

# 苦瓜子衣色素蛋白提取及抗氧化能力研究

于群, 张惠, 安磊, 杨浩宇 (宁夏职业技术学院, 宁夏银川 750021)

**摘要** [目的]研究苦瓜子衣色素蛋白的最佳提取工艺及其抗氧化能力,为天然色素的开发应用提供参考。[方法]采用乙酸乙酯法提取苦瓜子衣色素,双水相法提取苦瓜子衣色素蛋白,经 DEAE-52 阴离子层析, Sephadex G-100 凝胶柱层析得到纯化蛋白,参考芬顿法测定其抗氧化能力。[结果]确定苦瓜子衣色素提取的最佳条件为温度 50 ℃,料液比 1:40 (g: mL),时间 30 min,该条件下提取率最高,为 45.54%。双水相法中硫酸铵质量分数为 35%,聚乙二醇质量分数为 30%,提取得到苦瓜子衣色素粗蛋白,经过层析得到分子量为 74.10 kD 的纯化蛋白。抗氧化试验表明,纯化苦瓜子衣色素蛋白具有抗氧化能力,且随着质量浓度的增加抗氧化性增强。[结论]该试验采用新兴的双水相法提取苦瓜子衣色素蛋白,简化了提取工艺,减少了蛋白质的流失;抗氧化试验为从天然色素中制备高品质无污染的抗氧化剂奠定了理论基础。

**关键词** 苦瓜子衣色素蛋白;分离纯化;柱层析;抗氧化作用

中图分类号 S642.5 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)05-0054-03

## Study on Antioxidant Effects and Extracting of *Momordica charantia* Sub-skin Pigment Protein

YU Qun, ZHANG Hui, AN Lei et al (Ningxia Polytechnic, Yinchuan, Ningxia 750021)

**Abstract** [Objective] To study the best condition for the extraction and antioxidant activity of sub-skin pigment from *Momordica charantia*, to provide a reference for the development and application of natural pigment. [Method] Extracted *Momordica charantia* sub-skin pigment with ethyl acetate, extracted the protein with aqueous two-phase system, purified it by DEAE-52 anion chromatography and Sephadex G-100 gel column chromatography, determined the antioxidant effects by Fenton method. [Result] The best condition revealed that: temperature 50 ℃, proportion of solid to liquid is 1:40 (g: mL), time 30 min, the extraction rate up to 45.54%. The condition of aqueous two-phase system was: 35% ammonium sulfate and polyethylene glycol of 30%, purified the protein with molecular weight 74.10 kD. The antioxidant tests indicated that *Momordica charantia* sub-skin pigment protein had antioxidant effects and their eliminate capacity increased with the concentration of solution increased. [Conclusion] This test used a new aqueous two-phase system to extract the protein, simplified the extraction process and reduced the loss of protein. The antioxidant test provided a theoretical basis for the preparation of high quality and non polluting antioxidant preparation from natural pigments.

**Key words** *Momordica charantia* sub-skin pigment protein; Separation and purification; Column chromatography; Antioxidant

近年来,随着人们对合成色素毒性问题的认识及各国对使用合成色素种类的限制增多,消费者对天然色素的需求急剧增加,人们的关注点逐渐转移到天然色素的开发和应用上。天然食用色素不仅可为食品着色,有的品种由于保留了植物体内的多种天然活性物质,如维生素、氨基酸、核苷酸、小分子活性肽、芳香物质及某些必需元素等<sup>[1]</sup>,还兼有营养保健功能,因此天然色素的开发具有巨大潜力和研究价值。苦瓜(*Monlordica charantia* L.)为葫芦科苦瓜属一年生蔓性草本植物,营养丰富,含有丰富的蛋白质,具有抗氧化、抑菌、抗肿瘤、抗 HIV 活性、降低血糖、调节免疫功能等作用<sup>[2]</sup>。王先远等<sup>[3]</sup>研究了苦瓜皂苷的抗氧化作用;傅明辉<sup>[4]</sup>对苦瓜果肉及籽提取液的抗氧化活性进行了探讨,发现苦瓜果肉及籽的提取液均具有较强的抗氧化活性。成熟苦瓜子衣色素作为一种重要的天然植物色素,具有潜在研究价值。笔者在借鉴国内外最新研究成果的基础上,以苦瓜子衣为研究材料,在确定色素最佳提取条件的基础上,对色素的稳定性及基本成分进行定性分析的同时,分离纯化出与色素形成相关联的色素蛋白并研究其抗氧化作用。

