

DOI: 10. 3969/j. issn. 1000-3142. 2013. 05. 020

郝小燕, 顾爱星, 刘众悦, 等. 鹰嘴豆种子发芽和成熟过程中  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂的活性研究 [J]. 广西植物, 2013, 33 (5): 695—698

Hao XY, Gu AX, Liu ZY, et al. Activity of  $\alpha$ -amylase inhibitor of chickpea seeds during their germination and maturation [J]. *Guihaia*, 2013, 33 (5): 695—698

## 鹰嘴豆种子发芽和成熟过程中 $\alpha$ -淀粉酶抑制剂的活性研究

郝小燕<sup>1,2,3</sup>, 顾爱星<sup>4</sup>, 刘众悦<sup>1,5</sup>, 麻浩<sup>1\*</sup>

(1. 南京农业大学 作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京 210095; 2. 常州市新北区孟河镇农业综合服务站, 江苏 常州 213138; 3. 常州市新北区农业局, 江苏 常州 213022; 4. 新疆农业大学 农学院, 乌鲁木齐 830052; 5. 瑞克斯旺(中国)种子有限公司, 山东 青岛 266112)

**摘要:** 以 5 种不同来源的  $\alpha$ -淀粉酶为检测试剂, 对鹰嘴豆种胚芽和子叶  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂在发芽和成熟过程中的抑制活性进行测定。结果表明:  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂主要存在于胚芽中; 发芽过程中, 发芽 1 d 后, 胚芽提取液对 AOA 的抑制活性降为 9.9%, 而对 HSA、PPA 和 PA 的抑制活性都检测不到。子叶提取液对 AOA 和 HSA 的抑制活性分别降为 21.5% 和 28.3%, 而对 BSA 和 PPA 则检测不到活性。发芽 4 d 后, 无论是子叶还是胚芽提取液对 5 种来源的  $\alpha$ -淀粉酶都检测不到抑制活性; 种子成熟过程中, 子叶和胚芽提取液对  $\alpha$ -淀粉酶的抑制活性均随种子成熟度的提高而提高, 30 d 时达到最大, 且胚芽提取液对 HSA、PA 的抑制活性较高, 分别为 48.9% 和 47.5%。

**关键词:** 鹰嘴豆; 发芽; 成熟;  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂; 抑制活性

中图分类号: Q945.34; Q945.6 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142 (2013) 05-0695-04

## Activity of $\alpha$ -amylase inhibitor of chickpea seeds during their germination and maturation

HAO Xiao-Yan<sup>1,2,3</sup>, GU Ai-Xing<sup>4</sup>, LIU Zhong-Yue<sup>1,5</sup>, MA Hao<sup>1\*</sup>

(1. *Nanjing Agriculture University, State Key Laboratory of Crop Genetic and Germplasm Innovation*, Nanjing 210095, China; 2. *Menghe Town Agricultural Comprehensive Service Station of New North District in Changzhou City*, Changzhou 213138, China; 3. *Agriculture Bureau of New North District in Changzhou City*, Changzhou 213022, China; 4. *Xinjiang Agriculture University, College of Agriculture*, Urumqi 830052, China; 5. *Ruk Zwaan China Seed Co., Ltd*, Qingdao 266112, China)

**Abstract:** Inhibitory activity of  $\alpha$ -amylase from chickpea seeds (embryo and cotyledon) during germination and maturation against  $\alpha$ -amylase derived from 5 different sources were determined. The results showed that  $\alpha$ -amylase inhibitor mainly exists in the embryo. During germination, 1 d after germination, inhibitory activity of embryo extracts reduced to 9.9% against AOA, and there was no inhibitory activity to HSA, PPA and PA; inhibitory activity of cotyledon extracts against AOA and HSA reduced to 21.5%, 28.3%, respectively, and there was no inhibitory activity to BSA and PPA. 4 d after germination, both cotyledon and germ extracts on 5 sources were undetectable inhibitory activity. During seed maturation, both cotyledon and embryo extracts on the activity of  $\alpha$ -amylase inhibitor increased with the days of seed maturity and reached to the maximum on 30 d, and the inhibitory activity of embryo extract was higher on HSA and PA, 48.9% and 47.5%, respectively.

