

畜禽及水产蛋白抗氧化肽的酶法制备及其构效关系研究进展

梅 辉, 王海滨*

(武汉工业学院食品科学与工程学院, 湖北 武汉 430023)

摘 要: 以畜禽及水产类动物性蛋白为原料通过酶法制备抗氧化肽, 由于其原料易得、附加值高、应用安全等特点现已成为国内外研究的热点。本文阐述抗氧化肽的作用机理及其抗氧化能力的评定标准, 重点探讨酶法制备的畜禽及水产蛋白抗氧化肽的技术方法和构效关系, 指出存在的问题及不足, 并对抗氧化肽在医药及食品等科学领域的开发研究及应用前景进行展望。

关键词: 蛋白酶解物; 抗氧化肽; 制备; 构效关系

Research Progress in Enzymatic Preparation and Structure-activity Relationship of Antioxidant Peptides Derived from Proteins of Animal Origin

MEI Hui, WANG Hai-bin*

(College of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

Abstract: Enzymatic preparation of antioxidant peptides derived from proteins of livestock, poultry and aquatic origin has become a hot research topic around the world due to rich raw materials, high value-added benefits and good safety. This paper reviews the mechanism of action of antioxidant peptides and indicators of their antioxidant activity. Current methods for enzymatic preparation and structure-activity relationship of antioxidant peptides derived from proteins of livestock, poultry and aquatic origin are emphatically explored and existing problems and defects are pointed out. Meanwhile, the current status and further prospects of research and development of antioxidant peptides and their applications in the pharmaceutical and food industries are discussed.

Key words: protein hydrolysates; antioxidant peptides; preparation; structure-activity relationship

中图分类号: TS251.2; TS254.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-8123(2012)11-0036-05

人类的衰老与人体代谢所产生的氧化物有关, 特别是自由基的产生, 它会产生许多对人体及细胞的不良影响, 引起脂质氧化反应从而生成对人体有害的难以降解的脂褐素, 攻击生命大分子物质, 破坏细胞内DNA、蛋白质以及细胞膜, 诱导细胞凋亡, 加速人体衰老。同时, 自由基过多, 也会诱发一系列疾病, 如老年痴呆症、脑血栓、动脉粥样硬化和癌症等^[1]。

抗氧化肽是继化学性抗氧化物质如BHA、BHT、PG等和天然抗氧化活性物质如茶多酚、VC、类胡萝卜素等之后的一种新型外源性抗氧化剂, 其对清除人体内自由基、抑制人体衰老具有良好的效果, 而且安全无毒。随着营养学的研究和生物技术的发展, 人们又发现抗氧化肽不仅分子质量小、容易被人体吸收, 而且还有易溶解、低黏度、不易形成凝胶等良好的功能特性, 故抗氧

化肽正作为一种新兴抗氧化剂而逐渐受到人们推崇。

1 抗氧化肽酶法制备的一般技术路线

1.1 抗氧化肽的种类及来源

生物体内的天然抗氧化肽有肌肽和谷胱甘肽(GSH), 其中肌肽可以有效清除自由基, 使细胞免受损害, 与维生素类抗氧化剂相比, 肌肽的抗氧化能力更强, 并且肌肽可以参与胞内维生素类不能参与的氧化还原反应, 其生物活性更强^[2]。谷胱甘肽是一种三肽, 广泛存在于动植物、谷物、油料作物中, 是由谷氨酸、半胱氨酸、甘氨酸通过肽键缩合而成的一种短肽, 由于其具有抗氧化性, 正常的谷胱甘肽有维持人体免疫系统的作用, 还有解毒、抗辐射、保护肝脏、美容养颜抗衰老等

收稿日期: 2012-08-20

基金项目: 湖北省科技计划研究与开发项目(2011BBB104)

