



李鑫, 周鹏飞, 周东来, 杨琼, 邝哲师. 黑水虻幼虫蛋白及其酶解产物的抗氧化活性研究 [J]. 环境昆虫学报, 2022, 44 (2): 453–461.

# 黑水虻幼虫蛋白及其酶解产物的抗氧化活性研究

李鑫, 周鹏飞, 周东来, 杨琼, 邝哲师\*

(广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 广州 510610)

**摘要:** 为了探究黑水虻 *Hermetia illucens* 幼虫蛋白及酶解产物的抗氧化活性, 以鲜活黑水虻幼虫冻虫为原料, 采用碱提酸沉法提取黑水虻蛋白, 通过碱性蛋白酶、菠萝蛋白酶、风味蛋白酶、木瓜蛋白酶对其蛋白质溶液进行酶解, 分别从 2, 2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸 (ABTS) 自由基、羟自由基、1, 1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH) 自由基 3 个方面对黑水虻蛋白及其酶解液的抗氧化能力进行测定。结果表明: 黑水虻幼虫蛋白及 4 种酶解后的蛋白肽具有较好的抗氧化活性, 其中黑水虻幼虫蛋白对 ABTS 自由基、羟自由基、DPPH 自由基的半抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 分别为 2.91、0.232、0.764 mg/mL, 而酶解过后的蛋白肽具有更强的抗氧化活性, 对 ABTS 自由基、羟自由基、DPPH 自由基的最低半抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 分别为 0.295、0.082、0.354 mg/mL。本研究初步证明了酶解制备抗氧化肽的可行性, 为昆虫蛋白资源的利用和无抗饲料的研制提供了新的研究思路。

**关键词:** 黑水虻; 酶解法; 抗氧化肽

中图分类号: Q965; S89

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2022) 02-0453-09

## Antioxidant activity of protein and its enzymatic hydrolysate from the black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae

LI Xin, ZHOU Peng-Fei, ZHOU Dong-Lai, YANG Qiong, KUANG Zhe-Shi\* (Sericultural & Agri-Food Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510610, China)

**Abstract:** In order to explore the antioxidant activity of protein and enzymatic hydrolysates of black water fly larvae, the protein of black water fly larvae was extracted by alkali extraction and acid precipitation. The protein solution was hydrolyzed by alkaline protease, bromelain, flavourzyme and papain. Hydroxyl radical, 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical three aspects of the black water fly protein and its enzymatic hydrolysate antioxidant capacity were determined, and polypropylene gel electrophoresis for molecular weight determination. The results showed that: The protein and four kinds of protein peptides of black water fly larvae had good antioxidant activity. The half inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) of the protein of black water fly larvae to ABTS free radical, hydroxyl free radical and DPPH free radical were 2.91, 0.232 and 0.764 mg/mL, respectively. The protein peptides of black water fly larvae had stronger antioxidant activity to ABTS free radical, hydroxyl free radical and DPPH free radical. The lowest half inhibitory concentrations ( $IC_{50}$ ) of the three groups were 0.295, 0.082 and 0.354 mg/mL. This study preliminarily proved the feasibility of preparing antioxidant peptides by enzymatic hydrolysis, and provided a new research idea for the utilization of insect protein resources and the development of non-resistant feed.

**Key words:** Black soldier fly; enzymolysis; antioxidant peptide

基金项目: 广东省自然资源厅促进海洋经济发展专项资金项目 (2019014); 广东省科技专项 (“大专项+任务清单”) 项目—清远市乡村振兴和农业科技创新项目 (2020DZX016); 广东省农业科学院院长基金项目 (201902)

作者简介: 李鑫, 男, 1992 年生, 山东济宁人, 硕士, 研究实习员, 主要研究方向为昆虫资源化利用, E-mail: xinl0605@163.com

\* 通讯作者 Author for correspondence: 邝哲师, 男, 研究员, 主要研究方向为农业微生物, E-mail: kzs1234@163.com

收稿日期 Received: 2020-12-04; 接受日期 Accepted: 2021-05-21

在生命体中,机体的氧化与抗氧化一般处于一种动态的平衡,随着细胞代谢的进行,机体会产生具有高氧化活性的自由基,如果自由基产生过多或清除较少,可能会导致机体处于氧化应激状态 (Gülçin, 2012; Li *et al.*, 2015)。研究表明这种氧化应激状态会导致细胞自噬、凋亡,并引起组织的不可逆损伤 (Shen *et al.*, 2017)。常用的化学合成抗氧化剂如丁基羟基茴香醚 (BHA)、没食子酸丙酯 (PG)、丁基羟基甲苯 (BHT) 和叔丁基氢醌 (TBHQ) 等 (张强, 2020), 及天然抗氧化物质如抗坏血酸 (Vc)、谷胱甘肽 (GSH) 以及一些酶类 (张泽生等, 2017)。尽管化学合成的抗氧化物质具有高效、廉价的特点,但是其潜在的安全隐患,使其应用受到限制,因此人们把更多的关注转移到天然抗氧化物质。

近年来,大量研究证明昆虫蛋白及昆虫水解蛋白具有较强的抗氧化特性,如丰年虫 *Chirocephalus diaphanous* (聂路等, 2011)、大麦虫 *Zophobas morio* (郭倩等, 2011)、黑水虻 *Hermitia illucens* (许彦腾等, 2014)、蜜蜂 *Apis mellifera* (Dong *et al.*, 2016)、编织蚁 *Oecophylla smaragdina* (Werawich *et al.*, 2017) 等。

黑水虻 *Hermitia illucens*, 英文名为 Black soldier fly, 学名为亮斑扁角水虻, 是双翅目 Diptera 水虻科 Stratiomyidae 的一种陆生、营腐食性生活的昆虫 (柴志强等, 2012; 沈媛等, 2012)。目前对黑水虻的研究主要集中在黑水虻幼虫饲养、畜禽粪便处理、饲用价值开发等方面 (邓文辉等, 2019; 袁橙等, 2019; 陈柏宇等, 2020)。近些年来部分学者开始对黑水虻幼虫蛋白 (black soldier fly larva proteins, BSFLP) 制备 (陈苏婉等, 2019; 朱定等, 2020) 与抗氧化活性进行研究 (许彦腾等, 2014), 而基于 BSFLP 及其酶解产物的抗氧化活性研究较少。本文以鲜活黑水虻幼虫冻虫为对象, 采用碱提酸沉法制备黑水虻幼虫蛋白, 并通过碱性蛋白酶 (Alkaline)、菠萝蛋白酶 (Bromelain)、风味蛋白酶 (Flavourzyme)、木瓜蛋白酶 (Papain) 对其蛋白质溶液进行酶解, 分别从 ABTS 自由基、羟自由基、DPPH 自由基 3 个方面对黑水虻蛋白及其酶解液的抗氧化能力进行测定, 旨在初步了解黑水虻蛋白及其酶解产物的抗氧化能力, 为黑水虻抗氧化肽的研究提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

