

文章编号: 1674-8085(2017)03-0039-06

响应面法优化酶解提取鳊鱼鱼鳞胶原蛋白的工艺研究

*邱小明^{1,2}, 黄聪亮^{1,2}, 陈建福²

(1. 漳州职业技术学院食品与生物工程系, 福建, 漳州 363000; 2. 农产品深加工及安全福建省高校应用技术工程中心, 福建, 漳州 363000)

摘 要: 采用响应面法对酶解提取鳊鱼鱼鳞胶原蛋白的工艺进行优化。在单因素实验的基础上, 根据 Box-Behnken 实验设计的原理, 以酶解温度、pH 值、酶解时间为自变量, 以胶原蛋白含量为响应值进行响应面优化分析。结果表明: 设定的 3 个影响鱼鳞胶原蛋白提取效果的因素, 其影响大小依次为 pH 值 > 酶解温度 > 酶解时间; 优化分析获得鱼鳞胶原蛋白的最佳工艺条件为: 酶解温度 31.32℃、pH 值 4.24、酶解时间 1.95 h、加酶量 1.5%, 胶原蛋白的含量为 883.64 mg/g。为了方便实际操作, 将鱼鳞胶原蛋白的最优工艺条件修正为: 酶解温度 31℃, pH 值 4.2, 提取时间 2 h、加酶量 1.5%, 实际得到胶原蛋白含量为 881.78 mg/g, 实验结果与理论值基本吻合, 说明模型的可靠性较高。

关键词: 响应面; 酶解法; 鱼鳞; 胶原蛋白

中图分类号: TS254.4

文献标识码: A

DOI:10.3969/j.issn.1674-8085.2017.03.007

EXTRACTION PROCESS OF BREAM FISH SCALE COLLAGEN BY ENZYMOLYSIS OPTIMIZED BY RESPONSE SURFACE METHOD

*QIU Xiao-ming^{1,2}, HUANG Cong-liang^{1,2}, CHEN Jian-fu²

(1. Foods and Biology Engineering Department, Zhangzhou Institute of Technology, Zhangzhou, Fujian 363000, China;

2. The Applied Technical Engineering Center of Further Processing and Safety of Agricultural Products, Higher Education Institutions in Fujian Province, Zhangzhou, Fujian 363000, China)

Abstract: Enzymolysis in extraction process of bream fish scale collagen was optimized by response surface method. On the basis of single factor experiment, taking enzymolysis temperature, pH value and enzymolysis time as independent variables, the content of collagen as the response value, the response surface method was applied to optimize according to the principle of Box-Behnken experimental design. The results show that the effects of three factors influencing scale collagen extraction are: pH value > enzymolysis temperature > enzymolysis time. The optimal process conditions achieved by optimization analysis for bream fish scale collagen are: temperature 31.32℃, pH value 4.24, enzymolysis time 1.95 h, and enzyme addition 1.5%. The collagen content is 883.64 mg/g. For the sake of convenience in practical operation, the optimal process conditions of fish scale collagen are modified as enzymolysis temperature 31℃, pH value 4.2, extraction time 2 h, and enzyme addition 1.5%. The actual collagen content is 881.78mg/g. The results agree with the theoretical value, which shows the high reliability of the model.

Key words: response surface; enzymolysis; fish scale; collagen

收稿日期: 2017-01-06; 修改日期: 2017-03-07

基金项目: 福建省中青年骨干教师教育科研项目 (JAT160870)

作者简介: *邱小明(1979-), 男, 江西信丰人, 讲师, 硕士, 主要从事食品生物技术与生物化工研究(E-mail: 648181233@qq.com);

黄聪亮(1976-), 男, 福建诏安人, 副教授, 硕士, 主要从事食品加工技术研究(E-mail: 7448832@qq.com);

陈建福(1982-), 男, 福建南安人, 副教授, 博士, 主要从事天然产物化学工艺研究(E-mail: qjfl996@163.com).

