

# 不同加热处理发酵酸肉多肽的体外抗氧化活性比较

李苗云, 吴慧琳, 朱瑶迪, 肖康, 任宏荣, 赵改名, 郝云鹏, 马阳阳

(河南农业大学食品科学技术学院, 河南郑州 450002)

**摘要:** 以酸肉为研究对象, 研究酸肉微波、蒸制、油炸、烤制处理后多肽抗氧化活性。比较不同状态下酸肉多肽提取率、巯基(-SH)含量、清除1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)及羟自由基(-OH)能力、螯合金属离子( $Fe^{2+}$ )、抑制脂质氧化及清除亚硝酸盐能力。结果表明, 微波、蒸制、油炸、烤制等热处理后酸肉粗肽液-SH含量分别为25.41 nmol/mg, 22.89 nmol/mg, 26.62 nmol/mg, 24.60 nmol/mg, 随粗肽液浓度增加, 抗氧化能力显著增强, 相同浓度不同热处理状态下酸肉粗肽液抗氧化能力不同。在粗肽液质量浓度为5 mg/mL时, 微波、蒸制、油炸、烤制、生酸肉等处理粗肽液DPPH自由基清除率及-OH自由基清除率均表现为蒸制>烤制>微波>油炸>生酸肉,  $Fe^{2+}$ 螯合能力分别为50.61%、52.67%、48.76%、50.58%、57.77%, 在与亚油酸反应144 h时, 粗肽对脂质氧化的抑制率分别为47.33%、57.60%、44.26%、49.03%、51.63%, 亚硝酸盐清除率分别为68.81%、75.37%、70.05%、74.86%、76.01%。综合分析, 与生酸肉相比, 加热处理后酸肉粗肽抗氧化活性提高, 且蒸制最好, 因此酸肉抗氧化多肽提取适宜的热处理方式方式为蒸制>烤制>微波>油炸。

**关键词:** 酸肉; 加热方式; 多肽; 抗氧化活性

文章编号: 1673-9078(2020)02-38-45

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.2.007

## Comparison of *in Vitro* Antioxidant Activities of Fermented Meat

### Polypeptides Extracted with Different Methods

LI Miao-yun, WU Hui-lin, ZHU Yao-di, XIAO Kang, REN Hong-rong, ZHAO Gai-ming, HAO Yun-peng,

MA Yang-yang

(College of Food Science and Technology, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** Taking acidified meat as the research object, the antioxidant activity of the peptides from acidified meat after microwaving, steaming, deep frying and grilling was studied. Comparison was made on the extraction rate of polypeptide, thiol (-SH) content, scavenging abilities of 1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine (DPPH) and hydroxyl (-OH) radicals, metal ions ( $Fe^{2+}$ ) chelating ability, inhibitory effect against lipid oxidation, and ability to remove nitrite. The results showed that the content of -SH in the crude peptide extract from acidified meat after microwaving, steaming, deep frying, and grilling was 25.41, 22.89, 26.62, and 24.60nmol/mg, respectively. The antioxidant capacity significantly increased with an elevated concentration of crude peptide extract. At the same concentration, the antioxidant capacity of the crude peptide extract from the acidified meat after different heating methods varied.. When the mass concentration of the crude peptide extract was 5 mg/mL, the scavenging rates of DPPH and -OH radicals of the crude peptide extract from acidified meats decreased in this order: steaming>grilling>microwaving>deep frying>raw. Their corresponding  $Fe^{2+}$ -chelating abilities were 50.61%, 52.67%, 48.76%, 50.58%, 57.77%, respectively. Their corresponding lipid oxidation-inhibiting rates were 47.33%, 57.60%, 44.26%, 49.03%, 51.63%, respectively. and nitrite clearance rates were 68.81%, 75.37%, 70.05%, 74.86% and 76.01%, respectively, after the reaction with linoleic acid for 144 h. In summary, compared with the raw acidified meat, the antioxidant activity of the crude peptide extract was improved after one of the above heat treatments, with steaming being the best. Therefore, the suitability of the heat treatment methods for the extraction of the antioxidative polypeptides from acidified meat decreased in this order: steaming>grilling>microwaving>deepfrying .

**Key words:** acidified meat; heating method; polypeptide; antioxidant activity

投稿日期: 2019-06-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(31571856); 河南省高校创新人才计划(18HAST1T036); 河南省科技攻关项目(192102110216); 国家重点研发计划重点专项(2018YFD0401200)

作者简介: 李苗云(1976-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 肉类加工与产品质量安全控制技术

近年来,人们对食物具有功能性营养成分的关注越来越深入,发酵酸肉是我国少数民族地区的特色发酵肉制品,主是以猪肉、米粉为原料,添加食盐或辣椒粉经厌氧发酵获得的发酵肉制品,酸肉在发酵过程中微生物大量繁殖,使蛋白质、脂肪等大分子降解生成小肽类、脂肪酸等成分,酸肉中蛋白质经降解成活性小肽。研究表明,酸肉多肽具有清除自由基、抗氧化、免疫调节及结合胆酸盐的能力<sup>[1]</sup>,对大鼠血管皮细胞具有一定的影响,具有调节血脂紊乱及抗动脉粥样硬化病变。

肉制品是蛋白质、游离氨基酸的重要来源,具有抗氧化、抗菌、抗炎等<sup>[2]</sup>活性成分。蛋白质修饰不仅发生在肉类储存包装中,同时受营养成分,加工工艺,加热方式等方面的影响<sup>[3,4]</sup>。氧化应激是导致自由基增加及脂质氧化的主要原因。自由基的活跃性使其与周围环境的分子、原子等游离自由基配对,形成相对稳定的物质,而对环境中自由基的清除能力反映该物质抗氧化能力的强弱<sup>[5]</sup>。生物活性肽具有清除自由基,抗氧化,免疫调节,降低胆固醇等作用<sup>[6,7]</sup>。Escudero<sup>[8]</sup>等研究分析,火腿在发酵过程中,蛋白质水解导致小肽和氨基酸数量增加,火腿的成熟决定蛋白质降解程度。酸肉多肽对 DPPH 自由基、羟自由基、亚硝酸盐具有较强的清除能力及还原能力<sup>[9]</sup>。

