灵芝蛋白酶解产物分析及其抗氧化活性的研究

黄生权[1]，敖宏[1]，曾凡逵[2,3]，杨博[4]
（1. 华南理工大学轻工与食品学院，广东广州 510640）（2. 中国热带农业科学院农产品加工研究所，广东湛江 524001）（3. 农业部热带作物产品加工重点开放实验室，广东湛江 524001）
（4. 华南理工大学生物科学与工程学院，广东广州 510006）

摘要：采用商品蛋白酶Alcalase和Protamex对灵芝蛋白进行水解，并对灵芝蛋白水解前后抗氧化活性的变化进行了比较。结果表明：灵芝蛋白经过蛋白酶Alcalase和Protamex水解10 h后，氨基酸态氮含量从酶解前的0.15 mg/mL分别增长到0.61 mg/mL和0.54 mg/mL；Protamex酶解得到的游离氨基酸Lys、Val、Leu、Thr、Phe、Ala、Arg、Ile、Cys、His和Try含量较高，Alcalase酶解得到的游离氨基酸Ala、Val、Glu、Leu、Arg、Try和Thr含量较高；灵芝蛋白经过蛋白酶Alcalase和Protamex水解后，清除羟自由基的能力显著增强，水解前·OH自由基清除率为28.70%，水解后分别为39.10%和33.30%；还原力亦显著增强，水解前OD700值为0.21，水解后分别为0.35和0.34。

关键词：灵芝蛋白；蛋白酶；抗氧化；水解
文章篇号：1673-9078(2013)1-24-28

Analysis of Enzymetic Hydrolysis of *Ganoderma lucidum* Protein and Antioxidation of its Hydrolysates

HUANG Sheng-quan[1], AO Hong[1], ZENG Fan-kui[2,3], YANG Bo[4]
(1.College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China) (2.Agriculture Products Processing Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Zhanjiang 524001, China) (3.Key Laboratory of Tropical Crop Products Processing of Ministry of Agriculture, Zhanjiang 524001, China) (4.School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Commercial proteases Alcalase and Protamex were used to hydrolysis *Ganoderma lucidum* protein, the antioxidant activity of *Ganoderma lucidum* protein before and after hydrolysis were evaluated. The results showed that the free amino acid content increased from 0.15 mg/mL to 0.61 and 0.54 mg/mL when use Alcalase and Protamex as catalyzer. The main free amino acid were Lys, Val, Leu, Thr, Phe, Ala Arg, Ile, Cys, His and Try when treated with Protamex, while the main free amino acid were Ala, Val, Glu, Leu, Arg, Try and Thr when treated with Alcalase. Before hydrolysis, the hydroxyl radical scavenging rate of *Ganoderma lucidum* protein was 28.70%, increased to 39.10% and 33.30% when treated with Alcalase and Protamex respectively. The reducing power also increased significantly and the OD 700 was 0.21 before hydrolysis, being increased to 0.35 and 0.34 after hydrolysis.

Key words: *Ganoderma lucidum* protein; proteinase; antioxidation; hydrolysis

灵芝(*Ganoderma lucidum*)属于担子菌纲(*Basidiomycetes*)多孔菌目(*Polyporales*)灵芝科(*Ganodermataceat*)，是一种珍贵的药用真菌。灵芝的重要活性物质主要有灵芝蛋白、灵芝多糖和三萜[1]。1989年，Kino和Tanaka等[2,3]首次从灵芝中发现了一种具有免疫活性的球蛋白，并将该蛋白命名为LZ-8，且蛋白具有免疫调节功能。

灵芝蛋白还具有较强的抗氧化活性。Lin和Yen[4,5]等报道了灵芝水溶性蛋白和醇溶性蛋白都具有抗氧化活性；赵镭等[6~9]比较了富硒灵芝蛋白和普通灵芝蛋白的抗氧化活性，发现富硒灵芝蛋白的抗氧化活性比普通灵芝蛋白的抗氧化活性强；杜明等[10~12]研究了几种不同种类的灵芝粗蛋白的抗氧化活性，发现每种粗蛋白·OH自由基的清除率与蛋白的浓度之间的关系可以用对数方程来表示；杜明等[13]从富硒灵芝蛋白中纯化

