DOI:10.11721/cqnuj20190620

尖吻蝮蛇毒不同蛋白酶水解物的制备及抗氧化活性研究*

曹雪婷，和七一，聂学奎，黄达春，王　萍，熊　艳，余晓东，彭建军
(重庆师范大学 生命科学学院 重庆市动物生物学重点实验室
重庆市生物活性物质工程研究中心 教育部活性物质生物技术工程研究中心，重庆 401331)

摘要:【目的】研究尖吻蝮(*Deinagkistrodon acutus*)蛇毒的不同蛋白酶水解产物的制备及抗氧化活性。【方法】分别用碱性蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶和胰蛋白酶水解尖吻蝮蛇毒,以水解物的水解度、清除自由基活性、金属离子螯合能力和总还原力作为抗氧化活性比较指标来选出最佳水解蛋白酶,并比较该蛋白酶水解物在超滤后得到的不同分子量组分的抗氧化活性大小。【结果】碱性蛋白酶水解物的清除 DPPH 自由基活性、亚铁离子螯合能力和总还原力均为最佳;该酶解物经超滤得到的 3 个组分中,分子量为 3～10 kDa 的组分对 DPPH 自由基和羟基自由基清除能力最强,分子量大于 10 kDa 的组分的亚铁离子螯合能力和总还原力最强。【结论】尖吻蝮蛇毒的不同蛋白酶水解物均具有抗氧化活性,其中用碱性蛋白酶水解物抗氧化活性较强。

关键词:尖吻蝮蛇毒;蛋白酶;活性肽;抗氧化

中图分类号:TQ464.7　　**文献标志码:**A　　**文章编号:**1672-6693(2019)06-0125-07

通过酶解法可从动物或植物蛋白质中获得多种具有不同生理功能的活性肽[1]。例如,花生、大豆等植物的蛋白质经不同的蛋白酶水解,可产生具有抗氧化、降血压、抑菌、促进消化吸收、增强人体免疫力等不同生物功能的活性肽[2-7]。其中,抗氧化活性肽通常通过抑制脂质过氧化、清除自由基、螯合金属离子捕捉体内自由基等方式发挥抗氧化的功效[8]。目前,已从皮氏叫姑鱼(*Johnius belengerii*)[9]、小麦(*Triticum aestivum*)胚[10]、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)鳞片[11]、猪(*Sus scrofa domesticus*)血液[12]、鹰嘴豆(*Cicer arietinum*)[13]等生物个体或组织的蛋白质酶解产物中制备出具有抗氧化性的活性肽。

蛇毒是毒蛇的毒腺分泌的一种复杂的蛋白质混合物,具有多种生物活性[14-20]。尖吻蝮(*Deinagkistrodon acutus*)蛇毒的主要成分包括金属蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、C-型凝集素、磷脂酶 A_2 等组分[21],这些蛋白组分在尖吻蝮进行捕食、消化和防御行为时发挥着重要的作用。本研究在体外条件下用不同蛋白酶对尖吻蝮蛇毒进行水解,制备出小肽混合物,并测定了这些混合物的抗氧化活性,从而为有关毒蛇咬伤患者的自身组织酶对蛇毒的抵抗作用研究提供实验数据,同时也为进一步开发相关小肽产物奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

尖吻蝮蛇毒采用咬皿法制备,冷冻干燥后于−20 ℃保存。蛋白酶购于上海瑞永生物科技有限公司。甲醇、乙醇购于重庆川东化工有限公司。1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picryl -hydrazyl,DPPH)、菲洛嗪一钠盐水合物和水杨酸购于上海源叶生物科技有限公司。邻苯二甲醛购于 Sigma 公司。其他试剂为分析纯。

1.2 主要仪器

研究所用主要仪器有:恒温水浴锅(跃进医疗有限公司)、漩涡振荡器(IKA 公司)、酶标仪(Tecan 公司)、Z513K 台式低温高速离心机(Hermle 公司)、BT25S 分析天平(Sartorius 公司)、DHG-9023A 型电热恒温鼓风干