蛋白质变性很大程度上取决于样品类型及所处环境,加热会促进活性氧的产生。不同加工方式也可增强蛋白质之间的硫醇反应、自由基反应及分子间二硫键增强作用,使其生物活性成分增加,而加热温度的不同会对蛋白质的特性和消化产生影响,进而影响其潜在的生物活性<sup>[10]</sup>。短时间轻度的热处理可提高肉制品的抗氧化活性<sup>[11]</sup>,而长时间剧烈的热处理会导致肉自身引起热氧化,抗氧化物质消耗和总抗氧化能力降低<sup>[12]</sup>。不同的烹饪方式也会造成生物活性发生不同程度变化<sup>[13]</sup>。盐对蛋白质具有促氧化作用,表现为膜结构的破坏,降低抗氧化活性<sup>[14]</sup>,盐参与高铁肌红蛋白的形成,可促进氧化<sup>[15]</sup>,肽可以抵消的自然存在氯化钠的不利影响,有助于保持健康血压。

本研究以发酵酸肉为研究对象,分别对微波、蒸制、油炸、烤制的酸肉多肽进行分离提取,研究不同状态下酸肉粗肽液抗氧化活性及清除亚硝酸盐能力,对拓宽酸肉抗氧化肽的应用具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

酸肉经去除表面辅料,剔除瘦肉中脂肪及肌筋、

肌膜等,切碎均匀置于-20℃冰箱中保存备用。

盐酸(优级纯)、30%过氧化氢(分析纯),洛阳昊华化学试剂有限公司;氯化亚铁,天津市光复精细化工研究所;菲洛嗪(分析纯),生工生物工程(上海)股份有限公司;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、5,5'-二硫双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)、乙二胺四乙酸、硫酸亚铁、酒石酸钾钠、1,10-菲罗啉、无水乙醇、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、N-(1-萘基)乙二胺盐酸盐、亚硝酸钠、4-氨基苯磺酸均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

### 1.2 仪器与设备

N-1100 旋转蒸发器,上海爱郎仪器有限公司;SHB-III 循环水式多用真空泵,郑州长城科工贸有限公司;AE224 电子天平,上海舜宇恒平科学仪器有限公司;FSP-625 匀浆机;Neofuge1600 离心机,力新仪器上海有限公司;CU-240 电热恒温水槽,上海一恒科学仪器有限公司;UV-2600 紫外可见分光光度计,岛津分析仪器有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 样品前处理

##### 1.3.1.1 发酵酸肉加工工艺基本流程

原料肉(五花肉)→清洗沥水→预煮→冷却→切块(3×2×1 cm)→加米粉,食盐混匀→装坛→密封发酵→真空包装→灭菌→成品

##### 1.3.1.2 生酸肉状态

酸肉经去除表面辅料,剔除瘦肉中脂肪及肌筋、肌膜等,切碎均匀置于-20℃冰箱中保存备用。

##### 1.3.1.3 加热烹饪

参考 WenSiyang 等<sup>[16]</sup>的方法,稍作修改。将切碎酸肉肉样分别置于微波、蒸锅、油炸、烤制加热处理,以数显温度计测得肉样中心温度为70~73℃,取出肉样,用吸水纸吸干肉样表面的水分。

#### 1.3.2 酸肉生状态与酸肉烹饪后粗肽的提取

参考 ZhuChaozhi 等<sup>[17]</sup>方法。分别取生酸肉及加热烹饪后酸肉30g,加100mL磷酸盐缓冲液(0.2M, pH=7.2),冰浴状态8000r/min匀浆10次约10min;匀浆液4℃静置2h,4℃离心(12000×g, 20min),上清液加3倍体积无水乙醇,4℃静置12h,4℃离心(12000×g, 20min),上清液抽滤后旋转蒸发,浓缩液冷冻干燥即为肉样的粗肽粉。

#### 1.3.3 酸肉多肽含量的测定

参考 Church<sup>[18]</sup>等方法。采用标准牛血清蛋白绘制标准曲线,以双缩脲法测定多肽含量。

标准曲线的绘制: 准确配置 1.0 mg/mL 牛血清蛋白溶液, 分移取 0.0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL 于试管, 加入 4.0 mL 双缩脲试剂 (双缩脲试剂 A: 双缩脲试剂 B=3:1), 以蒸馏水补液至 10.0 mL, 静置 10 min, 2000 r/min 离心 15 min, 上清液于 540 nm 波长处测定吸光度值 (以未添加牛血清蛋白溶液为空白对照), 以牛血清蛋白浓度为横坐标 X (mg/mL), 吸光度值为纵坐标 Y, 绘制标准曲线为  $Y=0.0341+0.0027X$ ,  $R^2=0.9987$ 。

多肽含量测定程序: 取 2.5 mL 样品溶液于离心管, 加 2.5 mL 10% 三氯乙酸溶液, 混匀, 静置反应 5 min, 4 °C 4000 r/min 离心 15 min, 上清液转移至 50 mL 容量瓶定容至刻度; 取 6.0 mL 溶液加 4.0 mL 双缩脲试剂 (双缩脲试剂 A: 双缩脲试剂 B=3:1), 摇匀, 静置反应 10 min, 2000 r/min 离心 15 min, 取上清液于 540 nm 处测定吸光度值, 根据标准曲线计算样品多肽含量。

### 1.3.4 游离巯基 (-SH) 的测定

参考 Ellman<sup>[19]</sup>的方法。将冷冻干燥的粗肽配置成 5 mg/mL 多肽液, 将 250  $\mu$ L 粗肽液与 0.1 M pH=7.2 磷酸钠缓冲液 2.5 mL (含 1 mmol/L EDTA) 混合均匀, 加 50  $\mu$ L 4 mg/mL 的 DTNB 溶液 (磷酸缓冲液溶解), 混匀, 静置 30 min 于 412 nm 测定溶液吸光度。以缓冲液代替样品作为空白对照。DTNB 的摩尔消光系数为 14150 mol/(L·cm), 巯基含量以每毫克肽所含巯基的纳摩尔数表示, 单位为 nmol/mg。

