

# 金鲳鱼内脏脂肪酶的初步纯化 及鱼皮酶法脱脂的工艺优化

刘洪霞<sup>1,2</sup>, 夏光华<sup>1</sup>, 李川<sup>1</sup>, 张培<sup>1</sup>, 申铨日<sup>1,2,\*</sup>

(1.海南大学食品学院, 海南海口 570228;

2.海南大学热带生物资源教育部重点实验室, 海南海口 570228)

**摘要:**以金鲳鱼内脏为原料,采用磷酸盐缓冲液提取,硫酸铵分级沉淀的方法,初步纯化得到内脏粗脂肪酶;分别探讨了不同反应温度和 pH 对上述粗脂肪酶活力的影响;研究了酶在罗非鱼皮脱脂中的应用,并通过单因素实验和响应面实验优化了鱼皮酶法脱脂工艺。结果表明,经硫酸铵分级沉淀后,金鲳鱼内脏粗脂肪酶的比活力达 12.60 U/mg,纯化倍数为 6.06,纯度达 81.65%;其最适温度为 45 °C,最适 pH 为 8.0,在 0~50 °C 及 pH6.0~11.0 的范围内酶活力较稳定。金鲳鱼内脏粗脂肪酶对罗非鱼皮脱脂实验结果表明,在酶添加量 90 U/g, pH7.5, 温度 37 °C, 作用时间 60 min 的条件下,罗非鱼皮脱脂率达 67.02% ± 1.61%,说明粗脂肪酶能在温和条件下有效脱除鱼皮脂肪。本研究为金鲳鱼加工废弃物的高值化利用提供了一定的理论依据。

**关键词:**金鲳鱼, 内脏, 脂肪酶, 酶法脱脂

## Partial purification of lipase from golden pompano viscera and optimization of enzymatic degreasing of tilapia skin

LIU Hong-xia<sup>1,2</sup>, XIA Guang-hua<sup>1</sup>, LI Chuan<sup>1</sup>, ZHANG Pei<sup>1</sup>, SHEN Xuan-ri<sup>1,2,\*</sup>

(1.College of Food Science and Technology, Hainan University, Haikou 570228, China;

2.Key Laboratory of Tropical Biological Resource of Ministry of Education, Hainan University, Haikou 570228, China)

**Abstract:** The visceral crude lipase was extracted in phosphate buffer saline and partially purified by ammonium sulfate fractionation. The effects of different reaction temperature and pH on crude enzyme activity and stability were studied. In the application of tilapia skin degreasing, the single factor test and response surface test were used to optimize the fish skin enzymatic degreasing process. Experimental results showed that the specific activity, purification factor and purity after  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  precipitation reached 12.60 U/mg, 6.06 and 81.65%, respectively. The optimum temperature and pH was 45 °C and 8.0, respectively. The crude lipase was relatively stable between 0~50 °C and in the pH range of 6.0~11.0. Additionally, the crude lipase was found to be effective in degreasing of tilapia skin. The results showed that the degreasing rate of tilapia skin reached 67.02% ± 1.61% under the conditions of enzyme addition of 90 U/g, pH value of 7.5, temperature of 37 °C for 60 min, indicating that the crude lipase could be effective in the removal of fish skin fat in mild conditions. The results offer experimental basis and theoretical reference and practical foundation for further study of the high value utilization of golden pompano processed waste.

**Key words:** golden pompano; viscera; lipase; enzymatic degreasing

中图分类号: TS254.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2017)20-0098-07

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2017.20.018

脂肪酶(Triacylglycerol acylhydrolase; lipase, E.C.

3.1.1.3) 又称三酰甘油酯基水解酶,可以在油水界面催化水解甘油三酯生成相应的脂肪酸和甘油<sup>[1-2]</sup>。脂肪酶作为加工助剂已被广泛用于食品<sup>[3-4]</sup>和其它

行业<sup>[5]</sup>。为满足工业生产,人们格外关注能够催化特殊反应和在特定 pH、温度条件下有较高活性的特异性酶。由于水产动物具有不同的生理机能、饮食习惯,水产动物源脂肪酶表现出新的活性<sup>[6]</sup>。目前,国

收稿日期: 2017-03-04

作者简介: 刘洪霞(1993-),女,硕士研究生,研究方向:水产资源高效利用技术, E-mail: lhx.jorly.26@163.com。

\* 通讯作者: 申铨日(1968-),男,博士,教授,研究方向:热带水产品精深加工、生理活性物质的分离纯化及功能性评价、海洋医用生物材料的研究开发, E-mail: shenxuanri2009@163.com。

基金项目: 海南省自然科学基金(317038); 海南省重点研发计划(ZDYF2017104); 海南省科协青年科技英才学术创新计划项目(HAST201624); 海南大学科研启动基金项目(KYQD1609)。

内外学者已经从鲮鱼<sup>[7]</sup>、沙丁鱼<sup>[8]</sup>、鲑鱼和鳕鱼<sup>[9]</sup>等鱼类消化腺体中纯化脂肪酶。对于金鲳鱼内脏酶类资源的开发利用研究较少。

金鲳鱼是暖水性中上层鱼类,其生长速度快,味道鲜美,营养价值高<sup>[10]</sup>,在我国东南沿海地区已实现大规模养殖<sup>[11]</sup>。其加工利用率仅为50%~80%,产生大量鱼内脏、鱼头、鱼骨、鱼尾等副产物。这些副产物或直接丢弃,或用于生产鱼粉、鱼饲料,不仅造成环境污染,而且其附加值低。金鲳鱼内脏酶的开发利用有助于提高产品附加值,具有重要的研究价值。

