

胶原蛋白肽功能饮料的贮藏稳定性 及体内抗血栓活性评价

梁芮涵, 李博*

(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要: 抗血小板活性功能食品可以代替药物在血栓的预防中发挥作用。前期研究表明, 鲢鱼皮胶原蛋白肽 (Silver Carp Skin Collagen Peptides, SCPs) 具有良好的抗血小板活性, 开发基于 SCPs 的饮料有望起到预防血栓的作用。该研究探究 SCPs 粉末和饮料在不同贮藏条件下的稳定性, 并采用尾血栓模型对贮藏前后的 SCPs 粉末和饮料进行体内抗血栓活性评价。结果显示, 真空包装的 SCPs 粉末常温 (25 ℃) 贮藏两个月肽损失率约为 1.43%; SCPs 饮料常温贮藏三个月肽损失率约为 5.90%, 高温 (37 ℃) 贮藏三个月肽损失率约为 12.87%, 且伴随着美拉德反应、菌落数的生长和感官品质的下降; SCPs 粉末在 200 mg/kg.bw 的饲喂剂量下对小鼠尾血栓形成的抑制率为 66.4%, 常温贮藏两个月后的 SCPs 粉末相较于贮藏前体内活性未发生显著下降; SCPs 饮料对小鼠尾血栓形成的抑制率为 58.7%, 高温贮藏三个月后抑制率降至 45.3%, 但仍能与 25 mg/kg.bw 饲喂剂量的阿司匹林作用效果相似。该研究表明, SCPs 作为粉末或开发成液体饮料的产品形式均为可行方案, 二者均可作为预防血栓的膳食补充剂。

关键词: 鲢鱼皮胶原蛋白肽; 抗血小板; 功能饮料; 稳定性; 小鼠尾血栓模型

文章编号: 1673-9078(2024)06-178-188

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.6.0681

Storage Stability and *in Vivo* Antithrombotic Activity Evaluation of Collagen Peptide Functional Beverage

LIANG Ruihan, LI Bo*

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: Antiplatelet functional foods can replace drugs in the prevention of thrombosis. Previous studies have shown that silver carp skin collagen peptides (SCPs) have a good antiplatelet activity, and the developed SCPs-based beverages are anticipated to play a role in the prevention of thrombus. In this study, the stability of SCPs powder and derived beverage under different storage conditions was investigated, and a tail thrombosis model was used to evaluate the antithrombotic activity of SCPs powder and derived beverage before and after the storage. The results showed that the peptide loss rate of the vacuum packed SCPs powder stored at room temperature (25 ℃) for two months was about 1.43%; The peptide loss rate of the derived SCPs beverage was about 5.90% after being stored at room temperature for three months, and was about 12.87% after being stored at a relatively high temperature (37 ℃) for three months, accompanied by the occurrence of the Maillard
引文格式:

梁芮涵,李博.胶原蛋白肽功能饮料的贮藏稳定性及体内抗血栓活性评价[J].现代食品科技,2024,40(6):178-188.

LIANG Ruihan, LI Bo. Storage stability and *in vivo* antithrombotic activity evaluation of collagen peptide functional beverage [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(6): 178-188.

收稿日期: 2023-06-07

基金项目: 国家大宗淡水鱼产业技术体系 (CARS-45)

作者简介: 梁芮涵 (1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 天然产物与功能食品, E-mail: 1071339718@qq.com

通讯作者: 李博 (1970-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 天然产物与功能食品, E-mail: libo@cau.edu.cn

reaction, growth of bacterial colony and decline of sensory quality; The inhibitory rate of SCPs powder against the tail thrombus formation in mice was 66.4% when the feeding dose was 200 mg/kg·bw. The activity of SCPs powder after two months of storage at room temperature did not decrease significantly compared with that before the storage. The inhibitory rate of the derived SCPs beverage against the tail thrombosis in mice was 58.7%, which decreased to 45.3% after three months of the high-temperature storage, though a similar effect as that of aspirin at a dose of 25 mg/kg·bw was still detected. This study indicates that SCPs powder or liquid beverage are feasible product options, both of which can be used as dietary supplements for the prevention of thrombosis.

Key words: silver carp skin collagen peptides; antiplatelet; functional beverage; stability; mouse tail thrombosis model

近年来, 心血管疾病因其高发病率和致死率, 已成为世界上最受关注的慢性病之一。血栓的形成是心血管疾病的病理学基础, 血栓会导致血管部分或完全阻塞, 从而使器官缺血, 长此以往就会形成心血管疾病^[1]。而在血栓的形成中, 血小板的黏附、活化和聚集起到了关键作用, 当血管内皮受到损伤时, 血小板会粘附在损伤部位并被激活, 活化后的血小板会分泌多种活性因子促进血栓的形成, 同时也会引起更多的血小板聚集, 这种连锁反应会导致血管受损部位持续恶化, 最终形成血栓^[2]。所以, 抑制血小板的活化聚集能够有效抑制血栓发生, 是降低心血管疾病风险的重要途径。

在大量关于功能因子的研究中, 国内外学者已经发现了一系列具有良好抗血小板活性的天然活性物质, 这些物质不仅可以作为膳食补充剂在血栓的一级预防中发挥作用, 而且不良反应的发生率低^[3]。活性肽由于具有独特的吸收机制, 避免了和蛋白质及游离氨基酸之间的吸收竞争, 部分可完整到达作用靶点发挥良好生物活性^[4], 近年来受到了广泛关注, 研究人员已经从不同食源性蛋白中分离得到抗血小板活性肽^[5-7]。课题组前期研究制备了鲢鱼皮胶原蛋白肽 (Silver Carp Skin Collagen Peptides, SCPs), 体外血小板聚集抑制实验证实 SCPs 对二磷酸腺苷 (Adenosine Diphosphate, ADP) 诱导的血小板活化聚集有较强的抑制作用, 随后逐渐从中分离鉴定出一系列以 Hyp-Gly (OG) 或 Pro-Gly (PG) 为骨架的抗血小板肽段序列^[8-10], 它们是通过作用于 P₂Y₁₂ 受体抑制血栓的形成, 证实 SCPs 可以作为抗血小板功能性配料, 且具备开发成抗血栓功能食品的潜力。

而在开发功能饮料时, SCPs 可能因存在于食品体系中而出现贮藏稳定性问题, 且容易受到环境因素影响。根据贮藏方式和贮藏时间的不同, 其生物活性会发生不同程度的下降, 这主要是由于 SCPs

中的活性肽在贮藏过程中因氧化、脱酰胺或环化等作用而发生降解^[11], 导致肽的结构发生改变, 进而影响其生物活性。也可能会与饮料中的其他成分发生相互作用, 导致其生物活性和生物利用度下降^[12]。因此, 需要着重研究 SCPs 在饮料中的贮藏稳定性和活性稳定性问题, 以更好地作为膳食补充剂, 发挥在血栓的零级预防或一级预防中的作用。

