

双酶酶解鸽胸肉工艺优化及抗氧化性评价

Optimization of response surface methodology and evaluation of antioxidant activity of double-enzyme hydrolyzed pigeon brisket

沈畅华 杨娟 张远红 曾晓房

SHEN Chang-hua YANG Juan ZHANG Yuan-hong ZENG Xiao-fang

(仲恺农业工程学院轻工食品学院, 广东 广州 510225)

(College of Food Science and Technology, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou, Guangdong 510225, China)

摘要:目的:根据鸽肉酶解产物的水解度与抗氧化性,探究最佳酶解工艺条件。方法:以水解度与 ABTS 自由基清除率为评价指标,探讨酶种类、加酶量、pH 值、酶解温度、酶解时间、料液比和酶配比等因素对鸽胸肉酶解物抗氧化活性的影响,并对最优条件下制备的鸽肉酶解物进行总氨基酸含量测定。结果:中性蛋白酶与碱性蛋白酶为最佳复配用酶, $m_{\text{中性蛋白酶}} : m_{\text{碱性蛋白酶}}$ 为 3 : 1、加酶量 800 U/g、料液比($m_{\text{鸽肉}} : m_{\text{复合酶}}$) 为 1 : 1.5、pH 值 7.5、酶解温度 50 °C、酶解时间 3 h,所得样品在 1 mg/mL 质量浓度下对 ABTS 自由基清除率为 36.10%,与预测值相近。最佳工艺所制得的肽中共检出 16 种氨基酸,总氨基酸含量的 47.97% 为必需氨基酸,抗氧化活性氨基酸的占比为 29.27%。结论:该条件下制备的鸽肉肽具有一定的抗氧化活性与营养价值。

关键词: 鸽肉;酶解;抗氧化肽;响应面;氨基酸组成

Abstract: Objective: The enzymatic hydrolysis conditions of pigeon meat were optimized, according to the hydrolytic degree and the antioxidant activity of the hydrolysates. **Methods:** Using hydrolysis degree and ABTS free radical scavenging rate as evaluation indexes, the effects of enzyme type, enzyme addition amount, pH value, enzymatic hydrolysis temperature, enzymatic hydrolysis time, solid to liquid ratio and enzyme ratio on the antioxidant activity of pigeon brisket hydrolysate were investigated, and the total amino acid content of the hydrolysate

prepared under optimal conditions was determined. **Results:** Neutral protease and alkaline protease were the best compound enzymes. The enzyme ratio was 3 : 1, and the enzyme dosage was 800 U/g, with solid-liquid ratio of 1 : 1.5, hydrolyzed at pH value 7.5 and 50 °C for 3 h. The ABTS radical scavenging rate of the obtained samples was 36.10% at the concentration of 1 mg/mL, which was close to the predicted value. A total of 16 kinds of amino acids were detected in the peptide prepared by the optimal process. 47.97% of the total amino acids were essential amino acids, and the proportion of antioxidant amino acids was 29.27%. **Conclusion:** The pigeon meat peptide prepared under this condition has certain antioxidant activity and nutritional value.

Keywords: pigeon meat; enzymatic hydrolysis; antioxidant peptides; response surface; amino acid composition

生物活性肽通常是一种由 2~20 个氨基酸残基组成的活性小肽^[1],能够调节生物机体的生命活动以及生理活性,可受到多种方式的特异性切割而从前体蛋白中释放出来,其功能包括且不限于抗疲劳^[2]、抗氧化^[3]、抗衰老^[4]、降血压^[5]。其中抗氧化肽不仅能够供给人体必需氨基酸,还具备维持人体内环境稳定,提高机体酶活性与抗氧化能力等功能,拥有较大的研究价值与前景^[6]。目前,抗氧化肽的制备方法较多,主要包括化学/物理提取、微生物发酵、酸碱水解与蛋白酶水解等。其中提取与酸碱水解法存在成本高、副产物多的问题。因此在制备某类目标肽时,通常采用高性价比的蛋白酶酶解或微生物发酵法作为制备方法^[7-9]。

鸽肉富含氨基酸,蛋白质含量高而脂质含量低,且其脂肪酸与氨基酸构成非常符合人类的营养需求,是符合现代人健康营养需求的理想食品原料^[10-11]。研究拟以

基金项目:广东省科技厅项目(编号:2021B1212040013);广东省普通高校重点领域专项(乡村振兴)项目(编号:2020ZDZX1015);校级创新强校项目(编号:KA210318527)

作者简介:沈畅华,男,仲恺农业工程学院在读硕士研究生。

通信作者:曾晓房(1979—),男,仲恺农业工程学院教授,博士。
E-mail:59592743@qq.com

收稿日期:2022-06-12 **改回日期:**2022-12-31

鸽胸肉为原料,采用蛋白酶解法复配酶解制备抗氧化肽。从 4 种蛋白酶中筛选出产物抗氧化活性较高的酶作为复配用酶,结合响应面优化法对鸽肉复配酶解制备抗氧化肽的进行工艺优化,并对最佳条件下制备的鸽肉肽进行总氨基酸测定,以期对鸽肉的健康属性与潜在功能性价值研究提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鸽肉:取自 21 日龄的白羽王鸽,梅州金绿现代农业发展有限公司;

