

# 鱿鱼内脏蛋白酶的提取工艺研究

尹青春<sup>1</sup>, 岑燕钊<sup>1</sup>, 许纯绚<sup>1</sup>, 段杉<sup>1</sup>, 姚伟鑫<sup>2</sup>, 纪育明<sup>2</sup>

(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642) (2. 汕头市侨丰集团有限公司, 广东汕头 515133)

**摘要:** 本文以鱿鱼内脏为原料提取蛋白酶。考察了各因素对提取效果的影响, 包括用于提取的 NaCl 溶液浓度、内脏和提取液的固液比、提取温度、提取时间等。此外, 根据蛋白质等电点沉淀原理, 调粗酶液的 pH 值去除杂蛋白; 并进一步比较了各种絮凝剂去除粗酶提取液中杂蛋白的效果。结果表明: NaCl 溶液浓度为 0.5%, 固液比为 1.0:1.5, 常温下提取 60 min 可达到较好的提取效果, 蛋白酶的回收率达到 96.06%, 比酶活达到 1.33 U/mg。调粗酶液的 pH 值为 4.5 左右, 杂蛋白去除效果较好;  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  是较好的絮凝剂, 向粗酶液中添加 1%  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  溶液, 当添加比为 4:1 (V/V, 粗酶液/ $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  溶液) 时, 进一步去除杂蛋白的效果较好, 蛋白酶的回收率达 80.33%, 比酶活达到 9.37 U/mg。

**关键词:** 鱿鱼内脏; 蛋白酶; 提取

**文章编号:** 1673-9078(2012)3-304-308

## Extraction of Protease from Squid Viscera

YIN Qing-chun<sup>1</sup>, CEN Yan-zhao<sup>1</sup>, XU Chun-xuan<sup>1</sup>, Duan SHAN<sup>1</sup>, YAO Wei-xin<sup>2</sup>, JI Yu-ming<sup>2</sup>

(1. College of Food Science, South China Agriculture University, Guangzhou 510642, China)

(2. Guangdong Qiaofeng Group Co., Ltd, Shantou 515133, China)

**Abstract:** In this paper, extraction of protease from squid viscera was studied. Factors such as the concentration of NaCl solution used in protease extraction, the ratio of squid viscera solid to NaCl solution, extracting temperature, extracting time and so on, which influenced the extraction effect, were investigated. The pH of the crude protease extraction solution was adjusted to remove impurity based upon the isoelectric precipitation principle. Various flocculants were compared in terms of their removing effect of impurity from crude protease extraction solution. Results showed that the optimal extracting conditions were as follows: the concentration of NaCl solution 0.5%, the ratio of solid to solution 1.0:1.5, ambient temperature and extraction time 60 min. Under the above-mentioned conditions, 96.06 % of total protease activity was recovered; the specific protease activity reached 1.33 U/mg. by Adjusting the pH of crude protease extraction solution to 4.5, the impurities was removed. Among various flocculants,  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  was found to be the best. By adding 1%  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  solution to crude protease extraction solution, the impurities can be removed when the ratio of crude protease extraction solution to  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  solution reaching 4:1 (V/V). Under such conditions, 80.33 % of total protease activity was recovered; the specific protease activity reached 9.37 U/mg.

**Key words:** squid viscera; protease; extraction

鱿鱼是目前远洋渔业中最具有开发潜力的品种之一<sup>[1]</sup>。一般来说, 在鱿鱼加工中有30%左右的内脏及表皮等废弃物产生<sup>[2]</sup>。对这些废弃物, 一般将其用于生产鱿溶浆等饲料, 或者作为垃圾处理, 这不仅是对渔业资源的巨大浪费, 而且还造成严重的环境污染<sup>[3,4]</sup>。因此, 鱿鱼内脏等废弃物的利用亟待加强。

鱿鱼内脏等废弃物中含有丰富的内源蛋白酶<sup>[5-7]</sup>。LEE 等报道了鱿鱼肌肉和内脏 (主要是肝脏和胰脏) 含有丰富的活性较高的组织蛋白酶 C, 该酶具有二肽转移酶和二肽水解酶活力, 利用其水解鱿鱼蛋白可提

