

# 榛子肽的体外抗氧化稳定性分析

高嘉彤, 王冠, 吕春茂\*, 孟宪军, 宣景宏, 岳鑫颖

(沈阳农业大学食品学院, 辽宁沈阳 110034)

**摘要:** 利用中性蛋白酶制备榛子肽 (<3 ku), 探讨环境因素对榛子肽抗氧化活性的影响, 旨在为榛子肽的生产、贮藏和应用提供参考依据。随温度的升高, 榛子肽的抗氧化活性显著降低 ( $P<0.05$ ), 在 100 °C 处理 3 h 时, DPPH·和 OH·清除能力活性维持率分别为 83.61%、76.55%; pH 值为 6~8 时榛子肽的活性可处于较高水平; 当 NaCl 质量浓度在 10 g/100 mL 时, 活性维持率分别为 106.33% 和 100.25%; 蔗糖浓度在 2~10 g/100 mL 的范围内活性维持率达到 92% 以上; 葡萄糖质量浓度为 10 g/100 mL 时, 活性维持率分别达到 102.88% 和 103.39%; 柠檬酸质量浓度为 0.20 g/100 mL 时, 维持率分别为 89.76%、102.64%; 防腐剂在 0.20 g/100 mL 质量浓度, 榛子肽活性能维持原有活性的 80% 以上; 反复融冻 10 次, 榛子肽的活性维持率分别为 95.86%、95.15%; 榛子肽在  $K^+$ 、 $Ca^{2+}$  离子环境中的活性维持率较高; 榛子肽经胃蛋白酶处理后的活性高于胃-胰蛋白酶处理。综合分析, 为保持榛子肽较好的抗氧化活性, 应避免长时间高温、强酸强碱及  $Cu^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$  离子接触, 可添加适宜浓度 NaCl、蔗糖、葡萄糖、柠檬酸、防腐剂, 可冻融, 对胃、胰蛋白酶具有耐受性。

**关键词:** 榛子肽; 抗氧化能力; 活性维持率; 环境因素; 稳定性

文章编号: 1673-9078(2023)06-204-211

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.6.0786

## *In Vitro* Antioxidant Stability Analysis of Hazelnut Peptides

GAO Jiatong, WANG Guan, LYU Chunmao\*, MENG Xianjun, XUAN Jinghong, YUE Xinying

(College of Food Science and Technology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110034, China)

**Abstract:** Hazelnut peptides (<3 ku) were prepared using neutral protease and the effects of environmental factors on their antioxidant activity were studied. The aim of this research was to provide reference for the production, storage, and application of hazelnut peptides. The antioxidant activity of hazelnut peptides was found to decrease significantly as temperature increased ( $P<0.05$ ), and DPPH· and OH· radical scavenging rates of 83.61% and 76.55%, respectively, were obtained after three hours at 100 °C. Hazelnut peptide activity was found to be relatively high at pH 6~8, and at a NaCl concentration of 10 g/100 mL, the radical scavenging ability preservation rates of hazelnut peptides, DPPH· and OH·, were 106.33% and 100.25%, respectively. Activity preservation rates of hazelnut peptides of more than 92% were obtained at sucrose concentrations in the range of 2~10 g/100 mL, while antioxidant activity preservation rates of 102.88% and 103.39% were obtained at 10 g/100 mL glucose concentration and 89.76% and 102.64% at 0.20 g/100 mL citric acid concentration. The addition of 0.20 g/100 mL preservatives led to a decrease in the activity of hazelnut peptides; however, more than 80% of the original activity was retained. Ten cycles of freezing and thawing resulted in activity preservation rates of 95.86% and 95.15%. The activity preservation rates of hazelnut peptides remained relatively high in  $K^+$  and  $Ca^{2+}$  environments and the activity of hazelnut peptides treated with pepsin was higher than that obtained under gastro-trypsin. In summary, to maintain good antioxidant activity in hazelnut peptides, long-term exposure to high temperatures, strong acids and alkalis, and  $Cu^{2+}$  and  $Zn^{2+}$  ions should be avoided, while appropriate concentrations of NaCl, sucrose, glucose, citric acid, and preservatives can be added. Hazelnut peptides can be freeze-thawed and show tolerance to pepsin and trypsin.

**Key words:** hazelnut peptides; antioxidant capacity; activity preservation rate; environmental factors; stability

引文格式:

高嘉彤,王冠,吕春茂,等.榛子肽的体外抗氧化稳定性分析[J].现代食品科技,2023,39(6):204-211.

GAO Jiatong, WANG Guan, LYU Chunmao, et al. *In vitro* antioxidant stability analysis of hazelnut peptides [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(6): 204-211.

