

肖 岚,李 诚,程小平,等. 牦牛血抗氧化低聚肽的稳定性及与其他食源性低聚肽抗氧化互作分析[J]. 江苏农业科学,2019,47(15):226-232.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.15.053

牦牛血抗氧化低聚肽的稳定性及与其他食源性低聚肽抗氧化互作分析

肖 岚^{1,2}, 李 诚², 程小平³, 杜 昕²

(1. 四川旅游学院食品学院, 四川成都 610100; 2. 四川农业大学食品学院, 四川雅安 625014;

3. 四川高金实业集团有限公司, 四川遂宁 629000)

摘要:通过菌酶联合法发酵制备牦牛血低聚肽(分子量 < 1 ku), 研究其氨基酸组成、热稳定性、酸碱稳定性、金属离子稳定性、冻融稳定性及对食品辅料的稳定性; 同时, 运用等辐射分析法评价 3 种食源性低聚肽按不同比例组合后组合肽的抗氧化相互作用。结果表明, 牦牛血低聚肽具有良好的热稳定性, 100 ℃ 水浴热处理 5 h 后的 ·OH 清除活性仍有 84.32%。牦牛血低聚肽在 pH 值为 6~10, 即高 pH 值下 ·OH 清除活性几乎没有受到影响, 而低 pH 值条件下的 ·OH 清除能力较差。Zn²⁺、Cu²⁺ 对牦牛血低聚肽的 ·OH 清除活性影响较大, 当二者浓度达到 500 mg/L 时, 其 ·OH 清除活性保持率仅为 49.35%、46.15%; K⁺、Mg²⁺ 对其 ·OH 清除活性影响较小。牦牛血低聚肽对 ·OH 清除活性保持率随冻融次数增多而降低。食品辅料 NaCl 对其 ·OH 自由基清除活性有增效作用, 特别是 NaCl 添加量为 0.5%~1.5% 时, 而当 NaCl 添加量为 1.5%~2.5% 时, 增效作用不明显; 葡萄糖浓度为 8%~10% 时, 对其 ·OH 清除活性有明显抑制作用; 柠檬酸对其 ·OH 清除活性有明显抑制作用, 但柠檬酸浓度变化对其 ·OH 清除活性影响不大。牦牛血低聚肽的体外抗氧化活性优于商品化的大豆低聚肽以及鱼胶原蛋白低聚肽, 将 3 种食源性低聚肽按比例组合后, 在 DPPH 模型和脂质过氧化抑制能力模型中, 大部分组合低聚肽表现出较强的协同作用, 组合低聚肽中的牦牛血低聚肽比例超过 50% 时表现出拮抗作用; 在 ABTS 模型中组合低聚肽中的牦牛血低聚肽比例越高协同作用越低。

关键词:牦牛血低聚肽; 稳定性; 抗氧化互作作用; 食源性低聚肽

中图分类号: TS251.93 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)15-0226-07

在日本、欧美等发达国家, 动物屠宰血液(特别是猪血)用于开发生物肽类药物、功能性食品与食品添加剂等的利用率已达到 60% 以上^[1], 而我国对动物屠宰血液的利用率却非常低。牦牛是我国青藏高原的特殊家畜, 牦牛血中蛋白质含

量明显高于其他畜禽类血液^[2]。因此, 利用牦牛血制备抗氧化低聚肽既能满足人们对抗氧化剂安全性的要求^[3], 又能解决牦牛血随意排放对环境造成污染的问题, 提高牦牛血的附加值。笔者所在试验组以体外抗氧化指标作为评价体系, 采用枯草芽孢杆菌(SICC1.197)联合碱性蛋白酶发酵, 并采用超滤分级已制备出分子量 < 1 ku 的牦牛血抗氧化低聚肽^[1]。然而, 关于牦牛血抗氧化低聚肽物理化学稳定性的报道较少。王雪芹发现, 鲐鱼多肽在 100 ℃ 条件下能保持一定的抗氧化活性, 冻融次数和紫外线照射对多肽的 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基(DPPH·)和羟基自由基(·OH)清除能力

收稿日期: 2018-04-26

基金项目: 四川省科技项目(编号: 2018JY0317); 四川省教育厅自然科学重点项目(编号: 17ZA0289)。

作者简介: 肖 岚(1981—), 女, 四川南充人, 博士研究生, 副教授, 主要从事畜产品加工与安全控制方面的研究。E-mail: 30430664@qq.com。

参考文献:

- [1] 郭 旭. 汉滨区核桃产业发展现状, 问题与对策研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2016.
- [2] 恩斯明格. 《食物与营养百科全书》选集(5)[M]. 北京: 农业出版社, 1989.
- [3] 恩斯明格. 《食物与营养百科全书》选集(1)[M]. 北京: 农业出版社, 1989.
- [4] 李正明. 植物蛋白生产工艺与配方[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998.
- [5] 张庆祝, 丁晓雯, 陈宗道, 等. 核桃蛋白质研究进展[J]. 粮食与油脂, 2003(5): 21-23.
- [6] 姜荣庆. 复合酶提取山核桃油及副产物综合利用的研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2011.

- [7] Pereira J A, Oliveira I, Sousa A, et al. Bioactive properties and chemical composition of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars[J]. Food and Chemical Toxicology, 2008, 46(6): 2103-2111.
- [8] Poulou S M, Bielinski D F, Shukitt-Hale B. Walnut diet reduces accumulation of polyubiquitinated proteins and inflammation in the brain of aged rats[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2013, 24(5): 912-919.
- [9] Albert C M, Gaziano J M, Willett W C, et al. Nut consumption and decreased risk of sudden cardiac death in the Physicians' health study[J]. Archives of Internal Medicine, 2002, 162(12): 1382-1387.
- [10] 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定: GB 5009.5—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.

