

响应面法优化草鱼皮中有效抗氧化物质提取工艺

吴晓洒¹, 蔡路昀^{1,2,*}, 黄作庆³, 苏 洵¹, 冷利萍¹, 宋 卓¹, 励建荣^{1,2,*}

(1.渤海大学食品科学与工程学院, 生鲜农产品贮藏加工及安全控制技术
国家地方联合工程研究中心, 辽宁省食品安全重点实验室, 辽宁锦州 121013;

2.西南大学食品科学学院, 重庆北碚 400716;

3.大连天宝绿色食品股份有限公司, 辽宁大连 116600)

摘要:以草鱼皮为原料, 采用六种蛋白酶酶解, 以 DPPH 自由基清除率和水解度为指标, 筛选两种较优的酶, 再通过响应面分别优化两种酶制备抗氧化酶解液的工艺条件, 并在此基础上进行双酶酶解实验, 确定酶解草鱼皮的最优工艺。结果表明: 碱性蛋白酶酶解草鱼皮的最适条件为加酶量 6.3%、料水比 1:40.6、温度 51.3 °C、时间 115.1 min, 此时清除率最高为 54.98%。木瓜蛋白酶最适条件为加酶量 4.6%、料水比 1:41.2、温度 50.5 °C、时间 133.0 min, 清除率最高为 41.06%。采用分步酶解(先碱性蛋白酶后木瓜蛋白酶)得到的酶解液 DPPH 自由基清除能力最高为 92.07%, 明显优于单酶水解和混合酶解的效果。

关键词:草鱼皮, 响应面, 酶解, 提取, 抗氧化

Optimization of enzymolysis conditions for antioxidant components from Grass Carp Skin by response surface methodology

WU Xiao-sa¹, CAI Lu-yun^{1,2,*}, HUANG Zuo-qing³, SU Xun¹, LENG Li-ping¹, SONG Zhuo¹, LI Jian-rong^{1,2,*}

(1.College of Food Science and Engineering of Bohai University, National & Local Joint Engineering Research Center of Storage, Processing and Safety Control Technology for Fresh Agricultural and Aquatic Products, Food Safety Key Lab of Liaoning Province, Jinzhou, Liaoning, 121013, China)

2.College of Food Science, Southwest University, Beipei 400716, China;

3.DaLian TianBao Green Foods Co., Ltd, Dalian 116600, China)

Abstract: Six kinds of proteases were used to hydrolyze grass carp skin in order to select two optimum proteases by determining DPPH radical scavenging capacity and degree of hydrolysis (DH). Response surface methodology (RSM) was used to optimize hydrolysis conditions of two optimum proteases. Based on the results of RSM, the double enzyme hydrolysis tests were carried out to find out the best hydrolysis conditions. The results showed that hydrolysis conditions for alcalase were enzyme addition amount of 6.3%, material-liquid ratio of 1:40.6, hydrolysis temperature of 51.3 °C, and hydrolysis time of 115.1 min, and the scavenging activity on DPPH free radicals under the above conditions reached 54.98%. The optimal hydrolysis conditions for papain were 4.6%, 1:41.2, 50.5 °C and 133.0 min, and the scavenging activity reached 41.06%. By combined and sequential use of alcalase followed by papain, the DPPH scavenging activity was 92.07%, which was more effective than either of them.

Key words: Grass carp skin; enzymatic hydrolysis; response surface methodology; extraction; antioxidant activity

中图分类号: TS254.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)19-0202-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.19.034

自由基是机体氧化反应过程中产生的有害化合物, 具有较强的氧化性, 一旦平衡遭到破坏, 造成机体

在分子水平、细胞水平及组织水平严重损伤, 进而加速机体衰老并诱发各种慢性疾病^[1], 而抗氧化剂可清除

收稿日期: 2014-12-15

作者简介: 吴晓洒(1990-), 女, 硕士, 研究方向: 水产品加工与贮藏, E-mail: wxs090436@163.com。

* 通讯作者: 蔡路昀(1981-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 水产品加工, E-mail: clyun2007@163.com。

励建荣(1964-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 水产品 and 果蔬贮藏加工、食品安全, E-mail: lijrb6491@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金(31401478; 31471639); 中国博士后基金面上项目(2015M570760); “十二五”国家科技支撑计划(2012BAD29B06); 辽宁省科技攻关项目(201500098)。

