酸肉肽抗氧化活性的研究

叶 春[1]，马顺强[1]，张 倩[2,*]，刘世会[1]
(1.贵州大学生命科学学院，贵州 贵阳 550025；2.杭州万向职业技术学院，浙江 杭州 310023)

摘 要：通过测定酸肉肽对DPPH自由基、羟自由基、亚硝酸盐的清除能力及其还原能力，研究其抗氧化活性。结果：酸肉肽对DPPH自由基有良好的清除能力，IC_{50}值为247.96μg/mL，是BHT的4.97倍；酸肉肽具有显著的清除羟自由基能力，IC_{50}值为33.60μg/mL，是BHT的1.52倍；酸肉肽的还原能力较强，约为BHT的0.25倍；酸肉肽对亚硝酸盐具有一定的清除作用。实验表明酸肉肽具有明显的抗氧化效果。

关键词：酸肉肽；DPPH自由基；羟自由基；还原力；亚硝酸盐

Antioxidant Activity of Sour Meat Peptide

YE Chun[1]，MA Shun-qiang[1]，ZHANG Qian[2,*]，LIU Shi-hui[1]
(1.College of Life Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China；
2.Hangzhou Wanxiang Polytechnic College, Hangzhou 310023, China)

Abstract: Antioxidant activity of sour meat peptide was studied by measuring its scavenging capacity against 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radicals, hydroxyl free radicals and nitrite, and its reducing power. Results indicated that sour meat peptide had better scavenging capacity against DPPH free radicals with the IC_{50} value of 247.96 μg/mL, which was 4.97 times higher than that of BHT. In addition, it possessed remarkable scavenging capacity against hydroxyl free radicals with the IC_{50} value of 33.60 μg/mL, which was 1.52 times higher than that of BHT. Moreover, it possessed strong reducing power, which was approximately one quarter of that of BHT. Furthermore, it also exhibited strong scavenging capacity against nitrite. Therefore, sour meat peptide has an obvious antioxidant activity.

Key words: sour meat peptide; DPPH free radical; hydroxyl free radical; reducing power; nitrite
中图分类号：TQ936.16 文献标识码：A 文章编号：1002-6630(2010)07-0094-04

中国传统酸肉，古称“鲊”，是有两千多年历史的乳酸细菌型发酵肉制品，目前主要流行于湖南、贵州、广西、四川等地，是少数民族地区特色性的发酵肉制品，有着丰富的饮食文化内涵[1-2]，特别在苗族和侗族盛行，有“吃不离酸”和“三天不吃酸，走路打乱窜”的俗语[3-4]。酸肉经长期的微生物及酶的作用，发生了复杂的化学变化，不经加热便可食用，食之鲜嫩，且富含多种营养和功能性成分，是保健之佳品[2,5-6]。随着人民生活水平的提高，且受当地旅游业的发展带动，酸肉具有巨大的市场潜力[7]。

衰老、癌症及心血管等疾病被公认为与氧化应激损伤及自由基代谢失调有关[8-9]。抗氧化肽因具有抑制生物大分子过氧化或清除体内自由基的功能，是近年来国内外科学工作者的研究热点[10-11]。一些研究试图利用发酵的方法制备抗氧化肽，如利用牛乳、紫贻贝、大豆的发酵产物提取分离抗氧化肽[12]。从发酵酸肉中提取肽并对其抗氧化活性进行研究，目前尚未见报道。本实验拟以酸肉为原料，采用超滤等方法提取分子量小于10kD的酸肉肽，通过测定它对DPPH自由基、羟自由基、亚硝酸盐的清除能力及还原能力考察其抗氧化性能，以期揭示酸肉的保健价值，为进一步加速酸肉的研发提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

酸肉 贵州大学生命科学学院食品加工实验室；乳酸菌 贵州大学生命科学学院食品微生物实验室；1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)标准品 Sigma公司；其他

收稿日期：2009-08-22
基金项目：贵州省教育厅自然科学基金项目(黔教高发(2008)364号)
作者简介：叶春(1973—)，女，副教授，硕士，研究方向为食品分析和功能性食品。E-mail：yechun126@163.com
*通信作者：张倩(1961—)，女，教授，博士，研究方向为食品营养与功能性食品。E-mail：zhangqian4223@hotmail.com

