

紫红薯糖蛋白体外抗氧化活性研究

罗秋水, 上官新晨*, 蒋艳, 吴少福

(江西农业大学 食品科学与工程学院, 江西 南昌 330045)

摘要: 研究紫红薯糖蛋白的体外抗氧化活性。使用水提醇沉方法、Sevage 法除游离蛋白, 用 DEAE-52 纤维素层析及 Sephadex G-75 纯化制备糖蛋白。采用超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)、羟基自由基($\cdot OH$)、1,1-二苯基-2-苯胍自由基(DPPH \cdot)清除率测定法及还原力测定法评价紫红薯糖蛋白体外抗氧化活性。糖蛋白在 0~640 $\mu g/mL$ 内, 均具有明显的抗氧化活性, 随着质量浓度的增加活性增强; 其中在紫红薯糖蛋白的质量浓度为 640 $\mu g/mL$ 时, 对超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)清除作用达到 69.80%; 对羟基自由基($\cdot OH$)的清除作用达到 73.29%。

关键词: 糖蛋白; 抗氧化; 超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$); 羟基自由基($\cdot OH$); DPPH \cdot ; 还原力

中图分类号: TQ936.22⁺3 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2012)04-0809-05

Antioxidant Activity of Glycoprotein from the Purple Sweet Potato

LUO Qiu-shui, SHANGGUAN Xin-chen*, JIANG Yan, WU Shao-fu

(College of Food Science and Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: To study the anti-oxidant activity of glycoprotein from purple sweet potato. The glycoprotein from the purple sweet potato was extracted by water extracting-alcohol precipitating process, and the protein was removed by Sevage method. Then the glycoprotein was isolated and purified by cellulose column and Sephadex G-75. The antioxidant activity of purple sweet potato glycoprotein was evaluated by superoxide anion free radical ($O_2^{\cdot-}$), hydroxyl free radical ($\cdot OH$), 1,1-diphenyl-2-phenylhydrazine radical (DPPH \cdot) and reductive force. The glycoprotein powder has significant antioxidant activity in the range of 0-640 $\mu g/mL$ concentration, and the activity was enhanced with increased concentration. when the concentration of glycoprotein was 640 $\mu g/mL$, the clearance effect on superoxide anion free radical ($O_2^{\cdot-}$) could reach 69.80%, the clearance effect on hydroxyl free radical ($\cdot OH$) could reach 73.29%.

Key words: glycoprotein; antioxidant; superoxide anion free radical ($O_2^{\cdot-}$); hydroxyl free radical ($\cdot OH$); DPPH \cdot ; reductive force

紫红薯又名川山紫(*Dioscorea kooroo*)是从日本引进的一种红芋新品种,营养丰富,富含糖蛋白、色素^[1]、硒元素、糖蛋白、花青素和花色苷^[2]等。糖蛋白(glycoprotein)是一类糖类同多肽或蛋白质以共价键连接而形成的结合蛋白^[3],作为一种糖和蛋白质的复合物,具有多方面的生物活性,如抗氧化^[4]、免疫调节作用^[5-9]、体外抗肿瘤活性^[10]、降血脂^[11]等。对于紫红薯糖蛋白的研究,目前国内外鲜见有关紫红薯糖蛋白抗氧化方面的研究报道。因此本文为研究紫红薯产品的开发提供理论依据和参考价值。

收稿日期: 2012-02-20 修回日期: 2012-04-28

基金项目: 江西省教育厅重点项目(GJJ10018)

作者简介: 罗秋水(1977—)男,实验师,硕士,主要从事食品质量与安全研究, E-mail: lqsh2001@126.com; * 通讯

作者: 上官新晨,教授,博士,博士生导师, E-mail: shangguanxc_818@sina.com。

1 材料与方法

1.1 试验材料与设备

紫红薯(川山紫):江西鹰潭;牛血清白蛋白:标准品,上海振兴化工一厂;考马斯亮蓝 G-250:生化试剂,上海化学试剂有限公司;三羟甲基氨基甲烷(Tris):分析纯,Amresco;DEAE-52 纤维素:Whatman;SephadexG-75:Pharmacia;DPPH:分析纯,Sigma. 公司;邻苯三酚、邻二氮菲、硫酸亚铁、铁氰化钾、三氯乙酸、氯仿、正丁醇、磷酸、95%乙醇、苯酚、葡萄糖、浓硫酸、碳酸氢钠、氢氧化钠、盐酸、H₂O₂、FeCl₃均为分析纯。