自由基,缓解一系列的氧化反应。目前食品行业普遍使用的抗氧化剂多为化学合成物质,它们本身具有一定的毒副作用,对人们的身体健康存在一定的潜在危害,因此在使用上受到严格的控制,所以对天然高效的食品抗氧化剂的开发利用显得尤为重要。

草鱼(*Ctenopharyngodon idella*),中国四大家鱼之一,属鲤形目鲤科,具有生长快、产量高、肉质好、味鲜美等特点,因而备受消费者的青睐^[2]。而草鱼加工过程会产生约占鱼体70%~85%的下脚料,主要包括:鱼头、鱼皮、鱼骨、鱼鳞和鱼内脏,其中鱼皮和鱼骨约30%^[3]。这些废弃物通常被丢弃或加工成饲料等,有效利用率较低。近年来,对水产下脚料的开发利用已成为研究热点之一,现已从罗非鱼鳞^[4]、草鱼肉^[5]、黄花鱼肉^[6]、比目鱼肉^[7]、鳕鱼肉^[8]、金枪鱼皮^[9]、黄缘盒龟肉^[10]等原料中提取出不同的抗氧化肽,而关于草鱼皮中抗氧化肽的提取未见报道。研究表明,采用酶法制备的抗氧化肽具有抗氧化活性强和安全性高等特点。鉴于此,本实验采用酶法从草鱼皮中提取有效抗氧化物质,分别利用响应面法优化单酶酶解参数,然后基于响应面实验结果,以自由基清除率为指标,比较双酶酶解(包括混合酶解和分步酶解)与单酶效果,得出最佳酶解条件。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新鲜草鱼 锦州林西水产批发市场。

碱性蛋白酶(20万U/g)、木瓜蛋白酶(20万U/g)、复合蛋白酶(20万U/g)、中性蛋白酶(20万U/g)风味蛋白酶(20万U/g)、胃蛋白酶(50万U/g) 江苏锐阳生物有限公司;1,1-二苯基-2-三硝基苯酚(DPPH) 美国Sigma公司;其余试剂均为分析纯 锦州国药器械化玻有限公司。

PL602-L电子天平 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;Milli-Q超纯水系统 美国Millipore公司;高速冷冻离心机 Thermo公司;UV2550紫外分光光度计 日本岛津公司;超声波清洗器 上海科导超声仪器有限公司;Free Zone2.5真空冷冻干燥机 美国Labconco公司。

1.2 实验方法

1.2.1 草鱼皮酶解物的制备工艺 新鲜草鱼→取鱼皮洗净→冷冻干燥→剪刀剪碎→按比例加异丙醇→沥干→在一定温度下磁力搅拌酶解→95℃水浴灭酶10min→10000 r/min,4℃离心20min取上清液→酶解液→冻干成粉末^[10]。

1.2.2 蛋白酶的选择 参考Ko等^[7]和Ren等^[5]的研究,分别选用碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶、复合蛋白酶、中性蛋白酶、风味蛋白酶和胃蛋白酶水解草鱼皮。按表1设计,分别在各蛋白酶的适宜条件下水解,以DPPH清除率为主要衡量指标,水解度(DH)为辅助指标筛选较优酶。

1.2.3 DPPH自由基清除率的测定 用95%乙醇配制浓度为0.1 mmol/L的DPPH·溶液,避光保存。取2.5 mL DPPH·溶液与等体积的5 mg/mL待测液(冷冻干燥的粉末用超纯水溶解)混合摇匀,暗室常温静

置30 min,在517 nm下以2.5 mL的超纯水和等体积的95%乙醇混合液为对照测吸光度^[11-12]。DPPH自由基清除率R(%)按公式(1)计算:

$$R(\%) = (A_c - A_i + A_j) / A_c \times 100 \quad \text{式(1)}$$

式中: A_c 为2.5 mL DPPH溶液+2.5 mL超纯水的吸光度; A_i 为2.5 mL DPPH溶液+2.5 mL样品液的吸光度; A_j 为2.5 mL样品液+2.5 mL 95%乙醇的吸光度。

表1 制备草鱼皮酶解液的条件

Table 1 Parameters for enzymatic hydrolysis of grass carp skin

酶	加酶量 (%) *	料水比	温度 (°C)	时间 (min)	pH
碱性蛋白酶	5	1:40	50	180	8.5
木瓜蛋白酶	5	1:40	50	180	6.5
复合蛋白酶	5	1:40	50	180	7.0
中性蛋白酶	5	1:40	50	180	7.0
风味蛋白酶	5	1:40	50	180	6.5
胃蛋白酶	2	1:40	39	180	2.0

