

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2020.04.030

藏绵羊胎盘肽的抗氧化能力及结构表征

Antioxidant capacity of placental peptide from tibetan sheep and its structural characterization

任海伟 石菊芬 王曼琪 范文广 李志忠

REN Hai-wei SHI Ju-fen WANG Man-qi FAN Wen-guang LI Zhi-zhong

(兰州理工大学生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730050)

(School of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou, Gansu 730050, China)

摘要:以藏绵羊胎盘肽为研究对象,采用自由基清除、金属离子螯合和还原能力等方法分析不同浓度羊胎盘肽的抗氧化能力,并结合分子质量分布、氨基酸组成和结构表征分析探讨羊胎盘肽的抗氧化能力成因。结果表明,藏绵羊胎盘肽的抗氧化能力与其质量浓度呈正相关,有较强DPPH自由基和羟基自由基清除能力, IC_{50} 值分别为2.83, 0.94 mg/mL,与BHT能力相当;还具有一定的超氧阴离子自由基清除能力、螯合 Fe^{2+} 能力和 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 还原能力。羊胎盘肽中相对分子质量 <1000 Da的寡肽含量接近90%,富含天冬氨酸、谷氨酸和甘氨酸等。酶解得到的羊胎盘肽仍保留源蛋白质特征官能团,微观形貌呈致密球状颗粒,蛋白质降解为肽的过程中分子发生重排和聚集, α 螺旋结构减少, β -折叠和无规卷曲增加。适宜的小分子寡肽含量和氨基酸组成、特殊的微观形貌和空间结构赋予藏绵羊胎盘肽良好的抗氧化能力。

关键词:藏绵羊;胎盘肽;分子质量分布;氨基酸组成;抗氧化能力;结构表征

Abstract: The free radical scavenging ability, metal ion chelation ability and reducing ability of different concentrations of placenta peptide from Tibetan sheep were determined, and the distribution of relative molecular weight, amino acid composition and structural characterization were also investigated to explain the causes of antioxidant capacity. The results showed that the antioxidant capacity of sheep placenta peptide was positively correlated with its concentration, and it had strong radical scavenging ability for

DPPH· and ·OH with IC_{50} of 2.83 mg/mL and 0.94 mg/mL, respectively, which were comparable to BHT. In addition, the placenta peptide from Tibetan sheep also had certain O_2^- · scavenging ability, metal ion chelating ability for Fe^{2+} and reduction ability for Fe^{3+} and Cu^{2+} . Moreover, the placenta peptide below 1 000 Da of molecular weight accounted for nearly 90% in total peptide, which contained an abundance of aspartic acid, glutamic acid, glycine and so on. Structural characterization results showed that the placenta peptide still remained the proper functional group structures of protein in sheep placental, the micromorphology of dense spherical granular happened, and the rearranged protein molecules aggregated during degradation of proteins to peptide. Based on the results of circular dichroism, the decreased content of α -helices, increased content of β -sheets and random curl were observed. In a word, the placental peptide from the Tibetan sheep have nice antioxidant capacity due to its appropriate content of oligopeptides and amino acids profile, special micromorphology properties and space structure.

Keywords: Tibetan sheep; placental peptide; molecular weight distribution; amino acid composition; antioxidant capacity; structural characterization

生物体的正常代谢和外部刺激(包括吸烟、空气污染物和工业化学品)都会导致体内产生大量的不稳定自由基,这些自由基易与体内生物大分子如蛋白质、不饱和脂肪酸和核酸等发生反应,引起氧化损伤细胞或组织,甚至导致基因突变^[1]。

人工合成的抗氧化剂(如BHA、BHT)抗氧化效果虽好,但对人体有潜在毒副作用,寻找天然安全的生物抗氧化剂已成为国内外研究的热点。抗氧化肽是一种具有抗氧化能力、生物安全性高的肽类物质,能抑制或阻止底物被氧化,是生物抗氧化剂的良好来源。动物源活性肽营养价值丰富,与人体营养结构吻合性好;进入人体后会选择性作用于相应器官,靶向效应好,更易于吸收;合理的

基金项目:陇原青年创新创业人才项目(编号:2019-39-GR28);中国博士后科学基金(编号:2019T120961, 2018M631217);国家大学生创新创业训练计划项目(编号:DC201710731210);甘肃省大学生创新创业训练计划项目(编号:DC2018140)

作者简介:任海伟,男,兰州理工大学副教授,博士。

通信作者:李志忠(1963—),男,兰州理工大学教授,硕士。

E-mail: zlz2004@lut.cn

收稿日期:2020-03-04

氨基酸组成使其抗氧化能力优于植物源肽^[2]。研究表明,山羊胎盘喂幼犬后能增强血清总抗氧化能力、血清谷胱甘肽过氧化物酶活性和超氧化物歧化酶活性^[3];山羊或小尾羊胎盘肽具有良好的 DPPH 自由基、超氧阴离子自由基、羟基自由基清除能力,抗氧化活性较好^[4]。张丙云等^[5]曾对复合酶法制备藏系绵羊胎盘肽的工艺条件进行了优化,但有关藏系绵羊胎盘肽的抗氧化能力研究还未见报道。

常见的体外抗氧化化学分析方法主要有脂质氧化降解、自由基清除和螯合金属离子等,根据作用机理可分为基于单电子转移(Fe^{3+} 和 Cu^{2+} 还原能力、DPPH 自由基和 ABTS 自由基清除能力)和氢原子转移(超氧阴离子自由基和羟基自由基清除能力、金属离子螯合能力)两种^[6]。试验拟以藏绵羊胎盘肽为研究对象,通过 6 种不同的体外化学评价体系探讨其抗氧化能力,利用傅里叶变换红外光谱(FTIR)、扫描电镜(SEM)、X-射线衍射(XRD)和圆二色光谱(CD)等方法表征其结构变化,并结合肽的氨基酸组成、相对分子质量分布剖析藏绵羊胎盘肽的抗氧化能力成因,为藏绵羊胎盘资源的高值化利用提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

