

响应面法优化鳖甲胶原蛋白肽制备工艺 及其抗氧化活性研究

张瑞棋¹ 宋 伟^{1,2} 武志亿¹ 赵琼瑜¹

(1. 浙江万里学院生物与环境学院, 浙江 宁波 315100; 2. 新疆农业大学动物科学学院, 新疆 乌鲁木齐 830000)

摘要: [目的] 优化鳖甲胶原肽的酶解制备工艺, 探究其体外抗氧化活性及对氧化损伤细胞的保护作用。[方法] 以鳖甲胶原蛋白为原料, 采用 Box-Behnken 响应面法优化酶解工艺参数, 通过超滤分级获得不同相对分子质量胶原肽组分, 测定其体外自由基清除能力, 并利用 H₂O₂ 诱导的 B16F10 细胞氧化损伤模型评估其细胞保护效应。[结果] 最佳酶解条件为采用酸性蛋白酶, 酶解温度 44.899 °C、料液比 1:20.3 (g/mL)、酶添加量 4 970.527 U/g、pH 4.038、酶解时间 15.419 h。所得胶原肽对 DPPH 自由基和 ABTS⁺ 自由基清除率分别为 90.9% 和 94.8%。超滤组分中, 相对分子质量 < 5 的胶原肽抗氧化能力最强, 对 DPPH 自由基、ABTS⁺ 自由基和 OH 自由基的清除率均在 60% 以上, 且能显著提高细胞存活率 ($P < 0.05$), 上调 CAT 和 GSH-Px 水平 ($P < 0.05$), 降低 LDH 释放量 ($P < 0.05$)。[结论] 小相对分子质量鳖甲胶原肽具有显著抗氧化活性及细胞保护功能。

关键词: 鳖甲; 胶原蛋白肽; 抗氧化; 氧化损伤保护

Preparation optimization of Trionycis Carapax collagen peptide using response surface methodology and research on antioxidant activity

ZHANG Ruiqi¹ SONG Wei^{1,2} WU Zhiyi¹ ZHAO Qiongyu¹

(1. College of Biological & Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo, Zhejiang 315100, China;

2. College of Animal Sciences, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang 830000, China)

Abstract: [Objective] To optimize the enzymatic hydrolysis process for collagen peptides from Trionycis Carapax and investigate their *in vitro* antioxidant activity and cytoprotective effects against oxidative damage. [Methods] With collagen peptides from Trionycis Carapax as the raw material, enzymatic hydrolysis parameters were optimized by using Box-Behnken response surface methodology. Ultrafiltration fractionation was applied to obtain collagen peptide fractions of different molecular weights, and the *in vitro* free radical-scavenging capacity was assessed. The cytoprotective effects were evaluated using an H₂O₂-induced oxidative damage model in B16F10 cells. [Results] The optimal enzymatic hydrolysis conditions were as follows: acid protease as the enzyme additive, temperature of 44.899 °C, solid-to-liquid ratio of 1:20.3 (g/mL), enzyme amount of 4 970.527 U/g, pH of 4.038, and hydrolysis time of 15.419 h. Under these conditions, the collagen peptides exhibited 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)· and 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic) acid (ABTS⁺) scavenging rates of 90.9% and 94.8%, respectively. Collagen peptides with a relative molecular weight of less than five had the strongest antioxidant capacity, with scavenging rates exceeding 60% for DPPH, ABTS⁺, and hydroxyl radical (OH). Additionally, they significantly increased cell viability ($P < 0.05$), upregulated catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px) levels ($P < 0.05$), and reduced lactate dehydrogenase (LDH) release ($P < 0.05$). [Conclusion] Collagen peptides from Trionycis Carapax with a low relative molecular weight exhibit significant antioxidant activity and cytoprotective effects.

Keywords: Trionycis Carapax; collagen peptide; antioxidation; oxidative damage protection

基金项目: 浙江省公益技术应用研究计划一般项目 (编号: LGN19C190006); 浙江省重大育种专项 (编号: 2016C02055-4-1)

通信作者: 宋伟 (1988—), 男, 浙江万里学院实验师, 硕士。E-mail: sw2014wl@163.com

收稿日期: 2025-04-12 **改回日期:** 2025-08-21

引用格式: 张瑞棋, 宋伟, 武志亿, 等. 响应面法优化鳖甲胶原蛋白肽制备工艺及其抗氧化活性研究[J]. 食品与机械, 2026, 42(4): 192-201.

Citation: ZHANG Ruiqi, SONG Wei, WU Zhiyi, et al. Preparation optimization of Trionycis Carapax collagen peptide using response surface methodology and research on antioxidant activity[J]. Food & Machinery, 2026, 42(4): 192-201.

随着人口老龄化进程的加剧以及代谢类疾病发病率的增加,慢性疾病防控已成为重大公共卫生挑战^[1]。氧化应激诱导的细胞功能紊乱与心血管疾病、恶性肿瘤、神经退行性疾病等密切相关^[2-3],而食品中的脂质氧化导致的品质劣变问题亦亟待解决^[4]。生物活性肽因其安全性和结构多样性,成为化学抗氧化剂的理想替代品。其中,水产动物来源的抗氧化肽因结构新颖且更益于人体健康而备受关注^[5]。吴松霞等^[6]研究发现,金枪鱼低聚肽能够显著降低 B16-f10 细胞内的活性氧自由基水平,呈现出良好的抗氧化效果。来源于小黄鱼鱼鳞的胶原肽对脂质过氧化表现出高抑制能力,对氧化损伤细胞具有良好的保护活性^[7]。赵侠等^[8]通过酶解南极磷虾粉获得不同相对分子质量的抗氧化肽段,其中低相对分子质量的肽组分具有更强的抗氧化活性。

2023 年中华鳖年产量达 49.7 万 t,鳖甲作为加工中的副产物常被丢弃,其富含 I 型胶原蛋白^[9],其酶解产物具有独特的抗氧化活性^[10]。目前,有关研究多集中在中华鳖肌肉纤维蛋白的活性分析^[11-13],针对鳖甲胶原肽的酶解工艺优化及抗氧化肽活性研究尚未见报道。此外,传统酶解工艺存在参数不精确、活性肽得率低等问题^[14]。

试验拟以鳖甲为研究对象,采用响应面法优化酶解工艺,利用超滤分离技术对酶解产物进行不同相对分子质量胶原肽的分离,通过体外抗氧化活性检测探究不同相对分子质量鳖甲酶解胶原肽与抗氧化活性之间的关系;同时,建立 H₂O₂ 诱导的 B16F10 细胞氧化损伤模型评估不同相对分子质量胶原肽对细胞的保护效应,揭示鳖甲胶原肽通过调节 CAT/GSH-Px 通路发挥细胞保护作用的机制,为鳖甲抗氧化肽在功能食品及黑色素瘤细胞抗氧化方面的应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

