

金鲳鱼内脏酸性蛋白酶的 分离纯化及酶学性质研究

张培, 申铨日*, 李川*, 段庆飞, 王科威
(海南大学食品学院, 海南海口 570228)

摘要: 以金鲳鱼内脏为原料, 依次采用 pH7.0 的磷酸钠缓冲液浸提、0~55% 硫酸铵沉淀、Sephadex G-100 和 Sephadex G-50 凝胶过滤法得到纯化的酸性蛋白酶, 并研究了其酶学性质。结果表明, 纯化酶的分子量为 18.5 ku, 最适 pH 为 4.0, 最适温度为 35 °C, 具有较好的酸稳定性和耐盐能力; 以血红蛋白为底物时, 该蛋白酶的米氏常数 K_m 为 10.13 g/L; 胃蛋白酶抑制剂 (pepstatin A) 对该酶活性有抑制作用, 而乙二胺四乙酸 (EDTA)、反-环氧丁二酰基-L-亮氨酸胺基 (4-胍基) 丁烷 (E-64) 和苯甲基磺酰氟 (PMSF) 对此酶活性基本无影响, 据此推断该蛋白酶是一种天冬氨酸蛋白酶; 此酶对罗非鱼皮明胶的酶解能力强于猪胃蛋白酶, 与木瓜蛋白酶和碱性蛋白酶的能力相近。

关键词: 金鲳鱼, 内脏, 酸性蛋白酶, 酶学性质

Isolation, purification and enzymatic characterization of acid protease from golden pompano viscera

ZHANG Pei, SHEN Xuan-ri*, LI Chuan*, DUAN Qing-fei, WANG Ke-wei

(College of Food Science and Technology, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: Golden pompano viscera was taken as raw material in the present study. Acid protease was obtained by homogenation of tissue in sodium phosphate buffer (pH7.0), precipitation by 0~55% ammonium sulfate, Sephadex G-100 gel and Sephadex G-50 gel. Then the enzymatic characterization was also studied. The experimental results showed that the molecular weight of purification enzyme was 18.5 ku, the optimum pH was 4.0 and the most suitable temperature was 35 °C. It had good acid stability and salt tolerance. Using hemoglobin as a substrate, the K_m was 10.13 g/L. Pepstatin A inhibited the enzyme, while EDTA, E-64 and PMSF had no influence on the enzyme, which indicated that this enzyme was probably aspartic proteinase. It had the similar hydrolysis ability of gelatin of tilapia fish skin to papain and alkaline protease, and stronger than porcine pepsin.

Key words: golden pompano; viscera; acid protease; characterization

中图分类号: TS254.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2017)02-0210-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2017.02.032

蛋白酶是市场上需求最大的三种酶之一^[1], 在食品^[2]、药品^[3]和化工^[4]等方面都有着广泛的应用。蛋白酶主要来源是陆生动物、植物和微生物, 但来源于海洋和其他水生动物的蛋白酶并没有被广泛应用。有研究报道指出, 一些水生来源蛋白酶在大范围 pH 和温度条件下都具有高活性, 在食品加工中具有广泛的应用前景^[5]。

食品加工行业对鱼类蛋白水解酶的需求量日益增加。鱼内脏是水产品的加工过程中产生的主要副产品之一, 可作为提取蛋白酶的重要来源。鱼内脏

中主要的消化蛋白酶是天冬氨酸蛋白酶(如胃蛋白酶)和丝氨酸蛋白酶(如胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶和胶原酶)。酸性蛋白酶最适活性在 pH2.0~4.0 之间, 而碱性蛋白酶最适活性在 pH8.0~10.0 之间^[6]。天冬氨酸蛋白酶一般在酸性或中性 pH 范围内呈现活性, 并且在活性位点都包含两个天冬氨酸残基^[7]。目前, 国内外学者已经从沙丁鱼^[8]、鲈鱼^[9]和黄鲷^[7]等鱼类内脏器官中分离出了天冬氨酸蛋白酶。