黑水虻幼虫购自广西上林县方圆农资店; 定量 (TP) 测定试剂盒 (BCA 法)、DPPH 自由基清除能力试剂盒、总抗氧化能力 (T-AOC) 测试盒 (ABTS 法)、羟自由基测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所; 碱性蛋白酶 (Alkaline)、菠萝蛋白酶 (Bromelain)、风味蛋白酶 (Flavourzyme)、木瓜蛋白酶 (Papain) 购自上海源叶生物科技有限公司; Vc (标准品) 购自广州市齐云生物技术有限公司; 氢氧化钠、浓盐酸、冰醋酸、无水乙醇购自天津市大茂化学试剂厂。

### 1.2 仪器与设备

DHG-9240A 电热恒温鼓风干燥箱, 上海一恒科学仪器有限公司; HZQ-X300C 恒温振荡器, 上海一恒科学仪器有限公司; SIGMA-3K15 高速冷冻离心机, 德国 SIGMA 仪器有限公司; DF-401S 集热式恒温加热磁力搅拌器, 巩义市予华仪器有限责任公司; PHS-3E pH 计, 上海雷磁仪器有限公司; Synergy H4 多功能酶标仪, 美国 BioTek 仪器有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 样品制备

取新鲜黑水虻 5 龄幼虫适量, 置于冰箱冷冻, 将冰冻幼虫使用粉碎机粉碎, 制成虫浆后于  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱中冷冻保存。取上述冷冻虫浆适量, 于  $50^{\circ}\text{C}$  烘箱中干燥 48 h 后去除杂质, 置于打粉机中研碎, 过 60 目筛网, 制成虫粉作为送检样品。

#### 1.3.2 BSFLP 粗提液的制备

参照许彦腾等 (2014) 的方法并略有改动, 取适量冷冻虫浆, 放入锥形瓶中, 按照料液比 1:22 加入  $0.61\text{ mol/L}$  氢氧化钠溶液, 在  $53.2^{\circ}\text{C}$ ,  $200\text{ r/min}$  的条件下摇床反应 2 h。将提取液通过纱布进行过滤, 除去虫浆中的部分不溶物, 将过滤好的提取液转入离心管中进行离心 ( $8\ 000\text{ r/min}$ ) 10 min。离心结束后取上清液, 并用  $1\text{ mol/L}$  盐酸调节 pH 至等电点 4.8。离心 ( $8\ 000\text{ r/min}$ ) 10 min, 提取沉淀并用去离子水复溶, 用  $0.1\text{ mol/L}$  氢氧化钠溶液调节 pH 至 7.0, 获得 BSFLP 粗提液, 保存于  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱备用。

### 1.3.3 BSFLP 的酶解

将适量 BSFLP 溶液加入试管, 放入水浴锅中, 调节水浴锅的温度使其达到适宜酶解温度。用 NaOH 或 HCl 调节到适当的 pH, 并按照比例加入

适量的蛋白酶, 酶解条件见表 1 (朱作艺等, 2020)。酶解结束后, 将 BSFLP 酶解液放入 100℃ 水浴锅中迅速灭酶 10 min, 冷却后, 8 000 r/min 离心 10 min, 取上清液。

表 1 4 种蛋白酶的酶解条件  
Table 1 Optimal reaction conditions of four kinds of enzymes

| 酶种类<br>Types of enzymes | 加酶量 (U/g)<br>Enzyme amount | pH  | 温度 (°C)<br>Temperature | 时间 (h)<br>Time | 料液比<br>Material liquid ratio |
|-------------------------|----------------------------|-----|------------------------|----------------|------------------------------|
| 木瓜蛋白酶 Papain            | 6 000                      | 6.0 | 60                     | 4              | 1:10                         |
| 碱性蛋白酶 Alkaline          | 6 000                      | 8.4 | 60                     | 4              | 1:10                         |
| 菠萝蛋白酶 Bromelain         | 6 000                      | 6.5 | 60                     | 4              | 1:10                         |
| 风味蛋白酶 Flavourzyme       | 6 000                      | 6.1 | 60                     | 4              | 1:10                         |

### 1.3.4 蛋白质含量测定

BSFLP 和 4 种蛋白酶酶解液的蛋白质含量测定均按照试剂盒说明书进行。

### 1.3.5 抗氧化活性的测定

分别配置不同浓度的 BSFLP 和 4 种蛋白酶酶解液, 并采用 Vc 作为阳性对照。BSFLP 和 4 种蛋白酶酶解液对 ABTS 自由基、羟自由基、DPPH 自由基的清除能力测定均按照试剂盒说明书进行。

### 1.3.6 黑水虻幼虫蛋白质的氨基酸组成测定

黑水虻幼虫粉送至广东省分析测试研究所作氨基酸组分分析, 测定参照中华人民共和国国家标准 (GB 5009.124-2016) 中的方法进行, 采用氨基酸分析仪 (茚三酮柱后衍生离子交换色谱仪) 测定黑水虻中的 16 种水解氨基酸。

## 1.4 数据处理及分析

所有实验均重复 3 次, 结果取平均值, 实验结果以平均数 ± 标准差进行表示。采用 SPSS 19.0 软件进行分析, Origin 2017 软件作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 BSFLP 的氨基酸组成分析

BSFLP 的氨基酸组成, 委托广东省分析测试研究所 (中国广州分析测试中心) 进行测定, 测定结果如表 3 所示。在测定的 16 种氨基酸中, 通过计算得出疏水性氨基酸的占比为 39.8%, 此外在测定的 16 种氨基酸中, 谷氨酸 (GLU) 含量占比最高, 为 18.3%, 其次为天冬氨酸 (ASP), 占氨基酸总体含量的 10.1%。

表 2 黑水虻幼虫的氨基酸组成

Table 2 Composition and content of amino acid of *Hermetia illucens* (black soldier fly) larvae

| 氨基酸 Amino acids | 含量 (%) Content |
|-----------------|----------------|
| 谷氨酸 GLU         | 18.3           |
| 天冬氨酸 ASP        | 10.1           |
| 脯氨酸 PRO         | 9.0            |
| 赖氨酸 LYS         | 7.2            |
| 丙氨酸 ALA         | 6.6            |
| 甘氨酸 GLY         | 5.9            |
| 缬氨酸 VAL         | 5.9            |
| 组氨酸 HIS         | 5.9            |
| 精氨酸 ARG         | 5.9            |
| 亮氨酸 LEU         | 5.7            |
| 苯丙氨酸 PHE        | 5.1            |
| 异亮氨酸 ILE        | 4.1            |
| 丝氨酸 SER         | 3.6            |
| 苏氨酸 THR         | 3.5            |
| 酪氨酸 TYR         | 2.0            |
| 蛋氨酸 Met         | 1.5            |

注: 疏水性氨基酸包括 TYR、ALA、MET、VAL、PHE、ILE、LEU 和 PRO。Note: Hydrophobic amino acids included TYR, ALA, MET, VAL, PHE, ILE, LEU and PRO.

