

基于 UF、GFC 及 RP-HPLC 的长牡蛎 (*Crassostrea gigas*)蛋白抗衰老小分子活性肽 (Zel'ner)的纯化及结构解析*

何定芬¹ 谢超² 梁佳² 梁瑞萍² 李海波¹

(1. 浙江国际海运职业技术学院 舟山 316021; 2. 浙江海洋大学食品与医药学院 舟山 316022)

摘要 牡蛎肉质鲜美, 营养丰富, 具有很高的食用价值。本研究以舟山长牡蛎(*Crassostrea gigas*)为研究对象, 以 DPPH 自由基清除率为测试指标, 通过 UF、GFC 及 RP-HPLC 等技术, 对牡蛎蛋白酶解液进行分离纯化, 获得牡蛎蛋白小分子肽样品, 并对其氨基酸组成进行营养性评价。研究结果表明: 浓度为 30%—100% 的硫酸铵处理酶解液的分离效果明显优于低于浓度为 30% 硫酸铵的分离效果, 其 DPPH 自由基清除率达到 52.43%; 纯化后得到两种牡蛎蛋白小分子肽分别标记为组分 a(Mw < 1kDa)和组分 b(1kDa < Mw < 3kDa); 组分 a 中牡蛎蛋白小分子肽分子量分布主要为 1995.2Da、1258.9Da、1023.3Da、398.1Da; 对牡蛎蛋白小分子肽组分 a 进行检测, 发现其中氨基酸种类及含量丰富, 其中必需氨基酸(EAA)含量为 18.863%, 总氨基酸含量(TAA)为 43.3748%, 必需氨基酸占总氨基酸 43.49%, 必需氨基酸与非必需氨基酸(NEAA)的比例为 76.95%, 风味氨基酸(FAA)含量为 18.9147%, 占总氨基酸含量的 43.61%。综上所述, 牡蛎蛋白小分子肽具有极高的营养价值和市场经济效益, 此研究为牡蛎蛋白抗衰老小分子活性肽(Zel'ner)的开发提供了新的思路和方向。

关键词 长牡蛎(*Crassostrea gigas*); 小分子肽(Zel'ner); 分离纯化; 氨基酸分析

中图分类号 TS254; Q956 doi: 10.11693/hyhz20190700143

随着社会的发展, 海洋生物已被认为是具有重要营养和药用价值的生物活性化合物的丰富来源。牡蛎是世界养殖第一大贝类, 也是中国养殖最大的贝类(阙华勇等, 2003; 于文超等, 2015), 因富有极高的营养, 被誉为“海底牛奶”(陈艳辉等, 2011)。牡蛎含有钙、磷、锌和维生素等营养物质, 高蛋白, 低脂肪(董晓伟等, 2004; 叶盛权等, 2009; 刘慧等, 2012; 邱娟等, 2017), 具有避免过度疲劳、改善身体机能等功能(汪何雅等, 2003), 是我国第一批被列为药食同源的食品之一。

近年来, 海洋生物活性肽引起了人们的广泛关注, 其具有多种生物学特性, 例如抗氧化、抗高血压、

抗人类免疫缺陷病毒、抗增殖、抗凝血、抗肥胖、抗糖尿病活性等(姜红, 2008), 对人体健康有许多有利的影响。相比于蛋白质, 小分子肽具有分子量小、结构简单、毒副作用小且易被机体吸收等优点(庞婉婷等, 2018), 相比大分子量的多肽活性更强, 能够直接作用于人体细胞且效果十分迅速(范秀萍等, 2008)。但是, 目前我国对牡蛎的深加工能力还十分欠缺, 而研究小分子肽产品可以使牡蛎的营养和价值得到高效利用, 因此, 牡蛎小分子肽的研究有着非常大的市场前景和社会意义。

罗齐军等(2013)发现补充牡蛎多肽可以改善长期大负荷训练导致的低血糖。牡蛎肽可在一定程度上增

* 浙江省基础公益基金项目, LGN19C200016 号; 2018 年国家级大学生创新创业训练计划项目, 201810340044S 号。何定芬, 副教授, E-mail: 360186817@qq.com