高水解物的鲜美味<sup>[8]</sup>。鱿溶浆的生产也是利用鱿鱼内脏自身的内源蛋白酶将自身液化; 童军锋提出鱿鱼内脏可采用自身酶解发酵法, 可作为制造鱼酱油的原料<sup>[9]</sup>。以上事实表明, 鱿鱼内脏中含有丰富的蛋白酶, 可以作为提取蛋白酶的原料。根据鱿鱼内脏的上述特点, 本文将研究从鱿鱼内脏中提取混合蛋白酶的工艺条件, 这不仅可以解决环境污染问题, 还为鱿鱼内脏等废弃物的综合利用提供了一条新途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

#### 1.1.1 实验材料

鱿鱼内脏: 广州市天河区长湴市场提供。

#### 1.1.2 试剂

收稿日期: 2011-10-18

基金项目: 广东省海洋与渔业局海洋渔业科技推广专项 (A201005103)

作者简介: 尹青春 (1986-), 女, 硕士研究生, 食品化学与营养方向

通讯作者: 段杉, 男, 博士, 副教授, 研究方向: 水产品综合利用

干酪素(酪蛋白)、三氯乙酸、酪氨酸、盐酸、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氢氧化钠、G-250 考马斯亮蓝、磷酸、无水乙醇、95%乙醇、NaCl、KAl(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>、Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>、Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>、FeCl<sub>3</sub>、冰乙酸、乙酸钠,均为分析纯

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 原料处理

取鱿鱼内脏用组织捣碎机捣碎匀浆,于-20℃冰箱储藏,用时取出解冻。

### 1.2.2 蛋白酶活性的测定

按参考文献<sup>[10]</sup>的方法略作改进,采用紫外分光光度法测定。以酪蛋白为底物,取1.0% (m/V) 酪蛋白1.0 mL,于37℃预热5 min,再加入蛋白酶液0.1 mL于37℃反应10 min后,加入3.0 mL 10.0%的三氯乙酸终止反应,静置15 min后过滤,上清液于275 nm下测定OD值。对照管先加10%三氯乙酸,后加蛋白酶液。标准曲线方程为: $y=0.0710x-0.0012$ ,  $R^2=0.9997$ ,其中y代表吸光度,x代表酪氨酸的浓度。

蛋白酶活力单位定义:规定在37℃、pH 7.0的条件下,水解酪蛋白每分钟产生酪氨酸1.0 μg为一个活力单位。则1.0 g蛋白酶在37℃、pH 7.0的条件下所具有的活力单位U为:

$$\text{酶活}(U) = \frac{A_{\text{样}} \times K \times V \times N}{t}$$

注: A<sub>样</sub>: 样品液光吸收值; K: 标准曲线上光吸收为1时的酪氨酸的吸光度; V: 比色管的总体积(mL),本试验V=4.1 mL; t: 酶促反应的时间(min),本实验t=10 min; N: 酶液的稀释倍数。

### 1.2.3 蛋白质的测定

Bradford法<sup>[11]</sup>,即每支试管加入0.1 mL样品溶液(或稀释后的样品溶液),再加入5.0 mL考马斯亮蓝试剂,将溶液振荡摇匀,放置10 min后,以0.1 mL蒸馏水中加5.0 mL考马斯亮蓝试剂为空白对照,在595 nm测定OD值。根据标准曲线定义的线性方程: $y=0.0007x+0.0058$ ,  $R^2=0.9996$ ,计算出待测样品的蛋白浓度。其中y代表吸光度,x代表蛋白质浓度μg/mL。

### 1.2.4 鱿鱼内脏蛋白酶比酶活、纯化倍数以及回收率的计算

比酶活=蛋白酶总酶活/蛋白质总含量

纯化倍数=每次处理后的比酶活/原料比酶活

蛋白酶回收率%=每次处理后总酶活/原料总酶活×100%

### 1.2.5 鱿鱼内脏蛋白酶提取液NaCl浓度的选择

各取1.0 g经过组织捣碎机捣碎的鱿鱼内脏,加入0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1.0%的NaCl溶液1.0 mL,摇匀,常温放置抽

