

# 灰树花多糖提取副产物中蛋白的分离和理化性质研究

杨开<sup>1</sup>, 方伦<sup>1</sup>, 胡君荣<sup>2</sup>, 孙培龙<sup>1</sup>

(1. 浙江工业大学食品系, 浙江杭州 310014) (2. 杭州娃哈哈集团有限公司研究院, 浙江杭州 310018)

**摘要:** 对灰树花多糖提取副产物中的蛋白进行了分离、酶解多肽和部分功能性质研究。采用 5.0 ku 膜超滤分离灰树花多糖醇沉上清液中的蛋白, 测定其氨基酸组成和营养评价; 蛋白经酶解和二次超滤得多肽, 分析比较了分离蛋白和酶解多肽的溶解性、起泡性和抗氧化等功能性质。结果显示: 超滤能够有效地实现蛋白质的分离纯化, 分离后的蛋白纯度可达 70.24%, 得率 7.26%, 必需氨基酸/总氨基酸 (EAA/TAA) 为 40.5%, 必需氨基酸/非必需氨基酸 (EAA/NEAA) 为 68.0%, 是一种优质食用蛋白。分离蛋白经三种蛋白酶酶解后均能显著增强溶解性和抗氧化性, 其中木瓜蛋白酶的水解度最高 (DH 为 8.94%), 其酶解多肽抗氧化效果也较好, 对 DPPH、ABTS<sup>+</sup>、羟基自由基的最高清除率分别达到 65.78%、98.95%、66.14%, 而分离蛋白仅为 44.01%、72.74%、50.88%。

**关键词:** 灰树花; 多糖副产物; 蛋白; 分离; 酶解; 功能性质

文章编号: 1673-9078(2015)11-68-73

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.11.012

## Isolation of Proteins from By-Products of *Grifola frondosa* Polysaccharides Extraction and Their Functional Properties

YANG Kai<sup>1</sup>, FANG Lun<sup>1</sup>, HU Jun-rong<sup>2</sup>, SUN Pei-long<sup>1</sup>

(1. Department of Food Science and Technology, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China)

(2. Research institute of Hangzhou Wahaha Group Company Limited, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** Proteins in the by-products of *Grifola frondosa* polysaccharides extraction were isolated and their functional properties were studied. Proteins in the supernatant obtained after ethanol precipitation of *Grifola frondosa* polysaccharide extract were isolated by ultrafiltration membrane with a molecular weight cut-off of 5.0 ku. Polypeptides were obtained by enzymolysis and secondary ultrafiltration of the isolated protein. Functional properties of the polypeptides and proteins, including solubility, foaming capacity, and antioxidant activities, were analyzed and compared. The results indicated that ultrafiltration could effectively isolate and purify the protein, with a purity of 70.24% and a yield of 7.26%. The isolated protein was found to be a high-quality edible protein, with essential amino acids/total amino acids (EAA/TAA) and nonessential amino acids/total amino acids (EAA/NEAA) values of 40.5% and 68.0%, respectively. The solubility and antioxidant activities of the isolated protein were significantly increased after enzymolysis by each enzyme tested. Of these enzymes, papain yielded the highest degree of hydrolysis (DH = 8.94%). The polypeptide showed relatively good antioxidant activities, with scavenging rates for hydroxyl radical (OH), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), and [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] (ABTS) + free radical, of 66.14%, 65.78%, and 98.95%, respectively, while those of the isolated protein were 50.88%, 44.01%, and 72.74%, respectively.

**Key words:** *Grifola frondosa*; by-product of polysaccharides; protein; isolation; enzymolysis; functional properties

收稿日期: 2014-12-16

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2013BAD16B07); 浙江省自然科学基金项目 (LY13200011)

作者简介: 杨开 (1978-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 食药菌深加工

通讯作者: 孙培龙 (1964-), 男, 教授, 博导, 研究方向: 生物活性物质分离提取

灰树花 (*Grifola frondosa*) 属担子菌亚门、层菌纲、非褶菌目、多孔菌属中的一种大型食药两用真菌, 主要分布在亚热带至温带森林中, 外观灰白色。其子实体干品富含蛋白质 (31.5%)、碳水化合物 (49.69%)、粗纤维 (10.7%), 以及少量的脂肪、维生素和无机微量元素等营养成分<sup>[1]</sup>。其中含有的多糖是灰树花中主要的活性成分, 具有显著的抗肿瘤

