

微小杆菌属 SWJS2 蛋白酶对鱼肉酶解特性的研究

赵谋明, 雷芬芬, 钟泓波, 崔春, 郇惠杰

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 本文以凤尾鱼、草鱼为原料, 研究了本实验室新筛选的微小杆菌属 SWJS2 所产蛋白酶对凤尾鱼和草鱼蛋白的酶解特性。结果表明: 微小杆菌属 SWJS2 蛋白酶对凤尾鱼和草鱼的最适酶解温度分别为 40 °C 和 45 °C。微小杆菌属 SWJS2 蛋白酶对凤尾鱼的酶解效果优于木瓜蛋白酶, 酶解 12 h 时蛋白回收率为 72.64%, 水解度达 21.38%, ORAC 值与还原力均高于木瓜蛋白酶的酶解产物。微小杆菌属 SWJS2 蛋白酶酶解草鱼的蛋白回收率及抗氧化性能则不及木瓜蛋白酶, 但水解度较高。微小杆菌属 SWJS2 蛋白酶对两种鱼肉的酶解产物中游离氨基酸组成与 6 种商业蛋白酶有明显差异, 亮氨酸、丙氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、异亮氨酸含量显著高于商业酶, 而精氨酸、天冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、天冬酰胺等的含量较低。说明其优先酶切位点与 6 种商业蛋白酶有较明显的差异。

关键词: 微小杆菌属 SWJS2 蛋白酶; 酶解; 鱼肉蛋白; 抗氧化性; 氨基酸组成

文章编号: 1673-9078(2014)2-153-158

Enzymatic Hydrolysis of Fish Proteins using Protease Produced by *Exiguobacterium sp.* SWJS2

ZHAO Mou-ming, LEI Fen-fen, ZHONG Hong-bo, CUI Chun, HUAN Hui-jie

(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The hydrolysis characteristics of the protease produced by a new isolated *Exiguobacterium sp.* SWJS2 on *Coilia mystus* and *Grass carp* were studied. The results showed that the optimal hydrolysis temperature of *Exiguobacterium sp.* SWJS2 protease (EP) was 40 °C for *Coilia mystus* and 45 °C for *Grass carp*. The enzymatic hydrolysis effect of EP on *Coilia mystus* was better than that of papain. The protein recovery was 72.64% and the degree of hydrolysis was 21.38% after 12 h. The ORAC value and reducing power were higher than the hydrolysates by papain. For *Grass carp* hydrolysates by EP, the protein recovery and antioxidant activities were poorer than papain hydrolysates, but the degree of hydrolysis was much higher. The free amino acids compositions of *Coilia mystus* and *Grass carp* hydrolysates by EP were quite different from those of six commercial proteases. The contents of Leu, Ala, Val, Phe and Ile were much higher in EP hydrolysates, while the contents of Arg, Asp, Thr, Ser and Asn were rather low, which reflected that the prior cleavage site of EP had obvious differences from the six commercial proteases.

Key words: protease; enzymatic hydrolysis; protein; antioxidant activity; amino acids

蛋白质经蛋白酶控制酶解制备功能性蛋白、功能性肽和呈味基料是实现食物蛋白资源高值化利用的重要途径。不同的蛋白酶因具有各自的特异性及优先酶切位点, 对同种原料进行酶解后所得的产物的肽的分子量分布、氨基酸组成等都会有不同程度的差异, 从而导致酶解产物的功能特性不同^[1~2]。目前食品行业中常用于酶解的商业蛋白酶主要包括动物蛋白酶(胃蛋白酶、胰蛋白酶等)、植物蛋白酶(木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶等)和微生物蛋白酶(中性蛋白酶、碱性蛋白酶等)。

收稿日期: 2013-06-18

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)课题(2012AA092104; 2013AA102201-1); 海洋公益性行业科研专项(2013418018-7)

