

单钱艺, 沈岳明, 张明兴, 等. 正交试验优化超声波-复合酶水解法提取中华鳖油的工艺 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(22): 256–264.
doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022030035

SHAN Qianyi, SHEN Yueming, ZHANG Mingxing, et al. Optimization of Ultrasonic-Compound Enzyme Hydrolysis Method for Extracting Chinese Softshell Turtle Oil by Orthogonal Experiment[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(22): 256–264. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022030035

· 工艺技术 ·

正交试验优化超声波-复合酶水解法 提取中华鳖油的工艺

单钱艺^{1,2}, 沈岳明³, 张明兴³, 唐嘉诚¹, 陈彦婕¹, 包建强^{1,4,5,*}

(1.上海海洋大学食品学院, 上海 201306;

2.上海市静安区市场监督管理局, 上海 200072;

3.宁波市明凤渔业有限公司, 浙江宁波 315464;

4.上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306;

5.农业部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室(上海), 上海 201306)

摘要:本研究以中华鳖加工副产物为原料, 为提高中华鳖油提取率, 使其高值化利用为生产企业提供新的利润源。采用超声波协同复合酶水解进行鳖油提取实验(酶解 pH 控制在 7.5~8.5), 利用单因素实验结合正交试验优化提取工艺参数, 得到超声波-复合酶水解法提取最佳工艺条件: 料液比为 1:1.5 (g/mL)、蛋白酶用量为 2.4%、酶比例为 1:1.5 (中性蛋白酶:碱性蛋白酶)、酶水解时间 2 h、酶水解温度 65 ℃、超声功率 180 W、超声时间 30 min, 所得中华鳖油提取率为 81.65%±0.62%。将中华鳖油进行精制后, 测得其各项理化指标均符合国家水产行业标准(SC/T 3502-2016)精制鱼油一级标准。同时, 脂肪酸组成分析得到精制后中华鳖油含有脂肪酸共计 28 种, 其中饱和脂肪酸占总量 23.81%, 单不饱和脂肪酸占总量 46.94%, 多不饱和脂肪酸占总量 26.38%, DHA 及 EPA 含量占总量 10.05%。

关键词:中华鳖加工副产物, 超声波, 复合酶, 油脂提取, 工艺优化, 脂肪酸

中图分类号: TS225.2; TS254.9

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2022)

22-0256-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022030035



本文网刊:

Optimization of Ultrasonic-Compound Enzyme Hydrolysis Method for Extracting Chinese Softshell Turtle Oil by Orthogonal Experiment

SHAN Qianyi^{1,2}, SHEN Yueming³, ZHANG Mingxing³, TANG Jiacheng¹, CHEN Yanjie¹, BAO Jianqiang^{1,4,5,*}

(1.College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2.Shanghai Jing'an District Market Supervision Administration, Shanghai 200072, China;

3.Ningbo Mingfeng Fishery Co., Ltd., Ningbo 315464, China;

4.Shanghai Engineering Research Center of Aquatic Product Processing and Preservation, Shanghai 201306, China;

5.Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Aquatic Products Storage and Preservation (Shanghai), Ministry of Agriculture, Shanghai 201306, China)

Abstract: In this study, the by-products of Chinese softshell turtle processing were used as raw materials, which provided the possibility to improve the extraction efficiency of Chinese softshell turtle oil and make it high-value utilization to provide a new source of profit for production enterprises. The extraction experiment of turtle oil was carried out by using ultrasonic combined with complex enzymatic hydrolysis (The pH of enzymatic hydrolysis was controlled at 7.5~8.5), and the extraction parameters were optimized by single factor experiments combined with orthogonal experiment, and the

收稿日期: 2022-03-03

作者简介: 单钱艺 (1993-), 男, 硕士, 助理工程师, 研究方向: 水产品加工及贮藏、食品保鲜, E-mail: 1016405013@qq.com。

* 通信作者: 包建强 (1963-), 男, 硕士, 教授, 研究方向: 食品加工、冷冻冷藏, E-mail: baojq@shou.edu.cn。

optimal extraction process conditions of ultrasonic-complex enzymatic hydrolysis method were obtained: The ratio of solid to liquid was 1:1.5 (g/mL), the amount of protease was 2.4%, the ratio of enzyme was 1:1.5 (neutral protease:alkaline protease), the enzymatic hydrolysis time was 2 h, the enzymatic hydrolysis temperature was 65 °C, the ultrasonic power was 180 W, and the ultrasonic time was 30 min. The extraction rate of Chinese softshell turtle oil was 81.65%±0.62%. After the Chinese softshell turtle oil was refined, its physical and chemical indicators were all in line with the national aquatic industry standard (SC/T 3502-2016) refined fish oil first-class standard. At the same time, fatty acid composition analysis showed that the refined Chinese softshell turtle oil contained a total of 28 kinds of fatty acids, of which saturated fatty acids accounted for 23.81% of the total, monounsaturated fatty acids accounted for 46.94% of the total, polyunsaturated fatty acids accounted for 26.38% of the total, DHA and EPA content accounted for 10.05% of the total.

Key words: by-products of Chinese softshell turtle processing; ultrasonic wave; compound enzyme; oil extraction; process optimization; fatty acids

中华鳖作为我国最为常见的养殖鳖类,截止至 2020 年我国鳖类养殖产量已高达 33.26 万吨,二十年间其养殖产量增长近十倍^[1]。中华鳖油脂对动脉硬化有很好的预防作用,能减轻机体中胆固醇的沉积^[2],调节胰岛素抵抗(IR)^[3],也逐步得到中老年消费者认可。

