

# 基于 ESR 和细胞培养体系的海参肠自溶寡肽 抗氧化活性研究

段秀红, 齐申, 赵雅婷, 吴海涛

(大连工业大学食品学院, 国家海洋食品工程技术研究中心, 辽宁大连 116034)

**摘要:** 本文在前期工作基础上, 研究了两种海参肠自溶寡肽 Val-Gly-Thr-Val-Glu-Met、Val-Thr-Pro-Tyr 的抗氧化活性。应用电子自旋共振的方法 (ESR), 检测海参肠自溶寡肽对羟基自由基 ( $\cdot\text{OH}$ )、超氧阴离子自由基 ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH $\cdot$ ) 自由基的清除情况。同时, 采用人白血病细胞 Jurkat, 考察海参肠自溶寡肽对  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导的细胞氧化损伤的影响。结果表明, 两种海参肠自溶寡肽对  $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$  和 DPPH 自由基均有很强的清除能力, 且呈明显的量效关系。对于不同自由基, Val-Gly-Thr-Val-Glu-Met 在相应的浓度下 ( $\cdot\text{OH}$  自由基-1 和 5 mM、 $\text{O}_2^{\cdot-}$  自由基-1、5 和 20 mM、DPPH 自由基-1 和 8 mM) 清除能力均显著高于 Val-Thr-Pro-Tyr ( $p < 0.05$ )。海参肠自溶寡肽在浓度为 5 mM 时未能对  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导的 Jurkat 细胞 DNA 氧化损伤起到保护作用, 而浓度为 20 mM 时引起 Jurkat 细胞死亡。这些结果说明, 海参肠自溶寡肽 Val-Gly-Thr-Val-Glu-Met 和 Val-Thr-Pro-Tyr 具有自由基清除能力, 具有一定的开发价值。

**关键词:** 海参肠; 自溶; 寡肽; 抗氧化

**文章编号:** 1673-9078(2014)5-28-32

## Analysis of Antioxidant Activities of Oligopeptides from Sea Cucumber Guts Based on ESR and Cell Culture System

DUAN Xiu-hong, QI Shen, ZHAO Ya-pin, WU Hai-tao

(School of Food Science and Technology, Dalian Polytechnic University, National Engineering Research Center of Seafood, Dalian 116034, China)

**Abstract:** In this paper, the antioxidant activities of oligopeptides (Val-Gly-Thr-Val-Glu-Met and Val-Thr-Pro-Tyr) from sea cucumber guts were studied by measuring the scavenging abilities on hydroxyl radical, superoxide radical and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical using an ESR spectrometer. Moreover, the influence of oligopeptides on  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced oxidative damage in Jurkat cells was also investigated. The results showed that two kinds of oligopeptides from sea cucumber guts showed scavenging abilities on  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$  and DPPH $\cdot$  in a dose-dependent manner. The scavenging ability of Val-Gly-Thr-Val-Glu-Met was significantly higher than that of Val-Thr-Pro-Tyr at different concentrations ( $p < 0.05$ ). The oligopeptides failed to protect the DNA oxidative damage induced by  $\text{H}_2\text{O}_2$  at concentrations of 5 mM in Jurkat cells, while induced cell death at concentration of 20 mM. These results suggest that the oligopeptides from sea cucumber guts (Val-Gly-Thr-Val-Glu-Met, Val-Thr-Pro-Tyr) possess free radical scavenging abilities, and have certain development value.

