凡纳滨对虾肌肉盐溶蛋白提取工艺研究

蓝尉冰[1,2]，毛伟杰[1]，池岸英[1,2]，吉宏武[1,2]
（1.广东海洋大学食品科技学院，广东湛江 524025）
（2.广东省高等学校水产品加工重点实验室，广东湛江 524025）

摘要：本实验以凡纳滨对虾肌肉为原料，盐溶蛋白得率为指标，研究盐溶蛋白最佳提取工艺参数，得到其最佳提取条件：NaCl浓度0.6 mol/L；抽提时间25 h；料液比1:4；pH值7。此条件下盐溶蛋白含量为105.73 mg/g，提取率为83.34%。

关键词：凡纳滨对虾；盐溶蛋白；提取
文章篇号：1673-9078(2012)3-313-315

Study on the Extraction Technology of Salt-soluble Protein in *Penaeus Vannamei* Muscle

LAN Wei-bing[1,2], MAO Wei-jie [1], CHI An-ying[1,2], JI Hong-wu[1,2]
(1.College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China) (2.Key Laboratory of Aquatic Product Advanced Processing of Guangdong Higher Education Institutions, Zhanjiang 524025, China)

Abstract: The extraction process parameters of salt-soluble protein were studied with the muscle of *Penaeus Vannamei* as raw materials and the salt- soluble protein yield as an indicator in this experiment. The optimized extraction conditions were determined as follows:NaCl 0.6 mol/L, extraction time 25 h, solid-liquid ratio 1:4, and pH 7. Under these conditions, the salt-soluble protein content was 105.73 mg/g and yield was 83.34%.

Key words: *Penaeus Vannamei*; salt- soluble protein; extraction

凡纳滨对虾又称南美白对虾*(Penaeus vannamei Boone)*[1]，属对虾科(*Family Penaeidae*)、对虾属(*Genus Penaeus*)、白对虾亚属（*Subgenus Litopenaeus*），原产于南美太平洋沿岸的水域，以厄瓜多尔沿岸分布最为集中,是当今世界养殖虾类产量最高的三大品种之一[1]。该虾肉质鲜美，蛋白含量高，加工出肉率高，是目前我国养殖量最大的对虾之一[2]。凡纳滨对虾捕获量大，在气温高时，鲜虾不宜保存，易腐败，除少数鲜售外，大多制成经济价值不高的虾皮 、虾酱等，有相当一部分因未能得到及时有效的利用而腐败变质，造成很大的资源浪费。而肌肉蛋白的功能性质在食品加工过程中直接影响产品的质量，其中最关键的是盐溶蛋白[3,4]。盐溶性蛋白是影响肉制品的保水性及凝胶特性的一类最主要的蛋白质[5]。虾肉的盐溶蛋白对于提高虾糜制品的黏合性和乳化稳定性具有重要的意义。因此，了解凡纳滨对虾蛋白质对于如何合理利用凡纳滨对虾这一蛋白质资源具有重要的现实意义。

收稿日期：2011-12-12
基金项目：国家虾产业技术体系建设（CARS-48）；科技部农业成果转化项目（2010GB2E000345）；广东省海洋渔业科技攻关重大项目（A201008102）；广东省科技团队项目（2011A020102005）。
作者简介：蓝尉冰(1987-)，女，硕士研究生，研究方向：水产品深加工
通讯作者：吉宏武(1962-)，男，博士，教授，从事南海低值水产原料化学成分及其高值化利用研究

1 材料与方法

1.1 材料

新鲜凡纳滨对虾（*Penaeus Vannamei*），于2010年12月02号购于湛江市东风市场；NaH_2PO_4、Na_2HPO_4、NaCl等均为分析纯。

1.2 仪器

HR2864飞利浦三合一搅拌器，珠海经济特区飞利浦家庭电器有限公司；FA2004电子分析天平，上海舜宇恒平科学仪器有限公司；TGL-20M高速台式冷冻离心机，湛江裕鑫实业有限公司；PB-10玻璃膜电极pH测量器，德国赛多利斯集团；UC-1200超声波清洗机，广州维力超声电子设备有限公司；722可见分光光度计，上海精密科学仪器有限公司；GZX-9246MBE数显鼓风干燥箱，上海博讯实业有限公司医疗设备厂；XW-80A漩涡混合仪，海门市其林贝尔仪器制造有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 盐溶蛋白提取

