

# Extraction Optimization and Function Evaluation of Peptides from Squid Viscera

Jiamin Zhou, Tingting Li\*, Yuanheng Wang, Xuan He

Key Laboratory of Biotechnology and Bioresources Utilization (Dalian Minzu University), Ministry of Education, Dalian Liaoning

Email: 97065658@qq.com, \*tingting780612@163.com

Received: Jul. 19<sup>th</sup>, 2018; accepted: Jul. 30<sup>th</sup>, 2018; published: Aug. 6<sup>th</sup>, 2018

## Abstract

In this study, the squid viscera was used as the main raw material, and the effect of trypsin on the degree of hydrolysis and the antioxidant activity of the hydrolysate were investigated. The effects of hydrolysis temperature, time, pH, and amount of enzyme on the degree of hydrolysis were investigated using single-factor and orthogonal experiments. Response surface methodology was used to optimize the hydrolysis conditions. The results showed that the optimal conditions for enzymatic hydrolysis of squid viscera were pH 7.04, enzymolysis temperature 42.43°C, enzymolysis time 6.98 h, enzyme addition amount 5250 U/g, and the degree of hydrolysis after enzymatic hydrolysis of squid viscera was 82.906%. To verify the feasibility of the response surface model, the modified optimal conditions were used: IE pH 7.0, enzymatic hydrolysis temperature 43°C, enzymolysis time 7.0 h, enzymatic addition of 5250 U/g for enzymatic digestion test of squid viscera, and the actual average of the sub-parallel test was 81.836%, and the relative deviation from the prediction value obtained by the regression equation was 1.31%. And hydroxyl radical scavenging rate was 28.9% and the degree of hydrolysis was 74.25% using the optimal conditions of enzymatic hydrolysis. The results showed that the squid viscera had a certain degree of antioxidant activity.

## Keywords

Squid Viscera, Degree of Hydrolysis, Hydroxyl Radical Scavenging Rate, Response Surface Methodology

# 鱿鱼内脏活性肽的提取工艺优化及功能评价

周家民, 李婷婷\*, 王元亨, 何璇

生物技术与资源利用教育部重点实验室(大连民族大学), 辽宁 大连

Email: 97065658@qq.com, \*tingting780612@163.com

\*通讯作者。

收稿日期：2018年7月19日；录用日期：2018年7月30日；发布日期：2018年8月6日

## 摘要

以鱿鱼内脏为主要原料，探究胰蛋白酶对其水解程度及水解产物抗氧化活性的影响。实验采用单因素和正交的实验方法研究水解温度、时间、pH值以及加酶量对水解度的影响，探讨胰蛋白酶水解蛋白质的最优条件，用响应面法再继续优化水解条件，分析得到胰蛋白酶酶解鱿鱼内脏的最佳工艺条件为pH 7.04，酶解温度42.43℃，酶解时间6.98 h，酶添加量5250 U/g，鱿鱼内脏酶解后的水解度为82.906%。为验证响应面模型的可行性，采用修正后的最佳工艺条件，即pH 7.0，酶解温度43℃，酶解时间7.0 h，酶添加5250 U/g进行鱿鱼内脏酶解验证试验，3次平行试验的实际平均值为81.836%，与回归方程所得预测值相对偏差为1.31%。并利用最优条件酶解并探究水解产物的抗氧化活性，其中胰蛋白酶水解液测得羟自由基清除率达28.9%，水解度为74.25%，研究结果表明鱿鱼内脏具有一定的抗氧化活性。

## 关键词

鱿鱼内脏，水解度，羟自由基清除率，响应面分析法

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

远洋渔业是我国战略性产业之一。鱿鱼捕捞量占到全国远洋渔业总产量的40%左右，在我国远洋渔业中占有举足轻重的地位，鱿鱼加工业已成为国内水产品加工行业的主要组成部分之一。而鱿鱼不可食部分约占体重的20%，一直以来鱿鱼的加工利用基本停留在其胴体上，内脏、足、耳等一些加工副产物利用率较低。鱿鱼内脏约占鱿鱼湿重的15%，鱿鱼内脏的消化液中含有能促进对虾等摄饵的氨基酸，故大部分鱿鱼内脏废弃物经初级加工成鱿鱼溶浆、鱿鱼内脏粉等作为鱼类和虾水产饲料。但是仅仅作饲料，其利用效率和经济效益都不会太高。此外，在加工过程中产生大量副产物，其中肝脏大都用于加工鱼粉、鱿鱼浆等初级产品或直接丢弃，这不仅造成资源浪费还对环境造成污染[1]。如何高效利用鱿鱼内脏部分，对它进行深入研究，使其不会造成污染和浪费成了鱿鱼加工行业的重要研究领域。本论文以鱿鱼内脏的水解度为指标，选择胰蛋白酶为水解酶，对鱿鱼内脏进行水解，用氨基态氮量与总氮含量的比值测其水解度，对水解液中的短肽自由基进行测定，对其水解能力、羟自由基清除率做初步分析，为以后鱿鱼内脏的开发提供一定的参考。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 材料与仪器

冷冻鱿鱼购于大连市开发区金玛商场、胰蛋白酶(实测酶活 249,980U)。

去离子水、0.2 mol/L 的氢氧化钠溶液、甲醛溶液、0.05 mol/L 的氢氧化钠溶液、硫酸铜、硫酸钾、浓硫酸、10 mol/L 的氢氧化钠溶液、混合指示剂、2 g/100 mL 的硼酸溶液、0.049 mol/L 的盐酸溶液。

