

鳊鱼鱼糜蛋白质结构与凝胶特性的关系

汪之和*, 朱孔辉, 施文正, 郭丰红
(上海海洋大学食品学院, 上海 201306)

摘要: 蛋白质对于鱼糜凝胶形成具有重要作用,通过研究鳊鱼鱼糜贮藏过程中肌球蛋白化学作用力、激光拉曼光谱等的变化探讨蛋白质结构对鱼糜凝胶形成的影响。结果发现,鱼糜在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻藏过程中,肌球蛋白含量、离子键、氢键与疏水相互作用含量呈现先快后慢的二段式下降趋势,与其凝胶强度变化趋势一致;在 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 贮藏过程中,肌球蛋白含量、离子键和氢键含量呈不断下降的趋势,与凝胶强度变化趋势基本一致,而疏水相互作用为先增加后减少,由此可见,肌球蛋白含量、离子键和氢键含量在维持鱼糜蛋白高级结构上起着重要的作用。激光拉曼光谱结果显示 α -螺旋结构是维持鳊鱼糜蛋白质网状结构的主要构象,在贮藏过程中,部分 α -螺旋结构转变成无规卷曲,使包埋于肌球蛋白分子内的疏水性残基暴露于分子表面,进而发生蛋白变性;贮藏温度越高,无规卷曲结构越多,蛋白变性程度越大,表现在凝胶强度降低越多。鱼糜贮藏过程中蛋白质结构变化的研究对于阐明鱼糜凝胶形成机理和防止鱼糜蛋白变性具有一定意义。

关键词: 鳊;鱼糜;化学作用力;蛋白质构象
中图分类号: TSZ 54.4;S 917

文献标识码: A

近年来,国内外研究学者普遍认为中国淡水鱼鱼糜制品加工是水产加工业发展的重要方向之一^[1],淡水鱼鱼糜蛋白质理化特性与品质之间关系已成为研究重点。鳊鱼(*Parabramis pекinensis*)是我国重要的淡水养殖鱼类,对鳊鱼糜蛋白质结构与凝胶特性的研究可为其他鱼糜制品的研究提供一定的理论依据。

肌肉蛋白质的构象是通过离子键、氢键、二硫键、疏水相互作用、范德华等化学作用力来维持的^[2-3]。在鱼糜冷冻冷藏过程中,这些化学作用力对蛋白质构象的贡献将会发生变化^[4-8],导致蛋白质发生冷冻变性,并对鱼糜品质特性产生影响。拉曼光谱受水溶剂的影响较少且对分子振动具有指纹式的分辨率,Raman(激光拉曼)是目前研究蛋白质构象的重要手段^[9-11]。目前国内在不同贮藏温度下鱼糜蛋白质构象对蛋白质二级结构的影响方面的报道较少^[12-13]。因此,本文通过研究不同温度贮藏下鱼糜的化学作用力和激光拉曼光谱的变化与鱼糜凝胶强度的关

系,探讨鱼糜凝胶的形成机理。

1 材料与方法

1.1 实验原料

活鳊鱼→去鳞、内脏、头、尾→清洗→采肉→精滤→漂洗(4倍于鱼糜重的清水,漂洗4次,水温不高于 $10\text{ }^{\circ}\text{C}$)→挤压脱水→鱼糜→添加抗冻剂(4%山梨醇、4%蔗糖和0.3%多聚磷酸盐)→密封分袋,分别贮藏在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

1.2 实验方法

凝胶强度测定 参考Luo法^[14],取鱼糜灌肠于 $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ 加热30 min,切成25 mm厚,用EZ-test型质构仪测定,探头类型为P/0.5 mm。凝胶强度($\text{g}\cdot\text{mm}$) = 凝胶破断强度(g) × 凝胶形变距离(mm)。

肌球蛋白提取 参考《水产食品化学分析手册》^[15]中方法提取肌球蛋白。鱼糜→用低离子强度磷酸缓冲液洗净→ $\text{ATP}-\text{MgCl}_2-0.45\text{ mol/}$

