



TG 酶催化过程中鲢肌原纤维蛋白凝胶性能的变化

冯倩¹, 裴诺¹, 孙洁¹, 姜昕¹,
苗思葳¹, 姜晴晴¹, 施文正^{1,2*}

(1. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306;

2. 国家淡水水产品加工技术研发分中心(上海), 上海 201306)

摘要: 为探究转谷氨酰胺酶(TG 酶)催化过程中, 鲢肌原纤维蛋白凝胶性能的变化, 进一步提升鲢鱼糜制品特性和营养价值。对不同催化时间(0、15、30、60 min)后鲢肌原纤维蛋白凝胶的交联度、凝胶强度、白度、持水性、微观结构及消化特性变化进行了分析。结果显示, TG 酶诱导蛋白胶凝后, 蛋白凝胶交联度显著提高。在 TG 酶催化过程中, 随交联时间的延长, 白度值增加、持水性提高。通过扫描电镜分析, 发现凝胶网络孔径变小, 结构变得更加致密。在催化时间 30 min 下, 交联度、白度值及持水力显著提高, 弛豫时间 T_{22} 显著减小。TG 酶催化后的蛋白凝胶在消化初始阶段水解程度较低, 因为交联度提升, 蛋白网络结构越来越致密, 降低了胃蛋白酶对其水解位点的可及性。蛋白消化 90 min 后, 网络遭到破坏, 导致其水解速率明显提高。研究表明, 在适当的交联时间下, 有助于提升蛋白凝胶的凝胶特性。该研究为 TG 酶对鱼肉制品品质及消化特性的改善提供了实验依据。

关键词: 鲢; 转谷氨酰胺酶; 肌原纤维蛋白; 体外消化; 凝胶

中图分类号: TS 254.4

文献标志码: A

近年来, 随着生产生活需求的提高, 中国作为水产养殖大国, 其淡水鱼生产加工量也随之增加, 鱼糜制品作为精深加工产物, 生产量及消费量逐渐增长, 2019 年国内生产总量达 139.40 万 t^[1]。鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*) 价格低廉、产量大, 但由于内源性蛋白酶的存在, 会导致凝胶强度低、质构特性差等问题, 鱼肉利用率不高, 所以提高生产价值, 促进其高值化利用成为研究热点。

在生产中通过添加转谷氨酰胺酶(transglutaminase, TG 酶)来提高其凝胶特性, 改善其质构, 达到生产要求, 以符合消费者的需求^[2-4]。TG 酶在参与催化蛋白交联反应时, 将酶肽链上谷氨酰胺残基的 γ -酰基与赖氨酸上的 ϵ -氨基、伯氨基和

水发生交联, 从而提高鱼糜制品破断力、硬度、持水力等^[5-7]。从而 TG 酶可取代一些传统的食品添加剂, 如淀粉、磷酸盐等。

但有文献报道, 随着鱼糜交联度的增加, 其消化率呈现下降的趋势, 出现难以消化的现象^[8]。目前针对 TG 酶导致的鱼糜肌原纤维蛋白凝胶特性增加的文献报道较多, 而相对于 TG 酶对鱼糜消化特性的研究较少, 其作用机制尚不明确。Fang 等^[9]证实, 添加 TG 酶后, 凝胶强度提升导致鱼糜网络结构变得致密, 消化位点变少, 胃蛋白酶水解速率降低。Glusac 等^[10]对鹰嘴豆的相关研究也证实了上述结论。模拟体外消化过程中, 食品首先经过口腔咀嚼, 经食物淀粉酶初步消化

收稿日期: 2021-04-21 修回日期: 2021-06-03

资助项目: 国家重点研发计划(2019YFD0902003)

第一作者: 冯倩(照片), 从事水产品加工研究, E-mail: 18361206059@163.com

通信作者: 施文正, 从事水产品加工与风味研究, E-mail: wzshi@shou.edu.cn



后进入胃部。在胃部的酸性环境 (pH 1~5) 中, 食物在胃蛋白酶等酶解作用下, 消化 15~240 min 后进入肠道, 经蠕动消化、吸收^[1]。在鱼糜制品凝胶化的过程中, 肌原纤维蛋白是关键蛋白, 探究 TG 酶催化过程中肌原纤维蛋白凝胶体外消化的变化规律十分重要。

本实验选取交联度、凝胶强度、白度、持水性、微观结构等指标对鲢肌原纤维蛋白凝胶进行表征, 探究 TG 酶催化过程中, 不同交联程度的凝胶消化率的变化。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

实验鱼体质量约为 3 kg, 体长约为 55 cm, 2020 年 10—12 月购于上海市浦东新区临港农工商超市。TG 酶购于江苏一鸣精细化工有限公司。其余试剂均为分析纯。

1.2 实验仪器

日立 SU5000 热场发射扫描电镜, 日立高新技术 (上海) 国际贸易有限公司; UV-1800PC 紫外分光光度仪, 上海梅普达仪器有限公司; MesoMR23-060H-I 纽迈脉冲核磁共振分析仪, 上海纽迈电子科技有限公司; THZ-300 恒温培养摇床, 上海一恒科技有限公司; CR-400 色差计, 日本 Minolta 公司; H-2050R 型高速冷冻离心机, 长沙湘仪有限公司。

1.3 实验方法

肌原纤维蛋白的提取 参考尹艺霖^[2]的方法并稍加改动。取鲢背部肌肉, 去除可见的红肉、结缔组织等, 切碎后, 加入 10 倍体积的预冷缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl、0.1 mol/L NaCl、2 mmol/L MgCl₂、1 mmol/L EDTA, pH 7.0), 冰浴均质 60 s, 分为 3 次, 每次 20 s。静置 15 min 后, 匀浆液在 4 °C 条件下 4 000 r/min 离心 15 min, 去除上清液, 保留沉淀, 重复以上步骤 3 次。沉淀中加入 3 倍体积的高盐缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, 0.6 mol/L NaCl, pH 7.0), 冰浴均质后, 4 °C 静置过夜, 10 000 r/min 离心 15 min, 去除沉淀, 保留上清液。在上清液中加入 10 倍体积的预冷水, 4 °C 静置 22 h, 匀浆液 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 离心 2 次, 保留沉淀。所得膏状沉淀即为肌原纤维蛋白。肌原纤维蛋白含量采用考马斯亮蓝

