DOI:10.12441/spyswjs.20250311001 [文章编号] 1673-1689(2026)02-0118-11

玉足海参低聚肽的制备及其体外抗氧化活性分析

毛 鑫[1,2] 卢覃培[1,2] 苏志恒[1,2] 冯 超[3] 李应坤[4] 王湘华[4] 郭宏伟[1,2*] 黄照权[3]

(1. 广西医科大学生物活性分子研究与评价重点实验室,广西 南宁 530021; 2. 广西医科大学药学院,广西 南宁 530021; 3. 广西医科大学第一附属医院,广西 南宁 530021; 4. 北海黑珍珠海洋生物科技有限公司,广西 北海 536000)

摘要:【目的】分析玉足海参(*Holothuria leucospilota*)体壁的营养成分,优化玉足海参低聚肽制备工艺并评价其体外抗氧化活性。**【方法】**采用国家标准中的方法测定玉足海参体壁的基本营养成分及氨基酸组成;以多肽得率和相对分子质量分布为指标,通过蛋白酶筛选、单因素试验结合正交试验优化玉足海参低聚肽提取工艺;采用自由基清除率和亚铁离子螯合能力评估其体外抗氧化活性。**【结果】**玉足海参体壁干基中粗蛋白质质量分数最高,为(64.59±9.45)%。最佳酶解工艺为:选择碱性蛋白酶,酶解温度 70 ℃、酶解 pH 9.5、酶解时间 3 h、加酶量 3 000 U/g、料液比 1 g∶11 mL。在此条件下,多肽得率达 75.75%,酶解产物中相对分子质量<2 000 的组分占比超 98.00%。$ABTS^+$自由基清除率、羟自由基清除率、超氧阴离子自由基清除率和亚铁离子螯合能力的 IC_{50} 分别为 0.93、0.51、8.97、0.40 mg/mL。**【结论】**玉足海参体壁富含优质蛋白质,该研究优化的酶解工艺合理可行、多肽得率较高,制得的玉足海参低聚肽具有良好的抗氧化活性,可作为功能食品开发的潜在原料。

关键词:玉足海参;碱性蛋白酶;多肽得率;低聚肽;抗氧化

Preparation of Oligopeptides from *Holothuria leucospilota* and Analysis of Their Antioxidant Activity *in Vitro*

MAO Xin[1,2] *LU Qinpei*[1,2] *SU Zhiheng*[1,2] *FENG Chao*[3] *LI Yingkun*[4] *WANG Xianghua*[4] *GUO Hongwei*[1,2*] *HUANG Zhaoquan*[3]

(1. Guangxi Key Laboratory for Bioactive Molecules Research and Evaluation, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2. School of Pharmacy, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 3. The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 4. Beihai Black Pearl Marine Biotechnology Co., Ltd., Beihai 536000, China)

Abstract: [**Objective**] This study aims to analyze the nutritional components of *Holothuria leucospilota* body wall, optimize the preparation process of *Holothuria leucospilota* oligopeptides, and evaluate their antioxidant activity *in vitro*. [**Method**] The basic nutritional components and amino acid composition were determined *via* national standard methods. Through protease screening and single-factor experiments combined with orthogonal design, the conditions for enzymatic hydrolysis were optimized, with the polypeptide yield and relative molecular weight distribution serving as evaluation indicators. Antioxidant activity *in vitro* of the obtained oligopeptides was assessed based on the free radical scavenging rates and Fe^{2+}-chelating ability. [**Result**] The body wall of *Holothuria leucospilota* (on a dry basis) exhibited the highest crude protein mass fraction of (64.59±9.45)%. The

基金项目:广西重点研发计划项目(桂科 AB22080063)。

通信作者:郭宏伟(1980—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事中药及食品来源的保健产品研究与开发。E-mail:hongweiguo@gxmu.edu.cn

收稿日期:2025-03-11 **修回日期:**2025-04-15

conditions for enzymatic hydrolysis were optimized as follows: hydrolysis with 3 000 U/g alkaline protease and a solid-to-liquid ratio of 1 g∶11 mL at 70 ℃ and pH 9.5 for 3 h. Under these conditions, the polypeptide yield reached 75.75%, with over 98.00% of components having the relative molecular mass below 2 000. The IC_{50} of the obtained oligopeptides for scavenging $ABTS^{+}$ free radicals, scavenging hydroxyl free radicals, scavenging superoxide anion free radicals, and chelating Fe^{2+} were 0.93, 0.51, 8.97, and 0.40 mg/mL, respectively. [**Conclusion**] The body wall of *Holothuria leucospilota* is rich in high-quality protein. The established enzymatic hydrolysis process is efficient and feasible, with a high polypeptide yield. The obtained oligopeptides of *Holothuria leucospilota* demonstrate strong antioxidant activity, serving as a potential raw material for the development of functional foods.

Keywords: *Holothuria leucospilota*; alkaline protease; polypeptide yield; oligopeptide; antioxidant activity

活性氧是一类高反应活性的含氧分子，主要包括超氧阴离子自由基、过氧化氢和羟自由基等，其在正常生理浓度下可参与免疫防御等生物学过程。然而，活性氧过量会诱发氧化应激，造成脂质、蛋白质及DNA氧化损伤，进而导致细胞功能紊乱[1]。因此，外源补充抗氧化剂是维持氧化还原稳态的重要手段。天然抗氧化剂因安全性高、绿色环保等特点备受关注[2]，其中食源性动物蛋白来源的抗氧化肽具有相对分子质量小、易吸收、热稳定性强等优势[3]，已成为食品科学与营养学领域的研究热点。

玉足海参隶属于海参科海参属，主要分布于我国海南、广西、广东和福建等沿海区域，是南海海域常见的食用海参品种，目前已实现人工繁育[4]。但该海参因体壁较薄、口感粗糙，被视为“次等参”，主要流通于中低端消费市场，尚未实现高值化利用。研究表明，玉足海参提取物具有抗肿瘤、抗菌、抗弓形虫等多种生物活性[5-8]，并具有开发为保健米酒[9]的潜力。尽管其生物活性多样，但目前针对玉足海参多肽的制备工艺及抗氧化功能的研究仍较为匮乏。例如，汪国威等[10]采用仿生酶解法探究了玉足海参的酶解工艺，但未深入解析酶解产物的生物活性；Safari等[11]发现碱性蛋白酶酶解产物的抗氧化活性优于风味蛋白酶，但未对其酶解工艺进行系统优化。

基于此，本研究以玉足海参为原料，测定其营养成分与氨基酸组成，评估其开发利用价值；以多肽得率和低聚肽占比为评价指标，筛选最适蛋白酶，并通过单因素试验和正交试验优化玉足海参低聚肽的最佳制备工艺；最后评估玉足海参低聚肽的体外抗氧化活性，为玉足海参资源的高值化开发与产业化利用提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

