

乌贼墨多肽体外抗氧化活性研究

景奕文, 杨最素, 丁国芳*, 黄芳芳

(浙江海洋学院食品与医药学院, 浙江省海洋生物医用制品重点工程技术研究中心, 浙江舟山 316004)

摘要 [目的]研究乌贼墨多肽体外抗氧化活性。[方法]采用分光光度法测定多肽对2,2'-连氨基-双-(3-乙基苯并二氢噻唑林-6-磺酸)二铵盐(ABTS)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、羟自由基(\cdot OH)的清除能力和还原能力,利用琼脂糖凝胶电泳检测多肽对羟自由基诱导的DNA损伤的保护作用。[结果]乌贼墨多肽具有明显清除ABTS自由基(半数有效浓度 EC_{50} 为3.45 mg/ml)、 \cdot DPPH自由基(EC_{50} 为4.34 mg/ml)和羟自由基(EC_{50} 为3.30 mg/ml)的能力;当乌贼墨多肽的浓度达到5.00 mg/ml时,还原力达到0.387。[结论]乌贼墨多肽具有较好的抗氧化活性。

关键词 乌贼墨;多肽;抗氧化

中图分类号 S567 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)27-10971-03

Study on the Antioxidant Activity of Sepia Ink Peptides *in vitro*

JING Yi-wen et al (Zhejiang Provincial Key Engineering Technology Research Center of Marine Biomedical Products, School of Food Science and Pharmacy of Zhejiang Ocean University, Zhoushan, Zhejiang 316004)

Abstract [Objective] To study the antioxidant activity of sepia ink peptides *in vitro*. [Method] The spectrophotometry method was adopted to determine the scavenging and reducing capacity of polypeptide on ABTS, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (\cdot DPPH) and hydroxyl radical; the protective effect of the peptides against hydroxyl-radical-induced DNA damage was measured by DNA agarose electrophoresis. [Result] The results showed that the ABTS, DPPH and hydroxyl free radicals radical-scavenging activity were increased with concentrations of the peptides, and the EC_{50} values were 3.45 mg/ml, 4.34 mg/ml, 3.30 mg/ml, respectively. [Conclusion] The peptides isolated from sepia ink hydrolyzate exhibited an obvious capability of antioxidation.

Key words Sepia ink; Polypeptide; Antioxidation

自从 Harman 提出自由基理论以来,人们认识到人的衰老和许多疾病与其体内氧化产生的超氧化物阴离子($O_2^{\cdot-}$)、过氧化氢(H_2O_2)、过氧化自由基(ROO)和羟自由基(\cdot OH)等自由基相关联^[1-2]。所以,体内自由基的清除成为了防御机体疾病发生的一个重要途径。抗氧化剂的摄入,对预防和治疗相关疾病的具有重要的意义^[2]。目前,许多合成的抗氧化剂大多数会对机体造成很大的伤害,存在潜在的安全隐患。而天然抗氧化剂来源于动植物的提取物,大多属于蛋白质类,其结构介于蛋白质和氨基酸之间,使用安全系数高,而且抗氧化活性强。所以,天然抗氧化剂的开发与利用,成为科学工作者研究的热点^[3]。

乌贼属于软体动物门(Phylum Mollusca)头足纲(Class Cephalopoda)的一种海洋动物。乌贼墨(Sepia Ink)是由墨囊中的分泌腺合成^[4],是乌贼遭遇天敌时为自我保护而喷射的一种黑色物质。近几年研究表明,从乌贼墨中得到多糖、肽聚糖和寡肽均具有很好的抗肿瘤作用^[5-8],乌贼墨黑色素、乌贼墨汁多糖具有良好的抗氧化活性^[9-10]。但是有关乌贼墨多肽抗氧化活性的研究鲜有报道。

