

DOI:10.13718/j.cnki.xsxb.2017.04.008

翡翠贻贝糖蛋白提取工艺优化及体外抗氧化活性^①

刘淑集^{1,2,3}, 潘裕添⁴, 刘智禹^{2,3},
王茵^{2,3}, 苏永昌^{2,3}, 刘秋凤^{2,3}, 陈锦权¹

1. 福建农林大学 食品科学学院, 福州 350002;
2. 福建省水产研究所, 国家海水鱼类加工技术研发分中心(厦门),
福建省海洋生物增殖与高值化利用重点实验室, 福建 厦门 361013;
3. 福建省海洋生物资源开发利用协同创新中心, 福建 厦门 361013;
4. 闽南师范大学 菌物工程技术研究中心, 福建 漳州 363000

摘要: 以翡翠贻贝肉为原料, 在单因素试验的基础上, 通过响应面试验设计优化了翡翠贻贝糖蛋白提取的工艺条件. 采用超滤方法获得翡翠贻贝超滤截留液糖蛋白 PGFR(Pernaviridis glycoprotein of the filter remains of MW cut off 5 KDa)和翡翠贻贝超滤透过液糖蛋白 PGFL(Pernaviridis glycoprotein of the filter leaching of MW cut off 5 KDa) 2 个组分, 并分别评价其体外抗氧化活性. 结果表明, 从翡翠贻贝肉中提取糖蛋白粗提物的最佳工艺条件为提取时间 61 min, 提取温度 62 ℃, NaCl 浓度 0.2 mol/L, 料液比 1:1, 在该条件下提取率为 51.55%. 体外抗氧化试验结果表明, 翡翠贻贝 PGFR 对 ·OH, ·O₂⁻ 和 DPPH 自由基的清除率及总抗氧化能力均优于 PGFL, 可作为后续研究的主要对象, 具有开发新型天然抗氧化剂的潜力.

关键词: 翡翠贻贝; 糖蛋白; 提取; 超滤; 抗氧化

中图分类号: TS254.9

文献标志码: A

文章编号: 1000-5471(2017)04-0045-08

翡翠贻贝 *Pernaviridis*, 俗名海红, 又称淡菜、青口螺, 是南方沿海养殖的主要品种之一, 肉质鲜美, 营养丰富. 当前已从贻贝中提取到多种活性成分, 如 Cho 等从新西兰绿唇贻贝中得到的脂溶性提取物抗炎效果良好, 尤其对慢性关节炎的治疗效果显著^[1]; 刘勇军等研究证实翡翠贻贝提取物 EME 对小鼠具有抗疲劳作用^[2]; 刘志峰等研究证明贻贝提取物能够明显降低食饵性高血脂大鼠的血浆总胆固醇、甘油三酯, 起到降血脂作用^[3]. 贻贝是一种极具深度开发价值的海洋资源.

糖蛋白是一类由糖类同蛋白质或多肽共价连接而成的结合蛋白^[4]. 根据肽链氨基酸残基上的羟基或酰胺基与糖基异头碳原子的羟基脱水形成 O-糖苷键和 N-糖苷键 2 大类^[5]. 糖蛋白是一类重要的生物活性物质, 具有抗氧化、抗肿瘤、免疫调节作用等功效. 但是对于翡翠贻贝中的糖蛋白成分及其抗氧化活性研究未见相关的报道. 因此, 开发翡翠贻贝糖蛋白具有重要的意义. 本文以翡翠贻贝肉为原料, 通过单因素结合响应面试验方法研究优化翡翠贻贝糖蛋白的最佳提取工艺, 为贻贝资源的高值化利用提供参考依据.

① 收稿日期: 2016-02-17

基金项目: 福建省省属公益类科研院所基本科研专项(2014R1003-9); 福建省科技重大专项(2014NZ0001-1; 14PZY017NF17); 厦门市科技专项(3502Z20132002); 国家海洋公益性行业科研专项(201405016-1; 2014FJPT01).

作者简介: 刘淑集(1981-), 女, 福建厦门人, 助理研究员, 博士研究生, 主要从事水产品加工及综合利用的研究.

通信作者: 陈锦权, 教授, 博士研究生导师.

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

翡翠贻贝, 厦门市东渡水产品市场购买, 除去碎壳、足丝等杂质后匀浆、分装, 冻藏于 -18°C ; 苯酚、浓硫酸、磷酸、考马斯亮兰等为国产分析纯。

5804R 离心机, 德国艾本德(eppendorf)公司; LET132 胶体磨, 深圳市雷通实业有限公司; 752 型紫外可见分光光度计, 上海光谱仪器有限公司; 大盘面磁力搅拌器, 德国 IKA 实验室技术公司; XW-80A 漩涡混合器, 上海康华生化仪器制造有限公司; LGJ-12 冷冻干燥机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; 2ZX-2 型旋片式真空泵, 浙江黄岩宁溪医疗器械有限公司。