罗非鱼皮是罗非鱼加工过程中的主要副产物之一,已被广泛用于制备胶原蛋白<sup>[12]</sup>。罗非鱼皮脂肪含量高,约占干基的11%,且罗非鱼皮脂肪酸大多数为不饱和脂肪酸,易氧化酸败<sup>[13-14]</sup>,因此脱脂是一道必不可少的工序。与传统的有机溶剂浸提法相比,酶法脱脂专一性强、条件温和、高效安全,适合产业化生产<sup>[15]</sup>。已有很多学者对酶法脱脂进行了研究,李佳<sup>[13]</sup>和蒋丽<sup>[16]</sup>等优化了市售脂肪酶对罗非鱼皮酶法脱脂工艺,脱脂率分别为63.71%和67.5%。然而,目前市售脂肪酶成本较高,且脂肪酶的最适作用温度一般为30~60℃,该温度范围适宜微生物繁殖,但不利于鱼皮后续的加工保存。因此,筛选成本低、作用温度低而脱脂率高的脂肪酶将是未来酶法脱脂研究的重点<sup>[17]</sup>。

本研究以金鲳鱼内脏为原料,初步纯化脂肪酶;探究了温度和pH对酶的活性和稳定性的影响;采用金鲳鱼内脏粗脂肪酶对罗非鱼皮进行酶法脱脂,以脱脂率为评价指标,响应面实验优化脱脂工艺,为金鲳鱼加工废弃物的利用提供一定理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

金鲳鱼(约500~700g/尾)和罗非鱼鱼皮 海南翔泰渔业股份有限公司;标准蛋白 THERMO;棕榈酸对硝基苯酯、脱氧胆酸钠 SIGMA-ALDRICH;蛋白酶抑制剂 Cocktail AMQUAR;其他试剂 均为国产分析纯。

GL-3250A 型磁力搅拌器 海门市其林贝尔仪器制造有限公司;EL303 型分析天平 梅特勒-托利多仪器有限公司;T18 型匀浆机 德国 IKA;ST-16R 型高速冷冻离心机 美国 Thermo Scientific;HH-4 型数显恒温水浴锅 常州奥华仪器有限公司;PHS-3C 型精密 pH 计 上海大普仪器有限公司;TV-1900/TV-1901 型双光束紫外可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司;DYY-2C 型电泳仪 北京六一仪器厂;SZF-06A 型脂肪测定仪 浙江托普云农科技股份有限公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 制备内脏粗酶提取液 参照多数鱼内脏脂肪酶的提取方法<sup>[7-8,18]</sup>并稍作改动,将金鲳鱼即杀后取内脏,去除心脏和胆囊,用去离子水冲洗,将内脏与缓冲液 A(25 mmol/L 缓冲液,含 150 mmol/L NaCl,含蛋白酶抑制剂 Cocktail,一定 pH)按照 1:3 (w/v)

进行匀浆处理 3~4 次,每次 15 s。低速搅拌 45 min,10000 × g 离心 30 min,抽滤,取上清液,为内脏粗脂肪酶液。上述操作皆于 4℃ 进行。对比了使用不同 pH(3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0)的缓冲液提取脂肪酶对酶活力的影响,以最适条件的酶活力为 100%,其他条件用相对酶活力表示。所用缓冲液分别是 Gly-HCl 缓冲液(pH3.0);乙酸-乙酸钠缓冲液(pH4.0 和 pH5.0);磷酸盐缓冲液(pH6.0 和 pH7.0);Tris-HCl 缓冲液(pH8.0 和 pH9.0);Gly-NaOH 缓冲液(pH10.0 和 pH11.0),下同。

1.2.2 硫酸铵分级沉淀 向金鲳鱼内脏粗酶液中边搅拌边缓慢添加硫酸铵至饱和度为 30%,搅拌 30 min 使其完全溶解,4℃、10000 × g 离心 15 min,收集沉淀并溶解于少量缓冲液 B(25 mmol/L 磷酸盐缓冲液,含蛋白酶抑制剂 Cocktail,pH 为 6.0)中;取离心所得上清液继续边搅拌边缓慢添加硫酸铵至饱和度为 45%,搅拌 30 min 后,离心收集沉淀并溶解。按上述方法取上清液继续添加硫酸铵至饱和度为 60%、75%、90%。将不同的硫酸铵饱和度沉淀的蛋白质于 4℃ 透析脱盐,测定每步所得蛋白含量及酶活力,计算比活力与纯化倍数。脂肪酶样品冷冻干燥后密封储存备用。

1.2.3 脂肪酶活力的测定 参照 Winkler and Stuckmann 的方法<sup>[19]</sup>并稍作改动,将 30 mg 棕榈酸对硝基苯酯(para-nitrophenyl palmitate, p-NPP)溶于 10 mL 异丙醇中,与 90 mL 25 mmol/L pH 为 8.0 的缓冲液混合,补充添加 207 mg 脱氧胆酸钠和 100 mg 阿拉伯树胶。将 2.4 mL 上述底物缓冲液与 0.1 mL 适当稀释的酶液混匀,于 45℃ 反应 10 min。反应结束后立即放入-20℃ 5 min 终止反应。于 410 nm 处测定吸光值,代入公式计算酶活。此为标准实验条件。在上述实验条件下,每毫升酶液每分钟催化底物释放出 1 μmol 对硝基苯酚,定义为一个脂肪酶活力单位(U)。

$$X = \frac{CV}{TV'}$$

式中:X-酶活力,U/mL;C-对硝基苯酚的浓度,μmol/mL;V-反应液的终体积,mL;T-反应时间,min;V'-酶液的体积,mL。

1.2.4 蛋白含量的测定 蛋白含量的测定按照 Bradford 法<sup>[20]</sup>,使用牛血清白蛋白为标准样品。

1.2.5 蛋白质电泳分析 根据 Laemmli 法<sup>[21]</sup>,采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析不同硫酸铵饱和度的纯化效果及蛋白质的相对分子量,并用标准蛋白质作对照,分离胶浓度为 15%,浓缩胶浓度为 4.5%,考马斯亮蓝 R-250 染色。