通信作者: 谢超, 副教授, E-mail: xc750205@163.com

收稿日期: 2019-07-18, 收修改稿日期: 2019-08-29

强小鼠免疫功能(陈晓文等, 2016), 牡蛎水解产物对小鼠有抗肿瘤活性和免疫作用(Wang *et al.*, 2010)。尽管有关牡蛎肽的加工国内外已有不少报道(Zhang *et al.*, 2009; Lau *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2017), 但是有关牡蛎小分子肽的情况却研究甚少。本研究通过对牡蛎小分子肽分离纯化, 得到牡蛎天然肽, 并对其分子量和氨基酸成分进行了分析, 提高了牡蛎的综合利用, 为牡蛎的加工提供了新的方向和思路。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

牡蛎购于舟山常青海洋食品有限公司, 采用低温碎冰保鲜运送方式 30min 内送至实验室, 于 -80°C 下保藏; DPPH 梯希爱(上海)化成工业发展有限公司; 胰岛素等标准品, 美国 Sigma 公司; 氨基酸标准品, 北京普天同创生物科技有限公司。

1.2 主要仪器和设备

紫外检测器 HD-21-2, 北京普天同创科技有限公司; 高效液相色谱仪 1100, 上海硅仪生化科技有限公司; 氨基酸分析系统 LC98-I AAA, 北京温分公司。

1.3 方法

1.3.1 牡蛎蛋白水解液制备 在风味蛋白酶酶添加量 1.3%、pH 7、酶解 5h 条件下进行酶解, 煮沸 12—15min 灭酶, 8000—9600r/min 离心 30—45min, 滤液即为水解液。

1.3.2 硫酸铵分级沉淀 向水解液中加入硫酸铵粉末, 使之饱和度分别达到 30%、70%和 100%, 分别得到沉淀 a、b、c, 再分别过 0.2—0.25 μm 微孔滤膜得到各个组分的蛋白。

1.3.3 超滤(UF)膜分子量分级 收集水解液, 稀释后分别通过截留分子量 1kDa、3kDa 的超滤膜, 收集两组牡蛎小分子蛋白肽, 组分 a: $M_w < 1\text{kDa}$; 组分 b: $1\text{kDa} < M_w < 3\text{kDa}$ 。

1.3.4 凝胶过滤层析(GFC) 取 2g 冻干水解液样品悬液和 2mL 0.05mol/L PBS, pH 7.0, 然后离心 1500r/min 20min。将透明上清液涂于 Sephadex G-15 柱 (1.6cm \times 80cm), 用 0.01mol/L PBS 按流速 0.3mL/min 洗脱通过测定, 得到洗脱曲线, 用紫外分光光度计在 230nm 和 280nm 处测定吸光度。表现出清除羟基自由基活性的组分收集并冻干得到粉末。利用反相高效液相色谱, 以乙腈为有机改性剂(丛艳君等, 2017), 在线性梯度洗脱条件下进行分离; 色谱柱: Kromasil ODS 柱; 流动相: 洗脱液 A(0.1%三氟乙酸),

洗脱液 B(90.4%乙腈和 0.1%三氟乙酸)。

1.3.5 反相高效液相色谱(RP-HPLC)确定牡蛎蛋白小分子肽的分子量 选用胰岛素标准品配置 0.2mg/mL 标准溶液, 测定分子量分布范围。凝胶色谱柱: TSK gel 2000 PWXL (7.8mm \times 300mm); 流动相: 含 0.1%的三氟乙酸的乙腈水溶液(1 : 1); 流速: 0.5mL/min; 柱温: 室温; 检测波长 220nm; 进样量: 10 μL 。组分 a 对照品色谱条件同上, 进样量设置为 50 μL (黄丹丹等, 2017)。

1.3.6 DPPH 自由基清除能力的测定 取 1mL H_2O 和样品分别加入 250 μL 浓度为 0.02% DPPH, 99.5%乙醇和 1mL 乙醇作为空白组和实验组, 取 1mL 样品加入 250 μL 乙醇和 1mL 乙醇作为对照组, 避光放置 6min, 于 517nm 处测吸光度。DPPH 清除率计算公式如下:

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_0 A_i}{A_j} \right) \times 100,$$

式中: A_0 为对照组吸光度; A_i 为样品组吸光度; A_j 为空白组吸光度(邱军强等, 2017)。

1.3.7 样品溶液配制 根据北京温分公司 LC98-I AAA 氨基酸分析系统标准配置标准溶液。取样品粉末 100mg, 加 6mol/L 盐酸 4mL, 充入氮气, 于 110°C 下反应 22—24h, 拿出后放置至室温; 参考李智等(2017)的方法进行酸水解; 参考于文清等(2014)的方法在 35°C 的电热恒温鼓风干燥箱中进行衍生反应, 所得样品作为牡蛎小分子肽样品溶液。