国内水产品加工副产物传统油脂提取方法有压榨法、稀碱水解法、超声波有机溶剂提取法等。传统物理提油法如压榨法工艺简单,但浪费严重,提油效率较低;稀碱水解法所得产物过氧化值和酸值过高;超声波有机溶剂提取法易溶剂残留、污染环境等问题。而目前新兴的油脂提取方法有亚临界流体萃取法、超临界流体萃取法、复合酶水解法等。超临界流体萃取法提取效率高,但其设备成本问题应用于工业化生产仍有局限性。目前复合酶水解法以反应温和、工业化生产难度低等优点在油脂加工中得到普及,Rubio-Rodriguez 等^[4]发现酶水解后产生的酶解液含有多种氨基酸还可再利用制作成各类风味调味品。由于酶价格昂贵,酶解时间长等问题,采用超声波-复合酶水解法可进一步降低成本、提高提油率。此法已被应用于核桃油、木棉籽油、柑橘皮油、米胚油、辣木籽油等植物油脂的提取^[5-9],但此法应用于提取动物油脂却鲜有报道。本实验以中华鳖加工副产物为原料,以超声波协同复合酶水解方式,研究料液比、蛋白酶用量、酶比例、酶水解时间、酶水解温度、超声功率和超声时间对中华鳖油提取率的影响,获得最佳提取工艺条件,同时对其精制对其理化性质、脂肪酸组分进行分析。为今后规模化综合利用中华鳖加工副产物提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

养殖中华鳖加工副产物(包括头部、颈部、足部)中的淡黄色脂肪块、鲜活中华鳖(平均每只在 1300 g 左右) 宁波市明凤渔业有限公司;超声波-复合酶水解法所得中华鳖油 实验室自制;中性蛋白酶(200000 U/g)、碱性蛋白酶(200000 U/g)、酸性蛋白酶(100000 U/g)、木瓜蛋白酶(180000 U/g)、胃蛋白酶(120000 U/g)、胰蛋白酶(130000 U/g) 四川宝顺

生物科技有限公司;氯化钠、氢氧化钾、冰乙酸、氢氧化钠、磷酸、石油醚、乙酸乙酯、正己烷、无水乙醇、三氟化硼甲醇溶液(14%)均为化学纯,甲醇、正己烷均为色谱级 国药集团化学试剂有限公司;37 种脂肪酸甲酯混标 美国默克公司;食品级白土 红宇漂土科技有限公司。

LXJ-IIB 型飞鸽牌低速大容量多管离心机 上海安亭科学仪器厂;HB10 型德国艾卡数显型加热锅 德国 IKA 公司;DHG-9073BS-III 型新苗恒温鼓风干燥机 上海新苗医疗器械制造有限公司;DK-S28 型精宏恒温水浴锅 上海精宏实验设备有限公司;JJ-2 型组织捣碎匀浆机 武汉格莱莫检测设备有限公司;力辰旋转蒸发仪 上海力辰仪器科技有限公司;PB-10 型酸度计 德国 Sartorius 公司;电烘箱 上海隽思实验仪器有限公司;ME204E 型梅特勒-托利多电子天平 瑞士 Mettler Toledo 公司;KQ-300VD 型三频数控超声波清洗机 昆山舒美超声仪器有限公司;UV3000PC 型美谱达紫外分光光度计 上海美谱达仪器有限公司;Nexis GC-2030 型岛津气相色谱仪(含氢火焰离子检测器) 日本岛津公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品前处理 将活中华鳖洗净急杀,从中华鳖头部、颈部、足部取出 30 g 左右淡黄色块状脂肪,用蒸馏水洗净血水并沥干,将其匀浆呈糜状,分 6 份以每份 5 g 左右进行分装,为防止其氧化变质,将脂肪块抽真空密封,于-18 °C 低温冰柜存放。实验前将样品于 0~4 °C 冰箱解冻,备用。

1.2.2 蛋白酶的筛选 依据实验选定的六种蛋白酶的不同最适酶解温度^[10-11],按料液比 1:1 来添加蒸馏水和解冻后的脂肪块匀浆,不同种蛋白酶均以 2% 酶用量(占油重,下同),酶解 2 h,另不添加蛋白酶作空白样进行实验对照。以中华鳖油提取率为参考指标来判断提取效果,从中选取提取效果较好的两种蛋白酶,按蛋白酶用量占油重质量,以对应蛋白酶比例(以下简称酶比例,即中性蛋白酶与碱性蛋白酶之比)分别准确称取中性蛋白酶与碱性蛋白酶并对其混合作为复合蛋白酶,pH 控制在 7.5~8.5 范围内进行酶解。

1.2.3 中华鳖油的提取 中华鳖加工副产物脂肪匀浆于 0~4 ℃ 解冻,将解冻后 5 g 左右样品按料液比 1:2 添加蒸馏水及 2% 蛋白酶用量(中性蛋白酶与碱性蛋白酶按 1:1 混合),进行 20 min(功率 180 W)超声处理,并在 50 ℃ 恒温条件下进行 2 h 酶解反应,酶解后在在离心机中离心(转速 5000 r/min,时间 25 min),离心后提取酶解液上层油脂层,称重并计算得到中华鳖油提取率,平行试验三次取平均值。中华鳖油提取率(%)=提取后鳖油的质量(g)/提取前脂肪块的总质量(g)×100。

1.2.4 单因素实验设计

1.2.4.1 料液比对中华鳖油提取率的影响 蛋白酶用量为 2%,酶比例为 1:1,酶水解时间为 2 h,酶水解温度为 55 ℃,超声功率为 180 W,超声时间为 20 min,料液比为 1:0.5、1:1、1:1.5、1:2、1:2.5、1:3 进行酶解反应,以中华鳖油提取率高低来确定料液比。

1.2.4.2 蛋白酶用量对中华鳖油提取率的影响 料液比为 1:2,酶比例为 1:1,酶水解时间为 2 h,酶水解温度为 55 ℃,超声功率为 180 W,超声时间为 20 min,蛋白酶用量为 0.8%、1.2%、1.6%、2%、2.4%、2.8% 进行酶解反应,以中华鳖油提取率高低来确定蛋白酶用量。

1.2.4.3 酶比例对中华鳖油提取率的影响 料液比为 1:2,蛋白酶用量为 2.4%,酶水解时间为 2 h,酶水解温度为 55 ℃,超声功率为 180 W,超声时间为 20 min,酶比例为 2:1、1.5:1、1:1、1:1.5、1:2 进行酶解反应,以中华鳖油提取率高低来确定酶比例。

1.2.4.4 酶水解时间对中华鳖油提取率的影响 料液比为 1:2,蛋白酶用量为 2.4%,酶比例为 1:1.5,酶水解温度为 55 ℃,超声功率为 180 W,超声时间为 20 min,酶水解时间为 0.5、1、1.5、2、2.5、3 h 进行酶解反应,以中华鳖油提取率高低来确定酶水解时间。