1.2.6 pH 对酶活性和稳定性的影响 收集硫酸铵分级沉淀后脂肪酶比活力和纯化倍数最高的级分,脂肪酶最适 pH 的测定是在 45℃ 下反应 10 min。所用底物为 p-NPP,反应在上述 pH 为 6.0 至 11.0 的缓冲液中进行。以最适 pH 的酶活力为 100%,其他 pH 的酶活力用相对酶活力表示。pH 稳定性的测定时使用上述 pH 为 3.0~11.0 的缓冲液。在进行实验前,样品在缓冲液中孵育 30 min(20℃)。然后在标准实

验条件下测定脂肪酶残余的活力。以初始酶活力为100%,脂肪酶在该pH的稳定性以孵育后残余的活力表示。

1.2.7 温度对酶活性和稳定性的影响 在不同的温度预热底物缓冲液(20~60℃,间隔5℃)10 min,测定脂肪酶在不同温度下的酶活力。以最适温度的酶活力为100%,其他温度的酶活力用相对酶活力表示。为了评估温度对脂肪酶稳定性的影响,样品在不同温度(0~80℃,间隔10℃)孵育30 min,迅速在冰中冷却到0℃。然后在标准实验条件下测定脂肪酶残余的活力。以初始酶活力为100%,脂肪酶在该温度下的稳定性以孵育后残余的活力表示。

1.2.8 金鲳鱼脂肪酶对鱼皮脱脂工艺及优化

1.2.8.1 鱼皮酶法脱脂工艺 参照蒋丽<sup>[16]</sup>等人的方法并稍作改动,在4℃条件下解冻罗非鱼鱼皮,去鳞,去鱼皮内侧残留肉质和脂质,用去离子水洗净,剪成1 cm×1 cm的小片,滤纸吸干表面水分。取5 g鱼皮,按照料液比1:5与去离子水混合,调节pH,添加一定量的金鲳鱼脂肪酶,在一定的时间内,恒温振荡脱脂。鱼皮脱脂后,用去离子水反复漂洗,室温风干,100℃烘干至恒重。参照GB 5009.6-2016,使用索氏抽提法测定鱼皮酶法脱脂前后的粗脂肪含量。

$$\text{脱脂率}(\%) = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100$$

式中: $A_1$ 为脱脂前鱼皮脂肪含量, $A_2$ 为脱脂后鱼皮脂肪含量。

1.2.8.2 鱼皮酶法脱脂的单因素实验 固定pH7,反应温度40℃,时间60 min,分析酶添加量(60、120、180、240、300 U/g鱼皮(以下简称U/g))对鱼皮酶法脱脂效果的影响。固定酶添加量120 U/g,反应温度40℃,时间60 min,分析缓冲液pH(6、7、8、9、10)对鱼皮酶法脱脂效果的影响。固定酶添加量120 U/g,pH7,时间60 min,分析反应温度(25、30、35、40、45℃)对鱼皮酶法脱脂效果的影响。最后,固定酶添加量120 U/g,pH7,反应温度35℃,分析反应时间(45、60、75、90、105 min)对鱼皮酶法脱脂效果的影响。

1.2.8.3 酶法脱脂工艺优化的响应面实验设计 在单因素实验基础上,选择对鱼皮酶法脱脂影响较大的温度、pH和酶添加量这三个因素,以鱼皮脱脂率为响应值,采用Box-Behnken原理,进行三因素三水平实验设计,相应的因素水平见表1。

表1 响应面实验因素与水平表

因素	水平		
	-1	0	1
A 温度(℃)	30	35	40
B pH	6	7	8
C 酶添加量(U/g)	60	120	180

1.2.9 统计分析 每组实验进行三次独立的重复实验,采用SPSS Statistics17软件进行数据方差分析,OriginPro 2016作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 金鲳鱼内脏脂肪酶的提取

在酶的提取过程中,合适pH的缓冲液有利于维持酶的活性和构象稳定性。如图1所示,提取液的酶活力随pH的增大先升后降,pH为6.0的条件下,提取液酶活力最高,故选择pH6.0为缓冲液的最佳pH。这与多数鱼内脏脂肪酶<sup>[7-8,22]</sup>类似,多数选用中性pH的缓冲液提取脂肪酶。

