

目 录

摘 要	I
ABSTRACT.....	III
第 1 章 绪论.....	1
1.1 动物源蛋白肽研究现状	1
1.1.1 动物源蛋白肽的分类和制备工艺	1
1.1.2 动物源蛋白肽的功能和应用	2
1.2 牛肉蛋白、鲫鱼蛋白和猪蹄胶原蛋白的研究概述	3
1.2.1 牛肉蛋白肽的研究现状	3
1.2.2 鲫鱼蛋白肽的研究现状	3
1.2.3 猪蹄胶原蛋白的研究现状	4
1.3 抗疲劳活性肽的研究进展	4
1.3.1 疲劳的定义与发生机制	4
1.3.2 生物活性肽在抗疲劳方面的作用机制	5
1.3.3 生物活性肽抗疲劳和抗氧化之间的关联	6
1.3.4 抗疲劳活性肽的应用研究现状	7
1.4 本研究的研究意义和主要内容	8
1.4.1 研究目的和意义	8
1.4.2 本研究的主要内容	8
1.5 创新点与技术路线.....	9
1.5.1 创新点	9
1.5.2 技术路线	10
第 2 章 多酶复配制备混合动物蛋白活性肽的工艺优化.....	11
2.1 实验材料与仪器	11
2.1.1 实验材料	11
2.1.2 仪器和设备	12
2.1.3 试剂	12
2.2 实验方法	13
2.2.1 蛋白酶解液的制备	13
2.2.2 蛋白酶的选择	13

2.2.3 复合酶解的单因素实验	14
2.2.4 均匀实验设计	14
2.2.5 水解度 DH 的测定	15
2.2.6 总抗氧化(T-AOC)能力的测定	15
2.2.7 还原力的测定	15
2.2.8 蛋白酶解物的感官评价	16
2.2.9 肽分子质量分布的测定	17
2.2.10 氨基酸组成的测定	17
2.2.11 数据处理与统计分析	17
2.3 结果与分析	17
2.3.1 最佳用酶的筛选	17
2.3.2 复合酶解的单因素实验	19
2.3.3 混合动物蛋白酶解的均匀实验结果	23
2.3.4 混合动物蛋白酶解物的分子质量分布	25
2.3.5 混合动物蛋白酶解物的氨基酸组成分析	25
2.4 本章小结	27
第 3 章 混合动物蛋白肽的抗疲劳功效和作用机制研究	29
3.1 实验材料与仪器	29
3.1.1 材料	29
3.1.2 仪器和设备	30
3.1.3 试剂	30
3.2 实验方法	31
3.2.1 MAPHs 体外抗氧化活性测定	31
3.2.2 MAPHs 抗疲劳功效研究	32
3.2.3 数据处理和统计分析	34
3.3 结果与分析	34
3.3.1 MAPHs 的体外抗氧化活性	34
3.3.2 MAPHs 对小鼠体重的影响	37
3.3.3 MAPHs 对小鼠脏器系数的影响	37
3.3.4 MAPHs 对小鼠力竭游泳时间的影响	39

3.3.5 MAPHs 对小鼠疲劳相关生化指标的影响.....	39
3.3.6 MAPHs 对小鼠氧化应激状态的影响.....	43
3.3.7 MAPHs 对小鼠体内抗氧化酶体系的影响.....	44
3.3.8 MAPHs 对小鼠血清中炎症因子的影响.....	46
3.4 本章小结	47
第 4 章 混合动物蛋白肽的抗氧化稳定性和应用研究.....	49
4.1 实验材料与仪器	49
4.1.1 材料	49
4.1.2 仪器和设备	50
4.1.3 试剂	50
4.2 实验方法	51
4.2.1 MAPHs 抗氧化活性的稳定性研究.....	51
4.2.2 抗氧化活性的测定方法	52
4.2.3 混合动物蛋白肽抗疲劳固体饮料的研制	52
4.2.4 数据处理和统计分析	55
4.3 结果与分析	55
4.3.1 不同因素对 MAPHs 抗氧化活性的稳定性影响.....	55
4.3.2 潜在抗疲劳固体饮料的设计研发	60
4.4 本章小结	66
第 5 章 结论与展望.....	69
5.1 主要结论	69
5.2 展望	70
参考文献	71
致谢	81
附录	83
硕士期间科研情况	85

混合动物蛋白的酶解工艺优化及其抗疲劳功效研究

摘要

蛋白质是调节人体生理功能的重要物质，人们每天需要补充足量的蛋白质以避免亚健康状态。研究表明食疗保元汤具有补气益血、增强免疫力的功能，是由于其配方中的牛肉蛋白、鲫鱼蛋白和猪蹄胶原蛋白富含抗氧化氨基酸和支链氨基酸，具有多种生物活性功能，但其具体的作用机理缺乏探讨，且目前的研究多集中于单一蛋白肽的制备提取和功能探究。因此本论文将现代食品加工技术与保元汤传统工艺结合，探究混合动物源蛋白肽的制备工艺和功效作用，拟为动物蛋白资源的综合利用和功能性食品的开发提供理论基础。

本论文以食疗保元汤中的牛肉、鲫鱼和猪蹄为原料，通过可控酶解技术制备混合蛋白肽，首先运用主成分分析法和均匀设计确定最佳酶解工艺参数，其次利用体外抗氧化化学模型评价混合动物蛋白肽的抗氧化活性，并在此基础上利用力竭游泳动物模型评价其抗疲劳功效，初步探究抗疲劳的作用机制。最后研究了混合动物蛋白肽在不同环境条件下抗氧化活性的稳定性，并研制一款具有抗疲劳功效的复合固体饮料。主要研究结果如下：

（1）采取多酶复配的方式对混合动物蛋白进行酶解，并在此基础上运用主成分分析法和均匀设计优化酶解工艺。选择 6 种蛋白酶分别水解牛肉蛋白、鲫鱼蛋白和猪蹄胶原蛋白，以水解度和总抗氧化力为评价指标，确定了菠萝蛋白酶、中性蛋白酶和风味蛋白酶为 3 种动物源蛋白各自的最适作用酶。分析加酶量、酶解时间、酶解 pH 和酶解温度对酶解混合动物蛋白的影响，采用主成分分析法确定各因素的最优值分别为：加酶量 1200 U/g、酶解时间 6 h、酶解温度 40 °C 和酶解 pH=6.5。最后在此基础上，利用均匀设计实验对酶解工艺进行优化，结果表明，混合动物蛋白的最佳酶解工艺为：酶解温度 43 °C，酶解 pH 值为 6，酶解时间 6 h，加酶量为 1200 U/g，在此条件下，混合动物蛋白的水解度为 43.12%，总抗氧化能力为 0.0792 mmol/g，还原力为 0.4415，感官评分为 32.15。混合动物蛋白的氨基酸含量丰富，组成合理，可用于功能肽的制备和新型保健食品的开发。

(2) 以还原型谷胱甘肽 (GSH) 为对照物, 通过 4 种体外化学模型对混合动物蛋白酶解物 (MAPHs) 的抗氧化活性进行综合评价测定。结果表明: 当 MAPHs 的浓度为 GSH 的 5 倍左右时, 二者的还原力相当; MAPHs 清除 DPPH 自由基的 IC_{50} 值为 2.64 mg/mL; MAPHs 清除 $ABTS^+$ 自由基的 IC_{50} 值为 1.40 mg/mL, 且清除羟基自由基的 IC_{50} 值为 6.34 mg/mL。

(3) 进行小鼠力竭游泳试验, 探究混合动物蛋白肽 (MAPHs) 的抗疲劳功效及其作用机制。结果表明: 灌胃 MAPHs 不会影响小鼠的体重和正常生长, 且无毒副作用; 相比对照组, MAPHs 给药处理还能增加肝脏指数和胸腺指数, 降低脾脏指数, 并恢复接近正常小鼠的水平; MAPHs 各剂量组的力竭游泳时间相比于对照组皆显著上升 ($p < 0.05$), 分别是对照组的 4.45 倍、1.75 倍和 1.84 倍。MAPHs 能够显著降低 ($p < 0.05$) 小鼠体内的疲劳及能量代谢相关标志物 LA、BUN 和 CK 的含量; MAPHs 给药处理后, 各组的抗氧化酶体系皆恢复逐渐接近正常水平; MAPHs 各组的促炎因子显著下降 ($p < 0.05$) 且 IL-10 水平较对照组分别提高了 11.22%, 45.17% 和 56.03%。因此, 混合动物蛋白肽可能是通过补充能源物质、消除代谢产物和自由基和维持内环境稳态从而发挥抗疲劳功效

(4) 探究混合动物肽抗氧化活性的稳定性, 并在此基础上制备混合蛋白肽功能性固体饮料。结果表明: 混合动物蛋白肽的耐热性和耐酸性较好, 而在碱性条件下的抗氧化活性较差; Zn^{2+} 和 Cu^{2+} 显著降低 MAPHs 清除 DPPH 自由基和 $ABTS^+$ 自由基的能力; 三种杀菌方式对 MAPHs 的抗氧化活性影响的大小顺序为: 高压蒸气灭菌、煮沸杀菌和巴氏杀菌; 经过体外胃肠道消化模拟后, MAPHs 抗氧化活性得到了较好的保持。此外, 以混合动物蛋白肽为主要功能因子的抗疲劳固体饮料的最佳配方为: 混合蛋白肽冻干粉添加量为 2.20 g, 中药粉添加量为 1.70 g, 甜菊糖苷添加量为 0.05 g, 罗汉果甜苷添加量为 0.03 g, 柠檬酸添加量为 0.07 g。

综上, 本研究利用多酶复配酶解的方法得到了具有较好抗氧化活性的混合蛋白肽, 为混合蛋白肽的制备提供了一定的理论技术支持。动物实验结果表明, 混合动物蛋白肽能够补充能量物质, 消除自由基和维持内环境稳态, 从而具有一定的抗疲劳功效。最后基于上述研究结果, 开发了一款具有抗疲劳功能的复合固体饮料。为多种蛋白资源的综合利用提供了一定的理论依据和实验基础。

关键词: 混合动物蛋白; 酶解工艺; 抗氧化; 抗疲劳; 固体饮料

OPTIMIZATION OF ENZYMATIC HYDROLISIS PROCESS AND ANTI-FATIGUE EFFICACY OF MIXED ANIMAL PROTEINS

ABSTRACT

Protein is an important substance to regulate the physiological function of human body, people need to supplement sufficient amount of protein every day to avoid sub-healthy state. Studies have shown that therapeutic Baoyuan decoction can nourish qi and blood, enhance immunity, which is attributed to the fact that the beef protein, crucian carp protein and pig's hoof collagen in its formula are rich in antioxidant amino acids and branched-chain amino acids, which have a variety of biologically active functions; however, its specific mechanism of action lacks of exploration, and most of the current research focuses on the preparation and extraction of a single protein peptide and the exploration of its function. Therefore, this study will combine the modern food processing technology with the conventional technique of Baoyuan decoction to explore the preparation process and efficacy of mixed animal source protein peptides, which is expected to provide a theoretical basis for the comprehensive utilization of animal protein resources and the exploitation of functional foods.

In this dissertation, beef protein, crucian carp protein and pig's hoof collagen from therapeutic preservation soup were used as raw materials to prepare hybrid protein peptides by controlled enzymatic digestion technology, and firstly, principal component analysis and uniform design were used to determine the optimal enzymatic digestion process parameters. Secondly, the antioxidant activity of the mixed animal protein peptides was evaluated using an in vitro chemical model, and on the basis of which the anti-fatigue efficacy was evaluated using an animal model of exhaustion swimming, so as to preliminarily investigate the mechanism of anti-fatigue. Finally, the stability of the

antioxidant activity of the mixed animal protein peptides under different environmental conditions was investigated, and a compound solid beverage with anti-fatigue effect was developed. The main results of the study are as follows:

(1) The enzymatic hydrolysis of mixed animal proteins was carried out by adopting multiple enzyme compounding, and on the basis of which the enzymatic hydrolysis process was optimized by using principal component analysis and uniform design. Six proteases were selected to hydrolyze beef protein, crucian carp protein and pig's hoof collagen, and the hydrolysis degree and total antioxidant power were used as the evaluation indexes, and pineapple protease, neutral protease and flavor protease were identified as the optimal functioning enzymes for each of the three kinds of animal source proteins. The effects of enzyme addition, enzyme digestion time, enzyme digestion pH and enzyme digestion temperature on the enzymatic hydrolysis of mixed animal proteins were analyzed, and the optimal values of each factor were determined by principal component analysis as follows: enzyme addition of 1200 U/g, enzyme digestion time of 6 h, enzyme digestion temperature of 40 °C, and enzyme digestion pH=6.5, and finally, the enzymatic hydrolysis process was optimized by using the homogeneous design of experiments. The results showed that the optimal enzymatic hydrolysis process for the mixed animal protein was 43.12%, the total antioxidant capacity was 0.0792 mmol/g, the reducing power was 0.4415, and the organoleptic score was 32.15. The amino acid content of the mixed animal protein was rich and the composition was reasonable. preparation of functional peptides and the development of novel health food.