取新鲜活虾，去头去壳去肠，称取 20 g 虾肉分散于 4 体积的磷酸盐缓冲液（0.05 mol/L，pH7.4）中，高速组织匀浆机匀浆 2 min，匀浆液置于 4 ℃条件下，抽提 90 min（不时搅拌），离心（8000 r/min，20 min，4 ℃），将沉淀分散于磷酸盐缓冲液（0.05 mol/L，pH7.4）中，重复上述操作三次。除去水溶性蛋白。取沉淀按以下设计实验加入 NaCl 溶液，置于 4 ℃条件抽提，后离心（8000 r/min，10 min)所得上清液即为盐溶性蛋白溶液[6]。

1.3.2 盐溶蛋白提取优化

分别讨论 NaCl 浓度、料液比、浸提时间、pH 对盐溶蛋白得率的影响，后用正交试验对其进行优化。

1.3.3 蛋白质的测定

采用双缩脲法测定盐溶蛋白含量[7]。

1.4 数据处理与统计分析

采用正交设计助手 IIV 3.1 破译版软件进行正交方差分析，平均数的比较、不同因素之间的比较均采用 JMP 软件，显著水平为 a<0.05。

JMP 是 SAS 推出的一种交互式可视化统计发现软件系列，主要用于实现统计分析。主要运用的是交互性：JMP 可以帮助用户很好地实现与数据之间的“互动”，包括图形、数据表等之间都是实时交互的，这对实现探索性数据分析和提高分析效率比较有帮助。

2 结果与讨论

2.1 盐溶蛋白提取条件单因素结果

2.1.1 NaCl 浓度对蛋白提取率的影响

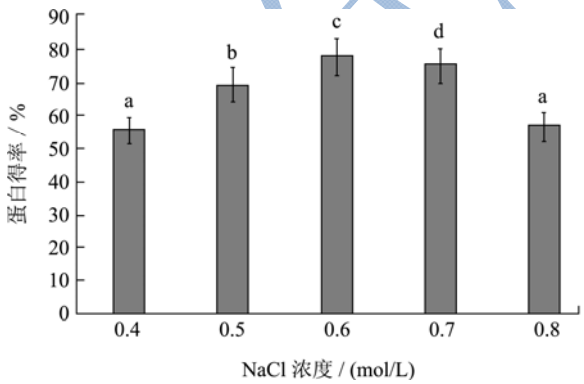


图 1 NaCl 浓度对蛋白得率的影响

Fig.1 Effect of sodium chloride concentration on yield of salt-soluble protein from the muscle of *Penaeus Vannamei*

注：不同字母表示差异显著，同一字母表示无显著差异，下同。

在料液比为 1:4、提取时间为 20 h、提取 pH 值为 7 的条件下，分别考察不同 NaCl 浓度（0.4、0.5、0.6、0.7、0.8 mol/L）对盐溶蛋白提取率的影响，结果如图 1。

由 1 可知，相同条件下，NaCl 浓度大小对盐溶蛋白得率影响显著（P<0.05），NaCl 浓度在 0.4~0.6 mol/L 范围内，蛋白得率随盐浓度的增加而增加，说明在这个范围内较高的盐溶度能提高盐溶蛋白的浸出率；盐浓度在 0.6~0.8 mol/L 范围内，蛋白得率随盐浓度的增加而减少，说明在这个范围内高的盐浓度反而抑制了盐溶蛋白的浸出。故当 NaCl 浓度为 0.6 mol/L 时提取率最高，提取率高达 77.41%。

2.1.2 提取时间对蛋白提取量的影响

在 NaCl 浓度为 0.6 mol/L、料液比 1:4、提取 pH 值 7 的条件下，考察不同提取时间（10 h、15 h、20 h、25 h、30 h）对盐溶蛋白提取得率的影响，结果如图 2。

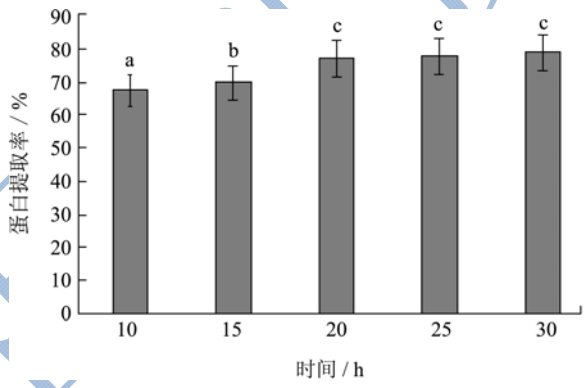


图 2 提取时间对蛋白得率的影响

Fig.1 Effect of sodium chloride concentration on yield of salt-soluble protein from the muscle of *Penaeus Vannamei*

