

不同提取方法的马骨髓蛋白结构及活性比较研究

吾哈丽妮萨·麦麦提托合提, 帕尔哈提·柔孜*, 则拉莱·司马依, 古丽米热·阿巴拜克热, 杨晓君,
古扎努尔·艾斯卡尔, 王娟

(新疆农业大学食品科学与药学学院, 新疆乌鲁木齐 830052)

摘要: 研究不同提取方法对马骨髓蛋白提取率、结构及抗菌、抗氧化活性的影响, 探讨其食用和药用价值。以蛋白含量、提取率、分子量及抗氧化活性为考察指标筛选 12 种提取方法, 采用 UV、SDS-PAGE、FT-IR、SEM-EDX 进行结构表征; 通过体外抗菌和抗氧化活性实验评价其生物活性。经综合考察得出水、0.25% NaCl (质量分数) 及生理盐水提取所得马骨髓蛋白指标较高, 蛋白含量分别为 41.91、39.93、37.82 mg/mL, 提取率为 19.26%、14.86%、23.22%。UV 图谱显示不同方法制备的马骨髓蛋白在 270 nm 附近出现最大吸收峰, SDS-PAGE 显示蛋白分子量主要集中在 66 ku 附近、且出现相应的多肽条带, FT-IR 图谱显示其在 4 000~400 cm^{-1} 区域均出现典型的蛋白吸收峰, SEM-EDX 显示其蛋白由球状、条状和不规则颗粒构成。生物活性试验结果表明以上三种方法所得的马骨髓蛋白具有较好的抑菌及抗氧化作用, 对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径分别为 12.0、16.0、11.0 mm; 清除 DPPH 及 ABTS 自由基的 IC_{50} 分别为 0.32、0.29、0.31 mg/mL 及 0.26、0.15、0.20 mg/mL。研究结果可为马肉副产物骨类资源的进一步开发利用提供科学依据。

关键词: 马骨髓; 蛋白; 结构表征; 生物活性

文章编号: 1673-9078(2022)09-264-274

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.9.1078

Comparative Study on the Structure and Activity of Horse Bone Marrow Protein Extracted by Different Methods

UGULNISA Mamattohti, PARHAT Rozi*, ZILALA Ismayil, GULMIRA Ababakri, YANG Xiaojun,
GUZALNUR Askar, WANG Juan

(College of Food Science and Pharmacy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

Abstract: The effects of different extraction methods on extraction rate, structure, antibacterial activity and antioxidant activity of horse bone marrow protein were studied, and its edible and medicinal values were examined. Twelve extraction methods were screened through using protein content, extraction rate, molecular weight and antioxidant activity as the indicators, and structural characterizations were performed by UV, SDS-PAGE, FT-IR, and SEM-EDX analysis. The biological properties of the obtained proteins were evaluated by *in vitro* antibacterial and antioxidant activities. After comprehensive investigations, it was found that the index scores of the horse bone marrow proteins extracted with water, 0.25% NaCl, and normal saline were higher, with their corresponding protein contents being 41.91, 39.93 and 37.82 mg/mL, and extracted rates being 19.26%, 14.86% and 23.22%, respectively. UV spectra showed that the horse bone marrow proteins prepared by different methods had the maximum absorption peak around 270 nm. SDS-PAGE revealed that the molecular weights of the obtained proteins were mainly around 66 ku, with the presence of corresponding polypeptide bands. FT-IR spectra showed typical protein absorption signals in the region of 4000~400 cm^{-1} . SEM-EDX analysis showed that the obtained proteins were composed of spherical, striped and irregular particles. The results of biological activity experiments demonstrated that the horse bone marrow proteins prepared by the three methods exhibited sound

引文格式:

吾哈丽妮萨·麦麦提托合提,帕尔哈提·柔孜,则拉莱·司马依,等.不同提取方法的马骨髓蛋白结构及活性比较研究[J].现代食品科技,2022,38(9):264-274

UGULNISA Mamattohti, PARHAT Rozi, ZILALA Ismayil, et al. Comparative study on the structure and activity of horse bone marrow protein extracted by different methods [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(9): 264-274

收稿日期: 2021-09-26

基金项目: 新疆维吾尔自治区高校科研计划自然科学青年项目 (XJEDU2019Y022)

作者简介: 吾哈丽妮萨·麦麦提托合提 (1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品营养与安全, E-mail: nisa141@126.com

通讯作者: 帕尔哈提·柔孜 (1989-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 生物大分子化合物提取分离与活性筛选, E-mail: parhatruzi@126.com

antibacterial and antioxidant effects, and the zone diameters of inhibition against *Staphylococcus aureus* were 12.0, 16.0 and 11.0 mm, respectively. The IC_{50} values of DPPH and ABTS free radicals scavenging activities were 0.32, 0.29 and 0.31 mg/mL, and 0.26, 0.15 and 0.20 mg/mL, respectively. The research results can provide a scientific basis for further development and utilization of horse meat processing by-products, bone resources.

Key words: horse bone marrow; protein; structure characterization; biological activity

动物类药材在传统中药材中有着悠久的药用历史,《本草纲目》记载了 444 种动物药,其中畜禽骨骼作为珍贵药材广泛记载于我国各代本草中,民间应用和治疗作用历来受到中医名家的高度重视^[1]。现代研究表明,动物骨骼中富含蛋白、肽、硫酸软骨素及多种矿物质等成分,具有抗菌、抗氧化、抗疲劳、抗高血压、免疫调节、促进矿物质吸收及延缓皮肤衰老等作用^[2]。胶原蛋白作为动物骨骼主要活性成分之一,能促进成骨细胞增殖、加速骨骼发育、改善骨骼强度、减轻关节疼痛^[3,4],从而保护骨骼健康。目前,中国已成为世界上最大的动物源性食品生产和消费国家之一。每年有大量的动物骨骼未被充分利用,资源浪费和环境污染现象严重。前期相关研究主要集中在珍稀濒危或海洋动物骨骼功效成分、作用和开发方面^[4-6],对常见动物骨类功能蛋白的重视和开发程度不足,加之动物骨骼胶原蛋白原有的特殊分子结构、加工方式的单一、高端产品种类不多及产业链提质增效速度缓慢等因素阻碍了相关研究进展。因此,如何才能有效利用畜禽骨资源,怎样建立稳定高效的技术制备骨源性胶原蛋白,提高食用价值,开发其药用功能作用是需要解决的重点课题及热点问题之一。

新疆是我国五大传统牧区之一,畜牧资源丰富,其中伊犁马是多年培育的主要马品种^[7]。新疆马存栏量和马肉产量在世界马业中占据重要地位,其中马肉、马油及马奶等具有良好的药用价值^[8],但占胴体比重较大的马骨资源尚未得到有效开发利用,影响了马产业下游产业链的整体发展。课题组前期研究发现,马骨髓蛋白含量和活性均强于马骨^[9],具有良好的开发应用价值。因此进一步探讨如何制备马骨髓蛋白的最佳方法对促进马产业可持续发展具有现实意义。

因此,本文以马骨髓为试验对象,以蛋白含量、提取率、相对分子量及抗氧化活性等作为评价指标,选用水、乙醇、NaCl、Tris-HCl,丙酮、醋酸提取等 12 种提取方法,采用紫外光谱(UV)、十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、红外光谱(FT-IR)及扫描电镜-X射线能谱(SEM-EDX)等对其进行结构表征。以大肠杆菌(*Escherichia coli*, EC)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, SA)和枯草

芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*, BS)为供试评价其抗菌性能。同时,测定马骨髓蛋白对 2,2-联苯基-1-苦基肼基自由基(DPPH·)、羟自由基(·OH)、超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)、2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸自由基(ABTS⁺·)的清除能力和总还原能力来综合评价其抗氧化活性,旨在提高马骨髓的高值化利用率及附加值,为开发新的骨蛋白产品提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

马骨采购于乌鲁木齐华凌牛羊肉批发市场 D 座(防疫鉴定),由新疆农业大学食品科学与药学院巴吐尔·阿不力克木教授鉴定为“新疆伊犁马骨”。取骨髓样品,用蒸馏水冲洗 3 次,去除碎骨头,加 1:5 比例液氮粉碎成粉末,骨髓粉末置于塑料盒中用锡箔纸包裹,存于-40℃度冰箱,备用。

考马斯亮蓝上海蓝季公司;二喹啉甲酸(BCA)试剂盒江苏艾康医药公司;10% SDS、30%丙烯酰胺溶液、1% TEMED 武汉科技有限公司;琼脂粉、酵母浸粉、蛋白胨北京博星公司;金黄色葡萄球菌(批号 B26003)、大肠杆菌(批号 B 44102)、枯草芽孢杆菌(批号 B 63501)均由新疆农业大学食品科学与药学院微生物实验室供应;本实验使用的所有其他化学品均为分析纯。

1.2 仪器设备

DF-101 集热式恒温加热磁力搅拌器上海兴创科学仪器有限公司;LCJ-12 冷冻干燥机上海腾方仪器设备有限公司;RE-52AA 紫外分光光度计上海美普达仪器有限公司;X mark 酶标仪上海新领生物科技发展有限公司;XRS 凝胶成像仪上海新领生物科技发展有限公司;Power Pac 电泳仪上海新领生物科技发展有限公司;SW-CJ-2FD 超洁净工作台苏州金圣航智能装备有限公司;ARL4460 光谱仪美国 Thermo 公司;JSM-7610FPlus 热场发射扫描电子显微镜日本电子株式会社(JEOL);Nicolet Is5 傅里叶变换红外 Thermo Fisher 公司。

表 1 马骨髓蛋白提取方法

Table 1 Extraction method of horse bone marrow protein

序号	提取法		料液比/(g/mL)	提取温度/°C	时间/h	提取次数
	分类	溶剂				
1	水	水	1:10	45	2	2
2	有机溶剂	1%醋酸	1:10	45	2	2
3		85%丙酮	1:10	45	2	2
4	盐溶液	1% NaCl 提取	1:10	45	2	2
5		生理盐水	1:10	45	2	2
6		0.5% NaCl	1:10	45	2	2
7		0.25% NaCl	1:10	45	2	2
8	缓冲溶液	磷酸盐缓冲溶液 (PBS 1 mol/L, pH 值 6.6)	1:10	45	2	2
9		Tris-HCl (1 mol/L, pH 值 8.4)	1:10	45	2	2
10		0.1% HCl	1:10	45	2	2
11	酸碱	0.2% NaOH 提取	1:10	45	2	2
12		0.2% KOH 提取	1:10	45	2	2

1.3 方法

1.3.1 马骨髓蛋白的提取

提取流程如下。

马骨髓粉末→不同提取方法→适当浓缩→调 pH 值 (6.5~7.5)→透析 (48 h)→冷冻干燥→马骨髓蛋白粉末

称取马骨髓粉各 10 g, 按表 1 中 12 种方法进行磁力搅拌回流提取, 提取液经过滤、脱脂、浓缩、透析、冷冻干燥, 得马骨髓蛋白粉末。

1.3.2 蛋白含量测定

通过 BCA 法测定蛋白质含量 (参考 BCA 试剂盒说明书)。以牛血清蛋白为标准品, 蛋白含量为横坐标 (mg/mL), 吸光度为纵坐标绘制标准曲线, 测定马骨髓蛋白含量。以马骨髓蛋白含量, 提取率及 DPPH 自由基清除能力综合评分为考察指标, 由于其贡献值大小未知, 因此设定总值为 100%, 蛋白浓度为主要考察指标占 50%, 提取率和 DPPH 自由基清除能力为次要考察指标各占 25%, 计算其综合得分。

1.3.3 UV 分析

分别配制浓度为 1 mg/mL 的马骨髓蛋白溶液, 测定其在 200~400 nm 范围内的紫外吸收光谱。

1.3.4 SDS-PAGE 分析

准确称取马骨髓蛋白 5 mg, 加 1 mL PBS (50 mmol/L, pH=7) 溶液, 溶解、离心、取上清液。取 30 μ L 上述马骨髓蛋白溶液, 按照体积比为 4:1 加入蛋白上样缓冲液、混匀、煮沸 5 min, 取 10 μ L, 上样。初始电压为 75 V, 分离 30 min, 电压调到 120 V 继续分离 90 min。结束后, 固定 1~2 h, 用考马斯亮蓝 G-250 进行染色 (1.5~2 h), 脱色 (重复更替脱色

液到背景清晰)^[10]。

1.3.5 SEM-EDX 分析

取少量马骨髓蛋白样品在离子溅射装置上镀上导电膜。使用 SEM 在 500 \times ~3 000 \times 下拍照, 加速电压为 20 kV。通过 X-射线能谱仪测定马骨髓蛋白元素含量。

1.3.6 FT-IR 分析

取少量马骨髓蛋白样品, 与适量溴化钾混合, 用压片法测定其 4 000~400 cm^{-1} 范围内的红外吸收光谱。

1.3.7 生物活性检测

1.3.7.1 马骨髓蛋白抗菌活性测定

1) 培养基的制备按配方配制 250 mL 培养基。将所有盛有培养基的三角烧瓶密封后 121 $^{\circ}\text{C}$ 下高压灭菌 20 min, 并在净化工作台里倒入培养皿中, 等平板冷却凝固 5~10 min 后将平板倒放, 制备成固体培养基。

2) 样品的制备配制质量浓度为 30 mg/mL 的骨髓蛋白样品, 稀释成不同浓度的溶液。采用打孔法检测抗菌活性, 每孔加入不同浓度的样品溶液 25 μ L, 置于培养皿中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 48 h, 测定抗菌环直径并记录。若抑菌圈直径小于等于 7 mm, 则认为样品无抗菌功效。

1.3.7.2 抗氧化活性测定

1) DPPH·清除能力的测定

取 100 μ L 一定浓度的样品溶液于 96 孔板中, 加入同体积的 DPPH-甲醇溶液, 混匀, 室温避光 30 min, 用酶标仪在 517 nm 处测定吸光度。用水代替样品作为空白组, 用甲醇代替 DPPH-甲醇溶液作为对照组, Vc 作为阳性对照^[11]。DPPH 自由基清除率按式 (1) 计算:

$$F_1 = \left(1 - \frac{A_y - A_d}{A_k} \right) \times 100\% \quad (1)$$

式中:

F_1 —DPPH 自由基清除率, %;

A_k —空白组吸光度;

A_y —样品组吸光度;

A_d —对照组吸光度。

2) OH·清除能力的测定

将 1 mL 不同质量浓度的蛋白溶液、1 mL 硫酸亚铁溶液 (6 mmol/L) 和 1 mL 水杨酸-乙醇溶液 (6 mmol/L) 混合。再加入 1 mL 的质量分数 0.1% 过氧化氢, 摇匀, 在 37 °C 下避光反应 30 min。取 200 μ L 至 96 孔板中, 在 510 nm 下测吸光度。用水代替样品作为空白组, 用水代替过氧化氢溶液作为对照组, Vc 作为阳性对照^[12], 按上式 (1) 计算清除率。