(2) The antioxidant activity of mixed animal proteolytic hydrolysates (MAPHs) was determined by a comprehensive evaluation of four in vitro chemical models using reduced glutathione (GSH) as a control. The results showed that the reducing power of MAPHs was comparable when the concentration of MAPHs was about 5 times that of GSH; the IC_{50} value of MAPHs for scavenging DPPH radicals was 2.64 mg/mL; the IC_{50} value of MAPHs for scavenging ABTS⁺ radicals was 1.40 mg/mL, and the IC_{50} value of MAPHs for scavenging hydroxyl radicals was 6.34 mg/mL.

(3) A mouse exhaustion swimming test was performed to investigate the anti-fatigue efficacy of mixed animal protein peptides (MAPHs) and their mechanism of

action. The results showed that: the gavage of MAPHs did not affect the body weight and normal growth of mice, and there were no toxic side effects; compared with the control group, the administration of MAPHs also increased the liver index and the thymus index, decreased the spleen index, and restored the level close to that of the normal mice; the duration of exhaustion swimming time of each dose group of MAPHs was significantly increased compared with that of the control group ($p<0.05$), and was 4.45, 1.75, and 1.84 times higher than that of the control group, respectively. MAPHs significantly reduced ($p<0.05$) the levels of LA, BUN and CK, markers related to fatigue and energy metabolism in mice; the antioxidant enzyme systems of all groups were restored to close to the normal level after the administration of MAPHs; the levels of pro-inflammatory factors in all groups of MAPHs were significantly reduced ($p<0.05$) and the levels of IL-10 were increased by 11% compared with those of the control group, respectively; and the levels of IL-10 were increased by 11% compared with those of the control group, respectively. levels increased by 11.22%, 45.17% and 56.03%, respectively, compared with the control group. Therefore, the mixed animal protein peptides may exert anti-fatigue effects by replenishing energy substances, eliminating metabolites and free radicals, and maintaining the homeostasis of the internal environment.

(4) The stability of antioxidant activity of mixed animal peptides was explored, and based on this, mixed protein peptide functional solid beverages were prepared. The results showed that: the mixed animal protein peptides had better heat and acid resistance, and poorer antioxidant activity under alkaline conditions; Zn^{2+} and Cu^{2+} significantly reduced the ability of MAPHs to scavenge DPPH radicals and $ABTS^+$ radicals; the order of the effects of the three methods of sterilization on the antioxidant activity of MAPHs was autoclaving, boiling and pasteurization; and the antioxidant activity of MAPHs was better maintained after in vitro gastrointestinal digestion simulation, the antioxidant activity of MAPHs was better maintained. In addition, the optimal formulations of anti-fatigue solid beverages with mixed animal protein peptides as the main functional factors were as follows: mixed protein peptide lyophilized powder added at 2.20 g, Chinese herbal powder added at 1.70 g, stevioside added at 0.05 g, rosmarinic acid sweetened glycoside added at 0.03 g, and citric acid added at 0.07 g. The results of this study were

summarized in the following table.

In conclusion, this study utilized the method of multi-enzyme complex enzymatic hydrolysis to obtain hybrid protein peptides with better antioxidant activity, which provided certain theoretical technical support for the preparation of hybrid protein peptides. The results of animal experiments showed that the hybrid animal protein peptides could replenish energy substances, eliminate free radicals and maintain the homeostasis of the internal environment, thus having certain anti-fatigue efficacy. Finally, based on the above research results, a compound solid beverage with anti-fatigue function was developed. It provides certain theoretical basis and experimental foundation for the comprehensive utilization of multiple protein resources.

Keywords: mixed animal proteins; enzymatic hydrolysis process; antioxidant; anti-fatigue; solid beverages

第 1 章 绪论

1.1 动物源蛋白肽研究现状

1.1.1 动物源蛋白肽的分类和制备工艺

蛋白质是生命的物质基础，是构成细胞、组织和器官的基本物质，也是调节人体生理功能的重要物质，如维持免疫功能、维持肌肉功能、调节凝血机制、提供能量等^[1,2]。因此，人体每天都需要补充大量的蛋白质。动物是人体获取蛋白质的重要来源，在我国居民膳食中动物蛋白占据着重要的地位。相比较于植物源蛋白质，动物源蛋白质因含有全部的人体必需氨基酸，且其氨基酸的含量更高、比例更科学，故被称为“完全蛋白质”^[3]。

根据动物蛋白的来源，主要可以将其分为 5 类：第一类是禽及禽蛋类蛋白肽，主要是从禽类的肌肉及蛋中分离得到。此外，Inkanuwat^[4]还从鸡的羽毛中分离得到了具有生物活性的多肽，其可以降低促炎因子的转录水平来发挥抗炎作用。第二类是哺乳动物蛋白，除了常见的猪、牛、羊外，人们还从乳、皮肤、骨骼和血液等副产品中提取不同的动物活性肽用于实际生产过程，大部分已发现的哺乳动物多肽具有抗炎、抗疲劳等功能^[5]；第三类是昆虫类蛋白肽，主要是指昆虫蛋白经诱导处理后分解产生的一类具有生物活性的小分子物质，部分昆虫多肽被证实具有免疫、抗病毒等活性^[6]。Ji^[7]等人从以色列暗褐蝎中提取得到的活性肽对登革热病毒（DENV）和寨卡病毒（ZIKV）有明显的抑制作用。冯挺^[8]则发现蜂毒肽对肿瘤细胞起到直接的杀伤效应，诱导肿瘤细胞发生损伤和凋亡；第四类是海洋动物蛋白，海洋动物蛋白质含量丰富，且种类众多，来源广泛。Li^[9]从阿拉斯加鳕鱼中分离纯化得到两个多肽，结果发现其能够保护由环磷酰胺（Cy）引起的肠道屏障破坏；Kang^[10]等人从角螺螺发现的 FAPQY 可以通过抑制髓过氧化物酶的活性起到抗氧化的作用。当然，海洋动物由于其生存环境的特殊性，相较其他动物多肽，海洋生物多肽的来源更加广泛，且其中一部分已应用于生物医学临床试验，在疫苗与药物开发等领域拥有广阔的市场前景。第五类是其他动物蛋白，王洁^[11]等发现林蛙骨肉中的活性肽可以通过促进细胞分泌 TNF- α 和 IL-2，进而增强细胞的免疫。Conlon^[12]等人还从青蛙的皮肤中提取到了具有抗菌及免疫调节活性的多肽。

目前，生物活性肽的制备方法已经日趋成熟和完善，研究人员也针对不同生物活性肽开发了不同的提取方法，进一步开发了活性肽的潜能。目前应用较为广泛的方法主要有化学提取法、微生物发酵法、生物合成法和酶解法^[13, 14]。

化学提取法顾名思义直接利用化学试剂进行提取，比如 Fu^[15]等人用 0.2 mmol/L 盐酸从宣威火腿中提取得到含量为 8.49%的生物活性肽，后续利用实验证实了该活性肽可以抑制脂多糖诱导的细胞炎症。化学提取法操作简单，但也存在环境污染大、化学试剂及设备成本较高等缺点^[16]。根据发酵类型，可将微生物发酵分为固态发酵和液态发酵两种。通过微生物发酵法制备活性肽，其工艺简单、成本低，效率高，但是由于发酵过程难以精准控制，同时产物也会受到原料、菌种及发酵工艺等不同因素的影响，因而发酵所得到的产物也存在不稳定、纯度低的缺点^[17, 18]。生物合成法制备生物活性肽具有高纯度和成熟的优势，但这种方法成本较高，产率却很低^[19]。而酶解法则是目前应用最为广泛的制备方法，由于酶解过程条件容易控制，酶解产物产量大、纯度较高且成本较低，而广受研究人员的青睐^[20, 21]。同时，在酶解条件上由于可选择的酶种类丰富，因此可以通过多种酶复配以提高酶解效率和产物浓度。此外，探究最高效的酶解条件、改善酶解工艺、提高酶解产物纯度及得率也是目前科学研究和工业生产的热点。

1.1.2 动物源蛋白肽的功能和应用

动物多肽的功能在近些年深受科学家们的关注。根据目前已有的研究结果，发现动物多肽不仅具备抗氧化、降血压、降血脂、免疫调节和抑菌等功能，在维持机体健康上也发挥着重要的作用，还可以调节食品风味，作为潜在的食品添加剂来源^[22, 23]。同时，科学家们现在还利用生物信息学对蛋白的结构进行分析或在线模拟对其物理化学性质和生物学功能进行预测，此外，分子对接等生物学技术也被应用于动物多肽功能的研究^[24]。

活性肽是一类通过发酵、酶解等不同方式从前体蛋白质中水解后产生的一类富有生物功能和其他营养价值的氨基酸序列片段，活性肽的长度通常在 2 ~ 20 个氨基酸残基之间，分子量通常小于 6 kDa^[25]。在前体蛋白中，他们一般都是不具备活性的，会在水解后产生抗菌、抗氧化、抗疲劳以及降压等一系列生物学活性，同时活性肽还拥有易代谢、毒性小等一系列优点^[26]，因而动物活性肽由于其来源丰富、原材料安全且提取成本较低，目前已经被广泛应用于生物医学、功能食品

的研究及开发中。

1.2 牛肉蛋白、鲫鱼蛋白和猪蹄胶原蛋白的研究概述

蛋白质对机体至关重要，是维持人们生命活动最基本的物质，但是随着年龄的增长，人体合成蛋白质的能力下降，从而容易进入亚健康疲劳状态^[27]。西药治疗此类疾病疗效不佳，副作用大，但中医的优势明显^[28]。保元汤始载于明代孙志宏的《简明医彙》，距今已有 500 多年的历史，是一个治疗元气虚弱的著名方剂。此外，保元汤也是一种很好的中医食疗配方，由牛肉、鲫鱼、猪蹄、红枣和山楂组成，具有健脾养胃、补气益血和增强免疫力的功效，且其营养丰富，富含多种蛋白质和氨基酸^[29, 30]。有研究证明，其食疗配方中牛肉蛋白的氨基酸组成更接近人体需求，同时牛肉中还具有抗菌、降血压和保护神经等多种功能活性的肽；鲫鱼蛋白营养丰富，易于吸收，能够在一定程度上抗氧化、抗炎和降低胆固醇；猪蹄胶原蛋白被证实具有改善微循环、促进胃溃疡愈合和调节神经等多种作用^[31-33]。

1.2.1 牛肉蛋白肽的研究现状

目前，已从牛肉蛋白分离提取得到不同功能的生物活性肽，如降血压肽、降血脂肽、抗菌肽和抗氧化肽等。Juhui^[34]等人首先在干陈化牛肉的硬壳样品上发现其可以显著抑制血管紧张素转换酶（ACE）的活性，而 ACE 的生物学功能则是可以将血管紧张素 I 转化成血管紧张素 II，进而引起血管收缩最终导致血压的升高，其研究结果表明牛肉蛋白可以通过抑制 ACE 的活性从而起到降低血压的作用。蔺茜莎^[35]等人通过喂养小鼠牛肉蛋白，发现牛肉蛋白可以显著降低总胆固醇和血糖浓度，可能是通过降低小鼠肝脏代谢水平，实现降血脂的功能。Hu^[36]等人从牛血红蛋白中纯化分离得到 VNFKLLSHSLVTLASHL 的蛋白序列，实验结果表明其对大肠杆菌、白色念珠菌和金黄色葡萄球菌均具有明显的抗菌性。上述关于牛肉生物活性肽功能的研究结果表明，牛肉蛋白肽拥有多样的生物学功能，在未来存在广泛开发以应用于新型保健食品或药物研究的可能。

1.2.2 鲫鱼蛋白肽的研究现状

鲫鱼作为我国居民膳食中的一种常见淡水鱼，不仅饱受广大人民群众欢迎，其蛋白也被发现具有多样的生物学功能。纪慧卓^[37]等人发现使用胃蛋白酶和胰蛋白酶将鲫鱼鱼卵蛋白进行虚拟酶解后分析其释放的多肽，利用分子对接筛选出可

能与新冠病毒竞争其受体的多肽，结果表明 QPVTTPSSVAIQCGENR 和 FVDSCVATQVPDVNAL 均可以在不影响自身活性的情况下与新冠病毒的受体血管紧张素转化酶 2 结合，表明其可能通过相互作用维持生物肽与病毒受体复合物的稳定性进而作为一种潜在抑制新冠病毒的药物来源。周晓春^[33]则依次通过脱脂、水提等方法从鲫鱼鱼卵中获得水溶性唾液酸糖蛋白后，对快速骨老化小鼠进行灌胃喂养，结果发现鲫鱼卵唾液酸糖蛋白可以显著提高快速老化小鼠股骨、腔骨和腰椎的骨密度，同时还显著提高股骨、腔骨的最大载荷和结构强度，表明鲫鱼蛋白能够显著改善老年性骨质疏松症，提高骨强度。

1.2.3 猪蹄胶原蛋白的研究现状

猪蹄中含有丰富的蛋白质、脂肪和碳水化合物，同时还富含维生素 A、维生素 E、维生素 D 与维生素 K 等营养成分。众所周知，猪蹄中含有丰富的胶原蛋白，而这些胶原蛋白又可被消化为甘氨酸，去参与胶原的生物合成过程，同时还可以在脑中作为一种抑制性递质起到对中枢神经的镇静作用^[32]。

