

# 南极磷虾酶解液氯化钙法 脱氟工艺的研究

李红艳, 薛长湖, 王灵昭, 王玉明, 薛勇

(中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东青岛 266003)

**摘要:**为解决南极磷虾酶解液氟含量过高问题,以脱氟率为指标,利用响应面法对南极磷虾酶解液氯化钙法脱氟工艺进行优化。优化结果表明,在氯化钙添加量 1.38%,初始 pH9.0,反应温度 20℃时,脱氟率达到 89.43%。而且,氯化钙法脱氟过程对酶解液氨基氮、总氮的影响都不显著,是一种较为理想的脱氟方法。

**关键词:** 南极磷虾 酶解液 响应面法 脱氟 氯化钙

## Study on defluoridation technology of antarctic krill hydrolyzate by adding calcium chloride

LI Hong-yan, XUE Chang-hu, WANG Ling-zhao, WANG Yu-ming, XUE Yong

(College of Food Science and Technology, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

**Abstract:** Seeking a solution to the excessive content of fluoride in antarctic krill (*Euphausia superba*) hydrolyzate, the technology of adding calcium chloride to the hydrolyzate to lower the fluoride content was studied. Taking defluoridation rate as the evaluation index, the condition of defluoridation was optimized through response surface methodology. The results showed that the defluoridation condition was optimal when adding amount of calcium chloride was 1.38% (m/v), initial pH was 9.0, and reaction temperature was 20℃. Under that condition, the defluoridation rate was 89.43%. Besides, the defluoridation process had insignificant effect on amino nitrogen and total nitrogen content of the hydrolyzate, suggesting that this would be an ideal method of defluoridation.

**Key words:** antarctic krill; hydrolyzate; response surface methodology; defluoridation; calcium chloride

中图分类号: TS254.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2011)03-0330-04

南极磷虾是 21 世纪人类巨大的蛋白库,其开发利用有着广阔的前景。任艳<sup>[1]</sup>等对南极磷虾进行酶解获得磷虾蛋白酶解液,蛋白回收率可达到 80% 以上,是一种较为理想的磷虾蛋白利用方式。但是,磷虾酶解液存在氟含量过高的问题(氟含量达 50~60mol/L)。氟是一种具有双阈值性质的微量生命元素,摄入量过高会引起氟斑牙、氟骨病等一系列疾病<sup>[2]</sup>。GB4809-1984 规定了食品中氟允许量的标准<sup>[3]</sup>,要求鱼类(淡水)氟含量应小于 2.0mg/kg,而海产品由于地域差异导致氟含量变化很大,难以规定统一的标准。我国卫生部食品氟允许量制定协作组于 1981 年规定,每人每天摄取氟的安全限量为 3.5mg<sup>[4]</sup>。为达到安全食用的要求,需要对磷虾酶解液中的氟进行脱除。钙盐沉淀法是化学沉降脱氟的常规处理方法,其原理是  $\text{Ca}^{2+} + 2\text{F}^{-} = \text{CaF}_2 \downarrow$ 。该方法具有简单、处理方便、成本低等优点,在工业处理

含氟废水中得到广泛应用<sup>[5]</sup>。本研究采用氯化钙法对南极磷虾酶解液进行脱氟,并对影响脱氟效果的因素(添加量、温度、pH、反应时间等)进行研究,采用响应面法优化得到最佳脱氟工艺,为进一步探索磷虾酶解液的加工利用,达到安全食用的要求做准备。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料与仪器

南极磷虾胰蛋白酶酶解液 实验室自制<sup>[1]</sup>;氯化钙、氢氧化钠、硫酸铜、硫酸钾、冰乙酸、柠檬酸钠、高氯酸、氯化钠等 均为分析纯。

PHS-3C 精密酸度计 上海雷磁仪器厂;HH-4 电热恒温水浴锅 国华企业;GL-G-II 立式离心机 上海安亭科学仪器厂;JB-1A 磁力搅拌器 上海精密科学仪器有限公司;PF-1 氟选择电极、232 甘汞参比电极 上海雷磁精密仪器有限公司。

