸光度。以不加效应物的原酶活力为正对照。

1.3.6 碱性磷酸酶活性测定

参考文献[5]做一定的调整, 1 ml Na₂CO₃-NaHCO₃ 缓冲液(0.1mol/L, pH10.0)、0.1ml MgCl₂(0.1mol/L)、780μl 不同浓度的效应物水溶液和 0.1ml 对硝基苯酚(PNPP, 50mmol/L)、20μl ALP 酶液(200μg/ml), 37℃ 水浴反应 20min, 加入 2ml 0.1mol/L NaOH 终止反应, 测定 405nm 处的吸光度。以不加效应物的原酶活力为正对照。

1.3.7 清除羟基自由基能力^[6]

用 Fenton 反应产生 ·OH, ·OH 氧化水杨酸生成有色物质, 该产物在 510nm 处有强吸收峰, 测定 510nm 处的吸光度。以 H₂O 代替样品为空白对照, 其吸光度记为 A₀, 样品的吸光度记为 A₁。

$$\cdot\text{OH 清除率}(\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

1.3.8 总还原能力^[7]

采用 FRAP 法测定样品的总还原能力, 当 Fe³⁺-TPTZ 被还原成 Fe²⁺ 形式时, 呈现出明显的蓝色, 于 593nm 处具有最大光吸收, 测定 593nm 处的吸光度。以 FeSO₄ 制作标准曲线, 样品抗氧化活性以达到同样吸光度所需的 FeSO₄ 的毫摩尔数表示。

1.3.9 单糖组成鉴定^[8]

用纸层析法鉴定南瓜多糖的单糖组成, 称取南瓜粗多糖 10mg, 以 2ml 1mol/L H₂SO₄ 封管, 100℃ 水解 6h, 饱和 Ba(OH)₂ 水溶液中和, 离心后取上清液点样。以乙酸乙酯-吡啶-水(10:4:3)为展开剂, 用硝酸银显色剂进行显色, 糖显棕黑色斑点, 并与单糖标准品进行比较, 根据 R_f 值鉴定其单糖组成。

2 结果与分析

2.1 南瓜粉基本成分分析

对研制的南瓜粉进行成分分析, 测定其水分、灰分、蛋白质、脂肪及糖类物质的含量, 测定结果见表 1。结果表明, 南瓜粉中水分占 7.93%、灰分占 10.35%、蛋白质占 13.24%、脂肪占 0.91%、糖类物质占 68.52%、其它占 4.71%。从成分分析结果可见, 南瓜粉的脂肪含量很低, 为很好的低脂食品。糖类物质含量为最高, 其中大部分是水溶性南瓜多糖。

表 1 南瓜粉基本营养成分分析

Table 1 Analysis of basic nutritional compositions of pumpkin powder

成分	水分	灰分	蛋白质	脂肪	总糖	其他
含量(%)	7.93	10.35	13.24	0.91	68.52	4.71

2.2 南瓜粉对 ACE 活力的影响

南瓜粉对 ACE 也有一定的抑制作用, 随着南瓜粉浓度的增大, ACE 的活力逐渐降低。其 IC₅₀ 约为 8mg/ml。南瓜粉对 ACE 的活力影响结果见图 1。

