张远红, 方煜, 李滢, 等. 酶解鸽血制备抗氧化及抗衰老活性肽的工艺优化及产物特性 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(3): 254−262. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025020108

ZHANG Yuanhong, FANG Yu, LI Ying, et al. Optimization of Enzymatic Hydrolysis Process and Characterization of Antioxidant and Anti-aging Peptides from Pigeon Blood[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(3): 254−262. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025020108

· 工艺技术 ·

酶解鸽血制备抗氧化及抗衰老活性肽的工艺优化及产物特性

张远红[1], 方　煜[1], 李　滢[1], 陈伟波[2,3], 曾晓房[1,*]

（1.仲恺农业工程学院轻工食品学院, 农业农村部岭南特色食品绿色加工与智能制造重点实验室, 广东省岭南特色食品科学与技术重点实验室, 广东广州 510225;
2.宁夏大学食品科学与工程学院, 宁夏银川 750021;
3.梅州市金绿现代农业发展有限公司, 广东梅州 514500）

摘　要: 为了使肉鸽加工副产物鸽血得到高值化利用，本研究通过酶解鸽血蛋白制备抗氧化和抗衰老活性肽。首先采用一定的预处理手段使鸽血血红蛋白溶出，再通过不同的蛋白酶对鸽血蛋白进行酶解，以 DPPH 自由基清除率、$ABTS^+$自由基清除率和酪氨酸酶抑制活性为主要筛选指标，采用单因素和正交试验优化鸽血活性多肽的酶解工艺。结果显示，100 W 下超声 5 min 预处理的溶血效果最好，鸽血血红蛋白溶出量最高，为 192.65 mg/mL；不同蛋白酶中胃蛋白酶酶解鸽血蛋白得到的产物 DPPH、$ABTS^+$自由基清除率及酪氨酸激酶抑制活性均较高，且产物蛋白质回收利用率（PR）较高；胃蛋白酶酶解的最佳工艺条件为：血水比 1∶1.2、酶添加量 12000 U/g、酶解时间 4 h、酶解温度 37 ℃、pH 2.0。该工艺下得到的酶解产物酪氨酸酶抑制率最高，达到 45.93%，ABTS 清除率为 83.84%。该酶解多肽主要由分子量小于 5000 Da 的肽段组成，占总酶解液的 78.98%；其必需氨基酸、疏水性氨基酸和抗氧化氨基酸含量分别占总氨基酸的 42.01%、38.62% 和 27.22%，表明得到的鸽血活性肽具有非常好的营养价值和抗氧化、抗衰老功效。本研究结果为鸽血活性肽的开发及肉鸽加工副产物的资源化再利用提供依据。

关键词: 鸽血, 酶解, 抗氧化活性, 抗衰老活性, 工艺优化, 分子量分布, 氨基酸组成

中图分类号: TS251.93　　**文献标识码:** B　　**文章编号:** 1002−0306(2026)03−0254−09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025020108　　本文网刊:

Optimization of Enzymatic Hydrolysis Process and Characterization of Antioxidant and Anti-aging Peptides from Pigeon Blood

ZHANG Yuanhong[1], FANG Yu[1], LI Ying[1], CHEN Weibo[2,3], ZENG Xiaofang[1,*]

（1.Key Laboratory of Green Processing and Intelligent Manufacturing of Lingnan Specialty Food, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangdong Provincial Key Laboratory of Lingnan Specialty Food Science and Technology, College of Food Science and Technology, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China;
2.School of Food Science and Engineering, Ningxia University, Yinchuan 750021, China;
3.Meizhou Golden Green Modern Agriculture Development Co., Ltd., Meizhou 514500, China）

Abstract: In order to achieve a high-value utilization of pigeon blood, a by-product during the processing of meat pigeon, this study focused on the preparation of antioxidant and anti-aging peptides from pigeon blood through enzymatic hydrolysis. First, pretreatments of pigeon blood were adopted to help the hemoglobin in blood erythrocytes dissolve out.

收稿日期: 2025−02−17

基金项目: 梅州市科技计划项目（2023A0304001）; 广东省重点建设学科科研能力提升项目（2024ZDJS005）; 广东省本科教学质量与教学改革工程项目“科产教融合实践教学基地”（KA25YY098）; 广东省博士工作站粤人社函 [2024]60 号-广东明德升科农牧有限公司。

作者简介: 张远红（1989−）, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 蛋白质精深加工、食品营养与健康, E-mail: zyh5801307075@163.com。

*** 通信作者:** 曾晓房（1979−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 肉品加工和质量控制, E-mail: xiaofang_zeng2015@163.com。

Then, different proteases were employed to enzymatically hydrolyze the hemoglobin in pigeon blood, and the DPPH and $ABTS^+$ radical scavenging activity of the resultant hydrolysate, as well as the tyrosinase inhibitory activity were selected as screening indexes to optimize the enzymolysis conditions. The enzymatic hydrolysis process of active peptides in pigeon blood was optimized by using single-factor and orthogonal experiments. Result showed that ultrasonic treatment for 5 min at 100 W owned the highest dissolving hemoglobin content for 192.65 mg/mL, which indicating the best hemolysis effect. The DPPH and $ABTS^+$ radical scavenging activity and tyrosinase inhibitory activity of hydrolysate obtained from pepsin treatment were all basically higher than those from other proteases, and the protein recovery was also relative higher, revealing pepsin as the most effective protease for the enzymatic hydrolysis. The optimum conditions for the preparation of antioxidant and anti-aging peptides from pigeon blood established: blood-to-water ratio at 1∶1.2, protease addition at 12000 U/g, hydrolysis time at 4 h, hydrolysis temperature at 37 ℃, and pH at 2.0. Under this process, the tyrosinase inhibition rate of the obtained pigeon blood hydrolysate reached the highest, at 45.93%, and the $ABTS^+$ scavenging rate was 83.84%. The hydrolysate was mainly consisted of peptides with molecular weight smaller than 5000 Da, accounting for 78.98% of the total. And the essential amino acids, hydrophobic amino acids, and antioxidant amino acids accounted for 42.01%, 38.62%, and 27.22% of the total amino acids, respectively, which indicated excellent nutritional value and antioxidant and anti-aging effects of the hydrolysate obtained from pigeon blood. All these provided a fundamental basis for the development of bioactive peptides from pigeon blood and the reutilization of meat pigeon processing by-products.

