

文章编号:1004-7271(2006)01-0078-06

## 蚯蚓蛋白酶解工艺及其产物分析

刘波, 谢骏, 郑小平, 戈贤平

(中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 江苏无锡 214081)

**摘要** 采用 As1.398 枯草蛋白酶制备蚯蚓肽, 通过单因素与正交试验设计 ( $L_9(3^4)$ ), 以氨基氮数、多肽浓度为衡量指标, 对最佳酶条件进行筛选研究, 并分析了酶解液氨基酸含量和相对分子量的分布。结果表明: 最佳酶解条件为 pH 6.5、酶浓度为 1%、温度 50 °C 反应、时间 8 h, 在此条件下, 酶解蚯蚓蛋白的水解液氨基氮数可以达到 16.55 mmol/100 mL, 水解液多肽浓度达 9.22 mg/mL, 酶解液分子量大部分是在 5 000 以下的多肽、小肽及氨基酸的混合物, 其中分子量在 220 以下的占了 72.09%, 氨基酸组成平衡, 含量丰富, 可用来制取新型氨基酸微量元素及小肽添加剂。

**关键词**: As1.398 枯草蛋白酶; 蚯蚓; 酶解; 产物分析

中图分类号: TS 201.2 文献标识码: A

## Enzymatic technology and analysis of earthworm enzymatic hydrolysate

LIU Bo, Xie Jun, ZHENG Xiao-ping, GE Xian-ping

(Freshwater Fisheries Research Center of Chinese Academy of Fishery Science, Wuxi 214081, China)

**Abstract**: Hydrolysis of earthworm with *As1.398 subtilisin* and content of amino acid and distribution of molecular weight of enzymatic products of earthworm were studied. The optimum conditions of enzymatic hydrolysis were determined with content of amino acid nitrogen and polypeptide concentration of earthworm through mono-factor analysis and orthogonal test ( $L_9(3^4)$ ). The optimum conditions of enzymatic hydrolysis were pH value 6.5, temperature 50 °C, time 8 hours, enzyme concentration 1 percent of earthworm substrate protein. In these conditions, the content of amino acid nitrogen and polypeptide concentration of earthworm enzymatic hydrolysates can reach 16.55 mmol/100 mL and 9.22 mg/mL. And enzymatic hydrolysates of earthworm mainly consisted of polypeptides, small peptides and amino acids and its molecular weight was below 5 000, and the matter under molecular weight of 220 takes 72.09%. They are plenty of essential amino acid, the balance of component of amino acid and can manufacture new additive of amino acid microelement and small peptide.

**Key words**: *As1.398 subtilisin*; earthworm; enzymatic hydrolysis; analysis of enzymatic hydrolysate

蚯蚓是属于环节动物门寡毛纲 (*Oligochaeta*) 的一类低等无脊椎环节动物, 体细长成柱状, 全身分化为许多节。蚯蚓浑身是宝, 为多功能性生物资源, 既能肥沃土壤, 净化环境, 又能提供动物需要的蛋白

收稿日期: 2005-04-12

基金项目: 中国水产科学研究基金项目 (2003-01-07)

