

略阳乌鸡低聚肽制备工艺优化 及抗氧化活性研究

张馨月^{1,2} 陈锐^{1,2,3,4} 陈黎维^{1,3} 李海成^{1,4}

(1. 陕西理工大学生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723000; 2. 陕西省资源生物重点实验室, 陕西 汉中 723000;

3. 陕南秦巴山区生物资源综合开发利用协同创新中心, 陕西 汉中 723000;

4. 秦巴生物资源与生态环境省部共建国家重点实验室(培育), 陕西 汉中 723000)

摘要: [目的] 为提高略阳乌鸡附加值, 制备略阳乌鸡低聚肽, 并测定其抗氧化活性。[方法] 以略阳乌鸡肉为原料, 利用两种蛋白酶复合酶解, 采用响应面法优化略阳乌鸡低聚肽制备工艺, 并进行抗氧化活性评价。[结果] 略阳乌鸡低聚肽双酶复合酶解的最佳制备工艺为采用中性蛋白酶和酸性蛋白酶复合, 底物质量浓度 3 g/100 mL, 酶解时间 4 h, 酶添加总量 9 300 U/g, 酶解 pH 6.5, 酶配比 1:1。该条件下, 酶解产物中三氯乙酸(TCA)可溶性短肽含量最高, 为 10.29 mg/mL, 与预测值接近, 蛋白回收率为 71.52%。略阳乌鸡低聚肽对 DPPH 自由基、ABTS⁺ 自由基、羟自由基的 IC₅₀ 分别为 4.675 mg/mL、31.401 μg/mL、4.769 mg/mL, 且 10 mg/mL 略阳乌鸡低聚肽的还原能力接近于 0.02 mg/mL 的抗坏血酸。[结论] 试验工艺可以获得较多具有抗氧化活性的略阳乌鸡低聚肽。

关键词: 略阳乌鸡; 低聚肽; 制备; 体外抗氧化活性

Optimization of the preparation process and antioxidant activity of oligopeptides from Lueyang black-bone chicken

ZHANG Xinyue^{1,2} CHEN Rui^{1,2,3,4} CHEN Liwei^{1,3} LI Haicheng^{1,4}

(1. School of Biological Science & Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong, Shaanxi 723000, China;

2. Shaanxi Province Key Laboratory of Bio-Resources, Hanzhong, Shaanxi 723000, China;

3. Collaborative Innovation Center for Comprehensive Development of Bio-Resources in Qinba

Mountain Area of Southern Shaanxi, Hanzhong, Shaanxi 723000, China; 4. Qinba State Key

Laboratory of Biological Resources and Ecological Environment, Hanzhong, Shaanxi 723000, China)

Abstract: [Objective] To prepare oligopeptides from Lueyang black-bone chicken in order to increase its added value and to determine their antioxidant activity. [Methods] Lueyang black-bone chicken meat was used as the raw material. Two proteases were employed for compound enzymatic hydrolysis, and response surface methodology was applied to optimize the preparation process of Lueyang black-bone chicken oligopeptides and to evaluate their antioxidant activity. [Results] The optimal preparation process for compound hydrolysis of Lueyang black-bone chicken oligopeptides was as follows: neutral protease and acid protease in combination, substrate concentration 3 g/100 mL, enzymatic hydrolysis time 4 h, total enzyme addition 9 300 U/g, hydrolysis pH 6.5, and enzyme ratio 1:1. Under these conditions, the hydrolysate had the highest trichloroacetic acid (TCA)-soluble short peptide content of 10.29 mg/mL, which was close to the predicted value, with a protein recovery rate of 71.52%. The IC₅₀ values of Lueyang black-bone chicken oligopeptides for scavenging DPPH

基金项目: 陕西省科技厅社发项目(编号: 2015SF255); 陕西省科技厅农业科技创新与攻关项目(编号: 2020NY-001); 秦巴生物资源与生态环境重点实验室(培育)“市校共建”科研项目(编号: SXC-2101)

通信作者: 陈锐(1979—), 男, 陕西理工大学高级实验师, 硕士。E-mail: rchen0411@163.com

收稿日期: 2024-12-05 **改回日期:** 2025-08-05

引用格式: 张馨月, 陈锐, 陈黎维, 等. 略阳乌鸡低聚肽制备工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 食品与机械, 2026, 42(1): 130-138.

Citation: ZHANG Xinyue, CHEN Rui, CHEN Liwei, et al. Optimization of the preparation process and antioxidant activity of oligopeptides from Lueyang black-bone chicken[J]. Food & Machinery, 2026, 42(1): 130-138.

radicals, ABTS⁺ radicals, and hydroxyl radicals were 4.675 mg/mL, 31.401 μ g/mL, and 4.769 mg/mL, respectively, and the reducing ability of 10 mg/mL oligopeptides was close to that of ascorbic acid at 0.02 mg/mL. **[Conclusion]** The experimental process can yield a considerable amount of Lueyang black-bone chicken oligopeptides with antioxidant activity.

Keywords: Lueyang black-bone chicken; oligopeptide; preparation; *in vitro* antioxidant activity

低聚肽是指相对分子质量 $\leq 1\ 000$ 的生物活性肽,不需进一步分解消化就可直接被人体吸收,不仅能以主动吸收的方式保存活性,还可起到载体的作用运输营养物质^[1]。研究^[2-7]表明,低聚肽具有降血压、降血糖、降胆固醇、抗菌、调节免疫活性、抗氧化等生物活性。略阳乌鸡作为陕西略阳的地理标志产品,与泰和乌鸡相比其氨基酸总含量更高,且具有丰富的营养和药用保健价值^[8]。乌鸡肽的制备目前多以酶解法为主。刘文颖等^[9]利用碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶,通过两步酶解法制备出乌鸡低聚肽,其肽含量较高,且具有良好的热稳定性、pH稳定性和消化稳定性。钟群^[10]通过超声波和高压水提技术对雪峰乌鸡进行预处理,利用正交试验优化复合蛋白酶酶解乌鸡肉工艺条件,并进一步利用乳酸菌发酵法发酵酶解后所剩肉渣和骨头,获得乌鸡活性肽,从而提高了短肽含量和乌鸡利用率。虽然微生物发酵法比较温和,但其过程复杂,产物难以控制。试验拟以略阳乌鸡为原料,通过响应面法优化双酶酶解工艺,超滤制得略阳乌鸡低聚肽,并对其进行基本营养成分和氨基酸组成分析及体外抗氧化活性研究,以期进一步丰富略阳乌鸡产品的种类,提高其附加值,为略阳乌鸡低聚肽在食品、保健品等领域的开发应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新鲜略阳乌鸡:市售;