KQ3200DA 数控超声清洗器,昆山市超声仪器有限公司;723 可见分光光度计,尤尼柯(上海)仪器有限公司;QT-2 漩涡混合器,上海琪特分析仪器有限公司;BS224S 电子天平,赛多利斯(北京)公司;LD4-20 低速离心机,北京医用离心机厂;JJ-2 组织捣碎匀浆机,常州国华电器有限公司;RE-52A 型旋转蒸发器:上海亚荣生化仪器厂;FD-1 真空冷冻离心机,北京博医康技术公司;BS-100A 自动部分收集器:上海沪西;HD-21-88 紫外检测仪,上海琦特;层析柱(1.5 cm × 33 cm),上海沪西;HW-2000 色谱工作站:千谱软件有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 紫红薯糖蛋白的制备 新鲜紫红薯洗净,破碎,按超声功率为 150 W、料液比为 1:10、提取次数为 3 次、超声时间为 30 min 的条件超声提取,过滤,离心(4 000 r/min,10 min),75%乙醇醇沉(3 次),离心(4 000 r/min,10 min),所得沉淀溶于蒸馏水,Sevage 法去除游离蛋白(3 次),离心,所得沉淀经真空冷冻干燥得到粗糖蛋白粉末。称取一定量的粗糖蛋白粉末溶解配成质量浓度为 10 mg/mL 后上 DE-AE-52 纤维素树脂柱,依次用 0.05、0.10、0.20、0.30、0.40、0.50 mol/L 的 NaHCO₃ 进行梯度洗脱,收集蛋白质和多糖重叠峰的洗脱液进行透析,真空冷冻干燥得到微红色紫红薯糖蛋白粉末,然后进行 SephadexG-75 纯化,收集蛋白质和多糖重叠峰的洗脱液进行透析、真空冷冻干燥得到白色紫红薯糖蛋白粉末,用 8~14 ku 透析袋流动蒸馏水透析 48 h,冷冻干燥,制得紫红薯糖蛋白。

1.2.2 紫红薯糖蛋白对超氧阴离子自由基(O^{-2·})的清除作用^[12-13] 采用邻苯三酚自氧化法,具体步骤是:按表 1 加入 Tris-HCl 缓冲液 4.5 mL,在 25 °C 恒温水浴 20 min,加入邻苯三酚,用漩涡混合器混匀,以空白作对照在 325 nm 波长下,每隔 0.5 min 记录 1 次值,连续 30 min。在同样条件下测定样品吸光值,氧化速率是指每分钟吸光度的增值。

$$\text{清除率 (E) \%} = \frac{\text{对照的氧化速率} - \text{样品的氧化速率}}{\text{对照的氧化速率}} \times 100$$

表 1 邻苯三酚自氧化法加样

Tab.1 The mixing sample form of adjacent pyrogallol oxidation

试剂 Reagent	空白/mL Blank	自氧化/mL Self oxidtion	样品管/mL Sample tube
Tris-HCl	4.50	4.50	4.50
蒸馏水 Distilled water	0.50	0.40	-
邻苯三酚 Adjacent benzene three phenol	-	0.10	0.40
糖蛋白 Glycoprotein	-	-	0.10
总体积 Total volume	5.00	5.00	5.00

1.2.3 紫红薯糖蛋白对羟基自由基(·OH)的清除作用 采用邻二氮菲-金属离子-H₂O₂^[14]通过 Fenton 反应(H₂O₂ + Fe²⁺ → ·OH + H₂O + Fe³⁺)生成羟自由基,促使邻二氮菲-Fe²⁺被氧化为邻二氮菲-Fe³⁺,造成其水溶液在波长 510 nm 处最大消失,来测算其清除率。具体步骤是:

- (1) 取 pH7.4 浓度为 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液 2.0 mL 和 8.0 mL 蒸馏水于试管中,混匀做空白管;
- (2) 取 2.0 mL 磷酸盐缓冲液、1.5 mL 邻二氮菲、1.0 mL 7.5 mol/L 硫酸亚铁和 5.5 mL 蒸馏水于试管中,混匀作未损伤管(记为 A);
- (3) 取 2.0 mL 磷酸盐缓冲液、1.5 mL 邻二氮菲、1.0 mL 7.5 mol/L 硫酸