1.3.8 牡蛎小分子肽氨基酸的成分测定 采用北京温分公司 LC98-I AAA 氨基酸分析系统, 准确量取对照品、样品溶液 60 μL 完成进样, 每次实验做两次平行, 得到牡蛎小分子多肽的色谱图。

1.4 数据统计分析

采用 Excel 2007 对数据进行制图。

2 结果与分析

2.1 牡蛎酶解液蛋白沉淀结果

盐析可以从酶解液中沉淀分离目标蛋白质, 为进一步分离牡蛎蛋白小分子肽做准备(袁梦媛, 2016)。将沉淀的固体用去离子水复溶后发现, 浓度为 30%—100%的硫酸铵处理后的分离效果明显优于低于 30%硫酸铵的分离效果。将牡蛎蛋白沉淀复溶后, 稀释样品浓度约为 1.0mg/mL, DPPH 自由基清除能力的测定结果如表 1, 硫酸铵浓度 30%—100%综合的 DPPH 自由基清除率达 52.43%, 而且 DPPH 自由基清

除率较高,说明此时的蛋白具有高生物活性(韦献雅等, 2014),可进一步对其进行分离纯化。

表 1 硫酸铵分级沉淀牡蛎蛋白结果

Tab.1 Ammonium sulfate fractional precipitation of oyster protein results

硫酸铵饱和度 (%)	溶液中 DPPH 自由基清除率 (%)	沉淀溶液的复溶性
0—30	9.32	较差
30—70	27.74	良好
70—100	24.69	良好

2.2 牡蛎两组小分子蛋白肽的凝胶过滤层析(GFC)

实验通过葡聚糖凝胶 SephadexG-50 对两组牡蛎小分子肽组分进行凝胶过滤层析,如图 1 中分别为组分 a、组分 b 的洗脱曲线。由图 1 可知,洗脱曲线都出现两种明显的峰,前者是盐等杂质被洗脱出来,后者是多肽被洗脱出来。分光光度计测量吸光值,收集两个组分的多肽,然后冷冻干燥,即得到纯化后的两种牡蛎天然肽:组分 a(Mw < 1kDa)、组分 b(1kDa < Mw < 3kDa)。

