

凡纳滨对虾虾头自溶动力学

朱国萍, 曹文红, 章超桦*, 吉宏武

(广东海洋大学食品科技学院, 广东 湛江 524025)

摘要:研究了温度、pH和底物浓度等对凡纳滨对虾虾头自溶过程的影响,以及自溶产物随自溶时间的变化规律:0~5 h内自溶反应产物的溶出遵循一级反应速度方程: $Y = 39.496e^{-0.3913x}$, $KP = -1.1464Y + 59.506$, $Pe = -0.7167Y + 32.551$;溶出总蛋白和5 000 u以下自溶产物及残余蛋白之间存在很好的线性相关性;自溶过程中,温度、pH、固液比是影响自溶速率常数(Ka)的重要因素。自溶过程中,40~50℃温度范围内, Ka 值随温度的升高而增大,50℃时 Ka 值达最大值,50~60℃, Ka 值随温度的升高而减少;pH与固液比对 Ka 的影响不呈规律性,在pH 9、固液比1:3时 Ka 值分别达最大值。利用自溶速率常数的对数与绝对温度的倒数建立了Arrhenius方程 $\ln Ka = -13654/T_k + 41.353$,经此方程验证了所建立自溶动力学方程的有效性。在自溶初始阶段(0~1 h),5 000 u以上自溶产物占较大比例,为58%,自溶2~3 h 5 000 u以下产物的比例增幅较快,3 h时5 000 u以下产物达66.8%,自溶4~5 h后5 000 u以下产物增加趋缓,为71.47%。自溶过程中,从0 h到5 h,大部分脂肪族氨基酸溶出2~8倍不等,特别是天门冬氨酸(Asp),自溶前为0.017 mg/100 mL,自溶5 h后含量增加将近8倍,达0.13 mg/100 mL,谷氨酸(Glu)增加量次之,自溶前为0.041 mg/100 mL,自溶5 h后为0.17 mg/100 mL;杂环氨基酸—脯氨酸(Pro)、组氨酸(His)和含硫氨基酸—胱氨酸(Cys)、甲硫氨酸(Met)溶出量较少,特别是胱氨酸(Cys)和脯氨酸(Pro),胱氨酸的平均含量基本保持在0.006~0.009 g/100 mL,脯氨酸平均含量基本保持在0.07~0.09 g/100 mL。

关键词:凡纳滨对虾;虾头;自溶;动力学

中图分类号:TS 254.1; S 917

文献标识码:A

在一定条件下,生物体内的内源酶被激活,与相应的机体组织生物大分子底物作用,发生自溶作用,生成各种较低分子量的产物。自溶过程中生物体的内源蛋白酶起着重要的作用。生物体组织蛋白在内源内肽酶和外肽酶的联合作用下以可溶性蛋白质、肽和氨基酸的形式释放出来。利用自溶作用可进行动物特别是水产加工废弃物中蛋白质等营养物质的回收。Intarasirisawat等^[1]研究大眼鲷(*Priacanthus macracanthus*)鱼皮自溶过程中蛋白质与可溶性肽降解的影响因素,分析引起大眼鲷鱼皮自溶最关键的蛋白酶类,通过与添加蛋白抑制剂后凝胶降解条件的对比,认识到温度是影响所生成的凝胶的产量和凝胶蛋白质成分

组成的因素;Raa等^[2]研究了鳕内脏在内源酶作用下发生的自溶反应,发现自溶时产生的含大量蛋白质和少量脂质的可溶性相氨基酸组成与含蛋白质和脂质的不溶性沉淀物的氨基酸组成明显不同;Eakpetch等^[3]研究了太平洋白虾(*Litopenaeus vannamei*)自溶活力最大时的最佳温度、pH和NaCl的浓度,在最佳条件下获得了最高的可溶性肽。鉴于生物体内源酶系的多样性和复杂性,在特定条件下仅有部分酶在起作用,营养物质的回收率受到限制,近年有研究者采用一些技术手段以提高自溶回收率,发现适度的紫外光照射会激活部分内源酶,促进组织发生自溶^[4];而梯度升温有助于自溶时不同水解酶对温度的要求,达到

较好的自溶效果^[5];增大压力和升高温度可提高自溶时溶出的总氮、氨基态氮和游离氨基酸的含量^[6]。

近年来,我国对虾养殖发展迅速,每年的产量都保持在100万t以上,其中凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)的产量为90多万t。目前,对虾的加工出口呈现持续增长的态势。对虾加工一般会去壳或去头,虾头占虾体重的35%~45%,由此产生大量的虾头副产物。虾头副产物富含氨基酸、肽、蛋白质和其它有用的生物物质,回收后可以用来作为基料应用到各种食品^[7]。虾的内源酶系约60%集中在头部(如类似胰蛋白酶、类似肠肽酶等),在一定的条件下能够被激活而发生自溶作用,将自身组织蛋白质降解成肽和氨基酸。自溶的温度、pH、底物浓度是影响自溶的主要因素^[8-10],这些因素将影响自溶产物的组成。有关水产品自溶机理及其规律的研究报道较少。本文通过研究温度、pH、底物浓度等对凡纳滨对虾虾头自溶的影响规律和溶出产物随自溶时间的变化规律,建立自溶动力学模型。根据动力学模型监控虾头的自溶进程,既可用于获取预期分子量分布的自溶产物,也可用于经济有效地提高虾头蛋白质的回收率,具有很好的实用价值。