3) 超氧阴离子自由基清除能力的测定

取 1 mL 马骨髓蛋白样品溶液, 加 2 mL Tris-HCl 缓冲液 (50 mmol/L, pH=8.2)、混匀、于室温放置 15 min, 加 1 mL 邻苯三酚 (6 mmol/L, 用 10 mmol/L 稀盐酸配制), 室温放置 4 min, 再加入 0.1 mL 10 mol/L 浓盐酸终止反应。取 200 μ L 至 96 孔板中, 320 nm 处测定吸光度。用水代替样品作为空白组, 用水代替邻苯三酚溶液作为对照组, Vc 作为阳性对照^[13], 按上式 (1) 计算清除率。

4) ABTS⁺清除能力的测定

分别配制浓度为 7 mmol/L 的 ABTS⁺ 溶液及 2.45 mmol/L 的过硫酸钾溶液, 室温避光反应 12~16 h。将上述溶液用蒸馏水稀释至其在 734 nm 处的吸光度为 0.70±0.02。将 50 μ L 一定质量浓度的样品溶液和

150 μ L ABTS⁺ 自由基溶液加入 96 孔板中, 室温下避光反应 6 min。用酶标仪于 734 nm 处测定溶液吸光度。用蒸馏水代替样品溶液作为空白组, Vc 作为阳性对照组^[14], 按式 (2) 计算马骨髓蛋白的 ABTS⁺ 自由基清除能力。

$$F_2 = \left(1 - \frac{A_y}{A_k} \right) \times 100\% \quad (2)$$

式中:

F_2 —ABTS⁺ 自由基清除率, %;

A_k —空白组吸光度;

A_y —样品组吸光度。

5) 总还原能力的测定

取 0.8 mL 不同浓度的样品溶液于试管中, 分别加入 0.4 mL 的 PBS 溶液 (pH 值 6.6)、0.4 mL 的质量分数 1% 铁氰化钾溶液, 在 50 °C 下放置 20 min, 冷却, 加入 0.4 mL 的 10% 三氯乙酸溶液、1.6 mL 蒸馏水和 0.4 mL 0.1% 三氯化铁溶液, 室温放置 10 min, 在 700 nm 处测量吸光度, 用蒸馏水代替样品溶液作为空白组, Vc 为阳性对照^[15]。

1.4 数据分析

所有实验重复 3 次, 实验结果用平均值±标准差表示, 用 SPSS 20, Origin 8.6 进行实验数据分析。

2 结果与讨论

2.1 马骨髓蛋白提取研究

表 2 不同提取溶剂对马骨髓蛋白影响 ($n=3$)

Table 2 Effects of different extraction solvents on the horse bone marrow protein ($n=3$)

序号	方法	蛋白含量/(mg/mL)	提取率/%	DPPH 清除率/%	综合得分
A	水提取	41.91±1.68 ^b	19.26±1.89 ^d	41.73±1.81 ^{bc}	95.00
B	1%醋酸提取	26.92±0.11 ^f	9.12±0.65 ^{fg}	39.91±1.93 ^a	65.14
C	85%丙酮提取	23.29±0.28 ^g	6.23±1.00 ^h	23.68±0.68 ^g	48.26
D	PBS 提取	35.10±1.12 ^d	16.02±0.03 ^c	38.03±1.41 ^e	81.23
E	Tris-HCl 提取	35.64±1.07 ^d	10.51±0.81 ^f	38.81±1.32 ^{cde}	76.40
F	0.2% NaOH 提取	21.68±0.23 ^g	7.59±2.08 ^{gh}	14.61±0.09 ^b	42.52
G	0.2% KOH 提取	21.71±0.18 ^g	5.87±1.04 ^h	9.46±0.06 ⁱ	37.72
H	0.1% HCl 提取	31.01±0.51 ^e	8.32±2.80 ^{gh}	40.06±1.24 ^{bcd}	69.25
I	1% NaCl 提取	25.07±0.22 ^{fg}	8.78±1.05 ^{fg}	28.01±0.38 ^f	55.64
J	0.25% NaCl 提取	39.93±1.27 ^{bc}	14.86±1.21 ^c	43.01±1.17 ^b	88.64
K	0.5% NaCl 提取	36.91±1.09 ^{cd}	10.07±0.09 ^{fg}	38.48±1.03 ^{de}	77.24
L	生理盐水提取	37.82±1.63 ^{cd}	23.22±2.01 ^e	41.15±1.70 ^{bcd}	94.04

注: 同列右肩不同的小写字母表示具有显著差异 ($p<0.05$), 综合得分: 蛋白含量 (50%) + 提取率 (25%) + DPPH 清除率 (25%)。

2.1.1 不同提取方法对马骨髓蛋白的影响

不同提取方法对马骨髓蛋白的含量、提取率和

DPPH 自由基清除能力的影响如表 2 和图 1 所示。结果表明, 不同的提取方法对马骨髓蛋白提取和活性具

有较大的影响。如表 2 所示, 蛋白含量大小顺序为 A>J>L>K>E>D>H>B>I>C>G>F; 提取率大小顺序为 L>A>D>J>E>K>B>I>H>F>C>G, 抗氧化活性强弱为 J>A>L>H>B>E>K>D>I>C>F>G。经综合对比得出, A、J 及 L 等三种方法所得的骨髓蛋白综合指标显著高于其余 9 种, 这可能是因为溶剂对活性成分的溶解度大, 而对杂质的溶解度小所引起的。同时, 这三种溶剂经济、易得、使用安全, 故选用水、生理盐水及 0.25% NaCl 为提取溶剂进行下一步试验验证, 确定最佳制备方法。

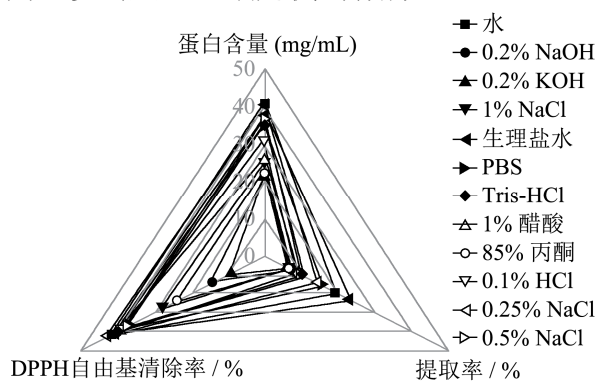


图 1 马骨髓蛋白提取方法对比雷达图

Fig.1 Radar chart of comparison of horse bone marrow protein extraction methods

2.1.2 UV 分析

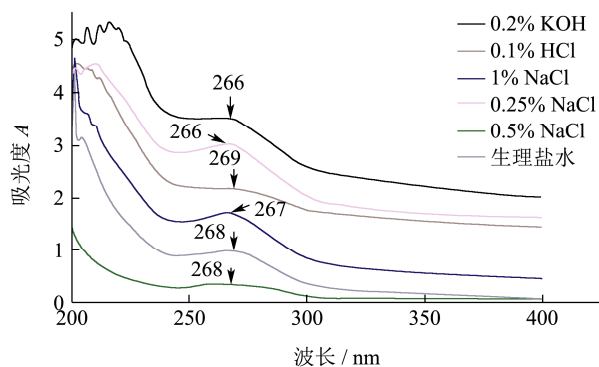
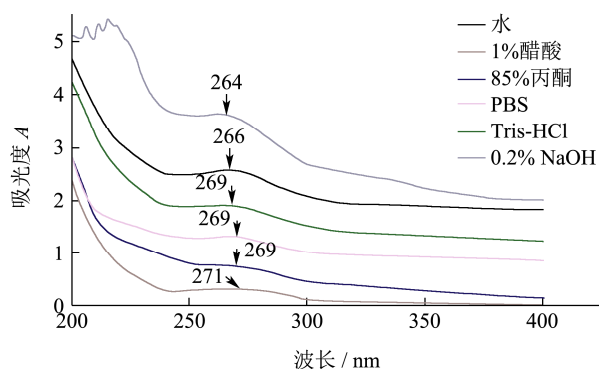