收稿日期：2012-11-07
基金项目：国家自然科学基金项目（20436020），广东省科技计划项目（2009A030700007）
作者简介：黄生权（1977-），男，博士，主要从事制糖工程、食品科学的研究
通讯作者：杨博（1973-），男，博士，教授，主要从事酶工程，发酵工程，蛋白提取与分离纯化研究

出一种分子量为 36.6 kDa 的灵芝蛋白 Se-GL-P，发现其具有较高的·OH 自由基和超氧自由基清除活性。

一般情况下，经过蛋白酶水解后的蛋白质其抗氧化作用会增强，如大豆蛋白[14]。然而关于酶法水解灵芝蛋白及其抗氧化效果的评价未见相关报道。本研究采用 Alcalase 和 Protamex 两种商品蛋白酶对灵芝蛋白进行水解并对水解后灵芝蛋白的抗氧化效果进行评价。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

赤灵芝子实体，由浙江龙泉市科达农副产品有限公司提供，产地浙江龙泉灵芝栽培基地；Protamex 蛋白酶，酶活为 87250 U/g，Alcalase 碱性蛋白酶，酶活力为 68000 U/mL，均由丹麦 NovoNordisk 公司提供，所用试剂均为分析纯。

注：蛋白酶活力单位的定义为：1 g Protamex 酶粉（或 1 mL Alcalase 液体酶），在 50℃和 pH 7.5 条件下，1 min 水解酪素产生 1μg 酪氨酸为一个活力单位，以 U/g(U/mL)表示。

1.2 主要仪器

TDL-40B 台式离心机，上海安亭科学仪器厂；DYY-4C 型电泳仪，北京市六一仪器厂；BIO-RAD 制胶器，BIO-RAD 公司；KDN-04A 定氮仪，上海洪纪仪器设备有限公司；722N 可见分光光度计，上海精密科学仪器有限公司；JA2003 电子天平，上海精科天平仪器厂；HK-06B 摇摆式高速粉碎机，广州市旭郎机械设备有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 灵芝蛋白的提取[6]

准确称取 70.00 g 灵芝子实体，粉碎到 20 目，加入 1000 mL 0.05 mol/L 的磷酸缓冲液(pH 7.5)于 4 ℃的展示柜中浸泡过夜，4000 r/min 离心 10 min，取上清液缓慢添加硫酸铵至 85%饱和度，4 ℃静止过夜。4000 rpm 离心 40 min，用 40 mL 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)缓冲液溶解，1000 mL 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)缓冲液分 3 次在 4 ℃下透析 24 h，透析所得灵芝蛋白提取液，冰箱冷藏备用。

1.3.2 蛋白水解酶活力的测定

QB/T 1803-1993 工业酶制剂通用实验方法（福林法）。

1.3.3 蛋白质的含量测定

凯氏定氮法（GB/T 5009.5-2003）。

1.3.4 灵芝蛋白凝胶电泳

电泳板厚度为 0.75 mm，胶浓度为 12%。电泳前取 500 μL 灵芝蛋白样品，加 1000 μL 无水乙醇，摇匀后 14000 r/min 离心 3 min，用电吹风将沉淀吹干，然后用 50 μL 上样缓冲液溶解沉淀，即得浓缩 10 倍的灵芝蛋白样品，将浓缩后的样品煮沸 3 min 再进行凝胶电泳。

1.3.5 灵芝蛋白酶法水解

取制备好的灵芝蛋白提取液 5 mL 于 10 mL 的甘油管中，预热到 45 ℃后分别加入 10 mg Protamex 和 10 μL Alcalase 蛋白酶，在 45 ℃的水浴摇床中进行水解。