因此, 本实验在课题组前期研究基础上, 对 SCPs 进行风味调配和热杀菌, 制备成 SCPs 饮料。而 SCPs 粉末既可以作为一种功能性食品配料, 又可以作为固体饮料。所以本研究首先检测了 SCPs 粉末和 SCPs 饮料的质量指标, 其次检验二者在贮藏期间的稳定性, 最后采用小鼠尾血栓模型评价贮藏前后的 SCPs 粉末和 SCPs 饮料的体内抗血栓功能, 为胶原肽功能食品的开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鲢鱼皮胶原蛋白, 购自上海即景生物科技有限公司; 复合蛋白酶 (1.5 AU/g) 食品级, 购自丹麦诺维信公司; 柠檬酸、赤藓糖醇、三氯蔗糖、百香果香精, 抗坏血酸 (Vc) 食品级, 购自河南万邦化工科技有限公司; 二磷酸腺苷 (ADP)、Folin- 酚试剂、κ 卡拉胶、PBS 缓冲液, 购自北京索莱宝科技有限公司; 色谱级乙腈、阿司匹林、戊巴比妥钠, 购自美国 Sigma 公司; 盐酸 (HCl)、氢氧化钠 (NaOH)、无水碳酸钠 (Na₂CO₃)、硫酸铜 (CuSO₄·5H₂O)、酒石酸钾钠等其他试剂均为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司。

实验动物: 雄性 ICR 小鼠, 4~6 周龄, 25~30 g, SPF 级; 雄性 SD 大鼠, 8 周龄, 280~300 g, 均购自北京维通利华实验动物技术有限公司 [合格证号 SCXK (京) 2012-0001], 所有涉及动物的实验均符

合北京实验动物中心福利委员会的相关法律和制度指南（批准号 AW21603202-4-1）。

1.2 仪器与设备

LBY-NJ4 血小板聚集仪, 北京普利生有限公司; LC-15C 高效液相色谱系统, 日本岛津公司; FA1004 分析天平, 上海精密科学仪器有限公司; Five FE20 pH 计, 梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司; HZS-HA 恒温振荡水浴锅, 哈尔滨东联电子技术开发有限公司; UV-5100 紫外可见分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司; HWS12 电热恒温水浴锅, 上海一恒科技有限公司; QL-720D 固形物仪, 厦门莱斯德科学仪器有限公司; LGJ-28 冷冻干燥机, 北京四环科学仪器厂; MJ-CF50W3-011 真空包装机, 美的集团股份有限公司; LHS-250HC-11 恒温培养箱, 上海一恒科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 SCPs粉末的制备

1.3.1.1 胶原蛋白的酶解

采用酶解法制备 SCPs^[13]。将鲢鱼皮胶原蛋白与去离子水按照料液比 1:10 (m/V) 混合均匀, 沸水浴 40 min 使胶原蛋白充分溶解, 冷却至室温后, 用 1 mol/L 的 HCl 和 NaOH 将胶原蛋白溶液的 pH 值调整至 7.0, 恒温水浴锅 60 °C 下预温 15 min 后, 按照 2.0% 的酶与底物比 (质量分数) 添加复合蛋白酶启动酶解反应, 边水解边水浴震荡, 酶解 6.0 h 后进行 10 min 的沸水浴灭酶, 冷却至室温后滤纸过滤, 得到胶原蛋白酶解液。

1.3.1.2 胶原蛋白酶解液的脱腥脱苦

采用大孔树脂静态吸附法对胶原蛋白酶解液进行脱腥脱苦处理^[14]。每 10 mL 酶解液添加 0.9 g AB-8 型大孔树脂, 在 pH 值 6.0 和温度 30 °C 条件下水浴震荡吸附 2.0 h, 抽滤取滤液, 得到 SCPs 溶液, 在 -50 °C, 20 Pa 以下冷冻干燥得到 SCPs 粉末, 采用复合薄膜袋真空包装, 每包 3 g, 如图 1a。

1.3.2 SCPs饮料的制备

用纯净水将 SCPs 粉末配制成 6.0 g/100 mL 质量浓度, 添加 0.4 g/100 mL 柠檬酸, 0.6 g/100 mL 赤藓糖醇, 0.4 g/100 mL 百香果香精, 4 mg/100 mL 三氯蔗糖和 6 mg/100 mL 维生素 C, 充分溶解后分装于 50 mL 复合薄膜耐高温吸嘴袋中, 排气封口后于 95 °C 水浴热杀菌 7 min, 立即冷却至室温, 得到

SCPs 饮料, 如图 1b 所示。

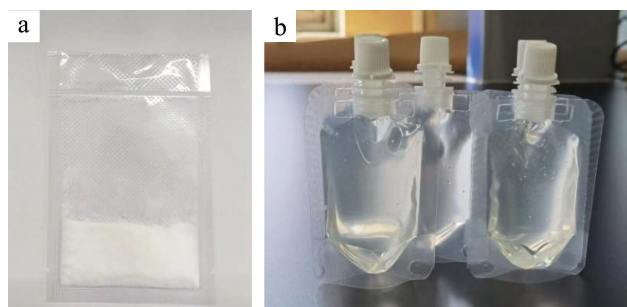


图 1 SCPs 粉末 (a) 和 SCPs 饮料 (b) 的外观

Fig.1 Appearance of SCPs powder (a) and SCPs beverage (b)

1.3.3 SCPs粉末质量指标测定

感官评价: 参考 GB 31645-2018; 总氮含量测定: 参考 GB 5009.5-2016; 羟脯氨酸含量测定: 参考 GB/T 9693.23-2008; 分子量分布: 参考李雨奇等^[13], 采用高效液相色谱法 (HPLC) 进行测定; 水分测定: 参考 GB 5009.3-2016; 灰分测定: 参考 GB 5009.4-2016。

1.3.4 SCPs饮料质量指标的测定

感官评价: 参考 GB 7101-2015; pH 值: pH 计测定; 总酸含量: 参考 GB/T 12456-2008, 酸碱滴定法; 固形物含量: 参考 GB 5009.3-2016, 固形物仪法; 菌落总数和大肠杆菌数: 参考 GB 7101-2015 测定; 饮料离心沉淀率检测方法如下^[15]: 在刻度离心管中准确加入 20 mL 饮料, 以 5 000 r/min 离心 15 min, 弃上层溶液, 准确称取沉淀物质量, 按下列公式计算沉淀率:

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

式中:

D ——离心沉淀率, %;

m_1 ——沉淀物质量, g;

m_2 ——离心饮料质量, g。

1.3.5 抗血小板活性的测定

大鼠血小板的制备参照 Maheswaraiah 等^[16]的方法进行制备, 血小板聚集抑制率的测定参考 Yu 等^[17]的方法并稍作修改: 称取一定量的 SCPs 粉末溶于蒸馏水中配成终质量浓度 (加到测试杯中的样品质量浓度) 为 3.0 mg/mL, 以 ADP (0.1 mol/L) 为激活剂诱导血小板发生活化聚集, 以贫血小板血浆为空白对照, 利用比浊法测定血小板在 5 min 时的聚集率。按下列公式计算抗血小板活性:

$$C=\frac{n_1-n_2}{n_1}\times 100\%$$

(2)

式中:

C——抗血小板活性, %;

n_1 ——模型组聚集率, %;

n_2 ——样品组聚集率, %。

1.3.6 SCPs粉末的贮藏稳定性

按 1.3.1 中方法制备 SCPs 溶液, 一部分装于 50 mL 复合薄膜耐高温吸嘴袋中并密封, 密封后于恒温水浴锅中 95 ℃ 灭菌 7 min, 结束后立即冷却至室温; 另一部分冷冻干燥成 SCPs 粉末, 分装于复合薄膜真空包装袋中抽真空并热封口。两组样品于常温下 (25 ℃) 避光贮存, 每月检测样品肽含量, 考察贮藏方式对 SCPs 稳定性的影响。

1.3.7 SCPs饮料的贮藏稳定性

将包装并灭菌好的 SCPs 饮料中于 25 ℃ (室温环境样品) 和 37 ℃ (高温环境样品) 中避光贮存, 定期取样测定美拉德反应程度、肽含量变化和菌落总数的变化, 考察温度对饮料贮藏稳定性的影响。同时制备两组饮料, 在室温条件下分别于自然光照和遮光条件下贮存, 定期取样检测上述指标变化, 考察光照对饮料贮藏稳定性的影响。

1.3.8 美拉德反应程度的测量

使用紫外可见分光光度计检测饮料中美拉德反应程度^[18]。294 nm 处的紫外 - 可见光度 (A_{294}) 作为美拉德中间反应阶段的指标, 420 nm 处的紫外 - 可见光度 (A_{420}) 作为褐变强度的指标。

1.3.9 肽含量检测

采用 Folin- 酚法检测肽含量^[19]: 将胶原肽配置

成约含 200 μg/mL 蛋白的溶液, 取 1 mL 加入 5 mL 福林酚试剂甲混匀, 25 ℃ 放置 10 min, 再加 0.5 mL 福林酚试剂乙, 立即摇匀, 25 ℃ 保温 30 min, 在 750 nm 下比色, 以 1 mL 水代替样品做空白对照。以牛血清白蛋白代替样品绘制标准曲线。

1.3.10 SCPs饮料感官评分标准

根据 GB/T 16291.1-2012 筛选出 7 名经过训练的感官评价员对 SCPs 饮料进行感官评分, 取 10 mL 饮料置于 20 mL 一次性样品杯中, 于室温下静置 10 min 后进行评价, 在自然光下观察外观和组织状态; 闻其气味, 评价其香气浓郁程度和有无不良气味; 用温开水漱口, 品其滋味, 评价其酸甜度和苦涩味, 感官评分为饮料外观、气味、口感、组织状态和整体接受度的综合评分, 总分采用十分制, 分数越高感官品质越好, 感官评价标准见表 1, 根据各指标对饮料品质影响的程度赋予不同的权重: 外观 0.2, 气味 0.3, 口感 0.3, 组织状态 0.2。

1.3.11 体内抗血栓活性评价

1.3.11.1 实验方案

购买 4~6 周龄 SPF 级雄性 ICR 小鼠, 体质量 25~30 g, 由维通利华提供, 饲养于 16 ℃ 以下温度环境中, 按照体质量随机分为模型组、阳性对照组和四组样品组, 每组 10 只, 适应性饲养 7 d 后连续灌胃 1 周, 灌胃量为 0.1 mL/10 g·bw。实验分组与剂量见表 2^[20]。

1.3.11.2 小鼠体质量变化

在 7 天的连续灌胃中, 每日灌胃前称量体质量, 精确到 0.1 g, 记录体质量变化。

表 1 SCPs饮料感官评价标准
Table 1 Sensory evaluation standards for SCPs beverage

评定项目	权重		评价标准 (分值)				
			1	2	3	4	5
外观 (10)	0.2	颜色	差	一般	较好	好	非常好
		明亮度	暗淡	较暗	一般	明亮	鲜亮
气味 (10)	0.3	香气浓郁程度	过淡 / 过浓	一般	稍淡 / 稍浓	适宜	非常好
		有无不良气味	很重	较重	较轻	微弱	无
口感 (10)	0.3	酸甜度	过甜 / 过酸	一般	稍甜 / 稍酸	适宜	非常好
		苦涩味	很重	较重	较轻	微弱	无
状态 (10)	0.2	透明度	浑浊	一般	较好	好	非常好
		有无沉淀	大量	较多	适中	稍有	没有

表 2 小鼠尾血栓实验分组和剂量

Table 2 Group grouping and dosage of mouse tail thrombosis experiments

组别	灌胃物	灌胃剂量	相当于人每日服用当量
模型组	生理盐水		
阳性对照组	阿司匹林	25 mg/kg·bw	165 mg/60 kg·bw
样品组 1 (SCPs)	SCPs 粉末 - 新鲜	200 mg/kg·bw	1.32 g/60 kg·bw
样品组 2 (SCPs-2m)	SCPs 粉末 -25 ℃ 贮藏两个月	200 mg/kg·bw	1.32 g/60 kg·bw
样品组 3 (SCPB)	SCPs 饮料 - 新鲜	4.8 mL(肽含量 200 mg/kg·bw)	32 mL/60 kg·bw
样品组 4 (SCPB-3m)	SCPs 饮料 -37 ℃ 贮藏三个月	4.8 mL(肽含量 200 mg/kg·bw)	32 mL/60 kg·bw

1.3.11.3 小鼠尾部出血实验

第 5 天灌胃结束 1 h 40 min 后，麻醉小鼠，在尾尖 3 mm 处用消毒后的剪刀剪下，用滤纸轻轻吸收剪断处血珠来监测出血情况，并使用秒表记录出血时间，每隔 15 s 检验一次是否还有血液流出，直至确定出血停止，超出 900 s 以 900 s 计算，实验结束后对小鼠伤口进行消毒处理并放回鼠笼。

1.3.11.4 小鼠尾血栓

第 7 天灌胃结束 1 h 40 min 后，配制质量分数 1.0% κ -卡拉胶，按 50 mg/kg·bw 的剂量进行腹腔注射，24 h 后断颈处死小鼠，用尺子测量小鼠尾部血栓形成长度。

1.3.11.5 小鼠脏器指数变化

从断颈处死后的 ICR 小鼠身上切下胸腺和脾脏并用 PBS 洗涤。吸干多余的液体后，立即称重胸腺和脾脏，并根据以下公式计算：

$$I=\frac{m_1}{m_2}\times100\%$$

(3)

式中：

I ——胸腺指数（脾脏指数），mg/g；

m_1 ——胸腺（脾脏）的质量，mg；

m_2 ——小鼠体质量，g。

1.3.12 数据统计与分析

所有实验数据至少重复测定三次，实验数据以“平均值 $\pm$ 标准差”（SD）的形式表示。实验数据采用统计分析软件：GraphPad prism 8.3.0 进行作图和显著性分析。

2 结果与讨论

2.1 SCPs粉末质量指标及体外抗血小板活性

2.1.1 SCPs粉末质量指标

经过酶解制备、脱腥脱苦和冷冻干燥后的 SCPs 粉末作为一种开发出的功能性食品配料，成分是

胶原蛋白肽，理应符合国家相关标准，故按照 GB 31645-2018 胶原蛋白肽，对 SCPs 粉末进行感官特性评价：产品为粉末状，呈乳白色，无肉眼可见的杂质，无异味，水溶液呈澄清微黄色，略有苦味。随后进行其他理化指标的测定，结果见表 3，可以看出各项理化指标均符合国标要求。