### 2.2 BSFLP 的抗氧化活性

#### 2.2.1 总抗氧化能力 (ABTS 法)

BSFLP 溶液和 Vc 对 ABTS 自由基的清除率随着浓度的增加而增大, 且呈现出一定的剂量效应。

在 0~0.2 mg/mL 浓度范围内, Vc 溶液对 ABTS 自由基的清除率随着溶液浓度的增加而显著增加, 在浓度达到 0.2 mg/mL 后, 增长速率趋于平缓, 最大清除率为 91.3%。对 Vc 进行多项式模型拟合, 拟合方程为:  $Vc y = -857.748x^2 + 612.987x - 0.923$  ( $R^2 = 0.996$ ), 通过拟合方程计算出 Vc 的半抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) (0.96 mg/mL)。BSFLP 溶液对 ABTS 自由基的清除率随着溶液质量浓度的增加而增加, 表现出明显的剂量效应关系。对 BSFLP 进行多项式拟合, 其拟合方程为:  $BSFLP y = -1.435x^2 + 20.902x + 1.309$  ( $R^2 = 0.997$ ), 通过拟合方程的计算出 BSFLP 的  $IC_{50}$  (2.91 mg/mL) (图 1)。

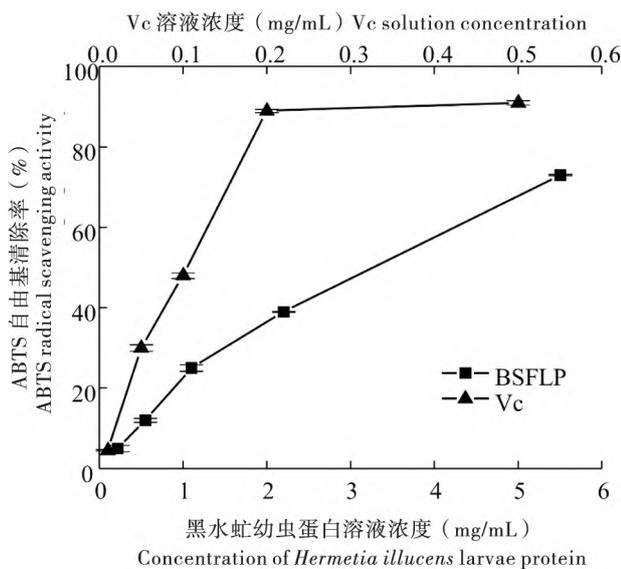


图 1 BSFLP 的 ABTS 自由基清除能力

Fig. 1 ABTS radical scavenging activity of *Hermetia illucens* larvae protein

## 2.2.2 羟自由基清除活性

阳性对照 Vc 在 0.05~0.5 mg/mL 范围内, 对羟自由基的清除率随着溶液质量浓度的增加而增加, 呈现出良好的线性关系, 线性拟合方程为:  $Vc y = 173.333x + 5.867$  ( $R^2 = 0.994$ ), 通过拟合方程得到 Vc 的  $IC_{50}$  (0.229 mg/mL)。BSFLP 溶液对羟自由基的清除率随着质量浓度的增加而逐渐上升, 但增加速度逐渐趋于平缓。对 BSFLP 进行多项式模型拟合, 其拟合方程为:  $BSFLP y = -225.789x^2 + 259.613x + 1.787$  ( $R^2 = 0.926$ ), 通过拟合方程得到 BSFLP 的  $IC_{50}$  为 0.232 mg/mL, 与阳性对照 Vc 的  $IC_{50}$  接近 (图 2)。

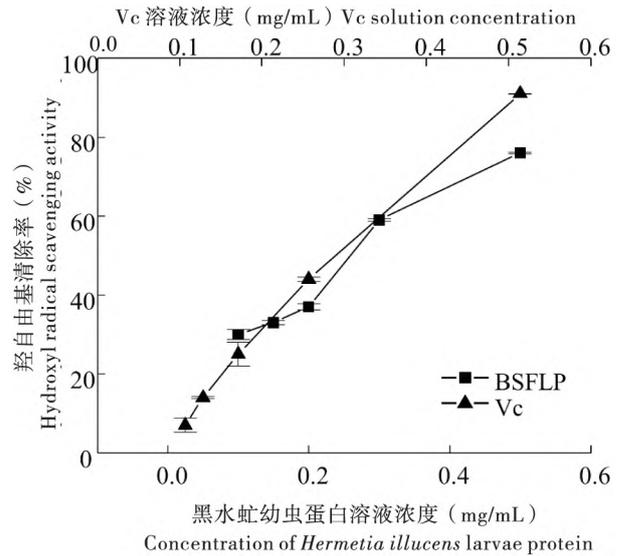


图 2 BSFLP 的羟自由基清除能力

Fig. 2 Hydroxyl radical scavenging activity of *Hermetia illucens* larvae protein

## 2.2.3 DPPH 自由基清除活性

BSFLP 溶液和阳性对照 Vc 随着质量浓度的增加, 对 DPPH 自由基的清除率逐渐增加, BSFLP 溶液在 0~2.5 mg/mL 的范围内的清除率与溶液浓度基本呈线性关系, 其线性拟合方程为:  $BSFLP y = 25.366x + 21.794$  ( $R^2 = 0.915$ ), 通过拟合方程计算其  $IC_{50}$  为 0.794 mg/mL。阳性对照组 Vc 在 0~0.025 mg/mL 范围内剂量效应明显, 当质量浓度达到 0.05 mg/mL 时, 清除率趋于平缓且达到最大值 (95%)。对 Vc 进行多项式模型拟合, 其拟合方程为:  $Vc y = -18160.383x^2 + 2539.281x + 21.232$  ( $R^2 = 0.916$ ), 通过拟合方程计算其  $IC_{50}$  为 0.0124 mg/mL。相比于阳性对照 Vc, BSFLP 表现出的抗氧化活性一般 (图 3)。