* **收稿日期:**2019-05-23　**修回日期:**2019-06-20　**网络出版时间:**2019-11-25 10:34

资助项目:国家自然科学基金(No. 31470570);重庆市自然科学基金(No. cstc2017chmsxdny0246;No. cstc2015shmszxl20052)

第一作者简介:曹雪婷,女,研究方向为生物毒素与药物研发,E-mail:1530073560@qq.com;**通信作者:**余晓东,男,教授,博士,E-mail:yxd@cqnu.edu.cn

网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20191125.1033.002.html

燥箱(上海精宏实验设备有限公司)和FD-1A-50冻干机(北京博医康实验仪器有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 制备水解物 参照文献[22-23]的方法制备尖吻蝮蛇毒的不同蛋白酶水解物。选取碱性蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶和胰蛋白酶进行酶解反应。配制粗毒溶液,按1∶100的酶和蛇毒质量比在最适的反应温度和pH条件下酶解反应3 h。反应结束后将立即于100 ℃处理10 min使酶灭活,10 000 r·min^{-1}离心10 min,冻干保存备用。

1.3.2 水解度测定 参考Nielsen等人[24]的方法测定尖吻蝮蛇毒的不同蛋白酶水解物的水解度(Degree of hydrolysis)。取蛋白酶水解物测试样品、丝氨酸标准品和水解前蛇毒样品各40 μL分别与160 μL邻苯二甲醛溶液混合均匀后,静置2 min,再于340 nm处测吸光值。用去离子水作空白对照。水解度是指蛋白质中被水解的肽键占总肽键的百分比,基本计算公式为:

$$\text{水解度}=\frac{\text{被水解的肽键数}}{\text{蛋白质总肽键数}}\times 100\%。$$

1.3.3 抗氧化活性实验 1) DPPH自由基清除率(V_{DPPH})测定。参照He等人[25]的方法,稍作改进。取1,2,3,4和5 mg·mL^{-1}蛋白酶水解物各100 μL,分别与1 mmol·L^{-1} DPPH溶液(溶于甲醇)100 μL混合,在黑暗条件下室温孵育30 min后,在517 nm处测吸光值A_{s1}。用双蒸水替代样品溶液做空白对照,在相同条件下测吸光值A_{c1}。V_{DPPH}的计算公式为:

$$V_{\mathrm{DPPH}}=\frac{A_{\mathrm{c1}}-A_{\mathrm{s1}}}{A_{\mathrm{c1}}}\times 100\%。$$

2) 羟基自由基清除率($V_{\text{羟基}}$)测定。参考文献[26-27]的方法。取0.2,0.4,0.6,0.8和1 mg·mL^{-1}蛋白酶水解物各50 μL,分别与9 mmol·L^{-1}硫酸亚铁溶液50 μL和9 mmol·L^{-1}水杨酸溶液(溶于乙醇)50 μL,混合反应后加入50 μL质量分数为0.01%的过氧化氢溶液,在510 nm处测定吸光值A_{s2}。用双蒸水替代样品溶液做空白对照,在相同条件下测吸光值A_{c2}。$V_{\text{羟基}}$的计算公如下:

$$V_{\text{羟基}}=\frac{A_{\mathrm{c2}}-A_{\mathrm{s2}}}{A_{\mathrm{c2}}}\times 100\%。$$

3) 金属离子螯合能力($V_{\text{螯合}}$)测定。参照Xie等人[28]的方法。取0.2,0.4,0.6,0.8和1 mg·mL^{-1}蛋白酶水解物各50 μL,分别与50 μL的2 mmol·L^{-1}氯化亚铁溶液和50 μL双蒸水混合反应。之后将5 mmol·L^{-1}菲洛嗪溶液50 μL加入混合液中,室温下静置反应10 min后在562 nm处测吸光度A_{s3}。用双蒸水替代样品溶液做空白对照,在相同条件下测吸光值A_{c3}。$V_{\text{螯合}}$的计算公式为:

$$V_{\text{螯合}}=\frac{A_{\mathrm{c3}}-A_{\mathrm{s3}}}{A_{\mathrm{c3}}}\times 100\%。$$

