

王桃云,邱业先,汪金莲,等.银杏叶抑制脲酶活性成分提取条件优化及其成分初步鉴定[J].江苏农业科学,2013,41(10):246-249.

银杏叶抑制脲酶活性成分提取条件优化 及其成分初步鉴定

王桃云,邱业先,汪金莲,赵 琪,盛 齐,王罗玲

(苏州科技学院化学与生物工程学院,江苏苏州 215009)

摘要:以脲酶活性抑制率为评价指标,采用单因素试验和正交试验对银杏叶抑制脲酶活性成分的提取条件进行优化;并应用化学反应鉴定法,对银杏叶抑制脲酶活性成分进行了初步鉴定。结果表明:银杏叶抑制脲酶活性成分的最佳提取工艺为微波功率 231 W、液料比 20 mL : 1 g、提取时间 2 min、乙醇体积分数 60%,该工艺条件下银杏叶提取液对脲酶活性的抑制率达 55.79%;银杏叶中抑制脲酶活性的主要成分为多酚及黄酮类化合物。

关键词:银杏叶;抑制;脲酶;成分;正交试验

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)10-0246-03

脲酶是一种水解酶,能将尿素分解为可被作物利用的 NH_4^+ 。但由于脲酶水解作用非常迅速,容易造成氨挥发,导致尿素利用率通常低于 30%^[1],同时土壤微域内氨浓度的增加会对幼小植株产生伤害^[2],也会造成地下水硝酸盐含量超标,使水体遭受污染^[3]。为了提高尿素利用率,减少环境污染,必须找到合适的脲酶抑制剂,适当抑制脲酶活性,使尿素分解速度与植物吸收氮的速度同步。在抑制脲酶活性的研究中,国内外学者做了大量工作。现今已发现几百种脲酶抑制剂,这些物质抑制脲酶的效果各不相同,但存在成本高、有毒、对植物及土壤有害、对环境造成污染等缺点^[4-5]。所以,寻找既可以抑制脲酶活性,又适用于任何土壤,对环境友好的脲酶抑制剂显得非常重要。银杏(*Ginkgo biloba*)是我国特有的孑遗植物,集果用、药用、材用、防护、观赏于一体,是我国发展高效创汇农业的重要经济作物。我国银杏叶资源占全球的 70% 以上,研究发现,银杏叶提取物对脲酶有抑制作用^[6]。本研究对银杏叶中抑制脲酶活性成分(UICGBL)的提取工艺及其主要成分进行了研究,旨在开发一种高效无毒的植物性脲酶抑制剂,从而提高尿素利用率。

1 材料与方法

1.1 材料

银杏叶:7 月份采自苏州科技学院校园内的银杏雌株,室温阴干,粉碎后过 60 目筛,密封贮存于广口瓶后置于 -86 ℃ 冰箱中,备用。

收稿日期:2013-03-26

基金项目:江苏省科技创新与成果转化(重大科技支撑与自主创新)专项资金(编号:BE2010388)。

作者简介:王桃云(1973—),男,江西安福人,博士,副教授,主要从事植物资源与天然产物研究与开发。E-mail: wangtaoyun@mail.usts.edu.cn。

通信作者:邱业先(1954—),男,江西永丰人,教授,主要从事蛋白质、酶研究及天然产物研究与开发。E-mail: qyx542@mail.usts.edu.cn。

1.2 主要试剂

固体刀豆脲酶(使用前用去离子水配制成 10 U/mL 的溶液),美国 Sigma-Aldrich 公司;大孔吸附树脂,上海摩速科学器材公司;无水乙醇、次氯酸钠、氢氧化钠、脲(尿素)、甲醇、丙酮、柠檬酸、甲苯、硫酸铵、苯酚钠、氢氧化钾、硫酸铜、酒石酸钾钠、茚三酮、浓硫酸、浓盐酸、镁粉、醋酸、苦味酸、甲萘酚、三氯化铁等均为国产分析纯。

