

# 海洋生物蛋白的酶解及酶解产物的抗氧化活性

吴继卫, 何海伦, 路敬涛, 陈秀兰, 张玉忠

(山东大学 微生物技术国家重点实验室, 山东 济南 250100)

**摘要:** 应用4种蛋白酶: 实验室保藏菌株 *Bacillus* sp. SM98011 和 *Bacillus* sp. SM97010 所产的中性蛋白酶SM98011和SM97010以及购自诺维信公司的碱性蛋白酶和风味蛋白酶分别酶解鲨鱼、牡蛎、扇贝和毛虾, 分析了酶解液中蛋白质含量、氨基酸组成及肽的含量, 并测定了酶解液的抗氧化能力。结果表明, 酶解液中必需氨基酸含量丰富、均衡, 营养价值较高; SM98011蛋白酶、SM97010蛋白酶和碱性蛋白酶的酶解液中肽的比例较高; 而风味蛋白酶的酶解产物主要以游离的风味氨基酸为主, 肽的含量较低。SM97010和SM98011蛋白酶的酶解液具有较高的抗氧化能力, 预示在功能食品开发方面具有较好的前景。

**关键词:** 游离氨基酸; 肽; 蛋白酶; 抗氧化性

**中图分类号:** Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2005)03-0076-05

中国是世界上海岸线最长的国家之一, 海洋生物蛋白资源丰富。目前海洋鱼、虾、贝等的捕捞量已达到9300万t/a。这些蛋白资源除了部分直接食用外, 大部分低值的蛋白资源及水产品加工的下脚料或通过压榨、烘干加工成鱼粉, 或废弃掉, 产品的附加值很低。鱼粉加工的废水直接排入近海水域, 造成近海水域的严重污染。因此, 对低值的海洋生物蛋白进行高值化、资源化、生态化利用, 是当前海洋生物技术急需开展研究的内容。其中, 运用发酵工程和酶工程技术, 是开发利用海洋生物蛋白资源的重要途径。蛋白质经蛋白酶酶解后, 其肽产物具有分子量低, 乳化效果好、适热能力增加、易被机体吸收和新的生物活性等优点, 使它们可以被应用到许多领域。

抗氧化活性肽是生物活性肽的一种, 它通过减少氧自由基、羟自由基, 从而达到抗衰老的功能。目前, 对抗氧化活性肽的研究主要集中在一些陆地蛋白资源上, 比如大豆蛋白, 乳蛋白, 玉米蛋白, 而从海洋蛋白资源中获取抗氧化活性肽的研究还比较少。海洋生物的生存环境与陆地有着极大的不同, 蛋白质的结构和氨基酸序列都有其独特性。通过酶解后会为人类提供许多结构新颖、功能独特和生理活性很强的抗氧化活性肽类<sup>[1~4]</sup>。作者对4种海洋蛋白源用4种蛋白酶进行酶解, 分别对酶解液的蛋白含量, 多肽含量、氨基酸组成、抗氧化效果进行了研究, 总结了4种蛋白酶的作用特点。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

酶解原料: 中国毛虾, 牡蛎, 扇贝, 鲨鱼肉由山东大鱼岛有限公司提供。

酶制剂: 本实验室保藏菌株 *Bacillus* sp. SM98011 和 *Bacillus* sp. SM97010 所产的中性蛋白酶SM9801、SM97010和和购自诺维信公司的碱性蛋白酶和风味蛋白酶。用Folin法测定蛋白酶活力<sup>[5]</sup>。酶活力定义为在一定温度下, 每分钟催化酪蛋白水解生成1 $\mu$ g酪氨酸的酶量为1个单位(U)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 样品酶解

将毛虾、牡蛎、鲨鱼肉、扇贝肉分别切碎匀浆, 各称取50g(湿质量)放到三角瓶中, 将具有相同酶活力的4种蛋白酶(4000U/mL)按5:1(W/V)加入, 混匀。对照组以相同体积的蒸馏水代替蛋白酶液。调整pH, 碱性蛋白酶为pH9.0,