## 2.3 BSFLP 酶解液的抗氧化活性

### 2.3.1 总抗氧化能力

BSFLP 溶液和风味蛋白酶酶解液 (Flavourzyme enzymatic hydrolysate, Feh)、菠萝蛋白酶酶解液 (Bromelain enzymatic hydrolysate, Beh)、碱性蛋白酶酶解液 (Alkaline enzymatic hydrolysate, Aeh)、木瓜蛋白酶酶解液 (Papain enzymatic hydrolysate, Peh) 均表现出一定的 ABTS 自由基清除能力, 且都随着溶液质量浓度的增加, 清除率不断增加。然而当浓度达到某一特定值时 (如 Feh, 当质量浓度达到 0.5 mg/mL 时清除率增加速率趋于平缓), 清除速率的增加开始变慢。对

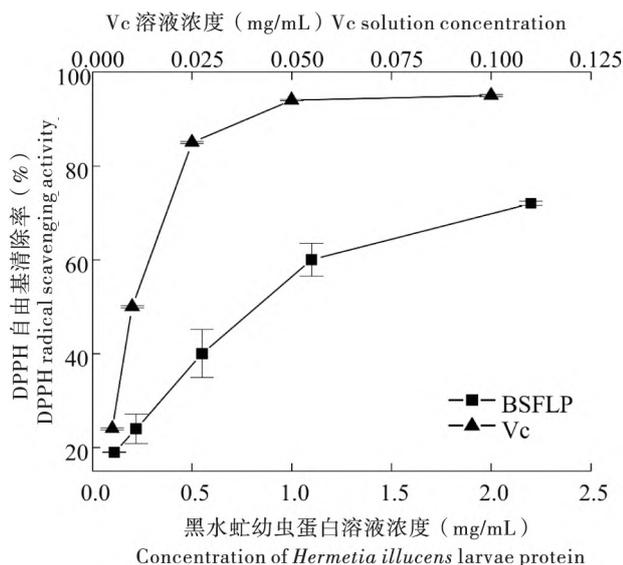


图3 BSFLP 的 DPPH 自由基清除能力

Fig. 3 DPPH radical scavenging activity of *Hermetia illucens* larvae protein

BSFLP 溶液和酶解液进行多项式模型拟合, 得到的多项式模型分别为 BSFLP:

$$y = 1.09 + 20.92x - 1.435x^2 (R^2 = 0.997)$$

$$\text{Feh: } y = 33.81 + 60.105x - 17.77x^2 (R^2 = 0.996)$$

$$\text{Beh: } y = 20.61 + 35.289x - 5.811x^2 (R^2 = 0.996)$$

$$\text{Aeh: } y = 19.791 + 21.962x - 2.65x^2 (R^2 = 0.995)$$

$$\text{Peh: } y = 20.33 + 25.195x - 3.72x^2 (R^2 = 0.982)$$

通过拟合方程计算出 BSFLP 溶液和 4 种酶解液的  $IC_{50}$  分别为 BSFLP  $IC_{50}$  (2.91 mg/mL)、Feh  $IC_{50}$  (0.295 mg/mL)、Beh  $IC_{50}$  (0.996 mg/mL)、Aeh  $IC_{50}$  (1.733 mg/mL)、Peh  $IC_{50}$  (1.51 mg/mL)。BSFLP 和 4 种酶解液的 ABTS 自由基清除能力大小顺序为: Feh > Beh > Peh > Aeh > BSFLP, 其中 4 种酶解液的 ABTS 自由基清除能力均高于 BSFLP 溶液, 清除能力最强的 Feh 约为 BSFLP 溶液 ABTS 自由基清除能力的 9.86 倍, 因此酶解液具有更强的 ABTS 自由基清除能力 (图 4)。

### 2.3.2 羟自由基清除能力

BSFLP 溶液和 Feh、Beh、Aeh、Peh 均表现出一定的羟自由基清除能力, 且随溶液质量浓度的增加, 清除能力逐渐增强。Feh、Aeh、Peh 三种酶解液中, 当质量浓度达到一定值时, 羟自由基的清除率增加速度趋于平缓, 当质量浓度为 0.5 mg/mL 时, Peh 的清除率达到最大值 (80%)。对 BSFLP 溶液和 4 种酶解液进行多项式模型拟合, 得到的

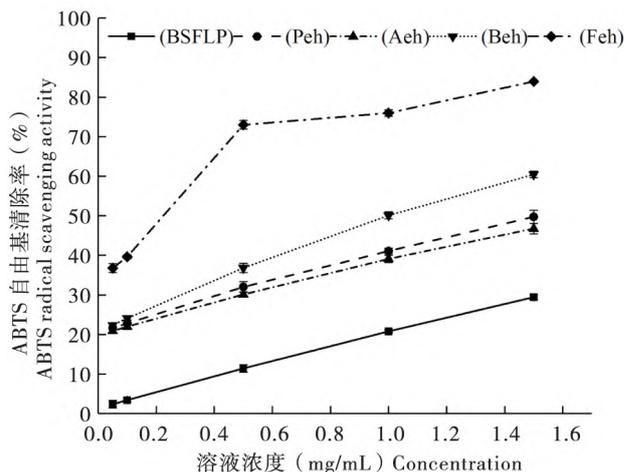


图4 酶解液的 ABTS 清除能力

Fig. 4 ABTS radical scavenging activity of enzymatic hydrolysate

多项式模型分别为 BSFLP:

$$y = 1.787 + 259.6x - 225.8x^2 (R^2 = 0.976)$$

$$\text{Feh: } y = -12.287 + 211.093x - 106.7x^2 (R^2 = 0.965)$$

$$\text{Beh: } y = -9.887 + 223.598x - 157x^2 (R^2 = 0.993)$$

$$\text{Aeh: } y = -4.124 + 226.04x - 132.511x^2 (R^2 = 0.968)$$

$$\text{Peh: } y = 31.483 + 207.509x - 219.625x^2 (R^2 = 0.987)$$

通过拟合方程计算出 BSFLP 溶液和 4 种酶解液的 ( $IC_{50}$ ) 分别为 BSFLP  $IC_{50}$  (0.232 mg/mL)、Feh  $IC_{50}$  (0.36 mg/mL)、Beh  $IC_{50}$  (0.357 mg/mL)、Aeh  $IC_{50}$  (0.288 mg/mL)、Peh  $IC_{50}$  (0.082 mg/mL)。BSFLP 溶液和 4 种酶解液的羟自由基清除能力大小顺序为: Peh > BSFLP > Aeh > Beh > Feh。4 种酶解液中只有 Peh 的羟自由基清除能力强于 BSFLP 溶液, 约为 BSFLP 溶液羟自由基清除能力的 2.82 倍, 其余的 3 种酶解液的羟自由基清除能力略低于 BSFLP 溶液 (图 5)。