#### 1.2 实验方法

1.2.1 分析方法 氟含量分析:0.1mol/L 高氯酸浸提-氟离子选择电极法;氨基氮含量分析:甲醛滴定

收稿日期:2010-03-26

作者简介:李红艳(1988-),女,硕士研究生,研究方向:水产品加工与贮藏。

法; 蛋白质含量分析: 微量凯氏定氮法; 数据分析: design expert 7.1.3。

$$\text{脱氟率} = 1 - \frac{\text{脱氟后酶解液氟含量}}{\text{脱氟前酶解液氟含量}} \times 100\%$$

$$\text{氨基氮损失率} = 1 - \frac{\text{脱氟后酶解液氨基氮含量}}{\text{脱氟前酶解液氨基氮含量}} \times 100\%$$

### 1.2.2 脱氟条件的单因素优化

1.2.2.1 氯化钙添加量的单因素实验 向酶解液中分别添加 0.1%、0.5%、1%、1.5%、2% 的氯化钙, 磁力搅拌混匀, pH 不加调整, 25℃ 水浴反应沉降 2h, 4800r/min 离心分离, 取上清液回调 pH 至初始 pH, 测定脱氟率和氨基氮损失。

1.2.2.2 初始 pH 的单因素实验 向酶解液中添加适量的氯化钙, 磁力搅拌混匀, pH 分别调整为 7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、11.0、12.0, 25℃ 水浴反应沉降 2h, 4800r/min 离心分离, 取上清液回调 pH 至初始 pH, 测定脱氟率和氨基氮损失。

1.2.2.3 沉降时间的单因素实验 向酶解液中添加适量的氯化钙, 磁力搅拌混匀, pH 不加调整, 25℃ 水浴分别反应沉降 0、0.25、0.5、1、2、3、4、5h, 4800r/min 离心分离, 取上清液回调 pH 至初始 pH, 测定脱氟率和氨基氮损失。

1.2.2.4 沉降温度的单因素实验 向酶解液中添加适量的氯化钙, 磁力搅拌混匀, pH 不加调整, 分别于 4、25、30、35、40、45℃ 水浴沉降反应 1h, 4800r/min 离心分离, 取上清液回调 pH 至初始 pH, 测定脱氟率和氨基氮损失。

1.2.3 响应面法优化脱氟条件 在单因素实验的基础上, 选择对脱氟率影响较大的氯化钙添加量、初始 pH、反应温度三个因素, 按照 Box-Bohnken 设计法每个因素取三个水平, 以 (-1 0 1) 编码进行实验, 以脱氟率为响应值, 借助 design expert 7.1.3 软件进行数据分析并建立二次响应面经验模型, 从而寻找最佳脱氟条件。共有 17 个实验, 其中 12 个为析因点, 5 个为零点以估计误差。实验因素水平设计如表 1。

表 1 因素水平设计表

| 因素          | 水平  |    |     |
|-------------|-----|----|-----|
|             | -1  | 0  | 1   |
| A 氯化钙添加量(%) | 0.5 | 1  | 1.5 |
| B 初始 pH     | 7   | 8  | 9   |
| C 反应温度(℃)   | 20  | 30 | 40  |

## 2 结果与讨论

### 2.1 氟离子检测标准曲线的绘制

由 0.1mol/L 高氯酸浸提-氟离子选择电极法, 获得氟离子检测的标准曲线方程为  $y = 58.6x - 246.16$ , 其中  $y$  为电势值 (mV),  $x$  为氟离子浓度的对数 [ $\lg C(F^-)$ ],  $R^2$  为 0.9998, 在氟浓度 0.05~500mol/L 范围内线性关系良好。

### 2.2 单因素实验

2.2.1 氯化钙添加量对脱氟的影响 由图 1 可以看出, 随着氯化钙添加量的增加, 酶解液脱氟率逐渐增加, 添加量超过 1% 后, 脱氟率随添加量的增幅变缓, 这与 M.Islam 等<sup>[6]</sup>的研究结果类似。M.Islam 认为, 这

可能是由于添加量大时反应活性位点重叠, 有效表面积减小的缘故。实验中还发现, 氯化钙添加量过大会使酶解液有酸涩味和苦味, 而且, 氯化钙作为食品加工助剂, 国标<sup>[7]</sup>中规定一般应在制成最后成品之前除去, 有规定食品中残留量的除外。因而添加量并非越大越好, 综合考虑我们认为氯化钙添加量 1% 为宜。

