

蝇蛆酶解产物体外抗氧化活性研究

甘萍贵^{1,2}, 邓业成^{1,2*}, 邓志勇^{1,2}, 骆海玉^{1,2}

¹珍稀濒危动植物生态与环境保护教育部重点实验室(广西师范大学);

²广西师范大学生命科学学院, 桂林 541006

摘要: 本研究以鲜蝇蛆为原料, 采用两种蛋白酶水解制备出酶解产物, 研究了酶解产物的体外抗氧化活性; 采用凝胶过滤色谱检测酶解产物的多肽分子量分布, 用氨基酸自动分析仪测定其氨基酸组成和含量; 最后用超滤膜初步分离出分子量在 3 000 Da 以下的小分子肽组分, 并测定了其抗氧化活性。结果表明, 用中性蛋白酶和碱性蛋白酶水解蝇蛆获得的酶解产物均具有良好的自由基清除活性和 Fe²⁺螯合能力。两种酶解产物中分子量在 3 000 Da 以下的小分子肽均达到 97%以上。蝇蛆酶解产物主要包含 17 种氨基酸, 中性蛋白酶和碱性蛋白酶酶解产物与抗氧化相关的 3 类氨基酸(疏水性氨基酸、酸性氨基酸、碱性氨基酸)分别占 83.48%和 83.83%。经超滤膜初步分离后获得的分子量小于 3 000 Da 的小分子肽的抗氧化活性显著提高, 两种酶解产物 3 000 Da 以下的小分子肽组对 DPPH 自由基、ABTS 自由基、羟基自由基及 Fe²⁺螯合的 IC₅₀ 分别为 0.40 mg/mL 和 0.26 mg/mL、0.35 mg/mL 和 0.33 mg/mL、0.92 mg/mL 和 1.00 mg/mL 及 1.09 mg/mL 和 1.75 mg/mL。综上, 利用中性蛋白酶和碱性蛋白酶制备的蝇蛆小分子肽具有较强的抗氧化能力, 氨基酸种类丰富、营养全面, 为天然抗氧化药物的开发和应用提供后备资源和理论基础。

关键词: 蝇蛆; 酶解产物; 小分子肽; 氨基酸组成; 抗氧化活性

中图分类号: Q966 文献标识码: A

In vitro antioxidant activity of hydrolysates of fly maggots

GAN Ping-gui^{1,2}, DENG Ye-cheng^{1,2*}, DENG Zhi-yong^{1,2}, LUO Hai-yu^{1,2}

¹Key Laboratory of Ecology and Environmental Protection of Rare and Endangered Animals and Plants, Ministry of

Education(Guangxi Normal University); ²College of Life Sciences, Guangxi Normal University, Guilin 541006, China

Abstract: In this study, fresh fly maggots were used as raw materials, two kinds of proteases were used to prepare the protein hydrolysates, and the *in vitro* antioxidant activity of hydrolysates were investigated. The molecular weight distribution of peptides of hydrolysates were detected by gel filtration chromatography, and the amino acid composition and content were determined by automatic amino acid analyzer. Finally, the small peptide with molecular weights of less than 3 000 Da were preliminarily separated by ultrafiltration membranes and the antioxidant activities of the peptides were determined. The results showed that neutral protease hydrolysate and alcalase hydrolysate obtained by fly maggots both had good free radical scavenging activity and Fe²⁺ chelating ability. The fractions with molecular weights below 3 000 Da reached more than 97% for both hydrolysates. The hydrolysate mainly contained 17 amino acids, and the three classes of amino acids (hydrophobic amino acid, acidic amino acid, basic amino acid) associated with antioxidants in the neutral protease hydrolysate and alcalase hydrolysate were accounted for 83.48% and 83.83%, respectively. The antioxidant activities of small peptides with molecular weights less than 3 000 Da obtained after preliminary separation by ultrafiltration membranes were significantly improved, and the IC₅₀ of the small peptide with hydrolysates below 3 000 Da against DPPH radical, ABTS radical, hydroxyl radical, and Fe²⁺ chelating were 0.40 mg/mL and 0.26 mg/mL, 0.35 mg/mL and 0.33 mg/mL,

0.92 mg/mL and 1.00 mg/mL, 1.09 mg/mL and 1.75 mg/mL, respectively. In conclusion, both neutral protease hydrolysate and alcalase hydrolysate prepared from fly maggots has strong antioxidant capacity, rich amino acids and high nutrition, which can provide reserve resources and theoretical basis for the development and application of natural antioxidant medicines.

Key words: fly maggots; hydrolysates; small peptides; amino acid composition; antioxidant activity

自由基是细胞代谢过程中的副产物, 此外, 在某些外界不良因素及生活习惯影响下, 也会刺激机体产生大量自由基。自由基具有双重性, 正常情况下体内产生的自由基在自身抗氧化酶系统的清除下维持在无害的动态平衡状态, 但当机体出现病变或代谢不正常时就会出现过氧化的状况, 过量的自由基会导致 DNA 损伤、破坏蛋白质及细胞结构, 活性氧和自由基还与人体衰老有关^[1]。此外, 一些疾病的发生与体内自由基过多或清除能力下降有关, 如心血管疾病、肿瘤、炎症及帕金森病等神经退行性疾病^[2]。因此, 人们逐渐认识到要减少自由基给人体带来的伤害, 除了依靠自身的清除系统, 还需要寻找和挖掘一些外源性的自由基清除剂。常用的化学合成的抗氧化物质对人和动物具有潜在的危害和毒性^[3], 维生素 C、多酚、类黄酮等抗氧化活性物质存在稳定性差, 易受空气氧化、易热分解的问题。抗氧化肽因其安全高效、稳定性好、易吸收等特点受到了人们的关注。当前抗氧化肽主要从大豆、玉米、牛奶、水产动物等^[4]中获得, 对昆虫资源的开发比较少, 因此从蛋白资源丰富的蝇蛆中挖掘抗氧化肽具有开发潜力。

