

# 草鱼内脏复合蛋白酶提取工艺研究

刘明华, 王大红

(武汉职业技术学院 生物工程学院, 湖北 武汉 430074)

**摘要:** 为充分利用草鱼加工下脚料, 以草鱼内脏为原料, 以复合蛋白酶酶比活为指标, 对草鱼内脏复合蛋白酶的提取、分离、干燥条件进行优化。结果表明, 最佳的草鱼内脏脱脂物是工业己烷; 最佳的复合蛋白酶提取条件为磷酸盐缓冲液 pH 值 8、提取温度 20 ℃、浸提时间 80 min, 超声波辅助提取频率 15 kHz、功率 50 W、时间 4 min; 最佳的复合蛋白酶分离方法是添加质量浓度为 8 g/L 的茶多酚; 最佳的干燥条件是聚乙二醇终质量浓度 20 g/L、装液厚度 6 mm、快速冷冻、干燥时间 24 h。在此条件下, 复合蛋白酶酶比活为 4.33 U/mg。

**关键词:** 草鱼; 内脏; 复合蛋白酶; 提取

中图分类号: Q55 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2013)07-0145-05

## Study on Extraction Process of Compound Protease from Viscera of Grass Carp

LIU Ming-hua, WANG Da-hong

(School of Biological Engineering, Wuhan Polytechnic, Wuhan 430074, China)

**Abstract:** In order to make full use of scraps of grass carp processing, the extraction, separation, and drying process of compound protease from viscera of grass carp were optimized with specific activity of compound protease as an index. The results showed that the best extraction condition of compound protease was pH value of 8, extraction temperature of 20 ℃, extraction time of 80 min, ultrasonic frequency of 15 kHz, ultrasonic power of 50 W, sonification time of 4 min; the best separation condition of compound protease was tea polyphenol of 8 g/L; the best drying condition of compound protease was polyethylene glycol of 20 g/L, material thickness of 6 mm, quick-freezing, drying time of 24 h. Under the conditions, the specific activity of compound protease was 4.33 U/mg.

**Key words:** grass carp; viscera; compound protease; extraction

随着淡水鱼加工制品的日益开发和生产, 大量的淡水鱼加工下脚料未能充分利用, 其中约占原料鱼 10%~15% 的内脏更是如此, 这不仅造成了资源浪费, 而且污染了环境。淡水鱼内脏中含有各种酶, 如蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶和纤维素酶等, 其中以蛋白酶为主。刘忠义<sup>[1]</sup>对草鱼消化道酸性、碱性胰蛋白酶进行了分离纯化及鉴定; 张继平等<sup>[2]</sup>对草鱼碱性磷酸酶进行了分离纯化与部分性质研究; 郝志明<sup>[3]</sup>对罗非鱼内脏中的酶进行筛选, 发现蛋白酶、超

氧化物歧化酶、胆碱酯酶和碱性磷酸酶具有较高的活性。

目前, 部分企业主要将淡水鱼内脏用来生产饲料鱼粉、粗提部分油脂等, 而对其更有利用价值的成分, 特别是内脏中的各种酶尚未充分利用, 主要原因是其提取工艺比较复杂, 工厂化实施比较困难。如能充分利用这些淡水鱼内脏, 从中提取出能应用于洗衣粉等清洁剂产品或其他食品中的复合蛋白酶, 不仅可提高鱼类加工的附加值, 同时可减少环境污

收稿日期: 2013-03-14

基金项目: 湖北省教育厅科学技术研究项目(B2013270); 武汉职业技术学院校级项目(2012YK671)

作者简介: 刘明华(1968-), 男, 湖北仙桃人, 副教授, 本科, 主要从事食品生物技术的研究与教学工作。

E-mail: lmh\_0948@163.com

染,获得良好的经济效益和社会效益。目前,还未见关于淡水鱼内脏复合蛋白酶提取方面的研究报道。为此,以淡水鱼——草鱼内脏为原料,对其复合蛋白酶的提取、分离、干燥条件进行优化,确定最适生产工艺条件,以期对淡水鱼内脏的高值化利用提供参考,为淡水鱼的综合加工和利用开辟新的途径。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 供试淡水鱼 草鱼内脏(武汉关山街集贸市场),购回立即放入 4℃ 以下的 RO(反渗透)水中,去除草鱼内脏表面脂肪及鱼肠内容物,尽量除去沾附在肠内壁的内容物和黏液,清洗干净,沥干称质量。

