

# 天然黄茧丝蛋白多肽的抗氧化活性研究

包立军<sup>1</sup>, 彭云武<sup>1</sup>, 孙敏瑞<sup>2</sup>, 杨洁<sup>2</sup>

(1. 安康学院 陕西省蚕桑重点实验室, 陕西 安康 725000;

2. 安康学院 现代农业与生物科技学院, 陕西 安康 725000)

**摘要:**以天然黄茧“金丝1号”茧丝为对象,制备蚕丝蛋白液,利用碱性蛋白酶酶解得到蚕丝蛋白多肽,测定其清除DPPH、羟自由基和超氧阴离子能力,探讨蚕丝蛋白多肽的抗氧化活性。结果表明,酶解3.5h时,其对DPPH和羟自由基清除率最佳,分别为58.3%和87.3%;酶解4h时对超氧自由基清除率最大,为43.0%;酶解3.5h的天然黄茧蚕丝蛋白多肽液抗氧化性由于BHT和VC。为天然黄茧的高附加值开发利用提供了参考。

**关键词:**天然黄茧;酶解;抗氧化性

天然黄茧作为蚕桑生产中的一种特色原料茧,近年来引起家蚕育种工作者的广泛关注,先后有“金丝1号”<sup>[1]</sup>、“黄茧一号”<sup>[2]</sup>、“蜀黄1号”<sup>[3]</sup>、“湘彩黄1号”<sup>[4]</sup>等品种选育报道。天然黄茧的茧色来自于桑叶中的胡萝卜素和含氧类胡萝卜素<sup>[5]</sup>,受到家蚕对桑叶中色素成分及含量的吸收与利用程度及家蚕消化管和绢丝腺管壁通透性的影响,黄茧品种的茧色深浅也有差异。天然黄茧因茧丝呈黄色,因此可以免去印染工序而体现天然绿色环保的特点,同时又具有高微空隙率、高色素含量、高SOD含量、抗菌、防紫外线等特性<sup>[6]</sup>,越来越受到消费者认可,具有良好的高档丝绸服装及化妆品开发应用前景。

蚕丝蛋白生物相容性好,易生物降解且无致敏性,是化妆品研发中的高档原料之一<sup>[7,8]</sup>,其水解后得到的多肽和氨基酸,易被人体小肠吸收,且具有多种功能活性,可开发功能性食品<sup>[9]</sup>。金丝1号是通过与野桑蚕远缘杂交及系统选择培育的天然彩色茧品种,品种茧质性状接近白茧品种,且具有良好的强健性<sup>[1]</sup>,在陕南地区农村中试结果表明,其茧质成绩理想<sup>[10]</sup>,试验拟以该品种茧丝酶解后所得的蚕丝蛋白多肽为对象,研究其抗氧化活性,以期食品化妆品开发应用提供有益参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 仪器与试剂

1.1.1 材料与试剂 天然黄茧茧壳取自安康学院陕西省蚕桑重点实验室培育品种“金丝一号”鲜茧,透析袋、碱性蛋白酶购自上海源叶生物有限公

司。金龙鱼菜籽油购自本地超市。

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、CaCl<sub>2</sub>、EDTA、NaHCO<sub>3</sub>、AgNO<sub>3</sub>、Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、DPPH、BHT、VC、水杨酸、三氯甲烷、冰乙酸、无水乙醇、碘化钾、硫代硫酸钠、胭脂红、可溶性淀粉均为分析纯。

1.1.2 主要试验仪器 YP202N型电子分析天平,上海良平仪器仪表有限公司;PHS-3C型电热恒温水浴锅,上海精科雷磁公司;755B型紫外可见分光光度计,上海菁华科技仪器有限公司;SHZ-D型旋转蒸发器,巩义市予华仪器有限公司;TGL-16G型台式离心机,上海安亭科学仪器有限公司。