4) 总还原能力(V_{t})测定。按照文献[29-30]稍作改进。取1,2,3,4和5 mg·mL^{-1}蛋白酶水解物各100 μL,分别与100 μL的0.2 mol·L^{-1}磷酸缓冲液(pH为6.6)和100 μL质量分数为1%铁氰化钾溶液混合,50 ℃保温20 min。冷却后加入100 μL质量分数为10%的三氯乙酸溶液,混合均匀后9 000 r·min^{-1}离心10 min。取100 μL上清液,加入100 μL的蒸馏水和50 μL质量分数为0.1%的三氯化铁溶液,在700 nm处测吸光度A_1。用双蒸水替代样品溶液做空白对照,在相同条件下测吸光值A_0。用以下计算公式计算V_{t}:

$$V_{\mathrm{t}}=A_1-A_0。$$

1.3.4 酶解物的超滤 通过对上述测定结果进行比较得到水解尖吻蝮蛇毒效果最佳的蛋白酶,然后分别采用截留分子量为3,10 kDa的超滤离心管对该蛋白酶水解物进行超滤,得到分子量小于3 kDa、3~10 kDa和大于10 kDa共3个组分样品,分别收集、冻干保存,并按前述方法测定这3个组分样品的抗氧化活性。

1.3.5 数据处理 研究所得数据均采用“平均值±标准误”表示。使用GraphPad Prism 5软件作图并进行单因素方差分析,当$p<0.05$时,所得结果具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 不同蛋白酶水解物的水解度

与中性蛋白酶水解物和胰蛋白酶水解物相比,碱性蛋白酶水解物和木瓜蛋白酶水解物的水解度相对较高,

但四者无统计学意义上的差异(图 1)。经不同蛋白酶水解尖吻蝮蛇毒而得到的水解物中多肽含量有所不同，从而导致它们的水解度也不相同，而胰蛋白酶水解物的水解度略低于其他蛋白酶水解物，这一结果与Karamać等人[31]早期的研究结果一致。出现这种情况可能原因在于：碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶的水解位点较为广泛，而中性蛋白酶和胰蛋白酶对底物存在特异性选择。

2.2 不同蛋白酶水解物的 DPPH 清除活性

图 2 显示：不同蛋白酶水解尖吻蝮蛇毒所得产物的质量浓度越高，清除 DPPH 自由基效果也越好，其中碱性蛋白酶水解物质量浓度在 2～4 mg · mL^{-1}时，它的 DPPH 自由基清除率增长较快。在 5 mg · mL^{-1}质量浓度条件下，碱性蛋白酶水解物对 DPPH 自由基清除效果最好，清除率达 21.84%±1.79%，与胰蛋白酶水解物的这一指标相比，差异有具有统计学意义($p<0.001$)，但与其余两种蛋白酶水解物的 DPPH 自由基清除率相比则无统计学意义上的差异。

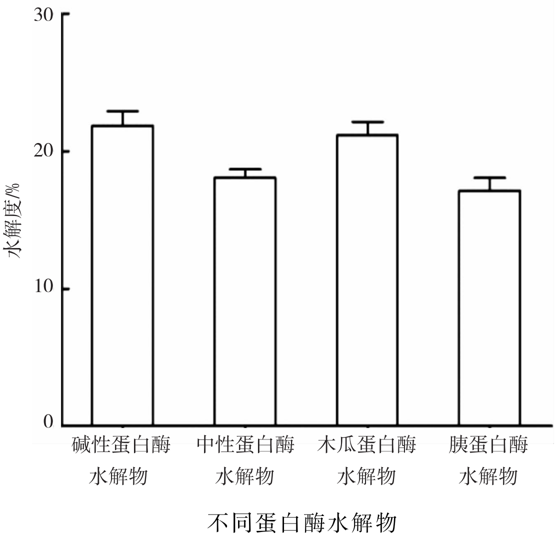
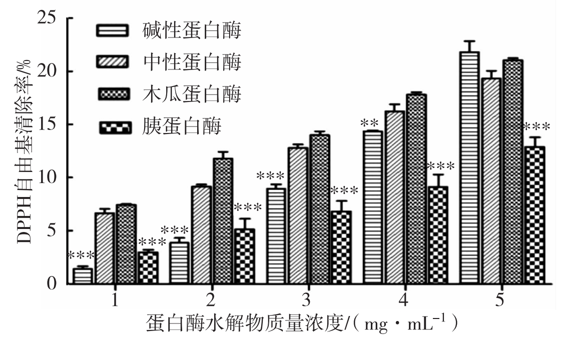


