DOI:10.12161/j.issn.1005-6521.2026.17.016

罗非鱼皮胶原三肽的制备及抗氧化活性

马淑平[1],石径[1],田顺风[1],冯萌萌[1],罗永康[2],姜燕飞[1],赵春月[1*]
(1.北京青颜博识健康管理有限公司,北京 100085;2.中国农业大学 食品科学与营养工程学院,北京 100083)

摘　要:为有效利用罗非鱼皮制备具有抗氧化活性的胶原三肽,该研究采用响应面法优化酶解条件制备罗非鱼皮胶原三肽,并通过对比其与市售胶原三肽的分子量分布、氨基酸组成、抗氧化活性的差异,评价罗非鱼皮胶原三肽的品质。结果表明,利用碱性蛋白酶和菠萝蛋白酶复配酶解(加酶量为5 000 U/g,酶活比为1∶1),在酶解温度为55 ℃、液料比为6.3∶1(mL/g)、酶解pH值为9.2的条件下,制备的罗非鱼皮胶原三肽的含量最高,为37.25%。与市售胶原三肽相比,罗非鱼皮胶原三肽具有更小的重均分子量(476 Da),更高含量的必需氨基酸(15.42%)和疏水性氨基酸(32.53%)。此外,当罗非鱼皮胶原三肽浓度为2.00 mg/mL时,DPPH自由基和$ABTS^+$自由基清除率分别达38.55%和61.97%,表现出优于市售胶原三肽的抗氧化能力。

关键词:胶原三肽;优化酶解条件;分子量分布;氨基酸组成;抗氧化活性

Preparation and Antioxidant Activity of Collagen Tripeptide from Tilapia Skin

MA Shuping[1], SHI Jing[1], TIAN Shunfeng[1], FENG Mengmeng[1], LUO Yongkang[2], JIANG Yanfei[1], ZHAO Chunyue[1*]
(1. Beijing Qingyan Boshi Health Management Co., Ltd., Beijing 100085, China; 2. College of Food Science & Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: To effectively utilize tilapia skin for the preparation of collagen tripeptides with antioxidant activity, response surface methodology was adopted to optimize the enzymatic hydrolysis conditions. The quality of tilapia skin's collagen tripeptide was evaluated by comparing its molecular weight distribution, amino acid composition, and antioxidant activity with those of commercial collagen tripeptide. The results showed that the highest tripeptide content of 37.25% was obtained using a compound enzyme of alkaline protease and bromelain (enzyme dosage od 5 000 U/g at a ratio of 1∶1) under the conditions of enzymatic hydrolysis temperature of 55 ℃, liquid-solid ratio of 6.3∶1 (mL/g), and pH of 9.2. Compared with commercial collagen tripeptide, the tilapia skin's collagen tripeptide had a smaller weight-average molecular weight (476 Da) and higher contents of essential amino acids (15.42%) and hydrophobic amino acids (32.53%). Furthermore, at a concentration of 2.00 mg/mL, the DPPH and $ABTS^+$ free radical scavenging rates of tilapia skin's collagen tripeptide reached 38.55% and 61.97%, respectively, indicating superior antioxidant capacity compared to commercial collagen tripeptide.

Key words: collagen tripeptide; optimized enzymatic hydrolysis condition; molecular weight distribution; amino acid composition; antioxidant activity

引文格式:
马淑平,石径,田顺风,等.罗非鱼皮胶原三肽的制备及抗氧化活性[J].食品研究与开发,2026,47(17):131-140.
MA Shuping, SHI Jing, TIAN Shunfeng, et al. Preparation and Antioxidant Activity of Collagen Tripeptide from Tilapia Skin[J]. Food Research and Development,2026,47(17):131-140.

基金项目:"十四五"国家重点研发计划重点专项(2022YFD2100900)
作者简介:马淑平(1993—),女(汉),硕士研究生,研究方向:功能食品原料制备工艺及功能活性。
*通信作者:赵春月(1987—),女,研究员,博士,研究方向:拮抗皮肤衰老新原料开发及作用机制。

胶原蛋白是细胞外基质的关键组成部分，是由 3 条多肽链排列而成的三螺旋结构，$(Gly\text{-}X\text{-}Y)_n$ 重复序列是胶原蛋白的一级结构（其中 X、Y 常为脯氨酸和羟脯氨酸）[1]。这种结构赋予了胶原蛋白高度的稳定性与机械强度，在维持皮肤的紧致、骨骼的韧性以及肌腱的弹性等方面起着不可或缺的作用[2-4]。因此，胶原蛋白被广泛应用于医学、美容和食品工业等领域[5-6]。长期以来，市面上的胶原蛋白主要来源于哺乳动物（如猪、牛、鸡）的皮和骨[7]，然而，由于近年来禽流感、疯牛病、口蹄疫和其他传染病的爆发，海洋胶原蛋白肽的需求迅速增长，鱼类加工副产物（鱼皮和鱼鳞）来源的胶原蛋白已成为全球胶原蛋白肽的重要原料来源[8]。罗非鱼生长速度快、产量高，加工副产物约占全鱼质量的 60%~70%，且鱼皮中蛋白质含量丰富，脂肪含量较低，是胶原蛋白的良好原料来源[9]。Xiao 等[10]探究了罗非鱼皮胶原蛋白肽改善中波紫外线（ultraviolet b，UVB）诱导的人角质形成细胞光老化的作用与机制，结果表明，该肽可显著降低细胞内活性氧水平，提高抗氧化因子的表达，抑制基质金属蛋白酶-1（matrix metalloproteinase-1，MMP-1）和基质金属蛋白酶-9（matrix metalloproteinase-9，MMP-9）的表达，增加 I 型前胶原蛋白的生成，从而减轻 UVB 诱导的细胞损伤。

胶原蛋白分子量较大，在体内的消化和吸收效率较低，难以被机体快速有效地利用，从而限制了其在生物医学和营养保健领域的应用效能[11]。刘冬艳等[12]利用分子量分别为小于 1 000、1 000~<3 000、3 000~<6 000 Da 的胶原蛋白肽对大鼠进行灌胃，通过测定大鼠粪便、尿液、血液中的羟脯氨酸含量，研究不同分子量的鱼皮胶原蛋白肽的口服生物利用度，结果表明，分子量为 1 000~<3 000 Da 的胶原蛋白肽更易被吸收。Hong 等[13]的研究表明，口腔黏膜组织对胶原蛋白的吸收率与分子量相关，与分子量为 1 000 Da 的胶原蛋白肽相比，分子量为 500 Da 的胶原蛋白肽的吸收率提高了 2~3 倍。有学者发现，人体肠道存在肽转运体寡肽转运蛋白 1（oligopeptide transporter 1，PepT 1），能特异性转运二肽和三肽，因此胶原三肽可直接被肠道吸收或者经不完全消化后再被人体吸收[14-15]，且胶原三肽的小肠吸收率明显高于大分子的胶原蛋白肽和游离氨基酸[16]。汪雪莲等[17]以罗非鱼皮为原料，通过分步酶解制备了甘氨酸-脯氨酸-羟脯氨酸（glycyl-prolyl-hydroxyproline，GPH）肽段含量为 1.46% 的胶原三肽。周先艳[18]利用碱性蛋白酶酶解制备了甘氨酰-脯氨酰-丙氨酸（glycyl-prolyl-alanine，GPA）、甘氨酰-脯氨酰-丝氨酸（glycyl-prolyl-serine，GPS）和甘氨酰-脯氨酰-精氨酸（glycyl-prolyl-arginine，GPR）肽段含量较多的鳕鱼胶原蛋白肽。Wang 等[19]研究发现富含 GPH 肽段的胶原蛋白水解物，具有减轻经长波紫外线（ultraviolet a，UVA）诱导的人体真皮成纤维细胞损伤、促进 I 型胶原蛋白合成的活性。艾奇丽[20]的研究表明，GPA 能够通过提高超氧化物歧化酶、抑制活性氧的产生和胶原酶的活性，修复光损伤成纤维细胞，提高光损伤成纤维细胞的存活率。Tang 等[21]的研究表明，猪皮胶原三肽能够通过降低血清总胆固醇水平，抑制巨噬细胞和主动脉平滑肌细胞的增殖、减少活性氧诱导的氧化应激，从而延缓动脉粥样硬化的发展。

