

基于促成骨活性的金枪鱼蒸煮液蛋白酶酶解工艺优化

吴羽茜, 王 瑛, 林晓姿, 陈秉彦, 何志刚

Optimization of Protease Digestion Process of Tuna Cooking Liquid Based on Bone-enhancing Activity

WU Yuxi, WANG Ying, LIN Xiaozhi, CHEN Bingyan, and HE Zhigang

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024060372>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

金枪鱼蒸煮液中蛋白质的提取工艺优化及性质分析

Optimization of Protein Extraction from Tuna Cooking Liquid and Its Property Analysis

食品工业科技. 2021, 42(23): 228-234 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021040151>

响应面法优化金枪鱼蒸煮液发酵制备海鲜调味基料工艺

Optimization of Preparation of Seafood Flavor Condiment Base from Tuna Cooking Liquor by Fermentation

食品工业科技. 2021, 42(21): 166-172 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021010165>

复合酶制备鱼蒸煮液水解肽及其抗氧化活性研究

Preparation of Hydrolyzed Peptides from Anchovy Cooking Liquid by Complex Enzyme and Its Antioxidant Activity

食品工业科技. 2020, 41(9): 131-136,143 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.09.021>

超声波辅助黄鳍金枪鱼免疫活性肽酶解工艺优化

Optimization of Ultrasound-Assisted Enzymatic Hydrolysis of Immune Peptides from *Thunnus albacores*

食品工业科技. 2024, 45(2): 168-174 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023030011>

中华鳖酶解产物的理化性质及促成骨细胞增殖活性分析

Analysis of the Physicochemical Properties and Osteocyte Proliferative Activity of the Enzymatic Hydrolysis Products of Chinese Soft-shelled Turtle

食品工业科技. 2022, 43(15): 81-88 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021100235>

金枪鱼蒸煮汁的抗氧化性、脱腥处理及其风味沙拉酱的研制

Antioxidant and Deodorizing Treatment of Tuna Steamed Juice and Development of Its Flavor Salad

食品工业科技. 2020, 41(4): 153-160 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.04.026>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

吴羽茜,王瑛,林晓姿,等. 基于促成骨活性的金枪鱼蒸煮液蛋白酶酶解工艺优化 [J]. 食品工业科技, 2025, 46(11): 224–231. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024060372

WU Yuxi, WANG Ying, LIN Xiaozhi, et al. Optimization of Protease Digestion Process of Tuna Cooking Liquid Based on Bone-enhancing Activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(11): 224–231. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024060372

· 工艺技术 ·

基于促成骨活性的金枪鱼蒸煮液蛋白酶酶解工艺优化

吴羽茜^{1,2}, 王 瑛^{1,2}, 林晓姿^{1,2}, 陈秉彦^{1,2,*}, 何志刚^{1,2,*}

(1.福建省农业科学院农产品加工研究所, 福建福州 350003;

2.福建省农产品(食品)加工重点实验室, 福建福州 350003)

摘 要: 为了明确金枪鱼蒸煮液蛋白酶解物的理化特征, 并探究其促成骨细胞增殖的活性, 采用 6 种蛋白酶水解金枪鱼蒸煮液蛋白, 研究不同蛋白酶对蒸煮液蛋白酶解率、分子量及氨基酸组成的影响, 评价不同酶解物的促成骨细胞增殖活性并优化酶解工艺。结果表明, 胰蛋白酶表现出较高的金枪鱼蒸煮液蛋白酶解率 (53.51%)。酶解物的小分子肽占比达 85.85%, 且富含甘氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸等促成骨细胞增殖活性特征氨基酸。胰蛋白酶酶解物的促成骨细胞增殖活性最佳, 剂量-效应关系符合 $y=0.4139x^3-20.558x^2+49.581x+99.203$ ($R^2=0.9597$)。经正交试验优化获得胰蛋白酶最佳酶解工艺为: 酶解时间 3.5 h、酶解温度 50 ℃、酶比活 10000 U/g、pH8.0。金枪鱼蒸煮液蛋白在最优工艺下酶解物 (1 mg/mL 蛋白浓度) 促成骨细胞增殖率达 136.71%。因此, 胰蛋白酶在生产金枪鱼成骨细胞增殖活性肽方面具有潜力。

关键词: 金枪鱼蒸煮液, 促成骨细胞增殖肽, 水解物, 工艺优化

中图分类号: TS254.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2025)11-0224-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2024060372



本文网刊:

Optimization of Protease Digestion Process of Tuna Cooking Liquid Based on Bone-enhancing Activity

WU Yuxi^{1,2}, WANG Ying^{1,2}, LIN Xiaozhi^{1,2}, CHEN Bingyan^{1,2,*}, HE Zhigang^{1,2,*}

(1. Agricultural Product Processing Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China;

2. Key Laboratory of Agricultural Products (Food) Processing, Fuzhou 350003, China)

Abstract: In order to clarify the physicochemical characteristics of the proteolytic digest of tuna cooking liquid and to investigate its osteoblast-promoting activity, the proteins in the tuna cooking liquid were separately hydrolysed by six proteases. The effects of different proteases on the proteolysis, molecular weight and amino acid composition of cooking liquids were investigated. The osteoblast-proliferative activities of different proteolyte was evaluated and the enzymatic process was optimized. Trypsin showed a high proteolysis (53.51%) of tuna cooking liquid protein. The proportion of small molecule peptides in the hydrolysate was 85.85% and was rich in glycine, tyrosine, phenylalanine that promoted osteoblast proliferation. Trypsin hydrolysate had the best osteoblast-proliferative activity, the dose-response relationship was consistent with $y=0.4139x^3-20.558x^2+49.581x+99.203$ ($R^2=0.9597$). The optimal enzymatic process of trypsin was 3.5 h, 50 ℃, 10000 U/g specific activity of enzyme and pH8.0. Under the optimal process, the osteoblast proliferation rate of the tuna cooking liquid protein hydrolysate was 136.71%. Thus, trypsin has the potential to produce active peptides for osteoblast proliferation in tuna.

