

热变性对海参肠酶解物活性的影响

姜 卉¹, 金文刚², 许景光¹, 吴海涛¹, 王笑涵¹, 商文慧¹, 韩佳润¹, 唐 越^{1,*}

(1. 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;

2. 陕西理工大学生物科学与工程学院, 陕西省资源生物重点实验室, 陕西汉中 723001)

摘 要:为充分利用海参蛋白质资源,以海参肠为原料,结合热变性预处理来制备海参肠活性多肽,利用中性蛋白酶酶解两组海参肠匀浆液(100 ℃预处理 10 min 的变性组和未变性组),并比较分析两组蛋白的水解度、可溶性蛋白、三氯乙酸(TCA)可溶性寡肽的含量、肽得率、分子量分布以及抗氧化能力,检测层析分离后样品的蛋白含量及还原能力,探究热变性预处理对多肽性质的影响。结果表明,经过变性处理后,海参肠酶解液水解度由 23.76% 提高到 37.28%,肽得率由 13.97% ± 1.25% 提高到 25.13% ± 1.59%。Superdex Peptide 10/300GL 凝胶过滤色谱分析表明,变性组海参肠多肽组分的分子量主要分布范围为 0.5~3 kDa,占水解液的 57.29%,且变性处理组的 ABTS⁺ 与 DPPH 自由基清除率最高可达 0.51 Trolox equi/μL Sample 与 90.95%。以上结果说明,结合变性预处理工序,利用中性蛋白酶可获得较低分子量范围的海参肠多肽,具有潜在的开发价值。

关键词:海参肠,多肽,热变性,酶解,分离

Effect of Heat Denaturation on the Activity of Sea Cucumber (*Stichopus japonicas*) Guts Hydrolyzates

JIANG Hui¹, JIN Wen-gang², XU Jing-guang¹, WU Hai-tao¹,
WANG Xiao-han¹, SHANG Wen-hui¹, HAN Jia-run¹, TANG Yue^{1,*}

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

2. Key Laboratory of Bio-resources of Shaanxi Province, School of Bioscience and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723001, China)

Abstract: In order to make full use of the sea cucumber protein resources, sea cucumber guts were used as a raw material, which combined with heat denaturation pretreatment to prepare sea cucumber guts activity polypeptide and explored the effect of heat denaturation pretreatment on the properties of peptides. Using neutral proteases digest the two sea cucumber intestine homogenates (the denatured group with pretreatment at 100 ℃ for 10 min and non-denatured group), and compared the degree of hydrolysis, soluble protein and trichloroacetic acid (TCA) soluble oligopeptide content, peptide yield, molecular weight distribution, and antioxidant capacity of enzymolysate. And the protein content and reduction capacity of separation were determined. The results showed that, after degeneration, the degree of hydrolysis increased from 23.76% to 37.28%, and the peptide yield increased from 13.97% ± 1.25% to 25.13% ± 1.59%. The molecular weight of primary peptide fraction in hydrolysates (denatured) of sea cucumber guts ranged from 0.5 to 3 kDa which determined by gel filtration chromatography on Superdex Peptide 10/300 GL, accounting for 57.29% of the hydrolysates, and the ABTS⁺ and DPPH free radical scavenging rate up to 0.51 Trolox equi/μL Sample and 90.95%. These results suggested that the sea cucumber guts peptides with low molecular weight, prepared with a combination of denaturing pretreatment and neutrase hydrolysis, would have potential value for exploitation.

Key words: sea cucumber guts; peptides; denaturing treatment; enzymatic hydrolysis; isolation

中图分类号: TS254.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2018)14-0029-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2018.14.006

引文格式: 姜卉, 金文刚, 许景光, 等. 热变性对海参肠酶解物活性的影响[J]. 食品工业科技, 2018, 39(14): 29-33.

