

罗非鱼内脏蛋白酶超声波提取工艺的研究

吴燕燕¹, 王剑河², 李来好¹, 周婉君¹, 陈胜军¹, 戚 勃¹

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300 2. 广东省海洋与渔业局, 广东 广州 510222)

摘 要: 本实验以罗非鱼加工废弃物——内脏为原料, 研究提取蛋白酶的工艺方法, 用单因素试验和正交试验研究确定了超声波法提取内脏中蛋白酶的最佳工艺条件。结果表明: 从罗非鱼胃中提取胃蛋白酶的最佳工艺是: 缓冲液 pH1, 提取温度为 25℃, 提取时间为 60min, 超声波强度为 70W。从罗非鱼肠中提取蛋白酶的最佳工艺是: 缓冲液 pH7.5, 提取温度为 35℃, 提取时间为 85min, 超声波强度为 70W。为进一步研究和应用罗非鱼内脏蛋白酶提供了基础参数。

关键词: 罗非鱼内脏; 蛋白酶; 提取工艺; 超声波

Study on Ultrasonic Extracting Process of Protease from Tilapia Viscera

WU Yan-yan¹, WANG Jian-he², LI Lai-hao¹, ZHOU Wan-jun¹, CHEN Sheng-jun¹, QI Bo¹

(1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China

2. Guangdong Provincial Bureau of Ocean and Fisheries, Guangzhou 510222, China)

Abstract: The method of extracting process of protease, the optimum ultrasonic extracting conditions of protease from viscera of tilapia which processing waste by single factor test with the orthogonal test design were studied. The results showed that the optimum conditions of pepsin from stomach of tilapia were: pH1, 25℃, 60min, ultrasonic intensity 70 W. The optimum conditions of protease from intestines of tilapia were: 35℃, 85min, pH7.5, ultrasonic intensity 70 W. Further work should be carried out on the character of the enzymes and the applications.

Key words viscera of tilapia; protease; extracting technology; ultrasonic

中图分类号: Q959.483 Q814 S986.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)07-0245-04

蛋白酶作为市场上需求量最大的三种酶之一, 在食品、医药、化工等方面都有很广泛的应用^[1]。蛋白酶主要来源于动物、植物和微生物, 其中, 动物消化蛋白酶已经成为酶工业的重要来源之一。作为水产加工副产物的鱼类内脏产量大, 所含蛋白酶在较宽的温度范围内都具有活性, 是良好的蛋白酶来源^[1-4]。以廉价而丰富的鱼内脏作为工业生产酶的原料来源对降低工业成本增加酶产出具有较强的可行性。

近几年, 罗非鱼在我国发展迅速, 已经形成从繁殖、养殖到加工的良好生产体系, 2006 年我国罗非鱼产量已达 120 万吨, 罗非鱼由于其味道鲜美、营养丰富, 在全球的消费呈上升趋势, 罗非鱼加工量逐年递增, 成为我国加工出口创汇的主要品种。罗非鱼加工过程产生大量的废弃物, 如罗非鱼片加工中产生 54% 的废弃物, 所以亟待对罗非鱼加工废弃物进行高值化利用^[5-6]。集约型的鱼类加工方式为罗非鱼内脏的收集与

利用提供了有利的条件。鱼类内脏中蛋白酶含量丰富, 鱼类消化蛋白酶中最重要的是胃酸性蛋白酶和肠碱性蛋白酶^[7]。

目前, 对于鱼类内脏中酶类资源的开发利用研究甚少。本实验以罗非鱼内脏为原料, 研究罗非鱼内脏中蛋白酶的超声波提取工艺, 为其合理开发应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

罗非鱼内脏: 由广东省中山食品水产进出口集团有限公司提供, 为加工冷冻罗非鱼片的下脚料, 冰箱内 -20℃ 下低温保存。

牛血清蛋白 Genview 公司; 酪蛋白、胃蛋白酶为 Mechem 公司; 三氯乙酸、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、甘氨酸(均为分析纯) 广州新粤盛公司。

收稿日期: 2007-05-25

基金项目: 广东省重点项目(2005B33201002); 广东省重点项目(2003C32803); 农业部“948”资助项目(2006-G40)