木瓜蛋白酶(800 U/mg)、中性蛋白酶(100 U/mg)、碱性蛋白酶(200 U/mg)、风味蛋白酶(20 U/mg)、ABTS、DPPH、四硼酸钠、乙醇、邻苯二甲醛、二硫代苏糖醇、丝氨酸、十二烷基硫酸钠:分析纯,上海源叶生物科技有限公司;

其余化学试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

紫外分光光度计:UV-1780 型,岛津仪器(苏州)有限公司;

真空冷冻干燥机:FD-1A-80 型,北京博医康实验仪器有限公司;

全自动氨基酸分析仪:L-8080 型,日立科学仪器有限公司;

水浴恒温振荡器:SHZ-B 型,上海博迅实业有限公司;

台式冷冻离心机:HR/T20M 型,湖南赫西仪器装备有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 鸽肉抗氧化肽制备工艺

取生鸽胸肉 30 g→除去明显脂肪与筋膜→绞碎→加入去离子水[料液比 1 : 2 (g/mL)]→酶解→高温灭酶(95 ℃,15 min)→4 ℃、10 000 r/min 离心 15 min 取上清液→抽滤→冻干

1.3.2 鸽胸肉复配酶解用酶筛选 分别以木瓜蛋白酶、风味蛋白酶、碱性蛋白酶、中性蛋白酶为酶解用酶,于各酶的最适反应温度与 pH 下对鸽胸肉进行酶解,其余条件参照曹廷锋等^[12-13]的方法,以各酶酶解产物的 DPPH 自由基清除率、ABTS 自由基清除率与羟自由基清除率的 IC₅₀ 值作为评价指标。

1.3.3 单因素试验

(1) 酶配比对鸽肉酶解的影响:固定加酶量 800 U/g,酶解时间 3 h,料液比($m_{\text{鸽肉}} : m_{\text{复合酶}}$)1 : 1.5,酶解温度 50 ℃,pH 值 8.0,考察 $m_{\text{中性蛋白酶}} : m_{\text{碱性蛋白酶}}$ (1 : 1,3 : 1,1 : 3,1 : 0,0 : 1)对鸽肉肽水解度与抗氧化性的影响。

(2) pH 值对鸽肉酶解的影响:固定酶量 800 U/g,酶

解时间 3 h,料液比($m_{\text{鸽肉}} : m_{\text{复合酶}}$)为 1 : 1.5,酶解温度 50 ℃, $m_{\text{中性蛋白酶}} : m_{\text{碱性蛋白酶}}$ 为 3 : 1,考察 pH 值(7.0,7.5,8.0,8.5,9.0)对鸽肉肽水解度与抗氧化性的影响。

(3) 料液比对鸽肉酶解的影响:固定加酶量 800 U/g,酶解时间 3 h,酶解温度 50 ℃, $m_{\text{中性蛋白酶}} : m_{\text{碱性蛋白酶}}$ 为 3 : 1,pH 值为 7.5,考察 $m_{\text{鸽肉}} : m_{\text{复合酶}}$ (1 : 0.5,1 : 1,1 : 1.5,1 : 2,1 : 2.5)对鸽肉肽水解度与抗氧化性的影响。

(4) 加酶量对鸽肉酶解的影响:固定酶解时间 3 h,酶解温度 50 ℃, $m_{\text{中性蛋白酶}} : m_{\text{碱性蛋白酶}}$ 为 3 : 1,pH 值为 7.5,料液比($m_{\text{鸽肉}} : m_{\text{复合酶}}$)为 1 : 1.5,考察加酶量(400,600,800,1 000,1 200 U/g)对鸽肉肽水解度与抗氧化性的影响。

(5) 酶解时间对鸽肉酶解的影响:固定加酶量 800 U/g,酶解温度 50 ℃, $m_{\text{中性蛋白酶}} : m_{\text{碱性蛋白酶}}$ 为 3 : 1,pH 值为 7.5,料液比($m_{\text{鸽肉}} : m_{\text{复合酶}}$)为 1 : 1.5,考察酶解时间(2.0,2.5,3.0,3.5,4.0 h)对鸽肉肽水解度与抗氧化性的影响。

1.3.4 响应面试验 根据单因素试验,选择加酶量、酶配比、pH 值、酶解时间 4 个因素作为响应面试验设计的自变量,由于相同浓度下样品的 ABTS 自由基清除率通常高于 DPPH 自由基清除率^[14],在样品浓度较低时能够更好地体现不同样品间抗氧化活性的区别;而水解度代表了鸽肉蛋白的酶解程度。因此,响应值选择鸽肉肽对 ABTS 自由基的清除率和水解度,对鸽胸肉制备抗氧化肽的最佳酶解工艺条件进行优化。

