

文章编号:1000-0615(2004)01-0093-07

鲢酶解物对羟自由基的清除作用

许庆陵^{1,2}, 曾庆祝³, 朱莉娜², 崔铁军²

(1. 大连水产学院农业部海洋水产增养殖学与生物技术重点开放实验室, 辽宁 大连 116023;

2. 大连水产学院生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116023;

3. 大连水产学院食品工程系, 辽宁 大连 116023)

摘要:通过测定酶解物对 Fenton 体系产生的羟自由基的清除效果, 从胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、胃蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶和复合蛋白酶 5 种酶中, 筛选出木瓜蛋白酶和胰蛋白酶作为酶解鲢制备具有较高清除羟自由基活性酶解物的理想水解酶; 用正交试验 $L_9(3^4)$ 对两种酶的水解条件进行了优化, 并对最佳酶解条件下得到的酶解物进行 Sephadex G-25 凝胶柱分离, 洗脱液分别在波长 280nm 处比色, 测定酶解物中主要抗氧化活性肽的分子量分布。结果表明, 木瓜蛋白酶在温度 50℃、酶解时间 15min, pH=6.5、酶质量分数 1.50%、底物:水=1:2 的水解条件下, 酶解物对羟自由基清除效果较好, 清除率为 88.2%; 胰蛋白酶在温度 55℃、酶解时间 60min, pH=8.0、酶质量分数 0.25%、底物:水=1:2 的水解条件下, 酶解物对羟自由基清除效果较好, 清除率为 84.2%。木瓜蛋白酶酶解物在最大洗脱峰时有最大羟自由基清除率峰, 清除率为 95.1%, 在最大峰处酶解物中活性肽的分子量为 2.2kDa; 胰蛋白酶酶解物在最大洗脱峰时也有最大羟自由基清除率峰, 其清除率为 89.6%, 该峰处活性肽的分子量为 14.2kDa。

关键词:鲢; 酶解; 活性肽; 羟自由基; 抗氧化

中图分类号:S985 **文献标识码:**A

Scavenging effect of the hydrolysates from *Hypophthalmichthys molitrix* meat protein on hydroxyl radical

XU Qing-ling^{1,2}, ZENG Qing-zhu³, ZHU Li-na², CUI Tie-jun²

(1. Key Lab of Marine Aquaculture and Biotechnology of Ministry of Agriculture, Dalian Fisheries University, Dalian 116023, China;

2. College of Life Science and Technology, Dalian Fisheries University, Dalian 116023, China;

3. Department of Food Science and Engineering, DaLian Fisheries University, Dalian 116023, China)

Abstract: The purpose of this study was to investigate the scavenging activity (SA) of the fish protein hydrolysates (FPH), which were produced using five different hydrolytic enzymes from *Hypophthalmichthys molitrix* protein, on hydroxyl free radical, and to separate the active peptides produced by hydrolysis and measure the molecule weight distribution of the active peptides. The fish protein hydrolysates (FPH) are of increasing interest due to their potential applications as a source of bioactive peptides or as nutritional ingredients of food products or as nitrogenous substrates for the fermentation media. According to the scavenging activity (SA) of *Hypophthalmichthys molitrix* protein hydrolysates on hydroxyl free radical produced by Fenton reaction, papain and trypsin, whose hydrolysates had higher scavenging activity (SA = 81.5% and 83.5%, respectively) on

收稿日期:2003-06-30

资助项目:大连水产学院农业部海洋水产增养殖学与生物技术重点开放实验室资助项目(2002k012)

