

绿茶抗氧化肽的分离纯化 与抗氧化活性研究

覃平, 张国栋*, 黄清霞

(西华大学生物工程学院, 四川成都 610039)

摘要:通过饱和硫酸铵盐析的方法从干绿茶中提取得到绿茶粗蛋白,粗蛋白透析除盐后用葡聚糖凝胶 Sephadex G-75 层析柱进行凝胶色谱法分离纯化,收集具有抗氧化活性的蛋白样品,并冷冻干燥,同时利用 SDS-PAGE 的方法对凝胶分离后收集的活性样品进行纯度的鉴定及相对分子质量的测定,并采用 $\cdot\text{OH}$ 清除法及 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 清除法研究绿茶抗氧化多肽纯品的抗氧化活性。结果表明,绿茶抗氧化多肽经葡聚糖凝胶 sephadex G-75 层析柱后,得到很好的分离和纯化,在 SDS-PAGE 电泳图谱上只有 1 条条带,其相对分子质量为 2~15ku;绿茶抗氧化多肽对 $\cdot\text{OH}$ 具有很强的清除作用,其半清除浓度(IC_{50})为 $0.069\mu\text{g/mL}$;对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 也具有较强的清除作用,其半清除浓度(IC_{50})为 $18.462\mu\text{g/mL}$,与 V_C 的清除作用(IC_{50} 为 $11.186\mu\text{g/mL}$)相当。

关键词:绿茶,抗氧化多肽,纯化,SDS-PAGE,抗氧化活性

Study on the purification and antioxidant activity of the antioxidant peptide from green tea

QIN Ping, ZHANG Guo-dong*, HUANG Qing-xia

(College of Bioengineering, Xihua University, Chengdu 610039, China)

Abstract: The crude proteins of green tea were extracted by saturated ammonium sulfate precipitation from dry green tea in this experiment, and the dialyzed crude proteins were purified further by dextran gel Sephadex G-75 column. The purity and relative molecular weight of the purified samples were determined by SDS-PAGE method. The scavenging capacity to $\cdot\text{OH}$ and $\text{O}_2^{\cdot-}$ free radical were also examined in order to investigate antioxidant activity of the antioxidant peptide. The results showed that the antioxidant peptide of green tea was purified completely by dextran gel Sephadex G-75 Column, only 1 band on SDS-PAGE, and its relative molecular weight was 2~15ku. The green-tea antioxidant peptide had strong scavenging ability to hydroxyl radical and its half scavenging concentration was $0.069\mu\text{g/mL}$. And it also had strong scavenging ability to superoxide anion radical, and its half scavenging concentration was $18.462\mu\text{g/mL}$, which had little difference from V_C scavenging effect (IC_{50} $11.186\mu\text{g/mL}$).

Key words: green-tea; antioxidant peptide; purification; SDS-PAGE; antioxidant activity

中图分类号: TS202.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2014)09-0105-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2014.09.013

茶叶在我国种植并加以饮用有近千年的历史,其作为中国人民的传统饮料,是世界三大无酒精饮料之一,健康饮料排名第一是绿茶。许多研究表明绿茶本身含有许多具有生物活性的物质,如茶多酚、咖啡碱等^[1]。目前市场上的抗氧化剂大多为人工合成的抗氧化剂,作用效果虽好,但存在着安全隐患,它在清除自由基的同时也对人体的其他组织或器官产生副作用。相比较而言,天然安全的生物活性肽则更具优势^[2]。已有研究证明大豆肽^[3]、玉米肽^[4]、

花生肽^[5]、黑豆多肽^[6]等植物多肽具有抗氧化活性,但关于茶叶中重要的具有抗氧化活性的多肽蛋白类物质,国内外迄今为止未见报道。

本研究以干绿茶为原料,通过盐析沉降、透析除盐得到具有抗氧化活性的绿茶粗蛋白,然后用葡聚糖凝胶 Sephadex G-75 层析柱进行凝胶色谱法分离纯化,收集具有抗氧化活性的蛋白样品,再利用 SDS-PAGE 的方法对凝胶分离后的样品进行纯度的鉴定及相对分子质量的测定,并采用 $\cdot\text{OH}$ 清除法及 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 清除法研究绿茶抗氧化肽纯品的抗氧化活性。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