1.3.5 DPPH 自由基清除率测定 根据文献^[15]并加以改动。将样品溶液根据试验需要,以无水乙醇做溶剂配置不同浓度样品液。向试管中加入 2 mL 浓度为 0.2 mmol/L 的 DPPH—无水乙醇溶液,加入 2 mL 样品。空白组以相同体积无水乙醇代替样品与 DPPH—无水乙醇溶液混合;对照组则以无水乙醇代替 DPPH 溶液与样品液混合。每组混匀后于室温避光静置 30 min,测定 517 nm 处吸光值,并按式(1)计算 DPPH 自由基清除率。

$$C_{\text{DPPH}} = [1 - (A_i - A_j) / A_0] \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

C_{DPPH} ——DPPH 自由基清除率,%;

A_i ——样品组吸光度;

A_j ——对照组吸光度;

A_0 ——空白组吸光度。

1.3.6 鸽肉肽清除 ABTS 自由基能力测定 参照文献^[16-17]略作修改:将 ABTS 和过硫酸钾以 2.45 mmol/L 的终浓度稀释在水中制备为母液,暗处放置 16 h,取部分母液稀释,当稀释后母液的吸光度在 734 nm 处达到约 0.7 时可用。测试时,将 0.96 mL ABTS 自由基溶液与 0.04 mL 的 1 mg/mL 样品液混合,反应 3 min 后测量

734 nm 处吸光度,并按式(2)计算 ABTS 自由基清除率。

$$c_{ABTS} = [(A_0 - A_i) / A_0] \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

c_{ABTS} ——ABTS 自由基清除率,%;

A_i ——样品组吸光度;

A_0 ——空白组吸光度。

1.3.7 鸽肉肽清除羟自由基能力测定 参考文献[18—19]略作修改:将 2 mmol/L $FeSO_4$ 溶液、6 mmol/L 水杨酸溶液、6 mmol/L H_2O_2 各 1 mL 混匀,测定 510 nm 处吸光度。向反应体系中加入 1 mg/mL 样品,并按式(3)计算羟自由基清除率。

$$c_{\cdot OH} = [(A_0 - A_i) / A_0] \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

$c_{\cdot OH}$ ——羟自由基清除率,%;

A_i ——样品组吸光度;

A_0 ——空白组吸光度。

1.3.8 鸽肉酶解水解度测定 采用 OPA 法^[20],按式(4)计算水解度。

$$D_H = h / h_{tot} \times 100\%, \quad (4)$$

式中:

D_H ——水解度,%;

h ——断裂肽键数;

h_{tot} ——总肽键数,鸽肉取 7.6。

1.3.9 鸽肉肽总氨基酸含量测定 参照史晋源^[21]的方法并稍作修改:称取一定量的鸽肉肽,加入 6 mol/L HCl,充氮气后密封,110 °C 水解 24 h,用水定容至 1 mg/mL,过 0.22 μm 过滤膜,上样检测。氨基酸自动分析仪条件:柱温 40 °C;检测波长 338 nm;流速 1 mL/min;反应液为茚三酮;进样量 20 μL 。

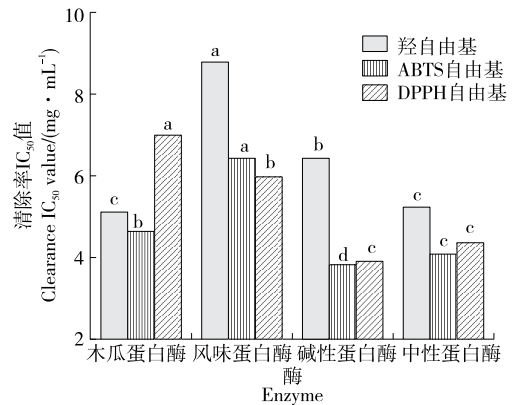
1.4 数据处理

采用 Excel 和 IBM SPSS Statistics 22.0 软件进行数据处理,结果用均值 \pm 标准差表示,均值比较利用 ANOVA 中的 Duncan 法,取 95% 置信度 ($P < 0.05$);采用 Origin 2018 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 蛋白酶筛选

由图 1 可知,4 种蛋白酶酶解产物的自由基清除能力差异显著 ($P < 0.05$)。在各蛋白酶酶解产物的抗氧化活性中,以中性蛋白酶最优,风味蛋白酶最差。其中中性蛋白酶清除羟自由基、ABTS 自由基、DPPH 自由基的 IC_{50} 值分别为 5.18, 4.08, 4.38 mg/mL。而碱性蛋白酶在清除羟自由基方面表现较差,但对其余两种自由基的清除能力较为优秀,因此选取中性蛋白酶与碱性蛋白酶作为后续酶解的复配用酶。



字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)

图 1 不同种类蛋白酶酶解鸽胸肉产物的抗氧化能力
Figure 1 Antioxidant capacity of different proteases in enzymolysis of pigeon breast products

2.2 响应面优化

2.2.1 试验设计与结果 选择加酶量、pH 值、酶配比和酶解时间 4 个因素作为自变量进行优化,以水解度和 ABTS 自由基清除率作为响应值进行响应面优化试验。各因素水平见表 1,试验设计及结果见表 2。