1.2.4.5 酶水解温度对中华鳖油提取率的影响 料液比为 1:2,蛋白酶用量为 2.4%,酶比例为 1:1.5,酶水解时间为 2 h,超声功率为 180 W,超声时间为 20 min,酶水解温度为 45、50、55、60、65、70 ℃ 进行酶解反应,以中华鳖油提取率高低来确定酶水解温度。

1.2.4.6 超声功率对中华鳖油提取率的影响 料液比为 1:2,蛋白酶用量为 2.4%,酶比例为 1:1.5,酶水解时间为 2 h,酶水解温度为 65 ℃,超声时间为 20 min,超声功率为 140、180、220、240、260、300 W 进行酶解反应,以中华鳖油提取率高低来确定超声功率。

1.2.4.7 超声时间对中华鳖油提取率的影响 料液比为 1:2,蛋白酶用量为 2.4%,酶比例为 1:1.5,酶水解时间为 2 h,酶水解温度为 65 ℃,超声功率为 220 W,超声时间为 10、15、20、25、30 min,进行酶解反应,

以中华鳖油提取率高低来确定超声功率。

1.2.5 正交试验设计 在单因素实验的结果基础上,进行正交试验设计分析。选取料液比(A)、蛋白酶用量(B)、酶比例(C)、酶水解时间(D)、酶水解温度(E)、超声功率(F)、超声时间(G)作为正交试验因素,以中华鳖油提取率为参考指标,采用正交试验进行工艺优化,以确定中华鳖油最佳提取工艺条件,正交实验因素水平编码见表 1。

表 1 七因素三水平正交试验因素水平设计
Table 1 Factor level design of seven factors three levels orthogonal experiment

因素	水平		
	1	2	3
A料液比	1:1.5	1:2	1:2.5
B蛋白酶用量(%)	2	2.4	2.8
C酶比例	1:1	1:1.5	1:2
D酶水解时间(h)	1.5	2	2.5
E酶水解温度(℃)	60	65	70
F超声功率(W)	180	220	240
G超声时间(min)	20	25	30

1.2.6 中华鳖油的精制 参考 [12-15] 对鱼油的精制方法,对中华鳖油进行脱胶、脱酸、脱色、脱腥的精制处理。中华鳖油中加入 0.75%(占油重,下同)磷酸溶液(浓度为 75%),水浴锅加热至 80 ℃,加热搅拌 5 min,转速 5000 r/min 离心后取上层油样。脱胶后中华鳖油加入 8% 氢氧化钠溶液(浓度为 7.5%),水浴锅加热至 75 ℃,加热搅拌 15 min,转速 5000 r/min 离心后取上层油样。脱酸后中华鳖油加入 25% 食品级活性白土加热至 55 ℃,加热搅拌 20 min,转速 5000 r/min 离心后取上层油样。在真空条件下,加热至 65 ℃,利用旋转蒸发仪对脱色后中华鳖油进行 45 min 脱腥处理。

1.2.7 中华鳖油理化指标及脂肪酸组成测定 参照 GB 5009.236-2016《动植物油水分及挥发物的测定》(第二法)对油脂进行测定;参照 GB/T 5532-2008《动植物油碘值的测定》对碘值进行测定;参照 GB/T 15688-2008《动植物油不溶性杂质含量的测定》对不溶性杂质含量进行测定;参照 GB/T 5009.229-2016《食品中酸价的测定》(第一法)对酸值进行测定;参照 GB/T 5009.227-2016《食品中过氧化值的测定》(第一法)对过氧化值进行测定;参照 GB 5009.168-2016《食品中脂肪酸的测定》(第一法)对脂肪酸进行测定。

1.3 数据处理

本研究实验数据用软件 SPSS 22.0、Excel 2010 进行实验设计、统计分析及作图。每组实验均进行 3 次重复实验,所有结果均以“平均值±标准差”的形式表示。用 SPSS 22.0 进行差异显著性分析, $P<0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 蛋白酶的选取

对于添加不同品种的蛋白酶之后, 提油实验呈现效果有不同程度的提升^[16-17]。利用蛋白酶分解蛋白质与脂肪结合状态, 使油脂易游离出来。

如图 1 结果所示, 提油效果按显著程度排序: 中性蛋白酶>碱性蛋白酶>酸性蛋白酶>木瓜蛋白酶>胃蛋白酶>胰蛋白酶, 未加蛋白酶的空白样呈现中华鳖油提取率最低, 仅为 22.54%。蛋白酶品种不一, 酶切位点也各不相同, 针对不同样品中油脂提取效果也有所差异^[18]。较其他蛋白酶相比, 中性蛋白酶与碱性蛋白酶在中华鳖油提取率为 65% 以上, 且两种蛋白酶提取率存在显著性差异($P<0.05$)。

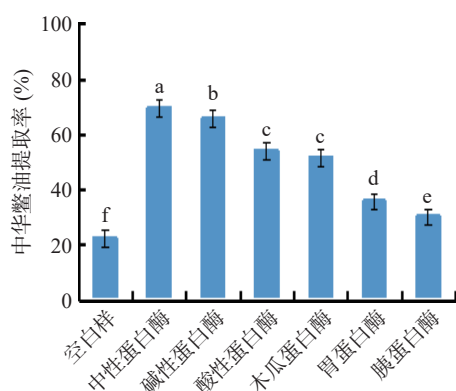


图 1 不同蛋白酶对中华鳖油提取效果

Fig.1 Extraction effect of different proteases on Chinese softshell turtle crude oil

注: 小写字母不同, 表示差异显著($P<0.05$); 图 2~图 9 同。

参照 1.2.2 方法, 将 2% 蛋白酶用量(其中中性蛋白酶与碱性蛋白酶按 1:1 混合), 比较单一酶与复合酶对中华鳖油提取率影响, 如图 2 可以看出, 使用复合蛋白酶的油脂提取率高于两种单一蛋白酶, 中性蛋白酶与碱性蛋白酶之间可能存在协同作用, 联合使用能提升提油效果, 因此选择中性蛋白酶和碱性蛋白酶作复合酶为后续试验研究。