## 1 材料与方

**1.1 材料** 供试原料为新鲜老龄苦瓜。

## 1.2 方法

**1.2.1 原材料的预处理。**将老龄苦瓜剖开,取出里面红色

的子衣,用组织捣碎机打成匀浆,放入冰箱保藏备用。

**1.2.2 最佳提取工艺条件的筛选。**选择对有机溶剂萃取苦瓜子衣色素效果影响较大的 3 个因素:萃取时间(A)、萃取温度(B)、料液比(C),并以乙酸乙酯为萃取剂,以苦瓜子衣色素提取率为指标,设计正交试验。

表 1 苦瓜子衣色素提取正交试验因素及水平设计

Table 1 Orthogonal test factors and levels of *Momordica charantia* sub-skin pigment extraction

水平 Level	因素 Factor		
	萃取时间(A) Extraction time//min	萃取温度(B) Extraction temperature//℃	料液比(C) Solid-liquid ratio(g: mL)
1	30	40	1:20
2	35	45	1:30
3	40	50	1:40

**1.2.3 双水相体系的制备。**固定聚乙二醇 4000 质量分数为 25%,不添加无机盐,以不同质量分数的硫酸铵(25%、30%、35%、40%、45%)组成双水相体系,加入 6 g 苦瓜子衣,pH 调至 7.0,4 ℃萃取 4 h,测定蛋白质的分配系数及相比和萃取率。

固定硫酸铵质量分数为 35%,不添加无机盐,以不同质量分数的聚乙二醇 4000(25%、30%、35%、40%、45%)组成双水相体系,加入 6 g 苦瓜子衣,pH 调至 7.0,4 ℃萃取 4 h,测定蛋白质的分配系数及相比和萃取率。

相关公式<sup>[5]</sup>:

$$\text{分配系数 } K = C_1/C_0$$

相比  $R = V_i/V_b$

上相回收率  $Y_i = \text{上相蛋白质浓度} / \text{上下相总浓度}$   
 $= C_i V_i / (C_i V_i + C_b V_b)$

下相回收率  $Y_b = \text{下相蛋白质浓度} / \text{上下相总浓度}$   
 $= C_b V_b / (C_i V_i + C_b V_b)$

式中,  $C_i$ 、 $C_b$  分别代表上、下相蛋白质浓度;  $V_i$ 、 $V_b$  分别代表上、下相体积。

**1.2.4 苦瓜子衣蛋白提取。** 分别量取 100 mL 30% 聚乙二醇 4000 溶液和 100 mL 35% 硫酸铵溶液于锥形瓶中, 加入 6 g 苦瓜子衣, 混匀后, 调节溶液 pH 为 7.0, 4 °C 搅拌提取 4 h, 10 000 r/min 离心 20 min, 得苦瓜子衣色素蛋白粗提液。用聚乙二醇 6000 包埋透析袋进行浓缩至 1.5 mL, 装入离心管中冷冻备用。

**1.2.5 苦瓜子衣色素蛋白的纯化。**

**1.2.5.1 DEAE 纤维素柱 (10 mm × 300 mm) 层析纯化苦瓜子衣色素蛋白。** 将苦瓜子衣色素粗蛋白样品用 PBS 缓冲液 (pH 8.0, 0.05 mol/L) 溶解, 使其浓度为 1 mg/mL, 4 °C、10 000 r/min 离心 20 min, 去除不溶物, 并将上清液加载于 DEAE 纤维素柱上, 用 0.02 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 8.0) 洗柱, 进行 0~0.6 mol/L NaCl 的梯度洗脱, 以 1 mL/min 的流速洗涤, 经紫外仪检测, 收集洗脱液, 4 °C 浓缩。