试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

MSC300杯式超滤器 上海摩速科学器材有限公司；BS110S电子天平 北京赛多利斯天平有限公司；WFJ7200分光光度计 龙尼科(上海)仪器有限公司；828台面式pH测试仪 美国Orion Research公司；LD4-2低速离心机 北京医用离心机厂；D.D.S-300型高速组织捣碎机 长沙市西区红星电器厂。

1.3 方法

1.3.1 酸肉肽的提取[13-14]

酸肉→剔除脂肪→生理盐水洗去脂肪→剪碎→加1:2的生理盐水，用高速组织捣碎机匀浆→反复冻融(－20℃下冻结，每次24h，共3次)→4000r/min离心10min(离心2次)→过滤→取滤液用0.45μm微孔滤膜过滤→超滤(膜截留分子量为10kD)→收集滤液得酸肉肽

1.3.2 超滤液中酸肉肽含量的测定

分别用凯氏定氮法[15]和甲醛值法[16]测定超滤液中的总氮含量和氨基氮含量，酸肉肽含量按式(1)计算。

酸肉肽含量＝超滤液总氮量－超滤液氨基氮量 (1)

1.3.3 酸肉肽的抗氧化性能实验

1.3.3.1 清除DPPH自由基的测定[17-19]

将酸肉肽稀释成不同的质量浓度梯度后分别做为待测样品溶液备用。1)在10mL具塞试管中依次加入4.0mL 25.7μg/mL的DPPH溶液和1.0mL无水乙醇，混匀，避光50min后，以无水乙醇为参比，在517nm波长处测吸光度，记为A_0；2)在10mL具塞试管中依次加入4.0mL无水乙醇和1.0mL待测样品溶液，混匀，避光50min后，以无水乙醇为参比，在517nm波长处测吸光度，记为A_r；3)在10mL具塞试管中依次加入4.0 mL 25.7μg/mL的DPPH溶液和1.0mL 待测样品溶液，混匀，避光50min后，以无水乙醇为参比，在517nm波长处测吸光度，记为A_s。4)按式(2)计算酸肉肽对DPPH自由基的清除率Y。

$$Y/\% = (1-\frac{A_s-A_r}{A_0})\times 100 \quad (2)$$

同时配制不同质量浓度的BHT溶液，按照上述方法测定BHT对DPPH自由基的清除率。

1.3.3.2 清除羟自由基的测定[20]

将酸肉肽稀释成不同的质量浓度梯度，各取不同质量浓度的酸肉肽溶液，依次加入2mL 6mmol/L的$FeSO_4$、2mL 6mmol/L的H_2O_2，混匀后静置10min，再加入2mL 6mmol/L的水杨酸，混匀，静置30min，在510nm波长处测其吸光度记为A_i；当用蒸馏水代替水杨酸时的吸光度记为A_j。空白对照组以蒸馏水代替酸肉肽溶液，吸光度记为A_k。按式(3)计算酸肉肽对羟自由基的清除率E。

$$E/\% = (1-\frac{A_i-A_j}{A_k})\times 100 \quad (3)$$

同时配制不同质量浓度的BHT溶液，按照上述方法测定BHT对羟自由基的清除率。

1.3.3.3 还原力的测定[21-23]

在具塞试管中加入不同质量浓度的酸肉肽溶液1.0mL、磷酸缓冲液(0.2mol/L，pH6.6)2.5mL、1%铁氰化钾2.5mL。50℃水浴20min，取出后迅速冷却，加入10%三氯乙酸2.5mL，混匀3000r/min离心10min。取上清液2.5mL加入蒸馏水2.5mL及0.1%三氯化铁0.5mL。10min后在700nm波长处测定吸光度。

同时配制不同质量浓度的BHT溶液，按照上述方法测定BHT的还原力。

1.3.3.4 清除亚硝酸盐的测定[24]

准确吸取1μg/mL的亚硝酸钠1mL分别置于试管中，各加入2mL不同质量浓度的酸肉肽溶液，对照管用蒸馏水代替，最后用蒸馏水补足到4mL，摇匀，反应10min后，各管加入0.4%对氨基苯磺酸2mL，摇匀，静置5min，再加入0.2%的盐酸萘乙二胺1mL，摇匀，静置15min，于538nm波长处测定吸光度。对照管的吸光度记为A_n，样品管的吸光度记为A_m。按式(4)计算酸肉肽对亚硝酸盐的清除率W。