法测定, 以牛血清白蛋白作为标准蛋白。

凝胶的制备 参考黄莉等^[3]的方法, 并稍加改动。将肌原纤维蛋白用蛋白缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, 0.6 mol/L NaCl, pH 7.0) 配制成 40 mg/mL 的溶液, 添加 TG 酶 (15 U/g 蛋白), 并冰浴磁力搅拌 2 h, 混合均匀。采用二段式加热, 先在 45 °C 水浴锅中分别加热 0、15、30、60 min 后取出, 再置于 90 °C 加热 15 min, 立即静置于冰水中 30 min, 4 °C 下过夜, 待测。制备好的凝胶在每次分析前须回温到室温 (25 °C)。

交联度的测定 参考 Yang 等^[4]的方法并稍加改动。取 2 g 蛋白凝胶分散于 18 mL 0.125 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 8.2) 中, 分段加热 (60 °C 2 h, 75 °C 15 min) 后过滤, 保留上清液。取上清液 200 μL, 加入 4 mL 邻苯二甲醛 (OPA) 试剂, 37 °C 反应 2 min 后, 在 340 nm 处测定吸光度。相同条件下的缓冲液作为空白对照代替蛋白溶液。根据 L-亮氨酸标准曲线计算游离氨基的含量。OPA 试剂配制: 取 40 mg OPA 溶于 1 mL 无水甲醇后, 加入 25 mL 0.1 mol/L 硼砂、2.5 mL 20% (W/W) SDS 和 100 μL β-巯基乙醇, 用去离子水定容至 50 mL。现配现用。交联度计算公式:

$$\text{交联度}(\%) = \frac{C_0 - C}{C} \times 100\%$$

式中, C_0 为蛋白溶液的游离氨基含量, mmol/L; C 为凝胶样品的游离氨基含量, mmol/L。

凝胶强度的测定 将凝胶室温平衡 1 h 后, 进行蛋白凝胶强度测定。蛋白凝胶强度定义为探头穿刺至 4 mm 时的力值, g。用 TA.XT-plus 质构仪进行凝胶强度的测试。采用 P/0.5 的探头穿刺样品, 参数设置: 测试前速度为 1.5 mm/s, 测试速度为 1.0 mm/s, 测试后速度为 1.0 mm/s, 触发力为 3 g, 穿透距离为 15 mm。每组样品重复测定 6 次。

凝胶白度值的测定 使用白度仪测定凝胶亮度 L^* 值、红度 a^* 值和黄度 b^* 值。白度值 W 计算公式:

$$\text{白度值}(W) = \sqrt{(100 - L^*)^2 + (a^*)^2 + (b^*)^2}$$

蒸煮损失的测定 在加热过程中, 用一小团棉花吸去从凝胶中挤出的水分。蒸煮损失计算公式:

$$\text{蒸煮损失}(\%) = \frac{W_w}{W_0} \times 100\%$$

式中, W_w 为从凝胶中挤出的水分质量, g; W_0 为凝胶样品的初始质量, g。

持水力 将熟凝胶进行冷冻离心, 800 r/min 离心 10 min。被离心力挤压出来的水用一小团棉花吸去, 将离心前后凝胶的质量进行比较。持水力计算公式:

$$\text{持水力}(\%) = \frac{W_a}{W_b} \times 100\%$$

式中, W_a 为离心后的凝胶质量, g; W_b 为离心前的凝胶质量, g。

磁场核磁共振分析水分状态及成像 参照李双等^[15]的实验方法, 并加以修改。将蛋白凝胶置于玻璃纸上, 放置 1 h, 使凝胶温度达到室温后, 擦去表面水分进行测定。利用 CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) 脉冲序列测定样品横向弛豫时间 T_2 。脉冲序列参数: 采样频率 SW=200 kHz, 模拟增益 RG1=10, P1=20.00 μ s, 数字增益 DRG1=3, TD=480 160, PRG=1, 重复采样间隔时间 TW=2 500 ms, 累加次数 NS=8, P2=39.04 μ s, 回波时间 TE=0.3 ms, 回波个数 NECH=8 000。

每个样品用磁共振成像软件中的多层回旋波序列来实现。将凝胶样品放于永磁场中心位置的射频线圈的中心进行信号采集。成像参数设置: 采样频率 SW=100 kHz, 主频 SF=21 MHz, RFD=0.002 ms, RG1=20.0 db, 偏移频率 O1=171 543.05 Hz, 90°脉冲宽度 P1=19.00 μ s, 180°脉冲宽度 P2=39.04 μ s, 90°脉冲幅度 RFA1=0.3%, 180°脉冲幅度 RFA2=0.4%, 重复采样间隔时间 TW=1 500 ms。

扫描电镜 根据 Fang 等^[9]的方法, 并加以修改。取蛋白凝胶, 放入 2.5% 戊二醛溶液, 4 °C 浸泡固定 24 h。固定后的样品放置于 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 中漂洗 3 次, 每次 15 min。分别用 30%、50%、70%、90% 的乙醇溶液脱水 15 min 后, 用无水乙醇脱水 3 次, 每次 15 min。采用真空冷冻干燥, 干燥后随机选取 1 mm³ 的蛋白凝胶样品固定在样品台上, 喷金, 进行扫描电镜观察。电压 3 kV, 放大倍数 2 000 倍。