2.2.2 水解度响应面模型的建立与分析 由表 3 可知,模型 $P < 0.000 1$,极显著;失拟项 $P = 0.741 8 > 0.05$,表明未知因素对试验结果的影响较小,残差主要源于随机误差。模型的调整确定系数为 0.981 0,说明该模型能够解释 98.10% 的响应值变化,拟合程度良好,可以用于对鸽肉酶解的水解度进行分析和预测。各因素均对模型具有极显著影响 ($P < 0.01$)。

利用旋转试验设计软件得到回归方程为:

$$Y_1 = 47.77 + 2.07A + 0.766 7B + 0.429 2C - 0.461 7D + 0.737 5AB - 0.29AC - 0.315AD + 0.87BC + 0.092 5BD - 1.91CD - 3.89A^2 - 3.45B^2 - 3.10C^2 - 3.54D^2. \quad (5)$$

2.2.3 水解度响应面各因素交互作用分析 由图 2 可知,加酶量与酶解时间、酶解时间与 pH 值、酶配比与 pH 值的两因素交互作用对鸽肉酶解水解度的影响较为显著,与方差分析结果相匹配。

表 1 响应面因素水平设计

Table 1 Design factors and levels for response surface experiment

水平	A 加酶量/ ($U \cdot g^{-1}$)	B pH 值	C 酶配比 (m 中性蛋白酶 : m 碱性蛋白酶)	D 酶解 时间/h
-1	600	7.0	2 : 1	2
0	800	7.5	3 : 1	3
1	1 000	8.0	4 : 1	4

表 2 响应面试验设计及结果

Table 2 Response surface test design and results

试验号	A	B	C	D	Y ₁ 水解度/%	Y ₂ ABTS 自由基清除率/%
1	0	-1	0	-1	40.78	29.51
2	-1	1	0	0	38.42	28.81
3	0	1	-1	0	40.67	31.31
4	0	0	-1	1	42.15	32.61
5	1	0	0	1	41.51	31.32
6	1	0	1	0	42.82	32.55
7	0	0	0	0	47.98	36.33
8	1	1	0	0	44.59	34.17
9	0	1	1	0	43.04	32.05
10	0	0	0	0	47.33	35.53
11	0	0	0	0	48.56	35.94
12	0	1	0	1	41.01	31.41
13	1	0	0	-1	42.87	30.81
14	0	1	0	-1	41.68	30.97
15	0	0	1	-1	44.27	32.14
16	0	-1	1	0	39.61	30.57
17	0	-1	0	1	39.73	30.57
18	-1	0	1	0	39.81	28.96
19	0	0	0	0	47.61	35.74
20	0	0	-1	-1	39.52	28.25
21	1	-1	0	0	41.29	30.52
22	-1	0	0	1	38.01	29.68
23	-1	-1	0	0	38.07	29.53
24	-1	0	0	-1	38.12	28.08
25	0	0	0	0	47.35	36.46
26	0	-1	-1	0	40.72	30.41
27	1	0	-1	0	42.39	31.36
28	-1	0	-1	0	38.22	29.08
29	0	0	1	1	39.27	29.34

表 3 鸽肉肽水解度响应面试验结果方差分析[†]

Table 3 Variance analysis of response surface test results for pigeon meat peptide hydrolytic degree

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	288.61	14	20.61	104.31	<0.000 1	**
A	51.38	1	51.38	259.97	<0.000 1	**
B	7.05	1	7.05	35.69	<0.000 1	**
C	2.21	1	2.21	11.18	0.004 8	**
D	2.56	1	2.56	12.94	0.002 9	**
AB	2.18	1	2.18	11.01	0.005 1	**
AC	0.34	1	0.34	1.70	0.213 0	
AD	0.40	1	0.40	2.01	0.178 3	
BC	3.03	1	3.03	15.32	0.001 6	**
BD	0.03	1	0.03	0.17	0.683 6	
CD	14.55	1	14.55	73.65	<0.000 1	**
A ²	98.31	1	98.31	497.43	<0.000 1	**
B ²	77.40	1	77.40	391.63	<0.000 1	**
C ²	62.15	1	62.15	314.50	<0.000 1	**
D ²	81.37	1	81.37	411.72	<0.000 1	**
残差	2.77	14	0.20			
失拟值	1.70	10	0.17	0.64	0.741 8	
误差	1.06	4	0.27			
总离差	291.37	28				

[†] * 代表差异显著 ($P < 0.05$); ** 代表差异极显著 ($P < 0.01$)。

2.2.4 ABTS 自由基清除率的响应面模型的建立与分析

由表 4 可知,模型 $P < 0.000 1$,极显著;失拟项 $P = 0.828 4 > 0.05$,不显著,表明未知因素对试验结果的影响较小,残差主要来自随机误差。模型的调整确定系数为 0.984 2,说明该模型能够解释 98.42% 的响应值变化,拟合程度良好,可用于对鸽肉肽清除 ABTS 自由基的能力进行分析和预测。各因素均对模型具有显著影响 ($P < 0.05$)。