Key words: pigeon blood; enzymolysis; antioxidant activity; anti-aging activity; process optimization; molecular weight distribution; amino acid composition

近年来, 老龄化已成为全球面临的首要问题。2015 年至 2050 年期间, 全球 60 岁及以上人口数量预计将增加一倍以上, 达到约 21 亿[1]。我国自 2002 年已进入“老龄化社会”, 预计到 2035 年进入“超高龄社会”[2]。虽然目前人类预期寿命与以前相比明显延长, 但多种与衰老相关的疾病如心脑血管疾病、神经退行性疾病、癌症等的高发, 带来了一系列的健康、社会和医疗问题, 如何延缓衰老已成为当今社会生命科学领域的重要课题。衰老是生物体在生命周期中普遍遵循的渐进性生理衰退过程, 且该过程是不可逆转的, 最终会导致组织或器官的退化[3]。体内自由基和衰老密切相关, 是衰老形成的重要机制之一[4]。在机体健康的状态下, 机体内自由基的产生和机体对自由基的清除处于动态平衡。然而, 随着年龄的增长, 组织器官功能发生异常, 机体内自由基大量积累, 过量的自由基会攻击机体组织细胞造成机体损伤, 当机体损伤和积累超过了机体自身的修复能力, 就会引起细胞分化状态改变甚至丧失, 进而导致衰老[5]。抗氧化剂是一类能中和自由基的物质, 衰老的进程可以通过抗氧化和抗衰老物质的干预有一定程度的延缓。因此, 开发具有显著抗氧化和抗衰老活性的功能成分已经成为目前功能性食品和医药领域的研究热点。

肉鸽是中国特色、广东省优势家禽产业, 已成为继鸡、鸭、鹅之后的第四大家禽。肉鸽营养丰富, 具有高蛋白低脂肪的特点, 是一种传统的滋补佳品, 素有“一鸽胜九鸡”的美誉[6]。鸽血是肉鸽屠宰加工过程的主要副产物之一, 约占肉鸽体重的 6%~8%, 是一种极大的蛋白质资源库。据《事林广记》中记载, 鸽血可解诸药、百蛊毒[7]。而现代医学认为, 鸽血具有强身健体、美容养颜、造血补血、滋补益气和祛风解毒等功效。然而, 由于血液保存难、血腥味重、极易受污染、宗教限制等原因, 屠宰后的鸽血绝大部分作为废弃物排放, 造成大量的资源浪费和环境污染。因此, 需要对鸽血进行合理的开发和利用, 以提高鸽血的经济效益, 避免环境污染和资源浪费[8]。近年来国内外对动物血液的研究主要集中在鸭血、鸡血、猪血、鹿血、驴血和驼血等。孙子怡等[9] 研究发现猪血可作为微量元素补充剂的良好载体。胡鑫等[10] 和郑炯等[11] 分别从猪血中酶解制备得到 ACE 抑制肽和金属螯合肽。Yang 等[12] 和 Zheng 等[13] 优化了从鸭血浆和血细胞中酶解制备抗氧化肽的工艺, 得到具有良好 DPPH 自由基清除活性的肽段。郑召君等[14–15] 从鸡血球中酶解制备得到具有较高抗氧化活性的酶解产物, 其中胃蛋白酶和酸性蛋白酶酶解后的抗氧化活性最好。王爽等[16] 和张艳等[17] 采用不同的蛋白酶水解驴血蛋白, 得到具有良好的 DPPH 自由基清除能力的抗氧化肽。黄和平等[18] 研究发现鳄鱼血浆和血球蛋白酶解产物对 ACE 具有良好的抑制力, 其最大抑制率可分别达到 75.56% 和 86.42%。周雨等[19] 确定了牦牛血抗氧化肽最佳制备工艺。吉日木图教授团队[20–22] 对骆驼血液进行了大量的研究, 开发了驼血降血压、降血脂和降糖活性多肽。施用晖教授团队[23–24] 从马鹿茸血中制备得到了具有良好免疫活性及抗氧化、抗疲劳的活性肽段, 为马鹿茸血的高附加值利用提供指导。Ding 等[25] 和付彩霞[26] 研究发现鹿茸血和梅花鹿血具有良好的酪氨酸酶抑制活性和抗衰老活性。综上可知, 畜禽动物血液可以作为良好的食物来源进行生物活性肽的开发。然而, 目前对于鸽血功效的研究相对较少, 尤其在以鸽血为原料开发具有特定生理活性的功能性肽方面更是罕见报道, 仅有少量关于鸽血抗氧化活性肽的报道[27]。

基于此, 本研究以鸽血为原料, 拟通过蛋白酶水解制备具有抗氧化和抗衰老活性的多肽, 测定蛋白

回收率(Protein recovery, PR)和水解度(Degree of hydrolysis, DH),并以 DPPH 自由基清除率、$ABTS^+$自由基清除率和酪氨酸酶抑制活性为主要筛选指标,采用单因素和正交试验优化鸽血活性肽的制备工艺,并测定最佳酶解工艺下制备的鸽血活性肽的肽分子量分布和氨基酸组成,以期为鸽血酶解产物功能活性的开发和肉鸽屠宰加工副产物的高值化利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

鸽血 采自 21 日龄白羽王鸽,梅州金绿现代农业发展有限公司;微量游离血红蛋白(Free hemoglobin, FHb)试剂盒、ABTS([2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ammonium salt; 2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑啉-6-磺酸二铵盐)、DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl,1,1-二苯基-2-三硝基苯肼)、OPA(1,2-phthalic dicarboxaldehyde,邻苯二甲醛)、木瓜蛋白酶(800 U/mg)、碱性蛋白酶(200 U/mg)、风味蛋白酶(20 U/mg)、复合蛋白酶(120 U/mg)、中性蛋白酶(100 U/mg)、胰蛋白酶(250 U/mg) 上海源叶生物科技有限公司;胃蛋白酶(1000 U/mg) Geniview 公司;其余试剂均为分析纯。

SHZ-B 水浴恒温振荡器 上海博迅实业有限公司;XO-SM100 超声波微波协同反应工作站 南京先欧仪器制造有限公司;T10 高速组织匀浆机 德国 IKA 公司;HR/T20M 台式低温冷冻离心机 湖南赫西仪器装备有限公司;Synergy H1 酶标仪、1260 Infinity III Prime 高效液相色谱仪 安捷伦科技有限公司;UV-1780 紫外分光光度计 岛津仪器(苏州)有限公司;L-8900 全自动氨基酸分析仪 日立高新技术公司。

1.2 实验方法

1.2.1 鸽血抗氧化和抗衰老活性肽的制备工艺 鸽血→加入柠檬酸钠(终浓度为 0.4%)抗凝→预处理→蛋白酶酶解→灭酶→离心取上清液→冷冻干燥得到鸽血活性肽。

1.2.2 鸽血溶血预处理 采用反复冻融、均质以及超声破碎三种方式对鸽血进行溶血预处理。

反复冻融:将新鲜鸽血装入离心管中放入−18 ℃冰箱中冷冻 2 h 使其凝固后取出,置于室温使其溶解,完成 1 次冻融。将新鲜鸽血分别冻融 1、2、3 次。

超声溶血:采用探头式超声,超声功率 100 W,对新鲜鸽血分别处理 1、3、5 min,同时进行冰浴防止样品温度升高。

均质溶血:使用高速组织匀浆机对新鲜鸽血分别均质 1、3、5 min。

预处理后的鸽血在 5000 r/min, 4 ℃下离心 20 min,取上清液适量稀释后,按照微量游离血红蛋白(FHb)试剂盒的方法测定血红蛋白含量。以未经预处理的鸽血在同样条件下离心作为对照,通过测定血红蛋白的溶出量来衡量溶血效果,以确定最佳的溶血预处理方式。

1.2.3 蛋白酶种类的筛选 选择最佳的溶血方式预处理后,分别采用中性蛋白酶、碱性蛋白酶、风味蛋白酶、复合蛋白酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶对鸽血进行酶解。选择各酶的最适酶解温度和 pH,如表 1 所示,按照血水比 1∶2、加酶量 10000 U/g、酶解时间 3 h 的酶解条件进行酶解,酶解结束后于沸水浴中加热 15 min 灭酶,迅速冷却至室温后调节酶解液的 pH 为 7.0,于 10000 r/min, 4 ℃下离心 15 min,取上清液即鸽血酶解物,分别测定蛋白质回收率(PR)、水解度(DH)、DPPH 自由基清除率、$ABTS^+$自由基清除率及酪氨酸酶抑制能力,以确定最佳酶解用酶。

