

基于湛江对虾下脚料水解产物抗氧化活性优化酶解工艺

梁铭豪¹, 钟秋琼¹, 徐 焯², 张世奇^{1*}

¹岭南师范学院食品科学与工程学院, 广东 湛江

²广东省湛江市质量计量监督检测所, 广东 湛江

收稿日期: 2023年12月6日; 录用日期: 2024年1月29日; 发布日期: 2024年2月18日

摘要

通过提高湛江对虾下脚料水解产物的抗氧化活性, 对湛江对虾下脚料的酶解工艺进行优化。以DPPH自由基清除率、羟自由基清除率和还原力为指标, 筛选得到最佳蛋白酶并鉴定湛江对虾下脚料水解产物具有抗氧化性, 然后通过单因素试验和响应面试验确定湛江对虾下脚料的最适酶解条件。结果表明: 最佳蛋白酶为中性蛋白酶, 湛江对虾下脚料水解产物具有抗氧化性, 酶解的最优工艺为温度45℃、pH 7.5、加酶量11,000 U/g, 所得的酶解液的DPPH自由基清除率为71.47%、羟自由基清除率为91.54%、还原力吸光值为2.16。

关键词

湛江对虾, 酶解工艺, 响应面, 抗氧化活性

Optimization of Enzymatic Hydrolysis Process Based on Antioxidant Activity of Hydrolyzed Products from Offal of Penaeus Zhanjiang

Minghao Liang¹, Qiuqiong Zhong¹, Ye Xu², Shiqi Zhang^{1*}

¹College of Food Science and Engineering, Lingnan Normal University, Zhanjiang Guangdong

²Quality Measurement Supervision and Testing Institute of Zhanjiang, Zhanjiang Guangdong

Received: Dec. 6th, 2023; accepted: Jan. 29th, 2024; published: Feb. 18th, 2024

*通讯作者。

文章引用: 梁铭豪, 钟秋琼, 徐焯, 张世奇. 基于湛江对虾下脚料水解产物抗氧化活性优化酶解工艺[J]. 食品与营养科学, 2024, 13(1): 69-82. DOI: 10.12677/hjfn.2024.131010

Abstract

The enzymatic hydrolysis process of *Penaeus Zhanjiang* offal was optimized by improving the antioxidant activity of hydrolyzed products from offal of *Penaeus Zhanjiang*. Using DPPH radical scavenging rate, hydroxyl radical scavenging rate and reducing power as indexes, the optimal protease was screened and the antioxidant activity of the hydrolyzed product of *Penaeus Zhanjiang* offal was identified. Then, the optimal enzymatic hydrolysis conditions of *Penaeus Zhanjiang* offal were determined by single factor test and response surface test. The results show that: the optimal protease was neutral protease, and the hydrolyzed product from the offal of *Penaeus Zhanjiang* had antioxidant activity. The optimal enzymatic hydrolysis process was 45°C, pH 7.5 and enzyme dosage of 11,000 U/g. The DPPH free radical scavenging rate and hydroxyl free radical scavenging rate of the obtained enzymatic hydrolysis solution were 71.47%, 91.54% and 2.16.

Keywords

Penaeus Zhanjiang, Enzymatic Hydrolysis Process, Response Surfaces, Antioxidant Activity

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

抗氧化多肽是一种有抗氧化作用的生物活性肽,它包含 2~20 种氨基酸,有时甚至多于 20 种氨基酸。抗氧化多肽在蛋白的序列中并不活跃,通过水解释放出来才有活性[1]。抗氧化肽的作用机制包括清除自由基、调节肠道菌群、保护细胞等,因此适量摄入具有抗氧化性的食物,能够让人体内的自由基保持平衡,增强人体的免疫功能,从而保持人体健康[2] [3]。抗氧化肽的来源有植物性来源和动物性来源,植物性来源有绿豆[4]、燕麦[5]、鹰嘴豆[6]、玉米[7]和杏鲍菇[8]等,动物性来源有鲭鱼[9]、扇贝[10]、扁舵鲹鱼[11]、鸽血[12]和鸡肉[13]等。海洋生物作为抗氧化肽的理想来源,海洋生物抗氧化肽的研究在医药、化妆品、保健品行业具有广泛的应用[14]。

广东是对虾养殖第一大省,而湛江对虾的养殖规模居广东首位。湛江对虾产业依靠其独特的海洋环境和地理位置,已发展成为一条成熟的产业链[15]。对虾在加工过程中会产生占总质量 30%~40%的下脚料,这些下脚料主要包括虾头、虾壳等[16] [17]。对虾加工下脚料的主要成分为甲壳素、蛋白质和脂肪,同时其含有的氨基酸和矿物质种类丰富[18]。对虾头的综合利用,目前主要有乙酰壳聚糖、甲壳质、虾黄酱、虾钙粉、虾脑油、虾黄素、几丁质酶和透明质酸酶等相关产品上市[19],这些产品的开发不仅提高了虾头的利用率,也为相关行业提供了更多的资源选择。据李等最新治疗效果分析表明,笔者医院对收治的 17 例面部注射透明质酸导致血管栓塞的患者采取综合治疗,包括局部注射透明质酸酶、按摩、扩张血管、药物湿敷、清创换药及全身抗感染治疗等,结果为 17 例患者中,14 例患者完全康复,2 例患者遗留色素沉着,1 例患者遗留瘢痕[20]。壳聚糖在重金属治理领域有着广泛应用,例如黄吉等研究发现,壳聚糖和甲壳素主要通过混凝、沉淀、絮凝、吸附、浮选、过滤、膜滤等方式去除水中的污染物,特别地,氨基和羟基含量高的壳聚糖可作为吸附剂用于净化含重金属的废水,对价金属的回收和废水处理具有重要的应用价值和市场前景[21]。

但上述利用虾头所开发的产品并未合理利用蛋白质, 浪费了宝贵的蛋白质资源。因此, 本研究以湛江对虾下脚料作为原料, 蛋白酶水解、单因素试验和三响应面试验优化设计来制备抗氧化肽, 并鉴定湛江对虾下脚料水解产物的抗氧化活性, 为湛江对虾下脚料抗氧化肽的研究提供新的思路。

