



天津科技大学学报

Journal of Tianjin University of Science & Technology

ISSN 1672-6510, CN 12-1355/N

《天津科技大学学报》网络首发论文

题目： 卤虫酶解产物制备工艺优化及活性评价
作者： 李智，闫新荣，解伟，马浩然，陈耀沪，隋丽英
DOI： 10.13364/j.issn.1672-6510.20250042
收稿日期： 2025-03-10
网络首发日期： 2025-07-29
引用格式： 李智，闫新荣，解伟，马浩然，陈耀沪，隋丽英. 卤虫酶解产物制备工艺优化及活性评价[J/OL]. 天津科技大学学报.
<https://doi.org/10.13364/j.issn.1672-6510.20250042>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。



DOI: 10.13364/j.issn.1672-6510.20250042

卤虫酶解产物制备工艺优化及活性评价

李 智, 闫新荣, 解 伟, 马浩然, 陈耀沪, 隋丽英

(亚洲区域卤虫参考中心, 天津科技大学海洋与环境学院, 天津 300457)

摘要: 卤虫 (*Artemia*) 是盐湖重要的生物资源, 为了深度开发卤虫成虫的生物活性和应用潜力, 以水解度为指标, 采用单因素实验结合 Box-Behnken 响应面方法探究卤虫酶解产物的最佳制备条件。结果表明: 酶解最佳条件为碱性蛋白酶添量 2500 U/g、温度 55.6 °C、pH 9.0、酶解时间 2 h。在此条件下, 卤虫蛋白质水解度为 68.28%, 粗提物中多肽含量 (以卤虫干质量计) 为 35.0 mg/g, 其中低相对分子质量 (<3000) 组分中多肽含量为 20.9 mg/g。卤虫酶解产物具有较强的抗氧化活性, 其 DPPH 自由基、ABTS⁺ 自由基的 IC₅₀ 分别为 1.658 mg/mL、0.136 mg/mL; 当酶解产物质量浓度为 4 mg/mL 和 0.4 mg/mL 时, 其 DPPH 自由基、ABTS⁺ 自由基清除率与同浓度维生素 C 相当。卤虫酶解产物对 α -淀粉酶和二肽基态酶 IV (DPP-IV) 具有抑制作用, 表现出潜在的降血糖活性, 其中 DPP-IV 的 IC₅₀ 为 33.88 mg/mL。当酶解粗提物质量浓度为 100 mg/mL 时, DPP-IV 抑制活性接近于同质量浓度的西他列汀。本研究系统优化了卤虫成虫酶解工艺条件, 并证实卤虫酶解产物的抗氧化和降血糖活性, 为卤虫资源高值化利用提供了新的视角。

关键词: 卤虫; 酶解; 响应面法; 抗氧化活性; 降血糖活性

中图分类号: TS201.2

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510 (0000)00-0000-00

Optimization of Enzymatic Hydrolysis of *Artemia* Biomass and Bioactivity Evaluation

LI Zhi, YAN Xinrong, XIE Wei, MA Haoran, CHEN Yaohu, SUI Liying

(Asian Regional Artemia Reference Center, College of Marine and Environmental Sciences, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: *Artemia* is a crucial biological resource in saline lakes. To comprehensively explore the bioactivities and application prospects of *Artemia* biomass, this study investigated the optimal enzymatic hydrolysis conditions for preparing *Artemia* hydrolysates using single-factor experiments combined with Box-Behnken response surface methodology, with hydrolysis degree as the evaluation index. The results demonstrated that the optimal enzymatic conditions were: alkaline protease dosage 2500 U/g, 55.6°C, pH 9.0, and hydrolysis duration 2 h. Under these conditions, the protein hydrolysis degree reached 68.28%, with peptide content in the crude extract attaining 35.0 mg/g dry weight, including 20.9 mg/g of low molecular weight peptides (<3000). The *Artemia* hydrolysates exhibited remarkable antioxidant activity, showing IC₅₀ of 1.658 mg/mL and 0.136 mg/mL for DPPH and ABTS⁺ radical scavenging, respectively. At concentrations of 4 mg/mL and 0.4 mg/mL, its radical scavenging capacities were comparable to vitamin C at the same concentration. Notably, the hydrolysates demonstrated potential hypoglycemic activity through inhibition of α -amylase and dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV), with an IC₅₀ value of 33.88 mg/mL for DPP-IV inhibition. At a concentration of 100 mg/mL, its DPP-IV inhibitory activity approached that of Sitagliptin at the same concentration. This study systematically optimized the enzymatic hydrolysis conditions for *Artemia* for the first time, and confirmed both antioxidant and hypoglycemic activities of the hydrolysates, providing new perspectives for high-value utilization of *Artemia* resources.

收稿日期: 2025-03-10

基金项目: 山西省运城盐湖保护利用研究院“揭榜挂帅”项目(YHYJ-2023005)

作者简介: 李智(1998-), 女(汉族), 天津人, 硕士研究生, lizhi6833@163.com; 通讯作者: 隋丽英, 教授, suily@tust.edu.cn

Key words: *Artemia* biomass; enzymatic hydrolysis; response surface methodology; antioxidant activity; hypoglycemic activity

活性肽是由氨基酸组成的小分子化合物,广泛参与新陈代谢、免疫调节、神经传导等生理过程,在医药、食品、化妆品等领域有巨大应用潜力^[1]。海洋环境的复杂性(如高盐、低温、高压等)促使海洋生物进化形成独特的防御和代谢机制,进而产生多种具有特殊功能的活性多肽^[2-3]。研究^[4-5]表明,从海洋鱼类中提取的活性肽具有显著的抗氧化、抗菌和抗高血压活性。盐湖环境比海洋更为极端,其盐度一般高于海水,对生物生存构成严峻挑战。为适应高盐、高渗等恶劣条件,盐湖生物进化出独特的生存机制和代谢途径,更易产生特殊功能的活性物质,如杜氏盐藻能够积累具备抗氧化、抗肿瘤以及抗炎功效的 β -胡萝卜素^[6],嗜盐古菌 *Halorubrum* 可合成具有多重生物活性的菌红素^[7],一些嗜盐细菌还含有抑菌活性物质^[8]。盐湖生物是新型活性物质的重要来源,研究和应用前景广阔。