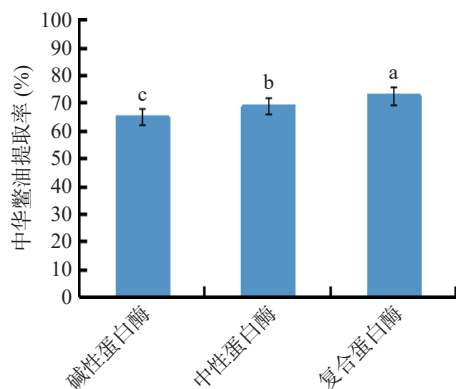


图 2 单一酶与复合酶对中华鳖油提取效果

Fig.2 Extraction effect of single enzyme and compound enzyme on Chinese softshelled turtle oil

2.2 单因素实验结果

2.2.1 料液比的选择

由图 3 结果可知, 料液比从

1:0.5 至 1:2, 中华鳖油提取率呈上升趋势。当料液比为 1:2 时, 中华鳖油提取率为 71.22%。料液比从 1:2 至 1:3, 中华鳖油提取效果反而有所下降。这表明当添加蒸馏水过少时, 酶分子不能与底物充分接触, 导致蛋白酶活性无法发挥, 造成油脂提取不完全。而过多添加蒸馏水使酶分子扩散范围变大, 降低蛋白酶与底物接触效率^[19], 会影响中华鳖油提取率。因此综合从效益与成本方面看, 料液比定为 1:2 最为适宜。

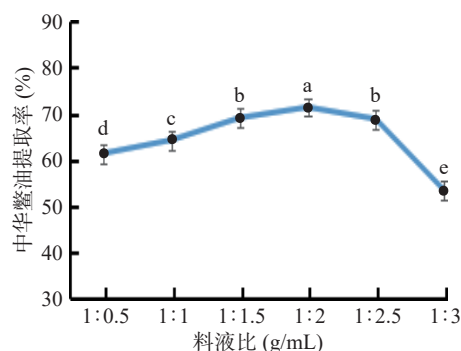


图 3 料液比与中华鳖油提取率关系

Fig.3 Relationship between the ratio of solid to liquid and the extraction rate of Chinese softshell turtle crude oil

2.2.2 蛋白酶用量的选择 由图 4 结果可知, 随着蛋白酶用量的增加, 中华鳖油提取率呈先上升后下降的趋势。当蛋白酶用量为 0.8% 时, 酶分子控制底物反应, 而随着酶用量增大, 酶分子之间接触面变大互相影响, 降低酶分子对底物反应效率, 导致中华鳖油提取率降低。王文婷等^[20]研究酶水解提取鲫鱼下脚料鱼油时, 酶用量的增加导致提取率呈先升后降的结果, 图形基本与其实验结果相近。因此, 蛋白酶用量 2.4% 最为适宜。

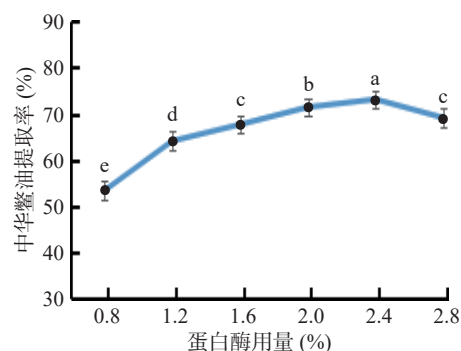


图 4 蛋白酶用量与中华鳖油提取率关系

Fig.4 Relationship between the amount of protease and the extraction rate of Chinese softshell turtle crude oil

2.2.3 酶比例的选择 中性蛋白酶用量与碱性蛋白酶用量按不同比例混合, 对中华鳖油提取率影响由图 5 结果可知, 当中性蛋白酶用量与碱性蛋白酶用量比例为 1:1.5 时, 中华鳖油提取率可达 75.15%。而当酶比例为 1:2 时, 中华鳖油提取率开始下降。不同蛋白酶催化分解的基团不同, 中性蛋白酶与碱性

蛋白酶相比更能催化分解出中华鳖的油脂^[21-22],碱性蛋白酶的占比可能增加至一定量时,中性蛋白酶与碱性蛋白酶之间出现了竞争现象,抑制了酶的催化作用,导致中华鳖油提取率下降。

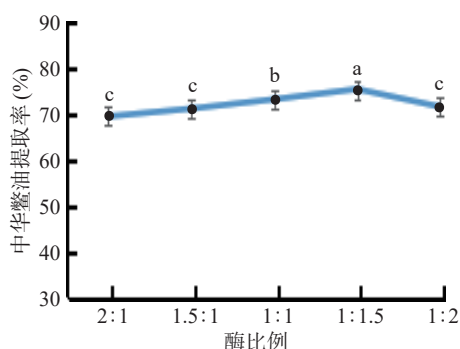


图 5 酶比例与中华鳖油提取率关系

Fig.5 Relationship between enzyme ratio and the extraction rate of Chinese softshell turtle crude oil

2.2.4 酶水解时间的选择 由图 6 结果可知,随着酶解反应时间的加长,中华鳖油提取率呈急升缓降的趋势。这是由于酶解时间过短,仅仅部分酶分子与底物反应,提取效果不佳。在酶水解时间为 2 h 时,蛋白酶与底物酶解反应充分,中华鳖油提取率达峰值。随着酶水解时间继续延长,因为中华鳖油中富含不饱和脂肪酸被氧化,中华鳖油品质会随之降低。因此,将酶水解时间定为 2 h。

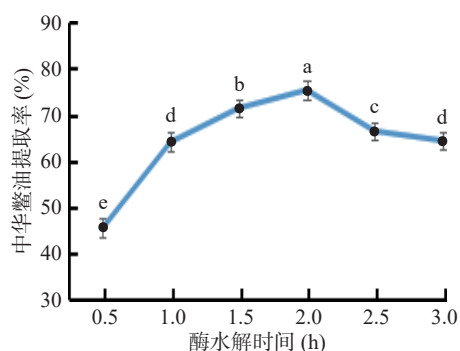


图 6 酶水解时间与中华鳖油提取率关系

Fig.6 Relationship between the enzymatic hydrolysis time and the extraction rate of Chinese softshell turtle crude oil

2.2.5 酶水解温度的选择 由图 7 结果可知,随着酶水解温度的稳步升高至 65 ℃,中华鳖油提取率高达 78.6%。这是由于温度的升高会促使酶分子加速运动,从而激发蛋白酶活性,与底物接触频率增多,提高酶促反应速度。而温度继续升高,导致酶分子活性钝化,待温度达到一定限制时,可直接导致蛋白酶直接失活,酶分子将停止与底物发生反应。因此选择酶水解温度为 65 ℃ 最理想。