作者简介: 吴燕燕(1969-), 女, 副研究员, 主要从事水产品加工与质量安全研究。

1.2 仪器

电子控温水浴锅、紫外分光光度计 GENESYS 5、SIGMA 冷冻离心机、SANYO 贮酶冰箱、CHRIST 冷冻干燥机、T25B 型均质仪、TI-H-10 型超声波仪等。

1.3 方法

1.3.1 蛋白酶活性测定

按照参考文献[8], 以 1% 酪蛋白为底物, 用不同 pH 值的缓冲溶液配制 1% 酪蛋白, 调节 pH 值分别至 1~13。取 2.5ml 酪蛋白于 10ml 试管中, 测胃蛋白酶活时 pH3.0 的酪蛋白, 测肠蛋白酶活时 pH9.8 的酪蛋白。37℃ 预热 5min, 加入同温度下预热的酶液 0.5ml, 反应 10min, 立即加入 2.5ml、10% 三氯乙酸终止反应, 滤纸过滤, 于 280nm 处测定其 OD 值, 以先加三氯乙酸再加蛋白酶液的对照管为空白。一个酶活力单位定义为, 在测定条件下(37℃), 样品水解酪蛋白时每分钟产生 1μg 酪氨酸所需的酶量, 以 U 表示。

由于 OD 值与酶的活性成正比, 因此以下所有关于酶活性的比较一致用 OD 值代替。

1.3.2 蛋白质含量的测定

采用考马斯亮蓝 G250 染色法, 以牛血清蛋白为标准样品[9]。

1.3.3 罗非鱼内脏蛋白酶提取工艺

取冰冻罗非鱼内脏, 解冻, 分出胃、肠, 用蒸馏水洗净, 按 1:5(W/V) 加入 0.02mol/L 的磷酸缓冲液, 匀浆破碎, 将匀浆后的样品分别放置于 4℃ 冰箱和超声波仪中处理一段时间, 取出, 匀浆液在 4℃ 10000r/min 离心 30min, 收集上清液为提取蛋白酶液。

1.3.4 超声波提取条件下罗非鱼内脏蛋白酶最佳提取工艺的确定

考察超声条件下提取温度、提取时间、pH、超声强度对内脏蛋白酶提取效果的影响, 并确定该条件下的最佳提取工艺。

1.3.5 实验数据处理

用 SAS (V8.0)、Excel 软件进行处理。

2 结果与分析

2.1 提取方式对蛋白酶活性的影响

在相同 pH 缓冲液匀浆破碎条件下, 分别采用低温浸提法(4℃)和超声波法, 提取罗非鱼胃蛋白酶和鱼肠蛋白酶, 在相同处理时间下, 测定酶活, 结果如图 1、2 所示。不管是胃蛋白酶还是肠蛋白酶, 采用超声波法进行提取效果明显优于低温浸提法。随着提取时间的延长, 超声波法提取的蛋白酶活性有所下降, 而低温浸提法处理 90min 比 60min 时酶活性有所提高, 但到 120min 之后酶活性趋于稳定。