利用旋转试验设计软件得到回归方程为:

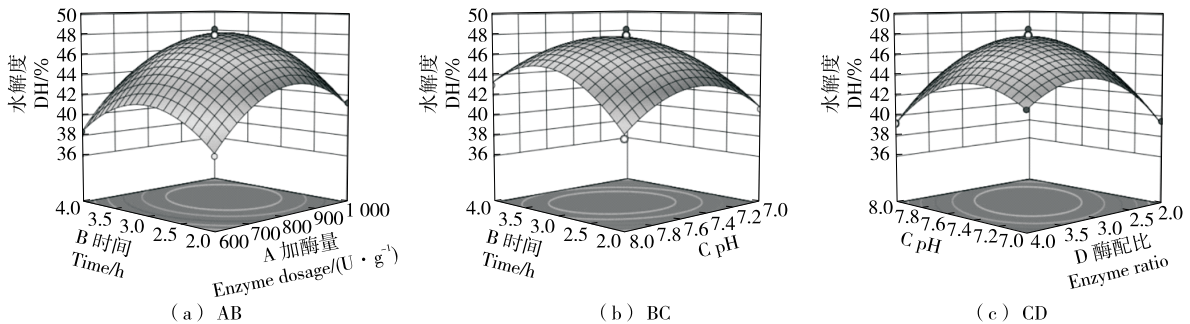


图 2 各因素间交互作用对鸽肉肽水解度的曲面图

Figure 2 Surface diagram of the interaction of various factors on the degree of hydrolysis of pigeon meat peptide

表 4 鸽肉肽清除 ABTS 自由基能力响应面试验结果方差分析[†]

Table 4 Variance analysis of response surface test results of pigeon peptide scavenging ABTS free radicals

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	173.00	14	12.36	125.27	<0.000 1	**
A	22.94	1	22.94	232.50	<0.000 1	**
B	4.83	1	4.83	48.92	<0.000 1	**
C	0.56	1	0.56	5.67	0.032 0	*
D	2.23	1	2.23	22.58	0.000 3	**
AB	4.77	1	4.77	48.40	<0.000 1	**
AC	0.43	1	0.43	4.35	0.055 8	
AD	0.30	1	0.30	3.01	0.104 6	
BC	0.08	1	0.08	0.85	0.371 5	
BD	0.10	1	0.10	0.97	0.340 4	
CD	12.82	1	12.82	129.92	<0.000 1	**
A ²	57.41	1	57.41	581.97	<0.000 1	**
B ²	35.97	1	35.97	364.68	<0.000 1	**
C ²	40.7	1	40.70	412.61	<0.000 1	**
D ²	58.28	1	58.28	590.81	<0.000 1	**
残差	1.38	14	0.10			
失拟值	0.77	10	0.08	0.50	0.828 4	
误差	0.61	4	0.15			
总离差	174.38	28				

† * 代表差异显著 (P<0.05); ** 代表差异极显著 (P<0.01)。

$$Y_2 = 36.00 + 1.38A + 0.634 2B + 0.215 8C + 0.430 8D + 1.09AB + 0.327 5AC - 0.277 5AD + 0.145BC - 0.155BD - 1.79CD - 2.97A^2 - 2.35B^2 - 2.51C^2 - 3.00D^2 \quad (6)$$

2.2.5 ABTS 自由基清除率响应面各因素交互作用分析

由图 3 可知,当一个因素的数值被固定时,随着另一因素水平的升高,响应值均呈先增大后减小的趋势,并在中间出现最大值,与单因素试验结果类似,在一定程度上证明了响应面试验结果的科学性。

2.2.6 实验验证 结合响应曲面进行优化分析,以水解度和 ABTS 自由基清除率作为响应值,响应值最大时,拟合得到鸽肉酶解的最优酶解工艺为加酶量 855.131 U/g,酶解时间 3.175 h, pH 值 7.542, $m_{\text{中性蛋白酶}} : m_{\text{碱性蛋白酶}}$ 为 2.998 : 1。在此条件下,软件预测水解度和 ABTS 自由基清除率分别为 48.14% 和 36.25%。实际操作中,将条件修改为加酶量 800 U/g,酶解时间 3 h, pH 值 7.5, $m_{\text{中性蛋白酶}} : m_{\text{碱性蛋白酶}}$ 为 3 : 1,此时水解度为 47.51%, ABTS 自由基清除率为 36.10%,与预测值较接近,说明预测较为准确,模型可行。

2.3 鸽肉肽中的总氨基酸含量

由表 5 可知,鸽肉肽中氨基酸种类齐全,除色氨酸外,其他所有人体必需氨基酸均被测出,且必需氨基酸占比较高为 47.97%,高于 FAO 建议值(40%);抗氧化氨基酸占比为 29.27%。鸽肉肽中谷氨酸含量较高,为 11.46%,有研究^[22]发现该氨基酸的侧链羧基能钝化金属离子,终止自由基链式反应;此外,疏水性氨基酸对肽的抗氧化活性存在一定影响,其总含量在鸽肉肽中占比较

