酶法提取克氏原螯虾头和虾壳的中蛋白质

王 燕，邓放明*，刘 焱，廖 泉，刘文倩
(湖南农业大学食品科学技术学院，食品科学与生物技术湖南省重点实验室，湖南 长沙 410128)

摘 要：采用蛋白酶法对克氏原螯虾头和虾壳中蛋白质的提取工艺进行研究。单因素试验和正交试验结果表明：虾头和虾壳中蛋白质提取的最优工艺条件为木瓜蛋白酶与风味蛋白酶按1:1.5混合作为复合蛋白酶，酶解温度为50℃、酶解时间为3h、蛋白酶用量为1.0%、pH6.5、料液比为1:10，该条件下蛋白质提取率为54.22%。

关键词：克氏原螯虾头；克氏原螯虾壳；木瓜蛋白酶；风味蛋白酶；蛋白质

Enzymatic Extraction of Protein from Crayfish Head and Shell

WANG Yan，DENG Fang-ming*，LIU Yan，LIAO Quan，LIU Wen-qian
(Hunan Provincial Key Laboratory of Food Science and Biotechnology, College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract：This paper describes the enzymatic extraction of protein from crayfish head and shell. Using one-factor-at-a-time and orthogonal array design, we established the optimum conditions for extracting protein from crayfish head and shell as follows: 1:1.5 of papain/flavourzyme ratio with a total enzyme concentration of 1.0%, pH 6.5, 1:10 of solid/liquid ratio, 50 ℃ and a hydrolysis duration of 3 h. The extraction efficiency of protein under the optimized conditions was 54.22%.

Key words：crayfish head；crayfish shell；papain；flavourzyme；protein
中图分类号：TS254.9 文献标志码：A 文章编号：1002-6630(2013)12-0001-05
doi:10.7506/spkx1002-6630-201312001

克氏原螯虾(crayfish)，俗称淡水小龙虾。小龙虾在虾仁加工中产生了约占虾质量85%的虾头和虾壳下脚料，这些下脚料中含粗蛋白36%～40%，其粗蛋白含有必需氨基酸45.33%，与牛奶蛋白粉中必需氨基酸(46.59%)和酪蛋白中必需氨基酸(46.14%)基本接近[1-2]。由此可知，克氏原螯虾头和虾壳下脚料是极好的蛋白质来源，具有很好的开发利用价值。目前，常用的蛋白质提取方法有酶法、盐法、碱法等[3-4]。本实验以克氏原螯虾头和虾壳为原料，研究其酶法提取蛋白质的优化工艺，以便为克氏原螯虾头和虾壳的利用提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

克氏原螯虾头和虾壳 湖南顺祥水产食品有限公司。

木瓜蛋白酶(内切酶，酶比活力800U/mg)、风味蛋白酶(外切酶，酶比活力20U/mg)、中性蛋白酶(内切酶，酶比活力50U/mg)、碱性蛋白酶(200U/mg)、胰蛋白酶(内切酶，酶比活力2500U/mg) 合肥博美生物科技有限责任公司；甲醛、浓硫酸、硫酸钾、硫酸铜、氢氧化钠等均为分析纯。

1.2 仪器与设备

AUY220电子分析天平 岛津国际贸易(上海)有限公司；KDN-103F自动定氮仪 上海纤检仪器有限公司；电热恒温水浴锅 北京市光明医疗仪器厂；雷磁PhS-3C pH计 上海精科电子有限公司；台式低速离心机 湖南赫西仪器装备有限公司。

1.3 方法

1.3.1 原料预处理

将克氏原螯虾头和虾壳洗净，在电热鼓风干燥箱50℃干燥28h，用高速中药粉碎机粉碎，过60目筛，在－18℃条件下保存[5-7]。采用超声波结合有机酸浸提钙离子后，滤渣用水洗涤至中性，在电热鼓风干燥箱50℃干燥，过60目筛，在－18℃保存，备用。