### 1.3.5 DPPH 自由基清除率的测定

参考 SheihChuan 等<sup>[20]</sup>的方法。将酸肉生状态、加热烹饪后粗肽粉分别配置成 1、2、3、4、5 mg/mL 的粗肽液, 以相应浓度的 L-谷胱甘肽 (GSH) 和丁基羟基甲苯 (BHT) 为对照。分别取 2 mL DPPH 0.2 mM (以 95% 乙醇溶解) 置于试管, 加入 2.0 mL 粗肽液及对照溶液, 混匀, 避光反应 30 min, 于 517 nm 处测定样品吸光度, 同时以 2.0 mL 95% 乙醇加 2.0 mL 样品作空白对照  $A_{\text{空白}}$ , 2.0 mL DPPH 自由基溶液加上 2.0 mL 95% 乙醇为对照  $A_{\text{对照}}$ , DPPH 清除率按公式 (2) 计算。

$$\text{DPPH 自由基清除率 (\%)} = \left[ 1 - \frac{(A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}})}{(A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})} \right] \times 100\% \quad (1)$$

式中:  $A_{\text{样品}}$ 、 $A_{\text{对照}}$  和  $A_{\text{空白}}$  分别为样品组、对照组和空白对照组溶液的吸光度。

### 1.3.6 -OH 自由基清除率

参考 YanHongLi 等<sup>[21]</sup>方法, 将酸肉生状态、加热烹饪后提取的粗肽粉分别配置成 1、2、3、4、5 mg/mL 的粗肽液, 以相应浓度的 L-谷胱甘肽 (GSH) 和丁基

羟基甲苯 (BHT) 为对照。样品管: 0.6 mL 邻二氮菲溶液 (5 mmol/L) 加 0.4 mL 磷酸钠缓冲液 (0.2 mol/L, pH=7.4) 混匀, 加 0.6 mL 粗肽液及 0.6 mL EDTA (15 mmol/L), 混匀, 加 0.6 mL  $\text{FeSO}_4$  溶液 (5 mmol/L) 及 0.8 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.1%), 摇匀置于 37 °C 反应 1 h, 536 nm 波长测定样品吸光度  $A_{\text{样品}}$ ; 损伤管: 以去离子水代替样品, 吸光度记为  $A_{\text{损伤}}$ ; 未损伤管: 以去离子水代替样品及  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 吸光度记为  $A_{\text{未损伤}}$ 。

$$-\text{OH 自由基清除率 (\%)} = \frac{(A_{\text{样品}} - A_{\text{损伤}})}{(A_{\text{未损伤}} - A_{\text{损伤}})} \times 100\% \quad (2)$$

### 1.3.7 $\text{Fe}^{2+}$ 螯合能力的测定

参考 Lee<sup>[22]</sup>等方法, 稍作修改。将酸肉生状态、加热烹饪后提取的粗肽粉分别配置成 1、2、3、4、5 mg/mL 的粗肽液, 以相应浓度的 L-谷胱甘肽 (GSH) 和丁基羟基甲苯 (BHT) 为对照。取 1 mL 样品加 0.05 mL  $\text{FeCl}_2$  (2 mmol/L), 混匀后加入 0.2 mL 菲洛嗪 (5 mmol/L) 摇匀, 室温反应 10 min, 于 562 nm 波长测定溶液吸光度, 以去离子水代替样品测得吸光度为  $A_{\text{对照组}}$ 。

$$\text{Fe}^{2+} \text{螯合率 (\%)} = \frac{A_{\text{对照组}} - A_{\text{样品}}}{A_{\text{对照组}}} \times 100\% \quad (3)$$

### 1.3.8 模拟脂质氧化研究酸肉粗肽抑制脂质过氧化能力

参考 Qian<sup>[23]</sup>等方法, 亚油酸乳化液 (0.2 mol/L, pH=7.0): 0.56 g 亚油酸, 0.056 g 吐温-20, 磷酸盐缓冲液定容至 100 mL。将酸肉生状态、加热烹饪后提取的粗肽粉分别配置成 1、2、3、4、5 mg/mL 的粗肽液, 以相应浓度的 L-谷胱甘肽 (GSH) 和丁基羟基甲苯 (BHT) 为对照。取 2.0 mL 样品液加 0.5 mL 乙醇, 2.5 mL 亚油酸乳化液, 2.0 mL 磷酸盐缓冲液 (0.2 M, pH=7.0), 避光反应 10 min, 获得亚油酸混合液, 空白以去离子水代替样品、GSH、BHT。

以硫氰化铁法测定过氧化值: 移取 0.1 mL 亚油酸混合液, 加 75% 乙醇 4.7 mL、0.1 mL 30% 硫氰酸铵溶液, 摇匀, 加 0.1 mL 0.02 mol/L  $\text{FeCl}_2$  (以 3.5% 盐酸溶液进行溶解), 混匀反应 3 min, 500 nm 波长处测定样品吸光度。样品分别测定 24、48、72、96、120、144 h 时吸光度值, 脂质氧化抑制率计算如下:

$$\text{脂质氧化抑制率 (\%)} = \frac{[1 - (A_{\text{样},144h} - A_{\text{样},0h})]}{(A_{\text{空},144h} - A_{\text{空},0h})} \times 100\% \quad (4)$$