收稿日期:2009-11-19 修回日期:2010-01-30

资助项目:上海市农委项目

通讯作者:汪之和,E-mail:zhwang@shou.edu.cn

L KCl-磷酸缓冲液(pH 6.4)提取→提取液用14倍容量的冷却水稀释沉淀→将沉淀蛋白质溶解于0.6 mol/L KCl溶液中→肌球蛋白。

化学作用力测定 参考刘海梅等^[16]方法。取鱼糜2 g的样品4份分别与10 mL的0.05 mol/L NaCl(SA)、0.6 mol/L NaCl(SB)、0.6 mol/L NaCl+1.5 mol/L 尿素(SC)和0.6 mol/L NaCl+8 mol/L 尿素(SD)混合并均质,于4℃静置1 h,然后10 000×g离心15 min,用Lowry^[17]法测定上清液蛋白质的含量。

激光拉曼光谱测定 激光拉曼光谱仪为英国REN-ISHAW公司生产的Renishaw inVia Raman Microscope。激光光源为Coherent公司的Innova 70 氦离子激光器。激光波长514 nm,功率为10 mW,采集时间为10 s,扫描次数为40次,分辨率1 cm⁻¹,拉曼位移范围300~3 800 cm⁻¹。

2 结果与分析

2.1 凝胶强度的变化

凝胶强度反映了鱼糜制品的品质,不同贮藏温度下鳊鱼鱼糜凝胶强度随时间变化趋势如图1所示。

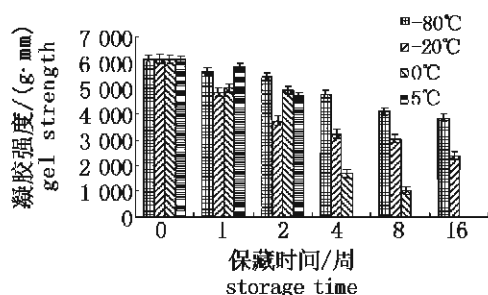


图1 不同贮藏温度下鳊鱼鱼糜凝胶强度的变化
Fig. 1 The change of gel strength of *Parabramis pekinensis* surimi at different storage temperatures

由图1可知,随着冻藏时间的延长,凝胶强度呈明显下降趋势,且温度越高,变化越快,主要是由于蛋白质变性导致肌球蛋白之间的交联作用下降,不能形成良好的空间网状结构所致^[16]。-80℃条件下贮藏,凝胶强度下降缓慢,贮藏16周,凝胶强度为新鲜样品的63.2%;-20℃条件下贮藏16周,凝胶强度为新鲜样品的38.8%;在非冻藏条件下,短时间(一周内)由于鱼糜肌球蛋白变性较少,维持蛋白质稳定结构的化学作用力没有受到破坏,使得凝胶强度降幅较小,但长时

间后,由于微生物的繁殖,凝胶强度下降趋势较快,0℃贮藏8周后,凝胶强度仅为新鲜样品的16.9%;5℃鱼糜在贮藏4周后,开始腐败变质,肌球蛋白含量下降,无法形成凝胶。

2.2 肌球蛋白含量的变化

肌球蛋白的变性在一定程度上导致肌球蛋白含量的下降,不同贮藏温度下鳊鱼鱼糜肌球蛋白含量下降率见图2。

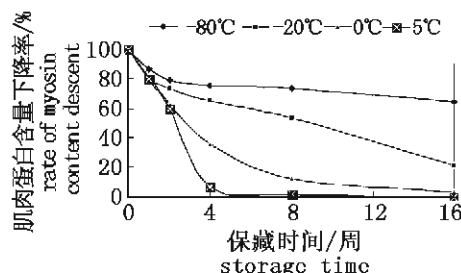


图2 不同贮藏温度下鳊鱼鱼糜肌球蛋白含量的变化
Fig. 2 The change of myosin content of *Parabramis pekinensis* surimi at different storage temperatures

