

响应面法优化双髻鲨(*Sphyrna zygaena*)肌肉盐溶蛋白的提取和凝胶形成条件*

徐大伦 颜伟华 杨文鸽 何斌辉 丁宁 陈丹 顾玲芳

(宁波大学 应用海洋生物技术教育部重点实验室 宁波 315211)

提要 采用响应面分析法,以双髻鲨肉盐溶蛋白凝胶保水性为依据,对盐溶蛋白的提取和凝胶形成条件 NaCl 浓度、pH 和低温加热时间进行优化。结果表明:(1) 根据中心组合试验设计,采用三因素三水平的响应面分析法,建立了双髻鲨肉盐溶蛋白凝胶保水性与其提取条件的数学模型:保水性(%) = $65.440 + 10.868X_1 + 1.835X_2 - 0.502X_3 - 4.647X_1^2 + 0.121X_1X_2 - 0.415X_1X_3 - 0.856X_2^2 + 0.487X_2X_3 - 1.789X_3^2$,其中 NaCl 浓度和 pH 对双髻鲨肉盐溶蛋白凝胶的保水性影响极其显著,低温加热时间对保水性影响不显著;(2) 在分析各因素显著性及其交互作用的基础上,得出盐溶蛋白提取和凝胶形成的适宜条件为:NaCl 浓度为 0.90mol/L,提取溶液的 pH = 7.0,低温加热时间为 35min,此时盐溶蛋白凝胶的保水性达到 72%,与模型预测值基本相符。

关键词 双髻鲨,盐溶蛋白,凝胶保水性,响应面法

中图分类号 TS254.1

鲨鱼全身是宝,目前国内外对鲨鱼的研发主要集中在鱼翅、鱼肝、鱼骨和鱼皮(Huang *et al*, 2005; 肖志群等, 2008; 陈申如等, 2006; 陈小娥等, 2008)。作为鱼翅加工的下脚料,鲨鱼肉虽然量很大,但由于其肉质粗糙、口感差,又有尿素臭味而常常被舍弃或低值利用。因此,高值化利用鲨鱼肉,提高鲨鱼产业的附加值,已是迫在眉睫。

在鱼肉蛋白质中,肌肉盐溶蛋白除了参与肌肉收缩、影响肌肉嫩度外,还与肉制品的流变学特性如保水性、粘弹性、质地等密切相关,是鱼肉形成弹性凝胶体的主要成分,直接影响着鱼糜制品的口感特性、保水性及产品得率等(李小勤等, 2008)。而盐溶蛋白凝胶的形成与其提取条件密切相关,因此研究外界因素对鱼肉盐溶蛋白凝胶特性的影响,改良其凝胶性能具有重要意义。但目前国内外对鱼肉制品——鱼糜凝胶特性的研究报道较多(Chaijan *et al*, 2004; Baxter *et al*, 2008),对肌肉盐溶蛋白凝胶特性的研究

大多以畜禽肉为对象(Chang *et al*, 2001; Lantto *et al*, 2007; Tomasz *et al*, 2003),对鱼肉盐溶蛋白凝胶特性的研究报道较少,于巍等(2007)研究了混合磷酸盐对草鱼盐溶蛋白的凝胶保水性及流变性的影响,王金余等(2008)对白鲢鱼糜肌球蛋白交联反应和凝胶化最适条件进行了研究,而关于鲨鱼盐溶蛋白的提取及其凝胶特性的研究未见报道。

本试验以捕获量较大的双髻鲨(*Sphyrna zygaena*)肌肉为材料,考察盐溶蛋白提取时 NaCl 浓度、pH 以及制备凝胶时的低温加热时间对鲨鱼肉盐溶蛋白热诱导凝胶保水性的影响,利用响应面试验优化盐溶蛋白的提取及其凝胶形成条件,为改善鲨鱼肉盐溶蛋白的凝胶性能,开发具有高品质的鲨鱼鱼糜制品提供理论依据。

1 材料与仪器

鲨鱼为刚捕获的新鲜双髻鲨(*Sphyrna zygaena*),

* 国家“十一五”科技支撑计划重大项目, 2008BAD94B05 号;宁波市自然科学基金项目, 2010A610013 号;浙江省大学生科技创新基金项目, 2009—2010。徐大伦, 副教授, E-mail: xudalun@nbu.edu.cn