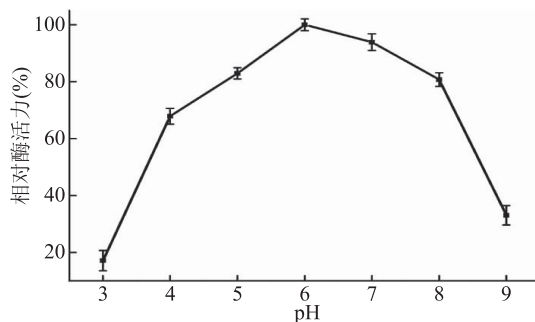


图1 不同pH的提取缓冲液对酶活力的影响

Fig.1 Effect of extraction buffer of different pH on enzyme activity

### 2.2 金鲳鱼内脏脂肪酶的初步纯化

硫酸铵分级沉淀是一种有效的蛋白质粗分离方法。本实验采用硫酸铵分级沉淀对内脏脂肪酶进行初步纯化。如表2所示,采用饱和度为75%~90%的硫酸铵沉淀得到的组分,比活力与纯化倍数均达到最高值,分别为12.60 U/mg和6.06倍。

进一步采用SDS-PAGE鉴定硫酸铵分级沉淀的分离效果并判断脂肪酶的分子量。图2结果表明,粗酶(泳道2)中杂蛋白较多,而经饱和度为75%~90%的硫酸铵沉淀(泳道7)后,电泳条带中杂带明显减少,说明杂蛋白含量较少。通过image J软件分析SDS-PAGE条带的灰度比来间接评价纯化后脂肪酶

表2 硫酸铵分级沉淀结果

Table 2 Result of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  precipitation

纯化步骤	总蛋白(mg)	总酶活(U)	比活力(U/mg)	纯化倍数
粗酶液	1342.74	2799.95	2.08	1
0~30% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀	96.49	136.75	1.42	0.68
30%~45% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀	111.35	227.36	2.04	0.98
45%~60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀	114.69	322.27	2.81	1.35
60%~75% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀	126.56	582.17	4.60	2.21
75%~90% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀	66.02	831.85	12.60	6.06

的纯度,结果表明,使用饱和度为75%~90%的硫酸铵沉淀得到的脂肪酶纯度为81.65%。根据标准蛋白分子量推测出金鲳鱼内脏脂肪酶的相对分子量为14.2 ku。综合考虑,选择饱和度为75%~90%的硫酸铵对金鲳鱼内脏脂肪酶进行初步纯化。

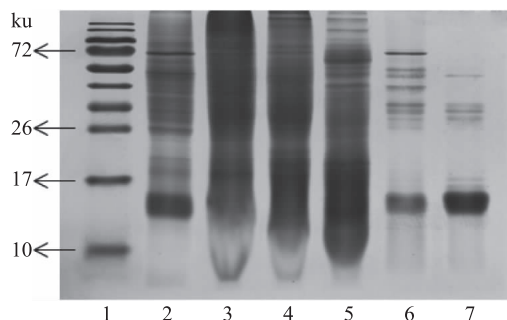


图2 硫酸铵分级沉淀 SDS-PAGE 结果

Fig.2 SDS-PAGE analysis of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  precipitation

注:1、标准蛋白;2、粗酶;3、0~30%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  沉淀;4、30%~45%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  沉淀;5、45%~60%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  沉淀;6、60%~75%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  沉淀;7、75%~90%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  沉淀。

### 2.3 粗脂肪酶的最适反应 pH 和 pH 稳定性

在不同 pH 的 p-NPP 底物溶液中测定金鲳鱼内脏粗脂肪酶的最适酶活力。结果如图 3 所示,金鲳鱼内脏粗脂肪酶在 pH 为 8.0 时酶活力最高, pH 大于 10.0 酶活力较低。过酸或过碱的环境破坏酶的空间结构,影响酶分子基团的解离状态,从而引起酶构象的改变,酶活性较低。金鲳鱼内脏粗脂肪酶的最适反应 pH 与黄鲮鱼<sup>[7]</sup>、奇努克鲑鱼<sup>[9]</sup>等相似。

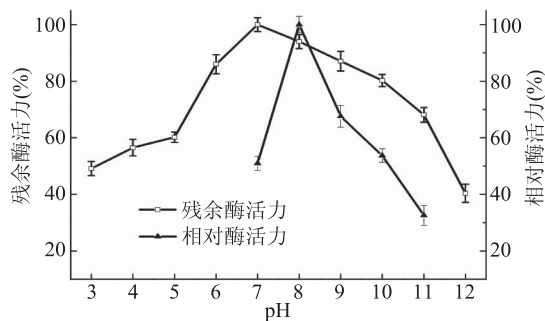


图3 pH 对酶活性和稳定性的影响

Fig.3 Effect of pH on activity and stability

研究发现粗脂肪酶在 pH 为 6.0~10.0 的范围内较为稳定。经过 30 min 孵育后,粗脂肪酶在 pH 为 7.0 的条件下最稳定,值得一提的是,粗脂肪酶在 6.0~11.0 的 pH 范围内保留了 70% 以上的酶活力,其 pH 作用范围与其他鱼类脂肪酶<sup>[7,9,22]</sup>相比较广。

### 2.4 粗脂肪酶的最适反应温度和温度稳定性

测定不同温度下脂肪酶的活力。结果如图 4 所示,金鲳鱼内脏粗脂肪酶随着温度的升高,酶活力逐渐升高,在 45 °C 时达到最大值。继续升高温度,酶逐渐变性失活,表现为酶活力下降。金鲳鱼内脏粗脂肪酶与已报道的黄鲮鱼<sup>[7]</sup>和螃蟹<sup>[23]</sup>等的脂肪酶表现出相似的热激活性。