注:*加酶量(%)是酶与干基底物的质量比。

1.2.4 水解度的测定 采用甲醛滴定法测蛋白水解度^[13],取灭酶后的水解液5.0 mL于200 mL烧杯中,加60 mL超纯水,用0.05 mol/L的NaOH标准溶液滴定至pH8.2,加10.0 mL的甲醛溶液(含量为36%~40%),迅速用0.05 mol/L的NaOH标准溶液滴定至pH9.2,记录消耗NaOH溶液的体积 V_1 ,取5 mL超纯水代替水解液重复以上操作,记录消耗NaOH溶液的体积 V_0 ,按公式(2)计算鱼皮蛋白酶解的DH。

$$DH(\%) = (V_1 - V_0) \times c \times 0.014 \times [10^7 / (Y \times V \times h)] \quad \text{式(2)}$$

式中: c 为NaOH标准滴定溶液的浓度 mol/L; V_1 为滴定样品消耗的NaOH标准滴定溶液的体积 mL; V_0 为滴定空白样品消耗的NaOH标准滴定溶液的体积 mL; Y 为样品溶液的蛋白质量浓度 g/100 mL; h 为干物质的总氮含量 mg/100 g。

1.2.5 响应面实验设计 响应面法是利用合理的实验设计,采用多元二次回归方程拟合因素与响应值之间的函数关系,通过对回归方程的分析来寻求最优工艺参数,解决多变量问题的一种统计方法^[14-16]。根据蛋白酶选择结果对较优的酶分别采用Box-Behnken中心组合设计,参照前期单因素实验结果选取加酶量(A)、料水比(B)、温度(C)、时间(D)为变量,展开四因素三水平的响应面实验,设计水平见表2和表3。

表2 碱性蛋白酶响应面因素及水平表

Table 2 Factor and levels of response surface methodology for alcalase			
水平	-1	0	1
A_1 加酶量(%, w/w)	2	6	10
B_1 料水比(w/v)	1:30	1:40	1:50
C_1 温度(°C)	40	1:50	60
D_1 时间(min)	60	110	160

表3 木瓜蛋白酶响应面因素及水平表

Table 3 Factor and levels of response surface methodology for papain

水平	-1	0	1
A ₂ 加酶量(% ,w/w)	1	4	7
B ₂ 料水比(w/v)	1:30	1:40	1:50
C ₂ 温度(℃)	40	1:50	60
D ₂ 时间(min)	60	120	180

1.2.6 最优酶解工艺条件的确定 选取较优酶进行双酶酶解实验,包括混合酶解和分步酶解。混合酶解即两种酶混合后分别在其中一种酶的最适条件下酶解。分步酶解即先加入一种酶,在其最适条件下酶解,灭酶后再加入另一种酶在其最适条件下酶解。以 DPPH 自由基清除率为指标比较单酶水解和双酶酶解的效果,得到草鱼皮蛋白酶解的最佳酶解工艺。

1.3 数据处理与分析

采用 Design-Expert 8.0.6 和 origin pro 8 软件进行数据处理和分析。

2 结果与分析

2.1 蛋白酶的选择

不同蛋白酶作用蛋白质对其水解度以及有效抗氧化成分的组成有不同的影响,因此,选用蛋白酶的种类至关重要。目前,国内外用于评价抗氧化活性指标各异,包括 DPPH 自由基清除实验、羟自由基清除实验、超氧阴离子自由基清除实验、ABTS 自由基清除实验、β-胡萝卜素漂白实验、三价铁离子还原实验等。由于 DPPH 自由基清除实验相对独立、简单、快速、经济、可重现性好,因此,采用 DPPH 自由基清除实验评估 6 种酶解物的抗氧化活性。如图 1 所示,6 种蛋白酶解液(5 mg/mL)对 DPPH 自由基清除能力有明显差异,碱性蛋白酶解液的清除效果最高(45.34%),木瓜蛋白酶次之(41.08%),其余蛋白酶解液清除能力一般。蛋白酶解原液的 DH 差异不大,对比分析,酶解液的水解度与其抗氧化活性不存在明显的对应关系。由于每种蛋白酶作用不同,相同浓度下的不同酶解液的氨基酸组成和多肽大小也不相同,最终产物的有效抗氧化能力也不尽相