2.2.6 超声功率的选择 由图 8 结果可知,当超声功率增强至 220 W,中华鳖油提取率最大值达到 81.18%。超声波具有空化效应,利用超声波辅助蛋白酶,可改变酶的构象,从而改变酶分子与底物的结合程度,催

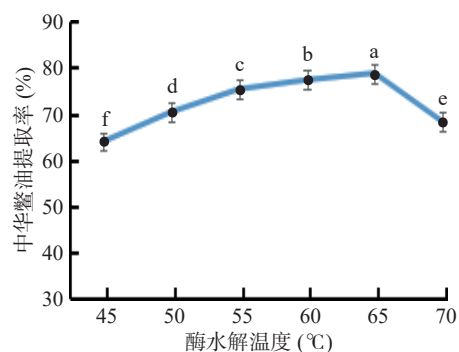


图 7 酶水解温度与中华鳖油提取率关系

Fig.7 Relationship between the enzymatic hydrolysis temperature and the extraction rate of Chinese softshell turtle crude oil

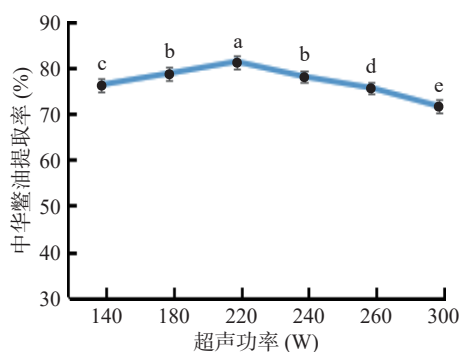


图 8 超声功率与中华鳖油提取率关系

Fig.8 Relationship between ultrasonic power and the extraction rate of Chinese softshell turtle crude oil

化酶分子活性^[23]。超声波对底物均质作用越明显,伴随振动产生的能量加快了酶分子运动,增加了酶与底物的接触概率。在超声功率 140~220 W 范围内,鳖油提取率呈上升趋势,超声功率 220~300 W,鳖油提取率反而下降。由于超声功率过大,超声波空化效应产生的微泡生成自由基,使部分酶分子被降解,说明超声功率针对不同蛋白酶只有在一定范围内有促进作用^[24]。因此,超声功率选择为 220 W 最适宜。

2.2.7 超声时间的选择 由图 9 结果可知,随着超声时间的延长,超声时间 25 min,中华鳖油提取率达最大值 81.08%。说明随着超声时间延长,酶分子运动加快,酶与底物充分接触,促进了酶解反应的进行。超声空化作用还可以改变蛋白质的次生结构和亚基组成,从而提高蛋白质的酶解敏感性^[25]。而当超声时间延长至 30 min 时,中华鳖油提取率明显降低。有研究表明超声处理 40 min 内不仅不会导致酶失活,反而有一定的激活作用,即使超声时间达 100 min,酶活仅损失 5%^[26-27]。长时间的超声处理使体系内热能增加,空化效应增强,液体介质中微泡的形成,气泡中生成的自由基可能会破坏酶分子构象,导致后续酶解过程中与底物结合的酶变少,鳖油得率降低。因此,超声时间选择为 25 min 最理想。

2.3 正交试验结果

基于单因素实验结果,选择以料液比(A)、蛋白

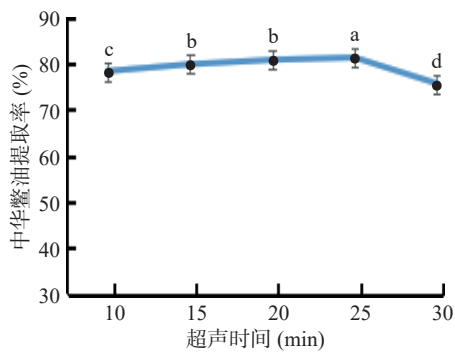


图 9 超声时间与中华鳖油提取率关系

Fig.9 Relationship between ultrasonic time and the extraction rate of Chinese softshell turtle crude oil

酶用量(B)、酶比例(C)、酶水解时间(D)、酶水解温度(E)、超声功率(F)、超声时间(G)作为正交试验因素,以中华鳖油提取率为参考指标,再利用七因素三水平正交试验设计进行分析,正交试验结果见表 2。

由表 2~表 3 结果所示,在使用超声波-复合酶水

解法提取中华鳖加工副产物中鳖油的过程,七个变量因素对中华鳖油提取率影响程度大小依次为:酶水解温度>酶比例>蛋白酶用量>超声时间>料液比>酶水解时间>超声功率,其中酶比例和酶水解温度对中华鳖油提取率影响显著($0.01 < P < 0.05$)。得到超声波-复合酶水解法提取中华鳖油的最佳工艺条件为 $A_1B_2C_2D_2E_2F_1G_3$,即料液比为 1:1.5、蛋白酶用量为 2.4%、酶比例为 1:1.5(中性蛋白酶与碱性蛋白酶用量之比)、酶水解时间 2 h、酶水解温度 65 ℃、超声功率 180 W、超声时间 30 min。在最优水平条件下进行验证试验^[28-29],对此进行三次平行试验,得到中华鳖油提取率为 $81.65\% \pm 0.62\%$,与正交试验结果基本相近,进一步证明最佳工艺的可行性。

2.4 精制前后中华鳖油理化指标对比

通过超声波-复合酶水解法所得中华鳖油部分理化指标不能满足国家水产行业(SC/T 3502-2016)中粗鱼油的一级标准,因此需对中华鳖油进行进一步处理。由于中华鳖油中含有黏液质、部分蛋白质、色

