

富硒灵芝中不同粗蛋白的 抗氧化活性及其协同作用研究

杜明^{1,2}, 胡小松¹, 赵广华¹

(1.中国农业大学食品科学与营养工程学院 北京 100083 2.哈尔滨工业大学食品科学与工程学院 黑龙江哈尔滨 150086)

摘要:通过电子自旋共振捕捉技术(ESR)对富硒灵芝中不同种类的粗蛋白的抗氧化活性进行了评价,研究了羟自由基清除率同蛋白质剂量之间的关系,并对它们之间的抗氧化协同作用进行了分析。结果表明,四种粗蛋白都具有一定的·OH和O₂⁻清除活性,并且以水溶性粗蛋白的抗氧化活性最高。每种粗蛋白对·OH的清除率与蛋白浓度之间的关系可以用对数(指数)方程来表示。各种粗蛋白之间不存在抗氧化活性的协同作用,而且醇溶性粗蛋白对其它三种蛋白还具有一定程度的拮抗作用。

关键词:富硒灵芝,粗蛋白,抗氧化活性,协同作用

Abstract:In the paper, the antioxidant activities of different crude proteins from Se-enriched *Ganoderma Lucidum* were evaluated by method of ESR, the relation between the hydroxyl radical scavenging activities and the dose of different crude proteins were studied, and the interactive effects on antioxidant activity between the different crude proteins were analyzed. The results showed that all of the four crude proteins showed antioxidant activities, water-soluble protein extracts had the strongest free radical scavenging activity. All crude proteins exhibited scavenging activity of hydroxyl radicals in a dose-dependent manner; the relation can be express as the equation of logarithm (exponent) regression. There are no interactive effects on antioxidant between different crude proteins. However, ethanol-soluble protein extracts refrain the other three protein extracts from exhibiting their activity to quench free radicals.

Key words:Se-enriched *Ganoderma Lucidum*; crude protein; antioxidant activity; interactive effect

中图分类号:TS201.2 文献标识码:A
文章编号:1002-0306(2006)09-0111-04

灵芝能够从培养基质中吸收20%~30%的无机硒,并将其中的绝大部分转化为有机硒。而且,约有

40%的有机硒存在于蛋白质中,硒元素可以显著地提高富硒灵芝中的蛋白质组分的抗氧化活性。经研究结果发现,灵芝的水溶性提取物及醇提取物都具有一定的自由基清除活性^[1-3]。已有研究结果表明,可以根据提取溶液的不同将富硒灵芝蛋白分成水溶性、盐溶性、醇溶性和碱溶性^[4]。赵镭曾对这四种蛋白粗提物的硒含量进行了报导^[5],然而迄今为止,对于富硒灵芝中不同蛋白提取物的抗氧化活性以及这四种蛋白粗提物是否具有协同的抗氧化作用却未见报导。本文对这部分工作进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

Se-GL子实体 由西北农林科技大学秦巴山区研究中心提供;5,5'-甲基吡咯啉-N-氧化物(DMPO)购自日本Labtec公司;次黄嘌呤(HPX)、黄嘌呤氧化酶(XOD)购自美国Sigma公司(北京);其它试剂均为分析纯,购自国内公司。

LGJ-10冷冻干燥机 北京松源华兴科技发展有限公司;UV 762紫外/可见分光光度计 上海精密科学仪器有限公司;TGL-16G-A冷冻离心机 上海安亭科学仪器厂;超滤装置 Minipore;JES-TE 200 EPR电子自旋波谱仪 日本JEOL公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品的制备

1.2.1.1 富硒灵芝蛋白水提取物(A)的制备 在200g粉碎冻干的富硒灵芝子实体样中,加去离子水2000mL,搅拌提取8h,抽滤,用少量去离子水分3次洗涤残渣,抽滤至干,滤液经HAC酸化至pH 4.3后添加(NH₄)₂SO₄至80%的饱和度,4℃静置12h,4800×g离心20min,去除上清液,沉淀以5mL pH 8.0 Tris-HCl缓冲液溶解,然后使用截留分子量为3000Da的膜进行超滤过滤,重复3次,所得蛋白质溶

