

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20231227012

# 超声波-酶法协同制备梅花鹿鹿血肽及其体内抗疲劳活性研究

刘超<sup>1,2,3,4</sup>, 马遥<sup>1</sup>, 刘艳秋<sup>1</sup>, 李凤林<sup>1,2,3,4\*</sup>

(1. 吉林农业科技学院, 食品科学与营养工程学院, 吉林 132101; 2. 吉林省酿造技术科技创新中心, 吉林 132101; 3. 吉林农业科技学院“国家食物与营养教育示范基地”, 吉林 132101; 4. 吉林省谷物精深加工校企联合技术创新实验室, 吉林 132101)

**摘要:** **目的** 采用超声波辅助生物酶法协同制取鹿血肽, 研究酶解条件对鹿血肽得率的影响。**方法** 通过单因素和正交实验优化混合蛋白酶不同酶解时间、酶解温度、加酶量、pH。以小鼠游泳时间为指标, 研究鹿血多肽的抗疲劳活性。**结果** 鹿血酶解的温度为 50°C、酶解时间为 4.0 h、加酶量 5.5%、pH 7.5 为较优酶解条件, 此时水解度为 29.10%。小鼠抗疲劳实验显示: 鹿血多肽高、中、低剂量组小鼠游泳力竭时间延长率分别为 159.46%、91.89%、13.51%, 与对照组相比, 鹿血多肽高、中剂量组游泳力竭时间均显著延长( $P<0.05$ ); 鹿血多肽高剂量组小鼠游泳力竭后, 解剖检测发现肝脏中肝糖原含量以及血液中的尿素氮浓度、乳酸含量均显著提升( $P<0.05$ ), 明显提高运动后小鼠机体代谢活动, 增强其抗疲劳能力。**结论** 本研究为进一步研究梅花鹿鹿血肽的抗疲劳机制和开发鹿血肽酒等相关产品奠定了基础。

**关键词:** 鹿血肽; 超声波-酶法水解; 抗疲劳活性

## Preparation of deer blood peptide from sika deer by ultrasonic-enzymatic synergistic preparation and research on the antifatigue activity *in vivo*

LIU Chao<sup>1,2,3,4</sup>, MA Yao<sup>1</sup>, LIU Yan-Qiu<sup>1</sup>, LI Feng-Lin<sup>1,2,3,4\*</sup>

(1. College of Food Science and Nutrition Engineering, Jilin Agricultural Science and Technology University, Jilin 132101, China; 2. Jilin Brewing Technology Innovation Center, Jilin 132101, China; 3. Jilin Institute of Agricultural Science and Technology “National Food and Nutrition Education Demonstration Base”, Jilin 132101, China; 4. Jilin Province Grain Deep Processing School Enterprise Joint Technology Innovation Laboratory, Jilin 132101, China)

**ABSTRACT: Objective** To prepare deer blood peptide by ultrasonic-assisted biological enzyme method, and study the effect of enzymatic hydrolysis conditions on the yield of deer blood peptide. **Methods** The effect of different enzyme reaction conditions on the yield of deer blood peptide was studied. The enzymatic hydrolysis time, temperature, dosage, and pH of mixed enzymes were optimized by single factor tests and orthogonal experiments. The antifatigue activity of deer blood peptides were researched by using mouse swimming time as an indicator.

基金项目: 吉林省科技厅重大专项(20220304002YY)、食品科学与工程重点学科项目

**Fund:** Supported by the Important Science & Technology Specific Projects Foundation of Jilin Province (20220304002YY), and the Key Discipline of Food Science and Engineering

\*通信作者: 李凤林, 博士, 教授, 主要研究方向为功能性食品及食品营养健康方向研究。E-mail: 568169115@qq.com

\*Corresponding author: LI Feng-Lin, Ph.D., Professor, College of Food Science and Nutrition Engineering, Jilin Agricultural Science and Technology University, No.77, Hanlin Road, Changyi District, Jilin 132101, China. E-mail: 568169115@qq.com

**Results** The results showed that the optimal process conditions for enzymatic hydrolysis of deer blood were as follows: The blood hydrolyzing at 50°C and pH 7.5 for 4.0 hours with 5.5% mixed enzymes. The degree of dehydration was 29.10%. In the swimming experiment of mice, the elongation rates with the high, medium, and low dose of deer blood peptide were 159.46%, 91.89%, and 13.51%, respectively. Compared with the control group, the high and medium dose groups were significantly prolonged swimming time ( $P<0.05$ ). After exercise fatigue, the mice were treated with high-dose deer blood peptide, and it was found that the liver glycogen content, the nitrogen concentration in the blood and urea and the lactate content were significantly increased ( $P<0.05$ ). The experiment showed the improved activity of metabolism and antifatigue after exercise. **Conclusion** This study shows the foundation for further research on the antifatigue mechanism of sika deer blood peptide and the development of related products such as deer blood peptide wine.