1.3 主要仪器设备

UV-2450 型紫外-可见分光光度计(岛津仪器有限公司);EYELA 旋转蒸发仪(日本东京理化器械株式会社);JA5003 型电子天平(上海精密科学仪器厂);GL-12B 型离心机(上海安亭科学仪器厂);微波炉(广东美的微波炉制造有限公司);MDF-U4086S 超低温冰箱(日本 SANYO 生物有限公司);LGJ-10 冷冻干燥机(北京四环科学仪器厂)。

1.4 方法

1.4.1 标准曲线绘制 称取硫酸铵 0.471 7 g 溶于去离子水,并稀释至 1 L,得含氮 0.1 mg/mL 的标准液。绘制标准曲线时,可再将该溶液稀释至 10 倍备用。以去离子水为对照,分别吸取稀释的标准液 1、3、5、7、9、11、13 mL 为试验组,移于 50 mL 容量瓶中,加去离子水至 20 mL,再加苯酚钠溶液 4 mL 和次氯酸钠溶液 3 mL,边加边摇匀。20 min 后显色、定容。1 h 内在分光光度计上 578 nm 波长处比色。以氨浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标绘制标准曲线。标准曲线方程为: $y = 252.5x + 0.004$, $r^2 = 0.9995$ 。

1.4.2 脲酶活性及抑制率测定 采用靛酚比色法测定脲酶活性^[7]。抑制率计算方法为:

$$\text{抑制率} = (A - B) / A \times 100\%。$$

式中: A 表示不加抑制剂时的酶活, B 表示加抑制剂后的酶活。

1.4.3 单因素对银杏叶抑制脲酶活性成分提取的影响 分别以微波功率、液料比、提取时间、乙醇体积分数为变量,在其他试验条件相同的情况下,进行单因素试验。以不同试验条件下提取的银杏叶提取物对脲酶抑制率为标准,确定各单因素的优化条件。

1.4.4 银杏叶抑制脲酶活性成分提取工艺条件的优化 在单因素试验基础上,对微波功率、液料比、提取时间、乙醇体积分数等 4 个因素进行 $L_9(3^4)$ 正交试验,得到各因素综合的 UICGBL 优化提取工艺。

1.4.5 银杏叶中抑制脲酶活性成分初步鉴定 工艺流程:取已处理的银杏粉 150 g→利用试验所得的优化提取工艺进行提取→提取液减压旋蒸浓缩→利用不同极性的有机溶剂(石油醚、乙酸乙酯、正丁醇)萃取→萃取液浓缩→冷冻干燥成粉状→抑制脲酶活性测定→得抑酶活性最强的萃取相→大孔吸附树脂柱分离纯化→不同浓度乙醇洗脱液→洗脱液旋蒸浓缩→冷冻干燥成粉状→抑制脲酶活性测定→得抑酶活性最强的洗脱部分→化学反应初步鉴定抑酶活性成分。

2 结果与分析

2.1 微波提取银杏叶抑制脲酶成分的单因素试验

2.1.1 微波功率对银杏叶抑制脲酶成分提取效果的影响 在乙醇体积分数 60%,液料比 20 mL : 1 g,微波功率分别为 119、231、385、539、700 W 的条件下提取 2 min,对所得提取液进行脲酶活性及抑制率测定,结果见图 1。

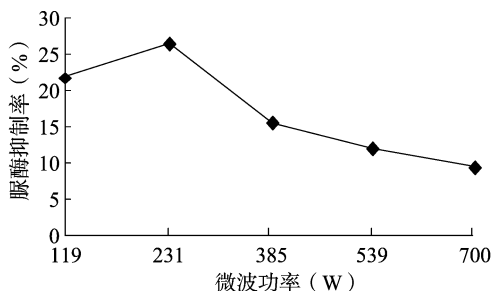


图1 微波功率对银杏叶抑制脲酶成分提取效果的影响

由图 1 可知,在一定范围内,随着微波功率的增大,脲酶抑制率逐渐递增;微波功率达到 231 W 时,抑制脲酶成分含量达到最高,脲酶活性抑制率达到最大;微波功率超过 231 W 后,脲酶抑制率逐渐下降。可能是因为微波功率太小时,细胞破坏程度较小,难以使有效成分溶出,而功率过大会导致活性物质被分解或破坏,因此选定微波功率为 119、231、385 W 作为正交试验的 3 个水平^[8]。