### 2.3.3 DPPH 自由基清除能力

BSFLP 溶液和 Feh、Beh、Aeh、Peh 均表现出一定的 DPPH 自由基清除能力, 且随溶液质量浓度的增加, 清除能力逐渐增加。对 BSFLP 溶液和 4 种水解溶液进行多项式模型拟合, 得到的多项式模型分别为 BSFLP:

$$y = 12.132 + 59.246x - 14.55x^2 (R^2 = 1.00)$$

$$\text{Feh: } y = 3.596 + 92.329x - 23.109x^2 (R^2 = 0.997)$$

$$\text{Beh: } y = 11.176 + 137.317x - 78.54x^2 (R^2 = 0.995)$$

$$\text{Aeh: } y = 4.738 + 64.746x - 14.292x^2 (R^2 = 0.997)$$

$$\text{Peh: } y = 7.531 + 92.338x - 29.093x^2 (R^2 = 0.998)$$

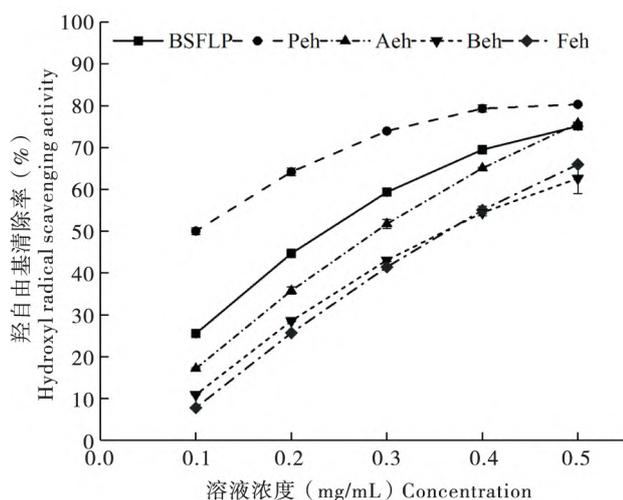


图5 酶解液的羟自由基清除能力

Fig. 5 Hydroxyl radical scavenging activity of enzymatic hydrolysate

通过拟合方程计算出 BSFLP 溶液和 4 种酶解液的  $IC_{50}$  分别为 BSFLP  $IC_{50}$  (0.794 mg/mL)、Feh  $IC_{50}$  (0.589 mg/mL)、Beh  $IC_{50}$  (0.354 mg/mL)、Aeh  $IC_{50}$  (0.862 mg/mL)、Peh  $IC_{50}$  (0.558 mg/mL)。BSFLP 溶液和 4 种酶解液的羟自由基清除能力大小顺序为: Beh > Peh > Feh > BSFLP > Aeh。4 种酶解液的羟自由基清除能力大多数强于 BSFLP 溶液, 其中 Beh 是 BSFLP 溶液 DPPH 自由基清除能力的 2.24 倍, 因此, 酶解液具有更好的 DPPH 自由基清除能力 (图 6)。

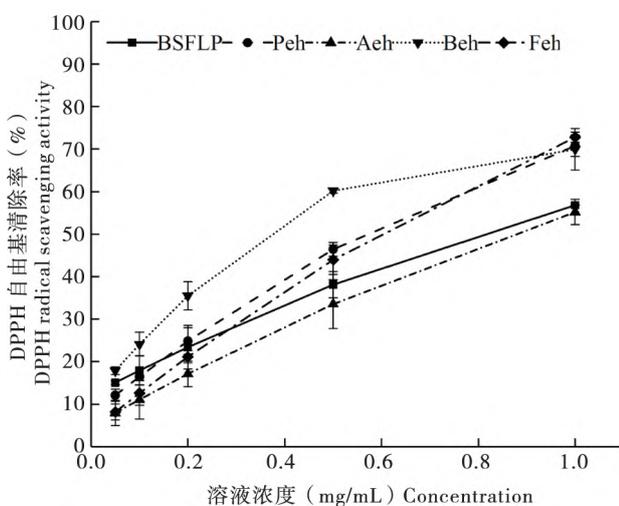


图6 酶解液的 DPPH 自由基清除活性

Fig. 6 DPPH radical scavenging activity of enzymatic hydrolysate

### 3 结论与讨论

#### 3.1 BSFLP 的抗氧化活性

ABTS 经氧化后产生稳定的蓝绿色 ABTS 水溶性自由基, 抗氧化剂与 ABTS 自由基反应后使其溶液褪色, 特征吸光值降低, 故待测样品的 ABTS 自由基清除活性可利用分光光度法进行测定, 该方法具有操作简单、快速、高通量等优点 (郑善元等, 2010)。本次实验结果表明 BSFLP 对 ABTS 自由基的  $IC_{50}$  约为 2.91 mg/mL, 而蔡雨娇等 (2020) 对神农架蜂蜜的抗氧化能力研究中发现其 ABTS 的  $IC_{50}$  约为 48.48 mg/mL; 朱作艺等 (2020) 在对蜂王浆蛋白肽的抗氧化能力研究中发现其 ABTS 的  $IC_{50}$  约为 14.18 mg/mL,  $IC_{50}$  值均高于 BSFLP。一般认为某种物质的  $IC_{50}$  低于 10.0 mg/mL 时, 说明其具有良好的抗氧化活性 (郑义等, 2014), 因此 BSFLP 具有较好的 ABTS 自由基清除能力。

羟自由基被认为是毒性最强的活性氧自由基, 辐射损伤等物理、化学因子都会促进其形成, 是造成生物有机体过氧化损伤的主要因素 (郭倩, 2011)。本次实验结果表明 BSFLP 对羟自由基的  $IC_{50}$  约为 0.232 mg/mL, 明显低于相关文献报道的南美白对虾酶解肽 (林丽英等, 2012) 及家蝇蛹抗氧化肽 (孙婷婷等, 2019) 的羟自由基的  $IC_{50}$  值。因此相比于常见的动物抗氧化肽, BSFLP 具有较好的羟自由基清除活性。

