

栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 中抗氧化肽的 分离纯化及性质研究*

胡文婷 孙 谧¹⁾ 王跃军

(中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 青岛科技大学化工学院 青岛 266042)

(中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

摘要 以栉孔扇贝内脏团为原料, 对其中抗氧化肽的制备、纯化及性质进行了研究。首先采用硫酸铵沉淀、DEAE-Sephadex A-50 阴离子交换层析的方法, 进行了扇贝提取蛋白的制备, 其次采用海洋蛋白酶 YS-80 水解、Sephadex G-25 凝胶层析的方法, 进行扇贝抗氧化肽的制备, 获得多肽粗品 (海洋肽, PCF), 并进一步采用 CM Sepharose 阳离子交换层析和反相高效液相色谱的方法, 对扇贝抗氧化肽进行了纯化, 结果得到组分 PCF-3A, 反相高效液相显示为单一峰。采用茚三酮反应、Sephadex G-15 凝胶层析和 AccQ-Tag 氨基酸分析柱, 进行了 PCF-3A 的理化性质研究。结果表明, 茚三酮反应呈阳性; 分子量约为 794D; 由 7 种氨基酸组成, 分别为天冬氨酸、甘氨酸、苏氨酸、丙氨酸、缬氨酸、赖氨酸和脯氨酸。采用邻苯三酚自氧化体系和 Fenton 反应体系对 PCF-3A 的抗氧化活性进行了研究, 发现该肽可有效清除羟自由基和超氧阴离子, 半抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 0.39 mg/ml 和 2.85 mg/ml 具有明显的抗氧化、抗衰老作用。

关键词 栉孔扇贝, 抗氧化肽, 分离纯化, 性质

中图分类号 Q514.3

自由基可造成机体的多种损伤和病变, 加速机体的衰老。自由基清除剂也称为抗氧化剂可清除体内多余的自由基, 从而增强机体免疫力, 延缓衰老。合成抗氧化剂, 如 BHT、BHA, 虽然有较强的抗氧化能力, 但是却对人体构成多种潜在的危害 (Saiga *et al.* 2003)。因此, 近年来寻找和开发安全、无毒的天然抗氧化剂的研究引起了广泛关注 (沈文英等, 2004; 孙虎山等, 2005)。以一定的蛋白为底物, 在适宜的酶解作用下可产生具有抗氧化作用的肽类。Chen 等从大豆蛋白 (1998)、Suetsuna 等 (2000a, b) 从酪蛋白、沙丁鱼肉的酶解产物中均分离得到了具有抗氧化活性的功能肽。酶解蛋白制备的生物活性肽具有生理活性强、安全可靠等优点, 已成为新型天然抗氧化剂的主要来源。

我国沿海海域中蕴藏着丰富的蛋白资源 (陈

师勇等, 2004; 于华华等, 2005), 海洋贝类内脏团中就包含许多具有较强生理活性的蛋白质。作者通过水解扇贝内脏团中具有抗氧化活性的蛋白, 得到了抗氧化活性肽——海洋肽 (PCF) (王春波等, 1998)。通过动物及病理模型实验表明, 该肽具有明显的抗皮肤衰老及抗紫外线对皮肤损伤作用 (刘晓萍等, 2001; 贺孟泉等, 1998), 并且对小鼠的肝脏和胸腺淋巴细胞的活性具有促进或保护作用 (王玉贞等, 2001; 杜卫等, 2000)。本文中报道了海洋肽的制备方法, 并在此基础上进一步对其中活性物质的纯化及性质进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 由黄海水产研究所小麦岛养殖实验基地提供, 内脏团为剥离扇贝柱后的剩余部分。海洋蛋白酶 YS-80 由黄海水

* 国家“863”计划资助项目, 2003AA625070号。胡文婷, 硕士, E-mail huwenting_0@yahoo.com.cn

1) 通讯作者: 孙 谧, 研究员, 博士生导师, E-mail summ@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2004-11-14 收修改稿日期: 2004-12-21