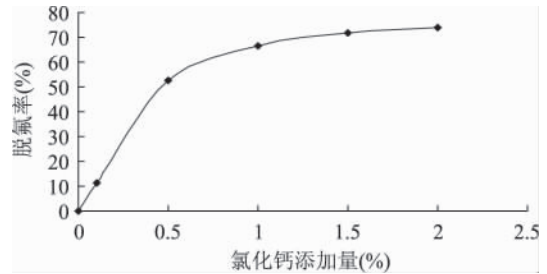


图 1 氯化钙添加量与脱氟率的关系

2.2.2 初始 pH 对脱氟率的影响 由图 2 可知, 随着初始 pH 的升高, 脱氟率呈先上升后稳定不变的趋势, 在约 pH 8.5 时首先达到最大脱氟率, 其后脱氟率基本保持不变。这与王歆然等<sup>[8]</sup>的研究结果略有不同, 王歆然等的研究表明, 氯化钙与原水中的氟反应最佳 pH 为 7.0~9.0, 当 pH > 10 时, 氟的去除率大幅降低, 认为这与 pH 高时,  $Ca^{2+}$  与  $OH^-$  形成  $Ca(OH)_2$  使  $Ca^{2+}$  浓度降低有关。但是由本实验结果来看, pH > 10 时, 脱氟率没有大的变化, 推测是由于酶解液中大量的氨基酸小肽等起到缓冲作用的缘故。

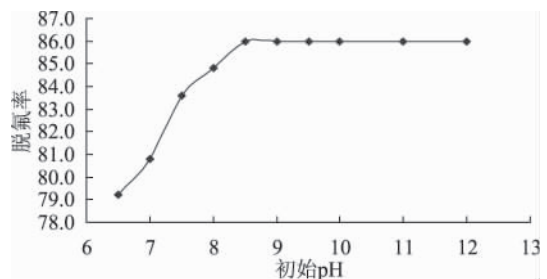


图 2 初始 pH 对脱氟率的影响

2.2.3 沉降时间对脱氟率的影响 据文献 [9] 报道, 因为  $Ca^{2+}$  和  $F^-$  生成  $CaF_2$  的反应速度较慢, 且形成的  $CaF_2$  微细晶粒本身具有一定的溶解度, 所以达到平衡时需较长的时间, 脱氟反应的沉降时间对脱氟率有显著影响。

由图 3 可以看出, 酶解液的吸附沉降反应非常迅速, 在 0.5h 时已经基本达到平衡, 延长沉降时间对提高脱氟率无显著作用 (78.4%~80.4%), 这与 M.Islam 等<sup>[6]</sup>的研究结果基本相符。因此选定沉降最佳时间为 0.5h。

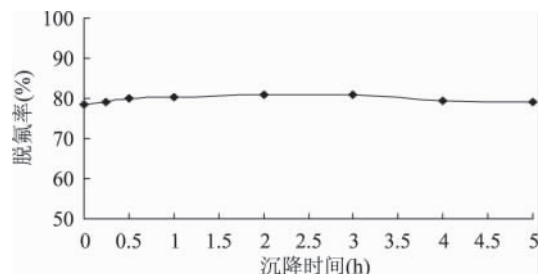


图 3 沉降时间对脱氟率的影响

2.2.4 沉降温度对脱氟率的影响 由图 4 可以看出,

脱氟率随温度升高而增大。沉降温度由 4℃ 上升至 25℃ 时,脱氟率显著提高;温度超过 30℃ 后,脱氟率随温度升高变化不大,这一结果与 M.Islam 等<sup>[6]</sup>的报道类似。由此推测氯化钙沉脱氟离子脱氟过程是一个吸热过程。