现有胶原三肽的相关报道主要聚焦于特定三肽肽段的生物活性的研究，关于胶原三肽的制备工艺的研究较少，且已有报道中胶原三肽的制备工艺多为分步酶解，工艺复杂。本研究以罗非鱼皮为原料，以三肽含量为评价指标，通过单因素试验和响应面试验确定罗非鱼皮胶原三肽的制备工艺，并将其与市售胶原三肽进行对比，测定其组成成分及抗氧化活性，旨在为高品质罗非鱼皮胶原三肽的开发提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

冷冻湿罗非鱼皮：湛江市金霆进出口有限公司；碱性蛋白酶（50 万 U/g）、中性蛋白酶（30 万 U/g）、菠萝蛋白酶（50 万 U/g）：南宁庞博生物工程有限公司；胶原蛋白酶（20 万 U/g）、复配酶 1（木瓜酶+风味酶，3 万 U/g）、复配酶 2（中性酶+风味酶，4 000 U/g）：南宁东恒华道生物科技有限责任公司；鱼源胶原三肽 1、胶原三肽 2：市售。

2，2′联氮-双-（3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸）[2，2-azino-bis（3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate），ABTS]：美国 Sigma 公司；1，1-二苯基-2-三硝基肼（1，1-diphenyl-2-picrylhydrazyl，DPPH）：上海麦克林生化科技有限公司；氢氧化钠、无水柠檬酸、无水乙醇、过硫酸钾（均为分析纯）：国药集团化学试剂有限公司；乙腈、三氟乙酸（均为色谱纯）：上海阿拉丁生化科技股份有限公司；GPH 标准品（285.29 Da）、乙氨酰-乙氨酰-乙氨酸（189 Da）、乙氨酰-乙氨酰-酪氨酰精氨酸（451 Da）、细胞色素 C（cytochrome C，12 384 Da）、抑肽酶（aprotinin，6 511.44 Da）、杆菌酶（bacitracin，1 422.69 Da）、谷胱甘肽：北京索莱宝科技有限公司；羟脯氨酸试剂盒（酸水解法）：南京建成生物工程研究所有限公司。

LC-OES-60 悬臂式搅拌器：上海力辰邦西仪器有限公司；FA2104 电子天平：上海舜宇恒平科学仪器有限公司；D-3L 三孔水浴锅：上海铂温仪器有限公司；LGJ-12A 真空冷冻干燥机：北京四环起航科技有限公司；SpectraMax Mini 酶标仪：普思百得（北京）科技发展有限公司；ST20 手持 pH 计：奥豪斯仪器（上海）有限公司；Sigma3P 离心机：德国 Sigma Laborzentrifugen 公司；SIL-20AC 高效液相色谱仪：日本岛津公司；L-8900 氨

基酸分析仪：日本日立公司。

1.2 试验方法

1.2.1 罗非鱼皮胶原三肽的制备

取50 g湿罗非鱼皮清洗，将鱼皮剪成0.5 cm×0.5 cm左右小块，加入250 mL质量浓度为0.1%的氢氧化钠溶液，室温浸泡8 h，每4 h更换一次氢氧化钠溶液，去除脂肪和杂蛋白，浸泡结束后用蒸馏水将鱼皮清洗至中性。向脱脂罗非鱼皮加入5倍质量的蒸馏水，于90 ℃热提30 min后冷却至室温，在酶的最适温度和pH值条件下，利用悬臂式搅拌器在100 r/min条件下搅拌酶解，达到酶解时间后升温至85℃，保持15 min灭酶，冷却，8 000 r/min离心15 min取上清液，将上清液冷冻干燥，按照下列公式计算罗非鱼皮胶原三肽的三肽得率（D，%）。

$$D = W_d / W_w \times 100$$

式中：W_d为冻干后样品质量，g；W_w为湿鱼皮质量，g。

1.2.2 三肽含量测定

采用高效液相色谱法测定罗非鱼皮胶原三肽和市售胶原三肽的三肽含量。

色谱条件：TSKgel G2000色谱柱；流动相：乙腈∶水∶三氟乙酸（40∶60∶0.1，体积比）；检测波长：220 nm；流速：0.5 mL/min；柱温：30 ℃；进样体积：10 μL。

标准品和样品的制备：用流动相配制质量分数为10 mg/mL的GPH标准品溶液和样品溶液，过0.45 μm微滤膜。

1.2.3 酶解工艺条件的优化

1.2.3.1 蛋白酶的筛选

以胶原三肽得率和三肽含量为评价指标，选用碱性蛋白酶、中性蛋白酶、菠萝蛋白酶、胶原蛋白酶、复配酶1和复配酶2，在酶添加量为2 500 U/g、酶解时间为5 h的条件下对罗非鱼皮进行酶解，比较6种蛋白酶在其最适酶解条件下的酶解效果，并选用最适的两种蛋白酶用于下一步试验研究。各种蛋白酶的最适酶解条件见表1。

表1 各种蛋白酶的最适酶解条件

Table 1 Optimal conditions of each enzyme

酶种类	酶解条件		
	最适温度/℃	最适pH值	酶解时间/h
中性蛋白酶	57	6.5	5
碱性蛋白酶	60	9.0	5
复配酶1	55	7.5	5
复配酶2	55	7.5	5
菠萝蛋白酶	55	7.0	5
胶原蛋白酶	55	8.0	5

1.2.3.2 单因素试验

根据最适蛋白酶的筛选结果，将碱性蛋白酶和菠萝蛋白酶按酶活比1∶1进行复配，加酶量为5 000 U/g，在不同液料比[2∶1、4∶1、6∶1、8∶1、10∶1（mL/g）]、酶解温度（45、50、55、60、65 ℃）、酶解时间（4、5、6、7、8 h）和酶解pH值（8.0、8.5、9.0、9.5、10.0）条件下进行酶解，制备罗非鱼皮胶原三肽，测定不同酶解条件下制备的罗非鱼皮胶原三肽的三肽含量，从而确定合适的液料比、酶解温度、酶解时间和酶解pH值。

1.2.3.3 响应面优化试验设计

利用Design Expert 13.0软件按照Box-Behnken试验设计原理，综合单因素试验结果，选取酶解温度、酶解pH值和液料比3个工艺参数，以三肽含量为响应值，进行三因素三水平的响应面分析，优化酶解工艺，因素和水平如表2所示。

表2 响应面试验因素与水平

Table 2 Factors and levels for response surface experiment

水平	因素		
	A 液料比/(mL/g)	B 酶解温度/℃	C 酶解pH值
−1	4∶1	50	8.5
0	6∶1	55	9.0
1	8∶1	60	9.5

1.2.4 分子量分布

采用高效液相色谱法测定罗非鱼皮胶原三肽和市售胶原三肽的分子量分布，配制浓度为5 mg/mL的样品溶液，充分溶解后过0.22 μm滤膜，采用TSKgel G2000 SWXL 300 mm×7.8 mm色谱柱，以含有三氟乙酸的乙腈溶液（乙腈、水、三氟乙酸体积比为40∶60∶0.05）为流动相，流速为0.5 mL/min，等度洗脱。柱温为30 ℃，进样体积为10 μL，紫外检测波长为220 nm。以乙氨酰-乙氨酰-乙氨酸、乙氨酰-乙氨酰-酪氨酰精氨酸、细胞色素C、抑肽酶和杆菌酶为标准品建立标准曲线，标准曲线方程为 Y=0.005 024 359X^3−0.249 855 1X^2+3.831 032X−14.582 15（X为标准品保留时间，min；Y为标准品分子量的对数，即lgMw），R^2=0.999 999 1，计算罗非鱼皮胶原三肽及市售胶原三肽的相对分子质量分布。