作者简介: 赵谋明(1964-), 男, 教授, 博导, 主要从事蛋白质化学与工程、食品生物技术方面的研究

酶等)。这些蛋白酶具有不同的最适酶解条件及不同的酶切位点^[3~4], 在一定程度上能够为不同加工目的提供选择。但自然界蛋白资源种类繁多, 在结构和功能上各有特色。只有不断研发新蛋白酶, 才能不断挖掘出蛋白资源的新功能特性。随着酶解技术的成熟及蛋白质控制酶解产业的高速发展, 开发新型特异性蛋白酶的需求日益迫切。

微生物蛋白酶与动植物蛋白酶相比具有下游技术相对简单, 价格低廉、来源广泛、易于工业化大批量生产等优势, 已成为新型蛋白酶开发的重要来源。目前最常用的蛋白酶生产菌株主要是曲霉属和芽孢杆菌属, 科技工作者不断筛选出产蛋白酶的新菌属, 如 *Serratia sp.* SYBC H^[5]、*Brevibacterium oxydans* 15E^[6]、短小芽孢杆菌^[7]等, 但其大多处于在产酶条件优化、

酶的分离纯化等阶段,关于酶解应用特性的研究还较少。本实验室从南极深海海泥中筛选出一株中性蛋白酶高产菌株微小杆菌属,其所产蛋白酶的性质与已报到的微小杆菌属均产碱性蛋白酶有较大的差异^[8-9]。本文对微小杆菌属 SWJS2 所产蛋白酶对凤尾鱼和草鱼为代表的鱼肉蛋白酶解特性进行了初步研究,并与商业蛋白酶进行对比,为其应用开发提供技术支持。

1 材料与方 法

1.1 材料与设备

酶制剂:微小杆菌属 SWJS2 蛋白酶(以下简称自制酶)由实验室新筛选的微小杆菌属(*Exiguobacterium* sp. SWJS2, CGMCC No.7387)液体发酵后,经超滤浓缩后得到,为澄清的棕色液体(0.29 万 U/mL)。木瓜蛋白酶(Papain,37 万 U/g)购于江 门拜奥生物科技有限公司,Neutrase(13 万 U/mL),protamex(24 万 U/g),PTN6.0S(97 万 U/g),Alcalase2.4L(76 万 U/mL),Flavorzyme500MG(6.2 万 U/g)购于丹麦诺维信公司。Trolox 标准品购于 Sigma 公司。其他试剂均为国产分析纯。

凤尾鱼购于黄沙水产市场,草鱼购于华南理工大学后勤集团,去头、去尾、去内脏,洗净沥干后绞成肉糜,装于密封袋中,储存在-18℃冰柜中备用。

MM12 型绞肉机,广东省韶关市食品机械厂;SHA-C 水浴恒温振荡器,江苏省金坛市农仪器厂;GL-21M 高速冷冻离心机,长沙湘仪离心机仪器有限公司;KDN-2C 型定氮仪,上海纤检仪器有限公司;UV-754 分光光度计,上海精密科学仪器有限公司;Varioskan Flash 多功能酶标仪,芬兰 Thermo Scientific 公司;A300 全自动氨基酸分析仪,德国 membrapure GmbH 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 酶解工艺

取解冻后的鱼肉糜 50 g,按 1:1 的质量比加入蒸馏水,混匀。以蛋白酶与底物蛋白浓度比为 1000 U/g 蛋白为标准添加不同的蛋白酶。在不同的温度下恒温水浴振荡酶解 4 h、8 h、12 h。然后置于沸水中 10 min 灭酶,冷却后 6000 r/min 离心 20 min,减压抽滤,即得酶解液。