[2]、增强免疫<sup>[3]</sup>和抗氧化<sup>[4]</sup>等功效。

目前,对灰树花的研究和利用也主要集中在多糖方面,绝大多数食药菌多糖生产企业采用传统的“水提醇沉工艺”提取其中的粗多糖物质。然而,粗多糖提取过程中通常会伴随大量副产物产生,如水提后的滤渣以及醇沉后的上清液均含有一定量的蛋白质;尤其是醇沉上清液中的蛋白就占多糖水提液蛋白总量三分之一左右。但是现有多糖生产时却大多将其当作废液直接处理掉,不仅增加企业“三废”处理成本,而且也造成优质蛋白资源浪费。因为灰树花蛋白也具有一定的功能性,如 Tsao 等人<sup>[5]</sup>从灰树花子实体原料中分离得到的一种分子量为 83 kD 的蛋白,能激活自然杀伤细胞和树突状细胞,显著增强患瘤小鼠的免疫活性。此外,蛋白经适宜的蛋白酶酶解后,得到的小分子多肽往往具有更好的生物活性。如王天明等<sup>[6]</sup>研究发现海地瓜酶解多肽能明显降低 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对 HePG-2 及 HEK293 细胞的氧化损伤作用。

目前,关于食药菌多糖提取副产物中蛋白的研究和利用报道还十分缺乏。本文以灰树花为例,对多糖生产副产物进行了蛋白分离和氨基酸营养评价,分析比较了蛋白与酶解多肽的溶解性、起泡性和抗氧化等性能,为今后食药真菌原料的综合利用和新产品开发提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

灰树花子实体原料由杭州百山祖生物科技有限公司提供。经粉碎后过60目筛,聚乙烯袋密封包装后 4 °C 冷藏。DPPH[(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical 2,2-Diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl) hydrazyl)、ABTS[2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate)]、脱氧核糖、牛血清蛋白,购于美国Sigma公司;木瓜蛋白酶、胃蛋白酶和中性蛋白酶(酶活均为3000 U/g),购自阿拉丁试剂(上海)有限公司;其它试剂均为分析纯。

### 1.2 主要仪器与设备

RE-2000A 旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂;CR21GII型高速冷冻离心机,日本日立仪器;ALPHA 2-4 LD冷冻干燥机,德国Christ公司;UV-2450紫外-可见分光光度计,日本岛津公司;默克密理博Labscale小型切向流超滤仪,德国Merck公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 工艺路线

灰树花多糖提取工艺:

灰树花子实体粉末→称量→95%乙醇浸泡脱脂→加入原料重量 30 倍的水,沸腾搅拌提取→5000 r/min 离心去渣→上清液旋转蒸发浓缩至原有提取液体积 1/4→70%终浓度乙醇醇沉→沉淀(粗多糖)和副产物(醇沉上清液)

副产物蛋白研究工艺:

灰树花多糖提取醇沉上清液→一次超滤→分离蛋白→蛋白酶酶解→二次超滤→多肽

其中主要步骤说明如下:

##### 1.3.1.1 一次超滤

醇沉上清液,使用截留分子量为 5.0 KD 的超滤膜进行超滤处理,收集浓缩液,然后冻干。

##### 1.3.1.2 酶解

3 种蛋白酶(木瓜蛋白酶、胃蛋白酶、中性蛋白酶)在各自推荐 pH 和温度条件下对分离蛋白进行酶解,其中胃蛋白酶, pH 2.5, 37 °C;木瓜蛋白酶, pH 6.0, 45 °C, 中性蛋白酶 pH 6.5, 50 °C;加酶量为底物(蛋白质)质量的 10%,反应时间 4.0 h。

##### 1.3.1.3 二次超滤

使用截留分子量为 5.0 kD 的超滤膜进行二次超滤处理,得到的滤过液即为所需的多肽,将其冻干。

#### 1.3.2 蛋白、多肽含量的测定

蛋白和多肽含量均采用福林酚法(Lowry法)<sup>[7]</sup>测定。

#### 1.3.3 总糖的测定

总糖采用苯酚-硫酸法<sup>[8]</sup>测定。

#### 1.3.4 氨基酸含量与水解度测定

采用三硝基苯磺酸(TNBS)法<sup>[9]</sup>测定氨基酸含量与水解度。取一定量的亮氨酸标准品,将其配制成浓度依次为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/mL 的溶液。取 6 个 10 mL 试管,分别加入 0.2 mL 标准液、1.0 mL pH 8.2 的磷酸盐缓冲液,混匀后加入 1.0 mL 0.1% 的 TNBS 溶液。将反应液置于 50 °C 恒温水浴锅中,避光反应 1 h 后,再加入 2.0 mL 0.1 mol/L 的 HCl 溶液终止反应,于 420 nm 下测定吸光值。同时,蒸馏水作空白对照。以亮氨酸的浓度为横坐标,吸光值为纵坐标,绘制标准曲线。

