

# 双酶法酶解文庆鲤蛋白的研究

张帅, 黄志明, 梁巧荣

(肇庆学院轻工化学系, 广东 肇庆 526061)

**摘要:** 同时加入枯草杆菌中性蛋白酶和木瓜蛋白酶对文庆鲤进行蛋白水解得到文庆鲤酶解蛋白的酶解率为 71.21%。最佳工艺条件: 温度 50 ℃, 前者酶量为 2%, 后者酶量为 2.5%,  $m(\text{底物}):m(\text{水})=1:2$ , 酶解时间为 5.5 h。文庆鲤酶解蛋白为优质蛋白制品。

**关键词:** 文庆鲤; 酶解蛋白; 枯草杆菌中性蛋白酶; 木瓜蛋白酶

**中图分类号:** TS201.2<sup>+</sup>1; **文献标识码:** B; **文章编号:** 1673-9078(2007)02-0059-03

## Hydrolysis of Wenqing Carp Protein by two Enzymes

ZHANG Shuai, HUANG Zhi-ming, LIANG Qiao-rong

(Department of Light Industry & Chemistry, Zhaoqing University, Zhaoqing 526061, China)

**Abstract:** Protein of Wenqing Carp was hydrolyzed by subtilisin and papain simultaneously. The yield of the hydrolysis was 71.21% under the optimum temperature, ratio of substrate to water, subtilisin dosage, papain dosage and hydrolysis time being of 50 ℃, 1:2, 2%, 2.5% and 5.5 h, respectively.

**Key words:** Wenqing Carp; protein hydrolysis; Subtilisin; Papain

文庆鲤是广东肇庆市鼎湖区特产淡水鲤鱼种。其主要特点是头细, 鳞薄, 内脏少, 体侧有三条金线。其肉质鲜嫩甘美, 鱼腥味少, 且营养丰富, 深受当地群众的喜爱。但目前, 这一稀有鲤鱼种尚未得到有效开发和利用, 而对文庆鲤进行酶解研究的报道更是一片空白。本文从开发这一淡水鱼类资源角度出发, 经分析比较, 选择性质不同的两种外源酶来水解文庆鲤蛋白, 通过正交实验来优化这两种酶的酶解条件, 从而大大提高了酶解率。

## 1 材料与方法

### 1.1 原料

文庆鲤, 市购。经清洗、切碎、装袋, 冷冻备用。

### 1.2 试剂

酶制剂: 胃蛋白酶、枯草杆菌中性蛋白酶、木瓜蛋白酶及胰酶。盐酸等实验常规试剂均为分析纯。

### 1.3 仪器与设备

FJ-200 型组织匀浆器、HH.S-6 型电热恒温水浴锅、202A-1 型数显电热恒温干燥箱、UV-2501PC 紫外分光光度计等。另有烧杯等实验室常规仪器若干。

### 1.4 方法

#### 1.4.1 酶解方法

将文庆鲤切碎, 取 200 g, 加 400 mL 水匀浆。将

匀浆好的浆汁以 5 mol/L HCl 调至所用酶的最适 pH, 以一定酶量梯度 (1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、3.5%) 在恒温水浴锅中进行酶解, 并不时进行搅拌; 2 h 后每隔 0.5 h 进行取样, 共取 8 次; 沸水浴 10 min 灭酶活, 冷却后测定酶解率。

#### 1.4.2 酶解率的计算

以福林酚法<sup>[3]</sup>测得的可溶性蛋白含量在酶解前后的变化作为指标, 得到酶解率<sup>[4]</sup>。因为酶解的最终目的是生产可溶性蛋白含量最高的液体, 所以酶解率是衡量酶解效果的主要指标。

酶解率%=[(酶解后可溶性蛋白含量-酶解前可溶性蛋白含量)/总蛋白质含量]\*100

#### 1.4.3 正交实验

在酶促反应中, 温度、底物浓度、酶解时间及酶用量等因素是影响酶促反应的主要因素, 本实验对以上四个因素确定四或三水平, 因此采用  $L_{16}(4^4)$  及  $L_9(4^3)$  的正交表来确定水解的最佳条件。

## 2 结果与讨论

### 2.1 酶的筛选与确定

不同蛋白酶具有不同的专一性, 即作用于同一底物时其产物不同。这四种酶的最佳作用条件和专一性如表 1。

收稿日期: 2006-10-11

作者简介: 张帅, 讲师, 硕士, 研究方向: 生物产品分离分析技术

表 1 四种酶的最适条件与专一性比较<sup>[5]</sup>

蛋白酶	最适 pH 和温度	专一性
胃蛋白酶(酸性)	2.0,37 °C	芳香族氨基酸 -COOH 和 -NH <sub>2</sub> ; Leu-; Asp-; Glu-COOH
胰酶(碱性)	7.8,50 °C	特异性广泛
枯草杆菌中性蛋白酶	7.0,48 °C	Leu-; Phe-NH <sub>2</sub> 等
木瓜蛋白酶(中性)	7.0,50 °C	Lys-; Arg-; Phe-X-COOH

