

低值紫菜蛋白酶解产物中抗氧化活性肽的纯化及分析鉴定

姚翔, 田亚平*

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 无锡, 214122)

摘要: 采用中性蛋白酶和氨肽酶复配酶解低值紫菜, 体积分数 60% 乙醇沉淀去多糖, 上清液为紫菜抗氧化多肽粗品, 该粗品利用 Sephadex G-10、DEAE-52 和 SOURCE 3RPC 等色谱手段分离纯化, 得到酶解紫菜抗氧化活性肽(ELAP)。当 ELAP 的质量浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 时, 其对超氧自由基、DPPH 和羟自由基的清除率依次为 23.25%, 47.12%, 47.12%, 分别是同浓度下抗坏血酸(VC)的 0.79, 0.87, 0.91 倍, 还原能力为 VC 的 1.23 倍, 有很强的抗氧化性。ELAP 经反相高效液相(RP-HPLC)分析型色谱测定其纯度达 87.44%。超高效液相色谱-质谱法(Q-TOF-MS)分析鉴定 ELAP 为一种 6 肽 DGVGYG (Asp-Gly-Val-Gly-Tyr-Gly), 其组成中 Tyr 与 Gly 本身就属于具抗氧化活性的氨基酸。

关键词: 低值紫菜; 蛋白酶解; 抗氧化肽; 纯化; Q-TOF-MS

中图分类号: Q 55 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2012)06-0647-07

Purification and Identification of Antioxidant Peptides from the Product of Protease Hydrolysis the Low-Cost Laver

YAO Xiang, TIAN Ya-ping*

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The low-cost laver was hydrolyzed with neutral protease and aminopeptidase in this study. The antioxidative peptides were purified initially by adding 60% ethanol to remove polysaccharides in the hydrolysate. The supernatant was further purified through Sephadex G-10 gel, DEAE-52 anion-exchange and SOURCE 3RPC to get more purer enzymatic laver antioxidative peptides(ELAP). The scavenging activities of Superoxide-radical, DPPH radical and Hydroxyl-radical were 23.25%, 47.12% and 47.12% respectively when the content of the ELAP was at 100 $\mu\text{g/mL}$. Compared to vitamin C at the same content (100 $\mu\text{g/mL}$), the scavenging activities in the ELAP were 0.79, 0.87 and 0.91 times of the activities in vitamin C. Furthermore, the reducing ability of the low-cost laver peptides was 1.23 times than that of vitamin C. According to the chromatographic of analytical reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC), the purity of ELAP was up to 87.44%. The ELAP was identified as a hexapeptide AGVGTG (Asp-Gly-Val-Gly-Tyr-Gly) with analysis of the ultra-performance liq-

收稿日期: 2011-10-09

基金项目: 国家 863 计划资助项目(2011AA100905)。

* 通信作者: 田亚平(1964-), 女, 安徽淮南人, 工学博士, 教授, 主要从事生物活性物质方面的研究。E-mail: yapingtian@hotmail.com

uid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (Q-TOF-MS). The composition of the hexapeptide(AGVGTG) in the ELAP which contained Tyr and Gly has the typical function of antioxidation.

Key words: the low-valued laver, protease hydrolysis, antioxidant peptides, purification, Q-TOF-MS

天然抗氧化肽具有较强的抗氧化活性和很高的安全性,近年来已成为各国研究的重点。从水产品中以酶解法制备抗氧化肽已经得到广泛研究^[1],如 Binsan 等^[2]从白虾头中提取出的抗氧化肽具有很好的体外清除自由基及还原的能力,Qian 等^[3]分别用多种酶水解牛蛙皮蛋白提取并纯化得到抗氧化活性很高的多肽,Hsu 等^[4]从枯草芽孢杆菌中提取出一种肽链内切酶 Orientase,用该酶酶解金枪鱼蒸煮液,将酶解物纯化后得到 3 个抗氧化肽组分。Kim 等^[5]用多种蛋白酶分别对新西兰无须鳕的骨蛋白进行酶解,得到 1 种酶解多肽 APHPH (Ala-Pro-His-Pro-His),其对 DPPH 自由基、羟基、过氧化氢自由基及超氧化物自由基的均有抑制作用,钱晓婕等^[6]在坛紫菜中提取出了藻胆蛋白,其对羟基、过氧化氢自由基均有很高的抑制作用。这些都充分证明水产品中的优质蛋白具有制备抗氧化肽的潜力。

