

螺肉盐溶蛋白提取工艺优化及其加工特性

Optimization of extraction conditions of freshwater snail salt soluble protein and its processing properties

王伯华^{1,2,3} 朱宝红^{1,2,3} 杨品红^{1,2,3}

WANG Bo-hua^{1,2,3} ZHU Bao-hong^{1,2,3} YANG Pin-hong^{1,2,3}

曹 真^{1,2,3} 王婷云^{1,2,3} 陈慧敏^{1,2,3}

CAO Zhen^{1,2,3} WANG Ting-yun^{1,2,3} CHEN Hui-min^{1,2,3}

(1. 湖南文理学院生命科学学院, 湖南 常德 415000; 2. 水产高效健康生产湖南省协同创新中心, 湖南 常德 415000; 3. 环洞庭湖水产健康养殖及加工湖南省重点实验室, 湖南 常德 415000)

(1. College of Life Science, Hunan University of Arts and Science, Changde, Hunan 415000, China; 2. Collaborative Innovation Center for Efficient and Health Production of Fisheries in Hunan Province, Changde, Hunan 415000, China; 3. Key Laboratory of Health Aquaculture and Product Processing in Dongting Lake Area of Hunan Province, Changde, Hunan 415000, China)

摘要:以新鲜螺肉为原料,对其盐溶蛋白提取工艺参数进行优化,并测定其乳化性、起泡性和保水性等主要加工性质。结果表明:螺肉中盐溶性蛋白的最佳提取条件为盐浓度 0.7 mol/L、pH 值 8.0、固液比 1:6(g/mL)、浸取时间 24 h,该条件下盐溶性蛋白质提取率为 13.6%。其最佳乳化活性为 27.67 m²/g,ESI 指数最大值为 0.62,略低于大豆分离蛋白,在碱性条件下其起泡能力和泡沫稳定性较好,分别可达 68%和 42%,优于大豆分离蛋白,保水性最大为 78.25%。螺肉盐溶蛋白具备制成肉糜制品品质改良剂的性能,是一种较好的功能性蛋白质资源。

关键词:螺肉;盐溶性蛋白;提取;乳化性;起泡性;保水性
Abstract: The resource of freshwater snail is very rich in China, but its processed products are not very much. Using salt soluble protein as a natural food additive in meat products can improve its quality. Extraction conditions were optimized using salt soluble protein yield, and determined the main processing properties such as emulsification capability, foaming capability and water-holding capability. The Results showed that freshwater snail salt soluble protein yield can reach 13.6% when NaCl concentration was 0.7 mol/L, pH 8.0, extraction time and solid-liquid ratio of 1:6 for 24 hours. The best emulsifica-

tion ability and emulsification stability index were 27.67 m²/g and 0.62 respectively, slightly lower than gluten. The best foaming ability and foam stability were 68% and 42% respectively in alkaline conditions, better than gluten. Water-holding capability was 78.25%. Freshwater snail salt soluble proteins can improve the quality of mincemeat products. It's a good functional protein resource.

Keywords: freshwater snail; salt soluble protein; extraction; emulsification; foaming; water-holding capability

中国螺类资源丰富,因此探寻有效的螺肉精深加工方法是充分利用中国丰富的螺类资源、提高其附加值的首要途径^[1]。螺肉是一种典型的高蛋白低脂肪食品,其中的肌原纤维蛋白是一类重要的具有生物学功能的结构蛋白质群,与肉糜制品的口感、风味、质地结构等品质相关的特征紧密关联^[2]。其乳化性能可应用于香肠、汤料、奶酪、蛋糕等食品体系^[3],决定着产品的均匀性、水油渗出率、产品稳定性等^[4]。蛋白质的乳化性主要由蛋白质的来源、氨基酸组成等因素来决定^[5],同时也受加工条件包括离子强度、pH、油的种类和添加量、压力、添加物(磷酸盐、非肉类蛋白)等多种因素的影响^[6-7]。蛋白质分子表面张力降低^[8],可以形成一定强度的薄膜^[9-10],蛋白质凝胶结构及静电作用影响着肉制品的保水性^[11]。热诱导凝胶的特性与低脂肉制品的质地和风味密切相关^[12-13]。