图 1　尖吻蝮蛇毒不同蛋白酶水解物的水解度

Fig. 1　The hydrolysis degree of different protease hydrolysate of *D. acutus* vemon



注：*，**，***分别表示在 $p<0.05$，$p<0.01$ 和 $p<0.001$水平上与同一质量浓度下的最高值相比差异具有统计学意义，下同。

图 2　尖吻蝮蛇毒不同蛋白酶水解物在不同质量浓度条件下的 DPPH 自由基清除率

Fig. 2　The DPPH free radical scavenging rate of different protease hydrolysate of *D. acutus* vemon under different mass concentration condition

2.3 不同蛋白酶水解物羟基自由基清除活性的比较

由图 3 可见：不同蛋白酶水解物的质量浓度与它们的羟基自由基清除能力存在明显的量效关系。其中碱性蛋白酶水解物和中性蛋白酶水解物的质量浓度为 1 mg · mL^{-1}时，对羟基自由基有着较高的清除率，分别为 73.26%±0.36%和 75.35%±0.86%，两者无统计学意义上的差异；但碱性蛋白酶水解物与木瓜蛋白酶水解物和胰蛋白酶水解物的这一指标间存在着统计学意义上的差异($p<0.05$)。

2.4 不同蛋白酶水解物亚铁离子螯合能力的比较

由图 4 可知：碱性蛋白酶水解物在质量浓度 1 mg · mL^{-1}时亚铁离子螯合能力较强，达 72.51%±2.88%；其次是中性蛋白酶水解物，该指标为 67.65%±0.94%。两者存在统计学意义上的差异($p<0.01$)。然而，木瓜蛋白酶水解物的亚铁离子螯合能力不及其他 3 组蛋白酶水解物，与碱性蛋白酶水解物的这一指标相比具有统计学意义上的差异($p<0.001$)。

2.5 不同蛋白酶水解物对总还原力的影响

由图 5 可知，随着不同蛋白酶水解物质量浓度的增加，它们的总还原力也不断增加。其中碱性蛋白酶水解物在 5 mg · mL^{-1}时表现出较高的总还原力，但与中性蛋白酶水解物的该项指标相比不具有统计学意义上的差异，而同其他两种蛋白酶水解物的总还原力存在统计学意义上的差异($p<0.05$)。

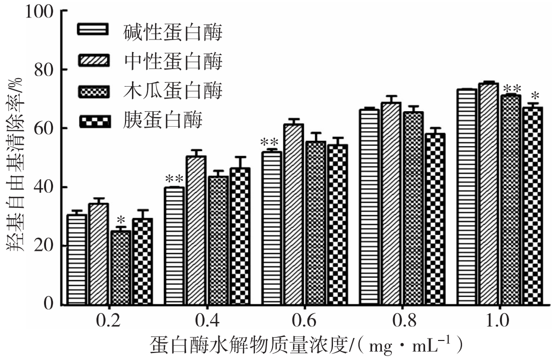


图3 尖吻蝮蛇毒不同蛋白酶水解物在不同质量浓度条件下的羟基自由基自由基清除率

Fig. 3 The hydroxyl radical scavenging rate of different protease hydrolysate of *D. acutus* vemon under different mass concentration condition

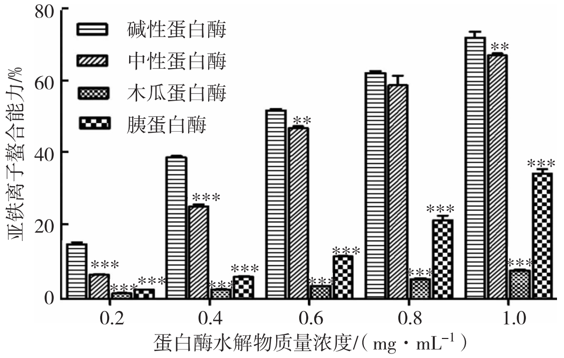


图4 尖吻蝮蛇毒不同蛋白酶水解物在不同质量浓度条件下的亚铁离子螯合能力

Fig. 4 The ferrous ions chelating ability of different protease hydrolysate of *D. acutus* vemon under different mass concentration condition

