

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240120003

模拟酶解海参蛋白制备抗氧化肽及其 抗疲劳活性研究

杜战稳¹, 陈嘉^{2*}

(1. 西南大学体育学院, 重庆 400715; 2. 西南大学食品科学学院, 重庆 400715)

摘要: **目的** 采用虚拟酶解和传统酶法相结合制备海参抗氧化肽, 并进一步考察其抗疲劳功效。**方法** 以海参为原料, 借助在线数据库进行虚拟酶解, 对水溶性、生物毒性、致敏性等特性预测, 筛选制备抗氧化肽的最佳蛋白酶, 通过单因素和响应面实验考察反应温度、时间、加酶量、pH、底物浓度对海参蛋白水解度、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)自由基清除率的影响, 并确定最佳的抗氧化肽制备工艺参数, 进一步采用负重游泳实验小鼠模型探讨其抗疲劳功效。**结果** 经过多轮筛选最终获得亲水性、安全性、稳定性较好的蛋白酶为蛋白酶 K, 在反应时间 2.0 h, 加酶量 350 U/g 的条件下, 最佳的工艺参数为温度 50°C、pH 6.4、底物浓度 1.0%, 此条件下的 DPPH 自由基清除率为 64.2%±1.1%, 与理想值接近。抗疲劳功效研究表明海参抗氧化肽对小鼠体重影响不大, 能够明显延长负重游泳时间($P<0.05$), 显著降低血清尿素氮、乳酸含量, 增加肝糖原、肌糖原储备量($P<0.05$), 提升运动耐力。**结论** 通过虚拟酶解和实际酶解相结合的方法制备的海参抗氧化肽具有明显的抗疲劳作用。

关键词: 海参; 虚拟; 抗氧化肽; 酶解; 抗疲劳

Preparation of antioxidant peptides from simulated enzymatic hydrolysis of sea cucumber protein and their anti-fatigue activity

DU Zhan-Wen¹, CHEN Jia^{2*}

(1. School of Physical Education, Southwest University, Chongqing 400715, China;
2. School of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China)

ABSTRACT: Objective To prepare sea cucumber antioxidant peptides by combining virtual enzymatic hydrolysis and traditional enzymatic methods, and further investigate their anti fatigue effects. **Methods** Using sea cucumber as raw material, virtual enzymatic hydrolysis was carried out using an online database to predict and screen the best protease for preparing antioxidant peptides based on characteristics such as water solubility, biological toxicity, and allergenicity. The effects of reaction temperature, time, enzyme dosage, pH, and substrate concentration on sea cucumber protein hydrolysis degree and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) clearance rate were investigated through single factor and response experiments. The optimal process parameters for preparing antioxidant peptides were determined, and their anti fatigue effects were further explored using a load swimming mouse model. **Results** After multiple rounds of screening, the protease K with good hydrophilicity, safety, and stability was finally obtained.

*通信作者: 陈嘉, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品营养学。E-mail: swaumyh@126.com

*Corresponding author: CHEN Jia, Ph.D, Professor, School of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China. E-mail: swaumyh@126.com

Under the conditions of reaction time of 2.0 hours and enzyme addition of 350 U/g, the optimal process parameters were temperature 50°C, pH 6.4, and substrate concentration of 1.0%. The DPPH clearance rate obtained under these conditions was 64.2%±1.1%, which was close to the ideal value, indicating that the feasibility of the process was good. Research on the anti fatigue effect showed that sea cucumber antioxidant peptides had little effect on mouse body weight, could significantly prolong weight-bearing swimming time ($P<0.05$), significantly reduced serum urea nitrogen and lactate content, increased liver glycogen and muscle glycogen reserves ($P<0.05$), and improved exercise endurance. **Conclusions** The sea cucumber antioxidant peptide prepared by combining virtual enzymatic hydrolysis and actual enzymatic hydrolysis has a significant anti fatigue effect.

KEY WORDS: sea cucumber; virtual; antioxidant peptides; enzymatic hydrolysis; anti fatigue

0 引言

海参又名刺参、海地瓜, 隶属于棘皮动物门海参纲, 主要分布于我国的黄海、渤海、东海等沿海地区, 全球的海参约有 1700 多种, 大多来自于亚太地区, 我国约有 140 多种, 可食海参约 20 种^[1-2]。海参是一种高蛋白、低脂肪、低胆固醇食物, 营养价值和保健价值极高^[3], 深受消费者喜爱。海参富含蛋白质、不饱和脂肪酸、多糖、皂苷、维生素及矿物质, 其蛋白含量高达 63.6%^[4], 集中于体壁部位, 胶原蛋白和卵黄蛋白是其主要的组成成分, 其中胶原蛋白约占总蛋白的 70%^[5-6]。研究表明经常食用海参蛋白能够降低高血压、糖尿病、心血管疾病等慢性疾病的发病风险^[2]。

近年来, 从水产品中获取活性肽成为提高海洋资源利用率的重要研究方向, 生物活性肽具有来源广、性温和、易吸收、副作用低等优点, 故其提取工艺和活性研究成了目前食品领域的研究热点, 尤其是低分子量生物肽表现出更高的活性、稳定性及特异性^[7]。海参作为优质蛋白的良好来源, 具有巨大的潜在应用价值, 酶法水解是海参肽常用的制备方法, 利用酶解技术将海参蛋白降解为小分子肽段, 获得活性水解产物^[8], 但不同的酶由于酶切位点不同, 可能获得生物活性多样的水解产物, 此外利用传统的方法筛选活性小分子肽周期较长、成本较高, 因此, 酶的筛选方法探索对于活性多肽的制备至关重要。随着生物信息学的发展, 生物信息工具为已知蛋白质氨基酸序列的虚拟筛选提供了一种新兴技术, 利用虚拟酶解方法预测肽段生物活性及安全性, 达到缩短研发时长, 节省成本的目的, 使研究过程简单、系统、可控^[9], 于志鹏等^[10]利用虚拟酶解方法以鸡蛋蛋白为原料, 筛选 ACE 抑制肽, 并进一步对其结构进行鉴定。曲亭菲等^[11]利用生物信息学结合分子对接能够快速筛选刺参胶原蛋白中 DPP-IV 抑制肽。抗氧化肽是生物活性肽研究的热点之一, 但目前鲜少有应用于海参多肽的研究中。

目前已经有大量研究表明海参蛋白具有抗氧化作用^[12], 本研究以海参为原料进行抗氧化肽制备, 通过计算机虚拟筛选获取最佳的海参蛋白水解酶, 以水解度、1,1-二苯基

