

# 利用菠萝蛋白酶提取对虾虾壳 蛋白质和钙的工艺研究

王大巾,何露,祁鹏飞,程丽军,屠逸飞,叶婷

(浙江理工大学生命科学院,杭州 310018)

**摘要:**为开发对虾虾壳资源,利用中性蛋白酶、碱性蛋白酶、菠萝蛋白酶和木瓜蛋白酶水解虾壳,提取蛋白质和钙。在对水解酶的选定和条件优化实验中发现,菠萝蛋白酶为最佳水解酶,其最适水解工艺为:反应温度 55℃,底物量 10 g/100 mL,菠萝蛋白酶 0.65 g/100 mL,先使 pH 为 7.5,反应时间 6h,后调整 pH 为 5.5,搅拌 10 min。在此工艺条件下,酶解液中钙提取率为 39.14%,占对虾虾壳总量的 12.33%;蛋白质提取量为 0.055g,占对虾虾壳总量的 0.55%。菠萝蛋白酶水解体系的酸性 pH,对游离钙的形成非常有利;同时在蛋白水解方面,菠萝蛋白酶作用于疏水性氨基酸残基的 C-末端,这为进一步制备生物有机钙类奠定研究基础。该研究在海洋虾贝类的资源利用具有一定的实用意义和参考价值。

**关键词:** 虾壳;蛋白质;钙;菠萝蛋白酶

**中图分类号:** S985.2+1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-3851(2016)02-0304-05 **引用页码:** 030706

## 0 引言

我国海岸线长度达 1.8 万 km,具备养殖对虾的优越地理环境。对虾是餐桌上常见的美味佳肴,然而虾壳作为边料,虽具有极高的营养价值,但大部分被弃,势必造成资源浪费。虾壳中含有丰富的蛋白质,其中有 8 种人体必需氨基酸和 4 种呈味氨基酸;同时含有矿物质及多种微量元素,其中矿物质以钙含量居首<sup>[1-3]</sup>;另外虾壳中还含有甲壳素和虾青素,其中甲壳素以显著抗癌功效著称,而虾青素更以抗氧化作用被人认可。据报道,目前以对虾为材料的研究中,较多偏向于制备甲壳素<sup>[4-5]</sup>、虾青素<sup>[6-8]</sup>和蛋白质<sup>[9-10]</sup>;然而同时制备钙和蛋白质的研究颇少。

钙是机体必需的营养元素,其在神经传递、肌肉收缩等过程发挥重要作用。钙的缺乏可导致诸如佝偻病等疾病。虾壳中的钙是一种生物效价高、易吸收的生物活性钙剂。虾壳中钙的提取主要以酸和碱

抽提的方式<sup>[11-12]</sup>完成,但此类方法多因污染环境且产生的钙不宜用于生产其他复合钙制剂等原因被淘汰。近年来,可持续发展战略促使研究者逐渐致力于酶法提取工艺的优化。酶法反应温和,便于操作,且高效,产生的钙可用于制备易吸收的可溶性钙制剂,如氨基酸钙<sup>[13]</sup>、钙结合肽<sup>[14-16]</sup>。本研究以对虾虾壳为材料,利用中性蛋白酶、碱性蛋白酶、菠萝蛋白酶和木瓜蛋白酶进行水解,提取钙和蛋白质,并对提取工艺进行优化,以期找到更加高效的利用虾壳废料的方法,也为后续制备氨基酸钙或钙结合肽奠定一定的实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

对虾虾壳由温州瑞渔一品店购买;木瓜蛋白酶(Cat. no. G8430),中性蛋白酶(Cat. no. Z8030),碱性蛋白酶(Cat. no. B8360),菠萝蛋白酶(Cat.

收稿日期: 2015-08-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(31302220);浙江省分析测试科技计划项目(2015C37031);浙江理工大学优秀博士启动金(13042164-Y);浙江省高校生物学重中之重学科(2012A11-C)

作者简介: 王大巾(1985-),女,河南襄城县人,助理实验师,主要从事海洋资源的开发和利用方面的研究。

通信作者: 叶婷, E-mail: ytzstu@126.com

no. B8290), Bradford 法蛋白浓度测定试剂盒 (Cat. no. PC0010) 均购自索莱宝科技有限公司。

### 1.2 仪器与设备

BS233S 精密电子天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司); CR21G 高速冷冻离心机 (日本日立); DELTA 320 型 pH 计 (梅特勒-托利多仪器有限公司); LA613 超纯水制备装置 (ELGA 公司); DHG-9053J 恒温鼓风干燥箱 (上海三发科学仪器有限公司); LGJ-18 冷冻干燥机 (北京松源华兴科技发展有限公司); CJJ-931 (HJ-6A) 数显六连磁力搅拌器 (江苏金坛市晶玻实验仪器厂); DU800 分光光度计 (Beckman 公司)。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 工艺流程