2. 材料与方法

2.1. 试剂与设备

湛江对虾加工下脚料(湛江国联水产开发股份有限公司); 木瓜蛋白酶(980 u/mg, 北京鸿润宝顺科技有限公司); 菠萝蛋白酶(800 u/mg, 北京鸿润宝顺科技有限公司); 中性蛋白酶(200 u/mg, 北京鸿润宝顺科技有限公司); 碱性蛋白酶(200 u/mg, 北京鸿润宝顺科技有限公司); 胰蛋白酶(250 u/mg, 北京鸿润宝顺科技有限公司); 氢氧化钠(分析纯, 广东光华科技股份有限公司); 30%过氧化氢(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 盐酸(分析纯, 廉江市爱廉化试剂有限公司); 三氯乙酸(分析纯, 广东光华科技股份有限公司); 五水硫酸铜(分析纯, 广东光华科技股份有限公司); 无水乙醇(分析纯, 广东光华科技股份有限公司)其他试剂均为国产分析纯。

电子分析天平 AUY120 岛津仪器有限公司; 粉碎机 MJ-BL25B3 美的生活电器制造有限公司; 数显恒温水浴锅 HH-2 常州荣华仪器制造有限公司; 精密 pH 计 PHSJ-4F 上海仪电科学仪器股份有限公司; 电热鼓风干燥箱 DHG-9035A 东方化玻科技有限公司; 紫外可见分光光度计 TU-1810 北京普析通用仪器有限责任公司; 台式高速冷冻离心机 H3-20KR 湖南可成仪器设备有限公司; 旋涡混合器 GL-88B 其林贝尔仪器制造有限公司。

2.2. 试验方法

2.2.1. 原料预处理

使用粉碎机将湛江对虾下脚料粉碎至无明显块状, 装袋置于 -20°C 冰箱中保存备用。

2.2.2. 湛江对虾下脚料的酶解工艺

将虾糜与蒸馏水按照 1:9 的料液比混匀, 将其调节至适合的 pH 值后, 再添加适量的蛋白酶, 置于已调节至适宜温度的恒温水浴锅中酶解 4 h, 酶解结束后置于沸水浴中灭酶 15 min, 冷却后以 10000 r/min 离心 10 min, 取上清液备用[22]。

2.2.3. 蛋白酶的筛选

采用 2.2.2 的酶解工艺, 按表 1 中各蛋白酶的最适条件调整酶解条件, 对虾糜进行酶解, 离心后取上清液, 利用双缩脲法测定其多肽含量, 并将其配制成系列浓度的样品, 同时配制一系列相同浓度的 L-抗坏血酸溶液作为阳性对照, 以 DPPH 自由基清除率、羟自由基清除率和还原力为评价指标, 从五种蛋白酶中筛选出最佳蛋白酶, 并验证湛江对虾下脚料水解产物具有抗氧化活性。

Table 1. Conditions for the enzymatic reaction of various protease

表 1. 各蛋白酶的酶解反应条件

酶种类	最适 pH	最适温度($^{\circ}\text{C}$)	加酶量(U/g)
木瓜蛋白酶	6.0	55	6000
菠萝蛋白酶	7.5	40	6000
胰蛋白酶	8.0	40	6000
中性蛋白酶	7.0	45	6000
碱性蛋白酶	9.0	55	6000

2.2.4. 多肽含量的测定

取 5 mL 酶解液于烧杯中, 再用 5% 三氯乙酸定容至 50 mL 容量瓶中, 混匀后静置 10 min。取 2 mL 样品溶液加入 4 mL 双缩脲试剂混匀, 静置 30 min 后取上清液在 540 nm 下测定吸光值, 对照标准曲线计算样品溶液中的多肽浓度 C (mg/mL)。

用 5% 三氯乙酸(TCA)溶液配制一系列浓度的谷胱甘肽(GSH)标准溶液, 取 2 mL GSH 溶液加入 4 mL 双缩脲试剂, 其它步骤同上, 以 GSH 浓度为横坐标, OD₅₄₀ 为纵坐标绘制标准曲线[23] (图 1)。

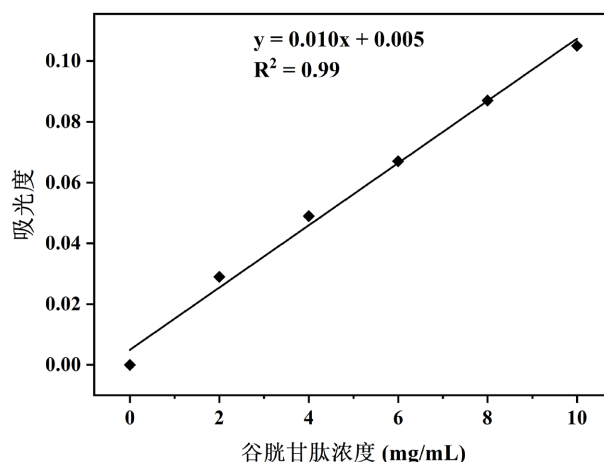


Figure 1. Glutathione standard curve

图 1. 谷胱甘肽标准曲线

2.2.5. DPPH 自由基清除率的测定

取 2 mL 酶解液与 2 mL DPPH 溶液(0.2 mmol/L)于试管中, 混匀, 在室温下避光反应 30 min, 于 517 nm 处测吸光度, 作样品组; 用等体积的无水乙醇替换 DPPH 溶液, 其余步骤同上, 作对照组; 用等体积的无水乙醇替换酶解液, 其余步骤同上, 作空白组[23]。DPPH 自由基清除率根据下式计算:

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0} \right) \times 100$$

式中 A_i 、 A_j 、 A_0 分别为样品组、对照组、空白组吸光度。

2.2.6. 羟自由基清除率的测定

取 1 mL 酶解液、5 mL FeSO₄ 溶液(1 mmol/L)及 5 mL H₂O₂ 溶液(3 mmol/L)于比色管中, 充分混匀后再加入 14 mL 水杨酸 - 乙醇溶液(3 mmol/L), 置于 37°C 的恒温水浴锅中, 反应 30 min。于 510 nm 处测吸光度, 作样品组; 用等体积的蒸馏水替换 H₂O₂ 溶液, 其余步骤同上, 作对照组; 用等体积的蒸馏水替换酶解液, 其余步骤同上, 作空白组[23]。羟自由基清除率根据下式计算:

$$\text{羟自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_s - A_b}{A_0} \right) \times 100$$

式中 A_s 、 A_b 、 A_0 分别为样品组、对照组、空白组吸光度。

2.2.7. 还原力的测定

样品组: 取 2 mL 酶解液, 2 mL 磷酸盐缓冲液(0.2 mol/L, pH 6.6)与 2 mL 铁氰化钾溶液(1%)于试管中, 振荡混匀, 置于 50°C 恒温水浴锅中保温 20 min, 然后向混合液加入 2 mL 三氯乙酸溶液(10%), 混匀后静

置 10 min, 取 2 mL 上清液置于另一试管中, 再加入 2 mL 蒸馏水和 1 mL 三氯化铁溶液(0.1%), 混匀, 放置 10 min 后, 于 700 nm 处测定其吸光度; 空白组: 用等体积的蒸馏水替换酶解液, 其余与样品组相同[24]。还原力根据下式计算:

$$\text{还原力} = A_s - A_0$$

式中 A_s 、 A_0 分别为样品组、空白组吸光度。

2.3. 单因素试验设计

选择 2.2.3 筛选出的最佳蛋白酶进行酶解。

2.3.1. 温度对湛江对虾下脚料多肽抗氧化活性的影响

料液比 1:9, 加酶量 6000 U/g, pH 7, 分别在温度为 35℃、40℃、45℃、50℃、55℃ 下酶解 4 h, 测定抗氧化活性。

2.3.2. pH 对湛江对虾下脚料多肽抗氧化活性的影响

料液比 1:9, 加酶量 6000 U/g, 温度 45℃, 分别在 pH 为 6、6.5、7、7.5、8 下酶解 4 h, 测定抗氧化活性。

2.3.3. 添加酶量对湛江对虾下脚料多肽抗氧化活性的影响

料液比 1:9, 温度 45℃, pH 7.5, 分别加入 8000、9000、10,000、11,000、12,000 U/g 蛋白酶酶解 4 h, 测定抗氧化活性。

2.4. 响应面试验设计

基于单因素试验结果, 以各因素 3 个最佳条件作为自变量, 酶解液 DPPH 自由基清除率、羟自由基清除率和还原力为响应值, 进行响应面试验。运用 Box-Behnken 设计 3 因素 3 水平试验(表 2), 确定湛江对虾下脚料抗氧化肽最佳酶解工艺。

Table 2. Code in response surface design

表 2. 响应面设计编码表

因素	水平		
	-1	0	1
A 温度(℃)	40	45	50
B pH	6.5	7	7.5
C 加酶量(U/g)	9000	10,000	11,000

3. 结果与分析

3.1. 蛋白酶的筛选及鉴定湛江对虾下脚料多肽的抗氧化活性

3.1.1. 不同蛋白酶对 DPPH 自由基清除率的影响

由图 2 知, 浓度增大, DPPH 自由基清除率也随之增大, 表明湛江对虾下脚料水解产物与 L-抗坏血酸具有 DPPH 自由基清除能力。不同蛋白酶酶解得到的水解产物的 DPPH 自由基清除率由高到低依次为: 中性蛋白酶 > 木瓜蛋白酶 > 碱性蛋白酶 > 菠萝蛋白酶 > 胰蛋白酶, 但均弱于 L-抗坏血酸。当质量浓度为 25 mg/mL 时, 由中性蛋白酶酶解得到的水解产物的 DPPH 自由基清除率为 64.63%, 最为接近对照

品 L-抗坏血酸的 DPPH 自由基清除率 91.81%，表明由中性蛋白酶酶解得到的水解产物相较于其它蛋白酶酶解得到的水解产物具有更好的 DPPH 自由基清除能力。

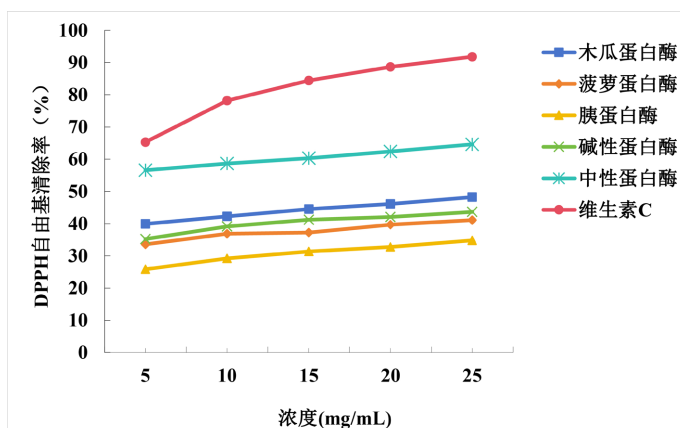


Figure 2. Effect of different protease on DPPH free radical scavenging
图 2. 不同蛋白酶对 DPPH 自由基清除率的影响

3.1.2. 不同蛋白酶对羟自由基清除率的影响

由图 3 知，浓度增大，羟自由基清除率也随之增大，表明湛江对虾下脚料水解产物与 L-抗坏血酸具有羟自由基清除能力。不同蛋白酶酶解得到的水解产物的羟自由基清除率由高到低依次为：胰蛋白酶 > 菠萝蛋白酶 > 碱性蛋白酶 > 中性蛋白酶 > 木瓜蛋白酶，但均弱于 L-抗坏血酸。当质量浓度为 25 mg/mL 时，由胰蛋白酶酶解得到的水解产物的羟自由基清除率为 84.38%，最为接近对对照品 L-抗坏血酸的羟自由基清除率 85.16%，说明由胰蛋白酶酶解得到的水解产物相较于其它蛋白酶酶解得到的水解产物具有更好的羟自由基清除能力。