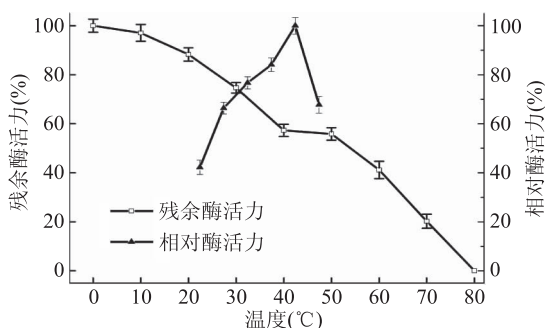


图4 温度对酶活性和稳定性的影响

Fig.4 Effect of temperature on activity and stability

金鲳鱼内脏粗脂肪酶具备一定的耐热性,0~50 °C 之间孵育 30 min 后,仍残余 60% 以上酶活力。这与张培等<sup>[23]</sup>研究的金鲳鱼内脏酸性蛋白酶耐热性结果类似,这可能与金鲳鱼是暖水性鱼类有关。同时酶也对热敏感,当温度高于 50 °C,酶活力开始急剧下降。经过在 80 °C 孵育 30 min 后,酶活力完全丧失。另外,粗脂肪酶在 45 °C 时酶活力最高,可能是由于粗脂肪酶中含有少量杂质,也可能是由于底物的保护作用。在黄鲮鱼<sup>[7]</sup>、螃蟹<sup>[23]</sup>中也有相似的结果,底物的存在增强了酶的热稳定性。

### 2.5 金鲳鱼内脏粗脂肪酶对罗非鱼皮脱脂单因素实验

2.5.1 酶添加量对脱脂率的影响 在金鲳鱼内脏粗脂肪酶对罗非鱼皮脱脂过程中,酶添加量对脱脂率有显著影响 ( $p < 0.05$ )。如图 5 所示,脱脂率随着添加量的增大先升高后下降,添加 120 U/g 的脂肪酶时脱脂效果最高,继续加大酶添加量脱脂率开始下降。这是因为脂肪酶催化油脂水解的反应是可逆的。在有限的体系内,水解反应下降到最低程度后,酯交换反应使游离脂肪酸重新合成大分子的甘油酯,体系中总脂质含量回升,表现为脱脂率下降<sup>[24]</sup>。

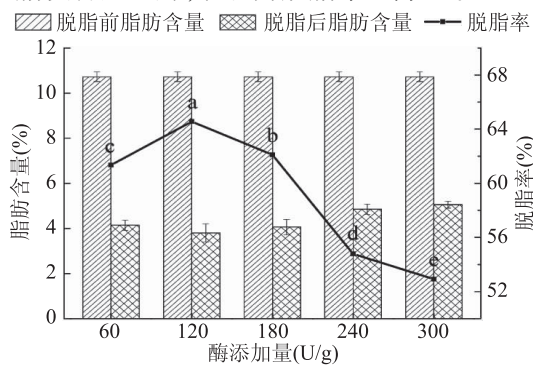


图5 酶添加量对脱脂率的影响

Fig.5 Effect of enzyme dosage on decreasing rate of tilapia skin

注:不同字母表示脱脂率差异显著 ( $p < 0.05$ ),图 6~图 8 同。

2.5.2 pH 对脱脂率的影响 在金鲳鱼内脏粗脂肪酶对罗非鱼皮脱脂过程中, pH 在 6.0~9.0 的范围内对脱脂率有显著影响 ( $p < 0.05$ )。如图 6 所示,脱脂率随着 pH 的增大先升高后下降, pH 为 7.0 时脱脂效果最好,脱脂率达到 65.88%。这与脂肪酶的 pH 稳定性结果相仿,酶在 pH 为 7.0 的条件下稳定性最好。

pH 过高时,可能影响酶分子活性中心的构象,继而影响脱脂效果,导致脱脂率下降。

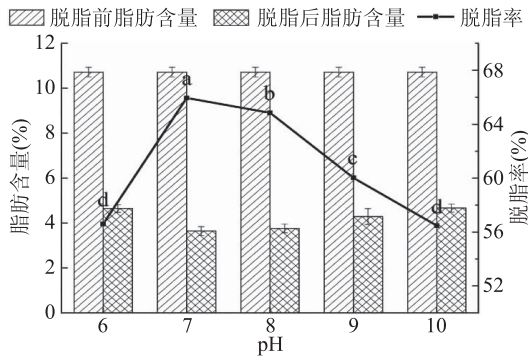


图6 pH对脱脂率的影响

Fig.6 Effect of pH on degreasing rate of tilapia skin

2.5.3 温度对脱脂率的影响 如图7所示,温度对脱脂率有显著影响( $p < 0.05$ )。脱脂率随着温度的升高先增大后减小,在35℃达到最大值。酶在不同温度的脱脂效果与酶的最适温度和温度稳定性结果相符。值得一提的是,25℃的温度下,脂肪酶的脱脂率也高于55%。为节约成本,降低高温对胶原蛋白的影响,可适当降低脱脂温度,达到较好的脱脂效果且产品品质尽量不被破坏。