-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)自由基清除率为指标, 在单因素基础上, 通过响应面法优化抗氧化肽制备工艺, 并进一步对其抗疲劳活性进行了探讨, 为海参资源高值化应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

小鼠: 无特定病原体级雄性小鼠, 购买自山西医科大学动物实验中心, 体重为(20.0±2.0) g, 所有小鼠生活在明暗交替(循环周期 12 h), 室温 20~22°C, 湿度为 40%~60%, 适应性喂养 1 周。干海参: 市售。

蛋白酶 K (20 mg/mL, 上海佰利莱生物科技有限公司); DPPH(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 肝糖原、肌糖原试剂盒、血清尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、血乳酸(blood lactic acid, BLD)试剂盒(南京建成生物工程研究所);

1.2 仪器与设备

FA 2004 电子天平(精度 0.1 mg, 上海衡际科学仪器有限公司); HH-4S 恒温水浴锅(上海捷呈实验仪器有限公司); LanJ-40AL 超声波清洗机(广东蓝鲸超声波清洗技术有限公司); HD-LG10A 真空冷冻干燥机(山东霍尔德电子科技有限公司); TG18-WS 台式高速离心机[拓赫机电科技(上海)有限公司]; UV1800 紫外可见分光光度计(上海美析仪器有限公司); YP-96A 全自动多功能酶标仪(山东优云谱光电科技有限公司); PHS-3C 型 pH 计(青岛明博环保科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 海参蛋白的模拟酶解

参考文献[11]方法, 略有修改。采用数据库 UniProt (<https://www.uniprot.org/>)获得海参蛋白氨基酸序列, 选取胶原蛋白(Accessions: A0A119W676)、卵黄蛋白(Accessions: C4TQH8)为原料, 氨基酸数分别为 1400、1345。采用 PeptideCutter 在线软件(https://web.expasy.org/peptide_cutter/)进行模拟酶解, 选择水解度较高的蛋白酶, 并挑选二肽以上

序列。

1.3.2 预测肽段的水溶性、毒性及致敏性

将 1.3.1 获得的肽段整理, 去除重复性, 将水解后的小分子蛋白肽输入 Peptide Ranker(<http://distilldeep.ucd.ie/PeptideRanker/>)网址, 预测小分子的生物活性评分, 预测值大于 0.5 代表具有一定的生物活性, 在此基础上, 分别利用 Innovagen (<http://www.innovagen.com/proteomics-tools/>)在线软件预测水溶性, 采用 ToxinPred (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/toxinpred/design.php>)在线软件预测毒性, 通过 AllerTOP (<http://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/>)在线软件预测其致敏性, 通过系列的筛选选取水解海参蛋白较合适的蛋白酶。

1.3.3 海参多肽的制备

干海参体壁粉碎过 100 目筛网, 准确称量一定量海参干粉, 配制浓度 1% 的水溶液, 设置水浴锅温度 60℃, 利用 2 mol/L 的 HCl 或 50% 质量浓度的 NaOH 调整反应液 pH 6, 加入一定量酶, 维持恒温进行酶解反应, 反应 2 h 后, 沸水浴 10 min, 冷却、离心(4000 r/min, 15 min), 取上清液, 冷冻干燥。

1.3.4 蛋白水解度的测定

参考马建伟^[13]方法测定。海参酶解液中氨基酸态氮利用 GB 5009.235—2016《食品安全国家标准 食品中氨基酸态氮的测定》法测定; 海参总氮测定按照 GB 5009.5—2016《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》; 按照式(1)计算水解度。

$$\text{水解度} / \% = \frac{\text{氨基酸态氮含量}}{\text{总氮含量}} \times 100\% \quad (1)$$

1.3.5 抗氧化能力的测定

DPPH 自由基清除率的测定: 参照张梦雪等^[14]的测定方法并稍作调整。分别吸取 2 mL 不同实验组的海参酶解产物上清液于试管中, 加入 2 mL 以 95% 的乙醇配制的 0.1 mmol/L 的 DPPH 溶液, 混匀, 空白组吸取 2 mL 海参酶解产物上清液加入 2 mL 95% 乙醇, 混匀, 对照组吸取 2 mL 蒸馏水加入 2 mL 0.1 mmol/L 的 DPPH 溶液, 室温下静置 30 min, 在波长 517 nm 下测定吸光值。通过式(2)计算不同样品对 DPPH 自由基的清除率。

$$\text{DPPH清除率} / \% = \frac{A_0 - (A_2 - A_1)}{A_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中: A_0 为对照组吸光值; A_1 为空白组吸光值; A_2 为样品组吸光值。

1.3.6 单因素实验

按照 1.3.1 制备海参多肽酶解液, 取上清液, 测定水解度、DPPH 自由基清除率。固定底物浓度 1%, 水浴温度 60℃, 加酶量 350 U/g, pH 调整为 8 的条件, 维持反应 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h, 考察反应时间对水解度、DPPH 自由基清除率的影响; 固定底物浓度 1%, pH 为 8, 加酶量

350 U/g, 分别在 40、50、60、70、80℃ 下反应 2 h, 考察反应温度对水解度、DPPH 自由基清除率的影响; 固定底物浓度 1%, 维持温度 60℃, 加酶量 350 U/g, 调整 pH 为 5、6、7、8、9, 反应 2 h, 考察 pH 对水解度、DPPH 自由基清除率的影响; 固定底物浓度 1%, 温度 60℃, pH 为 8, 改变加酶量 250、350、450、550、650 U/g, 考察加酶量对水解度、DPPH 自由基清除率的影响; 设置不同的底物浓度 (0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%), 固定水浴温度 60℃, pH 为 8, 加酶量 350 U/g, 反应 2 h, 研究底物浓度对水解度、DPPH 自由基清除率的影响。

1.3.7 响应面设计

以反应温度、底物浓度、pH 为因变量, 以 DPPH 自由基清除率为响应值, 利用 Design-Expert 软件设计响应面优化实验, 见表 1。

表 1 响应面因素与水平
Table 1 Response surface factors and levels

水平	A: 反应温度/°C	B: 底物浓度/%	C: pH
-1	40	0.5	5
0	50	1	6
1	60	1.5	7

1.3.8 抗疲劳活性研究

(1) 动物分组及给药

参考余毅豪^[15]方法, 对 60 只小鼠进行基础饲料喂养 7 d, 按照体重随机分为 4 组, 对照组(CON 组): 灌胃等量生理盐水; 低剂量组(L-Scp 组): 灌胃海参小分子肽(以 0.5% 羧甲基纤维素钠配制悬浮液)0.7 mg/(g·d); 中剂量组(M-Scp 组): 1.4 mg/(g·d); 高剂量组(H-Scp 组): 2.8 mg/(g·d), 每次灌胃 2 mL。整个实验, 小鼠自由进食, 适宜条件下饲养, 连续灌胃 30 d, 每隔 2 d 测定小鼠平均体重并记录。