近年来随着鱼加工业的快速发展,我国淡水鱼的产量也增长迅速,其年产量居世界首位^[1]。目前对淡水鱼的加工主要是利用鱼肉部分,对于鱼鳞部分则作为废弃物丢弃^[2]。我国鱼加工后的鱼鳞每年可达 30 多万吨,其中只有少数部分被利用于饲料生产^[3]。若能对鱼鳞加以充分利用,在减少环境污染的同时又可提升资源的利用,增加相关企业的经济效益^[4]。

鳊鱼(*Parabramis pekinensis*)是我国主要养殖的淡水鱼类之一,主要分布于我国的长江中、下地区,其味道鲜美、肉质嫩滑,具有适应能力强、生长迅速的特点,它是养殖户喜欢养殖的鱼类之一^[5]。鳊鱼鱼鳞中含有丰富胶原蛋白、脂肪以及磷、钙等多种矿物质^[6],目前胶原蛋白在化妆品、食品、医药等领域被广泛应用,价高且市场有着很大的需求量^[7-8],因此开展鳊鱼鱼鳞胶原蛋白的提取研究有着很高的经济价值。本研究以鳊鱼鱼鳞为原料,采用酶解法提取其胶原蛋白,并通过响应面法优化提取工艺,以期提高鱼资源的综合利用率。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

新鲜鳊鱼鱼鳞,从当地水产市场购得,购回后在实验室用清水洗净,并在干燥箱 35℃ 下烘干后备用。

胃蛋白酶,比活力为 1:3000(中国医药集团上海化学试剂公司)。

1.2 试验仪器

电热鼓风干燥箱、型低速离心机、恒温水浴锅、电子分析天平、组织捣碎机、磁力搅拌器、冷冻干燥机、分光光度计。

1.3 方法

1.3.1 鱼鳞的脱钙

将新鲜的鳊鱼鱼鳞洗净并在干燥箱 35℃ 下烘干,用盐酸脱钙。

1.3.2 胶原蛋白提取

1.3.2.1 单因素实验

鳊鱼鱼鳞胶原蛋白采用胃蛋白酶酶法提取,以酶解温度、pH 值、加酶量、酶解时间等 4 个因素进行单因素实验。

(1) 酶解温度对胶原蛋白含量影响

称取一定量脱钙后的鳊鱼鱼鳞,设置 pH 值 5、加酶量 1%、酶解时间 3 h,研究 20、25、30、35、40℃ 等不同酶解温度对胶原蛋白含量的影响。

(2) pH 值对胶原蛋白含量影响

称取一定量脱钙后的鳊鱼鱼鳞,在上述确定的酶解温度下,设置加酶量 1%、酶解时间 3h,研究 pH 值为 3、4、5、6、7 等,不同 pH 值对胶原蛋白含量的影响。

(3) 加酶量对胶原蛋白含量影响

称取一定量脱钙后的鳊鱼鱼鳞,在上述确定的酶解温度、pH 值下,设置酶解时间 3 h,研究不同加酶量为 0.5%、1.0%、1.5%、2%、2.5%对胶原蛋白含量的影响。

(4) 酶解时间对胶原蛋白含量影响

称取一定量脱钙后的鳊鱼鱼鳞,在上述确定的酶解温度、pH 值、加酶量下,研究不同酶解时间为 1、2、3、4、5 h 下对胶原蛋白含量的影响。

1.3.2.2 响应面实验设计

在上述单因素研究的基础上,以胶原蛋白含量为指标,设计响应面实验,具体设计详见表 1、表 2。

1.3.3 胶原蛋白含量的计算^[9-10]

提取得到的胶原蛋白含量测定以羟脯氨酸计,采用对二甲氨基苯甲醛比色法。提取得到的胶原蛋白含量的计算公式为: $Y = CV / (M \times 1000) \times N \times 11.1$ 。

式中:Y 为提取得到的胶原蛋白的含量(mg/g);C 为羟脯氨酸浓度($\mu\text{g/mL}$);V 为所配制溶液的体积(mL);M 为称取的鱼鳞质量(g);N 为稀释倍数;11.1 为胶原蛋白水解为羟脯氨酸的系数。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

