

南珠贝壳珍珠层源抗氧化肽的制备及对酪氨酸酶的抑制活性

徐嘉欣, 罗哲, 何安, 黄潘钊, 沈金鹏, 郭俊斌, 苗建银

Preparation of Antioxidant Peptides Derived from Nacre of Nanzhu Shell and Their Inhibitory Activity against Tyrosinase

XU Jiaxin, LUO Zhe, HE An, HUANG Pantian, SHEN Jinpeng, GUO Junbin, and MIAO Jianyin

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024040262>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

番石榴不同部位乙醇提取物的抗氧化、降血糖及酪氨酸酶抑制活性

Antioxidant, Hypoglycemic Activities and Inhibitory Effect on Tyrosinase of Ethanol Extracts of Different Parts from *Psidium guajava* L.

食品工业科技. 2022, 43(8): 365-371 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021070263>

雀嘴茶中三大酚类成分的抗氧化活性和酪氨酸酶抑制活性分析

Antioxidant Activity and Tyrosinase Inhibitory Activity of Three Phenolic Compounds from Quezui Tea

食品工业科技. 2023, 44(8): 405-411 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022070024>

金盏菊乙酸乙酯萃取相的酚酮类物质含量及其抗氧化、抑菌和酪氨酸酶抑制活性

Phenolic Ketone Contents and Antioxidant, Antibacterial Properties and Inhibitory Tyrosinase Activity of the Ethyl Acetate Extracted from *Calendula officinalis* L.

食品工业科技. 2023, 44(19): 347-355 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022110304>

在线抗氧化分析和超滤亲和液质联用技术快速筛选桂花抗氧化及抑制酪氨酸酶的活性成分

Identification of Antioxidant Components and Tyrosinase Specific Inhibitors from *Osmanthus fragrans* Flower by Using Online UPLC-ABTS⁺ · -assay and UF-LC-MS Technology

食品工业科技. 2022, 43(7): 67-79 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021070130>

响应面法优化珍珠龙胆石斑鱼肉肽的酶法制备工艺及酶解产物的抗氧化活性

Optimization of Enzymatic Preparation Process of Peptides from Pearl Grouper by Response Surface Methodology and the Antioxidant Activity of the Enzymatic Hydrolysis Products

食品工业科技. 2020, 41(19): 205-211,239 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.19.032>

苦荞蛋白降血脂肽的酶解制备、氨基酸组成及活性研究

Preparation, Amino Acid Composition and Activity of Tartary Buckwheat Protein Lipid-lowering Peptide

食品工业科技. 2024, 45(21): 129-139 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023110029>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

徐嘉欣, 罗哲, 何安, 等. 南珠贝壳珍珠层源抗氧化肽的制备及对酪氨酸酶的抑制活性 [J]. 食品工业科技, 2025, 46(6): 242–251.
doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024040262

XU Jiaxin, LUO Zhe, HE An, et al. Preparation of Antioxidant Peptides Derived from Nacre of Nanzhu Shell and Their Inhibitory Activity against Tyrosinase[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(6): 242–251. (in Chinese with English abstract).
doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024040262

· 工艺技术 ·

南珠贝壳珍珠层源抗氧化肽的制备及对酪氨酸酶的抑制活性

徐嘉欣, 罗 哲, 何 安, 黄潘钿, 沈金鹏, 郭俊斌, 苗建银*

(华南农业大学食品学院广东省功能食品活性物重点实验室, 广东广州 510642)

摘 要: 本研究旨在制备南珠贝壳珍珠层源抗氧化肽, 评价其抗氧化和酪氨酸酶抑制活性, 并对其氨基酸组成成分进行分析。以南珠贝壳珍珠层中提取的蛋白为原料, 采用 DPPH 自由基清除率作为评价指标, 通过酶的筛选、单因素和响应面实验得到最优酶解工艺, 并对其酶解物进行了氨基酸组成分析、体外抗氧化和酪氨酸酶抑制活性研究。南珠贝壳珍珠层源抗氧化肽的最优酶解工艺为: 以胰蛋白酶为水解酶, 酶解温度 37 °C、pH7.0、酶解时间 3 h、酶底比 0.32%, 所得酶解物 DPPH 自由基清除率为 76.34%±0.24%。在此条件下制备得到的珍珠层抗氧化肽具有优异的 ABTS⁺ 自由基清除率 (IC₅₀=0.1735 mg/mL)、DPPH 自由基清除率 (IC₅₀=2.342 mg/mL) 和氧自由基清除能力 (ORAC 值=1124.86 μmol TE/g 冻干粉)。此外, 珍珠层抗氧化肽还可通过混合型可逆抑制的方式抑制酪氨酸酶活力, 具有良好的酪氨酸酶抑制活性, 其抑制率的 IC₅₀ 值为 12.38 mg/mL。本研究结果表明珍珠层抗氧化肽在食品或化妆品领域具有良好的应用前景, 为贝壳珍珠层的高值化利用提供了理论依据。

关键词: 珍珠层, 活性肽, 抗氧化活性, 酪氨酸酶抑制活性, 响应面分析, 氨基酸组成

中图分类号: TS201.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2025)06-0242-10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2024040262

本文网刊:



Preparation of Antioxidant Peptides Derived from Nacre of Nanzhu Shell and Their Inhibitory Activity against Tyrosinase

XU Jiaxin, LUO Zhe, HE An, HUANG Pantian, SHEN Jinpeng, GUO Junbin, MIAO Jianyin*

(College of Food Science, South China Agricultural University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Nutraceuticals and Functional Foods, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The aim of this study was to prepare antioxidant peptides derived from nacre of Nanzhu shell, evaluate their antioxidant and tyrosinase inhibitory activities, and analyze their amino acid components. Using the protein from nacre of Nanzhu shell as raw material, DPPH free radical clearance rate as evaluation index, the optimal enzymatic hydrolysis process was obtained by sieve enzyme, single factor and response surface experiments. The amino acid composition, antioxidant and tyrosinase inhibitory activities of the enzymatic hydrolysis products were analyzed *in vitro*. The optimal enzymatic hydrolysis of the nacre of Nanzhu shell source antioxidant peptide was as follows: Using trypsin as hydrolase, hydrolysis temperature 37 °C, pH7.0, enzymolysis time 3 h, enzymolysis ratio 0.32%, the DPPH free radical scavenging rate of the enzymolysis product was 76.34%±0.24%. The nacre antioxidant peptide prepared under these conditions had excellent ABTS⁺ free radical scavenging rate (IC₅₀=0.1735 mg/mL), DPPH free radical scavenging rate (IC₅₀=2.342 mg/mL) and oxygen free radical scavenging ability (ORAC value=1124.86 μmol TE/g lyophilized powder). In addition, nacre antioxidant peptides could also inhibit tyrosinase activity by mixed reversible inhibition, and had good tyrosinase inhibitory activity, the inhibitory rate of IC₅₀ value was 12.38 mg/mL. The results of this study indicate that nacre antioxidant peptides

收稿日期: 2024-04-22

基金项目: 广西重点研发计划项目 (桂科 AB21220065)。

作者简介: 徐嘉欣 (2000–), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品新原料与功能性食品, E-mail: 1540895598@qq.com。

* 通信作者: 苗建银 (1981–) (ORCID: 0000-0002-4785-3196), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品科学, E-mail: miaojy8181@scau.edu.cn。

have a good application prospect in the field of food and cosmetics, and provide a theoretical basis for the high-value utilization of shell nacre.

