引用格式:卢艳慧,李迎秋. 带鱼蛋白酶解工艺条件的响应面优化[J]. 轻工学报,2020,35(4):23 - 33.
中图分类号:TS254.4 **文献标识码**:A
DOI:10.12187/2020.04.004
文章编号:2096 - 1553(2020)04 - 0023 - 11

带鱼蛋白酶解工艺条件的响应面优化

Response surface optimization of proteolysis technological conditions of hairtail

卢艳慧,李迎秋
LU Yanhui,LI Yingqiu

齐鲁工业大学(山东省科学院)食品科学与工程学院,山东 济南 250353
College of Food Science and Engineering,Qilu University of Technology (Shandong Academy of Science),Ji'nan 250353,China

关键词:
带鱼;蛋白酶解;碱性蛋白酶;响应面优化

Key words:
hairtail;proteolysis;alkaline protease;response surface optimization

摘要:以带鱼为原材料,从 6 种蛋白酶中筛选出碱性蛋白酶作为带鱼蛋白酶解的最佳蛋白酶,进而利用单因素试验和响应面试验优化带鱼蛋白酶解的工艺条件. 结果表明:带鱼蛋白酶解的最佳工艺条件为底物质量分数 5.3%,蛋白酶质量分数 2.7%,酶解 pH 值 8.3,酶解温度 63 ℃,酶解时间 168 min,在该工艺条件下,带鱼蛋白水解度达到 37.07%,与响应面优化试验回归模型的预测值基本一致.

收稿日期:2020 - 02 - 22
基金项目:国家自然科学基金项目(31371839);山东省重点研发计划项目(2018YYSP001)
作者简介:卢艳慧(1995—),女,山东省烟台市人,齐鲁工业大学硕士研究生,主要研究方向为食品生物技术.
通信作者:李迎秋(1972—),女,山东省菏泽市人,齐鲁工业大学教授,博士,主要研究方向为食品生物技术.

Abstract: Taking hairtail as raw material, alkaline protease was selected from 6 kinds of proteases as the best protease for hairtail proteolysis, and the technological conditions of hairtail proteolysis were optimized by single factor test and response surface test. The results showed that the optimum conditions for proteolysis of hairtail were as follows: the substrate mass fraction was 5.3%, the protease mass fraction was 2.7%, the pH value of hydrolysis was 8.3, the hydrolysis temperature was 63 ℃, and the hydrolysis time was 168 min. Under these conditions, the hydrolysis degree of hairtail protein reached 37.07%, which was basically consistent with the predicted value of regression model of response surface optimization test.

0　引言

海洋生物约占全球生物的 1/2，从海洋生物中摄取功能性蛋白和生物活性物质是沿海国家开发海洋资源的目的之一[1]. 海洋生物蛋白种类多样，是制备生物活性肽的理想材料[2]. 在海洋生物蛋白的氨基酸序列中，潜藏着很多具有生物活性的多肽片段，利用生物技术（如采用蛋白酶进行水解）可将这些多肽片段释放出来，以开发高附加值的生物活性肽.

目前，采用酶解的方法从海洋生物蛋白中获取生物活性肽一直是国内外业界的研究热点. 研究表明，从海洋生物蛋白中提取的生物活性肽，具有抗菌、抗肿瘤、抗病毒、调节免疫、降血压、降血脂等功能[3]. 不同的蛋白酶对酶解产物的性质会有很大影响，故蛋白酶的选择在海洋低附加值鱼类蛋白酶解工业中至关重要[4]. 常用的蛋白酶主要有微生物蛋白酶（如酸性蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶、复合蛋白酶等）、植物蛋白酶（如木瓜蛋白酶等）和动物蛋白酶（如胃蛋白酶、胰蛋白酶等）[5]. 其中，碱性蛋白酶虽属于微生物蛋白酶（胞外酶），但它同时具有动植物源蛋白酶的全部特性，以及更强的水解能力和耐碱能力，此外，它还具有较强的耐热性、高产菌株选育简单、来源广、产量高、下游技术处理相对简单、价格低廉、海洋生物蛋白提取率较高等优点，易于实现工业化生产[6]. G. A. Gbogouri 等[7]研究发现，采用碱性蛋白酶对鱼蛋白进行水解，可得到低分子肽和氨基酸，实现低附加值鱼类的有效加工. 张群飞等[8]利用碱性蛋白酶对虾籽进行酶解后，具有提鲜效果的天冬氨酸和谷氨酸含量明显提高，这为调味料的生产提供了重要的依据. M. Ovissipour 等[9]利用碱性蛋白酶对黄鳍金枪鱼内脏进行水解，水解度超过 53%，水解液中蛋白质含量（72.34%）较高，氨基酸含量丰富，脂肪含量（1.43%）较低，可作为宠物食品的原料.

带鱼是我国盛产的经济鱼种之一. 近年来，过度捕捞使得捕捞的带鱼体型较小，而这些小带鱼通常会被加工成鱼粉等系列产品，造成带鱼蛋白资源的浪费. 因此，业界越来越关注如何进行小带鱼深加工、提高小带鱼附加值等问题. 使用碱性蛋白酶对带鱼蛋白进行酶解以获取带鱼蛋白肽是一种有益的探索，但目前对该类研究鲜有报道. 鉴于此，本文拟以带鱼为材料，从 6 种蛋白酶中筛选出带鱼蛋白酶解的最佳蛋白酶，进而利用单因素试验和响应面试验优化带鱼蛋白酶解的工艺条件，以期为小带鱼深加工研究和小带鱼附加值的提高提供参考，同时为带鱼蛋白肽粉的工业化生产提供数据支撑.

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

带鱼，购于超市；NaOH，HCl，浓 H_2SO_4，均为分析纯，天津市大茂化学试剂有限公司产；正己烷，分析纯，国药集团化学试剂有限公司产；碱性蛋白酶、复合蛋白酶、风味蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶，成都诺维信科技有限公司产；胰蛋白酶，杭州三叶新材料股份有限公司产.

1.2 仪器与设备

AL-204 型电子分析天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司产;DS-1 型高速组织绞碎机,上海标本模具厂产;DK-98-ⅡA 型数显恒温水浴锅,金坛市金南仪器厂产;PB-10 标准型 pH 计,德国赛多利斯有限公司产;GZX-9140MBE 型数显鼓风干燥箱,上海博讯实业有限公司医疗设备厂产.