在冻藏过程中鳊鱼鱼糜的肌球蛋白含量在下降,并呈现两段下降规律,即前期贮藏过程中下降迅速,后期下降缓慢(图2)。肌球蛋白的下降表明鱼糜蛋白在贮藏中发生了变性。前4周,二种冻藏条件下蛋白变性相差不大,而冷藏条件下则变性都较快,这与微生物的作用使蛋白质降解有关。鱼糜在-80℃下贮藏4个月后肌球蛋白含量下降了35.68%,-20℃下降了78.76%,-80℃的贮藏效果明显好于-20℃,说明冻藏温度决定了鱼糜蛋白质变性的程度。鱼糜在5℃下可以较好的贮藏一周,在0℃下可以较好的贮藏两周,0℃的贮藏效果好于5℃,这与在低温条件下可以减缓蛋白的降解与微生物繁殖较慢有关。

2.3 化学作用力的变化

离子键的贡献以溶解于SB溶液与SA溶液中蛋白质含量之差表示(图3);氢键的贡献以溶解于SC溶液与SB溶液中蛋白质的含量之差来表示(图4);疏水性相互作用的贡献以溶解于SC溶液与SD溶液中蛋白质的含量之差来表示(图5)。

稳定蛋白质空间结构的作用力主要包括氢键,范德华力,疏水相互作用、盐键(离子键)及共价二硫键。

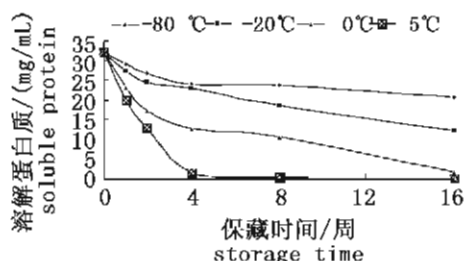


图3 不同贮藏温度下鲮鱼鱼糜离子键的变化

Fig. 3 The change of ionic bonds of *Parabramis pekinensis surimi* at different storage temperatures

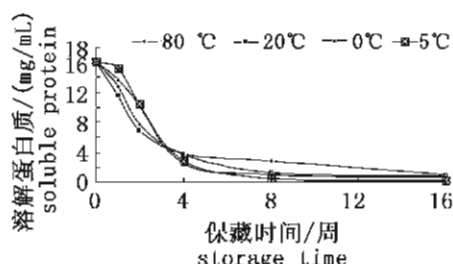


图4 不同贮藏温度鲮鱼鱼糜氢键的变化

Fig. 4 The change of hydrogen bonds of *Parabramis pekinensis surimi* at different storage temperatures

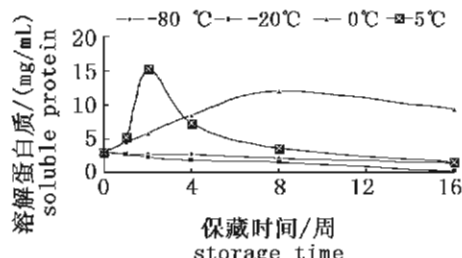


图5 不同贮藏温度下鲮鱼鱼糜疏水相互作用的变化

Fig. 5 The change of hydrophobic interactions of *Parabramis pekinensis surimi* at different storage temperatures

由图3、图4可知,鲮鱼鱼糜蛋白质的离子键、氢键随着贮藏时间延长,呈现两段式下降规律,并且贮藏温度越高,下降越快,而鱼糜的凝胶强度变化趋势和离子键、氢键变化趋势基本相同,由此可以推断,离子键、氢键是维持其蛋白质稳定构象的主要作用力。

从图5可知,在不同的贮藏温度下,疏水相互作用呈现不同的趋势。 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的鱼糜,因蛋白质冷冻变性而使疏水基团暴露,由于冰晶的形成而使非极性基周围的水凝聚,导致疏

水性残基被破坏,降低了其疏水性,并使疏水相互作用不断的下降。而在 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 贮藏的鱼糜中,由于前期贮藏过程中蛋白质疏水性残基不断地暴露,使得疏水相互作用增加,后期由于鱼糜自身的生化反应,使疏水相互作用被破坏而导致其下降,因此,低温冷藏的鱼糜蛋白质间疏水相互作用有先上升后下降的趋势,疏水相互作用在维持蛋白质稳定的构象上也起到重要的作用。