### 1.3.9 模拟胃液体系研究酸肉粗肽清除亚硝酸盐能力

参考吴宝森<sup>[24]</sup>等方法, 稍作修改。胃液配制: NaCl 1.0 g, 蒸馏水溶解, 加 3.5 mL HCl, 蒸馏水定容至 500 mL; 取 2.0 mL 胃液于 10 mL 比色管, 37 °C 水浴 10

min, 加 0.4 mL NaNO<sub>2</sub> (10 μg/mL) 溶液及 2.0 mL 粗肽液 (5 mg/mL), 摇匀后静置 10 min, 加 0.4 mL 对氨基苯磺酸溶液 (0.4%), 37 °C 水浴反应 4 min, 加 0.2 mL 盐酸萘乙二胺溶液 (2 g/L), 混匀后于 542 nm 波长测定样品吸光度记为 A<sub>1</sub>; 以蒸馏水代替 NaNO<sub>2</sub> 记为 A<sub>2</sub>, 以蒸馏水代替样品记为 A<sub>3</sub>, 同时相应的 L-谷胱甘肽 (GSH) 和丁基羟基甲苯 (BHT) 为对照。

$$\text{亚硝酸盐清除率 (\%)} = \frac{(A_3 + A_2 - A_1)}{A_3} \times 100\% \quad (5)$$

## 1.4 数据处理

数据指标采用平行测定 3 次, 结果以平均值±标准差表示。数据采用 Excel 进行统计分析, Origin 8.0 进行数据整理及作图分析, 采用 SPSS 19.0 进行单因素方差分析和 Duncan's 多重比较。

表 1 不同状态酸肉粗肽得率

Table 1 Extraction rates of crude peptides from sour meat in different states

组别	微波	蒸制	油炸	烤制	生酸肉
粗肽得率/%	2.05±0.04 <sup>bc</sup>	2.50±0.13 <sup>a</sup>	2.05±0.01 <sup>bc</sup>	2.31±0.28 <sup>ab</sup>	1.89±0.10 <sup>c</sup>

注: 同行小写字母不同, 表示差异性显著 ( $p < 0.05$ ), 下同。

表 2 不同状态酸肉粗肽液-SH 含量

Table 2 Contents of -sh in crude peptide solution of sour meat in different states

组别	微波	蒸制	油炸	烤制	生酸肉
-SH 含量/(nmol/mg)	25.41±0.00 <sup>c</sup>	22.89±0.01 <sup>e</sup>	26.62±0.03 <sup>b</sup>	24.60±0.00 <sup>d</sup>	37.23±0.00 <sup>a</sup>

酸肉在发酵成熟的过程中蛋白质、脂肪等大分子物质在微生物的作用下先降解成多肽氮及氨基酸肽氮等物质, 进一步分解形成小分子的肽类、氨基酸、脂肪酸及含硫化合物。肉制品中蛋白质在热激条件下使其发生不同程度的变性, 如分子间氢键的断裂、蛋白质重组及螺旋结构的破坏, 因此不同的热处理导致蛋白质降解程度不同, 产物不同。

## 2.2 酸肉粗肽液抗氧化活性

### 2.2.1 酸肉粗肽液游离巯基 (-SH) 含量

含巯基的小分子物质由于活性游离巯基的作用, 使其具有不同程度的消除自由基能力, 因此, 巯基含量的多少反映该物质清除自由基及螯合金属离子能力的强弱。氧化反应的发生使游离巯基减少、二硫键增多<sup>[26]</sup>。本研究以测定提取多肽中-SH 含量比较酸肉在生状态与微波、蒸制、油炸、烤制等不同烹饪方式处理下粗肽的抗氧化活性。

由表 2 可知不同加热方式处理后酸肉粗肽液中-SH 含量存在显著差异 ( $p < 0.05$ ), 未经热处理的酸肉-SH 含量显著高于热处理酸肉, 主要表现为生酸肉>油炸>微波>烤制>蒸制, 这与王乐<sup>[27]</sup>等研究结果相似

## 2 结果与分析

### 2.1 酸肉粗肽提取率

本试验以不同加热方式处理酸肉评价不同热处理对酸肉多肽提取率的影响, 即酸肉在不同的热处理下降解释放多肽的强弱。不同加热方式的酸肉多肽提取率测定结果如表 1 所示。

由表 1 可知, 不同加热处理的酸肉多肽提取率存在显著差异 ( $p < 0.05$ )。与熟制的酸肉相比, 生酸肉的多肽提取率显著低于熟制的酸肉, 这与 Bauchart<sup>[25]</sup>研究的结果一致, 加热与未加热相比, 热处理使得牛肉肌肉中活性肽增加。在熟制的酸肉中蒸制处理的酸肉多肽提取率最高, 且显著高于微波和油炸处理的肉样 ( $p < 0.05$ ), 油炸处理的酸肉多肽提取率最低。

的。Simonetti<sup>[28]</sup>等研究结果表明, 与未加热相对经热加工后猪肉多肽中-SH 含量显著降低。在经热处理的酸肉中油炸最高, 其含量为 26.62 nmol/mg, 蒸制最低, 其含量为 22.89 nmol/mg。热激诱导活性氧的产生<sup>[29]</sup>, 由于肽中-SH 具有结合自由基的能力, 使其-SH 断裂的氢离子与活性氧结合, 从而达到清除自由基的目的。王乐<sup>[27]</sup>等研究金华火腿与猪肉生状态及加热后粗肽液中-SH 含量, 结果表明与未经热处理相比, 加热处理后肉中-SH 含量减少, 与 Simonetti<sup>[30]</sup>研究结果一致。张天义<sup>[31]</sup>等研究发现, 微波加热使猪肉蛋白质中活性巯基含量下降。

### 2.2.2 酸肉粗肽液 DPPH 自由基清除率

由图 1 可知, 随粗肽液浓度的增大, 不同处理酸肉 DPPH 自由基清除能力增强, 肽类具有电子供体物质, 阻断自由基的链式反应。与生酸肉相比, 加热处理后的酸肉中提取的多肽其 DPPH 清除率均有所升高, 综合表现为蒸制>烤制>微波>油炸>生酸肉。

当粗肽液质量浓度为 1 mg/mL 时, 生酸肉的多肽液清除 DPPH 自由基的能力由原本的 10.46% 分别提高至熟制后微波的 13.35%、蒸制的 15.11%、油炸的 12.18% 及烤制的 13.80%, 且 DPPH 自由基清除率存在