产研究所酶工程开放实验室提供。邻苯三酚、番红花红为进口分装, DEAE Sephadex A-50, Sephadex G-25, Sephadex G-15, CM Sepharose FF 购于 Pharmacia 公司, 杆菌肽、P 物质片段 (4-11)、二肽 (Phe-Ser) 购于 sigma 公司, 乙腈 (色谱纯) 购于上海星狮生物工程有限公司, 其他试剂均为国产商品试剂 (分析纯)。

1.2 主要仪器

HITACHI 20PR-52D 高速冷冻离心机, IKB 2021 恒温层析冷柜, Gilson III 型低压制备色谱, Waters 2690 高效液相色谱系统, LGJ 0.5 冷冻干燥机。

1.3 抗氧化肽的制备

1.3.1 扇贝提取蛋白的制备 将新鲜的扇贝内脏团绞碎, 加入 1:1 (W/W) 的生理盐水匀浆, 4℃ 抽提 6h 后离心 (6000 r/min, 20 min)。取上清用硫酸铵分级沉淀, 取 60%—90% 饱和度的沉淀, 对 5 mmol/L Tris-HCl pH 7.5 缓冲液透析至无硫酸根离子。浓缩后的样品上 5 mmol/L Tris-HCl pH 7.5 缓冲液平衡的 DEAE Sephadex A-50 柱 (柱规格 18 mm × 80 mm), 采用浓度为 0—0.2 mol/L 梯度的 NaCl 溶液洗脱, 部分收集, 每管 10 ml 流速为 0.5 ml/min 检测波长为 280 nm。同时测定每管的抗氧化活性, 合并蛋白峰, 浓缩后对 5 mmol/L Tris-HCl pH 7.5 缓冲液进行透析并冻干。

1.3.2 抗氧化肽粗品的制备 将 0.36 g 扇贝提取蛋白溶于 100 ml 双蒸水, 加入 0.018 g 海洋低温蛋白酶 YS-80, 用 1 mol/L 的 NaOH 调 pH 至 9.0 于 30℃ 恒温水浴中酶解 24h。酶解物经沸水浴加热 10 min 后离心除去沉淀, 上 Sephadex G-25 柱 (柱规格 16 mm × 600 mm), 以双蒸水进行洗脱, 流速为 3.0 ml/min 检测波长为 280 nm, 部分收集, 每管 6 ml 合并蛋白峰, 同时以未经水解的扇贝提取蛋白作为参比。

1.4 抗氧化肽的纯化

PCF 先经 CM Sepharose FF 阳离子交换柱层析纯化 (柱规格 30 mm × 160 mm), 上样缓冲液为 2 mmol/L pH 3.0 Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲液, 采用浓度为 0—0.5 mol/L 的 NaCl 溶液梯度洗脱, 部分收集, 每管 2 ml 流速为 1.0 ml/min 检测波长为 280 nm。测定每管的抗氧化活性, 合并蛋白峰, 进一步经反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 分析, 使用 Symmetry C18 分析型色谱柱 (5 μm, 3.9 mm × 150 mm)、Waters 2690 高效液相色谱系统, 上样溶液为过膜去离子水, 以流动相为 0%—30% 的乙腈-水

溶液进行梯度洗脱。对各峰进行抗氧化活性测定。

1.5 抗氧化肽理化指标的测定

1.5.1 纯度鉴定 采用反相 C₁₈ HPLC, 乙腈梯度。

1.5.2 分子量测定 采用 Sephadex G-15 凝胶柱层析法测定, 柱规格为 10 mm × 950 mm, 洗脱液为 0.02 mol/L Tris-HCl pH 7.2 缓冲液, 内含 0.15 mol/L NaCl 流速为 1.0 ml/min 检测波长为 280 nm。以杆菌肽 (1450D)、P 物质片段 (4-11, 966D)、二肽 (Phe-Ser 234D) 为标准分子量多肽。

1.5.3 氨基酸组成测定 取经纯化的抗氧化肽, 用 6 mol/L HCl 在 110℃ 水解 22h, 将水解后的样品全部转移至旋转蒸发仪内蒸干, 用 0.1 mol/L HCl 溶解定容后进行柱前衍生, 以 AccQ.Tag 氨基酸分析柱 (Waters 3.9 mm × 150 mm) 进行氨基酸组成的测定。

