

人工抗氧化肽的设计、表达纯化及功能表征

尧馨慧^{1,2}, 张云丰^{1,2}, 康振^{1,2}, 陈坚^{*1,2}

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 为获得具有抗氧化功能的寡肽,人工设计了3条由不同寡肽串联组成的含胰蛋白酶切割位点的多肽序列,分别命名为ATO、ATW和WIT,并在*E. coli* BL21(DE3)宿主中实现可溶性表达。纯化的多肽经过胰蛋白酶处理得到3种多肽水解物,体外抗氧化性功能评价实验表明,3种多肽水解物均对不同自由基具有清除作用,其中ATW多肽水解物抗氧化性最强,对DPPH自由基、超氧阴离子自由基和羟基自由基的IC₅₀值分别为0.53、0.45、0.34 mg/mL。本研究为制备抗氧化肽提供一种新思路。

关键词: 抗氧化肽;人工设计;寡肽制备;功能评价

中图分类号:Q 789 文章编号:1673-1689(2020)08-0010-07 DOI:10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.08.002

Design, Expression, Purification and Functional Characterization of Artificial Antioxidant Peptides

YAO Xinhui^{1,2}, ZHANG Yunfeng^{1,2}, KANG Zhen^{1,2}, CHEN Jian^{*1,2}

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Three novel polypeptides were designed with trypsin hydrolyzing residues for manufacturing anti-oxidant oligopeptides. These polypeptides successfully expressed in *E. coli* BL21 (DE3) were named as ATO, ATW and WIT, respectively. Three kinds of polypeptide hydrolysates were achieved with trypsin digestion. In vitro antioxidant ability evaluation revealed that the generated polypeptide hydrolysates performed scavenging activity towards different free radicals. In comparison, the ATW hydrolysates showed the highest antioxidant activity, of which the IC₅₀ values of DPPH free radical, superoxide anion free radical and hydroxyl free radical were 0.53 mg/mL, 0.45 mg/mL and 0.34 mg/mL, respectively. The present study provided a novel approach for antioxidant peptides design.

Keywords: antioxidant peptide, artificial design, oligopeptide preparation, function evaluation

收稿日期: 2019-01-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(31670092);江南大学自主科研计划重点项目(JUSRP51707A);国家轻工技术与工程一流学科自主课题(LITE2018-16)。

* 通信作者: 陈坚(1962—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事发酵工程、酶技术和食品生物技术等方面的研究。

E-mail: jchen@jiangnan.edu.cn

在 D. Harman 提出自由基学说后^[1],随着研究的深入,人们逐渐认识到人体衰老和许多疾病与自由基的产生相关。生物体内的抗氧化体系主要包括抗氧化酶、低相对分子质量非酶抗氧化剂、分隔过渡金属的蛋白质等自由基清除剂^[2]。当机体内活性氧分子(ROS)大量积累,会导致机体处于氧化应激状态,并氧化损伤 DNA、RNA、线粒体等生物分子,引起细胞死亡和组织损伤^[3]。因此,具有自由基清除作用的抗氧化剂在药品、化妆品、食品和保健品中具有很大的应用价值。

将动植物来源的生物活性肽或蛋白质水解物作为天然抗氧化剂是当前的一大研究热点。蛋白质水解物是将提取得到的大分子蛋白质通过酶解、酸解、碱处理或生物发酵等方式分解成具有生物活性的寡肽,如已报道的鸡血水解物^[4]、鲭鱼蛋白水解物^[5]、鸡蛋水解物^[6]、发酵乳水解物^[7]、阿魏菇水解物^[8]、羊胎盘水解物^[9]、螺旋藻水解物^[10]等。一般而言,具有生物活性的肽通常由 2~20 个氨基酸构成^[11],相对分子质量小于 6 000^[12],而具有抗氧化活性的肽一般由 5~16 个氨基酸残基组成^[13]。

