

# 多模式超声波预处理促进克氏原螯虾酶解效果的优化

张超<sup>1</sup>, 韩畅<sup>1</sup>, 冯敏<sup>1</sup>, 阮文燕<sup>1</sup>, 杨浩泽<sup>1</sup>,  
徐保国<sup>\*1,2</sup>, 颜伟强<sup>3</sup>, 周存山<sup>1</sup>, 马海乐<sup>1,2</sup>

(1. 江苏大学 食品与生物工程学院, 江苏 镇江 212013; 2. 江苏大学 食品物理加工研究院, 江苏 镇江 212013; 3. 汇能生物科技(江苏)有限公司, 江苏 淮安 223199)

**摘要:** 为了探寻一种多模式超声高效促进克氏原螯虾酶解效果的方法, 分别采用双频探头式超声波和三频发散式超声波对克氏原螯虾进行预处理, 对比研究了多模式超声预处理对克氏原螯虾酶解效果的促进作用。通过单因素实验得到探头式双频超声设备的最佳频率模式为 20/28 kHz 双频顺序超声, 三频发散式超声波设备的最佳频率为 20/40 kHz 双频顺序超声。在此基础上, 通过三因素三水平的响应面实验对超声预处理条件进行改进, 并建立相应回归方程, 优化试验以获得最佳的超声预处理条件。结果表明: 双频探头式超声设备的最佳处理条件为: 超声功率为 250 W, 时间为 10 min, 温度为 35 ℃, 此时克氏原螯虾的水解度为 38.98%; 三频超声波设备的最佳处理条件为: 超声功率为 250 W, 时间为 40 min, 温度为 40 ℃, 此时克氏原螯虾的水解度为 46.12%。实验结果表明多模式超声可以有效提高克氏原螯虾酶解效果。

**关键词:** 克氏原螯虾; 多模式超声; 水解度; 响应面试验

中图分类号: TS 224.6

文章编号: 1673-1689(2023)10-0051-12

DOI: 10.12441/spyswjs.20220327001

## Optimization of Enzymatic Hydrolysis of *Procambarus clarkii* via Multi-Mode Ultrasonic Pretreatment

ZHANG Chao<sup>1</sup>, HAN Chang<sup>1</sup>, FENG Min<sup>1</sup>, RUAN Wenyan<sup>1</sup>, YANG Haoze<sup>1</sup>,  
XU Baoguo<sup>\*1,2</sup>, YAN Weiqiang<sup>3</sup>, ZHOU Cunshan<sup>1</sup>, MA Haile<sup>1,2</sup>

(1. School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; 2. Institute of Food Physical Processing, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; 3. Huineng Biotechnology (Jiangsu) Co., Ltd., Huaian 223199, China)

**Abstract:** In order to explore a high-efficient method to promote the enzymatic hydrolysis of *Procambarus clarkii* with multi-mode ultrasound, the dual-frequency probe ultrasound and tri-frequency divergent ultrasound were used to pretreat *Procambarus clarkii* in this study, and the promotion effects of multi-mode ultrasonic pretreatment on the enzymatic hydrolysis of *Procambarus clarkii* were comparatively investigated. Through the single factor experiments, the optimal frequency mode of the dual-frequency probe ultrasonic equipment was found to be 20/28 kHz in the

收稿日期: 2022-03-27 修回日期: 2022-04-27

基金项目: 江苏省政策引导类计划项目(苏北科技专项 SZHZ202002)。

\* 通信作者: 徐保国(1985—), 男, 博士, 副研究员, 硕士研究生导师, 主要从事食品物理加工技术及装备研究。E-mail: xbg@ujs.edu.cn

sequential mode, while that of the three-frequency divergent ultrasonic equipment was 20/40 kHz in the sequential mode. On this basis, the response surface experiment with three factors and three levels was carried out to optimize the ultrasonic pretreatment conditions and to establish a corresponding regression equation. The optimization experiment was conducted to obtain the best ultrasonic pretreatment conditions. The optimal pretreatment conditions of the dual-frequency probe ultrasonic equipment were determined, including the use of 250 W ultrasonic power, treatment time of 10 minutes, and temperature of 35 °C. As a result, the degree of hydrolysis of *Procambarus clarkii* reached 38.98%. Similarly, the tri-frequency ultrasonic equipment achieved an optimal hydrolysis rate of 46.12% under the optimal conditions of 250 W ultrasonic power, 40 minutes duration, and 40 °C. The experimental results showed that multi-mode ultrasound could effectively improve the enzymatic hydrolysis effect of *Procambarus clarkii*.

**Keywords:** *Procambarus clarkii*, multi-mode ultrasound, degree of hydrolysis, response surface test

克氏原螯虾是一种在淡水中生活的硬壳类动物<sup>[1]</sup>。20 世纪 20 年代,日本从美国引入克氏原螯虾,1930 年前后从日本流入中国<sup>[2]</sup>。近年来,我国克氏原螯虾养殖业发展迅速。据统计,在 2003 至 2018 年这十几年的时间里,我国的养殖量从 5.16 万 t 快速增长至 163.87 万 t,尤其在 2018 年增幅最大,达到 45.1%<sup>[3]</sup>。据统计,仅 2018 年一年,克氏原螯虾就创造了超过 3 500 亿元的产值,同比增长了近 40%<sup>[4]</sup>。克氏原螯虾作为重要的水产品,受到更多消费者的喜爱<sup>[5-6]</sup>。

超声波上是一种由于机械振动所产生的能量在媒介中传递的过程,其频率一般在 20 kHz 以上<sup>[8-9]</sup>,被大量用于食品行业,特别是在酶解等方面。超声在酶解反应中的作用主要体现在以下几个方面:底物酶解前的超声预处理、边酶解边超声底物和超声处理酶方面<sup>[10]</sup>。利用超声波对含有蛋白质的底物酶解前进行预处理,不仅可以明显增加蛋白质利用率、酶的酶解率和产物的质量<sup>[11]</sup>,还能有效降低反应时间,从而降低生产成本,提高经济效益。超声波引起的空化是一种物理和化学反应<sup>[12]</sup>,并非引起空化就能形成明显的空化反应,只有保证超声的介质温度、机器功率、发射频率和反应时间等条件比较恰当时,空化核心才能成长为能形成空化反应的气泡,并产生有效的空化效应<sup>[13]</sup>。当空化气泡坍塌时,在气泡周围极小的空间内会发生物理化学相互作用和特别的物理作用,这为超声能成功的加强酶解反应奠定了基础<sup>[14]</sup>。