表 3 SCPs粉末理化指标

Table 3 Physicochemical indicators of SCPs powder

项目	指标	
	GB 31645-2018 胶原蛋白肽	SCPs 粉末
总氮(以干基计)/%	≥ 15.0	17.43 ± 0.07
羟脯氨酸/%	≥ 3.0	7.65 ± 0.43
相对分子量 <10 000 u 肽段所占比例/%	≥ 90.0	100
灰分/%	≤ 7.0	3.24
干燥失重/%	≤ 7.0	5.95

2.1.2 SCPs粉末分子量分布

对 SCPs 的分子量分布进行了测定，结果见表 4，SCPs 的分子量分布均集中在 10 000 u 以下，其中分布在 1 000 u 以下的肽占 72.76%，500 u 以下的小分子肽占到了 36.27%，通常小分子的肽具有更高的生物活性，这是由于小分子肽分子量小，缺乏肠胃酶水解位点，因而能够以完整形式被肠道吸收转运到达作用靶点。

表 4 SCPs分子量分布

Table 4 The molecular weight distribution of SCPs

样品	相对含量/%		
	1000 u 以上	1 000~500 u	500 u 以下
SCPs	27.24 ± 0.62	36.49 ± 0.83	36.27 ± 0.36

2.1.3 SCPs粉末体外抗血小板活性

按照 1.3.5 中方法检测 SCPs 粉末对 ADP 诱导的体外血小板聚集抑制率，结果如图 2 所示，随着

SCPs 质量浓度的升高,其抗血小板活性也逐渐增加,呈现良好的量效关系,其抗血小板活性 IC_{50} 值约为 2.069 mg/mL。

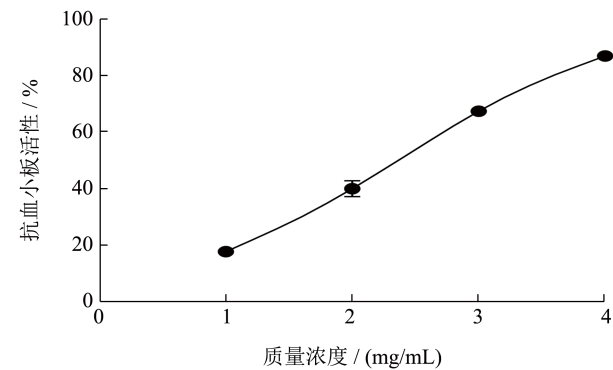


图 2 SCPs 粉末的抗血小板活性随质量浓度的变化
Fig.2 The change of antiplatelet activity of SCPs powder with mass concentration

2.2 SCPs 饮料质量指标

按照 1.3.2 制备 SCPs 饮料并进行感官评价：饮料呈微黄色且色泽鲜亮，质地均匀，无沉淀和分层，无鱼腥味，淡淡百香果香味，口感细腻，酸甜适中，无苦涩后味。在常温条件下测 SCPs 饮料理化指标和微生物指标。SCPs 饮料的 pH 值、总酸含量、可溶性固形物、离心沉淀率见表 5，SCPs 饮料中菌落总数和大肠杆菌属符合国标 GB 7101-2022 要求，保证了饮料的安全性。

表 5 SCPs 饮料理化及微生物指标
Table 5 Physicochemical and microbiological indicators of SCPs beverage

项目	指标
pH 值	4.29
总酸 (柠檬酸)/(g/kg)	3.24
可溶固形物 /%	7.18
离心沉淀率 /%	0
菌落总数/(CFU/mL)	未检出
大肠杆菌数/(CFU/mL)	未检出

2.3 SCPs 粉末贮藏稳定性

SCPs 虽然具有良好的抗血小板活性，但在贮藏过程可能会因氧化作用等发生肽键断裂，导致原活性肽序列损失造成生物活性下降。SCPs 作为胶原蛋白酶解产物，其中肽含量约为 88.1%，其余基本为游离氨基酸。为了增强 SCPs 粉末的贮藏稳定性，采用复合薄膜真空袋抽真空包装，以隔绝空气抑制

吸潮和氧化，同时以密封并灭菌的 SCPs 溶液为对照，监测常温条件下两种贮藏形式的 SCPs 肽含量变化，考察 SCPs 的贮藏稳定性，结果如图 3。可以看出，在两个月的贮藏时间内，SCPs 粉末肽含量基本保持稳定，第二个月时的肽损失率仅为 1.43%，相比之下，SCPs 溶液中的肽含量在第一个月内下降速度较快，第二个月下降速度有所减缓，两个月时的肽损失率为 4.94%。说明 SCPs 本身具有较好的贮藏稳定性，并且采用粉末真空贮藏的方式相对于使用液体密封贮藏更加稳定，是 SCPs 贮藏的较优方式。尚可心在对蜂毒肽进行贮藏稳定性实验时，发现其在水溶液体系下贮藏 12 h 以后逐渐开始降解，室温相较于冷藏环境降解率更高^[21]。可见，肽在溶液体系下存在着贮藏稳定性问题，且受到贮藏环境的影响。

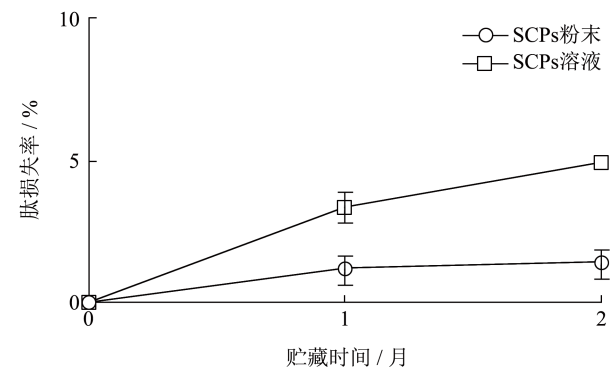


图 3 SCPs 粉末和 SCPs 溶液贮藏期间肽损失率
Fig.3 Peptide loss rate during storage of SCPs powder and SCPs solution

2.4 SCPs 饮料贮藏稳定性

SCPs 经过风味调配和杀菌制备成饮料，其中的活性肽可能因存在于液体体系下而出现贮藏稳定性问题，也可能会与饮料中的其他成分发生相互作用，导致其生物活性和生物利用度下降^[12]，例如和糖类物质发生美拉德反应，同时，饮料中微生物的生长也可能会影响饮料品质和活性。因此，按照 1.3.7 贮藏样品，定期监测饮料中美拉德反应、肽含量和菌落总数变化，以考察贮藏温度和光照对饮料贮藏稳定性的影响。