提30 min,5000 r/min 冷冻离心20 min,取上清液测定总酶活和总蛋白质含量,计算蛋白酶的比酶活、纯化倍数和蛋白酶回收率。

### 1.2.6 固液比的选择

各取1.0 g经过组织捣碎机捣碎的鱿鱼内脏,分别加0.5% NaCl溶液0.5 mL、1.0 mL、1.5 mL、2.0 mL、2.5 mL、3.0 mL、3.5 mL,使鱿鱼内脏与NaCl溶液的固液比为1.0:0.5~1.0:3.5,室温静置30 min,5000 r/min 冷冻离心20 min,取上清液测定总酶活和总蛋白质含量。计算蛋白酶比酶活、纯化倍数和蛋白酶回收率。

### 1.2.7 提取时间的选择

选择固液比为1.0:1.5,进行以下的实验。各取1.0 g鱿鱼内脏加1.5 mL 0.5% NaCl溶液溶解,室温静置15 min、30 min、45 min、60 min、75 min、90 min、105 min,5000 r/min 冷冻离心20 min,取上清液测定总酶活和总蛋白质含量,计算蛋白酶比酶活、纯化倍数和蛋白酶回收率。

### 1.2.8 调pH值沉淀杂蛋白的条件研究

按优化后的条件提取鱿鱼内脏蛋白酶,取所得粗酶液1.0 mL,以0.1 mol/L HCl和0.1 mol/L NaOH调pH为4~8,5000 r/min 冷冻离心20 min,弃沉淀,测定上清液的总酶活和总蛋白质含量,计算蛋白酶比酶活、纯化倍数和蛋白酶回收率。根据蛋白酶纯化倍数和回收率确定合适的pH。

### 1.2.9 絮凝剂的选择

取1.2.8中的经处理的鱿鱼内脏蛋白酶液1.0 mL,分别添加1.0%的絮凝剂KAl(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>、Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>、Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>、FeCl<sub>3</sub>、壳聚糖<sup>[12-14]</sup>各0.2 mL、0.4 mL、0.6 mL,沉淀杂蛋白,常温静置30 min,并观察絮凝现象,过滤,取滤液测定蛋白酶总酶活和总蛋白质含量。比较不同添加量的各种絮凝剂对蛋白酶比酶活、纯化倍数和蛋白酶回收率的影响,选择最好的一种絮凝剂。

### 1.2.10 絮凝剂添加量的选择

分别取1.2.8中经处理的鱿鱼内脏蛋白酶液6.0 mL,分别添加0.5 mL、1.0 mL、1.5 mL、2.0 mL、2.5 mL、3.0 mL 1.0% Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>溶液,静置30 min,过滤,测定上清液中蛋白酶的总酶活和总蛋白含量。比较不同添加量的硫酸铁对蛋白酶比酶活、纯化倍数和蛋白酶回收率的影响,选择最适的硫酸铁添加量。

### 1.2.11 鱿鱼内脏蛋白酶提取液中残留铁离子的测定

铁离子测定方法,采用国标邻二氮菲(1,10-二氮杂菲,也称邻菲罗啉)的方法测定微量铁<sup>[15]</sup>。铁离子测定的标准曲线方程为: $y=0.004x+0.0028$ ,  $R^2=0.9997$ ,y代表吸光度,x代表铁离子的浓度μg/mL。

于50.0 mL容量瓶中分别加入5.0 mL 1.2.10中的

试样溶液, 分别加入 10.0% 盐酸羟胺溶液 1.0 mL, 稍摇动, 再加入 0.1% 邻二氮菲溶液 2.0 mL 及 5.0 mL 醋酸-醋酸钠缓冲溶液, 加水稀释至刻度, 充分摇匀, 放置 5 min, 用 1.0 cm 比色皿, 以不加铁标准溶液的试液为参比液, 选择最大测定波长 510 nm 为测定波长, 平行测 A 值。求其平均值, 在标准曲线上查出铁的质量, 计算样液中铁的质量浓度。