1.3 实验方法

1.3.1 样品预处理

剔除带鱼的鱼鳞、鱼骨、鱼鳍和鱼皮后,于 65 ℃条件下烘干,粉碎后过 60 目筛,收集带鱼粉末;在带鱼粉末中加入正己烷(m(带鱼粉):V(正己烷)=1 g:4 mL)进行脱脂后,真空抽滤,于 65 ℃条件下烘干,得到脱脂带鱼粉,备用.

1.3.2 最佳蛋白酶的筛选

取 7 份相同质量(2 g)的脱脂带鱼粉为底物,除第 1 份不加蛋白酶(自溶)以外,其余 6 份分别加入单位酶活为 50 000 U/mL 的木瓜蛋白酶、胰蛋白酶、复合蛋白酶、风味蛋白酶、碱性蛋白酶和中性蛋白酶. 在底物质量分数为 4.0%,蛋白酶质量分数为 2.5%,酶解时间为180 min,酶解温度为 50 ℃,酶解 pH 值为 8.0 的条件下,测定并计算各蛋白酶酶解之后的带鱼蛋白水解度(DH),通过比较带鱼蛋白水解度,从中筛选出最佳蛋白酶.

运用 pH-stat 法[10]测定带鱼蛋白水解度(DH),公式如下:

$$DH = \frac{B \times C}{M \times \alpha \times h_{tot}} \times 100\%$$

式中,B 为维持 pH 值时加入的 NaOH 体积/mL;C 为 NaOH 的浓度/(mol·L^{-1});M 为蛋白质的质量/g;α 为蛋白质水解时的氨基解离度;h_{tot}为每 g 蛋白中肽键的物质的量/mmol,h_{tot}(带鱼)=8.17 mmol[11].

1.3.3 单因素试验

1.3.3.1 底物质量分数对脱脂带鱼粉酶解效果的影响 在酶解过程中,底物质量分数对酶解过程有非常大的影响. 在蛋白酶质量分数为 2.5%,酶解 pH 值为 8.0,酶解温度为 50 ℃,酶解时间为 180 min 的条件下,设置底物质量分数分别为 4.0%,4.5%,5.0%,6.0%,7.0%,通过比较带鱼蛋白水解度,从中选取最佳的底物质量分数.

1.3.3.2 酶解温度对脱脂带鱼粉酶解效果的影响 温度对蛋白酶活性的影响很大,温度过高或过低都会降低蛋白酶的活性,即作用效果. 毋瑾超等[12]研究了鲢鱼降血压肽的酶解条件,确定其最佳酶解温度为 60 ℃;王雪芹等[13]在鲐鱼蛋白酶解工艺优化及其抗氧化活性测定中发现,鲐鱼蛋白酶酶解的最佳温度为 55 ℃. 因此,本研究在底物质量分数为 5.0%,蛋白酶质量分数为 2.5%,酶解 pH 值为 8.0,酶解时间为 180 min的条件下,设置酶解温度分别为 40 ℃,50 ℃,60 ℃,65 ℃,70 ℃,75 ℃,通过比较带鱼蛋白水解度,从中选取最佳的酶解温度.

1.3.3.3 酶解时间对脱脂带鱼粉酶解效果的影响 在酶解的过程中,并非酶解时间越长酶解效果就越好,还需要寻找最佳的酶解时间. 在底物质量分数为 5.0%,蛋白酶质量分数为 2.5%,酶解温度为 50 ℃,酶解 pH 值为 8.0 的条件下,设置酶解时间分别为 90 min,120 min,150 min,180 min,240 min,270 min,通过比较带鱼蛋白水解度,从中选取最佳的酶解时间.

1.3.3.4 蛋白酶质量分数对脱脂带鱼粉酶解效果的影响 在酶解温度和酶解 pH 值一定的条件下,当底物质量分数远远大于蛋白酶质量分数时,反应速度与蛋白酶质量分数呈正比. 在底物质量分数为5.0%,酶解 pH 值为8.0,酶解温度为 50 ℃,酶解时间为 180 min 的条件下,设置蛋白酶质量分数分别为 1.1%,1.3%,

1.7%,1.9%,2.1%,2.3%,2.5%,2.7%,通过比较带鱼蛋白水解度,从中选取最佳的蛋白酶质量分数.

1.3.3.5　酶解 pH 值对脱脂带鱼粉酶解效果的影响　在底物质量分数为 5.0%,蛋白酶质量分数为 2.5%,酶解温度为 50 ℃,酶解时间为 180 min 的条件下,用浓度为 2.0 mol/L 的 NaOH 溶液调节 pH 值,设置酶解 pH 值分别为 6.5,7.0,7.5,8.0,8.5,9.0,9.5,通过比较带鱼蛋白水解度,从中选取最佳的酶解 pH 值.

1.3.4　响应面法优化试验

在单因素试验的基础上,利用 Design Expert 8.0.6.0 响应面软件,选择底物质量分数(X_1)、蛋白酶质量分数(X_2)、酶解 pH 值(X_3)、酶解温度(X_4)、酶解时间(X_5)5 个因素为响应面优化试验设计中的关键因素,以带鱼蛋白水解度(Y)为响应值,进行带鱼蛋白酶解工艺条件的优化,同时,绘制响应面图和等高线图,分析各因素间的交互作用. 响应面自变量因素编码和水平见表 1.

表 1　响应面自变量因素编码和水平表

Table 1　Factors encoding and levels table in response surface methodology

水平	因素				
	X_1/%	X_2/%	X_3	X_4/℃	X_5/min
−1	4.5	2.4	7.5	55	120
0	5.0	2.5	8.0	60	150
1	5.5	2.6	8.5	65	180

1.4　数据处理与分析

每个实验均重复进行 3 次,所得数据用 Origin 8.0 软件进行统计和方差分析(ANOVA),结果用(平均值 ± 标准误差)表示,并采用回归分析确定 5% 可信区间的显著性差异($P<0.05$). 利用 Microsoft Excel 2010 软件绘图,图中数据添加误差线. 响应面试验采用 Design Expert 8.0.6.0 软件对数据进行回归分析.

2　结果与分析

2.1　最佳蛋白酶筛选结果

不同蛋白酶对脱脂带鱼粉酶解效果的影响如图 1 所示. 由于不同蛋白酶的切割位点和专一性不同,所以不同蛋白酶酶解蛋白质产生的多肽也会不同. 由图 1 可以看出,脱脂带鱼粉自溶、风味蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、复合蛋白酶、胰蛋白酶、碱性蛋白酶对应的带鱼蛋白水解度依次为 3.94%,9.93%,13.37%,14.12%,17.03%,18.87%,21.54%,这表明经碱性蛋白酶酶解脱脂带鱼粉后,带鱼蛋白水解度最大,酶解效果最好,这再次验证了碱性蛋白酶应用于海洋生物蛋白提取的优势. 因此,选取碱性蛋白酶作为酶解脱脂带鱼粉的最佳蛋白酶.