(2) 负重游泳实验

参考李西婷等^[16]方法, 末次给药 30 min 后, 在小鼠尾部系上体重 5% 的铅块, 放置于水深 40 cm、水温 30℃±0.5℃ 的游泳箱中, 从小鼠开始游泳计时, 以小鼠头部没入水面 8 s 不能浮出为结束点, 记录游泳时间。

(3) 生化指标的测定

末次给药 30 min 后, 进行负重游泳实验, 实验结束后, 捞出小鼠, 擦拭干净毛发, 休息 30 min, 进行眼球取血, 4℃、5000 r/min 下离心 15 min, 取血清, 利用 BUN 试剂盒、BLA 试剂盒测定尿素氮、乳酸含量。将小鼠处死, 取小鼠肝脏和腿部腓肠肌, 用生理盐水漂洗干净, 按照试剂盒方法测定肌糖原、肝糖原含量。

1.4 数据处理

利用 Origin 8.0 作图, 利用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析, 组间差异分析采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 具有显著性。

2 结果与分析

2.1 海参模拟酶解结果

通过模拟酶解可知, 针对胶原蛋白, 使用蛋白酶 K 酶解共获得多肽 281 种, 使用嗜热菌蛋白酶酶解共得到多肽 174 种, 使用胃蛋白酶(pH>2)酶解共获得 75 种; 针对卵黄蛋白, 使用蛋白酶 K 酶解共获得多肽 331 种, 使用嗜热菌蛋白酶酶解共得到多肽 251 种, 使用胃蛋白酶(pH>2)酶解共获得 180 种。因此, 蛋白酶 K 在水解胶原蛋白和卵黄蛋

白时均获得了更多的蛋白多肽。

2.2 活性肽的水溶性、毒性和致敏性预测

通过不同蛋白酶模拟水解海参蛋白得到小分子肽段, 分别针对小分子活性肽的生物活性(评分>0.5)、水溶性、毒性及致敏性等进行多轮筛选, 结果见表 2。由表可知, 经过酶解模拟共获得 66 条水溶性良好、无毒副作用、非致敏性小分子多肽, 其中使用蛋白酶 K 水解海参蛋白的酶解位点最多, 小分子活性肽段也显著高于另外两种酶, 通过模拟

表 2 虚拟筛选海参蛋白源多肽
Table 2 Virtual screening of sea cucumber protein source peptides

蛋白酶	蛋白源	肽段序列	评分	水溶性	毒性	致敏性
蛋白酶 K	胶原蛋白	PGPPGPPGRRGGPGDRGPL	0.962351	好	无	非致敏
		GPRGF	0.962121	好	无	非致敏
		GRQGSQGP GPPGPPGPPGT	0.826472	好	无	非致敏
		NNRF	0.769817	好	无	非致敏
		PGPRGGY	0.694589	好	无	非致敏
		RGL	0.678651	好	无	非致敏
		RGPA	0.618519	好	无	非致敏
		GSGDL	0.568202	好	无	非致敏
		GQRGMPGA	0.563222	好	无	非致敏
		GNPGSQGGPGPQGA	0.548745	好	无	非致敏
		GDL	0.546664	好	无	非致敏
		MRDY	0.544697	好	无	非致敏
		嗜热菌蛋白酶	胶原蛋白	GSPGRPGSA	0.51328	好
AGPPGPPG	0.923232			好	无	非致敏
FYCRN	0.894886			好	无	非致敏
LRGP	0.691045			好	无	非致敏
MDG	0.676555			好	无	非致敏
ATGPQGQQSRGERGPEGQQGQ	0.642051			好	无	非致敏
ARG	0.563547			好	无	非致敏
LEF	0.502781			好	无	非致敏
KGPVMPAG	0.623199			好	无	非致敏
CSRHRRTLL	0.546525			好	无	非致敏
胃蛋白酶 (pH>2)	胶原蛋白	KDINNRF	0.536743	好	无	非致敏
		RW	0.978386	好	无	非致敏
		DPF	0.955551	好	无	非致敏
		SF	0.948796	好	无	非致敏
		PPPL	0.940951	好	无	非致敏
		PNF	0.937503	好	无	非致敏
		GSW	0.933634	好	无	非致敏
蛋白酶 K	卵黄蛋白 2	ML	0.894564	好	无	非致敏
		PGL	0.855192	好	无	非致敏

表 2(续)

蛋白酶	蛋白源	肽段序列	评分	水溶性	毒性	致敏性
		GNDF	0.807265	好	无	非致敏
		PRL	0.80628	好	无	非致敏
		GY	0.741592	好	无	非致敏
		SQW	0.740276	好	无	非致敏
		MA	0.693293	好	无	非致敏
		PGA	0.674335	好	无	非致敏
		DKF	0.660518	好	无	非致敏
		KDF	0.632642	好	无	非致敏
		RCI	0.625113	好	无	非致敏
		PRI	0.619307	好	无	非致敏
		KNF	0.616999	好	无	非致敏
		GSRL	0.600948	好	无	非致敏
		CSPDI	0.592677	好	无	非致敏
		GHL	0.588729	好	无	非致敏
		RMCV	0.574224	好	无	非致敏
		MKNRML	0.566966	好	无	非致敏
		NPMRV	0.564584	好	无	非致敏
		NSNF	0.552389	好	无	非致敏
		PRPV	0.538183	好	无	非致敏
		PA	0.53447	好	无	非致敏
		KKF	0.532541	好	无	非致敏
		DGL	0.525785	好	无	非致敏
		FDW	0.989141	好	无	非致敏
		FWKK	0.857864	好	无	非致敏
		FNPDT	0.604902	好	无	非致敏
嗜热菌蛋白酶		IKPSTHDWVKERRH	0.57767	好	无	非致敏
		MGRK	0.574557	好	无	非致敏
		FDYS	0.533473	好	无	非致敏
		LEF	0.502781	好	无	非致敏
		RW	0.978386	好	无	非致敏
		YAPRL	0.757587	好	无	非致敏
胃蛋白酶 (pH>2)		FNPDT	0.604902	好	无	非致敏
		GSRL	0.600948	好	无	非致敏
		CQ	0.540359	好	无	非致敏
		WKK	0.508406	好	无	非致敏