收稿日期: 2024-06-27

基金项目: 福建省农科院优秀科技创新人才专项 (YCZX202410); 福建省属公益类科研院所基本科研专项 (2022R1032004)。

作者简介: 吴羽茜 (1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品生物工程, E-mail: 1053056076@qq.com。

* 通信作者: 陈秉彦 (1988-), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向: 食品加工、纤维素改性及益生菌肠道递送, E-mail: cbyfst@163.com。

何志刚 (1964-), 男, 本科, 研究员, 研究方向: 农产品贮藏与加工、食品发酵, E-mail: njgzx@163.com。

Key words: tuna cooking liquid; osteoblast proliferation peptides; hydrolysate; process optimization

金枪鱼(Tuna)是硬骨鱼纲鲈形目鲭科大洋暖水性洄游鱼类。金枪鱼作为一种深海鱼类,富含蛋白质,主要被加工成鱼柳罐头、鱼糜等制品^[1]。金枪鱼蒸煮液(Tuna cooking liquid)是金枪鱼在加工成鱼柳罐头过程中形成的主要副产物之一^[2],富含易吸收的氨基酸及可溶性蛋白等营养物质。然而,金枪鱼蒸煮液没有得到良好的开发利用,多经简单处理而排放,不仅造成蛋白质资源浪费,同时容易引起水体富营养化^[3-4]。因此,金枪鱼蒸煮液的高值化开发利用不仅能够削减该产业的高氮油脂废水排放,还能延长其产业链,提高金枪鱼生产加工的附加值。

海洋中存在一类被称为生物活性肽(Biological active peptide, BAP)的肽类物质,广泛分布于生物体或植物体内,可通过蛋白酶酶解方法制备得到。海洋中的 BAP 能够防止胰岛细胞凋亡,维持血糖水平的稳定,甚至能够增强骨骼强度,预防骨质疏松^[5]。生物活性肽因其潜在的预防骨质疏松症效果,日益受到研究者的关注。在骨质疏松症方面的临床研究和动物试验中,生物活性肽已经被证实能够发挥成骨细胞增殖、分化和矿化作用,且研究发现由于其独特的理化性质,如小尺寸和氨基酸特定序列是其引起生物学作用的关键要素^[6]。因此,生物活性肽在未来可作为一种重要的营养强化剂,被广泛应用于骨质疏松症的预防和治疗^[7]。

国内外关于促骨增殖肽的研究主要聚焦于从鱼骨或相关副产物中提取的胶原蛋白肽。目前,鲜见金枪鱼蒸煮液关于促骨增殖的相关报道。王珊珊^[8]的研究已证实,鳕鱼骨胶原肽与活性钙的结合应用能够显著提高骨质疏松大鼠的股骨钙含量,并改善骨小梁的数量与骨密度。杨溢等^[9]选用去卵巢大鼠为模型,深入探讨天门冬氨酸钙及鱼骨胶原低聚肽单独或联合使用对骨密度的影响,二者对骨密度均具有显著提升作用,且两者联合使用的效果更为显著。此外,舒聪涵^[10]的研究发现金枪鱼骨胶原肽及其钙螯合物在促进成骨细胞增殖、分化及矿化能力方面展现出了显著的效果。这些研究为金枪鱼源促骨增殖肽的开发与应用提供了有力的科学依据。本文采用酶法制备金枪鱼蒸煮液蛋白肽,筛选最适蛋白酶并对其酶解工艺进行优化,以期促成骨细胞增殖活性肽的靶向筛选和工业化制备提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

大目金枪鱼,大目鲷(*Thunnus obesus*)蒸煮液 福建博科食品有限公司提供,经过碟式离心机和管式离心机脱油处理。金枪鱼蒸煮液经植物乳杆菌 RP26 和费比恩塞伯林德纳氏酵母 JGM9-1 进行生物脱腥^[11],其中接种量为乳酸菌 5×10⁷ CFU/mL,酵母菌 1×10⁷ CFU/mL,发酵时间为 72 h,处理后-20℃保存。

经测定,金枪鱼蒸煮液中总蛋白质含量为 4.56 g/100 g、酸溶性蛋白含量为 3.49 g/100 g、羟脯氨酸含量为 0.15 g/100 g 并占蛋白的 3.29%、灰分含量为 4.50 g/100 g、脂肪含量为 0.50 g/100 g;羟脯氨酸(Hyp)含量检测试剂盒、黄嘌呤(纯度≥98.00%)、别嘌呤(纯度>98.00%) 北京索莱宝生物科技有限公司;MEMα 培养基、胎牛血清、青霉素链霉素溶液(双抗)、二甲基亚砷(DMSO)、0.25% 胰酶、磷酸盐缓冲溶液 PBS(pH7.4) 厦门泰京生物技术有限公司;MC3T3-E1Subclone14(小鼠颅顶前骨细胞亚克隆 14)细胞 武汉普诺赛生命科技有限公司;氨基酸标准品 北京万家标准物质研发中心;尿酸通 海必优国际生物公司;动物水解蛋白酶(60823±133 U/g) 南宁东恒华道生物科技有限责任公司;复配酶 F106(24963±188 U/g) 安琪公司;菠萝蛋白酶(37956±225 U/g)、木瓜蛋白酶(31022±258 U/g)、碱性蛋白酶(75999±293 U/g)、胰蛋白酶(62866±165 U/g) 江苏锐阳生物科技有限公司,6 种蛋白酶的酶活参照行业标准 SB/T 10317-1999^[12]统一标定。

K9840 型半自动凯氏定氮仪 海能未来技术集团股份有限公司;T&J EnzyR 型生物酶解反应系统 迪必尔生物有限公司;Epoch2 型全波长酶标仪 美国伯腾仪器有限公司;S-433D 型全自动氨基酸分析仪 德国赛卡姆公司;e2695 型高效液相色谱仪 美国沃特世仪器有限公司;Ts2 型荧光倒置显微镜 尼康映像仪器销售(中国)有限公司;二氧化碳培养箱 美国赛默飞世尔科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 金枪鱼蒸煮液蛋白酶酶解 为了确定后期进行工艺优化的蛋白酶种类,分别取解冻的金枪鱼蒸煮液 100 g,按酶比活 10000 U/g(酶活/金枪鱼蒸煮液总蛋白)的比例加入酶液,在各蛋白酶最适酶解参数下进行酶解,见表 1。以 0.1 mol/L NaOH 溶液自动滴定控制 pH,酶解时间 4 h(根据预实验该时间可获得较高酶解率)。酶解结束后,酶解液 95℃水浴加热 10 min 灭酶,8000 r/min、15℃、离心 10 min,上清液储存于-20℃,备用。

表 1 不同蛋白酶的最适酶解参数

Table 1 Optimal enzymatic hydrolysis parameters for different proteases

蛋白酶	pH	酶解温度(℃)	酶解时间(h)
动物水解蛋白酶	7	55	4
复配酶(F106)	7	50	4
菠萝蛋白酶	6.5	45	4
木瓜蛋白酶	7	50	4
碱性蛋白酶	9	50	4
胰蛋白酶	8	50	4

1.2.2 理化指标测定

1.2.2.1 蛋白质、酸溶性蛋白及酶解率测定 蛋白质参照 GB/T 5009.5-2016^[13]《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》进行测定。酸溶性蛋白参照 GB/T 22729-2008^[14]《海洋鱼低聚肽粉》测定。酶解率计算公式如下:

$$D(\%) = \frac{X_1 - X_0}{X_2 - X_0} \times 100$$

式中: D 表示酶解率, %; X_1 表示酶解后酸溶性蛋白(g/100 g); X_2 表示酶解前的总蛋白质(g/100 g); X_0 表示酶解前酸溶性蛋白(g/100 g)。