作者简介: 刘波 (1978-), 男, 重庆市人, 研究实习员, 硕士, 主要从事水产动物营养与饲料方面的研究。

通讯作者: 戈贤平 (1963-), 男, 江苏常州市人, 研究员, 主要从事水产动物营养学方面的研究。E-mail: gexp@ffrc.cn

质、氨基酸、维生素、矿物质等营养物质,还含有溶栓酶、抗氧化酶、抗肿瘤成分及溶血素等生物活性成分<sup>[1]</sup>。蚯蚓来源广泛,养殖成本低,可部分替代鱼粉作为一种新型饲料原料,经济效益好,极具发展潜力,但是目前水产养殖中蚯蚓主要以直接投喂水产动物为主,造成利用率低,浪费大<sup>[2]</sup>,对蚯蚓的深加工,充分利用蚯蚓的生物活性成分成为研究热点。目前通过酶法水解动植物蛋白不产生消旋作用,也不破坏氨基酸,反应条件温和,反应效率高,酶解产物很少被破坏,水解生成有些小肽具有生物活性能促进动物的生产性能和免疫能力,成为提高饲料蛋白资源的一个新的亮点和热点<sup>[3,4]</sup>。本试验采用 Asl.398 蛋白酶解蚯蚓,进行酶解条件的筛选研究,确定最佳酶解条件,并对酶解产物进行分析,为蚯蚓在水产饲料中的应用提供理论依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验材料

太平二号蚯蚓粗蛋白(干质量)约 63.74%,水分 82.87%,由苏州绿环生物工程有限公司提供;枯草蛋白酶 Asl.398(50 000U/g)购于无锡酶制剂厂。

### 1.2 设备与试剂

茚三酮(上海三爱思试剂有限公司),甘氨酸(永嘉精细化工厂),AE-100 分析天平(上海梅特勒-托利多),21CR6 型恒温水浴锅(江苏南通竹行仪器厂),PXS-450 型离子计(上海康仪),J-6M 低温大容量离心机(Beckman.LTD),756 MC 紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司),YQ-3 型匀浆机(江苏江阴初唐仪器厂),Waters600 高效液相色谱(美国 WATERS 公司)等。

### 1.3 实验方法

将蚯蚓洗净,让其尽量吐出体内的食物残渣。称取 10 g 蚯蚓用高速捣碎机捣碎,加入 30 mL 水,调 pH 后加 Asl.398 蛋白酶水解,保温一定时间,100 ℃沸水浴加热灭活 100 min,室温放置 30 min,经低速(3 500 r/min),低温(4 ℃)离心 10 min,取上清液分装,密封备用。

### 1.4 试验设计

酶解工艺中对酶解效果有影响的主要因素一般为 pH 值、温度、酶浓度([E])、时间、底物浓度([S])等,由于底物浓度与加酶量有一定关系,本试验考虑 [E][S],其中加酶量为底物蚯蚓粗蛋白(干质量)含量的百分比。为了确定最佳的反应条件,先进行温度、pH、时间、[E][S]等单因子试验,以氨基氮数、多肽浓度为指标;后在单因素试验的基础上,进行正交试验,按  $L_9(3^4)$  正交表安排各自四因素和三水平,以氨基氮数为筛选指标,确定最适的酶解条件。

### 1.5 测定指标

#### 1.5.1 氨基酸的测定

氨基氮采用茚三酮比色法<sup>[5]</sup>,氨基酸采用高效液相色谱仪(HPLC),测定时样品经高速(12 000 r/min),低温(4 ℃)离心 15 min,后用 0.45 μm 滤膜过滤。

#### 1.5.2 多肽浓度

多肽浓度采用三氯乙酸(TCA)结合福林酚法测定<sup>[6]</sup>,将 5 mL 10%的 TCA 加到 5 mL 待测样品溶液中,混匀,4 ℃离心 15 min(3 000 r/min)取上清液,用 Folin 酚法测定多肽浓度。

#### 1.5.3 酶解产物分子量分布

以 Waters600 高效液相色谱,采用标准曲线法测定酶解样品的相对分子质量。分析条件在 TSK gel 2 000 SWXL 300 mm × 7.8 mm 色谱柱 30 ℃下,以乙腈/水/三氟乙酸,45/55/0.1(V/V)为流动相,0.5 mL/min 流速 UV200 nm 下测定。分子量校正曲线所用标准品为:细胞色素 C(MW12500)、抑肽酶(MW6500)、杆菌酶(MW1450)、乙氨酸-乙氨酸-酪氨酸-精氨酸(MW451)、乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸(MW189),首先根据标准蛋白质相对分子质量及其对应的出峰时间,求出相对分子质量标准曲线为:LogM