1.5.4 茚三酮反应 取样品液四滴, 加入 0.1% 茚三酮乙醇溶液 2 滴混合, 沸水浴 1—2 min 冷却后观察颜色变化。

1.6 抗氧化活性检测

1.6.1 清除超氧阴离子 采用邻苯三酚自氧化法 (Marklund *et al.* 1974), 邻苯三酚在碱性条件下会发生自氧化, 生成有色中间产物和超氧阴离子自由基, 超氧阴离子自由基对自氧化有催化作用。具体操作: 取 0.05 mol/L Tris-HCl pH 8.2 缓冲液 4.5 ml 置 25℃ 水浴预热 20 min 加 0.1 ml 不同浓度的样品, 2.5 mmol/L 邻苯三酚 0.4 ml 混合后在 25℃ 水浴中反应 4 min, 立即用维生素 C 溶液终止反应, 测 A_{299nm} 值。以蒸馏水代替样品做空白组, 按下式计算清除率并求得 IC₅₀ (半抑制浓度, 即达到 50% 清除率所需要的样品浓度)。

$$\text{清除率} = (A_{\text{空白}} - A_{\text{样品}}) / A_{\text{空白}} \times 100\%$$

式中, A_{样品}、A_{空白} 分别为样品和空白的吸光值。

1.6.2 清除羟自由基 采用 Fenton 反应体系 (陈学勤, 1996), 亚铁离子催化过氧化氢产生羟自由基, 该反应产生的羟自由基可使番红花红褪色。抗氧化剂可清除羟自由基, 抑制番红花红褪色。具体操作: 取 0.025 mol/L pH 7.4 的磷酸缓冲液 1 ml 40 μg/ml 的番红花红 1 ml 不同浓度样品 0.5 ml 3% 过氧化氢 1 ml (新鲜配制), 0.945 mmol/L EDTA-Fe²⁺ 1 ml (新鲜配制), 混合后在 37℃ 水浴中反应 30 min, 测 A_{520nm} 值, 空白组以 0.5 ml 蒸馏水代替供试样品, 对照组以 1.5 ml 蒸馏水代替 EDTA-Fe²⁺ 和供试样品。按下式计

算清除率并求得 IC_{50} 。

$$\text{清除率} = (A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$$

式中, $A_{\text{样品}}$ 、 $A_{\text{空白}}$ 、 $A_{\text{对照}}$ 分别为样品、空白和对照的吸光值。

2 结果与分析

2.1 抗氧化肽的制备

2.1.1 扇贝抗氧化蛋白的制备 经组织匀浆和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级分离后, 活性部分主要存在于所收集的沉淀中, 该组分经 DEAE Sephadex A-50 柱层析后的结果见图 1, 活力峰在 15—24 管之间。

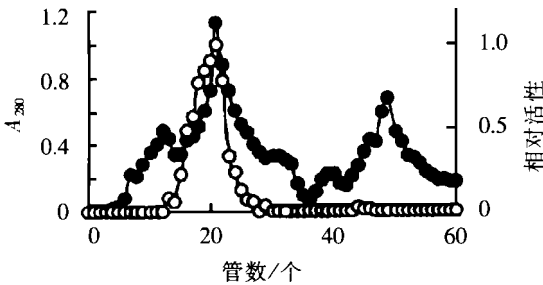


图 1 扇贝蛋白 DEAE-Sephadex A-50 层析曲线

Fig. 1 Column chromatogram of proteins in scallop tails on DEAE-Sephadex A-50

—●—蛋白浓度, —○—活性

2.1.2 抗氧化肽粗品的制备 酶解产物经 Sephadex G-25 柱层析分离后显示有两个峰(图 2), 第一峰蛋白吸收峰为大分子物质, 第二峰的分子量相对较小, 为扇贝提取蛋白经蛋白酶 YS-80 酶解后产生的小肽类物质, 将 28—44 管收集合并。经过此步分离可去除样品中的大分子杂质, 制备得到海洋多肽 (PCF)。