1.3.6 氨基酸态氮的测定

GB/T5009.39-96 甲醛值法。

1.3.7 灵芝蛋白酶水解液中游离氨基酸含量的测定

采用反向 HPLC 法[15]测定游离氨基酸含量。色谱条件：Waters 高效液相色谱仪，PICO.TAG 氨基酸分析柱，柱温为 38 ℃，检测波长为 254 nm，流速为 1 mL/min。

1.3.8 抗氧化活性测定

1.3.8.1 羟自由基(·OH) 清除率的测定[14]

取2 mL灵芝蛋白样品，依次加入2 mL 6 mmol/L的$FeSO_4$、2 mL 6 mmol/L的H_2O_2，混匀后静置10 min，再加入2 mL 6 mmol/L水杨酸，混匀，静置30 min后，在510 nm处测吸光值记为A_i，当用双蒸水代替水杨酸时测得的吸光值记为A_j。空白对照组以双蒸水代替样品测得的吸光值记为A_0。则样品对羟自由基(·OH)的清除率(%)可用$E_{(\cdot OH)}$表示为：

$$E_{(\bullet OH)}=\left[1-\frac{(A_i-A_j)}{A_0}\right]\times 100\%$$

1.3.8.2 还原力的测定[16]

取 1 mL 的灵芝蛋白样品与 2.5 mL 的磷酸缓冲液(0.20 mol/L，pH 6.6)及 2.5 mL 的铁氰化钾(1%)混合，于 50 ℃下保温 20 min。然后将 2.5 mL 10%的三氯乙酸加入到上述混合液中，4000 r/min 离心 10 min。取 2.5 mL 上清液，加入 2.5 mL 的蒸馏水以及 0.5 mL 的$FeCl_3$ (0.1%)混合后于 700 nm 下读取吸光度。吸光度越大，表明样品的还原力越强。

2 结果与讨论

2.1 灵芝蛋白凝胶电泳

经测定，灵芝蛋白提取液中总蛋白含量为 5.06 mg/mL，取按 1.3 制备的灵芝蛋白提取液进行凝胶电泳，上样量为 15 μL。灵芝蛋白凝胶电泳结果如图 1 所示。

从图 1 可以看出经硫酸铵沉淀，Tris-HCl 透析过的灵芝蛋白提取液中含有 7 条清晰的蛋白条带，分子量在 10~90 kDa 之间。

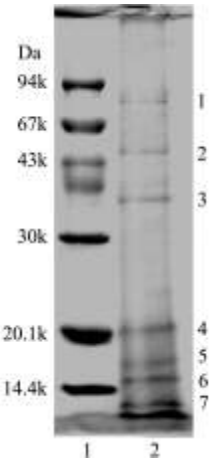


图 1 灵芝蛋白 SDS-PAG 凝胶电泳图

Fig.1 SDS-PAG gel electrophoresis photo of *Ganoderma lucidum* protein

2.2 酶解实验结果

2.2.1 氨基酸态氮含量随酶解时间的变化

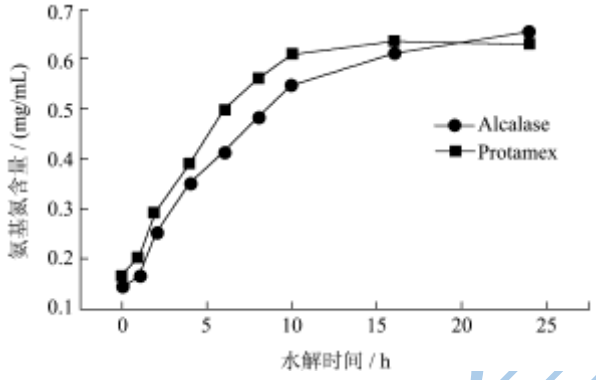


图 2 酶解时间对灵芝蛋白酶解液中氨基酸态氮含量的影响

Fig.2 Effect of enzymatic hydrolysis time on the content of amino nitrogen in hydrolysate of *Ganoderma lucidum* protein