虽然超声技术在酶解过程中的应用很常见,但是将多模式超声波技术应用于克氏原螯虾酶解工艺中的研究却少有报道。作者利用不同的超声机器对克氏原螯虾进行实验<sup>[15]</sup>,提高酶解反应速率,减少生产所需时间,这对于增加其附加值,拓宽应用市场具有积极意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

克氏原螯虾:市售产品。

### 1.2 仪器与试剂

**1.2.1 主要仪器** 探头式双频超声设备:江苏大学自主研制(图 1(a));三频超声波反应设备:江苏大学自主研制(图1(b));离心机:LD5-2A,北京医用离心机厂产品。

**1.2.2 主要试剂** 氢氧化钠、浓硫酸、浓盐酸、甲醛、硼酸、甲基红、邻苯二甲酸氢钾、溴甲酚绿:分析纯,国药集团上海化学试剂公司产品。

### 1.3 实验方案

挑选饱满正常、大小适中的克氏原螯虾,用超声波清洗机清洗后,按照虾和水质量比为 1:2 加入蒸馏水,然后使用多功能破壁机将原料进行破碎处理。将虾浆液放入真空包装袋,使用不同模式的超声波机器对其进行超声处理,超声完成后加入碱性蛋白酶进行酶解反应。酶解的条件是:酶解时间 3 h,加酶量 2 000 U/g、pH 8.0、温度 60 °C;酶解反应完成后,迅速放入 95 °C 的水浴锅中灭酶,灭酶 10

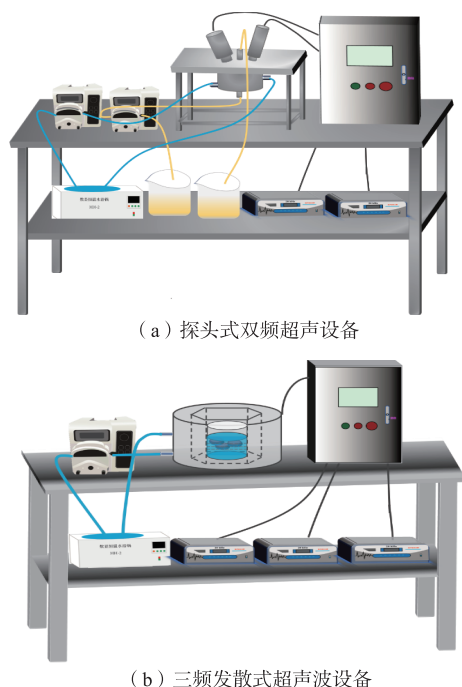


图1 多模式超声设备图

Fig. 1 Devices of multi-mode ultrasound equipment

min后,在5 000 r/min离心10 min,取克氏原螯虾酶解液的上清液测定水解度。选择的单因素试验条件分别为超声功率、时间、频率和超声温度,考察超声预处理对克氏原螯虾酶解的影响。

#### 1.4 水解度测定

参照GB 5009.235—20100的方法对克氏原螯虾酶解液中的氨基酸态氮进行测定,量取5.00 mL克氏原螯虾底物的酶解上清液至100 mL容量瓶,混匀后吸取20~200 mL烧杯,然后吸取60 mL的蒸馏水加入其中,用仪器搅拌混匀。用0.05 mol/L NaOH溶液滴定至pH 8.20,准确量取10.00 mL甲醛溶液加入其中后搅匀,接着用0.05 mol/L的NaOH溶液进行滴定,滴定到pH到9.20。对照实验用80 mL蒸馏水。记录相关溶液的所用体积,然后进行计算。运算公式如下:

$$A = \frac{0.014V_4(V_1 - V_2)C}{VV_3} \times 100\% \quad (1)$$

式中: $A$ 为底物所含的氨基酸态氮质量浓度,g/dL; $V_1$ 为第二次滴定时氢氧化钠所用试样的体积,mL; $V_2$ 为空白对照所用试液的体积,mL; $V_3$ 为将原料稀释后消耗的体积,mL; $V_4$ 为将原料稀释后的总体积,mL; $V$ 为所用试样的体积,mL; $C$ 为所使用的氢氧化钠溶液浓度,mol/L。

$$DH = \frac{A_N - A_{N1}}{N} \times 100\% \quad (2)$$

式中:DH为水解度,%; $A_N$ 为克氏原螯虾离心液上清液中氨基态氮的质量浓度,g/dL; $A_{N1}$ 为克氏原螯虾原液未水解时的游离态氨基酸质量浓度,g/dL; $N$ 为克氏原螯虾原液中的总氮质量浓度,g/dL。

#### 1.5 统计分析

实验重复3次,最终结果以数值的平均值和标准偏差表示,使用SPSS 26.0分析软件对数据进行处理。

## 2 结果与分析

### 2.1 探头式双频超声预处理对克氏原螯虾酶解的影响

**2.1.1 不同超声功率对酶解反应的影响** 将超声条件设置为:超声温度40℃、超声时间10 min、超声频率为顺序双频超声20/28 kHz、超声功率依次为0、125、250、375、500 W,在此基础上将克氏原螯虾原液进行完实验后,立即按照酶解实验要求进行反应,然后测量克氏原螯虾酶解液的水解度,用水解度来衡量酶解效果,考察不同超声功率对酶解效果的影响。

从图2可知,当超声的功率不断增大时,水解度是先增加后减少。在超声功率为250 W时水解度达到最大,这可能是由于超声波功率在一定范围内可以使蛋白质分子的构造发生变化,随着超声功率的加大,超声波处理产生的空化效应也加强,显露出原来位于蛋白质分子内部的部分,增加了和酶的接触点,使酶促反应速率加快,从而提高了水解度。但当超声功率继续加大时,水解度反而减小,原因或许是因为当超声功率进一步加大时,会改变原本容易和酶结合的结构,从而导致超声功率虽然增大,但不能使反应的效果同步加强<sup>[6]</sup>。所以最佳的超声频率为250 W。

**2.1.2 不同超声时间对酶解反应的影响** 将超声条件设置为:超声温度40℃、超声功率250 W、超声频率为20/28 kHz、超声时间依次为5、10、15、20、25 min,在此基础上将克氏原螯虾原液进行实验后,遵循酶解实验要求进行反应,然后测量克氏原螯虾酶解液的水解度,用水解度来衡量酶解效果,考察不同超声时间对酶解效果的影响。