电子天平、数显水浴锅、H1850 台式高速离心机(湘仪离心机仪器有限公司)、磁力搅拌器、电磁炉、

凯氏定氮装置、通风橱、酶标仪、标准 pH 计。

## 2.2. 实验方法

### 2.2.1. 单因素实验设计

在单因素实验时,依次改变 pH、温度、酶解时间、蛋白酶添加量等因素,以水解度作为评价指标,进行研究分析。基本条件为时间 4 h、pH 8.0、温度 50℃、加酶量 5000 U/g、料液比 1:2,利用控制变量法,分别考察各因素影响水平。其中各因素水平梯度为温度 30℃、40℃、50℃、60℃;加酶量 3000、4000、5000、6000、7000 U/g;时间 4、5、6、7、8 h; pH 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0。

### 2.2.2. 酶解

将冷冻鱿鱼室内流水解冻,取内脏部分匀浆。将匀浆后的内脏和去离子水比例为 1:2 取入烧杯,搅拌均匀后盖上保鲜膜放入沸水浴中 5 min,沸水浴结束后冷却至室温调节 pH,然后放入相应温度的水浴锅中预热,预热 20 min 后再加酶。从加酶开始计时,水解 4~9 h,结束后在沸水浴中灭酶,时间为 10 min 即可,冷却后离心(11,000 r/min, 25 min, 4℃)得到鱿鱼内脏酶解液,备用。

### 2.2.3. 总氨基氮含量的测定

总氨基态氮含量的测定采用电位滴定法[2]。取鱿鱼内脏水解液 5 mL,定容至 100 mL。然后取定容好的样品 20 mL 于 250 mL 烧杯中,再加入 60 mL 水,放到磁力搅拌器上持续搅拌,用 0.05 mol/L NaOH 标准液将溶液 pH 滴定至 8.2,再加入 10 mL 甲醛溶液,待混匀后,再用 0.05 mol/L NaOH 溶液继续滴定至 pH 9.2,加入甲醛之后滴定所用 NaOH 溶液的量即为  $V_1$ ,可代入公式计算。在滴定之前要用此法做试剂空白实验,即空白实验加入甲醛之后滴定所用 NaOH 溶液量为  $V_2$ ,可代入公式计算。计算见公式(1)。

$$X = \frac{(V_1 - V_2) \times C \times \frac{14}{1000}}{5 \times \frac{V_3}{100}} \times 1000 \times 100 \quad (1)$$

式中,  $X$ —样品中总氨基氮含量,单位为毫克每一百毫升(mg/100 mL);  $V_1$ —加入甲醛后样品稀释液消耗氢氧化钠的体积,单位为毫升(mL);  $V_2$ —试剂空白实验加入甲醛后样品稀释液消耗氢氧化钠的体积,单位为毫升(mL);  $V_3$ —样品稀释液的取用量,单位为毫升(mL);  $C$ —氢氧化钠标准溶液的浓度,单位为摩尔每升(mol/L)。

### 2.2.4. 总氮的含量测定

总氮的含量测定采用 GB/T 5009.5-2003 [3]蛋白质测定中的凯氏定氮法。取样品  $M$  毫升、6 g 硫酸钾粉末状固体、20 ml 浓硫酸和 0.2 g 硫酸铜固体于消化管中,将消化管置于通风橱中进行消化,温度为 440℃,待消化的样液至澄清蓝绿色半小时后拿出,即为消化完全。消化后的样液定容至 100 ml,备用。

本实验采用国家标准的凯氏定氮装置。取 10 ml 定容好的样液和 10 ml 10 mol/L 氢氧化钠溶液加入到凯氏定氮装置中,用加了混合指示剂的 20 g/L 的硼酸溶液作为接收液,待溶液变蓝后,继续反应 10 min 即为反应终止,最后用 0.05 mol/L 的盐酸溶液进行滴定,消耗盐酸的体积即为  $V_1$ ,可代入公式计算。在滴定前要用此法做试剂空白试验,滴定所用的盐酸的体积为  $V_2$ ,可代入公式计算。计算见公式(2)。

$$X = \frac{(V_1 - V_2) \times C \times 0.014}{M \times \frac{10}{100}} \times 100 \quad (2)$$

式中,  $X$ —样品中总氮含量,单位为毫克每一百毫升(mg/100 ml);  $V_1$ —试样消耗盐酸标准滴定液的体积,

单位为毫升(ml);  $V_2$ —试剂空白消耗盐酸标准液的体积, 单位为毫升(ml);  $C$ —盐酸标准液的浓度, 单位为摩尔每升(mol/L);  $M$ —试样的体积, 单位为毫升(ml)。

### 2.2.5. 水解度的计算

蛋白质中水解度是指水解后上清液中总氨基氮量与总氮量之比。水解度能够有效的反映出胰蛋白酶在不同的条件下对内脏水解程度的差异。

### 2.2.6. 羟自由基清除率的计算

羟自由基的清除率按公式(3)计算。

$$D\% = \frac{(A_{\text{测定}} - A_{\text{标准}})}{(A_{\text{空白}} - A_{\text{标准}})} \times 100\% \quad (3)$$

