

DOI:10.6041/j.issn.1000-1298.2012.04.028

油茶籽糖蛋白提取工艺优化及抗氧化性*

李婷婷^{1,2} 张 晖¹ 吴彩娥² 范龚建²

(1. 江南大学食品学院, 无锡 214122; 2. 南京林业大学森林资源与环境学院, 南京 210037)

【摘要】 为探讨油茶籽糖蛋白的最优提取工艺及抗氧化活性,在单因素试验基础上采用响应面法对提取油茶糖蛋白的关键参数进行了优化。同时以维生素 C 作为对照,采用 4 种不同方法考察了油茶籽糖蛋白的抗氧化性能。结果表明,油茶籽糖蛋白的最佳提取工艺条件为:浸提时间 8.81 h、提取盐浓度 0.12 mol/L、pH 值 8.77 和液料比 11.62 mL/g,在此条件下蛋白得率为 8.76%,糖得率为 10.14%。抗氧化试验表明,油茶籽糖蛋白能显著清除 DPPH、羟基自由基和超氧阴离子自由基,具备一定的还原能力。

关键词: 油茶籽 糖蛋白 提取 抗氧化

中图分类号: TS229; S794.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2012)04-0148-08

Extraction Optimization and Antioxidant Activity of Glycoprotein from *Camellia oleifera* Seed

Li Tingting^{1,2} Zhang Hui¹ Wu Caie² Fan Gongjian²

(1. Food Science & Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

2. College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract

The optimum extraction technology and antioxidant activity of glycoprotein from *Camellia oleifera* seed were performed for future development and utilization of the *Camellia oleifera*. On the base of single-factor experiment, the optimum parameters of extraction for glycoprotein from *Camellia oleifera* seed were determined by response surface methodology. The antioxidant activity of glycoprotein was examined by using various antioxidant assays with vitamin C co-assayed as positive control. As a result, the optimized condition of glycoprotein extraction was as follows: extraction time of 8.81 h, salinity of 0.12 mol/L, pH value of 8.77, ratio of liquid to solid of 11.62 mL/g. At the optimum conditions, the yield of protein reached to 8.76%, and the yield of saccharide reached to 10.14%. The results of above antioxidant tests demonstrated that the glycoprotein from *Camellia oleifera* seed has certain antioxidant activities.

Key words *Camellia oleifera* seed, Glycoprotein, Extraction, Antioxidant

引言

随着糖生物学的不断发展,研究发现作为糖缀合物的糖蛋白,表现出重要的生物学功能。现报道的一些糖蛋白都具有显著的药用功效和保健功能,如天花粉糖蛋白具有抗癌功效,伴刀豆球蛋白具有

抗肿瘤和诱发细胞凋亡活性,茶叶、鼠掌老鹤草糖蛋白具有抗肿瘤和抗氧化活性,甘薯糖蛋白具有降血脂和提高免疫力的活性^[1-8]。这些糖蛋白的功能活性具有极大的利用价值,在生化、医药和食品等领域的功能越来越得到人们的认可,而目前对油茶籽糖蛋白及其生理活性的研究国内外尚未见报道。

收稿日期: 2011-06-23 修回日期: 2011-09-02

* 江苏省高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)

作者简介: 李婷婷,博士生,南京林业大学讲师,主要从事食品功能成分研究,E-mail: litingting82@163.com

通讯作者: 张晖,教授,博士生导师,主要从事谷物功能成分及功能性食品研究,E-mail: zhanghui@jiangnan.edu.cn

油茶(*Camellia oleifera* Abel.)是我国特有的优良乡土树种,作为一种优良的木本油料植物,在我国栽培历史悠久且在南方各省多有分布^[9]。油茶籽油中不饱和脂肪酸含量高达90%以上,维生素E的含量比橄榄油高一倍,作为油茶籽榨油后的副产品,油茶籽粕中含有多种功能成分^[10]。近年来,为改善我国耕地不足和食用油需求量增大的现状,同时有效利用南方地区的山地丘陵,全面开发利用油茶资源,发展油茶产品的精深加工已成为当前面临的问题和研究热点^[11]。目前,针对油茶籽的利用研究多集中在茶籽油、茶皂素和茶多糖等方面,对油茶糖蛋白的研究国内外未见报道^[12]。因此,本文采用响应面法对影响油茶糖蛋白提取的因素进行优化,确定其得率较高的浸提工艺,并对提取的油茶粗糖蛋白进行抗氧化活性评价,旨在为提高油茶资源的综合利用以及油茶产业的可持续发展提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂及设备

原料:油茶籽为长林系列,购自江西省新余市,由超临界CO₂萃取脱脂后,经体积分数为90%的乙醇除皂素,干燥备用。

试剂:无水乙醇、三氨基甲烷(Tris)、考马斯亮蓝、苯酚、浓硫酸、体积分数30% H₂O₂、邻二氮菲、硫酸亚铁、铁氰化钾、三氯化铁、三氯乙酸、邻苯三酚、二苯基苦基苯肼自由基(DPPH)和硫酸铵等均为分析纯。

设备:HA121-50-01型超临界CO₂萃取设备,华安石油科研仪器有限公司;ALPHA1-2型冷冻干燥机,德国Christ公司;UVmini-1240型紫外分光光度计,日本岛津公司;pp-15型pH计,德国Sartorius公司;BS210S型电子天平,德国Sartorius公司;HJ-3型数显恒温磁力搅拌器,国华电器有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 油茶籽糖蛋白提取单因素试验