家蝇 (*Musca domestica* Linnaeus) 隶属双翅目、蝇科、蝇属, 是完全变态发育的昆虫, 蝇蛆即家蝇的幼虫, 具有营养价值高、繁殖快、产出高、便于人工培养的优点^[5]。当前蝇蛆蛋白的应用大多集中在直接运用原形干虫或蛋白粉作为饲料^[6], 因此如何将蝇蛆蛋白充分提取出来并降解为发挥特定功能活性的小分子肽具有重要意义。酶解法是生产生物活性肽的一种有效、安全的技术, 不同来源的蛋白酶酶切位点不同, 所获得的多肽的大小、种类等不同, 发挥的功能活性效果可能会有所不同。此前, 有研究从蝇蛆蛋白粉中获得了抗氧化肽^[7,8], 但直接从新鲜蝇蛆中酶解制备生物活性肽的研究很少, 新鲜蝇蛆体含有更广泛的蛋白底物, 如体内所分泌的免疫蛋白、肽类等活性物质值得充分挖掘。本研究探究了鲜蝇蛆中性蛋白酶及碱性蛋白酶酶解产物的体外抗氧化活性, 并探讨了两种酶解产物的多肽分子量分布及氨基酸组成对抗氧化活性的影响, 为蝇蛆抗氧化肽的深开发及利用提供理论基础和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料与试剂

蝇蛆幼虫鲜虫速冻品 (合肥大元生物科技有限公司); 中性蛋白酶 (批号: N25IS233323, 上海源叶生物科技有限公司); 碱性蛋白酶 (批号: S22IS226446, 上海源叶生物科技有限公司); 2,2-

联苯基-1-苦基肼基 (DPPH) (纯度: 96%, 批号: C15568523, 上海麦克林生化科技有限公司); 2,2-联氨-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐 (ABTS) (纯度: 98%, 批号: C15283881, 上海麦克林生化科技有限公司); 菲啰嗪 (纯度: 97%, 批号: C15683514, 上海麦克林生化科技有限公司); 五水硫酸铜 (分析纯, 批号: 0309142, 广东汕头市西陇化工厂); 酒石酸钾钠 (分析纯, 批号: 0509141, 广东汕头市西陇化工厂); 抗坏血酸 (分析纯, 批号: 2305051, 西陇科学有限公司); 氯化亚铁 (分析纯, 批号: 240108B2, 西陇科学有限公司); 水杨酸 (分析纯, 批号: B2111182, 西陇科学有限公司); 乙二胺四乙酸二钠 (分析纯, 批号: 2309181, 西陇科学有限公司)。

1.1.2 仪器与设备

PB40X2-166 破壁机 (美的集团股份有限公司); HH-4 数显恒温水浴锅 (常州国华电器有限公司); KH20RF 高速冷冻离心机 (湖南凯达科学仪器有限公司); Infinite®M200Pro 全波长多功能酶标仪 (瑞士 Tecan 公司); L-8900 全自动氨基酸分析仪 (日本日立公司); Waters 2695 高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司)

1.2 方法

1.2.1 蝇蛆提取液的制备

用自来水反复清洗蝇蛆去除杂物, 再用蒸馏水冲洗三次, 最后用滤纸吸干蛆体表面水分。称取一定量新鲜蝇蛆, 按一定料液比加入蒸馏水, 用破壁机捣成匀浆, 放至 4 °C 冰箱中浸提 24 h 后, 10 000 r/min 离心 20 min, 弃去沉淀及上层漂浮的脂肪, 获得蝇蛆提取液。

1.2.2 蝇蛆提取液的酶解

蝇蛆提取液在 90 °C 中水浴加热 10 min 使蛋白质变性, 取出冷却后, 分别加入中性蛋白酶和碱性蛋白酶进行酶解。中性蛋白酶酶解条件为: 酶添加量 8 000 U/g 鲜蝇蛆、料液比 1 : 10 (g/mL)、温度 50 °C、酶解时间 6 h。碱性蛋白酶酶解条件为: 酶添加量 12 000 U/g 鲜蝇蛆、料液比 1 : 8 (g/mL)、温度 60 °C、酶解时间 2 h。酶解结束后, 沸水浴下灭酶 15 min, 终止反应, 10 000 r/min 离心 20 min, 去除外源蛋白酶及未水解的大分子蛋白, 获得酶解产物, 用滤纸过滤后再用 0.45 μm 水系滤膜过滤, 保存于 4 °C 冰箱备用。

1.2.3 总肽含量测定

双缩脲试剂配制: 在 500 mL 蒸馏水中加入五水硫酸铜 1.5 g 和酒石酸钾钠 6.0 g 溶解, 在搅拌下加入 300 mL 10% NaOH 溶液, 定容至 1 L。

取 5 支试管编号, 按表 1 加入牛血清蛋白标准溶液 (15 mg/mL) 和蒸馏水, 并分别加入双缩脲试剂 4 mL, 混匀, 室温下 (37 °C) 显色 30 min, 用酶标仪测定 540 nm 处的吸光度值。以吸光值为纵坐标, 蛋白质浓度为横坐标, 绘制标准曲线。取 1 mL 蝇蛆酶解产物加入 4 mL 双缩脲试剂, 室温