金鲳鱼是我国南方沿海重要的海产经济鱼类之一, 其鱼肉细嫩, 味道鲜美, 国内市场对金鲳鱼的需

收稿日期: 2016-08-09

作者简介: 张培(1993-) 男, 硕士研究生, 研究方向: 水产资源高效利用技术, E-mail: zhangpeilzx2014@163.com。

* 通讯作者: 申铨日(1968-) 男, 博士, 教授, 研究方向: 海洋生物资源利用、食品科学、组织工程学, E-mail: shenxuanri2009@163.com。

李川(1986-) 男, 博士, 讲师, 研究方向: 热带水产品的精深加工、食品营养与功能评价, E-mail: lichuanbest@126.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31260376); 海南省科协青年科技英才学术创新计划项目(HAST201624); 海南大学科研启动基金项目(KYQD1609)。

求不断上升。目前,对于金鲳鱼内脏酶类资源的开发利用研究较少。本实验将对金鲳鱼内脏蛋白酶进行分离纯化,并对分离纯化的酸性蛋白酶性质进行初步研究,为该酶的进一步开发应用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新鲜金鲳鱼 海口沿江三路市场;蛋白质标准品 美国 Thermo Fisher 公司;胃蛋白酶(1200 U/g) 国药集团化学试剂有限公司;木瓜蛋白酶(2000 U/mg)、碱性蛋白酶(200 U/mg) 西宁庞博生物工程有限公司;Sephadex G-100、Sephadex G-50 北京瑞达恒辉科技发展有限公司;牛血红蛋白、E-64、pepstatin A、PMSF 美国 Sigma 公司;其他试剂 均为国产分析纯。

ST-16R 高速冷冻离心机 美国 Thermo Fisher 公司;HH-4 数显恒温水浴锅 常州奥华仪器有限公司;TV-1900/TV-1901 双光束紫外可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司;DYY-2C 电泳仪 北京市六一仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 粗酶提取物的制备 粗酶提取物的制备参考肖鑫鑫等^[10]的方法作适当修改。具体方法如下:新鲜的金鲳鱼即杀后取内脏(46 g)使用冷蒸馏水洗净,将内脏切成小段,加入预冷的三倍体积 50 mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH7.0)进行匀浆,置于 4 ℃ 下浸提 3 h,离心(10000 × g, 15 min),所得上清液即为金鲳鱼内脏粗酶提取物。

1.2.2 分离纯化

1.2.2.1 硫酸铵沉淀 金鲳鱼内脏粗酶粗提物(155 mL)经 0~55% 饱和度硫酸铵沉淀后,在 4 ℃, 10000 × g 下离心 15 min,沉淀溶解在 5 mL 的 50 mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH7.0)中,然后在 4 ℃ 的蒸馏水中透析 24 h,每 8 h 换一次蒸馏水。

1.2.2.2 Sephadex G-100 凝胶过滤层析 透析液上样于 Sephadex G-100 凝胶柱(1.6 cm × 100 cm),采用 50 mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH7.0)进行平衡,并用相同的缓冲液洗脱,流速为 1.2 mL/min 3.6 mL/管,检测波长为 280 nm,收集活性峰。在冷蒸馏水中透析 12 h 后冷冻干燥。

1.2.2.3 Sephadex G-50 凝胶过滤层析 将冻干样品溶解于 2 mL 50 mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH7.0)中,上样于 Sephadex G-50 凝胶柱(1.6 cm × 100 cm),采用 50 mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH7.0)平衡柱子,并用相同缓冲液进行洗脱,流速为 1.2 mL/min 3.6 mL/管,检测波长为 280 nm,收集活性峰。在冷蒸馏水中透析 12 h 后冷冻干燥。