2.1.1 酶解温度对胶原蛋白含量影响

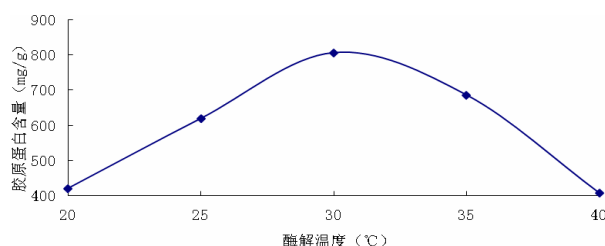


图 1 不同酶解温度对胶原蛋白含量影响

Fig.1 Effect of temperature on collagen content

从实验结果可以看出(见图 1), 鳊鱼鱼鳞提取得到的胶原蛋白含量在酶解温度 30℃时达到最大, 酶解温度低于或高于 30℃, 胃蛋白酶的活性会受到了抑制。

2.1.2 pH 值对胶原蛋白含量影响

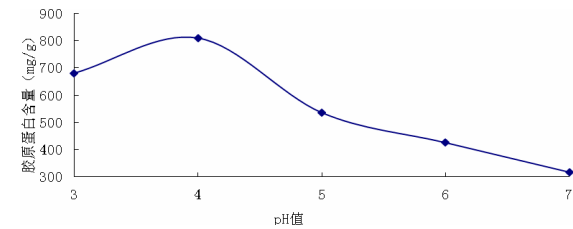


图 2 不同 pH 值对胶原蛋白含量影响
Fig.2 Effect of pH on collagen content

从实验结果可以看出(见图 2), 鳊鱼鱼鳞提取得到的胶原蛋白含量在 pH 为 4 时胶达到最大, pH 值高或低于 4 时胃蛋白酶的活性受到了抑制。

2.1.3 加酶量对胶原蛋白含量影响

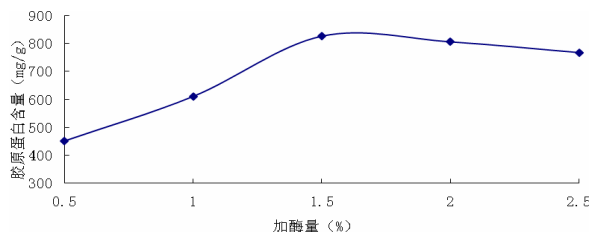


图 3 不同加酶量对胶原蛋白含量影响
Fig.3 Effect of enzyme amount on collagen content

从实验结果可以看出(见图 3), 鳊鱼鱼鳞提取得到的胶原蛋白含量在加酶量 1.5%时达到最大, 之后增大加酶量, 提取得到的胶原蛋白含量基本趋于稳定。

2.1.3 酶解时间对胶原蛋白含量影响

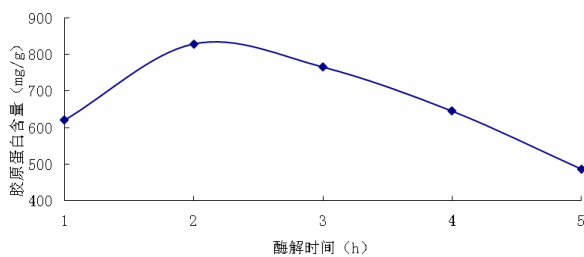


图 4 不同酶解时间对胶原蛋白含量影响
Fig.4 Effect of time on collagen content

从实验结果可以看出(见图 3), 鳊鱼鱼鳞提取得到的胶原蛋白含量在酶解时间达到为 2 h 时达到

最大, 之后延长酶解时间, 提取得到的胶原蛋白含量大幅下降。

2.2 响应面法优化酶解提取鳊鱼鱼鳞胶原蛋白的实验结果

根据上述单因素的试验结果可以看出, 酶解温度、pH值、酶解时间对胶原蛋白含量的影响显著。根据Box-Behnken实验设计的原理, 设计三因素三水平实验, 以胶原蛋白含量为响应值进行响应面优化分析, 实验因素水平见表1, 实验设计与结果见表2。

表 1 Box-Behnken 实验因素水平
Table 1 Factor and levels of Box-Behnken experimental

水平	因素		
	X1 酶解温度 (℃)	X2 pH 值	X3 酶解时间 (h)
-1	25	3	1
0	30	4	2
1	35	5	3

表 2 Box-Behnken 实验设计与结果
Table 2 Design and result of Box-Behnken experiment

序号	X1 酶解温度 (℃)	X2 pH 值	X3 酶解时间 (h)	Y 胶原蛋白含量 (mg/g)
1	0	-1	-1	653.37
2	0	1	-1	702.04
3	1	0	-1	811.83
4	0	1	1	700.54
5	0	0	0	886.36
6	1	-1	0	756.11
7	-1	-1	0	816.12
8	0	0	0	885.48
9	0	0	0	879.36
10	-1	0	1	822.72
11	-1	1	0	608.74
12	1	1	0	814.36
13	1	0	1	736.44
14	0	0	0	875.61
15	0	0	0	871.86
16	-1	0	-1	811.17
17	0	-1	1	752.59