2.4.1 贮藏温度对 SCPs 饮料贮藏稳定性的影响

2.4.1.1 贮藏温度对饮料中胶原肽美拉德反应的影响

SCPs 饮料为常温贮藏的饮料，37 ℃ 下进行加速实验可推算产品货架期，因此选择 25 ℃ 和 37 ℃ 进行贮藏稳定性实验，虽然在 SCPs 饮料风味调配

时选择了非还原性的赤藓糖醇和三氯蔗糖,但实际贮藏中发现仍有美拉德反应的发生,不同贮藏温度下饮料美拉德反应程度见图4。常温及高温两种贮藏条件下,前3周的 A_{294} 值均显著增加,常温下由1.051提升至1.183,高温下提升至1.266,表明不断有美拉德反应中间产物的生成,3周后趋于平缓,说明美拉德中间产物的生成与消耗达到了平衡,12周时常温下达到1.191,高温下达到1.331(图4a)。另外,前2周的 A_{420} 增加,常温下由0.093提升至0.111,高温下提升至0.116,表明饮料体系不断有褐变产物生成,2周后维持稳定,表明褐变反应基本到达终点,12周时常温下达到0.111,高温下达到1.131(图4b),由此可以得出高温环境比常温环境更有利于促进美拉德反应的进行。鲍志杰等^[22]也发现蛋清蛋白肽在贮藏过程中能够和残留糖类发生美拉德反应,且贮藏温度越高反应程度越明显等。肽与糖类发生美拉德反应时,通常情况下不会导致肽键的断裂,但若反应温度过高或时间过长时,可能会导致肽的降解和氨基酸的脱落,从而影响肽的结构和功能。

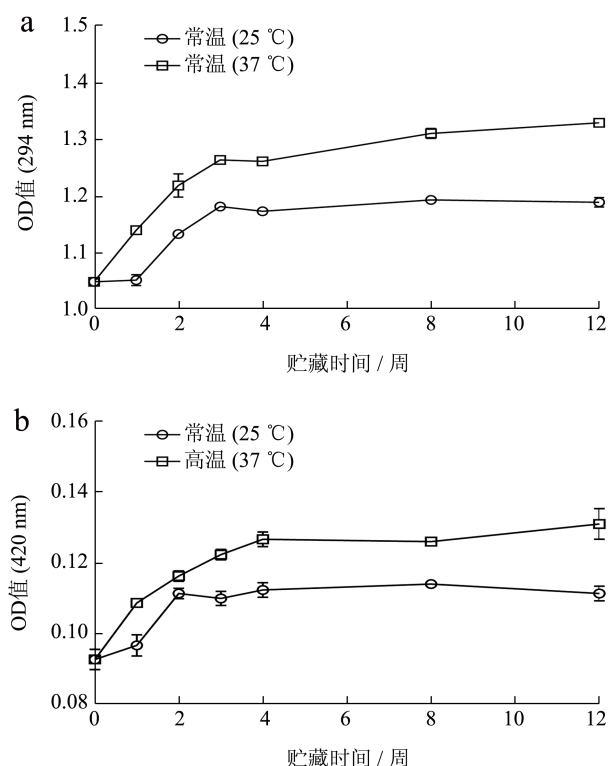


图4 温度对 SCPs 饮料中美拉德反应的影响

Fig.4 Effect of temperature on Maillard reaction in SCPs beverage

注:(a) 294 nm 处紫外可见吸光值;(b) 420 nm 处紫外可见吸光值。

2.4.1.2 贮藏温度对饮料中肽含量的影响

图5为饮料在贮藏过程中肽含量变化,可以看出,在常温和高温两种贮藏条件下,前4周内肽含量下降速度均较快,4周后降解速度放缓。常温条件下,12周时肽损失率约为5.90%左右,与第8周无显著性差异($P>0.05$),而高温条件下,12周时的肽损失率达到12.87%,相较于第八周仍在显著增加($P<0.05$),这说明高温环境不利于肽在饮料体系中的稳定。

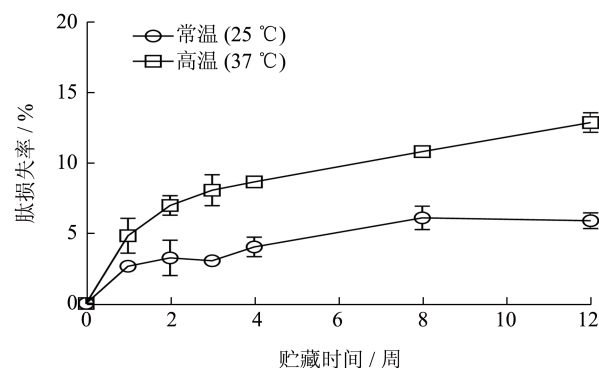


图5 温度对 SCPs 饮料中肽损失率的影响

Fig.5 Effect of temperature on peptide loss rate in SCPs beverage

2.4.1.3 贮藏温度对饮料中菌落数的影响

检测常温及高温贮藏条件下饮料中菌落总数的变化,结果见表6:在常温下贮藏12周内,均未检测到菌落数的生长,在高温条件下,前4周基本未检测到菌落生长,第8周时检测到14 CFU/mL,第12周时检测到23 CFU/mL,远低于国家标准(1 000 CFU/mL)。这表明经过95 °C、7 min的热杀菌和pH值4.29的酸性环境,饮料中的微生物的生长得到了较好的抑制,但高温贮藏条件可能会促进一些芽孢类微生物的生长^[15]。

2.4.1.4 贮藏温度对饮料感官品质的影响

因两种贮藏条件下 SCPs 饮料美拉德反应和肽损失逐渐达到平衡,对贮藏三个月的样品进行感官评价,图6结果显示,贮藏三个月时,常温贮藏条件下饮料感官评分为7.57,与贮藏前(7.86)未见显著差异($P>0.05$),而高温贮藏条件下饮料感官评分为6.29,较贮藏前存在显著下降($P<0.05$)。与贮藏前的饮料相比,高温贮藏三个月的饮料口感上仍无苦味,无沉淀物出现,但澄清度下降,颜色加深,酸味变明显、异味略微升高,推测是由于高温贮藏条件下饮料中美拉德反应和微生物的生长对饮料的外观、口感和气味产生了影响。

表 6 SCPs饮料在常温及高温贮藏过程中的菌落总数变化

Table 6 Changes in total bacterial count of SCPs beverage during storage at room temperature and high temperature

菌落总数/(CFU/mL)	第 0 周	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周	第 8 周	第 12 周
常温 (25 ℃)	0	0	0	0	0	0	0
高温 (37 ℃)	0	2	4	0	0	14	23

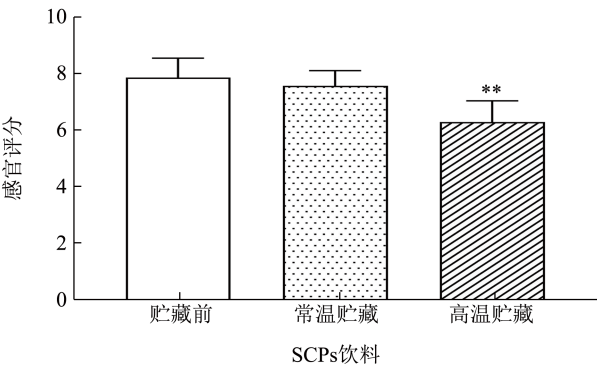


图 6 温度对 SCPs 饮料感官品质的影响
Fig.6 Effect of temperature on sensory quality
of SCPs beverage