DPPH 是一种较为稳定的自由基, 一般通过生物体的正常代谢形成。研究表明 DPPH 与生物体的衰老、各种炎症疾病及癌症都有一定的关系 (闵建华等, 2019)。高涵等人 (2019) 在对几种常见测定抗氧化性方法的比对中发现 DPPH 法测定抗氧化能力时, 其测定结果变异系数低、标准偏差小、精密度高。因此 DPPH 法可以作为一种测定抗氧化活性的常用方法。本次实验中, 虽然 BSFLP 的 DPPH 自由基  $IC_{50}$  明显高于对照组 Vc, 但其  $IC_{50}$  显著低于文献报道的河蚬抗氧化肽 (刘晶晶等, 2020) 及三文鱼皮胶原低聚肽 (刘文颖等, 2010) 的  $IC_{50}$ , 因此 BSFLP 具有较好的 DPPH 自由基清除活性。

研究表明, 蛋白质的抗氧化活性主要来源于具有抗氧化的氨基酸, 因此蛋白质中的氨基酸组成是影响其抗氧化能力的重要因素之一 (Peng *et al.*, 2009; Tang and Wang, 2012)。一般认为组

氨酸 (His)、亮氨酸 (Leu)、等氨基酸具有较强的抗氧化活性 (Saito *et al.*, 2003)。在本研究中, BSFLP 中组氨酸 (His)、亮氨酸 (Tyr) 含量较高, 分别占 BSFLP 中氨基酸总量的 5.9%、5.7%, 因此 BSFLP 较强的抗氧化活性可能与此类氨基酸含量较高有关。此外, 疏水性氨基酸含量较多的蛋白和多肽往往具有较高的抗氧化活性。葛晓鸣等人 (2019) 在对海马酶解多肽的研究中发现疏水性氨基酸对其抗氧化活性贡献较多。黄湛媛等人 (2017) 发现疏水性氨基酸结构对自由基清除有重要影响。这有可能是因为疏水性氨基酸可以通过提供氢受体, 与其它氨基酸相互作用来增强多肽的疏水性, 进而增加抗氧化能力 (Chen *et al.*, 2009), 也可能是疏水性氨基酸通过促进蛋白和多肽的脂溶性, 从而提高其自由基清除能力 (Najafian and Babj, 2014)。在本研究中, BSFLP 的氨基酸组成中, 疏水性氨基酸占比高达 39.8%, 其中脯氨酸 (Pro)、缬氨酸 (Val) 等疏水性氨基酸含量均较高, 因此 BSFLP 中高含量的疏水性氨基酸对其抗氧化活性产生了重要影响。丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 是生物体内过氧化反应的最终产物, Femi 等人 (2020) 在使用 BSFLP 替代鱼粉对罗非鱼的投喂试验中发现, 随着 BSFLP 替代比例的增加, 鱼体血清中 MDA 的含量逐渐降低, 表明鱼体内的过氧化反应减少, 从某种程度上证明了 BSFLP 的抗氧化活性, 综上 BSFLP 具有良好的抗氧化活性。

### 3.2 BSFLP 与酶解液的抗氧化活性

本次研究结果表明, 酶解液对 ABTS 和 DPPH 自由基的清除能力均强于 BSFLP 溶液, 而在羟自由基的清除实验中, 仅 Peh 清除能力强于 BSFLP 溶液。出现这一结果的原因可能是由于 BSFLP 对 ABTS、DPPH 自由的清除基于电子转移法 (SET) 机制, 而对羟自由基的清除基于氢转移 (HAT) 机制 (Selga *et al.*, 2004; 朱作艺等, 2020)。

氢原子转移 (HAT) 和电子转移 (SET) 是两种不同的清除自由基机制 (Prior *et al.*, 2005)。在电子传递法 (SET) 的反应机制中, 主要通过含半胱氨酸、色氨酸和组氨酸的肽段或氨基酸残基发挥作用。在氢原子转移 (HAT) 反应机制中, 主要通过含酪氨酸的肽段或氨基酸残基发挥作用 (Ashaolu *et al.*, 2019)。因此根据 4 种酶解液对 ABTS、DPPH 自由基以及羟自由基表现出的不同清除能力, 推断 4 种酶解液中, 半胱氨酸、色氨

酸和组氨酸为主要组成成分, 而酪氨酸在酶解液的氨基酸组成成分中占比不高。

已有研究表明多肽的抗氧化活性与其分子大小、疏水性以及氨基酸组成和序列密切相关 (Chai *et al.*, 2017; Hu *et al.*, 2020)。在本次实验中 4 种蛋白酶由于酶切位点不同, 酶解得到的多肽分子质量以及氨基酸残基也有所不同, 因此表现出不同的抗氧化活性。如在对 ABTS 自由基的清除实验中, Feh 表现出较强的自由基清除能力, 其  $IC_{50}$  约为 (0.295 mg/mL), 是 BSFLP 溶液清除率的 9.86 倍。这可能是因为风味蛋白酶同时具有内切酶和外切酶的特点 (刘丽君等, 2019), 因此在水解过程中得到了更多、更小的多肽分子和氨基酸残基。吴靖娜等人 (2017) 在对海马抗氧化肽的研究中也发现了类似的结果。在对 DPPH 自由基的清除实验中, Beh 表现出较强的自由基清除活性, 这可能与菠萝蛋白酶作用于疏水性氨基酸的羧基 (C) 末端有关, 从而形成了更多疏水性氨基酸残基 (吴茂玉等, 2008; 李荣乔, 2014; 王大巾等, 2016)。疏水性氨基酸是影响多肽抗氧化活性的关键因素之一, 这些疏水性氨基酸残基能够促进多肽在脂质-水界面处的溶解, 从而更好地发挥清除自由基的作用 (Wong *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2020)。Aeh 的自由基清除能力低于 BSFLP 溶液, 刘天红等人 (2019) 在对沙蚕酶解产物的抗氧化研究中也发现了类似的结果。其原因可能是, 酶解产物的小肽被过度水解, 导致其丧失部分功能键, 进而降低了酶解液中小肽的抗氧化活性。

综上所述, 经蛋白酶处理过的大多数蛋白肽具有更强的抗氧化能力, 对 ABTS 自由基、羟自由基、DPPH 自由基有着更好的清除能力。本次实验证明了酶解制备抗氧化肽的可行性, 为今后利用昆虫蛋白肽作为一种新型饲料添加剂提供了一定的研究基础, 同时也为无抗饲料以及昆虫资源化利用提供了新的研究思路。