**KEY WORDS:** deer blood peptide; ultrasonic-enzymatic hydrolysis; antifatigue activity

## 0 引言

梅花鹿属脊索动物门,哺乳纲,是我国传统药食两用动物,其血具有养血益精、行血祛瘀、消肿疗伤等功效<sup>[1]</sup>。随着人们生活水平的提高,保健意识的增强,人们对鹿血产品的需求日益增加,尤其是鹿茸血保健品等深加工产品的需求量快速增长<sup>[2]</sup>,其作为一种天然动物源食材在食品市场逐渐得到广泛应用,消费者们已经深刻认识到鹿血食品所蕴含的保健功效和经济效应。鹿血酒具有滋补肝肾、增强性功能、抵抗疲劳、提高免疫机能、增强体质和增强抗病能力等功效,其中抗疲劳作用是鹿血产品的突出作用<sup>[3]</sup>。目前,国内对鹿血食品的生产工艺进行了一系列的研究,其中鹿源生物活性肽的提取、分离、纯化、合成及功能评价,已成为人们研究的热点,从梅花鹿副产品的多种生物活性来看,鹿可作为生物活性肽的良好来源应用于食品领域。以梅花鹿副产品为原料制备生物活性肽,不仅能开发食品、保健品和药品等高附加值产品,而且能充分利用鹿类资源,提高鹿产业价值,促进我国鹿产业发展。

传统的鹿血食品生产方式仅仅是加工原血液或与其他原料混合,其中大部分都是以鹿血酒的形式存在,存在利用率低下、口感粗糙、生物活性不突出等问题,因此,鹿血制品开发需要融入现代食品加工技术,提高产品附加值和感官特性:例如张翠侠等<sup>[4]</sup>研究了由鹿血、枸杞、桑椹和黄精等原料制成的鹿血酒中鹿血多肽的酶解提取工艺,以改善其有机性能和稳定性,消除生腥味,提高鹿血有效成分的利用率,在提升鹿血酒感官、降低鹿血腥味、增强酒的稳定性等方面,发挥了至关重要的作用。薄士儒等<sup>[5]</sup>以鹿血为主要药物,并辅以西洋参、枸杞子和天冬等药材制备出高品质的鹿血复方口服液。

鹿血蛋白质中富含 19 种氨基酸<sup>[6]</sup>,采用酶解技术能提高梅花鹿血液资源利用率,是生产鹿血多肽的主要方法,具有高效、无污染、反应条件温和、产品安全性高、且易于控制的优点,已经应用于羊、猪血肽制备。曹效海等<sup>[7]</sup>

采用抗凝、过滤、喷雾干燥等工艺制得血粉,再通过酶解和活性炭制备藏羊血多肽;周庆等<sup>[8]</sup>采用复合酶对猪血进行水解,再用活性炭对其水解液吸附脱色,经过喷雾干燥,制得脱色血球蛋白粉,其产品颜色、气味、颗粒形状、质地等方面均优于未水解和脱色的猪血。随着经济与科学文化的进步,人们生活品质的提高,消费者的注意力已由功能活性大分子物质转向功能活性小分子肽上<sup>[9-10]</sup>。本研究拟采用超声波破壁结合生物酶水解法制备鹿血多肽,采用胰蛋白酶和中性蛋白酶组成的复合酶水解超声波破壁处理后的鹿血制备多肽,通过单因素实验、正交实验法优化鹿血肽酶解工艺,对酶解后鹿血多肽的体内抗疲劳活性开展研究,为开发具有抗疲劳活性功能的鹿血肽保健酒、鹿血肽口服液等产品提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

梅花鹿血:购于长春市双阳区占营梅花鹿养殖场。

昆明种雄性小鼠:购于长春市亿斯实验动物技术有限公司,许可证号:SCXK(吉)2020-0002,伦理实验批准号:2022009。

胰蛋白酶、中性蛋白酶(酶活 1:250 U/mg,北京博奥拓达科技有限公司);茚三酮(分析纯,天津化学试剂有限公司);甘氨酸对照品(纯度 $\geq 98\%$ ,恒诚致远生物有限公司);全血乳酸测定试剂盒(编号:A019-1-1)、肝糖原测定试剂盒(编号:43-1-1)、尿素氮测定试剂盒(编号:C013-2-1)(南京建成生物工程研究所)。

### 1.2 仪器与设备

pHS-3cu 酸度计(上海越平科学仪器制造有限公司);UV-755B 紫外可见分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司);GK-500 凯氏定氮仪(山东格林凯瑞精密仪器有限公司);HH-6 恒温水浴锅(上海力辰邦西仪器科技有限公司);SCQ-5201B 超声波提取仪(上海声彦超声波仪器有限公司);

BT125D 万分之一分析天平(德国赛多利斯有限公司); UV-6100 紫外可见分光光度计(上海元析仪器有限公司); BTP-9EGEXO 台式歧管型冻干机(德祥科技有限公司); L-8900 型氨基酸自动分析仪(日本日立公司)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 制取工艺及实验流程

鹿血→超声波处理→调节 pH→血细胞酶解→灭活→离心分离→过滤→鹿血肽→动物实验。

#### 1.3.2 鹿血超声波处理及多肽制备工艺

取一定量的鹿血置于离心管,放入 20 kHz 超声波中处理 15 min,调节 pH 后,采用胰蛋白酶和中性蛋白酶的混合酶液进行水解,反应液放入恒温水浴锅中水解一定时间,待酶解结束后于 95°C 条件下保温 10 min 灭活,冷却至室温,在 4000 r/min 的条件下离心 15 min 后,收集上清液浓缩、冻干,制成鹿血肽样品备用。

