

响应面法优化中性蛋白酶提取牡蛎牛磺酸酶解工艺条件

刘亚南, 张志胜*, 佟海菊, 孙克岩, 宋欣
(河北农业大学食品科技学院, 河北保定 071001)

摘要: 利用中性蛋白酶对牡蛎进行酶解, 在单因素试验基础上, 研究加酶量、pH 值、温度 3 个因素对酶解过程中牛磺酸提取量的影响, 通过三因素三水平 Box-Behnken 响应面分析法优化其酶解工艺。结果显示: 在加酶量 1300 U/g、pH 7.5、温度 48℃ 条件下, 牛磺酸提取量实际值可达 2.724 mg/g。

关键词: 牡蛎; 牛磺酸; 响应面法; 酶解

Employing Response Surface Methodology to Optimize Process Conditions for Enzymatic Extraction of Taurine from Oyster Meat with Neutral Protease

LIU Ya-nan, ZHANG Zhi-sheng*, TONG Hai-ju, SUN Ke-yan, SONG Xin
(College of Food Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

Abstract: In this study, neutral protease hydrolysis was used to extract taurine from oyster meat and the extraction process was optimized. On the basis of one-factor-at-a-time experiments, a three-variable, three-level Box-Behnken experimental design coupled with response surface analysis was employed to explore the effects of enzyme dosage, pH and temperature on the extraction efficiency of taurine. The optimum hydrolysis conditions for taurine extraction were enzyme dosage 1300 U/g fresh meat, pH 7.5 and hydrolysis temperature 48 °C, and the resulting extraction yield of taurine was 2.724 mg/g fresh meat.

Key words: oyster; taurine; response surface methodology; enzymolysis

中图分类号: TS254.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)14-0025-04

牛磺酸是人和动物重要的营养物质, 具有消炎解毒、保肝利胆、降血脂、促进幼儿大脑发育及安神健脑等重要的生理活性^[1-5]。国内外对牛磺酸的制取主要有两种, 一是化学合成, 二是从天然产物中提取。化学合成的生产量虽然高, 但成本高、污染严重, 而且生物活性与天然牛磺酸比较低, 因此从天然产物中提取牛磺酸具有广阔的前景。牛磺酸广泛存在于除植物外的许多生物体的组织间液或细胞内液中, 并以小分子的二肽或三肽的形式存在于中枢神经系, 但不参与蛋白质的合成^[6]。在水产品中含量最为丰富, 如青花鱼、墨鱼、章鱼、牡蛎、蛤蜊、虾等, 而牡蛎、蛤蜊等海洋生物中牛磺酸提取量较高, 据文献报道每千克鲜牡蛎中约含有 4~8 g 的牛磺酸^[6-7]。

目前, 海洋生物中牛磺酸的提取多采用水煮法, 利用溶出的氨基酸量或水解度来衡量牛磺酸的提取效

果。但时间过短牛磺酸溶出不彻底, 时间过长又会使细胞内杂质大量溶出^[8]。考虑到后续分离纯化, 而采用较温和的酶解法, 既减少杂质的溶出, 又提高了牛磺酸的溶出量。本实验利用中性蛋白酶对牡蛎进行酶解, 以牛磺酸提取量为指标, 结合响应面分析对酶解工艺进行优化, 得到牛磺酸提取的适宜条件。

1 材料与方法

1.1 原料

牡蛎 唐山丰瑞水产食品有限公司; 枯草芽孢杆菌中性蛋白酶(以下称中性蛋白酶, 实际酶活 80000 U/g) 索来宝科技有限公司; 牛磺酸标准样(纯度 ≥ 99%) 上海蓝季科技发展有限公司; 其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

收稿日期: 2010-09-09

基金项目: 国家海洋公益性行业科研专项(200805046)

作者简介: 刘亚南(1984—), 女, 硕士研究生, 研究方向为农产品加工与贮藏工程。E-mail: yananliu1984@sina.cn

* 通信作者: 张志胜(1970—), 男, 教授, 博士, 研究方向为农产品加工与贮藏工程。E-mail: zhangzhisheng66@139.com

UV2800H紫外分光光度计 尤尼科(上海)仪器有限公司; HH-4 电热恒温水浴锅 金坛市杰瑞尔电器有限公司; DELTA320 精密 pH 计 上海精密科学仪器有限公司; 79-1 磁力搅拌器 金坛市医疗仪器厂; JJ-2 组织捣碎均浆机 江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司; GL2G2 II 立式冷冻离心机 上海安亭科学仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 牛磺酸酶解提取工艺^[9-10]

