

doi: 10.11830/ISSN.1000-5013.201606011



# 响应面法优化章鱼内脏酸性 蛋白酶提取条件

黄惠莉<sup>1,2</sup>, 张秀娟<sup>1</sup>, 张育荣<sup>3</sup>, 张鹭鹰<sup>3</sup>, 王开明<sup>3</sup>

(1. 华侨大学 化工学院, 福建 厦门 361021;

2. 华侨大学 环境与资源技术研究所, 福建 厦门 361021;

3. 厦门东海洋水产品进出口有限公司, 福建 厦门 361012)

**摘要:** 首先,以章鱼内脏为原料,通过单因素实验,分析 pH 值、温度、料液比、抽提时间对提取粗酶液中酸性蛋白酶活性的影响.然后,通过响应面法优化,得到多项式拟合回归方程,并对酶活的预测值和实测值进行验证.最后,测定粗酶液中蛋白酶的种类和活性.结果表明:酸性蛋白酶的最优抽提条件为 pH 值 5.0、温度 30 ℃、时间 2.5 h、料液比 1:5,由此得到的粗酶液酶活为  $917.2 \text{ nkat} \cdot \text{g}^{-1}$ ,对应比活为  $28.5 \text{ nkat} \cdot \text{mg}^{-1}$ ;响应面回归方程计算的预测值与实际值位于误差范围内,说明该方程具有预测作用;粗酶液中,蛋白酶大部分为酸性蛋白酶,占总蛋白酶 76.0%.

**关键词:** 章鱼内脏;响应面优化;酸性蛋白酶;酶活;比活

中图分类号: Q 55

文献标志码: A

文章编号: 1000-5013(2016)06-0714-06

## Extraction Condition Optimization of Acid Protease From Octopus Viscera by Response Surface Method

HUANG Huili<sup>1,2</sup>, ZHANG Xiujuan<sup>1</sup>, ZHANG Yurong<sup>3</sup>,  
ZHANG Luying<sup>3</sup>, WANG Kaiming<sup>3</sup>

(1. College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China;

2. Institute for Environment and Resources Technology, Huaqiao University, Xiamen 361021, China;

3. Xiamen East Ocean Aquatic Products Import and Export Company Limited, Xiamen 361012, China)

**Abstract:** To investigate the pH value, temperature, solid-liquid ratio, and extraction time on the acidic protease activity of the crude enzyme solution, the single factor experiment was carried out using octopus viscera as the raw material. The regression was obtained equation by response surface methodology, and the accuracy between predicted and actual values was verified. Finally, the kind and activity of three proteases in the crude enzyme solution were measured. The results showed that the optimum extraction conditions of acid proteases were: pH 5.0, temperature 30 ℃, time 2.5 h, and solid-liquid ratio of 1:5. Under these conditions, the enzyme activity was  $917.2 \text{ nkat} \cdot \text{g}^{-1}$ , and the specific activity was  $28.5 \text{ nkat} \cdot \text{mg}^{-1}$ . The predicted value and actual value lay within the range of error, which indicated that the regression equation has a predictive role. In addition, most of the total protease, approximately 76.0%, was acidic protease in the crude enzyme solution.

**Keywords:** octopus viscera; response surface optimization; acid protease; enzyme activity; specific activity

收稿日期: 2015-11-20

通信作者: 黄惠莉(1962-),女,教授,主要从事海洋水产资源开发利用的研究. E-mail: hlhuang@hqu.edu.cn.

基金项目: 福建省重点科研资助项目(2013N0022)

章鱼(*Octopus vulgaris*)属于软体动物门、头足纲、八腕目、蛸科、蛸属,俗称“八爪鱼”,大部分为浅海性种类,也有少数深海性种类<sup>[1]</sup>.在食品加工中,占章鱼总质量 50%的内脏表皮眼窝等部位被丢弃,既浪费又污染环境.近年来,对水产下脚料的再利用主要集中在酶解制备氨基酸及多肽<sup>[2-3]</sup>、膜法提取章鱼胺等非蛋白质含氮类化合物<sup>[4]</sup>、酶制剂提取<sup>[5-6]</sup>等方面.在制备酶制剂方面,已成功从南极磷虾中提取胰蛋白酶<sup>[7]</sup>、大鲵胃中提取胃蛋白酶<sup>[8]</sup>、淡水鱼内脏中提取复合酶<sup>[9]</sup>.在酶的提取方面,水、稀酸、稀盐、稀碱、有机溶剂均可作为抽提液.考虑到酸性蛋白酶的溶解性和 pH 值的稳定性,本文以章鱼内脏为原料,采用缓冲液进行抽提,以酸性蛋白酶活高低为指标,结合响应面法<sup>[10]</sup>,研究从章鱼内脏中提取酸性蛋白酶的适宜条件,以获取更多的酸性蛋白酶.