$$W/\% = \frac{A_n-A_m}{A_n}\times 100 \quad (4)$$

同时配制不同质量浓度的BHT溶液，按照上述方法测定BHT对亚硝酸盐的清除率。

2 结果与分析

2.1 酸肉肽清除DPPH自由基的能力

DPPH自由基是一种稳定的深紫色自由基，在517nm波长处有最大吸光度，当其从能够释放质子的物质处得到质子时，会形成一种稳定的反磁性分子，其517nm波长处吸光度会变小。释放质子是物质抗氧化的机理之一，通过测定物质对DPPH自由基的清除能力，可以较迅速地评价物质的抗氧化能力[24-25]。实验数据用Excel进行多项式回归，回归方程见图1，酸肉肽和BHT的R^2值均在0.95以上，回归方程显著。通过回归方程得出酸肉肽的IC_{50}为247.96μg/mL，BHT的IC_{50}为49.86μg/mL，酸肉肽IC_{50}约为BHT IC_{50}的4.97倍，尽管酸肉肽清除DPPH自由基的效果不如BHT好，但酸肉肽已表现出良好的清除DPPH自由基的能力。

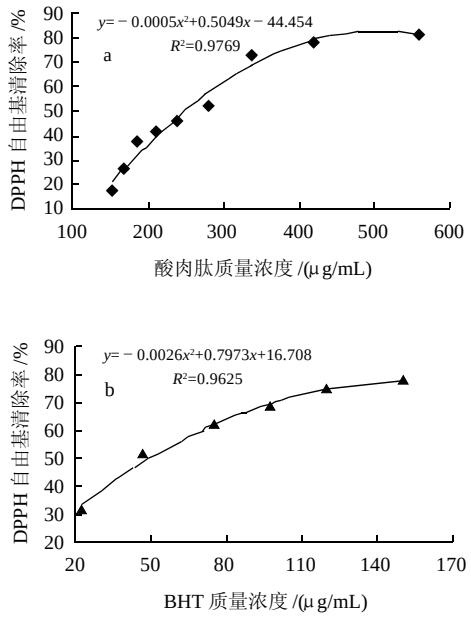
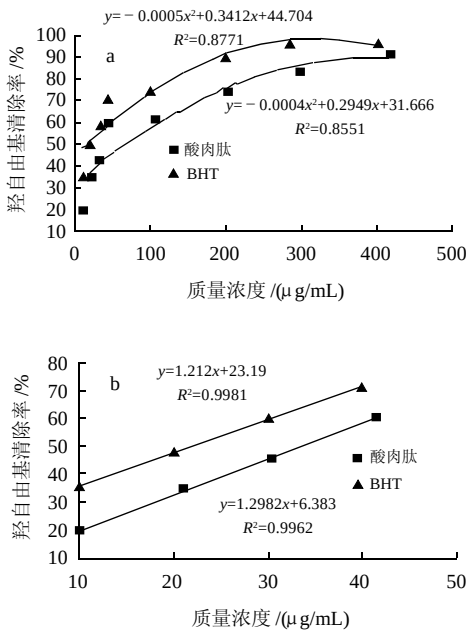


图 1 酸肉肽和 BHT 对 DPPH 自由基的清除能力

Fig.1 Concentration dependence of scavenging rate of sour meat peptide and BHT against DPPH free radicals

2.2 酸肉肽清除羟自由基的能力



a.高质量浓度的酸肉肽和 BHT；b.低质量的酸肉肽和 BHT。

图 2 不同质量浓度酸肉肽和 BHT 对羟自由基的清除能力

Fig.2 Concentration dependence of scavenging rate of sour meat peptide and BHT against hydroxyl free radicals: a. low concentration; b. high concentration

用 Excel 分别对实验数据进行多项式回归，回归方程见图 2a，酸肉肽和 BHT 的 R^2 值分别为 0.8551 和 0.8771，回归方程不显著，可见，抗氧化剂质量浓度较高时，其质量浓度与羟自由基清除率的量效关系较差。而从图 2b 中可以看出，抗氧化剂质量浓度较低时，即酸肉肽清除率在 15%～60% 和 BHT 清除率在 35%～70% 的范围内，质量浓度与清除率呈很好的线性关系，从图中直线回归方程可以得出酸肉肽的 IC_{50} 为 33.60 μg/mL，BHT 的 IC_{50} 为 22.12 μg/mL，酸肉肽 IC_{50} 约为 BHT IC_{50} 的 1.52 倍，说明酸肉肽清除羟自由基的能力比较接近 BHT，因此酸肉肽具有显著的清除羟自由基的能力。

