

# Flavourzyme - Papain 复合蛋白酶水解龙虾副产物工艺条件的研究

高翔, 王蕊, 张嫚

(江苏食品职业技术学院, 江苏 淮安 223003)

**摘要:** 以底物浓度为 10%、Flavourzyme 与 Papain 复合酶比为 1:1 的条件, 利用单因素试验和正交试验, 研究了 pH 值、加酶量、温度、酶解时间对龙虾副产物蛋白质水解度的影响, 在此基础上进一步确定了合适的底物浓度。结果表明, Flavourzyme-Papain 复合蛋白酶水解龙虾副产物的最佳条件为: pH7.0、加酶量 1.5%、温度 50~55℃、时间 5h, 在底物浓度 25% 的条件下水解, 最大水解度为 26.2%。

**关键词:** Flavourzyme-Papain 复合蛋白酶; 龙虾副产物; 水解度

Study on Optimization of Hydrolysis Process of *Procambarus clarkii* Byproduct by Flavourzyme-Papain Compound Protease

GAO Xiang, WANG Rui, ZHANG Man

(Jiangsu Food Science College, Huaian 223003, China)

**Abstract:** Under the fixed conditions of 10% substrate, Flavourzyme - Papain ratio 1:1, the effects of pH, enzyme amount, temperature, reaction time on hydrolysis degree of *Procambarus clarkii* byproduct were investigated, and these factors were optimized by orthogonal test. The optimal substrate concentration was also determined. Results showed that the optimal hydrolysis conditions are, pH 7.0, amount of compound enzyme 1.5%, temperature 50~55 °C, time 5 hours and substrate concentration 25%. The maximum hydrolysis degree reaches 26.2%.

**Key words:** Flavourzyme-Papain compound enzyme; *Procambarus clarkii* byproduct; hydrolysis degree

中图分类号: TS254.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)10-0195-04

龙虾即淡水小龙虾, 学名克氏原螯虾 *Procambarus clarkii*(Girard), 分类上隶属节肢动物门、甲壳纲、十足目、螯虾亚目、螯虾科, 其英文名为 Red Swamp Crayfish 或 Red Swamp Crawfish<sup>[1]</sup>。原产美国南部和墨西哥北部, 1918 年人们将其作为牛蛙饵料由美国移植到日本的本州, 1929 年又由日本引入到中国, 在江苏的南京和安徽的滁县附近地区生长繁殖, 后沿长江流域自然扩散<sup>[2-3]</sup>, 目前, 龙虾已成为我国主要经济水产品。据测定<sup>[4]</sup>, 虾副产物含粗蛋白 36.00%、粗脂肪 7.78%、甲壳素 17.69%, 还含有丰富的钙、磷等矿物质。同时, 龙虾副产物中蛋白质的氨基酸组成优于普通的肉类, 特别是含有人体必需的八种氨基酸, 还含有脊椎动物体内含量很少的精氨酸以及幼儿必需的组氨酸<sup>[2]</sup>。因此, 利用龙虾副产物水解蛋白可加工成味道鲜美的调味品及虾味食品的添加剂, 综合利用龙虾资源, 提高龙虾养殖、加工企业的经济效益。为了达到较高的水解程度、降

低成本、提高经济实用性, 本研究采用 Flavourzyme-Papain 复合水解, 主要对其水解工艺条件进行探讨, 为利用龙虾副产物制备水解蛋白提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

龙虾副产物(虾头、虾壳以及低值小虾) 江苏省洪泽湖食品有限公司。

Flavourzyme(活力  $5 \times 10^5$  IU/g) NovoNordisk 公司; Papain(活力  $1.5 \times 10^5$  IU/g) 上海伯奥生物科技有限公司; 化学试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

JA2003 型数字电子天平 上海天平仪器厂; PHS-25 型 pH 计 上海精科雷磁仪器厂; 80-2B 型离心机 上海安亭科学仪器总厂; DSHZ-300 多用途水浴恒温振荡器 江苏太仓市实验设备厂; No.954 型多功能捣碎机

收稿日期: 2007-09-17

基金项目: 淮安市科技局资助项目(HAG04056)

作者简介: 高翔(1965-), 男, 副教授, 硕士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: gaoxiang6510@sina.com