藏绵羊胎盘:蛋白质含量 87.50%,兰州名德药业有限公司;

木瓜蛋白酶(酶活力 8×10^5 U/g)和中性蛋白酶(酶活力 6×10^4 U/g):北京索莱宝科技有限公司;

总抗氧化能力(T-AOC)测试盒、Cupric ion reducing antioxidant capacity(CUPRAC)试剂盒:南京建成生物工程研究所;

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、氯化硝基四氮唑蓝(NBT)、二丁基羟基甲苯(BHT)、1,10-邻二氮杂菲及菲洛嗪:美国 Sigma 公司;

牛血清白蛋白:上海伯奥生物科技有限公司;

其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

高剪切分散乳化机:FA25 型,上海弗卢克流体机械制造有限公司;

酶标仪:SpectraMax i3x 型,美谷分子仪器(上海)有限公司;

冷冻干燥机:SCIENTZ-18N 型,宁波新芝生物科技股份有限公司;

圆二色光谱仪:JASCO-200C 型,日本岛津公司;

扫描电子显微镜:JSM-5600LV 型,日本电子光学公司;

傅里叶变换红外光谱仪:Nexus 670 型,美国 Nicolet

公司;

高效液相色谱仪:Waters 1525 型,美国 Waters 公司。

1.3 方 法

1.3.1 羊胎盘肽粉的制备 取一定量洁净的羊胎盘原料剪碎,与蒸馏水以 1:5 (g/mL) 比例混匀配成匀浆液,经超声波预处理(功率 438 W,时间 16.5 min,温度 25.5 °C)后,以 8 000 U/g 加酶量加入复合蛋白酶(木瓜蛋白酶:中性蛋白酶=3:7),50 °C、pH 7.0 下水解 4.9 h,离心,浓缩,冷冻干燥,得羊胎盘肽粉(简称肽粉)^[7]。

1.3.2 多肽含量测定 准确称取 100 mg 肽粉配制成浓度为 10 mg/mL 的粗肽液,量取 2.5 mL 粗肽液,加入 2.5 mL 10%三氯乙酸溶液混匀静置 10 min,5 000 r/min 离心 10 min,取 1 mL 上清液置于 10 mL 比色管中,加入 4 mL 双缩脲试剂混匀,37 °C 恒温显色 30 min,测定 540 nm 处吸光度值,对照品标准曲线 $y = 0.054 8x - 0.019 9$ ($R^2 = 0.992$)。

1.3.3 相对分子质量分布分析 采用高效液相色谱仪测量相对分子质量分布,分析柱为 TSKgel 2000 SW_{XL} 300 mm×7.8 mm;流动相为乙腈/水/三氟乙酸(40/60/0.1,体积比),流速 0.5 mL/min,检测波长 220 nm^[7]。

1.3.4 氨基酸组成分析 精确称取 1.00 g 肽粉置于水解管中,加入 5%三氯乙酸溶液溶解并静置沉淀 2~3 h,双层滤纸过滤,取 1 mL 滤液离心,观察无沉淀或无明显分层后上机测定氨基酸组成^[7]。

1.3.5 抗氧化能力测定

(1) DPPH 自由基清除能力:参考 Xing 等^[8]的方法略作修改,将 2 mL 不同浓度肽液(2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 mg/mL)与 1 mL 蒸馏水、3 mL 含 0.1 mmol/L DPPH 的无水乙醇溶液混匀,25 °C 避光反应 30 min,4 000 r/min 离心 20 min,测定 517 nm 处的吸光度值;以无水乙醇代替 DPPH 溶液作样品对照,蒸馏水代替肽液作空白对照,BHT 作阳性对照,DPPH 自由基清除率按式(1)计算。

$$C = \left(1 - \frac{A_s - A_x}{A_c}\right) \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

c ——DPPH 自由基清除率,%;

A_s ——样品组吸光度值;

A_x ——样品对照组吸光度值;

A_c ——空白对照组吸光度值。

(2) 超氧阴离子自由基清除能力:参考 Najafian 等^[9]的方法略作修改,将 0.75 mL 氮蓝四唑(300 $\mu\text{mol/L}$)溶解于 3 mL Tris-HCl 缓冲液(100 mmol/L, pH 7.4)中,再加入 0.75 mL 还原型辅酶 I (936 $\mu\text{mol/L}$)、0.3 mL 不同浓度肽液(5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0 mg/mL)和 0.75 mL 吩嗪硫酸甲酯(120 $\mu\text{mol/L}$),室温反应 5 min,用 96 孔板测

定 560 nm 处吸光度值,以蒸馏水作空白对照,BHT 作阳性对照,超氧阴离子自由基清除率按式(2)计算。

$$d = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

d ——超氧阴离子自由基清除率,%;

A_0 ——样品组吸光度值;

A_1 ——空白对照组吸光度值。

(3) 羟基自由基清除能力:参考 Xing 等^[8]的方法略作修改,依次将 40 μL 2 mmol/L 硫酸亚铁溶液、40 μL 2 mmol/L 1,10-邻二氮杂菲溶液和 80 μL 不同浓度肽液(2.0,4.0,6.0,8.0,10.0 mg/mL)混合,加入 40 μL 0.03% 双氧水,37 $^\circ\text{C}$ 恒温反应 60 min,用 96 孔板测定 536 nm 处吸光度值,以无抗氧化剂为阴性对照,无双氧水为空白对照,BHT 作阳性对照,羟基自由基清除率按式(3)计算。

$$e = \frac{A_s - A_x}{A_b - A_n} \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

e ——羟基自由基清除率,%;