**1.2.5.2 Sephadex G-100 柱 (10 mm × 300 mm) 层析纯化苦瓜子衣色素蛋白。** 将 DEAE-52 柱层析中收集的蛋白洗脱

液上 Sephadex G-100 柱, 用 PBS 缓冲液 (pH 8.0, 0.05 mol/L) 平衡洗脱, 分管收集, 流速控制在 1 mL/min, 每管收集 1 mL, 在波长 280 nm 处检测吸光度。

**1.2.6 苦瓜子衣色素纯化蛋白的 SDS-PAGE 电泳。** 聚丙烯酰胺凝胶浓度: 分离胶 12.5%, 浓缩胶 2.5%。加样量 35 μL/槽。室温, 恒流 25 mA, 电泳 6~7 h。考马斯亮蓝 (CBB-R250) 染色, 透射照相记录。

**1.2.7 苦瓜子衣色素纯化蛋白的抗氧化试验 (参考 Fenton 法) [6-7]。** 在试管中加入 0.1 mL 0.6 mmol/L 的  $H_2O_2$ 、0.1 mL 0.6 mmol/L 的水杨酸溶液、0.1 mL 0.6 mmol/L  $FeSO_4$  溶液, 加入后立即混匀。再向其中分别加入 0.1 mL 苦瓜子衣色素纯化蛋白和粗蛋白溶液 (浓度分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0 mg/mL) 混匀。以蒸馏水为参比, 与试剂空白液比较。在波长 510 nm 处测 2 种蛋白不同浓度的吸光度, 计算被测物对羟自由基的清除率。

羟自由基清除率 =  $(A_1 - A_x) / A_1 \times 100\%$

式中,  $A_1$  为空白对照液的吸光度;  $A_x$  为加入提取液后的吸光度。

## 2 结果与分析

**2.1 最佳提取工艺条件的筛选** 由表 2 可知,  $A_1 B_3 C_3$  为最佳组合, 即萃取温度为 50 °C、料液比为 1:40、萃取时间为 30 min 时, 苦瓜子衣色素的提取率最高, 为 45.54%。此条件为苦瓜子衣色素提取的最佳工艺条件。

表 2 苦瓜子衣色素提取正交试验结果

Table 2 Orthogonal test results of *Momordica charantia* sub-skin pigment extraction

试验号 Test No.	因素 Factor			空列 Blank column	吸光度 (A) Absorbance	提取率 Yield//%
	A	B	C			
1	1	1	1	3	0.579 0	18.92
2	1	2	2	1	0.775 5	25.34
3	1	3	3	2	1.393 5	45.54
4	2	1	2	2	0.654 0	21.37
5	2	2	3	3	0.717 0	23.43
6	2	3	1	1	0.747 5	24.42
7	3	1	3	1	0.729 0	23.82
8	3	2	1	2	0.543 0	17.75
9	3	3	2	3	1.058 5	34.59

**2.2 双水相体系的制备** 表 3 显示, 当聚乙二醇 4000 的质量固定时, 一定范围内随着硫酸铵质量分数的增加, 蛋白质的回收率逐渐上升; 当硫酸铵质量分数大于 35% 时, 蛋白质回收率又逐渐下降。硫酸铵质量分数过高, 不仅会破坏酶表面

表 3 硫酸铵质量分数对苦瓜子衣蛋白萃取率的影响

Table 3 Effects of ammonium sulfate mass fraction on extraction yield of *Momordica charantia* sub-skin pigment protein

硫酸铵质量分数 Ammonium sulfate mass fraction//%	分配系数 Distribution coefficient	相比 Ratio	回收率 Recovery %
25	0.223	0.359	55.0
30	0.201	0.652	56.2
35	0.095	0.786	60.5
40	0.527	0.625	42.6
45	0.440	0.500	32.2

的水化层, 使蛋白发生盐析, 蛋白的萃取率下降; 而且扰乱双水相系统, 改变各相中成相物质的组成和相体积比<sup>[8]</sup>。综合考虑, 确定硫酸铵的质量分数 35% 为佳。