作者简介:许庆陵(1965-),女,重庆市人,工程师,主要从事生物化学实验方面的研究工作。Tel: 0411-4762887; E-mail: Xuqingling@dlfu.edu.cn

hydroxyl free radical, had been chosen to be the good hydrolytic enzymes from the five applied enzymes such as trypsin, papain, pepsin, subtilisin and flavourzyme. Furthermore, the optimal hydrolysis parameters of papain and trypsin hydrolysis reaction, including the temperature, time, pH, enzyme content, and the substance concentrations in enzymatic reaction system, were determined by the orthogonal design $L_9(3^4)$, respectively. The influence of the process variables enzyme substrate ratio; effect of intermediate substrate and enzyme addition was studied with regards to the extent of proteolytic degradation and the scavenging activity on hydroxyl free radical, and to the molecular weight distribution of the active peptides. Although the degree of hydrolysis (DH) increased with the time and the enzyme addition, there were no direct relationship between degree of hydrolysis (DH) and scavenging activity (SA). Then the *Hypophthalmichthys molitrix* protein hydrolysates produced by using papain and trypsin with higher scavenging activity on hydroxyl free radical were fractionated with Sephadex G-25 resin, respectively. The absorbance of every fractionated component was measured at 280nm and its molecular weight distribution was calculated according to the absorbance and standards graphs drawn. The results showed that the optimal enzymatic hydrolysis conditions that could produce the protein hydrolysates with the highest scavenging activity on hydroxyl free radical for using papain were temperature 50°C, time duration 15 min, pH 6.5, enzyme content 1.50% (w/w) and enzyme/substances ratio 1:2, and that the highest scavenging activity (SA) was 88.2%; And the optimal enzymatic hydrolysis conditions that could produce protein hydrolysates with the highest scavenging activity on hydroxyl free radical for using trypsin were enzyme content 0.25% (w/w), time duration 60min, pH 8.0, temperature 55°C and substance concentration 1:2, and that the highest scavenging activity (SA) was 84.2%. The fractionated active peptide, which separated from the *Hypophthalmichthys molitrix* protein hydrolysates produced by papain, had the highest scavenging activity, SA = 95.1%, on hydroxyl free radical and its molecular weights was 2.2 kDa. And the fractionated peptides, which separated from the *Hypophthalmichthys molitrix* protein hydrolysates produced by trypsin had the strong scavenging activity, SA = 89.6%, on hydroxyl free radical, and its molecular weight was 14.2 kDa.

Key words: *Hypophthalmichthys molitrix*; enzymatic hydrolysis; bioactive peptides; hydroxyl free radical; antioxidant activity

生物活性肽(bioactive peptides)是指那些有特殊的生理活性的肽类^[1]。近几年来,有关生物活性肽的研究已引起食品科学界的高度关注。在国外,从鱼蛋白中制备生物活性肽的研究已取得了很大进展。Rozenn^[2]等从鳕酶解物中找到促内分泌肽及生长因子,Fujita和Yashikawa^[3]从鳕酶解物中提取出血管紧张素转化酶抑制肽,Kawasaki等^[4]从沙丁鱼肉酶解物中提取出一种小肽作为抗高血压药物,Bernet等^[5]从鱼酶解物 gabolysat P C 60 中找到类肾上腺素活性肽,可以用来舒缓焦虑等。在抗氧化肽的研究方面,Shimonoseki^[6]已从鳕酶解物中提取出抗氧化活性肽。然而,国内在水产类水解蛋白酶解物抗氧化活性肽方面的研究少有报道。

近10年来,我国淡水渔业迅猛发展,上世纪90年代初,年产量已超过 500×10^4 t^[7]。鲢是我国四大家鱼之一,是常见养殖种类中耐低氧能力最

差的种类^[8],其量大价廉,基本以鲜活方式进入市场,上市集中季节往往会引起“压塘现象”(滞销)。目前,对鲢的加工利用技术水平低,主要是由于鲢肉刺多和固有的土腥味,以及采肉得率不高等原因。对此,寻求鲢蛋白新的开发途径,是非常必要的。

在生物体生命活动的氧化代谢过程中,不断地产生各种自由基,其中羟自由基(\cdot OH)是体内最活泼的活性氧,可介导许多病理变化,如引发不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应,并损伤膜结构及功能等等。因此,羟自由基的清除,对维持生物机体正常的生理活动和抗衰老具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