**Key words:** chickpea; germination; mature;  $\alpha$ -amylase inhibitor; inhibitory activity

收稿日期: 2012-12-31 修回日期: 2013-02-17

基金项目: 国家自然科学基金 (30960206)

作者简介: 郝小燕, 女, 山西河曲县人, 博士, 从事农业系统相关的工作, (E-mail) haohxy@yahoo.com.cn。

\* 通讯作者: 麻浩, 教授, 博士生导师, 主要从事作物种质资源学, 品质改良和加工利用, 耐逆分子生物学, (E-mail) Lq.ncsi@njau.edu.cn。

鹰嘴豆属豆科鹰嘴豆属植物,在豆科作物中居第三位,在我国新疆、甘肃、青海、内蒙古等地有种植,新疆甚至有2500年的种植历史(Singh, 1997; Cho *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2006)。有研究(Giri & Kachole, 1996; Hao *et al.*, 2009)证明鹰嘴豆种子中含有蛋白质类 $\alpha$ -淀粉酶抑制剂,这种抑制剂可有效抑制人肠道内淀粉酶的活性,且对其它哺乳动物、昆虫以及微生物的 $\alpha$ -淀粉酶也有很强的特异性抑制作用(Guzman-Partida *et al.*, 2007; Yetter *et al.*, 1979)。该实验就鹰嘴豆种子 $\alpha$ -淀粉酶抑制剂抑制活性在发芽和成熟过程中的动态变化规律进行研究,以期为鹰嘴豆生长期病虫害的防治及抗病虫育种提供一定的依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 试剂 可溶性淀粉、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氯化钠、氯化钙、氢氧化钠、3,5-二硝基水杨酸、酒石酸钾钠等(分析纯)均购于上海国药集团化学试剂有限公司。真菌源 $\alpha$ -淀粉酶(BSA)(*Bacillus subtilis*  $\alpha$ -amylase, 380 U/mg)、哺乳动物源 $\alpha$ -淀粉酶(PPA)(Porcine pancreas  $\alpha$ -amylase, 27 U/mg)、植物源 $\alpha$ -淀粉酶(PA)(maize  $\alpha$ -amylase, 1 000 U/mg)、细菌源 $\alpha$ -淀粉酶(AOA)(*Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -amylase, 150~250 U/mg),购于Sigma公司。

1.1.2 材料 鹰嘴豆种子由新疆农业大学提供,储存于4℃冰箱备用。不同发芽程度材料:将鹰嘴豆种子放置于25℃的恒温箱中发芽,分别取发芽后1、2、3、4、5、6和7d的种子待测。不同成熟程度材料:将鹰嘴豆种子种植后,待鹰嘴豆开花后,挂牌,取开花后5、10、15、20、25和30d的种子待测。

### 1.2 方法

1.2.1 鹰嘴豆种子 $\alpha$ -淀粉酶抑制剂的提取 切取种子的胚芽与子叶,分别进行提取,提取方法参照Hao *et al.* (2009)。

1.2.2 人唾液 $\alpha$ -淀粉酶的制备 人的唾液 $\alpha$ -淀粉酶(HSA)的制备参照Giri & Kachole (1996)的方法。

1.2.3  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂的抑制活力测定  $\alpha$ -淀粉酶和 $\alpha$ -淀粉酶抑制剂的活力测定参照Ishimoto (1996)并作适当修改,即25  $\mu$ L的人的唾液 $\alpha$ -淀粉酶与等体积的 $\alpha$ -淀粉酶抑制剂提取溶液混合,