胰蛋白酶、碱性蛋白酶、中性蛋白酶、酸性蛋白酶、复合蛋白酶、木瓜蛋白酶:广西南宁庞博生物工程有限公司;

牛血清蛋白:上海金穗生物科技有限公司;

三氯乙酸:分析纯,福晨(天津)化学试剂有限公司;

硫酸铜:分析纯,天津永晟精细化工有限公司;

酒石酸钾钠:分析纯,北京金盏化工厂;

1,1-二苯基-2-苦肟基(DPPH)、2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS):分析纯,上海源叶生物科技有限公司;

无水乙醇:分析纯,天津市富宇精细化工有限公司;

水杨酸:分析纯,天津市天力化学试剂有限公司;

抗坏血酸、30%过氧化氢、硫酸亚铁:分析纯,天津市大茂化学试剂厂;

过硫酸钾、三氯化铁、氢氧化钠、铁氰化钾:分析纯,天津市鑫博特化工有限公司;

全波长紫外分光光度计:EVOLUTION 201型,美国赛默飞世尔科技公司;

半自动凯氏定氮仪:SKD-100型,上海沛欧分析仪器有限公司;

pH计:PE28型,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;

六级膜分离实验机:DMJ60-6型,山东博纳生物科技集团有限公司;

多功能酶标仪:MULTISKAN MK3型,美国赛默飞世尔科技公司;

真空冷冻干燥机:LJG-40E型,北京四环科学仪器厂有限公司;

离心机:Allegra X-30R型,美国贝克曼库尔特有限公司;

高速氨基酸自动分析仪:HITACHI835-50型,日本日立公司。

1.2 试验方法

1.2.1 略阳乌鸡低聚肽制备 去除乌鸡内脏,清洗,切块,搅碎,加入适量水煮沸约30 min,匀浆,冷却,6 000 r/min离心15 min,去掉油脂,保留下层液料,冷冻干燥^[11]。按3 g/100 mL的比例添加略阳乌鸡粉和蒸馏水,调节pH至6.5,以酶添加总量9 300 U/g加入混合酶(中性蛋白酶和酸性蛋白酶活力配比为1:1),酶解4 h,沸水浴灭酶15 min,冷却,4 $^{\circ}$ C、8 000 r/min离心15 min,收集上清液,经六级膜过滤后,取 $\leq 1\ 000$ 组分冷冻干燥,得到略阳乌鸡低聚肽。

1.2.2 三氯乙酸(TCA)可溶性短肽含量测定 参照徐娟等^[12]的方法。以标准蛋白质BSA浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线方程 $y=0.049x-0.000\ 4$, $R^2=0.999\ 98$ 。

1.2.3 水解度测定 按式(1)计算水解度。

$$C_1 = \frac{m_1}{m_2} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

C_1 ——水解度,%;

m_1 ——水解后生成游离氨基氮含量,g;

m_2 ——样品中总氮含量,g。

1.2.4 游离氨基氮含量测定 采用中性甲醛滴定法。

1.2.5 总氮含量测定 参照凯氏定氮法^[13]。

1.2.6 蛋白回收率测定 按 GB 5009.5—2016 测定蛋白质含量,再根据式(2)计算蛋白质回收率^[14]。

$$C_2 = \frac{m_3}{m_4} \times 100\%, \tag{2}$$

式中:

C_2 ——蛋白质回收率,%;

m_3 ——酶解上清液中 TCA 可溶蛋白含量,g;

m_4 ——原料中总蛋白质含量,g。

1.2.7 最适蛋白酶筛选 选取底物质量浓度 3 g/100 mL 为酶解基准条件,用 1 mol/L 氢氧化钠或盐酸溶液调整至所需 pH 值,加入目标蛋白酶按各自最适条件酶解(具体参数见表 1)。酶解结束后,沸水浴灭酶 15 min,冷却,8 000 r/min 离心 15 min,测定上清液中 TCA 可溶性短肽含量。

表 1 不同酶最适酶解条件

Table 1 Optimal enzymatic hydrolysis conditions for different enzymes

酶种类	总加酶量/(U·g ⁻¹)	pH 值	温度/℃	时间/h
碱性蛋白酶	6 000	8	60	3
中性蛋白酶	6 000	7	55	3
酸性蛋白酶	6 000	4	50	3
胰蛋白酶	6 000	8	45	3
木瓜蛋白酶	6 000	7	60	3
复合蛋白酶	6 000	7	45	3

1.2.8 最佳加酶方式确定 在单酶酶解基础上,筛选 TCA 可溶性短肽含量最高的两种酶制剂进行复合酶解,考察不同加酶方式对 TCA 可溶性短肽含量的影响(具体加酶方式见表 2)。分步酶解为先用一种酶酶解,灭酶后再用另一种酶酶解。混合酶解则是分别在两种酶最适条件下复合酶解 3 h。试验过程中,统一酶解条件为底物质量浓度 3 g/100 mL,酶添加总量 6 000 U/g,酶活力配比 1:1。

表 2 双酶酶解的加酶方式

Table 2 Enzyme addition methods for dual enzyme digestion

加酶方式	酶种类	酶解温度/℃	酶解 pH	加酶量/(U·g ⁻¹)	酶解时间/h
分步 1	酸性蛋白酶	50	4	6 000	1.5
	中性蛋白酶	55	7	6 000	1.5
分步 2	中性蛋白酶	55	7	6 000	1.5
	酸性蛋白酶	50	4	6 000	1.5
混合 1		50	4	6 000	3.0
混合 2		55	7	6 000	3.0

