

大豆胰蛋白酶抑制因子的研究进展

谷春梅¹, 韩玲玲¹, 曲洪生¹, 秦贵信²

(1. 吉林农业大学 食品科学与工程学院, 吉林 长春 130118; 2. 吉林农业大学 动物科技学院, 吉林 长春 130118)

摘要:大豆胰蛋白酶抑制因子是大豆中的主要抗营养因子, 是一种多肽类或蛋白质。该文对大豆胰蛋白酶抑制因子的种类, Kunitz 型胰蛋白酶抑制因子和 Bowman-Birk 型胰蛋白酶抑制因子的结构和特性, 大豆胰蛋白酶抑制因子的功能及提取纯化方法进行了综述, 旨在为大豆胰蛋白酶抑制因子的进一步开发和利用提供参考。

关键词:大豆胰蛋白酶抑制因子; 功能; 提取; 纯化

中图分类号: S816.4

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2012)01-0149-03

Recent Advances in Soybean Trypsin Inhibitor

GU Chun-mei¹, HAN Ling-ling¹, QU Hong-sheng¹, QIN Gui-xin²

(1. College of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun 130118; 2. College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin, China)

Abstract: Soybean trypsin inhibitor is a major anti-nutritional factor in soybean. It is a polypeptide or protein. In this paper, the type of the soybean trypsin inhibitor, the structure and characteristics of the Kunitz-type trypsin inhibitor and Bowman-Birk-type trypsin inhibitor, the extraction and purification methods of the soybean trypsin inhibitor were reviewed. It is mainly to provide references for the further development of the soybean trypsin inhibitor.

Key words: Soybean trypsin inhibitor; Function; Extraction; Purification

自 1917 年 Osborne 和 Mendel^[1] 首次发现大豆中含有不利于动物消化利用的成分以来, 对大豆中抗营养因子的研究已进行了 90 多年, 发现的抗营养因子达 10 余种^[2], 大豆胰蛋白酶抑制因子 (Soybean Trypsin Inhibitor, STI) 是大豆主要抗营养因子之一, 属于多肽类或蛋白质, 分子量在 7 975 ~ 21 500 D 之间, 大约由 72 ~ 197 个氨基酸残基组成^[3]。该文对大豆胰蛋白酶抑制因子的概况及国内外大豆胰蛋白酶抑制因子的提取纯化方法进行了综述, 旨在为今后更深入的研究提供参考。

1 大豆胰蛋白酶抑制因子的类型

大豆胰蛋白酶抑制因子大约有 7 ~ 10 种。但是目前只有 2 种胰蛋白酶抑制因子得到了比较广泛且详细的研究, 分别是 Kunitz 型胰蛋白酶抑制因子 (Kunitz trypsin inhibitor, KTI) 和 Bowman-Birk 型胰蛋白酶抑制因子 (Bowman-Birk trypsin inhibitor, BBI), 它们在大豆中的含量分别为 1.4% 和 0.6%^[4]。

1.1 Kunitz 型胰蛋白酶抑制因子

KTI 是由 Kunitz 于 1945 年首次从大豆中分离

出来的, 其分子量为 20 ~ 25 kD, 由 181 个氨基酸和少量的半胱氨酸形成的 2 个二硫键组成。分子内只有 1 个活性中心, 因此又称其为单头抑制因子。活性中心位于第 63 号精氨酸 (Arg) 和第 64 号异亮氨酸 (Ile) 之间, 主要对胰蛋白酶直接且专一地起作用, 与胰蛋白酶 1:1 定量结合^[5]。

KTI 不溶于乙醇, 易被酸和蛋白酶失活。由于分子内的二硫键含量少, 所以对热也比较敏感, 一般 80℃ 短时间加热即可使其变性, 而在 90℃ 时就发生不可逆失活。

1.2 Bowman-Birk 型胰蛋白酶抑制因子

1944 年, Bowman 首先从大豆中分离出 BBI 并由 Birk 于 1961 年鉴定, 其分子量为 6 ~ 10 kD, 含有 71 个氨基酸, 其中多为半胱氨酸, 共形成 7 个二硫键。它有 2 个独立的活性中心, 因此又称为双头抑制因子; 这 2 个活性中心分别位于第 16 号赖氨酸 (Lys) 和第 17 号丝氨酸 (Ser)、第 43 号亮氨酸 (Leu) 和第 44 号丝氨酸 (Ser) 之间, 因此它可形成与胰蛋白酶或糜蛋白酶 1:1 结合或与 2 种酶同时结合的复合物^[6]。