酶法水解提取活性多肽,条件较温和,水解过程较易控制,制备和生产成本比较低,成为生产活性肽最推广的提取方法^[11]。笔者采用酶解法从乌贼墨中提取活性多肽,经过

一系列的分离纯化得到一种具有10个氨基酸的多肽,采用分光光度法测定该多肽对 \cdot OH、 \cdot DPPH、ABTS自由基的清除效果及还原力进行测定,并采用琼脂糖电泳评价其对由羟自由基导致的DNA损伤的保护能力,对乌贼墨抗氧化活性作了初步研究,旨在为进一步将乌贼墨开发成为一种高效、无毒副作用的新型抗氧化剂提供可靠的、有效的理论和试验依据,同时也为乌贼墨的多用途、高产值的开发开辟一条新的途径。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 研究对象。乌贼墨,购自舟山南珍菜市场,由浙江海洋学院赵盛龙教授进行种类鉴定,经分离纯化后再经高效液相色谱检测为单一峰,且测乌贼墨多肽纯化物的氨基酸组成分析,测得其序列为:Leu-Lys-Glu-Glu-Asn-Arg-Arg-Arg-Arg-Asp,命名为乌贼墨多肽(Sepia Ink polypeptide, SHP)。

1.1.2 主要仪器。CF16RXII型高速冷冻离心机,购自日本日立公司;LGJ-18冷冻干燥机,购自北京松原华兴科技发展有限公司;SSW-420-2S恒温水浴锅,购自上海民仪电子有限公司;UV-1600PC,购自上海美谱达有限公司;电泳仪,购自美国Bio-Rad公司;alpha凝胶成像系统,购自美国Alpha公司。

1.1.3 主要试剂。琼脂糖(Regular Agarose G-10),购自法国biowest公司;pBR322DNA,6 \times Loading Buffer,购自宝生物工程(大连)有限公司;抗坏血酸(V_c),购自美国Sigma公司;ABTS、邻二氮菲、硫酸亚铁、浓度30%过氧化氢等均均为分析纯,市售。

1.2 方法

1.2.1 ABTS自由基清除测定^[12]。参照Re等的方法对乌

基金项目 国家自然科学基金面上项目(81273429);浙江省科技厅重大专项(2010C13009,2011C02003);浙江省自然科学基金立项(LY12C20005,LY12C20008);舟山市科技计划项目(2012C23023)。

作者简介 景奕文(1989-),女,安徽亳州人,硕士研究生,研究方向:海洋功能食品、海洋药物,E-mail:jingyiwen2011@yeah.net。
*通讯作者,教授,硕士生导师,从事海洋功能食品、海洋药物研究,E-mail:dingg2007@163.com。

收稿日期 2013-08-19

贼墨多肽的 ABTS 自由基清除能力进行检测。将一定量的 7 mmol/ml 的 ABTS 溶液至于具塞试管中,加入等体积 2.45 mmol/ml 的过硫酸钾溶液,混匀后,避光条件下室温孵育 16 h,该阶段反应产物为 $ABTS^+$;取 1.0 ml $ABTS^+$ 溶液以 5 mmol/ml 的磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 进行稀释,使稀释后的 $ABTS^+$ 溶液在 734 nm 下吸光度为 (0.70 ± 0.01) 。立即取 0.5 ml $ABTS^+$ 稀释液与 0.5 ml 不同浓度的样品溶液充分混匀,反应 5 min 后于 734 nm 处分别测量吸光度 A_i ,蒸馏水代替样品测得吸光度为 A_c ,以抗坏血酸 (V_c) 代替样品作为阳性对照。 $ABTS^+$ 清除率按以下公式计算:

$$ABTS \text{ 自由基清除率}(\%) = \frac{A_c - A_i}{A_c} \times 100$$

1.2.2 DPPH 自由基清除活性测定^[13]。按照参考文献的方法,配置一定浓度的样品液 (0.1 mol/L DPPH 的醇溶液)。取 1.5 ml 样品液和等量的 DPPH 溶液,充分混匀后,室温避光反应 25 min,在 517 nm 下测定吸光度 A_i ,空白组取等量的去醇溶液代替 DPPH 溶液测定吸光度 A_0 ,对照组以等体积去离子水代替待测样品液测定吸光度 A_j 。DPPH 自由基清除率计算公式如下:

$$DPPH(\%) = \left[\frac{1 - (A_i - A_j)}{A_0} \right] \times 100$$

1.2.3 羟自由基清除能力测定。参照 Sinh and Rajini 的研究方法并稍作调整^[14],取 1.0 ml 0.75 mmol/L 邻二氮菲的无水乙醇溶液,加入 2.0 ml pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲液,1.0 ml 样品溶液,充分混匀后加入 1.0 ml 浓度为 0.75 mmol/L 的 $FeSO_4$ 溶液,混匀后,加入 1.0 ml 浓度 0.12% 的 H_2O_2 溶液,于 37 °C 水浴 90 min 后,置于 536 nm 下分别测定各样品组吸光值计作 A_s ,以去离子水代替样品液测吸光值 A_p ,以去离子水代替 H_2O_2 测吸光度 A_b 。羟自由基清除率按如下公式计算:

$$\text{羟自由基清除率}(\%) = \frac{(A_s - A_p)}{(A_b - A_p)} \times 100$$

1.2.4 还原力的测定。参照 oyaizu 方法并略有改动^[15],取 1.5 ml 待测样品溶液,加入 2.0 ml pH 为 7.2 的磷酸盐缓冲液,2.0 ml 的浓度 1% 铁氰化钾,充分混匀后,于 50 °C 水浴 20 min,然后加入 2.0 ml 浓度 10% 的 TCA,混匀后,于 5 000 r/min 离心 10 min,取 2.0 ml 上清液,加入 2.0 ml 去离子水和 0.4 ml 浓度 0.1% 三氯化铁,充分反应 10 min,置于 700 nm 波长处测定吸光值,加入 2.0 ml 去离子水和 0.4 ml 浓度 0.1% 的三氯化铁,反应 10 min 之后,于 700 nm 波长处测定混合液的吸光值。

1.2.5 乌贼墨多肽对羟自由基诱导 pBR322 DNA 损伤的保护作用检测。参照 Zhong 等的试验方法^[16],利用琼脂糖电泳来评价乌贼墨多肽对由羟基自由基诱导的 DNA 损伤的保护作用,将 0.5 μ l 的 pBR322 DNA 溶解在 3.0 μ l 浓度为 0.1 mol/L, pH 7.4 的磷酸盐缓冲液中,并转移到微量离心管中;同时加入 2 mmol/L 新鲜配制的 $FeSO_4$ 溶液 3.0 和 2.0 μ l 不同浓度的乌贼墨多肽溶液,再加入 4.0 μ l 浓度 30% 的 H_2O_2 溶液,于 37 °C 条件下孵育 30 min,立即加入 6 \times DNA Loading

Buffer(荧光)结束反应,空白对照组为 pBR322 DNA + 上样缓冲液,上样于浓度 0.8% 琼脂糖凝胶,70 V 电压条件下电泳 70 min。凝胶成像系统观察,并拍摄照片。

2 结果与分析

2.1 ABTS 自由基清除能力 试验检测乌贼墨多肽与 ABTS 自由基的结合能力,ABTS 自由基溶液呈蓝绿色,且在 734 nm 波长处有最大吸收,与抗氧化物质络合后,溶液褪色,吸光度相应减小。图 1 表明,乌贼墨多肽对 ABTS 自由基有良好的清除作用,随着样品浓度的增加乌贼墨多肽对 ABTS 自由基的清除能力逐渐增强,乌贼墨多肽清除 ABTS 自由基的 EC_{50} 值为 3.50 mg/ml;但是这种清除能力较同浓度的抗坏血酸弱。