2.2　单因素试验结果分析

2.2.1　底物质量分数对脱脂带鱼粉酶解效果的影响分析

底物质量分数对脱脂带鱼粉酶解效果的影响如图 2 所示. 由图 2 可以看出,当底物质量分数从 4.0% 增加到 5.0% 时,带鱼蛋白水解度从 14.71% 增加到 15.18%;当底物质量分数从 5.0% 继续增加到 7.0% 时,带鱼蛋白水解度从 15.18% 减少到 12.14%. 这说明当底物质量分数为 5.0% 时,酶解效果最好,带鱼蛋白水解度

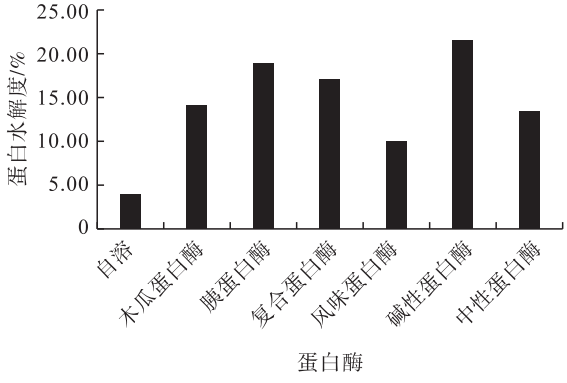


图 1　不同蛋白酶对脱脂带鱼粉酶解效果的影响

Fig. 1　Effect of different proteases on the hydrolysis of defatted hairtail meal

最大(为 15.18%).这可能是因为酶解反应过程中水必须作为反应底物参与整个带鱼蛋白酶解过程,加水量的多少直接影响带鱼蛋白酶解生成氨基酸和多肽,但这并不意味着加水量越多越好.因此,选取底物质量分数 5.0% 作为响应面试验设计的中心值.

2.2.2 酶解温度对脱脂带鱼粉蛋白酶解效果的影响分析

酶解温度对脱脂带鱼粉酶解效果的影响如图 3 所示.由图 3 可以看出,当酶解温度从 40 ℃ 升高到 60 ℃ 时,带鱼蛋白水解度从 33.60% 增加到 35.56%;当酶解温度从 60 ℃ 继续升高到 75 ℃ 时,带鱼蛋白水解度从 35.56% 减少到 32.78%.这说明当酶解温度为 60 ℃时,酶解效果最好,带鱼蛋白水解度最大(为 35.56%).这可能是因为酶解温度是决定酶催化活性的重要参数之一,温度过高或过低均会抑制酶活性甚至使酶失活,导致酶解效果变差[14].因此,选取酶解温度 60 ℃ 作为响应面试验设计的中心值.

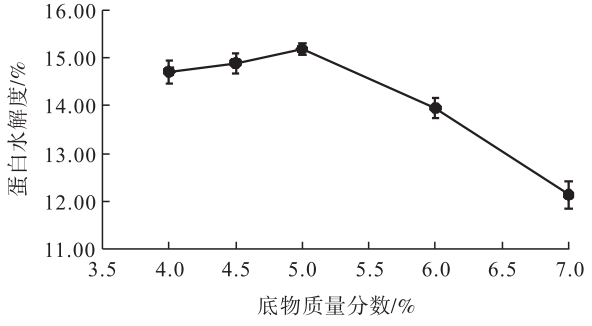


图 2 底物质量分数对脱脂带鱼粉酶解效果的影响

Fig. 2 Effect of substrate mass fraction on the hydrolysis of defatted hairtail meal

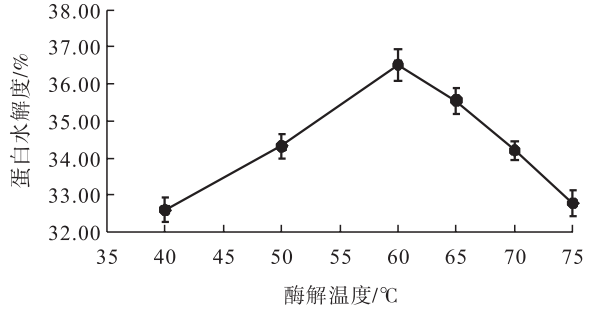


图 3 酶解温度对脱脂带鱼粉酶解效果的影响

Fig. 3 Effect of hydrolysis temperature on the hydrolysis of defatted hairtail meal

2.2.3 酶解时间对脱脂带鱼粉酶解效果的影响分析

酶解时间对脱脂带鱼粉酶解效果的影响如图 4 所示.由图 4 可以看出,当酶解时间从 30 min增加到 150 min 时,带鱼蛋白水解度从 15.28% 增加到 21.21%;当酶解时间从150 min 增加到 210 min 时,带鱼蛋白水解度变化很小.应当承认,酶解时间越长酶解得越彻底,但酶解时间过长会产生苦味氨基酸,且造成能源的严重浪费[15].因此,选取酶解时间 150 min 作为响应面试验设计的中心值.

2.2.4 蛋白酶质量分数对脱脂带鱼粉酶解效果的影响分析

蛋白酶质量分数对脱脂带鱼粉酶解效果的影响如图 5 所示.由图 5 可以看出,当蛋白酶质量分数从 1.3% 增加到 2.5% 时,带鱼蛋白水解度从 29.37% 增加到 35.94%;当蛋白酶质量分数从 2.5% 继续增加到 2.7% 时,带鱼蛋白水解度从 35.94% 减少到 34.01%.这表明当蛋白酶质量分数为 2.5% 时,酶解效果最好,带鱼蛋白水解度最大(为 35.94%).这可能是因为在其他条件一定的情况下,随着蛋白酶质量分数的增加,蛋白酶与底物充分接触,带鱼蛋白水解度