对虾壳 → 分拣、去杂 → 50℃ 水浸泡 → 反复冲

表 1 四种蛋白酶的最适宜反应条件和性质<sup>[17-18]</sup>

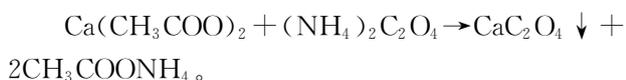
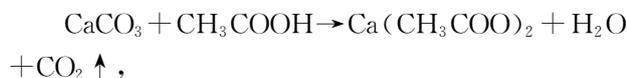
蛋白酶种类	反应温度/℃	最适 pH 值	作用方式	酶切位点	产物类型
中性蛋白酶	40	7.7	内切	芳香族氨基酸的羧基	多肽、氨基酸
碱性蛋白酶	45	10.4	内切	疏水氨基酸的 C-末端	多肽、氨基酸
菠萝蛋白酶	55	6.0	内切	疏水氨基酸的 C-末端	多肽、氨基酸
木瓜蛋白酶	55	6.0	内切	广泛特异性	多肽、氨基酸

#### 1.3.3 最适宜蛋白酶水解工艺优化

确定最适宜水解酶后,以钙提取率和蛋白质提取量为指标,通过改变酶用量和 pH 值进一步优化该蛋白酶的水解工艺。分别称取 0.45 g/100 mL、0.50 g/100 mL、0.55 g/100 mL、0.60 g/100 mL、0.65 g/100 mL、0.70 g/100 mL 菠萝蛋白酶水解 10 g/100 mL 虾壳粉进行实验。同时设置不同 pH 值 (5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5) 水解 10 g/100 mL 虾壳粉进行实验。所有实验均独立重复 3 次。

#### 1.3.4 钙提取率的测定方法

分别取 20 mL 水解上清液于 3 只烧杯中,加入足量醋酸酸化的饱和草酸铵溶液,充分反应,反应式如下:



然后 12000 r/min, 离心 5 min, 弃上清, 烘干, 分别称得 3 次反应中  $\text{CaC}_2\text{O}_4$  质量, 计算得  $\text{CaC}_2\text{O}_4$  中钙质量, 根据韩凯宁等<sup>[20]</sup> 的研究: 虾壳粉中钙的总含量为总干重的 31.5%, 可据此计算出 10 g 虾壳粉中总钙量, 得到钙提取率。

$$\text{钙提取率} = m_2/m_1 \times 100\%.$$

其中:  $m_1$  为 10 g 虾壳粉中总钙量,  $m_2$  为反应产生

洗 → 干燥箱干燥 → 充分研磨 → 虾壳粉 → 蛋白酶水解 → 可溶性钙与蛋白质产物。

#### 1.3.2 最适宜蛋白酶的筛选

根据中性蛋白酶、碱性蛋白酶、菠萝蛋白酶和木瓜蛋白酶的性质 (表 1), 分别取不同质量的酶 (0.25 g/100 mL、0.45 g/100 mL、0.60 g/100 mL) 在其最适 pH 值溶液中反应 6h<sup>[17-19]</sup>, 其中反应底物为对虾壳粉 (10 g/100 mL)。同时设置不同比例的混合蛋白酶进行水解反应。各实验组水解后, 将各组实验所得的水解上清液分别进行钙提取率和蛋白质含量的测定, 确定最适宜的蛋白水解酶。每个实验均独立重复 3 次。

$\text{CaC}_2\text{O}_4$  中钙质量。

#### 1.3.5 蛋白质提取量的测定方法

采用 Bradford 法测定蛋白质含量<sup>[21]</sup>, 首先配置标准蛋白溶液, 分光光度计分别测得  $\text{OD}_{595}$ , 以蛋白质的浓度为横坐标, 以  $\text{OD}_{595}$  为纵坐标做出标准曲线, 得到关系方程, 然后根据水解上清液  $\text{OD}_{595}$  计算该溶液中蛋白质的含量, 减去该上清液中蛋白酶的含量, 得到蛋白质提取量。

