

蚕蛹中促进糖酵解作用活性因子的研究^{*}

张明春, 韩克勤, 张媛(天津商学院生物技术与食品科学学院制药工程系, 天津 300134)

中图分类号: R282.74

文献标识码: A

文章编号: 1007-7693(2005)09-0823-02

糖尿病在中医上归为“消渴症”, 而《本草纲目》中有“蚕蛹煎汁饮, 止消渴”的记载。蚕蛹系传统中药, 是蚕蛾科桑蚕的蛹。《本草纲目》、《日华子本草》、《东医宝鉴》、《医林纂要》、《圣惠方》、《圣济总录》等古代医药经典著作中均有详细记载。蚕蛹具有生津止渴、消食理气、镇惊、壮阳、和脾胃、祛风湿、长肌退热等功效, 用于治疗糖尿病、虚损、小儿疳瘦、心血管疾病、慢性肝炎、肾阳不足等疾病。蚕蛹蛋白中含有 18 种氨基酸, 且含有人体所需的 8 种必需氨基酸, 另外, 干蚕蛹中还含一定数量的微量元素, 有 K、Na、Ca、Mg、P、Fe、Mn、Cr 等。现代医药学研究证明, 蚕蛹蛋白水解液对四氧嘧啶模型小鼠具有明显的降血糖作用而对正常小鼠无影响。我们

研究小组探讨了蚕蛹蛋白水解液中具有降血糖作用的组分, 我们用微生物发酵法对其活性进行检测, 其中一分子量为 7600 的含铬蛋白组分具有促进糖酵解作用。所做的实验研究尚未见报道。

1 实验

1.1 实验材料

新鲜蚕蛹, 吉林省蚕业科学研究所提供。

1.2 实验方法

1.2.1 防止蚕蛹蛋白褐变研究 新鲜蚕蛹去皮后为淡黄色, 几分钟内就会发生严重的酶促褐变, 可采用加热的方法钝化酶, 防止褐变。但由于蚕蛹蛋白以球蛋白为主, 受持续

^{*} 基金项目: 天津市重点科技攻关项目(编号: 023121011)

作者简介: 张明春, 女, 天津商学院 生物技术与食品科学学院 制药工程系主任, 天津大学药学院在读博士, 主要从事天然产物的生物活性研究。

高温作用时空间构型解体,有秩序的螺旋分子内部的一些非极性基团暴露在分子的表面,因而降低了蛋白质的溶解性,促使蛋白质分子间相互结合而凝结,使蛋白质沉淀,故加热时间要尽可能短。新鲜蚕蛹去壳,在 90℃,3min,即可有效地钝化酶,防止发生褐变,再用 10% 的盐酸调 pH 至 4.5 左右,静置 12h(隔夜)。用离心机离心(4000r/min,10min),弃去上清液,沉淀,干燥,得蚕蛹粗蛋白粉。

1.2.2 脱脂方法研究 蚕蛹石油醚冷浸提法与索氏(Soxhlet)提取法比较研究。将蚕蛹粗蛋白用索氏提取器提取,在恒重后的定量瓶中加入 2/3 以下的石油醚,恒温水浴在 60℃,连续加热 12h,提取后回收石油醚。将粗蛋白粉加入等量的石油醚,冷浸提取多次,至溶液为无色。分析索氏脱脂法与石油醚冷浸提法两种方法提取的产品,索氏提取脱除脂肪率高,所得蚕蛹蛋白较纯,外观颜色好。但由于索氏提取时间较长,易影响蚕蛹蛋白的活性,所以选用石油醚冷浸提法。

1.3 酶解实验

1.3.1 材料与试剂 自制脱脂蚕蛹蛋白粉,胰蛋白酶(新疆生化研究所生化厂 1:250)。

1.3.2 实验方法 酶作用量:0.5%;酶解固液比:20:70;酶解温度:45℃;酶解 pH:7.0。酶解时间:5h,将温度调至 80℃使酶失活,然后离心(4000r/min,10min),取上清蛋白水解液。

1.4 PEG-磷酸盐双水相萃取实验

蛋白含量测定用 Folin-酚法。用不同 PEG-磷酸盐双水相纯化酶解液各组分,得到不同组分 K 值。PEG-磷酸盐双水相萃取实验结果如表 1。

表 1 PEG-磷酸盐双水相萃取实验

Tab 1 Extract with PEG-phosphate-salt double-water-phase

sample	PEG	phosphate-salt	C _t (mol/L)	C _b (mol/L)	K
1	18%	11%	0.935	0.751	1.245
2	17%	11%	1.029	0.650	1.583
3	16%	11%	1.201	0.988	1.216
4	15%	11%	0.902	0.901	1.001
5	14%	11%	1.339	0.785	1.707
6	14%	9.0%	1.0	0.611	1.636
7	14%	10%	1.067	0.903	1.182
8	14%	11%	1.064	0.611	1.741
9	14%	12%	1.445	1.067	1.355
10	14%	13%	1.101	0.901	1.222
11	16%	12%	1.071	0.705	1.519
12	20%	10%	1.299	0.961	1.352