胃消化 根据 Fang 等^[9]的方法并加以修改。称取 0.6 g (精确到 0.001 g) 凝胶分散至 20 mL 人工胃消化液 (pH 2.0), 混匀后, 置于 37 °C 水浴预温 5 min。加入 0.017 1 g (1 : 35, W/W, 体积分数) 胃蛋白酶, 在 37 °C, 95 r/min 摇床消化 4 h。分别在 0、5、20、30、90、120、240 min 取出 1 mL, 用 1 mol/L NaCO₃ 将 pH 调至 7.0, 灭酶。灭酶后,

取出所有样品在 4 000×g 下离心 20 min, 上清液保存在 -20 °C 以备之后的分析。胃消化液的制备见表 1。

表 1 胃消化液的配制

Tab. 1 Preparation of artificial gastric digestive juice

组份 composition	质量浓度/(g/L) mass concentration
NaHCO ₃	84.0
NaCl	117.0
MgCl ₂	30.5
KCl	37.3
KH ₂ PO ₄	68.0
(NH ₄) ₂ CO ₃	48.0

上清液中游离氨基含量的测定 通过游离氨基的含量来表示消化液上清液中的消化度。取 1 mL 消化液, 加入 0.4 mL 磷酸盐缓冲液 (pH 8.0, 0.125 mol/L) 后, 加入 0.4 mL 2.0% 茚三酮, 沸水加热 15 min, 冷却至室温后, 定容至 10 mL, 在 570 nm 处测定吸光度。根据 L-亮氨酸标准曲线计算游离氨基的含量。

1.4 数据分析

所得数据均为 3 次重复的平均值, 结果表示为 $\bar{x} \pm s$ 。采用 IBM SPSS Statistics 25.0 软件进行数据分析, 多重比较采用 Duncan 氏法, 采用 Origin 2019 软件作图。

2 结果

2.1 TG 酶催化过程中交联度的变化

经测定, 未交联的蛋白溶液中游离氨基的浓度为 0.89 mmol/L。TG 酶催化过程中, 蛋白凝胶的交联程度如图 1 所示, 随着 TG 酶催化时间的延长, 交联程度呈现先上升后下降的趋势。在加热时间为 30 min 时, 交联程度最大, 达到 61.21%。但随着催化时间延长到 60 min, 交联程度并没有持续上升, 且无显著差异 ($P>0.05$)。

2.2 TG 酶催化过程中凝胶强度的变化

随着 TG 酶催化时间的增加, 蛋白凝胶强度逐渐增大。当催化时间达到 60 min 后, 凝胶强度达到最大。但加热 30 min 与 60 min 的凝胶样品之间没有显著变化 ($P>0.05$)。在催化 30 min 时, 蛋白凝胶强度相较未催化组增加了 186.68% (图 2)。

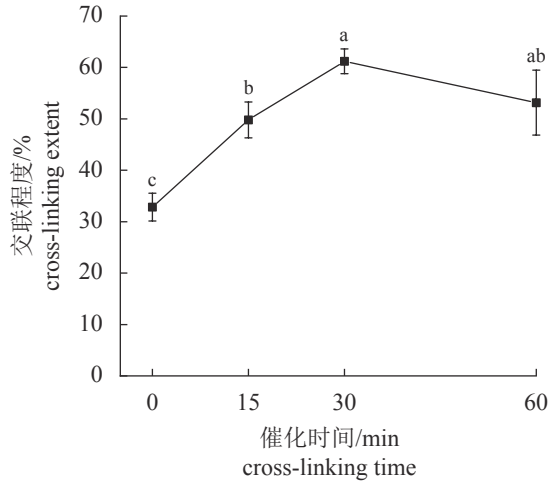


图 1 TG 酶催化过程中交联程度的变化

不同小写字母代表差异显著 ($P < 0.05$), 下同

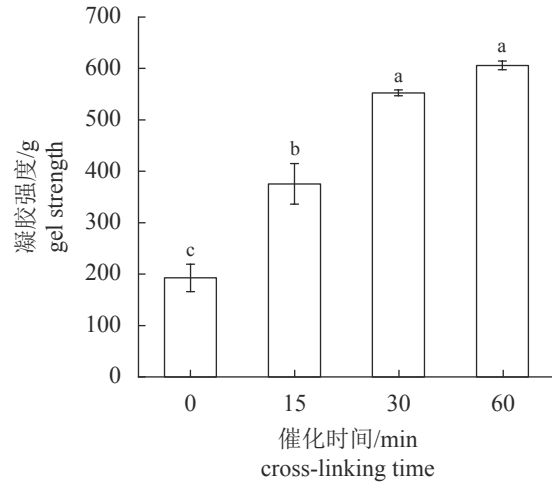


图 2 TG 酶催化过程中凝胶强度的变化

Fig. 2 Changes of gel strength during TG catalysis

Fig. 1 Changes of cross-linking extent during TG catalysis

Different lowercase letters superscripts mean significant differences ($P < 0.05$), the same below

密度增大, 在 30 min 时达到顶峰。

2.3 TG 酶催化过程中色泽的变化

TG 酶催化过程中, L^* 、 a^* 、 b^* 和白度的变化如表 2 所示, 数值以平均值 \pm 标准差的形式表示。观察发现 a^* 、 b^* 、 L^* 和白度值呈现上升的趋势, 且样品间存在显著差异 ($P < 0.05$)。在 60 min 时, L^* 和白度值分别增加了 5.37% 和 5.30%。

2.5 TG 酶催化过程中凝胶微观结构的变化

在加热 0 min 时, TG 酶未催化的蛋白凝胶样品电镜图显示, 蛋白网络结构松散, 具有不规则的孔洞。随着 TG 酶催化时间的延长, 蛋白网络结构逐渐变得致密, 孔径逐渐变得规则, 变得更小、更均匀 (图 6)。