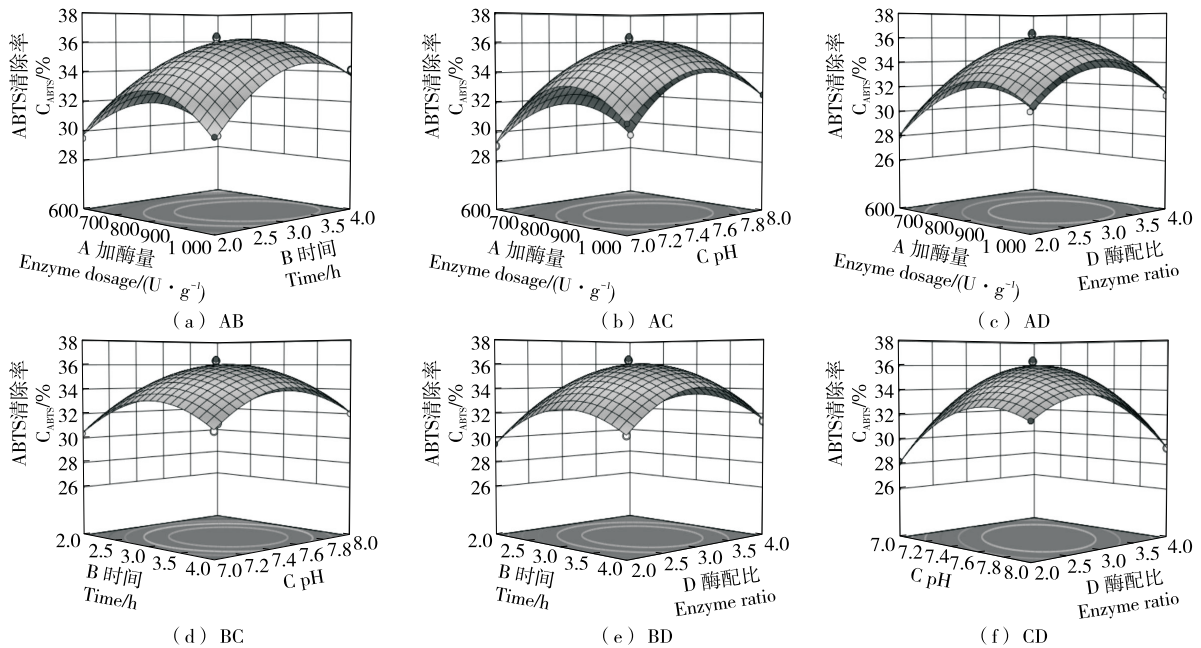


图 3 各因素间交互作用于 ABTS 自由基清除率的曲面图

Figure 3 Curved surface of interaction between factors on ABTS free radical clearance

表 5 鸽肉肽中总氨基酸含量[†]
Table 5 Total amino acid content in pigeon meat peptide

氨基酸名称	含量/ (mg · g ⁻¹)	比例/ %	氨基酸名称	含量/ (mg · g ⁻¹)	比例/ %
酪氨酸 [△]	32.65	4.75	谷氨酸	78.80	11.46
蛋氨酸 ^{#△}	32.20	4.68	甘氨酸	20.18	2.94
组氨酸 ^{*△}	21.42	3.12	丙氨酸 [#]	60.28	8.77
赖氨酸 ^{*△}	8.16	1.19	异亮氨酸 ^{*#}	42.61	6.20
苯丙氨酸 ^{*#△}	80.86	11.76	亮氨酸 ^{*#}	86.38	12.56
半胱氨酸 [△]	7.97	1.16	精氨酸	55.59	8.09
脯氨酸 ^{#△}	17.96	2.61	抗氧化氨基酸	201.21	29.27
天冬氨酸	24.71	3.59	疏水性氨基酸	369.51	53.75
苏氨酸 [*]	41.13	5.98	必需氨基酸	329.78	47.97
丝氨酸	27.39	3.98	总氨基酸	687.51	

[†] * 表示人体必需氨基酸; # 表示疏水性氨基酸; △ 表示抗氧化氨基酸。

高为 53.75%，可以一定程度上解释其存在的抗氧化功能。

3 结论

试验表明,从 4 种蛋白酶中筛选出了中性蛋白酶与碱性蛋白酶作为鸽肉复配酶解用酶。经响应面优化,复合酶酶解鸽肉制备抗氧化肽的最佳工艺参数为加酶量 800 U/g, 酶解时间 3 h, pH 值为 7.5, $m_{\text{中性蛋白酶}} : m_{\text{碱性蛋白酶}}$ 为 3 : 1、酶解温度为 50 °C、 $m_{\text{鸽肉}} : m_{\text{复合酶}}$ 为 1 : 1.5。在此条件下,当鸽肉肽质量浓度为 1 mg/mL 时,其对 ABTS 自由基清除率为 36.10%,水解度为 47.51%。鸽肉酶解肽中共检出 16 种氨基酸,其中必需氨基酸与抗氧化活性氨基酸各占总氨基酸含量的 47.97% 和 29.27%。后续将对鸽肉肽进行逐级分离纯化,筛选出抗氧化活性最佳的组分后,对其进行质谱鉴定,以期发掘新的功能性肽段,并进行动物试验以探究和验证鸽肉肽的体内抗氧化活性。

参考文献

[1] 张舒,王长远,张东杰. 食源性生物活性肽对 2 型糖尿病的干预作用及其机制研究进展[J]. 食品科学, 2023, 44(3): 278-287.
ZHANG S, WANG C Y, ZHANG D J. Food-derived bioactive peptides and its in the intervention and regulation of type 2 diabetes mellitus[J]. Food Science, 2023, 44(3): 278-287.

