

金线鱼-白鲢鱼混合鱼糜凝胶蛋白质构象和作用力的研究

于传龙¹, 王 崑^{1*}, 乔翠平¹, 仪淑敏¹, 王 轰², 李学鹏¹, 励建荣¹, 邓尚贵³

(1. 渤海大学食品科学与工程学院, 生鲜农产品贮藏加工及安全控制技术国家地方联合工程研究中心, 国家鱼糜及鱼糜制品加工技术研发分中心, 锦州 121013; 2. 蓬莱京鲁渔业有限公司, 烟台 265600; 3. 浙江海洋大学食品与医药学院, 舟山 316022)

摘 要: **目的** 研究金线鱼鱼糜和白鲢鱼鱼糜的混合鱼糜体系凝胶过程中的蛋白质构象和作用力。**方法** 以金线鱼鱼糜和白鲢鱼鱼糜为对象, 利用拉曼光谱、电泳和热稳定性测量等方法检测。**结果** 混合鱼糜中疏水性氨基酸总量均高于 34.3%。从热稳定性的分析可知, 在 45 °C 和 67 °C 附近出现了吸热峰, 在 78 °C 左右出现了放热峰。随着金线鱼鱼糜含量的增加, α -螺旋含量先下降后趋于稳定, β -折叠和 β -转角含量逐渐增加。当金线鱼鱼糜和白鲢鱼鱼糜的比例为 3:1 时, 混合鱼糜的破断力和凝胶强度分别为 524.08 g 和 6226.25 g·cm, 较白鲢鱼鱼糜分别提高 89.05% 和 95.78%。相关性分析结果表明凝胶强度与蛋氨酸、 β -折叠结构和二硫键呈极显著性正相关; 混合鱼糜凝胶中的蛋氨酸、酪氨酸、组氨酸和精氨酸与非特异性关联、氢键呈显著性负相关。**结论** 混合鱼糜体系中的凝胶强度有增效现象。

关键词: 混合鱼糜; 蛋白质构象; 化学作用力

Study on the protein conformation and chemical forces of mixed surimi from *Nemipterus virgatus* and *Silver carp*

YU Chuan-Long¹, WANG Wei^{1*}, QIAO Cui-Ping¹, YI Shu-Min¹, WANG Hong², LI Xue-Peng¹, LI Jian-Rong¹, DENG Shang-Gui³

(1. College of Food Science and Technology, Bohai University, National & Local Joint Engineering Research Center of Storage, Processing and Safety Control Technology for Fresh Agricultural and Aquatic Products, National R & D Branch Center of Surimi and Surimi Products Processing, Jinzhou 121013, China; 2. Penglai Jinglu Fishery Co., Ltd., Yantai 265600, China; 3. College of Food and Medicine Technology, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China)

ABSTRACT: Objective To study the conformation and action of protein in gelation process of mixed surimi of *Nemipterus virgatus* and *Silver carp*. **Methods** *Nemipterus virgatus* and *Silver carp* surimi were detected by Raman spectroscopy, electrophoresis and thermal stability measurement. **Results** The total amount of hydrophobic amino acids in mixed surimi were higher than 34.3%. From the analysis of thermal stability, it could

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0901004)、国家自然科学基金项目(31571868, 31972107)、辽宁省“兴辽英才计划”青年拔尖人才项目(XLYC1907040, 1807133)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Project (2018YFD0901004), the National Natural Science Foundation of China (31571868, 31972107), and Liaoning Revitalization Talents Program (XLYC1907040, 1807133)

***通讯作者:** 王崑, 实验师, 主要研究方向为食品加工与质量安全控制。E-mail: wwll812002@163.com

***Corresponding author:** WANG Wei, Experimentalist, College of Food Science and Technology, Bohai University, Jinzhou 121013, China. E-mail: wwll812002@163.com

be seen that the absorption peak appeared around 45 °C and 67 °C, and the exothermic peak appeared around 78 °C. With the increase of *Nemipterus virgatus* surimi content, the content of α -helix was first decreased and then stabilized, and the content of β -folding and β -angle was gradually increased. When the ratio of *Nemipterus virgatus* and *Silver carp* surimi was 3:1, the breaking force and gel strength of mixed surimi were 524.08 g and 6226.25 g·cm respectively, which were 89.05% and 95.78% higher than that of silver carp and silver carp respectively. The correlation analysis showed that the gel strength was positively correlated with methionine, β -folded structure and disulfide bond. Methionine, tyrosine, histidine and arginine in mixed surimi gel were negatively correlated with non-specific correlation and hydrogen bonding. **Conclusion** The gel strength in the mixed surimi system is enhanced.

KEY WORDS: mixed surimi; protein conformation; chemical forces

1 引言

鱼糜制品是鱼类深加工的主要产品之一, 是鱼肉经一系列处理后, 去除水溶性蛋白及其他杂质, 浓缩肌纤维蛋白得到的加工制品^[1]。鱼的种类不同, 其鱼糜凝胶强度和蛋白质构象存在差异^[2]。鱼糜凝胶网络结构主要是依靠蛋白质分子内、分子间及水-蛋白质分子间构象的变化和化学作用力的改变来维持^[3,4]。蛋白质之间的作用力还会受到鱼体内源酶的种类、含量及其活性的影响。对鱼糜进行热处理时, 其中的蛋白质构象发生改变, 氨基酸的疏水基团相互作用, 提高了鱼糜的凝胶特性^[2]。2019 年中国鱼糜加工产量约为 139 万吨, 海水鱼是鱼糜加工的主要生产原料。全国海水产品的总产量较 2018 年减幅 0.35%, 提供的海水鱼类资源减少。而淡水产品的总产量较 2018 年增幅 1.32%, 我国用于加工鱼糜的淡水鱼类资源丰富。将淡水鱼类资源应用到鱼糜加工将逐渐成为趋势^[5]。2019 年, 我国金线鱼的捕获产量为 32 万吨, 鲢鱼的养殖产量达 381 万吨^[5]。两者都是鱼糜加工的重要原料鱼种。许多学者对混合鱼糜性能进行了研究, 徐文鑫^[6]研究的罗非鱼-鲮鱼的混合鱼糜凝胶强度显著提高。郭培等^[7]发现金鲳鱼-罗非鱼的混合鱼糜的凝胶特性具有显著的协同增效作用。仪淑敏等^[8]研究发现混合合适比例的鳊鱼鱼肉与白鲢鱼鱼糜能够提高混合鱼糜的凝胶强度。Abdollahi 等^[9]以鲱鱼蛋白和鲤鱼蛋白为研究对象, 按 1:1(w:w)混合, 发现弹性模量增速提高的现象。