中国沿海大量养殖紫菜,低值紫菜因口感较差而售价很低。但其蛋白质含量在 25%左右、另外还含有多糖、琼脂、VC、各种矿物质^[7]等。目前低值紫菜的主要利用途径是制成海苔休闲食品,深加工产品较少^[8],不断开展对低值紫菜的深加工和综合利用显得尤为迫切和必要。本实验选用中性蛋白酶和氨肽酶水解低值紫菜制备紫菜抗氧化肽,利用一系列的色谱手段进行分离纯化,并对分离所得紫菜酶解抗氧化肽进行纯度测定和序列分析,以期为进一步研究低值紫菜抗氧化肽的开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

低值紫菜 购自南通千鹤食品有限公司产品;大孔树脂 D101,西安蓝晓科技有限公司产品;Sephadex G-10、DEAE-52、SOURCE 3RPC ST4.6/100,Amersham 生物有限公司生产;DPPH (1,1-二苯基-2-三硝基苯肼)、邻苯三酚、抗坏血酸、水杨酸、三氯乙酸、重水、硫酸亚铁(均为分析纯);乙腈(色谱

纯)。

4K15 冷冻离心机:Sigma 公司产品;722 型紫外可见分光光度计:尤尼柯(上海)仪器有限公司生产;LGJ-10 冷冻干燥器:北京四环自动化设备有限公司生产;HL-2 恒流泵、BS-100A 型自动部份收集器:上海市沪西仪器厂生产;Water 600 高效液相色谱仪:美国 Waters 公司产品;HP1100 型高效液相色谱仪:美国 Aglient 公司产品;4700 proteomics Analyzer 串联飞行时间质谱仪:美国 Applied Biosystems 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 酶解低值紫菜抗氧化肽粗品的制备 以烘干到恒重的低值紫菜粉末为底物,以 pH8.5 Na₂HPO₄-KH₂PO₄ 缓冲液(缓冲液 A)为介质,底物与缓冲液的比例为 1:30,中性蛋白酶加入量为 E/S=1.48×10³ U/g,固体氨肽酶加入量为 E/S=1.30×10⁴ U/g。50℃水解 6 h,80℃灭酶 15 min,加入乙醇至体系乙醇体积分数为 60%。室温静置 12 h,10 000 r/min 离心 10 min,得到的上清液为含抗氧化紫菜多肽(ELAP)的混合物。

1.2.2 酶解低值紫菜抗氧化肽粗品的分离纯化

1) 大孔树脂脱色处理 将大孔树脂 D101 装柱,去离子水清洗平衡,将紫菜多肽粗样上柱,检测波长为 220 nm,收集未吸附部分,进行冷冻干燥。

2) 凝胶分离色谱分离纯化 取冷冻干燥后的样品溶于 0.1 mol/L NaCl 溶液,浓度为 100 mg/mL。平衡 Sephadex G-10 色谱柱后,进样量为 1 mL,以同样浓度的 NaCl 溶液进行洗脱。流速 0.1 mL/min,检测波长为 220 nm。收集各个峰组分,并对各峰组分的抗氧化活性进行比较,取抗氧化活性较高的峰组分冷冻干燥。

3) 离子交换色谱分离纯化 取冷冻干燥后的样品溶于缓冲液 A,浓度为 10 mg/mL。采用阶段洗脱的方法,流动相:0~250 min 含 0.1 mol/L NaCl 的缓冲液 A,250~400 min 含 0.2 mol/L NaCl 的缓冲液 A,400~550 min 含 0.3 mol/L