1.1.2 试剂 茶多酚(食品级)、磷酸盐缓冲溶液、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、三氯乙酸、酪蛋白、酪氨酸、HCl、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、NaOH、G-250 考马斯亮蓝、 $\text{H}_3\text{PO}_4$ 、无水乙醇、95%乙醇。

1.1.3 仪器设备 台式电子天平(PS401F)、恒温水浴锅(HH-2)、组织捣碎机(JJ-2)、磁力搅拌器(Feb-85)、高速冷冻离心机(J-EHIGH)、紫外可见分光光度计(T6)、超声波提取器(KESP-100KN)、pH 计(DELTA320)、小型高速喷雾干燥机(SY6000)、台式冷冻干燥机(FD-1A-50)。

### 1.2 方法

1.2.1 草鱼内脏的脱脂 称取清洗干净的草鱼内脏 100 g 4 份,按照固液比 1:4 分别加入蒸馏水、石油醚、丙酮、工业己烷,用组织捣碎机于 4℃ 捣碎 30 s,放置 10 min,于 4℃、6 000 r/min 离心 10 min,收集沉淀,晾干备用。

1.2.2 草鱼内脏复合蛋白酶的提取 按照固液比 1:5 向上述沉淀物中加入一定 pH 值的磷酸盐缓冲液,用组织捣碎机匀浆 30 s,然后在一定温度下浸提一段时间;再用超声波提取器于一定频率、功率下辅助提取一段时间,然后于 4℃、6 000 r/min 离心 15 min,上清液即为粗酶液。

1.2.2.1 超声波辅助提取草鱼内脏复合蛋白酶的单因素试验 选取超声频率、功率和时间作为影响超声波辅助提取蛋白酶效果的主要因素,在超声功率 40 W、时间 5 min 的条件下,研究超声频率分别为 0、13、14、15、16、17、18 kHz 时对蛋白酶提取效果的影响;在超声频率 15 kHz、时间 5 min 的条件下,研究超声功率分别为 0、30、40、50、60、70、80 W 时对蛋白酶提取效果的影响;在超声频率 15 kHz、功率 50 W 的条件下,研究超声时间分别为 0、1、2、3、

4、5、10、15 min 时对蛋白酶提取效果的影响。

1.2.2.2 草鱼内脏复合蛋白酶提取条件的正交试验 对磷酸盐缓冲液 pH 值、提取温度、浸提时间、超声功率 4 个主要影响因素进行四因素三水平正交试验(试验设计见表 1),确定最佳提取条件。

表 1 草鱼内脏复合蛋白酶提取条件的正交试验设计

水平	因素			
	磷酸盐缓冲液 pH(A)	提取温度(B)/℃	浸提时间(C)/min	超声功率(D)/W
1	7	10	40	40
2	8	20	60	50
3	9	30	80	60

1.2.3 草鱼内脏复合蛋白酶的分离 分别用茶多酚络合沉淀法<sup>[4]</sup>和硫酸铵分级沉淀法对上述粗酶液中的复合蛋白酶进行分离。

茶多酚络合沉淀法:取粗酶液,于磁力搅拌器上边搅拌边添加 200 g/L 的茶多酚溶液(用 pH 值 7.0 的磷酸盐缓冲液配制),至一定的茶多酚终质量浓度(2、4、6、8、10、12、14 g/L),然后搅拌 30 min,使其完全络合。在 4℃ 冰箱内放置 5 h,于 4℃、6 000 r/min 离心 20 min,弃上清,沉淀用 1/2 原粗酶液体积的磷酸盐缓冲液(pH 值 7.0)溶解,4℃ 放置 24 h,离心,上清液即为复合蛋白酶液。

