

拟黑多刺蚁乙醇浸提液的理化性质及抗氧化活性研究

高力, 刘通讯

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 采用 Alcalase 2.4 L 水解拟黑多刺蚁, 以抗氧化活性为指标, 并结合蛋白质利用率、多肽含量等指标比较拟黑多刺蚁及其酶解物的醇提物的理化性质及抗氧化性的区别。结果表明, 在乙醇浓度介于 35~75%, 酶解拟黑多刺蚁醇提物的氨基酸和多肽含量分别介于 4.20~3.19 mg/g 和 5.19~4.07 mg/mL, 是没有经酶解的拟黑多刺蚁醇提物的 2 倍左右。酶解提高了拟黑多刺蚁醇提物的抗氧化性, 在乙醇浓度为 55% 时, 其超氧自由基、DPPH 自由基、羟基自由基清除能力和还原力的 IC_{50} 分别为 0.276、0.106、0.279 和 0.227 mg/mL。同时, 酶解拟黑多刺蚁醇提物的重要微量元素 Zn、Mn 和 Ca 也有显著提高。

关键字: 拟黑多刺蚁; 酶解; 抗氧化活性

文章编号: 1673-9078(2013)4-741-744

Physical-chemical and Antioxidant Properties of the Alcohol Extracts of *Polyrhachis vicina* Roger

GAO Li, LIU Tong-xun

(College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: *Polyrhachis vicina* Roger was hydrolyzed by alcalase 2.4L. The differences in physical-chemical and antioxidant activity of the extracts and hydrolysate of *Polyrhachis vicina* Roger were evaluated. The results showed that, when alcohol concentration was between 35~75%, the amino acid and peptide contents of the extracts of hydrolyzed *Polyrhachis vicina* Roger were 4.20~3.19 mg/g and 5.19~4.07 mg/mL respectively, almost 2 times higher than that of the unhydrolyzed. The enzymatic hydrolysis could improve the antioxidant activity of the extracts. When alcohol concentration was of 55%, the IC_{50} of superoxide radical, DPPH· and hydroxyl radical and reducing power were 0.276, 0.106, 0.279 and 0.227 mg/mL, respectively. Furthermore, the important trace minerals such as Zn, Mn and Ca of the alcohol extract of enzymatic hydrolysates were increased significantly.

Key words: polyrhachis vicina roger; enzymatic hydrolysis; antioxidant activity

蚂蚁酒在蚂蚁制品中占有极高的比重, 已通过审批的有天力神酒、蜉蝗神酒、蚁力神牌滋补酒、宫廷蚁酒、蚂蚁清风酒等^[1]。刘爱文等发现拟黑多刺蚁 30% 乙醇提取液超氧阴离子清除率最高, 其次是 40%, 再次 20%, 50% 乙醇提取液效果最差^[2]。汪建国等将酶解引入蚂蚁酒的制备中以便达到酶解破壁的目的。但尚不清楚酶解对蚂蚁酒理化性质及功能特性影响。

本文主要比较拟黑多刺蚁及其酶解物的醇提物的理化性质及抗氧化性的区别, 分析乙醇浓度对拟黑多刺蚁酶解物的醇提物的影响, 以为拟黑多刺蚁酒的制备提供有益的参考。

1 材料与方

收稿日期: 2012-11-15

作者简介: 高力 (1990-), 女, 硕士, 研究方向粮食、油脂及植物蛋白工程

1.1 材料与仪器

拟黑多刺蚁干 产地云南, 粉碎, 过 40 目筛, 备用; 碱性蛋白酶 (Alcalase 2.4L)。其他化学试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 酶解物制备

根据单因素筛选出来的最适条件设计响应面实验, 固定底物浓度为 8%, 选取酶添加量、酶解温度、pH 值、酶解时间四个因素, 分别对各个抗氧化指标进行优化, 获得了最佳工艺条件: pH=8.73、T=41.59 °C、E/S=0.27%、t=2.27 h。抽滤, 冷冻干燥。