现代食品加工对肉制品的营养及风味要求越来越高,目前国内外肉品加工中为改善产品组织、增加蒸煮产量、降低配方成本、加强产品风味,常通过添加大豆蛋白、香精香料、

基金项目:湖南文理学院博士科研启动项目(编号:14BSQD04);湖南文理学院大学生研究性学习和创新性实验计划项目
作者简介:王伯华,女,湖南文理学院讲师,博士。
通讯作者:杨品红(1964—),男,湖南文理学院教授,博士。
E-mail: yph588@163.com
收稿日期:2016-02-03

聚合磷酸盐等辅料来实现^[14]。将天然水产品中提取的盐溶蛋白应用于肉糜制品的加工,能束缚住食品体系中的水分和脂肪,赋予产品较好的组织结构及口感风味。但是目前还未见螺肉盐溶蛋白提取及加工特性方面的报道,因此本研究拟以新鲜螺肉为原料,优化盐溶性蛋白的提取方案,并选定影响蛋白质加工特性的主要因素 pH,测定其对螺肉盐溶蛋白的乳化性、起泡性和凝胶保水性等功能性质的影响,旨在为螺肉资源的精深加工利用提供新途径。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜螺肉:购于常德市武陵区菜市场;
PVDC 肠衣:河北雄县鸿达包装制品有限公司;
大豆蛋白:谷神生物科技股份集团有限公司;
玉米变性淀粉:长春大华淀粉有限公司;
牛血清蛋白:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;
碘化钾:分析纯,天津市福晨化学试剂厂。

1.2 仪器与设备

台式离心机:TGL-16B 型,上海安亭科学仪器厂;
高速匀浆机:DS-1 型,上海艾测电子科技有限公司;
台式酸度计:FE20K 型,梅特勒—托利多仪器有限公司;
电子天平:BSA224S 型,北京赛多利斯仪器系统有限公司;
分光光度计:UV-8000A 型,上海元析仪器有限公司;
冰箱:BCD-312WDPM 型,海尔股份有限公司;
斩拌机:HLQ-20 型,安徽华菱装备股份有限公司。

1.3 螺肉盐溶蛋白的提取

参考文献[15]。

1.4 蛋白质含量的测定

采用双缩脲法。

1.5 单因素试验

1.5.1 盐浓度的确定 提取时间 25 h、固液比 1:6(g/mL)、pH 6.0 条件下,盐浓度分别为 0.3,0.4,0.5,0.6,0.7,0.8 mol/L 时,测定盐溶蛋白得率。

1.5.2 固液比的确定 盐浓度 0.6 mol/L、浸提时间 25 h、浸提 pH 6.0 条件下,固液比分别为 1:4,1:5,1:6,1:7,1:8(g/mL)时,测定盐溶蛋白得率。

1.5.3 浸提时间的确定 盐浓度 0.6 mol/L、固液比 1:6(g/mL)、浸提 pH 6.0 条件下,浸提时间分别为 20,24,28,32,36 h 时,测定盐溶蛋白得率。

1.5.4 pH 值的确定 盐浓度 0.6 mol/L、固液比 1:6(g/mL)、浸提时间 28 h 条件下,浸提 pH 分别为 4.0,5.0,6.0,7.0,8.0 时,测定盐溶蛋白得率。

1.6 正交试验

根据单因素试验结果确定正交试验的因素与水平,进行正交试验,以确定最佳提取方案。

1.7 螺肉盐溶蛋白加工特性测定方法

1.7.1 乳化活性的测定 参考文献[16]和[17]的方法,改良如下:将制备的盐溶蛋白沉淀溶于磷酸盐缓冲溶液,配制成

1 g/100 mL 的蛋白质溶液,用 0.1 mol/L 的氢氧化钠调 pH。将盐溶蛋白溶液与大豆油按相应体积比例混合,并取出 20 mL 混合物用高速组织捣碎机 10 000 r/min 乳化 1 min。立刻将乳化液倒入 25 mL 的玻璃杯中,在距离杯底取 50 μL 乳浊液,与 5 mL 0.1% SDS 溶液混匀后于 500 nm 处测其吸光值。取 3 次操作平均值。乳化活性指数按式(1)计算:

$$EAI = \frac{2 \times 2.303 \times A \times \Phi}{C \times D \times 10\,000}, \tag{1}$$