根据每种酶的最适作用条件,以酶解率为衡量标准来确定最佳酶量和酶解时间,所得结果如表 2。

表 2 四种酶水解文庆鲤蛋白能力的比较

	酶解时间/h	酶量/%	酶活力/(U/mg)	酶解率/%
胃蛋白酶	3.5	0.6	3000	36.9
枯草杆菌中性蛋白酶	5	1.5	133	34.3
木瓜蛋白酶	5.5	2.0	100	33.2
胰酶	6	3.0	250	33.8

表 2 可看出,胃蛋白酶的酶解率最高;其次为枯草杆菌中性蛋白酶与木瓜蛋白酶;胰酶在酶解过程中,其酶解率随胰酶用量的增加呈现波浪状,没有规律性。胃蛋白酶的酶解率虽然最高,但由于经过匀浆的鱼肉需调节 pH 值至 2.0 左右,会使最终的酶解液中含有大量的盐分,从而使后续要增加脱盐工艺和设备,给生产造成不便。另外,从风味角度来看,胃蛋白酶的专一性底物多为疏水性氨基酸,会使酶解产物产生苦味,因此本实验不用胃蛋白酶。

实验过程中加水匀浆后的鱼肉 pH=6.6,接近于中性,而枯草杆菌中性蛋白酶和木瓜蛋白酶的反应条件相当,且两者的最适 pH 值接近中性,由表 1 知这两种酶的专一性底物又具有一定的互补性。因此,最终选择枯草杆菌中性蛋白酶和木瓜蛋白酶作为水解文庆鲤蛋白的双酶。

## 2.2 正交实验结果

### 2.2.1 枯草杆菌中性蛋白酶正交实验结果

为了考查枯草杆菌中性蛋白酶的最适酶解效果,以影响酶解效果的四因素(温度、酶用量、底物浓度(底物/水)和时间)作四因素四水平的正交实验(4<sup>4</sup>),并以酶解率(酶解前后可溶性蛋白含量的变化率)为指标来衡量蛋白水解效果。正交实验的因素水平见表 3,结果见表 4。

由表 4 可看出,影响酶解率指标的最重要因素是 C(底物浓度),最优值 C<sub>3</sub>;影响指标的次要因素是 D(酶解时间),最优值 D<sub>1</sub>,考虑到酶解时间过短则蛋

白质片段比较长,易于在贮藏过程中沉淀<sup>[6]</sup>,因此可选 D<sub>3</sub>;第三个重要因素 B(酶量),选 B<sub>4</sub>,考虑到酶用量太高会使成本增加,一般可选 B<sub>3</sub>;A(温度)是影响酶解率的最次要因素,考虑到枯草杆菌中性蛋白酶的最适温度,可取值 A<sub>2</sub>。

因此,枯草杆菌中性蛋白酶最终的酶解方案是:A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>D<sub>3</sub>,即:温度 45 °C,酶量 2%, $m_{(底物)}:m_{(水)}=1:2$ ,时间 5.5 h。验证实验验证酶解率为 63.2%。

表 3 枯草杆菌中性蛋白酶正交实验因素与水平

水平	A.温度/°C	B.酶解量/%	C.底物:水	D.时间/h
1	40	1	1:1	4.5
2	45	1.5	1:1.5	5
3	50	2	1:2	5.5
4	55	2.5	1:2.5	6

表 4 枯草杆菌中性蛋白酶酶解条件的正交实验设计 L<sub>16</sub>(4<sup>4</sup>)

实验号	A	B	C	D	酶解率
1	1	1	1	1	39.88
2	1	2	2	2	45.33
3	1	3	3	3	49.12
4	1	4	4	4	59.61
5	2	1	2	3	42.22
6	2	2	1	4	39.45
7	2	3	4	1	59.68
8	2	4	3	2	55.49
9	3	1	3	4	48.38
10	3	2	4	3	44.35
11	3	3	1	2	47.41
12	3	4	2	1	55.32
13	4	1	4	2	53.02
14	4	2	3	1	57.26
15	4	3	2	4	51.73
16	4	4	1	3	47.03
K <sub>1</sub>	193.94	183.50	173.77	212.14	
K <sub>2</sub>	196.84	186.39	201.25	201.25	
K <sub>3</sub>	195.46	207.94	210.25	182.72	
K <sub>4</sub>	209.04	211.45	199.17	199.17	
R	15.10	27.95	36.48	29.42	