硫酸铵分级沉淀法:向粗酶液中缓慢加入硫酸铵至一定饱和度(10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%),4℃ 静置 4 h,然后于 4℃、6 000 r/min 离心 10 min,弃上清,沉淀用 1/2 原粗酶液体积的磷酸盐缓冲液(pH 值 7.0)溶解,然后于 4℃ 条件下用去离子水透析 24 h,换去离子水 2 次,透析袋内酶液即为复合蛋白酶液。

1.2.4 复合蛋白酶的干燥 采用冷冻干燥法对复合蛋白酶液进行干燥。对装液厚度、聚乙二醇终质量浓度、冷冻速度、干燥时间 4 个主要影响因素进行正交试验(试验设计见表 2),根据酶活力测定结果,确定复合蛋白酶冷冻干燥最佳条件。

表 2 冷冻干燥复合蛋白酶的正交试验设计

水平	因素			
	装液厚度(A)/mm	聚乙二醇终质量浓度(B)/(g/L)	冷冻速度(C)	干燥时间(D)/h
1	4	0	慢速	18
2	6	20	中速	24
3	8	40	快速	30

1.2.5 蛋白质含量测定 参照 Bradford 法<sup>[5]</sup>,每支试管加入 0.1 mL 样品溶液,再加入 5.0 mL 考马斯亮蓝试剂,振荡摇匀,放置 10 min,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 波长处测定吸光度。以吸光度( $y$ )为纵坐标,蛋白质质量浓度( $x$ )为横坐标,绘制标准曲线,用最小二乘法进行线性回归得标准回归方程: $y=0.0069x-0.0046$ ,  $R^2=0.9996$ ,相关性良好。根据该方程计算出待测样品的蛋白质含量。

1.2.6 复合蛋白酶活性测定 按参考文献[6]中的方法,采用紫外分光光度法测定。以酪蛋白为底物,取 1.0 mL 10 g/L 的酪蛋白,37 °C 预热 5 min,加入复合蛋白酶液 0.1 mL,37 °C 反应 10 min,加入 3.0 mL 100 g/L 的三氯乙酸终止反应,静置 15 min,过滤,上清液于 275 nm 波长处测定吸光度。对照管先加 100 g/L 的三氯乙酸,后加复合蛋白酶液。

复合蛋白酶活力单位定义:在 37 °C、pH 值 7.0 的条件下,样品水解酪蛋白每分钟产生酪氨酸 1.0  $\mu$ g 所需的酶量为 1 个活力单位(U)。

草鱼内脏复合蛋白酶的比活力(U/mg)定义为:每 1 mg 蛋白质所具有的酶活力单位,即酶比活=复合蛋白酶酶活/蛋白质含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 草鱼内脏的脱脂结果

采用 1.2.1 中的方法对草鱼内脏进行脱脂,按照固液比 1:5 向收集得到的沉淀物中加入 pH 值 7.0 的磷酸盐缓冲液,溶解后测定其酶比活。由表 3 可以看出,蒸馏水处理后的草鱼内脏干质量最大,为 86 g,草鱼内脏复合蛋白酶磷酸盐粗提液的酶比活最小,为 1.73 U/mg;石油醚处理后的草鱼内脏干质量和酶比活居中,分别为 68 g、2.06 U/mg;工业己烷处理后的草鱼内脏干质量最小,为 63 g,酶比活最大,为 2.35 U/mg;丙酮与工业己烷脱脂效果相当。从工业化操作和成本考虑,选择工业己烷脱脂较好。

表 3 不同溶剂对草鱼内脏脱脂效果的影响

溶剂	内脏原质量/g	脱脂后干质量/g	酶比活/(U/mg)
蒸馏水	100	86	1.73
石油醚	100	68	2.06
丙酮	100	64	2.32
工业己烷	100	63	2.35

### 2.2 草鱼内脏复合蛋白酶的提取结果

2.2.1 超声波辅助提取草鱼内脏复合蛋白酶的单一因素试验结果

2.2.1.1 超声频率 由表 4 可以看出,当超声频率

小于 15 kHz 时,随着超声频率的增加,草鱼内脏复合蛋白酶粗酶液的酶比活增加;当超声频率达到 15 kHz 时,酶比活最高,为 3.08 U/mg,比未经超声波处理的提高了 31.1%;当超声频率超过 15 kHz 时,酶比活开始下降。因此,超声频率选择 15 kHz 为佳。