清香绿茶 四川省茗山茶业有限公司;磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、硫酸铵、盐酸、焦性没食子酸、甲

收稿日期: 2013-09-05 * 通讯联系人

作者简介: 覃平(1989-),男,硕士研究生;研究方向:食品生物技术。

基金项目: 四川省教育厅自然科学重点项目(08ZA028);西华大学研究生创新基金项目(ycii201238)。

醇、冰乙酸、溴酚蓝、乙二醇四乙酸二钠、四甲基乙二胺 (TEMED)、过硫酸铵、过氧化氢 (H_2O_2)、硫酸亚铁、水杨酸等 均为分析纯,成都科龙化工厂;透析袋 3ku、Sephadex G-75、考马斯亮蓝 R-250、甘氨酸等 成都荣海生物有限公司;丙烯酰胺 (Acr)、十二烷基硫酸钠 (SDS)、三(羟甲基)氨基甲烷 (Tris)、N-N-甲叉双丙烯酰胺 (Bis) 等 均为超级纯,成都荣海生物有限公司(进口分装);低分子量标准预染蛋白 Marker 上海捷瑞生物工程有限公司。

HL-Z 恒流泵 上海青浦沪西仪器厂;凝胶成像系统 北京安能天创仪器有限公司;TS-A 脱色摇床 金坛市医疗仪器厂;高速冷冻离心机 科大创新股份有限公司中佳分公司;HD-3 紫外检测仪 上海沪西分析仪器厂;DYY-8C 型电泳仪 北京市六一仪器厂;YC-1 型层析实验冷柜 北京博医康实验仪器有限公司;Minin-Protein 垂直板式电泳槽 Bio-Rad 公司;UV-2100 型紫外可见分光光度计 北京瑞利分析仪器公司;层析柱 (1.6cm × 60cm) 北京瑞达恒辉科技发展有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 绿茶粗蛋白的提取制备 将干绿茶置于粉碎机中打成粉末,加入绿茶粉末 10 倍质量的 pH7.0 磷酸缓冲液,搅拌均匀,4℃ 静止过夜,四层纱布过滤后于 4℃ 8000r/min 高速离心 20min,取上清;用 40% 饱和硫酸铵盐析沉淀上清液,4℃ 静止过夜后于 4℃ 8000r/min 高速离心 20min,取沉淀;将沉淀用 2~5 倍的磷酸缓冲液溶解并透析过夜,得绿茶粗蛋白提取液^[7-8]。

1.2.2 绿茶抗氧化多肽的分离纯化 采用葡聚糖凝胶 Sephadex G-75 层析柱色谱法对绿茶粗蛋白样品进行分离纯化,洗脱液为 pH7.0、50mmol/L 的磷酸缓冲液,洗脱流速为 0.5mL/min,每 5min 收集 1 管,收集到的样品通过紫外分光光度计在波长 280nm 处检测蛋白的含量,并绘制出洗脱曲线,同时测定样品清除超氧阴离子自由基 ($\text{O}_2^{\cdot-}$) 的能力,具有清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 能力的样品管即为抗氧化活性绿茶多肽,收集具有抗氧化活性的蛋白样品,并冷冻干燥^[9]。

1.2.3 绿茶抗氧化多肽的纯度鉴定及分子量的测定 采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳法,分离胶浓度为 12%,堆积胶浓度为 5%,电极缓冲液为 Tris-甘氨酸电泳缓冲液,用水:甲醇:冰醋酸 (9:9:2) 的 0.1% 考马斯亮蓝 R-250 溶液染色,水:甲醇:冰醋酸 (8:1:1) 的溶液脱色,采用标准分子量蛋白质作标准,溴酚蓝为指示剂,以分子量的对数对各蛋白相对迁移率做出标准曲线,再根据绿茶抗氧化肽的相对迁移率从标准曲线上读取相对分子量^[10-12]。