将海水鱼鱼糜和淡水鱼鱼糜混合, 由于其各种氨基酸的比例、蛋白构象与单一鱼糜存在差异性^[10], 在适宜条件下, 有利于蛋白质形成稳定的有序构象, 提高淡水鱼的利用价值, 增强淡水鱼鱼糜的凝胶特性, 改善淡水鱼鱼糜的风味^[11], 此外, 还可以降低纯海水鱼鱼糜的加工成本。本研究探讨了混合鱼糜凝胶过程中蛋白质构象和化学作用力的变化, 以期对海水鱼-淡水鱼混合鱼糜相关研究提供参考。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

白鲢鱼鱼糜(AA 级)(洪湖市井力水产食品有限公司); 金线鱼鱼糜(FA 级)(青岛佰腾国际贸易有限公司)。

食盐(中盐长江盐化有限公司); 尿素、 β -巯基乙醇(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。

丙烯酰胺、N, N'-亚甲基双丙烯酰胺、十二烷基磺酸钠(sodium dodecyl sulfonate, SDS)、Tris、过硫酸铵和四甲基乙二胺(tetramethylethylenediamine, TEMED)[分析纯, 生工生物工程(上海)股份有限公司]; 氯化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、无水乙醇(分析纯, 天津市风船化学试剂科技有限公司)。

2.2 仪器与设备

UMC 5 真空斩拌锅(德国 Stephan 机械有限公司); YSN 立式灌肠机(广州优连食品加工机械有限公司); DSC Q 2000 差示热量扫描仪(美国 TA 公司); Lab RAM HR Evolution 拉曼光谱仪[堀场(中国)贸易有限公司]; GS-800 拍照系统(美国 Bio-Rad 公司)。

2.3 凝胶的制备

金线鱼鱼糜与白鲢鱼鱼糜按质量比 1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1 混合。对照组: 金线鱼鱼糜, 白鲢鱼鱼糜。

冷冻鱼糜流水解冻 0.5 h, 切丁, 混合后, 和 2.5%盐一起在常压下斩拌 1 min, 水分含量调至 80%后, 真空斩拌 6 min, 得混合鱼糜溶胶, 整个过程温度控制在 10 °C 以下。选取直径为 43~45 mm 的肠衣灌肠, 二段加热成型。4 °C 下过夜。

2.4 凝胶强度的测定

样品切成 2.5 cm×2.5 cm×2.5 cm 的圆柱体。使用 P/5S 探头进行相关数据检测; 测前速度、测试速度和测后速度

均为 1 mm/s; 压缩形变为 50%; 触发力为 15 g。各组样品重复 5 次。

2.5 总氨基酸含量的测定

选用色谱柱: #2622 ph Column 855-3506 4.6 mm×60 mm, 参考国家标准 GB 5009.124-2016《食品中氨基酸的测定进行检测》^[9]进行检测。

样品前处理: 准确称取样品适量, 放入水解管中, 加 10 mL 6 mol/L 盐酸, 氮吹排氧后封口, 将水解管放入 110 °C 恒温干燥箱内水解 24 h, 完毕冷却后, 开管过滤定容 50 mL, 取 1 mL 滤液放置在氮吹仪上蒸发至干, 加入 5 mL 样品稀释液(0.02 mol/L 的盐酸), 摇匀、过滤待用。

2.6 热稳定性的测定

准确称取约 25 mg 鱼糜样品于铝盘中, 用压片机密封, 同时以密封的空铝盘作为参比。氮气保护状态下, 初始温度为 20 °C, 结束温度为 90 °C, 升温速度为 10 °C/min, 氮气流速 50 mL/min, 得差示扫描量热法(differential scanning calorimetric, DSC)曲线。借助 DSC Q 2000 的分析软件, 得到样品相变过程的焓变 ΔH 。

2.7 拉曼光谱的测定

按照 Poowakanjana 等^[10]的方法稍作修改。使用高分辨率拉曼光谱仪, 激发光源为半导体激光器, 激光波长 532 nm, 功率为 100%, 采集时间为 30 s, 扫描次数为 2 次, 光谱分辨率为 0.6 cm^{-1} , 拉曼位移范围为 400~3 600 cm^{-1} 。得到的光谱图利用 Labspec 5 软件进行基线校正和平滑处理。利用 Alix 的方法对测定结果进行分析计算^[12,13]。

2.8 肌原纤维蛋白的提取

参考 Hashimoto 等^[14]的方法。

2.9 化学作用力的测定

参考 Gómez-Guillén 等^[15]方法。

2.10 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳

参考 Laemmli 等^[16]的方法并稍作修改。将各组样品溶解, 蛋白液质量浓度调至 2.5 mg/mL, 与上样缓冲液按 1:1(V:V)比例混合, 沸水浴 5 min。制胶后, 加样 10 μL (浓缩胶浓度: 4%、分离胶浓度: 10%)。跑电泳时, 80 V 恒压和 120 V 恒压下运行时间分别为 15 min 和 80 min。蓝色标记到达底部, 取胶, 再进行染色、脱色, 得到清晰的胶板后扫胶。

2.11 统计分析

利用 Origin 9.0 软件作图, 采用 SPSS 19.0 对数据进行

平均值、标准差的计算以及显著性差异的分析($P<0.05$)。

3 结果与分析

3.1 混合鱼糜凝胶氨基酸含量的分析

如表 1 所示, 与已知的淡水鱼鱼糜的氨基酸相比, 金线鱼与白鲢鱼的混合鱼糜凝胶氨基酸组成与含量的变化趋势具有相似性^[17], 谷氨酸、天冬氨酸、赖氨酸、亮氨酸和精氨酸是白鲢鱼鱼糜凝胶中的主要组成部分, 它们的含量依次降低, 作为海水鱼糜的金线鱼鱼糜, 凝胶的主要氨基酸含量的排序与白鲢鱼鱼糜凝胶一致。根据侧链 R 的极性差异, 氨基酸可分为 4 类: 极性(亲水性)、非极性(疏水性)、碱性和酸性。其中, 位于蛋白质分子内部的主要是非极性(疏水性)氨基酸, 是构成蛋白质三级结构的主要动力, 也能影响蛋白质的稳定性^[18]。

由表 1 知, 当混合鱼糜中金线鱼鱼糜占比越来越大, 赖氨酸和谷氨酸含量表现出先增大后降低的趋势; 胱氨酸、组氨酸、脯氨酸和蛋氨酸含量较低; 所有鱼糜凝胶样品的疏水性氨基酸总量均高于 34.3%; 对照组和实验组凝胶样品的谷氨酸和赖氨酸含量均未出现显著性变化($P>0.05$), 但值得注意的是混合鱼糜凝胶强度表现出差异性不同, 推测这是由于蛋白质来源于不同种类的鱼肉, 谷氨酰胺转氨酶(glutamine transaminase, TG)和其他组织蛋白酶活性也不同^[19]。随金线鱼鱼糜含量一定范围内的增加, 酪氨酸含量逐渐增加, 金线鱼鱼糜与白鲢鱼鱼糜对于凝胶强度的协同作用增强, 当含量进一步增加时, 2 种鱼糜的协同作用减弱, 天冬氨酸和酪氨酸的变化趋势一致。天冬氨酸和酪氨酸含量的增加说明这 2 种氨基酸参与了协同作用或对协同作用有一定的贡献。