2.1.2 液料比对银杏叶抑制脲酶成分提取效果的影响 在乙醇体积分数 60%,微波功率 231 W,液料比分别为 10 mL : 1 g、15 mL : 1 g、20 mL : 1 g、25 mL : 1 g、30 mL : 1 g 的条件下提取 2 min,对所得提取液进行脲酶活性及抑制率测定,结果如图 2 所示。

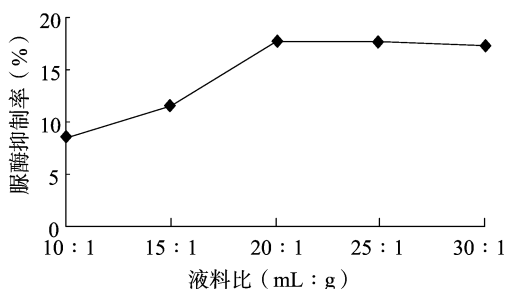


图2 液料比对银杏叶抑制脲酶成分提取效果的影响

由图 2 可知,UICGBL 的抑制率随着液料比的增加而增大,但当液料比达 20 mL : 1 g 后,脲酶抑制率几乎没有太大变化。这是因为液料比在 20 mL : 1 g 左右时,基本上能将大部分有效物质溶出,再增大液料比时,萃取效果变化不明显。因此选定液料比为 15 mL : 1 g、20 mL : 1 g、25 mL : 1 g 作为正交试验的 3 个水平^[9]。

2.1.3 微波辅助提取时间对银杏叶抑制脲酶成分提取效果的影响 在乙醇体积分数 60%,微波功率 231 W,液料比 20 mL : 1 g 的条件下,分别提取 1、2、3、4、5 min,对所得提取液进行脲酶活性及抑制率测定,结果如图 3 所示。

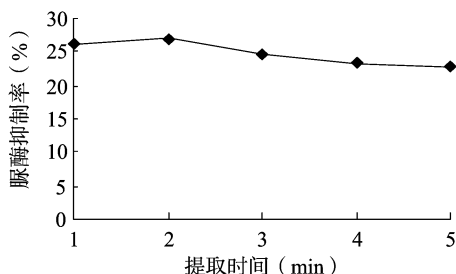


图3 提取时间对银杏叶抑制脲酶成分提取效果的影响

由图 3 可知,UICGBL 的抑制率随着微波提取时间的增加变化幅度很小。微波提取时间为 2 min 时,脲酶抑制率达到最大值。提取时间太短时,可能浸提不充分,抑制脲酶成分含量较少。微波提取时间超过 2 min 时,脲酶抑制率反而减小,可能是因为随着提取时间延长,较多抑制脲酶的活性成分被氧化,结构受到破坏;虽然提取充分,但杂质增多。因此选定提取时间为 1、2、3 min 作为正交试验的 3 个水平。

2.1.4 乙醇体积分数对银杏叶抑制脲酶成分提取效果的影响 在微波功率 231 W,液料比 20 mL : 1 g,乙醇体积分数分别为 20%、40%、60%、80%、95% 的条件下提取 2 min,对所得提取液进行脲酶活性及抑制率测定,结果如图 4 所示。

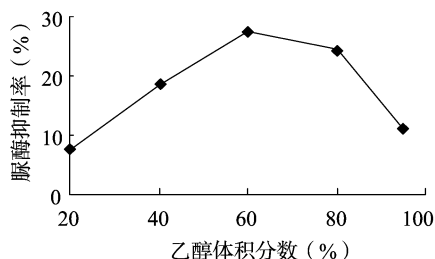


图4 乙醇体积分数对银杏叶抑制脲酶成分提取效果的影响

由图 4 可知,在乙醇体积分数低于 60% 时,随着乙醇体积分数增大,脲酶抑制率不断增大,即抑制脲酶成分含量在不断增加。乙醇体积分数为 60% 时脲酶抑制率最大,即 UICGBL 得率最高,随着乙醇体积分数的继续增大,脲酶抑制率明显下降。由此可知,在 60% 乙醇萃取条件下,UICGBL 在总量上能够被最大限度萃出,原因是 UICGBL 极性与 60% 乙醇最接近^[10]。因此选定乙醇体积分数为 40%、60%、80% 作为正交试验的 3 个水平。