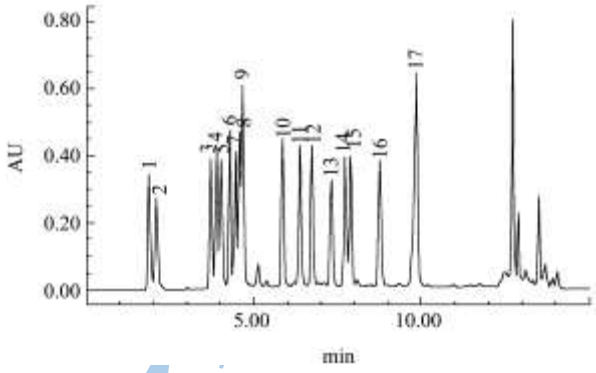


图 3 游离氨基酸标样的 HPLC 图谱

Fig.3 HPLC Spectrum of free amino acid standard sample

注：1.天门冬氨酸，2.谷氨酸，3.丝氨酸，4.甘氨酸，5.组氨酸，6.精氨酸，7.苏氨酸，8.丙氨酸，9.脯氨酸，10.酪氨酸，11.缬氨酸，12.蛋氨酸，13.半胱氨酸，14.异亮氨酸，15.亮氨酸，16.苯丙氨酸，17.赖氨酸。

酶解液中氨基酸态氮的含量随时间的变化如图 2 所示。从图 2 中可以看出，未酶解前，灵芝蛋白提取液中的氨基酸态氮含量为 0.15 mg/mL，酶解液中氨基酸态氮的含量随酶解时间的延长而增加。Alcalase 蛋白酶作用 10 h 后基本达到平衡，氨基酸态氮含量为 0.61 mg/mL。Protamex 蛋白酶水解灵芝蛋白相对缓慢，水解 10 h 后，水解液中氨基酸态氮含量为 0.55 mg/mL。Alcalase 蛋白酶相对 Protamex 蛋白酶水解灵芝蛋白的效率更高，可能的原因是 pH 8.0 的环境更有利于碱性蛋白酶 Alcalase 对灵芝蛋白进行水解。

2.2.2 游离氨基酸的组成随酶解时间的变化

表 1 Protamex 蛋白酶酶解时间对灵芝蛋白酶解液中游离氨基酸的含量的影响 (10^{-2} mg/mL)

Table 1 Effect of Protamex enzymaetic hydrolysis time on the content of free amino acid in hydrolysate of *Ganoderma lucidum* protein

游离氨基酸	水解时间/h						
	0	2	4	6	8	10	24
天门冬氨酸	0.05	0.11	0.12	0.11	0.16	0.19	0.19
谷氨酸	0.18	0.74	0.78	0.85	0.92	1.04	1.12
色氨酸	0.42	1.54	1.57	1.67	1.88	2.07	2.30
甘氨酸	0.18	0.68	0.75	0.77	0.81	1.00	1.10
组氨酸	0.53	1.51	1.97	1.99	2.09	2.35	2.43
精氨酸	0.76	1.86	2.08	2.20	2.39	2.62	2.75
苏氨酸	0.80	2.19	2.41	2.57	2.78	3.11	3.21
丙氨酸	0.71	2.04	2.46	2.62	2.78	3.03	3.12
脯氨酸	0.14	0.48	0.51	0.55	0.68	0.82	0.96
酪氨酸	0.19	0.53	0.67	0.72	0.93	1.14	1.24
缬氨酸	0.92	2.19	2.66	2.70	2.92	3.29	3.60
蛋氨酸	0.18	0.46	0.56	0.63	0.72	0.73	0.79
半胱氨酸	1.47	1.71	1.95	2.13	2.34	2.35	2.44
异亮氨酸	0.70	1.52	1.93	2.01	2.12	2.23	2.60
亮氨酸	1.03	2.50	3.27	3.30	3.40	3.59	3.59
色氨酸	0.20	0.52	0.72	0.75	0.80	0.81	0.82
苯丙氨酸	0.83	2.10	2.44	2.50	2.65	2.78	3.19
赖氨酸	1.18	1.78	2.96	3.20	3.60	3.87	4.27
总量	10.47	24.48	29.82	31.27	33.97	37.03	39.72