酶解,可以在传统酶解的基础上,使过程更加具有目标性,更高效。综上所述,蛋白酶 K 在水解海参蛋白方面更具有优势,蛋白酶 K 是溶酶体半胱氨酸蛋白酶,研究表明蛋白酶 K 是导致海参自溶的主要原因之一^[17]。

2.3 单因素实验结果

不同影响因素对海参酶解产物水解度、DPPH 自由基清除率的影响见图 1。如图 1(A)所示,随着温度的升高,海参蛋白水解度逐渐升高,在 50℃时水解度最大,之后水解

度降低, 原因可能是在 40~50℃时, 随着温度升高, 酶活力逐渐变强, 在 50℃时酶的活力最佳, 继续升温会导致酶变性, 反应减弱, 抗氧化肽产量下降, 因此随着温度升高 DPPH 自由基清除率呈现先增加后降低的趋势, 在 50℃时清除率最高, 之后, 随着酶活降低, 抗氧化肽数量变少, 清除率降低。因此, 50℃是制备抗氧化肽较合适的温度, 季晓彤等^[18]研究发现蛋白酶 K 在 50℃时酶活较高, 这与本研究结果相一致。

不同时间对水解率、DPPH 自由基清除率的影响见图 1(B), 在 1.0~2.0 h 内, 海参蛋白水解度呈增加趋势, 在 2 h 时达到最大, 之后变化幅度较小, 在 2.5~3.0 h 内出现一定程度的增长, 原因可能是 1.0~2.0 h 之间, 底物与酶充分结合, 水解逐渐增加, 到 2.0 h 时酶的结合达到饱和, 之后水解度变化不大, 在 2.5 h 时产物出现过度水解^[19], 导致抗氧化肽数量减少, 对 DPPH 自由基清除作用变弱, 此外考虑到时间成本因素, 因此本研究选择 2.0 h 作为最佳反应时间, 不再参与后续的优化实验。

不同加酶量对水解度、DPPH 自由基清除率的影响见图 1(C), 随着加酶量的增加, 海参蛋白水解度逐渐升高, 在 350 U/g 时最高, 之后水解度略有增加, 表明在 350 U/g 时, 酶和底物之间结合达到饱和状态, 加酶量继续增加可能导致产物过水解, 产物中的部分抗氧化肽结构被破坏, 对 DPPH 自由基清除能力下降, 因此, 在 350 U/g 之后, 抗氧化能力略有下降, 因此本研究综合考虑成本因素将 350 U/g 作为最佳加酶量, 不参与后续的优化实验。

不同 pH 对水解度、DPPH 自由基清除率的影响见图

1(D), 在 pH 5~8 之间, 海参蛋白的水解度逐渐增加, 在 pH 6 时水解度、DPPH 自由基清除率均达到最高, 之后明显降低, pH 对蛋白酶 K 的影响, 一方面影响酶的空间结构, 导致失活, 一方面酸碱度影响酶与底物的结合位点的亲和力^[20], 因此蛋白酶 K 的最适 pH 为 6, 有研究表明在 pH 5 时蛋白酶 K 的酶活最高^[21], AIBE 等^[22]发现兔子蛋白酶 K 水解海参的最适 pH 为 5.5, 力俊琛等^[23]以鸽子血红蛋白为原料制备抗氧化肽, 发现 pH 8 时水解度最大, 可能蛋白酶 K 活性与来源及反应底物种类均有一定关联, 需要进一步研究论证。

不同底物浓度对水解度、DPPH 自由基清除率的影响见图 1(E), 底物浓度在 0.5%~1.0% 范围内, 水解度、DPPH 自由基清除率均增加, 在 1.0% 时达到最大值, 之后随着底物浓度增加水解度、DPPH 自由基清除率不在增加, 反而降低, 可能是当底物浓度较低时, 酶切位点大量暴露, 水解度逐渐增大, 随着底物浓度进一步增加, 酶解液浓度增大, 增大底物与酶结合位点接触的阻力^[24], 酶解抗氧化肽含量减少, 导致 DPPH 自由基清除率降低, 因此, 选择 1.0% 作为底物浓度进一步优化的重点考察因素水平。

2.4 响应面优化实验

2.4.1 响应面实验结果与方差分析

在单因素实验基础上, 固定反应时间为 2.0 h, 加酶量为 350 U/g, 以温度(A)、底物浓度(B)、pH (C)为考察指标, 以 DPPH 自由基清除率为响应指标, 采用响应面法进一步优化抗氧化肽制备工艺, 结果见表 3。

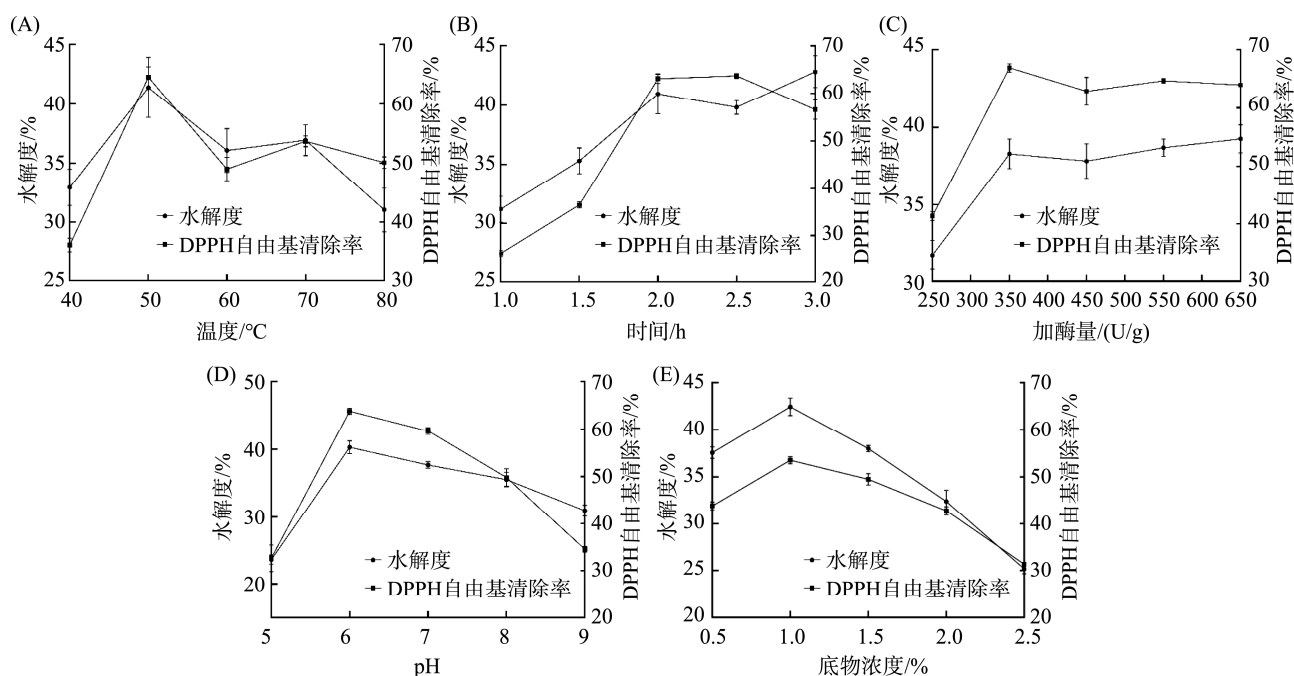


图1 不同因素对水解度、DPPH自由基清除率的影响

Fig.1 Influences of different factors on hydrolysis degrees and DPPH free radical clearance rates