2.2 微波辅助提取银杏叶抑制脲酶成分的正交试验

2.2.1 正交试验设计及试验结果 根据单因素试验结果,将考察因素定为微波功率、液料比、微波提取时间、微波功率,每

个因素选择 3 个水平,采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验。正交试验设计与结果分别见表 1、表 2。

表 1 银杏叶抑制脲酶成分提取工艺正交试验因素水平

水平	因素			
	A:微波功率 (W)	B:液料比 (mL : g)	C:提取时间 (min)	D:乙醇体积 分数(%)
1	119	15 : 1	1	40
2	231	20 : 1	2	60
3	385	25 : 1	3	80

从表 2 中脲酶抑制率的极差可以看出,B 因素(液料比)为主要的脲酶抑制率影响因素,A 因素(微波功率)次之,D 因素(乙醇体积分数)为第 3 影响因素,C 因素(提取时间)的影响最小。

2.2.2 银杏叶抑制脲酶活性成分最优提取工艺条件 根据表 2 的试验结果,对所得极差进行直观分析,结果如图 5 所示。由图 5 可知,UICGBL 最优提取工艺条件为 $A_2B_3C_2D_2$ (微波功率 231 W,液料比 25 mL : 1 g,提取时间 2 min,乙醇体积分数 60%)。在优化的工艺条件条件($A_2B_3C_2D_2$)下进

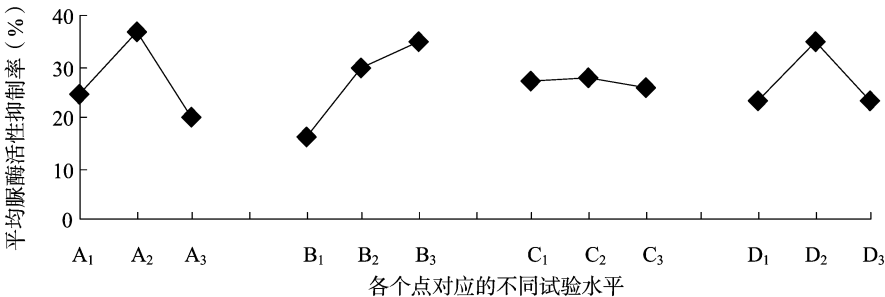


图5 不同因素水平试验结果的直观分析

2.3 银杏叶中抑制脲酶活性成分初步鉴定

按照“1.4.5”的工艺流程,得出 30% 乙醇洗脱物的抑制脲酶活性最高,参照梁臣艳等的方法^[12]对 30% 洗脱物中主要抑制脲酶活性成分进行了初步鉴定,结果见表 3。由表 3 可知,抑制脲酶活性最强的洗脱物(30% 乙醇洗脱物)的主要成分是酚类、黄酮类化合物。这与汪金莲等报道的茶多酚对脲酶具有较强抑制作用^[13]及黄赛驾等报道的通过添加黄酮类化合物可以提高尿素氮素利用率^[14]的结果相吻合,因此银杏叶中抑制脲酶活性的主要成分是酚类和黄酮类化合物。

表 3 主要抑制脲酶活性成分鉴定结果

检查项目	试验方法	试验现象	结果
蛋白质	双缩脲反应	无紫红色	-
氨基酸	茚三酮反应	无蓝紫色	-
酚类	三氯化铁反应	呈深绿色	+
皂苷	冰醋酸-浓硫酸反应	无红紫色和蓝绿色	-
黄酮类物质	盐酸-镁粉反应	呈红色	+
萜醌类	氢氧化钠反应	无荧光	-
强心苷	苦味酸反应	无橙色	-
生物碱	碘化铋钾试验	无沉淀	-