1.3.2 蛋白酶解工艺

称取2g经预处理的原料，然后调节蛋白酶用量、复合蛋白酶比例、料液比、pH值、酶解时间和酶解温度进行酶解。酶解结束后置于沸水浴中灭酶5min，离心

收稿日期：2013-01-19
基金项目：国家星火计划重大项目(2011GA770007)
作者简介：王燕(1988—)，女，硕士研究生，研究方向为水产品加工与工程。E-mail：wangyan6521@yeah.net
*通信作者：邓放明(1962—)，男，教授，博士，研究方向为食品科学。E-mail：fmdenghnau@yahoo.com.cn

(4000r/min，15min)，取上清液，测定上清液中蛋白质含量和样品蛋白质含量[8-9]，计算蛋白质提取率。

1.3.3 蛋白质提取率的测定

原料中蛋白质含量使用凯氏定氮仪测定[10]；酶解液中蛋白质含量使用电位滴定仪依照甲醛滴定法测定[11-12]；蛋白质提取率按下式[13-15]计算。

$$蛋白质提取率/\% = \frac{酶解液中蛋白质含量}{原料中蛋白质含量} \times 100$$

1.3.4 蛋白酶解工艺优化设计

1.3.4.1 不同蛋白酶对克氏原螯虾头和虾壳中蛋白质提取率的影响

选取木瓜蛋白酶(papain，Pa)、中性蛋白酶(neutral protease，N)、碱性蛋白酶(allcaescent，A)、风味蛋白酶(flavourzyme，F)、胰蛋白酶(trypsin，T)5种蛋白酶为实验用酶，根据姜震[16]、高翔[17]等研究报道的5种蛋白酶的最适水解条件，分别用5种蛋白酶对克氏原螯虾头和虾壳进行酶解，酶解条件见表1。

表1 5种蛋白酶的酶解条件

Table 1 Enzymatic reaction conditions for papain, neutral protease, alkaescent, flavourzyme and trypsin

酶种类	酶解温度/℃	酶解时间/h	pH	蛋白酶用量/%	料液比(g/mL)
木瓜蛋白酶	60	3	6.5	2	1:10
中性蛋白酶	50	3	7.0	2	1:10
碱性蛋白酶	55	3	8.0	2	1:10
风味蛋白酶	50	3	6.5	2	1:10
胰蛋白酶	40	3	8.0	2	1:10

1.3.4.2 复合蛋白酶对克氏原螯虾头和虾壳中蛋白质提取率的影响

选取木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶、风味蛋白酶、胰蛋白酶为实验用酶，根据pH值范围选取2种蛋白酶进行组合，再对克氏原螯虾头和虾壳进行酶解，复合蛋白酶组合及酶解条件见表2。

表2 复合蛋白酶组合及酶解条件

Table 2 Hydrolysis conditions for combined use of proteases

酶种类	酶用量/%	酶比例	pH	温度/℃	时间/h	料液比(g/mL)
碱性蛋白酶＋风味蛋白酶	2	1:1	7.0	55	3	1:10
碱性蛋白酶＋木瓜蛋白酶	2	1:1	7.5	58	3	1:10
碱性蛋白酶＋胰蛋白酶	2	1:1	8.0	42	3	1:10
碱性蛋白酶＋中性蛋白酶	2	1:1	7.8	55	3	1:10
木瓜蛋白酶＋风味蛋白酶	2	1:1	6.5	60	3	1:10
木瓜蛋白酶＋中性蛋白酶	2	1:1	6.5	55	3	1:10
胰蛋白酶＋中性蛋白酶	2	1:1	7.8	42	3	1:10
风味蛋白酶＋中性蛋白酶	2	1:1	6.5	50	3	1:10