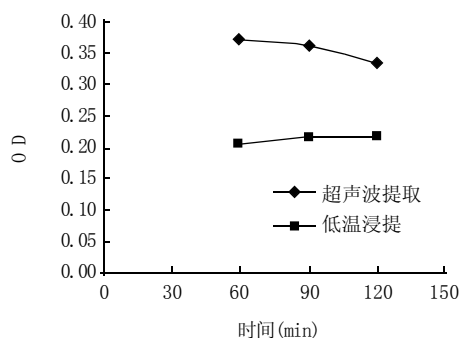


图1 不同提取方式对胃蛋白酶的影响
Fig.1 Effects of pepsin on different extraction methods

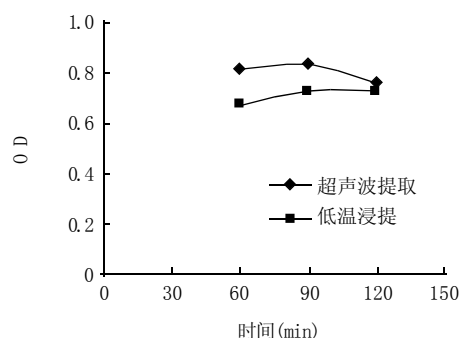


图2 不同提取方式对肠蛋白酶的影响
Fig.2 Effects of protease on different extraction methods

2.2 超声波法提取罗非鱼内脏蛋白酶工艺条件研究

影响超声波提取罗非鱼内脏蛋白酶的因素主要有: 提取温度、提取时间、缓冲液 pH、超声波强度。通过单因素试验比较提取过程不同因素对蛋白酶活性的影响。

2.2.1 缓冲液 pH 的影响

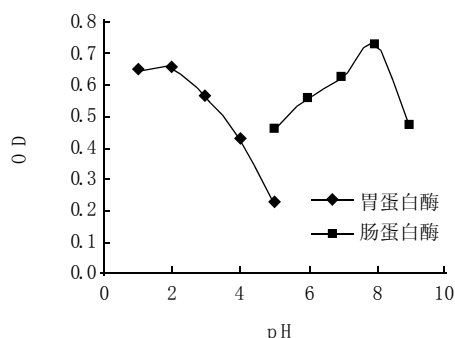


图3 缓冲液 pH 的影响
Fig.3 Effects of buffer solution pH values

由图 3 可以看出, 从罗非鱼内脏中提取蛋白酶, 从罗非鱼胃中提取的胃蛋白酶缓冲液 pH 要求是酸性的, 在 pH1~3 左右的提取的胃蛋白酶的活性最高, 随着 pH 的升高, 提取的胃蛋白酶活性明显降低。而从罗非鱼肠中提取的蛋白酶所需缓冲液 pH 是弱碱性的, 在 pH7~

8, 蛋白酶活性最高, 当 $\text{pH} < 6$ 时, 活性较低, 当 $\text{pH} > 9$ 时, 活性下降明显。

2.2.2 提取温度的影响

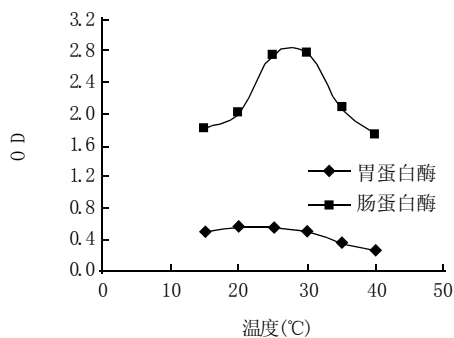


图4 提取温度的影响
Fig.4 Effects of extraction temperature

由图4可以看出, 提出温度对蛋白酶活性有影响, 其中从胃中提取的胃蛋白酶活性随着提取温度的升高呈缓慢下降趋势, 在20℃左右提取的蛋白酶活性较高; 从肠中提取的蛋白酶活性随温度的变化明显, 在25~35℃提取的蛋白酶活性较高。

2.2.3 提取时间对蛋白酶活性的影响

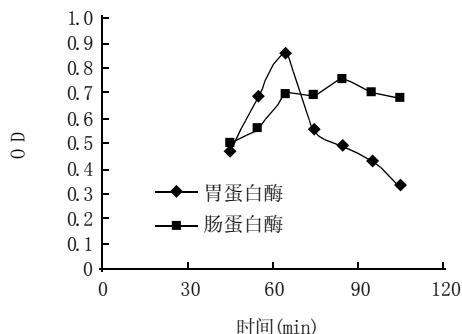


图5 提取时间对蛋白酶的影响
Fig.5 Effects of extraction time on protease

从图5可以看出, 提取时间对蛋白酶活性有明显的影响, 胃蛋白酶的活性开始时随提取时间的增加不断上升, 到了55~70min时酶活性最高, 其后随时间的延长而下降。而从肠中提取的蛋白酶活性在80~90min时最高。

2.2.4 超声波强度的影响

从图6可以看出, 超声波强度对从肠中提取的蛋白酶活性有明显的影响, 在超声波强度70W时, 活性最高, 随着超声波强度的增强, 曲折下降。而从胃中提取的蛋白酶活性在超声波强度为60~90W时, 相对较高, 当超声波强度>90W时, 蛋白酶活性明显降低。