2.6 超滤组分抗氧化活性测定

根据上述结果,选取具有较好抗氧化活性的碱性蛋白酶水解物进行超滤,对得到的3个组分进行抗氧化活性比较。结果显示:分子量为3~10 kDa的超滤组分对DPPH自由基和羟基自由基的清除能力较好(图6a,b),特别是该组分质量浓度在4和5 mg·mL^{-1}时,它的DPPH自由基清除率与其他两组的该项指标相比具有统计学意义上的差异($p<0.05$),但在0.2~1 mg·mL^{-1}范围3个组分的羟基自由基清除率均无统计学意义上的差异。由图6c,d可知,分子量大于10 kDa的超滤组分的亚铁离子螯合能力较强,总还原力较高,除在质量浓度为0.2 mg·mL^{-1}时与其他两组的亚铁离子螯合能力差异无统计学意义外,均与其他两组的这两项指标存在统计学意义上的差异($p<0.01$)。

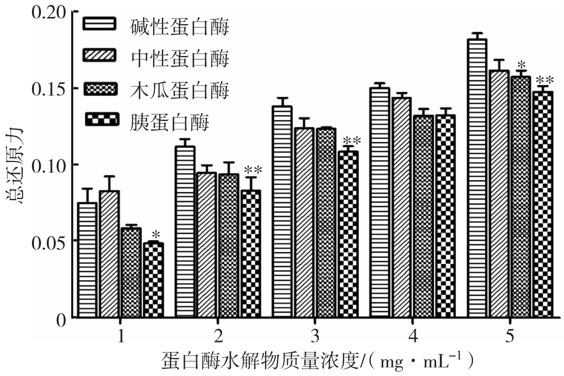


图5 尖吻蝮蛇毒不同蛋白酶水解物在不同质量浓度条件下的总还原力

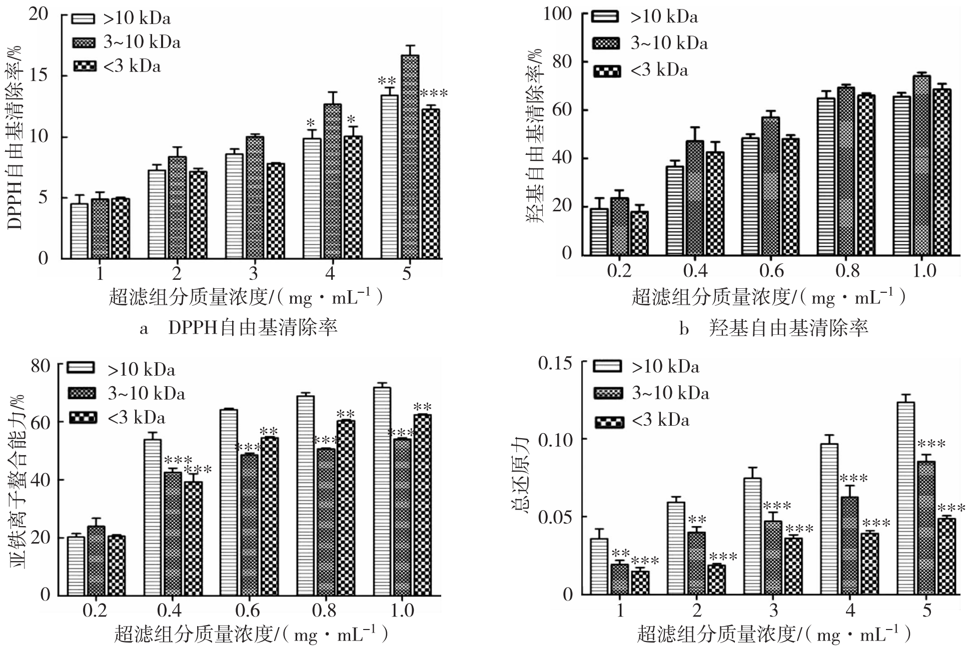
Fig. 5 The total reducing power of different protease hydrolysate of D. acutus vemon under different mass concentration condition