表 3 实验设计及结果
Table 3 Experimental design and results

序列	A: 温度	B: 底物浓度	C: pH	DPPH 自由基清除率/%
1	0	0	0	63.03
2	-1	-1	0	40.25
3	0	0	0	63.83
4	0	0	0	63.70
5	0	1	-1	33.72
6	-1	0	-1	35.43
7	0	0	0	63.63
8	0	1	1	53.72
9	-1	1	0	38.06
10	1	0	1	45.58
11	0	-1	-1	44.30
12	0	0	0	63.28
13	1	1	0	33.56
14	-1	0	1	47.54
15	0	-1	1	47.849
16	1	0	-1	31.32
17	1	-1	0	35.78

利用 Design-Expert 12.0 软件对以上 17 组实验结果进行分析, 得到二次多项式回归方程: $Y = -613.82 + 15.25A + 35.05B + 88.58C - 0.0018AB + 0.0536AC + 8.23BC - 0.1576A^2 - 43.3B^2 - 7.77C^2$, 由表 4 可知, 模型 $P < 0.0001$, 极显著, 失拟

项为不显著, 表明该方程拟合性良好, 调整后的 $R^2_{adj} = 0.9976$, 代表该模型能够解释 99.76% 该酶水解海参蛋白制备抗氧化肽的变化。由表 4 可知, 一次项 A、B、C 均显著 ($P < 0.05$), 其中 A、C 为极显著 ($P < 0.01$), 二次项中 BC、 A^2 、 B^2 、 C^2 为极显著 ($P < 0.01$)。由 F 值大小可以判断 A、B、C 对 DPPH 自由基清除率的影响强弱次序为: 温度 > pH > 底物浓度。通过对拟合方程求解, 得到最佳的工艺参数为: 温度 49.47°C、底物浓度 1.01%、pH 6.43, 预期的 DPPH 自由基清除率为 64.8%。为了便于开展结果验证实验, 化整取零, 取温度 50°C, 底物浓度 1.0%, pH 6.4, 重复实验 3 次, 得到 DPPH 自由基清除率为 64.2%±1.1%, 与理想值相差较小, 因此该模型能够较好的预测海参蛋白抗氧化肽的制备工艺。

2.4.2 交互作用分析

不同因素之间的交互作用见图 2, 由 3D 曲面图可知, 开口向下, 说明存在最大值, 由等高线图可知, 均为椭圆形, 表明两两交互作用显著。温度与底物浓度之间的交互作用见图 2A, 从等高线图可知, 温度对应的图形颜色(红色→蓝色)变化较快, 表明温度对 DPPH 自由基清除率的影响更强。温度和 pH 之间的交互作用见图 2B, 从等高线图可知, 相比 pH, 温度方向的图形颜色变化较快, 曲面图坡度更陡, 表明温度对 DPPH 自由基清除率的影响更强。底物浓度和 pH 之间的交互作用见图 2C, 从等高线图可知, 底物浓度方向的图形颜色变化更快, 因此, 底物浓度对 DPPH 自由基清除率的影响更强。综上所述, 不同因素对 DPPH 自由基清除率的影响强弱次序为: 温度 > pH > 底物浓度, 这与方差分析中 F 的结果一致。

表 4 模型方差分析
Table 4 Analysis of variance of the model

来源	平方和	df	均方	F	P	显著性
模型	2399.67	9	266.63	747.50	< 0.0001	显著
A-温度	651.89	1	651.89	1827.59	< 0.0001	**
B-底物浓度	3.00	1	3.00	8.40	0.0230	*
C-pH	200.07	1	200.07	560.90	< 0.0001	**
AB	0.0003	1	0.0003	0.0009	0.9766	
AC	1.15	1	1.15	3.23	0.1155	
BC	67.67	1	67.67	189.73	< 0.0001	**
A^2	1045.26	1	1045.26	2930.41	< 0.0001	**
B^2	493.36	1	493.36	1383.15	< 0.0001	**
C^2	254.24	1	254.24	712.76	< 0.0001	**
残差	2.50	7	0.3567			
失拟项	2.06	3	0.6876	6.34	0.0533	不显著
纯误差	0.434	4	0.1085			
总和	2402.16	16				