低等甲壳动物卤虫对盐度的耐受性极强,广泛分布于盐湖、盐田等高盐水环境^[9],其体内含有丰富的蛋白质^[10],是开发生物活性肽的优质来源。研究^[11]表明,从卤虫(*Artemia urmiana*)中分离得到的蛋白质提取物能够抑制白血病细胞 HL-60 增殖,并且与维甲酸在诱导细胞正常分化方面表现出显著的协同作用。此外,*A. urmiana* 蛋白质提取物还可以诱导人皮肤成纤维细胞增殖,刺激 I 型胶原蛋白的表达,在抗衰老方面具有应用潜力^[12]。卤虫水醇提取物可用于生物合成金纳米粒子,具有较强的抗氧化和杀菌效果^[13]。这些发现为卤虫提取物在食品、医药和化妆品领域提供了新的研究思路。然而,目前卤虫主要用于水产养殖的补充饵料,市场应用较为单一,尚未能得到深度开发和利用^[14]。

本研究以卤虫成虫为原料,通过酶解法制备卤虫酶解产物,使用 4 种蛋白酶,并以酶添加量、酶解 pH、酶解温度和酶解时间为变量因素,比较不同酶解产物的水解度,优化卤虫酶解工艺条件。在此基础上,通过超滤分段处理,进一步对酶解工艺优化后的酶解粗提物和相对分子质量小于 3000 组分的抗氧化和降血糖能力进行评估,以期合理开发,提高卤虫高值化资源利用率提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

冷冻卤虫,唐山曹妃甸惠通水产科技有限公司;碱性蛋白酶(20 万 U/g);天津诺奥酶生产力促进有限公司;木瓜蛋白酶(200 万 U/g)、酸性蛋白酶(70 万 U/g),上海麦克林生化科技有限公司;胃蛋白酶(300 万 U/g),上海毕得医药科技有限公司。

超滤管, Cytiva Pall 公司; CHT210R 型大容量高速台式离心机,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; 752G 型紫外可见分光光度计,上海析谱仪器有限公司; Pilot 5-8ES 型冷冻干燥机,北京博医康实验有限公司; T18 型高速组织分散机, IKA 公司。

1.2 卤虫酶解提取物制备

准确称取 100 g 卤虫冻块,自然解冻,匀浆处理 3 min,调节 pH 至所用蛋白酶的最适 pH,按照 100 U/g 的比例(以卤虫干质量计)加入蛋白酶,在最适温度下酶解 2 h。最适 pH 和最适温度分别为:碱性蛋白酶 pH 9, 50 °C;酸性蛋白酶 pH 3, 37 °C;胃蛋白酶 pH 2, 37 °C;木瓜蛋白酶 pH 6.5, 50 °C。酶解结束后,100 °C 水浴 15 min,终止酶解反应。冷却至室温后,8000 r/min 离心 12 min,收集上清液,过滤后进行冷冻干燥,得到卤虫酶解产物干粉。卤虫酶解粗提液使用截留相对分子质量为 3000 的超滤管,4000 r/min 离心 40 min,收集相对分子质量小于 3000 的组分,冷冻干燥备用。

1.3 卤虫酶解产物制备工艺优化

1.3.1 蛋白酶的选择

选择 4 种蛋白酶(碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶、酸性蛋白酶和胃蛋白酶),酶添量 100 U/g(以卤虫干重计),于最适酶解温度和 pH 条件下酶解卤虫成虫 2 h,酶解结束后沸水浴灭酶,离心收集上清液,以蛋白质水解度^[15]为指标确定最佳蛋白酶。

1.3.2 单因素实验

称取卤虫冻块 100 g,以酶添量 100 U/g(以卤虫干重计)、pH 9、50 °C 和酶解时间 2 h 为基准条件,固定其他因素和对应水平条件,以蛋白质水解度为指标,探究酶添量(100、600、1100、1600、2100 U/g)、温度(35、40、45、50、55、60 °C)、pH(6、7、8、9、10、11)和时间(0.5、1、2、3、4、5、6 h)对酶解效果的影响。

1.3.3 最陡爬坡实验

在单因素实验的基础上设计最陡爬坡实验,按一定的梯度增加酶添量、酶解温度、酶解 pH 和酶解时

间,测定蛋白质水解度,确定各单因素的最佳条件。

1.3.4 Box-Behnken 响应面优化设计

在爬坡实验基础上,选取酶添量(A)、酶解温度(B)、酶解pH(C)3个因素为自变量,以蛋白质水解度为响应值,利用Design-Expert 13软件进行响应面Box-Behnken Design实验设计。

1.4 蛋白质水解度的测定

参考林虬等^[16]的方法配制邻苯二甲醛(OPA)试剂。分别配制A溶液(3.810 g四硼酸钠和100 mg十二烷基磺酸钠溶于75 mL蒸馏水)和B溶液(80 mg 97% OPA溶于2 mL乙醇),等体积混匀后加88 mg二巯苏糖醇(DTT),蒸馏水定容至100 mL,全程需避光。取400 μL酶解液加入3 mL OPA试剂,避光反应2 min,测定样品在340 nm处的吸光度,通过标准曲线得到丝氨酸当量值 $C_{\text{Serine-NH}_2}$ (mmol/L),按照式(1)一式(3)计算蛋白质水解度。

$$W_{\text{serine-NH}_2} = C_{\text{serine-NH}_2} \times \frac{V \cdot N}{X \cdot P\%} \quad (1)$$

$$h = \frac{W_{\text{serine-NH}_2} - \beta}{\alpha} \quad (2)$$

$$DH = \frac{h}{h_{\text{tot}}} \quad (3)$$

式中: $W_{\text{serine-NH}_2}$ 为每克蛋白质中含serine-NH₂的量,mmol/g; X 为样品质量,g; P ,为待测样品中蛋白质质量分数,%; V 为待测样品体积,L; N 为稀释倍数; h 为每克样品蛋白被断裂的肽键数,mmol/g; h_{tot} ,为每克样品蛋白质所含的总肽键数,mmol/g; α 、 β 为常数,分别为1.00、0.40。

