

藏羊血多肽制备工艺优化及其抗氧化活性

刘鑫¹, 赵成周², 韩丽娟³, 罗唐君¹, 桂林生³, 侯生珍³, 陈秀梅¹, 孙胜男^{1*}

(1. 青海大学 药理学系, 青海 西宁 810001; 2. 青海大学 藏医学院, 青海 西宁 810016; 3. 青海大学 农牧学院, 青海 西宁 810016)

摘要: 以藏羊血液为原料, 通过优化酶解条件, 制备藏羊血多肽并分析其抗氧化活性。使用风味蛋白酶、碱性蛋白酶、中性蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶和胰蛋白酶分别对藏羊血液进行水解, 并以水解度为指标筛选适宜蛋白酶, 在此基础上, 研究酶解时间、加酶量、酶解温度、料液比和 pH 值对水解度的影响; 采用响应面分析法对酶解参数进行优化; 使用中高压液相色谱对血肽进行初步分离纯化和制备, 以 DPPH 自由基和 ABTS⁺ 自由基清除率试验探究藏羊血多肽的体外抗氧化活性。结果表明, 藏羊血多肽最佳水解酶为风味蛋白酶, 最佳酶解条件为水解时间 5 h、酶解温度 56 °C、料液比 1:7 (mg/mL)、加酶量 1 050.00 U/g。在此条件下, 水解度可达 (54.90±0.32)%; 体外抗氧化试验结果显示, 藏羊血多肽粗品在高浓度时对 DPPH 自由基和 ABTS⁺ 自由基的清除率分别可达阳性对照 V_C 的 77% 和 87%, IC₅₀ 分别为 (17.97±1.07) mg/mL 和 (14.36±0.63) mg/mL, 使用 SpHerical C18 色谱柱将藏羊血肽分离为 10 个组分, 分离后的组分 Fr3 显示出较好的抗氧化活性, 超过阳性对照。

关键词: 藏羊血; 多肽; 风味蛋白酶; 水解度; 分离纯化; 抗氧化能力

Optimization of the Preparation Process of Tibetan Sheep Blood Peptide and Its Antioxidant Activity

LIU Xin¹, ZHAO Chengzhou², HAN Lijuan³, LUO Tangjun¹, GUI Linsheng³, HOU Shengzhen³,
CHEN Xiumei¹, SUN Shengnan^{1*}

(1. Department of Pharmacy, Qinghai University, Xining 810001, Qinghai, China; 2. College of Tibetan Medicine, Qinghai University, Xining 810016, Qinghai, China; 3. College of Agriculture and Animal Husbandry, Qinghai University, Xining 810016, Qinghai, China)

Abstract: Tibetan sheep blood was used as the raw material to prepare blood peptides by optimizing the enzymatic hydrolysis conditions, and their antioxidant activity was analyzed. Flavor protease, alkaline protease, neutral protease, pepsin, papain, and trypsin were used to hydrolyze Tibetan sheep blood, with the degree of hydrolysis as the indicator for selecting the appropriate protease. On this basis, the effects of hydrolysis time, enzyme concentration, hydrolysis temperature, material-to-liquid ratio, and pH on the hydrolysis degree were investigated. The enzymatic hydrolysis parameters were optimized using response surface methodology. Blood peptides were preliminarily separated, purified, and prepared using medium-and high-pressure liquid chromatography, and their *in vitro* antioxidant activity was explored using DPPH and ABTS⁺ radical scavenging assays. The results showed that flavor protease was the optimal enzyme for hydrolyzing Tibetan sheep blood peptides, with the best hydrolysis conditions being a hydrolysis time of 5 h, a temperature of 56 °C, a material-to-liquid ratio of 1:7 (mg/mL), and an enzyme concentration of 105.00 U/g. Under these conditions, the degree of hydrolysis reached (54.90±0.32)%. The *in vitro* antioxidant activity results showed that, at high concentrations, the crude Tibetan sheep blood peptides exhibited DPPH and ABTS⁺ radical scavenging rates of 77% and 87%, respectively, compared to the positive control VC, with IC₅₀ values of (17.97±1.07) mg/mL and (14.36±0.63) mg/mL. The Tibetan sheep blood peptides were separated into 10 fractions using a spherical C18 column, with the Fr3 showing better antioxidant activity than the positive control.

Key words: Tibetan sheep blood; peptide; flavor protease; degree of hydrolysis; isolation and purification; antioxidant capacity

基金项目: 青海省“帅才科学家负责制”项目 (2022-NK-169-4); 青海大学大学生创新训练计划项目 (2024-QX-63)

作者简介: 刘鑫 (1999—), 男 (汉), 硕士研究生, 研究方向: 特色生物资源。

*通信作者: 孙胜男 (1988—), 女 (汉), 副教授, 博士, 研究方向: 特色生物资源。

引文格式:

刘鑫,赵成周,韩丽娟,等.藏羊血多肽制备工艺优化及其抗氧化活性[J].食品研究与开发,2025,46(5):114-121,211.
LIU Xin, ZHAO Chengzhou, HAN Lijuan, et al. Optimization of the Preparation Process of Tibetan Sheep Blood Peptide and Its Antioxidant Activity[J]. Food Research and Development, 2025, 46(5): 114-121, 211.

藏羊(Tibetan sheep)又叫西藏羊,是我国现存原始绵羊之一,也是青海省的主要畜种资源^[1]。羊血是藏羊屠宰加工的主要副产物,目前往往作为废弃物丢弃,不仅造成了珍贵资源的大量浪费,也带来了环境污染。因此,充分开发利用藏羊血液资源,变废为宝,是提高藏羊产业附加值的重要方式。

羊血富含蛋白质、铁、氨基酸、脂肪酸等,营养丰富,具有良好的功效,其中84.7%为粗蛋白^[2],以血细胞内含的血红蛋白为主,还有血浆中的纤维蛋白、白蛋白和各类球蛋白等,是优质的天然蛋白质来源,具有较大的开发潜力。近年来利用动物血液制备生物活性肽的研究较多:以鸡血为原料,以木瓜蛋白酶和黄酮酶酶解鸡血血红蛋白得到鸡血多肽,具有较好的抗氧化效果^[3];利用胰蛋白酶水解新鲜鹿血制备鹿血多肽,在高浓度时对羟自由基和DPPH自由基清除效果较好,可能含有抗氧化活性肽^[4];Nikhita等^[5]采用酶和酸水解法对鸡血血红蛋白进行水解,通过单因素和响应面法优化得到最佳条件为加酸量0.03%、温度50℃、时间32.0h,并通过DPPH自由基清除试验和血管紧张素转化酶抑制试验,验证其具有抗氧化和降压的活性。