#### 1.3.3 鹿血肽水解度测定

按 1.3.2 方法制备鹿血肽样品,并测定多肽水解度(degree of hydrolysis, DH)。

##### (1) 蛋白质含量的测定

采用 GB 5009.5—2016《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》中凯氏定氮法测定。

##### (2) 蛋白质水解度测定

鹿血肽制备量用 DH 表示,指鹿血蛋白水解过程中被裂解的肽键占蛋白质总肽键的百分数,参照甲醛滴定法<sup>[11]</sup>,见公式(1):

$$DH\% = M \times (V_1 - V_2) \times \frac{1000}{C_{wo} \times V} \times \frac{1}{h_{tot}} \quad (1)$$

式(1)中:  $M$ —NaOH 标准溶液的浓度, mol/L;  $V_1$ —滴定样品消耗的 0.05 mol/L 的 NaOH 标准溶液的体积, mL;  $V_2$ —空白实验所消耗的 0.05 mol/L NaOH 标准溶液的体积, mL;  $C_{wo}$ —鹿血肽水解液中蛋白浓度, g/L;  $V$ —甲醛滴定的水解液的体积数, mL;  $h_{tot}$ —底物中蛋白质肽键的毫摩尔数,对于血液蛋白该值取 8.3, mmol/g。

#### 1.3.4 鹿血酶解肽氨基酸组成分析

取鹿血肽样品冻干粉 10 mg,加入 10 mL 盐酸(6 mol/L),配成质量浓度为 1 mg/mL 的溶液,110°C 水解 24 h,利用氨基酸自动检测仪分析检测氨基酸组成并计算含量。

#### 1.3.5 单因素实验设计

##### (1) 酶解时间对酶解后鹿血肽含量的影响

取 5 份各 50 mL 鹿血分别加入 5.0% 的胰蛋白酶与中性蛋白酶混合酶,调节 pH 为 7.5,置于 55°C 水浴中,分别反应 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 h,测定其多肽得率,研究在相同提取条件下,不同酶解时间对水解度的影响。

##### (2) 酶解温度对酶解后鹿血肽含量的影响

取 5 份各 50 mL 鹿血分别加入 5.0% 的胰蛋白酶与中性蛋白酶混合酶,pH 为 7.5,调节酶解温度分别为 45、50、55、60、65°C,反应 4.0 h,测定其多肽得率,研究在相同

提取条件下,不同酶解温度对水解度的影响。

##### (3) pH 对酶解后鹿血肽含量的影响

取 5 份各 50 mL 鹿血分别加入 5.0% 的胰蛋白酶与中性蛋白酶混合酶,置于 55°C 水浴中,调节 pH 为 6.5、7.0、7.5、8.0、8.5,反应 4.0 h,测定其多肽得率,研究在相同提取条件下,不同 pH 对水解度的影响。

##### (4) 加酶量对酶解后鹿血肽含量的影响

取 5 份各 50 mL 鹿血,调节 pH 为 7.5,分别加入 3.0%、4.0%、5.0%、6.0%、7.0% 的胰蛋白酶与中性蛋白酶混合酶,置于 55°C 水浴中,反应 4.0 h,测定其多肽得率,研究在相同提取条件下,不同加酶量对水解度的影响。

#### 1.3.6 正交实验设计

通过上述单因素实验结果分析,采用  $L_9(3^4)$  正交实验,以 DH 为指标对酶解工艺进行优化。

#### 1.3.7 抗疲劳实验

##### (1) 实验动物的分组

选用昆明种雄性小鼠 100 只,7 周龄,体重 25 g±2 g,置于 25°C 恒温清洁环境下饲养,自然光照,保持通风良好。实验动物分为运动组和不运动组,两大组各分 5 小组,分别为空白组、实验组、对照组,实验组按照鹿血肽样品剂量高、中、低分为 3 组,每组 10 只,各组分开饲喂。第 1 组为实验组高剂量组(灌胃鹿血肽样品剂量 0.6 g),第 2 组为实验组中剂量组(灌胃鹿血肽样品剂量 0.16 g),第 3 组为实验组低剂量组(灌胃鹿血肽样品剂量 0.02 g),第 4 组空白组灌胃等量 0.9% 生理盐水,第 5 组对照组灌胃未经酶解处理的等量鹿血冻干粉,各实验组小鼠自由进食、进水 2 d 后开始灌胃,连续给药 20 d<sup>[12]</sup>。

##### (2) 小鼠抗疲劳游泳实验

将小鼠各剂量组分为运动组和不运动组两组,末次给药 30 min,运动组小鼠置于 25°C 恒温水域中自由游泳,并记录游泳力竭时间。小鼠开始游泳至小鼠头部完全没入水面以下 10 s 不能浮出水面为游泳力竭时间。若小鼠浮在水面上不动,用玻璃棒在其附近搅动,使其运动直至不能动为止,然后进行解剖,测定各项指标:运动组游泳完毕后记录各小组游泳时间;将运动组与不运动组两组小鼠解剖后取小鼠新鲜肝脏以及血液,肝脏经生理盐水漂洗后用滤纸吸干,精确称取肝脏 100 mg,使用肝糖原试剂盒测定肝糖原含量,血液经过离心处理后用于尿素氮试剂盒与全血乳酸试剂盒分别测定尿素氮浓度与全血乳酸含量<sup>[13-14]</sup>。