1.2.2 拟黑多刺蚁酶解物的乙醇浸提液

按 1.2.1 所优化酶解蚂蚁粉, 用无水乙醇、蒸馏水配成一定底物浓度 (m/m) 的醇溶液, 常温密封浸提 18 d, 每 3 d 搅拌一次, 4000 r/m 离心 20 min, 抽滤,

收集滤液。拟黑多刺蚁乙醇浸提液：取 2 g 蚂蚁粉用无水乙醇、蒸馏水配成底物浓度 (m/m) 为 2% 的醇溶液 (醇浓度为 55%)，常温密封浸提 18 d，每 3 d 搅拌一次。

1.2.3 羟自由基清除率^[4]

分别测定 0.25 mg/mL、0.5 mg/mL、0.75 mg/mL、1 mg/mL 样品的清除率；DPPH 清除率^[5]分别测定 0.2 mg/mL、0.3 mg/mL、0.4 mg/mL、0.6 mg/mL 样品的清除率；还原力测定^[6]分别测定 2 mg/mL、4 mg/mL、6 mg/mL、20 mg/mL 样品的还原力；铁螯合能力^[7]分别测定 1 mg/mL、2 mg/mL、4 mg/mL、8 mg/mL 样品的螯合能力。

1.2.4 超氧自由基清除能力^[8]

取 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.2, 含 2 mmol/L EDTA) 4.5 mL 于 25 °C 水浴保温 20 min，加入一定体积 3 mmol/L 的邻苯三酚 (实验前于 25 °C 保温) 和同体积的蒸馏水，迅速摇匀，每隔 30 s 测一次 A_{325} nm 值，绘制时间与吸光度间的坐标图，计算自氧化速率 V_1 ，将其控制在 0.050~0.065 A/min 范围内，线性时间为 4.5 min，以样品代替蒸馏水测得 V_2 。分别测定 4 mg/mL、10 mg/mL、15 mg/mL、20 mg/mL 样品的清除率。

$$\text{清除率}(\%) = (V_1 - V_2) / V_2 \times 100\%$$

1.2.5 理化检测指标

pH 值、总酸、总酯、酒精度，白酒分析方法 GBT 10345-2007，氨基酸：高效液相色谱法。蛋白质：凯氏定蛋法。

1.2.6 矿物质含量检测

采用 5% 的硝酸配制不同浓度梯度的金属元素标准溶液；称取 0.4 g 样品加入 5 mL 浓硝酸于微波炉中消解，消解后定容至 50 mL，采用电感耦合等离子体质谱 (ICP-MS) 测定矿物质含量。微波消解条件：第一阶段，温度 120 °C、压强 730 KPa、时间 3 min；第二阶段，150 °C、1200 KPa、3 min；第三阶段，175 °C、1500 KPa、5 min。ICP-MS 条件：RF 功率 1300 W；雾化室温度 2 °C；采样锥 1.0 mm；截取锥 0.4 mm；载气流速 1.18 L/min；冷却气流速 12 L/min；全定量采样模式；采样深度 7.8 mm；扫描方式跳峰；每点停留时间 0.1~0.5 s；元素积分时间 0.3~1.5 s；质谱计数模式脉冲/模拟 (P/A)；质量分辨率 0.65~0.8 amu。

1.2.7 统计分析

绘制清除率与酶解物含量的二元一次方程，计算其 IC_{50} 。

2 结果与分析

2.1 乙醇浓度对酶解拟黑多刺蚁浸提液的影响

表 1 乙醇浓度对酶解拟黑多刺蚁浸提液理化指标的影响

Table 1 Effect of ethanol concentration on physical and chemical indicators of extracts of the *Polyrhachis vicina* Roger

hydrolysate					
乙醇浓度/%	总酸/(g/L)	总酯/(g/L)	总糖/(mg/L)	多肽含量/(mg/mL)	蛋白质含量/(mg/mL)
75	0.19	0.53	151.86	4.07	4.69
65	0.21	0.63	175.83	4.50	5.30
55	0.23	0.74	196.48	4.75	5.58
45	0.23	0.62	205.24	5.00	5.59
35	0.26	0.74	208.71	5.19	5.38

