

蒙古绵羊脾脏多肽的酶法制备及体外抗氧化性能

德力格尔桑¹ 韩杰² 玛丽娜² 乌兰塔娜³

(1. 内蒙古农业大学 食品科学与工程学院, 呼和浩特 010018;

2. 内蒙古农业大学 生物工程学院, 呼和浩特 010018; 3. 北京纳贝斯克食品有限公司, 北京 100053)

摘要 探索蒙古绵羊脾蛋白的最佳酶解条件, 确定最具抗氧化活性的脾肽及其分子质量。将不同饱和度硫酸铵沉淀制得的脾蛋白分别经胰蛋白酶、木瓜蛋白酶及二者混合物(质量比 1:1, 下称酶混合物)水解制得脾肽, 经 G-25 柱层析分离后, 电泳确定脾肽分子质量。分别在非脂质的 DPPH 和 ·OH 体系, 及脂质的卵磷脂和猪油体系中对制得的脾肽进行体外抗氧化活性试验, 结果表明: 60 °C, pH 7.0, 酶混合物添加量 5.0% (质量分数), 5.5 h 为最佳酶解条件。饱和度为 60% 的硫酸铵沉淀制得的脾蛋白电泳条带最多, 此脾蛋白经酶混合物水解后, 柱层析分离得到 F₁、F₂、F₃、F₄ 4 个峰区, 其中 F₃ (分子质量 6 ku) 的脾肽在非脂质体系中清除 ·OH 的作用显著 ($P < 0.01$), 且随剂量的增加对非脂质体系中 DPPH 的清除能力增强。在脂质的卵磷脂体系中小分子质量脾肽在浓度较低时对 TBARS 仍有显著抑制作用 ($P < 0.05$), 但随着浓度的增大, 层析后不同脾肽对其抑制作用不尽相同。在猪油体系中, 小分子质量脾肽均表现出一定的抗氧化活性 ($P < 0.05$), 且随着浓度的增加抗氧化活性不断增强。脾肽的抗氧化性具有广谱性。

关键词 脾脏蛋白; 酶水解; 脾脏多肽; 体外抗氧化

中图分类号 S 826; TS 251.1

文章编号 1007-4333(2006)06-0060-07

文献标识码 A

Preparation of spleen polypeptides of mongolian sheep through enzymatic hydrolyzation and its antioxidant ability in vitro

Deligeersang¹, Han Jie², Malina², Wulantana³

(1. Food science and Engineering College of Inner Mongolia Agriculture University, Huhhot 010018, China; 2. Biology Engineering College of Inner Mongolia Agriculture University, Huhhot 010018, China; 3. Beijing Nabisco Foods Limited, Beijing 100053, China)

Abstract The purpose of the study was to explore the best condition under which the Mongolian Sheep spleen polypeptides were produced through enzymatic hydrolysis and to identify its antioxidant characteristics as well as its corresponding molecular weight. Spleen protein samples, precipitated by ammonium sulfate at different unsaturated levels, were hydrolyzed with trypsin, papain, and a mixture of both (in the ratio of 1 to 1), respectively. The yielded polypeptides solutions were fractionated with G-25 column chromatography and analyzed with electrophoresis to identify its molecular weight. The inhibitory effect of the polypeptides on auto-oxidation was tested in vitro with 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and ·OH in non-liposome system and with phosphatidylcholine in liposome system and swine lard system. The results showed that the optimal condition for the hydrolysis developed five and half hours after the 5.0% dosage of the enzyme mixture was added at a temperature of 60 °C and a pH value of 7.0 (mass fraction, ration of trypsin to papain in the mixture is 1 to 1). We also found that spleen protein precipitated with 60% unsaturated ammonium sulfate displayed more stripes of fractions than those precipitated at other levels. This spleen protein was hydrolyzed in a mixture of trypsin and papain and fractionated. Four peaks of fractions, F₁, F₂, F₃, and F₄, were detected. Among them F₃ (molecular weight of 6 ku) inhibited the development of ·OH significantly ($P < 0.01$) in the nonliposome system and DPPH· scavenging capability grew stronger as the dosage increased. In the phosphatidylcholine liposome system, small molecular weight spleen polypeptides at low concentration still had significant inhibitory effect on TBARS, but with the increase of concentration, the inhibitory effect of different spleen polypeptides was not the same. In the lard system, small molecular weight spleen polypeptides all showed certain antioxidant activity ($P < 0.05$), and with the increase of concentration, the antioxidant activity increased continuously. Spleen polypeptides had broad spectrum antioxidant activity.