作者简介: 梅辉(1986—), 男, 硕士研究生, 研究方向为蛋品深加工。E-mail: meihui516@163.com

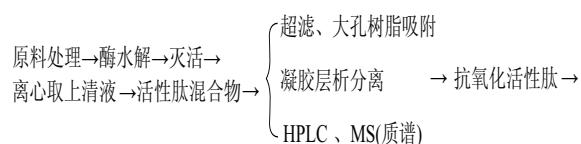
*通信作者: 王海滨(1964—), 男, 教授, 博士, 研究方向为营养与功能食品。E-mail: whb6412@163.com

功效,但谷胱甘肽由机体产生的量非常少。

抗氧化肽主要来源于植物和动物,其中对植物性抗氧化肽的研究主要包括豆类、稻谷及蔬菜类等,Chen Huaming等^[3]从大豆蛋白中分离得到了具有抗氧化活性的多肽,Li Xiuxia等^[4]通过水解玉米蛋白粉也得到了抗氧化活性肽。而对于畜禽及水产等动物性抗氧化肽的研究,由于其原料资源丰富易得,并可充分利用其副产物、提高附加值,故已成为近年来研究的热点,本文主要对畜禽及水产蛋白抗氧化肽的制备及其构效关系进行探讨。

1.2 畜禽及水产蛋白抗氧化肽的酶法制备和分离纯化

目前,针对畜禽及水产蛋白抗氧化肽的制备方法众多,主要有提取法、化学水解法、酶解法、发酵法、化学合成法、基因重组法等。其中提取法成本高、难度大、不宜于推广;化学水解法会残留对人体产生有害的物质,也不适于人类使用;基因重组法合成肽链也较繁琐,不适于大批生产;而酶解法和发酵法安全无毒,操作相对简单,便于推广。由于酶解法制备抗氧化肽的过程中,其条件温和易于控制、反应时间短、效率高,且其专一性强、副产物少,故国内外有关人士对该法研究较多。再通过超滤、大孔树脂吸附、凝胶色谱、HPLC(高效液相色谱)等实验手段对酶解产物进一步分离纯化,以期得到抗氧化肽,其酶法制备一般工艺流程为:



冻干(或不冻干) → 分析检测

已经报道的用于制备抗氧化肽的动物蛋白原料主要有畜禽肉类或副产物蛋白、蛋清蛋白、乳类蛋白、鱼类蛋白、虾类蛋白等。杨万根等^[5]用Protease N蛋白酶和碱性蛋白酶Alcalase 2.4L水解鸡蛋蛋清,结果表明前者酶解产物的抗氧化活性明显高于后者。王金枝^[6]通过测定猪血浆5种蛋白酶水解产物的还原能力(RP),确定碱性蛋白为猪血浆抗氧化肽制备的最佳蛋白酶,确定最佳酶解条件为pH8.0、温度55℃、酶的添加量0.8mg/mL,并指出质量浓度为25μg/mL的血浆蛋白抗氧化肽对小鼠细胞中丙二醛有显著的清除作用。Ren等^[7]采用碱性蛋白酶水解草鱼肌肉蛋白,并采用超滤和离子交换色谱、凝胶过滤层析纯化,得出草鱼肌肉蛋白的氧化活性肽氨基酸序列为Pro-Ser-Lys-Tyr-Glu-Pro-Phe-Val,且疏水性氨基酸在抗氧化活性肽中的比例远大于亲水性氨基酸。蛋白质用不同酶制剂或不同条件水解所得产物及其性质有很大的差异,刘志东等^[8]采用凝胶过滤色谱对分子质量小于5kD的乳清分离蛋白酶解物进行分离,抗氧化活性强的组分继续采用RP-HPLC进行纯化,通过MALDI-TOF-MS(基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱)与氨基酸组成分析鉴定,得到乳清抗氧化活性肽为His-Ile-Arg。Chang Chiyue等^[9]将质量浓度为5g/L的猪血红蛋白先用2%碱性蛋白酶水解4h,