1.5 多肽含量的测定

采用双缩脲试剂法测定可溶性多肽含量^[17]。称取1.50 g五水硫酸铜和6.0 g酒石酸钾钠溶解于500 mL蒸馏水中,搅拌并缓慢加入300 mL 10%氢氧化钠溶液,充分混匀后用蒸馏水定容至1 L,制得双缩脲试剂。取1 mL样品溶液加入4 mL双缩脲试剂,混匀静置30 min,测定540 nm波长处吸光度,通过牛血清白蛋白标准曲线计算多肽含量,实验过程中以超纯水设置样品空白和试剂空白对照组。卤虫样品干质量为 m_1 ,样品多肽质量为 m_2 ,卤虫酶解提取物多肽含量(w ,单位为mg/g)按照式(2)计算。

$$w = m_2 / m_1 \quad (4)$$

1.6 抗氧化活性测定

1.6.1 DPPH 自由基清除能力

参考Huang等^[18]的方法,用95%甲醇配制0.2

mmol/L DPPH 自由基溶液,将500 μL DPPH 溶液与500 μL待测液混合,25 °C避光放置30 min后,测定517 nm处吸光度,以相同浓度维生素C为阳性对照,根据式(3)计算DPPH清除率(R_{DPPH}),并通过GraphPad Prism 8.0软件进行非线性回归拟合,计算抑制率达50%时对应的浓度,即为IC₅₀。

$$R_{\text{DPPH}} = \frac{A_0 - (A_x - A_1)}{A_0} \times 100\% \quad (5)$$

式中: A_0 为DPPH溶液的吸光度, A_x 为待测液和DPPH溶液的吸光度, A_1 为待测液的吸光度。

1.6.2 ABTS⁺自由基清除能力

参考Fan等^[19]的方法,配制7 mmol/L ABTS⁺溶液和2.45 mmol/L K₂S₂O₈溶液,混合后常温避光16 h,用乙醇将混合液制成734 nm下吸光度为(0.70±0.02)的工作液,将300 μL待测液与600 μL工作液混匀,30 °C反应6 min后测定734 nm处吸光度,以相同浓度维生素C为阳性对照,根据式(4)计算ABTS⁺清除率(R_{ABTS^+}),并计算IC₅₀值。

$$R_{\text{ABTS}^+} = \frac{A_0 - (A_x - A_1)}{A_0} \times 100\% \quad (6)$$

式中: A_0 为ABTS⁺溶液的吸光度, A_x 为待测液和ABTS⁺溶液的吸光度, A_1 为待测液的吸光度。

1.7 降糖活性的测定

1.7.1 二肽基肽酶(DPP-IV)抑制能力

参考Matheussen等^[20]的方法,采用试剂盒(荧光法)对DPP-IV抑制率进行测定,以相同浓度的西格列汀为阳性对照,计算卤虫酶解提取物DPP-IV的IC₅₀。

1.7.2 α-淀粉酶抑制能力

参考李雨鸿等^[21]的方法,取200 μL 50 mg/mL样品溶液与400 μL 2 U/mL α-淀粉酶溶液混合,37 °C反应5 min;加入400 μL 1%淀粉溶液,37 °C继续反应10 min;依次加入1.5 mL 3,5-二硝基水杨酸(DNS)试剂,沸水浴10 min,冰浴冷却后加2 mL蒸馏水,测定540 nm处吸光度。以相同浓度的阿卡波糖为阳性对照,根据式(5)计算抑制率($R_{\alpha\text{-淀粉酶}}$),并计算IC₅₀值。

$$R_{\alpha\text{-淀粉酶}} = \left(1 - \frac{A_{\text{样本}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{对照}}} \right) \times 100\% \quad (7)$$

式中: $A_{\text{样本}}$ 为待测样品和酶的吸光度, $A_{\text{空白}}$ 为样品

的吸光度, $A_{\text{对照}}$ 为酶的吸光度。

1.8 数据处理

所有实验均为 3 组平行, 采用 SPSS 22.0 进行单因素方差分析 (ANOVA), 采用 Waller-Duncan's 多重比较法检验组间显著性差异 ($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 蛋白酶的选择

不同蛋白酶对卤虫蛋白质水解度的影响如图 1 所示, 不同小写字母表示组间差异显著 ($P < 0.05$)。在相同酶解时间条件下, 4 种蛋白酶对卤虫蛋白的酶解程度依次为: 碱性蛋白酶 > 木瓜蛋白酶 > 酸性蛋白酶 > 胃蛋白酶 (图 1), 碱性蛋白酶的水解度显著高于其他 3 种酶 ($P < 0.05$)。因此, 本研究选择碱性蛋白酶进行后续卤虫酶解条件的探究。