3.2 混合鱼糜热稳定性的分析

由表 2 可知, 实验组鱼糜的峰值温度的趋势为先升高后趋于稳定。在 45 °C 和 67 °C 附近出现吸热峰, 说明肌球蛋白的头部和尾部相继发生了变性; 在 78 °C 左右出现放热峰, 表明肌动蛋白在此温度下发生分子聚集行为。金线鱼鱼糜的 T_{max} 和 ΔH 均显著高于白鲢鱼鱼糜。在金线鱼鱼糜和白鲢鱼鱼糜比例为 1:1~4:1 范围内, 混合鱼糜蛋白的变性温度逐渐升高, 相应的焓值 ΔH 也逐渐增加, 表明热稳定性逐渐增强。虽然混合鱼糜中的金线鱼鱼糜的占比进一步升高, 但是对于峰值温度的影响不明显。混合鱼糜的 ΔH_1 数值变化趋势与相对应的温度相似。当分子内和分子间的相互作用达到平衡状态时, 整个蛋白凝胶体系的自由能降到最低^[20]。随着金线鱼鱼糜含量进一步提高, 会在一定程度上影响混合体系蛋白质的结构和维持构象稳定性的化学作用力, 降低混合鱼糜凝胶体系中蛋白质分子热稳定性。

3.3 混合鱼糜凝胶强度的分析

凝胶强度是评价鱼糜凝胶质量的重要指标之一, 该指标能够反映鱼糜凝胶的结构特性, 决定了鱼糜凝胶产品的质量好坏。由图 1 可知, 在金线鱼鱼糜的作用下, 混合鱼糜的凝胶强度呈现出先增加后趋于平稳的趋势, 与金线鱼鱼糜的凝胶强度相近。当混合鱼糜中的金线鱼鱼糜占比增加, 能够显著提高混合鱼糜的破断力, 混合鱼糜的凝胶强度呈现出先增加后趋于平稳的变化。混合鱼糜的破断距离并没有因为金线鱼鱼糜含量增加而发生显著变化。当金线鱼鱼糜与白鲢鱼鱼糜混合比例大于 2:1(质量比)时, 与白鲢鱼鱼糜凝胶相比, 破断力和凝胶强度均显著增加($P<0.05$); 当混合比例为 3:1(质量比)时, 破断力和凝胶强度分别为 524.08 g 和 6226.25 g·mm, 分别较白鲢鱼

鱼糜提高 89.05%和 95.78%。混合鱼糜凝胶强度的显著提高, 可能因为是 2 种来源不同的蛋白质, 经加热处理后, 破坏了它们的高级结构, 天然构象也随之发生改变, 部分蛋白质结构的重折叠现象暴露出更多的活性巯基和疏水基团, 疏水基团重新组合, 与水分子发生作用, 聚集形成保水的网状结构, 形成的二硫键起到维持稳定的作用, 改善凝胶强度^[21]。谷氨酰胺转氨酶以谷氨酸和赖氨酸残基作为作用底物, 在适宜范围内底物含量越高, 越有利于发生酰胺转移反应, 通过共价交联的方式增强鱼糜凝胶的网络结构及其强度, 有利于维持混合鱼糜凝胶构象的稳定性^[22]。蛋白质所含的半胱氨酸在凝胶化过程中提供共价键, 能够加强蛋白质分子间的聚合作用, 有利于凝胶网络的形成^[23]。

表 1 金线鱼鱼糜与白鲢鱼鱼糜混合鱼糜凝胶氨基酸组成与含量(干基, g/100 g)

Table 1 Amino acid composition and content of mixed surimi gels from *Nemipterus virgatus* and *Silver carp* (dry matter, g/100 g)