通讯作者: 杨文鸽, 博士, 教授, E-mail: yangwenge@nbu.edu.cn

收稿日期: 2010-01-28, 收修改稿日期: 2010-03-26

体重(3.5±0.5)kg, 购于宁波水产交易市场。

台式高速冷冻离心机 Biofuge stratos (Thermo scientific), 电子分析天平 BP221S(德国 Sartorius 公司), 数字酸度计 PHS-3C(上海精密科学仪器有限公司), 高速分散器 XHF-D(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

2 实验方法

2.1 前处理

新鲜鲨鱼即杀后, 沿脊椎剖开, 去头、尾、内脏和皮, 取鲨鱼肉, 冻藏备用。

2.2 鲨鱼肉盐溶蛋白的提取

参照 Bertram 等(2004)方法, 并略作修改。取鱼肉, 加 4 倍量预冷的磷酸缓冲液(pH 6.6)匀浆, 高速离心 10min(4[°]), 沉淀加入 4 倍量预冷的 NaCl 溶液(不同浓度), 并调整提取溶液的 pH(不同 pH), 匀浆, 4[°]下静置 24h 后离心, 上清液即为提取的盐溶蛋白溶液。

2.3 鲨鱼肉盐溶蛋白凝胶的制备

参照于巍等(2007)方法, 并略作改进。将提取的盐溶蛋白置于离心管, 水浴加热, 40[°]低温加热(不同时间)后, 立即在 85[°]下恒温 30min。凝胶形成后快速冷却, 4[°]保存, 24h 后测定其保水性。

2.4 凝胶保水性的测定

将制备的盐溶蛋白凝胶 4000r/min, 4[°]离心 5min, 称重并计算凝胶保水性(WHC)。

$$WHC = \frac{W_1 - W}{W_2 - W} \times 100\%$$

式中: W_1 为离心管+离心后的凝胶质量(g), W_2 为离心管+离心前的凝胶质量(g), W 为离心管质量(g)。

2.5 数据统计

每次实验设 3 个平行, 取平均值。数据采用 SPSS 软件和 SAS9.1.3 软件进行统计分析(王志铮等, 2009; 赵思明, 2005; 黄润龙, 2004)。

3 结果与分析

3.1 响应面(RSM)试验设计

根据 Box-Behnken 中心设计原理, 以 NaCl 浓度、提取溶液的 pH 和 40[°]低温加热时间三个因素为自变量, 并以 -1、0、1 分别代表自变量的低、中、高水平, 以鲨鱼肉盐溶蛋白凝胶的保水性为响应值, 设计 3 因素 3 水平试验, 具体水平见表 1; 设计 15 个试验点, 其中 12 个析因点, 3 个零点, 试验设计及结果见表 2。

表 1 响应面分析因素及水平

因素		水平		
		- 1	0	1
NaCl 浓度(mol/L)	X_1	0.5	0.7	0.9
pH	X_2	5.5	6.5	7.5
低温加热时间(min)	X_3	0	40	80

表 2 Box-Behnken 试验设计及结果

试验号	X_1	X_2	X_3	保水性(%)
1	- 1	- 1	0	46.60
2	- 1	1	0	51.11
3	1	- 1	0	68.52
4	1	1	0	73.52
5	0	- 1	- 1	62.66
6	0	- 1	1	60.34
7	0	1	- 1	64.28
8	0	1	1	63.90
9	- 1	0	- 1	48.27
10	1	0	- 1	70.40
11	- 1	0	1	48.44
12	1	0	1	68.91
13	0	0	0	65.04
14	0	0	0	65.31
15	0	0	0	65.97

对试验数据进行二次回归拟合, 得到带交互项和平方项的二次方程: $Y = \beta_0 + \sum \beta_i \chi_i + \sum \beta_{ij} \chi_i \chi_j + \sum \beta_{ii} \chi_i^2$, 其中 Y 是预测响应值, χ_i 是自变量, β_0 、 β_i 、 β_{ij} 、 β_{ii} 是待估计参数偏移值。

采用 SAS9.1.3 软件对表 2 进行多元回归分析, 建立的鲨鱼肉盐溶蛋白热诱导凝胶保水性与各因素之间的回归方程如下: 保水性(%) = 65.440 + 10.868 X_1 + 1.835 X_2 - 0.502 X_3 - 4.647 X_1^2 + 0.121 $X_1 X_2$ - 0.415 $X_1 X_3$ - 0.856 X_2^2 + 0.487 $X_2 X_3$ - 1.789 X_3^2 。

3.2 响应面试验结果分析

对上述回归方程进行方差分析, 以验证回归模型及各参数的显著度, 结果见表 3。可以看出, 模型 Prob> F 值为 0.0001 小于 0.01, 表明该模型是极显著的, 其中参数 X_1 、 X_2 的 Prob> F 值均小于 0.01, X_3 的 Prob> F 值大于 0.05, 说明 NaCl 浓度、提取溶液的 pH 对鲨鱼肉盐溶蛋白凝胶的保水性影响极显著, 而低温加热时间对凝胶的保水性影响不显著。