海参 (*Stichopus japonicas*) 属棘皮动物门, 海参纲, 是一类重要的海洋无脊椎动物。海参是一种传

收稿日期: 2017-10-13

作者简介: 姜卉 (1993-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 水产品加工理论与技术, E-mail: 18842634726@163.com。

* 通讯作者: 唐越 (1985-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 水产品加工理论与技术, Email: 249913440@qq.com。

基金项目: 大连市高层次人才创新支持计划项目 (2015R083); 辽宁省教育厅科学研究一般项目 (L2015050)。

统的海洋来源食品,同时也是重要的药物资源,深受亚洲各国消费者的喜爱^[1]。相关研究表明,海参体内含有较多如多糖^[2]、皂苷^[3]、萜甙^[4]、脂肪酸^[5]、多肽^[6]等利于人体健康的成分,具有抗炎、抗过敏^[3]、抗真菌^[4]、提高免疫力^[5]、降血压^[6]、延缓衰老和防治肿瘤^[7]等作用。

海参制品主要以海参体壁为加工对象,海参肠大多数被直接丢弃,不仅对环境造成了污染,还浪费了蛋白质资源,附加值较低^[8]。随着人们对海洋生物资源认识的提高,从海洋中获得食品蛋白质和生物活性物质,利用酶制剂加工海产品副产物,制备蛋白质水解产物和多肽,获得功能性食品原料等,已成为各国进行海洋资源开发利用的重要项目^[9],例如非洲鲶鱼抗菌肽^[10],巴沙鱼皮血管紧张素转化酶抑制肽^[11]等,相关研究还讨论了预处理对鳙鱼水解产物抗氧化活性的影响^[12],但对于海参肠活性肽的研究仍属少数。

本课题组前期已对海参肠进行了一定的研究,主要集中在对海参肠中各种酶类进行分离纯化,如 β -1,3-葡聚糖酶^[13],溶菌酶^[14],海参自溶酶^[15]和组织蛋白酶 B^[16]等,探究多种海参肠内源酶的特性及其对海参自溶的影响,但并未研究外源酶对海参肠的影响。本研究以海参肠为原料,结合热变性预处理,选用中性蛋白酶对其进行酶解,制备海参肠活性多肽,为海洋来源生物活性物质的进一步扩展研究提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

海参肠 大连长兴水产品批发市场;中性蛋白酶(酶活 370000 U/g) 南宁庞博生物制药有限公司;Sephadex G-25 葡聚糖凝胶 Pharmacia 公司;还原型谷胱甘肽(GSH)、肽分子量标准品:18 肽(2342 Da) 西安联美生物科技有限公司;维生素 B12(1355 Da)、N-Hippuryl-His-Leu(430 Da) Sigma 公司;细胞色素 C(12500 Da)、抑肽酶(6512 Da) 上海生工生物工程技术有限公司;其余试剂 为国产分析纯。

KDN-103F 型自动定氮仪 上海纤检仪器有限公司;SZF-106A 型粗脂肪测定仪 上海新嘉电子有限公司;pHS-3C 型精密 pH 计 上海雷磁仪器厂;P230p 型高效液相色谱 大连依利特分析仪器有限公司;UV2100 型紫外可见分光光度计 上海尤尼柯仪器有限公司;Superdex™ Peptide 10/300GL 凝胶柱(10 mm×300 mm) GE Healthcare 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 海参肠化学组成分析 将海参肠洗净后匀浆,取部分匀浆液冻干,对匀浆液(湿基)和海参肠冻干粉(干基)分别采用常规干燥法、凯氏定氮法、索氏提取法测定海参肠样品的水分、蛋白质以及脂肪含量^[17],采用苯酚-硫酸法测定总糖含量^[18],参照标准曲线: $y = 0.0126x - 0.0182$ ($R^2 = 0.9928$) 进行分析;还原糖含量采用 DNS 法测定,参照标准曲线: $y = 0.001x + 0.001$ ($R^2 = 0.9994$) 进行分析;绘制标准曲线的标