1.2.3 酶活测定 蛋白酶活性的测定参考 Anson 等^[11]的方法并适当修改,具体测定方法如下:50 μL 酶液与 500 μL 0.1 mol/L 甘氨酸-HCl 缓冲液(pH4.0)混合,加入 500 μL 2% 酸变性牛血红蛋白后开始反应。在 35 ℃ 下孵育 20 min 后,混合物添加 500 μL 的 20.0% 三氯乙酸(TCA),然后在 10000 × g 下离心 10 min。上清液在 280 nm 下测定吸光度。在

上述反应体系中,将 20 min 内蛋白酶消化底物使其上清液吸光度增加 1.0 定义为一个酶活单位。蛋白酶活重复测定,重复样本间的差异小于 5%;中间值被采用。

1.2.4 蛋白含量测定 以牛血清白蛋白为标准样品,按 Lowry 法^[12]进行测定。

1.2.5 蛋白酶分子量测定 根据 Laemmli 法^[13]采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)测定,分离胶浓度为 12.5%。

1.2.6 最适 pH 和温度 在 35 ℃ 下,以 2% 牛血红蛋白作为底物, pH1.0~7.0 的范围内测定酶活来确定酶的最适 pH。在 pH4.0, 20~60 ℃ 的不同温度条件下测定酶活,计算相对酶活来确定最适温度。最适 pH 和温度下的酶活设定为 100%。选用的缓冲液体系为:100 mmol/L 甘氨酸-HCl 缓冲液, pH1.0~4.0; 100 mmol/L 乙酸-乙酸钠缓冲液, pH5.0~6.0; 100 mmol/L 磷酸缓冲液, pH7.0。

1.2.7 pH 稳定性和热稳定性 将酶置于不同 pH 环境中处理 30 min 后,在 35 ℃ 下,以 2% 牛血红蛋白为底物,测定酶液残余活力,以确定金鲳鱼内脏酸性蛋白酶 pH 稳定性。酶液分别在 20、30、35、40、50、60 ℃ 条件下处理 30 min 后,测定酶液残余活力,以确定金鲳鱼内脏酸性蛋白酶热稳定性。

1.2.8 NaCl 浓度对酶活的影响 分别测定 NaCl 浓度为 5%、10%、15%、20% 和 25% 条件下的酶活,不加 NaCl 作为空白对照组,对应的酶活设定为 100%。

1.2.9 米氏常数 K_m 的测定 在 35 ℃, pH4.0 的条件下分别以质量浓度为 5、4、3、2、1、0.5 g/L 的血红蛋白溶液为底物,用双倒数作图法(Lineweaver-Burk 法)作图 $y=0$ 时的 x 负倒数即为 K_m 值。

1.2.10 抑制剂对酶活的影响 分别添加四种不同类型的蛋白酶抑制剂(pepstatin A、E-64、EDTA 和 PMSF)到酶液中,使其终浓度分别为:0.1 mg/mL、0.1 mg/mL、5 mmol/L 和 5 mmol/L。混合物 35 ℃ 下放置 30 min 后,以血红蛋白为底物分别测定其相对活力,以不添加抑制剂的酶液活性作为对照,设为 100%。

1.2.11 几种不同蛋白酶对罗非鱼鱼皮明胶酶解能力研究 罗非鱼鱼皮明胶采用郭培等^[14]的方法制备。取 1 mL 浓度为 10 mg/mL 的罗非鱼皮明胶溶液,加入 0.85 U 的金鲳鱼内脏酸性蛋白酶、猪胃蛋白酶、木瓜蛋白酶和碱性蛋白酶,然后在各自适宜的 pH 和温度(金鲳鱼内脏酸性蛋白酶为 pH4.0, 35 ℃;猪胃蛋白酶为 pH2.0, 37 ℃;木瓜蛋白酶为 pH6.0, 50 ℃;碱性蛋白酶为 pH10.0, 50 ℃)下反应 60 min 后,煮沸 3 min 终止反应。用分离胶为 7.5%, 浓缩胶为 4.5% 的 SDS-PAGE 检测反应后的分子量分布。

