

响应面法优化罗非鱼肉内源酶酶解工艺

刘石生, 林志锋, 周国英, 徐献兵

(海南大学食品学院, 热带生物资源教育部重点实验室, 海南海口 570228)

摘要: 为促进罗非鱼加工下脚料的利用, 用响应面方法研究了pH值、时间、温度三条件对内源酶酶解罗非鱼肉蛋白的影响, 建立了拟合良好的回归方程。最优水解条件为温度58.0℃, pH 7.49, 时间5.83 h, 水解度最大值为7.4689%。

关键词: 罗非鱼; 蛋白; 内源酶; 响应面

文章编号: 1673-9078(2010)1-85-4

Optimization of Hydrolysis of Tilapia Meat by Endogenous Enzymes with Response Surface Methods

LIU Shi-sheng, LIN Zhi-feng, ZHOU Guo-ying, XU Xian-bin

(Food College, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: The effects of pH value, time, and temperature on hydrolysis of tilapia protein by endogenous enzymes were studied with response surface methods for the full utilization of the by-product of tilapia procession. The optimized conditions were determined as follows: pH 7.49, temperature 58.0℃, and time 5.83 h, under which the hydrolysis degree (HD) reached the highest value of 7.4689%.

Key words: Tilapia; protein; endogenous enzyme; response surface

罗非鱼是我国海南、广东优势水产养殖、出口品种, 主要用于加工成罗非鱼片出口, 其加工下脚料含有丰富的蛋白, 目前主要用于生产鱼粉等产品用于饲料制造, 也有研究将其开发为食品。在罗非鱼下脚料的高值化加工中, 蛋白的提取和利用是关键的一环, 相关研究人员采用发酵、酶水解等方法利用其蛋白质^[1,2]。在水提取、酶水解过程中, 都不可避免涉及鱼下脚料中内脏中内源酶对加工过程的影响。因此, 研究鱼体内脏中内源酶对鱼肉的水解特性对鱼肉及下脚料蛋白的水解工艺有一定的指导作用。本文采用响应面法研究了罗非鱼内脏内源酶酶解罗非鱼肉特性, 获得酶解的最佳条件。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

原料: 市售罗非鱼。其余试剂为分析纯。

数显恒温水浴锅 HH-4 (常州市华普达教学仪器有限公司), 电热鼓风干燥箱 DHG-9123A 型 (上海

收稿日期: 2009-09-03

基金项目: 海南省教育厅指导性项目 (HJ200603), 国家科技支撑计划项目 (2007BAD6B06), 国家科技支撑计划项目 (2007BAD29B09)

作者简介: 刘石生 (1977-), 男, 博士, 副教授, 主要从事天然资源开发及功能食品研究

恒科技有限公司), 梅特勒-托利多 DELTA320 pH 计 (梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司), 电子天平 AL204 (梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司), 85-1 恒温磁力搅拌器 (金坛市富华仪器有限公司), 台式离心机 TGL-16B (湖南凯达科学仪器有限公司)。

1.2 实验方法

氨基态氮测定: 甲醇滴定法^[3]