将牡蛎肉清洗匀浆, 称取一定量按照试验设计方案确定的试验参数调整料液比、pH 值、温度、酶解时间等, 将匀浆液在水浴锅中按试验设计温度预热 15min, 然后按照试验设计方案添加蛋白酶进行恒温酶解, 期间每 10min 用玻璃棒搅拌一次, 酶解完成后样品在沸水浴中灭酶 10min, 冷却, 6000r/min 离心 15min 后取上清液, 测定牛磺酸提取量, 实验平行 3 次。

1.3.2 牛磺酸提取量的测定

1.3.2.1 检测方法^[11]

在醋酸钠的作用下, 牛磺酸与乙酰丙酮和甲醛加热反应生成黄色配合物, 其吸光度与牛磺酸浓度在一定范围内呈正比。显色剂: 10mL NaAc(1mol/L)、0.6mL 乙酰丙酮、0.4mL 甲醛用水定容至 25mL。测定时精密量取 1mL 样品, 加入 1.5mL 显色剂和 2.5mL 水, 用棉塞封住口, 100℃水浴 15min, 冷却后在 400nm 波长处测定牛磺酸提取量。

1.3.2.2 标准曲线方程的得出

配制不同浓度的牛磺酸标准溶液, 在 400nm 波长处进行测定吸光度。每次测定所用提取液, 用蒸馏水定容至 50mL, 从中吸取 1mL 进行测定, 按标准曲线进行计算。回归方程为 $y=2.0207x+0.0054$, $R^2=0.9993$, 式中, y 为吸光度、 x 为牛磺酸提取量/(mg/g)。

1.3.3 中性蛋白酶酶解工艺参数的优化^[12-14]

在单因素试验的基础上, 根据 Box-Behnken 的中心组合试验设计原理, 结合单因素试验结果, 以加酶量(X_1)、pH 值(X_2)和温度(X_3)为变量因素, 每一个自变量的低、中、高实验水平分别以 -1、0、1 进行编码, 试验设计见表 1。

表 1 响应面分析因素水平

Table 1 Variables and their coded levels in the response surface design

水平	因素		
	X_1 加酶量/(U/g)	X_2 pH	X_3 温度/℃
-1	1000	7.2	35
0	1200	7.4	45
1	1400	7.6	55

2 结果与分析

2.1 酶解工艺回归模型的建立

根据表 1 进行响应面试验, 测定每个因素水平时牛磺酸的提取量, 结果如表 2 所示。

表 2 牛磺酸提取工艺 Box-Behnken 试验设计与结果

Table 2 Experimental design and results for response surface analysis

试验号	X_1 加酶量	X_2 pH	X_3 温度	牛磺酸提取量/(mg/g)
1	-1	-1	0	1.26
2	1	-1	0	2.17
3	-1	1	0	2.05
4	1	1	0	2.65
5	-1	0	-1	1.54
6	1	0	-1	2.18
7	-1	0	1	1.96
8	1	0	1	2.86
9	0	-1	-1	1.87
10	0	1	-1	2.43
11	0	-1	1	1.76
12	0	1	1	2.61
13	0	0	0	2.79
14	0	0	0	2.93
15	0	0	0	2.86
16	0	0	0	2.62
17	0	0	0	2.71

利用 Design Expert 软件, 对表 2 数据进行二次回归拟合, 得到回归方程 $Y=2.78+0.38X_1+0.33X_2+0.15X_3-0.078X_1X_2+0.065X_1X_3+0.072X_2X_3-0.39X_1^2-0.36X_2^2-0.26X_3^2$ 。

2.2 回归模型的检验

表 3 回归模型的方差分析

Table 3 Analysis of variance for the fitted regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	3.92	9	0.44	15.66	0.0008
X_1	1.16	1	1.16	41.82	0.0003
X_2	0.90	1	0.90	32.29	0.0007
X_3	0.17	1	0.17	6.15	0.0422
X_1^2	0.64	1	0.64	23.15	0.0019
X_2^2	0.54	1	0.54	19.46	0.0031
X_3^2	0.28	1	0.28	9.92	0.0161
X_1X_2	0.024	1	0.024	0.86	0.3836
X_2X_3	0.021	1	0.021	0.76	0.4134
X_1X_3	0.017	1	0.017	0.61	0.4612
残差	0.19	7	0.028		
失拟性	0.14	3	0.045	3.03	0.1561
纯误差	0.059	4	0.015		
总差	7.59	16			