式中,  $A$  测定、 $A$  标准和  $A$  空白分别为测定管、标准管和空白管的吸光值。

## 3. 结果与分析

### 3.1. 单因素实验

#### 3.1.1. PH 对胰蛋白酶水解度的影响

胰蛋白酶水解鱿鱼内脏过程中, 控制体系的酶解温度为  $50^{\circ}\text{C}$ , 酶加量为  $5000 \text{ U/g}$ , 酶解时间为  $4 \text{ h}$ , 设置不同的 pH。其中, pH 对鱿鱼内脏水解效果见图 1。鱿鱼内脏的水解度随着 pH 的升高, 呈现递增趋势。根据递增趋势, 又增加了 pH 为 9.0、10.0、11.0 三组实验来证明 pH 是否在 8.0 时为最佳水解条件, 实验结果显示样品并未水解, 由此推断出 pH 值过高使酶失活。所以在 pH 为 8.0 时, 水解效果最佳; 因此选取 6.0、7.0、8.0 继续对鱿鱼内脏酶解做正交实验分析, 并加以确定最佳的 pH 值。

#### 3.1.2. 加酶量对胰蛋白酶水解度的影响

在研究加酶量对胰蛋白酶水解度的影响时控制体系 pH 为 8.0, 酶解温度为  $50^{\circ}\text{C}$ , 酶解时间为  $4 \text{ h}$ , 设置不同的酶添加量, 研究酶添加量对鱿鱼内脏水解效果的影响, 结果如图 2 所示。当胰蛋白酶的添加量小于  $7000 \text{ U/g}$  时, 鱿鱼内脏酶解后的水解度呈平稳状态, 当胰蛋白酶的添加量为  $7000 \text{ U/g}$  时达到最大值, 为  $44.96\%$ 。因此选取  $3000$ 、 $5000$ 、 $7000 \text{ U/g}$  继续对鱿鱼内脏酶解做正交实验分析, 并加以确定最佳的酶添加量。

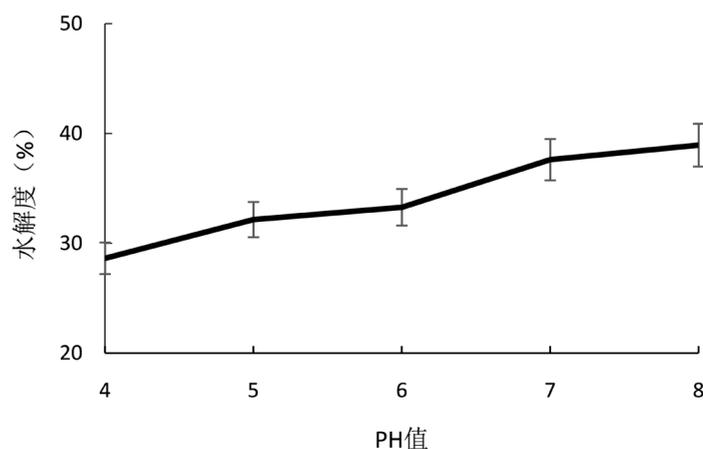
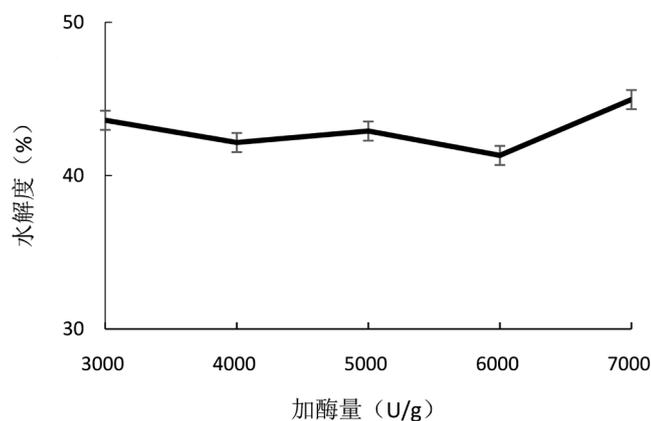


Figure 1. The influence of pH on the hydrolysis degree of trypsin  
图 1. PH 对胰蛋白酶水解度的影响



**Figure 2.** The influence of enzyme concentration on the hydrolysis degrees of trypsin  
**图 2.** 加酶量对胰蛋白酶水解度的影响

### 3.1.3. 温度对胰蛋白酶水解度的影响

胰蛋白酶酶解鱿鱼内脏过程中控制体系 pH 为 8.0, 酶加量为 5000 U/g, 酶解时间为 4 h, 设置不同的酶解温度, 研究酶解温度对鱿鱼内脏水解影响, 结果如图 3 所示。随着酶解温度的提高, 鱿鱼内脏的水解程度逐渐提高。温度达到 50℃时, 水解度达到最大值, 为 43.6%。当酶解温度超过 50℃时, 水解度呈现明显下滑趋势, 因此选取 30℃、40℃、50℃继续对鱿鱼内脏酶解做正交实验分析, 以确定最佳的酶解温度。

### 3.1.4. 时间对胰蛋白酶水解度的影响

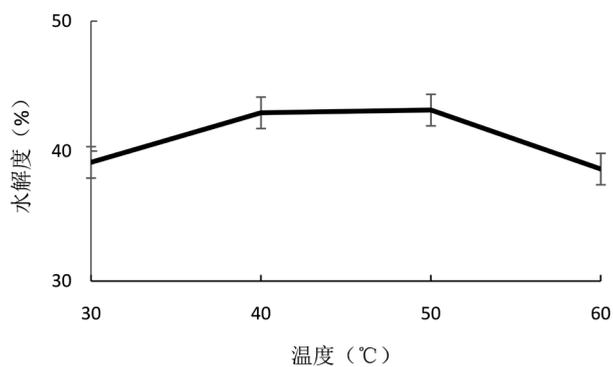
控制体系 pH 为 8.0, 酶加量为 5000 U/g, 酶解温度为 50℃, 设置不同的酶解时间, 研究酶解时间对鱿鱼内脏水解效果的影响, 结果如图 4 所示。鱿鱼内脏的水解在 8 h 时达到最大水解程度, 虽然 7 h 所对应的水解程度要略低于 6 h, 但是总体要比 6 小时之前所对应的值要高, 所以选取 6、7、8 h 继续对鱿鱼内脏酶解做正交实验分析, 并加以确定最佳的酶解时间。