Key words: nacre; peptides; antioxidant activity; tyrosinase inhibitory activity; response surface analysis; amino acid composition

氧化应激是自由基的过度累积造成的。在外界或内部环境的压力下,如紫外线辐射、环境污染、电子辐射等,活性氧的产生会显著增加,导致细胞死亡和组织损伤,从而引起一系列慢性疾病,如衰老、炎症、癌症、动脉粥样硬化等^[1]。同时,氧化应激还会激活酪氨酸酶活性,从而促使黑色素细胞产生过量的黑色素,导致多种皮肤疾病,如雀斑、老年斑、黄褐斑,甚至是恶性黑色素瘤^[2]。常用的合成抗氧化剂丁基羟基茴香醚和没食子酸等,有效果好、价格低廉等优点,但是由于其潜在毒性限制了在食品工业中的应用^[3],因此,开发天然、安全、高效的抗氧化剂成为了近年来的研究热点。抗氧化肽由于其结构相对简单,分子量小易于吸收,且没有免疫反应,因此,开发高活性抗氧化肽是当前的研究趋势,在食品和健康医学应用中具有很大的潜力^[4]。目前,已在厚壳贻贝肽^[5]、海参肽^[6]和大西洋鲑鱼骨胶原蛋白肽^[7]的研究中均发现了良好的抗氧化活性。

贝壳的结构从外到里分别是角质层、棱柱层和珍珠层^[8]。通过处理南珠生产过程中产生的贝壳,得到去角质层和棱柱层后的壳,即为南珠贝壳珍珠层。珍珠层与珍珠同为外套膜上皮细胞分泌的大量珍珠质而来^[9],同质同源,组成成分除了其主要成分碳酸钙之外,还有许多的功能活性物质,如蛋白质、多肽、氨基酸、多糖、微量元素、维生素等^[9-11]。目前,关于珍珠层源功能活性物质的研究主要是成骨活性^[11],其抗氧化与酪氨酸酶抑制活性的研究甚少。珍珠层与珍珠同质同源,它们有着相似的组成成分和活性。研究表明珍珠具有抗氧化、抗衰老、美白、修复、抑菌、抗炎以及保湿等功效^[12],常被用于护肤品和保健品的开发^[9]。但由于珍珠是一种珍贵饰品,成本高,因此,珍珠层源功能活性物质有望在保健品和化妆品中作为珍珠的功能替代物,在降低成本的同时,还能实现贝壳的高值化利用。

本研究以从南珠贝壳珍珠层中提取的蛋白为原料,采用 DPPH 自由基清除率为指标,优化酶解工艺,以最优酶解条件制备得到珍珠层抗氧化肽,再对其进行氨基酸组成成分分析,评估了其抗氧化和酪氨酸酶抑制活性。珍珠层抗氧化肽的研究有助于贝壳的高值化利用,为珍珠层资源的开发利用提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

南珠贝壳珍珠层 来自广西北海市;木瓜蛋白酶(8×10^5 U/g)、中性蛋白酶(2×10^5 U/g)、碱性蛋白

酶(2×10^5 U/g)、菠萝蛋白酶(6×10^5 U/g)、胃蛋白酶(3000 NF U/g)和胰蛋白酶(2500 USP U/g) 南宁庞博生物工程有限公司;1,1-二苯基-2-苦基苯肼(DPPH)、2,2'-联氮基-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS)、6-羟基-2,5,7,8-四甲基色烷-2-羧酸(Trolox)、荧光素钠、L-酪氨酸 上海麦克林生化科技股份有限公司;2,2'-偶氮二异丁基脒二盐酸盐(AAPH) 上海瑞永生物科技有限公司;过硫酸钾 天津市百世化工有限公司;酪氨酸酶 上海源叶生物科技有限公司。

ME204 型万分之一电子天平 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;PHS-3D 型 pH 计 上海三信沛瑞仪器科技有限公司;RD-50DTZ 型低速离心机 上海卢湘离心机有限公司;HH-6 型恒温水浴锅 常州朗越仪器制造有限公司;FD-1 型冷冻干燥机 海门市其林贝尔仪器制造有限公司;VersaMax 光栅型酶标仪、SpectraMax i3x 连续波长多功能微孔板检测平台 美国 Molecular Devices 公司;S433D 型全自动氨基酸分析仪 德国 Sykam 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 珍珠层蛋白的提取 将南珠贝壳珍珠层粉碎后,用 200 目筛网过筛,得到珍珠层粉。取珍珠层粉按照 1(g):3(mL)的固液比与 0.3 mol/L 的盐酸溶液混合,室温静置 12 h 后,进行高压处理(121 ℃, 20 min),待冷却至室温后,4000 r/min 离心 10 min,弃去上清液,得到酸化高压后的珍珠层粉。随后,向珍珠层粉中按照 1(g):5(mL)的固液比加入 1% 的氢氧化钠溶液,55 ℃ 水浴 3 h 后,抽滤得到上清液。接着,用盐酸溶液将上清液 pH 调至等电点 3.7,放入 4 ℃ 冰箱静置 24 h。将静置分层的珍珠层蛋白提取液以转速 4000 r/min 离心 10 min,收集沉淀进行冷冻干燥,得到的冻干粉即为珍珠层蛋白,将其密封后放置-20 ℃ 待后续实验使用。

1.2.2 珍珠层抗氧化肽的制备

1.2.2.1 酶的筛选 根据胰蛋白酶(pH8.5, 温度 37 ℃)、木瓜蛋白酶(pH6, 温度 55 ℃)、中性蛋白酶(pH6.5, 温度 55 ℃)、碱性蛋白酶(pH9, 温度 55 ℃)、菠萝蛋白酶(pH7, 温度 55 ℃)、胃蛋白酶(pH2, 温度 45 ℃)的最适酶解条件,对珍珠层蛋白进行酶解,加酶量为底物的 0.3%,酶解体系底物浓度为 3%,恒温水浴酶解 3 h。酶解结束时,将样品放入 95 ℃ 水浴锅灭酶 15 min,冷却后,在 4000 r/min 条件下离心 20 min 取上清液。稀释 5 倍后测定 DPPH 自由基清除率。

1.2.2.2 单因素实验 结合 1.2.2.1 的结果,根据胰蛋白酶厂商给出的酶解条件,分别考察酶解温度(27、32、37、42、47 ℃)、酶解时间(1、2、3、4、5 h)、酶解 pH(7.0、7.5、8.0、8.5、9.0)和酶底比(0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%)对酶解液抗氧化能力的影响,在考察不同浓度梯度时,酶解温度固定为 37 ℃,酶解时间固定为 3 h,酶解 pH 固定为 8.0,酶底比固定为 0.3%。得到酶解液后,稀释 5 倍测定 DPPH 自由基清除率。

1.2.2.3 响应面优化试验 结合 1.2.2.2 单因素实验结果,根据 Design-Expert 8.0.6 软件的 Box-Behnken 实验设计原理,设计 3 因素 3 水平的响应面试验,试验参数如表 1 所示。

表 1 响应面试验水平设计
Table 1 Box-Behnken level parameters

因素	编码值	水平		
		-1	0	1
酶解时间(h)	A	2	3	4
酶解温度(℃)	B	32	37	42
酶底比(%)	C	0.2	0.3	0.4

1.2.3 氨基酸分析 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》中的方法对珍珠层抗氧化肽进行前处理。称取珍珠层抗氧化肽 23.4 mg 于水解管中,加入 10 mL 浓度为 6 mol/L 的盐酸溶液,氮吹 2 min 后,迅速封口;在 110±1 ℃ 烘箱放置 22 h 后拿出冷却到室温,将其定容至 50 mL 后过滤;取 1 mL 滤液于 100 mL 烧杯中,置于 60 ℃ 烘箱蒸干溶液,再加一级水 1 mL 蒸干,重复 2 次后,加入 2 mL 浓度为 0.02 mol/L 盐酸溶解,过 0.22 μm 滤膜,转移至离心管备用。

使用 S433D 全自动氨基酸分析仪进行氨基酸组成测定,将处理后的珍珠层抗氧化肽加载到 LCA K06/Na 色谱柱上,装载体积为 50 μL,标准氨基酸浓度为 100 μmol/L。流动相包括 A 液(柠檬酸钠, pH3.45)和 B 液(柠檬酸钠, pH10.85),洗脱泵流速为 0.45 mL/min,衍生泵流为 0.25 mL/min,检测波长为 570 nm 和 440 nm, 58~74 ℃ 梯度升温。

1.2.4 DPPH 自由基清除能力测定 参考黄潘钊等^[13]的方法,用无水乙醇配制浓度为 0.000078 g/mL DPPH 溶液,现配现用。分别吸取不同浓度的样品水溶液 100 μL 于 96 孔板中,加入 100 μL 浓度为 0.000078 g/mL 的 DPPH 溶液,混匀,在室温下避光反应 30 min 后,于 517 nm 下测定吸光值 A_t 。同时测定 100 μL 样品溶液与 100 μL 无水乙醇混合溶液吸光值 A_r , 100 μL DPPH 溶液与 100 μL 无水乙醇混合溶液吸光值 A_0 。每组测定设计三个平行,以相同浓度的还原型谷胱甘肽为阳性对照。计算公式见式(1)。

$$\text{DPPH自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_t - A_r}{A_0}\right) \times 100 \quad \text{式(1)}$$