美国 Oster 公司; 722 可见分光光度计 上海精密科学仪器有限公司; HJ-1 型磁力搅拌器 江苏国华仪器厂。

### 1.3 测定方法

#### 1.3.1 蛋白质含量的测定

凯氏定氮法<sup>[5]</sup>。

#### 1.3.2 蛋白质水解度的测定<sup>[5]</sup>

$$\text{蛋白质水解度(\%)} = \frac{\text{上清液中的氨基氮质量}}{\text{样品中总氮质量}} \times 100$$

#### 1.3.3 酶活力的测定

Folin-酚法<sup>[6-7]</sup>, 酶活力的定义为: 每 g 酶制剂在一定温度、pH 值的条件下水解酪蛋白, 1min 产生 1 $\mu$ g 酪氨酸为 1 个酶活力单位。

#### 1.3.4 水解蛋白质的制备

龙虾副产物 $\rightarrow$ 清洗去杂 $\rightarrow$ 粉碎为抑制挥发性盐基氮的产生, 减少苦味氨基酸或肽的生成, 并起到一定的防腐效果, 龙虾副产物粉碎后添加 4% 的食盐 $\rightarrow$ 调到合适的试验条件(pH 值、温度、底物浓度) $\rightarrow$ 加酶反应一定时间(风味蛋白酶:木瓜蛋白酶为 1:1) $\rightarrow$ 灭酶(85~95 $^{\circ}$ C, 10min) $\rightarrow$ 离心(室温, 4000r/min, 15min) $\rightarrow$ 上清液即为蛋白质水解液, 测定蛋白质水解度(注:龙虾副产物的虾头、虾壳以及低值小虾混合后随机取样)。

#### 1.3.5 最佳酶解条件的确定

底物浓度为 10%、Flavourzyme 与 Papain 复合酶比为 1:1 的条件下, 以选用的复合蛋白酶对龙虾副产物进行水解, 对影响蛋白质水解度的温度、pH 值、酶量、酶解时间等四个因素进行单因素试验, 确定影响范围后, 设计正交试验  $L_9(3^4)$ , 以水解度为指标, 确定最佳水解条件, 并在正交试验的基础上, 确定合适的底物浓度, 以上实验均重复三次。

## 2 结果与分析

### 2.1 pH 值对水解度的影响

在水解底物浓度为 10%、恒定温度为 55 $^{\circ}$ C、水解时间为 5h、复合酶添加量为 1.0%, 分别在 pH 值为 5.5、6、6.5、7、7.5 的条件下下酶解, 测定蛋白质水解度, 结果见图 1。

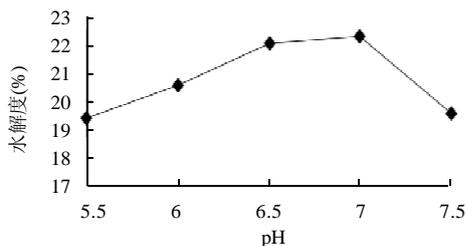


图 1 pH 值对水解度的影响  
Fig.1 Effects of pH values on degree of hydrolysis

从图 1 可以看出, 水解 pH 值在 5.5~7.0 范围内, 随着 pH 值的上升, 水解度不断上升, 当 pH > 7.0, 随着 pH 值上升, 水解度呈下降趋势, 由此可见 Flavourzyme-Papain 复合蛋白酶的最适 pH 值范围为 6.0~7.0, 最佳 pH 值为 7.0。酶作为一种特殊的蛋白质分子, 其酶促催化反应能力与环境 pH 密切相关, 环境 pH 会影响酶分子的构象和酶分子及底物的解离状态, 从而影响酶的活性和酶促反应速度<sup>[8]</sup>, pH 值过高、过低均会抑制酶的活性, 甚至使酶失活。

### 2.2 酶用量对水解度的影响

水解底物浓度为 10%、恒定温度为 55 $^{\circ}$ C、水解时间为 5h、pH 值为 6.5、在复合酶添加量分别为 0%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0% 的条件下酶解, 测定蛋白质水解度, 结果见图 2。