## 3.2. 酶解条件的优化

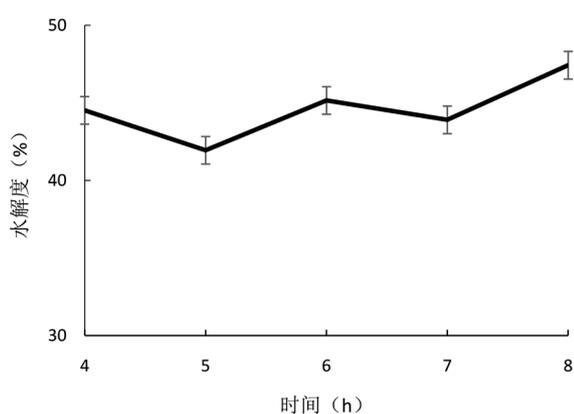
在初步获得的单因素实验的基础上, 要从较优的水解条件中筛选出最好的水解条件, 所以选择 pH、加酶量、水解时间和水解温度 4 个因素, 设计 3 个水平的正交实验, 见表 1、表 2。

由表 2 极差分析表明,  $D > A > C > B$ , 即胰蛋白酶正交水解中影响羟自由基清除率大小的因素为时间  $>$  pH  $>$  加酶量  $>$  温度, 而且清除能力最优条件是 7 号实验组。本次实验以羟自由基清除率为第一指标, 水解度为第二指标, 所以综合表 2 和图 5 可以得出, 7 号实验组的条件为酶解最优条件, 即  $A_3B_1C_3D_2$  组合。在上述找出胰蛋白酶水解的最佳条件下进行实验验证, 胰蛋白酶水解液测得羟自由基清除率达 28.9%, 水解度为 74.25%。因此确认胰蛋白酶最佳酶解条件为  $A_3B_1C_3D_2$ , 即 pH8.0、温度 30℃、酶量为 7000 U/g、酶解时间为 7 h。

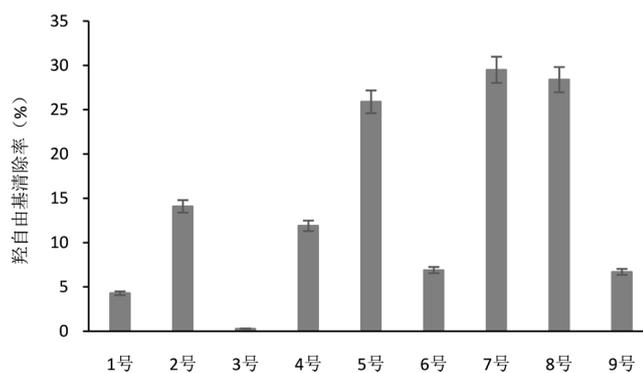
在机体的新陈代谢过程中, 可产生 -OH 自由基, 容易对机体造成损伤, 对细胞结构、核酸造成伤害, 使得脂质和蛋白质发生氧化, 在人体内堆积过多的自由基还会造成各种慢性病的发生。因此, 清除体内过剩的自由基是防治疾病发生的重要途径。本次实验以羟自由基清除率为第一指标, 水解度为第二指标, 在单因素基础上, 选用 pH、酶解温度、酶解时间、酶添加量等作为自变量, 确认胰蛋白酶最佳酶解条件为 pH 8.0、温度 30℃、酶量 7000 U/g、酶解时间 7 h, 酶解水解度为 74.25%, 羟自由基清除率为 28.9%, 因此本研究显示鱿鱼内脏经过胰蛋白酶水解后均表现出一定的羟自由基清除能力。



**Figure 3.** The influence of temperature on the hydrolysis degrees of trypsin  
**图 3.** 温度对胰蛋白酶水解度的影响



**Figure 4.** The influence of time on the hydrolysis degrees of trypsin  
**图 4.** 时间对胰蛋白酶水解度的影响



**Figure 5.** Orthogonal hydroxyl radical scavenging rate of trypsin  
**图 5.** 胰蛋白酶正交羟自由基清除率

**Table 1.** Orthogonal experimental factors of trypsin

**表 1.** 胰蛋白酶酶解正交实验因素水平表

| 水平 | A (pH) | B (温度/°C) | C (加酶量/U/g) | D (时间/h) |
|----|--------|-----------|-------------|----------|
| 1  | 6.0    | 30        | 3000        | 6        |
| 2  | 7.0    | 40        | 5000        | 7        |
| 3  | 8.0    | 50        | 7000        | 8        |

