

鲛鱼副产物中产蛋白酶微生物的分离与表征

王宗敏^{1*}, 王辛禹¹, 白桦¹, 李赫², 彭林³, 闫洪波¹, 朱兰兰^{1*}, 王彦波⁴

(1. 山东理工大学农业工程与食品科学学院, 淄博 255000; 2. 齐鲁工业大学化学与化工学院, 菏泽 274000;
3. 台州学院生命科学院, 台州 318000; 4. 浙江工商大学食品与生物工程学院, 杭州 310035)

摘要: **目的** 以鲛鱼副产物为实验材料, 定向筛选高产蛋白酶的野生菌株。**方法** 以脱脂牛奶培养基对鲛鱼副产物中的产蛋白酶微生物进行初筛, 采用福林酚方法对各菌株产蛋白酶的活力进行测定, 复筛出具有高产碱性蛋白酶和中性蛋白酶的野生菌株, 并通过分子生物学方法(16S rDNA 测序分析)对高产蛋白酶菌株进行物种鉴定。进一步通过测定高产菌发酵过程中的菌株浓度和蛋白酶活力, 分析菌株随发酵时间的生长情况和产酶动力学。**结果** 采用选择性培养基初步筛选获得 8 株具有蛋白酶活性的菌株, 进一步复筛发现两株菌 Z3 和 Z8 菌株产蛋白酶的能力较强[碱性蛋白酶活力分别为(393.87±19.69)、(358.87±17.94) U/mL; 中性蛋白酶活力分别为(344.87±17.24)、(291.20±14.56) U/mL]。经分子生物学测序比对分析菌株 Z3 和 Z8 分别鉴定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)。对两株菌的生产情况和产酶能力进行研究, 发现两株菌的产酶模式均为部分生长偶联型, 枯草芽孢杆菌 Z3 菌株合成碱性蛋白酶和中性蛋白酶的能力优于蜡样芽孢杆菌 Z8。**结论** 本研究从鲛鱼副产物中定向分离得到 2 株产蛋白酶的野生菌株, 在基础发酵培养基上展现出较好的产蛋白酶的能力。

关键词: 鲛鱼副产物; 蛋白酶活性; 产酶能力; 枯草芽孢杆菌; 蜡样芽孢杆菌

Isolation and characterization of microorganisms producing proteinase from by-products of *Scomberomorus niphonius*

WANG Zong-Min^{1*}, WANG Xin-Yu¹, BAI Hua¹, LI He², PENG Lin³, YAN Hong-Bo¹,
ZHU Lan-Lan^{1*}, WANG Yan-Bo⁴

(1. School of Agricultural Engineering and Food Science, Shandong University of Technology, Zibo 255000, China;
2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Qilu University of Technology, Heze 274000, China;
3. School of Life Science, Taizhou University, Taizhou 318000, China; 4. School of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310035, China)

ABSTRACT: Objective To screen the wild strain with high proteinase yield using the by-product of *Scomberomorus*

基金项目: 山东省重点研发计划项目(2022CXGC020414)、国家自然科学基金项目(31701584)、国家重点研发计划项目(2018YFC1604103-05)、江苏省自然科学基金项目(BK20170183)

Fund: Supported by the Provincial Key Research and Development Program of Shandong Province (2022CXGC020414), the National Natural Science Foundation of China (31701584), the National Key Research and Development Program of China (2018YFC1604103-05), and the Provincial Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20170183)

*通信作者: 王宗敏, 博士, 副教授, 主要研究方向为传统发酵食品功能开发。E-mail: wangmin110120@126.com

朱兰兰, 博士, 教授, 主要研究方向为水产品功能物质开发。E-mail: chinaxiaolan@163.com

*Corresponding author: WANG Zong-Min, Ph.D, Associate Professor, School of Agricultural Engineering and Food Science, Shandong University of Technology, No.266, Xincun West Road, Zibo 255000, China. E-mail: wangmin110120@126.com

ZHU Lan-Lan, Ph.D, Professor, School of Agricultural Engineering and Food Science, Shandong University of Technology, No.266, Xincun West Road, Zibo 255000, China. E-mail: chinaxiaolan@163.com