1.2.12 统计分析 每组实验分别进行三次独立的重复实验,用 SPSS 19.0 for Windows 软件对数据进行方差分析。采用 Origin 7.5 软件制图。

2 结果与分析

2.1 金鲳鱼内脏酸性蛋白酶的分离纯化

金鲳鱼内脏粗提物经 0~55% 饱和度的硫酸铵沉淀后,运用 Sephadex G-100 层析柱洗脱,如图 1(A)

表1 金鲷鱼内脏酸性蛋白酶纯化表

Table 1 Summary of purification procedures of acid protease from golden pompano viscera

纯化步骤	总酶活(U)	总蛋白含量(mg)	比活力(U/mg)	得率(%)	纯化倍数
粗提物	2760.18	1074	2.57	100	1
0~55% (NH ₄) ₂ SO ₄ 沉淀	1192.46	270.4	4.41	43.20	1.71
Sephadex G-100	836.65	57.94	14.44	30.31	5.62
Sephadex G-50	578.36	12.65	45.72	20.95	17.79

得到5个蛋白峰,第1个峰酶活最高,合并活性峰组分,透析冻干后,上样于Sephadex G-50层析柱,如图1(B)所示,得到3个蛋白峰,收集合并活性最高峰峰1,透析冻干后备用。

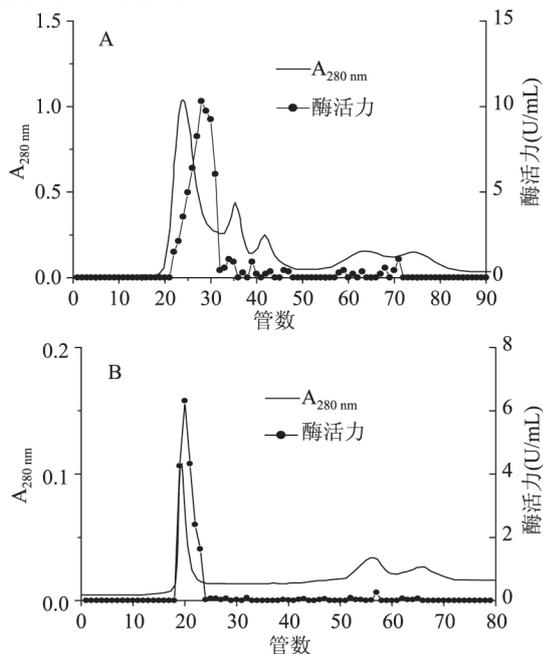


图1 金鲷鱼内脏酸性蛋白酶的纯化图

Fig.1 Sephadex G-100(A) Sephadex G-50(B) column chromatographic profiles for purification of acid protease from golden pompano viscera

注: A: Sephadex G-100 凝胶层析;

B: Sephadex G-50 凝胶层析。

纯化实验结果如表1所示,经过硫酸铵盐析、Sephadex G-100和Sephadex G-50凝胶过滤等一系列步骤纯化后,得到12.65 mg蛋白,酶活得率为20.95%,纯化倍数为17.79。Khaled等^[8]从沙丁鱼内脏中分离出的天冬氨酸蛋白酶得率为23.3%,纯化倍数为9.47。林建城等^[15]从日本鳗鲡肠道中分离出蛋白酶得率为42.01%,纯化倍数为18.12。实验中纯化得率较低可能是由于分离纯化过程没有达到最优,造成蛋白酶的损失。

SDS-PAGE结果如图2所示,考马斯亮蓝染色显示一条蛋白带,纯化酶相对分子量约为18.5 ku。该分子量低于黄鲮^[16]胃部蛋白酶(36 ku)和鲑鱼^[17]肝胰腺中组织蛋白酶D(36.5 ku)的分子量。与Khaled等^[8]从沙丁鱼内脏中提取的天冬氨酸蛋白酶分子量接近(17 ku)。