表 2 正交试验设计及结果
Table 2 Design and results of orthogonal experiment

实验号	A	B	C	D	E	F	G	鳖油提取率(%)
1	1	1	1	1	1	1	1	66.27
2	1	2	2	2	2	2	2	82.25
3	1	3	3	3	3	3	3	72.20
4	2	1	1	2	2	3	3	78.13
5	2	2	2	3	3	1	1	77.08
6	2	3	3	1	1	2	2	65.63
7	3	1	2	1	3	2	3	64.21
8	3	2	3	2	1	3	1	73.28
9	3	3	1	3	2	1	2	62.92
10	1	1	3	3	2	2	1	79.36
11	1	2	1	1	3	3	2	63.24
12	1	3	2	2	1	1	3	76.55
13	2	1	2	3	1	3	2	67.95
14	2	2	3	1	2	1	3	81.45
15	2	3	1	2	3	2	1	61.18
16	3	1	3	2	3	1	2	69.32
17	3	2	1	3	1	2	3	69.34
18	3	3	2	1	2	3	1	73.28
k ₁	73.31	70.87	66.85	69.01	69.84	72.27	71.74	
k ₂	71.90	74.44	73.55	73.45	76.23	70.33	68.55	
k ₃	68.73	68.63	73.54	71.48	67.87	71.35	73.65	
R	4.59	5.81	6.71	4.44	8.36	1.94	5.10	
最优水平	A ₁	B ₂	C ₂	D ₂	E ₂	F ₁	G ₃	

表 3 正交试验方差分析
Table 3 Orthogonal test analysis of variance

因素	偏差平方和	自由度	F值	P值
A	66.245	2	2.477	0.232
B	103.127	2	3.856	0.148
C	179.561	2	6.715	0.048
D	59.332	2	2.219	0.256
E	229.294	2	8.574	0.037
F	11.262	2	0.421	0.690
G	79.528	2	2.974	0.194
误差	40.112	3		

素、水分等杂质,通过参照 1.2.7 方法进行精制处理。由表 4 结果可知,经过精制中华鳖油外观澄清,微黄色,腥臭味不明显,无酸败味。从各项理化指标对比来看,均优于中华鳖油品质,且均符合国家水产行业标准(SC/T 3502-2016)精制鱼油一级标准。

2.5 精制中华鳖油脂肪酸组成分析

运用气相色谱分析精制中华鳖油的脂肪酸组成及含量,结果见表 5。由表 5 结果可知,通过气相色谱仪测定所得精制中华鳖油含有脂肪酸共计 28 种。这与其它鱼油研究相比,脂肪酸组成略有差异,可能是由于实验对象品种、季节气候条件等差异引起的^[30-31]。其中油酸、棕榈酸、亚油酸所占比例较高,饱和脂肪酸占总量 23.81%,单不饱和脂肪酸占总量 46.94%,多不饱和脂肪酸占总量 26.38%。精制中华鳖油中含有 ω -3 脂肪酸占总量 11.83%, ω -6 脂肪酸占总量 15.51%。 ω -3 脂肪酸、 ω -6 脂肪酸作为人体体内无法自身合成的“好脂肪”^[32],能有效降血压、降血液黏稠度、软化血管作用。有研究表明,体内 ω -3 脂肪酸含量高的人群,心源性猝死的发病率比

ω -3 低的人群低 81%^[33]。此外,中华鳖油中含有 DHA 与 EPA 含量占总量 10.05%。DHA 和 EPA 具有促进脑部发育、促进视网膜光感细胞的成熟、治疗自身免疫缺陷等作用。作为功能性食品、母婴食品的宠儿,深受婴幼儿和中老年人青睐。

3 结论

基于单因素结合正交试验进行工艺优化,得到影响超声波-复合酶水解法中华鳖油提取率最佳工艺条件:料液比为 1:1.5、蛋白酶用量为 2.4%、酶比例为 1:1.5(中性蛋白酶:碱性蛋白酶用量)、酶水解时间 2 h、酶水解温度 65℃、超声功率 180 W、超声时间 30 min,中华鳖油提取率为 81.65%±0.62%。此法所得中华鳖油精制后,各项理化指标均符合国家水产行业标准(SC/T 3502-2016)精制鱼油一级标准。通过气相色谱仪测定所得精制中华鳖油含有脂肪酸共计 28 种。由此可见,通过超声波-复合酶水解法可以提高中华鳖油提取效果且品质较优,后续需要进一步探究此法对不同品种鳖油提取的影响,为规模化综合利用鳖种加工副产物提供理论参考。

表 4 中华鳖油与精制中华鳖油理化指标对比

Table 4 Comparison of physical and chemical indexes between Chinese softshell turtle crude oil and refined Chinese softshell turtle oil

理化指标	精制中华鳖油	SC/T 3502-2016(精制鱼油)		中华鳖油	SC/T 3502-2016(粗鱼油)		
		一级	二级		一级	二级	三级
水分及挥发物(%)	0.03±0.01	≤0.1	≤0.2	0.5±0.02	≤0.3	≤0.5	≤0.8
酸值(以KOH计)(mg/g)	0.73±0.09	≤1.0	≤3.0	3.43±0.18	≤8.0	≤15.0	≤30.0
过氧化值(meq/kg)	2.21±0.12	≤5.0	≤10.0	6.21±0.14	≤12.0	≤20.0	
碘值(g/100 g)	221.82±3.15	≥140		203.59±2.13	≥120		
不溶性杂质(%)	0.07±0.02	≤0.1		0.57±0.08	≤0.5		

表 5 精制中华鳖油脂肪酸组成

Table 5 Refined oil composition of fatty acids

脂肪酸	相对含量(%)	脂肪酸	相对含量(%)
月桂酸(C _{12:0})	0.03±0.00	二十碳三烯酸(C _{20:3n3})	1.18±0.03
肉豆蔻酸(C _{14:0})	1.88±0.01	二十碳四烯酸(C _{20:4n6})	0.09±0.01
肉豆蔻稀酸(C _{14:1})	0.07±0.02	二十碳五烯酸(C _{20:5n3})	3.03±0.14
十五烷酸(C _{15:0})	0.28±0.02	二十一烷酸(C _{21:0})	0.04±0.01
棕榈酸(C _{16:0})	22.14±0.32	山萘酸(C _{22:0})	0.02±0.00
棕榈油酸(C _{16:1})	6.41±0.43	芥酸(C _{22:1n9})	0.14±0.03
十七烷酸(C _{17:0})	0.02±0.00	二十二碳二烯酸(C _{22:2})	0.78±0.10
硬脂酸(C _{18:0})	0.21±0.00	二十二碳六烯酸(C _{22:6n3})	7.57±0.42
反油酸(C _{18:1n9t})	3.39±0.07	二十三烷酸(C _{23:0})	0.05±0.02
油酸(C _{18:1n9c})	38.85±0.71	二十四烷酸(C _{24:0})	0.39±0.02
亚油酸(C _{18:2n6c})	16.15±0.27	二十四碳烯酸(C _{24:1})	0.55±0.17
γ -亚麻酸(C _{18:3n6})	0.11±0.02	饱和脂肪酸(SFA)	25.10±0.40
α -亚麻酸(C _{18:3n3})	1.87±0.01	单不饱和脂肪酸(MUFA)	49.49±1.44
花生酸(C _{20:0})	0.04±0.00	多不饱和脂肪酸(PUFA)	27.81±0.87
二十碳烯酸(C _{20:1})	0.08±0.01	ω -3脂肪酸	12.47±0.57
二十碳二烯酸(C _{20:2})	0.02±0.00	ω -6脂肪酸	16.35±0.30
二十碳三烯酸(C _{20:3n6})	0.04±0.01	DHA+EPA	10.60±0.56