目前关于抗氧化肽的研究主要集中在蛋白质水解物中的肽的分离、纯化和鉴定,但鲜有关于生物法制备特定序列的寡肽的报道。对于微生物法直接表达寡肽而言,存在两个较大的难点:其一是寡肽极小的相对分子质量导致其在表达过程中难以正常的进行转录和翻译;其二是表达出的寡肽较难使用简单的、可工业化的策略进行纯化。在工业生产中,小分子肽的生产仍以化学合成为主,但化学法反应条件复杂且纯化过程繁琐。

针对上述微生物法直接表达寡肽的难点,作者提出表达串联寡肽的新思路,将表达小分子寡肽变为表达合适相对分子质量的多肽蛋白质。根据抗氧化肽的二级结构、氨基酸组成、亲疏水性、带电性等特点^[14-18],结合本课题组前期关于抗氧化寡肽的高通量筛选结果,人工设计了 3 条由不同寡肽串联组成的氨基酸序列,分别命名为 ATO、ATW 和 WIT。这些寡肽序列的 C 端均为可被胰蛋白酶特异性识别和切割的 Arg 或 Lys。同时,本课题组前期构建的高产胰蛋白酶的 *P. pastoris* 工程菌^[19-20],为酶解法制备寡肽提供了工业化的可能。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株和质粒 克隆宿主 *E. coli* JM109、表达宿主 *E. coli* BL21 (DE3)、大肠杆菌表达载体 pRSFDuet-1 等均为作者所在实验室保存。

1.1.2 主要试剂 Prime STAR (HS) DNA 聚合酶、PCR 产物纯化试剂盒:购自 TaKaRa 公司;一步克隆试剂盒:购自 Vazyme 公司;SDS-PAGE 试剂盒、蛋白质电泳 marker:购自碧云天公司;BCA 蛋白质含量检测试剂盒:购自上海生工生物工程有限公司,引物和基因合成及测序服务也由该公司完成;胰蛋白酶(Trypsin):由作者所在实验室构建的重组菌经发酵及纯化而得^[20];其他常规试剂为国产分析纯。

1.1.3 培养基 LB 培养基:胰蛋白胨 10 g/L,酵母提取物 5 g/L,NaCl 10 g/L,自然 pH。固体培养基另添加 20 g/L 琼脂粉。

TB 培养基:胰蛋白胨 12 g/L,酵母提取物 24 g/L,甘油 4 g/L,K₂HPO₄ 2.31 g/L,KH₂PO₄ 12.54 g/L。

1.2 菌株构建

根据本课题组前期研究成果,筛选得到了一系列具有抗氧化功能的寡肽序列。在此基础上,将这些具有抗氧化性的且 C 端为 Arg 或 Lys 的不同寡肽进行串联,人工设计了 3 条多肽序列,分别命名为 ATO、ATW 和 WIT,见表 1。

经大肠杆菌宿主密码子优化后,全基因合成上述多肽的基因序列,且在其 N 端添加 His 标签和胰蛋白酶切割位点以便于表达和纯化。用表 2 中的引物扩增目的基因序列,添加上下游同源臂,采用一步克隆的方式将扩增得到的序列连接至线性化的 pRSFDuet-1 载体上,连接位点为 Nco I 和 Hind III。构建表达载体 pRSFDuet1-His-ATO、pRSFDuet1-His-ATW 和 pRSFDuet1-His-WIT,分别转化 *E. coli* JM109 感受态细胞。进行菌落 PCR 和琼脂糖凝胶电泳验证,并进行测序。构建成功的质粒分别转化 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞得到 3 株重组菌。

1.3 重组大肠杆菌的发酵

种子培养:挑取单菌落接种于含 50 μg/L 卡那霉素的 LB 培养基中,250 mL 离心管装液量为 30 mL。在 37 °C、220 r/min 条件下振荡过夜培养。