准品均为葡萄糖。

1.2.2 酶解物制备 海参肠经匀浆处理,加去离子水使其质量浓度为 4% (w/v),沸水浴 10 min(变性处理组),实验中以未经沸水浴处理的样品为对照(未变性处理组)。根据课题组的前期研究^[19],选用中性蛋白酶为外源酶,变性处理和未变性处理两组分别用 HCl 和 NaOH 溶液调 pH 至 7.0 后,加酶(3000 U·g⁻¹ pro.) 在 50 ℃ 水浴条件下,两组样品均恒温酶解 3 h,沸水浴 10 min 灭酶,4000 r/min 离心 15 min 后取上清液,-25~-50 ℃ 条件下真空冷冻干燥 60~72 h。

1.2.3 水解度测定 参照 pH-stat 法^[20],通过控制标准 NaOH 溶液的滴加量进行水解度的测定,取水解 5、10、20、40、60、80、100、130、160、180 min 的样品,记录对应的 NaOH 溶液消耗量,计算水解度,公式如下:

$$DH(\%) = \frac{B \times Nb}{Mp} \times \frac{1}{a} \times \frac{1}{h_{tot}} \times 100$$

式中:DH-水解度,% ;B-滴定过程消耗碱液量,mL;Nb-碱的当量浓度,mol/L;Mp-底物中蛋白总量,g;h_{tot}-底物蛋白质中肽键总数,mmol/g,计算时取值为 7.5; α -水解过程中 α -氨基的解离度。

1.2.4 酶解液中可溶蛋白、三氯乙酸(TCA)可溶性寡肽含量和肽得率的测定 将经变性预处理和未变性处理的海参肠酶解液去离子水稀释 20 倍后,选用考马斯亮蓝 G-250 法对两组海参肠酶解液的可溶性蛋白含量进行测定^[18],通过相应标准曲线进行计算。采用 TCA 沉淀法结合 Folin-酚法检测酶解液中 TCA 可溶性寡肽的含量^[21],根据绘制的牛血清白蛋白标准曲线 $y = 0.0035x + 0.00128$ ($R^2 = 0.9977$),参照文献[21]对肽得率进行计算,公式如下:

$$\text{肽得率}(\%) = \frac{N_1}{N_0} \times 100$$

式中:N₁-酶解液中 TCA 可溶性寡肽含量,mg;N₀-酶解液总蛋白量,即酶解液中底物蛋白量,mg。

1.2.5 海参肠酶解液层析分离 采用 Sephadex G-25 凝胶层析柱(1.6 cm×50 cm),海参肠酶解液上样量 0.5 mL,用去离子水进行洗脱,流速为 0.25 mL/min,采用部分收集器每次收集 40 管,作为待测样品。

1.2.6 样品蛋白质含量及还原能力的测定 蛋白含量的测定采用紫外分光光度法,测定其在 280 nm 下的吸光度(OD₂₈₀)^[22]。还原能力的测定参照文献[22]进行:取层析分离收集到的样品溶液 1 mL,经过一系列反应后测定 OD₇₀₀,空白组为去离子水。

1.2.7 变性处理组样品分子量分布的测定 将变性处理组海参肠酶解液用去离子水稀释 5 倍,经 0.45 μm 微孔膜过滤,采用 Superdex Peptide 10/300GL(10 mm×300 mm)凝胶过滤色谱柱进行高效液相色谱法测定分子量分布范围。具体方法参考文献[22]进行:进样量:50 μL;检测波长:220 nm;洗脱流量:0.5 mL/min。分子量标准品分别选用 Cytochrome C(12.5 kDa),Aprotinin(6.512 kDa),18 肽(2.342 kDa),Vitamin B12(1.355 kDa)和 N-

Hippuryl-His-Leu (0.43 kDa) 和 gly-gly (0.132 kDa)。对凝胶过滤色谱而言,分子质量的对数(y)与保留时间(x)呈线性关系,从而得到标准曲线 $y = -0.0834x + 5.7554 (R^2 = 0.9944)$, 计算海参肠酶解液的分子量分布。