亚铁、4.5 mL 蒸馏水和 1.0 mL 0.1% H_2O_2 于试管中,混匀作损伤管(记为 B);(4)取 2.0 mL 磷酸盐缓冲液、1.5 mL 邻二氮菲、2.0 mL 7.5 mol/L 硫酸亚铁、1.0 mL 糖蛋白样品液、3.5 mL 蒸馏水和 1.0 mL 0.1% H_2O_2 于试管中,混匀作为样品管(记为 C)将上述各管混匀后于恒温水锅中,37 °C 保温 20 min,在 510 nm 波长处测其吸光值,按下式计算 $\cdot OH$ 自由基清除率:

$$\cdot OH \text{ 清除率} / \% = \frac{C - B}{A - B} \times 100 \quad (1)$$

1.2.4 紫红薯糖蛋白还原力的测定 普鲁士兰法:参照 Oyaizu^[15] 并进行调整,在 10.0 mL 试管中分别加入质量浓度不同 0、40、80、160、320 和 640 $\mu g/mL$ 的样品溶液 1.0 mL,磷酸盐缓冲液(0.2 mol/L, pH6.6) 0.5 mL 和 0.3% 铁氰化钾溶液 1.5 mL,在 50 °C 水浴 20 min 后快速冷却,再加入 1.0 mL 10% 三氯乙酸溶液(TCA),混匀后以 3 000 r/min 的转速离心 10 min,取上清液 2.0 mL,加入 0.5 mL 0.3% 三氯化铁溶液,充分混匀,静置 10 min 后,在 700 nm 下测定其吸光度值,每个浓度平行做 3 次取平均值,以蒸馏水作参比溶液。

1.2.5 紫红薯糖蛋白 1,1-二苯基-2-苯肼自由基(DPPH \cdot)能力测定 参照 Shimada 等^[16] 方法并调整,DPPH 法用于确定样品清除自由基能力。称取一定量的 DPPH 用少量无水乙醇溶解,然后用 50% 乙醇配成 30 $\mu mol/L$ 的溶液,取 2.0 mL DPPH 溶液,分别加入 0.2 mL 不同质量浓度 0、40、80、160、320 和 640 $\mu g/mL$ 的糖蛋白溶液,摇匀,放入 25 °C 水浴中反应 15 min 后取出,测定 517 nm 处吸光值 A,以 0.2 mL 50% 乙醇配代替样品作为空白对照管,以 0.2 mL 50% 乙醇配代替 DPPH 溶液作为样品参比,并以等体积蒸馏水和 50% 乙醇混合液空白调零,按同样方法测 517 nm 处吸光值 B,样品对 DPPH \cdot 自由基的清除作用计算公式为:

$$\text{清除率} / \% = \left(1 - \frac{A}{B}\right) \times 100 \quad (2)$$

2 结果与分析

2.1 紫红薯糖蛋白对超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)的清除作用

由图 1 可知,测定体系中加入紫红薯糖蛋白后,当紫红薯糖蛋白质量浓度在 0 ~ 320 $\mu g/mL$ 时虽有清除邻苯三酚自氧化反应中所产生的超氧阴离子自由基的作用,但清除效果并不大;在紫红薯糖蛋白的质量浓度为 320 $\mu g/mL$ 之后,紫红薯糖蛋白对邻苯三酚自氧化反应中所产生的超氧阴离子自由基具有明显的清除作用;当质量浓度为 640 $\mu g/mL$ 时,维生素 C 超氧阴离子自由基清除作用达到 94.1%,而紫红薯糖蛋白对邻苯三酚自氧化反应中所产生的超氧阴离子自由基清除作用达到了 69.80%。

2.2 紫红薯糖蛋白对羟基自由基($\cdot OH$)的清除作用

由图 2 可知紫红薯糖蛋白对羟基自由基($\cdot OH$)的清除作用随着紫红薯糖蛋白的质量浓度增加清除率基本成直线趋势增加,在本实验浓度范围内质量浓度 640 $\mu g/mL$ 时维生素 C 清除率为 96.7%,而紫红薯糖蛋白清除率达到了 73.29%。