氨基酸组成	1:0	0:1	1:1	2:1	3:1	4:1	5:1	6:1	7:1
天冬氨酸	6.53±0.14 ^a	5.87±0.27 ^a	6.37±0.84 ^a	6.59±0.09 ^a	6.63±0.33 ^a	6.49±0.45 ^a	6.50±0.27 ^a	6.49±0.14 ^a	6.20±0.21 ^a
*苏氨酸	3.02±0.06 ^a	2.69±0.11 ^a	2.97±0.31 ^a	3.03±0.04 ^a	3.05±0.15 ^a	2.99±0.20 ^a	3.00±0.12 ^a	2.99±0.07 ^a	2.85±0.10 ^a
丝氨酸	2.62±0.05 ^a	2.37±0.09 ^a	2.58±0.28 ^a	2.62±0.02 ^a	2.65±0.13 ^a	2.60±0.16 ^a	2.60±0.10 ^a	2.60±0.06 ^a	2.47±0.08 ^a
谷氨酸	12.16±0.30 ^a	11.19±0.48 ^a	12.04±1.50 ^a	12.33±0.16 ^a	12.31±0.56 ^a	12.09±0.84 ^a	12.07±0.52 ^a	12.05±0.27 ^a	11.52±0.37 ^a
甘氨酸	2.35±0.10 ^a	2.33±0.07 ^a	2.42±0.21 ^a	2.44±0.02 ^a	2.43±0.13 ^a	2.39±0.15 ^a	2.36±0.11 ^a	2.35±0.03 ^a	2.30±0.07 ^a
丙氨酸	3.67±0.09 ^a	3.22±0.13 ^b	3.60±0.34 ^{ab}	3.74±0.06 ^a	3.70±0.18 ^a	3.62±0.23 ^{ab}	3.63±0.16 ^{ab}	3.63±0.08 ^{ab}	3.51±0.12 ^{ab}
胱氨酸	0.42±0.01 ^{abc}	0.27±0.03 ^c	0.49±0.16 ^{ab}	0.57±0.00 ^a	0.40±0.02 ^{bc}	0.38±0.04 ^{bc}	0.43±0.05 ^{abc}	0.36±0.03 ^{bc}	0.36±0.06 ^{bc}
*缬氨酸	3.29±0.05 ^{ab}	2.91±0.12 ^b	3.30±0.27 ^a	3.40±0.07 ^a	3.32±0.16 ^a	3.24±0.22 ^{ab}	3.26±0.13 ^{ab}	3.26±0.08 ^{ab}	3.15±0.11 ^{ab}
*蛋氨酸	2.09±0.05 ^a	1.77±0.09 ^b	2.03±0.22 ^a	2.13±0.04 ^a	2.12±0.10 ^a	2.07±0.13 ^a	2.08±0.10 ^a	2.06±0.02 ^a	1.99±0.08 ^{ab}
*异亮氨酸	3.18±0.05 ^b	2.76±0.13 ^{ab}	3.15±0.32 ^a	3.20±0.05 ^a	3.21±0.15 ^a	3.13±0.21 ^{ab}	3.14±0.12 ^{ab}	3.16±0.07 ^a	3.01±0.09 ^{ab}
*亮氨酸	5.37±0.09 ^c	4.82±0.22 ^{bc}	5.35±0.52 ^a	5.41±0.08 ^{bc}	5.46±0.27 ^b	5.32±0.36 ^{bc}	5.34±0.21 ^{bc}	5.34±0.14 ^{bc}	5.10±0.17 ^{bc}
酪氨酸	2.36±0.01 ^a	2.20±0.08 ^a	2.29±0.26 ^a	2.35±0.04 ^a	2.44±0.11 ^a	2.35±0.15 ^a	2.39±0.04 ^a	2.37±0.04 ^a	2.29±0.08 ^a
*苯丙氨酸	2.50±0.04 ^a	2.19±0.12 ^a	2.85±0.30 ^a	2.51±0.04 ^a	2.53±0.12 ^a	2.49±0.17 ^a	2.48±0.09 ^a	2.48±0.07 ^a	2.37±0.06 ^a
*赖氨酸	6.18±0.14 ^a	5.69±0.27 ^a	6.29±0.55 ^a	6.28±0.09 ^a	6.33±0.31 ^a	6.17±0.41 ^a	6.20±0.26 ^a	6.16±0.15 ^a	5.89±0.20 ^a
*组氨酸	1.40±0.02 ^a	1.22±0.06 ^b	1.40±0.09 ^a	1.39±0.02 ^a	1.44±0.05 ^a	1.40±0.12 ^a	1.41±0.07 ^a	1.40±0.06 ^a	1.32±0.03 ^{ab}
*精氨酸	4.14±0.07 ^b	3.68±0.18 ^{bc}	4.08±0.39 ^{bc}	4.15±0.08 ^{bc}	4.29±0.18 ^a	4.15±0.30 ^{bc}	4.16±0.21 ^{bc}	4.19±0.17 ^{bc}	3.99±0.14 ^{bc}
脯氨酸	2.13±0.02 ^a	1.99±0.08 ^a	2.19±0.20 ^a	2.14±0.09 ^a	2.13±0.05 ^a	2.14±0.10 ^a	2.11±0.05 ^a	2.08±0.03 ^a	2.07±0.05 ^a
HOAA	22.23±0.90 ^a	19.67±0.38 ^b	22.47±1.56 ^a	22.54±0.44 ^a	22.47±0.69 ^a	22.01±0.47 ^a	22.04±0.86 ^a	22.00±1.43 ^a	21.20±1.03 ^{ab}
HIAA	10.78±0.39 ^a	9.86±0.21 ^a	10.75±0.90 ^a	11.01±0.13 ^a	10.96±0.38 ^a	10.70±0.16 ^a	10.78±0.42 ^a	10.67±0.71 ^a	10.27±0.53 ^a
BAA	11.73±0.51 ^{ab}	10.59±0.22 ^b	11.77±1.04 ^{ab}	11.82±0.19 ^{ab}	12.07±0.37 ^a	11.72±0.38 ^{ab}	11.77±0.55 ^{ab}	11.74±0.83 ^{ab}	11.20±0.54 ^{ab}
AAA	18.69±0.75 ^a	17.06±0.44 ^a	18.41±2.34 ^a	18.92±0.25 ^a	18.94±0.58 ^a	18.58±0.40 ^a	18.57±0.79 ^a	18.54±1.29 ^a	17.72±0.89 ^a

注: AA 为氨基酸, *为必需氨基酸, HOAA 为疏水性氨基酸总量, HIAA 为亲水性氨基酸总量, BAA 为碱性氨基酸总量, AAA 为酸性氨基酸总量; 在相同的参数下, 同一指标中字母不同表示显著差异($P<0.05$)。

表 2 金线鱼鱼糜与白鲢鱼鱼糜混合鱼糜 DSC 参数的变化
Table 2 Changes of the parameters describing the DSC characteristics of mixed surimi gels from *Nemipterus virgatus* and *Silver carp*

N: S	峰 1		峰 2		峰 3	
	$T_{\max 1}/^{\circ}\text{C}$	$\Delta H_1/(\text{J/g})$	$T_{\max 2}/^{\circ}\text{C}$	$\Delta H_2/(\text{J/g})$	$T_{\max 3}/^{\circ}\text{C}$	$\Delta H_3/(\text{J/g})$
1:0	46.86	0.194	67.38	0.100	77.73	-0.032
0:1	43.40	0.175	67.82	0.076	73.81	-0.031
1:1	44.26	0.152	67.65	0.151	74.14	-0.006
2:1	45.30	0.176	67.94	0.083	76.41	-0.009
3:1	46.09	0.227	66.98	0.087	78.20	-0.026
4:1	47.03	0.231	68.84	0.074	80.30	-0.020
5:1	46.21	0.211	67.05	0.114	77.75	-0.011
6:1	46.38	0.197	66.21	0.129	77.21	-0.027
7:1	46.29	0.198	65.60	0.104	76.10	-0.023