收稿日期:2006-01-11

作者简介:杜明(1977-),男,在读博士研究生,研究方向:富硒灵芝中硒蛋白的纯化与生物学活性研究。

基金项目:教育部“新世纪优秀人才计划”资助(NCET-04-0134)。

液真空冷冻干燥, -20°C 保存^[6]。

1.2.1.2 富硒灵芝蛋白盐提取物 (B) 的制备 在 1.2.1.1 提取的残渣中, 加 2000mL 0.5mol/L NaCl, 搅拌提取 8h。其它操作除了 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 饱和度添加至 50% 以及沉淀溶解在 0.5mol/L NaCl 之外, 都与 1.2.1.1 相同。

1.2.1.3 富硒灵芝蛋白醇提取物 (C) 的制备 在 1.2.1.2 提取的残渣中, 加 1500mL 的 75%(v/v) 乙醇, 搅拌提取 8h, 抽滤至干。滤液中加入 1500 mL 的去离子水, 静置 12h 后 4800 \times g 离心 20min。沉淀以 75% (v/v) 乙醇溶解后, 在 4°C 以 1L 去离子水透析 24h。透析后的溶液冻干后在 -20°C 下储藏备用。

1.2.1.4 富硒灵芝蛋白碱提取物 (D) 的制备 在 1.2.1.3 提取的残渣中, 加入 2000mL 0.1mol/L NaOH 溶液, 搅拌提取 8h。其它操作除了 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 饱和度添加至 50% 以及沉淀溶解在 0.1mol/L NaOH 之外, 都与 1.2.1.1 相同。

1.2.1.5 样品溶液的配制 将 A、B、C 和 D 用各自的提取液配制成浓度为 1mg/mL 的溶液, 然后进行羟自由基 ($\cdot\text{OH}$) 及超氧自由基 ($\text{O}_2^{\cdot-}$) 清除率的测定, 研究单个粗蛋白的抗氧化活性的差异。将 A、B、C 和 D 分别配制成不同浓度梯度的溶液, 进行 $\cdot\text{OH}$ 清除率的测定, 研究自由基清除率同蛋白质浓度之间的关系。将 A、B、C 和 D 配制成 0.5mg/mL 的溶液, 并将此四种溶液等比例两两组合, 然后进行 $\cdot\text{OH}$ 清除率的测定, 研究不同种类蛋白质之间是否存在协同的抗氧化活性关系。

1.2.2 硒和蛋白质含量的测定 用氢化物原子荧光法 (HGAFS) 进行富硒灵芝蛋白提取物中硒含量的测定^[7], 在清华大学分析测试中心完成; 用 Lowry 法进行蛋白质含量的测定^[8]。

1.2.3 顺磁共振自旋捕集技术 (EPR) 清除 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 作用研究

1.2.3.1 羟自由基 ($\cdot\text{OH}$) 的测定 Fenton 反应体系: 依次取 DMPO (4.0 mmol/L) PBS (10mmol/L, pH 7.4) 或试样, DETAPAC (4.0mmol/L), Fe_2SO_4 (0.1mmol/L), H_2O_2 (4.0mmol/L) 各 $5\mu\text{L}$, 混合均匀立即吸入毛细管, 放入谐振腔, 在中心磁场强度 336.5mT; 调制幅度 1.0G; 响应时间 0.1s; 放大倍数 5.0×10 ; 调制频率 100kHz; 微波功率 10.0mW; 微波频率 9.44GHz; X 波段下描记 120s 时的 DMPO-OH 的 ESR 波谱。以波谱信号第二个峰高值表示信号的相对强度, 用下列公式计算清除率: 清除率 = $[(\text{本底峰高 } h_0 - \text{加样后峰高 } h_s) / \text{本底峰高 } h_0] \times 100\%$ ^[9]。

1.2.3.2 超氧自由基 ($\text{O}_2^{\cdot-}$) 的测定 次黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶体系: 分别取 $5\mu\text{L}$ 1.0mol/L DMPO, $5\mu\text{L}$ 6mmol/L HPX, $5\mu\text{L}$ 4.0mmol/L DETAPAC, $5\mu\text{L}$ 10mmol/L pH7.4 PBS 或试样和 $5\mu\text{L}$ 50mU/mL

XOD 混合均匀后立即吸入毛细管, 在中心磁场强度 336.3mT; 调制幅度 1.0G; 响应时间 0.1s; 放大倍数 5.0×10 ; 调制频率 100kHz; 微波功率 10.0mW; 微波频率 9.44 GHz; X 波段下描记 80s 时的 DMPO-OOH 的 ESR 波谱^[10, 11]。以波谱信号第一个峰高值表示信号的相对强度, 清除率计算方法同上。