1.2.9 酶解条件单因素试验 采用中性蛋白酶和酸性蛋白酶复合酶解,将略阳乌鸡粉溶于一定比例的去离子水中,将底物质量浓度调节至 3 g/100 mL。考察酶解时间(1,2,3,4,5 h)、酶添加总量(4 000,6 000,8 000,10 000,12 000 U/g)、酶配比(3:7,4:6,5:5,6:4,7:3)、酶解温度(35,45,55,65,75 ℃)和酶解 pH(4,5,6,7,8)对酶解液 TCA 可溶性短肽含量的影响。

1.2.10 酶解条件响应面优化试验 在单因素试验基础上,选取酶添加总量、酶解 pH、酶配比作为考察因素,以 TCA 可溶性短肽含量为响应值,依据 Design-Expert 13 软件中的 Box-Behnken 设计三因素三水平试验优化酶解工艺。

1.2.11 略阳乌鸡低聚肽基本成分分析

- (1) 水分含量:参照 GB 5009.3—2016。
- (2) 蛋白质含量:参照 GB 5009.5—2016。
- (3) 灰分含量:参照 GB 5009.4—2016。
- (4) 脂肪含量:参照 GB 5009.6—2016。
- (5) 氨基酸组成:参照谢莎等^[15]的方法。

1.2.12 体外抗氧化活性评价

(1) DPPH 自由基清除能力:根据郑昌亮等^[16]的方法。按式(3)计算 DPPH 自由基。

$$C_3 = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\%, \tag{3}$$

式中:

C_3 ——自由基清除率,%;

A_0 ——空白组吸光度;

A_1 ——样品组吸光度;

A_2 ——对照组吸光度。

(2) ABTS⁺自由基清除能力:根据张靖^[17]的方法稍作修改。配制 ABTS⁺自由基工作液,将低聚肽样品配制成一定浓度的溶液,以维生素 C 为对照,测定 734 nm 处吸光度,按式(1)计算 ABTS⁺自由基清除率。

(3) 羟自由基清除能力:根据杨玉亮等^[18]的方法稍作修改。将低聚肽样品配制成一定浓度的溶液,以维生素 C 为对照,测定 510 nm 处吸光度,按式(3)计算羟自由基清除率。

(4) 还原能力:根据 Sarabandi 等^[19]的方法,以维生素 C 为对照。

1.3 数据分析

利用 Design-Expert 13 软件进行响应面试验设计和结果分析,进行 3 次平行试验,结果以平均值±标准偏差表示。通过 SPSS 23.0 软件进行数据单因素方差分析和邓肯多重比较,字母不同表示差异显著($P<0.05$)。利用 Origin 2018 软件绘图。

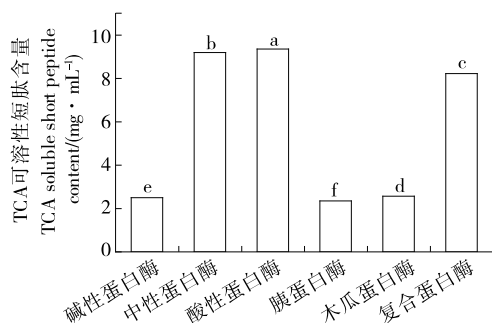


图1 不同蛋白酶酶解产物中TCA可溶性短肽含量

Figure 1 Content of TCA-soluble short peptide of different protease digestion products

2 结果与分析

2.1 最适蛋白酶筛选结果

由图1可知,酶活力相同情况下,目标蛋白酶在各自最适条件下酶解3 h,中性蛋白酶和酸性蛋白酶可以酶解得到更多的TCA可溶性短肽,显著高于其他蛋白酶($P < 0.05$)。因此,选择中性蛋白酶和酸性蛋白酶为最适蛋白酶进行后续试验。

低聚肽的抗氧化活性与其一级结构组成和相对分子质量大小有关,相对分子质量越小,低聚肽的抗氧化活性越高^[20]。不同蛋白酶具有不同的酶切位点,因而对于不同的酶解底物,选择合适的蛋白酶会增加水解肽键的数量,释放出更多肽段。由于酶具有专一性,一种酶往往只具有一种酶切位点,限制了酶解产物的水解程度。双酶酶解则可以增加酶切位点数量,使底物充分水解,获得相对分子质量更小的肽段^[21]。

2.2 双酶最适加酶方式确定

由图2可知,双酶不同的加酶方式对酶解过程有影响。在中性蛋白酶最适条件下进行混合酶解,所得到的TCA可溶性短肽含量最高($P < 0.05$),说明利用中性蛋白酶和酸性蛋白酶酶解略阳乌鸡过程中,混合酶解方式要优于分步酶解法,可用于后续试验。

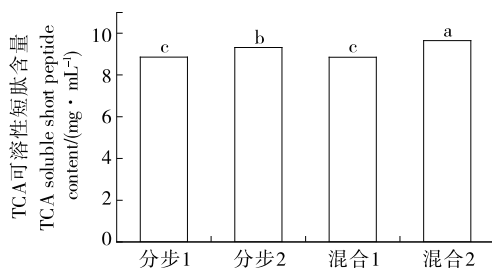


图2 双酶不同加酶方式对TCA可溶性短肽含量的影响

Figure 2 Effect of different enzyme addition methods on the TCA-soluble short peptide content by dual enzymes