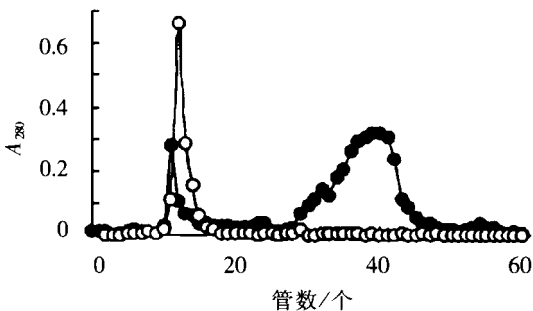


图 2 扇贝抗氧化蛋白与肽的凝胶层析曲线

Fig. 2 Column chromatogram of antioxidative peptides and protein on Sephadex G-25

—●—多肽吸收, —○—蛋白吸收

2.2 抗氧化肽的分离纯化

PCF 经 CM Sepharose FF 阳离子交换层析柱分离后的结果见图 3 活力峰在 42—49 管之间, 收集合并。阳离子交换得到的样品再经反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 分析, 结果如图 4 保留时间为 20.919 min 的峰为主要活性峰。因该峰与杂峰临近并有部分交叉, 所以只收集峰尖部分并冻干保存。该组分命名为 PCF-3A。

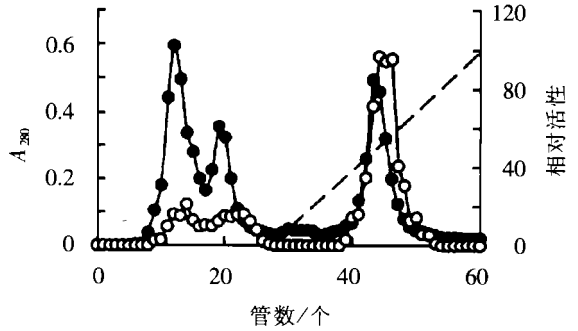


图 3 扇贝肽 CM Sepharose 阳离子柱层析曲线

Fig. 3 Column chromatogram of scallop peptide on CM Sepharose

—●—多肽吸收, —○—蛋白吸收,
..... NaCl 梯度

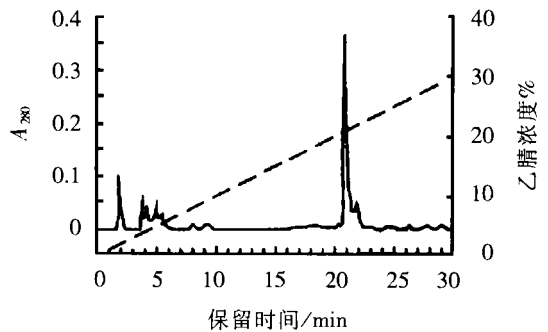


图 4 扇贝肽 RP-HPLC 分析曲线

Fig. 4 Column chromatogram of scallop peptide on RP-HPLC

— A_{280} 乙腈浓度

2.3 抗氧化肽的理化性质

2.3.1 纯度 PCF-3A 经反相 C18 色谱柱检测结果为单一峰, 峰面积积分测定纯度大于 99%, 说明该样品经纯化最终达到了 HPLC 纯(图 5)。

2.3.2 分子量 根据标准品的分子量和洗脱体积, 以 $K_{av} = \lg MW$ 作标准曲线(图 6), 得回归方程 $K_{av} = -0.7775 \lg MW + 2.7521$ ($r^2 = 0.998$)。

其中, K_{av} 为分配系数, 表示被分离物质在固定相和流动相中的比例关系; MW 为分子量。经计算, PCF-3A 的分子量约为 794D。

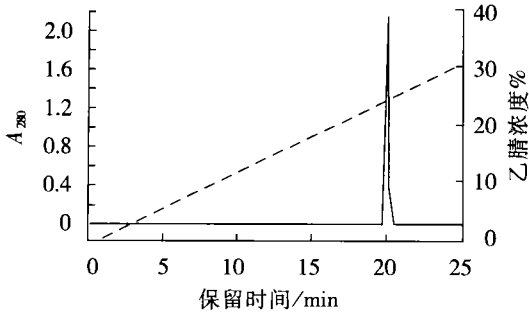


图 5 反相 C_{18} HPLC 鉴定 PCF-3A 纯度

Fig. 5 Identifying the purity of PCF-3A through reversed C_{18} HPLC
— A_{280} 乙腈浓度