注: **代表显著性为极显著 ($P < 0.01$); *代表显著性为显著 ($P < 0.05$)。

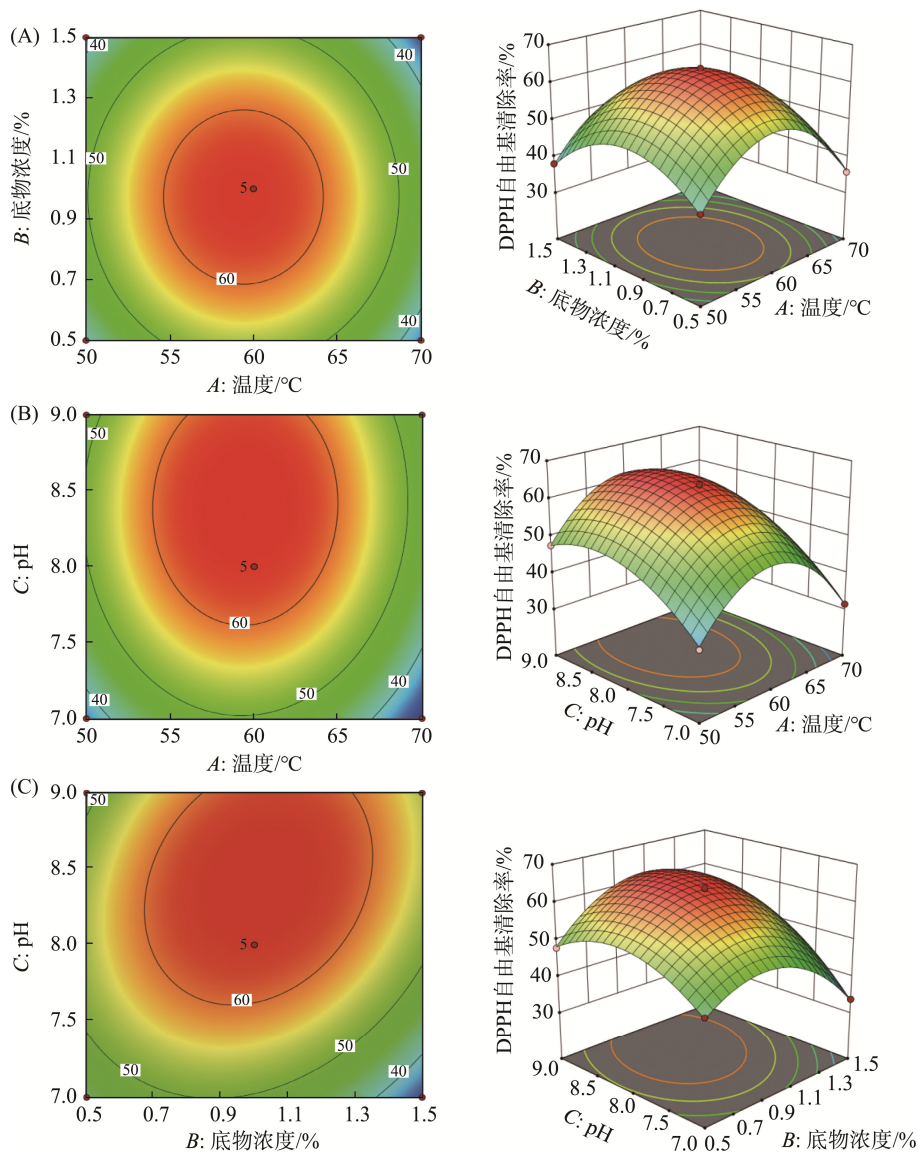


图 2 交互作用分析
Fig.2 Interaction analysis

2.5 海参抗氧化肽对小鼠的抗疲劳作用

2.5.1 海参抗氧化肽对小鼠体重的影响

体重能够反映小鼠的健康状况和运动能力, 一般体重越轻, 运动负荷越小^[25], 由图 3 可知, 在对小鼠灌胃的 0~30 d 内, 各组小鼠的体重变化没有明显差异($P>0.05$), 小鼠体重随着灌胃天数的增加呈现递增趋势, 最终体重控制在 36 g 左右, 表明海参抗氧化肽对小鼠机体的安全性没有危害。

2.5.2 海参抗氧化肽对小鼠负重游泳时长的影响

游泳时间能够客观反应机体的运动能力下降情况, 强迫负重游泳实验是经典的抗疲劳动物模型^[26], 由图 4 可知, 对照组、L-Scp 组、M-Scp 组、H-Scp 组的游泳时间分别为 (13.41±1.72)、(21.32±2.32)、(26.45±2.35)、(33.4±3.84) min, 试

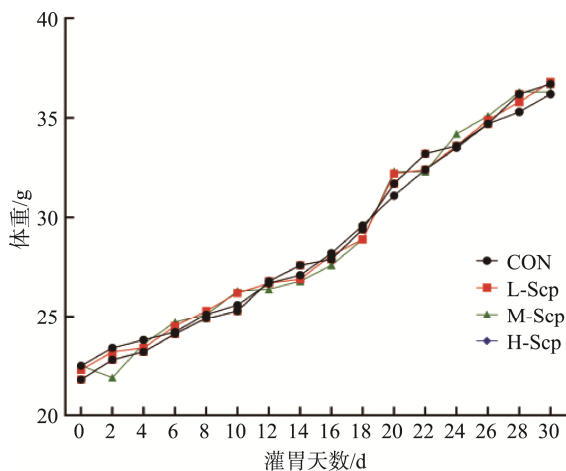


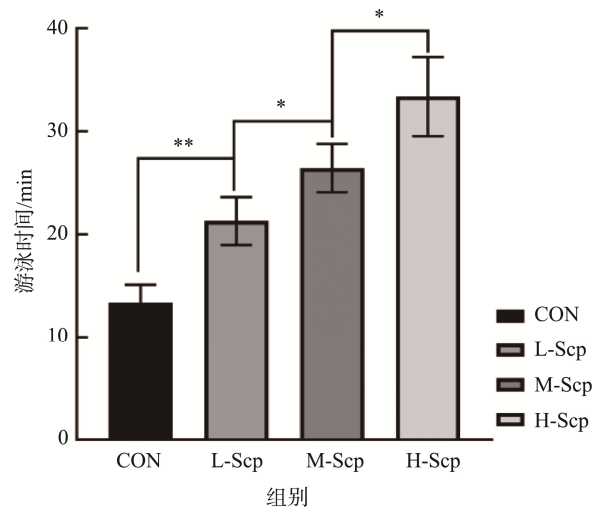
图 3 小鼠体重随时间的变化
Fig.3 Changes in mouse body weight over time

验组的游泳时间明显长与对照组, 其中高剂量组游泳时间比 CON 组延长了 59.8%, 因此, 海参抗氧化肽对提升小鼠运动耐力有一定作用。

2.5.3 运动后小鼠抗疲劳生理指标的变化

图 5 反映了与疲劳相关的生理指标变化, 长期运动会 导致葡萄糖消耗过度, 机体就会启用肝糖原和肌糖原补充 能量^[27], 由图 5 可知实验组肝糖原、肌糖原明显高于 CON 组, 且呈一定的剂量依赖性关系, 相比 CON 组, H-Scp 组 肌糖原含量升高了 1.57 倍, 表明海参抗氧化肽能够提升小 鼠的糖原储备能力。BUN 是蛋白质降解的产物, 当脂肪和 糖类消耗完毕, 蛋白质被用来提供能量, BUN 通常用来衡 量运动耐力^[28]。从图 4 中可以看出实验组小鼠的 BUN 含 量均低于对照组, 尤其是 H-Scp 组明显降低($P<0.05$), 比 对照组低了 38.4%, 表明海参抗氧化肽能够提升小鼠的运 动持久性。肌肉缺氧会产生大量乳酸, 高含量的乳酸能够降 低肌肉收缩力, 产生疲劳感, 因此 BLA 含量能够客观反映 运动疲劳状况^[29-30], 由图 5 可知, 实验组 BLA 含量均低 于 CON 组, L-Scp 组和 M-Scp 组的 BLA 含量与 CON 组之 间无显著性差异($P>0.05$), H-Scp 组的 BLA 含量明显降低 ($P<0.05$)。综上所述, 海参抗氧化肽对运动后小鼠疲劳可以