2.3 双酶混合酶解工艺优化

2.3.1 单因素试验 由图3(a)可知,随着酶解时间的延长,TCA可溶性短肽含量呈先增加后减少趋势,当酶解时间为4 h时,TCA可溶性短肽含量为10.01 mg/mL,明显高于其他水解时间($P < 0.05$)。这可能是因为超出一定的酶解时间,酶解产物中游离氨基酸含量增加^[22],故选择酶解时间为4 h。由图3(b)可知,随着酶添加总量的增加,TCA可溶性短肽含量逐渐增加,当酶添加总量为1 000 U/g时,TCA可溶性短肽含量达到最大值,当酶添加总量 $> 1 000$ U/g时,TCA可溶性短肽含量逐渐下降,可能是由于过量的酶影响了酶与底物之间的传质速率,降低了反应速率^[23]。故选择酶添加总量为1 000 U/g。由图3(c)可知,当酶配比为1:1时,TCA可溶性短肽含量最高,故选择酶配比为1:1。由图3(d)可知,随着水解温度的增加,TCA可溶性短肽含量先增加后减小,当水解温度为55℃时,TCA可溶性短肽含量最高。过高的酶解温度会抑制酶活力^[24],故选择酶解温度为55℃。由图3(e)可知,pH可以显著影响TCA可溶性短肽含量($P < 0.05$),当pH为7时,TCA可溶性短肽含量最高,偏酸或偏碱均会使酶结构变化,影响其活性^[25],故选择pH为7。

2.3.2 响应面试验 经过单因素试验及综合考虑,选取酶添加总量、酶解pH、酶配比3个对TCA可溶性短肽含量影响较大的因素,依据Design-Expert 13软件中的Box-Behnken设计三因素三水平试验。试验因素水平见表3,试验设计及结果见表4。

利用Design-Expert 13软件建立多元二次回归模型,得

$$Y = 10.25 + 0.06A + 0.05B + 0.10C - 0.08AB + 0.15AC - 0.11BC - 0.34A^2 - 1.06B^2 - 0.48C^2 \quad (4)$$

由表5可知,回归模型 $P < 0.01$,极显著。模型失拟项 $P = 0.1118 > 0.05$,不显著。模型回归方程 $R^2 = 0.9974$, $R^2_{Adj} = 0.9940$,说明回归方程拟合良好。变异系数为 $0.54\% < 10\%$,信噪比为 $45.98 > 4$,进一步说明模型合理,可以对略阳乌鸡低聚肽的制备工艺进行分析和预测。A、B、C、AB、AC、BC、 A^2 、 B^2 和 C^2 对TCA可溶性短肽含量均有显著影响($P < 0.05$),且各因素之间存在交互作用。

由图4可知,各因素之间的3D响应面图均开口向下,说明固定一种因素值,另一种因素呈先增大后减小趋势,与单因素试验结果类似。

通过响应面优化,最终预测得到双酶酶解略阳乌鸡的最佳工艺条件为酶添加总量9 300 U/g,酶解pH 6.5,酶配比1:1,该条件下的TCA可溶性短肽含量预测值为10.262 mg/mL。经3次验证实验,该条件下酶解产物中TCA可溶性短肽含量为10.293 mg/mL,接近模型预测值,

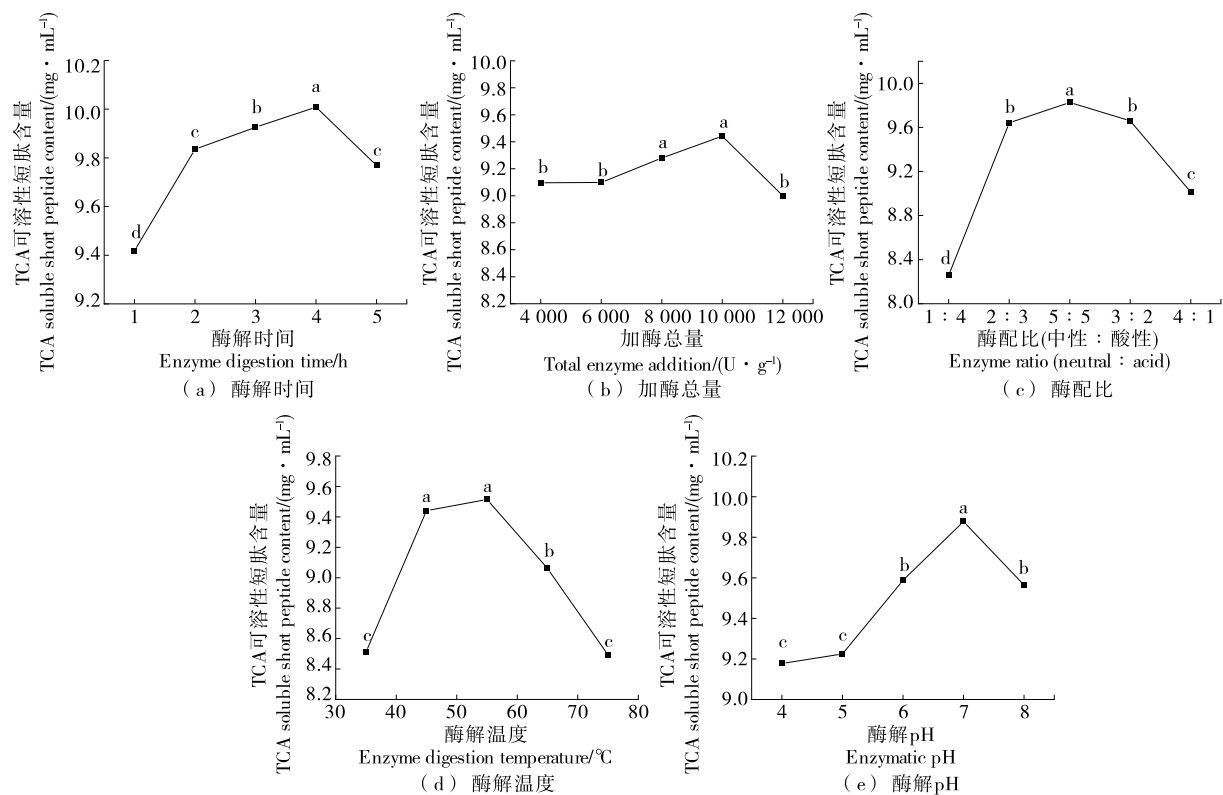


图3 各因素对TCA可溶性短肽含量的影响

Figure 3 Effect of factors on TCA-soluble short peptide content

表3 双酶酶解响应面优化因素水平表

Table 3 Factors and levels for optimization of response surface for dual enzyme digestion