3 讨论

有研究认为,DPPH自由基清除能力可能与疏水性氨基酸含量有关,较高DPPH自由基清除活性与疏水性氨基酸或肽的高含量有关[32-33]。而本研究中,4种蛋白酶水解物均呈现良好的DPPH自由基清除能力,其中碱性蛋白酶水解物清除效果最好。由于碱性蛋白酶和中性蛋白酶的切割位点都为疏水性氨基酸,因此这可能是这两种蛋白酶水解物对自由基的清除效果较好的主要原因。

本研究结果显示,碱性蛋白酶水解物的金属离子螯合能力最强,其中原因可能在于肽的抗氧化活性高低高度依赖于一级结构,并取决于氨基酸组成[34],而不同蛋白酶水解的特异性也影响着活性大小。此外,有文献报道[35],抗氧化物质一般通过自身的还原能力达到抗氧化效果,抗氧化活性与样品还原能力呈正相关关系。本研究中碱性蛋白酶水解物吸光度变化最大,说明它的总还原力最高。

总体上看,本研究中碱性蛋白酶水解物的抗氧化活性最佳。在此基础上,本研究选取该蛋白酶水解物进行超滤,测定了各超滤组分的抗氧化活性。结果显示:碱性蛋白酶水解物不同分子量大小组分的抗氧化活性存在较大差异,这可能是因为碱性蛋白酶作用于不同酶解位点,水解物中暴露出不同氨基酸残基,活性肽的供氢或供电子能力存在差异,从而使各组分具有不同的抗氧化能力。



a　DPPH自由基清除率　　b　羟基自由基清除率

c　亚铁离子螯合能力　　d　总还原力

图 6　不同质量浓度条件下的 3 组超滤组分的抗氧化活性

Fig. 6　Antioxidant activities of three groups of ultrafiltration components under different mass concentration condition

总之,本研究主要对尖吻蝮蛇毒不同蛋白酶水解产物的抗氧化能力进行了初步探究。结果显示,不同蛋白酶水解物都具有一定的抗氧化活性,其中碱性蛋白酶水解物呈现出最佳抗氧化活性。然而,由于酶解反应存在复杂性,本研究涉及的蛋白酶水解物的具体组成、结构等尚不清楚,仍需进行进一步的分离纯化和结构鉴定。

参考文献:

[1] 唐良艳,丁兰,季金林. 生物活性肽—白蛋内多肽[J]. 食品工业科技,2008,29(5):301-303.
TANG L Y, DING L, JI J L. Bioactive peptides: albumin peptides[J]. Science and Technology of Food Industry, 2008,29(5): 301-303.

[2] RIZZELLO C G, LOSITO I, GOBBETTI M, et al. Antibacterial activities of peptides from the water-soluble extracts of Italian cheese varieties[J]. Journal of Dairy Science, 2005,88(7):2348-2360.

[3] JANG A, LEE M. Purification and identification of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from beef hydrolysates[J].Meat Science,2005,69(4):653-661.

[4] 陈成,刘文玉,杨青. 大豆蛋白活性肽的生物学功能及其应用[J]. 黑龙江农业科学,2004(3):40-42.
CHEN C, LIU W Y, YANG Q. Biological function and application of soy protein active peptides[J]. Heilongjiang Agricultural Science,2004(3):40-42.

[5] MEISEL H, FITZGERALD R J. Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytmodulatory effects[J]. Current Pharmaceutical Design, 2003, 9(16): 1289-1296.

[6] 张宁,王强. Alcalase 酶水解花生蛋白制备花生短肽的研究[J]. 农业工程学报,2007(4):258-263.
ZHANG N, WANG Q. Study on the preparation of peanut short peptide by Alcalase hydrolyzing peanut protein[J]. Journal of Agricultural Engineering,2007(4):258-263.

[7] 邓乾春,陈春艳,潘雪梅,等. 白果活性蛋白的酶法水解及抗氧化活性研究[J]. 农业工程学报,2005,21(11):155-159.
DENG G C, CHEN C Y, PAN XM, et al. Study on enzymatic hydrolysis and antioxidant activity of active protein from *Ginkgo biloba*[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering,2005,21(11):155-159.