2.3 紫红薯糖蛋白还原力的测定

一些研究发现植物提取物的抗氧化能力与其还原力呈正比例关系,常用还原铁氰化钾方法来测定紫红薯糖蛋白还原力。抗氧化剂提供电子给 Fe^{3+} 还原成 Fe^{2+} 形式,700 nm 处吸光值大小反映 Fe^{2+} 数量多少。还原力大小表明了给电子能力,因此认为它与抗氧化活力紧密相关,还原力越大,抗氧化能力

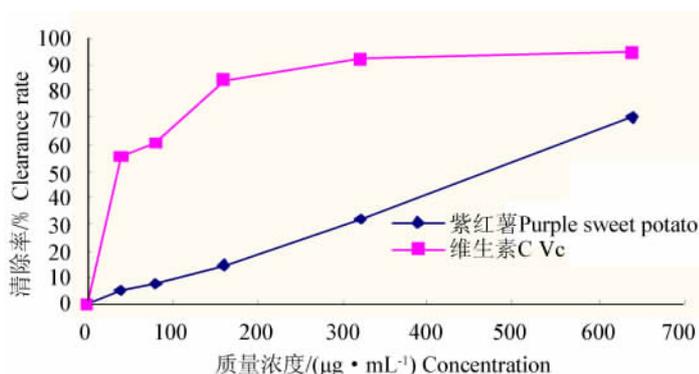


图 1 紫红薯糖蛋白对超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)的清除作用

Fig. 1 The scavenging of superoxide anion free radical ($O_2^{\cdot-}$) on the purple ipomoea batatas glycoprotein

越强,各个样品反应后的生成物在 700 nm 处吸光度的大小即反应其抗氧化的能力的大小,值越大则样品的还原能力越强。由图 3 可知紫红薯糖蛋白对还原力的作用在质量浓度为 0 ~ 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时增加比较快,在 80 ~ 320 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 增加比较缓慢,在 320 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 后,还原力作用又出现较快增加趋势。

2.4 紫红薯糖蛋白 1,1-二苯基-2-苯胍自由基 (DPPH·) 清除作用

紫红薯糖蛋白清除 DPPH· 自由基活力 DPPH (1,1-二苯基-2-苯胍自由基) 是一种稳定的以氮为中心的自由基,其乙醇溶液呈紫色,最大吸收波长为 517 nm。该方法基于抗氧化剂还原紫色的 DPPH· 自由基成黄色非自由基 DPPH-H 形式。当 DPPH 溶液中加入自由基清除剂时,其孤电子被配对,吸收消失或减弱,导致溶液颜色变浅,在 517 nm 处的吸光度变小,其变化程度与自由基清除程度呈线性关系。故该法可以用来表征某种物质对自由基的清除能力,通常用清除率表示,清除率越大,表明该物质清除自由基的能力越强。由图 4 可知,紫红薯糖蛋白 DPPH· 自由基清除率在质量浓度 0 ~ 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时增加较快,到 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 后增加比较平缓,在质量浓度为 640 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时维生素 C 清除率为 96.8%,而紫红薯糖蛋白清除率达到了 53.6%。

3 结论与讨论

紫红薯糖蛋白质量浓度从 0 ~ 320 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对超氧阴离子自由基清除效果并不大;在紫红薯糖蛋白的质量浓度为 320 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 后,紫红薯糖蛋白对超氧阴离子自由基具有明显的清除作用;当紫红薯糖蛋白的质量浓度为 640 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,紫红薯糖蛋白对超氧阴离子自由基清除作用达到 69.80%。紫红薯糖蛋白对羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$) 的清除作用随着紫红薯糖蛋白的质量浓度增加清除率基本成直线增加趋势,表明清除作用比较明显,在本实验浓度范围内紫红薯糖蛋白浓度为 640 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时其清除率达到 73.29%;紫红薯糖蛋白对还原力的作用在质量浓度为 0 ~ 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时增加比较快,在 80 ~ 320 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 增加比较缓慢,在 320 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 后,还原力作用又出现较快增加趋势;紫红薯糖蛋白 DPPH· 自由基清除率在质量浓度 0 ~ 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时增加较快,到 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 后增加比较平缓。