(1) 浸提液盐浓度

为保证油茶籽糖蛋白的活性,采用4℃低温条件下以0.1 mol/L Tris-HCl缓冲液进行静置浸提。配制含不同浓度NaCl的Tris-HCl浸提液,NaCl的浓度为0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30 mol/L,其他条件控制在浸提液pH值为8、液料比为10 mL/g、浸提时间为10 h。浸提完成后经sewage法脱除游离蛋白,以蛋白质和糖含量为指标,考察浸提液盐浓度对糖蛋白提取效果的影响。

(2) 浸提时间

浸提液NaCl浓度为0.1 mol/L、pH值为8、液料

比为10 mL/g,浸提时间分别为4、6、8、10、12、14 h,浸提完成后经sewage法脱除游离蛋白,以蛋白质和糖含量为考察指标,进行浸提时间对糖蛋白提取效果影响的单因素试验。

(3) 浸提液pH值

调节浸提液pH值分别为5、6、7、8、9、10,其他条件控制在浸提液NaCl浓度为0.1 mol/L、浸提时间为10 h、液料比为10 mL/g。浸提完成后经sewage法脱除游离蛋白,以浸提液中蛋白质和糖含量为指标,考察浸提液pH值对糖蛋白提取效果的影响。

(4) 液料比

浸提液与油茶籽的液料比分别为6、8、10、12、14、16 mL/g,其他条件控制在浸提液NaCl浓度为0.1 mol/L、pH值为8、浸提时间为10 h。浸提完后经sewage法脱除游离蛋白,进行液料比对糖蛋白提取效果影响的单因素试验,同样以浸提液中蛋白质和糖含量为考察指标。

1.2.2 油茶籽糖蛋白提取响应面法优化试验

试验运用Design-Expert 7.0.0软件,采用响应曲面法的中心组合设计,以蛋白质和糖含量为指标对糖蛋白的提取进行优化试验。在单因素试验的基础上,确定浸提时间、盐浓度、pH值、液料比4个因素的水平编码如表1所示。根据试验所得数据,进行回归拟合建立回归模型。

表1 油茶糖蛋白提取工艺条件因素水平

Tab.1 Coding of factors and levels

水平	因素			
	浸提时间 x_1/h	盐浓度 $x_2/mol \cdot L^{-1}$	pH值 x_3	液料比 $x_4/mL \cdot g^{-1}$
-2	6	0	6	6
-1	8	0.05	7	8
0	10	0.10	8	10
1	12	0.15	9	12
2	14	0.20	10	14

1.2.3 分析测定

糖蛋白中的蛋白质与多糖通过糖肽共价键相连,不同种类的糖蛋白中蛋白质含量和糖含量各不相同,因而对提取液中蛋白质和糖的含量分别进行测定,以全面反映糖蛋白的提取率。

(1) 糖蛋白中蛋白质含量的测定

采用考马斯亮蓝法测定糖蛋白中的蛋白质含量^[13]。将牛血清蛋白配制成0.1 mg/mL的蛋白质标准液,各取0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL,由蒸馏水补足1 mL后,加入5 mL考马斯亮蓝G-250试剂,混匀,静置5 min,于波长595 nm处测定其吸光

度,绘制标准曲线。其方程为 $y = 0.0071x + 0.0111$, $R^2 = 0.9991$, 式中 y 为蛋白质质量浓度 $\mu\text{g}/\text{mL}$, x 为该浓度下的吸光度。稀释后的待测样液以同样方法测定,由标准曲线求得其浓度。

(2) 糖蛋白中多糖含量的测定

采用苯酚-硫酸法测定糖蛋白中多糖的含量^[14]。将葡萄糖配制成为 $0.1 \text{ mg}/\text{L}$ 的葡萄糖标准液,准确移取 0.2 、 0.4 、 0.6 、 0.8 、 1.0 、 1.2 、 1.4 mL 的葡萄糖标准液,加蒸馏水补至 2.0 mL ,加入质量分数为 6% 苯酚 1.0 mL ,摇匀后迅速加入浓硫酸 5 mL ,室温放置 30 min ,于波长 490 nm 处测定吸光度,绘制标准曲线,得到标准曲线回归方程为 $y = 0.0129x + 0.0088$, $R^2 = 0.9994$, 式中 y 为糖质量浓度 $\mu\text{g}/\text{mL}$, x 为该浓度下的吸光度。稀释后的待测样液以同样方法测定,由标准曲线求得其浓度。

(3) 蛋白质与糖得率的计算

$$r = \frac{CVN10^{-6}}{m} \times 100\% \quad (1)$$

式中 r ——蛋白质或糖的得率, %

C ——提取液中蛋白质或糖质量浓度, $\mu\text{g}/\text{mL}$

V ——提取液体积, mL N ——稀释倍数

m ——油茶籽样品的质量, g

1.2.4 油茶籽糖蛋白抗氧化活性

将最优提取方案所得油茶糖蛋白提取液,经硫酸铵沉淀, 4°C 下进行蒸馏水透析,真空冷冻干燥透析液得油茶籽糖蛋白样品。采用总还原能力、清除羟自由基 ($\cdot\text{OH}$) 能力、清除超氧阴离子自由基 (O_2^-) 能力、清除 DPPH 能力 4 种方法评价其抗氧化活性,并以维生素 C 作阳性对照。