NaCl 的缓冲液 A, 550~650 min 含 0.4 mol/L NaCl 的缓冲液 A。进样量为 20 mL, 流速 1 mL/min, 检测波长为 220 nm。收集各个峰组分, 并对各峰组分的抗氧化活性进行比较, 取抗氧化活性较高的峰组分冷冻干燥。

4) 反相色谱分离纯化 SOURCE 3RPC ST4.6/100 色谱, 流动相: A, 10% 乙腈 (V/V), 0.1% 三氟乙酸 (TFA) (V/V); B, 80% 乙腈 (V/V), 0.1% 三氟乙酸 (TFA) (V/V)。梯度洗脱程序: 0~20 min 100% A (V/V); 20~40 min 100% A (V/V)~100% B (V/V); 40~60 min, 100% B (V/V)。进样量为 2 mL, 流速 1.5 mL/min, 检测波长为 220 nm。收集各个峰组分, 并对各峰组分的抗氧化活性进行比较, 取抗氧化活性较高的峰组分收集浓缩。

1.2.3 酶解低值紫菜抗氧化肽抗氧化特性的测定

通过测定 DPPH 消除能力、清除超氧自由基能力, 清除羟自由基能力和还原力来综合反映低值紫菜抗氧化肽的抗氧化性。

1) DPPH 消除能力的测定^[9] 取 2 mL 待测样品, 加入 2 mL 质量浓度为 0.04 g/L 的 DPPH·无水乙醇溶液, 混合均匀后反应 20 min, 在转速 3 500 r/min 下, 离心 10 min, 取上清液, 在波长 517 nm 处测其吸光度为 A_i ; 另取 2 mL 待测样品于试管中, 分别加入无水乙醇 2 mL, 反应 20 min, 在转速 3 500 r/min 下离心 10 min, 取上清液, 在波长 517 nm 处测其吸光度为 A_j ; 以 2 mL 质量浓度 0.04 g/L 的 DPPH·无水乙醇溶液和 2 mL 无水乙醇反应作为参比, 其吸光度记为 A_0 , 按照下列式子计算样品对 DPPH 自由基的清除率:

$$\text{清除率} = (1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}) \times 100\%$$

2) 超氧自由基清除率的测定 采用邻苯酚自氧化法^[10]。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 pH 8.2 的 0.05 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 4.5 mL, 置于 25 °C 水浴中预热 20 min, 加入 0.1 mL 样品, 浓度为 2.5 mmol/L 的邻苯三酚 0.4 mL, 混匀后在 25 °C 水浴中准确反应 4 min, 在波长 325 nm 处测吸光度 A 值。以蒸馏水代替样品作空白组, 按下式计算清除率:

$$\text{清除率} = \frac{A_{\text{空白}} - A_{\text{样}}}{A_{\text{空白}}} \times 100\%$$

式中: $A_{\text{空白}}$ 为空白样的吸光度; $A_{\text{样}}$ 为样品的吸光度。

3) 羟自由基清除率的测定^[11] 在 2 mL 待测样品中, 分别加入 2 mL 浓度为 6 mmol/L 的 Fe-SO_4 , 2 mL 浓度为 6 mmol/L 的 H_2O_2 , 混合后室温静置 10 min, 然后加入 2 mL 浓度为 6 mmol/L 的水杨酸, 混合均匀, 室温静置 30 min 后, 在波长 510 nm 处测量其吸光度, 记录为 A_i ; 用蒸馏水代替水杨酸再次测量其吸光度, 记录为 A_j , 空白对照组以蒸馏水代替样品, 测量吸光度, 记录为 A_0 。清除羟自由基计算公式为:

$$\text{清除率} = (1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}) \times 100\%$$

4) 还原力的测定 取样品液 0.1 mL, 加入缓冲液 A 和 10 mg/mL 的铁氰化钾溶液各 2.5 mL, 混合物于 50 °C 水浴中加热 20 min, 再加 100 mg/mL 三氯乙酸溶液 2.5 mL, 充分混合后, 3 000 r/min 离心 5 min。取上清液 2.5 mL, 加入蒸馏水 2.5 mL 和 1 g/mL 三氯化铁溶液 0.5 mL, 静置 10 min 后, 在 700 nm 波长处测定其吸光度 $A_{700\text{nm}}$ 。以 $A_{700\text{nm}}$ 值反映还原力大小, $A_{700\text{nm}}$ 值越高, 水解物的还原力越大^[12]。