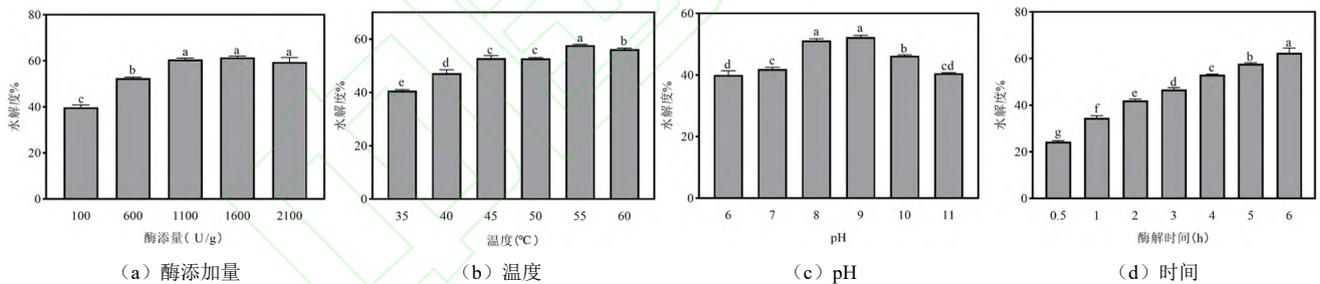
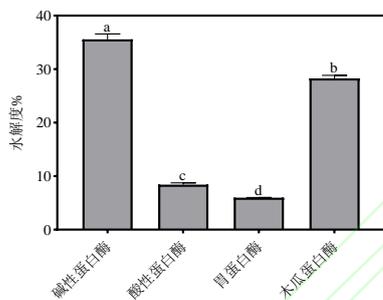


图 2 不同因素对卤虫蛋白质水解度的影响

Fig. 2 Effects of different factors on the degree of protein hydrolysis of *Artemia* biomass

2.3 酶解工艺优化

2.3.1 爬坡实验

爬坡实验设计及结果见表 1。当酶添加量 (A) 1500 U/g (以卤虫干质量计)、酶解温度 (B) 55°C、酶解 (C) pH 9 时, 蛋白质水解度 (Y) 达到最大, 因此选择其作为响应面实验的中心点。

表 1 爬坡实验设计及结果

Tab. 1 Experimental design and results of steepest ascent

实验号	A / (U/g)	B / °C	C	Y / %
1	600	40	6	30.86
2	900	45	7	48.71

图 1 不同蛋白酶对卤虫蛋白质水解度的影响

Fig. 1 Effects of different proteases on the degree of protein hydrolysis of *Artemia* biomass

2.2 单因素实验结果

不同因素对卤虫蛋白质水解度的影响如图 2 所示, 不同小写字母表示组间差异显著 ($P < 0.05$)。随着蛋白酶添加量的增加, 卤虫蛋白质水解度呈现出先上升后趋于稳定的变化趋势。当酶添加量为 1100 U/g 时, 水解度达到最大值。因此, 选择 1100 U/g 作为蛋白酶的最佳添加量。

随着酶解温度增加, 蛋白质水解度逐渐提高, 当酶解温度为 55 °C 时, 水解度达到最大值。因此, 选择 55 °C 作为最佳酶解温度。

卤虫蛋白质水解度随 pH 的增大先升高后降低。当 pH > 9 时, 酶的生物活性显著下降, 酶解能力也随之减弱。因此, 选择 pH 9 作为后续实验的条件。

卤虫蛋白质水解度随酶解时间的延长逐渐升高, 但过长的酶解时间可能导致酶活性下降或底物过度水解, 从而影响产物的品质。综合考虑水解度和时间成本, 本研究选择 2 h 作为酶解时间。

3	1200	50	8	57.45
4	1500	55	9	63.59
5	1800	60	10	57.10
6	2100	65	11	34.45

2.3.2 响应面优化实验

对酶添加量 (A)、酶解温度 (B) 和酶解 pH (C) 这 3 个实验变量进行 3 因素 3 水平的响应面优化实验, 以卤虫蛋白质水解度为考察指标, 响应面实验设计及结果见表 2。

利用软件 Design-Expert13 对卤虫蛋白质水解度

进行多元回归拟合, 得到二次多项式回归模型方程 $Y=66.74+4.03A-0.0770B+0.0562C-0.3559AB+0.1959AC+1.26BC-1.15A^2-6.54B^2-4.65C^2$ 。对该方程进行方差分析, 并对该模型各系数进行显著性检验, 结果见表 3。

表 2 响应面实验设计及结果

Tab. 2 Response surface experiment design and results

实验号	A/ (U/g)	B/°C	C	Y/%
1	500	45	9	53.70
2	2500	45	9	63.18
3	500	65	9	55.64
4	2500	65	9	63.70
5	500	55	8	57.20
6	2500	55	8	64.16
7	500	55	10	57.33
8	2500	55	10	65.08
9	1500	45	8	57.73
10	1500	65	8	53.67
11	1500	45	10	54.91
12	1500	65	10	55.89
13	1500	55	9	66.27
14	1500	55	9	67.19
15	1500	55	9	67.53
16	1500	55	9	66.91
17	1500	55	9	65.78

表 3 回归模型方差分析

Tab. 3 Analysis of variance of regression model equation

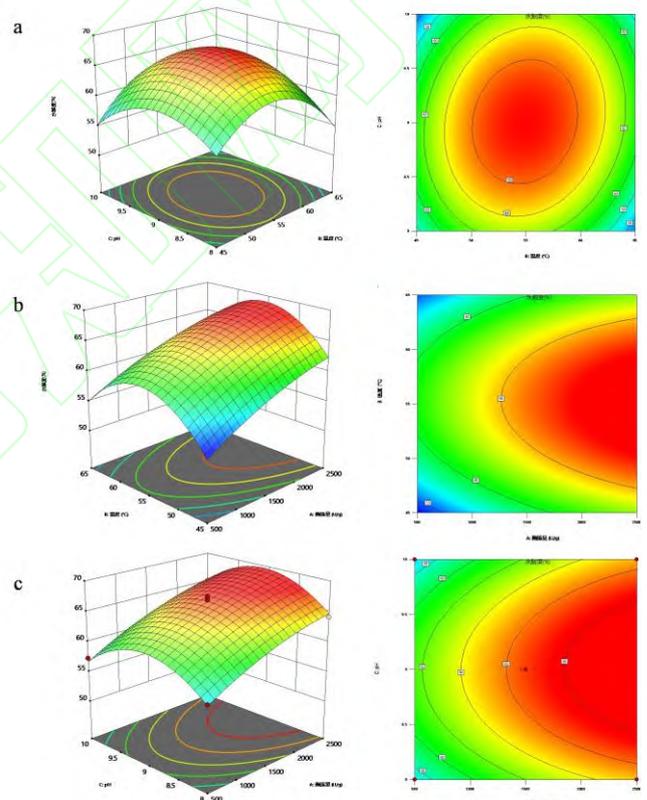
差异来源	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
模型	435.43	9	48.38	47.15	<0.0001	**
A	129.87	1	129.87	126.57	<0.0001	**
B	0.0475	1	0.0475	0.0463	0.8358	
C	0.0253	1	0.0253	0.0246	0.8797	
AB	0.5066	1	0.5066	0.4937	0.5050	
AC	0.1536	1	0.1536	0.1497	0.7103	
BC	6.37	1	6.37	6.21	0.0415	*
A ²	5.52	1	5.52	5.38	0.0534	
B ²	179.95	1	179.95	175.38	<0.0001	**
C ²	91.03	1	91.03	88.72	<0.0001	**
残差	7.18	7	1.03			
失拟项	5.17	3	1.72	3.43	0.1326	
纯误差	2.01	4	0.5030			
总误差	442.62	16				