1 材料与方 法

1.1 材 料

新鲜凡纳滨对虾虾头,由湛江国联水产公司提供。马尿酸组氨酰亮氨酸(Hippuryl-Histidyl-Leucine, HHL, MW423Da)购自日本Peptide Institute;分子量标准多肽Triosephosphate-isomerase(MW26625Da)、Myoglobin(MW16950Da)、Aprotinin(MW6512Da)、Insulin-B(MW3496Da)、Bacitracin(MW1423Da)购自美国Biorad公司。

1.2 仪 器 与 设 备

奇能SS250-E匀浆机(佛山市顺德区方胜电器实业有限公司);pHS-25CpH计(上海康仪仪器有限公司);THZ-82恒温振荡器(上海天呈科技有限公司);TDS低速自动平衡离心机(长沙平凡仪器仪表有限公司);华焯KDN-F自动定氮仪(上海纤检仪器有限公司);Waters 600E高效液相色谱(美国Waters公司);日立835-50型高速氨基酸分析仪(日本日立公司)。

1.3 试 验 方 法

虾头自溶方法 虾头经匀浆后,分别称取30g于广口瓶中,加入90mL的蒸馏水,摇匀后调pH为9,盖上瓶盖后,置于恒温振荡器,于50℃下水浴,在0.5、1、2、3、4、5h时分别取样置于100℃水浴中灭酶10min,冷却后以4000r/min离心10min,将上清液和残渣分别收集备用。

蛋白质的测定 采用微量凯氏定氮法^[11]。

分子量分布的测定 采用高效体积排阻色谱(HPSEC)法测定虾头自溶上清液的分子量分布,流动相为50mmol/L Tris-HCl缓冲液(pH 8.3)。将6种分子量标准多肽(Triosephosphate-isomerase, Myoglobin, Aprotinin, Insulin-B, Bacitracin和HHL)配制成溶液,上样10μL至Waters-PROTEIN-PAK 60柱进行高效液相色谱洗脱(Waters 600E),流动相流速0.7mL/min,监测214nm处的吸光值,建立分子量M的对数与洗脱保留时间t之间的回归方程为分子量。将酶解产物配制可溶性蛋白含量为5mg/mL的溶液,经过针式过滤头(0.45μm)过滤后在相同的条件下进行高效液相色谱洗脱,分子量回归方程为 $LgM = -0.2261t + 6.4872$,决定系数为0.9837。利用分子量回归方程考察虾头自溶产物的分子量分布。

游离氨基酸的测定 虾头自溶离心后的上清液,经过针式过滤头(0.45μm)过滤后直接上样至日立835-50型高速氨基酸分析仪进行氨基酸的分析。

温度对自溶反应影响的实验方法 在pH 9、固液比1:3不变的条件下,取40、45、50、55和60℃进行虾头自溶试验,测定自溶产物离心后残渣中总蛋白含量,每个样品做3个平行,所得数据取平均值后采用最小方差回归方法拟合。

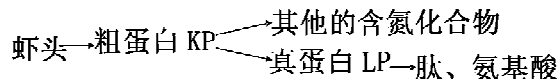
pH对自溶反应影响的实验方法 在50℃、固液比1:3不变的条件下,取pH 6、pH 7、pH 8、pH 9、pH 10 5点进行虾头自溶试验,测定自溶产物离心后的残渣中总蛋白的量,每个样品做3个平衡,所得数据取平均值后采用最小方差回归方法拟合。

固液比对自溶反应影响的实验方法 在50℃、pH 9不变的条件下,取固液比为1:1、1:2、1:3、1:4、1:5 5点进行虾头自溶试验,测定自溶产物离心后的残渣中总蛋白的量,每个样品做3个

平行,所得数据取平均值后采用最小方差回归方法拟合。

1.4 虾头自溶动力学模型的建立

虾头自溶过程是一个机体组织逐渐溶解的过程,与之伴随的是介质中粗蛋白(KP)、真蛋白(LP)的量不断增加,溶出的蛋白质随即降解为肽和氨基酸。



用下列微分方程来表示虾头的自溶过程^[12-13](Ka 定义为自溶速率常数, Y 定义为残余总蛋白, KP 定义为溶出总蛋白, Pe 定义为 5 000 u 以下自溶产物)。

$$dY/dt = -Ka(Y - Y_{\infty}) \quad (1)$$

$$d[KP]/dt = -\alpha_{KP}(dY/dt) \quad (2)$$

$$d[Pe]/dt = -\alpha_{Pe}(dY/dt) \quad (3)$$

$$d[Pe]/dt = \beta_{KP}(d[KP]/dt) \quad (4)$$

假定所有的系数均为常数,积分初始条件为 $t=0$ 时, $Y=Y_0$, $[KP]=[KP]_0$, $[Pe]=[LP]_0$,由上述微分方程可以得到以下的积分方程:

$$\ln[(Y - Y_{\infty})/(Y_0 - Y_{\infty})] = -Kat$$

$$Y = (Y_0 - Y_{\infty})e^{-Kat} + Y_{\infty} \quad (5)$$

$$[KP] = [KP]_0 - \alpha_{KP}(Y - Y_0)$$

$$[KP] = -\alpha_{KP}Y + C_1 \quad (6)$$

$$[Pe] = [Pe]_0 + \alpha_{Pe}(Y - Y_0)$$

$$[Pe] = -\alpha_{Pe}Y + C_2 \quad (7)$$

$$[Pe] = [Pe]_0 + \beta_{KP}[KP] - [KP]_0$$

$$[Pe] = \beta_{KP}[KP] + C_3 \quad (8)$$

当 $Y_{\infty}=0$ 时,方程(5)可简化:

$$Y = Y_0 e^{-Kat} \quad (9)$$

2 结果

2.1 虾头自溶曲线及自溶动力学模型

根据前期试验结果,确定在温度 50 °C、pH 9、固液比 1:3 的条件下进行虾头自溶试验,测定自溶产物离心后得到的上清液的总蛋白、5 000 u 以下自溶产物及离心后的残渣中总蛋白的量,所得的数据采用最小方差回归方法拟合,如图 1-图 4 和表 1 所示,虾头自溶速率常数为 0.391 3,溶出总蛋白生成系数为 1.146 4,5 000 u 以下自溶产物生成系数为 0.716 7,虾头自溶动力学方程为 $Y = 39.496e^{-0.3913x}$,0 ~ 5 h 时范围内虾头自溶过程

遵循一级反应速率方程,产物溶出动力学方程呈指数规律衰减,溶出总蛋白和 5 000 u 以下自溶产物均与残余总蛋白之间存在很好的线性相关性,5 000 u 以下自溶产物的溶出量随着溶出总蛋白的量的增加而增加,且呈很好的线性相关性。

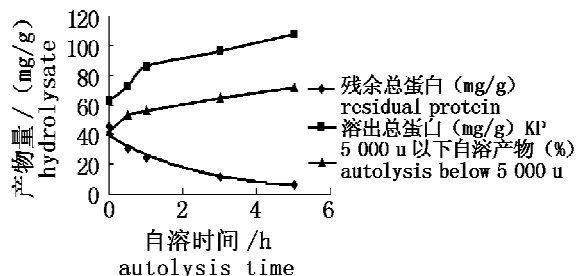


图 1 虾头自溶产物溶出时间曲线

Fig. 1 Autolysis kinetic curve of shrimp head at different time

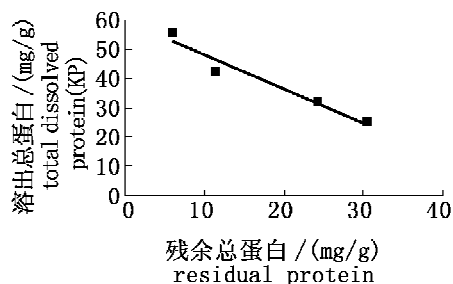


图 2 自溶过程中溶出总蛋白与残余总蛋白的关系

Fig. 2 Relationship between KP and residual protein

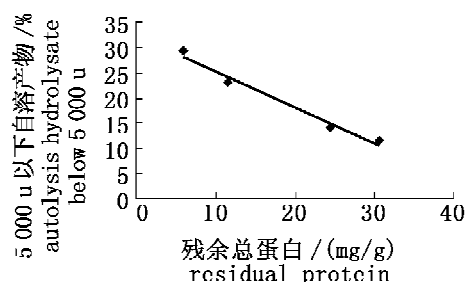


图 3 自溶过程中 5 000 u 以下自溶产物与残余总蛋白的关系

Fig. 3 Relationship between autolysis yield below 5 000 u and residual protein

2.2 理化因素对自溶速率常数的影响

由于虾头自溶产物溶出动力学过程呈指数衰减规律,衰减指数即溶出反应的速度常数,这个常数并不固定,受很多因素影响,如自溶温度、pH、固液比等都会对自溶过程产生较大的影响,因此,

以 Ka 为指标,建立不同条件下溶出动力学方程,分析确定合适的自溶工艺参数。

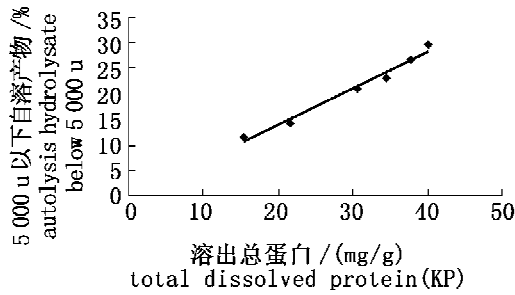


图4 溶出总蛋白与5000 u以下自溶产物的关系
Fig.4 Relationship between KP and autolysis yield below 5000 u

表1 虾头自溶动力学参数拟合结果
Tab.1 Fitted results of the autolysis kinetic parameters of shrimp head

参数 parameters	拟合结果 fitted results	r^2
Ka (/h)	0.391 3	0.98
α_{KP} (mg/g)	1.146 4	0.95
α_{Pk} (%)	0.716 7	0.98
β_{KP} (mg/g)	0.715 9	0.98

温度对虾头自溶速度的影响 虾头自溶时当温度从40℃上升到50℃时,自溶速率常数逐渐升高,在50℃时达到最高值0.391 3,50℃时自溶速率常数为40℃时自溶速率常数的3.9倍,但当温度从50℃升至60℃时,自溶速率常数逐渐减小,到60℃时,自溶速率常数仅为50℃时自溶速率常数的14.4%。