niphonius as experimental material. **Methods** The proteinase-producing microorganisms from the by-products of *Scomberomorus niphonius* were selected by using the skim milk medium. The ability of producing proteinase for each strain was measured by Folinol-Ciocalteu method, and wild strains with high-yield of alkaline proteinase and neutral proteinase were screened. The species of high-yield abilities of producing proteinase strain was identified by molecular biological method (16S rDNA sequencing analysis). Further, the growth and production of proteinases for each strain were analyzed by measuring the concentration of bacteria and the activity of proteinase during the fermentation process. **Results** Eight microbial strains with potential activity of proteinase were obtained by preliminary screening using selective medium from the by-products of *Scomberomorus niphonius*. Further, it was found that the 2 strains of Z3 and Z8 performed more excellent abilities of producing proteinase. The activity of alkaline proteinase from strain Z3 and Z8 was (393.87±19.69) and (358.87±17.94) U/mL respectively; and the activity of neutral proteinase was (344.87±17.24) and (291.20±14.56) U/mL for strain Z3 and Z8. Using molecular biology identification methods, it was determined that the strains of Z3 and Z8 were identified as *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus*, respectively. The production situation and enzyme production capacity of the 2 strains were studied. It was found that the enzyme production mode of the 2 strains was partial growth-related type. *Bacillus subtilis* Z3 had a better ability to synthesize alkaline proteinase and neutral proteinase than *Bacillus cereus* Z8. **Conclusion** In this study, 2 wild strains producing proteinase are obtained by directional isolation from by-products of *Scomberomorus niphonius* and shows good abilities of producing proteinase on basic fermentation medium.

KEY WORDS: by-products of *Scomberomorus niphonius*; proteinase activity; production capacity of proteinase; *Bacillus subtilis*; *Bacillus cereus*

0 引言

水产品在加工处理后产生大量的副产物, 约占总产量的 30%~70%^[1-3]。目前对水产品副产物的利用率相对较低, 仅有小部分被当作普通饲料或肥料, 大部分直接被丢弃在环境中^[4-10]。然而水产品副产物中仍有可利用的营养物质, 水产品的头部、皮肤和内脏等副产物中含有丰富的蛋白质^[11-12]。另外, 像鳗骨、鳗头等废弃物中还含有磷脂质、软骨素和维生素等^[13], 这些副产物中的营养物质在自然条件下就可以被微生物菌群利用, 因此水产品下脚料是微生物生长的良好基质。

以水产品为原料的发酵食品如鱼露和虾酱是通过加盐后自然发酵而成, 在发酵过程中, 水产品原料及环境中的微生物种类和数量逐渐增加^[14], 其中一些功能微生物能分泌大量蛋白酶, 将水产品中的蛋白质水解生成氨基酸和小分子肽, 赋予鱼露和虾酱的主体鲜味和香味^[15-17]。研究表明发酵水产品中的优势微生物为乳酸杆菌属、葡萄球菌属、芽孢杆菌属、弧菌属、四联球菌属等嗜盐细菌^[18-19], 这些细菌在蛋白质水解和虾酱风味形成中起着重要作用^[20-22]。因此水产品下脚料也是筛选高产蛋白酶微生物的良好来源。目前对水产品副产物的处理大多采用商品化的蛋白酶类, 底物特异性相对偏低, 而专门用于水产品副产物综合利用的微生物资源有限, 因此为了拓宽水

产品副产物在综合利用过程中蛋白质分解的方法, 本研究以鲢鱼副产物为实验材料原位筛选高产蛋白酶的微生物资源。

本研究采用选择性培养方法从鲢鱼原位副产物中筛选出具有高产蛋白酶的微生物菌株, 通过分子生物学和形态学方法对菌种进行鉴定, 并初步分析菌株所产蛋白酶的发酵特性, 为水产品副产物的高值化利用(制备风味肽和其他生物活性肽)提供高效、有特异性的微生物蛋白酶类, 也为水产品副产物的综合利用(肥料腐熟或饲料加工)提供良好的微生物资源。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鲢鱼头、骨(淄博市水产品市场)。

牛肉膏、蛋白胨、福林酚(生物试剂)、牛肉浸膏、考马斯亮蓝 G250(分析纯)、D-无水葡萄糖(优级纯)(上海麦克林生化科技公司); 脱脂牛奶(德国甘蒂牧场); 中性蛋白酶(50 U/mg)、碱性蛋白酶(200 U/mg)、L-酪氨酸(优级纯)(上海贤鼎生物科技有限公司); 牛血清蛋白(优级纯, 上海生工生物工程有限公司); 干酪素(生物试剂, 阿达玛斯试剂有限公司)。

1.2 仪器与设备

UV-2102PCS 型紫外线分光光度计(上海美普达仪器

有限公司); H1850R 台式高速冷冻离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司); LMQ.C 立式灭菌器(山东新华医疗器械股份有限公司); ZS-AR 全温振荡培养箱(浙江华源仪器有限公司); FA2204 电子分析天平(精度 0.1 mg, 上海衡平仪器仪表厂)。