1.2.4 分析型反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 测定纯度 将分离后活性最高的组分用 RP-HPLC 法测定其纯度。取冻干后的样品用二次蒸馏水溶解后用 0.22 μm 微孔滤膜过滤。色谱条件: Restek C18 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相: A, 20% 乙腈 (V/V), 0.1% 三氯乙酸 (V/V); B, 70% 乙腈 (V/V), 0.1% 三氯乙酸 (V/V)。梯度洗脱程序: 0~3 min 100% A (V/V), 5-20 min: 0~100% B (V/V)。体积流量为 1 mL/min; 柱温为 25 °C, 进样量为 5 μL ; 检测波长为 220 nm^[13-14]。

1.2.5 Q-TOF-MS 测定氨基酸序列 液相色谱条件: 检测器: WATERS ACQUITY PDA; 分析柱: BEH C18 (Φ 2.1 mm $\times$ 100 mm); 检测波长 220 nm; 柱温 30 °C; 体积流量 0.3 mL/min; 流动相: A, 超纯水 (含体积分数 0.2% 甲酸); B, 乙腈 (含体积分数 0.2% 甲酸)。洗脱程序: 0 min 100% A (V/V), 15 min 50% A (V/V) + 50% B (V/V); 20 min 100% B (V/V)。

质谱仪条件:离子方式 ESI⁺;毛细管电压 2.5 kV;锥孔电压 30 V;离子源温度 100 °C;脱溶剂气体温度 250 °C;脱溶剂气体流量 600 L/h;锥孔气体流量 50 L/h;碰撞能量 70 V;质荷比扫描范围:50~3 000 m/z;检测电压 1 600 V^[15]。

2 结果与分析

2.1 酶解低值紫菜抗氧化肽粗品的分离

2.1.1 Sephadex G-10 色谱分离纯化结果 低值紫菜抗氧化肽粗品经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后用葡聚糖凝胶 G-10 色谱进行分离(见图 1)。

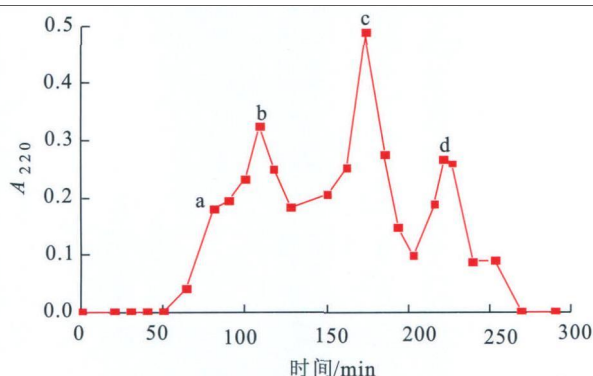


图 1 低值紫菜抗氧化肽的 Sephadex G-10 色谱图
Fig. 1 Chromatogram of crude antioxidant peptides from the low-cost laver on Sephadex G-10 column

主要得到 a、b、c、d 4 个组分,将其配成质量浓度为 10 mg/mL 的溶液,测定其抗氧化活性。发现这 4 个峰组分均有一定的抗氧化活性,其中 c 组分和 d 组分的抗氧化活性相对较高。由于 d 组分的部分抗氧化活性很快消失,其抗氧化活性不稳定,而 c 组分尚未出现活性消失现象,所以选择 c 组分收集浓缩后冷冻干燥成淡黄色粉末,以备进一步离子交换色谱分离使用。

2.1.2 DEAE-52 离子交换色谱分离纯化结果 离子交换色谱分离纯化结果见图 2。分别收集各个峰组分,并对各个峰组分进行抗氧化活性测定,发现收集的各峰组分均有抗氧化活性。由图 2 看出,其中 0.1 mol/L NaCl 的洗脱峰和 0.2 mol/L NaCl 的第二个洗脱峰的 DPPH 消除率、羟自由基清除能力和超氧自由基清除能力均相对较高。0.2 mol/L NaCl 的第二个洗脱峰放置 2 d 后其活性消失,其活性不稳定,因此选择收集 0.1 mol/L NaCl 的洗脱峰(组分 c1)冷冻干燥,待进一步的分离。