## 2 结果与分析

### 2.1 最适宜蛋白酶筛选

为了筛选最适宜蛋白酶, 首先选用中性蛋白酶、碱性蛋白酶、菠萝蛋白酶和木瓜蛋白酶各 0.25 g/100 mL 在各自最适宜 pH 值和反应温度下 (表 1) 水解 10 g/100 mL 对虾壳粉 6h, 并将各蛋白酶水解上清液分别进行钙提取率的测定。实验结果表明, 菠萝蛋白酶水解上清液的钙提取率最高为 9.2% (图 1a), 而碱性蛋白酶水解上清液的钙提取率最低为 0.8% (图 1a), 因此选用中性蛋白酶、菠萝蛋白酶和木瓜蛋白酶做进一步的研究。

为了进一步筛选适宜蛋白酶, 分别选定不同用量的中性蛋白酶 (0.45 g/100 mL, 0.60 g/100 mL)、菠萝蛋白酶 (0.45 g/100 mL, 0.60 g/100 mL)、木瓜蛋白酶 (0.45 g/100 mL, 0.60 g/100 mL)

水解虾壳(10 g/100 mL)6h,将水解上清液分别进行钙提取率的测定。实验结果显示,0.45 g/100 mL 菠萝蛋白酶的水解上清液中钙提取率与 0.60 g/100 mL 菠萝蛋白酶的水解上清液中钙提取率较高,分别为 15.9%(图 1b)和 16.8%(图 1b)。同时设置由菠萝蛋白酶、中性蛋白酶及木瓜蛋白酶组成的混合酶进行水解反应(反应温度 40℃,pH 值为 6,反应时间 6h)<sup>[19]</sup>,实验所得水解上清液分别进行钙提取率的测定,结果发现 0.45 g/100 mL 混合酶与 0.60 g/100 mL 混合酶的水解上清液中钙提取率均不高,分别为 6.6%(图 1b)和 7.2%(图 1b)。综上,选定菠萝蛋白酶为最适宜蛋白酶。

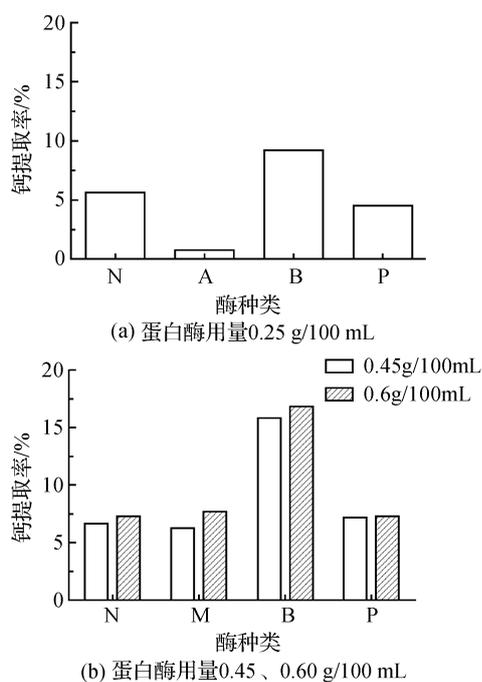


图1 不同蛋白酶对钙提取率的影响

注:N为中性蛋白酶;A为碱性蛋白酶;B为菠萝蛋白酶;P为木瓜蛋白酶;M为混合蛋白酶;a)各种蛋白酶用量分别为0.25 g/100 mL;b)各种蛋白酶用量分别为0.45 g/100 mL和0.60 g/100 mL。其中0.45 g/100 mL混合酶组成为菠萝蛋白酶0.27 g/100 mL、中性蛋白酶0.09 g/100 mL、木瓜蛋白酶0.09 g/100 mL;0.60 g/100 mL混合酶组成为菠萝蛋白酶0.30 g/100 mL、木瓜蛋白酶0.20 g/100 mL、中性蛋白酶0.10 g/100 mL。

## 2.2 菠萝蛋白酶水解工艺的优化

### 2.2.1 酶用量对其水解效果的影响

为使菠萝蛋白酶水解效果最佳化(以钙提取率和蛋白质含量为指标),在最适宜反应温度和 pH 值(表 1)条件下,首先对菠萝蛋白酶的用量进行优化,分别设定 0.45 g/100 mL、0.50 g/100 mL、0.55 g/100 mL、0.60 g/100 mL、0.65 g/100 mL、0.70 g/100 mL 菠萝蛋白酶水解 10 g/100 mL 虾壳粉 6h。