下反应 30 min，测定 540 nm 处的吸光度值，根据标准曲线计算酶解产物的总肽含量。

表 1 蛋白标准曲线的制作

Table 1 Preparation of protein standard curves

序号 Serial number	0	1	2	3	4	5
15 mg/mL 标准蛋白 15 mg/mL standard protein (mL)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
蒸馏水 Distilled water (mL)	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0
蛋白浓度 Protein concentration (mg/mL)	0	3	6	9	12	15

1.2.4 抗氧化活性测定

1.2.4.1 DPPH 自由基清除活性测定

根据 Liu 等^[9]的方法测定 DPPH 自由基清除活性，将蝇蛆酶解产物用水稀释成不同多肽浓度梯度的样液，以相同质量浓度梯度的 V_C 做阳性对照，测定各反应组在 517 nm 处的吸光度值，根据公式 (1) 计算清除率 (R)。

$$R=[1-(A_1-A_2)/A_0]\times 100\% \quad (1)$$

式中， A_0 为水代替酶解产物反应的吸光值（空白对照）； A_1 为样品组吸光值； A_2 为甲醇或水代替反应试剂的吸光值（酶解产物本底吸光值）。

1.2.4.2 ABTS 自由基清除活性测定

参照 Lu 等^[10]的方法稍作修改，取 0.2 mL 不同多肽浓度梯度的蝇蛆酶解产物与 4 mL 工作液充分混匀，室温下反应 6 min，以相同质量浓度梯度的 V_C 做阳性对照，测定 734 nm 处的吸光度值，根据公式 (1) 计算清除率。

1.2.4.3 羟基自由基清除活性测定

根据 Liu 等^[9]的方法测定 DPPH 自由基清除活性，将蝇蛆酶解产物用水稀释成不同多肽浓度梯度的样液，以相同质量浓度梯度的 V_C 做阳性对照，测定各反应组在 510 nm 处的吸光度值，根据公式 (1) 计算羟基自由基清除活性。

1.2.4.4 Fe²⁺螯合能力测定

利用 Fe²⁺与菲啰啉络合形成的紫色络合物在 562 nm 处有特征吸收的原理，取 1 mL 不同多肽浓度梯度的蝇蛆酶解产物，依次加入 0.1 mL FeCl₂ (0.002 mol/L)、0.2 mL 菲啰啉 (0.005 mol/L) 和 2.7 mL 蒸馏水，混匀，室温下反应 10 min，以相同质量浓度梯度的 EDTA-2Na 为阳性对照，测定 562 nm 处的吸光度值^[11]，根据公式 (1) 计算金属离子螯合能力。

1.2.5 酶解产物多肽分子量分布测定

色谱条件：凝胶柱为 TSKgel 2000 SW×L (300 mm×7.8 mm)；流动相为乙腈：水：三氟乙酸=40：60：0.1 (V/V)；检测波长为 UV220 nm。以乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸、乙氨酸-乙氨酸-酪氨酸-精氨酸、杆菌肽、抑肽酶、细胞色素 C 为标准品^[12]。以标准品相对分子质量的对数 (lg Mw) 和对应保留时间 (T) 作线性回归得到相对分子质量校正曲线 ($\lg Mw=7.04-0.242T$, $R^2=0.9881$)。根据相对分子质量校正曲线方程，计算酶解产物的相对分子质量。

1.2.6 酶解产物氨基酸组成分析

根据 Xu 等^[13]的方法进行适当改进，对“1.2.2”中制备的酶解产物进行前处理。取酶解产物 3 mL，加入 3 mL 6 mol/L HCl，用氮吹仪吹气 15 min 后封管，置于烘箱中水解 (110 °C, 24 h) 后，取出冷却，定容至 25 mL，准确吸取定容后的样品 2 mL，用旋转蒸发仪脱酸 (60 °C) 至干燥，加入 2 mL 0.02 mol/L HCl，振荡混匀，过 0.22 μm 水系滤膜，上机检测。

1.2.7 超滤膜分离小分子肽

将蝇蛆酶解产物转移至分子截留量为 3 000 Da 的 15 mL 的 Millipore 超滤离心管中，4 000×g 离心 50 min，获得分子量在 3 000 Da 以下的小分子肽组分，收集在样品瓶中，保存于 4 °C 冰箱备用。

1.2.8 数据分析

运用 SPSS22.0 软件进行统计学分析， $P<0.05$ 被认为差异具有统计学意义；运用 Origin21.0 软件进行绘图。

2 结果与分析

2.1 蝇蛆酶解产物总肽含量

蛋白质浓度与吸光度值之间的标准曲线如图 1 所示，根据标准曲线进行计算，中性蛋白酶和碱性蛋白酶水解蝇蛆提取液获得的酶解产物总肽含量分别为 59.44 ± 3.94 mg/g 鲜蝇蛆和 66.47 ± 5.18 mg/g 鲜蝇蛆。