1.2 方法

1.2.1 翡翠贻贝糖蛋白提取工艺流程

取 100 g 预处理的翡翠贻贝肉, 除去碎壳、足丝等杂质后, 匀浆。在一定料液比的匀浆液中添加不同浓度的 NaCl 溶液, 混匀, 并在不同的温度、时间条件下提取, 8 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 加入 2 倍体积无水乙醇, 放置 -20°C 过夜, 离心取沉淀, 沉淀溶解后用 Sevage 法脱除游离蛋白(氯仿与正丁醇的体积比为 4:1), 冻干获得粗糖蛋白样品, 测定多糖和蛋白质质量分数, 以其之和当作糖蛋白提取率作为考察指标。

1.2.2 翡翠贻贝糖蛋白提取工艺参数单因素试验

在保持其他因素相同条件下, 分别考察不同的 NaCl 浓度、料液比、提取时间、提取温度等各因素对翡翠贻贝糖蛋白提取率(糖、蛋白质质量分数)的影响。重复进行 3 次平行试验, 取平均值进行统计分析。

1.2.2.1 NaCl 浓度的选择

料液比 1:1, 加入 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 mol/L 浓度的 NaCl, 60°C 提取 1.0 h, 8 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 加入 2 倍体积无水乙醇 -20°C 沉淀过夜, Sevage 法脱除游离蛋白, 冻干获得粗糖蛋白, 测定糖和蛋白质质量分数。

1.2.2.2 料液比的选择

NaCl 浓度为 0.1 mol/L, 分别加入(体积比或质量比)2:1, 1:1, 1:3, 1:5, 1:7 的蒸馏水, 60°C 提取 1.0 h, 8 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 加入 2 倍体积无水乙醇 -20°C 沉淀过夜, Sevage 法脱除游离蛋白, 冻干获得粗糖蛋白, 测定糖和蛋白质质量分数。

1.2.2.3 提取时间的选择

料液比 1:1, NaCl 浓度 0.1 mol/L, 60°C 条件下分别提取 30, 60, 90, 120, 180 min, 8 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 加入 2 倍体积无水乙醇 -20°C 沉淀过夜, Sevage 法脱除游离蛋白, 冻干获得粗糖蛋白, 测定糖和蛋白质质量分数。

1.2.2.4 提取温度的选择

料液比 1:1, NaCl 浓度 0.1 mol/L, 分别在 25, 45, 60, 75, 90°C 下提取时间 1.0 h, 8 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 加入 2 倍体积无水乙醇 -20°C 沉淀过夜, Sevage 法脱除游离蛋白, 冻干获得粗糖蛋白, 测定糖和蛋白质质量分数。

1.2.3 响应面法优化提取工艺条件

通过 spss13.0 软件对各单因素试验的基础上进行分析, 确定 Box-Behnken 中心组合设计的自变量^[6], 即以提取温度(45°C , 60°C , 75°C)、提取时间(30, 60, 90 min)和 NaCl 浓度(0.1, 0.2, 0.3 mol/L)为自变量, 以提取率为响应值(Y)进行 3 因素 3 水平响应面分析, 优化翡翠贻贝糖蛋白的最佳提取条件。

1.2.4 翡翠贻贝不同超滤组分糖蛋白的基本成分分析

将最优提取方案所得的翡翠贻贝糖蛋白粗提物经过 Sevage 法脱除游离蛋白后, 采用 5 KDa 膜包的超滤系统进行超滤, 获得 2 种组分, 即大于 5 KDa 的截留液 PGFR(Pernaviridis glycoprotein of the filter remains of MW cut off 5KDa)和小于 5 KDa 的滤出液 PGFL(Pernaviridis glycoprotein of the filter leaching

of MW cut off 5KDa), 真空冷冻干燥, 分别对其基本成分进行分析。

1.2.5 翡翠贻贝糖蛋白抗氧化活性

采用清除羟自由基($\cdot\text{OH}$)能力, DPPH, 超氧阴离子自由基($\cdot\text{O}_2^-$)能力和总抗氧化能力等4种方法评价 PGFR 和 PGFL 的体外抗氧化活性, 并以抗坏血酸 Vc 为阳性对照。

1.2.6 测定方法

- 1) 总糖: 苯酚-硫酸法测定^[7];
- 2) 蛋白质: 考马斯亮兰法测定^[8];
- 3) 总氮: 凯氏定氮法测定;
- 4) 水分: GB 5009.3-2010 直接干燥法测定;
- 5) 灰分: GB 5009.4-2010 灼烧称重法测定;
- 6) 硫酸根: 硫酸钡比浊法测定;