游离氨基酸标准样品的 HPLC 图谱如图 3 所示，通过将样品的出峰时间同标准样品的出峰时间进行对比，确定样品的峰对应的游离氨基酸的种类并计算其含量。

酶解液中游离氨基酸的组成随酶解时间的变化如表 1 和表 2 所示。由表 1 可以看出，Protamex 蛋白酶水解 12 h 后，Lys、Val、Leu、Thr、Phe、Ala、Arg、Ile、Cys、His、Try 含量较高。由表 2 可以看出，Alcalase 蛋白酶水解 12 h 后，Ala、Val、Glu、Leu、Arg、Try、Thr 的含量较高。酶法水解灵芝蛋白产生的游离氨基

酸的量同赵镭报道的灵芝蛋白总的氨基酸组成相比不太一致[6]，可能的原因是酶对蛋白质的水解具有一定的选择性，Alcalase 蛋白酶主要裂解 Glu、Met、Leu、Tyr、Lys 和 Gln 的羧端肽键[17]。

表2 Alcalase蛋白酶酶解时间对灵芝蛋白酶解液中游离氨基酸的含量的影响(10^{-2} mg/mL)

Table 2 Effect of Alcalase enzymatic hydrolysis time on the content of free amino acid in hydrolysate of *Ganoderma lucidum* protein

游离氨基酸	水解时间/h						
	0	2	4	6	8	10	12
天门冬氨酸	0.34	0.61	0.74	1.03	1.37	1.62	1.76
谷氨酸	1.30	3.68	4.51	5.03	5.44	5.58	5.63
色氨酸	0.84	2.40	2.86	3.46	4.44	4.67	4.90
甘氨酸	0.48	1.07	1.40	1.71	2.36	2.58	3.00
组氨酸	0.45	1.11	1.84	2.28	2.82	3.33	3.40
精氨酸	1.29	1.84	3.02	3.57	4.53	4.74	4.99
苏氨酸	1.22	1.85	2.75	3.05	3.95	4.26	4.52
丙氨酸	1.27	3.65	4.72	5.42	5.61	5.93	6.10
脯氨酸	0.38	0.54	0.78	0.92	1.47	2.05	2.17
酪氨酸	0.25	0.91	1.57	1.84	2.24	2.36	2.45
缬氨酸	0.14	3.28	3.77	4.52	4.99	5.55	5.87
蛋氨酸	0.51	0.96	0.98	1.13	1.24	1.74	1.86
半胱氨酸	0.62	1.48	1.52	1.59	1.67	2.16	2.24
异亮氨酸	0.95	1.42	1.56	1.76	2.31	2.89	3.02
亮氨酸	1.50	3.64	3.95	4.36	4.80	5.07	5.19
色氨酸	0.20	0.35	0.39	0.41	0.60	0.70	0.96
苯丙氨酸	1.19	1.77	1.94	2.09	2.73	3.22	3.39
赖氨酸	2.02	2.04	2.16	2.40	2.51	2.97	3.23
总量	14.92	32.59	40.47	46.58	55.08	61.42	64.69