[2] 肖岚,李诚,杜昕,等. 牦牛血低聚肽对小鼠抗疲劳能力和缺氧 H9c2 细胞的影响[J]. 核农学报, 2020, 34(4): 831-838.
XIAO L, LI C, DU X, et al. Effects of Yak Blood Oligopeptides on anti-fatigue ability of mice and Hypoxia H9c2 cells[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2020, 34(4): 831-838.

[3] 王军琦,王祖哲,刘心田,等. 海参低聚肽对家蚕抗衰老功效的

初步研究[J]. 海洋湖沼通报, 2019(5): 164-170.
WANG J Q, WANG Z Z, LIU X T, et al. A preliminary study of sea cucumber oligo-peptides influence on anti-senescence of silkworm [J]. Transactions of Oceanology and Limnology, 2019(5): 164-170.

[4] 魏连会,董艳,石杰,等. 汉麻籽抗氧化肽的制备与氨基酸序列分析[J]. 中国油脂, 2022, 47(4): 36-40.
WEI L H, DONG Y, SHI J, et al. Preparation and amino acid sequence analysis of antioxidant peptides from hemp seeds[J]. China Oils and Fats, 2022, 47(4): 36-40.

[5] 刘飞,苗建银,杨余语,等. 牛乳酪蛋白源 ACE 抑制肽对大鼠的降血压作用[J]. 现代食品科技, 2021, 37(7): 1-7.
LIU F, MIAO J Y, YANG Y Y, et al. Antihypertensive effect of the ACE inhibitory peptides derived from bovine casein in rats [J]. Modern Food Science & Technology, 2021, 37(7): 1-7.

[6] LI F, REN D Y, CUI L Y, et al. Antifatigue, antioxidant and immunoregulatory effects of peptides hydrolyzed from Manchurian walnut (*Juglans mandshurica* Maxim.) on mice[J]. Grain & Oil Science and Technology, 2018, 1(1): 44-52.

[7] 栾俊家,张尚悦,李昂达,等. 响应面法优化秋刀鱼酶解制备抗氧化活性肽的工艺[J]. 食品工业科技, 2022, 43(5): 172-181.
LUAN J J, ZHANG S Y, LI A D, et al. The optimization of the preparation process of antioxidative active peptide from the enzymatic hydrolysate of pacific saury (*Cololabis saira*) by response surface methodology[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(5): 172-181.

[8] 杜昕,李诚,肖岚,等. 牦牛血抗氧化肽制备方法对比及分离纯化研究[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(8): 861-867.
DU X, LI C, XIAO L, et al. Preparation comparison of yak blood antioxidant peptides and its purification[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2018, 37(8): 861-867.

[9] 朱梦媛,李冲伟. 植物源功能肽的制备、生理活性与应用研究进展[J]. 食品科学, 2021, 42(17): 363-369.
ZHU M Y, LI C W. A review of the preparation, physiological activities and application of plant-derived functional peptides[J]. Food Science, 2021, 42(17): 363-369.

[10] 张媛,刘迥,王艳萍,等. 鸽肉营养成分与脂肪沉积相关基因的研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2020(4): 121-124.
ZHANG Y, LIU J, WANG Y P, et al. Study on the relationship between pigeon meat nutrients and fat deposition-related genes[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2020(4): 121-124.

[11] 王翔. 鸽肉营养而且保健[J]. 肉类工业, 2014(4): 26.
WANG X. Pigeon meat is nutritious and healthy[J]. Meat Industry, 2014(4): 26.

[12] 曹廷锋,刘金丽,樊芳,等. 红岛蛤蜊肉酶解工艺优化及其产物降血压功能研究[J]. 食品工业科技, 2021, 42(7): 216-222.
CAO T F, LIU J L, FAN F, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis of Hongdao Clam and anti-hypertensive activity of the

