



引用格式:李松林,林静,蒋长兴,等. 枸杞多肽的制备及其抗氧化活性研究[J]. 轻工学报, 2016,31(6):31-37.

中图分类号:TS255.1 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2016.6.005

文章编号:2096-1553(2016)06-0031-07

枸杞多肽的制备及其抗氧化活性研究

Study on preparation and antioxidant activity of the *Lycium barbarum* polypeptide

李松林¹,林静²,蒋长兴¹,陈晓明¹,王小花¹,叶华¹,王辉¹

LI Song-lin¹, LIN Jing², JIANG Chang-xing¹, CHEN Xiao-ming¹, WANG Xiao-hua¹, YE Hua¹, WANG Hui¹

1. 淮阴工学院 生命科学与食品工程学院, 江苏 淮安 223003;

2. 淮安市科学技术情报研究所, 江苏 淮安 223002

1. Faculty of Life Science and Food Engineering, Huaiyin Institute of Technology, Huai'an 223003, China;

2. Institute of Scientific and Technical Information of Huai'an, Huai'an 223003, China

关键词:

枸杞多肽; 酶解; 纯化; 抗氧化活性

Key words:

Lycium barbarum polypeptide; enzymolysis; purification; antioxidant activity

摘要:研究了中性蛋白酶和木瓜蛋白酶复合水解制备枸杞活性肽的工艺条件,并采用离子交换层析和凝胶柱层析对酶解产物进行纯化,以制备具有较高抗氧化活力的枸杞多肽。以 DPPH·清除率为指标,通过响应面优化得到最佳酶解工艺条件:酶解温度 51 ℃,中性蛋白酶与木瓜蛋白酶质量比 1:2.65,酶解时间 4.3 h, pH = 7.0。此条件下得到的枸杞多肽对 DPPH·清除率为 (23.32 ± 0.47)%。分别采用 DEAE 阴离子交换层析和 Sephadex G-25 凝胶柱层析对枸杞多肽进行分离,最终获得 DPPH·和 OH·清除率分别为 (72.65 ± 1.84)% 和 (58.72 ± 1.88)% 的 A-1 组分,该组分的 DPPH·清除能力、ABTS + ·清除能力和 OH·清除能力均随浓度的增大而提高。

收稿日期:2016-05-28

基金项目:江苏省科技厅科技型企业技术创新项目(BC2013427);淮安市科技支撑计划项目(HAN2015003)

作者简介:李松林(1982—),男,安徽省淮北市人,淮阴工学院副教授,博士,主要研究方向为食品资源的开发与利用。

Abstract: Enzymatic preparation conditions of *Lycium barbarum* bioactive peptides which were derived from hydrolyzation by compound of neutral protease and papain were studied. And then enzymatic hydrolysate was purified by ion-exchange column chromatography and gel filtration chromatography in order to prepare antioxidative bioactive peptides. Based on the DPPH · radical scavenging rate, the preparation method was optimized by response surface methodology. The optimal temperature, composite enzyme quality ratio, time and pH were 51 °C, 1 : 2.65, 4.3 h and 7.0, which resulted in a DPPH · radical scavenging rate of (23.32 ± 0.47)%. Then the enzymatic hydrolysate flowed through anion-exchange chromatography and sephdex G-25 gel chromatography in order to get purified polypeptide. Component A-1 was acquired which had the DPPH · and OH · removal rate of (72.65 ± 1.84)% and (58.72 ± 1.88)% respectively. DPPH ·, ABTS + · and OH · radical scavenging activity of protein peptide A-1 increased with the increase of concentration.

0 引言

枸杞(*Lycium barbarum*)具有补肝肾、增强免疫系统功能、抑制脂肪在肝细胞沉淀聚集、促进肝细胞再生、抗氧化和降低血糖等作用^[1-2],在我国西北地区分布广泛.近年来,对枸杞的药理、药用活性成分和综合利用等方面研究较多,但主要集中于枸杞的含糖、维生素、甜菜碱和黄酮类等方面.对于枸杞蛋白的研究多集中于其稳定性方面,而对于其蛋白水解产生的活性多肽的研究甚少^[3-4].已知枸杞全果粗蛋白含量10.6 wt%左右,含有18种氨基酸,其中8种为人体必需氨基酸^[5].鉴于此,本课题拟采用酶法制备枸杞多肽,并对其抗氧化活性进行研究,以期为枸杞的开发利用提供理论参考.