## 2 结果与讨论

### 2.1 NaCl 溶液浓度对鱿鱼内脏蛋白酶提取液提取效果的影响

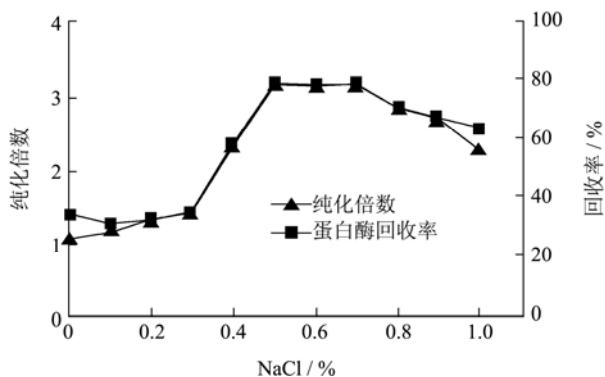


图 1 NaCl 溶液浓度对蛋白酶纯化倍数及回收率的影响

Fig.1 The influence of NaCl solution concentration on the recovery rate and purity of protease

由图 1 可以看出: 随着 NaCl 溶液浓度的增大, 提取液中蛋白酶纯化倍数和回收率均呈先增大后降低的趋势。当 NaCl 的浓度达到 0.5% 时, 蛋白酶的比酶活为 0.97 U/mg, 纯化倍数为 3.23, 回收率为 78.74%。而此后的蛋白酶纯化倍数和回收率均不再增加。综合图 1 中蛋白酶纯化倍数和蛋白酶回收率, 考虑到工业化生产蛋白酶, 最终产品中 NaCl 含量越低越好; 同时为尽量降低生产成本, NaCl 溶液浓度宜选择 0.5%。

### 2.2 固液比对提取效果的影响

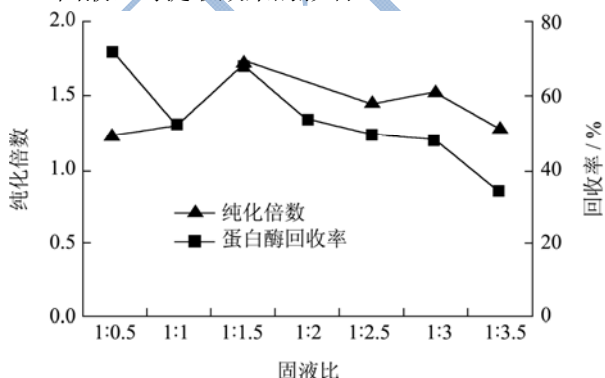


图 2 固液比对蛋白酶纯化倍数和回收率的影响

Fig.2 The influence of the ratio of solid to liquid on the recovery rate and purity of protease

由图 2 可以看出: 随着固液比的增大, 鱿鱼内脏

蛋白酶提取液的蛋白酶的纯化倍数呈先增大后降低的趋势, 蛋白酶回收率呈递减的趋势, 当鱿鱼内脏与提取液的固液比为 1.0:1.5 时, 纯化倍数最大为 1.76, 比酶活为 1.66 U/mg, 蛋白酶回收率为 69.36%, 说明随着固液比的增大, 鱿鱼内脏中的蛋白酶被盐溶液溶解出来。虽然蛋白酶的回收率在 1.0:0.5 和 1.0:1.5 时都较大, 1.0:0.5 的纯化倍数不高, 综合图 2 中蛋白酶纯化倍数和回收率, 选择固液比 1.0:1.5 提取鱿鱼内脏中的蛋白酶。

### 2.3 提取时间对提取效果的影响

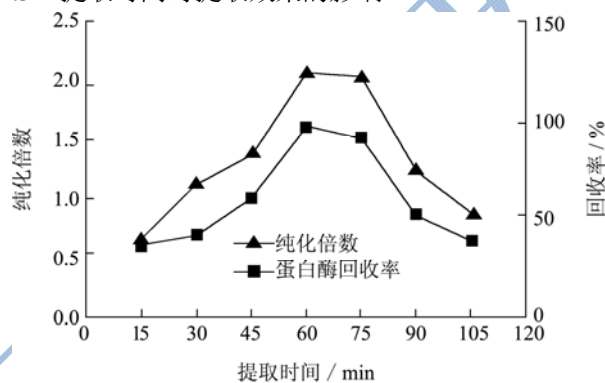


图 3 提取时间对蛋白酶纯化倍数和回收率的影响

Fig.3 The influence of extracting time on the recovery rate and purity of protease