摇瓶发酵:将种子培养液按体积分数 1%转接至含 50 μg/L 卡那霉素的 TB 培养基中,250 mL 摇

表 1 人工设计的多肽序列

Table 1 Polypeptide sequences designed artificially

名称	氨基酸序列
ATO	PKEKGQPRPKEKGQPRPKEKGQPRRKRKRRQVLLKLPSTVGSVMKVLLKQVAVKRRRQPRPKERPKEKGQPRPKEKRKRRQ RRRGQPRGHKADIFYLINE
ATW	ANAAFRPRGEEMQRRANAAFRPRGEEMQRRGEEMQVRVQNGERYHDRDQVWKRANAAFRPRANAAFRPRVGVAPGANAAFRP RRPGSKKCVIKRRRRTTKS
WIT	YPPAKNGPLQAGQPGERGHKVKCFKYPPAKFIKKGHKEPLNQLNANKQVAVKVVLLKNGPLQAGQPGERYPPAKFIKKGHKNP LQAGQPGERGHKYPPAKSHCMN

表 2 本文所用的引物

Table 2 Primers used in this study

引物	序列(5' - 3')
pRS-F	AAGCTTGC GGCCGCATAA
pRS-R	CCATGGTATATCTCCTTATTAAGT
P-F	<u>AATAAGGAGATATA</u> CCATGGAAGGAGAAAATATATGCATCATCACC
ATO-R	CATTATGCGGCCGCAAGCTTTTAGCAATTTTGGCCTGGC
ATW-R	CATTATGCGGCCGCAAGCTTTTAACTTTTGGTGGTTTTACGACG
WIT-R	CATTATGCGGCCGCAAGCTTTTACTCGTTAATCAGATAGAAAATATCTG

注:表中标注下划线部分为同源臂序列

瓶装液量为 50 mL。在 37 °C、220 r/min 条件下培养至 OD₆₀₀ 值为 0.6~0.8, 添加终浓度为 1 mmol/L IPTG 进行诱导, 37 °C 诱导 6 h。

发酵液于 8 000 r/min、4 °C 下离心 10 min, 收集菌体。菌体洗涤 2 次后重悬于 20 mmol/L、pH 7.5 的 PBS 缓冲液中进行超声破碎。破碎液 12 000 r/min、4 °C 下高速离心 20 min, 取上清液进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析。

1.4 多肽的纯化

破碎上清液经 0.22 μm 滤膜过滤, 使用 AKTA 蛋白质纯化仪及 Ni-NTA 亲和层析柱进行蛋白质纯化。

上样及平衡缓冲液 A (20 mmol/L NaH₂PO₄ - Na₂HPO₄, 500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑, pH 7.8), 洗脱液 B (20 mmol/L NaH₂PO₄-Na₂HPO₄, 500 mmol/L NaCl, 500 mmol/L 咪唑, pH 7.8)。依次使用体积分数 10%、30%、50%、100% 的洗脱液 B 进行梯度洗脱, 每个梯度洗脱 10 个柱体积, 收集蛋白质峰。通过 SDS-PAGE 电泳检测蛋白质纯度, 并将纯化得到的多肽透析脱盐。

1.5 寡肽的水解制备

使用由毕赤酵母工程菌发酵并纯化得到的胰蛋白酶(200 U/mL)水解上述多肽, 加酶量为体积分

数的 5%, 37 °C 下酶解 4 h。反应结束后, 立即 70 °C 水浴加热 10 min 使酶灭活。在 7 000 r/min、4 °C 离心 10 min, 收集上清液, 得到 3 种混合寡肽溶液。

使用相对分子质量 3 000 的超滤浓缩管对寡肽溶液进行浓缩, 留取含小相对分子质量物质的溶液, 并使用 BCA 法测定蛋白质质量浓度。

1.6 抗氧化性测定

1.6.1 对 DPPH 自由基的清除能力测定 测定方法在文献[21]方法的基础上有所改动。以维生素 C (VC) 为对照, 使用无水乙醇配制 4×10⁻⁴ mol/L 的 DPPH 溶液, 避光保存。