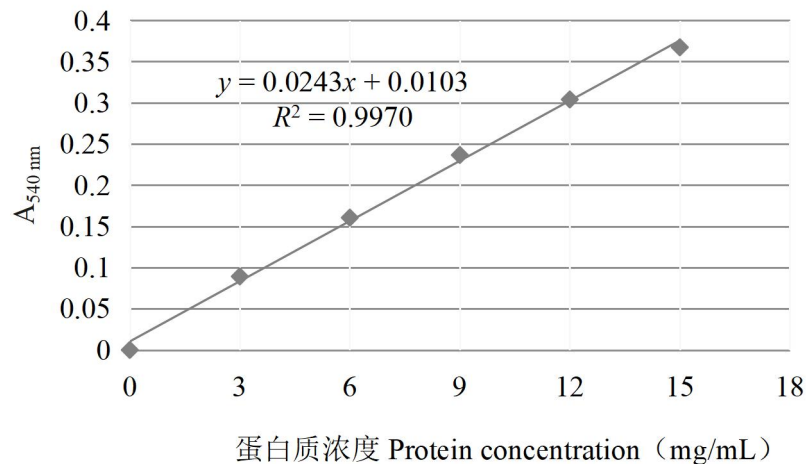


图 1 蛋白质浓度标准曲线

Fig. 1 Protein concentration standard curve

2.2 蝇蛆酶解产物的抗氧化活性

2.2.1 DPPH 自由基清除活性

两种蝇蛆酶解产物对 DPPH 自由基的清除能力如图 2 所示。酶解产物的 DPPH 自由基清除能力与其中的多肽含量存在剂量依赖性，中性蛋白酶和碱性蛋白酶酶解产物的 IC_{50} 分别为 0.37 mg/mL 和 0.36 mg/mL。当蝇蛆中性蛋白酶和碱性蛋白酶酶解产物中多肽浓度为 0.8 mg/mL 时，清除率分别达到 $80.63\% \pm 0.59\%$ 和 $80.96\% \pm 0.80\%$ ，与 Vc 的 DPPH 清除率 ($84.48\% \pm 0.14\%$) 相当。可见，蝇蛆中性蛋白酶和碱性蛋白酶酶解产物均具有较强的 DPPH 自由基清除活性，且清除能力接近。

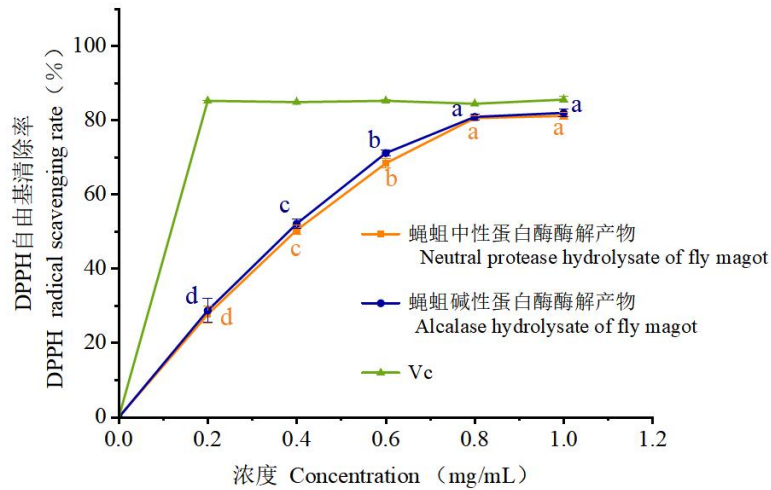


图 2 酶解产物对 DPPH 自由基的清除活性

Fig. 2 DPPH radical scavenging activity of hydrolysates

注：图中不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)，下同。

Note: Different lowercase letters in the figure indicate significant differences ($P < 0.05$), the same below.

2.2.2 ABTS 自由基清除活性

蝇蛆酶解产物对 ABTS 自由基的清除能力如图 3 所示，酶解产物对 ABTS 自由基的清除能力随着多肽含量的增加而增大，蝇蛆中性蛋白酶和碱性蛋白酶酶解产物对 ABTS 自由基的 IC_{50} 分别为 0.41 mg/mL 和 0.36 mg/mL。当蝇蛆中性蛋白酶和碱性蛋白酶酶解产物中多肽浓度为 1 mg/mL 时，对 ABTS 自由基的清除率最高，分别达到 $79.18\% \pm 1.66\%$ 和 $81.02\% \pm 0.15\%$ 。在测定浓度范围内，与 Vc 相比，酶解产物的 ABTS 自由基清除率较弱于 Vc。

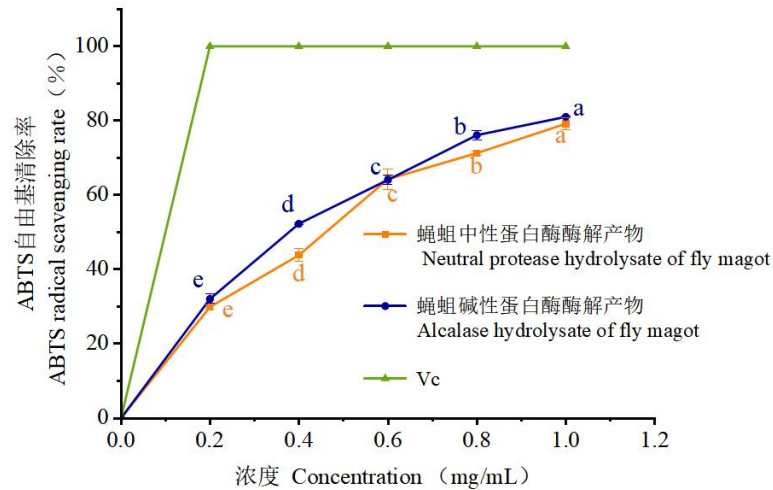


图3 酶解产物对 ABTS 自由基的清除活性

Fig. 3 ABTS radical scavenging activity of hydrolysate

2.2.3 羟基自由基清除活性

酶解产物对羟基自由基的清除活性如图 4 所示，蝇蛆中性蛋白酶和碱性蛋白酶酶解产物中的多肽对羟基自由基的 IC_{50} 分别为 1.57 mg/mL 和 1.79 mg/mL。两种酶解产物在多肽浓度为 5 mg/mL 时对羟基自由基清除活性都超过了 80%，表现出良好的羟基自由基清除活性。