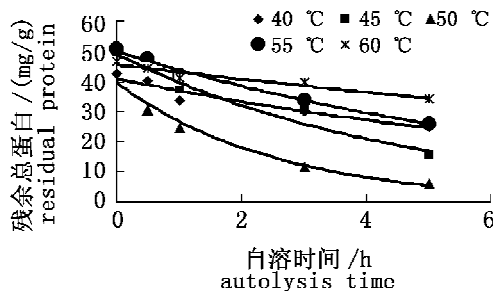


图5 不同温度虾头自溶产物溶出情况
Fig.5 Autolysis kinetic curve of shrimp head at different temperatures

pH对虾头自溶速度的影响 由图6和表3可见,pH对虾头自溶速度的影响十分明显,在pH为6时自溶速率常数最小,为0.132 3,当pH

为9时,自溶速率常数最大,为0.391 3,最小的自溶速率常数仅为最大的自溶速率常数的1/3。

表2 温度对虾头自溶速度的影响
Tab.2 Effect of temperature on shrimp head autolysis rate

	温度(℃) temperature				
	40	45	50	55	60
Ka (/h)	0.101 3	0.211 7	0.391 3	0.130 7	0.056 5
Y_0 (mg/g)	42.44	48.21	45.95	50.66	46.8
r^2	0.95	0.95	0.98	0.99	0.94

表3 pH对虾头自溶速度的影响
Tab.3 Effect of pH on shrimp head autolysis rate

	pH				
	6	7	8	9	10
Ka (/h)	0.132 3	0.274 3	0.199 2	0.391 3	0.167 7
Y_0 (mg/g)	42.76	46.72	50.22	45.95	39.74
r^2	0.89	0.89	0.89	0.98	0.96

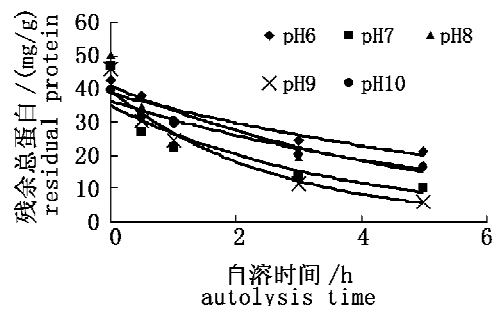


图6 不同pH虾头自溶产物溶出情况
Fig.6 Autolysis kinetic curve of shrimp head at different pH

固液比对虾头自溶速度的影响 固液比(酶的浓度)是影响虾头自溶其中一个因素,虾头自溶时固液比为1:3时,自溶速率常数最大,为0.391 3,固液比为1:5时,自溶速率常数最小,仅为最大自溶速率常数的37%(图7和表4)。

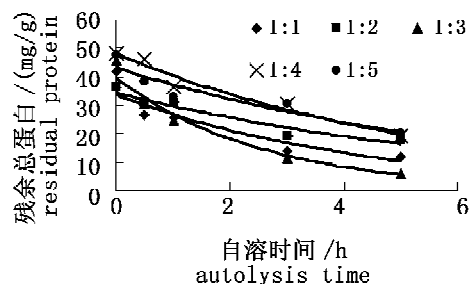


图7 不同固液比虾头自溶产物溶出情况
Fig.7 Autolysis kinetic curve of shrimp head at different solid/liquid ratio

表 4 固液比对虾头自溶速度的影响
Tab. 4 Effect of solid-liquid ratio on shrimp head autolysis rate

	固液比 solid-liquid ratio				
	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5
$Ka(h)$	0.234 4	0.147 4	0.391 3	0.176 9	0.146 7
$Y_0(mg/g)$	41.81	36.15	45.95	48.1	47.67
r^2	0.89	0.92	0.98	0.97	0.91

自溶速率常数与温度的关系 Arrhenius 方程是反映速率常数与反应温度关系的方程,表达式为 $k = Ae^{-Ea/RT}$ 或 $\ln k = -Ea/RT + \ln k_0$, $\ln k$ 与 $1/T$ 呈直线关系^[14]。虾头自溶时,不同温度下自溶速率常数各不相同,当温度从 40 ℃ 上升到 50 ℃ 时,自溶速率常数逐渐升高,在 50 ℃ 时达到最高值 0.391 3,以速率常数和绝对温度作图(图 8)。回归后得到类似 Arrhenius 方程: $\ln Ka = -13\ 654/T_k + 41.353$ 。

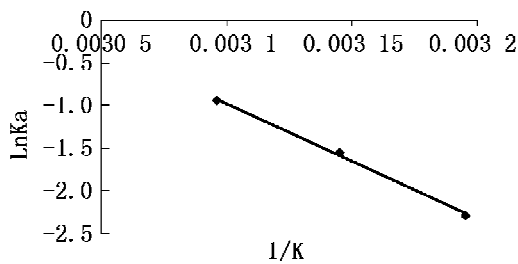


图 8 自溶速率常数与绝对温度回归曲线

Fig. 8 Regression curve of autolysis rate constant vs absolute temperature

2.3 虾头自溶动力学模型的验证

在已知活化能值和某一温度下的 Ka , 可通过 Arrhenius 方程 $\ln k = -Ea/RT + \ln k_0$ 求出另一 Ka 下的温度。预设 48 ℃ 时进行虾头自溶得到自溶动力学方程为 $y = 55.842e^{-0.2796x}$, Ka 为 0.279 6, 将 Ka 代入 Arrhenius 方程 $\ln Ka = -13\ 654/T_k +$