作为一种丰富的胶原蛋白来源，猪蹄胶原蛋白因其具有与人体皮肤胶原蛋白十分相似的空间结构，且同属于非水溶性纤维状含糖蛋白质。因此，猪蹄胶原蛋白不仅可以保护皮肤，还可以促进毛发和指甲的生长，维持毛发的光泽^[38, 39]。虽然胶原蛋白被证实在哺乳动物体内可以起到改善微循环、促进胃溃疡愈合^[40]、调节神经、降血压等多种作用，但针对于猪蹄胶原蛋白的研究大部分停留在其加工方式上，对于其在生物医学与保健食品中的应用研究却比较少^[41]。因此，鉴于猪蹄中丰富的胶原蛋白含量，其在营养保健与和临床医学中的研究有着广阔的发展前景。

1.3 抗疲劳活性肽的研究进展

1.3.1 疲劳的定义与发生机制

Enoka 和 Duchateau^[42]在其研究中将疲劳定义为一种疾病症状。疲劳是中枢和外周神经相互作用的一种结果，外周因素主要包括体内能量的过量消耗、有害代谢物的积累以及氧化应激等，中枢因素则为交感神经肾上腺髓质和下丘脑-垂体-肾上腺轴活动的改变^[43]。

综合前人相关的研究结果，疲劳的发生机制主要有以下几种主流假说：

疲劳物质蓄积堵塞假说：随着肌肉收缩、腺体分泌、神经冲动传递等生理过程的重复进行，其生化代谢产生的代谢物质过量积累，肌肉或血液中的乳酸、丙酮酸等酸性物质会不断增加，最终导致机体产生疲劳^[44, 45]。同时，机体在进行生命活动的过程中，产生的活性氧自由基会与细胞膜结构发生过氧化反应，破坏细胞膜结构，影响细胞膜结构的正常生物学功能，同时还存在诱发肌蛋白、血清酶和血红蛋白尿升高的可能性^[46, 47]。Fu^[48]等人的研究结果表明，运动后产生的大量活性氧自由基与机体运动能力降低、肌肉疲劳和肌肉损伤密切相关。

中枢递质失衡假说：脑内中枢兴奋性神经递质是依靠多巴胺进行的，而 5-羟色胺是抑制性神经递质。在机体进行正常活动时，脑内多巴胺和 5-羟色胺的含量会维持在相对平衡的状态^[49]。机体进行长时间或高强度运动后，游离色氨酸和支链氨基酸的相对比值升高^[50]。长时间、高强度的运动导致糖元、蛋白质供能不足，而甘油和脂肪酸氧化供能增加，以此为肌肉供能，但由于脂肪酸不溶于水，因此在其运输途中必须与血浆中的白蛋白结合。在此过程中，游离脂肪酸会与游离色氨酸竞争白蛋白上的结合位点，而色氨酸与白蛋白的结合力较弱，在竞争中处于劣势，从而导致血液中游离色氨酸含量升高。之后，色氨酸通过血液运输进入脑内，在色氨酸羟化酶和 5-羟色胺脱羧酶的作用下合成 5-羟色胺。5-羟色胺大量增加致使多巴胺和 5-羟色胺比例失调，从而机体运动能力下降，产生疲劳^[51-53]。

能源物质耗竭学说：葡萄糖是供给机体生命活动的能量物质，在细胞呼吸过程中可以被氧化产生三磷酸腺苷（Adenosine Triphosphate, ATP）。该学说认为引发疲劳的原因是体内 ATP、脂肪与糖元等能源物质在运动时的大量消耗^[54]。Qi^[55]等人认为，糖元的消耗和血糖水平的下降是机体疲劳的重要原因。因为体内的 ATP 和 CP 含量是有限的，而长时间运动则会大量消耗糖元物质，从而导致机体能源物质供给不足，器官功能下降，最终产生机体疲劳。

1.3.2 生物活性肽在抗疲劳方面的作用机制

生物活性肽能够通过增加机体内的糖元含量起到抗疲劳的作用。许多研究结果表明：机体在进行长时间的运动后，糖元物质急剧消耗，从而使机体产生疲劳。服用生物活性肽则可以提高机体的糖元含量，延缓机体产生疲劳症状^[56, 57]。刘娜^[58]等人研究大豆寡肽的抗疲劳作用，其结果表明：大豆寡肽能够提高肌糖原与肝糖原的含量，并显著延长小鼠的游泳时间，具有一定的抗疲劳作用。此外，张铁

华^[59]等人通过复合酶水解玉米蛋白粉得到高 F 值的寡肽后灌胃小鼠，发现灌胃组小鼠游泳后的肝糖原含量均显著高于对照组，这表明高 F 值的寡肽通过维持肝糖原含量起到一定的抗疲劳作用。

生物活性肽可以通过清除体内自由基起到抗疲劳的作用。体内自由基的过量积累将导致酶活性大幅降低、蛋白质变性、细胞生物膜通透性降低等一系列生化指标的变化，进而造成机体工作能力的下降^[60, 61]。基于此，自由基的过量积累被认为与机体运动能力降低、肌肉疲劳和肌肉损伤等有着密不可分的关系。Pan^[62]等人通过对牛奶蛋白多肽的分离纯化，发现其产物具有很强的抗氧化活性，不仅可以清除羟自由基和超氧自由基，还能显著延长小鼠游泳时间，降低小鼠体内尿素氮和乳酸水平，从而发挥抗疲劳的作用。

生物活性肽通过消除疲劳物质的积累起到抗疲劳的作用。运动疲劳会导致血液内乳酸和尿素氮等疲劳相关物质的含量上升，有研究发现抗疲劳肽能够抑制乳酸、血清尿素氮等在运动机体内的积累^[63]。徐恺^[64]等人定期灌胃小鼠南极磷虾蛋白肽，其研究结果发现高剂量实验组小鼠的力竭游泳时间显著高于空白组，同时血清中血乳酸、血尿素氮含量显著低于空白组，这表明蛋白肽通过降低疲劳物质在体内的积累起到抗疲劳功效。而尹晓平^[65]等人通过定期灌胃小鼠天山马鹿血蛋白，结果发现各剂量组小鼠在运动后的尿素氮和乳酸含量水平均低于对照组，这表明酶解后得到的鹿血蛋白肽同样能够降低疲劳物质含量，具备一定的抗疲劳作用。

1.3.3 生物活性肽抗疲劳和抗氧化之间的关联

目前学术研究中判断生物活性肽是否具有抗疲劳的功效，通常会构建小鼠力竭游泳模型并对其生理生化指标进行测定来评价其功能。但饲养小鼠时间周期一般较长，同时在实验过程中难免会遇到不同小鼠个体间出现较大的个体差异同时很难制定统一、通用的标准，因此，根据疲劳的发生机制以及目前已有的生物活性肽抗疲劳机制，研究人员发现了不管是清除体内过量的自由基，还是通过氧化还原反应来为机体提供能量，亦或是降低体内疲劳物质的含量，在体外模型中主要是通过测定清除羟自由基、DPPH 自由基和抗脂质过氧化能力等^[66-68]。

目前疲劳的发生机制中，自由基积累是目前研究人员较为主流的研究方向，由于自由基这一物质的特殊性，其在抗疲劳的相关研究中也获得了相较其他学说

更高的关注度。在这一机制中，疲劳被认为是氧化系统与抗氧化系统之间的平衡在机体进行长时间或高强度的活动后被打破的结果，导致自由基在体内无法及时清除^[69, 70]。目前已有多种生物活性肽在被证实同时具备抗氧化活性和抗疲劳作用。例如，Liu^[71]等人将乳清蛋白酶解后，发现酶解产物不仅具有自由基清除能力和离子螯合能力，还可以显著提高小鼠的肝糖原含量和 SOD、GSH-Px 活性，具有抗疲劳的作用。综上所述，研究人员在评价生物活性肽的抗疲劳作用时，大多都会先通过体外化学模型对其抗氧化活性进行测定，在确认其具备一定的抗氧化性后再通过动物实验来评价该活性肽的体内抗疲劳效果。

1.3.4 抗疲劳活性肽的应用研究现状

抗疲劳肽目前多源于动植物，其中动物来源包括牡蛎、秋刀鱼、海星、霞水母、鲑鱼、扇贝等，而植物来源则包括金针菇、灵芝、人参、丹参、玉米、大豆、小麦等^[42, 72, 73]。从其来源不难看出，动物来源主要集中在海洋动物，而对于猪肉、河鱼等我国居民广泛摄入的动物蛋白质来源研究较少。因此，探究原材料取材简单、成本相对低廉的动物来源也是对抗疲劳活性肽进行长期研究，从而解决产业问题并满足大众对健康产品需求的重要保障措施。

目前国内已经有许多学者将从动植物中提取的生物活性肽应用于抗疲劳食品的开发。马晓伟^[74]等人以人参总皂苷提取物、牛磺酸、精氨酸、浓缩果汁和肌醇等物质为原材料制成人参肽饮料，研究结果发现该饮料在一定程度上可以有效提高小鼠在运动后的肝糖原含量，降低血液中的乳酸含量，具有良好的抗疲劳作用。雷海容^[75]等人利用大豆低聚肽和低脂奶粉等原料混合制备出了一种富肽奶粉，通过小鼠游泳试验来检验其是否具有抗疲劳作用，其实验结果表明，服用剂量为 6g/d 的试验组小鼠平均游泳时间显著高于 2g/d 的实验组，并且比对照组延长了 3.3 min，这表明富肽奶粉具有一定的延缓疲劳作用。余毅豪^[67]喂养小鼠不同剂量的海参肽，通过力竭游泳实验构建运动性疲劳模型后，发现海参肽可以提高小鼠肌糖原含量、加速体内脂肪分解代谢，提高线粒体的拷贝数以及 ATP 生成能力，显著降低了氧化应激对小鼠的负面影响和炎症因子的水平，从而起到了抗疲劳作用。但是，结合目前国内的主流研究，我们发现绝大多数关于生物肽抗疲劳作用的相关研究，其原料来源均是单一的，而很少采用从两种或多种生物肽进行提取后探究其混合后的抗疲劳作用，因此探究不同动物生物肽的混合作用对于开发价格低

廉的新型保健类食品符合产业和人民群众的广泛需求。

1.4 本研究的研究意义和主要内容

1.4.1 研究目的和意义

目前，随着科技技术的进步，人们的生活节奏变得很快，因此过度疲劳的现象也就越来越普遍。当人们的过度疲劳症状出现后，倘若不及时缓解，将会形成亚健康状态，甚至严重损害人体器官。2024 年中央一号文件提出：大力提倡健康饮食。因此，如何通过食疗的方式改善亚健康疲劳症状就具有十分重要的意义。蛋白质是人体生理活动的重要物质，在我国居民膳食中占据着重要的地位，人体每天都需要补充足够的蛋白质以维持生命活动。中医食疗保元汤能够补气益血、增强免疫力，对于现代人们的亚健康症状具有较好的缓解和治疗效果，从前人的研究报道可知，其配方中的牛肉蛋白、鲫鱼蛋白和胶原蛋白含有多功能活性肽，以及较高营养价值的氨基酸。因此本研究从这三种动物蛋白入手，将其与现代酶解工艺结合制备出具有抗氧化活性和抗疲劳功能的肽段，并开发一款具有抗疲劳功效的功能性食品，为动物蛋白资源的综合利用拓宽范围。

结合目前国内的主流研究，我们发现绝大多数关于蛋白肽抗疲劳作用的相关研究，其原料来源均是单一的，而很少针对两种或多种生物肽探究其混合后的抗疲劳作用，因此探究不同动物源生物肽的综合作用对于开发价格低廉的新型保健类食品符合产业和人民群众的广泛需求。同时，深入开展混合动物源蛋白肽的研究，不仅可以大大增加动物蛋白的资源综合利用率和附加值，还能扩大抗疲劳肽的资源并拓宽和应用范围。

1.4.2 本研究的主要内容

（1）最佳蛋白酶的筛选：选择常见商业用酶，即碱性蛋白酶、复合蛋白酶、木瓜蛋白酶、风味蛋白酶、菠萝蛋白酶和中性蛋白酶分别酶解牛肉蛋白、鲫鱼蛋白和猪蹄胶原蛋白，以酶解物的水解度和总抗氧化力为衡量指标筛选出三种最适蛋白酶。

（2）混合动物蛋白酶解工艺条件的优化：将上述筛选出来的三种蛋白酶进行复配，对混合动物蛋白进行多酶复配酶解。分别对混合蛋白复合酶解过程中的加酶量、酶解时间、酶解温度和酶解 pH 进行单因素试验，在此基础上采用均匀

设计实验优化混合动物蛋白的酶解工艺，制备出品质最好的酶解产物。

(3) 酶解物的体外抗氧化活性研究：通过还原力、DPPH 自由基清除率、ABTS⁺自由基清除率和羟基自由基清除率这 4 种体外抗氧化模型，全面综合地评价混合动物蛋白酶解物的体外抗氧化活性。

(4) 酶解物的抗疲劳功效研究：构建能客观反映机体运动疲劳的小鼠力竭游泳模型，对小鼠力竭游泳时间和反映小鼠机体疲劳的生理生化指标（如乳酸、尿素氮、肌酸激酶、肝糖原含量、丙二醛、抗氧化酶和炎症因子等）等进行测定，对酶解物的抗疲劳功效进行评价，并初步探讨分析其作用机制。