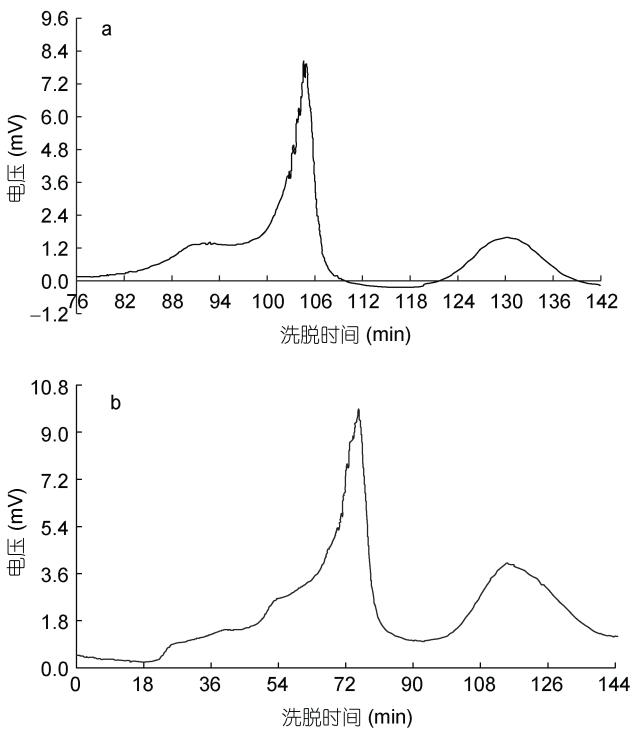


图 1 牡蛎两组小分子肽的洗脱曲线

Fig.1 Elution curves of two groups of small molecular peptides in oyster

2.3 牡蛎两组小分子肽的分子量分布

采用 RP-HPLC 来估计牡蛎酶解多肽组分 a 的分子量分布情况,结果如图 2,通过各标准品对应的出峰时间绘制标准曲线,可知标准品的分子量对数与出峰

时间呈良好的线性关系,线性相关系数为 0.9958,拟合程度较好,线性回归方程为: $y = -0.1469x + 6.1883$ 。

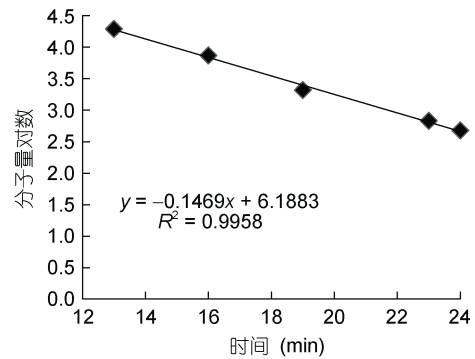


图 2 标准对照品分子量分布标准曲线

Fig.2 Standard curve of molecular weight distribution of standard reference material

图 3 和图 4 分别为胰岛素对照品和组分 a 的 RP-HPLC 图谱,可知主要有 4 种物质组成牡蛎小分子多肽组分 a 中的蛋白,这四个峰出峰时间分别为 18.708、19.857、20.552、23.591min,其中出峰时间为 18.708min 的峰为主要峰,说明该组分中分离提纯的牡蛎小分子肽纯度较高,具有研究价值。结合标准曲线计算,组分 a 中的牡蛎酶解液中小分子肽分子量分布约为 1995.2、1258.9、1023.3、398.1Da。因此,可以看出分离的活性多肽分子量较小,而小分子肽在各方面存在广泛的应用(Gao *et al.*, 2010; 马国兴等, 2015; 庞秀枰等, 2015),此研究为更深层次探讨牡蛎多肽的组成提供研究依据,为探究牡蛎小分子肽的营养组分做准备。

2.4 牡蛎小分子肽氨基酸图谱分析

如图 5 和图 6 所示,分别为 18 种混合氨基酸对照品图谱和牡蛎小分子肽样品氨基酸图谱。经单一对照品预实验可知,18 种氨基酸出峰顺序分别为:天门冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)、丝氨酸(Ser)、甘氨酸(Gly)、组氨酸(His)、苏氨酸(Thr)、丙氨酸(Ala)、精氨酸(Arg)、脯氨酸(Pro)、酪氨酸(Tyr)、缬氨酸(Val)、蛋氨酸(Met)、胱氨酸(Cys)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、苯丙氨酸(Phe)、色氨酸(Trp)、赖氨酸(Lys)。对应的出峰时间分别为: 3.232、3.290、10.698、12.273、15.898、16.973、17.757、18.023、18.365、24.373、25.390、26.832、28.932、29.448、29.832、32.332、33.340min。