收稿日期: 2004-11-09; 修回日期: 2004-12-20

基金项目: 国家海洋863计划资助项目(2003AA625040)

作者简介: 吴继卫(1967-), 女, 山东武城人, 副教授, 研究方向: 海洋生物高值化, 电话: 0531-8364326, E-mail: 777770754@sina.com; 张玉忠, 通讯联系人, E-mail: zhangyz@sdu.edu.cn

其它3种为pH 7.0。50℃下水浴震荡(120 r/min)酶解,分别酶解1, 3, 5, 7, 9 h,然后在90℃保温15 min,使酶灭活。8000 r/min离心得到上清液,即为4种海洋蛋白资源的酶解液。

1.2.2 可溶性蛋白、游离氨基酸、短肽含量的测定  
蛋白含量用Folin-酚法测定<sup>[6]</sup>。游离氨基酸和肽含量测定方法见文献<sup>[7]</sup>。

1.2.3 酶解产物的抗氧化活性分析

羟基自由基清除率的测定(α-脱氧核糖法):取0.2 mL的FeSO<sub>4</sub>-EDTA混合液(10 mmol/L)于具塞试管中,加入0.2 mL的α-脱氧核糖溶液(20 mmol/L),然后再加入0.2 mL测试样品,并用磷酸缓冲液(pH 7.4)定容至1.8 mL,最后加入0.2 mL的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(10 mmol/L),37℃水浴保温1 h,然后加入1 mL 2.8%的三氯乙酸终止反应,再加入1 mL 1%的硫代巴比妥,混匀后沸水浴中加热10 min,冷却后532 nm处测光吸收值As。不加样品,同上操作处理,测定其对比吸光值Ac。样品的自由基清除能力(Scavenging Activity, S<sub>A</sub>)可表示为:

$$S_A (\%) = (A_s - A_c) / A_s^{[8]}$$

## 2 结果与分析

### 2.1 酶解液蛋白含量分析

与对照组相比,4种海洋蛋白经酶解后,随着酶解时间的延长,酶解液体积逐渐增大,酶解液中蛋白含量随之提高,酶解液的粘度慢慢降低,可知溶液中固态的大分子蛋白发生水解,释放出大量可溶性的肽和氨基酸。酶解时间3 h左右时,增加的幅度明显减小,趋于平衡。随着酶解时间延长,有个别酶解液体积减少,可能是因为长时间的酶解造成了酶解液的蒸发。可见,一般蛋白的酶解都是在最初的3 h保持较高的水解速度,随着时间的延长,酶解的速度迅速下降,最终达到一个极限。

### 2.2 酶解液的氨基酸分析

表1中给出了各种酶解液的总氨基酸含量,并比较了必需氨基酸所占的比例。4种海洋蛋白经不同的蛋白酶酶解后,酶解液中的总氨基酸含量都有了明

表1 海洋蛋白酶解5 h的酶解液中氨基酸含量(×10<sup>-2</sup>g/mL)