1.2.2.2 游离氨基酸组成分析 参考贾鹏禹等^[15]的方法测定游离氨基酸, 色谱柱: Sepax AAA(250 mm×4.6 mm ID), 梯度洗脱: 流动相 A: 0.1 mol/L 醋酸盐缓冲溶液(pH6.5), 流动相 B: 乙腈, 在 35 min 内, 流动相 B 由 5% 线性增加至 40%, 并保持 10 min, 流动相流速: 0.5 mL/min, 柱箱温度: 35 °C, 检测波长 254 nm, 进样体积 1 μL。

1.2.2.3 蛋白质分子质量测定 采用高效液相色谱法, 参照 GB 31645-2018^[16]《食品安全国家标准 胶原蛋白肽法》测定蛋白质的分子质量分布, 采用国标要求的相对分子质量校正曲线标准品。

1.2.3 促成骨细胞增殖活性评价 参考舒聪涵^[10]的方法, 以 MC3T3-E1 Subclone 14 为模型细胞进行促成骨细胞增殖活性实验。细胞经 MEM α 完全培养基孵育至细胞生长密度达 80%~90% 后采用 0.25% 胰酶消化传代, 细胞贴壁生长。将不同浓度(以加入蒸煮液的体积在反应体系中的浓度计算)金枪鱼蒸煮液经过 0.22 μm 滤膜过滤后与细胞培养基共混培养细胞 48 h 后, 采用噻唑蓝法(MTT 法), 在酶标仪 490 nm 处测定各样品的吸光值, 细胞增殖率计算公式如下:

$$Cpr(\%) = \frac{OD_{\text{实验组}}}{OD_{\text{对照组}}} \times 100$$

式中: Cpr 表示细胞增殖率, %; $OD_{\text{实验组}}$ 和 $OD_{\text{对照组}}$ 分别表示实验组和对照组的吸光度。

1.2.4 酶解工艺优化

1.2.4.1 单因素实验 以筛选的胰蛋白酶为酶制剂, 以酶解率及促成骨细胞增殖率为指标, 进行以温度、时间、酶比活和体系 pH 为单因素的酶解实验。酶解时间选取 2、3、4、5、6 h, 固定酶比活 10000 U/g、pH8.0 和温度 50 °C; 酶解温度选择 40、45、50、55、60 °C, 固定时间 4 h、酶比活 10000 U/g 和 pH8.0; 酶比活选择 8000、9000、10000、11000、12000 U/g, 固定时间 4 h、pH8.0 和温度 50 °C; pH 选择 7.0、7.5、8.0、8.5、9.0, 固定时间 4 h、酶比活 10000 U/g 和温度 50 °C。酶解液经过 95 °C 水浴灭酶 10 min 后终止反应, 离心(8000 r/min, 15 °C, 10 min), 上清液调节 pH7.0±0.1, 测定酶解物(蛋白浓度 1 mg/mL)的促

成骨细胞增殖率及酶解率。

1.2.4.2 正交试验 根据单因素实验的结果, 考察上述 4 个因素对促成骨细胞增殖率和酶解率的影响, 各取 3 水平进行正交试验, 试验因素水平见表 2。

表 2 金枪鱼蒸煮液蛋白酶解工艺的 $L_9(3^4)$ 正交设计表
Table 2 $L_9(3^4)$ Orthogonal design table of tuna cooking liquid protein enzymolysis process

水平	因素			
	酶解时间(h)	酶解温度(°C)	酶比活(U/g)	pH
1	3.5	47	9500	7.7
2	4.0	50	10000	8.0
3	4.5	53	10500	8.3

1.3 数据处理

实验数据平行测定 3 次, 以平均值±标准差表示, 采用 Origin 软件(OriginLab 8.5)作图, 采用 DPS7.5 软件 Duncan 检验进行均值之间的显著性分析, 其中 $P<0.05$ 表示差异显著, $P<0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 金枪鱼蒸煮液蛋白酶筛选

金枪鱼蒸煮液分别经动物水解蛋白酶、复配酶(F106)、菠萝蛋白酶、木瓜蛋白酶、碱性蛋白酶及胰蛋白酶水解后, 多肽及游离氨基酸含量均显著提高且处理间存在显著差异($P<0.05$), 见表 3。木瓜蛋白酶处理组的酶解率最高, 为 59.85%。多肽含量与未处理相比提高了 18.10%; 动物水解蛋白酶和胰蛋白酶处理组效果次之, 酶解率分别达到了 54.12% 与 53.51%, 多肽含量与未处理相比分别提高了 15.56% 和 14.29%, 且二者间差异不显著; 碱性蛋白酶处理组的酶解率最低, 仅为 24.73%。复配酶 F106 处理组的游离氨基酸含量最高, 达 496.81 mg/100 g, 与未处理相比提高了 55.77%, 碱性蛋白酶处理组最低, 为 397.40 mg/100 g, 与未处理组相比仅提高 24.60%。

表 3 金枪鱼蒸煮液酶解液理化指标及酶解率
Table 3 Physicochemical indexes and enzymatic hydrolysis rate of enzymatic hydrolysate of tuna cooking liquid

蛋白酶处理组	酶解后酸溶性蛋白(g/100 g)	游离氨基酸含量(mg/100 g)	多肽含量(g/100 g)	酶解率(%)
金枪鱼蒸煮液	/	318.93±25.01 ^{Bb}	3.15±0.01 ^{Ec}	/
木瓜蛋白酶	4.13±0.02 ^{Aa}	414.31±24.73 ^{ABab}	3.72±0.03 ^{Aa}	59.85±1.71 ^{Aa}
动物水解蛋白酶	4.10±0.02 ^{Aab}	463.36±31.03 ^{ABa}	3.64±0.03 ^{ABb}	54.12±1.43 ^{ABb}
胰蛋白酶	4.06±0.04 ^{ABab}	465.79±30.65 ^{ABa}	3.60±0.02 ^{BCbc}	53.51±1.50 ^{ABb}
复配酶(F106)	4.04±0.01 ^{ABb}	496.81±34.45 ^{Aa}	3.54±0.02 ^{Cc}	52.01±0.69 ^{Bb}
菠萝蛋白酶	3.94±0.00 ^{Bc}	400.54±27.91 ^{ABab}	3.54±0.02 ^{Cc}	42.50±0.36 ^{Cc}
碱性蛋白酶	3.75±0.03 ^{Cd}	397.40±30.21 ^{ABab}	3.35±0.01 ^{Dd}	24.73±1.38 ^{Dd}

注: 以每列结果进行显著性分析, 大写字母表示差异极显著($P<0.01$), 小写字母表示差异显著($P<0.05$); 多肽含量=酶解后酸溶性蛋白-游离氨基酸含量。