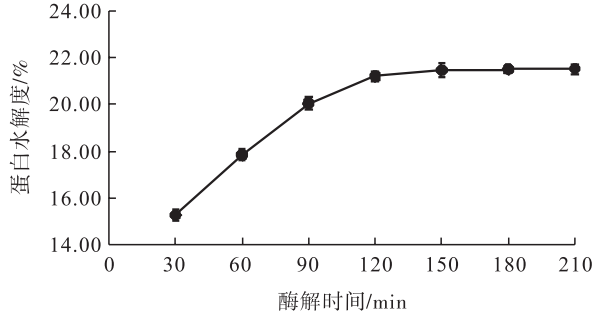


图 4 酶解时间对脱脂带鱼粉酶解效果的影响

Fig. 4 Effect of hydrolysis time on the hydrolysis of defatted hairtail meal

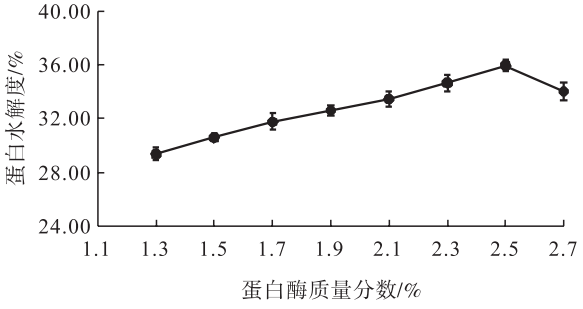


图 5　蛋白酶质量分数对脱脂带鱼粉酶解效果的影响

Fig. 5　Effect of protease mass fraction on the hydrolysis of defatted hairtail meal

呈上升的趋势,但当蛋白酶质量分数超过一定值时,过量的碱性蛋白酶可能会削弱酶对底物的作用. 另外,蛋白酶质量分数过大不仅造成蛋白酶的浪费,还会产生苦味氨基酸,影响酶解效果[16]. 因此,选取蛋白酶质量分数 2.5% 作为响应面试验设计的中心值.

2.2.5　酶解 pH 值对脱脂带鱼粉酶解效果的影响分析

酶解 pH 值对脱脂带鱼粉酶解效果的影响如图 6 所示. 由图 6 可以看出,当酶解 pH 值从 5.5 增加到 8.0 时,带鱼蛋白水解度从 12.25% 增加到 18.32%;当 pH 值从 8.0 继续增加到 8.5时,带鱼蛋白水解度从 18.32% 减少到 17.15%. 这表明当酶解 pH 值为 8.0 时,酶解效果最好,带鱼蛋白水解度最大(为 18.32%). 这可能是因为碱性蛋白酶酶活性很大程度上取决于酶解 pH 值,酶解 pH 值可显著影响碱性蛋白酶酶活性位点的氨基酸电离状态,而且酶解 pH 值在维持酶的正常构象方面也起着重要作用[17];另一方面,酶解 pH 值会影响脱脂带鱼粉的溶解度,酶解 pH 值过低会使带鱼蛋白之间的静电斥力减小而发生聚集沉降,进一步影响带鱼蛋白水解度,而过高的酶解 pH 值又会使带鱼蛋白变性,黏度增大,影响带鱼蛋白的酶解过程. 酶解 pH 值过高或过低还会造成环境污染,加大生产成本. 因此,选取酶解 pH 值 8.0

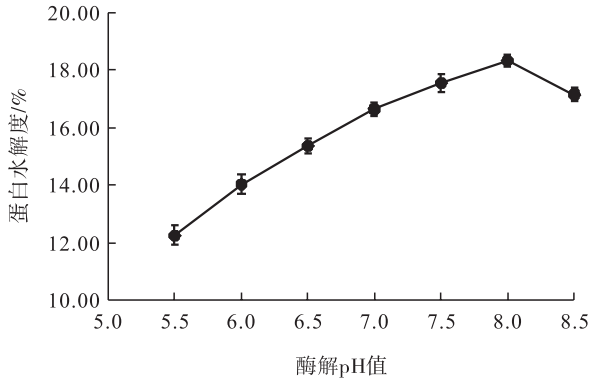


图 6　酶解 pH 值对脱脂带鱼粉酶解效果的影响

Fig. 6　Effect of hydrolysis pH value on the hydrolysis of defatted hairtail meal

作为响应面试验设计的中心值.

2.3　响应面优化试验结果分析

带鱼蛋白水解度的响应面设计方案和结果见表 2. 利用 Design Expert 8.0.6.0 响应面软件对表 2 所示试验结果进行回归分析,得到带鱼蛋白水解度对底物质量分数、蛋白酶质量分数、酶解 pH 值、酶解温度和酶解时间五因素的二次多项回归方程,即

$$Y = 38.21 + 0.27X_1 + 0.099X_2 + 0.22X_3 + 0.21X_4 + 0.11X_5 - 0.11X_1X_2 - 0.22X_1X_3 - 0.28X_1X_4 - 0.36X_1X_5 - 0.032X_2X_3 - 0.14X_2X_4 - 0.28X_2X_5 - 0.22X_3X_4 - 0.13X_3X_5 - 0.28X_4X_5 - 0.70X_1^2 - 0.60X_2^2 - 0.48X_3^2 - 0.72X_4^2 - 0.79X_5^2$$

带鱼蛋白水解度的回归模型方差分析见表 3. 由表 3 可知,带鱼蛋白水解度的二次多项式相关系数 $R^2 = 0.9378$,这表明带鱼蛋白水解度对 5 个自变量因素的二次多项回归模型具有良好的拟合度. 模型 $P < 0.0001$,表明带鱼蛋白水解度的回归模型极显著,可以较好地分析和预测带鱼蛋白酶解工艺条件. 此外,回归模型的一次项 X_1 是极显著的($P < 0.0001$),X_3,X_4 和 X_5 是显著的($P < 0.05$),X_2 是不显著的($P > 0.05$);二次项 X_1^2,X_2^2,X_3^2,X_4^2 和 X_5^2 均是显著的;交互项 X_1X_3,X_1X_4,X_1X_5,X_2X_5,X_3X_4 和

表 2 带鱼蛋白水解度的响应面设计方案和结果

Table 2 Response surface design and results of hairtail protein hydrolysis degree