水解度的测定:取 5.0 mL 10.0 mg/mL 蛋白质溶液,分别加入木瓜蛋白酶、胃蛋白酶、中性蛋白酶 5.0 mg,混合均匀,置于 3 种酶的最适条件下反应 4 h。取等量的分离蛋白与酶解液,按上述方法测定,得到酶解液与分离蛋白中的氨基酸含量,分别为 C<sub>酶解</sub>与 C<sub>蛋白</sub>,各种酶的水解度(DH)计算公式如下:

$$DH = \frac{(C_{\text{酶解}} - C_{\text{蛋白}}) \times d}{C}$$

其中, d-稀释倍数, C-分离蛋白中的蛋白浓度。

### 1.3.5 溶解性的测定

将分离蛋白与酶解多肽用不同 pH 值 (4.0、7.0、11.0) 的缓冲液配制成浓度分别为 20 mg/mL 与 100 mg/mL 的溶液, 于 10000 r/min 离心 10 min。取上清液, 测定蛋白或多肽含量, 其溶解指数 NSI=水溶性蛋白含量/样品中蛋白含量×100%<sup>[10]</sup>。

### 1.3.6 起泡性的测定

将分离蛋白与 3 种酶解多肽配制成 10.0 mg/mL 的溶液。取 5.0 mL 溶液于 10 mL 量筒中, 用保鲜膜封住量筒口, 上下用力振荡 30 s, 立即读取此时的总体积 V。然后再每隔 5 min 读取一次, 其起泡性 FC=[(V-5)/5]×100%。以时间为横坐标, 起泡性为纵坐标作图。

### 1.3.7 清除 DPPH 自由基能力的测定

将分离蛋白与 3 种酶解多肽配制成 6 种不同的浓度, 依次为 8 mg/mL、4 mg/mL、2 mg/mL、1 mg/mL、0.5 mg/mL 和 0.25 mg/mL。取 2.0 mL 样品和 1.0 mL 0.2 mmol/L 的 DPPH 溶液于 10 mL 试管中, 混匀后反应液置于 25 °C 恒温水浴锅中, 避光反应 1 h, 然后置于 517 nm 处测吸光值 A<sub>i</sub><sup>[11]</sup>。同时, 以蒸馏水作空白对照 A<sub>c</sub>, 乙醇代替 DPPH 溶液作为样品对照组 A<sub>j</sub>, 试验平行 3 次, DPPH 自由基清除能力计算公式如下:

$$\text{DPPH 自由基清除率} (\%) = [1 - (A_i - A_j) / A_c] \times 100\%$$

### 1.3.8 清除 ABTS 自由基活性测定

将 176 μL 140 mmol/L 的过硫酸钾溶液加入到 10.0 mL 7.0 mmol/L 的 ABTS 溶液中, 混合均匀后, 于常温下避光反应 12~16 h 以制备 ABTS 储备液。测定前, 用 0.01 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.4) 将上述储备液稀释至吸光值为 0.7±0.02 (734 nm) 并避光保存。将蛋白与多肽配制成 5 mg/mL、2.5 mg/mL、1 mg/mL、0.5 mg/mL、0.25 mg/mL 和 0.1 mg/mL 的溶液, 取样

液 1.0 mL 与 3.0 mL ABTS 自由基溶液避光反应 30 min, 测定其吸光值 A<sub>x</sub><sup>[12]</sup>。以蒸馏水作空白对照 A<sub>0</sub>, 以缓冲液代替 ABTS 作对照组 A<sub>y</sub>, 试验平行 3 次, ABTS 清除能力计算公式为:

$$\text{ABTS 清除率} (\%) = [1 - (A_x - A_y) / A_0] \times 100\%$$

### 1.3.9 清除羟基自由基活性测定

将分离蛋白与各多肽配成不同浓度的溶液, 依次为 5 mg/mL、2.5 mg/mL、1.0 mg/mL、0.5 mg/mL、0.25 mg/mL 和 0.1 mg/mL。