在37℃水浴共培养30 min后,加入400  $\mu$ L 1%的可溶性淀粉溶液。37℃水浴处理10 min,加250  $\mu$ L的DNS溶液终止反应,经沸水浴处理10 min,冷却,加适量的水定容到一定的体积,546 nm下测定吸光值。抑制率的计算公式如下:

$$\text{相对抑制率}(\%) = (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}} \times 100$$

式中,  $A_{\text{control}}$  代表酶的吸光值;  $A_{\text{sample}}$  代表样品的吸光值。

$\alpha$ -淀粉酶的活力定义为每分钟释放1  $\mu$ mol的麦芽糖所需的 $\alpha$ -淀粉酶的量;1单位的 $\alpha$ -淀粉酶抑制剂抑制活力定义为降低1单位 $\alpha$ -淀粉酶所需抑制剂的量(Mulimani & Rudrappa, 1994)

## 2 结果与分析

### 2.1 子叶和胚芽中 $\alpha$ -淀粉酶抑制剂抑制活力测定

在表1中,子叶和胚芽提取液对BSA均未检测到抑制活性;对哺乳动物源 $\alpha$ -淀粉酶(HSA和PPA),胚芽提取液的抑制活力分别为46.9%和4.3%,子叶提取液对HSA的抑制活力为32.1%,而对PPA则没有检测到抑制活力;对植物源 $\alpha$ -淀粉酶(PA),胚芽提取液的抑制活力为46.6%,而子叶则未检测到抑制活力;对细菌源 $\alpha$ -淀粉酶,子叶和胚芽的提取液的抑制活力分别为29.8%和28.3%。这表明供试种子对所测定的 $\alpha$ -淀粉酶的抑制活力主要存在于胚芽中,而在子叶中不存在或少量存在。

表1 鹰嘴豆种子子叶和胚芽中 $\alpha$ -淀粉酶抑制剂活力  
Table 1  $\alpha$ -Amylase inhibitor's activity from cotyledon and embryo of chickpea seeds

不同来源的 $\alpha$ -淀粉酶 Sources of $\alpha$ -amylase	$\alpha$ -淀粉酶的 活力(U) Activity of $\alpha$ -amylase	抑制活力(%) Inhibitory activity	
		子叶 Cotyledon	胚芽 Embryo
Human salivary (HSA)	4.4 ± 0.69	32.1 ± 1.58	46.9 ± 4.68
<i>Bacillus subtilis</i>	139.4	—	—
Porcine pancreas (PPA)	14.32 ± 1.08	—	4.3 ± 2.10
Maize	5.9 ± 0.40	—	46.6 ± 14.55
<i>Aspergillus oryzae</i>	200.9 ± 1.55	29.8 ± 9.92	28.3 ± 1.35

注:“—”代表没有检测到抑制活力。淀粉酶活性单位1U定义为每份钟释放1nmol的麦芽糖所需淀粉酶的量

Note: “—” displays no inhibitory activity. Amylase activity unit 1 U is defined as the amylase releasing 1 nmol maltose each minute.

### 2.2 发芽过程中 $\alpha$ -淀粉酶抑制剂抑制活力的测定

种子发芽1d后,子叶和胚芽提取液对AOA的抑制活性分别降为21.5%和9.9%,而当种子发芽4d后,子叶和胚芽提取液对AOA则几乎检测不到抑制活性(图1:A);在发芽1d后,胚芽提取液对