玉足海参：广西涠洲岛海域，经广西中医药大学海洋药物研究院高程海研究员鉴定为*Holothuria leucospilota*，采集后热水快速汆烫以避免自溶，分离出体壁，装入干冰运输箱，运至广西医科大学药学院中药学实验室，并置于−80 ℃冰箱备用。

中性蛋白酶（50 000 U/g）、碱性蛋白酶（200 000 U/g）、菠萝蛋白酶（500 000 U/g）、胃蛋白酶（3 500 U/g）、木瓜蛋白酶（800 000 U/g）、风味蛋白酶（30 000 U/g）和胰蛋白酶（250 000 U/g）：北京索莱宝科技有限公司；复合蛋白酶（30 000 U/g）：南宁东恒华道生物科技有限公司；ABTS：分析纯，上海阿拉丁生化科技股份有限公司；纯净水：杭州娃哈哈集团有限公司；三氟乙酸：色谱纯，上海麦克林生化科技股份有限公司；盐酸：分析纯，南宁源莱仪器有限公司；细胞色素C（相对分子质量12 384）、抑肽酶（相对分子质量6 512）、杆菌酶（相对分子质量1 423）、乙氨酸−乙氨酸−酪氨酸−精氨酸（相对分子质量451）、乙氨酸−乙氨酸−乙氨酸（相对分子质量189）：色谱纯，苏州科盛实验设备有限公司；氯化亚铁、硫酸亚铁、过氧化氢、水杨酸、Tris和邻苯三酚、乙腈：均为分析纯，上海泰坦科技股份有限公司。

1.2 仪器与设备

pH计：FiveEasy Plus型，瑞士梅特勒−托利多仪器有限公司；高效液相色谱仪：LC-20A型，日本SHIMADZU制作所；紫外分光光度计：Gary 3500型，美国安捷伦科技有限公司；磁力搅拌水浴锅：

HH-6A 型，常州国宇仪器制造有限公司；离心机：TDT5-WS 型，湖南湘仪实验室仪器开发有限公司；电子天平：ATY224 型，深圳天溯计量检测股份有限公司；破壁机：L18-Y916 型，九阳股份有限公司；冷冻干燥机：SCIENTZ-12N/B 型，宁波新芝冻干设备股份有限公司；纯水仪：ZYC-I型，四川卓水越医疗科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 基本营养成分测定

水分质量分数参照 GB 5009.3—2016 中的直接干燥法测定；灰分质量分数参照 GB 5009.4—2016 中的高温灼烧法测定；粗蛋白质质量分数参照 GB 5009.5—2016 中的凯式定氮仪法测定；粗脂肪质量分数参照 GB 5009.6—2016 中的索氏抽提法测定；总糖质量分数参照 GB/T 5009.8—2023 中的苯酚硫酸法测定。

1.3.2 氨基酸组成测定

氨基酸组成参照 GB 5009.124—2016 中的氨基酸分析仪法测定。

1.3.3 酶解工艺流程

将玉足海参体壁取出，解冻后用滤纸吸干表面水分，称质量，剪成小块放至破壁机，加入纯净水打碎至匀浆状，用 0.5 mol/L 盐酸或 0.5 mol/L 氢氧化钠调节至各酶最适 pH，待温度和 pH 处于最适条件时加入酶进行酶解，酶解结束后于 95 ℃灭酶 15 min，冷却至室温后于 4 000 r/min 离心 15 min，收集上清液。不同蛋白酶的酶解条件见表 1。

1.3.4 蛋白酶的筛选

固定料液比 1 g∶5 mL、加酶量 3 000 U/g、酶解时间 3 h。以多肽得率和相对分子质量分布为考察指标，筛选出最佳蛋白酶。

表 1 不同蛋白酶的酶解条件

Table 1 Hydrolysis conditions of different proteases

蛋白酶	pH	温度/℃
碱性蛋白酶	9.5	50
中性蛋白酶	7.0	50
菠萝蛋白酶	7.0	50
木瓜蛋白酶	6.5	50
胰蛋白酶	8.0	45
胃蛋白酶	3.0	37
风味蛋白酶	6.5	53
复合蛋白酶	自然 pH	55

1.3.5 单因素试验

采用碱性蛋白酶水解玉足海参体壁制备玉足海参低聚肽，以多肽得率为评价指标，分别评价酶解温度（40、50、60、70、80 ℃）、酶解 pH（7.5、8.5、9.5、10.5、11.5、12.5）、酶解时间（1、2、3、4、5 h）、加酶量（500、1 500、3 000、4 500、6 000 U/g）、料液比（1 g∶3 mL、1 g∶5 mL、1 g∶7 mL、1 g∶9 mL、1 g∶11 mL、1 g∶13 mL）对玉足海参体壁酶解效果的影响。

1.3.6 正交试验

基于单因素试验结果，固定料液比 1 g∶11 mL，对酶解温度（50、60、70 ℃）、酶解 pH（8.5、9.5、10.5）、酶解时间（1、2、3 h）和加酶量（3 000、4 500、6 000 U/g）设计四因素三水平 $L_9(3^4)$ 的正交试验，以多肽得率为评价指标，确定最优酶解工艺。

1.3.7 多肽得率的测定

参照文献[12-14]的方法，采用三氯乙酸-双缩脲法测定多肽得率。称取 100.0 mg 的乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸，用纯水定容至 10 mL，得到质量浓度为 10.00 mg/mL 的标准品母液。分别移取 0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35、0.40、0.45、0.50 mL 的标准品母液至各试管中，用纯水补足至 1 mL，加入 4 mL 双缩脲试剂，混合均匀，反应 30 min 后于 540 nm 处测定吸光度，绘制标准曲线。

取一定量的酶解液加入等体积的 0.10 g/mL 的三氯乙酸，混合均匀，静置 10 min，于 4 000 r/min 离心 20 min，取 1 mL 上清液与 4 mL 双缩脲试剂混合均匀，静置 30 min 后于 2 000 r/min 离心 10 min，取上清液在 540 nm 处测定吸光度，以 1 mL 0.05 g/mL 三氯乙酸加 4 mL 双缩脲试剂为空白对照，根据标准曲线计算多肽质量浓度和多肽得率。

1.3.8 相对分子质量分布测定

采用 GB 31645—2018 中的高效排阻色谱法[15]测定酶解液的相对分子质量分布。色谱柱为 TSKgel G2000 SWXL（300 mm×7.8 mm×5 μm），流动相为乙腈-水-三氟乙酸溶液（体积比 40∶60∶0.05），检测波长 220 nm，流量 0.5 mL/min，柱温 30 ℃，进样量 10 μL。标准品和样品均用流动相配制，用 0.22 μm 的滤膜过滤后测定。