参考文献

- [1] 王丹, 吴反修, 宋丹丹, 等. 2021 年中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2020: 24-27. [WANG D, WU F X, SONG D D, et al. 2021 China fishery statistical yearbook [M]. Beijing: China Agricultural Press, 2020: 24-27.]
- [2] MASON R, SHERRATT S. Eicosapentaenoic acid (EPA) inhibits human low density lipoprotein oxidation in a concentration and time dependent manner at pharmacologic doses *in vitro* [J/OL]. *Atherosclerosis*, 2019, 287: e80. [https://www.atherosclerosis-journal.com/article/s0021-9150\(19\)30687-2/fulltext](https://www.atherosclerosis-journal.com/article/s0021-9150(19)30687-2/fulltext).
- [3] 孙林, 柏友萍, 林伟其. 脂肪因子 Vaspin 在运动与甲鱼油对老年肥胖大鼠胰岛素抵抗的作用 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2020, 36(5): 461-464. [SUN L, BO Y P, LIN W Q. Effects of adipokines Vaspin on exercise and turtle oil on insulin resistance in elderly obese rats [J]. *Chinese Journal of Applied Physiology*, 2020, 36(5): 461-464.]
- [4] RUBIO-RODRIGUEZ N, DE DIEGO S M, BELTRAN S, et al. Supercritical fluid extraction of fish oil from fish by-products: A comparison with other extraction methods [J]. *Journal of Food Engineering*, 2012, 109(2): 238-248.
- [5] 何秋实, 王志兴, 赵城彬. 超声辅助复合酶法制备核桃油工艺研究 [J]. *中国油脂*, 2017, 42(8): 13-16. [HE Q S, WANG Z X, ZHAO C B. Study on the preparation of walnut oil by ultrasonic-assisted compound enzymatic method [J]. *China Oils and Fats*, 2017, 42(8): 13-16.]
- [6] 叶茂, 邓毛程, 李静. 超声波辅助水酶法提取木棉籽油的工艺优化及性质研究 [J]. *粮食与油脂*, 2021, 34(5): 63-67. [YE M, DENG M C, LI J. Study on process optimization and properties of ultrasonic-assisted water enzymatic extraction of kapok seed oil [J]. *Grain and Oil*, 2021, 34(5): 63-67.]
- [7] 黄诚, 尹红. 超声波辅助复合溶剂提取柑橘皮油工艺条件优化 [J]. *现代农业科技*, 2018(12): 262-264. [HUANG C, YIN H. Optimization of ultrasonic-assisted compound solvent extraction process conditions for citrus peel oil [J]. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2018(12): 262-264.]
- [8] 吴非, 李钊, 周琪, 等. 超声波辅助水酶法提取米胚油及其成分分析 [J]. *食品科学*, 2020, 41(24): 233-241. [WU F, LI Z, ZHOU Q, et al. Ultrasonic-assisted water enzymatic extraction of rice germ oil and analysis of its components [J]. *Food Science*, 2020, 41(24): 233-241.]
- [9] 邓韦丝, 王敏, 吕秋冰. 复合酶法提取辣木籽油及其体外抗氧化活性 [J]. *粮食与油脂*, 2019, 32(12): 67-72. [DENG W S, WANG M, LÜ Q B. Extraction of *Moringa oleifera* seed oil by compound enzymatic method and its antioxidant activity *in vitro* [J]. *Food and Oil*, 2019, 32(12): 67-72.]
- [10] 高珊, 郝孟琪. 鲛鱼油提取工艺研究 [J]. *现代食品*, 2021(19): 99-101. [GAO S, HAO M Q. Study on the extraction technology of mackerel fish oil [J]. *Modern Food*, 2021(19): 99-101.]
- [11] HOU Y, KEXIN M, YANG M, et al. Composition, characteristics and antioxidant activities of fruit oils from *Idesia polycarpa* using homogenate-circulating ultrasound-assisted aqueous enzymatic extraction [J]. *Industrial Crops and Products*, 2018, 138(34): 235-237.
- [12] 付雪媛, 钟宏, 宋文山, 等. 章鱼内脏鱼油的提取及品质分析 [J]. *中国油脂*, 2020, 45(5): 17-22. [FU X Y, ZHONG H, SONG W S, et al. Extraction and quality analysis of fish oil from *Octopus viscera* [J]. *China Oils and Fats*, 2020, 45(5): 17-22.]
- [13] SÁNCHEZ-MACHADO D I, LÓPEZ-CERVANTES J, NÚÑEZ-GASTÉLUM J A, et al. Effect of the refining process on *Moringa oleifera* seed oil quality [J]. *Food Chemistry*, 2015, 187: 53-57.
- [14] 叶丽姿, 李佳, 潘英杰, 等. 鱿鱼加工副产物中油脂的综合利用研究进展 [J]. *食品与机械*, 2021, 37(10): 215-221. [YE L Z, LI J, PAN Y J, et al. Research progress on comprehensive utilization of oils and fats in by-products of squid processing [J]. *Food and Machinery*, 2021, 37(10): 215-221.]
- [15] 窦鑫. 大黄鱼鱼肝油的酶法制取与脱腥研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2021. [DOU X. Study on the enzymatic preparation and deodorization of large yellow croaker liver oil [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2021.]
- [16] 王倩倩, 吕顺, 陆剑锋, 等. 酶法提取罗非鱼内脏鱼油及脂肪酸组成分析 [J]. *中国粮油学报*, 2015(9): 72-78. [WANG Q Q, LÜ S, LU J F, et al. Enzymatic extraction of tilapia visceral fish oil and analysis of fatty acid composition [J]. *Chinese Journal of Cereals and Oils*, 2015(9): 72-78.]
- [17] 谢丹, 李磊磊, 谢亮亮. 酶解技术在南极磷虾油提取中的应用研究进展 [J]. *中国油脂*, 2021, 46(4): 133-138. [XIE D, LI L L, XIE L L. Research progress on the application of enzymolysis technology in the extraction of Antarctic krill oil [J]. *China Oils and Fats*, 2021, 46(4): 133-138.]
- [18] 王妍, 崔红花, 蔡振峰, 等. 酶解法从深海明太鱼内脏中提取鱼油工艺研究 [J]. *延边大学农学报*, 2013(2): 147-151. [WANG Y, CUI H H, QI Z F, et al. Study on the extraction of fish oil from deep-sea plaice viscera by enzymatic hydrolysis [J]. *Journal of Agronomy of Yanbian University*, 2013(2): 147-151.]
- [19] 张丽娟, 郑碧远. 复合酶法提取鱿鱼内脏油工艺研究 [J]. *食品工业*, 2018, 39(5): 123-126. [ZHANG L J, ZHENG B Y. Study on the extraction of squid visceral oil by compound enzyme method [J]. *Food Industry*, 2018, 39(5): 123-126.]
- [20] 王文婷, 苏博, 杜丹丹, 等. 酶解法提取鲫鱼下脚料中鱼油的工艺研究 [J]. *兰州文理学院学报 (自然科学版)*, 2019, 33(3): 48-52. [WANG W T, SU B, DU D D, et al. Research on the extraction of fish oil from crucian carp waste by enzymatic hydrolysis [J]. *Journal of Lanzhou University of Arts and Sciences (Natural Science Edition)*, 2019, 33(3): 48-52.]
- [21] 王青, 王晓东, 程安玮, 等. 酶解预处理对水酶法提取牡丹籽油提油率的影响 [J]. *中国食物与营养*, 2019, 25(10): 26-29. [WANG Q, WANG X D, CHENG A W, et al. The effect of enzymolysis pretreatment on the oil extraction rate of water-enzymatic extraction of peony seed oil [J]. *China Food and Nutrition*, 2019, 25(10): 26-29.]
- [22] 夏蕴实, 刘畅, 王梓, 等. 复合酶水酶法提取鹿油及其脂肪酸组成分析 [J]. *食品工业*, 2021, 42(12): 108-112. [XIA Y S, LIU C, WANG Z, et al. Extraction of deer oil by compound enzyme-water enzymatic method and analysis of its fatty acid composition [J]. *Food Industry*, 2021, 42(12): 108-112.]