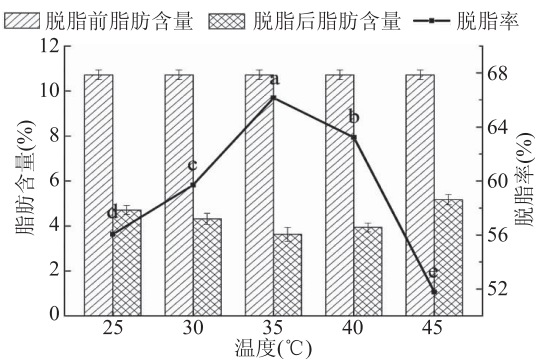


图7 温度对脱脂率的影响

Fig.7 Effect of temperature on degreasing rate of tilapia skin

2.5.4 时间对脱脂率的影响 如图8所示,在45~75 min内,时间对脱脂率有显著影响( $p < 0.05$ )。脱脂率在45~60 min内随着时间的延长逐渐升高,脱脂60 min时效果最佳,达到65.62%。继续延长反应时间,脱脂率先降低后趋于平缓。这是因为脂肪酶催化油脂水解的反应是可逆的。已被水解的大分子酰基基团和小分子酰基甘油酯之间发生交换反应,生成大分子的甘油酯,从而使脱脂率下降<sup>[13]</sup>。由于脱脂60 min之后,脱脂率变化不显著( $p > 0.05$ ),因此固定60 min为后续实验的脱脂时间。

## 2.6 Box-Behnken 响应面实验优化鱼皮酶法脱脂工艺

2.6.1 响应面模型实验结果 在单因素实验的基础上,选择对鱼皮酶法脱脂影响较大的3个因素:酶添加量、pH、温度,采用 Design-Expert 8.0.6 软件,以表1的因素水平设计17组实验,测定脱脂率,响应面实验设计及结果见表3。

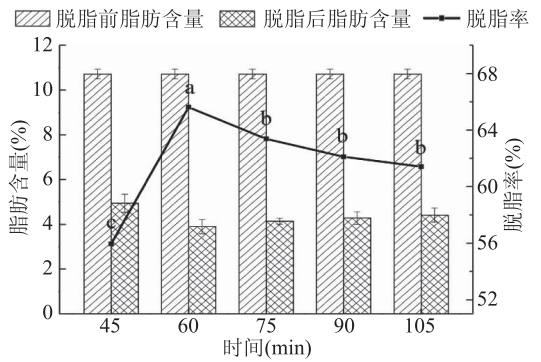


图8 时间对脱脂率的影响

Fig.8 Effect of time on degreasing rate of tilapia skin

表3 鱼皮酶法脱脂响应面实验设计及结果

Table 3 Experimental design and results of response surface methodology for the tilapia skin degreasing

实验号	A	B	C	Y:脱脂率 (%)
1	-1	0	-1	59.16
2	0	0	0	67.22
3	0	0	0	66.42
4	1	0	-1	63.71
5	1	-1	0	59.01
6	0	1	-1	64.41
7	-1	0	1	50.43
8	1	0	1	53.88
9	0	0	0	66.38
10	0	0	0	65.21
11	0	-1	1	57.80
12	1	1	0	63.92
13	-1	1	0	57.80
14	-1	-1	0	60.82
15	0	-1	-1	57.89
16	0	0	0	64.36
17	0	1	1	51.34

由表4可知,模型 $p < 0.0001$ ,回归模型达到极显著水平,可以用来进行响应值的预测;变异系数为2.03%,说明模型置信度较高;多元相关系数为 $R^2 = 0.9762$ ,调整 $R^2 = 0.9455$ ,说明模型相关度很好;失拟项 $p = 0.3551 > 0.05$ ,失拟项不显著,说明实验数据与模型拟合良好,因此二次模型成立,此模型可以预测鱼皮酶法脱脂工艺。影响脱脂率的主次因素为酶添加量>温度>pH;酶添加量达到极显著水平。3个因素中,温度和pH交互作用显著,pH和酶添加量交互作用极显著。根据各项回归系数,得到模型的回归方程为: $Y = 65.92 + 1.56A + 0.22B - 3.96C + 2.03AB - 0.28AC - 3.24BC - 3.32A^2 - 2.26B^2 - 5.80C^2$ 。

2.6.2 响应面图分析与优化 根据回归方程,各因素交互作用的响应面图及等高线图见图9。从响应面图中可以得到最佳参数以及各参数之间的交互作用。响应面图曲面较陡说明因素影响显著,等高线图椭圆表明两因素交互作用显著<sup>[26]</sup>。由图9(a)可

表4 响应面二次模型方差分析

Table 4 Analysis of variance of response surface quadratic model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值	显著性
模型	434.19	9	48.24	31.85	<0.0001	**
A	19.53	1	19.53	12.9	0.0088	**
B	0.39	1	0.39	0.26	0.6286	
C	125.77	1	125.77	83.04	<0.0001	**
AB	16.48	1	16.48	10.88	0.0131	*
AC	0.30	1	0.30	0.20	0.6684	
BC	42.12	1	42.12	27.81	0.0012	**
A <sup>2</sup>	46.45	1	46.45	30.67	0.0009	**
B <sup>2</sup>	21.44	1	21.44	14.16	0.0071	**
C <sup>2</sup>	141.72	1	141.72	93.57	<0.0001	**
残差	10.60	7	1.51			
失拟项	5.51	3	1.84	1.44	0.3551	
纯误差	5.09	4	1.27			
总变异	444.79	16				