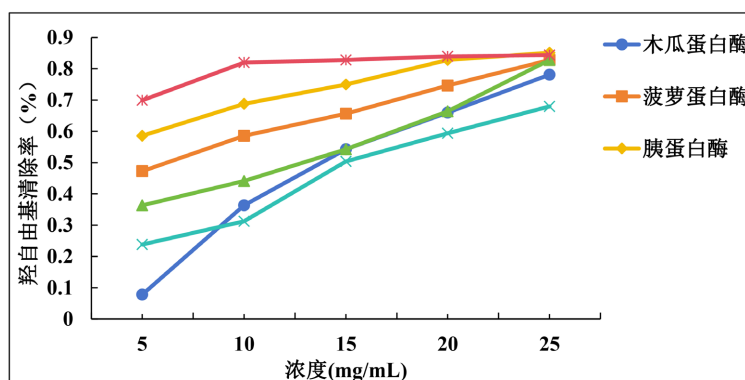


Figure 3. Effect of different protease on hydroxyl radical scavenging
图 3. 不同蛋白酶对羟自由基清除率的影响

3.1.3. 不同蛋白酶对还原力的影响

由图 4 知，浓度增大，还原力也随之增强，表明湛江对虾下脚料水解产物与 L-抗坏血酸具有还原力。不同蛋白酶酶解得到的水解产物的还原力由高到低依次为：中性蛋白酶 > 菠萝蛋白酶 > 碱性蛋白酶 > 胰蛋白酶 > 木瓜蛋白酶，但均弱于 L-抗坏血酸。当质量浓度为 25 mg/mL 时，由中性蛋白酶酶解得到的水解产物的还原力吸光值为 1.627，最为接近对照品 L-抗坏血酸的还原力吸光值 2.063，说明由中性蛋白

酶酶解得到的水解产物相较于其它蛋白酶酶解得到的水解产物具有更好的还原力。

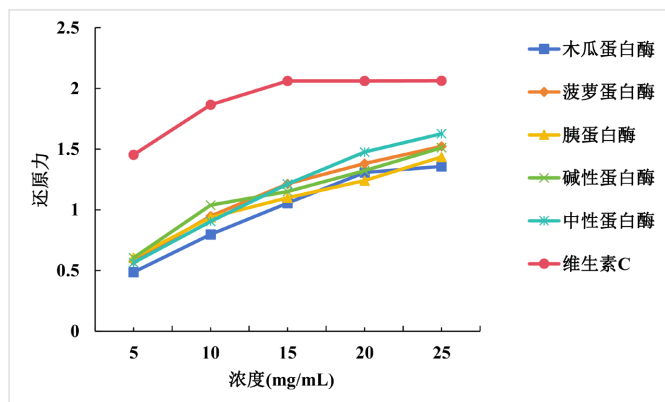


Figure 4. Effect of different protease on reducing power

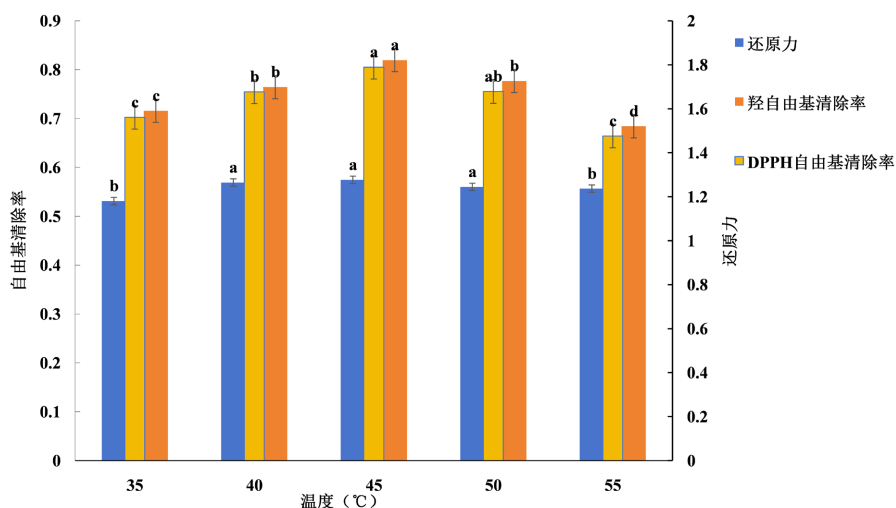
图 4. 不同蛋白酶对还原力的影响

由上述可知，由中性蛋白酶酶解得到的水解产物对 DPPH 自由基的清除作用和还原力最强，而由胰蛋白酶酶解得到的水解产物对羟自由基的清除作用最强。综合各蛋白酶酶解得到的水解产物对抗氧化活性的影响的结果，最终选定中性蛋白酶作为本次试验用酶。

3.2. 单因素试验结果

3.2.1. 温度对抗氧化活性的影响

由图 5 知，DPPH 自由基清除率、羟自由基清除率及还原力三者均随温度的上升呈先升高后降低的趋势，在 45℃时达到最高值。这是因为在某一温度范围内，当温度上升时，蛋白酶的活力会随之上升，酶解所得多肽的含量也随之上升，但温度再继续上升就会导致蛋白酶失活，所以当温度超过 45℃时，抗氧化活性下降。通过显著性分析知，温度为 45℃时对抗氧化活性效果显著($P < 0.05$)。综上所述，确定 45℃为蛋白酶水解的最适温度，因此选择 45℃为试验温度。