(1) 清除 DPPH 能力

参考文献[15~16]取不同浓度的样品 0.5 mL ,依次加入 2.5 mL 、 $6.5 \times 10^{-5} \text{ mol}/\text{L}$ DPPH 溶液,室温下避光反应 30 min ,测定波长 517 nm 的吸光度 A_s ,同时以无水乙醇为空白对照测定 A_c 。糖蛋白对 DPPH 的清除率计算公式为

$$P = \left(1 - \frac{A_s}{A_c}\right) \times 100\% \quad (2)$$

(2) 清除羟自由基 ($\cdot\text{OH}$) 能力

参考文献[17~18]取 1 mL 、 $0.75 \text{ mmol}/\text{L}$ 邻二氮菲的无水乙醇溶液加入 2 mL 、 $0.15 \text{ mol}/\text{L}$ 的磷酸缓冲液 (pH 值为 7.4),加入 1 mL 不同浓度的样品,震荡混匀,再加入 1 mL 、 $0.75 \text{ mmol}/\text{L}$ 的硫酸亚铁,最后加入体积分数为 0.01% H_2O_2 溶液 1 mL , 37°C 水浴 60 min ,在波长 536 nm 测定其吸光度 B_s ,并以蒸馏水作对照。油茶籽糖蛋白对羟自由基的清除率计算公式为

$$W = \frac{B_s - B_c}{B_b - B_c} \times 100\% \quad (3)$$

式中 B_c ——以同样体积的蒸馏水代替样品及 H_2O_2 溶液的吸光度

B_b ——以同样体积的蒸馏水代替样品的吸光度

(3) 还原能力

参考文献[19~20]取 2 mL 不同浓度的样品,加入 $0.2 \text{ mol}/\text{L}$ 磷酸缓冲液 (pH 值为 6.6) 2 mL ,质量分数为 1% 铁氰化钾溶液 2 mL ,混匀, 50°C 水浴下保温 20 min ;再加入质量分数为 10% 三氯乙酸溶液 2 mL ,震荡混匀后,在 $3000 \text{ r}/\text{min}$ 条件下离心 5 min ,取上清液 2 mL ;加入 2 mL 蒸馏水和 0.4 mL 质量分数为 0.1% 三氯化铁溶液,混匀, 50°C 水浴下保温 10 min ;溶液由黄色变为蓝色,在波长 700 nm 测定其吸光度。以蒸馏水代替样品作为空白对照。

(4) 清除超氧阴离子自由基 (O_2^-) 能力

参考文献[21~22]取 0.1 mL 不同浓度的样品溶液加入 2.8 mL 的 $0.1 \text{ mol}/\text{L}$ Tris 缓冲液 (pH 值为 8.2),震荡均匀,在 25°C 水浴 10 min 后,加入 0.1 mL 的 $3 \text{ mmol}/\text{L}$ 邻苯三酚溶液 (25°C 水浴预热),迅速混匀并开始计时,在波长 325 nm 处测定吸光度,每隔 30 s 读取 A_{325} , 5 min 后结束。作吸光度随时间变化的回归方程,其斜率为邻苯三酚的自氧化速率 V_s 。以蒸馏水代替样品为空白对照测得斜率为 V_c 。油茶籽糖蛋白对超氧阴离子自由基的抑制率计算公式为

$$K = \frac{V_c - V_s}{V_c} \times 100\% \quad (4)$$

2 结果与分析

2.1 油茶糖蛋白提取单因素试验结果分析

2.1.1 浸提液盐浓度

图1为浸提液盐浓度对油茶籽糖蛋白的蛋白质及糖得率的影响。由图可以看出,蛋白质与糖得率变化趋势一致,随着盐浓度的增加呈现先急剧增大而后下降的趋势。当 NaCl 浓度为 $0.1 \text{ mol}/\text{L}$ 时,蛋白质和糖均达到最大得率。

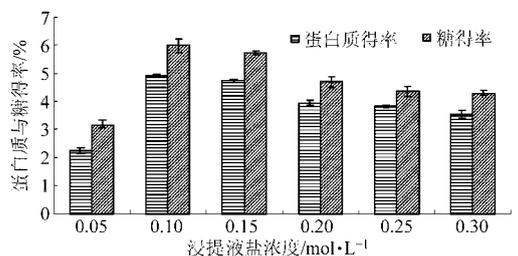


图1 浸提液盐浓度对蛋白质与糖得率的影响

Fig. 1 Effect of salinity on yield of protein and saccharide

低浓度盐溶液可以增加蛋白质分子表面的电荷,增强蛋白质分子与水分子的作用,使蛋白质溶解度增大,因此低浓度条件下随着盐浓度的增加,蛋白质的溶解度也随之增大。当盐浓度增加到一定程度后,由于盐离子可以中和电荷、破坏水化膜,蛋白质溶解度随之下降,对糖蛋白的提取有负影响,故盐浓度不宜过大。