收稿日期: 2022-06-21

基金项目: 辽宁省重点研发计划项目 (2020JH2/10200037); 横向课题 (H2019388); 辽宁省科技特派团项目 (2021JH5/10400003)

作者简介: 高嘉彤 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 果蔬深加工, E-mail: 1042284762@qq.com

通讯作者: 吕春茂 (1970-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 果蔬精深加工, E-mail: Syaulcm70@syau.edu.cn

榛子为桦木科榛属植物,有“坚果之王”的美誉,含有大量人体所必需的营养物质且经济价值极高<sup>[1]</sup>。榛子粕是生产榛子油的副产物,其蛋白质含量丰富,可作为制备生物活性肽的优质植物蛋白原料<sup>[2,3]</sup>,但目前榛子粕利用率极低,大多作为废弃物处理,既污染环境,又造成资源的极大浪费。近些年人们逐渐意识到可持续发展的重要性,食品加工副产物的高值化利用是当前行业关注的焦点之一,因此榛子粕的资源再利用是十分有价值的。

生物活性肽具有多种生理调节功能,是蛋白质具有活性的降解衍生物,具有高吸收性、高营养、安全性高等特点,也是重点研究的功能因子之一<sup>[4,5]</sup>。目前,对其研究主要集中在从不同来源的蛋白质中如何提取、分离纯化、活性评价等方面,而环境因素对生物活性肽稳定性方面的研究较少<sup>[6]</sup>。环境因素的影响可能会直接导致生物活性肽发生氧化、水解等反应,这将在一定程度上影响到其产品的开发和应用。其中,姬中伟<sup>[7]</sup>分析了小米醇溶蛋白肽 PFLF 的稳定性,发现长时间的高温、强酸强碱等条件不利于其活性的维持。栾晓旭等<sup>[8]</sup>发现 NaCl 和糖类的添加显著提高发酵香肠源抗氧化肽的自由基清除活性。郭世良等<sup>[9]</sup>则发现高浓度的 NaCl 和葡萄糖会抑制或破坏酸肉肽。之所以肽对各影响因素的反应结果不同,是因为其分子量大小、氨基酸组成和生物活性差异所致。

研究已证明利用榛子粕为原料制备的榛子肽 (<3 ku),可作为一种天然抗氧化剂应用于食品加工中<sup>[10,11]</sup>,但榛子肽 (<3 ku)的稳定性尚不清楚,在生产和应用中受到一定限制。本研究考察温度、pH、食品原辅料(糖类、酸类、防腐剂)、反复冻融、金属离子(Mg<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、K<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>)以及胃、胰蛋白酶对榛子肽活性的影响,目的是为其在后续生产和应用方面提供参考。通过明确榛子肽 (<3 ku)的稳定性,为榛子功能性肽产品的开发提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

HCl、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、NaOH、无水乙醇、FeSO<sub>4</sub>、水杨酸、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、NaCl、蔗糖、葡萄糖、NaHCO<sub>3</sub>、柠檬酸、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、苯甲酸钠、山梨酸钾、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CuSO<sub>4</sub>、CaCl<sub>2</sub>、ZnSO<sub>4</sub>, 国药集团化学试剂有限公司; 中性蛋白酶, 北京 Solarbio 科学技术有限公司; 胃、胰蛋白酶, 鼎国昌盛生物技术有限公司; 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl, DPPH), 美国 Sigma 公司。

XMTD-8222 电热恒温水浴锅, 国华电器有限公司; FD-1A-50 真空冷冻干燥机, 北京博医康实验仪器有限公司; TU-1810 紫外分光光度计, 北京普析通用仪器有限公司; CR21N2400604 离心机, 日本 HITACHI; MSC300 超滤杯、MSC80003 超滤膜, 上海摩速科学器材有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 榛子肽的制备工艺

参考文献<sup>[11,12]</sup>的方法,将脱脂的榛子粕粉,先碱溶( $m=1\%$  NaOH 调节 pH 值至 8.5; 47 °C、58 min; 4 000 r/min 离心 25 min; 收集上清液),再酸沉( $\varphi=1\%$  HCl 调节 pH 值至 4.5; 4 000 r/min 离心 25 min; 收集沉淀; 冷冻干燥),进行酶解(中性蛋白酶 17 000 U/g; pH 值 7.0~7.2; 温度 43.7 °C、1.7 h),灭酶处理(90 °C、10 min),即榛子肽(调节 pH 值至 7.0; 4 000 r/min 离心 25 min; 收集上清液)。

#### 1.2.2 榛子肽超滤

将收集的上清液,用滤纸抽滤去除杂质,除杂后装入超滤杯,操作压力为 0.2 MPa、超滤膜为 3 ku 进行分液截留。冷冻干燥后,密封至 -20 °C 备用。

#### 1.2.3 体外抗氧化活性和活性维持率的测定

##### 1.2.3.1 DPPH 自由基清除能力

根据 Xie 等<sup>[13]</sup>方法,按下式(1)计算。

$$C_1 = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3}\right) \times 100\% \quad (1)$$

式中:

C<sub>1</sub>—DPPH 自由基清除率, %;

A<sub>1</sub>—样液的吸光值;

A<sub>2</sub>—空白的吸光值;

A<sub>3</sub>—对照组的吸光值。

##### 1.2.3.2 OH 清除能力的测定

根据慕菁华等<sup>[14]</sup>的方法,按下式(2)计算。

$$C_2 = \frac{A_0 - (A_4 - A_5)}{A_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

C<sub>2</sub>—OH 清除率, %;

A<sub>0</sub>—空白的吸光值;

A<sub>4</sub>—样液的吸光值;

A<sub>5</sub>—对照组的吸光值。

##### 1.2.3.3 抗氧化活性维持率

以处理前榛子肽样品的自由基清除活性为参照,即处理前的活性维持率为 100%。按下式(3)和(4)计算:

$$R_1 = \frac{C_1'}{C_1} \times 100\% \quad (3)$$

式中:

$R_1$ —DPPH 自由基清除能力维持率, %;