1.3 实验方法

1.3.1 培养基

选择性培养基^[23]: 脱脂牛奶 62%, 纯化水 36%, 琼脂 2%, 110°C 灭菌 15 min。

纯化培养基^[24]: 蛋白胨 10 g/L, 氯化钠 5 g/L, 牛肉膏 3 g/L, 121°C 灭菌 20 min。

基本培养基^[25]: D-葡萄糖 5.0 g/L, 硫酸铵 1.0 g/L, 磷酸二氢钾 0.5 g/L, 磷酸二氢钠 1.5 g/L, 氯化钠 1.0 g/L, 七水硫酸镁 0.2 g/L, 调节 pH 至 7.2, 121°C 灭菌 20 min^[26]。

1.3.2 水产品副产物中产蛋白酶微生物的筛选分离与纯化

预处理: 取 10 g 样品于装有 90 mL 液体纯化培养基中, 放置于 37°C 恒温培养箱中培养 36 h, 进行富集培养。

分离与纯化: 取 1 mL 富集培养液进行梯度稀释(10^{-2} ~ 10^{-5}), 将合适稀释倍数的菌悬液分别涂布于固体选择性培养基上, 放置于 37°C 的恒温培养箱中培养 24~36 h, 挑选具有透明圈的、且具有不同形态单菌落进一步分离与纯化, 直至形成形态均一的单菌落。最后在光学显微镜下用沙黄染色, 观察单菌落形态。

复筛: 将纯化后的菌株接种至液体基础培养基中, 在 37°C、140 r/min 条件下恒温摇床培养 48 h。将培养好的菌液进行离心(10000 r/min, 5 min), 测定上清液中蛋白酶的酶活力。

1.3.3 微生物蛋白酶活力测定

采用福林酚法测定蛋白酶活力^[27]。

(1) 酪氨酸标准曲线绘制

取 1 mL 不同质量浓度 L-酪氨酸标准工作溶液(0、20、40、60、80、100 $\mu\text{g/mL}$)于试管内, 按顺序加入 5 mL 0.4 mol/L 碳酸钠溶液和 1 mL 福林酚试剂(原液 3 倍稀释后), 放置于 40°C 恒温水浴锅中, 显色反应 20 min, 取出冷却后, 以酪氨酸浓度为 0 $\mu\text{g/mL}$ 的反应液为空白对照, 使用紫外线分光光度计测定在波长为 680 nm 下的吸光值, 绘制浓度对应吸光值的标准曲线。

(2) 样品酶活的测定

取试管加入酪蛋白标准溶液(100 $\mu\text{g/mL}$)各 1 mL, 40°C 水浴保温 5 min; 在试管中加入预热的菌株培养液上清液 1 mL, 阴性对照中加入空白基础培养基, pH 分别控制在中性和碱性条件, 40°C 水浴反应 60 min 后, 加入 2 mL 三氯乙酸溶液(4 mol/L)终止反应, 摇匀在 40°C 水浴中保温 20 min; 反应液离心(10000 r/min, 5 min)取上清液 1 mL 于比色管内, 并依次加入 5 mL 碳酸钠溶液(0.4 mol/L)和 1 mL 福林

试剂(原液 3 倍稀释后), 40°C 水浴反应 20 min, 取出待冷却至室温后, 使用紫外线分光光度计在波长为 680 nm 下分别测定吸光值, 根据标准曲线 $Y=0.01X+0.0072$ ($r^2=0.9991$, X 为酪氨酸浓度, $\mu\text{g/mL}$, Y 为 680 nm 波长下福林酚显色反应液的吸光值)进行定量。

蛋白酶活力单位: 蛋白酶活力的大小用酶活力单位表示, 定义为: 在温度为 40°C 和不同酸碱度下(中性 pH 7.00、碱性 pH 10.20), 每分钟能催化水解酪蛋白生成 1 μg 的酪氨酸所用酶量为一个酶活力单位(U)。

1.3.4 产蛋白酶微生物的鉴定

用细菌基因组提取试剂盒提取产蛋白酶活力较高的微生物菌株 Z3 和 Z8 的基因组 DNA, 以此作为 PCR 扩增模板, 对 16S rRNA 基因进行扩增。将 16S rDNA 全长扩增产物送至生工生物工程公司进行测序。将测序后的 16S rDNA 序列与已知序列进行同源比对(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), 选择与比对序列相似度最高的物种作为鉴定结果, 并制作系统进化树。

1.3.5 产蛋白酶微生物菌株生长情况和产酶情况分析

将产蛋白酶活力较好的菌株 Z3 和 Z8 接种到基础培养基中, 放置于恒温振荡器内, 200 r/min、37°C 振荡培养。每隔 4 h 取样, 分别测定样品的菌液浓度(OD_{600})和蛋白酶活力, 蛋白酶活力测定方法与 1.3.3 方法相同, 分析各个菌株随着发酵时间的变化的生长情况和蛋白酶的动态变化规律。