[8] POWER O, JAKEMAN P, FITZGERALD R. Antioxidative peptides: enzymatic production, in vitro and in vivo antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides[J].Amino Acids,2013,44(3):797-820.

[9] KIM S Y, JE J Y, KIM S K. Purification and characterization of antioxidant peptide from hoki (*Johnius belengerii*) frame protein by gastrointestinal digestion[J]. Journal of Nutritional Biochemistry,2007,18(1):31-38.

[10] ZHU K X, LIAN C X, GUO X N, et al. Antioxidant activi-

ties and total phenolic contents of various extracts from defatted wheat germ[J]. Food Chemistry,2011,126(3):1122-1126.

[11] 杜云建,赵玉巧,李念念.酶解法制备草鱼鱼鳞多肽及其清除羟自由基的研究[J].食品科学,2010,31(7):168-172.

DU Y J,ZHAO Y Q,LI N N. Enzymatic preparation and hydroxyl free radical scavenging activity of polypeptides from grass carp scales[J]. Food Science,2010,31(7):168-172.

[12] QIAN L,KONG B H,XIONG Y L,et al. Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis[J]. Food Chemistry,2010,118(2):403-410.

[13] LI Y,JIANG B,ZHANG T,et al. Antioxidant and free radical- scavenging activities of chickpea protein hydrolysate(CPH)[J]. Food Chemistry,2008,106(2):444-450.

[14] 雷丹青,周先丽,李映新.尖吻蝮蛇毒活性肽K组分的研究[J].时珍国医国药,2007,18(7):1608-1610.

LEI D Q,ZHOU X L,LI Y X. Study on the K component of the active peptide of *Agkistrodon acutus* venom[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research,2007,18(7):1608-1610.

[15] KNUDSEN K A,TUSZYNSKI G P,HUANG T F,et al. Trigramin,an RGD-containing peptide from snake venom,inhibits cell-substratum adhesion of human melanoma cells[J].Experimental Cell Research,1988,179(1):42-49.

[16] XIE J P,YUE J,XIONG Y L,et al. *In vitro* activities of small peptides from snake venom against clinical isolates of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*[J]. International Journal Antimicrobial Agents,2003,22(2):172-174.

[17] XU X L,LI B,ZHU S S,et al. Hypotensive peptides from snake venoms: structure, function and mechanism[J]. Current Topics in Medicinal Chemistry,2015,15(7):658-69.

[18] HUANG T F,SHEU J R,TENG C M. Mechanism of action of a potent antiplatelet peptide,triflavin from *Trimeresurus flavoviridis* snake venom[J]. Thrombosis & Haemostasis,1991,66(4):489-493.

[19] BON-BARET V,BURBAN M,CIOLEK J,et al. Identification of a hypotensive and bradycardic peptide from black mamba snake venom[J]. Archives of Cardiovascular Diseases Supplements,2018,10(2):207.

[20] VENKATESH M,PRASAD N,SING T,et al. Purification, characterization and chemical modification of neurotoxic peptide from *Daboia russelii* snake venom of India [J]. Journal of Biochemical & Molecular Toxicology,2013,27(6):295-304.

[21] ZHANG B,LIU Q,YIN W,et al. Transcriptome analysis of *Deinagkistrodon acutus* venomous gland focusing on cellular structure and functional aspects using expressed sequence tags [EB/OL].[2019-06-20].https://link.springer.com/article/10.1186/1471-2164-7-152.

[22] REN Y,WU H,LAI F R,et al. Isolation and identification of a novel anticoagulant peptide from enzymatic hydrolysates of scorpion (*Buthus martensii* Karsch) protein[J]. Food Research International,2014,64:931-938.

[23] CHEN M,YE X,MING X,et al. A Novel direct factor Xa inhibitory peptide with antiplatelet aggregation activity from *Agkistrodon acutus* venom hydrolysates[EB/OL].[2019-06-20]. http://europepmc.org/articles/PMC4451689.

[24] NIELSEN P M,PETERSEN D,DAMBMANN C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis[J]. Journal of Food Science,2001,66(5):642-646.