2.1.2 浸提时间

浸提时间对油茶籽糖蛋白的蛋白质及糖得率的影响如图2所示。由图可以看出,蛋白质与糖得率变化趋势基本一致,整体观之,浸提时间越长,得率越高。浸提时间为4~10 h时得率变化显著;而在10~14 h时间段内得率处于平稳趋势,差异不显著。

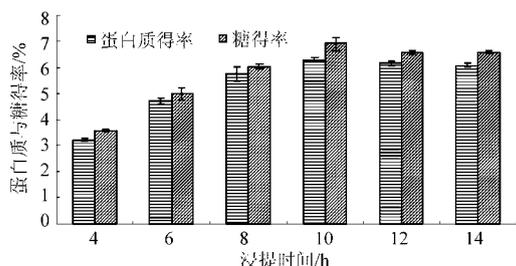


图2 浸提时间对蛋白质与糖得率的影响

Fig. 2 Effect of extraction time on yield of protein and saccharide

浸提过程主要是通过油茶籽颗粒与浸提液的充分接触,实现蛋白质、糖的溶出。时间的增长有利于颗粒胞膜的破裂,促进蛋白质及糖的溶出,因而可以提高糖蛋白得率。不过当时间足够长,原料浸提液接触充分,溶出达到平衡后时间的增加不再影响糖蛋白得率。

2.1.3 浸提液 pH 值

图3为蛋白质与糖得率随pH值的变化。由图可知,当pH值为5~6时蛋白质与糖的得率都处于较低水平,之后随着pH值的增加有所提高。当pH值为8时,糖蛋白得率显著增大,而此后pH值的增加对提取效果影响不明显,得率趋于稳定。

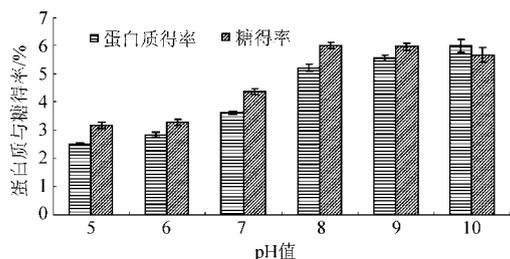


图3 pH值对油茶蛋白质与糖得率的影响

Fig. 3 Effect of pH value on yield of protein and saccharide

pH值的变化可以使蛋白质的带电情况发生变化,直接影响到蛋白质之间,以及蛋白质与水之间的相互作用。油茶糖蛋白质等电点较低,故适宜的碱

性环境对蛋白质的提取较为有利,pH值增加,糖蛋白得率增大。但pH值过大,强碱性环境有可能会造成蛋白质变性,故不宜太大。

2.1.4 液料比

图4为液料比对糖蛋白提取的影响。由图可知,蛋白质及糖得率变化趋势一致,总体而言都随着液料比的增加而增大。液料比为6、8 mL/g时糖与蛋白质得率明显低于液料比为10 mL/g的得率,但当液料比大于10 mL/g,得率基本处于稳定水平,差异不显著。

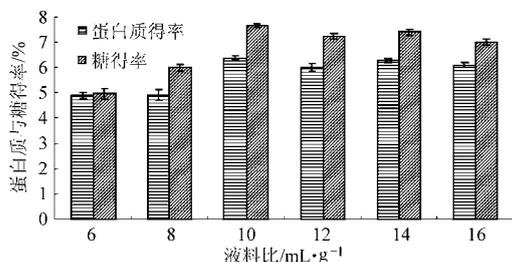


图4 液料比对油茶蛋白质与糖得率的影响

Fig. 4 Effect of ratio of materials to solution on yield of protein and saccharide

糖蛋白是包裹在油茶籽颗粒中,糖蛋白的溶出需要经过颗粒胞膜的破裂或溶解。而液料比的增大,能使油茶籽颗粒得到充分浸提接触,有利于把蛋白质从颗粒中溶出,故能够提高糖蛋白得率。不过,当液料比达到一定程度后,再增加提液量的作用就不再明显,从资源节约和后续样品处理角度考虑,液料比不易太大。

2.2 响应面优化提取工艺条件

2.2.1 回归模型的建立

按照试验设计方案进行试验,结果如表2所示。应用Design-Expert 7.0.0软件对表2中蛋白质得率和糖得率进行回归拟合,得到回归方程。其中,蛋白质得率的回归方程为

$$Y_1 = 8.3 + 0.1X_1 + 0.51X_2 + 0.7X_3 + 0.71X_4 - 0.098X_1X_2 - 0.019X_1X_3 - 0.15X_1X_4 + 0.77X_2X_3 - 0.53X_2X_4 + 0.35X_3X_4 - 0.19X_1^2 - 0.91X_2^2 - 0.75X_3^2 - 0.65X_4^2 \quad (5)$$

糖得率的回归方程为

$$Y_2 = 9.94 + 0.25X_1 + 0.54X_2 + 0.49X_3 + 0.99X_4 - 0.57X_1X_2 - 0.77X_1X_3 - 3.7510^{-3}X_1X_4 - 0.059X_2X_3 + 0.093X_2X_4 + 1.2510^{-3}X_3X_4 - 0.39X_1^2 - 0.82X_2^2 - 0.73X_3^2 - 0.48X_4^2 \quad (6)$$