1.3.9 体外抗氧化活性测定

$ABTS^+$ 自由基清除率参照 GB/T 39100—2020 中的方法测定[16]；亚铁离子螯合能力和羟自由基清除率参照刘玥等[17]的方法测定；超氧阴离子自

由基清除率参照洪佳伟等[18]的方法测定。

1.3.10　统计分析

所有试验均进行3次重复测试，结果以平均值±标准偏差表示。采用SPSS 20.0进行统计分析，采用单因素方差分析，$P<0.05$表示差异显著。正交试验设计采用Minitab 19软件，并用Origin软件制图。

2　结果与讨论

2.1　玉足海参体壁基本营养成分分析

在玉足海参体壁干基中，粗蛋白质质量分数最高，达（64.59±9.45）%，其次是灰分，粗脂肪和总糖质量分数较低，见表2。这与黄亮华等[19]报道的玉足海参粗蛋白质和灰分趋势一致，但质量分数（粗蛋白质52.90%，灰分36.80%）存在一定差异；尽管两者采样地点均为涠洲岛海域，但采样季节不同可能是导致成分差异的主要因素之一。此外，本研究测得的灰分结果与郁亚凡等[20]报道的湛江来源的玉足海参体壁灰分质量分数（22.20%）较为接近，但粗蛋白质质量分数（57.60%）稍低于本研究。与12种常见的海参相比，玉足海参体壁粗蛋白质质量分数处于中等水平，低于海地瓜（81.20%）、福建仿刺参（83.66%）、大连刺参（67.71%）和阿拉斯加红参（68.40%），高于烟台刺参（64.67%）、梅花参（55.20%）等其他8种海参[21]。多数海参的灰分质量分数均高于10.00%，这一现象可能与其栖息地环境和摄食偏好有关[22]。结果表明，尽管玉足海参被视为次等参，但其仍具有高蛋白质特性，是酶解制备小分子多肽的优质原料。

2.2　玉足海参体壁氨基酸组成分析

由表3可以看出，玉足海参体壁干基中总氨基酸（total amino acid，TAA）质量分数为（63.49±6.79）%，与粗蛋白质测定结果基本一致；共检出17种氨基酸，种类齐全。其中质量分数较高的氨基酸依次为甘氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、丙氨酸，该组成特征与文献报道的玉足海参[20]及其他海参品种[23]的氨基酸组成基本一致，符合海参种群典型的氨基酸组成特征。甘氨酸不仅对海参体壁的韧性与弹性起支撑作用，还能积极调控海参的免疫功能[24-25]；谷氨酸则可补充脑细胞营养、促进机体生长发育等[25]。此外，玉足海参体壁中谷氨酸、天冬氨酸、精氨酸、甘氨酸等药用氨基酸的质量分数较高，占TAA的67.49%，表明其在药用价值开发方面具有一定的潜力。干基中必需氨基酸（essential amino acid，EAA）占TAA的28.76%，而优质蛋白质的判定标准为EAA/TAA>12.70%[26]，表明玉足海参体壁的氨基酸组成符合优质蛋白质标准，具备开发为功能食品的潜力。

表2　玉足海参体壁基本营养成分

Table 2　Basic nutritional components of the body wall of *Holothuria leucospilota*

指标	湿基中质量分数/（g/100 g）	干基中质量分数/%
水分	89.10±1.35	
粗蛋白质	7.04±1.03	64.59±9.45
粗脂肪	0.50±0.11	4.59±1.01
总糖	<0.24	<2.20
灰分	2.47±0.40	22.66±1.05

表3　玉足海参体壁的氨基酸组成

Table 3　Amino acid composition of the body wall of *Holothuria leucospilota*

种类	氨基酸	湿基中质量分数/（g/100 g）	干基中质量分数/%
必需氨基酸	亮氨酸	0.37±0.12	3.39±1.10
	缬氨酸	0.31±0.09	2.84±0.83
	赖氨酸	0.31±0.09	2.84±0.83
	异亮氨酸	0.23±0.06	2.11±0.55
	苏氨酸	0.36±0.13	3.30±1.19
	苯丙氨酸	0.22±0.07	2.02±0.64
	甲硫氨酸	0.13±0.06	1.19±0.55
	色氨酸	0.07±0.05	0.66±0.46
非必需氨基酸	天冬氨酸	0.71±0.19	6.51±1.74
	精氨酸	0.55±0.13	5.05±1.19
	甘氨酸	1.03±0.22	9.45±2.02
	谷氨酸	0.99±0.28	9.08±2.57
	脯氨酸	0.50±0.26	4.72±2.39
	丝氨酸	0.27±0.05	2.47±0.46
	丙氨酸	0.58±0.13	5.32±1.19
	酪氨酸	0.22±0.07	2.01±0.64
	组氨酸	0.09±0.03	0.83±0.28
EAA		1.99±0.64	18.26±5.87
NEAA		4.93±1.23	45.23±11.17
TAA		6.92±1.83	63.49±16.79

2.3　最适蛋白酶筛选结果

2.3.1　三肽标准曲线的建立

以乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸质量浓度为横坐标，540 nm处测得的吸光度为纵坐标，得到标准曲线$y=0.067\ 3x+0.001\ 4$，$R^2=0.999\ 6$，其质量浓度与吸光度相关性较好，见图1。

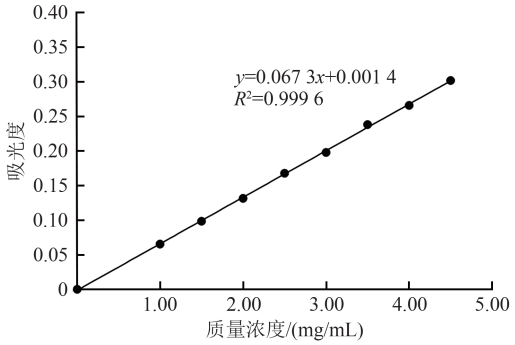


图 1　乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸标准曲线

Fig. 1　Standard curve of glycine-glycine-glycine

2.3.2　不同蛋白酶酶解玉足海参体壁的多肽得率

不同蛋白酶的酶切位点存在差异，导致其酶解产物在组成、结构及功能上均存在一定差异。由表 4 可知，在相同酶活力下，不同蛋白酶酶解玉足海参体壁后的多肽得率为 35.52%~52.00%，其中多肽得率排名前 4 的蛋白酶依次为胰蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶，均高于风味蛋白酶、菠萝蛋白酶、复合蛋白酶和胃蛋白酶。结果表明，偏碱性的酶解环境可能更有利于玉足海参体壁蛋白质的水解。由于排名前 4 的蛋白酶其多肽得率无显著差异，因此进一步采用高效排阻色谱法考察这 4 种蛋白酶酶解产物的相对分子质量分布，以筛选最适蛋白酶。