41.353, 得到计算的自溶温度为 47.3 ℃, 此结果与预设的温度(48 ℃)接近, 表明所建立的虾头自溶动力学模型能较准确地反映不同条件下虾头自溶产物溶出与残余蛋白间的关系(图 9)。

2.4 自溶过程产物分子量分布的变化

虾头在自溶的过程中, 随着时间的延长, 大分子的蛋白质逐渐降解为小分子的肽和游离的氨基酸, 从图 10 可以看出在自溶较短初期阶段(0 ~ 1 h), 5 000 u 以上分子量的产物占较大比例; 自溶 2 ~ 3 h 后, 5 000 u 以下自溶产物比例达 60% 以上, 4 ~ 5 h 趋于稳定, 自溶反应基本结束(表 5)。

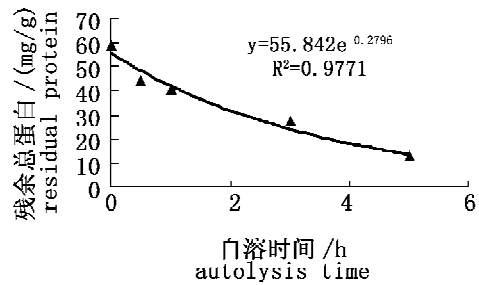


图 9 48 ℃ 虾头自溶产物溶出曲线
Fig. 9 Autolysis kinetic curve of shrimp head at 48 ℃

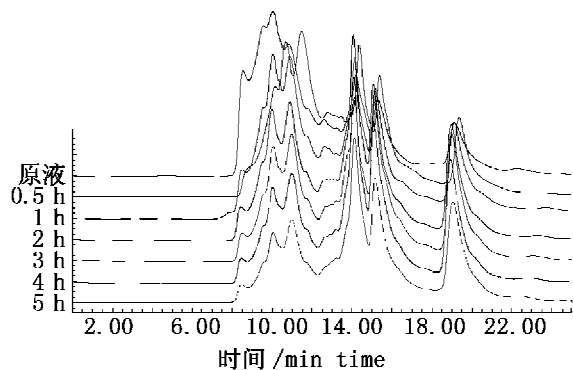


图 10 不同时间虾头自溶产物分子量分布的变化
Fig. 10 Molecular weight distribution of shrimp head hydrolysate during autolysis

表 5 不同时间虾头 5 000 u 以下自溶产物的百分比

Tab. 5 Yield of shrimp head autolysis solution at different time

	时间(h) time						
	0	0.5	1	2	3	4	5
比例(%) rate	42.00	53.61	56.16	62.98	66.80	68.65	71.47

2.5 虾头自溶过程中氨基酸的释放规律

虾头自溶过程中, 随着时间的延长, 释放出来的游离氨基酸呈逐渐增加的趋势, 其中的天门冬

氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)、异亮氨酸(Ile)、缬氨酸(Val)等增加幅度较大, 自溶 5 h 后释放的这些氨基酸的量是未自溶时的 3 倍以上, 而脯氨酸

(Pro)、组氨酸(His)、胱氨酸(Cys)、甲硫氨酸(Met)等增长幅度平缓,特别是胱氨酸(Cys)和脯氨酸(Pro),胱氨酸的平均含量基本保持在

0.006~0.009 g/100 mL,脯氨酸平均含量基本保持在0.07~0.09 g/100 mL。

表6 虾头自溶过程中释放的游离氨基酸
Tab.6 Free amino acids released from shrimp head during autolysis g/100 mL

	自溶时间(h) autolysis time						
	0	0.5	1	2	3	4	5
天门冬氨酸 Asp	0.017	0.032	0.051	0.086	0.069	0.110	0.130
苏氨酸 Thr	0.080	0.055	0.120	0.120	0.130	0.150	0.160
丝氨酸 Ser	0.031	0.044	0.053	0.064	0.058	0.075	0.081
谷氨酸 Glu	0.041	0.064	0.087	0.120	0.110	0.150	0.170
脯氨酸 Pro	0.073	0.073	0.076	0.092	0.074	0.100	0.110
甘氨酸 Gly	0.130	0.140	0.140	0.140	0.130	0.150	0.170
丙氨酸 Ala	0.084	0.110	0.130	0.150	0.140	0.160	0.190
胱氨酸 Cys	0.006	0.008	0.010	0.009	0.011	0.011	0.009
缬氨酸 Val	0.053	0.079	0.092	0.110	0.100	0.130	0.150
甲硫氨酸 Met	0.036	0.052	0.051	0.055	0.053	0.055	0.065
异亮氨酸 Ile	0.040	0.063	0.077	0.099	0.087	0.110	0.130
亮氨酸 Leu	0.110	0.140	0.160	0.190	0.170	0.200	0.230
酪氨酸 Tyr	0.097	0.110	0.100	0.098	0.100	0.094	0.150
苯丙氨酸 Phe	0.110	0.130	0.140	0.140	0.140	0.150	0.170
赖氨酸 Lys	0.140	0.150	0.170	0.180	0.170	0.190	0.210
组氨酸 His	0.020	0.031	0.037	0.048	0.042	0.056	0.063
精氨酸 Arg	0.180	0.190	0.200	0.200	0.220	0.210	0.240
色氨酸 Trp	0.011	0.017	0.019	0.021	0.021	0.030	0.034