2 结果与讨论

2.1 四种蛋白粗提物自由基清除能力的比较

在蛋白质浓度为 1mg/mL 的条件下, 四种蛋白粗提物对 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除率结果如图 1 所示。从图中我们可以看出, 在相同的蛋白质浓度下, A 显示出相对较强的 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除能力。对两种自由基的清除能力从弱到强的顺序为 $\text{C} < \text{B} < \text{D} < \text{A}$ 。而且可以看出除 C 之外, A、B 和 D 对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除能力均强于对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力。

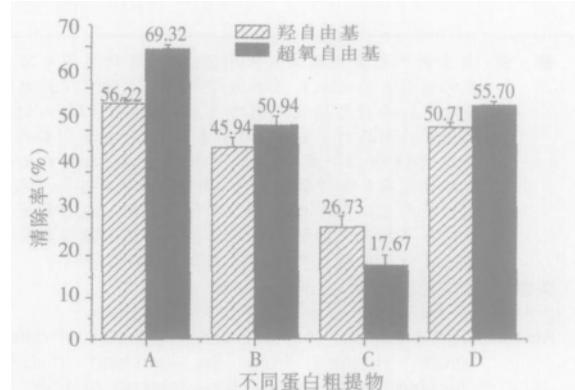


图 1 四种蛋白粗提物的羟自由基和超氧自由基清除率比较

从实验结果我们可以看出, 这四种粗蛋白都具有一定的 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除活性, 以水溶性富硒灵芝蛋白提取物的抗氧化活性最高。这与四种蛋白提取物中含有的硒元素有重要关系, 与本课题组此前的研究结果相一致^[12]。并且在蛋白的制备工艺中, 已经排除了有明确报道的灵芝多糖或者灵芝硒多糖对此实验结果的干扰。

2.2 四种蛋白粗提物各自的 $\cdot\text{OH}$ 清除率与蛋白质浓度之间的关系

每个蛋白提取物选取 7 个不同浓度, 根据不同蛋白质中硒含量的大小来确定每种粗蛋白的浓度水平和梯度。实验中每个样品取各自的溶解液为对照, 测定的结果如表 1 所示。从表中可以直观的判断出四种粗蛋白对 $\cdot\text{OH}$ 清除能力的强弱。

为了进一步分析 $\cdot\text{OH}$ 与蛋白质浓度之间的关系, 对两者用 SAS 2002 分析软件进行回归分析, 结果得到良好的对数(指数)回归方程。如图 2~图 5 所示, 所有蛋白提取物的羟自由基清除率与蛋白质剂量(浓度)之间存在对数回归关系。A、D、B 和 C 对羟自由基半数清除率 (IC_{50}) 的剂量分别为 618.23L、

表 1 不同浓度的蛋白提取物的·OH清除能力

样品	·OH清除率(%)	蛋白浓度(μg/mL)									
A ₁	18.65	200	B ₁	5.86	200	C ₁	5.76	200	D ₁	20.72	200
A ₂	37.74	400	B ₂	17.85	400	C ₂	15.15	326	D ₂	40.59	700
A ₃	45.39	600	B ₃	30.62	600	C ₃	20.54	489	D ₃	50.71	1000
A ₄	50.52	800	B ₄	38.01	800	C ₄	24.32	733	D ₄	61.37	1617
A ₅	56.22	1000	B ₅	45.94	1000	C ₅	26.73	1000	D ₅	67.85	2425
A ₆	73.53	1200	B ₆	71.35	1500	C ₆	38.25	1400	D ₆	77.71	3637
A ₇	92.35	1600	B ₇	81.35	2000	C ₇	48.71	1650	D ₇	89.79	5456