- [23] CRAVOTTO G, BOFFA L, MANTEGNA S, et al. Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2008, 15(5): 898–902.
- [24] JACOBS H, DELCOURJ A. Hydrothermal modifications of granular starch, with retention of the granular structure: A review [J]. *J Agri Food Chem*, 1998, 46(8): 2895–2905.
- [25] OLIVEIRA G R, SANTOS A V, LIMA A S, et al. Neural modelling in adsorption column of cholesterol-removal efficiency from milk[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2015, 64: 632–638.
- [26] 赵欣欣, 孔保华, 孙方达, 等. 功率超声对酶催化反应影响因素的研究进展[J]. *食品工业*, 2016, 37(10): 208–211. [ZHAO X X, KONG B H, SUN F D, et al. Research progress on factors affecting enzymatic catalysis by power ultrasound[J]. *Food Industry*, 2016, 37(10): 208–211.]
- [27] 吕鹏, 庄重, 凌建亚, 等. 超声对酶的影响[J]. *生物技术通讯*, 2004(5): 534–536. [LÜ P, ZHUANG Z, LING J Y, et al. Effect of ultrasound on enzymes[J]. *Biotechnology Communications*, 2004(5): 534–536.]
- [28] 李泽民, 何生林, 丁云桥, 等. 五因素混水平正交实验优化鱼鳞胶原提取工艺[J]. *山东化工*, 2019, 48(20): 18–22, 24. [LI Z M, HE S L, DING Y Q, et al. Five-factor mixed-level orthogonal experiment to optimize the extraction process of fish scale collagen[J]. *Shandong Chemical Industry*, 2019, 48(20): 18–22, 24.]
- [29] 李利华. 正交实验法优选花椒多酚的超声波辅助提取工艺[J]. *中国调味品*, 2018, 43(4): 1–3, 27. [LI L H. Optimization of ultrasonic-assisted extraction process of *Zanthoxylum bungeanum* polyphenols by orthogonal experimental method[J]. *China Condiments*, 2018, 43(4): 1–3, 27.]
- [30] SHARMA A, CHAURASIA S P, DALAI A K. Enzymatic hydrolysis of cod liver oil for the fatty acids production[J]. *Catalysis Today*, 2013, 207(30): 93–100.
- [31] RUBIO-RODR GUEZ N, DIEGO S D, BELTR N S, et al. Supercritical fluid extraction of the omega-3 rich oil contained in hake (*Merluccius capensis*-*Merluccius paradoxus*) by-products: Study of the influence of process parameters on the extraction yield and oil quality[J]. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2008, 47(2): 215–226.
- [32] 宋恭帅, 张蒙娜, 马永钧, 等. 大目金枪鱼加工副产物中鱼油提取制备及 EPA 分离纯化[J]. *核农学报*, 2019(6): 1122–1130. [SONG G S, ZHANG M N, MA Y J, et al. Extraction and preparation of fish oil from by-products of bigeye tuna processing and separation and purification of EPA[J]. *Chinese Journal of Nuclear Agriculture*, 2019(6): 1122–1130.]
- [33] 于淑池, 李晨晨, 徐云升, 等. 金鲳鱼骨中鱼油的提取工艺及脂肪酸成分分析[J]. *食品工业*, 2021, 42(3): 147–152. [YU S C, LI C C, XU Y S, et al. Extraction process and fatty acid composition analysis of fish oil from golden pomfret bones[J]. *Food Industry*, 2021, 42(3): 147–152.]