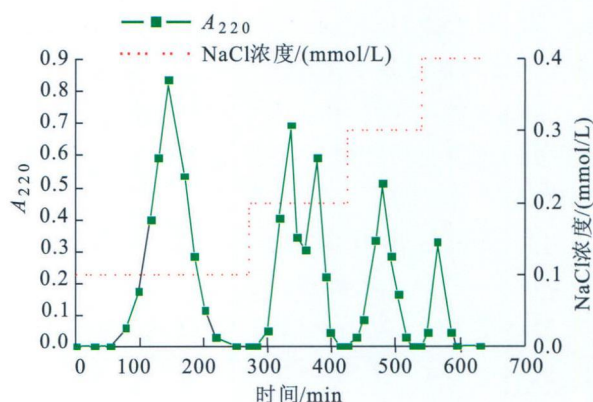


图 2 多肽的 DEAE-52 离子交换色谱图谱
Fig. 2 Chromatogram of peptide on DEAE-52

2.1.3 反相色谱分离纯化结果 组分 c1 经凝胶色谱和离子交换色谱分离纯化后,为保证分离出来的酶解紫菜抗氧化肽得到最大可能的纯化,我们又采用了 SOURCE 3RPC 色谱分离技术来进行更进一步的分离,其分离结果见图 3。

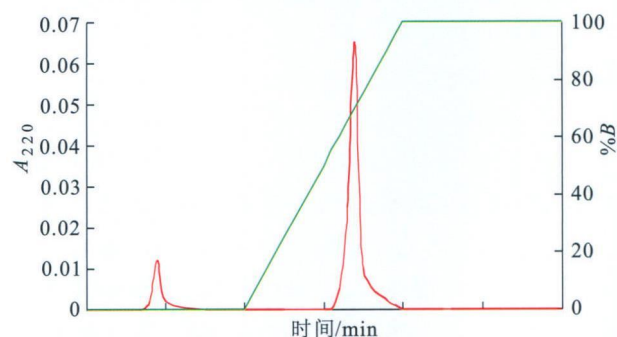


图 3 组分 c1 的反相色谱图谱
Fig. 3 SOURCE 3RPC chromatogram of the sample c1

得到一个渗透峰和一个洗脱峰,收集这 2 个峰组分并进行抗氧化活性测定,发现渗透峰无抗氧化活性。在大约 60% B(V/V)处得到了一个有抗氧化活性的洗脱峰,收集后冷冻干燥得到浅黄色粉末,可初步确定此为纯化后的酶解紫菜抗氧化肽 ELAP。

2.2 酶解低值紫菜多肽抗氧化特性

从表 1 可以看出,ELAP 在 100 μg/mL 质量浓度下,其 DPPH 消除率,羟自由基清除能力和超氧自由基清除能力均比同浓度的低值紫菜抗氧化肽粗品高。并且在该质量浓度下,其对超氧自由基、DPPH 和羟自由基的清除率依次为 23.25%、47.12%、47.12%,分别是同质量浓度下 VC 的 0.79、0.87、0.91 倍,还原能力为 VC 的 1.23 倍,表现出较强的体外抗氧化活性。结合上述抗氧化性测定结果可知,ELAP 有较强的抗氧化活性,因此确

定 ELAP 为分离纯化的最终产物,并对其的纯度及氨基酸组成进行测定。

表 1 低值酶解紫菜多肽抗氧化活性

Tab.1 Scavenging rates of crude antioxidant peptides from the low-cost laver and various subfractions of their reaction against hydroxyl and superoxide anion free radicals

多肽	DPPH 消除能力/%	超氧自由基清除率/%	羟自由基清除率/%	还原力(A ₇₀₀)
抗坏血酸	26.73	59.64	51.78	0.315
粗品	19.37	39.64	44.38	0.321
ELAP	23.25	47.12	47.12	0.387