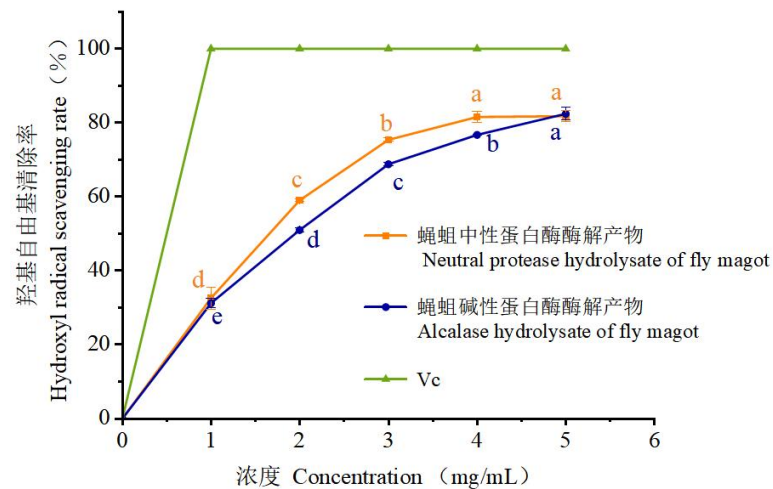


图4 酶解产物对羟基自由基的清除活性

Fig. 4 Hydroxyl radical scavenging activity of hydrolysate

2.2.4 Fe^{2+} 螯合能力

金属离子在价态改变过程中会促进电子传递从而缩短链引发时间，加快氧化速度，因此物质的金属离子螯合能力是评价抗氧化性能的重要方法之一。蝇蛆酶解产物 Fe^{2+} 螯合能力的测定结果如图 5 所示。酶解产物的 Fe^{2+} 螯合能力与其中的多肽含量存在剂量依赖性，中性蛋白酶和碱性蛋白酶酶解

产物中的多肽对 Fe^{2+} 螯合的 IC_{50} 分别为 2.01 mg/mL 和 3.50 mg/mL，在 5 mg/mL 时 Fe^{2+} 螯合能力最强，分别达到 $69.95\% \pm 0.82\%$ 和 $62.01\% \pm 0.83\%$ ，前者对 Fe^{2+} 的螯合能力强于后者。

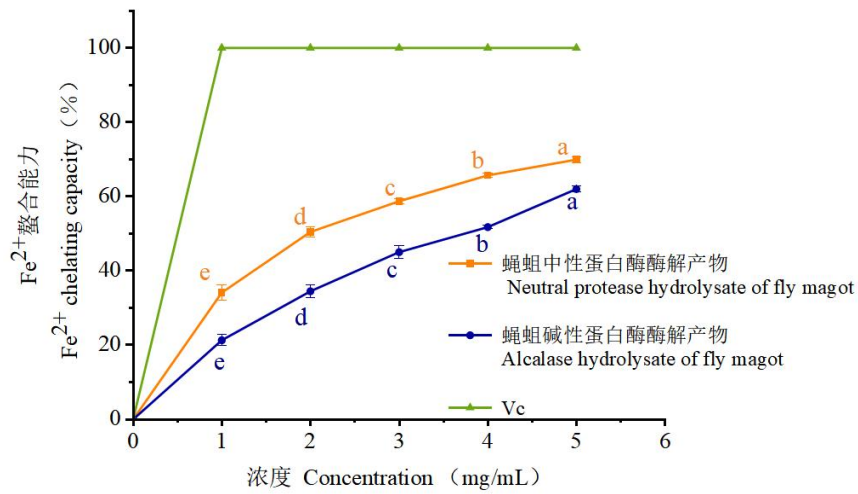


图 5 酶解产物的 Fe^{2+} 螯合能力

Fig. 5 Fe^{2+} chelating capacity of hydrolysate

2.3 酶解产物多肽的分子量分布

图 6 为两种蝇蛆酶解产物的多肽分子量分布情况，由图可见两种蛋白酶制备出的蝇蛆酶解产物在多肽分子量分布上无明显差异，酶解产物主要是由分子量小于 1 000 Da 的小分子肽组成。中性蛋白酶和碱性蛋白酶酶解产物分子量在 1 000 Da 以下的小分子肽分别为占 91.03%和 93.52%，分子量在 3 000 Da 以下的小分子肽分别为占 97.79%和 98.45%。