1.2.8 变性处理组海参肠多肽的 ABTS⁺ 自由基清除率检测 以 Trolox 为标准品,绘制标准曲线。具体操作步骤如下:准确称量 0.05006 g Trolox,加入 40 mL 磷酸盐缓冲溶液 (0.2 mol/L, pH7.4)。将其用 PBS (0.2 mol/L, pH7.4) 稀释,使浓度梯度为:0、1、2、3、4、5 mmol/L,分别取 10 μL 与稀释好的 1 mL ABTS⁺ 溶液在 30 ℃ 干浴器中反应 6 min,在 734 nm 下测定吸光值,所得标准曲线为 $y = 19.008x - 3.5205$ 。将两组样品的冻干粉用去离子水复溶,配制成浓度为 5、10、20、50、100 mg/mL 的样液,检测方法同上,样品浓度梯度为 5、10、20、50、100 mg/mL,并将结果换算为 Trolox 当量。以还原型谷胱甘肽 (5 mg/mL) 为阳性对照。

1.2.9 变性处理组海参肠多肽的 DPPH 自由基清除率检测 分别取 200 μL 浓度为 5、10、20、50、100 mg/mL 的去离子水复溶后的样液与磷酸盐缓冲溶液 (0.1 mol/L pH6.0) 400 μL、DPPH (0.04 g/L) 400 μL 混匀后室温避光反应 30 min,离心 (2000 × g, 10 min),取上清液测定其在 517 nm 下的吸光值。以还原型谷胱甘肽 (5 mg/mL) 为阳性对照。

1.3 数据处理

实验重复 3 次,数据以平均值 ± 标准差表示。采用 SPSS 13.0 软件进行显著性分析, $p < 0.05$ 时具有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 海参肠主要化学组成

经测定,海参肠原料水分含量为 88.13% ± 0.06%,干物质中粗蛋白、粗脂肪、总糖、还原糖及灰分含量见表 1。

表 1 海参肠主要化学组成
Table 1 Main chemical composition of *Stichopus japonicus* guts

指标	干基含量 (%)	湿基含量 (%)
粗蛋白	70.94 ± 0.57	8.42 ± 0.03
粗脂肪	13.90 ± 1.41	1.65 ± 0.08
总糖	8.60 ± 0.25	1.02 ± 0.02
还原糖	7.33 ± 1.04	0.87 ± 0.06
灰分	7.33 ± 0.47	0.75 ± 0.03

由表 1 可见,海参肠中粗蛋白含量高于其他主要化学成分,所占比例超过干基的 70%。其次为粗脂肪与总糖,灰分含量最低。刘小芳等^[23]研究表明,乳山刺参体壁和内脏的粗蛋白含量分别为 49.75%、34.90%,均低于 70%,因此,本研究的海参肠是一种具有开发利用潜力的高价值蛋白资源。

2.2 海参肠酶解物的水解曲线

对海参肠进行变性预处理,以未变性组为对照,在酶解过程中水解度随水解时间的变化如图 1 所

示,在整个水解过程中,两组海参肠在酶解前 30 min 内水解度上升较快,随后增加趋势平缓,变性组至 160 min 达到平稳期,随后变化无显著差异,此时其水解度达到 37.28%,而未变性处理组的水解度至 45 min 达到 23.76%,且与之后的水解度无显著性差异。由此可知,采用中性蛋白酶水解海参肠效果良好,并且底物经变性处理后,水解度是未变性组的 1.57 倍,原因可能是经变性处理后,海参肠蛋白的二、三、四级结构被破坏,导致中性蛋白酶与蛋白质酶切位点间相互作用,有利于酶解过程的进行^[24],这与金文刚等^[21]发现的虾夷扇贝生殖腺经热变性处理后,其水解度增大的结果一致。