### 1.2 技术路线与方法

1.2.1 试验技术路线 茧壳剪碎→称量→Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液脱胶→CaCl<sub>2</sub>溶液溶解→过滤→真空浓缩→透析脱盐→离心去杂→酶解→灭酶活→冷却离心→抗氧化活性测定

1.2.2 蚕丝蛋白液制备 鲜茧茧壳剪碎,冲洗晾干。准确称取20.00g茧壳,用0.5%Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>沸液按料液比1:50脱胶多次,直至胭脂红检验为无色<sup>[11]</sup>,得精炼丝。40%CaCl<sub>2</sub>溶液按料液比1:20将精炼丝煮沸溶解1h,纱布过滤,旋转蒸发器70℃真空浓缩。浓缩液放入透析袋中,流动水中透析2d、蒸馏水中透析1d。透析液4000r·min<sup>-1</sup>离心15min,弃沉淀即为蚕丝蛋白液。

1.2.3 蚕丝蛋白多肽制备 将一定体积蚕丝蛋白液放入锥形瓶中,加热至45℃恒温,用0.1mol·L<sup>-1</sup>NaOH调节pH至9.5,加入碱性蛋白酶进行酶解,并维持酶解体系pH稳定。酶解结

收稿日期:2017-06-06 修回日期:2017-07-10

基金项目:陕西省农业科技创新与攻关项目(2014K02-13-01),安康市科技计划项目(2014AK01-11)。

第一作者简介:包立军(1982-),男,安徽池州人,硕士,助理研究员,主要从事桑育种及蚕桑资源综合开发研究。

束后加热至 90℃ 灭酶活 10 min。酶解液冷却至室温,8 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,弃沉淀即为蚕丝蛋白多肽液。为考察酶解时间对抗氧化活性的影响,设置 5 个酶解时间的蚕丝蛋白多肽液样品:2.5 h、3.0 h、3.5 h、4.0 h、4.5 h,每试验 3 次重复。

1.2.4 DPPH 清除能力测定 具体方法见文献<sup>[12]</sup>。取 2 mL 蚕丝蛋白多肽液与 1 mL H<sub>2</sub>O 混合后,与 1 mL 含 0.02% DPPH 乙醇溶液混合,摇匀,室温避光 30 min,分光光度计 517 nm 测定吸光度,以空白为对照。

自由基清除率 S% 计算公式:  $S\% = (1 - \frac{A_s - A_c}{A_0}) \times 100\%$

式中 A<sub>0</sub>:空白对照;A<sub>c</sub>:多肽溶液与 DPPH 反应后的溶液吸光值;A<sub>s</sub>:未加 DPPH 时的多肽溶液的吸光值。

1.2.5 羟自由基清除能力测定 具体方法参考文献<sup>[13]</sup>。试管中分别加入 1 mL 6 mmol·L<sup>-1</sup> FeSO<sub>4</sub> 和 1 mL 6 mmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,再加入 1 mL 蚕丝蛋白多肽液和 1 mL H<sub>2</sub>O,摇匀、静置 10 min 后,再加入 6 mmol·L<sup>-1</sup> 水杨酸溶液 1 mL,摇匀,静置 30 min,510 nm 测吸光值。

羟自由基清除率 S% 计算公式:  $S\% = (1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}) \times 100\%$

式中,A<sub>0</sub>:空白对照;A<sub>i</sub>:多肽溶液与水杨酸反应后的溶液吸光值;A<sub>j</sub>:无水杨酸时多肽溶液的吸光值。

1.2.6 超氧自由基清除能力测定 参考文献<sup>[14]</sup>方法。取 4 mL 0.05 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl 缓冲液(pH8.2),25℃ 预热 20 min,加入 1 mL 蚕丝蛋白多肽溶液和 0.5 mL H<sub>2</sub>O 后,再加入 25 mmol·L<sup>-1</sup> 邻苯三酚溶液 0.5 mL 混合后 25℃ 5 min,加入 8% HCl 0.2 mL 终止反应,320 nm 测吸光值。

超氧自由基清除率 S% 计算公式:  $S\% = (1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3}) \times 100\%$