运动组小鼠游泳时间按公式(2)计算游泳时间延长率:

$$LR\% = \frac{T_1 - T_0}{T_0} \times 100\% \quad (2)$$

式(2)中: LR—延长率,%;  $T_1$ —实验组小鼠游泳时间, min;  $T_0$ —空白组小鼠游泳时间, min。

## 1.4 数据处理

统计结果以平均数±标准偏差表示,应用 SPSS 18.0

和 Origin 2021 统计软件对实验数据进行分析, 组间比较采用配对  $t$  检验分析, 所有指标的测定均重复 3 次, 各组数据之间比较采用单因素方差分析。采用 Microsoft Excel 2010 进行数据处理和作图,  $P < 0.05$  表示具有显著性差异。

## 2 结果与分析

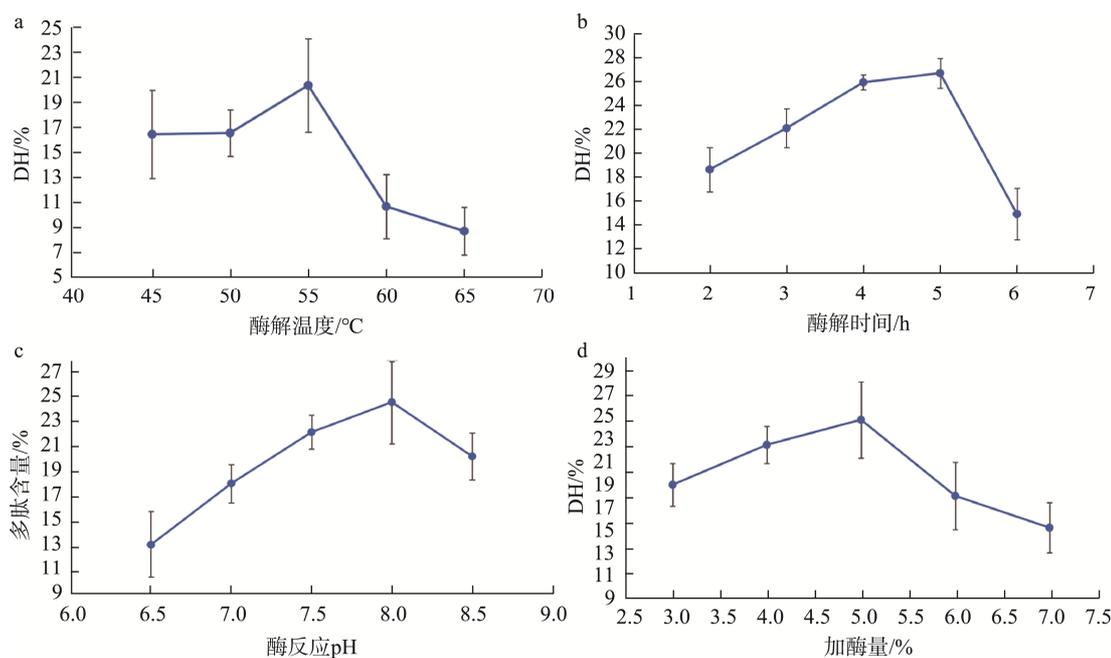
### 2.1 单因素实验结果分析

按 1.3.5 方法, 考察酶解条件对多肽水解度的影响, 结果如图 1 所示。图 1a 显示, 在水解温度较低时水解度随着酶解温度的提高而增加; 但当酶解温度达到一定时, 水解度最高, 如果继续提高酶解温度, 水解度反而下降, 酶解温度控制在 45~55°C 为宜; 图 1b 显示, 酶解时间的延长可以提

高水解度, 但是达到一定时间后, 水解度反而下降, 鉴于提高多肽得率, 酶解时间控制在 4~5 h 为宜; 图 1c 显示, pH 在 7.5~8.0 范围内, 复合酶水解活性高, 鹿血蛋白水解度较高, 这与弱碱提取法实验结果相似<sup>[15-17]</sup>, 从酶活性和鹿血多肽适合的 pH 双重因素考虑, 酶反应 pH 应该调节在 7.5~8.5 之间; 图 1d 显示, 加酶量与水解度呈正相关, 当加酶量达到 5.0% 时, 水解度最高, 当加酶量继续增加时, 水解度呈下降趋势, 因此加酶量控制在 4.5%~5.5% 为宜。

### 2.2 正交实验结果分析

通过  $L_9(3^4)$  正交设计, 研究了鹿血多肽酶解过程中 4 个关键因素: 酶解时间、温度、pH 和加酶量, 以确定最佳的提取工艺参数, 具体参数设计见表 1。



注: a、b、c、d 分别表示酶解温度、酶解时间、酶反应 pH、加酶量对水解度影响。

图 1 酶解条件对水解度的影响

Fig.1 Effects of enzymatic condition on DH

表 1 正交实验因素水平表  
Table 1 Orthogonal experimental factors level table

水平	因素			
	酶解时间 (A)/h	酶解温度 (B)/°C	pH (C)	加酶量 (D)/%
1	4.0	45	7.5	4.5
2	4.5	50	8.0	5.0
3	5.0	55	8.5	5.5

正交实验结果如表 2 可得, 酶解时间、酶解温度、pH、加酶量 4 个因素的极差大小顺序为  $D > B > C > A$ 。当正交实验条件在  $A_1B_3C_1D_3$  时, 此时水解度最高, 但在正交的 9 组数据中没有这种组合, 由结果分析表可看出, 在  $A_1B_3C_3D_3$