1.3.4.3 单因素试验与正交试验

根据1.3.4.1和1.3.4.2节的实验结果，选取木瓜蛋白酶和风味蛋白酶作为复合蛋白酶种类，采用单因素试验考察蛋白酶用量、复合蛋白酶比例(Pa:F)、料液比、pH值、酶解时间和酶解温度6个因素对克氏原螯虾头和虾壳中蛋白质提取率的影响，单因素试验设计见表3。

表3 单因素试验设计

Table 3 One-factor-at-a-time design

水平	酶解温度/℃	酶解时间/h	蛋白酶用量/%	复合蛋白酶比例(Pa:F)	pH	料液比(g/mL)
1	40	0.5	0.50	1:0.5	5.0	1:04
2	45	1.0	1.00	1:1.0	5.5	1:06
3	50	1.5	1.50	1:1.5	6.0	1:08
4	55	2.0	2.00	1:2.0	6.5	1:10
5	60	2.5	2.50	1:2.5	7.0	1:12
6	65	3.0	3.00	1:3.0	7.5	1:14

根据单因素试验结果，选择蛋白酶用量、复合蛋白酶比例(Pa:F)、pH值和料液比为试验因素进行正交试验[18]，以蛋白质提取率为评定指标，确定蛋白酶法提取克氏原螯虾头和虾壳中蛋白质的优化工艺。

2 结果与分析

2.1 克氏原螯虾头和虾壳基本组成成分

经检测，克氏原螯虾头和虾壳的基本组成成分为水分8.81%、粗脂肪4.04%、蛋白质34.14%、灰分28.65%；脱钙后克氏原螯虾头和虾壳中蛋白质46.57%。

2.2 不同蛋白酶对克氏原螯虾头和虾壳蛋白质提取率的影响

选取木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶、风味蛋白酶和胰蛋白酶对克氏原螯虾头和虾壳在其最适水解条件进行酶解，计算其蛋白质提取率，结果见图1。

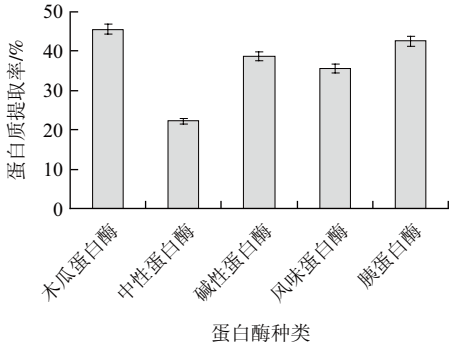


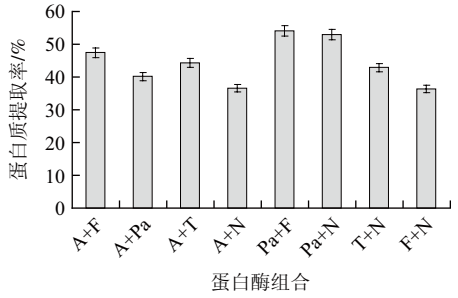
图1 不同蛋白酶对克氏原螯虾头和虾壳中蛋白质提取率的影响

Fig.1 Effect of spapain, neutral protease, alkaescent, flavourzyme and trypsin alone on the extraction efficiency of protein

由图1可知，单酶水解克氏原螯虾头和虾壳后，蛋白质提取率大小为木瓜蛋白酶、胰蛋白酶、碱性蛋白酶、风味蛋白酶、中性蛋白酶。同时，通过方差分析以及最小显著极差法($LSR_{0.05}$和$LSR_{0.01}$)比较，结果显示：木瓜蛋白酶与胰蛋白酶、碱性蛋白酶与风味蛋白酶及碱性蛋白酶与胰蛋白酶差异不显著，其余两两均数间的比较差异

极显著。其中，木瓜蛋白酶水解效果最好，蛋白质提取率达45.62%。

2.3 两种蛋白酶复合对克氏原螯虾头和虾壳蛋白质提取率的影响



A.碱性蛋白酶；F.风味蛋白酶；Pa.木瓜蛋白酶；T.胰蛋白酶；N.中性蛋白酶。

图2 双酶对克氏原螯虾头和虾壳中蛋白质提取率的影响

Fig.2 Effect of combined use of two of the proteases on the extraction efficiency of protein