2.2.1 实验数据处理及数值分析

为了得到酶解提取鳊鱼鱼鳞胶原蛋白的最佳工艺条件, 通过响应面法优化实验共设计了 17 个实验点, 其中自变量 X1、X2 和 X3 构成的三维顶点有 12 个析因点, 其余 5 个为零点, 即为区域中心点, 利用这 5 区域中心点可估计整个实验的误差。

以胶原蛋白含量为响应值, 得到的二阶多项方程为: $Y=879.63-1.23X_1-1.55X_2+0.49X_3+6.39X_1X_2-4.24X_1X_3-0.19X_2X_3-9.69X_1^2-20.59X_2^2-16.38X_3^2$ 。

二阶多项方程的分析结果见表 3, 此模型 $P =$

$0.0004 < 0.01$, $R^2 = 0.9736$, 高度显著, 说明此方程可很好地解释 97.36% 的胶原蛋白含量的变化。从回归模型方差分析可看出 (见表 3), 三个因素对胶原蛋白含量影响的顺序为: $X_2 > X_1 > X_3$, 且 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 的 P 值说明这三个因素对胶原蛋白含量的

影响极显著 ($P < 0.01$), X_1X_2 对胶原蛋白含量的影响显著 ($P < 0.05$)。而失拟相不显著 ($P = 0.3306 > 0.05$), 即本实验的误差由随机误差引起, 说明二阶多项方程与真实的响应面拟合度较高。

表 3 回归模型方差分析
Table 3 Analysis of variance for the regression model

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P-值 Prob > F	
模型	3892.58	9	453.96	20.47	0.0004	significant
X1	14.54	1	14.54	0.61	0.4596	
X2	19.88	1	19.88	0.94	0.3267	
X3	1.76	1	1.76	0.088	0.7773	
X1X2	178.04	1	178.04	7.97	0.0286	
X1X3	77.26	1	77.26	3.44	0.1057	
X2X3	0.14	1	0.14	6.332E-003	0.9398	
X_1^2	401.93	1	401.93	18.97	0.0033	
X_2^2	1778.72	1	1778.72	84.78	0.0001	
X_3^2	1113.29	1	1113.29	53.73	0.0002	
纯误差	87.41	4	18.59			
失拟相	68.74	3	23.18	1.18	0.3306	not significant
总和	3741.71	16				
	回归系数 R^2	0.9736				
	置信区间	11.093				
	C.V./%	0.88				