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器

章鱼内脏由厦门东海洋水产品进出口有限公司提供.由前期实验测定可知,章鱼盲肠无酸性蛋白酶活性.原料预处理方法:将章鱼内脏摘除盲肠后,打碎匀浆,于-20℃保存备用.

实验试剂:牛血清蛋白(北京奥博星生物技术有限责任公司);干酪素(上海三浦化工有限公司);柠檬酸、十二水合磷酸氢二钠(广东省西陇化工股份有限公司);福林试剂(北京索莱宝科技有限公司).

仪器:ME204 型电子天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司);TGL-20M 型台式高速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);VIS-7220 型可见光分光光度计(北京瑞科分析仪器公司);DK-8D 型电热恒温水槽(上海精宏实验设备有限公司);SXT-02 型索氏提取器(上海洪纪仪器设备有限公司);pH 700 型台式 pH 计(美国优特公司);HJ-4A 型数显恒温磁力搅拌器(江苏省金坛市医疗仪器厂).

### 1.2 实验方法

1.2.1 章鱼内脏组分测定 章鱼内脏基本成分(水分、灰分、蛋白质和脂肪质量分数)的测定分别参照文献<sup>[11-14]</sup>.

1.2.2 粗酶液制备 称取章鱼内脏匀浆与柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液按照一定的比例混合,适宜温度下抽提一定时间.于 10 000 r·min<sup>-1</sup> 转速下,离心 10 min,得到的上清液即为粗酶液.取上清液进行酸性蛋白酶的酶活测定,蛋白酶活性测定采用分光光度法<sup>[15]</sup>.

1.2.3 单因素实验 分别测定不同缓冲液 pH 值、温度、料液比和抽提时间对粗酶液中酸性蛋白酶抽提效果的影响.

1.2.4 响应面优化实验 在单因素实验基础上,选取酶活为响应值(Y),缓冲液 pH 值、温度( $\theta$ )、抽提时间( $t$ )、料液比为自变量,进行 Box-Behnken 响应面实验<sup>[16]</sup>.其实验水平编码值,如表 1 所示.表 1 中:+1,0,-1 分别代表四因素的高、中、低水平.

1.2.5 粗酶液中蛋白酶种类及活性分析 为了验证粗酶液中酸性蛋白酶的含量,分别测定粗酶液中酸性蛋白酶、中性蛋白酶和碱性蛋白酶的酶活和比活.其中,酸性蛋白酶酶活测定采用 pH 值为 3.0 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液体系;中性蛋白酶酶活测定采用 pH 值为 7.0 的磷酸二氢钾-氢氧化钠缓冲液体系;碱性蛋白酶酶活测定采用 pH 值为 10.0 的碳酸氢钠-氢氧化钠缓冲液体系.

## 2 结果与分析

### 2.1 章鱼内脏基本成分

对章鱼内脏组分进行分析,测得各组分的质量分数如下:水分为 75.8%,灰分为 2.6%,蛋白质为 16.0%,脂肪为 2.6%,其他为 3.0%.由此可知,蛋白质质量分数仅次于水分,说明章鱼内脏可作为提取蛋白酶等含氮类物质的原料.

表 1 实验因素及编码水平  
Tab.1 Experimental factors and levels  
of response surface methodology

因素	标识	编码水平		
		-1	0	+1
pH 值	A	3	5	7
$\theta/^\circ\text{C}$	B	20	30	40
$t/\text{h}$	C	1	2	3
料液比	D	1:4	1:5	1:6

2.2 单因素实验结果

2.2.1 pH 值对粗酶液酶活影响 pH 值是酶促反应的重要决定因素,酸性蛋白酶的最适 pH 值为 2~6 左右,在 4 ℃,料液比为 1:5 条件下,将一定量的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液加入章鱼匀浆中,抽提 4 h,控制 pH 值为 2.2~7.0,测定 40 ℃时,粗酶液的酸性蛋白酶酶活( $z$ ),结果如图 1 所示.由图 1 可知:当 pH 值为 2.2~5.0 时,粗酶液中酸性蛋白酶活逐渐升高,这是因为随着 pH 值的升高,酸性蛋白酶溶解度增大;当 pH 值为 5.0~7.0 时,酶活有所降低,这是由于 pH 值继续增大至中性,使酸性蛋白酶的溶解度降低,酶活损失较大.因此,选择浸提粗酶液的最佳 pH 值为 5.0.