7) 清除超氧阴离子自由基($\cdot\text{O}_2^-$)能力测定: $\cdot\text{O}_2^-$ 的测定参照 Smirnoff^[9-10] 的方法并进行改进。取不同浓度的样品溶液 1.0 mL, 加入 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 值为 8.04)3.5 mL, 混匀, 加入 10 mmol/L 邻苯三酚溶液 0.5 mL, 迅速混匀并开始计时, 在 325 nm 处测定吸光度, 0.5 min 后开始记录读取数据 (A_1), 每隔 30 s 记录一次直至 3.5 min (A_2)。以蒸馏水代替样品, 测定邻苯三酚自氧化速率; 以 0.5 mL 10 mmol/L HCl 代替邻苯三酚作为空白对照。翡翠贻贝糖蛋白对超氧阴离子自由基的清除率 P 公式为

$$SO_0 = \frac{A_2 - A_1}{3}$$

$$P = \frac{SO_0 - SO_1}{SO_0} \times 100\%$$

式中, SO_0 为邻苯三酚自氧化速率; SO_1 为加入样品后邻苯三酚自氧化速率。

8) 清除羟自由基($\cdot\text{OH}$)能力测定: $\cdot\text{OH}$ 的测定参考 Li Yanhong 等^[11] 的方法并进行改进。取不同浓度的样品溶液 1.0 mL, 分别加入 9.0 mmol/L 硫酸亚铁 0.5 mL, 9.0 mmol/L 水杨酸-无水乙醇 0.5 mL, 8.8 mmol/L H_2O_2 , 混匀, 37 °C 恒温水浴 30 min, 在波长 510 nm 处测定吸光度, 记为 A 。以蒸馏水代替样品, 测定吸光度记为 $A_{\text{空}}$; 以蒸馏水代替 H_2O_2 , 测定吸光度记为 A_0 。翡翠贻贝糖蛋白对羟自由基清除率 P 公式为

$$P = \frac{A_{\text{空}} - (A - A_0)}{A_{\text{空}}} \times 100\%$$

9) 清除 DPPH 能力测定: DPPH 的测定参考 Baltrusaityte 等^[12] 的方法并进行改进。取不同浓度的样品溶液 1.0 mL, 加入无水乙醇配制的 0.1 mmol/L DPPH 4 mL, 混匀, 室温下静置 30 min, 在波长 517 nm 处测定吸光度, 记为 A 。以蒸馏水代替样品溶液, 测定吸光度记为 A_0 ; 以无水乙醇代替 DPPH, 测定吸光度记为 A_1 。翡翠贻贝糖蛋白对 DPPH 的清除率 P 公式为

$$P = \frac{A_0 - (A - A_1)}{A_0} \times 100\%$$

10) 总抗氧化活力的测定: FRAP(Ferric reducing antioxidant power)法^[13]

FRAP 工作液的配制: 0.3 mol/L 的醋酸盐缓冲液(pH 值为 3.6) 25 mL, 10 mmol/L 的 TPTZ 溶液(用 40 mmol/L 盐酸配制) 2.5 mL, 20 mmol/L FeCl_3 溶液 2.5 mL, 用前 37 °C 预热。

FeSO_4 的标准曲线的绘制: 以 0.01~0.1 mmol/L FeSO_4 的标准溶液, 用蒸馏水补足到 2.0 mL, 加入 FRAP 工作液 3.0 mL 混匀, 置于 37 °C 恒温水浴反应 10 min, 测定 OD_{593} nm, 重复 3 次, 计算其平均值, 绘制标准曲线。

在试管中加入 2.0 mL 一定浓度的样品水溶液, 后按上述方法测定翡翠贻贝不同醇沉物的 OD_{593} nm 值。抗氧化活性以相同吸光度值的 FeSO_4 浓度表示。

11) 数据处理: 试验数据均重复 3 次, 采用 SPSS 软件进行方差分析; 采用 excel 和 Origin 处理作图。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 NaCl 浓度对提取率的影响

一般情况下,低浓度盐溶液有助于蛋白质的提取.翡翠贻贝糖蛋白的提取率随着 NaCl 溶液浓度的升高而升高,当 NaCl 溶液浓度为 0.2 mol/L 时,提取率达最高.之后增加 NaCl 浓度,提取率反而下降(图 1a).因此,初步确定翡翠贻贝糖蛋白提取溶剂为 0.2 mol/L NaCl 溶液.

2.1.2 料液比对提取率的影响

在提取温度 60 °C 条件下,加入不同比例的 0.1 mol/L NaCl 溶液提取 1.0 h,结果如图 1b 所示.随着提取溶剂添加量的增加,翡翠贻贝糖蛋白的提取率呈逐渐下降的趋势.综合考虑成本及易操作性,确定以料液比 1:1 为最适宜的比例.