表 1 不同蛋白酶的最适酶解条件

Table 1 Optimal hydrolysis conditions for different proteases

酶种类	温度(℃)	pH	酶种类	温度(℃)	pH
中性蛋白酶	50	7.5	胃蛋白酶	37	2.0
碱性蛋白酶	50	8.5	胰蛋白酶	37	7.5
风味蛋白酶	50	7.5	木瓜蛋白酶	50	7.0
复合蛋白酶	50	7.0			

1.2.4 单因素实验 血水比对鸽血酶解效果的影响:确定最佳酶解用酶后,在其最适温度和 pH 下,固定酶添加量 10000 U/g、酶解时间 3 h,研究不同血水比(1∶0.5、1∶1、1∶1.5、1∶2、1∶2.5)对鸽血酶解物抗氧化及抗衰老活性的影响。

酶添加量对鸽血酶解效果的影响:固定血水比为 1∶1、酶解时间为 3 h,蛋白酶最适温度和 pH 条件下,研究不同加酶量(4000、6000、8000、10000、12000 U/g)对鸽血酶解物抗氧化及抗衰老活性的影响。

酶解时间对鸽血酶解效果的影响:固定血水比为 1∶1、酶添加量为 10000 U/g,蛋白酶最适温度和 pH 条件下,研究不同酶解时间(1、2、3、4、5 h)对鸽血酶解物抗氧化及抗衰老活性的影响。

1.2.5 正交优化试验 采用正交试验研究不同水解条件对鸽血酶解物 PR、DH、$ABTS^+$自由基清除活性及酪氨酸激酶抑制能力的影响。以血水比(A)、加酶量(B)、酶解时间(C)为自变量,设计 $L_9(3^4)$正交试验,试验设计见表 2。

表 2 正交试验因素水平设计

Table 2 Design of orthogonal factor level

水平	因素		
	A: 血水比	B: 加酶量(U/g)	C: 酶解时间(h)
1	1∶0.8	8000	3
2	1∶1	10000	4
3	1∶1.2	12000	5

1.2.6　指标测定

1.2.6.1　蛋白质回收率(PR)的测定　使用双缩脲法测定上清液中蛋白质的浓度。PR 的计算公式为:

$$PR(\%)=\left(\frac{C_sV_s}{C_tV_t}\right)\times 100$$

式中: C_s、C_t 分别为上清液和初始酶解液中的蛋白质浓度, mg/mL; V_s、V_t 分别为上清液和初始酶解液的体积, mL。

1.2.6.2　水解度(DH)的测定　水解度的测定参考 Nielsen 等[28] 的方法略作修改: 向 3 mL OPA 试剂中加入 400 μL 适当稀释的上清液, 混合均匀后精确反应 2 min, 于 340 nm 处测定吸光值, 记为 ODsample。标准样品和空白的测定分别用 0.9516 mmol/L 的丝氨酸(Serine)和去离子水代替, 读数分别记为 ODstandard 和 ODblank。DH 计算公式如下:

$$SerineNH_2=\frac{OD_{sample}-OD_{blank}}{OD_{standard}-OD_{blank}}\times 0.9516\times\frac{1}{c}$$

$$h=\frac{SerineNH_2-\beta}{\alpha}$$

$$DH(\%)=\frac{h}{h_{tot}}\times 100$$

式中: c 为上清液的蛋白浓度, mg/mL; h 为断裂肽键数; h_{tot} 为蛋白总肽键数; 本实验中 h_{tot}、α 和 β 分别为 7.6、1.0 和 0.4。

1.2.6.3　DPPH 自由基清除能力的测定　DPPH 自由基清除能力的测定根据 Brand-Williams 等[29] 的方法进行适当修改。取 2 mL 用去离子水稀释到 1 mg/mL 的鸽血酶解物与等体积的 0.2 mmol/L 的 DPPH-无水乙醇溶液混合均匀。空白组以相同体积的去离子水代替样品与 DPPH-无水乙醇溶液混合; 对照组则以无水乙醇代替 DPPH 溶液与样品混合。每组使用涡旋仪剧烈振荡混匀后, 室温下避光静置 30 min, 于 517 nm 处测定吸光值。DPPH 自由基清除活性的计算公式为:

$$DPPH自由基清除活性(\%)=\left(1-\frac{A_i-A_j}{A_0}\right)\times 100$$

式中: A_i、A_j 和 A_0 分别为样品、对照和空白组在 517 nm 处的吸光值。

1.2.6.4　$ABTS^+$自由基清除能力的测定　$ABTS^+$自由基清除能力的测定参考 Xiao 等[30] 测定方法稍作修改: 将 7 mmol/L 的 ABTS 水溶液与 2.45 mmol/L 的过硫酸钾溶液等体积充分混合, 于室温避光条件下静置过夜。使用前用去离子水稀释 30~50 倍 ABTS 储备液, 调节其在 734 nm 处的吸光度达到 0.70±0.02 作为 ABTS 工作液备用。取 0.75 mL 用去离子水稀释到 2 mg/mL 的鸽血酶解物与 3 mL ABTS 工作液充分混匀, 室温避光条件下反应 6 min, 以去离子水调零, 于 734 nm 处测定其吸光度, 记为 A_i; 以水代替样液, 测空白对照吸光度 A_0。$ABTS^+$自由基清除率计算公式为:

$$ABTS^+自由基清除率(\%)=\frac{A_0-A_i}{A_0}\times 100$$

1.2.6.5　酪氨酸酶抑制能力的测定　酪氨酸酶(tryosinase)的抑制能力根据 Ding 等[25] 的测定方法稍作修改: 将 100 μL 稀释到 2 mg/mL 的鸽血酶解物与等体积的 125 U/mL 酪氨酸酶(0.05 mol/L PBS, pH6.8 溶解), 25 ℃ 下孵育 5 min 后加入等体积的 10 mmol/L 左旋多巴胺(L-Dopamine, 用 0.05 mol/L PBS, pH6.8 溶解), 在 25 ℃ 下将所得反应混合物再孵育 5 min。通过检测 475 nm 处的吸光度来测定反应混合物中多巴色素的含量。以维生素 C 为阳性对照。酪氨酸酶抑制活性计算公式如下:

$$酪氨酸酶抑制活性(\%)=\frac{(A-B)-(C-D)}{A-B}\times 100$$

式中: A 为不含样品的酪氨酸酶混合物; B 为不含样品和酪氨酸酶的混合物; C 为样品和酪氨酸酶的混合物; D 为含样品但不含酪氨酸酶的混合物。

1.2.6.6　鸽血活性肽的分子量分布　将优化后得到的最佳制备工艺下的酶解上清液进行冷冻干燥, 得到鸽血活性肽粉。采用高效液相色谱法测定鸽血酶解多肽的分子量分布, 参考张喆等[31] 的测定方法并略作修改。取适量的鸽血活性肽粉末用超纯水溶解并配制成 2 mg/mL 的溶液, 通过 0.22 μm 滤膜过滤。将标准品溶液过 0.22 μm 滤膜后上样, 根据标准品洗脱时间计算分子量分布比例。色谱柱为安捷伦 polargel-OH 色谱柱, 流动相为 0.02 mol/L pH7.4 的磷酸盐缓冲液, 流速为 1 mL/min, 紫外检测波长为 220 nm, 进样量为 100 μL, 检测温度为 40 ℃, 柱温 40 ℃, 对鸽血活性肽的分子量分布组成进行测定。