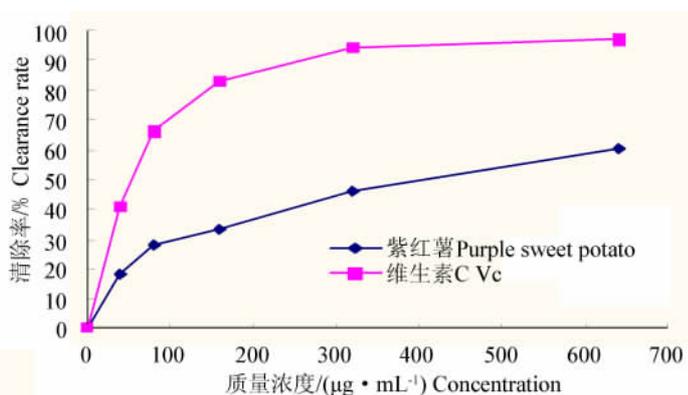


图 2 紫红薯糖蛋白对羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$) 的清除作用
Fig. 2 The scavenging of Hydroxyl free radical ($\cdot\text{OH}$) on the purple ipomoea batatas glycoprotein

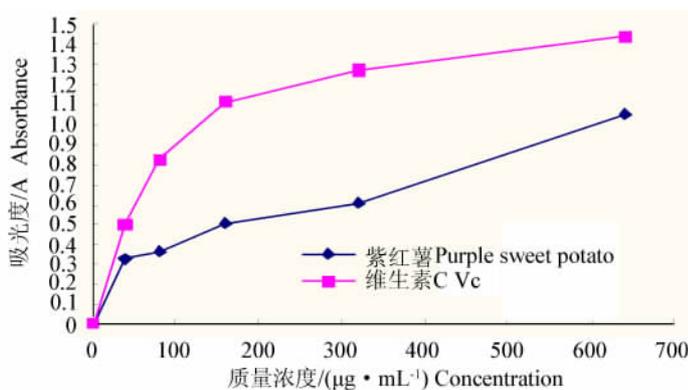


图 3 紫红薯糖蛋白对还原力

Fig. 3 The reductive force of the purple ipomoea batatas glycoprotein

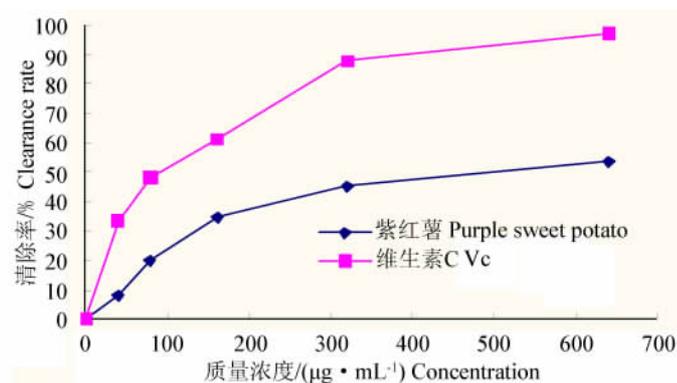


图 4 紫红薯糖蛋白清除 DPPH 自由基能力测定

Fig. 4 The determination of clearing DPPH free radical ability on the purple ipomoea batatas glycoprotein

在正常状态下,机体内的自由基处于动态平衡中,如果机体的平衡被打破,就会对机体造成损害,从而导致一系列相关疾病^[17]。大量的研究表明,从天然产物中分离得到的糖蛋白化合物具有清除自由基、抑制脂质氧化、抑制亚油酸氧化、清除多种活性氧(reactive oxygen species,ROS)等抗氧化作用^[18-20]。本实验浓度范围内紫红薯糖蛋白浓度640 μg/mL时其清除率达到73.29%。

超氧化物歧化酶(SOD)是机体细胞中重要的抗氧化酶之一,是维持生物体自由基产生和过氧化物清除能力平衡的重要物质,对机体的氧与抗氧化平衡起着相当重要的作用。SOD也是体内清除超氧O·的主要酶,它能够催化O·歧化为H和O·,清除氧自由基保护细胞免受损伤。血脂升高时,脂质过氧化作用增强,SOD活性降低,活性氧自由基浓度升高,对生物膜的不饱和脂质酸诱发产生氧化反应,使细胞结构与功能发生改变^[21]。本实验中紫红薯糖蛋白对超氧阴离子自由基清除作用达到69.80%。

还原力的测定可检验化合物是否为良好的电子供应体,它所提供的电子可以使Fe³⁺还原为Fe²⁺,从而使体系溶液颜色改变,即反映出体系中氧化还原状态的改变。体系溶液吸光值越大,则表示被测物还原力越强,抗氧化效果越佳^[22]。紫红薯糖蛋白0~640 μg/mL内还原力效果很明显。