由图 3 可以看出: 当提取时间为 60 min 时鱿鱼内脏蛋白酶提取液的蛋白酶纯化倍数最高为 2.10, 比酶活为 1.33 U/mg、蛋白酶回收率为 96.06%。此后蛋白酶纯化倍数降低, 回收率也降低。综合图 3 中蛋白酶纯化倍数和回收率, 选择提取时间为 60 min。

### 2.4 去除粗酶液中杂蛋白的研究

根据蛋白质的等电点原理, 调粗酶液中蛋白质的等电点, 去除杂蛋白。

在粗酶液中加入絮凝剂, 通过絮凝剂的电中和、吸附和桥连等作用可使杂蛋白形成絮状物而沉淀下来, 达到提高粗酶液纯度的效果。

#### 2.4.1 调 pH 值沉淀杂蛋白的效果

由图 4 可以看出: 随着 pH 值的增大, 蛋白酶纯化倍数呈现减小的趋势, 蛋白酶回收率先增大后减小。虽然蛋白酶的纯化倍数在 pH 4 时最高, 但 pH 4 时蛋白酶回收率比 pH 4.5 时的低, 且蛋白酶回收率在 pH 4.5 时最高, 所以综合图 4 中蛋白酶纯化倍数和回收率, 选择 pH 4.5 沉淀鱿鱼内脏中的杂蛋白。pH 4.5 时蛋白酶纯化倍数为 5.57, 比酶活为 2.62 U/mg, 蛋白酶回收率 95.18%。因为粗蛋白酶液中的杂蛋白通过等电点法沉淀下来, 所以蛋白酶的纯化倍数、比酶活和回收率相对较高。

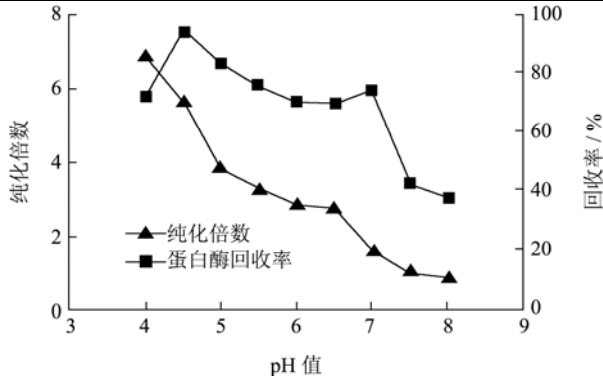


图4 pH值对蛋白酶纯化倍数和回收率的影响

Fig.4 The influence of pH on the recovery rate and purity of protease

2.4.2 絮凝的选择

表1 向鱿鱼内脏蛋白酶提取液中添加各种絮凝剂后的现象

Table 1 The phenomena after the addition of various flocculants to the crude protease extraction solution

絮凝剂	絮凝现象	过滤情况	絮凝效果
KAl(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	有絮状沉淀产生,静置分层,分层较大,絮体清晰	较快	好
Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	有絮状沉淀产生,静置分层,分层较大,絮体清晰	较快	好
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	有絮状沉淀产生,静置分层,分层较大,絮体清晰	较快	好
FeCl <sub>3</sub>	有絮状沉淀产生,静置分层,分层较大,絮体清晰	较快	好
壳聚糖	有絮状沉淀产生,絮体较小,絮体清晰	一般	较好

由表1中可以看出: 添加了KAl(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>、Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>、Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>、FeCl<sub>3</sub>的粗酶液过滤都较快, 而且效果都很好, 说明铝盐和铁盐都有沉淀杂蛋白的效果。而壳聚糖过滤速度一般, 效果较好。由于要用于工业生产, 壳聚糖的生产成本太高, 所以不采用。