从图3能够发现,当时间增加时,水解度先是

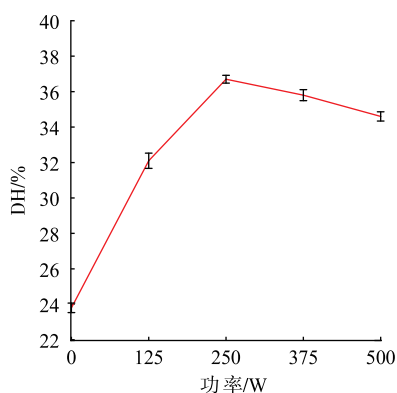


图2 不同超声功率对水解度的影响

Fig. 2 Effect of different ultrasonic power on degree of hydrolysis

随着时间的增长而增大,并在 10 min 时达到最大,然后水解度缓慢减小。这可能是因为超声波会产生空化效应时,空化效应在短时间内会随着超声时间的增加而增强,所以适当的空化效应可以使酶促反应速率加快和水解度升高。但当时间超过 10 min 后水解度有所下降,可能是由于过长的超声时间使原本能和酶接触反应的结构遭到了破坏,使酶解过程受到阻碍<sup>[17]</sup>。所以最佳的超声时间为 10 min。

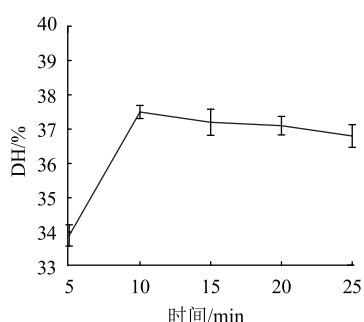


图3 不同超声时间对水解度的影响

Fig. 3 Effect of different ultrasonic time on degree of hydrolysis

**2.1.3 不同超声温度对酶解反应的作用** 将超声条件设置为:超声时间为 10 min、超声功率为 250 W、超声频率 20/28 kHz、超声温度依次为 30、35、40、45、50 °C,在此基础上将克氏原螯虾原液进行实验,按照酶解实验要求进行反应,然后测量克氏原螯虾酶解液的水解度,用水解度来衡量酶解效果,考察不同超声温度对酶解效果的影响。

从图 4 可以看出,随着温度的上升,克氏原螯虾酶解液的水解度先增大再减小,在 35 °C 时达到最大,其原因可能是细胞壁被超声波击破,扩大了蛋白

质与酶接触的面积,有利于蛋白酶解反应的发生。然而,随着温度的继续升高,蛋白质可以和酶接触的结构会被超声波不断破坏,因此水解度出现不断下降的现象<sup>[18]</sup>,因此最佳的超声温度为 35 °C。

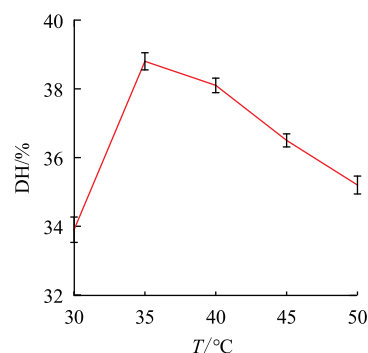


图4 不同超声温度对水解度的影响

Fig. 4 Effect of different ultrasonic temperatures on degree of hydrolysis

**2.1.4 不同超声频率对酶解反应的作用** 将超声条件设置为:超声时间为 10 min、超声功率为 250 W、超声温度 40 °C,调节超声频率分别为单频 20、28、35 kHz,顺序双频 20/28、20/35、28/35 kHz,同步双频 20+28、20+35、28+35 kHz,在此基础上将克氏原螯虾原液进行实验后,遵循酶解实验要求进行反应,然后测量克氏原螯虾酶解液的水解度,用水解度来衡量酶解效果,考察不同超声频率对酶解效果的影响。

从图 5 可以看出,不同的超声频率对水解度的影响不同。单频超声时,克氏原螯虾酶解液的水解度随着频率的增大而增大,其原因可能是随着超声频率的不断增大,底物中的蛋白质空间结构产生了变化,有利于酶解反应的进行。顺序双频与同步双频超声时,酶解液的水解度随着频率的增大反而减小,其原因可能是随着超声频率的增大,蛋白质分子构象进一步改变,影响了酶解反应的进行<sup>[19]</sup>。通过 SPSS 26.0 软件进行显著性分析,发现不同频率之间均存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )。当超声频率为 20/28 kHz 时水解度最大,所以最佳的超声频率为 20/28 kHz。

**2.1.5 Box-Beknken 实验** 在超声实验的基础上,将考察因数设置为超声功率、时间和温度,水解度为响应值进行设计。通过 Design expert 11 软件进行数据分析和实验设计,优化探头式双频超声的实验条件,克氏原螯虾 Box-Beknken 实验的因素与水平



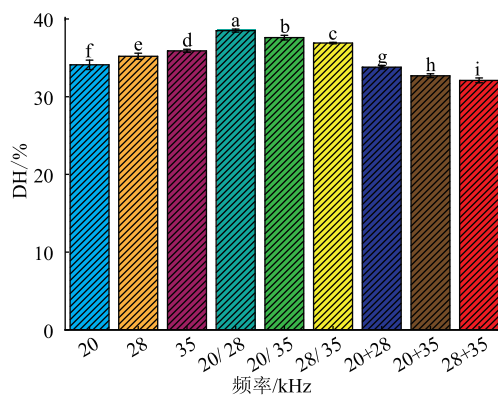


图5 不同超声频率对水解度的影响

Fig. 5 Effect of different ultrasonic frequency on degree of hydrolysis

如表1所示。

表1 克氏原螯虾响应面分析的因素和水平

Table 1 Factors and levels of response surface analysis of *Procambarus clarkii*

水平	因素		
	A 功率/W	B 时间/min	C 温度/℃
-1	125	5	30
0	250	10	35
1	375	15	40

**2.1.6 优化实验及方差分析** 根据所设计的响应面实验,确定超声波实验不同因数的最佳条件,实

表2 实验方案与结果

Table 2 Experimental scheme and results

实验编号	A	B	C	M
1	250	10	35	39.23
2	375	10	40	36.97
3	375	10	30	36.59
4	250	5	30	32.90
5	250	10	35	38.88
6	250	15	40	36.92
7	250	15	30	36.23
8	375	15	35	35.51
9	125	5	35	32.26
10	125	10	40	36.11
11	125	15	35	36.50
12	125	10	30	35.93
13	250	10	35	39.14
14	250	10	35	39.21
15	250	5	40	37.14
16	250	10	35	39.07
17	375	5	35	36.14

