

鱿鱼墨黑色素酶解法提取工艺优化及其紫外、红外光谱特征分析

宋 茹, 李厚宝, 邓尚贵
(浙江海洋学院食品与药学学院, 浙江 舟山 316000)

摘 要: 以鱿鱼墨水解度为指标, 分别测定木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、酸性蛋白酶、胃蛋白酶和胰蛋白酶对鱿鱼墨水解效果, 选用水解能力最强的胃蛋白酶为试验用酶, 测定酶解反应 pH 值、反应时间、反应温度和加酶量对鱿鱼墨水解度的影响。在单因素试验基础上进行 $L_9(3^4)$ 正交试验优化得到胃蛋白酶水解鱿鱼墨的最佳酶解条件为酶解反应 pH1.5、酶解温度 37℃、酶解反应时间 5h、加酶量 1.5%。在最优酶解反应条件下, 胃蛋白酶水解鱿鱼墨的水解度大于 13.50%。紫外-可见光谱分析显示酶解法制备的鱿鱼墨黑色素在 220nm 处有特征吸收波长, 红外光谱中的 3384.54cm^{-1} 和 1617.35cm^{-1} 处出现吡咯环结构归属的强吸收峰。

关键词: 鱿鱼墨; 黑色素; 蛋白酶酶解; 工艺优化; 光谱特征

Optimization of Enzymatic Preparation of Natural Melanin from Squid Ink and Its Spectral Characterization

SONG Ru, LI Hou-bao, DENG Shang-gui
(School of Food Science and Pharmacy, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316000, China)

Abstract: In this work, the enzymatic hydrolysis of squid ink was investigated to prepare natural melanin. Squid ink was hydrolyzed by papain, neutral protease, acidic protease, pepsin and trypsin, respectively, and pepsin was found to have the strongest ability to hydrolyze squid ink. Based on one-factor-at-a-time experiments, an $L_9(3^4)$ orthogonal array design was used to optimize the hydrolysis of squid ink by pepsin. The degree of hydrolysis of squid ink was investigated with respect to pH, hydrolysis time, temperature and enzyme amount. The four conditions were optimized as follows: pH 1.5, temperature 37 °C, reaction time 5 h and pepsin amount 1.5%. Under the optimized conditions, the degree of hydrolysis of squid ink exceeded 13.50%. Ultraviolet-visible spectral analysis revealed the characteristic absorption of melanin derived from squid ink at 220 nm wavelength. High-intensity absorption peaks at 3384.54 cm^{-1} and 1617.35 cm^{-1} , assigned to the structure of indole ring were observed in the infrared spectrum.

Key words: squid ink; melanin; protease hydrolysis; process optimization; spectral characteristics

中图分类号: TS254

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)18-0063-05

鱿鱼墨约占鱿鱼体质量的 1.3%, 相对于鱿鱼加工副产物, 如鱿鱼皮、肝脏等研究利用而言^[1-3], 鱿鱼墨黑色素的综合利用现状远低于鱿鱼加工现状, 而在美国和日本, 鱿鱼墨黑色素已作为一种天然黑色素应用到食品生产中。研究证实鱿鱼墨汁具有一定的抗肿瘤、抗溃疡、提高免疫力等作用^[4-7], 所以, 鱿鱼墨黑色素作为天然食品添加剂或药效成分的市场空间巨大。采用传统的碱溶酸沉法提取黑色素化学试剂消耗大, 而且也不

利于天然黑色素形态结构的保持^[8]。虽然高速离心法可以快速从鱿鱼墨汁中分离水不溶性黑色素^[9], 但与黑色素结合在一起的蛋白质也同时被提取, 不利于高纯度黑色素的制备。阎克路等^[8]采用木瓜蛋白酶水解牦牛绒法得到形态结构和化学组成改变均小于盐酸水解法制备的牦牛绒黑色素, 国内发明专利鱿鱼墨黑色素的制备方法及其应用(申请号利用酶解酸沉法制备纯度为 30%~99% 的鱿鱼墨黑色素, 所需要的酶解反应时间为 12~24h^[10]。

收稿日期: 2011-06-11

基金项目: 浙江省水产品加工产业创新团队项目(2011R09031-08)

作者简介: 宋茹(1976—), 女, 讲师, 博士, 研究方向为食品化学和食品营养。E-mail: happysong545@yahoo.com.cn

本实验以鱿鱼墨的水解度为指标,考察几种商业蛋白酶水解鱿鱼墨效果,筛选水解效果高的试验用酶,并对该蛋白酶的水解条件进行试验优化,缩短鱿鱼墨黑色素酶解法制备时间。同时,测定酶解法制备鱿鱼墨黑色素的紫外可见光谱和红外光谱,旨在为其光谱特征分析提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