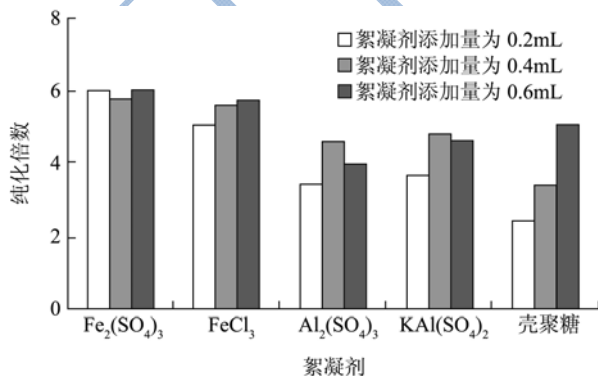


图5 不同添加量的絮凝剂对蛋白酶纯化倍数的影响

Fig.5 The influence of flocculant dosage on the purity of protease

由图5可以看出: 铁盐的蛋白酶的纯化倍数高于

铝盐和壳聚糖。

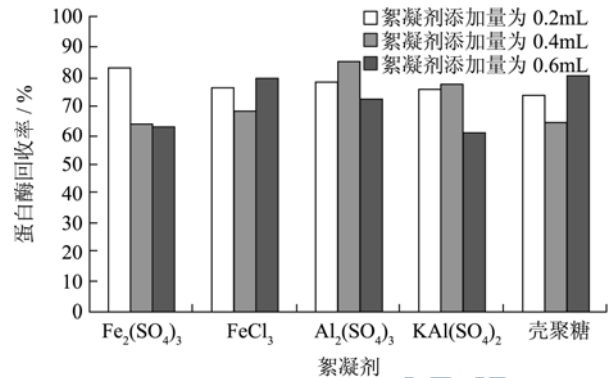


图6 不同添加量的絮凝剂对蛋白酶回收率的影响

Fig.6 The influence of flocculant dosage on the recovery rate of protease

由图6可以看出: 随着的添加量增大, Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>对蛋白酶回收率的影响是呈减小的趋势, FeCl<sub>3</sub>和壳聚糖的影响是先减小后增大; KAl(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>、Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>的影响均呈先增大后减小的趋势, Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>添加量较少, 而蛋白酶回收率较高。

综合比较图5、6中的结果, 选择Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>作为除杂的絮凝剂。

2.4.3 絮凝剂添加量以及残留铁含量的测定

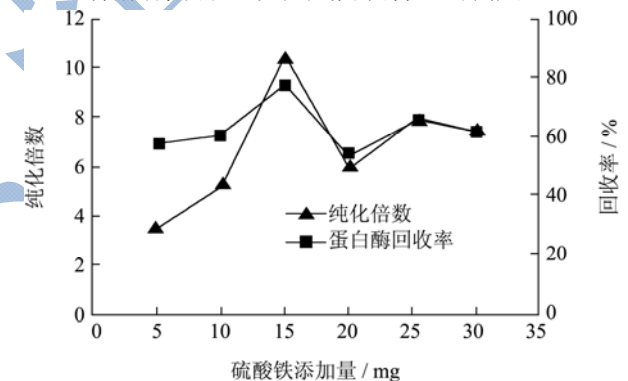


图7 硫酸铁的添加量对蛋白酶纯化倍数和回收率的影响

Fig.7 The influence of Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> dosage on the purity and recovery rate of protease

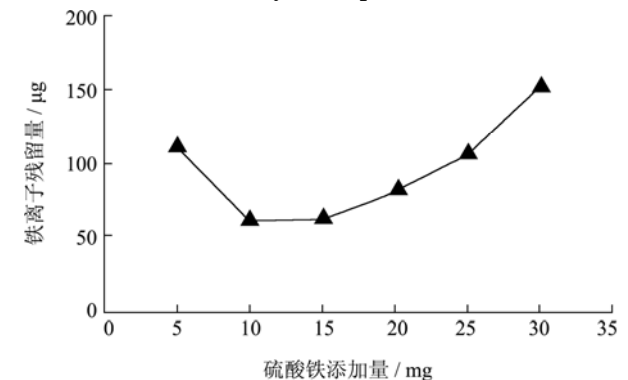


图8 硫酸铁添加量对铁离子残留量的影响

Fig.8 The influence of Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> dosage on the residual rate of iron ion