收稿日期: 2006-04-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30470440)

作者简介: 德力格尔桑, 教授, 主要从事畜产品加工原理与技术研究, E-mail: dl.g.sang@yahoo.com.cn

some system, the low-molecular weight spleen polypeptides in a small dosage could inhibit the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) effectively ($P < 0.05$). But as the dosage increased, fractionated spleen polypeptides had different effects on inhibiting TBARS in the liposome system. In the swine lard system, the small molecular weight demonstrated antioxidative activity ($P < 0.05$) and the antioxidative activity strengthened as the dosage increased. The anti-oxidative property of spleen polypeptides can be generalized on a bigger scale.

Key words spleen protein; enzymatic hydrolysis; spleen polypeptides; antioxidation in vitro

据农业部畜牧兽医局统计,2004年我国牛羊猪饲养量已达到87060万头(只),可获得脾脏44万t,这个数字相当于内蒙古2003年的羊肉产量。我国大多数居民没有食用动物脾脏的习惯,脾脏被大量遗弃,造成资源的极大浪费。动物脾脏含有的多种生物活性成分,对于医学、药理学、食品科学和化妆品的开发均有重要价值。我国中医学常将动物脾脏作为药方的成分治疗某些疾病。国内外已有关于分离提纯脾脏有效成分用于疾病治疗的报道: Borghard等从猪脾脏中提取脾肽,用于患者头部和颈部肿瘤的支撑性治疗^[1];苏秀兰等从羊脾脏中提取的体内诱导的抑癌因子^[2],对人胃癌细胞及乳腺癌细胞的增殖具有明显抑制作用。脾脏作为机体免疫器官,可能存在多种功能因子,一些具有特殊功能的物质尚有待于开发。包斌等^[3]采用超滤法分别得到分子质量超过100和3ku的脾蛋白提取液,并证实其在卵黄和亚油酸模拟体系中具有抗氧化性。此前从动物脾脏中提取抗氧化因子的相关研究未见报道。酶法可较超滤分离法缩短提取时间,且提取纯度高,广谱性、抗氧化性强,故本研究采用酶法,旨在探索蒙古绵羊脾蛋白的最佳酶解条件,分离最具抗氧化活性的脾肽,并确定其相对分子质量,分析该脾肽在体外非脂质和脂质模拟体系中的抗氧化特性和影响因素,拟为绵羊脾脏多肽的工业化制备提供理论依据。

1 试验材料与方法

1.1 酶法试验

1.1.1 材料、试剂与主要仪器设备

1)材料。蒙古绵羊脾脏(采集于呼和浩特市屠宰加工现场), -80°C 条件下冷冻备用。

2)主要试剂。胰蛋白酶(5000 U/mg)、G25葡聚糖凝胶、木瓜蛋白酶(15~30 U/mg)、二苯代苦味酰基自由基(DPPH)、十二烷基磺酸钠、脲、过硫酸铵、丙烯酰胺、N,N-甲叉双丙烯酰胺、三(羟甲基)甲基甘氨酸(Tricine),购自Sigma公司;四甲基乙二

胺(TEMED)、低分子质量蛋白标准品、胰岛素,购自上海西宝生物科技有限公司。

3)主要仪器与设备。721型分光光度计、G25葡萄糖凝胶柱、层析系统(LKB2023)、冻干机(KARL. KOLB型)、低温高速离心机(SCR20BC型)、Bio-Rad小型垂直式电泳附件模具和日立835-50型氨基酸自动分析仪。

1.1.2 方法

1)羊脾脏蛋白的制备。取定量绵羊脾脏,去掉外表脂肪、表皮及皮下筋膜,加入10倍与绵羊脾脏体积比为1:1的蒸馏水,手动匀浆,按照 $V(\text{乙醚})/V(\text{匀浆})=4:1$ 加入乙醚,在常温下密封抽提2h脱脂,分离得到脱脂脾脏匀浆,回收乙醚。将脱脂脾脏匀浆以4000 r/min离心20min,取上清液。用不同饱和度(25%、40%、60%、80%、95%)的硫酸铵溶液沉淀蛋白,室温静置15min,离心,透析,SDS-PAGE检查沉淀情况。