1.4 数据处理

产蛋白酶微生物菌株的复筛实验以及两株优势产酶菌株的产酶分析实验均重复 3 次, 结果以“平均值 \pm 标准偏差”表示。采用 Excel 2013 和 SPSS 22.0 软件进行数据统计和分析, 采用 Origin 9.3 和 Mega 10.0 进行绘图。

2 结果与分析

2.1 产蛋白酶微生物菌株的分离、纯化

从脱脂牛奶培养基上, 根据菌落的大小、颜色以及形态的区别, 挑取分离后的单个菌落, 利用相同的培养基, 通过反复纯化后得到 8 株菌株, 分别为 Z1、Z2、Z3、Z4、Z5、Z6、Z7、Z8。菌株形态大都为在透明圈中呈乳白色, 四周较平整, 而中心位置出现凸起并且存在环绕的呈放射状的裂缝。部分菌株的菌落形态和显微镜下的形态如图 1 所示, 大部分菌株均呈杆状, 呈链状排布。

2.2 产蛋白酶微生物菌株的复筛

为了进一步筛选出具有高产蛋白酶能力的微生物, 采用福林酚法测定蛋白酶活力, 从图 2 中可看到筛选出的除了菌株 Z5 外, 其他菌株的碱性蛋白酶活力均高于中性蛋白酶活力, 说明这些菌株发挥酶活力的最适环境均为碱性。在 8 株菌株中碱性蛋白酶活力最高的菌株为 Z3

[(393.87±19.69) U/mL], 其次是菌株 Z8 和 Z1[酶活力分别为(358.87±17.94) U/mL 和(349.53±17.47) U/mL]。对菌株产中性蛋白酶的情况考察发现菌株 Z3 的中性蛋白酶活力最高[(344.87±17.24) U/mL], 其次是菌株 Z5、Z8 和 Z1, 中性蛋白酶活力分别为(298.20±14.91)、(291.20±14.56)和(272.53±13.62) U/mL。综合分析各菌株产两种蛋白酶的能力发现 Z3 和 Z8 为产蛋白酶的优势菌株。

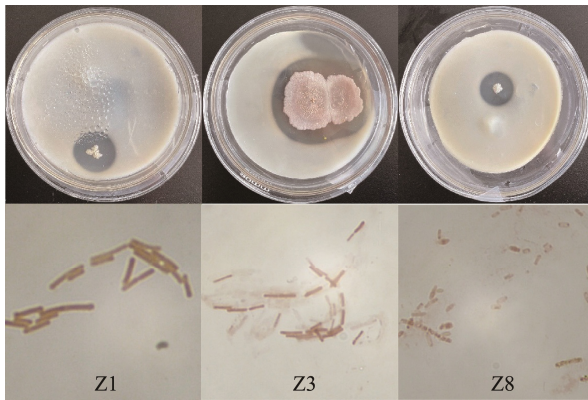
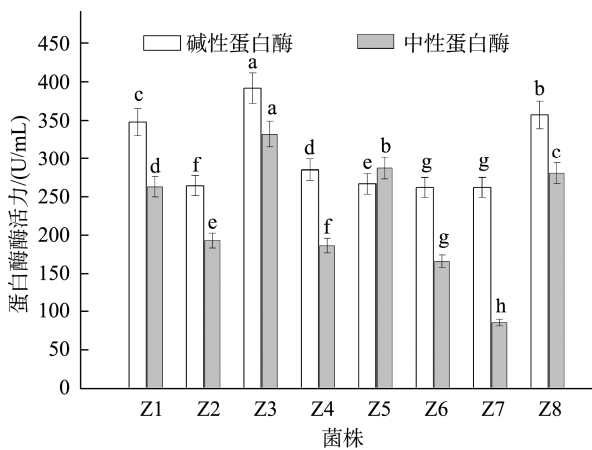


图 1 部分产蛋白酶微生物固体培养基上菌落形态和显微镜下形态(10×100 倍)

Fig.1 Colony morphology in solid medium and microscopic morphology of some protease producing microorganisms (10×100)