1.2.2 蛋白质回收率的测定

采用按 GB/T 5009.5 规定的方法测定原料及酶解液中的总氮:蛋白质回收率=(酶解液中总氮/原料中总氮)×100%。

1.2.3 水解度(DH)的测定

按 GB/T 5009.39 规定的方法测定酶解液中氨基酸态氮,则 DH=(酶解液中氨基酸态氮含量-未酶解前游离氨基氮的含量)/酶解液中总氮含量×100%。

1.2.4 氧自由基吸收能力(ORAC)的测定

将酶解液用 75 mmol/L pH 7.4 的磷酸盐缓冲液稀释 1000 倍。取 20 μL 稀释后的样品于 96 孔酶标板中,加入 120 μL 荧光素溶液(70 nmol/L),37℃保温 10 min 后,加入 60 μL AAPH 溶液(40 mM),反应 2 h,每隔 2 min 读取吸光值一次,以 Trolox 为参照,计算出酶解液的氧自由基吸收能力,以 μmol Trolox equiv/g 蛋白来表示。

1.2.5 还原力的测定

用蒸馏水稀释酶解液至其蛋白浓度为 10 mg/mL,取 2 mL 样品,加入 2 mL 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 6.6)和 2 mL 1% (m/V)的铁氰化钾溶液,混合物 50℃保温 20 min。再加入 2 mL 10% (m/V)的 TCA,混合后以 3000 r/min 离心 10 min。取上清液 2 mL,加入 2 mL 蒸馏水以及 0.4 mL 0.1% (m/V)氯化铁,10 min 后测定其在 700 nm 处的吸光值。吸光值越大,表明该样品的还原力越强。

1.2.6 游离氨基酸含量分析

取 4 mL 酶解液加入 1 mL 10%的磺基水杨酸,混匀后放置于 4℃冰箱中冷藏 60 min,以 10000 r/min 离心 15 min,取上清液再次以 10000 r/min 离心 15 min。将上清液用特定的样品稀释液适当稀释后,经 0.2 μm 滤膜过滤。取滤液上德国 MembraPure 自动氨基酸分析仪 A300 分析。

1.3 数据分析

数据平行测定三次取平均值,用 Excel 2003 进行数据分析处理并作图。

2 结果与分析

2.1 不同条件酶解凤尾鱼、草鱼的蛋白质回收率、水解度

采用自制酶分别在 30℃、35℃、40℃、45℃下酶解凤尾鱼(图 1)和草鱼(图 2),研究不同温度下,水解 4 h、8 h、12 h 时蛋白回收率及水解度,并与商业蛋白酶进行比较。由于相关文献^[10]及预实验数据表明商业蛋白酶中木瓜蛋白酶对草鱼等鱼蛋白的水解效果较好,最适水解温度为 50℃。本实验中不再重复比较各种商业酶的酶解效果,直接将自制酶与木