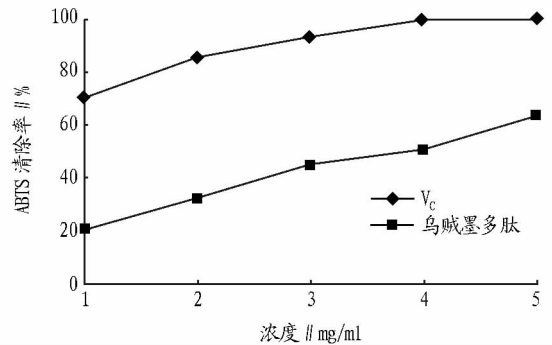


图 1 乌贼墨多肽对 ABTS 自由基的清除能力

2.2 乌贼墨多肽对 \cdot DPPH 自由基的清除作用 二苯代苦味酰基自由基 (\cdot DPPH) 是一种稳定的自由基,醇溶液呈现深紫色,当乌贼墨多肽与其发生反应时,紫色随多肽浓度的增加而变浅,最大吸收波长为 517 nm。在质量浓度 1 ~ 5 mg/ml 范围内,乌贼墨多肽对清除 \cdot DPPH 自由基的能力随质量浓度的增大而增大,而且呈现良好的线性相关,其线性相关方程 $y = 11.109x + 2.409$, $R^2 = 0.9880$ 。相关系数 $r = 0.994$,查相关系数检测表^[17],可知 $P < 0.01$,线性关系极明显。当乌贼墨多肽对 \cdot DPPH 的清除率达到 50% 时,所需要的多肽的质量浓度 EC_{50} 为 4.29 mg/ml。

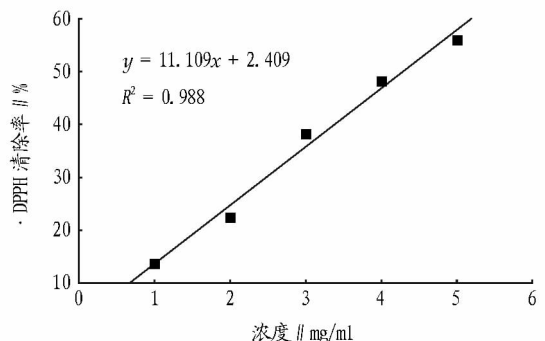


图 2 乌贼墨多肽的 DPPH 自由基清除能力

2.3 乌贼墨多肽对羟自由基 (\cdot OH) 清除作用 图 3 表明,乌贼墨多肽对 \cdot OH 的清除作用明显,低浓度时就有清除作用,且随着浓度的升高对 \cdot OH 的清除作用越大,当乌贼墨多肽的浓度为 5 mg/ml,对羟自由基的清除率达到 63.47%。乌贼墨多肽清除羟自由基的 EC_{50} 为 3.30 mg/ml。

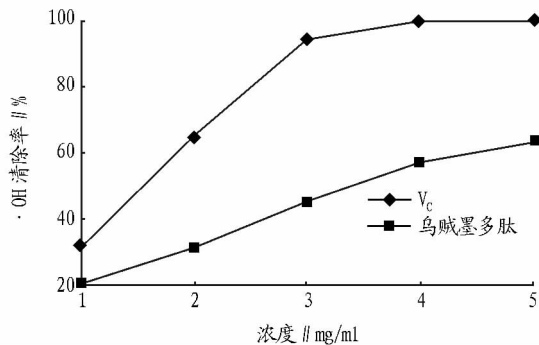


图3 乌贼墨多肽对·OH的清除作用

2.4 还原能力的测定 乌贼墨多肽还原能力在 700 nm 处的吸光度越大,还原能力越强。图 4 表明,乌贼墨多肽还原能力在一定浓度范围内随浓度的增加而增大,在 1~5 mg/ml 浓度范围内,线性相关方程 $y = 0.1135x + 0.0517$, $R^2 = 0.9982$,查相关系数表得 $P < 0.01$,线性关系明显。2 mg/ml 的抗坏血酸的吸光值为 1.83,同等浓度 V_c 的还原能力远远大于乌贼墨多肽的还原能力。

