

蜂王浆水溶性蛋白及其酶解产物的抗氧化活性

许建香¹, 张智武^{1,*}, 刘永东², 苏志国², 彭文君¹

(1. 中国农业科学院蜜蜂研究所, 北京 100093; 2. 中国科学院过程工程研究所, 北京 100190)

摘要: 本研究分别采用清除二苯基-2-苦肟自由基(DPPH·), 抑制亚油酸氧化和总抗氧化能力测定等方法, 探讨蜂王浆水溶性蛋白及其酶解产物的抗氧化特性。结果表明, 蜂王浆水溶性蛋白(WSPs)本身的抗氧化活性很弱, 但酶解后抗氧化活性增强, 其中胃蛋白酶和胰蛋白酶共同酶解产物(PT-WSPs)的抗氧化活性最强。对 WSPs 及其酶解产物进行膜分离后发现, 分子量小于 3kD, 尤其是小于 1kD 的肽类物质其清除 DPPH·、抑制亚油酸氧化及总抗氧化能力最强。

关键词: 蜂王浆; 蛋白质; 酶解产物; 肽; 抗氧化活性

Antioxidant Activities of Water Soluble Proteins in Royal Jelly and Their Hydrolysates

XU Jian-xiang¹, ZHANG Zhi-wu^{1,*}, LIU Yong-dong², SU Zhi-guo², PENG Wen-jun¹

(1. Bee Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093, China;

2. Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China)

Abstract: Through the measurement of total antioxidant capability (T-AOC), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH·) radical scavenging ability and inhibitory ability against oxidation of linoleic acid, the antioxidant activities of water soluble proteins (WSPs) in royal jelly and their hydrolysates were investigated. The results indicated that although WSPs have no obvious antioxidant activity, their activity significant increases after hydrolyzed, especially the product PT-WSPs from WSPs hydrolyzed by both pepsin and trypsin shows the highest antioxidant activity. Furthermore, the membrane separation of WSPs and their hydrolysates were conducted. It was discovered that small peptides with molecular weight of lower than 3 kD, especially lower than 1 kD, have powerful T-AOC, DPPH radical scavenging ability and inhibitory ability against oxidation of linoleic acid.

Key words: royal jelly; protein; hydrolysate; peptide; antioxidant activity

中图分类号: TS201.21

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)05-0072-04

蜂王浆是 5~15 日龄工蜂舌腺和上颚腺的分泌物, 呈乳白色或淡黄色, 专门用于喂养蜂王及 3 日龄幼蜂的浆状物质^[1]。蜂王浆中含有大量蛋白质, 其中 2/3 为白蛋白、1/3 为球蛋白, 其含量与人体血清中白蛋白、球蛋白的比例相同, 对许多疑难病症具有神奇的疗效。蜂王浆作为一种传统的营养品及药品, 具有增强机体免疫力、延缓衰老、防癌抗癌、降血糖、降血压、抗疲劳、抗菌等保健功能^[2-3]。因此, 蜂王浆被誉为“生命长春的源泉”。

蜂王浆中的蛋白质可分为水溶性(46%~89%)和水不溶性蛋白质^[4]。目前已经鉴定出 9 种蜂王浆主要蛋白, 简称为 MRJPs(major proteins of royal jelly, 分子量为

49~87kD)。其中 5 种蛋白质, 即 MRJP1~MRJP5, 占蜂王浆总蛋白的 82%~90%, 而 MRJP1 占水溶性蛋白总量的 48%^[5]。蜂王浆中的蛋白质和肉类中的完全性蛋白质的不同之处是: 不含中性脂肪, 不仅含有 10 种必需氨基酸, 还含有 12 种非必需氨基酸, 因此是人类滋补的良好食物^[6]。自由基衰老学说认为, 人类的衰老是因为人体过多地产生与积累自由基, 只有清除这些过多的自由基, 健康才能有保障^[7]。Takeshi 等发现蜂王浆的水溶性蛋白和碱性蛋白具有很强的抗氧化及清除氧自由基的能力^[8]。Guo 等的研究表明, 蜂王浆水溶性蛋白的酶解产物中分子量小于 1 kD 的肽类具有最高的抗氧化的能力, 其中有四种二肽(Phe-Asp、Trp-Val、Leu-

