

# 酶法进行海洋低值蛋白资源高值化利用初探\*

师晓栋 何海伦 王运涛 张玉忠 高培基

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

**摘要** 首先分析了鳀鱼与四角蛤两种低值海洋蛋白资源的营养成分,然后利用两株高产蛋白酶菌株通过液体发酵制备的蛋白酶制剂对两种蛋白资源进行了酶解,经过比较酶解率和肽含量,表明对于四角蛤,菌株 SM98013 产生的碱性蛋白酶和 SM98011 产生的中性蛋白酶都可高效酶解;而对于鳀鱼,菌株 SM98013 产生的碱性蛋白酶的酶解效率较高。文中对海洋低值蛋白资源的高值化利用的途径进行了讨论。

**关键词** 低值海洋蛋白资源,蛋白酶,酶解

我国海洋生物资源蕴藏量十分丰富,其中海洋蛋白资源种类尤其繁多,由于海洋环境不同于陆地环境,为适应某些极端生境,海洋生物蛋白无论是氨基酸组成还是氨基酸序列上都与陆地蛋白有很大不同。向海洋索取食物、功能蛋白和特殊活性物质,已成为世界各沿海国家海洋开发的一项重要内容。我国每年捕获的低值海产品产量十分丰富,目前主要用来制作鱼粉等低值产品,产品的得率和附加值没有得到有效的提高,并且在一定程度上造成了对海洋环境的严重污染<sup>[1]</sup>。

本文在对两种低值海洋蛋白资源营养成分进行分析的基础之上,将酶工程技术应用于海洋蛋白资源的酶解效应研究,试图为开发源于海洋蛋白的活性肽,促进低值海洋蛋白资源高值化利用探索有效途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本文选用两种低值海洋蛋白资源鳀鱼 (*Engraulis japonicus*) 和四角蛤 (*Mactra veneriformis* Deshayes), 鳀鱼捕自山东荣成海域, 四角蛤捕自山东无棣近海水

域。

### 1.2 蛋白酶制剂的制备

以高产中性和碱性蛋白酶的枯草芽孢杆菌菌株 *Bacillus subtilis* SM98011 和 *Bacillus subtilis* SM98013 为菌株,通过液体摇瓶发酵制备蛋白酶制剂,产酶培养基参照文献[2,3]的方法,转速 220 r/min, 35℃ 下通风培养。

### 1.3 营养成分分析

粗蛋白、粗脂肪、粗纤维、灰分、总磷、钙的测定按文献[4]中的国标规定的方法进行;水分测定:冷冻干燥法;氨基酸测定见文献[5];蛋白酶活测定方法见文献[3]。

蛋白酶解率:酶解液氨基酸总量/底物蛋白总氨基酸含量 × 100%

### 1.4 海洋蛋白资源的酶解

1.4.1 工艺流程见图 1。

1.4.2 酶解处理

\* 国家海洋 863 计划海洋生物技术主题资助项目 819-02-2 号。

收稿日期:2000-12-19;修回日期:2001-01-08

鳀鱼去头去尾去骨等不可食部分,四角蛤去壳,洗净后粉碎成肉糜。肉糜和酶液为1:1(鲜重/体积);酶解液的pH:中性蛋白酶为7.2,碱性蛋白酶9.5;酶解温度:中性蛋白酶40℃,碱性蛋白酶50℃;酶解时间4h。酶解完毕后80℃下15min灭酶活。

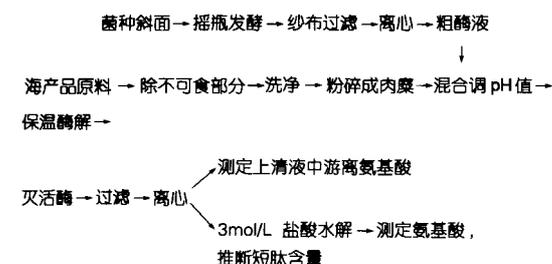


图1 工艺流程  
Fig.1 Technological process

## 2 结果与分析

### 2.1 鳀鱼、四角蛤的营养成分

鳀鱼和四角蛤的含水量分别为70.90%、85.68%,都在2/3以上。鳀鱼的蛋白含量占干物质的一半以上,并且脂肪含量很高,达到干重的近30%,这可能是鳀鱼离水后容易腐烂的原因之一。朱碧英等<sup>[6]</sup>报道鳀鱼油中多元不饱和脂肪酸含量很高达到26%,其中最具有生理功能活性的二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA)占鱼油总量的21%左右<sup>[6]</sup>,作者测定的结果与之相近(结果未列出),所以鳀鱼油的制取分离开发技术的研究也是前景广阔。四角蛤中蛋白含量也比较高,至今未被很好地开发利用,是一种具有开发潜力的海洋蛋白资源。