2.3 酶解低值紫菜抗氧化肽纯度鉴定

从图 4 可以看出,色谱峰基本达到了基线分离的要求。在保留时间为 9.808 min 处,得到 1 个峰面积比为 87.44% 的洗脱峰,这说明 ELAP 已基本得到纯化。

2.4 酶解低值紫菜抗氧化多肽 ELAP 的主要肽组成实验采用的是 BEH C18 柱。使用乙腈-水做流动相比甲醇-水作流动相时灵敏度略高;当流动相中含有 0.2%(V/V)的甲酸时有利于改善色谱峰的峰形和提高色谱的灵敏度,因此采用 0.2%(V/V)甲酸乙腈溶液和 0.2%(V/V)甲酸水溶液做流动相。Q-TOF-MS 采集的数据经过 Profiling Solution 软件进行峰提取和匹配,同时转换正负离子模式数据,经过峰面积归一化处理后进行主要成分分析。通过质谱信号推断出多肽的氨基酸序列,ELAP 的主要离子峰 m/z 505.25。Q-TOF-MS 分析 ELAP 为

六肽 DGVGYG (Asp-Gly-Val-Gly-Tyr-Gly),如图 5,即 m/z 505.25 为 ELAP 带一个正电荷的质谱信号。研究表明^[16],各种抗氧化肽的分子量基本在 500~5 000 u,由 3~16 个氨基酸组成。这可能是由于肽段中含有某些能与自由基反应的特殊基团即供氢基团,肽段只有处在适当相对分子质量时,才能使供氢基团得到最大暴露,并与自由基充分作用发挥抗氧化作用^[17]。另外,某些氨基酸组成是抗氧化肽不可缺少的活性结构,这些氨基酸本身具有一定的清除自由基和抗氧化能力,可能与抗氧化肽作用机制有关,Pro、Tyr、Met、Lys、Asp 是文献中抗氧化肽通常含有的氨基酸^[18],并且 Tyr 氨基酸与 Gly 氨基酸^[19-20]本身属于具抗氧化活性的氨基酸。

3 结 语

采用本实验室自产的氨肽酶与商业酶复配,在一定的条件下利用可控的酶解方式对低值紫菜进行酶解,所获得的多肽产物总抗氧化能力较强;通过凝胶、离子交换、反相三步组合的色谱分离步骤从酶解紫菜多肽的混合物中分离出达一定纯度抗氧化活性较高的酶解紫菜多肽 ELAP;利用超高效液相色谱-质谱法(Q-TOF-MS)分析出 ELAP 为一种六肽(Asp-Gly-Val-Gly-Tyr-Gly);ELAP 具有较小分子量,能够有效清除自由基,可作为食源性抗氧化剂。本文通过多种色谱技术的组合利用,从复杂成分中成功分离纯化出单一小分子物质,同时为海洋低值紫菜原料的深度加工和综合利用提供了一定的依据。

