

山药糖蛋白微波辅助提取 及抗氧化活性研究

邵海^{1,2}, 龚钢明^{2,*}, 管世敏³

(1.上海海洋大学食品学院, 上海 200090;

2.上海应用技术学院香料香精技术与工程学院, 上海 200235;

3.上海师范大学生命与环境科学学院, 上海 200234)

摘要:采用正交实验得出了微波辅助提取山药糖蛋白的优化实验条件,即微波功率 200W、提取时间 1min、料液比 1:10。山药提取液经脱蛋白、透析,乙醇沉淀物经 DEAE-52 及 Sephadex G-75 柱层析得到一种糖蛋白组分,经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,相对分子量为 35200Da。利用 α -脱氧核糖法、邻苯三酚自氧化法进行抗氧化实验,结果表明,该糖蛋白有一定抗氧化能力。

关键词:山药,糖蛋白,微波技术,纯化,抗氧化活性

Microwave assisted extraction and antioxidation activity of glycoprotein from Chinese yam

SHAO Hai^{1,2}, GONG Gang-ming^{2,*}, GUAN Shi-min³

(1.College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 200090, China;

2.School of Perfume and Aroma Technology, Shanghai Institute of Technology, Shanghai 200235, China;

3.College of Life and Environment Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China)

Abstract: Through orthogonal test, the extraction of glycoprotein from Chinese yam by microwave assisted was studied. The result showed that the optimum extracting condition was as follows; microwave power was 200W, extracting time was 1min, material-water ratio was 1:10. One glycoprotein constituent was isolated from Chinese yam with microwave extraction, Sevage deproteinization, dialysis, alcohol sedimentation, DEAE-52 and Sephadex G-75 column chromatography. Its molecular weight was 35200Da with SDS-PAGE. The antioxidant activity was tested using α -Deoxyribose method and Pyrogallol autoxidation method. The result showed that glycoprotein from Chinese yam had capacity of antioxidation.

Key words: Chinese yam; glycoprotein; microwave technique; purification; antioxygenic activity

中图分类号: TS255.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2009)05-0131-03

山药为薯蓣科 (*Dioscoreaceae*) 植物薯蓣 (*Dioscorea opposita* Thunb.) 的干燥根茎。糖蛋白 (glycoprotein) 是一种由糖类同多肽或蛋白质以共价键连接而形成的结合蛋白^[1]。山药糖蛋白 (Chinese yam glycoprotein) 是从山药的根茎中分离得到的一种有效成分。本文以山药粗糖蛋白得率为考察指标, 采用 $L_9(3^3)$ 正交实验对提取过程中微波功率、提取时间、料液比 3 个因素进行了优选研究, 并且对山药粗糖蛋白进行分离、纯化, 获得糖蛋白纯品, 并测定了糖蛋白的抗氧化活性。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

山药 江苏新鲜山药, 购自上海市冠生园农贸市场; 透析袋 美国 Sigma 公司, 分子截量 10000Da; DEAE-52 英国 Whatman 公司; Sephadex G-75 瑞典 Pharmacia 公司; 低分子量标准蛋白质 上海升正生物技术有限公司; 牛血清白蛋白 上海昱民生物技术有限公司; 其它试剂 均为化学纯或分析纯。

紫外分光光度计 UV-2000, 尤尼柯仪器有限公司; 微波炉 WP800, 顺德格兰仕电器实业有限公司; 电泳仪 DYY-2C, 北京六一仪器厂; 旋转蒸发器 R201, 上海申胜生物技术有限公司; 自动部分收集器 DBS-160F, 上海精科实业有限公司; 高速组织捣碎机 DS-1, 上海标本模型厂。

收稿日期: 2008-09-01 * 通讯联系人

作者简介: 邵海 (1984-), 男, 硕士研究生, 主要从事生物技术方面的研究。

1.2 实验方法

1.2.1 山药糖蛋白的微波辅助提取与纯化 称取一定量的新鲜山药,加适量水,用组织捣碎机粉碎后,微波辅助提取,离心,收集上清液,减压浓缩。加入氯仿:正丁醇=4:1(V/V)的Sevage试剂,以充分去除脂质、游离蛋白质,然后样液取水层透析,收集透析袋内液,离心,上清液即为山药糖蛋白粗品液,粗品液依次经DEAE-52柱层析($\Phi 1.0\text{cm} \times 20\text{cm}$),去离子水、0.05mol/L氯化钠、0.1mol/L氯化钠溶液阶段洗脱;Sephadex G-75柱层析($\Phi 1.0\text{cm} \times 40\text{cm}$),去离子水洗脱,逐管采用在280nm下和硫酸-苯酚法在490nm下检测其吸光度,并分别绘制曲线,取两个曲线峰重叠的管,可得到纯品山药糖蛋白。