1.2.4 绿茶抗氧化多肽对 $\cdot\text{OH}$ 清除能力的测定 采用 Fenton 检测法。 H_2O_2 和 Fe^{2+} 混合发生 Fenton 反应,生成具有很高反应活性的 $\cdot\text{OH}$,其能够被水杨酸有效的捕捉,并生成有色物质,若加入具有清除作用的物质,便会与水杨酸竞争,从而使有色产物生成量减少。在 10mL 的试管中依次加入 6mmol/L 的 FeSO_4 溶液 1mL,不同浓度的绿茶抗氧化多肽溶液 1mL,

6mmol/L 的 H_2O_2 溶液 1mL,摇匀,静置 10min,然后加入 6mmol/L 的水杨酸溶液 1mL,摇匀,静置 30min 后于 510nm 处测定其吸光值^[13-14]。清除率计算公式为:

$$\text{清除率 } S(\%) = (1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}) \times 100 \quad \text{式(1)}$$

其中: A_0 为空白对照管; A_i 为某质量浓度多肽的吸光值; A_j 为无水杨酸时多肽的吸光值。

1.2.5 绿茶抗氧化多肽对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 清除能力的测定 采用邻苯三酚检测法。在试管中加入 5mL pH 为 8.2 浓度为 50mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液,1.8mL 不同浓度的绿茶抗氧化多肽于 25℃ 恒温水浴中放置 20min,再加入 200 μL 3mmol/L 的邻苯三酚溶液,立即混匀倒入比色杯中,用紫外分光光度计在 325nm 处测定其吸光值,每反应 30s 记录一组,共反应 5min。将记录的数据以时间为横坐标,吸光值为纵坐标,做直线回归得到的斜率表示绿茶抗氧化多肽清除超氧阴离子的速率 V_1 ;按同样的方法测定邻苯三酚自氧化速率 V_0 ,即不加样品时所测定的速率^[15]。清除率计算公式为:

$$\text{清除率 } (\%) = \frac{V_1 - V_0}{V} \times 100 \quad \text{式(2)}$$

2 结果与讨论

2.1 凝胶过滤层析法分离绿茶抗氧化肽的研究

凝胶过滤层析法是利用球状凝胶内筛孔的大小,在不同水力学半径的分子通过凝胶填料时,其运行路径存在差异,从而将不同大小的蛋白质进行了分离^[16]。绿茶粗蛋白提取液在葡聚糖凝胶 Sephadex G-75 层析柱上的洗脱曲线如图 1 所示。

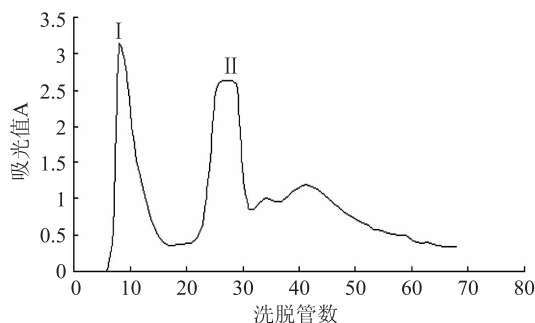


图1 绿茶粗蛋白提取液在 Sephadex G-75 层析柱上的洗脱曲线

Fig.1 Elution curve of the crude protein extraction from green tea on Sephadex G-75 Chromatography

从图 1 可知,葡聚糖凝胶 Sephadex G-75 层析柱能很好的分离绿茶粗蛋白,绿茶粗蛋白提取液经过 Sephadex G-75 层析柱后得到两个主洗脱峰,峰 I 范围是 8~15 管,峰 II 范围是 23~30 管,在 30 管以后有一些小的次峰,并且未能完全分离。通过测定各洗脱管中样品清除超氧阴离子自由基 ($\text{O}_2^{\cdot-}$) 的能力,其中具有清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 能力的管为 10~14 管,说明具有抗氧化活性的多肽主要集中在峰 I,即绿茶抗氧化多肽在 15 管之前就被洗脱出来,收集 10~14 管的分离样品进行冷冻干燥,进一步分析其纯度及分子量。