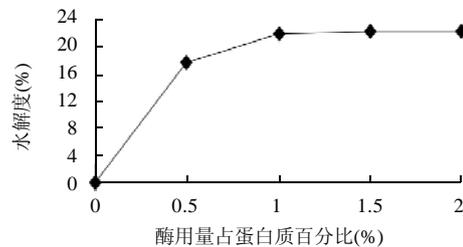


图 2 酶用量对水解度的影响  
Fig.2 Effects of enzyme amount on degree of hydrolysis

从图 2 可以看出, 酶用量在 0~1% 范围内, 随着酶用量的增加, 水解度显著增大, 当酶用量在 1%~2% 范围内时, 随酶用量增加, 水解度上升得却十分缓慢。由于酶只是一种催化剂, 能够降低反应的活化能, 增加活化分子的有效碰撞, 缩短反应时间, 当达到一定用量后就足以起到催化的目的, 使酶促反应达到动态平衡, 即使再增加酶量也只能缩短到达平衡的时间, 而不能改变反应方向, 无助于酶解效果的提高。此反应选用 1% 酶量较为经济。

### 2.3 温度对水解度的影响

在水解底物浓度为 10%、水解时间为 5h、pH6.5、复合酶添加量为 1.0% 的条件下分别于 45、50、55、60、65 $^{\circ}$ C 酶解, 测定蛋白质水解度, 结果见图 3。

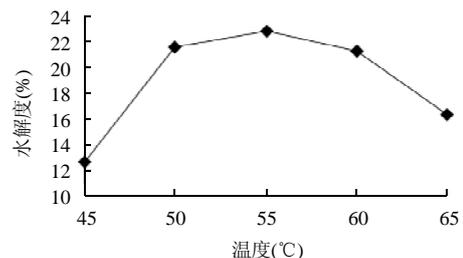


图 3 温度对水解度的影响  
Fig.3 Effects of temperature on degree of hydrolysis

从图3可以看出, Flavourzyme- Papain 复合酶在温度 45~55℃ 范围内, 随着温度的上升, 水解度不断上升, 当温度超过 60℃ 时, 水解度呈下降趋势, 这主要是因为 Flavourzyme 最适温度为 40~55℃、Papain 最适温度为 50~65℃, 温度过高, 导致酶迅速失活。由此可见 50~60℃ 是复合酶解的最适温度, 55℃ 是此水解反应的最佳温度。

2.4 水解时间对水解度的影响

在水解底物浓度为 10%、温度为 55℃、pH 为 6.5、复合酶添加量为 1.0% 的条件下, 分别水解 3、4、5、6、7 h, 测定蛋白质水解度, 结果见图 4。

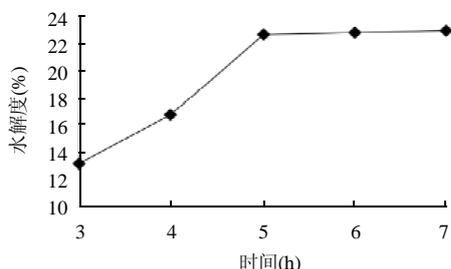


图4 水解时间对水解度的影响  
Fig.4 Effects of time on degree of hydrolysis

从图4可以看出, 水解时间在 3~5h 范围内, 随着时间的延长, 水解度显著增加, 5h 以后, 水解反应趋于平衡, 在 5~7h 范围内, 水解度上升得十分缓慢。这可能是由于反应底物浓度降低, 或体系的 pH 值发生了改变, 使酶活性逐渐降低, 或水解产物的反馈抑制作用等因素所致。一般说来, 水解时间同酶用量有关, 酶用量越大, 水解时间就越短; 如果加酶量不变, 在一定时间范围内, 随着时间延长, 水解度增大, 但考虑到延长会增加生产成本、导致蛋白质水解液变质以及苦味肽或氨基酸的产生等因素, 水解时间不宜过长, 此水解反应时间 5h 为宜。

2.5 酶解条件的优化

2.5.1 正交试验

为进一步确定酶解的最佳条件和提高蛋白的综合利用效率, 更好地了解不同酶解条件对酶解效果的影响, 在底物浓度为 10% 的条件下, 综合考虑 pH 值、酶量、温度、酶解时间等四个因素, 在单因素试验的基础上, 以水解度为指标, 采用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交设计确定酶的最佳反应条件。各因素与水平排列见表 1, 实验结果见表 2。

从表 2 可以看出, 最佳酶解条件为: pH 值 7.0、加酶量 1.5%、温度 50~55℃、时间 5h。通过极差分析可以发现各因素的最优化水平为 A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>1</sub>D<sub>2</sub> 或 A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>2</sub>D<sub>2</sub>, 影响复合酶水解的几种因素顺序为 A > B > C > D。

