

废弃鱼骨中蛋白质的提取分离及酶解工艺研究

张振兴^{1,2,3}, 刘永峰^{1,2}, 刘毅^{1,2}, 裴栋^{1,2}, 魏鉴腾^{1,2}, 邸多隆^{1,2,3}

(1. 中国科学院 兰州化学物理研究所 中国科学院西北特色植物资源化学重点实验室和甘肃天然药物重点实验室, 甘肃 兰州 730000; 2. 中国科学院 兰州化学物理研究所 青岛市资源化学与新材料研究中心, 山东 青岛 266100; 3. 甘肃中医学院 药理学系, 甘肃 兰州 730000)

摘要: 以蛋白提取率和多肽分子质量分布为评价指标, 采用不同提取方法和不同蛋白酶对废弃鱼骨蛋白质的提取和酶解工艺进行了研究。结果表明, 高压蒸煮法提取的鱼骨蛋白质中蛋白含量为 86.15%, 蛋白提取率为 16.76%, 明显高于恒温水浴和热回流提取法。中性蛋白酶酶解的多肽中蛋白含量为 88.46%, 多肽比例高达 95%以上, 明显高于其他三种酶。先利用高压提取法提取蛋白质, 再利用中性蛋白酶酶解蛋白质制备多肽, 可降低酶用量, 该方法为多肽工业化生产提供参考及新思路。

关键词: 废弃鱼骨; 蛋白质; 酶解; 多肽

中图分类号: TQ936.1 文献标识码: A
doi: 10.11759/hyxx20130330001

文章编号: 1000-3096(2014)06-0031-06

我国是世界上鱼类养殖和出口大国, 每年鱼类的产量与出口量约占全世界的 50%以上, 主要以冷冻水产品、鱼糜制品、鱼干制品、鱼油等形式内销及出口。在鱼类加工过程中会产生大量的废弃物, 约占总质量的 30%~50%, 其中废弃鱼骨所占比例较高^[1-3]。大量的废弃鱼骨没有得到妥善的利用, 仅作为农业肥料, 或者作为垃圾直接丢弃。这样不但造成了资源的浪费, 还会污染环境。因此, 利用废弃鱼骨制备多肽, 提高鱼类资源的附加值, 具有重要的研究意义。

近年来, 利用海洋生物资源制备多肽的研究被越来越多的人所关注。师晓栋等^[4]利用高产蛋白酶菌株产生的蛋白酶对鱼骨进行了酶解, 研究表明, 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。胡文婷等^[5]认为海洋生物的蛋白质结构中蕴藏着许多功能特异、结构新颖的多肽类物质, 因此选择了合适的蛋白酶对海洋生物源蛋白的多肽链进行了水解切割, 来制备功能多样、结构新颖的海洋生物活性肽。但是大部分利用酶解制备鱼骨/鱼皮多肽的研究均是直接将酶加入到原料中进行酶解^[6-12]。对于工业生产来说, 酶的消耗量较大, 生产成本较高。

本文对 3 种提取方法(恒温水浴法、热回流法以及高压提取法)提取蛋白质的影响因素和酶解工艺进行了研究, 具体如下: 先将蛋白质从鱼骨中提取出来, 提取液经浓缩、醇沉, 沉淀物再酶解得到多肽。

由于从鱼骨中分离制备多肽生产中构成成本的主要因素是酶的用量, 本研究建立的方法不但可以降低酶的用量, 还能提高生产效率, 这为多肽工业生产提供一个新思路。

1 仪器与材料

1.1 仪器

红外智能消化炉(SKD-200, 上海沛欧分析仪器有限公司); 凯式定氮仪(SKD-08S2, 上海沛欧分析仪器有限公司); 串联飞行时间质谱仪 5800 Proteomics Analyzer (TOF/TOF) (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA); 旋转蒸发器(RE-52AA, 杭州德茂科技有限公司); 高压蒸煮机(E200, 天津慈恩机械设备销售有限公司); 电子天平(BP221S, sartorius, 德国); 高速离心机(80-3, 金坛市城东新瑞仪器厂)。

1.2 材料与试剂

废弃鱼骨为鳕鱼鱼骨(购于青岛信义海产品加工厂), 在-20℃冰箱保存、备用; 碱性蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、胰蛋白酶(Sigma 公司), 氢氧化