1.2.6.7　鸽血活性肽的氨基酸组成与含量测定　称取约 10 mg 的鸽血活性肽粉末, 加入 10 mL 的 6 mol/L HCl, 充氮气后密封, 在 110 ℃ 条件下水解 24 h。准确吸取 1.0 mL 进行氮吹干后, 用 1 mL 0.02 mol/L HCl 溶液复溶, 振荡混匀后过 0.22 μm 滤膜, 样品的氨基酸组成和含量用自动氨基酸分析仪进行测定, 氨基酸组成含量用 mg/g protein 表示。氨基酸自动分析仪条件: 色谱柱型号: ADVANCEBIO AAA; 柱温: 40 ℃, 检测波长: 338 nm; 流动相: 标准生理性液体分析洗脱液(PF-1、PF-2、PF-4 和 PF-RG); 流速: 1 mL/min; 反应液: 茚三酮染色液; 进样量: 20 μL。另外, 因色氨酸在样品高温酸解前处理过程中会发生分解, 如果需要检测色氨酸, 需要单独进行高温的碱水解前处理, 再单独进行上机检测, 且通常样品中的色氨酸含量较少, 因此, 本研究未对色氨酸进行检测。

1.3　数据处理

所有数据均至少测定三次, 并以平均值±标准偏差表示。采用 Excel 和 Origin2022 对数据进行处理及绘图, 采用 IBM SPSS Statistics 22.0 软件对试验

数据进行方差分析及 Duncan's 多重比较，显著水平 $P<0.05$。

2 结果与分析

2.1 预处理对溶血效果的影响

红细胞破裂（即溶血）可促进细胞内血红蛋白的溶出，提高酶解效果[32]。本研究采用超声、均质和反复冻融三种方式对鸽血细胞进行溶血处理，结果如图 1 所示。从图中可以看出，未进行溶血处理的鸽血样品（Blank）中游离血红蛋白含量仅为 0.28±0.01 mg/mL，而经过溶血处理后的样品血红蛋白溶出量都有明显增加。其中超声和均质溶血的样品游离血红蛋白溶出量都随着处理时间的增加而增加，超声 5 min 的样品游离血红蛋白溶出量最高，达到 192.65±14.29 mg/mL，且样品呈现完全溶血的状态；而均质处理的样品游离血红蛋白溶出量显著低于超声处理组（$P<0.05$）；反复冻融对游离血红蛋白的溶出也有较好效果，在 1 次冻融后血红蛋白的溶出量达到较高值，略低于超声 5 min 的样品，但随着冻融次数的增加血红蛋白溶出量变化不显著（$P>0.05$）。因此，本研究选择超声功率 100 W，超声时间 5 min 作为最佳的血细胞溶血方式。

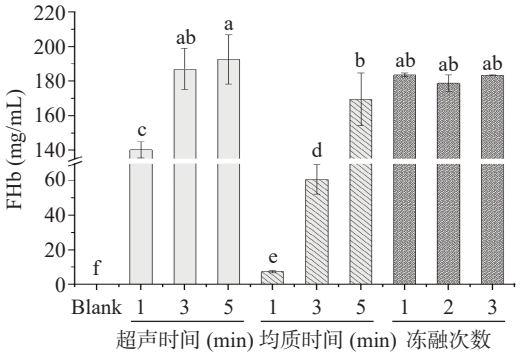


图 1 不同溶血方式对鸽血血红蛋白溶出效果的影响

Fig.1 Effect of different ways of hemolysis on the dissolution of hemoglobin in pigeon blood

注：不同的字母代表差异显著（$P<0.05$），图 2~图 5 同。

2.2 蛋白酶种类筛选

由于不同蛋白酶的特异性酶切位点不同，酶解程度有所差异，导致酶解产物分子量和氨基酸组成不同，进而影响酶解产物的生理功能。蛋白回收率（PR）可反映不同蛋白酶酶解后鸽血蛋白的回收利用程度。由图 2 可知，7 种蛋白酶中木瓜蛋白酶、胃蛋白酶和复合蛋白酶酶解后的蛋白质回收率相对较高，分别为 34.03%、29.63% 和 28.77%；而胰蛋白酶和中性蛋白酶的蛋白质回收率较低，仅有 10.56% 和 11.28%。水解度（DH）方面，风味蛋白酶酶解后的产物 DH 最高，达到 29.63%，木瓜蛋白酶次之，胃蛋白酶的水解度最低，仅 3.50%，这与风味蛋白酶为内切酶和外切酶的复合酶有关，不仅可以从肽链内部切割氨基酸之间的肽键，生成更小的肽段和游离氨基酸，还可以从肽链的 N-末端或 C-末端切割单个氨基酸，

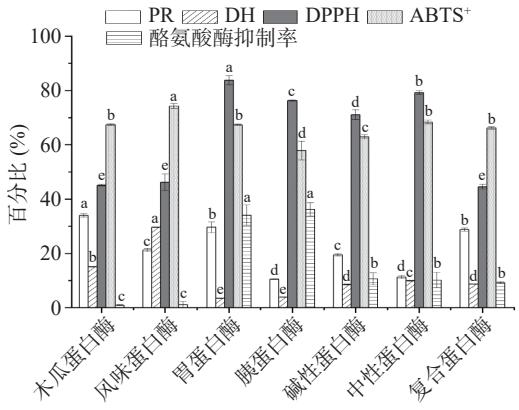


图 2 不同蛋白酶对鸽血酶解程度及产物 DPPH、$ABTS^+$ 自由基清除率和酪氨酸酶抑制率的影响

Fig.2 Effect of different proteases on the enzymatic hydrolysis of pigeon blood and the DPPH, $ABTS^+$ scavenging activity and the anti-tyrosinase activity of resultant hydrolysates

释放特定的游离氨基酸，因此，得到的酶解液水解程度较高；而胃蛋白酶和胰蛋白酶都是限制性内切酶，得到的酶解产物水解度较低。

在抗氧化活性方面，胃蛋白酶酶解后的产物 DPPH 自由基清除能力最高，其次是中性蛋白酶、胰蛋白酶和碱性蛋白酶，风味蛋白酶、木瓜蛋白酶和复合蛋白酶最低；$ABTS^+$ 自由基清除能力则风味蛋白酶最高，其次是中性蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、复合蛋白酶、碱性蛋白酶和胰蛋白酶。抗衰老活性主要以酪氨酸酶抑制能力进行评价，7 种蛋白酶水解后的产物酪氨酸酶抑制率在 0.97%~36.25% 之间，其中胃蛋白酶和胰蛋白酶的酶解产物酪氨酸酶抑制率显著高于其他酶（$P<0.05$）。总体来看，胃蛋白酶和胰蛋白酶酶解产物的酪氨酸酶抑制能力、DPPH 和 $ABTS^+$ 自由基清除能力均较高。这一定程度上与胃蛋白酶和胰蛋白酶酶解后形成的肽段的氨基酸组成和序列有关。胃蛋白酶能特异性地酶切苯丙氨酸（Phe）、色氨酸（Trp）、酪氨酸（Tyr）等疏水性氨基酸，形成较多的疏水性氨基酸残基[33]；而胰蛋白酶可以特异性地识别精氨酸（Arg）和赖氨酸（Lys）。研究表明，疏水性氨基酸对抗氧化活性具有较大的贡献，Tyr、Phe、Trp 和 Lys 被认为是抗氧化氨基酸，而抗氧化物质可以作为底物与 L-酪氨酸竞争氧原子或自由基，从而抑制酪氨酸酶的活性[34–35]。Arg 可以刺激人体生长激素的释放，能改善与衰老相关的多种疾病，还与细胞增殖等生理功能相关。因此，虽然胃蛋白酶和胰蛋白酶酶解后得到的产物水解度较低，但它们的酪氨酸酶抑制能力和抗氧化能力总体上较其它酶高。胡鑫等[10] 研究也发现胃蛋白酶和胰蛋白酶水解猪血红蛋白的 ACE 抑制活性最佳。考虑到胰蛋白酶酶解后的蛋白回收率显著低于胃蛋白酶（$P<0.05$），本研究综合选择胃蛋白酶作为后续实验的最佳蛋白酶。