注: 不同小写字母代表差异显著($P<0.05$)。

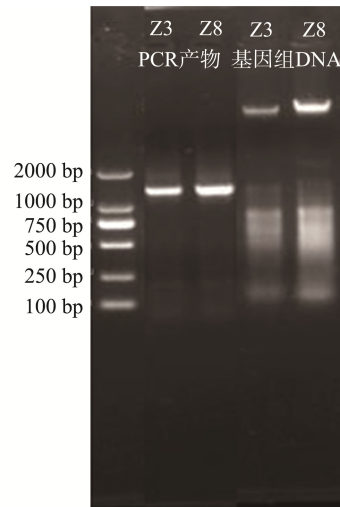
图 2 各菌株在碱性条件和中性条件下的蛋白酶活力情况

Fig.2 Activities of alkaline and neutral proteinase in different strains

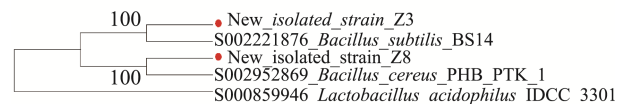
2.3 产蛋白酶微生物菌株的分子生物学鉴定结果

为了确定菌株 Z3 和 Z8 的分类学所在种属, 通过 DNA 提取和 16S rDNA 扩增获得菌株 Z3 与 Z8 的基因组 DNA 和 16S rDNA 产物, 片段大小符合目的片段(图 3a)。16S rDNA 测序后的序列在 NCBI 同源比对分析, 从图 3b

中可以看到产蛋白酶菌株 Z3 与枯草芽孢杆菌 BS14 (*Bacillus subtilis* BS14) 同源性最高, 相似度为 99.86%, 菌株 Z3 鉴定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。与产蛋白酶菌株 Z8 16S rDNA 序列同源性最高的是蜡样芽孢杆菌 pHB_PTK_1 (*Bacillus cereus* pHB_PTK_1)(97.88%), 因此菌株 Z8 可初步鉴定为蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)。目前芽孢杆菌属是工业上用于产蛋白酶的优势微生物。中性蛋白酶高产菌集中在曲霉属和芽孢杆菌属, 曲霉属以米曲霉为主^[28], 而芽孢杆菌属菌株包括枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、耐热解蛋白芽孢杆菌 (*B. sporothermodurans*)、蜡样芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)^[29-31]。工业上采用 *B. subtilis* AS1.398 生产中性蛋白酶已有多年的历史^[32]。工业化生产碱性蛋白酶的菌株主要集中在链霉菌属和芽孢杆菌属, 如地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*)、解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)、短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) 和嗜碱芽孢杆菌 (*Bacillus alcalophilus*)^[32]。我国最早用于碱性蛋白酶工业化生产的微生物是 *Bacillus licheniformis* C1213, *Bacillus pumilus* 289 和 *Bacillus pumilus* 209 也相继应用于工业化生产碱性蛋白酶^[13]。



(a)



(b)

注: (a)为菌株基因组和 16S rDNA 电泳图; (b)为基于 16S rDNA 序列产蛋白酶菌株系统进化树分析图。

图 3 菌株 Z3 和 Z8 分子生物学鉴定

Fig.3 Molecular biological identification of strain Z3 and Z8 based on 16S rDNA sequences

2.4 枯草芽孢杆菌 Z3 发酵过程中的生长情况和产蛋白酶规律研究

枯草芽孢杆菌 Z3 在发酵过程中的生长情况如图 4 所示, 菌株 Z3 在前 8 h 处于生长迟缓期, 8 h 后逐渐适应环境进入生长对数期(12~24 h), 该阶段枯草芽孢杆菌 Z3 的生物量急剧上升; 24 h 后枯草芽孢杆菌 Z3 的生长速率变缓, 逐渐进入稳定期(24~40 h), 40 h 后菌株进入衰退期, 生物量缓慢下降。

伴随着枯草芽孢杆菌 Z3 的生长, 碱性蛋白酶和中性蛋白酶的酶活力菌呈逐渐上升的趋势(图 4)。两种蛋白酶的酶活力在枯草芽孢杆菌 Z3 进入对数期后开始升高, 随着枯草芽孢杆菌 Z3 进入稳定期后两种蛋白酶活力继续上升, 其中碱性蛋白酶的合成量一直高于中性蛋白酶, 当枯草芽孢杆菌 Z3 进入衰退期后两种蛋白酶的活力仍然在升高, 并且碱性蛋白酶的合成速率高于菌株处于稳定期的合成速率, 这说明两种蛋白酶的合成与枯草芽孢杆菌 Z3 的生长关系均为部分生长偶联型, 菌株 Z3 在进入稳定期和衰退期后中性蛋白酶和碱性蛋白酶的合成基因仍能够正常进行表达和翻译, 延续两种蛋白酶的合成。当枯草芽孢杆菌 Z3 发酵结束时, 合成的碱性蛋白酶的活力为(394.08±19.70) U/mL, 中性蛋白酶活力为(276.32±13.82) U/mL。

