

刺参不同酶解产物的抗氧化活性分析

倪明龙¹, 闫瑞峰², 王永丽³, 李威^{4*}

(1. 广东食品药品职业学院实验实训中心, 广东广州 510520) (2. 苏州中西医结合医院心血管内科, 江苏苏州 215000) (3. 广东食品药品职业学院化妆品与艺术设计学院, 广东广州 510520)
(4. 广东食品药品职业学院中药学院, 广东广州 510520)

摘要: 为了探究刺参不同酶解产物的抗氧化活性, 外源添加了3种蛋白酶(碱性蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶)酶解鲜活刺参。测定了不同蛋白酶组的水解度、分子量分布、3种自由基(DPPH·、O₂⁻·、·OH)的清除率。结果表明: 空白组水解度随着酶解时间的延长没有明显差异, 蛋白酶组的水解度与酶解时间呈正相关关系, 不同蛋白酶组水解度高低顺序为, 中性蛋白酶>碱性蛋白酶>木瓜蛋白酶, 中性蛋白酶组最高为19.4%, 木瓜蛋白酶组最低为16.1%; 酶解后大分子量片段减少, <200 u的氨基酸片段增加; 碱性蛋白酶组, 酶解时间1 h, 粗肽得率最高达到64.2%。酶解时间2 h内, 蛋白酶酶解后酶解液的抗氧化能力比未处理的样品明显提高, 并且与酶解液浓度呈正相关关系; 质量浓度为5 mg/mL的中性蛋白酶组(酶解0.5 h), DPPH·清除率可达到79.64%; 碱性蛋白酶组3 h, ·O₂⁻清除率为49.58%, 0.5 h·OH清除率最高为21.78%。综上所述, 在抗氧化活性方面, 中性蛋白酶酶解产物在外源添加的三种蛋白酶中效果最好, 外源添加蛋白酶是提高刺参蛋白利用率的有效方式。

关键词: 刺参; 酶解产物; 抗氧化活性

文章编号: 1673-9078(2023)07-53-59

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.7.1557

Antioxidant Activities of *Stichopus japonicus* (Sea Cucumber)

Proteolysates from Different Proteases

NI Minglong¹, YAN Ruifeng², WANG Yongli³, LI Wei^{4*}

(1. Experimental Training Center, Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520, China)
(2. Cardiovascular Medicine, Suzhou Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital, Suzhou 215000, China)
(3. School of Cosmetics and Art Design, Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520, China)
(4. School of Chinese Medicine, Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520, China)

Abstract: To investigate the antioxidant activities of *Stichopus japonicus* (sea cucumber) proteolysates produced by different proteases, three proteases were exogenously added to fresh sea cucumber (alkaline protease, neutral protease, and papain). The degree of proteolysis, molecular distribution, and radical scavenging rates (for DPPH·, O₂⁻· and ·OH) of each protease group were measured. The degree of proteolysis correlated positively with proteolysis time in the protease groups, whereas no significant change occurred in the control group. The degree of proteolysis was highest for neutral protease (19.4%), followed by alkaline protease, and lastly, papain (16.1%). After proteolysis, the number of large molecular-weight fragments decreased while that of <200 u amino acid fragments increased. The highest crude peptide yield (64.2%) was obtained after one hour of proteolysis in the alkaline protease group. Compared to the proteolysates produced by the untreated sample, the proteolysates produced by the samples subjected to proteolysis for up to two hours had significantly increased antioxidant activities, and their antioxidant activities were positively proportional with the proteolysate concentration. In the neutral protease group, a DPPH· scavenging rate of

引文格式:

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 Minglong, YAN Ruifeng, WANG Yongli, et al. Antioxidant activities of *Stichopus japonicus* (sea cucumber) proteolysates from different proteases [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(7): 53-59.

收稿日期: 2022-12-09

基金项目: 广东高校省级重点平台和重大科研项目(2019GKQNCX061); 广东食品药品职业学院自然科学研究项目(2020ZR17)

作者简介: 倪明龙(1985-), 女, 硕士研究生, 实验师, 研究方向: 食品加工及质量安全检测, E-mail: 379430443@qq.com

通讯作者: 李威(1984-), 男, 硕士研究生, 讲师, 研究方向: 药食同源产品研究与开发, E-mail: 569716948@qq.com

79.64% was achieved with a proteolysate concentration of 5 mg/mL and proteolysis time of 0.5 h. In the alkali protease group, an $\cdot\text{O}_2^-$ scavenging rate of 49.58% was achieved with three hours of proteolysis, and the highest $\cdot\text{OH}$ scavenging rate (21.78%) was achieved with 0.5 h of proteolysis. In summary, the sea cucumber proteolysate produced by neutral protease exhibited the best antioxidant activity among the three exogenous proteases. Further, exogenous protease addition was found to be an effective method for improving the utilization of sea cucumber proteins.

