

林丽云. 波纹巴非蛤活性肽的体外抗氧化活性[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(10): 298–300.

波纹巴非蛤活性肽的体外抗氧化活性

林丽云

(韩山师范学院, 广东潮州 521041)

摘要: 研究波纹巴非蛤活性肽体外清除自由基的作用, 以实验室自制的波纹巴非蛤活性肽(27 406 ~ 69 000 u)为原料, 测定其对羟自由基、超氧自由基、过氧化氢和亚硝酸根离子的清除能力。结果表明, 当波纹巴非蛤活性肽的相对分子质量在 40 000 ~ 45 000 u 时, 清除超氧自由基、过氧化氢、羟自由基和亚硝酸根的能力均达到最高峰。

关键词: 生物活性肽; 波纹巴非蛤; 抗氧化活性

中图分类号: TS202.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2014)10–0298–02

抗氧化剂能够保护食物免受氧化损伤而变质, 并且在人体的消化道内具有抗氧化作用, 可以防止消化道发生氧化损伤; 被人体吸收后, 抗氧化剂可在机体其他组织器官内发挥作用。天然抗氧化剂具有较强的抗氧化活性和良好的食用安全性, 因此在食品、保健品、药品等领域已经展现出良好的应用前景。随着海洋生物研究的深入和研究技术的提高, 从海洋生物中寻找新的天然抗氧化剂已经成为海洋食品、药物、保健品研究的重要目标之一。

波纹巴非蛤(俗称花甲)是我国重要的海洋贝类资源, 营养丰富、肉质鲜美, 同时具有很高的食疗和药用价值。本试验以笔者所在实验室自制的波纹巴非蛤活性肽为原料, 通过测定波纹巴非蛤活性肽清除亚硝酸根、过氧化氢、超氧自由基和羟自由基 4 种物质的能力, 以期测定其抗氧化活性, 从而进一步检验波纹巴非蛤活性肽的抗氧化能力, 以期为波纹巴非蛤活性肽的后续研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

波纹巴非蛤活性肽, 为笔者所在实验室自制。

主要试剂有茚三酮、酚酞、罗丹明 B 液、 H_2SO_4 、 FeSO_4 、邻苯三酚、Tis–HCl 缓冲溶液(pH 值 8.0)、浓盐酸、丙酮、 NaNO_2 标准溶液、0.01 mol/L 藏红 T 溶液、靛蓝胭脂红、铜(II)溶液等, 均为分析纯。

1.2 试验仪器

UV–2102/PC/PCS 型紫外分光光度计, 上海尤尼科仪器有限公司; pHs–3C 精密酸度计, 上海虹益仪器有限公司; KA–1000 飞鸽牌高速离心机; 气浴恒温振荡器, 江苏省金坛市宏华仪器厂; 电子天平, 北京赛多利斯仪器系统有限公司; 分析天平, 潮州凯普生物有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 波纹巴非蛤活性肽清除羟自由基($\cdot\text{HO}$)的能力

1.3.1.1 羟自由基的测定 取 2 支 10 mL 的刻度试管, 在 1

支管中分别加入 2.5 mL 罗丹明 B 液、0.8 mL 硫酸溶液、1.5 mL FeSO_4 溶液、1.0 mL H_2O_2 溶液, 加蒸馏水稀释至刻度处, 摇匀并放置 5 min 后, 置于 1 cm 比色皿中, 用紫外分光光度计测定其吸收峰, 确定其最大吸收波长为 558 nm。然后用紫外分光光度计在 558 nm 处测定吸光度, 计算其与空白参比的吸光度之差 $\Delta D_{\text{羟自由基}}$ 。