试验号	因素 X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	蛋白水解度/%	试验号	因素 X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	蛋白水解度/%
1	−1	−1	0	0	0	36.63 ±0.03	24	0	1	1	0	0	37.15 ±0.03
2	1	−1	0	0	0	37.29 ±0.04	25	−1	0	0	−1	0	36.05 ±0.04
3	−1	1	0	0	0	36.99 ±0.04	26	1	0	0	−1	0	37.26 ±0.03
4	1	1	0	0	0	37.21 ±0.02	27	−1	0	0	1	0	36.66 ±0.04
5	0	0	−1	−1	0	36.25 ±0.03	28	1	0	0	1	0	36.75 ±0.05
6	0	0	1	−1	0	37.29 ±0.06	29	0	0	−1	0	−1	36.78 ±0.02
7	0	0	−1	1	0	37.22 ±0.05	30	0	0	1	0	−1	37.23 ±0.07
8	0	0	1	1	0	37.38 ±0.02	31	0	0	−1	0	1	36.96 ±0.06
9	0	−1	0	0	−1	36.01 ±0.04	32	0	0	1	0	1	36.91 ±0.02
10	0	1	0	0	−1	37.12 ±0.01	33	−1	0	0	0	−1	35.91 ±0.03
11	0	−1	0	0	1	36.88 ±0.02	34	1	0	0	0	−1	37.25 ±0.01
12	0	1	0	0	1	36.89 ±0.03	35	−1	0	0	0	1	36.94 ±0.01
13	−1	0	−1	0	0	36.22 ±0.03	36	1	0	0	0	1	36.85 ±0.03
14	1	0	−1	0	0	37.12 ±0.06	37	0	−1	0	−1	0	36.46 ±0.02
15	−1	0	1	0	0	37.36 ±0.07	38	0	1	0	−1	0	36.89 ±0.04
16	1	0	1	0	0	37.37 ±0.04	39	0	−1	0	1	0	37.23 ±0.04
17	0	0	0	−1	−1	36.02 ±0.02	40	0	1	0	1	0	37.08 ±0.02
18	0	0	0	1	−1	37.18 ±0.02	41	0	0	0	0	0	38.26 ±0.05
19	0	0	0	−1	1	36.89 ±0.05	42	0	0	0	0	0	38.19 ±0.07
20	0	0	0	1	1	36.93 ±0.01	43	0	0	0	0	0	38.11 ±0.04
21	0	−1	−1	0	0	36.96 ±0.02	44	0	0	0	0	0	38.33 ±0.03
22	0	1	−1	0	0	36.98 ±0.06	45	0	0	0	0	0	38.02 ±0.05
23	0	−1	1	0	0	37.26 ±0.03	46	0	0	0	0	0	38.36 ±0.03

表 3 带鱼蛋白水解度的回归模型方差分析

Table 3 Analysis of variance of regression model for the hydrolysis degree of hairtail protein

差异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	差异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	14.73	20	0.74	18.85	<0.000 1	X_3X_4	0.19	1	0.19	4.95	0.035 3
X_1	1.18	1	1.18	30.13	<0.000 1	X_3X_5	0.06	1	0.06	1.60	0.217 6
X_2	0.16	1	0.16	4.04	0.055 2	X_4X_5	0.31	1	0.31	8.03	0.009 0
X_3	0.75	1	0.75	19.15	0.000 2	X_1^2	4.24	1	4.24	108.47	<0.000 1
X_4	0.69	1	0.69	17.63	0.000 3	X_2^2	3.14	1	3.14	80.24	<0.000 1
X_5	0.19	1	0.19	4.90	0.036 2	X_3^2	2.03	1	2.03	51.86	<0.000 1
X_1X_2	0.05	1	0.05	1.24	0.276 3	X_4^2	4.57	1	4.57	116.93	<0.000 1
X_1X_3	0.20	1	0.20	5.07	0.033 4	X_5^2	5.44	1	5.44	139.17	<0.000 1
X_1X_4	0.31	1	0.31	8.03	0.009 0	残差	0.98	25	0.04		
X_1X_5	0.51	1	0.51	13.08	0.001 3	失拟	0.89	20	0.05	2.59	0.147 2
X_2X_3	0.00	1	0.00	0.11	0.745 0	纯误差	0.09	5	0.02	18.85	<0.000 1
X_2X_4	0.08	1	0.08	2.15	0.154 8	总和	15.70	45	0.74	30.13	<0.000 1
X_2X_5	0.30	1	0.30	7.74	0.010 1						

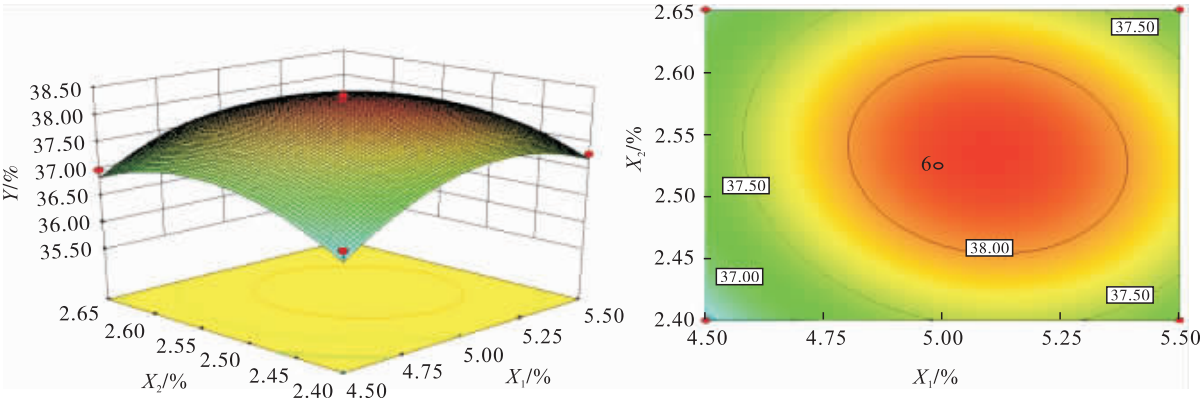
注:$P<0.001$ 表示极显著,$P<0.05$ 表示显著,$P>0.05$ 表示不显著.

X_4X_5 是显著的,X_1X_2,X_2X_3,X_2X_4 和 X_3X_5 是不显著的. 通过上述分析可知,二次多项回归模型显著,影响酶解效果的各因素对带鱼蛋白水解度的影响不是简单的线性关系,其中,底物质量

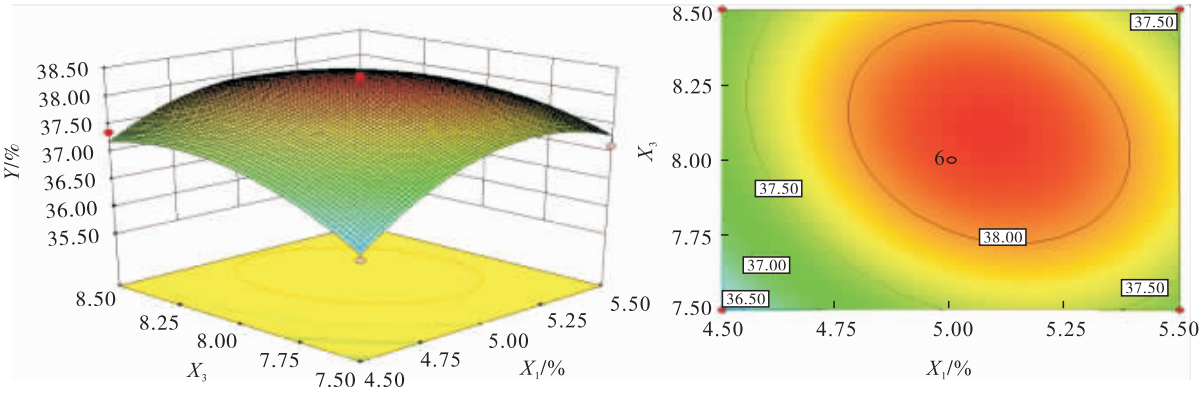
分数、酶解 pH 值、酶解温度和酶解时间是影响带鱼蛋白酶解工艺的重要因素.