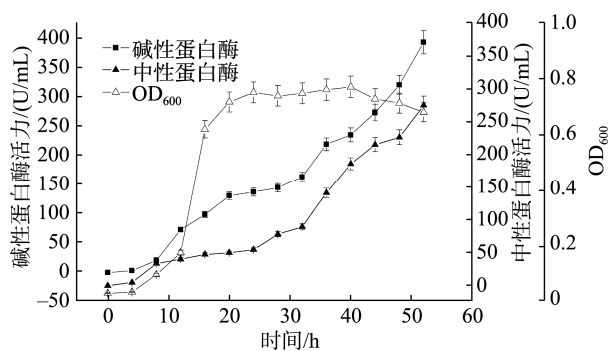


图 4 枯草芽孢杆菌 Z3 生长曲线和产蛋白酶的动态变化
Fig.4 Growth curve and dynamics of proteinase for the strain of *Bacillus subtilis* Z3

2.5 蜡样芽孢杆菌 Z8 在发酵过程中的生长情况和产蛋白酶规律研究

蜡样芽孢杆菌 Z8 在发酵过程中的生长情况如图 5 所示, 在前 4 h 处于生长迟缓期, 4 h 蜡样芽孢杆菌 Z8 逐渐适应环境进入生长对数期, 8~12 h 蜡样芽孢杆菌 Z8 的生物量急剧上升; 12 h 后蜡样芽孢杆菌 Z8 的生长速率变缓, 逐渐进入稳定期(16~44 h), 44 h 后菌株 Z8 生物量明显下降, 逐渐进入衰退期。伴随着蜡样芽孢杆菌 Z8 的生长, 碱性蛋

白酶和中性蛋白酶的酶活力呈现逐渐上升趋势(图 5)。中性蛋白酶和碱性蛋白酶活力在蜡样芽孢杆菌 Z8 进入对数期后迅速升高, 当菌株进入稳定期后两种蛋白酶活力随着微生物的生长继续上升, 其中碱性蛋白酶的产量要高于中性蛋白酶, 当蜡样芽孢杆菌 Z8 进入衰退期后两种蛋白酶的活力仍然在升高, 并且碱性蛋白酶的合成速率高于菌株处于稳定期的合成速率, 这说明碱性蛋白酶和中性蛋白酶的合成与蜡样芽孢杆菌 Z8 的生长关系均为部分生长偶联型, 蜡样芽孢杆菌 Z8 在进入稳定期和衰退期后中性蛋白酶和碱性蛋白酶的合成基因仍能够正常进行表达和翻译, 延续两种蛋白酶的合成。当蜡样芽孢杆菌 Z8 发酵结束时, 合成的碱性蛋白酶的活力为(358.40±17.92) U/mL, 中性蛋白酶活力为(252.72±12.63) U/mL。

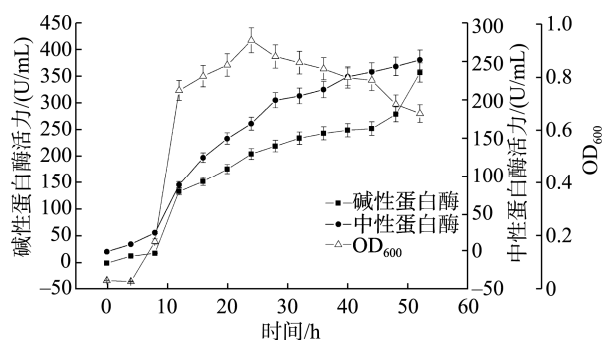


图 5 蜡样芽孢杆菌 Z8 生长曲线和产蛋白酶的动态变化
Fig.5 Growth curve and dynamics of proteinase for the strain of *Bacillus cereus* Z8

3 讨论与结论

本研究从鲑鱼副产物中分离出 8 株菌落形态各不相同的产蛋白酶菌株, 测定 8 株菌株的蛋白酶活力, 发现菌株 Z3 和 Z8 具有较强的蛋白酶活力, 在碱性条件下酶活分别为(393.87±19.69)、(358.87±17.94) U/mL, 中性条件下酶活分别为(344.87±17.24)、(291.20±14.56) U/mL。经 16S rDNA 测序分析鉴定, 菌株 Z3 和 Z8 分别鉴定为 *Bacillus subtilis*(枯草芽孢杆菌)和 *Bacillus cereus*(蜡样芽孢杆菌)。综合分析枯草芽孢杆菌 Z3 和蜡样芽孢杆菌 Z8 两株菌的种生长情况和产酶情况, 两株菌的产酶模式均为部分生长偶联型, 枯草芽孢杆菌 Z3 菌株合成碱性蛋白酶和中性蛋白酶的能力优于蜡样芽孢杆菌 Z8 菌株。两株产蛋白酶微生物是从水产品副产物中分离得到的野生菌株, 在基础发酵培养基上已经展现出较好的产蛋白酶的能力。在今后的工作中将以水产品或其副产物作为底物进行驯化培养, 定向筛选出能高效并特异性水解水产品中蛋白质的优势微生物, 为水产品下脚料的综合利用、提高其附加值提供有效的微生物资源。