$C_1$ 、 $C_1'$ —处理前、后 DPPH 自由基清除率, %。

$$R_2 = \frac{C_2'}{C_2} \times 100\% \quad (4)$$

式中:

$R_2$ —OH 清除能力维持率, %;

$C_2$ 、 $C_2'$ —处理前、后 OH 清除率, %。

## 1.2.4 榛子肽的抗氧化稳定性研究

### 1.2.4.1 温度对榛子肽抗氧化活性的影响

将榛子肽溶液 (2 mg/mL) 放置水浴中反应 3 h (25、40、55、70、85、100 °C), 取样后迅速冷却至室温进行测定。以 25 °C (室温) 条件下的测定结果作为参照, 计算清除能力维持率。

### 1.2.4.2 pH 对榛子肽抗氧化活性的影响

将榛子肽溶液 (200 μg/mL) 溶于  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -柠檬酸缓冲溶液, 调节至相应 pH 值 (pH 值为 2、4、6、8、10、12), 室温下反应 5 h 进行测定。以蒸馏水配置成相同质量浓度的榛子肽溶液测定结果作为参照, 计算清除能力维持率。

### 1.2.4.3 食品原辅料对榛子肽抗氧化活性的影响

在榛子肽溶液 (2 mg/mL) 中添加食品原辅料。其中 NaCl、蔗糖、葡萄糖溶液配成质量浓度为 2、4、6、8、10 g/100 mL; 柠檬酸、防腐剂溶液配成质量浓度为 0.04、0.08、0.12、0.16、0.2 g/100 mL; 其中添加蔗糖和葡萄糖组在 100 °C 下放置 20 min, 其他组在室温下静置反应 2 h 进行测定。以未添加以上原辅料的榛子肽样品测定结果作为参照, 计算清除能力维持率。

### 1.2.4.4 反复冻融对榛子肽抗氧化活性的影响

将榛子肽溶液 (2 mg/mL) 放置超低温冰箱进行反复冻融 (1、2、4、6、8、10 次), 以未处理的榛子肽溶液测定结果作为参照, 计算清除能力维持率。

### 1.2.4.5 金属离子对榛子肽抗氧化活性的影响

添加  $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  的金属盐到榛子肽溶液 (2 mg/mL), 质量浓度分别配置为 50、100、150、200、250 μg/mL, 室温静置 2 h 进行测定。以未添加以上金属离子的榛子肽样品测定结果作为参照, 计算清除能力维持率。

### 1.2.4.6 胃-肠道蛋白酶对榛子肽抗氧化活性的影响

参照 Zhu 等<sup>[15]</sup>的方法稍作修改。胃蛋白酶消化: 配制 2 mg/mL 的榛子肽溶液 (1 mol/L HCl, pH 值至 2.0), 加入质量分数 4% 的胃蛋白酶 (37 °C 处理 2 h), 反应完成后分成两部分, 一部分沸水浴 15 min 终止反应, 为胃蛋白酶反应样品。另一部分用于胰蛋白酶反应。

胰蛋白酶消化: 在上述样品溶液中继续加入质量

分数 4% 的胰蛋白酶 (pH 值 7.5, 37 °C 处理 2 h), 反应完成后沸水浴 15 min, 为胰蛋白酶反应样品。

## 1.2.5 数据分析

采用 IBM SPSS Statistics 26 进行数据分析, ANOVA 进行数据方差分析, 多重比较采用 Duncan's 检验, 结果以平均值±标准偏差 (Mean±SD) 进行表示,  $P < 0.05$  认为结果存在显著性差异, 使用 Origin 64 进行绘图。

## 2 结果与讨论

### 2.1 温度对榛子肽抗氧化活性的影响

温度条件对榛子肽抗氧化活性的影响如图 1 所示, 当温度处于 40、55、70 °C 时, DPPH、OH 自由基清除能力的活性都能维持到原有活性的 90% 以上, 当温度高于 85 °C 时, DPPH、OH 自由基清除能力活性维持率显著降低 ( $P < 0.05$ )。当温度升高至 100 °C 处理 3 h 时, 此时 DPPH、OH 自由基清除能力活性维持率分别为 83.61% 和 76.55%。总之, 热处理的温度越高, 榛子肽的抗氧化活性下降越大, 可能是因为长时间高温条件处理改变了肽的构象, 影响了其稳定性<sup>[16]</sup>。而本实验中选取的是榛子肽的分子量较小, 具有肽链一级结构及二级结构, 二级结构可维持肽的生物活性, 小分子量的肽对高温的敏感程度也较低, 所以在不超过某个特定温度的条件下, 活性的变化也不明显<sup>[17]</sup>。普通的热处理工艺对于其活性的影响不大, 但长时间高温处理可能使肽的二级结构发生变化。因此榛子肽加工储存的过程应避免处理温度过高, 加热时间过长。

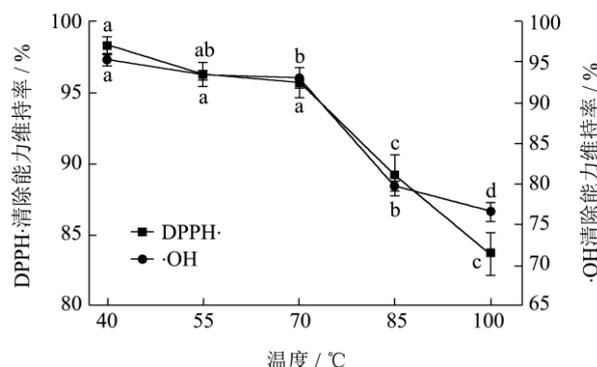


图 1 不同温度对榛子肽抗氧化活性的影响

Fig.1 Effects of different temperatures on antioxidant activity of hazelnut peptides