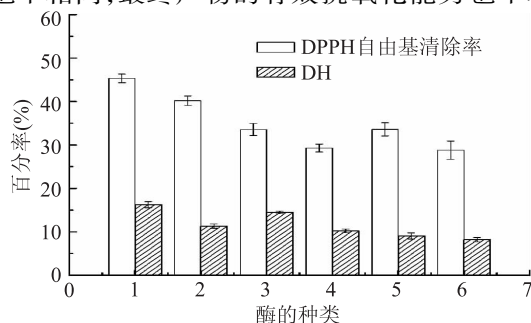


图1 六种酶解原液的 DH 和 5 mg/mL 酶解液的自由基清除能力

Fig.1 Radical scavenging abilities and DH of hydrolysates by six proteases

注:1.碱性蛋白酶;2.木瓜蛋白酶;3.复合蛋白酶;
4.中性蛋白酶;5.风味蛋白酶;6.胃蛋白酶。

同。综合考虑,选用碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶进行下一步的响应面设计,分别优化两种酶的最适水解条件。

2.2 碱性蛋白酶水解条件的优化

通过软件 Design-Expert 8.0.6 进行数据分析,碱性蛋白酶法处理建立二次回归方程: DPPH 自由基清除率 = 53.50 + 2.45A₁ + 2.36B₁ + 3.82C₁ + 3.78D₁ - 3.84A₁B₁ - 1.40A₁C₁ + 3.09A₁D₁ - 5.16B₁C₁ - 0.36B₁D₁ - 5.25C₁D₁ - 16.75A₁² - 12.30B₁² - 11.35C₁² - 16.20D₁², 响应面设计及结果见表 4,方差分析见表 5。方差分析表明,本实验所选用的模型显著($p = 0.0005$),失拟项不显著($p = 0.1382 > 0.05$),该模型 $R^2 = 0.9007$,说明该模型方程回归效果较好,可信度较高,实验误差小。因此可用来评估碱性蛋白酶对草鱼鱼皮的酶解。

表4 碱性蛋白酶响应面设计及结果

Table 4 Experimental design and results for response surface analysis for alcalase

实验号	A ₁	B ₁	C ₁	D ₁	DPPH 自由基清除率(%)
1	-1	-1	0	0	20.08
2	1	-1	0	0	28.67
3	-1	1	0	0	27.62
4	1	1	0	0	20.85
5	0	0	-1	-1	12.83
6	0	0	1	-1	32.10
7	0	0	-1	1	30.00
8	0	0	1	1	28.25
9	-1	0	0	-1	18.50
10	1	0	0	-1	21.66
11	-1	0	0	1	20.42
12	1	0	0	1	35.92
13	0	-1	-1	0	20.08
14	0	1	-1	0	34.85
15	0	-1	1	0	42.33
16	0	1	1	0	36.47
17	-1	0	-1	0	17.22
18	1	0	-1	0	24.47
19	-1	0	1	0	22.21
20	1	0	1	0	23.88
21	0	-1	0	-1	12.29
22	0	1	0	-1	22.87
23	0	-1	0	1	20.96
24	0	1	0	1	30.09
25	0	0	0	0	53.42
26	0	0	0	0	51.29
27	0	0	0	0	54.78

结果显示,各因素对 DPPH 自由基清除率的影响不是简单的线性关系。由 F 值可知,酶解温度和时间对结果的影响比较大,料水比和加酶量影响较小。对上述回归方程求解得: A₁ = 0.071, B₁ = 0.057, C₁ = 0.127, D₁ = 0.102, 清除率最高,即碱性蛋白酶酶解液

清除 DPPH 自由基最高的条件为:加酶量 6.3%、料水比 1:40.6、温度 51.3 ℃、时间 115.1 min,此时清除率最高为 54.09%。为了验证模型的准确性,在其最优条件下进行实际验证实验,测得清除率为 54.98%,实际值和最佳理论值误差在 1% 以内,可见此模型能够很好的预测碱性蛋白酶酶解液清除 DPPH 自由基。