2.4 蛋白质构象的变化

对贮藏了一个月的鲮鱼鱼糜进行激光拉曼测定分析。Amide III区($1\ 230\text{ cm}^{-1} \sim 1\ 320\text{ cm}^{-1}$)附近出现的谱带是构象灵敏谱带(图6)。Amide III区的谱带来源于肽键的C-N伸缩振动和N-H面内振动。 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 鱼糜仅在 $1\ 270\text{ cm}^{-1}$ 、 $1\ 303\text{ cm}^{-1}$ 处出现 α -螺旋特征谱带,而 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 鱼糜不仅在 $1\ 266\text{ cm}^{-1}$ 、 $1\ 304\text{ cm}^{-1}$ 处出现 α -螺旋的特征谱带,还在 $1\ 244\text{ cm}^{-1}$ 处出现无规卷曲的特征谱带。 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 鱼糜不仅在 $1\ 272\text{ cm}^{-1}$ 、 $1\ 301\text{ cm}^{-1}$ 处出现 α -螺旋的特征谱带,还在 $1\ 244\text{ cm}^{-1}$ 处出现无规卷曲的特征谱带, $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 鱼糜不仅在 $1\ 266\text{ cm}^{-1}$ 、 $1\ 301\text{ cm}^{-1}$ 处出现 α -螺旋的特征谱带,还在 $1\ 245\text{ cm}^{-1}$ 处出现无规卷曲的特征谱带,说明在 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 贮藏温度下的鱼糜蛋白质的 α -螺旋结构部分转变成了无规卷曲结构。

Amide I区的谱带($1\ 600 \sim 1\ 700\text{ cm}^{-1}$)主要来自于C=O伸缩振动,还包括C-N振动、C-C-N振动和N-H面内振动。 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 鱼糜 $1\ 661\text{ cm}^{-1}$ 附近出现无规卷曲,进一步说明鱼糜蛋白质的 α -螺旋结构贮藏后部分转变成无规卷曲。

830 cm^{-1} 和 850 cm^{-1} 附近的费米共振双峰为肌球蛋白侧链酪氨酸残基的谱图,双峰反映的是酪氨酸残基中苯环上para取代基的振动,其受环境和氢键中酚羟基的影响。I850/I830比值可判明酪氨酸在蛋白质分子中所处的状态。 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 鱼糜在 839 cm^{-1} 、 853 cm^{-1} 附近出现酪氨酸残基的双峰,对比两峰的强度可以发现,I853/I839比值为1.02,说明酪氨酸残基位于蛋白质分子的外部; $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 鱼糜酪氨酸残基的双峰出现在 838 cm^{-1} 、 850 cm^{-1} 附近,I850/I838比值为1.28, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 鱼糜中酪氨酸残基暴露程度高于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 鱼糜; $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 鱼糜的酪氨酸残基的双峰出现在 832 cm^{-1} 、 855 cm^{-1} 附近,且I855/I832比值为1.97,

说明 0 ℃鱼糜中酪氨酸残基暴露程度高于 -20 ℃鱼糜。5 ℃鱼糜的酪氨酸残基的双峰出现在 831 cm^{-1} 、855 cm^{-1} 附近,且 1855/1831 比值为 1.52,说明 5 ℃鱼糜酪氨酸残基暴露程度低于 0 ℃温度下鱼糜。由此可以推测,在 -80 ℃、-20

℃冻藏条件下,鳊鱼鱼糜蛋白质的疏水性残基被破坏,降低了其疏水性。在 0 ℃、5 ℃冷藏条件下,鳊鱼鱼糜蛋白质的疏水性残基不断暴露,增加了其疏水性。此结果与化学法测定结果基本一致。