表 2 乙醇浓度对酶解拟黑多刺蚁浸提液抗氧化性的影响

Table 2 Effect of ethanol concentration on antioxidative activity of extracts of the *Polyrhachis vicina* Roger hydrolysate

乙醇浓度/%	超氧 IC_{50} /(mg/mL)	DPPH IC_{50} /(mg/mL)	羟基 IC_{50} /(mg/mL)	还原力 IC_{50} /(mg/mL)
75	0.430	0.133	0.614	0.330
65	0.329	0.117	0.394	0.263
55	0.276	0.106	0.279	0.227
45	0.274	0.104	0.225	0.220
35	0.263	0.117	0.191	0.204

乙醇浓度对酶解拟黑多刺蚁乙醇浸提液的影响见表 1 和 2。除总酸值无明显变化外，酶解拟黑多刺蚁浸提液各项理化指标均随乙醇浓度的升高而降低。这主要是由于拟黑多刺蚁的酸性物质只要由有机酸组成，其溶解度与乙醇浓度无关，而总糖、多肽和蛋白质的溶解性与乙醇的浓度升高而降低。这与宋悦华等的研究结果不同，后者测定了不同溶剂浸泡大黑蚂蚁后的蛋白质和 pH 值，发现蚂蚁经三次沸水浸提与经三次乙醇浸泡所浸提出的蛋白含量相近，乙醇浓度对结果影响不大，用不同浸泡液浸泡蚂蚁，浸泡液 pH 值与浸泡次数关系不大，溶出酸量较少，说明蚂蚁体内的蚁酸不易被水和乙醇溶液溶出。在抗氧化活性方面，除醇浓度为 35% 的 DPPH 自由基清除率较差外，酶解拟黑多刺蚁浸提液的抗氧化能力趋势随乙醇浓度的升高而降低。从多肽含量与各抗氧化的线性分析可知，除了羟基自由基清除能力的相关系数较低外 (0.3513)，超氧自由基、DPPH 自由基、还原力与多肽浓度的相关系数分别为 0.8514, 0.9452, 和 0.9252，呈显著正相关，说明酶解拟黑多刺蚁的乙醇浸提物的抗氧化物质主要来自水解物中的多肽。

从表 3 中得知酶解提高了蚂蚁醇提物各氨基酸含量，但对各氨基酸比例影响不大。乙醇浓度对氨基酸含量有显著性影响，各氨基酸含量随乙醇浓度的降低

而升高, 除色氨酸 Cys 外, 乙醇浓度为 75% 的酶解拟黑多刺蚁浸提液各氨基酸含量显著降低, 乙醇浓度为 35%、45%、55% 的酶解拟黑多刺蚁浸提液的氨基酸含量间差异不大。

2.2 拟黑多刺蚁及其酶解物的醇提物的理化性质及抗氧化性比较拟

表 3 拟黑多刺蚁及其酶解物的醇提物的氨基酸组成 (10² mg/g)