式中, A_t : 100 μL 样品溶液+100 μL DPPH 溶液的吸光值; A_r : 100 μL 样品溶液+100 μL 无水乙醇溶液的吸光值; A_0 : 100 μL 无水乙醇溶液+100 μL DPPH 溶液的吸光值。

1.2.5 ABTS⁺自由基清除能力测定 参考黄潘钊^[13]的方法,配制浓度为 0.0378 g/mL 过硫酸钾溶液为 A 液,浓度为 0.00384 g/mL ABTS 溶液为 B 液。取 A 液 0.088 mL 与 B 液 5 mL 混合,在室温下避光静置过夜(12 h)得到 ABTS 储备液。测定前将储备液用一级水稀释至 734 nm 下吸光度为 0.7±0.02。分别吸取不同浓度样品水溶液 100 μL 于 96 孔板中,加入 100 μL ABTS 工作液,混匀,在室温下避光反应 10 min 后,于 734 nm 下测定吸光值 A_t 。同时测定 100 μL 样品溶液与 100 μL 一级水混合溶液吸光值 A_r , 100 μL ABTS 工作液与 100 μL 一级水混合溶液吸光值 A_0 。每组测定设计三个平行,以相同浓度的还原型谷胱甘肽为阳性对照。

$$\text{ABTS}^+\text{自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_t - A_r}{A_0}\right) \times 100 \quad \text{式(2)}$$

式中: A_t : 100 μL 样品溶液+100 μL ABTS 工作液的吸光值; A_r : 100 μL 样品溶液+100 μL 一级水的吸光值; A_0 : 100 μL 一级水+100 μL ABTS 工作液的吸光值。

1.2.6 ORAC(氧自由基吸收能力)测定 参考李原^[14]的方法略作修改,分别吸取不同浓度样品溶液 50 μL 于黑色 96 孔板中,加入浓度为 0.96 μmol/L 的荧光素钠溶液 100 μL, 37 ℃ 保温 10 min 后,迅速加入浓度为 153 mmol/L 的 AAPH 溶液 50 μL 启动反应,以激发波长 485 nm,发射波长 538 nm 进行测定,仪器温度保持在 37 ℃,总测定时长为 120 min,期间每 2 min,一共测定 61 次,记为样品组(sample)。同时测定以 50 μL 缓冲溶液代替样品溶液的+AAPH 组,以 100 μL 缓冲溶液代替样品溶液和 AAPH 溶液的-AAPH 组(表 2)。每组测定设计三个平行。Trolox 溶液(25、50、75、100、125 μmol/L)作为标准参考物,并计算标准曲线: $Y=0.3696X+3.934(R^2=0.9923)$ 。以上溶液均用磷酸盐缓冲液(75 mmol/L, pH7.4)配制。

将所有组记录的 61 次荧光值除以同时间下

表 2 ORAC 实验组

Table 2 Experimental group of ORAC

组别	反应体系
样品组	50 μL 样品+100 μL 荧光素钠+50 μL AAPH
+AAPH 组	50 μL 缓冲溶液+100 μL 荧光素钠+50 μL AAPH
-AAPH 组	100 μL 缓冲溶液+100 μL 荧光素钠

-AAPH 的荧光值,得到相对荧光值 FRU_x 。

根据荧光曲线下面积 (AUC) 和相对面积 (NetAUC) 计算 ORAC 值。

$$AUC = 1 + \frac{RFU_1}{RFU_0} + \frac{RFU_2}{RFU_0} + \frac{RFU_3}{RFU_0} + \cdots + \frac{RFU_{59}}{RFU_0} + \frac{RFU_{60}}{RFU_0}$$

式 (3)

式中, RFU_0 : 0 min 的相对荧光值; RFU_x : x min 的相对荧光值 (例如, RFU_5 是 5 min 时的相对荧光值); AUC: 荧光曲线下面积; NetAUC: 样品组 (sample) 与 +AAPH 组的相对荧光曲线下面积; $NetAUC = AUC_{sample} - AUC_{+AAPH}$ 。

将 NetAUC 带入标准曲线得出 X 值 ($\mu\text{mol/L}$), 以微摩尔每升 Trolox 当量 (TE) 或每克样品的 TE ($\mu\text{mol TE/g}$ 或 $\mu\text{mol TE/L}$) 表示 ORAC 值。

1.2.7 珍珠层抗氧化肽对酪氨酸酶的抑制实验

1.2.7.1 珍珠层抗氧化肽对酪氨酸酶的抑制活性研究 参考黄潘铨等^[13]的方法稍作修改。分别吸取不同浓度样液 40 μL 于 96 孔板中, 加入 40 μL 浓度为 125 U/mL 的酪氨酸酶溶液, 再加入 80 μL PBS (50 mmol/L, pH6.8), 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 10 min, 再加入浓度为 0.0002 g/mL 的底物 (L-酪氨酸或多巴), 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min 后, 于 475 nm 处测定吸光值 A_1 , 同时测定 A_2 、 A_3 、 A_4 组。以上溶液均用 PBS 配制。每组测定三个平行。

$$\text{酪氨酸酶抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3 - A_4}\right) \times 100 \quad \text{式 (4)}$$

式中, A_1 : 40 μL 样品+40 μL 酶+80 μL PBS+40 μL 底物; A_2 : 40 μL 样品+40 μL 酶+120 μL PBS; A_3 : 40 μL 酶+120 μL PBS+40 μL 底物; A_4 : 40 μL 酶+160 μL PBS。

1.2.7.2 珍珠层抗氧化肽对酪氨酸酶的抑制作用机理研究 酶抑制机理分为可逆性抑制和不可逆性抑制, 参照郭璟煊等^[15]的方法稍作修改, 固定底物 L-酪氨酸的浓度为 1.1 mmol/L, 在酶浓度为 125、150 和 200 U/mL 的条件下, 分别添加浓度为 0、5、10 和 15 mg/mL 的珍珠层抗氧化肽, 按照 1.2.7.1 的方法每隔 30 s 测定一次吸光值。以酶浓度为横坐标, 酶反应初速率为纵坐标作散点图, 绘制拟合曲线, 探究不同浓度珍珠层抗氧化肽对酪氨酸酶的催化活性与酶浓度的关系。根据交点位置判断珍珠层抗氧化肽对酪氨酸酶的抑制作用机理。

1.2.7.3 珍珠层抗氧化肽对酪氨酸酶的抑制作用类型研究 酶抑制作用类型分别为竞争性抑制、非竞争性抑制、反竞争性抑制和混合型抑制。参照彭思琪^[16]的方法稍作修改, 固定酶浓度为 125 U/mL, 在底物 L-酪氨酸浓度为 0.55、1.1 和 2.2 mmol/L 的条件下, 分别添加浓度为 0、5、10 和 15 mg/mL 的珍珠层抗氧化肽, 按照之前的方法每隔 30 s 测定一次吸光值。以底物浓度的倒数为横坐标, 酶反应初速率的

倒数为纵坐标, 结合 Lineweaver-Burk 双倒数作图法作图, 根据交点位置判断抑制类型。

1.3 数据处理

各个实验均进行 3 次平行实验, 采用 SPSS 软件进行数据处理, $P < 0.05$ 具有统计学差异, Design-Expert 8.0.6 进行响应面分析, Origin 2021 和 Graphpad Prism 8 绘图。

2 结果与分析

2.1 适宜酶的筛选

由于不同种类蛋白酶的专一性和作用位点各不相同, 因此不同蛋白酶酶解同一蛋白底物时, 水解程度不相同, 所产生多肽的结构和分子量大小也会有一定的区别, 随之所得酶解产物的抗氧化能力会有所差异^[17]。以 6 种蛋白酶酶解南珠贝壳珍珠层蛋白, 其酶解物的 DPPH 自由基清除率如图 1 所示。由图可知, 采用胰蛋白酶酶解制得的珍珠层酶解液 DPPH 自由基清除率最高, 因此选择胰蛋白酶作为后续实验的水解酶。