目前,我国在羊血资源的开发利用方面,主要开展了血红素提取^[6]、血肽制备^[7]、超氧化物歧化酶分离^[8]等方面的研究。研究表明,羊血具有抗氧化、补血等功效,开发潜力较大,但对于高原特种藏羊血液的研究较少,且关键技术和活性尚不清晰,还需进一步探索。本研究以藏羊血液为原料,在筛选适宜水解酶基础上,以单因素筛选酶的适宜条件范围,采用响应面分析法优化酶解工艺条件,确定最佳酶解工艺,并对藏羊血多肽进行分离纯化,探讨其体外抗氧化活性,以期对藏羊血液资源的综合利用、提高产品附加值、促进青海省藏羊产业高质量发展提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

1.1.1 主要材料与试剂

藏羊血液:海晏金藏生态高原藏羊养殖繁育专业合作社提供。胰蛋白酶(25万U/g)、木瓜蛋白酶(80万U/g)、风味蛋白酶(1.5万U/g)、中性蛋白酶(5万U/g):北京索莱宝科技有限公司;碱性蛋白酶(10万U/g)、胃蛋白酶(3万U/g)、邻苯二甲醛:上海源叶生物科技有限公司;1,1-二苯基-2-苦肟基(1,1-di-

phenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)、2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS]:美国Sigma公司;亚硫酸钠:山东奥创化工有限公司;水杨酸、FeSO₄·H₂O₂:长春赛奥克生物科技有限公司。所用试剂均为分析纯。

1.1.2 主要仪器与设备

L530R 医用离心机:长沙湘仪离心机仪器有限公司;雷磁PHSI-5实验室pH计:上海仪电科学仪器股份有限公司;GHH-1数显恒温水浴锅:上海博迅实业有限公司;PIONEER™ 准微量天平:奥豪斯国际贸易(上海)有限公司;Spark 酶标仪:TECAN公司;SCIENTZ-10N 冷冻干燥机、BCG-16A 超声波清洗机:宁波新芝生物科技股份有限公司;NS4210 汉邦制备型高效液相色谱仪:江苏汉邦科技有限公司;N-1100V 旋转蒸发仪:日本东京理化公司;LC16 型高效液相色谱仪:日本岛津公司;Reprosil C18 AQ 色谱柱、SpHerical C18 色谱柱(50 μm, 50 mm×500 mm):迈德施(上海)分析仪器有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 藏羊血的预处理

收集新鲜屠宰藏羊血液,加入4%柠檬酸钠抗凝,经2层纱布过滤,放入-80℃超低温冰箱预冷冻,在冷冻干燥机冻干为血粉,备用。

1.2.2 藏羊血多肽的最适水解酶筛选

从中性蛋白酶、风味蛋白酶、木瓜蛋白酶、碱性蛋白酶、胃蛋白酶和胰蛋白酶中筛选最适水解酶。称取1g血粉于烧杯,以料液比为1:7(mg/mL)加入去离子水,置于恒温水浴锅中,调节至各酶适宜温度,以0.1mol/L的NaOH或HCl溶液调节至酶最适pH值,加酶量均为4%,在恒温水浴锅中酶解。各酶适宜酶解条件如表1所示。

表1 不同蛋白酶的水解条件

Table 1 Hydrolysis conditions of different proteases

序号	蛋白酶种类	适宜温度/℃	最适 pH 值	酶解时间/h
1	中性蛋白酶	50	7.0	5
2	风味蛋白酶	50	5.0	5
3	木瓜蛋白酶	50	6.0	5
4	碱性蛋白酶	37	10.0	5
5	胃蛋白酶	37	2.0	5
6	胰蛋白酶	37	8.0	5

反应期间不断向反应液中加入 NaOH 或 HCl 溶液,使酶解液的 pH 值基本稳定(± 0.1),反应 5 h 后,迅速转移到沸水浴中灭酶 10 min,终止水解反应。酶解液于 3 500 r/min 离心 20 min,取上清液,测定水解度,确定最适蛋白酶。

1.2.3 藏羊血多肽的酶解条件优化

称取适量血粉,在筛选最佳蛋白酶的基础上,以水解度为指标,依次考察 pH 值(5、6、7、8、9)、酶解时间(4、5、6、7、8 h)、酶解温度(40、45、50、55、60 °C)、料液比[1:6、1:8、1:10、1:12、1:14 (mg/mL)]和加酶量(300、600、900、1 200、1 500 U/g)对水解度的影响^[9]。

1.2.4 响应面优化试验

根据单因素试验结果,以酶解时间(A)、酶解温度(B)、料液比(C)和加酶量(D)为自变量,水解度为响应值(Y)设计四因素三水平响应面试验,试验的因素和水平见表 2。

表 2 响应面试验因素与水平
Table 2 Factors and levels of response surface test

水平	因素			
	A 酶解时间/h	B 酶解温度/°C	C 料液比/(mg/mL)	D 加酶量/(U/g)
-1	4	50	1:6	600
0	5	55	1:8	900
1	6	60	1:10	1 200

1.2.5 藏羊血多肽色谱分离

将藏羊血多肽酶解液冷冻干燥制备成粉,由于藏羊血多肽黏度较大,对色谱柱影响较大,故取 215.52 g 藏羊血多肽,将其加入硅胶层析柱进行滤过,去除其中黏度较大的杂质,溶剂为二氯甲烷:甲醇:水(7:3:0.5, 体积比),经旋转蒸发器干燥得到 72.32 g 藏羊血多肽粗样。使用中高压制备液相色谱,称取 72.02 g 粗滤样品,采用固体上样法进行测定,使用 SpHerical C18 色谱柱,甲醇(流动相 B)线性上升溶于 0.10% 三氟乙酸色谱级水溶液(流动相 A),在 60 min 内 5% B 等度洗脱,在 60~720 min 以 5% B 至 100% B 梯度洗脱,在 720~960 min,使用 100% B 等度洗脱,洗脱液流速为 50.00 mL/min,在 210、254 nm 处监测洗脱液吸光度。

