

风味蛋白酶水解金枪鱼(Eleotridae) 碎肉蛋白的动力学模型研究*

杜帅¹ 宋茹¹ 郑斌² 杨会成² 罗红宇¹

(1. 浙江海洋学院食品与医药学院 舟山 316000; 2. 浙江省海洋开发研究院 舟山 316100)

提要 本文对风味蛋白酶水解金枪鱼碎肉蛋白的特性进行了研究, 采用测定不同底物浓度下的瞬时速率的方法来测定米氏常数 K_m 值, 探讨了水解时间、底物浓度与水解速率及水解度的关系, 并拟合出水解时间与水解度之间关系的数学模型。结果表明: 该酶解反应的米氏常数 $K_m=0.0098$, 酶解过程的动力学方程为 $DH = 8.621 \ln(1 + 0.053t - 0.0003[S]t)$ 。通过动力学方程求得当酶浓度为 $200U/g$ 时, 最大临界初始底物浓度 $[S]$ 为 $176.81g/L$ 。验证实验表明此模型的可信度高 ($R^2=0.99$), 实际值与拟合值基本吻合, 可以用于模拟风味蛋白酶水解金枪鱼碎肉蛋白制备活性肽的反应过程和酶解条件的工艺优化。

关键词 金枪鱼碎肉; 风味蛋白酶; 动力学模型; 米氏常数

中图分类号 TS254.1

活性肽具有易消化吸收、生理活性广泛等特性, 在保健食品中有着广泛的应用(袁勤生等, 2005)。然而, 目前大多数研究集中在蛋白的酶解工艺、肽的分离纯化技术及活性评价方面, 对酶解动力学规律研究较少, 建立的酶解动力学模型有限。如赵电波等(2011)利用 Protamex 复合蛋白酶酶解猪骨, 并对其酶解动力学进行研究。结果表明, 酶解动力学方程为 $Y = 1.918 \ln x - 0.779$, 米氏常数 $K_m=221.27mmol/L$, $V_{max}=0.1448 mmol/(L \cdot min)$ 。刘尊英等(2008)用胰蛋白酶对鳕鱼(*Gadus macrocephalus*)皮胶原蛋白酶解, 得到酶解动力学模型, 反应速率(R) = $(14.231E_0 - 1.745S_0) \exp[-0.514(DH)]$, 水解度(DH) = $1.946 \ln[1 + (7.315E_0/S_0 - 0.897)t]$, 并求得该体系反应速率常数 $K_2=14.231 min^{-1}$, 酶失活常数 $K_d=18.809min^{-1}$ 。Nouri 等(1997)对胃蛋白酶酶解小麦蛋白机理和动力学进行研究, 得到 $K_m=7.5 \times 10^{-4} mol/L$, $V_{max}=4.2 \times 10^{-3} mol/(L \cdot min)$ 。Marquez 等(1999)利用碱性蛋白酶 Alcalase 0.6L 酶解牛

血红蛋白并对动力学常数测定, 得到酶解速率常数为 $39.19g/(AU \cdot min)$, 酶失活速率常数为 $4.66g/(AU \cdot min)$ 。张青等(2007)对米曲霉蛋白酶水解酪蛋白产生酪氨酸的动力学特性进行研究, 在酶解温度 $40^\circ C$ 时, 速度方程为 $r = \frac{0.234C_s}{0.0282 + C_s}$, 反应速度与氢离子浓度的关系为

$$r = \frac{\lg Cr + 3.14013}{0.19759 + 0.05484(\lg Cr + 3.14013) + (\lg Cr + 3.14013)^2} \circ$$

金枪鱼(Eleotridae)碎肉是生产金枪鱼加工制品的下脚料, 它与金枪鱼肉一样具有高蛋白、低脂肪的营养特点。但由于碎肉中含有骨刺, 制约了其深度加工利用, 而低值利用又造成资源的浪费(韩云峰, 2007; 张青等, 2009)。本研究以金枪鱼碎肉蛋白为原料, 采用风味蛋白酶作为水解用酶, 制备一种高 F 值活性寡肽(Juan *et al*, 1999; 刘金伟, 2012¹⁾)。在一定的水解条件下, 建立水解度与反应时间的动力学模型, 从而通过控制水解时间来制备给定水解度的目标活性小肽,