= 7.38 - 0.244(t<sub>1</sub> - t<sub>2</sub>) ,再用待测酶解样品上柱 ,记录出峰时间 ,从标准曲线求出酶解样品的相对分子质量。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因子试验

#### 2.1.1 温度

保持 pH=7.0 ,时间 = 6 h [ E ] [ S ] = 5% ,温度梯度为 40 ℃ ,45 ℃ ,50 ℃ ,55 ℃ ,60 ℃ ,随着温度的增加 ,氨基氮数先上升后下降 ,多肽浓度趋于平缓的下降后有上升的趋势 ,50 ℃ 时氨基氮数和多肽浓度都比较高 ,故最适酶解温度可能在 50 ℃ 左右(图 1)。

#### 2.1.2 pH

保持温度 = 50 ℃ [ E ] [ S ] = 5% ,时间 = 6h ,pH 梯度为 6.0 ,6.5 ,7.0 ,7.5 ,8.0 ,随着 pH 的增加 ,氨基氮数也先上升后下降 ,多肽浓度趋于平缓下降后有上升的趋势 ,pH = 6.5 时氨基氮数和多肽浓度都比较高 ,故最适酶解 pH 可能在 6.5 左右(图 2)。

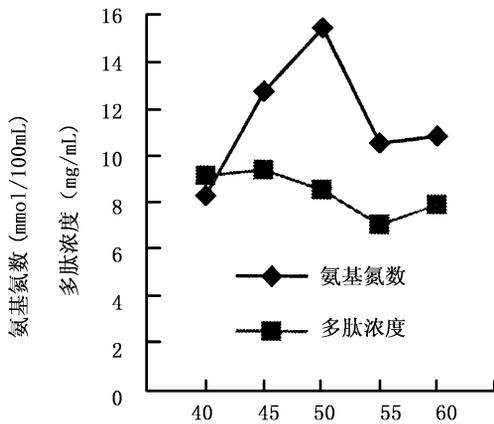


图 1 不同酶解温度( ℃ )下酶解产物的氨基氮数和 多肽浓度

Fig.1 Amino acid nitrogen and polypeptide concentration of enzymatic hydrolysate in different temperature

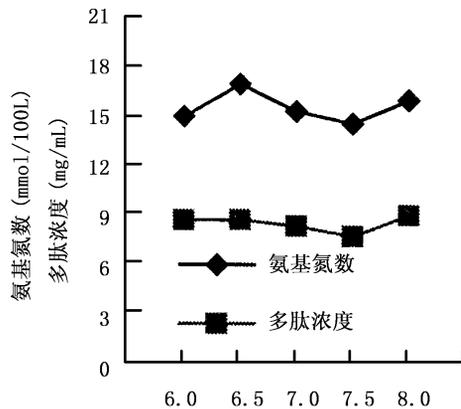


图 2 不同 pH 下酶解产物的氨基氮数和 多肽浓度

Fig.2 Amino acid nitrogen and polypeptide concentration of enzymatic hydrolysate in different pH

#### 2.1.3 时间

保持温度 = 50 ℃ [ E ] [ S ] = 5% ,pH = 7.0 ,时间梯度为 2 ,4 ,6 ,8 ,10 ,14 ,随着酶解时间的延长 ,氨基氮数在 6 小时后上升趋于平缓 ,多肽浓度在 10 小时后达最大后有下降趋势 ,故最适酶解时间可能在 10 小时左右(图 3)。

#### 2.1.4 加酶量

保持温度 = 50 ℃ ,时间 = 6 h ,pH = 7.0 [ E ] [ S ] 梯度为 0.5% ,1% ,2% ,3% ,5% 随着 [ E ] [ S ] 浓度的增加 ,达 2% 后氨基氮数和多肽浓度增加没有什么变化 ,故最适 As1.398 蛋白酶的添加量为 2% 左右(图 4)。