### 参考文献 (References)

- Ashaolu TJ. Antioxidative peptides derived from plants for human nutrition: Their production, mechanisms and applications [J]. *European Food Research and Technology*, 2020, 246 (2): 853 - 865.
- Cai YJ, Sun LP, Zhang XQ. Analysis of physicochemical characterization and antioxidant activity of honey produced by *Apis cerana* in Shennongjia Forestry district [J]. *Food Research and Development*, 2020, 41 (14): 183 - 187. [蔡雨娇, 孙丽萍, 张

- 雪琦. 神农架林区中蜂蜜理化指标及抗氧化活性分析 [J]. 食品研究与开发, 2020, 41 (14): 183-187
- Chai TT, Law YC, Wong FC, *et al.* Enzyme-assisted discovery of antioxidant peptides from Edible Marine invertebrates: A review [J]. *Marine Drugs*, 2017, 15 (2): 42-68.
- Chen BY, Li CJ, Hu B, *et al.* Value of black soldier fly larvae as feed [J]. *Feed Industry*, 2020, 41 (10): 9-15. [陈柏宇, 李楚君, 胡斌, 等. 黑水虻幼虫饲用价值 [J]. 饲料工业, 2020, 41 (10): 9-15]
- Chen HM, Muramoto K, Yamauchi F, *et al.* Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2014, 44 (9): 2619-2623.
- Deng WH, Wu JY, Chen TY, *et al.* Starvation tolerance and biological characteristics after starvation and refeeding of *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) larvae [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2019, 62 (4): 73-79. [邓文辉, 吴家园, 陈天阳, 等. 黑水虻幼虫的耐力及饥饿幼虫复食后的生物学特性 [J]. 昆虫学报, 2019, 62 (4): 73-79]
- Ding Z, Xue W, Fen T, *et al.* Preparation antioxidant activity evaluation and identification of antioxidant peptide from black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) larvae [J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2020, 44 (5): e13186.
- Dong D, Dong M, Liu K, *et al.* Antioxidant activity of queen bee larvae processed by enzymatic hydrolysis [J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2018, 42 (2): e13461.
- Femi JF, Ayodeji AA, Lateef O, *et al.* Substituting fishmeal with *Hermetia illucens* in the diets of african catfish (*Clarias gariepinus*): Effects on growth, nutrient utilization, haemato-physiological response, and oxidative stress biomarker [J]. *Aquaculture*, 2020, 518 (C): 734849.
- Gao H. Comparison of Commonly Used Methods for Measuring Antioxidant Peptide Activity [D]. Hebei: Agricultural University of Hebei, 2019. [高涵. 常用测定抗氧化肽活性方法的比较 [D]. 河北: 河北农业大学, 2019]
- Ge XM, Gu W, Xu YJ. Relationship of amino acids composition and antioxidative capacity of hydrolyzed protein from *Hippocampus kuda Bleeker* [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2019, 33 (2): 322-329. [葛晓鸣, 顾伟, 徐永健. 海马水解蛋白的氨基酸组成与抗氧化能力的关系 [J]. 核农学报, 2019, 33 (2): 322-329]
- Guo Q. Study on Separation Purification and Antioxidant Activity of Proteins from Barley Pest (*Zophobas morio* L.) [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2011. [郭倩. 大麦虫蛋白质的分离纯化及其抗氧化性研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2011]
- Hu XM, Wang YM, Zhao YQ, *et al.* Antioxidant peptides from the protein hydrolysate of Monkfish (*Lophius litulon*) muscle: Purification identification and cytoprotective function on HepG<sub>2</sub> Cells damage by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [J]. *Marine Drugs*, 2020, 18 (3): 153-174.
- Huang ZY, Li L, Xiong YF, *et al.* Study on ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis of *Penaeus japonicus* head and separation of the antioxidant peptides [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2017, 31 (8): 1556-1566.
- İlhami G. Antioxidant activity of food constituents: An overview [J]. *Archives of Toxicology*, 2012, 86 (3): 345-391.
- Jiménez A, Selga A, Torres JL, *et al.* Reducing activity of polyphenols with stable radicals of the TTM series. Electron transfer versus H-abstraction reactions in flavan-3-ols [J]. *Organic Letters*, 2004, 6 (24): 4583-4586.
- Li RQ. Preparation of Antioxidant Peptides from Scallop Skirt of *Argopecten irradians* by Bromelain Hydrolysis [D]. Hebei: Agricultural University of Hebei, 2014. [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]. 河北: 河北农业大学, 2014]
- Li S, Tan HY, Wu N, *et al.* The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases [J]. *International Journal of Molecular Science*, 2015, 16 (11): 26087-26124.
- Li X, Luo YK, You J, *et al.* Antioxidant activity and functional property of protein hydrolysates from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) meat [J]. *Journal of China Agricultural University*, 2011, 16 (1): 94-99. [李雪, 罗永康, 尤娟, 等. 草鱼鱼肉蛋白酶解物抗氧化性及功能特性研究 [J]. 中国农业大学学报, 2011, 16 (1): 94-99]
- Lin LY, Zhou AM, Shi XL, *et al.* Research of antioxidant hydrolysate produced from the waste of white shrimp (*Penaeus vannamei*) through enzymatic hydrolysis [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2012, 6: 332-335. [林丽英, 周爱梅, 石晓玲, 等. 酶解南美白对虾下脚料制备抗氧化酶解液的研究 [J]. 食品工业科技, 2012, 6: 332-335]
- Liu JJ, Zhou YY, Xu HT, *et al.* A study on preparation and antioxidant activity of oral liquid of zinc-binding antioxidant peptides from *Corbicula fluminea* [J]. *Journal of Changshu Institute of Technology*, 2020, 34 (5): 91-96. [刘晶晶, 周一渊, 徐华亭, 等. 河蚬抗氧化肽锌制剂口服液的制备及抗氧化活性研究 [J]. 常熟理工学院学报, 2020, 34 (5): 91-96]
- Liu LJ, Yi L, Li T, *et al.* Process parameters of preparing antioxidant peptides by enzymolysis camel blood [J]. *Food Science and Technology*, 2019, 44 (6): 119-125. [刘丽君, 伊丽, 李彤, 等. 驼血蛋白酶解制备抗氧化肽工艺参数 [J]. 食品科技, 2019, 44 (6): 119-125]
- Liu TH, Wang Y, Sun YQ, *et al.* Research on the antioxidant effect of different enzymatic hydrolysis products of *Nereis succinea* [J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2020, 22 (1): 149-161. [刘天红, 王颖, 孙元芹, 等. 沙蚕不同酶解产物抗氧化效果研究 [J]. 中国农业科技导报, 2020, 22 (1): 149-161]
- Liu WY, Xu YG, Ren W, *et al.* Antioxidant activities of salmon skin collagen peptides *in vitro* [J]. *Food Science and Technology*, 2010, 35 (12): 86-89. [刘文颖, 徐亚光, 任玮, 等. 三文鱼皮胶原肽体外抗氧化活性研究 [J]. 食品科技, 2010, 35 (12): 86-89]
- Min JH, Wang H. Separation of silkwormpupa protein antioxidant activity peptide and determination of amino acids [J]. *Journal of Hubei*