再用1%复合风味蛋白酶水解6h后,水解产物用Sephadex G-25凝胶层析进行分析,结果表明,水解产物对铁离子清除能力达到63.54%,对DPPH自由基清除能力达到41.49%。Liu Qian等^[10]采用酶水解、超滤、离子交换层析和RP-HPLC进行分离纯化猪血浆蛋白,并用LC-MS-MS测定纯化后样品氨基酸的组成,得到猪血浆蛋白抗氧化活性肽为His-Asn-Gly-Asn。Kunio^[11]采用胃蛋白酶水解、离子交换层析、凝胶过滤层析和HPLC色谱法分离纯化对虾肌肉蛋白,分离出抗氧化活性较高的3种多肽氨基酸序列为Ile-Lys、Phe-Lys-Lys和Phe-Ile-Lys-Lys。

2 抗氧化肽作用机理及其抗氧化能力的评定

2.1 抗氧化肽的作用机理

关于抗氧化肽的作用机制尚没有定论,不过就目前研究状况来看,抗氧化肽的抗氧化作用机理主要有以下几方面。首先,构成肽链的氨基酸种类、数量及其排列顺序会对抗氧化活性产生重要影响。Wu Huichun等^[12]采用自溶法和外加蛋白酶法水解鲮鱼蛋白,通过对水解产物中的小肽和游离氨基酸的组成及含量进行研究分析,发现鲮鱼蛋白水解产物具有显著抗氧化活性,且其抗氧化活性与肽的数量呈良好的相关性,并指出分子质量在1400D左右的小肽抗氧化活性优于分子质量为900、200D的小肽。Suetsuna等^[13]从酪蛋白水解物中分离出的抗氧化肽具有清除超氧自由基的能力,得到其氨基酸序列为Tyr-Phe-Tyr-Pro-Glu-Leu,其中C端的Glu-Leu对抗氧化活性有较大的贡献。其次,作为氢供体或电子供体的抗氧化肽,能够与金属离子发生螯合作用,使自由基得到有效地清除,进而起到抗氧化作用。Qian Zhongji等^[14]指出含巯基的半胱氨酸对肽的抗氧化活性具有重要贡献,因其能够直接与自由基进行反应。同时,对于抗氧化肽的体外抑制机理,Chen Huaming等^[3]认为,活性肽可能会与铁红蛋白、血红蛋白、脂质氧化酶和单态氧进行催化脂质氧化作用,这些肽还可通过与多酚氧化酶催化醌式产物反应,而减少食物褐变,防止聚合氧化产物的生成。

2.2 抗氧化肽抗氧化能力的评定指标

目前,评定抗氧化肽抗氧化能力指标主要有:1)清除自由基:清除DPPH自由基、·OH和O₂⁻·等能力是体外评价抗氧化能力的常用指标^[15]。另外还原Fe³⁺的能力也常作为抗氧化能力的评价指标^[16]。2)抑制脂质过氧化:硫代巴比妥酸法以脂质过氧化产物丙二醛(MDA)为测定指标,抑制MDA的生成已广泛作为评价抗氧化肽抑制脂质过氧化能力的重要指标^[16]。3)体外细胞培养测试其抗氧化性:通过抗氧化肽对过多自由基所造成的DNA损伤的保护作用进行评价^[17]。

3 畜禽及水产蛋白抗氧化肽的构效关系研究进展

影响多肽抗氧化活性的因素主要有底物蛋白、蛋白



酶、水解度、pH值、温度、肽的化学结构等。大量学者研究表明,肽的抗氧化能力与其分子质量大小、氨基酸种类、序列及肽构象有关,它们的差异直接影响着抗氧化肽的氨基酸强弱。如Kim等^[18]研究分别使用碱性蛋白酶、链霉菌蛋白酶E及胶原酶水解牛皮明胶,发现用链霉菌蛋白酶E水解得到的分子质量为1.5~4.5kD的活性肽抗氧化性能较好,这表明了小分子肽抗氧化性能较优。