2.2.2 温度对粗酶液酶活影响 在 pH 值为 5.0、料液比为 1:5、抽提时间为 4 h 的条件下,研究温度( $\theta$ )对粗酶液中酸性蛋白酶酶活( $z$ )的影响,结果如图 2 所示.由图 2 可知:当温度为 4~30 ℃时,酶活变

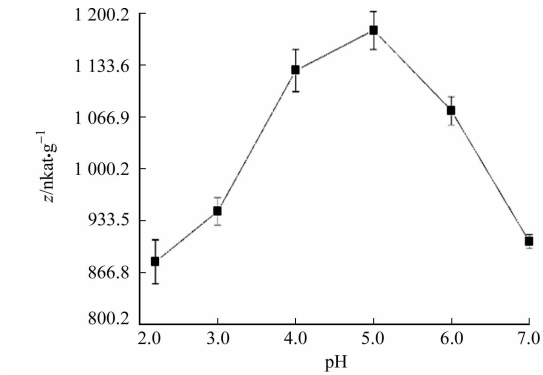


图 1 pH 对粗酶液酸性蛋白酶酶活的影响  
Fig. 1 Effect of pH on activity of acid protease in crude enzyme solution

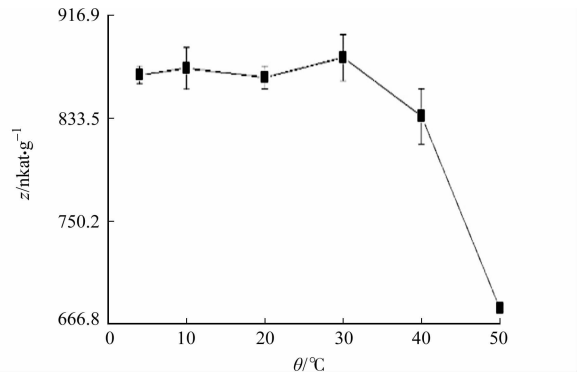


图 2 温度对粗酶液酶活的影响  
Fig. 2 Effect of temperature on activity of acid protease in crude enzyme solution

化不大;当温度继续升高时,酶活急剧下降,这是因为高温导致部分酶变性失活.由于低温条件较难操控,且需额外消耗能源,因此,选取最佳温度条件为 30 ℃.

2.2.3 料液比对粗酶液酶活影响 在 30 ℃,pH 值为 5.0,抽提时间为 4 h 的条件下,研究不同料液比对粗酶液酶活的影响,结果如图 3 所示.由图 3 可知:随着缓冲液比例的增加,粗酶液酶活逐渐升高,当料液比为 1:5 时,酸性蛋白酶活性达到最大;而后继续增加缓冲液用量,酶活波动不大.这主要是因为相同质量的内脏中,酸性蛋白酶的含量是一定的,缓冲液越多,提取就越充分.然而,过多的缓冲液会增加后续浓缩过程的工作量.因此,选取最佳的料液比为 1:5.

2.2.4 抽提时间对粗酶液酶活影响 在 30 ℃,pH 值 5.0,料液比为 1:5 的条件下,研究不同抽提时间( $t$ )对粗酶液酶活的影响,结果如图 4 所示.由图 4 可知:随着抽提时间的增加,内脏匀浆与缓冲液接触越充分,酸性蛋白酶酶活越高;当抽提时间为 2.5 h 时,酶活达到最高点,而后短时间内保持稳定;继续增加抽提时间至 4 h 以上,酶活稍有下降,这是由于此时的粗酶液为液态,长时间放置会使酶活有少量的损失.因此,选取最佳提取时间为 2.5 h.

2.3 响应面结果分析

根据响应面设计 29 组实验,经过实测后得到的结果,如表 2 所示.表 2 中: $\theta$  为温度; $t$  为抽提时间; $z$  为粗酶液中酸性蛋白酶的酶活.