Tab.1 The concentration of amino acid of hydrolysate digested for 5 hours

种类	蛋白酶	必需氨基酸									总氨基酸
		Thr	Val	Met	Ile	Leu	Phe	Lys	His	Arg	
	对照	0.03	0.05	0.01	0.04	0.07	0.02	0.07	0.03	0.04	0.77
鲨鱼	SM98011	0.33	0.33	0.18	0.28	0.59	0.26	0.70	0.24	0.44	6.84
	碱性蛋白酶	0.30	0.29	0.18	0.28	0.57	0.19	0.59	0.19	0.37	5.88
	SM97010	0.26	0.29	0.19	0.26	0.51	0.27	0.60	0.15	0.40	5.78
	风味蛋白酶	0.35	0.41	0.26	0.44	0.66	0.29	0.37	0.20	0.09	6.15
牡蛎	对照	0.04	0.04	0.03	0.03	0.06	0.01	0.01	0.14	0.04	0.95
	SM98011	0.18	0.23	0.13	0.19	0.29	0.18	0.26	0.12	0.27	3.93
	碱性蛋白酶	0.14	0.16	0.10	0.15	0.24	0.05	0.21	0.08	0.18	3.02
	SM97010	0.12	0.16	0.08	0.15	0.23	0.06	0.26	0.08	0.18	2.65
扇贝	风味蛋白酶	0.13	0.14	0.06	0.14	0.23	0.08	0.22	0.06	0.18	2.66
	对照	0.04	0.04	0.02	0.03	0.07	0.01	0.09	0.01	0.22	2.04
	SM98011	0.28	0.29	0.25	0.28	0.55	0.29	0.60	0.13	0.38	7.25
	碱性蛋白酶	0.21	0.26	0.21	0.26	0.48	0.12	0.47	0.12	0.49	5.82
毛虾	SM97010	0.23	0.22	0.17	0.27	0.51	0.22	0.58	0.13	0.62	6.96
	风味蛋白酶	0.26	0.33	0.21	0.32	0.58	0.15	0.62	0.17	0.54	7.19
	对照	0.06	0.08	0.04	0.06	0.13	0.04	0.14	0.02	0.08	1.45
	SM98011	0.10	0.22	0.10	0.15	0.24	0.15	0.22	0.06	0.18	2.78
毛虾	碱性蛋白酶	0.14	0.16	0.11	0.17	0.30	0.15	0.28	0.08	0.15	3.08
	SM97010	0.14	0.19	0.11	0.18	0.29	0.09	0.29	0.10	0.17	3.12
	风味蛋白酶	0.13	0.19	0.10	0.18	0.28	0.09	0.26	0.09	0.14	2.85

显的提高,而且氨基酸含量均衡,特别是必需氨基酸的含量比较高,其比例明显高于WHO/FAO标准(35.38%),都是高营养价值的蛋白源,可以作为高品质的饲料添加剂,甚至可以作乳制品的替代品。其中鲨鱼肉的风味蛋白酶的酶解液中必需氨基酸比例最高(48%)。牡蛎和扇贝的对照组的必需氨基酸与总氨基酸的比值较低,经过酶解作用后,该比例大幅上升。

除了必需氨基酸含量较高以外,酶解液中的风味氨基酸的含量也很丰富。如谷氨酸、天冬氨酸、甘氨酸等是提供鲜味或甜味的氨基酸,在蛋白酶SM98011和风味蛋白酶酶解液中,游离风味氨基酸的总含量明显高于其它2种蛋白酶的酶解液。说明蛋白酶SM98011和风味蛋白酶是酶解海洋蛋白资源开发海鲜调味品的较好的工具酶。

### 2.3 多肽含量

酶解液中的短肽含量用总氨基酸含量( $\times 10^{-2}$  g/mL) - 游离氨基酸含量( $\times 10^{-2}$  g/mL)来表示<sup>[9]</sup>。

经过游离氨基酸和总氨基酸测定,发现风味蛋白酶酶解液中游离氨基酸含量明显高于其它3种酶的酶解液,而肽含量明显低于其它3种酶的酶解液,说明风味蛋白酶的酶解产物多为游离氨基酸。这可能是由于风味蛋白酶主要由外肽酶组成,从蛋白的N-末端或者是C-末端逐个的切下单个的氨基酸,所以不适合做筛选活性肽的工具酶,而适合作为生产氨基酸调味剂的工具酶。

蛋白酶SM98011、碱性蛋白酶、SM97010酶解液中的肽比例与对照组相比都有了明显的提高(图1),说明这3种酶中含有大量的内肽酶,底物的大分子蛋白被其切断,释放出大量的短肽。特别是鲨鱼和扇贝经过这3种蛋白酶酶解后,其酶解液中的短肽含量明显增加。蛋白酶SM98011、碱性蛋白酶、SM97010的作用效果相差不大,能较多的释放肽类物质,可以作为筛选活性肽的工具酶。