1.2.6 水解度的测定

采用邻苯二甲醛(o-phthalaldehyde, OPA)法测定蛋白水解度(degree of hydrolysis, DH)^[10-11]。根据 GB 5009.5—2016《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》,采用凯氏定氮法测定藏羊血粉以及藏羊血多肽水解液的蛋白质含量,取藏羊多肽水解液 1 μ L,用去离子水稀释 1 000 倍,取 40 μ L 稀释液加入到 300 μ L 的 OPA 试剂中,反应 2 min,在 340 nm 处测定吸光度。

以丝氨酸为对照品制备标准曲线^[12]。配制 0.8 mg/L 丝氨酸标准溶液,采用倍比稀释法将其浓度分别稀

为 0.40、0.20、0.10、0.05、0.01 mg/mL,各吸取 40 μ L,分别加入 OPA 试剂 300 μ L,混合均匀,反应 2 min 后,在 340 nm 下测定吸光度,以丝氨酸浓度为横坐标,吸光度为纵坐标绘制标准曲线。根据丝氨酸的标准曲线回归方程,计算酶解液中游离氨基的浓度。水解度计算公式如下。

$$H = \frac{C}{N} \times 100$$

式中:H 为水解度,%;C 为水解液游离氨基浓度,mg/mL;N 为水解液氮含量,mg/mL。

1.2.7 抗氧化能力测定

采用体外抗氧化模型对最优工艺条件下制备的藏羊血多肽进行抗氧化能力测定。以维生素 C(vitamin C, V_C)为阳性对照,分别配制不同浓度的多肽样品和 V_C 溶液,研究多肽对 DPPH· 和 ABTS⁺· 的清除能力。

1.2.7.1 DPPH·清除能力测定

参考文献^[13]方法,略有修改。配制浓度为 2 mmol/L 的 DPPH 乙醇溶液,避光存储。取不同浓度的藏羊血多肽溶液或 V_C 溶液 100 μ L 至 96 孔板中,加入 DPPH 储备液 100 μ L 混合,室温条件下避光反应 30 min,在 517 nm 处检测吸光度。DPPH· 的清除能力(X,%)计算公式如下。

$$X = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3}\right) \times 100$$

式中:A₁ 为藏羊血多肽或 V_C 溶液的吸光度;A₂ 为藏羊血多肽或 V_C 与无水乙醇混合反应后的吸光度;A₃ 为去离子水与 DPPH 溶液混合反应后的吸光度。

1.2.7.2 ABTS⁺自由基清除能力测定

将 5 mmol/L 的 ABTS 溶液与 7 mmol/L 的 K₂S₂O₈ 溶液混合振荡,在室温下避光放置 12 h 以稳定自由基,用去离子水稀释 50 倍,制备自由基试剂^[14]。取不同浓度的藏羊血多肽溶液或 V_C 溶液 50 μ L 于 96 孔板中,分别加入 ABTS 储备液 200 μ L,混合,避光反应 6 min,测定 734 nm 处的吸光度。ABTS⁺ 自由基的清除能力(Y,%)计算公式如下。

$$Y = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

式中:A₁ 为藏羊血多肽或 V_C 溶液的吸光度;A₀ 为去离子水替代藏羊血多肽或 V_C 溶液后的吸光度。

1.3 数据统计与分析

试验数据采用 SPSS 进行数据分析、Graph Pad Prism.9.0.0.121 软件进行单因素试验作图,Design-Expert 11 软件进行响应面试验和方差分析,P<0.01 表示影响极显著。

2 结果与分析

2.1 藏羊血多肽最佳水解酶的筛选

不同酶对藏羊血多肽水解度的影响见图 1。

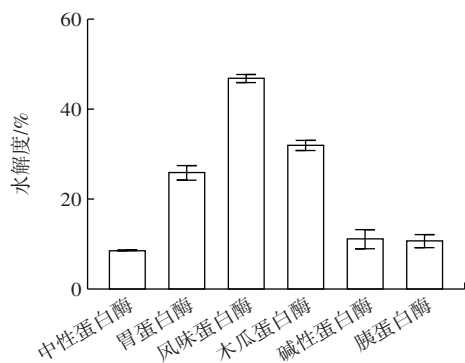


图1 不同酶对藏羊血多肽水解度的影响
Fig.1 Effect of different enzymes on the degree of hydrolysis of Tibetan sheep blood peptides