取 750 μL 待测样品于 1.5 mL EP 管中, 加入 750 μL DPPH 溶液, 混匀后避光静置 30 min, 10 000 r/min 离心 5 min。取 200 μL 上清液于 96 孔板, 在吸收波长 517 nm 处测其吸光度 D₁; 另取同样量待测样品加入无水乙醇重复上述操作, 测得的结果记为 D₂; 取同样量 DPPH 溶液加入无水乙醇重复上述操作, 结果记为 D₀。DPPH 自由基清除率 C_D 计算公式如下:

$$C_D = (1 - (D_1 - D_2) / D_0) \times 100\%$$

1.6.2 对超氧阴离子自由基的清除能力测定 采用邻苯三酚自氧化法^[22]。以 VC 作为对照, 配制 0.1 mol/L 的 Tris-HCl (pH 8.2) 溶液。使用 0.1 mol/L

的HCl溶液溶解邻苯三酚,配为0.75 mmol/L的邻苯三酚水溶液。

将15 μ L待测液和170 μ L Tris-HCl加入96孔板,37 $^{\circ}$ C保温振荡20 min后加入15 μ L邻苯三酚溶液,振荡混匀后立即测吸收波长为325 nm处的吸光值。每隔30秒测定一次,反应时间3 min。绘制吸光值A随时间变化的曲线,斜率即为邻苯三酚自氧化率 $V(\Delta A/\text{min})$ 。超氧阴离子自由基清除率 C_V 计算公式如下:

$$C_V = (V_0 - V_1) / V_0 \times 100\%$$

其中: V_0 为空白组的邻苯三酚自氧化率; V_1 为实验组的邻苯三酚自氧化率。

1.6.3 对羟基自由基的清除能力测定 测定方法在文献[23]方法的基础上有所改动。以VC为对照。使用无水乙醇配制0.75 mmol/L的邻二氮菲溶液,配制0.75 mmol/L的 FeSO_4 溶液,配制0.15 mol/L的PBS缓冲液(pH 7.4)。

在96孔板中依次加入35 μ L邻二氮菲溶液、70 μ L PBS缓冲液、35 μ L FeSO_4 溶液、35 μ L样品和35 μ L H_2O_2 ,混匀后37 $^{\circ}$ C保温振荡1 h,测吸收波长在536 nm处的吸光值 A_2 ;另取同样量蒸馏水替代样品重复上述操作,测得的吸光值记为 A_0 ;取同样量蒸馏水替代样品和 H_2O_2 重复上述操作,测得的吸光值记为 A_1 。羟基自由基清除率 C_A 计算公式如下:

$$C_A = (A_2 - A_0) / (A_1 - A_0) \times 100\%$$

1.6.4 半抑制浓度 IC_{50} 的测定 将对照VC及3种多肽水解物样品梯度稀释成不同质量浓度,分别测定其不同质量浓度时的DPPH自由基清除率、超氧阴离子自由基清除率和羟基自由基清除率。以样品质量浓度为横坐标,清除率测定值为纵坐标,使用origin软件绘制拟合曲线,并计算半抑制浓度 IC_{50} 值。

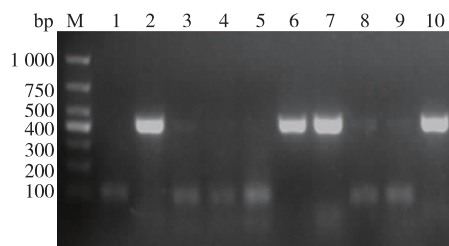
2 结果与分析

2.1 重组抗氧化肽的构建

以pRS-F和pRS-R为上下游引物线性化载体pRSFDuet-1。以合成的基因ATO为模板,以P-F和ATO-R为引物进行扩增;以合成的基因ATW为模板,以P-F和ATW-R为引物进行扩增;以合成的基因WIT为模板,以P-F和WIT-R为引物进行扩增。使用PCR产物纯化试剂盒进行胶回收,回收后得到的具有pRSFDuet-1载体上下游同源臂的