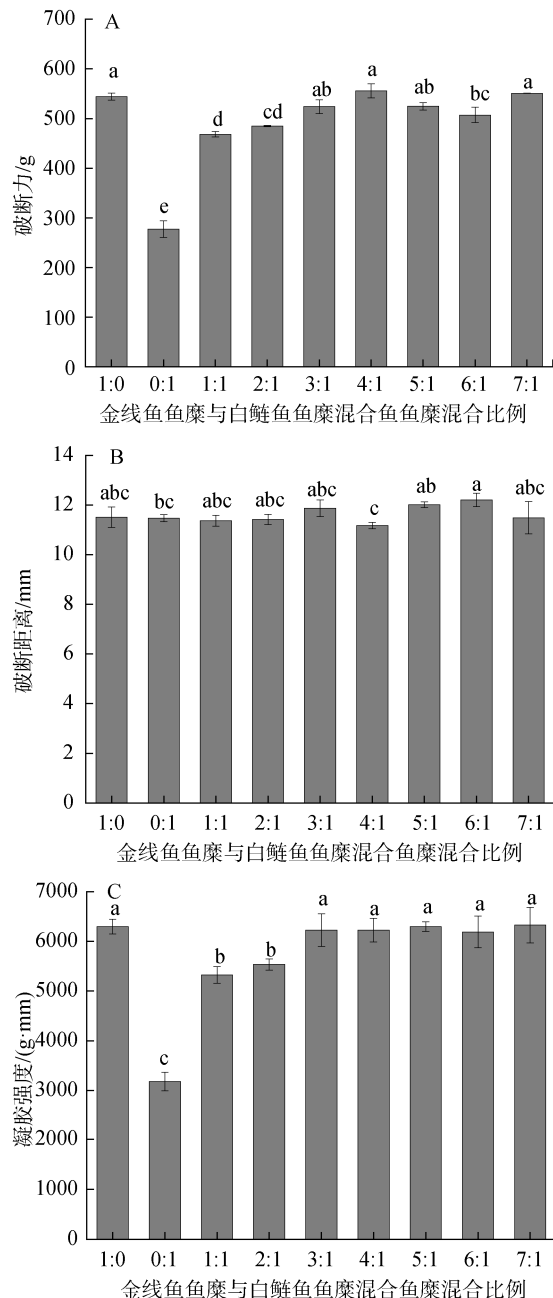
注: N 和 S 分别代表金线鱼鱼糜和白鲢鱼鱼糜。

3.4 混合鱼糜凝胶拉曼光谱的分析

酰胺 I 带(amide I)和酰胺 III 带(amide III)作为较容易指认的谱峰,在金线鱼鱼糜与白鲢鱼鱼糜组成的混合鱼糜中,可作为蛋白质构象的主要特征峰。Amide I ($1645\sim 1685\text{ cm}^{-1}$)主要来源于 C=O 伸缩振动,还包括部分 C-N 伸缩振动和 N-H 弯曲振动,蛋白质二级结构在此区域特别敏感,可以反映蛋白质的二级结构随着混合鱼糜过程的变化;Amide III($1220\sim 1350\text{ cm}^{-1}$)表示 C-N 伸缩振动、C-C 伸缩振动和 N-H 弯曲振动,能够反映肌球蛋白的构象。拉曼光谱图中,选择苯丙氨酸和 CH_2 弯曲振动作为研究蛋白质的标准峰,位置分别在 1003 cm^{-1} 和 1450 cm^{-1} 。酪氨酸在 830 cm^{-1} 和 850 cm^{-1} 处形成共振双峰,双偶带(I_{850}/I_{830})的强度比用来反映酪氨酸残基的微环境^[24]。

由图 2 可知,混合鱼糜凝胶的二级结构中, α -螺旋结构含量高于 44%,含量介于两空白组之间;且随金线鱼鱼糜含量的增加,混合鱼糜凝胶的 α -螺旋占比先下降后趋于稳定, β -转角和 β -折叠结构呈逐渐增加的趋势,同时,无规则卷曲结构无明显变化。随着金线鱼鱼糜含量的增加, I_{850}/I_{830} 比值先增加后降低,数值范围在 0.92~1.26 之间。由图 2 可知,当金线鱼鱼糜与白鲢鱼鱼糜混合比例为 3:1(质量比)时, I_{850}/I_{830} 比值最高。 β -折叠和 β -转角结构含量的增加,会促进混合鱼糜凝胶形成有序的三维结构, α -螺旋结构的减少,可能是由于不同来源的蛋白质相互作用,破坏了蛋白质原有的构象,金线鱼鱼糜和白鲢鱼鱼糜中的蛋白质分子之间重新组合,产生高分子量的聚合物,相邻肽链主链的 N-H 和 C=O 之间形成有规则的氢键,一定程度上提高了 β -折叠结构含量。混合鱼糜的凝胶特性和持水能力也会随之增强^[25,26]。当两者比值 < 1 时,表示该酪氨酸被包埋;当 I_{850}/I_{830} 的比值 ≥ 1 时,氢键被破坏,在水相中出现更多

的酪氨酸残基,也就是暴露在蛋白质的表面,凝胶的表面疏水性增强,提高了混合鱼糜凝胶固定水分的能力,促进蛋白质分子和水分子的聚集作用,诱导 α -螺旋结构转化为 β -折叠和 β -转角^[27]。从而增强金线鱼鱼糜和白鲢鱼鱼糜之间的协同作用,促进了混合鱼糜凝胶蛋白质构象的稳定。



注: 破裂强度(A)、破裂距离(B)和凝胶强度(C)。在相同的参数下,同一指标中字母不同表示显著差异($P < 0.05$)。

图 1 金线鱼鱼糜与白鲢鱼鱼糜混合鱼糜作用力的变化($n=10$)
Fig.1 Changes of force mixed surimi gels from *Nemipterus virgatus* and *Silver carp* ($n=10$)

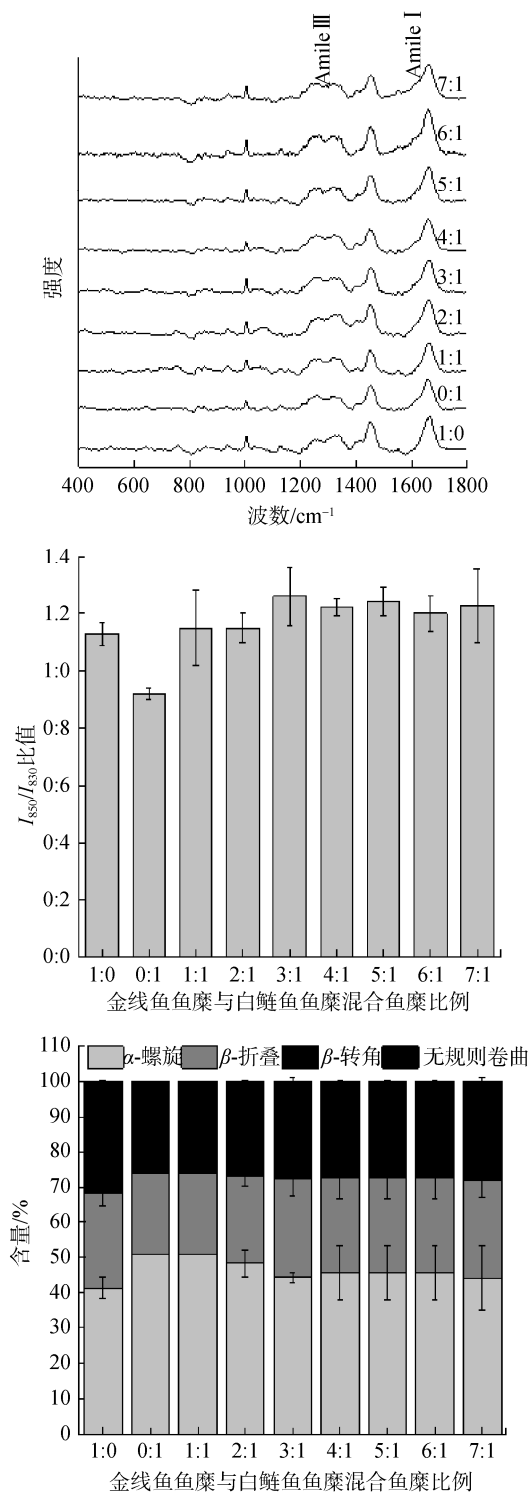


图 2 混合鱼糜凝胶拉曼光谱、拉曼光谱 I_{850}/I_{830} 含量和凝胶二级结构的变化($n=3$)