2.4 TG 酶催化过程中凝胶持水性的变化

随着催化时间的延长, 蒸煮损失、持水力逐渐增加 (图 3), 数值以均值 \pm 标准差的形式表示。肌原纤维蛋白凝胶出现 4 个峰; TG 酶催化的蛋白凝胶网络的 T_{22} 弛豫时间缩短且图谱上峰位置左移 (图 4)。观察表 3 可以发现, 在 TG 酶的催化下, 凝胶样品的 T_{2b} 、 T_{21} 、 T_{22} 和 T_{23} 都有所降低。鲢肌原纤维蛋白在 TG 酶催化的过程中, 横截面的质子密度成像的伪彩图见图 5, 其中蓝色和红色分别表示低质子密度和高质子密度。随着 TG 酶催化时间的增加, 红色区域的面积增加, 高质子

2.6 TG 酶催化过程中凝胶体外消化的变化

在最初消化时间 (0~90 min) 内, 蛋白凝胶的消化速率较缓。随着消化时间的 (90~120 min) 进一步延长, 消化速率明显增加。随着消化时间的持续增加 (120~240 min), 催化时间为 0~30 min 的蛋白凝胶消化的游离氨基的含量都接近于 440 mmol/L。在消化时间接近 4 h, 0~30 min 的蛋白凝胶降解出的氨基含量都趋于一致, 而催化 60 min 的凝胶样品消化后的游离氨基含量与消化 90 min 时没有差异 (图 7)。

表 2 不同交联时间下 TG 酶催化过程中凝胶色泽的变化

Tab. 2 Changes of gel color during TG catalysis at different cross-linking time

凝胶色泽 gel color	0 min	15 min	30 min	60 min
L^*	79.63 \pm 1.19 ^c	81.20 \pm 0.13 ^{bc}	82.36 \pm 0.50 ^{ab}	83.91 \pm 1.17 ^a
a^*	-2.60 \pm 1.87 ^c	-2.12 \pm 0.06 ^b	-2.05 \pm 0.48 ^b	-1.75 \pm 1.86 ^a
b^*	-0.26 \pm 1.89 ^b	1.40 \pm 0.10 ^{ab}	1.58 \pm 0.26 ^{ab}	2.16 \pm 1.85 ^{ab}
白度 whiteness	79.45 \pm 1.92 ^c	81.02 \pm 0.12 ^{bc}	82.16 \pm 0.40 ^{ab}	83.66 \pm 1.91 ^a

注: 同一行不同小写字母代表差异显著 ($P < 0.05$)

Notes: different superscripts lowercase letters in the same line mean significant differences ($P < 0.05$)

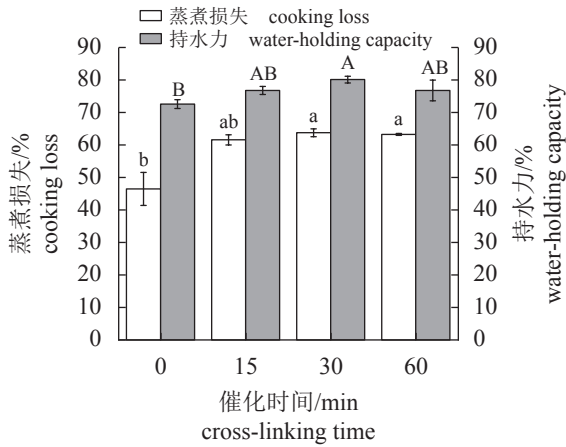


图3 TG 酶催化过程中蒸煮损失及持水力的变化

不同大写字母代表持水力差异显著 ($P < 0.05$), 不同小写字母代表蒸煮损失差异显著 ($P < 0.05$)

Fig. 3 Changes of cooking loss and water-holding capacity during TG catalysis

Different capital letters represented significant difference in water-holding capacity ($P < 0.05$), and different lowercase letters represented significant difference in cooking loss ($P < 0.05$)

3 讨论

3.1 TG 酶催化过程中交联度的变化

在 TG 酶催化过程中, 赖氨酸是反应底物, 通常以反应前后赖氨酸含量的比值来表示 TG 酶

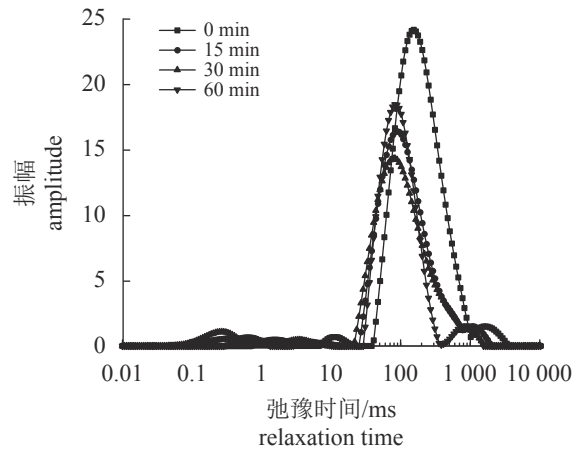


图4 TG 酶催化过程中弛豫时间 (T_2) 的变化

Fig. 4 Changes of relaxation time (T_2) during TG catalysis

交联反应的程度^[16]。交联程度提升是因为在催化过程中, TG 酶通过催化谷氨酰胺的酰基转移反应, 使得蛋白分子间及分子内发生共价键交联, 从而降低了游离氨基的含量, 交联程度增大^[17]。催化时间 60 min 与 30 min 的凝胶样品之间没有显著差异 ($P > 0.05$), 这是由于肌原纤维蛋白中的谷氨酰胺和赖氨酸含量一定, 共价键不能一直产生。因此, 肌原纤维蛋白凝胶的交联度不随催化时间的延长而无限制地增大。