$$R^2=0.9838 \quad R^2_{Adj}=0.9629$$

注: *表示差异显著, $P<0.05$; **表示差异极显著, $P<0.01$ 。

由表 3 可知, 该模型的 F 为 47.15, $P<0.0001$, 表明该响应面拟合模型极显著, 失拟项误差不显著 ($P>0.05$), 说明回归模型拟合程度良好。校正系数 R^2 为 0.9838, 决定系数 R^2_{adj} 为 0.9629, 表明该模型较为可靠, 预测值与实验值之间具有较强的相关性。各因素对卤虫酶解产物水解度的影响程度排序为: 酶添加量 (A) > 酶解温度 (B) > 酶解 pH (C)。

卤虫蛋白质水解度的响应曲面与等高线图如图 3 所示。相较于酶添量与酶解温度、酶添量与酶解 pH, 酶解 pH 与酶解温度的响应面坡度更陡, 表明这两个因素之间存在交互作用, 与模型预测结果一致。



a: 酶解 pH 与酶解温度 b: 酶添量与酶解温度 c: 酶添量与酶解 pH

图 3 卤虫蛋白质水解度的响应曲面与等高线图

Fig. 3 Response surface diagram and contour line of protein hydrolysis of *Artemia* biomass

2.4 最佳制备条件预测及验证

经过响应面优化得到制备卤虫酶解提取物的最优条件, 即酶添加量 2500 U/g, 酶解温度 55.6°C, 酶解 pH 9.0, 此时预测蛋白质水解度最大值为 70.15%。采用预测条件进行酶解实验, 测得此条件下卤虫蛋白质水解度为 68.28%, 与预测值 70.15%较为接近, 证

明此模型参数可靠。此时，酶解粗提物中多肽含量为 35.0 mg/g，小相对分子质量组分多肽含量为 20.9 mg/g。

2.5 卤虫酶解产物的抗氧化活性

卤虫成虫酶解提取物抗氧化活性如图 4 所示。

以维生素 C 作阳性对照，卤虫酶解产物 DPPH 自由基清除活性随样品浓度的增加而增加。与维生素 C 相比，卤虫酶解粗提物对 DPPH 自由基的清除率整体低于维生素 C，当质量浓度达到 4 mg/mL 时，其清除率接近于同浓度维生素 C，达到 82.97%。卤虫酶解粗提物清除率的 IC₅₀ 为 1.772 mg/mL，相对分子质量小于 3000 组分的 IC₅₀ 为 1.658 mg/mL。

以维生素 C 作阳性对照，卤虫酶解产物 ABTS⁺ 自由基清除活性也呈浓度依赖性，当卤虫酶解粗提物为 0.8 mg/mL 时，ABTS⁺ 自由基清除效果与同浓度维生素 C 相似。粗提物 IC₅₀ 为 0.136 mg/mL，相对分子质量小于 3000 组分的 IC₅₀ 为 0.105 mg/mL。

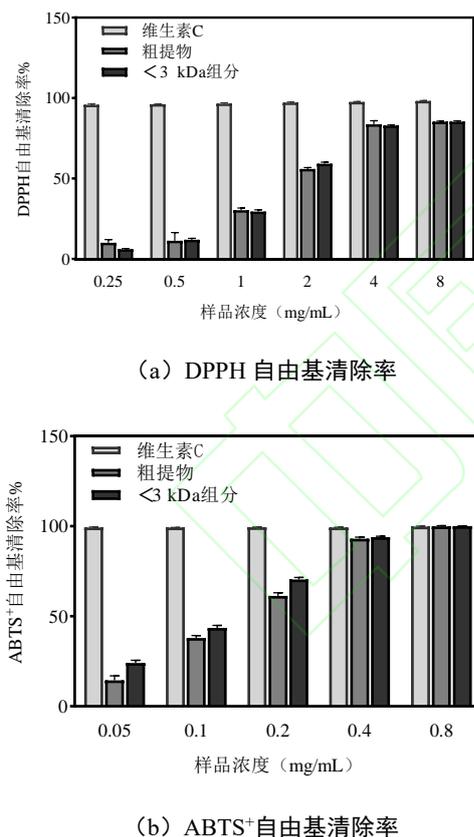


图 4 卤虫成虫酶解提取物抗氧化活性

Fig. 4 Antioxidant activities of the enzymatic extract from *Artemia* biomass

2.6 卤虫酶解产物的降糖活性

卤虫成虫酶解提取物降糖活性如图 5 所示。

以西他列汀作为阳性对照，卤虫酶解产物的 DPP-IV 抑制活性呈浓度依赖性。与西他列汀相比，

卤虫酶解粗提物对 DPP-IV 抑制率整体低于西他列汀，当质量浓度达到 100 mg/mL 时，其活性接近于同浓度西他列汀，达到 84.15%。粗提物抑制率的 IC₅₀ 为 33.88 mg/mL，相对分子质量小于 3000 组分的 IC₅₀ 为 72.60 mg/mL。