显著差异 ( $p<0.05$ )；质量浓度为 5 mg/mL 时，生酸肉的粗肽液清除 DPPH 自由基为 37.17%，较 1mg/mL 粗肽液提高了 3.55 倍，同时微波、蒸制、油炸、烤制等处理的酸肉清除 DPPH 自由基为 44.27%、47.99%、40.63%、46.34%，较 1 mg/mL 粗肽液分别提高了 3.32、3.18、3.34、3.36 倍。GSH 及 BHT 对 DPPH 自由基清除率达 69.60%、61.26%，与微波、蒸制、油炸、烤制及生酸肉相比存在显著差异 ( $p<0.05$ )。酸肉粗肽液及 GSH、BHT 对 DPPH 自由基清除率随浓度增大而增强，这与王乐<sup>[27]</sup>等研究火腿中粗肽液抗氧化活性的结果一致。热处理后酸肉粗肽液 DPPH 自由基清除率较生酸肉显著增加 ( $p<0.05$ )。加热使蛋白质高级结构受损，结构发生变化，导致其疏水基团暴露，疏水性增加，更易与 DPPH 自由基发生结合，从而达到清除游离基，抗氧化的目的。热处理对食品抗氧化活性的影响还未得出明确的结论，大量结果显示热处理对抗氧化活性的作用表现为增强，高温下氧化酶失活，抗氧化能力增强<sup>[32]</sup>。

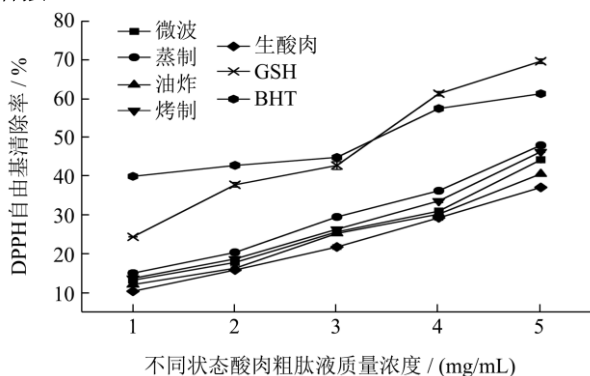


图 1 不同状态酸肉粗肽液 DPPH 自由基清除率

Fig.1 Free radical scavenging rate of DPPH in crude peptide solution of sour meat in different states

### 2.2.3 酸肉粗肽液-OH 自由基清除率

由图 2 可知，随粗肽液浓度的增大，不同处理酸肉-OH 自由基清除能力逐渐增强，与生酸肉相比，加热处理后酸肉中提取的粗肽其-OH 自由基清除率均提高，综合表现为蒸制>烤制>微波>油炸>生酸肉，与 DPPH 自由基清除率结果一致。

当粗肽液质量浓度为 1 mg/mL 时，生酸肉的粗肽液清除-OH 自由基的能力由原本的 8.65% 分别提高至熟制后微波的 10.26%、蒸制的 13.34%、油炸的 10.10% 及烤制的 10.57%，且-OH 自由基清除率存在显著差异 ( $p<0.05$ )；质量浓度为 5 mg/mL 时，生酸肉的粗肽液清除-OH 自由基率为 43.65%，较 1 mg/mL 粗肽液提高了 5.05 倍，同时微波、蒸制、油炸、烤制等处理的酸肉清除-OH 自由基能力为 46.94%、48.90%、46.60%、47.31%，较 1 mg/mL 粗肽液分别提高了 4.57、

3.67、4.61、4.48 倍。GSH 及 BHT 对-OH 自由基清除率达 68.60%、65.15%，与微波、蒸制、油炸、烤制及生酸肉相比存在显著差异 ( $p<0.05$ )。酸肉粗肽液及 GSH、BHT 对-OH 自由基清除率随浓度增大而增强，这与忽晓平<sup>[33]</sup>研究金华火腿中多肽对-OH 自由基的结果一致。Qian 等<sup>[34]</sup>等采用酶解方法分离提取牛蛙皮多肽，当多肽质量浓度为 1.5 mg/mL，-OH 自由基清除率高达 34%。祝超智<sup>[35]</sup>等对金华火腿粗肽液的抗氧化活性研究表明，金华火腿粗肽液在质量浓度为 1.5 mg/mL 时，对-OH 自由基的清除率接近 90%，酸肉粗肽液在质量浓度为 2 mg/mL 时，对-OH 自由基的清除率在 14%~19% 范围，表明不同样品原料其多肽含量及抗氧化活不同，而酸肉多肽在经过不同加热处理及生状态时其抗氧化活性较低。

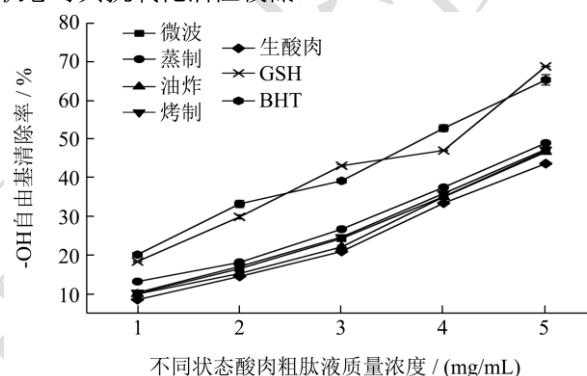


图 2 不同状态酸肉粗肽液-OH 自由基清除能力

Fig.2 Scavenging ability of -oh radical in crude peptide solution of sour meat with different states

### 2.2.4 酸肉粗肽液 Fe<sup>2+</sup>螯合能力

由图 3 可知，随粗肽液浓度的增大，不同处理酸肉 Fe<sup>2+</sup>螯合能力逐渐增强，与生酸肉相比，加热处理后酸肉中提取的粗肽其 Fe<sup>2+</sup>螯合能力均降低，与 DPPH 自由基清除率及-OH 自由基清除率结果相反。Fe<sup>2+</sup>螯合能力综合表现为生酸肉>蒸制>烤制>微波>油炸>生酸肉。