**Table 2.** Orthogonal experiment of trypsin  
**表 2.** 胰蛋白酶正交实验表

| 实验号            | A (pH) | B (温度/℃) | C (加酶量/U/g) | D (时间/h) | 水解度(%) |
|----------------|--------|----------|-------------|----------|--------|
| 1              | 6.0    | 30       | 3000        | 6        | 63.74  |
| 2              | 6.0    | 40       | 5000        | 7        | 46.97  |
| 3              | 6.0    | 50       | 7000        | 8        | 62.84  |
| 4              | 7.0    | 40       | 5000        | 8        | 61.11  |
| 5              | 7.0    | 50       | 3000        | 7        | 70.65  |
| 6              | 7.0    | 30       | 7000        | 6        | 23.68  |
| 7              | 8.0    | 30       | 7000        | 7        | 65.29  |
| 8              | 8.0    | 40       | 3000        | 8        | 13.89  |
| 9              | 8.0    | 50       | 5000        | 6        | 16.44  |
| K <sub>1</sub> | 0.579  | 0.509    | 0.494       | 0.346    |        |
| K <sub>2</sub> | 0.518  | 0.407    | 0.415       | 0.610    |        |
| K <sub>3</sub> | 0.319  | 0.500    | 0.506       | 0.459    |        |
| R              | 0.260  | 0.102    | 0.091       | 0.264    |        |

### 3.3. 响应面法优化鱿鱼内脏酶解工艺的研究

根据 Box-Behnken 中心组合实验设计原理, 综合分析单因素实验, 选取对鱿鱼内脏水解影响的 4 个因素, 即胰蛋白酶添加量、pH、酶解温度和酶解时间, 设计了 4 因素 3 水平的响应面分析实验(见表 3)。(本次 29 组试验均是 10 g 鱿鱼内脏匀浆液加 20 g 去离子水)。

#### 3.3.1. 实验设计及结果分析

运用 Design-Expert 8.0.6 程序软件, 以 pH、酶解温度、酶解时间、胰蛋白酶添加量为响应变量, 以水解度为响应值(指标值)对表 4 中的数据进行处理, 得到表 5 方程方差分析表, 利用软件进行拟合非线性回归方程的二次多项式, 得到的预测模型如下:

$$\begin{aligned} \text{水解度} = & 78.39 + 1.03A + 3.80B + 2.13C + 15.63D + 0.84AB + 5.92AC - 2.56AD \\ & + 3.51BC + 6.64BD + 3.57CD - 14.57A^2 - 15.93B^2 - 13.22C^2 - 18.14D^2 \end{aligned}$$

回归方差分析显著性检验表明, 该模型回归显著( $p < 0.0001$ )。模型与实验拟合的程度用失拟项来表示, 即二者之间差异的程度。本分析表中失拟项不显著( $p = 0.1448 > 0.05$ ), 对模型是有利的, 因此没有失拟因素的存在。

通过对各因素之间的影响的程度分析,  $F$  值越大, 表明对实验指标的影响越大, 即重要性越高。从表 5 可知,  $F_A = 0.71$ ,  $F_B = 9.68$ ,  $F_C = 3.03$ ,  $F_D = 163.95$ , 即各因素对鱿鱼内脏酶解水解度的影响大小顺序依次为: 酶解时间 > 酶解温度 > 酶添加量 > pH。

方差分析结果还表明, B 和 D 对响应值的影响显著, 二次项 AC、BD、 $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$ 、 $D^2$  对响应值的影响显著。由此可得出结论, 各具体响应值以及实验因素之间的影响不是简单的线性关系。

#### 3.3.2. 各因素之间的交互作用

作出响应面分析图, 观察相应曲面的形状, 图 6 至图 11 分析了 pH、酶解温度、酶解时间和酶添加量对鱿鱼内脏酶解水解度的影响。

**Table 3.** Experimental factors of the response surface**表 3.** 响应面实验因素水平表

| 水平 | A (pH) | B (温度/°C) | C (加酶量/g) | D (时间/h) |
|----|--------|-----------|-----------|----------|
| 1  | 6.0    | 30        | 0.12      | 6        |
| 2  | 7.0    | 40        | 0.20      | 7        |
| 3  | 8.0    | 50        | 0.28      | 8        |