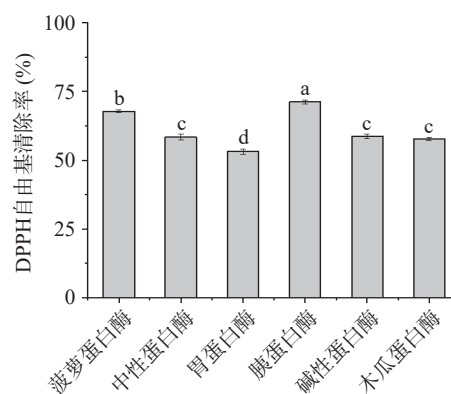


图 1 六种蛋白酶对珍珠层酶解液 DPPH 自由基清除能力的影响

Fig.1 Effects of six kinds of proteases on the scavenging rate of DPPH free radicals in the hydrolysate of nacre

注: 不同字母表示组间存在显著性差异, $P < 0.05$, 图 2~图 5, 图 9~图 12 同。

2.2 单因素实验

2.2.1 酶解温度对珍珠层酶解液 DPPH 自由基清除率的影响 温度会影响底物与酶的结合, 由图 2 所示, 当温度在 27~37 $^{\circ}\text{C}$ 范围内时, 珍珠层酶解液的 DPPH 自由基清除率随酶解温度的升高而增大, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 时达到最大值, 为 $72.88\% \pm 0.44\%$, 而当温度大于 37 $^{\circ}\text{C}$ 时, DPPH 自由基清除率随着温度的升高而降低。其原因在于, 当温度低于 37 $^{\circ}\text{C}$ 时, 温度的升高有利于激活酶的活性位点, 从而促进底物与酶的结合^[18]; 而当温度高于 37 $^{\circ}\text{C}$ 后, 会导致蛋白酶分子结构的次级键解离, 导致蛋白酶变性, 酶活性降低^[19]。结合实验结果初步选定酶解温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ 左右。

2.2.2 酶解时间对珍珠层酶解液 DPPH 自由基清除率的影响 由图 3 所示, 当酶解时间低于 3 h 时, 珍珠层酶解液的 DPPH 自由基清除率随酶解时间的增

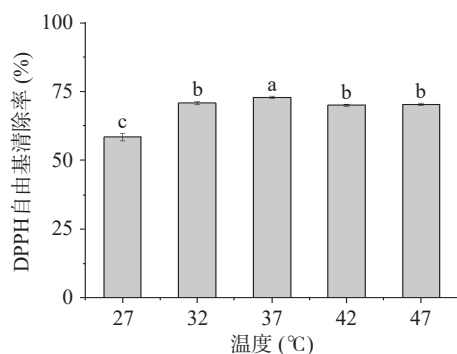


图2 酶解温度对珍珠层酶解液 DPPH 自由基清除能力的影响

Fig.2 Effect of enzymatic hydrolysis temperature on DPPH radical scavenging rate of nacre enzymatic hydrolysate

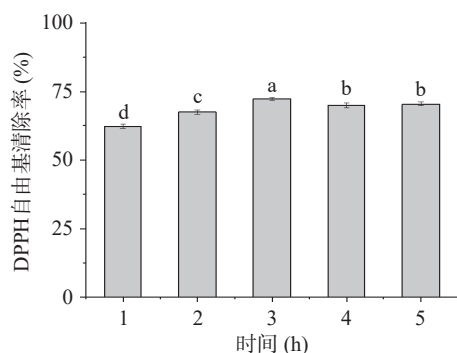


图3 酶解时间对珍珠层酶解液 DPPH 自由基清除能力的影响

Fig.3 Effect of enzymatic hydrolysis time on DPPH radical scavenging rate of nacre enzymatic hydrolysate

加而增大,在 3 h 时达到峰值,为 $72.28\% \pm 0.62\%$,但酶解时间超过 3 h 时,珍珠层酶解液的 DPPH 自由基清除率随着时间的增长而减小。其原因可能是当酶解时间较短时,部分底物没有被酶解,此时处于低抗氧化活性的大分子蛋白质状态,而随着酶解时间的延长,大分子的蛋白质被继续酶解,生成具有较高活性的小分子肽段^[20]。但酶解时间过长,会导致底物过度水解,多肽的氨基酸组成和构象会发生改变,从而造成多肽抗氧化活性的降低^[21]。因此,选择酶解时间为 3 h 左右作为后续工艺优化条件。

2.2.3 酶底比对珍珠层酶解液 DPPH 自由基清除率的影响 如图 4 所示,当反应体系中酶底比从 0.1% 逐渐升高至 0.3% 时,珍珠层酶解液的 DPPH 自由基清除率有显著的提高($P < 0.05$),酶底比为 0.3% 时达到最大值,为 $70.81\% \pm 0.53\%$;而将底物浓度继续扩大直至 0.5% 时,DPPH 自由基清除率逐渐降低。其原因可能是当酶浓度较低时,底物与酶的结合少,蛋白质水解程度低,所产生的具有抗氧化活性的肽段也相对较少,因此随着酶量的增加,蛋白质被充分酶解,具有抗氧化活性的肽含量也随之增加^[22]。但反应体系中酶浓度过高的话,部分酶会与已生成的多肽接触,使其水解成分子量更小的肽段甚至是游离氨基酸,造成具有抗氧化活性的肽段含量降低,因此导致体系 DPPH 自由基清除率下降^[22]。结合实验结果,

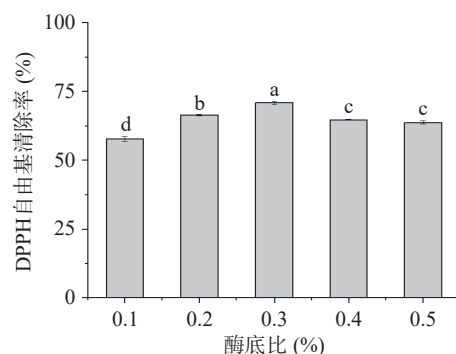


图4 酶底比对珍珠层酶解液 DPPH 自由基清除能力的影响

Fig.4 Effect of enzyme to substrate ratio on DPPH radical scavenging rate of nacre enzymatic hydrolysate

选取酶底比为 0.3% 作为后续响应面优化试验参数。

2.2.4 酶解 pH 对珍珠层酶解液 DPPH 自由基清除率的影响 由图 5 可知,当 pH 为 7 时珍珠层酶解液的 DPPH 自由基清除率最大,为 $75.28\% \pm 0.67\%$,pH 大于 7 时,DPPH 自由基清除率随之减小。其原因是由于蛋白酶的催化能力与所处反应体系的 pH 密切相关,反应体系的 pH 会影响蛋白酶活性部位的构象及酶-底物复合物的解离,从而影响蛋白酶的稳定性、酶与底物的结合以及酶解产物,最终影响酶的催化效率^[23]。因此,选择 pH7 作为后续实验的酶解 pH。

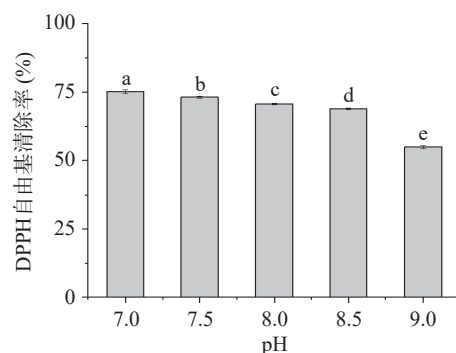


图5 酶解 pH 对珍珠层酶解液 DPPH 自由基清除能力的影响

Fig.5 Effect of enzymatic hydrolysis pH on DPPH radical scavenging rate of nacre enzymatic hydrolysate

2.3 响应面试验结果

2.3.1 响应面试验设计与结果分析 在单因素实验基础上,选取酶解时间(A)、酶解温度(B)和酶底比(C)作为自变量,以珍珠层酶解液的 DPPH 自由基清除率作为响应值(Y),设计 3 因素 3 水平的响应面试验,优化酶解工艺,实验设计与结果见表 3。