注:“+”表示含有相关化学物质,“-”表示不含相关化学物质。

3 结论

银杏叶中抑制脲酶活性成分提取的 4 个因素的影响大小

表 2 银杏叶抑制脲酶成分提取工艺正交试验结果与极差分析

编号	因素水平				脲酶抑制率 (%)
	A:微波功率	B:液料比	C:提取时间	D:乙醇体积分数	
1	1	1	1	1	10.17
2	1	2	2	2	36.27
3	1	3	3	3	27.48
4	2	1	2	3	22.43
5	2	2	3	1	34.39
6	2	3	1	2	52.77
7	3	1	3	2	15.76
8	3	2	1	3	18.96
9	3	3	2	1	24.76
k_1	24.64	16.12	27.30	23.11	
k_2	36.53	29.87	27.82	34.93	
k_3	19.83	35.00	25.88	22.96	
R	16.70	18.88	1.94	11.97	

行 3 次重复验证试验,结果表明平均脲酶抑制率为 55.79%,高于表 2 中各处理的脲酶抑制率结果,故 $A_2B_3C_2D_2$ 为最佳提取工艺条件^[11]。

次序为:液料比>微波功率>乙醇体积分数>提取时间,因此实际提取过程中应着重注意液料比、微波功率、乙醇体积分数。采用正交试验法优选出抑制脲酶活性成分的最佳提取工艺条件:微波功率 231 W、液料比 25 mL : 1 g、提取时间 2 min、乙醇体积分数 60%,该工艺下提取物对脲酶抑制率达到 55.79%。银杏叶中抑制脲酶活性的主要成分是酚类和黄酮类化合物。有关银杏叶中抑制脲酶活性的具体活性成分结构,还有待于通过植物化学方法进一步分离纯化,并结合光谱学方法进行结构鉴定。

参考文献:

[1]赵 略,孙庆元,于英梅,等. 脲酶抑制剂 nBPT 对土壤脲酶活性和脲酶产生菌的影响[J]. 大连轻工业学院学报,2007,26(1): 24-27.

[2]武慧玲,薛立微,王胜华,等. 小叶女贞叶提取物对脲酶的抑制作用[J]. 土壤通报,2011,42(2):311-315.

[3]倪秀菊,李玉中,徐春英,等. 土壤脲酶抑制剂和硝化抑制剂的研究进展[J]. 中国农学通报,2009,25(12):145-149.

[4]Dawar K, Zaman M, Rowarth J S, et al. Urease inhibitor reduces N losses and improves plant - bioavailability of urea applied in fine particle and granular forms under field conditions[J]. Agriculture, Ecosystems and Environment,2011,144(1):41-50.

冯 敏,朱佳廷,李 澧,等.花生辐照杀虫防霉工艺剂量确定[J].江苏农业科学,2013,41(10):249-250.

花生辐照杀虫防霉工艺剂量确定

冯 敏¹,朱佳廷¹,李 澧¹,李淑荣²,杨 萍¹,王德宁¹,顾贵强¹

(1.江苏省农业科学院农业设施与装备研究所,江苏南京 210014; 2.中国农业科学院农产品加工研究所,北京 100193)

摘要:以散装花生为材料,经不同剂量的 γ 射线辐照处理后在室温下贮藏,定期观察害虫侵染程度及霉菌感染程度。结果表明:未经辐照的花生贮存2个月开始生虫,贮存4个月害虫侵染率随贮存时间延长而提高,贮存6个月时害虫侵染率达58%~100%,经辐照处理的花生始终未受害虫侵染。未经辐照的花生贮存3个月后发现霉变,辐照剂量为0.3~0.5 kGy的花生贮存6个月后发现霉变,辐照剂量为1.0、4.0 kGy的花生在辐照后12个月内都未发生霉变。结合相关国际、国内标准以及国内外学者的研究结果,确定花生辐照杀虫的最低有效剂量为0.3 kGy,辐照防霉最低有效剂量为1.0 kGy,最高耐受剂量为4.0 kGy。

关键词:花生;辐照杀虫;辐照防霉;吸收剂量

中图分类号: S565.209 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)10-0249-02

花生是我国重要的油料作物和经济作物,也是重要的食品加工原料,极易受虫害和霉菌污染,收获后如仓贮不当,霉菌会产生黄曲霉毒素。由于缺乏减少花生霉菌侵染的有效措施,我国花生霉菌污染十分严重^[1]。近年来,辐照技术在保障花生及其制品食用安全方面发挥着重要作用^[2]。辐照处理不仅能够有效杀灭各种害虫和病原微生物^[3],同时能够降解黄曲霉毒素,降低花生致敏蛋白的致敏性^[4-5],提高花生食用安全性。本研究结合相关国际与国家标准,确定花生辐照杀虫防霉适宜的工艺剂量范围,旨在为花生仓贮管理提供指导。