**Table 4.** Experiment results of Box-Behnken**表 4.** Box-Behnken 实验结果

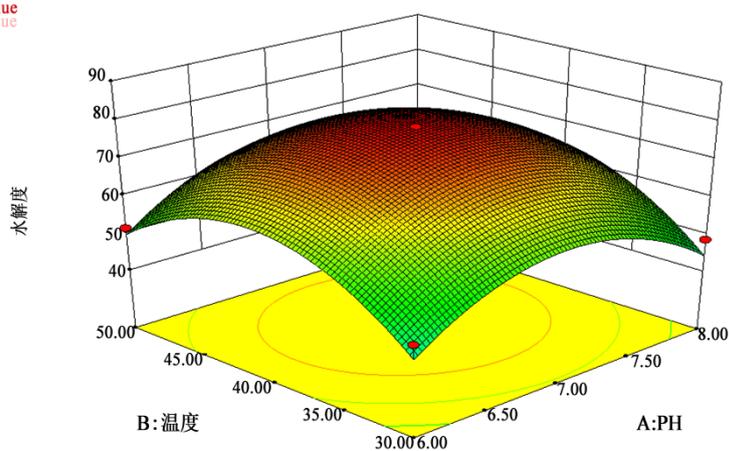
| 实验号 | A (pH) | B (温度/°C) | C (加酶量/U/g) | D (时间/h) | 水解度(%) |
|-----|--------|-----------|-------------|----------|--------|
| 1   | 7.00   | 30.00     | 0.20        | 4.00     | 26.98  |
| 2   | 6.00   | 40.00     | 0.20        | 8.00     | 65.33  |
| 3   | 7.00   | 50.00     | 0.20        | 8.00     | 70.46  |
| 4   | 6.00   | 40.00     | 0.20        | 4.00     | 25.16  |
| 5   | 6.00   | 50.00     | 0.20        | 6.00     | 51.46  |
| 6   | 6.00   | 40.00     | 0.28        | 6.00     | 42.93  |
| 7   | 7.00   | 30.00     | 0.20        | 8.00     | 43.91  |
| 8   | 6.00   | 30.00     | 0.20        | 6.00     | 47.61  |
| 9   | 7.00   | 40.00     | 0.28        | 8.00     | 67.32  |
| 10  | 8.00   | 40.00     | 0.28        | 6.00     | 58.94  |
| 11  | 7.00   | 40.00     | 0.12        | 4.00     | 39.87  |
| 12  | 7.00   | 50.00     | 0.12        | 6.00     | 42.61  |
| 13  | 8.00   | 40.00     | 0.20        | 8.00     | 59.53  |
| 14  | 7.00   | 40.00     | 0.20        | 6.00     | 78.56  |
| 15  | 8.00   | 50.00     | 0.20        | 6.00     | 55.84  |
| 16  | 6.00   | 40.00     | 0.12        | 6.00     | 49.62  |
| 17  | 7.00   | 30.00     | 0.28        | 6.00     | 47.31  |
| 18  | 7.00   | 50.00     | 0.28        | 6.00     | 58.31  |
| 19  | 7.00   | 40.00     | 0.20        | 6.00     | 78.34  |
| 20  | 7.00   | 40.00     | 0.20        | 6.00     | 78.49  |
| 21  | 7.00   | 40.00     | 0.20        | 6.00     | 78.13  |
| 22  | 7.00   | 50.00     | 0.20        | 4.00     | 26.96  |
| 23  | 8.00   | 40.00     | 0.20        | 4.00     | 29.62  |
| 24  | 7.00   | 40.00     | 0.28        | 4.00     | 31.64  |
| 25  | 7.00   | 30.00     | 0.12        | 6.00     | 45.63  |
| 26  | 8.00   | 30.00     | 0.20        | 6.00     | 48.62  |
| 27  | 8.00   | 40.00     | 0.12        | 6.00     | 41.93  |
| 28  | 7.00   | 40.00     | 0.20        | 6.00     | 78.41  |
| 29  | 7.00   | 40.00     | 0.12        | 8.00     | 61.28  |

**Table 5.** Variance analysis of the regression equation  
**表 5.** 回归方程方差分析表

| 项目             | 平方和     | 自由度 | 均方      | F 值    | p 值     | 显著性 |
|----------------|---------|-----|---------|--------|---------|-----|
| Model          | 7648.00 | 14  | 548.86  | 30.68  | <0.0001 | **  |
| A              | 12.75   | 1   | 12.75   | 0.71   | 0.4127  |     |
| B              | 173.13  | 1   | 173.13  | 9.68   | 0.0077  | *   |
| C              | 54.23   | 1   | 54.23   | 3.03   | 0.1036  |     |
| D              | 2932.81 | 1   | 2932.81 | 163.95 | <0.0001 | **  |
| AB             | 2.84    | 1   | 2.84    | 0.16   | 0.6963  |     |
| AC             | 140.42  | 1   | 140.42  | 7.85   | 0.0141  | *   |
| AD             | 26.32   | 1   | 26.32   | 1.47   | 0.2452  |     |
| BC             | 49.14   | 1   | 49.14   | 2.75   | 0.1197  |     |
| BD             | 176.49  | 1   | 176.49  | 9.87   | 0.0072  | **  |
| CD             | 50.91   | 1   | 50.91   | 2.85   | 0.1138  |     |
| A <sup>2</sup> | 1377.39 | 1   | 1377.39 | 77.00  | <0.0001 | **  |
| B <sup>2</sup> | 1646.75 | 1   | 1646.75 | 92.06  | <0.0001 | **  |
| C <sup>2</sup> | 1134.00 | 1   | 1134.00 | 63.39  | <0.0001 | **  |
| D <sup>2</sup> | 2134.07 | 1   | 2134.07 | 19.30  | <0.0001 | **  |
| 残差             | 250.43  | 14  | 17.89   |        |         |     |
| 失拟项            | 250.33  | 10  | 25.03   | 915.94 | 0.1448  |     |
| 净误差            | 0.11    | 4   | 0.027   |        |         |     |
| 总离差            | 7934.43 | 28  |         |        |         |     |

注: \*\*表示极显著( $p < 0.01$ ); \*表示显著( $p < 0.05$ )。

Design Expert ? Software  
 Factor Coding Actual  
 水解度  
 ● Design points above predicted value  
 ○ Design points above predicted value  
 78.56  
 25.16  
 X1 = A:PH  
 X2 = B:温度  
 Actual Factors  
 C:酶量 = 0.20  
 D:时间 = 6.00



**Figure 6.** The influence of pH value and enzymolysis temperature on the hydrolysis degree  
**图 6.** PH 和酶解温度对水解度影响的响应面图

Design Expert ? Software  
 Factor Coding Actual  
 水解度  
 ● Design points above predicted value  
 ○ Design points above predicted value  
 78.56  
 25.16  
 X1 = A:PH  
 X2 = B:温度  
 Actual Factors  
 B:温度 = 40.00  
 D:时间 = 6.00