(5) 混合动物蛋白抗氧化肽的稳定性研究：研究了温度、pH、金属离子、杀菌方式、胃肠道消化等条件对混合动物蛋白肽抗氧化活性保持率的影响情况，旨在为混合动物蛋白肽作为功能性因子或者食品添加剂应用于食品、保健品等生产提供参考依据。

(6) 抗疲劳功能性固体饮料的开发：研究了以混合动物蛋白肽为主要功能因子的固体饮料配方，对饮料中的蛋白肽添加量、中药粉添加量、甜菊糖苷添加量、罗汉果甜苷添加量和柠檬酸添加量进行了优化，制备出口感良好的功能性多肽固体饮料。

1.5 创新点与技术路线

1.5.1 创新点

(1) 本论文聚焦于食疗保元汤，采取现代酶解工艺对其进行加工，并开发一款功能性固体饮料，完善了保元汤在食疗方面的理论空缺，为现代保元汤成品不方便携带的问题提供一种解决办法，拓宽其应用范围。

(2) 不同于传统的单一蛋白酶解方式，本论文以三种动物蛋白组成的混合蛋白为研究对象，探讨其复配酶解加工工艺和功效作用，得到具有抗氧化活性和抗疲劳功效的多肽，为多种蛋白的综合利用提供理论基础。同时，本研究得到的蛋白肽溶液无苦味和腥味，口感较好，为蛋白在生产应用中的苦味问题提供了解决思路。

1.5.2 技术路线

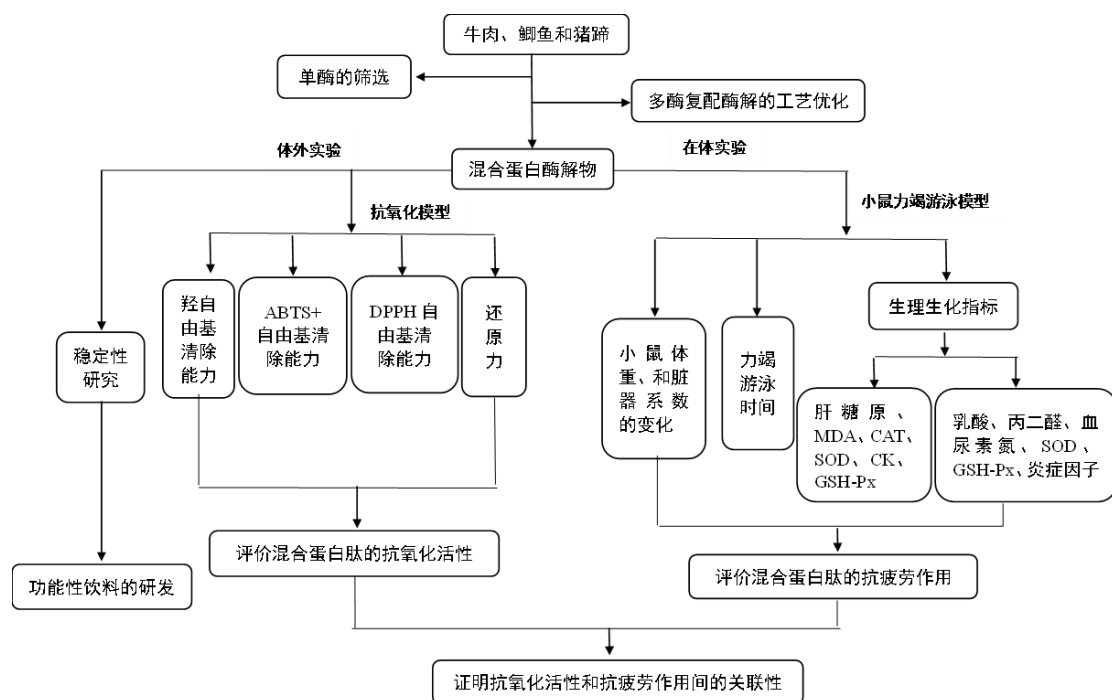


图 1.1 技术路线图

Fig.1.1 Technology Roadma

第2章 多酶复配制备混合动物蛋白活性肽的工艺优化

随着现代酶工程技术的进步，对蛋白质进行酶解处理以改善其功能性质，已成为高效利用开发蛋白质的重要技术之一。与此同时，通过可控酶解技术制备功能活性肽已经成为近年来的研究热点^[18, 76]。酶水解法以其安全性高、条件温和、过程易控等优势成为制备食品级活性肽的首选方法^[77]。相比于单一酶水解，多种蛋白酶复配使用往往具有更好的酶解效果，例如碱性蛋白酶、胃蛋白酶以及一些细菌或真菌来源的蛋白酶等复配使用后能够增加多肽得率，并在一定程度上提高水解度^[78-80]。动物源蛋白经酶解处理后，原本分子量大、结构复杂和不容易消化的成分被分解，从而导致肉的食用口感、营养价值和消化利用率均得到了提高^[26]，进一步酶解后可获得具有某一种或多种功能特性的生物活性肽段，同时促进氨基酸组成与高消化率之间达到有效的平衡^[81]。

目前，大部分关于蛋白酶解的实验研究多是以单一蛋白作为底物，探讨它的酶解工艺和功能作用，未见有关于多来源动物蛋白混合物的研究探讨，而相较于单一蛋白，混合蛋白的氨基酸组成和配比含量更符合人体需求。基于此，本研究尝试研究一种有效的混合动物蛋白酶解方式，以期对蛋白酶解机理的探讨提供理论基础，并应用到食品生产工艺中。利用 6 种食品级蛋白酶分别对牛肉蛋白、鲫鱼蛋白和猪蹄胶原蛋白进行酶解，以水解度和总抗氧化能力为评价指标筛选出各自的最适作用酶系，并在此基础上将筛选出的蛋白酶进行复配，运用单因素和均匀设计实验探讨多酶复配酶解混合动物蛋白的最佳工艺条件。

2.1 实验材料与仪器

2.1.1 实验材料

牛肉、猪蹄、鲫鱼，购于重庆市南岸区永辉超市；碱性蛋白酶（200000 U/g）、菠萝蛋白酶（600000 U/g）、木瓜蛋白酶（800000 U/g），北京索莱宝科技有限公司；复合蛋白酶（120000 U/g）、中性蛋白酶（100000 U/g），上海源叶生物科技有限公司；风味蛋白酶（150000 U/g），上海麦克林生化科技有限公司；总抗氧化力（T-AOC）检测试剂盒（ABTS 微板法），北京雷根生物技术有限公司

2.1.2 仪器和设备

表 2.1 实验仪器和设备

Tab 2.1 apparatus and equipments for experiment

名称	型号	厂家
恒温磁力搅拌器		四川蜀科仪器有限公司
高速冷冻离心机	TG-16	四川蜀科仪器有限公司
多功能酶标仪	INFINITE 200	奥地利帝肯有限责任公司
立式压力蒸汽灭菌器		上海博讯医疗生物仪器股份有限公司
水浴恒温振荡器	SHZ-C	上海博讯医疗生物仪器股份有限公司
pH 计	PB-10	赛多利斯科学仪器（北京）有限公司
电子分析天平（d=0.01g）	JY20002	上海舜宇恒平科学仪器有限公司
电子分析天平（d=0.001g）		上海舜宇恒平科学仪器有限公司
电热恒温鼓风干燥箱	DHG	上海龙跃仪器设备有限公司
全自动凯式定氮仪	K1100F	济南海能仪器股份有限公司
电炉		北京中兴伟业仪器有限公司

2.1.3 试剂

表 2.2 实验试剂

Tab 2.2 Reagents for experiment

名称	质量等级	厂家
十二烷基硫酸钠（SDS）	分析纯	北京索莱宝科技有限公司
L-亮氨酸（纯度 98%）	分析纯	北京索莱宝科技有限公司
邻苯二甲醛（OPA）	分析纯	上海麦克林生化科技有限公司
N-乙酰-L-半胱氨酸（纯度 99%）	分析纯	上海麦克林生化科技有限公司
硫酸	分析纯	成都市科隆化学品有限公司
无水乙醇	分析纯	成都市科隆化学品有限公司
甲醇	分析纯	上海麦克林生化科技有限公司
铁氰化钾	分析纯	上海泰坦科技股份有限公司
三氯乙酸（TCA）	分析纯	上海阿拉丁生化科技有限公司

2.2 实验方法

2.2.1 蛋白酶解液的制备

酶解工艺流程：牛肉、鲫鱼和猪蹄等质量混合→121 °C高压灭菌 30 min→控制 1:2 料液比→调节 pH 值→加酶→恒温酶解→灭酶（95 °C，15 min）→冷却后离心（8000 ×g，15 min）→取上清液→蛋白酶解液

具体操作步骤：首先将牛肉、鲫鱼和猪蹄清洗干净，去除鲫鱼的头、尾和内脏，再等质量混合后，置于 121 °C下高压灭菌 30 min。灭菌完成后，去除骨头后冷却至室温并搅碎，再按照 1:2 的质量比添加蒸馏水混合均匀，调节 pH 值和温度至各蛋白酶的最适反应条件后添加各类蛋白酶，恒温酶解 5 h。在 95 °C水浴条件下灭酶 15 min；冷却至室温，离心（8000 ×g，15 min）后取上清液。

2.2.2 蛋白酶的选择

选择 6 种常见商业用酶，即碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶、复合蛋白酶、风味蛋白酶、菠萝蛋白酶和中性蛋白酶，在各类酶的最适反应条件下（条件见表 1）分别对牛肉、鲫鱼和猪蹄恒温酶解 5 h。为保证各类蛋白酶水解能力的可比性，根据其各自实际酶活大小确定加酶量，最终使得酶与底物比例（E/S）均达到 1000 U/g 蛋白。酶解完成后，将样品置于 95 °C水浴条件下灭酶 15 min；冷却后，在 8000 ×g 条件下离心 15 min，过滤取上清液。以总抗氧化能力（T-AOC）和水解度（DH）为评价指标比较各酶的酶解效果，分别筛选出三种动物蛋白水解的最佳蛋白酶。

表 2.3 蛋白酶的酶解条件

Tab 2.3 Enzymatic hydrolysis conditions of protease

酶种类	加酶量（U/g）	pH	温度（℃）	反应时间（h）	料液比(w/w)
碱性蛋白酶	1000	9.0~12.0	40~50	5	1:2
木瓜蛋白酶	1000	6.0~7.0	50~65	5	1:2
复合蛋白酶	1000	5.0~8.0	40~50	5	1:2
风味蛋白酶	1000	7.5	50	5	1:2
菠萝蛋白酶	1000	6.0~6.8	30~45	5	1:2
中性蛋白酶	1000	7.5	45	5	1:2

2.2.3 复合酶解的单因素实验

由于单酶酶解达不到较高的水解度，且酶解后暴露的疏水性基团会影响酶解产物的感官风味，而多酶复配酶解能够提高水解度、酶解速率以及产物得率^[82]，因此采用多酶复配酶解来弥补单酶酶解的不足。对酶解过程中的加酶量、时间、温度和 pH 进行单因素试验，并以水解度、抗氧化活性和感官评分为指标综合评价混合蛋白肽的品质。

2.2.3.1 蛋白酶加酶量的确定

设置 800、1000、1200、1400、和 1600 U/g 五个水平加酶量，在酶解温度 50 °C，酶解 pH 值为 7 的条件下酶解 5 h，以水解度、总抗氧化能力、还原力和感官评分为评价指标，优化加酶量。

2.2.3.2 酶解时间的确定

设置 1.5、3.0、4.5、6.0 和 7.5 h 五个水平的酶解时间，在加酶量 1000 U/g，酶解温度 50 °C，酶解 pH 值为 7 的条件下进行酶解，以水解度、总抗氧化能力、还原力和感官评分为评价指标，优化酶解时间。

2.2.3.3 酶解温度的确定

设置 30、40、50 和 60 °C四个水平的酶解温度，在加酶量 1000 U/g，酶解 pH 值为 7 的条件下酶解 5 h，以水解度、总抗氧化能力、还原力和感官评分为评价指标，优化酶解温度。

2.2.3.4 酶解 pH 的确定

设置 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 五个水平的酶解 pH，在加酶量 1000 U/g，酶解温度 50 °C的条件下酶解 5 h，以水解度、总抗氧化能力、还原力和感官评分为评价指标，优化酶解 pH。

2.2.4 均匀实验设计

在前面单因素实验结果的基础上，选择加酶量、酶解时间、酶解温度和酶解 pH 四个因素，参照 $U_5(5^4)$ 均匀设计表进行实验，每组做三次平行实验，并用 MATLAB7.1 软件设计均匀方案，均匀设计因素水平如表 2 所示。

表 2.4 均匀设计因素水平 $U_5(5^4)$

Tab 2.4 Factors and levels of $U_5(5^4)$ uniform design

实验号	酶解温度 (°C)	酶解 pH	酶解时间 (h)	加酶量(U/g)
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
1	30	6.5	6.0	1500
2	35	7.5	4.5	1200
3	40	6.0	7.0	1000
4	50	7.0	5.0	500