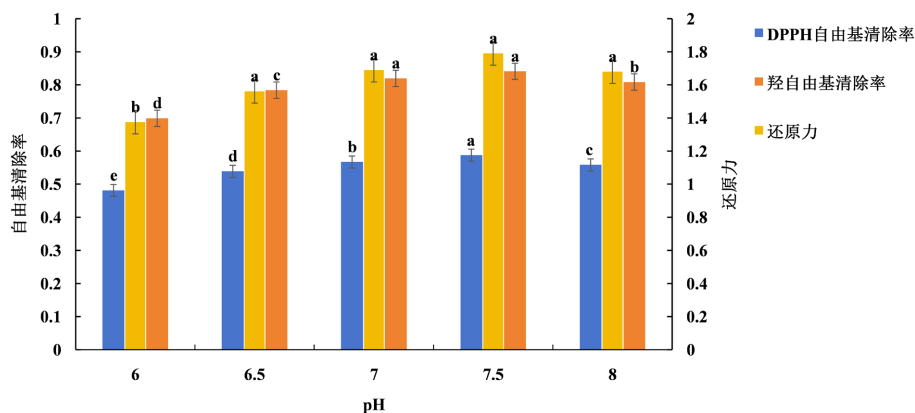
注：不同处理间没有相同的小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Figure 5. Effect of temperature on antioxidant activity

图 5. 温度对抗氧化活性的影响

3.2.2. pH 对抗氧化活性的影响

由图 6 知, DPPH 自由基清除率、羟自由基清除率及还原力三者均随着 pH 的增大呈先升高后下降的趋势, 在 7.5 时达最高值。这是因为 pH 值太高或者太低, 都会对蛋白酶的结构产生影响, 进而影响到酶解的效果。通过显著性分析知, pH 为 7.5 时对抗氧化活性效果显著($P < 0.05$)。综上所述, 确定 7.5 为蛋白酶水解的最适 pH, 因此选择 7.5 为试验 pH。



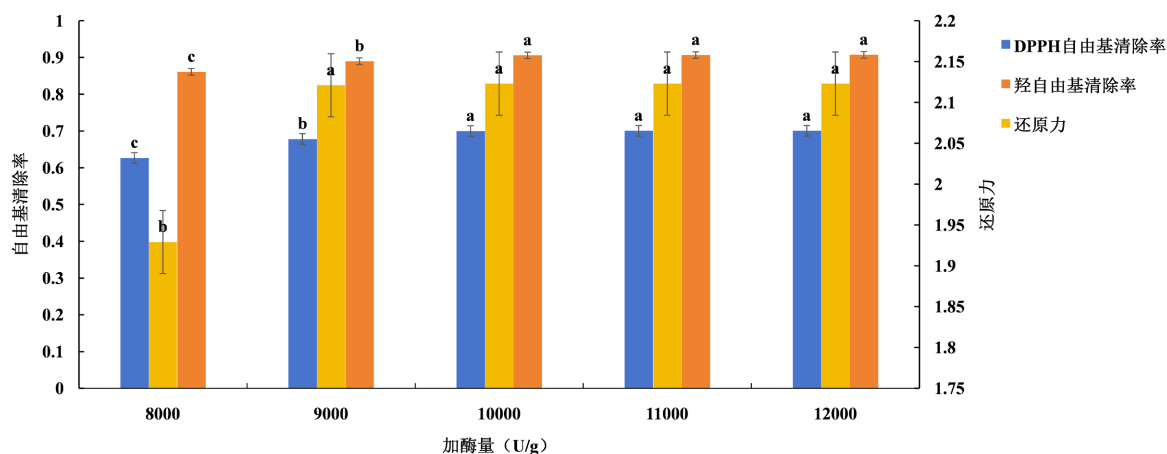
注: 不同处理间没有相同的小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Figure 6. Effect of pH on antioxidant activity

图 6. pH 对抗氧化活性的影响

3.2.3. 加酶量对抗氧化活性的影响

由图 7 知, DPPH 自由基清除率、羟自由基清除率及还原力三者均随加酶量的增加呈先升高后趋于平缓的趋势。开始时升高是因为酶的用量越多, 与底物结合的越多, 能被酶解的蛋白质的量就越多; 后面变得平缓, 是因为底物与蛋白酶的接触位点已达到饱和, 所以后面即使加入再多的酶, 多肽的含量也不会增加。通过显著性分析知, 加酶量为 10,000、11,000、12,000 U/g 时对抗氧化活性效果显著($P < 0.05$), 但考虑成本问题, 选择 10,000 U/g 作为最适加酶量。综上所述, 确定 10,000 U/g 为蛋白酶水解的最适加酶量, 因此选择 10,000 U/g 为试验加酶量。



注: 不同处理间没有相同的小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Figure 7. Effect of enzyme dosage on antioxidant activity

图 7. 加酶量对抗氧化活性的影响

3.3. 响应面试验设计结果

3.3.1. 响应面试验设计结果

根据单因素试验结果, 选择温度 45℃, pH 7.5, 加酶量 10,000 U/g 为优化因素, 以 DPPH 自由基清除率、羟自由基清除率和还原力为响应值, 进行响应面试验。运用 Box-Behnken 设计 3 因素 3 水平试验, 确定湛江对虾下脚料抗氧化肽最佳酶解工艺, 结果如表 3 所示。

Table 3. Design and results of response surface methodology

表 3. 响应面试验设计方案及试验结果

序号	温度(℃)	pH	酶添加量 (U/g)	DPPH 自由基清除率(%)	羟自由基清除率(%)	还原力
1	40	7.5	11,000	68.45	87.86	1.964
2	45	7	11,000	67.67	86.63	1.859
3	45	7	9000	63.39	83.87	1.521
4	40	8	10,000	61.81	80.73	1.17
5	45	8	11,000	66.78	86.29	1.877
6	40	7.5	9000	66.03	79.72	1.743
7	45	7.5	10,000	71.35	90.71	2.123
8	45	7.5	10,000	72.87	91.34	2.123
9	45	7.5	10,000	70.06	90.89	2.124
10	50	7	10,000	61.63	79.92	1.282
11	45	7.5	10,000	71.3	89.79	2.123
12	45	8	9000	63.02	82.45	1.469
13	50	7.5	11,000	67.65	87.51	1.931
14	45	7.5	10,000	69.54	91.65	2.124
15	40	7	10,000	62	81.35	1.232
16	50	7.5	9000	64.38	83.58	1.657
17	50	8	10,000	61.37	77.39	1.171