研究结果表明木瓜蛋白酶、动物水解蛋白酶以及胰蛋白酶对金枪鱼蒸煮液蛋白具有较高的酶解效

率,且各处理组酶解物多肽及游离氨基酸含量差异较大。多肽的功能活性与其组成的特征氨基酸密切相关^[17],不同酶解产物的游离氨基酸组成见表 4。结果显示,各处理组的游离氨基酸含量均增加,复配酶(F106)处理组的游离氨基酸含量与未处理组相比差异达极显著水平($P<0.01$)。有报道表明促成骨细胞增殖活性的特征氨基酸通常含有甘氨酸、酪氨酸、羟脯氨酸和苯丙氨酸^[18-19]。各酶解物的促成骨细胞增殖活性功能游离氨基酸的总量由低到高的顺序为:动物水解蛋白酶处理组<胰蛋白酶处理组<菠萝蛋白酶处理组<木瓜蛋白酶处理组<复配酶(F106)处理组<碱性蛋白酶处理组。由于不同蛋白酶的酶切位点差异,蒸煮液蛋白经酶解后生成多肽及游离氨基酸含量也存在差异,酶解产物中游离氨基酸含量越低,N 端特征氨基酸构成的活性肽被酶解的越少,其潜在的功能活性相对较强。

2.2 不同蛋白酶酶解产物的分子质量分布

金枪鱼蒸煮液蛋白酶解产物的分子量分布如图 1 所示。金枪鱼蒸煮液蛋白主要以小分子肽为主,分子量组分<500 Da 的占比达到了 70.58%,这与蒸煮液富含酸溶性蛋白的结果一致。金枪鱼蒸煮液经蛋白酶酶解后,5k~1k Da 分子量组分占比出现了明显下降,<500 Da 分子量组分占比明显提高。分子量<500 Da 的组分占比由高到低的排序为:胰蛋白酶、动物水解蛋白酶、碱性蛋白酶、复配酶(F106)、木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶,占比分别为 85.85%、84.00%、82.76%、81.53%、80.70%、76.94%。蛋白

酶在把大分子蛋白分解为肽及氨基酸的同时,也将金枪鱼蒸煮液的多肽降解为小分子短肽或氨基酸,不同蛋白酶酶解处理间存在差异。

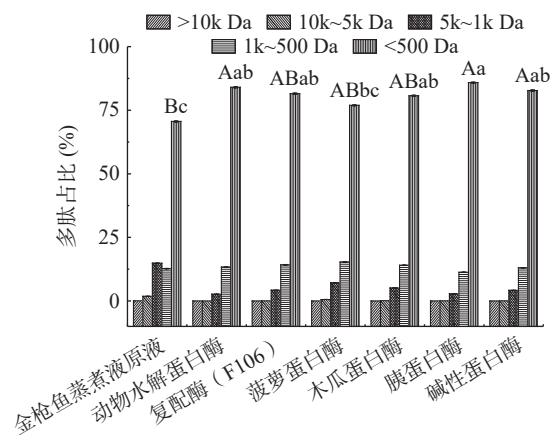


图 1 各酶解产物蛋白不同分子量占比
Fig.1 Different molecular weight proportions of each enzyme hydrolysis product protein
注:各酶解处理<500 Da 作显著性差异分析,大写字母表示差异极显著($P<0.01$),小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

2.3 不同蛋白酶酶解产物的促成骨细胞增殖活性评价

金枪鱼蒸煮液蛋白酶解产物的促成骨细胞增殖率随着酸溶性蛋白浓度增加呈先升高后降低的趋势,如图 2 所示,这与舒涵聪^[10]对金枪鱼骨胶原蛋白肽的成骨细胞增殖活性的研究结果一致。金枪鱼蒸煮液、动物水解蛋白酶、复配酶(F106)、菠萝蛋白酶、木瓜蛋白酶、碱性蛋白酶及胰蛋白酶处理的最高

表 4 金枪鱼蒸煮液不同蛋白酶解产物的游离氨基酸组成(mg/100 g)

Table 4 Composition of free amino acids in different hydrolysates of tuna cooking liquid (mg/100 g)