1.2.5 胶原三肽的氨基酸组成测定

根据GB 5009.124—2016《食品安全国家标准 食品中氨基酸的测定》，使用氨基酸分析仪（茚三酮柱后衍生离子交换色谱仪）对罗非鱼皮胶原三肽及市售胶原三肽中氨基酸组成及含量进行测定。

1.2.6 羟脯氨酸含量测定

利用酸水解法，通过羟脯氨酸试剂盒测定罗非鱼皮胶原三肽和市售胶原三肽中羟脯氨酸的含量。

1.2.7　ABTS 阳离子自由基清除能力测定

ABTS 母液配制：称取 17 mg 过硫酸钾加 26 mL 水配制过硫酸钾溶液，取上述过硫酸钾溶液 2.6 mL，加入 10 mg ABTS，配制成 ABTS 母液，暗处放置 12~16 h。

取 ABTS 母液 1 mL，加入 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液（pH7.4）稀释至 50 倍左右，在 734 nm 下吸光度为 0.70±0.10。取不同浓度（0.25、0.50、1.00、2.00 mg/mL）的样品溶液 0.2 mL 与 2 mL 稀释后的 ABTS 溶液混合振荡 30 s 后避光放置 6 min，吸取 0.2 mL 于 96 板中，在 734 nm 下测定其吸光度，吸光度越小说明自由基清除能力越强，空白组用蒸馏水代替样品。$ABTS^+$自由基清除率（A，%）的计算公式如下。

$$A = (A_c - A_s)/A_c \times 100$$

式中：A_c 为空白组吸光度；A_s 为样品吸光度。

1.2.8　DPPH 自由基清除能力测定

称取 5 mg DPPH 粉末，加入适量无水乙醇，避光混匀充分溶解，定容至 100 mL，得到 DPPH 自由基溶液。取 2 mL 不同浓度（0.25、0.50、1.00、2.00 mg/mL）的样品溶液，分别向各样品溶液中加入 2 mL DPPH 自由基溶液，混合均匀后室温避光反应 30 min，于 517 nm 处测定其吸光度记为 $A_{样品}$，以 2 mL 无水乙醇代替 DPPH 自由基溶液与 2 mL 样品溶液反应作为空白组，吸光度记为 $A_{空白}$，以 2 mL 蒸馏水代替样品溶液与 2 mL DPPH 自由基溶液反应作为对照组，吸光度记为 $A_{对照}$。以谷胱甘肽作为阳性对照。按下列公式计算 DPPH 自由基清除率（X，%）。

$$X = \left(1 - \frac{A_{样品} - A_{空白}}{A_{对照}}\right) \times 100$$

1.3　数据处理

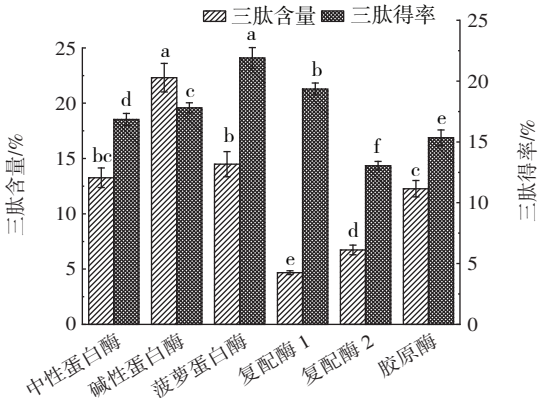
使用 Origin 2018 软件进行绘图；利用 SPSS 软件进行单因素方差分析检验差异显著性；利用 Design-Expert 13.0 软件 Box-Behnken 试验中心设计对响应面结果进行分析。

2　结果与分析

2.1　蛋白酶种类的筛选

用不同商业蛋白酶对罗非鱼皮进行酶解制备胶原三肽，由于不同酶的酶切位点不同，其水解产物的得率和三肽含量会存在差异[22]。蛋白酶种类对罗非鱼皮胶原三肽得率和三肽含量的影响如图 1 所示。

由图 1 可知，6 种蛋白酶制备的罗非鱼皮胶原三肽的得率和三肽含量存在明显差异，菠萝蛋白酶酶解制备的罗非鱼皮胶原三肽的得率（21.9%）显著（$p<0.05$）高于其他蛋白酶。碱性蛋白酶酶解制备的罗非鱼皮胶原三肽中的三肽含量最高，为 22.31%，菠萝蛋白酶次之，为 14.49%，两种复配酶制备的罗非鱼皮胶原三肽中的三肽含量均较低（复配酶 1 为 4.68%，复配酶 2 为 6.73%）。综合三肽得率和三肽含量结果考虑，选择碱性蛋白酶和菠萝蛋白酶两种酶协同酶解罗非鱼皮，用于罗非鱼皮胶原三肽制备工艺优化的后续试验研究。



同一指标不同小写字母表示存在显著性差异，$p<0.05$。

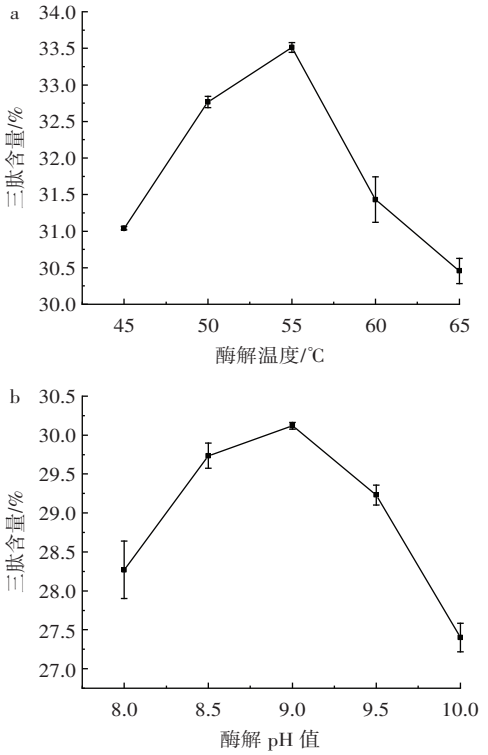
图 1　蛋白酶种类对罗非鱼皮胶原三肽得率和三肽含量的影响

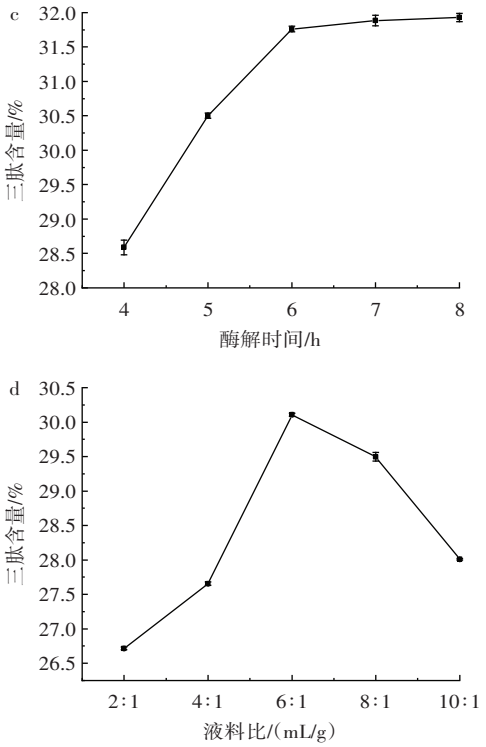
Fig.1　Effects of protease types on the yield and tripeptide content of collagen tripeptide from tilapia skin

