

常桂英,于加平,高桂凤. 榆耳低聚肽的制备及抗氧化活性研究[J]. 江苏农业科学,2017,45(20):225-227.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.20.056

榆耳低聚肽的制备及抗氧化活性研究

常桂英^{1,2}, 于加平¹, 高桂凤¹

(1. 吉林农业科技学院生物工程学院, 吉林吉林 132101; 2. 吉林省高校长白山动植物资源利用与保护重点实验室, 吉林吉林 132101)

摘要:以榆耳为原料,经提取、纯化、酶解,获得2.0~10.6 μm超滤膜截留范围的低聚肽,通过邻苯三酚法测其抗氧化活性,对氨基苯磺酸法测定对亚硝酸盐的清除率。结果表明,榆耳蛋白及低聚肽对超氧自由基和亚硝酸盐都有较强清除效果,但缓冲溶液提取的榆耳蛋白最强,而对于2种提取方法得到的榆耳蛋白水解的低聚肽的对超氧自由基和亚硝酸盐都有较强清除效果比榆耳蛋白的清除效果要差很多,其中缓冲溶液提取的低聚肽清除效果最低。说明榆耳蛋白具有很强的抗氧化活性,是天然的抗氧化剂,在食品领域及化妆品产业均有很高的开发利用价值。

关键词:榆耳;低聚肽;提取;抗氧化

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)20-0225-03

榆耳是分布于我国长白山区的一种食药兼用珍贵食用菌品种,属多孔菌目伏革菌科胶韧革菌,又称榆蘑,它的浸出液对痢疾和肠胃系统疾病亦有奇效^[1]。低聚肽可以改善肝功能,缓解血液芳香族氨基酸浓度过高导致肝昏迷;可以提供能量,缓解疲劳,可以改善手术后病人营养状态,广泛应用于烧伤、外科手术等病人及消化酶缺失患者的肠道营养剂和蛋白营养食品;也可用作高强度劳动者及运动员的食品营养剂,能及时补充能量、消除疲劳、增强体力;还具有抗氧化活性,同时具有良好风味^[2]。

本研究以榆耳为原料,通过碱法、缓冲液提取法对其蛋白质进行提取、纯化,以酶解法制备高F值低聚肽,并对不同提取物进行活性分析,为榆耳的深加工及产品开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

榆耳子实体。

1.2 仪器与试剂

LC-10AT氨基酸自动分析仪(检测器S-TD-10A VTPplus);756PC紫外/可见分光光度计;YP2001N电子天平;TDL-5台式离心机;JJ-5恒温电动搅拌器;超滤装置(超滤膜孔径:2.0 μm);高速万能粉碎机;紫外-可见分光光度计;离心机;恒温干燥箱;烧杯;量筒;CaCl₂固体;0.2%苯酚;6.0 mol/L盐酸;0.4%对氨基苯磺酸;0.2%盐酸萘乙二胺;NaOH溶液;盐酸溶液;NH₄Cl溶液;牛血清白蛋白;考马斯亮蓝G-250;85%磷酸;乙醇。

1.3 试验方法

1.3.1 榆耳蛋白质的提取与纯化

1.3.1.1 NaCl的碱性溶液提取榆耳蛋白质 称取20 g榆耳粉末,加入0.5 mol/L的NaCl溶液,pH值为10.0(料液比1 g:30 mL),在40℃下浸泡4.0 h,12 000 r/min离心20 min后,上清液即为榆耳蛋白质粗提取液。

性能研究[J]. 食品科技,2011(11):140-144.

收稿日期:2016-11-09

基金项目:吉林省教育厅科学技术规划课题(编号:吉教科合字[2014]第377号)。

作者简介:常桂英(1965—),女,吉林吉林人,硕士,教授,主要从事生物化学的教学与科研工作。E-mail:cyg650607@126.com。

[10] 食品卫生微生物学检测 菌落总数测定:GB/T 4789.2—2008[S].

[11] Zhou Z, Robards K, Helliwell S, et al. Ageing of stored rice: changes in chemical and physical attributes[J]. Journal of Cereal Science, 2002, 35(1): 65-78.

[12] 任红, 曹兵, 李劲松, 等. 大米包装的现状与发展对策[J]. 粮油食品科技, 2007, 15(1): 11-13.