游离氨基酸	金枪鱼蒸煮液	木瓜蛋白酶	动物水解蛋白酶	胰蛋白酶	复配酶(F106)	菠萝蛋白酶	碱性蛋白酶
Asp天冬氨酸	3.12±0.36 ^{Ac}	4.64±0.64 ^{Aabc}	5.33±0.47 ^{Aa}	4.32±0.54 ^{Aabc}	4.36±0.51 ^{Aabc}	5.13±0.63 ^{Aab}	3.43±0.42 ^{Abc}
Thr苏氨酸	2.54±0.28 ^{Cd}	4.86±0.55 ^{BCbc}	5.29±0.39 ^{BCbc}	6.73±0.56 ^{Bb}	16.94±0.87 ^{Aa}	4.21±0.44 ^{BCcd}	2.79±0.71 ^{Cd}
Ser丝氨酸	0.41±0.09 ^{Dd}	2.77±0.79 ^{BCDbc}	3.86±0.22 ^{BCb}	4.27±0.35 ^{Bb}	7.91±1.10 ^{Aa}	1.76±0.12 ^{BCDcd}	1.28±0.11 ^{BCDcd}
Glu谷氨酸	8.32±0.54 ^{Bc}	12.00±1.18 ^{ABb}	15.19±0.99 ^{Aa}	11.82±0.74 ^{ABb}	11.73±1.23 ^{ABb}	9.38±0.54 ^{Bbc}	9.55±0.53 ^{Bbc}
Gly甘氨酸	11.3±0.96 ^{Bd}	21.97±2.48 ^{Aab}	12.30±0.96 ^{Bd}	13.10±0.64 ^{Bcd}	17.37±1.42 ^{ABbc}	22.24±1.48 ^{Aa}	17.60±0.64 ^{ABabc}
Ala丙氨酸	59.47±2.81 ^{Ac}	72.53±2.17 ^{Aab}	69.09±2.45 ^{Aab}	68.17±2.76 ^{Aabc}	72.75±2.63 ^{Aa}	63.53±2.24 ^{Abc}	69.65±2.43 ^{Aab}
Cys胱氨酸	2.09±0.17 ^{Aa}	2.56±0.39 ^{Aa}	2.62±0.54 ^{Aa}	2.53±0.45 ^{Aa}	2.52±0.46 ^{Aa}	2.60±0.31 ^{Aa}	2.69±0.64 ^{Aa}
Val缬氨酸	21.77±2.45 ^{Bb}	23.39±2.12 ^{Bb}	26.59±2.38 ^{Bb}	26.67±1.89 ^{Bb}	44.83±2.88 ^{Aa}	24.91±1.67 ^{Bb}	25.50±1.43 ^{Bb}
Met蛋氨酸	2.55±0.09 ^{Bc}	5.02±0.69 ^{Bb}	5.32±0.73 ^{Bb}	5.68±0.70 ^{Bb}	9.10±0.83 ^{Aa}	4.60±0.66 ^{Bbc}	5.14±0.73 ^{Bb}
Ile异亮氨酸	12.29±1.35 ^{Bb}	12.34±1.53 ^{Bb}	14.32±0.95 ^{Bb}	15.05±0.73 ^{Bb}	25.37±0.90 ^{Aa}	12.89±0.75 ^{Bb}	14.32±0.77 ^{Bb}
Leu亮氨酸	32.28±2.21 ^{Bc}	37.84±2.78 ^{ABbc}	43.87±2.79 ^{ABbc}	39.19±2.66 ^{ABbc}	48.97±2.92 ^{Aa}	36.88±2.16 ^{ABbc}	34.49±2.36 ^{Bc}
Tyr酪氨酸	5.70±0.78 ^{Bb}	5.93±0.88 ^{Bb}	8.91±1.01 ^{ABab}	8.49±1.11 ^{ABab}	6.80±0.76 ^{ABb}	5.82±0.73 ^{Bb}	11.26±1.21 ^{Aa}
Phe苯丙氨酸	7.60±0.86 ^{Bd}	9.89±1.11 ^{ABbcd}	12.67±1.18 ^{ABbcd}	13.88±1.21 ^{Aab}	14.08±1.25 ^{Aa}	9.62±1.16 ^{ABcd}	13.42±1.17 ^{ABbcd}
Lys赖氨酸	27.42±1.88 ^{Cc}	31.4±1.94 ^{Ccd}	44.17±1.99 ^{ABa}	45.54±1.98 ^{Aa}	36.20±1.54 ^{BCb}	29.06±1.36 ^{Cc}	28.77±1.18 ^{Cc}
His组氨酸	60.39±3.96 ^{Bb}	90.25±3.71 ^{Aa}	88.04±2.81 ^{Aa}	90.72±3.44 ^{Aa}	91.26±3.63 ^{Aa}	90.61±3.24 ^{Aa}	90.82±3.33 ^{Aa}
Arg精氨酸	11.55±1.62 ^{Bc}	16.67±1.13 ^{Bbc}	36.77±2.13 ^{Aa}	36.86±2.14 ^{Aa}	20.07±1.62 ^{Bb}	16.88±1.21 ^{Bbc}	12.01±1.01 ^{Bc}
Pro脯氨酸	20.44±2.83 ^{Aa}	23.45±2.11 ^{Aa}	22.75±2.01 ^{Aa}	23.34±2.24 ^{Aa}	23.38±2.41 ^{Aa}	24.55±2.10 ^{Aa}	23.25±2.12 ^{Aa}
GABA γ-氨基丁酸	1.86±0.42 ^{Ab}	2.99±0.24 ^{Aab}	2.48±0.21 ^{Aab}	2.53±0.31 ^{Aab}	2.45±0.27 ^{Aab}	3.51±0.27 ^{Aa}	2.58±0.49 ^{Aab}
Asn天冬酰胺	1.04±0.09 ^{Cd}	3.93±0.25 ^{Bbc}	4.84±0.23 ^{Bb}	4.59±0.13 ^{Bb}	6.41±0.46 ^{Aa}	3.50±0.33 ^{Bc}	1.56±0.32 ^{Cd}
Gln谷氨酰胺	26.79±2.42 ^{Bb}	29.88±2.23 ^{ABb}	38.95±2.53 ^{ABb}	42.31±2.58 ^{Aa}	34.31±2.56 ^{ABab}	28.86±2.13 ^{Bb}	27.29±2.41 ^{Bb}
促成骨细胞增殖活性游离氨基酸	24.60±2.6 ^{Ab}	37.79±4.47 ^{Aa}	33.88±3.15 ^{Aab}	35.47±2.96 ^{Aab}	38.25±3.43 ^{Aa}	37.68±3.37 ^{Aa}	42.28±3.02 ^{Aa}

注:以每行结果进行显著性分析,大写字母表示差异极显著($P<0.01$),小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

促成骨细胞增殖率分别为 129.53%、142.37%、128.19%、129.75%、131.4%、119.21%、132.68%，对应的酸溶性蛋白浓度分别为 2.09、2.05、1.21、1.97、1.24、1.88、1.05 mg/mL。动物水解蛋白酶、胰蛋白酶及木瓜蛋白酶组的促成骨细胞增殖率较高，且这三种处理组的成骨特征氨基酸含量与其他处理相比较低，这与其酶解后仍保持有较高的特征氨基酸活性肽的结果是一致的。

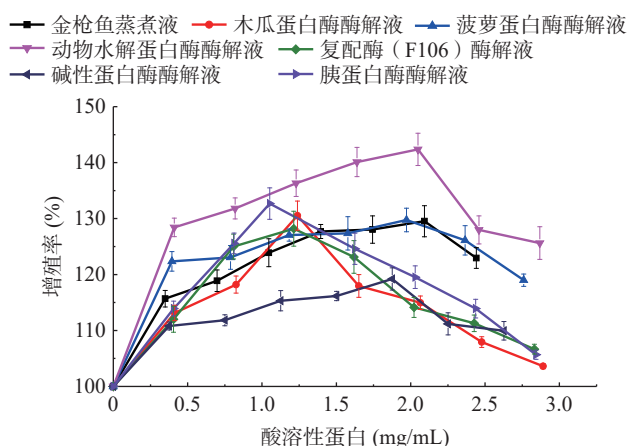


图2 金枪鱼蒸煮液不同蛋白酶处理对促成骨细胞增殖活性的影响

Fig.2 Effects of different protease treatments on the proliferation activity of osteoblasts in tuna cooking liquid

在酸溶性蛋白浓度 ≤ 2.0 mg/mL 时,促成骨细胞增殖率(y)与酸溶性蛋白浓度(x)的剂量-效应关系分别符合多元线性关系拟合方程:

$$y = 15.071x^3 - 60.056x^2 + 80.345x + 101.08 (R^2 = 0.9756)$$

$$y = 0.4139x^3 - 20.558x^2 + 49.581x + 99.203 (R^2 = 0.9597)$$

$$y = -1.0957x^3 - 12.445x^2 + 37.17x + 99.769 (R^2 = 0.8664)$$

动物水解蛋白酶和胰蛋白酶处理在酸溶性蛋白浓度为 1 mg/mL 时的细胞增殖率相当,且二者的酶解率无显著性差异。胰蛋白酶是肠道消化的关键酶,为降低蛋白水解物在肠道中经历二次酶解而损失促成骨细胞增殖活性,综合考虑,通过剂量-效应关系在 1 mg/mL 时动物水解蛋白酶和胰蛋白酶处理组的促成骨细胞增殖率无显著差异,胰蛋白酶酶解物具有更好的肠道消化耐受性优势,因此后续选择胰蛋白酶进行酶解工艺优化。