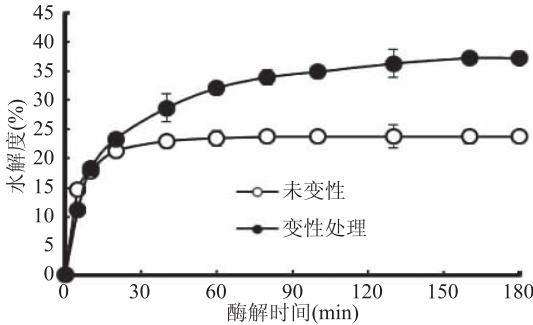


图 1 海参肠酶解液水解度曲线

Fig.1 Hydrolysis degree curve of *Stichopus japonicus* guts hydrolysates

2.3 海参肠酶解液的可溶蛋白含量、TCA 可溶性寡肽含量及肽得率

两组海参肠酶解液中可溶蛋白含量、TCA 可溶性寡肽含量及肽得率结果见表 2,由表 2 可知,可溶性蛋白含量均低于 TCA 可溶性寡肽,这主要是因为考马斯亮蓝 G-250 法检测到的可溶性蛋白为大分子量体系,海参肠经过酶解后体系中的大分子量蛋白大部分被分解为小分子的可溶性寡肽,从而导致体系中 TCA 可溶性寡肽含量较多;变性处理组海参肠酶解液中可溶性蛋白含量低于未变性组,这是由于变性处理组海参肠酶解程度比未变性处理组高,蛋白质水解为小分子肽,从而表现为变性处理组 TCA 可溶性寡肽含量和肽得率均显著高于未变性组 ($p < 0.05$)。与未变性组相比,海参肠变性处理后 TCA 可溶性寡肽含量和肽得率分别提高了 95% 和 80%,表明以中性蛋白酶酶解海参肠,变性处理所得的水解液具有较高的可溶性寡肽含量及肽得率。这与金文刚等^[25]发现的虾夷扇贝性腺蛋白经 100 ℃ 加热处理 10 min 后,更易于酶解的结果一致。

表 2 海参肠酶解液中可溶性蛋白、TCA 可溶性寡肽含量及肽得率

Table 2 Content of soluble protein, TCA-soluble oligopeptide and peptide yield of *Stichopus japonicus* guts hydrolysates

指标	变性处理组	未变性组
可溶性蛋白含量 (mg·mL ⁻¹)	1.29 ± 0.09 ^a	1.91 ± 0.12 ^a
TCA 可溶性寡肽含 (mg·mL ⁻¹)	6.19 ± 0.39 ^a	3.18 ± 0.13 ^b
肽得率 (%)	25.13 ± 1.59 ^a	13.97 ± 1.25 ^b

注:小写字母表示两组具有显著差异 ($p < 0.05$)。

表3 变性处理组海参肠多肽的分子量分布结果

Table 3 Results of molecular weight distribution of *Stichopus japonicus* guts peptides (denaturated)

分子量分布 (kDa)	0.2~0.25	0.25~0.5	0.5~1	1~3	3~5
含量 (%)	16.34	12.68	27.86	29.43	5.19

2.4 海参肠多肽的分离及还原能力监测

利用 Sephadex G-25 凝胶柱进一步将海参肠变性处理和未变性处理组的酶解液进行层析分离,并监测其还原能力,结果见图2。两组海参肠酶解液经层析分离后,主要出现两个蛋白峰,都具有一定的还原能力,其中未变性处理组洗脱液在 280 nm 下吸光值分别在第 11、20 管出现峰值,而变性处理组洗脱液在第 9、16 管出现峰值,表明变性处理使海参肠多肽分子量的分布向较小分子量方向偏移,此外,相应峰值的升高表明经热变性后,其对应的蛋白质的回收率提高,并且样品在 700 nm 下的吸光值表明其同样具有一定的还原能力,其原因可能在于,高温预处理使蛋白质的螺旋结构发生松散,暴露出了更多的蛋白酶结合位点,从而更加利于蛋白质和蛋白酶结合^[24],进而得到了更多的小分子肽,影响其还原能力。比较变性与未变性组凝胶分离曲线可见,海参肠变性处理组酶解液组分相对比较均一,分子量比较集中,推测其与蛋白酶的充分结合作用会使海参肠蛋白分子裂解得更为彻底,使整个体系的分子量趋于均一^[24]。