2.2.2 回归模型分析

对试验所得数据进行方差分析和显著性检验,结果如表3所示。由结果可以看出,蛋白质得率回归方程的 $p < 0.0001$,糖得率的回归方程的 p 为

0.000 4,表明蛋白质得率和糖得率的回归方程与全体自变量之间的关系高度显著,方程极显著;而蛋白质得率回归方程和糖得率回归方程的失拟项 p 值均大于 0.05,差异不显著,这说明其他因素对试验结果干扰较小,残差由随机误差引起,模型能较好地反映数据;同时 2 个回归方程的复相关系数 R^2 分别为 0.927 0 和 0.905 6 均大于 0.800 0,与实际情况拟合良好,因此可以利用该回归方程对糖蛋白提取过程进行分析和预测。同时由表 3 可以看出,蛋白质得率回归方程的自变量中一次项 X_2 、 X_3 、 X_4 及其对应的二次项均影响极显著,交互项 X_2X_3 、 X_2X_4 影响也极显著,而其他交互项影响不显著。这表明盐浓度、pH 值和液料比对蛋白质得率的影响极显著,而且盐浓度和 pH 值以及盐浓度和液料比具有交互作用的影响。由表 3 可知糖得率回归方程中的一次项 X_2 、

表 2 试验方案设计与结果

Tab. 2 Design and results of experiment

编号	X_1	X_2	X_3	X_4	蛋白质得率 $Y_1/\%$	糖得率 $Y_2/\%$
1	1	-1	1	1	6.67	7.54
2	-1	-1	1	1	6.28	8.50
3	-1	-1	-1	-1	3.92	4.22
4	0	-2	0	0	3.79	4.27
5	-1	1	-1	1	5.05	8.02
6	0	2	0	0	6.26	7.63
7	1	-1	-1	1	6.08	8.75
8	2	0	0	0	7.96	8.28
9	0	0	-2	0	3.72	4.36
10	0	0	2	0	7.57	8.26
11	-2	0	0	0	7.85	7.10
12	1	1	-1	-1	5.30	6.32
13	1	-1	1	-1	3.32	6.39
14	1	1	1	1	7.94	7.66
15	-1	-1	1	-1	3.60	5.87
16	0	0	0	-2	3.99	4.73
17	-1	1	1	1	7.45	9.32
18	0	0	0	2	8.11	9.88
19	0	0	0	0	8.49	9.71
20	1	1	-1	1	3.88	8.98
21	1	-1	-1	-1	5.51	7.60
22	-1	1	-1	-1	4.65	6.17
23	-1	1	1	-1	6.95	8.10
24	1	1	1	-1	7.28	5.88
25	-1	-1	-1	1	5.91	5.32
26	0	0	0	0	8.02	9.58
27	0	0	0	0	8.39	9.12

X_3 、 X_4 及二次项 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 、 X_4^2 均影响显著,而交互项 X_1X_2 、 X_1X_3 影响显著,即对于糖得率而言,盐浓度、pH 值和液料比对糖得率的影响显著,且提取时间和盐浓度以及提取时间和 pH 值具有交互作用的影响。

2.2.3 模型交互项的解析

由表 3 可知,蛋白质得率回归方程的交互项 X_2X_3 、 X_2X_4 影响极显著,对其进行响应面分析如图 5 和图 6 所示。从图 5 可以看出,当提取时间和液料比固定在零水平时,在盐浓度较低时随着 pH 值的升高,蛋白质得率呈先升高后下降的趋势。当蛋白质得率较高时,pH 值和盐浓度均在零水平附近。从液料比和盐浓度对蛋白质得率影响的响应面图(图 6)上可以看出,在盐浓度较低时,液料比越大,蛋白质得率越高;当液料比较小时,随着盐浓度的升高,蛋白质得率呈先上升后下降的趋势。当蛋白质得率较高时,pH 值和盐浓度均在零水平附近。

对糖得率回归方程中影响糖得率显著的交互项进行响应面分析,如图 7 和图 8 所示。从盐浓度和浸提时间对糖得率影响的响应面图(图 7)可以看出,在盐浓度较低水平时,糖得率随浸提时间的增大而升高;盐浓度高时,浸提时间的影响不明显。当浸提时间较短时,随着盐浓度的增加,糖得率开始呈现上升趋势,到一定水平后基本稳定。从图 8 可以看出,浸提时间较短时糖得率随 pH 值的增大而升高。pH 值较小时,随着浸提时间的加长,糖得率也呈现上升趋势。

2.2.4 响应面优化及其验证试验

运用 Design-Expert 7.0.0 软件,设置蛋白质得率和糖得率同时达到极大值时,求解得到油茶糖蛋白提取的理论最优条件为:浸提时间 8.81 h、浸提液盐浓度 0.12 mol/L、pH 值 8.77、液料比 11.62 mL/g,在此条件下的蛋白质得率的理论值为 8.86%,糖得率的理论值为 10.21%。按照上述最佳提取条件进行验证试验,重复 3 次,得蛋白质得率平均值为 8.76%,糖得率平均值为 10.14%,可见所得回归方程可以较好地拟合油茶糖蛋白的提取情况。