2.3 单因素实验

2.3.1 血水比对鸽血酶解效果的影响 血水比对鸽血酶解效果的影响如图 3 所示。由图可知，随着血

水比增加，蛋白回收率 PR 呈现先增加后下降的趋势，且差异显著（P<0.05），血水比为 1∶2 时，蛋白回收率达到最高值 38.84%。而 DH、ABTS$^+$自由基清除能力和酪氨酸激酶抑制率则呈现先下降后上升的趋势，当血水比为 1∶0.5 时，酶解产物的 DH、ABTS$^+$自由基清除能力和酪氨酸酶抑制率最高，分别为 10.31%、77.23%、37.96%。水作为酶解过程中的反应介质和运输载体，能保证底物与蛋白酶充分接触。随着血水比的增加，底物浓度逐渐降低，底物与酶接触越充分，水解越彻底，因此，蛋白回收率逐渐增加，但过低的底物浓度可能会增加酶的自溶性，导致酶解产物过稀，甚至会使具有较高活性的肽段降解为更小的肽段或氨基酸[36]，从而降低产物的抗氧化和抗衰老活性，不利于活性肽的制备和收集。PR 在一定程度能反映酶解后蛋白的回收利用率，血水比为 1∶0.5 时，PR 较低，仅 6.33%。因此综合考虑 PR、ABTS$^+$自由基清除能力和酪氨酸酶抑制率，选择血水比较为适中的 1∶1 作为最佳血水比。

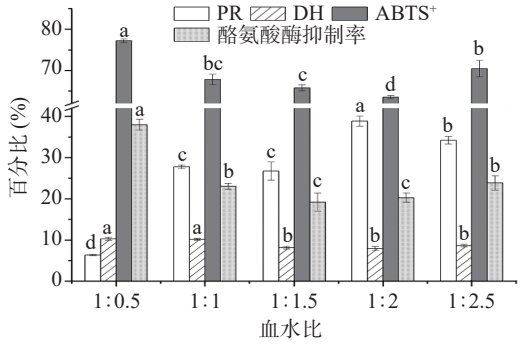


图 3　血水比对酶解效果的影响

Fig.3　Effect of blood-water ratio on the enzymatic hydrolysis

2.3.2　酶添加量对鸽血酶解效果的影响　酶添加量对鸽血酶解效果的影响如图 4 所示。由图可知，随着酶添加量的增加，鸽血酶解物的 PR 逐渐增加；DH、ABTS$^+$自由基清除率和酪氨酸酶抑制率则先缓慢增加后趋于稳定。这是因为当酶添加量较低时，酶不足以和底物充分接触，酶解不充分；随着加酶量的增加，酶和底物接触更充分，更多的大分子底物蛋白质被酶解成更小分子肽段或氨基酸，PR、DH 及产物活性增加。当加酶量增加到一定程度时，底物基本被水解完全，这时继续添加酶对酶解程度及产物活性影响不大。本实验中当酶添加量达到 10000 U/g 时，产物的 ABTS$^+$自由基清除活性和酪氨酸酶抑制活性均基本稳定，达到 67.80% 和 22.40%，继续增加酶添加量对产物活性无显著影响（P>0.05）。因此，选择酶添加量 10000 U/g 为最佳加酶量进行后续实验。

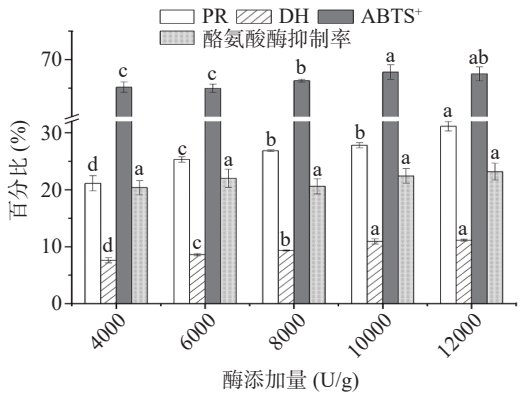


图 4　酶添加量对酶解效果的影响

Fig.4　Effect of enzyme dosage on the enzyme hydrolysis

2.3.3　酶解时间对鸽血酶解效果的影响　酶解时间对鸽血酶解效果的影响如图 5 所示。随着酶解时间的延长，PR 和 DH 呈先增加后降低的趋势，这主要是由于水解时间的增加导致更多的大分子蛋白被水解为多肽，PR 和 DH 增加；而当酶解时间进一步延长时，PR 和 DH 反而出现下降，这可能与胃蛋白酶的酶切方式有关。胃蛋白酶能特异性酶切 Phe、Try 和 Tyr 残基连接的肽段，导致更多的疏水性氨基酸残基暴露[33]，热灭酶时这些疏水性氨基酸残基之间可能会发生疏水聚集，形成不溶性的聚集物，从而降低可溶性蛋白或多肽的含量，导致 PR 和 DH 下降。酶解产物的 ABTS$^+$自由基清除能力和酪氨酸酶抑制率随着酶解时间的延长呈现先下降后上升的趋势，这可能与酶解后产生的肽段长短及其氨基酸组成和序列有关，有可能是酶解 1 h 时已得到活性较高的肽段，但随着酶解时间的延长，活性肽段被降解导致活性降低；当酶解至 4 h 时，形成的更小分子量的肽段又具有较高的 ABTS$^+$自由基清除能力和酪氨酸酶抑制率，其中 ABTS$^+$自由基清除能力在 4 h 时达到最高，为 69.60%；而酪氨酸酶抑制率在 5 h 时达到最高，为 30.69%。考虑酶解时间成本，选择 ABTS$^+$自由基清除能力最高，蛋白回收率、酪氨酸酶抑制率适中的酶解时间 4 h 作为最佳酶解时间。

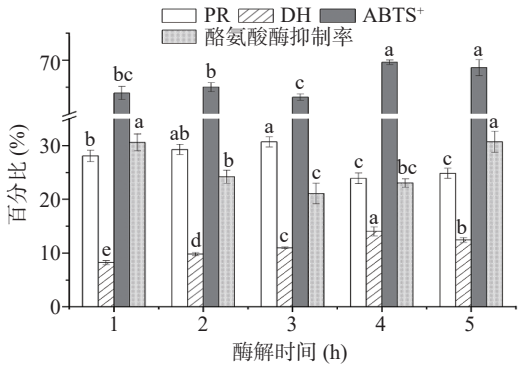


图 5　酶解时间对酶解效果的影响

Fig.5　Effect of hydrolysis time on the enzymatic hydrolysis

2.4　正交试验确定鸽血酶解工艺条件

在单因素实验的基础上，进一步采用正交试验优化胃蛋白酶酶解鸽血制备抗氧化和抗衰老活性肽的工艺条件。以酶解产物的 ABTS$^+$自由基清除能力和酪氨酸酶抑制率作为主要考察指标，设计了 L_9（3^4）正交试验，同时监测了不同实验组得到的酶解物的 RP 和 DH，结果见表 3。根据表 3 进行极差分析，