2.3.2 回归模型和方差分析 运用 Design-Expert 8.0.6 软件对表 4 数据进行拟合分析后,得二次回归方程为:

$$Y = 76.22 + 0.39A + 0.11B + 1.45C + 2.62AB + 0.23AC + 5.63BC - 3.62A^2 - 1.8B^2 - 4.13C^2$$

由表 4 方差分析可知:模型 F 值为 38.8548,

表 3 响应面试验设计及结果

Table 3 Box-behnken design and results for response surface analysis

试验号	A 酶解时间	B 酶解温度	C 酶底比	Y DPPH自由基清除率(%)
1	1	0	1	70.99
2	0	0	0	75.88
3	1	1	0	71.07
4	-1	0	1	66.38
5	-1	1	0	70.77
6	0	-1	1	71.41
7	-1	0	1	69.26
8	0	-1	1	68.96
9	0	0	0	76.43
10	0	1	1	69.14
11	0	0	0	77.10
12	0	1	1	71.62
13	1	0	1	67.21
14	0	0	0	76.67
15	-1	-1	0	70.53
16	1	-1	0	70.82
17	0	0	0	75.00

表 4 方差分析

Table 4 Variance analysis

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	173.6367	9	19.2930	38.8548	<0.0001	***
A-酶解时间	1.2392	1	1.2392	2.4956	0.1582	
B-酶解温度	0.0959	1	0.0959	0.1932	0.6735	
C-酶底比	16.8042	1	16.8042	33.8426	0.0007	**
AB	0.0000	1	0.0000	0.0001	0.9943	
AC	0.2052	1	0.2052	0.4133	0.5408	
BC	0.0001	1	0.0001	0.0003	0.9877	
A ²	55.2302	1	55.2302	111.2301	<0.0001	***
B ²	13.6626	1	13.6626	27.5156	0.0012	**
C ²	71.9509	1	71.9509	144.9047	<0.0001	***
残差	3.4758	7	0.4965			
失拟项	0.8566	3	0.2855	0.4360	0.7394	不显著
纯误差	2.6192	4	0.6548			
总和	177.1125	16				

注: $P<0.05$, 差异显著, 以*表示; $P<0.01$, 差异极显著, 以**表示; $P<0.0001$, 差异极显著, 以***表示; $P>0.05$, 差异不显著。

P 值 <0.0001 , 表明该设计模型具有极显著差异, 试验方法可信度高; 失拟项值为 0.7394, 大于 0.05, 不显著, 表明该模型的试验值与预测值线性相关, 具有较好的拟合度^[24]。相关系数 $R^2=0.9804>0.9$, 表明该模型相关度好。校正系数 $R^2_{adj}=0.9551$, 说明有 95.51% 的响应值变化可用于珍珠层酶解液的 DPPH 自由基清除率的分析与检测。由图 6~图 8 可知, 酶解时间、酶解温度和酶底比三因素交互作用对于珍珠层酶解液 DPPH 自由基清除率的影响均呈先上升后下降的趋势, 说明在试验范围内存在最大值。三因素交互作用的响应曲面弯曲程度越大, 则两因素的交互作用对珍珠层酶解液 DPPH 自由基清除率的影响越大^[25]。此外, 模型因素 F 值越大, 对于试验结果的影响也越大。结合表 4 方差分析结果可知, 交互项不

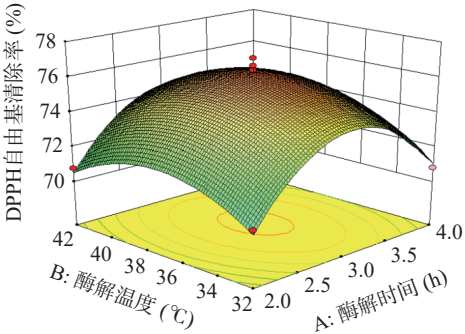


图 6 酶解时间和酶解温度对珍珠层酶解液 DPPH 自由基清除能力的影响

Fig.6 Effects of enzymatic hydrolysis time and temperature on DPPH radical scavenging rate of nacre enzymatic hydrolysate

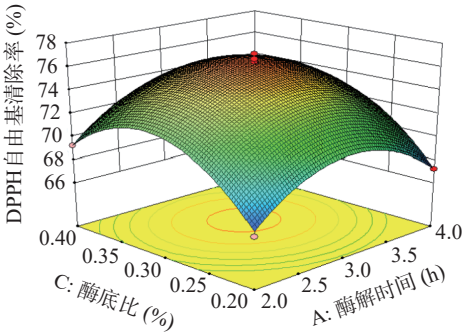


图 7 酶解时间和酶底比对珍珠层酶解液 DPPH 自由基清除能力的影响

Fig.7 Effects of enzymatic hydrolysis time and enzymatic substrate ratio on DPPH radical scavenging rate of nacre enzymatic hydrolysate

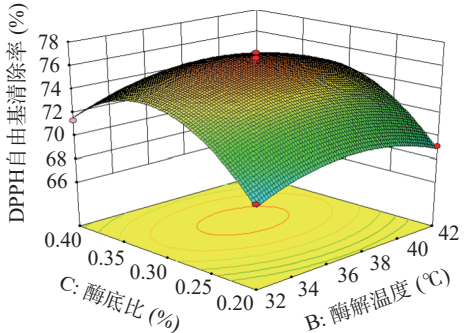


图 8 酶解温度和酶底比对珍珠层酶解液 DPPH 自由基清除能力的影响

Fig.8 Effects of enzymatic hydrolysis temperature and enzymatic substrate ratio on DPPH radical scavenging rate of nacre enzymatic hydrolysate

具有显著性, 酶解时间与酶底比的交互影响对于酶解物 DPPH 自由基清除率影响最大, 酶解温度和酶底比的影响次之, 酶解时间和酶解温度的影响最弱, 而单个因素对于响应值的影响为酶底比 $>$ 酶解时间 $>$ 酶解温度。

通过 Design-Expert 8.0.6 软件对试验结果进行分析, 模型预测最佳酶解工艺为酶解时间 3.06 h、酶解温度 37.15 $^{\circ}\text{C}$ 、酶底比 0.32%, 预测在此条件下所得到的酶解液的 DPPH 自由基清除率为 76.36%。结合实验室实际情况, 将酶解条件修整为时间 3 h,

温度 37 ℃, 酶底比 0.32%。最终在此条件下制备的酶解液 DPPH 自由基清除率为 76.34%±0.24%, 与预测结果相近, 无显著性差异($P>0.05$), 说明该模型优化结果较为准确。将最优酶解工艺制备得到的珍珠层酶解液冻干得到固体, 即为珍珠层抗氧化肽。

2.4 氨基酸组成分析

南珠贝壳珍珠层抗氧化肽的氨基酸组成分析结果如表 5 所示, 其中疏水性氨基酸高达 33.9%, 酸性氨基酸和碱性氨基酸分别占总氨基酸的 29.58% 和 18.36%, 芳香族氨基酸占比 19.48%。相关研究表明, 疏水性氨基酸是活性肽自由基抑制能力的关键因素^[26], 其结构中的脂肪烃侧链容易与自由基结合^[27], 这也是珍珠层抗氧化肽自由基清除率高的原因之一。同时, 珍珠层抗氧化肽中的酸性氨基酸能够通过提供质子来猝灭未配对电子或自由基^[27-28], 从而影响其自由基清除能力。不仅如此, 芳香族氨基酸和碱性氨基酸也是有效的自由基清除剂^[28-30]。因此, 在这四种类型氨基酸的共同作用下, 珍珠层抗氧化肽表现出了良好的抗氧化活性。

表 5 氨基酸组成分析

Table 5 Analysis of amino acids contents

氨基酸种类	相对含量(%)
Asp(天冬氨酸)	19.34
Thr(苏氨酸)	0.92
Ser(丝氨酸)	1.89
Glu(谷氨酸)	10.23
Gly(甘氨酸)	6.93
Ala(丙氨酸)	4.48
*Cys(胱氨酸)	1.61
Val(缬氨酸)	1.96
Met(蛋氨酸)	1.65
Ile(异亮氨酸)	2.07
Leu(亮氨酸)	6.76
Tyr(酪氨酸)	13.74
Phe(苯丙氨酸)	5.73
*His(组氨酸)	8.59
*Lys(赖氨酸)	2.23
*Arg(精氨酸)	7.53
Pro(脯氨酸)	4.31
EAA/TAA(%)	21.33
HAA/TAA(%)	33.9
ARAA/TAA(%)	19.48
AAA/TAA(%)	29.58
BAA/TAA(%)	18.36