无显著性影响, pH 值变化对其抗氧化活性影响较大^[4]; 赵谋明等发现, 蓝圆鲈抗氧化肽具有较强耐热性^[5]; 刘丹发现, 大豆抗氧化肽在温度达到 80 ℃ 时的活性明显降低, Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 对大豆抗氧化肽的活性干扰较大^[6]。为了方便牦牛血低聚肽作为配料在保健食品、化妆品以及医药行业中的广泛应用, 本试验拟对牦牛血抗氧化低聚肽的热稳定性、酸碱稳定性、金属离子稳定性、冻融稳定性以及作为食品辅料的稳定性进行研究, 以获得相关基础数据。

目前, 关于食源性抗氧化低聚肽的制备及其抗氧化活性的研究报道较多, 例如大豆蛋白抗氧化肽^[7]、罗非鱼皮胶原蛋白抗氧化肽^[8]、棉籽粕抗氧化肽^[9]、菜籽蛋白抗氧化肽^[10]等, 然而关于食源性抗氧化低聚肽的抗氧化互作报道较少。等辐射分析法是一种简单、精确分析药物之间相互作用的方法^[11], 本试验借鉴等辐射分析法, 评价 3 种食源性抗氧化低聚肽按不同比例组合后, 它们之间的抗氧化相互作用, 以期为合理复配食源性抗氧化低聚肽以及通过天然动物化学物之间的增效作用提高低聚肽的抗氧化能力提供帮助。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂 牦牛血, 四川省大渡河食品有限公司生产; 碱性蛋白酶, 活性为 85.61 U/mg, 上海楷洋生物技术有限公司生产; 枯草芽孢杆菌 SICC1.197, 四川省工业微生物资源平台菌种保藏管理中心提供; 其他化学试剂, 国产分析纯; 大豆低聚肽, 分子量 < 1 ku, 西安百川生物科技有限公司生产; 鱼胶原低聚肽, 分子量 < 1 ku, 济南东轩生物工程有限公司生产。

1.1.2 主要仪器设备 台式高速冷冻离心机, H2050R 型, 长沙湘仪离心机仪器有限公司生产; 恒温振荡培养箱, QYC-2102C 型, 上海福玛实验设备有限公司生产; 紫外可见分光光度计, UV Power 型, 北京莱伯泰科仪器股份有限公司生产; 冷冻干燥机, LGJ-50F 型, 北京松源华兴科技发展有限公司生产。

1.2 方法

1.2.1 菌酶联合法制备牦牛血抗氧化低聚肽 采用笔者所在试验组前期研究的菌酶联合法^[1]制备牦牛血抗氧化低聚肽。将前期制备所得的枯草芽孢杆菌菌液 (1×10^9 CFU/mL) 以接种量为 2.5 mL/100 mL 加入底物浓度为 75 g/L 的高压灭菌 (121 ℃, 15 min) 牦牛血液中, 在 35 ℃、135 r/min 下恒温振荡培养 72 h, 发酵结束后经高压灭菌 (121 ℃, 15 min) 得到牦牛血发酵液。待牦牛血发酵液冷却后加入碱性蛋白酶, 在酶底比为 190 U/g、pH 值为 9.5、60 ℃ 的条件下进行酶解 3 h, 酶解结束后用沸水水浴灭酶活 10 min, 得到牦牛血酶解液。将牦牛血酶解液在 4 ℃、6 000 r/min 条件下离心 15 min, 取上清液用 0.45 μm 水性微孔滤膜抽滤去除菌体残渣, 再将滤液置于 5 ku 超滤管中在 4 ℃、4 000 r/min 条件下离心 10 min, 取上清液得到分子量 < 5 ku 的牦牛血低聚肽; 进一步将肽液置于 1 ku 超滤管中在 4 ℃、4 000 r/min 条件下离心 30 min, 得到分子量 < 1 ku 的牦牛血低聚肽。

1.2.2 牦牛血低聚肽氨基酸组分分析 采用 A300 自动氨基酸分析仪分析得到氨基酸组分分析谱图。

1.2.3 牦牛血低聚肽体外抗氧化活性研究 (1) 体外抗氧化活性采用 $\cdot\text{OH}$ 清除率表示, 其测定参照 Tian 等的方法^[12], 脂质过氧化抑制能力的测定参照陈乃富的方法^[13], 还原力的测定参照刘昭明等的方法^[14], 2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二胺盐自由基 (ABTS $^{\cdot+}$) 清除率的测定参照潘瑶等的方法^[15], DPPH \cdot 清除率的测定参照朱夕波的方法^[16], 总抗氧化力的测定参照 Yang 等的方法^[17]。(2) 半抑制浓度值测定 分别测定其 $\cdot\text{OH}$ 清除率、抑制脂质过氧化能力、还原力、ABTS $^{\cdot+}$ 清除率、DPPH \cdot 清除率、总抗氧化力。参照杜昕的方法^[1], 以样品浓度为横坐标, 抑制率为纵坐标, 绘制成圆滑曲线, 根据曲线计算半抑制浓度 (IC_{50}) 值。

1.2.4 牦牛血低聚肽稳定性研究 (1) 温度对牦牛血低聚肽稳定性的影响 将低聚肽粉配制浓度为 2 mg/mL 溶液, 分别在 20、40、60、80、100 ℃ 条件下水浴保温 1~5 h, 快速冷却至室温, 测其 $\cdot\text{OH}$ 清除能力。(2) pH 值对牦牛血低聚肽稳定性的影响 取相同质量的低聚肽粉分别溶解于 pH 值为 2、4、6、8、10、12 的磷酸缓冲液中, 室温静置 1~5 h, 测其 $\cdot\text{OH}$ 清除能力。(3) 金属离子对牦牛血低聚肽稳定性的影响 取 2 mg/mL 牦牛血低聚肽溶液, 分别加入 KCl、ZnSO $_4$ 、CaCl $_2$ 、MgSO $_4$ 、CuSO $_4$, 使溶液中 K^+ 、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 的浓度分别按 5、10、50、100、500 mg/L 顺序递增, 混匀静置 2 h, 测其 $\cdot\text{OH}$ 清除能力。(4) 食品辅料对牦牛血低聚肽稳定性的影响 取 2 mg/mL 牦牛血低聚肽溶液, 分别加入适量的 NaCl、葡萄糖、柠檬酸, 使 NaCl 质量分数达到 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%; 葡萄糖、柠檬酸质量分数达到 2%、4%、6%、8%、10%, 混匀静置 2 h, 测其 $\cdot\text{OH}$ 清除能力。(5) 冻融次数对牦牛血低聚肽稳定性的影响 取 2 mg/mL 牦牛血低聚肽溶液, 在 -80 ℃ 条件下反复冻融 10 次, 流动水解冻, 测其 $\cdot\text{OH}$ 清除能力。