R 值说明了不同的酶解条件对 ABTS$^+$自由基清除率有着较为显著的影响，其因素主次顺序为 C>B>A，即对鸽血酶解物 ABTS$^+$自由基清除活性影响最大的是酶解时间，其次是酶添加量，最后是血水比，最优方案为 $A_1B_2C_2$，即血水比 1∶0.8、加酶量 10000 U/g、酶解时间为 4 h，该条件下得到的酶解物 ABTS$^+$自由基清除率最高，为 85.95%，此时酶解物的酪氨酸酶抑制率为 28.26%；同时，由 *R*’可知，在酪氨酸酶抑制率的影响因素中，血水比的影响最大，其次是酶添加量，酶解时间的影响最小，即 A>B>C，影响酪氨酸酶抑制率的最优方案为 $A_3B_3C_2$，即血水比 1∶1.2、酶添加量为 12000 U/g、酶解时间为 4 h，该条件下得到的酶解物的酪氨酸酶抑制率达到最大值，为 45.93%，此时酶解物的 ABTS$^+$自由基清除率也较高，为 83.84%。对比两组最优方案，可以发现，$A_3B_3C_2$ 组合下得到的酶解物的酪氨酸酶抑制率显著高于 $A_1B_2C_2$（P<0.05），而它们的 ABTS$^+$自由基清除率差异较小，不显著（P>0.05）。因此综合考虑，选择 $A_3B_3C_2$ 作为鸽血抗氧化和抗衰老活性肽的最佳酶解工艺，即血水比为 1∶1.2、酶添加量为 12000 U/g、酶解时间为 4 h，该条件下得到的酶解物的 PR 也达到较高值，为 23.55%。

表 3 鸽血酶解物正交优化试验结果及分析

Table 3 Results and analysis of orthogonal optimization test of pigeon blood enzymes

试验号	血水比	酶添加量	酶解时间	ABTS$^+$自由基清除率(%)	酪氨酸酶抑制率(%)	PR (%)	DH (%)
1	1	1	1	80.97	20.82	23.20	12.85
2	1	2	2	85.95	28.26	20.32	13.01
3	1	3	3	85.12	31.24	18.19	14.16
4	2	1	2	85.39	31.19	19.65	11.92
5	2	2	3	86.23	28.87	20.03	11.50
6	2	3	1	79.19	37.44	20.46	9.38
7	3	1	3	81.46	40.24	24.03	10.48
8	3	2	1	81.66	41.63	26.06	8.64
9	3	3	2	83.84	45.93	23.55	7.72
K1	84.01	82.61	80.61				
K2	83.60	84.61	85.06				
K3	82.32	82.72	84.27				
k1	28.00	27.54	26.87	因素主次顺序: C>B>A			
k2	27.87	28.20	28.35				
k3	27.44	27.57	28.09				
R	0.56	0.66	1.48	最优方案: $A_1B_2C_2$			
K1’	26.77	30.75	33.30				
K2’	32.50	32.92	35.13				
K3’	42.60	38.20	33.45				
k1’	8.92	10.25	11.10	因素主次顺序: A>B>C			
k2’	10.83	10.97	11.71				
k3’	14.20	12.73	11.15				
R’	5.28	1.76	0.61	最优方案: $A_3B_3C_2$			

2.5 鸽血活性多肽的肽分子量分布

进一步对最佳酶解工艺下得到的鸽血活性肽进行分子量分布测定，结果见表 4。由表可知，最佳酶解条件下得到的鸽血活性肽中分子量在 1000~3000 Da 的肽段占比最高，达到 35.01%，其次是分子量小于 1000 Da 的肽段，占比最少的是分子量大于 10000 Da 的组分，仅为 2.76%，说明该酶解条件下的胃蛋白酶表现出较优的酶解效果，大分子蛋白质基本都被酶解，且该条件下水解度较低，为 7.72%，避免了过度酶解，生成的游离氨基酸较少，大多数为具备潜在生理活性的小分子短肽，该结果与力俊琛[27] 的研究结果一致。综上，该活性肽主要由分子量小于 5000 Da 的肽段组成，占总酶解液的 78.98%。较小分子量的肽段往往表现出更强的生理活性和更优的消化吸收动力学[37]。

表 4 鸽血活性多肽的分子量分布

Table 4 Molecular weight distribution of bioactive peptide derived frompigeon blood

组别	分子量(Da)	占比(%)
1	>10000	2.76
2	5000~10000	18.28
3	3000~5000	15.70
4	1000~3000	35.01
5	<1000	28.27

2.6 鸽血活性肽的氨基酸组成

鸽血活性肽的氨基酸组成如表 5 所示。由表可知，鸽血活性肽中氨基酸(amino acid, AA)种类齐全，除色氨酸(Trp)未检测外，其余人体所需 AA 均被检出，且必需氨基酸(essential AA, EAA)占总氨基酸的比例较高，为 42.01%，高于联合国粮食及农业组织(FAO)的建议值(40%)[38]，被认为具有较高的营养价值。此外，鸽血酶解多肽中谷氨酸(Glu)含量最高，占总氨基酸的 11.76%，其次是亮氨酸(Leu)和赖氨酸(Lys)，分别占总氨基酸的 11.02% 和 10.24%。研究表明，Glu 不仅参与红细胞的生成，还能抵抗记忆力衰退和改善脑细胞活性等[39]。Lys 是人体第一限制性氨基酸，在谷类食物中含量很低，人体缺乏会引起蛋白质代谢障碍和机能障碍，对蛋白质的质量起着决定性的作用[40]，而本研究制备得到的鸽血活性肽具有较高含量的 Lys，营养价值较高。Leu 及缬氨酸(Val)及异亮氨酸(Ile)等支链氨基酸能有效改善机体的身体机能和认知功能，被广泛认为具有抗氧化和延缓衰老的功效[41]。甘氨酸(Gly)是内源性抗氧化谷胱甘肽的重要组成氨基酸；精氨酸(Arg)可以刺激人体生长激素的释放，能改善与衰老相关的多种疾病，还与细胞增殖等生理功能相关[42]；此外，苯丙氨酸(Phe)、Lys、丙氨酸(Ala)等疏水性氨基酸也被广泛认为具有较强的抗氧化功效[33−34]。从表 5 可知，鸽血活性肽中抗氧化氨基酸占比 27.22%，疏水性氨基酸占比 38.62%。因此，从氨基酸组成和含量上看，本研究制备的鸽血活性肽可具备较高的抗氧化和抗衰老功能，这也在前文中对最优制备工艺下得到的鸽血酶解物的 ABTS$^+$自由基清除活性及酪氨酸酶抑制活性的测定结果得到了证实。