2.2.2 模型的响应曲面与等高线

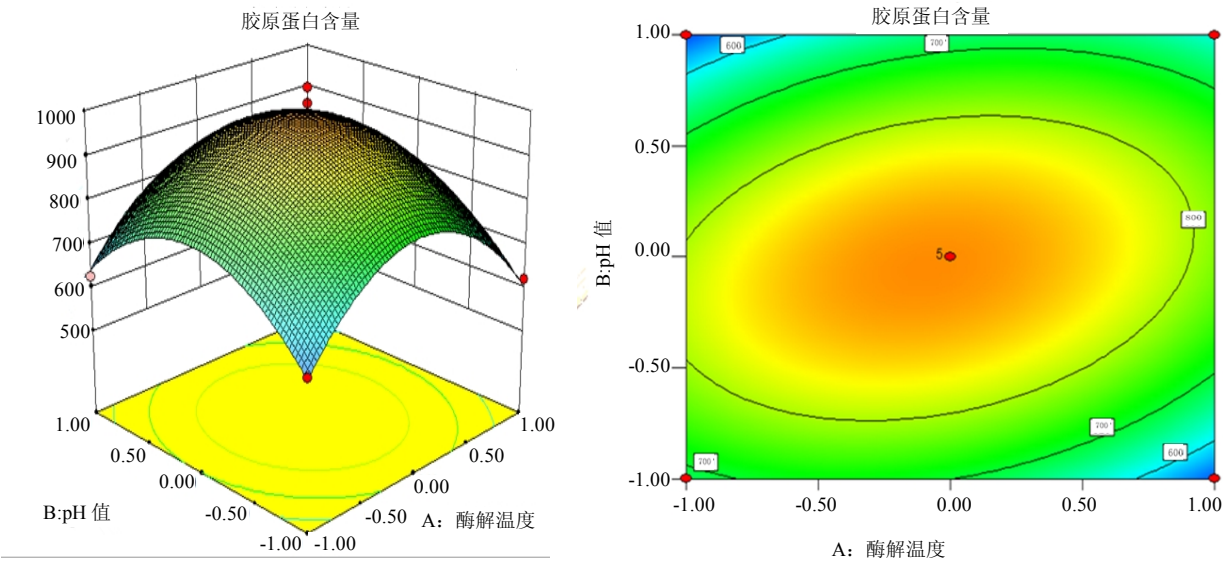


图 5 酶解温度与 pH 值对胶原蛋白含量的响应面图及等高线图
Fig.5 Contour plots and response surfaces of temperature and pH to the collagen content

从图 5 可看出, 整个响应面的坡度比较陡, 说明酶解温度与 pH 值对胶原蛋白含量的影响较大,

其中 pH 值对胶原蛋白含量的影响更大些, 等高线较密。

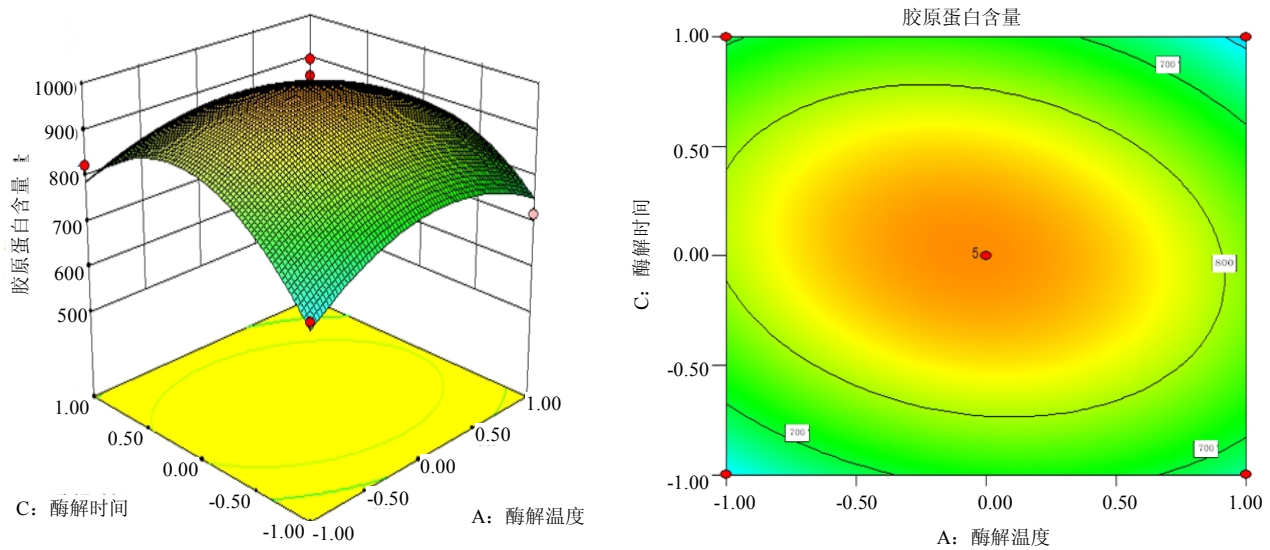


图 6 酶解温度与酶解时间对胶原蛋白含量的响应面图及等高线图
Fig.6 Contour plots and response surfaces of temperature and time to the collagen content