1.2.5 牦牛血低聚肽与其他食源性低聚肽抗氧化相互作用的研究 根据“1.2.3”节(2)中的方法求得 3 种低聚肽的抗氧化指标半抑制浓度 (IC_{50}) 值, 根据 Luszczi 等的方法^[18], 由相加等效公式(1)分别计算理论值 $\text{IC}_{50\text{mix}}$ 。

$$\text{IC}_{50\text{mix}} = \text{IC}_{50\text{A}} / (P_{\text{A}} + R \times P_{\text{B}}) \quad (1)$$

式中: $\text{IC}_{50\text{A}}$ 为抗氧化剂 A 单独作用时的 IC_{50} 值; R 为协同组合中 2 种抗氧化剂的效价比, $R = \text{IC}_{50\text{A}} / \text{IC}_{50\text{B}}$, 其中 $\text{IC}_{50\text{B}}$ 为抗氧化剂及单独作用时的 IC_{50} 值; P_{A} 为抗氧化剂 A 在 AB 2 种抗氧化剂协同组合中的比例; P_{B} 为抗氧化剂 B 在 AB 2 种抗氧化剂协同组合中的比例。

1.3 数据处理

数据经 3 次平行试验后得到, 通过方差分析 (ANOVA) 来检测数据之间的差异显著性。统计分析使用 Excel 2013、SPSS 16.0、Origin 8.1 等软件。

2 结果与分析

2.1 牦牛血低聚肽的氨基酸组成

对通过超滤分级得到的分子量 < 1 ku 牦牛血低聚肽进行氨基酸组分分析, 分析结果见表 1, 可以看出, 分子量 < 1 ku 牦牛血低聚肽的氨基酸组成较为丰富, 由 12 种氨基酸构成, 氨基酸含量为 85.101%。研究结果表明, 大部分抗氧化肽在

N 端包含疏水性氨基酸如缬氨酸 (Val) 或亮氨酸 (Leu), 并且序列中含有脯氨酸 (Pro)、组氨酸 (His)、酪氨酸 (Tyr)、色氨酸 (Trp) 和半胱氨酸 (Cys) 等氨基酸^[19]。牦牛血抗氧化低聚肽的抗氧化活性可能与高含量的 Leu、Pro 以及 Tyr 有关。当然,除了氨基酸组成会影响抗氧化活性外,肽段序列、一级结构以及活性位点也会影响其抗氧化活性^[19]。

表 1 分子量 <1 ku 牦牛血低聚肽的氨基酸组成

序号	时间 (min)	氨基酸名称	含量 (%)
1	13.943	天冬氨酸 (Asp)	1.528
2	16.567	苏氨酸 (Thr)	4.580
3	17.899	丝氨酸 (Ser)	9.520
4	23.125	谷氨酸 (Glu)	15.180
5	26.230	甘氨酸 (Gly)	5.230
6	27.464	丙氨酸 (Ala)	12.150
7	31.352	缬氨酸 (Val)	2.640
8	37.363	亮氨酸 (Leu)	19.240
9	38.997	酪氨酸 (Tyr)	5.221
10	40.426	苯丙氨酸 (Phe)	2.933
11	45.383	赖氨酸 (Lys)	1.590
12	79.577	脯氨酸 (Pro)	5.289
合计			85.101

2.2 牦牛血低聚肽的体外抗氧化活性及与其他低聚肽的相互作用

2.2.1 牦牛血低聚肽的体外抗氧化活性 不同来源低聚肽体外抗氧化活性的 IC₅₀值见表 2,可以看出,牦牛血低聚肽的总抗氧化能力极显著优于大豆低聚肽以及鱼胶原低聚肽;牦牛血低聚肽的还原力显著优于大豆低聚肽,与鱼胶原低聚肽差异不显著;牦牛血低聚肽的脂质过氧化抑制能力极显著优于大豆低聚肽,与鱼胶原低聚肽差异不显著;牦牛血低聚肽对 ·OH 自由基的清除能力极显著优于大豆低聚肽以及鱼胶原低聚肽;牦牛血低聚肽对 DPPH · 自由基的清除能力极显著

优于大豆低聚肽,显著优于鱼胶原低聚肽;但是,牦牛血低聚肽对 ABTS⁺ · 自由基的清除能力弱于大豆低聚肽和鱼胶原低聚肽。表明本试验制备的牦牛血低聚肽的抗氧化活性优于商品化的大豆低聚肽以及鱼胶原低聚肽,牦牛血低聚肽具有作为天然抗氧化剂开发的潜力。

2.2.2 牦牛血低聚肽与其他低聚肽的相互作用 DPPH 模型中不同来源低聚肽组合的理论值和试验值见表 3。从表 2、表 3 可以看出,在 DPPH 模型中,大部分组合低聚肽均表现出协同作用。如牦牛血低聚肽 - 大豆低聚肽比例为 1 : 9 时, IC_{50 mix} 为 3.65 mg/mL,而大豆低聚肽的 IC₅₀ 为 4.10 mg/mL, 表现为协同作用; 牦牛血低聚肽 - 鱼胶原低聚肽比例为 1 : 9 时, IC_{50 mix} 为 2.40 mg/mL, 而鱼胶原低聚肽的 IC₅₀ 为 2.49 mg/mL,也表现出协同作用。同时,也有部分表现为拮抗作用,如牦牛血低聚肽 - 大豆低聚肽比例为 9 : 1 时, IC_{50 mix} 为 1.95 mg/mL,而牦牛血低聚肽的 IC₅₀ 为 1.84 mg/mL;牦牛血低聚肽 - 鱼胶原低聚肽比例为 9 : 1 时, IC_{50 mix} 为 1.89 mg/mL,而牦牛血低聚肽的 IC₅₀ 为 1.84 mg/mL。虽然牦牛血低聚肽在组合低聚肽中的比例增加会引起拮抗作用,但是却降低了组合低聚肽的 IC_{50 mix},即组合低聚肽的 DPPH · 清除能力随牦牛血低聚肽比例的增加而增大。为了验证 IC_{50 mix} 可靠性,测定不同比例组合的低聚肽 DPPH · 清除率,如牦牛血低聚肽 - 大豆低聚肽比例为 1 : 9 时, DPPH · 清除率为 62.55%,而大豆低聚肽 (3 mg/mL) 的清除率为 59.90%,表现为协同作用;牦牛血低聚肽 - 鱼胶原低聚肽比例为 1 : 9 时, DPPH · 清除率为 70.40%,而鱼胶原低聚肽 (3 mg/mL) 的 DPPH · 清除率为 67.14%,也表现出协同作用。而牦牛血低聚肽 - 大豆低聚肽比例为 9 : 1 时, DPPH · 清除率为 82.57%,牦牛血低聚肽 (3 mg/mL) DPPH · 清除率为 91.41%;牦牛血低聚肽 - 鱼胶原低聚肽比例为 9 : 1 时, DPPH · 清除率为 88.88%,牦牛血低聚肽 (3 mg/mL) 的清除率为 91.41%,表现为抗氧化拮抗作用。