北太平洋鱿鱼墨囊 浙江舟山兴业公司;木瓜蛋白酶、胰蛋白酶、胃蛋白酶(生化试剂) 中国医药集团上海化学试剂公司;中性蛋白酶、酸性蛋白酶(生化试剂) 无锡市酶制剂厂;其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

HH-4 型数显恒温水浴锅 常州市国华电器有限公司;SHY-3 型水浴恒温振荡器 江苏金坛市金城国盛实验仪器厂;LXJ-IIB 低速大容量多管离心机 上海安亭科学仪器厂;LGJ-10 冷冻干燥机 上海军事医学科学院实验仪器厂;UV-2100 紫外可见分光光度计 日本日立公司;769YP-15A 粉末压片机 天津市科器高新技术公司;TENSOR27 傅里叶变换红外光谱仪 瑞士 Bruker 公司。

1.3 方法

1.3.1 鱿鱼墨蛋白水解用酶选择

人工剖开鱿鱼墨囊取出黑色素,组织捣碎机粉碎,等质量分成5份,按照1:10比例加入蒸馏水,用6mol/L盐酸或6mol/L氢氧化钠溶液调节混合物的pH值分别至木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、酸性蛋白酶、胃蛋白酶和胰蛋白酶水解最佳pH值,水浴恒温至各蛋白酶的水解温度(表1),然后按照鱿鱼墨的质量分数1.0%加入各蛋白酶,搅拌均匀,恒温水浴水解30min后,加热灭酶(95~100℃,5min),离心分离(7000r/min,15min),取上清液测定水解度。水解度越大表示与鱿鱼墨结合在一起的蛋白质解离程度越高,即有利于高纯度鱿鱼墨黑色素的制备。

1.3.2 水解度测定

采用甲醛电位滴定法测定离心后上清液中游离氨基态氮量,采用半微量凯氏定氮法测定原料总氮量^[11],并计算鱿鱼墨水解度(degree of hydrolysis, DH)。

$$DH/\% = \frac{\text{上清液中游离氨基态氮总量}}{\text{原料总氮量}} \times 100$$

1.3.3 鱿鱼墨的酶解反应优化试验

选用木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、酸性蛋白酶、胃蛋白酶和胰蛋白酶水解鱿鱼墨,以鱿鱼墨水解液的水解度大小为考察指标,确定合适用酶。然后在考察酶解

反应pH值、加酶量、酶解反应温度和反应时间单因素试验基础上,进行四因素三水平正交试验 $L_9(3^4)$,确定蛋白酶水解鱿鱼墨的最佳酶解条件。

1.3.4 鱿鱼墨黑色素的光谱特征

在最佳水解条件下,鱿鱼墨经蛋白酶水解得到黑色素沉淀,经蒸馏水反复水洗、离心分离,然后冷冻干燥得到黑色素粉末用于光谱分析。

1.3.4.1 紫外-可见光谱扫描

将鱿鱼墨黑色素粉用二甲亚砜溶解,稀释合适倍数后,在190~600nm进行紫外-可见光谱扫描,确定蛋白酶解法制备的鱿鱼墨黑色素的特征吸收波长。

1.3.4.2 红外光谱特征分析

按照1:100比例将鱿鱼墨黑色素粉末与KBr干粉混合,研磨均匀后压片,测定400~4000 cm^{-1} 的红外光谱,分析酶解法制备鱿鱼墨天然黑色素的官能团信息。

2 结果与分析

2.1 蛋白酶水解鱿鱼墨用酶选择

木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、酸性蛋白酶、胃蛋白酶和胰蛋白酶水解鱿鱼墨的结果如表1所示。

表1 不同蛋白酶水解鱿鱼墨水解度比较

Table 1 Comparison of hydrolysis degrees of squid ink by papain, neutral protease, acidic protease, pepsin and trypsin under optimal reaction conditions

蛋白酶	反应pH	酶解温度/℃	水解度/%
木瓜蛋白酶	7.0	50	6.40
中性蛋白酶	7.0	45	7.32
酸性蛋白酶	3.5	40	8.99
胃蛋白酶	1.8	40	9.75
胰蛋白酶	7.0	50	5.67

