

优选南极磷虾蛋白肽抗氧化活性组分

郑景如¹, 孙馨婷¹, 蔡紫仪¹, 李 聪¹, 邹学儒¹, 林松毅^{1,2,3}, 孙 娜^{1,2,3*}

(1. 大连工业大学食品学院, 大连 116034; 2. 大连工业大学国家海洋食品工程技术研究中心, 大连 116034;
3. 辽宁省食品工程技术研究中心, 大连 116034)

摘 要: **目的** 制备南极磷虾抗氧化肽, 优选出抗氧化活性最好的南极磷虾肽成分。**方法** 采用脱脂、酶解、超滤等手段制备南极磷虾抗氧化肽; 以 DPPH 自由基清除率、ABTS 自由基清除率、抗氧化能力指数 3 个抗氧化指标和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)活力 2 个酶活力指标为评价指标, 优选出抗氧化活性最好的南极磷虾肽组分; 基于 G-25 凝胶层析技术对抗氧化活性最好的南极磷虾肽组分进行分离纯化, 进一步基于电子顺磁共振(electron paramagnetic resonance, EPR)方法测定洗脱后各峰的 DPPH 自由基清除率, 得到抗氧化活性最好的南极磷虾抗氧化肽组分。**结果** 通过抗氧化指标测定, 截留分子量 3~10 KDa 的肽的 DPPH 自由基清除率最高, 为(30.10±1.10)%, 截留分子量 < 3 KDa 的南极磷虾肽的 ABTS 清除能力和抗氧化指数较好, 则 IC₅₀ 值为(0.74±0.08) mg/mL、氧化自由基吸收能力(oxygen radical absorbance capacity, ORAC)值为 6.39±0.21; 通过酶活力指标测定, 截留分子量 < 3 KDa 的肽的 SOD 活力和 CAT 活力最好, 分别为(45.7±0.13) U/mg 和(17.1±0.19) U/mg 蛋白质。对截留分子量 < 3 KDa 和 3~10 KDa 的南极磷虾肽进行 G-25 分离纯化后, 测定各组分的 DPPH 自由基清除率, 可知截留分子量 3~10 KDa 的 F2-2 峰清除率最好, 为(51.55±1.54)%。**结论** 基于 EPR 方法优选出分子量为 3~10 KDa 的南极磷虾肽的 F2-2 组分的 DPPH 自由基清除率最高。

关键词: 南极磷虾; 蛋白肽; 抗氧化活性

Optimizing the antioxidant components of Antarctic krill protein peptides

ZHENG Jing-Ru¹, SUN Xin-Pin¹, CAI Zi-Yi¹, LI Cong¹, ZOU Xue-Ru¹,
LIN Song-Yi^{1,2,3}, SUN Na^{1,2,3*}

(1. School of Food Science and Technology, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China; 2. National Engineering Research Center of Seafood, Dalian 116034, China; 3. Liaoning Province Food Engineering Research Center, Dalian 116034, China)

ABSTRACT: Objective To prepare antarctic krill antioxidant peptide and select the Antarctic krill peptide components with the best antioxidant activity. **Methods** The antioxidant peptides of Antarctic krill were prepared by means of degrease, enzymatic hydrolysis, and ultrafiltration. DPPH radical scavenging capacity, ABTS radical

基金项目: 国家大学生创新创业训练计划项目(201910152008)

Fund: National College Students Innovation and Entrepreneurship Training Program (201910152008)

*通讯作者: 孙娜, 教授, 主要研究方向为蛋白质资源开发与利用。E-mail: sunna1215@126.com

*Corresponding author: SUN Na, Professor, School of Food Science and Technology, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China. E-mail: sunna1215@126.com

scavenging capacity, oxygen radical absorbance capacity, superoxide dismutase (SOD) activity and catalase (CAT) activity were used as evaluation indicators to select Antarctic krill peptide components with the best antioxidant activity. Based on G-25 gel chromatography, the Antarctic krill peptides were further separated and purified. The DPPH free radical removal rate of the elution peaks was determined by using the electron paramagnetic resonance (EPR) method, and the Antarctic krill antioxidant peptide component with the maximal antioxidant activity was obtained. **Results** From the results of antioxidant indicators, the Antarctic krill peptides with the molecular weight of 3-10 KDa peptide have the best DPPH radical scavenging capacity ($30.10\% \pm 1.10\%$); the Antarctic krill peptides with the molecular weight of <3 KDa have the best ABTS radical scavenging capacity ($0.74 \text{ mg/mL} \pm 0.08 \text{ mg/mL}$) and antioxidant index (6.39 ± 0.21). From the results of enzymatic activity, the Antarctic krill peptides with the molecular weight of <3 KDa produced higher SOD and CAT activity than other components. After the purification by G-25 gel chromatography, the F2-2 peak of Antarctic krill peptides with the molecular weight of 3-10 KDa generated the maximal DPPH radical scavenging capacity ($51.5 \pm 1.54\%$) measured by the EPR method. **Conclusion** Based on the EPR method, the highest DPPH free radical scavenging capacity is derived from the F2-2 component of Antarctic krill peptides with the molecular weight of 3-10 KDa.