表 4 超声频率对草鱼内脏复合蛋白酶提取效果的影响

项目	频率/kHz						
	0	13	14	15	16	17	18
酶比活/(U/mg)	2.35	2.58	2.83	3.08	2.81	2.52	2.41

2.2.1.2 超声功率 由表 5 可以看出,随着超声功率的增加,草鱼内脏复合蛋白酶粗酶液的酶比活先增加后降低,当超声功率为 50 W 时,酶比活最高,为 3.28 U/mg,比未经超声波处理的升高了 39.6%。因此,超声功率以 50 W 为佳。

表 5 超声功率对草鱼内脏复合蛋白酶提取效果的影响

项目	功率/W						
	0	30	40	50	60	70	80
酶比活/(U/mg)	2.35	2.70	2.82	3.28	3.24	2.78	2.51

2.2.1.3 超声时间 由表 6 可以看出,随着超声时间的增加,草鱼内脏复合蛋白酶粗酶液的酶比活先增加后降低,超声时间为 4 min 时,酶比活最高,为 3.25 U/mg,比未经超声波处理的升高了 38.3%。因此,超声时间选择 4 min 为佳。

表 6 超声时间对草鱼内脏复合蛋白酶提取效果的影响

项目	时间/min							
	0	1	2	3	4	5	10	15
酶比活/(U/mg)	2.35	2.73	2.91	3.18	3.25	3.05	2.76	2.24

2.2.2 草鱼内脏复合蛋白酶提取条件的正交优化结果 由表 7 可以看出,影响复合蛋白酶提取效果的因素主次顺序为:  $A > D > C > B$ ; 最佳组合为  $A_2B_2C_3D_2$ , 即磷酸盐缓冲液 pH 值 8、提取温度 20 °C、浸提时间 80 min、超声功率 50 W。在此条件下,进行验证试验,草鱼内脏复合蛋白酶粗酶液的酶比活为 3.52 U/mg,高于表 7 中所有酶比活值。

表 7 草鱼内脏复合蛋白酶提取条件的正交试验结果

试验号	因素				酶比活/(U/mg)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	1.86
2	1	2	2	2	2.95
3	1	3	3	3	2.35
4	2	1	2	3	3.24
5	2	2	3	1	3.22
6	2	3	1	2	3.48

续表 7 草鱼内脏复合蛋白酶提取条件的正交试验结果

试验号	因素				酶比活/(U/mg)
	A	B	C	D	
7	3	1	3	2	3.11
8	3	2	1	3	2.57
9	3	3	2	1	2.38
$K_1$	7.16	8.21	7.91	7.46	
$K_2$	9.94	8.72	8.57	9.54	
$K_3$	8.06	8.21	8.68	8.16	
R	0.927	0.170	0.257	0.693	

### 2.3 草鱼内脏复合蛋白酶的分离结果

由图 1 可以看出,随着茶多酚质量浓度的增加,草鱼内脏复合蛋白酶酶液的酶比活先增加后降低,当茶多酚质量浓度为 8 g/L 时,酶比活最大,为 4.48 U/mg。由图 2 可以看出,随着硫酸铵饱和度的增加,草鱼内脏复合蛋白酶酶液的酶比活先增加后降低,当硫酸铵饱和度为 50% 时,酶比活最大,为 4.01 U/mg。由此可以看出,茶多酚沉淀法所得产物的酶比活较大,且茶多酚用量比硫酸铵少很多。鉴于茶多酚和蛋白酶之间络合作用的可逆性,复合蛋白酶中少量的茶多酚不会影响酶的活性,也不会影响其在清洁剂或食品加工中的应用。因此,选择茶多酚进行草鱼内脏复合蛋白酶的分离比较好,且其质量浓度以 8 g/L 为佳。