2)脾肽的酶法制备。将所有脾脏蛋白调制成67 mg/mL溶液,pH7.0,水浴温度 55°C ,加酶量5%(质量分数,分别为胰蛋白酶、木瓜蛋白酶和质量比1:1的二者混合物(下称酶混合物)),保温搅拌,不断加入NaOH溶液(1 mol/L),使pH稳定。5.5h后,沸水浴加热10min,终止水解反应。4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,以4000 r/min离心酶解液15min,取上清液,纱布过滤。

3)脾肽的分离纯化与鉴定。采用Tricine-SDS-PAGE方法测定酶解液多肽分子质量^[4],选用Sephadex G25型凝胶分离脾脏多肽并电泳鉴定,将分离得到的样品冷冻干燥。

1.2 体外抗氧化试验

1.2.1 材料 试验材料包括:羊脾脏多肽冻干粉、铁氰化钾、三氯化铁、三氯乙酸(TCA)、已二胺四乙酸(EDTA)、2-脱氧核糖(DR)(购自Fluka)、硫代巴比妥酸(TBA)、DPPH、二丁基羟基甲苯(BHT)、猪油、淀粉、柠檬酸、抗坏血酸(VC)和蛋黄卵磷脂(北京双旋制品)、1,1,3,3-四乙氧基丙烷(TEP)(购自

Sigma 公司)。

1.2.2 方法

1)脾肽清除·OH 效果测定。按照 Halliwell^[5]的方法进行。每个试样做 3 个平行,取平均值。

2)脾肽清除 DPPH·能力测定。DPPH·在乙醇中呈紫色,于 517 nm 处有强吸收,加入抗氧化剂后,其褪色程度可反映抗氧化剂对自由基的清除能力。将 DPPH·用无水乙醇配成 6.5×10^{-4} mol/L 的溶液,冰箱存放,用时稀释为 6.5×10^{-5} mol/L。将 2 mL DPPH·有机溶液加入到 2 mL 提取液中,30 min 后在 517 nm 处测定吸光度,每个试样做 3 个平行,取平均值。

3)卵磷脂体系脾蛋白及脾肽的抗氧化效果。

a. 卵磷脂脂质体的制备^[6]。将 5 mL 甲醇加入 4 mL 含有卵磷脂的氯仿溶液(5 mg/mL)中,在旋转蒸发器上(50 r/min,水浴 45℃)用油泵抽真空,旋转蒸发 30 min 除去溶剂,得到均匀分散的卵磷脂薄膜,加入 4 mL 磷酸缓冲液,卵磷脂薄膜缓慢溶解,摇匀,得白色乳状脂质体溶液。

b. TBA 测定。反应混合物(终反应体积 1.0 mL)含 3.5 mg 卵磷脂脂质体、 1000×10^{-6} VC 及 FeCl₃。分别加入脾肽或去离子水,37℃ 反应 30 min 后,加入 20 μL 质量分数 2% 的 BHT 后终止反应,防止后加热过程造成的脂类氧化。1 mL 反应体系加入 2 mL TBA 贮备液,沸水浴 95~100℃,发色 15 min,冷却 10 min,5 500 r/min 离心 20 min,取上清液在 532 nm 比色,定量。

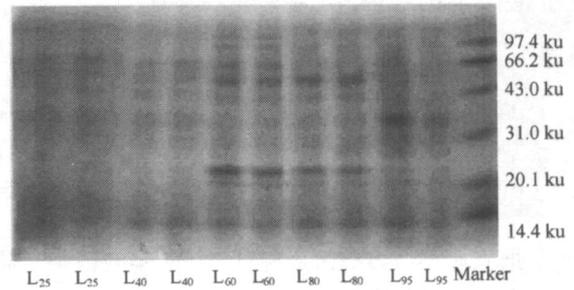
4)猪油体系脾肽的抗氧化效果。分别取 100、200 μL 的脾肽溶液(67 mg/mL),加入 5 g 自制猪油,搅拌均匀,(70 ±1)℃ 恒温水浴,测定前于紫外灯下照射 40 min,测定猪油过氧化值(POV),同时取 5 g 自制猪油做对照。每个试样做 3 个平行,取平均值。

2 试验结果

2.1 酶法试验

2.1.1 不同硫酸铵饱和度下脾脏蛋白的电泳结果

采用 15%(质量分数,下同)的分离胶进行电泳时,随着硫酸铵饱和度的增加,脾脏蛋白中小分子质量蛋白增多,60%饱和度硫酸铵沉淀的脾脏蛋白电泳条带最多,分子质量大多低于 100 ku(图 1)。