对表 2 的数据进行多项式拟合回归,经优化后得到以酶活( $Y$ )为因变量,以 pH 值( $A$ )、温度( $B$ )、时间( $C$ )、料液比( $D$ )为自变量的回归方程,即

$$Y = 54.70 - 0.66A - 0.27B + 0.51C + 0.066D - 4.68AB + 0.59AC - 1.04AD + 1.36BC + 3.30BD + 3.46CD - 10.79A^2 - 4.14B^2 - 1.31C^2 - 5.39D^2.$$

(1)

对响应面回归方程(1)进行系数显著性检验和方差分析,结果如表 3、4 所示.由表 3 可知:模型大于  $F$  值的概率  $P < 0.0001$ ,表明模型具有显著的统计学意义,可信度较高;模型失拟项无统计学意义,表明若用此模型进行结果预测,出现失误的概率不大; $AB, BD, CD, A^2, B^2, D^2$  的  $P$  值均小于 0.05,表明其对粗酶液酶活的影响有统计学意义.根据模型线性数值的大小,可以得出影响粗酶液酶活的因素大小依次为 pH 值>抽提时间>温度>料液比.

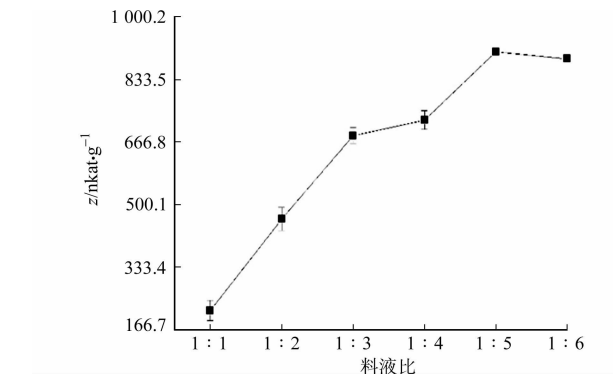


图 3 料液比对粗酶液酶活的影响

Fig. 3 Effect of liquid ratio on activity of acid protease in crude enzyme solution

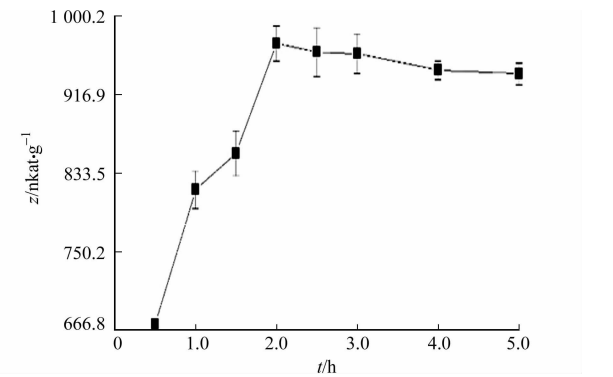


图 4 时间对粗酶液酶活的影响

Fig. 4 Effect of time on activity of acid protease in crude enzyme solution

表 2 响应面实验结果

Tab. 2 Experimental results of response surface methodology					
序号	pH 值	$\theta/^{\circ}\text{C}$	$t/\text{h}$	料液比	$z/\text{nkat} \cdot \text{g}^{-1}$
1	3.0	30	2.0	1 : 6	725.0
2	3.0	30	3.0	1 : 5	712.1
3	5.0	30	2.0	1 : 5	886.0
4	5.0	30	2.0	1 : 5	906.3
5	5.0	30	3.0	1 : 6	839.0
6	7.0	30	2.0	1 : 4	654.8
7	3.0	30	2.0	1 : 4	707.6
8	5.0	40	2.0	1 : 4	694.0
9	3.0	40	2.0	1 : 5	673.1
10	7.0	30	2.0	1 : 6	606.0
11	5.0	20	3.0	1 : 5	854.5
12	7.0	40	2.0	1 : 5	567.9
13	5.0	30	2.0	1 : 5	932.2
14	7.0	20	2.0	1 : 5	750.8
15	5.0	20	2.0	1 : 4	797.5
16	7.0	30	1.0	1 : 5	685.8
17	5.0	20	2.0	1 : 6	699.1
18	5.0	30	2.0	1 : 5	893.3
19	5.0	40	3.0	1 : 5	893.3
20	5.0	30	1.0	1 : 6	712.0
21	5.0	40	1.0	1 : 5	802.8
22	5.0	20	1.0	1 : 5	854.5
23	3.0	20	2.0	1 : 5	543.8
24	5.0	30	2.0	1 : 5	941.4
25	3.0	30	1.0	1 : 5	738.0
26	5.0	30	1.0	1 : 4	818.3
27	5.0	40	2.0	1 : 6	815.7
28	5.0	30	3.0	1 : 4	714.6
29	7.0	30	3.0	1 : 5	699.0