Table 3 Amino acid composition of the extracts from

Polyrhachis vicina Roger and its hydrolysate

氨基 酸	不同醇浓度下酶解拟黑多刺蚁浸提液					拟黑多刺蚁 55% 乙醇浸提液
	35%	45%	55%	65%	75%	
Asp	45.88	50.07	50.7	46.39	37.98	21.05
Glu	71.6	73.69	76.87	71.84	57.79	33.22
Ser	18.35	19.65	18.52	18.18	14.88	8.66
Gly	21.42	21.48	22.21	19.95	16.75	9.21
His	11.1	11.15	9.37	9.6	7.06	2.53
Arg	24.51	25.53	23.39	23.6	19.56	8.89
Thr	21.75	21.97	22.19	20.89	17.74	10.16
Ala	24.64	23.4	24.58	24.36	18.22	11.06
Pro	19.32	20.59	20.42	18.42	16.42	10.13
Tyr	21.93	22.64	22.15	21.95	19.04	10.86
Val	24.73	25.76	25.5	24.9	20.47	10.98
Met	7.8	8.03	7.47	7.09	4.22	3.2
Cys	0.34	0.22	0.18	0.26	0.19	0.14
Ile	24.31	23.8	23.85	23.28	18.32	9.14
Leu	31.16	32.11	31.76	30.69	25.36	11.17
Phe	17.43	16.89	16.2	15.78	12.13	6.31
Lys	23.39	23.13	21.96	20.87	13.3	8.41
总量	409.64	420.11	417.34	398.05	319.41	175.11

拟黑多刺蚁及其酶解物的醇提物的理化性质及抗氧化性比较结果见表 3~5。除总酯无显著性变化外, 酶解显著提高了各种游离氨基酸和总的氨基酸总酸含量, 拟黑多刺蚁的 55% 醇提液的游离氨基酸总量为 1.7511 mg/g, 而在相同的醇浓度下, 酶解拟黑多刺蚁 55% 的醇提液的游离氨基酸总量达到 4.17 mg/g (表 3)。多肽含量也是拟黑多刺蚁的 55% 醇提液的两倍多 (表 4), 从表 5 中可以看出, 酶解蚂蚁醇提物的超氧自由基、DPPH 自由基、羟基自由基清除能力和还原力的 IC₅₀ 分别低于没有酶解的浸提物。王婧等^[10] 的研究表明, 拟黑多刺蚁是制备抗氧化肽的优良载体, 与抗氧化活性相关的三种氨基酸: 抗氧化活性氨基酸、疏水性氨基酸、酸性氨基酸分别占氨基酸总量的 14.83%、43.56%、18.64%。然而由于拟黑多刺蚁含有较多的纤维, 体壳中含有大量的壳聚糖和甲壳素, 矿物质含量高且其在整个 pH 范围蛋白的溶解性较低

^[10]。本文的结果表明可以通过酶解技术, 使与抗氧化活性相关的氨基酸以小肽或游离氨基酸被释放出来, 提高其在乙醇溶液中的溶解性, 从而显著提高了酶解拟黑多刺蚁的醇提液的抗氧化活性。此结果为黑多刺蚁酒的制备提供有益的参考。

表 4 拟黑多刺蚁及其酶解物的醇提物的理化性质

Table 4 Physical and chemical indicators of the extracts from *Polyrhachis vicina* Roger and its hydrolysate

种类	总酸 (g/L)	总酯 (g/L)	总糖 (mg/L)	多肽含量 (mg/mL)	蛋白质含量 (mg/mL)
1	0.32±0.001	0.73±0.003	152.13±1.12	2.21±0.03	3.17±0.03
2	0.23±0.001	0.74±0.002	196.48±1.46	4.75±0.01	5.58±0.02

注: 1, 拟黑多刺蚁浸提液; 2, 拟黑多刺蚁酶解物浸提液; 下同。

表 5 拟黑多刺蚁及其酶解物的醇提物的抗氧化指标

Table 5 Antioxidative activity of the extracts from *Polyrhachis vicina* Roger and its hydrolysate

种类	超氧 IC ₅₀ (mg/mL)	DPPH IC ₅₀ (mg/mL)	羟基 IC ₅₀ (mg/mL)	还原力 IC ₅₀ (mg/mL)
1	0.428	0.118	0.416	0.308
2	0.276	0.106	0.279	0.227

2.3 拟黑多刺蚁及其酶解物的醇提物的矿物质含量

表 6 拟黑多刺蚁及其酶解物的醇提物的矿物质含量 (mg/L)