* 2013年海洋公益性行业科研专项经费资助, 201305013号; “十二五”国家科技支撑计划课题资助, 2012BAD29B06号。
杜帅, E-mail: charliedushuai163@163.com

1) 刘金伟, 2012. 酶法制备玉米高 F 值寡肽及其抗疲劳活性的研究. 济南: 山东轻工业学院硕士学位论文, 6—7

通讯作者: 罗红宇, 博士, 教授, E-mail: lisa8919@163.com

收稿日期: 2012-10-26, 收修改稿日期: 2013-02-18

为利用金枪鱼碎肉蛋白规模化生产活性肽提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

金枪鱼碎肉由宁波丰盛食品有限公司提供; 风味蛋白酶酶活为 80 万 U/g, 购于广西南宁庞博生物工程有限公司; 氢氧化钠、盐酸均为分析纯。

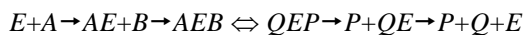
1.2 仪器设备

PHS-3C 型精密酸度计, 上海精密科学仪器有限公司; SHA-C 型(数显)水浴恒温振荡器, 常州国华电器有限公司; 奥豪斯 CP214-JY19 精密电子天平, 奥豪斯仪器(上海)有限公司; 85-2 恒温磁力搅拌器, 江苏金坛宏华仪器厂。

1.3 实验方法

1.3.1 酶解工艺 将解冻的金枪鱼碎肉, 按料水比 1 : 7 加入蒸馏水, 匀浆。调节 pH 至 7.0, 加入一定量的风味蛋白酶, 恒温(53℃)振荡酶解一定时间, 反应结束后, 用 95℃ 水浴保温 10min 灭酶, 测定不同时刻体系的水解度。

1.3.2 米氏常数的测定方法 风味酶水解金枪鱼碎肉蛋白的反应属于双底物反应, 根据序列机制的反应历程及稳态学说, 它遵循有序反应机理, 即双底物与酶的结合有一定的顺序, A 称为领先底物(鱼蛋白), 先与酶 E 结合, 然后再与 B(底物水)结合形成 AEB 三元复合物, 当缺少 A 时, B 不能与 E 结合。形成的产物——酶的三元络合物 QEP 的释放也遵循先后顺序, 先释放反应产物 P, 最后是 Q(A 的产物), 且产物不可以在底物完全结合前释放(王镜岩等, 2002):



双底物有序反应的动力学方程可以表示为:

$$V = \frac{V_{\max}[A][B]}{K_s^A K_m^B + K_m^A[B] + K_m^B[A] + [A][B]} \quad (1)$$

式中, V 表示反应初始速度, V_{\max} 表示当底物浓度达到饱和时的最大反应速度, 底物 A 表示金枪鱼碎肉, 底物 B 表示水。 K_m^A 、 K_m^B 分别为底物 A、B 的米氏常数。由于本试验的底物 B(水)作为溶剂大量存在, 一般视为 [B] 时, 则上式可表示为:

$$V = \frac{V_{\max}[A]}{K_m^A + [A]} \quad (2)$$

米氏常数 K_m 是当酶促反应达到最大反应速度一半时的底物浓度。通常采用 pH-stat 法测定, 通过检测水解过程中的 pH 值得到碱的消耗量, 从而计算反应速率; 当检测时间间隔非常短时, 就可用平均酶解速率表征反应的瞬时速率。本试验采用在两个不同底物浓度下测定瞬时速率的方法计算米氏常数, 计算公式如下(Marquez, 1993; 吴建中, 2003¹⁾):

$$K_m = \frac{\left(\frac{dB_1}{dt}\right)_{t \rightarrow 0} - \left(\frac{dB_2}{dt}\right)_{t \rightarrow 0}}{\left(\frac{dB_2}{dt}\right)_{t \rightarrow 0} - \left(\frac{dB_1}{dt}\right)_{t \rightarrow 0}} \times \frac{1}{A} \quad (3)$$

式中, $\left(\frac{dB_1}{dt}\right)_{t \rightarrow 0}$ 和 $\left(\frac{dB_2}{dt}\right)_{t \rightarrow 0}$ 表示不同底物(金枪鱼碎肉)浓度时的酶解反应瞬时速率, m_1 、 m_2 表示碎肉质量(本试验分别为 1g、0.2g), A 表示酶活与底物之比, 本试验为 200U/g。以酶解时间为横坐标, 碱消耗量为纵坐标, 通过作图得到的直线斜率即为酶解速率。