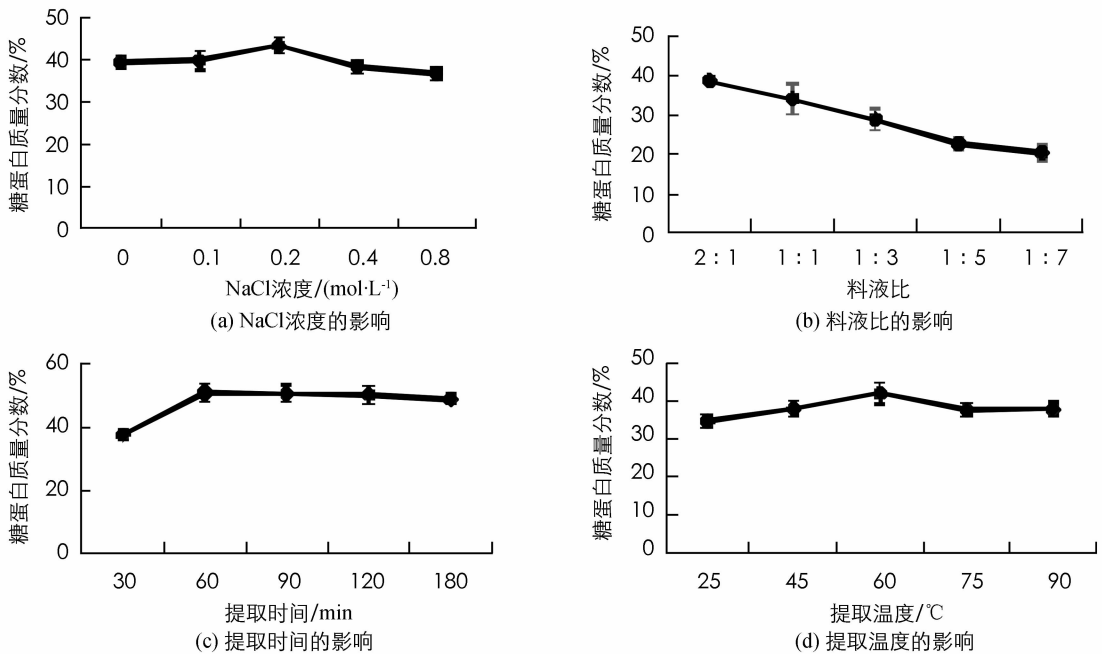


图 1 单因素分析翡翠贻贝糖蛋白提取率的影响

2.1.3 提取时间对提取率的影响

在料液比 1:1, 提取温度 60 °C 条件下, 0.1 mol/L NaCl 溶液提取不同的时间, 结果如图 1c 所示. 在浸提时间 30~60 min 范围内, 翡翠贻贝糖蛋白的提取率随着时间延长逐渐升高, 当反应 60 min 时, 提取率达到最大值 51.8%, 再增加提取时间, 提取率趋于平缓, 因此确定单因素最佳提取时间为 60 min.

2.1.4 提取温度对提取率的影响

从料液比 1:1, 提取 1.0 h, 在不同温度条件下提取结果(见图 1d)来看, 在 25~60 °C 范围内, 翡翠贻贝糖蛋白的提取率逐渐增加, 当温度为 60 °C 时, 提取率达到最高, 即 42.26%; 温度继续升高时, 提取率略有降低. 因此, 确定单因素最佳的提取温度为 60 °C.

2.2 响应面分析法对翡翠贻贝糖蛋白提取工艺的优化

2.2.1 回归模型的建立及方差分析

根据单因素试验的结果, 综合考虑选择提取温度(X_1), 提取时间(X_2)和 NaCl 浓度(X_3)3 个因素进行 3 水平的 Box-Benhnken 中心组合试验. 响应面分析方案与结果见表 1. 利用 Design-Expert 8.0 软件对表 1 试验数据进行多元回归拟合, 获得以翡翠贻贝糖蛋白提取率为响应值的回归方程:

$$Y = -18.12 + 1.52X_1 + 0.43X_2 + 99.06X_3 - 1.08 \times 10^{-3}X_1X_2 - 0.35X_1X_3 - 0.23X_2X_3 - 0.01X_1^2 - 2.65 \times 10^{-3}X_2^2 - 169.82X_3^2$$

上述回归方程的 ANOVA 的分析结果见表 2. 由表 2 可知, 模型 $P=0.0001$ 为极显著, 失拟项 $P=12.58$ 为不显著, 说明该方程对试验有较好的拟合性, 模型可靠, 可用于优化翡翠贻贝糖蛋白提取率的工艺条件. 同时, 观察一次项和二次项的影响都具有显著性, 因此各因子对响应值的影响不是简单的线性关系.

表 1 响应面的试验方案及试验结果

| 试验编号 | X_1 (提取温度/ $^{\circ}\text{C}$) | X_2 (提取时间/min) | X_3 (NaCl 浓度/ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) | Y (翡翠贻贝糖蛋白质量分数/%) |
|------|--------------------------------------|---------------------|-------------------------------------------------------|----------------------|
| 1 | 45 | 60 | 0.3 | 46.17 |
| 2 | 60 | 30 | 0.1 | 45.17 |
| 3 | 75 | 30 | 0.2 | 48.42 |
| 4 | 75 | 60 | 0.1 | 48.87 |
| 5 | 60 | 30 | 0.3 | 47.65 |
| 6 | 60 | 60 | 0.2 | 51.36 |
| 7 | 60 | 90 | 0.1 | 48.05 |
| 8 | 60 | 60 | 0.2 | 52.51 |
| 9 | 60 | 90 | 0.3 | 47.69 |
| 10 | 60 | 60 | 0.2 | 50.74 |
| 11 | 45 | 60 | 0.1 | 47.80 |
| 12 | 75 | 60 | 0.3 | 45.14 |
| 13 | 60 | 60 | 0.2 | 50.12 |
| 14 | 60 | 60 | 0.2 | 51.41 |
| 15 | 45 | 90 | 0.2 | 45.16 |
| 16 | 75 | 90 | 0.2 | 46.31 |
| 17 | 45 | 30 | 0.2 | 45.33 |