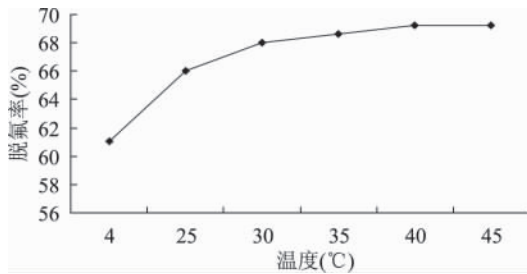


图4 沉降温度对脱氟率的影响

### 2.3 响应面结果分析

响应面的设计方案及实验结果如表 2 所示。

表 2 Box-Bohnken 设计方案及响应值结果

| 实验号 | A   | B | C  | 脱氟率 (%) |
|-----|-----|---|----|---------|
| 1   | 1   | 7 | 40 | 83.59   |
| 2   | 1   | 9 | 40 | 86.52   |
| 3   | 0.5 | 7 | 30 | 73.71   |
| 4   | 1   | 8 | 30 | 84.83   |
| 5   | 1   | 8 | 30 | 84.23   |
| 6   | 0.5 | 8 | 20 | 79.23   |
| 7   | 1   | 7 | 20 | 80.8    |
| 8   | 1.5 | 8 | 40 | 87.04   |
| 9   | 1.5 | 7 | 30 | 83.59   |
| 10  | 1   | 8 | 30 | 84.23   |
| 11  | 1.5 | 8 | 20 | 87.54   |
| 12  | 1   | 8 | 30 | 85.42   |
| 13  | 1   | 8 | 30 | 84.83   |
| 14  | 0.5 | 8 | 40 | 79.23   |
| 15  | 1   | 9 | 20 | 87.54   |
| 16  | 0.5 | 9 | 30 | 81.54   |
| 17  | 1.5 | 9 | 30 | 88.02   |

#### 2.3.1 方差分析 方差分析的结果见表 3。

表 3 方差分析

| 变异来源           | 自由度 | 平方和    | 均方     | F 值    | P 值     | 显著性 |
|----------------|-----|--------|--------|--------|---------|-----|
| 模型             | 8   | 223.59 | 27.95  | 87.82  | <0.0001 | **  |
| A              | 1   | 131.87 | 131.87 | 414.36 | <0.0001 | **  |
| B              | 1   | 60.12  | 60.12  | 188.89 | <0.0001 | **  |
| C              | 1   | 0.20   | 0.20   | 0.63   | 0.4755  |     |
| AB             | 1   | 2.89   | 2.89   | 9.08   | 0.0245  | *   |
| BC             | 1   | 3.63   | 3.63   | 11.40  | 0.0151  | *   |
| A <sup>2</sup> | 1   | 19.88  | 19.88  | 62.46  | 0.0001  | **  |
| B <sup>2</sup> | 1   | 2.83   | 2.83   | 8.90   | 0.0256  | *   |
| C <sup>2</sup> | 1   | 2.21   | 2.21   | 6.95   | 0.0412  | *   |
| 残差             | 8   | 2.55   | 0.32   |        |         |     |
| 失拟项            | 4   | 1.55   | 0.39   | 1.56   | 0.3381  |     |
| 纯误差            | 4   | 0.99   | 0.25   |        |         |     |
| 总变异            | 16  | 226.14 |        |        |         |     |

注:  $P \leq 0.0001$ , 为高度显著, 用 \*\* 表示;  $P \leq 0.05$ , 为显著, 用 \* 表示;  $P > 0.05$ , 为不显著。

利用软件对实验结果进行二次多元回归拟合, 对表 2 的数据进行方差分析后, 除去不显著项 AC 得到模型的二次多项回归方程为:

$$y = +84.71 + 4.06A + 2.74B + 0.16C - 0.85AB - 0.95BC - 2.17A^2 - 0.82B^2 + 0.72C^2$$

由表 3 可知, 失拟项不显著 ( $P = 0.3381 < 0.05$ ), 而模型的  $P$  值  $< 0.0001$ , 表明模型高度显著。从表 3 还可以看出, 因素一次项 (A、B)、交互项 (AB、BC)、二次项 ( $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$ ) 对结果影响是显著的 ( $P < 0.05$ ), 一次项 C 对结果影响不显著 ( $P > 0.05$ )。同时, 软件分析的复相关系数 R 的  $R_{adj}^2$  的值为 97.75%, 表明模型拟合程度良好, 实验误差小, 可以用于对酶解液氯化钙法脱氟进行分析和预测。