2.5.2 底物浓度对水解度的影响

表1 因素水平表  
Table 1 Factors and levels of orthogonal test

水平	因素			
	ApH	B 酶量(%)	C 温度(℃)	D 时间(h)
1	6.0	0.5	50	4
2	6.5	1.0	55	5
3	7.0	1.5	60	6

注: 酶添加量为样品中蛋白质含量的百分比。

表2 正交试验方案及结果  
Table 2 Design and results of orthogonal test

试验号	因素				DH(%)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	15.7
2	1	2	2	2	19.3
3	1	3	3	3	17.1
4	2	1	2	3	19.6
5	2	2	3	1	18.8
6	2	3	1	2	22.4
7	3	1	3	2	20.2
8	3	2	1	3	23.3
9	3	3	2	1	22.5
K <sub>1</sub>	52.1	55.5	61.4	57.0	
K <sub>2</sub>	60.8	61.4	61.4	61.9	
K <sub>3</sub>	66.0	62.0	56.1	60.0	
k <sub>1</sub>	17.37	18.50	20.47	19.00	
k <sub>2</sub>	20.27	20.47	20.47	20.63	
k <sub>3</sub>	22.00	20.67	18.70	20.00	
R	4.63	2.17	1.77	1.63	
优化水平	A <sub>3</sub>	B <sub>3</sub>	C <sub>1</sub> (C <sub>2</sub> )	D <sub>2</sub>	
优先度	A > B > C > D				

在水解时间为 5h、pH 值为 7.0、复合酶添加量为 1.5%、温度为 50~55℃ 的条件下, 分别取龙虾副产物底物浓度为 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35% 进行水解, 测定蛋白质水解度, 结果见图 5。

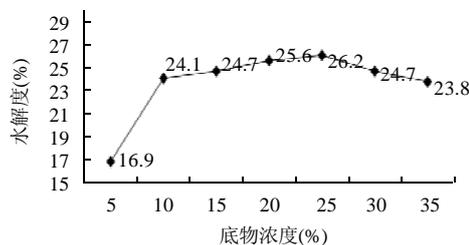


图5 底物浓度对水解度的影响  
Fig.5 Effects of substrate concentration on degree of hydrolysis

从图5可以看出, 底物浓度在 5%~25% 时, 随着底物浓度的上升, 水解度显著上升, 当底物浓度达到 25% 时, 水解度为 26.2%, 水解度最大, 当底物浓度大于 25% 时, 随着底物浓度的上升, 水解度反而减小。一方面是由于体系底物浓度过高, 有效水解浓度过低,

降低了底物与酶分子的有效碰撞几率,使反应速度降低;另一方面,可能是体系中水分减少,高浓度的底物蛋白聚集于蛋白酶的活性部位,抑制了酶的活性,抵制水解反应进行。因此,最高水解度的酶解条件为:pH值7.0、加酶量1.5%、温度50~55℃、时间5h、底物浓度25%。

### 3 结论

在底物浓度为10%、Flavourzyme与Papain复合酶比为1:1的条件下,由正交试验确定了Flavourzyme-Papain复合蛋白酶水解龙虾副产物的最佳条件为:pH值7.0、加酶量1.5%、温度50~55℃、时间5h。如在此条件下以底物浓度为25%水解,可以得到龙虾副产物蛋

白质的最大水解度为26.2%。

### 参考文献:

- [1] 沈嘉瑞. 我国的虾类[M]. 北京: 科学出版社, 1976.
- [2] 陆剑锋, 赖年悦, 成永旭. 淡水小龙虾资源的综合利用及其开发价值[J]. 农产品加工, 2006(10): 47-52.
- [3] 张爱军, 沈继红. 龙虾的综合加工利用[J]. 中国资源综合利用, 2005(9): 35-36.
- [4] 王润莲, 张政军, 梁沛琼, 等. 虾、蟹、螺副产物的营养价值[J]. 饲料研究, 2006(6): 61-62.
- [5] 大连轻工业学院. 食品分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994.
- [6] 李建武. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京: 北京大学出版社, 1994.
- [7] ADLER-NISSEN J. Enzymic hydrolysis of food proteins[M]. New York: Elsevier Applied science Publishers, 1986.
- [8] 于美娟, 马美湖, 单杨, 等. 采用两酶复合水解猪血红蛋白(Hb)制备水解蛋白的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(1): 196-200.