水解度定义^[4]: $HD = \frac{\text{水解液中总氨基态氮}}{\text{样品中总氮含量}} \times 100\%$

1.3 试验工艺

新鲜罗非鱼, 取内脏, 匀浆, 待用。

新鲜罗非鱼肉→切块→绞碎→加水匀浆 (或缓冲液调节 pH) →加内脏混匀→水解→取样→离心→水解液→测水解度。

1.4 试验设计与数据处理

Minitab 14.0 软件。

2 结果及讨论

主要考察试验时间、温度、pH 值 3 个主要因素。

2.1 时间对水解度的影响结果

在温度为 55℃, 料液比为 1:3, pH 7.0 条件下水解, 水解度随水解时间变化结果如图 1。

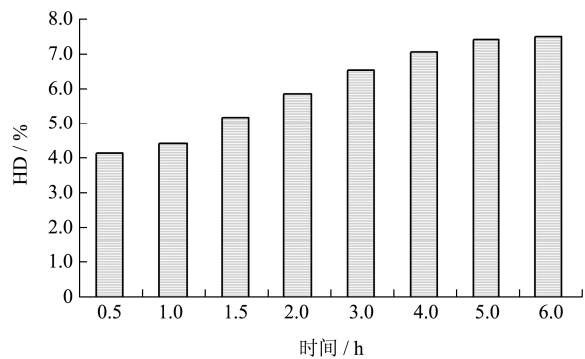


图1 时间对水解度的影响

Fig.1 Effect of time on hydrolysis degree of tilapia protein

由图1可知,水解度随着时间的变化不断的增加,在水解前期0.5~4 h内水解度变化较快,在4 h后期变化较缓慢。

2.2 温度对水解度的影响

在pH 7.0, 料液比 1:3 条件下水解 4 h, 水解度随水解温度变化结果如图2。

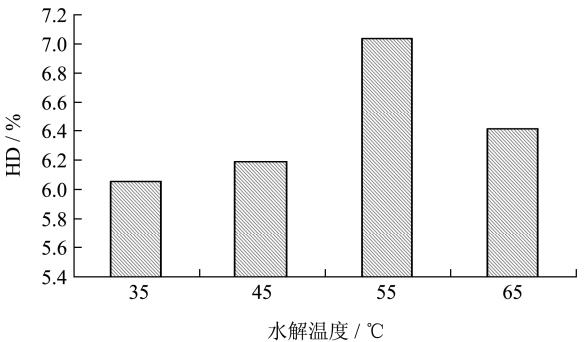


图2 温度对水解度的影响

Fig.2 Effect of temperature on hydrolysis degree of tilapia protein

由图2可知,55 °C时水解度最高,最接近最适酶解温度。

2.3 pH 对水解度的影响

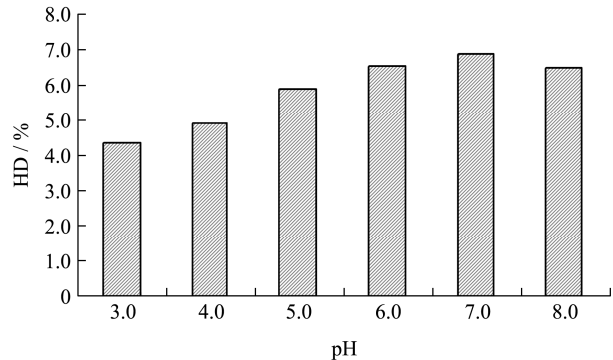


图3 pH 对水解度的影响

Fig.3 Effect of pH on hydrolysis degree of tilapia protein

在温度为 55 °C, 料液比 1:3 条件下水解 4 h, 水解度随水解 pH 变化结果如图3。由图3可知,在 pH 7.0

时,水解度最大,因此酶的最适酸碱度为 7.0 左右。同时,在 pH 6.0~8.0 范围内水解度均保持于较好的水平,表明内源酶的 pH 适应范围较广,可能与内源酶中酶的种类较复杂有关。

3 响应面分析

3.1 回归模型的建立

以水解温度、pH 和时间为自变量,用 minitab 14.0 软件设计出试验方案并对试验结果进行分析,试验方案见表 1,结果见表 2。

表 1 响应面试验因素水平表

Table 1 Factors and levels of response surface experiment

水平	X ₁ (温度/°C)	X ₂ (pH)	X ₃ (时间/h)
1.68	67	8.7	6.7
1	60	8	6
0	50	7	5
-1	40	6	4
-1.68	33	5.3	3.3