2.4.2 光照对SCPs饮料贮藏稳定性的影响

2.4.2.1 光照对饮料中胶原肽美拉德反应的影响

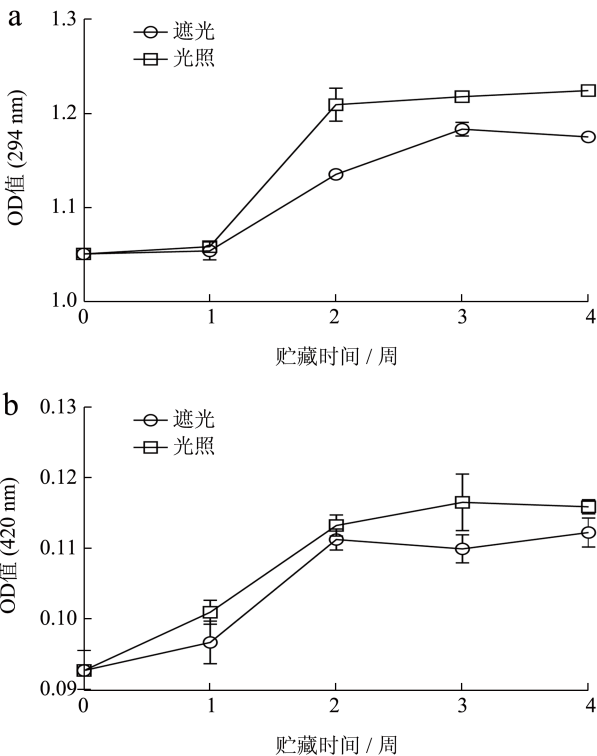


图 7 光照对 SCPs 饮料中美拉德反应的影响
Fig.7 Effect of light on Maillard reaction in SCPs beverage

注：(a) 294 nm 处紫外可见吸光值；(b) 420 nm 处紫外可见吸光值。

饮料在常温条件下分别进行光照和遮光条件下的贮藏实验，同样监测饮料中美拉德反应的发生情况，从图 7 结果中可以看出，随着贮藏时间的延长，饮料 A_{294} 和 A_{420} 均呈现不同程度的升高，升高趋势先快速后趋向于平缓，在 2 周后基本保持不变，说明基本达到了美拉德反应终点，4 周时遮光组 A_{294} 由 1.051 升高至 1.175， A_{420} 由 0.093 升高至 0.112，光照组 A_{294} 和 A_{420} 分别升高至 1.224 和 0.116。可以看出，相较于遮光贮藏，光照并未对饮料中美拉德反应产生明显的增强作用。

2.4.2.2 光照对饮料肽含量的影响

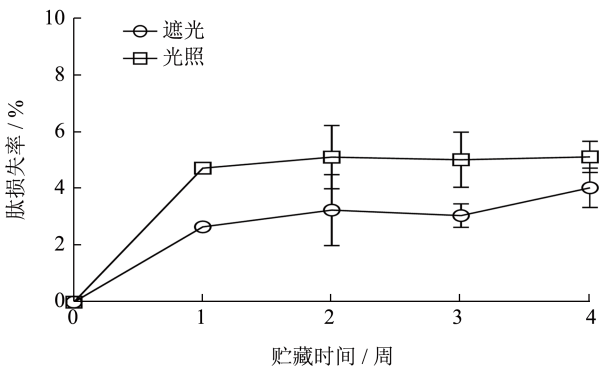


图 8 光照对 SCPs 饮料中肽损失率的影响
Fig.8 Effect of light on peptide loss rate in SCPs beverage

图 8 展示了在光照和遮光贮藏条件下饮料中肽的损失率，可以看出，在第 1 周的贮藏时间内，两组贮藏条件下肽含量均下降速度较快，在 1 周后基本保持不变，虽然光照贮藏下饮料肽损失率略高于遮光贮藏，但在贮藏 4 周时遮光条件下肽损失率约为 4.03%，光照条件下肽损失率约为 5.11%，两者无显著性差异 ($P>0.05$)，说明光照不会对饮料中肽的稳定性产生显著影响。

以上实验结果说明光照不会对饮料的贮藏稳定性产生明显影响，贮藏一个月的饮料也未观察到菌落总数的生长，相较于贮藏前也未发现感官品质的显著变化，说明在饮料的贮藏过程中不需要进行避光处理。

表 7 口服 SCPs 粉末和饮料的小鼠体质量变化 (g)

Table 7 Body weight changes in mouse treated with oral SCPs powder and beverage

体质量/g	生理盐水	Apc	SCPs	SCPs-2m	SCPB	SCPB-3m
第 1 天	28.13 ± 1.76	27.97 ± 1.53	27.70 ± 1.35	27.90 ± 1.57	27.38 ± 0.96	27.53 ± 1.66
第 2 天	29.47 ± 1.22	29.69 ± 2.01	29.23 ± 1.87	29.37 ± 1.42	29.37 ± 0.87	28.03 ± 1.13
第 3 天	30.13 ± 1.51	30.32 ± 2.07	29.91 ± 1.80	30.44 ± 1.40	30.26 ± 1.14	29.69 ± 1.68
第 4 天	30.14 ± 1.56	30.12 ± 1.67	30.39 ± 2.39	30.52 ± 1.25	29.75 ± 1.18	30.00 ± 1.71
第 5 天	31.17 ± 1.78	30.42 ± 1.83	30.64 ± 2.08	30.63 ± 1.28	31.27 ± 1.48	30.88 ± 1.59
第 6 天	31.23 ± 1.73	30.48 ± 2.29	30.73 ± 2.28	31.43 ± 1.75	30.71 ± 1.37	30.27 ± 1.92
第 7 天	31.16 ± 1.96	31.27 ± 1.32	31.42 ± 2.12	32.05 ± 1.40	31.60 ± 1.85	30.94 ± 1.93

注: Apc: 阿司匹林; SCPs: 鲑鱼皮胶原蛋白肽; SCPs-2m: 25 ℃ 真空贮藏两个月的 SCPs; SCPB: SCPs 饮料; SCPB-3m: 37 ℃ 贮藏三个月的 SCPB, 下同。

2.5 SCPs 粉末和饮料的体内抗血栓活性评价

2.3 和 2.4 实验结果反映了 SCPs 粉末和饮料在贮藏过程中均存在着一定程度的劣变, 这些变化是否对抗血小板活性产生影响还不得而知。因此, 采用小鼠尾血栓模型, 对新鲜 SCPs 粉末 (SCPs) 和常温贮藏两个月的真空包装的 SCPs 粉末 (SCPs-2m) 进行体内抗血栓评价, 考察该种贮藏形式对 SCPs 活性影响; 同时对新鲜 SCPs 饮料 (SCPB) 和高温下贮藏三个月的 SCPs 饮料 (SCPB-3m) 进行体内抗血栓评价, 考察将 SCPs 开发成饮料形式的可行性以及加速条件下活性的变化。以阿司匹林 (Apc) 作为阳性对照。

2.5.1 SCPs 粉末和饮料对小鼠体质量变化影响

动物实验中体质量是反应动物健康状况的重要指标, 监测饲喂期间的体质量变化, 从而可以初步判断受试物质对动物健康的影响。结果见表 7: 和生理盐水组相比, 连续 7 d 的灌胃各组小鼠体质量均无显著性差异 ($P > 0.05$), 说明连续 7 d 以 200 mg 肽/kg·bw 的剂量饲喂 SCPs、SCPs-2m、SCPB、SCPB-3m, 均不会引起小鼠体质量异常变化, 对小鼠的生长无负面影响。