通过 Design Expert 对表 2 数据进行方差分析, 结果见表 3。模型的 P 值为 0.0008 (< 0.01), 说明该模型在概率为 0.01 水平上能够拟合试验数据, 回归模型极显著。模型中加酶量(X_1)、pH 值(X_2)、 X_1^2 、 X_2^2 对牛磺酸提取量的影响极显著, X_3 (温度)、 X_3^2 对牛磺酸提取量的影响显著。该模型回归显著($P < 0.01$)、失拟项不显著($P=0.1561 > 0.05$), 并且该模型的 $R^2=0.9527$, $R^2_{Adj}=0.8919$, 说明该模型与实际实验拟合较好, 自变量与响应值之间线性关系显著, 可以用于牛磺酸提取的实验预测。

2.3 酶解工艺参数的确定

为直观寻找最适宜变量组合, 使得响应值达到最大, 采用 Design Expert 软件对 3 因素之间的交互作用进行全面的模型分析, 并绘制响应面曲线图。响应面图形是响应值对各试验因子 X_1 、 X_2 、 X_3 所构成的三维空间的曲面图, 从响应面分析图上可形象地看出最佳参数及各级参数之间的相互作用。当特征值均为正值时, 响应面的分析图形为山谷形曲面, 有极小值存在; 当特征值为负值时, 响应面的分析图形为山丘形曲面, 有极大值存在; 当特征值有正有负时, 为马鞍形曲面, 无极值存在。等高线图可以直观地反映两变量交互作用的显著程度, 圆形表示两因素交互作用不显著, 而椭圆形与之相反。图 1b、图 2b 及图 3b 中等高线均呈椭圆形, 表明各图中两因素交互作用显著^[15]。图 1~3 分别显示了 3 组实验参数以牛磺酸提取量为响应值的趋势图。

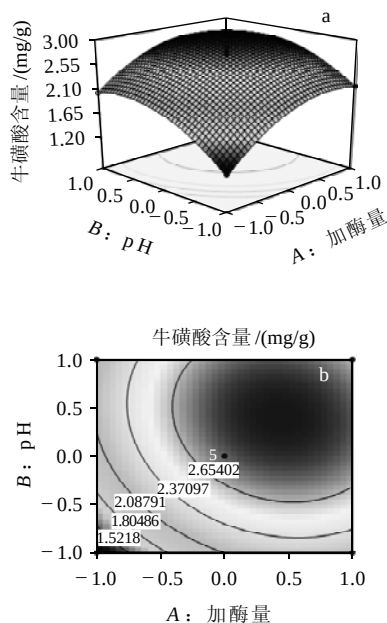


图 1 加酶量和 pH 值对牛磺酸提取量影响的响应曲面和等高线图
Fig.1 Response surface plot and contour showing the effects of enzyme dosage and pH value on taurine extraction yield

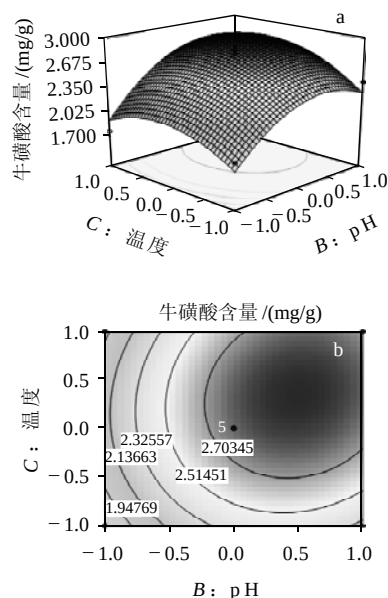


图 2 pH 值和温度对牛磺酸提取量影响的响应曲面和等高线图
Fig.2 Response surface plot and contour showing the effects of pH value and temperature on taurine extraction yield

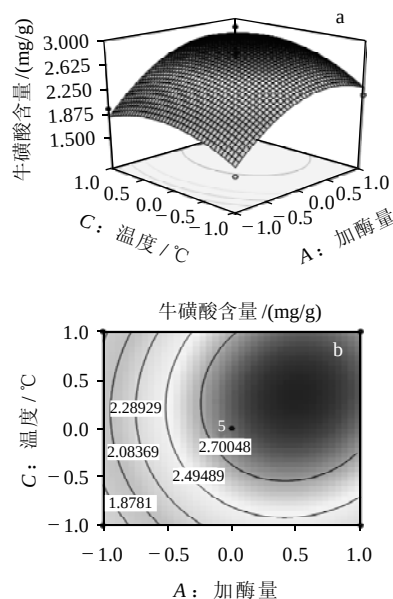


图 3 加酶量和温度对牛磺酸提取量影响的响应曲面和等高线图
Fig.3 Response surface plot and contour showing the effects of enzyme dosage and temperature on taurine extraction yield