表 3 响应回归方程系数显著性检验

Tab. 3 Coefficient significance test of regression equation			
方差来源	平方和	$F$ 值	$P$ 值
模型	$2.972 \times 10^5$	10.51	$< 0.000\ 1$
$A$	1 297.92	0.72	0.409 5
$B$	217.60	0.12	0.736 3
$C$	790.60	0.42	0.525 2
$D$	12.61	$7.193 \times 10^{-3}$	0.933 6
$AB$	25 181.00	12.13	0.003 7
$AC$	382.20	0.19	0.670 1
$AD$	1 173.06	0.60	0.451 0
$BC$	1 883.56	1.02	0.329 8
$BD$	12 111.00	6.02	0.027 8
$CD$	13 305.62	6.62	0.022 1
$A^2$	$2.108 \times 10^5$	104.43	$< 0.000\ 1$
$B^2$	31 609.21	15.39	0.001 5
$C^2$	3 123.78	1.55	0.233 4
$D^2$	52 025.16	26.09	0.000 2
失拟项	26 074.84	4.44	0.081 9

表 4 响应面回归方程的方差分析

Tab. 4 Variance analysis of regression equation							
标准差	平均值	变异系数/%	PRESS	模型相关系数	模型确定系数	$R^2$ 预测	信噪比
45.04	762.22	5.88	$1.538 \times 10^5$	0.913 2	0.826 3	0.529 9	10.621

由表 4 可知:模型相关系数为 0.913 2,说明该模型能够解释 91.32%的总变异;模型确定系数越大,表示模型预测值与实际值之间的拟合越好,该模型的确定系数为 0.826 3(大于 0.80),表明模型是显著的; $R^2$  预测为 0.529 9,表明模型是显著的;变异系数越小,表示模型精度和可靠性越高,该模型变