表 2 回归模型的方差分析结果

| 方差来源 | 平方和 | 自由度 | 均方 | F 值 | P 值 | 显著性 |
|----------|-------|-----|-------|-------|------------|-----|
| 模型 | 78.13 | 9 | 8.68 | 3.86 | 0.0001 | *** |
| X_1 | 2.30 | 1 | 2.30 | 1.02 | < 0.0001 | *** |
| X_2 | 0.053 | 1 | 0.053 | 0.023 | 0.0074 | ** |
| X_3 | 1.33 | 1 | 1.33 | 0.59 | 0.0004 | *** |
| X_1X_2 | 0.95 | 1 | 0.95 | 0.42 | 0.0337 | * |
| X_1X_3 | 1.10 | 1 | 1.10 | 0.49 | 0.3150 | |
| X_2X_3 | 2.01 | 1 | 2.01 | 0.89 | 0.3150 | |
| X_1^2 | 27.08 | 1 | 27.08 | 12.04 | 0.7479 | |
| X_2^2 | 24.01 | 1 | 24.01 | 10.68 | 0.0002 | *** |
| X_3^2 | 12.14 | 1 | 12.14 | 5.40 | < 0.0001 | *** |
| 残差 | 15.74 | 7 | 2.25 | — | — | |
| 失拟项 | 12.58 | 3 | 4.19 | 5.30 | 0.0705 | |
| 纯误差 | 3.16 | 4 | 0.79 | — | — | |
| 总和 | 93.87 | 16 | — | — | — | |

注: $R^2=0.9908$, * 表示 $P<0.05$, ** 表示 $P<0.01$, *** 表示 $P<0.001$, 差异有统计学意义.

2.2.2 响应面分析及最佳工艺研究

通过软件 Design-Expert 8.0 分析得到翡翠贻贝糖蛋白的最佳提取条件: 提取温度为 61.77°C , 提取时间为 60.77 min , NaCl 浓度为 0.19 mol/L , 提取率预测值为 51.29% . 为了实际操作简便, 将上述最优提取条件简化为提取温度为 62°C , 提取时间为 61 min , NaCl 浓度为 0.2 mol/L , 并进行 3 次重复试验, 则翡翠贻贝糖蛋白的提取率为 $(51.55 \pm 0.02)\%$, 略大于预测值, 但差异无统计学意义, 说明此响应面法得到的回归模型具有一定的可靠性.

2.3 翡翠贻贝不同超滤组分糖蛋白的基本成分分析

超滤是一种膜分离原理, 不发生相变化, 用于截留溶液中大于膜截留量的物质, 而水和低分子量溶质则允许透过膜. 将翡翠贻贝糖蛋白粗提液经过 5 KDa 超滤膜过滤, 截留液即 PGFR 中的蛋白+糖质量分数

达到了 91.96%，高于滤出液即 PGFL 的蛋白+糖质量分数 60.59% (表 3)。说明截留液中集中了大部分的糖蛋白。PGFL 的硫酸根质量分数是 PGFR 的 5 倍，可能是存在较多低分子量的硫酸酯。

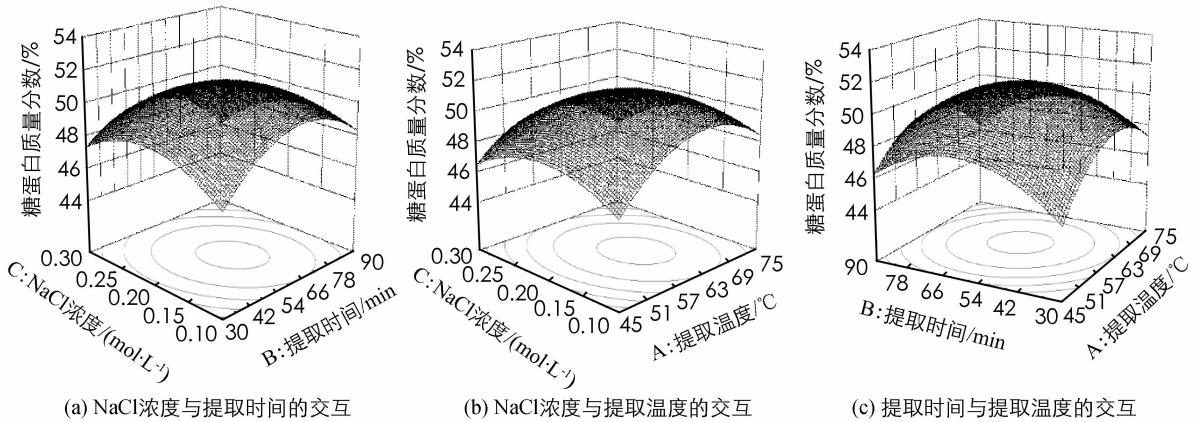


图 2 各因素交互作用的响应面图

表 3 翡翠贻贝不同超滤组分糖蛋白的成分分析

| 组分 | 总氮质量 分数/% | 总糖质量 分数/% | 硫酸根质量 分数/% | 水分 /% | 灰分 /% |
|--------------|--------------|--------------|---------------|----------|----------|
| 截留糖蛋白(PGFR) | 53.40 | 38.56 | 0.59 | 7.38 | 3.76 |
| 滤出液糖蛋白(PGFL) | 35.83 | 24.76 | 2.91 | 7.41 | 9.38 |