表 4 显示, 当硫酸铵的量固定时, 随着聚乙二醇 4000 质量分数的增加, 蛋白质回收率先增大后减小, 并且在聚乙二

表 4 聚乙二醇 4000 质量分数对苦瓜子衣色素蛋白萃取率的影响

Table 4 Effects of polyethylene glycol 4000 mass fraction on extraction yield of *Momordica charantia* sub-skin pigment protein

聚乙二醇 4000 质量分数 Polyethylene glycol 4000 mass fraction//%	分配系数 Distribution coefficient	相比 Ratio	回收率 Recovery %
25	0.325	0.39	88.8
30	0.089	0.47	96.0
35	0.090	0.69	94.1
40	0.304	1.15	73.5
45	0.409	1.55	61.3

醇 4000 质量分数为 30% 时,蛋白质的回收率达到最佳值。从分配理论上解释,随着聚乙二醇 4000 量增加,黏度增大,阻止相间分子转移的能力增加,相界面张力亦增加。当聚乙二醇 4000 用量较低时,硫酸铵的盐析作用起主要作用,使蛋白质大部分分布在下相中<sup>[9]</sup>。

**2.3 苦瓜子衣色素蛋白的纯化** 苦瓜子衣色素粗蛋白样品上 DEAE 阴离子交换柱,共得到 2 个洗脱峰。进一步纯化目的蛋白,将洗脱液继续上 Sephadex G-100 凝胶柱,共得到 1 个吸收峰(图 1)。进行 SDS-PAGE 检测,如图 2 所示,电泳结果示仅为 1 条带,说明其已经达到电泳纯,分子量为 74.10 kD。

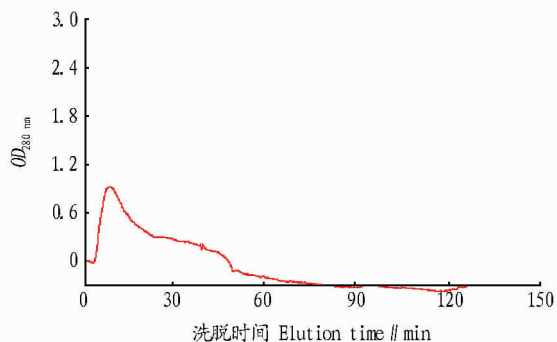
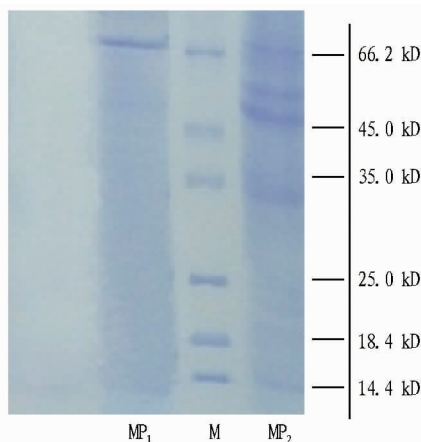


图 1 苦瓜子衣色素蛋白过 Sephadex G-100 柱层析图谱

Fig. 1 Sephadex G-100 column chromatogram of *Momordica charantia* sub-skin pigment protein



注:MP<sub>1</sub>. 纯化苦瓜子衣色素蛋白;MP<sub>2</sub>. 粗提苦瓜子色素蛋白;M. 标准蛋白

Note: MP<sub>1</sub>. Purified *M. charantia* sub-skin pigment protein; MP<sub>2</sub>. Crude extracted *M. charantia* pigment protein; M. Standard protein

图 2 纯化苦瓜子衣色素蛋白的 SDS-PAGE

Fig. 2 SDS-PAGE of purified *Momordica charantia* pigment protein

**2.4 苦瓜子衣色素纯化蛋白的抗氧化作用** 由表 5 可知,苦瓜子衣纯化蛋白和粗蛋白均具有抗氧化能力,其清除羟自

由基的能力随着质量浓度的增加抗氧化性增强,但苦瓜子衣纯化蛋白在同等质量浓度下均稍弱于粗蛋白,原因可能是粗蛋白中含多种具抗氧化活性的蛋白共同产生作用。

表 5 样品浓度对羟自由基清除率的影响

Table 5 Effects of sample concentration on scavenging rate of hydroxy radical

样品浓度 Sample//mg/mL	清除率 Scavenging rate//%	
	纯化蛋白 Purified protein	粗蛋白 Crude protein
0.5	4.9	8.7
1.0	11.2	20.3
1.5	23.6	27.2
2.0	31.1	36.0
3.0	50.1	51.2
4.0	54.7	60.3