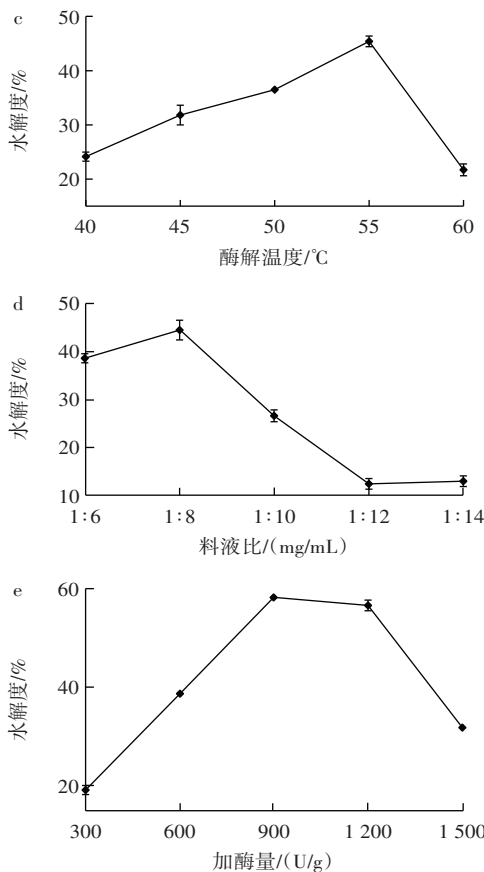
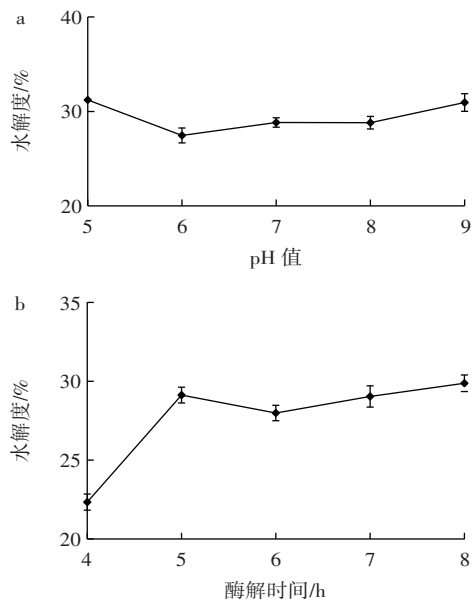
按照 GB 5009.5—2016 方法,采用凯氏定氮法测得藏羊干燥血粉中蛋白含量为 91.6%。由图 1 可知,各酶对血粉的水解度不同。以风味蛋白酶最佳,酶解 5 h 水解度可达 48%,木瓜蛋白酶和胃蛋白酶次之,依次为 31% 和 27%,高于碱性蛋白酶(26.97%)^[15]和胃蛋白酶(23.41%)^[16]对藏羊血血清蛋白酶解后的水解度。本研究采用风味蛋白酶对藏羊血进行酶解,水解度更高,对蛋白质的解离效果更好。同时,许多酶的活性容易受环境特别是 pH 值影响,而风味蛋白酶适宜的 pH 值较为稳定,且具有天然安全、可去除苦味、改善口感等优点^[17],因此本研究选用风味蛋白酶进行后续试验。

2.2 最佳酶解条件筛选

不同酶解条件对水解度的影响见图 2。

由图 2a 可知,在 pH5~9,随着碱性增强,水解度变化幅度不大,波动范围在 28%~31%,因此后续试验可忽略 pH 值的影响。

由图 2b 可知,酶解时间在 4~5 h,水解度随酶解时间延长明显升高,5 h 时水解度达到最大,为 29.87%。



a. pH 值; b. 酶解时间; c. 酶解温度; d. 料液比; e. 加酶量。

图 2 不同酶解条件对水解度的影响

Fig.2 Effect of different enzymatic conditions on the degree of hydrolysis

酶解时间继续延长,可反应的底物量减少,反应趋于平稳^[18],水解度波动不大。因此选用 4~6 h 进行响应面试验。

由图 2c 可知,酶解温度在 40~55 °C,水解度随酶解温度升高而增大,55 °C 时水解度达到最大,为 45.42%。继续升高温度,酶逐渐变性而失活,使酶解效率下降,水解度降低^[19]。因此选用 50~60 °C 进行响应面试验。

由图 2d 可知,料液比在 1:6~1:8 (mg/mL) 时,随着溶剂用量增加,水解度增大。在料液比为 1:8 (mg/mL) 时,水解度达到最大,为 44.53%。进一步增加溶剂用量,水解度下降明显。可能因为随着溶剂的增加,酶的比例减少,酶与底物接触受限,从而降低了酶促反应效率^[20]。因此,选取料液比 1:6~1:10 (mg/mL) 进行响应面试验。

由图 2e 可知,加酶量在 300~900 U/g 时,随着加酶量提高,水解度升高明显,加酶量为 900 U/g 时,水解度达到最大,为 58.3%。继续提高酶量,水解度降低,可能是由于藏羊血蛋白分子与酶分子结合的位点有限,当结合位点被酶分子全部占用后,增加酶量意义不大。

同时,从成本角度考虑,酶用量不宜过多^[21-22]。因此,选取加酶量 600~1 200 U/g 进行响应面试验。

2.3 响应面试验优化与验证结果

在单因素试验的基础上,以酶解时间、酶解温度、料液比和加酶量为考察因素优化酶解条件,结果如表 3 所示。

表 3 试验方案及结果
Table 3 Experimental program and results

序号	因素				水解度/%
	A 酶解时间/h	B 酶解温度/℃	C 料液比/(mg/mL)	D 加酶量/(U/g)	
1	5	55	1:6	600	40.07
2	4	55	1:8	600	33.46
3	4	55	1:6	900	41.49
4	5	60	1:8	600	43.87
5	4	55	1:10	900	24.83
6	4	55	1:8	1 200	38.11
7	5	50	1:8	1 200	49.72
8	6	50	1:8	900	42.49
9	5	50	1:8	600	34.97
10	5	55	1:8	900	48.62
11	5	55	1:8	900	50.44
12	5	60	1:10	900	30.69
13	5	55	1:8	900	50.35
14	6	60	1:8	900	37.05
15	5	55	1:10	600	33.16
16	5	55	1:10	1 200	33.25
17	5	55	1:6	1 200	54.66
18	5	50	1:6	900	40.33
19	6	55	1:8	1 200	43.36
20	5	50	1:10	900	35.70
21	6	55	1:8	600	41.57
22	6	55	1:10	900	34.04
23	5	60	1:6	900	48.98
24	5	60	1:8	1 200	43.61
25	5	55	1:8	900	50.70
26	5	55	1:8	900	51.03
27	6	55	1:6	900	43.41
28	4	50	1:8	900	31.74
29	4	60	1:8	900	33.51

水解度模型方程为 $Y=52.08+2.95A+0.743 4B+6.44C+3.51D-1.8AB-1.86AC-0.715 0AD+3.45BC-3.75BD+3.66CD-8.4A^2-4.95B^2-8.31C^2-2.81D^2$ 。

方差分析见表 4。

由表 4 可知,模型的总回归极显著($p<0.01$),决定系数 R^2 为 0.982 9, R^2_{Adj} 为 0.965 8, R^2 与 R^2_{Adj} 接近于 1 且差值较小,说明响应面的优化程度好,失拟项不显著($p>0.05$),说明该模型可用于藏羊血多肽的最优制备