式中:
EAI——乳化活性指数,m²/g;
A——500 nm 处的吸光值;
D——分散相体积分数,本试验取 0.47;
Φ——稀释倍数,100;
C——蛋白质浓度,g/mL。

1.7.2 乳化稳定性的测定 将标准曲线的绘制中经均质得到的乳浊液静置 10 min 后,再从底部吸取 50 μL,用 SDS 溶液将乳浊液稀释 100 倍后混匀,于 500 nm 处测其吸光度。乳化稳定性按式(2)计算:

$$ESI = \frac{A_{10}}{A_0}, \tag{2}$$

式中:
ESI——乳化稳定性;
A₁₀——10 min 时所测的吸光值;
A₀——0 min 时所测的吸光值。

1.7.3 起泡能力的测定 参考文献[18]和[19]的方法,改良如下:肌原纤维蛋白溶解到蒸馏水中,配制得到 100 mL 1%蛋白分散液。用 NaOH 调节 pH,使用高速匀浆机 10 000 r/min 充分匀浆 2 min 后,迅速转移至量筒中。记录均质停止时泡沫的体积,按式(3)计算起泡能力。

$$FC = \frac{V_1}{V_0} \times 100\%, \tag{3}$$

式中:
FC——起泡能力,%;
V₁——蛋白分散液均质后的体积,mL;
V₀——蛋白分散液均质前的体积,mL。

1.7.4 泡沫稳定性的测定 参考文献[20]。

1.7.5 凝胶的制备及保水性的测定 参考文献[15]。

1.8 螺肉盐溶蛋白在鱼肉肠中的初步应用

1.8.1 鱼肉肠制作工艺流程

鱼背肉→预处理→切块→绞肉→漂洗→过滤脱水→斩拌(加入辅料)→灌装→加热熟制→冷却→成品

1.8.2 配方及操作要点 参考文献[21]。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果分析

2.1.1 盐浓度对盐溶蛋白得率的影响 盐浓度对盐溶蛋白得率的影响见图 1。由图 1 可知,盐浓度为 0.3~0.6 mol/L 时,盐溶蛋白得率随着 NaCl 浓度的提高而大体呈现增加趋势,这是因为离子强度增加时蛋白质之间的相互作用被弱化,肌原纤维解离为肌丝,盐溶性蛋白溶解度增加,故较高盐

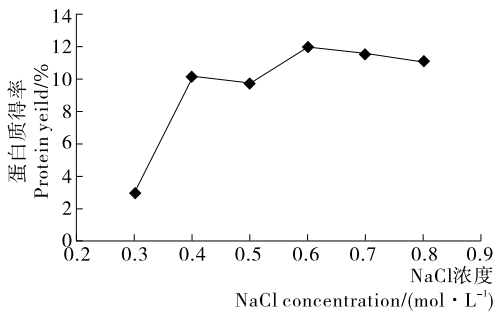


图 1 盐浓度与螺肉盐溶性蛋白得率的关系
Figure 1 Effects of salt concentration on salt soluble protein yield

浓度能提高浸出率;盐浓度为 0.6 mol/L 时,盐溶性蛋白溶解度达到最大值,继续增加盐浓度,盐溶性蛋白提取率变化不大,因此取 0.6 mol/L 盐浓度进行后续试验。

2.1.2 固液比对盐溶蛋白得率的影响 固液比对盐溶蛋白得率的影响见图 2。由图 2 可知,随着固液比梯度的增加,蛋白质得率增加,当固液比达到 1 : 6(g/mL)后,随着固液比的变化,蛋白质得率变化不明显,这是由于浸提液少时,无法溶解更多的盐溶性蛋白,这时增加浸提液可以提高蛋白质得率,当样品中盐溶性蛋白基本溶出后,再增加浸提液,对盐溶蛋白提取率的影响将不再明显。因此,选择固液比 1 : 6 (g/mL)进行后续试验。