从图 6 可看出，整个响应面坡度较缓，说明酶解温度与酶解时间的交互作用对胶原蛋白含量的

影响较小，从等高线可以看出，酶解时间的变化对胶原蛋白含量影响区别较小。

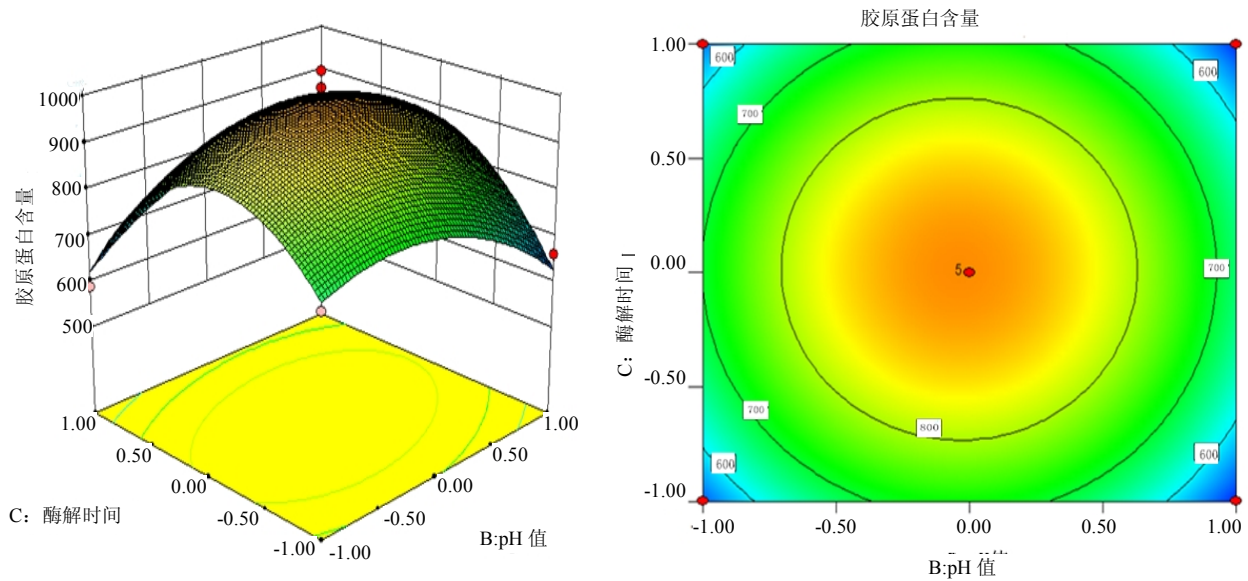


图 7 酶解时间与 pH 值对胶原蛋白含量的响应面图及等高线图
Fig.7 Contour plots and response surfaces of time and pH to the collagen content

从图 7 可看出，响应面坡度较缓，说明酶解时间与 pH 值的交互作用对胶原蛋白含量的影响较小，从等高线可以看出，酶解时间的变化对胶原蛋白的含量影响区别较小。

2.2.3 优化后工艺参数验证

回归方程： $Y=879.63-1.23X_1-1.55X_2+0.49X_3+6.39X_1X_2-4.24X_1X_3-0.19X_2X_3-9.69X_1^2-20.59X_2^2-16.38X_3^2$ ，分别对 X_1 、 X_2 、 X_3 求一阶偏导，得到： $X_1 = 0.087$ ， $X_2 = 0.049$ ， $X_3 = -0.028$ ；即鱼鳞胶原蛋白的最佳工艺条件为：酶解温度 31.32℃、pH 值

4.24、酶解时间 1.95 h、加酶量 1.5%，胶原蛋白的含量为 883.64 mg/g。为了方便实际操作，将鱼鳞胶原蛋白的最优工艺条件改为：酶解温度 31℃，pH 值 4.2，提取时间 2 h，加酶量 1.5%，得到实际胶原蛋白含量为 881.78mg/g，这与理论值基本相吻合，说明模型的可靠性较高。

3 小结

本研究采用响应面法优化酶解提取鳊鱼鱼鳞胶原蛋白的工艺，以对二甲氨基苯甲醛比色法测定胶原蛋白含量。在单因素实验的基础上，得出了酶解温度、pH 值、酶解时间对胶原蛋白含量的影响显著，因此根据 Box-Behnken 实验设计的原理，以胶原蛋白含量为响应值进行响应面优化分析，得出鱼鳞胶原蛋白的最佳工艺条件为：酶解温度 31.32℃、pH 值 4.24、酶解时间 1.95 h、加酶量 1.5%，胶原蛋白的含量为 883.64 mg/g。为了方便实际操作，将鱼鳞胶原蛋白的最优工艺条件改为：酶解温度 31℃，pH 值 4.2，提取时间 2 h，加酶量 1.5%，得到实际胶原蛋白含量为 881.78 mg/g，这与理论值基本相吻合，说明模型的可靠性较高。