条件下水解度最高, 所以需要进行验证实验。在  $A_1B_3C_1D_3$  条件下, 水解度为 29.10%, 在  $A_1B_3C_3D_3$  条件下水解度为 28.02%, 因此确定最佳酶解条件为酶解时间 4.0 h、酶解温度 50°C、pH 7.5、加酶量 5.5%。

### 2.3 鹿血肽氨基酸组成

鹿血酶解肽氨基酸组成分析结果及含量如表 3 所示。由表 3 可知, 共分析出 19 种氨基酸, 其中 Lys 相比较下含量最多, 达到 16.54%; 人体必需氨基酸(Lys、Phe、Val、Leu、Thr、Ile、Met)含量占氨基酸总含量的比重较大, 为 44.47%。Thr、Ile、Met、Leu 低于人体必需氨基酸模式, 其他几种必需氨基酸均高于或与人体模式相近, 这表明鹿血具有较高的营养价值以及保健功能。

表 2  $L_9(3^4)$ 正交实验表  
Table 2  $L_9(3^4)$  orthogonal experimental table

实验号	A/h	B/°C	C	D/%	DH/%
1	1	1	1	1	20.35
2	1	2	2	2	21.25
3	1	3	3	3	28.02
4	2	1	2	3	25.27
5	2	2	3	1	14.80
6	2	3	1	2	24.48
7	3	1	3	2	20.78
8	3	2	1	3	27.17
9	3	3	2	1	19.17
$K_1$	69.62	66.40	72.00	54.32	
$K_2$	64.55	63.75	65.69	66.51	
$K_3$	67.12	71.67	63.60	80.46	
$k_1$	23.21	21.13	24.00	18.11	
$k_2$	21.52	21.25	21.90	22.17	
$k_3$	22.37	23.89	21.30	26.82	
R	1.69	2.76	2.70	8.71	
因素主次	D>B>C>A				
最优方案	$A_1B_3C_1D_3$				

2.4 小鼠游泳时间测定

当身体出现疲劳时,最主要的表现是运动耐力降低,游泳时间是衡量身体运动耐力的最客观指标,因此也是抵抗运动疲劳的重要指标。表 4 可知鹿血多肽高、中、低剂量组游泳时间延长率分别为 159.46%、91.89%、13.51%,说明鹿血多肽可显著影响小鼠游泳耐力。表 4、5 显示通过单因素方差分析,不同处理组小鼠游泳时间存在显著性差异( $F = 165.003, P < 0.05$ )。表 5 说明鹿血多肽的高、中剂量组的小鼠游泳时间有明显提高。以上结果表明鹿血多肽具有抗疲劳作用,能够有效地延长小鼠游泳耐力。

表 3 鹿血肽氨基酸组成及含量  
Table 3 Amino acid composition and content of deer blood peptide

氨基酸种类	氨基酸含量/%
天冬氨酸(Asp)	4.98
苏氨酸(Thr)*	2.85 (4.0)
丝氨酸(Ser)	2.81
甘氨酸(Gly)	6.62
丙氨酸(Ala)	7.05
谷氨酸(Glu)	2.47
半胱氨酸(Cys)	1.04
胱氨酸	10.32
色氨酸	12.87
甲硫氨酸(Met)*	0.23 (3.5)
缬氨酸(Val)*	5.87 (5.0)
异亮氨酸(Ile)*	0.93 (4.0)
亮氨酸(Leu)*	4.71 (7.0)
酪氨酸(Tyr)	1.06
苯丙氨酸(Phe)*	13.34 (6.0)
赖氨酸(Lys)*	16.54 (5.5)
组氨酸(His)	4.18
精氨酸(Arg)	0.45
脯氨酸(Pro)	3.66
总和	102.52

注: \*为必需氨基酸; 括号内是人体必需氨基酸含量。

表 4 小鼠自由泳时间及延长率  
Table 4 Mouse free swimming time and extension rate

组别	游泳时间/min	延长率/%
空白组	37	-
对照组	77	108.11
鹿血多肽低剂量组	42	13.51
鹿血多肽中剂量组	71	91.89
鹿血多肽高剂量组	96	159.46

注: -表示空白数值。

表 5 鹿血多肽对小鼠游泳时间的 Dunnett's T 检验分析  
Table 5 Dunnett's T-test analysis of the effect of deer blood peptides on mouse swimming time

		多重比较				95%置信区间	
		因变量: 游泳时间					
(I)组别	(J)组别	均值差(I-J)	标准误	显著性	下限	上限	
LSD	对照组	高剂量组	-15.95300*	.77470	.000	-17.5242	-14.3818
		中剂量组	-13.99200*	.77470	.000	-15.5632	-12.4208
		低剂量组	-2.80700*	.77470	.001	-4.3782	-1.2358
	高剂量组	对照组	15.95300*	.77470	.000	14.3818	17.5242
		中剂量组	1.96100*	.77470	.016	.3898	3.5322
		低剂量组	13.14600*	.77470	.000	11.5748	14.7172
	中剂量组	对照组	13.99200*	.77470	.000	12.4208	15.5632
		高剂量组	-1.96100*	.77470	.016	-3.5322	-.3898
		低剂量组	11.18500*	.77470	.000	9.6138	12.7562

表 5(续)