原材料及预处理 鲜活鲢10尾,购于大连市黑石礁市场。去头尾、内脏和鳞,采肉、搅碎混匀

后,分袋包装并密封,于冰箱冷冻保存。

酶及其它试剂 枯草杆菌蛋白酶:丹麦 NOVO 公司出品;复合蛋白酶:丹麦 NOVO 公司出品;胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、胃蛋白酶:上海化学试剂公司出品。2-脱氧核糖:Sigma 公司出品;硫代巴比妥酸(TBA):上海化学试剂公司出品。葡聚糖凝胶(Sephadex) G-25:Amsham Bioscience 公司出品;细胞色素 C、胰岛素、维生素 B₁₂、杆菌肽 D:Sigma 公司出品;蓝色葡聚糖 2000:上海伯奥生物科技有限公司出品;辅酶 I(NAD):中国科学院东方仪器设备公司生产部出品;5'-腺嘌呤核苷-磷酸(AMP):中国科学院上海生物化学研究所出品。

1.2 主要仪器设备

UV-754 紫外分光光度计和 721 分光光度计:上海第三分析仪器厂。J-6M 型大容量冷冻离心机:美国 BECKMAN 公司;250701 部分收集器:LABOMATIC, Switzerland - suisse; STA-131900 蠕动泵:Desage GmbH, Heidelbe, W - German。XW-80A 旋涡混合器:上海精科实业有限公司;PHS-2C 型精密酸度计:上海雷磁仪器厂。DPX45 多用搅馅机:中国哈尔滨商业机械总厂制造;酶解反应瓶:自制。

1.3 方法

酶活力测定 根据 Folin 酚法^[9,10],并对其作了适当的改变。酶活力:1.0g 固体酶粉(1.0mL 酶液)在一定温度和 pH 条件下,1min 水解酪素产生 1.0 μg 酪氨酸为一个酶活力单位,以 U·g⁻¹表示。测定结果为:胰蛋白酶 13500 U·g⁻¹;木瓜蛋白酶 4700 U·g⁻¹;胃蛋白酶 4600 U·g⁻¹;枯草杆菌蛋白酶 13600 U·g⁻¹;复合蛋白酶 7300 U·g⁻¹。

总氮测定 微量凯氏定氮法^[11]。

氨基氮测定 中性甲醛电位滴定法^[12]。

水解度(DH)^[13] $DH(\%) = [\text{水解的肽键数目} \div \text{原料中总肽键数目}] \times 100 = [(B - C) \div (A - C)] \times 100$

式中:A:原料中总氨基氮数目;B:水解后酶解液中氨基氮数目;C:原料液本身含有的氨基氮数目。

鲢酶解物对羟自由基清除能力的测定 采用酶解物对 Fenton 体系产生的羟自由基清除率的体外实验进行测定^[14-16]。取 0.2mL 的 FeSO₄ - EDTA 混合液(10.0mmol·L⁻¹)于 5mL 刻度试管中,加入 0.5mL 的 2-脱氧核糖溶液(10.0mmol·L⁻¹)和 0.6mL 鲢酶解物,用磷酸缓冲液(pH 值为 7.4, 0.1mol·L⁻¹)定容至 1.8mL,再加入 0.2mL H₂O₂(10.0mmol·L⁻¹),混匀后置于 37℃ 恒温水浴中反应 1h。然后加入 2.8% (w/w)三氯乙酸(TCA)溶液 1.0mL,在 4000 r·min⁻¹下离心 20min,取上清液 2.0mL 于另一支试管中,加入 1.0% (w/w)硫代巴比妥酸(TBA)溶液 1.0mL,混匀后置沸水浴反应 15min,冷却后稀释 5 倍,在波长 532nm 处测其吸光度值。酶解物对羟自由基的清除效果用清除率(SA / %)表示,按下式计算:

$$SA(\%) = [(A_C - A_S) \div (A_C - A_0)] \times 100$$

式中:A_C为不加清除剂的吸光度,A_S为加入鲢酶解液后的吸光度,A₀为试剂空白的吸光度。

酶解物分子量分布测定 酶解物分子量分布测定参见文献[17]。取 1.0mL 酶解物,经过 Sephadex G-25 凝胶柱层析,用 0.1mol·L⁻¹磷酸缓冲液(pH 7.0)洗脱,洗脱速度为 0.6mL·min⁻¹,并控制恒定流速,每管收集 3.0mL 洗脱液。然后在波长 280nm 处分别测定各管的吸光度值,再在同一条件下制得的分子量标准曲线上求出酶解物分子量分布。