瓜蛋白酶的酶解效果进行比较。

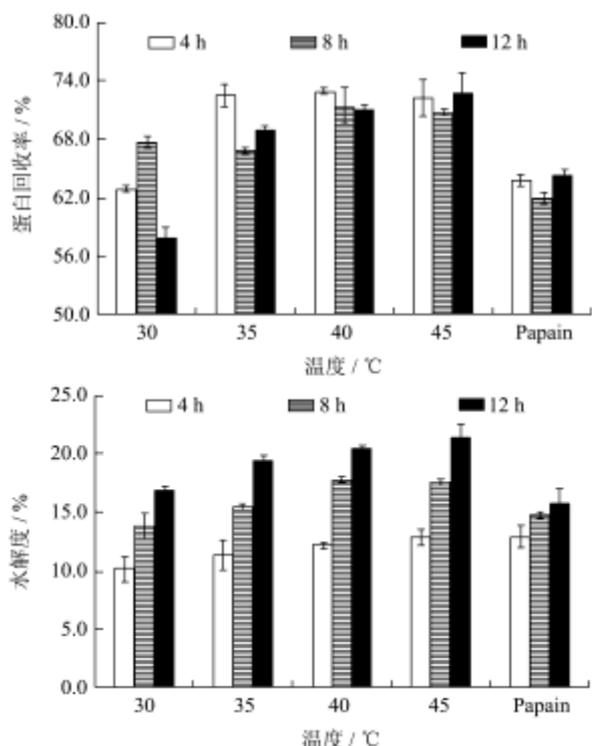


图1 酶解凤尾鱼的蛋白质回收率、水解度

Fig.1 Protein recovery and the degree of hydrolysis of *Coilia*

mystus hydrolysates

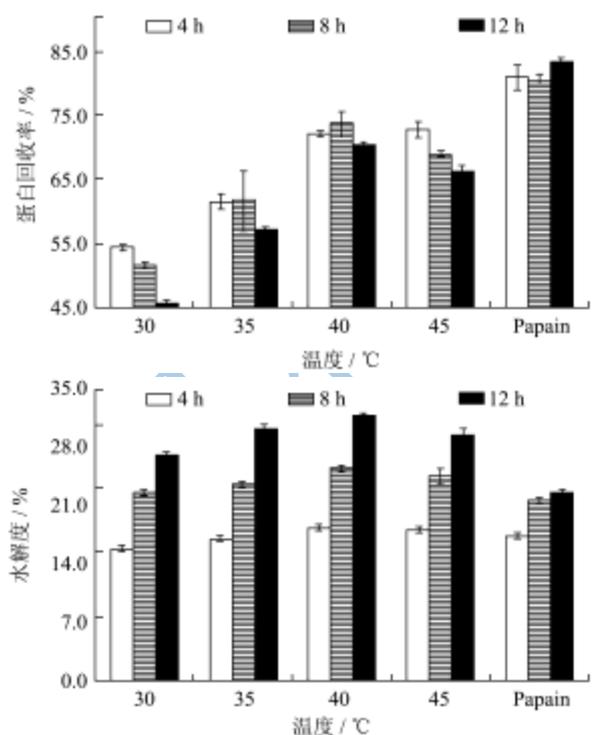


图2 酶解草鱼的蛋白质回收率、水解度

Fig.2 Protein recovery and the degree of hydrolysis of *Grass*

carp hydrolysates

由图1可看出,对于凤尾鱼蛋白,自制酶在35 °C、40 °C、45 °C下蛋白回收率都能达70%,高于木瓜蛋

白酶,木瓜蛋白酶的蛋白回收率最高仅为64.29%。自制酶随着水解时间的延长,水解度有较明显的提高,在35 °C、40 °C、45 °C下水解12 h时达20%,而木瓜蛋白酶随着水解时间从8 h延长至12 h时,水解度增加不明显,最高水解度仅为15.73%。由图2可看出,对于草鱼蛋白,自制酶的蛋白回收率最高仅为72.6%,而木瓜蛋白酶在不同水解时间均达到80%以上,但自制酶的水解度高于木瓜蛋白酶,在35 °C、40 °C、45 °C下都能达30%左右,而木瓜蛋白酶的水解度最高为22.7%。以上数据表明,不同蛋白酶对同种原料酶解效果不同,同种蛋白酶对不同的原料的酶解也有一定的选择性。自制酶对凤尾鱼、草鱼都能有效的酶解,其酶解凤尾鱼的蛋白质回收率及水解度都高于木瓜蛋白酶,其酶解草鱼的回收率低于木瓜蛋白酶,水解度则高于木瓜蛋白酶。

2.2 不同条件酶解凤尾鱼、草鱼酶解产物的抗氧化性

氧化性

2.2.1 不同酶解条件下酶解产物的抗氧化能力指数(ORAC)