实验结果显示,总体上,钙提取率和蛋白质提取量均随着酶用量的增加而相应提高,其中 0.65 g/100 mL 菠萝蛋白酶水解上清液中钙提取率为 9.6%(图 2a)和蛋白质含量均达最大值为 0.032g(图 2b)。然而可能由于虾壳中钙原本的存在方式,游离钙的形成易受环境中 pH 和蛋白质等物质的解离程度的制约,而蛋白质的提取又受酶促反应的影响,故在 0.50 g/100 mL 的酶用量时,酶促反应受蛋白质水解制约,相应的钙提取率稍低;然而随着酶用量的增加,酶促反应的制约条件转为有限的反应底物(10 g/100 mL 虾壳粉),故在 0.7 g/100 mL 酶用量时,其蛋白质提取量并不再升高,其钙提取率也相应不再升高。

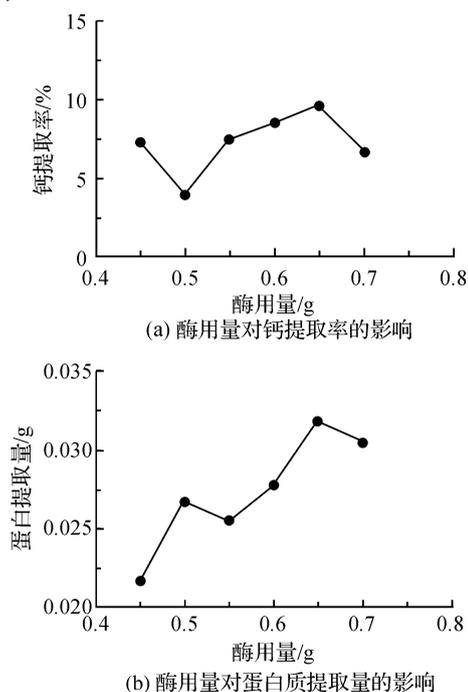


图2 菠萝蛋白酶用量对水解效果的影响

### 2.2.2 pH 值对其水解效果的影响

根据酶用量的优化结果,确定 0.65 g/100 mL 菠萝蛋白酶为最佳酶用量。为进一步提高水解效率,在 0.65 g/100 mL 菠萝蛋白酶用量的条件下,分别设置不同 pH 值(5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5)水解 10 g/100 mL 虾壳粉 6h。实验结果表明,pH 值为 5.0 时,0.65 g/100 mL 菠萝蛋白酶水解上清液中钙提取率最高为 16%(图 3a),然而其蛋白质提取量仅为 0.026 g;pH 值为 7.5 时,0.65 g/100 mL 菠萝蛋白酶水解上清液中蛋白质提取量最高为 0.055 g,(图 3b),而其钙提取率为 6.1%。总体上,随着反应体系 pH 值的增加,酶解产物中钙提取率逐渐下降,然而蛋白质提取量却随着 pH 值增加而上升。

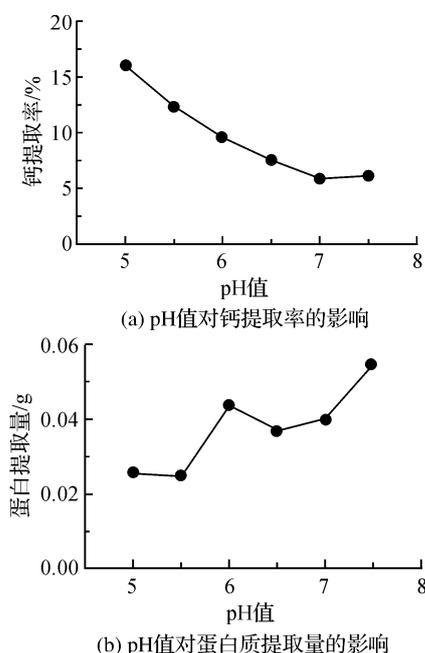


图3 反应体系的pH值对水解效果的影响

碱性pH环境不利于游离钙的形成。首先通过比较中性蛋白酶、碱性蛋白酶、菠萝蛋白酶和木瓜蛋白酶的水解效果(图1a),碱性蛋白酶水解上清液中钙提取率最低;然后通过菠萝蛋白酶反应体系pH值对钙提取率的影响(图3a),随着pH值逐渐增高,水解上清液中的钙提取率反而逐渐下降。水解效果与碱性蛋白酶水解所需碱性pH环境(表1)呈负相关,碱性环境下易形成微溶于水的氢氧化钙,导致水解上清液中游离钙的减少。因此酸性或中性pH环境有利于游离钙的形成。酶活性受pH环境的影响,在菠萝蛋白酶适宜pH值(5~8)范围内,其蛋白质提取量伴随酶的用量增加而上升,尤其在最适宜pH值条件(6)下,酶促反应达到较高,其相应蛋白质提取量也相应提高(图3b)。