收稿日期: 2013-03-30; 修回日期: 2013-07-29

项目资助: 国家自然科学基金项目(No. 20974116); 中国科学院“百人计划”项目

作者简介: 张振兴(1986-), 男, 陕西咸阳人, 硕士研究生, 研究方向为中药有效成分及质量标准, 电话: 0931-4968094, E-mail: zzx13772-161825@163.com; 邸多隆, 通信作者, 电话: 0931-4968248, E-mail: didl@licp.cas.cn

钠; 盐酸; 95%乙醇(工业级)。

2 试验方法

2.1 鱼骨中含水率的测定

将冷冻的鱼骨取出, 室温解冻, 沥干。称取湿鱼骨约 300.0 g, 置入 105℃真空干燥箱中干燥 3 h, 取出, 置入干燥器中冷却 30 min, 称其质量。计算鱼骨的含水率。

$$\text{湿鱼骨含水率 (\%)} = \frac{\text{自然解冻湿鱼骨质量} - \text{干燥鱼骨质量}}{\text{自然解冻湿鱼骨质量}} \times 100\%$$

2.2 鱼骨中蛋白质含量的测定

参照国家标准 GB 5009.5-2010。分别精密称取干鱼骨约 0.25 g、硫酸钾 6.0 g 和硫酸铜 0.2 g 置于消化管内, 再加入浓硫酸 10 mL, 高温消化 45 min, 至鱼骨消解完全, 颜色呈亮蓝色。利用硼酸水溶液吸收铵盐与氢氧化钠反应生成的氨水, 加入显色剂, 利用酸式滴定法记录所消耗的盐酸体积, 计算蛋白质的含量。计算公式如下:

$$\text{蛋白质含量 (\%)} = \frac{(V_1 - V_2) \times c \times 0.014}{m \times V_3 / 100} \times F \times 100$$

其中, V_1 为滴定消耗盐酸标准滴定液的体积 (mL); V_2 为滴定空白对照样消耗盐酸标准滴定液的体积 (mL); V_3 为消解加入浓硫酸的体积 (mL); c 为盐酸标准滴定溶液浓度 (mol/L); m 为样品的质量 (g); F 为氮换算为蛋白质的系数 (6.25)。

2.3 多肽分子质量分布测定

参照文献[13]进行多肽分子质量分布测定。仪器参数设定: 加速电压为 20 kV; MALDI 激光源为 200 Hz 脉冲 Nd-YAG 激光源 (355 nm); 采集谱图数为每个样品点累积 1 000 张谱图; 激光强度时以获得良好信噪比 (S/N) 为基础, 同一比较试验取固定强度分析; 多肽检测模式为线性模式, TOF 扫描分子质量范围 700~20 000 Da。采用 GPS Explorer 软件 (Version 3.6, Applied Biosystems) 进行数据处理。

2.4 鱼骨中蛋白质提取方法考察

2.4.1 样品前处理方法的考察

称取两份湿鱼骨, 各约 35 g, 一份经过组织搅碎机处理将鱼骨粉碎, 另一份不经过粉碎处理。按照 2.3.3 节“高压蒸煮法”分别制备蛋白, 再根据 2.2 节“鱼骨中蛋白质含量的测定”进行含量测定, 计算

蛋白质提取率。

2.4.2 恒温水浴提取法

称取清洗干净的鱼骨约 35 g, 置于 500 mL 烧瓶中, 加入 350 mL 蒸馏水 (料液比 1:10, V/V), 在 60℃恒温水浴锅中提取 12 h。过滤, 滤液在旋转蒸发仪上 (65℃, -0.08 MPa) 浓缩至原体积的 10% 时, 然后向滤液中加入 95%乙醇, 直至滤液中乙醇浓度达到 80%, 静置 12 h, 醇沉得到蛋白质。过滤, 沉淀, 在 105℃下烘干, 称质量, 利用凯式定氮仪测定沉淀蛋白质含量, 并计算蛋白提取率。

2.4.3 热回流提取法

称取清洗干净的鱼骨约 35 g 置于 500 mL 烧瓶中, 加入 350 mL 蒸馏水 (料液比 1:10, V/V), 放置到热回流装置中, 回流提取 40 min。过滤, 滤液在旋转蒸发仪上 (65℃, -0.08 MPa) 浓缩至原体积的 10% 时, 然后向滤液中加入 95%乙醇, 直至滤液中乙醇浓度达到 80%, 静置 12 h, 醇沉得到蛋白质。过滤, 沉淀, 在 105℃下烘干, 称质量, 利用凯式定氮仪测定沉淀蛋白质含量, 并计算蛋白提取率。