[13] 姜平. 储藏方式对小包装大米品质变化的影响[D]. 无锡: 江南大学, 2012.

[14] 郭光平, 张建梅, 刘彩霞, 等. 气调包装技术对烧肉品质的影响[J]. 肉类研究, 2015(9): 20-24.

[15] 宋渊. EVOH高阻隔包装对低温加工肉质量的保护效果[J]. 塑料包装, 2013, 24(3): 17-23.

[16] 梁晓红, 呼和, 王羽, 等. 高阻隔复合膜对冷鲜肉货架期的影响[J]. 食品科技, 2015(5): 150-153.

[17] 徐长妍, 刘杰, 周捍东, 等. 大米包装材料的透湿性能和保鲜

[18] 王颖, 张蕾. 不同阻隔性包装材料对大米储藏品质的影响[J]. 中国包装, 2006, 26(6): 57-61.

[19] 李益良, 毛金水. 小包装优质鲜米品质变化及其保鲜期的研究[J]. 粮油科技, 2004(5): 42-43.

[20] 成岩萍. 浅析粮食微生物与粮食储藏的关系[J]. 粮油仓储科技通讯, 2003(5): 49-51.

[21] 李荣涛. 粮食微生物与粮食防霉[J]. 垦殖与稻作, 2004(3): 52-53.

[22] 秦永喜, 王建清, 晁璐松. 储存温度对不同包装材料包装的大米品质的影响研究[J]. 包装工程, 2011(21): 37-41.

[23] 于莉, 陈丽, 张建新, 等. 不同气调储藏方式下大米陈化过程中的品质变化[J]. 粮油加工, 2007(8): 96-98.

[24] 陈玮. 大米气调储藏过程中脂质的变化研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2007.

1.3.1.2 缓冲液提取榆耳蛋白质 称取20 g榆耳粉末,加入到1.0 mol/L Tris-HCl(pH值为8.0)、甘油、聚乙烯吡咯烷酮混合定容,并经高压灭菌的缓冲液里(料液比1 g:30 mL),在4℃下浸泡4.0 h,12 000 r/min离心20 min后,上清液即为榆耳蛋白质粗提取液。

1.3.1.3 纯化 (1)去多糖:将所得的榆耳蛋白提取液减压浓缩,并加入3倍体积的95%乙醇,进行醇沉除去多糖,离心,将所得溶液减压浓缩除去乙醇,得到除去多糖的榆耳蛋白溶液。(2)盐析:向去多糖的蛋白质提取液中按氯化铵60 g/200 mL固液比缓慢加入氯化铵粉末,盐析后,4℃静置过夜,待沉淀完全后再离心(4 000 r/min,40 min),弃上清,NaCl碱性溶液提取的榆耳蛋白质沉淀物用蒸馏水溶解;缓冲液提取的榆耳蛋白质沉淀物用缓冲液溶解。

1.3.1.4 透析 取10倍以上蛋白质体积的去离子水,将装好样品的透析袋悬于大烧杯中。在烧杯底部放一个磁子,缓慢搅拌以促进溶液交换。更换洗脱溶液数次(约30 min/次),至达到透析平衡为止(洗出液中无Cl⁻),获得榆耳蛋白质。

1.3.2 蛋白质含量测定——考马斯亮蓝法

1.3.2.1 蛋白质标准溶液配制 用牛血清白蛋白配制成0.1 mg/mL的标准蛋白溶液。

1.3.2.2 染色液(考马斯亮蓝G-250溶液) 称取0.1 g考马斯亮蓝G-250,溶于50.0 mL 90%乙醇中,加入85%的磷酸100.0 mL,蒸馏水定容至1 L,贮存在棕色瓶中。

1.3.2.3 蛋白质标准曲线的制作 用考马斯亮蓝法测定蛋白质含量方法绘制标准曲线^[3]。得回归方程:

$$D = 0.342C + 0.0364, r^2 = 0.9999.$$

式中: D 表示吸光值, C 表示蛋白质浓度。

1.3.2.4 样品中蛋白质含量测定 取2支试管(1个为重复)A和B,加入样品提取液1.0 mL,考马斯亮蓝溶液5.0 mL,按“1.3.2.3”节方法进行测定。