2.4 酶解工艺优化

2.4.1 单因素实验 酶解时间对金枪鱼蒸煮液蛋白促成骨细胞增殖率和酶解率的影响见图 3(a)。酶解物的促成骨细胞增殖率和酶解率随着酶解时间的增加而升高后略有下降,最大峰值(124.53% 和 53.51%)出现在 4 h。因此,选取最适酶解时间为 4 h。酶解温度对金枪鱼蒸煮液蛋白促成骨细胞增殖率和酶解率的影响见图 3(b)。酶解物的促成骨细胞增殖活性和酶解率随着温度(40~60 °C)升高呈先上升后下

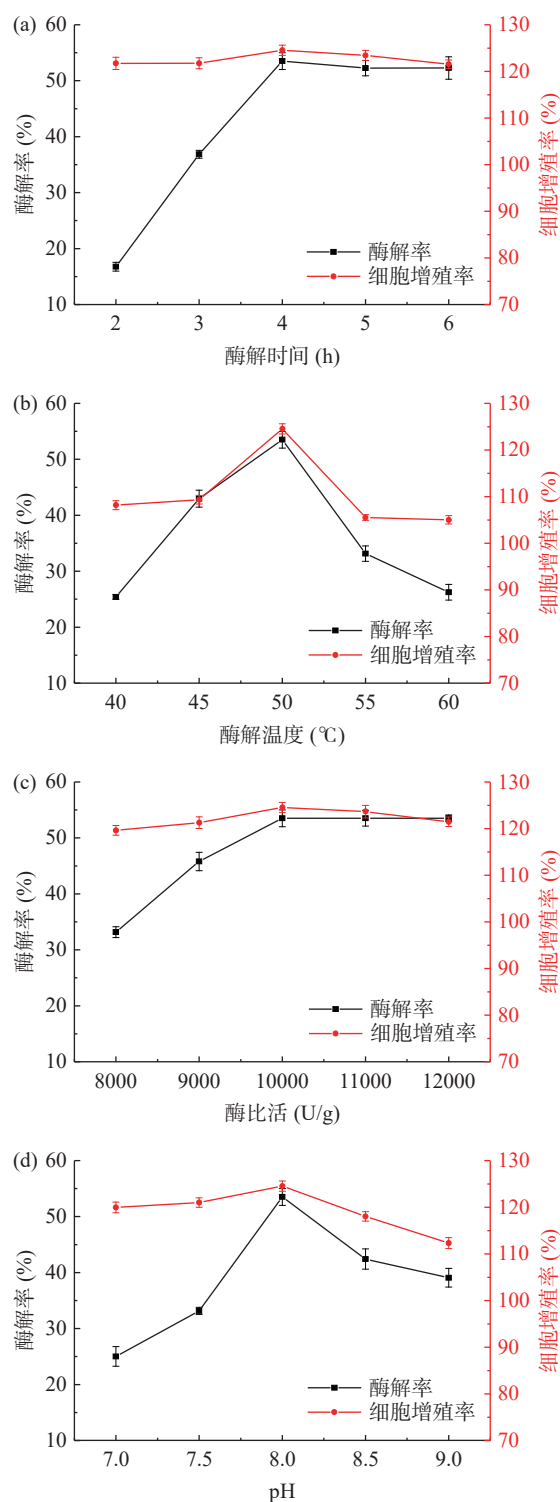


图3 不同酶解条件对促成骨细胞增殖活性和酶解率的影响

Fig.3 Effect of different enzymatic hydrolysis conditions on promoting osteocyte proliferation activity and enzymatic hydrolysis rate

降的趋势,均在 50 °C 时达到峰值(124.53% 和 53.51%),选取 50 °C 为最适酶解温度。酶比活对金枪鱼蒸煮液蛋白促成骨细胞增殖率和酶解率的影响见图 3(c),研究发现酶比活为 10000 U/g 时酶解物的促成骨细胞增殖率达到峰值(124.53%)。进一步增加酶量,蛋白酶解率变化不明显,而酶解物增殖率呈下降趋势,选取酶比活为 10000 U/g。pH 对金枪

鱼蒸煮液蛋白促成骨细胞增殖率和酶解率的影响见图 3(d)。酶解物促成骨细胞增殖率和酶解率随着 pH 增加呈先上升后下降的趋势,两者在 pH8.0 时达到峰值(124.53% 和 53.51%),选取 8.0 为最适 pH。叶孟亮^[3]和舒聪涵^[10]在研究酶解工艺优化时酶解温度及 pH 同样对酶解产物的酶解率影响较大,与本文的研究结果一致。上述结果可知,酶解温度及 pH 对酶解产物的促成骨细胞增殖率和酶解率的影响较大,有必要进一步通过正交试验对酶解工艺进行优化。

2.4.2 正交试验 以酶解率为指标的正交试验结果见表 5。影响金枪鱼蒸煮液蛋白酶解率在设计的工艺参数范围内的主次因素为 B>A>D>C,即酶解温度>酶解时间>pH>酶比活。由 K 值比较可以得出,最优的水平为 A₂B₂C₃D₂。酶解时间、酶解温度和 pH 对酶解率的影响为显著($P<0.05$),酶比活对酶解率的影响不显著,见表 6。最优工艺为:酶解时间 4 h,酶解温度 50 ℃,酶比活 10500 U/g, pH8.0。按正交试验结果得到的最优组合 A₂B₂C₃D₂ 进行验证实验,其酶解率可达到 55.02%±1.30%,促成骨细胞增殖率可达 133.54%±2.93%。

表 5 酶解率的 L₉(3⁴)正交试验结果

Table 5 L₉(3⁴) Orthogonal test results of enzymatic hydrolysis rate

试验号	A 酶解时间	B 酶解温度	C 酶比活	D pH	酶解率(%)
1	1	1	1	1	45.71±1.01
2	1	2	2	2	52.36±0.25
3	1	3	3	3	49.23±1.62
4	2	1	2	3	49.79±0.84
5	2	2	3	1	53.12±1.36
6	2	3	1	2	53.01±1.46
7	3	1	3	2	50.6±1.59
8	3	2	1	3	49.62±0.14
9	3	3	2	1	49.15±1.63
K ₁	294.59	292.18	296.67	295.94	
K ₂	311.82	310.19	302.59	311.94	
K ₃	298.74	302.78	305.89	297.27	
k ₁	49.90	48.70	49.45	49.32	
k ₂	51.97	51.70	50.43	51.99	
k ₃	49.79	50.46	50.98	49.55	
R	2.87	3.00	1.54	2.67	
主次顺序	B>A>D>C				
最优水平	A ₂	B ₂	C ₃	D ₂	

表 6 酶解率的方差分析结果

Table 6 Results of variance analysis of enzymatic hydrolysis rate

变异来源	平方和	自由度	均方	F值	显著性
酶解时间	26.96	2	13.48	4.47	*
酶解温度	27.31	2	13.66	4.53	*
酶比活	7.27	2	3.64	1.21	
pH	26.28	2	13.14	4.36	*
误差	27.13	9	3.01		
总和	114.95				