水平	A 酶添加总量/(U·g ⁻¹)	B 酶解 pH	C 酶配比
-1	6 000	5.0	1:4
0	9 000	6.5	1:1
1	12 000	8.0	4:1

表明预测结果实际可行。在最优工艺条件下,水解产物的水解度为23.63%,蛋白回收率为71.52%。

2.4 略阳乌鸡低聚肽成分分析

2.4.1 基本营养成分 由表6可知,略阳乌鸡低聚肽中蛋白质含量较高,为(84.65±1.54)%。脂肪含量为(0.47±0.05)%,灰分含量为(4.35±0.38)%,水分含量为(7.72±0.14)%。与刘文颖等^[9]的结果相比,试验制备的略阳乌鸡低聚肽中总蛋白质含量和水分含量较高。

2.4.2 氨基酸组成 由表7可知,略阳乌鸡低聚肽中共检出17种氨基酸,其中谷氨酸、赖氨酸、天冬氨酸含量较高,成人必需氨基酸含量为39.35%,满足机体需求。略阳乌鸡低聚肽中含有供氢或供电子能力的氨基酸(酪氨酸、色氨酸、半胱氨酸、蛋氨酸及组氨酸)含量为12.68%,

表4 Box-Behnken试验设计及结果

Table 4 Box-Behnken experimental design and results

试验号	A	B	C	TCA 可溶性短肽含量/(mg·mL ⁻¹)
1	0	0	0	10.24±0.02
2	1	-1	0	8.95±0.11
3	0	-1	-1	8.48±0.03
4	-1	1	0	8.93±0.17
5	1	0	1	9.71±0.04
6	0	0	0	10.22±0.03
7	0	0	0	10.31±0.04
8	0	1	-1	8.75±0.09
9	0	0	0	10.24±0.04
10	-1	0	-1	9.46±0.05
11	1	0	-1	9.22±0.41
12	-1	-1	0	8.61±0.02
13	0	1	1	8.73±0.03
14	1	1	0	8.95±0.19
15	0	-1	1	8.91±0.13
16	0	0	0	10.25±0.05
17	-1	0	1	9.35±0.17

表5 Box-Behnken回归模型方差分析[†]

Table 5 Box-Behnken regression model ANOVA

来源	平方和	自由度	均方和	F值	P值	显著性
模型	6.954 0	9	0.772 7	297.50	<0.000 1	**
A	0.028 9	1	0.028 9	11.12	0.012 5	*
B	0.021 9	1	0.021 9	8.44	0.022 8	*
C	0.075 1	1	0.075 1	28.93	0.001 0	**
AB	0.025 1	1	0.025 1	9.65	0.017 2	*
AC	0.089 6	1	0.089 6	34.50	0.000 6	**
BC	0.052 1	1	0.052 1	20.08	0.002 9	**
A ²	0.486 2	1	0.486 2	187.19	<0.000 1	**
B ²	4.695 0	1	4.695 0	1 807.74	<0.000 1	**
C ²	0.961 2	1	0.961 2	370.10	<0.000 1	**
残差	0.018 2	7	0.002 6			
失拟项	0.013 5	3	0.004 5	3.88	0.111 8	不显著
纯误差	0.004 7	4	0.001 2			
总和	6.972 2	16				

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

表6 略阳乌鸡低聚肽营养成分表

Table 6 Nutritional composition of oligopeptides in Lueyang black-bone chicken %

蛋白质	水分	脂肪	灰分
84.65±1.54	7.72±0.14	0.47±0.05	4.35±0.38

疏水性氨基酸(色氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、丙氨酸、脯氨酸和蛋氨酸)含量为27.48%,酸性和碱性氨基酸(天冬氨酸、谷氨酸)含量为26.91%,表明略阳乌鸡低聚肽富含抗氧化氨基酸,具有一定的抗氧化能力。

2.5 略阳乌鸡低聚肽的体外抗氧化活性

2.5.1 DPPH 自由基清除能力

由图5可知,在2~

表7 略阳乌鸡低聚肽氨基酸组成

Table 7 Amino acid composition of oligopeptides of Lueyang black-bone chicken

氨基酸	含量/(mg·g ⁻¹)	氨基酸	含量/(mg·g ⁻¹)
天冬氨酸	90.491±5.30	异亮氨酸	40.379±1.70
苏氨酸	52.161±0.60	亮氨酸	75.312±1.80
丝氨酸	44.901±2.10	酪氨酸	39.602±1.30
谷氨酸	159.888±4.60	苯丙氨酸	41.402±1.10
甘氨酸	36.614±0.10	组氨酸	32.391±0.10
丙氨酸	41.659±0.10	赖氨酸	92.046±3.50
胱氨酸	20.326±0.03	精氨酸	64.564±0.30
缬氨酸	39.186±2.20	脯氨酸	33.819±0.70
蛋氨酸	25.66±0.70	总氨基酸	930.401±26.23

14 mg/mL质量浓度范围内,略阳乌鸡低聚肽对DPPH自由基的清除率随着肽质量浓度的升高而增大,半抑制质量浓度(IC₅₀值)为4.675 mg/mL。维生素C作为一种广为人知的抗氧化剂,对DPPH自由基具有极好的清除效果,其IC₅₀值为2.246 μg/mL。与维生素C相比,略阳乌鸡低聚肽的DPPH自由基清除率较低。

2.5.2 ABTS⁺自由基清除能力 由图5可知,在一定质量浓度范围内,略阳乌鸡低聚肽与ABTS⁺自由基清除率呈现良好的量效关系,ABTS⁺自由基的IC₅₀值为31.401 μg/mL,维生素C的IC₅₀值为1.369 μg/mL。与DPPH自由基清除率相比,略阳乌鸡低聚肽对ABTS⁺自由基的清除活性更好。与米春孝等^[26]的结果相比,略阳乌鸡低聚肽对ABTS⁺自由基的清除率更高。