ATO、ATW和WIT片段分别和线性化的pRSFDuet-1载体片段同源重组,转化*E. coli* JM109感受态细胞。

以转化空质粒pRSFDuet-1的*E. coli* JM109为对照,挑取转化子进行菌落PCR验证,见图1。2号、6号、7号和10号泳道含有大小正确且清晰的目的基因条带,约350 bp。将2号、6号和10号菌提取质粒交由上海生工生物工程有限公司测序,测序结果正确,得到构建成功的重组载体pRSFDuet1-His-ATO、pRSFDuet1-His-ATW和pRSFDuet1-His-WIT。分别转化*E. coli* BL21(DE3)感受态细胞,得到*E. coli* BL21(DE3)-pRSFDuet1-His-ATO、*E. coli* BL21(DE3)-pRSFDuet1-His-ATW和*E. coli* BL21(DE3)-pRSFDuet1-His-WIT重组菌。



M:DNA marker;1:对照;2~4:ATO PCR产物;5~7:ATW PCR产物;8~10:WIT PCR产物。

图1 重组大肠杆菌的PCR鉴定

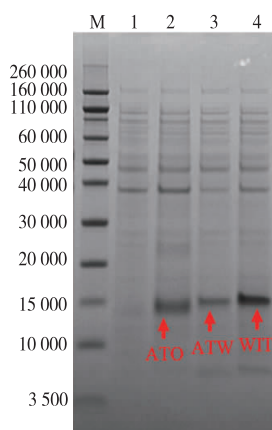
Fig. 1 Identification of recombinant *E. coli* by PCR

2.2 重组肽的表达分析

以转化空pRSFDuet-1质粒的*E. coli* BL21(DE3)-pRSFDuet1为对照,挑取构建成功的*E. coli* BL21(DE3)-pRSFDuet1-His-ATO、*E. coli* BL21(DE3)-pRSFDuet1-His-ATW和*E. coli* BL21(DE3)-pRSFDuet1-His-WIT单菌落进行摇瓶发酵,发酵结束后离心收集菌体并超声破碎,对其胞内上清液进行SDS-PAGE分析,结果见图2。与对照相比,3株重组菌胞内上清液中均可明显检测到大小约为14 000的蛋白质条带,即ATO、ATW和WIT多肽均能在*E. coli*胞质中以可溶性形式进行表达。

2.3 重组肽的纯化与酶解

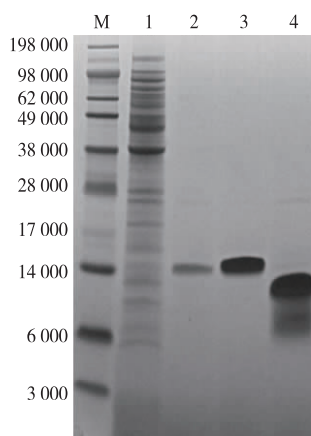
使用Ni-NTA亲和层析柱对重组大肠杆菌的胞内上清液进行纯化,当梯度洗脱的咪唑浓度为200 mmol/L时可洗脱得到纯化的多肽,见图3。其中,ATO多肽相对分子质量约为13 000,ATW和WIT多肽相对分子质量约为14 000,均符合理性设计多肽的预期大小,透析后可得到脱盐的多肽溶液。



M: 蛋白质 marker; 1: 对照菌 *E. coli* BL21 (DE3)-pRSFDuet1 的胞内上清液; 2: *E. coli* BL21 (DE3)-pRSFDuet1-His-ATO 的胞内上清液; 3: *E. coli* BL21 (DE3)-pRSFDuet1-His-ATW 的胞内上清液; 4: *E. coli* BL21 (DE3)-pRSFDuet1-His-WIT 的胞内上清液。

图 2 重组大肠杆菌蛋白质表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 Analysis of the products expressed in recombinant *E. coli* by SDS-PAGE



M: 蛋白质 marker; 1: 对照 *E. coli* BL21 (DE3)-pRSFDuet1 的胞内上清液; 2: 纯化的 ATW 多肽; 3: 纯化的 WIT 多肽; 4: 纯化的 ATO 多肽。

图 3 大肠杆菌胞内蛋白质纯化结果的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE of purified sample extracted from the *E. coli* cultures