参考文献

- [1] OLSEN RL, TOPPE J, KARUNASAGAR I, *et al.* Challenges and realistic opportunities in the use of by-products from processing of fish and shellfish [J]. *Trends Food Sci Technol*, 2014, 36(2): 144–151.
- [2] CHALAMAIAH M, DINESH KUMAR B, HEMALATHA R, *et al.* Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review [J]. *Food Chem*, 2012, 135(4): 3020–3038.
- [3] 蔡路昀, 张滋慧, 李秀霞, 等. 鱼类下脚料在工业中应用的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(8): 356–363.
- CAI LY, ZHANG ZH, LI XX, *et al.* Research progress of industrial applications of fish processing by-products [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2017, 38(8): 356–363.
- [4] GOUR S, CHOUDHURY, BINOY K, *et al.* Extrusion processing of fish muscle [J]. *J Aquat Food Prod T*, 1996, 4(4): 37–67.
- [5] CHO JK, JIN YG, RHA SJ, *et al.* Biochemical characteristics of four marine fish skins in Korea [J]. *Food Chem*, 2014, 159: 200–207.
- [6] SAE-LEAW T, BENJAKUL S. Lipase from liver of seabass (*Lates calcarifer*): Characteristics and the use for defatting of fish skin [J]. *Food Chem*, 2018, 240: 9–15.
- [7] NICOL S, FOSTER J, KAWAGUCHI S, *et al.* The fishery for Antarctic krill—recent developments [J]. *Fish Fisher*, 2012, 13(1): 30–40.
- [8] ROUDY JC. Reproductive strategies of the Mediterranean krill, *Meganyctiphanes norvegica* and the Antarctic krill, *Euphausia superba* (Crustacea:Euphausiacea) [J]. *Invertebr Reprod Dev*, 2011, 23(23): 2–114.
- [9] IVANOV BG. On the biology of the Antarctic krill *Euphausia superba* [J]. *Mar Biol*, 1970, 7(4): 340–351.
- [10] WANG Y, ZHANG M, MUJUMDAR AS, *et al.* Trends in processing technologies for dried aquatic products [J]. *Dry Technol*, 2011, 29(4): 382–394.
- [11] GHALY AE, RAMAKRISHNAN VV, BROOKS MS, *et al.* Fish processing wastes as a potential source of proteins, amino acid and oils: A critical review [J]. *J Microb Biot*, 2013, 2(4): 107–129.
- [12] RAMAKRISHNAN VV, GHALY AE, BROOKS MS, *et al.* Extraction of oil from mackerel fish processing waste using alcalase enzyme [J]. *Enzyme Eng*, 2013, 2(2): 1–10.
- [13] 赖海涛, 黄志勇, 涂开生, 等. 酶法提取烤鳗下脚料水解动物蛋白的研究[J]. *集美大学学报(自然科学版)*, 2002, (1): 11–14.
- LAI HT, HUANG ZY, TU KS, *et al.* The study of extracting HAP from the eel scraps by enzymatic hydrolysis [J]. *J Jimei Univ (Nat Sci Ed)*, 2002, (1): 11–14.
- [14] LV XR, LI Y, CUI TQ, *et al.* Bacterial community succession and volatile compound changes during fermentation of shrimp paste from Chinese Jinzhou region [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2020, 122: 108998.
- [15] PHEWPAN A, PHUWAPRISIRISAN P, TAKAHASHI H, *et al.* Microbial diversity during processing of Thai traditional fermented shrimp paste, determined by next generation sequencing [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2020, 122: 108989.
- [16] JIANG WD, WU P, TANG RJ, *et al.* Nutritive values, flavor amino acids, healthcare fatty acids and flesh quality improved by manganese referring to up-regulating the antioxidant capacity and signaling molecules TOR and Nrf2 in the muscle of fish [J]. *Food Res Int*, 2016, 89(1): 670–678.
- [17] BERMÚDEZ R, FRANCO D, CARBALLO J, *et al.* Influence of muscle type on the evolution of free amino acids and sarcoplasmic and myofibrillar proteins through the manufacturing process of Celta dry-cured ham [J]. *Food Res Int*, 2014, 56: 226–235.
- [18] SANG X, MA X, HAO H, *et al.* Evaluation of biogenic amines and microbial composition in the Chinese traditional fermented food grasshopper sub shrimp paste [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2020, 134: 109979.
- [19] DUAN S, HU X, LI M, *et al.* Composition and metabolic activities of the bacterial community in shrimp sauce at the flavor-forming stage of fermentation as revealed by metatranscriptome and 16S rRNA gene sequencings [J]. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(12): 2591–603.
- [20] GANZLE MG. Lactic metabolism revisited: Metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage [J]. *Curr Opin Food Sci*, 2015, 2: 106–117.
- [21] PESSIONE E, CIRRINCIONE S. Bioactive molecules released in food by lactic acid bacteria: Encrypted peptides and biogenic amines [J]. *Front Microbiol*, 2016, 7: 876.
- [22] NAM YD, LEE SY, LIM SI. Microbial community analysis of Korean soybean pastes by next generation sequencing [J]. *Int J Food Microbiol*, 2012, 155(1–2): 36–42.
- [23] 金楚杰, 吴津, 郭伟鑫, 等. 一株产蛋白酶海洋细菌的分离鉴定及发酵条件研究[J]. *浙江农业科学*, 2020, 61(12): 2629–2633, 2638.
- JIN CJ, WU J, GUO WX, *et al.* Isolation and identification of an protease-producing marine bacterium and study on its fermentation condition [J]. *J Zhejiang Agric Sci*, 2020, 61(12): 2629–2633, 2638.
- [24] 周雪雁, 米玛普尺, 马咸莹, 等. 1株血红蛋白分解菌的分离鉴定及其蛋白酶活力测定[J]. *微生物学杂志*, 2020, 40(2): 66–71.
- ZHOU XY, MIMA PC, MA XY, *et al.* Isolation and determination of protease activity of a hemoglobin-decomposing bacteria [J]. *J Microbiol*, 2020, 40(2): 66–71.
- [25] 黄炯, 张读朴, 朱刚, 等. 用MM培养基生产羊大肠杆菌病灭活疫苗的试验[J]. *中国兽药杂志*, 2003, (2): 42–43.
- HUANG J, ZHANG DP, ZHU G, *et al.* Production of inactivated vaccine against sheep colibacillosis by MM medium [J]. *Chin J Vet Drug*, 2003, (2): 42–43.
- [26] 张超, 刘双平, 邹慧君, 等. 黄酒发酵过程中微生物筛选及菌株产香分析[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(14): 94–102.