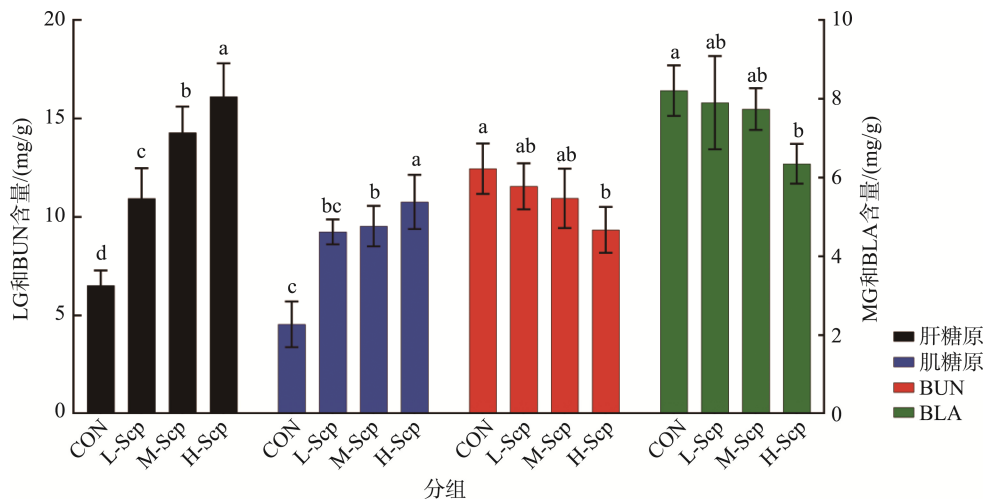
起到一定的缓解作用。



注: **表示存在极显著差异($P<0.01$), *表示存在显著性差异 ($P<0.05$)。

图4 海参抗氧化肽对负重游泳时长的影响

Fig.4 Effects of sea cucumber antioxidant peptides on the duration of weight-bearing swimming



注: 同一指标内, 不同小写字母表示组间具有显著性差异, $P<0.05$ 。

图5 海参抗氧化肽对小鼠生理指标的影响

Fig.5 Effects of sea cucumber antioxidant peptides on physiological indicators in mice

3 结 论

本研究利用计算机辅助在线模拟酶解技术与常规酶法相结合的方法制备海参抗氧化肽, 通过生物信息学方法经多轮筛选得到安全、亲水性及稳定性强的水解酶蛋白酶 K, 并进一步考察反应温度、时间、pH、底物浓度、加酶量对水解度和 DPPH 自由基清除率的影响, 并设计响应面优化实验得到最佳的海参抗氧化肽制备工艺参数为温度 60°C、pH 8.4、底物浓度 1.0%, 得到的 DPPH 自由基清除

率为 64.2%±1.1%, 与预测值相差较小, 表明模型可信度良好。负重游泳小鼠实验结果表明, 海参抗氧化肽对 CON 组和实验组小鼠体重的影响无显著性差异, 相比 CON 组, 海参抗氧化肽能够明显延长负重游泳时间($P<0.05$); 提高小鼠肝糖原、肌糖原含量($P<0.05$), 降低血清总 BUN、BLA 水平, 表明海参抗氧化肽能够提升糖原储备能力, 增强运动耐力, 在抗疲劳方面作用效果明显, 可以作为抗疲劳功能健康食品开发的良好原料来源。