反应缓冲液: 由 0.2 mol/L pH 7.4 磷酸缓冲液、2.67 mmol/L 脱氧核糖、0.13 mmol/L EDTA 混合组成。取各浓度样液 0.1 mL 与 0.6 mL 反应缓冲液混合, 再向其中加入 0.2 mL 0.4 mmol/L 的硫酸亚铁铵、0.05 mL 2.0 mmol/L 的抗坏血酸、0.05 mL 20 mmol/L 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 充分振荡混匀后, 将反应液置于 37 °C 的恒温水浴锅中反应 15 min。最后, 再加入 1% 的硫代巴比妥酸和 1.0 mL 20% 的三氯乙酸, 混匀后放入沸水浴中反应 15 min, 冷却, 于 532 nm 下测定吸光值<sup>[13]</sup>。羟基自由基清除率计算公式同 ABTS。

### 1.3.10 氨基酸成分分析

参照 GB/T5009.124-2003, 分析分离蛋白中的氨基酸成分。

## 1.4 数据处理与分析

数据均为 3 次重复试验结果, 均以 (平均值±标准偏差) 表示, 不同水平间差异采用 SPSS 16.0 进行 ANOVA (Analysis of Variance) 差异显著性分析, 以 P<0.05 确定是否具有统计学意义。

## 2 结果与讨论

### 2.1 超滤、酶解前后成分研究

超滤、酶解前后各组分经冷冻干燥后得到粉末, 成分分析结果如表 1 所示。

表 1 样品成分和含量

Table 1 Composition and contents of the samples

|                   | 蛋白(多肽)/%                 | 总糖/%                    | 氨基酸/%                  | 水/%                    | 蛋白(多肽)得率/% <sup>B</sup> |
|-------------------|--------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| 醇沉上清液蛋白           | 35.63±1.41 <sup>c</sup>  | 48.75±2.11 <sup>a</sup> | 2.14±0.05 <sup>c</sup> | 7.25±0.32 <sup>a</sup> | 7.94±0.32 <sup>a</sup>  |
| 分离蛋白 <sup>A</sup> | 70.24±3.31 <sup>a</sup>  | 21.43±0.67 <sup>b</sup> | 0.76±0.02 <sup>d</sup> | 6.94±0.31 <sup>a</sup> | 7.26±0.23 <sup>a</sup>  |
| 木瓜蛋白酶多肽           | 66.56±4.36 <sup>ab</sup> | 16.64±0.73 <sup>c</sup> | 8.38±0.46 <sup>a</sup> | 6.87±0.26 <sup>a</sup> | 1.55±0.05 <sup>b</sup>  |
| 胃蛋白酶多肽            | 64.83±2.07 <sup>ab</sup> | 20.12±0.40 <sup>b</sup> | 6.49±0.25 <sup>b</sup> | 7.43±0.21 <sup>a</sup> | 1.24±0.04 <sup>c</sup>  |
| 中性蛋白酶多肽           | 62.98±2.60 <sup>b</sup>  | 19.65±1.24 <sup>b</sup> | 9.15±0.33 <sup>a</sup> | 7.21±0.35 <sup>a</sup> | 0.96±0.04 <sup>d</sup>  |

注: A“分离蛋白”为一次超滤后的蛋白; B“蛋白(多肽)%”是指各组分重量与灰树花原料相除的百分比。同一列数据的不同字母表差异显著 (P<0.05)。

由表 1 可知, 醇沉上清液冻干品的蛋白纯度仅有

35.63%, 经截留分子量为 5.0 KD 的超滤膜超滤后,

其蛋白纯度可达 70.24%，且总糖含量也从最初的 48.75% 下降到 21.43%。分离蛋白（7.94%）与醇沉上清液蛋白（7.26%）相比下降较少，说明超滤对目标蛋白总量损失较少，5.0 KD 超滤能有效透过醇沉上清液中的一些低分子糖和色素类杂质，而蛋白透过较少。分离蛋白经过蛋白酶酶解、二次超滤之后，得到的多肽中仍含有少量的糖类成分，可能是一次超滤不彻底，或部分糖蛋白中的小分子糖链经酶解解离下来，与小分子多肽一同被超滤透过。另外多肽的得率在 0.96~1.55% 之间，若提高得率，可采用复合酶或多步酶解工艺继续优化研究。

如表 1 的三种蛋白酶酶解效果比较，木瓜蛋白酶酶解多肽具有更高的多肽纯度和得率。另外，各酶的水解度结果如表 2 所示。

表 2 各种酶的水解度

Table 2 Degree of hydrolysis by different enzymes

|          | 木瓜蛋白酶                  | 胃蛋白酶                   | 中性蛋白酶                  |
|----------|------------------------|------------------------|------------------------|
| 水解度 DH/% | 8.94±0.12 <sup>a</sup> | 5.67±0.05 <sup>c</sup> | 6.39±0.10 <sup>b</sup> |