成年中华鳖:宰杀后取其背甲得鳖甲,浙江省畝田水产有限公司;

黑色素瘤细胞 B16-F10、胃蛋白酶(300 万 U/g)、碱性蛋白酶(20 万 U/g)、胰蛋白酶(25 万 U/g)、风味蛋白酶(1.5 万 U/g)、中性蛋白酶(5 万 U/g)、酸性蛋白酶(5 万 U/g)、三羟甲基氨基甲烷:北京索莱宝科技有限公司;

EDTA-2Na、水杨酸钠、DPPH、ABTS⁺、RPMI 1640 培养基、无菌 PBS、特级牛血清(FBS)、MTT、0.25%胰酶:上海生工生物有限公司;

Omni-Easy™即用型 BCA 蛋白定量试剂盒:上海雅酶生物医药科技有限公司;

过氧化氢酶检测试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶检测试剂盒、细胞凋亡-Hoechst 染色试剂盒:宁波碧云天生物技术有限公司;

盐酸、氢氧化钠、七水合硫酸亚铁、双氧水、甲醇、无

水乙醇等:分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

紫外—可见分光光度计:Cary 100 型,美国 Agilent 公司;

磁力搅拌器:MAG HS 7 control 型,德国 IKA 公司;

电热恒温水槽:DK-8D 型,上海精宏实验设备有限公司;

pH 计:Seven Compact 型,美国 Mettler Toledo 公司;

电子天平:FA 2004 型,上海舜宇恒平科学仪器有限公司;

超滤系统:SAS 67120 型,德国 Merck Millipore 公司;

超速离心机:Sorvall LYNX 6000,美国 Thermo Scientific 公司;

水套式 CO₂ 培养箱:Form 3 型,美国 Thermo Scientific 公司;

台式离心机:Centrifuge 5427 R 型,德国 Eppendorf 公司;

倒置荧光显微镜:IX 73 型,日本 Olympus 公司;

冷冻干燥机:Alpha 1-4 LSCbasic 型,德国 Christ 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 鳖甲胶原蛋白的制备 参照赵琼瑜等^[15]的方法,鳖甲胶原蛋白纯度可达 95% 以上。

1.3.2 胶原抗氧化肽制备工艺优化

(1) 蛋白酶筛选:取 0.2 g 鳖甲胶原蛋白,在料液比 1:20 (g/mL)、酶添加量 5 000 U/g,酶解时间 15 h 下,根据不同种类蛋白酶的特性调节酶解温度及 pH 值。酶解结束后,离心取上清液,以 DPPH 自由基和 ABTS⁺ 自由基清除率为主要指标筛选最佳蛋白酶。

(2) 单因素试验:采用酸性蛋白酶,分别考察酶解温度(35, 40, 45, 50, 55 °C)、料液比[1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30 (g/mL)]、酶添加量(4 000, 5 000, 6 000, 8 000 U/g)、pH(2, 3, 4, 5, 6)和酶解时间(6, 9, 12, 15, 18 h)对 DPPH 自由基和 ABTS⁺ 自由基清除率的影响。

(3) 响应面试验:根据单因素试验结果,以酶解温度、料液比、酶添加量、pH、酶解时间作为试验因素进行五因素三水平响应面试验。采用 Design-Expert 软件设计 Box-Behnken 响应面试验条件,以 DPPH 自由基和 ABTS⁺ 自由基清除率为评价指标。

1.3.3 不同相对分子质量胶原肽的制备 参照 Wang 等^[16]的方法对最佳酶解条件下获得的胶原肽通过超滤系统结合不同相对分子质量(50, 30, 10, 5)超滤膜进行分离,获得不同相对分子质量胶原肽,所得组分标记为 A (<5)、B(5~10)、C(10~30)、D(30~50)、E(>50),各组分冷冻干燥后低温保存。通过 BCA 蛋白定量试剂盒测定待测样品蛋白浓度。

1.3.4 胶原肽的体外抗氧化活性

(1) DPPH 自由基清除率测定:参照 Zhang 等^[17]的方法,按式(1)计算 DPPH 自由基清除率。

$$R=[A_0-(A_1-A_2)]/A_0\times 100\%,\tag{1}$$

式中:

R——自由基清除率,%;

A₀——空白组吸光值;

A₁——样品组吸光值;

A₂——本底组吸光值。

(2) ABTS⁺ 自由基、羟自由基清除率测定:参照 Cui 等^[18]的方法,按式(1)计算 ABTS⁺ 自由基和羟自由基清除率。

1.3.5 不同相对分子质量胶原肽对 H₂O₂ 诱导损伤的 B16F10 黑色素瘤细胞的保护作用

(1) B16F10 细胞的培养及细胞损伤模型的建立:参照曹少谦等^[19]的方法进行 B16F10 黑色素瘤细胞培养。以 1×10⁴ 个细胞/孔的密度将 B16F10 细胞接种于 24 孔板中,培养基中分别加入 1,2,3,4,5 mmol/L 的 H₂O₂ 进行培养,平行设置 6 个孔,以细胞存活率为评价指标。

(2) 不同相对分子质量胶原肽对 H₂O₂ 诱导 B16F10 细胞损伤影响的测定:以 1×10⁴ 个细胞/孔的密度将 B16F10 细胞接种于 24 孔板中,使用含 1% FBS 的 RPMI 1640 培养基饥饿处理 24 h 后,更换为含有 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基,分别加入 50 μg/mL 不同相对分子质量(>50,30~50,10~30,5~10,<5)的胶原肽。设置阳性对照(B16F10 细胞+PBS 缓冲液,记为 A)、阴性对照(H₂O₂ 损伤 B16F10 细胞+PBS 缓冲液,记为 B)及试验组(H₂O₂ 损伤 B16F10 细胞+不同相对分子质量胶原肽,根据胶原肽相对分子质量由大到小分别记为 C~G),平行设置 6 个孔。37℃、5% CO₂ 下培养 48 h 后使用 MTT 法^[20]测定细胞存活率,Hoechst 荧光染色法^[21]测定细胞凋亡率,MDA 法、LDH 法和 GSH-PX 法^[22]检测抗氧化酶活性。

1.3.6 数据处理与分析 试验数据以平均数±标准差表示,采用 SPSS 17.0 统计软件进行单因素方差分析(ANOVA),用 Duncan 多重比较法进行显著性检验(P<0.05);应用 Design-Expert.V8.0.6 对响应面进行设计与分析;利用 Graphpad prism 8.0 进行数据整理并作图。