1.3.3 水解度测定方法 采用 pH-stat 法测定水解度(Adler-Nissen, 1979; 李天娇等, 2010): 通过对水解过程中 pH 变化的实时监控, 记录滴定过程中的碱消耗量来计算水解度。

$$DH(\%) = \frac{h}{ht} = \frac{B \times N}{m \times \alpha \times ht}$$

式中: h 表示已水解的肽键数(mmol/g), ht 表示水解前蛋白质肽键总数(mmol/g, 取鱼蛋白的经验值 8.65mmol/g), B 为滴定过程中消耗的碱量(mL), N 为滴定液氢氧化钠的浓度(mol/L, 本试验为 0.05mol/L), m 为水解液中蛋白质的质量(g), α 为 α -NH₂ 的平均解离度, 实验条件下 $\alpha = 0.85$ 。

2 结果与讨论

2.1 米氏常数值的测定

本试验选择底物浓度分别为 0.2% 和 1%, 在水解过程中连续滴加 0.05mol/L NaOH 以保持水解液的 pH 值恒定在 7.0±0.3, 分别测定水解 0.5、1、2、3、5min 时碱的消耗量(Shi *et al.*, 1996; 吴建中等, 2004), 结果如图 1 所示, 图中红线表示拟合线。

由图 1 可知, 在酶解初期, 当底物浓度不同时, 水解的最初 5min 内, 碱消耗量与水解时间均呈良好的线性关系, 表明水解速率近似不变, 可以作为酶解

1) 吴建中, 2003. 大豆蛋白的酶法水解及产物抗氧化活性的研究. 广州: 华南理工大学博士学位论文, 55—57

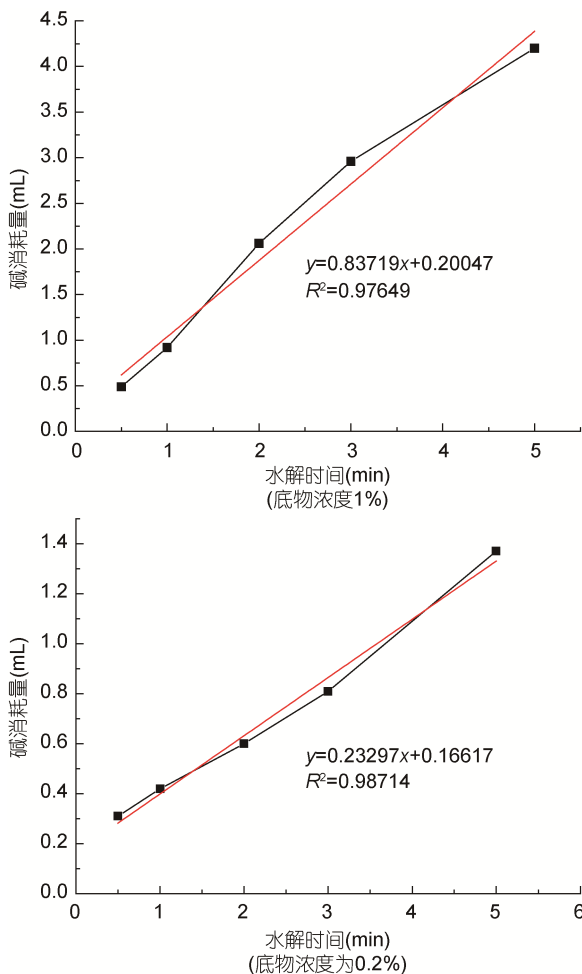


图 1 水解时间与耗碱量的关系(酶解初期)

Fig.1 Interaction between hydrolysis time and consumption of alkali at different concentrations (initial stage of hydrolysis)

反应的瞬时速率(李培骏等, 2005; 刘忠义, 2008)。与预期设想一致。拟合的线性回归方程分别为 $y = 0.83719x + 0.20047$ ($R^2=0.97649$, 底物浓度 1%), $y = 0.23297x + 0.16617$ ($R^2=0.98714$, 底物浓度 0.2%), 表明两个拟合方程可信度高。由此计算出米氏常数:

$$K_m = \frac{0.84 - 0.23}{\frac{0.23}{0.2} - \frac{0.84}{1}} \times \frac{1}{200} = 0.0098$$