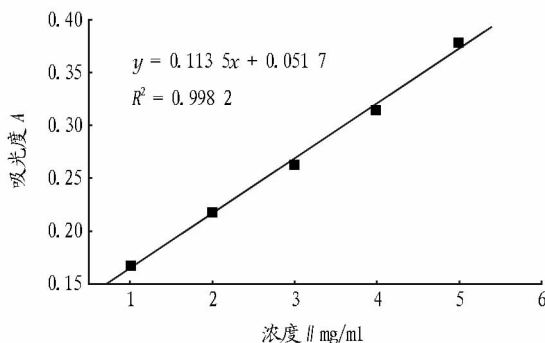


图4 乌贼墨多肽的还原活力

2.5 对羟自由基诱导的 DNA 损伤的保护作用 正常的 pBR322DNA 为完整超螺旋双链环状 DNA,在电泳过程中泳动速度最快;当硫酸亚铁和双氧水体系存在的条件下,发生 Fenton 反应产生大量的羟自由基,当正常的 pBR322DNA 被羟自由基损伤后,双螺旋结构中的双链发生断裂转化为开环 DNA,单链 DNA 断裂转化成直链 DNA,其泳动速度均落后于完整的超螺旋双链环状 DNA。若反应体系中存在抗氧化物质,就可以有效抑制羟自由基对 DNA 的氧化损伤。图 5 表明,在体系中加入不同浓度的乌贼墨多肽后,对羟自由基诱导的 pBR322DNA 氧化损伤均有明显的保护作用。与空白组相比,对照组超螺旋结构的双链 DNA 几乎完全被破坏,转化为开环 DNA;而样品对照组随着浓度的增加,DNA 损伤的程度越来越小。试验结果表明,乌贼墨多肽对羟自由基诱导的 DNA 损伤显示出有效的保护作用,并且这种保护作用呈现一定的剂量依赖性。乌贼墨多肽对羟自由基致 DNA 氧化损伤的保护机理可能与其提取物中含有的抗氧化剂能够清除自由基和有关,但详细机理有待进一步研究。

3 结论与讨论

活性氧(包括 $O_2^{\cdot-}$ 、 HO_2^{\cdot} 、 $\cdot OH$ 等氧自由基及其衍生物)是需氧细胞内的正常成分,在免疫活性细胞和细胞的

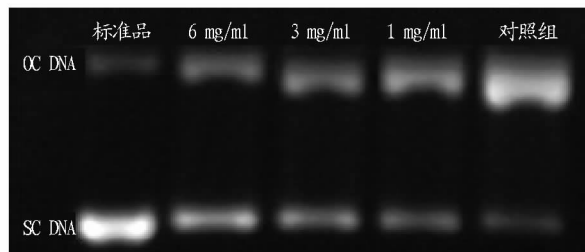


图5 乌贼墨多肽抗羟自由基诱导 pBR322DNA 损伤能力的琼脂糖凝胶电泳结果

信号传导中发挥着举足轻重的作用。但是大量科学研究表明,过多的活性氧会造成生物大分子机构性损伤,进而影响其正常的生物功能^[18-19],在生命活动中的衰老、癌症及其他众多疾病都与这类氧化胁迫有着密切的联系^[20]。所以,安全、有效的抗氧化物质的摄入成为了预防甚至治疗这些疾病的重要途径。近年来,许多科学研究表明,海洋动物蛋白酶解肽具有良好的抗氧化效果^[21-22]。

试验结果表明,乌贼墨多肽对·OH、·DPPH、ABTS 均具有良好的清除作用,对清除·OH、·DPPH、ABTS 自由基的 EC_{50} 值分别是 3.30、4.34 和 3.45 mg/ml;乌贼墨多肽也具有一定的还原能力,但是较同浓度的维生素 C 对 Fe^{3+} 的还原能力较弱。乌贼墨多肽对羟基导致的 DNA 损伤具有较好的保护作用,可能与乌贼墨多肽能够清除羟自由基有关,但具体的作用机理有待于进一步的验证。乌贼墨多肽是一种具有较强的潜在的较高价值的天然抗氧化剂;研究乌贼墨多肽的抗氧化作用,为促进乌贼墨作为水产品加工中废物被高值化利用,同时也为开发乌贼墨功能食品产品提供试验依据。