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

主要材料:宁夏枸杞,无病虫害和霉变,购于淮安厚生药房.

主要试剂:木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶、纤维素酶、胃蛋白酶,均为分析纯,采购于江苏锐阳生物科技有限公司;DEAE-52阴离子交换树脂和SephadexG-25葡聚糖凝胶,购于南京奥多福尼生物科技有限公司;二苯代苦味酰基自由基(DPPH),2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)和

谷胱甘肽(GSH),均为生物试剂,美国Sigma-aldrich公司生产;其他试剂均为分析纯,购于国药集团化学试剂有限公司.

主要仪器:BS-40A型自动部分收集器,上海嘉鹏科技有限公司产;层析柱(18~40 cm),上海五相仪器仪表有限公司产;Free Zone 6 L型真空冷冻干燥机,美国Labconco公司产.

1.2 实验方法

1.2.1 制备枸杞多肽的工艺流程 枸杞→干燥→研磨→枸杞粉→脱脂→碱提酸沉→离心→沉淀物→真空冷冻干燥→枸杞蛋白→酶解→灭酶→离心→上清液→浓缩→真空冷冻干燥→枸杞多肽.

1.2.2 酶解工艺的优化 预实验中分别选择胃蛋白酶、碱性蛋白酶、纤维素蛋白酶、中性蛋白酶和木瓜蛋白酶在各自的适宜条件下酶解枸杞蛋白,在获得的酶解产物中以DPPH·清除活性最好的中性蛋白酶和木瓜蛋白酶进行复配实验.采用4因素3水平二次回归试验设计,研究温度 X_1 、中性蛋白酶和木瓜蛋白酶质量比(以下简称加酶比) X_2 ,酶解时间 X_3 ,pH值 X_4 对水解产物DPPH·自由基清除能力(Y)的影响,优化酶解条件.二次回归试验亦称响应面试验.各因素水平见表1.

1.2.3 枸杞多肽的分离纯化

1.2.3.1 DEAE-52离子交换层析 将2 mL样液加入到层析柱中,分别使用水和0.1 mol/L,

表1 响应面试验各因素水平表

Table 1 Factor levels table of response surface experiment

因素	水平		
	-1	0	1
$X_1/^\circ\text{C}$	45	50	55
X_2	1:2	1:3	1:4
X_3/h	4.0	4.5	5.0
X_4	6.0	6.5	7.0

0.5 mol/L, 1.0 mol/L 的 NaCl 溶液逐级洗脱, 流速为 0.8 mL/min, 每 10 min 收集一管, 并于 280 nm 波长处测吸光值, 根据检测到的峰值合并试管内溶液, 比较各峰 DPPH· 及 OH· 清除能力, 选择活性最高的组分进行收集, 备用。

1.2.3.2 Sephadex G-25 凝胶过滤层析 凝胶装柱后, 用 3 倍于柱床体积的 0.02 mol/L, pH=6.5 的 NH_4AC 溶液洗涤平衡。平衡结束之后, 将 2 mL 的样液加入到层析柱中, 以水为流动相, 设定流速为 0.6 mL/min, 每 10 min 收集一管, 并于 280 nm 波长处测吸光值, 根据检测到的峰值合并试管内溶液, 比较各峰 DPPH· 及 OH· 清除能力, 选择活性最高的组分进行收集, 真空冷冻干燥之后备用。

1.2.4 枸杞多肽抗氧化功能评价 DPPH· 自由基清除能力的测定参照 Z. X. Wang 等^[6]的测定方法; ABTS + · 清除能力的测定参照 D. Kumar 等^[7]的测定方法; OH· 清除能力的测定参照 T. P. Schultz 等^[8]的测定方法。