- ZHANG C, LIU SP, ZOU HJ, *et al.* Microbes isolated from Chinese rice wine and functions on flavor compounds in special culture medium [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2018, 39(14): 94–102.
- [27] 王学标, 何云侠, 刘强. 福林酚试剂法与缩二脲试剂法测定饲用蛋白酶活力的比较分析[J]. *畜牧与兽医*, 2019, 51(3): 23–28.
- WANG XB, HE YX, LIU Q. Comparison of the Folinphenol reagent method and the Biuret reagent method for determination of feed protease activity [J]. *Anim Husband Vet Med*, 2019, 51(3): 23–28.
- [28] ROCHA-PIZAÑA MDR, CHEN WN, LEE JLL, *et al.* Production of a potential collagenolytic protease by Nejayote fermentation with *Aspergillus oryzae* [J]. *Int J Food Sci Technol*, 2020, 55(10): 3289–3296.
- [29] 许波, 黄遵锡, 陈金全, 等. 枯草芽孢杆菌 AS1.398 中性蛋白酶基因的克隆及其在毕赤酵母中的高效表达[J]. *云南师范大学学报(自然科学版)*, 2005, (3): 51–56.
- XU B, HUANG ZX, CHEN JQ, *et al.* Cloning and overexpression of gene encoding the neutral protease from *B. subtilis* AS1.398 in *Pichia pastoris* [J]. *J Yunnan Normal Univ (Nat Sci Ed)*, 2005, (3): 51–56.
- [30] BARZKAR N. Marine microbial alkaline protease: An efficient and essential tool for various industrial applications [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 161: 1216–1229.
- [31] 王兴吉, 佟新伟, 王克芬, 等. 芽孢杆菌产碱性蛋白酶的研究进展[J]. *食品与发酵科技*, 2019, 55(1): 62–65.
- WANG XJ, TONG XW, WANG KF, *et al.* Preparation of alkaline protease by fermentation of *Bacillus subtilis* [J]. *Food Ferment Sci Technol*, 2019, 55(1): 62–65.
- [32] TEODORA B, GIULIA C, IMMACOLATA S, *et al.* Immobilization of neutral protease from *Bacillus subtilis* for regioselective hydrolysis of acetylated nucleosides: Application to capecitabine synthesis [J]. *Molecules*, 2016, 21(12): 1621–1621.

(责任编辑: 韩晓红 黄周梅)

作者简介

王宗敏, 博士, 副教授, 主要研究方向为传统发酵食品功能开发。

E-mail: wangmin110120@126.com

朱兰兰, 博士, 教授, 主要研究方向为水产品功能物质开发。

E-mail: chinaxiaolan@163.com