2.4.4 高压提取法

称取清洗干净的鱼骨约 35 g 置于高压蒸煮机内, 加入 350 mL 蒸馏水 (料液比 1:10, V/V)。在 0.2 MPa 下, 提取 40 min。过滤, 滤液在旋转蒸发仪上 (65℃, -0.08 MPa) 浓缩至原体积的 10% 时, 然后向滤液中加入 95%乙醇, 直至滤液中乙醇浓度达到 80%, 静置 12 h, 醇沉得到蛋白质。过滤, 沉淀, 在 105℃下烘干, 称质量, 利用凯式定氮仪测定沉淀蛋白质含量, 并计算蛋白提取率。

2.5 酶解工艺的考察

2.5.1 直接酶解鱼骨与酶解蛋白质制备多肽的比较

称取两份湿鱼骨, 各约 300 g。一份加入底物浓度 0.5% 的中性蛋白酶进行酶解, 测定上清液的质量和蛋白质含量; 另一份湿鱼骨经过高压蒸煮提取、醇沉, 得到蛋白质, 再加入 0.5% 中性蛋白酶进行酶解, 测定上多肽质量和蛋白质含量。

2.5.2 中性蛋白酶酶解

称取 2.4.4 节用“高压提取法”制备的蛋白质样品约 10 g, 置入 250 mL 锥形瓶中, 加入水 100 mL (料液比 1:10, V/V), 超声溶解。然后加入底物浓度 0.5% 的中性蛋白酶 (活性 50 u/mg), 再用 1% NaOH 调节溶液 pH 至 6~8。将锥形瓶置于 55℃恒温振荡器中, 酶解 4 h。然后在沸水中加热 20 min, 使酶灭活。离

心, 分别将上清液和沉淀烘干, 称质量。

2.5.3 胃蛋白酶酶解

称取 2.4.4 节“高压提取法”制备的蛋白质样品约 10 g, 置入 250 mL 锥形瓶中, 加入水 100 mL(料液比 1:10, *V/V*), 超声溶解。然后加入底物浓度 0.5% 的胃蛋白酶(活性 800~2 500 u/mg), 再用 1% HCl 调节溶液 pH 至 2~3。将锥形瓶放入 55°C 恒温振荡器中, 酶解 4 h。然后在沸水中加热 20 min, 使酶灭活。离心, 分别将上清液和沉淀烘干, 称质量。

2.5.4 木瓜蛋白酶酶解

称取 2.4.4 节“高压提取法”项制备的蛋白质样品约 10 g, 置入 250 mL 锥形瓶中, 加入水 100 mL(料液比 1:10, *V/V*), 超声溶解。然后, 加入底物浓度 0.5% 木瓜蛋白酶(活性 1 000 u/mg), 再用 %NaOH 调节溶液 pH 至 6~8。将锥形瓶放入 55°C 恒温振荡器中, 酶解 4 h。然后在沸水中加热 20 min, 使酶灭活。离心, 分别将上清液和沉淀烘干, 称质量。

2.5.5 胰蛋白酶酶解

称取 2.4.4 项“高压提取法”项制备的蛋白质样品约 10 g, 置入 250 mL 锥形瓶中, 加入水 100 mL(料液比 1:10, *V/V*), 超声溶解。然后加入底物浓度为 0.5% 的胰蛋白酶(活性 20~40 u/mg), 再用 1% NaOH 调节溶液 pH 至 8~9。将锥形瓶放入 55°C 恒温振荡器中, 酶解 4 h。然后在沸水中加热 20 min, 使酶灭活。离心, 分别将上清液和沉淀烘干, 称质量。

2.6 酶解多肽分子质量的测定

将四种酶酶解所得酶解液, 按照 2.3 节“多肽分子质量分布测定”的方法进行测定。具体操作如下: 基质和样品分别溶于配制好的乙腈-双蒸水(1:1)的饱和溶液, 分别取 1.5 μ L 和 0.5 μ L 均匀混合。然后, 取 0.5 μ L 点样。室温自然干燥后, 将点样板放入离子源中进行测定。