注：同一行数据的不同字母表差异显著 ( $P < 0.05$ )。

从表 2 可见，与表 1 的多肽纯度和得率一致，木瓜蛋白酶的水解度要显著高于胃蛋白酶和中性蛋白酶。与木瓜蛋白酶相比，中性蛋白酶水解度较低的原因可能是分离蛋白中的酶解位点更加适合与木瓜蛋白酶反应。而胃蛋白酶的水解度最低，其原因可能是胃蛋白酶的最适 pH 在 2~3 左右，此时，分离蛋白会有部分沉淀析出，从而导致该部分蛋白不易被水解。

## 2.2 蛋白氨基酸成分分析

分离蛋白经酸水解，氨基酸成分分析结果如表 3 所示。

表 3 分离蛋白的氨基酸组成

Table 3 Amino acid compositions of the isolated protein

| 必需氨基酸/%  |            | 非必需氨基酸/% |           |
|----------|------------|----------|-----------|
| 苏氨酸 Thr  | 6.81±0.23  | 天冬氨酸 Asp | 2.65±0.22 |
| 缬氨酸 Val  | 0.58±0.08  | 丝氨酸 Ser  | 4.89±0.17 |
| 甲硫氨酸 Met | 0.84±0.07  | 谷氨酸 Glu  | 9.48±0.27 |
| 异亮氨酸 Ile | 0.79±0.10  | 甘氨酸 Gly  | 4.36±0.09 |
| 亮氨酸 Leu  | 1.99±0.15  | 丙氨酸 Ala  | 0.96±0.21 |
| 苯丙氨酸 Phe | 0.39±0.09  | 半胱氨酸 Cys | 5.20±0.06 |
| 赖氨酸 Lys  | 13.43±0.19 | 酪氨酸 Tyr  | 0.64±0.05 |
| EAA/TAA  | 40.49      | 组氨酸 His  | 2.93±0.18 |
| EAA/NEAA | 68.03      | 精氨酸 Arg  | 5.34±0.19 |
|          |            | 脯氨酸 Pro  | 0.06±0.01 |

从表 3 可知，除酸水解破坏的色氨酸外，分离蛋白中其余的 17 种氨基酸齐全，其氨基酸总量 (TAA)

为 61.33%。其中，必需氨基酸 (EAA) 和非必需氨基酸 (NEAA) 分别占分离蛋白的 24.83% 和 36.5%。据 FAO/WHO 提出的参考蛋白质模式，食品中必需氨基酸总量应占总氨基酸 (EAA/TAA) 的 40% 左右，必需氨基酸与非必需氨基酸的比值 (EAA/NEAA) 应该大于 0.6。因此，灰树花多糖副产物中得到的分离蛋白 (EAA/TAA 为 40.5%，EAA/NEAA 为 68.0%) 符合 FAO/WHO 提出的蛋白质参考模式，是一种营养丰富的优质食用蛋白。

## 2.3 溶解性与起泡性

从分离蛋白与酶解多肽的溶解性结果 (图 1) 可以看出，酶解后的多肽与灰树花多糖醇沉上清液中分离蛋白相比，其溶解性得到了显著的提高。在浓度 20 mg/mL 的条件下，蛋白仍然未完全溶解，尤其是在 pH 4.0 的情况下，分离蛋白仅有 50% 左右溶解。经蛋白酶酶解、超滤处理之后，得到的小分子多肽溶解性显著增加，在该浓度条件下均能够完全溶解。灰树花分离蛋白的溶解性与其他一些蛋白相比，其溶解性要高出不少，如江晨等<sup>[14]</sup>提取的花生蛋白在 10 mg/mL 浓度下已无法完全溶解，当 pH 值为 4.0 时，其溶解指数甚至只有 10% 左右。