根据带鱼蛋白水解度的回归模型,利用 Design Expert 8.0.6.0 响应面分析软件绘制各因素交互作用的响应曲面图和等高线图,如图 7 所示. 在响应曲面图中,对蛋白水解度影响越大的因素,其曲线变化趋势越大. 在等高线图中,轴向等高线越密集,说明该因素对蛋白水解度的影响越显著[18]. 从图 7 的响应曲面图可以看出,X_1,X_3,X_4,X_5 对蛋白水解度影响显著,X_2 对蛋白水解度影响不显著;从图 7 的等高线图可以看出,X_1X_3,X_1X_4,X_1X_5,X_2X_5,X_3X_4,X_4X_5 之间交互作用显著,X_1X_2,X_2X_3,X_2X_4,X_3X_5 之间交互作用不显著.

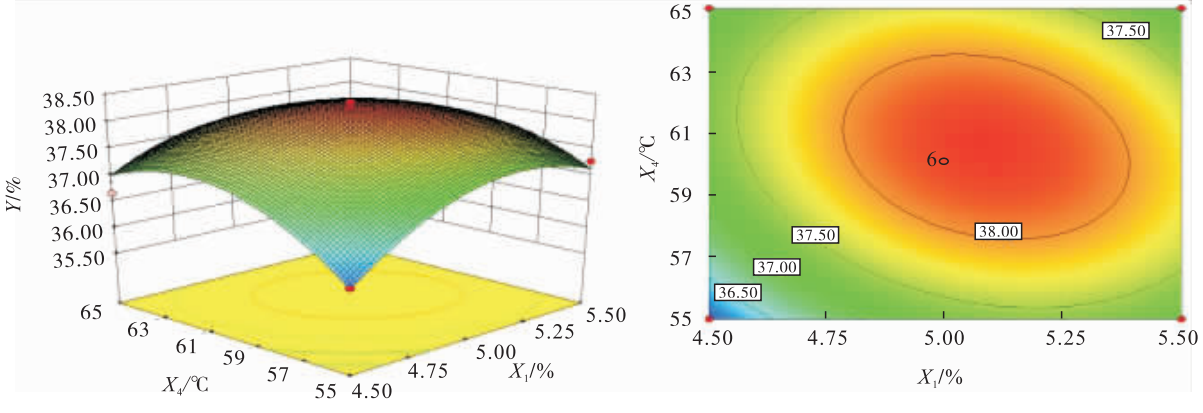
响应面优化试验结果表明,当底物质量分数为 5.29%,蛋白酶质量分数为 2.66%,酶解