### 2.2 正交试验

在单因素试验的基础上 ,每个因素只选 3 个水平 ,选用 L<sub>9</sub>( 3<sup>4</sup> )正交试验 ,以氨基氮数定指标确定反应的最佳酶解条件 ,因素和水平排列见表 1 2。

由极差分析可知 ,以氨基氮数为指标 ,影响 As1.398 蛋白酶酶解蚯蚓蛋白的因素主次关系为 C > A > D > B ,即 :影响酶解最主要因素是温度 ,其次是 pH ,再次为酶解时间 ,最后为酶浓度 ,最佳酶解条

件组合为 A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>C<sub>2</sub>D<sub>1</sub> 即 pH 6.5、[ E ] [ S ] 1%、温度 50 ℃、反应时间 8 h,在此条件下,酶解蚯蚓蛋白的每 100 mL 水解液氨基氮数可达到 16.55 mmol,水解液多肽浓度达 9.22 mg/mL。

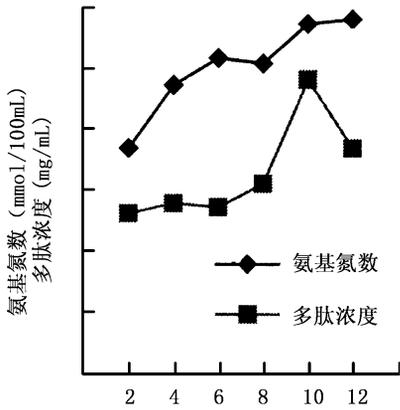


图 3 不同酶解时间(h)下酶解产物的氨基氮数和 多肽浓度

Fig.3 Amino acid nitrogen and polypeptide concentration of enzymatic hydrolysate in different time

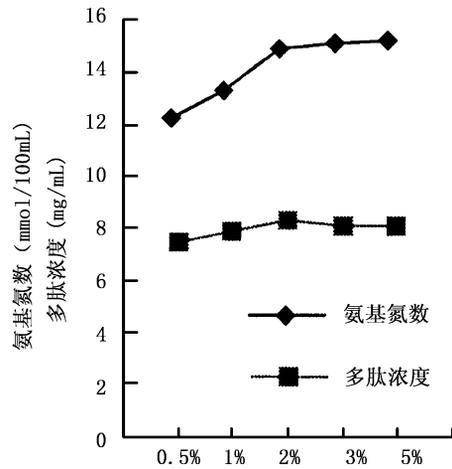


图 4 不同 Asl.398 蛋白酶浓度下酶解产物的 氨基氮数和多肽浓度

Fig.4 Amino acid nitrogen and polypeptide concentration of enzymatic hydrolysate in different concentration of Aspl.398 subtilisin

表 1 Asl.398 蛋白酶酶解蚯蚓正交试验的各因素水平表 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)

Tab.1 Factor Levels of orthogonal experiment[ L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) ]of earthworm hydrolysate with Asl.398 subtilisin

I 水平 level	A pH	B [ E ] [ S ] (%)	C 温度( ℃ )	D 时间( h )
1	6.0	1	45	8
2	6.5	2	50	10
3	7.0	3	55	12

表 2 Asl.398 蛋白酶酶解蚯蚓正交试验条件及结果分析

Tab.2 Results and analyses of orthogonal experiment of earthworm hydrolysate with Aspl.398 subtilisin