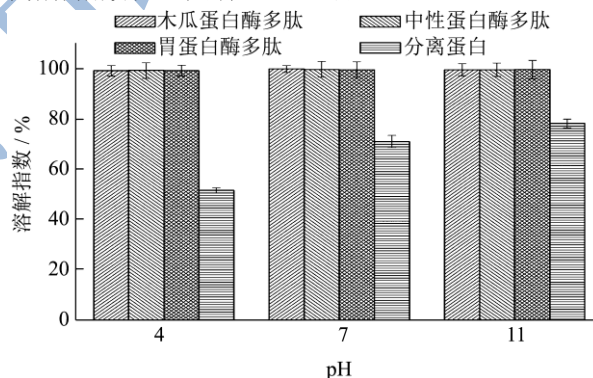


图 1 样品浓度 20 mg/mL 的溶解性

Fig.1 Solubility of the samples at a concentration of 20 mg/mL

当多肽浓度达到 100 mg/mL 时 (图 2)，三种蛋白酶酶解多肽均未完全溶解，但是各多肽的溶解指数仍高达 90% 左右。其中，以胃蛋白酶酶解得到的多肽溶解性最好，其次是木瓜蛋白酶多肽，而中性蛋白酶所得多肽的溶解性最差。三种多肽与分离蛋白的溶解性之间呈显著关系 ( $R^2 = 0.994 \sim 0.999$ ,  $p < 0.05$ )。

分离蛋白与酶解后多肽各组分的起泡程度如图 3 所示。与分离蛋白相比，小分子多肽的起泡性与起泡稳定性整体较差，尤其是胃蛋白酶酶解后得到的多肽，其产生的泡沫少，在 15 min 左右就完全消失。这在一定程度上表明胃蛋白酶酶解多肽的溶解性要

优于其他几种多肽。随时间延长,分离蛋白和酶解多肽的起泡性之间呈显著关系 ( $R^2=0.969\sim 0.979$ ,  $P<0.05$ );此外,其溶解性与起泡性之间也存在显著关系 ( $R^2=0.810\sim 0.929$ ,  $P<0.05$ )。