验结果如表2、3所示。

根据表2中所输入的实验数据可以由 design expert 11 软件得出  $M$ (水解度)与各个因素间的回归方程为:

$$M=39.11+0.55\times A+0.84\times B+0.69\times C-1.22\times AB+$$

表3 回归模型方差分析

Table 3 Variance analysis of regression model

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	63.42	9	7.05	18.62	<0.000 1**
A	2.21	1	2.21	5.83	<0.000 1**
B	5.61	1	5.61	14.82	<0.000 1**
C	3.78	1	3.78	9.99	<0.000 1**
AB	5.76	1	5.76	15.22	0.005 9
AC	0.010 0	1	0.010 0	0.026 4	0.875 5
BC	3.06	1	3.06	8.09	0.024 9
A <sup>2</sup>	12.36	1	12.36	32.66	0.000 7**
B <sup>2</sup>	22.05	1	22.05	58.26	<0.000 1**
C <sup>2</sup>	4.54	1	4.54	12.00	0.010 5
残差	2.65	7	0.378 5		
失拟项	2.59	3	0.862 5	55.57	0.091 3
纯误差	0.062 1	4	0.015 5		
总差	66.06	16			
$r^2=0.981\ 2\ r^2_{Adj}=0.931\ 6$					

$$0.55 \times AC - 0.89 \times BC - 1.70 \times A^2 - 2.30 \times B^2 - 1.01 \times C^2$$

式中:  $A$  为超声功率,  $W$ ;  $B$  为超声时间,  $\min$ ;  $C$  为超声温度,  $^{\circ}\text{C}$ 。

由上表可知, 此模型的  $P < 0.0001$ , 所以该模型方程极为显著; 又因为此模型的失拟项  $P$  值为  $0.0913$ , 大于  $0.05$ , 所以不显著, 因此该方程成立。而且超声时间、温度和功率的  $P$  值均小于  $0.0001$ , 所以它们对水解度有极显著的影响, 影响程度为: 功率 > 时间 > 温度。由  $r^2 = 0.9812$ ,  $r^2_{\text{Adj}} = 0.9316$  可知, 该模拟方案的拟合度和可信度均符合要求, 所以可以用于实验的理论预测。

**2.1.7 因素间交互作用分析** 利用软件做出响应曲面图, 分析超声功率、时间、温度之间的交互作用, 得出超声功率、时间、温度对于克氏原螯虾酶解

液的最佳工艺条件, 结果如图 6~8 所示。

从以上的 3 张图可得出, 3 种因素之间的交互作用都不明显, 因此实验的最佳条件为: 超声功率  $251.22\text{ W}$ , 时间  $10.36\text{ min}$ , 温度  $35.68\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 水解度为  $39.22\%$ 。为了能够在实际生产中实现, 将最佳工艺参数取整, 调整为: 超声的功率为  $250\text{ W}$ , 时间为  $10\text{ min}$ , 温度为  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 进行 3 次验证实验, 酶解实验水解度的平均值为  $38.98\%$ , 与模型理论值相差  $0.24\%$ , 证明回归方程有很高的拟合度和实用效果, 所以该实验的可行性高。

## 2.2 三频超声波预处理对克氏原螯虾酶解的影响

### 2.2.1 不同超声功率对酶解反应的作用

将超声条件设置为: 超声温度  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、超声时间  $30\text{ min}$ 、超声频率为  $20/40\text{ kHz}$ 、超声功率依次为  $0$ 、 $125$ 、 $250$ 、