1.2.5 数据处理 利用 Design-Expert 软件和 SPSS 23.0 软件对数据进行分析。

2 结果与讨论

2.1 酶解工艺的优化

响应面试验设计和结果见表 2。采用 Design-Expert 软件对表 2 中的试验设计与结果进行回归拟合, 得到 DPPH· 清除率对温度、加酶比、时间和 pH 的二次多项回归模型, 即

$$Y = 24.93 + 1.84X_1 - 0.3X_2 - 0.05X_3 + 0.41X_4 - 2.97X_1X_2 + 0.77X_1X_3 + 1.59X_1X_4 + 0.042X_2X_3 + 1.75X_2X_4 - 3.41X_3X_4 - 7.04X_1^2 - 3.37X_2^2 - 3.80X_3^2 - 3.82X_4^2$$

对此模型进行方差分析, 结果见表 3。分析结果表明交互项 X_1X_4 与 X_2X_4 差异性达到显著水平 ($P < 0.05$), 一次项 X_1 , 交互项 X_1X_2 , X_3X_4 及二次项 X_1^2 , X_2^2 , X_3^2 , X_4^2 差异性极显著 ($P < 0.01$), 而 X_2 , X_3 , X_4 , X_1X_3 与 X_2X_3 差异性不显

表2 响应面试验设计和结果

Table 2 Design and test results of the response surface experiment

编号	$X_1/^\circ\text{C}$	X_2	X_3/h	X_4	Y/%
1	0	0	-1	1	20.36
2	0	-1	-1	0	18.17
3	1	1	0	0	10.70
4	0	0	0	0	25.79
5	-1	0	-1	0	13.55
6	0	0	0	0	24.81
7	-1	-1	0	0	12.20
8	0	1	-1	0	18.26
9	0	1	0	-1	15.96
10	0	0	0	0	25.18
11	0	-1	0	1	15.71
12	0	1	1	0	17.99
13	1	0	-1	0	16.06
14	0	0	-1	-1	12.27
15	0	-1	1	0	17.73
16	-1	1	0	0	15.78
17	-1	0	1	0	10.26
18	1	0	0	-1	15.28
19	0	-1	0	-1	19.08
20	-1	0	0	-1	12.37
21	1	0	0	1	19.50
22	-1	0	0	1	10.22
23	0	0	1	-1	20.89
24	0	0	1	1	15.35
25	1	0	1	0	15.85
26	0	0	0	0	23.51
27	1	-1	0	0	19.01
28	0	0	0	0	25.38
29	0	1	0	1	19.59

表3 二次回归方程的方差分析

Table 3 Variance analysis of the quadratic regression equation

方差	自由度	平方和	均方	F 值	Pr > F
X_1	1	40.41	40.41	19.1	0.0006**
X_2	1	1.09	1.09	0.52	0.4843
X_3	1	0.03	0.03	0.014	0.9069
X_4	1	1.98	1.98	0.94	0.3493
X_1X_2	1	35.34	35.34	16.7	0.0011**
X_1X_3	1	2.37	2.37	1.12	0.3077
X_1X_4	1	10.14	10.14	4.79	0.046*
X_2X_3	1	7.23E-03	7.23E-03	3.41E-03	0.9542
X_2X_4	1	12.25	12.25	5.79	0.0305*
X_3X_4	1	46.44	46.44	21.95	0.0004**
X_1^2	1	321.66	321.66	152.01	<0.0001**
X_2^2	1	73.54	73.54	34.75	<0.0001**
X_3^2	1	93.52	93.52	44.19	<0.0001**
X_4^2	1	94.5	94.5	44.66	<0.0001**
模型	14	555.75	39.7	18.76	<0.0001**
失拟项	10	26.59	2.66	3.5	0.1191
误差	4	3.04	0.76		
总和	28	585.38			

注: * 表示差异显著 ($P < 0.05$), ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$).