当粗肽液质量浓度为 1 mg/mL 时，生酸肉的粗肽液 Fe<sup>2+</sup>螯合能力由原本的 28.69% 分别降低至熟制后微波的 25.16%、蒸制的 28.41%、油炸的 24.02% 及烤制的 24.55%，且-OH 自由基清除率存在显著差异 ( $p<0.05$ )，且 Fe<sup>2+</sup>螯合能力存在显著差异 ( $p<0.05$ )。质量浓度为 5 mg/mL 时，生酸肉的粗肽液 Fe<sup>2+</sup>螯合能力为 57.77%，较 1 mg/mL 粗肽液提高了 2.01 倍，同时微波、蒸制、油炸、烤制等处理的酸肉 Fe<sup>2+</sup>螯合能力为 50.61%、52.67%、48.76%、50.58%，较 1 mg/mL 粗肽液分别提高了 2.01、1.85、2.03、2.06 倍。GSH 及 BHT 对 Fe<sup>2+</sup>螯合达 41.39%、36.59%，与微波、蒸制、油炸、烤制及生酸肉相比存在显著差异 ( $p<0.05$ )。

酸肉粗肽液对  $\text{Fe}^{2+}$  螯合随浓度增大而增强, 这与祝超智<sup>[35]</sup>、忽晓平<sup>[33]</sup>等研究金华火腿中粗肽液对  $\text{Fe}^{2+}$  螯合能力的结果一致。研究发现, 短肽中中性和酸性氨基酸的暴露使其具有携带的游离羧基具有抑制  $\text{Fe}^{2+}$  产生自由基的作用<sup>[35]</sup>, 因此是酸肉粗肽液对  $\text{Fe}^{2+}$  螯合作用可能与多肽中存在的中性或酸性氨基酸有关。热处理使蛋白质结构发生变化, 蛋白质降解的多肽极性降低, 从而导致其清除-OH 自由基能力降低。

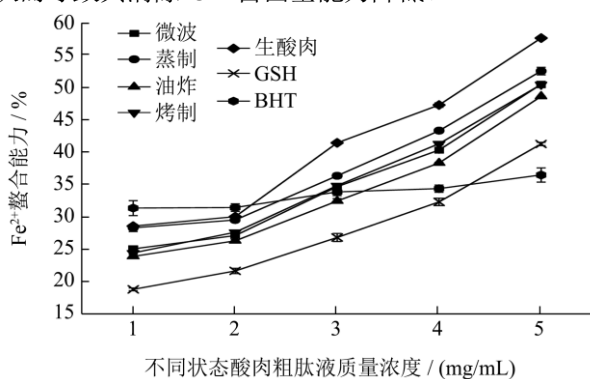


图3 不同状态酸肉粗肽液  $\text{Fe}^{2+}$  螯合能力

Fig.3  $\text{Fe}^{2+}$  chelating ability of crude acid meat peptide solution in different states

## 2.2.5 模拟脂质氧化酸肉粗肽抑制脂质过氧化能力

脂质过氧化是在自由基引发的一系列连锁反应, 产生脂质过氧自由基最终形成丙二醛、短链醛酸类, 而这些产物亲电子能力较强, 在生物体内与蛋白质等大分子物质结合, 使其结构和功能发生变化, 引发机体炎症、免疫疾病、心脑血管疾病及动脉粥样硬化等<sup>[36]</sup>。研究发现, 含 5~16 个氨基酸的多肽类物质具有较好的抑制脂质过氧化的作用<sup>[35]</sup>。本实验对测定酸肉粗肽液分别在 24、48、72、96、120、144 h 时粗肽液对脂质氧化的抑制率。在反应 144 h 时, 其抑制率表现为  $\text{BHT}$  > 蒸制 > 生酸肉 > 烤制 > 微波 > 油炸 >  $\text{GSH}$ 。

酸肉粗肽液及  $\text{GSH}$ 、 $\text{BHT}$  对脂质氧化抑制率结果如图 4, 结果可知, 随时间的增加, 酸肉粗肽液及  $\text{GSH}$ 、 $\text{BHT}$  对脂质氧化抑制率也增加, 在 96 h 范围内抑制脂质氧化能力增加较明显, 且  $\text{BHT}$  抑制脂质氧化能力最高 ( $p < 0.05$ ), 72 h 后抑制率增加趋势减缓。在 144 h 时, 微波、蒸制、油炸、烤制、生酸肉粗肽液对脂质氧化抑制率分别为 47.33%、57.60%、44.26%、49.03%、51.63%, 与  $\text{GSH}$  (42.88%)、 $\text{BHT}$  (79.40%) 的抑制效果存在极显著差异 ( $p < 0.05$ ); 在 144 h 时, 与  $\text{GSH}$  相比微波、蒸制、油炸、烤制、生酸肉分别增加了 1.10、1.34、1.03、1.14、1.20 倍, 而与微波、蒸制、油炸、烤制、生酸肉相比  $\text{BHT}$  抑制脂质氧化能力分别增加了 0.60、0.73、0.56、0.62、0.65 倍。酸

肉多肽及  $\text{GSH}$ 、 $\text{BHT}$  对脂质过氧化抑制能力随反应时间的增加而增强, 达到一定反应时间基本趋于稳定, 这与吴宝森<sup>[24]</sup>等研究火腿中多肽抗氧化活性的结果一致。脂质过氧化产生自由基具有诱导蛋白质、肽类分子的聚集的作用, 分子之间发生交联, 形成自由基链式反应, 达到清除自由基的目的<sup>[37]</sup>。随脂质氧化时间的增长, 亚油酸氧化体系中样品的蛋白质氧化与表面疏水性增加, 二硫键及巯基含量下降, 导致自由基链式反应减缓, 脂质氧化抑制率降低<sup>[38]</sup>。

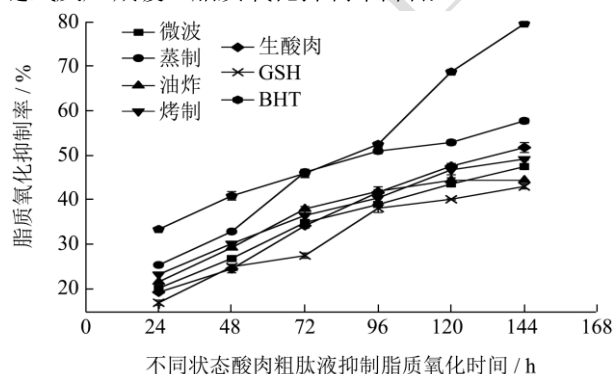


图4 不同状态酸肉粗肽液脂质氧化抑制率

Fig.4 Lipid oxidation inhibition rate of crude peptide liquid in sour meat in different states