2.2 底物浓度对水解度的影响

考察了初始底物浓度分别为 60、80、100、120、140g/L 时, 不同酶解反应时刻的水解度, 结果如图 2 所示。

由图 2 可知, 在酶解反应初期, 底物浓度越大, 酶解速率越大, 且水解都是匀速进行的, 结果与图 1

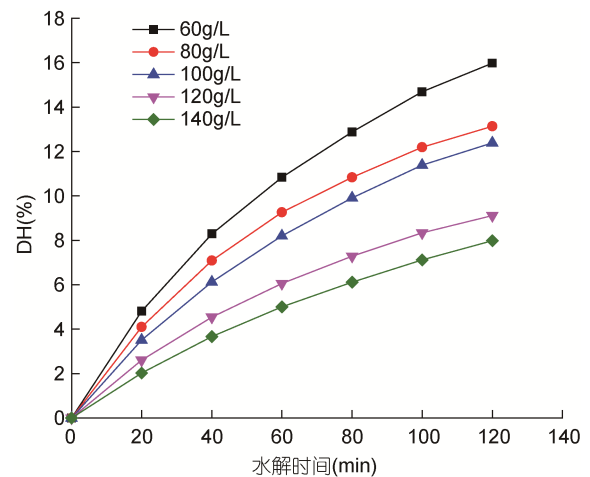


图 2 不同初始底物浓度对水解度的影响

Fig.2 Effect of different initial substrate concentration on hydrolysis

一致。当水解时间为 20—60min 时, 在所有试验底物浓度下, 水解度均随反应时间的增加而迅速增大, 而水解速率随反应时间不断降低, 但与时间不再呈线性关系。当水解进行 60min 后, 水解度增加缓慢, 水解速率呈缓慢下降趋势, 直至恒定(Bradford, 1976)。

根据中间复合物学说, 反应开始时, 酶还未被底物饱和, 此时参与反应的底物浓度较小, 因而反应速率取决于底物浓度; 随着反应的进行, 与酶结合的底物浓度逐渐增加, 反应速率会随中间产物 ES 的增加而增大; 同时伴随着水解产物的积累, 产物对酶的抑制效应也会随着反应的进行而增大。因此, 水解中后期反应速率是两者共同作用的结果, 直至最后反应达到平衡, 此时反应速率不再变化。

2.3 酶解动力学模型的建立

研究表明, 蛋白的水解度与制备的活性肽的功能特性之间存在密切联系, 本试验对水解时间与水解度的关系进行数学模拟, 利用此模型可以通过控制水解时间来获得指定水解度的目标活性肽。

由林伟峰(2003)¹⁾的研究可知, 蛋白酶解动力学方程为:

$$\frac{d(DH)}{dt} = a \exp[-b(DH)] \quad (4)$$

即

$$DH = \frac{1}{b} \ln(1+abt) \quad (5)$$

1) 林伟峰, 2003. 可控酶解从海洋鱼蛋白中制备生物活性肽. 广州: 华南理工大学博士学位论文, 75—79

将不同初始底物浓度下的酶解时间 t 与水解度 DH 代入上式求得参数 a 、 b 值, 结果见表 1。以参数 a 为纵坐标, 初始底物浓度 $[S]$ 为横坐标作图, 结果如图 3。

从图 3 看出, 参数 a 与初始底物浓度 $[S]$ 存在良好的线性关系, 拟合的可信度高:

$$a = 0.4597 - 0.0026[S], \quad R^2 = 0.9858$$

表 1 风味酶水解金枪鱼碎肉在不同底物浓度条件下的参数 a 、 b 值 ($[E]=200\text{U/g}$)

Tab.1 Kinetic parameters a and b of hydrolysates from tuna meat at different substrate concentration ($[E]=200\text{U/g}$)

$[S](\text{g/L})$	60	80	100	120	140
a	0.305	0.276	0.213	0.159	0.118
b	0.09	0.12	0.10	0.14	0.13