表 5 二次响应面回归模型方差分析

Table 5 Variance analysis of regression equation

变异来源	平方和	均方	F	p	显著性
A ₁	72.03	72.03	2.51	0.1391	
B ₁	66.93	66.93	2.33	0.1526	
C ₁	174.73	174.73	6.09	0.0296	*
D ₁	171.69	171.69	5.98	0.0308	*
A ₁ B ₁	58.98	58.98	2.06	0.1772	
A ₁ C ₁	7.78	7.78	0.27	0.6120	
A ₁ D ₁	38.07	38.07	1.33	0.2718	
B ₁ C ₁	106.40	106.40	3.71	0.0782	
B ₁ D ₁	0.53	0.53	0.018	0.8946	
C ₁ D ₁	110.46	110.46	3.85	0.0734	
A ₁ ²	1496.93	1496.93	52.17	<0.0001	**
B ₁ ²	806.33	806.33	28.10	0.0002	**
C ₁ ²	687.61	687.61	23.96	0.0004	**
D ₁ ²	1400.47	1400.47	48.80	<0.0001	**
残差	344.35	28.70			
失拟	334.26	33.43	6.63	0.1382	
误差	10.09	5.04			
模型	3121.94	223.00	7.77	0.0005	**

注: * 表示差异显著 ($p < 0.05$); ** 表示差异极显著 ($p < 0.001$),表 7 同。

2.3 木瓜蛋白酶水解条件的优化

软件分析木瓜蛋白酶法处理建立二次回归方程: DPPH 自由基清除率 = $39.68 + 3.38A_2 + 1.47B_2 + 1.36C_2 + 4.46D_2 + 0.44A_2B_2 - 2.57A_2C_2 + 0.16A_2D_2 + 0.35B_2C_2 - 0.050B_2D_2 - 1.99C_2D_2 - 9.49A_2^2 - 7.71B_2^2 - 5.49C_2^2 - 11.05D_2^2$ 。响应面设计及结果见表 6,方差分析见表 7。方差分析表明,本实验所选用的模型显著 ($p = 0.0003$),失拟项不显著 ($p = 0.1432 > 0.05$),该模型 $R^2 = 0.9086$,说明该模型拟合程度良好,可信度较高,实验误差小。因此可用来预测各因素对木瓜蛋白酶酶解作用的影响。

表中结果显示,各因素对 DPPH 自由基清除率的影响不是简单的线性关系。由 F 值可知,加酶量和时间对结果的影响比较大,料水比和温度影响较小。对上述回归方程求解得: $A_2 = 0.191$, $B_2 = 0.116$, $C_2 = 0.054$, $D_2 = 0.218$,清除率最高,即木瓜蛋白酶酶解液清除 DPPH 自由基最高的条件为:加酶量 4.6%、料水比 1:41.2、温度 50.5 ℃、时间 133.0 min,此时清除率最高为 40.51%。为了验证模型的准确性,在其最优条件下进行实际验证实验,测得清除率为 41.06%,实际值和最佳理论值误差在 1% 以内,可见此模型能够很好的预测木瓜蛋白酶酶解液清除 DPPH 自由基的能力。

表 6 木瓜蛋白酶响应面设计及结果

Table 6 Experimental design and results for response surface analysis for papain

实验号	A ₂	B ₂	C ₂	D ₂	DPPH 自由基清除率 (%)
1	-1	-1	0	0	18.27
2	1	-1	0	0	20.71
3	-1	1	0	0	21.63
4	1	1	0	0	25.83
5	0	0	-1	-1	13.68
6	0	0	1	-1	23.57
7	0	0	-1	1	25.43
8	0	0	1	1	27.36
9	-1	0	0	-1	12.69
10	1	0	0	-1	19.84
11	-1	0	0	1	22.71
12	1	0	0	1	30.49
13	0	-1	-1	0	26.03
14	0	1	-1	0	29.38
15	0	-1	1	0	27.93
16	0	1	1	0	32.69
17	-1	0	-1	0	15.43
18	1	0	-1	0	30.07
19	-1	0	1	0	20.20
20	1	0	1	0	24.58
21	0	-1	0	-1	14.37
22	0	1	0	-1	15.02
23	0	-1	0	1	23.14
24	0	1	0	1	23.59
25	0	0	0	0	39.35
26	0	0	0	0	37.42
27	0	0	0	0	40.68

表 7 二次响应面回归模型方差分析

Table 7 Variance analysis of regression equation

变异来源	平方和	均方	F	p	显著性
A ₂	137.30	137.30	11.87	0.0048	**
B ₂	26.08	26.08	2.25	0.1590	
C ₂	22.17	22.17	1.92	0.1914	
D ₂	238.97	238.97	20.66	0.0007	**
A ₂ B ₂	0.77	0.77	0.067	0.8002	
A ₂ C ₂	26.32	26.32	2.28	0.1573	
A ₂ D ₂	0.099	0.099	8.579E-003	0.9277	
B ₂ C ₂	0.50	0.50	0.043	0.8392	
B ₂ D ₂	1.000E-002	1.000E-002	8.646E-004	0.9770	
C ₂ D ₂	15.84	15.84	1.37	0.2646	
A ₂ ²	504.62	504.62	43.63	<0.0001	**
B ₂ ²	317.00	317.00	27.41	0.0002	**
C ₂ ²	160.72	160.72	13.90	0.0029	**
D ₂ ²	650.87	650.87	56.28	<0.0001	**
残差	138.78	11.70			
失拟	134.56	4.63	6.37	0.1432	
误差	4.22	2.91			
模型	1378.95	98.50	8.52	0.0003	**