A_s ——样品组吸光度值;

A_b ——空白对照组吸光度值;

A_n ——阴性对照组吸光度值。

(4) 金属离子(Fe^{2+})螯合能力:参考 Zhang 等^[10]的方法略作修改,取 0.5 mL 不同浓度肽液(5.0,10.0,15.0,20.0,25.0 mg/mL)与 1.6 mL 蒸馏水和 0.05 mL 2 mmol/L 二氯化铁混匀,静置 30 s,加入 0.1 mL 5 mmol/L 菲洛嗪室温反应 10 min,测定 562 nm 处吸光度值。以等体积蒸馏水代替肽液作空白对照,BHT 作阳性对照,金属离子螯合率按式(4)计算。

$$f = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\%, \quad (4)$$

式中:

f ——金属离子螯合率,%;

A_0 ——空白对照组吸光度值;

A_1 ——样品组吸光度值。

(5) 铁离子(Fe^{3+})还原能力:参考 Wu 等^[11]的方法略作修改,取 1 mL 不同浓度肽液(5.0,10.0,15.0,20.0,25.0 mg/mL),依次加入 2.5 mL 0.2 mol/L 磷酸缓冲液(pH 6.6)和 2.5 mL 1% 铁氰化钾溶液,混匀,50 $^\circ\text{C}$ 水浴 20 min,迅速冷却并加入 2.5 mL 10% 三氯乙酸溶液,振荡混匀,3 000 r/min 离心 10 min。取上清液 1 mL,加入 0.2 mL 0.1% 三氯化铁溶液,混匀,加入 1 mL 去离子水摇匀,50 $^\circ\text{C}$ 恒温水浴 10 min,以蒸馏水调零并在 700 nm 下进行比色分析。以 BHT 作阳性对照,吸光度值越大说明抗氧化能力越强。

(6) 铜离子(Cu^{2+})还原能力:参照 CUPRAC 试剂盒

说明书进行测定。

1.3.6 结构表征分析

(1) 扫描电镜(SEM):分别称取适量羊胎盘原料、肽粉样品置于导电胶上,固定后喷金,采用电子束对样品进行微观形貌拍摄,探针电压 30 kV,电流 50 pA,电子束加速电压 5 kV。

(2) 傅里叶变换红外光谱(FTIR):将羊胎盘原料、肽粉样品与适量溴化钾混合置于玛瑙研钵中,研磨数分钟并用压片机压成透明小块;然后在分辨率 4 cm^{-1} 、扫描范围 4 000~400 cm^{-1} 条件下进行 FTIR 谱图采集。以溴化钾作空白背景,进行结果校正。

(3) X 射线衍射(XRD):将羊胎盘原料、肽粉样品置于显微镜载玻片上,然后滴加一定量无水乙醇制成样品试片,放入 X 射线衍射仪中。测试条件为扫描范围(2θ) 5 $^\circ$ ~80 $^\circ$,扫描速度 2 $^\circ$ /min,Cu-K α 射线为靶材,步长 0.02,电压 40 kV,电流 100 mA。

(4) 圆二色谱(CD):将羊胎盘原料、肽粉样品分别溶解于去离子水中,置 10 mm 光径样品池,扫描波长 300~190 nm,扫描速度 100 nm/min,响应时间 1 s。

1.3.7 数据处理 所有试验均进行 3 次重复,采用 SPSS 软件进行显著性差异分析,采用 Origin6.1 软件作图。

2 结果与分析

2.1 羊胎盘肽的相对分子量分布

由图 1 可知,羊胎盘肽的分子质量分布主要集中在 1 000 Da 以下,比例达 89.04%;其中,分子量为 500~1 000 Da 的寡肽占 14.05%,分子量 <500 Da 的小肽占 74.99%,而 1 000~2 000,2 000~3 000,3 000~5 000,>5 000 Da 的多肽分别为 5.98%,2.00%,1.56%,1.43%。说明制备的羊胎盘肽主要以 <1 000 Da 的寡肽为主。

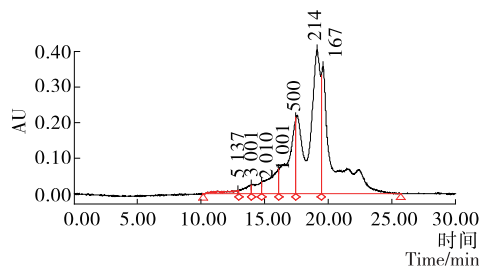


图 1 羊胎盘肽的相对分子量分布

Figure 1 Distribution of relative molecular weight of placental peptide from tibetan sheep

2.2 羊胎盘肽的氨基酸组成

由表 1 可知,羊胎盘肽中 Glu 含量最高,羊胎盘肽中必需氨基酸(EAA)含量丰富,组成合理,占总氨基酸(TAA)含量的 34.54%,营养价值较高。据文献^[12]报道,Ala、Met、Pro、Cys、Leu、Gly 和 Val 对清除自由基有较好

表 1 羊胎盘肽粉的氨基酸组成[†]

Table 1 Amino acid composition of peptide from tibetan sheep placenta mg/mL

氨基酸	含量	氨基酸	含量	氨基酸	含量
天冬氨酸(Asp)	1.66	半胱氨酸(Cys)	0.05	精氨酸(Arg)	1.07
谷氨酸(Glu)	3.03	缬氨酸*(Val)	1.06	丙氨酸(Ala)	1.32
丝氨酸(Ser)	0.62	蛋氨酸*(Met)	0.40	酪氨酸(Tyr)	0.49
组氨酸(His)	0.38	苯丙氨酸*(Phe)	0.82	赖氨酸*(Lys)	1.05
甘氨酸(Gly)	1.92	异亮氨酸*(Ile)	0.77	脯氨酸(Pro)	1.23
苏氨酸*(Thr)	0.72	亮氨酸*(Leu)	1.39	总计	17.98