Fig.2 Changes of Raman spectra, Raman spectra I_{850}/I_{830} content and secondary structure fractions of mixed surimi gels from *Nemipterus virgatus* and *Silver carp* ($n=3$)

3.5 混合鱼糜凝胶化学作用力的分析

由图 3 可知, 随金线鱼鱼糜含量的上升, 混合鱼糜凝

胶的非特异性关联、离子键和氢键含量先逐渐降低后趋于平缓, 2 种鱼糜混合可能影响了相邻蛋白分子中正负电荷氨基酸的结合, 故呈现图 3 的现象; 当 $N:S < 5:1$ 时, 二硫键呈增加的趋势, 说明不同来源的蛋白质分子间, 其作用力存在不同的形成程度, 且在一定范围内, 金线鱼鱼糜与白鲢鱼鱼糜之间有一定的协同作用。但超过一定比例范围, 混合体系达到一种近似饱和的状态, 化学作用力的变化不显著。混合鱼糜体系中, 蛋白质来源不同, 2 种蛋白质之间以及同种蛋白质之间的非共价相互作用减弱, 就能解释非特异性关联作用、离子键和氢键含量降低的现象^[28], 与图 2 变化趋势一致。混合鱼糜凝胶中二硫键含量的增加, 尤其当 $N:S=7:1$ 时, 一方面因为金线鱼鱼糜为白鲢鱼鱼糜提供了更多的胱氨酸, 当混合鱼糜经过加热处理, 混合鱼糜中的蛋白质发生变性, 使得半胱氨酸残基暴露在环境中^[29], 为二硫键的形成打下基础; 另一方面由于混合体系中肌球蛋白含量增多, 加热过程中, 随着温度升高, 蛋白质变性, 暴露出极性基团, 特别是肌球蛋白疏水基团^[30], 有利于蛋白质分子之间的聚集和交联。

3.6 混合鱼糜凝胶 SDS-PAGE 的分析

由图 4 可知, 混合鱼糜凝胶网络结构的关键蛋白主要是肌球蛋白, 其重链可以通过共价键和非共价键进行交联, 促进鱼糜凝胶的形成^[24], 含量与凝胶网络的质量成正比。当大于 3:1 时, 各组几乎没有变化(2:1 电泳图谱也没有变化)。与表 1 结果一致, 混合鱼糜凝胶中的赖氨酸和谷氨酸的含量增大, TG 酶作用底物增多, 凝胶性较强。蛋白质的种类(肌球蛋白重链、副肌球蛋白、肌动蛋白和原肌球蛋白)和相对含量能够影响蛋白质分子间相互作用发生变化^[31], 促进鱼糜蛋白的变性和热聚集行为以及凝胶结构的形成。

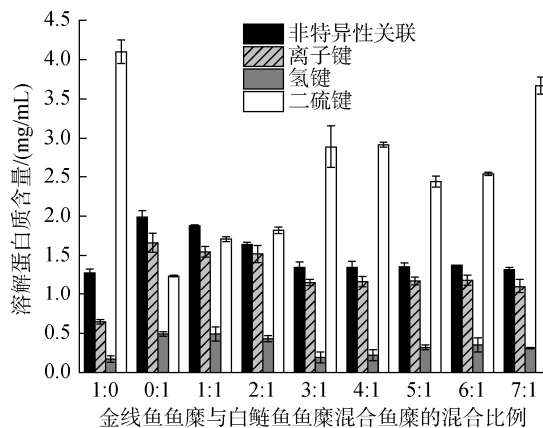
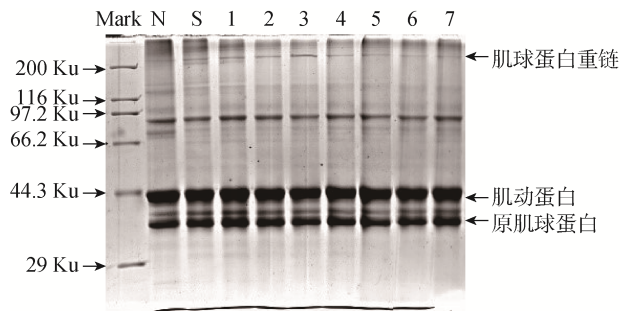


图 3 混合鱼糜凝胶化学作用力的变化($n=3$)

Fig.3 Changes of chemical forces of mixed surimi gels ($n=3$)



注: 1~7 分别表示 N: S=1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1。

图 4 金线鱼鱼糜与白鲢鱼鱼糜混合鱼糜凝胶 SDS-PAGE 图

Fig.4 Changes of SDS-PAGE pattern of mixed surimi gels from *Nemipterus virgatus* and *Silver carp*

3.7 混合鱼糜凝胶氨基酸组成与凝胶强度的关系

将混合鱼糜凝胶的氨基酸组成与凝胶强度的指标进行相关性分析, 可以找出混合鱼糜凝胶中氨基酸对凝胶强

度的联系, 为研究凝胶性质差异提供理论基础。由表 3 可知, 蛋氨酸与凝胶强度高度相关($P<0.01$); 丙氨酸、异亮氨酸、组氨酸、精氨酸和疏水性氨基酸总量与凝胶强度显著性相关($P<0.05$), 由此可见, 疏水性氨基酸对混合鱼糜凝胶强度的贡献不容忽视; 其余氨基酸与凝胶强度之间不具有相关性。

3.8 混合鱼糜凝胶氨基酸组成与化学作用力的关系

将混合鱼糜凝胶的氨基酸组成与化学作用力的指标进行相关性分析, 如表 4 所示。混合鱼糜凝胶中的蛋氨酸、酪氨酸、组氨酸和精氨酸与非特异性关联、氢键呈显著性负相关($P<0.05$), 表明 2 种鱼糜凝胶基质发生相互作用, 在一定程度上可以证明两者发挥协同作用, 在混合鱼糜凝胶强度的增强过程中, 其他化学作用力的贡献较大; 氨基酸组成与离子键呈不显著负相关($P>0.05$), 与二硫键呈不相关($P>0.05$)。

表 3 氨基酸与凝胶强度的相关性分析
Table 3 Results of correlation analysis on amino acid and gel strength

	丙氨酸(Ala)	蛋氨酸(Met)	异亮氨酸(Ile)	组氨酸(His)	精氨酸(Arg)	疏水性氨基酸(HOAA)	凝胶强度
Ala	1						
Met	0.992**	1					
Ile	0.991**	0.982**	1				
His	0.948**	0.942**	0.966**	1			
Arg	0.964**	0.955**	0.972**	0.973**	1		
HOAA	0.977**	0.964**	0.987**	0.966**	0.946**	1	
凝胶强度	0.534*	0.621**	0.541*	0.560*	0.533*	0.506*	1