著 ($P > 0.01$). 即本实验中温度与加酶比、温度与 pH、加酶比与 pH、时间与 pH 之间的交互作用影响显著, 各交互作用对枸杞多肽 DPPH · 清除率影响的响应面图如图 1 所示. 由图 1 可知, 温度对 DPPH · 清除率的影响最为显著, 表现为曲线较陡; 而 pH 和加酶比的影响次之, 表现为曲线较为平滑, 且随其数值的变化, 响应值变化较小. 通过二次响应面回归分析, 去一阶偏倒数等于 0, 得到回归方程稳定点 X_1, X_2, X_3, X_4 的编码值分别为 0.19, 0.13, -0.43, 1.00, 即酶解温度 50.95 °C, 加酶比 1 : 2.65, 酶解时间 4.285 h, 酶解 pH = 7.0, 此时的枸杞多肽 DPPH · 清除率最高, 达到 (22.70 ± 0.35)%. 考虑到实验的可行性, 实际酶解条件修改为: 酶解温度 51 °C, 加酶比 1 : 2.65, 酶解时间 4.3 h, 酶解 pH = 7.0, 在此优化条件下重复实

验 3 次, DPPH · 清除率为 (23.32 ± 0.47)%, 与预测值较为接近. 因此, 运用此模型得到的提取条件精确可靠, 具有实用价值.

2.2 离子交换层析分离纯化

将 2 mL 离心后的酶解液加到 DEAE - 52 阴离子交换层析柱上进行逐级洗脱, 得到的洗脱曲线见图 2. 收集到 5 个组分的色谱峰: A 组分得率为 10.02%, 蛋白质含量为 10.62 μg/mL; B 组分得率为 4.96%, 蛋白质含量为 9.01 μg/mL; C 组分得率为 8.96%, 蛋白质含量为 7.69 μg/mL; D 组分得率为 7.46%, 蛋白质含量为 3.54 μg/mL; E 组分得率为 5.62%, 蛋白质含量为 2.85 μg/mL. 随后对 5 个组分进行 DPPH · 和 OH · 清除率实验, 结果见图 3. 由图 3 可见, 在 50 mg/mL 浓度下, A, B, C, D 和 E 组分对 DPPH · 清除率分别为 (73.58 ± 1.26)%, (67.91 ± 1.45)%, (34.40 ± 2.06)%, (65.43 ± 3.07)%, (62.41 ± 2.46)%; 对 OH · 清除率分别为 (60.16 ± 2.31)%, (45.45 ± 1.87)%, (30.08 ± 0.65)%, (34.15 ± 2.41)%, (26.83 ± 1.96)%. A 组分活性最好且组分得率最高, 故将其用做进一步纯化.

2.3 Sephadex G - 25 分离纯化

将上述经离子交换层析分离出的 A 组分取 2 mL, 使用 Sephadex G - 25 凝胶层析柱进行进一步分离洗脱, 曲线见图 4. 图 4 显示, A 组分经凝胶柱层析后获得组分 A - 1 和 A - 2, 得率分别为 5.64% 和 4.96%. 测得 A - 1 和 A - 2 组分的 DPPH · 清除率分别为 (72.65 ± 1.84)% 和 (62.20 ± 1.34)%; OH · 清除率分别为 (58.72 ± 1.88)% 和 (46.05 ± 2.12)%. 故选择活性最好的组分 A - 1 做进一步的抗氧化活性研究.

2.4 抗氧化活性研究

DPPH · 清除率是快速定量分析多肽作为电子受体转移电子能力的通用方法^[9]. 枸杞多肽 A - 1 组分对 DPPH · 自由基的清除率如表 4

所示,并与 GSH 作对比. 在 $0.2 \sim 1.2 \text{ mg/mL}$ 的浓度范围内, A-1 对 DPPH· 自由基的清除能力与样品的浓度呈明显的线性关系,清除能力

随浓度的升高而增强. A-1 对 DPPH· 自由基的半数有效清除浓度 $IC_{50} = 1.19 \text{ mg/mL}$. ABTS + · 在抗氧化多肽提供的电子作用下生成 ABTS,