## 2.2.6 模拟胃液体系酸肉粗肽清除亚硝酸盐能力

肽类在人体消化系统中由于受伤、胃肠微环境的影响其酸化和酶解作用受一定影响, 从而影响肽的活性, 因此采用模拟胃液体系研究不同加热处理后酸肉多肽对亚硝酸盐清除能力的影响。

由表 3 可知, 不同加热处理的酸肉多肽清除亚硝酸盐能力存在显著差异 ( $p < 0.05$ )。酸肉肽的质量浓度为 5 mg/mL 时, 与熟制的酸肉相比, 生酸肉肽的清除亚硝酸盐能力显著高于熟制的酸肉肽。在熟制的酸肉中蒸制处理的酸肉清除亚硝酸盐能力最高, 其清除率为 75.37%, 且显著高于微波和油炸处理的肉样 ( $p < 0.05$ ), 微波处理酸肉最低, 为 68.81%。叶春等<sup>[9]</sup>研究酸肉肽, 结果表明酸肉肽质量浓度分别为 0.10 mg/mL 和 0.2 mg/mL 时, 其亚硝酸盐清除率分别为 17.79% 和 19.68%,  $\text{BHT}$  质量浓度为 0.10 mg/mL 和 0.2 mg/mL 时, 亚硝酸盐清除率分别为 27.87% 和 44.2%, 均高于相同质量浓度的肽液。吴宝森<sup>[24]</sup>等研究不同成熟时间诺邓火腿粗肽亚硝酸盐抑制率, 结果表明, 粗肽液质量浓度为 10 mg/mL 时, 成熟时间分别为 1、2、3 年的火腿对亚硝酸盐的清除率分别为 69.39%、76.97%、83.94%, 均比  $\text{GSH}$  清除率低。本实验结果表明, 不同热处理条件下酸肉粗肽液对亚硝酸盐清除率不同, 均明显低于相同质量浓度的  $\text{BHT}$ 、 $\text{GSH}$ 。

表3 不同状态酸肉粗肽液清除亚硝酸盐的能力

Table 3 Scavenging ability of nitrite in crude peptide solution of sour meat in different states

组别	亚硝酸盐清除率/%
微波	68.81±0.66 <sup>d</sup>
蒸制	75.37±0.39 <sup>c</sup>
油炸	70.05±0.33 <sup>d</sup>
烤制	74.86±0.29 <sup>c</sup>
生酸肉	76.01±0.02 <sup>c</sup>
GSH	92.55±2.04 <sup>a</sup>
BHT	85.85±2.50 <sup>b</sup>

注：同列小写字母不同，表示差异显著 ( $p < 0.05$ )。

### 3 结论

发酵酸肉多肽具有清除自由基、抗氧化、免疫调节及结合胆酸盐的能力，不同热处理方式会引起肉制品发生不同程度的物理化学变化，自由基的存在是导致氧化的主要原因，因此对自由基清除率直接反映了抗氧化活性，而评价抗氧化活性的指标为清除自由基能力、金属离子螯合能力及对脂质氧化的抑制率。本研究以-OH、DPPH 清除率、螯合  $Fe^{2+}$  能力及抑制脂质过氧化能力评价酸肉粗肽液抗氧化活性。结果表明，微波、蒸制、油炸、烤制 4 种热处理方式对酸肉多肽提取、多肽抗氧化活性及清除亚硝酸盐能力均存在显著影响，尤其是与生酸肉相比，加热处理后酸肉粗肽抗氧化活性提高，且蒸制最好，因此酸肉抗氧化多肽提取适宜的热处理方式方式为蒸制>烤制>微波>油炸，-SH 含量显著高于热处理酸肉，主要表现为生酸肉>油炸>微波>烤制>蒸制，且在粗肽液质量浓度为 5mg/mL 时，粗肽液 DPPH 自由基清除率及 -OH 自由基清除率均表现为蒸制>烤制>微波>油炸>生酸肉， $Fe^{2+}$  螯合能力表现为生酸肉>蒸制>烤制>微波>油炸，亚硝酸盐清除率清除能力表现为生酸肉>蒸制>烤制>油炸>微波；热处理后酸肉粗肽的提取率、DPPH 自由基清除率、-OH 自由基清除率均高于生酸肉，均表现为蒸制>烤制>微波>油炸>生酸肉。综上所述，酸肉多肽的抗氧化活性在不同热处理方式下具有很大差异，该研究为酸肉最佳加工方式提供手段，为功能性食品的开发提供理论依据。

### 参考文献

[1] Silva S V, Malcata F X. Caseins as source of bioactive peptides [J]. International Dairy Journal, 2005, 15(1): 1-15

[2] Lafarga T, Hayes M. Bioactive peptides from meat muscle and by-products: generation, functionality and application as