KEY WORDS: Antarctic krill; protein peptide; antioxidant activity

1 引言

南极磷虾(*Euphausia superba*)^[1,2], 以食用浮游植物为主^[3], 是全球现存的单种生物资源量最为丰富的生物之一^[4], 也是维持南极生态系统的关键物种和高营养层级生物的重要食物来源^[5,6]。蛋白质含量比较高, 肌肉鲜样粗蛋白含量为 16.31% ^[7], 且脂肪含量低, 具有人体所必需的各种营养物质, 如磷脂型多不饱和脂肪酸、甲壳素、虾青素以及低温活性酶等^[8-10], 矿物质含量丰富, 蛋白水解产物中氨基酸种类丰富, 其中包含人体所需 8 种必需氨基酸, 同时尚未被充分开发利用^[11]。南极磷虾不但营养物质丰富, 还含有多种活性物质, 如蛋白消化酶、类胞菌素氨基酸等, 在医药化工及功能食品方面具有巨大的开发前景^[12-14]。

南极磷虾粉, 主要由原冻虾加工而成^[15]。相对于冷冻虾砖, 南极磷虾粉具有流通成本低、储存方便的优点。目前, 国内外围绕南极磷虾粉的开发与利用大多是将南极磷虾粉简单加工成高价值的水产饲料添加剂^[16], 应用前景虽好, 但是附加值较低。对南极磷虾粉的进一步研究仍停留在分析储藏方式对其品质的影响, 围绕南极磷虾粉对人体保健营养功能的研究较缺乏。

从动植物中提取的抗氧化肽粉属于具有抗氧化活性的天然肽, 能降低自动氧化速率和脂肪的过氧化物含量^[17], 与化学的抗氧化活性肽相比, 安全性高, 抗氧化能力强, 对人体的副作用小。迄今为止, 抗氧化肽是科学家们探索最多的一种功能性肽, 目前常采用酶解制肽的方法进行多肽的制备^[18]。国内在此方面的研究比较滞后, 但在抗氧化肽的发现后, 国内外都频繁地展开了对其的研究, 主要的提取原料从植物到了动物, 然而对南极磷虾抗氧化肽的研究还较少。

因此, 本研究采用脱脂、酶解、超滤等操作方法制备南极磷虾抗氧化肽粉, 并优选抗氧化活性最好的南极磷虾肽组分, 以期将南极磷虾抗氧化肽应用于功能性食品、保健食品、特殊医疗用品等多个领域, 增加南极磷虾粉的高值化利用, 具有良好的商业效益。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

无水乙醇(纯度 $\geq 99.7\%$, 天津市富宇精细化工有限公司); 甲醇(纯度 $\geq 99.5\%$, 天津市科密欧化学试剂有限公司); 冰乙酸(纯度 $\geq 99.5\%$)、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠(含量 $\geq 99.0\%$, 天津市大茂化学试剂厂); 氢氧化钠(含量 $\geq 96.0\%$, 天津市东丽区天大化学试剂厂); DPPH(分析纯, 美国 Sigma 公司); HepG2(上海抚生实业有限公司); DMEM 培养基、L-谷氨酰胺[赛默飞世尔科技(中国)有限公司]; 10%胎牛血清(上海远慕生物科技有限公司); 青链霉素混合液(广州鼎国生物技术有限公司); 总超氧化物歧化酶活力测定试剂盒、过氧化氢酶测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

2.2 仪器与设备

DF-101S 水浴锅(巩义市予华仪器有限责任公司); JJ-1 精密定时电动搅拌器(常州荣华仪器制造有限公司); PB-10 pH 计(赛多利斯科学仪器有限公司); SCIENTZ-10ND 冷冻干燥机(宁波新芝生物科技股份有限公司); CR22N 高速冷冻离心机(日立工机株式会社); UV-5200 紫外可见分光光度计(上海元析仪器有限公司); CXG-1F 智能电脑层析柜(苏州江东精密仪器有限公司); BT125D 分析天平(赛多利斯科学仪器有限公司); Legend Micro 17R 冷冻高速离心机

(赛默飞世尔科技有限公司); Bruker EMXnano 台式 EPR 波谱仪(布鲁克北京科技有限公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 南极磷虾的预处理

采用电加热夹层锅煮虾, 水沸后放入含水量为 5% 的冻虾或原虾, 100 °C 下加热 5 min 后捞出, 在 14000 r/min 离心 10 min, 在 50 °C 鼓风式烘箱中烘干至含水量 2%~7%, 粉碎过筛得到 40 目的南极磷虾粉。