表 4 回归方程方差分析

Table 4 ANOVA for regression equation

方差来源	自由度	均方	F 值	p 值
模型	14	113.07	57.53	<0.000 1**
A 酶解时间	1	98.45	50.09	<0.000 1**
B 酶解温度	1	6.23	3.17	0.096 7
C 料液比	1	497.55	253.15	<0.000 1**
D 加酶量	1	139.07	70.75	<0.000 1**
AB	1	13	6.61	0.022 2*
AC	1	14.31	7.28	0.017 3*
AD	1	2.04	1.04	0.325 0
BC	1	49.25	25.06	0.000 2**
BD	1	56.33	28.66	0.000 1**
CD	1	55.37	28.17	0.000 1**
A ²	1	457.8	232.92	<0.000 1**
B ²	1	159	80.9	<0.000 1**
C ²	1	393.6	200.25	<0.000 1**
D ²	1	51.12	26.01	0.000 2**
残差	14	1.97		
失拟项	10	2.4	2.73	0.172 3
纯误差	4	0.877 9		
总和	28			

注: *表示影响显著($p<0.05$); **表示影响极显著($p<0.01$)。

工艺的模拟。模型中一次项 A、C、D 和二次项 A²、B²、C²、D² 对试验结果影响极显著($p<0.01$)。根据 F 值大小可知,各因素对藏羊血多肽水解度影响的主次顺序为 C>D>A>B,即料液比>加酶量>酶解时间>酶解温度。

两因素交互作用响应面图见图 3。

由图 3 可知,BC、BD、CD 的交互作用强于其余各组,BC 相互作用时,料液比 3D 结构陡峭且 2D 结构呈椭圆形,变化程度高于酶解温度,表明料液比相较于酶解温度更显著;BD 相互作用时,加酶量 3D 结构陡峭且 2D 结构呈椭圆形,幅度变化明显高于酶解温度,表明加酶量相较于酶解温度更显著;CD 交互作用时,料液比 3D 结构陡峭变化程度高于加酶量,且 2D 结构呈较为密集的椭圆状,表明料液比对水解度的影响远高于加酶量。

通过拟合回归方程计算,理论水解度最大可达 54.97%,制备藏羊血多肽的最佳工艺为酶解时间 5.12 h、酶解温度 55.67 ℃、料液比 1:6.75 (mg/mL)、加酶量 1 053.78 U/g。

为便于试验操作,将最佳酶解条件修正为酶解时间 5 h、酶解温度 56 ℃、料液比 1:7 (mg/mL)、加酶量 1 050.00 U/g。在该条件下开展验证试验,测得水解度为 (54.90±0.32)%,与预测值接近,表明此模型预测的