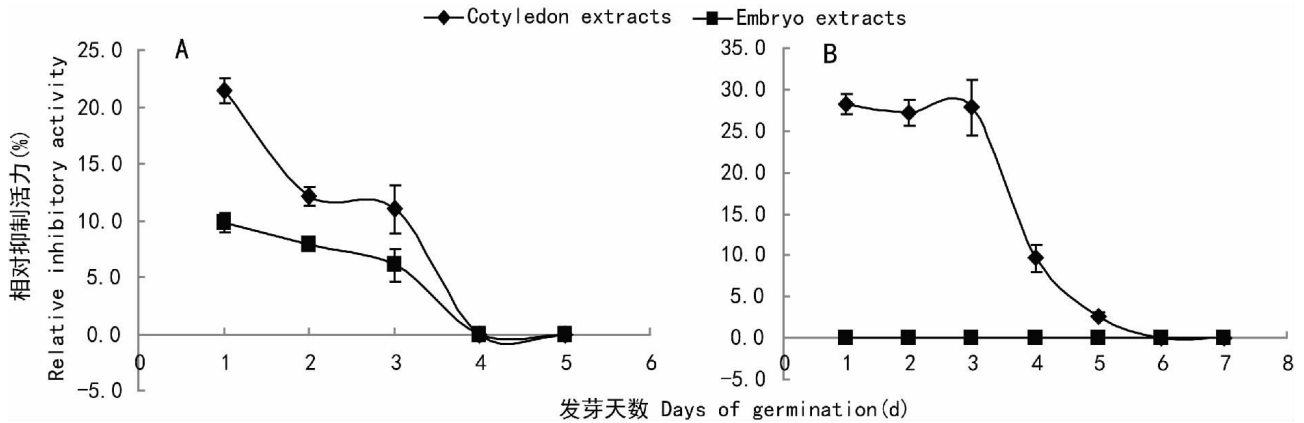


图 1 种子发芽过程中胚芽和子叶提取液对不同来源  $\alpha$ -淀粉酶的抑制活性 A. AOA; B. HSA。

Fig. 1 Inhibitory activity of cotyledon and embryo extracting solutions on amylases during seed germination A. amylase from *Aspergillus oryzae*; B. Amylase from human salivary.

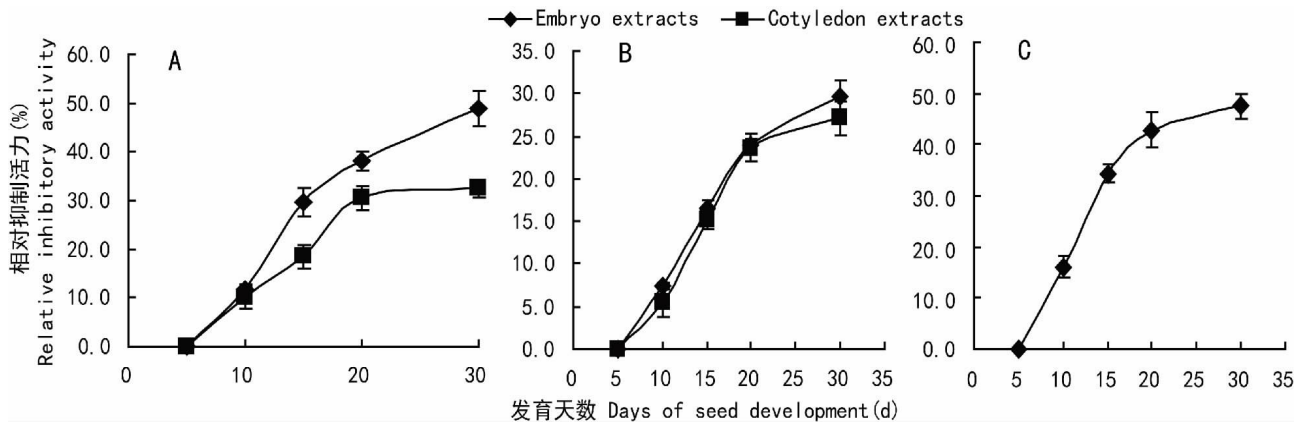


图 2 种子成熟过程中  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂对不同来源  $\alpha$ -淀粉酶的抑制活性 A. HSA; B. AOA; C. PA。

Fig. 2 Inhibitory activity of cotyledon and embryo extracting solutions on amylases during seed development A. Amylase from human salivary; B. Amylase from *Aspergillus oryzae*; C. Amylase from maize.