L_x 为不同硫酸铵饱和度下的绵羊脾脏蛋白,下标为硫酸铵饱和度,下同;Marker 为标准低分子质量蛋白

图 1 不同 (NH₄)₂SO₄ 饱和度下绵羊脾脏蛋白电泳图

Fig. 1 Electrophoretogram of spleen protein precipitated in solutions of (NH₄)₂SO₄ at different concentration levels

2.1.2 不同硫酸铵饱和度下脾脏蛋白酶解后的电泳图谱分析 不同 (NH₄)₂SO₄ 饱和度下沉淀的脾脏蛋白,酶解后利用 15%分离胶进行电泳,大分子质量蛋白基本没有明显谱带,酶解后的脾肽分子质量多集中在 14.4 ku 以下(图 2)。

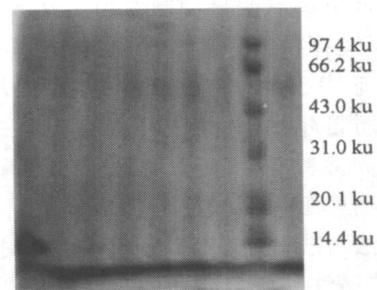


图 2 不同 (NH₄)₂SO₄ 饱和度下绵羊脾脏蛋白酶解后的电泳图谱

Fig. 2 Electrophoretogram of spleen protein hydrolysates precipitated in solutions of (NH₄)₂SO₄ at different levels of concentrations

2.1.3 脾蛋白酶解液的 DPPH 测试 在理论最适条件(55℃,pH7.0,5.5 h,下同)下,利用酶混合物进行酶解,加酶量 5%(质量分数,下同)。经 SAS 软件分析,分离沉淀后的不同分子质量脾肽(将脾肽冻干成粉,配成 67 mg/mL 的溶液)的 DPPH·吸光值均明显低于对照组($P < 0.05$),且 L₆₀酶解液明显低于其他酶解液($P < 0.01$)。由表 1 可以看出,所有脾蛋白酶解液对 DPPH·均有一定清除作用,L₆₀酶解液清除效果最好。

表 1 绵羊脾脏蛋白酶解液 DPPH 清除率测试结果

Table 1 DPPH · of hydrolysate solution of spleen protein ($n=3, X \pm s$)

试样名称	添加量/ μL	吸光值	DPPH 清除率/ %
对照		0.294 \pm 0.005	
L ₂₅ 酶解液	300	0.251 \pm 0.003 *	14.740 \pm 0.008
L ₄₀ 酶解液	300	0.221 \pm 0.001 *	24.717 \pm 0.002
L ₆₀ 酶解液	300	0.157 \pm 0.003 **	46.480 \pm 0.007
L ₈₀ 酶解液	300	0.250 \pm 0.001 *	15.080 \pm 0.004
L ₉₅ 酶解液	300	0.257 \pm 0.001 *	12.473 \pm 0.005

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; $n=3$, 测试结果为测试值 \pm 标准差 ($X \pm s$); 下表同。

表 2 不同酶解绵羊脾脏蛋白 L₆₀后的 DPPH 值Table 2 DPPH · values of various enzymatic hydrolysates precipitated in 60% (NH₄)₂SO₄ solutions ($n=3, X \pm s$)

试 样	添加量/ μL	吸光值	DPPH 清除率/ %	水解度/ %
对照		0.253 \pm 0.014		
木瓜蛋白酶酶解液	450	0.080 \pm 0.005	68.83 \pm 0.020 b	42.34 \pm 0.005 b
胰蛋白酶酶解液	450	0.085 \pm 0.004	67.87 \pm 0.008 b	34.86 \pm 0.002 b
胰蛋白酶 + 木瓜蛋白酶酶解液	450	0.071 \pm 0.002	72.47 \pm 0.008 a	51.76 \pm 0.003 a

注: 将 L₆₀ 不同酶解液冻干成粉配成 67 mg/mL 的溶液; 同列不同字母表示数据间差异显著 ($P < 0.05$), 下表同。

表 3 不同酶水解时间对 DPPH 清除率及水解度的影响

Table 3 Effects of reaction time on DPPH · and extent of hydrolysis

试验号	因 素				衡 量 指 标			
	水解时间/h	温度/	pH	加酶量/ %	w(总氮)/ %	w(游离氮)/ %	水解度/ %	DPPH 清除率/ %
1	4.5	55	7.0	5	1.134 1	0.386 3	34.04 b	18.383 b
2	5.5	55	7.0	5	1.082 3	0.562 7	51.76 a	25.510 a
3	6.5	55	7.0	5	1.178 9	0.423 8	35.78 b	19.741 b