2.3 南瓜粉对 ALP 活力的影响

南瓜粉对 ALP 也有一定的抑制作用, 随着南瓜粉浓度的增大, ALP 的活力逐渐降低。南瓜粉的浓度在

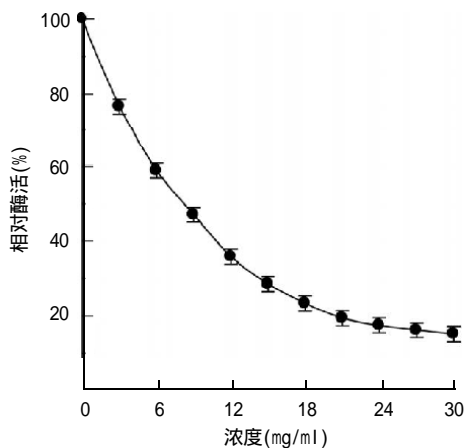


图1 南瓜粉对ACE活力的影响
Fig.1 Effects of pumpkin powder on activity of ACE

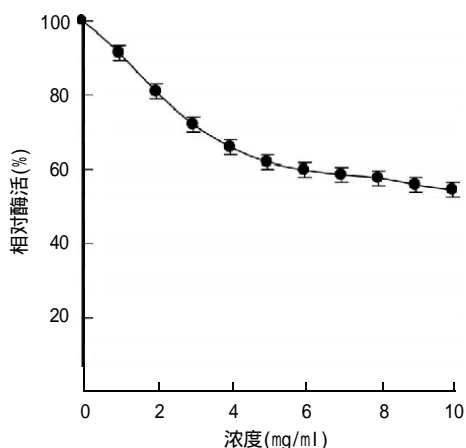


图2 南瓜粉对ALP活力的影响
Fig.2 Effects of pumpkin powder on activity of ALP

0~5mg/ml变化时,ALP活力下降比较明显,当南瓜粉的浓度为5mg/ml时,ALP的活力降低约为原来的61.9%,而当南瓜粉浓度达到一定时,抑制效率增加缓慢。南瓜粉对ALP的活力影响效应见图2。

2.4 南瓜粉的抗氧化活性

2.4.1 清除羟基自由基($\cdot\text{OH}$)能力

南瓜粗多糖具有一定的清除 $\cdot\text{OH}$ 能力,随着南瓜粗多糖浓度的增加,清除率逐渐增大,增加到一定浓度时,清除率渐渐达到一稳定值而不再变化。当南瓜粗多糖浓度为30mg/ml时,清除率达49.5%,能清除一半的 $\cdot\text{OH}$,表现出良好的清除 $\cdot\text{OH}$ 能力。与灵芝多糖和莲子多糖比较,南瓜多糖清除 $\cdot\text{OH}$ 的能力高于莲子多糖,低于灵芝多糖,当三种多糖浓度均为30mg/ml时,南瓜粗多糖、和莲子粗多糖的清除率分别为49.5%、74.8%和23.7%。结果见图3。

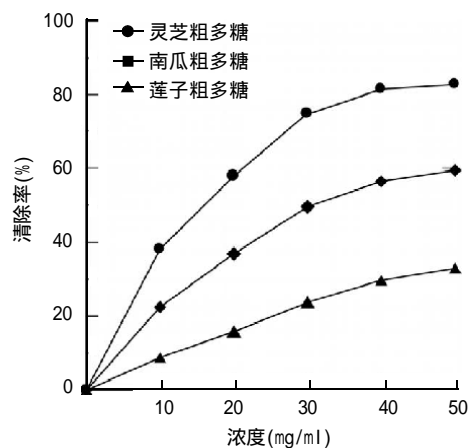


图3 清除率与三种粗多糖的关系
Fig.3 $\cdot\text{OH}$ scavenging rates of three kinds of polysaccharide

2.4.2 总还原能力

随着多糖浓度的增加,总还原能力逐渐增强。当三种多糖浓度均为8mg/ml时,南瓜多糖、灵芝多糖和莲子多糖的总还原能力分别相当于0.66mmol/L Fe^{2+} 、4.08mmol/L Fe^{2+} 和0.23mmol/L Fe^{2+} 。灵芝粗多糖的总还原能力远高于南瓜粗多糖,而南瓜粗多糖高于莲子粗多糖,南瓜粗多糖的还原能力约是莲子粗多糖的3倍。结果见图4。

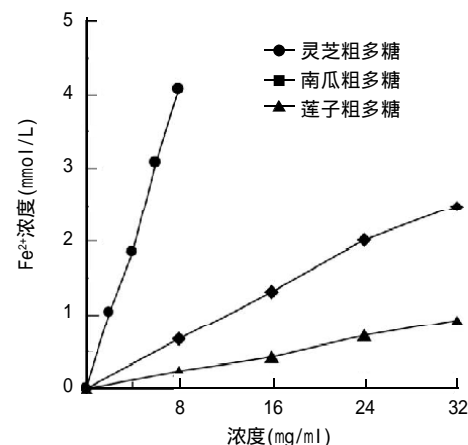


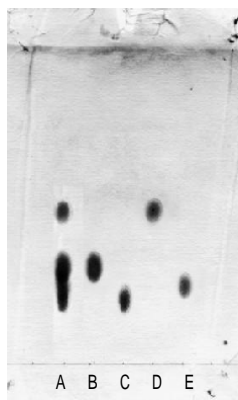
图4 总还原能力与三种粗多糖的关系
Fig.4 Total reducing powers of three kinds of polysaccharides

2.5 南瓜多糖的单糖组分鉴定

利用纸层析法对南瓜多糖进行单糖组分鉴定,并与单糖标准品进行比较,根据 R_f 值鉴定出其单糖组成。其分析结果见表2,纸层析图谱见图5。结果表明,南瓜多糖中含有半乳糖、葡萄糖、阿拉伯糖和鼠李糖四种单糖成分。