1.3.3 低聚肽的制备 分别取NaCl碱性溶液提取的榆耳蛋白质提取液和缓冲液提取的榆耳蛋白质提取液各10.0 mL,取1 g蛋白质样品加20.0 mL蒸馏水,在35℃条件下预热15 min后,加凝乳蛋白酶酶解4.0 h后备用。

1.3.4 维生素C溶液的制备 称取含量分别与NaCl碱性溶液提取的榆耳蛋白质提取液和缓冲液提取的榆耳蛋白质提取液具有相同含量的维生素C粉末制备溶液备用。

1.3.5 超氧自由基抑制率测定 超氧自由基测定采用改良的邻苯三酚自氧化法^[3]。在试管中按表1加入缓冲液和蒸馏水,于25℃恒温15 min后加入25℃预热过的样本和邻苯三酚,迅速摇匀,立即倾入比色皿中,在波长325 nm处每30 s测定1次吸光度 D 。

$$\text{超氧自由基清除率} = (D_0 - D_f) / D_0 \times 100\%.$$

式中: D_0 表示试剂空白液的吸光值; D_f 表示分别加入各种样品和邻苯三酚后的吸光值。

表1 超氧自由基测定中试剂用量

试剂	0.1 mol/L Tris-HCl (mL)	蒸馏水 (mL)	样品 (mL)	10 mmol/L HCl (mL)	邻苯三酚 (mL)	总体积 (mL)
对照组	4.5	4.2	0	0.3	0	9.0
样品管	4.5	3.9	0.3	0	0.3	9.0

1.3.6 对亚硝酸盐的抗氧化性的测定^[4-8] 分别精确吸取5.000 μg/mL的NaNO₂标准液1.2 mL于6支15.0 mL试管中,再分别加含量为0.300 μg/mL(缓冲液提取)或0.300 μg/mL(碱提)的榆耳蛋白提取液1.2、1.8、2.4、3.0、3.6、4.8 mL,35℃恒温反应10 min。加入质量分数0.4%的对氨基苯磺酸1.2 mL摇匀,静置5 min后再加入质量分数0.2%盐酸萘乙二胺0.6 mL,用蒸馏水稀释至刻度,摇匀静置10 min后,在538 nm处测定吸光度,分别进行2次平行试验,取平均值为 D 。样本空白管用来调零的试剂空白管即样本用蒸馏水代替测得值为 D_0 。

$$\text{清除率}(SR) = (D_0 - D) / D_0 \times 100\%.$$

式中: D_0 表示未加试样后NaNO₂的吸光度; D 表示加试样时NaNO₂的吸光度。

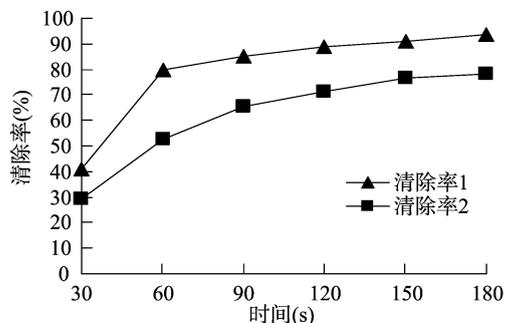
2 结果

2.1 样品中蛋白质含量的测定

按“1.3.2.3”节方法测得样品中蛋白质含量的结果为NaCl碱性溶液提取的榆耳蛋白质含量为0.312 μg/mL,缓冲液提取的榆耳蛋白质含量为0.297 μg/mL。

2.2 样品中蛋白质对超氧自由基清除效果研究结果

取等浓度和体积的NaCl碱性溶液提取的榆耳蛋白质、缓冲液提取的榆耳蛋白质溶液,分别对邻苯三酚的抗氧化活性进行研究。由图1可见,这2种方法提取的榆耳蛋白对邻苯三酚超氧自由基都具有清除作用。缓冲液提取的榆耳蛋白质比NaCl碱性溶液提取的榆耳蛋白质对超氧自由基的清除效果要好得多,180 s时缓冲液提取的榆耳蛋白质对超氧自由基的清除率达93%,而NaCl碱性溶液提取的榆耳蛋白质对超氧自由基的清除率为78%。