2.5 牡蛎小分子肽氨基酸含量

氨基酸的检测结果见表 2,样品中能够检测到 17 种氨基酸,其中胱氨酸检测值为 0。由表 2 可知,牡蛎小分子肽中含量最多的氨基酸是谷氨酸 6.1632%,

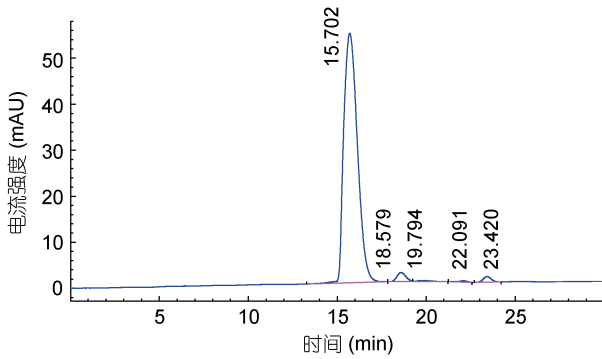


图3 胰岛素对照品的 HPLC 图谱

Fig.3 HPLC spectrum of insulin reference substance

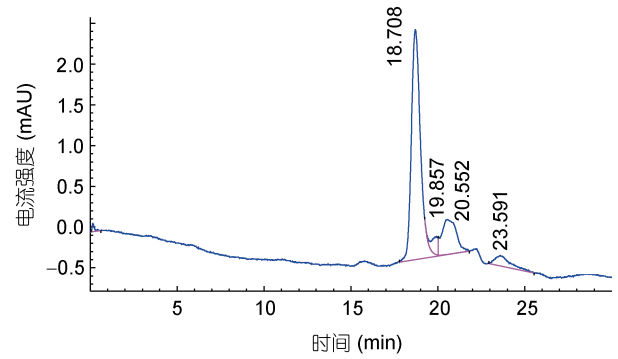


图4 牡蛎小分子组分 a 的 HPLC 图谱

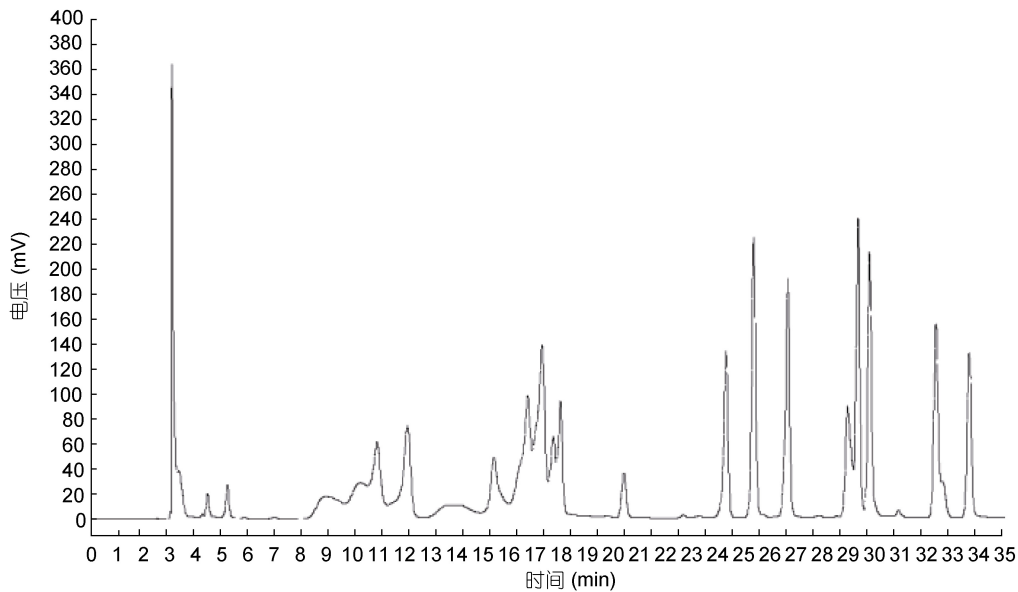
Fig.4 HPLC spectrum of micromolecule component *a* in oyster

图5 18 种混合氨基酸对照品图谱

Fig.5 Diagram of 18 mixed amino acid reference substances

其次是赖氨酸 5.2110%，说明经酶解提取的牡蛎小分子肽中氨基酸含量丰富。检测到 8 种必需氨基酸均存在，其余为 9 种非必需氨基酸。牡蛎小分子肽样品中均含有丰富的赖氨酸(5.2110%)、谷氨酸(6.1632%)、甘氨酸(3.0640%)、精氨酸(1.3473%)和酪氨酸(0.9171%)，这些氨基酸有助于维持蛋白质的营养平衡，调节氨基酸的吸收。

牡蛎的营养价值与必需氨基酸的含量以及氨基酸的种类有密切的关联，由表 3 可知，牡蛎小分子多肽必需氨基酸(EAA)含量为 18.863%，总氨基酸(TAA)含量为 43.3748%，必需氨基酸占总氨基酸的 43.49%，必需氨基酸与非必需氨基酸(NEAA)的比例为 76.95%；风味氨基酸(FAA)含量为 18.9147%，占总氨基酸含量 43.61%。由此可知，将牡蛎蛋白质提纯或酶解成小分子多肽后，营养成分丰富，富含多种氨基酸种类，可作为营养强化剂添加到婴儿食品、保健食品或饲料中(刘娜

等, 2016; 张元可等, 2019)，补充营养从而改善体质。

3 结论

通过对牡蛎蛋白酶解液进行分离纯化，发现浓度为 30%—100%的硫酸铵处理后的分离效果明显优于低于 30%硫酸铵的分离效果，其 DPPH 自由基清除率达 52.43%；得到纯化后的两种牡蛎天然肽：组分 a(Mw < 1kDa)、组分 b(1kDa < Mw < 3kDa)。采用高效液相法分析组分 a 的分子量组成，结果表明主要有 4 种物质组成牡蛎小分子多肽组分 a 中的蛋白，这四种物质对应峰出峰时间分别是 18.708、19.857、20.552、23.591min，其中出峰时间为 18.708min 的峰为主要峰，说明该组分中分离提纯的牡蛎小分子肽纯度较高，具有研究价值。其中小分子肽分子量分布约为 1995.2、1258.9、1023.3、398.1Da。