2.4　不同蛋白酶酶解玉足海参体壁的多肽相对分子质量分布结果

混合标准品溶液中不同相对分子质量标准品对应的保留时间见图 2。相对分子质量越大，保留时间越短。图中从左至右对应的标准品依次为细胞色素 C、抑肽酶、杆菌酶、乙氨酸-乙氨酸-酪氨酸-精氨酸、乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸。

表 4　不同蛋白酶酶解玉足海参体壁的多肽得率

Table 4　Yields of polypeptides obtained from the body wall of *Holothuria leucospilota* through enzymatic hydrolysis with different proteases

蛋白酶	多肽得率/%
碱性蛋白酶	50.91±0.73^{ab}
中性蛋白酶	52.00±2.31^{a}
风味蛋白酶	35.52±2.00^{d}
菠萝蛋白酶	46.15±4.51^{bc}
木瓜蛋白酶	47.87±4.38^{abc}
胃蛋白酶	37.49±5.88^{d}
胰蛋白酶	52.00±0.63^{a}
复合蛋白酶	44.16±1.91^{c}

注：同列不同小写字母表示差异显著（P<0.05）。

以标准品相对分子质量的对数（lg M）为纵坐标，保留时间为横坐标，得到相对分子质量分布范围的校正曲线及其方程（y=−0.261 4x+7.154 9，R^2=0.989 2），见图 3。

由表 5 可知，对多肽得率较高的前 4 种蛋白酶酶解产物进行相对分子质量分布测定，碱性蛋白酶组中相对分子质量<2 000 和<1 000 的低聚肽占比均最高。这可能与碱性蛋白酶的酶切位点更多，可酶解产生更多小分子多肽有关[27]。综合考虑多肽得率、低聚肽占比及生产成本等因素，最终确定碱性蛋白酶为最适蛋白酶，用于后续单因素试验。

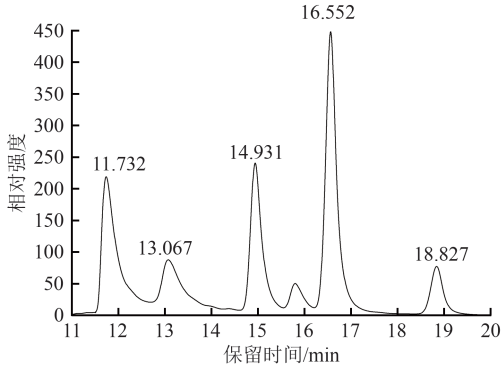


图 2　标准品的相对分子质量分布

Fig. 2　Relative molecular mass distribution of standards

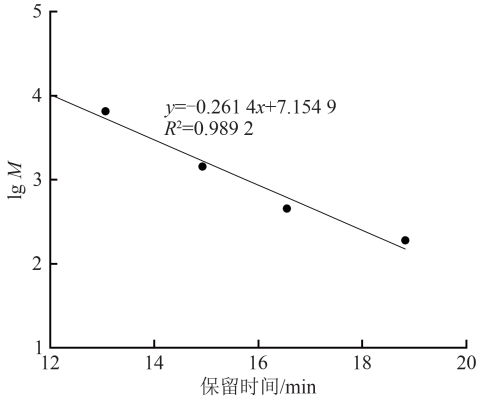


图 3　相对分子质量分布范围的校正曲线

Fig. 3　Calibration curve for the range of relative molecular mass distribution

表5　不同蛋白酶酶解产物相对分子质量分布

Table 5　Relative molecular mass distribution of products obtained through enzymatic hydrolysis with different proteases

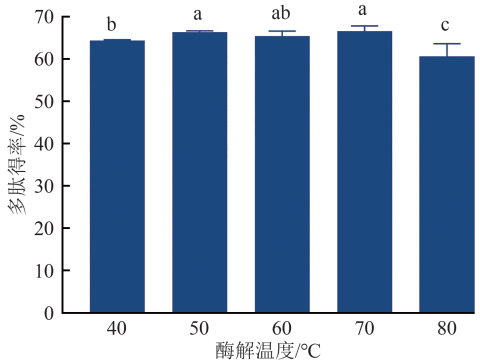
蛋白酶	相对分子质量<2 000的占比/%
碱性蛋白酶	98.80±0.24^{a}
中性蛋白酶	95.15±2.48^{b}
木瓜蛋白酶	92.85±0.35^{bc}
胰蛋白酶	91.65±0.29^{c}

注：同列不同小写字母表示差异显著（P<0.05）。

2.5　单因素试验结果

2.5.1　酶解温度对多肽得率的影响

固定其他酶解因素，考察酶解温度对多肽得率的影响，见图4。随着酶解温度的升高，多肽得率呈先升高后降低的趋势。50、60、70 ℃时的多肽得率较高，分别为66.33%、65.42%、66.57%；80 ℃时多肽得率最低，仅为60.68%。在适宜温度范围内，升高温度可提高酶与底物分子的碰撞概率，从而加快反应速率；而温度过高会破坏酶的空间结构，使其无法与底物特异性结合，最终导致多肽得率下降。结果表明，在适宜温度范围内，升高温度可加快反应速率、提高多肽得率。为缩短酶解反应时间、提高效率，选择70 ℃作为后续单因素试验的酶解温度。



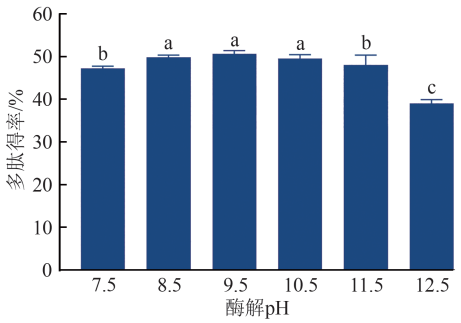
不同小写字母代表差异显著（P<0.05）。

图4　酶解温度对多肽得率的影响

Fig. 4　Effect of enzymatic hydrolysis temperature on polypeptide yield

2.5.2　酶解pH对多肽得率的影响

固定其他酶解条件，考察酶解pH对多肽得率的影响，见图5。不同pH条件下多肽得率差异明显，pH 8.5、9.5、10.5时的多肽得率显著高于pH 7.5、11.5、12.5时的多肽得率。碱性蛋白酶在pH为8.5~10.5时，活性中心空间构象较稳定，可有效与底物特异性结合，催化效率更高；相反，pH过高或过低均会导致酶分子结构发生改变，使酶活性降低甚至失活。结果表明，pH 9.5处于最适pH范围的中间值，且多肽得率最高，因此选择酶解pH 9.5进行后续单因素试验。