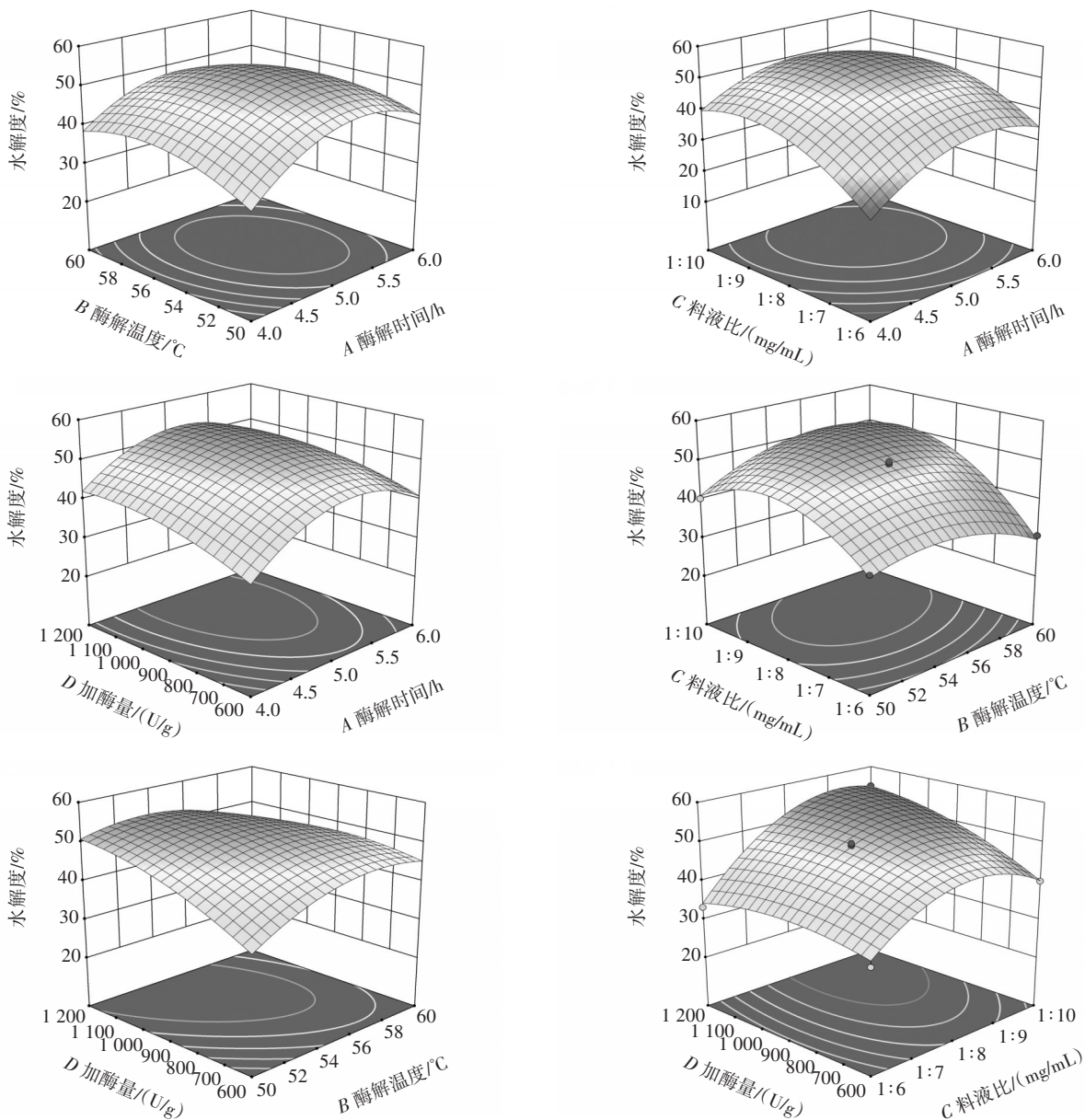


图3 两因素交互作用对水解度的影响

Fig.3 Effect of the interaction of two factors on the degree of hydrolysis

最优工艺条件与实际相符。

2.4 藏羊血多肽粗样抗氧化能力

藏羊血多肽粗样抗氧化能力见图4。

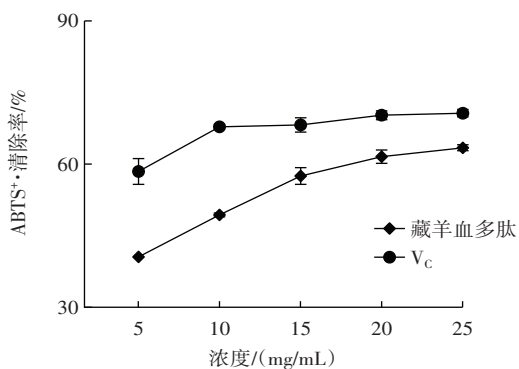
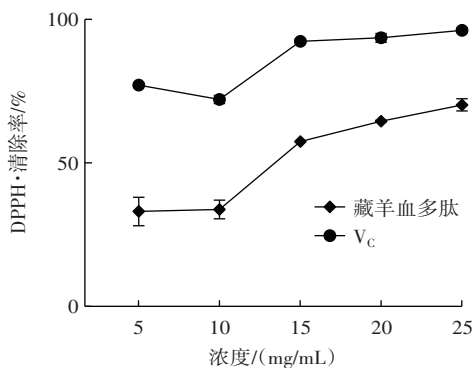


图4 藏羊血多肽抗氧化能力

Fig.4 Antioxidant capacity of Tibetan sheep blood peptides

由图4可知,藏羊血多肽浓度在5~25 mg/mL时,

对 DPPH· 和 ABTS⁺·清除能力与阳性对照 V_c 趋势一致,均随浓度升高而增大,清除率分别从 35.45% 升高到 70.68%,从 40.32% 升高到 63.75%。浓度为 25 mg/mL 时,对 DPPH· 和 ABTS⁺·清除能力分别达到 V_c 的 77% 和 87%,IC₅₀ 分别为 (17.97±1.07) mg/mL 和 (14.36±0.63) mg/mL,说明高浓度的多肽具有较好的抗氧化能力。

2.5 藏羊血多肽各组分抗氧化活性

使用旋转蒸发器干燥后得到样品共 47.85 g,回收率为 66.5%。使用 SpHerical C18 色谱柱分离制备,分离得到 10 个组分(Fr1~Fr10),其液相色谱图和抗氧化试验结果如图 5 和图 6 所示。

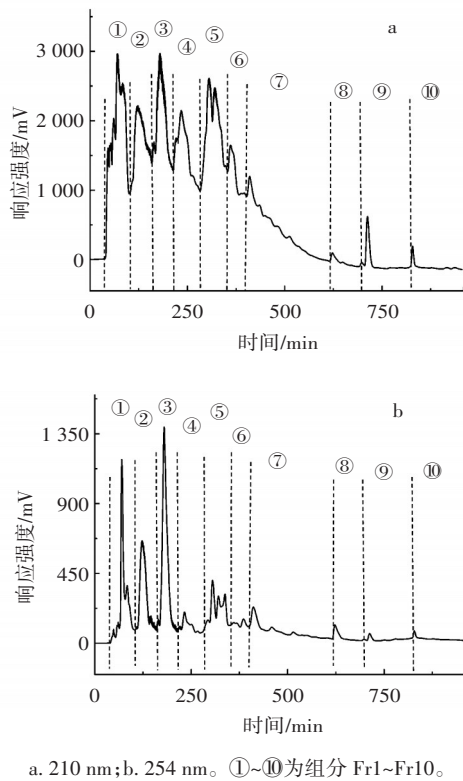
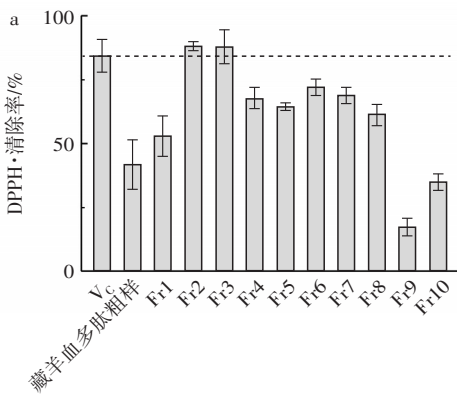
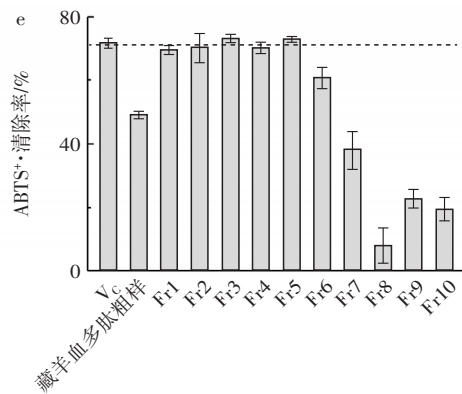
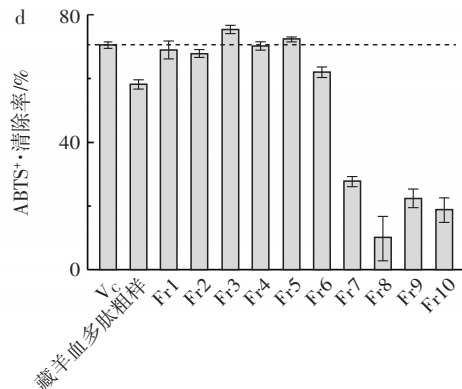
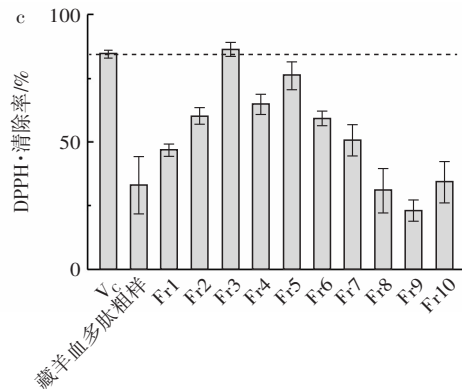
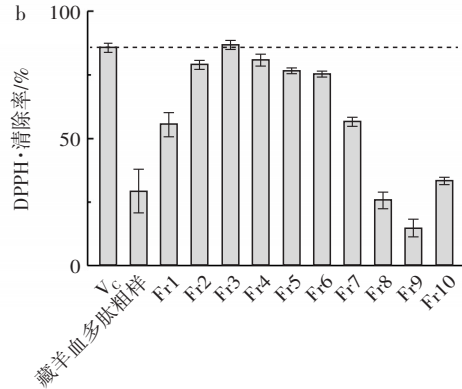