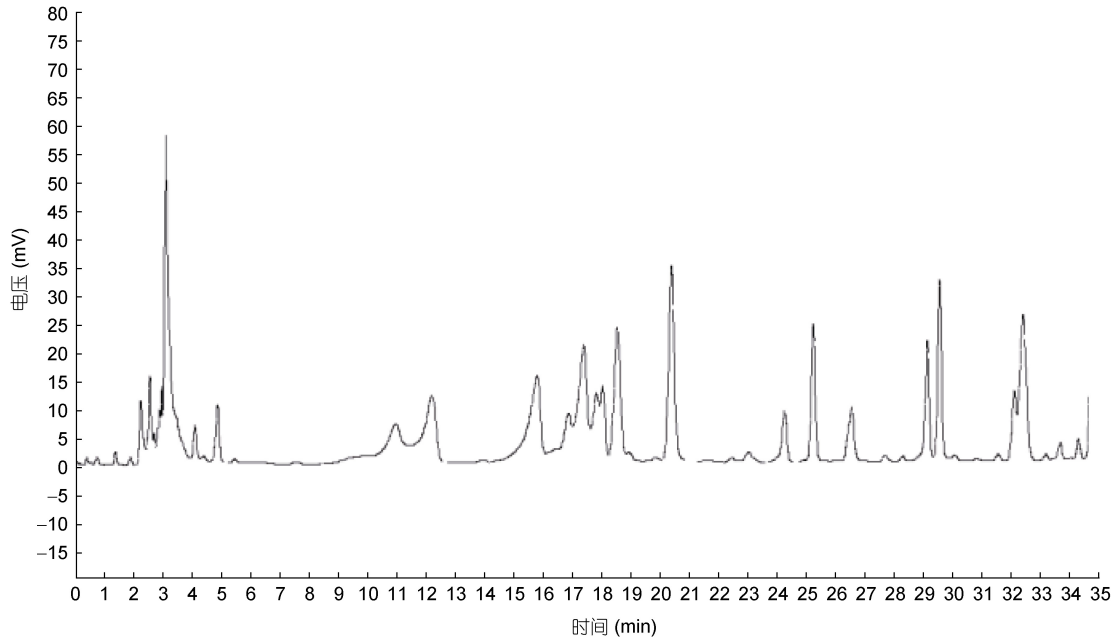


图 6 牡蛎小分子肽样品氨基酸图谱

Fig.6 Graph of amino acid of oyster small-molecule peptide sample

表 2 氨基酸分子量、浓度及峰面积

Tab.2 Molecular weight, concentration and peak area of amino acids

氨基酸	称重(mg)	小分子肽氨基酸含量(%)	样品 S	混合对照品 S
天门冬氨酸(Asp) [#]	13.31	0.9200	114307.297	2118708.500
谷氨酸(Glu) [#]	14.71	6.1632	765765.188	481955.031
丝氨酸(Ser)	10.53	2.3227	288590.594	1547304.250
甘氨酸(Gly) [#]	7.54	3.0640	380689.469	1823584.875
组氨酸(His)	15.53	3.4224	425478.188	1330269.125
苏氨酸(Thr) [*]	11.90	1.4176	176128.922	2629746.000
丙氨酸(Ala) [#]	8.93	3.2735	406730.250	3026017.000
精氨酸(Arg)	17.41	1.3473	167397.281	1015203.875
脯氨酸(Pro)	11.51	2.6194	325457.094	1276474.500
酪氨酸(Tyr) [#]	18.21	0.9171	113942.039	1618648.250
缬氨酸(Val) [*]	11.74	2.0311	252361.000	2483131.500
蛋氨酸(Met) [*]	14.90	1.3076	162469.984	2319080.500
胱氨酸(Cys)	24.04	0.0000	0.000	3872052.000
异亮氨酸(Ile) [*]	13.12	1.8500	229859.469	2200044.500
亮氨酸(Leu) [*]	13.13	2.4688	306741.813	171117.047
苯丙氨酸(Phe) ^{* #}	16.53	4.5769	568669.250	2221554.000
色氨酸(Trp)	20.44	0.4622	57421.895	1707640.625
赖氨酸(Lys) [*]	14.64	5.2110	647456.125	234113.042