2.1.3 浸提时间对盐溶蛋白得率的影响 浸提时间对盐溶蛋白得率的影响见图 3。由图 3 可知,随着浸提时间的延长,盐溶性蛋白溶解越充分。浸提时间由 20h 增加到 28h 的过

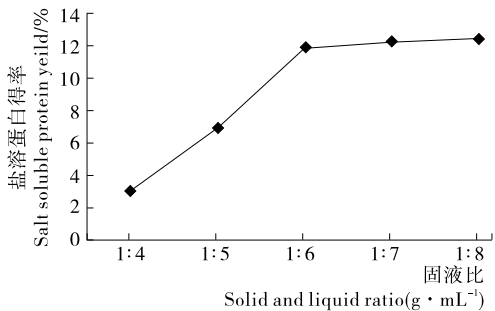


图 2 固液比与盐溶性蛋白得率的关系
Figure 2 Effects of solid-liquid ratio on salt soluble protein yield

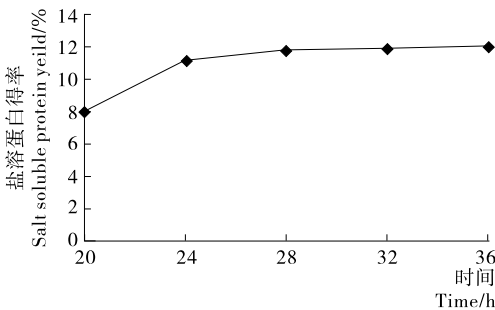


图 3 浸提时间与盐溶性蛋白得率的关系
Figure 3 Effects of extraction time on salt soluble protein yield

程中,盐溶性蛋白的得率随着时间延长而增加,28 h 时达到较大值,之后随着时间的延长蛋白质的得率无明显增加,说明此时盐溶蛋白已基本溶出。故后续试验中选用 28 h 为提取时间。

2.1.4 pH 对盐溶蛋白得率的影响 pH 值发生改变时会使肌原纤维蛋白周围的静电荷发生改变而影响其溶解度,提取液 pH 值与盐溶性蛋白得率的关系见图 4。由图 4 可知,pH 值在 4.0~6.0 时,盐溶蛋白的得率较低,因为此时接近蛋白质等电点 5.5,蛋白质发生了沉降,当 pH 远离等电点时,肌原纤维蛋白所含静电荷较多,盐溶性蛋白得率较高,pH 大于 7.0 后变化不明显。故选择 pH 7.0 进行后续试验。

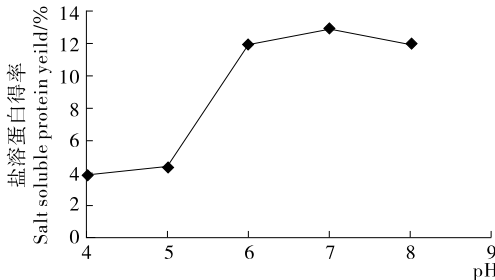


图 4 pH 与盐溶性蛋白质得率的关系
Figure 4 Effects of pH on salt soluble protein yield

2.1.5 正交试验 根据单因素试验结果,设计正交试验表进行优化,因素水平表见表 1,正交试验结果见表 2。由表 2 可知,pH 值对蛋白质得率的影响最小,故选取 pH 值作为误差项来进行方差分析,方差分析结果见表 3。

表 1 正交试验因素和水平表				
Table 1 Factors and levels of orthogonal test				
水平	A 固液比 (g · mL ⁻¹)	B 盐浓度/ (mol · L ⁻¹)	C 浸提时 间/h	D pH 值
1	1 : 5	0.5	20	6.0
2	1 : 6	0.6	24	7.0
3	1 : 7	0.7	28	8.0

表 2 正交试验表					
Table 2 Resultsoforthogonal experiment test					
处理	A	B	C	D	蛋白提取率/%
1	1	1	1	1	4.12
2	1	2	2	2	10.90
3	1	3	3	3	10.32
4	2	1	2	3	10.50
5	2	2	3	1	13.20
6	2	3	1	2	11.30
7	3	1	3	2	5.50
8	3	2	1	3	8.10
9	3	3	2	1	10.80
<i>Xi</i> ₁	8.447	6.707	7.840	9.373	<i>T</i> = 84.74
<i>Xi</i> ₂	11.667	10.733	10.733	9.233	
<i>Xi</i> ₃	8.133	10.807	9.673	9.640	
<i>R</i>	3.534	4.100	2.893	0.407	