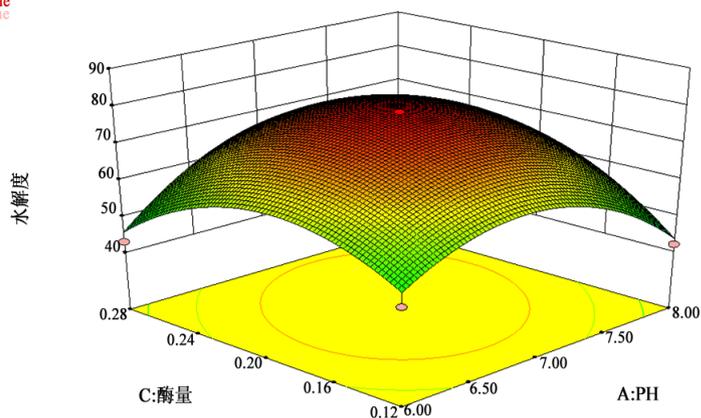


Figure 7. The influence of pH value and enzyme concentration on the hydrolysis degree

图 7. PH 和酶添加量对水解度影响的响应面图

Design Expert ? Software  
 Factor Coding Actual  
 水解度  
 ● Design points above predicted value  
 ○ Design points above predicted value  
 78.56  
 25.16  
 X1 = A:PH  
 X2 = B:温度  
 Actual Factors  
 B:温度 = 40.00  
 C:酶量 = 0.20

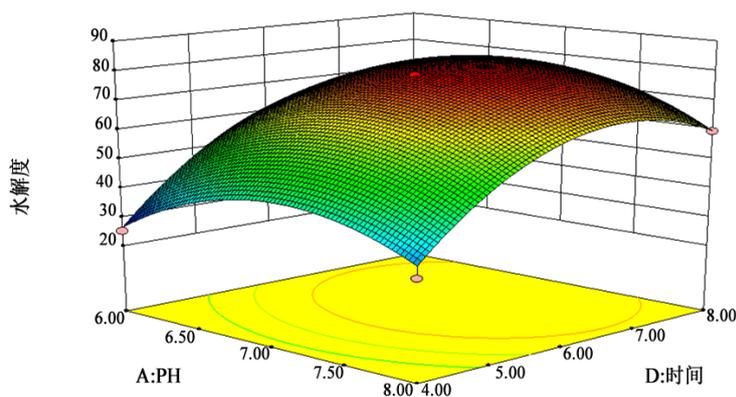


Figure 8. The influence of pH value and enzymolysis time on the hydrolysis degree

图 8. PH 和酶解时间对水解度影响的响应面图

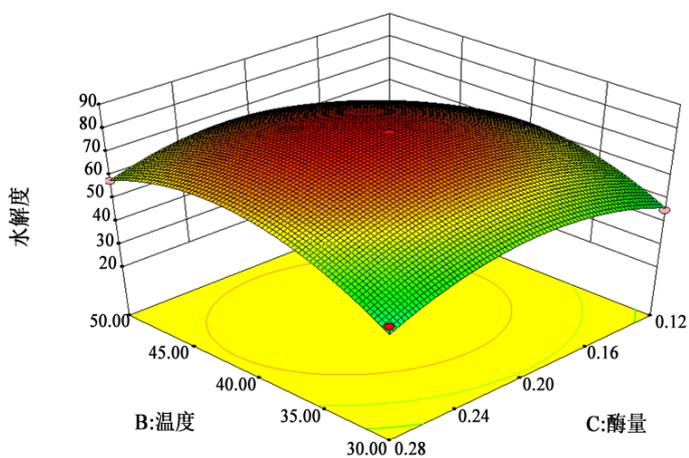


Figure 9. The influence of temperature and concentration of enzymolysis on the hydrolysis degree

图 9. 酶解温度和酶添加量对水解度影响的响应面图

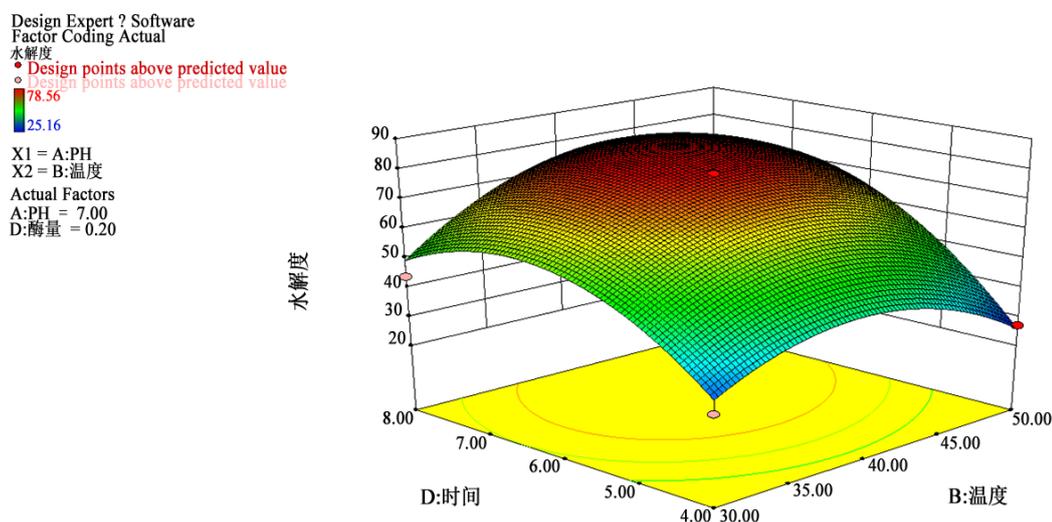


Figure 10. The influence of time and temperature of enzymolysis on the hydrolysis degree