2 结果与分析

2.1 蛋白酶的选择

由图 1 可知,酸性蛋白酶酶解产物的 DPPH 自由基和 ABTS⁺ 自由基清除率显著高于其他蛋白酶(P<0.05),而其他酶种类对 DPPH 自由基和 ABTS⁺ 自由基清除率相对较低,这与蟹甲胶原的酸溶性特性一致^[14]。说明蟹甲胶原在酸性条件下更易释放生物活性肽,故选择酸性蛋白酶作为最优水解酶。

2.2 单因素试验

由图 2 可知,蟹甲胶原肽的 DPPH 自由基和 ABTS⁺ 自

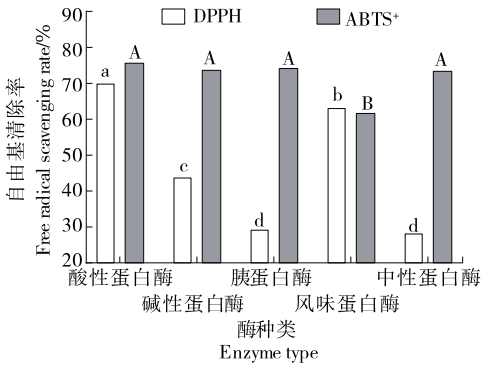


图 1 不同蛋白酶酶解产物对 DPPH 自由基和 ABTS⁺ 自由基清除率的影响

Figure 1 Effect of different protease enzyme hydrolysis products on scavenging rate of free radicals DPPH and ABTS⁺

由基清除率均随着酶解温度、pH 的增加呈先升后降趋势,可能是因为酸性蛋白酶具有最适酶解温度及 pH,因此选择酶解蟹甲胶原肽的最适酶解温度为 45℃、最适 pH 为 4.0。当酶解时间为 15 h,酶添加量为 5 000 U/g 时,DPPH 自由基和 ABTS⁺ 自由基清除率均达到最大,过长的酶解时间及过多的酶添加量可能会导致部分抗氧化多肽片段被切断,导致酶解产物的抗氧化能力下降。当料液比为 1:20 (g/mL) 时,DPPH 自由基和 ABTS⁺ 自由基清除率均显著增加,随着料液比增加到 1:30 (g/mL),ABTS⁺ 自由基清除率有少许增加,而 DPPH 自由基清除率开始下降。由于料液比增加会使体系流动性变差,不利于酶与底物反应,故选择料液比为 1:20 (g/mL)。

2.3 响应面试验

Box-Behnken 试验因数水平见表 1,试验设计及结果见表 2。根据 Design-expert 8.0.6 分析分别获得 DPPH 自由基清除率(Y₁)和 ABTS⁺ 自由基清除率(Y₂)的二次响应面回归方程为:

$$Y_1=0.95+0.008\ 178A+0.005\ 158B-0.022C+0.003\ 214D-0.026E-0.012AB+0.006\ 974AC+0.005\ 511AD+0.022AE+0.044BC+0.007\ 588BD+0.062BE-0.002\ 568CD+0.004\ 079CE-0.033DE-0.12A^2-0.15B^2-0.12C^2-0.13D^2-0.097E^2,\tag{2}$$

表 1 Box-Behnken 试验设计因素水平表

Table 1 Factors and levels in Box-Behnken test design					
水平	A 酶添加量 (U·g ⁻¹)	B pH	C 酶解 时间/h	D 料液比 (g/mL)	E 酶解 温度/℃
-1	4 500	3.5	12	1:10	40
0	5 000	4.0	15	1:20	45
1	5 500	4.5	18	1:30	50

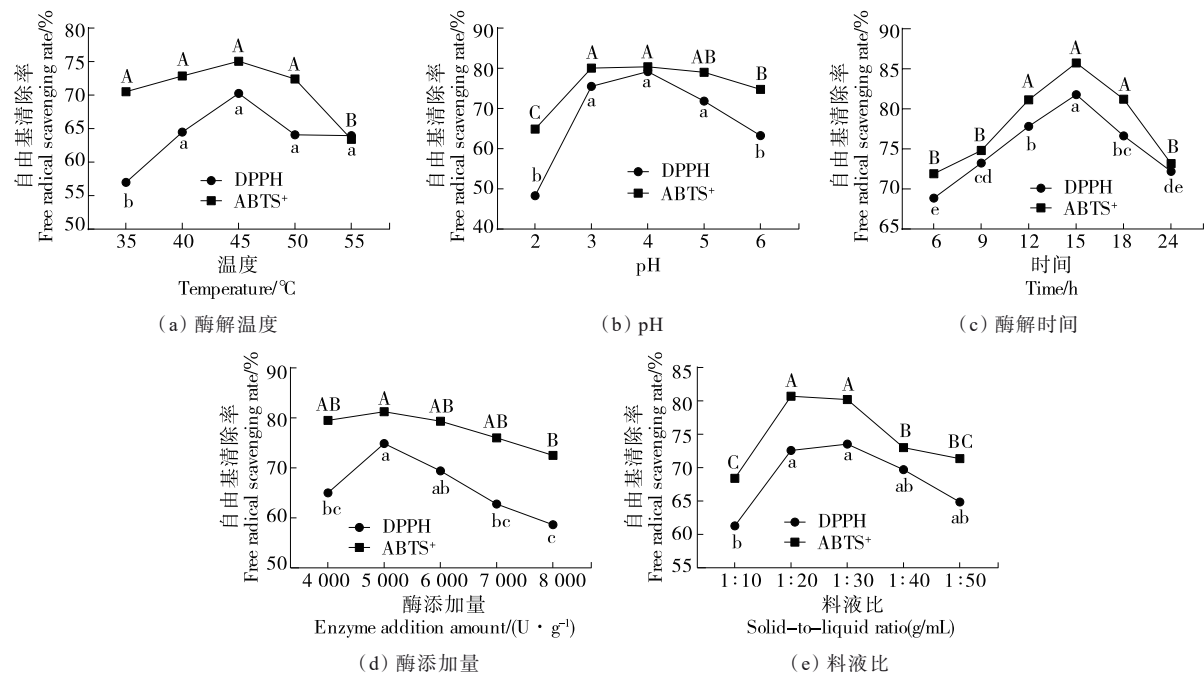


图2 各因素对DPPH自由基和ABTS⁺自由基清除率的影响

Figure 2 Effect of various factors on scavenging rate of free radicals DPPH and ABTS⁺