表 2 不同来源低聚肽体外抗氧化活性的 IC₅₀ 值

不同来源低聚肽	IC ₅₀ (mg/mL)					
	还原力	脂质过氧化抑制能力	·OH 清除率	ABTS ⁺ · 清除率	DPPH · 清除率	总抗氧化力
牦牛血低聚肽	3.15 ± 0.24aA	2.30 ± 0.15aA	0.76 ± 0.044aA	1.97 ± 0.112bB	1.84 ± 0.15aA	2.67 ± 0.22aA
大豆低聚肽	3.62 ± 0.18bA	6.21 ± 0.34bB	1.84 ± 0.11cC	1.54 ± 0.107aA	4.10 ± 0.39cB	12.32 ± 0.14cC
鱼胶原低聚肽	3.48 ± 0.12abA	2.73 ± 0.17aA	1.43 ± 0.094bB	1.65 ± 0.143aA	2.49 ± 0.27bA	7.64 ± 0.59bB

注:同列数据后不同大、小写字母分别表示差异极显著 ($P < 0.01$)、显著 ($P < 0.05$)。表 3 至表 5 同。

表 3 DPPH 模型中不同来源低聚肽组合的理论值和试验值

混合低聚肽 (3 mg/mL)	混合比例 (体积比)	IC _{50 mix} (mg/mL)	实测 DPPH · 清除率 (%)
牦牛血低聚肽 - 大豆低聚肽	1 : 9	3.65 ± 0.34dC	62.55 ± 1.17
	3 : 7	3.00 ± 0.27cB	66.21 ± 1.35
	1 : 1	2.54 ± 0.22bAB	70.71 ± 0.64
	7 : 3	2.14 ± 0.22abA	76.13 ± 0.85
	9 : 1	1.95 ± 0.16aA	82.57 ± 0.75
牦牛血低聚肽 - 鱼胶原低聚肽	1 : 9	2.40 ± 0.25bA	70.40 ± 0.67
	3 : 7	2.25 ± 0.22abA	78.47 ± 0.99
	1 : 1	2.10 ± 0.20abA	80.49 ± 0.63
	7 : 3	2.00 ± 0.18aA	84.30 ± 0.62
	9 : 1	1.89 ± 0.16aA	88.88 ± 2.07

ABTS 模型中不同来源低聚肽组合的理论值和试验值见表 4。从表 2、表 4 可以看出,在 ABTS 模型中,大部分组合低聚肽均表现出协同作用,与 DPPH 模型不同,组合低聚肽中的牦牛血低聚肽的比例越高协同作用越低,如牦牛血低聚肽-大豆低聚肽比例为 9:1、7:3、1:1 时,IC_{50 mix} 均低于牦牛血低聚肽的 IC₅₀,表现为协同作用;牦牛血低聚肽-鱼胶原低聚肽比例为 9:1、7:3、1:1 时,IC_{50 mix} 均低于牦牛血低聚肽的 IC₅₀,也表现为协同作用。但是,牦牛血低聚肽-大豆低聚肽比例为 3:7、1:9 时,IC_{50 mix} 均高于大豆低聚肽的 IC₅₀,牦牛血低聚肽-鱼胶原低聚肽比例为 3:7、1:9 时,IC_{50 mix} 均高于鱼胶原低聚肽的 IC₅₀ 值,表现为拮抗作用。在牦牛血低聚肽-大豆低聚肽组合中,1:9 组合和 9:1 组合的 IC_{50 mix} 差异极显著;3:7 组合和 9:1 组合的 IC_{50 mix} 差异显著;1:1 组合、7:3 组合和 9:1 组合的 IC_{50 mix} 差不显著,说明在牦牛血低聚肽中添加一定比例的大豆低聚肽可显著提高其对 ABTS⁺ 的清除能力。在牦牛血低聚肽-鱼胶原低聚肽组合中,所有组合之间的 IC_{50 mix} 差异均不显著,说明大豆低聚肽较鱼胶原低聚肽对牦牛血低聚肽的协同作用更显著。试验测得

的 ABTS⁺·清除率结果与 IC_{50 mix} 结论一致。

脂质过氧化抑制能力模型中不同来源低聚肽组合的理论值和试验值见表 5。从表 2、表 5 可以看出,在脂质过氧化抑制能力模型中,大部分组合低聚肽均表现协同作用,如牦牛血低聚肽-大豆低聚肽比例为 1:9 时,IC_{50 mix} 为 5.31 mg/mL,较大豆低聚肽的 IC₅₀ 低;牦牛血低聚肽-鱼胶原低聚肽比例为 1:9 时 IC_{50 mix} 为 2.68 mg/mL,而鱼胶原低聚肽的 IC₅₀ 为 2.73 mg/mL,也表现出协同作用。与 DPPH 模型类似,牦牛血低聚肽-大豆低聚肽比例为 1:1 时,IC_{50 mix} 为 3.36 mg/mL,远低于大豆低聚肽的 IC₅₀ (6.21 mg/mL),但是高于牦牛血低聚肽的 IC₅₀ (2.30 mg/mL),从大豆低聚肽的角度考虑表现为协同作用,从牦牛血低聚肽的角度考虑表现为拮抗作用;随着牦牛血低聚肽所占比例的增加,混合低聚肽的 IC_{50 mix} 降低,其中 1:1 混合低聚肽和 7:3 混合低聚肽差异显著,1:1 混合低聚肽和 9:1 混合低聚肽差异极显著;7:3 混合低聚肽和 9:1 混合低聚肽差异不显著,说明增加牦牛血低聚肽的比例可增加协同作用。混合低聚肽的 DPPH·清除率验证试验也得出了相似的结论。