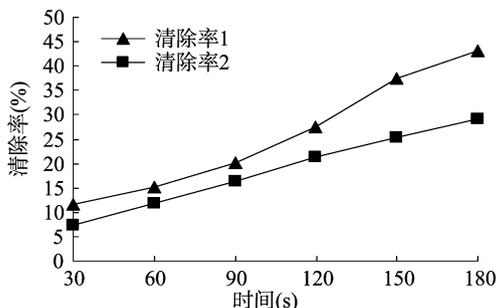


清除率1表示缓冲液提取的榆耳蛋白质对邻苯三酚超氧自由基的清除率测定曲线;清除率2表示NaCl碱性溶液提取的榆耳蛋白质对邻苯三酚超氧自由基的清除率测定曲线

图1 榆耳蛋白质对邻苯三酚超氧自由基的清除测定

2.3 样品中蛋白质水解产物对超氧自由基清除效果研究结果

分别取等质量的NaCl碱性溶液提取的榆耳蛋白质水解产物和缓冲液提取的榆耳蛋白质水解产物,研究水解产物对邻苯三酚的抗氧化活性。由图2可知,2种方法提取的榆耳蛋白水解产物对邻苯三酚超氧自由基都具有一定的清除作用,但比原液清除效果低很多,说明榆耳蛋白质水解产物比榆耳蛋白质的抗氧化活性要弱得多,在应用时最好直接应用榆耳蛋白质。180 s时缓冲液提取的榆耳蛋白水解产物对超氧自由基的清除率为43%,而NaCl的碱性溶液提取的榆耳蛋白水解产物对超氧自由基的清除率仅为29%。

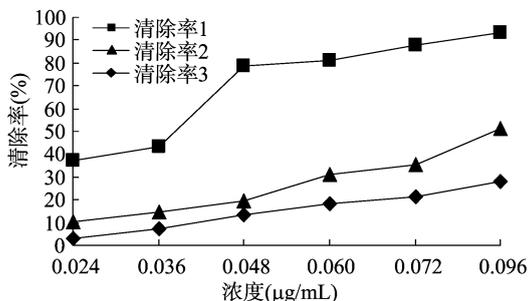


清除率1表示缓冲液提取的榆耳蛋白质水解产物对邻苯三酚超氧自由基的清除率测定曲线；清除率2表示NaCl碱性溶液提取的榆耳蛋白质水解产物对邻苯三酚超氧自由基的清除率测定曲线

图2 榆耳蛋白质水解产物对邻苯三酚超氧自由基的清除测定

2.4 样品中蛋白质与维生素C对亚硝酸盐清除作用的比较研究

取等浓度和体积的NaCl碱性溶液提取的榆耳蛋白质、缓冲液提取的榆耳蛋白质和维生素C溶液,分别对亚硝酸盐清除作用进行研究,由图3可知,这2种方法提取的榆耳蛋白及维生素C对亚硝酸盐都有一定的清除作用,随着浓度的提高清除率都加强。但缓冲液提取的榆耳蛋白质对亚硝酸盐的清除效果最好,当浓度为0.096 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,清除率达93%。而NaCl碱性溶液提取的榆耳蛋白质对亚硝酸盐的清除效果次之,当浓度为0.096 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,清除率达51%。维生素C对亚硝酸盐的清除效果最差,当浓度为0.096 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,清除率仅28%。由此可知,榆耳蛋白对亚硝酸盐的清除效果强于维生素C,在应用时最好选择缓冲液提取的榆耳蛋白质清除亚硝酸盐类。



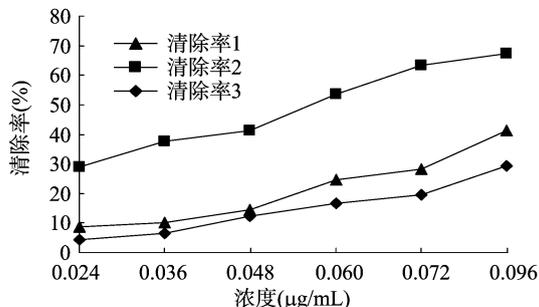
清除率1表示NaCl碱性溶液提取的榆耳蛋白质对亚硝酸盐的清除率测定曲线；清除率2表示缓冲液提取的榆耳蛋白质对亚硝酸盐的清除率测定曲线；清除率3表示维生素C对亚硝酸盐的清除率测定曲线