注: 图中不同的小写字母表示差异显著性分析。下同。

### 2.2 pH 对榛子肽抗氧化活性的影响

pH 影响榛子肽的稳定性结果如图 2 所示, 当 pH

为6~8时榛子肽的DPPH、·OH清除能力处于较高水平,活性维持率最高分别达到95.33%和91.12%。pH值处于2和12时,榛子肽的活性显著下降( $P < 0.05$ ),此时OH活性维持率分别为59.88%和51.14%。DPPH清除能力变化趋势与此类似,此时DPPH活性维持率分别为67.88%和48.31%,说明榛子肽在极端的酸性或碱性环境中的稳定性较差,可能是改变了电离势和电子转移能力<sup>[18]</sup>,也可能是极端的酸碱环境使肽链的构象发生了改变,抑制了与自由基的结合能力。当pH值为12(强碱)条件下,碱性环境会使榛子肽活性下降<sup>[19,20]</sup>,可能是因为外消旋、脱酰胺反应的发生,还可能是提供清除自由基的氢供体上的氢被消耗,影响其带电荷性质<sup>[21]</sup>,这与红花籽抗氧化肽<sup>[22]</sup>在过酸过碱环境中活性变化结果一致。因此,榛子肽在加工过程中应避免将其暴露在极端的酸碱条件下。

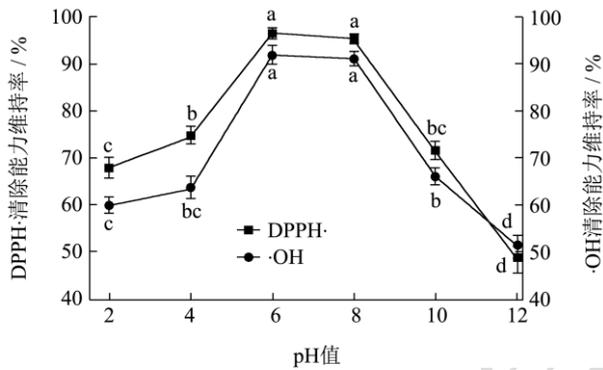


图2 不同pH对榛子肽抗氧化活性的影响

Fig.2 Effect of pH on antioxidant activity of hazelnut peptides

### 2.3 食品原辅料对榛子肽抗氧化活性的影响

#### 2.3.1 NaCl对榛子肽抗氧化活性的影响

如图3所示,随着NaCl浓度的增加,活性维持率呈现上升趋势,说明榛子肽的抗氧化活性逐渐升高。在NaCl浓度添加至10 g/100 mL时,样品的DPPH自由基清除能力的维持率显著升高( $P < 0.05$ ),此时活性维持率达到106.33%。在此浓度下,OH清除能力活性维持率达到100.25%。这可能是因为添加NaCl,供氢体或供质子体随着多肽溶液中的离子强度的改变而暴露出来,捕捉大量的自由基,使抗氧化活性增强,因此增强了榛子肽的自由基清除能力<sup>[23]</sup>。然而,郭世良等<sup>[9]</sup>表明NaCl会使酸肉肽的抗氧化活性受到抑制,唐宁等<sup>[24]</sup>、姬中伟<sup>[7]</sup>证实了添加NaCl有利于维持玉米抗氧化肽Leu-Pro-Phe和小米醇溶蛋白肽PFLF的生物活性,这是因为肽的分子量大小、氨基酸组成和生物活性各异,所以环境因素对生物活性肽的影响结果也是不同的。因此,适量添加NaCl,可使榛子肽处于较高的活性。

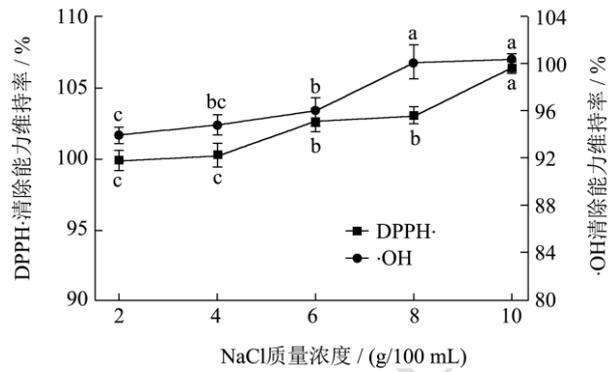


图3 不同NaCl质量浓度对榛子肽抗氧化活性的影响

Fig.3 Effects of different NaCl concentrations on antioxidant activity of hazelnut peptides

#### 2.3.2 蔗糖对榛子肽抗氧化活性的影响

如图4所示,随着蔗糖质量浓度的增加,榛子肽的抗氧化能力会有所下降。蔗糖质量浓度为2 g/100 mL时,DPPH、·OH自由基清除能力活性维持率分别为99.28%和95.55%。蔗糖在4~10 g/100 mL质量浓度范围内,DPPH、·OH自由基清除能力活性维持率变化不显著( $P > 0.05$ ),活性维持率均保持在92%以上,可能与与蔗糖的性质紧密相关,因为蔗糖不属于还原糖,与其不能发生美拉德反应,无法生成具有还原性物质,与蔗糖对鸢乌贼抗氧化肽<sup>[25]</sup>活性影响结果一致。因此,在试验浓度范围内,食品加工中可以与蔗糖接触。