3.1 畜禽及水产蛋白抗氧化肽活性与氨基酸种类的关系

许多酶水解后的畜禽及水产鱼类蛋白多肽皆能表现出抗氧化活性,比如乳类、肉类等蛋白质的酶解物。而酸性、抗氧化性及疏水性氨基酸通常包含于抗氧化活性较强的抗氧化肽中,可得出某些氨基酸在抗氧化肽的活性结构中起着重要的作用,如含有疏水性丙氨酸、亮氨酸、缬氨酸等非极性脂肪烃的侧链能够加强抗氧化肽与疏水性多不饱和脂肪酸的相互作用;脂质过氧化链式反应可能通过含疏水性氨基酸的肽段与氧结合或抑制脂质中氢释放来延缓等。Meisel^[19]研究发现,乳肽中富含的半胱氨酸能通过有效维持细胞内谷胱甘肽体系从而起到抗氧化作用。Rajakpase^[20]、Je^[21]等通过研究酸性氨基酸的抗氧化肽,得出其抗氧化活性主要表现在酸性氨基酸侧链羧基与金属离子的螯合作用上。亮氨酸、色氨酸、半胱氨酸、酪氨酸等氨基酸及其衍生物具有一定的抗氧化活性,其原理为具有供氢能力的色氨酸和酪氨酸能将氢原子给予自由基,自身形成苯氧自由基和吲哚自由基中间体,借助共振达到稳定,从而致使自由基链式反应减慢或终止。表1列出了部分源于畜禽及水产蛋白的抗氧化活性肽与其氨基酸种类的关系。

3.2 畜禽及水产蛋白抗氧化肽活性与氨基酸序列的关系

抗氧化肽活性的大小直接受氨基酸序列的影响。Chen Huaming等^[23]根据Leu-Leu-Pro-His-His设计了32个新肽,其最长由6个氨基酸残基组成,最短有2个氨基酸残基,它们对诱导亚油酸氧化、DPPH自由基、O₂•、单线态氧均有一定的抑制或淬灭能力,但在不同体系中不同肽的抗氧化能力却有较大差异,如若在N端连接Pro后,抗氧化活性明显加强;若在His-His中间插入Leu-Pro或Pro-Leu,抗氧化活性可明显降低,并且氨基酸残基在抗氧化肽时与非肽类抗氧化剂显示出协同效应。Suetsuna等^[26]从酪蛋白中分离并鉴定得到一个具有自由基淬灭能力的肽Tyr-Phe-Tyr-Pro-Glu-Leu,研究证实,C末端的Glu-Leu对于该肽的抗氧化活性起着重要的作用。Jae等^[27]从阿拉斯

加鲑鱼的水解物中分离制备了具有显著抗氧化活性的多肽,其氨基酸序列为Leu-Pro-His-Ser-Gly-Tyr、分子质量为672D。

国内外不少学者利用凝胶层析、离子交换层析及HPLC等方法对畜禽及水产蛋白酶解物中的抗氧化活性肽进行了分离纯化,并通过氨基酸分析和质谱等方法鉴定了其氨基酸序列。表2列出了部分已研究的蛋白酶解物中抗氧化活性肽的氨基酸序列。

表2 畜禽酶解物中抗氧化活性肽的氨基酸序列
Table 2 Amino acid sequences of antioxidant peptides in hydrolyzed proteins of livestock, poultry and aquatic origin