参考文献

- [1] MOSKOVITZ J, YIM K A, CHOKE P B. Free radicals and disease[J]. Arch Biochem Biophys, 2002, 397: 354-359.
- [2] HARMAND. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry[J]. Journal of Gerontology, 1956, 11(3): 298-300.
- [3] 崔剑, 李兆陇, 洪喆吟. 自由基生物抗氧化与疾病[J]. 清华大学学报: 自然科学版, 2000, 40(6): 9-12.
- [4] 张君慧, 张晖, 王兴国, 等. 抗氧化活性肽的研究进展[J]. 中国粮油学报, 2008, 23(6): 227-233.
- [5] PALUMBO A, COSMO A D, GESUALDO I, et al. Subcellular localization and function of melanogenic enzymes in the ink gland of Sepia officinalis[J]. Biochem. J, 1997, 323: 749-756.
- [6] CHEN S G, WANG J F, XUE C H, et al. Sulfation of a squid ink polysaccharide and its inhibitory effect on tumor cell metastasis[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 81: 560.
- [7] 郑玉真. 乌贼墨肽聚糖抗前列腺癌活性研究及产品研发[D]. 舟山: 浙江海洋学院, 2012.
- [8] 丁国芳, 黄芳芳, 杨素素, 等. 乌贼墨酶肽提取方法及其抗肿瘤活性[J]. 中国天然药物, 2011, 9(2): 151-155.
- [9] HUANG F F, YANG Z S, YU D, et al. Sepia Ink Oligopeptide Induces Apoptosis in Prostate Cancer Cell Lines via Caspase-3 Activation and Elevation of Bax/Bcl-2 Ratio[J]. Marine Drugs, 2012, 10(10): 2153-2165.
- [10] 孙楠楠, 李和生, 张丽媛, 等. 乌贼墨汁多糖的提取及抗氧化作用研究[J]. 食品科学, 2011, 32(22): 95-99.
- [11] GUO X, CHEN S G, HUA Y Q, et al. Preparation of water-soluble melanin from squid ink using ultrasound-assisted degradation and its antioxidant activity[J]. J Food Sci Technol, 2013, 13: 937-942.
- [12] 彭德翔, 丁卓平. 抗衰老活性肽的研究进展[J]. 现代食品科技, 2006, 22(2): 267-270.
- [13] RE R, PELLEGRINI N, PROTEGGENTE A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay[J]. Free

害,大发生年份 5、6 d 时间即可将树叶食光。该虫在北方 1 年 1 代,在浙江地区 1 年可发生 3 代^[18-19]。柞粉舟蛾天敌有 20 多种,其中舟蛾赤眼蜂、舟蛾绒茧蜂、寄生蝇等寄生率达 60% 左右,螳螂、步甲虫及鸟类可大量捕食幼虫^[20]。防治手段主要有营林措施、灯光诱杀、保护利用天敌和药剂防治。

2.3 黄褐天幕毛虫 (*Malacosoma neustris testacea* Metschulsky) 雄蛾翅展 24~33 mm,雌蛾翅展 29~40 mm。雄蛾全体黄褐色,前翅中央有 2 条深褐色横线纹,两条纹间色深,呈褐色宽带,后翅中间呈不明显的褐色横线;雌蛾与雄蛾显著不同,体翅呈褐色,腹部色较深,前翅中部褐色宽带内、外侧呈淡褐色横纹^[13]。该虫隶属鳞翅目蚕蛾总科枯叶蛾科天幕毛虫属,杂食性,危害多种阔叶树,危害严重时也危害落叶松、云杉等针叶树种,严重时可使叶片全部被食光,造成树木枯死^[21-25]。该虫以幼虫取食树叶危害,5、6 龄幼虫食叶量占总食叶量的 73.4%,易暴发成灾^[26]。该虫的天敌有天幕毛虫抱寄蝇、枯叶蛾绒茧蜂、柞蚕饰腹寄蝇、脊腿鬃瘤姬蜂、舞毒蛾黑卵蜂、稻苞虫黑瘤姬蜂、核型多角体病毒及鸟类等^[27]。卵寄蜂的寄生率为 15% 左右^[26]。防治手段主要有营林措施、灯光诱杀、保护利用天敌和药剂防治。