2.2.5 超声波法提取罗非鱼胃蛋白酶的工艺条件优化

通过单因素试验比较提取过程不同因素对蛋白酶活

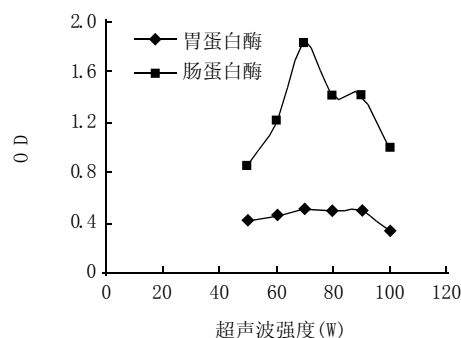


图6 超声波强度的影响
Fig.6 Effects of ultrasonic intensity

性的影响, 由于各因素之间相互交叉影响, 因此为全面考察工艺的最佳参数条件, 根据单因素试验的结果, 确定以提取的温度(A)、超声波强度(B)、缓冲液pH(C)、提取时间(D)四个因素为试验因素, 以提取的蛋白酶活性为试验指标, 进行正交试验^[10]。

超声波法提取罗非鱼胃蛋白酶的因子水平见表1, 试验结果及极差分析见表2、3。由分析可知, 影响超声波提取罗非鱼胃蛋白酶的主要因素是B、A, 次要因素是D、C。按最优组合是 $A_2B_1C_1D_2$, 即缓冲液pH为1, 提取温度为25℃, 提取时间为60min, 超声波强度为70W。

表1 影响罗非鱼胃蛋白酶提取的因子水平表

Table 1 Pepsin extraction of tilapia impact factors and levels of orthogonal test

水平	因素			
	A 提取温度(°C)	B 超声波强度(W)	C 缓冲液 pH	D 提取时间(min)
1	20	70	1.0	50
2	25	80	2.0	60
3	30	90	3.0	70

表2 罗非鱼胃蛋白酶超声波提取条件正交试验结果

Table 2 Results of orthogonal test on ultrasonic extraction conditions of pepsin from tilapia viscera

试验号	A 温度(°C)	B 强度(W)	C pH	D 时间(min)	OD
1	1	1	1	1	0.604
2	1	2	2	2	0.558
3	1	3	3	3	0.559
4	2	1	2	3	0.647
5	2	2	3	1	0.563
6	2	3	1	2	0.670
7	3	1	3	2	0.658
8	3	2	1	3	0.605
9	3	3	2	1	0.615
K_1	1.721	1.909	1.879	1.781	5.479
K_2	1.880	1.726	1.820	1.886	
K_3	1.878	1.844	1.780	1.811	
R	0.159	0.183	0.099	0.105	

表3 方差分析
Table 3 Variance analysis

方差来源	偏差平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A	0.340	2	0.17	27.6423	*
B	0.3412	2	0.1706	27.7398	*
C	0.3371	2	0.1685	27.3983	*
D	0.3362	2	0.1681	27.3333	*
误差e	0.0123	2			

2.2.6 超声波法提取罗非鱼肠蛋白酶的工艺条件优化

表4 影响罗非鱼肠蛋白酶提取的因素水平表
Table 4 Protease extraction of tilapia intestines impact factors and levels of orthogonal tests

水平	因素			
	A 提取温度(℃)	B 超声波强度(W)	C 缓冲液 pH	D 提取时间(min)
1	25	60	7.5	75
2	30	70	8.0	80
3	35	80	8.5	85

表5 罗非鱼肠蛋白酶超声波提取条件正交试验结果
Table 5 Results of orthogonal test on ultrasonic extraction conditions of protease from tilapia intestines

试验号	A 温度(℃)	B 强度(W)	C pH	D 时间(min)	OD
1	1	1	1	1	1.738
2	1	2	2	2	2.012
3	1	3	3	3	1.893
4	2	1	2	3	2.068
5	2	2	3	1	2.318
6	2	3	1	2	2.496
7	3	1	3	2	2.084
8	3	2	1	3	2.973
9	3	3	2	1	2.769
K ₁	5.643	5.89	7.207	6.825	20.351
K ₂	6.882	7.303	6.849	6.592	
K ₃	7.826	7.158	6.295	6.934	
R	2.183	1.413	0.912	0.342	

表6 方差分析
Table 6 Variance analysis

方差来源	偏差平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A	0.8172	2	0.4086	15.0221	*
B	0.4210	2	0.2105	7.7390	*
C	0.1587	2	0.0794	2.9191	
D	0.0385	2	0.0193	0.7096	
误差e	0.0544	2			