表 2 响应面试验结果

Table 2 Results of response surface experiment

编号	X ₁	X ₂	X ₃	HD 测定值(%)
1	-1	1	-1	4.667
2	0	0	0	6.981
3	0	0	0	6.866
4	1.68	0	0	6.789
5	0	0	0	6.895
6	-1.68	0	0	5.493
7	0	0	1.68	7.310
8	1	1	-1	6.493
9	0	0	0	7.010
10	0	0	0	6.952
11	-1	-1	1	6.636
12	0	1.68	0	7.125
13	0	0	-1.68	4.679
14	-1	1	1	6.177
15	1	1	1	7.057
16	-1	-1	-1	4.964
17	0	0	0	6.952
18	0	-1.68	0	5.430
19	1	-1	1	7.217
20	1	-1	-1	5.487

将试验数据输入计算机可得回归模型方程:

$$Y=6.9427+0.7377X_1+0.3621X_2+0.12192X_3-0.8023X_1^2-0.6665X_2^2-0.9491X_3^2+0.5666X_1*X_2-0.3137X_1*X_3$$

-0.4694X₂*X₃, R=0.93。

3.2 回归模型检验

F 检验反映的是回归模型的有效性, t 检验是对回归模型的系数进行显著性检验, 结果如表 3、表 4。

表 3 回归模型方差分析

Table 3 Variance analysis of regression model					
方差来源	自由度	平方和	均方和	F	P
回归模型	9	14.0861	1.56513	15.60	0.000
一次项	3	10.4377	3.47925	34.68	0.000
平方项	3	3.0086	1.00287	10.00	0.002
交互项	3	0.6398	0.21326	2.13	0.160
残差	10	1.0032	0.10032		
失拟检验	5	0.9889	0.19778	69.13	0.000
纯误差	5	0.0143	0.00286		
总方差	19	15.0893			

表 4 回归模型中回归系数

Table 4 Parameters of regression model				
变量	系数	标准误差	T	P (Std)
Constant	6.9427	0.1292	53.744	0.000
X ₁ (温度)	0.7377	0.1441	5.118	0.000
X ₂ (pH)	0.3621	0.1441	2.512	0.031
X ₃ (时间)	1.2192	0.1441	8.458	0.000
X ₁ ²	-0.8023	0.2360	-3.400	0.007
X ₂ ²	-0.6665	0.2360	-2.824	0.018
X ₃ ²	-0.9491	0.2360	-4.022	0.002
X ₁ *X ₂	0.5666	0.3167	1.789	0.104
X ₁ *X ₃	-0.3137	0.3167	-0.990	0.345
X ₂ *X ₃	-0.4694	0.3167	-1.482	0.169

从模型方差分析（表 3）可知, 模型整体为显著水平, 表明回归模型与试验结果数据吻合良好。表 4 为模型中各项系数估计值以及各项对试验结果的影响显著性分析, 可见在三个因素中, 影响最显著的因素是酶解时间, 其次是酶解温度, 在试验 pH 范围内, pH 值的影响作用相对较小, 从大到小的影响作用依次为时间>温度>pH 值。原因可能在于内脏内源酶的种类比较复杂, 其最适作用 pH 范围较大, 在试验 pH 范围内, 其总体活力表现较稳定, 与前面的单因素试验结果一致。

3.3 拟合模型降维分析

通过降维分析方法将多元问题转化为一元或二元问题, 便于分析单因素及双因素与蛋白水解度的效应关系, 并用图形表示, 可获得形象图相。将任一因素固定在 0 水平, 得到另外两个因素的交互影响结果, 得响应面和二维的等高线如图 4、图 5、图 6。