2.5.3 羟自由基清除能力 羟自由基具有极强的氧化能力,能够与生物体内多种分子发生反应,导致机体损伤,引发疾病^[27]。由图5可知,略阳乌鸡低聚肽在一定质量浓度范围内与羟自由基清除率呈现良好的线性关系,当低聚肽质量浓度为8 mg/mL时,羟自由基清除率达到

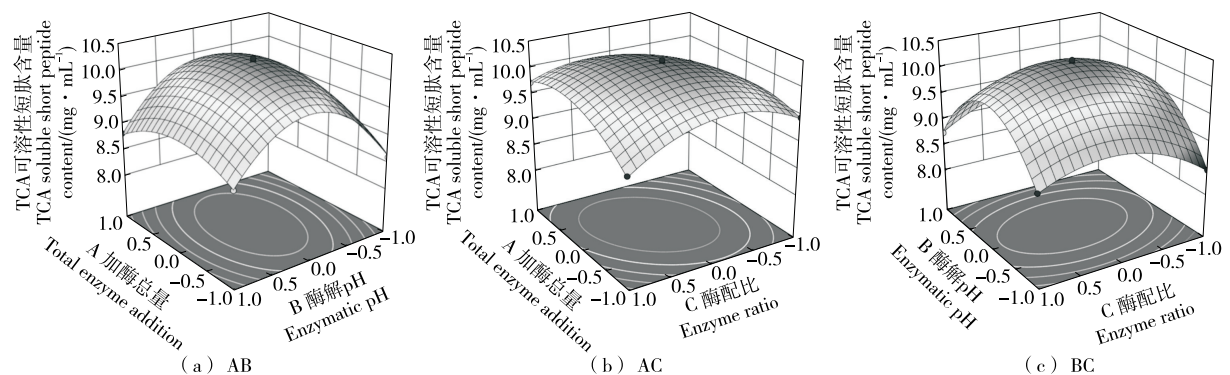


图4 各因素交互作用响应面图

Figure 4 Response surface plot of factor interaction

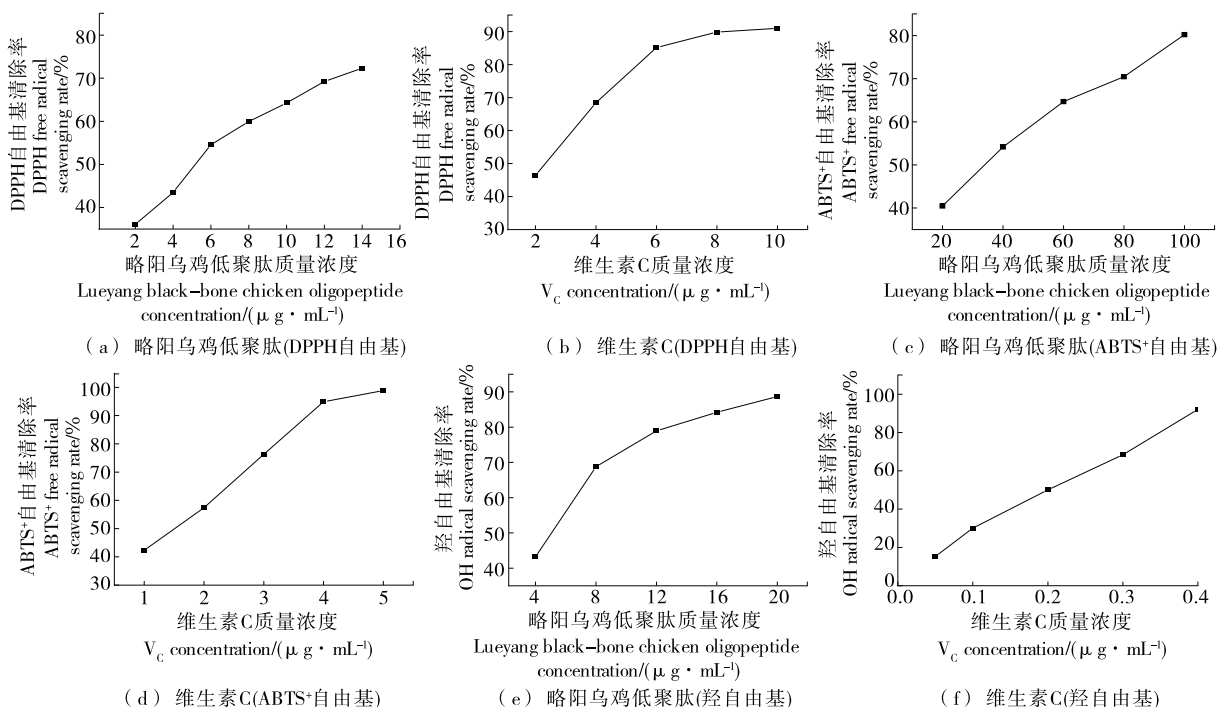


图5 略阳乌鸡低聚肽和维生素C对自由基的清除率

Figure 5 Scavenging rates of free radicals by oligopeptides and Vc in Lueyang black-bone chicken

67.78%, 随后逐渐变缓, IC_{50} 值为 4.769 mg/mL。以维生素C为对照, 其 IC_{50} 值为 0.164 mg/mL。略阳乌鸡低聚肽的羟自由基清除率与其 DPPH 自由基清除率接近, 且与曹燕峰等^[28]的结果相近。

2.5.4 还原能力 还原能力是指样品在化学反应中, 其分子、原子或离子失去电子的能力, 抗氧化剂通过自身给

出电子而清除自由基, 因此还原能力越强, 抗氧化活性越高。而吸光度大小与样品还原能力成正比。由图6可知, 略阳乌鸡低聚肽在低质量浓度时几乎无还原能力, 其还原能力随着低聚肽质量浓度的增加逐渐增强。当略阳乌鸡低聚肽质量浓度为 10 mg/mL 时, 其吸光值约为 0.25, 此时的还原能力与 0.02 mg/mL 维生素C的接近。