2.2　酶解条件的单因素试验结果及分析

酶解条件对罗非鱼皮胶原三肽中三肽含量的影响如图 2 所示。

由图 2a 可知，酶解温度对罗非鱼皮酶解反应的影响较大，当酶解温度在 45~55 ℃范围内，三肽含量随着酶解温度的升高而增加，在 55 ℃时三肽含量达到最大值，为 33.51%；随着酶解温度的继续升高，三肽含量开始快速下降。这与曾庆冉[23]的研究结果相似，该研究利用复合蛋白酶水解鸡皮制备鸡皮胶原蛋白肽，当酶





a. 酶解温度;b. 酶解 pH 值;c. 酶解时间;d. 液料比。

图 2 酶解条件对罗非鱼皮胶原三肽中三肽含量的影响

Fig.2 Effects of enzymatic hydrolysis conditions on the tripeptide content of collagen tripeptide from tilapia skin

解温度在 35~50 ℃时,水解度随温度的升高不断增大,在酶解温度为 50 ℃时,水解度达到最大值,当酶解温度高于 50 ℃时水解度开始下降。这是因为温度对酶解反应具有双重影响,升高酶解温度可提高酶解反应速度,但当温度过高时会使酶发生变性,酶活力降低,从而影响了酶解反应的进行。因此,选择酶解温度 50、55、60 ℃进行后续响应面优化试验。

由图 2b 可知,当酶解 pH 值在 8.0~9.0 范围内,罗非鱼皮胶原三肽中的三肽含量随着酶解 pH 值的增大而升高,酶解 pH 值为 9.0 时,三肽含量最高,当酶解 pH 值大于 9.0 时,三肽含量明显降低。pH 值会通过影响蛋白酶的结构以及酶和底物之间的解离状态,从而改变酶的活性以及酶和底物的结合能力,最终影响酶解反应的效率[24]。pH 值过高或者过低都会使酶失活,导致酶解反应的终止。综上,选择酶解 pH 值为 8.5、9.0 和 9.5 进行后续响应面优化试验。

从图 2c 可以看出,三肽含量随着酶解时间的延长而增加,当酶解时间为 6 h 时,三肽含量达到最高,为 31.76%,当酶解时间大于 6 h 时,三肽含量趋于平稳,这可能是由于 6 h 时罗非鱼皮胶原三肽酶解反应接近终点。这与文献[25-26]的研究结果一致,许书敏[25]利用碱性蛋白酶水解狭鳕鱼皮制备胶原蛋白肽,当酶解时间达 5 h 时,水解度达到最大值;杨莎[26]利用风味蛋白酶对猪骨汤进行水解的过程中,当水解时间达 4 h 时,水解度不再持续上升,说明蛋白酶的水解作用不会持续进行,存在反应终点。这可能是由于蛋白质的水解机理是切断特定的肽键,当蛋白质中该酶的特定切割位点被完全水解后,酶解反应即停止。此外,随着水解反应的进行,酶解体系中小分子肽和氨基酸的分子增多,蛋白酶可能受到产物抑制,导致活力降低。因此,选择酶解时间为 6 h 进行后续试验。

如图 2d 所示,随着液料比的增加,罗非鱼皮胶原三肽中的三肽含量呈现先增加后逐渐下降的趋势,在液料比 6∶1 (mL/g)时,三肽含量最高。液料比过低时,反应体系可能由于鱼皮胶原蛋白的胶体性质而黏度较大,不利于酶解,当液料比过高,可能由于酶浓度太低,导致酶解效果较差。因此,选择液料比 4∶1、6∶1、8∶1 (mL/g)进行后续响应面优化试验。

2.3 酶解条件的响应面优化

2.3.1 响应面试验设计及结果

根据单因素的试验结果可知,液料比、酶解温度和酶解 pH 值对罗非鱼皮胶原三肽酶解效果的影响十分显著,因此,以 Design Expert 13.0 软件对其进行三因素三水平响应面中心组合试验设计。试验条件设计及结果含量如表 3 所示。

表 3 响应面试验设计及结果

Table 3 Design and results of response surface experiments

试验号	*A* 酶解温度/℃	*B* 液料比/(mL/g)	*C* 酶解 pH 值	三肽含量/%
1	55	4∶1	8.5	32.5
2	50	4∶1	9.0	30.5
3	55	6∶1	9.0	36.5
4	55	6∶1	9.0	37.0
5	50	6∶1	8.5	31.2
6	55	6∶1	9.0	36.6
7	55	8∶1	8.5	30.2
8	60	6∶1	8.5	30.5
9	55	4∶1	9.5	32.8
10	50	6∶1	9.5	32.6
11	55	8∶1	9.5	34.8
12	50	8∶1	9.0	31.5
13	55	6∶1	9.0	37.5
14	60	8∶1	9.0	32.3
15	60	4∶1	9.0	30.1
16	55	6∶1	9.0	36.1
17	60	8∶1	9.5	31.5

2.3.2 方差分析与回归分析

采用 Design-Expert 13.0 软件程序对以上试验数据进行二次多元回归拟合,分析结果得出罗非鱼皮胶原三肽的三肽含量随酶解温度、液料比和酶解 pH 值变化的回归方程如下:三肽含量=$-485.799+13.929\,59A+2.066\,7B+28.55C+0.020\,2AB+0.029AC+0.488\,6BC-0.130\,2A^2-0.618B^2-1.780C^2$。

回归方程方差分析如表 4 所示。

表 4　罗非鱼皮胶原三肽中三肽含量的响应面二次回归方程方差分析

Table 4　Variance analysis of the quadratic regression equation of the response surface for the tripeptide content in collagen tripeptide from tilapia skin

方差来源	总方差	自由度	均方	*F* 值	*p* 值	显著性
模型	107.87	9	11.99	25.66	0.000 2	极显著
A	0.020	1	0.020	0.043	0.842 5	
B	0.81	1	0.81	1.74	0.228 7	
C	7.72	1	7.72	16.53	0.004 8	极显著
AB	0.17	1	0.17	0.37	0.560 3	
AC	0.069	1	0.069	0.15	0.712 2	
BC	4.08	1	4.08	8.73	0.021 3	显著
A^2	41.72	1	41.72	89.30	<0.000 1	极显著
B^2	21.10	1	21.10	45.17	0.000 3	极显著
C^2	12.48	1	12.48	26.71	0.001 3	极显著
残差	3.27	7	0.47			
失拟项	2.14	3	0.71	2.52	0.196 8	
纯误差	1.13	4	0.283 0			
总和	111.14	16				

由表 4 可以看出，试验模型的 *F* 值为 25.66，*p* 值为 0.000 2，达极显著水平，失拟项 p=0.196 8>0.05，不显著，模型回归系数 R^2=0.970 6，校正系数 R^2_{Adj}=0.932 7，说明选用的模型与实际相切合，此方程对试验拟合度较好，能较好地反映出各因素与三肽含量的关系。由 *F* 值可知，3 个因素中对三肽含量影响最显著的为酶解 pH 值，液料比次之，酶解温度的影响最小。交互项 *BC*（液料比与酶解 pH 值）对罗非鱼皮酶解制备的胶原三肽的三肽含量影响显著，*AB*（酶解温度与液料比）对三肽含量的影响大于 *AC*（酶解温度与酶解 pH 值）。回归模型的变异系数为 2.06%，小于 10%，表明试验的可信度和精确度高。

2.3.3　交互作用分析

两两因素交互作用的响应面与等高线见图 3~图 5。

如图 3 所示，当酶解 pH 值固定时，随着酶解温度和液料比的增加，三肽含量先增加后降低。酶解温度和液料比的交互响应面图为凸型，有极值最高点，等高线图呈近圆形，结合表 4 中 *AB* 交互项 p=0.560 3>