1.3.1.2 羟自由基清除率的测定 在 10 mL 具塞刻度试管中依次加入 2.5 mL 罗丹明 B 溶液、0.8 mL 硫酸溶液、1.5 mL FeSO_4 溶液、1.0 mL H_2O_2 溶液, 摇匀并放置 5 min 后, 加入 1 mL 波纹巴非蛤活性肽溶液(浓度 10 mg/mL), 加蒸馏水稀释至刻度处, 测定其吸光度 D_1 ; 对照以溶剂代替, 其余步骤同上, 测定对照蒸馏水吸光度 $D_{\text{对照1}}$ 、空白体系(罗丹明 B 和 H_2SO_4 溶液)吸光度 $D_{\text{空白1}}$, 计算清除率 $P_1^{[1-6]}$:

$$P_1 = \frac{D_1 - D_{\text{对照1}}}{D_{\text{空白1}} - D_{\text{对照1}}} \times 100\%。$$

1.3.2 波纹巴非蛤活性肽清除超氧自由基能力的测定 取 5 mL 0.05 mol/L (pH 值 8.0) 的 Tis–HCl 缓冲溶液, 置于 25 °C 水浴中预热 20 min, 然后分别加入波纹巴非蛤活性肽样品液(蛋白浓度 10 mg/mL) 和 0.4 mL 25 mol/L 邻苯三酚溶液, 混匀后置于 25 °C 水浴中反应 4 min, 再加入 8 mol/L HCl 终止反应, 于 299 nm 处测定溶液的吸光度(D_2)。空白对照组以相同体积的丙酮代替待测样品, 测定吸光度 $D_{\text{空白2}}$, 计算清除率 $P_2^{[2,5]}$:

$$P_2 = \frac{D_{\text{空白2}} - D_2}{D_{\text{空白2}}} \times 100\%。$$

1.3.3 波纹巴非蛤活性肽清除亚硝酸根离子能力的测定

1.3.3.1 亚硝酸离子的测定 分别于 2 只容量瓶中加入 1.1 mL 2 mol/L H_2SO_4 溶液、0.25 mL 0.01 mol/L 藏红 T 溶液和一定量的亚硝酸根标准溶液, 用蒸馏水稀释至刻度并摇匀, 置于沸水浴中加热 10 min, 流水冷却 3 min 终止反应, 在 558 nm 处测定溶液的吸光度 D_3 , 以对应的空白试剂为 $D_{\text{空白3}}$, 计算 $\Delta D_{\text{亚硝酸离子}}$:

$$\Delta D_{\text{亚硝酸离子}} = D_3 - D_{\text{空白3}}。$$

1.3.3.2 亚硝酸离子清除率的测定 分别于 2 只容量瓶中加入 1.1 mL 2 mol/L H_2SO_4 溶液、0.25 mL 0.01 mol/L 藏红 T 溶液和一定量的亚硝酸根标准溶液, 加蒸馏水 20 mL, 摇匀后置于沸水浴中加热 11 min, 流水冷却 3 min 以终止反应。加

收稿日期: 2013–12–06

基金项目: 韩山师范学院青年科学基金(编号: LQ200811)。

作者简介: 林丽云(1982—), 女, 广东潮州人, 硕士, 实验师, 从事食品生物技术研究。E–mail: leiyun_lin@126.com。

入 1 mL 波纹巴非蛤活性肽样品溶液(蛋白浓度 10 mg/mL), 摇匀后在室温下反应 15 min, 滴加 0.3 g/mL 的 ZnSO_4 溶液沉淀蛋白质, 冷却至室温后定容并摇匀, 取滤液测定吸光度 D_4 , 计算亚硝酸根清除率 P_3 :

$$P_3 = \frac{D_3 - D_4}{D_3 - D_{\text{空白3}}} \times 100\%^{[3]}。$$

1.3.4 波纹巴非蛤活性肽清除过氧化氢离子能力的测定

1.3.4.1 过氧化氢离子的测定 分别于 2 支 10 mL 比色管中加入 2.0 mL 0.2 mmol/L H_3PO_4 溶液、1.0 mL 0.5 mmol/L 靛蓝胭脂红溶液、1.5 mL 20 $\mu\text{g/mL}$ 铜(II)溶液, 其中 1 支加入过氧化氢标准溶液或试液(含量 0.1~4.0 μg), 另 1 支不加 H_2O_2 , 分别用水稀释至 10 mL, 置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中放置反应 15 min, 以水为参比, 用 1 cm 比色皿于 612 nm 波长处分别测定催化、非催化体系吸光度 D_5 、 D_6 , 计算吸光度差值 $\Delta D_{\text{过氧化氢离子}}$:

$$\Delta D_{\text{过氧化氢离子}} = D_6 - D_5。$$

1.3.4.2 清除过氧化氢离子能力的测定 分别于 10 mL 比色管中加入 2.0 mL 0.2 mmol/L H_3PO_4 溶液、1.0 mL 0.5 mmol/L 靛蓝胭脂红溶液、1.5 mL 20 $\mu\text{g/mL}$ 铜(II)溶液、1 mL 波纹巴非蛤活性肽样品溶液(蛋白浓度 10 mg/mL)、过氧化氢标准溶液或试液(含过氧化氢 0.1~4.0 μg), 分别用水稀释至 10 mL, 置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中放置反应 15 min, 以水为参比, 用 1 cm 比色皿于 612 nm 波长处测定吸光度 D_7 , 计算清除率 P_4 :

$$P_4 = \frac{D_6 - D_7}{\Delta D_{\text{过氧化氢离子}}} \times 100\%^{[4]}。$$

2 结果与分析

2.1 波纹巴非蛤活性肽对羟自由基的清除率

由图 1 可以看出, 波纹巴非蛤活性肽具有较强的清除羟自由基离子的能力, 当相对分子质量在 30 000~50 000 u 时, 清除效果明显; 当相对分子质量约为 43 000 u 时, 达到最高峰, 清除率达 45%。

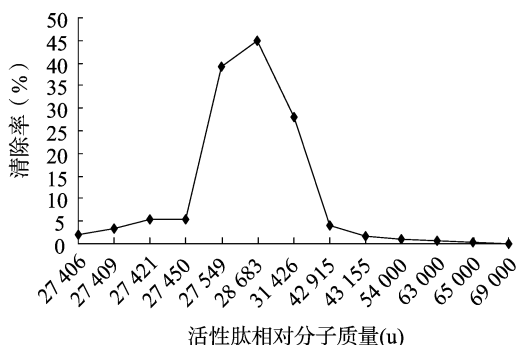


图1 不同分子量的波纹巴非蛤活性肽对羟自由基离子的清除率

2.2 波纹巴非蛤活性肽对超氧自由基离子的清除率

由图 2 可知, 波纹巴非蛤活性肽具有较强的清除超氧自由基离子的能力, 清除效果明显, 当相对分子质量在 43 000 u 左右时, 达到最高峰, 清除率达 74%。