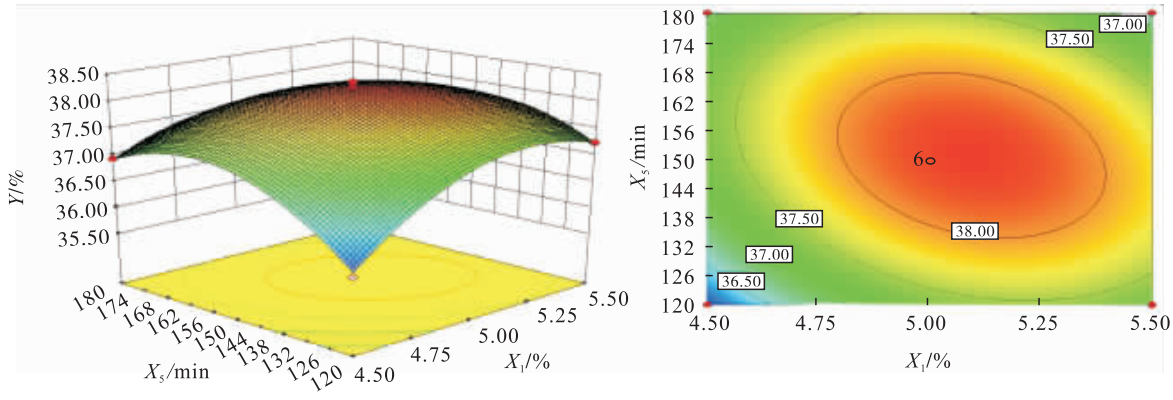
a) 底物质量分数与蛋白酶质量分数的交互作用



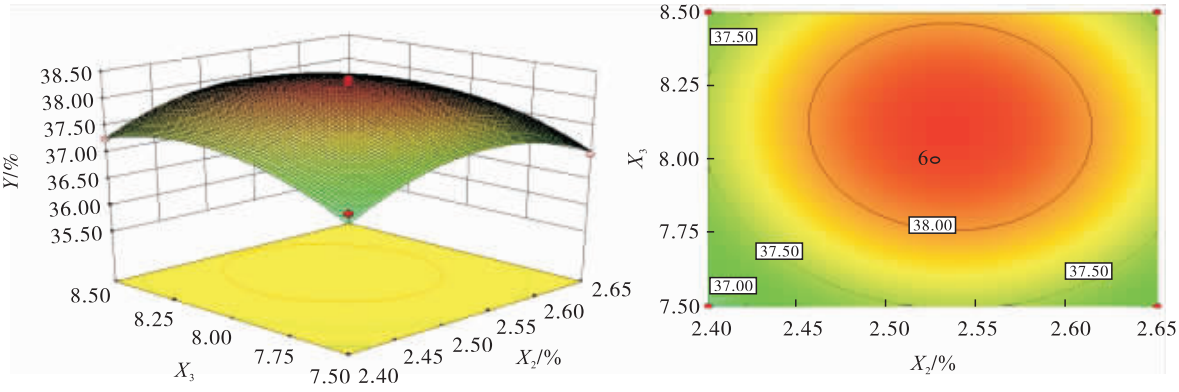
b) 底物质量分数与酶解pH值的交互作用



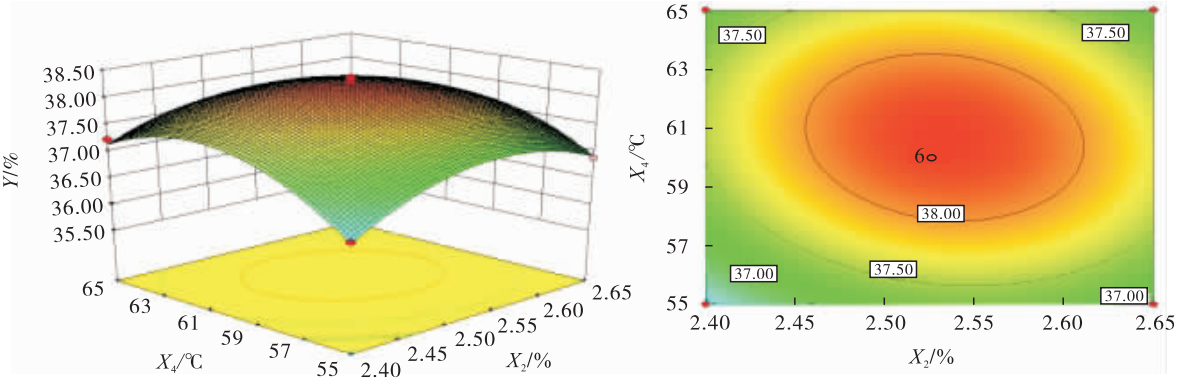
c) 底物质量分数与酶解温度的交互作用



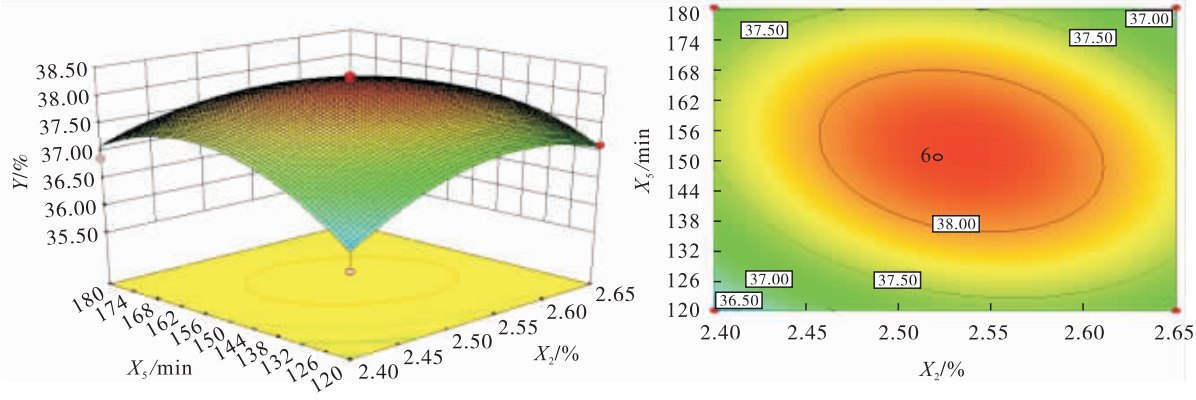
d) 底物质量分数与酶解时间的交互作用



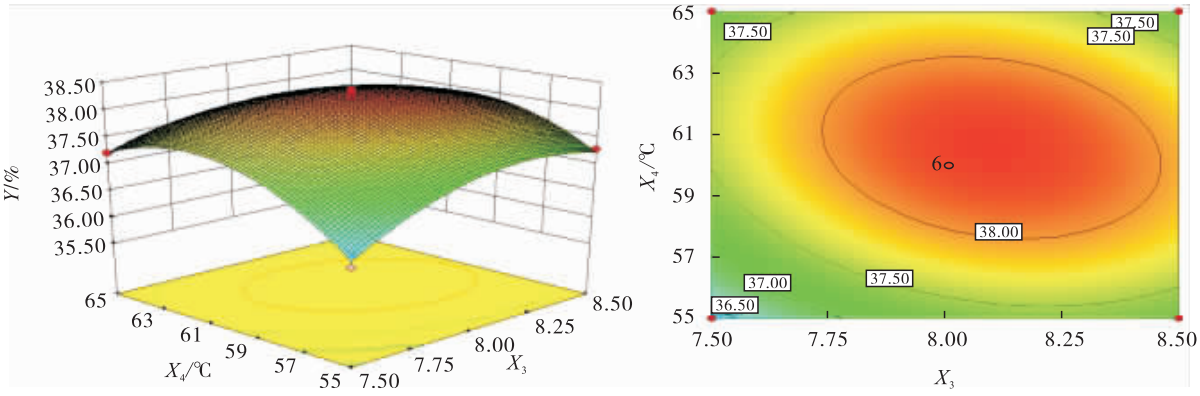
e) 蛋白酶质量分数与酶解pH值的交互作用



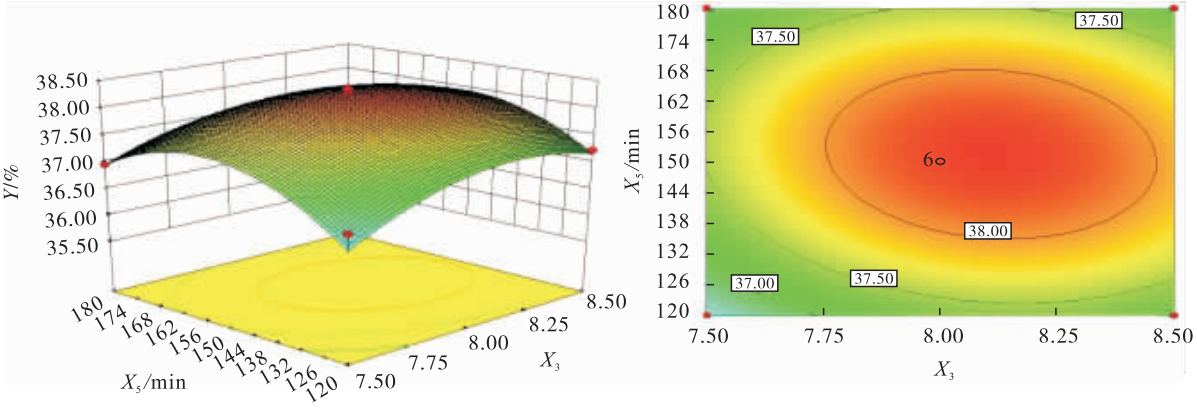
f) 蛋白酶质量分数与酶解温度的交互作用



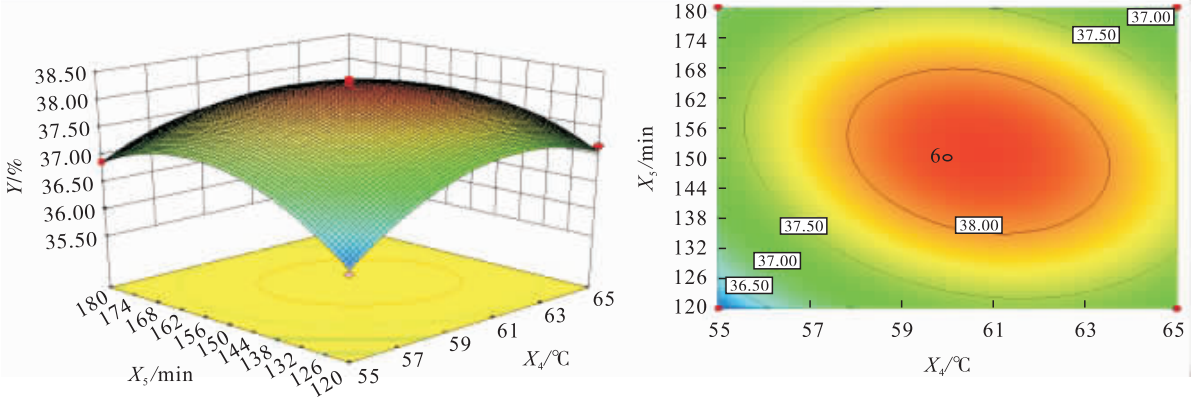
g) 蛋白酶质量分数与酶解时间的交互作用



h) 酶解pH值与酶解温度的交互作用



i) 酶解pH值与酶解时间的交互作用



j) 酶解温度与酶解时间的交互作用

图 7　各因素交互作用的响应曲面图和等高线图

Fig. 7　Response surface plots and contour plots for the interaction of various factors

pH 值为 8.29，酶解温度为 62.95 ℃，酶解时间为 167.69 min 时，理论上带鱼蛋白水解度最高，为 36.49%. 为了便于试验操作，将最优酶解工艺条件修正为底物质量分数为 5.3%，蛋白酶质量分数为 2.7%，酶解 pH 值为 8.3，酶解温度为 63 ℃，酶解时间为 168 min. 在该酶解条件下，进行了 3 次平行验证试验，得到带鱼蛋白水解度为 37.07%. 验证试验的结果与响应面优化试验回归模型预测值之间的差异不显著（$P>0.05$），说明该模型适用于带鱼蛋白酶解工艺的分析和预测.

3　结论

本文以带鱼为原材料，从 6 种蛋白酶中筛

选出碱性蛋白酶作为带鱼蛋白酶解的最佳蛋白酶,进而利用单因素试验和响应面试验优化了带鱼蛋白酶解的工艺条件. 结果表明:带鱼蛋白酶解的最佳工艺条件为底物质量分数 5.3%,蛋白酶质量分数2.7%,酶解 pH 值8.3,酶解温度 63 ℃,酶解时间 168 min. 在此条件下,带鱼蛋白水解度达到 37.07%,与响应面优化试验回归模型预测值基本一致. 该研究有望减少带鱼蛋白资源的浪费,为使用碱性蛋白酶酶解带鱼蛋白获取带鱼蛋白肽提供了参考,为开发带鱼蛋白肽粉等海洋功能性蛋白产品提供了借鉴.

参考文献:

[1] 刘云国,李八方,汪东风,等. 海洋生物活性肽研究进展[J]. 中国海洋药物,2005,24(3):52.

[2] HARNEDY P A, FITZGERALD R J. Bioactive peptides from marine processingwaste and shellfish: A review[J]. Journal of Functional Foods, 2012,4(1):6.

[3] 崔欣,效梅,安立龙,等. 海洋生物活性肽的生理功能及其应用研究进展[J]. 广东农业科学,2013,40(9):103.