表8 双酶复合酶解 DPPH 自由基清除能力

Table 8 DPPH radical scavenging capacity of double enzyme complex enzymatic hydrolysis

酶解方式	碱性蛋白酶 + 木瓜蛋白酶	木瓜蛋白酶 + 碱性蛋白酶	碱性蛋白酶-木瓜蛋白酶	木瓜蛋白酶-碱性蛋白酶
DPPH 自由基清除率 (%)	56.18	42.64	92.07	78.35
DH (%)	17.42	15.26	18.47	19.31

2.4 双酶酶解

每种酶都有专一的酶切位点,从固定的氨基酸位置切断肽链,产生的末端氨基酸比较单一,因此,为了寻找清除能力更强的酶解产物,进行双酶酶解实验。表8中,“碱性蛋白酶+木瓜蛋白酶”表示两种酶混合后在碱性蛋白酶的最优条件下水解草鱼皮;“木瓜蛋白酶+碱性蛋白酶”表示两种酶混合后在木瓜蛋白酶的最优条件下水解;“碱性蛋白酶-木瓜蛋白酶”表示先采用碱性蛋白酶在其最优条件下酶解鱼皮,灭酶后采用木瓜蛋白酶在其最优条件下二次酶解;“木瓜蛋白酶-碱性蛋白酶”表示首先采用木瓜蛋白酶在其最优条件下酶解鱼皮,灭酶后采用碱性蛋白酶在其最优条件下二次酶解。实验结果显示,四种处理的水解度相近,而自由基清除率的效果明显不同。说明水解度的大小与酶解产物的抗氧化能力并无直接的关系。采用分步酶解的效果优于混合酶解的效果,“碱性蛋白酶-木瓜蛋白酶”作用后清除效果最佳,“木瓜蛋白酶-碱性蛋白酶”效果其次。采用混合酶解,两种酶同时作用蛋白,不同的反应条件下酶活力有差异,所得到的切割位点稍有不同,对DPPH 自由基清除能力变化不大。庄永亮等人^[17]采用双酶法从罗非鱼皮中提取抗氧化肽得出双酶复合酶解的效果最佳,范鸿冰等人^[18]的研究结果也表明双酶酶解较单一酶酶解得到的产物具有较强的抗氧化性。因此,分步酶解相比单酶酶解,丰富了肽链的种类和数目,其有效抗氧化能力也相应有所提高。由于碱性蛋白酶是一种内切丝氨酸蛋白酶,可以裂解谷氨酸、蛋氨酸、亮氨酸、酪氨酸和赖氨酸等羧基末端肽^[19]。木瓜蛋白酶属内肽酶,能切开全蛋白质分子内部肽链-CO-NH-生成分子量较小的多肽类^[20]。可能先采用碱性蛋白酶再用木瓜蛋白酶可以生成更多的有效氨基酸末端,充分发挥两种酶的优势,有效抗氧化能力增强,所以最优方案为先碱性蛋白酶酶解后木瓜蛋白酶可得到抗氧化能力较强的酶解物。

3 结论

综合 DPPH 自由基清除率和水解度指标,选取碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶酶解草鱼皮蛋白,在前期单因素的基础上,采用 Design Expert 8.0.6 软件,通过 Box-Behnken 设计分别得出单酶水解条件的最优工艺条件,最后比较单酶水解、混合酶解、分步酶解的效果,得出“碱性蛋白酶-木瓜蛋白酶”酶解物抗氧化性能最强,而酶解产生的多肽的分离纯化、构效、作用机理仍有待进一步的研究,本研究可为以后的深入探索提供一定的参考和依据。