2.4 银杏大蚕蛾 (*Dietyopoca japonica* Moore) 成虫:雄体长约 28 mm,翅长约 56 mm;雌体长约 34 mm,翅长约 62 mm。体翅灰褐色、黄褐或紫褐色;前翅顶角外突,顶端钝圆,顶角前缘具一梭形黑斑,外缘半部与翅基部色较深;后翅中部呈较宽的红色区,中室端具 1 枚大眼状斑纹黑色。该虫隶属鳞翅目大蚕蛾科,杂食性,危害多种林木、果木。其幼虫可取食危害 20 科 30 属 38 种经济林木,虫口密度大时能把全树的叶片吃光,造成结果树严重落果甚至枯死,且对纯林的危害比混交林大^[28-29]。目前报道的寄生卵的天敌有平腹小蜂、赤眼蜂、黑卵蜂、姬小蜂、旋小蜂等,其中平腹小蜂的寄生率为 20.9%,赤眼蜂自然寄生率达 21.2%^[30]。防治手段主要有营林措施、灯光诱杀、保护利用天敌和药剂防治。

参考文献

- [1] 中国农业百科全书编辑部. 中国农业百科全书. 蚕业卷[M]. 北京:农业出版社,1987:312.
- [2] 李喜升,吴艳,董绪国. 中国柞树主要害虫名录(I)[J]. 蚕业科学,2010,36(2):330-336.
- [3] 陈世骧. 中国经济昆虫志(第一册)[M]. 北京:科学技术出版社,1959.
- [4] 谢振东,张绪成,张佩勇,等. 栗山天牛生物学特性的研究[J]. 吉林林业科技,1999,141(4):1-3.
- [5] 何春光,王虹物,盛璐晔,等. 吉林省外来物种入侵特征的初步研究[J]. 生态环境,2004,13(2):197-199.
- [6] 韩国升,黄培发. 辽宁省突发性森林害虫发生现状及其防治对策[J]. 辽宁林业科技,2002(4):24-26.
- [7] 辽宁省森林病虫害防治检疫站. 栗山天牛防治技术[M]. 沈阳:辽宁科学技术出版社,2001.
- [8] 孙晓玲,程彬,高长启,等. 栗山天牛发生及防治的研究现状[J]. 吉林师范大学学报,2006,27(1):54-56.
- [9] 杨忠歧. 利用天敌昆虫控制我国重大林木害虫研究进展[J]. 中国生物防治,2004,20(4):221-227.
- [10] 高俊崇,山广茂,赵海滨,等. 吉林省首次发现捕食栗山天牛的天敌——花绒坚甲[J]. 吉林林业科技,2003,32(1):45-47.
- [11] 侯振明,崔明哲,孙金玉. 利用触破式微粒胶囊剂防治栗山天牛成虫试验初报[J]. 吉林林业科技,2003,32(4):16-18.
- [12] 黎明,文希胜,马祥文. 威雷微胶囊水悬剂喷干法防治栗山天牛试验初报[J]. 吉林林业科技,2003,32(3):29-32.
- [13] 中国林科院. 中国森林昆虫[M]. 北京:中国林业出版社,1983.
- [14] 杨学军. 舞毒蛾生物防治研究进展[J]. 陕西林业科技,1996(1):68-73.
- [15] 严静君,PEMBERTON R W,姚德富. 四川省大邑县舞毒蛾天敌的研究[J]. 林业科学研究,1994,7(3):269-276.
- [16] 岳书奎,宁长林,张庆贺. 舞毒蛾生命表的初步研究[J]. 林业科技通讯,1989(10):6-10.
- [17] 胡春祥. 舞毒蛾生物防治研究进展[J]. 东北林业大学学报,2002,30(4):40-43.
- [18] 刘书平. 柞粉舟蛾的发生与防治[J]. 陕西林业,1997(3):30.
- [19] 刘书平,董军强,陈西怀. 柞粉舟蛾的生物学特性观察与防治[J]. 陕西林业科技,2001(2):53-54.
- [20] 封光伟,张晓丽,张雪杰,等. 柞粉舟蛾生物学特性及防治技术研究[J]. 河南林业科技,1999,19(2):31-32.
- [21] 郑淑杰,王瑞玲. 大兴安岭地区黄褐天幕毛虫发生规律原因及防治[J]. 内蒙古林业调查设计,2004,27(3):41-44.
- [22] 赵绥林,蔡纪文. 哈尔滨市三种园林害虫发生期测报的研究[J]. 中国森林害虫,2003,22(2):23-27.
- [23] 安瑞军,李秀辉,张冬梅. 榆紫叶甲生物学特性的研究[J]. 林业科技,2005,30(5):18-20.
- [24] 刘岩,张立志,周素娟. 黄褐天幕毛虫生物学特性与防治[J]. 辽宁林业科技,2004(5):7-9.
- [25] 于国辉,王志林. 黄褐天幕毛虫危害指标研究初报[J]. 吉林林业科技,1997(5):29-30.
- [26] 李荣波,宋维嘉. 黄褐天幕毛虫发生规律及防治的研究[J]. 内蒙古林业大学学报,1991(1):63-67.
- [27] 张健全,孙伟. 天幕毛虫在李树上的发生规律及防治技术[J]. 农业科技通讯,2008(8):108-181.
- [28] 丁冬荪,袁龙云,陈华,等. 银杏大蚕蛾的生物学及无公害防治[J]. 江西林业科技,2006(4):21-22.
- [29] 杨宝山,张希科,曹兰娟,等. 银杏大蚕蛾生物学特性及防治技术[J]. 农药,2008,47(2):153-154.
- [30] 吴猛耐,杨世璋,陈杰. 林间释放平腹小蜂防治银杏大蚕蛾研究[J]. 昆虫天敌,2001,23(1):26-29.