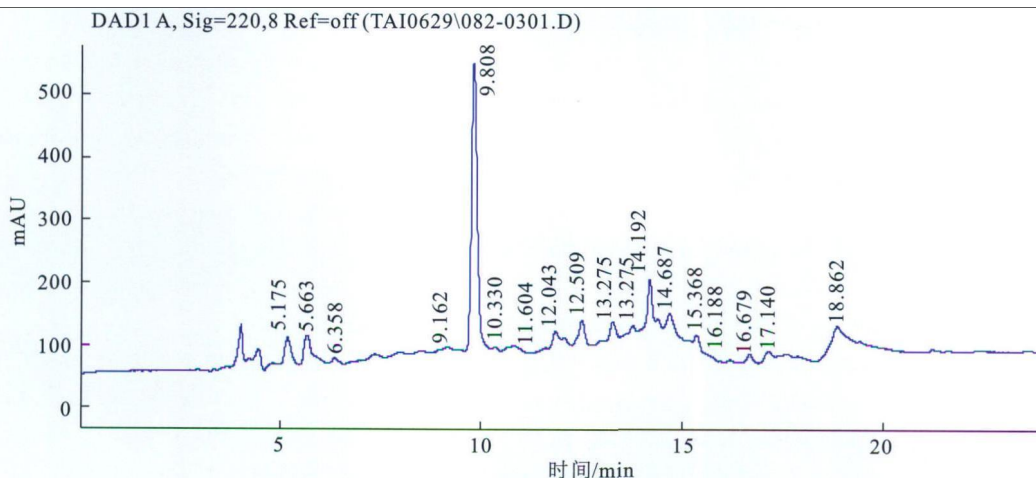


图 4 ELAP 的 RP-HPLC 色谱图谱
Fig.4 RP-HPLC separation profile of subfraction No. 1

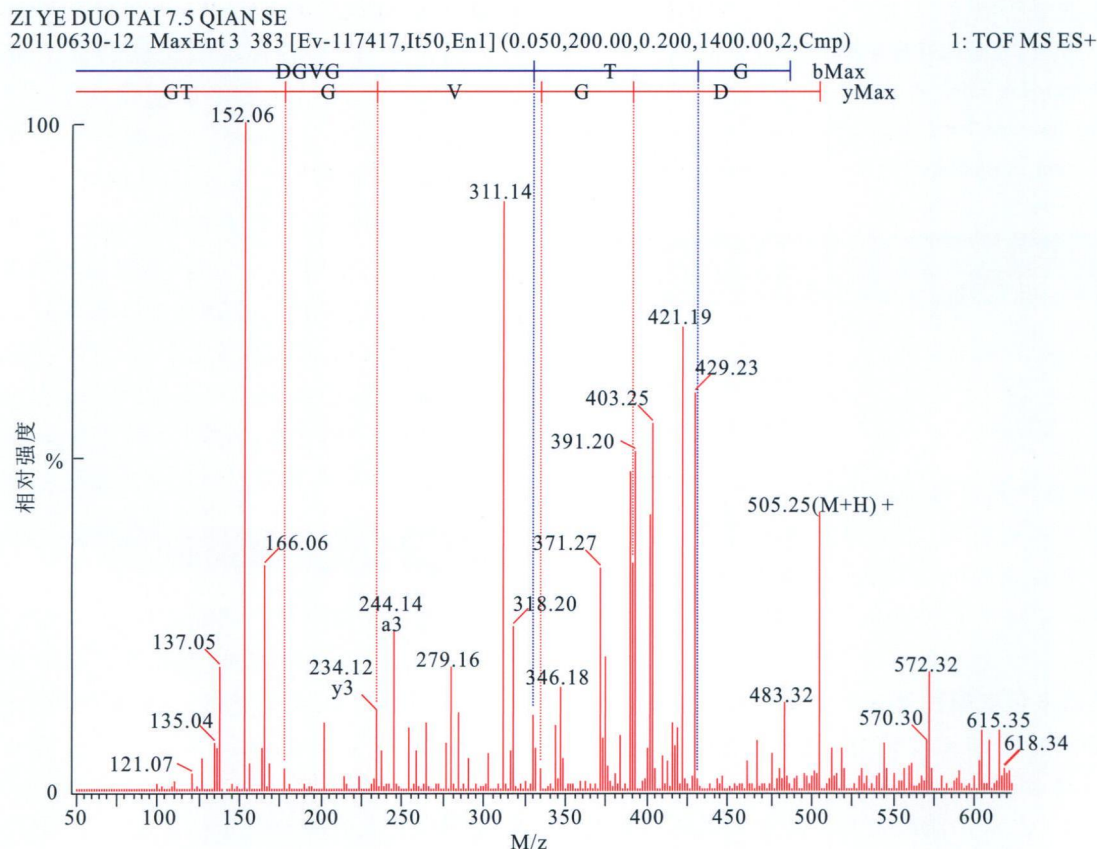


图 5 ELAP m/z 505.25 的质谱图
Fig. 5 ELAP spectrogram of m/z 505.25

参考文献(References):