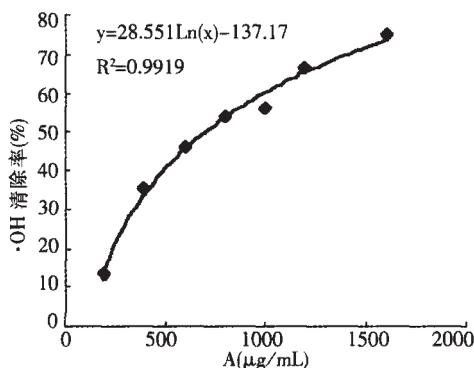


图 2 ·OH清除率对 A 浓度的回归曲线

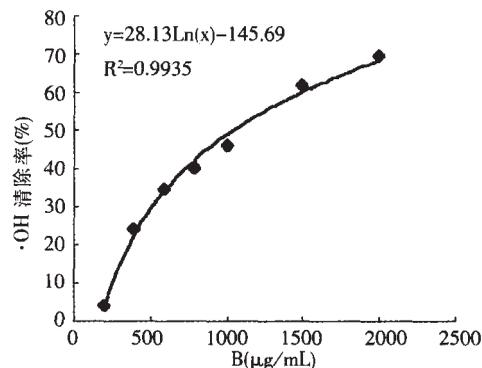


图 3 ·OH清除率对 B 浓度的回归曲线

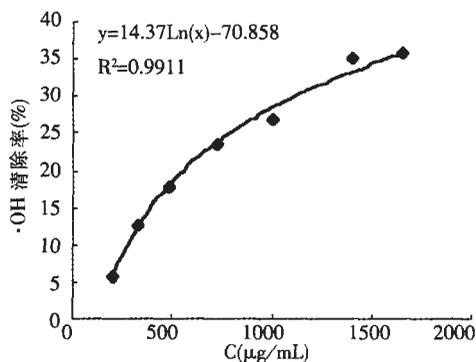


图 4 ·OH清除率对 C 浓度的回归曲线

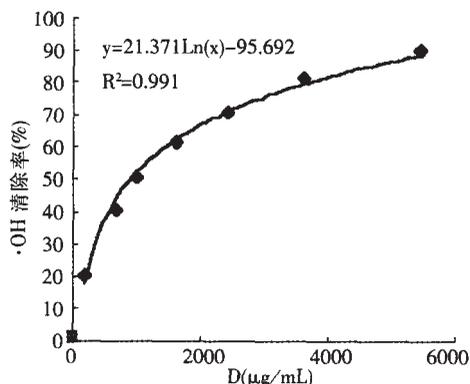


图 5 ·OH清除率对 D 浓度的回归曲线

939.14L、943.27L 和 2618.26L。

众所周知, IC_{50} 值越低, 测试样品的自由基清除活性越高。因此, 结果进一步证明了上述的四种蛋白粗提物的抗氧化活性。A 具有最强的自由基清除活性, 而 C 的自由基清除活性最弱。

2.3 四种粗蛋白之间的抗氧化活性协同作用分析

由于这四种粗蛋白的硒含量、结合的糖量、氨基酸的组成分布、蛋白质种类及分子量分布等方面都存在一定程度的差异, 而且本文中 2.1 和 2.2 部分已经可以看出它们在抗氧化活性方面也存在一定的差异。因此, 这四种粗蛋白的抗氧化活性之间是否存在协同作用的问题引起了我们的关注。

实验结果如图 6 所示, 这四种粗蛋白两两之间并没有明显的抗氧化协同作用。

A、B 和 D 的任意一种组合的·OH清除率都明显高于 A、B 或者 D。A+B、A+D 和 B+D 的·OH清除率分别是 44.76%、46.00% 和 40.76%, 明显高于 A

(40.26%)、B(29.13%)和 D(37.12%), 但明显低于 A、B 和 D 各自清除率之和。然而, 从实验结果来看, C 对其它三种粗蛋白的·OH清除率有一定程度的降低作用。这种现象分析原因是: C 的溶液是有机相的(75%

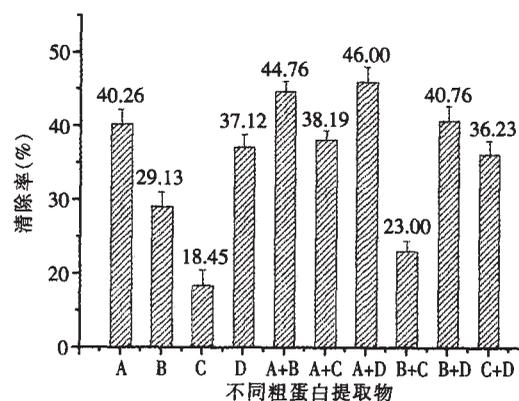


图 6 等量不同粗蛋白混合物的·OH清除能力比较

(下转第 156 页)

其抗拉强度均比初时增大,而后随着放置时间的延长抗拉强度又有所下降。

3.2 随着存放时间的延长,蛋白膜的水蒸汽透过率和透氧率均呈上升趋势。

3.3 存放时间对蛋白膜的挥发性盐基氮影响不是很大,随着存放时间的延长,挥发性盐基氮略有增加。

3.4 不同的蛋白膜的横截面微观结构有所不同。随着放置一段时间后,蛋白膜的网状结构均有所变化,与新制的相比网状结构变得疏松。

参考文献:

- [1] Butler B L, Vergano P J, Testin R F, Bunn J M. Mechanical and barrier properties of edible chitosan films as affected by composition and storage[J]. J Food Sci, 1996, 61 (5): 953~955.
- [2] McHugh T H, Aujard J F, Krochta J M. Plasticized whey

protein edible films: water vapor permeability properties [J]. J Food Sci, 1994, 59: 416~419.