### 2.4 酶解产物的抗氧化性研究

一些蛋白酶水解物中存在具有抗氧化性的活性肽,这类活性肽能抑制机体内自由基的大量积累,具有清除自由基的功效,因此可在一定程度上消除机体内多种生理功能的障碍,延缓机体的衰老,减少各种老年性疾病的发生<sup>[10~12]</sup>。4种海洋蛋白酶解产物的抗氧化活性,即自由基清除能力见图2。

鲨鱼肉经不同蛋白酶酶解后,其酶解液的抗氧化能力明显不同。随着酶解时间的延长蛋白酶

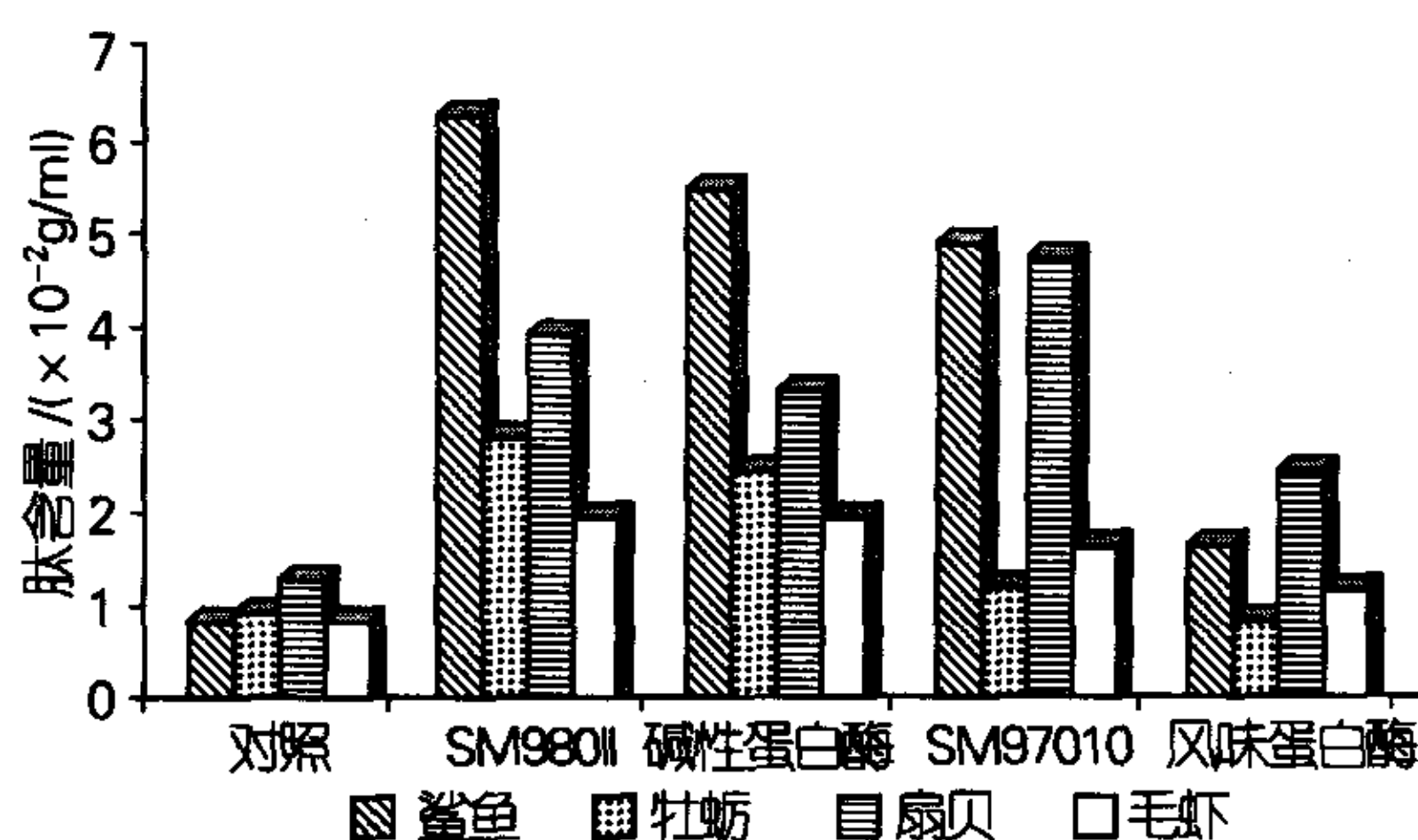


图1 海洋蛋白酶解液中肽的含量

Fig.1 The concentration of peptides in hydrolysates

SM98011的酶解液,抗氧化活性也逐渐增加,到7h时基本达到平衡。碱性蛋白酶的酶解液随时间延长,抗氧化能力基本没有变化。SM97010的酶解液随着酶解时间延长抗氧化能力有所提高,在3h时抗氧化能力达到峰值。风味蛋白酶的鲨鱼酶解液随着酶解时间的延长,抗氧化能力反而显著降低,说明它的酶解液有着较强的氧化作用。