2.2 pH对纯化酶酶活及稳定性的影响

如图3最适pH曲线所示,纯化酶在pH4.0酶活

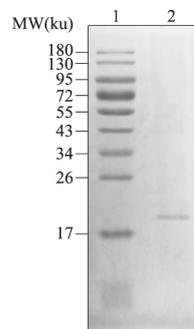


图2 金鲷鱼内脏酸性蛋白酶的 SDS-PAGE

Fig.2 SDS-PAGE of acid protease

from golden pompano viscera

注: 1: 蛋白 Marker; 2: 纯化酶。

达到最大值,说明该酶的最适pH为4.0,为酸性蛋白酶。随着pH的升高,金鲷鱼内脏酸性蛋白酶在pH1.0~4.0范围内活性逐渐增加;在pH4.0~7.0范围内活性逐渐减小。pH为1.0和7.0时酶活较低,推测可能由于蛋白酶在强酸和中性条件下,自身所带电荷数改变从而导致蛋白构象发生变化引起。

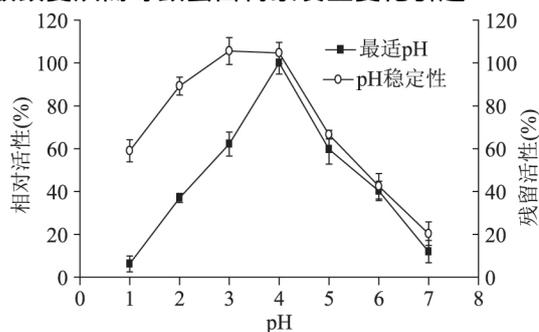


图3 pH对纯化酶酶活及稳定性的影响

Fig.3 The effect of pH on the activity and stability of purified protease

如图3 pH稳定性曲线所示,纯化酶在偏酸性环境下有较高的稳定性,在35℃下孵育30 min后,在pH1.0~5.0范围内酶活维持了初始活性的60%以上。这与之前的研究结果相符,Khaled等^[8]从沙丁鱼中提取出一种酸性蛋白酶在pH1.0~5.0条件下稳定。

2.3 温度对纯化酶的酶活及稳定性影响

金鲷鱼内脏酸性蛋白酶的温度曲线如图4所示。在35℃下达到最大值,说明其最适温度为35℃。随着温度的升高,金鲷鱼内脏酸性蛋白酶在20~35℃范围内活性逐渐增加;在35~60℃范围内活性逐渐减小。该酶最适温度低于长鳍金枪鱼^[18](50℃)和海鲷^[19](45℃)酸性蛋白酶,与欧洲鳗鲡^[20](35℃)酸性蛋白酶相同。最适温度的不同可

能与生长环境和物种导致的酶构效差异有关。

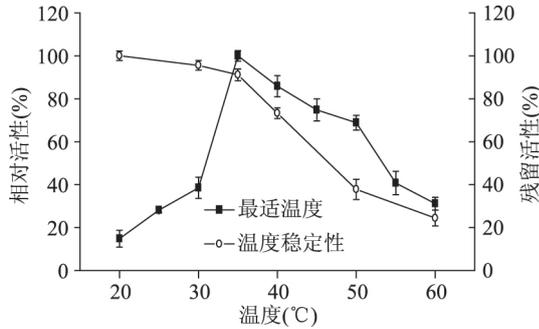


图4 温度对纯化酶酶活及稳定性的影响

Fig.4 The effect of temperature on the activity and stability of purified protease

热稳定性曲线如图4所示。金鲳鱼内脏酸性蛋白酶表现出一定的耐热性,20~40℃时孵育30 min仍保持60%以上的活性。温度高于40℃,酶活急剧下降。60℃下残留活性降至24.4%。