Key words: *Stichopus japonicus*; proteolysate; antioxidant activity

刺参 (*Stichopus japonicus*), 属棘皮动物门 (Echinodermata), 游走亚门 (Eleutherozoa), 海参纲 (Holothuroidea), 木盾手目 (Aspidochlrota), 刺参科 (Stichopodidae), 仿刺参属。刺参属于温带参种, 主要分布在北太平洋的浅海区域^[1], 是我国典型的海珍产品, 产量大、营养价值高, 富含人体所必需的营养物质以及海参多糖、皂苷、脑苷脂和胶原蛋白等生物活性物质, 具有抗氧化、降血压、抗疲劳等功能^[2-8]。随着人们对健康保健食品的关注度提高, 刺参的消费市场不断扩大, 常被加工成刺参干、即食刺参等。根据调查, 目前加工方式以粗加工为主, 刺参保健品、功能性食品、美容产品等精深加工产品较少^[9,10]。

刺参养殖作为北方海水养殖的重要产业, 提高刺参产品的附加值是目前的研究热点, 关于刺参活性物质的研究主要集中于抗氧化、降血压、抗疲劳等生物活性, 产业化开发研究较少^[9-12]。酶解技术是发掘天然蛋白质资源的重要手段^[13,14], 通过选择性的可控酶解, 生物活性功能被掩盖或被共存杂质干扰的许多多肽类水解产物会释放出来, 表现出各种生理活性如抗氧化、降血压、调节免疫力等作用^[15-22]; 并且不同种类的蛋白酶其作用的位点也不同, 对酶解产物的抗氧化活性可能有一定的影响, 因此选择合适的蛋白酶对刺参的产业化开发有重要意义。

本文以刺参为研究对象, 采用外源酶, 分别添加碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、酶解新鲜刺参, 未添加酶作为空白对照, 测定了不同酶解时间 (0.5~4 h) 下的粗肽得率、水解度、分子量分布、DPPH· (1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基) 清除率、超氧阴离子自由基 ($\cdot\text{O}_2^-$)、羟自由基 ($\cdot\text{OH}$) 等指标, 探究不同蛋白酶酶解产物的抗氧化活性差异, 为刺参多肽的后续功能性研究提供数据支持, 为刺参的精深加工及产业化开发提供基础数据支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用鲜刺参 (单个约为 65~80 g) 于 2020 年 5 月采自山东省青岛莱州湾琅琊海域, 围堰养殖, 采集后清洗去内脏, 酶解后将酶解液真空冷冻干燥备用。

碱性蛋白酶 (200 000 U/g)、中性蛋白酶 (200 000 U/g)、木瓜蛋白酶 (800 000 U/g), 南宁庞博生物工程有限公司; 其他所用试剂均为国产分析纯。

1.2 主要仪器与设备

CR21N 高速冷冻离心机, 日本日立公司; UV2540 紫外-可见分光光度计, 日本岛津公司; 真空冷冻干燥机, 北京博医康医学设备有限公司; 水浴恒温振荡器, 上海双捷实验设备有限公司; LC-20A 高效液相色谱仪 (带 GPC 软件), 日本岛津公司。

1.3 试验方法

1.3.1 酶解条件

采用 1:3 的料液比 (质量比) 制备刺参匀浆, 采用 600 U/g 酶活为标准, 根据所测定酶制剂酶活力的不同, 分别称取如下质量的固体酶制剂。将称量好的固体酶制剂与双蒸水混合, 待酶制剂完全溶解后, 加入 100 g 浆液, 并用玻璃棒搅拌均匀。酶解条件如下表格, 分别酶解 0.5、1、2、3、4 h, 得到粗酶解液。

表 1 不同蛋白酶 (含原液) 酶解条件

Table 1 Enzymatic hydrolysis conditions of different proteases (including raw solution)

蛋白酶	加酶量/g	pH 值	温度/℃
空白对照	0	7.0	50
碱性蛋白酶	0.240 74	10.0	50
中性蛋白酶	0.243 49	7.0	50
木瓜蛋白酶	0.593 90	7.0	50

将获得的酶解液沸水浴灭活 5 min, 于 8 000 r/min 离心 15 min, 将上清液进行滤纸过滤 (澄清透明), 处理完后置于 -80 ℃ 冷冻 24 h, 冻干得冻干粉。

1.3.2 酶解产物水解度和粗肽得率的测定

首先计算氨态氮质量分数和匀浆蛋白质质量分数, 按照公式 (1) 计算水解度。酶解液氨基态氮的测定参照 GB 5009.235-2016 《食品安全国家标准食品中氨基酸态氮的测定》^[23], 刺参匀浆总氮含量参照 GB 5009.5-2016 《食品安全国家标准食品中蛋白质的测定》^[24]。称量刺参未处理之前的质量和酶解液冻干后的质量, 按照公式 (2) 计算多肽得率。

$$h = \frac{X_1}{X_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

h ——水解度, %;