2.3.2 南极磷虾粉的脱脂

将南极磷虾粉置于烧杯中, 加入 3:1(*m*:*V*)的正己烷/乙醇混合液脱脂, 南极磷虾粉与正己烷/乙醇混合液的体积比为 1:2(*V*:*V*), 50 °C 搅拌 6 h, 倒掉上清液, 取沉淀, 重新加入 3:1(*m*:*V*)的正己烷/乙醇混合液, 50 °C 搅拌 6 h, 抽滤, 所得滤饼自然风干、粉碎过筛得到 60 目的南极磷虾脱脂粉。

2.3.3 南极磷虾粉的热变性、酶解

称取 31.45 g 南极磷虾脱脂粉于烧杯中, 加水至底物蛋白浓度为 2% 制得酶解反应液 2000 mL, 升温至 90 °C, 保持 10 min, 使原有蛋白质解旋变性, 原有酶失活, 按 1000 U/g 底物蛋白的比例向所述酶解反应液中加入胰蛋白酶进行酶解反应, 调节酶解反应液 pH 至 7.5, 温度为 37 °C, 反应 3 h; 90 °C 灭酶 10 min, 1000 r/min 离心 20 min, 静置, 收集上清液, 得南极磷虾酶解物。

2.3.4 南极磷虾酶解物的超滤

将南极磷虾酶解物, 用 1 mol/L 盐酸溶液调 pH 至 7.0, 进行超滤分离, 最大工作压力为 0.1~0.15 MPa, 得到膜上液(未过膜)和膜下液。保留膜下液超高温瞬时杀菌, 真空冷冻干燥, 得到截留分子量分别为 >30, 10~30, 3~10, <3 kDa 的南极磷虾抗氧化肽粉。

2.3.5 DPPH 自由基清除能力测定

分别称取 0.1 g 3 个组分的南极磷虾肽粉, 加 1 mL 超纯水配成 1 mg/mL 样品溶液于 2 mL 离心管中, 用超纯水稀释成 1.6、0.8、0.4、0.2、0.1 mg/mL 的样品溶液; 称取 0.00237 g DPPH 加入 10 mL 甲醇配成 DPPH 溶液(避光保存), 室温下, 向 96 孔板的每个孔中依次加入 100 μL 样液、100 μL 甲醇、及 100 μL DPPH 溶液, 充分混匀, 避光 30 min, 于 515 nm 处测吸光度(*A*); 100 μL 超纯水代替样液, 作为空白对照(*A*_空)。

$$\text{DPPH 自由基清除率} = \frac{A_{空} - A}{A_{空}} \times 100\% \quad (1)$$

2.3.6 ABTS 自由基清除能力测定

称取 0.1920 g ABTS 固体样品, 加 50 mL 超纯水, 再加 0.03311 g 过硫酸钾配成 ABTS 试剂, 室温放置 12 h, 于 734 nm 处测量, 测定值达到 0.7±0.02 时, 向 96 孔板中加入 50 μL 样液和 100 μL ABTS 试剂, 734 nm 处测吸光度值(*AS*), 超纯水作空白组(*AB*)。

$$\text{ABTS 自由基清除率} = \frac{AB - AS}{AB} \times 100\% \quad (2)$$

2.3.7 抗氧化能力指数(antioxidant capacity index, ORAC)测定

称取 2.9 g 磷酸氢二钠溶于 81 mL 超纯水与 0.296 g 磷酸二氢钠溶于 19 mL 超纯水混合配成 100 mL 溶液后, 取出 25 mL, 再加 25 mL 超纯水配成磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer solution, PBS); 称取 0.1883 g 荧光素(fluorescein, FL)固体样品溶于 10 mL PBS 溶液; 称取 2.712 g 偶氮引发剂(azo initiator, AAPH)固体样品溶于 25 mL PBS 溶液; 向 96 孔板中加入 50 μL 样品、150 mL AAPH 溶液、50 μL FL 溶液于酶标仪下测量, 作阴阳性对照, 阴性组的 AAPH 溶液改为超纯水, 空白组用超纯水, 每个孔循环 2 min。

$$\text{ORAC 值} = \frac{(\text{AUC}_{\text{Sample}} - \text{AUC}_{+\text{AAPH}}) / (\text{AUC}_{\text{Trolox}} - \text{AUC}_{+\text{AAPH}})}{(\text{Trolox 的浓度} / \text{样品的浓度})^{[16]}} \quad (3)$$

其中: AUC 为荧光衰退曲线下面积, Sample 指样品, +AAPH 指不添加抗氧化剂的样品, Trolox 指标准溶液。

2.3.8 HepG2 细胞培养

将在 37 °C 水浴锅中迅速溶解的细胞转移至离心管中, 加入新鲜的细胞培养液(DMEM 培养基+10%胎牛血清+1%青链霉素混合液+1%L-谷氨酰胺), 混匀后 1000 r/min 条件下离心 5 min。弃上清液, 加入 4 mL 培养液, 混匀后移入到培养瓶中, 放置在 37 °C, 5%二氧化碳的培养箱中进行培养。