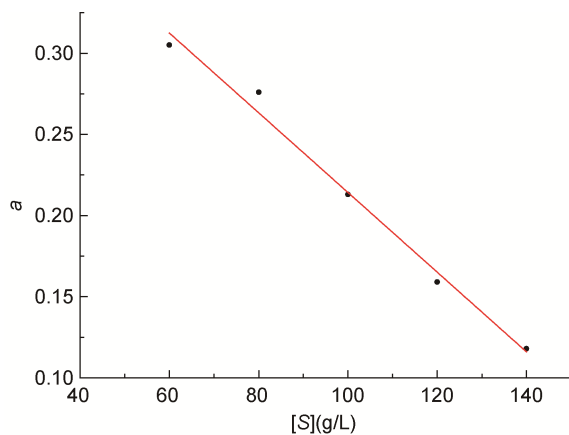


图 3 a - $[S]$ 关系曲线

Fig.3 Relation curve of a and $[S]$

由表 1 可知, 不同底物浓度对应的参数 b 变化不大, 接近常数, 取其平均值 0.116。与林伟峰(2003)¹⁾ 推导出的温度恒定时、参数 b 与初始底物浓度和蛋白酶浓度无关、为一常数的结论一致。将 a 、 b 代入(5) 得到风味酶在温度 53°C 、 $\text{pH} 7.0$ 条件下, 酶解金枪鱼碎肉蛋白的动力学方程:

$$\text{DH} = 8.621 \ln(1 + 0.053t - 0.0003[S]t) \quad (6)$$

由式(5)可推出: 因为 $b > 0$, 只有当 $a = 0$ 时, $\text{DH} = 0$, 此时求得临界初始底物浓度 $[S] = 176.81\text{g/L}$, 即本试验采用的酶浓度 200U/g 对应的最高初始底物浓度是 176.81g/L , 当初始底物浓度大于该值时, 水解反应进行困难。

3 动力学模型的实验验证

验证实验反应条件: 初始底物浓度 80g/L , 风味

蛋白酶浓度 200U/g , $\text{pH} = 7.0$, 水解温度为 53°C 。结果如图 4 所示。

把实验水解度与拟合水解度进行比较, 结果表明, 实验水解度与理论水解度吻合度高 ($R^2 = 0.99$)。说明此动力学方程具有较高的可信度, 实际应用价值高。

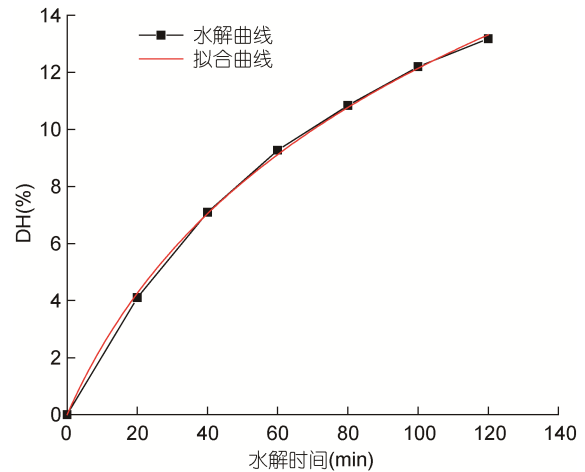


图 4 实验水解度与拟合水解度比较

Fig.4 Comparison of practical DH and theoretical DH

4 结论

金枪鱼碎肉蛋白的酶解过程遵循双底物反应的有序反应机理, 水解反应中, 水作为溶剂趋于无穷大且消耗很少, 可将水解反应视为单底物反应, 遵循米氏方程。通过试验和计算推导, 得到了酶解反应的动力学方程为:

$$\text{DH} = 8.621 \ln(1 + 0.053t - 0.0003[S]t)$$

本文在崔继科等(1998)测定 K_m 值方法的基础上, 做了适当改进, 由水解初期平均碱消耗速率推导计算出 K_m 的方法。与常规作图法相比, 减少由于作图不准确带来的较大误差, 结果更加精确。在实验数据范围内, 计算出 $K_m = 0.0098$ 。研究表明, 碱性蛋白酶和中性蛋白酶的 K_m 值大多小于 1% , 实验所测定的 K_m 满足其范围, 具有可行性。在水解过程中, 由于底物浓度过大, 水解得到的产物会抑制正反应中酶的活力, 造成水解速率降低, 因此, 存在底物临界浓度为 $[S] = 176.81\text{g/L}$ 。

实验中得到的酶解动力学方程可以为进一步研究水解度与酶解液功能特性之间的关系提供依据,

1) 林伟峰, 2003. 可控酶解从海洋鱼蛋白中制备生物活性肽. 广州: 华南理工大学博士学位论文, 75—79

还可通过控制有限水解反应, 获得具有生理功能的目标多肽, 研究不同水解度的多肽制品与其生理功能的关系, 制备功能食品或保健药物。同时也可作为工业生产提供理论依据。