X_1 ——酶解液中氨基态氮含量, g/100 mL;

X_0 ——海参匀浆总氮含量, g/100 mL。

$$Y = \frac{m_s}{m_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

Y ——粗肽得率, %;

m_s ——酶解液冻干后的质量, g;

m_0 ——刺参未处理的原始质量, g。

1.3.3 DPPH 自由基清除率的测定

DPPH·清除率测定方法见文献^[25], 并采用公式(3)计算:

$$C_1 = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100\% \quad (3)$$

式中:

C_1 ——DPPH 清除率, %;

A_0 ——空白吸光值;

A ——酶解液样品或阳性对照吸光值。

DPPH 溶液的配制方法: 称取 0.039 432 g 固体 DPPH·溶解于 500 mL 甲醇, 避光 4 °C 低温保存。

1.3.4 超氧自由基清除率的测定

采用联苯三酚法测定超氧阴离子自由基清除率^[25]。计算空白联苯三酚溶液和酶解液样品联苯三酚溶液的吸光值随时间的变化。测定前采用双蒸水调零。

$$\Delta A_0 = A_1 - A_2 \quad (4)$$

$$\Delta A_{\text{样}} = A_{\text{样}1} - A_{\text{样}2} \quad (5)$$

$$C_2 = \frac{\Delta A_0 - \Delta A_{\text{样}}}{\Delta A_0} \times 100\% \quad (6)$$

式中:

A_1 ——空白联苯三酚溶液 30 s 后的吸光值;

A_2 ——空白联苯三酚溶液稳定后的吸光值;

ΔA_0 ——空白联苯三酚溶液的吸光值随时间的变化;

$A_{\text{样}1}$ ——加入酶解液样品后联苯三酚溶液 30 s 后的吸光值;

$A_{\text{样}2}$ ——加入酶解液样品后联苯三酚溶液稳定后的吸光值;

$\Delta A_{\text{样}}$ ——酶解液样品联苯三酚溶液的吸光值随时间的变化;

C_2 ——超氧阴离子自由基清除率, %。

其中: 25 mmol/L 联苯三酚溶液的配制: 称取 0.031 53 g 溶于 10 mL 水 (锡纸包裹避光保存), 现用现配。

1.3.5 羟基自由基清除率的测定

采用水杨酸法测定 OH 自由基清除率^[25]。羟基自由基清除率如下公式 (7) 计算:

$$C_3 = \frac{A_0 - (A_x - A_{x0})}{A_0} \times 100\% \quad (7)$$

式中:

C_3 ——羟基自由基清除率, %;

A_0 ——空白吸光值;

A_x ——样品或阳性对照吸光值;

A_{x0} ——样品不加 H_2O_2 溶液的吸光值。

1.3.6 酶解液肽分子量分布

参照 GB/T 22729-2008^[26]海洋鱼低聚肽粉中高效凝胶过滤色谱法, 并进行了适度修改, 色谱柱为东曹 (TOSOH) TSKgel G2000SWXL (7.8 mm×300 mm), 流动相为 30% 乙腈-水+0.1% 三氟乙酸 (CV), 紫外检测器 (220 nm), 进样量 10 μ L, 超声脱气 5 min, 流速梯度升至 0.5 mL/min, 室温, 检测时间 35 min。采用 GPC 软件, 以标准品分子-出峰时间作三次方程拟合, 计算各蛋白酶酶解液中肽分子量分布。

1.3.7 数据处理

使用 Excel 2010 进行显著性分析, 使用 GraphPad Prism 9 进行单因素方差分析

2 结果与讨论

2.1 不同蛋白酶组不同酶解时间对刺参蛋白

水解度的影响

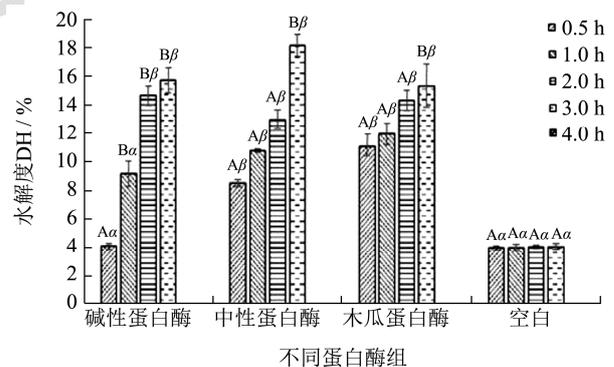


图 1. 不同蛋白酶对刺参蛋白水解度的影响

Fig.1 Effects of different proteases on proteolytic degree of *Stichopus japonicus*

注: 同一蛋白酶在不同酶解时间下不同希腊字母表示差异在 $P < 0.05$ 水平具有统计学意义, 同一酶解时间不同蛋白酶间不同英文字母表示差异在 $P < 0.05$ 水平具有统计学意义。