异系数为 5.88%,说明模型是高度可靠的。

为了更直观地检测模型并确定最优点,两两因素之间互相作用的曲面图,如图 5 所示。

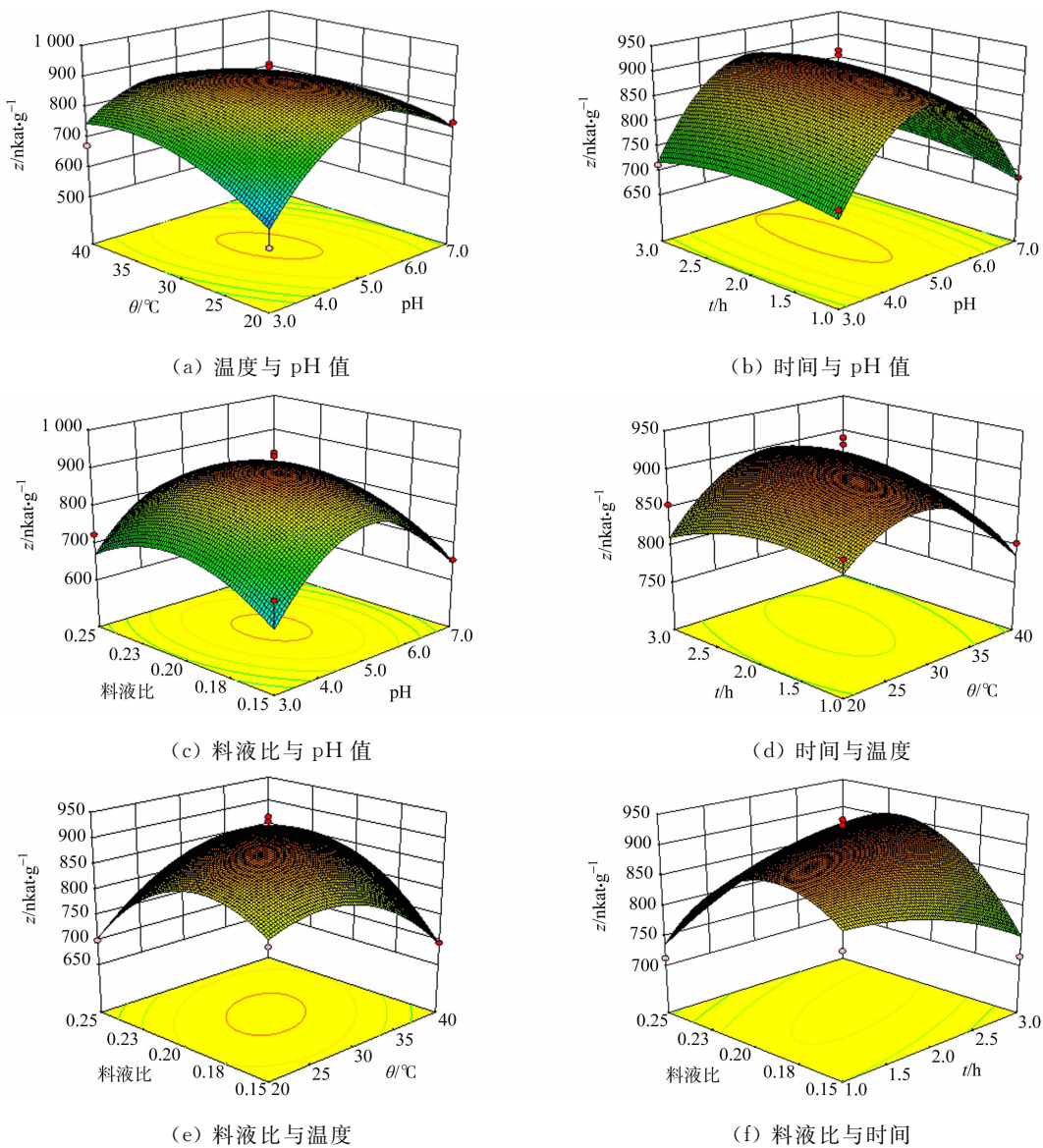


图 5 两两因素间的交互影响

Fig. 5 Interaction diagram between two factors

## 2.4 最优方案预测与验证

由响应面结果可知,响应值  $Y$  存在最大值。 $Y$  值越大,说明所取的对条件下,酸性蛋白酶酶活越高。响应面的理论最优方案如下:pH 值为 4.8,温度为 32.9 ℃,时间为 2.8 h,料液比为 1 : 5.4。由此得到预测酸性蛋白酶酶活为 915.2 nkat · g<sup>-1</sup>。为了验证该模型的准确性,调整优化方案,取 pH 值 5.0,温度 30 ℃,时间 2.5 h,料液比 1 : 5 为实验条件,得到实测酸性蛋白酶酶活为 917.2 nkat · g<sup>-1</sup>。预测值与实际值在误差范围内,说明该响应面回归方程具有预测作用。

## 2.5 蛋白酶种类及活性的分析

采用优化条件(pH 值 5.0,温度 30 ℃,抽提时间 2.5 h,料液比 1 : 5),对章鱼内脏匀浆进行提取,于 10 000 r · min<sup>-1</sup>离心后得到粗酶液。对粗酶液进行酸性蛋白酶、中性蛋白酶和碱性蛋白酶的酶活和比活测定,结果如表 5 所示。表 5 中: $z$  为酶活; $u$  为比活; $\eta$  为比活百分比。由表 5 可知:酸性蛋白酶活性远高于中性及碱性蛋白酶活性,说明经最优

表 5 粗酶液中蛋白酶种类分析

Tab. 5 Species analysis of crude enzyme protease

蛋白酶种类	$z/\text{nkat} \cdot \text{g}^{-1}$	$u/\text{nkat} \cdot \text{mg}^{-1}$	$\eta/\%$
酸性	915.7	27.5	76.0
中性	193.7	5.8	16.1
碱性	97.0	2.8	7.8

化条件,酸性蛋白酶活性远高于中性及碱性蛋白酶活性,说明经最优

方案提取的粗酶液中大部分是酸性蛋白酶, 该方案适合酸性蛋白酶的提取.

### 3 结论

以章鱼内脏为原料, 研究 pH 值、温度、料液比、抽提时间等因素对提取酸性蛋白酶粗酶液酶活的影响. 通过响应面法优化抽提条件, 并经冷冻干燥得到酸性蛋白酶粗品. 通过上述研究确定了各关键提取参数, 为纯化获得章鱼源性纯品酸性蛋白酶提供了重要技术参数和应用参考.