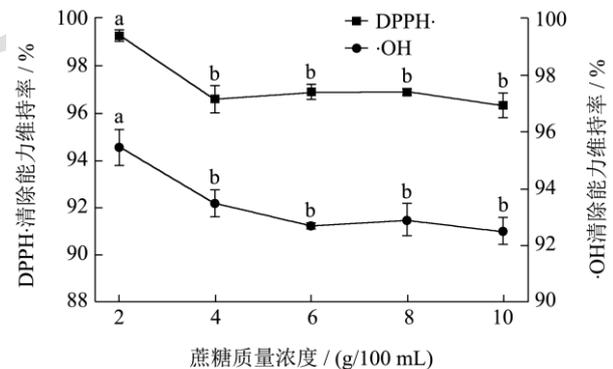


图4 不同蔗糖质量浓度对榛子肽抗氧化活性的影响

Fig.4 Effects of different sucrose concentration on antioxidant activity of hazelnut peptides

#### 2.3.3 葡萄糖对榛子肽抗氧化活性的影响

添加葡萄糖对榛子肽抗氧化活性的影响如图5所示,葡萄糖质量浓度在2~10 g/100 mL范围内时,DPPH、·OH清除能力活性维持率明显上升( $P < 0.05$ )。葡萄糖质量浓度为10 g/100 mL时,DPPH、·OH清除能力活性维持率分别为102.88%和103.39%。与蔗糖对榛子肽抗氧化活性的影响结果变化趋势不一致,可能是因为加热条件下,榛子肽溶液与葡萄糖发生了美拉德反应,生成了某些还原性物质,

从而提高抗氧化能力。花生肽<sup>[26]</sup>、小麦肽<sup>[27]</sup>美拉德反应后抗氧化活性提高得到的结果相似，也证实了高温条件下还原糖可与多肽结合产生某些物质能增强抗氧化活性这一结论。因此，添加适宜浓度的葡萄糖能增强榛子肽的抗氧化活性。

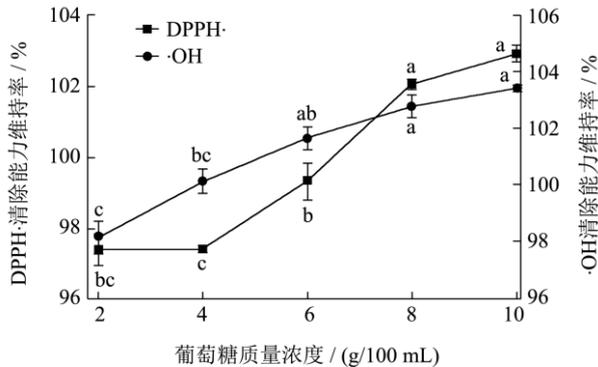


图5 不同葡萄糖质量浓度对榛子肽抗氧化活性的影响

Fig.5 Effects of different glucose concentrations on antioxidant activity of hazelnut peptides

### 2.3.4 柠檬酸对榛子肽抗氧化活性的影响

添加不同浓度的柠檬酸对榛子肽抗氧化活性的影响如图6所示，在0.04~0.20 g/100 mL质量浓度范围内，DPPH自由基清除能力的活性维持率显著下降 ( $P<0.05$ )，但活性维持率始终在90%左右，这与菜籽肽在添加柠檬酸后的活性变化类似<sup>[28]</sup>。然而随着柠檬酸的质量浓度增加，·OH清除能力显著升高 ( $P<0.05$ )，当添加质量浓度增加0.20 g/100 mL时，抗氧化活性处于较高水平，此时OH清除能力活性维持率为102.64%，这可能是由于柠檬酸中的羧、羟基与肽链上的某些氨基酸残基结合，更易捕捉自由基。添加试验质量浓度范围内的柠檬酸并不会显著影响溶液的pH值。因此，食品加工过程中可以添加适量柠檬酸。

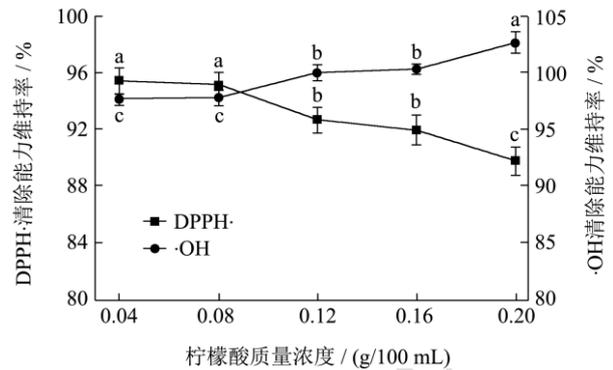


图6 不同柠檬酸质量浓度对榛子肽抗氧化活性的影响

Fig.6 Effects of different citric acid concentration on antioxidant activity of hazelnut peptides

### 2.3.5 防腐剂对榛子肽抗氧化活性的影响

山梨酸钾和苯甲酸钠是食品加工生产中的两种常用防腐剂，如表1和表2所示，山梨酸钾和苯甲酸钠质量浓度在0.04~0.20 g/100 mL范围内时，榛子肽的活性维持率有所下降 ( $P<0.05$ )。山梨酸钾和苯甲酸钠质量浓度在0.20 g/100 mL时，抗氧化活性处于较低水平，此时DPPH、·OH清除能力活性维持率分别为81.00%、81.79%、81.89%、83.74%，但活性维持率始终在80%以上。此结果表明，可添加适宜质量浓度的防腐剂。