由图 1 可以看出, 空白组水解度随着酶解时间的延长没有明显差异, 所有酶解组水解度比空白组都有显著的增高, 所有蛋白酶酶解组水解度随酶解时间的延长而增高。实验条件下酶解时间 4 h 时水解度最高, 其中中性蛋白酶组的水解度最高, 酶解时间 4 h 达到

19.21%，其次是碱性蛋白酶，酶解时间 4 h 达到 16.72%，木瓜蛋白酶组的水解度最低，4 h 为 16.11%。

2.2 粗肽得率

通过表 2 可以看出，与空白相比，酶解处理后的酶解液粗肽得率 2 h 内有明显的提高，空白样品放置 3 h 后，可能由于体内自溶酶的原因，粗肽得率

63.28%。三种酶处理酶解产物都是在酶解时间 1 h 多肽得率达到最高值，碱性蛋白酶达到 64.19%、中性蛋白酶为 63.64%、木瓜蛋白酶为 58.39%，粗肽得率最高的是碱性蛋白酶酶解产物。1 h 后随着酶解时间的延长多肽得率呈现下降的趋势，推断随着酶解时间的延长多肽可能出现了 2 次聚合，导致多肽得率下降。

表 2 不同蛋白酶酶解刺参粗肽得率 (%)

酶解处理方式	0.5 h	1 h	2 h	3 h	4 h
碱性蛋白酶	61.29±1.26	64.19±3.12	58.36±3.56	57.75±3.22	56.91±3.55
中性蛋白酶	57.12±2.13	63.64±3.98	58.57±3.21	56.75±3.67	55.82±3.33
木瓜蛋白酶	53.31±3.89	58.39±2.83	57.30±2.98	56.21±2.99	55.22±2.87
空白	30.12±2.34	37.17±2.31	39.19±1.23	63.28±4.21	64.53±4.01

表 3 不同蛋白酶酶解产物的分子量分布 (百分比含量)

分子量范围/u	空白/%	碱性蛋白酶/%	中性蛋白酶/%	木瓜蛋白酶/%
>6 500	1.47±0.26	0.02±0.02	0.34±0.16	0.21±0.06
1 500~6 500	0.00	0.00	4.01±0.21	15.79±0.28
500~1 500	46.94±3.9	42.39±2.5	37.61±2.6	24.69±2.69
200~500	35.64±2.3	35.04±2.1	30.72±2.4	32.22±3.16
<200	16.65±2.5	22.56±1.3	27.31±4.3	27.08±6.06

2.3 不同蛋白酶组酶解产物的分子量分布

利用 GPC 软件拟合肽标准品出峰时间-分子量标准曲线，其三次方拟合标准方程为： $f(x)=2.687851e^{-3}x^3-0.1494297x^2+2.472481x-8.71806$ ， $R^2=0.9989$ ，相关性良好。通过标准曲线计算各酶解产物分子量分布。

由表 3 可以看出，(1) 未添加酶处理的海参原液放置 3 h 后，可能由于海参自溶酶的作用，分子量 <1 500 u 的占比为 98.53%，各酶解产物中含有大量小分子肽 (200~6 500 u，含多肽和寡肽) 或氨基酸 (<200 u)，碱性蛋白酶组的小分子肽含量最高，达到了 99.98%。

(2) 与空白组相比，分子量 >6 500 u 的占比中，碱性蛋白酶组、中性蛋白酶组、木瓜蛋白酶组、都有不同程度的下降 (<1%)、碱性蛋白酶组占比最低，0.02%，这与酶解的目的吻合，将大分子量的物质降解为小分子量物质。

(3) 分子量 500~1 500 u 和 200~500 u 范围，所有蛋白酶组酶解产物分子量占比相比空白组都有了一定程度的下降，木瓜蛋白酶酶解效果最好，由 46.94%、35.64% 分别降到了 24.69%、32.22%，酶解效果非常明显；碱性蛋白酶酶解效果最差，分别为 42.39%、35.04%。

(4) 分子量 <200 u，空白组为 16.65%，其他酶解组占比明显增加，中性蛋白酶组最高，占比为 27.31%，碱性蛋白酶组最低，占比 22.56%，从整体来看，酶解后，小分子肽含量增加。