**Key words:** Sea cucumber guts; autolysis; oligopeptides; antioxidant activity

自由基是生物体内有关酶促系统需氧代谢过程和电子传递链中电子传递的中间产物, 也是生物体组织或细胞经历某些病理损害过程的中间产物。医学界已

收稿日期: 2014-01-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31370037, 31000754); 辽宁省教育厅科学研究一般项目 (L2013217)

作者简介: 段秀红 (1987-), 女, 硕士研究生, 研究方向海洋生理活性物质开发利用

通讯作者: 吴海涛 (1980-), 女, 博士, 副教授, 研究方向海洋生理活性物质开发利用

发现近百种疾病都与自由基氧化损伤有关, 特别是神经退行性疾病, 如动脉粥样硬化、肿瘤、白内障、衰老、关节炎、高血压等<sup>[1-2]</sup>。

抗氧化剂能捕获并中和氧化应激产生的自由基, 从而去除自由基对人体的损害。近年来, 食源性抗氧化肽作为一类天然抗氧化剂得到广泛研究。由于食物蛋白质来源非常广泛, 特别是以哺乳动物和水产动物蛋白为原料制备的活性肽, 备受研究人员关注<sup>[3]</sup>。

海参 (*Stichopus japonicus*) 是重要的海洋棘皮类动物, 近十几年内, 在许多亚洲国家, 海参养殖得到了

迅速发展<sup>[4]</sup>。海参肠是海参加工中的副产物,很容易发生自溶。海参肠其干基中含有70.9%的蛋白质<sup>[5]</sup>,是开发活性肽的良好来源。海参肠中含有丰富的蛋白水解酶,如胃蛋白酶,胰蛋白酶<sup>[6]</sup>,组织蛋白酶B<sup>[7]</sup>,高碱性蛋白酶<sup>[8]</sup>和肽水解酶<sup>[9]</sup>,为利用自溶手段制备海参肠寡肽创造了有利条件。

在前期的研究中,已经利用响应面法获得海参肠自溶的优化条件,制备得到海参肠自溶水解物,并分离出2种具有潜在抗氧化能力的水溶性海参肠自溶寡肽,分别为Val-Thr-Pro-Tyr和Val-Gly-Thr-Val-Glu-Met<sup>[5]</sup>。本研究针对这两种海参肠自溶寡肽,利用顺磁共振自旋捕集技术(ESR)进一步分析海参肠自溶寡肽清除羟基自由基( $\cdot\text{OH}$ )、超氧阴离子自由基( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )和1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基的能力。同时,利用细胞培养体系,分析海参肠自溶寡肽对过氧化氢诱导的细胞氧化损伤的影响,为海参肠活性肽的深入开发奠定研究基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

海参肠自溶寡肽 Val-Thr-Pro-Tyr、Val-Gly-Thr-Val-Glu-Met,由上海强耀生物科技有限公司合成,纯度>98%;RPMI 1640培养基、胎牛血清,为美国Gibco公司产品;CCK-8试剂盒(Cell Counting Kit-8),购自日本同仁化工;RNA酶、蛋白酶K,购自宝生物工程(大连)有限公司;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、谷胱甘肽(GSH)、黄嘌呤氧化酶(XOD),购自美国Sigma-Aldrich公司;次黄嘌呤(HPX)、EDTANa<sub>2</sub>,来于生工生物工程(上海)股份有限公司;二甲基吡咯啉氮氧化物(DMPO)、二乙烯三胺五乙酸(DETAPAC),购自阿拉丁试剂(上海)有限公司;其他试剂均为生化试剂或分析纯。

### 1.2 主要仪器设备

电子顺磁共振波谱仪(ESR),购自德国Bruker BioSpin公司;平行电泳仪,购自日本Advance公司;凝胶成像仪,购自DNR Bio-imaging;显微镜、倒置显微镜,购自OLYMPUS;CO<sub>2</sub>培养箱,购自日本三洋;高速低温离心机,购自HITACHI;掌上离心机,购自TOMY;往复式脱色摇床,购自QILINBEIER;低速离心机,购自北京雷勃尔离心机有限公司;生物洁净工作台,购自哈东联。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 羟基自由基( $\cdot\text{OH}$ )清除试验