表 4 ABTS 模型中不同来源低聚肽组合的理论值和试验值

混合低聚肽 (3 mg/mL)	混合比例 (体积比)	IC _{50 mix} (mg/mL)	实测 ABTS ⁺ ·清除率 (%)
牦牛血低聚肽-大豆低聚肽	1:9	1.57 ± 0.94aA	94.86 ± 2.21
	3:7	1.65 ± 0.12abAB	89.28 ± 0.83
	1:1	1.73 ± 0.14abcAB	87.84 ± 2.52
	7:3	1.82 ± 0.16bcAB	86.87 ± 2.36
	9:1	1.92 ± 0.15cB	84.26 ± 4.76
牦牛血低聚肽-鱼胶原低聚肽	1:9	1.68 ± 0.97aA	90.60 ± 1.67
	3:7	1.73 ± 0.15aA	88.93 ± 1.65
	1:1	1.80 ± 0.13aA	75.00 ± 3.36
	7:3	1.86 ± 0.12aA	71.91 ± 1.90
	9:1	1.94 ± 0.16aA	69.84 ± 1.79

表 5 脂质过氧化抑制能力模型中不同来源低聚肽组合的理论值和试验值

混合低聚肽 (3 mg/mL)	混合比例 (体积比)	IC _{50 mix} (mg/mL)	实测脂质过氧化抑制率 (%)
牦牛血低聚肽-大豆低聚肽	1:9	5.31 ± 0.30dD	27.81 ± 0.55
	3:7	4.11 ± 0.25cC	31.80 ± 0.39
	1:1	3.36 ± 0.21bB	33.72 ± 0.93
	7:3	2.84 ± 0.18aAB	40.45 ± 0.95
	9:1	2.45 ± 0.16aA	41.72 ± 0.75
牦牛血低聚肽-鱼胶原低聚肽	1:9	2.68 ± 0.17bA	25.41 ± 0.17
	3:7	2.56 ± 0.16abA	33.92 ± 0.46
	1:1	2.50 ± 0.16abA	39.05 ± 0.94
	7:3	2.41 ± 0.16abA	41.52 ± 0.75
	9:1	2.34 ± 0.15aA	42.51 ± 0.76

2.3 牦牛血低聚肽稳定性

2.3.1 处理环境对牦牛血低聚肽稳定性影响 温度对牦牛血低聚肽稳定性影响的试验结果见图 1-A。温度为 20~60℃ 时,牦牛血低聚肽对·OH 清除活性保持率随水浴加热时间的延长无明显变化;而温度为 80~100℃ 时,牦牛血低聚肽的·OH 清除活性保持率随水浴加热时间的延长呈明显降低趋势;然而,100℃ 水浴热处理 5 h 后的牦牛血低聚肽仍有

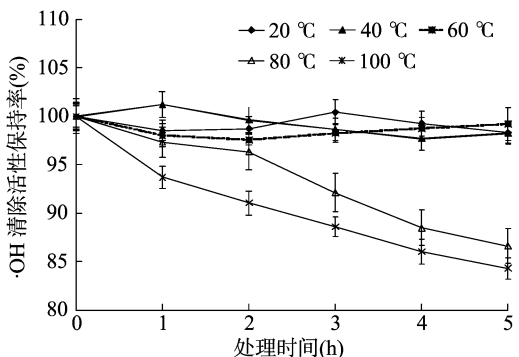
84.32% 的·OH 清除活性,说明热处理在一定程度上破坏了牦牛血低聚肽的抗氧化活性,可能因为加热导致肽链断裂^[20],但有报道认为,加热可能使多肽中羰基与氨基缩合发生美拉德反应,生成一些抗氧化活性更强的物质^[21]。总之,牦牛血低聚肽具有一定程度的热耐受性,与刘丹等对秋刀鱼蛋白抗氧化肽以及鲢鱼鱼鳞胶原蛋白抗氧化肽的研究结果^[22-23]一致。

pH 值对牦牛血低聚肽稳定性影响的试验结果见图 1-B。当 pH 值为 6、8、10 时,即高 pH 值下牦牛血低聚肽的 $\cdot\text{OH}$ 清除活性保持率随 pH 值升高和处理时间延长变化不大;而低 pH 值条件下的 $\cdot\text{OH}$ 清除能力较差,随着 pH 值的下降以及处理时间的延长,牦牛血低聚肽的 $\cdot\text{OH}$ 清除活性保持率总体呈下降趋势。总之,牦牛血低聚肽对碱的耐受程度优于酸。这与河蚬^[24]、秋刀鱼^[22]抗氧化肽耐酸不耐碱的性质不符,可能是由于枯草芽孢杆菌的发酵使具有耐碱能力的抗氧化肽得以保留。

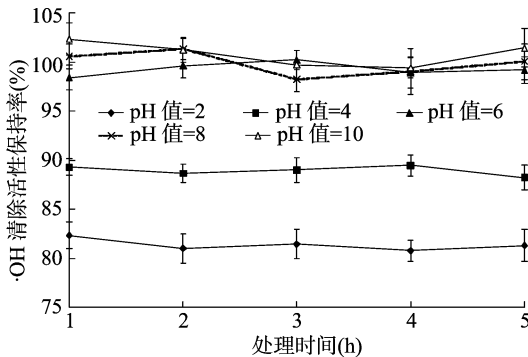
不同金属离子对牦牛血低聚肽稳定性的影响试验结果见图 1-C,各金属离子浓度为 5~500 mg/L 时,随着金属离子浓度的增加,牦牛血低聚肽抗氧化活性均总体呈下降趋势,对

牦牛血低聚肽抗氧化活性影响较大的是 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} ,当二者浓度达到 500 mg/L 时, $\cdot\text{OH}$ 清除活性保持率仅为 49.35%、46.15%。对牦牛血低聚肽抗氧化活性影响较小的是 K^{+} 、 Mg^{2+} ,当二者浓度达到 500 mg/L 时, $\cdot\text{OH}$ 清除活性保持率为 87.92%、66.14%。因此,在食品加工与贮藏过程中应尽量减少与铜、锌接触。