2.4 不同蛋白酶组酶解产物的 DPPH·清除效果

通过图 2 可以看出，不同酶解条件下，三种蛋白酶酶解产物以及空白组的样品浓度与 DPPH·清除率呈正相关关系，随着浓度的增加，对 DPPH·的清除率也增加 (木瓜蛋白酶酶解时间 2 h 除外)，实验条件下各酶解产物浓度 5 mg/mL 时，对 DPPH·清除率最高。不同酶解时间下，同一种蛋白酶酶解产物浓度不同对 DPPH·清除率的影响有所不同。碱性蛋白酶酶解刺参 1 h 后，其产物对 DPPH·的清除率最强，为 70.37%，随后酶解时间越长，对 DPPH·的清除率越低；中性蛋白酶酶解 0.5 h 时，其产物对 DPPH·的清除效果最高，为 79.64%；木瓜蛋白酶酶解产物基本在酶解时间 0.5 h 达到最高值；空白组酶解 3 h 的产物对 DPPH·清除率最高，可能与海参中存在的自溶酶有关，时间延长，海参自身溶解越充分有关。从数据可以看出，酶解时间 <2 h，三种蛋白酶酶解产物对 DPPH·清除率高于空白对照组，随着酶解时间的延长，酶解产物的 DPPH·清除率低于空白对照组，

说明在 50 °C 条件下,可能存在部分活性蛋白不稳定。三种蛋白酶酶解产物,中性蛋白酶酶解产物的 DPPH·清除率最高。Rajapakse 等^[27]研究认为,水解产物清除 DPPH 自由基活性与疏水性氨基酸或肽呈正相关关系,碱性蛋白酶的酶切位点为疏水性氨基酸,木瓜蛋白酶是特性内切酶,作用位点比较广泛,可以从蛋白质内部切开肽链生成小分子质量的生物活性多肽,这两种酶都增加了酶解液中疏水性氨基酸的含量,中性蛋白酶也属于内切酶,可以将蛋白质分解为小分子肽或者氨基酸,所以三种蛋白酶酶解产物 2 h 内对 DPPH·的清除率明显高于未处理的空白样品。酶解液浓度在 5 mg/mL 时,中性蛋白酶组对 DPPH·的清除率最高,为 79.64% (酶解时间 0.5 h),也说明外源酶酶解时间 2 h 是一个关键时间点。

2.5 不同蛋白酶组酶解产物的 O₂⁻清除率

通过图 3 可以看出,空白样品在 3 h 对 O₂⁻清除率最高,为 54.94%。不同蛋白酶酶解产物和空白样品 O₂⁻清除率基本上随着酶解液浓度的升高而升高,呈现正相关关系,但同一种酶在不同酶解时间的酶解液 O₂⁻清除率有所不同,碱性蛋白酶 3 h 对 O₂⁻清除率最强,为 49.58%;而木瓜蛋白酶在 1 h 对 O₂⁻清除率最强。碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶酶解产物在酶解时间 2 h 内 O₂⁻清除率比空白组明显高,说明酶解时间 2 h 内,酶解提高了酶解液的 O₂⁻清除能力;中性蛋白酶酶解产物在酶解时间 4 h 对 O₂⁻清除率最强,为 51.72%,并且呈现随着酶解时间的延长 O₂⁻清除率越来越强的趋势。清除率效果来看,中性蛋白酶组最强,木瓜蛋白酶组最弱。