表2 Box-Behnken试验设计与结果

Table 2 Box-Behnken test design and results

试验号	A	B	C	D	E	Y ₁ DPPH自由 基清除率/%	Y ₂ ABTS ⁺ 自由 基清除率/%	试验号	A	B	C	D	E	Y ₁ DPPH自由 基清除率/%	Y ₂ ABTS ⁺ 自由 基清除率/%
1	0	0	0	-1	-1	70.34	71.20	24	0	0	-1	-1	0	76.03	76.00
2	1	0	0	-1	0	73.36	68.24	25	0	0	0	0	0	85.29	92.08
3	0	-1	0	0	-1	82.38	79.25	26	0	0	0	0	0	87.22	88.00
4	0	0	0	0	0	85.31	91.33	27	0	0	0	0	0	86.99	89.09
5	0	1	-1	0	0	67.47	71.35	28	0	0	0	0	0	84.71	88.23
6	1	0	0	0	-1	75.10	76.41	29	-1	0	1	0	0	69.47	85.69
7	0	1	0	1	0	71.80	75.27	30	-1	0	0	-1	0	65.69	82.07
8	-1	0	-1	0	0	74.06	70.64	31	-1	0	0	0	-1	81.39	76.03
9	0	0	-1	0	1	69.79	71.13	32	0	-1	0	-1	0	64.73	85.26
10	0	-1	0	0	1	63.94	77.25	33	0	0	0	1	1	68.50	80.53
11	0	0	1	0	1	67.47	87.85	34	1	1	0	0	0	64.22	82.37
12	0	0	0	-1	1	72.65	79.12	35	-1	1	0	0	0	67.50	88.74
13	0	0	-1	1	0	73.32	71.35	36	0	1	0	0	1	74.07	83.29
14	1	0	1	0	0	68.60	79.85	37	0	-1	1	0	0	63.38	83.17
15	0	0	1	1	0	66.36	85.85	38	0	0	1	0	-1	71.37	81.49
16	0	1	1	0	0	74.41	88.03	39	1	0	-1	0	0	75.97	82.20
17	0	1	0	0	-1	67.70	83.66	40	0	-1	0	1	0	64.64	75.10
18	0	0	0	0	0	82.57	90.02	41	-1	0	0	1	0	66.47	80.60
19	0	-1	-1	0	0	74.13	73.64	42	1	-1	0	0	0	68.11	77.37
20	0	0	-1	0	-1	75.33	76.75	43	0	0	0	1	-1	79.46	79.34
21	-1	0	0	0	1	71.17	78.49	44	-1	-1	0	0	0	66.48	82.38
22	0	0	1	-1	0	70.10	79.07	45	0	1	0	-1	0	68.85	78.35
23	1	0	0	1	0	76.34	75.58	46	1	0	0	0	1	73.62	78.45

$$Y_2 = 0.9 - 0.015A + 0.011B + 0.049C + 0.002703D + 0.007495E - 0.003413AB - 0.043AC + 0.022AD - 0.001047AE + 0.018BC + 0.018BD + 0.004087BE + 0.029CD + 0.03CE - 0.017DE - 0.054A^2 - 0.038B^2 - 0.055C^2 - 0.073D^2 - 0.058E^2.$$

(3)

根据回归模型,各因素对 DPPH 自由基清除率影响的主次顺序为酶解温度>酶解时间>酶添加量>pH>料液

比,对 ABTS⁺ 自由基清除率影响的主次顺序为酶解时间>酶添加量>pH>酶解温度>料液比。由图 3~图 4 可知,各因素两两间的交互作用明显。

由表 3 可知,各回归模型 $P < 0.0001$,说明模型极显著,失拟项分别为 $P_{\text{DPPH 自由基}} = 0.0706$, $P_{\text{ABTS}^+ \text{ 自由基}} = 0.1175$,表明模型拟合程度良好。预测最佳工艺为酶解温度 44.899 °C、料液比 1:2.030 (g/mL)、酶添加量 4 970.527 U/g、