注: *表示显著($P<0.05$), **表示极显著($P<0.01$), 表8同。

以促成骨细胞增殖率为指标的正交试验结果见表 7。影响金枪鱼蒸煮液蛋白促成骨细胞增殖活性工艺参数的主次因素为 A>D>C>B,即酶解时间>pH>酶比活>酶解温度。由 K 值比较可以得出,最优的水平为 A₁B₂C₂D₂。在试验设计参数范围内,酶解时间和 pH 对细胞增殖活性的影响为极显著($P<0.01$),酶比活对细胞增殖率的影响为显著($P<0.05$),酶解温度对细胞增殖率的影响为不显著,见表 8。最优工艺为:酶解时间 3.5 h,酶解温度 50 ℃,酶比活 10000 U/g, pH8.0。在此条件下成骨细胞增殖活性达 136.71%,酶解率为 52.36%。

表 7 细胞增殖率的 L₉(3⁴)正交试验结果

Table 7 L₉(3⁴) Orthogonal test results of cell proliferation rate

试验号	A 酶解时间	B 酶解温度	C 酶比活	D pH	细胞增殖率(%)
1	1	1	1	1	135.20±0.88
2	1	2	2	2	136.71±1.42
3	1	3	3	3	127.84±1.63
4	2	1	2	3	122.47±0.76
5	2	2	3	1	123.69±1.10
6	2	3	1	2	124.93±1.00
7	3	1	3	2	127.72±1.40
8	3	2	1	3	126.51±0.71
9	3	3	2	1	127.63±0.75
K ₁	799.49	770.78	773.27	773.03	
K ₂	742.17	773.80	773.62	778.72	
K ₃	763.71	760.79	758.48	753.62	
k ₁	133.25	128.46	128.88	128.84	
k ₂	123.70	128.97	128.94	129.79	
k ₃	127.29	126.80	126.41	125.60	
R	9.55	2.17	2.52	4.18	
主次顺序	A>D>C>B				
最优水平	A ₁	B ₂	C ₂	D ₂	

表 8 细胞增殖率的方差分析结果

Table 8 Results of variance analysis of cell proliferation rate

变异来源	平方和	自由度	均方	F值	显著性
酶解时间	279.43	2	139.72	55.60	**
酶解温度	15.45	2	7.73	3.10	
酶比活	24.89	2	12.45	4.99	*
pH	57.73	2	28.86	11.57	**
误差	22.46	9	2.50		
总和	399.96				

以促成骨细胞增殖率为目标的最优水平 A₁B₂C₂D₂ 的酶解率为 52.36%,与正交试验设计内最高酶解率(53.12%)比较无显著性差异,优先考虑促成骨细胞增殖率指标,其酶解最优水平为 A₁B₂C₂D₂。

3 讨论与结论

不同酶制剂作用于蛋白酶解时,因其作用位点的差异,导致酶解产物的羧基端和氨基端氨基酸种类及肽段结构各异^[20-21]。木瓜蛋白酶和菠萝蛋白酶均属含巯基的内切酶,木瓜蛋白酶能广泛水解蛋白质中的羧基末端,如精氨酸、赖氨酸等;而菠萝蛋白酶则特定作用于碱性(如精氨酸)或芳香族(如苯丙氨酸、

酪氨酸)氨基酸的羧基侧链,二者均能增强疏水性^[22-25]。动物水解蛋白酶主要由木瓜蛋白酶辅以其他蛋白酶构成。胰蛋白酶作为一种丝氨酸蛋白酶,主要源自如猪等哺乳动物的胰脏。因此,酶解产物的活性功能受蛋白原料及酶解策略的影响尤其显著。金枪鱼蒸煮液蛋白经酶解后,酶解率、疏水氨基酸组成及分子量分布均产生显著差异,这些变化影响着肽序列和酶解产物活性,这是改变酶解物促成骨细胞增殖活性的主要原因。本文研究发现金枪鱼蒸煮液的羧脯氨酸(Hyp)占总蛋白含量的3.29%,其中脯氨酸和羧脯氨酸等促成骨细胞特征氨基酸含量占比可达15.05%^[26], Ohara等^[27]研究表明,脯氨酸-羧脯氨酸二肽可显著刺激滑膜细胞产生透明质酸,改善骨骼健康。Guillermine等^[28]研究表明牛、猪、鱼骨胶原蛋白肽均可显著提高成骨细胞增殖数目和成骨细胞分化作用,减少破骨细胞的骨吸收。这与本文研究结果一致。

本文采用动物水解蛋白酶、复配酶(F106)、菠萝蛋白酶、木瓜蛋白酶、碱性蛋白酶及胰蛋白酶对金枪鱼蒸煮液蛋白进行水解,结果表明胰蛋白酶是金枪鱼蒸煮液蛋白酶解的最适酶,其酶解产物的促成骨细胞增殖活性最佳。胰蛋白酶最佳酶解工艺条件下1 mg/mL蛋白浓度的酶解产物促成骨细胞增殖率达136.71%,酶解率为52.36%。本研究仅初步挖掘和分析了金枪鱼蒸煮液的促成骨细胞增殖率,然而,若要完整解析金枪鱼蒸煮液在促成骨细胞增殖以及改善骨质疏松方面的活性作用机制,仍需在后续研究中进一步对成骨细胞的分化能力、矿化能力进行验证,并开展转录组分析。通过这些深入研究,能够为全面、客观地评价金枪鱼蒸煮液的抗骨质疏松活性提供更为坚实的理论依据。本研究所得结果,也将为金枪鱼加工副产物活性肽的研发提供有力的理论支持,从而丰富金枪鱼蒸煮液蛋白肽生物活性内涵,开发多功能健康食品原料。

© The Author(s) 2025. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] 王欣欣. 金枪鱼蒸煮液主要组分的提取及生物活性研究[D]. 青岛: 青岛科技大学, 2023. [WANG X X. Extraction and bioactivity of the main components of tuna cooking liquid[D]. Qingdao: Qingdao University of Science and Technology, 2023.]
- [2] 孙丽, 夏文水. 蒸煮对金枪鱼肉及其蛋白质热变性的影响[J]. 食品与机械, 2010, 26(1): 22-25. [SUN L, XIA W S. Effect of steaming on thermal denaturation of tuna meat and its proteins[J]. Food and Machinery, 2010, 26(1): 22-25.]
- [3] 叶孟亮. 牦牛骨胶原蛋白肽抗骨质疏松作用机制研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2019. [YE M L. Research on the mechanism of anti-osteoporosis effect of yak collagen peptide[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2019.]
- [4] 缪函霖, 蒋璐, 王锡昌, 等. 不同新鲜度金枪鱼肉蒸煮品质的