[25] HE R,GIRGIH A T,MALOMO S A,et al. Antioxidant activities of enzymatic rapeseed protein hydrolysates and the membrane ultrafiltration fractions[J].Journal of Functional Foods,2013,5(1):219-227.

[26] GIRGIH A T,UDENIGWE C C,ALUKO R E. *In vitro* antioxidant properties of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) protein hydrolysate fractions[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society,2011,88(3):381-389.

[27] WANG J,WANG Y,DANG X,et al. Housefly larvae hydrolysate:orthogonal optimization of hydrolysis,antioxidant activity,amino acid composition and functional properties[EB/OL][2019-06-20].https://link.springer.com/article/10.1186/1756-0500-6-197.

[28] XIE Z J,HUANG J R,XU X M,et al. Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate [J]. Food Chemistry,2008,111(2):370-376.

[29] ROMDHANE M B,HADDAR A,GHAZALA I,et al. Optimization of polysaccharides extraction from watermelon rinds:structure,functional and biological activities [J]. Food Chemistry,2017,216:355-364.

[30] ESCUDERO E,MORA L,FRASER P D,et al. Identification of novel antioxidant peptides generated in Spanish dry-cured ham[J]. Food Chemistry,2013,138(2/3):1282-1288.

[31] KARAMAĆ,KOSIŃSKA-CAGNAZZO A,KULCZYK A. Use of different proteases to obtain flaxseed protein hydrolysates with antioxidant activity[EB/OL].[2019-06-20]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4964

403/

[32] RAJAPAKSE N, MENDIS E, JUNG W K, et al. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties[J]. Food Research International, 2005, 38(2): 175-182.

[33] WANG J S, ZHAO M M, ZHAO Q Z, et al. Antioxidant properties of papain hydrolysates of wheat gluten in different oxidation systems[J]. Food Chemistry, 2007, 101(4): 1658-1663.

[34] DU Z, LIU J, ZHANG D, et al. Individual and synergistic antioxidant effects ofdipeptides in *in vitro* antioxidant evaluation systems[J]. International Journal of Peptide Research & Therapeutics, 2019, 25(1): 391-399.

[35] 夏光华，申铉日，蔡锦红，等. 三酶法制备罗非鱼鱼皮胶原蛋白抗氧化肽及活性研究[J]. 食品科学，2012，33(23)：175-179.

XIA G H, SHEN X R, CAI J H, et al. Study on the antioxidant peptide and its activity of Tilapia fish skin collagen by three enzyme method[J]. Food Science, 2012, 33(23): 175-179.

Preparation and Antioxidant Activity of Different Protease Hydrolysate of *Deinagkistrodon acutus* Venom

CAO Xueting, HE Qiyi, NIE Xuekui, HUANG Dachun, WANG Ping, XIONG Yan, YU Xiaodong, PENG Jianjun

(Engineering Research Center of Active substance and Biotechnology (Ministry of Education), Chongqing Engineering Research Center of Bioactive substance, Chongqing Key Laboratory of Animal Biology, College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: [**Purposes**]The preparation and antioxidant activity of different protease hydrolysate of *Deinagkistrodon acutus* venom were studied. [**Methods**]The hydrolysis of *D. acutus* by four proteases, alkaline protease, neutral protease, papain, and trypsin, the best hydrolyzed protease was selected by comparing the degree of hydrolysis, scavenging free radical activity, metal ion chelation ability and total reducing power, and compare the antioxidant activity of different molecular weight components obtained by ultrafiltration after the protease hydrolysate. [**Findings**]The alkaline protease hydrolysate is optimal for scavenging DPPH free radicals, ferrous ion chelation ability and total reducing power, among the three components obtained by ultrafiltration, the 3～10 kDa molecular weight components of the three components obtained had the strongest antioxidant activity in DPPH radicals and hydroxyl radicals. The >10 kDa molecular weight fraction has a better effect in the determination of ferrous ion chelation ability and total reducing power. [**Conclusions**]Different protease hydrolysate of *D. acutus* have antioxidant activity, and alkaline protease hydrolysate has strong antioxidant activity.

Keywords: *Deinagkistrodon acutus*; protease; active peptide; antioxidant

(责任编辑　方　兴)