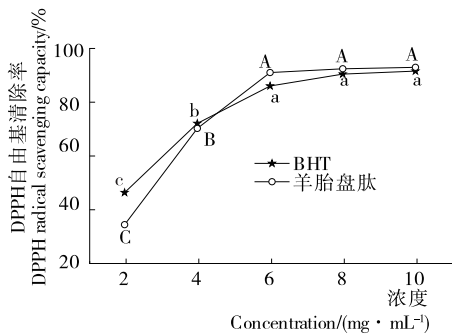
† *为必需氨基酸。

效果,上述氨基酸含量占总氨基酸含量的 40.99%,此外,芳香族氨基酸 Trp、Tyr 和 Phe 可供氢,能减慢或终止自由基链式反应,有可能成为抗氧化肽的活性位点。

2.3 羊胎盘肽的抗氧化能力

2.3.1 DPPH 自由基清除能力 由图 2 可知,羊胎盘肽的 DPPH 自由基清除率随肽浓度的增加而提高,存在一定的剂量效应关系,与涂宗财等^[13]得出的结果一致。当肽浓度为 2~6 mg/mL 时,DPPH 自由基清除率的增速最快;当肽浓度为 6 mg/mL 时,清除率达 85.70%;当肽浓度为 6~10 mg/mL 时,DPPH 自由基清除率为 85.70%~87.50%,差异不显著($P>0.05$),与小尾羊胎盘肽的清除能力接近^[4]。羊胎盘肽的 DPPH 自由基清除能力与 BHT 基本相当,其 IC_{50} 值分别为 2.83、2.28 mg/mL,二者抗氧化能力明显高于何小庆等^[14]的结果。综上,羊胎盘肽具有良好的 DPPH 自由基清除能力,可能是因为羊胎盘酶解过程中释放出更多疏水性氨基酸侧链,作为氢供体与 DPPH 自由基反应,从而淬灭自由基,呈现出较强的抗氧化能力^[15]。

2.3.2 超氧阴离子自由基清除能力 由图 3 可知,羊胎盘肽对超氧阴离子自由基的清除能力随浓度的升高而快速增加,呈良好线性量效关系,当肽浓度为 25 mg/mL 时,超氧阴离子自由基清除率达 75.51%;当 BHT 浓度为 10 mg/mL 时,超氧阴离子自由基清除率已高达 92.43%。

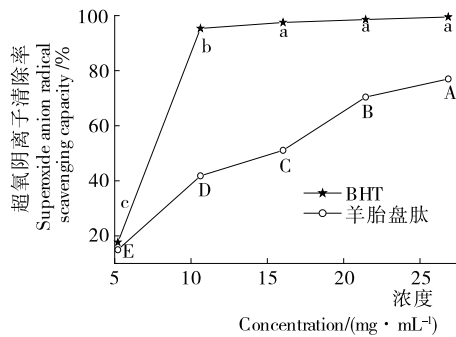


大写或小写字母不同表示差异显著($P<0.05$)

图 2 DPPH 自由基的清除能力

Figure 2 Scavenging capacity of DPPH radical

羊胎盘肽和 BHT 的 IC_{50} 值分别为 15.17、6.89 mg/mL,前者约为后者 2.2 倍;与 BHT 相比,羊胎盘肽清除超氧阴离子自由基的能力相对较弱。



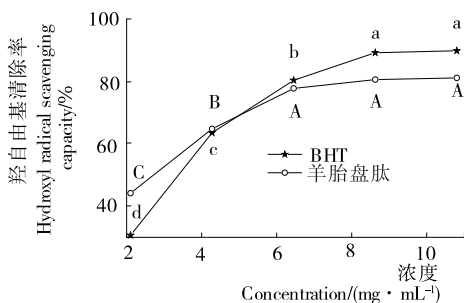
大写或小写字母不同表示差异显著($P<0.05$)

图 3 超氧阴离子自由基的清除能力

Figure 3 Scavenging capacity of $O_2^- \cdot$ radical

2.3.3 羟基自由基清除能力 由图 4 可知,羊胎盘肽和 BHT 对羟基自由基清除率的变化趋势基本相同。当肽浓度为 2~6 mg/mL 时,羊胎盘肽对羟基自由基清除率与浓度呈正相关;当肽浓度 >10 mg/mL 时,羟基自由基清除率达 84.46%,明显高于小尾羊胎盘肽的清除能力(46.88%)^[4]。羊胎盘肽和 BHT 的 IC_{50} 值分别为 0.94、2.62 mg/mL,前者清除羟基自由基能力强于 BHT,也明显优于羊肝抗氧化肽(IC_{50} 值为 17.01 mg/mL)^[16]。这可能是因为羊胎盘肽中含有离子化的氨基或羧基等供氢体,能提供质子还原具有氧化性的自由基,从而终止自由基连锁反应,达到清除或抑制目的。

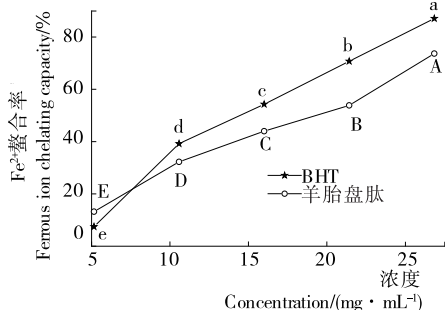
2.3.4 金属离子(Fe^{2+})螯合能力 由图 5 可知,羊胎盘肽对 Fe^{2+} 螯合率随肽浓度的增加而快速增强,呈明显量效关系;BHT 对 Fe^{2+} 螯合率也表现出相同趋势,二者 IC_{50} 值分别为 18.19、15.33 mg/mL。与鱼肌原纤维蛋白对 Fe^{2+} 螯合率(IC_{50} 值为 42.98 mg/mL)相比^[9],羊胎盘肽表现出优良的 Fe^{2+} 螯合能力,主要是因为羊胎盘酶水解后的游离组氨酸含量增加,而组氨酸中咪唑基的氨基可与 Fe^{2+} 螯合,从而减少游离 Fe^{2+} 浓度。此外,具有螯合金属离子能力的活性短肽链逐渐暴露也是具有良好