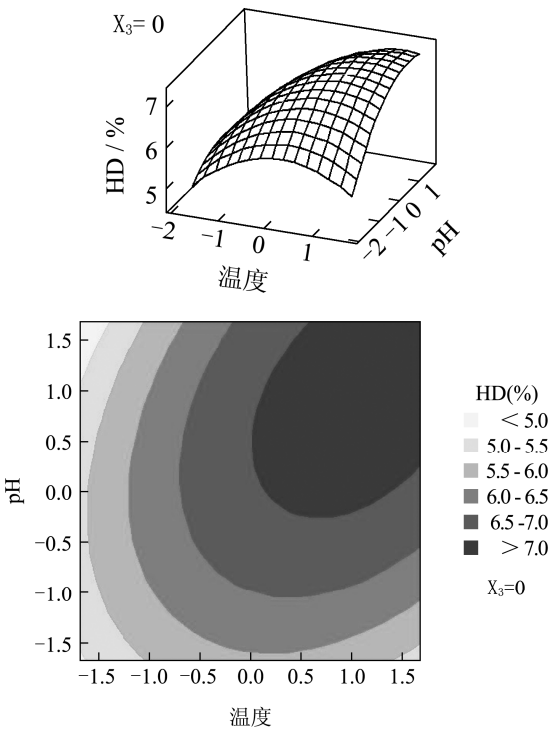


图 4 温度和 pH 对水解度的交互影响
Fig.4 Combined effects of pH and temperature on hydrolysis degree of tilapia protein

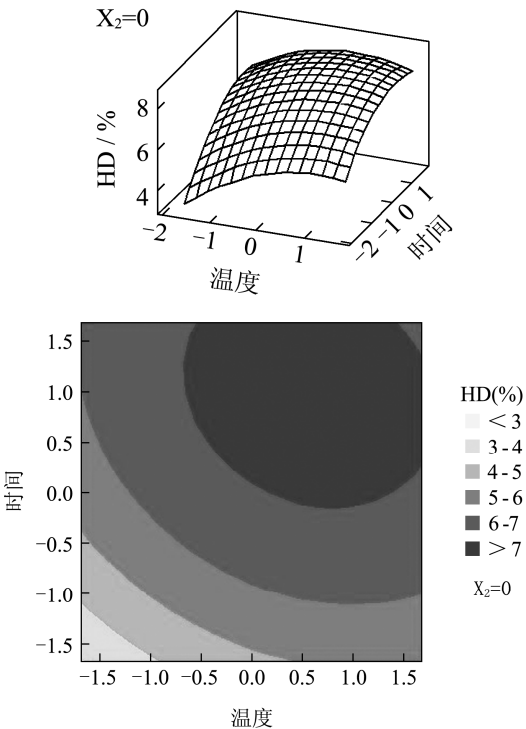


图 5 温度和时间对水解度的交互影响
Fig.5 Combined effects of time and temperature on hydrolysis degree of tilapia protein

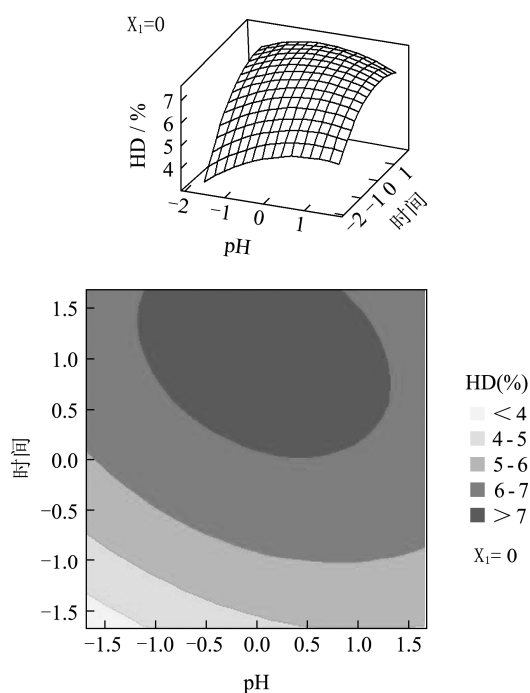


图 6 pH 和时间对水解度的交互影响

Fig.6 Combined effects of pH and time on hydrolysis degree of tilapia protein

由图 4 可知, 当时间(X_3)固定时, 水解度对温度变化较为敏感, 呈先上升后下降势头, 水解度随 pH 变化幅度也较敏感。同时, 从曲面可知, 温度(X_1)与 pH 值(X_2)二因素对水解度的影响有一定交互作用。图 5 显示水解度随温度上升趋势较时间因素更为显著, 同时基本无交互作用。以上趋势在图 6 中也得以体现。