模型失拟项表示模型预测值与实际值不拟合的概率(Rastogi *et al*, 1999)。表 3 中模型失拟项的

Prob>F 值=0.1943(>0.05), 说明模型失拟项不显著, 模型选择合适。同时, 软件分析得到模型的相关系数为 0.997, 大于 0.90, 说明模型相关度很好, 凝胶保水性的变化 99.70% 来源于所选变量。变异系数(CV)反映模型的置信度, CV 值越低, 模型的置信度越高, 本试验的 $CV = 1.34\%$, 说明模型能够较好地反映真实值, 可以使用该模型来分析响应值的变化。

表 3 盐溶蛋白凝胶保水性的响应面方差分析

Tab.3 ANOVA of RSM for the WHC of the salt-soluble protein gel

方差来源	自由度	平方和	均方	F 值	Prob>F	显著性
X_1	1	944.60	0.09	1388.19	0.0001	**
X_2	1	26.97	26.97	39.51	0.0015	**
X_3	1	2.02	2.02	2.96	0.1460	
X_1^2	1	79.71	79.71	116.75	0.0001	**
X_1X_2	1	0.06	0.06	0.09	0.7788	
X_1X_3	1	0.69	0.69	1.01	0.3612	
X_2^2	1	2.71	2.71	3.97	0.1031	
X_2X_3	1	0.94	0.94	1.38	0.2933	
X_3^2	1	11.81	11.81	17.30	0.0088	**
失拟项	3	2.96	0.99	4.30	0.1943	
模型	9	1063.19	118.13	173.03	0.0001	**
误差	5	3.41	0.68			
总和	14	1066.61				

注: Prob>F 值的大小表明模型及各个考察因素的显著水平;

**表示影响极显著($P < 0.01$)

3.3 响应面图形分析与条件优化

为进一步研究相关变量之间的作用及确定最优条件, 通过 SAS9.1.3 软件绘制三组以凝胶保水性为响应值的趋势图, 结果如图 1a、b、c。

由图 1a 可知, 相同 NaCl 浓度下, 凝胶的保水性随 pH 的增加而升高; 相同 pH 下, 保水性随 NaCl 浓

度的增加而升高。溶液的离子强度和 pH 均能够影响蛋白质中氨基酸侧链基团的解离, 改变盐溶蛋白在溶液中的存在状态, 从而降低或增加蛋白质和蛋白质的相互作用, 影响盐溶蛋白的凝胶特性。添加氯化钠能增加盐溶蛋白之间的静电斥力, 使蛋白质结构松弛, 从而可以提高盐溶蛋白凝胶的保水性; 但当添加氯化钠的浓度过高, 会造成蛋白质溶解度降低, 使凝胶脱水而降低其保水性。杨芳等(2008)研究认为添加的 NaCl 浓度为 0.7mol/L, pH 6.6 时, 阿根廷鱿鱼肌原纤维蛋白凝胶的保水能力最好。

由图 1b 可知, 相同 pH 下, 凝胶的保水性随低温加热时间的增加先升后降, 在低温加热时间接近 40min 时, 凝胶的保水性最大; 相同低温加热时间下, 保水性随 pH 的增加而升高。加热升温直接影响盐溶蛋白热诱导凝胶的形成, 研究表明(罗永康等, 2001; 王金余等, 2008), 盐溶蛋白经低温(0—40)处理, 有利于形成凝胶结构, 从而改进凝胶的保水性。但随着低温加热时间的延长, 其凝胶保水性反而逐渐下降, 这可能是由于盐溶蛋白分子形成的网状结构失水, 发生了凝胶劣化, 从而导致凝胶的保水性下降。

从图 1c 可知, 在相同 NaCl 浓度下, 凝胶保水性随低温加热时间的延长先升后降, 低温加热时间接近 40min 时, 保水性达到最大; 在相同低温加热时间下, 保水性随 NaCl 浓度的增加而升高。

为确定各因素的最佳值, 利用 SAS9.1.3 软件进行岭脊分析(吴有炜, 2002; Gupta *et al*, 2004), 得出回归模型存在最大值点, 保水性的最大预测值为 72.18%, 各因素的取值分别为: NaCl 浓度 0.88mol/L, 提取溶液的 pH 6.92, 低温加热时间 35.80min。考虑实际操作, 将 NaCl 浓度、提取溶液的 pH、低温加热时间分别修正为: 0.90mol/L、7.0、35min。在修正条