2.4 翡翠贻贝糖蛋白体外抗氧化活性分析

采用对羟自由基，超氧阴离子自由基，DPPH 自由基的清除能力和总抗氧化能力 4 种指标评价方法分析了翡翠贻贝糖蛋白的体外抗氧化活性，结果如图 3 所示。抗坏血酸 Vc 对羟自由基，超氧阴离子自由基，DPPH 自由基的清除能力和总抗氧化能力均高于翡翠贻贝糖蛋白。

一般情况下，抗氧化剂是通过自身的还原作用给出电子达到清除自由基的目的^[14]，因此其还原力越强，它的抗氧化能力也就越强。由图 3a1 标准曲线图可以看出， FeSO_4 浓度在 0~0.1 mmol/mL 范围内的回归方程式为 $y=9.83152x+0.01947$ ， $R^2=0.9962$ ，与吸光值的线性关系良好。图 3a2 中，在一定范围内翡翠贻贝糖蛋白对于 Fe^{3+} 的还原力与样品的质量浓度呈显著的线性关系。较低浓度时，PGFR 和 PGFL 的 TAC 差别不大，随着浓度的增加，PGFR 的 TAC 吸光度值迅速增加，说明其抗氧化能力迅速增强；PGFL 的 TAC 吸光度值也呈逐渐增加的趋势，但总体而言，低于 PGFR。

从图 3b 可以看出，翡翠贻贝提取物 PGFR 和 PGFL 对 $\cdot\text{OH}$ 均有清除作用，且随着浓度的增加，清除率明显提高，显著正相关。当浓度大于 8 mg/mL，PGFR 对羟自由基的清除率相差不大，趋向平缓。当浓度为 12 mg/mL 时，PGFL 对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率增幅变小。PGFR 和 PGFL 清除 $\cdot\text{OH}$ 的拟合曲线方程式分别为 $y=51.292\ln(x)-12.439$ ， $R^2=0.9851$ ； $y=39.882\ln(x)-27.525$ ， $R^2=0.8288$ 。根据曲线方程式计算 IC_{50} 分别为 3.38, 6.99 mg/mL。结果表明 PGFR 和 PGFL 对 $\cdot\text{OH}$ 自由基具有一定的清除作用，PGFR 的清除能力优于 PGFL。

翡翠贻贝 2 种不同提取物 PGFR 和 PGFL 对 $\cdot\text{O}_2^-$ 自由基的清除作用如图 3c 所示。Vc 对 $\cdot\text{O}_2^-$ 的清除作用高于 PGFR 和 PGFL。随着翡翠贻贝糖蛋白质量浓度的增加，对 $\cdot\text{O}_2^-$ 的清除能力显著增强，具有明显的量效关系。PGFR 和 PGFL 清除 $\cdot\text{O}_2^-$ 的拟合曲线方程式分别为 $y=24.786\ln(x)+19.996$ ， $R^2=0.9857$ ； $y=24.381\ln(x)-2.5385$ ， $R^2=0.9745$ 。根据曲线方程式计算 IC_{50} 分别为 3.36, 8.63 mg/mL。PGFR 对 $\cdot\text{O}_2^-$ 的清除能力强于 PGFL。

图 3(d) 表明，翡翠贻贝糖蛋白对 DPPH 的清除率也随着糖蛋白质量浓度的增大而增强。当质量浓度低于 15 mg/mL 时，PGFR 对 DPPH 的清除能力低于 PGFL。当质量浓度高于 15 mg/mL 时，PGFR 对 DPPH 的清除率反而高于 PGFL。分析原因可能是 PGFL 是经过超滤膜的滤出液，主要为一些小分子物质包括盐等。在高浓度的 PGFL 体系中，盐浓度可能较高，从而影响对 DPPH 的清除效果。PGFR 和 PGFL 清除 DPPH 的拟合曲线方程式分别为 $y=41.932\ln(x)-66.871$ ， $R^2=0.9328$ ； $y=27.112\ln(x)-26.938$ ，

$R^2=0.9455$. 根据曲线方程式计算 IC_{50} 分别为 16.23, 17.07 mg/mL, PGFR 清除 DPPH 的效果略优于 PGFL. 但是, 相比较于对 $\cdot\text{OH}$ 和 $\cdot\text{O}_2^-$ 的清除效果, PGFR 和 PGFL 对 DPPH 的清除效果均较差.