2.3 波纹巴非蛤活性肽清除亚硝酸根离子的能力

由图 3 可知, 波纹巴非蛤活性肽清除亚硝酸根离子的能力较弱, 相对分子质量在 31 000~54 000 u 时, 清除率在 10%

以上; 相对分子质量在 43 000 u 左右时, 达到最高峰, 清除率达 25%。

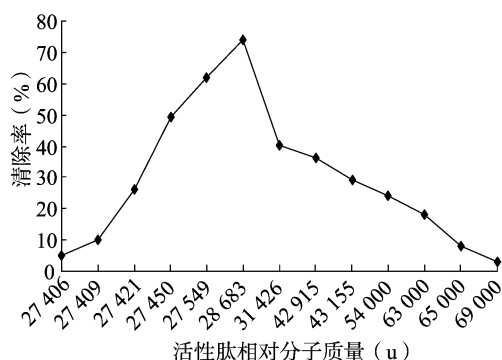


图2 不同分子量的波纹巴非蛤活性肽对超氧自由基离子的清除率

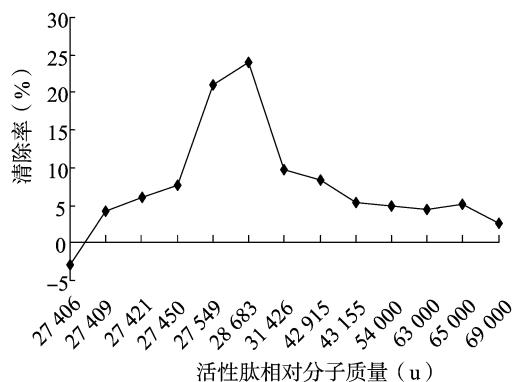


图3 不同分子量的波纹巴非蛤活性肽对亚硝酸根离子的清除率

2.4 波纹巴非蛤活性肽清除过氧化氢离子的能力

由图 4 可知, 波纹巴非蛤活性肽清除过氧化氢离子的能力强, 各阶段的清除率均在 10% 以上, 相对分子质量在 43 000 u 左右时达到最高峰, 清除率在 60% 以上。

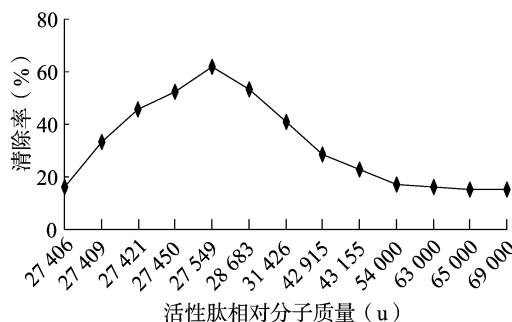


图4 不同分子量的波纹巴非蛤活性肽对过氧化氢离子的清除率

2.5 波纹巴非蛤活性肽清除 4 种离子的能力对比

由图 5 可知, 波纹巴非蛤活性肽清除各种离子的能力为: 超氧自由基 > 过氧化氢 > 羟自由基 > 亚硝酸根。波纹巴非蛤多肽液的相对分子质量在 40 000~45 000 u 时, 清除 4 种离子的能力最强; 当相对分子质量小于 40 000 u 时, 随着相对分子质量的增大, 抗氧化活性增大; 当相对分子质量大于 45 000 u 时, 随着相对分子质量的增大, 抗氧化活性减小。

3 结论

波纹巴非蛤活性肽应用于体外清除自由基的试验中效果

宋凯凯, 卢伟东, 徐丽丽, 等. ERIC-PCR 指纹图谱及电镜技术在纳豆生产菌鉴定中的应用[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(10): 300-302.

ERIC-PCR 指纹图谱及电镜技术在纳豆生产菌鉴定中的应用

宋凯凯, 卢伟东, 徐丽丽, 郭立忠

(青岛农业大学山东省应用真菌重点实验室, 山东青岛 266109)

摘要:纳豆是一种传统的日本食品,由纳豆菌在一定温度湿度条件下发酵大豆而来,新鲜纳豆表面金黄色,风味独特营养丰富。纳豆的主要发酵菌为纳豆菌,属芽孢杆菌属,称为纳豆枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* var. *natto*),是好氧的革兰氏阳性菌。利用扫描电子显微镜和 ERIC-PCR 指纹图谱技术对 4 株纳豆菌(高桥纳豆、MIZKAM 1、寿纳豆、MIZKAM 无臭)进行了亲缘关系鉴定。结果显示,MIZKAM 无臭与寿纳豆的亲缘关系较近,而高桥纳豆与其他品种亲缘关系较远。

关键词:纳豆菌;形态学;ERIC-PCR;聚类分析;电镜

中图分类号: Q934; Q933 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)10-0300-03

纳豆(natto)是日本传统大豆发酵食品。纳豆的主要发酵菌为纳豆菌,属芽孢杆菌属,是好氧的革兰氏阳性菌^[1]。纳豆菌能分解蛋白质、碳水化合物、脂肪等大分子物质,使发酵产品中富含氨基酸、有机酸、寡聚糖等多种易被人体吸收的成分,还能分泌各种酶和维生素,从而可促进小肠黏膜细胞的增殖,保证小肠功能正常^[2-6]。纳豆还能有效预防和辅助治疗心脑血管疾病。纳豆防治心脑血管疾病的药用价值主要源自纳豆激酶^[7]。自 1987 年纳豆中发现强力溶栓激酶——纳豆激酶以来,纳豆引起了全世界的广泛关注^[8]。该酶不仅有