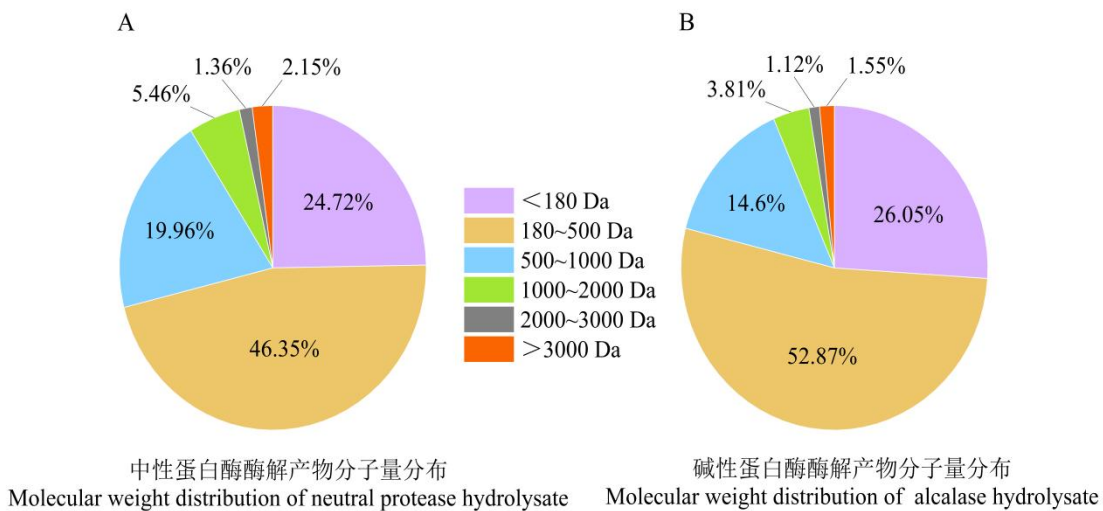


图 6 两种蝇蛆酶解产物的多肽分子量分布

Fig. 6 Peptide molecular weight distribution of two hydrolysates of fly maggots

2.4 酶解产物的氨基酸组成

多肽的抗氧化活性与其氨基酸组成有很大的关系，因此，我们对两种酶解产物的氨基酸组成和含量进行了测定，结果见表 2。测定结果显示，蝇蛆酶解产物主要由谷氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸等 17 种氨基酸组成，中性蛋白酶和碱性蛋白酶酶解产物中的必需氨基酸分别占氨基酸总量的 36.72%和 39.42%，与抗氧化相关的 3 类氨基酸（疏水性氨基酸、酸性氨基酸、碱性氨基酸）分别占氨基酸总量的 83.48%和 83.83%。

表 2 两种蝇蛆酶解产物的氨基酸组成

Table 2 Analysis of amino acid composition of two hydrolysates of fly maggots

氨基酸组成 Amino acid composition	中性蛋白酶酶解产物 Neutral protease hydrolysate		碱性蛋白酶酶解产物 Alcalase hydrolysate	
	含量	占比	含量	占比
	Content (mg/L)	Proportion (%)	Content (mg/L)	Proportion (%)
天冬氨酸 Asp	332.72	6.46	393.27	5.83
苏氨酸 Thr	306.81	5.96	440.79	6.53
丝氨酸 Ser	243.99	4.74	264.96	3.93
谷氨酸 Glu	1 042.93	20.25	1 341.49	19.88
甘氨酸 Gly	261.89	5.08	340.91	5.05
丙氨酸 Ala	445.38	8.65	579.45	8.59
半胱氨酸 Cys	38.35	0.74	44.06	0.66
缬氨酸 Val	238.14	4.62	327.32	4.85
蛋氨酸 Met	113.76	2.21	195.71	2.90
异亮氨酸 Ile	154.70	3.00	206.05	3.05
亮氨酸 Leu	292.87	5.69	368.51	5.46
酪氨酸 Tyr	355.54	6.90	482.38	7.15
苯丙氨酸 Phe	393.95	7.65	556.93	8.25
赖氨酸 Lys	391.14	7.59	564.58	8.37
组氨酸 His	113.84	2.21	141.34	2.09
精氨酸 Arg	165.79	3.22	186.06	2.76
脯氨酸 Pro	259.41	5.04	313.91	4.65
氨基酸总量 Total amino acids (mg/L)	5 151.21		6 747.70	
必需氨基酸 Essential amino acid (%)	36.72		39.42	

疏水性氨基酸 Hydrophobic amino acid (%)	43.75	44.90
酸性氨基酸 Acidic amino acids (%)	26.71	25.71
碱性氨基酸 Basic amino acid (%)	13.02	13.22

2.5 超滤分离后小分子肽的抗氧化活性

上述分子量分布检测结果显示两种蝇蛆酶解产物中分子量小于 3 000 Da 的小分子肽占到了 97% 以上, 因此我们利用分子截留量为 3 000 Da 的超滤膜离心管对酶解产物中小于 3 000 Da 的小分子肽进行了初步分离纯化, 分离出的小分子肽抗氧化活性如图 7 所示。中性蛋白酶和碱性蛋白酶酶解产物中分子量小于 3 000 Da 的小分子肽组分对 DPPH 自由基、ABTS 自由基、羟基自由基和 Fe^{2+} 螯合的 IC_{50} 分别为 0.40 和 0.26 mg/mL、0.35 和 0.33 mg/mL、0.92 和 1.00 mg/mL、1.09 和 1.75 mg/mL。经超滤分离后自由基清除活性和 Fe^{2+} 螯合能力有所提高。