收稿日期: 2008-05-13

基金项目: “十一五” 国家科技支撑计划项目(2006BAD06B04); 中国农业科学院基本科研业务专项项目(JBKY0032007005CAAS)

作者简介: 许建香(1974-), 女, 硕士, 主要从事蜂产品研究与开发。E-mail: xjx1974@163.com

* 通讯作者: 张智武(1971-), 女, 教授, 博士, 研究方向为食品科学。E-mail: zhangzhiwu@yahoo.com

Trp、Trp-Leu)具有潜在的脂质过氧化能力,而且Phe-Asp、Trp-Val和Leu-Trp等二肽在人类细胞培养实验中还具有抵抗氧化压力引起细胞死亡的能力^[9]。

目前对于蜂王浆抗氧化性的研究只局限于对其总体成分的研究和推断,研究方法也比较单一。本研究综合利用清除DPPH·、抑制亚油酸氧化和总抗氧化能力测定等方法,分别对蜂王浆水溶性蛋白(WSPs)、WSPs的酶解产物及其不同肽段等的抗氧化活性进行研究,从而深入了解蜂王浆蛋白的特性。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

蜂王浆(RJ) 中国农科院蜜蜂研究所;胰蛋白酶(trypsin)、胃蛋白酶(pepsin)、二苯基-2-苦肟基(DPPH·)、2,6-二叔丁基-4-甲基酚(BHT)、α-生育酚(α-tocopherol)和亚油酸(linoleic acid) Sigma公司;圆片超滤膜(1kD、3kD) Millipore公司;NH₄SCN和FeCl₂(分析纯) 广州化学试剂厂;总抗氧化能力测定试剂盒南京建成生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 样液制备

1.2.1.1 蜂王浆水溶性蛋白混合物(WSPs)的制备

将RJ按1:10的比例加入到去离子水中,充分搅拌均匀,于4℃冰箱静置30min后离心(5000×g、30min、4℃),上清液中即含有WSPs。

1.2.1.2 蜂王浆蛋白酶解产物的制备

将WSPs分成三份,取其中一份调pH值至2.0,加入胰蛋白酶(0.4%, W/V),充分混匀后置于37℃恒温箱中酶解4h;再取一份调pH值至7.5,加入胰蛋白酶(0.2, W/V),充分混匀后置于37℃恒温箱中酶解4h;剩余一份先调pH值至2.0,加入胰蛋白酶(0.4%, W/V),充分混匀后置于3℃恒温箱中酶解2h,然后再调pH值至7.5,加入胰蛋白酶(0.2, W/V),充分混匀后置于37℃恒温箱中酶解2h。酶解结束后将以上三份物质于沸水浴中煮15min使酶失活,离心(12000×g、10min、4℃)后得酶解产物,依次命名为P-WSPs、T-WSPs、PT-WSPs。

1.2.1.3 WSP和酶解产物中不同分子量肽段的制备

将酶解产物P-WSPs、T-WSPs、PT-WSPs分别用截留分子量为3kD和1kD的膜进行超滤,每种产物分别得到三种肽段的产物,即大于3kD的肽段、1~3kD的肽段和小于1kD的肽段。

1.2.1.4 所得各样品的蛋白浓度测定

各样品的蛋白浓度采用Bradford方法^[10]进行测定。

1.2.2 抗氧化活性测定

1.2.2.1 清除DPPH·法

用无水乙醇溶解DPPH,使其浓度为0.2mmol/L(78mg/L),对照物BHT和α-生育酚用无水乙醇溶解,使得浓度分别为1mg/ml。将待测样品和对照物分别按一定的稀释梯度进行稀释后按以下方法进行测定:取待测样品和对照物各2ml,分别加入2ml 0.2mmol/L的DPPH溶液,混匀。以溶剂为对照在520nm处测其吸光度(A_i);同时,待测样品和对照物各2ml,分别加入2ml无水乙醇,充分混匀,测其在520nm处的吸光度(A_j);测定空白对照的520nm处的吸光度(A_c)。抑制率(IR)根据下列公式计算^[11]:

$$IR(\%) = (1 - \frac{A_i - A_j}{A_c}) \times 100$$

1.2.2.2 抑制亚油酸氧化法^[12]