functional ingredients [J]. Meat Science, 2014, 98(2): 227-239

- [3] J G Rodríguez-Carpena, D Morcuende, M Estévez. Avocado by-products as inhibitors of color deterioration and lipid and protein oxidation in raw porcine patties subjected to chilled storage [J]. Meat Science, 2011, 89(2): 166-173
- [4] Marianne N Lund, Marchen S Hviid, Chris Claudi-Magnussen, et al. Effects of dietary soybean oil on lipid and protein oxidation in pork patties during chill storage [J]. Meat Science, 2008, 79(4): 727-733
- [5] 张仁改. 人体中的氧自由基[J]. 化学教育, 2003, 24(12): 4-6
- ZHANG Ren-gai. Oxygen free radicals in human body [J]. Chemistry Education, 2003, 24(12): 4-6
- [6] Anusha G P Samaranayaka, Eunice C Y Li-Chan. Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications [J]. Journal of Functional Foods, 2011, 3(4): 229-254
- [7] Sánchez, Adrián, Vázquez, Alfredo. Bioactive peptides: A review [J]. Food Quality & Safety, 2017, 1(1): 29-46
- [8] Escudero E, Mora L, Fraser P D, et al. Purification and identification of antihypertensive peptides in spanish dry-cured ham [J]. Journal of Proteomics, 2013, 78: 499-507
- [9] 叶春, 马顺强, 张倩, 等. 酸肉肽抗氧化活性的研究[J]. 食品科学, 2010, 31(7): 94-97
- YE Chun, MA Shun-qiang, ZHANG Qian, et al. Study on antioxidant activity of acid meat peptide [J]. Food Science, 2010, 31(7): 94-97
- [10] Sayd T, Chambon C, Santé-Lhoutellier V. Quantification of peptides released during *in vitro* digestion of cooked meat [J]. Food Chemistry, 2016, 197: 1311-1323
- [11] Serpen A, Gökmen V, Fogliano V. Total antioxidant capacities of raw and cooked meats [J]. Meat Science, 2012, 90(1): 60-65
- [12] Davis P J, Williams S C. Protein modification by thermal processing [J]. Allergy, 1998, 53(46): 102-105
- [13] Saydt, Chambon C, Santé-Lhoutellier V. Quantification of peptides released during *in vitro* digestion of cooked meat [J]. Food Chemistry, 2016, 197: 1311-1323
- [14] Lee S K, Mei L, Decker E A. Influence of sodium chloride on antioxidant enzyme activity and lipid oxidation in frozen ground pork [J]. Meat science, 1997, 46(4): 350-355
- [15] K S Rhee, Y A Ziprin. Pro-oxidative effects of NaCl in microbial growth-controlled and uncontrolled beef and chicken [J]. Meat Science, 2001, 57(1): 110-112
- [16] Wen Siying, Zhou Guanghong, Li Li, et al. Effect of cooking

- on *in vitro* digestion of pork proteins: A peptidomic perspective [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 63(1): 250-261
- [17] Zhu Chaozhi, Zhang Wangang, Zhou Guanghong, et al. Isolation and identification of antioxidant peptides from Jinhua ham [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(6): 1265-1271
- [18] Church Frank C, Swaisgood Harold E, Porter David H, et al. Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins1 [J]. Journal of Dairy Science, 1983, 66(6): 1219-1227
- [19] Ellman G L. Tissue sulfhydryl groups [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1959, 82(1): 70-77
- [20] Sheih Chuan, Tung Kung Wu, Tony J Fang. Antioxidant properties of a new antioxidative peptides from algae protein waste hydrolysate in different oxidation systems [J]. Bioresource Technology, 2009, 100(13): 3419-3425
- [21] Yan Hong Li, Jiang Bo, Tao Zhang, et al. Antioxidant and free radical scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH) [J]. Food Chemistry, 2008, 106(2): 444-450
- [22] Lee S J, Kim E K, Hwang J W, et al. Purification and characterisation of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysates of duck processing by-products [J]. Food Chemistry, 2010, 123(2): 216-220
- [23] Qian Z J, Jung W K, Byun H G, et al. Protective effect of antioxidative peptide purified from gastrointestinal digests of oyster, *Crassostrea gigas* against free radical induced DNA damage [J]. Bioresearch Technology, 2008, 99: 3365-3371
- [24] 吴宝森. 诺邓火腿抗氧化肽分离纯化及其特性研究[D]. 昆明: 云南农业大学, 2017
- WU Bao-sen. Isolation, purification and characterization of antioxidant peptides from nuodeng ham [D]. Kunming: Yunnan Agricultural University, 2017
- [25] Bauchart C, Rémond D, Chambon C, et al. Small peptides (<5 ku) found in ready-to-eat beef meat [J]. Meat Science, 2006, 74(4): 658-666
- [26] Haak L, Raes K, Van Dyck S, et al. Effect of dietary rosemary and  $\alpha$ -tocopheryl acetate on the oxidative stability of raw and cooked pork following oxidized linseed oil administration [J]. Meat Science, 2008, 78(3): 239-247
- [27] 王乐, 成晓瑜, 马晓钟, 等. 金华火腿加热烹饪和体外模拟消化后粗肽抗氧化和 ACE 抑制活性比较研究[J]. 肉类研究, 2018, 32(1): 16-22
- WANG Le, CHENG Xiao-yu, MA Xiao-zhong, et al. Comparative study on antioxidant and ACE inhibitory activity of crude peptides after heated cooking and *in vitro* simulated digestion of jinhua ham [J]. Meat research, 2008, 32(1): 16-22
- [28] Simonetti A, Gambacorta E, Perna A. Antioxidative and antihypertensive activities of pig meat before and after cooking and *in vitro* gastrointestinal digestion: comparison between Italian autochthonous pig Suino Nero Lucano and a modern crossbred pig [J]. Food Chemistry, 2016, 212: 590-595
- [29] Soladoye O P, Juárez M L, Aalhus J L, et al. Protein oxidation in processed meat: mechanisms and potential implications on human health [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2015, 14(2): 106-122
- [30] Simonetti A, Gambacorta E, Perna A. Antioxidative and antihypertensive activities of pig meat before and after cooking and *in vitro* gastrointestinal digestion: Comparison between Italian autochthonous pig Suino Nero Lucano and a modern crossbred pig [J]. Food Chemistry, 2016, 212: 590-595
- [31] 张天义. 微波加热对猪肉中蛋白质及苯并芘形成的影响研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2013
- ZHANG Tian-yi. Effects of microwave heating on protein and benzopyrene formation in pork [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2013
- [32] 赵钜阳, 夏秀芳, 孔保华, 等. 微波加热对食品中酚类物质的含量及抗氧化活性的影响[J]. 食品工业科技, 2012, 33(13): 395-399
- ZHAO Yu-yang, XIA Xiu-fang, KONG Bao-hua, et al. Effects of microwave heating on the content and antioxidant activity of phenolic compounds in foods [J]. Food Science and Technology, 2012, 33(13): 395-399
- [33] 忽晓平. 金华火腿多肽的提取及功能特性研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2017
- HU Xiao-ping. Extraction and functional properties of Jinhua ham peptide [D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2017
- [34] Qian Z, Jung W, Kim S. Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* Shaw [J]. Bioresource Technology, 2008, 99(6): 1690-1698