3 讨论

3.1 虾头的自溶动力学方程的建立

水解动力学方程是反映水解过程中物质规律性的动力学关系式,是从反应机理出发建立符合实验数据的实验模型^[15]。目前对水解动力学研究主要集中于蛋白酶解蛋白质方面^[16-19],如 Rasco 等^[16]通过利用四种酶解大西洋鲑的肌肉蛋白,建立酶活力与反应速率之间的动力学方程; Va'zquez 等^[17]建立了牛血清蛋白酶解的动力学方程,并研究不同底物浓度、酶浓度和温度对速率常数的影响。本文通过对凡纳滨对虾虾头自溶过程中残余总蛋白(Y)、溶出总蛋白(KP)、5 000 u 以下自溶产物(Pe)数据进行回归,证实凡纳滨对虾虾头自溶遵循一级反应速率方程: $Y = 39.496 e^{-0.3913x}$, $KP = -1.1464Y + 59.506$, $Pe = -0.7167Y + 32.551$ 。利用 Arrhenius 方程 $\ln Ka = -13654/T_k + 41.353$ 验证虾头自溶动力学模型,得到计算的自溶温度与预设的温度接近,表明所建立的虾头自溶动力学模型较准确地反映了虾头自溶过程中蛋白质、多肽和氨基酸的释放规律。

3.2 温度对虾头自溶速度的影响

虾头自溶是由于虾头内源酶在一定条件下被激活而发生的酶解反应,当温度升高时虾头自溶速度加快,达到酶反应的最适温度时,内源酶活力达到最大,但当温度超过酶反应的最适温度时,内源酶在高温中逐渐失活而使其自溶速率逐渐降低。根据实验结果,可以推测虾头内部存在许多酶学性质不同的内源自溶酶系,不同的酶其最佳反应温度各不相同,回归得到的速率常数中 45 ℃ 和 50 ℃ 两个温度点的速率常数较高,根据温度与自溶速率的关系可推断 45~50 ℃ 是虾头内源自溶酶的最适作用温度区间。

3.3 pH 对虾头自溶速度的影响

pH 是影响酶促反应的一个因素,在最适 pH 时,酶的活力最大,底物的解离状态也最适合与酶结合^[20]。本实验进行的虾头自溶,是在一定的条件下虾头的内源酶被激活而发生的酶解反应。虾头内源酶是由许多酶学性质不同的内源自溶酶系组成的混合酶,各种酶的含量不同且其最适 pH 各不相同,因此不同 pH 时发生的虾头自溶,其自溶速率常数各不相同,本实验中, pH 为 7、8、9 时

其自溶速率常数均较大,当 pH 为 9 时,自溶速率常数最大,为 0.391 3,这可能是虾头内源酶中所含的中性和嗜碱性内源酶的含量较多所致,在 pH 9 时正好达到或较接近这些酶的最适 pH,使酶速反应更快,因此亦可推断 pH 7~9 是虾头内源自溶酶的最适作用 pH 区间。

3.4 固液比对虾头自溶速度的影响

固液比(酶的浓度)是影响酶速反应的一个因素,随着溶剂的加入,溶解的蛋白质增加,继续加大溶剂的量,会稀释酶的浓度,减少酶与作用物的接触,导致蛋白质溶解减少。Barros 等^[19]发现乳清蛋白在固液比为 4:500 时酶解反应达到最快,低于此比例时,酶解反应迅速下降。虾头自溶是由于虾头内源酶在一定的条件下被激活而发生的酶解反应,固液比(酶的浓度)是影响虾头自溶的一个因素,当底物量足够时,酶反应的速度随酶浓度的增加而加快,但虾头自溶时水溶性蛋白的溶出还受水的比例影响,水含量的比例大有助于水溶性蛋白的溶出,因此只有当固液比适当时,虾头匀浆液中的内源酶的含量足以满足虾头自溶的需要,同时又适合水溶性蛋白溶出时,虾头自溶的速度才能达到最大。本研究表明,虾头自溶固液比为 1:3 时,自溶速率常数最大,达 0.391 3。

3.5 速率常数与自溶条件的确定

速率常数是反映化学反应速度快慢的一个指标,速率常数越大,化学反应速度越快,反之越慢,其大小受很多因素的影响,温度、酶浓度(固液比)、pH 等都是其中的因素,通常温度升高,活化分子数增加,有效碰撞增多,反应速率增多,从而使速率常数增大;酶是生物催化剂,通过降低活化能而使反应速率加快,同时酶反应通常需在一定的 pH 范围内才能发挥作用,因此它们共同影响着反应速率。以自溶速率常数 K_a 为指标分别考察温度、pH、固液比对虾头自溶的影响,通过 K_a 值大小的比较,可找出虾头自溶过程中自溶速率最快时的最佳条件,另外由于 K_a 值是由一系列的数据回归分析的结果,以 K_a 值为指标比一般优化时取某一点数据为指标考察影响自溶的因素更合理准确,实验结果表明,温度、pH、固液比皆对自溶速率常数有较大的影响,通过优化最终确定虾头自溶的条件为 50 °C、pH 9、固液比 1:3。