表3 TG 酶催化过程中弛豫时间 (T_2) 的变化

Tab. 3 Changes of relaxation time (T_2) during TG catalysis

交联时间/min (cross-linking time)	T_{2b}	T_{21}	T_{22}	T_{23}
0	1.72±0.32 ^a	23.41±7.22 ^a	947.64±239.42 ^a	2 159.45±691.04 ^a
15	2.56±1.76 ^a	9.15±0.18 ^b	652.94±94.19 ^{ab}	1 077.08±149.61 ^{ab}
30	0.63±0.03 ^a	7.15±2.18 ^b	700.76±51.12 ^{ab}	891.98±54.03 ^b
60	0.66±0.32 ^a	7.66±1.73 ^b	376.17±49.47 ^b	1 119.23±53.06 ^{ab}

注: 同一列不同小写字母代表差异显著 ($P < 0.05$)

Notes: different lowercase letters on the same column superscripts mean significant differences ($P < 0.05$)

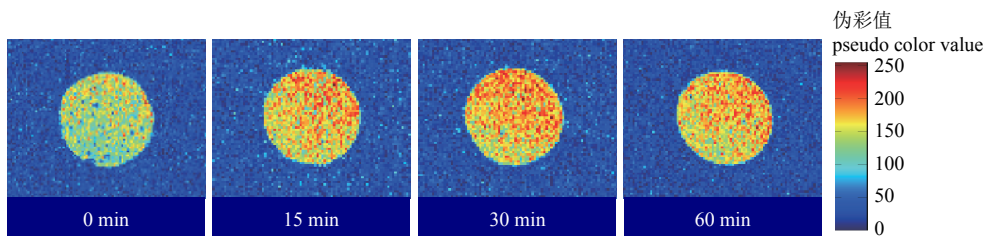


图5 TG 酶催化过程中水分分布伪彩图

蓝色的信号和红色的信号分别代表低水分信号和高水分信号

Fig. 5 Pseudo color map of water distribution during TG catalysis

The blue signal and the red signal represent low and high moisture signals, respectively

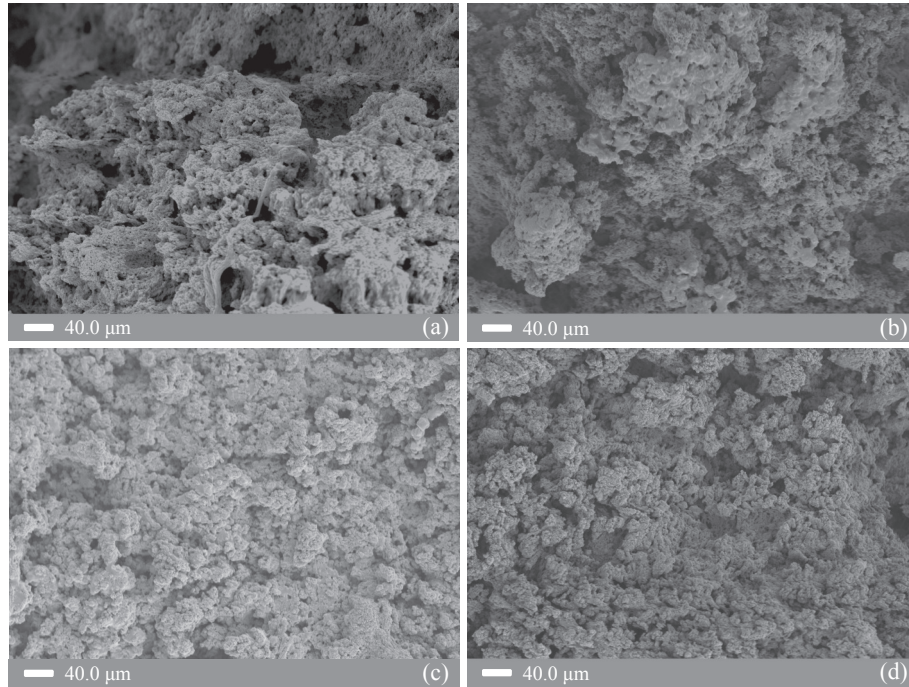


图 6 TG 酶催化过程中微观结构的变化

Fig. 6 Changes of microstructure during TG catalysis

(a) 0 min, (b) 15 min, (c) 30 min, (d) 60 min

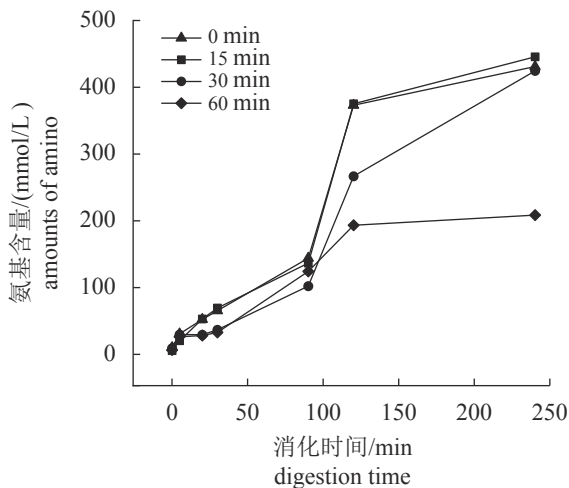


图 7 TG 酶催化过程中凝胶胃消化的变化

Fig. 7 Changes of gel gastric juice during TG catalysis

3.2 TG 酶催化过程中凝胶强度的变化

凝胶强度反映了蛋白质的聚集能力, 是衡量鱼糜制品凝胶特性的重要指标。凝胶强度的变化与蛋白质的变性、蛋白分子间及蛋白分子内的交联有关^[18]。TG 酶催化肌原纤维蛋白发生共价交联, 使得蛋白凝胶网络密度增加, 从而提高了蛋白凝胶的凝胶强度^[19-20]。在二段式加热过程中, 肌原纤维蛋白经历凝胶化、劣变化、鱼糕化三个过程。