BBI 不溶于丙酮, 对热、酸较稳定, 即使在

收稿日期: 2011-09-09

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31000769); 吉林农业大学科学研究启动基金资助项目 (201034)。

第一作者简介: 谷春梅 (1976 -), 女, 讲师, 博士, 硕士生导师, 研究方向为农产品加工及营养调控。E-mail: jinnong2008@126.com。

通讯作者: 秦贵信 (1956 -), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为动物营养与饲料科学。E-mail: guixin@public.cc.jl.cn。

105℃干热 10 min 仍可以保持活性。而且 BBI 不易被多数蛋白酶水解,仅在少数情况下某些蛋白酶可以使双头抑制因子变成单头抑制因子,只抑制胰蛋白酶或糜蛋白酶。用溴化氰和胃蛋白酶处理过的 BBI 可以被剪切为 2 个活性部分,一个和糜蛋白酶结合,另一个和胰蛋白酶结合^[7]。

2 大豆胰蛋白酶抑制因子的功能

生大豆抗营养作用的 40% 是由胰蛋白酶抑制因子引起的。目前,大豆胰蛋白酶抑制因子的抗营养作用主要表现在抑制动物生长和引起胰腺增生、胰腺肿大 2 个方面^[8]。当人和动物食入胰蛋白酶抑制因子时,它能迅速地与小肠内的胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶发生反应形成稳定的复合物从而使这 2 种酶失活。这样,一方面引起食物蛋白的消化率降低,导致外源氮的损失;另一方面促使胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的过度分泌,导致内源氮的大量损失^[9]。李素芬等^[10]以 15 日龄的 AA 肉仔鸡为研究对象,分别饲喂不同水平大豆胰蛋白酶抑制因子。结果表明随着饲料中的胰蛋白酶抑制因子含量的增加,肉仔鸡的采食量随之下降而且随着胰蛋白酶抑制因子含量的提高在一段时间内肉仔鸡胰腺重量明显增加,胰腺细胞数量增多、体积增大且伴有空泡样变性。

然而随着对胰蛋白酶抑制因子的深入研究,近年来人们发现胰蛋白酶抑制因子在营养、医学以及农业等领域中均有着广泛的应用前景。尤其是 Bowman-Birk 型抑制因子(BBI),大量的研究证明 BBI 是一种有效的抗癌因子^[11-13],虽然对于 BBI 的抗癌机制仍不是十分清楚,但是已有的研究表明它对肿瘤的抑制作用不同于其它抗癌药物,是不可逆的且在含量较低时也能发挥有效的抗癌作用^[14]。另外,在临床上,胰蛋白酶抑制因子还被广泛用于治疗胰腺炎、休克和脑外科、手术止血等,临床研究表明其副作用小、安全性好^[15]。因此提取及利用胰蛋白酶抑制剂是极具研究意义的。

3 大豆胰蛋白酶抑制因子的提取纯化方法

Kakade 等在 1974 年提出了大豆胰蛋白酶抑制因子的提取方法^[16],由于 KTI 对热酸环境相对稳定,因此制备 STI 可采用 pH 6.8 的磷酸缓冲液浸提,50% 饱和度的硫酸铵溶液沉淀再经 DEAE-Sephadex A-50 离子交换和 Sephadex G-200 葡聚糖凝胶进行纯化,但是得率和纯度都不高。

随着对胰蛋白酶抑制因子的类型及理化性质

研究的不断深入,1981 年 Alexander 等^[17]以脱脂的 *Acacia elata* 种子粗粉为材料经过盐溶,等电点沉淀再采用 trypsin-sepharose 4B 亲和层析柱 SP-Sephadex C-25 和 Sephadex G-100 对大豆胰蛋白酶抑制因子进行纯化,结果得到 2 种胰蛋白酶抑制因子,等电点分别为 6.4 和 5.9。该方法与之前 Kakade 的方法相比在胰蛋白酶抑制因子的粗提上采用了等电点沉淀,根据 TI 的等电点不同可将不同种类的胰蛋白抑制因子分别提取出来,此外,在 TI 的纯化上采用 trypsin-sepharose 4B 亲和层析柱,利用胰蛋白酶抑制因子可抑制胰蛋白酶的专一性,将胰蛋白酶固定化,可获得高纯度的胰蛋白酶抑制因子。