多重比较							
因变量: 游泳时间							
(I)组别	(J)组别	均值差(I-J)	标准误	显著性	95%置信区间		
					下限	上限	
Dunnett's T3	低剂量组	对照组	2.80700*	.77470	.001	1.2358	4.3782
		高剂量组	-13.14600*	.77470	.000	-14.7172	-11.5748
		中剂量组	-11.18500*	.77470	.000	-12.7562	-9.6138
	对照组	高剂量组	-15.95300*	.81536	.000	-18.3764	-13.5296
		中剂量组	-13.99200*	.77057	.000	-16.3192	-11.6648
		低剂量组	-2.80700*	.92157	.039	-5.5078	-1.062
	高剂量组	对照组	15.95300*	.81536	.000	13.5296	18.3764
		中剂量组	1.96100*	.59247	.023	.2178	3.7042
		低剂量组	13.14600*	.77881	.000	10.8416	15.4504
	中剂量组	对照组	13.99200*	.77057	.000	11.6648	16.3192
		高剂量组	-1.96100*	.59247	.023	-3.7042	-.2178
		低剂量组	11.18500*	.73179	.000	8.9874	13.3826
低剂量组	对照组	2.80700*	.92157	.039	.1062	5.5078	
	高剂量组	-13.14600*	.77881	.000	-15.4504	-10.8416	
	中剂量组	-11.18500*	.73179	.000	-13.3826	-8.9874	

注: \*表示均值差的显著性水平为 0.05。

## 2.5 生理指标检测

通过动物抗疲劳实验, 鹿血肽对运动后小鼠具有抗疲劳作用。由表 6 可知小鼠运动高剂量组、运动中剂量组与运动空白组相比具有显著性差异( $P<0.05$ ), 鹿血多肽可明显增加小鼠肝脏中的肝糖原含量<sup>[18]</sup>。

表 6 鹿血多肽对肝脏中肝糖原含量影响  
Table 6 Effects of deer blood polypeptide on hepatic glycogen content

组别	n	肝糖原含量/(mg/g)
不运动空白组	4	9.59±0.50
运动空白组	5	7.31±2.10
运动对照组	5	12.04±5.70
运动低剂量组	5	7.34±2.49
运动中剂量组	5	16.21±4.46*
运动高剂量组	4	22.18±9.70*▲▲

注: \*表示运动各组含量与运动空白组比较具有显著性差异( $P<0.05$ ), ▲表示各运动组含量与不运动空白组比较具有显著性差异( $P<0.05$ ), \*表示各运动剂量组含量与运动对照组比较具有显著性差异( $P<0.05$ ), 其余对照组与运动剂量组含量比较无显著性差异( $P=0.204, P=0.258$ )。

由表 7 可知, 运动高剂量组小鼠尿素氮含量显著提高( $P<0.05$ ), 高剂量鹿血肽明显提高了小鼠的代谢活动, 增强其抗疲劳能力<sup>[19-20]</sup>。

由表 8 可知鹿血肽低剂量组、中剂量组、对照组对比空白组中全血乳酸含量具有显著的差异性( $P<0.05$ ), 可见鹿血多肽可显著升高运动小鼠的全血液中乳酸含量。

表 7 鹿血多肽对尿素氮浓度影响

Table 7 Effects of deer blood peptides on urea nitrogen concentration

组别	n	尿素氮浓度/(mmol/L)
不运动空白组	4	6.69±2.88
运动空白组	5	12.32±3.19
运动对照组	5	8.31±3.57
运动低剂量组	5	8.51±3.20
运动中剂量组	5	12.03±2.31
运动高剂量组	4	25.29±12.70*▲▲

注: \*表示运动各组含量与运动空白组比较具有显著性差异( $P<0.05$ ), ▲表示各运动组含量与不运动空白组比较具有显著性差异( $P<0.05$ ), \*表示各运动剂量组含量与运动对照组比较具有显著性差异( $P<0.05$ ), 其余对照组与运动剂量组含量比较无显著性差异( $P=0.955, P=0.296$ )。

表 8 鹿血多肽对全血乳酸含量影响

Table 8 Effects of deer blood peptides on whole blood lactate content

组别	n	全血乳酸含量/(mmol/L)
不运动空白组	4	17.37±3.52
运动空白组	5	20.21±10.15
运动对照组	5	36.89±7.48*▲
运动低剂量组	5	40.73±14.59*▲
运动中剂量组	5	37.15±13.50*▲
运动高剂量组	4	29.64±7.63

注: \*表示运动各组含量与运动空白组比较具有显著性差异( $P<0.05$ ), ▲表示各运动组含量与不运动空白组比较具有显著性差异( $P<0.05$ ), 运动对照组与各运动剂量组含量比较无显著性差异( $P=0.569, P=0.969, P=0.315$ )。

### 3 讨论与结论

本研究通过超声波-酶协同处理鹿血制备具有抗疲劳活性鹿血肽,通过单因素和正交实验优化酶解工艺条件为:酶解时间 4.0 h、酶解温度 50℃、pH 7.5、加酶量 5.5%的情况下,鹿血多肽得率最高为 29.10%。传统鹿血酒的养生功能由于加工技术落后,没有发挥其最大功效<sup>[21]</sup>。很多活性成分由于分子量大、不易吸收等原因被浪费掉<sup>[22]</sup>。本研究采用超声波-复合酶分解鹿血蛋白,通过调节酶反应条件提高多肽得率,与王宝丽等<sup>[22]</sup>研究结论一致,该方法可以作为鹿源活性肽的主要加工方法<sup>[23]</sup>,可以调节工艺制备具有抗菌、抗氧化、提高免疫力等作用的活性肽<sup>[24-26]</sup>。