试验号	A PH	B [ E ] [ S ] (%)	C 温度( ℃ )	D 时间( h )	氨基氮数 ( mmol/100mL )	多肽浓度 ( mg/mL )
1	1(6.0)	1(1%)	1(45 ℃)	1(8 h)	10.57 ± 0.14	9.06 ± 0.02
2	1(6.0)	2(2%)	2(50 ℃)	2(10 h)	14.15 ± 0.36	9.16 ± 0.19
3	1(6.0)	3(3%)	3(55 ℃)	3(12 h)	12.56 ± 0.04	7.98 ± 0.05
4	2(6.5)	1(1%)	2(50 ℃)	3(12 h)	15.74 ± 0.24	9.50 ± 0.12
5	2(6.5)	2(2%)	3(55 ℃)	1(8 h)	14.51 ± 0.15	9.02 ± 0.14
6	2(6.5)	3(3%)	1(45 ℃)	2(10 h)	11.37 ± 0.15	7.80 ± 0.03
7	3(7.0)	1(1%)	3(55 ℃)	2(10 h)	15.44 ± 0.53	9.49 ± 0.11
8	3(7.0)	2(2%)	1(45 ℃)	3(12 h)	9.01 ± 0.28	6.77 ± 0.25
9	3(7.0)	3(3%)	2(50 ℃)	1(8 h)	16.47 ± 0.14	9.13 ± 0.04
k1	12.43	13.92	10.32	13.85		
k2	13.87	12.56	15.45	13.66		
k3	13.46	13.48	14.17	12.44		
R	1.44	1.36	5.14	1.41		

因素主次 :C > A > D > B

### 2.3 酶解产物分析

#### 2.3.1 酶解产物分子量分布

由表 3、图 5 及图 6 可知:在 Asl.398 蛋白酶最佳酶解条件下,蚯蚓酶解产物大部分都生成了分子量

在 5 000 以下的多肽、小肽及氨基酸的混合物,其中分子量在 220~5 000 的占了 15.98%,分子量在 220 以下占了 72.94%。这表明枯草蛋白酶 Asl.398 酶解蚯蚓可用来制取新型小肽添加剂。

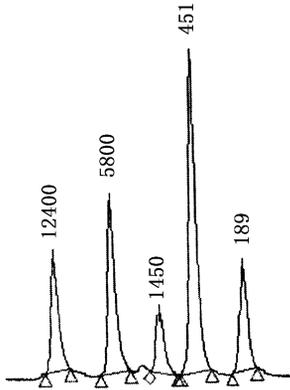


图 5 标准蛋白样品高效液相色谱分析图

Fig.5 Analysis chromatogram of standard protein with HPLC

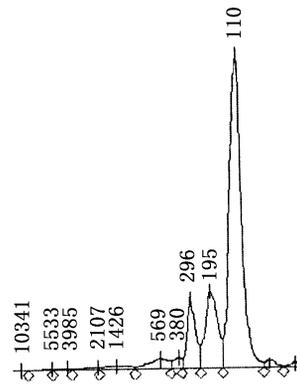


图 6 Asl.398 蛋白酶酶解蚯蚓产物高效液相色谱图

Fig.6 Analysis chromatogram of earthworm enzymic hydrolysate with Asl.398 subtilisin

表 3 Asl.398 蛋白酶酶解蚯蚓产物相对分子量分布范围

Tab.3 Distributing of relative molecular weight of earthworm hydrolysate with Asl.398 subtilisin

相对分子量范围	氨基酸残基数	含量(%)
$\geq 28\ 760$	$\geq 221$	10.60
28 760 ~ 5 000	221 ~ 38	0.48
5 000 ~ 860	38 ~ 6	2.55
860 ~ 320	6 ~ 2	4.37
320 ~ 220	$\leq 2$	9.06
$\leq 220$	$\leq 2$	72.94

### 2.3.2 酶解产物氨基酸分析

由表 4 可知:Asl.398 蛋白酶最佳酶条件下的水解液总游离氨基酸有 4.55 mg/mL,必需氨基酸达 3.10 mg/mL,占总氨基酸的 68.17%,另外组氨酸、亮氨酸、赖氨酸等相对含量比较高,其中提高适口性的天冬氨酸、谷氨酸、丙氨酸及甘氨酸等含量也相对较多,这表明蚯蚓水解液中氨基酸含量丰富,可以制取氨基酸饲料添加剂。