2.2 绿茶抗氧化多肽纯度的研究

在 SDS-PAGE 电泳法中蛋白质仅存在分子大小的差别,于是可利用分子量差异将各种蛋白质分开,当只有单条条带出现时,就可以说明其达到了电泳纯,通过凝胶成像分析系统还可以得出条带成分所占的百分比^[17-18]。绿茶粗蛋白提取液及经凝胶层析分离后所得样品的 SDS-PAGE 电泳图如图 2 所示。

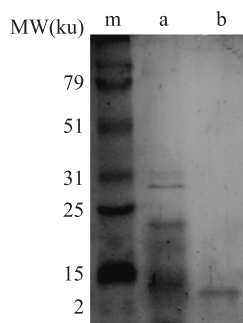


图 2 SDS-PAGE 电泳图

Fig.2 The electrophoretogram of the SDS-PAGE

注:m;marker;lane a:绿茶蛋白粗提取液;
lane b:凝胶层析后收集的多肽样品。

从 SDS-PAGE 电泳图(图 2)中可以看到, lane a 即绿茶蛋白粗提取液中蛋白相对分子质量主要集中在 2~31ku, lane b 即经凝胶层析分离后的多肽样品只有 1 条条带,基本没有其它杂蛋白条带,说明此多肽已达到电泳纯,也说明葡聚糖凝胶 Sephadex G-75 层析柱对绿茶抗氧化肽进行了完全纯化,其相对分子质量在 15ku 以下。

2.3 绿茶抗氧化多肽抗氧化活性的研究

2.3.1 绿茶抗氧化多肽对·OH 清除能力的研究 在众多的自由基中,羟自由基是已知的最活泼的自由基,反应性极强,是对生物分子破坏能力最强的自由基之一,导致机体受损和基因突变,引起机体衰老和病变。因此,清除·OH 对于机体健康而言十分重要^[19]。

不同浓度绿茶抗氧化多肽清除羟自由基效果的结果如图 3 所示,绿茶抗氧化多肽对羟自由基的清除率随着其浓度的增加而表现出增强的趋势,具有较好的量效关系,经计算得出绿茶抗氧化多肽对·OH 的半清除浓度(IC_{50})为 0.069 $\mu\text{g/mL}$ 。此结果说明了绿茶抗氧化多肽清除·OH 的能力明显强于相关报道的多肽物质^[20-21],可能是因为此种抗氧化活性肽含有某些能与自由基反应的特殊基团,能最大的暴露而充分与自由基作用进而提高了对自由基的捕捉能力,从而表现出较强的清除自由基的能力。

2.3.2 绿茶抗氧化多肽对 O_2^- 清除能力的研究 O_2^- 虽然本身不太活泼,但是机体内寿命最长的自由基,通常作为自由基链式反应的引发剂,产生活性更强的过氧化氢和羟自由基,是生物体系中自由基产生的根源,并且 O_2^- 及其衍生的自由基均具有细胞毒性,会导致细胞 DNA 损伤及细胞膜损伤,所以清除 O_2^- 意义很大^[21-23]。

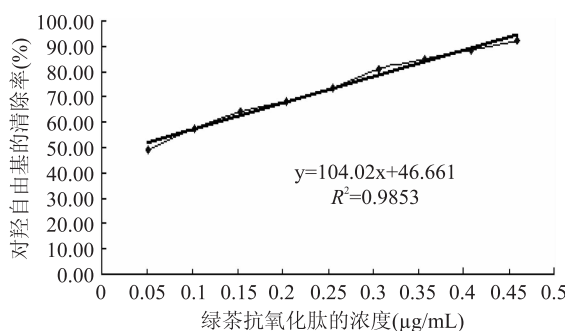


图 3 绿茶抗氧化多肽清除·OH 的量效关系

Fig.3 Relationship between concentration and scavenging effect of green-tea antidexiodant peptide on ·OH