毛虾经4种蛋白酶酶解,其中蛋白酶SM98011酶解液与鲨鱼酶解液抗氧化效果一致,呈现随酶解时间延长抗氧化功能增强的现象。SM97010的酶解液酶在解1h时其抗氧化活力就达到最大值。碱性蛋白酶的酶解液在3h时抗氧化力达到了峰值。风味蛋白酶的酶解液也出现了随酶解时间延长,抗氧化性减弱的现象。SM97010的酶解液抗氧化性提高的最为明显。

扇贝的4种蛋白酶酶解液的抗氧化性都有了一定的提高,其中SM97010的酶解液抗氧化效果最为明显,在1h便到达了抗氧化能力的峰值,然后随酶解时间延长抗氧化能力逐渐减弱。碱性蛋白酶也呈现这一趋势。风味蛋白酶的酶解液的抗氧化性则在3h时达到最高值,然后随时间延长最近逐渐下降。只有SM98011的酶解液随着酶解时间的延长,抗氧化强度有微弱的增加,在7h达到峰值。

牡蛎的4种蛋白酶酶解液中SM97010的酶解液的抗氧化趋势和以上3种海洋蛋白相同。SM98011的酶解液在5h时达到了抗氧化能力的峰值,风味蛋白酶的酶解液在1h时达到了峰值,而碱性蛋白酶的酶解液随着酶解时间的延长抗氧化能力缓慢增加。牡蛎经SM97010和SM98011酶解后,酶解液有较好的清除自由基的能力。