以Fenton反应体系产生 $\cdot\text{OH}$ 。取磷酸盐缓冲溶液(PBS)(pH 7.4, 0.15 mol/L)78  $\mu\text{L}$ , DMPO(1 mmol/L)5  $\mu\text{L}$ , EDTANa<sub>2</sub>和FeSO<sub>4</sub>混合液(6 mmol/L)10  $\mu\text{L}$ , H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(6%)8  $\mu\text{L}$ ,混合均匀,40  $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min,立即吸入毛细管中,一端用凡士林封口后放入谐振腔,进行羟基自由基信号谱图的测定。利用磷酸盐缓冲溶液(PBS)配制不同浓度的海参肠自溶寡肽溶液(1 mM、5 mM、20 mM),以GSH为对照,测定时以样品溶液代替磷酸盐缓冲溶液(PBS)获取羟基自由基信号谱图。

测试条件:中心磁场强度 3368.99 G,微波功率 0.721 mw,微波频率 9.44 GHz,放大倍数  $1.0 \times 10^5$ ,调制幅度 1.00 G,调制频率为 100 kHz,时间常数 81.92 ms,转换时间 40 ms。

$$\cdot\text{OH} \text{ 的清除率 } E = [(h_0 - h_x) / h_0] \times 100\%^{[10]}$$

其中  $h_0$  和  $h_x$  分别为体系中加入试样前后 ESR 图谱中第二个峰的峰高。

#### 1.3.2 超氧阴离子自由基( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )清除试验

用次黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶(HPX-XOD)体系产生  $\text{O}_2^{\cdot-}$ 。取 PBS(50 mmol/L, pH 7.4)溶液 31.8  $\mu\text{L}$ , DMPO(1 mmol/L)7.5  $\mu\text{L}$ , HPX(50 mmol/L)5  $\mu\text{L}$ , DETAPAC(二乙烯三胺五乙酸)(10 mmol/L)5  $\mu\text{L}$ , XOD(50 U)1  $\mu\text{L}$ ,混匀后立即吸入毛细管中,一端凡士林封口后,放入谐振腔,测其 ESR 波谱。利用磷酸盐缓冲溶液(PBS)配制不同浓度的海参肠自溶寡肽溶液(1 mM、5 mM、20 mM),以GSH为对照,测定时以样品溶液代替磷酸盐缓冲溶液(PBS)获取超氧阴离子自由基信号谱图。

测试条件:中心磁场强度 3367.95 G,微波功率 1.16 mw,微波频率 9.44 GHz,放大倍数  $1.0 \times 10^5$ ,调制幅度 1.00 G,调制频率为 100 kHz,时间常数 2621.44 ms,转换时间 480.00 ms。

$$\text{O}_2^{\cdot-} \text{ 的清除率 } E = [(h_0 - h_x) / h_0] \times 100\%^{[10]}$$

其中  $h_0$  和  $h_x$  分别为体系中加入试样前后 ESR 图谱中第一个峰的峰高。

#### 1.3.3 DPPH 自由基的清除试验

取 300  $\mu\text{L}$  PBS(pH 6.0, 0.1 mol/L),200  $\mu\text{L}$  DPPH(200  $\mu\text{mol/L}$ ),混合均匀,避光 30 min,2000 $\times$ g 离心 10 min,取上清,立即吸入毛细管中,一端凡士林封口后,放入谐振腔,测其 ESR 波谱。利用磷酸盐缓冲溶液(PBS)配制不同浓度的海参肠自溶寡肽溶液使其在整个体系的终浓度为 1 mM、5 mM、8 mM,以GSH为对照,测定时以样品溶液代替磷酸盐缓冲溶液(PBS)获取 DPPH 自由基信号谱图。

测试条件：中心磁场强度 3317.71 G，微波功率 5.07 mw，微波频率 0.44 GHz，放大倍数  $1.0 \times 10^5$ ，调制幅度 1.00 G，调制频率为 100.00 kHz，时间常数 327.68 ms，转换时间 160.00 ms。

$$DPPH\cdot \text{的清除率 } E = [(h_0 - h_x) / h_0] \times 100\%^{[10]}$$

其中  $h_0$  和  $h_x$  分别为体系中加入试样前后 ESR 图谱中中间最高峰的峰高。

### 1.3.4 细胞培养及处理

将人 T 淋巴白血病 Jurkat 细胞按常规培养在 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基中，加入青霉素 100 U/mL，链霉素 100  $\mu\text{g/mL}$ ，于 37  $^\circ\text{C}$ 、5%二氧化碳条件下培养，取对数生长期细胞进行实验。