2.3.2 响应曲面图分析 手动优化后, 回归方程中的交互项所作的响应面图如图 5、图 6 所示。

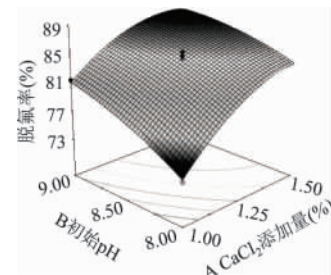


图 5 氯化钙添加量与初始 pH 对脱氟率的影响

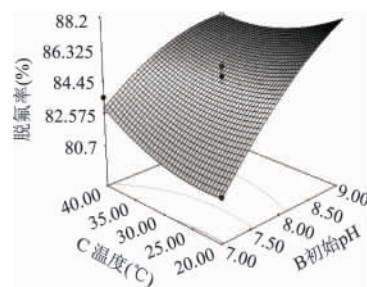


图 6 初始 pH 与反应温度对脱氟率的影响

由图 5、图 6 可以看出, 在所选范围之内, 脱氟率随氯化钙添加量的增加和 pH 的升高而升高, 随温度的升高先上升后下降。并且氯化钙添加量与 pH 的交互作用比较显著, 温度的影响不显著, 这与表 3 的结果一致。

2.3.3 验证实验 通过 Design Expert 7.1.3 软件对经手动优化后的回归方程求解, 在实验的因素水平范围内预测氯化钙脱氟的最佳条件为: 氯化钙添加量 1.38%, 初始 pH 为 9.0, 反应温度 20℃, 此时的酶解液脱氟率达到 89.43%。在此条件下, 进行三次验证性实验, 测得的脱氟率为 87.54%, 与理论预测值基本吻合, 平均误差为 2.11%, 说明手动优化后的回归方程对磷虾酶解液氯化钙脱氟的分析和预测都非常可靠。

### 2.4 脱氟过程中酶解液中氨基氮的变化

单因素实验过程中, 对酶解液总氮和氨基氮指标的检测表明, 氯化钙法脱氟对酶解液的营养成分影响不显著 (总氮损失约 5%, 氨基氮约 3%)。图 7 是响应面实验中氨基氮损失率与脱氟率的关系图, 由图 7 可见, 在氯化钙法脱氟的过程中, 氨基氮损失率随脱氟率的增加而呈增加趋势, 但是损失率仅在 3% 左右, 表明该方法对酶解液的主要营养成分破坏不显著, 是比较理想的脱氟方法。

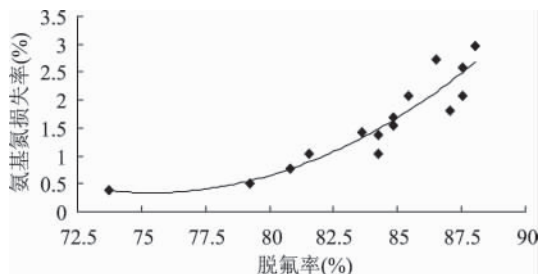


图7 氨基氮损失率与脱氟率的关系

### 3 结论

通过响应面法优化得到对南极磷虾酶解液氯化钙法脱氟的最佳工艺为:氯化钙添加量 1.38%,初始 pH9.0,反应温度 20℃。经验证,脱氟后酶解液氟含量为 8.3mg/L,实际脱氟率达到理论预测值的 97.89%。氯化钙法脱氟过程对酶解液氨基氮、总氮的影响都比较小,是一种较为理想的脱氟方法,对南极磷虾酶解液的进一步开发利用和安全食用有重要意义。

研究中发现,酶解液在氯化钙法脱氟处理后略有苦味涩味,在进一步开发时需要将残存的钙离子除去或通过调味、添加掩蔽剂等掩蔽苦味,这将是今后研究中着重解决的问题。

(上接第 329 页)

根据方差分析结果可知,在本正交实验选取的水平范围内,超声波强度对提取率的影响显著。

表3 方差分析表

| 因素    | 偏差平方和 | 自由度 | F 比    | F <sub>0.05</sub> 临界值 | 显著性 |
|-------|-------|-----|--------|-----------------------|-----|
| A 料液比 | 0.134 | 2   | 7.882  | 19.000                |     |
| B 时间  | 0.017 | 2   | 1.000  | 19.000                |     |
| C 强度  | 0.643 | 2   | 37.824 | 19.000                | *   |
| 误差    | 0.02  | 2   |        |                       |     |