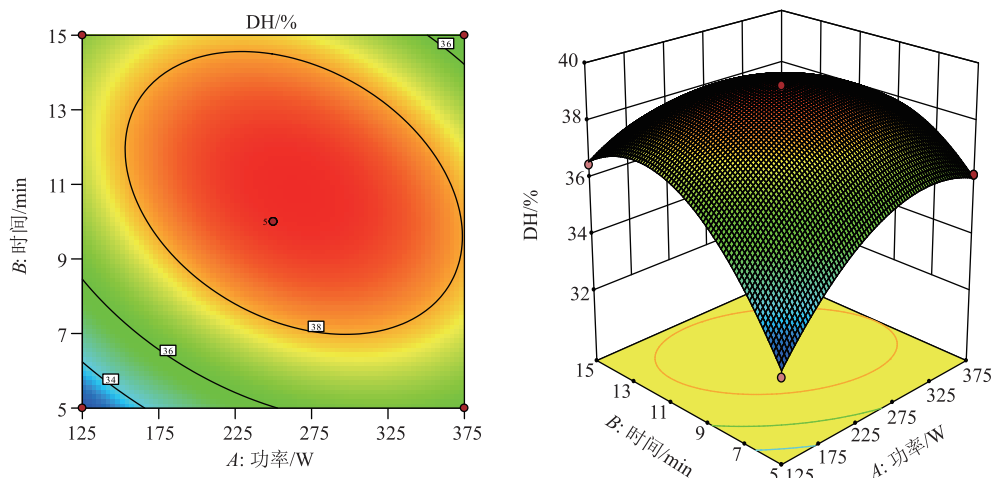


图 6 超声功率与时间对水解度的影响

Fig. 6 Effect of ultrasonic power and time on degree of hydrolysis

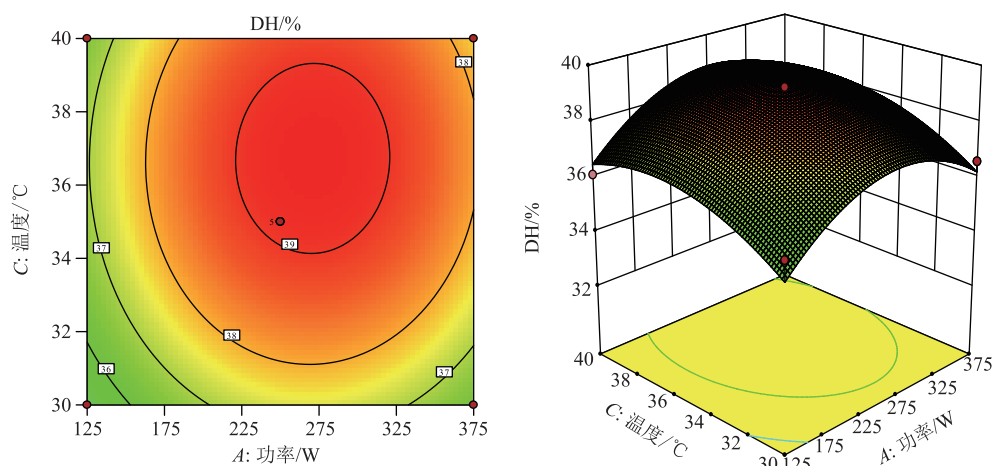


图 7 超声功率与温度对水解度的影响

Fig. 7 Effect of ultrasonic power and temperature on degree of hydrolysis

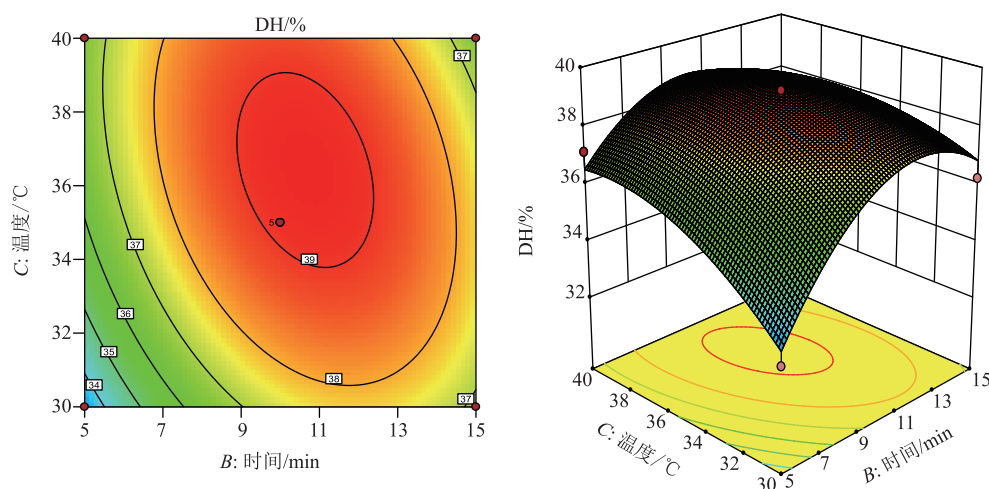


图 8 超声时间与温度对水解度的影响

Fig. 8 Effect of ultrasonic time and temperature on degree of hydrolysis

375、500 W,在此基础上将克氏原螯虾原液进行实验后,按照酶解实验要求进行反应,测量克氏原螯虾酶解液的水解度,用水解度来衡量酶解效果,考察不同超声功率对酶解效果的影响。

从图 9 可知,当功率增大时,克氏原螯虾酶解液水解度先增加后减少。在超声功率为 250 W 时水解度最高,这可能是由于当超声波功率较低时,产生的空化作用较为缓和,显露出原来位于蛋白质分子内部的结构,更易与酶结合。但当超声功率继续加大时,水解度变化趋势转变为不断下降。这是因为超声波功率过大反而会破坏了蛋白质的内部结构,不利于酶解反应的进行,使水解度反而下降<sup>[20]</sup>。所以最佳的超声功率为 250 W。

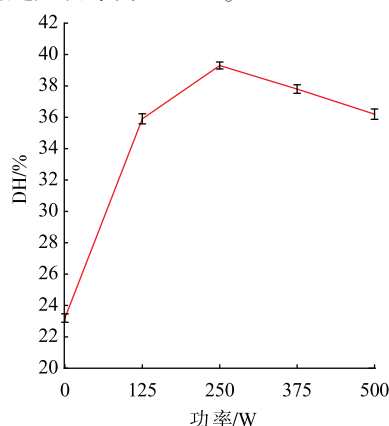


图 9 不同超声功率对水解度的影响

Fig. 9 Effect of different ultrasonic power on degree of hydrolysis

**2.2.2 不同超声时间对酶解反应的影响** 将超声条件设置为:超声温度 40 °C、超声功率 500 W、超声

频率为 20/40 kHz、超声时间依次为 10、20、30、40、50 min,在此基础上将克氏原螯虾原液进行实验,按照酶解实验要求进行反应,测量克氏原螯虾酶解液的水解度,用水解度来衡量酶解效果,考察不同超声时间对酶解效果的影响。

当时间增加时,克氏原螯虾酶解液的水解度先是上升,然后随着时间的延长下降(图 10)。这是因为随着时间的增加,超声波使蛋白质分子的结构被逐渐破坏,更多的酶结合位点被暴露出来。但是当超声时间过长,暴露出的结合位点也会被逐渐破坏,所以当时间超过 40 min 后水解度反而下降<sup>[21]</sup>。所以最佳的超声时间为 40 min。

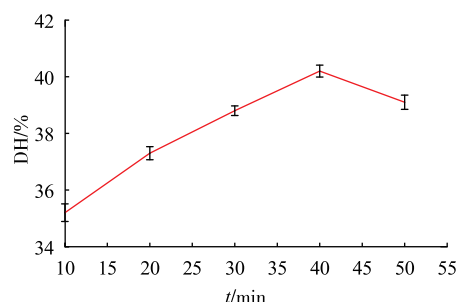


图 10 不同超声时间对水解度的影响

Fig. 10 Effect of different ultrasonic time on degree of hydrolysis

**2.2.3 不同超声温度对酶解反应的作用** 将超声条件设置为:超声时间 30 min、超声功率 500 W、超声频率为 20/40 kHz、超声温度依次为 30、35、40、45、50 °C,在此基础上将克氏原螯虾原液进行实验后,按照酶解实验要求进行反应,然后测量克氏原

螯虾酶解液的水解度,考察不同超声温度对酶解效果的影响。

从图 11 可知,当温度升高时,克氏原螯虾酶解液的水解度先增加后减少。在超声温度为 40 °C 时水解度最高,其原因可能是在超声温度较低时,随着温度的不断升高,分子活性增大,蛋白质易受到超声的作用更容易降解,有利于酶解的进行。当超声介质的温度继续升高时,使部分可以和酶结合的活性片段被破坏,不利于酶解反应的进行,因此克氏原螯虾酶解液的水解度反而下降<sup>[22]</sup>。所以超声的最佳温度为 40 °C。

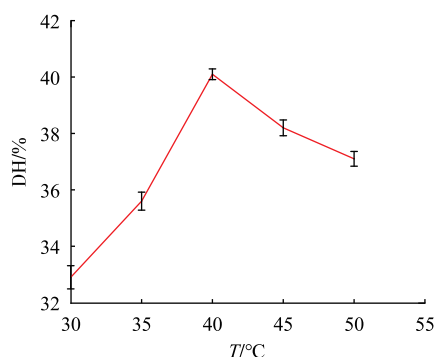


图 11 不同超声温度对水解度的影响

Fig. 11 Effect of different ultrasonic temperature on degree of hydrolysis

**2.2.4 不同超声频率对酶解反应的作用** 将超声条件设置为:超声温度 40 °C、超声功率 500 W、超声时间为 30 min, 调节超声频率为单频 20、40、60 kHz, 顺序 20/40、20/60、40/60、20/40/60 kHz, 同步 20+40、20+60、40+60、20+40+60 kHz, 在此基础上将克氏原螯虾原液进行实验后, 遵循酶解实验要求进行反应, 然后测量克氏原螯虾酶解液的水解度, 用水解度来衡量酶解效果, 考察不同超声频率对酶解效果的影响。