参考文献

- [1]刘微微,任虹,曹学丽,等.天然产物抗氧化活性体外评价方法研究进展[J].食品科学,2010,31(17):415-419.
- [2]Ministry of Agriculture of the People's Republic of China.The general analysis on the tendency of the development of the aquatic product market on the year of 2006. Available from. http://www.agri.gov.cn/xxfb/120060728_658023.htm.
- [3]Wasswa J, Tang J, Gu X H, et al. Influence of the extent of enzymatic hydrolysis on the functional properties of protein hydrolysate from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin [J]. Food Chemistry, 2007, 104(4): 1698-1704.
- [4]刘永,梁仕华,洪秀榕,等.罗非鱼鳞抗氧化肽的制备与脂质过氧化性能[J].食品工业,2013,34(11):133-136.
- [5]Ren J Y, Zhao M M, Shi J, et al. Optimization of antioxidant peptide production from grass carp sarcoplasmic protein using response surface methodology [J]. LWT - Food Science and Technology, 2008, 41: 1624-1632.
- [6]Chi C F, Hu F Y, Wang B, et al. Purification and characterization of three antioxidant peptides from protein hydrolyzate of croceine croaker (*Pseudosciaena crocea*) muscle [J]. Food Chemistry, 2015, 168(1): 662-667.
- [7]Ko J K, Lee J H, Samarakoon K, et al. Purification and determination of two novel antioxidant peptides from flounder fish (*Paralichthys olivaceus*) using digestive proteases [J]. Food and Chemical Toxicology, 2013, 52: 113-120.
- [8]Farvin S K H, Andersen L L, Nielsen H H, et al. Antioxidant activity of Cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysates: *In vitro* assays and evaluation in 5% fish oil-in-water emulsion [J]. Food Chemistry, 2014, 149(15): 326-334.
- [9]Chi C F, Wang B, Hu F Y, et al. Purification and identification of three novel antioxidant peptides from protein hydrolysate of bluefin leatherjacket (*Navodon septentrionalis*) skin [J]. Food Research International, 73: 124-129.
- [10]王艳梅,万全,赖年悦,等.黄缘盒龟肉的酶解工艺优化及其体外抗氧化活性研究[J].水产学报,2013,37(4): 622-630.
- [11]Cotellen N, Bernier J L, Cateau J P, et al. Antioxidant properties of hydroxyl flavones [J]. Free Radical Biology Medicine, 1996, 20(1): 35-43.
- [12]白红进,周忠波,杜红梅,等.黑果枸杞叶片甲醇提取物清除自由基活性研究[J].时珍国医国药,2008,19(2): 326-327.
- [13]赵新淮,冯志彪.蛋白质水解物水解度的测定[J].食品科学,1994,15(11):65-67.

(下转第212页)

Chlorella sp.U4341 油脂产率的因素进行效应评价,筛选出 NaNO_3 和葡萄糖两个影响显著的因素。通过最陡爬坡实验进一步逼近最大油脂产率区域,采用响应面中心组合实验建立 *Chlorella* sp.U4341 的油脂产率预测模型,并预测最大油脂产率及确定培养条件。

微藻 *Chlorella* sp.U4341 优化后的培养条件为: NaNO_3 $1.67 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 葡萄糖 $25.34 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, KH_2PO_4 $0.70 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ $0.45 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, A_5 微量元素 $1.2 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$, 光照强度 $70 \mu \cdot \text{Em}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 温度 $25 \text{ }^\circ\text{C}$, 转速 $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 初始 pH6.8。利用优化后的培养条件, *Chlorella* sp.U4341 的油脂产率为 $280.57 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 比优化前培养条件下 ($181.60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 提高了 54%。