### 2.4 反复冻融对榛子肽抗氧化活性的影响

如图7所示，榛子肽在反复冻融10次后，DPPH自由基清除能力活性变化并不显著 ( $P>0.05$ )，DPPH自由基清除能力活性维持率为95.86%。而在此时OH清除能力活性也能维持在95.15%，结果表明在生产加工过程中，榛子肽是可以冻融、耐受低温条件。这与苦荞抗氧化肽AFYRW在反复融冻中抗氧化活性变化类似<sup>[29]</sup>。

表1 不同山梨酸钾质量浓度对榛子肽抗氧化活性的影响

Table 1 Effects of different potassium sorbate concentrations on antioxidant activity of hazelnut peptides

自由基类型	山梨酸钾质量浓度/(g/100 mL)				
	0.04	0.08	0.12	0.16	0.2
DPPH清除能力维持率/%	92.34±2.61 <sup>a</sup>	91.14±0.88 <sup>ab</sup>	88.32±1.28 <sup>bc</sup>	85.47±1.33 <sup>c</sup>	81.00±1.57 <sup>d</sup>
·OH清除能力维持率/%	90.76±0.63 <sup>a</sup>	89.39±0.62 <sup>a</sup>	87.32±1.12 <sup>b</sup>	83.8±0.23 <sup>c</sup>	81.79±0.47 <sup>d</sup>

注：同列右肩不同的小写字母表示具有显著差异 ( $P<0.05$ )。下表同。

表2 不同苯甲酸钠质量浓度对榛子肽抗氧化活性的影响

Table 2 Effects of different concentrations of sodium benzoate on antioxidant activity of hazelnut peptides

自由基类型	苯甲酸钠质量浓度/(g/100 mL)				
	0.04	0.08	0.12	0.16	0.2
DPPH清除能力维持率/%	94.43±0.49 <sup>a</sup>	93.85±0.56 <sup>a</sup>	85.56±1.72 <sup>b</sup>	84.41±1.51 <sup>bc</sup>	81.89±1.59 <sup>c</sup>
·OH清除能力维持率/%	94.4±0.86 <sup>a</sup>	91.39±1.18 <sup>b</sup>	89.24±1.69 <sup>b</sup>	84.42±0.89 <sup>c</sup>	83.74±0.49 <sup>c</sup>

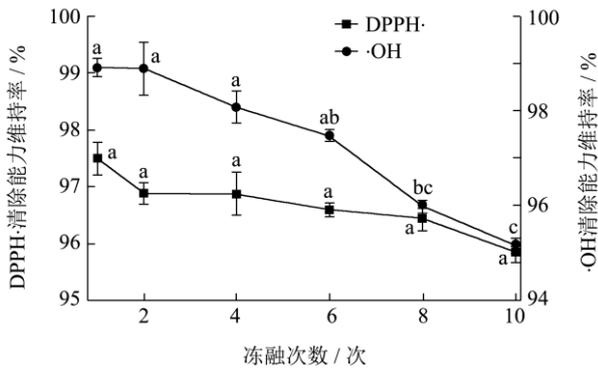


图7 不同冻融次数对榛子肽抗氧化活性的影响

Fig.7 Effects of different thawing times on antioxidant activity of hazelnut peptides