将表 3 中的试验结果利用 Design-Expert 8.0.6 软件模拟, 得出回归模型方程:

$$\text{DPPH} = 0.71 - 4.075 \times 10^{-3} A - 2.137 \times 10^{-3} B + 0.017 C - 1.750 \times 10^{-4} AB + 2.125 \times 10^{-3} AC - 1.300 \times 10^{-3} BC - 0.040 A^2 - 0.054 B^2 - 4.420 \times 10^{-3} C^2$$

$$\text{OH} = 0.91 + 9.250 \times 10^{-4} A - 3.637 \times 10^{-3} B + 0.023 C + 2.250 \times 10^{-4} AB - 0.011 AC + 2.700 \times 10^{-3} BC - 0.053 A^2 - 0.052 B^2 - 8.730 \times 10^{-3} C^2$$

$$\text{还原力} = 2.12 - 8.500 \times 10^{-3} A - 0.026 B + 0.16 C - 0.012 AB + 0.013 AC + 0.017 BC - 0.38 A^2 - 0.53 B^2 + 0.084 C^2$$

3.3.2. 响应面试验结果的方差分析

由表 4、表 5 和表 6 知, 三个模型的 P 值均小于 0.05, 说明三个模型均显著。以 DPPH 自由基清除

Table 4. Model regression equation variance analysis (DPPH free radical clearance is response value)
表 4. 模型回归方程方差分析(DPPH 自由基清除率为响应值)

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	0.023	9	2.517×10^{-3}	22.50	0.0002	significant
A-温度	1.328×10^{-4}	1	1.328×10^{-4}	1.19	0.3119	
B-pH	3.655×10^{-5}	1	3.655×10^{-5}	0.33	0.5855	
C-加酶量	2.356×10^{-3}	1	2.356×10^{-3}	21.07	0.0025	**
AB	1.225×10^{-7}	1	1.225×10^{-7}	1.095×10^{-3}	0.9745	
AC	1.806×10^{-5}	1	1.806×10^{-5}	0.16	0.6998	
BC	6.760×10^{-6}	1	6.760×10^{-6}	0.060	0.8129	
A ²	6.584×10^{-3}	1	6.584×10^{-3}	58.86	0.0001	**
B ²	0.012	1	0.012	108.42	<0.0001	**
C ²	8.226×10^{-5}	1	8.226×10^{-5}	0.74	0.4195	
残差	7.830×10^{-4}	7	1.119×10^{-4}			
失拟误差	1.109×10^{-4}	3	3.695×10^{-5}	0.22	0.8781	not significant
纯误差	6.722×10^{-4}	4	1.680×10^{-4}			
综合	0.023	16				

注: P < 0.05, 表明差异具备显著性, 用*表示; P < 0.01, 表明差异极显著, 用**表示。

Table 5. Model regression equation variance analysis (hydroxyl radical clearance is response value)
表 5. 模型回归方程方差分析(羟自由基清除率为响应值)

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	0.030	9	3.3873	22.08	0.0002	significant
A-温度	6.845×10^{-6}	1	6.8456	0.045	0.8387	
B-pH	1.059×10^{-4}	1	1.0594	0.69	0.4336	
C-加酶量	4.357×10^{-3}	1	4.357×10^{-3}	28.40	0.0011	**
AB	2.025×10^{-7}	1	2.025×10^{-7}	1.320×10^{-3}	0.9720	
AC	4.431×10^{-4}	1	4.431×10^{-4}	2.89	0.1330	
BC	2.916×10^{-5}	1	2.916×10^{-5}	0.19	0.6760	
A ²	0.012	1	0.012	78.14	<0.0001	**
B ²	0.011	1	0.011	74.02	<0.0001	**
C ²	3.209×10^{-4}	1	3.209×10^{-4}	2.09	0.1913	
残差	1.074×10^{-3}	7	1.534×10^{-4}			
变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
失拟误差	8.716×10^{-4}	3	2.905×10^{-4}	5.75	0.0621	not significant
纯误差	2.022×10^{-4}	4	5.054×10^{-5}			
综合	0.032	16				

注: P < 0.05, 表明差异具备显著性, 用*表示; P < 0.01, 表明差异极显著, 用**表示。

Table 6. Model regression equation variance analysis (reducing force is response value)
表 6. 模型回归方程方差分析(还原力为响应值)

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	2.09	9	0.23	116.63	<0.0001	significant
A-温度	5.780×10^{-4}	1	5.780×10^{-4}	0.29	0.6063	
B-pH	5.356×10^{-3}	1	5.356×10^{-3}	2.70	0.1446	
C-加酶量	0.19	1	0.19	96.92	<0.0001	**
AB	6.003×10^{-4}	1	6.003×10^{-4}	0.30	0.5996	
AC	7.023×10^{-4}	1	7.023×10^{-4}	0.35	0.5708	
BC	1.225×10^{-3}	1	1.225×10^{-3}	0.62	0.4580	
A ²	0.62	1	0.62	312.09	<0.0001	**
B ²	1.16	1	1.16	586.39	<0.0001	**
C ²	0.030	1	0.030	14.98	0.0061	**
残差	0.014	7	1.986×10^{-3}			
失拟误差	0.014	3	4.634×10^{-3}	15447.50	<0.0001	significant
纯误差	1.200×10^{-6}	4	3.000×10^{-7}			
综合	2.10	16				

注: $P < 0.05$, 表明差异具备显著性, 用*表示; $P < 0.01$, 表明差异极显著, 用**表示。

率和羟自由基清除率为响应值的失拟项误差均不显著, 说明回归模型拟合度较高, 可靠性强; 而以还原力为响应值的模型失拟项显著, 表明数据中有少量的差异点。三个模型的相关系数 R^2 分别为 0.9666, 0.9660, 0.9934, 均大于 0.95, 说明相关度好。各因素对 DPPH 自由基清除率和羟自由基清除率的响应均为: C 极显著, A² 极显著, B² 极显著, 对还原力的响应为 C 极显著, A² 极显著, B² 极显著, C² 极显著。由显著性及 F 值可知, 各因素对 DPPH 自由基清除率的响应值影响的顺序为: 加酶量 > 温度 > pH, 对羟自由基清除率和还原力的响应值影响的顺序为: 加酶量 > pH > 温度。