将 Jurkat 细胞 ( $2.5 \sim 3.0 \times 10^6$  个) 接种于 60 mm 培养板，以 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导细胞氧化凋亡，37  $^\circ\text{C}$  培养 6 h。同时，考察海参肠寡肽 (Val-Thr-Pro-Tyr 和 Val-Gly-Thr-Val-Glu-Met) 对细胞氧化损伤的保护作用，以 GSH 为阳性对照。

### 1.3.5 DNA 片段化

收集细胞，用 PBS (-) 缓冲液清洗，离心 (1000 r/min, 5 min) 去上清。沉淀中加入 200  $\mu\text{L}$  Lysis Buffer (10 mM pH 7.4 Tris-HCl, 10 mM pH 8.0 EDTA, 0.5% Triton X-100)，混匀，冰浴 10~15 min，离心 (12000 r/min, 20 min, 4  $^\circ\text{C}$ )，取上清液，加入 4  $\mu\text{L}$  RNase (10 mg/mL)，37  $^\circ\text{C}$  孵育 1 h，再加入 2  $\mu\text{L}$  Proteinase K (20 mg/mL)，37  $^\circ\text{C}$  孵育 1 h。加入 40  $\mu\text{L}$  NaCl (5 M)、240  $\mu\text{L}$  异丙醇，混匀，-20  $^\circ\text{C}$  下保存 48 h，离心 (12000 r/min, 25 min)，沉淀用 70%乙醇清洗 1 次，离心去

上清，加入 10  $\mu\text{L}$  TE 缓冲液 (10 mM pH 8.0 Tris-HCl, 1 mM pH 8.0 EDTA) 将沉淀充分溶解并进行平行电泳分析。上样量为 5  $\mu\text{L}$ ，通过 2%的琼脂糖凝胶电泳，用 GelRed 染色 30 min，用 Bio-Imaging Systems MF-ChemBIS 2.0 的凝胶成像仪成像，观察 DNA 片段化情况。

### 1.3.6 统计分析

试验数据以平均值 $\pm$ 标准差表示。采用 [http://www.physics.csbsju.edu/stats/t-test\\_bulk\\_form.html](http://www.physics.csbsju.edu/stats/t-test_bulk_form.html) 在线软件进行 student's *t* 检验， $p < 0.05$  具有显著性差异。

## 2 结果讨论

### 2.1 海参肠自溶寡肽对羟基自由基 ( $\cdot\text{OH}$ ) 的清除效果

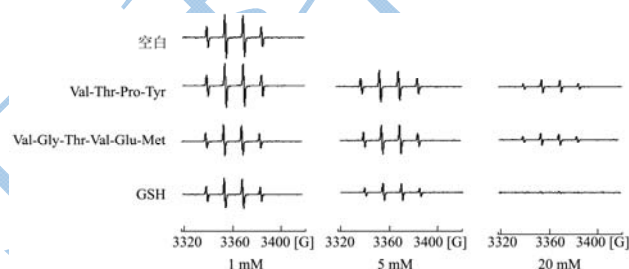


图1 海参肠自溶寡肽对羟基自由基清除效果的 ESR 图谱

Fig.1 ESR spectra of hydroxyl radical scavenging activity of oligopeptides from sea cucumber guts