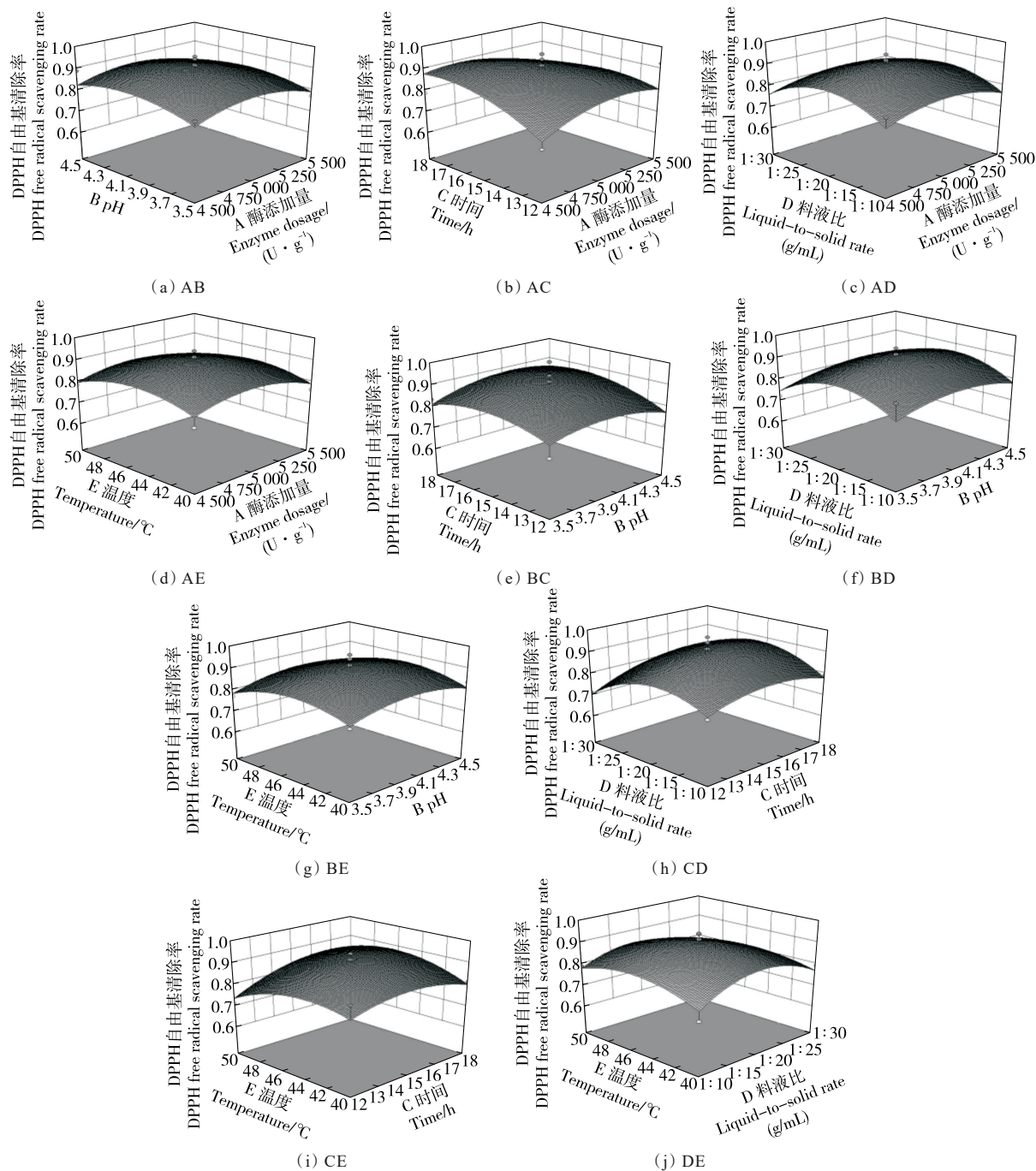
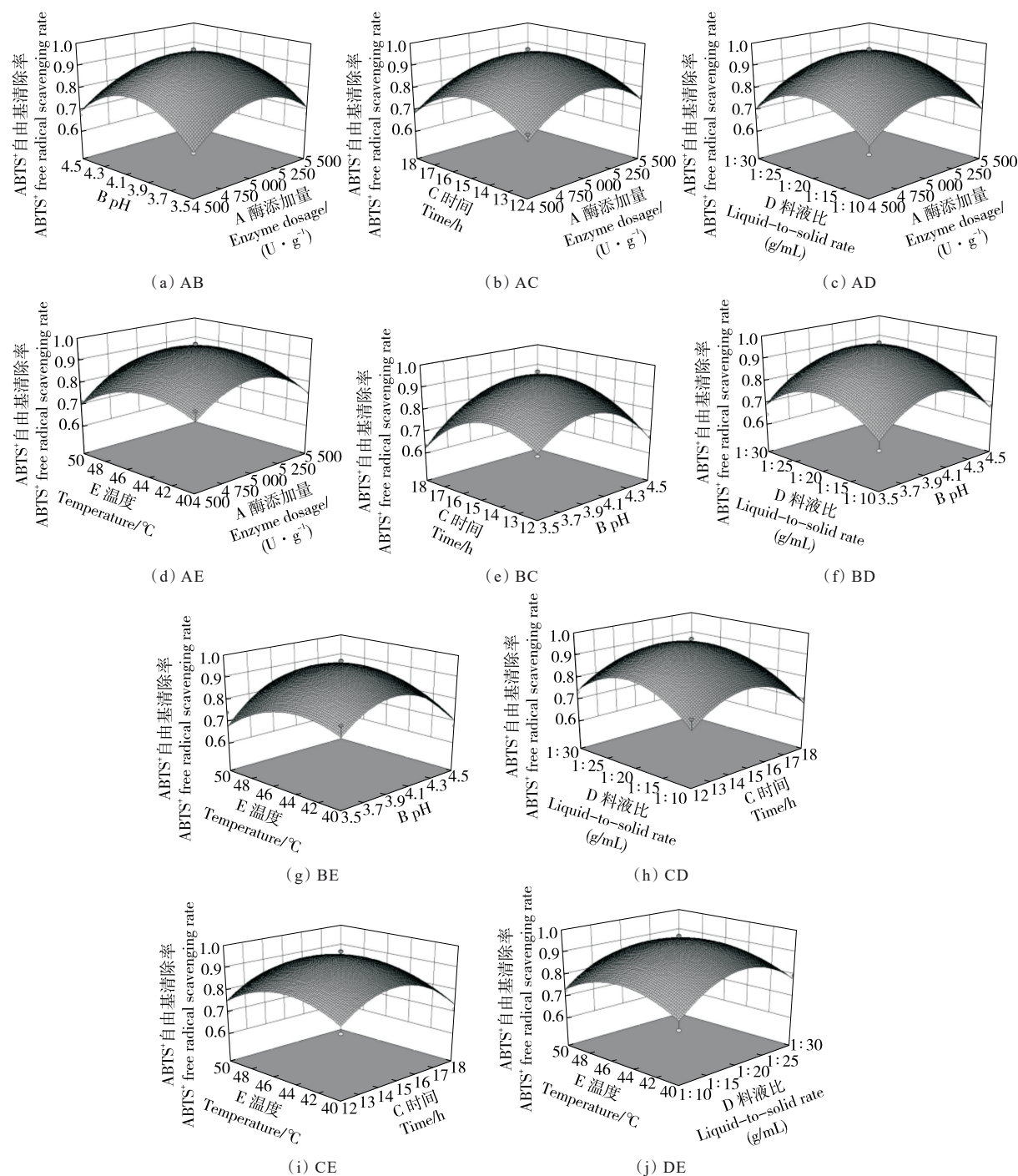


图 3 各因素间交互作用对 DPPH 自由基清除率的影响

Figure 3 Effect of interaction among various factors on DPPH scavenging rate

图4 各因素间交互作用对ABTS⁺自由基清除率的影响Figure 4 Effect of interaction among various factors on ABTS⁺ scavenging rate

pH 4.038、酶解时间 15.419 h,此时 DPPH 自由基清除率为 90.9%,ABTS⁺自由基清除率为 94.80%。

2.4 体外抗氧化性分析

由图 5 可知,相对分子质量 <5 的鳖甲胶原蛋白肽对 DPPH 自由基、ABTS⁺自由基、羟自由基、O₂⁻ 自由基清除率显著高于其他相对分子质量肽段 ($P < 0.05$),与 Xie