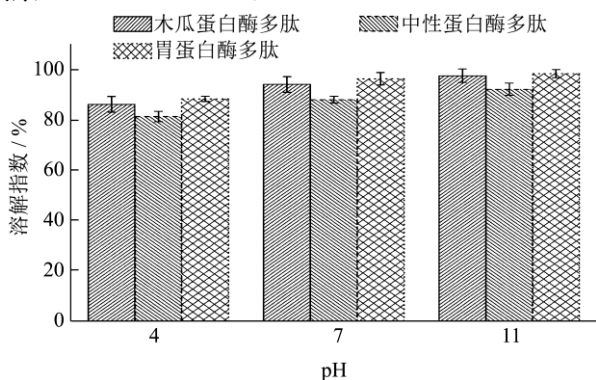


图2 样品浓度 100 mg/mL 的溶解性

Fig.2 Solubility of the samples at a concentration of 100

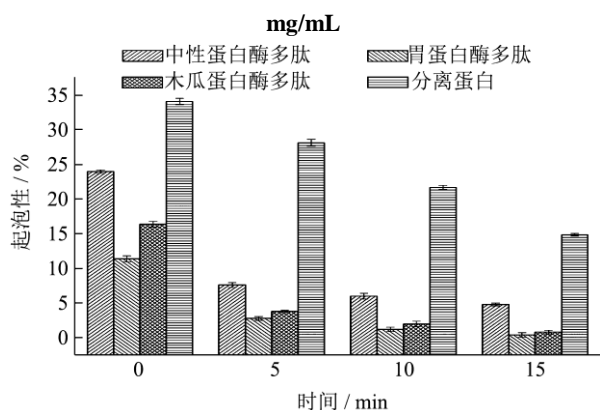


图3 样品的起泡性

Fig.3 Foaming properties of the samples

## 2.4 分离蛋白与多肽的抗氧化活性

### 2.4.1 DPPH 自由基清除率

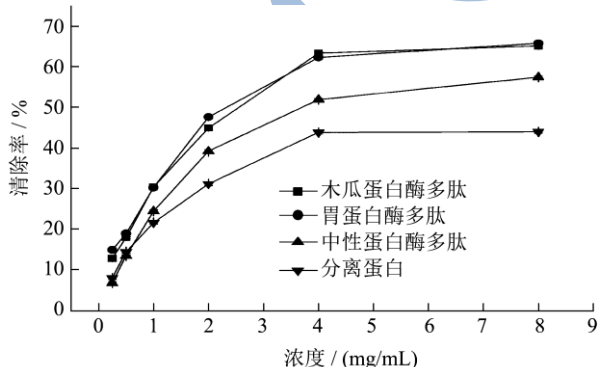


图4 各样品的 DPPH 清除能力对比

Fig.4 Comparison of DPPH radical scavenging activities of the samples

从图4中可以看出,随样品浓度增加,分离蛋白与酶解多肽对 DPPH 自由基的清除率均不断提高。当浓度超过 4.0 mg/mL 时,其抑制作用逐渐趋缓。其中,

胃蛋白酶多肽对 DPPH 的清除效果与木瓜蛋白酶类似,其  $IC_{50}$  分别为 2.62 mg/mL 和 2.72 mg/mL,中性蛋白酶酶解多肽清除效果较差,  $IC_{50}$  值为 4.27 mg/mL,分离蛋白对 DPPH 的清除效果最差。可能是酶解后的多肽小分子侧链有更多的氢供体与 DPPH 发生反应,因而具有更好的抗氧化效果。

### 2.4.2 ABTS 自由基清除率

分离蛋白与多肽对 ABTS 自由基清除率的结果如图5所示。各样品对  $ABTS^+$  的清除能力均比较显著,且随浓度增加而清除率提高,在 5.0 mg/mL 浓度时,各多肽对 ABTS 的清除率均接近 100%;然而,分离蛋白在该浓度时的清除率只有 80%左右。木瓜蛋白酶多肽、胃蛋白酶多肽、中性蛋白酶多肽以及分离蛋白的  $IC_{50}$  值分别为 0.49 mg/mL、0.76 mg/mL、0.58 mg/mL 和 1.52 mg/mL。

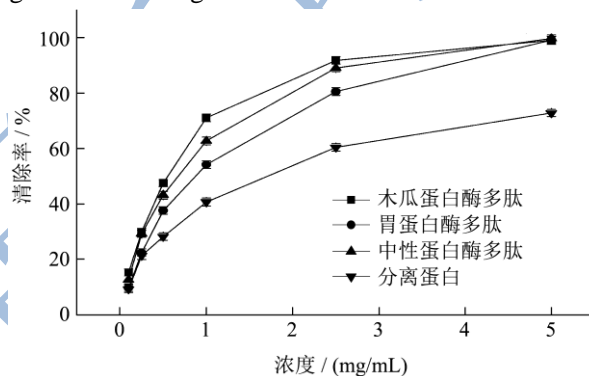


图5 各组分的 ABTS 清除能力对比

Fig.5 Comparison of ABTS radical scavenging activities of the samples

### 2.4.3 OH 自由基清除率

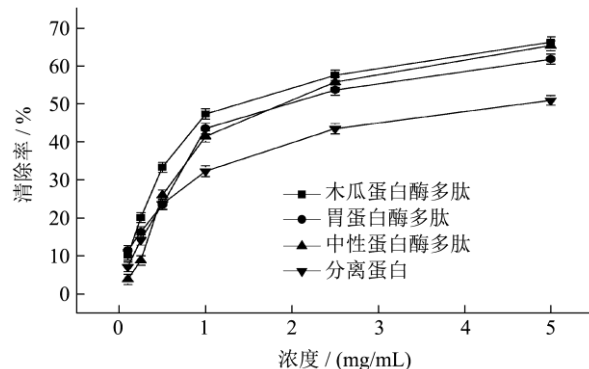


图6 各组分的羟基自由基清除能力对比

Fig.6 Hydroxyl free radical scavenging activities of the samples

从图6的分离蛋白与多肽清除 OH 自由基结果可知与 DPPH 和 ABTS 方法结果类似,均随浓度增加而效果增强。在 5.0 mg/mL 浓度时,不同多肽对 OH 自由基的清除率比较接近,达 60%左右,而分离蛋白的清除率显著偏低,不到 50%。其中木瓜蛋白酶多肽

对 OH 自由基的清除效果最佳, 其 IC<sub>50</sub> 值为 1.55 mg/mL。

综合以上抗氧化结果, 胃蛋白酶多肽对 DPPH 清除率最好, 木瓜蛋白酶对 ABTS<sup>+</sup>和 OH 自由基的清除效果较好, 同一个样品对不同自由基的清除能力存在一定差异性。因此, 为了全面评价样品的抗氧化活性, 往往需要采用多种抗氧化体系进行综合评价。木瓜蛋白酶多肽对 DPPH、ABTS、羟基自由基的最高清除率分别可以达到 65.78%、98.95%、66.14%, 而分离蛋白对这三种自由基的最高清除率分别仅有 44.01%、72.74%、50.88%。此外, 其它两种多肽的清除率要远高于蛋白, 说明分离蛋白质经酶解后, 能够显著提高抗氧化活性。