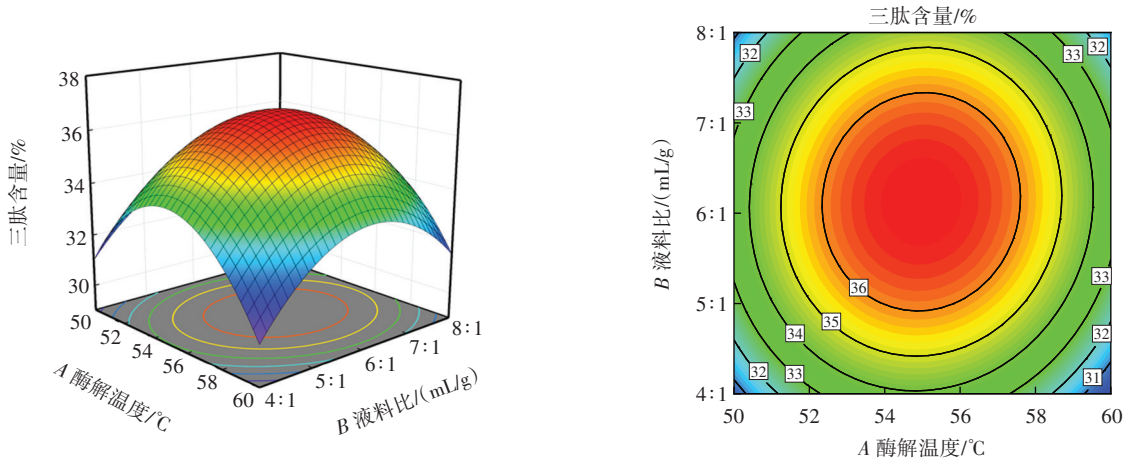


图 3　酶解温度与液料比交互作用的响应面与等高线

Fig.3　Response surface and contour lines of the interaction between enzymatic hydrolysis temperature and liquid-solid ratio

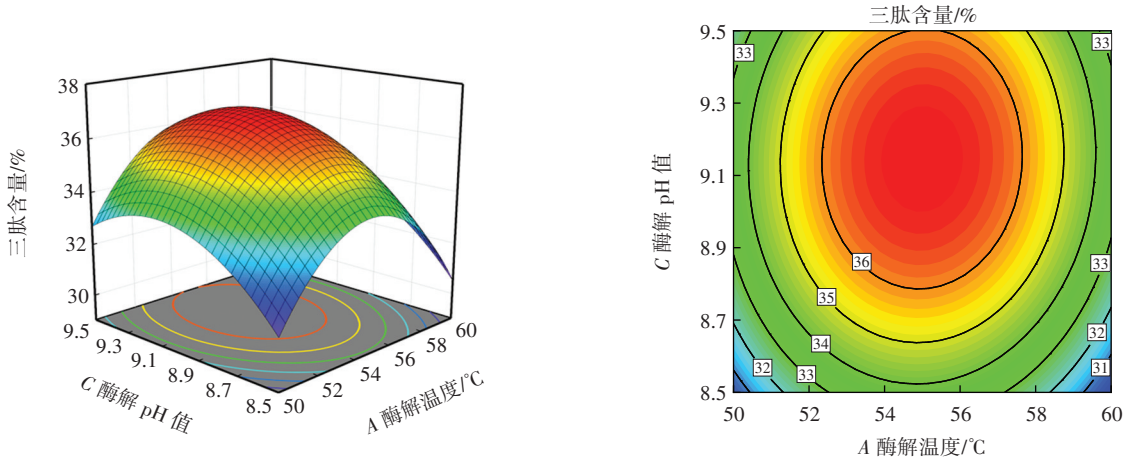


图 4　酶解温度与酶解 pH 值交互作用的响应面与等高线

Fig.4　Response surface and contour lines of the interaction between enzymatic hydrolysis temperature and enzymatic hydrolysis pH

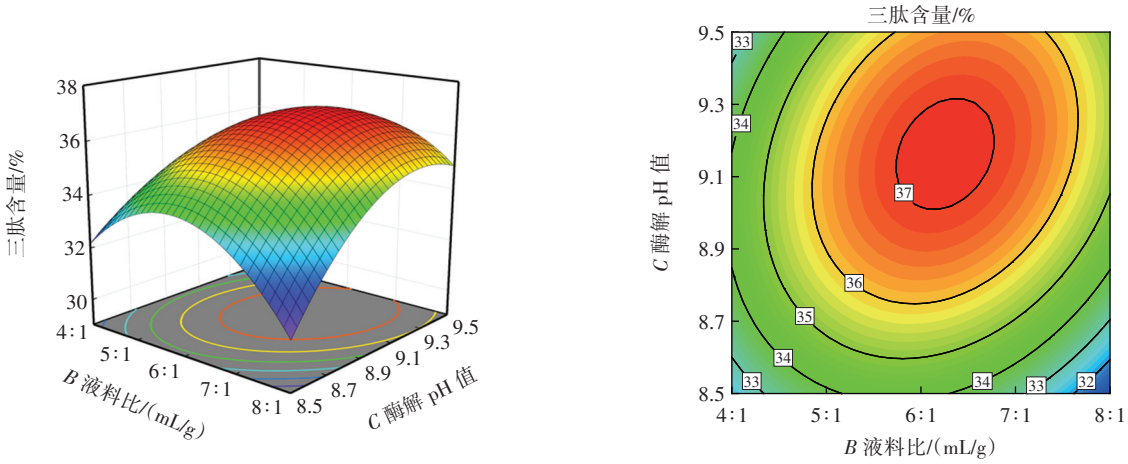


图 5　液料比与酶解 pH 值交互作用的响应面与等高线

Fig.5　Response surface and contour lines of the interaction between liquid-solid ratio and enzymatic hydrolysis pH

0.05，说明酶解温度与液料比之间的交互作用不显著。

从图 4 可以看出，在固定液料比的情况下，随着酶解温度和酶解 pH 值的增加，三肽含量先增加后降低。酶解温度和酶解 pH 值的交互响应面为凸型，等高线趋近圆形，与表 4 中 *AC* 交互项 p=0.712 2>0.05 的结果一致，表明二者交互作用不显著。

由图 5 可知，在酶解温度固定的条件下，随着酶解 pH 值和液料比的增加，三肽含量先增加后降低，酶解 pH 值和料液比的交互响应面为凸型，有极值最高点，等高线呈椭圆形，说明液料比和酶解 pH 值存在显著交互作用。

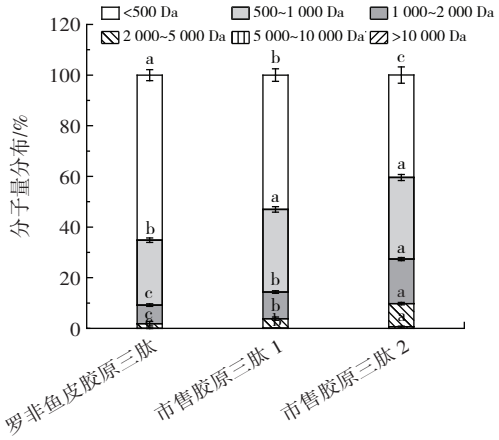
2.3.4　模型的验证

在此模型的基础上，使用软件 Design-Expert 13.0 对罗非鱼皮酶解制备胶原三肽的最佳工艺参数进行预测，在酶解温度为 55.02 ℃、液料比为 6.26∶1（mL/g）、酶解 pH 值为 9.16 的酶解条件下，得到的罗非鱼皮胶原三肽的三肽含量为 36.968%。根据试验条件，将最佳工艺参数调整为酶解温度 55 ℃、液料比 6.3∶1（mL/g）、酶解 pH9.2，并在此酶解条件下进行 3 次平行试验，测得罗非鱼皮胶原三肽的三肽含量为 37.25%，与预测值基本符合，高于市售胶原三肽的三肽含量（市售胶原三肽 1 为 30.60%，市售胶原三肽 2 为 19.51%）。