### 3 结论与讨论

该试验采用传统的乙酸乙酯法提取苦瓜子衣色素,确定苦瓜子衣色素提取的最佳条件。采用新兴的双水相法提取苦瓜子衣色素蛋白,为苦瓜子衣色素蛋白的提取开创新的途径。双水相法分离不同物质,系统中的聚乙二醇、硫酸铵的质量分数、pH、盐离子浓度等均不相同<sup>[10]</sup>,此法减少了蛋白的流失,且特异性强,有机试剂用量少,不必进行脱盐处理,简化了试验操作。

该试验发现,苦瓜子衣色素粗蛋白和纯化蛋白具有不同程度的抗氧化能力,苦瓜子衣色素蛋白粗提液中成分复杂,可能含有多种抗氧化能力的蛋白,因此苦瓜子衣色素粗蛋白的抗氧化活性大于纯化蛋白。苦瓜子衣色素蛋白是一种良好的、无毒害、纯天然的抗氧化物质,对其进行深入研究将为大规模生产抗氧化制剂奠定坚实基础。

### 参考文献

- [1] 彭子模,李进,孟冬丽.植物源天然色素的开发与应用研究现状与展望[J].新疆师范大学学报(自然科学版),2000,19(4):44-45.
- [2] 刘璇,时祥柱,叶秀云.苦瓜子中一种抗胰蛋白肽的分离及抗真菌作用观察[J].福州大学学报,2008,36(1):148-151.
- [3] 王先远,蒋与刚,金宏,等.苦瓜子皂甙的抗氧化作用初探[J].解放军预防医学杂志,2001,19(5):317-332.
- [4] 傅明辉.苦瓜子蛋白的分离、纯化及其抗氧化作用的研究[J].药物生物技术,2001,8(5):248-250.
- [5] 黄淑霞,吴晓莉,尹卓容. PEG/(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 双水相体系提取和纯化糖化酶[J].酿酒科技,2003(2):24-25.
- [6] QIN G F. Effects of *Momordica charantia* extract on fertility of male rats[J]. Journal of guiyang medical college, 1995, 10(3):167-169.
- [7] WEI M H, WEI M X, LIU Z, et al. Research in the comparison of ribosome-inactivating protein between luffa cylindrica and *Momordica charantia* Linn [J]. Journal of henan university (Natural science), 2002, 30(1):115-118.
- [8] 周红航,王维香.聚乙二醇/硫酸铵双水相体系萃取猪胰蛋白酶[J].化工进展,2009,28(2):305-308.
- [9] 郑楠,刘杰.双水相萃取技术分离纯化蛋白质的研究[J].化学与生物工程,2006,23(10):7-9.
- [10] MOKHTARANI B, KARIMZADEH R, AMINI M H, et al. Partitioning of ciprofloxacin in aqueous two-phase system of poly(ethylene glycol) and sodium sulphate[J]. Biochemical engineering journal, 2008, 38(2):241-247.

(上接第 53 页)

- [7] 许俊杰,钟文文. LY424 细菌菌株产红色素条件的优化[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2010, 41(1):39-44.
- [8] 袁保红,杜青平,蔡创华,等. 海洋细菌 *Pseudomonas* sp. 色素的提取及稳定性的研究[J]. 海洋通报, 2005, 24(6):92-96.
- [9] 杨涛,林亲录,马美湖. 高色价低粘霉素红曲色素的提取研究[J]. 食品

科技, 2005, 21(3):51-66.

- [10] 袁保红,杜青平,蔡创华,等. 一株新海洋细菌生物学特性及其色素性质的研究[J]. 广州药学院学报, 2005, 21(2):183-186.
- [11] 郝名慧,楼志华,张梁,等. 一株新粘质沙雷氏菌发酵产红色素及其结构的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2007(19):439-442.