3.3.3. 响应面分析

三维曲线图曲线的弧度反映了因素对响应值的影响程度, 曲线弧度越大表示该因素对响应值的影响越大[25]。响应面等高线图反映了各因素对响应值的影响程度, 坡面越陡表示该因素对响应值影响越显著[26]。由图 8 知, 以 DPPH 自由基清除率为响应值时温度与 pH 两因素间的交互效应响应面坡面最为陡峭, 三维曲面图的弧度最大, 与表 4 中的回归分析结果相符。

3.3.4. 工艺条件的优化和验证

综合上述响应面试验结果, 运用 Design-Expert 8.0.6 软件得到酶法制备湛江对虾下脚料抗氧化肽的最佳工艺为温度 44.88℃、pH 7.48、加酶量 10999.92 U/g, 在此条件下所得的酶解液的 DPPH 自由基清除率为 72.3061%、羟自由基清除率为 92.355%、还原力吸光值为 2.36193。为方便实际操作稍作调整: 温度 45℃、pH 7.5、加酶量 11,000 U/g, 在此条件下所得的酶解液的 DPPH 自由基清除率为 71.47%、羟自由基清除率为 91.54%、还原力吸光值为 2.16。由上述可知实际值与预测值无显著差异, 模型可靠。

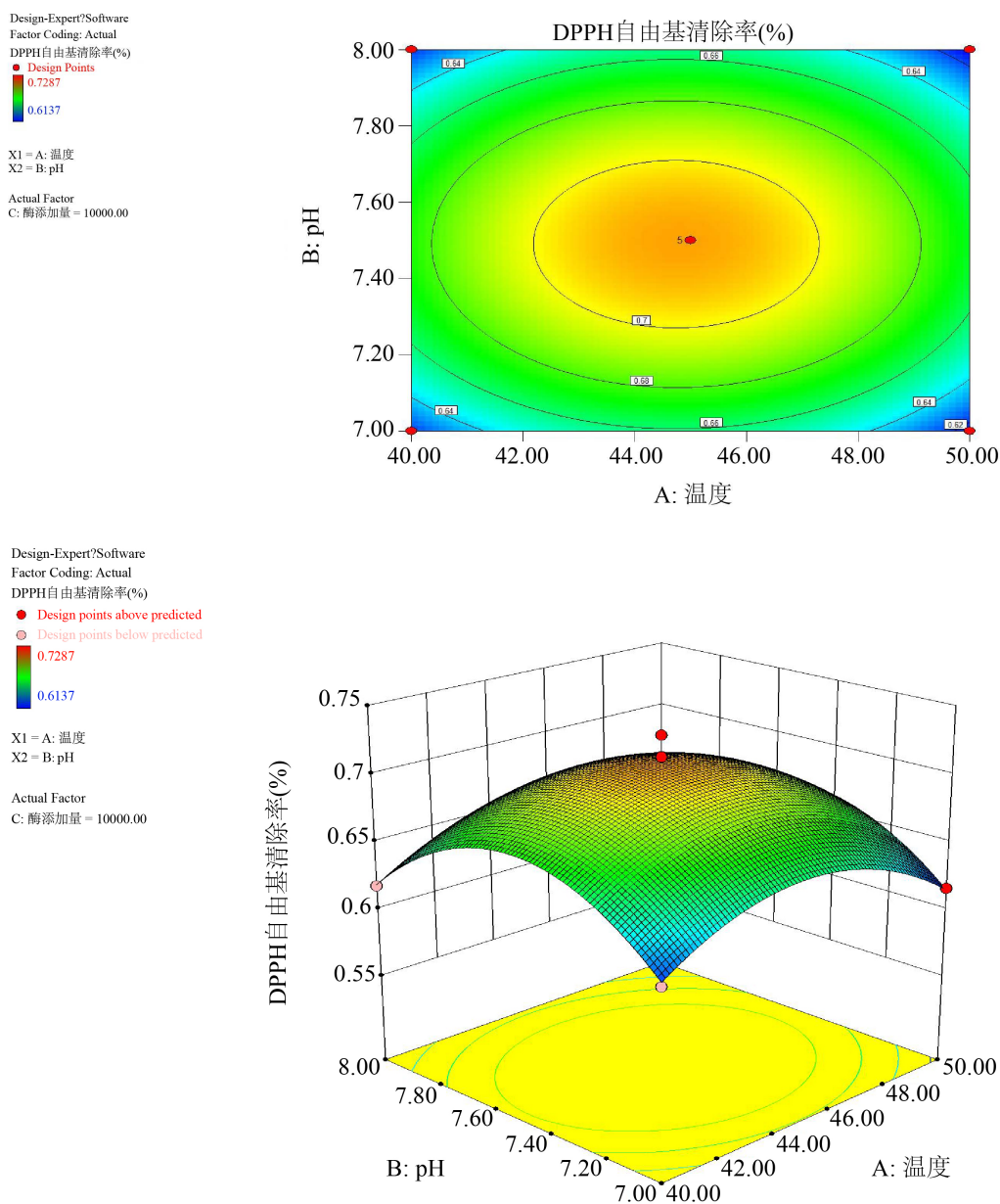


Figure 8. 3-D surface and contour map of enzymolysis temperature and pH on DPPH free radical clearance

图 8. 温度与 pH 对 DPPH 自由基清除率交互影响的三维曲面和等高线图

4. 结论

本试验在筛酶的基础上,验证了湛江对虾下脚料水解产物具有抗氧化性,通过单因素试验探究温度、pH、加酶量对 DPPH 自由基清除率、羟自由基清除率和还原力的影响,经响应面法优化确定酶解最佳工艺为温度 45℃、pH 7.5、加酶量 11,000 U/g,所得的酶解液的 DPPH 自由基清除率为 71.47%、羟自由基清除率为 91.54%、还原力吸光值为 2.16。本研究与刘、符等[27] [28]的研究成果相比,实现了对虾下脚料中抗氧化物质的高效提取,有效保留了对虾下脚料中的抗疲劳、抗氧化多肽成分,且其加工方式也更为环保,为对虾下脚料的高值化应用提供了理论基础和数据支撑。