注: *代表 $P<0.05$, **代表 $P<0.01$ 。

表 4 氨基酸与化学作用力的相关性分析
Table 4 Results of correlation analysis on amino acid and chemical forces

	Met	Tyr	His	Arg	非特异性关联	离子键	氢键	二硫键
Met	1							
Tyr	0.877**	1						
His	0.942**	0.863**	1					
Arg	0.955**	0.927**	0.973**	1				
非特异性关联	-0.533*	-0.491*	-0.481*	-0.514*	1			
离子键	-0.399	-0.372	-0.366	-0.358	0.852**	1		
氢键	-0.516*	-0.540*	-0.495*	-0.526*	0.858**	0.836**	1	
二硫键	0.358	0.277	0.300	0.311	-0.858**	-0.935**	-0.824**	1

注: *代表 $P<0.05$, **代表 $P<0.01$ 。

3.9 混合鱼糜凝胶强度与化学作用力和蛋白质二级结构的关系

将混合鱼糜凝胶的凝胶强度与化学作用力和蛋白质二级结构的指标进行相关性分析, 如表 5 所示。混合鱼糜凝胶强度与非特异性关联、离子键、氢键和 α -螺旋结构呈

极显著性负相关($P<0.01$), 混合鱼糜凝胶强度与 β -折叠结构和二硫键呈极显著性正相关($P<0.01$), 表明当 2 种鱼糜凝胶基质相互作用, 使得混合鱼糜凝胶强度增强, 其中其他化学作用力的贡献比非特异性关联和氢键大; 凝胶强度与 β -转角和无规则卷曲呈不相关($P>0.05$)。

表 5 凝胶强度与化学作用力和蛋白质二级结构的相关性分析
Table 5 Results of correlation analysis on gel strength, chemical forces and secondary structure

	凝胶强度	非特异性关联	离子键	氢键	二硫键	α -螺旋	β -折叠	β -转角	无规则卷曲
凝胶强度	1								
非特异性关联	-0.848**	1							
离子键	-0.698**	0.852**	1						
氢键	-0.646**	0.858**	0.836**	1					
二硫键	0.710**	-0.858**	-0.935**	-0.824**	1				
α -螺旋	-0.626**	0.833**	0.816**	0.785**	-0.842**	1			
β -折叠	0.640**	-0.828**	-0.626**	-0.724**	0.707**	-0.919**	1		
β -转角	0.395	-0.603**	-0.829**	-0.660**	0.794**	-0.843**	0.586*	1	
无规则卷曲	0.429	-0.519*	-0.753**	-0.589*	0.699**	-0.702**	0.415	0.831**	1

注: *代表 $P<0.05$, **代表 $P<0.01$ 。

4 结论

将金线鱼鱼糜与鲢鱼鱼糜混合, 在一定范围内, 天冬氨酸和酪氨酸含量增加, 热稳定性增强, α -螺旋结构减少, β -折叠和 β -转角结构含量增加, 二硫键增加, 重链肌球蛋白聚集。当金线鱼鱼糜和鲢鱼鱼糜比例为 3:1 时, 凝胶强度增效显著。

参考文献

- [1] Quan TH, Benjakul S. Impact of salted duck egg albumen powder on proteolysis and gelling properties of sardine surimi [J]. J Texture Stud, 2019, 50(5): 434-442.
- [2] 王玉林. 淡水鱼鱼糜凝胶特性及凝胶形成过程中肌原纤维蛋白变化的研究[D]. 广州: 广东药科大学, 2019.
Wang YL. The gel properties of freshwater fish surimi gel and the changes of myofibrillar protein during gel formation [D]. Guangzhou: Guangdong Pharmaceutical University, 2019.
- [3] Liu HM, Gao LL, Ren YX, et al. Chemical interactions and protein conformation changes during *Silver carp* (*Hypophthalmichthys molitrix*) surimi gel formation [J]. Int J Food Prop, 2014, 17(8): 1702-1713.
- [4] Yi SM, Huo Y, Qiao CP, et al. Synergistic gelation effects in surimi mixtures composed of *Nemipterus virgatus* and *Hypophthalmichthys molitrix* [J]. J Food Sci, 2019, 84(12): 3634-3641.
- [5] 农业部渔业局. 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2020.
The People's Republic of China Ministry of Agriculture, Fisheries Bureau. China fishery statistical yearbook [M]. Beijing: China Agriculture press, 2020.
- [6] 徐文鑫. 罗非鱼复合鱼糜加工工艺的研究[J]. 农业工程技术, 2016, 36(5): 24-25.
Xu WX. Study on the processing technology of *Tilapia* mixed surimi [J]. Agric Eng Technol, 2016, 36(5): 24-25.
- [7] 郭培, 李川, 申铤日, 等. 金鲳鱼肉和罗非鱼皮明胶改善罗非鱼碎肉鱼糜品质[J]. 农业工程学报, 2016, 32(S2): 406-411.
Guo P, Li C, Shen XR, et al. Golden pompano fish and tilapia fish skin gelatin improving quality of tilapia surimi [J] Chin Soc Agric Eng, 2016, 32(S2): 406-411.
- [8] 仪淑敏, 姬颖, 姜天舒, 等. 鲢鱼鱼肉与白鲢鱼鱼糜混合热聚集行为分析[J/OL]. 食品工业科技, 2020, 14: 8-14.
Yi SM, Ji Y, Jiang TS, et al. Thermal aggregation behavior of blended anchovy (*Engraulis japonicus*) mince and *Silver carp* (*Hypophthalmichthys*