1 材料与方法

1.1 材料

散装花生购自江苏省南京市花生批发市场,100 g/袋用

自封袋分装备用。

1.2 辐照处理

在江苏省南京市辐照中心进行花生辐照处理,分别采用0.3、0.5、1.0、4.0、6.0 kGy辐照散装花生,于室温(10~35℃)下贮存,分别于贮存后第1、2、3、4、5、6、8、10、12个月检查害虫侵染程度及霉菌感染程度。

1.3 检测方法

参照《食品安全国家标准:食品微生物学检验:霉菌和酵母计数》(GB 4789.15—2010)规定的方法检测花生的霉菌含量。

2 花生辐照杀虫防霉工艺剂量的确定依据

2.1 国际标准

2003年7月,国际食品法典委员会(CAC)在罗马召开了第26届大会,会议通过了修订后的《辐照食品国际通用标准(CODEX STAN106—1983, Rev. 1—2003)》和《食品辐照加工工艺国际推荐准则(CAC/RCP19—1979, Rev. 1—2003)》标准,在法规上突破了食品辐照加工中10 kGy的最大吸收剂量的限制,允许在对食品结构完整性、功能性、感官品质不发生负面作用和不影响消费者健康的情况下,食品辐照的最大剂

收稿日期:2013-03-27

基金项目:公益性行业(农业)科研专项(编号:201103007)。

作者简介:冯 敏(1980—),女,江苏盐城人,硕士,助理研究员,从事农副产品辐照加工及质量安全研究。E-mail: fengmin8156@163.com。

通信作者:李淑荣,研究员,主要从事农产品保鲜与贮藏研究。E-mail: shurongl@hotmail.com。

[5] Ariz I, Cruchaga S, Lasa B, et al. The physiological implications of urease inhibitors on N metabolism during germination of *Pisum sativum* and *Spinacea oleracea* seeds[J]. Journal of Plant Physiology, 2012, 169(7): 673-681.

[6] 邵胜荣. 银杏叶活性成分提取纯化、制剂工艺及质量研究[D]. 杭州:浙江大学, 2005: 1-80.

[7] Eivazi F, Bayan M R, Schmidt K. Select soil enzyme activities in the historic Sanborn field as affected by long-term cropping system[J]. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 2003, 34(15/16): 2259-2275.

[8] Chen Y, Xie M Y, Gong X F, et al. Microwave-assisted extraction used for the isolation of total triterpenoid saponins from *Ganoderma atrum*[J]. Journal of Food Engineering, 2007, 81(1): 162-170.

[9] Sun Y X, Li Y J, Li M Q, et al. Optimization of extraction technology

of the *Anemone raddeana* polysaccharides (ARP) by orthogonal test design and evaluation of its anti-tumor activity[J]. Carbohydrate Polymers, 2009, 75(4): 575-579.

[10] 张艳军, 彭重威, 徐淑庆, 等. 银叶树树叶中总黄酮提取工艺优化[J]. 中药材, 2012, 35(4): 638-641.

[11] 谢普军, 黄立新, 张彩虹, 等. 低温减压沸腾提取橄榄苦苷的工艺研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(13): 1946-1951.

[12] 梁臣艳, 甄汉深, 黄晓玉, 等. 广西容县柚子皮化学鉴别的初步研究[J]. 中国民族民间医药, 2010, 19(5): 35-36.

[13] 汪金莲, 邱业先, 陈宏伟, 等. 茶多酚对几种植物病原真菌的抑制作用[J]. 江苏农业科学, 2007(4): 61-63.

[14] 黄赛鹭, 赵志东, 伍文辉, 等. 黄酮类化合物对产脲酶真菌生长的影响[J]. 仲恺农业工程学院学报, 2009, 22(1): 13-16.