鱿鱼墨黑色素不溶于水,通过蛋白酶水解作用,将与鱿鱼墨结合在一起的蛋白质解离到水溶液中,或蛋白质被进一步水解为小分子肽类,有利于分离得到高纯度黑色素。表1蛋白酶水解鱿鱼墨的结果显示胃蛋白酶水解鱿鱼墨的水解度最高(9.75%),其次为酸性蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶,胰蛋白酶水解鱿鱼墨的水解度最低(5.67%)。胃蛋白酶水解蛋白质具有较强专一性,要求水解位点两侧的氨基酸残基均为疏水性残基,如亮氨酸(Leu)、苯丙氨酸(Phe)、色氨酸(Trp)等^[12]。表1结果间接反映出与鱿鱼墨结合在一起的蛋白质应含有较多疏水性氨基酸残基,从而使胃蛋白酶有更多的酶切位点,结果表现出高水解度。与胃蛋白酶相比较,胰蛋白酶对蛋白质水解专一性更强,只裂解赖氨酸(Lys)和精氨酸(Arg)羧基参与形成的肽键^[12],所以水解程度低。在相同的酶解反应时间下,胃蛋白酶水解鱿鱼墨的水解

度最高, 选用胃蛋白酶为试验用酶, 进一步研究鱿鱼墨最优水解条件。

2.2 鱿鱼墨的酶解反应条件优化

2.2.1 酶解反应单因素试验

在固定料液比(鱿鱼墨/蒸馏水)为1:10(g/mL)条件下, 试验测定了胃蛋白酶的酶解反应pH值、酶解温度、酶解时间和加酶量对鱿鱼墨水解度的影响, 结果见图1。

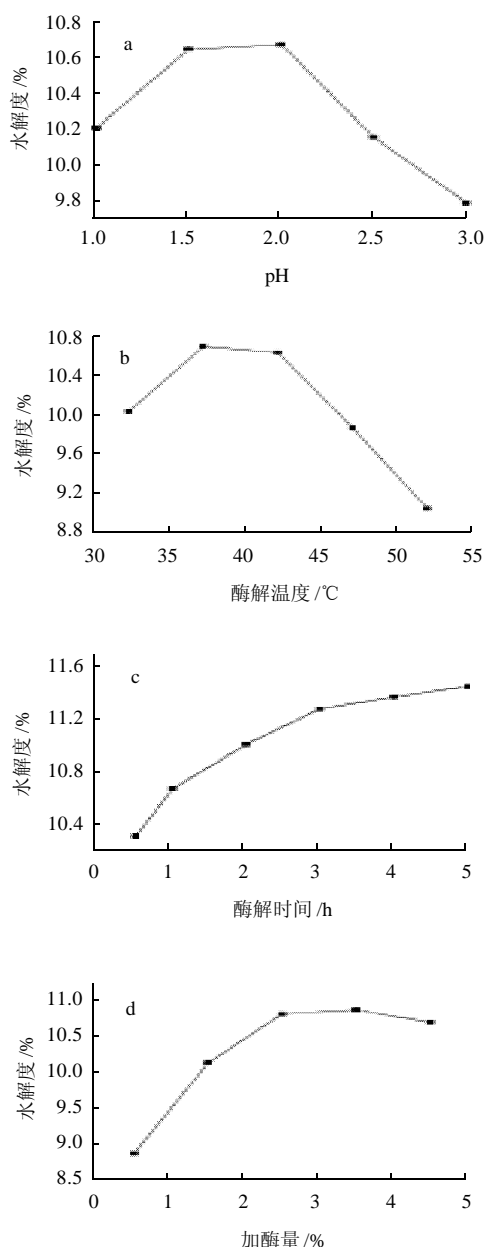


图1 反应pH值(a)、酶解温度(b)、酶解时间(c)和加酶量(d)对鱿鱼墨水解度的影响

Fig.1 Effects of pH (a), temperature (b), reaction time (c) and pepsin amount (d) on the hydrolysis degree of squid ink

pH值直接影响酶的活性和酶解反应速度, 图1a结果显示酶解反应pH值控制在1.5~2.0时, 胃蛋白酶水解鱿鱼墨水解度高, 当pH值大于2.0, 鱿鱼墨的水解度明显下降, 与胃蛋白酶的酶活性降低有关。