在多肽 N 端的 His 标签与多肽序列之间, 具有胰蛋白酶的特异性酶切位点, 人工设计为 Asp-Arg, Asp 有利于胰蛋白酶在 Arg 处的高效切割。使用胰蛋白酶水解 ATO、ATW 和 WIT 多肽溶液, 能够去掉 N 端的 His 标签, 并得到 3 种混合多肽水解物。

经超滤浓缩后, 使用 BCA 法测定 ATO、ATW 和

WIT 多肽水解物的蛋白质质量浓度分别为 2.46、1.73、2.04 mg/mL。

2.4 多肽水解物的抗氧化性评价

通过测定多肽水解物对人工生成的自由基的清除能力来反映其抗氧化活性, 具体为测定对 DPPH 自由基、羟基自由基和超氧阴离子自由基的清除率, 综合评价 3 种多肽水解物的抗氧化性。

2.4.1 对 DPPH 自由基的清除能力 如图 4 所示, 对照 VC 在较低质量浓度时对 DPPH 自由基就能够达到极好的清除效果, 其 $IC_{50} < 0.05$ mg/mL, 且当 VC 质量浓度不低于 0.2 mg/mL 时, 清除率即可达到 100%。3 种多肽水解物对 DPPH 自由基均具有清除效果, 清除能力随着质量浓度的增加而增强, 其中 ATW 多肽水解物对 DPPH 自由基的清除能力最强。3 种多肽水解物对 DPPH 自由基的清除效果均不如 VC。ATO、ATW 和 WIT 多肽水解物对 DPPH 自由基的 IC_{50} 值依次为 0.69、0.53、0.76 mg/mL。

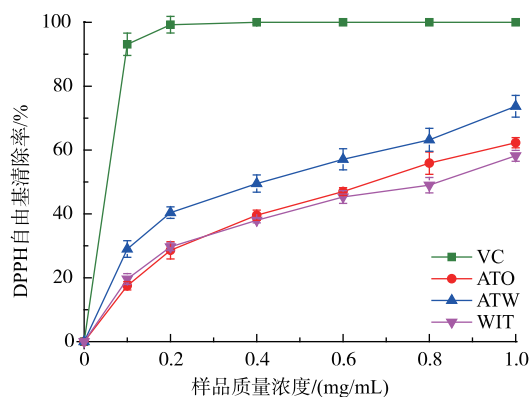


图 4 多肽水解物的 DPPH 自由基清除能力

Fig. 4 Activities of scavenging DPPH radical of the polypeptide hydrolysates

2.4.2 对超氧阴离子自由基的清除能力 3 种多肽水解物对超氧阴离子自由基均具有清除效果, 见图 5。对照 VC、ATO 多肽水解物、ATW 多肽水解物和 WIT 多肽水解物对超氧阴离子自由基的 IC_{50} 值依次为 0.48、0.90、0.45、0.90 mg/mL。值得关注的是, ATW 多肽水解物的半抑制质量浓度略低于 VC; ATO 和 WIT 多肽水解物的半抑制浓度相同, 但高于 VC。在较低质量浓度 (<0.4 mg/mL) 时, 3 种多肽水解物均表现出了对超氧阴离子自由基很好的清除效果, 明显优于对照 VC; 但随着质量浓度的增高, 清除率最终都低于 VC。由此可知, 在较低质量浓度下, 小分子的肽类对超氧阴离子自由基的清除更有优势。