- molitrix*) surimi [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2020, 14: 8–14.
- [9] Abdollahi M, Rezaei M, Jafarpour A, *et al.* Dynamic rheological, microstructural and physicochemical properties of blend fish protein recovered from kilka (*Clupeonella cultriventris*) and silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) by the pH-shift process or washing-based technology [J]. *Food Chem*, 2017, 229: 695–709.
- [10] Poowakanjana S, Mayer SG, Park JW. Optimum chopping conditions for alaska pollock, pacific whiting, and threadfin bream surimi paste and gel based on rheological and Raman spectroscopic analysis [J]. *J Food Sci*, 2012, 77(4): E88–E97.
- [11] Shumin Y, Ying J, Zhihan G, *et al.* Gel properties and flavor characteristics of blended anchovy (*Engraulis japonicus*) mince and silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) surimi [J]. *RSC Adv*, 2020, 10: 6563–6570.
- [12] Mabrey S, Sturtevant JM. Investigation of phase transitions of lipids and lipid mixtures by sensitivity differential scanning calorimetry [J]. *Proc Nat Acad Sci U.S.A.*, 1976, 73(11): 3862–3866.
- [13] Alix AJP, Pedanou G, Berjot M. Fast determination of the quantitative secondary structure of proteins by using some parameters of the Raman amide band [J]. *J Mol Struct*, 1988, 174: 159–164.
- [14] Hashimoto K, Watabe S, Kono M, *et al.* Muscle protein composition of sardine and mackerel [J]. *Bull Jap Soc Sci Fish*, 1979, 45(11): 1435–1441.
- [15] Gómez-Guillén MC, Borderías AJ, Montero P. Chemical interactions of nonmuscle proteins in the network of sardine (*Sardina pilchardus*) muscle gels [J]. *LWT—Food Sci Technol*, 1997, 30(6): 602–608.
- [16] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. *Nature*, 1970, 227(5259): 680–685.
- [17] 魏润平, 张泽峰, 王晶, 等. 美国鲟鱼肌肉营养成分分析[J]. *饲料与畜牧*, 2017, 17: 36–39.
- Wei RP, Zhang ZF, Wang J, *et al.* Analysis of muscle nutrients of American shad [J]. *Anim Husbandry Feed Sci*, 2017, 17: 36–39.
- [18] 邵颖. 食品生物化学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2015.
- Shao Y. *Food biochemistry* [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2015.
- [19] 贾丹. 青鱼肌肉蛋白质及其凝胶特性的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2016.
- Jia D. Study on protein and gelation properties of surimi from black carp [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2016.
- [20] 李艳青. 蛋白质氧化对鲤鱼蛋白结构和功能性的影响及其控制技术[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2016.
- Li YQ. Protein oxidation-induced structure and function changes of common carp (*Cyprinus carpio*) protein and its control technology [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2016.
- [21] Abdollahi M, Rezaei M, Jafarpour A, *et al.* Dynamic rheological, microstructural and physicochemical properties of blend fish protein recovered from kilka (*Clupeonella cultriventris*) and silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) by the pH-shift process or washing-based technology [J]. *Food Chem*, 2017, 229: 695–709.
- [22] Feng L, Lin L, He TH, *et al.* Effect of transglutaminase on gel properties of surimi and precocious Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) meat [J]. *Food Hydrocolloid*, 2020, 98: 105–261.
- [23] 钱璟, 王春光, 戚正武. 毒液中富含半胱氨酸分泌蛋白的研究进展[J]. *生命科学研究*, 2006, (4): 283–290.
- Qian J, Wang CG, Qi ZW. Research progress on cysteine-rich secretory proteins in venom [J]. *Life Sci Res*, 2006, (4): 283–290.
- [24] 于加美, 高瑞昌, 石彤, 等. 高脱乙酰度魔芋葡甘聚糖对鲢鱼鱼糜凝胶特性的影响[J]. *现代食品科技*, 2019, 35(8): 48–54.
- Yu JM, Gao RC, Shi T, *et al.* Effects of konjac glucomannan with high degree of deacetylation on the gelling properties of silver carp surimi [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2019, (358): 48–54.
- [25] 韩敏义. 肌原纤维蛋白结构与热诱导凝胶功能特性关系研究—低场 NMR 和拉曼光谱法[D]. 南京: 南京农业大学, 2009.
- Han MY. Study on relationship between the pork myofibrillar protein structure and its functionality of heat-induced gelation by low field NMR and Raman spectroscopy [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2009.
- [26] Beattie RJ, Bell SJ, Farmer LJ, *et al.* Preliminary investigation of the application of Raman spectroscopy to the prediction of the sensory quality of beef silverside [J]. *Meat Sci*, 2004, 66(4): 903–913.
- [27] Cortés-Ruiz JA, Pacheco-Aguilar R, Ramírez-Suárez JC, *et al.* Conformational changes in proteins recovered from jumbo squid (*Dosidicus gigas*) muscle through pH shift washing treatments [J]. *Food Chem*, 2016, 196: 769–775.
- [28] Jia D, Huang QL, Xiong SB. Chemical interactions and gel properties of black carp actomyosin affected by MTGase and their relationships [J]. *Food Chem*, 2016, 196: 1180–1187.
- [29] Kristo E, Corredig M. Functional properties of food proteins [M]. Hoboken: John Wiley & Sons, Ltd, 2015.

[30] Mi HB, Wang C, Su Q, *et al.* The effect of modified starches on the gel properties and protein conformation of *Nemipterus virgatus* surimi [J]. *J Texture Stud*, 2019, 50(6): 571–581.

[31] 周茹, 倪渠峰, 林伟伟, 等. 肌原纤维蛋白溶解度对盐离子浓度的依赖性[J]. *中国食品学报*, 2015, 15(3): 32–39.

Zhou R, Ni QF, Li WW, *et al.* The dependency of the Myofibrils Solubility on the ion concentration [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2015, 15(3): 32–39.

(责任编辑: 王 欣)

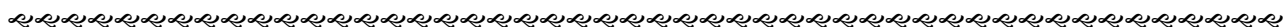
作者简介



于传龙, 硕士研究生, 主要研究方向为食品加工与安全。
E-mail: yuchuanlongvip@163.com



王 隼, 实验师, 主要研究方向为食品加工与质量安全控制。
E-mail: ww11812002@163.com



“果蔬加工和质量安全控制”专题征稿函

我国是果蔬生产大国, 水果蔬菜的总产量在世界名列前茅, 果蔬产品也成为我国较好的经济来源之一。蔬菜、水果等农产品的质量越来越受到全社会关注, 在生产阶段和加工、包装、储运等采后阶段进行质量安全风险控制显得越来越必要和紧迫。

鉴于此, 本刊特别策划了“果蔬加工和质量安全控制”专题, 由**郑州轻工业学院纵伟教授**担任专题主编。专题将围绕**(1)果蔬加工过程质量安全识别控制; (2)果蔬生产过程质量安全溯源控制; (3)果蔬产后处理与贮运过程质量安全控制**。或您认为本领域有意义的问题综述及研究论文均可, 专题计划在 2020 年 12 月出版。

本刊主编**国家风险评估中心吴永宁研究员**与**专题主编纵伟教授**及**编辑部全体成员**特邀请有关食品领域研究人员为本专题撰写稿件, 综述、研究论文和研究简报均可。请在 2020 年 11 月 30 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。

同时烦请您帮忙在同事之间转发一下, 希望您能够推荐该领域的相关专家并提供电话和 E-mail。再次感谢您的关怀与支持!

投稿方式(注明专题**果蔬加工和质量安全控制**):

网站: www.chinafoodj.com(备注: 投稿请登录食品安全质量检测学报主页-作者

登录-注册投稿-投稿栏目选择“2020 专题: **果蔬加工和质量安全控制**”)

邮箱投稿: E-mail: jfoodsq@126.com(备注: **果蔬加工和质量安全控制**专题投稿)

《食品安全质量检测学报》编辑部