表 1 海参肠自溶寡肽对自由基的清除效果

Table 1 Radical scavenging activity of oligopeptides from sea cucumber guts

肽序列	肽浓度	羟基自由基清除率/%	超氧阴离子自由基清除率/%	DPPH 自由基清除率/%
Val-Thr-Pro-Tyr	1 mM	-	-	-
	5 mM	26.23 $\pm$ 0.57 <sup>a</sup>	2.72 $\pm$ 1.59 <sup>a</sup>	36.97 $\pm$ 2.34 <sup>a</sup>
	8 mM	\	\	41.61 $\pm$ 0.36 <sup>b</sup>
	20 mM	68.69 $\pm$ 1.06 <sup>b</sup>	43.12 $\pm$ 0.90 <sup>b</sup>	\
Val-Gly-Thr-Val-Glu-Met	1 mM	26.82 $\pm$ 1.50 <sup>a</sup>	2.47 $\pm$ 0.86 <sup>a</sup>	6.45 $\pm$ 2.58 <sup>c</sup>
	5 mM	30.60 $\pm$ 1.33 <sup>c</sup>	14.30 $\pm$ 0.57 <sup>c</sup>	35.92 $\pm$ 1.36 <sup>a</sup>
	8 mM	\	\	57.28 $\pm$ 1.11 <sup>d</sup>
	20 mM	70.05 $\pm$ 1.37 <sup>b</sup>	55.68 $\pm$ 0.52 <sup>d</sup>	\
GSH	1 mM	31.00 $\pm$ 1.3 <sup>c</sup>	-	92.33 $\pm$ 0.03 <sup>e</sup>
	5 mM	59.61 $\pm$ 0.63 <sup>d</sup>	-	92.88 $\pm$ 0.05 <sup>f</sup>
	8 mM	\	\	94.65 $\pm$ 0.05 <sup>g</sup>
	20 mM	95.27 $\pm$ 0.95 <sup>e</sup>	58.51 $\pm$ 0.37 <sup>e</sup>	\

注：同一列，不同字母之间代表具有显著差异 ( $p < 0.05$ )；-不具有清除能力；\未检测。

由图及表 1 可见，海参肠自溶寡肽有明显的清除

羟基自由基的能力，且呈明显的量效关系。Val-Thr-Pro

-Tyr 在低浓度 (1 mM) 下, 未能起到清除羟基自由基的作用。浓度为 5 mM 的 Val-Thr-Pro-Tyr 与 1 mM 的 Val-Gly-Thr-Val-Glu-Met 清除羟基自由基的能力相当 ( $p>0.05$ ); 在高浓度下 (20 mM), 两种海参肠自溶寡肽的清除能力也相当 ( $p>0.05$ )。对于阳性对照 GSH, 其清除羟基自由基的能力均显著高于相同浓度的海参肠自溶寡肽 ( $p<0.05$ )。

## 2.2 海参肠寡肽对超氧阴离子(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)的清除效果

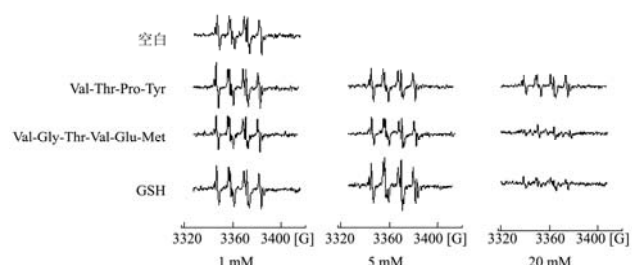


图2 海参肠自溶寡肽对超氧阴离子自由基清除效果的 ESR 图谱

Fig.2 ESR spectra of superoxide radical scavenging activity of oligopeptides from sea cucumber guts

由图2及表1可见, 海参肠寡肽有明显清除超氧阴离子自由基的能力, 且呈明显的量效关系。与羟基自由基体系相同, Val-Thr-Pro-Tyr 在低浓度 (1 mM) 下, 未能起到清除超氧阴离子自由基的作用; 浓度为 5 mM 的 Val-Thr-Pro-Tyr 与 1 mM 的 Val-Gly-Thr-Val-Glu-Met 清除超氧阴离子自由基的能力相当 ( $p>0.05$ )。在高浓度下 (20 mM), Val-Gly-Thr-Val-Glu-Met 清除超氧阴离子自由基的能力显著高于 Val-Thr-Pro-Tyr ( $p<0.05$ )。对于阳性对照 GSH, 在低浓度 (1 mM、5 mM) 下, 未能起到清除超氧阴离子自由基的作用。在高浓度下 (20 mM), GSH 清除超氧阴离子自由基的清除率达到  $58.51\pm 0.37\%$ , 略高于相同浓度的海参肠自溶寡肽 ( $p<0.05$ )。