从图 2 可看出，相同条件下，提取时间对盐溶蛋白提取得率影响显著（P<0.05）。对虾盐溶蛋白质得率随提取时间的增加而增加。在 15~20h 时，增长幅度加剧，而 20h 后，蛋白质得率增加幅度缓慢。这是因为提取时间达到 20 h 后，可溶于 NaCl 溶液的蛋白几乎全部溶出，同时考虑到长时间提取会有条件上的不稳定，可能会使部分蛋白变性，所以继续延长提取时间也无法溶出更多的蛋白，而且长时间提取也会增大成本，所以综合各方面因素，提取时间选 20 h 较合适。

2.1.3 料液比对蛋白提取量的影响

在 NaCl 浓度为 0.6 mol/L、提取时间为 20 h、提取 pH 值 7 的条件下，考察不同料液比（1:2、1:3、1:4、1:5、1:6）对盐溶蛋白提取率的影响，结果如图 3。

从图 3 可看出，随着料液比增加，盐溶蛋白提取率增加，且从 1:2 到 1:3 增幅明显；1:3 到 1:6 增加缓慢。说明当料液比达到 1:3 时盐溶蛋白已经能够较好的溶出，故选择 1:3 的固液比较合适。

2.1.4 pH 值对蛋白提取率的影响

在 NaCl 浓度 0.6 mol/L、料液比 1:3、提取时间为

20 h 的条件下，考察不同 pH 值（5、6、7、8、9）对盐溶蛋白提取的影响，结果如图 4。

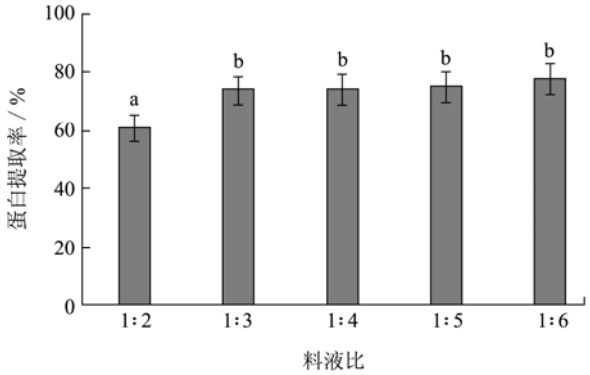


图 3 料液比对蛋白提取量的影响

Fig.3 Effect of material liquid on yield of salt-soluble protein from the muscle of *Penaeus Vannamei*

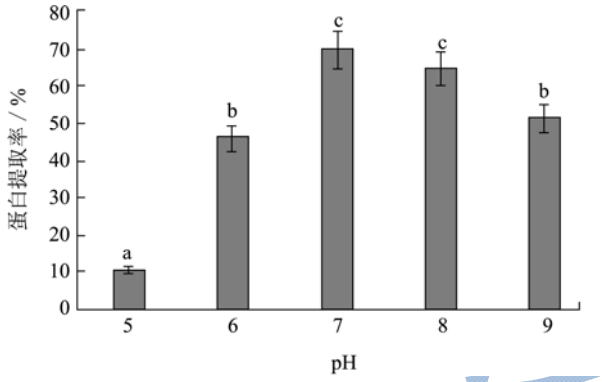


图 4 pH 值对蛋白提取量的影响

Fig.4 Effect of pH on yield of salt- soluble protein from the muscle of *Penaeus Vannamei*

由图 4 可看出，pH 值对盐溶蛋白提取率影响显著（$P<0.05$）。蛋白得率随着 pH 的增大先增大，后减少。在 pH 为 5 时，蛋白得率很少，这是因为此时 pH 值接近蛋白质的等电点，大多数的蛋白质发生沉降，所以蛋白提取总量减少；在 pH<7 时，得率随 pH 增大而显著增大，pH>7 时，得率反而降低，这说明盐溶蛋白在中性条件下更易析出，提取率更高。在 pH 为 7 时，提取率最高。

2.2 盐溶蛋白正交优化结果及分析

表 1 正交试验因素水平

Table 1 Factors and levels for the orthogonal test

水平	因素			
	A [NaCl 浓度/(mol/L)]	B (料液比)	C (pH 值)	D(时间/h)
1	0.5	1:2	6	15
2	0.6	1:3	7	20
3	0.7	1:4	8	25

通过正交试验分析，最后确定最佳盐溶蛋白提取条件为为 $A_2B_3C_2D_3$，即盐浓度为 0.6 mol/L、料液比为 1:4、pH 为 7、时间为 25 h。根据极差 R 的大小，进行因素的水平变化对试验影响的主次排序。R 越大，表示该因素的水平变化对试验影响越大。反之，R 越小，则该因素的水平变化对试验影响越小[8]。