从图 11 可以看出, 不同的超声频率对水解度的影响不同。单频超声时, 克氏原螯虾酶解液的水解度随着频率的增大而增大, 其原因是经超声预处理后, 蛋白质的结构分布发生了变化, 有利于与酶作用。顺序双频与同步双频超声时, 水解度随着频率的增大反而减小, 其原因可能是随着超声频率的增大, 原本易与酶作用的蛋白质分子结构发生了改变, 反而不利于酶解反应的进行<sup>[23]</sup>。通过 SPSS 26.0 软件进行显著性分析, 发现除 20 kHz 与 40+60、400 kHz 与 20+40 kHz 之间不存在显著性差异 ( $P>0.05$ )

外, 其余频率之间均存在显著性差异 ( $P<0.05$ )。当超声频率为 20/40 kHz 时水解度最大, 所以最佳的超声频率为 20/40 kHz。

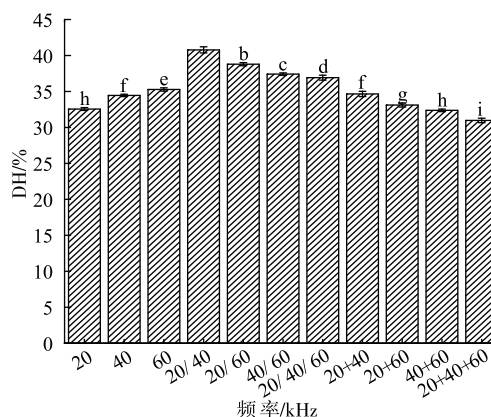


图 12 不同超声频率对水解度的影响

Fig. 12 Effect of different ultrasonic frequency on degree of hydrolysis

**2.2.5 Box-Beknken 实验** 在超声实验的基础上, 将考察因数设置为超声功率、时间和温度, 水解度为响应值进行设计, 用 Design expert 11 软件进行数据分析和实验设计, 优化三频超声波的实验条件, 克氏原螯虾 Box-Beknken 实验的因素与水平如表 4 所示。

表 4 克氏原螯虾响应面分析的因素和水平

Table 4 Factors and levels of response surface analysis of *Procambarus clarkii*

水平	因素		
	A 功率/W	B 时间/min	C 温度/°C
-1	125	30	25
0	250	40	40
1	375	50	45

**2.2.6 优化实验及方差分析** 根据所设计的响应面实验, 确定超声波实验不同因数的最佳条件, 实验结果如表 5~6 所示。

根据表 5 中所输入的实验数据可以由 Design expert 11 软件得出  $M$  (水解度) 与各个因素间的回归方程为:

$$M=46.10-0.83A+0.83B+0.10C+0.40AB+0.51AC+0.083BC-3.66A^2-1.31B^2-1.87C^2$$

式中:  $A$  为超声功率,  $W$ ;  $B$  为超声时间,  $min$ ;  $C$  为超



表5 优化实验方案与结果

Table 5 Optimization experimental scheme and results

试验编号	A	B	C	M
1	125	30	40	40.21
2	375	30	40	38.23
3	125	50	40	43.22
4	375	40	35	38.89
5	125	40	45	41.22
6	375	40	45	40.09
7	125	40	35	42.07
8	375	50	40	42.84
9	250	30	35	43.13
10	250	50	35	42.48
11	250	30	45	43.91
12	250	50	45	42.87
13	250	40	40	46.06
14	250	40	40	46.19
15	250	40	40	46.14
16	250	40	40	46.01
17	250	40	40	46.12

声温度,℃。

由表3可知,此模型的 $P$ 值小于0.000 1,所以该模型方程极为显著;又因为此模型的失拟项 $P$ 值为0.610 1,大于0.05,所以不显著,因此该方程成立。且时间、温度和功率的 $P$ 值均小于0.000 1,所以它们对水解度有极显著的影响,影响程度为:功率>时间>温度。由 $r^2=0.975\ 6$ , $r^2_{Adj}=0.921\ 3$ 可知,该模拟方案的拟合度和可信度均符合要求,可用于实验的理论预测。

**2.2.7 因素间交互作用分析** 利用软件做出响应曲面图,分析超声功率、时间、温度之间的交互作用,得出超声功率、时间、温度对于克氏原螯虾酶解的最佳工艺条件,结果如图13~15所示。

从以上多图可得出,3种因素之间的交互作用都是不明显,因此实验的最佳条件为:超声功率253.50 W,时间40.64 min,温度40.75℃,水解度为46.15%。为了能够在实际生产中实现,将最佳工艺参数取整,调整为:超声的功率为250 W,时间为40 min,温度为40℃,进行3次验证实验,酶解实验水解度的平均值为46.12%,与模型理论值相差0.03%,证明回归方程

表6 回归模型方差分析

Table 6 Variance analysis of regression model

来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	164.11	9	18.23	41.82	<0.000 1**
A	1.20	1	1.20	2.78	<0.000 1**
B	1.12	1	1.12	2.58	<0.000 1**
C	0.781 3	1	0.781 3	1.79	<0.000 1**
AB	0.202 5	1	0.202 5	0.464 8	0.675 2
AC	1.96	1	1.96	4.50	0.373 7
BC	0.422 5	1	0.4225	0.969 7	0.910 0
A <sup>2</sup>	116.32	1	116.32	266.96	< 0.000 1**
B <sup>2</sup>	28.05	1	28.05	64.37	0.005 4**
C <sup>2</sup>	3.46	1	3.46	7.93	0.003 1**
残差	3.05	7	0.435 7		
失拟项	3.03	3	1.01	231.31	0.610 1
纯误差	0.017 5	4	0.004 4		
总差	167.16	16			
$r^2=0.975\ 6$ $r^2_{Adj}=0.921\ 3$					

有很高的拟合度和实用效果,该实验的可行性高。

### 3 结 语

作者研究了超声波预处理对克氏原螯虾酶解的影响,在单因素试验的基础上,通过响应面法确定了超声预处理的最佳条件。

1) 探头式双频超声设备的最佳超声频率为20/28 kHz 双频顺序超声,在此基础上响应面优化确定的最佳处理条件为:超声的功率为250 W,时间为10 min,温度为35℃,此时克氏原螯虾的水解度为38.98%。