从图 1 可以看出, 加酶量和 pH 值对牛磺酸提取量影响较大。随着加酶量及 pH 值的提高, 牛磺酸提取量呈先升高后下降的趋势。加酶量到某一值时, 酶与底物达到饱和, 而随着 pH 值的升高酶活性也在降低。因此只有在适宜加酶量及 pH 值条件下, 牛磺酸的含量才会达到理想值。同样从图 2、3 可以看出, 只有在 pH 值与温度、加酶量与温度适宜的情况下, 牛磺酸提取量才能达到最大值。

由图 1a、2a、3a 可以得出, 响应面存在最大值。由数据分析可得牛磺酸提取最适宜酶解工艺条件为加酶量 1296U/g、pH7.53、温度 47.8℃, 牛磺酸提取量的理论最大值为 2.70mg/g。但考虑到实际生产的方便性, 最适宜工艺条件相应修正为加酶量 1300U/g、pH7.5、温度 48℃。在此修正条件下, 做 3 个平行, 测得实际提取量为 2.724mg/g, 与理论值相差不多, 可见该模型可较好的反应牛磺酸的提取条件。与水煮法相比酶解法溶出的杂质少, 而且水解液中含有丰富的氨基酸和肽类, 还可以用于分离其他氨基酸或肽类等, 对其进行多方面的综合利用。

3 结 论

本实验建立了以牛磺酸提取量为响应值, 以加酶量、pH 值、温度因素的数学模型。在本实验设计范围内, 影响牛磺酸提取量的主次顺序为加酶量、pH 值、温度。方差分析表明该模型拟合行较好。最终确定出牛磺酸提取的最适宜酶解工艺条件为加酶量 1300U/g、pH7.5、温度 48℃。

在最适宜条件下进行验证实验得到牛磺酸提取量为 2.724mg/g, 与理论值相差不明显, 说明该模型可以较好地反映牛磺酸提取的条件。因此, 采用响应面法优化得到的提取条件参数具有可行性与应用价值。

参考文献:

- [1] 陈惠源, 蔡俊鹏. 牡蛎的营养药用价值及其开发利用[J]. 中药材, 2005, 3(3): 172-173.
- [2] 龚丽芬, 黄慰生, 郑志福, 等. 牛磺酸的生物活性、提取与测定[J]. 福建化工, 2003(1): 26-28.
- [3] 张平伟, 杨祖英. 牛磺酸的生理功能及其营养作用(综述)[J]. 中国食品卫生杂志, 1997, 5(9): 36-40.
- [4] 张磊, 杨程, 侯志成, 等. 牛磺酸的生理作用[J]. 武警医学院学报, 2002, 11(1): 54-56.
- [5] 俞鸣, 田庆伟. 牛磺酸保健作用的研究进展[J]. 中国食品添加剂, 1999(4): 4-7.
- [6] 谭乐义, 章超桦, 薛长湖, 等. 牛磺酸的生物活性及其在海洋生物中的分布[J]. 湛江海洋大学学报, 2000, 20(3): 75-79.
- [7] 张辉, 管华诗, 赵志强. 长牡蛎中天然牛磺酸的提取[J]. 海洋科学, 2005(4): 1-4.
- [8] 粟桂娇, 阎欲晓, 覃洁, 等. 车螺肉酶解液中提取分离天然牛磺酸工艺[J]. 食品科学, 2005, 26(9): 372-376.
- [9] 郭玉华, 曾名勇. 牡蛎酶解工艺的研究[J]. 中国海洋药物, 2008(2): 40-44.
- [10] 吴文龙, 志娟. 双酶法水解牡蛎肉工艺条件的研究[J]. 食品科技, 2005(11): 39-41.
- [11] 汤志方. 海洋生物中牛磺酸的提取及分析[D]. 青岛: 青岛科技大学, 2005: 16-24.
- [12] 王钦德, 杨坚. 食品试验设计与统计分析[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2002: 423-425.
- [13] 苗建银, 吉宏武, 邵海艳, 等. 响应面法优化近江牡蛎肉酶解工艺参数[J]. 食品工业科技, 2009(4): 158-161.
- [14] 王素华, 励建荣, 吉宏武. 响应面法优化马氏珠母贝肉酶解工艺参数[J]. 食品科技, 2009, 34(4): 38-42.
- [15] SAYAN G, MANOHAR C S. An improved response surface method for the determination of failure probability and importance measures[J]. Structural Safety, 2004, 26(1): 123-132.