3 结果与讨论

3.1 鱼骨中的含水率及蛋白含量的测定

3.1.1 废弃鱼骨中的含水率测定

按照 2.1 节“鱼骨中含水率的测定”的方法进行测定, 鱼骨样品中含水率为 70.20%。

3.1.2 废弃鱼骨中的蛋白含量测定

按照 2.2 节“鱼骨中蛋白含量测定方法”进行测定, 测得干鱼骨中的蛋白质含量为 59.14%。由 3.1.1 节可知, 鱼类加工厂废弃的湿鱼骨含水率大约为

70.20%。所以, 湿鱼骨中的蛋白质含量大约为 17.62%。

3.2 样品前处理的考察

按照 2.4.1 节“样品前处理方法的考察”进行测定, 将粉碎处理与未粉碎处理的废弃鱼骨经过高压蒸煮法提取蛋白质并测定, 结果如表 1 所示。

表 1 未经粉碎处理与经过粉碎处理对提取蛋白质的影响
Tab.1 Effect of crushing on the extraction of proteins

处理方法	蛋白质质量 (g)	蛋白含量 (%)	蛋白提取率 (%)
未经过粉碎处理	1.05	88.46	16.32
经过粉碎处理	1.35	78.09	13.30

注: 蛋白提取率=蛋白质质量*蛋白质氮含量/样品质量*样品氮含量

由表 1 可知, 经过粉碎处理后的鱼骨提取得到的蛋白质中蛋白含量和蛋白提取率降低; 而得到的蛋白质质量升高。这是因为经过组织搅碎机处理过的鱼骨上碎肉的肌纤维及脂肪、无机物等, 在醇沉时发生共沉淀作用, 随着蛋白的沉淀, 一起沉淀下来, 导致了蛋白质总质量高, 而蛋白质含量和提取率较低。

3.3 提取方法比较

按照 2.4 节“鱼骨中蛋白质提取方法考察”进行测定, 利用凯式定氮法测定其蛋白含量, 并计算蛋白提取率, 结果见表 2。

表 2 不同提取方法对提取蛋白质的影响
Tab.2 Effect of different extraction methods on the extraction of proteins

试验方法	蛋白质质量(g)	蛋白含量(%)	蛋白提取率(%)
恒温水浴法	0.84	70.69	9.62
热回流法	1.02	79.30	13.07
高压蒸煮法	1.20	86.15	16.76

由表 2 可知, 高压蒸煮法得到的蛋白质蛋白含量达到 86.15%, 提取率达到 16.76%, 均为最高。所以, 高压蒸煮法为最佳蛋白质提取方法。

3.4 直接酶解法与间接酶解法制备多肽的比较

按照 2.5.1 节“直接酶解鱼骨与酶解蛋白质制备多肽的比较”进行测定, 经高压蒸煮法得到蛋白质 19.54 g, 加入 0.5% 中性蛋白酶进行酶解, 测定上清液的质量和蛋白质含量, 结果见表 3。

由表 3 可知, 直接酶解法所需的蛋白酶质量比间接酶解法高 4.5 倍, 直接酶解法得到的上清液质量

表 3 直接酶解法与间接酶解法对多肽的影响

Tab.3 Effect of direct and indirect enzymatic on enzymatic peptides

试验方法	加入酶质量(mg)	多肽质量(g)	蛋白含量(%)
直接酶解法	441	20.45	79.92
间接酶解法	97	17.34	86.15

比间接酶解法高 15.21%，而直接酶解法得到的多肽含量却比间接酶解法低 6.23%。对于工业化生产，酶的用量是生产成本中的主要因素之一。因此，先提取得到蛋白质，再酶解制备得到多肽的方法比直接酶解鱼骨具有更好的成本优势。

3.5 不同酶的酶解工艺及分子质量测定结果

按照 2.5 节“酶解工艺的考察”中酶解方法，利用凯式定氮法测定不同酶酶解上清液中的蛋白质含量，结果见表 4。

表 4 不同酶对酶解蛋白质制备多肽的影响

Tab.4 Effect of different enzymes on the peptide production by digestion of proteins

酶	多肽质量(g)	多肽蛋白含量(%)
胰蛋白酶	9.06	86.15
中性蛋白酶	9.96	88.46
木瓜蛋白酶	7.72	81.68
胃蛋白酶	9.05	79.77

由表 4 可知，不同蛋白酶的酶解上清液的蛋白质含量顺序为：中性蛋白酶>胰蛋白酶>木瓜蛋白酶>胃蛋白酶；而酶解上清液质量顺序为：中性蛋白酶>胰蛋白酶>胃蛋白酶>木瓜蛋白酶。进一步利用串联飞行时间质谱仪对不同酶的酶解上清液的分子质量分布进行测定，结果见图 1 至图 4。