2.5.2 SCPs 粉末和饮料对 κ 卡拉胶诱导的小鼠尾部血栓形成的影响

κ 卡拉胶是一种较强的致炎物质, 可以通过诱发相应的炎症反应诱导小鼠尾血栓形成^[23], 尾血栓形成的长度可以很好地反应饲喂物对血栓发生的预防作用, 该模型操作相对简单, 结果直观, 是作为体内抗血栓活性评价的最常用模型之一。实验结果如图 9 所示: 与生理盐水组相比, 在 200 mg 肽/kg·bw 灌

胃剂量下, SCPs 组血栓长度减少 66.4%, SCPs-2m 组相较于 SCPs 组活性略下降, 但未出现显著性差异 ($P > 0.05$), 说明粉末真空贮藏的形式能够较好地保留 SCPs 的体内抗血栓活性; 而在同样肽含量的灌胃剂量下, SCPB 组血栓长度减少 58.7%, 相较于 SCPs 存在显著下降 ($P < 0.05$); SCPB-3m 组血栓长度减少约 45.3%, 相比于 SCPB 活性也存在显著下降 ($P < 0.05$), 说明在饮料的调配、热杀菌过程和贮藏过程均会造成体内抗血栓活性的损失, 但是 SCPB-3m 仍能与 25 mg/kg·bw 灌胃剂量的 Apc 作用效果相似。

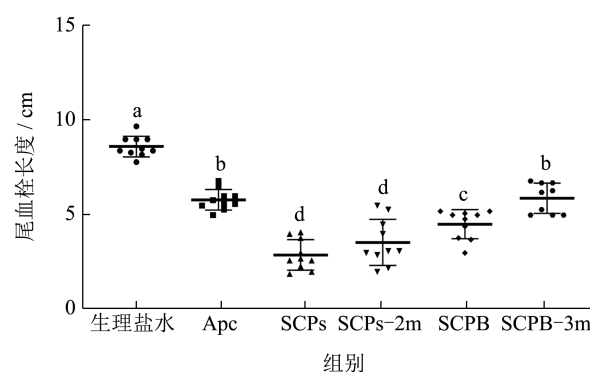


图 9 口服 SCPs 粉末和饮料对 κ 卡拉胶诱导的小鼠尾血栓形成的影响

Fig.9 The effect of oral SCPs powder and beverage on κ carrageenan induced tail thrombosis in mouse

注: 不同的小写字母表示有显著差异 ($P < 0.05$)。

余华军等^[24]研究发现, 经 HPLC 分离纯化后的麒麟菜多肽在 15、30 和 60 mg/kg·bw 灌胃剂量下对小鼠尾血栓形成的抑制率分别为 36.89%、17.25%、22.99%, 本研究中的 SCPs 作为一种未经分离纯化的混合酶解物抗血栓活性并不低, 以尾血栓模型中

小鼠每日给药量按照 9.1 系数计算^[25], 相当于人每日服用 1.32 g 的 SCPs 粉末或者 32 mL 的 SCPs 饮料, 低于胶原肽改善皮肤弹性^[26]、修复损伤软骨^[27]、增加骨密度^[28]等所使用剂量 (2~15 g/60 kg·bw), 为胶原酶解物的合理摄入量。根据 ASLT 法^[29]推算 SCPs 饮料在 25 °C 常温下贮藏 7 个月仍能保持良好的体内抗血栓活性, 说明将 SCPs 制备成饮料服用的方案是可行的。另外阳性药物 Apc 对小鼠尾血栓的形成具有极显著抑制作用 ($P<0.001$)。

2.5.3 SCPs粉末和饮料对小鼠胸腺和脾脏指数影响

小鼠的胸腺和脾脏是重要的免疫器官, 其重量指数的变化可能与免疫系统功能密切相关, 过高或过低都会对免疫功能产生影响。从图 10 结果中可以看出, 和生理盐水组相比, 连续 7 d 以 200 mg 肽/kg·bw 的剂量饲喂 SCPs、SCPs-2m、SCPB、SCPB-3m 小鼠胸腺指数和脾脏指数未出现显著性差异 ($P>0.05$), 不会引起小鼠免疫功能异常变化。

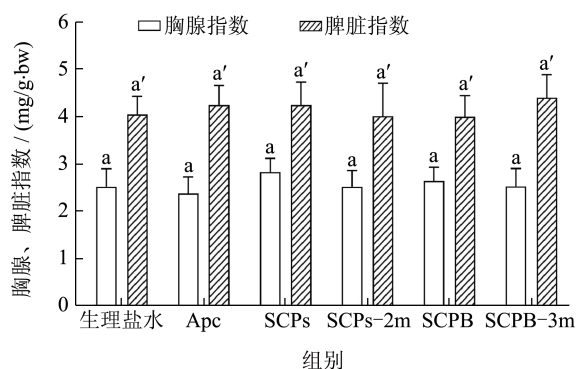


图 10 口服 SCPs 粉末和饮料对小鼠胸腺、脾脏指数的影响
Fig.10 Effect of oral SCPs powder and beverage on thymus spleen index in mouse

注: a 标注各组胸腺指数的差异性 ($P>0.05$), a' 标注各组脾脏指数的差异性 ($P>0.05$)

2.5.4 SCPs粉末和饮料对小鼠断尾出血时间的影响

小鼠断尾实验可以用来判断受试物是否会对机体凝血功能的影响以及出血风险。从图 11 结果中可以看出, 和生理盐水组相比, 在 200 mg 肽/kg·bw 饲喂剂量下, 连续五天饲喂 SCPs、SCPs-2m、SCPB、SCPB-3m 对小鼠凝血功能无显著性影响 ($P<0.01$), 不存在出血的风险。而以 25 mg/kg·bw 的剂量连续饲喂阿司匹林存在着出血风险出血的副作用, 这与文献报道的是一致的^[30], SCPs 作为一种混合物, 具有良好抗血栓活性的同时, 无出血副作用, 这可能与双向调节机制有关, 天然功能因子的多组分、

多靶点和多层次的治疗特性是其双向调节的基础, 不仅促进生理性止血过程, 而且通过抑制血小板聚集等过程影响体内血栓的形成^[3]。

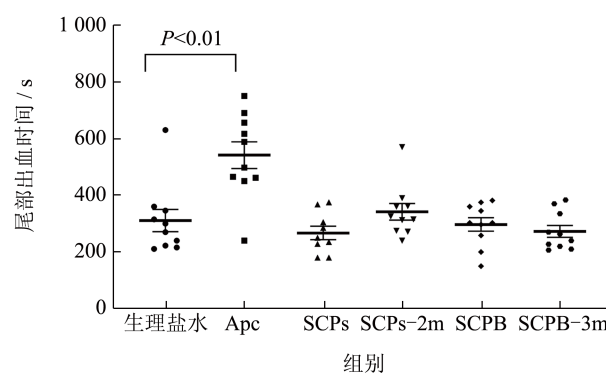


图 11 口服 SCPs 粉末和饮料对小鼠断尾出血时间的影响
Fig.11 Effect of oral SCPs powder and beverage on the duration of tail break bleeding in mouse