表1 两种海产品的营养成分(%,干重)  
Tab.1 The contents of nutrition component in the two kinds of marine products

种类	粗蛋白	总磷	钙含量	粗脂肪	粗纤维	灰分
鳀鱼	52.50	2.39	2.28	29.81	2.64	14.60
四角蛤	42.84	0.95	1.78	10.51	3.23	19.53

### 2.2 鳀鱼、四角蛤的氨基酸组成

从表2可以看出,两种海产品均含有牛磺酸(TAU),尤其以四角蛤含量较高,高达干物质的4.91%,此种含硫氨基酸对婴幼儿的发育具有重要的作用,所以廉价的四角蛤可用来生产此种高营养氨基酸。此外,两种海洋蛋白源8种人体必需氨基酸齐全,鳀鱼中必需氨基酸含量占到总氨基酸的44.60%,四

角蛤占到33.77%,并且比例合理。由于成人必需氨基酸的需要量约为蛋白质需要量的20%,学龄儿童与婴儿食物中必需氨基酸要求含量在30%以上<sup>[7]</sup>,这两种海产品经过酶工程技术的加工处理,可制成人类,特别是儿童的很好的蛋白食物。

表2 两种海产品的氨基酸含量( $\times 10^{-2}$ ,干重)  
Tab.2 The contents of amino acid in the two kinds of marine products ( $\times 10^{-2}$ ,干重)

氨基酸种类	氨基酸含量(%,干重)	
	鳀鱼	四角蛤
牛磺酸	0.851	4.91
天冬氨酸	2.91	2.66
苏氨酸	2.71	2.24
丝氨酸	6.42	3.33
谷氨酸	8.86	4.84
甘氨酸	2.61	2.28
丙氨酸	0.03	2.09
半胱氨酸	0.19	0.55
缬氨酸	2.31	1.38
甲硫氨酸	2.01	0.91
异亮氨酸	4.99	2.38
亮氨酸	4.43	1.99
酪氨酸	1.58	0.67
苯丙氨酸	2.06	1.23
赖氨酸	4.34	2.12
组氨酸	1.54	0.67
精氨酸	3.91	2.95
色氨酸	0.42	0.47
总计	52.16	37.65

### 2.3 高产蛋白酶菌株SM98013和SM98011的产酶特性

如表3所示,本室保存的两株菌产酶最佳时间有所不同,产碱性蛋白酶的SM98013菌株,产酶时间比较滞后,控制培养的先后顺序可以同时得到较高酶活的发酵液。在最适酶活温度下,保温4h,仍保持50%的酶活性,因此,确定碱性蛋白酶的酶解条件为:反应介质的pH值9.5,酶解温度50℃,酶解时间4h。中性蛋白酶的酶解条件为:反应介质的pH值为7.2,酶解温度40℃,酶解时间4h。

### 2.4 两种蛋白酶对两种海产品的酶解效果

#### 2.4.1 酶解效率

从表4可以看出,碱性蛋白酶对四角蛤的酶解效率与中性蛋白酶相近,都在60%以上,但碱性蛋白酶比中性蛋白酶对鳀鱼酶解效率高15%左右。因此,从酶解效率看,中性和碱性蛋白酶都可用做四角蛤的酶