2.4　分子量分布

罗非鱼皮胶原三肽和市售胶原三肽的分子量分布见图 6。

由图 6 可知，罗非鱼皮胶原三肽样品和市售胶原三肽中主要为分子量小于 1 000 Da 的小分子肽，其含量为罗非鱼皮胶原三肽（90.82%）>市售胶原三肽 1（85.65%）>市售胶原三肽 2（72.67%），且罗非鱼皮胶原三肽中分子量小于 500 Da 的肽段含量最高，为 65.19%。汪雪莲等[17]通过分步酶解法制备的罗非鱼皮胶原三肽中小于 1 000 Da 的小分子肽含量为 86.61%，



不同小写字母表示组间存在显著性差异，p<0.05。

图 6　罗非鱼皮胶原三肽和市售胶原三肽的分子量分布

Fig.6　Molecular weight distribution of collagen tripeptide from tilapia skin and commercial collagen tripeptide

与之相比，本研究中罗非鱼皮胶原三肽的小分子肽含量更高。胶原蛋白肽分子量的大小与其生物活性相关，低分子量的胶原蛋白肽由于更好的吸收利用度，从而更好地发挥生物活性[27-28]，罗非鱼皮胶原三肽重均分子量为 476 Da，小于市售胶原三肽 1（789 Da）和市售胶原三肽 2（561 Da）。

2.5　羟脯氨酸含量

羟脯氨酸是胶原蛋白的特征性氨基酸，通过羟基形成的链间氢键稳定了三螺旋结构，对胶原蛋白结构的稳定性至关重要。羟脯氨酸的含量与鱼的种类及其生活环境有关，一般来说，相较于冷水鱼来源的胶原蛋白，热水鱼和温水鱼来源的胶原蛋白中羟脯氨酸含量更高[29]。罗非鱼皮胶原三肽样品和市售胶原三肽中羟脯氨酸含量如表 5 所示。

由表 5 可知，本研究中罗非鱼皮胶原三肽样品和市售胶原三肽的羟脯氨酸含量接近，分别为 10.50%、

表 5　罗非鱼皮胶原三肽样品和市售胶原三肽中羟脯氨酸含量

Table 5　Hydroxyproline content in collagen tripeptide samples from tilapia skin and commercial collagen tripeptide

样品	羟脯氨酸含量/%
罗非鱼皮胶原三肽	10.50±0.23[a]
市售胶原三肽 1	10.21±0.16[a]
市售胶原三肽 2	9.30±0.28[b]

注：同列字母不同表示差异显著，$p<0.05$。

10.21% 和 9.30%。Dong[30]的研究表明，草鱼、鳙鱼和石斑鱼鱼鳔胶原蛋白中羟脯氨酸的含量分别为 10.36%、9.63% 和 9.30%，与本研究结果相似。

2.6　氨基酸组成

罗非鱼皮胶原三肽和市售胶原三肽的氨基酸组成见表 6。

表 6　罗非鱼皮胶原三肽和市售胶原三肽的氨基酸组成

Table 6　Amino acid composition of collagen tripeptide from tilapia skin and commercial collagen tripeptide

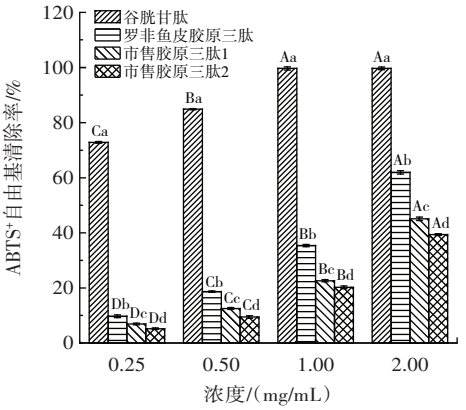
氨基酸名称	含量/%		
	罗非鱼皮胶原三肽	市售胶原三肽 1	市售胶原三肽 2
组氨酸（His）	1.32±0.12[a]	0.55±0.15[c]	0.97±0.08[b]
异亮氨酸（Ile）	1.28±0.12[a]	1.26±0.06[a]	1.30±0.08[a]
缬氨酸（Val）	2.15±0.02[b]	1.95±0.10[c]	2.40±0.08[a]
赖氨酸（Lys）	2.61±0.07[b]	2.38±0.11[c]	3.32±0.15[a]
蛋氨酸（Met）	1.45±0.17[a]	0.26±0.03[c]	1.05±0.06[b]
亮氨酸（Leu）	2.73±0.12[a]	2.75±0.15[a]	2.02±0.09[b]
苯丙氨酸（Phe）	1.22±0.02[b]	0.98±0.05[c]	1.76±0.03[a]
苏氨酸（Thr）	2.66±0.12[a]	2.26±0.13[b]	2.35±0.05[b]
酪氨酸（Tyr）	0.17±0.10[c]	0.26±0.03[b]	0.31±0.06[a]
丙氨酸（Ala）	12.50±0.09[b]	12.80±0.12[a]	10.60±0.11[c]
脯氨酸（Pro）	11.20±0.10[a]	9.85±0.08[c]	10.35±0.05[b]
精氨酸（Arg）	6.97±0.07[b]	7.02±0.01[b]	7.36±0.03[a]
丝氨酸（Ser）	3.85±0.01[b]	4.08±0.08[a]	3.64±0.12[c]
谷氨酸（Glu）	8.76±0.06[b]	10.50±0.13[a]	7.39±0.09[c]
甘氨酸（Gly）	30.05±0.10[a]	30.20±0.06[a]	29.01±0.03[b]
天门冬氨酸（Asp）	4.58±0.15[c]	6.05±0.12[a]	5.36±0.05[b]
必需氨基酸	15.42±0.06[a]	12.39±0.08[c]	15.17±0.13[b]
疏水性氨基酸	32.53±0.09[a]	29.85±0.05[b]	29.48±0.11[c]
氨基酸总量	93.50±0.07[a]	93.15±0.05[b]	89.19±0.09[c]

注：必需氨基酸包括 His、Ile、Val、Lys、Met、Leu、Phe 和 Thr；疏水性氨基酸包括 Phe、Val、Leu、Ile、Ala、Pro 和 Met；同行不同字母表示差异显著，$p<0.05$。

由表 6 可知，罗非鱼皮胶原三肽样品与市售胶原三肽中均检测出 16 种氨基酸，甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸和谷氨酸含量较高，其中甘氨酸含量最高，分别为 30.05%、30.20% 和 29.01%，酪氨酸和组氨酸含量较低，这符合 I 型胶原蛋白的氨基酸组成特点。脯氨酸和羟脯氨酸作为胶原蛋白的标志性氨基酸，它们限制了多肽链的二级结构变化，影响了胶原分子间的氢键形成，从而对胶原分子的稳定性起到了关键作用[31]。罗非鱼皮胶原三肽样品中脯氨酸的含量为 11.20%，高于市售胶原三肽 1（9.85%）和市售胶原三肽 2（10.35%）。罗非鱼皮胶原三肽样品中必需氨基酸含量（15.42%）与市售胶原三肽 2（15.17%）相似，高于市售胶原三肽 1（12.39%）。与市售胶原三肽相比，罗非鱼皮胶原三肽样品中疏水性氨基酸含量较高，为 32.53%。有研究表明，相较于其他的氨基酸，脯氨酸、丙氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸以及异亮氨酸等疏水性氨基酸具有更好的自由基清除作用[32]。此外，赖氨酸和组氨酸作为碱性氨基酸也具有提高自由基清除活性的特点[33]。