2.2.5 水解度 DH 的测定

选择 OPA 法测定混合动物蛋白酶解液的水解度^[83]。该方法基于 OPA 与氨基在巯基存在时发生的特异性反应。将 5mL 的 20%(w/v)SDS 溶液、10 mL 的 50 mmol/L OPA 甲醇溶液、75 mL 的 0.1 mol/L 硼酸缓冲溶液(pH=9.5)以及 10 mL 的 50 mmol/L 乙酰基-半胱氨酸水溶液混合，得到 OPA 试剂。OPA 试剂现配现用，并在使用前避光搅拌 60 min。将 1.2 mL OPA 试剂与 10 μL 样品混合反应 10 min 后，测定其在 340 nm 处的吸光度。以 L-亮氨酸为标准品进行标准曲线的绘制。用 6 mol/L 的 HCl 在 110 °C 下水解蛋白质样品 24 h 后再测定其所含氨基的总量。DH 的计算公式如下所示：

$$DH/\% = \frac{(\text{NH}_2)_{\text{Tx}} - (\text{NH}_2)_{\text{To}}}{(\text{NH}_2)_{\text{Total}} - (\text{NH}_2)_{\text{To}}} \times 100 \quad \text{式(2.1)}$$

式中：(NH₂)_{Tx} 为酶解液的游离氨基含量，μmol/mL；(NH₂)_{To} 为未酶解样品的游离氨基含量，μmol/mL；(NH₂)_{Total} 为蛋白质样品中游离氨基的总量，μmol/mL。

2.2.6 总抗氧化(T-AOC)能力的测定

参照总抗氧化能力(T-AOC)检测试剂盒（ABTS 微板法）进行测定。将 ABTS 溶液和氧化剂等体积混合，室温避光存放 12 h 后，用蒸馏水将其稀释 30~55 倍成 ABTS 工作液（A₇₃₄=0.7±0.05 或者 A₄₀₅=1.4±0.05）。ABTS 工作液与待测样品按照 40:1 的体积比依次加入 96 孔板中，避免产生气泡，小心混匀，室温反应 5 min 后于 734 nm 或者 405 nm 处测定吸光度。以 Trolox 为标准品绘制标准曲线。

2.2.7 还原力的测定

参考 Sampath Kumar^[84]方法并略有改变。用蒸馏水配制一定蛋白浓度的酶解液，取各样品 2 mL，首先加入 2 mL 的 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液，再加入 1%的铁

氰化钾溶液，混合均匀后，将混合液置于 50 °C 的条件下静置保温 20 min，再加入 2 mL10%的 TCA，然后在 3000 r/min 的条件下离心 10 min，再取 2 mL 上清液与 2 mL 蒸馏水以及 0.4 mL0.1%氯化铁溶液反应，10 min 后测定其在 700 nm 处的吸光值 OD₇₀₀。

2.2.8 蛋白酶解物的感官评价

参照 GB/T 29605-2013《感官分析—食品感官质量控制导则》和 GB/T 12312-2012《感官分析—味觉敏感度的测定方法》，选择定量描述分析法对混合蛋白酶解物进行感官评价^[77]。由 10 名专业的评定人员对样品的外观、气味、鲜味和苦味 4 个指标进行感官评价，平均分为最终得分，满分 40 分，感官评价标准见表 3^[85, 86]。在感官评价前，对评定小组进行味道培训，向其提供以下两种参考溶液：咖啡因 (0.4 g/L，苦味强度，5；0.8 g/L，苦味强度，10)，谷氨酸钠 (1.0 g/L，鲜味强度，5；2.0 g/L，鲜味强度，10)。

表 2.5 感官评价标准

Tab 2.5 Standards and stores of sensory evaluation		
项目指标	评分标准	评分（分）
外观	色泽金黄，澄清透明，无浮沫	8~10
	色泽浅黄/偏褐，略有浑浊，较少浮沫	5~7
	色泽呈褐色，有可见浑浊，较多浮沫	0~4
气味	肉香味浓郁，无不良气味	8~10
	肉香味较淡，有较淡腥味	5~7
	无肉香味，有明显腥味	0~4
鲜味	鲜味浓郁，明显咸味	8~10
	鲜味较淡，略有咸味	5~7
	无鲜味，无咸味，有肉腥味	0~4
苦味	无苦味	8~10
	略有苦味，可以接受	5~7
	苦味明显，难以接受	0~4

2.2.9 肽分子质量分布的测定

采用高效液相色谱技术（HPLC）进行混合蛋白酶解物的肽分子质量分布的测定。取样品于 10mL 容量瓶中，用流动相稀释至刻度，超声 5min，离心后用微孔过滤膜过滤。进样的色谱条件为：色谱柱：TSKgel 2000SWxl 300MM*7.8mm；流动相：乙腈/水/三氟乙酸，40/60/0.1(V/V)；检测：UV 220nm；流速：0.5mL/min；柱温：30 °C。分子量校正曲线所用标准品分别是：细胞色素（MW12384）；抑肽酶（Mw6500）；杆菌肽（Mw1422）；乙氨酸-乙氨酸-酪氨酸-精氨酸（Mw451）；乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸（Mw189）

2.2.10 氨基酸组成的测定

准确称取混合蛋白酶解物冻干样品 50-200 mg，加入水解管中。加入 1:1 的分析纯盐酸（约 6M）10 mL，向管中持续吹入氮气 30 s 后密封，置于 110 °C 油浴锅中水解 22-24 h。水解结束后待冷却至室温，将样品用 0.45 um 膜过滤到 50 mL 容量瓶中并定容。吸取 2 mL 定容后的样品，置于旋转蒸发仪上进行脱酸，温度 45 °C，直至瓶底部留有少许固体或痕迹即为结束。再加入 2 mL 样品缓冲液充分溶解，通过 0.45 um 过滤器过滤后上机分析。上机条件为：缓冲液流速：20 mL/hr，反应流速：10 mL/hr，分离柱 Na 型阳离子树脂层析柱，长度直径 200 mm*4.6 mm，紫外检测波长 570 nm、440 nm；柱温：55-65-77°C 程序升温，反应槽温度 138 °C，进样量 50 μL。

2.2.11 数据处理与统计分析

本研究的试验均进行了 3 次平行实验，且所有实验数据结果都采用平均值加标准偏差的形式来表示。与此同时，使用 SPSS 软件进行数据的差异性分析；利用方差分析方法（ANOVA）比较每组数据之间是否存在统计学差异；采用主成分分析法（principal component analysis, PCA）分析单因素实验数据；采用 MATLAB7.1 软件分析设计均匀实验；使用 Origin 2023 进行绘图。

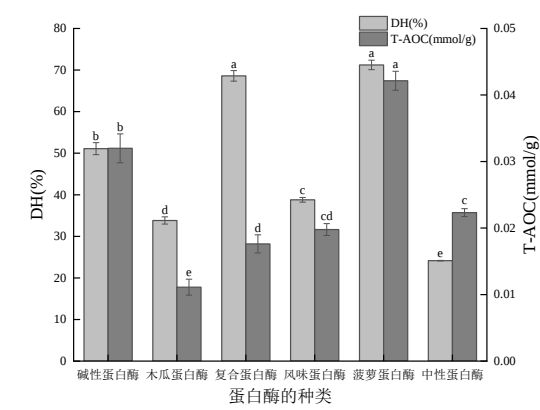
2.3 结果与分析

2.3.1 最佳用酶的筛选

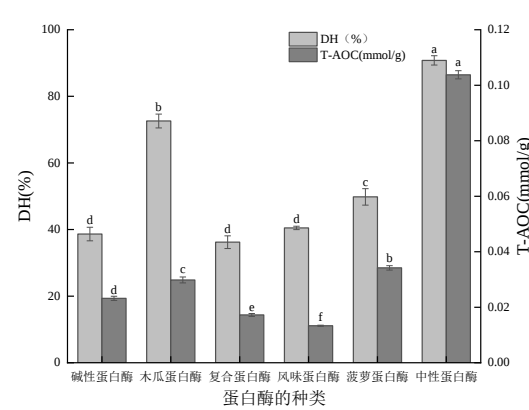
由图 2.1（a）可知，选择不同的蛋白酶水解牛肉蛋白，其酶解液的水解度和

总抗氧化能力具有显著性差异 ($p<0.05$)。从实验结果来看, 菠萝蛋白酶溶液的 DH 值最高, 为 71.23%, 其次为复合蛋白酶, 其中菠萝蛋白酶和复合蛋白酶酶解液的水解度与其他 4 种蛋白酶酶解液的水解度差异显著; 同时, 菠萝蛋白酶酶解液的 T-AOC 显著高于另外 5 种蛋白酶。综合水解度和总抗氧化能力的比较结果, 选择菠萝蛋白酶为牛肉蛋白酶解的最佳用酶, 进行后续的最佳工艺条件探讨。

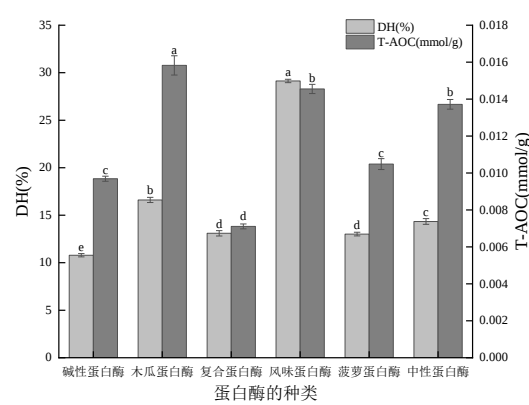
由图 2.1 (b) 可知, 鲫鱼的中性蛋白酶解液的 DH 和 T-AOC 皆达到了最大值, 分别为 70.79%和 0.1038 mmol/g, 与其他五组对比, 具有显著性差异 ($p<0.05$), 因此选择中性蛋白酶作为鲫鱼蛋白酶解的最佳用酶。由图 2.1 (c) 可知, 猪蹄的风味蛋白酶解液的 T-AOC 值略低于木瓜蛋白酶, 略高于中性蛋白酶, 但其 DH 值显著高于其他五种蛋白酶酶解液, 为 29.13%。因此, 综合考虑两个评价指标后, 选择风味蛋白酶作为猪蹄的最佳水解用酶。



(a) 不同蛋白酶对牛肉蛋白酶解液 DH 和 T-AOC 的影响



(b) 不同蛋白酶对鲫鱼蛋白酶解液 DH 和 T-AOC 的影响



(c) 不同蛋白酶对猪蹄蛋白酶解液 DH 和 T-AOC 的影响

图 2.1 不同蛋白酶对三种动物蛋白酶解液 DH 和 T-AOC 的影响

Fig.2.1 Effects of different proteases on DH and T-AOC of three animal protein hydrolysates.

注：不同小写字母代表差异显著 ($p < 0.05$)，相同代表差异不显著

2.3.2 复合酶解的单因素实验

分别对混合蛋白复合酶解过程中的加酶量、酶解时间、酶解温度和酶解 pH 进行单因素实验，以水解度、总抗氧化能力、还原力和感官评分为评价指标，确定最优值。

PCA 是一种聚类显示分析方法，在食品化学领域得到了广泛使用^[87]。PCA 的分析原理是，将实验中多个具有相关性的指标进行降维处理，从而得到了几个相关性较低但仍然保留了大部分原始数据差异的主成分因子^[88, 89]。利用 PCA 分析混合动物蛋白酶解液的品质，最终得到了相较于单一评价指标更为准确和全面的综合性分析结果，还防止了具有相关性的指标对品质评价结果产生影响^[90]。

2.3.2.1 加酶量单因素实验结果

在表 2.6 中，可以看出前三个主成分因子的方差贡献率分别为 73.280%、19.799%和 6.889%，三个主成分因子的累计方差贡献率达到了 99.968%，表明选取的这三个主成分因子所包含的信息超过了 95%的原始信息变量，故选择三个主成分因子是比较合适的。

PCA 综合得分是根据特征向量与特征值来进行计算的，反应了各指标在主成分因子中的得分^[91]。由表 2.7 可知，在五个梯度的加酶量中，酶解液的综合得分随着加酶量的增加先上升再降低，1200 U/g 的加酶量综合得分最高，其次是 1000 U/g 和 1400 U/g 的加酶量，这可能是因为当加酶量较少时，酶与底物充分反应，此时酶解液的水解度和抗氧化活性随着加酶量的增加而增加；当加酶量达到一定浓度时，酶趋于饱和导致酶解效果减弱，且加酶量过大时，酶解液的颜色过深，不良气味偏重。由于单因素实验选取的实验范围并非足够全面，根据其结果，后续的均匀设计实验考虑了可能出现的极端情况，并扩大了加酶量的范围，探讨是否会出现比 1200 U/g 更好的情况。

表 2.6 不同加酶量混合动物蛋白酶解液品质指标主成分分析解释总变量

Tab 2.6 Principal Component Analysis Explains Total Variables for Quality Indexes of mixed animal protein hydrolysates with different enzyme additions

成分	因子提取结果		
	特征值	方差贡献率/%	累计贡献率/%
1	2.931	73.280	73.280
2	0.792	19.799	93.079
3	0.276	6.889	99.968

表 2.7 不同加酶量混合动物蛋白酶解液品质指标综合得分

Tab 2.7 Comprehensive scores of quality indicators of mixed animal protein hydrolysates with different enzyme additions