今后, 对于反应过程中存在的底物竞争性作用、酶失活等复杂情况还需进行深入研究。

参 考 文 献

- 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法, 2002. 生物化学(上册). 北京: 高等教育出版社, 351—357
- 刘忠义, 2008. 草鱼肠道胰蛋白酶同工酶 GT-A 的动力学和热力学性质. 西北农林科技大学学报, 36(1): 211—217
- 刘尊英, 李八方, 曾名勇等, 2008. 鳕鱼皮胶原蛋白胰蛋白酶控制水解动力学模型. 食品科技, (2): 75—77
- 李天娇, 徐 响, 孙丽萍等, 2010. 油菜花粉蛋白水解度测定方法比较. 食品科学, 31(16): 184—187
- 李培骏, 袁永俊, 胡 婷等, 2005. 胰蛋白酶水解酪蛋白进程研究. 食品与机械, (6): 23—26
- 吴建中, 黄雪松, 汪 勇等, 2004. Protamex 蛋白酶水解大豆蛋白的机理及动力学研究. 食品与发酵工业, (5): 18—22
- 张 青, 王锡昌, 刘 源等, 2009. 中国金枪鱼渔业现状及发展趋势. 南方水产, 5(1): 68—74
- 张 青, 许学书, 谢静莉等, 2007. 米曲霉蛋白酶动力学特性的研究. 食品科学, 28(6): 213—217
- 赵电波, 陈 茜, 白艳红等, 2011. Protamex 复合蛋白酶酶解猪骨动力学模型的建立. 食品科技, 36(9): 161—165
- 袁勤生, 赵 健, 2005. 酶与酶工程. 上海: 华东理工大学出版社, 176—179
- 崔继科, 刘 景, 1998. 大豆分离蛋白酶解的研究(一). 郑州粮食学院学报, 19(3): 12—19
- 韩云峰, 2007. 世界金枪鱼产业发展状况. 中国渔业经济, (1): 34—37
- Adler-Nissen J, 1979. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by Trinitrobenzene nesulfonic acid. *Agric Food Chem*, 27(1): 256—262
- Bradford M M, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248—254
- Juan Bautista, Raquel Corpas, Olga Cremades *et al*, 1999. Sunflower protein hydrolysates for dietary treatment of patients with liver failure. *AOCS*, 77: 121—126
- Marquez M C, Fernandez Cuadrado V, 1993. Enzymatic hydrolysis of vegetable proteins. *Process Biochemistry*, 28: 481—490
- Marquez M C, Vazquez M A, 1999. Modeling of enzymatic protein hydrolysis. *Process Biochemistry*, 35: 111—117
- Nouria L, Legrand J, 1997. Enzymatic hydrolysis of wheat proteins Part I. Enzymatic kinetics and study of limited hydrolysis in a batch stirred reactor. *Chemical Engineering*, 65: 187—194
- Shi Jungea, Bai Hong, Yuan Hongshen *et al*, 1996. Continuous production of high degree case in hydrolysates by immobilized proteases in column reactor. *Journal of Biotechnology*, 50: 161—170

THE KINETICS MODEL FOR ENZYMATIc HYDROLYSIS OF TUNA (ELEOTRIDAE) MEAT BY FLAVOURZYME

DU Shuai¹, SONG Ru¹, ZHENG Bin², YANG Hui-Cheng², LUO Hong-Yu¹

(1. Department of Food and Medical, Zhejiang Ocean University, Zhoushan, 316000; 2. Zhejiang Marine Development Research Institute, Zhoushan, 316100)

Abstract We studied the kinetics of the hydrolysis of tuna meat by flavourzyme. The Michaelis-menten constant of enzymatic reation was determined by testing instantaneous rate under different substrate concentrations. The kinetic model and relevant parameters of enzymatic hydrolysis were obtained by using mathematic deduction and experimental analysis. A kinetic equation was established. We also concluded that the highest critical initial concentration of substrate was 176.81g/L when concentration of protease was 200U/g. Data obtained from experiments proved that theoretical degree of hydrolysis was almost consistant with the realistic one in high reliability ($R^2=0.99$). The model can be used to optimize hydrolysis process for tuna meat by flavourzyme. Therefore, it is a practical model.

Key words tuna meat; flavourzyme; kinetics model; Michaelis-menten constant