3) 确定最佳酶解条件。温度、pH、加酶量都可能影响酶解效果, 所以采用三因素三水平试验设计(表 4)。经 SAS 软件分析可知, A、B、C、A \times B、A \times C、B \times C、A \times B \times C 之间的水解度差异均显著。A、B、C 不同水平组合下, 以 A3B2C2 组合水解度均值最高。B、C、A \times B、A \times C、A \times B \times C 之间的 DPPH 清除率差异均显著。A3B2C2 组合 DPPH 清除率占所有组合的第 7 位, 将其与前 6 组合 A1B3C2、A2B1C2、A2B2C3、A3B1C3、A3B2C3、A3B3C1 进行 SAS 软件分析, 由结果可知, 此 7 组合的差异均不显著; 因此, 综合水解度可确定 A3B2C2 为最佳酶解条件, 即温度 60 $^{\circ}\text{C}$, pH7.0, 加酶量 5.0%。对水解度

2.1.4 酶解条件的筛选

1) 确定最佳水解酶。理论最适条件 (55 $^{\circ}\text{C}$, pH7.0, 5.5 h) 下, L₆₀ 中分别加入胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、酶混合物对脾蛋白进行水解, 可以看出, 酶混合物水解度明显高于单一酶 ($P < 0.05$), DPPH 清除率也大于单一酶 ($P < 0.05$) (表 2)。

2) 确定最佳酶解时间。加酶量 5%, 55 $^{\circ}\text{C}$, pH7.0 时, 首先根据 DPPH 清除率和水解度确定最佳酶解时间(表 3)。SAS 软件分析结果表明, 加酶量、温度、pH 不变时, 水解时间 5.5 h 时水解度和 DPPH 清除率均大于其他组 ($P < 0.05$), 据此将最佳水解时间定为 5.5 h。

进行逐步回归分析: 第 1 步引入温度, 差异极显著 ($P < 0.01$); 第 2 步引入 pH, 差异显著 ($P < 0.05$); 最后引入加酶量, 差异不显著。从此结果可知, 温度

表 4 蛋白酶水解度影响因子与试验水平

Table 4 Factors and Levels

影响因子	试验水平		
	1	2	3
A 温度/ $^{\circ}\text{C}$	50	55	60
B pH	6.5	7.0	7.5
C 加酶量/ %	4.5	5.0	5.5

是影响蛋白水解度的主要因子,其次为 pH,加酶量对水解度影响不明显。

2.1.5 脾肽的分离纯化与鉴定

1)脾肽的分离纯化。在最佳酶解条件下获得 L₆₀酶解液,用 G25 柱层析对酶解液进行分离纯化, $\lambda = 280 \text{ nm}$,结果见图 3。可以看出,L₆₀酶解液经柱层析分离得到 4 个峰,收集其样品,冻干机中冻干。

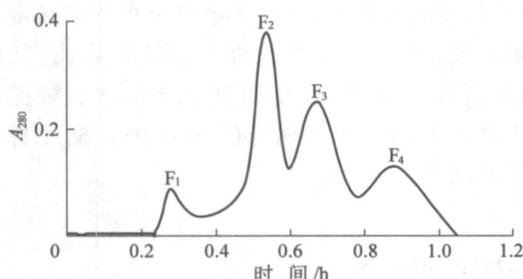
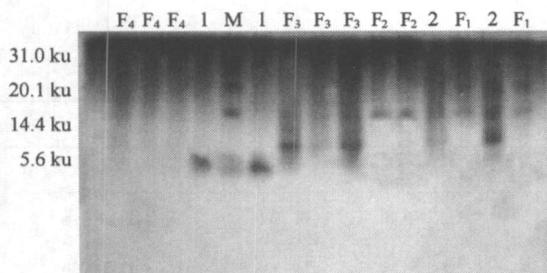


图 3 最佳酶解液 L₆₀的层析图谱

Fig. 3 Column chromatography of the optimal enzymatic hydrolysis solution.