以阿卡波糖作为阳性对照，卤虫酶解产物的 α-淀粉酶抑制活性虽呈浓度依赖性，但整体不及阳性对照阿卡波糖。卤虫酶解粗提物 IC₅₀ 为 135.23 mg/mL，相对分子质量小于 3000 组分的 IC₅₀ 为 137.10 mg/mL。

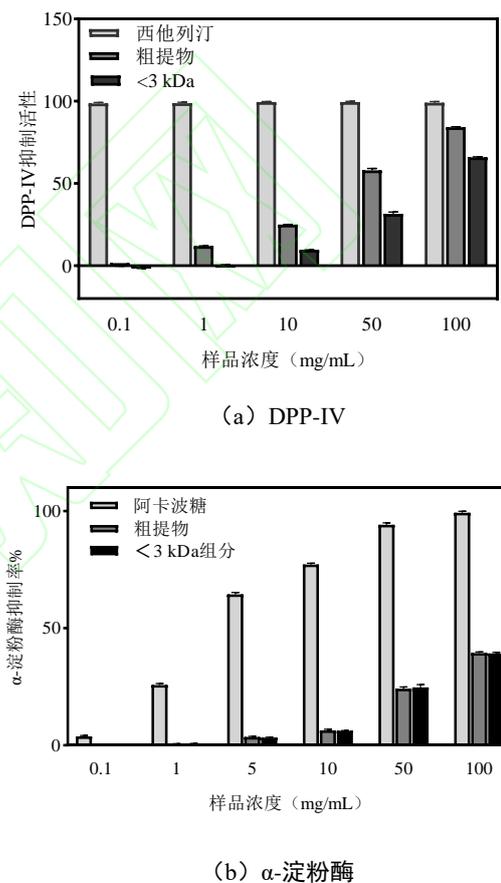


图 5 卤虫成虫酶解提取物降糖活性

Fig. 5 Hypoglycemic activities of the enzymatic extract from *Artemia* biomass

3 讨论

本研究中碱性蛋白酶在卤虫酶解中表现出更好的水解效果，显示出其与卤虫蛋白特性的高度适配性。碱性蛋白酶特异性切割赖氨酸和精氨酸的羧基端肽键^[22]，而卤虫的蛋白中富含这两种碱性氨基酸，因此更容易被碱性蛋白酶识别和切割^[23]。此外，碱性环境 (pH 8-10) 可以促进卤虫蛋白变性以暴露更多切割位点，同时能够削弱卤虫几丁质外骨骼的物理屏障，

从而提升酶解效率^[24-25]。酸性蛋白酶、胃蛋白酶偏好疏水/芳香族氨基酸(如苯丙氨酸 Phe、酪氨酸 Tyr),且极端酸性(pH 2-3)环境易导致蛋白聚集,不利于蛋白酶发挥水解功能^[26]。因此,碱性蛋白酶可以更好识别卤虫蛋白的氨基酸组成,加之碱性环境协同提高蛋白质水解度,显著优于其他蛋白酶。

反应体系中酶的浓度影响酶促反应的效果。酶添加量较小时,酶与底物结合位点有限,酶解反应不充分;而酶添加量过高则会导致底物饱和,酶促反应速率不再增加,甚至因过度水解导致蛋白质结构不稳定^[27]。温度也会直接影响蛋白酶的活性,适度升高的温度可增加酶与底物的碰撞频率,促进反应,但温度过高会使酶失活,降低反应效率^[28]。pH 是酶促反应的关键因素之一,适当的 pH 才能有效地断开肽键发挥蛋白酶的功效^[29],而偏离正常范围则会导致酶活性和结合能力下降。关于酶解时间的优化结果表明,卤虫蛋白质水解度随酶解时间的延长呈显著上升的趋势,酶解 2 h 后水解度达到 42.08%。这一结果与陈铭中等^[30]以禾虫(疣吻沙蚕)为原料的研究结果具有相似性,这可能源于两种原料都具有丰富的内源蛋白酶和相对松散的组织结构。此外,本研究的酶解效率显著高于陈秋月等^[31]报道的白乌鱼鱼肉酶解结果(5 h 水解度 40%),这可能与原料的基质特性有关。虽然延长酶解时间可以进一步提高水解度,但考虑到过长时间的酶解会导致产物降解或者活性降低等问题,因此将酶解时间控制在 2 h 为最佳。综上,本研究通过单因素实验、最陡爬坡实验和响应面设计,优化了卤虫成虫酶解产物的制备工艺,确定了碱性蛋白酶添加量 2500 U/g、温度 55.6 °C、pH 9.0、酶解时间 2 h 的最佳条件。

优化后的酶解工艺使卤虫蛋白质水解度达到 68.28%,与文献报道的海洋动物蛋白酶解工艺相比处于较高水平。研究^[32]表明以对虾虾头和虾壳为原料,采用复合酶解工艺优化后,蛋白质水解度为 15.62%。贝类(如牡蛎、扇贝)因蛋白结构致密且疏水氨基酸占比高,其水解度普遍低于 40%^[33],以南极磷虾为原料经酶解工艺优化后蛋白质水解度仅为 42.17%^[34]。这一差异可能和卤虫独特的生物学特性相关,卤虫体内富含内源性蛋白酶且结构较为松散,容易发生自溶现象^[35]。此外,卤虫蛋白中富含碱性氨基酸使得碱性蛋白酶能识别更多的酶切位点,从而提高蛋白水解效率。本研究卤虫粗提物中多肽含量为 35.0 mg/g(以卤虫干重计),与牡蛎(23.14 mg/g)相比具有一定的优势,但低于南极磷虾(240 mg/g)、海参(288.4 mg/g)

等高蛋白原料^[36-37]。这一差异可能与卤虫蛋白含量(成虫干质量约 50%~60%)及酶解产物的相对分子质量分布相关。未来可尝试使用复合酶分步水解或膜分离富集技术,以进一步提高多肽产率。