式中,A<sub>1</sub>:空白对照;A<sub>2</sub>:多肽溶液与邻苯三酚反应并中止后的溶液吸光值;A<sub>3</sub>:加邻苯三酚前多肽溶液的吸光值。

1.2.7 与抗氧化剂 BHT、Vc 的过氧化值比较 参照国标 GB/T5009 37-1996 方法。锥形瓶中加入 5 g 食用油、2 mL 待测液、30 mL 三氯甲烷冰乙酸溶液(体积比 2:3)和 1 mL 饱和 KI 溶液,

振荡 30 s 避光 5 min。加入 75 mL 蒸馏水后,加入 1 mL 1% 淀粉指示剂,静置至颜色不再加深。加入 0.002 mol·L<sup>-1</sup> 标准硫代硫酸钠溶液滴定至颜色完全消失,记录标液消耗量,同时以空白为对照。

过氧化值 POV 计算公式:  $POV (mmol \cdot L^{-1}) = \frac{(C \times (V - V_0))}{(m \times 1000)}$

式中,V:样品消耗硫代硫酸钠溶液的体积,mL;V<sub>0</sub>:空白消耗硫代硫酸钠溶液体积,mL;C:硫代硫酸钠标准溶液浓度,0.02 mol·L<sup>-1</sup>;m:食用油质量,5 g

## 2 结果与分析

### 2.1 不同酶解时间对 DPPH 清除能力的影响

图 1 为不同酶解时间对天然黄茧蚕丝蛋白多肽的 DPPH 清除能力的影响。从图 1 可以看出,蚕丝蛋白多肽在酶解初期,DPPH 清除能力随水解时间延长而不断增强,3.5 h 达到峰值,DPPH 自由基清除率为 58.3%。之后随时间延长,DPPH 自由基清除能力逐渐降低。

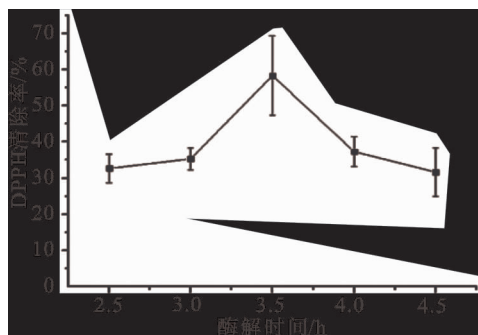


图 1 不同酶解时间对 DPPH 自由基清除作用的影响

### 2.2 不同酶解时间对羟自由基清除能力的影响

不同酶解时间对羟自由基清除能力的影响见图 2。图 2 表明,随酶解时间的延长,羟自由基清除能力先增后减,酶解 3.5 h 的蚕丝蛋白多肽具有最大羟自由基清除能力,达 87.3%。

图 2 不同酶解时间对羟自由基清除作用的影响

### 2.3 不同酶解时间对超氧阴离子清除能力的影响

图 3 为不同酶解时间对超氧阴离子清除能力的影响,酶解 4 h 的蚕丝蛋白多肽具有最大的超氧阴离子清除能力,可达到 43.0%。

### 2.4 与一般抗氧化剂 BHT、Vc 的抗氧化效果差异研究

表 1 为 BHT、VC 与天然黄茧蚕丝蛋白多肽液的过氧化值比较。从表 1 可知,蚕丝蛋白多肽的过氧化值达 3.57 mmol·L<sup>-1</sup>,说明其抗氧化活

多肽清除 DPPH、羟自由基、超氧自由基清除能力要优于白茧品种<sup>[15]</sup>,这可能与天然黄茧茧丝中含有的色素类物质及白茧茧丝在缫丝过程中的蛋白变性有关。

天然黄茧蚕丝蛋白多肽具有良好的抗氧化活性,可作为抗氧化功能食品或者化妆品基料,从而推动蚕丝产业向功能食品、化妆品等高附加值产业方向发展,为今后合理开发和高效利用提供了有益参考。

参 考 文 献:

[1] 胡必利,楚渠,彭云武. 天然彩色茧蚕品种金丝 1 号的选育过程及特征特性[J]. 安徽农业科学,2010,38(08):4 031-4 033.