2.4 NaCl 浓度对酶活的影响

NaCl 浓度对金鲳鱼内脏酸性蛋白酶酶活的影响如图5所示。随着 NaCl 浓度的增加,酶活逐渐降低。当 NaCl 浓度为10%时,相对活性为60.27%;浓度为25%时,相对活性降至31.5%。活性降低可能由于 NaCl 浓度增加引起“盐析”作用有关。高浓度的氯化钠可能与酶竞争水结合,导致更强的蛋白质-蛋白质相互作用,从而引起沉淀。Khaled 等^[8]报道了沙丁鱼纯化酶在10% NaCl 浓度下相对活性降为20%。Klomkiao 等^[21]也报道了一种鳕鱼胃中提取的两种蛋白酶活性随着 NaCl 浓度的升高而活性降低。

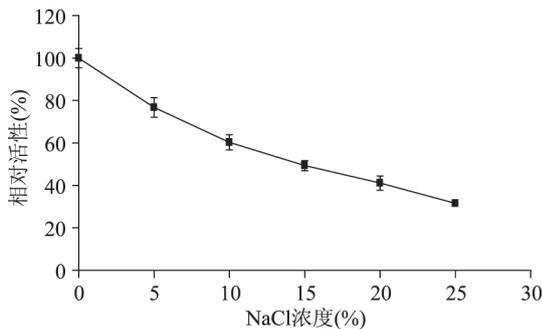


图5 NaCl 浓度对纯化酶酶活的影响

Fig.5 The effect of NaCl concentration on the activity of purified protease

2.5 酶的米氏常数 K_m

通过测定不同底物浓度下的反应速度,可以确定酶催化反应的米氏常数 K_m 。采用双倒数作图法(Lineweaver-Burk 法),以 $1/V$ 为纵坐标, $1/[S]$ 为横坐标作图。如图6所示,金鲳鱼内脏酸性蛋白酶的 K_m 为 10.13 g/L。

2.6 抑制剂对酶活的影响

不同抑制剂对金鲳鱼内脏酸性蛋白酶活性的影响如表2所示。Pepstatin A(天冬氨酸蛋白酶抑制剂)对纯化酶活性有强烈抑制作用,说明该酶活性中心具有天冬氨酸残基,是一种天冬氨酸蛋白酶;E-64(半胱氨酸蛋白酶抑制剂)、EDTA(金属蛋白酶抑制

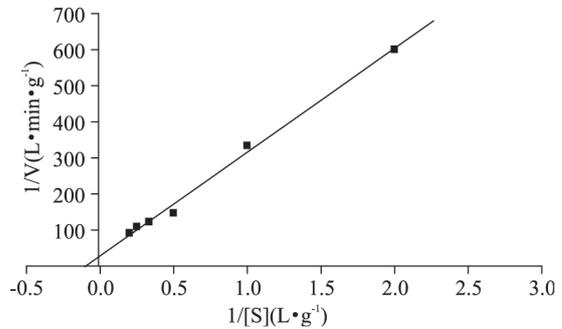


图6 Lineweaver-Burk 图

Fig.6 Lineweaver-Burk

剂)和PMSF(丝氨酸蛋白酶抑制剂)对纯化酶活力基本无影响,说明该酶可能不属于半胱氨酸蛋白酶、金属蛋白酶和丝氨酸蛋白酶。

表2 不同抑制剂对金鲳鱼内脏酸性蛋白酶活性的影响

Table 2 Effect of inhibitors on activity of acid protease

from golden pompano viscera

抑制剂	终浓度	相对活性(%)
-	-	100
Pepstatin A	0.1 mg/mL	ND
E-64	0.1 mg/mL	99.42 ± 0.40
EDTA	5 mmol/L	82.20 ± 3.04
PMSF	5 mmol/L	80.95 ± 0.91