2 结果与讨论

2.1 酶的筛选

取 5 份:鱼肉 5.0g、水 10.0mL、酶量 300U。在胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、胃蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶和复合蛋白酶五种酶的适宜条件(表 1)下于三颈恒温的酶解瓶中分别进行酶解。然后测定每一种酶在不同酶解时间的酶解物对羟自由基清除率及其水解度。

表1 五种酶的适宜酶解条件

Tab.1 The suitable hydrolytic conditions of the five enzymes

	pH	温度(℃) temperature	酶活力(U·g ⁻¹) enzyme activity	酶质量分数(%) E/S
胰蛋白酶 trypsin	8.0	50	13500	0.4444
胃蛋白酶 pepsin	2.0	37	4600	1.3043
木瓜蛋白酶 papain	7.0	55	4700	1.2766
枯草蛋白酶 subtilisin	7.0	50	13600	0.4412
复合蛋白酶 flavowrzyme	7.0	50	7300	0.8219

实际上,鲢蛋白水溶液本身具有一定的羟自由基清除能力,测定SA值为57.0%,这可能与鲢肉本身的水溶性蛋白及自溶作用而产生的肽、氨基酸等有关。经过多次不同时间段的酶解实验发现,羟自由基清除率较高的酶解物都在酶解作用的120min以内,酶解时间超过120min以后,酶解物对羟自由基清除能力随着时间的增加均呈现不同程度的下降趋势。

从图1可知,酶解时间为20min时,木瓜蛋白酶酶解物显示出最强的羟自由基清除作用活性,清除率为83.5%;酶解时间为40min时,胰蛋白酶酶解物的羟自由基清除作用活性最强,其清除率为81.5%;酶解时间分别为60min、80min、100min、120min时,都是木瓜蛋白酶酶解物的羟自由基清除作用活性最强,其

清除率依次为79.2%、76.1%、81.1%、80.6%。所以,酶解物对羟自由基清除作用能力随酶解时间的增加,并未体现出显著的规律性变化。另外,对酶解物的水解度测定结果表明,木瓜蛋白酶及胰蛋白酶在酶解时间为20min、40min、60min、80min、100min、120min的水解度分别为7.02%、9.77%、12.83%、14.53%、15.34%、17.03%和1.52%、2.95%、4.26%、5.21%、6.17%、6.78%,呈现出逐渐增加的趋势,其它三种酶酶解物的水解度也是随着水解时间的延长呈现不同程度的增加。由此可以认为,酶解物的水解度和酶解物对羟自由基清除作用之间并无直接的相关性,酶解物对羟自由基的清除作用主要取决于肽链中暴露的氨基酸侧链基团的性质和肽的氨基酸序列。