$R^2 = 0.9762$ 
 $R^2_{Adj} = 0.9455$ 
CV = 2.03%

注: \*\* : 差异极显著 ( $p < 0.01$ ); \* : 差异显著 ( $p < 0.05$ )。

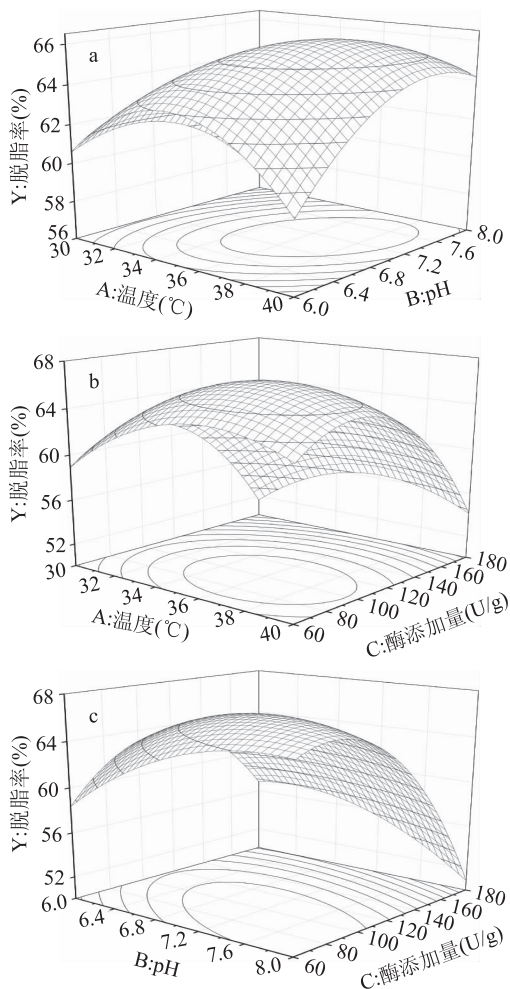


图9 各因素交互作用对鱼皮酶法脱脂率的响应面图

Fig.9 Response surface and contour plots for the interactive effects of various factors on enzymatic degreasing of tilapia skin

知,温度和 pH 交互作用图为椭圆形,交互作用显著。随着温度和 pH 的升高,脱脂率呈先升高后降低的趋

势。说明酶法脱脂的温度和 pH 过高会影响酶的活力,降低酶的脱脂效果。由图 9(b)可知,酶添加量和温度交互作用不显著。随着酶添加量和温度的升高,脱脂率呈先升高后降低的趋势,这与单因素实验结果相符。酶催化油脂水解的反应是可逆的,在有限的反应体系内,酶解反应产生的游离脂肪酸和甘油酯重新合成大分子脂质,从而脱脂率表现出先升高后降低的趋势。由图 9(c)可知,酶添加量和 pH 交互作用极显著。一定范围内,脱脂率随酶添加量的增大先升高后降低,pH 对脱脂率的影响则是先升高后趋于平稳。酶添加量曲面变化较 pH 曲面变化更陡,进一步说明酶添加量对脱脂率的影响较 pH 更显著。

2.6.3 响应面优化鱼皮酶法脱脂的最佳工艺条件 利用响应面优化得到鱼皮酶法脱脂的最佳工艺条件为:温度 37.25 °C、pH7.63、酶添加量 88.22 U/g,该条件下脱脂率为 67.39%。考虑到实际操作性,将酶法脱脂条件设为温度 37 °C、pH7.5、酶添加量 90 U/g,按上述最优条件进行 3 次重复验证实验,测得脱脂率达到 67.02% ± 1.61%。实际值与理论值相近,说明拟合程度较好,可以利用该工艺条件对罗非鱼皮进行酶法脱脂。

### 3 讨论

关于鱼皮酶法脱脂工艺的优化,已有不少研究报道。蒋丽等<sup>[16]</sup>使用市售脂肪酶对罗非鱼皮进行酶法脱脂,采用响应面法优化,得到的最佳工艺条件为 pH9.0、加酶量 0.5%、脱脂温度 39 °C、脱脂时间 56 min,在此条件下鱼皮脱脂率为 63.71%。李佳等<sup>[13]</sup>在制备罗非鱼皮明胶过程中,使用市售脂肪酶,采用正交实验设计,确定罗非鱼皮酶法脱脂的最佳工艺条件为:pH9.0,脱脂时间 3 h,酶添加量 2%,该工艺所得的脱脂率达 67.5%。此外,梁鹏等<sup>[25]</sup>优化了市售碱性脂肪酶对鲢鱼皮脱脂工艺。本优化工艺能够在更短时间、更低温度和 pH 条件下,达到同样

或更好的脱脂效果。通过脱脂工序,显著减少了鱼皮的脂肪含量,改善了鱼皮的加工适应性和品质。本脱脂工艺使用的脂肪酶是由金鲳鱼加工废弃物——内脏制备得到的,成本低,易于制备,应用效果良好,适合工业生产中应用。本工艺所用脂肪酶为粗酶,虽然在提取分离过程中添加了广谱蛋白酶抑制剂,仍然可能含有少量的、具备活性的蛋白酶。蛋白酶可能会水解粗酶液中的脂肪酶,削弱脂肪酶活性,从而降低脱脂效果;也有可能破坏蛋白质和脂肪的结合关系<sup>[27]</sup>,促进鱼皮中油脂的溶出,协同促进脂肪酶的脱脂作用。

#### 4 结论

以金鲳鱼内脏为原料,采用硫酸铵分级沉淀的方法初步纯化得到内脏粗脂肪酶。其中,采用饱和度为75%~90%的硫酸铵沉淀的组分,总酶活力达831.85 U,比活力达12.60 U/mg,纯化倍数为6.06倍,其最适反应温度为45℃,最适反应pH为8.0,在0~50℃、pH6.0~11.0的范围内较为稳定。进一步采用单因素实验和响应面实验优化了金鲳鱼内脏粗脂肪酶对罗非鱼皮脱脂工艺,最佳工艺条件为:温度37℃、pH7.5、酶添加量90 U/g、时间60 min,脱脂率达67.02%±1.61%,说明金鲳鱼内脏粗脂肪酶能够在温和的条件下有效脱除鱼皮脂肪。今后有必要对金鲳鱼内脏脂肪酶的特性和应用进行深入研究,揭示它的潜在应用价值,这将对拓宽鱼类内脏废弃物的高值化应用具有重要的意义。

#### 参考文献

[1] ANTHONSEN H W, BAPTISTA A, DRABLØS F, et al. Lipases and esterases; a review of their sequences, structure and evolution [J]. *Biotechnology Annual Review*, 1995, 1(8): 315-317.