大写或小写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)

图 4 羟自由基的清除能力

Figure 4 Scavenging capacity of hydroxyl radical



大写或小写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)

图 5 金属离子螯合能力

Figure 5 The Ferrous iron-chelation capacity

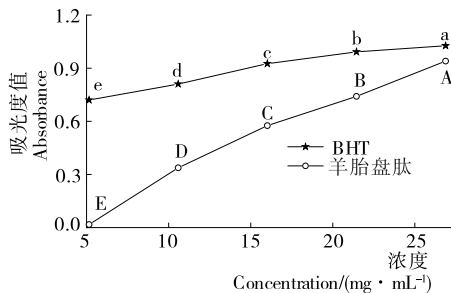
螯合能力的原因之一^[10]。

2.3.5 铁离子(Fe^{3+})还原能力 由图 6 可知,羊胎盘肽和 BHT 在 700 nm 处的吸光度值随其浓度的提高而增强,但 IC_{50} 值相差明显,分别为 14.32, 0.04 mg/mL;与 BHT 相比,羊胎盘的还原力表现一般。Zhou 等^[16]发现鲍足肌抗氧化肽的 Fe^{3+} 还原力 IC_{50} 值为 15 mg/mL,与羊胎盘肽能力相似。

2.3.6 铜离子(Cu^{2+})还原能力 由图 7 可知,当肽浓度为 2~10 mg/mL 时,羊胎盘肽对 Cu^{2+} 还原能力随肽浓度的增加而显著升高, IC_{50} 值为 8.91 mg/mL;相同浓度下羊胎盘的还原能力始终低于 BHT (IC_{50} 值为 1.91 mg/mL)。一般认为某物质的 IC_{50} 值低于 10 mg/mL 时具有较好的抗氧化性,表明羊胎盘肽具有较强的 Cu^{2+} 还原力和抗氧化能力,但仍弱于 BHT。

2.4 结构表征分析

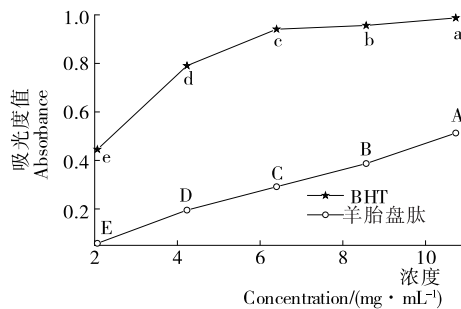
2.4.1 傅里叶变换红外光谱 由图 8 可知,羊胎盘在 3 430 cm^{-1} 处吸收峰属于酰胺 A 带,是由游离态 O—H 伸缩振动引起的;2 930 cm^{-1} 处吸收峰为 C—H 伸缩振动;1 650 cm^{-1} 处吸收峰归属于酰胺 I 带,是由 C—O 伸缩振动所引起。研究^[17]表明,1 650~1 660 cm^{-1} 为 α -螺旋,1 600~1 640 cm^{-1} 为 β -折叠,说明羊胎盘中的蛋白质结构主要为致密的 α -螺旋。羊胎盘在 1 540 cm^{-1} 处吸收



大写或小写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)

图 6 铁离子还原力

Figure 6 Reduction capacity of Ferric iron



大写或小写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)

图 7 铜离子还原力

Figure 7 Reducing capacity of cupric ion

峰为酰胺 II 带特征范围,主要由 N—H 键弯曲振动引起;1 240 cm^{-1} 处吸收峰证明了蛋白质结构的完整性^[22];1 410~1 100 cm^{-1} 处吸收峰主要由极性 C—O 键伸缩振动引起。

当蛋白酶解为肽后,特征吸收峰出现了小幅移动,3 430 cm^{-1} 处吸收峰由尖锐变得平缓且发生红移,可能是由于游离态 O—H 伸缩振动与氢键缔合,致使 O—H 键长增大,并向低波数位移,活泼羟基变少。2 930 cm^{-1} 处吸收峰变弱表明蛋白质分子内和分子间的氢键断裂变弱;1 650 cm^{-1} 处吸收峰发生变化可能是酰胺 I 带 (C=O 伸缩振动) 的 β 折叠,酰胺 I 带特征峰由多肽骨架的 C=O 伸缩振动在特定的氢键环境下引起的,其对二

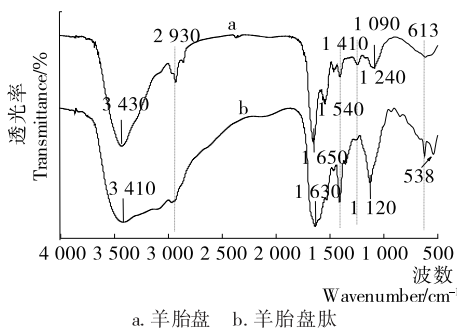


图 8 羊胎盘和羊胎盘肽的红外光谱图

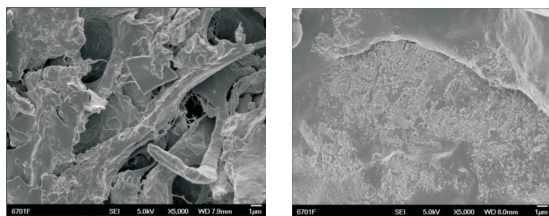
Figure 8 FTIR of sheep placenta and sheep placenta peptide