3 结论

本研究探究 SCPs 粉末和饮料在不同贮藏条件下的稳定性, 并采用尾血栓模型对贮藏前后的 SCPs 粉末和饮料进行体内抗血栓活性评价, 结果发现真空包装是 SCPs 粉末贮藏的较优方式, 可以有效抑制其中肽的降解; SCPs 饮料在贮藏过程伴随着肽的降解、美拉德反应、菌落数的生长和感官品质的下降, 高温环境会促进这些反应的进行; SCPs 粉末在 200 mg/kg·bw 的饲喂剂量下对小鼠尾血栓形成的抑制率为 66.4%, 常温贮藏两个月后的 SCPs 粉末相较于贮藏前体内活性未发生显著下降; SCPs 饮料对小鼠尾血栓形成的抑制率为 58.7%, 高温贮藏三个月后抑制率降至 45.3%, 但仍能与 25 mg/kg·bw 饲喂剂量的阿司匹林作用效果相似。SCPs 作为粉末或开发成液体饮料的产品形式均为可行方案, 二者均可作为预防血栓的膳食补充剂。

参考文献

- [1] TOTZECK M, MINCU R I, MROTZEK S, et al. Cardiovascular diseases in patients receiving small molecules with anti-vascular endothelial growth factor activity: A meta-analysis of approximately 29000 cancer patients [J]. European Journal of Preventive Cardiology, 2018, 25(5): 482-494.
- [2] KHODADI E. Platelet function in cardiovascular disease: activation of molecules and activation by molecules [J]. Cardiovascular Toxicology, 2020, 20(1): 1-10.
- [3] ZHOU Y, ZHANG D, TAN P, et al. Mechanism of

- platelet activation and potential therapeutic effects of natural drugs [J]. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 2022, 108: 154463.
- [4] 任娇艳,王敏,侯传丽,等.食源性肽的功能特性评价方法、分子构效关系及吸收代谢机制[J].食品科学技术学报,2023,41(2):7-22.
- [5] CHEN M, YE X, MING X, et al. A novel direct factor xa inhibitory peptide with anti-platelet aggregation activity from agkistrodonacutus venom hydrolysates [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5(1): 10846.
- [6] LIU X, WANG C H, DING X, et al. A novel selective inhibitor to thrombin-induced platelet aggregation purified from the leech *Whitmaniapigra* [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2016, 473(1): 349-354.
- [7] KHIARI Z, RICO D, MARTIN-DIANA A B, et al. Structure elucidation of ACE-inhibitory and antithrombotic peptides isolated from mackerel skin gelatine hydrolysates [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2014, 94(8): 1663-1671.
- [8] CUI L, LI B. Enrichment of antiplatelet peptides and removal of fishy odor from silver carp skin collagen hydrolysates by macroporous resins: pH value of loading sample affects the peptides separation [J]. *Food Chemistry*, 2023, 411: 135481.
- [9] SONG H, TIAN Q, LI B. Novel Hyp-Gly-containing antiplatelet peptides from collagen hydrolysate after simulated gastrointestinal digestion and intestinal absorption [J]. *Food & Function*, 2020, 11(6): 5553-5564.
- [10] TIAN Q, LI S, LI B. The Pro-Gly or Hyp-Gly containing peptides from absorbates of fish skin collagen hydrolysates inhibit platelet aggregation and target P₂Y₁₂ receptor by molecular docking [J]. *Foods*, 2021, 10(7): 1553.
- [11] RAO Q, KLAASSEN K A, LABUZA T P. Storage stability of food protein hydrolysates-a review [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2016, 56(7): 1169-1192.
- [12] KAMDEM J P, TSOPMO A. Reactivity of peptides within the food matrix [J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2019, 43(1): e12489.
- [13] 李雨奇,李博,王成涛.鱼皮抗血小板胶原肽的功效评价及酶法制备工艺优化[J].食品工业科技,2019,40(18):185-193.
- [14] 梁芮涵,李博.大孔树脂吸附法对鲢鱼皮胶原肽脱腥脱苦的作用效果[J].食品与发酵工业,2023,49(19):217-225.
- [15] 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.
- [16] MAHESWARAIAH A, RAO L J, NAIDU K A. Anti-platelet activity of water dispersible curcuminoids in rat platelets [J]. *Phytotherapy Research: PTR*, 2015, 29(3): 450-458.
- [17] GUOYONG Y, FENG W, BOLIN Z, et al. *In vitro* inhibition of platelet aggregation by peptides derived from oat (*Avena sativa* L.), highland barley (*Hordeum vulgare* Linn. var. *nudum* Hook. f.), and buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) proteins [J]. *Food Chemistry*, 2016, 194: 577-586.
- [18] YANG B, JOE G, LI W, et al. Comparison of maillard-type glycated collagen with alginate oligosaccharide and glucose: its characterization, antioxidant activity, and cytoprotective activity on H₂O₂-induced cell oxidative damage [J]. *Foods*, 2022, 11(15): 2347.
- [19] 卫国,边海旭,奚苗苗,等.福林酚比色法测定优泌嘉胶囊中多肽[J].中成药,2016,38(1):91-93.
- [20] 刘海韵,王维民,谌素华,等.马尾藻岩藻聚糖分离纯化及其对小鼠黑尾血栓的效果[J].食品科学,2020,41(9):91-97.
- [21] 尚可心,白洁,武慧超,等.蜂毒肽在不同溶剂系统中的稳定性研究[J].中国中药杂志,2014,39(22):4324-4328.
- [22] 鲍志杰,程缘,迟玉杰.蛋清蛋白抗氧化肽贮藏稳定性的研究(英文)[J].黑龙江大学自然科学学报,2016,33(1):101-107.
- [23] ZHANG H, LIU H, YANG M, et al. Antithrombotic activities of aqueous extract from *Gardenia jasminoides* and its main constituent [J]. *Pharmaceutical Biology*, 2013, 51(2): 221-225.
- [24] 余华军,伍俊,吴尚,等.麒麟菜多肽对血小板聚集及角叉菜胶诱导的小鼠尾部血栓形成的影响[J].解放军医学杂志,2018,43(2):96-100.
- [25] 熊远珍.实验动物与人用药量的新换算[J].江西医学院学报,1997,4:41.
- [26] McAlindon T E, NUIE N, KRISHNAN N, et al. Change in knee osteoarthritis cartilage detected by delayed gadolinium enhanced magnetic resonance imaging following treatment with collagen hydrolysate: a pilot randomized controlled trial [J]. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2011, 19(4): 399-405.
- [27] ZDZIEBLIK D, OESSER S, GOLLHOFFER A, et al. Corrigendum: Improvement of activity-related knee joint discomfort following supplementation of specific collagen peptides [J]. *Applied Physiology Nutrition and Metabolism*, 2017, 42(11): 1237.
- [28] DENISE Z, STEFFEN O, MANFRED W B, et al. Collagen peptide supplementation in combination with resistance training improves body composition and increases muscle strength in elderly sarcopenic men: a randomised controlled trial [J]. *British Journal of Nutrition*, 2015, 114(8): 1237-1245.
- [29] 赵鹏.不同灭菌方式对枸杞汁品质的影响及货架期预测[J].青海农林科技,2020,4:36-41.
- [30] 陈丹丹,于楠.新型抗血小板药物的研究进展[J].海峡药学,2018,30(1):95-98.