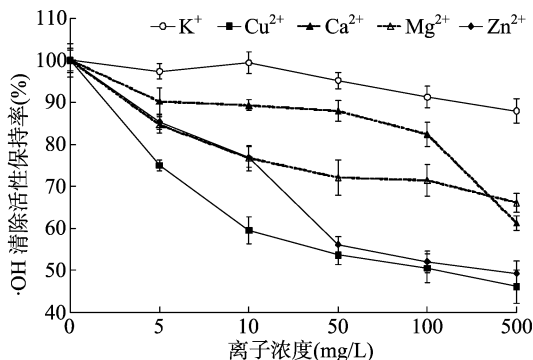
从图 1-D 可以看出,牦牛血低聚肽的 $\cdot\text{OH}$ 清除活性保持率随冻融次数增多而降低,可能与反复冻融诱发的蛋白质变性有关,有研究报道,牦牛血低聚肽反复冻融后出现轻微浑浊现象,离心后有少量白色沉淀物,可能是蛋白质变性析出所致^[25]。



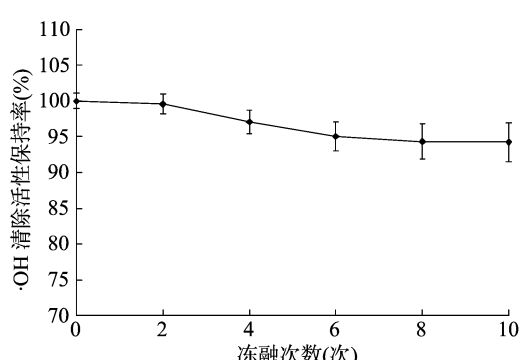
A. 温度对牦牛血低聚肽稳定性的影响



B. pH 值对牦牛血低聚肽稳定性的影响



C. 金属离子浓度对牦牛血低聚肽稳定性的影响



D. 冻融次数对牦牛血低聚肽稳定性的影响

图1 温度、pH 值、不同浓度金属离子及冻融次数对牦牛血低聚肽稳定性的影响

2.3.2 食品配制 对牦牛血低聚肽活性的影响从图 2-A 可以看出,随着 NaCl 添加量的增加,牦牛血低聚肽的 $\cdot\text{OH}$ 自由基清除活性保持率增高,说明 NaCl 对牦牛血低聚肽的 $\cdot\text{OH}$ 自由基清除活性有增效作用,特别是 NaCl 添加量为 0.5%~1.5% 时;而当 NaCl 添加量为 1.5%~2.5% 时,增效作用不明显。这与唐宁等的研究结果^[26]一致,可能因为 NaCl 吸附了低聚肽表面的部分电荷导致水化膜被破坏,使低聚肽的供氢体或供质子体充分暴露而更易与自由基结合,进而提高了对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力。

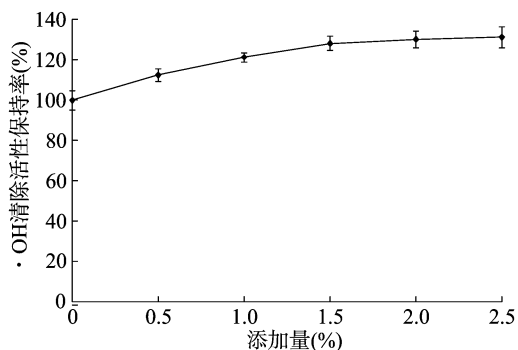
从图 2-B 可以看出,牦牛血低聚肽的 $\cdot\text{OH}$ 自由基清除活性保持率随葡萄糖浓度的增加总体呈下降趋势,当葡萄糖浓度为 2%~6% 时,对 $\cdot\text{OH}$ 清除能力的影响不明显;当葡萄糖浓度为 8%~10% 时,对 $\cdot\text{OH}$ 清除能力的影响明显。葡萄糖浓度为 10% 时, $\cdot\text{OH}$ 活性保持率仅为 65.11%,与陈日春等的研究结果^[23-24]一致。柠檬酸对牦牛血低聚肽的 $\cdot\text{OH}$

清除活性有明显抑制作用,但柠檬酸浓度变化对低聚肽的 $\cdot\text{OH}$ 清除活性影响不大。可能因为柠檬酸的添加导致溶液 pH 值降低,酸性条件抑制了牦牛血低聚肽对 $\cdot\text{OH}$ 自由基的清除能力,与前述得到的牦牛血低聚肽对酸不稳定的结论一致。

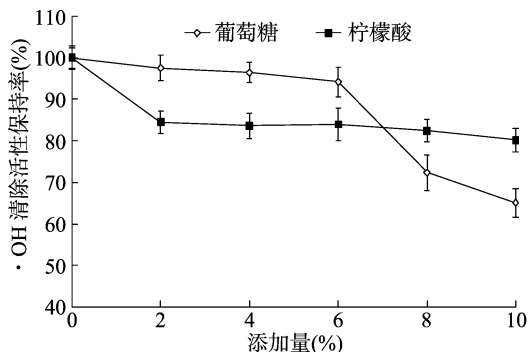
3 讨论与结论

3.1 牦牛血低聚肽的体外抗氧化活性

牦牛血低聚肽在总抗氧化能力、对 $\cdot\text{OH}$ 以及 DPPH \cdot 的清除能力、还原能力、对脂质过氧化抑制能力方面均优于大豆低聚肽以及鱼胶原低聚肽。牦牛血低聚肽具有良好的抗氧化活性,可能与牦牛血的高蛋白含量、菌酶联合发酵关键技术以及牦牛血低聚肽的氨基酸组成、肽序列、肽的结构等有关。You 等研究发现,ABTS \cdot 清除率和 DPPH \cdot 清除率相关性可能较低^[27]。这与本试验发现牦牛血低聚肽对 ABTS \cdot 的清