不同浓度绿茶抗氧化多肽清除 O_2^- 效果的结果如图 4 所示,绿茶抗氧化多肽浓度在 2.50~25.00 $\mu\text{g/mL}$ 范围时,对 O_2^- 的清除率随着其浓度的增加而表现出明显的增强趋势,且具有较好的量效关系。在浓度大于 25.00 $\mu\text{g/mL}$ 时,对 O_2^- 的清除率随着其浓度的增加几乎没有多大的变化,其最高清除率为 71.43%,经计算得出绿茶抗氧化多肽对 O_2^- 的半清除浓度(IC_{50})为 18.462 $\mu\text{g/mL}$ 。从图中可看出,绿茶抗氧化肽对 O_2^- 的清除率与 V_c 相当,略低于 V_c 。 V_c 对 O_2^- 的半清除浓度(IC_{50})为 11.186 $\mu\text{g/mL}$ 。

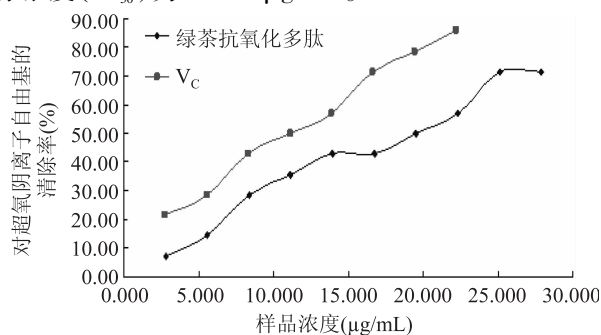


图 4 样品清除 O_2^- 的量效关系

Fig.4 Relationship between concentration and scavenging effect of the samples on O_2^-

3 结论

通过对绿茶抗氧化肽的分离纯化及抗氧化活性的研究,实验结论如下。

3.1 绿茶粗蛋白提取液经过 Sephadex G-75 层析柱后得到两个主洗脱峰,其中峰 I 处的多肽样品具有良好的抗氧化活性,即绿茶抗氧化多肽在峰 I 处被洗脱出来。

3.2 SDS-PAGE 电泳图谱显示,经凝胶层析分离纯化得到的多肽样品(峰 I)只有 1 条条带,基本没有其它杂蛋白条带,说明此多肽已达到电泳纯,即通过葡聚糖凝胶 Sephadex G-75 层析对绿茶抗氧化肽得到了完全的纯化。

3.3 通过 SDS-PAGE 电泳法测定绿茶抗氧化肽的相对分子质量,测定出纯化得到的绿茶抗氧化肽相对分子质量为 2~15ku。

3.4 通过·OH 清除法及 O_2^- 清除法研究绿茶抗氧化多肽纯品的抗氧化活性,结果表明绿茶抗氧化多

肽对 $\cdot\text{OH}$ 及 $\text{O}_2\cdot$ 均有较强的清除作用,其半清除浓度(IC_{50})分别为0.069、18.462 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