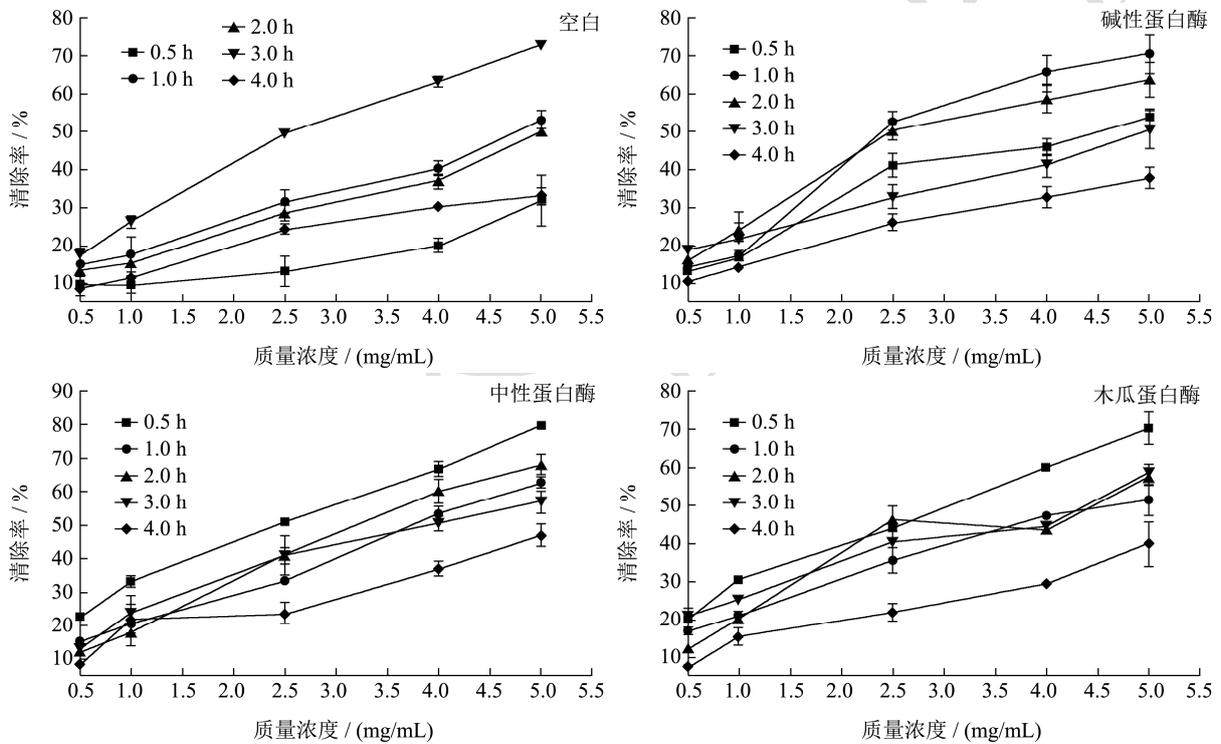
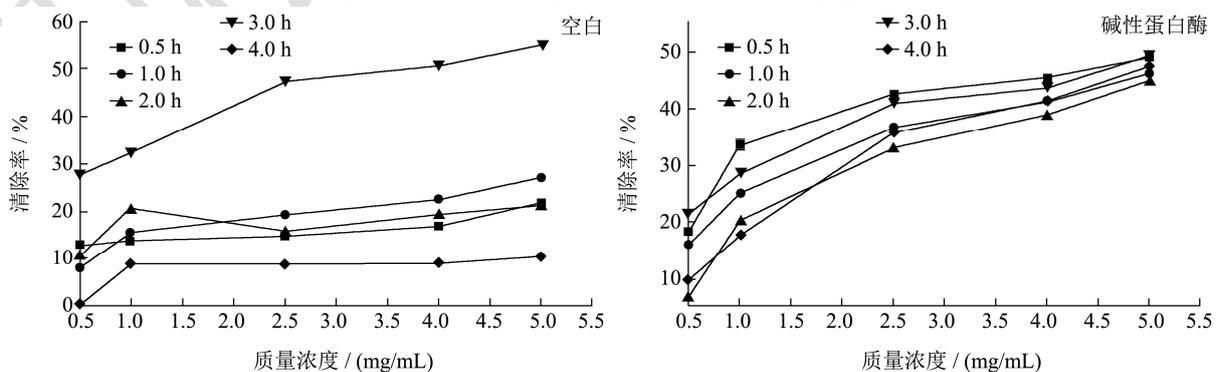