由图2可知，2种蛋白酶复合水解克氏原螯虾头和虾壳后，蛋白质提取率大小为：木瓜蛋白酶＋风味蛋白酶(Pa＋F)、木瓜蛋白酶＋中性蛋白酶(Pa＋N)、碱性蛋白酶＋风味蛋白酶(A＋F)、碱性蛋白酶＋胰蛋白酶(A＋T)、胰蛋白酶＋中性蛋白酶(T＋N)、碱性蛋白酶＋木瓜蛋白酶(A＋Pa)、碱性蛋白酶＋中性蛋白酶(A＋N)、风味蛋白酶+中性蛋白酶(F＋N)。同时，通过方差分析以及最小显著极差法($LSR_{0.05}$和$LSR_{0.01}$)比较，结果显示：A＋Pa与A＋T、A＋N、Pa＋F及T＋N差异不显著；A＋T与A＋F、A＋Pa及T＋N差异不显著；A＋N与F＋N差异不显著；Pa＋F与A＋Pa、A＋T及Pa＋N差异不显著；A＋N与F＋N差异显著，其余两两均数间的比较差异极显著。其中，木瓜蛋白酶与风味蛋白酶复合水解效果最好，蛋白质提取率达54.02%，高于木瓜蛋白酶(45.62%)和风味蛋白酶(35.67%)单一作用的提取效果，故选取木瓜蛋白酶与风味蛋白酶复合来提取克氏原螯虾头和虾壳中蛋白质。

2.4 酶解提取条件对克氏原螯虾头和虾壳中蛋白质提取率的影响

2.4.1 酶解温度的影响

在蛋白酶用量1.0%、复合蛋白酶比例(Pa:F)1:1.5、pH6.5、酶解时间3h、料液比1:10条件下，考察酶解温度对复合蛋白酶提取克氏原螯虾头和虾壳中蛋白质的影响，结果见图3。在40～65℃范围内，随着酶解温度的升高，蛋白质提取率先升高后降低，50℃时蛋白质提取率最高，蛋白质提取率达到，可见复合蛋白酶比例(Pa:F)的最适酶解温度为50℃。

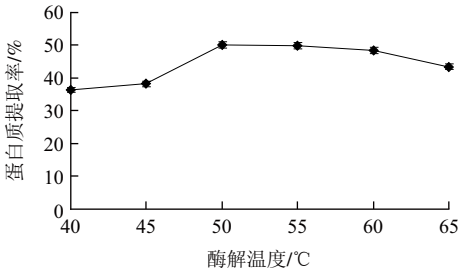


图3 酶解温度对蛋白质提取率的影响

Fig.3 Effect of hydrolysis temperature on the extraction efficiency of protein

2.4.2 酶解时间的影响

在蛋白酶用量1.0%、复合蛋白酶比例(Pa:F)1:1.5、pH6.5、酶解温度50℃、料液比1:10条件下，考察酶解时间对复合蛋白酶提取克氏原螯虾头和虾壳中蛋白质的影响，结果见图4。

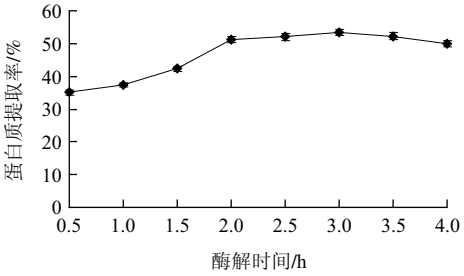


图4 酶解时间对蛋白质提取率的影响

Fig.4 Effect of hydrolysis time on the extraction efficiency of protein

由图4可知，在3h以前，随着酶解时间的延长蛋白质提取率逐渐增大；在3h时，蛋白质的提取率最高；在3h后，随着酶解时间的延长蛋白质提取率渐渐降低。这可能是由于随着酶解时间的延长，蛋白酶与底物充分接触发生反应，在3h时酶解反应已完全发生，因而此时蛋白质提取率最高；3h之后，随着酶解时间延长，可能是酶解产生的氨基酸对酶产生反作用，阻止酶的继续水解，因而蛋白质提取率会下降。因此选择3h为最佳酶解时间。