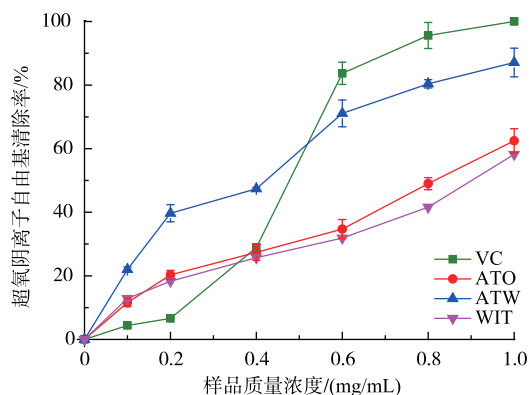


图5 多肽水解物的超氧阴离子自由基清除能力

Fig. 5 Activities of scavenging superoxide anion of the polypeptide hydrolysates

2.4.3 对羟基自由基的清除能力 3种多肽水解物对羟基自由基均具有清除能力。如图6所示,在质量浓度低于0.1 mg/mL时,ATW多肽水解物表现出了强于VC的清除力效果,但随着质量浓度的增加,仍弱于VC。对照VC、ATO多肽水解物、ATW多肽水解物和WIT多肽水解物对羟基自由基的IC₅₀值依次为0.20、1.06、0.34、1.24 mg/mL。ATW多肽水解物对羟基自由基的清除效果明显优于另外两种多肽水解物。

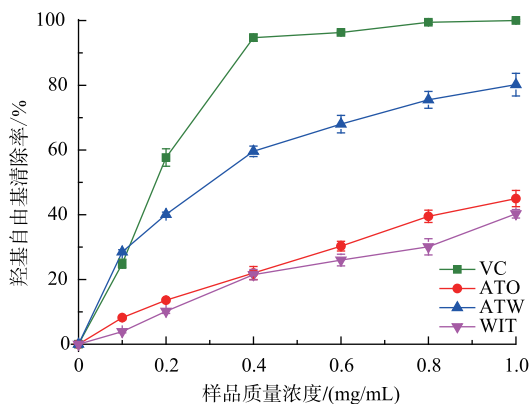


图6 多肽水解物的羟基自由基清除能力

Fig. 6 Activities of scavenging hydroxyl radical of the polypeptide hydrolysates

2.4.4 多肽水解前后抗氧化活性比较 3种多肽及多肽水解物均具有抗氧化活性,但相同蛋白质浓度时,水解物的抗氧化活性远高于水解前的大分子多

肽。以ATW多肽和ATW多肽水解物为例,当样品质量浓度为0.5 mg/mL时,如图7所示,ATW多肽水解物对DPPH自由基、超氧阴离子自由基和羟基自由基的清除率分别为水解前的4.39、15.71和6.71倍。ATO多肽和WIT多肽也表现出了相似的趋势。结果表明,通过大肠杆菌直接表达出的3种多肽并没有很好的抗氧化活性,是通过胰蛋白酶的水解作用,获得了具有抗氧化活性的功能性寡肽。

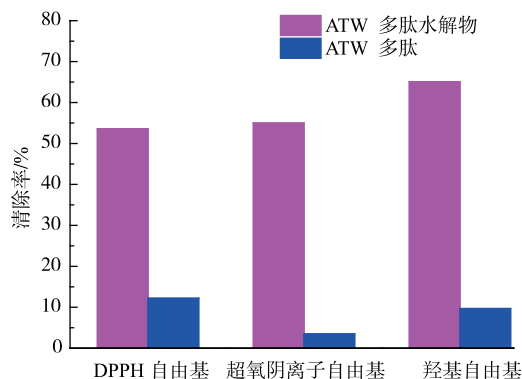


图7 多肽水解前后的抗氧化性比较

Fig. 7 Antioxidant activity of polypeptide before and after hydrolysis

3 结语

作者在*E. coli*中成功表达了3种多肽,且均以可溶形式在胞质中存在。通过亲和层析、透析脱盐、胰蛋白酶水解和超滤浓缩等流程得到了3种不同的多肽水解物。DPPH自由基清除率、超氧阴离子自由基清除率和羟基自由基清除率等体外抗氧化性测定结果表明,3种多肽水解物均具有清除自由基的效果。在较低质量浓度时,ATW多肽对超氧阴离子自由基和羟基自由基的清除效果甚至优于对照VC。ATW多肽水解物在3种多肽水解物中具有最强的抗氧化性,对DPPH自由基、超氧阴离子自由基和羟基自由基的IC₅₀值分别为0.53、0.45、0.34 mg/mL。生物酶法为制备功能性寡肽提供了一种新思路,同时本研究得到的一组抗氧化肽在食品、药品和化妆品中具有广阔的应用前景。

参考文献:

[1] HARMAN D. Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry[J]. *Journal of Gerontology*, 1956, 11(3):298-300.
 [2] 王秋林,王浩毅,王树人. 氧化应激状态的评价[J]. *中国病理生理杂志*, 2005, 21(10):2069-2074.