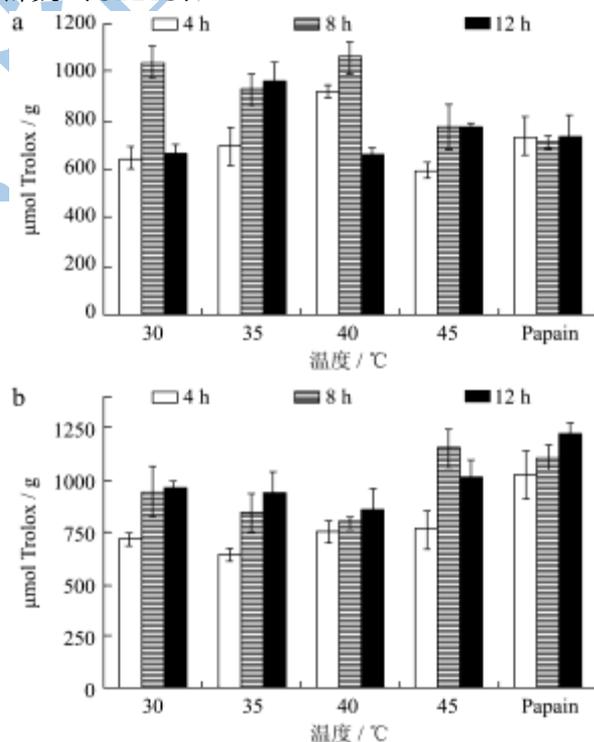


图3 凤尾鱼(a)草鱼(b)酶解产物的抗氧化能力指数

Fig.3 The ORAC value of *Coilia mystus* and *Grass carp* hydrolysates

ORAC方法是目前抗氧化研究中具有代表性的一个评价方法。从图3可以看出,自制酶在40 °C酶解凤尾鱼8 h时,酶解产物的ORAC值最大,达1059

μmol Trolox equiv/g 蛋白, 高于木瓜蛋白酶酶解产物 (735 μmol Trolox equiv/g 蛋白)。自制酶在 45 °C 酶解草鱼 8 h 时, 酶解产物 ORAC 值最高, 为 1156 μmol Trolox equiv/g 蛋白, 而木瓜蛋白酶酶解 12 h 时酶解产物的 ORAC 值高达 1213 μmol Trolox equiv/g 蛋白。从 ORAC 的评价结果来看, 自制酶酶解凤尾鱼制备抗氧化肽比木瓜蛋白酶更有优势, 酶解草鱼的抗氧化性能与木瓜蛋白酶相差不多。

太一致, 是由于不同方法的基理不同及抗氧化体系的复杂性导致的, 与许多文献的报道是一致的^[11]。但这并不影响我们得出结论, 自制酶在酶解鱼肉蛋白制备抗氧化肽方面有较大的潜力。

2.3 凤尾鱼、草鱼不同蛋白酶酶解产物的游离氨基酸组成

由于不同的蛋白酶具有不同的优先酶切位点, 使酶解产物中游离氨基酸组成有较大的差异, 这些差异最终导致产物的生物活性不同。为了研究自制酶的酶切位点的特异性, 将其酶解凤尾鱼、草鱼的酶解产物游离氨基酸组成与 6 种常用的商业蛋白酶进行了对比。游丽君^[12]的研究表明, 当水解度达到一定程度时, 酶解产物中游离氨基酸的含量及组成将不再发生明显变化, 所以表 1、表 2 分别给出了不同蛋白酶对凤尾鱼、草鱼酶解 12 h 后, 酶解产物中各种游离氨基酸的摩尔百分比。