2) L₆₀酶解液与 4 个峰冻干物质的 Tricine-SDS-PAGE 电泳结果。从图 4 可以看出,F₄没有明显谱带,可能是样品量不足造成的。根据已知标准物的分子质量和相对迁移率可知,F₃分子质量大致为 6 ku。



1 为胰岛素;M 为标准分子质量蛋白;2 为 L₆₀酶解液

图 4 酶解液与 4 个峰冻干物质的电泳图谱

Fig. 4 Electropherogram of lyophilised substance related to the four peaks of the enzymatic hydrolysis solution

3) F₁、F₂、F₃、F₄ 抗氧化活性的确定。在脾肽溶液质量浓度相同(0.05 g/mL)的条件下,F₁和 F₂对 DPPH 有微弱的清除作用(表 5),F₃的 DPPH 清除率与 F₁、F₂和 F₄ 差异均显著($P < 0.01$),而且 F₃的产率较高,为白色絮状物。F₄ 虽然也有相对较高的 DPPH 清除率,但产率较低。

2.2 体外抗氧化试验

2.2.1 不同浓度脾蛋白和脾肽(F₃)对 ·OH 的清除作用 2-脱氧核糖溶液在 ·OH 作用下可发生明显降解^[7],降解产物与 TBA 起显色反应,在 $\lambda = 532$

nm 处有显著光吸收。脾脏蛋白和脾肽 F₃ 在试验添加量(10~200 μL)范围内对 ·OH 均有清除作用(表 6),且随添加量的增加清除作用增强。根据 SAS 软件分析,脾肽 F₃ 比脾脏蛋白的清除作用显著($P < 0.01$),说明抑制羟自由基的成分应是分子质量较小的肽。

表 5 F₁、F₂、F₃、F₄ 对 DPPH 的清除作用

Table 5 Scavenging rate of DPPH · by F₁, F₂, F₃ and F₄ respectively ($n = 3$, $X \pm s$)

试样名称	添加量/ μL	吸光值	DPPH 清除率/ %
对照		0.288 \pm 0.003	
F ₁	200	0.274 \pm 0.005	4.979 \pm 0.017 *
F ₂	200	0.271 \pm 0.012	5.902 \pm 0.043 *
F ₃	200	0.237 \pm 0.005	18.173 \pm 0.016 **
F ₄	200	0.259 \pm 0.007	10.116 \pm 0.027 **

注:4 峰值样品冻干粉质量浓度 0.05 g/mL。

表 6 不同添加量脾蛋白和脾肽(F₃)对 ·OH 的清除作用

Table 6 Scavenging rate of ·OH by the solution of spleen protein and polypeptides (F₃) at different levels of concentrations ($n = 3$, $X \pm s$)

试样名称	添加量/ μL	吸光值	·OH 清除率/ %
空白		0.049 0 \pm 0.002 9	
对照		1.888 5 \pm 0.007 5	
脾肽(F ₃)	10	0.667 5 \pm 0.004 5	67.25 \pm 0.002 **
	50	0.564 5 \pm 0.037 5	72.70 \pm 0.019 **
	100	0.525 0 \pm 0.039 0	74.79 \pm 0.020 **
	200	0.468 0 \pm 0.031 0	78.20 \pm 0.016 **
未酶解的脾蛋白(L ₆₀)	10	1.557 5 \pm 0.059 0	20.12 \pm 0.031 *
	50	1.529 0 \pm 0.020 0	21.89 \pm 0.010 *
	100	1.410 0 \pm 0.010 0	27.93 \pm 0.005 *
	200	1.131 0 \pm 0.025 0	42.71 \pm 0.013 *

注: = 67 mg/mL;空白无 2-脱氧核糖,对照有 2-脱氧核糖。

2.2.2 脾肽(F₃)清除 DPPH 能力的测定 根据表 7 结果,随着脾肽添加量的增加(起始质量浓度 0.1 g/mL),其 DPPH 清除率增加,且清除率与对照相比差异均显著($P < 0.01$)。

2.2.3 食品模拟体系下脾肽的抗氧化效果

1)卵磷脂体系中脾肽的抗氧化效果。从表 8 可以看出,F₂、F₃的添加量为 300 μL 时,对 TBARS 基

表 7 不同添加量脾肽(F₃)对 DPPH 的清除作用

Table 7 DPPH · values of spleen polypeptides at different levels of concentrations (n = 3, X ± s)

试样名称	添加量/μL	吸光值	DPPH 清除率/ %
对照		0.252 ± 0.008	
脾肽	100	0.158 ± 0.002	37.17 ± 0.011 * *
脾肽	150	0.097 ± 0.019	61.51 ± 0.039 * *
脾肽	200	0.071 ± 0.009	71.96 ± 0.036 * *