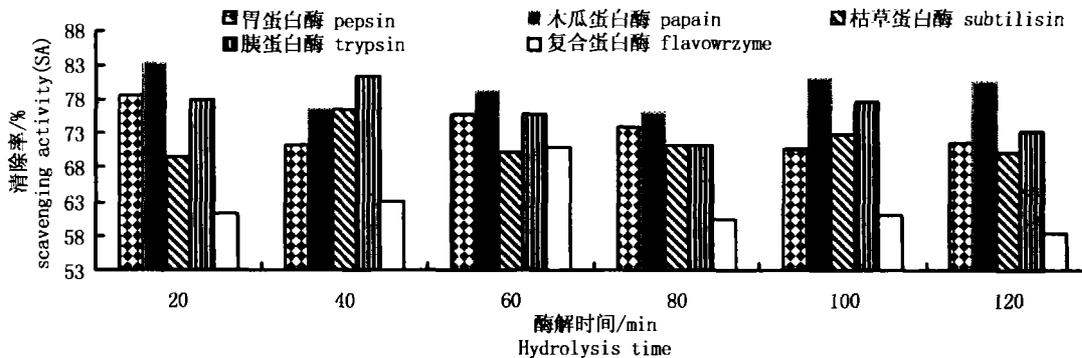


图1 酶解物对羟自由基的清除作用

Fig.1 The scavenging effect of hydrolysates on hydroxyl free radical

2.2 酶解工艺条件优化

木瓜蛋白酶酶解条件优化 按照木瓜蛋白酶酶解因数(表2)进行L₉(3⁴)正交试验^[18](表3)。

将表3的正交试验结果进行极差分析,结果表明影响木瓜蛋白酶酶解物羟自由基清除作用各因素排列顺序为:A>B>D>C,即酶解温度影

表2 木瓜蛋白酶酶解因素水平表

Tab.2 The factors and levels of papain hydrolysis

水平 level	因数 factors			
	A 温度(℃) temperature	B 时间(min) time	C pH	D 酶质量分数(%) E/S
1	50	15	6.5	1.00
2	55	30	7.0	1.25
3	60	45	7.5	1.50

注:底物浓度为肉水比1:2 Notes: substance concentration 1:2

响最大, pH 的影响最小; 木瓜蛋白酶酶解物对羟自由基清除作用最强的酶解条件是 $A_1B_1C_1D_3$, 即温度 50°C , 时间 15min, 酶质量分数 1.50%, pH 为 6.5。在此结果基础上, 保持温度、酶质量分数、pH 和底物浓度不变的条件下, 进一步对 5min、

10min、15min 和 20min 4 个时间段酶解物的羟自由基清除作用进行了比较(表 4), 其结果仍在 15min 的酶解时间获得的酶解物对羟自由基清除作用最强。

表 3 木瓜蛋白酶酶解物对羟自由基清除作用

Tab.3 The scavenging effect of hydrolysates produced by papain on hydroxyl free radical

序号 no.	酶解条件 conditions of hydrolysis				清除率(%) SA	序号 no.	酶解条件 conditions of hydrolysis				清除率(%) SA
	A	B	C	D			A	B	C	D	
1	1	1	1	1	94.7	2	1	2	2	2	87.9
3	1	3	3	3	91.9	4	2	1	2	3	88.6
5	2	2	3	1	74.6	6	2	3	1	2	81.0
7	3	1	3	2	79.9	8	3	2	1	3	80.9
9	3	3	2	1	72.8	K_1	274.5	263.2	256.6	242.1	
K_2	244.2	243.1	249.3	248.9		K_3	233.6	245.7	246.4	261.2	
\bar{K}_1	91.5	87.7	85.6	80.7		\bar{K}_2	81.4	81.0	83.1	83.0	
\bar{K}_3	77.9	81.9	82.1	87.1		R	13.6	6.7	3.5	6.4	

胰蛋白酶酶解条件优化 按照胰蛋白酶酶解因素(表 5)进行 $L_9(3^4)$ 正交试验(表 6)。从表 6 可知, 胰蛋白酶酶解物对羟自由基清除作用最佳的酶解条件是 $A_3B_3C_2D_1$, 即温度为 55°C , 时间是

60min, 酶质量分数是 0.25%, pH 为 8.0。极差值反映出影响胰蛋白酶酶解物羟自由基清除作用的各因素排列顺序为: $D > B > C > A$, 即酶的质量分数影响最大, 温度的影响最小。

表 4 木瓜蛋白酶最佳时间条件的优化

Tab.4 The optimization of time with papain

时间 (min) time	温度($^\circ\text{C}$) temperature	酶质量分数 (%) E/S	pH	清除率 (%) SA
5	50	1.50	6.5	76.5
10	50	1.50	6.5	80.5
15	50	1.50	6.5	88.2
20	50	1.50	6.5	82.3