鉴于菠萝蛋白酶水解工艺优化结果,酶的用量和pH值的改变要综合考虑酶料比(酶和底物的配比)、游离钙的形成条件以及蛋白质的提取量。为更合理地提高钙提取率和蛋白质提取量,实验先使反应体系pH为7.5,0.65 g/100 mL菠萝蛋白酶水解6 h,然后调节反应体系pH为5.5,搅拌10 min,离心,得上清液。对上清液进行钙提取率和蛋白质提取量测定,其中游离钙质量约为1.23 g,钙提取率为39.14%,占虾壳总量的12.33%;蛋白质为0.055 g,占虾壳总量的0.55%。与pH值为5.5钙提取率(12.3%,图3a)相比提高3倍,与pH值为7.5钙提取率(6.1%,图3a)相比提高6.4倍;与pH值为5.5蛋白质提取量(0.025 g,图3b)相比提高2倍,与

pH值为7.5蛋白质提取量(0.055 g,图3b)相当。

可变pH环境能最大限度提高水解效果。在底物量充足情况下(底物不是酶促反应的制约因素),菠萝蛋白酶用量对于钙提取率和蛋白质提取量呈正相关;pH环境对菠萝蛋白酶水解上清液中钙提取率却呈负相关,与蛋白质提取量呈正相关。实验通过改变反应体系pH值(反应前期pH值为7.5,后期pH值为5.5),在酶活性保持的前提下,既有利于蛋白质的提取,又有利于游离钙的形成,进而最大限度地提高水解效果。菠萝蛋白酶适宜pH值偏酸性,对游离钙的形成非常有利,在蛋白水解方面,其作用于疏水性氨基酸残基的C-末端<sup>[22-23]</sup>,产生N-末端的甘氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸和缬氨酸<sup>[23-24]</sup>,这为进一步制备生物有机钙类奠定研究基础。菠萝蛋白酶作为常见的植物性蛋白酶,原料易获得且其成品酶价格低廉<sup>[25]</sup>,这也为开发对虾虾壳资源降低成本。

### 3 结论

本研究通过比较4种蛋白酶水解上清液中的钙提取率和蛋白质提取量,筛选出菠萝蛋白酶为对虾虾壳的最适宜水解酶。在固定底物量(10 g/100 mL)和反应温度(55 °C)两个参数情况下,通过实验对菠萝蛋白酶的用量和pH值进行优化,结果表明0.65 g/100 mL酶用量和可变pH环境(反应前期pH值为7.5,后期pH值为5.5)对于兼顾钙提取率和蛋白质提取量的效果最佳。

#### 参考文献:

- [1] 李冬生, 王金华, 吴周和. 利用淡水虾头壳制备生物蛋白钙[J]. 适用技术市场, 1997(8): 3-4.
- [2] 唐红枫. 凡纳对虾虾干虾壳营养成分检测分析[J]. 饲料工业, 2013, 34(2): 35-37.
- [3] 张祥刚, 周爱梅, 林晓霞, 等. 南美白对虾虾头虾壳化学成分的对比较研究[J]. 现在食品科技, 2009, 25(3): 224-227.
- [4] 李婷, 程燕霞, 陈健聪, 等. 利用有机酸结合蛋白酶从虾头虾壳中提取甲壳素[J]. 农产品加工: 创新版(中), 2014(2): 1-4.
- [5] 刘芳, 叶克难. 虾头、壳废弃物的综合利用[J]. 水产养殖, 2007, 28(5): 30-33.
- [6] 刘洪铃, 刘建军, 赵祥颖. 果酸钙的研究现状及展望[J]. 中国食品添加剂, 2007(1): 105-113.
- [7] 武一琛, 杨慧茹, 方园, 等. 天然虾青素提取及分离纯化研究进展[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(12): 117-