[3] 陈秀芳,肖刚,许时婴,等.可食用膜通透性的测定[J].食品科学,1997,18(6):12.

[4] 王若兰.植物蛋白为主要的可食用膜的研究[D].无锡轻工大学硕士论文,2002.17.

[5] Koelsch C M, Labuza T P. Functional, physical and morphological properties of methylcellulose and fatty acid-based edible films[J]. Lebensm Wiss u Technol, 1992, 25: 404~411.

[5] Were L, Hettiarachchy N S, Coleman M. Properties of cysteine-added soy protein-wheat gluten films[J]. J Food Sci, 1999, 64(3): 514~518.

[7] Gennadios A, Weller C L, Testin R F. Temperature effect on oxygen permeability of edible protein-based films[J]. J Food Sci, 1993, 58: 212~214.

(上接第 113 页)

的乙醇),而其它三种是水相的(去离子水,NaCl溶液,NaOH溶液),所以在C与其它三者进行等量混合时,溶液中的蛋白质出现了不同程度的沉淀,使得溶液中的总蛋白及总硒含量降低了,对混合物的·OH清除率产生了不良影响。

3 结论

四种富硒灵芝粗蛋白都具有一定的·OH和O₂⁻清除活性,并且以水溶性富硒灵芝粗蛋白的抗氧化活性最高。每种粗蛋白对·OH的清除率与蛋白浓度之间的关系可以用对数(指数)方程来表示。各种粗蛋白之间不存在抗氧化活性的协同作用,而且醇溶性粗蛋白对其它三种蛋白还具有一定程度的拮抗作用。

参考文献:

- [1] Lin J M, Lin C C, Chen M F, et al. Radical scavenger and antihepatotoxic activity of Ganoderma formosanum, Ganoderma lucidum and Ganoderma neo-japonicum [J]. Journal of Ethnopharmacology, 1995, 47: 33~41.
- [2] Shi Y. Mushroom-derived preparations in the prevention of oxidative damage to cellular DNA. Ph D dissertation. Chinese University of Hong Kong, People's Republic of China, 2001.
- [3] Yen G C, Wu J Y. Antioxidant and radical scavenging properties of extracts from Ganoderma tsugae [J]. Food Chemistry, 1999, 65: 375~379.
- [4] 姚敏.富硒灵芝中硒含量的分布和赋存形态研究[J].上

海大学学报(自然科学版),1997,3(5):485~491.

[5] Zhao L, Zhao G, Zhao Z, et al. Selenium Distribution in a Se-Enriched Mushroom Species of the Genus Ganoderma [J]. Agriculture and Food Chemistry, 2004, 52: 3954~3959.

[6] Wasser S P, Weis A L. Medical properties of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: current perspective (review) [J]. Intl J Medicinal Mushrooms, 1999(1): 31~62.

[7] 莫定琪,倪悦勇,黄志.微波消解-ICP-AES法测定化妆品中无机元素的研究[J].光谱学与光谱分析,1999,19(4): 598~600.

[8] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent [J]. Journal of Biological Chemistry, 1951, 193: 265~275.

[9] Finkelstein E, Rosen G M, Rauckman E J. Spin trapping of superoxide and hydroxyl radical: practical aspects [J]. Arch Biochem Biophys, 1980, 200: 1~16.

[10] Grady J K, Chen Y, Chasteen N D, et al. Hydroxyl radical production during oxidative deposition of iron in ferritin [J]. J Biol Chem, 1989, 264: 20224~20229

[11] Finkelstein E, Rosen G M, Rauckman E J, et al. Spin trapping of superoxide [J]. Mol Pharmacol, 1979(6): 675~685.

[12] Zhao L, Zhao G, Hui B, et al. Effect of selenium on increasing the antioxidant activity of protein extracts from a selenium-enriched mushroom species of the Ganoderma Genus [J]. Journal of Food Science, 2004, 69: 183~187.