在蛋白酶解反应中, 反应温度过高和过低均不利于酶活性保留和发挥, 图1b表明, 酶解反应温度控制在32~42℃, 胃蛋白酶水解鱿鱼墨的水解度可以保持10%以上。

酶解反应时间在0.5~3.0h时, 随着反应时间的延长, 胃蛋白酶水解鱿鱼墨的水解度明显增大(图1c), 酶解反应时间大于3.0h后, 水解度增加缓慢。因为酶解反应时间充裕时, 胃蛋白酶可以寻找更多酶切位点, 将黑素蛋白(黑色素与蛋白质复合体)水解, 或是将已被释放出来的蛋白质进一步水解为小分子肽类或氨基酸类, 但当达到足够的酶解反应时间后, 蛋白质水解度就不再剧烈地增加。

由图1d可知, 胃蛋白酶加入量低于2.5%时, 鱿鱼墨水解度随加酶量的增加而迅速增大, 当加酶量大于2.5%后, 水解度增加缓慢, 甚至在4.5%加酶量的条件下, 水解度出现轻度下降。酶解反应时间一定时, 反应系统中加大酶量, 即是增加了蛋白质被酶切机率, 所以表现出水解度增加。但当加酶量达到一定程度后, 酶解液中脯氨酸含量增加机率也变大, 而在甲醛电位滴定法中脯氨酸与甲醛相互作用生成不稳定的化合物, 造成测定结果偏低^[11]。所以, 图1d中加酶量大于4.5%, 鱿鱼墨水解度降低可能与水解液中脯氨酸含量增加有关, 但具体原因需要进一步分析。

2.2.2 鱿鱼墨的酶解反应正交试验

在胃蛋白酶水解鱿鱼墨的单因素试验基础上, 采用四因素三水平正交试验优化酶解反应条件, 结果见表2。

表2 胃蛋白酶水解鱿鱼墨L₉(3⁴)正交试验设计及结果
Table 2 L₉(3⁴)orthogonal array design and corresponding results

试验号	A pH	B 酶解温度/°C	C 酶解时间/h	D 加酶量/%	水解度/%
1	1(1.5)	1(32)	1(3)	1(1.5)	11.86
2	1	2(37)	2(4)	2(2.5)	11.67
3	1	3(42)	3(5)	3(3.5)	12.15
4	2(2.0)	1	2	3	11.60
5	2	2	3	1	12.12
6	2	3	1	2	11.60
7	3(2.5)	1	3	2	11.13
8	3	2	1	3	11.33
9	3	3	2	1	11.28
K ₁	35.68	34.59	34.79	35.26	
K ₂	35.32	35.12	34.55	34.40	
K ₃	33.74	35.03	35.40	35.08	
R	1.94	0.53	0.85	0.86	
最优水平	A ₁	B ₂	C ₃	D ₁	

表2极差R值大小反映出各因素对鱿鱼墨水解度大小影响顺序为:反应pH值>加酶量>酶解时间>酶解温度。根据正交试验结果,确定胃蛋白酶水解鱿鱼墨的最佳条件为 $A_1B_2C_3D_1$,即酶解反应pH1.5、酶解温度 37°C 、酶解时间5h、加酶量1.5%,在最优水解条件下,鱿鱼墨的水解度大于13.50%,高于表2中出现的任一水解度,说明经过正交试验方案优化得到的水解条件是合理的。

2.3 鱿鱼墨黑色素的光谱特征

2.3.1 紫外-可见扫描光谱

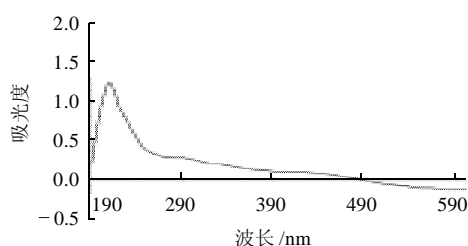


图2 胃蛋白酶水解鱿鱼墨制备黑色素的紫外-可见光谱图
Fig.2 UV-visible spectrum of squid melanin derived from squid ink

由图2可知,胃蛋白酶水解鱿鱼墨制备的天然黑色素在紫外区域的吸光度随着波长的变短而增加,在220nm附近有特征吸收峰,而可见光区域的吸光度随着波长的变长而逐渐降低。黑色素能吸收紫外线,但是不同来源的动物黑色素所表现的特征吸收波长可能会存在一定差异,即使原料相同或类似,由于黑色素制备方法的不同,所得黑色素的紫外-可见光谱特征也不一定相同,如李兴旺等^[13]用反复酸沉法精制太平洋褶柔鱼和阿根廷短鳍枪乌贼黑色素在200~400nm波长范围内存在两个吸收峰,其中最大吸收峰值在215nm,与本实验最大吸收峰220nm接近;陈士国等^[14]用高速离心法制备的北太平洋鱿鱼墨黑色素除在紫外光区210nm和330nm处存在吸收峰外,可见光区的410nm处也有明显吸收峰,并且黑色素与Fe(III)络合后在226nm处出现新吸收峰,330nm处的吸收峰则随着Fe(III)离子浓度增加而增强,但是黑色素—Fe(III)络合物在410nm的吸收峰则随着Fe(III)离子强度的增强而减弱。