2.3 油茶籽糖蛋白抗氧化活性结果分析

采用 4 种抗氧化活性评价方法(还原能力测定、对超氧阴离子、羟自由基及 DPPH 自由基的清除能力)考察了油茶糖蛋白的体外抗氧化活性,其结果如图 9 所示。油茶籽糖蛋白清除 DPPH 的能力随着浓度的增大而增加,当其质量浓度为 5.00 mg/mL 时,DPPH 的清除率达到 70.87%,这与对照维生素 C 相接近(图 9a)。随着油茶糖蛋白质量浓度的增大,清除羟自由基的能力明显增强,呈现较为明显的量效关系,当油茶籽糖蛋白质量浓度为 5 mg/mL

表 3 蛋白质得率和糖得率的方差分析
Tab.3 Variance analysis of protein and saccharide yield

变异来源	平方和		自由度	均方		F		p	
	蛋白质得率	糖得率		蛋白质得率	糖得率	蛋白质得率	糖得率	蛋白质得率	糖得率
回归模型	72.67	72.30	14	5.19	5.16	10.89	8.22	< 0.000 1	0.000 4
X_1	0.24	1.48	1	0.24	1.48	0.50	2.36	0.493 3	0.150 7
X_2	6.15	7.02	1	6.15	7.02	12.91	11.18	0.003 7	0.005 9
X_3	11.89	5.68	1	11.89	5.68	24.94	9.05	0.000 3	0.010 9
X_4	12.00	23.68	1	12.00	23.68	25.18	37.70	0.000 3	< 0.000 1
$X_1 X_2$	0.15	5.22	1	0.15	5.22	0.32	8.31	0.580 2	0.013 8
$X_1 X_3$	6.006×10^{-3}	9.36	1	6.006×10^{-3}	9.36	0.013	14.91	0.912 5	0.002 3
$X_1 X_4$	0.36	2.250×10^{-4}	1	0.36	2.250×10^{-4}	0.76	3.582×10^{-4}	0.399 9	0.985 2
$X_2 X_3$	9.44	0.055	1	9.44	0.055	19.81	0.088	0.000 8	0.771 9
$X_2 X_4$	4.46	0.14	1	4.46	0.14	9.36	0.22	0.009 9	0.649 0
$X_3 X_4$	2.00	2.500×10^{-5}	1	2.00	2.500×10^{-5}	4.19	3.980×10^{-5}	0.063 3	0.995 1
X_1^2	0.77	3.19	1	0.77	3.19	1.61	5.07	0.229 0	0.043 8
X_2^2	17.65	14.40	1	17.65	14.40	37.02	22.92	< 0.000 1	0.000 4
X_3^2	12.14	11.41	1	12.14	11.41	25.48	18.17	0.000 3	0.001 1
X_4^2	9.10	4.97	1	9.10	4.97	19.10	7.91	0.000 9	0.015 7
残差	5.72	7.54	12	0.48	0.63				
失拟项	5.60	7.35	10	0.56	0.73	9.13	7.64	0.102 7	0.121 2
纯误差	0.12	0.19	2	0.061	0.096				
总和	78.39	79.84	26						

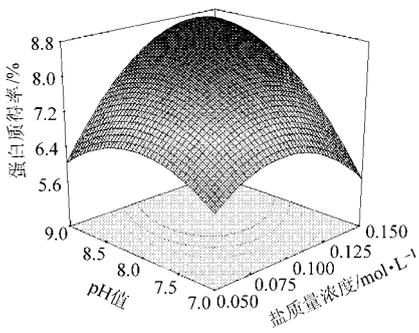


图 5 盐质量浓度和 pH 值对蛋白质得率影响的响应面
Fig.5 Effect of pH value and salinity on yield of protein

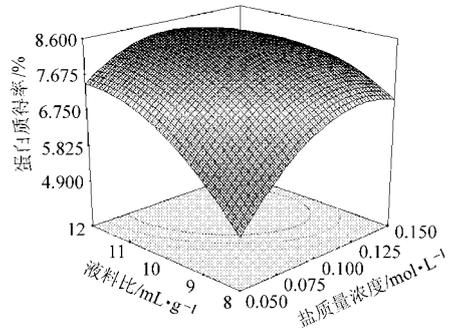


图 6 料液比和盐质量浓度对蛋白质得率影响的响应面
Fig.6 Effect of ratio of material to liquid and salinity on yield of protein

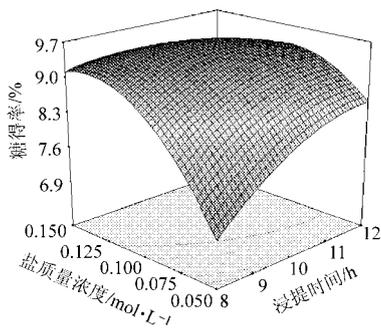


图 7 盐质量浓度和浸提时间对糖得率影响的响应面
Fig.7 Effect of time and ratio of material to liquid on yield of saccharide

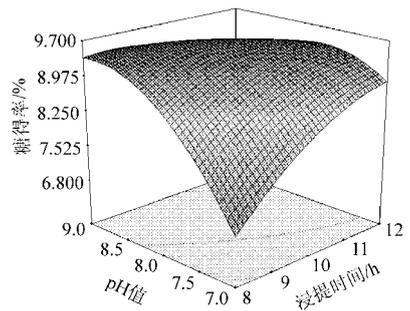


图 8 浸提时间和 pH 值对糖得率影响的响应面
Fig.8 Effect of time and pH value on yield of saccharide