注: EAA: 必需氨基酸; *: 半必需氨基酸; TAA: 总氨基酸; AAA: 酸性氨基酸(Asp, Glu); BAA: 碱性氨基酸(His, Arg, Lys); HAA: 疏水性氨基酸(Ala, Phe, Ile, Leu, Met, Pro, Val, Gly); ARAA: 芳香族氨基酸(Trp, Tyr, Phe); 由于氨基酸分析采用酸水解法处理样品, 所得检测结果中色氨酸全部破坏。

此外, 珍珠层抗氧化肽中的亮氨酸、丝氨酸、苏氨酸、精氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸和半胱氨酸有助于抑制酪氨酸酶的活性^[31], 这 8 种氨基酸在珍珠层抗氧化肽中占比达到 30.88%, 为珍珠层抗氧

化肽的酪氨酸酶抑制能力奠定了物质基础。

2.5 DPPH 自由基清除能力测定

如图 9 所示, 在珍珠层抗氧化肽和还原型谷胱甘肽浓度为 0.1~4 mg/mL 范围时, 其 DPPH 自由基清除率随着浓度的增大而增大, 呈现出良好的量效关系, 在浓度为 4 mg/mL 时分别达到 62.43%±0.53% 和 97.72%±1.09%。在这 6 个浓度下, 阳性对照的 DPPH 自由基清除能力远远高于珍珠层抗氧化肽。相关研究表明, 珍珠蚌多肽 DPPH 自由基清除率的 IC₅₀ 为 3.140 mg/mL^[32], 而本实验珍珠层抗氧化肽 DPPH 自由基清除率的 IC₅₀ 为 2.342 mg/mL, 清除效果明显高于珍珠蚌多肽。由此可见, 珍珠层抗氧化肽具有良好的 DPPH 自由基清除能力。

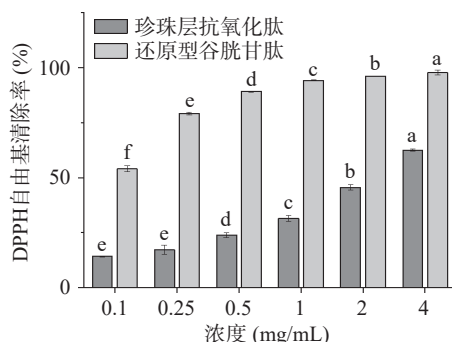


图 9 不同浓度珍珠层抗氧化肽和还原型谷胱甘肽的 DPPH 自由基清除率

Fig.9 DPPH radical scavenging rates of nacre antioxidant peptides and GSH in different concentrations

2.6 ABTS⁺自由基清除能力测定

由图 10 可知, 珍珠层抗氧化肽和还原型谷胱甘肽的 ABTS⁺自由基清除率随着其浓度的增大而增大, 呈现出良好的线性关系, 且珍珠层抗氧化肽的 ABTS⁺自由基清除率在浓度为 2 mg/mL 时为 99.97%±1.22%, 优于阳性对照的 98.07%±0.07%, 清除率接近 100%。Yu 等^[33]的研究表明, 太平洋牡蛎超分子多肽自组装材料(CAPs)浓度为 5 mg/mL 时, ABTS⁺自由基清除率约为 50%, 而本实验制备得到的珍珠层抗氧化肽 ABTS⁺的 IC₅₀ 值为 0.1735 mg/

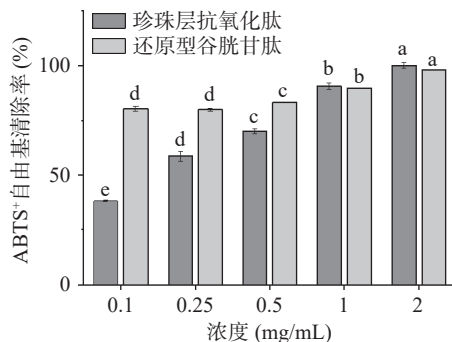


图 10 不同浓度珍珠层抗氧化肽和还原型谷胱甘肽的 ABTS⁺自由基清除率

Fig.10 ABTS⁺ radical scavenging rates of nacre antioxidant peptides and GSH in different concentrations

mL, 显著低于 CAPs。因此, 珍珠层抗氧化肽具有很好的 ABTS⁺ 自由基清除能力。

2.7 ORAC (氧自由基吸收能力) 测定

由图 11A 可知, 与空白+AAPH 组相比, 珍珠层抗氧化肽的添加可以明显缓解荧光素荧光信号的衰减, 曲线下面积(AUC)越大, 抗氧化活性越强, 因此, 多浓度的珍珠层抗氧化肽均表现出良好的抗氧化活性, 并且呈一定的量效关系。将标准参考物 Trolox 代替样品进行实验, 得到了标准曲线 $Y=0.3696X+3.934$ ($R^2=0.9923$), 其中“X”代表 Trolox 浓度, “Y”代表 Net AUC。根据标准曲线得出的数据作柱状图 11B, 即表示相同 Net AUC 下, 不同浓度的珍珠层抗氧化肽所对应的 Trolox 浓度。由图 11B 可知, 浓度为 50~90 $\mu\text{g/mL}$ 的珍珠层抗氧化肽所对应的 Trolox 浓度为 $50.36\pm 2.58\sim 105.36\pm 1.33$ $\mu\text{mol/L}$, 以该数据计算得到的 Trolox 当量表示珍珠层抗氧化肽的 ORAC 值, 即为 1124.86 $\mu\text{mol TE/g}$ 冻干粉。相关研究表明^[34] 金枪鱼蛋白水解物(TPH)的 ORAC 值为 576.15 ± 1.77 $\mu\text{mol/L TE/g}$ 蛋白, 远低于珍珠层抗氧化肽, 由此说明珍珠层抗氧化肽有很好的氧自由基吸收能力。

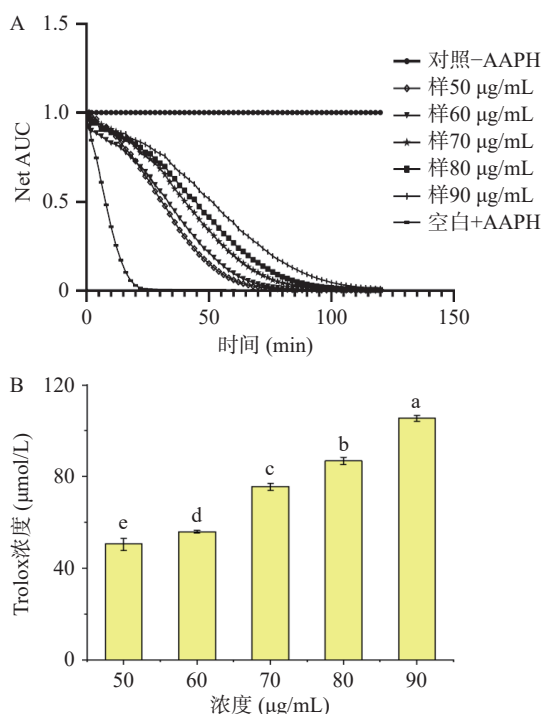


图 11 珍珠层抗氧化肽荧光衰减曲线(A)和相同 Net AUC 下珍珠层抗氧化肽物对应的 Trolox 浓度(B)

Fig.11 Fluorescence decay curve of the optimal digest hydrolysate of nacre antioxidant peptides (A) and Trolox concentration corresponding to the optimal digest hydrolysate of nacre antioxidant peptides under the same Net AUC (B)

2.8 珍珠层抗氧化肽对酪氨酸酶的抑制

2.8.1 珍珠层抗氧化肽对酪氨酸酶的抑制活性 由图 12 可知, 在珍珠层抗氧化肽浓度为 5~25 mg/mL 时, 其酪氨酸酶抑制率随着浓度的增加而增大, 呈现

出良好的量效关系。有研究报道, 海地瓜胶原蛋白多肽在浓度为 40 mg/mL 时, 对酪氨酸酶的抑制率为 50% 左右^[35], 而珍珠层抗氧化肽对酪氨酸酶抑制率的 IC_{50} 值为 12.38 mg/mL , 远低于海地瓜胶原蛋白多肽, 说明其具有良好的酪氨酸酶抑制能力。