Table 6 Mineral content of the extracts from *Polyrhachis vicina* Roger and its hydrolysate

元素	1	2	元素	1	2
K	100.00	117.700	Sr	0.023	0.012
Fe	1.482	2.728	Cd	0.005	0.015
Ca	6.152	4.452	Pb	0.029	0.024
Mg	5.535	1.759	Li	-	-
Na	20.500	20.705	Mo	0.0007	0.002
Al	0.718	1.023	Hg	0.006	0.001
Mn	0.728	0.513	Ag	-	0.005
Ba	0.041	0.018	Ge	0.0002	0.0003
Zn	9.000	1.276	Cr	0.013	0.003
Cu	0.258	0.460	Y	0.003	0.003
V	0.007	0.011	Sb	-	-
Co	0.009	0.016	La	-	-
As	0.018	0.033	B	-	-
Ni	0.120	0.199	总量	144.650	150.960

酶解拟黑多刺蚁的醇提物的 K、Fe、Na、Al、Cu、V、Co、As、Ni、Mo、Cd、Ag 含量低于拟黑多刺蚁的醇提物, 但 Ca、Mn、Ba、Zn、Mg、Hg、Sr、Pb 含量高于拟黑多刺蚁的醇提物 (表 6)。拟黑多刺蚁 Fe、Ca、Na、Mn、Ba、Zn、Cu 的含量远超常见食品,

即使与昂贵的滋补食品相比, Fe、Mn 的含量也尤为突出^[10]; 然而这些矿物质元素在乙醇中的溶解性较差, 导致了拟黑多刺蚁及其酶解物的醇提物的矿物质总量无显著差别, 总量都很低, 这说明蚂蚁醇提物对多数必需矿物质的利用率较低, 因此利用蚂蚁酒补充矿物质元素如 Fe、Ca 和 Zn 等是不明智的。

3 结论

乙醇浓度对酶解拟黑多刺蚁的醇提物的影响较大, 各项理化指标及抗氧化能力均随乙醇浓度的升高而降低, 证明具有抗氧化性的物质主要集中在水溶性成分中, 其中拟黑多刺蚁的醇提物的抗氧化性与多肽含量呈显著正相关。但矿物质总量无显著差别。

参考文献

- [1] 钟介虎.我国蚂蚁保健制品开发现状初探[J].上海医药情报所,1996,2:27-31,49
- [2] 刘爱文,陈忻,梁志权,等.蚂蚁提取液中微量元素的测定及对氧自由基的清除作用[J].食品工业科技,2006,27(3):73-74
- [3] 汪建国,汪琦.蚁皇养生黄酒的研制与开发[J].江苏调味副食品,2006,23(1):25-27
- [4] Isa G.J. de Avellar, Marta M.M. Magalhães, André B. Silva,

et al. Reevaluating the role of 1, 10-phenanthroline in oxidative reactions involving ferrous ions and DNA damage [J]. Biochim Biophys Acta, 2004, 1675:46-53

- [5] Saiga A, Tanabe S, Nishimura T. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment [J]. J. Agric. Food Chem, 2003, 51(12): 3661-3667
- [6] Yen G C, Chen H Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity [J]. J. Agric. Food Chem, 1995, 43 (1):27-32
- [7] Decker E A, Welch B. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food [J]. J. Agric. Food Chem, 1990, 38 (3): 674-677
- [8] Yu W L, Zhao Y P, Xue Z, et al. The antioxidant properties of lycopene concentrate extracted from tomato paste[J]. Journal of the American Oil Chemists Society, 2001, 78(7): 697-701
- [9] 宋悦华,赵琳.不同溶剂浸泡大黑蚂蚁后的蛋白质和 pH 值测定结果[J].广西预防医学,1997,3(4):238-239
- [10] 王婧,刘通讯.拟黑多刺蚁的理化分析[J].现代食品科技, 2010,26(10):1092-109