等^[23]的研究规律一致,表明小分子肽可能更易与自由基发生氢键或电子转移反应。

2.5 鳖甲胶原肽对 H₂O₂ 诱导 B16F10 细胞损伤的减弱作用

由图 6 可知,随着 H₂O₂ 浓度的增加,细胞存活率逐渐降低。与对照组相比,2 mmol/L H₂O₂ 刺激 24 h 后,

表 3 回归模型方差分析[†]
Table 3 Analysis of variance for regression model

方差来源	平方和		自由度	均方		F 值		P 值	
	DPPH 自由基	ABTS ⁺ 自由基		DPPH 自由基	ABTS ⁺ 自由基	DPPH 自由基	ABTS ⁺ 自由基	DPPH 自由基	ABTS ⁺ 自由基
模型	0.140 0	0.380 0	20	0.006 9	0.019 0	5.110 0	20.200 0	<0.000 1***	<0.000 1
A	0.003 6	0.001 1	1	0.003 4	0.001 1	2.720 0	1.140 0	0.111 6	0.295 5
B	0.001 9	0.000 4	1	0.001 9	0.000 4	1.450 0	0.450 0	0.239 5	0.506 6
C	0.038 0	0.007 6	1	0.038 0	0.007 6	28.340 0	8.140 0	<0.000 1***	0.008 6
D	0.000 1	0.000 2	1	0.000 1	0.000 2	0.087 0	0.180 0	0.770 2	0.678 1
E	0.000 9	0.011 0	1	0.000 9	0.011 0	0.670 0	11.680 0	0.420 6	0.002 2
AB	0.000 0	0.000 6	1	0.000 0	0.000 6	0.035 0	0.640 0	0.853 6	0.429 6
AC	0.007 6	0.000 2	1	0.007 6	0.000 2	5.650 0	0.210 0	0.025 5*	0.652 6
AD	0.001 9	0.000 1	1	0.001 9	0.000 1	1.450 0	0.130 0	0.240 3	0.721 8
AE	0.000 0	0.001 9	1	0.000 0	0.001 9	0.003 3	2.040 0	0.954 8	0.165 5
BC	0.001 3	0.007 8	1	0.001 3	0.007 8	0.950 0	8.350 0	0.338 3	0.007 9
BD	0.001 3	0.000 2	1	0.001 3	0.000 2	0.940 0	0.250 0	0.342 4	0.624 4
BE	0.000 1	0.015 0	1	0.000 0	0.015 0	0.050 0	16.410 0	0.825 1	0.000 4
CD	0.003 3	0.000 0	1	0.003 3	0.000 0	2.440 0	0.028 0	0.130 9	0.868 1
CE	0.003 6	0.000 1	1	0.003 6	0.000 1	2.680 0	0.071 0	0.114 2	0.792 0
DE	0.001 1	0.004 4	1	0.001 1	0.004 4	0.840 0	4.690 0	0.366 9	0.040 1
A ²	0.026 0	0.120 0	1	0.026 0	0.120 0	19.240 0	133.100 0	0.000 2**	<0.000 1
B ²	0.013 0	0.190 0	1	0.013 0	0.190 0	9.520 0	203.100 0	0.004 9**	<0.000 1
C ²	0.027 0	0.130 0	1	0.027 0	0.130 0	19.880 0	133.700 0	0.000 2**	<0.000 1
D ²	0.046 0	0.140 0	1	0.046 0	0.140 0	34.560 0	150.200 0	<0.000 1***	<0.000 1***
E ²	0.030 0	0.083 0	1	0.030 0	0.083 0	22.230 0	88.150 0	<0.000 1***	<0.000 1***
残差	0.034 0	0.023 0	25	0.001 3	0.000 9				
失拟项	0.031 0	0.022 0	20	0.001 5	0.001 1	2.940 0	3.840 0	0.117 5	0.070 6
纯误差	0.002 6	0.001 4	5	0.000 5	0.000 3				
总计	0.170 0	1.140 0	45						

† *为 $P<0.05$; **为 $P<0.01$; ***为 $P<0.001$ 。

B16F10 细胞存活率为 $(54.93\pm 1.67)\%$, 表明损伤模型建立成功。与模型组相比, 相对分子质量 <5 鳖甲胶原肽对 B16F10 细胞存活率的提升效果最为显著, 可达到 $(81.53\pm 3.63)\%$; 相对分子质量为 5~10 和 10~30 胶原肽组的存活率提升较少, 分别为 $(67.94\pm 2.86)\%$ 和 $(64.27\pm 1.08)\%$; 相对分子质量为 30~50 胶原肽组的存活率提升最低, 为 $(57.93\pm 1.45)\%$ ($P<0.05$)。Hoechst 3342 染色显示, 在对照组细胞中几乎没有检测到凝聚核, 而在 H_2O_2 损伤组细胞中出现明亮的凝聚核, 添加相对分子质量 <5 的

胶原肽组细胞中凝聚核明显减少, 说明该大小的鳖甲胶原肽对细胞具有减轻氧化损伤的作用, 与 Feng 等^[24]的研究结果类似。

由表 4 可知, 与对照组相比, 模型组 CAT 和 GSH-PX 活性显著降低, 而 LDH 含量显著升高。相对分子质量 <5 的胶原肽组可提高 CAT 和 GSH-PX 活性, 降低 LDH 含量, 表明 <5 的胶原肽可能通过激活内源性抗氧化酶系统来减轻细胞的氧化损伤。