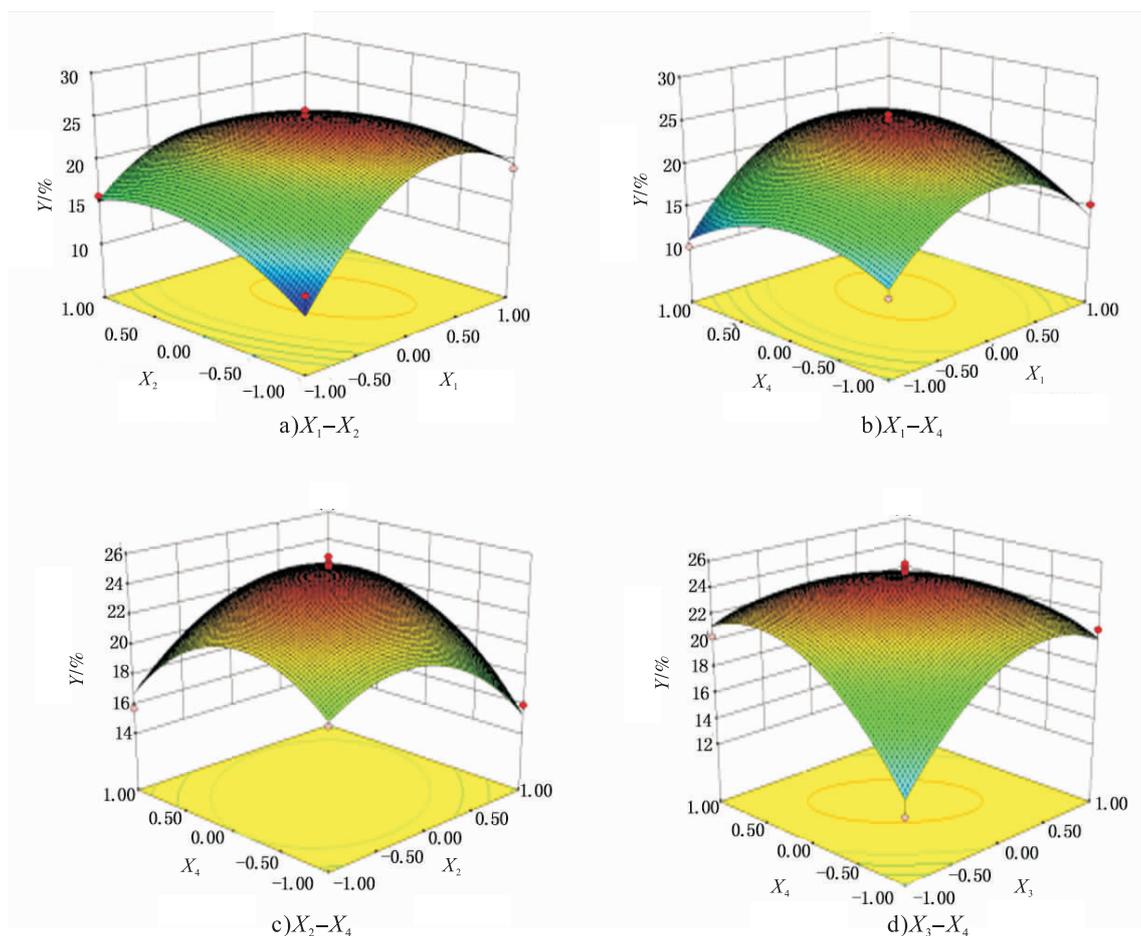


图 1 不同自变量交互作用对枸杞多肽 DPPH· 清除率影响的响应面图

Fig. 1 Response surface for the interaction effects of independent variables on the DPPH· radical scavenging rate of *Lycium barbarum* polypeptide