图 2 马骨髓蛋白紫外全波长扫描图

Fig.2 UV spectrum of the horse bone marrow protein

如图 2 所示, 马骨髓蛋白提取物均在 270 nm 附近出现最大吸收峰, 且峰型均较窄、无其他杂峰, 表明在该

波长范围内产生了价电子跃迁。该范围内的吸收峰主要因蛋白中芳香族氨基酸的构象变化而引起的特征吸收峰^[6], 此结果进一步证实了各提取物中蛋白质的存在。

2.1.3 SDS-PAGE 分析

三种方法提取的马骨髓蛋白 SDS-PAGE 图谱如图 3 所示, 所制备的马骨髓蛋白在分子量 4.1~66 ku 范围内显出相应条带, 既含有蛋白也含有多肽, 蛋白部分均在 66 ku 处, 与牛血清白蛋白类似。其中, D、E、F、K、L 方法制备的马骨髓蛋白出现多肽条带, 需要通过分离纯化来进一步确认其相对分子量信息。

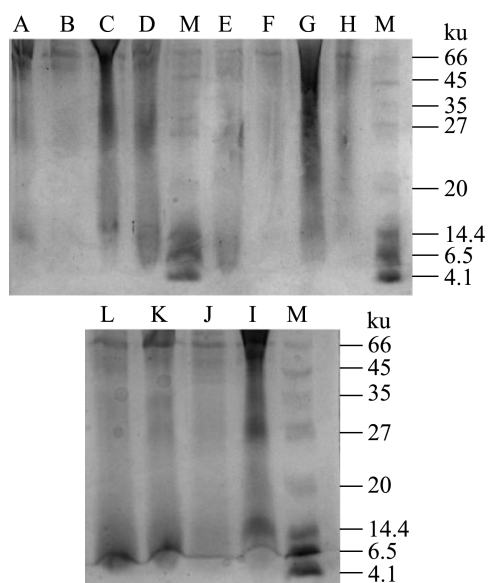


图 3 12 种方法制备的蛋白 SDS-PAGE 图谱

Fig.3 SDS-PAGE profile of protein prepared by 12 methods

注: M: 蛋白标准品; (A) 水; (B) 质量分数 0.2% NaOH; (C) 质量分数 0.2% KOH; (D) 质量分数 1% NaCl; (E) PBS (pH 值 6.6); (F) 生理盐水; (G) Tris-HCl (pH 值 8.4); (H) 体积分数 1% 醋酸; (I) 体积分数 85% 丙酮; (J) 体积分数 0.1% HCl; (K) 质量分数 0.25% NaCl; (L) 质量分数 0.5% NaCl。

2.2 FT-IR 分析

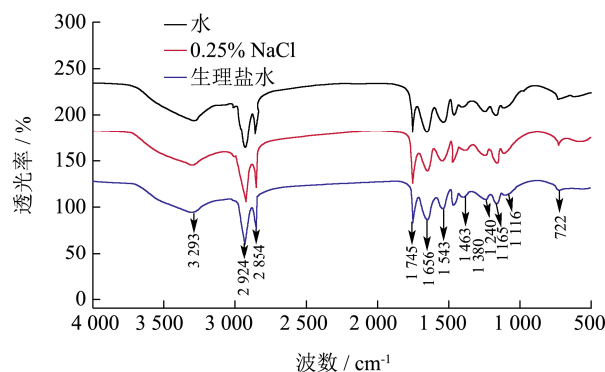


图 4 马骨髓蛋白红外光谱图

Fig.4 Infrared spectrum of the horse bone marrow protein

三种马骨髓蛋白在 4 000~400 cm⁻¹ 区域均显示典

型的蛋白吸收峰(图4)。在 $3\ 290\ \text{cm}^{-1}$ 附近的吸收峰对应于 N-H 的伸缩振动; $2\ 920\ \text{cm}^{-1}$ 附近的吸收峰为 C-N 伸缩振动吸收峰; $1\ 640\ \text{cm}^{-1}$ 附近的强吸收峰是酰胺 I 带特征峰, 由多肽骨架的 C=O 伸缩振动产生; $1\ 540\ \text{cm}^{-1}$ 附近的吸收峰为酰胺 II 的特征吸收, 因 N-H 弯曲振动和 C-N 伸缩振动产生的。 $1\ 380\sim 1\ 240\ \text{cm}^{-1}$

处的峰为马骨髓蛋白样品的酰胺 III 带吸收峰, 该吸收峰因 C-N 伸缩振动和 N-H 变形振动产生的。总而言之, 三种蛋白均显出了蛋白特征吸收峰, 但各吸收峰的强度均有差异, 说明不同提取方法对蛋白的结构有一定的影响。

表 3 骨髓蛋白傅里叶红外光谱峰位分配

Table 3 Peak location distribution of the bone marrow protein by Fourier infrared spectroscopy

谱带	水	0.25% NaCl	生理盐水	产生原因
酰胺 A 带	3 294.13	3 294.01	3 293.78	N-H 伸缩振动
酰胺 B 带	2 924.44	2 924.25	2 924.36	C-N 伸缩振动
酰胺 I 带	2 854.16	2 854.17	2 854.14	C=O 伸缩振动
酰胺 II 带	1 542.49	1 542.98	1 543.15	N-H 面内弯曲振动
	1 463.25	1 463.15	1 463.48	C-N 伸缩振动
酰胺 III 带	1 382.01	1 380.01	1 380.97	C-N 伸缩振动
	1 240.50	1 240.89	1 240.53	N-H 面内弯曲振动
α 螺旋	1 656.48	1 655.97	1 656.48	$1\ 646\sim 1\ 664\ \text{cm}^{-1}$
β -折叠	-	-	-	$1\ 616\sim 1\ 637$ 、 $1\ 681\sim 1\ 700\ \text{cm}^{-1}$
β -转角	-	-	-	$1\ 665\sim 1\ 681\ \text{cm}^{-1}$
无规则卷首	-	-	-	$1\ 638\sim 1\ 645\ \text{cm}^{-1}$