表 2 正交试验表

Table 2 Results of the 0rthogonal experimental

实验号	因素				蛋白得率/%
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	32.09
2	1	2	2	2	66.28
3	1	3	3	3	57.22
4	2	1	2	3	61.89
5	2	2	3	1	46.48
6	2	3	1	2	48.45
7	3	1	3	2	34.59
8	3	2	1	3	50.71
9	3	3	2	1	58.31
k_1	17.29	14.29	14.58	15.21	
k_2	17.54	18.04	20.72	16.70	
k_3	15.85	18.33	15.37	18.76	
R	1.69	4.05	6.14	3.55	

在本试验中，对试验影响的大小顺序是：C＞B＞D＞A，即 pH＞料液比＞时间＞盐浓度。

表 3 正交实验方差分析表

Table 3 Orthogonal experiment method anova table

因素	偏差平方和	自由度	F	临界值	显著性
A	38.96	2	0.14	4.46	
B	228.30	2	1.03	4.46	*
C	588.60	2	2.15	4.46	*
D	5182.86	2	0.66	4.46	
误差	1093.51	8			
总变异	4186.98				

注：* 表示影响显著

为直观起见，可以取因素的水平为横坐标，作出因素和实验指标的关系如图 5。

通过以上分析可以看出，虽然正交设计的试验点并不一定包括了全面实验的最有实验组合，但是通过正交试验，不但可以对列入了试验的水平组合作出评价，而且通过对试验的分析找出试验点以外的最优处理组合，这是全面试验比之不及的优点。因找出的最优水平组合 $A_2B_3C_2D_3$ 并未出现在正交表中，因此又按最佳组合进行重新试验。测得在此最佳条件下盐溶蛋白提取量为 105.73 mg/g，提取率为 83.34%。又因组合 $A_2B_3C_2D_3$ 得到的提取率 83.34% 大于组合 $A_1B_2C_2D_2$ 得到的提取率 66.27%，故最佳工艺条件为 $A_2B_3C_2D_3$。

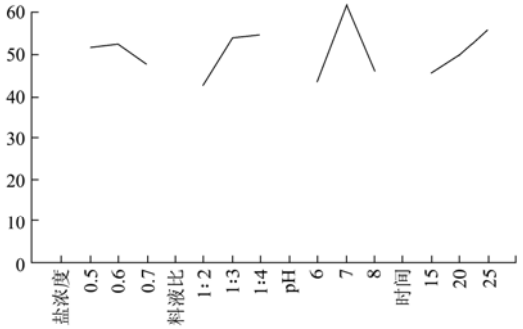


图 5 正交试验效应曲面图

Fig.5 Orthogonal test effect surface figure

3 结论

提取盐溶蛋白的优化工艺表明，各因素对盐溶蛋白提取率的影响程度依次是 pH＞料液比＞提取时间＞NaCl 浓度；确定盐溶蛋白质提取的最佳工艺条件为 NaCl 浓度 0.6 mol/L，提取时间为 25 h，料液比 1:4，pH 值为 7。在此条件下，提取率为 83.34%。

参考文献

[1] 黄凯,王武.南美白对虾国外养殖发展概况及我国养殖现状、存在的问题与对策[J].内陆水产, 2002, 8: 11-14.

[2] 黄凯,王武,卢洁等.盐度对南美白对虾的生长及生化成分的影响[J].海洋科学, 2004, 28(9): 20-25.

[3] 杨速攀,彭增起.肌原纤维蛋白凝胶研究进展[J].河北农业大学学报,2003,26:160-166.

[4] Zhou Mei, Zeng Qing xiao, Liu Xin, et al. Improvement of Gel Properties of Bighead (A ristichthy Nobilis)Surimi by Two Protein Additives [J]. Journal of South China University of Technology(Natural Science Edition), 2005, 33(4): 87-91

[5] 张崟,曾庆孝,朱志伟,等.罗非鱼与四种海水鱼鱼糜比较[J].现代食品科技, 2008, 24(12):1222-1226.

[6] T. saito, et al. Effect of thermal on ext reaction of proteins from meats [J]. Bull, Japan. Soc. Sic. Fish. 1983, 46 (10): 1569- 597

[7] 陈永绥.血清总蛋白测定不同双缩脲试剂及标准化评价[J].临床检验杂志,1996,14(3):115-117

[8] 王钦德,杨坚.食品实验设计与统计分析[M].中国农业大学出版社,2002

现代食品科技