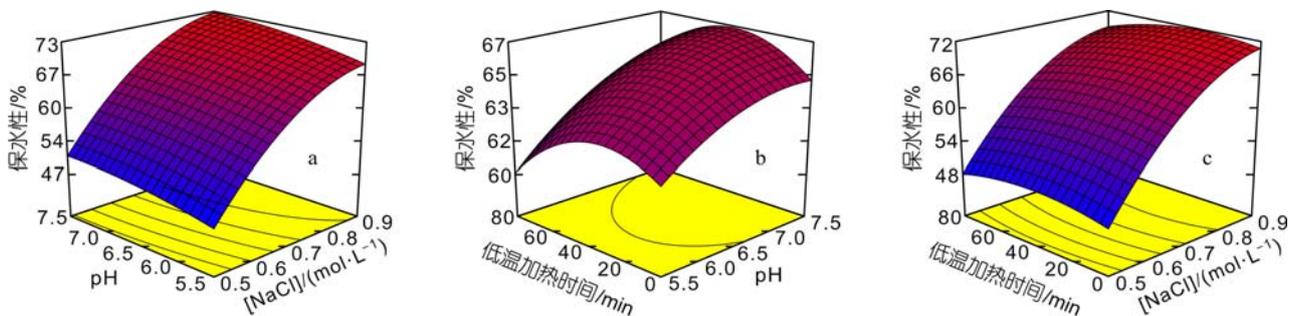


图 1 提取条件对盐溶蛋白凝胶保水性影响的响应曲面图

Fig.1 Response surface diagram for the effect of extractive conditions on the WHC of the salt-soluble protein gel

a. pH 和 NaCl 浓度对盐溶蛋白凝胶保水性的影响; b. 低温加热时间和 pH 对盐溶蛋白凝胶保水性的影响; c. NaCl 浓度和低温加热时间对盐溶蛋白保水性的影响

件下,制备一批鲨鱼肉盐溶蛋白热诱导凝胶,测得凝胶的保水性为 $72.00\% \pm 1.00\%$,与模型预测值 72.18% 非常接近。

4 结论

(1) 采用响应面分析法建立了鲨鱼肉盐溶蛋白凝胶保水性与其提取条件的回归方程: 保水性($\%$) = $65.440 + 10.868X_1 + 1.835X_2 - 0.502X_3 - 4.647X_1^2 + 0.121X_1X_2 - 0.415X_1X_3 - 0.856X_2^2 + 0.487X_2X_3 - 1.789X_3^2$, 其中 NaCl 浓度和提取溶液的 pH 对鲨鱼盐溶蛋白凝胶的保水性影响极其显著,低温加热时间对凝胶的保水性影响不显著。

(2) 利用 SAS9.1.3 软件进行岭脊分析,得出回归模型存在最大值点。NaCl 浓度为 0.88mol/L ,提取溶液的 pH 为 6.92 ,低温加热时间为 35.80min ,保水性最大预测值为 72.18% 。将 NaCl 浓度、提取溶液的 pH、低温加热时间分别修正为: 0.90mol/L 、 7.0 、 35min ,在此条件下得到鲨鱼肉盐溶蛋白凝胶的保水性为 $72.00\% \pm 1.00\%$,与预测值接近。可见,通过响应面建立的数学模型,优化鲨鱼盐溶蛋白的提取和凝胶形成条件是可靠的。