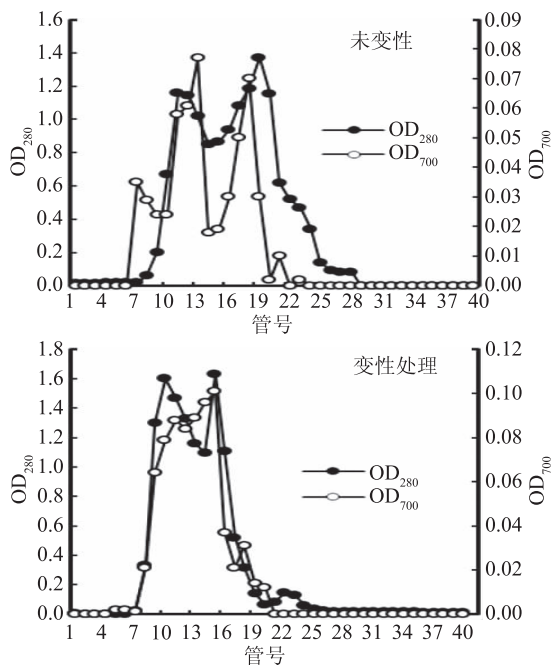


图2 海参肠酶解液经 Sephadex G-25 凝胶柱层析分离及还原能力

Fig.2 Reducing activity and separation of *Stichopus japonicus* guts hydrolysates by Sephadex G-25 chromatography

2.5 变性处理组海参肠多肽的分子量分布

由以上实验结果可知变性处理组海参肠多肽的还原能力较高,因此对其分子量分布进行测定,结果见图3。以标准曲线作为参照,根据变性处理组海参肠多肽的保留时间以及峰面积,分析可知,该组海参

肠多肽的分子量分布范围主要集中于 0.5~3 kDa,占水解液的 57.29%,进一步说明热变性处理能使海参肠更加充分地酶反应,利于酶解。金文刚等^[25]对虾夷扇贝雌性生殖腺进行热变性处理,酶解后分子量集中于 0.25~5 kDa,与本实验研究结果相似。

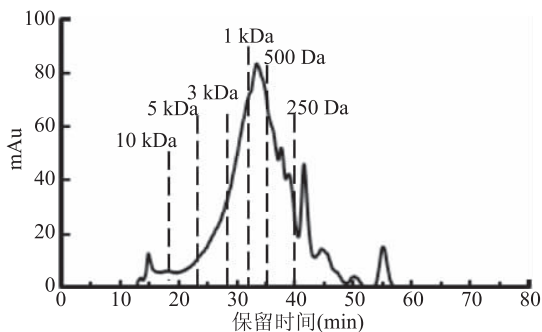


图3 变性处理组海参肠多肽的分子量分布

Fig.3 Molecular weight distribution of *Stichopus japonicus* guts peptides (denaturated)

2.6 变性处理组海参肠多肽的 ABTS⁺ 自由基清除率检测

检测结果见图4,海参肠多肽的 ABTS⁺ 自由基清除率呈现明显的剂量依赖性,在浓度低于 20 mg/mL 时,其对 ABTS⁺ 自由基的清除效果均随浓度的提高显著增加 ($p < 0.05$),最高达到 0.51 Trolox equi/ μ L Sample,与袁坤山等^[26]的实验结果相近。但是在 5 mg/mL 浓度下其清除率为 0.25 Trolox equi/ μ L Sample 低于 GSH (0.51 Trolox equi/ μ L Sample)。结果表明,变性处理组海参肠多肽确实具有一定的 ABTS⁺ 自由基清除能力。