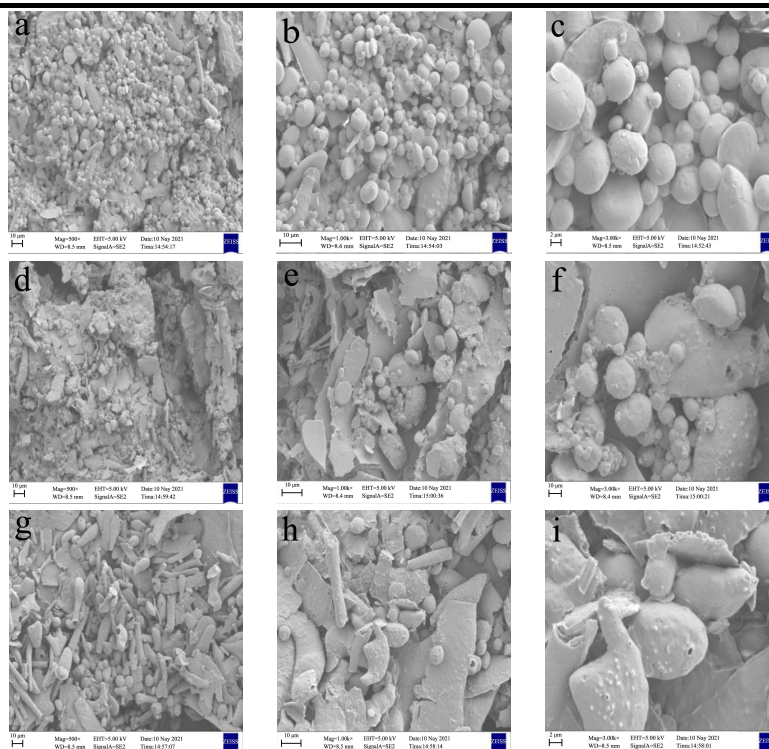


图 5 三种蛋白 SEM 图

Fig.5 SEM images of three proteins

注: a、b、c: 水; d、e、f: 质量分数 0.25% NaCl; g、h、i: 生理盐水。a、d、g: 500 \times ; b、e、h: 1 000 \times ; c、f、i: 3 000 \times 。

2.3 SEM-EDX 分析

一般, 蛋白的表面结构均以碎片状态存在, 以及部分小颗粒聚集。马骨髓蛋白在 500 \times 、1 000 \times 及 3 000 \times

下的 SEM 图如图 5 所示。水提法所得的马骨髓蛋白由大小不一的球状颗粒构成, 其表面略微光滑; 质量分数 0.25% NaCl 提取法制备的马骨髓蛋白由条状颗粒组成, 其表面粗糙; 生理盐水提取法制备的马骨髓

蛋白由片状和球状结构的混合物组成，其表面较为粗糙。由于分子间相互作用力，蛋白的聚合程度及分子间连接紧密度不一样。同时，3种提取法所制备的蛋白颗粒大小均不一样；在同一条件下，分子量越小其颗粒尺寸也越小。随着分子量的增加，表面突起和结晶状态变得更加明显。当放大3 000倍后，骨髓蛋白空间网络结构十分疏松，孔隙大，表面突起多。这些孔隙形成了良好的亲水性，提高了蛋白质的整体持水能力和结合能力。EDX结果表明三种提取方法制备的马骨髓蛋白主要由C、O、N组成，同时有少量的Na、

Ca及Cl等微量元素（表4），能证实骨髓蛋白在保健食品的开发方面具有较好的潜力。

表4 元素组成分析结果

Table 4 Elemental composition analysis results

方法	原子百分比/%						
	C	O	N	Cl	S	Ca	P
水	73.40	16.03	9.29	0.10	0.43	0.11	0.65
质量分数 0.25% NaCl	76.72	18.77	3.89	-	0.62	-	-
生理盐水	73.05	20.26	6.12	-	0.57	-	-

表5 马骨髓蛋白体外抗菌活性效果

Table 5 *In vitro* antibacterial activity of horse bone marrow protein

项目	方法	浓度/(mg/mL)	抑菌圈直径/mm		
			水	0.25% NaCl	生理盐水
A	SA	10 ⁻¹	10.1±0.02	11.2±0.03	8.2±0.02
		10 ⁻²	11.2±0.02	11.0±0.03	9.5±0.01
		10 ⁻³	12.0±0.02	9.9±0.03	12.0±0.02
B	EC	10 ⁻¹	16.0±0.03	-	-
		10 ⁻²	12.4±0.02	-	-
		10 ⁻³	8.9±0.03	14.09±0.02	9.9±0.02
C	BS	10 ⁻¹	11.2±0.02	10.5±0.03	9.7±0.03
		10 ⁻²	-	-	-
		10 ⁻³	-	-	-

注：-表示没有抑菌效果。

2.4 生物活性检测

2.4.1 抗菌试验结果分析

不同浓度的水提蛋白、质量分数0.25% NaCl及生理盐水提取的蛋白对金黄色葡萄球菌有明显的抗菌功效，水提所得蛋白对大肠杆菌显出较强的抑菌活性。然而，质量分数0.25% NaCl及生理盐水所得的蛋白对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的抑菌作用较小，此结果可能与蛋白含量、溶解度及结构有关。随着样品蛋白含量的增加，其对金黄色葡萄球菌，大肠杆菌以及枯草杆菌的抗菌活性增强。

2.4.2 马骨髓蛋白的抗氧化活性分析

2.4.2.1 DPPH·清除能力的测定

DPPH是一种稳定的自由基，通常用于测定天然产物和衍生物的抗氧化活性。如图6所示，由三种方法所提取的马骨髓蛋白在浓度为0~1.0 mg/mL范围内对DPPH自由基的清除率与蛋白浓度呈正相关，随着浓度的升高，清除能力增强。其中，生理盐水提取的蛋白清除率略低于其他两种方法。当浓度为1 mg/mL时，水提取蛋白、质量分数0.25% NaCl提取蛋白及生理盐水提取蛋白清除率分别达90.68%、85.74%、

84.79%；IC₅₀分别为0.32、0.29及0.31 mg/mL，清除能力的大小是：质量分数0.25% NaCl提取蛋白>生理盐水提取蛋白>水提取蛋白。当浓度为1 mg/mL时，清除率与Vc相近，这表明马骨髓蛋白具有良好的抗氧化性能。

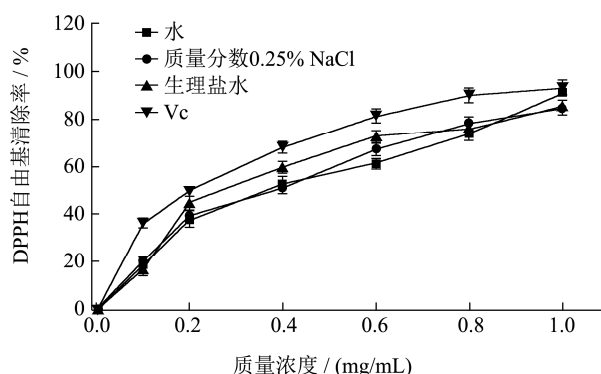


图6 马骨髓蛋白的DPPH·清除能力

Fig.6 DPPH· scavenging activity of horse bone marrow protein

2.4.2.2 ·OH清除能力的测定

羟自由基在生物系统中是一种非常活跃的氧自由基，也是毒性较大的自由基。如图7所示，三种方法所提取的马骨髓蛋白在浓度0~1 mg/mL范围内，其对羟自由基的清除能力与蛋白浓度成正相关。当浓度为

1.0 mg/mL 时,水提取蛋白、质量分数 0.25% NaCl 提取蛋白及生理盐水提取蛋白清除率分别达 88.81%、89.64%、82.65%; IC₅₀ 浓度分别为 0.26、0.33 及 0.32 mg/mL。清除能力的大小为:水提取蛋白>生理盐水提取蛋白>0.25% NaCl 提取蛋白。总之,三种马骨髓蛋白对 OH 自由基抗氧化能力均强,当浓度为 1 mg/mL 时,马骨髓蛋白对羟自由基抗氧化能力与抗氧化剂 Vc 相近。