注: ND 代表未检出。

2.7 几种不同蛋白酶对罗非鱼鱼皮明胶酶解能力研究

图7为利用不同蛋白酶酶解罗非鱼鱼皮明胶获得的明胶水解产物的电泳图,如泳道1所示,不添加酶的罗非鱼鱼皮明胶电泳图上方有胶原蛋白特征的3条带,分别为 α_1 、 α_2 和 β 链。分析试样2~5的电泳条带可知,添加酶反应60 min后,大分子量条带均呈现不同程度的水解现象。其中金鲳鱼内脏酸性蛋白酶处理的明胶水解产物与猪胃蛋白酶处理组相比分子量更小,说明金鲳鱼内脏蛋白酶对罗非鱼明胶的酶解能力强于胃蛋白酶。该结果与肖鑫鑫等^[10]的实验结果相似。内脏酸性蛋白酶处理的明胶水解产物

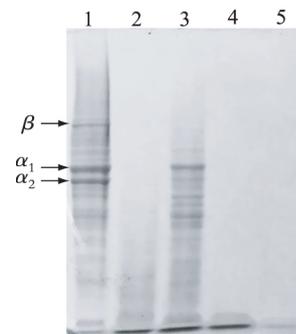


图7 罗非鱼鱼皮明胶酶解产物电泳图

Fig.7 SDS-PAGE of Tilapia skin gelatin hydrolysates

注: 1: 未添加酶的罗非鱼鱼皮明胶;

2: 纯化酶处理明胶; 3: 猪胃蛋白酶处理明胶;

4: 木瓜蛋白酶处理明胶; 5: 碱性蛋白酶处理明胶。

与木瓜蛋白酶和碱性蛋白酶处理组相近,说明金鲳鱼内脏蛋白酶对罗非鱼明胶的酶解能力与木瓜蛋白酶和碱性蛋白酶相似。酶法是制备明胶水解产物的方法之一,酶促水解得到的水解明胶分子量分布较窄,容易被人体吸收。Ngo 等^[22]使用不同的蛋白酶酶解罗非鱼鱼鳞明胶制备出具有抗氧化活性的水解产物。本实验可为金鲳鱼内脏蛋白酶制备小分子胶原蛋白肽的应用方面提供参考。

3 结论

本研究经纯化得到的金鲳鱼内脏酸性蛋白酶比酶活为 45.72 U/mg,纯化倍数为 17.79,回收率为 20.95%; SDS-PAGE 测定该酶的分子量约为 18.5 ku。金鲳鱼内脏酸性蛋白酶的最适 pH 为 4.0,最适温度为 35 ℃,具有较好的酸稳定性和耐盐能力。该酶的米氏常数 K_m 为 10.13 g/L,天冬氨酸蛋白酶抑制剂 Pepstatin A 能强烈抑制其酶活,而 E-64、EDTA 和 PMSF 对其基本没有抑制效果,说明该酶属于天冬氨酸蛋白酶类。用纯化得到的金鲳鱼内脏酸性蛋白酶酶解罗非鱼鱼皮明胶,结果发现其酶解能力强于猪胃蛋白酶,与木瓜蛋白酶和碱性蛋白酶相似。本文为金鲳鱼内脏酸性蛋白酶的进一步应用提供依据。