解用酶,而对于鳀鱼酶解而言,碱性蛋白酶更适合。

### 2.3.2 酶解产物中肽含量

从表5中可以看出,对于四角蛤,中性和碱性蛋白酶酶解之后,肽含量差不多,说明在酶解条件充分的情况下,两种蛋白酶酶解四角蛤后得到的游离氨基酸和肽的能力比较近似。

从表6可以看出,虽然碱性蛋白酶比中性蛋白酶对鳀鱼的酶解效率高,碱性蛋白酶酶解物中肽含量比中性蛋白酶酶解物中肽的含量

少。因此,对鳀鱼进行酶解,如果以充分酶解为目的,可选用碱性蛋白酶,如果以短肽为目的,S M98011产

生的中性蛋白酶更适合。

## 3 讨论

表3 两株菌的产蛋白酶条件

Tab.3 The conditions for the protease excretion in the two strains of bacteria

菌种	最适产酶温度 ( $^{\circ}\text{C}$ )	培养时间 (h)	最高酶活 (IU/ml)	最适酶解温度 ( $^{\circ}\text{C}$ )	最适 pH
S M98013	37	50 ~ 55	6 897	50	9.5
S M98011	35	37 ~ 40	4 700	40	7.2

表4 两种蛋白酶对两种海产品的酶解效率的比较

Tab.4 Comparison of enzymatic hydrolysis efficiency of the two marine products by the two kinds of proteases

原料	总氨基酸含量 ( $\times 10^{-3}$ ,鲜重)	中性蛋白酶酶解		碱性蛋白酶酶解	
		酶解部分的 氨基酸含量 ( $\times 10^{-3}$ )	酶解率 (%)	酶解部分的 氨基酸含量 ( $\times 10^{-3}$ ,鲜重)	酶解率 (%)
四角蛤	54.20	34.58	63.80	37.70	69.56
鳀鱼	152.61	43.10	28.24	66.10	43.31

表5 两种蛋白酶的四角蛤酶解液中游离氨基酸和短肽含量的比较

Tab.5 Comparison of the contents of free amino acids and peptides in the hydrolysate solution of *Macra veneris formis* Deshayes by the two kinds of proteases

氨基酸 种类	中性蛋白酶酶解		碱性蛋白酶酶解	
	游离氨基 酸含量 (mg/ml)	酸解后氨 基酸含量 (mg/ml)	游离氨基 酸含量 (mg/ml)	酸解后氨 基酸含量 (mg/ml)
牛磺酸	0.852	4.648	0.513	0.719
天冬氨酸	0.691	2.385	0.353	3.556
苏氨酸	1.140	1.239	0.839	1.647
丝氨酸	0.300	1.182	0.678	1.618
谷氨酸	/	4.109	1.742	5.519
甘氨酸	0.979	1.809	0.453	1.785
丙氨酸	/	1.635	1.385	2.299
半胱氨酸	1.087	0.372	/	0.287
缬氨酸	0.456	1.187	1.534	2.532
甲硫氨酸	0.789	0.689	0.741	1.373
异亮氨酸	1.848	1.016	0.950	1/916
亮氨酸	0.663	2.040	1.664	2.752
酪氨酸	1.293	0.997	1.015	1.346
苯丙氨酸	0.897	1.222	1.127	1.587
赖氨酸	0.054	0.932	1.036	2.242
组氨酸	0.243	0.555	0.173	0.678
精氨酸	1.495	2.398	0.028	0.048
总计	13.017	28.746	14.570	32.450
肽含量(%)	54.72		55.10	

表6 两种蛋白酶的鳀鱼酶解液中游离氨基酸和短肽含量的比较

Tab.6 Comparison of the contents of free amino acids and peptides in the hydrolysate solution of *Engraulis japonicus* by the two kinds of proteases

氨基酸 种类	中性蛋白酶酶解		碱性蛋白酶酶解	
	游离氨基 酸含量 (mg/ml)	3 mol/L 盐酸水解 后氨基酸 (mg/ml)	游离氨基 酸含量 (mg/ml)	3 mol/L 盐酸水解 后氨基酸 (mg/ml)
牛磺酸	0.586	0.597	0.789	0.686
天冬氨酸	0.369	4.503	/	5.305
苏氨酸	0.275	2.192	1.212	2.930
丝氨酸	0.550	5.097	/	2.109
谷氨酸	0.483	5.105	3.113	10.477
甘氨酸	0.641	2.249	0.782	3.378
丙氨酸	0.034	1.587	2.266	4.551
缬氨酸	0.909	1.587	2.346	3.763
甲硫氨酸	0.811	1.342	1.838	2.216
异亮氨酸	0.579	1.019	1.327	3.071
亮氨酸	1.562	3.294	3.168	5.327
酪氨酸	0.877	1.043	1.628	1.517
苯丙氨酸	1.682	2.108	2.680	2.293
赖氨酸	0.468	3.001	1.467	4.724
组氨酸	0.477	1.161	0.688	1.567
精氨酸	1.498	3.434	0.349	1.348
总计	12.003	41.281	23.653	56.121
肽含量(%)	77.4		57.9	