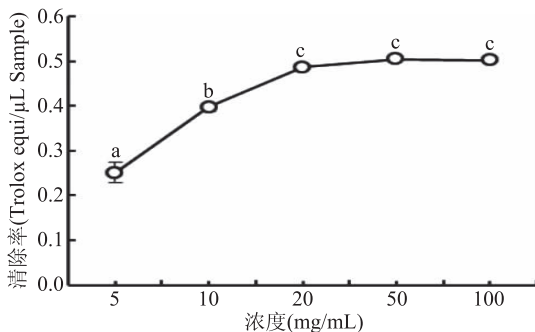


图4 变性处理组海参肠多肽的 ABTS 自由基清除率

Fig.4 ABTS free radical scavenging rate of *Stichopus japonicus* guts peptides (denaturated)

注:小写字母表示两组具有显著差异 ($p < 0.05$);图5 同。

2.7 变性处理组海参肠多肽的 DPPH 自由基清除率检测

检测结果见图5,海参肠多肽的 DPPH 自由基清除率在浓度低于 20 mg/mL 时呈现明显的剂量依赖性,其对 DPPH 自由基的清除效果均随浓度的提高显

著增加($p < 0.05$),最高达到90.95%。浓度为5 mg/mL时清除率为62.76%,与曹荣等^[27]的研究结果接近,但是低于同浓度的GSH(90.34%)。结果表明,变性处理组海参肠多肽确实具有一定的DPPH自由基清除能力。

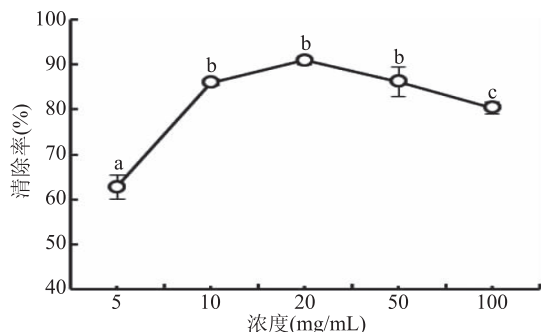


图5 变性处理组海参肠多肽的DPPH自由基清除率

Fig.5 DPPH free radical scavenging rate of *Stichopus japonicus* guts peptides (denatured)

3 结论

利用中性蛋白酶对海参肠进行酶解,可获得低分子量多肽,酶解效果比较好;海参肠经变性预处理后,水解度和肽得率均有显著提高($p < 0.05$),所得产物分子量集中于0.5~3 kDa,还原能力、ABTS⁺与DPPH自由基清除率检测结果证明其具有一定的抗氧化能力。上述结果为今后对变性处理后的海参肠水解液中的活性多肽进行分离、纯化以及序列鉴定打下了基础。

参考文献

- [1] 杨佳洪,黄义松,魏好程,等.海参内脏酶解工艺条件的优化[J].食品工业科技,2017,38(3):180-185.
- [2] 胡艳芳,董书君,续晓琪,等.3种低值海参中海参多糖的提取分离及化学组成研究[J].食品与发酵工业,2015,41(2):227-232.
- [3] Min J S, Dong K P, Moonjae C, et al. Anti-inflammatory and anti-allergic activities of sea cucumber (*Stichopus japonicus*) extract[J]. Food Science and Biotechnology, 2013, 22(6): 1661-1666.
- [4] Wang Z L, Zhang H W, Yuan W H, et al. Antifungal nortriterpene and triterpene glycosides from the sea cucumber *Apostichopus japonicus* Selenka[J]. Food Chemistry, 2012, 232(1): 295-300.
- [5] Morakot S, Peter J H, Tanapan S, et al. Nutritional components of the sea cucumber *Holothuria scabra* [J]. Functional Foods in Health and Disease, 2017, 7(3): 168-181.
- [6] Bitar F, Mohammad Z, Afshin E, et al. Purification and characterization of angiotensin converting enzyme-inhibitory peptides derived from *Stichopus horrens*: Stability study against the ACE and inhibition kinetics [J]. Journal of Functional Foods, 2016, 20(2): 276-290.
- [7] 付学军,金海珠.海参肽的抗氧化活性与分子量的相关性研究[J].食品科技,2013,38(7):63-67.
- [8] 周洁静,谢蓝华,杜冰.海参肠胶原蛋白酶解工艺及抗氧化性研究[J].食品安全质量检测学报,2013,4(5):

1401-1407.