2.4.3 蛋白酶用量的影响

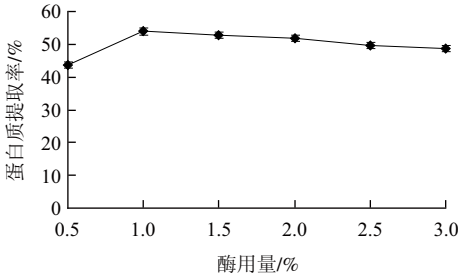


图5 蛋白酶用量对蛋白质提取率的影响

Fig.5 Effect of total enzyme concentration on the extraction efficiency of protein

在复合蛋白酶比例(Pa:F)1:1.5、pH6.5、酶解温度50℃、酶解时间3h、料液比1:10条件下，考察蛋白酶用量对复合蛋白酶提取克氏原螯虾头和虾壳中蛋白质的影响。由图5可知，当复合蛋白酶用量为1.0%时蛋白质提取率较高，继续添加蛋白酶蛋白质提取率降低。这可能是由于蛋白酶用量低于1.0%时，酶促反应的作用位点还未饱和，与反应底物不能充分接触，致使蛋白质提取率不高；当蛋白酶用量高于1.0%时，酶促反应的作用位点已经饱和，再提高蛋白酶用量并不能加强酶促反应。所以选择最适的蛋白酶用量为1.0%。

2.4.4 复合蛋白酶比例(Pa:F)的影响

在蛋白酶用量1.0%、pH6.5、酶解温度50℃、酶解时间3h、料液比1:10条件下，考察复合蛋白酶比例(Pa:F)对复合蛋白酶提取克氏原螯虾头和虾壳中蛋白质的影响，结果见图6。

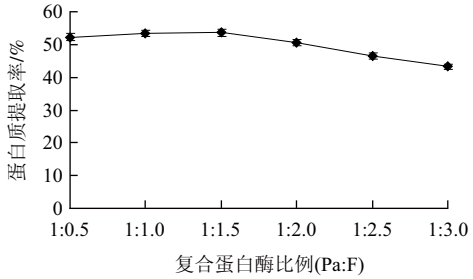


图 6 复合蛋白酶比例对蛋白质提取率的影响

Fig.6 Effect of papain/ flavourzyme ratio on the extraction efficiency of protein

由图6可知，复合蛋白酶比例(Pa:F)为1:1.5时，蛋白质提取率较高，继续增加风味蛋白酶蛋白质提取率降低。所以选择最适的复合蛋白酶比例(Pa:F)为1:1.5。

2.4.5 pH值的影响

在蛋白酶用量1.0%、复合蛋白酶比例(Pa:F)1:1.5、酶解温度50℃、料液比1:10、酶解时间3h条件下，考察pH值对复合蛋白酶提取克氏原螯虾头和虾壳中蛋白质的影响，结果见图7。

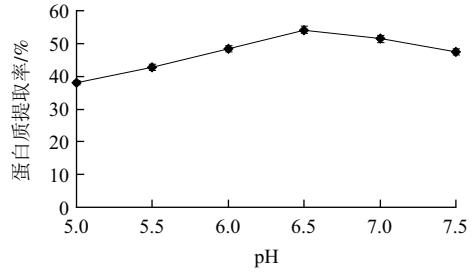


图 7 pH 值对蛋白质提取率的影响

Fig.7 Effect of pH on the extraction efficiency of protein

由图7可知，在pH5.0～7.5的范围内，随pH值变大蛋白质提取率先升高后降低，pH6.5时提取率最高。这可能是由于pH值低于或者高于6.5时，抑制了蛋白酶的活性，蛋白质提取率下降。因此最适的pH值为6.5。