参考文献

- [1] 陈宗懋.茶叶内含成分及其保健功效[J].中国茶叶,2009(5):4-6.
- [2] 晓春,黄继珍,沈生荣,等.茶叶生物化学[M].北京:中国农业出版社,2003:9-21.
- [3] 周媛媛,周瑞宝.大豆多肽的分离纯化与抗氧化活性研究[J].中国油脂,2008,33:34-36.
- [4] 徐力,李相鲁,黄宜兵,等.小分子玉米肽保护线粒体抗氧化损伤的研究[J].高等学校化学学报,2004,25:1073-1075.
- [5] Hwang JY, Shue YS, Chang HM. Antioxidative activity of roasted and defatted peanut kernels [J]. Food Research International, 2001, 34: 639-647.
- [6] 任海伟,王常青,宋育璇.黑头多肽分离及其抗氧化活性的研究[J].天然产物研究与开发,2009,21:136-139.
- [7] 陈芳,陈久存.藻胆蛋白提取分离及抗氧化活性的测定[J].陕西理工学院学报,2007,23(2):62-64.
- [8] Lianqing Shen, Xiangyang Wang, Zhongying Wang, et al. Studies on tea protein extraction using alkaline and enzyme methods [J]. Food Chemistry, 2008, 107(2): 929-938.
- [9] 陈钧辉,李俊,张太平,等.生物化学实验[M].北京:科学出版社,2008.
- [10] 魏文志,夏文水,吴玉娟.小球藻糖蛋白的分离纯化与抗氧化活性评价[J].食品与机械,2006,22(5):20-22.
- [11] 李莹莹,吴彩娥,杨剑婷,等.白果蛋白质提取及 SDS-PAGE 分析[J].食品科学,2010,32(22):36-40.
- [12] 张龙翔,张庭芳,李令媛.生化实验方法和技术[M].北京:高等教育出版社,1981,112-118.
- [13] Smirnoff N, Cumbes QJ. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes [J]. Phytochemistry, 1989(28): 1057-1060.
- [14] 刘明.豆粕发酵制备抗氧化肽的研究[D].厦门:集美大学,2007.
- [15] 吴建中.大豆蛋白的酶法水解及产物抗氧化活性的研究[D].广州:华南理工大学,2003.
- [16] 汪家政,范明.蛋白质技术手册[M].北京:科学出版社,2000.
- [17] 陆建.蛋白质纯化技术及应用[M].北京:化学工业出版社,2005.
- [18] 孟如杰,田亚平.银杏种仁中一种抗氧化活性蛋白的纯化及性质[J].天然产物研究与开发,2010,22:388-391.
- [19] 潘牧.脱皮冷榨菜籽蛋白的制备及其性质的研究[D].合肥:合肥工业大学,2009.
- [20] 张焕新,臧大存,刘婧,等.银杏肽的抗氧化性研究[J].食品研究与开发,2008,29(12):27-29.
- [21] 王兴平,谢笔均,潘思轶,等.葛仙米藻蓝蛋白抗氧化作用研究[J].食品科学,2007,28(12):458-461.
- [22] Dorman HJD, Peltoketo A, Hiltunen R. Characterization of the antioxidant properties of deionised aqueous extracts from selected Lamiaceae Herbs [J]. Food Chemistry, 2003, 83: 255-262.
- [23] Macdonald J, Galley HF, Webster NR. Oxidative stress and gene expression in sepsis [J]. British Journal of Anaesthesia, 2003, 90: 221-232.

我国成全球巧克力消费最具潜力市场之一

巧克力作为广受大众欢迎的高端休闲零食由来已久,据行业预测,2016 年全球巧克力以及相关产业销售额将从 2005 年的 1.05 亿新币(1 新元约合人民币 4.8 元)增长到 1.24 亿新币,其中亚洲市场将会成为巧克力产业发展的主要动力。然而,随着生活质量的提高,人们对巧克力品质和口味的需求也日益挑剔,除了用精美的产品外形设计来吸引消费者,各大国际巧克力品牌也开始注重原料质量认证和口味设计创新。

近日某知名法国巧克力品牌举行新品发布会。据介绍,该品牌为了迎合消费者追求巧克力质量的趋势,专门对可可豆处理采用了独特的高质发酵方式,同时还对全球范围内的可可豆供应商进行培训与监管。

品牌负责人表示,中国的巧克力市场非常大,中国消费者对于巧克力产品需求增长是全球其他市场无法比拟的。如今在各大品牌都力求从方方面面渗透中国市场的情形下,对不同层面中国消费者吸引力的打造是商家们挖空心思专研的方向。该品牌负责人介绍说,公司十分重视根据来自不同国家和地区的消费者口味来开发巧克力产品,比如他们发现亚洲人会更喜欢甜度较低的巧克力,于是品牌也相应生产专门针对亚洲消费者口味的低糖型产品。

来源:慧聪食品工业网