2.5 金属离子对榛子肽抗氧化活性的影响

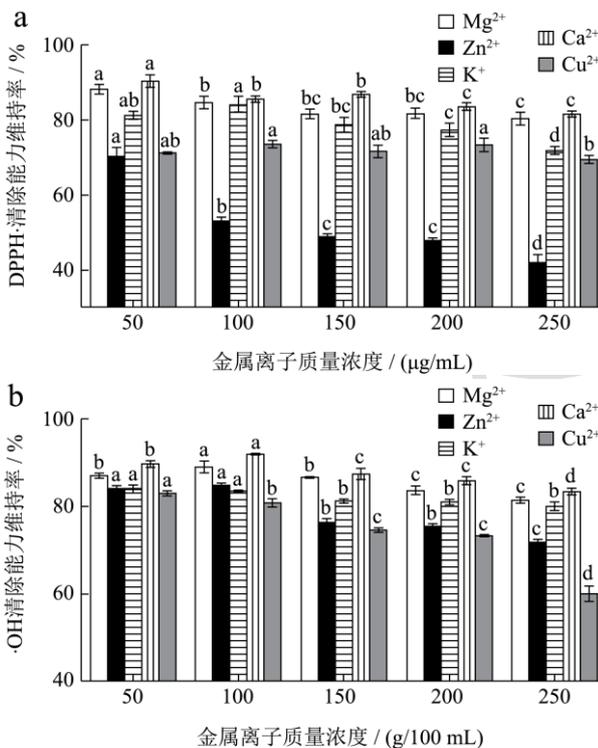


图8 金属离子对榛子肽抗氧化活性的影响

Fig.8 Effects of metal ions on antioxidant activity of hazelnut peptides

如图8所示,金属离子对榛子肽的DPPH·、OH清除能力影响大小顺序为Zn<sup>2+</sup>>Cu<sup>2+</sup>>K<sup>+</sup>>Mg<sup>2+</sup>>Ca<sup>2+</sup>和Cu<sup>2+</sup>>Zn<sup>2+</sup>>K<sup>+</sup>>Mg<sup>2+</sup>>Ca<sup>2+</sup>。当Zn<sup>2+</sup>和Cu<sup>2+</sup>质量浓度达到250 µg/mL时,DPPH·、OH清除能力活性维持率都显著降低(P<0.05),此时活性维持率分别为41.97%和60.25%;相同浓度离子条件下,Ca<sup>2+</sup>的DPPH清除率和OH清除能力处于最高水平,DPPH·、OH清除能力活性维持率分别为81.77%和83.39%。说明金属离子在一定程度上对榛子肽的活性存在抑制或破坏作用。总体而言,Zn<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>对于榛子

肽抗氧化活性的影响要明显大于其余3种金属离子,这可能是因多肽之间的特殊化学力作用遭受破坏,导致溶解度下降、疏水基团暴露等性质改变<sup>[30]</sup>。因此,在榛子肽应避免与含铜和含锌材料器皿接触,确保其活性维持在较高的水平。

2.6 胃胰蛋白酶对榛子肽抗氧化活性的影响

由图9可知,榛子肽经胃蛋白酶水解后,其对抗氧化活性显著提高(P<0.05),DPPH·、OH清除能力分别提高了3.3%和6.01%,是因为胃蛋白酶作用下,疏水性氨基酸侧链被暴露,更容易捕捉自由基。而经胃-胰蛋白酶处理后,其抗氧化活性明显降低(P<0.05),DPPH·、OH清除能力分别为62.81%和50.07%,表明胰蛋白酶进一步作用,生成了更多的游离氨基酸和小肽,亲水性提升,更难捕捉自由基,但榛子肽的抗氧化活性仍保持原有活性的80%左右,可能是因为本实验中的榛子肽分子量较小、结构简单,酶解位点酶切完全,在消化过程中结构没有被破坏,活性较稳定,对胃、胰蛋白酶具有一定耐受度。也说明经胃蛋白酶处理后的榛子肽抗氧化活性是高于经胃-胰蛋白酶处理。此结论与高闪闪<sup>[31]</sup>、冯晓文等<sup>[32]</sup>对羊胎盘多肽、海洋鱼蛋白低聚肽的稳定性研究结果一致。以上实验结果表明,在经处理后榛子肽(<3 ku)活性下降较少,基本能够耐受胃-胰蛋白酶的作用。

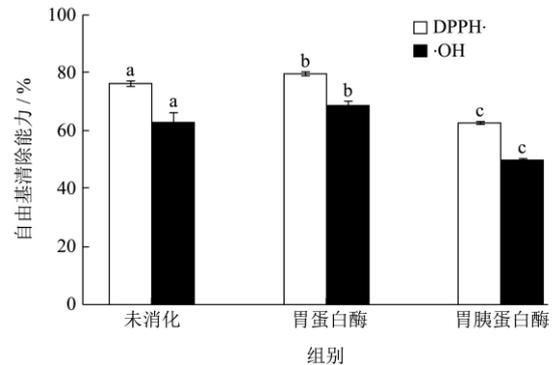


图9 胃肠道蛋白酶对榛子肽抗氧化活性的影响

Fig.9 Effects of gastrointestinal protease on antioxidant activity of hazelnut peptides

3 结论

本文研究了不同加工条件及胃胰蛋白酶等环境因素对榛子肽抗氧化活性的影响。榛子粕蛋白酶解产物(<3 ku)在不同温度、pH值、食品原辅料(糖类、酸类、防腐剂)、反复冻融、金属离子(Mg<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、K<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>)以及胃、胰蛋白酶环境条件下的体外抗氧化稳定性结果表明,长时间高温和强酸强碱环境下榛子肽的抗氧化活性降低。添加适宜质量浓度的

NaCl 和葡萄糖对榛子肽抗氧化活性具有增效作用,在食品加工过程中也可适量添加柠檬酸、蔗糖和防腐剂。榛子肽耐低温,可冻融。不同金属离子的影响作用各不相同,在加工过程中避免与含锌和铜金属离子介质接触。经胃蛋白酶-胰蛋白酶处理后,榛子肽抗氧化活性会有所下降,但活性维持率均保持在 80%左右,对胃肠消化具有一定耐受度。本试验结果可为榛子肽的开发利用提供一定的理论依据。