2) 三频超声波设备的最佳超声频率为20/40

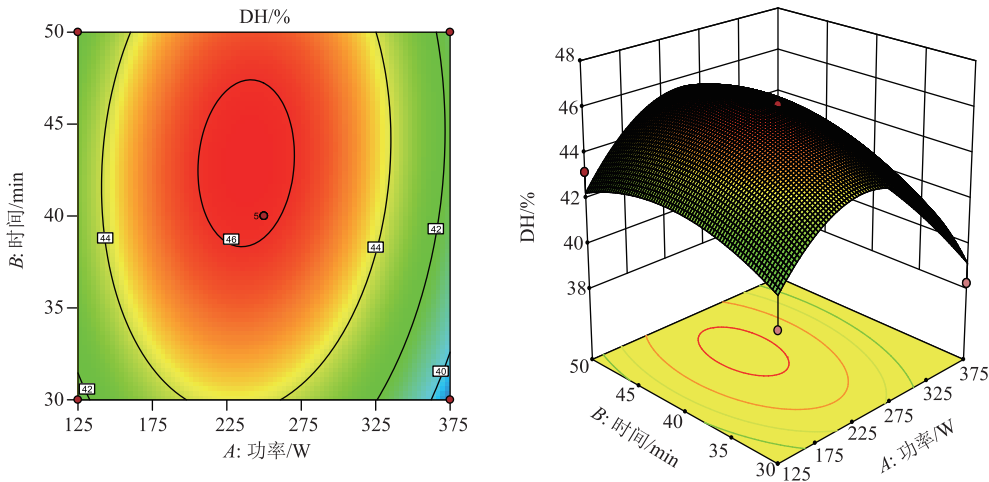


图 13 超声功率与时间对水解度的影响图

Fig. 13 Diagram of influence of ultrasonic power and time on degree of hydrolysis

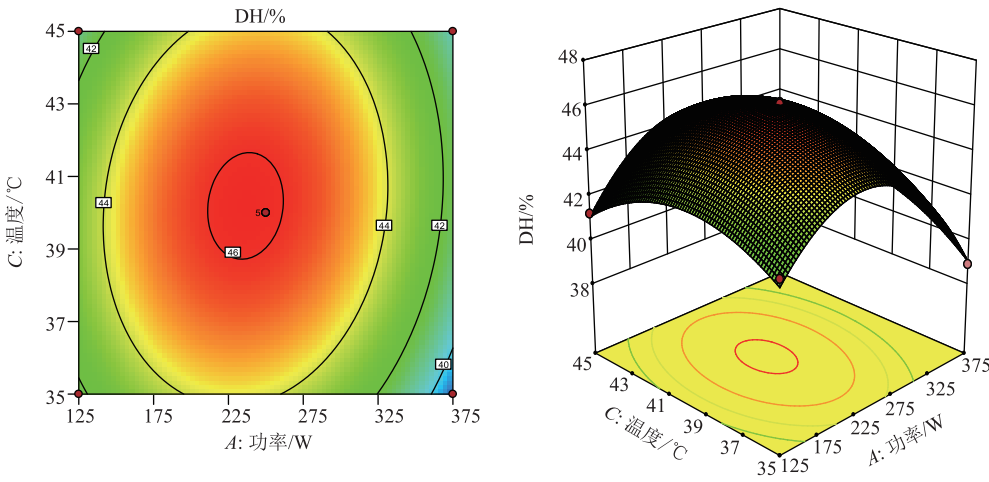


图 14 超声功率与温度对水解度的影响图

Fig. 14 Diagram of influence of ultrasonic power and temperature on degree of hydrolysis

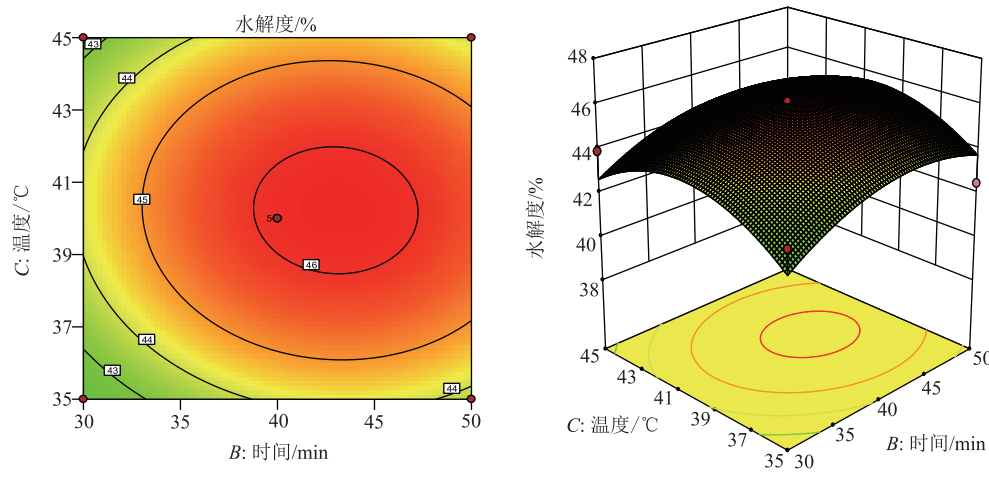


图 15 超声时间与温度对水解度的影响图

Fig. 15 Diagram of influence of ultrasonic time and temperature on degree of hydrolysis

kHz 双频顺序超声,在此基础上响应面优化确定的最佳处理条件为:超声的功率为 250 W,时间为 40 min,温度为 40 ℃,此时克氏原螯虾的水解度为 46.12%。