1.2.2 正交实验设计 以粗糖蛋白为考察指标,用正交实验法优选山药糖蛋白最佳提取工艺。以微波功率、提取时间和料液比为影响因素,每个因素设置3个水平,见表1。

表1 因素水平表

水平	因素		
	A 微波功率 (W)	B 提取时间 (min)	C 料液比 (W/W)
1	200	1	1:5
2	800	2	1:10
3	1200	3	1:15

1.2.3 标准曲线的绘制

1.2.3.1 葡萄糖标准曲线^[2] 精确称取分析纯恒重葡萄糖10mg,加水溶解后定容至250mL,配制成40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液。取16支试管,分成8组,分别加入标准糖溶液0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8mL,各以水补足至2.0mL,然后加入5%苯酚1mL,摇匀,加浓硫酸5.0mL,摇匀,室温放置20min,490nm下测吸光值。以2.0mL去离子水同上操作作为空白。以糖含量C为横坐标,吸光值A为纵坐标,进行线性回归,得回归方程: $A = 0.0129C - 0.0051$, $r = 0.9967$ 。线性范围:8~36 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.2.3.2 蛋白质标准曲线^[2] 精确称取牛血清白蛋白100mg,加水溶解后定容至100mL,配制成1mg/mL的溶液。取16支试管,分成8组,分别加入标准蛋白溶液0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0mL,各以水补足至4.0mL,摇匀,280nm下测吸光值。以4.0mL去离子水同上操作作为空白。以蛋白含量C为横坐标,吸光值A为纵坐标,进行线性回归,得回归方程: $A = 0.00064C - 0.0008$, $r = 0.9999$ 。线性范围:125~1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.2.4 纯度鉴定及分子量测定 采用SDS-PAGE电泳,分离胶浓度14%,Tris-甘氨酸电极缓冲液,水:甲醇:乙酸(5:5:1)的0.05%考马斯亮蓝R250染色液,水:甲醇:乙酸(35:2:3)的脱色液,采用低分子量标准蛋白质作为标准,溴酚蓝为指示剂,以标准蛋白质的相对迁移率u为横坐标,标准蛋白质分子量的对数lgMr为纵坐标,根据糖蛋白的迁移率从标准曲线上读取分子量^[3]。

1.2.5 羟基自由基清除率的测定 采用 α -脱氧核糖法^[4],取0.2mL FeSO_4 -EDTA混合液(10mmol/L)于具塞试管中,加入0.2mL的 α -脱氧核糖溶液

(20mmol/L),然后再加入0.2mL测试样品,并用 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ - KH_2PO_4 缓冲液(pH为7.4)定容至1.8mL,最后加入0.2mL的 H_2O_2 (10mmol/L),37 $^\circ\text{C}$ 水浴1h,然后加入2.8%的三氯乙酸1mL终止反应,再加入1%的硫代巴比妥酸1mL,混匀后沸水浴中加热10min,冷却后,取1mL溶液与4mL去离子水混匀,于532nm处测吸光度 A_s 。不加样品,同样操作处理,测定其对比吸光度 A_c 。

自由基清除能力 $\text{SA}(\%) = (A_s - A_c) / A_s \times 100\%$

1.2.6 类SOD活性测定 采用邻苯三酚自氧化法^[2]。测定时,在试管中加入4.5mL Tris-HCl-EDTA缓冲液(0.05mol/L的Tris-HC缓冲液,内含0.001mol/L的EDTA溶液,调pH为8.2),于25 $^\circ\text{C}$ 保温20min。然后加入0.01mL预热为25 $^\circ\text{C}$ 的0.045mol/L的邻苯三酚(对照管用0.01mol/L HCl代替),迅速摇匀倒入1cm比色杯,在325nm下,每隔30s测吸光度一次,要求自氧化速率控制在0.070A/min。

$$\text{单位体积活力}(\text{U}/\text{mL}) = \frac{\frac{0.070 - \text{样液速率}}{0.070} \times 100\%}{50\%} \times$$

$$\text{反应液总体积} \times \frac{\text{样液稀释倍数}}{\text{样液体积}}$$

2 结果与分析

2.1 正交实验结果

山药糖蛋白微波辅助提取实验结果见表2。方差分析的结果表明:以粗糖蛋白得率为指标,对山药糖蛋白得率影响因素的顺序为 $A > B > C$,确定最优工艺为微波功率200W、提取时间1min、料液比1:10。