2.4.6 料液比的影响

在蛋白酶用量1.0%、复合蛋白酶比例(Pa:F)1:1.5、pH6.5、酶解温度50℃、酶解时间3h条件下，考察料液比对复合蛋白酶提取克氏原螯虾头和虾壳中蛋白质的影响，结果见图8。

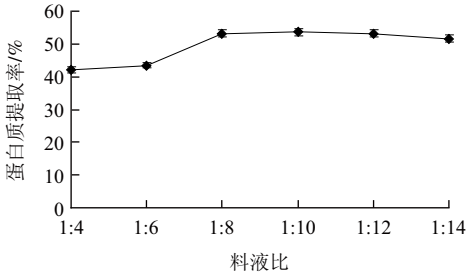


图 8 料液比对蛋白质提取率的影响

Fig.8 Effect of solid/liquid ratio on the extraction efficiency of protein

由图8可知，随着溶剂使用量的增大，蛋白质提取率先升高后降低，料液比为1:10蛋白质提取率最高。这可能是由于随溶剂的加入，溶解的蛋白质增加，提取率增加；继续加大溶剂的量，会稀释蛋白酶的浓度，减少蛋白酶与作用物的接触，导致提取率下降。因此最适的料液比为1:10。

2.5 复合蛋白酶提取克氏原螯虾头和虾壳中蛋白质的正交试验结果

酶解单因素试验确定了木瓜蛋白酶与风味蛋白酶组合提取克氏原螯虾虾头和虾壳中蛋白质，同时确定了酶解温度50℃、酶解时间3h。在此基础上，继续对蛋白酶用量、复合蛋白酶比例、pH值、料液比4个因素进行正交试验。正交试验选用$L_9(3^4)$正交表，试验设计与结果如表4所示。

表 4 正交试验设计及结果

Table 4 Orthogonal array design for the optimization of hydrolysis conditions

试验号	*A*蛋白酶用量/%	*B*复合蛋白酶比例(Pa:F)	*C* pH	*D*料液比(g/mL)	蛋白质提取率/%
1	1(0.75)	1(1:1.0)	1(6.0)	1(1:9)	48.11
2	1	2(1:1.5)	2(6.5)	2(1:10)	52.75
3	1	3(1:2.0)	3(7.0)	3(1:11)	48.90
4	2(1.0)	1	2	3	53.99
5	2	2	3	1	52.41
6	2	3	1	2	51.73
7	3(1.25)	1	3	2	49.47
8	3	2	1	3	50.14
9	3	3	2	1	51.05
k_1	49.920	50.523	49.993	50.523	
k_2	52.710	51.767	52.597	51.317	
k_3	50.220	50.560	50.260	51.010	
R	2.790	1.244	2.604	0.794	

由表4极差分析可知，各因素对酶解效果影响的主次顺序为A(蛋白酶用量)＞C(pH值)＞B(复合蛋白酶比例)＞D(料液比)，酶解效果最优的方案为$A_2B_2C_2D_2$，与蛋白质提取率最高的试验组合($A_2B_1C_2D_3$)不一致，需进行验证实验。验证实验结果证实，$A_2B_2C_2D_2$组合的蛋白质提取率为54.22%，优于$A_2B_1C_2D_3$组(53.99%)。因此确定$A_2B_2C_2D_2$为酶解最优方案，即蛋白酶用量为1.0%、复合蛋白酶比例(Pa:F)为1:1.5、pH6.5、料液比1:10、酶解温度50℃、酶解时间3h。