参考文献

- [1] 崔方超, 刘晓白, 王当丰, 等. 功能性海参肽的特性及其生物活性研究进展[J]. 食品工业, 2023, 44(11): 182–187.
- CUI FC, LIU XB, WANG DF, *et al.* Research progress on the characteristics and biological activities of functional sea cucumber peptides [J]. Food Ind, 2023, 44(11): 182–187.
- [2] 朱兰兰, 吴晶, 周德庆. 海参的加工利用与品质评价研究进展[J]. 农产品加工, 2015, (12): 60–63.
- ZHU LL, WU J, ZHOU DQ. Research progress on the processing, utilization, and quality evaluation of sea cucumber [J]. Agric Prod Process, 2015, (12): 60–63.
- [3] 王婷婷. 海参肽对II型糖尿病大鼠血糖活性调节作用及其机制研究[D]. 南宁: 广西大学, 2021.
- WANG TT. The regulatory effect of sea cucumber peptide on blood glucose activity in type II diabetes rats and its mechanism [D]. Nanning: Guangxi University, 2021.
- [4] PANGESTUTI R, ARIFIN Z. Medicinal and health benefit effects of functional sea cucumbers [J]. J Tradit Compl Ement Med, 2017, 8(3): 341–351.
- [5] 冯建慧. 海参卵黄蛋白抗炎活性及机制研究[D]. 无锡: 江南大学, 2022.
- FENG JH. Study on the anti-inflammatory activity and mechanism of sea cucumber yolk protein [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2022.
- [6] KHOTIMCHENKO Y. Pharmacological potential of sea cucumbers [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(5): 1342.
- [7] 李龙, 傅志宇, 姜鹏飞, 等. 海参肽的生物活性及作用机制[J]. 中国食品学报, 2023, 23(12): 407–420.
- LI L, FU ZY, JIANG PF, *et al.* The biological activity and mechanism of action of sea cucumber peptides [J]. Chin J Food Sci, 2023, 23(12): 407–420.
- [8] 倪明龙, 闫瑞峰, 王永丽, 等. 刺参不同酶解产物的抗氧化活性分析[J]. 现代食品科技, 2023, 39(7): 53–59.
- NI ML, YAN RF, WANG YL, *et al.* Analysis of antioxidant activity of different enzymatic hydrolysis products of sea cucumber [J]. Mod Food Technol, 2023, 39(7): 53–59.
- [9] 丛之慧. 基于虚拟筛选杏仁降糖肽及纳米包埋技术研究[D]. 重庆: 重庆三峡学院, 2023.
- CONG ZH. Research on virtual screening of almond hypoglycemic peptides and nanoencapsulation technology [D]. Chongqing: Chongqing Three Gorges University, 2023.
- [10] 于志鹏, 樊玥, 赵文竹, 等. 鸡蛋蛋白 ACE 抑制肽的筛选、鉴定及其作用机制[J]. 食品科学, 2020, 41(12): 129–135.
- YU ZP, FAN Y, ZHAO WZ, *et al.* Screening, identification, and mechanism of action of ACE inhibitory peptides from egg protein [J]. Food Sci, 2020, 41(12): 129–135.
- [11] 曲亭菲, 赵前程, 李双双, 等. 仿刺参胶原蛋白源二肽基肽酶抑制肽虚拟筛选及分子对接研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(2): 9–17.
- QU TF, ZHAO QC, LI SS, *et al.* Virtual screening and molecular docking of dipeptidyl peptidase inhibitory peptides derived from collagen of sea cucumber [J]. J Food Saf Qual, 2023, 14(2): 9–17.
- [12] GUO KX, SU LN, WANG YC, *et al.* Antioxidant and anti-aging effect of sea cucumber protein hydrolyzate and bioinformatic characterization of its composing peptides [J]. Food Funct, 2020, 11(6): 5004–5016.
- [13] 马建伟. 羊肚菌蛋白抗氧化肽的制备及抗运动疲劳活性研究[J]. 中国酿造, 2023, 42(9): 163–169.
- MA JW. Preparation and anti exercise fatigue activity of protein antioxidant peptides from Morchella esculenta [J]. Chin Brew, 2023, 42(9): 163–169.
- [14] 张梦雪, 叶静静, 高子鑫, 等. 双酶法制备条斑紫菜酶解液工艺优化及抗氧化、抗疲劳活性研究[J]. 中国调味品, 2023, 48(7): 7–13.
- ZHANG MX, YE JJ, GAO ZX, *et al.* Optimization of enzymatic hydrolysis process and study on antioxidant and anti fatigue activities of porphyra yezoensis by double enzyme method [J]. China Cond, 2023, 48(7): 7–13.
- [15] 余毅豪. 海参肽抗疲劳的作用及机制研究[D]. 无锡: 江南大学, 2021.
- YU YH. Study on the anti fatigue effect and mechanism of sea cucumber peptides [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2021.
- [16] 李西婷, 张明振, 乔乐克, 等. 金枪鱼蛋白肽产品的特征性成分及其抗疲劳活性[J]. 现代食品科技, 2023, 39(10): 44–50.
- LI XT, ZHANG MZ, QIAO LK, *et al.* Characteristic components and anti fatigue activity of tuna protein peptide products [J]. Mod Food Technol, 2023, 39(10): 44–50.
- [17] AGUDA AH, PANWAR P, DU X, *et al.* Structural basis of collagen fiber degradation by cathepsin K [J]. Proceed Nat Academ Sci United States Am, 2004, 111(49): 17474–17479.
- [18] 季晓彤, 王玲, 薛鹏, 等. 海参组织蛋白酶K的部分酶学性质及其对海参自溶的影响[J]. 中国农业大学学报, 2017, 22(9): 72–77.
- JI XT, WANG L, XUE P, *et al.* Partial enzymatic properties of sea cucumber tissue protease K and its effect on sea cucumber autolysis [J]. J China Agric Univ, 2017, 22(9): 72–77.
- [19] 王群, 郑海涛, 葛尧, 等. 酶法制备鳕鱼皮胶原蛋白肽及其清除超氧阴离子自由基的研究[J]. 中国农学通报, 2011, 27(14): 87–93.
- WANG Q, ZHENG HT, GE Y, *et al.* Study on enzymatic preparation of collagen peptide from flounder skin and its scavenging effect on superoxide anion free radicals [J]. Chin J Agric, 2011, 27(14): 87–93.
- [20] 王文侠, 尚庆, 李馥邑, 等. 纤维素酶法提取玉米麸皮多糖的工艺条件优化[J]. 中国食品添加剂, 2016, (3): 82–91.
- WANG WX, SHANG Q, LI FY, *et al.* Optimization of extraction conditions of corn bran polysaccharide by cellulase [J]. Chin Food Add, 2016, (3): 82–91.
- [21] LI ZQ, HOU WS, BROMME D. Collagenolytic activity of cathepsin K is specifically modulated by cartilage-resident chondroitin sulfates [J]. Biochemistry, 2000, 39(3): 529–536.
- [22] AIBE K, YAZAWA H, ABE K, *et al.* Substrate specificity of recombinant

- osteoclast-specific cathepsin K from rabbits [J]. *Biol Pharma Bull*, 1996, 19(8): 1026–1031.
- [23] 力俊琛, 高昕悦, 江晨怡, 等. 模拟酶解优化鸽血红蛋白抗氧化肽酶法制备[J]. *食品研究与开发*, 2023, 44(2): 108–115.
- LI JC, GAO XY, JIANG CY, *et al.* Preparation of pigeon hemoglobin antioxidant peptidase method by simulated enzymatic hydrolysis optimization [J]. *Food Res Dev*, 2023, 44(2): 108–115.
- [24] 张靖, 苏琳, 陈晓雨, 等. 羊骨抗氧化肽酶解法制备和响应面工艺优化[J]. *食品与生物技术学报*, 2021, 40(3): 18–27.
- ZHANG J, SU L, CHEN XY, *et al.* Preparation of sheep bone antioxidant peptide by enzymatic hydrolysis and optimization of response surface methodology [J]. *J Food Biotechnol*, 2021, 40(3): 18–27.
- [25] 林桐. 羊肚菌抗氧化肽制备及其抗疲劳作用研究[D]. 重庆: 西南大学, 2023.
- LIN T. Preparation of antioxidant peptides from *Morchella* and their anti fatigue effects [D]. Chongqing: Southwest University, 2023.
- [26] YOU LJ, REN JY, YANG B, *et al.* Antifatigue activities of loach protein hydrolysates with different antioxidant activities [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(50): 12324–12331.
- [27] 王瑶. 黄粉虫多肽的制备、抗氧化活性与抗疲劳作用研究[D]. 太原: 山西农业大学, 2022.
- WANG Y. Preparation, antioxidant activity, and anti fatigue effect of yellow mealworm peptides [D]. Taiyuan: Shanxi Agricultural University, 2022.
- [28] LIU R, WU L, DU Q, *et al.* Small molecule oligopeptides isolated from walnut (*Juglans regia* L.) and their anti-fatigue effects in mice [J]. *Molecules*, 2018, 24(1): 45.
- [29] WANG JJ, SHEN MJ, KUO SL, *et al.* Effect of red mold rice on antifatigue and exercise-related changes in lipid peroxidation in endurance exercise [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 70(2): 247–253.
- [30] PING G, KA-CHAI S, WANG Z, *et al.* Antifatigue functions and mechanisms of edible and medicinal mushrooms [J]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017: 1–16.

(责任编辑: 韩晓红 张晓寒)

作者简介

杜战稳, 硕士, 讲师, 主要研究方向为大众健康。

E-mail: 13527445744@163.com

陈嘉, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品营养学。

E-mail: swaumyh@126.com