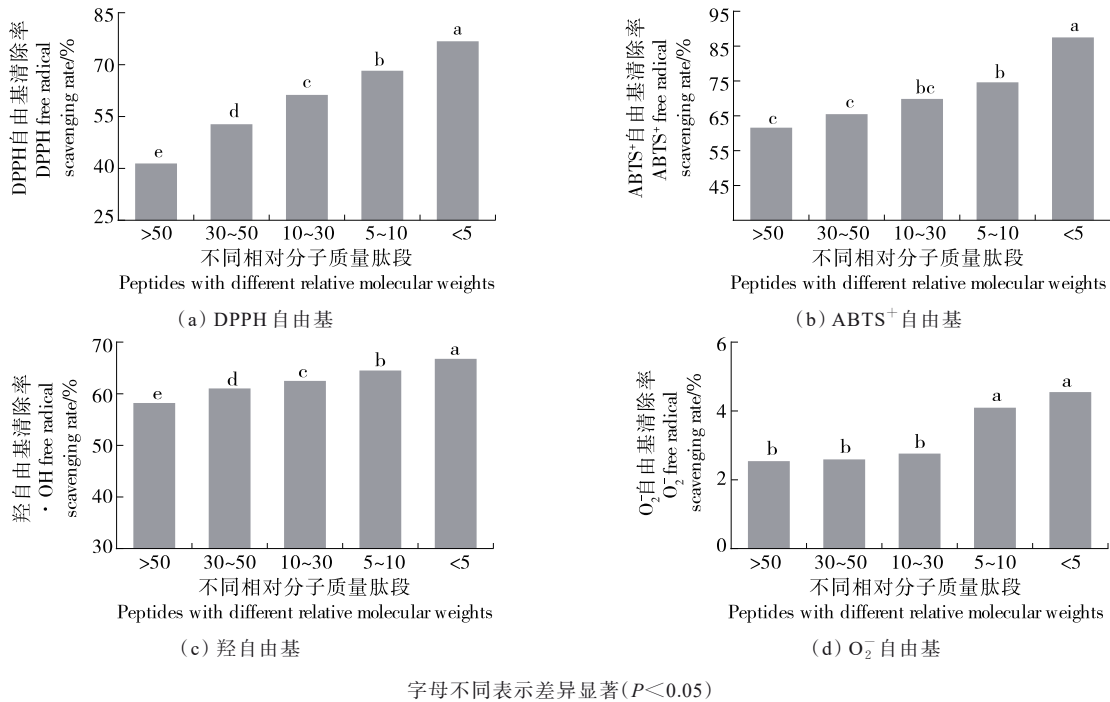


图5 不同相对分子质量胶原肽对体外自由基清除能力的影响

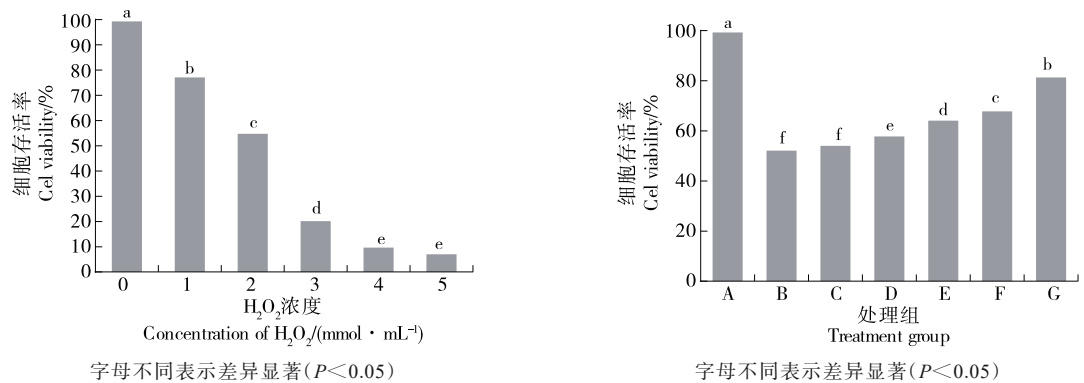
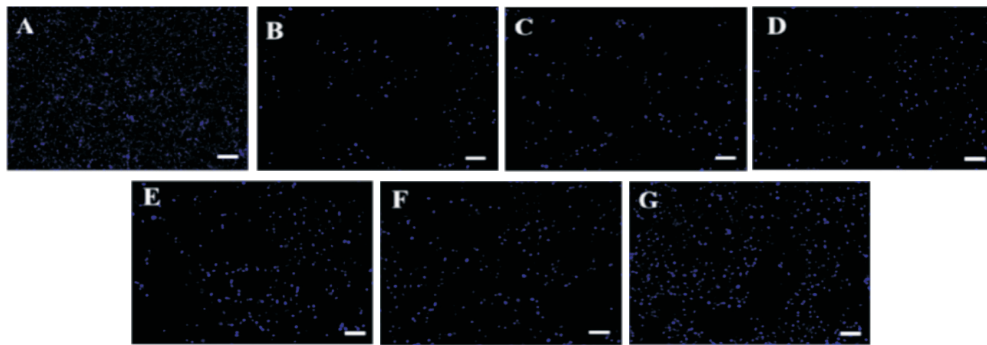
Figure 5 Effect of collagen peptides with different relative molecular weights on *in vitro* free radical scavenging capacity(a) 不同的 H₂O₂ 浓度对 B16F10 黑色素瘤细胞活力的影响(b) 不同相对分子质量胶原肽对 H₂O₂ 诱导 B16F10 黑色素瘤细胞的保护作用(c) 不同相对分子质量胶原肽对 H₂O₂ 诱导 B16F10 黑色素瘤细胞凋亡的影响图6 不同相对分子质量胶原肽对 H₂O₂ 诱导 B16F10 黑色素瘤细胞的保护作用Figure 6 Protective effect of collagen peptides with different relative molecular weights on H₂O₂-induced B16F10 melanoma cells

表 4 不同相对分子质量胶原肽对 B16F10 细胞中 CAT、GSH-Px、LDH 的影响[†]

Table 4 Effect of collagen peptides with different relative molecular weights on CAT, GSH-Px, and LDH in B16F10 cells

组别	CAT	GSH-PX	LDH
A	32.22±0.80 ^a	43.51±3.14 ^a	60.84±3.00 ^d
B	21.47±0.76 ^{cd}	24.54±2.58 ^{cd}	83.02±5.14 ^a
C	20.03±1.31 ^d	23.04±1.40 ^d	72.55±3.91 ^b
D	17.32±1.31 ^d	20.24±1.70 ^d	76.59±4.03 ^{ab}
E	20.54±3.60 ^{cd}	24.06±2.83 ^d	70.21±2.28 ^b
F	25.52±1.73 ^{bc}	27.45±4.36 ^c	63.74±3.39 ^c
G	29.99±1.16 ^{ab}	37.46±1.02 ^{ab}	59.06±2.70 ^d

[†] 字母不同表示差异显著($P<0.05$)。

3 结论

鳖甲胶原肽的最佳酶解工艺条件为采用酸性蛋白酶,酶解温度 44.899℃、料液比 1:2.030 (g/mL)、酶添加量 4 970.527 U/g、pH 4.038、酶解时间 15.419 h,此条件下制备的胶原肽对 DPPH 自由基和 ABTS⁺ 自由基的清除率分别为 90.9% 和 94.8%。相对分子质量<5 的鳖甲胶原肽可显著增加 H₂O₂ 诱导 B16F10 细胞损伤中的细胞存活率和抗氧化酶活性,说明小分子肽可通过调节 CAT/GSH-Px 通路减轻细胞氧化损伤。试验仅采用体外模型评估鳖甲胶原肽的抗氧化活性,未来可能需结合质谱鉴定关键活性序列,并通过动物试验验证其体内抗氧化功效。

参考文献

[1] 江振洲,袁子航,孙丽新,等. 中国药物作用靶点研究进展(I) [J]. 药学进展, 2020, 44(6): 433-450.

JIANG Z Z, YUAN Z H, SUN L X, et al. Progress in research on drug targets in China (I) [J]. Progress in Pharmaceutical Sciences, 2020, 44(6): 433-450.

[2] SIERRA L, FAN H B, ZAPATA J, et al. Antioxidant peptides derived from hydrolysates of red tilapia (*Oreochromis sp.*) scale [J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 146: 111631.

[3] 倪策,曹天红,陈敏,等. 核桃粕源抗氧化活性肽的酶解制备及活性分析[J]. 食品与机械, 2024, 40(5): 51-61.

NI C, CAO T H, CHEN M, et al. Enzymatic hydrolysis preparation and activity analysis of antioxidant peptides derived from walnut dregs[J]. Food & Machinery, 2024, 40(5): 51-61.

[4] 刘文颖,冯晓文,李国明,等. 牡蛎低聚肽的结构表征及体外抗氧化作用[J]. 中国食品学报, 2021, 21(12): 261-269.

LIU W Y, FENG X W, LI G M, et al. Structure characterization and antioxidant effects *in vitro* of oyster oligopeptides[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology,

2021, 21(12): 261-269.