### 3 结论

3.1 本文对灰树花多糖提取醇沉上清液中的蛋白进行了分离和部分功能性质研究。采用 5.0 KD 的超滤膜浓缩醇沉后上清液中的蛋白质, 目标物中的蛋白含量由 35.63% 上升到了 70.24%, 得率为 7.26%。

3.2 因酸水解未检出色氨酸外, 分离蛋白中其余 17 种氨基酸种类齐全, 含 7 种必需氨基酸, 且必需氨基酸与总氨基酸的比值在 0.4 左右, 必需氨基酸与非必需氨基酸的比值为 0.68, 符合 FAO/WHO 推荐的蛋白质模式。

3.3 通过分离蛋白与酶解后多肽的部分性质比较, 多肽具有更好的溶解性和抗氧化活性, 但多肽的抗氧化机理及其他生物活性还有待进一步研究。本文对灰树花多糖提取副产物中的优质蛋白进行了有效分离和部分功能性质研究, 为食药真菌多糖提取副产物的开发和利用提供参考。

### 参考文献

[1] 于荣利, 张桂玲, 秦旭升. 灰树花研究进展[J]. 上海农业学报, 2005, 21(3): 101-105  
YU Rong-li, ZHANG Gui-ling, QIN Xu-sheng. Advances in study on *grifola frondosa* [J]. Acta Agriculturae Shanghai, 2005, 21(3): 101-105

[2] Masuda Y, Ito K, Konishi M, et al. A polysaccharide extracted from *grifola frondosa* enhances the anti-tumor activity of bone marrow-derived dendritic cell-based immunotherapy against murine colon cancer [J]. Cancer Immunology, Immunotherapy, 2010, 59(10): 1531-1541

[3] Wang Y, Fang J, Ni X, et al. Inducement of cytokine release by GFPBW2, a novel polysaccharide from fruit bodies of *grifola frondosa*, through dectin-1 in

macrophages [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(47): 11400-11409

[4] Chen G T, Ma X M, Liu S T, et al. Isolation, purification and antioxidant activities of polysaccharides from *grifola frondosa* [J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 89 (1): 61-66

[5] Tsao Y W, Kuan Y C, Wang J L, et al. Characterization of a novel maitake (*grifola frondosa*) protein that activates natural killer and dendritic cells and enhances antitumor immunity in mice [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61 (41): 9828-9838

[6] 王天明, 苏意钢, 马永钧, 等. 海地瓜多肽分离及抗氧化活性研究[J]. 现代食品科技, 2014, 30(5): 75-81, 166  
WANG Tian-ming, SU Yi-gang, MA Yong-jun, et al. Separation and antioxidant activity evaluation of *acaudina molpadioides* peptide [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(5): 75-81, 166

[7] Redmile-Gordon M A, Armenise E, White R P, et al. A comparison of two colorimetric assays, based upon lowry and bradford techniques, to estimate total protein in soil extracts [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2013, 67: 53-55

[8] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. Analytical Chemistry. 1956, 28: 350-356

[9] Zhang Y, Olsen K, Grossi A, et al. Effect of pretreatment on enzymatic hydrolysis of bovine collagen and formation of ACE-inhibitory peptides [J]. Food Chemistry, 2013, 141(3): 2343-2354

[10] 杨柳, 江连洲, 李扬, 等. 水酶法提取的大豆蛋白功能特性研究[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(6): 80-84  
YANG Liu, JIANG Lian-zhou, LI Yang, et al. Study on the functional properties of soybean protein extracted by aqueous enzymatic method [J]. Food and Fermentation Industries, 2010, 36 (6): 80-84

[11] Nicklisch S C T, Waite J H. Optimized DPPH assay in detergent-based buffer system for measuring antioxidant activity of proteins [J]. MethodsX. 2014, 40: 1-6

[12] Van der Werf R, Marcic C, Khalil A, et al. ABTS radical scavenging capacity in green and roasted coffee extracts [J]. LWT-Food Science and Technology, 2014, 58(1): 77-85

[13] Ghiselli A, Nardini M, Baldi A, et al. Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an Italian Red Wine [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46: 361-367

[14] 江晨, 孙杰, 毕洁, 等. 花生多肽的理化性质及抗氧化性质研究[J]. 花生学报, 2013, 42(3): 32-37

JIANG Chen, SUN Jie, BI Jie, et al. Study on physicochemical properties and antioxidant properties of peanut polypeptide [J]. Journal of Peanut Science, 2013, 42 (3): 32-37