- [3] REUTER S, GUPTA S C, CHATURVEDI M M, et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked?[J]. **Free Radical Biology and Medicine**, 2010, 49(11): 1603-1616.
- [4] ZHENG Z, SI D, AHAMD B, et al. A novel antioxidative peptide derived from chicken blood corpuscle hydrolysate [J]. **Food Research International**, 2018: S0963996917309420.
- [5] WANG X, YU H, XING R, et al. Purification and identification of antioxidative peptides from mackerel (*Pneumatophorus japonicus*) protein[J]. **RSC Advances**, 2018, 8(37): 20488-20498.
- [6] NIMALARATNE C, BANDARA N, WU J. Purification and characterization of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed chicken egg white[J]. **Food Chemistry**, 2015, 188: 467-472.
- [7] PADGHAN P V, MANN B, HATI S. Purification and characterization of antioxidative peptides derived from fermented milk (*Lassi*) by lactic cultures[J]. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, 2017, 24(10): 1-15.
- [8] 郑晓吉, 许程剑, 牛博楠, 等. 新疆阿魏菇抗氧化肽分离纯化及抗氧化性质[J]. 食品与生物技术学报, 2015, 34(5): 524-529.
- [9] 姜惠敏, 李明, 曹光群, 等. 酶解制备羊胎盘抗氧化肽工艺条件的优化[J]. 食品与生物技术学报, 2017(01): 104-110.
- [10] 欧赞, 乔燕燕, 王维有, 等. 螺旋藻抗氧化肽的制备及其体外活性研究[J]. 食品与生物技术学报, 2014, 33(1): 22-26.
- [11] MEISEL H, FITZGERALD R J. Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects [J]. **Current Pharmaceutical Design**, 2003, 9(16): 1289-1295.
- [12] JIE S, HE H, BI J X. Novel antioxidant peptides from fermented mushroom *Ganoderma lucidum*[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2004, 52(21): 6646-6652.
- [13] CHEN H M, MURAMOTO K, YAMAUCHI F, et al. Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 1996, 44(9): 2619-2623.
- [14] SARMADI B H, ISMAIL A. Antioxidative peptides from food proteins: a review[J]. **Peptides**, 2010, 31(10): 1949-1956.
- [15] XUE P, SUN N, LI Y, et al. Targeted regulation of hygroscopicity of soybean antioxidant pentapeptide powder by zinc ions binding to the moisture absorption sites[J]. **Food Chemistry**, 2018, 242: 83-90.
- [16] 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.
- [17] SAITO K, JIN D H, OGAWA T, et al. Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by the combinatorial chemistry[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2003, 51(12): 3668-3674.
- [18] 张晖, 唐文婷, 王立, 等. 抗氧化肽的构效关系研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2013, 32(7): 673-679.
- [19] ZHANG Y, LING Z, DU G, et al. Improved production of active *Streptomyces griseus* trypsin with a novel auto-catalyzed strategy [J]. **Scientific Reports**, 2016, 6: 23158.
- [20] ZHANG Y, HUANG H, YAO X. High-yield secretory production of stable, active trypsin through engineering of the N-terminal peptide and self-degradation sites in *Pichia pastoris*[J]. **Bioresource Technology**, 2017, 247: 81-87.
- [21] BRAND-WILLIAMS W M, CUVELIER M E, BERSET C L W T. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity[J]. **LWT-Food Science and Technology**, 1995, 28(1): 25-30.
- [22] MARKLUND S, MARKLUND G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase[J]. **European Journal of Biochemistry**, 1974, 47(3): 469-474.
- [23] MULLER L, FROHLICH K, BOHM V. Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (α TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay[J]. **Food Chemistry**, 2011, 129(1): 139-148.