不同小写字母代表差异显著（P<0.05）。

图5　酶解pH对多肽得率的影响

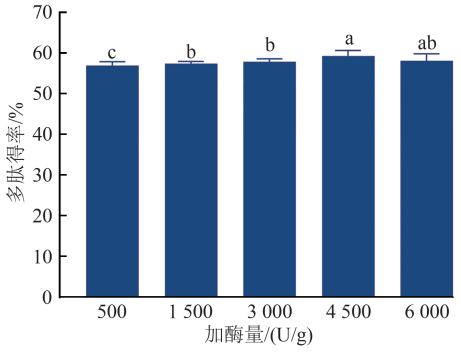
Fig. 5　Effect of enzymatic hydrolysis pH on polypeptide yield

2.5.3　加酶量对多肽得率的影响

固定其他酶解条件，考察加酶量对多肽得率的影响，见图6。在一定范围内，多肽得率随加酶量的增加呈上升趋势。当加酶量为4 500 U/g时，多肽得率最高，达59.19%；继续增加至6 000 U/g，多肽得率稍有下降。当底物质量浓度明显高于酶的催化能力时，加酶量与反应速率呈正相关，多肽得率随之提高；当加酶量过高时，多肽被进一步水解为氨基酸，致使多肽得率下降[28]。综上，选择加酶量4 500 U/g进行后续单因素试验。

2.5.4　酶解时间对多肽得率的影响

固定其他酶解条件，考察酶解时间对多肽得率的影响，见图7。在酶解初期，多肽得率随酶解

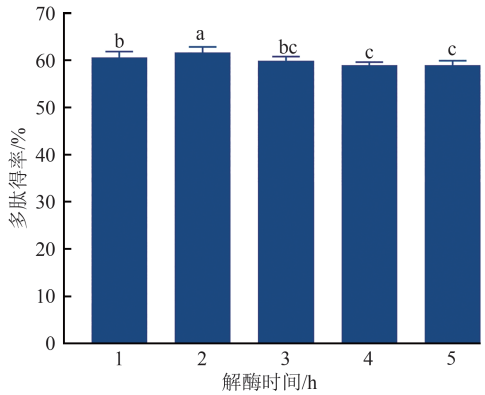


不同小写字母代表差异显著（P<0.05）。

图6　加酶量对多肽得率的影响

Fig. 6　Effect of enzyme dosage on polypeptide yield

时间的延长逐渐升高，在 2 h 时达到最大值，为 61.65%；当酶解时间超过 2 h 后，多肽得率随酶解时间的延长呈逐渐降低的趋势。酶解初期底物充足，延长酶解时间有利于蛋白质水解，多肽得率随之升高；但随着酶解时间持续延长，底物质量浓度逐渐降低，当蛋白质水解为多肽的速率小于多肽水解成氨基酸的速率时，多肽得率随之下降[29]。综上，选择酶解时间 2 h 用于后续单因素试验。



不同小写字母代表差异显著（P<0.05）。

图 7　酶解时间对多肽得率的影响

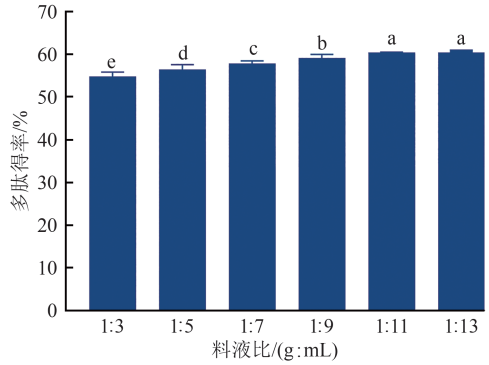
Fig. 7　Effect of enzymatic hydrolysis duration on polypeptide yield

2.5.5　料液比对多肽得率的影响

固定其他酶解条件，考察料液比对多肽得率的影响，见图 8。随着料液比减小，多肽得率呈上升趋势；当料液比为 1 g∶11 mL 和 1 g∶13 mL 时，多肽得率最高，达 60%，且两者无显著差异。底物质量浓度过高时，底物分子扩散性降低，与酶结合反应的概率降低，从而导致多肽得率下降；底物质量浓度适当降低后，酶与底物更易充分接触并发生催化反应；当底物质量浓度进一步降低时，酶与底物的特异性结合趋于饱和，多肽得率不再升高[30]。综合考虑多肽得率与生产成本，后续正交试验的料液比固定为 1 g∶11 mL。

2.6　正交试验结果

结合碱性蛋白酶单因素试验结果，以多肽得率为考察指标，对酶解温度（A）、酶解 pH（B）、酶解时间（C）和加酶量（D）进行四因素三水平正交试验，结果见表 6。各因素对多肽得率的影响顺序为：酶解 pH>酶解温度>酶解时间>加酶量。优化得到的最佳酶解工艺为：料液比



不同小写字母代表差异显著（P<0.05）。

图 8　料液比对多肽得率的影响

Fig. 8　Effect of solid-to-liquid ratio on polypeptide yield

1 g∶11 mL、酶解温度 70 ℃、酶解 pH 9.5、加酶量 3 000 U/g、酶解时间 3 h。在此酶解工艺下，多肽得率为 75.75%，酶解产物中相对分子质量<2 000 的肽段占比高于 98.00%。与文献中采用超滤富集低相对分子质量多肽的工艺相比[31]，本研究的酶解工艺显著提高了多肽得率、简化了工艺流程并降低了生产成本，整体合理可行，且提取效率较高。

表 6　四因素三水平正交试验结果

Table 6　Results of a 4-factor, 3-level orthogonal experiment

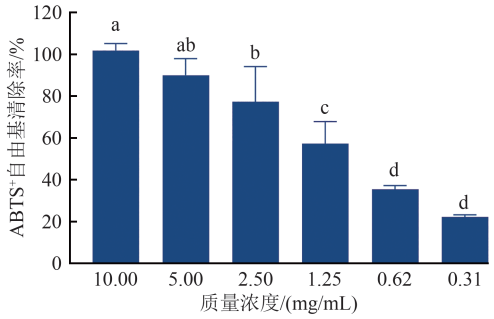
序号	酶解温度/℃	酶解 pH	酶解时间/h	加酶量/（U/g）	多肽得率/%
1	50	8.5	1	3 000	65.74
2	50	9.5	2	4 500	65.91
3	50	10.5	3	6 000	63.62
4	60	8.5	2	6 000	64.45
5	60	9.5	3	3 000	66.22
6	60	10.5	1	4 500	59.09
7	70	8.5	3	4 500	66.99
8	70	9.5	1	6 000	66.15
9	70	10.5	2	3 000	63.87
K_1	65.09	65.73	63.66	65.28	
K_2	63.25	66.09	64.74	64.00	
K_3	65.67	62.19	65.61	64.74	
极差	2.41	3.90	1.95	1.28	
影响顺序	$B>A>C>D$				
最优工艺	$A_3B_2C_3D_1$				