## 2.3 海参肠寡肽对 DPPH 自由基的清除效果

为了避免高浓度的肽溶液与 DPPH 醇溶液混合时产生沉淀, 在 DPPH 体系中, 海参肠自溶寡肽的最高浓度选取 8 mM。由图3及表1可见, 海参肠寡肽有明显清除 DPPH 自由基的能力, 且呈明显的量效关系。Val-Thr-Pro-Tyr 在低浓度 (1 mM) 下, 未能起到清除 DPPH 自由基的作用; 浓度为 5 mM 的 Val-Thr-Pro-Tyr 与 Val-Gly-Thr-Val-Glu-Met 清除 DPPH 自由基的能力相当 ( $p>0.05$ )。而 8 mM 的 Val-Gly-Thr-Val-Glu-Met

清除 DPPH 自由基的能力显著高于 Val-Thr-Pro-Tyr ( $p<0.05$ )。对于阳性对照 GSH, 在低浓度下, 清除超氧阴离子自由基的清除率已达到  $92.33\pm 0.03\%$ , 明显高于相同浓度的海参肠自溶寡肽 ( $p<0.05$ )。

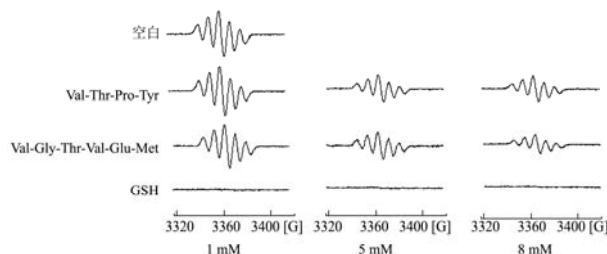


图3 海参肠自溶寡肽对 DPPH 自由基清除效果的 ESR 图谱  
Fig.3 ESR spectra of DPPH radical scavenging activity of oligopeptides from sea cucumber guts

## 2.4 海参肠自溶寡肽对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 Jurkat 细胞 DNA 氧化损伤的影响

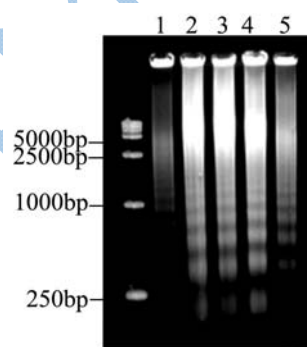


图4 海参肠自溶寡肽对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 Jurkat 细胞 DNA 氧化损伤的影响

Fig.4 The effect of oligopeptides from sea cucumber guts on DNA oxidative damage induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Jurkat cells

注: 1-正常对照组; 2-100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 模型组; 3-5 mM Val-Thr-Pro-Tyr+100μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 4-5 mM Val-Gly-Thr-Val-Glu-Met +100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 5-5 mM GSH+100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。

由图4可见, 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 6 h 显著诱导 Jurkat 细胞 DNA 发生氧化损伤, 出现片段化。5 mM 的海参肠自溶寡肽未对细胞氧化应激损伤的起到保护作用。而阳性对照 GSH (5 mM) 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 Jurkat 细胞 DNA 氧化损伤起到部分保护作用。采用高浓度的海参肠自溶寡肽 (20 mM), 发现与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 μM) 共同处理 6 h 后, 绝大多数细胞发生坏死, 在提取 DNA 过程中未获得 DNA 沉淀。由此可见, 在细胞体系下, 海参肠自溶寡肽对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的氧化损伤不敏感, 在高浓度下与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 协同抑制 Jurkat 细胞生长, 这种协同作用还有待于进一步研究。