一般而言, 温度和 pH 是影响酶活力的重要因素, 且相互之间会出现较多的交互作用。本试验研究发现, 罗非鱼内脏中的内源酶对罗非鱼肉的水解活力呈现一

般酶活力随温度和 pH 值变化的规律, 同时二者有一定的交互作用, 这一规律对指导罗非鱼下脚料蛋白的水解和进一步深加工有重要的意义。

对拟合模型进行响应优化, 得最优条件 $X_1 = 0.797387$, $X_2 = 0.492646$, $X_3 = 0.832403$, 即温度 58.0°C , pH7.49, 时间 5.83h, 水解度最大值为 7.46890%。

4 结论

经上文分析, 可得以下的结论:

(A) 采用响应面法建立的回归模型为: $Y = 6.9427 + 0.7377X_1 + 0.3621X_2 + 0.12192X_3 - 0.8023X_1^2 - 0.6665X_2^2 - 0.9491X_3^2 + 0.5666X_1X_2 - 0.3137X_1X_3 - 0.4694X_2X_3$, $R = 0.93$, 模型拟合良好。

(B) 罗非鱼内脏内源酶水解罗非鱼肉时, 三个因素影响大小顺序为: 时间>温度>pH值

(C) 在中性或偏碱 pH 条件下, pH 对蛋白水解度影响不敏感。

参考文献

- [1] 何雪莲, 夏秋瑜, 刘四新, 等. 罗非鱼加工废弃物酶法水解的研究. 中国酿造, 2007(1): 14-16
- [2] 陈瑜珠, 陶红丽, 曾庆孝, 等. 利用罗非鱼加工下脚料发酵鱼露的研究. 现代食品科技, 2008(5): 441-443
- [3] 黄伟坤. 食品检验与分析[M]. 北京: 轻工业出版社, 1989: 57-58
- [4] 陈彦, 王明蓉, 沈洁. 低值鱼蛋白的酸酶复合水解工艺研究[J]. 食品科学, 2006, 27(8): 200-204
- [5] 徐中儒. 农业试验最优回归设计. 黑龙江: 黑龙江科学技术出版社, 1988: 68-85

(上接第 91 页)

- [1] (美) Y.H. Hui 主编. 贝雷油脂化学与工艺[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2001: 22-42
- [2] 张根旺, 杨天奎, 郭净. 生物活性物质共轭亚油酸(CLA)的研究[J]. 中国油脂, 2000, 25(6): 13-16
- [3] 刘平, 段玉峰, 肖红, 等. 功能性油脂共轭亚油酸及其在食品工业中的应用[J]. 食品研究与开发, 2004, 25(6): 3-5
- [4] 陈岚, 满瑞林. 超临界萃取技术及其应用研究[J]. 现代食品科技, 2006, (1): 199-202
- [5] Xueli Cao, Yoichiro Ito. Supercritical fluid extraction of grape seed oil and subsequent separation of free fatty acids by high-

- speed counter-current chromatography. Journal of Chromatography A, 1021 (2003) 117-124
- [6] 朱自强. 超临界流体萃取原理和应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 23-27
- [7] 赵春海. 超临界流体萃取技术原理及应用研究简述[J]. 生命科仪器, 2006, 4(12): 33-35
- [8] 张忠义, 王鹏, 雷正杰, 等. 超临界 CO_2 萃取-分子蒸馏对白术挥发油的提取分离和 GC-MS 分析[J]. 分析测试学报, 2007, (4): 61-64
- [9] 张亚刚, 樊莉, 文彬等. 紫外可见分光光度法在共轭亚油酸定量分析中的应用. 新疆石油学院学报, 2002, 14(2)