A. NaCl 对牦牛血低聚肽稳定性的影响



B. 葡萄糖、柠檬酸对牦牛血低聚肽稳定性的影响

图2 NaCl、葡萄糖、柠檬酸对牦牛血低聚肽稳定性的影响

除能力较弱,而对 DPPH· 的清除能力较好的结果一致。本试验采用体外化学评价方法进行抗氧化活性分析,而生物体内氧化过程极其复杂,因而化学评价显示的抗氧化活性较高的低聚肽未必在生物体内能取得良好的抗氧化效果。因此,需在化学评价方法的基础上进一步结合生物试验对牦牛血低聚肽的抗氧化活性进行评价,为将牦牛血低聚肽开发成商品化的保健食品及配料提供数据支持。

3.2 牦牛血低聚肽与其他食源性低聚肽的相互作用

食源性蛋白质酶解产生的低聚肽是一种肽的混合物,李艳伏研究发现,核桃粕蛋白酶解物对 O_2^- 清除率比对 ·OH 清除率高,而酶解物提纯后则相反^[28],说明混合肽之间可能存在相互作用,从而影响其抗氧化性。关于食源性低聚肽之间是否有相互作用的研究较少,本试验研究了 3 种不同来源食源性低聚肽的抗氧化相互作用,结果发现,同一比例组合在不同抗氧化模型中表现出的相互作用不同,如牦牛血低聚肽-大豆低聚肽的 1:9 和 3:7 组合和牦牛血低聚肽-鱼胶原蛋白低聚肽的 1:9 和 3:7 组合在 DPPH 模型和脂质过氧化抑制能力模型中均表现为抗氧化协同作用,而牦牛血低聚肽-大豆低聚肽的 1:9 和 3:7 组合和牦牛血低聚肽-鱼胶原蛋白低聚肽(1:9 和 3:7)组合在 ABTS 模型中表现为抗氧化拮抗作用。这可能是由于 3 种不同的抗氧化模型其原理不同导致的^[29]。3 种低聚肽两两组合的相互作用及抗氧化活性强弱受组合比例的影响,可能与主抗氧化剂(其中抗氧化活性较强的低聚肽)在组合中的比例有关,相互作用受组合中不同肽的比例含量影响^[30]。有研究报道,多种抗氧化活性成分可形成氧化还原循环系统,从而使抗氧化效果明显强于单一抗氧化剂^[31]。在 ABTS⁺ 自由基体系中,胡晓贤研究发现,甘氨酸-L-酪氨酸与脯氨酸-组氨酸-组氨酸、甘氨酸-L-酪氨酸和 L-丙氨酸-谷氨酰胺、谷胱甘肽(GSH)和双甘氨酸在不同浓度下均有微弱的协同增效作用($P < 0.05$),L-肌肽与其他小肽之间有微弱的拮抗作用,通过改变温度和添加溶剂,初步判断肽之间的相互作用可能是氢键和疏水键相互作用共同影响的结果^[32]。

3.3 牦牛血低聚肽的稳定性

生物活性肽在制备、贮藏运输和应用过程中可能因为外源添加物、共存物、环境 pH 值、加热等原因,发生一系列的物理化学变化,导致其生物活性下降甚至完全丧失,严重影响肽类产品的商品价值。因此,研究温度、pH 值、冻融次数、金属离子以及添加物对牦牛血低聚肽稳定性的影响就非常有必要

要^[33]。根据试验结果,高浓度的 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 会抑制牦牛血低聚肽抗氧化活性,葡萄糖和柠檬酸的共存会降低其抗氧化活性,因此不宜作为抗氧化剂用于果蔬罐头类食品。

3.4 结论

牦牛血低聚肽的 ·OH 清除活性对温度有较好的稳定性;在弱酸以及碱性条件比较稳定;少次的冻融对其活性影响不大;高浓度的 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 会抑制其活性;NaCl 对其活性有增效作用,葡萄糖、柠檬酸对其活性有明显抑制作用。牦牛血低聚肽具有较好的理化稳定性,可用作常规食品的抗氧化剂或功能食品配料。

不同食源性低聚肽的体外抗氧化活性不同,牦牛血低聚肽的抗氧化活性最强,优于鱼胶原低聚肽与大豆低聚肽。由于抗氧化模型原理不同,相同的食源性低聚肽组合在不同的体外抗氧化模型中的相互作用存在差异。3 种不同来源低聚肽两两组合后,大多数组合表现出抗氧化协同作用,且协同作用的强弱受不同低聚肽比例的影响;部分组合表现出较强的抗氧化拮抗作用。在牦牛血低聚肽体系中加入适当比例的大豆低聚肽和鱼胶原低聚肽,在 DPPH 模型和脂质过氧化抑制能力模型中并不能提高牦牛血低聚肽的抗氧化活性,在 ABTS 模型中却能提高其抗氧化活性,究其产生协同作用或拮抗作用的具体原因有待今后进一步研究阐明。

参考文献:

- [1] 杜 昕. 菌酶联合制备牦牛血抗氧化肽及其分离纯化的研究[D]. 雅安:四川农业大学,2016.
- [2] 魏雅萍,张才骏,杨荣珍,等. 大通家牦牛及含野血牦牛血清亲血色蛋白多态性的比较研究[J]. 草食家畜,1996(1):22-23.
- [3] Zhang T, Li Y H, Miao M, et al. Purification and characterisation of a new antioxidant peptide from chickpea (*Cicer arietium* L.) protein hydrolysates[J]. Food Chemistry, 2011, 128(1):28-33.
- [4] 王雪芹. 鲑鱼多肽的抗氧化活性与抗疲劳作用研究[D]. 青岛:中国科学院大学,2014.
- [5] 赵谋明,何 婷,赵强忠,等. 蓝园鲈抗氧化肽抗氧化稳定性研究[J]. 食品科学,2009,30(1):128-130.
- [6] 刘 丹. 大豆抗氧化活性肽的生物制备技术及稳定性研究[D]. 长春:吉林大学,2014.
- [7] 杨洁芳,刘会平,张 宇,等. 菌酶协同制备大豆肽的工艺优化及其抗氧化特性的研究[J]. 食品工业科技,2013,34(13):245-249.
- [8] Ts V S, Ngo D H, Kim J A, et al. An antihypertensive peptide from