图 2 不同蛋白酶酶解产物对 DPPH·清除率的影响

Fig.2 Effect of different proteins on DPPH· scavenging rate



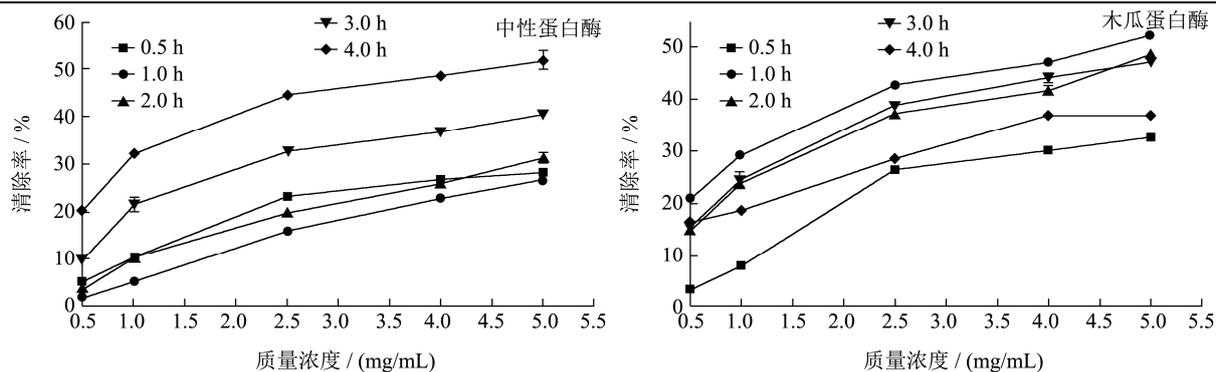


图3 不同蛋白酶酶解产物的 $O_2\cdot^-$ 清除率

Fig.3 Effect of different proteins on $O_2\cdot^-$ scavenging rate

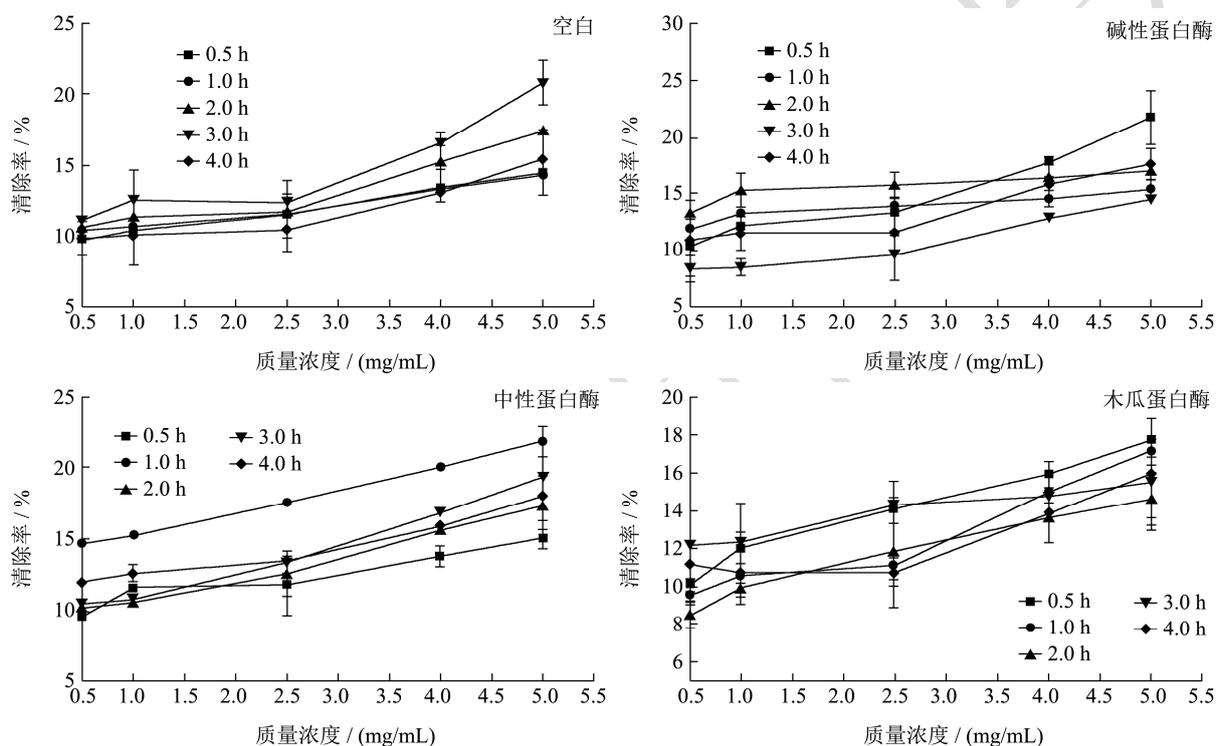


图4 不同蛋白酶酶解产物的 $\cdot OH$ 清除率

Fig.4 Effect of different proteins on $\cdot OH$ scavenging rate

2.6 不同蛋白酶组酶解产物的 $\cdot OH$ 清除率

通过图4可以看出,实验条件下,空白样品和不同蛋白酶酶解产物对 $\cdot OH$ 清除率与酶解液浓度呈正相关关系,酶解液浓度越高,对 $\cdot OH$ 清除效果越好。空白样品在3 h对 $\cdot OH$ 清除率最高,为20.84%;碱性蛋白酶酶解产物酶解时间3 h对 $\cdot OH$ 清除率最低,酶解时间0.5 h,酶解液浓度5 mg/mL, $\cdot OH$ 清除率最高为21.78%;中性蛋白酶酶解时间1 h时, $\cdot OH$ 清除率最高,酶解液浓度5 mg/mL, $\cdot OH$ 清除率达到21.90%;木瓜蛋白酶酶解时间0.5 h,酶解液浓度5 mg/mL, $\cdot OH$ 清除率17.69%;综合来看,三种蛋白酶酶解产物中碱性、中性蛋白酶组对 $\cdot OH$ 清除率效果较好,酶解时间短,比木瓜蛋白酶酶解产物清除效果好。

3 结论

本文通过对比分析三种不同外源蛋白酶酶解产物的水解度、多肽得率、分子量分布、抗氧化活性等指标发现,中性蛋白酶酶解产物在外源添加的三种蛋白酶中效果最好;酶解时间2 h内,酶解液的抗氧化能力比未处理的样品明显提高,与酶解液浓度呈正相关关系,并且随时酶解时间的延长而增加。数据表明空白组也有一定的抗氧化能力,但是蛋白酶酶解改变了海参蛋白的天然结构,将氨基酸残基暴露出来,增加了小分子肽含量,提高了海参多肽的抗氧化能力,这与付学军等的研究结果一致,在抗氧化能力相差不大的情况下,外源蛋白酶酶解制备刺参多肽所需时间更短,也充分说明酶解是提高刺参蛋白质利用率的有效

方式。空白组 3 h 显示出较强的抗氧化能力,与酶解处理的样品基本相当,说明海参体内自溶酶发挥了作用,自溶现象具有极高的研究价值,因此接下来有必要将体内自溶酶与外源酶制备刺参多肽的成分组成、功能活性方面的差异做对比研究。本实验研究为后续刺参的综合利用提供了理论依据,为刺参多肽的产业化开发提供另外一种思路。