图 10. 酶解时间和酶解温度对水解度影响的响应面图

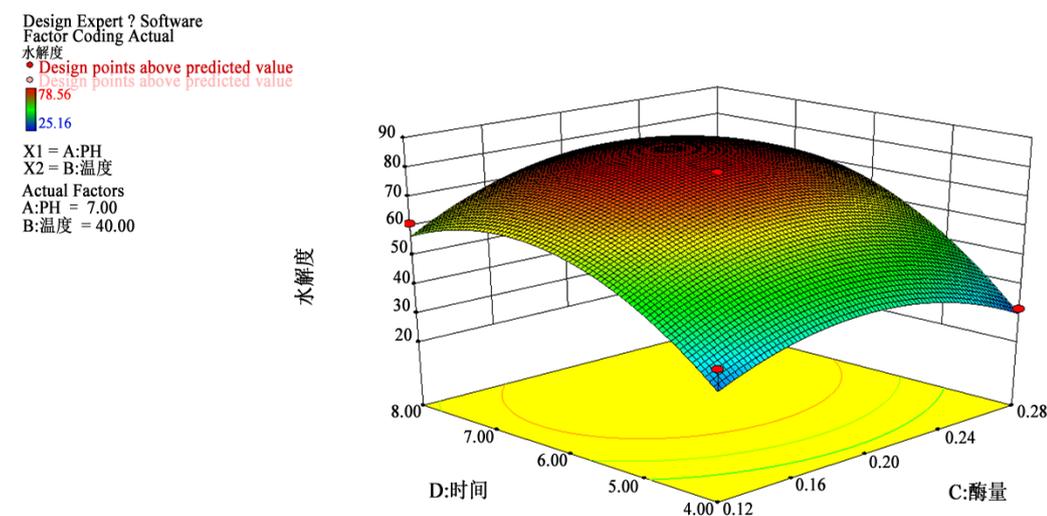


Figure 11. The influence of time and concentration of enzymolysis on the hydrolysis degree

图 11. 酶解时间和酶添加量对水解度影响的响应面图

### 3.3.3. 酶解工艺条件的验证

由 Design Expert 8.0.6 软件分析得到胰蛋白酶酶解鱿鱼内脏的最佳工艺条件为 pH 7.04，酶解温度 42.43℃，酶解时间 6.98 h，酶添加量 5250 U/g，鱿鱼内脏酶解后的水解度为 82.906%。为验证响应面模型的可行性，采用修正后的最佳工艺条件，即 pH 7.0，酶解温度 43℃，酶解时间 7.0 h，酶添加 5250 U/g 进行鱿鱼内脏酶解验证试验，3 次平行试验的实际值为 81.836%，与回归方程所得预测值相对偏差为 1.31%，该数值表明，通过响应面优化后得到的回归方程能够较好的反映各因素对鱿鱼内脏酶解的影响。

## 4. 结论

本实验结果表明，胰蛋白酶酶解鱿鱼内脏的水解度为 74.25%，羟自由基清除率高达 28.9%。后期利用胰蛋白酶对鱿鱼内脏进行酶解，综合单因素实验和响应面分析法对酶解结果进行分析，拟合了酶添酶量、pH、酶解温度、酶解时间这四个因素对鱿鱼内脏酶解程度回归模型的影响，实验模拟证明，该模型

合理,能较好的反应鱿鱼内脏的水解程度。根据响应面分析后,得出的酶解条件为加酶量 3000 U/g, pH 7.04, 水解温度 42.43℃, 水解时间 6.98 h。并经过 3 次平行试验可得,在此条件下鱿鱼内脏平均水解度为 81.836%。通过模型系数显著性分析,得到因素的主效应关系为:酶解时间 > 酶解温度 > 酶添加量 > pH。胰蛋白酶酶解工艺的优化,极大的提高了鱿鱼内脏酶解液的水解度,为鱿鱼内脏的加工提供了良好的理论基础。结果表明,酶解鱿鱼内脏得到的活性肽有一定的抗氧化活性,在实验过程中,在相同条件下得出的羟自由基清除能力是不一样的,这是由于每次进行前处理时偶然误差而引起浓度的变化所导致的,所以本研究只能说明水解出来的活性肽具有抗氧化活性,具体活性有多强还有待进一步研究。

鱿鱼内脏作为鱿鱼本身中低值部分,一直不被看好利用,如果能像本研究中对鱿鱼内脏进行进一步的分离纯化,提取有较高抗氧化活性的部分,相信其在未来的生活中能很好地扮演一个抗氧化剂的角色,同时也为鱿鱼内脏的食用、药用提供了良好的理论基础。

## 基金项目

大连民族大学大学生创新创业训练计划项目(201712026212)。

## 参考文献

- [1] 朱瑶,胡建恩,杨杰,等. 鱿鱼肝脏活性肽的制备及生物活性研究[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(15): 4666-4668.
- [2] GB/T 9725-2007, 化学试剂电位滴定法通则[S].
- [3] GB/T 5009.5-2003, 食品中蛋白质的测定[S].

### 知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>  
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2166-613X, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>  
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: [hjfn@s@hanspub.org](mailto:hjfn@s@hanspub.org)