待细胞生长到 80% 以上时吸弃培养液后, 加入 2 mL PBS 缓冲液冲洗 2 次, 然后加入 1 mL 胰酶, 放到二氧化碳培养箱中消化 5 min。显微镜观察后, 将轻微脱落的细胞立即加入 5 mL 完全培养液停止消化, 轻轻吹打使细胞全部脱落, 将悬液转移至离心管中, 1000 r/min 离心 5 min, 弃上清。加入 6.5 mL 完全培养液, 吸取 15 μL 细胞悬液进行细胞计数, 将剩余细胞悬液与样品溶液转入六孔板, 每孔 1.5 mL, 细胞数约 1×10⁶/孔, 轻轻摇匀悬液, 使其均匀完全覆盖, 37 °C 继续培养。

2.3.9 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活力测定

采用超氧化物歧化酶试剂盒进行测定, 于波长 550 nm 处测定吸光度。

$$\text{SOD 活力} = \frac{\text{对照 OD 值} - \text{测定 OD 值}}{\text{对照 OD 值}} \div 50\% \times \frac{\text{反应液总体积(mL)}}{\text{取样量(mL)}} \times \frac{\text{相同匀浆下的蛋白含量(mgprot / mL)}}{\text{白含量(mgprot / mL)}} \quad (4)$$

2.3.10 过氧化氢酶(catalase, CAT)活力测定

采用过氧化氢酶试剂盒进行测定, 于 240 nm 处用紫外分光光度计测量吸光度值(*OD*)。

$$\text{CAT 活力} = \log \frac{OD_1}{OD_2} \times \frac{2.303}{60 \text{秒}} \times \text{样本稀释前倍数} \times \text{反应体系} (U / gprot)$$

稀释倍数+待测匀浆蛋白浓度(gprot/mL) (5)

其中: OD_1 为 240 nm 处零时吸光度;

OD_2 为 240 nm 处 1 min 时吸光度。

2.3.11 G-25 凝胶层析技术分离纯化

分别取 20 mg/mL 截留分子量为 <3 kDa 的南极磷虾抗氧化肽液、40 mg/mL 截留分子量为 3~10 kDa 的南极磷虾抗氧化肽液置于 Sephadex G-25 柱上, 超纯水以 0.3 mL/min 的速度进行洗脱, 于 220 nm 处测吸光值。

2.3.12 电子顺磁共振(electron paramagnetic resonance, EPR)方法测定 DPPH 自由基清除率

分别称取 1.5601 g 磷酸二氢钠加水至 100 mL、1.7907 g 磷酸氢二钠加水至 50 mL, 取 87.7 mL 磷酸二氢钠溶液与 12.3 mL 磷酸氢二钠溶液混合均匀配成 pH0.6、0.1 mol/L 的 PBS 溶液; 称取 0.0039432 g DPPH 溶于 50 mL 乙醇配成 200 μ mol/L 的 DPPH 溶液。向 1.5 mL 离心管中依次加入 100 μ L PBS、100 μ L DPPH、10 μ L 样液(0.2 mg/mL), 混匀, 避光 30 min, 2000 \times g 条件下离心 10 min, 取上清液进行检测(A)。以去离子水代替样液作空白对照($A_{空}$)。

$$\text{清除率} = \frac{A_{空} - A}{A_{空}} \times 100\%$$

3 结果与分析

3.1 测定南极磷虾蛋白肽体外抗氧化活性指标

3.1.1 不同截留分子量南极磷虾抗氧化肽的 DPPH 自由基清除能力的测定

由图 1 可知: 随着浓度的增大, 各组分对 DPPH 自由基清除率增大, 清除能力增强。浓度为 1.6 mg/mL 时, 截留分子量为 3~10 kDa 的南极磷虾抗氧化肽对 DPPH 自由基清除率最高, 为(30.10 \pm 1.10)%; 并且从整个图来分析, 也是截留分子量为 3~10 kDa 的南极磷虾抗氧化肽对 DPPH 自由基清除率最好。

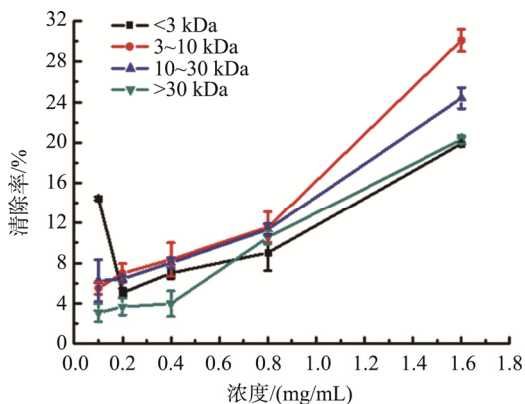


图 1 不同截留分子量南极磷虾抗氧化肽的 DPPH 自由基清除率 ($n=3$)