表2 $L_9(3^4)$ 正交实验设计及结果

实验号	A	B	C	误差	得率(%)
1	1	1	1	1	1.276
2	1	2	2	2	1.683
3	1	3	3	3	0.908
4	2	1	2	3	1.448
5	2	2	3	1	0.659
6	2	3	1	2	0.136
7	3	1	3	2	0.323
8	3	2	1	3	0.023
9	3	3	2	1	0.014
K_1	3.867	3.047	1.435	1.949	
K_2	2.243	2.365	3.145	2.142	
K_3	0.360	1.058	1.890	2.379	
k_1	1.289	1.015	0.478	0.649	
k_2	0.747	0.788	1.048	0.714	
k_3	0.120	0.352	0.630	0.793	
R	1.169	0.663	0.570	0.144	

2.2 纯化

过DEAE-52和Sephadex G-75层析柱的流速均为0.4mL/min。经DEAE-52层析柱的洗脱液,依次是去离子水(1~24管)、0.05mol/L NaCl(25~50管)、0.1mol/L NaCl(51~80管),洗脱曲线见图1。经Sephadex G-75层析柱的洗脱液为去离子水,洗脱曲线见图2。

2.3 纯度鉴定及分子量测定

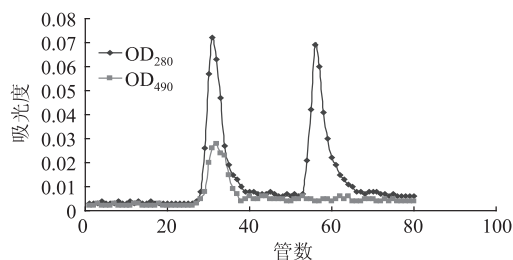


图1 糖蛋白在 DEAE-52 层析柱上的洗脱图

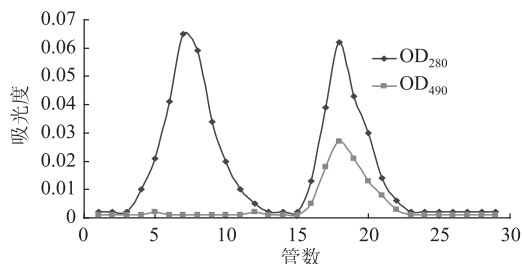


图2 糖蛋白在 Sephadex G-75 层析柱上的洗脱图

山药糖蛋白 SDS-PAGE 电泳图谱为一条带,说明该糖蛋白为电泳纯,见图3。以标准蛋白质的相对迁移率 u 为横坐标,标准蛋白质分子量的对数 $\lg Mr$ 为纵坐标,进行线性回归,得回归方程: $\lg Mr = -1.658u + 5.4367$, $r = 0.9932$ 。山药糖蛋白 (GLP) 的迁移率为 0.5370,由蛋白质标准曲线可知,GLP 的分子量为 35200Da。GLP 的糖含量为 16.59%,蛋白质含量为 83.41%。

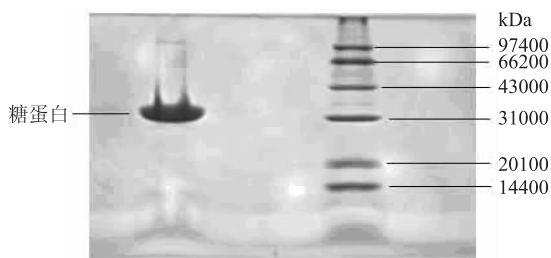


图3 糖蛋白的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图

2.4 山药糖蛋白的抗氧化活性

2.4.1 羟自由基清除率的测定 分别加入分离纯化的山药糖蛋白 0.001、0.01、0.1、1.0、10.0mg/mL 浓度梯度,每个梯度 3 个重复,计算平均值。图4 结果表明:山药糖蛋白对羟自由基 ($OH\cdot$) 有清除作用,并且随着浓度的增加,清除羟自由基的作用增强。