2.3 酸肉肽的还原能力

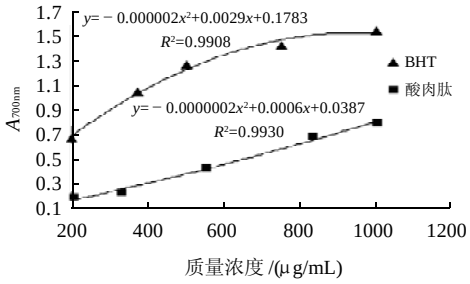


图 3 酸肉肽和 BHT 的还原能力

Fig.3 Concentration dependence of reducing power of sour meat peptide and BHT

在还原能力分析中，反应产物在 700nm 波长处的吸光度越大，样品的还原能力就越大。实验数据用 Excel 进行多项式回归，回归方程见图 3，酸肉肽和 BHT 的 R^2 值均在 0.95 以上，回归方程显著。由图 3 可知，随着酸肉肽和 BHT 质量浓度的增加，还原能力也进一步增加。当酸肉肽质量浓度为 200 μg/mL 时吸光度为 0.167，BHT 质量浓度为 200 μg/mL 时吸光度为 0.678，酸肉肽的还原力约为 BHT 的 0.25 倍。可见两者均表现出较强的还原能力，但酸肉肽的还原能力略低于 BHT。

2.4 酸肉肽清除亚硝酸盐的能力

亚硝胺是目前所知最强的化学致癌物之一，亚硝酸盐是亚硝胺合成的前体物质，清除体内亚硝酸盐是防止癌症的有效途径之一[24]，本实验研究了酸肉肽对亚硝酸盐的清除作用。实验数据用 Excel 进行多项式回归，回归方程见图 4，酸肉肽和 BHT 的 R^2 值均在 0.95 以上，回归方程显著。从图 4 可以看出，BHT 质量浓度为 0～600 μg/mL 时，清除率随质量浓度的增加迅速增强；酸肉肽质量浓度为 50～1670 μg/mL 时，随质量浓度的增加，其清除率增加缓慢。当酸肉肽质量浓度为 100 μg/mL 和 200 μg/mL 时，清除率分别是 17.79% 和 19.68%；BHT 质量浓度为 100 μg/mL 和 200 μg/mL 时，清除率质量分别是 27.87% 和 44.2%。由此可见，酸肉肽对亚硝酸盐具有一定的清除作用，但清除能力明显低于 BHT。

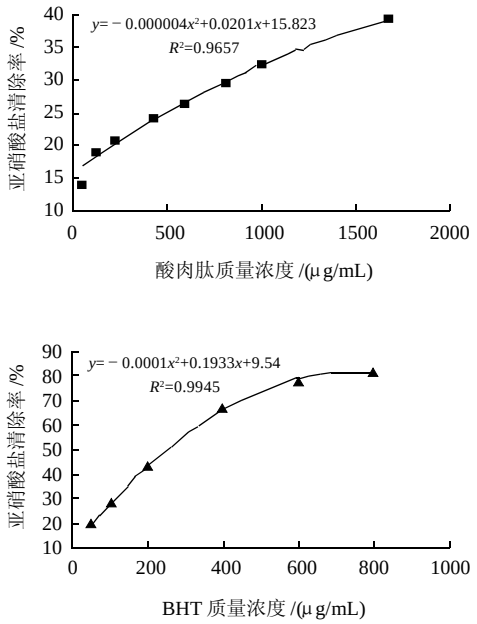


图4 酸肉肽和BHT对亚硝酸盐的清除能力

Fig.4 Concentration dependence of scavenging rate of sour meat peptide and BHT against nitrite

3 结 论

酸肉肽的抗氧化性能实验结果表明：酸肉肽有良好的清除DPPH自由基能力，其IC_{50}为247.96μg/mL，是BHT IC_{50}的4.97倍；酸肉肽具有显著的清除羟自由基能力，其IC_{50}为33.60μg/mL，较为接近BHT，仅为BHT IC_{50}的1.52倍；酸肉肽的还原力是BHT的1/4倍，表现出较强的还原能力；酸肉肽对亚硝酸盐具有一定的清除作用，但明显低于BHT。

酸肉肽对DPPH自由基、羟自由基和亚硝酸盐有不同程度的清除能力，且表现出较强的还原能力。这表明酸肉肽有明显的抗氧化效果，说明酸肉是一种具有抗氧化保健功能的食品。

参考文献：

[1] 李宗军, 江汉湖. 中国传统酸肉发酵过程中微生物的消长变化[J]. 微生物学通报, 2004, 31(4): 9-13.