TG 酶最适温度与凝胶化的温度 (45 °C) 一致, 在该温度下, 酶诱导肌原纤维蛋白二级结构发生变化, β -转角及 β -折叠含量显著增加, 无规则卷曲含量降低; 在胶凝化过程中, β -折叠在其中起着重要的作用^[21]。

3.3 TG 酶催化过程中色泽的变化

鱼糜制品色泽的变化能够影响消费者消费欲望。 a^* 和 b^* 值的增加, 说明 TG 酶催化使得凝胶颜色向红、黄转变; 其 L^* 值、白度值的改变是由于在加热过程中, 随着 TG 酶催化时间的延长, 鲢肌原纤维蛋白凝胶的空间结构发生了变化, 形成致密的网络, 增强了对光的反射^[22]。

3.4 TG 酶催化过程中凝胶持水性的变化

持水性是指蛋白结合水及截留住水的能力; 持水性的增加表示有更多的水能够被蛋白结合或储存在凝胶网络结构中^[23]。本研究从蒸煮损失、持水力及核磁共振弛豫时间等指标来阐述 TG 酶催化过程中, 肌原纤维蛋白凝胶持水性的变化趋势。持水力的增加, 表明合适的 TG 酶催化时间形成的蛋白凝胶网络有助于截留住更多的水。

低场核磁共振可以反映出 TG 酶诱导的肌原纤维蛋白凝胶内部的水分流动性。弛豫时间 T_2 的

长短表明水与底物结合的紧密程度, T_2 越短, 二者之间结合越紧密。 T_{2b} 、 T_{21} (0.1~10 ms) 表示能与蛋白质等大分子表面极性基团相结合的单层水及与蛋白中的酰胺基形成键能较小的氢键结合水; T_{22} (10~300 ms) 表示在肌原纤维蛋白凝胶网络中的不易流动水, 是蛋白凝胶中的最主要的水分; T_{23} (300~1 000 ms) 表示在蛋白凝胶网络结构之外的可以任意流动的自由水。TG 酶催化过程中, 蛋白凝胶网络中的水自由度逐渐减小^[24], 该结果与鲍佳彤等^[19]的研究一致。这可能是因为 TG 酶及热诱导条件下, 凝胶中的水被凝胶网络束缚得更加紧密。这与凝胶持水力的变化是一致的, 由于束缚在肌原纤维蛋白凝胶网络中的水不易从结构中挤压出来, 从而表现出持水力增加。在 TG 酶催化过程中, 有越来越多的水分被凝胶网络所束缚, 这与上述弛豫时间的结果分析一致^[25]。但随着 TG 酶催化时间的继续增加, 高质子密度的面积有所下降。这可能是因为过长时间的热处理使得蛋白四级结构持续展开, 从而导致之前束缚住的水分流失。

3.5 TG 酶催化过程中凝胶微观结构的变化

电镜图是为了探究在 TG 酶催化过程中, 鲢肌原纤维蛋白凝胶三维网络微观结构的变化规律。在 45 °C 孵育下, 蛋白凝胶网络展开, 暴露出赖氨酸残基, 促进了二硫键及疏水相互作用, 在 TG 酶交联反应时形成了紧密、均匀的网络结构^[26]。在 TG 酶催化的交联反应中, 形成了更多的非二硫共价键, 促进了蛋白凝胶的致密化^[27]。这样的变化趋势与凝胶交联度和持水性等变化规律一致。

3.6 TG 酶催化过程中凝胶体外消化的变化

体外模拟食品在胃中的消化过程, 虽然不能反映出真实的变化, 但可以反映出食品在胃消化过程中营养物质蛋白质的降解过程。0~90 min, 在 TG 酶催化的过程中, 赖氨酸与谷氨酰胺羧基产生异型肽键, 蛋白之间发生交联, 产生共价结合, 交联度提升, 蛋白凝胶网络空间结构变得致密, 使得胃蛋白酶对其作用仅停留于表面, 结合位点少, 产生的游离氨基较少^[28]。催化 60 min 的凝胶消化后, 氨基酸含量高于 30 min 的样品, 这可能是由于在加热过程中, 过长时间的热处理使得蛋白四级结构持续展开, 暴露出更多的胃蛋白酶结合位点。90~120 min, 肌原纤维蛋白凝胶

在酸性环境下空间结构展开, 暴露出内部的胃蛋白酶结合位点, 加速了胃蛋白酶的酶解。但催化 60 min 的凝胶样品消化 4 h 后的氨基酸含量与消化 120 min 时没有差异。这可能是持续的热处理使得蛋白在胶凝过程中的稳定结构被破坏, 部分氨基酸流失, 总体氨基酸含量下降。催化 30 min 及 60 min 的凝胶样品空间结构致密, 使得胃蛋白酶无法结合蛋白上的相关位点^[29]。消化速率始终低于 0 min 及 15 min 的凝胶。在 120~240 min 时, 大部分肌原纤维蛋白已经被胃蛋白酶水解。因此, 合适的交联时间有利于胃蛋白酶的酶解。

4 结论

TG 酶诱导鲢肌原纤维蛋白胶凝过程中, 交联度、凝胶强度、持水性显著提高 ($P<0.05$), 但由于致密的凝胶网络结构降低了胃蛋白酶的酶解速率。在胃蛋白酶作用 90 min 后, 蛋白凝胶结构破坏较大, 消化率提升较快, 氨基含量释放速率变快。本实验说明, 合适的交联时间在提高肌原纤维蛋白凝胶的凝胶特性的同时不会影响其消化性, 对改善鱼糜制品的凝胶特性和营养价值有一定的参考价值。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2020.
Bureau of Fishery and Fishery Administration of the Ministry of Agriculture and Rural Areas, National Aquatic Technology Promotion Station, China Fisheries Society. China fishery statistical yearbook [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2020 (in Chinese).
- [2] Guo X J, Shi L, Xiong S B, *et al.* Gelling properties of vacuum-freeze dried surimi powder as influenced by heating method and microbial transglutaminase [J]. *LWT*, 2019, 99: 105-111.
- [3] An Y Q, You J, Xiong S B, *et al.* Short-term frozen storage enhances cross-linking that was induced by transglutaminase in surimi gels from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) [J]. *Food Chemistry*, 2018, 257: 216-222.