表 5　鸽血酶解多肽水解氨基酸组成及含量

Table 5　Composition and content of amino acids in the hydrolysis of polypeptide

氨基酸种类	含量(mg/g)	占总氨基酸比例(%)
半胱氨酸(Cys)△	3.43±0.29	0.62
甲硫氨酸(Met)*#△	0.27±0.09	0.05
酪氨酸(Tyr)△	13.65±0.29	2.49
苯丙氨酸(Phe)*#△	31.93±0.84	5.82
赖氨酸(Lys)*#△	56.19±1.67	10.24
组氨酸(His)△	28.67±0.98	5.23
脯氨酸(Pro)#△	15.22±0.59	2.77
天冬氨酸(Asp)	54.6±2.95	9.95
苏氨酸(Thr)*	22.14±0.86	4.04
丝氨酸(Ser)	28.12±1.2	5.13
谷氨酸(Glu)	64.5±2.35	11.76
甘氨酸(Gly)	30.27±1.37	5.52
丙氨酸(Ala)#	44.57±1.83	8.13
缬氨酸(Val)*	35.51±1.14	6.47
异亮氨酸(Ile)*#	23.97±0.7	4.37
亮氨酸(Leu)*#	60.46±1.97	11.02
精氨酸(Arg)	26.75±0.8	4.88
抗氧化氨基酸	149.35	27.22
疏水性氨基酸	211.93	38.62
必需氨基酸	230.47	42.01
总氨基酸	548.51±19.86	100

注：*表示人体必需氨基酸，#表示疏水性氨基酸，△表示抗氧化氨基酸。

3　结论

通过以上实验发现超声功率 100 W、5 min 预处理对鸽血溶血效果最好，释放出的游离血红蛋白含量最高。在此基础上选择 7 种蛋白酶对鸽血蛋白进行酶解，其中胃蛋白酶酶解后得到的酶解产物 DPPH、$ABTS^+$自由基清除能力和酪氨酸激酶抑制能力均较高。进一步以该酶作为酶解用酶，利用单因素和正交试验对其酶解工艺进行优化，优化后的酶解条件为：血水比 1∶1.2、加酶量 12000 U/g、酶解时间 4 h、酶解温度 37 ℃、pH2.0。在该条件下得到的鸽血活性肽的酪氨酸激酶抑制率为 45.93%，$ABTS^+$自由基清除率为 83.84%，主要由分子量小于 5000 Da 的肽段组成，占比 78.98%；且该酶解多肽富含必需氨基酸，占总氨基酸的 42.01%；疏水性氨基酸和抗氧化氨基酸占比分别为 38.62% 和 27.22%。以上结果表明，最佳工艺下得到的鸽血活性肽具有非常好的营养价值和抗氧化、抗衰老活性。本研究可为利用鸽血制备抗氧化和抗衰老活性肽提供一定的理论依据，推动肉鸽加工副产物的高值化利用。但本研究所采用的活性测定均为体外通过与相关酶反应进行的，后续可进一步通过动物实验验证其体内消化吸收后是否仍具有活性。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

[1] WYSS-CORAY T. Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation[J]. Nature, 2016, 539(7628): 180−186.

[2] 马作霖. 乳清粉调节 D-半乳糖诱导衰老小鼠肠道菌群结构及抗衰老作用研究[D]. 兰州：甘肃农业大学, 2021. [MA Zuolin. Study on the regulation of gut microbiota structure and anti-aging effect of whey powder in D-galactose-induced aging mice[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2021.]

[3] 袁洁, 蔡时青. 衰老过程中行为和认知功能退化的调控机制研究[J]. 遗传, 2021, 43(6): 545−570. [YUAN Jie, CAI Shiqing. Research on the regulatory mechanism of behavioral and cognitive function degradation during aging process[J]. Inheritance, 2021, 43(6): 545−570.]

[4] HARMAN D. Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry[J]. Journal of Gerontology, 1956, 11(3): 298−300.

[5] ZHENG L, LIU M, ZHAI G, et al. Antioxidant and anti-ageing activities of mycelia zinc polysaccharide from *Pholiota Nameko* SW-03[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2014, 95(15): 3117−3126.

[6] 刘国乾, 陈益填, 刘思伽, 等. 肉鸽起源及品种发展历程[J]. 养禽与禽病防治, 2020(4): 12−15. [LIU Guoqian, CHEN Yitian, LIU Sijia, et al. Origin and development history of meat pigeons[J]. Poultry Farming and Poultry Disease Prevention and Control, 2020(4): 12−15.]

[7] 陈元靓, 等. 事林广记[M]. 南京：江苏人民出版社, 2011. [CHEN Yuanliang, et al. Shi Lin Guangji[M]. Nanjing: Jiangsu People's Publishing House, 2011.]

[8] 王丽媛, 高艳蕾, 张丽, 等. 畜禽副产物的加工利用现状及研究展望[J]. 食品科技, 2022, 47(6): 174−183. [WANG Liyuan, GAO Yanlei, ZHANG Li, et al. The current status and research prospects of processing and utilization of livestock and poultry by-products[J]. Food Technology, 2022, 47(6): 174−183.]

[9] 孙子怡, 杨剑婷, 谢宁宁, 等. 猪血球蛋白营养分析与水解工艺优化及制备金属螯合肽的研究[J]. 食品与机械, 2020, 36(11): 177−182. [SUN Ziyi, YANG Jianting, XIE Ningning, et al. Study on nutritional analysis and hydrolysis process optimization of pig blood cell protein and preparation of metal chelated peptides[J]. Food and Machinery, 2020, 36(11): 177−182.]

[10] 胡鑫, 罗永康, 于雪初. 胃蛋白酶水解猪血红蛋白制备 ACE 抑制肽条件的优化[J]. 食品科技, 2009, 34(11): 127−130. [HU Xin, LUO Yongkang, YU Xuechu. Optimization of the conditions for preparing ACE inhibitory peptide by hydrolyzing porcine hemoglobin with pepsin[J]. Food Technology, 2009, 34(11): 127−130.]

[11] 郑炯, 汪学荣, 阚建全. 血红蛋白多肽螯台铁的抗贫血功能研究[J]. 食品工业科技, 2009, 30(10): 312−313. [ZHENG Jiong, WANG Xuerong, HAN Jianquan. Study on the anti-anemia function of hemoglobin polypeptide chelated iron[J]. Food Industry Technology, 2009, 30(10): 312−313.]

[12] YANG J, HUANG J, ZHU Z, et al. Investigation of optimal conditions for production of antioxidant peptides from duck blood plasma: Response surface methodology[J]. Poult Science, 2020, 99(12): 7159−7168.

[13] ZHENG Z, WEI X, SHANG T, et al. Bioconversion of duck blood cell: Process optimization of hydrolytic conditions and peptide hydrolysate characterization[J]. BMC Biotechnology, 2018, 18(1): 67.

[14] 郑召君. 家禽血球酶解工艺及抗氧化肽分离鉴定和特性研究[D]. 北京：中国农业大学, 2017. [ZHENG Zhaojun. Enzymatic hydrolysis process of poultry blood cells and study on the isolation, identification and characteristics of antioxidant peptides[D]. Beijing: China Agricultural University, 2017.]