表 3 正交试验方差分析表

Table 3 Variety analysis of orthogonal test

方差来源	偏差平方和	自由度	均方	F 值	F 临界值	显著性
A	22.951 022 22	2	11.475 511 11	89.621 312 04	19	显著
B	33.029 422 22	2	16.514 711 11	128.976 397 1	19	极显著
C	12.856 088 89	2	6.428 044 444	50.201 666 09	19	显著
误差(D)	0.256 088 889	2	0.128 044 444			

通过以上正交分析可知,提取条件为 A₂B₂C₃D₁时螺肉盐溶蛋白提取率较高,各因素对盐溶性蛋白提取率的影响顺序是盐浓度>固液比>提取时间>pH 值。因为正交设计包含的仅是部分有代表性的不完全试验^[22],最优水平组合 A₂B₂C₃D₃并未出现在正交表中,因此进行了验证实验。测得的盐溶蛋白提取率为 13.6%,大于组合 A₂B₂C₃D₁,与正交表分析结果相符。因此,最佳提取条件为:NaCl 浓度 0.7 mol/L、固液比 1:6(g/mL)、提取液 pH 8.0、浸提时间 24 h。

2.2 pH 对盐溶蛋白加工特性的影响

2.2.1 pH 对盐溶蛋白乳化性的影响 蛋白质乳化性质的评价指标主要是 EAI 和 ESI。分别测定了 pH 值对螺肉盐溶蛋白乳化活性和乳化稳定性的影响见图 5、6。由图 5 可知,在蛋白质等电点附近盐溶蛋白的乳化性最低,pH 大于 5 时随着 pH 的上升乳化性也逐渐增加,在 pH 8.0 时,乳化活性值可达到 27.67 m²/g。螺肉盐溶蛋白的乳化稳定性随 pH 的升高而增强,在 pH 7.0 时 ESI 指数达到最大值 0.62,之后略有降低。可能是酸性溶液中的—COO—数量较少,不利于胶束形成,因而乳化性偏低。乳化性最低值是在等电点附近,因为蛋白质在等电点时呈中性且易聚集沉淀,使得乳化性降低。与吴卫国等^[23]对大豆分离蛋白乳化性的研究结果类似。

2.2.2 pH 对盐溶蛋白起泡性的影响 蛋白质的起泡性包括

起泡能力(FC)和起泡稳定性(FS)。影响其起泡性的因素主要有 pH、离子浓度、搅拌强度等。此次试验主要研究了 pH 对盐溶蛋白起泡能力和泡沫稳定性的影响。由图 7、8 可知:盐溶蛋白的起泡性略优于大豆分离蛋白;当 pH 小于 4.0 时,盐溶蛋白中过多的氢离子会影响蛋白质基团的伸展,阻止其吸附至界面,所以起泡能力和稳泡能力不高;在碱性条件下,盐溶蛋白的起泡性更好,pH 8.0 时发泡能力为 68%,泡沫稳定性为 42%。

2.2.3 pH 对盐溶蛋白保水性的影响 肉的保水性(WHC)对肉糜制品的嫩度、风味影响显著,pH 值与螺肉盐溶蛋白的保水性的关系见图 9。由图 9 可知,碱性条件下,螺肉盐溶蛋白的保水性较强,最大值为 78.25%。因为碱性条件时偏离了盐溶蛋白的等电点,蛋白质的净负电荷较多,加大了蛋白质分子之间的空间,使得蛋白质与水的结合量增加,而在凝胶过程中交联形成三维网状结构,能束缚更多水分,因此凝胶的保水性较好^[24]。