基本上没有抑制作用,但添加量为 100 μL 时,对 TBARS 的抑制作用显著。F₄ 的添加量为 100、300 μL 时,对 TBARS 均有显著抑制作用,且随着添加量的增大,脾肽抑制脂质体中 TBARS 形成的作用也增强。可见相同体系下,不同添加量的同种抗氧化剂的活性不尽相同。

表 8 F₂、F₃、F₄ 与 VC 的 TBA 测试结果Table 8 TBA values of F₂, F₃, F₄ and VC

样品	添加量/μL	吸光值	TBARS 值	抑制率/ %
对照		0.333	0.156 28	
F ₂	100	0.267	0.125 30	19.82 d
	300	0.319	0.149 71	4.20
F ₃	100	0.262	0.122 96	21.32 c
	300	0.341	0.160 03	
F ₄	100	0.237	0.111 22	28.83 b
	300	0.228	0.107 00	31.53 a
VC	300	0.352	0.165 19	

2) 猪油体系中脾肽的抗氧化效果。由表 9 可以看出,在猪油体系中, F₂ 在添加量 100、200 μL 时均没有很强的抗氧化活性,而 F₃、F₄ 在添加量 100、

表 9 猪油体系脾肽的 POV 值

Table 9 POV value of spleen polypeptides in the system of swine lard

样品	添加量/μL	POV 值/ %				
		1 d	3 d	4 d	5 d	7 d
对照		6.44	7.21	8.24	9.28	12.60
F ₂	100	5.76	6.44	6.94	9.12	12.64
	200	5.80	6.80	7.52	8.44	10.80
F ₃	100	4.48	4.92	5.32	6.24	9.20 a
	200	4.72	4.84	5.04	5.36	6.52 b
F ₄	100	4.40	4.84	5.16	5.28	6.08 c
	200	3.20	3.84	4.64	5.32	5.96 d

200 μL 时均表现出一定的抗氧化活性,且随着浓度增加,其抗氧化活性增强 (P < 0.05)。

3 讨论

随着硫酸铵溶液饱和度的增大小分子质量脾蛋白电泳谱带增多,饱和度 60% 的脾蛋白 L₆₀ 电泳谱带最多(图 1),可能是该饱和度下溶液离子强度最适于各种脾蛋白凝聚沉淀的缘故。此时的谱带分布在 20.1 ~ 97.4 ku。此区间的大分子质量脾蛋白基本没有呈现谱带,其谱带集中分布于 14.4 ku 以下区域(图 2),说明经酶处理后大分子质量脾蛋白被水解成小分子质量的脾肽。

酶水解后的脾蛋白硫酸铵溶液 DPPH · 吸光值 F 检验结果表明, L₆₀ 酶解溶液对 DPPH · 的清除率较高,与其他硫酸铵饱和度溶液相比差异极显著 (P < 0.01),这个结果证实了分子质量小于 14.4 ku 的脾肽的抗氧化活性,表明研究 L₆₀ 溶液是极具意义的。

最佳酶解条件试验结果表明,相同酶添加量条件下,胰蛋白酶和木瓜蛋白酶混合物(质量比 1:1)对脾蛋白的水解度和 DPPH · 清除率都显著高于单一酶 (P < 0.05)。这可以解释为单一酶总是选择切割脾蛋白肽链的特定部位,其切割点数量少,而酶混合物可实现多点切割;因此在相同条件下后者得到的脾肽数远远高于前者,清除 DPPH · 的能力和水解能力也自然高于前者。影响酶水解的因素中,温度的影响显著大于 pH 和酶添加量 (P < 0.01)。这是由于硫酸铵溶液是酸性溶液,而木瓜蛋白酶和胰蛋白酶是酸性酶,对 pH 的变化呈现一定的“惰性”。

最佳酶水解条件下对 L₆₀ 酶解液进行柱层析分离,得到峰区 F₁、F₂、F₃、F₄ (图 3),这 4 个峰区洗脱得到的冻干物质电泳分析结果(图 4)表明,5.6 ku 上方有 1 条明显的 F₃ 分布谱带,该谱带的分子质量确定为 6 ku。F₃、F₄ 对 DPPH · 的清除作用呈极显著水平 (P < 0.01) (表 5),且 F₃ 对羟基自由基的清除作用极显著 (P < 0.01) (表 6),说明抑制羟基自由基成分的应该是分子质量较小 (6 ku) 的肽。在清除 DPPH · 方面, F₃ 脾肽随着添加量的增加表现出显著的清除能力 (P < 0.01) (表 7)。