Fig.1 DPPH radical scavenging capacity of Antarctic krill antioxidant peptides with different molecular weights ($n=3$)

3.1.2 不同截留分子量南极磷虾抗氧化肽的 ABTS 自由基清除能力测定

IC_{50} 值指半抑制率, 即抑制率 50% 时药物的浓度。由图 2 可知, 截留分子量为 <3 kDa 的南极磷虾抗氧化肽的 IC_{50} 值最小, 即抑制率 50% 时 <3 kDa 的肽浓度最低, 为(0.74 \pm 0.08) mg/mL, 因此其抑制效果最好, ABTS 自由基清除能力最好。图中 a、b、c、d 表示同一字母组间无显著性差异、不同字母组间存在显著性差异。

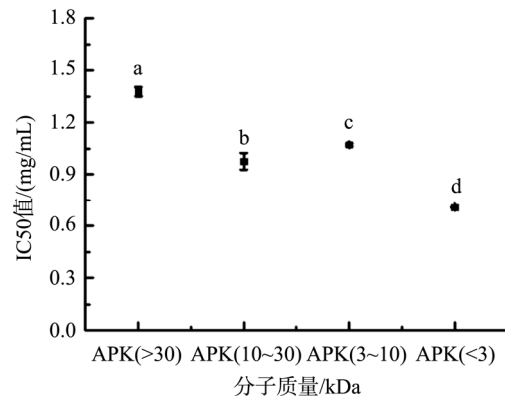


图 2 不同截留分子量南极磷虾抗氧化肽的 IC_{50} 值 ($n=3$)

Fig.2 IC_{50} value of Antarctic krill antioxidant peptides with different molecular weights ($n=3$)

3.1.3 不同截留分子量南极磷虾抗氧化肽的抗氧化能力指数测定

由图 3 可知, 以 1.6 mg/mL 浓度为例, 加了 AAPH 的样品的 ORAC 值显著高于不加 AAPH 的样品 ($P<0.05$); 无论是+AAPH 还是-AAPH, 都是截留分子量为 <3 kDa 的南极磷虾抗氧化肽的 ORAC 值最高, 分别为 6.39 \pm 0.21、5.14 \pm 0.01, 即该组分的抗氧化能力指数最大。图中 a、b、c、d 表示同一字母组间无显著性差异、不同字母组间存在显著性差异。

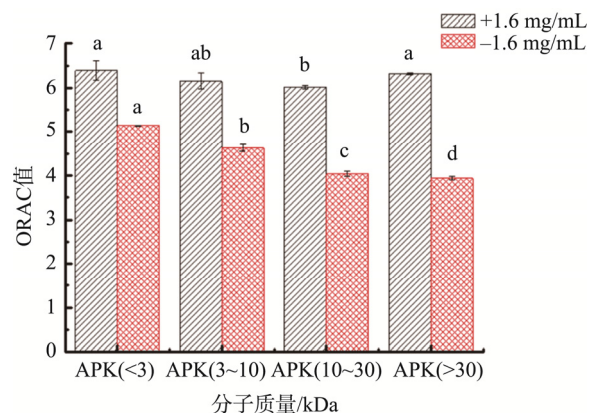


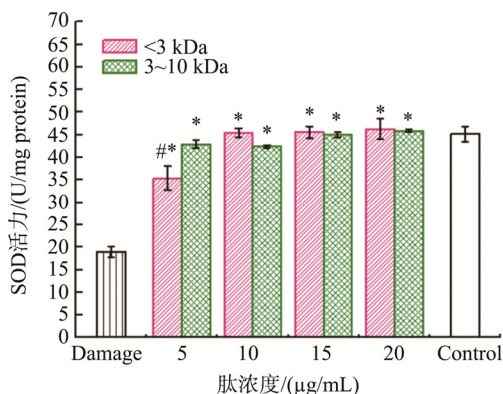
图 3 不同截留分子量的南极磷虾抗氧化肽的 ORAC 值 ($n=3$)

Fig.3 ORAC values of Antarctic krill antioxidant peptides with different molecular weights ($n=3$)

3.2 基于 HepG2 测定南极磷虾蛋白肽体内抗氧化活性指标

3.2.1 不同浓度南极磷虾抗氧化肽的 SOD 活力测定

由图 4 可知, 南极磷虾抗氧化肽浓度为 5 μg/mL 时, 截留分子量为 3~10 KDa 的 SOD 活力大于截留分子量 < 3 KDa 的 SOD 活力; 而肽浓度为 10、15、20 μg/mL 时, 截留分子量为 < 3 KDa 的 SOD 活力大于截留分子量 3~10 KDa 的 SOD 活力, 并且浓度越大, SOD 的活力越大; 综合分析, 截留分子量为 < 3 KDa 的 SOD 活力较好。