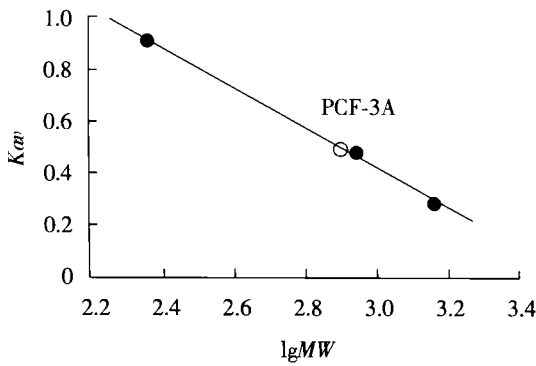


图 6 Sephadex G-15 凝胶过滤测定分子量

Fig. 6 Determination of molecular weight on Sephadex G-15

空心圆圈表示 PCF-3A; 三个黑点表示标准分子量多肽, 从上到下依次为二肽 (Phe-Ser, 234D)、P 物质片段 (4-11, 966D) 和杆菌肽 (1450D)

2.3.3 PCF-3A 的氨基酸组成 PCF-3A 的氨基酸组成分析结果见表 1, 它由 7 种氨基酸组成。其中酸性氨基酸的相对含量为 9.2%, 碱性氨基酸的相对含量为 12.6%, 极性氨基酸的相对含量为 44.7%。根据 PCF-3A 的分子量, 推测该多肽含有 8 个氨基酸残基。

表 1 PCF-3A 的氨基酸组成

Tab. 1 Components of amino acids in PCF-3A

氨基酸	Asp	Gly	Thr	Ala	Pro	Val	Lys
相对含量 (mo%)	9.2	10.3	12.6	14.9	27.6	12.6	12.6

2.3.4 茚三酮反应 PCF-3A 与茚三酮呈阳性, 表明该物质 N 端未被封闭且为链状多肽。

2.4 PCF-3A 的抗氧化活性

2.4.1 清除超氧阴离子 实验结果表明 (表 2), PCF 对 $O_2^{\cdot-}$ 有一定的清除作用, 但是产生 50% 清除效应所需的浓度大于特异性清除剂抗坏血酸的浓度。

表 2 PCF-3A 清除 $O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$ 的效应

Tab. 2 The effect of PCF-3A on scavenging $O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$

样品名称	效应	IC_{50} (mg/ml)
PCF-3A	清除 $O_2^{\cdot-}$	2.85
抗坏血酸	清除 $O_2^{\cdot-}$	0.09
PCF-3A	清除 $\cdot OH$	0.39
甘露醇	清除 $\cdot OH$	3.21

注: 以上数据的回归系数 r 均大于 0.99

2.4.2 清除羟自由基 由表 2 可知, PCF-3A 与羟自由基的特异性清除剂甘露醇相比较, 对 $\cdot OH$ 的清除作用是甘露醇的 8.2 倍, 说明其抗氧化活力相当强。推测该肽的抗氧化作用主要是通过提供氢离子或接受自由基以打断 Fenton 反应的氧化自由基链状反应实现的。