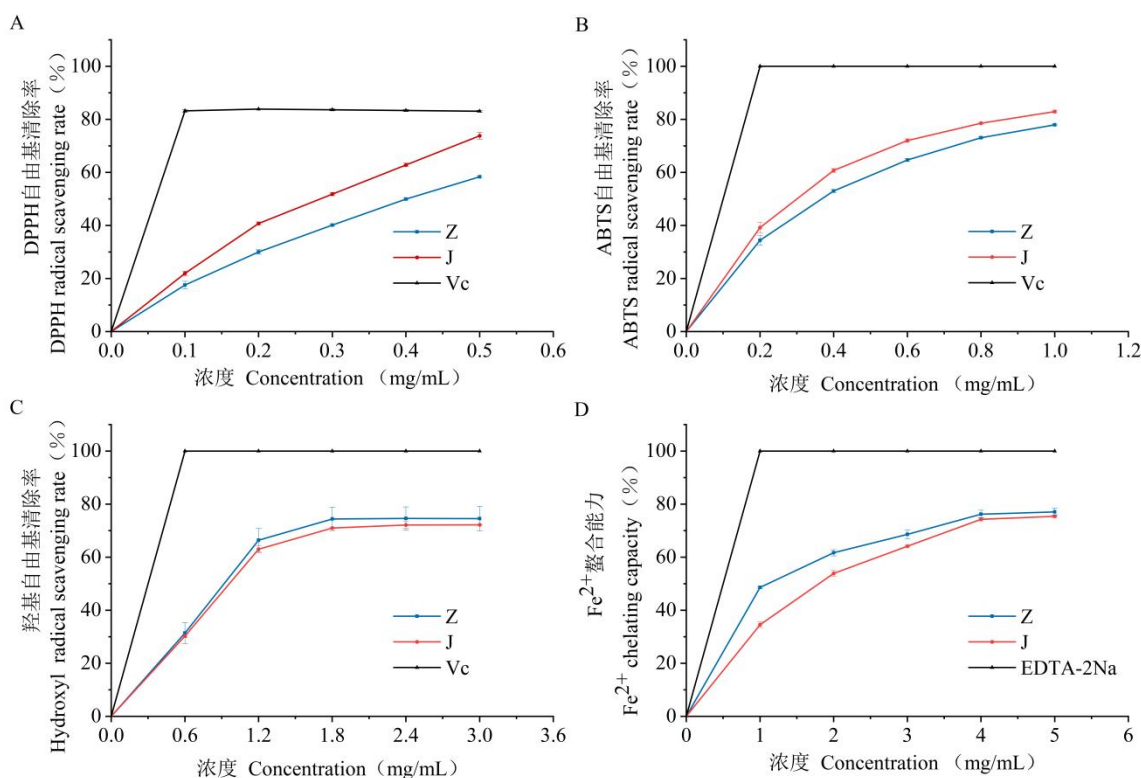


图 7 两种酶解产物中分子量在 3 000 Da 以下的小分子肽组分的抗氧化活性

Fig. 7 Antioxidant activity of small peptide fractions less than 3 000 Da in two hydrolysates

注: Z 和 J 分别指中性蛋白酶和碱性蛋白酶酶解产物中分子量小于 3 000 Da 的组分

Note: Z and J refer to the molecular weights less than 3 000 Da in the neutral protease hydrolysate and alcalase hydrolysate.

3 讨论与结论

李时珍早在《本草纲目》中就记载蝇蛆具有消肿解毒、消积化滞，辅助治疗热病谵妄、小儿疳积症等作用。但受到传统观念和印象的影响，人们对蝇蛆原形产品的应用受到了限制。此前大量研究证实小分子肽在抗菌、抗氧化、抗肿瘤等方面具有良好功效^[14, 15]，蝇蛆丰富的蛋白资源具有小分子肽开发的潜力和应用前景。本研究利用中性蛋白酶和碱性蛋白酶制备出的蝇蛆酶解产物对自由基有良好的清除活性，对 DPPH 自由基的 IC₅₀ 分别为 0.37 mg/mL 和 0.36 mg/mL，高于 Liu 等^[16]制备出的方格星虫多肽（1.197 mg/mL）、黄斑海蜇酶解产物（0.57 mg/mL）^[17]，与 Sun 等^[18]的家蝇蛹酶解产物相当（0.324 mg/mL）；对 ABTS 自由基的 IC₅₀ 分别为 0.41 mg/mL 和 0.36 mg/mL，优于鲟鱼水解产物（1.56 mg/mL）^[19]；对羟基自由基的 IC₅₀ 分别为 1.57 mg/mL 和 1.79 mg/mL，与方格星虫酶解产物相当（0.954 mg/mL）^[16]，但低于黄斑海蜇酶解产物（0.41 mg/mL）^[17]；中性蛋白酶酶解产物的 Fe²⁺螯合能力强于碱性蛋白酶酶解产物。通过酶解产物多肽分子量分布测定和氨基酸组成和含量分析发现，两种酶解产物在多肽分子量分布、氨基酸组成上无明显差异，两种酶解产物分子量小于 3 000 Da 的小分子肽均占到了 97% 以上，由此可以解释在上述测定的体外抗氧化活性相关指标中两种酶解产物显示出相似的抗氧化活性效果，有可能是小肽分子量组成相近，小肽发挥的活性功能显示出相似性。含有疏水性氨基酸（Tyr、Ala、Met、Val、Phe、Ile、Leu 和 Pro）的肽链有助于提高多肽的自由基清除能力^[20]，此外，酸性氨基酸（Glu、Asp）和碱性氨基酸（Arg、His、Lys）有助于抗氧化肽与金属离子发生螯合作用提高金属离子螯合能力和自由基清除能力^[21]，本研究两种酶解产物的氨基酸组成中与抗氧化活性相关的三类氨基酸（疏水氨基酸、酸性氨基酸、碱性氨基酸）分别占到了 83.48% 和 83.83%，由此可以推断蝇蛆酶解产物具有较强的抗氧化活性与其氨基酸组成密切相关，但小分子肽的抗氧化能力除了与分子质量、氨基酸组成有关外，还受氨基酸序列及结构等因素的影响，故对蝇蛆酶解产物中抗氧化肽的分离纯化及鉴定还有待进一步研究。此前有研究表明，分子量小于 3 000 Da 的小肽相比大分子量的肽显示出更高的抗氧化活性^[21-23]，本研究通过超滤膜初步分离后，分子量小于 3 000 Da 的组分抗氧化活性有所提高，与前人研究一致。

本研究利用中性蛋白酶和碱性蛋白酶制备水溶性蝇蛆小分子肽的工艺简单、高效、安全，制备过程不引进其他盐类或有机试剂。蝇蛆酶解产物具有较强的抗氧化活性，与当前研究较多的鱼类生物酶解产物的抗氧化活性相当^[16-19]，而蝇蛆相对渔产品的优势在于成本低。蝇蛆繁殖力强、培养周期短、易于大规模生产，并且能利用有机废弃物（如畜禽粪便、食品残渣等）进行转化，促进资源的循环利用和可持续发展。生物活性肽具有易吸收、稳定、高效、无毒无污染的特点，本研究利用蝇蛆酶解制备抗氧化肽，具有作为药物或添加剂，在生物医药、保健食品、化妆品等领域应用的潜力，为解决人们迫切需要健康绿色的药品来代替化学药物的需求，提供后备资源和理论基础。