底物蛋白	水解酶	抗氧化肽氨基酸序列
肌原纤维蛋白	木瓜蛋白酶	Asp-Ser-Gly-Val-Thr、Ile-Glu-Ala-Gly-Glu、Asp-Ala-Gln-Glu-Lys-Leu-Glu ^[28]
猪血浆蛋白	碱性蛋白酶	His-Asn-Gly-Asn ^[10]
牛乳蛋白	胰蛋白酶	Pro-His-Tyr-Trp ^[29]
鸡蛋血清蛋白	木瓜蛋白酶、胰蛋白酶	Asn-Thr-Asp-Gly-Ser-Thr-Asp-Tyr-Gly-Ile-Leu-Gln-Ile-Asn-Ser-Arg ^[30]
鲑鱼皮明胶	胰蛋白酶	Phe-Asp-Ser-Gly-Pro-Ala-Gly-Val-Leu、Val-Lys-Leu、Val-Val-Lys-Leu、Val-Lys-Val ^[28]
柴鱼蛋白	胃蛋白酶	Ile-Lys-Leu、Val-Pro-Ser-Gly-Lys、Glu-Ala-Lys、Phe-Val-Ala-Gly-Lys、Lys-Ala-Ile ^[31]
草鱼肌肉	碱性蛋白酶	Pro-Ser-Lys-Tyr-Glu-Pro-Phe-Val ^[7]
金枪鱼骨	胃蛋白酶	Val-Lys-Ala-Gly-Phe-Ala-Trp-Thr-Ala-Asn-Gln-Gln-Leu-Ser ^[32]
对虾肌肉蛋白	胃蛋白酶	Ile-Lys、Phe-Lys-Lys、Phe-Ile-Lys-Lys ^[11]

3.3 畜禽及水产蛋白抗氧化肽活性与肽构象的关系

蛋白质和肽的构象是指它们二级及以上的空间结构,肽的构象是维持肽功能活性的重要基础。Chen Huaming等^[3,33]研究得出抗氧化肽与氨基酸混合物在等浓度时两者的抗氧化活性并无明显关系,且大多数抗氧化肽与金属离子的亲和力决定于His含量及其在肽链末端的位置,在N末端存在His时更有利于形成螯合金属离子的构象。Hernández-Ledesma等^[34]发现从β-乳球蛋白得到的42个抗氧化肽中,Trp-Tyr-Ser-Leu-Ala-Met-Ala-Ala-Ser-Ile序列的抗氧化活性低于其等浓度的氨基酸混合物,而Tyr-Val-Glu-Glu-Leu序列的抗氧化活性却高于其等浓度氨基酸混合物,从而提出肽键或肽构象对混合氨基酸的抗氧化活性既有协同又有拮抗作用。Suetsuna等^[13]在酪蛋白抗氧化肽Tyr-Phe-Tyr-Pro-Glu-Leu的基础上,合成了末端缺失了Tyr、Tyr-Phe、Tyr-Phe-Tyr、Tyr-Phe-Tyr-Pro等残基的多肽,发现其清除自由基的能力发生了显著变化,表明抗氧化肽的活性与链内各氨基酸之间的短程相

表1 氨基酸成分和抗氧化活性肽的关系定位
Table 1 Mechanisms of action of amino acids in antioxidant peptides

氨基酸	作用机制	举例
芳香族氨基酸 (Tyr、His、Trp、Phe)	通过给电子的方式将自由基转化为稳定的分子形式,同时通过提高去除氨基酸残基中自由基的能力的共振结构来保持其稳定性 ^[22]	在N末端是有效的金属离子螯合剂,而在C末端是自由基清除剂 ^[23]
疏水性氨基酸	肽脂溶性增强,有利于极性物质和疏水性的多不饱和脂肪酸、甘氨酸作为氢供体 ^[10]	对于多不饱和脂肪酸组织中的Ala、Val、Leu有较高的反应活性 ^[1]
酸性和基本氨基酸	在侧链上有羧基和氨基的氨基酸可作为氢供体,成为金属离子螯合剂 ^[12]	在贻贝胃液发酵纯化后的蛋白肽中发现有Asp(酸性氨基酸)和His(碱性氨基酸)残留 ^[25]
半胱氨酸	作为自由基清除剂,通过氧化应激提高谷胱甘肽的活性 ^[24]	半胱氨酸的三肽作为过氧自由基清除剂强烈阻止氧化应激的发生 ^[25]