- Polytechnic University*. 2019, 35 (1): 44–48. [闵建华, 王浩. 蚕蛹蛋白抗氧化肽的分离及氨基酸组成测定 [J]. 湖北理工学院学报, 2019, 35 (1): 44–48]
- Najafian L, Babji AS. Production of bioactive peptides using enzymatic hydrolysis and identification antioxidative peptides from patin (*Pangasius sutchi*) sarcoplasmic protein hydrolysate [J]. *Journal of Functional Foods*, 2014, 9: 280–289.
- Peng XY, Xiong YL, Kong BH. Antioxidant activity of peptide fractions from whey protein hydrolysates as measured by electron spin resonance [J]. *Food Chemistry*, 2009, 113 (1): 196–201.
- Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53 (10): 4290–4302.
- Saito K, Jin DH, Ogawa T, et al. Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by the combinatorial chemistry [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2003, 51 (12): 3668–3674.
- Shen R, Liu D, Hou C, et al. Protective effect of potentilla anserina polysaccharide on cadmium-induced nephrotoxicity *in vitro* and *in vivo* [J]. *Food & Function*, 2017, 8 (17): 3636–3646.
- Sun TT, Yang WZ, Zhang SC, et al. Composition analysis of *Musca domestica* pupa and preparation of antioxidant peptides [J]. *Feed Industry*, 2019, 40 (18): 30–37. [孙婷婷, 杨文哲, 张思晨, 等. 家蝇蛹的营养成分分析及抗氧化肽制备工艺研究 [J]. 饲料工业, 2019, 40 (18): 30–37]
- Wang DJ, He L, Qi PF, et al. Technical study on extraction of protein and calcium from prawn shell with bromelain [J]. *Journal of Zhejiang Sci-Tech University*, 2016, 35 (2): 304–308. [王大巾, 何露, 祁鹏飞, 等. 利用菠萝蛋白酶提取对虾壳蛋白质和钙的工艺研究 [J]. 浙江理工大学学报, 2016, 35 (2): 304–308]
- Werawich P, Arjaree N, Onrapak R, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitory and antioxidant peptides from digestion of larvae and pupae of Asian weaver ant, *Oecophylla smaragdina* Fabricius [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2017, 97 (10): 3133–3140.
- Wong FC, Xiao JB, Wang SY, et al. Advances on the antioxidant peptides from edible plant sources [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2020, 99: 44–57.
- Wu JN, Chen XT, Su J, et al. Enzymatic preparation of antioxidant peptides from *Hippocampus trimaculatus* [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2017, 33 (32): 127–134. [吴靖娜, 陈晓婷, 苏捷, 等. 海马抗氧化活性肽制备工艺研究 [J]. 中国农学通报, 2017, 33 (32): 127–134]
- Wu MY, Ma C, Qiao XG, et al. Application and research progress of bromelain [J]. *Food Science and Technology*, 2008, 33 (8): 17–20. [吴茂玉, 马超, 乔旭光, 等. 菠萝蛋白酶的研究及应用进展 [J]. 食品科技, 2008, 33 (8): 17–20]
- Wang XY, Tang CH. Physicochemical and antioxidant properties of buckwheat protein isolates with different polyphenolic content modified by limited hydrolysis with trypsin [J]. *Food Technology and Biotechnology*, 2012, 50 (1): 17–24.
- Xu YT, Zhang XJ, Song ZZ, et al. Optimization of extraction of proteins from larvae of the black soldier fly *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) using response surface methodology [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2014, 57 (4): 401–410. [许彦腾, 张建新, 宋真真, 等. 响应面法优化黑水虻幼虫蛋白质提取工艺 [J]. 昆虫学报, 2014, 57 (4): 401–410]
- Yang J, Huang J, Dong X, et al. Purification and identification of antioxidant peptides from duck plasma proteins [J]. *Food Chemistry*, 2020, 319: 126534.
- Yuan C, Wei DX, Jie HM, et al. Research on treatment of fecal pollution on large scale pig farms with black soldier fly larva [J]. *Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2019, 51 (11): 49–53. [袁橙, 魏冬霞, 解慧梅, 等. 黑水虻幼虫处理规模化猪场粪污的试验研究 [J]. 畜牧与兽医, 2019, 51 (11): 49–53]
- Zhang Q, Li WH. Research progress of antioxidant peptides [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 12 (2): 1–9. [张强, 李伟华. 抗氧化肽的研究进展 [J]. 食品与发酵工业, 2020, 12 (2): 1–9]
- Zhang ZS, Guo P, Gao ZS, et al. Progress in the industrialization of natural antioxidants [J]. *Food Research And Development*, 2017, 38 (7): 206–209. [张泽生, 郭擎, 高云峰, 等. 天然抗氧化剂的产业化进展 [J]. 食品研究与开发, 2017, 38 (7): 206–209]
- Zheng SY, Chen TF, Zheng WJ, et al. Spectrometric investigation of the antioxidant activities of Dangcong Tea aqueous extracts against DPPH and ABTS free radicals [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2010, 30 (9): 2417–2423. [郑善元, 陈填烽, 郑文杰, 等. 单丛茶水提取物清除 DPPH 和 ABTS 自由基的光谱学研究 [J]. 光谱学与光谱分析, 2010, 30 (9): 2417–2423]
- Zheng Y, Wang WD, Li Y, et al. Optimization of extraction process and antioxidant activities of polysaccharides from *Alpinia officinarum* Hance [J]. *Food Science*, 2014, 35 (2): 126–131. [郑义, 王卫东, 李勇, 等. 高良姜多糖提取工艺优化及其抗氧化活性 [J]. 食品科学, 2014, 35 (2): 126–131]
- Zhu ZY, Zhang Y, Wang JH, et al. Study on preparation, hypoglycemic and antioxidative activity of peptide from royal jelly protein [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41 (17): 45–50, 57. [朱作芝, 张玉, 王君虹, 等. 蜂王浆蛋白肽的制备及其降血糖和抗氧化活性研究 [J]. 食品工业科技, 2020, 41 (17): 45–50, 57]