4种海洋蛋白经不同的蛋白酶酶解后,抗氧化力变化规律大体是随着水解度的增加而增加,达到一

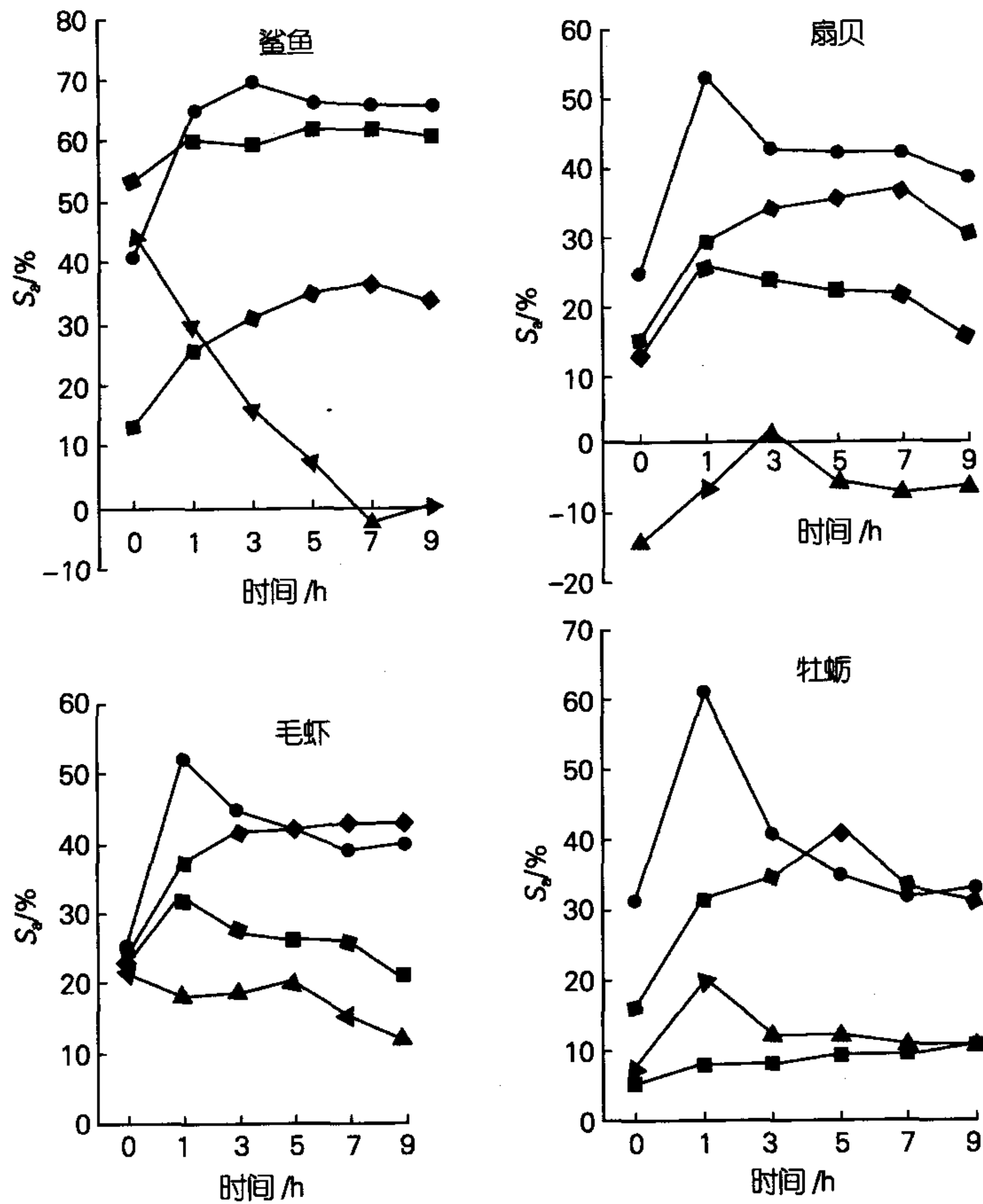


图2 海洋蛋白酶解产物的抗氧化性  
Fig. 2 Antioxidant activity of hydrolysates

定值后,随着水解度的增加而减少。抗氧化性能力的顺序为 SM97010 水解物最高, SM98011 水解物次之,碱性蛋白酶水解物和风味蛋白酶酶解物效果较差。特别是风味蛋白酶的鲨鱼肉酶解产物还有生成自由基的效果,这可能是与其外肽酶的特性有关,其产物多由氨基酸组成,肽的含量极少。这表明,由于各种酶解反应条件不同,影响底物蛋白构象的变化;而且各种酶的专一性不同,促使产物多肽的 N-末端、C-末端氨基酸组成及排列各异,这是影响肽功能性质的主要因素。如有文献报道, Val, Leu 位于肽段的 N-端和 C-端时,肽段具有较强的抗氧化性,而以 Ala 为 N-端的二肽的抗氧化能力也很强。其它双肽也都比构成它们的氨基酸的抗氧化能力强<sup>[13]</sup>。

### 3 讨论

鲨鱼肉、中国毛虾、牡蛎和扇贝经 4 种不同的蛋白酶酶解后,酶解液中的蛋白,必需氨基酸及肽的含量都有了不同程度的提高。其中蛋白酶 SM98011、碱性蛋白酶, SM97010 的酶解液中富含多肽;风味蛋白酶和蛋白酶 SM98011 的酶解产物风味氨基酸含量丰富,利于生产风味添加剂。近年来,肽的抗氧化作用受到广泛的重视。海洋生物生长于独特的海洋环境,其蛋白质的氨基酸组成和结构都有其特殊性,为从海洋蛋白酶解液中获取较高抗氧化能力多肽提供了可能性。通过对 SM98011、碱性蛋白酶, SM97010 和风味酶酶解海洋生物蛋白的酶解液的抗氧化活性的比较可以看出, SM97010 酶解产