注: 底物浓度为肉水比 1:2

Notes: substance concentration 1:2

最佳底物浓度的确定 木瓜蛋白酶、胰蛋白酶在各自最佳酶解条件下, 对不同肉水比的底物进行水解。结果表明, 欲得到具有较强的羟自由

表 5 胰蛋白酶酶解因素水平表

Tab.5 The factors and levels of trypsin hydrolysis

水平 level	因素 factors			
	A 温度($^\circ\text{C}$) temperature	B 时间(min) time	C pH	D 酶质量分数(%) E/S
1	45	30	7.5	0.25
2	50	45	8.0	0.50
3	55	60	8.5	0.75

注: 底物浓度为肉水比 1:2

Notes: substance concentration 1:2

基清除作用的酶解物, 木瓜蛋白酶、胰蛋白酶对胰酶解的最佳底物浓度均为肉:水 = 1:2(表 7)。

表 6 胰蛋白酶酶解物的羟自由基清除作用

Tab.6 The scavenging effect of hydrolysates produced by trypsin on hydroxyl radical

序号 no.	酶解条件 conditions of hydrolysis				清除率(%) SA	序号 no.	酶解条件 conditions of hydrolysis				清除率(%) SA
	A	B	C	D			A	B	C	D	
1	1	1	1	1	81.3	2	1	2	2	2	67.1
3	1	3	3	3	79.9	4	2	1	2	3	78.7
5	2	2	3	1	72.9	6	2	3	1	2	71.2
7	3	1	3	2	69.7	8	3	2	1	3	71.7
9	3	3	2	1	87.2	K ₁	228.3	229.8	224.2	241.4	
K ₂	222.8	211.6	232.9	208.0		K ₃	228.6	238.3	222.5	230.3	
K ₁	76.1	76.6	74.7	80.5		K ₂	74.3	70.5	77.6	69.3	
K ₃	76.2	79.4	74.2	76.8		R	1.9	8.9	3.4	11.2	

表 7 木瓜蛋白酶、胰蛋白酶最佳底物浓度

Tab.7 The optimal substance concentrations of trypsin and papain

肉水比 substance concentration	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5	1:6	1:7	1:8
木瓜蛋白酶酶解物的清除率(%) scavenging activity of hydrolysates by papain	77.6	88.2	85.6	80.0	75.2	72.0	70.8	66.6
胰蛋白酶酶解物的清除率(%) scavenging activity of hydrolysates by trypsin	76.7	84.2	80.7	78.9	76.6	74.8	69.5	67.3

2.3 酶解物分子量分布测定

标准曲线的制作 以蓝葡聚糖 2000(分子量 2000kDa)、细胞色素 C(分子量 12.3kDa)、胰岛素(分子量 5.7kDa)、杆菌肽 D(分子量 2.0kDa)、维生素 B₁₂(分子量 1355Da)、NAD(分子量 663.4Da)、AMP(347.2Da)作为标准物质配制溶液,分别进行 Sephadex G-25 凝胶柱层析,测定外水体积 V₀、洗脱体积 V_e,计算出分配系数 Kav 值,制作标准曲线(图 2)。

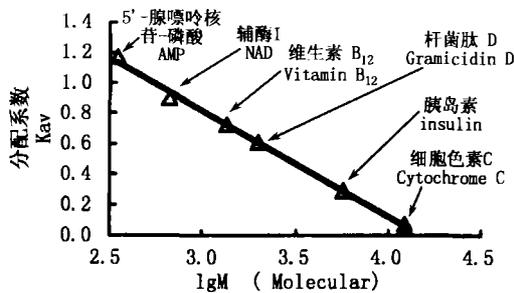


图 2 用葡萄糖凝胶(G-25)层析柱测分子量的标准曲线
Fig.2 Separation curve of standards by Sephadex G-25

木瓜蛋白酶酶解物的分子量分布及清除率 木瓜蛋白酶酶解物经 SephadexG-25 凝胶柱分离,收集液在波长 280nm 比色测定。结果(图 3)表明,在最大吸收峰处的 Kav = 0.5934 (31 号管),