图3 榆耳蛋白质和维生素C对亚硝酸盐清除的测定

2.5 样品中蛋白质水解产物低聚肽与维生素C对亚硝酸盐清除作用的比较研究

分别取等质量的NaCl碱性溶液提取的榆耳蛋白质和缓冲液提取的榆耳蛋白质6份进行水解,研究水解产物低聚肽对亚硝酸盐清除效果,结果再与相应浓度的维生素C溶液对亚硝酸盐清除效果进行对比,这2种方法提取的榆耳蛋白水解产物低聚肽及维生素C对亚硝酸盐都有一定的清除作用,随着浓度的提高清除率都增强(图4)。缓冲液提取的榆耳蛋白质水解产物低聚肽对亚硝酸盐的清除效果最好,当浓度为0.096 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时清除率为67%。NaCl碱性溶液提取的榆耳蛋白质水解产物低聚肽对亚硝酸盐的清除效果次之,当浓度

为0.096 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时清除率为41%。维生素C对亚硝酸盐的清除效果最差,当浓度为0.096 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时清除率仅29%。由此可知,榆耳蛋白水解产物低聚肽对亚硝酸盐的清除效果强于维生素C,但榆耳蛋白对亚硝酸盐清除效果要好于水解产物低聚肽,因此,在应用时最好选择缓冲液提取的榆耳蛋白质清除亚硝酸盐类。



清除率1表示NaCl碱性溶液提取的榆耳蛋白质水解产物低聚肽对亚硝酸盐的清除率测定曲线；清除率2表示缓冲液提取的榆耳蛋白质水解产物低聚肽对亚硝酸盐的清除率测定曲线；清除率3表示维生素C对亚硝酸盐的清除率测定曲线

图4 蛋白质水解产物低聚肽与维生素C对亚硝酸盐清除作用的测定

3 小结

由试验结果可知,NaCl碱性溶液和缓冲液2种方法提取的榆耳蛋白含量分别为0.312、0.297 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。榆耳蛋白质及其水解产物对超氧自由基和亚硝酸盐都有很好的清除效果,但缓冲液提取的榆耳蛋白质对超氧自由基和亚硝酸盐清除效果最好。由此可知,榆耳蛋白应用时最好选择缓冲液提取的榆耳蛋白质。榆耳蛋白质具有很强的抗氧化性能,本研究可为榆耳的进一步开发和利用奠定理论基础和数据支持。

参考文献:

- [1] 李士怡. 榆耳的药用价值研究[J]. 实用中医内科杂志, 2005, 19(3): 216.
- [2] 李小勇, 李洪军. 高F值低聚肽的研究进展[J]. 粮食与粮油, 2006(6): 9-11.
- [3] 郭祀远, 李琳. 考马斯亮蓝法测定野木瓜多糖中蛋白质含量[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(1): 115-117.
- [4] 韩少华, 朱靖博, 王妍妍. 邻苯三酚自氧化法测定抗氧化活性的方法研究[J]. 中国酿造, 2009(6): 155-157.
- [5] 李粉玲, 蔡汉权, 林泽平. 红豆多糖抗氧化性及还原能力的研究[J]. 食品工业, 2014, 35(2): 190-194.
- [6] 梁英岳, 傅亮, 孙颖莺, 等. 模拟胃液条件下红豆多肽清除亚硝酸盐及阻断亚硝胺合成的研究[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(4): 40-44.
- [7] 张虹, 许钢, 袁建耀, 等. 提取液对亚硝化反应的抑制作用[J]. 郑州粮食学院学报, 2000, 21(1): 50-53.
- [8] 赵二劳, 王晓妮, 张海容. 山楂清除亚硝酸盐及阻断亚硝胺合成的研究[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(10): 29-31.
- [9] 刘爱文, 陈忻, 郑建英. 荔枝核提取液对亚硝胺的抑制作用[J]. 食品工业科技, 2003, 24(12): 27-29.
- [10] 黄俊生. 南姜表皮花青清除亚硝酸盐及阻断亚硝胺合成的研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(2): 243-246.