本研究酶解工艺优化后,获得的卤虫酶解提取物展现出显著的抗氧化活性,其 DPPH 自由基清除能力($IC_{50}=1.658$ mg/mL)与 ABTS⁺自由基清除能力($IC_{50}=0.136$ mg/mL)均属于海洋动物酶解产物的较高水平。与文献报道相比,海参内脏酶解产物 DPPH 的 IC_{50} 为 1.26 mg/mL^[38],南极磷虾酶解产物 DPPH 的 IC_{50} 为 1.372 mg/mL, ABTS⁺自由基的 IC_{50} 为 0.16 mg/mL^[39]。卤虫酶解产物的高抗氧化活性可能源于卤虫蛋白中富集的碱性氨基酸(精氨酸 Arg、赖氨酸 Lys)在酶解后形成富含正电荷的短肽(如精氨酸 Arg-脯氨酸 Pro、赖氨酸 Lys-酪氨酸 Tyr),其可通过电子转移和氢键作用高效中和自由基^[40]。此外,碱性蛋白酶的水解特异性(靶向切割 Arg/Lys 羧基端)可能释放更多含芳香族或含硫氨基酸的活性片段(如酪氨酸 Tyr-甘氨酸 Gly、半胱氨酸 Cys-亮氨酸 Leu),进一步协同提升抗氧化性能^[41]。

本研究通过二肽基态酶 IV (DPP-IV) 和 α -淀粉酶双靶点评价体系,揭示了卤虫酶解提取物的降糖活性特征。卤虫酶解粗提物对 DPP-IV 产生抑制作用, IC_{50} 为 33.88 mg/mL,但抑制活性低于其他海洋动物来源的酶解提取物,如鳗鱼蛋白酶解提取物($IC_{50}=5.45$ mg/mL)^[42]和南极磷虾酶解提取物纯化组分($IC_{50}=15.39$ mg/mL)^[43]。卤虫酶解粗提物也具有一定的 α -淀粉酶的抑制活性,但与其他海洋生物来源的活性肽,如牡蛎肽相比,其对 α -淀粉酶的抑制作用偏弱^[44]。这一差异可能和卤虫本身氨基酸组成以及酶解工艺后的高水解度有关。本研究初步表明卤虫酶解粗提物具有一定的降糖活性,但未来需结合现代分离纯化技术获取纯度更高和活性更好的降糖活性肽。

4 结 语

本研究成功优化了卤虫酶解产物的制备工艺,最佳酶解条件为:碱性蛋白酶添加量 2500 U/g、温度 55.6 °C、pH 9.0、酶解时间 2 h。在此条件下,卤虫蛋白的水解度达到 68.28%,此时卤虫酶解产物表现出较强的 DPPH 自由基、ABTS⁺自由基清除活性和 DPP-IV 抑制活性。本研究不仅优化了卤虫的酶解工艺条件,还证实了其酶解产物的抗氧化和降血糖活性,为卤虫资源的高值化利用提供了新的视角。

参考文献:

- [1] KANG L, HAN T, CONG H, et al. Recent research progress of biologically active peptides[J]. *BioFactors*, 2022, 48(3): 575-596.
- [2] 林端权, 郭泽镔, 张怡, 等. 海洋生物活性肽的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(18): 367-373.
- [3] AHMED I, ASGHER M, SHER F, et al. Exploring marine as a rich source of bioactive peptides: challenges and opportunities from marine pharmacology[J]. *Marine drugs*, 2022, 20(3): 208.
- [4] PAN X Y, WANG Y M, LI L, et al. Four antioxidant peptides from protein hydrolysate of red stingray (*Dasyatis akajei*) cartilages: isolation, identification, and *in vitro* activity evaluation[J]. *Marine drugs*, 2019, 17(5): 263.
- [5] 闫洪波, 楚英珂, 李雯慧, 等. 海洋生物活性肽生物学和功能特性的研究进展[J]. *食品科学*, 2023, 44(7): 18-28.
- [6] 王波. 利用杜氏盐藻生产 β -胡萝卜素的研究以及光合反应器的开发[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2020.
- [7] 杨欢. 嗜盐古菌 *Halorubrum* 菌红素合成路径解析[D]. 天津: 天津科技大学, 2022.
- [8] 杨海山, 邹忠阳, 张鑫, 等. 青海盐湖抑菌活性嗜盐菌的筛选及其生物学特征研究 [J/OL]. *海洋湖沼通报*, 1-13[2025-03-27]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/37.1141.p.20240125.0945.006.html>.
- [9] 刘贤华, 许越. 卤虫的研究与应用[J]. *中国水产*, 2023(5): 73-74.
- [10] 刘晓翠, 邓洪刚, 于学权, 等. 不同产地卤虫幼体对云石斑鱼幼苗生长和抗胁迫能力的影响[J]. *天津科技大学学报*, 2022, 37(2): 18-23.
- [11] DEEZAGI A, CHASHNIDEL A, VASELI N, et al. The effects of purified *Artemia* extract proteins on proliferation, differentiation and apoptosis of human leukemic HL-60 cells[J]. *Asian pacific journal of cancer prevention*, 2016, 17(12): 5139-5145.
- [12] VASELI-HAGH N, DEEZAGI A, SHAHRAKI M K. Anti-aging effects of the proteins from *Artemia* extract on human fibroblasts cell proliferation and collagen expression in induced aging conditions[J]. *Annals of biotechnology*, 2018, 1(3): 1015.
- [13] ZINSAZ P, JAFARIZADEH-MALMIRI H, ANARJAN N, et al. Biogenic synthesis of gold nanoparticles using *Artemia urmiana* extract and five different thermal accelerated techniques: Fabrication and characterization[J]. *Zeitschrift für naturforschung C*, 2022, 77(9-10): 395-402.
- [14] 马婷, 韩朝婕, 贾旭颖, 等. 卤虫的研究进展[J]. *河北渔业*, 2020(3): 57-58.
- [15] SPELLMAN D, MCEVOY E, OCUINN G, et al. Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis[J]. *International dairy journal*, 2003, 13(6): 447-453.
- [16] 林虬, 黄薇, 宋永康, 等. 棉籽蛋白水解物水解度 3 种测定方法的比较[J]. *福建农业学报*, 2011, 26(6): 1076-1080.
- [17] 凌云霄, 江城, 郑娟, 等. 响应面法优化红外制备高凝胶性血浆蛋白粉工艺[J]. *肉类研究*, 2013, 27(7): 20-25.
- [18] HUANG H, CEN J, YANG D, et al. Isolation and characterization of antioxidant peptides from *oyster* (*Crassostrea rivularis*) protein enzymatic hydrolysates[J]. *Food science and nutrition*, 2023, 11(1): 261-273.
- [19] FAN C, GE X, HAO J, et al. Identification of high iron-chelating peptides with unusual antioxidant effect from sea cucumbers and the possible binding mode[J]. *Food chemistry*, 2023, 399: 133912.
- [20] MATHEEUSSEN V, LAMBEIR A M, JUNGRAITHMAYR W, et al. Method comparison of dipeptidyl peptidase IV activity assays and their application in biological samples containing reversible inhibitors[J]. *Clinica chimica acta*, 2012, 413(3/4): 456-462.
- [21] 李雨鸿, 殷朝敏, 范秀芝, 等. 桑黄提取物的体外抗氧化、降血糖及降尿酸活性[J]. *现代食品科技*, 2022, 38(5): 71-80.
- [22] 熊科, 邓蕾, 柳佳芸, 等. 蛋白酶水解底物特异性机制研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(19): 292-298.
- [23] NGUYEN T N A, HUYNH T T, NGUYEN V H. Evaluating *Artemia* biomass and gut weed (*Ulva intestinalis*) meal as a dietary protein source for black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) postlarvae[J]. *Egyptian journal of aquatic research*, 2023, 49(1): 97-103.
- [24] 李华伟. 几丁质结合蛋白在卤虫休眠卵形成过程中的功能研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2014.
- [25] 张阿磊, 魏国光, 张弛, 等. 几丁质资源生物降解和高值转化的研究进展[J]. *合成生物学*, 2024, 5(6): 1279-1299.
- [26] 张杰, 杨玺, 李游山. 蛋白酶及其抑制剂关键活性位点研究进展[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(2): 561-579.
- [27] 赵焱涛, 梁璋成, 何志刚, 等. 红曲糟制曲条件优化及