## 3 讨论

以往研究表明蛋白质的营养实际上就是小肽和氨基酸的营养,蛋白质在动物消化酶作用下的水解终产物大部分是 2 或 3 个氨基酸残基组成的肽,它们以完整的形式进入循环系统而被组织利用<sup>[7]</sup>,打破了长期以来一直认为游离氨基酸是主要的吸收形式。本试验研究表明:Asl.398 蛋白酶酶解蚯蚓的最佳条件为 pH=6.5、[E][S]、温度 50℃、反应时间 8 h,在这个条件下水解液分子量大部分是在 5 000 以下的多肽、小肽及氨基酸的混合物,其中分子量在 220~5 000 的占了 15.98%,分子量在 220 以下占了 72.94%。1996 年美国饲料管理官方协会(AAFCO)要求氨基酸微量元素整合物氨基酸平均分子量为 150 左右,所形成的整合物的分子量不得超过 800,这表明可用蚯蚓酶解物制取新型氨基酸微量元素和小肽添加剂方示之一。

表 4 蚯蚓酶解液游离氨基酸含量  
 Tab.4 Content of free amino acid of earthworm enzymic hydrolysate

氨基酸	蚯蚓酶解液*	
	氨基酸含量(mg/mL)	AA/TAA(%)
asp	0.53	11.66
glu	0.23	5.03
ser	0.14	3.13
his	0.55	11.99
gly	0.09	1.87
yjr	0.02	0.34
ala	0.29	6.45
arg	0.45	9.85
try	0.19	4.13
cys	0.16	3.62
val	0.19	4.16
met	0.10	2.28
phe	0.22	4.79
ile	0.18	4.03
leu	0.43	9.32
lys	0.79	17.36
pro	0.01	0.12
EAA	3.10	
TAA	4.55	
EAA/TAA(%)	68.17	

注 :AA 表示氨基酸 ,EAA 表示必需氨基酸 ,TAA 表示总氨基酸 ;\* 蚯蚓:水 = 1:3(g/mL)。

同时蚯蚓酶解物中游离的组氨酸、亮氨酸、赖氨酸等相对含量比较高,而在以谷物为主的饲料原料中的赖氨酸含量甚低,且在加工过程中易被破坏而缺乏,这样添加蚯蚓酶解物能起到平衡氨基酸的作用,提高饲料的营养价值;其中确定食物口味的丙氨酸、甘氨酸、天冬氨酸和谷氨酸等四种氨基酸<sup>[8]</sup>,其含量也相对较多,可提高动物的适口性,增加采食量,这可望作为诱食剂方法之一。

#### 参考文献:

- [1] 武金霞,赵晓瑜.蚯蚓体内生物活性成分的研究[J].自然杂志,2001(1):27-30.
- [2] Toshio Akiyana,Takeshi Murai,Yasuhiro Hirasawa. Supplementation of various meals to fish meal diet for chum salmon fry[J]. Aquaculture,1984,37(3):217-222.
- [3] Boza J J, Martinez-Augustin O, Baro L, et al. Protein V. enzymic Protein hydrolysates nitrogen utilization in started rat[J]. Br J Nutr,1995,73(1):65-71.
- [4] 冯 健,高 玲,刘永坚等.草鱼日粮中虾蛋白肽对幼龄草鱼生长性能的影响[J].中山大学学报(自然科学版),2004,43(2):100-103.
- [5] 张意静.食品分析技术[M].北京:中国轻工业出版社,1996.175-177.
- [6] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent[J]. Biol Chem,1951,193:265-275.
- [7] Webb K Jr, Matthews J C, Dirjenzo D B. Peptid absorption :A review of current concepts and future perspectives[J]. Anim Sci,1992,70(10):3248-3257.
- [8] 王安利,苗玉涛,王维挪等.水产动物诱食剂研究进展[J].水产学报,2002,26(3):265-268.