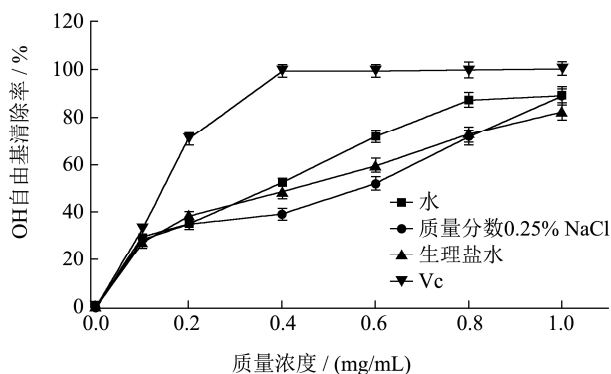


图7 马骨髓蛋白的·OH清除能力

Fig.7 Hydroxyl radical scavenging activity of horse bone marrow protein

2.4.2.3 O₂⁻清除能力的测定

超氧化物是一种较弱的氧化剂,但其能够降解成更强的活性氧自由基,从而影响机体,导致各种疾病的发生。马骨髓蛋白对 O₂⁻的清除能力如图 8 所示。在 0.1~1 mg/mL 范围内,清除能力与浓度呈正比关系,在浓度为 1 mg/mL 时,清除率分别 Vc 99.97%、水提取蛋白 58.64%、0.25 % NaCl 提取蛋白 65.26%、生理盐水 67.69%; IC₅₀ 分别为 0.830、0.340、0.37 mg/mL, Vc IC₅₀ 值为 0.036 mg/mL。清除能力的大小是:质量分数 0.25% NaCl 提取蛋白>生理盐水提取蛋白>水提取蛋白。当浓度为 0.1 mg/mL 时,三种马骨髓蛋白对 O₂⁻抗氧化能力与抗氧化剂 Vc 相近。当浓度继续增加时,对 O₂⁻清除能力都有继续增大的趋势。

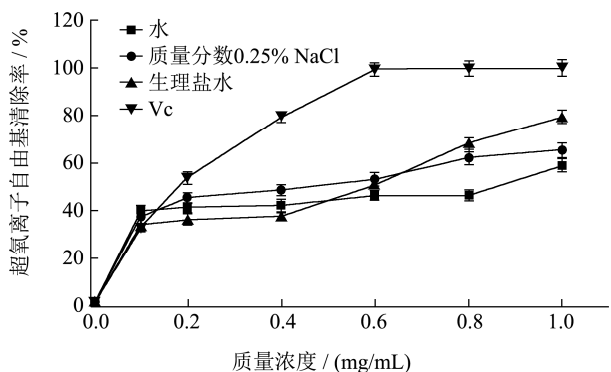


图8 马骨髓蛋白 O₂⁻清除能力

Fig.8 Superoxide anion radical scavenging activity of horse bone marrow protein

2.4.2.4 ABTS⁺清除能力的测定

ABTS⁺自由基清除能力也是一种表明化合物抗氧化活性强弱的重要指标。马骨髓蛋白对 ABTS⁺自由基的清除能力如图 9 所示,在 0.1~1 mg/mL 范围内,清除率随浓度的增加持续上升。其中质量分数 0.25% NaCl 提取的蛋白清除 ABTS⁺自由基能力高于其余两种蛋白,并且相似于 Vc。在浓度为 1 mg/mL 时,清除率分别达到 Vc 99.97%、水提蛋白 82.10%、质量分数 0.25% NaCl 提取蛋白 96.14%、生理盐水提取蛋白 81.05%。IC₅₀ 值分别为 0.26、0.15 及 0.20 mg/mL, Vc IC₅₀ 值为 0.32 mg/mL。清除能力的大小是:质量分数 0.25% NaCl 提取蛋白>生理盐水提取蛋白>水提取蛋白。综上所述,三种马骨髓蛋白对 ABTS⁺自由基抗氧化能力强,当浓度 1 mg/mL 时,对 ABTS⁺自由基抗氧化能力与抗氧化剂 Vc 相近。

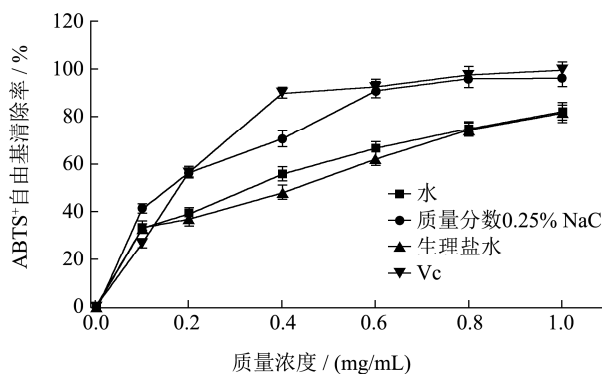


图9 马骨髓蛋白的 ABTS⁺自由基清除能力

Fig.9 ABTS radical scavenging activity of horse bone marrow protein

2.4.2.5 总还原能力的测定

总还原能力能够显著反映化合物抗氧化活性的强弱。由图 10 可知,质量分数 0.25% NaCl 提取蛋白还原能力比水提蛋白强,水提蛋白的还原能力比生理盐水提取蛋白强,主要是马骨髓蛋白有较强抗氧化活性。不同剂量的马骨髓蛋白的总还原能力如图 10 所示。在 0.1~1 mg/mL 范围内,总还原能力与浓度均呈剂量依

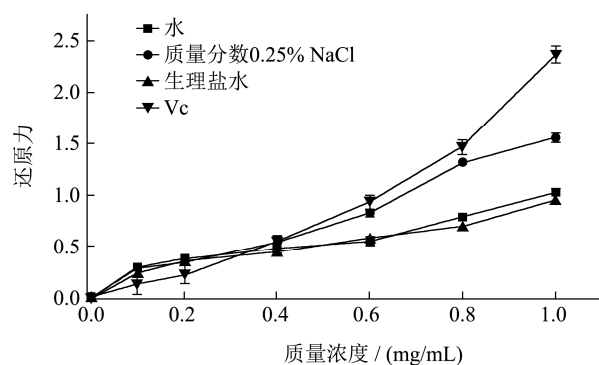


图10 马骨髓蛋白总还原能力

Fig.10 Reducing power of horse bone marrow protein

赖关系,浓度越高还原能力越强。还原能力大小为:质量分数 0.25% NaCl 提取蛋白>水提取蛋白>生理盐水提取蛋白的还原能力。以上结果显示,马骨髓蛋白具有较强的抗氧化活性。

3 讨论

动物的骨量占动物总体重的 20%~30%,马的骨量约占马总体积的 20.5%~25%,骨髓占新鲜骨的 4%~7%。动物骨骼中蛋白、肽及钙等活性成分和其它可利用资源较为丰富^[17,18]。从经济和环境的角度来看,将这些副产物转化为增值的功能成分是有意义的,这与创造更多的循环经济是一致的^[19]。可以用绿色提取方法从农业和食品副产物中分离出具有生物活性的化学物质,将其添加功能食品和开发新型马骨髓保健食品能加快产业链升级发展^[20,21]。

动物蛋白的提取与应用是动物骨营养成分开发研究领域的热点。动物胶原蛋白的研究主要集中在提取方法和活性筛选方面。本研究通过 12 种不同方法提取马骨髓蛋白,结果得出用水、生理盐水及 0.25% NaCl 提取所得蛋白的提取率、蛋白含量及抗氧化活性均显著高于其余 9 种方法。其中,水提法作为最常用的蛋白提取方法,具有节能、环保、无污染、适合工业化生产等优点。刘立新等^[13]优化了猪骨蛋白水提法提取工艺,得出最高提取率为 28.45%。