成芳等<sup>[8]</sup>在大鲈胃中提取得到胃蛋白酶粗液的比活为  $17.2 \text{ nkat} \cdot \text{mg}^{-1}$ ; 仇磊等<sup>[17]</sup>在扁玉螺食道腺内提取得到蛋白酶粗液的比活为  $24.3 \text{ nkat} \cdot \text{mg}^{-1}$ ; 王琨<sup>[7]</sup>从南极磷虾体内提取得到蛋白酶粗液的比活为  $0.7 \text{ nkat} \cdot \text{mg}^{-1}$ . 而文中提取的酸性酶酶活为  $917.2 \text{ nkat} \cdot \text{g}^{-1}$ , 对应比活为  $28.5 \text{ nkat} \cdot \text{mg}^{-1}$ , 说明采用响应面法优化提取得到的酸性蛋白酶含量较高.

对粗酶液中酸性蛋白酶、中性蛋白酶和碱性蛋白酶活性进行分析, 结果可知: 酸性蛋白酶活性 > 中性蛋白酶活性 > 碱性蛋白酶活性. 说明粗酶液中, 酸性蛋白酶的含量远高于其他种类蛋白酶含量.

文中提取的酸性蛋白酶为复合酶, 需经盐析、层析等操作后, 才能对该复合酶的种类、相对分子质量等有进一步了解, 从而纯化得到纯品酸性蛋白酶.

### 参考文献:

- [1] 房元勇. 房元勇章鱼增殖礁的试验研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2009: 1-3.
- [2] 于梅, 宁杰, 朴美子. 章鱼下脚料酶解工艺优化的研究[J]. 农产品加工(学刊), 2011(6): 52-54.
- [3] 董寰, 廖雪燕, 董梅, 等. 正交试验设计提取章鱼下脚料中牛磺酸[J]. 中国现代药物应用, 2010, 4(21): 166-167.
- [4] 张育荣, 张鹭勇, 张鹭军, 等. 利用膜法提取天然章鱼胺的工艺探讨[J]. 中国科技信息, 2012(8): 103.
- [5] KTARI N, BKHAIRIA I, JRIDI M, et al. Digestive acid protease from zebra blenny (*Salaria basilisca*): Characteristics and application in gelatin extraction[J]. Food Research International, 2014, 57(1): 218-224.
- [6] TANJI M, YAKABE E, KAGEYAMA T, et al. Purification and characterization of pepsinogens from the gastric mucosa of African coelacanth, *Latimeria chalumnae*, and properties of the major pepsins[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2007, 146(3): 412-420.
- [7] 王琨. 南极磷虾胰蛋白酶的分离纯化及酶学性质研究[D]. 大连: 大连理工大学, 2013: 12-13.
- [8] 成芳, 闫欣, 李伟, 等. 大鲈胃蛋白酶分离纯化及其性质的研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(1): 125-128.
- [9] 吴莎. 淡水鱼内脏制备复合酶的工艺研究[D]. 武汉: 湖北工业大学, 2011: 27-29.
- [10] 姜太玲, 吴红洋, 王微, 等. 响应面法优化胃蛋白酶制备花椒籽蛋白抗菌肽的研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(20): 226-231.
- [11] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 食品安全国家标准 食品中水分的测定: GB 50093-2010[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012: 1-8.
- [12] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 食品安全国家标准 食品中灰分的测定: GB 50094-2010[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012: 9-12.
- [13] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定: GB 50095-2010[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012: 13-22.
- [14] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 食品安全国家标准 食品中脂肪的测定: GBT 5009. 6-2003[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003: 1-8.
- [15] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 饲料添加剂酸性、中性蛋白酶活力的测定分光光度法: GBT 28715-2012[S]. 北京: 中国标准出版社, 2013: 1-12.
- [16] 肖怀秋, 李玉珍, 林亲录, 等. BoX-Behnken 响应面优化冷榨花生粕酶解制备花生肽工艺[J]. 中国粮油学报, 2014, 29(10): 106-111.
- [17] 仇磊. 扁玉螺食道腺蛋白酶定位及提取纯化、理化性质的初步研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2006: 25-43.

(责任编辑: 黄晓楠      英文审校: 刘源岗)