鱿鱼墨黑色素可以通过羧基和去质子化羟基等阴离子与金属阳离子发生络合反应,且不同金属离子,如 Fe^{3+} 和 $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ 等与黑色素的络合位点也不尽相同^[15-16]。由于鱿鱼自身生物学特性和生活海域中海水的金属元素等影响,鱿鱼墨中往往含有钙、铁、镉、铜、铅、镉等金属离子^[17]。鱿鱼墨黑色素制备方法不同,可能会对与黑色素络合在一起的金属离子产生影响,结果在光谱特征上表现出一定的差异性。

2.3.2 红外光谱特征

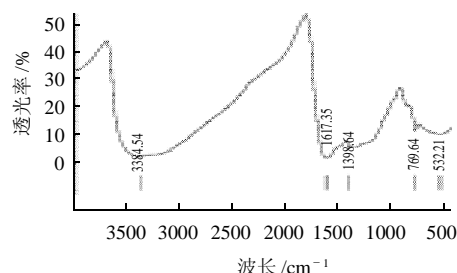


图3 胃蛋白酶水解鱿鱼墨制备黑色素的红外光谱图
Fig.3 Infrared (IR) spectra of squid melanin derived from squid ink hydrolysate

由图3可以看出,酶解法制备的鱿鱼墨黑色素特征吸收峰主要集中在以下3组峰:3500~3300 cm^{-1} 、1620~1600 cm^{-1} 和1465~1250 cm^{-1} ,其中3384.54 cm^{-1} 的强吸收峰为COO-或者O—H和N—H伸缩振动,1617.35 cm^{-1} 吸收是C=O伸缩振动(存在酰胺或酮基)或者是C—C变形振动(可能芳构化、环化),1398.64 cm^{-1} 吸收是COO—的变形振动或C—C变形振动(可能存在芳构化结构)。

动物源黑色素多属于吡啶型,根据构成黑色素结构单元骨架是吡啶还是苯并噻嗪,又将动物黑色素分为真黑色素(Eumelanin)和脱黑色素(Pheomelanin)两大类^[18],前者不含硫原子,黑色素呈棕色或者黑色,后者含有硫原子,黑色素颜色呈黄色或微红棕色。不同来源的动物黑色素有相似的红外光谱特征,3400 cm^{-1} 附近吸收峰是C—N延伸,归属于吡啶或吡咯环,1630 cm^{-1} 附近吸收峰为真黑素的吡啶环归属,1535 cm^{-1} 吸收峰则归属于苯并噻嗪环结构^[7,19-21]。由图3红外图谱可以判断胃蛋白酶水解鱿鱼墨制备的黑色素具有典型的吡啶环结构,与文献[13]报道一致。

3 结 论

胃蛋白酶可以有效水解鱿鱼墨,水解能力强于木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、酸性蛋白酶和胰蛋白酶。正交试验优化得到的胃蛋白酶水解鱿鱼墨最佳条件为反应pH1.5、酶解反应温度 37°C 、酶解反应时间5h、胃蛋白酶添加量1.5%。酶解法制备的鱿鱼墨黑色素在紫外区域220nm有特征吸收波长,红外谱图中3384.54 cm^{-1} 和1617.35 cm^{-1} 处的强吸收提示鱿鱼墨黑色素的主体结构应为吡啶环。

参考文献:

- [1] ALEMAN A, PEREZ-SANTIN E, BORDENAVE-JUCHEREAU S, et al. Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and