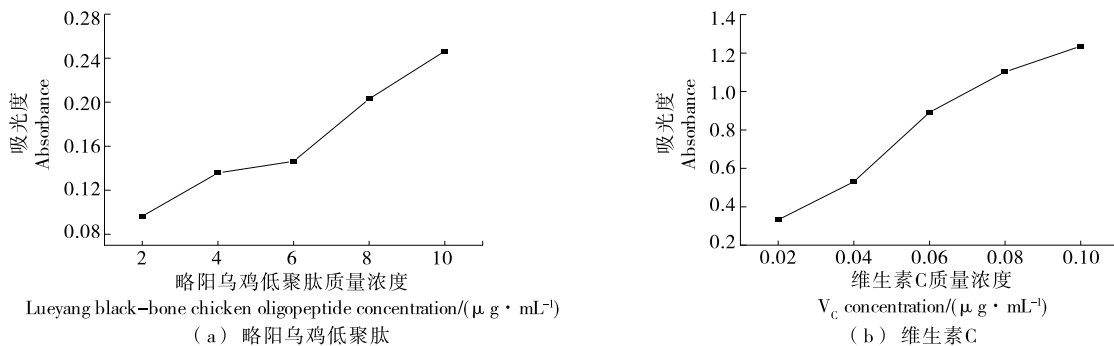


图6 略阳乌鸡低聚肽和维生素C的还原能力

Figure 6 Reducing capacities of oligopeptides and Vc in Lueyang black-bone chicken

3 结论

利用中性蛋白酶和酸性蛋白酶混合酶解略阳乌鸡, 其最佳酶解条件为底物质量浓度 3 g/100 mL, 酶解时间 4 h, 酶添加总量 9 300 U/g, 酶解 pH 6.5, 酶配比 1:1, 此时水解产物中 TCA 可溶性短肽含量最高, 与预测值接近。

经测定, 略阳乌鸡低聚肽中总蛋白含量较高, 为 84.65%, 水分含量为 7.72%, 脂肪含量低。此外, 乌鸡低聚肽中共检出 17 种氨基酸, 谷氨酸、赖氨酸和天冬氨酸含量较高, 富含抗氧化氨基酸, 拥有较好的 DPPH 自由基、ABTS⁺自由基、羟自由基清除能力和还原能力。该研究未对略阳乌鸡低聚肽的结构解析及体内功能进行验证。未来可

结合多组学分析肽段构效关系,并通过动物实验验证其应用潜力。

参考文献

- [1] 黄梦君, 许淑芳. 食源性低聚肽的消化吸收机制及营养功能的研究进展[J]. 中国食物与营养, 2021, 27(10): 55-58.
HUANG M J, XU S F. Research progress on digestion and absorption mechanism and nutritional function of food derived oligopeptides[J]. Food and Nutrition in China, 2021, 27(10): 55-58.
- [2] SOTOUDEH B, AZIZI M H. Production of bioactive peptides with antioxidant and antihypertensive activities from wheat gluten using *Withania coagulans*[J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2024, 18(3): 2101-2109.
- [3] HU H H, LI J F, CHEN F, et al. Isolation and characterization of DPP-IV inhibitory peptide from rabbit meat hydrolysate: Mechanism, gastrointestinal resistance, and hypoglycemic effects of Leucyl-leucine (LL)[J]. Food Bioscience, 2024, 61: 104592.
- [4] WANG K, HAN L H, TAN Y Q, et al. Novel hypocholesterolemic peptides derived from silver carp muscle: the modulatory effects on enterohepatic cholesterol metabolism *in vitro* and *in vivo*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(14): 5565-5575.
- [5] SHAN X X, YIN B, LIAO X Z, et al. Exploration and characterization of antimicrobial peptides from shrimp *litopenaeus vannamei* by A genomic and transcriptomic approach[J]. Marine Biotechnology, 2024, 26(5): 975-990.
- [6] 倪策, 曹天红, 陈敏, 等. 核桃粕源抗氧化活性肽的酶解制备及活性分析[J]. 食品与机械, 2024, 40(5): 51-61.
NI C, CAO T H, CHEN M, et al. Enzymatic hydrolysis preparation and activity analysis of antioxidant peptides derived from walnut dregs[J]. Food & Machinery, 2024, 40(5): 51-61.
- [7] NIE W, DU Y Y, XU F R, et al. Oligopeptides from Jinhua ham prevent alcohol-induced liver damage by regulating intestinal homeostasis and oxidative stress in mice[J]. Food & Function, 2021, 12(20): 10053-10070.
- [8] 刘福柱, 魏忠义, 刘景星. 乌鸡白凤丸药源的开发研究: 略阳鸡与泰和鸡的肉质比较[J]. 畜牧兽医杂志, 1992, 11(1): 3-6.
LIU F Z, WEI Z Y, LIU J X. Research on the development of medicinal source of Wuji Baifengwan: comparison of meat quality between Lueyang chicken and Taihe chicken[J]. Journal of Animal Science and Veterinary Medicine, 1992, 11(1): 3-6.
- [9] 刘文颖, 谷瑞增, 鲁军, 等. 乌鸡低聚肽的制备及其稳定性研究[J]. 食品科技, 2014, 39(12): 157-160.
LIU W Y, GU R Z, LU J, et al. Preparation and stability of black-bone silky fowl oligopeptides[J]. Food Science and Technology, 2014, 39(12): 157-160.
- [10] 钟群. 雪峰乌骨鸡活性肽制备及抗氧化功能测定[D]. 广州: 华南农业大学, 2016.
ZHONG Q. Research of bioactive peptide preparation by enzymatic methods and its antioxidant activity of Xuefeng black chicken[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2016.
- [11] 白芳, 李映红, 吴正治, 等. HPLC-PAD法优化乌骨鸡活性肽分离纯化[J]. 生物加工过程, 2019, 17(6): 610-614.
BAI F, LI Y H, WU Z Z, et al. Optimization of isolation conditions for active peptides from Black-Bone Silky Fowl (*Gallus gallus domesticus* Brisson) by HPLC-PAD[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2019, 17(6): 610-614.
- [12] 徐娟, 吕嘉彬. 乳蛋白水解液中多肽含量测定方法的研究[J]. 食品科技, 2010, 35(12): 275-278.
XU J, LV J L. Determination of content of peptides in milk protein hydrolysates[J]. Food Science and Technology, 2010, 35(12): 275-278.
- [13] 后鹏飞, 黄静, 罗丹, 等. 响应面法优化南方大口鲶鱼骨多肽酶解工艺及其风味分析[J]. 食品科技, 2023, 48(12): 127-134.
HOU P F, HUANG J, LUO D, et al. Optimization of polypeptidase hydrolysis process and flavor analysis of silurus meridionalis Chen bone by response surface methodology[J]. Food Science and Technology, 2023, 48(12): 127-134.
- [14] JI X M, CUI S X, ZHAO Z J, et al. Enzymatic hydrolysis of chicken bone for protein recovery[J]. Food Bioscience, 2025, 65: 106133.
- [15] 谢莎, 赵秋钰, 杨发忠, 等. 小孢粉孢牛肝菌营养成分及化学成分分析与评价[J]. 现代食品科技, 2024, 40(10): 113-124.
XIE S, ZHAO Q Y, YANG F Z, et al. Analysis and evaluation of nutritional and chemical components of *Tylopilus microsporus*[J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(10): 113-124.
- [16] 郑昌亮, 陈梦婷, 汪兰, 等. 鳙鱼肌原纤维蛋白源抗氧化肽的稳定性研究[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(8): 43-50.
ZHENG C L, CHEN M T, WANG L, et al. Stability of antioxidant peptides from bighead carp (*Aristichthys nobilis*) myofibrillar protein[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(8): 43-50.
- [17] 张靖. 羊骨多肽的制备及其抗氧化能力研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2021.
ZHANG J. Preparation of sheep bone polypeptide and its antioxidant ability[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2021.
- [18] 杨玉亮, 衣大龙, 刘春雨, 等. 体外模拟消化对牦牛骨胶原蛋白肽抗氧化活性的影响[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(13): 79-84.
YANG Y L, YI D L, LIU C Y, et al. Effects of *in vitro* simulated digestion on the antioxidant activity of yak bone collagen peptides[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(13): 79-84.