2.7　$ABTS^+$自由基清除能力

罗非鱼皮胶原三肽和市售胶原三肽的 $ABTS^+$自由基清除率如图 7 所示。



不同大写字母表示同一样品不同浓度差异显著，$p<0.05$；不同小写字母表示相同浓度不同样品间差异显著，$p<0.05$。

图 7　罗非鱼皮胶原三肽和市售胶原三肽的 $ABTS^+$自由基清除率

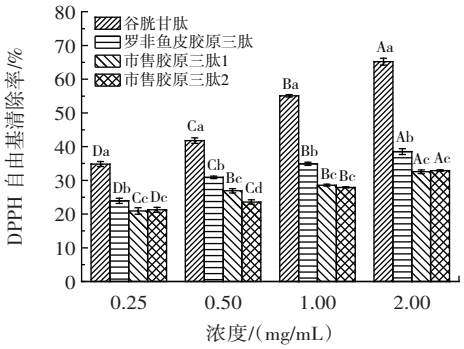
Fig.7　$ABTS^+$ free radical scavenging rate of collagen tripeptide from tilapia skin and commercial collagen tripeptide

由图 7 可知，相同浓度条件下，对 $ABTS^+$自由基清除率从高到低分别为谷胱甘肽、罗非鱼皮胶原三肽、市售胶原三肽 1 和市售胶原三肽 2，说明谷胱甘肽 $ABTS^+$自由基清除效果最好，其次为罗非鱼皮胶原三肽，显著高于 2 个市售样品的 $ABTS^+$自由基清除能力（$p<0.05$）。谷胱甘肽对 $ABTS^+$自由基的清除能力随着浓度的增加逐渐上升，当谷胱甘肽的浓度为 1.00 mg/mL 时，对 $ABTS^+$自由基的清除率达最高值（97.02%），与孔晓越[34]的研究结果一致。在 0.25~2.00 mg/mL 浓度范围内，罗非鱼皮胶原三肽的 $ABTS^+$自由基清除率与浓度呈正相关，当罗非鱼皮胶原三肽的浓度为 2 .00 mg/mL 时，$ABTS^+$自由基清除率达 61.97%，与大鲵皮胶原蛋白的 $ABTS^+$自由基清除率表现趋势一致[35]。Dong 等[30]的研究表明当草鱼鳔、鲢鱼鳔、石斑鱼鳔和鳕鱼鳔胶原蛋

白的浓度为 3 mg/mL 时，4 种胶原蛋白对 $ABTS^+$自由基的清除率仅为 29%~35%，远低于本研究中罗非鱼皮胶原三肽的 $ABTS^+$自由基清除率，表明罗非鱼皮胶原三肽的 $ABTS^+$自由基清除能力较强，这可能与罗非鱼皮胶原三肽中疏水性氨基酸和碱性氨基酸含量较高有关[36]。

2.8 DPPH 自由基清除能力

DPPH 是一种常用的自由基试剂，广泛应用于评估抗氧化剂的活性。罗非鱼皮胶原三肽和市售胶原三肽的 DPPH 自由基清除率见图 8。



不同大写字母表示同一样品不同浓度差异显著，$p<0.05$；不同小写字母表示相同浓度不同样品间差异显著，$p<0.05$。

图 8 罗非鱼皮胶原三肽和市售胶原三肽的 DPPH 自由基清除率

Fig.8 DPPH free radical scavenging rate of collagen tripeptide from tilapia skin and commercial collagen tripeptide

由图 8 可知，在 0.25~2.00 mg/mL 浓度范围内，所有样品的 DPPH 自由基清除率均随浓度的增加而升高。在各浓度条件下，罗非鱼皮胶原三肽样品的 DPPH 自由基清除率均高于市售胶原三肽，除 2.7 中提到的疏水性氨基酸含量差异的影响，可能还与罗非鱼皮胶原三肽的分子量较小有关，研究表明，分子量较低的肽可能更容易接近自由基提供质子或电子，自由基清除活性更高[37-38]。当罗非鱼皮胶原三肽浓度为 2.00 mg/mL 时，其 DPPH 自由基清除率达 38.55%，这与黑鲨鱼皮胶原蛋白肽[38]的 DPPH 自由基清除结果相似，高于罗非鱼皮抗氧化肽的 DPPH 自由基清除率[39]。因此，罗非鱼皮胶原三肽具有较好的 DPPH 自由基清除效果。

3 结论

本研究通过单因素试验及响应面优化试验对罗非鱼皮胶原三肽酶解条件进行优化，确定最佳酶解工艺：碱性蛋白酶和菠萝蛋白酶复配使用，加酶量为 5 000 U/g，酶活比为 1∶1，酶解温度为 55 ℃、液料比为 6.3∶1（mL/g）、酶解 pH 值为 9.2，并对最佳酶解工艺制备的罗非鱼皮胶原三肽与市售胶原三肽进行对比，分析其三肽含量、分子量分布、氨基酸组成及抗氧化活性。罗非鱼皮胶原三肽的三肽含量（32.75%）、分子量小于 500 Da 的肽段含量（65.19%）、必需氨基酸含量（15.42%）和疏水性氨基酸含量（32.53%）均高于市售胶原三肽，重均分子量最低，为 476 Da。抗氧化活性测定结果表明，罗非鱼皮胶原三肽自由基清除能力最佳，当浓度为 2.00 mg/mL 时，对 DPPH 自由基和 $ABTS^+$自由基清除率分别达 38.55% 和 61.97%，具有作为天然来源抗氧化活性物质的应用潜力。综上所述，本研究制备的罗非鱼皮胶原三肽中的三肽含量较高，分子量较小，表现出较好的抗氧化活性，具有高吸收利用率和高营养价值的应用潜力。

参考文献：

[1] SHOULDERS M D, RAINES R T. Collagen structure and stability[J]. Annual Review of Biochemistry, 2009, 78: 929-958.

[2] DING C C, CHENG K, WANG Y, et al. Dual green hemostatic sponges constructed by collagen fibers disintegrated from *Halocynthia roretzi* by a shortcut method[J]. Materials Today Bio, 2024, 24: 100946.

[3] DE MELO OLIVEIRA V, ASSIS C R D, DE AQUINO MARQUES COSTA B, et al. Physical, biochemical, densitometric and spectroscopic techniques for characterization collagen from alternative sources: A review based on the sustainable valorization of aquatic by-products[J]. Journal of Molecular Structure, 2021, 1224: 129023.

[4] PERES D D, HUBNER A, DE OLIVEIRA C A, et al. Hydrolyzed collagen interferes with *in vitro* photoprotective effectiveness of sunscreens[J]. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2017, 53 (2): 216119.

[5] ADDAD S, EXPOSITO J Y, FAYE C, et al. Isolation, characterization and biological evaluation of jellyfish collagen for use in biomedical applications[J]. Marine Drugs, 2011, 9(6): 967-983.

[6] LEONE A, LECCI R M, DURANTE M, et al. The bright side of gelatinous blooms: Nutraceutical value and antioxidant properties of three Mediterranean jellyfish (Scyphozoa)[J]. Marine Drugs, 2015, 13(8): 4654-4681.

[7] 张丰香, 李志华, 邵丽军, 等 . 鱼鳞明胶与哺乳动物明胶性质的比较[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(7): 89-93.
ZHANG Fengxiang, LI Zhihua, SHAO Lijun, et al. The comparative study of gelatin from fish scale and mammalian[J]. Food and Fermentation Industries, 2011, 37(7): 89-93.

[8] CHEN J D, LI L, YI R Z, et al. Release kinetics of Tilapia scale collagen I peptides during tryptic hydrolysis[J]. Food Hydrocolloids, 2018, 77: 931-936.

[9] 胡晓, 周雅, 陈星星, 等 . 罗非鱼肌浆蛋白源抗氧化肽的制备、分离纯化及其体外抗氧化活性[J]. 食品科学, 2021, 42(3): 63-70.
HU Xiao, ZHOU Ya, CHEN Xingxing, et al. Preparation, purification and *in vitro* evaluation of antioxidant peptides from tilapia (*Oreochromis niloticus*) sarcoplasmic protein[J]. Food Science, 2021, 42(3): 63-70.