- antioxidant activity[J]. Food Research International, 2011, 44(4): 1044-1051.
- [2] ALEMAN A, GIMENEZ B, MONTERO P, et al. Antioxidant activity of several marine skin gelatins[J]. LWT - Food Science and Technology, 2011, 44(2): 407-413.
- [3] SHETTY A K, KOBAYASHI T, MIZUMOTO S, et al. Isolation and characterization of a novel chondroitin sulfate from squid liver integument rich in *N*-acetylgalactosamine (4,6-disulfate) and glucuronate (3-sulfate) residues[J]. Carbohydrate Research, 2009, 344(12): 1526-1532.
- [4] CHEN Shiguo, WANG Jingfeng, XUE Changhu, et al. Sulfation of a squid ink polysaccharide and its inhibitory effect on tumor cell metastasis[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 81(3): 560-566.
- [5] TAKAYA Y, UCHISAWA H, MATSUE H, et al. An investigation of the antitumor peptidoglycan fraction from squid ink [J]. Biol Pharm, 1994, 17(6): 846-849.
- [6] SASAKI J, ISHITA K, TAKAYA Y, et al. Antitumor activity of squid ink [J]. Journal of Nutritional Science and Vitaminology (Tokyo), 1997, 43(4): 455.
- [7] 刘治东, 王静凤, 王玉明, 等. 鱿鱼墨黏多糖对小鼠免疫调节作用的研究[J]. 中国海洋大学学报, 2009, 39(增刊 1): 147-150.
- [8] 阎克路, 宋心远, SCHAEFER K, 等. 蛋白酶和盐酸分离牦牛绒中黑色素的提取[J]. 纺织学报, 2001, 22(6): 348-351.
- [9] 陈士国, 薛长湖, 薛勇, 等. 鱿鱼墨黑色素的自由基清除活性研究[J]. 中国海洋药物杂志, 2007, 26(1): 24-27.
- [10] 王静凤, 薛长湖, 陈士国, 等. 鱿鱼墨黑色素的制备方法及其应用: 中国, CN100999616[P]. 2007-07-18.
- [11] 吴谋成. 食品分析与感官评定[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 71-79.
- [12] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学(上册)[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002: 173-174.
- [13] 李兴旺, 王槌, 蒋云霞. 从鱿鱼墨中精制黑色素[J]. 上海水产大学学报, 2001, 10(3): 252-256.
- [14] 陈士国, 薛勇, 薛长湖, 等. 鱿鱼墨黑色素络合铁离子的活性研究[J]. 离子交换与吸附, 2010, 26(4): 310-316.
- [15] LIU Yan, SIMON J D. The effect of preparation procedures on the morphology of melanin from ink sac of *Sepia officinalis*[J]. Pigment Cell Research, 2003, 16(1): 72-80.
- [16] LIU Yan, SIMON J D. Metal ion interactions and the structural organization of sepia eumelanin[J]. Pigment Cell Research, 2005, 18(1): 42-48.
- [17] 郑高利, 张信岳, 周彦钢, 等. 鱿鱼墨和乌贼墨成分及微量元素含量比较[J]. 中国海洋药物, 2002, 21(3): 12-14.
- [18] NICOLAURS R A, PIATTELLI M, FATTORUSSO E. The structure of melanins and melanogenesis-IV: On some natural melanins[J]. Tetrahedron, 1964, 20(5): 1163-1172.
- [19] 王鑫玉, 孙守荣, 周艳华, 等. 黑色素分析指标的研究进展及其应用[J]. 中国畜牧兽医, 2008, 35(5): 31-35.
- [20] 王岩, 刘学慧, 陆懋荪, 等. 几种天然黑色素分子结构的红外光谱表征研究[J]. 分析实验室, 1996, 15(6): 63-65.
- [21] 林完全, 陈维泰. 国产乌骨鸡黑色素萃取物的物理化学特性[J]. 台湾农业化学与食品科学, 2004, 42(5): 335-342.




快速订阅

2011年《食品与发酵工业》征订启事

(月刊, 邮发代号: 12-331)

■全国中文核心期刊 ■第三届中国出版集团重点期刊
 ■中国期刊网(CNKI)数据库收录 ■中国科技网(CNKI)数据库收录
 ■美国《化学文摘》(CA)数据库收录
 ■中国学术期刊网(CAJ)数据库收录

本杂志创刊于1982年, 是全国食品工业领域内唯一的专业性学术期刊。创刊以来, 始终秉承“立足食品工业, 服务食品工业”的宗旨, 为食品工业的发展提供理论支持和实践指导。

2011年《食品与发酵工业》(月刊)共出版12期, 全年共出版12期。全年共出版12期, 全年共出版12期。全年共出版12期, 全年共出版12期。

订价: 100元/年(含邮费) 国外订价: 150元/年
 ISSN 1002-6359/12

地址: 北京中南海西便门内大街135号
 邮编: 100871 电话: 010-63135000
 传真: 010-63135001 E-mail: fli@caj.cn
<http://www.caj.cn>
 网站: <http://www.caj.cn>