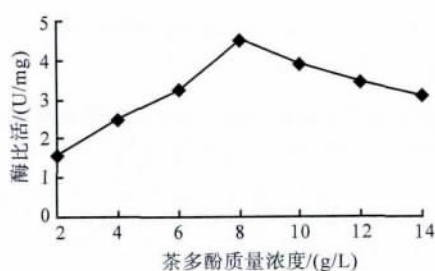


图 1 不同质量浓度茶多酚对酶比活的影响

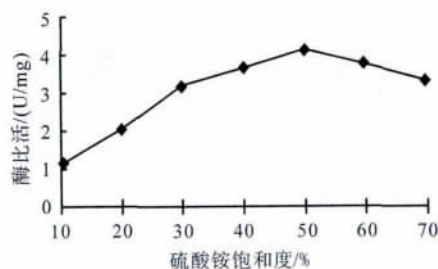


图 2 不同饱和度硫酸铵对酶比活的影响

### 2.4 草鱼内脏复合蛋白酶的干燥结果

由表 8 可以看出,影响复合蛋白酶干燥效果的因素主次顺序为  $B > A > D > C$ ; 最佳组合为  $A_2 B_2 C_3 D_2$ , 即装液厚度 6 mm、聚乙二醇终质量浓度 20 g/L、快速

冷冻、干燥时间 24 h。在此条件下,进行验证试验,酶比活为 4.33 U/mg,高于表 8 中酶比活值。

表 8 复合蛋白酶干燥条件的正交试验结果

试验号	因素				酶比活/(U/mg)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	2.98
2	1	2	2	2	4.02
3	1	3	3	3	3.35
4	2	1	2	3	3.27
5	2	2	3	1	4.22
6	2	3	1	2	4.13
7	3	1	3	2	3.21
8	3	2	1	3	3.62
9	3	3	2	1	2.56
$K_1$	10.35	9.46	10.73	9.76	
$K_2$	11.62	11.86	9.85	11.36	
$K_3$	9.39	10.04	10.78	10.24	
R	0.743	0.800	0.310	0.533	

## 3 结论与讨论

草鱼内脏油脂含量高达 35% 以上,部分酶成分被包裹其中,如不进行脱脂,酶溶出效果较差,不利于内脏酶的提取。淡水鱼内脏油脂的分离方法有很多,如热水提取法、钾法和酶解法等<sup>[7]</sup>,但都没有考虑鱼内脏酶的有效利用,破坏了酶的活性。因此,为了保证鱼内脏酶的活性,在低温条件下,用有机溶剂脱出油脂是有效的方法。本研究发现工业己烷脱脂效果最佳。

本研究发现,选择适宜的超声波辅助提取条件提取复合蛋白酶可提高酶比活。这可能是因为在短时间内,超声波通过空化作用破坏内脏组织结构,使其松散,其中的酶类溶出,而且超声波所释放的能量促使酶分子构象发生改变,对酶分子本身行使生物学功能有促进作用,从而提高酶比活。但超过一定时间、一定功率,酶分子构象又发生变化,反而造成酶比活降低。

通过比较茶多酚络合沉淀法和硫酸铵分级沉淀法分离草鱼内脏复合蛋白酶的效果,确定茶多酚络合沉淀法更利于酶比活的提高,且茶多酚是一种天然功能性食品添加剂,具有极高的抗氧化和防腐性能,不影响其在清洁剂或食品加工中的应用。

对制取的复合蛋白酶液进行冷冻干燥,将液体酶制成固体产品,可减小酶制剂的体积,方便保存、运输和使用。但在冷冻干燥过程中,脱水会使蛋白质受到损伤,可能造成复合蛋白酶制剂部分失活,要

添加保护剂来减少蛋白质的脱水损伤。聚乙二醇会与蛋白质表面形成氢键,代替水的存在,使蛋白质在缺水条件下仍能保持稳定的结构,从而减少酶活性的损失,而且由于大分子结合修饰,使酶的空间结构发生了某些细微的改变,对酶有一定的激活作用从而提高酶活性<sup>[8]</sup>。