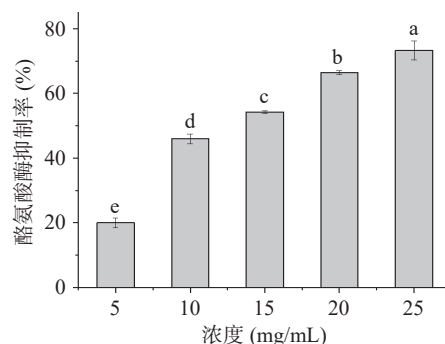


图 12 不同浓度珍珠层抗氧化肽的酪氨酸酶抑制率
Fig.12 Tyrosinase inhibition rates of nacre antioxidant peptides in different concentrations

2.8.2 珍珠层抗氧化肽对酪氨酸酶的抑制作用机理

以酶浓度为横坐标, 酶反应初速率为纵坐标作图如下, 由图 13 可知, 这是一组交于原点的直线, 酶浓度越大时, 酶反应初速率越大; 但随着珍珠层抗氧化肽浓度的增加, 酶反应初速率随之变小, 斜率变小。在酶的可逆反应中, 抑制剂的浓度改变, 斜率也随之改变, 且直线相交于原点; 但在不可逆反应中, 即使抑制剂的浓度改变, 斜率依然不变, 并且相互平行, 不会相交^[36]。因此, 珍珠层抗氧化肽对酪氨酸酶的抑制机理属于可逆反应, 说明其主要通过与酶发生非共价相互作用来抑制酶的活性, 不会使酶发生永久性失活^[37]。

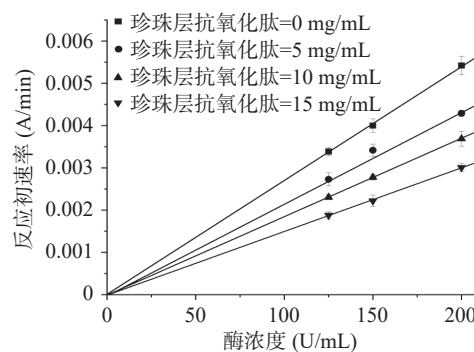


图 13 珍珠层抗氧化肽对酪氨酸酶抑制作用机理
Fig.13 Mechanism of inhibition of tyrosinase by nacre antioxidant peptides

2.8.3 珍珠层抗氧化肽对酪氨酸酶的抑制作用类型

以底物浓度的倒数为横坐标, 酶反应初速率的倒数为纵坐标做 Lineweaver-Burk 双倒数曲线图, 得到一组斜率为 K_m/V_m , 截距为 $1/V_m$ 的直线。结果如图 14 所示, 直线相交于第三象限, 且随着珍珠层抗氧化肽浓度的增大, K_m 和 V_m 随之减小, 符合竞争性和非竞争性混合型抑制类型^[38], 此时, 抑制剂既能与游离的酶结合, 又能与酶-底物络合物结合, 从而达到

抑制效果^[39]。珍珠层抗氧化肽对酪氨酸酶抑制动力学参数如表 6 所示,其中, Lineweaver-Burk 方程里“X”代表底物浓度的倒数,“Y”代表反应初速率的倒数。

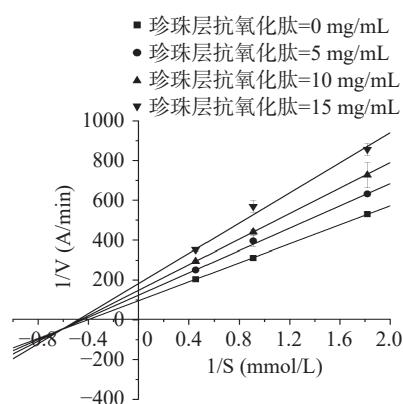


图 14 珍珠层抗氧化肽对酪氨酸酶的抑制作用类型

Fig.14 Types of inhibition of tyrosinase by nacre antioxidant peptides

表 6 珍珠层抗氧化肽对酪氨酸酶抑制动力学参数

Table 6 Kinetic parameters of inhibition of tyrosinase by nacre antioxidant peptides

珍珠层抗氧化肽浓度 (mg/mL)	Lineweaver-Burk 方程	K_m (mmol/L)	V_m (A/min)
0	$Y=237.69X+96.64$	2.46	0.0103
5	$Y=279.63X+124.64$	2.24	0.0080
10	$Y=320.46X+148.99$	2.15	0.0067
15	$Y=378.76X+182.87$	2.07	0.0054

3 结论

本研究以从南珠贝壳珍珠层中提取的蛋白为原料,通过酶解得到珍珠层抗氧化肽。通过氨基酸组成分析可知,与抗氧化能力相关的四种氨基酸:疏水性氨基酸(33.90%)、芳香族氨基酸(19.48%)、酸性氨基酸(29.58%)和碱性氨基酸(18.36%),在总氨基酸含量中占比较高,在这四种类型氨基酸的共同作用下,珍珠层抗氧化肽表现出了良好自由基清除活性。同时,有助于酪氨酸酶抑制能力的氨基酸占比为 30.88%,表明珍珠层抗氧化肽具备开发成美白剂的物质基础,实验得出珍珠层抗氧化肽通过混合型可逆抑制的方式抑制酪氨酸酶活力,并具有良好的酪氨酸酶抑制活性。因此珍珠层抗氧化肽有望被开发成具有双重功效的新型抗氧化剂和美白剂,为实现南珠贝壳珍珠层的高值化利用,带动经济发展奠定了理论基础。由于珍珠层抗氧化肽与其抗氧化和酪氨酸酶抑制活性之间的构效关系尚不清楚,后续我们将对珍珠层抗氧化肽进行分离纯化与鉴定,深入探究其抗氧化和酪氨酸酶抑制活性机制。

参考文献

- [1] NWACHUKWU I D, ALUKO R E. Structural and functional properties of food protein-derived antioxidant peptides[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2019, 43(1): e12761.
- [2] LI J, FENG L, LIU L, et al. Recent advances in the design and discovery of synthetic tyrosinase inhibitors[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2021, 224: 113744.
- [3] 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 Qiang, LI Weihua. Research progress of antioxidant peptides[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(2): 298-304.]
- [4] LIU Y, XIE Y P, MA X Y, et al. Preparation and properties of antioxidant peptides from wampee seed protein[J]. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2022: 1-10.
- [5] 孟乐, 金丹青, 冀宣伊, 等. 厚壳贻贝抗氧化肽的分离、鉴定及活性评价[J]. *中国海洋药物*, 2024, 43(3): 59-66. [MENG Yue, JIN Danqing, GONG Xuanyi, et al. Isolation, identification and activity evaluation of *Mytilus coruscus* antioxidant peptides[J]. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 2024, 43(3): 59-66.]
- [6] 崔方超, 刘晓白, 王当丰, 等. 功能性海参肽的特性及其生物活性研究进展[J]. *食品工业*, 2023, 44(11): 182-187. [CUI Fangchao, LIU Xiaobai, WANG Dangfeng, et al. Research progress on characteristics and bioactivity of functional sea cucumber peptides[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2023, 44(11): 182-187.]
- [7] 李爽, 刘小芳, 冷凯良, 等. 大西洋鳕鱼骨胶原蛋白肽的抗氧化活性及稳定性研究[J]. *食品与发酵工业*, 2024, 50(16): 50-56. [LI Shuang, LIU Xiaofang, LENG Kailiang, et al. Antioxidant activity and stability of collagen peptides from Atlantic cod (*Gadus morhua*) bone[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2024, 50(16): 50-56.]
- [8] 陈晓军, 常力丹, 刘雯雯, 等. 贝壳废弃物资源化利用研究进展[J]. *山东化工*, 2023, 52(13): 82-84, 88. [CHEN Xiaojun, CHANG Lidian, LIU Wenwen, et al. Research progress on resource utilization of shell waste[J]. *Shandong Chemical Industry*, 2023, 52(13): 82-84, 88.]
- [9] 钱荣华, 竹剑平. 珍珠粉延缓衰老作用的实验研究[J]. *浙江临床医学*, 2003(9): 718. [QIAN Ronghua, ZHU Jianping. Experimental study of the anti-aging effect of pearl powder[J]. *Zhejiang Clinical Medicine Journal*, 2003(9): 718.]
- [10] PEI J, WANG Y, ZOU X, et al. Extraction, purification, bioactivities and application of matrix proteins from pearl powder and nacre powder: A review[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2021, 9: 649665.
- [11] 刘琳, 徐普. 珍珠层成骨活性物质的研究进展[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2023, 29(7): 1007-1011. [LIU Lin, XU Pu. Research progress of osteogenic active substances in nacre[J]. *Chinese Journal of Osteoporosis*, 2023, 29(7): 1007-1011.]
- [12] 蔡松雨, 李璐瑶, 狄飞倩, 等. 珍珠的生物制备技术及其功效研究进展[J]. *日用化学品科学*, 2023, 46(11): 32-40. [CAI Songyu, LI Luyao, DI Feiqian, et al. Research progress on biotechnologies to extract active ingredients from pearls and the efficacy[J]. *Detergent & Cosmetics*, 2023, 46(11): 32-40.]
- [13] 黄潘钊, 陈冰冰, 沈金鹏, 等. 珍珠肌肉抗氧化肽制备工艺优化及其对酪氨酸酶的抑制活性[J]. *现代食品科技*, 2022, 38(4): 52-61. [HUANG Pantian, CHEN Binbin, SHEN Jinpeng, et al. Preparation process optimization for the antioxidant peptide from *Pinctada martensii* meat and its tyrosinase inhibitory activity[J].