注: *为必需氨基酸, #为风味氨基酸

表 3 牡蛎小分子多肽各种类氨基酸占比情况

Tab.3 Proportions of various amino acids in oyster small-molecule polypeptides

氨基酸	所占比例(%)
EAA	18.863
TAA	43.3748
NEAA	24.5118
E/T	43.49
E/N	76.95
FAA	18.9147
F/T	43.61

经检测发现牡蛎小分子多肽氨基酸种类及含量丰富, 其中必需氨基酸(EAA)含量为 18.863%, 总氨基酸含量(TAA)为 43.3748%, 必需氨基酸占总氨基酸的 43.49%, 必需氨基酸与非必需氨基酸(NEAA)的比例为 76.95%; 风味氨基酸(FAA)含量为 18.9147%, 占总氨基酸含量的 43.61%。随着生活水平的提高, 食品越来越追求安全、营养和功能, 牡蛎小分子肽在食品中将得到更广泛的应用。

参 考 文 献

- 于文超, 何成, 武长路等, 2015. 长牡蛎(*Crassostrea gigas*) 贝壳与外套膜中黑色素的提取和鉴定. 海洋与湖沼, 46(4): 909—914
- 于文清, 吕建民, 彭艳芳等, 2014. 香菇柄发酵物对猪肉营养和鲜味的影响. 饲料研究, (17): 62—67
- 马国兴, 蔡双凤, 周宇等, 2015. 海洋生物小肽分子的研究进展. 见: 全国第二届海洋与陆地多糖多肽及天然创新药物研发学术会议论文集. 漠河: 中国生物化学与分子生物学会, 中国微生物学会, 中华航海医学会, 上海市药学会, 224—226
- 韦献雅, 殷丽琴, 钟成等, 2014. DPPH 法评价抗氧化活性研究进展. 食品科学, 35(9): 317—322
- 叶盛权, 吴晖, 赖富饶等, 2009. 牡蛎酶解过程的成分变化及脱腥初步研究. 现代食品科技, 25(3): 262—265
- 丛艳君, 陈澍, 李晔等, 2017. 牛乳 α -乳白蛋白 IgE 线性表位的关键氨基酸识别. 食品科学, 38(11): 1—5
- 刘娜, 许家芬, 阴法强等, 2016. 早期不同剂量氨基酸在早产儿中的应用效果分析. 中外医疗, 35(12): 48—49
- 刘慧, 秦小明, 林华娟等, 2012. 牡蛎蛋白酶解液脱腥技术的研究. 中国食品学报, 12(9): 78—86
- 李智, 祁龙凯, 林励等, 2017. 柱前衍生-RP-HPLC 法测定蜂王幼虫冻干粉中 16 种氨基酸含量. 中国食品添加剂, (11): 176—182
- 邱娟, 沈建东, 翁凌等, 2017. 利用牡蛎制备 ACE 抑制肽的工艺优化. 食品科学, 38(16): 165—172
- 邱军强, 张华, 刘迪迪等, 2017. 9 种食用菌碱水提取物的抗氧化活性比较研究. 食品研究与开发, 38(15): 1—5
- 汪何雅, 杨瑞金, 王璋, 2003. 牡蛎的营养成分及蛋白质的酶法水解. 水产学报, 27(2): 163—168
- 张元可, 程强, 郭双双等, 2019. 几种蛋白质饲料原料和配合饲料氨基酸组成的调查. 饲料研究, 42(1): 61—65
- 陈艳辉, 李超柱, 吴磊等, 2011. 广西牡蛎小分子化合物的分离鉴定与抗肿瘤活性研究. 时珍国医国药, 22(4): 852—853
- 陈晓文, 刘文颖, 许丹等, 2016. 牡蛎肽对小鼠免疫功能影响的研究. 中国食物与营养, 22(10): 66—68
- 范秀萍, 吴红棉, 王娅楠等, 2008. 4 种贝类糖胺聚糖体外清除自由基活性的比较. 食品科技, 33(2): 165—167
- 罗齐军, 鲁顺保, 李红等, 2013. 牡蛎多肽对长期大负荷训练大鼠血睾酮、LH 和 StAR mRNA 表达的影响. 江西师范大学学报(自然科学版), 37(6): 611—616
- 庞秀枰, 尤肇韬, 陈忻等, 2015. 小分子肽的应用发展. 广东化工, 42(12): 111—112, 110
- 庞婉婷, 许锋, 陈忻等, 2018. 海洋生物小分子肽的功能特性. 广东化工, 45(10): 155, 167
- 姜红, 2008. 马鹿茸血酶解肽免疫活性及抗氧化活性的研究. 无锡: 江南大学硕士学位论文
- 袁梦媛, 2016. 盐析和双水相萃取法在纯化藻蓝蛋白过程中的研究. 合肥: 合肥工业大学硕士学位论文, 23
- 黄丹丹, 马良, 韩霜等, 2017. 超声预处理影响金枪鱼皮胶原酶解工艺及机理初探. 食品与发酵工业, 43(4): 141—146
- 董晓伟, 姜国良, 李立德等, 2004. 牡蛎综合利用的研究进展. 海洋科学, 28(4): 62—65
- 阙华勇, 刘晓, 王海艳等, 2003. 中国近海牡蛎系统分类研究的现状和对策. 动物学杂志, 38(4): 110—113
- Gao Y, Zhao F, Wang Q G *et al*, 2010. Small peptide nanofibers as the matrices of molecular hydrogels for mimicking enzymes and enhancing the activity of enzymes. Chemical Society Reviews, 39(9): 3425—3433
- Lau C C, Abdullah N, Aminudin N *et al*, 2013. Effect of freeze-drying process on the property of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in grey oyster mushrooms. Drying Technology, 31(13—14): 1693—1700
- Wang Y K, He H L, Wang G F *et al*, 2010. Oyster (*Crassostrea gigas*) hydrolysates produced on a plant scale have antitumor activity and immunostimulating effects in BALB/c mice. Marine Drugs, 8(2): 255—268
- Zhang L, Liu Y Z, Wu Z C *et al*, 2009. Preparation and characterization of coacervate microcapsules for the delivery of antimicrobial oyster peptides. Drug Development and Industrial Pharmacy, 35(3): 369—378
- Zhang X K, Zhang L, Xu M Q *et al*, 2017. Synthesis of microencapsulated oyster peptides and its effect on inflammatory cytokines and enzyme levels in mice. Journal of Food Measurement and Characterization, 11(2): 610—620