对于两种不同的原料, 自制酶酶解产物中, 摩尔百分比最高的三种氨基酸均为亮氨酸、丙氨酸、缬氨酸。6 中商业蛋白酶酶解产物中亮氨酸、丙氨酸的含量也比较高, 这可能是由于原料中亮氨酸、丙氨酸的含量较高导致, 但自制酶酶解产物中这两种氨基酸的百分比明显高于其他的商业酶。另外, 自制酶酶解产物中缬氨酸、苯丙氨酸、异亮氨酸的含量也都显著高于 6 种商业蛋白酶, 这表明其优先水解含有这些氨基酸的肽键。相反, 精氨酸、天冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、天冬酰胺等在自制酶酶解产物中的含量非常的低, 甚至低于检测限。已报道的 Papain 主要作用位点是 Arg-、Lys-、Phe-, PTN6.0S 主要作用位点是 Arg-、Lys-、Phe-、Try-, Alcalase2.4 L 主要作用位点是 Ala-、Leu-、Val-、Tyr-、Phe-、Try-, 本实验中的商业蛋白酶酶解产物游离氨基酸组成与上述报道是相符合的。虽然酶解产物中游离氨基酸组成与原料特性有一定的关系, 但以上差异表明自制酶酶解鱼肉蛋白的游离氨基酸组成与 6 种商业蛋白酶有着明显的不同。另外, 不同的蛋白酶对两种原料酶解产物中游离氨基酸的总量也各不相同。Wu^[13]及 Dong^[14]等人的研究都表明, 酶解产物中游离氨基酸的含量与组成与其抗氧化等功能特性有非常重要的相关性, 这可能也是导致自制酶酶解鱼肉蛋白的抗氧化性能与木瓜蛋白酶不同的原因。自制酶酶解产物氨基酸组成的特异性表明其优先酶切位点与目前常用的商业蛋白酶有显著差异, 是一种值得深入研究和开发的蛋白酶。

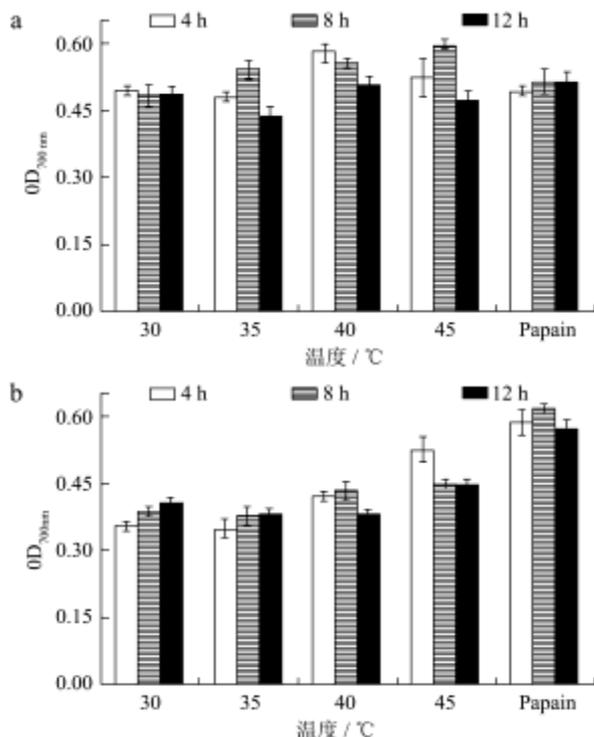


图 4 凤尾鱼 (a)、草鱼 (b) 酶解产物的还原力

Fig.4 The reducing power of *Coilia mystus* and *Grass carp* hydrolysates

2.2.2 不同酶解条件下酶解产物的还原力

物质的抗氧化能力在一定程度上与其还原力正相关。从图 4 可以看出, 在 30~45 °C 范围内, 自制酶酶解产物还原力差别不显著, 两种蛋白酶在不同水解时间下还原力基本不变。对于凤尾鱼, 自制酶酶解产物在 45 °C 水解 8 h 还原力最强, 吸光值达 0.60, 而木瓜蛋白酶酶解产物最大吸光值为 0.51。对于草鱼, 木瓜蛋白酶酶解产物的还原力强于自制酶酶解产物, 最大吸光值为 0.62, 而自制酶仅为 0.52。

两个抗氧化评价指标的结果表明, 酶解产物抗氧化能力的强弱除了与原料本身、酶解条件有关, 还与所选择的蛋白酶种类有重要关系。自制酶酶解凤尾鱼酶解产物的 ORAC 值与还原力均高于木瓜蛋白酶, 但木瓜蛋白酶酶解草鱼的酶解产物的还原力要显著高于自制酶, ORAC 值相差不多。两种评价方法的结果不