互作用密切相关。Laakso^[35]研究表明在抗氧化肽中氨基酸残基及其衍生物可以清除自由基,但是游离氨基酸并没有表现出抗氧化活性,因此肽的一级结构是构成其具有抗氧化作用的必要因素。

4 结 语

酶法水解畜禽及水产动物蛋白制取抗氧化活性肽的研究仍处于初级阶段,还存在不少问题。首先,酶水解动物蛋白相对于植物蛋白,工艺较复杂且提取效率较低;其次,由酶水解动物蛋白中获得的活性肽中存在着氨基酸结构相近、分子质量相差不大,但活性却有很大差异的组分,如何将其准确地进行分离是今后需要解决的难点;而对于抗氧化肽构效关系的研究,目前存在的难点包括抗氧化肽可能的活性位点的分析推测、抗氧化肽活性与肽链内氨基酸间短程相互作用及肽构象的关系等^[36];再次,很多抗氧化活性肽的研究开发仍处于实验室阶段,还存在产品质量及贮藏稳定性、产品标准指标的确定、抗氧化活性测定方法及其他相关指标的分析检测标准等问题;因此,酶法制备畜禽及水产动物蛋白抗氧化肽离规模化生产还有一定的距离。

对于畜禽及水产等动物蛋白而言,由于其原料易得,并可充分利用这些蛋白资源的下脚料等副产物,因此,其高附加值、高利用性等特点将会被更多的研究者加以研究开发。随着生物工程技术和各种新型分离及检测技术的不断发展,抗氧化肽活性与其结构的关系及其作用机理将会被进一步揭示,向产业化发展相衔接的技术问题也会逐步得以解决,酶法制备畜禽及水产等动物性蛋白的抗氧化肽将在食品及医药领域有着更加广阔的发展前景。

参考文献:

- [1] DENHAM. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry[J]. The Journal of Gerontology, 1956, 11: 298-300.
- [2] LYENGAR R, MCEVILY A J. Anti-browning agents: alternatives to the use of sulfites in foods[J]. Trends in Food Science and Technology, 1992, 3: 60-64.
- [3] CHEN Huaming, KOJI M, FUMIO Y. Structural analysis of antioxidative peptides from soybean β -conglycinin[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995, 43: 574-578.
- [4] LI Xiuxia, HAN Iujia, CHEN Longjian. *in vitro* antioxidant activity of protein hydrolysates prepared from corn gluten meal[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2008, 88(9): 1660-1666.
- [5] 杨万根, 张煜, 王璋, 等. 蛋清蛋白酶解物的抗氧化、抗凝血酶活性及生化特性的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(6): 202-207.
- [6] 王金枝. 猪血浆抗氧化肽的制备、分离及其活性的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2007.
- [7] REN J Y, ZHAO M M, SHI J, et al. Purification and identification of antioxidant peptides from grass carp muscle hydrolysates by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2008, 108(2): 727-736.
- [8] 刘志东, 郭本恒, 王荫榆, 等. 乳抗氧化肽的分离纯化与结构鉴定[J]. 天然产物研究与开发, 2010, (22): 740-746.
- [9] CHANG Chiye, WU Kueiching, CHIANG Shuhua. Antioxidant properties and protein compositions of porcine haemoglobin hydrolysates[J]. Food Chemistry, 2007, 100(4): 1537-1543.
- [10] LIU Qian, KONG Baohua, 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.
- [11] KUNIO S. Antioxidant peptides from the protease digest of prawn (*Penaeus japonicus*) muscle[J]. Marine Biotechnology, 2000, 2(1): 5-10.
- [12] WU Huichun, CHEN Huaming, SHIAU C Y. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*)[J]. Food Research International, 2003, 36(9/10): 949-957.
- [13] SUETSUNA K, UKEDA H. Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2000, 11(3): 128-131.
- [14] QIAN Zhongji, JUNG W K, KIM S K. Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* shaw[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(6): 1690-1698.
- [15] RICE-EVANS M. Spectrophotometric determination of antioxidant activity[J]. Redox Report, 1996, 2(3): 161-171.
- [16] BENZIE F F, STRAIN J J. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration[J]. Methods in Enzymology, 1999, 299: 15-27.
- [17] HALLIWELL B, WHITEMAN M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?[J]. British Journal of Pharmacology, 2004, 142(2): 231-255.
- [18] KIM S K, KIM T K, BYUM H G. Purification and characterization of antioxidative peptides from bovine skin[J]. Biochemistry and Molecular Biology Reports, 2001, 34(3): 219-224.
- [19] MEISEL H. Biochemical properties of peptides encrypted in bovine milk proteins[J]. Curr Med Chem, 2005, 12(16): 1905-1919.
- [20] RAJAPAKSE N, MENDIS E, BYUN H G, et al. Purification and *in vitro* antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2005, 16(9): 562-569.
- [21] JE J Y, QIAN Zhongji, KIM S K. Antioxidant peptide isolated from muscle protein of bullfrog, *Rana catesbeiana* shaw[J]. Journal of Medicinal Food, 2007, 10(3): 401-407.
- [22] 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.
- [23] CHEN Huaming, MURAMOTO K, YAMAUCHI F, et al. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein[J].



- Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46(1): 49-53.
- [24] SELVAM R, DEVARAJ S. Oxalate binding to rat kidney mitochondria: induction by oxidized glutathione[J]. Indian J Biochem Biophys, 1996, 33(1): 62-65.
- [25] MICHAEL D, SEVILLA, YAN M, et al. Thiol peroxyl radical formation from the reaction of cysteine thiyl radical with molecular oxygen: an ESR investigation[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1988, 155(1): 405-410.
- [26] SUETSUNA K, UKEDA H. Isolation of an octapeptide which possesses active oxygen scavenging activity from peptic digest of sardine muscat[J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1999, 65(6): 1096-1099.
- [27] JAE Y J, PARK J P, KIM S K. Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska Pollock (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate[J]. Food Research International, 2005, 38(1): 45-50.
- [28] MENDIS E, RAJAPAKSE N, BYUN H G, et al. Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects[J]. Life Sciences, 2005, 77(17): 2166-2178.
- [29] PIHLANTO A. Antioxidative peptides derived from milk proteins[J]. International Dairy Journal, 2006, 16(1): 1306-1314.
- [30] MINA M Y, ASODEH A, CHAMANI J. A novel antioxidant and antimicrobial peptide from hen egg white lysozyme hydrolysates[J]. Journal of Functional Foods, 2012, 4(1): 278-286.
- [31] KUNIO S. Separation of antioxidant peptides from proteolytic digest of dried bonito[J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1999, 65(1): 92-96.
- [32] JE J Y, QIAN Z J, BYUN H G, et al. Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis[J]. Process Biochemistry, 2007, 42(5): 840-846.
- [33] CHEN Huaming, MURAMOTO K, YAMAUCHI F, et al. Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soy bean protein[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1996, 44(9): 2619-2623.
- [34] HERNÁNDEZ-LEDESMA B, DÁVALOS A, BARTOLOMÉ B, et al. Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from α -lactalbumin and β -lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS-MS[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(3): 588-593.
- [35] LAAKSO S. Inhibition of lipid peroxidation by casein Evidence of molecular encapsulation of 1,4-pentadiene fatty acids[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism, 1984, 792(1): 11-15.
- [36] 程云辉, 曾知音, 郭建伟, 等. 抗氧化肽的酶法制备及其构效关系的研究进展[J]. 食品与机械, 2009, 25(6): 174-178.