### 2.2.2 木瓜蛋白酶正交实验结果

表 6 是木瓜蛋白酶根据同 2.2.1 项一样的分析方法所得出的结果(因素水平表见表 5),从表 6 的结果可知:木瓜蛋白酶最佳酶解方案为 A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>2</sub>D<sub>2</sub>,即:温度 50 °C,酶量 2.5%, $m_{(底物)}:m_{(水)}=1:2$ ,时间 5.5 h。验证实验验证酶解率为 65.3%。

表5 木瓜蛋白酶正交实验因素与水平

水平	A.温度/℃	B.酶解量/%	C.底物:水	D.时间/h
1	45	1.5	1:1	5
2	50	2	1:1.5	5.5
3	55	2.5	1:2	6

表6 木瓜蛋白酶酶解条件的正交实验设计 $L_9(4^3)$ 

实验号	A	B	C	D	酶解率/%
1	1	1	1	1	50.22
2	1	2	2	2	61.05
3	1	3	3	3	67.56
4	2	1	2	3	60.32
5	2	2	3	1	62.85
6	2	3	1	2	58.02
7	3	1	3	2	65.11
8	3	2	1	3	54.10
9	3	3	2	1	56.03
$K_1$	178.83	175.65	162.34	169.10	
$K_2$	181.19	178.00	177.40	184.18	
$K_3$	175.24	181.61	195.52	181.98	
$K_4$	5.95	5.96	33.18	15.08	
R	178.83	175.65	162.34	169.10	

### 2.2.3 酶解方案的确定

由2.1式知采用双酶(枯草杆菌中性蛋白酶与木瓜蛋白酶)进行水解有利。现对其不同的加入方式进行比较,结果如表7。

表7 不同方式双酶水解效果对照表

酶解方式	未水 解	先木后 枯(○)	先枯后 木(○)	同时 加入	先木 后枯	先枯 后木
酶解率/%	6.58	53.2	62.01	71.21	72.86	65.65

注: 枯表示枯草杆菌中性蛋白酶; 木表示木瓜蛋白酶;

○表示一种酶酶解完毕之后经过加热灭酶

由表7可看出,采用“先木瓜酶后枯草杆菌酶”的双酶酶解方式,且期间不需加热灭酶,其酶解效果最好,酶解率达到了72.86%,其次为同时加入两种酶,酶解率为71.21%。由于两者的酶解率非常相近,后者由于同时加入两种酶,使酶解时间大大缩短,在生产中更具有实际意义。当两种酶同时加入时,由于两种酶的最佳作用条件中底物浓度和最适温度不同,从实

际生产和发挥两酶最大活力的角度考虑,在双酶作用时均采用 $m_{(底物)}:m_{(水)}=1:2$ ,温度采用50℃,即木瓜蛋白酶的最适底物浓度和最适温度。

### 2.2.4 文庆鲤酶解蛋白的制备

按上述最优方案进行酶解之后制备文庆鲤酶解蛋白,具体工艺流程如下:

文庆鲤→清洗→称重→加入3倍体积蒸馏水→匀浆→匀浆液→双酶酶解→酶解液→筛滤→清液→浓缩→喷雾干燥→文庆鲤酶解蛋白,常温密封保存

1000 g原料文庆鲤经酶解和喷雾干燥得到242 g粉末,出品率为24.2%。这种酶解蛋白粉末呈暗黄色,味咸,略苦。

## 3 小结

四种酶中,用木瓜蛋白酶和枯草杆菌中性蛋白酶同时酶解有利于文庆鲤蛋白的水解,最佳条件:温度50℃,前者酶量2%,后者酶量2.5%, $m_{(底物)}:m_{(水)}=1:2$ ,酶解时间为5.5 h。最终酶解率为71.21%。

本实验主要是以可溶性蛋白含量在酶解前后的变化为指标来衡量酶解效果的,另外, $\alpha$ -氨基氮含量在酶解前后的变化以及酶解后的残渣剩余率都可作为衡量蛋白酶解效果的指标,本文没有述及。在今后的实验中,尚待进一步研究。

## 参考文献

- [1] 王长云等.低酶水解法提取无苦味文庆鲤水解蛋白[J].水产学报,1995,19(4):350-353
- [2] 邓尚贵等.翡翠贻贝双酶水解法的建立[J].水产学报,2000,24(1):72-75
- [3] 宁正祥.食品分析手册[M].北京:中国轻工业出版社.1998.263-344
- [4] 王璋.食品酶学[M].北京:轻工业出版社.1990,180-188
- [5] Jens Alder-Nissen. Enzymatic Hydrolysis of Food Protein[M]. London:Elsevier Applied Science Publishers Ltd,1986:25-40
- [6] Helbig,et al., Deitter of skim milk hydrolysates by absorptin for incorporation into acidic beverages[J]. J. Food Sci., 1980, 45:331-335