级结构变化十分敏感,是描述蛋白质二级结构的最主要峰,吸收峰发生红移且峰型变宽,说明超声辅助酶解导致蛋白质的二级结构发生变化,致密有序的 α -螺旋结构被破坏, β -折叠结构增多,同时也表明酶解羰基增加,蛋白质裂解产生了更多小分子肽;1 540 cm^{-1} 处吸收峰消失说明酶解作用使部分肽键断裂,大分子蛋白裂解为肽;1 410 cm^{-1} 处羰基对称伸缩振动吸收峰变尖锐表明酶解后-COOH含量增加。总之,二者红外光谱图基本相同,表明酶解在一定程度上改变了峰的位置、强度和面积,但并没有出现新的功能团,即酶解改变了蛋白各种构象所占的比例,二级结构发生了不同程度的变化,与温慧芳等^[18]的研究结果一致。

2.4.2 扫描电镜 由图9可知,羊胎盘原料酶解前后的微观结构差异明显。羊胎盘原料呈连续凹凸不平、不规则的大孔海绵状结构,且有少数片状结构存在。酶解后,羊胎盘的完整结构被破坏,表面不规则凹陷明显消失,变成大量紧密聚集的小球状颗粒,不规则碎片减少。这可能是酶解过程使蛋白质分子间的氢键和范德华力被超声波的空化作用产生的局部微射流及震荡波所产生的剪切力所破坏,蛋白质结构被破坏,粒径减小,蛋白质表面暴露出更多的疏水性基团,进而提高酶解产物的抗氧化能力。

2.4.3 X-射线衍射 由图10可知,羊胎盘在 20° 左右有较强吸收峰,而羊胎盘肽在 $18^\circ, 22^\circ, 31^\circ$ 左右有强吸收峰,且吸收峰变尖锐,说明酶解反应使大分子蛋白在降解过程中发生重排和聚集,形成了更多稳定的小分子肽晶体。含有高比例的疏水性氨基酸残基比亲水性较强的蛋白质一般更为稳定,说明经酶解后疏水性氨基酸含量提高,抗氧化活性增强^[19]。

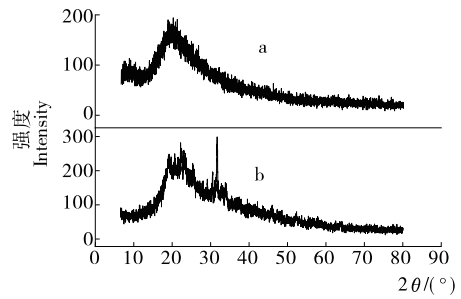
2.4.4 圆二色谱 由表2可知,羊胎盘酶解后的 α -螺旋结构(紧密且没有空腔的稳定结构)含量降低, β -折叠及无规则卷曲含量显著升高, β -转角含量增加不明显,导致蛋白质分子表面疏水性变大,与红外光谱结论一致。这可能是超声辅助酶解可以破坏蛋白质间氢键和肽键进而使蛋白质结构发生改变,羊胎盘蛋白的空间结构展开,蛋白质分子内无序结构含量相对较高, β -折叠和无规则卷曲增加,



(a) 羊胎盘 (b) 羊胎盘肽

图9 羊胎盘和羊胎盘肽的电镜扫描图

Figure 9 SEM photograph of sheep placenta and sheep placenta peptide (5 000 \times)



a. 羊胎盘 b. 羊胎盘肽

图10 羊胎盘和羊胎盘肽的X射线衍射图

Figure 10 XRD diagrams of sheep placenta and sheep placenta peptide

表2 羊胎盘及羊胎盘肽的二级结构

Table 2 Secondary structure of sheep placenta the and sheep placenta peptide %

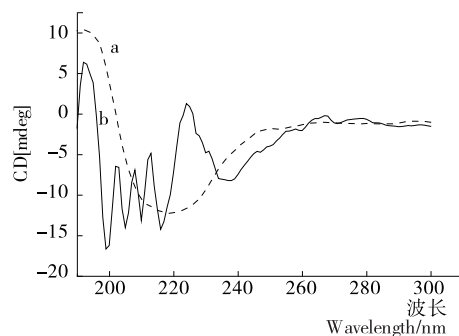
样品	α -螺旋	β -折叠	β -转角	无规卷曲
羊胎盘	55.5	5.6	17.0	23.3
羊胎盘肽	20.5	25.2	19.7	36.3

使得隐藏在内部的疏水性位点更多地显露出来,从而发挥特定的功能作用,这也是羊胎盘肽表现出一定抗氧化能力的原因之一。

由图11可知,羊胎盘及胎盘肽在192 nm处均有一正峰 α -螺旋特征峰,216 nm附近有一个负峰 β -折叠特征峰,为典型的蛋白质圆二色谱图。

2.5 不同动物源肽的抗氧化能力比较

由表3可知,藏绵羊胎盘肽清除羟自由基能力稍弱于鲍鱼水解肽、卵白蛋白低聚肽和山羊胎盘肽,但明显强于其他动物源肽,可能与其分子量分布、分子中活泼氢原子数量及其位置有关^[9]。研究^[20]表明,分子量 $<1\ 000$ Da抗氧化肽的羟自由基清除能力要优于 $>1\ 000$ Da的肽片段。试验中羊胎盘肽分子量 $<1\ 000$ Da的肽约占90%,同时小分子肽片段还能产生离子化氨基和羧基,易提供



a. 羊胎盘 b. 羊胎盘肽

图11 羊胎盘和羊胎盘肽的圆二色谱图

Figure 11 CD spectrum of sheep placenta and sheep placenta peptide

表 3 不同动物来源肽的抗氧化能力比较[†]