有许多研究表明,氨基酸的分子量、组成、序列及构象是影响蛋白质及其水解物抗氧化能力的最主要因素<sup>[11-12]</sup>。某种或某些特定的氨基酸残基与抗氧化活性有密切关系,从食品资源中获得的抗氧化活性肽在肽段的N端通常含有Val、Leu等疏水性氨基酸残基,在其氨基酸序列中,还通常含有Pro、His、Tyr、Trp、Met和Cys等氨基酸残基<sup>[13-14]</sup>。海参肠自溶寡肽Val-Gly-Thr-Val-Glu-Met和Val-Thr-Pro-Tyr的自由基清除能力与其氨基酸组成密切相关。

### 3 结论

3.1 海参肠自溶寡肽具有明显的清除羟基自由基、超氧阴离子自由基和DPPH自由基的能力,且明显的量效关系,Val-Gly-Thr-Val-Glu-Met效果好于Val-Thr-Pro-Tyr。

3.2 海参肠自溶寡肽在低浓度下,未能对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的Jurkat细胞DNA氧化损伤起到保护作用。在高浓度下与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>协同诱导细胞死亡,其作用机理还有待于进一步研究。

### 参考文献

- [1] Halliwell B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward [J]. *Biochemical Journal*, 2007, 401: 1-11
- [2] 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
- [3] Ryan JT, Ross RP, Bolton D, et al. Bioactive peptides from muscle sources: meat and fish [J]. *Nutrients*, 2011, 3(9): 765-791
- [4] Conand C. Present status of world sea cucumber resources and utilization: an international overview. In: Lovatelli A, Conand C, Purcell S, Uthicke S, Hamel J-F, Mercier A (eds) *Advances in sea cucumber aquaculture and management* [M]. FAO Fisheries Technical Paper. No.463
- [5] Zheng J, Wu HT, Zhu BW, et al. Identification of antioxidative oligopeptides derived from autolysis hydrolysates of sea cucumber (*Stichopus japonicus*) guts [J]. *Europe Food Research Technology*, 2012, 234: 895-2904
- [6] Gao F, Yang HS, Xu Q, et al. Effect of water temperature on digestive enzyme activity and gut mass in sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka), with special reference to aestivation [J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2009, 27: 714-722
- [7] Sun LM, Zhu BW, Wu HT, et al. Purification and characterization of cathepsin B from the gut of the sea cucumber (*Stichopus japonicus*) [J]. *Food Science and Biotechnology*, 2011, 20: 919-925
- [8] Fu XY, Xue CH, Miao BC, et al. Study of a highly alkaline protease extracted from digestive tract of sea cucumber (*Stichopus japonicus*) [J]. *Food Research International*, 2005, 38: 323-329
- [9] McGettigan S, Canning M, O'Cuinn G, et al. Peptide hydrolases in holothurian intestinal mucosa [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology & Pharmacology*, 1981, 69: 169-170
- [10] 赵晓丹,胡小松.ESR法评价醋蒜提取物的抗氧化活性[J]. *中国调味品*, 2011, 36(3): 46-73  
Zhao Xiao-dan, Hu Xiao-song. Antioxidant activity of vinegar pickled garlic extract by ESR assay [J]. *China Condiment*, 2011, 36(3): 46-73
- [11] Chen HM, 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
- [12] Kong X, Zhou H, Hua Y. Preparation and antioxidant activity of wheat gluten hydrolysates (WGHs) using ultrafiltration membranes [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2008, 88(5): 920-926
- [13] Elias RJ, Kellerby SS, Decker EA. Antioxidant activity of proteins and peptides [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2008, 48(5): 430-441
- [14] Samaranayaka AGP, Li-Chan ECY. Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications [J]. *Journal of Functional Foods*, 2011, 3(4): 229-254