加酶量 (U/g)	因子 1	因子 2	因子 3	综合得分
800	-0.3847	1.0676	-0.5003	-0.1050
1000	0.2773	0.8632	0.6532	0.4191
1200	2.1921	-0.6953	0.2063	1.4829
1400	0.4614	-0.4822	-0.5786	0.2028
1600	-2.5461	-0.7533	0.2194	-1.9998

2.3.2.2 酶解时间单因素实验结果

表 2.8 是不同酶解时间混合动物蛋白酶解液品质指标主成分分析解释总变量。由表 5.1 分析，该单因素实验选择三个主成分因子，其特征值为 3.288、0.674 和 0.037，其累计方差贡献率达到了 99.986%，表示选择的三个主成分因子包含了原始变量 99.986%的信息量，能较好的解释原始变量信息。根据表 2.9，可以得出结论，酶解时间过短或过长，酶解液的综合得分都不高。时间过短，酶与底物的作用不充分，酶解产物的抗氧化活性较弱；时间过长，水解过度反而导致酶解产物的活性降低和苦味增强。当酶解时间为 6 h 时，综合考虑 DH、T-AOC、还原力和感官评分四个指标，其综合得分最高，为最优酶解条件。据此结果，后续均匀设计时，选择酶解时间的范围为 3~7 h。

表 2.8 不同酶解时间混合动物蛋白酶解液品质指标主成分分析解释总变量

Tab 2.8 Principal Component Analysis Explains Total Variables for Quality Indexes of mixed animal protein hydrolysates with different enzymatic time

成分	因子提取结果		
	特征值	方差贡献率/%	累计贡献率/%

续表 2.8

成分	因子提取结果		
	特征值	方差贡献率/%	累计贡献率/%
1	3.288	82.200	82.200
2	0.674	16.851	99.051
3	0.037	0.935	99.986

表 2.9 不同酶解时间混合动物蛋白酶解液品质指标综合得分

Table 2.9 Comprehensive scores of quality indicators of mixed animal protein hydrolysates with different enzymatic time

酶解时间 (h)	因子 1	因子 2	因子 3	综合得分
1.5	-2.0290	-0.6093	-0.2131	-1.7725
3	-1.6493	0.2086	0.2933	-1.3178
4.5	0.7669	1.2869	-0.1098	0.8462
6	2.3185	-0.7844	0.0684	1.7743
7.5	0.5929	-0.1019	-0.0387	0.4698

2.3.2.3 酶解温度单因素实验结果

由表 2.10 分析可知，在不同酶解温度混合动物蛋白酶解液品质指标 PCA 中，选择三个主成分因子后续计算。三个主成分因子特征值分别为 3.390、0.493 和 0.116，其累计方差贡献率达到了 100%，这表示三个主成分因子包含了原始变量全部的信息，可以代替原始变量反映混合动物蛋白酶解液品质指标。由表 2.11 可知，温度过高或过低都会影响蛋白酶的活性，导致酶解液的综合得分降低。在四个温度梯度的综合得分中，酶解温度为 40℃时的品质指标综合得分最高，达到了 1.6591，为最优酶解参数。在 40℃左右时，蛋白在适度的热作用下，其结构发生变化，内部疏水基团暴露，有利于酶解反应的进行，在一定程度上综合提高了酶解液的水解度，抗氧化活性和感官风味。考虑酶的最适反应条件和实验环境，在后续均匀设计实验中，选择酶解温度的范围为 30~70℃。

表 2.10 不同酶解温度混合动物蛋白酶解液品质指标主成分分析解释总变量

Table 2.10 Principal Component Analysis Explains Total Variables for Quality Indexes of mixed animal protein hydrolysates with different enzymatic temperature

成分	因子提取结果		
	特征值	方差贡献率/%	累计贡献率/%
1	3.390	84.759	84.759
2	0.493	12.335	97.094
3	0.116	2.906	100.000

表 2.11 不同酶解温度混合动物蛋白酶解液品质指标综合得分

Table 2.11 Comprehensive scores of quality indicators of mixed animal protein hydrolysates with different enzymatic temperature

酶解温度 (°C)	DH	T-AOC	还原力	综合得分
30	-0.1926	0.6521	-0.4001	-0.0944
40	2.0595	-0.6832	-0.0785	1.6591
50	0.5071	0.5576	0.4237	0.5109
60	-2.3741	-0.5265	0.0549	-2.0756

2.3.2.4 酶解 pH 单因素实验结果

由表 2.12 分析可知，在酶解 pH 单因素实验中，选择三个主成分因子，其特征值分别为 3.139、0.754 和 0.099，其累计方差贡献率达到了 99.806%，表明这三个主成分因子几乎包含完整的原始数据指标信息，可以代替原始变量反应不同酶解 pH 混合动物蛋白酶解液的品质。根据表 2.13 可知，在 5 组酶解 pH 的综合得分中，当酶解 pH 为 6.5 时，混合动物蛋白的品质指标综合得分最高，达到了 2.0990，为最优酶解参数。其次综合得分较高的是 pH 为 6 和 7。推测原因，这可能是因为当 pH 为 6~7 时，三种蛋白酶的活性最好，且底物的溶解性较高，增加了酶与底物的接触概率；当 pH 过高时，蛋白酶失活，无法与底物发生反应。据此结果，在后续的均匀设计实验中，酶解 pH 选取的范围为 5~8，探讨是否会有更优值存在。

表 2.12 不同酶解 pH 混合动物蛋白酶解液品质指标主成分分析解释总变量

Table 2.12 Principal Component Analysis Explains Total Variables for Quality Indexes of mixed animal protein hydrolysates with different enzymatic pH

成分	因子提取结果		
	特征值	方差贡献率/%	累计贡献率/%
1	3.139	78.475	78.475

续表 2.12

成分	因子提取结果		
	特征值	方差贡献率/%	累计贡献率/%
2	0.754	18.845	97.320
3	0.099	2.486	99.806

表 2.13 不同酶解 pH 混合动物蛋白酶解液品质指标综合得分

Table 2.13 Comprehensive scores of quality indicators of mixed animal protein hydrolysates with different enzymatic pH

酶解 pH	因子 1	因子 2	因子 3	综合得分
6	-0.4906	1.3321	0.0769	-0.1335
6.5	2.7160	-0.1335	-0.2851	2.0990
7	0.6254	-0.0775	0.4368	0.4889
7.5	-0.9335	-1.1031	0.1021	-0.9398
8	-1.9173	-0.0181	-0.3308	-1.5146

2.3.3 混合动物蛋白酶解的均匀实验结果

按照表 2.4 设计的因素水平进行实验，各组实验所测得的 DH、T-AOC、还原力和感官评分如下表 2.14 所示。

表 2.14 $U_5(5^4)$ 均匀设计实验结果Table 2.14 Res μ Lt of $U_5(5^4)$ uniform design

实验号	DH(%)	T-AOC(mmol/g)	还原力	感官评价
	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4
1	41.20 $\pm$ 3.86	0.1137 $\pm$ 0.0082	0.3817 $\pm$ 0.0174	24.23 $\pm$ 0.77
2	43.51 $\pm$ 5.60	0.0336 $\pm$ 0.0052	0.3439 $\pm$ 0.0058	26.27 $\pm$ 0.82
3	45.35 $\pm$ 4.83	0.0344 $\pm$ 0.0022	0.3849 $\pm$ 0.0030	28.73 $\pm$ 0.78
4	39.75 $\pm$ 3.29	0.0279 $\pm$ 0.0012	0.3192 $\pm$ 0.0076	23.83 $\pm$ 1.38

2.3.3.1 线性回归方程的计算

由 SPSS 分析软件对表 2.14 中均匀设计实验的水解度、总抗氧化能力、还原力和感官评价结果进行二次多项式逐步回归分析，得到的方程分别为式 (2.2) ~

式 (2.5):

$$A_1 = 1.617 - 0.0973 \cdot X_2 - 9.856e^{-5} \cdot X_1^2 - 9.408e^{-8} \cdot X_4^2$$

式(2.2)

$$A_2 = -0.1927 - 0.002196 \cdot X_2 + 2.8055e^{-4} \cdot X_1^2 + 1.5977e^{-7} \cdot X_4^2$$

式(2.3)

$$A_3 = 0.2821 + 1.866e^{-5} \cdot X_3 \cdot X_4 - 2.926e^{-8} \cdot X_4^2$$

式(2.4)

$$A_4^2 = -744.57 + 2.612 \cdot X_1X_3 + 0.0337 \cdot X_1X_4 - 0.073 \cdot X_3X_4$$

式(2.5)

2.3.3.2 相关系数分析

通过查临界相关系数表可知，置信度大于 95%时， $R^2>0.3809$ ，则回归直线对观测值的拟合显著。而表 13 中 4 个模型的相关系数 R^2 分别为 0.817、0.817、0.875 和 0.815 都远大于 0.3809，因此 4 个回归方程成立。同时，各模型调整后的相关系数 R^2 分别为 0.749、0.748、0.847 和 0.746，与其对应的 R^2 相近，说明 4 个回归方程皆稳定。此外，各模型的标准偏差与对应实验测得数据的平均值相除皆小于 10%（在实验所允许的误差范围内，仪器误差约为 10%），说明方程具有可靠性。

表 2.15 相关系数分析

Tab 2.15 Correlation coefficient analysis

模型	R	R^2	调整 R^2	标准估计	更改统计量				
				的误差	R^2 更改	F 更改	df1	df2	Sig.F 更改
1	0.904 ^a	0.817	0.749	0.0323153	0.817	11.921	3	8	0.003
2	0.904 ^a	0.817	0.748	0.0369664	0.817	11.894	3	8	0.003
3	0.935 ^a	0.875	0.847	0.0119087	0.109	7.844	1	9	0.021
4	0.903 ^a	0.815	0.746	59.4075429	0.815	11.782	3	8	0.003

2.3.3.3 最佳酶解工艺及其验证

模拟最佳酶解工艺参数，通过 MATLAB7.1 编程计算，全部计算过程在联想 HP480 计算机运行。 X_1 的取值范围为 30~60 °C，每间隔 1 计算一次； X_2 的取值范围为 5~8，每间隔 0.5 计算一次； X_3 的取值范围为 3~7 h，每隔 0.5 计算一次； X_4 的取值范围为 500~1600 U/g，每隔 50 计算一次。 Y_1 ~ Y_4 的方程已由 SPSS 软件进行回归分析后得到，见公式(2)~公式(5)。

软件分析结果得出当酶解温度 43 °C，酶解 pH 值=6，酶解时间 6 h，加酶量 1200 U/g 为最佳酶解工艺，此时预测的混合动物蛋白酶解液的 DH 为 44.86%，T-

AOC 为 0.0715 mmol/g，还原力为 0.3967，感官评分为 34.1667。在该酶解条件下进行 3 次验证实验，测得四个指标的平均值分别为 43.12%、0.0792 mmol/g、0.4415 和 32.15，验证实验结果与理论结果相近，证明均匀实验设计可靠，可为混合动物蛋白酶解工艺的研究提供参考。

2.3.4 混合动物蛋白酶解物的分子质量分布

混合动物蛋白肽的分子量分布如表 2.16 所示。由表可知，多酶复配后的混合动物蛋白肽由一系列相对分子质量小于 2000（97.35%）的组分组成。其中相对分子质量在 2000-1000 Da 的分子范围内分布的组分有 6.43%，分子量在 1000-180 Da 的组分相对含量为 78.86%。

表 2.16 混合蛋白肽的分子量分布

Tab. 2.16 Molecular weight distribution of mixed protein peptides	
分子量范围 (Da)	相对含量 (%)
>2000	2.65
2000~1000	6.43
1000~180	78.86
<180	12.05

2.3.5 混合动物蛋白酶解物的氨基酸组成分析

酶解物的感官风味主要归因于蛋白质酶解生成的小分子肽、氨基酸或者其他相关的衍生物，因此分析氨基酸的组成对酶解物的风味研究意义重大。由表 2.17 可知，由牛肉、鲫鱼和猪蹄为原材料制得的混合动物蛋白酶解物，其氨基酸含量丰富，并且富含必需氨基酸、抗氧化活性氨基酸、支链氨基酸以及呈味氨基酸。

虽然色氨酸未测出，但是其余几种必需氨基酸的总含量占比达到了 38.11%，其中赖氨酸含量最高，其次是亮氨酸，这表明混合动物蛋白酶解物中的必需氨基酸含量丰富，种类齐全，具有较高的营养价值。组氨酸、酪氨酸、蛋氨酸能将电子转移使活性氧稳定，同时芳香族氨基酸也能通过共振的形式保持结构稳定，有助于提高抗氧化活性。支链氨基酸和抗氧化氨基酸的含量占比分别达到了氨基酸总量的 17.33%和 9.95%。这两种氨基酸能够延缓运动性疲劳的产生，快速消除疲劳并恢复状态，并改善肝功能，这表明混合动物蛋白有改善运动性疲劳的潜力，