Table 3 Antioxidant capacity comparison of different animal-derived antioxidative peptides

来源	半抑制浓度 $IC_{50}/(mg \cdot mL^{-1})$						文献来源
	DPPH 自由基清除率	超氧阴离子自由基清除率	羟基自由基清除率	Fe ²⁺ 螯合能力	Fe ³⁺ 还原能力	Cu ²⁺ 还原能力	
羊胎盘肽	2.83	15.17	0.94	18.19	14.32	8.91	
BHT	2.25	6.34	2.59	15.33	0.04	1.91	
山羊胎盘	0.68	3.24	0.68	—	—	—	[22]
波纹巴非蛤肽	4.82	3.75	4.70	—	—	—	[14]
羊肝蛋白肽	0.42	13.21	17.01	—	—	—	[15]
鳕鱼鱼鳔肽	8.29	5.03	5.43	1.35	—	—	[23]
海参多肽	8.39	15.07	2.95	—	—	—	[24]
低值海鱼肽	4.76	5.91	5.09	—	1.31	—	[25]
鱿鱼肽	8.80	10.30	16.50	—	—	—	[26]
猪血抗氧化肽	7.01	8.29	5.43	—	59.13	—	[27]
鲍鱼内脏抗氧化肽	4.61	—	16.24	—	—	—	[28]
林蛙低聚肽	2.30	15.00	3.00	—	—	—	[29]
藏羊血清蛋白肽	6.04	2.87	3.56	—	—	—	[30]
鲍鱼水解肽	0.48	—	0.74	—	2.91	—	[31]
卵白蛋白低聚肽	0.25	25.00	0.64	—	—	—	[32]
鱼鳞明胶肽	7.39	0.68	1.84	—	—	—	[33]

[†] “—”表示文献中无报道数据。

电子或氢原子干扰氧化,进而终止自由基介质的链式反应^[21]。

由表 3 还可知,藏绵羊胎盘肽清除 DPPH 自由基的 IC_{50} 值低于山羊胎盘肽、羊肝蛋白肽和林蛙低聚肽等 6 种肽。据报道^[34],抗氧化肽能同时与 DPPH 和 DPPH⁺ 中的一种或两种发生氧化还原反应,而羊胎盘肽由于酶解后空间构型、氨基酸组成和分子空间排列等原因,如酪氨酸(Tyr)含有酚羟基,能够作为电子供体而起到清除自由基的作用,但羊胎盘肽中 Tyr 含量相对较低,同时也可能多肽片段的供电子氨基酸(Ala、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Asp、Glu)并未完全暴露,故未能很好的将电子和质子传递给 DPPH 自由基,导致反应不完全,清除能力未能充分发挥。另一方面,藏绵羊胎盘肽的 DPPH 自由基清除能力仍高于鳕鱼鱼鳔肽、海参多肽等多数水产肽。藏绵羊胎盘肽清除超氧阴离子自由基能力优于卵白蛋白低聚肽,与海参多肽、林蛙低聚肽相当,低于羊肝蛋白肽等其他动物源肽。研究^[34]表明,超氧阴离子自由基可接受一个质子形成不稳定且易被清除的氢过氧自由基(HO₂⁻)。结合图 8 可知,由于羊胎盘肽分子的活泼羟基较少,不易传递质子使超氧阴离子自由基转化成 HO₂⁻,

使其清除超氧阴离子自由基能力相对较弱。刘泽宇等^[35]认为肽的抗氧化能力随 α -螺旋结构含量的下降而升高。

3 结论

藏绵羊胎盘肽具有良好的自由基清除能力,而还原能力和金属离子螯合能力相对较弱,且存在一定剂量依赖性。羊胎盘蛋白质在酶解过程中微观形态结构、结晶性能、蛋白分子构象和 α 螺旋、 β 折叠等空间结构的积极变化有助于小分子寡肽的抗氧化能力释放。后续仍需通过凝胶色谱、反相高效液相色谱等方法分离筛选高活性的抗氧化肽片段,并从氨基酸序列解析等角度进一步明确藏绵羊胎盘肽的抗氧化能力构效关系。

参考文献

- [1] CAI Lu-yun, WU Xiao-sa, ZHANG Yu-hao, et al. Purification and characterization of three antioxidant peptides from protein hydrolysate of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin[J]. Journal of Functional Foods, 2015, 16: 234-242.
- [2] 郑召君, 武如娟, 张日俊. 动物源性抗氧化肽的生物学功能及其与结构的关系[J]. 动物营养学报, 2015, 27(4): 1 034-1 040.