由图 1 可知，胰蛋白酶的酶解上清液中，70%的多肽分子质量均在 3 000 Da 以下。分子质量在 1 565

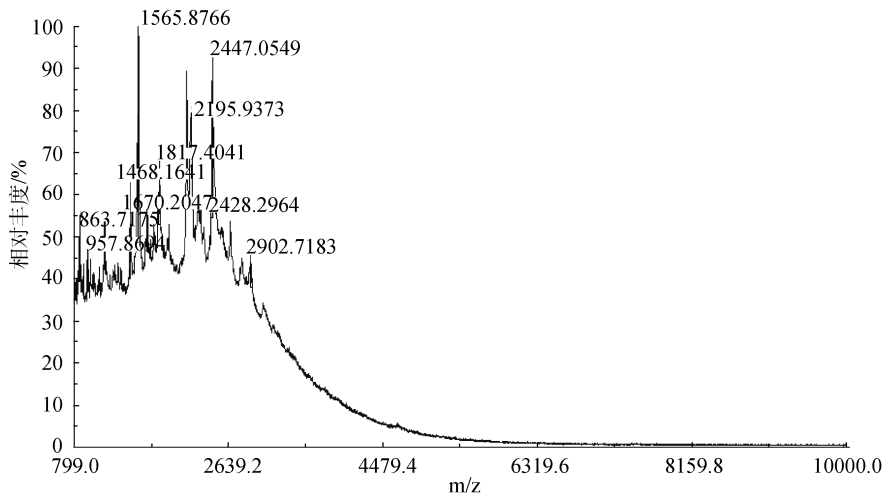


图 1 胰蛋白酶酶解上清液质谱图

Fig.1 The mass spectrum of enzymatic hydrolysate with trypsin

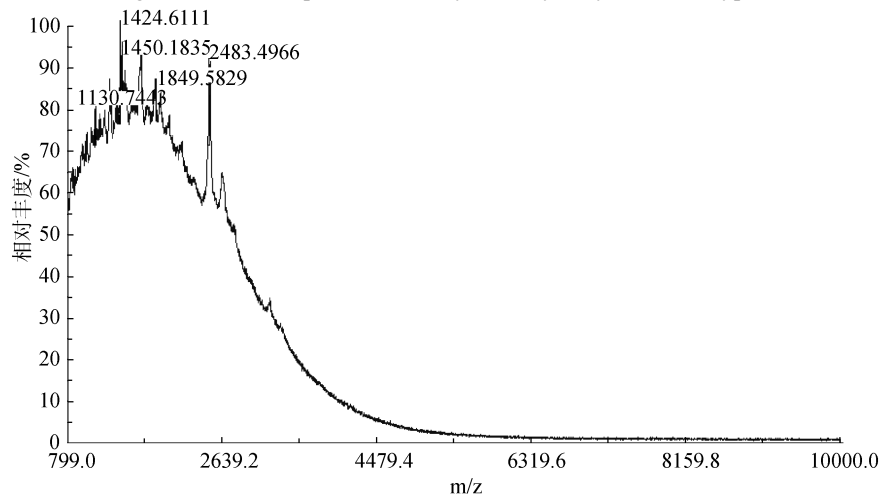


图 2 中性蛋白酶酶解上清液质谱图

Fig.2 The mass spectrum of enzymatic hydrolysate with neutral protease

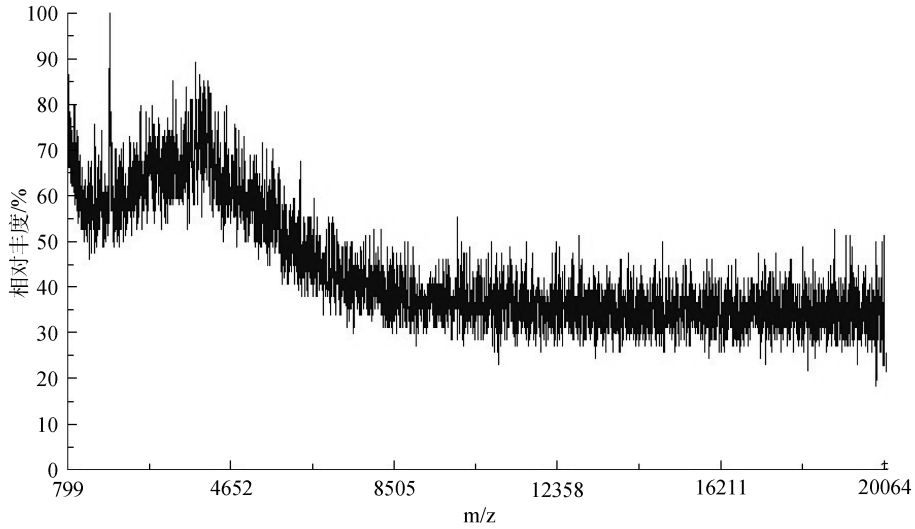


图 3 木瓜蛋白酶酶解上清液质谱图

Fig.3 The mass spectrum of enzymatic hydrolysate with papain

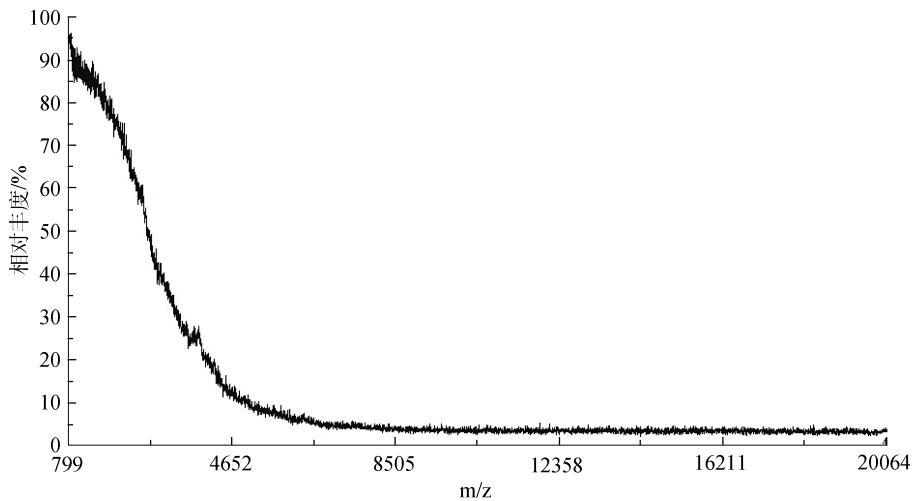


图 4 胃蛋白酶酶解上清液质谱图

Fig.4 The mass spectrum of enzymatic hydrolysate with pepsin