参考文献

- 1 Reiter JR,Tan XD,Rosales-Corral S,et al.Mitochondria:central organelles for melatonin's antioxidant and anti-aging actions[J].Molecules,2018,23:509-509.
- 2 Zhao QY,Xu JX.Research progress on antioxidative property of ergothioneine and its intervention in oxidative stress-related diseases[J].Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2023,35:1081-1087.
- 3 Yang XX,Sun ZD,Wang WY,et al.Developmental toxicity of synthetic phenolic antioxidants to the early life stage of zebrafish[J].Sci Total Environ,2018,643:559-568.
- 4 Ildephonse H,Daniel N,Bertrand M,et al.Recent and novel processing technologies coupled with enzymatic hydrolysis to enhance the production of antioxidant peptides from food proteins:A review[J].Food Chem,2023,423:136313.
- 5 Jiang L,He J.Application of fly maggot and its extractions in animal production[J].J Dom Anim Ecol(家畜生态学),2020,41:71-77.
- 6 Xuan QX,Yin XF,Qi GH,et al.Advances in research progress of application of maggot protein in livestock production[J].Feed Ind(饲料工业),2020,41:13-16.
- 7 Fan Y,Wen C,Mokhtar D,et al.Preparation of housefly(*Musca domestica*)larvae protein hydrolysates:Influence of dual-sweeping-frequency ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis on yield,antioxidative activity,functional and structural attributes[J].Food Chem,2024,440:138253.
- 8 Bai ZH,Zhang AZ,Zhang CH,et al.Hydrolysis and antioxidant properties of housefly larva protein powder from different sources[J].Bio Resour(生物资源),2021,43:512-517.
- 9 Liu Y,Du YQ,Wang JH,et al.Structural analysis and antioxidant activities of polysaccharide isolated from Jinqian mushroom[J].Int J Biol Macromol,2014,64:63-68.
- 10 Lu X,Zhang LX,Sun Q,et al.Extraction,identification and structure-activity relationship of antioxidant peptides from sesame(*Sesamum indicum* L.)protein hydrolysate[J].Food Res Int,2018,116:707-716.
- 11 Manivasagan P,Sivasankar P,Venkatesan J,et al.Production and characterization of an extracellular polysaccharide from *Streptomyces violaceus* MM72[J].Int J Biol Macromol,2013,59:29-38.
- 12 Hou YK,Lu YF,Jiang YF,et al.Optimization and evaluation of enzymatic hydrolysis process of hybrid broilers skeleton [J].Sci Technol Food Ind(食品工业科技),2022,43:232-242.
- 13 Xu XY,Jiang KX,Guo JX,et al.Effect of silver nanoparticles feeding on structure and properties of silk [J].Acta Sericol Sin(蚕业科学),2023,49:150-158.
- 14 Sun CQ,Zhao XY, Jiao ZL,et al.The antimicrobial peptide AMP-17 derived from *Musca domestica* inhibits biofilm formation and eradicates mature biofilm in *Candida albicans*[J].Antibiotics,2022,11:1474.
- 15 Kumar DD,Chanchal S,Yellamandayya V,et al.CopA3 peptide inhibits MDM2-p53 complex stability in colorectal cancers and activates p53 mediated cell death machinery[J].Life Sci,2023,318:121476.
- 16 Liu H,Qi Y,Tang XN,et al.Antioxidant activity and structural identification of enzymatic hydrolysis peptides from *Sipunculus nudus* L[J].Chin J Mar Drugs(中国海洋药物),2022,41:49-56.
- 17 Sun ZL,Yang ZJ,Liu X,et al.Study on enzymatic hydrolysis of *Rhopilema hispidum* Vanhoffen and its biological activities *in vitro* [J].Food Ind(食品工业),2015,36:20-23.
- 18 Sun TT,Yang WZ,Zhang SC,et al.Composition analysis of musca domestica pupa and preparation of antioxidant peptides [J].Feed Ind(饲料工业),2019,40:30-37.
- 19 Gao RC,Shen Y,Shu WH,et al.Optimization of enzymatic conditions of sturgeon muscles and their anti- inflammatory potential[J].J Food Qual,2020,2020:9698134.
- 20 Ge XL,Gu W,Xu YJ.Relationship of amino acids composition and antioxidative capacity of hydrolyzed protein from hippocampus kuda bleeker[J].J Nuc Agri Sci(核农学报),2019,33:322-329.
- 21 Wang L,Li X,Liu WY,et al.Antioxidant activities and amino acid composition of peptides extracted from pickled sauced

meat[J].Meat Res(肉类研究),2019,33:19-24.

- 22 Li YH,Li JH, Ji HW, et al. Isolation, purification and structural analysis of antioxidant peptides from *Sardinops sagax*[J].J Chin Ins Food Sci Tech(中国食品学报),2021,21:229-238.
- 23 Hashem AMA, Venmarath A, Kudre TG. Preparation, purification, and identification of novel antioxidant peptides from red-bellied pacu(*Piaractus brachypomus*) fish meat protein hydrolysate[J]. Food Sci Biotechnol, 2023, 32: 2057-2068.

收稿日期: 2024-09-19 接受日期:

基金项目:

*通信作者 E-mail: dyecheng@163.com