- [1] 裴小平,唐道邦,肖更生,等. 抗氧化肽的应用现状及趋势[J]. 食品工业科技,2009,30(2):319—322.
PEI Xiao-ping,TANG Dao-bang,XIAO Geng-sheng,et al. Application status and trends of preparation of antioxidation peptides [J]. **Food Industry Technology**, 2009,30(2): 319—322. (in Chinese)
- [2] Binsan W,Benjukul S,Visessanguan W,et al. Antioxidative activity of mungoong,an extract paste,from the cephalothorax of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. **Food Chemistry**, 2008,106(1):185—193.
- [3] Qian Z J,Jung W K,Kim S K,et al. 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.
- [4] Shu K C,Lu G H,Jao C L. Antioxidative properties of peptides prepared from tuna cooking juice hydrolysates with orientase (*Bacillus subtilis*) [J]. **Food Res Int**, 2009,42:647—652.
- [5] 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]. **J Nutr Biochem**. 2007,18:31—38.
- [6] 钱晓婕,陈舜胜,付杰. 坛紫菜中藻胆蛋白的提取及其抗氧化活性研究[J]. 中国海洋药物杂志,2008,27(2):42—46.
QIAN Xiao-jie,CHEN Yu-sheng,FU Jie. Studies oil extraction and antioxidation activity of phycobiliproteins from *Porphyra haitanensis* [J]. **China J Mar Drugs**. 2008,27(2):42—46. (in Chinese)
- [7] 段杉,朱佩敏,桂丹丹. 低值紫菜增殖技术研究[J]. 食品工业科技,2007,28(11):175—177.
DUAN Shan,ZHU Pei-min,GUI Dan-dan. The study to enhance the flavor of low valued laver [J]. **Science and Technology of Food Industry**. 2007,28(11):175—177. (in Chinese)

- [8] 应苗苗. 低值紫菜研究现状与高值化对策[J]. 温州农业科技, 2009, 3: 16—17.
YING Miao-miao. High-value countermeasure and current status of low valued laver [J]. **Wenzhou Agricultural Science And Technology**, 2009, 3: 16—17. (in Chinese)
- [9] Liu J, Sun H, Dong F, et al. The influence of the cation of quaternized chitosans on antioxidant activity [J]. **Carbohydrate Polymers**, 2009, 78(3): 439—443.
- [10] Wu H C, Chen H M, 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.
- [11] Thiansilakul Y, Benjakul S, Shahidi F. Comositions, functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from round scad (*Decapterus maruadsi*) [J]. **Food Chemistry**, 2007, 103(4): 1385—1394.
- [12] Viliak K, Soottawat B, Duangporn K, et al. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type [J]. **Food Chemistry**, 2007, 102(4): 1317—1327.
- [13] Zhang S J, Wang M Y, Wang C H. Preparative separation and purification of alkaloids from Rhizoma coptidis by high-speed counter-current chromatography [J]. **Separation and Purification Technology**, 2011, 76: 428—431.
- [14] Wang H P, Dass C. Characterization of bioactive peptides in bovine adrenal medulla by a combination of fast HPLC and ESI-MS [J]. **Peptides**, 2002, 23(12): 2143—2150.
- [15] Zhang J H, Zhang H, Wang L, et al. Isolation and identification of antioxidative peptides from rice endosperm protein enzymatic hydrolysate by consecutive chromatography and MALDI-TOF/TOF MS /MS [J]. **Food Chemistry**, 2011, 119(1): 226—234.
- [16] Suetsuna K, Ukeda H, Ochi H. Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein [J]. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 2000, 11(3): 128—131.
- [17] Qian Z J, 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.
- [18] Pihlanto A. Antioxidative peptides derived from milk proteins [J]. **International Dairy Journal**, 2006, 16(11): 1306—1314.
- [19] Chen H M, Yamauchi F, Fujimoko K, et al. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein [J]. **J Agric Food Chem**, 1998, 46(1): 49—53.
- [20] Li B, Chen F, Wang X, et al. Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electro spray ionization mass spectrometry [J]. **Food Chemistry**, 2007, 102(4): 1135—1143.