3 讨论

抗氧化肽的肽链长短对活性影响较大, 一般认为应在 20 个氨基酸残基以内 (丁晓雯等, 2003), 这要求蛋白酶在对底物蛋白水解时作用位点较多。栉孔扇贝内脏团蛋白中亲水性残基含量占 66% (苏秀榕等, 1997), 本文中采用的海洋蛋白酶 YS-80 可以选择性的作用于这些亲水性氨基酸残基, 因而释放出的肽的分子量较小。另外, 海洋蛋白酶 YS-80 来源于海洋环境, 该酶具有作用温度低、最适 pH 为碱性等特点, 在酶解过程中可能会影响蛋白构象及产物肽链结构, 并且可能对海洋生物蛋白的水解特异性较强。在组成蛋白的基本氨基酸中, Tyr Met His Lys Trp 被普遍认为具有抗氧化活性 (Marcuse 1962 Karel et al. 1966 Yamaguchi et al. 1971), 但是根据氨基酸分析结果, 在这些氨基酸中 PCF-3A 仅包括一个 Lys 残基。构成肽的氨基酸种类、数量及排列顺序共同决定着肽的抗氧化能力, 对于 PCF-3A 的构效关系仍需进一步研究。

为了适应极端的海洋环境,海洋生物蛋白无论是氨基酸的组成还是氨基酸的序列都与陆栖生物蛋白有很大的不同,其中潜在着很多具有生物活性的多肽片段。根据肽模拟物理论的指导,作者对扇贝内脏团中具有抗氧化活性的提取蛋白进行酶解,从酶切得到的大量多肽片断中,最终筛选得到了包含抗氧化活性功能单位的多肽序列片断——PCP-3A,这为下一步开展栉孔扇贝抗氧化肽结构与功能的研究奠定了基础,同时也为海洋生物蛋白资源的开发利用提供了理论依据。

氧自由基诱导的脂质过氧化反应与许多疾病的发生有密切的联系。其中羟自由基是已知的最强的氧化剂,对机体危害极大。扇贝抗氧化肽可有效清除 $\cdot\text{OH}$,动物及病理模型实验也已经证明了PCF具有良好的生理活性。另外,海洋蛋白资源酶解后普遍呈现出溶解性好,乳化性强,流动性增加等优点。因此,该抗氧化肽作为天然抗氧化剂在药物、日用化工、食品等方面均具有广阔的开发利用前景。

参 考 文 献

丁晓雯,李洪军,章道明,2003. 抗氧化肽研究进展. 食品研究与开发, 24(3): 36—38

于华,刘希光,邢荣娥等,2005. 水母毒素蛋白凝聚现象的初步研究. 海洋与湖沼, 36(5): 413—417

王玉贞,刘晓萍,姚如永等,2001. 扇贝多肽对 ^{60}Co 辐射损伤的胸腺细胞影响作用的研究. 中国海洋药物, 84(6): 20—24

王春波,贺孟泉,秦守哲等,1998. 海洋肽的体外抗氧化作用. 中国海洋药物, 67(3): 15—17

孙虎山,王宜艳,王晓安等,2005. 栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)血淋巴中一氧化氮和一氧化氮合酶的研究. 海洋与湖沼, 36(4): 343—348

刘晓萍,王春波,于业军等,2001. 扇贝多肽在体外对免疫细胞活性的影响及其抗紫外线的氧化损伤作用. 海洋与湖沼, 32(4): 414—419

杜卫,刘晓萍,梁惠等,2000. 扇贝多肽对淋巴细胞的保护作用 and 反相液相色谱分析. 中国海洋药物, 77(5): 27—29

苏秀榕,李太武,丁明进,1997. 扇贝营养成分的研究. 海洋科学, 2: 10—11

陈师勇,张培军,莫照兰等,2004. 鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)M3菌株生长条件及其对蛋白酶产量的影响. 海洋与湖沼, 35(1): 55—63

陈学勤,1996. 抗氧化研究实验方法. 北京: 中国医药科技出版社, 499—500

沈文英,胡洪国,潘雅娟,2004. 温度和pH值对南美白对虾(*Penaeus vannamei*)消化酶活性的影响. 海洋与湖沼, 35(6): 543—548

贺孟泉,王春波,秦守哲等,1998. 海洋肽的皮肤毒理学研究. 中国海洋药物, 67(3): 12—18

Saiga A i Tanabe Soichi Nishimura Toshihide, 2003. Antioxidant activity of obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment J Agric Food Chem, 51: 3661—3667

Chen Hua-Ming Koji Muramoto Fumio Yamachi et al, 1998. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein J Agric Food Chem, 46: 49—53