参 考 文 献

- 于 巍,周 坚,2007. 草鱼盐溶蛋白保水性及流变性质的研究. 食品与发酵工业, 33(10): 72—75
- 王志铮,吕敬堂,施建军等,2009. 4 种重金属离子对中华鳖 (*Trionyx sinensis*) 稚鳖的急性致毒效应. 海洋与湖沼, 40(6): 745—752
- 王金余,刘承初,赵善贞,2008. 白鲢鱼糜肌球蛋白交联反应和凝胶化最适条件的研究. 食品科学, 29(11): 223—225
- 李小勤,刘贤敏,冷向军等,2008. 盐度对乌鳢 (*Channa argus*) 生长和肌肉品质的影响. 海洋与湖沼, 39(5): 505—510
- 杨 芳,吴永沛,陈梅香等,2008. 阿根廷鱿鱼肌原纤维蛋白及肌肉组织凝胶保水性研究. 水产科学, 27(8): 386—389
- 肖志群,翁朝红,黄河清,2008. 鲨鱼肝铁蛋白理化特性及其储存有机磷农药分子的初步研究. 集美大学学报, (3): 1—6
- 吴有炜,2002. 试验设计与数据处理. 苏州: 苏州大学出版社, 135—142
- 陈小娥,方旭波,余 辉等,2008. 杂交鲟 (*Sturgeon cartilage*) 软骨中硫酸软骨素的提取方法及分析鉴定. 海洋与湖沼, 39(1): 49—54
- 陈申如,蔡扬鹏,周 琼等,2006. 鲨鱼鱼皮、鱼骨胶原蛋白的纯化及其特性的初步研究. 中国食品学报, 6(1): 173—178
- 罗永康,沈慧星,潘道东等,2001. 鲢鱼鱼糜蛋白质凝胶特性的研究. 食品与发酵工业, 28(1): 23—26
- 赵思明,2005. 食品科学与工程中的计算机应用. 北京: 化学工业出版社, 12—59
- 黄润龙,2004. 数据统计与分析技术: SPSS 软件实用教程. 北京: 高等教育出版社, 160—228
- Baxter S R, Skonberg D I, 2008. Gelation properties of previously cooked minced meat from Jonah crab (*Cancer borealis*) as affected by washing treatment and salt concentration. Food Chemistry, 109(2): 332—339
- Bertram H C, Kristensen M, Andersen H J, 2004. Functionality of myofibrillar proteins as affected by pH, ionic strength and heat treatment—a low-field NMR study. Meat Science, 68(2): 249—256
- Chaijan M, Benjakul S, Visessanguan W *et al*, 2004. Characteristics and gel properties of muscles from sardine (*Sardinella gibbosa*) and mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) caught in Thailand. Food Research International, 37(10): 1021—1030
- Chang H S, Feng Y M, Hultin H O, 2001. Role of pH in gel formation of washed chicken muscle at low ionic strength and water loss of muscle protein gels. Food Biochem, 5(5): 439—457
- Gupta S, Manohar C S, 2004. An improved response surface method for the determination of failure probability and importance measures. Structural Safety, 26(2): 123—139
- Huang F J, Wu W T, 2005. Antidiabetic effect of a new peptide from *Squalus mitsukurii* liver (S-8300) in streptozotocin-induced diabetes. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 57(12): 1575—1580
- Lantto R, Puolann E, Kruus K *et al*, 2007. Tyrosinase-aided protein cross-linking: effects on gel formation of chicken breast myofibrils and texture and water-holding of chicken breast meat homogenate gels. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55(4): 1248—1255
- Rastogi N K, Rashmi K R, 1999. Optimization of enzymatic liquefaction of mango pulp by response surface methodology. Eur Food Res Technol, 209: 57—62
- Tomasz L, Youling L X, 2003. Chicken muscle homogenate gelation properties: effect of pH and muscle fiber type. Meat Science, 64(4): 399—403

RESPONSE SURFACE OPTIMIZATION OF CONDITIONS FOR EXTRACTION AND GEL PREPARATION OF SALT-SOLUBLE PROTEINS FROM *SPHYRNA ZYGAENA* MUSCLE

XU Da-Lun, YAN Wei-Hua, YANG Wen-Ge, HE Bin-Hui, DING Ning, CHEN Dan, GU Ling-Fang
(Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology of Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo, 315211)

Abstract Based on the Box-Behnken experimental design with 3 factors and 3 levels, the effects of NaCl concentration (X_1), pH (X_2) and low-temperature heating time (X_3) on the water holding capacity (*WHC*) of the salt-soluble protein gel from *Sphyrna zygaena* muscle were studied and optimized by the respond surface methodology (RSM). The correlation between the *WHC* of the salt-soluble protein gel and its extractive conditions was $WHC(\%) = 65.440 + 10.868X_1 + 1.835X_2 - 0.502X_3 - 4.647X_1^2 + 0.121X_1X_2 - 0.415X_1X_3 - 0.856X_2^2 + 0.487X_2X_3 - 1.789X_3^2$. The effects of NaCl concentration and pH on the *WHC* of the salt-soluble protein gel were extremely significant; but the low-temperature heating time was not. Response surface and contour were graphed with the *WHC* as the response value. The optimal extraction and gel preparation conditions of salt-soluble proteins from *S. zygaena* muscle were 0.90mol/L NaCl, pH7.0 and 35min of low-temperature heating time. Experimentally, these conditions produced a salt-soluble protein gel with a *WHC* of 72%, confirming the model prediction.

Key words *Sphyrna zygaena*, Salt-soluble protein, Water holding capacity (*WHC*) of gel, Respond surface methodology