## 参考文献

- [1] Saadet Koç Güler, Saim Zeki Bostan, Ahmet Hilmi Çon. Effects of gamma irradiation on chemical and sensory characteristics of natural hazelnut kernels [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2017, 123: 12-31.
- [2] Levent Yurdaer Aydemir, Aysun Adan Gökbulut, Yusuf Baran. Bioactive, functional and edible film-forming properties of isolated hazelnut (*Corylus avellana* L.) meal proteins [J]. *Food Hydrocolloids*, 2014, 36: 130-142.
- [3] Dilay Sen, Derya Kahveci. Production of a protein concentrate from hazelnut meal obtained as a hazelnut oil industry by-product and its application in a functional beverage [J]. *Waste and Biomass Valorization*, 2020, 11(publish): 5099-5107.
- [4] Jiaxin Xiao, Yifei Li, Bingbing Chen, et al. Enzymatic preparation and antioxidative activity of hydrolysate from Rice bran protein [J]. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2020, 6: 14.
- [5] WANG Peixin, LIN Yan, WU Hongqiang, et al. Preparation of antioxidant peptides from hairtail surimi using hydrolysis and evaluation of its antioxidant stability [J]. *Food Science and Technology*, 2020, 40(4): 945-955
- [6] 周才琼,陈东华,杜木英.酸肉发酵中蛋白质降解及影响因素的研究[J].*食品科学*,2009,30(7):127-130.
- [7] 姬中伟.小米醇溶蛋白肽的制备及其抗氧化与抗炎活性研究[D].无锡:江南大学,2020.
- [8] 栾晓旭,冯美琴,孙健.发酵香肠源抗氧化肽的稳定性[J].*食品科学*,2020,41(16):1-7.
- [9] 郭世良,吴慧琳,朱瑶迪,等.发酵酸肉肽的抗氧化稳定性分析[J].*现代食品科技*,2021,37(8):226-233, 83.
- [10] 王宝琴.榛子抗氧化肽的制备及产品开发[D].长春:吉林大学,2019.
- [11] 陈艳.榛子粕抗氧化肽制备及结构鉴定[D].沈阳:沈阳农业大学,2018.
- [12] Fanali C, Tripodo G, Russo M, et al. Effect of solvent on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of hazelnut kernel [J]. *Electrophoresis*, 2018, 39(13): 1683-1691.
- [13] Zhengjun Xie, Junrong Huang, Xueming Xu, et al. Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate [J]. *Food Chemistry*, 2008, 111(2): 370-376.
- [14] 慕菁华,王有年,于同泉,等.不同品种桃的酚类活性成分及其抗氧化功能研究[J].*食品与发酵工业*,2006,1:103-106.
- [15] Chao Zhi Zhu, Wan Gang Zhang, Zhuang Li Kang, et al. Stability of an antioxidant peptide extracted from Jinhua ham [J]. *Meat Science*, 2014, 96(2): 783-789.
- [16] Asaduzzaman A, Chun B S. Recovery of functional materials with thermally stable antioxidative properties in squid muscle hydrolyzates by subcritical water [J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2015, 52(2): 793-802.
- [17] Arcan I, Yemenicioglu A. Antioxidant activity of protein extracts from heat-treated or thermally processed chickpeas and white beans [J]. *Food Chemistry*, 2007, 103(2): 301-312.
- [18] Lin S Y, Wang C C, Lu Y L, et al. Antioxidant, anti-semicarbazide-sensitive amine oxidase, and anti-hypertensive activities of geraniin isolated from *Phyllanthus urinaria* [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2008, 46(7): 2485-2492.
- [19] Liu Y, Wan S, Liu J, et al. Antioxidant activity and stability study of peptides from enzymatically hydrolyzed male silkworm [J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2017, 41(1): e13081.
- [20] Liu P, Zhao M, Cao Y, et al. Purification and identification of anti-oxidant soybean peptides by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry [J]. *Rejuvenation Research*, 2014, 17(2): 209-211.
- [21] Liardony R, Jost R. Racemization of free and protein-bound amino acids in strong mineral acid [J]. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 1981, 18(5): 500-505.
- [22] 刘晓艺,周玉岩,过利敏,等.不同分子量红花籽抗氧化肽稳定性研究[J].*食品工业科技*,2022,43(13):94-102.
- [23] 林松毅,郭洋,王莹,等.蛋清抗氧化肽增效剂的优化[J].*华南理工大学学报(自然科学版)*,2010,8:104-108.
- [24] 唐宁,庄红.玉米抗氧化肽 Leu-Pro-Phe 抗氧化稳定性研究[J].*中国食品学报*,2015,15(2):49-55.
- [25] 胡晓,吴静,杨贤庆,等.添加物和体外模拟胃肠道消化对鸚乌贼抗氧化肽稳定性的影响[J].*食品与发酵工业*,2016,42(11):91-96.
- [26] Guowan Su, Lin Zheng, Chun Cui, et al. Characterization of

- antioxidant activity and volatile compounds of Maillard reaction products derived from different peptide fractions of peanut hydrolysate [J]. Food Research International, 2011, 44(10): 3250-3258.
- [27] 郑志强,刘晋,魏晓娟,等.加工条件及模拟胃肠消化对小麦肽抗氧化稳定性的影响[J].农业机械学报,2017,48(9):330-336.
- [28] 姚轶俊,张晶,鞠兴荣.菜籽抗氧化肽 WDHAPQLR 的环境稳定性研究[J].中国粮油学报,2019,34(8):54-60.
- [29] 孙浩,左婕,雷霆雯.苦荞抗氧化肽 AFYRW 稳定性研究[J].食品研究与开发,2021,42(6):6-11.
- [30] Wong F C, Xiao J, Ong M G, et al. Identification and characterization of antioxidant peptides from hydrolysate of blue-spotted stingray and their stability against thermal, pH and simulated gastrointestinal digestion treatments [J]. Food Chemistry, 2019, 271: 614-622.
- [31] 高闪闪.奶山羊胎盘抗氧化多肽制备及其功能活性研究[D].咸阳:西北农林科技大学,2017.
- [32] 冯晓文,赵晓涵,潘骁琦,等.海洋鱼蛋白低聚肽结构和抗氧化活性的体外消化稳定性[J].现代食品科技,2021,37(5): 109-116.