参考文献

- [1] Bordbar S, Anwar F, Saari N. High-value components and bioactives from sea cucumbers for functional foods-a review [J]. *Marine Drugs*, 2011, 9(10): 1761-1805.
- [2] LIU Yuxin, LIU Ziqiang, SONG Liang, et al. Effects of collagenase type I on the structural features of collagen fibres from sea cucumber (*Stichopus japonicus*) body wall [J]. *Food Chemistry*, 2019, 301: 125302.
- [3] Yang W, Cai Y, Yin R, et al. Structural analysis and anticoagulant activities of two sulfated polysaccharides from the sea cucumber *Holothuria coluber* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 115: 1055-1062.
- [4] LIU Yuxin, ZHOU Dayong, MA Dongdong, et al. Changes in collagenous tissue microstructures and distributions of cathepsin L in body wall of autolytic sea cucumber (*Stichopus japonicus*) [J]. *Food Chemistry*, 2016, 212: 341-348.
- [5] SurayotU, Lee S M, You S G. Sulfated fucan from sea cucumber, *Stichopus japonicus*, on NK cell activation and cytotoxicity [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 108: 177-184.
- [6] ZftA, Yue D A, Jyt A, et al. Inhibition of Ultraviolet-Induced sea cucumber (*Stichopus japonicus*) autolysis by maintaining coelomocyte intracellular calcium homeostasis [J]. *Food Chemistry*, 2021, 368: 130768.
- [7] 童静静,章元炳,叶再镗等.海参多肽的研究进展[J].*食品工业科技*,2013,34(11):356-360.
- [8] Zhao Y-C, Xue C-H, Zhang T-T, et al. Saponins from sea cucumber and their biological activities [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(28): 7222-7237.
- [9] 付学军,崔志峰.小分子量海参肽对小鼠的抗疲劳作用[J].*食品科技*,2007,32(4):259-262.
- [10] 宋淑亮,王欢,梁浩,等.海参肽的分离纯化及其对 NIH/3T3 细胞胶原蛋白分泌的影响[J].*现代食品科技*,2017,33(3): 22-28.
- [11] Collin P D. Peptides having anticancer and antiinflammatory activity: US, 6767890 [P]. 2000 -05-25.
- [12] 王静,张京楼,王铎喜,等.海参多肽的抗氧化性能研究[J].*食品与机械*,2020,26(2):67-71.
- [13] 任娇艳,史传超,常博,等.核桃蛋白的分离制备及其酶解物的抗氧化特性[J].*现代食品科技*,2019,35(3):118-124.
- [14] 蒋清君,侯利霞.花生蛋白酶解液特性的研究[J].*现代食品科技*,2010,26(6):566-568.
- [15] 付学军,金海珠.海参肽的抗氧化活性与分子量的相关性研究[J].*食品科技*,2013,38(7):63-66.
- [16] 于平,易明龙,黄星星,等.东海海参胶原蛋白酶解物的制备与抗氧化活性及其对神经细胞损伤的保护作用[J].*中国食品学报*,2018,18(12):89-97.
- [17] PAN Saikun, YAO Dongrui, ZHOU Mingqian, et al. Hydroxyl radical scavenging activity of peptide from sea cucumber using enzyme complex isolated from the digestive tract of sea cucumber [J]. *African Journal of Biotechnology*, 2012, 11(5): 1214-1219.
- [18] 申彩虹.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.
- [19] Chen Z Y, Jiao R, Ma K Y, et al. Cholesterol-lowering nutraceuticals and functional foods [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(19): 8761-8773.
- [20] Jain K S, Kathiravan M K, Somani R S, et al. The biology and chemistry of hyperlipidemia [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2007, 15(14): 4674-4699.
- [21] Melvyn R, Robert D B, Robert S R. Treating mixed hyperlipidemia and the atherogenic lipid phenotype for prevention of cardiovascular events [J]. *American Journal of Medicine*, 2010, 123(10): 892-898.
- [22] 邹莉芳,沈以红,黄先智,等.食品功能性成分降血脂作用机理研究进展[J].*食品科学*, 2016,37(5):239-243.
- [23] GB 5009.235-2016,食品安全国家标准食品中氨基酸态氮的测定[S].
- [24] GB 5009.5-2016,食品安全国家标准食品中蛋白质的测定[S].
- [25] 刘天红,王颖,孙元芹,等.沙蚕不同酶解产物抗氧化效果研究[J].*中国农业科技导报*,2020,22(1):149-161.
- [26] GB/T 22729-2008,海洋鱼低聚肽粉[S].
- [27] Rajapakse N, Mendise E, Jung W K, et al. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties [J]. *Food Res. Int*, 2005, 38(2): 175-182.