[5] 米春孝,周慧,胡兴媛,等. 微波辅助酶解罗非鱼皮抗氧化肽制备及结构分析[J]. 食品与机械, 2025, 41(6): 173-181.

MI C X, ZHOU H, HU X Y, et al. Preparation and structural analysis of antioxidant peptides from tilapia skin by microwave-assisted enzymatic hydrolysis[J]. Food & Machinery, 2025, 41(6): 173-181.

[6] 吴松霞,郑硕磊,安颖,等. 金枪鱼胶原低聚肽抑制皮肤细胞黑色素生成及抗氧化损伤作用研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(1): 91-101.

WU S X, ZHENG S L, AN Y, et al. Study on the inhibition of melanogenesis and antioxidant damage of tuna skin collagen oligo-peptide[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(1): 91-101.

[7] WANG W Y, ZHAO Y Q, ZHAO G X, et al. Antioxidant peptides from collagen hydrolysate of redlip croaker (*Pseudosciaena polyactis*) scales: preparation, characterization, and cytoprotective effects on H₂O₂-damaged HepG2 cells[J]. Marine Drugs, 2020, 18(3): 156.

[8] 赵侠,李燕,孙慧敏,等. 脱脂南极磷虾粉中降血糖与抗氧化肽的分离纯化与鉴定[J]. 上海海洋大学学报, 2023, 32(6): 1 155-1 164.

ZHAO X, LI Y, SUN H M, et al. Purification and identification of antidiabetogenic and antioxidant peptide from defatted Antarctic krill powder hydrolysates[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2023, 32(6): 1 155-1 164.

[9] LI C Y, SONG W, WU J P, et al. Thermal stable characteristics of acid- and pepsin-soluble collagens from the carapace tissue of Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*) [J]. Tissue and Cell, 2020, 67: 101424.

[10] 卢梦楠,李兰芳,景玉蕾,等. 鳖甲胶原蛋白酶解物的分离纯化及体外抗氧化性研究[J]. 核农学报, 2020, 34(5): 1 047-1 053.

LU M N, LI L F, JING Y L, et al. Isolation, purification and antioxidant of collagen enzymatic hydrolysate from the carapace of Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*) [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2020, 34(5): 1 047-1 053.

[11] HOU M D, SUN W B, XIAO C B, et al. Integrated metabolome and transcriptome revealed the metabolite characteristics and potential gene regulation mechanism in muscle of different ages male Chinese soft-shelled turtles (*Pelodiscus sinensis*)[J]. Aquaculture, 2024, 586: 740784.

[12] QI M, WANG Y, HU L L, et al. Investigation of plasticity in morphology, organ traits and nutritional composition in Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*) under different culturing modes[J]. Fishes, 2025, 10(3): 89.

[13] 程小飞,高金伟,向劲,等. 饲料中添加虾壳粉对中华鳖肌肉营养成分及质构特性的影响[J]. 中国饲料, 2021(11): 72-77.

- CHENG X F, GAO J W, XIANG J, et al. Effects of dietary crawfish shell meal on muscle nutritional components and texture characteristics of Chinese soft-shell turtle (*Trionyx sinensis*) [J]. China Feed, 2021(11): 72-77.
- [14] 黄可承. 中华鳖粉胶原蛋白制备及多肽抗氧化性质研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2023.
- HUANG K C. Preparation of collagen from Chinese soft-shelled turtle powder and study of antioxidant properties of peptides[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2023.
- [15] 赵琼瑜, 胡鉴, 陈雨欣, 等. 中华鳖背甲脱钙工艺优化及其胶原蛋白结构表征[J]. 食品与机械, 2022, 38(10): 151-157, 223.
- ZHAO Q Y, HU J, CHEN Y X, et al. Optimization of calcium removal in the carapace of Chinese soft-shelled turtle and structural characteristics of its collagen[J]. Food & Machinery, 2022, 38(10): 151-157, 223.
- [16] WANG Y M, LI X Y, WANG J, et al. Antioxidant peptides from protein hydrolysate of skipjack tuna milt: purification, identification, and cytoprotection on H₂O₂ damaged human umbilical vein endothelial cells[J]. Process Biochemistry, 2022, 113: 258-269.
- [17] ZHANG W H, JIA N, ZHU Z H, et al. Changes of antioxidative activities and peptidomic patterns of *Auxenochlorella pyrenoidosa* protein hydrolysates: effects of enzymatic hydrolysis and decoloration processes[J]. LWT- Food Science and Technology, 2021, 152: 112306.
- [18] CUI Q, SUN Y X, CHENG J J, et al. Effect of two-step enzymatic hydrolysis on the antioxidant properties and proteomics of hydrolysates of milk protein concentrate[J]. Food Chemistry, 2022, 366: 130711.
- [19] 曹少谦, 刘亮, 朱孟飞, 等. 乌贼墨多糖提取物的制备及其对 B16F10 细胞的影响[J]. 核农学报, 2017, 31(5): 906-912.
- CAO S Q, LIU L, ZHU M F, et al. Preparation of polysaccharide extracts from sepia ink and its effects on B16F10 cells[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2017, 31(5): 906-912.
- [20] 马琮鉴, 黄凤英, 龚其海, 等. 淫羊藿次苷 II 对过氧化氢诱导的 bEnd.3 细胞氧化应激损伤的影响[J]. 中药药理与临床, 2021, 37(6): 43-47.
- MA C J, HUANG F Y, GONG Q H, et al. Effects of icariside II on oxidative stress injury induced by hydrogen peroxide in bEnd.3 cells[J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 2021, 37(6): 43-47.
- [21] 陈秋平, 林心健, 李申兰, 等. 二氢杨梅素和杨梅苷抑制 HepG2 细胞的协同作用[J]. 食品工业科技, 2021, 42(8): 333-337.
- CHEN Q P, LIN X J, LI S L, et al. Synergistic anti-tumor effect of dihydromyricetin and myricitrin on HepG2 cells[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(8): 333-337.
- [22] 玛依乐·艾海提, 刘焱杰, 李建科. 神经酸对 H₂O₂ 诱导 PC12 细胞氧化损伤的保护作用[J]. 食品科学, 2024, 45(9): 116-123.
- MAYILE A H T, LIU Y J, LI J K. Protective effect of nervonic acid on oxidative damage of PC12 cells induced by H₂O₂[J]. Food Science, 2024, 45(9): 116-123.
- [23] XIE Z K, WANG X G, YU S Y, et al. Antioxidant and functional properties of cowhide collagen peptides[J]. Journal of Food Science, 2021, 86(5): 1 802-1 818.
- [24] FENG L, PENG F, WANG X J, et al. Identification and characterization of antioxidative peptides derived from simulated in vitro gastrointestinal digestion of walnut meal proteins[J]. Food Research International, 2019, 116: 518-526.