抗氧化试验结果表明,猪油体系中 F₂ 脾肽添加量由 100 μL 增加到 200 μL 时无明显抗氧化活性,而 F₃、F₄ 随添加量的增加表现出明显的抗氧化活性 (P < 0.05) (表 9)。卵磷脂体系中当 F₂ 和 F₃ 脾肽

添加量为 300 μL 时对 TBARS 基本没有抑制作用,但添加量为 100 μL 时对 TBARS 抑制作用显著 ($P < 0.05$);而 F_4 在添加量为 100 和 300 μL 时均有显著抑制作用 ($P < 0.05$),且随着添加量的增加 TBARS 降低。出现这种不规律变化的原因在于卵磷脂体系较羟基和 DPPH 溶液体系复杂,除含有磷脂外,还含有油酸、亚油酸、亚麻酸及花生四烯酸等多种不饱和脂肪酸,双键的位置、数量、氧化途径差异很大。此现象其他文献也有报道^[8]。文献[3]报道分子质量 3~100 ku 的脾脏提取液在亚油酸体系和卵磷脂蛋白体系中均有明显抗氧化性,本研究中最具抗氧化活性的 F_3 脾肽的分子质量为 6 ku,位于上述范围之内,这说明文献[3]报道的脾脏提取液可能是 F_3 脾肽。以 F_3 为代表的小分子质量脾肽表现出的显著的抗氧化活性 ($P < 0.05$) 和抗氧化的广谱性,与脾脏的生理特性相关。脾脏是哺乳动物最大的外周淋巴器官,也是含铁量最高的脏器^[9]。在脾脏中铁以血红素铁的方式同蛋白(主要是胶原蛋白)结合,脾脏离体后,铁只能由 Fe^{2+} 向 Fe^{3+} 转变,此时会释放出大量电子,这些电子很容易同周围游离的各种自由基结合而被还原,失去氧化活性。这也许就是脾脏具有广谱性抗氧化作用的主要原因。

4 结 论

1) 最佳酶解条件为 60 $^{\circ}\text{C}$, pH7.0,胰蛋白酶和木瓜蛋白酶混合物(质量比 1:1)加酶量 5.0%(质量分数),酶解 5.5 h。

2) 非脂质的 DPPH 和羟基自由基体系中最具抗氧化活性的脾肽(F_3)分子质量为 6 ku。在脂质的卵磷脂体系中,添加量较低时小分子质量脾肽均对 TBARS 有显著抑制作用 ($P < 0.05$),但随着添加量的增大,层析后不同脾肽抑制脂质体中 TBARS 的作用也不尽相同。在猪油体系中,小分子质量脾肽

均表现出一定的抗氧化活性 ($P < 0.05$),且随着添加量的增加,抗氧化活性不断增强。

3) 脾肽的抗氧化作用具有广谱性。

参 考 文 献

- [1] Borghardt J, Rosien B, Gortelmeyer R, et al. Effects of a spleen peptide preparation as supportive therapy in inoperable head and neck cancer patients[J]. *Arzneimittel-Forschung*, 2000, 50(2): 178-184
- [2] 苏秀兰,王桂林,闫美荣,等. 体内诱导的抑癌因子对几种肿瘤细胞的临床辅助性疗效[J]. *世界名医论坛*, 1999(2): 66-67
- [3] 包斌,德力格尔桑,吴文惠. 羊脾脏提取液抗氧化作用的影响[J]. *食品科学*, 2003, 24(4): 47-50
- [4] 石继红,赵泳同,张英起,等. 应用 SDS-PAGE 显示小分子多肽技术的探讨[J]. *生物工程进展*, 2001, 21(1): 38-40
- [5] Halliwell B, Gutteridge J M C, Aruoma O I. The deoxyribose method: A simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals[J]. *Analytical Biochemistry*, 1987, 165(1): 215-219
- [6] Kohen R, Yamamoto Y, Cundy K C, et al. Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1988, 85(9): 3175-3179
- [7] 王爱国,罗广华. 羟自由基启动下的脱氧核糖降解及其产物的 TBA 反应[J]. *生物化学与生物物理进展*, 1993, 20(2): 150-152
- [8] 梁瑞云,陈秀妍. 甘草有效成分分离及抗氧化研究[J]. *广州食品工业科技*, 2001, 15(1): 27-31
- [9] Romans J R, Costello W J, Carlson W C, et al. *The Meat We Eat* [M]. 13th ed. Danville, IL: The Interstate Printers and Publishers, 1994