参考文献

- [1] 吴燕燕,李来好,郝志明,等.罗非鱼肠蛋白酶的分离纯化及其性质[J].水产学报,2010,34(3):357-366.
- [2] 何林玲,何贝,张霞.蛋白酶在食品加工中的应用进展研究[J].食品工程,2014(1):12-14.
- [3] Fujishiro M, Oka M, Yahagi N, et al. Correlation of serum pepsinogens and gross appearances combined with histology in early gastric cancer[J]. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research Cr, 2006, 25(2): 207-212.
- [4] 赵昌俊.蛋白酶在洗衣皂中的应用研究[D].广州:华南理工大学,2015.
- [5] Jellouli, Bougateg K, Daassi A, et al. New alkaline trypsin from the intestine of Grey triggerfish (*Balistes caprisicus*) with high activity at low temperature: Purification and characterization[J]. Food Chemistry, 2009(3): 664-650.
- [6] Khaled H B, Bougateg A, Balti R, et al. Isolation and characterisation of trypsin from sardinelle (*Sardinella aurita*) viscera[J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2008, 88(15): 2654-2662.
- [7] 吴涛.黄鳍和欧洲鳗鲡胃蛋白酶原的分离纯化与酶的性质研究[D].厦门:集美大学,2009.
- [8] Khaled H B, Ghorbel-Bellaaj O, Hmidet N, et al. A novel aspartic protease from the viscera of Sardinelle (*Sardinella aurita*): Purification and characterisation[J]. Food Chemistry, 2011, 128(4): 847-853.
- [9] Miura Y, Kageyama T, Moriyama A. Pepsinogens and pepsins from largemouth bass, *Micropterus salmoides*: Purification and characterization with special reference to high proteolytic activities of bass enzymes[J]. Comparative Biochemistry & Physiology Part B Biochemistry & Molecular Biology, 2015, 183: 42-48.
- [10] 肖鑫鑫,申铨日,张培.金鲳鱼内脏复合蛋白酶的分离及酶学性质研究[J].食品科技,2015(9):140-145.
- [11] Anson M L. The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin[J]. The Journal of General Physiology, 1938, 22: 79-89.
- [12] Lowry Q H, Rosebrough N J, Farr L A, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent[J]. Journal of Biological Chemistry, 1951, 193: 256-275.
- [13] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227(5259): 680-685.
- [14] 郭培,申铨日,徐翠红,等.一种添加鱼皮明胶的罗非鱼鱼碎肉鱼糜制品的配方研究[J].食品科技,2015(9):128-132.
- [15] 林建城,王国玲,闵志勇.日本鳗鲡肠道蛋白酶的分离纯化及其酶学性质研究[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2015,43(1):45-52.
- [16] Weng W Y, Wu T, Chen W Q, et al. Purification and characterization of pepsinogens and pepsins from the stomach of rice field eel (*Monopterus albus* Zuiew) [J]. Fish Physiology & Biochemistry, 2011, 37(3): 543-552.
- [17] Komai T, Kawabata C, Amano M, et al. Todarepsin, a new cathepsin D from hepatopancreas of Japanese common squid (*Todarodes pacificus*) [J]. Comparative Biochemistry & Physiology Part B Biochemistry & Molecular Biology, 2004, 137(3): 373-382.
- [18] Nalinanon S, Benjakul S, Kishimura H. Biochemical properties of pepsinogen and pepsin from the stomach of albacore tuna (*Thunnus alalunga*) [J]. Food Chemistry, 2010, 121(1): 49-55.
- [19] Zhou Q, Fu X P, Zhang L J, et al. Purification and characterization of sea bream (*Sparus latus* Houttuyn) pepsinogens and pepsins[J]. Food Chemistry, 2007, 103(3): 795-801.
- [20] Wu T, Sun L C, Du C H, et al. Identification of pepsinogens and pepsins from the stomach of European eel (*Anguilla anguilla*) [J]. Food Chemistry, 2009, 115(1): 137-142.
- [21] Klomklao S, Kishimura H, Yabe M, et al. Purification and characterization of two pepsins from the stomach of pectoral rattail (*Coryphaenoides pectoralis*) [J]. Comparative Biochemistry & Physiology Part B, 2007, 147(4): 682-689.
- [22] Ngo D H, Qian Z J, Ryu B M, et al. *In vitro* antioxidant activity of a peptide isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) scale gelatin in free radical-mediated oxidative systems [J]. Journal of Functional Foods, 2010, 2(2): 107-117.

欢迎订阅《食品工业科技》