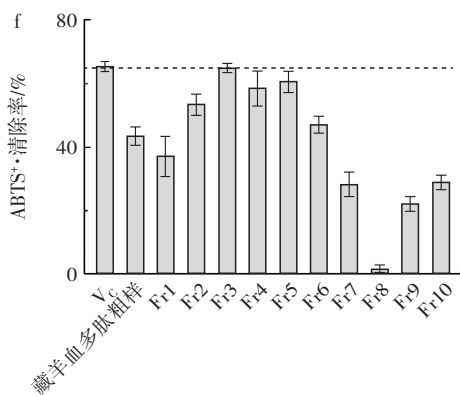
图 5 藏羊血多肽粗样液相色谱图

Fig.5 Liquid chromatography of crude samples of Tibetan sheep blood peptides



如图 6 所示,组分 Fr2~Fr5 与阳性对照相比, DPPH·清除能力超过阳性对照 90% 以上,组分 Fr2~Fr5 的 ABTS⁺·清除率均达阳性对照的 95%。其中 Fr3 的抗氧化活性在不同浓度时,DPPH· 和 ABTS⁺·清除能力均高于阳性对照,显示出较好的抗氧化活性。





a~c. 浓度为 5、2.5、1 mg/mL 时对 DPPH·清除率;d~f. 浓度为 5、2.5、1 mg/mL 时对 ABTS⁺·清除率。

图 6 藏羊血多肽粗样及各组分抗氧化能力

Fig.6 Antioxidant capacity of crude samples of Tibetan sheep blood peptides and each component

3 结论

本研究以藏羊血液为原料,采用单因素和响应面法优化藏羊血多肽的制备工艺,并进行体外抗氧化能力测定。结果显示,最佳蛋白酶为风味蛋白酶,最佳酶解条件为酶解时间 5 h、酶解温度 56 °C、料液比 1:7 (mg/mL)、加酶量 1 050.00 U/g。经测定,藏羊血肽粗样在高浓度时对 DPPH·和 ABTS⁺·的清除率分别可达阳性对照(V_c)的 77% 和 87%,IC₅₀分别为(17.97±1.07) mg/mL 和(14.36±0.63) mg/mL,分离后的组分 Fr3 显示出较好的抗氧化活性。本研究可为进一步探究藏羊血多肽的生物活性、开发和综合利用废弃畜血资源提供参考。

参考文献:

[1] 闫忠心, 靳义超, 白海涛, 等. 藏羊本品种选育研究现状与展望[J]. 青海畜牧兽医杂志, 2014, 44(4): 55.
YAN Zhongxin, JIN Yichao, BAI Haitao, et al. Present situation and prospect of breeding Tibetan sheep breeds[J]. Chinese Qinghai Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2014, 44(4): 55.

[2] 周成伟, 李芮洋, 李景敏, 等. 羊血的开发和利用[J]. 科技视界, 2019(13): 81-82.
ZHOU Chengwei, LI Ruiyang, LI Jingmin, et al. Development and utilization of sheep blood[J]. Science & Technology Vision, 2019 (13): 81-82.

[3] ZHENG Z J, SI D Y, AHMAD B, et al. A novel antioxidative peptide derived from chicken blood corpuscle hydrolysate[J]. Food Research International, 2018, 106: 410-419.

[4] 胡太超, 陶荣珊, 李庆杰, 等. 鹿血多肽的制备工艺及抗氧化能力研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(17): 107-110.
HU Taichao, TAO Rongshan, LI Qingjie, et al. Study on the preparation process and the antioxidant capacity of deer blood polypeptide[J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(17): 107-110.

[5] NIKHITA R, SACHINDRA N M. Optimization of chemical and enzymatic hydrolysis for production of chicken blood protein hydroly-

sate rich in angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activity[J]. Poultry Science, 2021, 100(5): 101047.

[6] 韩晴, 王维婷, 王守经, 等. 羊血亚铁血红素的酶法制备及抗氧化活性研究[J]. 食品科技, 2023, 48(3): 147-154.
HAN Qing, WANG Weiting, WANG Shoujing, et al. Enzymatic preparation and antioxidant activity of ferroheme from sheep blood[J]. Food Science and Technology, 2023, 48(3): 147-154.

[7] 曹效海, 王树林, 吴海燕, 等. 藏羊血液多肽制备的工艺研究[J]. 黑龙江畜牧兽医(上半月), 2016(8): 27-31.
CAO Xiaohai, WANG Shulin, WU Haiyan, et al. Technical study on the preparation of polypeptides from blood of Tibetan sheep[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2016(8): 27-31.

[8] SOUSA R S, MINERVINO A H H, OLIVEIRA F L C, et al. Impact of blood storage duration on hematologic, blood gas, biochemical, and oxidative stress variables in sheep undergoing allogeneic blood transfusions[J]. Veterinary Clinical Pathology, 2020, 49(4): 545-556.

[9] YANG J, HUANG J C, ZHU Z S, et al. Investigation of optimal conditions for production of antioxidant peptides from duck blood plasma: Response surface methodology[J]. Poultry Science, 2020, 99(12): 7159-7168.