- resulted products[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021(7): 216-222.
- [13] 叶沁. 鳄鱼里脊抗氧化肽的制备及其生物学功能研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2019: 19.
- YE Q. Studies on the preparation and biological functions of antioxidant peptides from crocodile tenderloin [D]. Xiamen: Xiamen University, 2019: 19.
- [14] LI X. Comparative Study of 1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl radical (DPPH) scavenging capacity of the antioxidant Xanthones family [J]. Chemistry Select, 2018, 3(46): 13 081-13 086.
- [15] XIE Z J, HUANG J R, XU X M, et al. Antioxidative activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate[J]. Food Chemistry, 2008, 111(2): 370-376.
- [16] 干建松. 超声辅助酶解海带蛋白制备抗氧化肽及其活性研究[J]. 中国食品添加剂, 2022, 33(5): 64-72.
- GAN J S. Study on preparation of antioxidant peptides from kelp protein by ultrasonic assisted enzymatic hydrolysis and its activity [J]. China Food Additives, 2022, 33(5): 64-72.
- [17] 吴明泽, 王笑, 胡祥昊, 等. 中华圆田螺肉抗氧化肽的分离纯化及小鼠体内外活性研究[J]. 食品与机械, 2019, 35(12): 151-157.
- WU M Z, WANG X, HU X H, et al. Purification of antioxidant peptides from the meat of *Oncomelania sinensis* and its in vivo and in vitro of mice activity[J]. Food & Machinery, 2019, 35(12): 151-157.
- [18] 于智慧, 郭艳, 周丽媛, 等. 双酶酶解驴骨泥工艺优化及酶解液抗氧化性、氨基酸含量分析[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(11): 60-66.
- YU Z H, GUO Y, ZHOU L Y, et al. The process optimization of Donkey bone mud with double enzyme and analysis of antioxidant activity and amino acid content of the enzymatic hydrolysis solution[J]. Food Research and Development, 2021, 42(11): 60-66.
- [19] 戴妍. 鸡肉寡肽的抗氧化、抗疲劳功能活性研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2019: 18-19.
- DAI Y. Antioxidant and anti-fatigue functional activities of chicken oligopeptides[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2019: 18-19.
- [20] NIELSEN P M, PETERSEN D, DAMMANN C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis [J]. Journal of Food Science, 2001, 66(5): 642-646.
- [21] 史晋源. 甲鱼肽的抗氧化活性与抗疲劳作用研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2021: 18.
- SHI J Y. Study on the antioxidant activity and anti-fatigue effect of soft-shelled turtle peptides [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2021: 18.
- [22] LIANG J, DENG B, LIU T, et al. Preparation of antioxidant peptides from *Porphyrha haitanensis* via response surface optimization[J]. Food Research and Development, 2020, 41(5): 1-6.
- (上接第 31 页)
- [18] 郑越, 段涛, 宋丹, 等. 六株植物乳杆菌的益生特性研究[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(10): 119-125.
- ZHENG Y, DUAN T, SONG D, et al. Study on the probiotic characteristics of six strains of *Lactobacillus plantarum*[J]. Food and Fermentation Industry, 2022, 48(10): 119-125.
- [19] 谢晓娜, 张元秋, 杨郑州, 等. 一株降胆固醇菌株的筛选鉴定及安全性评价[J]. 中国乳品工业, 2021, 49(3): 19-23, 56.
- XIE X N, ZHANG Y Q, YANG Z Z, et al. Screening, identification and safety evaluation of a cholesterol-lowering strain [J]. China Dairy Industry, 2021, 49(3): 19-23, 56.
- [20] 何宇星, 其其日力格, 刘玮, 等. 潜在益生作用乳酸菌的筛选鉴定及其生物学特性[J]. 现代食品科技, 2021, 37(11): 50-57, 67.
- HE Y X, QIQRILIGE, LIU W, et al. Screening and identification of potential probiotic lactic acid bacteria and their biological characteristics[J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(11): 50-57, 67.
- [21] 王炜哲, 翟征远, 郝彦玲. 市售酸奶中发酵剂乳酸菌的耐药性及耐药基因研究进展[J]. 中国乳品工业, 2022, 50(2): 34-37.
- WANG W Z, ZHAI Z Y, HAO Y L. Research progress on drug resistance and drug resistance genes of lactic acid bacteria used as starter in commercial yogurt[J]. China Dairy Industry, 2022, 50(2): 34-37.
- (上接第 134 页)
- [26] 赵菊润, 王艺涵, 金艳, 等. 石斛属植物化学成分及药理活性研究进展[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(9): 2 358-2 372.
- ZHAO J R, WANG Y H, JIN Y, et al. Research advances in chemical constituents and pharmacological activities of *Dendrobium* plants[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2022, 47(9): 2 358-2 372.
- [27] 林君, 黄友琴. 铁皮石斛生物活性成分及产品加工的研究进展[J]. 轻工科技, 2022, 38(2): 21-23, 56.
- LIN J, HUANG Y Q. Research progress on bioactive constituents and product processing of *Dendrobium officinales* [J]. Light Industry Science and Technology, 2022, 38(2): 21-23, 56.
- [28] 唐文文, 夏俊丽, 陈垣. 铁皮石斛茎、叶、花功能性成分、抗氧化活性及其相关性[J]. 食品与机械, 2021, 37(7): 45-50.
- TANG W W, XIA J L, CHEN H. Analysis of functional composition, antioxidant activity and their correlation in stem, leaf and flower from *Dendrobium officinale* [J]. Food & Machinery, 2021, 37(7): 45-50.