- 120.
- [8] 于沛沛, 吴文娟, 刘富俊, 等. 影响酶法回收南极磷虾壳中蛋白质及虾青素的因素研究[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(6): 265-266.
- [9] 段杉, 丁惠心, 熊云. 酶法回收虾头和虾壳中的蛋白质[J]. 农产品加工: 学刊, 2008 (1): 43-46.
- [10] 王燕, 邓放明, 刘焱, 等. 酶法提取克氏原螯虾头和虾壳的中蛋白质[J]. 食品科学, 2013, 34(12): 1-5.
- [11] 吴之传, 丁纯梅. 龙虾虾南的综合利用(II): 虾壳中氨基酸和甲壳素的提取及壳聚糖的制备[J]. 化学世界, 1995(9): 489-491.
- [12] 施旭丹. 酶解虾壳蛋白制备 ACE 抑制肽及抗氧化肽[D]. 杭州: 浙江大学, 2012: 40-42.
- [13] 任丽娥, 黄光荣, 蒋家新, 等. 胰蛋白酶水解虾壳制备钙结合肽的工艺条件优化研究[J]. 水产科学, 2011, 30(2): 107-112.
- [14] 薛荣涛, 李翠芹, 何腊平. 复合氨基酸螯合钙的研究进展[J]. 食品工业科技, 2014, 35(21): 390-394.
- [15] 粟桂娇, 阎欲晓, 申柯, 等. 酶法制取罗非鱼水解动物蛋白的工艺研究[J]. 食品科学, 2005, 26(4): 177-181.
- [16] 郭艳. 水解米渣蛋白及制备氨基酸螯合钙的工艺研究[D]. 成都: 四川大学, 2006: 5-6.
- [17] 吴茂玉, 马超, 乔旭光, 等. 菠萝蛋白酶的研究及应用进展[J]. 食品科技, 2008, 2008(8): 17-20.
- [18] 李荣乔. 菠萝蛋白酶酶解海湾扇贝裙边制备抗氧化肽的研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2014: 1-59.
- [19] 王彦超. 南极磷虾活性蛋白肽和甲壳质的性质研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013: 42-50.
- [20] 韩凯宁, 王盼盼, 林海, 等. 有机酸中虾壳中钙的溶出特性研究[J]. 广州化工, 2013, 41(8): 71-72.
- [21] BRADFORD 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(2): 248-254.
- [22] SEO W H, LEE H G, BAEK H H. Evaluation of bitterness in enzymatic hydrolysates of soy protein isolate by taste dilution analysis [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 73(1): 41-46.
- [23] ARSHAD Z I M, AMID A, YUSOF F, et al. Bromelain: an overview of industrial application and purification strategies[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(17): 7283-7297.
- [24] HEVIA P, OLCOTT H S. Flavor of enzyme-solubilized fish protein concentrate fractions [J]. Journal of Agricultural and food chemistry, 1977, 25(4): 772-775.
- [25] 吴园涛, 孙恢礼. 海洋贝类蛋白资源酶解利用[J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(9): 120-125.

## Technical Study on Extraction of Protein and Calcium from Prawn Shell with Bromelain

WANG Dajin, HE Lu, QI Pengfei, CHENG Lijun, TU Yifei, YE Ting

(College of Life Science, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** To fully exploit the prawn shell resources, prawn shells were hydrolyzed to extract calcium and proteins from prawn shell by using neutral protease, alkaline protease, bromelain and papain. In the selection and condition optimization experiments of the hydrolytic enzymes, the bromelain was the best hydrolase. The optimum hydrolysis conditions are as follows: the reaction temperature is 55°C; the amount of substrate is 10g/100mL; the amount of bromelain is 0.65 g/100mL; the pH value is set to be 7.5 at first, and the reaction time is 6 hours; after that, adjust the pH value to 5.5 and stir for 10min. Under this technological condition, the calcium extraction ratio from enzymatic hydrolysate is 39.14%, accounting for 12.33% of the total prawn shells. And the protein extraction quantity is 0.055g, accounting for 0.55% of the total prawn shells. The optimal pH value is acid for bromelain hydrolysis of prawn shells, because it is favorable to the formation of free calcium and it hydrolysis the nonpolar amino acid residues at the C-terminus of proteins. Therefore, this is the basis for the further preparation of biological organic calcium. This study has certain practical significance and reference value for the utilization of marine shrimp and shellfish.

**Key words:** prawn shell; protein; calcium; bromelain

(责任编辑: 许惠儿)