Kareim, Tannenbaum S R, Wallace S et al, 1966. Autooxidation of methyl linoleate in freeze-dried model systems. Effects of added amino acids J Food Sci 31: 892—896

Suetsuna K, Ukeda H, 2000a. Isolation of an octapeptide which possesses active oxygen scavenging activity from peptide digest of sardine muscle Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi 65(6): 1096—1099

Suetsuna K, Ukeda H, Ochi H, 2000b. Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein J of Nutritional Biochemistry 11(3): 128—131

Maruse R, 1962. The effect of some amino acids on the oxidation of linoleic acid and its methyl ester J Am Oil Chem Soc, 39: 97—103

Marklund S, Marklund G, 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autooxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase Eur J Biochem, 47(3): 469—473

Yamaguchi N, 1971. Studies on antioxidative activities of amino compounds on fats and oils Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi 18: 313—318

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ANTIOXIDATIVE PEPTIDE FROM SCALLOP *CHLAMYS FARRERI*

HU Wen-Ting, SUN Mi, WANG Yue-Jun

(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, 266071; College of Chemical Engineering, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao, 266042)

(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, 266071)

Abstract The preparation, purification and prime characterization of antioxidative peptide isolated from marine proteins, scallop visceral mass were studied.

Proteins of scallop were extracted in 0.9% NaCl at 4°C, then centrifuged and the precipitate was discarded. The supernatant was fractionated with ammonium sulfate. The precipitate between 60% and 90% saturation was collected and loaded into a DEAE-Sephadex A-50 column. The column was equilibrated with Tris-HCl buffer (5 mmol/L, pH 7.5) and eluted with a linear gradient of this buffer containing 0.2 mol/L NaCl. The peak monitored at 280 nm absorbance comprising mostly of activity was collected. Antioxidative proteins were hydrolyzed with low-temperature marine protease YS-80 at 30°C (pH 9.0) for 24 h, then centrifuged and the precipitate was discarded. And PCF was prepared by taking off macromolecular proteins on a Sephadex G-25 column. The column was equilibrated with redistilled water. The peak monitored at 280 nm absorbance comprising peptides was collected. Antioxidative peptide was purified in the first step by means of CM Sepharose FF cationic-exchange chromatography. The column was equilibrated with 2 mmol/L phosphate-citric buffer (pH 3.0) and eluted with a linear gradient of this buffer containing 1.0 mol/L NaCl. The third peak monitored at 280 nm absorbance comprising mostly of activity was collected. In the second step, the peptide was purified by a reversed phase high performance liquid chromatography (HPLC), the peak eluted at 20.919 min has most activities and named as PCF-3A.

The major physical and chemical characteristics of PCF-3A were studied. HPLC on C18 was used to check the homogeneity of the isolated product. After the purification with two column chromatographies, the separated product was verified to be homogeneous. The molecular weight was measured by size exclusion chromatography on a Sephadex G-15 column. The column was equilibrated with a 0.02 mol/L Tris-HCl buffer containing 0.15 mol/L NaCl at pH 7.2. The sample was applied to the column and eluted at a flow rate of 1.0 ml/min. PCF-3A possesses a molecular weight of 794 D. The purified PCF-3A was exhibited positive in biuret color reaction. Column of AccQ-Tag was used to analyze the amino acids of PCF-3A. The peptide was hydrolyzed with 6 mol/L HCl at 110°C for 22 h in a sealed tube. Amino acid analysis showed that PCF-3A was composed of D, G, T, A, P, V and K. It is suggested that eight amino acid residues were composed of PCF-3A according to the molecular weight.

The scavenging activity of PCF-3A on hydroxyl free radical was studied by Fenton reaction. And scavenging superoxide anion activity of PCF-3A was measured by self-oxidation method of pyrogallol. PCF-3A has distinctive effect on oxidation, the IC_{50} value for hydroxyl free radical and superoxide anion radical scavenging activities were 0.39 and 2.85 mg/ml respectively. And the activity of scavenging hydroxyl free radical is much greater than mannitol.

Key words Scallop *Chlamys farreri*, Antioxidative peptide, Separation and purification, Characterization