### 2.4.3.1 硫酸铁添加量的选择

由图7可以看出:当6 mL的粗酶液中 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 的添加量为15.0 mg时,蛋白酶的纯化倍数最大为10.65,比酶活为9.37 U/mg,蛋白酶的回收率也最大为80.33%。说明 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 的添加量为15.0 mg时,鱿鱼内脏蛋白酶提取液中的杂蛋白除去效果最好。

### 2.4.3.2 絮凝过滤后酶液中残留铁离子的测定

由图8可以看出:当6.0 mL的粗酶液中硫酸铁的添加量为10.0~15.0 mg时,滤液中铁离子的残留量最少,为64.08~65.39  $\mu\text{g}$ ,残留量为添加量的0.0044%~0.0064%,说明此时的硫酸铁大部分随着杂蛋白被沉淀除去。综合考虑,选择 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 作为絮凝剂。添加量的比例按6.0 mL粗酶液添加1.0%  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 溶液1.5 mL(相当铁的量15.0 mg),即粗酶液与1.0%  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 溶液(V/V)的比例为4:1。

## 3 结论

此方法提取的鱿鱼内脏蛋白酶为多种蛋白酶的混合物。提取的最佳工艺条件为:用于提取的NaCl溶液浓度为0.5%,固液比为1.0:1.5,在常温下抽提60 min;根据蛋白质等电点沉淀原理,调粗酶液的pH值为4.5左右去除杂蛋白;并选用 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 作为沉淀粗酶液中杂蛋白的絮凝剂,可进一步去除粗酶液中的杂蛋白,添加量按粗酶液与1%  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 溶液(V/V)的比例4:1。此工艺条件下蛋白酶的比酶活、纯化倍数和回收率都较高,蛋白酶的比酶活为9.37 U/mg,纯化倍数为10.65,回收率为80.33%。

## 参考文献

- [1] 李桂芬. 鱿鱼的营养与开发利用[J]. 科学养鱼, 2003, 7: 56
- [2] 袁亚辉, 姚美君. 利用鱿鱼内脏生产海味素的研究[J]. 现代渔业化, 2002, 1: 28-29
- [3] 王建中, 吕玉英, 徐正瑛. 鱿鱼内脏的综合利用研究[J]. 中国海洋药物, 1999, 69(1): 55-59
- [4] 章建设, 雷晓凌. 鱿鱼内脏糖蛋白提取工艺及其免疫活性初步研究[J]. 现代食品科技, 2008, 24(2): 166-169
- [5] Leblanc E L, Gill T A. Comparative study of proteolysis in short-finned (*Illex illecebrosus*) and long-finned (*Loligo pealei*) squid [J]. Comp Biochem Physiol B, 1982, 73B
- [6] Rodger G, Weddle R B, Carig P, et al. Effect of alkaline protease activity on some properties of comminuted squid [J]. J Food Sci, 1984, 49: 117-123
- [7] Sugiyama M, Kousu S, Hanabe Meta l. Chemical properties. In Utilization of Squid [M]. New Delhi India: Oxonian Press, 1989: 84-97
- [8] Lee YZ, Simpson BK, Haard NF. supplementation of squid fermentation with proteolytic enzymes [J]. Journal of Food Biochemistry, 1982, 6: 127-134
- [9] 童军锋, 张英. 加强鱿鱼资源的加工和综合利用技术研究[J]. 东海海洋, 2001, 19(4): 46-50
- [10] 孙君社, 江正强, 刘萍. 酶与酶工程及其应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006
- [11] 黄卓烈. 生物化学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2010: 86-88
- [12] 唐爱星. 胰酶的絮凝沉淀分离研究. 四川大学(硕士学位论文)[D], 四川: 2005
- [13] 王玉华, 董志远, 马春生, 等. 酶的絮凝法精制技术及其相关问题的探讨[J]. 食品与发酵工业, 1985(02)
- [14] 李凯崇. 浅谈水处理絮凝剂的研究进展[J]. 资源环境与发展, 2007, 3: 27-34.
- [15] 水质-铁的测定. 中华人民共和国环境保护行业标准. HJ/T 345- 2007