为后面的实验进展提供了理论基础。在最优酶解工艺下制得的混合动物蛋白酶解物，其呈味氨基酸总含量所占比例为 69.92%，其中的鲜味氨基酸含量占比高达 43.34%，苦味氨基酸的含量占氨基酸总量的 26.58%，具有较高的鲜味和较低的苦味。这可能是在高 DH 的情况下，苦味肽的 N 端或者 C 端会进一步分解成小肽（Mw<1 kDa）和游离氨基酸，有助于酶解物的鲜味提高和苦味降低。有研究证明，鲜味氨基酸对苦味氨基酸具有一定程度的抑制作用^[92]。由表 2.17 可知，制得的酶解物中含有较高比例的天冬氨酸和谷氨酸，因此酶解产物具有高鲜味和低苦味特点。

表 2.17 混合动物蛋白酶解物的氨基酸组成分析

Tab. 2.17 Analysis of the amino acid composition of enzymatic digests of mixed animal proteins

氨基酸	氨基酸含量（mg/mL）	氨基酸	氨基酸含量（mg/mL）
天冬氨酸	77.555	异亮氨酸	43.205
苏氨酸	36.496	亮氨酸	60.049
丝氨酸	33.071	酪氨酸	21.54
谷氨酸	106.856	苯丙氨酸	33.503
甘氨酸	62.955	组氨酸	30.512
丙氨酸	52.356	赖氨酸	72.335
胱氨酸	11.633	精氨酸	56.252
缬氨酸	36.966	脯氨酸	53.914
蛋氨酸	29.356	—	—
氨基酸总量		818.554	
必需氨基酸		311.91（38.11%）	
支链氨基酸		140.22（17.13%）	
抗氧化氨基酸		81.408（9.95%）	
鲜味氨基酸		354.765（43.34%）	
苦味氨基酸		217.605（26.58%）	

注：支链氨基酸包括亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸 3 种氨基酸的含量；抗氧化氨基酸包括组氨酸、酪氨酸、蛋氨酸 3 种氨基酸的含量；鲜味氨基酸包括天冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸 6 种氨基酸的含量；苦味氨基酸包括组氨酸、酪氨酸、精氨酸、缬氨酸和赖氨酸 5 种氨基酸的含量。

2.4 本章小结

本章研究了六种食品工业中常用的蛋白酶对牛肉蛋白、鲫鱼蛋白和猪蹄胶原蛋白的酶解效果，通过酶解产物的水解度和总抗氧化力，筛选出三种蛋白各自的最适蛋白酶。然后采用多酶复配的方式对混合动物蛋白进行酶解处理，并在单因素的基础上借助主成分分析法和均匀设计法对混合动物蛋白的酶解工艺进行优化，具体结果如下：

（1）牛肉的菠萝蛋白酶酶解液的 DH 值和 T-AOC 最高，分别为 71.23%和 0.042mmol/g；鲫鱼的中性蛋白酶解液的 DH 和 T-AOC 皆达到了最大值，分别为 70.79%和 0.1038 mmol/g；综合考虑猪蹄酶解液的两个评价指标后，选择风味蛋白酶作为猪蹄的最佳水解用酶。

（2）分别对混合蛋白复合酶解过程中的加酶量、酶解时间、酶解温度和酶解 pH 进行单因素实验，以水解度、总抗氧化能力、还原力和感官评分为评价指标，采用主成分分析法确定各因素的最优值分别为：加酶量 1200 U/g、酶解时间 6h、酶解温度 40 °C和酶解 pH=6.5。

（3）在单因素的基础上，进行 $U_5(5^4)$ 均匀设计试验，再模拟最佳酶解工艺参数，通过 MATLAB7.1 编程计算，确定混合动物蛋白的最佳酶解工艺为：酶解温度 43 °C，酶解 pH 值为 6，酶解时间 6 h，加酶量为 1200 U/g，在此条件下，混合动物蛋白的水解度为 43.12%，总抗氧化能力为 0.0792 mmol/g，还原力为 0.4415，感官评分为 32.15。

（4）混合动物蛋白肽几乎包含了人体所需的所有氨基酸，其总氨基酸含量为 818.554 mg/mL，其中必需氨基酸占比 38.11%，支链氨基酸和抗氧化氨基酸的含量占比分别达到了氨基酸总量的 17.33%和 9.95%，鲜味氨基酸含量占比高达 43.34%，苦味氨基酸的含量占氨基酸总量的 26.58%。因此，混合动物蛋白肽较高的营养价值，同时还具有良好的感官风味。

第3章 混合动物蛋白肽的抗疲劳功效和作用机制研究

关于疲劳的作用机制有很多种学说研究，目前尚无统一的理论，但现代的各种学说从不同的角度阐述了疲劳的发生机制，如能源物质耗尽学说；疲劳相关代谢产物堆积学说；内环境稳定失调学说；自由基学说；保护性抑制学说；内分析系统失调学说^[54]。很多研究表明，机体内自由基的大量产生和积累是引起疲劳产生的重要原因，长时间或者高强度的运动使自由基大量产生和积累，引起机体内组织器官及大分子蛋白受损，从而导致脂质过氧化危害机体的骨骼肌、心肌等^[93]。抗氧化活性肽是一类可以抑制生物大分子过氧化或清除体内自由基功效的生物活性肽，它能提高抗氧化防御系统的能力，阻止运动过程中伴随的氧化应激^[94, 95]。一般情况下，具有抗氧化活性的肽不仅仅只具有抗氧化活性，还具有某些营养价值或其他活性，如抗疲劳功效^[96]。

鉴于蛋白肽的抗疲劳功效与抗氧化活性之间的关系，本章首先选用体外抗氧化模型（包括 DPPH 自由基清除率、ABTS⁺自由基清除率、还原力和羟基自由基清除率）评价混合蛋白肽的抗氧化活性，然后用动物模型对其抗疲劳功效进行验证，并以被证实具有显著抗疲劳活性的草鱼蛋白肽和西洋参作为阳性对照组，全面地对混合动物蛋白肽的抗氧化和抗疲劳功效进行评价。

3.1 实验材料与仪器

3.1.1 材料

牛肉、鲫鱼和猪蹄，购置于重庆南岸区学府大道永辉超市，清洗干净，去除鲫鱼头和内脏，等质量混合后在 121 °C 下高压蒸汽灭菌 30 min，再按 1:2 质量比加入去离子水搅拌均匀，按照第二章 2.3.3.3 小结中经均匀设计优化后的最优酶解工艺对混合动物蛋白进行酶解处理，将酶解液以 $8000 \times g$ 的离心力离心 15 min，取上清液即得到混合动物蛋白肽(MAPHs)，将其真空冷冻干燥后置于 4 °C 冰箱内保存备用。

新鲜草鱼，购置于重庆南岸区学府大道永辉超市，清除干净，去除头和内脏，搅成肉糜，加入等质量的去离子水混合均匀后，加入由木瓜蛋白酶、碱性蛋白酶和 PTN6.0 复配组成的蛋白酶，使得 $E/S=0.68 \times 10^3$ U/g 蛋白，同时在 $t=3.8$ h，

T=51℃的条件下进行酶解。将酶解液以 8000 ×g 的离心力离心 15 min，取上清液即得到草鱼蛋白肽(GCPHs)，将其真空冷冻干燥后置于 4℃冰箱内保存备用^[81]。

阳性对照：西洋参粉，购置于西安晋湘辅料有限公司

实验动物：SPF 级雄性昆明小鼠，6 周龄，购置重庆莱彼特生物科技有限公司。

3.1.2 仪器和设备

表 3.1 实验仪器和设备

Tab 3.1 apparatus and equipments for experiment

名称	型号	厂家
多功能酶标仪	INFINITE 200	奥地利帝肯有限责任公司
立式压力蒸汽灭菌器		上海博讯医疗生物仪器股份有限公司
水浴恒温振荡器	SHZ-C	上海博讯医疗生物仪器股份有限公司
pH 计	PB-10	赛多利斯科学仪器（北京）有限公司
电子分析天平（d=0.001g）	YP15K-1	上海舜宇恒平科学仪器有限公司
电热恒温鼓风干燥箱	DHG	上海龙跃仪器设备有限公司
电炉		北京中兴伟业仪器有限公司
真空冷冻干燥机	ESH105	天美（中国）科学仪器有限公司
搅拌机	K1100F	四川蜀科仪器有限公司
高速冷冻离心机	DZ47-60 D16	四川蜀科仪器有限公司

3.1.3 试剂

表 3.2 实验试剂

Tab 3.2 Reagents for experiment

名称	质量等级	厂家
盐酸	分析纯	成都市科龙化工试剂厂
氢氧化钠	分析纯	重上海鸿鹄生物医药科技有限公司
无水乙醇	分析纯	成都市科隆化学品有限公司
DPPH	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
甲醇	分析纯	上海泰坦科技股份有限公司
ABTS	分析纯	上海阿达玛斯试剂有限公司
过硫酸钾	分析纯	成都市科隆化学品有限公司
超氧化物歧化酶（SOD）试剂盒	生化试剂	南京建成生物工程研究所
谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）	生化试剂	南京建成生物工程研究所

续表 3.2

名称	质量等级	厂家
过氧化氢酶（CAT）测定试剂盒	生化试剂	南京建成生物工程研究所
丙二醛（MDA）测定试剂盒	生化试剂	南京建成生物工程研究所
肝糖原测定试剂盒	生化试剂	南京建成生物工程研究所
IL-6	生化试剂	慧佳生物
IL-10	生化试剂	慧佳生物
TNF- α	生化试剂	慧佳生物
乳酸测定试剂盒	生化试剂	北京索莱宝科技有限公司
尿素氮测定试剂盒	生化试剂	南京建成生物工程研究所
肌酸激酶测定试剂盒	生化试剂	北京索莱宝科技有限公司

3.2 实验方法

3.2.1 MAPHs 体外抗氧化活性测定

Famuwagun^[97]建议采用多个模型来测定样品的抗氧化活性。因此，通过检测 MAPHs 的还原力、DPPH 自由基、ABTS⁺自由基和羟基自由基清除率，综合探究 MAPHs 的体外抗氧化活性，并选择谷胱甘肽（GSH）作为对照组。

3.2.1.1 还原力的测定

还原力的测定方法同第二章 2.2.7。

3.2.1.2 DPPH 自由基清除率的测定

参照 Nasri^[98]的方法，在其基础上略作修改。用 95%乙醇配制 0.2 mmol/L 的 DPPH 溶液，用蒸馏水将样品稀释为不同浓度梯度，样品加入 2 mL DPPH 后在室温下避光保存 30 min，于 517 nm 波长处测定吸光度。

$$DPPH \text{ 自由基清除率 } (\%) = (1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}) \times 100 \quad \text{式 (3.1)}$$

式中：

A_1 ：2 mL 样品+2 mL DPPH-乙醇溶液于 517 nm 的吸光度；

A_2 ：2 mL 样品+2 mL 95%乙醇于 517 nm 的吸光度；

A_0 ：2 mL 蒸馏水+2 mL DPPH-乙醇溶液于 517 nm 的吸光度。

3.2.1.3 ABTS⁺自由基清除率的测定

参照项昭保^[99]的方法，在其基础上略作修改。用甲醇配制 7 mmol/L 的 ABTS

溶液，与 2.45 mmol/L 过硫酸钾溶液等体积混合均匀，避光放置 12-16 h 后待用。将上述工作液用甲醇稀释，调整其在 734 nm 波长处吸光度为 0.7 ± 0.02 。用蒸馏水将样品稀释为不同浓度梯度，取 0.5 mL 样品，加入 4 mL ABTS 工作液，室温避光反应 10 min，在 734 nm 波长处测其吸光度。

$$ABTS \text{ 自由基清除率 } (\%) = (1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}) \times 100 \quad \text{式 (3.2)}$$

式中：

A_1 ：0.5 mL 样品+4 mL ABTS 在 734 nm 的吸光度；

A_2 ：0.5 mL 样品+4 mL 甲醇在 734 nm 的吸光度；

A_0 ：0.5 mL 甲醇+4 mL ABTS 在 734 nm 的吸光度。

3.2.1.4 羟基自由基清除率的测定

在王宏亮^[100]的方法基础上略作修改。用蒸馏水将样品稀释为不同浓度梯度，取 1 mL 样品，依次加入 1 mL 的 9 mmol/L 硫酸亚铁溶液、9 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液和 8.8 mmol/L H_2O_2 ，混合均匀后在室温下反应 30 min，510 nm 波长处测吸光度

$$\text{羟基自由基清除率 } (\%) = (1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}) \times 100 \quad \text{式 (3.3)}$$

式中：

A_1 ：样品与试剂在 510 nm 的吸光度；

A_2 ：为样品溶液本身在 510 nm 的吸光度，以蒸馏水代替 H_2O_2 溶液；

A_0 ：为用蒸馏水代替样品在 510 nm 的吸光度。

3.2.2 MAPHs 抗疲劳功效研究

3.2.2.1 实验小鼠的分组和喂养

实验共选取 70 只雄性 KM 小鼠，饲养于动物房。小鼠在进行分组实验之前经过 7d 的饲养以适应环境。明暗交替，光照适宜，每笼 4 只小鼠，自由饮食，定期更换小鼠垫料，饮水瓶经常补充^[101]。随后按照体重平均原则选择体重适宜的小鼠随机分为 7 组，每组 10 只。7 组分别为：空白组、对照组、草鱼蛋白肽组 (GCPHs)、西洋参组、混合蛋白肽低剂量组(MAPHs-L)、混合蛋白肽中剂量组