2.3 螺肉盐溶蛋白在鱼肉肠中的初步应用

尝试将螺肉盐溶蛋白替代 50%的大豆分离蛋白添加在鱼肉肠里,制备的鱼肉肠与只用大豆分离蛋白制备的鱼肉肠进行比较发现:鱼肉肠在外观形态、口味、香味、肉质等方面

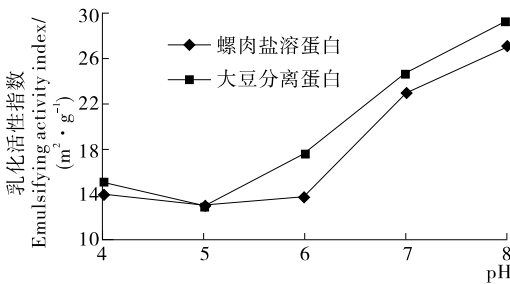


图 5 pH 值对盐溶蛋白 EAI 的影响

Figure 5 Effects of pH on EAI of salt soluble protein

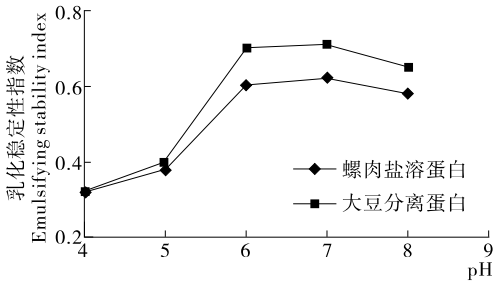


图 6 pH 对盐溶蛋白 ESI 的影响

Figure 6 Effects of pH on ESI of salt soluble protein

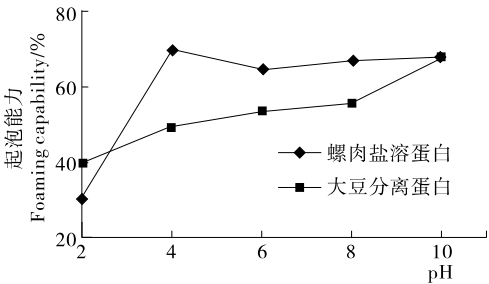


图 7 pH 对盐溶蛋白起泡能力的影响

Figure 7 Effect of pH on salt soluble protein foaming capability

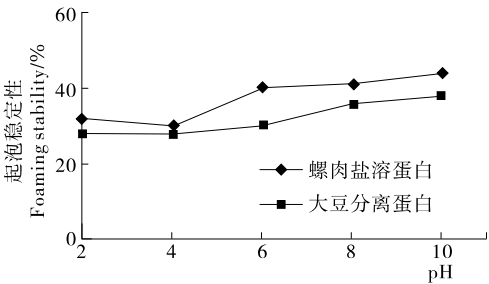


图 8 pH 对盐溶蛋白泡沫稳定性的影响

Figure 8 Effect of pH on salt soluble protein foam stability

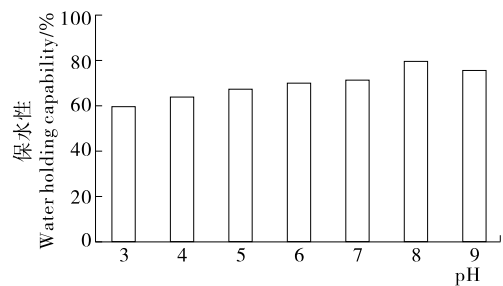


图 9 磷酸盐对盐溶蛋白凝胶保水性的影响

Figure 9 Effect of phosphate on salt soluble protein gel water retention

无明显差异。说明将螺肉盐溶蛋白作为品质改良剂应用于肉糜制品中是可行的。

3 结论

研究发现,螺肉盐溶性蛋白最佳提取条件是提取液中 NaCl 浓度 0.7 mol/L、固液比 1 : 6(g/mL)、提取液 pH 8.0、浸提时间 24 h,此时盐溶蛋白提取率为 13.6%。同时测定了螺肉盐溶性蛋白的加工特性,乳化性最大为 27.67 m²/g,乳化稳定指数为 0.62,略低于大豆分离蛋白,碱性条件下起泡性最大为 68%,泡沫稳定性为 42%,稍优于大豆分离蛋白,保水性达到 78.25%。将其替代部分大豆分离蛋白制备鱼肉肠,在外观、滋味、肉质等方面均无明显差异。综上所述,螺肉盐溶蛋白可以作为品质改良剂应用到肉糜制品中,并且价格低廉,天然安全,在肉糜制品加工中应用前景广阔,但是关于螺肉盐溶蛋白与磷酸盐等其余加工助剂之间的相关作用还需要作更深入的研究。

参考文献

[1] 王文彬. 水产品市场发展的新趋势[J]. 内陆水产, 2004, 29 (11): 37-38.