### 3 结论

本文利用超声波技术提取栀子总甾醇,以石油醚为提取溶剂,通过单因素实验得出当超声波处理功率 100W,超声波处理时间 20min,栀子籽粉与溶剂的比例为 1:8,栀子果油得率较高。在此基础上,通过正交实验对栀子总甾醇的超声波提取工艺进行优化,得出较优工艺条件为:料液比 1:8,超声波功率为 100W,超声波处理时间为 25min。在该条件下,超声波提取法提取的栀子总甾醇得率为 3.12mg/g。利用超声波技术提取的栀子总甾醇得率高,且甾醇成分全面,适合对栀子果油中总甾醇的化学成分组成和生理活性进行系统研究,可为合理有效利用栀子资源提供理论基础。

植物甾醇具有显著的降胆固醇功能,天然食物中较低剂量的植物甾醇即具有降低血浆胆固醇的作用,在特定人群的膳食中每日补充 2g 植物甾醇酯或甾烷醇酯可使血浆低密度脂蛋白胆固醇降低 10%<sup>[9]</sup>。其机理已通过基因工程得以证实。此外最新研究发现有几种植物甾醇还具有抗氧化效应,在

### 参考文献

- [1]任艳.南极磷虾蛋白加工利用的初步研究[D].中国海洋大学,2009.
- [2]Meenakshi R C.Maheshwari.Fluoride in drinking water and its removal[J].Journal of Hazardous Materials,2006,137:456-463.
- [3]国家标准局.GB 4809-1984 食品中氟允许量标准[S].北京:中国标准出版社,1984.
- [4]陆英,刘仲华.茶叶中氟的研究进展[J].吉首大学学报:自然科学版,2004,25(4):84-88.
- [5]陈后兴,罗仙平,刘立.含氟废水处理研究进展[J].四川有色金属,2006(1):31-35.
- [6]Islam R K.Patel.Evaluation of removal efficiency of fluoride from aqueous solution using quick lime[J].Journal of Hazardous Materials,2007,143:303-310.
- [7]中华人民共和国卫生部 中国国家标准化管理委员会.GB 2760-2007 食品添加剂使用卫生标准[S].北京:中国标准出版社,2007.
- [8]王歆然,石健,严淑,等.pH对氯化钙除氟效率的影响研究[J].消费导刊,2008(7):71-72.
- [9]刘庆斌.无机含氟废水处理的研究进展[J].黄石理工学院学报,2009,25(4):7-10.

植物抗衰老中起重要作用。植物甾醇产品开发在国外已得到迅速发展,各种甾醇类功能性制品不断问世,而我国在该领域的研究开发仍较滞后。栀子是我国特有植物,栀子果是卫生部颁布的第一批药食两用资源,除提取栀子黄色素外,系统研究栀子果油中的甾醇类物质,并进一步开发栀子甾醇类功能性产品,对栀子果的综合利用具有重要意义。

### 参考文献

- [1]槐华安.栀子历史行情[J].农村实用技术,2008(2):34-34.
- [2]管伟举,谷克仁.植物甾醇研究进展[J].粮食与油脂,2007,32(3):5-9.
- [3]李月,陈景萍,段玉峰.植物甾醇功能及开发前景展望[J].粮食与油脂,2004(5):11-13.
- [4]韩建钧.超声波技术和静电技术在现代农业中的应用研究[J].科技情报开发与经济,2008,18(24):209.
- [5]叶爱英,张培培,姚成.植物油中总甾醇的分析[J].南京师范大学学报:工程技术版,2007,7(2):45-48.
- [6]郑敏燕.超声波法提取紫丁香中丁香油的研究[J].青海师范大学学报:自然科学版,2003(3):32-33.
- [7]殷涌光,崔彦如,丁宏伟.超声波辅助提取桦褐孔菌中白桦脂醇的研究[J].农业机械学报,2008,39(4):204-206.
- [8]成纪宇,叶兴乾,江萍,等.超声波辅助提取杨梅核仁油[J].油脂加工,2008(2):50-53.
- [9]周晓星,苏宜香.植物甾醇降胆固醇作用的研究现状[J].国外医学·卫生学分册,2007,34(2):101-105.