表 1 凤尾鱼不同蛋白酶酶解产物的游离氨基酸组成 (mol%)

Table 1 Free amino acids composition of *Coilia mystus* hydrolysates by different proteases

氨基酸	自制酶	Papain	Neutrased	Protamex	PTN 6.0S	Alcalase 2.4L	Flavorzyme 500MG
Leu	25.34	12.76	20.10	22.86	16.27	18.64	20.85
Ala	15.16	12.94	12.41	12.11	6.62	12.64	9.16
Val	10.50	4.45	8.09	7.19	5.82	5.91	8.84
Phe	9.42	5.59	6.77	8.60	7.14	7.35	5.80
Ile	7.50	3.28	7.61	6.45	5.47	4.25	8.64
Lys	7.48	8.53	6.01	3.99	14.33	5.30	7.80
Met	6.14	3.76	2.61	3.36	4.37	6.69	4.35
Gly	5.76	7.10	4.52	3.23	1.78	2.67	2.81
Tyr	4.61	3.42	3.56	4.16	5.86	4.06	3.30
His	2.97	4.56	1.94	1.44	1.03	0.73	1.31
Glu	2.35	6.47	3.53	5.11	3.59	6.52	2.80
Pro	1.55	3.59	2.65	3.68	0.36	1.50	1.63
Trp	1.00	1.32	0.87	0.82	1.72	1.14	1.01
Arg	0.22	8.20	5.67	4.56	16.32	6.26	9.45
Asp	ND	2.83	1.77	2.46	1.19	2.29	1.49
Thr	ND	3.83	4.93	3.97	3.26	4.86	4.77
Ser	ND	4.34	4.67	4.36	1.81	5.07	4.12
Asn	ND	3.02	2.29	1.68	3.07	4.14	1.87

注：下划线表示明显高于其它蛋白酶，ND 表示低于检测限。

表 2 草鱼不同蛋白酶酶解产物的游离氨基酸组成 (mol%)

Table 2 Free amino acids composition of *Grass carp* hydrolysates by different proteases

氨基酸	自制酶	Papain	Neutrased	Protamex	PTN 6.0S	Alcalase 2.4L	Flavorzyme 500MG
Leu	21.81	16.17	16.20	18.12	14.60	15.53	14.62
Ala	15.48	11.14	10.39	9.60	5.81	9.72	9.33
Val	11.68	4.85	7.57	7.97	5.49	6.88	7.79
Ile	8.60	3.97	7.45	7.45	4.83	6.00	7.13
His	8.33	5.26	3.70	2.79	1.98	2.65	2.64
Phe	8.09	6.13	4.84	5.52	6.01	5.30	4.23
Gly	5.97	7.13	4.68	3.20	1.77	3.03	3.59
Pro	5.54	2.76	3.23	2.96	0.98	2.23	3.00
Met	5.42	4.42	4.06	5.03	3.48	4.60	3.49
Glu	4.99	5.62	2.81	3.02	3.10	5.70	3.42
Trp	1.77	2.02	1.01	1.12	1.20	1.15	1.02
Lys	1.13	7.66	6.66	5.18	12.89	6.66	8.37
Arg	0.75	7.23	8.27	6.82	22.42	11.12	6.05
Tyr	0.44	3.76	3.40	3.70	5.43	3.82	3.31
Asp	ND	3.41	3.64	3.55	1.93	3.92	4.87
Thr	ND	3.85	3.37	4.13	3.52	4.88	4.91
Ser	ND	4.25	2.11	4.15	2.51	5.35	4.96
Asn	ND	0.36	6.62	5.70	2.08	1.45	7.25

注：下划线表示明显高于其它蛋白酶，ND 表示低于检测限。

3 结论

从蛋白质回收率、水解度、抗氧化性能来看，自制酶运用于凤尾鱼、草鱼为代表的鱼肉蛋白资源的酶

解利用是可行的，可以为蛋白资源的酶解提供一种新的选择。自制酶对凤尾鱼、草鱼的最适酶解温度分别为 40 °C 和 45 °C。自制酶酶解凤尾鱼的蛋白回收率、水解度、抗氧化性能都要优于木瓜蛋白酶，对草鱼的