- [4] Zhang L T, Li Q, Shi J, *et al.* Changes in chemical interactions and gel properties of heat-induced surimi gels from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) fillets during setting and heating: effects of different washing solutions[J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 75: 116-124.
- [5] 杜洪振, 孙钦秀, 杨振, 等. 转谷氨酰胺酶对鲤鱼肌原纤维蛋白乳化活性和凝胶特性的影响[J]. 食品工业科技, 2019, 40(6): 126-130, 278.
- Du H Z, Sun Q X, Yang Z, *et al.* Effect of transglutaminase on the emulsifying activity index and gel properties of common carp myofibrillar protein[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(6): 126-130, 278 (in Chinese).
- [6] 范丽丽, 窦博鑫, 张晓琳, 等. 大豆7S球蛋白的MTGase条件对其表面疏水性 with 功能特性、溶液性质的影响及相关性分析[J]. 食品工业科技, 2020, 41(5): 52-57, 62.
- Fan L L, Dou B X, Zhang X L, *et al.* Effect of MTGase conditions on surface hydrophobicity, functional properties and solution properties of soybean 7 S globulin and correlation analysis of its indexes[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(5): 52-57, 62 (in Chinese).
- [7] Gaspar A L C, De Góes-Favoni S P. Action of microbial transglutaminase (MTGase) in the modification of food proteins: a review[J]. *Food Chemistry*, 2015, 171: 315-322.
- [8] Li Y, Xiong S B, Yin T, *et al.* The gastric digestion kinetics of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) surimi gels induced by transglutaminase[J]. *Food Chemistry*, 2019, 283: 148-154.
- [9] Fang M X, Xiong S B, Hu Y, *et al.* *In vitro* pepsin digestion of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) surimi gels after cross-linking by Microbial Transglutaminase (MTGase)[J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 95: 152-160.
- [10] Glusac J, Isaschar-Ovdat S, Fishman A. Transglutaminase modifies the physical stability and digestibility of chickpea protein-stabilized oil-in-water emulsions[J]. *Food Chemistry*, 2020, 315: 126301.
- [11] 张诗雯. 芹菜对鱼糜制品凝胶品质及体外消化特性的影响 [D]. 锦州: 渤海大学, 2019.
- Zhang S W. Effects of celery on gel quality and *in vitro* digestion characteristics of surimi-based production[D]. Jinzhou: Bohai University, 2019 (in Chinese).
- [12] 尹艺霖. 超声辅助 TG 酶处理对鲢鱼肌原纤维蛋白凝胶特性影响及应用研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2019.
- Yin Y L. Effect of ultrasound assisted TG enzyme treatment on gel properties of myofibrillar protein from silver carp and its application[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2019 (in Chinese).
- [13] 黄莉, 夏秀芳, 吕鸿鹄, 等. 转谷氨酰胺酶对鲤鱼肌原纤维蛋白功能特性的影响[J]. 食品工业, 2014, 35(9): 79-83.
- Huang L, Xia X F, Lü H H, *et al.* Influence of transglutaminase on functional properties of common carp myofibrillar protein[J]. *The food industry*, 2014, 35(9): 79-83 (in Chinese).
- [14] Yang X, Li Y L, Li S T, *et al.* Effects and mechanism of ultrasound pretreatment of protein on the Maillard reaction of protein-hydrolysate from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2020, 64: 104964.
- [15] 李双, 李锋, 焦阳. 不同添加物对鲢鱼鱼糜及鱼糜制品介电特性及水分迁移率的影响[J]. 食品科学, 2020, 41(15): 54-63.
- Li S, Li F, Jiao Y. Effects of different additives on dielectric properties and water mobility of silver carp surimi and surimi products[J]. *Food Science*, 2020, 41(15): 54-63 (in Chinese).
- [16] 刘广娟, 徐泽权, 邢世均, 等. 卡拉胶、转谷氨酰胺酶及大豆分离蛋白对猪PSE肉低温香肠保水性和感官品质的影响[J]. 肉类研究, 2019, 33(3): 34-39.
- Liu G J, Xu Z Q, Xing S J, *et al.* Effects of carrageenan, transglutaminase and soybean protein isolate on water-holding capacity and sensory quality of low-temperature sausage made from PSE pork[J]. *Meat Research*, 2019, 33(3): 34-39 (in Chinese).
- [17] 贾丹, 刘茹, 刘明菲, 等. 转谷氨酰胺酶对鳙鱼糜热诱导凝胶特性的影响[J]. 食品科学, 2013, 34(9): 37-41.
- Jia D, Liu R, Liu M F, *et al.* Effect of transglutaminase on heat-induced gel properties of bighead carp (*Aristichthys nobilis*) surimi[J]. *Food Science*, 2013, 34(9): 37-41 (in Chinese).
- [18] Wang L M, Wang X, Ma J, *et al.* Effects of radio frequency heating on water distribution and structural properties of grass carp myofibrillar protein gel[J]. *Food Chemistry*, 2021, 343: 128557.