[15] 郑召君, 张日俊. 酶解鸡血球制备抗氧化肽的工艺优化和分析鉴定[J]. 食品科学, 2018, 39(22): 71−79. [ZHENG Zhaojun, ZHANG Rijun. Process optimization and analysis and identification for preparing antioxidant peptides from enzyme-hydrolyzed chicken blood spheres[J]. Food Science, 2018, 39(22): 71−79.]
[16] 王爽, 刘雪松, 江波涛. 驴血蛋白酶解制备抗氧化肽工艺优化[J]. 生物学杂志, 2023, 40(2): 109−114. [WANG Shuang, LIU Xuesong, JIANG Botao. Optimization of the preparation process of antioxidant peptides by donkey blood protease hydrolysis[J]. Journal of Biology, 2023, 40(2): 109−114.]
[17] 张艳, 江波涛, 李莉, 等. 驴血血红蛋白肽的制备工艺研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2023, 66(17): 134−138. [ZHANG Yan, JIANG Botao, LI Li, et al. Research on the preparation process of donkey blood hemoglobin peptides[J]. Heilongjiang Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2023, 66(17): 134−138.]
[18] 黄和平, 陈孙福, 罗永康. 鳄鱼血蛋白酶解产物抗氧化特性和血管紧张素转化酶抑制活性研究[J]. 渔业现代化, 2014, 41(5): 44−48. [HUANG Heping, CHEN Sunfu, LUO Yongkang. Study on the antioxidant properties and angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of crocodile blood protease hydrolysates[J]. Fishery Modernization, 2014, 41(5): 44−48.]
[19] 周雨, 施丽芬, 朱捷, 等. 牦牛血抗氧化肽发酵制备工艺优化及结构分析研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(6): 270−278. [ZHOU Yu, SHI Lifen, ZHU Jie, et al. Optimization of fermentation process and structural analysis of yak blood antioxidant peptides[J]. Journal of Food Safety and Quality Testing, 2023, 14(6): 270−278.]
[20] 刘丽君. 驼血抗氧化与降糖活性肽的制备与鉴定[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2019. [LIU Lijun. Preparation and identification of antioxidant and hypoglycemic active peptides in camel blood[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2019.]
[21] 马志鹰. 驼血中降血压降血脂多肽的制备及鉴定[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2019. [MA Zhiying. Preparation and identification of polypeptides for lowering blood pressure and blood lipid in camel blood[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2019.]
[22] 孙茹欣. 驼血降血脂生物活性肽的制备与鉴定[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2021. [SUN Ruxin. Preparation and identification of lipid-lowering bioactive peptides in camel blood[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2021.]
[23] 姜红. 马鹿茸血酶解肽免疫活性及抗氧化活性的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2008. [JIANG Hong. Study on theimmune activity and antioxidant activity of enzymatic hydropeptides in horse deer antler blood[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2008.]
[24] 尹晓平. 马鹿茸血酶解制备抗疲劳活性肽的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2008. [YIN Xiaoping. Research on the preparation of anti-tatigue active peptides by enzymatic hydrolysis of horse deer antler blood[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2008.]
[25] DING C, HAO M, MA S, et al. Identification of peptides with antioxidant, anti-lipoxygenase, anti-xanthine oxidase and anti-tyrosinase activities from velvet antler blood[J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 168: 113889.
[26] 付彩霞. 梅花鹿血的蛋白酶水解及水解产物的抗衰老功能研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2009. [FU Caixia. Study on the protease hydrolysis of sika deer blood and the anti-aging function of its hydrolysis products[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2009.]
[27] 力俊琛. 鸽血抗氧化肽的分离、结构鉴定及体外抗氧化活性评价[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2022. [LI Junchen. Isolation, structural identification, and *in vitro* antioxidant activity evaluation of pigeon blood antioxidant peptides[D]. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2022.]
[28] NIELSEN P M, PETERSEN D, DAMBMANN C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis[J]. Journal of Food Science, 2001, 66(5): 642−646.
[29] BRAND-WILLIAMS W, CUVELIER M E, BERSET C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity[J]. LWT-Food Science and Technology, 1995, 28(1): 25−30.
[30] XIAO Chuqiao, TOLDRÁ F, ZHAO Mouming, et al. *In vitro* and *in silico* analysis of potential antioxidant peptides obtained from chicken hydrolysate produced using alcalase[J]. Molecular Brain Research, 1998, 58(52): 195−208.
[31] 张喆, 马凌云, 尚凡凡, 等. 酶解鱿鱼皮制备 ACE 抑制肽的工艺优化及产物特性研究[J]. 食品工业科技, 2025, 46(17): 252−259. [ZHANG Zhe, MA Lingyun, SHANG Fanfan, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis of squid skin to prepare ACE inhibiting peptides and study on product characteristics[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(17): 252−259.]
[32] PIRES I S, BERTHIAUME F O, PALMER A F. Engineering therapeutics to detoxify hemoglobin, heme, and iron[J]. Annual Review of Biomedical Eengineering, 2023, 25(2): 1−21.
[33] ZHENG L, REN J, SU G, et al. Comparison of *in vitro* digestion characteristics and antioxidant activity of hot- and cold-pressed peanut meals[J]. Food Chemistry, 2013, 141(4): 4246−4252.
[34] ADDAR L, BENSOUICI C, SI AHMED Z S, et al. Antioxidant, tyrosinase and urease inhibitory activities of camel α-casein and its hydrolysate fractions[J]. Small Ruminant Research, 2019, 173(74): 30−35.
[35] 宋玉琼, 胡晓, 李来好, 等. 食物蛋白源酪氨酸酶抑制肽的研究进展[J]. 陕西师范大学学报(自然科学版), 2023, 51(3): 16−28. [SONG Yuqiong, HU Xiao, LI Laihao, et al. Research progress of food protein-derived tyrosinase inhibitory peptides[J]. Journal of Shaanxi Normal University (Natural Science Edition), 2023, 51(3): 16−28.]
[36] 祝超智, 温耀涵, 许龙, 等. 牛血红蛋白肽的酶解工艺优化及其亚铁螯合物结构、稳定性研究[J]. 食品工业科技, 2024, 45(8): 75−87. [ZHU Chaozhi, WEN Yaohan, XU Long, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis process of bovine hemoglobin peptide and study on the structure and stability of its ferrous chelate[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(8): 75−87.]
[37] HU X, WANG Y, ZHAO Y, et al. Antioxidant peptides from the protein hydrolysate of monkfish (*Lophius Litulon*) muscle: Purification, identification, and cytoprotective function on HepG2 cells damage by H_2O_2[J]. Marine Drugs, 2020, 18(3): 153.
[38] 沈畅华, 杨娟, 张远红, 等. 双酶酶解鸽胸肉工艺优化及抗氧化性评价[J]. 食品与机械, 2023, 39(4): 163−169. [SHEN Changhua, YANG Juan, ZHANG Yuanhong, et al. Response surface methodology optimization and antioxidant evaluation of pigeon meat hydrolyzed by two enzymes[J]. Food and Machinery, 2023, 39(4): 163−169.]
[39] GARCIA E J, CAIN M E. Isolation housing elevates amphetamine seeking independent of nucleus accumbens glutamate receptor adaptations[J]. European Journal of Neuroscience, 2021, 54(7): 6382−6396.
[40] 陆东林. 乳蛋白质的氨基酸组成和氨基酸评分[J]. 新疆畜牧业, 2014(10): 4−8. [LU Donglin. The amino acid composition and amino acid score of milk protein[J]. Animal husbandry in Xinjiang, 2014(10): 4−8.]
[41] DALLE G R, CALUGI S, RUOCCO C, et al. Efficacy and tolerability of a specific blend of amino acids in patients with anorexia nervosa treated in a hospital setting: Study protocol for a randomized controlled trial[J]. Trials, 2023, 24(1): 104.
[42] CHEN C, HSU S, ANN D K, et al. Arginine signaling and cancer metabolism[J]. Cancers, 2021, 13(14): 3541.