显著的溶栓作用,还可以激活静脉内皮细胞的纤维蛋白酶原^[9-10]。此外,纳豆菌发酵液中含有多达 17 种氨基酸,其中包括人体必需的 8 种氨基酸^[11],因此纳豆具有“超级健康食品”的美誉。然而,由于当今市场纳豆产品种类繁多,都有各自的菌种命名,因此本试验利用扫描电子显微镜和 ERIC-PCR(enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR)指纹图谱技术^[12]对 4 个纳豆菌生产种进行鉴定分析,旨在鉴定其个体形态的差别及亲缘关系的远近。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

4 个纳豆菌株(高桥纳豆、MIZKAM 1、寿纳豆、MIZKAM 无臭),由青岛农业大学农业应用真菌研究室提供。

1.2 方法

1.2.1 单菌落培养 将 4 种纳豆菌株接种到 LB 液体培养基(成分为 10 g/L 蛋白胨、5 g/L 酵母粉、5 g/L NaCl)中,放

收稿日期:2013-12-12

基金项目:山东省科学技术厅省良种工程项目(编号:2011LZ006)。

作者简介:宋凯凯(1988—),女,山东潍坊人,硕士研究生,主要从事食用菌分子遗传育种。E-mail:skk1003@126.com。

通信作者:郭立忠,教授,主要从事食用菌的品种改良。E-mail:glz119@126.com。

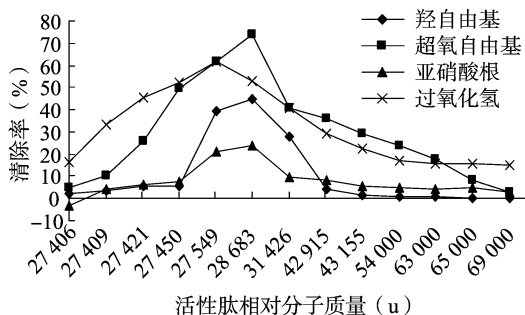


图5 不同分子量的波纹巴非哈活性肽对4种离子的清除率

明显。波纹巴非哈活性肽对超氧自由基清除率最高达 74%,对过氧化氢清除率最高达 61.5%,对羟自由基清除率最高达 45%,对亚硝酸根离子的清除率最高达 24%。当波纹巴非哈活性肽分子量在 40 000~45 000 u 时,其清除超氧自由基、过氧化氢、羟自由基和亚硝酸根的能力均达到最大。

参考文献:

- [1] 范秀萍, 吴红棉, 王娅楠, 等. 波纹巴非哈糖蛋白的分离提取及体外清除羟自由基活性的研究[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(1): 138-140.
- [2] 杨永芳, 杨最素, 丁国芳, 等. 菲律宾蛤仔酶解寡肽的分离及体外抗氧化作用研究[J]. 中华中医药学刊, 2011, 29(5): 1069-1072.
- [3] 郁迪, 许新建, 杨最素, 等. 菲律宾蛤仔木瓜蛋白酶水解物抗氧化活性研究[J]. 浙江海洋学院学报: 自然科学版, 2011, 30(6): 515-519.
- [4] 白林山, 王献钊, 李津晶. 靛蓝胭脂红-铜(II)体系催化光度法测定雨水中微量过氧化氢[J]. 安徽工业大学学报: 自然科学版, 2007, 24(2): 159-162.
- [5] 游丽君. 泥鳅蛋白抗氧化肽的分离纯化及抗疲劳、抗癌功效研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2010: 64-70.
- [6] 阎欲晓, 栗桂娇, 李小梅, 等. 文蛤蛋白抗氧化活性肽的研究[J]. 食品工业科技, 2007, 28(12): 121-123.