[2] ANDOVAL G, HC/BIOCHEMIE/BIOPHYSIK. Lipases and phospholipases; methods and protocols [M]. Humana Press, 2012: 3-19.

[3] MOAYEDALLAIE S, MIRZAEI M, PATERSON J. Bread improvers; Comparison of a range of lipases with a traditional emulsifier [J]. *Food Chemistry*, 2010, 122(3): 495-499.

[4] 武玉婷, 李春, 王晨旭, 等. 化学修饰改进脂肪酶催化特性的研究及食品中应用 [J]. *食品工业科技*, 2013, 34(21): 366-368.

[5] 刘虹蕾, 缪铭, 江波, 等. 微生物脂肪酶的研究与应用 [J]. *食品工业科技*, 2012, 33(12): 376-381.

[6] GALVEZ R P, BERGE J P. Utilization of fish waste: New Perspectives [M]. CRC Press, 2013: 7-22.

[7] SMICHI N, GARGOURI Y, MILED N, et al. A grey mullet enzyme displaying both lipase and phospholipase activities; purification and characterization [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, 58: 87-94.

[8] SMICHI N, FENDRI A, CHAÂBOUNI R, et al. Purification and biochemical characterization of an acid-stable lipase from the pyloric caeca of sardine (*Sardinella aurita*) [J]. *Applied*

*Biochemistry and Biotechnology*, 2010, 162(5): 1483-1496.

[9] KURTOVIC I, MARSHALL S N, ZHAO X, et al. Purification and properties of digestive lipases from Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and New Zealand hoki (*Macruronus novaezelandiae*) [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2010, 36(4): 1041-1060.

[10] 戴梓茹, 钟秋平, 林美芳, 等. 金鲳鱼营养成分分析与评价 [J]. *食品工业科技*, 2013, 34(1): 347-350.

[11] 孙立元, 郭华阳, 朱彩艳, 等. 卵形鲳鲹育种群体遗传多样性分析 [J]. *南方水产科学*, 2014, 10(2): 67-71.

[12] 陈胜军, 李来好. 罗非鱼加工产业相关情况 [J]. *科学养鱼*, 2014(9): 16-17.

[13] 李佳, 许永安. 罗非鱼鱼皮提取明胶的酶法脱脂工艺研究 [J]. *福建水产*, 2010(3): 26-30.

[14] 张立坚, 杨会邦, 张俊杰, 等. 罗非鱼不同组织脂肪酸含量的分析 [J]. *淡水渔业*, 2010, 40(2): 36-40.

[15] 陈胜军, 李来好, 杨贤庆, 等. 脂肪酶在鲷鱼脱脂中的应用 [J]. *食品科学*, 2007, 28(2): 153-155.

[16] 蒋丽, 陆剑锋, 吕顺, 等. 响应面法优化罗非鱼皮酶法脱脂工艺 [J]. *食品工业科技*, 2016, 37(6): 211-215.

[17] 吴燕燕, 朱小静. 鱼类脱脂方法研究进展 [J]. *核农学报*, 2016, 30(6): 1163-1168.

[18] SMICHI N, FENDRI A, GARGOURI Y, et al. A high salt-tolerant thermoactive esterase from golden grey mullet; purification, characterization and kinetic properties [J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2015, 39(3): 289-299.

[19] WINKLER U K, STUCKMANN M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens* [J]. *Journal of Bacteriology*, 1979, 138(3): 663-670.

[20] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1-2): 248-254.

[21] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. *Nature*, 1970, 227: 680-685.

[22] NORIEGA-RODRIGUEZ J A, GÓMEZ-MEZA N, MEDINA-JUÁREZ L A, et al. Extraction and fractionation of lipolytic enzyme from viscera of Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*) [J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2009, 44(6): 1223-1228.

[23] CHERIF S, FENDRI A, MILED N, et al. Crab digestive lipase acting at high temperature: purification and biochemical characterization [J]. *Biochimie*, 2007, 89(8): 1012-1018.

[24] 张培, 申炫日, 李川, 等. 金鲳鱼内脏酸性蛋白酶的分离纯化及酶学性质研究 [J]. *食品工业科技*, 2017(2): 210-214.

[25] 梁鹏, 赵卉双, 安然, 等. 碱性脂肪酶对鲶鱼鱼皮脱脂效果的影响 [J]. *食品科技*, 2015(6): 147-150.

[26] 曾小峰, 白小鸣, 盖智星, 等. 响应面实验优化超声辅助提取柚皮纤维素工艺 [J]. *食品科学*, 2015, 36(14): 34-38.

[27] 吴祥庭. 酶法提油技术的研究进展 [J]. *粮油食品科技*, 2006, 14(6): 41-42.