3 结 论

采用酶解的方法提取克氏原螯虾头和虾壳中蛋白质，是对克氏原螯虾加工废弃物进行综合利用的一个好途径。通过单因素与正交试验获取酶解法提取蛋白质最优工艺参数为：木瓜蛋白酶与风味蛋白酶作为复合酶，料液比1:10、复合蛋白酶比例(Pa:F)1:1.5、酶用量1.0%、pH6.5、酶解温度50℃、酶解时间3h，此条件下蛋白质提取率为54.22%。本实验采用蛋白酶法提取工艺，蛋白质提取率(54.22%)虽低于姜震等[19]利用超声波辅助碱提法提取龙虾加工废弃物中蛋白质的提取率(78.6%)，但相对于利用蛋白酶提取龙虾中蛋白质，明显高于姜震等[16]利用碱性蛋白酶提取龙虾废弃物中蛋白质的提取率(45.76%)。

参考文献：

[1] 陈天忠, 姚歆和, 文利新. 虾头、虾壳资源综合利用研究进展[J]. 湖南饲料, 2006(4): 35-36.

[2] 钱飞, 刘海英, 过世东. 木瓜蛋白酶水解克氏原螯虾虾壳提取虾青素的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2010, 29(2): 237-242.

[3] 姜启兴, 夏文水, 项建琳, 等. 虾蛋白粉的制备及其分析[J]. 食品与机械, 2008, 24(6): 51-53; 151.

[4] 李罗明, 王传花, 郑兵福, 等. 淡水鱼加工副产品中蛋白质提取及鱼冻的配方研究[J]. 食品与机械, 2008, 24(4): 119-123.

[5] 陈艳, 吴梦瑛. 小龙虾壳中生物蛋白钙提取工艺[J]. 科技向导, 2010(7): 5-9.

[6] 刘芳, 叶克维. 虾壳综合加工工艺的研究[J]. 现代食品科技, 2007, 23(9): 53-54.

[7] 刘宏超, 杨丹. 从虾壳中提取虾青素工艺及其生物活性应用研究进展[J]. 化学试剂, 2009, 31(2): 105-108.

[8] 任丽娥, 黄光荣, 蒋家新, 等. 胰蛋白酶水解虾头壳制备钙结合肽的工艺条件优化研究[J]. 南方水产科技, 2011, 7(2): 55-58.

[9] 谢超, 林琳, 唐君. 虾下脚料制备虾味香料的酶解工艺技术研究[J]. 肉类研究, 2009, 23(9): 40-43.

[10] 中华人民共和国国家标准 GB 5009.5—2010 食品中蛋白质的测定[S].

[11] 大连轻工业学院, 华南理工大学. 食品分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2008: 216-223.

[12] 赵珊珊. 酶法水解罗非鱼肉条件优化的研究[J]. 中国酿造, 2008(9): 36-40.

[13] 王智霖, 刘建伟, 罗子放, 等. 酶解米糠蛋白制备米糠营养液的工艺研究[J]. 食品与机械, 2009, 25(6): 140-152.

[14] ZHANG Shaobing, LU Qiyu, YANG Hongshun, et al. Aqueous enzymatic extraction of oil and protein hydrolysates from roasted peanut seeds[J]. American Oil Chemists' Socety, 2011, 88(5): 727-732.

[15] NILSANG S, LERTSIRI S, SUPHANTHARIKA M, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis offish soluble concentrate by commercial proteases[J]. Journal of Food Engineering, 2005, 70: 571-578.

[16] 姜震, 余顺火, 王荣, 等. 酶解法提取龙虾废弃物中蛋白质的工艺研究[J]. 现代食品科技, 2009, 25(2): 185-187.

[17] 高翔, 王蕊, 张嫚. 龙虾副产物水解蛋白酶的筛选[J]. 食品工业科技, 2008, 29(8): 199-204.

[18] 张音, 夏延斌. 酶解制备鸭肉香精前体物的工艺优化[J]. 湖南农业大学学报, 2012, 38(2): 217-220.

[19] 姜震, 王泽南, 余顺火, 等. 利用龙虾加工废弃物酶法制取龙虾蛋白粉的工艺研究[J]. 食品科学, 2008, 29(10): 337-340.