2.7　体外抗氧化活性结果

2.7.1　$ABTS^+$ 自由基清除能力

$ABTS^+$ 自由基清除率是测定自由基清除能力

最常见的间接方法，可同时评价亲水性和亲脂性物质的抗氧化能力[32]。如图9所示，玉足海参低聚肽的$ABTS^+$自由基清除能力呈质量浓度依赖性增强；当质量浓度为5.00 mg/mL时，$ABTS^+$自由基清除率为89.94%，IC_{50}为0.93 mg/mL。金丹莉等[33]酶解橙足海参得到相对分子质量<3 000的肽段，其$ABTS^+$自由基清除率的IC_{50}为2.76 mg/mL，高于本研究的玉足海参低聚肽，表明玉足海参体壁酶解产物比橙足海参具有更优的$ABTS^+$自由基清除能力。



不同小写字母代表差异显著（$P<0.05$）。

图9　玉足海参低聚肽的$ABTS^+$自由基清除能力

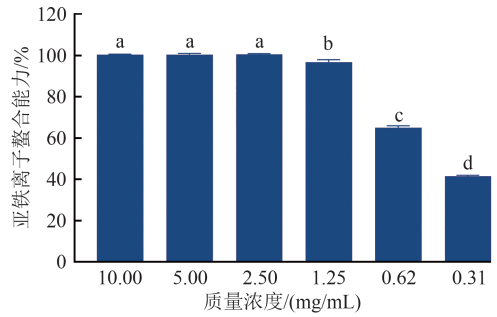
Fig. 9　$ABTS^+$ radical scavenging activity of oligopeptides from *Holothuria leucospilota*

2.7.2　亚铁离子螯合能力

在生物体系中，亚铁离子可通过Fenton反应与过氧化氢作用生成羟自由基，进而引发氧化应激损伤；而小分子肽是一类高效的亚铁离子螯合剂[34]，可通过与亚铁离子螯合阻断Fenton反应，减轻氧化应激程度。如图10所示，玉足海参低聚肽亚铁离子螯合能力的IC_{50}为0.40 mg/mL；当玉足海参低聚肽质量浓度为0.62 mg/mL时，其亚铁离子螯合能力达60%。Zhang等[35]研究表明，北极参酶解液中相对分子质量<2 000的肽段在质量浓度为0.50 mg/mL时，亚铁离子螯合能力为58%，表明玉足海参低聚肽与北极参低聚肽的亚铁离子螯合能力相当。

2.7.3　羟自由基清除能力

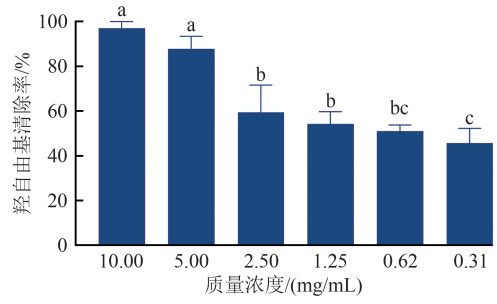
羟自由基可攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸、蛋白质和核酸等生物大分子，进而引发氧化应激损伤。抗氧化肽能够提供氢原子或电子[36]，与羟自由基结合形成稳定化合物，从而减轻其对生物大分子的氧化损伤。如图11所示，玉足海参低聚肽的羟自由基清除能力呈质量浓度依赖性增强，其IC_{50}为0.51 mg/mL，优于陈卉卉等[37]提取的东海海参胶原蛋白肽（IC_{50}为27.80 mg/mL），表明玉足海参低聚肽具有较强的羟自由基清除能力。



不同小写字母代表差异显著（$P<0.05$）。

图10　玉足海参低聚肽的亚铁离子螯合能力

Fig. 10　Ferrous ion-chelating ability of oligopeptides from *Holothuria leucospilota*



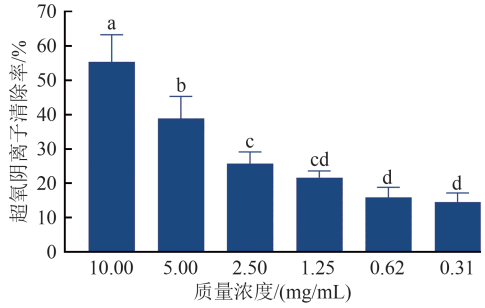
不同小写字母代表差异显著（$P<0.05$）。

图11　玉足海参低聚肽的羟自由基清除能力

Fig. 11　Hydroxyl free radical scavenging ability of oligopeptides from *Holothuria leucospilota*

2.7.4　超氧阴离子自由基清除能力

超氧阴离子自由基可攻击生物大分子，破坏细胞结构与功能，且与机体衰老及多种疾病的发生与发展密切相关。一般而言，物质的超氧阴离子自由基清除能力越强，对生物体的氧化保护作用越显著，其整体抗氧化活性也越高[38]。如图12所示，玉足海参低聚肽的超氧阴离子自由基清除能力呈质量浓度依赖性增强，当质量浓度为10.00 mg/mL时，超氧阴离子自由基清除率为55.37%，IC_{50}为8.97 mg/mL，优于苏永昌等[39]采用中性蛋白酶酶解制备的地瓜参多肽（IC_{50}为23.60 mg/mL），表明玉足海参低聚肽的超氧阴离子自由基清除能力优于地瓜参多肽。



不同小写字母代表差异显著(P<0.05)。

图 12 玉足海参低聚肽的超氧阴离子自由基清除能力

Fig. 12 Superoxide anion free radical scavenging ability of oligopeptides from *Holothuria leucospilota*

3 结论

本研究以玉足海参为原料，以多肽得率和相对分子质量分布为评价指标，从 8 种常用蛋白酶中筛选出碱性蛋白酶。通过单因素试验和正交试验优化酶解工艺参数，确定最佳酶解工艺为：料液比 1 g∶11 mL、酶解温度 70 ℃、酶解 pH 9.5、加酶量 3 000 U/g、酶解时间 3 h。在此工艺条件下，多肽得率达 75.75%，且相对分子质量<2 000 的组分占比高于 98.00%，展现出较高的提取效率与理想的酶解效果。体外抗氧化结果表明，玉足海参低聚肽的 $ABTS^+$ 自由基清除率、羟自由基清除率、超氧阴离子自由基清除率、亚铁离子螯合能力的 IC_{50} 分别为 0.93、0.51、8.97、0.40 mg/mL，展现出良好的体外抗氧化活性。本研究为玉足海参深加工与高值化利用提供了试验基础与理论支撑。后续研究将进一步通过细胞模型和斑马鱼等模式生物验证其体内抗氧化活性，并采用 LC-MS/MS 对其肽段进行鉴定，为玉足海参低聚肽的深入研究与产业化应用奠定基础。

参考文献

[1] NIMSE S B, PAL D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms[J]. RSC Advances, 2015, 5(35): 27986-28006.