表2 南瓜多糖中单糖成分的 R_f 值Table 2 R_f values of monosaccharides of pumpkin polysaccharides

单糖	标准单糖 R_f 值	南瓜多糖水解液 R_f 值
半乳糖	0.222	0.221
葡萄糖	0.265	0.266
阿拉伯糖	0.331	0.331
鼠李糖	0.5	0.494



A、B、C、D、E 分别为南瓜多糖、阿拉伯糖、半乳糖、鼠李糖和葡萄糖。

图5 南瓜多糖水解液纸层析图谱

Fig.5 Paper chromatography of hydrolysates of pumpkin polysaccharides

3 结论

本实验利用中性蛋白酶酶解制得南瓜粉，生产工艺简单，生产条件温和。利用蛋白酶对南瓜进行酶解，可以使大分子的蛋白质分解成小分子的肽，提高游离氨基酸的含量。实验结果发现，生产出来的南瓜粉脂肪含量低，糖类物质含量最高，其中含有大量水溶性南瓜多糖，南瓜多糖具有抗氧化、降血糖、降血脂和抗肿瘤作用^[2-3]。ACE 作为肾素-血管紧张素-醛固酮系统 (RAAS) 的关键酶，在参与血压调节方面发挥重要作用，南瓜粉可通过抑制 ACE 活性来降低血压^[9]；ALP 作为肿瘤组织的标志，与许多恶性肿瘤相关^[10-12]，南瓜粉可以抑制 ALP 活性，具有潜在的抗肿瘤活性。羟基自由

基($\cdot\text{OH}$)和超氧阴离子自由基($\text{O}_2\cdot$)是最常见的两种自由基。其中羟自由基是体内最活泼的活性氧，可介导许多病理变化，同时超氧阴离子自由基也会发生反应，产生具有高活性的羟自由基而起作用。南瓜粉主要功效成分为南瓜多糖，由半乳糖、葡萄糖、阿拉伯糖和鼠李糖四种单糖组成，由于其分子上具有还原性的半缩醛羟基，而有良好的抗氧化活性，具有抗衰老、抗肿瘤的功。其抗氧化活性高于莲子多糖，低于灵芝多糖，但是，由于南瓜多糖比灵芝多糖易得，而具有更广阔的应用前景。南瓜全国各地均有分布，产量高、价格低廉，由中性蛋白酶酶解南瓜制成的南瓜粉成品具有成本低同时有显著降血糖、降血压、抗肿瘤等功效，具有广阔的开发应用前景。

参考文献：

- [1] 贺小琼. 南瓜的营养与保健[J]. 中国食物与营养, 2003(8): 43-46.
- [2] 熊学敏, 石扬, 康明, 等. 南瓜多糖降糖有效部位的提取分离及降糖作用的研究[J]. 中成药, 2000, 22(8): 563-565.
- [3] 孔庆胜, 王彦英, 蒋滢. 南瓜多糖的分离、纯化及降血脂作用[J]. 中国生化药物杂志, 2000, 21(3): 130-132.
- [4] 许庆陵, 曾庆祝, 崔铁军. 鲑头酶解物对ACE的抑制活性[J]. 大连水产学院学报, 2004, 19(2): 87-91.
- [5] CHEN Q X, ZHANG W, ZHENG W Z, et al. Kinetics of inhibition of alkaline phosphatase from green crab (*Scylla serrata*) by N-Bromosuccinimide [J]. Protein Chem, 1996, 15(4): 345-350.
- [6] LIU F, OOI V E C, CHANG S T. Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts [J]. Life Sci, 1997, 60: 763-771.
- [7] BENZIE I F, STRAIN J J. The ferric reducing ability of plasma as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay [J]. Anal Biochem, 1996, 239: 70-76.
- [8] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1999.
- [9] 何海伦, 陈秀兰, 孙彩云, 等. 血管紧张素转换酶抑制肽的研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2004, 24(9): 7-11.
- [10] 吴晓岩, 张兰萍, 刘翠晴, 等. 碱性磷酸酶同工酶研究进展与应用[J]. 生物工程进展, 1999, 19(3): 18-21.
- [11] MILLIGAN T P, PARK H R, NOONAN K, et al. Assessment of the performance of a capture immunoassay for the bone isoform of alkaline phosphatase in serum clin [J]. Chem Acta, 1997, 263(2): 165-175.
- [12] ZANINOTTO M, SECHICIC S, RUBIN D. Serum bone alkaline phosphatase in the follow-up of skeletal metastase [J]. Anticancer Res, 1995, 15(5B): 2223-2228.