DPPH是一种稳定的自由基,它在可见光区有特征吸收,比色测定简便、快捷。自由基清除剂存在时,DPPH的单电子被配对而使其颜色变浅,在最大吸收波长处的吸光度变小,且颜色变浅的程度与配对电子数是成剂量关系的,因此可用于物质清除自由基的研究与天然抗氧化剂的筛选^[23]。紫红薯糖蛋白0~640 μg/mL清除效果成直线增加的趋势。

参考文献:

- [1]沈勇根,上官新晨,徐明生,等.紫红薯色素的提取和精制[J].江西农业大学学报,2004,26(6):912-914.
- [2]明兴加,李坤培,张明,等.紫色甘薯的开发前景[J].重庆中草药研究,2006(1):55-60.
- [3]孙册,莫汉庆.糖蛋白与蛋白聚糖结构、功能、代谢[M].北京:科学出版社,1998.
- [4]高居易,陈彦.建宁莲子糖蛋白的分离、纯化及清除自由基作用[J].武汉植物学研究,2003,21(2):175-178.
- [5]Harnett W, Margaret M. Modulation of the host immune system by phosphorylcholine containing glycoproteins secreted by parasitic filarial nematodes[J]. Biochimica Biophysica Acta (BBA) /Molecular Cell Research, 2001, 1539(12):7-15.
- [6]Matsuda T, Watanabe K, Nakamura R, Immunochemical and physical properties of peptic digested ovomucoid[J]. Agric Foodchem, 1983(93):661.
- [7]Tsuruta Gu. Immunoreactive glycopeptides swparated from peptic hydrolysate of chicken egg white ovomucoid[J]. Food Sci, 1985, 50(2):592-595.
- [8]Takuro KoGa. Isolation and characterization of a novel Immunomodulating fraction from soybeans[J]. Biosci Biotech Biochem, 1993, 57(3):367-391.
- [9]张彩梅,张红梅,于业军,等.扇贝多肽对小鼠免疫功能调节的研究[J].中国海洋药物杂志,2005,24(3):18-21.
- [10]马岩,曹瑞敏.亚侧耳硷溶性多糖蛋白的抗肿瘤作用[J].肿瘤,1998,18(1):43-44.
- [11]李亚娜,阚建全,陈宗道,等.甘薯糖蛋白的降血脂功能[J].营养学报,2002,24(2):433-434.
- [12]赵云涛,国兴明,李付振,等.金樱子多糖的抗氧化作用[J].生物学杂志,2003,20(2):23-24.
- [13]高春严,田呈瑞.枸杞多糖体外抗氧化特性研究[J].粮食与油脂,2005(7):28-29.
- [14]李小定,荣建华,吴谋成,等.灰树花多糖 PGF-1 体外对羟基自由基的抑制作用[J].食品科学,2003,24(7):126-130.
- [15]Oyaizu M. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine[J]. Japanese Journal of Nutrition, 1986, (44):307-315.
- [16]Shimada K, Fujikawa K, Yalara K, et al. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion[J]. J Agric Food Chem. 1992(40):945-948.
- [17]Marx J L. Oxygen free radicals linked to many diseases[J]. Science, 1987, 235(4788):529.
- [18]Yasser F M, Kishk Hanan M A, et al. Free-radical scavenging and antioxidative activities of some polysaccharides in emulsions[J]. LWT-Food Science and Technology, 2007, 40(2):270-277.
- [19]Hsia-Yin Lin, Cheng-Chun Chou. Antioxidative activities of watersoluble disaccharide chitosan derivatives[J]. Food Research International, 2004, 37:883-889.
- [20]万细妹,徐明生,蒋艳,等.河蚬酶解液抗氧化作用的研究[J].江西农业大学学报,2007,29(2):282-287.
- [21]黄森.氧自由基与糖尿病发病机制[J].实用临床医学,2006,7(4):146-147.
- [22]肖浩,郑小江,朱玉婷.藤茶多酚体外抗氧化作用[J].食品与生物技术学报,2011,30(5):679-682.
- [23]但飞君,褚立军,蔡正军,等.红毛七多糖体外抗氧化活性研究[J].江苏农业科学,2010,37(5):398-400.