[2] 张俊杰, 段蕊. 鱼糜的凝胶机理[J]. 淮海工学院学报, 1999, 8 (3): 59-62.

[3] 刘海梅, 严菁, 熊善柏, 等. 淡水鱼肉蛋白质组成及其在鱼糜制品加工中的变化[J]. 食品科学, 2007, 28(2): 40-44.

[4] DIFTIS N, KIOSSEOGLOU V. Stability against heat-induced aggregation of emulsions prepared with a dry-heated soy protein isolate - dextran mixture[J]. Food Hydrocolloids, 2006, 20 (6): 787-792.

[5] MU Tai-hua, TAN Sze-sze, XUE You-lin. The amino acid composition, solubility and emulsifying properties of sweet potato protein[J]. Food Chemistry, 2009, 112(4): 1 002-1 005.

[6] XIA Xiu-fang, KONG Bao-hua, XIONG You-ling, et al. Decreased gelling and emulsifying properties of myofibrillar protein from repeatedly frozen-thawed porcine longissimus muscle are due to protein denaturation and susceptibility to aggregation[J]. Meat Science, 2010, 85(3): 481-486.

[7] 高艳华, 王联结. 国内外食品蛋白质发展概况[J]. 食品研究与开发, 2003, 24(5): 58-60.

[8] 杨凯, 童正明. 大豆分离蛋白的性质测定与改性研究[J]. 化学与生物工程, 2006, 23(6): 36-37.

[9] 高彦祥. 食品添加剂[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2011: 213-224.

[10] 赵威祺. 大豆蛋白质的构造和功能特性(中)[J]. 粮食与食品工业, 2004, 11(2): 3-6.

[11] 陈胜军, 曾名勇. 淡水鱼加工利用的研究进展[J]. 中国水产, 2002(5): 70-71.

[12] RICHARDP Brown, PATRICIAL Gerbarg, ZAKIR Ramazanov. Rhodiolarosea: a phytomedicloverview[J]. J. of the American Botanical Council, 2002, 56: 40-52.

[13] 周伦, 郭善广, 蒋爱民, 等. 肌肉盐溶蛋白热诱导凝胶特性研究进展[J]. 食品与机械, 2009, 25(3): 129-131.

[14] 孙宝国. 食品添加剂[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008: 105-150.

[15] 王伯华, 雷颂, 刘玉娇, 等. 蚌肉盐溶蛋白提取工艺优化及其功能特性[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(11): 215-221.

[16] 占剑峰, 黄文. 对虾肉盐溶蛋白的提取条件对于热诱导凝胶特性的影响研究[J]. 食品科技, 2008, 33(11): 126-129.

[17] 徐新德, 王格玲, 张强, 等. 分光光度法测定纯牛乳乳化稳定性的研究[J]. 中国乳业, 2003(9): 35-36.

[18] HOWELL N K, TAYLOR C. Effect of ascorbic acid on the foaming and gelling of globular proteins [J]. International Journal of Food Science & Technology, 1995, 30(3): 321-334.

[19] 罗永康, 潘道东, 沈慧星, 等. 蛋白质浓度, pH, 离子强度对鲢鱼肌原纤维蛋白粘度的影响[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30 (7): 52-54.

[20] 雷颂, 窦建洲, 梅志方, 等. 白鲢中盐溶蛋白提取工艺优化及其特性研究[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(8): 234-238.

[21] 彭增起. 水产品加工学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2010: 153-165.

[22] 明道绪. 生物统计附试验设计[M]. 北京: 中国农业出版社, 2008: 248-261.

[23] WU Wei-guo, CLIFFORD M, HOWELL N K. The effect of instant green tea on the foaming and rheological properties of egg albumen proteins[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2007, 87(10): 1 810-1 819.

[24] 程文新, 罗飞, 单晓红, 等. 磷酸盐对肉制品品质构影响的研究[J]. 肉类工业, 2004(11): 12-14.