[2] 娄爱华, 邹畅, 李华丽. 酸肉生产主发酵期发酵条件的确定[J]. 肉品卫生, 2005(6): 20-25.

[3] 李华丽. 酸肉发酵方式的比较研究[J]. 农业工程技术, 2006(3): 24-29.

[4] 章德法, 徐为民, 徐幸莲. 侗族发酵酸肉中乳酸菌的筛选及鉴定[J]. 江苏农业学报, 2008, 24(6): 986.

[5] 李宗军. 不同碳源对传统酸肉中微生物菌群和生物胺的影响[J]. 食品工业科技, 2006, 27(5): 78-81.

[6] 车科, 麻成金, 黄群, 等. 湘西传统酸肉乳酸菌分离、筛选及鉴定[J]. 中国酿造, 2008(11): 25-28.

[7] 黄群, 麻成金, 欧阳玉祝, 等. 传统湘西酸肉发酵动态与Nisin保鲜试验[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(4): 167-170.

[8] 王莉娟, 陶文沂. 大豆肽体外抗氧化活性研究[J]. 生物加工过程, 2008, 6(4): 69-73.

[9] GMEZ-RUIZ J, LPEZ-EXPSITO I, PIHLANTO A, et al. Antioxidant activity of ovine casein hydrolysates: identification of active peptides by HPLC-MS/MS[J]. European Food Research and Technology, 2008, 227(4): 1061-1067.

[10] 朱小聪, 戴昱曼, 云田田, 等. 酶解荠蓝籽蛋白制备抗氧化肽工艺的优化[J]. 食品工业科技, 2008, 29(6): 238-239.

[11] ZHANG Junhui, ZHANG Hui, WANG Li, et al. Antioxidant activities of the rice endosperm protein hydrolysate: identification of the active peptide [J]. European Food Research and Technology, 2009, 229(4): 709-719.

[12] 宋春丽. 抗氧化肽的研究进展[J]. 农产品加工: 学刊, 2008(7): 112-114.

[13] 周国华, 孟凡军, 王永志, 等. 羊和猪胎盘肽的提取[J]. 动物医学进展, 2005, 26(9): 88-89.

[14] 蔡英姬. 羊胚胎盘肽的制备及其免疫活性的研究[D]. 延吉: 延边大学, 2007.

[15] 卫生部食品卫生监督检验所. GB/T 5009.5 － 2003 食品中蛋白质的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.

[16] 北京市卫生防疫站, 邯郸市卫生防疫站, 唐山市卫生防疫站. GB/T 5009.39 － 2003 甲醛值法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.

[17] 郭雪峰, 岳永德, 汤锋, 等. 用清除有机自由基DPPH法评价竹叶提取物抗氧化能力[J]. 光谱学与光谱分析, 2008, 28(7): 1579-1583.

[18] KITTS D D, WIJEWICKREME A N, HU C. Antioxidant properties of a North American ginseng extract[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2000, 203(1/2): 1-3.

[19] 陈丛瑾, 黄克瀛, 李德良, 等. 香椿叶提取物清除DPPH自由基能力的测定方法[J]. 林产化学与工业, 2006, 26(3): 70-73.

[20] 赵云霞, 马永昆, 宋万杰, 等. 桑椹红色素的纯化及其抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2008, 29(6): 251-254.

[21] 孙骞, 胡鑫, 罗永康, 等. 猪血红蛋白抗氧化肽的酶法制备及其体外抗氧化活力观察[J]. 中国农业大学学报, 2008, 13(4): 79-83.

[22] LIN Chunmao, XIN Pan, FEI Que, et al. Antioxidant properties of water and ethanol extracts from hotair-dried and freeze-dried daylily flowers[J]. European Food Research and Technology, 2006, 222(3/4): 237-241.

[23] 宋建华, 李小定, 谢笔钧, 等. 大豆肽体外抗氧化效果的研究[J]. 食品科学, 2002, 23(11): 118-120.

[24] 张强, 王松华, 孙玉军, 等. 体外化学模拟体系中米糠肽抗氧化活性的研究[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(4): 50-53.

[25] MALENI D R, MILADINOVI J A, POPOVI M T. Effects of linuron and dimethenamid on antioxidant systems in weeds associated with soybean [J]. Central European Journal of Biology, 2008, 3(2): 156-160.