[2] 杨新泉，田红玉，陈兆波，等. 食品添加剂研究现状及发展趋势[J]. 生物技术进展，2011，1(5)：305-311.
YANG X Q, TIAN H Y, CHEN Z B, et al. Current status and development trend of research of food additives[J]. Current Biotechnology, 2011, 1(5): 305-311.(in Chinese)

[3] 陈梅香，张洋，苏绿欣，等. 食源性活性肽递送系统的研究进展[J]. 食品科学，2023，44(17)：382-391.
CHEN M X, ZHANG Y, SU L X, et al. Research progress on delivery systems for food-derived bioactive peptides[J]. Food Science, 2023, 44(17): 382-391.(in Chinese)

[4] 黄海水产研究所. 海南成功人工繁育花刺参和玉足海参[J]. 水产养殖，2013，34(1)：3.
Yellow Sea Fisheries Research Institute. Hainan successfully artificially bred *Stichopus japonicus* and *Stichopus* Yuzu[J]. Journal of Aquaculture, 2013, 34(1): 3.(in Chinese)

[5] 韩华，易杨华，张文，等. 玉足海参中具有细胞毒活性的三萜皂苷成分研究[J]. 中国药学杂志，2012，47(15)：1194-1198.
HAN H, YI Y H, ZHANG W, et al. Cytotoxic triterpene glycosides from sea cucumber *Holothuria leucospilota*[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2012, 47(15): 1194-1198.(in Chinese)

[6] ADIBPOUR N, NASR F, NEMATPOUR F, et al. Antibacterial and antifungal activity of *Holothuria leucospilota* isolated from Persian Gulf and Oman Sea[J]. Jundishapur Journal of Microbiology, 2014, 7(1): e8708.

[7] ASADI N, YOUSEFI E, TAPPEH K H, et al. Anti-toxoplasma and cytotoxic activities of *Holothuria leucospilota* extract and TiO_2NPs *in vitro* and *in vivo*[J]. Infectious Disorders Drug Targets, 2022, 22(3): e170122200295.

[8] 王学锋，王鸿利，胡大萌，等. 玉足海参酸性粘多糖(抗栓胶囊)抗血栓形成作用的观察[J]. 中华血液学杂志，1997，18(9)：457-459.
WANG X F, WANG H L, HU D M, et al. Clinical study on the antithrombotic effects of *Holothuria ldeucospilota* acidic mucopolysaccharide [J]. Chinese Journal of Hematology, 1997, 18(9): 457-459.(in Chinese)

[9] 张翠侠，展学孔，洪玉程，等. 玉足海参糯米酒的酿造工艺优化研究[J]. 食品安全导刊，2024(23)：99-103.
ZHANG C X, ZHAN X K, HONG Y C, et al. Research on brewing process optimization of *Holothuria leucospilota* glutinous rice wine[J]. China Food Safety Magazine, 2024(23): 99-103.(in Chinese)

[10] 汪国威，张凌云，杨莹，等. 玉足海参仿生酶解的工艺研究[J]. 食品工业，2018，39(11)：151-154.
WANG G W, ZHANG L Y, YANG Y, et al. Study on the technology of biomimetic enzymatic hydrolysis of *Holothuria leucospilota*[J]. The Food Industry, 2018, 39(11): 151-154.(in Chinese)

[11] SAFARI R, YAGHOUBZADEH Z. Antioxidant activity of bioactive peptides extracted from sea cucumber (*Holothuria leucospilata*)[J]. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2020, 26(4): 2393-2398.

[12] 邵家威，汪慧慧，李庆腾，等. 碱性蛋白酶酶解芝麻粕制备蛋白肽的工艺优化[J]. 食品工业，2022，43(1)：16-20.
SHAO J W，WANG H H，LI Q T，et al. Process optimization of preparation of protein peptides from sesame meal by alkaline protease[J]. The Food Industry，2022，43(1)：16-20.(in Chinese)

[13] 于亚辉，陈沁雯，李晓婷，等. 响应面法优化鸡肉蛋白酶解工艺[J]. 福建农业学报，2020，35(1)：80-89.
YU Y H，CHEN Q W，LI X T，et al. Optimized proteolysis of chicken protein for food flavoring[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences，2020，35(1)：80-89.(in Chinese)

[14] 唐文林. 猪胎盘综合利用工艺与应用研究[D]. 无锡：江南大学，2014.

[15] 中华人民共和国国家卫生健康委员会，国家市场监督管理总局. 食品安全国家标准 胶原蛋白肽：GB 31645—2018[S]. 北京：中国标准出版社，2018.

[16] 国家市场监督管理总局，国家标准化管理委员会. 多肽抗氧化性测定 DPPH 和 ABTS 法：GB/T 39100—2020[S]. 北京：中国标准出版社，2021.

[17] 刘玥，刘晓兰，郑喜群，等. 复合蛋白酶水解玉米谷蛋白产物的抗氧化活性研究[J]. 食品与机械，2015，31(1)：141-145.
LIU Y，LIU X L，ZHENG X Q，et al. Antioxidant activity of hydrolysate from corn glutelin by protamex[J]. Food and Machinery，2015，31(1)：141-145.(in Chinese)

[18] 洪佳伟，肖柳柳，王爱琳，等. 核桃抗氧化肽的酶法制备、鉴定及其对脂氧合酶的抑制机理[J]. 食品与生物技术学报，2024，43(6)：112-118.
HONG J W，XIAO L L，WANG A L，et al. Enzymatic preparation and identification of walnut antioxidant peptides and their inhibitory mechanism on lipoxygenase[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2024，43(6)：112-118.(in Chinese)

[19] 黄亮华，庞全坚，钟声平，等. 北部湾玉足海参和花刺参骨片结构与营养成分研究[J]. 广西科学，2020，27(5)：578-584.
HUANG L H，PANG Q J，ZHONG S P，et al. Study on morphological character of ossicles and nutrient composition of *Holothuria leucospilota* and *Stichopus variegatus* in the Beibu Gulf[J]. Guangxi Sciences，2020，27(5)：578-584.(in Chinese)