ISOLATION, PURIFICATION AND NUTRITIONAL EVALUATION OF SMALL-MOLECULAR PEPTIDE OF LONG OYSTER PROTEIN FROM ZHOUSHAN, CHINA

HE Ding-Fen¹, XIE Chao², LIANG Jia², LIANG Rui-Ping², LI Hai-Bo¹

(1. Zhejiang International Maritime Vocational and Technical College, Zhoushan 316021, China;

2. College of Food and Medicine, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China)

Abstract *Crassostrea gigas* was used as the research object, and the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical scavenging rate was used as the test index. The oyster protein hydrolysate was separated and purified by UF, GFC, and RP-HPLC techniques to obtain small-molecular peptide from oyster protein (the SMP), for which nutrition of their amino acid composition was evaluated. The results show that the separation of ammonium sulfate treatment solution in concentration of 30%—100% was better than that of <30% ammonium sulfate and the DPPH free radical scavenging rate reached 52.43%. Two types of the SMP were obtained and labeled as Component *a* (Mw<1kDa) and Component *b* (1kDa<Mw<3kDa), respectively. The molecular weight distribution of the SMP in Component *a* is mainly 1995.2, 1258.9, 1023.3, and 398.1Da. Component *a* was found rich in amino acid species and content, e.g., essential amino acid (EAA) content: 18.86; total amino acid content (TAA): 43.37%; essential amino acids to the total amino acids: 43.49%, the ratio of essential amino acids to non-essential amino acids (NEAA): 76.95%; and the content of flavor amino acids (FAA): 18.91%, accounting for 43.61% of the total amino acid. Therefore, the SMP features with high nutritional and commercial value, providing us new ideas and directions for exploration and development of oyster protein anti-aging small-molecule active peptide (Zel'ner).

Key words *Crassostrea gigas*; small-molecular peptide; separation and purification; amino acid analysis