(MAPHs-M)、混合蛋白肽高剂量组 (MAPHs-H)。在连续四周的实验中, 按剂量设计连续喂养 28 d, 给药频率为 1 次/d。空白组不处理, 对照组小鼠被灌胃生理盐水, 草鱼蛋白肽组被灌胃草鱼蛋白肽 1.5 mg/(g · d), 西洋参组被灌胃 0.6 mg/(g · d)西洋参粉, 低剂量组的小鼠被灌胃 0.15 mg/(g · d)的混合蛋白多肽, 中剂量组的小鼠被灌胃 0.5 mg/(g·d)的混合蛋白多肽, 高剂量组的小鼠被灌胃 1.5 mg/(g · d)混合蛋白多肽。

3.2.2.2 负重力竭游泳实验

运动耐力的下降是疲劳最主要的一种表现形式, 相关的测定方法有前肢握力实验、疲劳转棒实验、跑台运动实验以及力竭游泳实验。其中力竭游泳实验不仅操作简单, 且还能客观的反应机体疲劳状态^[102]。

各组小鼠在最后一次给药 30 min 后, 将其放置于游泳箱中 (水温 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 水深 35 cm) 游泳, 直至小鼠沉入水底 10 s 后不再浮起, 作为力竭死亡标准。记录小鼠自开始游泳至力竭死亡的时间。在小鼠游泳期间, 为了保证其一直游动, 必要时可搅动水池。同时, 在小鼠尾部负重其体重 5%的锡丝。

3.2.2.3 体重和脏器指数的测定

每天监测小鼠的体重变化, 并连续记录 28 d, 同时观察小鼠的行为特征。

肝脏、脾脏和胸腺都是机体内重要的免疫器官, 其器官指数通常可以作为评估药物免疫药理学的初步指标。小鼠末次给药 30 min 后, 在经过游泳 1 h 后, 立马处死, 解剖取其肝脏、脾脏和胸腺。

3.2.2.4 小鼠生理生化指标测定

各组小鼠在最后一次给药 30 min 后, 将其放置于游泳箱中 (水温 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 水深 35 cm) 游泳 1 h, 将其捞出, 立马取眼球血, 离心 ($3000 \text{ r}/10\text{min}$, 4°C), 取血清采用试剂盒检测其尿素氮(BUN)的含量、丙二醛 (MDA) 的含量、乳酸 (LD) 的含量; 肌酸激酶(CK)的活性、超氧化物歧化酶(SOD)的活性、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)的活性、过氧化氢酶(CAT)的活性; TNF- α 、IL-6、IL-10 细胞因子水平。

小鼠取血完毕后, 立刻颈椎脱臼处死并解剖, 统一称取肝脏 100 mg, 于液氮暂时保存, 取材完毕转 -80°C 保存。根据试剂盒测定肝糖原、MDA、CAT、SOD 和 GSH-PX 的含量。

3.2.3 数据处理和统计分析

数据处理同 2.2.11。

3.3 结果与分析

3.3.1 MAPHs 的体外抗氧化活性

3.3.1.1 MAPHs 的还原力

还原力往往作为衡量抗氧化剂供电子能力的重要指标。抗氧化剂可在一定条件下将 Fe^{3+} 还原为 Fe^{2+} ，使溶液呈现普鲁士蓝色。溶液颜色越深，在 700 nm 处的吸光值就越大，还原力就越强^[103]。由图 3.1 可以看出，MAPHs 的还原力随着其质量浓度的增加而增强，这表明 MAPHs 能够作为电子供体，使自由电子和自由基结合而终止链反应。在 0-25 mg/mL 范围内，MAPHs 的还原力和其质量浓度呈量效关系。对曲线进行方程拟合，得到方程： $y = -0.0015x^2 + 0.0877x + 0.0309$ （拟合系数 $R^2 = 0.9953$ ），说明 MAPHs 的还原力在一定的浓度范围内会随着浓度逐渐增加至最大值，且当 MAPHs 的浓度为 GSH 的 5 倍左右时，二者的还原力相当。

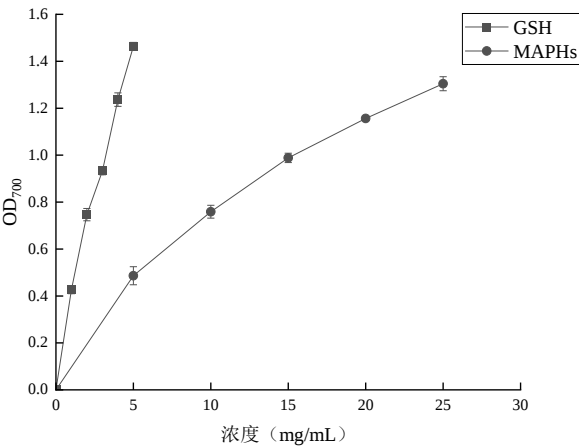


图 3.1 MAPHs 的还原力

Fig 3.1 The reducing power of MAPHs

3.3.1.2 MAPHs 清除 DPPH 自由基的能力

DPPH 是一种稳定的自由基，而 DPPH 自由基清除率通常作为判断抗氧化剂是否有抗氧化活性的指标。多肽与 DPPH 的电子结合，在 517 nm 处具有较强的吸收峰，溶液呈现紫罗兰色^[103]。如图 3.2 所示，在 0-5 mg/mL 的浓度范围内，

MAPHs 对 DPPH 自由基的清除能力逐渐升高，且清除率先增大后减缓，当浓度大于 2 mg/mL 时，其清除率上升缓慢。当质量浓度增至 5 mg/mL 时，MAPHs 和 GSH 对 DPPH 自由基的清除率皆达到 60% 以上，分别为 68.75% 和 95.98%。对 MAPHs 的 DPPH 自由基清除率进行方程拟合，得到方程： $y = -2.1358x^2 + 23.214x + 3.5418$ （拟合系数 $R^2 = 0.9758$ ），计算可得 MAPHs 清除 DPPH 自由基的 IC_{50} 值为 2.64 mg/mL。因此，混合动物蛋白肽可以有效的抑制 DPPH 自由基活性。

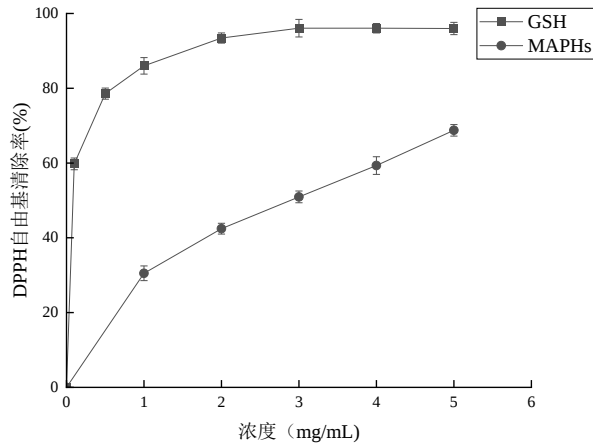


图 3.2 MAPHs 清除 DPPH 自由基的能力

Fig 3.2 The DPPH• radical scavenging activity of MAPHs

3.3.1.3 MAPHs 清除 ABTS⁺自由基的能力

抗氧化物质清除自由基的能力越强，ABTS⁺被还原为 ABTS 的速率就越快，表现为其荧光强度下降的速率就越快。因此 ABTS⁺自由基的清除率可作为评价物质的抗氧化能力^[104]。由图 3.3 可知，随着质量浓度的增加，MAPHs 和 GSH 的 ABTS⁺自由基清除率逐渐增加。当 GSH 的浓度为 0.2 mg/mL 时，其 ABTS⁺的抑制率就达到了最大值 99.48%，且当浓度大于 0.2 mg/mL 时，ABTS⁺抑制率就基本维持不变了。在 0-5 mg/mL 浓度范围内，MAPHs 的 ABTS⁺自由基清除率先快速增加，然后缓慢上升，当浓度为 5 mg/mL 时，其清除率达到 80.60%。对 MAPHs 的 ABTS⁺自由基清除率在其浓度范围内进行方程拟合，得到方程： $y = 1.8519x^3 - 20.302x^2 + 75.672x - 21.177$ （拟合系数 $R^2 = 0.9857$ ），计算得到 MAPHs 清除 ABTS⁺自由基的 IC_{50} 值为 1.40 mg/mL。综上所述，MAPHs 可以有效的抑制 ABTS⁺自由基活性，具有较强的抗氧化活性。

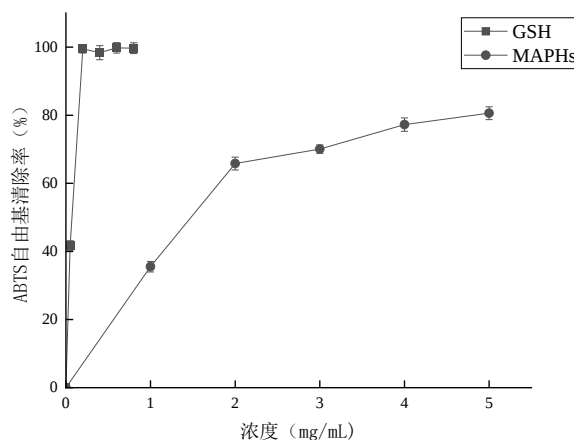


图 3.3 MAPHs 清除 ABTS⁺自由基的能力

Fig 3.3 The ABTS⁺ radical scavenging activity of MAPHs

3.3.1.4 MAPHs 清除羟基自由基的能力

在机体内的新陈代谢生命活动中，各种活性氧自由基会不断产生，其中的羟基自由基是一种很重要的活性氧，具有极强的得电子能力即氧化能力^[105]。由图 3.4 可知，随着 GSH 和 MAPHs 的浓度逐渐增加，其清除羟基自由基的能力也增加。当 MAPHs 浓度为 1 mg/mL 时，对羟基自由基的清除率仅为 5.79%；当 MAPHs 的浓度达到 5 mg/mL，其对羟基自由基的清除率达到 26.09%，这表明 MAPHs 对羟基自由基具有一定的清除能力，且其清除率和质量浓度在 0-5 mg/mL 范围内存在量效关系。对 MAPHs 的羟基自由基清除率在其浓度范围内进行方程拟合，得到方程 $y = 0.542x^3 - 4.3018x^2 + 14.084x - 4.5912$ （拟合系数 $R^2 = 0.9989$ ），基于此计算可知 MAPHs 清除羟基自由基的 IC₅₀ 值为 6.34 mg/mL。

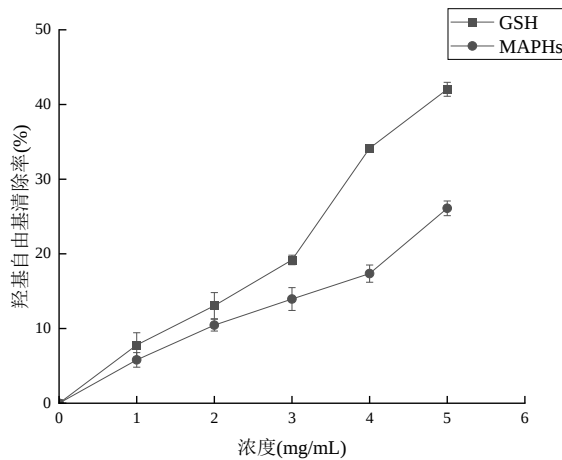


图 3.4 MAPHs 清除羟基自由基的能力

Fig 3.4 Hydroxyl radical scavenging activities of MAPHs

3.3.2 MAPHs 对小鼠体重的影响

小鼠的体重变化能够从侧面反应出 MAPHs 对小鼠健康状态的影响，不管是体重大幅增长还是迅速减少，都是不健康的症状表现。因此，有必要监测小鼠的体重变化。由表 4.3 可知，随着灌胃时间的延长，小鼠的体重逐渐增长，且各组之间的差异并不明显 ($p>0.05$)。其中，MAPHs 组和空白组、对照组、GCPHs 组以及西洋参组都没有显著性差异。在灌胃期间，小鼠的行为特征也并未出现异常或死亡的情况。综上所述，MAPHs 并不会影响小鼠的生长情况，且无毒害作用。

表 3.3 小鼠体重的变化

Tab 3.3 Changes in the body weight of mice

组别	小鼠体重 (g)				
	初始	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周
空白组	28.82±1.13	36.67±2.64	40.89±1.91	43.27±1.31	44.93±2.24
对照组	28.95±0.91	37.64±2.45	41.48±3.13	43.42±3.17	44.63±3.58
GCPHs	28.57±0.84	37.14±1.88	40.69±2.55	42.89±2.76	43.96±2.72
西洋参	28.31±1.46	36.35±1.99	40.49±2.12	43.28±2.46	43.82±2.46
MAPHs-L	28.35±0.68	36.48±1.91	41.05±2.09	43.88±3.08	44.84±2.26
MAPHs-M	28.69±1.07	37.51±1.22	41.76±1.67	43.68±2.23	45.02±2.33
MAPHs-H	28.46±0.76	36.96±1.09	41.47±1.60	43.38±2.02	44.05±2.24

3.3.3 MAPHs 对小鼠脏器系数的影响

肝脏是体内新陈代谢的重要器官，对非营养性物质具有生物转化作用；脾脏

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/978116040005006143>