3.6 虾头自溶过程中产物分子量分布的变化

虾头自溶过程中,随着时间的延长,大分子蛋

白质逐渐降解为小分子肽和游离氨基酸。在自溶初始时,虾头溶液中低于 5 000 u 的物质达 42.00%,这表明在虾头内尚存在低肽、氨基酸和其他较低分子量的物质,同时溶液中有较多的水溶性蛋白质。随着自溶的进行,水溶性蛋白质逐渐被虾头内源酶所降解,成为低分子肽和游离氨基酸。在 0~3 h 5 000 u 以下自溶产物增加速度较快,这是因为虾头内源酶对水溶性蛋白降解的结果,此时内源酶酶活、底物蛋白浓度均较高。当自溶到 3~5 h 时,5 000 u 以下产物增加速度明显减缓。这主要是因为作为底物的水溶性蛋白质已被大部分降解,且虾头内源酶在较长时间的高温(50 °C)下已经逐渐失活,因此在 4~5 h 时,自溶反应已基本完成。分子量分布的规律性与一些学者的结论相一致,酶解发生初期阶段,大分子物质通常占较大的比例,继续反应,大分子物质降解为小分子物质的速度加快,以小分子物质为主要成分。如周雪松等^[21]用碱性蛋白酶酶解鸡肉蛋白 24 h,水解初期,相对分子质量大于 10 000 u 的肽含量占一半以上,水解 4 h 后,所占比值显著减少,相对分子质量在 5 000~10 000 u 间以及小于 3 000 u 的肽含量比值显著增加,占 95% 以上;段会轲等^[22]分析酵母 β -1,3-葡聚糖的酶法增溶酶解产物的分子量组成比例时也发现水解 1 h 内,大分子量多糖占 60% 以上,随着水解时间的延长,小分子单糖和低聚糖的量开始增加,3 h 时寡聚糖、小分子单糖和低聚糖的比例接近 50%,12 h 时,小分子单糖和低聚糖的量几乎占 80%。

3.7 虾头自溶过程中氨基酸释放规律

蛋白质降解过程中,大分子蛋白质逐渐降解为小肽和游离氨基酸,大部分游离氨基酸含量是随着酶解时间的延长而增加,酶专一性作用位点的不同是游离氨基酸含量增幅不一的主要原因。朱志伟等^[23]利用近缘新对虾内源酶酶解时发现,随着时间的延长,游离氨基酸的含量不断增加,在酶解开始的 2 h 内,游离氨基酸生成速度较快,以后的生成速度稍有减慢,酶解 4 h 后,游离氨基酸含量的增加较为平缓;周雪松等^[21]发现鸡肉水解 4 h 内,游离氨基酸以亮氨酸、苏氨酸、谷氨酸增加量最多,色氨酸、半胱氨酸增加量最少,12 h 后,酶解产物中大部分游离氨基酸量继续平稳增加,其中色氨酸含量显著增加。本研究表明,虾头自溶过程中大部分的脂肪族氨基酸溶出较多,其

中的天门冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)、异亮氨酸(Ile)、缬氨酸(Val)的增长幅度较大,自溶5h后这些氨基酸的释放量是起始的3~8倍,杂环氨基酸及含硫氨基酸溶出较少。自溶时游离氨基酸释放量的种类、多少与虾头内源酶专一性有关。虾头中的消化酶主要有胃蛋白酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、弹性蛋白酶、羧肽酶A、B等^[24]。胃蛋白酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、弹性蛋白酶皆为内肽酶,羧肽酶A、B为外肽酶,内肽酶的切点在肽链的内部,把大肽链切割成小肽链,外肽酶的切点在肽链的末端,具有一定的位点识别特异性,一次次下一个氨基酸。虾头自溶过程中,通过外肽酶和内肽酶的共同作用使氨基酸释放出来,但释放机制还需要进一步研究。

参考文献:

- [1] Intarasirisawata R, Benjakula S, Visessanguan W, *et al.* Autolysis study of bigeye snapper (*Priacanthus macracanthus*) skin and its effect on gelatin [J]. *Food Hydrocolloids*, 2007, 21(4): 537 - 544.
- [2] Raa J, Gildberg A R. Autolysis and proteolytic activity of cod viscera [J]. *Journal of Food Technology*, 1976, 11: 619 - 628.
- [3] Eakpetch P, Benjakul S, Visessanguan W, *et al.* Autolysis of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) meat: Characterization and the effects of protein additives [J]. *Journal of Food Science*, 2008, 73(2): 95 - 103.
- [4] 章超桦, 邓尚贵, 洪鹏志. 刀额新对虾的快速自溶技术[J]. *水产学报*, 1999, 23(4): 387 - 391.
- [5] Cao W H, Zhang C H, Hong P Z, *et al.* Autolysis of shrimp head by gradual temperature and nutritional quality of the result hydrolysate [J]. *LWT-Food Science & Technology*, 2009, 42: 224 - 249.
- [6] Okazaki T, Shigeta Y, Aoyama Y, *et al.* Autolysis of unsalted fish protein under pressurization [J]. *Fisheries Science*, 2003, 69(6): 1257 - 1262.
- [7] Heu M S, Kim J S, Shahidi F, *et al.* Characteristics of protease from shrimp processing discards [J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2003: 27, 221 - 236.
- [8] Gómez-Guillén M C, Hurtado J L, Montero P. Autolysis and protease inhibition effects on dynamic viscoelastic properties during thermal gelation of squid muscle [J]. *Journal of Food Science*, 2002, 67(7): 2491 - 2496.
- [9] Mazorra-Manzano M A, Pacheco-Aguilar R, Ramirez-Suarez J C, *et al.* Pacific whiting (*Merluccius productus*) underutilization in the Gulf of California: Muscle autolytic activity characterization [J]. *Food Chemistry*, 2008, 107(1): 106 - 111.
- [10] Yongsawatdigul J, Piyadhamviboon P, Singchan K. Gel-forming ability of small scale mud carp (*Cirrhiana microlepis*) unwashed and washed mince as related to endogenous proteinases and transglutaminase activities [J]. *European Food Research and Technology*, 2006, 223(6): 769 - 774.
- [11] 宁正祥. 食品分析手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998.
- [12] Hunter J B, Asenjo J A. Kinetics of enzymatic lysis and disruption of yeast cells II. A simple model of lysis kinetics [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1987, 30(4): 481 - 490.
- [13] Hunter J B, Asenjo J A. A structured mechanistic model of the kinetics of enzymatic lysis and disruption of yeast cells [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1988, 31(9): 929 - 943.
- [14] 王正杰, 周亚平. 物理化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2001.
- [15] 刘璘, 叶峰, 欧志敏. 蛋白质酶法有限水解过程反应机理和动力学特性[J]. *化工学报*, 2002, 53(2): 199 - 202.
- [16] Rasco B A, Kristinsson H G. Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture [J]. *Process Biochemistry*, 2000, 36: 131 - 139.
- [17] Va'zquez M A, Ma'quez M C. Modeling of enzymatic protein hydrolysis [J]. *Process Biochemistry*, 1999, 35: 111 - 117.
- [18] Sousa R S, Lopes G P, Tardioli P W, *et al.* Kinetic model for whey protein hydrolysis by Alcalase multipoint immobilized on agarose gel particles [J]. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 2004, 21(2): 147 - 153.
- [19] Barros R M, Malcata F X. A kinetic model for hydrolysis of whey proteins by cardosin A extracted from *Cynara cardunculus* [J]. *Food Chemistry*, 2004, 88(3): 351 - 359.
- [20] 陈石根, 周润琦. 酶学[M]. 上海: 复旦大学出版社, 1997.