2.3 灵芝蛋白及灵芝蛋白酶解物的抗氧化作用比较

2.3.1 对·OH 自由基的清除作用

灵芝蛋白及灵芝蛋白酶解物清除·OH 自由基效果如图 4 所示，对照组为不添加任何外源蛋白酶在相同的条件下进行水解的灵芝蛋白。从图中可以看出，与对照组相比，灵芝蛋白经过 Alcalase 蛋白酶和 Protamex 蛋白酶水解后，清除·OH 自由基的能力显著增加(p<0.05)，且采用 Alcalase 蛋白酶水解得到的灵芝蛋白水解物清除·OH 自由基的能力比采用 Protamex 蛋白酶水解得到的灵芝蛋白水解物清除·OH 自由基的能力更强，二者同样达到了显著水平(p<0.05)。杜明等[10]报道灵芝蛋白的水提取物的浓度为 0.2 mg/mL 时，·OH 自由基的清除率为 18.65%，本研究的结果与其报道的结果一致。

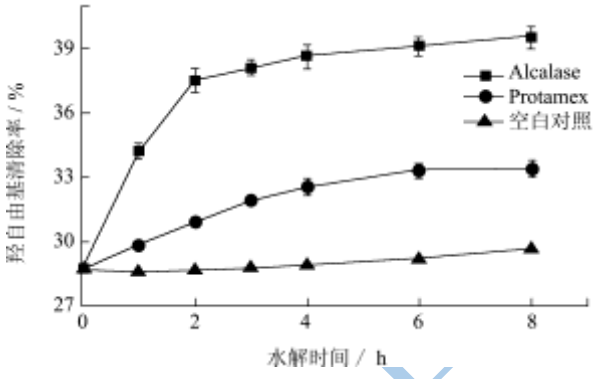


图 4 灵芝蛋白酶解物对·OH 自由基的清除作用

Fig.4 Hydroxyl radical scavenging rate of *Ganoderma lucidum* protein hydrolysate

2.3.2 还原力的比较

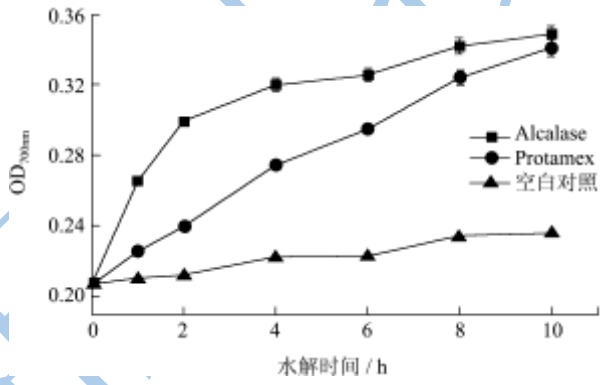


图 5 灵芝蛋白酶解液的还原力

Fig.5 Reducing power of *Ganoderma lucidum* protein hydrolysate

灵芝蛋白及灵芝蛋白酶解物的还原力如图 5 所示，从图中可以看出，灵芝蛋白经过 Alcalase 蛋白酶和 Protamex 蛋白酶水解以后，还原力显著增加，与对照组相比，都达到了显著水品(p<0.05)。Alcalase 酶解物在水解 4 h 以前还原力增长较快，4 h 以后增长缓慢，酶解 10 h 后，OD 700 值为 0.35。Protamex 酶解物的还原力随着酶解时间的延长而增加，当酶解 10 h 以后，OD 700 值为 0.34，与 Alcalase 酶解 10 h 小时后的灵芝蛋白水解物还原力相当，二者差异不显著(p>0.05)。总体上，Alcalase 蛋白酶水解得到的灵芝蛋白酶解物的还原力比 Protamex 蛋白酶水解得到的灵芝蛋白酶解物的还原力增长快，这跟灵芝蛋白酶解液对清除·OH 自由基的作用一致(图 4)。

3 结论

3.1 灵芝蛋白经 Alcalase 蛋白酶和 Protamex 蛋白酶水解后，氨基酸态氮含量明显增加，水解前为 0.15 mg/mL，水解 10 h 后分别为 0.61 mg/mL 和 0.54 mg/mL。

3.2 不同蛋白酶对灵芝蛋白的水解具有选择性。

Protamex 蛋白酶水解 12 h 后，Lys、Val、Leu、Thr、Phe、Ala、Arg、Ile、Cys、His、Try 含量较高；Alcalase 蛋白酶水解 12 h 后，Ala、Val、Glu、Leu、Arg、Try、Thr 的含量较高。