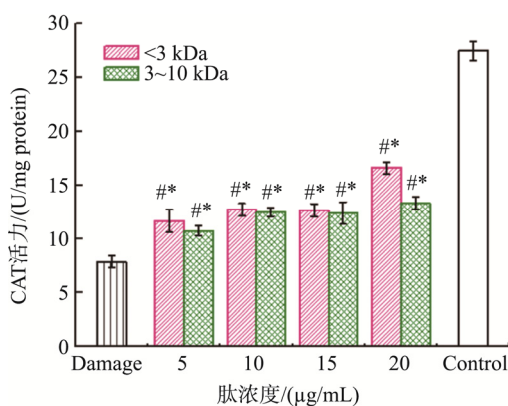
注: *与损伤组比较 $P < 0.05$, #与对照组比较 $P < 0.05$ 。

图 4 不同浓度的南极磷虾抗氧化肽的 SOD 活力(n=3)

Fig.4 SOD activity of Antarctic krill antioxidant peptides with different concentrations (n=3)

3.2.2 不同浓度南极磷虾抗氧化肽的 CAT 活力测定

由图 5 可知, 随着南极磷虾抗氧化肽浓度的增加, CAT 活力也随着增加, 并且截留分子量 < 3 KDa 的 CAT 活力要高于截留分子量 3~10 KDa 的 CAT 活力。



注: *指跟损伤组比较 $P < 0.05$, #指跟对照组比较 $P < 0.05$ 。

图 5 不同浓度的南极磷虾抗氧化肽的 CAT 活力(n=3)

Fig.5 CAT activity of Antarctic krill antioxidant peptides with different concentrations (n=3)

3.3 基于 G-25 凝胶层析技术分离纯化南极磷虾蛋白肽

3.3.1 截留分子量为 <3 KDa 南极磷虾抗氧化肽的分离纯化

由图 6 可知 <3 KDa 分子量的南极磷虾抗氧化肽的洗脱图谱 F₁ 可得 3 个吸收峰, 其中第 3 个峰 F₁-1 的峰值很明显, 吸光度值最大。

3.3.2 截留分子量为 3~10 KDa 南极磷虾抗氧化肽的分离纯化

由图 7 可知: 3~10 KDa 分子量的南极磷虾抗氧化肽的洗脱图谱 F₂ 可得 3 个吸收峰, 第 1 个峰 F₂-1 和第 2 个峰 F₂-2 的峰值较低; 第 3 个峰 F₂-3 的峰值较高。

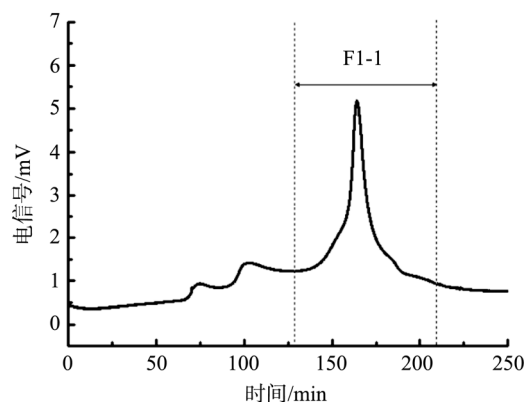


图 6 截留分子量为 <3 KDa 南极磷虾抗氧化肽的洗脱图谱(n=3)

Fig.6 Elution of Antarctic krill antioxidant peptides with the molecular weight of <3 KDa (n=3)

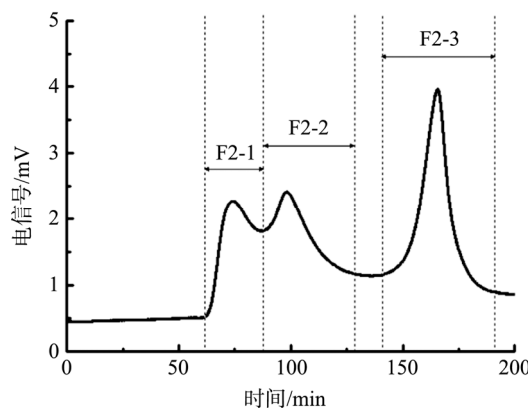


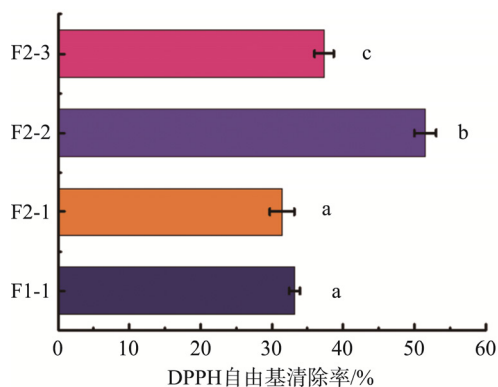
图 7 截留分子量为 3~10 KDa 南极磷虾抗氧化肽的洗脱图谱 (n=3)