总之,草鱼内脏复合蛋白酶的最佳提取、分离、干燥工艺为:按照固液比 1:4 向草鱼内脏中加入工业己烷进行脱脂,然后按照固液比 1:5 向其中加入 pH 值为 8 的磷酸盐缓冲液,在 20℃ 条件下浸提 80 min,再用超声仪在频率 15 kHz、功率 50 W 的条件下处理 4 min 进行辅助提取,6 000 r/min 离心 15 min;然后添加质量浓度为 8 g/L 的茶多酚进行初步分离纯化;最后添加聚乙二醇至其终质量浓度为 20 g/L,按 6 mm 装液厚度快速冷冻,干燥 24 h,将复合蛋白酶液制成固态粉剂,此条件下酶比活为 4.33 U/mg。

#### 参考文献:

- [1] 刘忠义. 草鱼肠道胰蛋白酶(GT-A)的纯化及其部分理化性质初探[J]. 西北农林科技大学学报, 2007, 35(10):189-195.
- [2] 张继平,林建成. 草鱼碱性磷酸酶的分离纯化与部分性质研究[J]. 厦门大学学报, 2005, 44(5):684-687.
- [3] 郝志明. 罗非鱼内脏中酶的筛选及其蛋白酶、超氧化物歧化酶的研究[D]. 湛江:广东海洋大学, 2006.
- [4] 郭彩华,陈昭华. 罗非鱼肠道蛋白酶的分离纯化及部分性质研究[J]. 中国食品学报, 2010, 10(4):100-104.
- [5] 黄卓烈. 生物化学实验技术[M]. 北京:中国农业出版社, 2010:86-88.
- [6] 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.
- [7] 何莉萍,刘良忠,江丽丽,等. 三种方法提取草鱼内脏油脂的比较[J]. 食品工业科技, 2007, 28(12):155-157.
- [8] 彭志英. 食品酶学导论[M]. 北京:中国轻工业出版社, 2002:166-180.

(上接第 144 页) 基因的表达差异与 DDK 综合症中的胚胎致死现象存在一定相关性。

#### 参考文献:

- [1] Wakasugi N, Tomita T, Kondo K. Differences of fertility in reciprocal crosses between inbred strains of mice; DDK, KK and NC[J]. Reprod Fertil, 1967, 13(1):41-50.
- [2] Renard J P, Baldacci P, Richoux-Duranthon V. A maternal factor affecting mouse blastocyst formation[J]. Development, 1994, 120(4):797-802.
- [3] Pardo-Manuel de Villena F, Slamka C, Fonseca M, et al. Transmission-ratio distortion through F<sub>1</sub> females at chromosome 11 loci linked to *Om* in the mouse DDK syndrome[J]. Genetics, 1996, 142(4):1299-1304.
- [4] Abe A, Inoue K, Tanaka T, et al. Quantitation of hepatitis B virus genomic DNA by real-time detection PCR[J]. Clin Microbiol, 1999, 37(9):2899-2903.
- [5] 柴保国. 小鼠早期胚胎发育相关功能基因作用机理研究[D]. 郑州:河南农业大学, 2010.
- [6] Pantaleon M, Whiteside E J, Harvey M B, et al. Func-

- tional growth hormone receptors and GH expressed by preimplantation mouse embryos: a role for GH in early embryogenesis? [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(10):25-30.
- [7] 严云勤,谭景和,张黎霞. 小鼠早期胚胎发育过程中 TGF- $\alpha$  和 EGF-R mRNA 的表达[J]. 动物学报, 2002, 48(4):567-569.
- [8] McEalfe A D, Huiner H R, Bloor D J, et al. Expression of 11 members of the BCL-2 family of apoptosis regulatory molecules during human preimplantation embryo development and fragmentation[J]. Mol Reprod Dev, 2004, 68(1):35-50.
- [9] Lockshin R A, Williams C M. Programmed cell death II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms[J]. J Insect Physiol, 1964, 10(4):643-649.
- [10] Domashenko A D, Latham K E, Hatton K S. Expression of myc-family, myc-interacting and myc target genes during preimplantation mouse development[J]. Mol Reprod Dev, 1997, 4(7):57-65.