Da 时, 达到了最大丰度。在 2 000 和 2 447 Da 时, 其多肽含量在整个分子质量分布中的相对丰度达到了 90%。总体来说, 胰蛋白酶酶解的多肽分子质量在 4 479 Da 以上低于 10%。因此, 胰蛋白酶酶解多肽比例高达 90% 以上。

由图 2 可知, 中性蛋白酶的酶解上清液中, 90% 的多肽均在分子质量 3 000 Da 以下。在分子量在 1 424 Da 时, 达到了最大丰度。在 1 450、1 849 和 2 483 Da 时, 其多肽含量在整个分子质量分布中的相对丰度达到了 90%。总体来说, 中性蛋白酶酶解的多肽含量在分子质量 4 479 Da 以上低于 5%。因此, 中性蛋白酶酶解多肽比例高达 95% 以上。

由图 3 可知, 从分子质量分布来看, 木瓜蛋白酶的酶解上清液中多肽的分子质量分布为 799~20 064 Da。在 1 790 Da 达到了最大丰度。低于 7 000 Da 的

多肽为 50%, 高于 7 000 Da 多肽为 30%~40%。总体来说, 从质谱图来看木瓜酶酶解的多肽分子质量分布比较广泛且分布均匀。因此, 木瓜蛋白酶不适合用于酶解废弃鱼骨中的蛋白质。

从分子质量分布来看(图 4), 胃蛋白酶的酶解上清液中 90% 的多肽均在分子质量 4 652 Da 以下。高于 5 000 Da 的多肽含量为 5%。总体来说, 胃蛋白酶酶解的蛋白质不完全, 多肽分子质量分布范围较大, 所以胃蛋白酶不适合酶解废弃鱼骨中的蛋白质。