王鹏等^[22]研究发现不同提取方法对鳕鱼蛋白的提取率及含量影响较大,其中 Tris-NaCl 法是鳕鱼蛋白最佳提取方法。张强等^[23]采用水提、酸提及酶解等方法制备鲢鱼胶原蛋白,结果得出不同提取方法对所得胶原蛋白的结构及理化性质产生显著的影响。温慧芳等^[24]研究不同提取方法对鲑鱼皮胶原蛋白的影响,结果得出不同方法得到的胶原蛋白在 UV 及 FT-IR 图谱较为相似,但提取方法对蛋白的表面结构、热化学性质、流变性等的影响较大。同时有一部分植物蛋白相关研究已证实提取方法对蛋白的各类性质影响较大,马洪鑫等^[25]研究碱溶酸沉法、盐析法、酸提法、水提法等对藜麦蛋白提取率、含量、抗氧化活性和氨基酸组成的影响,发现碱溶酸沉法得到的蛋白提取率最高,但盐析法制备的蛋白纯度最高,同时得出不同提取方法对蛋白的结构影响较为显著。本课题组采用多种方法提取牛骨髓蛋白^[26],研究不同条件对牛骨髓蛋白的影响,本实验结果与其相近。由此可见,不同提取法对蛋白的提取率、含量、结构及活性具有显著的影响。因此,可根据目标蛋白的功能性质和实际应用选择合适生产工艺。

抗氧化和抑菌结果显示三种方法制备的马骨髓蛋

白均有一定的生物活性。前期研究表明羊、牛、马及骆驼骨髓水提和硫酸铵沉淀所得蛋白对大肠杆菌和白色念珠菌有不同程度的抑制能力^[27]。羊骨中性蛋白酶解液对大肠杆菌、枯草杆菌和藤黄球菌均有较强的抑菌功能^[28]。本文研究的马骨髓蛋白对金黄色葡萄球菌有明显的抗菌作用,对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的抑菌作用较小。抗氧化作用是动物源性蛋白最重要的生物活性之一。在本实验中,测定了马骨髓蛋白清除 DPPH、ABTS⁺、OH[·]、O₂⁻ 自由基的能力及其总还原能力,以评价其体外抗氧化活性。结果表明,马骨髓蛋白具有较好的体外抗氧化活性,其对 DPPH 自由基清除能力明显高于羊骨抗氧化肽^[29]、牦牛骨碱性蛋白酶水解蛋白^[30]及猪骨酶解液^[31]。除此,马骨髓蛋白具有比羊骨、牛骨酶解物和鹿骨胶原肽更显著的超氧阴离子自由基清除能力^[11,32];马骨髓蛋白的总还原能力与鹿骨胶原蛋白肽相当^[32],比牦牛骨酶解物的总还原能力强^[30]。以上结果表明,不同的提取材料、提取方法、蛋白含量及分子量等均可能影响蛋白结构与活性。

4 结论

本文从 12 种提取方法中筛选了适合于马骨髓蛋白的三种最优方法,即:水提取、0.25% NaCl 提取和生理盐水提取,通过 FT-IR 及 SEM-EDX 等进行结构表征。马骨髓蛋白均显出典型的蛋白吸收峰,均以 α 螺旋结构为主,且具有不同的表面结构。生物活性试验结果表明,马骨髓蛋白均具有不同程度的的抗菌和抗氧化活性。对金黄色葡萄球菌显出明显的抑菌作用;对 DPPH[·]、ABTS⁺、O₂⁻ 及 OH[·] 具有较强的清除能力,其中对 DPPH 自由基的 IC₅₀ 值分别为 0.32、0.29、0.31 mg/mL;对 ABTS 自由基的 IC₅₀ 值分别为 0.26、0.15 及 0.20 mg/mL;对羟自由基的 IC₅₀ 值分别为 0.26、0.30 及 0.32 mg/mL。三种方法中水提法溶剂极性大、渗透能力强、操作简单可控,可以节约后期放大实验所需的时间,减少人力及物力的投入。马骨髓蛋白水提最佳提取方法的确定对马产业副产物的有效开发、产品研制及综合利用及提高产品附加值提供理论与技术支持,为动物骨类蛋白食品研究和生产提供新的开发思路。

参考文献

- [1] 王亮,张林凡,何玉琼,等.动物药中氨基酸药理活性及含量研究概况[J].亚太传统医药,2021,17(2):165-169
WANG Liang, ZHANG Linfan, HE Yuqiong, et al. Research on pharmacological activity and content of amino acids in animal drugs [J]. Asia Pacific Traditional Medicine, 2021,

- 17(2): 165-169
- [2] 蔡效信.复方骨肽注射液对老年骨质疏松压缩性腰椎骨折患者骨代谢指标及疼痛的影响[J].中国老年学杂志,2017,37(12):3011-3012
CAI Xiaoxin. Effects of compound bone peptide injection on bone metabolism and pain in elderly patients with osteoporotic and compressible lumbar fractures [J]. Chinese Journal of Gerontology, 2017, 37(12): 3011-3012
- [3] 吴越,李贤煜,杨洪军.动物类中药抗癌机制研究[J].中国中医基础医学杂志,2021,27(4):671-677
WU Yue, LI Xianyu, YANG Hongjun. Advances in anti-cancer mechanisms of animal traditional Chinese medicine [J]. Journal of Basic Chinese Medicine, 2021, 27(4): 671-677
- [4] Liu H, Han G, Zhang H, et al. Improving the physical and oxidative stability of emulsions based on the interfacial electrostatic effects between porcine bone protein hydrolysates and porcine bone protein hydrolysate-rutin conjugates [J]. Food Hydrocolloids, 2019, 94: 418-427
- [5] 安丽萍,任广凯,石力强,等.鹿骨多肽对地塞米松诱导的骨质疏松大鼠骨微结构的影响[J].中草药,2016,47(22):4030-4034
AN Liping, REN Guangkai, SHI Liqiang, et al. Effect of deer bone polypeptides on bone microarchitecture of dexamethasone - induced osteoporosis rats [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2016, 47(22): 4030-4034
- [6] Song Yihang, Fu Yousi, Huang Shiyang, et al. Identification and antioxidant activity of bovine bone collagen-derived novel peptides prepared by recombinant collagenase from bacillus cereus [J]. Food Chemistry, 2021, 349: 129143
- [7] 徐敏,何晓瑞,王丽,等.伊犁马乳粉的化学成分和氨基酸组成[J].新疆畜牧业,2020,35(6):15-19
XU Min, HE Xiaorui, WANG Li, et al. Chemical composition and amino acid composition of Yili horse milk powder [J]. Animal husbandry in Xinjiang, 2020, 35(6): 15-19
- [8] Hee-Jin Kim, Dongwook Kim, Nam-Young Kim, et al. Anti-wrinkle and anti-inflammatory effects of a combination of topically applied horse oil and dietary enzyme hydrolysates from horse bone [J]. Process Biochemistry, 2020, 90: 257-267
- [9] 帕尔哈提·柔孜,艾合米丁·外力,陈志慧,等.新疆4种动物骨质和骨髓中蛋白、常量及微量元素比较分析[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(12):39-46
PARHAT Rozi, AHMIDIN Waili, CHEN Zhihui, et al. Comparison analysis of protein, macro elements, and trace elements composition in bone and bone marrow from four types of Xinjiang characteristic animals [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2018, 24(12): 39-46
- [10] 戴春阳.SDS-PAGE 法鉴定鸡肉蛋白热变性的研究[J].现代食品,2019,23:126-128
DAI Chunyang. Study on the thermal denaturation of chicken protein by SDS-PAGE [J]. Modern Food, 2019, 23: 126-128
- [11] 李晓叶,张珍,王琼,等.羊骨多肽酶法制备工艺优化及抗氧化活性研究[J].食品与机械,2020,36(10):130-135,142
LI Xiaoye, ZHANG Zhen, WANG Qiong, et al. Optimization of enzymatic preparation of sheep bone polypeptide and its antioxidant activity [J]. Food and Machinery, 2020, 36(10): 130-135, 142
- [12] 谭杨,陈晓宇,郭文,等.牦牛骨胶原蛋白肽的制备及其抗冻性能研究[J].上海理工大学学报,2020,42(6):550-557
TAN Yang, CHEN Xiaoyu, GUO Wen, et al. Preparation of collagen peptides in bovine bone and its antifreeze properties [J]. Journal of University of Shanghai for Science and Technology, 2020, 42(6): 550-557
- [13] 刘立新.猪骨蛋白水提工艺的优化[J].食品与机械,2013,29(5):220-222
LIU Lixin. Process optimization of pig bones protein by water extraction method [J]. Food and Machinery, 2013, 29(5): 220-222
- [14] 唐琳琳,桑英,陈思睿,等.不同提取方法的红树莓籽油品质及体外抗氧化活性对比[J].现代食品科技,2020,36(3):80-88
TANG Linlin, SANG Ying, CHEN Sirui, et al. Comparison of antioxidant activity and quality of red raspberry seed oil extracted by different methods [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(3): 80-88
- [15] 李伟,陈熔,张小英,等.桉叶多酚的体外抗氧化活性及其改善肉鸡腿肌肉的品质[J].现代食品科技,2020,36(4):105-112
LI Wei, CHEN Rong, ZHANG Xiaoying, et al. *In vitro* antioxidant activity of eucalyptus leaf polyphenols and improvement of broiler thigh muscle meat quality [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(4): 105-112
- [16] 王孟丽,布冠好,陈复生,等.花生肽-钙螯合物的制备及其结构表征[J].河南工业大学学报(自然科学版),2021,42(5):47-54,76
WANG Mengli, BU Guanhao, CHEN Fusheng, et al. The preparation and Structural characterization of peanut peptide-calcium chelate [J]. Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition), 2021, 42(5): 47-54, 76