时,测得清除羟自由基($\cdot\text{OH}$)的能力达到 100% (图 9b)。而油茶籽糖蛋白对超氧阴离子的清除能力以及还原能力虽然也随油茶蛋白质量浓度的增大而增加,但与维生素 C 相比相对较弱(图 9c、9d)。

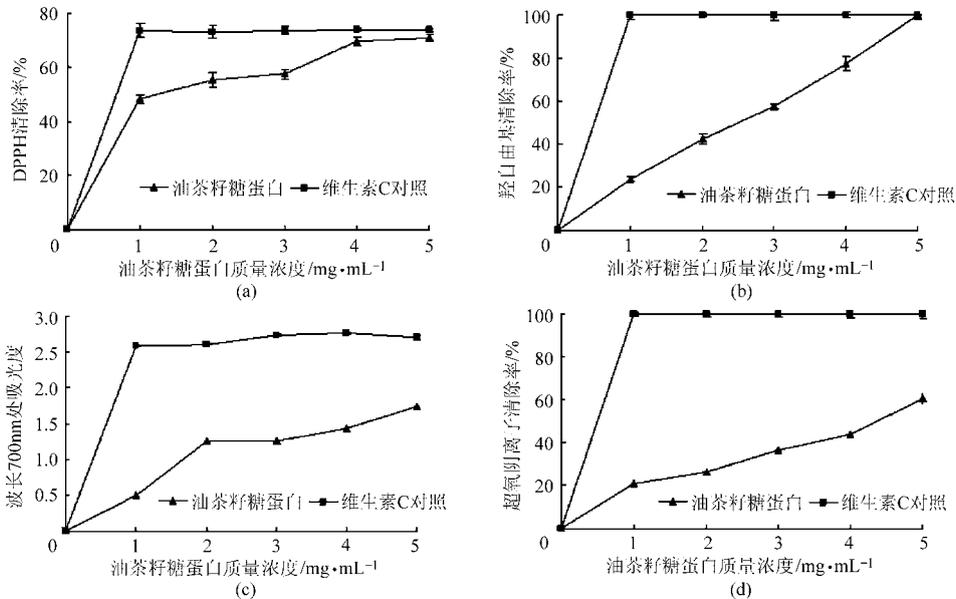


图 9 不同评价方法所测油茶籽糖蛋白的抗氧化活性

Fig. 9 Antioxidant activities of glycoprotein from *Camellia oleifera* seed by different methods
(a) DPPH 清除率 (b) 羟自由基清除率 (c) 还原能力 (d) 超氧阴离子清除率

3 结论

(1) 利用响应面法对提取油茶籽糖蛋白的关键因素进行了优化,并建立了回归模型,方差分析表明拟合较好。优化后的提取工艺条件为:浸提时间 8.81 h、浸提液盐浓度 0.12 mol/L、pH 值 8.77、液料比 11.62 mL/g,在此条件下蛋白质得率为 8.76%,

据文献[23]报道糖蛋白之所以呈现出强抗氧化性与其本身固有的分子结构有直接的关系。由相关的研究报道可知,其他一些糖蛋白质也呈现出较好的抗氧化性^[24-25]。

糖得率为 10.14%。

(2) 采用测定还原能力、清除超氧阴离子、羟自由基及 DPPH 自由基的能力 4 种方法考察了油茶糖蛋白的体外抗氧化活性,结果表明油茶籽糖蛋白具有一定的抗氧化活性,当其质量浓度为 5 mg/mL 时,其清除 DPPH 自由基和羟自由基的能力与维生素 C 接近。

参 考 文 献

- Lee J, Lim K T. Plant-originated glycoprotein (24 kDa) has an inhibitory effect on proliferation of BNL CL. 2 cells in response to di(2-ethylhexyl) phthalate[J]. *Cell Biochemistry and Function*, 2011, 29(6): 496 ~ 505.
- Chen J N, De Mejia E G, Wu J S B. Inhibitory effect of a glycoprotein isolated from golden oyster mushroom (*Pleurotus citrinopileatus*) on the lipopoly saccharide-induced inflammatory reaction in RAW 264.7 macrophage [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(13): 7 092 ~ 7 097.
- Russell S T, Tisdale M J. Studies on the anti-obesity activity of zinc-alpha(2)-glycoprotein in the rat[J]. *International Journal of Obesity*, 2011, 35(5): 658 ~ 665.
- Li Jie, Xia Xuechun, Nie Huiling, et al. PKC inhibition is involved in trichosanthin-induced apoptosis in human chronic myeloid leukemia cell line K562 [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2007, 1770(1): 63 ~ 70.
- Liu Bo, Li Chunyang, Bian Hejiao, et al. Antiproliferative activity and apoptosis-inducing mechanism of *Concanavalin A* on human melanoma A375 cells [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2009, 482(2): 1 ~ 8.
- Shim J U, Lim K T. Anti-oxidative and anti-proliferative character of glycoprotein isolated from geranium sibiricum linne in Chang liver cells[J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2008, 26(3): 320 ~ 324.
- Nie S P, Xie M Y, Zhou P, et al. In vitro antioxidative and anticancer activities of tea glycoprotein in green tea[J]. *Eur. Food Res.*, 2007(224): 437 ~ 442.
- 梁婧婧. 甘薯水溶性糖蛋白的提取纯化及降血脂机理的研究[D]. 沈阳:沈阳农业大学, 2009.
Liang Jingjing. Research on extraction purification and hypolipidemic mechanism of sweet-potato water-soluble glycoprotein [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2009. (in Chinese)