- [9] Kim S K, Isuru W. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review [J]. Journal of Functional Foods, 2010, 2: 1-9.
- [10] Li T, Wang X M, Wang Y, et al. Characterization of antimicrobial peptides isolated from the processing by-products of African Catfish *Clarias gariepinus* [J]. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2017, 23(2): 227-233.
- [11] Zhang Y H, Ma L, Otte J. Optimization of hydrolysis conditions for production of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from basa fish skin using response surface methodology [J]. Journal of Aquatic Food Product Technology, 2016, 25(5): 684-693.
- [12] Yang F, Hu F Y, Jiang Q X, et al. Effect of Pretreatments on hydrolysis efficiency and antioxidative activity of hydrolysates produced from bighead carp (*Aristichthys nobilis*) [J]. Journal of Aquatic Food Product Technology, 2016, 25(6): 916-927.
- [13] Zhu B W, Zhao J G, Yang J F, et al. Purification and partial characterization of a novel β -1,3-glucanase from the gut of sea cucumber *Stichopus japonicus* [J]. Process Biochemistry, 2008, 43: 1102-1106.
- [14] 谷跃峰,丛丽娜,骆宁.海参溶菌酶基因克隆及在毕赤酵母中的表达与纯化[J].大连工业大学学报,2010,29(5):1674-1704.
- [15] 朱蓓薇,韩冰.海参自溶酶的分离纯化和部分性质研究[J].食品与发酵工业,2004(30):132-137.
- [16] 于蕾,朱蓓薇,孙黎明,等.海参肠道组织蛋白酶B粗酶提取条件的优化[J].大连工业大学学报,2010,29(6):409-412.
- [17] 黎源倩,孙长颢,叶蔚云,等.食品理化检验[M].北京:人民卫生出版社,2006:35-57.
- [18] 李建武,萧能康,余瑞元,等.生物化学实验原理和方法[M].北京:北京大学出版社,1994:174-175.
- [19] 朱社默,韩佳润,唐越,等.基于ESR体系的海参肠酶解物自由基清除活性研究[J].中国食品学报,2017,17(10):227-133.
- [20] Zhu B W, Qin L, Zhou D Y, et al. Extraction of lipid from sea urchin (*Strongylocentrotus nudus*) gonad by enzyme-assisted aqueous and supercritical carbon dioxide methods [J]. European Food Research and Technology, 2010, 230: 737-743.
- [21] 赵鸿霞.海珍品生物活性肽的研究[D].大连:大连工业大学,2010:5-10.
- [22] 金文刚.虾夷扇贝生殖腺水解物及其衍生物的功能特性研究[D].陕西:西北农林科技大学,2013:24-25.
- [23] 刘小芳,薛长湖,王玉明,等.乳山刺参体壁和内脏营养成分比较分析[J].水产学报,2011,35(4):587-593.
- [24] 韩佳润,李雪薇,赵晨晨,等.虾夷扇贝生殖腺酶解物核糖美拉德反应产物抗氧化特性研究[J].食品工业科技,2017,38(1):81-86.
- [25] 金文刚,吴海涛,朱蓓薇,等.虾夷扇贝生殖腺多肽的制备及分离[J].大连工业大学学报,2011,30(6):391-395.
- [26] 袁坤山,孙国琼,郑艺,等.酶解白虹海地瓜蛋白制备抗氧化肽的工艺研究[J].食品科技,2014,39(7):76-83.
- [27] 曹荣,李冬燕,刘淇,等.刺身肠、性腺酶解多肽体外抗氧化作用研究[J].南方水产科学,2013,9(6):47-51.