(上接第 10973 页)

- [13] WANG B, LI L, CHI C F, et al. Purification and characterisation of a novel antioxidant peptide derived from blue mussel (*Mytilus edulis*) protein hydrolysate[J]. Food Chemistry, 2013, 138:1713-1719.
- [14] SINGH N, RAJINIPI P S. Free radical scavenging activity of an aqueous extract of potato Peels[J]. Food Chemistry, 2004, 85:611-616.
- [15] OYAIZU M. Antioxidative activities of browning Products of glucosamine fractionated by Organic solvent and thin-layer chromatography[J]. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 1998, 35:771-775.
- [16] ZHONG J Q, JUNG W K, BYUN H G, et al. Protective effect of an antioxidative peptide purified from gastrointestinal digests of oyster, *Crassostrea gigas* against free radical induced DNA damage [J]. Bioresour Technol, 2008, 99(9):3365-3371.
- [17] 韩芝莲. 概率论与数理统计[M]. 北京:化学工业出版社,2000:302.
- [18] BLAND J S. Oxidants and antioxidants in clinical medicine: Past, present

- and future potential [J]. Journal of Nutritional and Environment Medicine, 1995, 5(3):255-280.
- [19] YANG J L, WEISSMAN L, BOHR V A, et al. Mitochondrial DNA damage and repair in neurodegenerative disorder [J]. DNA Repair, 2008, 7(7):1110-1120.
- [20] ROWELORI A, DEGTYAREVA N, DOETSCH P W. DNA damage-induced reactive oxygen species (ROS) stress response in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2008, 45(8):1167-1177.
- [21] BOUGATEF A, NEDJAR-ARROUME N, MANNI L, et al. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysate of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins [J]. Food Chem, 2010, 118(3):559-565.
- [22] CHEUNG I W Y, CHEUNG L K Y, TAN N Y, et al. The role of molecular size in antioxidant activity of peptide fractions from Pacific hake (*Merluccius productus*) hydrolysate [J]. Food Chem, 2012, 134(3):129.