## 参考文献:

- [1] 徐加涛,阎斌伦,徐国成. 克氏原螯虾产业发展背景、现状与展望[J]. 水产科技情报,2011,38(4):172-176,180.  
XU J T,YAN B L,XU G C. Development background,present situation and prospect of *Procambarus clarkii* industry [J]. **Fisheries Science & Technology Information**,2011,38(4):172-176,180. (in Chinese)
- [2] 王昆鹏,庞卫,李霄,等. 克氏原螯虾秋冬季稻田养殖技术浅析[J]. 科学养鱼,2022(1):37-38.  
WANG K P,PANG W,LI X o,et al. Analysis on cultivation techniques of *Procambarus clarkii* in paddy fields in autumn and winter[J]. **Scientific Fish Farming**,2022(1):37-38. (in Chinese)
- [3] PENG G H,SUN J X,PENG B,et al. Assessment of essential element accumulation in red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) and the highly efficient selenium enrichment in freshwater animals[J]. **Journal of Food Composition and Analysis**,2021,101:103953.
- [4] YU J X,XIONG M T,YE S W,et al. Effects of stocking density and artificial macrophyte shelter on survival,growth and molting of juvenile red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) under experimental conditions[J]. **Aquaculture**,2020,521:735001.
- [5] SHUI Y,KUI Y,ZHU G Y,et al. Egg incubation and plasma proteome alterations in response to brood care in maternal crayfish (*Procambarus clarkii*)[J]. **Aquaculture**,2021,542:736888.
- [6] TAN Y F,PENG B,WU Y L,et al. Human health risk assessment of toxic heavy metal and metalloid intake via consumption of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) from rice-crayfish co-culture fields in China[J]. **Food Control**,2021,128:108181.
- [7] YIN C M,LI N Q,REN L C,et al. Identification and characterization of two highly homologous lysozymes from red swamp crayfish,*Procambarus clarkii*[J]. **Fish and Shellfish Immunology Reports**,2021,2:100017.
- [8] 徐保国,魏本喜,齐文慧,等. 多频超声波辅助磷脂酶处理对菜籽油脱胶效果及品质的影响[J]. 食品与生物技术学报,2018,37(12):1306-1312.  
XU B G,WEI B X,QI W H,et al. Effect of multi-frequency ultrasound assisted enzymatic treatment on the degumming efficiency and quality attributes of rapeseed oil[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2018,37(12):1306-1312. (in Chinese)
- [9] 张媛,冯新月,常思源,等. 超声-酶法水解小麦麸皮制备低聚木糖的研究[J]. 上海化工,2021,46(5):23-26.  
ZHANG Y,FENG X Y,CHANG S Y,et al. Study on production of xylooligosaccharides from wheat bran by ultrasonic-enzymatic hydrolysis[J]. **Shanghai Chemical Industry**,2021,46(5):23-26. (in Chinese)
- [10] 任广跃,靳力为,段续,等. 超声处理对果蔬干燥速率及品质的影响[J]. 食品与生物技术学报,2020,39(4):9-17.  
REN G Y,JIN L W,DUAN X,et al. Effect of ultrasonic treatment on drying rate and quality of fruits and vegetables[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2020,39(4):9-17. (in Chinese)
- [11] 王晓慧,姚茂君,陈怡君,等. 超声辅助复合酶法提取莓茶多糖的工艺优化[J]. 食品与机械,2021,37(11):166-172.  
WANG X H,YAO M J,CHEN Y J,et al. Research on extraction technology of *Ampelopsis grossedentata* polysaccharide by ultrasound-assisted enzymatic method[J]. **Food & Machinery**,2021,37(11):166-172. (in Chinese)
- [12] 张婵,杨强,张桦林,等. 超声辅助法优化提取红曲红、红曲黄色素[J]. 食品与生物技术学报,2014,33(8):805-813.  
ZHANG C,YANG Q,ZHANG H L,et al. Optimization for ultrasonic-assisted on extraction of *Monascus* red pigment and yellow pigments[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2014,33(8):805-813. (in Chinese)
- [13] 马艳弘,孟勇,崔晋,等. 牛蒡多酚超声辅助酶法提取工艺及抗氧化活性[J]. 食品与生物技术学报,2020,39(1):38-45.  
MA Y H,MENG Y,CUI J,et al. Optimization of ultrasonic-assisted enzyme extraction of polyphenols from burdock and its antioxidant activity evaluation[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2020,39(1):38-45. (in Chinese)
- [14] 滕井通,詹小龙,宫坤,等. 响应面优化超声-微波协同提取石榴叶中总黄酮工艺的研究[J]. 食品与生物技术学报,2015,34(7):744-750.  
TENG J T,ZHAN X L,GONG K,et al. Optimization of ultrasonic-microwave synergistic extraction of total flavonoids from leaves of *Punica granatum* L. by response surface methodology[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2015,34(7):744-750. (in Chinese)

- [15] 丁梁斌, 马春梅, 赵苹苹, 等. 响应面法优化酶解 - 超声辅助提取鸡血藤多糖工艺研究[J]. 中国食品添加剂, 2021, 32(7): 88-96.
- DING L B, MA C M, ZHAO P P, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis-ultrasonic assisted extraction of polysaccharides from *spatholobi* by response surface methodology[J]. **China Food Additives**, 2021, 32(7): 88-96. (in Chinese)
- [16] 马海乐, 耿静静, 骆琳, 等. 超声波预处理对燕麦蛋白制备 ACE 抑制肽的影响[J]. 农业机械学报, 2010, 41(9): 133-137.
- MA H L, GENG J J, LUO L, et al. Effect of oat-seed protein pretreatment by ultrasonic on preparation of ACE inhibitory peptides [J]. **Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery**, 2010, 41(9): 133-137. (in Chinese)
- [17] 丁青芝. 脉冲超声辅助酶解法制备玉米黄粉 ACEI 活性肽的研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2008.
- [18] 吉惠杰, 杨艳俊, 沈启慧, 等. 超声辅助酶解法提取仙人草多糖的工艺研究[J]. 粮油食品科技, 2017, 25(2): 74-77.
- JI H J, YANG Y J, SHEN Q H, et al. Study on extraction process of polysaccharide from *Mesona chinensis* by ultrasonic-assisted enzymatic method[J]. **Science and Technology of Cereals, Oils and Foods**, 2017, 25(2): 74-77. (in Chinese)
- [19] 黄湛媛, 李丽, 熊宇飞, 等. 超声辅助竹节虾头酶解及抗氧化肽分离研究[J]. 核农学报, 2017, 31(8): 1556-1566.
- HUANG Z Y, LI L, XIONG Y F, et al. Study on ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis of *Penaeus japonicus* head and separation of the antioxidant peptides[J]. **Journal of Nuclear Agricultural Sciences**, 2017, 31(8): 1556-1566. (in Chinese)
- [20] 马海乐, 耿静静, 骆琳, 等. 超声波预处理对燕麦蛋白制备 ACE 抑制肽的影响[J]. 农业机械学报, 2010, 41(9): 133-137.
- MA H L, GENG J J, LUO L, et al. Effect of oat-seed protein pretreatment by ultrasonic on preparation of ACE inhibitory peptides [J]. **Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery**, 2010, 41(9): 133-137. (in Chinese)
- [21] 徐忠, 王友健, 陈晓明, 等. 响应面试验优化超声波辅助酶解豌豆蛋白工艺研究[J]. 粮食与油脂, 2021, 34(10): 121-125.
- XU Z, WANG Y J, CHEN X M, et al. Optimization of ultrasonic assisted enzymatic hydrolysis of pea protein by response surface method[J]. **Cereals & Oils**, 2021, 34(10): 121-125. (in Chinese)
- [22] 王晓慧, 姚茂君, 陈怡君, 等. 超声辅助复合酶法提取莓茶多糖的工艺优化[J]. 食品与机械, 2021, 37(11): 166-172.
- WANG X H, YAO M J, CHEN Y J, et al. Research on extraction technology of *Ampelopsis grossedentata* polysaccharide by ultrasound-assisted enzymatic method[J]. **Food & Machinery**, 2021, 37(11): 166-172. (in Chinese)
- [23] 刘运. 超声预处理促进马铃薯蛋白酶解机理及影响其水解物模拟消化的研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2017.