近年来胰蛋白酶抑制因子的提取纯化方法已经逐步成熟,Maria 等^[18]采用酸提、硫酸铵分部沉淀、凝胶过滤、离子交换和亲和层析技术从 *Dimorphandra mollis* 种子中分离出胰蛋白酶抑制因子,SDS-PAGE 分析得到 1 条分子量为 20 kD 的单一谱带。

康庄等^[19]以菠菜种子为原料,经过乙醚脱脂,稀硫酸抽提,65℃热处理,硫酸铵分段盐析得到大豆胰蛋白酶抑制因子的粗提物,然后再经过阴离子交换,亲和层析和凝胶过滤进行纯化,纯化后的胰蛋白酶抑制因子与粗提液相比纯化倍数为 57.22,比活力为 $3\ 800\ \text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$,SDS-PAGE 检测得到 1 条分子量为 22 kD 的谱带。

陈星等^[20]从大豆乳清废水中分离纯化大豆胰蛋白酶抑制因子,主要采用固定化酶法即利用大豆胰蛋白酶抑制因子对胰蛋白酶的专一性,将胰蛋白酶固定在琼脂糖凝胶 4B 上,结果得到纯度较高的胰蛋白酶抑制因子,通过各阶段纯化后,最终纯化倍数为 324.6,SDS-PAGE 电泳结果为单谱带,纯化效果显著。

在大豆胰蛋白酶抑制因子提取纯化的诸多方法中,最常用的提取方法是酸提、硫酸铵分部沉淀,主要是由于硫酸铵分部沉淀简便易行,容易推广。最常用的纯化方法有:离子交换、亲和层析、凝胶过滤,其中亲和层析利用了胰蛋白酶抑制因子对胰蛋白酶的专一性结合特性,将胰蛋白酶偶联在琼脂糖凝胶 4B 上,这样既可以大大提高纯化效果,使大豆胰蛋白酶抑制因子与固定化胰蛋白酶充分结合,又可以提高产品得率。因此,可以根据各方法的特点选择适当的提取纯化方法。

4 展 望

多年来,国内外众多学者从不同角度对大豆胰蛋白酶抑制因子的结构性质、生理功能及抗营养作

用进行了系统的研究,发现大豆胰蛋白酶抑制因子主要是通过与蛋白酶结合形成复合物来发挥其抗营养作用。随着大豆加工技术及设备的发展,目前加工生产的大豆粕等饲料产品已基本消除了大豆胰蛋白酶抑制因子的不利影响。由此可以推断,在不久的将来,大豆中胰蛋白酶抑制因子的抗营养作用将不再是营养学家关注的问题,相反,随着对其认识的深入,人们会越来越关注它的保健功能,如初乳中添加蛋白酶抑制因子可以协助免疫球蛋白的吸收作用、BBI 的抗癌作用等。

为了有效地克服大豆胰蛋白酶抑制因子的抗营养作用,而保留其有益的保健功能,有必要深入研究各种动物(包括人)在不同生理阶段对大豆胰蛋白酶抑制因子的耐受规律,为科学地生产和利用大豆及其产品提供理论依据。