[10] XIAO Z B, LIANG P, CHEN J L, et al. A peptide YGDEY from tilapia gelatin hydrolysates inhibits UVB-mediated skin photoaging by regulating MMP-1 and MMP-9 expression in HaCaT cells[J]. Photochemistry and Photobiology, 2019, 95(6): 1424-1432.

[11] 杨晓东, 张杨, 张寿, 等 . 胶原蛋白肽的提取及应用研究进展[J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 469-476.
YANG Xiaodong, ZHANG Yang, ZHANG Shou, et al. Research progress in extraction and application of collagen peptides[J]. Sci-

ence and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 469-476.

[12] 刘冬艳, 尹利端, 秦松, 等 . 鱼皮胶原多肽口服生物利用度研究[J]. 生物学杂志, 2016, 33(5): 71-74.
LIU Dongyan, YIN Liduan, QIN Song, et al. Study on oral bio-availability of collagen peptides[J]. Journal of Biology, 2016, 33(5): 71-74.

[13] HONG J Y, CHA A, KIM G J, et al. Comparing molecular weight dependent absorption rates of collagen in oral mucosal and epidermis/dermis tissue models[J]. Journal of Food Hygiene and Safety, 2024, 39(4): 299-303.

[14] AITO-INOUE M, LACKEYRAM D, FAN M Z, et al. Transport of a tripeptide, Gly-Pro-Hyp, across the porcine intestinal brush-border membrane[J]. Journal of Peptide Science, 2007, 13(7): 468-474.

[15] YAMAMOTO S, DEGUCHI K, ONUMA M, et al. Absorption and urinary excretion of peptides after collagen tripeptide ingestion in humans[J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2016, 39(3): 428-434.

[16] MOSKOWITZ R W. Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease[J]. Seminars in Arthritis and Rheumatism, 2000, 30(2): 87-99.

[17] 汪雪莲, 刘鹏展, 崔春, 等 . 胶原三肽的酶法制备工艺研究[J]. 中国调味品, 2023, 48(1): 97-101.
WANG Xuelian, LIU Pengzhan, CUI Chun, et al. Study on preparation process of collagen tripeptide by enzymic method[J]. China Condiment, 2023, 48(1): 97-101.

[18] 周先艳 . 鳕鱼皮胶原蛋白水解液体外模拟消化研究及抗氧化肽的分离纯化[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2016.
ZHOU Xianyan. Study on simulated digestion of collagen hydrolysate from cod skin *in vitro* and separation and purification of antioxidant peptides[D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology, 2016.

[19] WANG X F, HONG H, WU J P. Hen collagen hydrolysate alleviates UVA-induced damage in human dermal fibroblasts[J]. Journal of Functional Foods, 2019, 63: 103574.

[20] 艾丽奇 . 鳕鱼皮胶原蛋白肽的抗皮肤光老化功效及其作用机制研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2020.
AI Liqi. Study on protective effect of cod skin collagen peptides against skin photoaging and its action mechanism[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2020.

[21] TANG L H, SAKAI Y, UEDA Y, et al. Effects of oral administration of tripeptides derived from type I collagen (collagen tripeptide) on atherosclerosis development in hypercholesterolemic rabbits[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2015, 119(5): 558-563.

[22] 杨文君, 段杉, 崔春 . 豌豆蛋白深度酶解制备咸味肽的研究[J]. 中国调味品, 2021, 46(8): 1-5.
YANG Wenjun, DUAN Shan, CUI Chun. Study on preparation of salty peptides by deep enzymatic hydrolysis of pea protein[J]. China Condiment, 2021, 46(8): 1-5.

[23] 曾庆冉 . 鸡皮胶原蛋白肽的制备及其富肽饮品的开发[D]. 无锡: 江南大学, 2013.
ZENG Qingran. The preparation of collagen peptides from chicken skin and the development of collagen peptide beverage[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2013.

[24] 魏洁琼, 余群力, 韩玲, 等 . 牛骨胶原蛋白肽制备工艺优化及抗氧化活性分析[J]. 甘肃农业大学学报, 2020, 55(5): 203-211, 218.
WEI Jieqiong, YU Qunli, HAN Ling, et al. Optimization of preparation process and antioxidant activity analysis of bovine bone collagen peptide[J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2020, 55 (5): 203-211, 218.

[25] 许书敏 . 狭鳕鱼皮、鱼骨胶原蛋白肽的提取与活性验证[D]. 烟台: 烟台大学, 2023.
XU Shumin. Extraction and activity validation of collagen peptides from the skin and bones of pollock[D]. Yantai: Yantai University, 2023.

[26] 杨莎 . 猪骨汤酶解液制备工艺的优化及其饮料的开发研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2014.
YANG Sha. Preparation of enzymatic hydrolysate of pork bone soup optimization and development of beverages[D]. Yaan: Sichuan Agricultural University, 2014.

[27] XU Q B, HONG H, WU J P, et al. Bioavailability of bioactive peptides derived from food proteins across the intestinal epithelial membrane: A review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2019, 86: 399-411.

[28] AHMED T, SUN X H, UDENIGWE C C. Role of structural properties of bioactive peptides in their stability during simulated gastrointestinal digestion: A systematic review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2022, 120: 265-273.

[29] AKITA M, NISHIKAWA Y, SHIGENOBU Y, et al. Correlation of proline, hydroxyproline and serine content, denaturation temperature and circular dichroism analysis of type I collagen with the physiological temperature of marine teleosts[J]. Food Chemistry, 2020, 329: 126775.

[30] DONG Y, DAI Z Y. Physicochemical, structural and antioxidant properties of collagens from the swim bladder of four fish species[J]. Marine Drugs, 2022, 20(9):550.

[31] 李八方, 郭鸣, 侯虎, 等 . 胡子鲶鱼皮酸溶性胶原蛋白的理化性质研究[J]. 现代食品科技, 2013, 29(11): 2580-2585.
LI Bafang, GUO Ming, HOU Hu, et al. Physicochemical properties of acid-soluble collagen from skin of *Clarias fuscus*[J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(11): 2580-2585.

[32] CHEN H M, MURAMOTO K, YAMAUCHI F. Structural analysis of antioxidative peptides from soybean.beta.-conglycinin[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995, 43(3): 574-578.

[33] AO J, LI B. Amino acid composition and antioxidant activities of hydrolysates and peptide fractions from porcine collagen[J]. Food Science and Technology International, 2012, 18(5): 425-434.

[34] 孔晓越 . 甲鱼源抗氧化肽筛选及构效关系研究[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2024.
KONG Xiaoyue. Screening and structure-activity relationship study of antioxidant peptides from soft-shelled turtle[D]. Hangzhou: Zhejiang A & F University, 2024.

[35] 易凡智 . 大鲵胶原蛋白、胶原蛋白肽及明胶制备及生物活性研究[D]. 大连: 大连海洋大学, 2024.
YI Fanzhi. Preparation collagen, collagen peptides and gelatines from the giant salamanders and biological activity studies[D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2024.

[36] FANG J Q, LU J H, ZHANG Y, et al. Structural properties, antioxidant and immune activities of low molecular weight peptides from soybean dregs (Okara)[J]. Food Chemistry, 2021, 12: 100175.

[37] SAE-LEAW T, KARNJANAPRATUM S, O'CALLAGHAN Y C, et al. Purification and identification of antioxidant peptides from gelatin hydrolysate of seabass skin[J]. Journal of Food Biochemistry, 2017, 41(3): e12350.

[38] YANG Q, CAI X X, YAN A N, et al. A specific antioxidant peptide: Its properties in controlling oxidation and possible action mechanism[J]. Food Chemistry, 2020, 327: 126984.

[39] ZHANG Y F, DUAN X, ZHUANG Y L. Purification and characterization of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatin[J]. Peptides, 2012, 38 (1): 13-21.

加工编辑:张岩蔚
收稿日期:2025-06-24