- 研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(13): 80-84, 295. [MU H L, JIANG L, WANG X C, et al. Study on cooking quality of tuna meat with different freshness[J]. Food Industry Science and Technology, 2014, 35(13): 80-84, 295.]
- [5] XU Y J, HAN X L, LI Y. Effect of marine collagen peptides on longbone development in growing rats[J]. J Sci Food Agric, 2010, 90(9): 1485-1491.
- [6] AKBARIAN M, KHANI A, EGHBALPOUR S, et al. Bioactive peptides: Synthesis, sources, applications, and proposed mechanisms of action[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(3): 14-45.
- [7] 李勇. 肽临床营养学[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2012: 1-356. [LI Y. Peptide clinical nutrition[M]. Beijing: Peking University Medical Press, 2012.]
- [8] 王珊珊. 鳕鱼骨胶原肽与活性钙的制备及其抗骨质疏松活性研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013. [WANG S S. Preparation of cod collagen peptide with active calcium and its anti-osteoporosis activity[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2013.]
- [9] 杨溢, 岳午阳, 张大超, 等. 海洋鱼骨胶原低聚肽与天门冬氨酸钙联用增加去卵巢大鼠骨密度[J]. 卫生研究, 2019, 48(4): 606-610. [YANG Y, YUE W Y, ZHANG D C, et al. Marine fish collagen oligopeptide in combination with calcium aspartate increases bone mineral density in ovariectomized rats[J]. Health Research, 2019, 48(4): 606-610.]
- [10] 舒聪涵. 金枪鱼骨胶原肽及其钙螯合物对成骨细胞的活性影响研究[D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2021. [SHU C H. Effects of tuna collagen peptide and its calcium chelate on the activity of osteoblasts[D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2021.]
- [11] MA W J, LIANG Z C, HE B, et al. Changes in the characteristic volatile aromatic compounds in tuna cooking liquid during fermentation and deodorization by *Lactobacillus plantarum* RP26 and *Cyberlindnera fabianii* JGM9-1[J]. Food Chemistry: X, 2023, 20: 100900.
- [12] 上海市酿造科学研究所. SB/T 10317-1999 蛋白酶活力测定法[S]. 北京: 中国标准出版社, 1999. [Shanghai Brewing Science Research Institute. SB/T 10317-1999 Protease activity assay[S]. Beijing: China Standard Press, 1999.]
- [13] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. GB/T 5009.5-2016 食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016. [National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, China Food and Drug Administration. GB/T 5009.5-2016 National standard for food safety-Determination of protein in food[S]. Beijing: China Standard Press, 2016.]
- [14] 全国特殊膳食标准化技术委员会. GB/T 22729-2008 海洋鱼低聚肽粉[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008. [National Technical Committee for Special Dietary Standardization. GB/T 22729-2008 Marine fish oligopeptide powder[S]. Beijing: China Standard Press, 2008.]
- [15] 贾鹏禹, 孙蕊, 寇芳, 等. 柱前衍生化液相色谱法测定牛血清中游离氨基酸含量[J]. 中国生物制品学杂志, 2018, 31(8): 869-873. [JIA P Y, SUN R, KOU F, et al. Determination of free amino acids in bovine serum by pre-column derivatization liquid chromatography[J]. Chinese Journal of Biological Products, 2018, 31(8): 869-873.]
- [16] 中华人民共和国国家卫生健康委员会, 国家市场监督管理总局. GB 31645-2018 食品安全国家标准 胶原蛋白肽法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2018. [National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, China Food and Drug Administration. GB 31645-2018 Food safety national stan-

- dard-Collagen peptide method[S]. Beijing: China Standard Press, 2018.]
- [17] UDENIGWE C C, ALUKO R E. Chemometric analysis of the amino acid requirements of antioxidant food protein hydrolysates[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2011, 12(5): 3148–3161.
- [18] YAN L J, SUN L C, CAO K Y, et al. Type I collagen from sea cucumber (*Stichopus japonicus*) and the role of matrix metalloproteinase-2 in autolysis[J]. *Food Bioscience*, 2021, 41: 100959.
- [19] AHMED R, HAQ M, CHUN B S. Characterization of marine derived collagen extracted from the by-products of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 135: 668–676.
- [20] 赵珊珊, 朱志伟, 曾庆孝, 等. 不同蛋白酶酶解罗非鱼肉制备蛋白水解液的过程变化规律研究[J]. 现代食品科技, 2008(2): 115–119. [ZHAO S S, ZHU Z W, ZENG Q X, et al. Study on the change pattern of protein hydrolysate prepared from tilapia meat by enzymatic hydrolysis with different proteases[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2008(2): 115–119.]
- [21] 阮晓慧, 韩军岐, 张润光, 等. 食源性生物活性肽制备工艺、功能特性及应用研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(6): 248–253. [RUAN X H, HAN J Q, ZHANG R G, et al. Progress of food-borne bioactive peptide preparation process, functional properties and application research[J]. *Food and Fermentation Industry*, 2016, 42(6): 248–253.]
- [22] KARAS M. Influence of physiological and chemical factors on the absorption of bioactive peptides[J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2019, 54(5): 1486–1496.
- [23] WOUTERS A G B, ROMBOUTS I, FIERENS E, et al. Relevance of the functional properties of enzymatic plant protein hydrolysates in food systems[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2016, 15(4): 786–800.
- [24] 叶子青. 菠萝蛋白酶对腊鸭品质的影响研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2021. [YE Z Q. Effects of bromelain on the quality of preserved ducks[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2021.]
- [25] 李荣乔. 菠萝蛋白酶酶解海湾扇贝裙边制备抗氧化肽的研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2014. [LI R Q. Study on the preparation of antioxidant peptides from the skirts of bay scallops by enzymatic hydrolysis with bromelain[D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2014.]
- [26] 吴羽茜, 陈秉彦, 林晓姿, 等. 金枪鱼蒸煮液蛋白营养评价及其功能特征氨基酸分析[J]. 福建农业学报, 2023, 38(12): 1–7. [WU Y X, CHEN B Y, LIN X Z, et al. Nutritional evaluation of tuna cooking liquid protein and amino acid analysis of its functional characteristics[J]. *Fujian Agricultural Journal*, 2023, 38(12): 1–7.]
- [27] OHARA H, IIDA H, ITO K, et al. Effects of pro-hyp, a collagen hydrolysate-derived peptide, on hyaluronic acid synthesis using in vitro cultured synovium cells and oral ingestion of collagen hydrolysates in a guinea pig model of osteoarthritis[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2010, 74(10): 2096–2099.
- [28] GUILLERMINET F, BEAUPIED H, FABIEN-SOULE V, et al. Hydrolyzed collagen improves bone metabolism and biomechanical parameters in ovariectomized mice: An *in vitro* and *in vivo* study[J]. *Bone*, 2010, 46(3): 827–834.