- tilapia gelatin diminishes free radical formation in murine microglial cells[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(22):12193–12197.
- [9] 孙 宏. 菌酶协同处理棉籽粕的营养特性、棉籽肽的制备及其抗氧化活性研究[D]. 杭州:浙江大学,2013.
- [10] 姚晓红,吴逸飞,王 新,等. 菌酶协同制备菜籽肽工艺的优化及其营养成分分析[J]. 饲料工业,2011,32(18):47–51.
- [11] Jiang H W, Li H Y, Yu C W, et al. The evaluation of antioxidant interactions among 4 common vegetables using isobolographic analysis[J]. Journal of Food Science, 2015, 80(6):1162–1165.
- [12] Tian F, Li B, Jia B P, et al. Antioxidant and antimicrobial activities of consecutive extracts from *Galla chinensis*; the polarity affects the bioactivities[J]. Food Chemistry, 2009, 113(1):173–179.
- [13] 陈乃富. 蕨菜黄酮类化合物的提取及其抗氧化作用[J]. 食品与发酵工业, 2003(11):63–66.
- [14] 刘昭明,黄翠姬,孟陆丽,等. 核桃蛋白中性蛋白酶水解物的制备及其抗氧化活性研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(35):15696–15697, 15701.
- [15] 潘 瑶,郑时莲,邹兴平,等. 葡萄、芒果、草莓乙醇提取物抗氧化活性组分分析及其抗氧化相互作用[J]. 食品科学, 2017, 38(4):133–140.
- [16] 朱夕波. 鲨鱼皮和猪皮胶原蛋白及其抗氧化活性酶解物的特性研究[D]. 上海:上海海洋大学,2008.
- [17] Yang M, Shen Q, Li L Q, et al. Phytochemical profiles, antioxidant activities of functional herb *Abrus cantoniensis* and *Abrus mollis*[J]. Food chemistry, 2015, 177:304–312.
- [18] Luszczyk J J, Antkiewicz M L, Czuczwar S J. Isobolographic analysis of interactions between 1-methyl-1, 2, 3, 4-tetrahydroisoquinoline and four conventional antiepileptic drugs in the mouse maximal electroshock-induced seizure model[J]. European Journal of Pharmacology, 2009, 602(2/3):298–305.
- [19] 张 晖,唐文婷,王 立,等. 抗氧化肽的构效关系研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2013, 32(7):673–679.
- [20] Nicoli M C, Anese M, Parpinel M T, et al. Loss and/or formation of antioxidants during food processing and storage[J]. Cancer Letters, 1997, 114(1/2):71–74.
- [21] Zhu C Z, Zhang W G, Kang Z L, et al. Stability of an antioxidant peptide extracted from Jinhua ham[J]. Meat Science, 2014, 96(2):783–789.
- [22] 刘 丹. 秋刀鱼蛋白抗氧化肽的分离纯化及其抗疲劳功效研究[D]. 广州:华南理工大学,2015.
- [23] 陈日春. 鲢鱼鱼鳞胶原蛋白肽的制备及其抗氧化活性的研究[D]. 福州:福建农林大学,2013.
- [24] 刘晶晶,王 焯,韩曜平,等. 河蚬抗氧化肽抗氧化稳定性研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(6):86–89.
- [25] Korzeniowska M, Cheung I W, Li-Chan E C. Effects of fish protein hydrolysate and freeze-thaw treatment on physicochemical and gel properties of natural actomyosin from Pacific cod[J]. Food Chemistry, 2013, 138(2/3):1967–1975.
- [26] 唐 宁,庄 红. 玉米抗氧化肽 Leu-Pro-Phe 抗氧化稳定性研究[J]. 中国食品学报, 2015, 15(2):49–55.
- [27] You S J, Udenigwe C C, Aluko R E, et al. Multifunctional peptides from egg white lysozyme[J]. Food Research International, 2010, 43(3):848–855.
- [28] 李艳伏. 核桃粕多肽提取分离及功能特性研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2008.
- [29] Labrigne E P, Georgiou G A. Stop-flow method for assessment of pH and time effect on the ABTS total antioxidant capacity assay[J]. Analytica Chimica Acta, 2004, 526(1):63–68.
- [30] Ip C, Thompson H J, Zhu Z J, et al. In vitro and in vivo studies of methylseleninic acid: Evidence that a monomethylated selenium metabolite is critical for cancer chemoprevention[J]. Cancer Research, 2000, 60(11):2882–2886.
- [31] Pinelo M, Manzocco L, Nunez M J, et al. Interaction among phenols in food fortification: negative synergism on antioxidant capacity[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(5):1177–1180.
- [32] 胡晓赞. 小肽抗氧化性及协同作用研究[D]. 无锡:江南大学,2012.
- [33] Cheetangdee N. Effects of rice bran protein hydrolysates on the physicochemical stability of oil-in-water emulsions[J]. Journal of Oleo Science, 2014, 63(12):1231–1241.
- (上接第 223 页)
- Life Sciences), 2013, 940:142–149.
- [19] Yao W, Luo X, Hu Y. Determination of amantadine sulfate in sodium chloride injection by capillary gas chromatography[J]. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, 2006, 60(3):138–143.
- [20] Ho C, Wong Y T. Fast and high throughput screening of amantadine in chicken muscle by extractive derivatization with pentafluorobenzoyl chloride and gas chromatography/negative ion chemical ionization-tandem mass spectrometry[J]. Journal of AOAC International, 2014, 97(4):1220–1224.
- [21] Berendsen B J, Wegh R S, Essers M L, et al. Quantitative trace analysis of a broad range of antiviral drugs in poultry muscle using column-switch liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2012, 402(4):1611–1623.
- [22] Xu L, Peng S, Liu L, et al. Development of sensitive and fast immunoassays for amantadine detection[J]. Food and Agricultural Immunology, 2016, 27(5):678–688.
- [23] Wu S, Zhu F, Hu L, et al. Development of a competitive immunochromatographic assay for the sensitive detection of amantadine in chicken muscle[J]. Food Chemistry, 2017, 232:770–776.
- [24] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京:科学出版社,1999:56–60.
- [25] 姚静静,胡晓飞,韩俊岭,等. 伏马菌素 B1 单克隆抗体的制备及免疫学检测方法初步应用[J]. 畜牧兽医学报, 2016, 47(5):1009–1017.