Fig.7 Elution of Antarctic krill antioxidant peptides with the molecular weight of 3-10 KDa (n=3)

3.3.3 基于 EPR 方法测定分离纯化后各组分的 DPPH 自由基清除率

由图 8、9 可知, 截留分子量为 3~10 KDa 的南极磷虾

抗氧化肽分离纯化后得到的 F2-2 峰组分的 DPPH 自由基清除率最高, 为(51.55±1.54)%, 因此该组分的抗氧化活性最好。



注: 图中 a、b、c 表示同一字母组间无显著性差异、不同字母组间存在显著性差异。

图 8 分离纯化后各组分的 DPPH 自由基清除率(n=3)

Fig.8 DPPH radical scavenging capacity of each component obtained by purification (n=3)

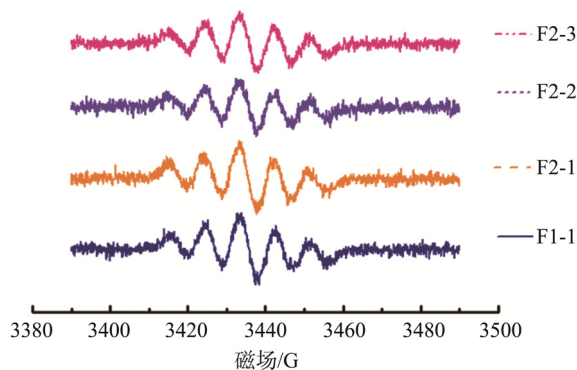


图 9 各组分的电子顺磁共振谱图(n=3)

Fig.9 Electron paramagnetic resonance spectra for each component (n=3)

4 结 论

本实验通过脱脂、酶解、超滤等手段制备截留分子量分别为 > 30、10~30、3~10、< 3 KDa 的南极磷虾抗氧化肽, 通过测定其 DPPH 自由基清除率, 得到 3~10 KDa 组分的肽清除率最高; 测定其 ABTS 自由基清除率, 得到 < 3 KDa 组分的肽 IC₅₀ 值最小, 为(0.74±0.08) mg/mL; 对于抗氧化能力指数来说, 截留分子量 < 3 KDa 的 ORAC 值最高, 为 6.39±0.21(+AAPH)、5.14±0.01(-AAPH); 基于 3 个抗氧化指标, 可以确定截留分子量 < 3 KDa 和 3~10 KDa 的肽抗氧化活性高; 再通过测定截留分子量 < 3 KDa 和 3~10 KDa 的肽的 SOD 活力和 CAT 活力 2 个酶活力指标, 可以确定截留分子量 < 3 KDa 的组分为抗氧化活性最高的南极磷虾肽组分。最后通过 G-25 凝胶层析技术对截留分子量 < 3

KDa 和 3~10 KDa 的南极磷虾抗氧化肽进行分离纯化, 采用 EPR 方法进行各洗脱峰组分的 DPPH 自由基清除率测定, 可以确定截留分子量 3~10 KDa 分离纯化后的第 2 个峰 F2-2 的抗氧化活性最好。