经动物实验证实该水解条件下鹿血肽具有较好抗疲劳活性,与对照组比有显著差异。对比未水解鹿血,其能显著降低运动小鼠疲劳生理指标,升高机体代谢乳酸、尿素氮能力,提高动物肝糖原含量。实验动物在疲劳游泳实验过程中,机体会产生不同代谢物质反映其疲劳状态,乳酸和尿素氮是常见检测物质,本实验得到的结论与其他活性物质在动物体内发挥抗疲劳作用后血样、尿样中乳酸和尿素氮变化较为一致<sup>[27-29]</sup>,可以说明酶解后鹿血肽缓解了动物运动疲劳,效果较为显著。上述结果说明经生物酶解技术,鹿血蛋白限制水解后产生具有抗疲劳活性的功能肽,可以作为功能因子开发健康鹿血食品,可以提高鹿血产品品质<sup>[30]</sup>,具有较好的市场开发潜力。

### 参考文献

- [1] 袁相恋, 薄士儒, 李庆杰, 等. 鹿血化学成分和药理作用及其应用研究进展[J]. 经济动物学报, 2011, 15(4): 207-211.
- [2] 王佳雯, 邢冉冉, 葛毅强, 等. 鹿茸物种来源 DNA 条形码鉴定技术研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(10): 3198-3205.
- [3] 韩欢胜, 郭喜明, 徐馨, 等. 鹿血酒种类、功效及加工工艺研究进展[J]. 特种经济动植物, 2021, 24(9): 27-29.
- [4] 张翠侠, 周海妹, 展学孔, 等. 鹿血酒中鹿血多肽提取工艺研究[J]. 中国食品工业, 2021, (10): 126-128.
- [5] 薄士儒, 李昂儒, 王全凯. 鹿血复方口服液的试制[J]. 吉林农业, 2017, 408(15): 54.
- [6] BO SR, LI BR, WANG QK. Trial production of deer blood compound oral liquid [J]. Agric Jilin, 2017, 408(15): 54.
- [7] 刘春娟. 鹿茸和鹿血活性多肽的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2012.
- [8] LIU CJ. A study on active peptides from deer antler and deer blood [D]. Changchun: Jilin University, 2012.
- [9] 曹效海, 王树林, 吴海燕, 等. 藏羊血液多肽制备的工艺研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2016, (15): 27-31.
- [10] CAO XH, WANG SL, WU HY, *et al.* Study on the preparation process of blood peptides from Tibetan sheep [J]. Heilongjiang Anim Sci Vet Med, 2016, (15): 27-31.
- [11] 周庆, 刘学文, 张欣. 酶解猪血制备血球蛋白粉的脱色工艺研究[J]. 食品与机械, 2009, 25(4): 89-91, 120.
- [12] ZHOU Q, LIU XW, ZHANG X. Study on the decolorization process of enzymatic hydrolysis of pig blood to prepare hemoglobin powder [J]. Food Mach, 2009, 25(4): 89-91, 120.
- [13] 尹馨雪. 鹿血酶解肽生物活性及鹿血肽产品开发研究[D]. 长春: 长春中医药大学, 2022.
- [14] YIN XX. Research on the biological activity of deer blood enzymatic hydrolysis peptide and the development of deer blood peptide products [D]. Changchun: Changchun University of Traditional Chinese Medicine, 2022.
- [15] 李晓杰, 李富强, 朱丽萍, 等. 生物活性肽的制备与鉴定进展[J]. 齐鲁工业大学学报, 2021, 35(1): 23-28.
- [16] LI XJ, LI FQ, ZHU LP, *et al.* Progress in the preparation and identification of bioactive peptides [J]. J Qilu Univ Technol, 2021, 35(1): 23-28.
- [17] 高冷, 刘达, 谢冠男. 响应面法优化 lu'xu 鹿血肽的制备工艺[J]. 化学工程师, 2011, (11): 64-66.
- [18] GAO L, LIU D, XIE GN. Response surface methodology to optimize the preparation process deer blood peptide [J]. Chem Eng, 2011, (11): 64-66.
- [19] 杜小琴, 夏炎, 张小琴, 等. 鹿血的酶解工艺优化及其抗运动疲劳活性评价[J]. 安徽农业大学学报, 2021, 48(3): 518-522.
- [20] DU XQ, XIA Y, ZHANG XQ, *et al.* Optimization of enzymatic hydrolysis process of deer blood and evaluation of its anti exercise fatigue activity [J]. J Anhui Agric Univ, 2021, 48(3): 518-522.
- [21] 施鹏, 吴鑫, 童国强, 等. 缓解体力疲劳功能白酒的抗疲劳活性分析研究[J]. 酿酒科技, 2022, (10): 26-30.
- [22] SHI P, WU X, TONG GQ, *et al.* Analysis and study on the anti fatigue activity of Baijiu with the function of alleviating physical fatigue [J]. Liquor-Mak Sci Technol, 2022, (10): 26-30.
- [23] SRIDHAR K, INBARAJ BS, CHEN BH. Recent developments on production, purification and biological activity of marine peptides [J]. Food Res Int, 2021, 147: 110468-110485.
- [24] 黄开华, 周艳明, 吴畏, 等. 胰蛋白酶酶解鹿血条件的优化[J]. 湖北农业科学, 2007, (2): 302-305.
- [25] HUANG KH, ZHOU YM, WU W, *et al.* Optimization of conditions for trypsin enzymatic hydrolysis of deer blood [J]. Hubei Agric Sci, 2007, (2): 302-305.
- [26] 沈雨佳. 鹿血多肽的制备、体内外免疫调节活性及其机制研究[D]. 长春: 吉林大学, 2023.