基金项目

2021 年度湛江市海洋青年人才创新项目(2021E05022)。

参考文献

- [1] Karami, Z., *et al.* (2019) Bioactive Food Derived Peptides: A Review on Correlation between Structure of Bioactive Peptides and Their Functional Properties. *Journal of Food Science and Technology*, **56**, 535-547.
<https://doi.org/10.1007/s13197-018-3549-4>
- [2] 张红玉, 李会珍, 张天伟, 等. 抗氧化肽作用机制研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(12): 3981-3988.
- [3] 赵保路. 自由基、营养、天然抗氧化剂与衰老[J]. 生物物理学报, 2010, 26(1): 26-36.
- [4] 夏吉安, 黄凯, 李森, 等. 绿豆抗氧化肽的酶法制备及其抗氧化活性[J]. 食品与生物技术学报, 2020, 39(10): 40-47.
- [5] 郭蕊. 燕麦抗氧化肽的分离纯化及生物活性研究[D]: [硕士学位论文]. 镇江: 江苏大学, 2022.
- [6] 梁雪荣, 路振康, 毛晓英, 等. 鹰嘴豆抗氧化肽的分离纯化、鉴定及其抗氧化活性[J]. 食品科学, 2023, 44(4): 209-216.
- [7] 姜源. 玉米抗氧化肽的分离纯化与结构鉴定及其完整吸收研究[D]: [硕士学位论文]. 长春: 吉林大学, 2018.
- [8] 赵成萍, 耿正伟, 张咏梅, 等. 酶法水解杏鲍菇谷蛋白制备抗氧化肽[J]. 农产品加工, 2020(17): 14-18+22.
- [9] 周燕芳, 杨启真. 超声波辅助酶解鲭鱼制备抗氧化肽的研究[J]. 天津农业科学, 2018, 24(3): 20-24.
- [10] 李姣, 杨键, 戴世鲲, 等. 扇贝蛋白酶解物中的新型抗氧化肽研究[J]. 中南药学, 2018, 16(5): 633-636.
- [11] 瞿瑜杉. 扁鲣鱼抗氧化肽的制备及其抗疲劳功效研究[D]: [硕士学位论文]. 湛江: 广东海洋大学, 2022.
- [12] 力俊琛. 鸽血抗氧化肽的分离、结构鉴定及体外抗氧化活性评价[D]: [硕士学位论文]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2022.
- [13] 裴小平, 唐道邦, 肖更生, 等. 酶法制备鸡肉蛋白抗氧化肽工艺研究[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(11): 104-109.
- [14] 梁方方, 郑兰红. 海洋生物抗氧化肽的综合应用研究进展[J]. 食品工业, 2017, 38(10): 236-239.
- [15] 白福臣, 金蕙. 湛江对虾出口竞争力分析与对策研究[J]. 经济研究导刊, 2008, 38(19): 187-188.
- [16] 滕瑜, 毕国栋, 于爱美, 等. 凡纳滨对虾的加工利用和产业发展概述[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(14): 5727-5733.
- [17] 舒亦雄, 徐秀芬, 李登, 等. 虾壳酱油制曲条件研究[J]. 中国调味品, 2020, 45(7): 108-113+119.
- [18] 张祥刚, 周爱梅, 林晓霞, 等. 南美白对虾虾头、虾壳化学成分的对比研究[J]. 现代食品科技, 2009, 25(3): 224-227.
- [19] 杨洋. 虾头的综合开发利用研究进展[J]. 齐鲁渔业, 2005(1): 34-35+7.
- [20] 李天竹, 叶飞轮. 注射透明质酸致面部血管栓塞的临床综合治疗效果分析[J]. 中国美容医学, 2023, 32(10): 19-21.
- [21] 黄吉, 黄兆坚, 唐林扬, 等. 壳聚糖及其衍生物在重金属污染治理中的应用[J]. 山西化工, 2023, 43(10): 102-103+109.
- [22] Fu, R., Zhang, Y., Guo, Y., *et al.* (2014) Antioxidant and Tyrosinase Inhibition Activities of the Ethanol-Insoluble Fraction of Water Extract of *Sapium sebiferum* (L.) Roxb. Leaves. *South African Journal of Botany*, **93**, 98-104.
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2014.04.003>
- [23] Bartłomiej, D. and Dziuba, M. (2014) Milk Proteins-Derived Bioactive Peptides in Dairy Products: Molecular, Biological and Methodological Aspects. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, **13**, 5-26.
<https://doi.org/10.17306/J.AFS.2014.1.1>
- [24] Zheng, L., Su, G., Ren, J., *et al.* (2012) Isolation and Characterization of an Oxygen Radical Absorbance Activity Peptide from Defatted Peanut Meal Hydrolysate and Its Antioxidant Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **60**, 5431-5437. <https://doi.org/10.1021/jf3017173>
- [25] 陶文斌, 吴燕燕, 李春生, 等. 响应面法优化腌制大黄鱼的低钠复合咸味剂配方[J]. 食品工业科技, 2019, 40(19): 136-144.
- [26] 郭宏焱, 李冬, 雷雄, 等. 花椒多酚提取工艺响应面优化及动力学分析[J]. 食品科学, 2018, 39(2): 247-253.

- [27] 刘小芳, 黄岳磊, 李雅婷, 等. 南极磷虾蛋白肽的抗氧化活性及稳定性研究[J]. 食品科技, 2022, 47(11): 114-120.
- [28] 符慧靖, 李彦, 于德阳, 等. 响应面法优化风味蛋白酶水解低值河蟹的酶解工艺[J]. 天津农学院学报, 2023, 30(2): 31-37.