- [21] 周雪松,赵谋明,林伟锋,等. Alcalase 酶解鸡肉蛋白及产物的自由基清除活性[J]. 华南理工大学学报, 2006, 34(3):117-122.
- [22] 段会轲,熊善柏,刘海梅. 酵母 β -1,3-葡聚糖的酶法增溶及产物分析[J]. 食品科学, 2008, 29(1):185-189.
- [23] 朱志伟,曾庆孝,林奕封,等. 虾头的内源蛋白酶酶解及复合酶解研究[J]. 武汉工业学院学报, 2003, 22(2):4-7.
- [24] 吴志强. 日本新糠虾消化系统组织学及胰蛋白酶样酶理化性质初步研究[D]. 青岛:中国海洋大学 2004.

Autolysis kinetics of *Litopenaeus vannamei* head

ZHU Guo-ping, CAO Wen-hong, ZHANG Chao-hua*, JI Hong-wu

(College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

Abstract: This investigation studied the effects of temperature, pH and substrate concentration on the autolysis processing of *Litopenaeus vannamei* head and the change law of the hydrolysate during the autolysis, a kinetic model of the autolysis reaction process was then established. Our purpose was to monitor autolysis course based on the kinetic model, by which we can not only obtain the anticipative molecular weight autolysate, but also increase protein recovery economically and effectively. The study was conducted to investigate the effects of temperature, pH and substrate concentration on the autolysis process of *Litopenaeus vannamei* head and the change law of the hydrolysate during the autolysis. The rules of the hydrolysate releasing during the first five hours fitted the first order reaction kinetics: $Y = 39.496e^{-0.3913x}$, $KP = -1.1464Y + 59.506$, $Pe = -0.7167Y + 32.551$. It showed a good linear relativity between KP , autolysis hydrolysate under 5 000 u and residual protein. In the course of autolysis, the important factors were temperature, pH and substrate concentration which affect shrimp head autolysis rate. During the autolysis, the value of Ka increased with temperature rising from 40 °C to 50 °C and reached a peak at 50 °C, while the value of Ka reduced with temperature rising from 50 °C to 60 °C; the effect of pH and substrate concentration on Ka did not show regularity, the value of Ka reaches a peak at pH9 and substrate concentration 1:3, respectively. We established an Arrhenius equation $\ln Ka = -13654/T_k + 41.353$ and used it to certify the efficacy of the kinetic model. At the beginning of the autolysis (0-1 h), the hydrolysate above 5 000 u took a greater proportion, the percentage was 58%; the percentage of the hydrolysate under 5 000 u increases rapidly during 2-3 h, and was up to 66.8% at 3 h, the increase trend slowed down at 4-5 h, the percentage was 71.47%. In the course of autolysis (0 h-5 h), the release quantity of most of fatty amino acids increased 2-8 times, the content of aspartic acid is 0.13 mg/100mL after autolysis 5 h while its content was 0.017 mg/100 mL before autolysis; the increase content of glutamic acid followed aspartic acid, the content was 0.17 mg/100 mL after autolysis 5 h and the content was 0.041 mg/100 mL before autolysis; while the contents of heterocyclic amino acids—praline, histidine and the amino acids contain the group of sulphur like cysteine, methionine were stable, the contents of cysteine and proline kept at 0.006-0.009 g/100 mL and 0.07-0.09 g/100 mL, respectively. This paper intended to establish a kinetic model to fit the autolysis of *Litopenaeus vannamei* head.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; shrimp head; autolysis; kinetics

Corresponding author: ZHANG Chao-hua. E-mail: zhangch@gdou.edu.cn