HSA 就几乎检测不到抑制活性，而在子叶中则还有 28.3% 的抑制活力，在发芽 5 d 后，子叶提取液对 HSA 已检测不到抑制活性（图 1：B）。Mulimani & Rudrappa (1994) 研究认为种子在萌发 6 d 后就检测不到抑制活性，与本研究的结果相似。但在发芽 1 d 后，无论子叶提取液还是胚芽提取液都检测不到对 PPA 和 PA 的抑制活力。

## 2.3 种子成熟过程中 $\alpha$ -淀粉酶抑制剂抑制活性测定

随着种子逐渐成熟，子叶和胚芽提取液对 HSA 的抑制活性也在增加，开花后 10 d，子叶和胚芽提取液中都检测到了抑制活性，30 d 时达到最大，分别为 32.5% 和 48.9%（图 2：A）；同样，子叶和胚芽提取液对 AOA 的抑制活性也呈增加趋势，开花后 10 d，子叶和胚芽提取液都检测到了抑制活性，30 d 时达到最大，分别为 27.2% 和 29.7%（图 2：B）；胚芽提取液对 PA 的抑制活性也呈增加趋势，30 d 时达到最大，为 47.

5%，而在子叶提取液中均未检测到抑制活性（图 2：C）。而在成熟过程中均未检测出对 BSA 和 PPA 的抑制活性。

## 3 结论与讨论

对鹰嘴豆中  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂在子叶和胚芽中的分布进行了研究。结果显示：胚芽中的活力相对于子叶要高，即  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂主要分布在胚芽中，这可能是由于植物在种子自我保护的过程中优先保护胚芽的缘故。

鹰嘴豆种子在发芽过程中，提取液中  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂的抑制活性随着发芽天数的增加而逐渐变小，分析其原因可能有两种：一是由于鹰嘴豆在发芽过程中  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂发生了失活、钝化、分解等变化，从而导致测得的  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂的抑制活性逐渐变小，印度学者 (Mulimani & Rud-

rappa, 1994) 的研究支持这一观点; 二是由于鹰嘴豆内源  $\alpha$ -淀粉酶在发芽过程中被激活(分解种子中的淀粉释放出足够种子发芽所需要的养分)造成  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂的活性被掩饰, 从而导致测定结果变小。艾志录等(2006)研究表明发芽时间对  $\alpha$ -淀粉酶活力有高度显著性影响, 且随发芽时间增加而增大, 而我们测得的  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂的抑制活性则随发芽时间的增加而降低, 这说明发芽过程中测得的  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂活性的降低更可能是由于被  $\alpha$ -淀粉酶活力的增加掩盖了。杨煜峰等(1990)研究显示在种子萌发的前3天淀粉酶显著被激活, 这与我们测得的  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂的抑制活性的结果(前2天还维持较高水平, 第3天显著降低)相近, 进一步证明了第二种分析结果的可能性。但也可能两种原因同时存在, 共同导致鹰嘴豆种子在发芽过程中, 测得的提取液中  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂的抑制活性逐渐变小。

鹰嘴豆种子在成熟过程中, 测得的提取液中  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂的抑制活性逐渐变大, 分析原因可能也有两种: 一是在成熟过程中, 植物为避免种子发芽或遭受虫害, 使得  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂的抑制活性被激活, Mundy(1984)认为在种子成熟的过程中, 在淀粉粒合成时,  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂对内源  $\alpha$ -淀粉酶的抑制发生了调整, 即被激活, 这种观点支持了我们的第一种分析; 二是随着种子的成熟, 其内源  $\alpha$ -淀粉酶逐渐被钝化, 从而造成测得的  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂的抑制活性相对提高。因此, 要从鹰嘴豆中获取较高抑制活性的  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂, 需要选择充分成熟而又未发芽的种子。