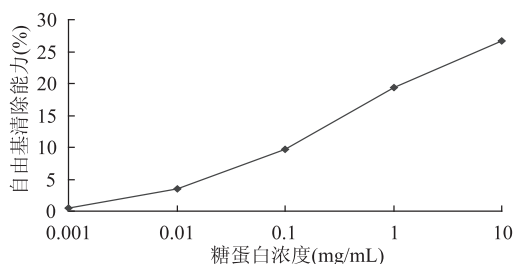


图4 不同浓度糖蛋白对羟基自由基清除率的影响

2.4.2 类 SOD 活性测定 分别加入分离纯化的山药糖蛋白 0.001、0.01、0.1、1.0、10.0mg/mL 浓度梯度,每个梯度 3 个重复,计算平均值。从图5 可以看出,山药糖蛋白能抑制邻苯三酚自氧化速率,因对超氧阴离子自由基 ($O_2^{\cdot-}$) 具有一定的清除能力。随着浓度的升高,清除率逐渐升高。

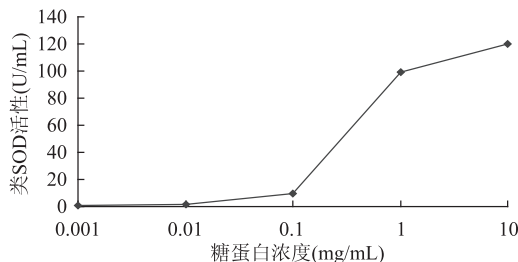


图5 不同浓度糖蛋白对类 SOD 活性的影响

3 结论

本文通过正交实验,得出提取山药糖蛋白的优化工艺条件,粗糖蛋白经 DEAE-52 柱层析和 Sephadex G-75 柱层析分离纯化后,得到纯度很高的山药糖蛋白,分子量为 35200Da,且该糖蛋白具有抗氧化的作用。

参考文献:

- [1] 孙册,莫汗庆. 糖蛋白与蛋白聚糖结构、功能和代谢 [M]. 北京:科学出版社,1998.
- [2] 余瑞元,陈来同,袁明秀,等. 生物化学实验原理和方法 [M]. 北京:北京大学出版社,2005.
- [3] 田亚平. 生化分离技术 [M]. 北京:化学工业出版社,2006.217.
- [4] 周站平,刘鲁宁,陈秀兰,等. 光照、变性剂和 pH 对钝顶螺旋藻类藻蓝蛋白抗氧化活性的影响 [J]. 海洋与湖沼, 2005,36(2):179~185.

及其细菌素生物学特征研究 [J]. 食品与发酵工业,1998,25(1):1~5.

- [6] 石金舟,陈丽园. 1 株产细菌素乳酸菌的筛选和鉴定 [J]. 中国微生物学杂志,2005,17(6):413~414.
- [7] 张艾青,刘书亮,教灵. 产广谱细菌素乳酸菌的筛选和鉴定 [J]. 微生物学通报,2007,34(4):753~756.
- [8] 姚丽娅,徐为民,诸永志,等. 产细菌素乳酸菌的筛选及鉴定 [J]. 食品工业科技,2008,29(1):160~164.
- [9] 东秀珠,蔡妙英编著. 常见细菌系统鉴定手册 [M]. 北京:科学出版社,2001.
- [10] 凌代文,东秀珠编著. 乳酸菌分类鉴定及实验方法 [M]. 北京:中国轻工业出版社,1999.

参考文献:

- [1] Jack R W, Tagg J R, Ray B. Bacteriocins of Gram positive bacteria [J]. Microbiological Reviews, 1995, 59: 171~200.
- [2] Cleveland J, Montville TJ, Nes I F, et al. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation [J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 71: 1~20.
- [3] Deegan L H, Cotter P D, Hill C, et al. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension [J]. International Dairy Journal, 2006, 16: 1058~1071.
- [4] 朱小乔,刘通讯. 极具潜力的天然防腐剂—Nisin [J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(4): 66~69.
- [5] 李平兰,张麓,江江湖. 产细菌素植物乳杆菌菌株的筛选

(上接第 130 页)