3.3 灵芝蛋白经 Alcalase 蛋白酶和 Protamex 蛋白酶水解后，清除羟自由基的能力显著增强，水解前·OH 自由基清除率为 28.70%，水解后分别为 39.10%和 33.30%。

3.4 灵芝蛋白经 Alcalase 蛋白酶和 Protamex 蛋白酶水解后，还原力显著增强，水解前 OD700 值为 0.21，水解后分别为 0.35 和 0.34。

参考文献

[1] 陈建旭,黄生权,敖宏,等.赤灵芝中水溶性蛋白响应面法优化提取[J].现代食品科技,2009,25(6):661-664, +668

[2] Kino K, Yamashita A Yamaoka K, Watanabe J, et al. Isolation and characterization of a new immunomodulatory protein, Ling Zhi-8 (LZ-8), from Ganoderma lucidium [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1989, 264(1): 472-478

[3] Tanaka S, Ko K, Kino K, et al. Complete amino acid sequence of an immunomodulatory protein, Ling Zhi-8 (LZ-8). The Journal of Biological Chemistry. 1989, 264(28): 16372-16377

[4] Lin JM, Lin CC, Chen MF, et al.Radical scavenger and antihepatotoxic activity of Ganoderma neo-japonicum [J]. J. Ethnopharmacol, 1995, 47(1): 33-41

[5] Yen G C, Wu J Y. Antioxidant and radical scavenging properties of extracts from Ganoderma tsugae [J]. Food Chemistry, 1999, 65: 375-379

[6] 赵镭,灵芝生物富硒及富硒灵芝蛋白的分离纯化和抗氧化性研究[D].北京:中国农业大学食品与营养工程学院,2004

[7] 赵镭,高海燕,吴继红,等.富硒灵芝不同提取物清除自由基活性的 ESR 研究[J].中国食品学报,2007,7(2):11-16

[8] Zhao L, Zhao G, Zhao Z, et al. Selenium Distribution in a Se-Enriched Mushroom Species of the *Genus Ganoderma* [J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2004, 52: 3954-3959

[9] Zhao L, Zhao G, Hui B, et al. Effect of selenium on increasing the antioxidant activity of protein extracts from a selenium-enriched mushroom species of the *Ganoderma Genus* [J]. Journal of Food Science, 2004, 69: 183-187

[10] 杜明,胡小松,赵广华.富硒灵芝中不同粗蛋白的抗氧化活性及其协同作用研究[J].食品工业科技,2006,27(9):111-114

[11] 杜明,赵镭,赵广华,等.富硒灵芝中不同蛋白提取物的组成特性及抗氧化活性研究[J].食品与发酵工业,2006,32(6):11-15

[12]]杜明,赵镭,陈芳,等.富硒灵芝中高抗氧化活力、高硒含量的水溶性硒蛋白的纯化.食品与发酵工业,2006,32(2):108-112

[13] 杜明,赵镭,李朝睿,等.富硒灵芝中一种新含硒蛋白的纯化、性质及其自由基清除活性研究.高等学校化学学报,2007,28(1):75-78

[14] 王章存,徐贤，魏翠平.大豆蛋白的酶解及其抗氧化活性研究.中国粮油学报,2009,24(5):21-24

[15] 高建华,宁正祥.不同蛋白酶对鱼鳞胶原蛋白酶解产物的氨基酸分析[J].食品科技,2009,34(5):117-119

[16] 陈双,史俊燕,钟洁,等.小麦麸皮黄酮的微波提取及抗氧化作用研究[J].粮油与饲料工业,2008(9):26-28

[17] Adamson NJ, Reynolds EC. Characterization of casein phosphopeptides prepared using Alcalase:Determination of enzyme specificity [J]. Enzyme and Microbial Technology, 1996, 19(3): 202-207