取待测样品和对照物各1ml,分别加入1ml浓度为2.51%(V/V)的亚油酸无水乙醇溶液,再加入2ml 0.05mol/L磷酸盐缓冲溶液(pH 7.0)和1ml无水乙醇(针对待测样品)或去离子水(针对对照物),密闭后放在暗处并保持40℃恒温。空白不加抗氧化剂,其它步骤同上。

取50μl上述混合液,加入4.85ml 75%的乙醇溶液和50μl 30%的NH₄SCN,再加入50μl 0.02mol/L已溶解于3.5%盐酸中的FeCl₂,准确反应3min后测其在500nm处的吸光度,以后每隔24h测定一次。

1.2.2.3 总抗氧化能力测定方法

用总抗氧化能力测定试剂盒。根据试剂盒说明分别测定对照管和测定管在520nm的吸光度,然后计算出总抗氧化能力,对于BHT和α-生育酚来说,可按照它们本身的重量来计算,单位为U/mg。计算公式为:

$$\text{总抗氧化能力} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{0.01 \times 30} \times \frac{\text{反应液总体积(ml)}}{\text{取样量(ml)}} \times \frac{\text{样品测试前稀释倍数}}{\text{样品蛋白含量(mg/ml)}}$$

(U/mg pro)

2 结果与分析

2.1 样品对DPPH·的清除作用

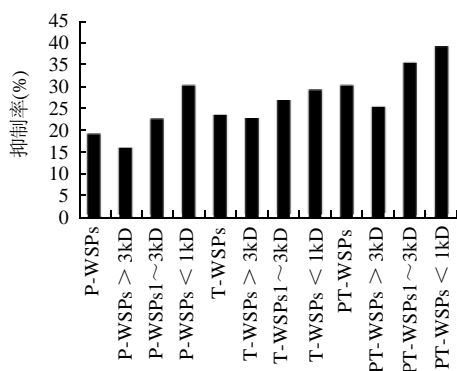
表1 WSPs水解物抑制DPPH·的IC₅₀

Table 1 IC₅₀ values of various WSPs hydrolysates to DPPH radical

样品	WSPs	P-WSPs	T-WSPs	PT-WSPs	BHT	α-生育酚
IC ₅₀ (mg pro/ml)	1.65	0.64	0.28	0.21	—	—
IC ₅₀ (mg/ml, W/V)	—	—	—	—	0.09	0.0115

样品的IC₅₀越小,则其清除DPPH·的能力越大。

由表 1 可知, 对照物 BHT 和 α -生育酚的 IC_{50} 非常小, 说明它们清除 DPPH \cdot 的能力很强。待测样品中, 酶解产物的 IC_{50} 明显小于 WSPs 的 IC_{50} , 说明蜂王浆蛋白本身清除 DPPH \cdot 的能力很小, 但其酶解产物清除 DPPH \cdot 的能力却大大提高了, 按其清除能力的大小排序为 PT-WSPs > T-WSPs > P-WSPs。从酶解产物及其超滤分段后的测定结果(图 1)可看出, 三种酶解产物中, 分子量大于 3kD 的肽段对 DPPH \cdot 的清除能力最低, 而分子量小于 1kD 肽段对 DPPH \cdot 的清除能力最强, 分子量处于 1~3kD 的肽段次之, 这说明酶解产物清除 DPPH \cdot 的能力主要是由分子量小于 1kD 的肽类物质起作用。