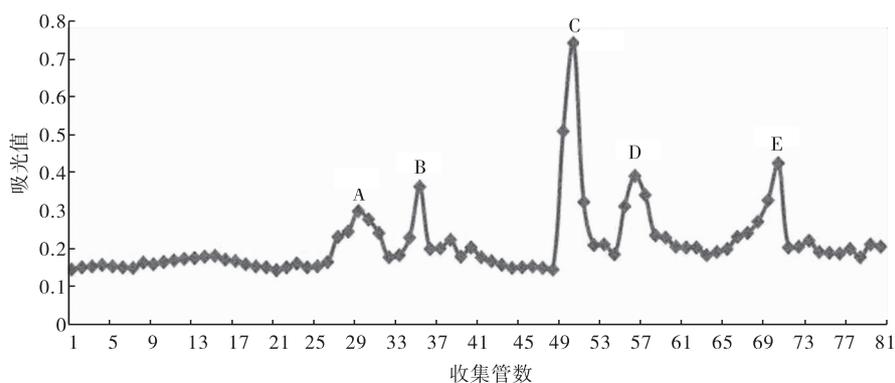


图 2 DEAE-52 阴离子交换层析洗脱曲线

Fig. 2 Elution curves of DEAE-52 anion exchange chromatography

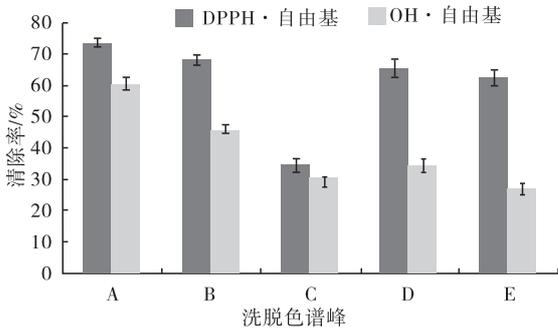


图3 离子交换层析洗脱峰的 DPPH· 和 OH· 的清除率

Fig.3 DPPH· and OH· radical scavenging rate of Ion exchange chromatography elution peak

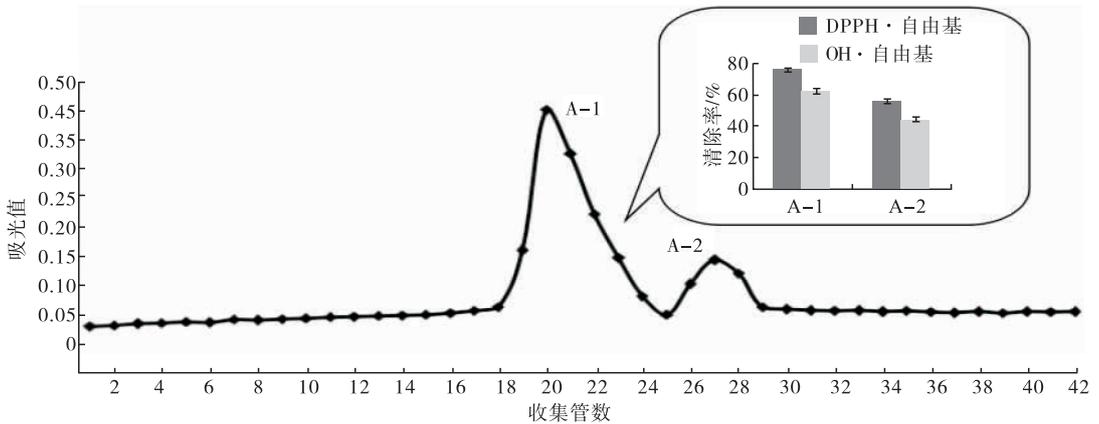


图4 Sephadex G-25 凝胶柱层析洗脱曲线

Fig.4 Elution curves of Sephadex G-25 gel column chromatography

表4 枸杞多肽 A-1 的 DPPH·, ABTS + · 和 OH· 的清除能力

表4 DPPH·, ABTS + · and OH· scavenging activity of *Lycium barbarum* polypeptide A-1