[5] GILDBERG A, ARNESEN J A, CARLEHOG M M. Utilisation of cod backbone by biochemical fractionation[J]. Process Biochemistry, 2002, 38:475.

[4] 管华诗,韩玉谦,冯晓梅. 海洋活性多肽的研究进展[J]. 中国海洋大学学报,2004,34(5):761.

[6] 邱秀宝,袁影,戴宏,等. 嗜碱性芽孢杆菌碱蛋白酶的研究Ⅱ:诱变株选育及产酶条件[J]. 微生物学报,1990,30(2):129.

[7] GBOGOURI G A, LINDER M, FANNI J, et al. Influence of hydrolysis degree on the functional properties of salmon byproducts hydrolysates [J]. Journal of Food Science, 2004, 69(8): 615.

[8] 张群飞,徐大伦,杨文鸽. 响应面法优化碱性蛋白酶酶解虾籽的工艺条件[J]. 核农学报,2014,28(5):876.

[9] OVISSIPOUR M, ABEDIAN K A, MOTAMEDZADEGAN A, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Yellowfin tuna (*Thunnus albacares*)[J]. Food and Bioprocess Technology,2012,5(2):696.

[10] ADLER-NISSEN J. Enzymic hydrolysis of food proteins[M]. London: Elsevier Applied Science Publishers,1986:116.

[11] 林慧敏. 带鱼下脚料酶解小肽亚铁螯合物结构鉴定及其生物活性研究[D]. 福州:福建农林大学,2012.

[12] 毋瑾超,汪依凡,方长富. 鲢鱼降血压肽的酶解条件[J]. 湛江海洋大学学报(自然科学),2006(1):67.

[13] 王雪芹,邢荣娥,刘松,等. 鲐鱼蛋白酶解工艺优化及其抗氧化活性测定[J]. 现代食品科技,2013,29(5):1023.

[14] 朱少娟,施用晖,乐国伟. 超声波对胰蛋白酶水解酪蛋白的影响[J]. 食品与生物技术学报,2005,24(2):116.

[15] 李学鹏,刘晏玮,高郡焕. 美拉德反应改良四角蛤蜊酶解液的风味[J]. 食品科学,2018,39(16):82.

[16] 魏鉴腾,刘永峰. 酶解法制备鱼籽多肽的工艺研究[J]. 食品工业,2015,36(1):71.

[17] KRAJEWSKA B. Application of chitin and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review [J]. Enzyme and Microbial Technology,2004,35(2):126.

[18] WETTASINGHE M, VASANTHAN T, TEMELLI F, et al. Volatiles from roasted by products of the poultry processing industry[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2000, 48(8): 3485.