- SHEN YJ. Preparation, *in vivo* and *in vitro* immune regulatory activity, and mechanism of deer blood peptides [D]. Changchun: Jilin University, 2023.
- [17] LI JJ, LI Y, ZHANG XY, *et al.* Anti-fatigue peptides from the enzymatic hydrolysates of *Cervus elaphus* blood [J]. *Molecules*, 2021, 26: 7164–7177.
- [18] 王祥山, 朱映黎, 吕美豫, 等. 鹿鞭对肾阴虚及肾阳虚小鼠抗疲劳作用及PI3K-Akt通路机制研究[J]. *中国中药杂志*, 2023, 48(11): 3032–3038. WANG XS, ZHU YL, LV MY, *et al.* Anti-fatigue effect of Lubian on kidney yin deficiency and kidney Yang deficiency mice and mechanism based on PI3K-Akt pathway [J]. *China J Chin Mater Med*, 2023, 48(11): 3032–3038.
- [19] 张凯月. 鹿胎肽对骨髓造血机能与免疫功能的影响[D]. 长春: 长春中医药大学, 2021. ZHANG KY. The effect of deer fetal peptide on bone marrow hematopoietic function and immune function [D]. Changchun: Changchun University of Traditional Chinese Medicine, 2021.
- [20] WANG S, ZHONG LC, ZHAI XC, *et al.* Antioxidant properties of deer blood hydrolysate and the possible mode of action [J]. *Adv Mater Res*, 2013, 2203: 634–638.
- [21] 郑周田, 赵东. 鹿血酒生产工艺和保健功能研究进展[C]. 中国畜牧业协会. 2013 中国鹿业进展, 2013. ZHENG ZT, ZHAO D. Research progress on the production technology and health function of deer blood wine [C]. *China Animal Husbandry Association. 2013 Progress in Deer Industry in China*, 2013.
- [22] 王宝丽, 张开屏, 刘嘉琪, 等. 发酵肉制品中生物活性肽的研究进展[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(6): 350–359. WANG BL, ZHANG KP, LIU JQ, *et al.* Research progress on bioactive peptides in fermented meat products [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2021, 21(6): 350–359.
- [23] 何贵祥, 赵全民, 赵岩, 等. 鹿源生物活性肽的研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(9): 2916–2923. HE GX, ZHAO QM, ZHAO Y, *et al.* Research progress of deer-derived bioactive peptides [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 13(9): 2916–2923.
- [24] 刘毅, 张君菡, 刘永峰, 等. 响应曲面法优化鹿血多肽制备工艺[J]. *食品科技*, 2016, 41(5): 136–140. LIU Y, ZHANG JH, LIU YF, *et al.* Optimization of the preparation process of deer blood peptides using response surface methodology [J]. *Food Sci Technol*, 2016, 41(5): 136–140.
- [25] LI D, REN JW, ZHANG T, *et al.* Anti-fatigue effects of small-molecule oligopeptides isolated from *Panax quinquefolium* L. in mice [J]. *Food Funct*, 2018, 9(8): 4266–4273.
- [26] LIU X, CHEN X, XIE L, *et al.* Sulfated Chinese yam polysaccharide enhances the immunomodulatory activity of RAW 264.7 cells via the TLR4-MAPK/NF-kappaB signaling pathway [J]. *Food Funct*, 2022, 13(3): 1316–1326.
- [27] ZHANG Y, ZHANG H, GHOSH D, *et al.* Just how prevalent are peptide therapeutic products? A critical review [J]. *Int J Pharmaceut*, 2020, 587: 119491–119509.
- [28] CUI J, SHI C, XIA P, *et al.* Fermented deer blood ameliorates intense exercise-induced fatigue via modulating small intestine microbiota and metabolites in mice [J]. *Nutrients*, 2021, 13(5): 1543–1557.
- [29] ZHANG WN, GONG LL, LIU Y, *et al.* Immunoenhancement effect of crude polysaccharides of *Helvella leucopus* on cyclophosphamide-induced immunosuppressive mice [J]. *J Funct Foods*, 2020, 69: 103942–103949.
- [30] 陈艳. 鹿血酒品质分析及抗疲劳功能的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2010. CHEN Y. Quality analysis and antifatigue effect of deer blood wine [D]. Nanjing: Nanjing Agriculture University, 2010.

(责任编辑: 张晓寒 于梦娇)

## 作者简介



刘超, 博士, 教授, 主要研究方向为生物活性物质分离制备及高值化利用。  
E-mail: liuchaocarrol@163.com



李凤林, 博士, 教授, 主要研究方向为功能性食品及食品营养健康方向研究。  
E-mail: 568169115@qq.com