每年全球海洋浮游生物产量约  $5 \times 10^{11}$  t, 近 10 多年来, 全世界每年从海洋获取的鱼、虾、贝、藻已达  $8 \times 10^7$  t。但由于现代化捕捞技术的推广普及, 大中型鱼类资源逐年受到破坏, 从而使生物链中的小鱼、小虾迅速繁殖起来。对渔获物非食用部分的利用更能体现出科学技术如何提高产品的附加值。非食用部分包括低值的小杂鱼及水产品加工的废弃物, 一般占渔获物的 28%, 如何开发这些量大质低的渔获物, 一直困扰着水产加工业。我国陆地微生物发酵工程和酶工程已有了长足的发展, 对陆地生物蛋白资源的酶解利用进行了大量的研究工作, 积累了丰富的研究资料和经验, 并开发出了一系列的高附加值的活性肽产品。将陆地微生物发酵工程和酶工程应用于海洋蛋白资源的综合利用研究, 以海洋生物蛋白资源为原料, 通过酶工程技术, 利用低值鱼类生产易消化吸收氨基酸、活性肽, 这类肽可作为肠道营养剂或以流质食物形式提供给处于特殊年龄或特殊身体状况下的人, 如消化能力不健全的新生儿, 经过手术特别是消化道手术后的康复者或有待于治疗的病人, 消化能力退化的老年人, 由于过度疲劳、生活没有规律而胃肠功能下降者, 还有对蛋白质抗原性过敏的过敏性体质者。易消化功能肽不仅能供丰富的必需氨基酸, 还能促进双歧杆菌

的生长繁殖, 促进乳酸杆菌的生长发育, 渴望在酸奶、面包、乳酪中提高营养价值, 改善风味和品质<sup>[1]</sup>。本文研究结果表明, 应用酶工程技术进行海洋低值蛋白资源的高值化开发是完全可行的。海洋生物资源的优化利用和海洋生物资源高值化是未来 15 a 我国海洋高技术的重要研究内容。

#### 参考文献

- 1 张玉忠、师晓栋等。海洋蛋白酶解物中生物活性肽的研究与开发: 见: 王志雄等编著, 1999。海洋高新技术发展研讨会论文集。北京: 海洋出版社, 2000: 222 ~ 225
- 2 张树政。酶制剂工业(下册)。北京: 科学出版社, 1984。434 ~ 436
- 3 郭勇。酶工程。北京: 中国轻工业出版社, 1997。314 ~ 316
- 4 中国饲料工业办公室。饲料工业标准汇编。北京: 中国标准出版社, 1996。22 ~ 42
- 5 陶慰孙等。蛋白质分子基础。北京: 高等教育出版社, 1995。88 ~ 89
- 6 朱碧英等。东海海洋, 1999, 17(2): 61 ~ 63
- 7 余传隆。氨基酸与生物资源, 1999, 21(4): 6 ~ 8

## PRELIMINARY STUDY ON

# VALUE- INCREMENT OF LOW VALUED MARINE PROTEIN BY ENZYMATIC HYDROLYSIS

SHI Xiaodong HE Hailun WANG Yuntao ZHANG Yuzhong GAO Peiji  
(State Key Lab of Microbial Technology, Shandong University, Jinan, 250100)

Received: Dec. 19, 2000

Key Words: Lowvalue marine protein sources, Protease, Enzymatic hydrolysis

### Abstract

The contents of the nutritional component in the two kinds of lowvalue marine proteins were analyzed and hydrolyzed by the neutral and alkaline proteases produced by liquid fermentation with the strains of *Bacillus subtilis* SM98011 and *B. subtilis* SM98013, respectively. It was showed that the *Mactm weni formis* Deshayes could be effectively hydrolyzed by both neutral and alkaline proteases, otherwise, the *Engmnlis japonicus* was hydrolyzed more effectively by alkaline protease from *B. subtilis* SM98013 than neutral protease from *B. subtilis* SM98013. The application possibility of this high-valued marine protein was also discussed.

(本文编辑:刘珊珊)