物和SM98011酶解产物表现出较高的自由基清除活性。酶解液的抗氧化能力不仅同原料的性质有关,而且同酶解所得的肽的种类和特性有关。试验结果为更好的使用酶解方法从海洋蛋白资源获取高营养价值的产物、风味添加剂及具有抗氧化活性的肽提供了科学依据,有利于进一步提高海洋蛋白资源的附加值。

#### 参考文献:

- [1] 沈培英. 大豆蛋白抗氧化性肽的研究[J]. 中国油脂, 1996, 21(6): 21-24.
- [2] 徐力, 刘立, 李相鲁, 等. 玉米功能短肽的制备及其类超氧化物歧化酶活性研究[J]. 中国生化药物杂志, 2002, 23(2): 78-80.
- [3] 邱隽, 王小雪, 李琳, 等. 乳蛋白活性肽的延缓衰老作用研究[J]. 中国公共卫生, 2002, 18(3): 312-313.
- [4] Chen H M, Muramoto K, Yamauchi F. Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digest s of soybean peptide [J]. *J Agric Food Chem*, 1996, 44: 2619-2623.
- [5] 张树政. 酶制剂工业[M]. 北京: 科学出版社, 1984. 446-447.
- [6] 李建武. 生物化学实验原理和方法[M], 北京: 北京大学出版社, 1994, 168-169.
- [7] 师晓栋 何海伦, 王运涛, 等. 酶法进行海洋低值蛋白资源的高值化利用初探[J]. 海洋科学, 2001, 25(3): 4-7.
- [8] 蒲健, 郭文萍, 赵榕. 肉食品中脂类氧化的测定方法综述[J]. 肉类研究, 1999, 2: 43-49.
- [9] He H L, Chen X L, Li J W, *et al.* Taste improvement of refrigerated meat treated with cold adapted protease [J]. *Food Chem*, 2004, 84 (2): 307-311.
- [10] Chen H M, Muramoto K, Yamauchi F. Structure analysis of antioxidative peptide from soybean  $\beta$ -conglycinin[J]. *J Agric Food Chem*, 1995, 43: 574-578.
- [11] Amarowicz R, Shahidi F. Antioxidant activity of peptide fractions of capelin protein hydrolysates[J]. *Food Chemistry*, 1997, 58(4): 355-359.
- [12] Wua H C, Chen H M, Shiaua 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.
- [13] Cuzzocrea S, Riley D, Caputi A P, *et al.* Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia / reperfusion injury [J]. *J Pharmacol Rev*, 2001, 53: 135-139.

## Enzymatic hydrolysis of marine proteins and hydrolysates antioxidant activity

WU Ji-wei, HE Hai-lun, LU Jing-tao, CHEN Xiu-lan, ZHANG Yu-zhong  
(State Key Lab of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China)

Received: Nov., 9, 2004

Key words: free amino acid; peptides; protease; antioxidant

**Abstract:** Marine proteins, shark, oyster, scallop, shrimp were hydrolyzed with four proteases: SM98011 produced by *Bacillus* sp.; SM98011, SM97010 produced by *Bacillus* sp. SM97010; Alcalase, and Flavourzyme. Their content of protein, amino acids and peptides were tested. All of the hydrolysates were rich in essential amino acids. The hydrolysates of marine proteins digested with protease SM98011, SM97010 and Alcalase were enriched in peptides. Compared to other three proteases, the Flavourzyme can dissociate more flavor amino acids. Antioxidant activity of each hydrolysate was determined. The hydrolysates from protease SM98011 and protease SM97010 possess more notable antioxidant activity than other two protease hydrolysates.

(本文编辑: 张培新)