- [19] 鲍佳彤, 宁云霞, 杨淇越, 等. TGase和Ca²⁺联合作用对未经漂洗的革胡子鲶鱼鱼糜凝胶特性的影响[J]. *食品科学*, 2020, 41(14): 50-57.
Bao J T, Ning Y X, Yang Q Y, *et al.* Combined effects of TGase and Ca²⁺ on gel properties of unwashed *Clarias gariepinus* surimi[J]. *Food Science*, 2020, 41(14): 50-57 (in Chinese).
- [20] Choi J, Chin K B. Evaluation of rheological properties of pork myofibrillar protein gel and quality characteristics of low-fat model sausages with pea protein concentrate and transglutaminase[J]. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 2020, 49(6): 617-624.
- [21] 孟林, 李艳萍, 康壮丽, 等. 谷氨酰胺转氨酶对鸭胸肉糜凝胶性能的影响[J]. *肉类研究*, 2019, 33(8): 25-28.
Meng L, Li Y P, Kang Z L, *et al.* Impact of transglutaminase on gel properties of duck breast meat batter[J]. *Meat Research*, 2019, 33(8): 25-28 (in Chinese).
- [22] 叶贝贝. 白鲢鱼/金线鱼混合肌原纤维蛋白及肌球蛋白热聚集的作用机制 [D]. 锦州: 渤海大学, 2019.
Ye B B. Mechanism of thermal aggregation of mixed myofibrillar protein and myosin from *Hyophthalmichthys molitrix* and *Nemipterus virgatus*[J]. Jinzhou: Bohai University, 2019 (in Chinese).
- [23] Felix M, Romero A, Rustad T, *et al.* Influence of Transglutaminase (TGase) enzyme on mechanical and bioactive properties of crayfish protein gels[J]. *Food Biophysics*, 2017, 12(3): 348-355.
- [24] Han M Y, Zhang Y J, Fei Y, *et al.* Effect of microbial transglutaminase on NMR relaxometry and microstructure of pork myofibrillar protein gel[J]. *European Food Research and Technology*, 2009, 228(4): 665-670.
- [25] 李然然. 基于低场核磁技术研究香菇干燥及贮藏过程中的品质变化 [D]. 大连: 大连工业大学, 2019.
Li R R. Quality changes of shiitake mushrooms in drying and storing based on low field nuclear magnetic technology[D]. Dalian: Dalian Polytechnic University, 2019 (in Chinese).
- [26] Qin X S, Chen S S, Li X J, *et al.* Gelation properties of transglutaminase-induced soy protein isolate and wheat gluten mixture with ultrahigh pressure pretreatment[J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2017, 10(5): 866-874.
- [27] Guo B Y, Zhou A M, Liu G, *et al.* Changes of physicochemical properties of greater lizardfish (*Saurida tumbil*) surimi gels treated with high pressure combined with microbial transglutaminase[J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2019, 43(10): e14150.
- [28] Ogilvie O, Roberts S, Sutton K, *et al.* The use of microbial transglutaminase in a bread system: a study of gluten protein structure, deamidation state and protein digestion[J]. *Food Chemistry*, 2021, 340: 127903.
- [29] 焦阜欣, 杨小雪, 尹涛, 等. 转谷氨酰胺酶诱导的鱼糜凝胶及其体外消化[J]. *食品科技*, 2017, 42(2): 142-148.
Jiao F X, Yang X X, Yin T, *et al.* The *in vitro* digestion of transglutaminase induced surimi gel[J]. *Food Science and Technology*, 2017, 42(2): 142-148 (in Chinese).

Gel properties changes of myofibrillar protein of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) in the process of TG catalysis

FENG Qian¹, PEI Nuo¹, SUN Jie¹, JIANG Xin¹,
MIAO Siwei¹, JIANG Qingqing¹, SHI Wenzheng^{1,2*}

(1. College of Food Sciences and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. National Research and Development Center for Processing Technology of Freshwater Aquatic Products (Shanghai), Shanghai 201306, China)

Abstract: In recent years, with the improvement of production and living needs, surimi products as a product of intensive processing, production and consumption are gradually increasing. Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) is low in price and large in output. But because of the existence of endogenous protease, it will lead to low gel strength and poor texture characteristics, and therefore the utilization rate of fish is not high. Improving production value and promoting its high value utilization has become a research hotspot. Transglutaminase (TG) is involved in the catalytic protein cross-linking reaction that improves the breaking force, hardness and water holding capacity of surimi products. However, with the increase of cross-linking degree of the product, the digestibility showed a downward trend, which was difficult to digest. In order to explore the changes of gel properties of silver carp myofibrillar protein during TG catalysis, further enhance the characteristics and nutritional value of silver carp surimi products, in this paper, myofibrillar protein (MP) of silver carp was catalyzed by TG for different time periods (0, 15, 30 and 60 min). The cross-linking extent, gel strength, whiteness, water-holding capacity, microstructure and digestive characteristic changes were analyzed to investigate the effect of TG on its gel properties and digestibility. The experiment results showed that the cross-linking extent of MP gel significantly increased after TG-induced protein gelling ($P < 0.05$). At 30 min, the crosslinking degree was the highest, reaching 61.21%. The gel strength of protein increased by 186.68% compared with that of non catalyzed group. In the process of TG catalysis, the whiteness and water-holding capacity increased with the prolonged crosslinking time. At 60 min, the L^* and whiteness value increased by 5.37% and 5.30% respectively. Scanning electron microscope (SEM) analysis showed that the pore size of the gel network structure became smaller and denser. Under the catalytic time of 30 min, the cross-linking extent, whiteness and water-holding capacity significantly increased ($P < 0.05$), and the relaxation time T_{22} significantly decreased ($P < 0.05$). The TG-induced MP gel had a low degree of hydrolysis in the initial stage of digestion, because the cross-linking extent increased and the protein network structure became denser and denser, which reduced the accessibility of pepsin to its hydrolysis site. After the digestion time reached 90 min, the protein network was destroyed and the hydrolysis rate increased significantly. These results suggested that appropriate crosslinking time can help to improve the gel properties of protein gels. This study provides an experimental basis for improving the quality and digestive characteristics of fish products by TG.

Key words: *Hypophthalmichthys molitrix*; transglutaminase; myofibrillar protein; *in vitro* digestion; gel

Corresponding author: SHI Wenzheng. E-mail: wzshi@shou.edu.cn

Funding projects: National Key Research and Development Program of China (2019YFD0902003)