参考文献

- [1] Osborne T B, Mendel L B. The use of soybeans as food[J]. Journal of Biochemistry, 1917, 32: 369-387.
- [2] 金蓓, 田少君. 大豆胰蛋白酶抑制剂研究概况[J]. 粮食与油脂, 2005(6): 3-5. (Jin B, Tian S J. Research survey in soybean trypsin inhibitor[J]. Journal of Cereals & Oils, 2005(6): 3-5)
- [3] 杨丽杰, 吴非, 霍贵成, 等. 豆制品中胰蛋白酶抑制剂的研究[J]. 粮油加工与食品机械, 2004(3): 53-55. (Yang L J, Wu F, Huo G C, et al. Study on trypsin inhibitor in soybean products[J]. Machinery for Cereals, Oil and Food Processing, 2004(3): 53-55.)
- [4] Wolfram B, Robert H. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinase [J]. Journal of Biochemistry, 1992, 204: 433-451.
- [5] 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[J]. 大豆科学, 2007, 26(5): 757-760. (Wang C L, Zhang Y Z, Sun Z G. Progress on the research of Bowman-Birk soybean trypsin inhibitor[J]. Soybean Science, 2007, 26(5): 757-760.)
- [6] Birk Y. Purification and properties of a highly active inhibitor of trypsin and chymotrypsin from soybeans[J]. Journal of Biochemistry, 1961, 54: 378-381.
- [7] 于炎湖. 饲料中胰蛋白酶抑制剂的研究状况[J]. 饲料工业, 2001, 22(6): 1-4. (Yu Y H. Research on trypsin inhibitor in feed [J]. Feed Industry, 2001, 22(6): 1-4.)
- [8] Naim M, Gerlter A, Birk Y. The effect of dietary raw and autoclaved soybean protein fractions on growth, pancreatic enlargement and pancreatic enzymes in rats [J]. The Journal of Nutrition, 1982, 47: 281-288.
- [9] Nitsan Z, Liener I E. Enzymatic activities in the pancreas, digestive tract and feces of rats fed raw or heated soy flour[J]. The Journal of Nutrition, 1976, 106: 300-305.
- [10] 李素芬, 杨丽杰, 霍贵成, 等. 肉仔鸡对胰蛋白酶抑制因子的耐受性研究[J]. 中国家禽, 2000(3): 8-10. (Li S F, Yang L J, Huo G C, et al. Study on the tolerance of broilers to dietary trypsin inhibitor[J]. China Poultry, 2000(3): 8-10.)
- [11] Kennedy, Ann R. The evidence for soybean products as cancer preventive agents[J]. The Journal of Nutrition, 1995, 125: 733-743.
- [12] Yavelow J, Finlay T H, Kennedy A R, et al. Bowman-Birk soybean proteinase inhibitor as an anticarcinogen[J]. Cancer Research, 1983, 43: 2454-2459.
- [13] Malkwicz S B, Mc Kenna W G, Vaughn D J, et al. Effects of Bowman-Birk inhibitor concentrate (BBIC) in patients with benign prostatic hyperplasia[J]. Prostate, 2001, 48(1): 16-28.
- [14] Messina M, Ende J W. The role of soy in preventing and treating chronic disease[J]. The Journal of Nutrition, 1995, 125: 567-808.
- [15] 谭竹钧, 沈明才, 张峰, 等. 胰蛋白酶抑制剂的研究进展[J]. 广东工业大学学报, 2007, 24(3): 6-10. (Tan Z J, Shen M C, Zhang F, et al. Research status of the trypsin inhibitor[J]. Journal of Guangdong University of Technology, 2007, 24(3): 6-10.)
- [16] Kakade M L. Biochemical basis for the differences in plant protein utilization[J]. Journal of Agricultural Food Chemistry, 1974, 22(4): 550-555.
- [17] Kortt A A, Jermyn M A. Acacia proteinase inhibitors purification and properties of the trypsin inhibitors from *Acacia elata* seed[J]. European Journal of Biochemistry, 1981, 115: 551-557.
- [18] Maria Ligi R, Daniel A, Gaspar G. Trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds: purification and properties[J]. Phytochemistry, 2000, 54: 553-558.
- [19] 康庄, 王竞, 张年辉, 等. 菠菜种子胰蛋白酶抑制剂的分离纯化与部分性质研究[J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17(2): 143-146. (Kang Z, Wang J, Zhang N H, et al. Purification and some properties of a trypsin inhibitor from *Spinacia oleracea* L. seeds [J]. Natural Product Research and Development, 2005, 17(2): 143-146.)
- [20] 陈星, 刘蕾, 刘辉. 固定化酶法分离纯化大豆胰蛋白酶抑制剂[J]. 食品科技, 2004(12): 12-15. (Chen X, Liu L, Liu H. Soybean trypsin inhibitor was separated and purified with immobilized trypsin method[J]. Food Science and Technology, 2004(12): 12-15.)