[10] LI C Z, DANG J, LV Y, et al. The isolation and preparation of samwinol from *Dracocephalum heterophyllum* and prevention on Aβ₂₅₋₃₅-induced neuroinflammation in PC-12 cells[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(19): 11572.

[11] 罗艳华, 王全杰, 陈沛海, 等. 蛋白水解物水解度测定方法的研究[J]. 皮革与化工, 2017, 34(2): 26-31.
LUO Yanhua, WANG Quanjie, CHEN Peihai, et al. Study on determination method for hydrolyzed de gree of protein hydrolysate[J]. Leather and Chemicals, 2017, 34(2): 26-31.

[12] 力俊琛. 鸽血抗氧化肽的分离、结构鉴定及体外抗氧化活性评价[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2022.
LI Junchen. Isolation, structural identification and *in vitro* antioxidant activity evaluation of pigeon blood antioxidant peptides[D]. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2022.

[13] 王萍, 葛丽花. 阿魏酸低聚糖的体外抗氧化性质的研究[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(3): 8-11.
WANG Ping, GE Lihua. Study on antioxidation of feruloylated oligosaccharides[J]. Food Research and Development, 2007, 28(3): 8-11.

[14] DING C B, HAO M Q, MA S, et al. Identification of peptides with antioxidant, anti-lipoxygenase, anti-xanthine oxidase and anti-tyrosinase activities from velvet antler blood[J]. LWT - Food Science and Technology, 2022, 168: 113889.

[15] 李昕宇, 马金璞, 张玉璇, 等. 碱性蛋白酶水解羊血清蛋白的工艺研究[J]. 现代畜牧兽医, 2022(8): 26-30.
LI Xinyu, MA Jinpu, ZHANG Yuxuan, et al. Study on optimum conditions of hydrolyzation of sheep serum protein by alkaline protease[J]. Modern Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2022(8): 26-30.

[16] 张娅俐, 洪晶, 曹竝, 等. 胃蛋白酶水解藏羊血清蛋白工艺研究[J]. 安徽农业科学, 2022, 50(3): 174-177, 208.
ZHANG Yali, HONG Jing, CAO Hong, et al. Study on the process of gastric protease hydrolysis and serum protein in sheep[J]. Anhui Agricultural Science, 2022, 50(3): 174-177, 208.

[17] DU T H, HUANG J Q, XIONG S J, et al. Effects of enzyme treatment on the antihypertensive activity and protein structure of black sesame

- lian: Liaoning Normal University, 2023.
- [58] 解春芝. 基于氨基酸代谢的腐乳酱风味促熟及机理研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2019.
- XIE Chunzhi. Study on flavor ripening and mechanism of sufu sauce based on amino acid metabolism[D]. Guiyang: Guizhou University, 2019.
- [59] 冯笑笑. 豆浆关键挥发性异味成分的形成机制及加工工艺对豆浆风味影响的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2021.
- FENG Xiaoxiao. Study on the formation mechanism of key off-flavor compounds and the effect of processing on soymilk flavor[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2021.
- [60] 黄璐, 贡献, 佟硕秋, 等. 枯草芽孢杆菌 pckA 影响四甲基吡嗪合成的研究[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(12): 47-53.
- HUANG Lu, GONG Xian, TONG Shuoqi, et al. Effects of *Bacillus subtilis* pckA on the synthesis of tetramethylpyrazine[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(12): 47-53.
- [61] 吴娜, 王锡昌, 陶宁萍, 等. 动物源食品中脂质氧化降解对香气物质形成的作用[J]. 中国食品学报, 2016, 16(7): 209-215.
- WU Na, WANG Xichang, TAO Ningping, et al. Contribution of lipid oxidation and degradation to the formation of aroma compounds in animal-derived foods[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2016, 16(7): 209-215.
- [62] WANG Y Q, WANG H F, WU Y Y, et al. Insights into lipid oxidation and free fatty acid profiles to the development of volatile organic compounds in traditional fermented golden pomfret based on multivariate analysis[J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 171: 114112.
- [63] 臧金红. 酸鱼发酵过程中特征风味形成与微生物的关系研究[D]. 无锡: 江南大学, 2020.
- ZANG Jinhong. Study on the relationship between characteristic flavors formation and microorganisms in Suanyu fermentation[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2020.

加工编辑: 张昱

收稿日期: 2023-12-18

(上接第 121 页)

- seed (*Sesamum indicum* L.) after fermentation pretreatment[J]. Food Chemistry, 2023, 428: 136781.
- [18] 王铮, 赵宇, 高晓晨, 等. 鸿雁雁血多肽的制备及免疫调节作用的初步研究[J]. 食品工业科技, 2020, 41(13): 65-71.
- WANG Zheng, ZHAO Yu, GAO Xiaochen, et al. Preliminary study on preparation and immunomodulatory effect of *Anser cygnoides* blood protein peptide[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(13): 65-71.
- [19] CARRERA-ALVARADO G, TOLDRÁ F, MORA L. Bile acid-binding capacity of peptide extracts obtained from chicken blood hydrolysates using HPLC[J]. LWT-Food Science and Technology, 2023, 173: 114381.
- [20] LU Z Q, SUN N, DONG L, et al. Production of bioactive peptides from sea cucumber and its potential health benefits: A comprehensive review[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(25): 7607-7625.
- [21] 于志成, 黄福气, 许宙, 等. 碱性蛋白酶酶解酱油渣蛋白制备免疫活性肽[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(11): 125-130.
- YU Zhicheng, HUANG Fuqi, XU Zhou, et al. Optimized process of immuno-active peptides from soy sauce residue protein hydrolyzed by alkaline protease[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(11): 125-130.
- [22] 刘春阳, 白金波, 杨尚青, 等. 枳椇子多糖的酸提取工艺优化及其理化性质与抗氧化活性研究[J]. 食品与发酵工业, 2024, 50(9): 148-156.
- LIU Chunyang, BAI Jinbo, YANG Shangqing, et al. Optimization of acid extraction process for polysaccharide from *Hovenia dulcis* seed and analysis of its antioxidant activity[J]. Food and Fermentation Industries, 2024, 50(9): 148-156.

责任编辑: 冯娜

收稿日期: 2024-01-02