[2] 彭云武,楚渠,胡必利. 限性蚕品种黄茧一号的育成[J]. 陕西农业科学, 2010, 56(01):58-59.

[3] 刘俊凤,刘彬斌,陈义安,等. 天然彩色茧家蚕品种“蜀黄 1 号”的选育[J]. 江西农业学报, 2014, 26(06):106-109.

[4] 艾均文,司马杨虎,薛宏,等. 家蚕夏秋用四元杂交天然黄色茧新品种湘彩黄 1 号的选育[J]. 蚕业科学,2017,43(01):45-55.

[5] 刘影侠,杜贝贝,岳玲,等. 不同茧色类型家蚕品种资源的茧壳和蚕蛹的总黄酮含量及蚕蛹的黄酮类物质组成分析[J]. 中国蚕业,2016,37(02):22-28.

[6] 孟繁利,艾均文,薛宏,等. 家蚕天然彩色茧资源的研究现状与开发前景[J]. 湖南农业科学,2011,(17):126-129.

[7] 黄先智. 蚕丝蛋白在食品和化妆品中的应用[J]. 四川丝绸,2003,(02):19-20.

[8] 董照明,张艳,杨佩,等. 蚕丝的基础研究与应用:从纤维到蛋白质的转型[J]. 蚕业科学,2015,41(03):395-404.

[9] 孔祥东,朱良均,闵思佳. 蚕丝蛋白的营养保健功能[J]. 中国食品与营养,2000,(05):42-43.

[10] 彭云武,胡必利,楚渠,等. 家蚕新品种“金丝一号”在农村的饲养效果[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(21):10 015-10 016.

[11] 冯丽春,徐水. 蚕丝生物学实验教程[M]. 北京:科学出版社,2016.

[12] 黄梅,王学军,杨凯. 中药抗氧化成分及抗氧化活性的体外评价方法[J]. 重庆科技学院学报(自然科学版), 2006,8(03):109-112.

[13] 刘明. 豆粕发酵制备抗氧化肽的研究[D]. 厦门:集美大学,2007.

[14] 韩少华,朱靖博,王妍妍. 邻苯三酚自氧化法测定抗氧化活性的方法研究[J]. 中国酿造, 2009,(06):155-157.

[15] 蓝建京. 丝素蛋白酶解多肽的抗氧化性研究[J]. 广东化工, 2013,40(24):38-40.

图 3 不同酶解时间对超氧阴离子清除作用的影响

性最强。三者的抗氧化性为:天然黄茧蚕丝蛋白多肽液>BHT>Vc。

表 1 不同抗氧化剂过氧化值的比较

试验组	过氧化值 POV/(mmol · L <sup>-1</sup> )
蚕丝蛋白多肽	3.57±0.06
BHT	6.80±0.44
VC	8.77±0.76

3 讨 论

试验利用碱性蛋白酶对天然黄茧家蚕品种“金丝 1 号”的茧丝蛋白进行酶解,并获得天然黄茧蚕丝蛋白多肽液,测定了 5 个酶解时间的产物对 DPPH、羟自由基、超氧自由基清除能力,并与 BHT、VC 进行了过氧化值比较,较全面地评价了天然黄茧蚕丝蛋白多肽的抗氧化活性。结果表明,酶解 3.5 h 时,其对 DPPH 和羟自由基清除率达最佳,分别为 58.3%和 87.3%;酶解 4 h 时对超氧自由基清除率最大,为 43.0%;酶解 3.5 h 的天然黄茧蚕丝蛋白多肽液抗氧化性由于 BHT 和 VC,因此,制备较强的抗氧化活性的蚕丝蛋白多肽液,应将碱性蛋白酶的酶解时间控制在 3.5 h~4 h 为宜。试验结果还表明,天然黄茧蚕丝蛋白