小于 1kD 肽段的蛋白浓度小于 0.002mg/ml, 其余肽段的蛋白浓度均稀释至 0.1mg/ml。

图 1 酶解产物对 DPPH \cdot 的清除能力

Fig. 1 DPPH radical scavenging activities of various hydrolysates

2.2 抑制亚油酸氧化作用

表 2 添加蜂王浆蛋白酶解产物的亚油酸-NH $_4$ SCN-FeCl $_2$ 反应体系吸光度随时间的变化

Table 2 Changes in absorbance (at 500 nm) of absolute ethanol solution of linoleic acid-NH $_4$ SCN-FeCl $_2$ added with various WSPs hydrolysates with time

样品	浓度 (mg pro/ml)	1	2	3	4	5	7	12
空白对照(dH $_2$ O)	—	0.056	0.155	0.136	0.174	0.162	0.250	0.407
WSPs	0.34	0.087	0.182	0.269	0.345	0.427	0.764	0.648
P-WSPs	0.34	0.065	0.080	0.132	0.140	0.127	0.191	0.380
P-WSPs>3kD	0.34	0.048	0.054	0.075	0.109	0.151	0.070	0.109
P-WSPs 1~3kD	<0.002*	0.056	0.061	0.091	0.137	0.086	0.108	0.216
P-WSPs<1kD	<0.002*	0.073	0.062	0.115	0.085	0.090	0.112	0.389
T-WSPs	0.34	0.120	0.076	0.089	0.094	0.068	0.096	0.199
T-WSPs>3kD	0.34	0.041	0.062	0.080	0.092	0.031	0.037	0
T-WSPs 1~3kD	0.030	0.066	0.076	0.086	0.114	0.174	0.091	0.083
T-WSPs<1kD	<0.002*	0.024	0.073	0.085	0.086	0.038	0.057	0
PT-WSPs	0.34	0.023	0.066	0.084	0.101	0.050	0.088	0.094
PT-WSPs>3kD	0.34	0.013	0.069	0.067	0.098	0.064	0.093	0.091
PT-WSPs~3kD	<0.002*	0.045	0.088	0.105	0.137	0.095	0.176	0.286
PT-WSPs<1kD	<0.002*	0.050	0.076	0.082	0.105	0.071	0.088	0.127
BHT	0.1(mg/ml, W/V)	0.045	0.060	0.071	0.078	0.007	0.019	0.013
α -生育酚	0.1(mg/ml, W/V)	0.085	0.108	0.133	0.152	0.119	0.133	0.168

注: * 表示蛋白浓度用 Bradford 法测不到, 在其极限值 0.002mg/ml 之外, 故以<0.002mg/ml 表示。下同。

由表 2 可知, 与空白对照相比, 除 WSP 外, 其余样品均对亚油酸的氧化有一定的抑制作用, 对照物 BHT 对亚油酸的抑制作用最强, 而大多样品抑制亚油酸氧化的作用要强于 α -生育酚。酶解产物抗亚油酸氧化作用的强弱顺序为 PT-WSPs > T-WSPs > P-WSPs, 这与以上清除 DPPH \cdot 的强弱顺序一致。如仅从实验所得数据来判断, WSPs 不但对亚油酸的氧化没有抑制作用, 反而起着促进亚油酸氧化的作用。实际原因是由于 WSPs 中大分子量的蛋白质与酒精发生反应, 蛋白质遇酒精变性沉淀而引起其在 500nm 处的吸光度增大。因此, 这种促进作用是一种假阳性现象。