本研究表明, 鹰嘴豆种子  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂对来源于哺乳动物(HSA)和植物源(PA)  $\alpha$ -淀粉酶有较高的抑制活力, 而对来源于细菌(AOA)和真菌(BSA)的  $\alpha$ -淀粉酶的抑制活力较低或没有检测到, 这一结果与 Le Berre-Anton *et al.* (1997) 从芸豆中纯化的蛋白质样  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂对不同来源  $\alpha$ -淀粉酶抑制效应相类似。Franco *et al.* (2002) 认为进行  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂对不同来源  $\alpha$ -淀粉酶抑制特性的研究是进行抗虫转基因重要的第一步, 因此这一结果对今后鹰嘴豆抗病虫育种工作的开展具有重要的

意义。

#### 参考文献:

- Ai ZL (艾志录), Zhang XY (张晓宇), Guo J (郭娟), *et al.* 2006. The change of amylase activity in different wheat cultivars during sprouting course (不同品种小麦发芽过程中淀粉酶活力变化规律的研究) [J]. *Chin Cereals Oils Assoc* (中国粮油学报), **21** (3): 41-44
- Cho S, Kumar J, Shultz JL, *et al.* 2002. Mapping genes for double podding and other morphological traits in chickpea [J]. *Euphytica*, **128**: 285-292
- Franco OL, Rigden DJ, Melo FR, *et al.* 2002. Plant  $\alpha$ -amylase inhibitors and their interaction with insect  $\alpha$ -amylases: structure, function and potential for crop protection [J]. *Eur Biochem*, **269** (2): 397-412
- Giri AP, Kachole MS. 1996. Detection of electrophoretically separated amylase inhibitors in starch polyacrylamide gels [J]. *J Chromatogr A*, **752**: 261-264
- Guzman-Partida AM, Jatomea-Fino O, Robles-Burgueo M, *et al.* 2007. Characterization of  $\alpha$ -amylase inhibitor from *Palo Fierro* seeds [J]. *Plant Physiol Biochem*, (45): 711-715
- Hao XY, Li JG, Shi QH, *et al.* 2009. Characterization of a novel legumin  $\alpha$ -amylase inhibitor from chickpea (*Cicer arietinum* L.) seeds [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, **73** (5): 1200-1202
- Ishimoto M, Chrispeels MJ. 1996. Protective mechanism of the Mexican bean weevil against high levels of  $\alpha$ -amylase inhibitor in the common bean [J]. *Plant Physiol*, **111**: 393-401
- Le Berre-Anton V, Bompard-Gilles C, Payan F, *et al.* 1997. Characterization and functional properties of the  $\alpha$ -amylase inhibitor ( $\alpha$ -AI) from kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds [J]. *Biochim Biophys Acta*, **1343**: 31-40
- Mulimani VH, Rudrappa G. 1994. Effect of heat treatment and germination on alpha amylase inhibitor activity in chick peas (*Cicer arietinum* L.) [J]. *Plant Foods Human Nutr*, **46** (2): 133-137
- Mundy J. 1984. Hormonal regulation of alpha-amylase inhibitor synthesis in germinated barley [J]. *Carlsberg Res Comm*, **49**: 439
- Singh KB. 1997. Chickpea (*Cicer arietinum* L.) [J]. *Field Crops Res*, **53** (1-3): 161-170
- Yang YF (杨煜峰), Shi TS (施天生), Lu DZ (陆定志). 1990. Amylase activity and GA<sub>3</sub> regulation in hybrid rice germinating seeds (杂交水稻萌种子淀粉酶活性和 GA<sub>3</sub> 的调节) [J]. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), **23** (6): 27-34
- Yetter MA, Saunders RM, Boles HP. 1979.  $\alpha$ -amylase inhibitors from wheat kernels as factor in resistance to post harvest insects [J]. *Cereal Chem*, **56**: 243-244
- Zhang T, Jiang B, Zhang W. 2006. Gelation properties of chickpea protein isolates [J]. *Food Sci*, **8**: 1-7