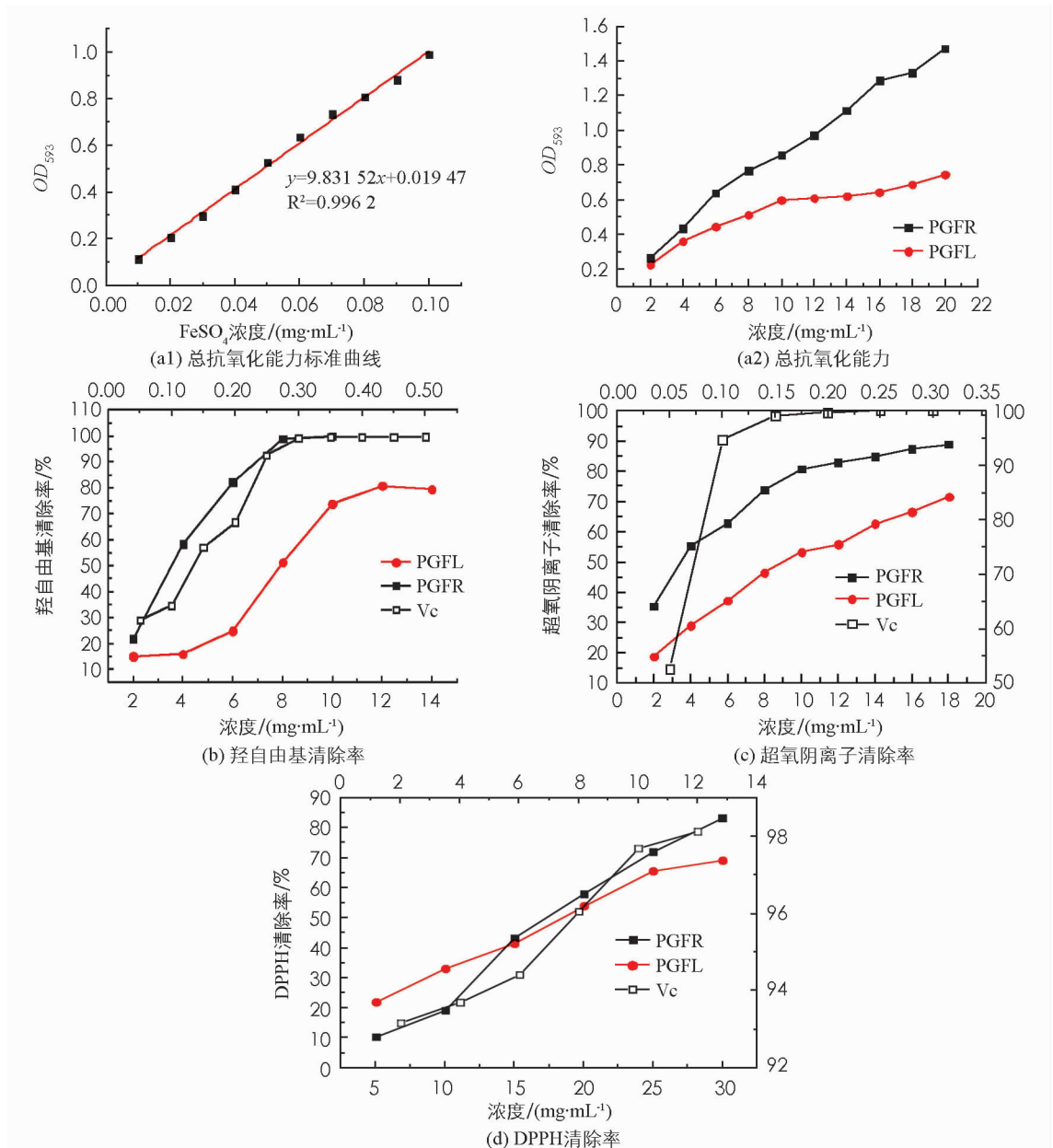


图3 不同评价方法测定翡翠贻贝糖蛋白抗氧化活性

3 结 论

通过单因素试验、响应面试验及验证试验, 获得了翡翠贻贝糖蛋白提取的最佳工艺条件为提取温度 $62\text{ }^{\circ}\text{C}$, 提取时间 61 min, NaCl 浓度 0.2 mol/L , 在此条件下的翡翠贻贝糖蛋白的提取率为 51.55% , 该工艺条件是提取糖蛋白较为理想的参考条件. 将糖蛋白粗提物进行 5 KDa 超滤膜超滤获得 PGFR 和 PGFL 2 个组分, 分别含有蛋白质、糖质量分数为 $(53.40\%, 38.56\%)$, $(35.83\%, 24.76\%)$.

本试验采用 4 种体外抗氧化指标评价翡翠贻贝 PGFR 和 PGFL 的抗氧化活性, 结果表明 PGFR 和 PGFL 对超氧阴离子自由基, DPPH, 羟自由基等均具有清除效果, 具有一定的总抗氧化能力, 且清除能力与浓度均有明显的量效关系, 说明翡翠贻贝糖蛋白具有较为全面的抗氧化活性. 总体而言, PGFR 对 $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{O}_2^-$ 和 DPPH 自由基的清除率及总抗氧化能力均优于 PGFL, PGFR 可作为后续研究的主要对象, 进一步分离纯化, 确定出起抗氧化作用的物质基础, 研究其抗氧化机制, 为开发新型天然抗氧化剂提供参考依据.