2.3 总抗氧化能力的测定

表 3 WSPs 水解产物总抗氧化能力

Table 3 Total antioxidant capabilities of various WSPs hydrolysates

WSPs 水解物	浓度(mg pro/ml)	A $_{520nm}$	T-AOC(U/mg pro)
WSPs	0.331	对照管	0.003
		测定管	0.009
		测定管	0.012
P-WSPs	1.370	对照管	0.000
		测定管	0.019
P-WSPs > 3kD	8.913	对照管	0.004
		测定管	0.052
P-WSPs 1~3kD	< 0.002*	对照管	0.000
		测定管	0.007
P-WSPs < 1kD	< 0.002*	对照管	0.000
		测定管	0.023
T-WSPs	1.305	对照管	0.004
		测定管	0.011
T-WSPs > 3kD	7.647	对照管	0.005
		测定管	0.067
T-WSPs 1~3kD	< 0.002*	对照管	0.003
		测定管	0.008
T-WSPs < 1kD	< 0.002*	对照管	0.003
		测定管	0.017
PT-WSPs	0.339	对照管	0.000
		测定管	0.013
PT-WSPs > 3kD	1.168	对照管	0.004
		测定管	0.066
PT-WSPs 1~3kD	< 0.002*	对照管	0.003
		测定管	0.005
PT-WSPs < 1kD	< 0.002*	对照管	0.004
		测定管	0.006
BHT	0.1 (mg/ml, W/V)	对照管	0.002
		测定管	0.006
		测定管	0.002
α -生育酚	0.1 (mg/ml, W/V)	对照管	0.002
		测定管	0.058

由表 3 可知, WSPs 及其水解产物和从中分离到大于 3kD 的片断等物质的总抗氧化能力均很小, 而小于 3kD 的片断均具有很高的总抗氧化能力, 尤其是小于

1kD 的片断具有非常高的总抗氧化能力, 为大于 3kD 的片断的数十倍至上千倍, 甚至高于远高于对照物 BHT 和 α -生育酚。

3 结 论

综合所有测定结果可知, 蜂王浆蛋白酶解产物的抗氧化活性大于未酶解物, 而且所有测定结果都表明, 三种酶解产物中, PT-WSPs 的抗氧化活性最强。将酶解产物经过膜分离后发现, 抗氧化活性最强的是小于 1kD 的肽类物质, 其次是 1~3kD 的肽类物质, 大于 3kD 片断的抗氧化活性很弱。由此可推断, 蜂王浆蛋白中起抗氧化作用的物质主要是小于 1kD 的肽类。

本研究所得结论与 Guo 等的研究结果^[9]一致, 可为蜂王浆蛋白的实际应用提供可靠数据和理论支持。

参考文献:

- [1] 张智武, 单斌, 彭文君, 等. 蜂王浆中水溶性蛋白质和活性肽的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(10): 32-36.
- [2] 杨远帆, 陈靖刚, 倪辉. 蜂王浆中蛋白质及肽类物质的研究进展[J]. 中国养蜂, 2004, 55(4): 27-28.
- [3] BATIA L, KEREN D Z Y, BENJAMIN A, et al. Honey and royal jelly, like human milk, abrogate lectin-dependent infection-preceding *Pseudomonas aeruginosa* adhesion[J]. International Society for Microbial Ecology, 2007(1): 149-155.
- [4] TAKENAKA T, ECHIGO T. Proteins and peptides in royal jelly[J]. Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan, 1983, 54 (12) : 1203-1209.
- [5] SCHMITZOVA J, KLAUDING J, ALBERT S, et al. A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L[J]. Cellular and Molecular Life Science, 1998, 54(6): 1020- 1030.
- [6] 朱黎. 蜂王浆中的蛋白质[J]. 蜜蜂杂志, 2005(5): 30.
- [7] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学: 上册[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002: 101-103.
- [8] TAKESHI N. REIJI I. Preparation and the functional properties of water extract and alkaline extract of royal jelly[J]. Food Chemistry, 2004, 84: 181-186.
- [9] GUO H, KOUZUMA Y, YONEKURA M. Isolation and properties of antioxidative peptides from water soluble royal jelly protein hysrolysate [J]. Food Science Technological Research, 2005, 11(2): 222-230.
- [10] BRADFORD M M, MCRORIE R A, WILLAMS W L. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-254.
- [11] OKADA Y, OKADA M. Scavenging effect of water soluble proteins in broad beans on free radicals and active oxygen species[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46: 401-406.
- [12] OSAWA T, NAMIKI M. Natural antioxidant isolated from eucalyptus leaf waxes[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1985, 33: 770-780.