参考文献

- [1] Chisti Y. Biodiesel from microalgae[J]. *Biotechnol Adv*, 2007, 25(3): 294-306.
- [2] Griffiths M J, Harrison S T L. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production[J]. *J Appl Phys*, 2009, 21(5): 493-507.
- [3] Zhila N O, Kalacheva G S, Volova T G. Influence of nitrogen deficiency on biochemical composition of the green alga *Botryococcus*[J]. *J Appl Phys*, 2005, 17(4): 309-315.
- [4] Liang Y N, Sarkany N, Cui Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions[J]. *Biotechnol Lett*, 2009, 31(7): 1043-1049.
- [5] Sharma K K, Schuhmann H, Schenk P M. High lipid induction in microalgae for biodiesel production[J]. *Energies*, 2012, 5(5): 1532-1553.
- [6] Singh N K, Dhar D W. Microalgae as second generation biofuel. A review[J]. *Agronomy Sust Developm*, 2011, 31(4): 605-629.
- [7] Williams P J L, Laurens L M L. Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: Review & analysis of the biochemistry, energetics & economics[J]. *Energy Environ Sci*, 2010, 3(5): 554-590.
- [8] 郑洪立, 高振, 黄和, 等. 响应面法优化自养小球藻产生物柴油油脂[J]. *中国生物工程杂志*, 2010, 30(8): 106-111.
- [9] Zhao P, Yu X Y, Li J J, et al. Enhancing lipid productivity by co-cultivation of *Chlorella* sp.U4341 and *Monoraphidium* sp.FXY-10[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2014, 118(1): 72-77.
- [10] Plackett R L, Burman J P. The design of optimum multifactorial experiments[J]. *Biometrika*, 1946, 33(4): 305-325.
- [11] Pettersen A K, Turchini G M, Jahangard S, et al. Effects of different dietary microalgae on survival, growth, settlement and fatty acid composition of blue mussel (*Mytilus galloprovincialis*) larvae[J]. *Aquaculture*, 2010, 309(1-4): 115-124.
- [12] Bligh E, Dyer W J. A rapid method of total lipid extraction and purification[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 1959, 37(8): 911-917.
- [13] Li Y H, Zhao Z B, Bai F W. High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture[J]. *Enzyme Microb Technol*, 2007, 41(3): 312-317.
- [14] Hansson L, Dostfilek M. Influence of cultivation conditions on lipid production by *Cryptococcus albidus*[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1986, 24(1): 12-18.
- [15] Papanikolaou S, Galiotou-Panayotou M, Fakasa S, et al. Lipid production by oleaginous Mucorales cultivated on renewable carbon sources[J]. *Eur J Lipid Sci Tech*, 2007, 109(11): 1060-1070.
- [16] Fei Q, Chang H N, Shang L, et al. The effect of volatile fatty acids as a sole carbon source on lipid accumulation by *Cryptococcus albidus* for biodiesel production[J]. *Bioresour Technol*, 2011, 102(3): 2695-2701.
- [17] Liu S M, Chen F, Liang S Z. Research on the heterotrophic culture of *Chlorella vulgaris*[J]. *J South Univ Technology*, 1999, 27(4): 111-115.
- [18] Li Z S, Yuan H L, Yang J S, et al. Optimization of the biomass production of oil algae *Chlorella minutissima* UTEX2341[J]. *Bioresour Technol*, 2011, 102(19): 9128-9134.
- [19] Kong W B, Hua S F, Cao H, et al. Optimization of mixotrophic medium components for biomass production and biochemical composition biosynthesis by *Chlorella vulgaris* using response surface methodology[J]. *J Taiwan Inst Chem E*, 2012, 43(3): 360-367.
- [20] Heredia-Arroyo T, Wei W, Hu B. Oil accumulation via heterotrophic/mixotrophic *Chlorella protothecoides*[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2010, 162(7): 1978-1995.
- [21] Wei A, Zhang X W, Wei D, et al. Effects of cassava starch hydrolysate on cell growth and lipid accumulation of the heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides*[J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2009, 36(11): 1383-1389.
- [14] Yu P, Chao X Y. Statistics-based optimization of the extraction process of kelp polysaccharide and its activities[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 91: 356-362.
- [15] 李雅双, 连路宁, 刘杰, 等. 芡苳多糖提取工艺及清除自由基活性的研究[J]. *食品与发酵工业*, 2014, 40(5): 235-240.
- [16] 何彦峰, 杨仁明, 胡娜, 等. 响应面法优化葫芦巴种子多糖提取工艺[J]. *天然产物研究与开发*, 2012, 25(10): 1463-1467.
- [17] 庄永亮, 张玉锋. 罗非鱼鱼皮抗氧化肽的制备及分离纯化[J]. *昆明理工大学学报*, 2014, 39(1): 87-93.
- [18] 范鸿冰, 陈孙福, 洪惠, 等. 鳕鱼骨双酶酶解产物的功能特性及其抗氧化活性[J]. *食品与发酵工业*, 2012, 38(12): 78-82.
- [19] Adamson N J, Reynolds E C. Characterization of casein phosphor peptides prepared using Alcalase: Determination of enzyme specificity[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1996, 19(3): 202-207.
- [20] 刘海霞, 章建浩, 王永丽, 靳国锋. 木瓜蛋白酶嫩化处理对淘汰蛋鸡凤鸡肌肉蛋白质水解和嫩度等品质的影响[J]. *食品工业科技*, 2009, 30(1): 174-177.

(上接第 206 页)