注: $K = C_t/C_b$ 式中: C_t 、 C_b —被萃取物质在上、下相的浓度, mol/L; K—分配系数

Note: $K = C_t/C_b$ C_t —concentration of extracted substance in above phase (mol/L) C_b —concentration of extracted substance in under phase (mol/L) K—partition of coefficient

冷冻干燥提取的上述各组分样品。

1.5 原子吸收光谱检测

原子吸收光谱检测到 2 个含有 Cr 的组分。

1.6 SDS—聚丙烯酰胺电泳测定分子量

SDS—聚丙烯酰胺电泳测定 1 号含 Cr 蛋白组分分子量为 9200;2 号含 Cr 蛋白组分分子量为 7600。

1.7 生物活性检测

1.7.1 培养酵母菌 将干燥完成后的提取物稀释至 1.8g/L,各取 3mL 加入已灭菌的 30mL 试管中,65℃ 巴氏灭菌 30min,分别标号。另取 5 支 30mL 试管,各加 3mL 50% 葡萄糖溶液,115℃,灭菌 30min。取一支 30mL 试管加 3mL 50% 葡萄糖溶液,加 3mL 水,115℃,灭菌 30min,为空白参照(0 号管)。将葡萄糖溶液加入各管中,再将已有氧培养 20-22h 的酵母培养液加满各管及空白对照管,无氧发酵 24h。

1.7.2 发酵液乙醇浓度的测定 仪器:ShimadzuGC-9A 气相色谱仪,1μL 微量进样器,10μL 微量进样器以 ShimadzuGC-9A 气相色谱仪,N₂载气,氢火焰离子检测器,PEG20M 柱,柱长 2m,柱温 90℃,标准样进样量 0.3μL,读 A_s。测发酵液乙醇浓度,待测物进样量 0.3μL,采用单点校正法进行数据处理,见表 2。

表 2 气相色谱测定发酵液乙醇浓度

Tab 2 Concentration of ethanol measured by GC

sample	A	C%
0	7170	0.393
1	7390	0.397
2	8781	0.472

注: A——峰面积; C%——乙醇浓度

Note: A——peak value; C%——Concentration of ethanol

通过上述实验发现,1 号样品使产生的乙醇浓度与空白对照相差无几,2 号样品促进生成的乙醇浓度比空白对照明显增多,分子量为 7600 组分对糖酵解过程有一定促进作用。

2 实验结果与讨论

1957 年 Schwarz 和 Mertz 曾经观察到铬在糖代谢中的作用,认为葡萄糖耐量因子是一种含铬化合物。实验证实铬缺乏导致葡萄糖耐量降低、生长发育不良、寿命减少、血清胆固醇水平升高。Mertx 等推测,三价铬是葡萄糖耐量因子的活性成分。近几年来,人们曾在许多糖尿病研究课题中给糖耐量降低的病人补充铬,这些人包括全部肠胃外营养的病人、营养不良的儿童和老人以及糖尿病人。但是,我们用没有胰岛的微生物进行实验,铬仍然具有促进糖代谢的作用,则说明铬作用机制可能不仅使胰岛组织敏感,还有可能的机制是:铬作为糖分解代谢途径,如糖酵解途径中酶的辅助因子或激动剂起作用,有待于进一步深入研究和探讨。

参考文献

[1] 杨东梅. 糖尿病治疗药物的选择. 药学快讯,2001,(1).
[2] Borthwick L. The effects of anomegaethy lester concentration blood lipid concentration patients with hyper lipid emia [J] Clin-Drug Invest 1998,15(5).
[3] Swahn Z, VonSchenck H, Olsson AG. Omega 3ethyl ester concntrate decreas in creaseantithrombin III in post muocardialinfarction patients[J]. Cl in Drug Invest, 1998,15(6):473.
[4] 张奇,张珩,杨艺虹,等. 双水相萃取技术应用在医药工业中的展望. 医药工程设计杂志,2001,22,(5).
[5] J. N. Baskir. T. A. Hatton, and U. W > Suter. Protein Partitioning in Two-phase Aqueous Systems, Biotechnol. Bioeng,1989,34.

收稿日期:2005-04-30