- 米曲霉产酶条件研究[J]. 中国酿造, 2024, 43(9): 124-129.
- [28] 冯晓焕, 罗毅皓, 蒋琳, 等. 青稞酒糟多肽的工艺优化及其体外 ADH 激活与抗氧化作用 [J/OL]. 食品与发酵工业, 1-13[2025-03-27]. <https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.041695>.
- [29] 林登峰, 李珊慧, 赵洪雷, 等. 响应面法优化三文鱼骨排酶解工艺的研究[J]. 中国调味品, 2024, 49(8): 90-97.
- [30] 陈铭中, 钟旭美, 陈怡帆, 等. 酶解法制备禾虫多肽液的工艺优化及其脱腥工艺探究[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(12): 304-313.
- [31] 陈秋月, 张佳怡, 张鹏程, 等. 白乌鱼鱼肉多肽的酶解工艺优化[J]. 中国调味品, 2024, 49(6): 77-82.
- [32] 张风, 夏旭, 周爱梅, 等. 虾头虾壳蛋白质酶解制备抗氧化肽的研究[J]. 南方水产科学, 2015, 11(6): 79-87.
- [33] 陈笑迎, 田桂芳, 陈智慧, 等. 贝类蛋白改性技术研究进展[J]. 食品工业科技, 2022, 43(6): 420-428.
- [34] 吕传萍, 李学英, 杨宪时, 等. 南极磷虾酶解工艺的研究[J]. 湖南农业科学, 2011(17): 130-133.
- [35] GULBRANDSEN J, BJERKENG B, KIM J, et al. Post mortem changes in the concentration of free amino acids in *Artemia franciscana* at different temperatures[J]. Aquaculture, 2009, 291(1/2): 111-114.
- [36] 张庆春, 余晓婉, 相兴伟, 等. 复配酶法制备南极磷虾鲜味酶解液的工艺优化[J]. 食品工业科技, 2022, 43(2): 195-205.
- [37] 方园, 郭鹏川, 刘小玉, 等. 超声-酶联半仿生法优化海参的水提工艺及体外抗肿瘤活性研究[J]. 华西药学杂志, 2019, 34(4): 388-392.
- [38] 杨佳洪, 黄义松, 魏好程, 等. 海参内脏酶解工艺条件的优化[J]. 食品工业科技, 2017, 38(3): 180-185.
- [39] ZHANG S Y, ZHAO G X, SUO S K, et al. Purification, identification, activity evaluation, and stability of antioxidant peptides from alcalase hydrolysate of antarctic krill (*Euphausia superba*) proteins[J]. Marine drugs, 2021, 19(6): 347.
- [40] 左依瑾, 于子淇, 申雪晴, 等. 鱼源抗氧化肽的结构与其功能关系研究进展[J]. 食品工业科技, 2023, 44(14): 419-429.
- [41] 孙跃如, 林桐, 赵吉春, 等. 谷物源抗氧化肽: 制备、构效及应用[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(10): 299-305.
- [42] 曹洪震. 鳗鱼蛋白源 DPP-IV抑制活性肽的制备、分离纯化及性质鉴定[D]. 无锡: 江南大学, 2023.
- [43] 赵侠. 脱脂南极磷虾粉源 DPP-IV抑制肽和抗氧化肽的研究及中试规模制备[D]. 上海: 上海海洋大学, 2023.
- [44] 张佩, 陈忠琴, 曹文红, 等. 牡蛎抗氧化及降糖肽的结构特征及其体外模拟消化特性[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(21): 196-203.