- [3] 王善辉, 葛利江. 山羊胎盘肽对幼犬免疫功能和抗氧化功能的影响[J]. 西南农业学报, 2007, 20(1): 123-127.
- [4] 姜惠敏, 李明, 曹光群, 等. 酶解制备羊胎盘抗氧化肽工艺条件的优化[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(1): 99-104.
- [5] 张丙云, 王聪, 谢言言, 等. 超声波辅助复合酶法制备藏系绵羊胎盘肽的工艺优化[J]. 食品工业科技, 2017, 38(21): 130-136.
- [6] 邵佩, 庄虎, 蹇顺华, 等. 罗汉果黄酮的提取、纯化及生物活性研究进展[J]. 食品与机械, 2019, 35(12): 221-225.
- [7] 任海伟, 石菊芬, 蔡亚玲, 等. 响应面法优化超声辅助酶解制备藏系羊胎盘肽工艺及抗氧化能力分析[J]. 食品科学, 2019, 40(24): 265-273.
- [8] XING Lu-juan, HU Ya-ya, HU Hong-yan, et al. Purification and identification of antioxidative peptides from dry-cured Xuanwei ham[J]. Food Chemistry, 2016, 194: 951-958.
- [9] NAJAFIAN L, BABJIA S. Isolation, purification and identification of three novel antioxidative peptides from patin (*Pangasius sutchi*) myofibrillar protein hydrolysates[J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 60(1): 452-461.
- [10] ZHANG Fang, QU Jie, THAKUR K, et al. Purification and identification of an antioxidative peptide from peony (*Paeonia suffruticosa Andr.*) seed dreg [J]. Food Chemistry, 2019, 285: 266-274.
- [11] WU Hai-tao, JIN Wen-gang, SUN Shi-Guang, et al. Identification of antioxidant peptides from protein hydrolysates of scallop (*Patinopecten yessoensis*) female gonads[J]. European Food Research and Technology, 2015, 242(5): 713-722.
- [12] GIMÉNEZ B, ALEMÁN, MONTERO P, et al. Antioxidant and functional properties of gelatin hydrolysates obtained from skin of sole and squid[J]. Food Chemistry, 2009, 114(3): 976-983.
- [13] 涂宗财, 唐平平, 郑婷婷, 等. 响应面优化鱼鳔胶原肽制备工艺及其抗氧化活性研究[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(5): 160-166.
- [14] 何小庆, 曹文红, 章超桦, 等. 波纹巴非蛤蛋白酶解产物的抗氧化活性及分子量分布研究[J]. 现代食品科技, 2014, 30(1): 74-80.
- [15] 文飞, 母应春, 李静雯, 等. 羊肝蛋白酶解条件优化及酶解产物抗氧化活性研究[J]. 中国酿造, 2017, 36(1): 157-163.
- [16] ZHOU Da-yong, TANG Yue, ZHU Bei-wei, et al. Antioxidant activity of hydrolysates obtained from scallop (*Patinopecten yessoensis*) and abalone (*Haliotis discus hannai Ino*) muscle[J]. Food Chemistry, 2012, 132(2): 815-822.
- [17] 谢孟峡, 刘媛. 红外光谱酰胺 III 带用于蛋白质二级结构的测定研究[J]. 高等学校化学学报, 2003, 24(2): 226-231.
- [18] 温慧芳, 陈丽丽, 白春清, 等. 基于不同提取方法的鲷鱼皮胶原蛋白理化性质的比较研究[J]. 食品科学, 2016, 37(1): 74-81.
- [19] 刘丽莉, 王焕, 李丹, 等. 鸡蛋清卵白蛋白酶解工艺优化及其结构性质[J]. 食品科学, 2016, 37(10): 54-61.
- [20] 齐希光, 陆晓婷, 张晖, 等. 不同分子量黑籽瓜种子多肽抗氧化能力的研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(9): 74-80.
- [21] 李铨军, 崔胜云. 抗坏血酸清除 DPPH 自由基的作用机理[J]. 食品科学, 2011, 32(1): 86-90.
- [22] 周洁静, 侯银臣, 刘旺旺, 等. 羊胎盘抗氧化肽制备工艺及其体外抗氧化活性研究[J]. 食品工业, 2015, 36(5): 11-15.
- [23] 李娜, 周德庆, 刘楠, 等. 鳕鱼鱼鳔抗氧化肽制备工艺研究[J]. 渔业科学进展, 2020, 42(2): 191-199.
- [24] 申彩红. 海参肽的酶法制备及其抗氧化、抗疲劳活性研究[D]. 厦门: 华侨大学, 2015: 56.
- [25] 丁树慧, 齐曼婷, 齐斌, 等. 低值海洋鱼低聚肽抗氧化和抗疲劳活性[J]. 食品科学, 2019, 40(1): 155-161.
- [26] 胡小军, 江敏, 莫秋远, 等. 鲑鱼肌肉蛋白肽的制备工艺优化及其抗氧化活性[J]. 食品工业科技, 2017, 38(5): 191-195.
- [27] 安攀宇, 肖岚, 何佩芸, 等. 菌酶联合制备猪血抗氧化低聚肽[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(19): 162-169.
- [28] 田裕心, 彭亚博, 姚昱锟, 等. 响应面优化鲍鱼内脏抗氧化肽制备工艺及其活性[J]. 食品工业, 2019, 40(4): 110-115.
- [29] 张江涛, 秦修远, 周明, 等. 林蛙低聚肽的体外抗氧化与 ACE 抑制作用[J]. 中国食品添加剂, 2019, 30(6): 46-53.
- [30] 高丹丹, 兰家国, 赵佩佩, 等. 中性蛋白酶水解藏羊血清蛋白制备抗氧化肽的研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(15): 229-233.
- [31] 梁杰, 赵晓旭, 汪秀妹, 等. 鲍鱼水解肽的抗氧化活性评价组成分析及稳定性研究[J]. 福州大学学报, 2019, 47(2): 479-284.
- [32] 张江涛, 秦修远, 贾福怀, 等. 卵白蛋白低聚肽的体外抗氧化及 ACE 抑制作用[J]. 食品与发酵工业, 2019, 42(12): 67-74.
- [33] 卢素珍, 涂宗财, 王辉, 等. 二步酶解法制备鱼鳞明胶抗氧化肽及其抗氧化活性[J]. 食品与机械, 2019, 35(5): 160-166.
- [34] 何喜珍, 牛延宁, 金明飞, 等. 不同分子量大豆多糖的表征和抗氧化研究[J]. 大豆科学, 2016, 35(5): 805-809.
- [35] 刘泽宇. 基于 FT-IR 和 CD 色谱分析方法解析 PEF 技术影响松子源抗氧化五肽活性与二级结构的实验研究[D]. 长春: 吉林大学, 2017: 67.