- [17] ZHANG Hongru, ZHAO Laiyu, SHEN Qingshan, et al. Preparation of cattle bone collagen peptides-calcium chelate and its structural characterization and stability [J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2021, 144(12): 111264
- [18] Songmin Cao, Yi Wang, Lujuan Xing, et al. Structure and physical properties of gelatin from bovine bone collagen influenced by acid pretreatment and pepsin [J]. *Food and Bioproducts Processing*, 2020, 121: 213-223
- [19] 吴立芳,马美湖.我国畜禽骨骼综合利用的研究进展[J].*中国食物与营养*,2005,3:21-24
WU Lifang, MA Meihu. Research progress of comprehensive utilization of animal skeleton in China [J]. *Chinese Food and Nutrition*, 2005, 3: 21-24
- [20] 王学标.家禽屠宰副产物复合酶解方案的优化及其对养分消化的影响[D].南京:南京农业大学,2019
WANG Xuebiao. Optimization of complex enzymatic hydrolysis scheme of poultry slaughtering by-products and its effect on nutrient digestion [J]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2019
- [21] 郭利华.肉羊副产物(肝脏)的营养成分分析及应用[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2019
GUO Lihua. Analysis and application of nutritional components of meat sheep by-product (liver) [D]. Huhhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2019
- [22] 王鹏,张雯,周迪,等.不同提取和测定方法对蟾酥蛋白提取率和含量的影响[J].*中成药*,1-6[2022-01-19]
WANG Peng, ZHANG Wen, ZHOU Di, et al. Effects of different extraction and determination methods on the extraction rate and content of toad crisp protein [J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 1-6[2022-01-19]
- [23] 张强,王倩倩,陆剑锋,等.不同方法提取鲢鱼皮胶原蛋白的理化特性比较[J].*现代食品科技*,2014,30(5):104-110
ZHANG Qiang, WANG Qianqian, LU Jianfeng, et al. Comparison of physicochemical properties of silver carp skin collagen extracted by different methods [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 30(5): 104-110
- [24] 温慧芳,陈丽丽,白春清,等.基于不同提取方法的鲮鱼皮胶原蛋白理化性质的比较研究[J].*食品科学*,2016,37(1):74-81
WEN Huifang, CHEN Lili, BAI Chunqing, et al. Comparative study on physicochemical properties of channel catfish skin collagen based on different extraction methods [J]. *Food Science*, 2016, 37(1): 74-81
- [25] 马洪鑫,袁浩浩,刘洪海,等.比较不同方法提取藜麦蛋白[J].*食品安全质量检测学报*,2021,12(5):1890-1898
MA Hongxin, YUAN Zhihao, LIU Honghai, et al. Different methods of extracting quinoa protein were compared [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2021, 12(5): 1890-1898
- [26] 帕尔哈提·柔孜,高彦华,木合布力·阿布力孜,等.中药牛骨髓中蛋白与多肽提取方法的比较研究[J].*中草药*,2018,49(15):3600-3608
PARHAT Rozi, GAO Yanhua, MUHBUL Abliz, et al. Comparative study of different extract methods for protein and peptides from Chinese medicine bovine bone marrow [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2018, 49(15): 3600-3608
- [27] Rozi P, Maimaiti P, Abduwaili A, et al. Isolation and evaluation of bioactive protein and peptide from domestic animals' bone marrow [J]. *Molecules*, 2018, 23(7): 1673
- [28] 韩晓强,马丽珍.中性蛋白酶酶解羊骨产物抗菌性的研究初探[J].*食品研究与开发*,2006,9:1-4
HAN Xiaoqiang, MA Lizhen. Preliminary study on antibacterial activity of sheep bone hydrolysate by neutral protease [J]. *Food Research and Development*, 2006, 9:1-4
- [29] 张靖,苏琳,陈晓雨,等.羊骨抗氧化肽酶解法制备和响应面工艺优化[J].*食品与生物技术学报*,2021,40(3):18-27
ZHANG Jing, SU Lin, CHEN Xiaoyu, et al. Optimization of enzymatic preparation of antioxidant peptides from sheep bone by response surface methodology [J]. *Journal of Food and Biotechnology*, 2021, 40(3): 18-27
- [30] 姜海洋.牦牛骨抗氧化胶原多肽的制备及其分离纯化和鉴定[D].雅安:四川农业大学,2018
JIANG Haiyang. Preparation, purification and identification of antioxidant collagen peptides from yak bone [D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2018
- [31] 李超,崔珏,王乃馨,等.猪骨蛋白的碱性蛋白酶酶解工艺及其产物抗氧化活性研究[J].*农业机械*,2011,2:131-134
LI Chao, CUI Yu, WANG Naixin, et al. Study on the alkaline protease enzymatic hydrolysis of porcine bone protein and the antioxidant activity of its products [J]. *Agricultural Machinery*, 2011, 2: 131-134
- [32] 于浩.鹿骨胶原蛋白的制备及抗氧化活性研究[D].长春:长春工业大学,2016
YU Hao. Preparation and antioxidant of collagen from deer bone [D]. Changchun: Changchun University of Technology, 2016