- 9 王斌,王开良,童杰洁,等.我国油茶产业现状及发展对策[J].林业科技开发,2011,25(2):11~15.
- 10 龙正海,王道平.油茶籽油与橄榄油化学成分研究[J].中国粮油学报,2008,23(2):121~123.
Long Zhenghai, Wang Daoping. Chemical constituents of olive oil and from *Camellia oleifera* seed oil [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2008, 23(2): 121~123. (in Chinese)
- 11 罗晓岚,朱文鑫.油茶籽油加工和油茶资源综合利用[J].中国油脂,2010,35(9):13~17.
Luo Xiaolan, Zhu Wenxin. Processing technology of oil-tea *Camellia* seed oil and comprehensive utilization of *Camellia oleifera* resources[J]. China Oils and Fats, 2010, 35(9):13~17. (in Chinese)
- 12 林翔云.油茶的深度开发利用[J].粮油食品科技,2010,18(3):24~28.
Lin Xiangyun. Development and utilization of *Camellia oleifera* [J]. Science and Technology of Cereals Oils and Foods, 2010, 18(3):24~28. (in Chinese)
- 13 陈钧辉.生物化学实验[M].北京:科学出版社,2008.
- 14 张帷杰.糖复合物生化研究技术[M].杭州:浙江大学出版社,2006.
- 15 Zhao J, Liu T, Ma L, et al. Antioxidant and preventive effects of extract from *nymphaea candida* flower on in vitro immunological liver injury of rat primary hepatocyte cultures[J]. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2009, 6(1): 1~8.
- 16 Baltrušaitytė V, Venskutonis P R, Čeksterytė V. Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts[J]. Food Chemistry, 2007, 101(2): 502~514.
- 17 Wang A N, Yi X W, Yu H F, et al. Free radical scavenging activity of *Lactobacillus fermentum* in vitro and its antioxidative effect on growing-finishing pigs[J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 107(4): 1 140~1 148.
- 18 Li Yanhong, Jiang Bo, Zhang Tao, et al. Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH) [J]. Food Chemistry, 2008, 106(2): 444~450.
- 19 Chua M T, Tung Y T, Chang S T. Antioxidant activities of ethanolic extracts from the twigs of *Cinnamomum osmophloeum* [J]. Bioresource Technology, 2008, 99(6): 1 918~1 925.
- 20 Kaur G, Jabbar Z, Athar M, et al. *Punica granatum* (pomegranate) flower extract possesses potent antioxidant activity and abrogates Fe-NTA induced hepatotoxicity in mice[J]. Food and Chemical Toxicology, 2006, 44(7): 984~993.
- 21 Smirnoff N, Cumbes Q J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes[J]. Phytochemistry, 1989, 28(4): 1 057~1 060.
- 22 Yang Y, Liu W S, Han B Q, et al. Antioxidative properties of a newly synthesized 2-glucosamine-thiazolidine-4(R)-carboxylic acid (GlcNH₂Cys) in mice[J]. Nutrition Research, 2006, 26(7): 369~377.
- 23 Medina-Navarro R, Durán-Reyes G, Díaz-Flores M. Protein antioxidant response to the stress and the relationship between molecular structure and antioxidant function [J]. PLOS One, 2010, 5(1): 1~10.
- 24 Lee S J, Oh P S, Ko J H, et al. Glycoprotein isolated from *Gardenia jasminoides* Ellis has a scavenging activity against oxygen radicals and inhibits the oxygen radical-induced protein kinase C alpha and nuclear factor-kappa B in NIH/3T3 cells [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2006, 21(1): 8~21.
- 25 段玉峰,李淼,王应强,等.丹参糖蛋白提取物抗氧化实验研究[J].食品工业科技,2009,30(1):139~141.
Duan Yufeng, Li Miao, Wang Yingqiang, Study on antioxidant of glycoprotein extraction (CSGP) of *Salvia miltiorrhiza* Bunge [J]. Science and Technology of Food Industry, 2009, 30(1): 139~141. (in Chinese)

(上接第147页)

- 14 李先锋,朱伟兴,纪滨,等.基于特征优化和LS-SVM的棉田杂草识别[J].农业机械学报,2010,41(11):168~172.
Li Xianfeng, Zhu Weixing, Ji Bin, et al. Weed identification based on features optimization and LS-SVM in the cotton field [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2010, 41(11): 168~172. (in Chinese)
- 15 祁朋祥.基于生物电阻抗的人体成分测试与研究[D].合肥:中国科学与技术大学,2009.
Qi Pengxiang. Testing and research of body composition-based on bioelectrical impedance[D]. Hefei: University of Science and Technology of China, 2009. (in Chinese)
- 16 张宽地,王光谦,吕宏兴,等.基于改进粒子群算法求解马蹄形断面正常水深[J].排灌机械工程学报,2011,29(1): 54~60.
Zhang Kuandi, Wang Guangqian, Lü Hongxing, et al. Applying particle swarm optimization algorithm on normal depth calculation of horse shoe section tunnel[J]. Journal of Drainage and Irrigation Machinery Engineering, 2011, 29(1): 54~60. (in Chinese)