Modern Food Science and Technology, 2022, 38(4): 52–61.]

[14] 李原. 凤眼果壳酚类化合物的鉴定及抗氧化和抗癌细胞增殖活性研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2020. [LI Yuan. Identification of phenolics in *Sterculia nobilis* Smith pericarp and research on antioxidant and anticancer cell proliferation activity[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2020.]

[15] 郭璟煊, 刘学, 刘春环, 等. 松茸的发酵条件优化及其对酪氨酸酶的抑制机理研究[J]. 食品与发酵工业, 2024, 50(13): 64–71. [GUO Jinxuan, LIU Xue, LIU Chunhuan, et al. Optimization of fermentation conditions of *Tricholoma matsutake* and mechanism of tyrosinase inhibition[J]. Food and Fermentation Industries, 2024, 50(13): 64–71.]

[16] 彭思琪. 香蕉皮黄酮的提取及其抑制酪氨酸酶和紫外吸收性质研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2022. [PENG Siqi. Extraction of flavonoids from banana peel and its tyrosinase inhibition and UV absorption properties[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2022.]

[17] 马骏, 石晓丹, 王家林. 酶解法制备啤酒糟抗氧化肽工艺优化[J]. 食品科技, 2021, 46(9): 73–78. [MA Jun, SHI Xiaodan, WANG Jialin. Optimization of enzymatic hydrolysis preparation of antioxidant peptide from the brewer's Spent Grains[J]. Food Science and Technology, 2021, 46(9): 73–78.]

[18] RESA P, ELVIRA L, SIERRA C, et al. Ultrasonic velocity assay of extracellular invertase in living yeasts[J]. *Analytical Biochemistry*, 2009, 384(1): 68–73.

[19] 徐杨林, 严宏孟, 高蕾, 等. 苦杏仁醇溶蛋白酶解抗氧化肽的制备工艺优化[J]. 现代食品科技, 2021, 37(6): 201–210, 192. [XU Yanglin, YAN Hongmeng, GAO Lei, et al. Optimizing antioxidant peptide preparation using the proteolysis of the prolamins produced by *Prunus dulcis* var. *Amara*[J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(6): 201–210, 192.]

[20] 李露, 张普香, 韩朋岑, 等. 酶法水解牦牛皮蛋白制备抗氧化肽工艺的优化[J]. 食品工业科技, 2021, 42(24): 188–196. [LI Lu, ZHANG Puxiang, HAN Pengcen, et al. Process of the preparation of antioxidant peptides by enzymatic hydroly of yak hide protein[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(24): 188–196.]

[21] ZOU T B, HE T P, LI H B, et al. The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins[J]. *Molecules*, 2016, 21(1): 72.

[22] LIN S Y, GUO Y, LIU J B, et al. Optimized enzymatic hydrolysis and pulsed electric field treatment for production of antioxidant peptides from egg white protein[J]. *African Journal of Biotechnology*, 2011, 10(55): 11648.

[23] 章超. 酶法水解金枪鱼肉制备生物活性肽[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2016. [ZHANG C. Preparation of bioactive peptides from tuna muscle protein enzymolysis[J]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2016.]

[24] DELSHADIAN Z, MORTAZAVIAN A M, TABARZAD M, et al. Optimisation of experimental conditions for binding of divalent iron to bioactive casein phosphopeptides[J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2018, 53(3): 784–793.

[25] ZHANG X, DU L, JIN W. Screening and optimization of conditions for the adsorption of Cd²⁺ in serpentine by using response surface methodology[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2022, 15: 19(24): 16848.

[26] 张晖, 唐文婷, 王立, 等. 抗氧化肽的构效关系研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2013, 32(7): 673–679. [ZHANG Hui,

TANG Wenting, WANG Li, et al. Review on structure-activity relationship of antioxidative peptides[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2013, 32(7): 673–679.]

[27] QIAN Z J, JUNG W K, KIM S K. Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* Shaw[J]. *Bioresource technology*, 2008, 99(6): 1690–1698.

[28] SAIGA A I, TANABE S, NISHIMURA T. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51(12): 3661–3667.

[29] LASS A, SUESSENBACHER A, WÖLKART G, et al. Functional and analytical evidence for scavenging of oxygen radicals by L-arginine[J]. *Molecular Pharmacology*, 2002, 61(5): 1081–1088.

[30] CHEN H M, MURAMOTO K, YAMAUCHI F, et al. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998, 46(1): 49–53.

[31] PRAKOT P, CHAITANAWISUTI N, SANGTANOO P, et al. Inhibitory activities of protein hydrolysates from spotted Babylon snails on tyrosinase and melanogenesis[J]. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 2018, 27(7): 811–829.

[32] 秦晓辉. 美拉德反应制备珠蚌抗氧化肽及其性质研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2014. [QIN Xiaohui. Research on the preparation and antioxidant of peptide from mussel by Maillard reaction[D]. Nanchang: Nanchang University, 2014.]

[33] YU D, CUI S, CHEN L, et al. Marine-derived bioactive peptides self-assembled multifunctional materials: Antioxidant and wound healing[J]. *Antioxidants*, 2023, 12(6): 1190.

[34] OLIVEIRA D, BERNARDI D, DRUMMOND F, et al. Potential use of tuna (*Thunnus albacares*) by-product: production of antioxidant peptides and recovery of unsaturated fatty acids from tuna head[J]. *International Journal of Food Engineering*, 2017, 13(7): 20150365.

[35] 朱洪珍. 海地瓜胶原蛋白多肽的提取及其在化妆品中的应用[D]. 福州: 福建农林大学, 2011. [ZHU Hongzhen. Study on the extraction of collagen peptide from acaudina *Molpadioide* and the application in cosmetics[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2011.]

[36] 陈佳欣. 核桃粕酪氨酸酶抑制肽制备、结构鉴定及其活性研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2020. [CHENG Jiaxin. Preparation, identification and activities of tyrosinase inhibitory peptide from walnut residue[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2020.]

[37] 丁小梅, 卢晶晶, 孙乐常, 等. 轮型和球型高核钼簇对酪氨酸酶的抑制作用[J]. 分子科学学报, 2020, 36(4): 271–276. [DING Xiaomei, HU Jingjing, SUN Lechang, et al. Inhibition of tyrosinase by round and spherical high-nuclear molybdenum clusters[J]. *Journal of Molecular Science*, 2020, 36(4): 271–276.]

[38] 王安杏, 方向红, 张庆. 多金属氧酸盐抑制酪氨酸酶活性研究进展[J]. 保山学院学报, 2021, 40(5): 35–41. [WANG Anxing, FANG Xianghong, ZHANG Qing. Research progress on inhibition of tyrosinase activity by polyoxometalates[J]. *Journal of Baoshan University*, 2021, 40(5): 35–41.]

[39] 聂华丽, 李树白, 吕新宇, 等. 奥扎格雷对蘑菇酪氨酸酶的抑制动力学[J]. 光谱实验室, 2010, 27(5): 2106–2110. [NIE Huali, LI Shubai, LÜ Xinyu, et al. Inhibitory kinetics of ozagrel on mushroom[J]. *Tyrosinase Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory*, 2010, 27(5): 2106–2110.]