[20] 郁亚凡，林海生，曹文红，等. 三种南海礁栖海参体壁营养成分分析[J]. 广东海洋大学学报，2023，43(2)：113-119.
XI Y F，LIN H S，CAO W H，et al. Analysis of nutritional components in the body wall of three reef-dwelling sea cucumbers in the South China Sea[J]. Journal of Guangdong Ocean University，2023，43(2)：113-119.(in Chinese)

[21] 潘南，吴靖娜，苏永昌，等. 福建养殖仿刺参基本营养成分分析与评价[J]. 渔业研究，2018，40(2)：134-140.
PAN N，WU J N，SU Y C，et al. Chemical composition and nutritional quality of aquaculture sea cucumber *Apostichopus japonicus* in Fujian[J]. Journal of Fisheries Research，2018，40(2)：134-140.(in Chinese)

[22] 高菲，许强，李秀保，等. 热带珊瑚礁区海参的生境选择与生态作用[J]. 生态学报，2022，42(11)：4301-4312.
GAO F，XU Q，LI X B，et al. Habitat preference and ecological function of sea cucumber in the tropical coral reef ecosystem[J]. Acta Ecologica Sinica，2022，42(11)：4301-4312.(in Chinese)

[23] LU Z Q，SUN N，DONG L，et al. Production of bioactive peptides from sea cucumber and its potential health benefits：a comprehensive review[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry，2022，70(25)：7607-7625.

[24] 李家旭，杨扬，王璧莹，等. 九香虫的营养评价及酶解多肽制备工艺优化[J]. 食品与机械，2024，40(4)：158-164.
LI J X，YANG Y，WANG B Y，et al. Nutritional evaluation and enzymatic hydrolysis peptide preparation process optimization of *Aspongopus*[J]. Food & Machinery，2024，40(4)：158-164.(in Chinese)

[25] 赵芹，王静凤，薛勇，等. 3种海参的主要活性成分和免疫调节作用的比较研究[J]. 中国水产科学，2008，15(1)：154-159.
ZHAO Q，WANG J F，XUE Y，et al. Comparative study on the bioactive components and immune function of three species of sea cucumber[J]. Journal of Fishery Sciences of China，2008，15(1)：154-159.(in Chinese)

[26] LI Z Q，HONG T N，SHEN G H，et al. Amino acid profiles and nutritional evaluation of fresh sweet-waxy corn from three different regions of China[J]. Nutrients，2022，14(19)：3887.

[27] 陈荣荣，李文，吴迪，等. 大球盖菇风味肽的制备及其抗氧化活性研究[J]. 食品与生物技术学报，2024，43(10)：140-152.
CHEN R R，LI W，WU D，et al. Preparation of flavor peptides from *Stropharia rugosoannulata* and study of their antioxidant activity[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2024，43(10)：140-152.(in Chinese)

[28] 范雪梅，万龙楠，段雪荣，等. 响应面法优化‘赤霞珠’葡萄皮可溶性膳食纤维的提取工艺[J]. 中外葡萄与葡萄

酒，2023(5)：86-93.
FAN X M，WAN L N，DUAN X R，et al. Response surface methodology for optimization of extraction process for soluble dietary fiber from ‘Cabernet Sauvignon’ grape peel[J]. Sino-Overseas Grapevine & Wine，2023(5)：86-93.(in Chinese)

[29] 刘静，李诚，胡迤萧，等. 酶解法制备牦牛骨胶原多肽及其加工性能评价[J]. 食品与生物技术学报，2018，37(5)：547-554.
LIU J，LI C，HU Y X，et al. Preparation by hydrolysis method and functional properties of yak bone collagen polypeptides [J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2018，37(5)：547-554.(in Chinese)

[30] 申彩红. 海参肽的酶法制备及其抗氧化、抗疲劳活性研究[D]. 泉州：华侨大学，2015.

[31] ZHU B，DONG X，ZHOU D，et al. Physicochemical properties and radical scavenging capacities of pepsin-solubilized collagen from sea cucumber *Stichopus japonicus* [J]. Food Hydrocolloids，2012，28(1)：182-188.

[32] 张海芬，高云涛，那吉，等. 8种水生蔬菜清除水溶性ABTS^{+}自由基活性研究[J]. 食品研究与开发，2019，40(6)：8-13，18.
ZHANG H F，GAO Y T，NA J，et al. Scavenging activities of water-soluble ABTS^{+} free radicals from eight species of aquatic vegetables[J]. Food Research and Development，2019，40(6)：8-13，18.(in Chinese)

[33] 金丹莉，程逸潮，洪杏德，等. 橙足海参多肽的制备工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. 中国调味品，2024，49(6)：22-30.
JIN D L，CHENG Y C，HONG X D，et al. Optimization of preparation process and research on antioxidant activity of polypeptides from *Cucumaria frondosa*[J]. China Condiment，2024，49(6)：22-30.(in Chinese)

[34] TIAN Q J，FAN Y，HAO L，et al. A comprehensive review of calcium and ferrous ions chelating peptides：preparation，structure and transport pathways[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition，2023，63(20)：4418-4430.

[35] ZHANG Y，HE S D，BONNEIL É，et al. Generation of antioxidative peptides from Atlantic sea cucumber using alcalase versus trypsin：*in vitro* activity，*de novo* sequencing，and in silico docking for *in vivo* function prediction[J]. Food Chemistry，2020，306：125581.

[36] 张强，李伟华. 抗氧化肽的研究现状[J]. 食品与发酵工业，2021，47(2)：298-304.
ZHANG Q，LI W H. Research progress of antioxidant peptides[J]. Food and Fermentation Industries，2021，47(2)：298-304.(in Chinese)

[37] 陈卉卉，于平，励建荣. 东海海参胶原蛋白多肽的制备及清除自由基功能研究[J]. 中国食品学报，2010，10(1)：19-25.
CHEN H H，YU P，LI J R. The preparation of collagen polypeptide with free radical scavenging ability purified from *Acaudina molpadioides* semper [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology，2010，10(1)：19-25.(in Chinese)

[38] BEHROOZI P. Free Radicals in Biology and Medicine [J]. Biology and Medicine，2021，13(8)：1.

[39] 苏永昌，刘淑集，吴成业. 海参多肽的制备工艺优化及其抗氧化测定[J]. 福建水产，2009，31(2)：6-10.
SU Y C，LIU S J，WU C Y. Optimization of the preparation procedure and the antioxidant activity of polypeptide from sea cucumber[J]. Journal of Fujian Fisheries，2009，31(2)：6-10.(in Chinese)