样品	浓度/ (mg · mL ⁻¹)	DPPH· 清除 能力/%	ABTS + · 清除 能力/%	OH· 清除 能力/%
A-1	0.2	6.21 ± 0.34	12.73 ± 0.83	10.62 ± 0.51
	0.4	10.34 ± 0.65	16.34 ± 0.46	15.39 ± 0.72
	0.6	13.76 ± 0.21	23.56 ± 0.34	36.92 ± 0.33
	0.8	19.59 ± 0.05	31.65 ± 0.33	49.21 ± 0.63
	1.0	34.28 ± 0.23	44.93 ± 0.21	59.33 ± 0.23
	1.2	50.21 ± 0.43	59.21 ± 0.10	72.59 ± 0.15
GSH	0.2	18.68 ± 0.72	27.56 ± 0.37	30.12 ± 0.56
	0.4	26.93 ± 0.07	45.32 ± 0.28	33.25 ± 0.32
	0.6	33.41 ± 0.12	65.56 ± 0.43	46.63 ± 0.41
	0.8	46.67 ± 0.43	80.32 ± 0.55	70.38 ± 0.23
	1.0	62.32 ± 0.38	85.98 ± 0.32	78.35 ± 0.56
	1.2	81.23 ± 0.32	90.32 ± 0.83	91.78 ± 0.83

3 结论

通过酶解的方式水解枸杞蛋白可以得到具有抗氧化活性的多肽. 确定酶解提取枸杞多肽的最佳工艺条件为: 酶解温度 51 °C, 中性蛋白酶与木瓜蛋白酶加酶比 1 : 2.65, 酶解时间 4.3 h, 酶解 pH = 7.0. 分别采用 DEAE 阴离子交换层析和 Sephadex G-25 凝胶柱层析对枸杞多肽进行分离, 最终获得 DPPH· 和 OH· 清除率分别为 (72.65 ± 1.84)% 和 (58.72 ± 1.88)% 的 A-1 组分. 枸杞蛋白多肽 A-1 组分的 DPPH·, ABTS + · 和 OH· 清除能力均随着浓度的增大而提高.

参考文献:

- [1] 崔树德. 中药大全[M]. 哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,1997.
- [2] 于宏. 枸杞子的化学成分与生物活性[J]. 国外医药,2007,22(2):45.
- [3] LIU W, LIU Y M, ZHU R, et al. Structure characterization, chemical and enzymatic degradation, and chain conformation of an acidic polysaccharide from *Lycium barbarum* L. [J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 147(20):114.
- [4] MARTINO F, LUCIANA T, CARMELA D A, et al. NMR-based identification of the phenolic profile of fruits of *Lycium barbarum* (goji berries): Isolation and structural determination of a novel *N*-feruloyl tyramine dimer as the most abundant antioxidant polyphenol of goji berries [J]. Food Chemistry, 2016, 194:1254.
- [5] 张英,唐玉峰,白杰. 宁夏枸杞营养成分分析及其应用研究进展[J]. 保鲜与加工, 2009, 9(4):2.
- [6] WANG Z X, LIU Y, LI H, et al. Rice proteins, extracted by alkali and α -amylase, differently affect in vitro antioxidant activity [J]. Food Chemistry, 2016, 206:137.
- [7] KUAMR D, CHATLI M K, SINGH R, et al. Antioxidant and antimicrobial activity of camel milk casein hydrolysates and its fractions [J]. Small Ruminant Research, 2016, 139:20.
- [8] SCHULTZ T P, NICHOLAS D D, HENRY W P, et al. Review of laboratory and outdoor exposure efficacy results of organic biocide: antioxidant combinations, an initial economic analysis and discussion of a proposed mechanism [J]. Wood and Fiber Science, 2005, 37(1):175.
- [9] SCHAICH K M, TIAN X, XIE J. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays [J]. Journal of Functional Foods, 2015, 14:111.
- [10] PARSA A, SALOUT S A. Investigation of the antioxidant activity of electrosynthesized polyaniline/reduced graphene oxide nanocomposite in a binary electrolyte system on ABTS and DPPH free radicals [J]. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2016, 760:113.