参考文献:

- [1] CHO S H, JUNG Y B, SEONG S C, et al. Clinical Efficacy and Safety of Lyprinol, a Patented Extract from New Zealand Green-Lipped Mussel (*Perna Canaliculus*) in Patients With Osteoarthritis of the Hip and Knee: A Multicenter 2-Month Clinical Trial [J]. *Allergie at Immunologie*, 2003, 35(6): 212–216.
- [2] 刘勇军, 李江滨, 侯 敢, 等. 翡翠贻贝提取物对小鼠抗疲劳作用的研究 [J]. *食品研究与开发*, 2006, 27(2): 126–129.
- [3] 刘志峰, 李桂生, 李 萍. 贻贝提取物抗高血脂作用的观察 [J]. *中国海洋药物*, 2001, 20(6): 9–10.
- [4] 孙 册, 黄汉庆. 糖蛋白与蛋白聚糖结构、功能、代谢 [M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [5] 韩益飞, 徐世清. 糖蛋白的结构与功能 [J]. *生物学杂志*, 2001, 18(2): 1–3.
- [6] 洪金艳, 李洪军, 甘 奕, 等. Box-Behnken 响应面法优化葛花与枳椇子中总黄酮提取工艺的研究 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2014, 36(10): 186–192.
- [7] 姜 波, 王艳颖, 刘长建, 等. 银杏叶多糖提取、纯化及其含量的测定 [J]. *时珍国医国药*, 2007, 18(11): 2729–2731.
- [8] 陈钧辉. 生物化学实验 [M]. 北京: 科学出版社, 2008.
- [9] SMIMOFF N, CUMBES Q J. Hydroxyl Radical Scavenging Activity of Compatible Solutes [J]. *Phytochemistry*, 1989, 28(4): 1057–1060.
- [10] YANG Y, LIU W S, HAN B Q, et al. Antioxidative Properties of a Newly Synthesized 2-Glucosamine-Thiazolidine-4 (R)-Carboxylic Acid(GlcNH₂Cys) in Mice [J]. *Nutrition Research*, 2006, 26(7): 369–377.
- [11] LI Yan-hong, JIANG Bo, ZHANG Tao, et al. Antioxidant and Free Radical-Scavenging Activities of Chickpea Protein Hydrolysate (CPH) [J]. *Food Chemistry*, 2008, 106(2): 444–450.
- [12] BALTRUSAITYTE V, VENSKUTONIS P R, CEKSTERYTE V. Radical Scavenging Activity of Different Floral Origin Honey and Beebread Phenolic Extracts [J]. *Food Chemistry*, 2007, 101(2): 502–514.
- [13] CHEN Hui-yin, YEN G C. Antioxidant Activity and Free Radical-Scavenging Capacity of Extract From Guava Leaves [J]. *Food Chemistry*, 2007, 101(2): 686–694.
- [14] HUANG De-jiang, OU Bo-xin. The Chemistry Behind Antioxidant Capacity Assays [J]. *Agric and Food Chemistry*, 2005, 53(6): 1841–1851.

On Extraction Optimization and Antioxidant Activity of Glycoprotein from *Pernaviridis*

LIU Shu-ji^{1,2,3}, PAN Yu-tian⁴, LIU Zhi-yu^{2,3}, WANG Yin^{2,3},
SU Yong-chang^{2,3}, LIU Qiu-feng^{2,3}, CHEN Jin-quan¹

1. College of Food Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;
2. Fisheries Research Institute of Fujian, National Research and Development Center for Marine Fish Processing (Xiamen), Key Laboratory of Cultivation and High-value Utilization of Marine Organisms in Fujian Province, Xiamen Fujian 361013, China;
3. Fujian Collaborative Innovation Center for Exploitation and Utilization of Marine Biological Resources, Xiamen Fujian 361013, China;
4. Engineering Technological Center of Mushroom Industry, Minnan Normal University, Zhangzhou Fujian 363000, China

Abstract: The optimum extraction technology and antioxidant activity of glycoprotein from *Pernaviridis* have been performed for future development and utilization of the *Pernaviridis*. On the basis of single-factor experiment, the optimum parameters of extraction for glycoprotein from *Pernaviridis* have been determined by response surface methodology (RSM). 2 fractions PGFR (*Pernaviridis* glycoprotein of the filter remains of MW cut off 5KDa) and PGFL (*Pernaviridis* glycoprotein of the filter leaching of MW cut off 5KDa) have been obtained by ultra-filtration. Then, antioxidant activities of 2 fractions have been examined by using various antioxidant assays with vitamin C co-assayed as positive control in vitro. Results show that the optimized condition of glycoprotein extraction was as follows: extraction temperature of 62°C, extraction time of 61 min, NaCl concentration of 0.2 mol/L, ratio of solid to liquid of 1:1. At the optimum conditions, the yield of saccharide and protein reached to 51.55%. The results of above antioxidant tests demonstrate that PGFR had higher scavenging effect of $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{O}_2^-$ and DPPH free radicals and total antioxidant activities than PGFL, which indicating that PGFR would be a good potential source for natural antioxidant and worth a subsequent research.

Key words: *Pernaviridis*; Glycoprotein; extraction; ultra-filtration; antioxidant

责任编辑 周仁惠