超声波法提取罗非鱼肠蛋白酶的因子水平表见表4, 试验结果及极差分析见表5、6。由分析可知, 影响超声波提取罗非鱼肠蛋白酶的主要因素是A、B, 次要因素是C、D。按最优组合是A₃B₂C₁D₃, 即缓冲液pH为7.5, 提取温度为35℃, 提取时间为85min, 超声波强度为70W。

3 结 论

罗非鱼是目前养殖加工量最大的鱼类, 加工过程产生大量内脏等下脚料, 本研究针对罗非鱼内脏蛋白酶, 这将为罗非鱼加工下脚料的开发提供一条新的途径。

从鱼类中提取蛋白酶的研究较少, 以往多是从动、植物的细胞中提取, 国内外对超声波的研究比较多, 主要是用于化学及生物活性物质方面, 而对于提取蛋白酶的研究比较少。本研究从罗非鱼加工废弃物中提取蛋白酶, 结果表明, 采用超声波法优于低温浸提法, 在相同的提取时间内, 能较大幅度的提高酶的活性和提取率。超声波靠空化作用破坏内脏组织结构, 使其结构松散, 有效的提取其中的酶类。

在超声波法提取过程中, 超声强度增加, 内脏中酶的扩散速度加快, 在较短时间内蛋白酶的提取率也逐渐升高, 但提取时间、温度等因素是相互作用的, 时间太长, 温度过高或过低都会使酶活性降低, 使提取率下降, 同时, 胃蛋白酶提取时需要酸性缓冲液进行激活, 而肠蛋白酶需要弱碱性缓冲液进行激活。通过研究确定了超声波法提取罗非鱼内脏蛋白酶的最佳工艺条件。从罗非鱼胃中提取胃蛋白酶的最佳工艺是: 缓冲液pH1, 提取温度为25℃, 提取时间为60min, 超声波强度为70W。从罗非鱼肠中提取蛋白酶的最佳工艺是: 缓冲液pH7.5, 提取温度为35℃, 提取时间为85min, 超声波强度为70W。

研究表明超声波法提取罗非鱼内脏蛋白酶方法简单、提取率高、低耗高效。该研究为罗非鱼加工废弃物——内脏的高值化开发提供有益的参考, 也为罗非鱼内脏蛋白酶性质及工业应用奠定基础。

参考文献:

- [1] GILDBERG A. Recovery of proteinase and protein hydrolysate from viscera[J]. Bioresour Technol, 1992, 39: 271-294.
- [2] MARTINEZ A, SERRA J. Proteolytic activities in digestive tract of anchovy (*Engraulis encrasicolus*) [J]. Comp Biochem Physiol B, 1989, 93: 61-66.
- [3] SIMPSON B K, HAARD N F. Trypsin and trypsin like enzymes from the stomach less cunner (*Tautoglabrus adspersus*) catalytic and other physical characteristics[J]. Agric Food Chem, 1987, 35: 652-656.
- [4] CANCRE I, RAVALLEC R, WORMHOUDT V A, et al. Secretagogues and growth factors in fish and crustacean protein hydrolysates[J]. Mar Biotechnol, 1999(1): 489-499.
- [5] 吴燕燕, 李来好, 岑剑伟, 等. 酶法由罗非鱼加工废弃物制取调味料的研究[J]. 南方水产, 2006, 2(1): 49-53.
- [6] 陈胜军, 李来好, 杨贤庆, 等. 我国罗非鱼产业现状分析及提高罗非鱼出口竞争力的措施[J]. 南方水产, 2007, 3(1): 75-80.
- [7] 郝志明, 吴燕燕, 李来好. 罗非鱼内脏中酶的筛选[J]. 南方水产, 2006, 2(2): 38-42.
- [8] STELLMACH B. Bestimmungsmethoden enzyme[M]. China Light Industry Press, 1992: 32-34.
- [9] 赵亚华, 高向阳, 罗素萍, 等. 生物化学与分子生物学实验技术教程[M]. 北京: 高等教育出版社, 2005: 95-96.
- [10] 中国科学院数学研究所统计组. 常用数理统计方法[M]. 北京: 科学出版社, 1973.