参考文献

- [1] 冯迪娜. 南极磷虾油生理功能的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(7): 115-117.
Feng DN. Research progress on physiological function of antarctic krill oil [J]. Food Res Dev, 2015, 36(7): 115-117.
- [2] 廖鄂. 南极磷虾蛋白提取技术研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.
Liao E. Study on extraction technology of Antarctic Krill protein [J]. Qingdao: Ocean University of China, 2014.
- [3] 左青, 左晖. 南极磷虾开发现状和展望[J]. 粮食与食品工业, 2019, (4): 53-55.
Zuo Q, Zuo H. Development status and prospect of Antarctic krill [J]. Cere Food Ind, 2019, (4): 53-55.
- [4] 吴伟平, 谢营樑. 南极磷虾及磷虾渔业[J]. 现代渔业信息, 2010, 25(1): 10-13.
Wu WP, Xie YL. Antarctic krill and krill fishery [J]. Mod Fish Inf, 2010, 25(1): 10-13.
- [5] Nicol S, Endo Y. Krill fisheries: development, management and ecosystem implications [J]. Aquat Liv Res, 1999, 12(2): 105-120.
- [6] 孙松, 刘永芹. 南极磷虾与南大洋生态系统[J]. 自然杂志, 2009, 31(2): 88-90, 104.
Sun S, Liu YQ. Antarctic krill and southern ocean ecosystem [J]. Nat Magaz, 2009, 31(2): 88-90, 104.
- [7] 孙雷, 周德庆, 盛晓凤. 南极磷虾营养评价与安全性研究[J]. 海洋水产研究, 2008, 29(2): 57-64.
Sun L, Zhou DQ, Sheng XF. Nutrition and safety evaluation of Antarctic krill [J]. Mar Fish Res, 2008, 29(2): 57-64.
- [8] 龚洋洋, 黄洪亮, 吴越, 等. 南设得兰群岛东部南极大磷虾活体磷脂含量分析[J]. 渔业信息与战略, 2015, 30(3): 200-204.
Gong YY, Huang HL, Wu Y, et al. Analysis of phospholipid content in Antarctic krill in the eastern South Shetland Islands [J]. Fish Inf Strat, 2015, 30(3): 200-204.
- [9] 宋素梅, 刘富俊, 姜启兴, 等. 南极磷虾壳中虾青素稳定性的研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(18): 96-98, 102.
Song SM, Liu FJ, Jiang QX, et al. Study on the stability of astaxanthin in Antarctic krill shell [J]. Food Ind Sci Technol, 2012, 33(18): 96-98, 102.
- [10] 楼乔明, 王玉明, 杨文鸽, 等. 南极磷虾脂类及脂肪酸组成分析[J]. 水产学报, 2012, 36(8): 1256-1262.
Lou QM, Wang YM, Yang WG, et al. Analysis of lipid and fatty acid composition in Antarctic krill powder [J]. J Aquat Sci, 2012, 36(8): 1256-1262.
- [11] 刘志东, 陈雪忠, 黄洪亮, 等. 南极磷虾粉加工与贮藏技术研究进展[J]. 食品工业科技, 2016, (16): 34-42.
Liu ZD, Chen XZ, Huang HL, et al. Research progress in processing and storage technology of Antarctic krill powder [J]. Food Ind Sci Technol, 2016, (16): 34-42.
- [12] 黄艳青, 高露姣, 陆建学, 等. 饲料中添加南极大磷虾粉对点带石斑鱼幼鱼生长与肌肉营养成分的影响[J]. 海洋渔业, 2010, 32(4): 440-446.
Huang YQ, Gao LJ, Lu JX, et al. Effect of Antarctic krill powder on

- growth and muscle nutritional composition of juvenile *Epinephelus punctatus* [J]. *Mar Fish*, 2010, 32(4): 440–446.
- [13] 龚洋洋, 陆建学, 黄艳青, 等. 南极磷虾粉氨基酸营养价值分析与评价[J]. *饲料工业*, 2013, 34(16): 38–41.
- Gong YY, Lu JX, Huang YQ, *et al.* Analysis and evaluation of amino acid nutritional value of Antarctic krill powder [J]. *Feed Ind*, 2013, 34(16): 38–41.
- [14] 崔秀明, 汪之和, 施文正. 南极磷虾粗虾油提取工艺优化[J]. *食品科学*, 2012, 32(24): 126–129.
- Cui XM, Wang ZH, Shi WZ. Optimization of extraction process of *Antarctic krill* crude shrimp oil [J]. *Food Sci*, 2012, 32(24): 126–129.
- [15] 赵伟, 刘建君, 苏学锋, 等. 南极磷虾粉制备新工艺研究[J]. *食品研究与开发*, 2014, (13): 15–18.
- Zhao W, Liu JJ, Su XF, *et al.* Study on the new process of preparing krill powder in Antarctica [J]. *Food Res Dev*, 2014, (13): 15–18.
- [16] 杜紫燕, 徐杰, 熊菁晶, 等. 南极磷虾粉贮藏过程中品质变化研究[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(9): 267–271, 277.
- Du ZY, Xu J, Xiong JJ, *et al.* Study on quality change of *Antarctic krill* powder during storage [J]. *Food Ind Technol*, 2018, 39(9): 267–271, 277.
- [17] 谢宁宁, 陈小娥, 方旭波, 等. 水产抗氧化肽研究进展[J]. *浙江海洋学院学报*, 2010, 29(1): 78–83.
- Xie NN, Chen XE, Fang XB, *et al.* Research progress of antioxidant peptides in aquatic products [J]. *J Zhejiang Ocean Univ*, 2010, 29(1): 78–83.
- [18] 刘艳秋. 大豆多肽生产工艺的优化及其生物活性的研究[D]. 长春: 吉

林农业大学, 2004.

- Liu YQ. Research on the optimization of production techniques of soybean polypeptides and its bio-activity [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2004.
- [19] 续洁琨, 姚新生, 栗原博. 抗氧化能力指数(ORAC)测定原理及应用[J]. *中国药理学通报*, 2006, 22(8): 10, 15–21.
- Xu JK, Yao XS, Li YB. Principle and application of antioxidant capacity index (ORAC) [J]. *Chin Phar Bul*, 2006, 22(8): 10, 15–21.

(责任编辑: 陈雨薇)

作者简介



郑景如, 主要研究方向为蛋白质资源开发与利用。

E-mail: 1967387217@qq.com



孙娜, 博士, 教授, 主要研究方向为蛋白质资源开发与利用。

E-mail: sunna1215@126.com