参考文献:

- [1] 樊世芳,王利强,游柳. 青鱼鳞胶原蛋白的研究进展[J]. 包装工程 2014,12(10): 65-67.
- [2] 艾超,黄灿灿,李致瑜,等. 鱼皮胶原蛋白提取工艺的研究进展[J].农产品加工·学刊,2012(5):93-95.
- [3] 周颖,林志峰,吴琼,等. 响应面法研究鱼鳞胃蛋白酶酶解特性[J].现代农业科学,2009,16(7):18-20.
- [4] 申锋,杨莉莉,熊善柏,等. 胃蛋白酶水解鳊鱼鱼鳞制备胶原肽的工艺优化[J].华中农业大学学报,2010,29(3): 387-391.
- [5] 孟祥忍,王恒鹏,饶胜其,等. 宰后冷藏对鳊鱼理化性状及食用品质的影响[J].江苏农业科学,2015,12(5): 56-58.
- [6] 王孟津,汪海波,桂萌,等. 鳊鱼鱼鳞胶原蛋白的提取及其理化性质研究[J].食品科学,2009,30(18):113-116.
- [7] 梅鑫东,曾江南,蒋柏泉,等. 酶法提取鱼鳞胶原蛋白的工艺优化[J].食品与机械 2014,11(18):101-104.
- [8] 曹俊. 鱼鳞胶原蛋白的研究进展和应用前景[J].水产科技情报,2009,36(1):41-42.
- [9] 张俊杰,曾庆孝. 比色法测定鱼鳞中羟脯氨酸的研究[J].食品科技,2004,12(4):83-85.
- [10] 郭恒斌,曾庆祝,闫磊,等. 分光光度法测定鱼皮中羟脯氨酸含量[J].现代食品科技,2007,23(7):81-83.

(上接第 38 页)

- [9] Xu H L, Wang F F, Chen W, et al. What is the role of the complexant in the large first hyperpolarizability of sodide systems $\text{Li}(\text{NH}_3)_n\text{Na}$ ($n = 1-4$)?[J]. Int. J. Quant. Chem, 2011, 110(12), 11725-11729.
- [10] Wang Y F, Li B, Huang J, et al. Effect of alkaline earth metal atom on the large static first hyperpolarizabilities of alkaline earth-based alkalides $\text{Be}(\text{NH}_3)_n\text{M}$ ($\text{M} = \text{Be}$ and Ca) in comparison with alkalides $\text{Li}(\text{NH}_3)_n\text{Na}$ ($n = 1-3$)[J]. Comput. Theor. Chem, 2015(1051): 10-16.
- [11] Wang Y-F, Huang J, Zhou G. Coordination number effect of nitrogen atom on the structures and NLO responses: alkaline earth-based alkalides[J]. Struct. Chem, 2013, 24(6): 1545-1553.
- [12] Wang Y F, Huang J, Li J, et al. Theoretical investigation of the structures, stabilities, and NLO responses of calcium-doped pyridazine: Alkaline-earth-based alkaline salt electrides[J]. J. Mol. Graph. Model., 2014(47): 77-82.
- [13] Hobza P, Havlas Z. Counterpoise-corrected potential energy surfaces of simple H-bonded systems[J]. Theor. Chem. Acc, 1998, 99(6): 372-377.
- [14] Alkorta I, Elguero J. Theoretical study of strong hydrogen bonds between neutral molecules: the case of amine oxides and phosphine oxides as hydrogen bond acceptors[J]. J. Phys. Chem. A, 1999, 103(2): 272-279.
- [15] Lide D R (Ed.), CRC Handbook of Chemistry and Physics[M]. USA: Florida: Boca Raton Press, 2000: 10-203.
- [16] Chen W, Li Z R, Wu D, et al. Nonlinear optical properties of alkalides $\text{Li}^+(\text{calixpyrrole})\text{M}^-$ ($\text{M} = \text{Li}, \text{Na}, \text{and K}$): alkali anion atomic number dependence[J]. J. Am. Chem. Soc, 2006, 128(4): 1072-1073.