蛋白回收率、抗氧化性略低于木瓜蛋白酶,但水解度高于木瓜蛋白酶。可见不同的蛋白酶对原料也有一定的选择性。自制蛋白酶酶解产物游离氨基酸组成与6种常用商业蛋白酶的明显差异,表明自制蛋白酶可能是一种新型蛋白酶,其酶解特异性与优势值得继续深入研究。

参考文献

- [1] Su G, Ren J, Yang B, et al. Comparison of hydrolysis characteristics on defatted peanut meal proteins between a protease extract from *Aspergillus oryzae* and commercial proteases [J]. *Food Chemistry*, 2011, 126: 1306-1311
- [2] Kammerdetch A, Weiss M, Kasper C, et al. An improvement of potato pulp protein hydrolyzation process by the combination of protease enzyme systems [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 40: 508-514
- [3] Li Q, Yi L, Marek P, et al. Commercial proteases: Present and future [J]. *FEBS Letters*, 2013, 587: 1155-1163
- [4] Tavano O L. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2013, 90: 1-11
- [5] 李桂英. *Serratia* sp. SYBC H 发酵产蛋白酶, 酶学性质, 应用及其基因克隆研究[D]. 无锡: 江南大学, 2011
Li G. Y. Study on the production, characterization, application and gene clone of the protease from *Serratia* sp. SYBC H [D]. Wuxi: Jiangnan university, 2011
- [6] 路炳声, 黄志强, 林白雪, 等. 海洋氧化短杆菌 15E 产碱性蛋白酶的发酵条件[J]. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 2007, 36(6): 591-595
Lu B, Huang Z, Lin B, et al. Fermentation conditions of alkaline protease from marine bacterium strain 15E (*Brevibacterium oxydans*) [J]. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)*, 2007, 36(6): 591-595
- [7] 姚大伟. 短小芽孢杆菌碱性蛋白酶酶学特性及其酶基因克隆、表达的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2010
Yao D W. Study on zymologic characteristics, genetic cloning and expression of alkaline protease in *Bacillus pumilus* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2010
- [8] Kasana R C, Yadav S K. Isolation of a Psychrotrophic *Exiguobacterium* sp. SKPB5 (MTCC 7803) and Characterization of Its Alkaline Protease [J]. *Current Microbiology* 2007, 54: 224-229
- [9] 石卉, 周志江, 韩焯. 金橙黄微小杆菌产碱性蛋白酶培养基组成及发酵条件优化[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(18): 205-213
Shi H, Zhou Z, Han Y. Optimization of alkaline protease-producing *Exiguobacterium aurantiacum* on medium compositions and fermentation process [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2012, 33(18): 205-213
- [10] 蓝灿华, 林小文, 黄薇, 等. 酶解法制备草鱼抗氧化多肽工艺的建立[J]. *生物技术*, 2012, 22(6): 71-74
Lan C, Lin X, Huang W, et al. Selection of Enzymes and Construction of Protocol to Produce Antioxidant Peptide by Digesting Grass Carp Protein [J]. *Biotechnology*, 2012, 22(6): 71-74
- [11] Cao G, Prior R L. Comparison of the analytical methods for assessing the total antioxidant capacity of human serum [J]. *Clinical Chemistry*, 1998, 44(6): 1309-1315
- [12] 游丽君. 泥鳅蛋白抗氧化肽的分离纯化及抗疲劳、抗癌功效研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2010
You L J. Study on the Purification of Antioxidant Peptide from Loach Protein and its Antifatigue and Anticancer Activities [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2010
- [13] 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: 949-957
- [14] Dong S Y, Zeng M Y, Wang D F, et al. Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) [J]. *Food Chemistry*, 2008, 107: 1485-149