- [19] SARABANDI K, SADEGHI MAHOONAK A, HAMISHEKAR H, et al. Microencapsulation of casein hydrolysates: physicochemical, antioxidant and microstructure properties[J]. *Journal of Food Engineering*, 2018, 237: 86-95.
- [20] CAI W W, HU X M, WANG Y M, et al. Bioactive peptides from skipjack tuna cardiac arterial bulbs: preparation, identification, antioxidant activity, and stability against thermal, pH, and simulated gastrointestinal digestion treatments[J]. *Marine Drugs*, 2022, 20(10): 626.
- [21] 沈畅华, 杨娟, 张远红, 等. 双酶酶解鸽胸肉工艺优化及抗氧化性评价[J]. *食品与机械*, 2023, 39(4): 163-169.
- SHEN C H, YANG J, ZHANG Y H, et al. Optimization of response surface methodology and evaluation of antioxidant activity of double-enzyme hydrolyzed pigeon brisket[J]. *Food & Machinery*, 2023, 39(4): 163-169.
- [22] 林登峰, 李珊慧, 赵洪雷, 等. 响应面法优化三文鱼骨排酶解工艺的研究[J]. *中国调味品*, 2024, 49(8): 90-97.
- LIN D F, LI S H, ZHAO H L, et al. Study on optimization of enzymatic hydrolysis process of salmon bone steak by response surface methodology[J]. *China Condiment*, 2024, 49(8): 90-97.
- [23] 朱秀清, 李美莹, 孙冰玉, 等. 复合酶分步水解法制备汉麻多肽及其抗氧化特性研究[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(2): 161-169.
- ZHU X Q, LI M Y, SUN B Y, et al. Preparation of polypeptides from hemp by two-step enzymatic hydrolysis with complex enzymes and its antioxidant properties[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(2): 161-169.
- [24] 虞丹丹, 魏文志, 关利, 等. 复合酶酶解法制备中华草龟皮胶原蛋白肽的工艺优化[J]. *中国调味品*, 2024, 49(8): 28-33.
- YU D D, WEI W Z, GUAN L, et al. Optimization of preparation technology of chinemys Reevesii skin collagen peptide by compound enzymes enzymatic hydrolysis method [J]. *China Condiment*, 2024, 49(8): 28-33.
- [25] 张典, 李龄佳, 崔春, 等. 牡蛎酶解工艺的响应面优化研究 [J]. *中国调味品*, 2019, 44(5): 12-16.
- ZHANG D, LI L J, CUI C, et al. Optimization of oyster enzymatic hydrolysis process by response surface method[J]. *China Condiment*, 2019, 44(5): 12-16.
- [26] 米春孝, 周慧, 胡兴媛, 等. 微波辅助酶解罗非鱼皮抗氧化肽制备及结构分析[J]. *食品与机械*, 2025, 41(6): 173-181.
- MI C X, ZHOU H, HU X Y, et al. Preparation and structural analysis of antioxidant peptides from tilapia skin by microwave-assisted enzymatic hydrolysis[J]. *Food & Machinery*, 2025, 41(6): 173-181.
- [27] 张瑞麟, 杜超, 鞠雪莹, 等. 超声辅助提取 3 种油茶籽粕多糖及抗氧化活性研究[J]. *中国粮油学报*, 2022, 37(7): 122-127.
- ZHANG R L, DU C, JU X Y, et al. Ultrasonic-assisted extraction of polysaccharides and antioxidant activity from three kinds of camellia oleifera meal[J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2022, 37(7): 122-127.
- [28] 曹燕峰, 常立炆, 张修正, 等. 海湾扇贝抗氧化肽对酒精性肝损伤的保护作用[J]. *食品科学*, 2024, 45(19): 87-93.
- CAO Y F, CHANG L Y, ZHANG X X, et al. Protective effect of antioxidant peptides from *Argopecten irradians* against alcoholic liver injury[J]. *Food Science*, 2024, 45(19): 87-93.