4 结论

研究了以废弃鱼骨为原料制备多肽的工艺。与传统的制备方法不同, 本研究先将废弃鱼骨中的蛋白质进行提取, 通过工艺条件筛选和优化, 建立了

适合工业化生产的工艺技术路线和技术参数。在优选的提取工艺条件下, 胶原蛋白的提取率为 16.76%, 蛋白含量为 86.15%。在此基础上, 进一步研究了从鱼骨蛋白质中制备多肽的酶解工艺, 研究了胰蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、胃蛋白酶酶解制备多肽的分子量分布。结果表明, 中性蛋白酶为制备鱼骨多肽的最佳蛋白酶, 制备多肽的得率为 16.69%, 蛋白含量为 88.46%。与传统制备工艺相比较, 本工艺可大幅度减少蛋白酶的用量, 降低生产成本。本研究可为工业制备鱼骨多肽提供新的技术参考。

参考文献:

- [1] 袁学会, 申铨日, 易美华, 等. 利用罗非鱼废弃碎肉制备低聚肽的研究[J]. 食品工业科技, 2011, 32(11): 264-269.
- [2] 黄梓荣. 南沙群岛西南陆架区金钱鱼资源与管理的研究[J]. 南方水产, 2005, 1(4): 18-23.
- [3] 岑剑伟, 李来好, 杨贤庆, 等. 美国罗非鱼贸易现状及展望[J]. 南方水产, 2006, 2(2): 71-75.
- [4] 师晓栋, 何海伦, 王运涛, 等. 酶法进行海洋低值蛋白资源高值化利用初探[J]. 海洋科学, 2001, 25(3): 4-7.
- [5] 胡文婷, 张凯. 酶解海洋生物源蛋白制备活性肽研究进展[J]. 海洋科学, 2010, 34(5): 83-88.
- [6] 石红, 郝淑贤, 李来好, 等. 利用鱼类加工废弃鱼骨制备鱼骨粉的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(9): 295-298.
- [7] 陆剑锋, 孟昌伟, 李进, 等. 斑点叉尾鲴鱼骨胶原多肽螯合钙的制备及其特征[J]. 水产学报, 2012, 36(2): 314-319.
- [8] 邵伟, 邓院芳, 陈菽. 鲑鱼皮胶原蛋白肽酶解法制备工艺条件研究[J]. 中国酿造, 2010, 7: 120-123.
- [9] 张建荣, 马俪珍, 梁鹏. 鲑鱼骨蛋白酶解物中抗菌活性物质的初步分离纯化[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(2): 48-52.
- [10] 张建荣, 马俪珍, 甄润英, 等. 鲑鱼骨酶解产物抑菌活性的酶解工艺优化[J]. 食品科技, 2008, 8: 173-176.
- [11] 梁鹏, 张阳, 窦媛. 鲑鱼骨酶解物抗氧化活性及其稳定性研究[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(11): 49-52.
- [12] 刘春娥, 刘峰, 刘苏瑶, 等. 鲑鱼皮胶原活性多肽的制备研究[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(12): 161-163.
- [13] 李俊峰. 中国林蛙皮肤生物活性肽的分离纯化、结构鉴定及生物活性检测[D]. 辽宁: 辽宁师范大学, 2009.

Study on extract and enzymolysis technology of protein from discarded fish bone

ZHANG Zhen-xing^{1, 2, 3}, LIU Yong-feng^{1, 2}, LIU Yi^{1, 2}, PEI Dong^{1, 2}, WEI Jian-teng^{1, 2}, DI Duo-long^{1, 2, 3}

(1. Key Laboratory of Chemistry of Northwestern Plant Resources and Key Laboratory for Natural Medicine of Gansu Province, Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China; 2. Center of Resource Chemical and New Material, Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266100, China; 3. Gansu College of Traditional Chinese Medicine, Department of Pharmacy, Lanzhou 730000, China)

Received: Mar., 30, 2013

Key words: discarded fish bones; protein; enzymatic; polypeptide

Abstract: Different extraction methods and different protease digestion of discarded fish bone proteins were studied using extraction rate of proteins and molecular weight of peptides as evaluation indexes. The results showed that the method of high-pressure cooking had a significantly higher protein content of 86.15% and protein extraction rate of 16.76% than the methods of constant temperature water bath and hot reflux extraction. The neutral protease had a higher activity than other three kinds of proteases. The protein content could reach 88.46% and the peptide ratio could reach 95% in the protein hydrolysates using neutral protease. The enzyme dosage could be reduced when the protein was extracted with high-pressure cooking method and the polypeptide was prepared with neutral protease. This method could provide reference and new idea for polypeptide industrial production.

(本文编辑: 康亦兼)