此处洗脱液同时还具有最大的对羟自由基清除率峰,其 SA = 95.1%。由图 2、图 3 表明,在最大洗脱峰处分子量为 2.2kDa。故在最大洗脱峰处获得的分离液即为木瓜蛋白酶酶解物中具有较强抗氧化活性的活性肽,它具有木瓜蛋白酶酶解物中最大羟自由基清除作用活性,该活性肽分子量为 2.2 kDa。

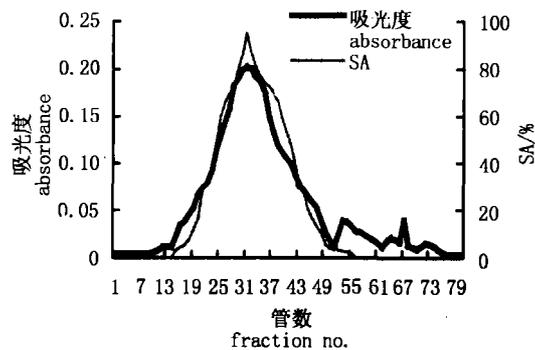


图 3 木瓜蛋白酶酶解液在 280nm 处的吸光度和 SA
Fig.3 The absorbance and SA of hydrolysates produced by papain at 280nm

胰蛋白酶酶解物的分子量分布及清除率 胰蛋白酶酶解物经 Sephadex G-25 凝胶柱分离,收集液在波长 280nm 比色测定(图 4)。

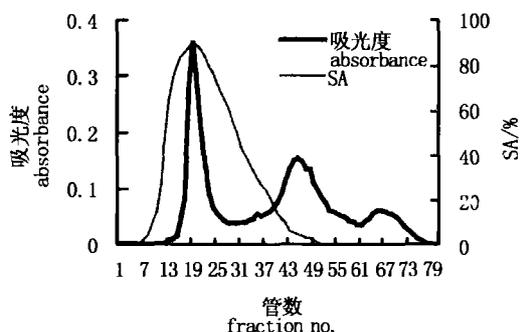


图4 胰蛋白酶酶解液在280nm处的吸光度和SA

Fig.4 The absorbance and SA of hydrolysates produced by trypsin at 280nm

由图4可知,最大洗脱吸收峰处的 $K_{av} = 0.0095$ (19号管),此处洗脱液同时还具有最大的对羟自由基清除率为89.6%;由图2和图4表明,在280nm最大洗脱峰处的分子量为14.2kDa。故在最大洗脱峰处获得的分离液即为胰蛋白酶酶解物中具有较强抗氧化活性的活性肽,它具有最大羟自由基清除作用活性,该活性肽分子量为14.2kDa。

3 结论

木瓜蛋白酶和胰蛋白酶分别在最佳酶解条件下对鲢蛋白进行水解,可以获得具有较高羟自由基清除作用能力的酶解物。木瓜蛋白酶酶解物中具有最大羟自由基清除效果的活性肽分子量为2.2kDa,其清除率为95.1%;胰蛋白酶酶解物中具有最大羟自由基清除效果的活性肽分子量为14.2kDa,其清除率为89.6%。

参考文献:

- [1] Zheng J X. Biological activity food[M]. Beijing: Light Industry Press of China, 1995. 347 - 352. [郑键仙. 功能性食品[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1995. 347 - 352.]
- [2] Rozenn Ravallec P. Influence of the hydrolysis process on the biological activities of protein hydrolysates from cod muscle[J]. Journal of Science of Food and Agriculture, 2000, 80: 2176 - 2178.
- [3] Fjita H, Yashikawa M. A product-type-ACE-inhibitory peptide derived from fish protein[J]. Immunopharmacology, 1999, 44 (1-2): 123 - 127.
- [4] Kawasaki T, Seju E, Isajima K. Antihypertensive effect of vallyl - tyrosine, a short chain peptide derived from sardine muscle hydrolysates, on mild hypertensive subjects [J]. J Hum Hypertens, 2000, 14(8): 519 - 523.
- [5] Bernet F. Diazepam-like effect of a fishprotein hydrolyste on stress responsiveness of the rat pituitary-adrenal system and sympathoadrenal activity [J]. Psychopharmacology, 2000, 149 (1): 34 - 40.
- [6] Shimonoseki. Separation and identification of antioxidant peptide from proteolyte digest of dried bonito [J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 1999, 65(1): 92 - 96.
- [7] China Editorial Committee of Agriculture Yearbook. Agriculture yearbook of China [M]. Beijing: Agriculture Press, 1993. 30 - 31. [中国农业年鉴编委会. 中国农业年鉴[M]. 北京: 农业出版社, 1993. 30 - 31.]
- [8] Qiu Y S. Handbook of fish culture [M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2001. 14 - 16. [岳永生. 简明养鱼手册[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2001. 14 - 16.]
- [9] Zhu J, Cao K M, Zhou R Q, et al. Experiment of biochemistry [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1987. 186 - 189. [朱俭, 曹凯鸣, 周润琦, 等. 生物化学实验[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1987. 186 - 189.]
- [10] Qian J Y. Bestimmungsmethoden enzyme [M]. Beijing: Light Industry Press of China, 1992. 242 - 313. [钱嘉渊. 酶的测定方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1992. 242 - 313.]
- [11] Dai Y J. Biochemistry [M]. Beijing: Higher Education Press, 1992. 353 - 359. [戴玉锦. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1992. 353 - 359.]
- [12] Gong W K. Food measurement and analysis [M]. Beijing: Light Industry Press, 1986. 87 - 88. [龚伟坤. 食品检测与分析[M]. 北京: 轻工业出版社, 1986. 87 - 88.]
- [13] Zhou T. Prelim in study on preparation of low-molecular-weight peptide by hydrolyzing *Pneumatophorus japonvais* protein with enzyme [J]. J Zhejiang Coll Fish, 1997, 16(1): 12 - 18. [周涛. 酶解鲢鱼蛋白制取低分子肽的初步研究[J]. 浙江水产学院学报, 1997, 16(1): 12 - 18.]
- [14] Cheng H Z, Yu J, Guo H M. Study on the scavenging activity of enzymic hydrolysates of the soy protein isolates on hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) of Fenton reaction [J]. Food Science, 2002, 23 (1): 43 - 46. [陈美珍, 余杰, 郭慧敏. 大豆分离蛋白酶解物清除羟自由基作用的研究[J]. 食品科学, 2002, 23(1): 43 - 46.]
- [15] Wang H K, Zhao X H, Jiang Y, et al. Isolation and the radical scavenging activity of the effective ingredient from licorice [J]. Food and Machine, 2002, 4: 23 - 24. [王海宽, 赵新淮, 姜岩, 等. 甘草有效成分分离及其对自由基的清除能力[J]. 食品与机械, 2002, 4: 23 - 24.]
- [16] Zhong H Y, Li Z H, Wei Y Q. The antioxidation and $\cdot\text{OH}$ free radical scavenging of malus doumeri leaf extracts [J]. Journal of Beihua University (Natural Science), 2001, 6(2): 522 - 525. [钟海雁, 李忠海, 魏元青. 林檎叶提取物抗氧化及 $\cdot\text{OH}$ 自由基清除作用的研究[J]. 北华大学学报, 2001, 6(2): 522 - 525.]
- [17] Zhao Y F. Technique principal and application of biochemistry [M]. Wuhan: Wuhan University Press, 2001. 113 - 145. [赵永芳. 生物化学技术原理及其应用[M]. 武汉: 武汉大学出版社, 2001. 113 - 145.]
- [18] Chen Z N, Qiu Z L, Yu J H. Analysis and design of experiment [M]. Shanghai: Shanghai Jiaotong University Press, 1986. 202 - 209. [陈兆能, 邱泽麟, 余经洪. 试验分析与设计[M]. 上海: 上海交通大学出版社, 1986. 202 - 209.]