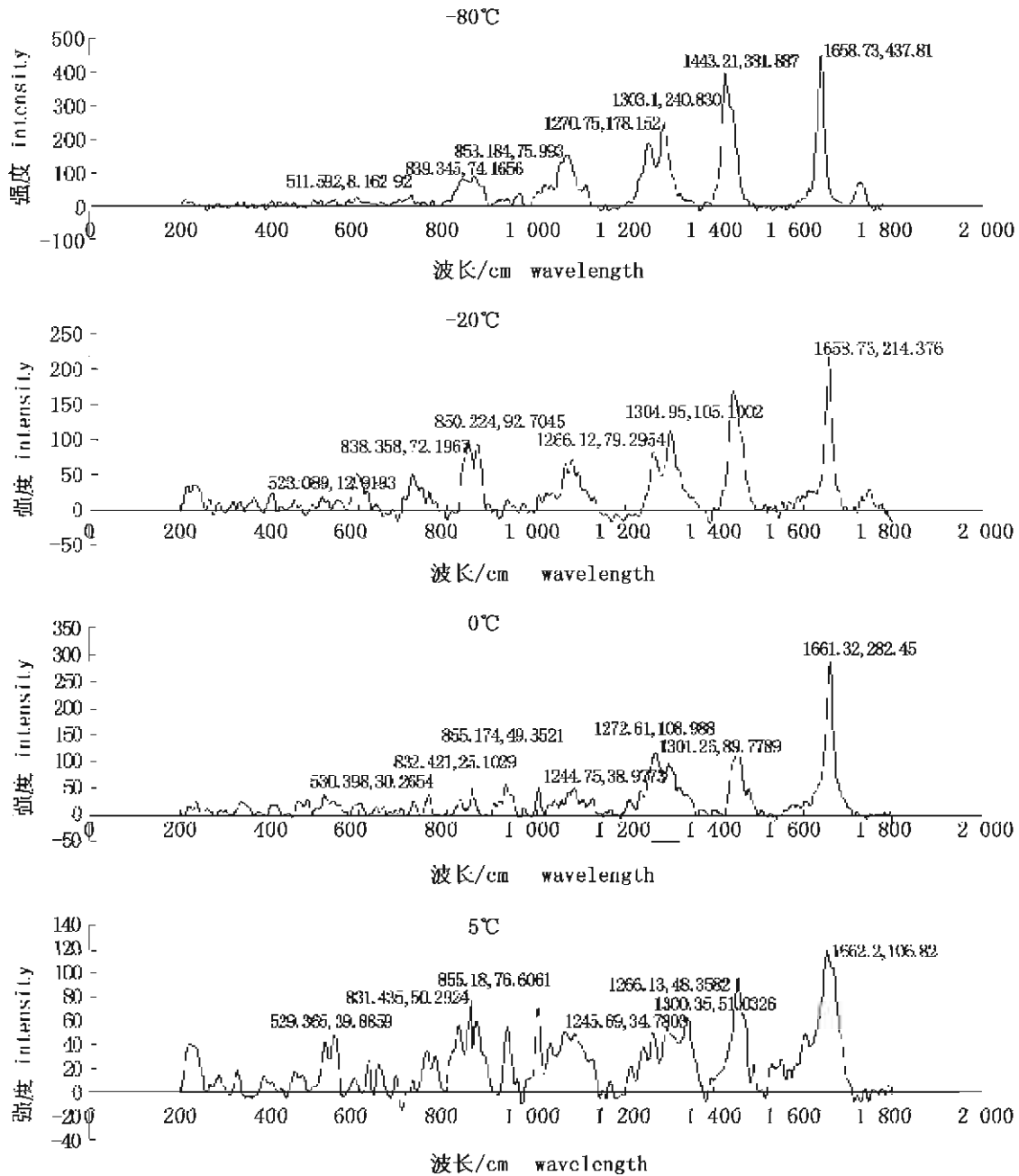


图 6 贮藏 4 周鳊鱼鱼糜的拉曼图谱

Fig. 6 Raman spectroscopy of *Parabramis pekinensis* surimi stored for 4 weeks

3 讨论

3.1 鱼糜蛋白质化学作用力对凝胶强度的影响

在贮藏中,温度越低,鳊鱼鱼糜凝胶强度下降越慢,即 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 最好, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 其次, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 一般, $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下降最快,且呈现先快后慢的特点,这种变化与鱼糜中肌球蛋白结构的变化密切相关。 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的鳊鱼鱼糜离子键、氢键呈现先快后慢的二段下降趋势,和凝胶强度变化趋势相同,这是由于鱼糜在冻藏过程中发生蛋白质发生聚集变性,化学键被破坏,使得品质下降。 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的鱼糜在贮藏过程中,疏水相互作用先增加后减少,可能与前期贮藏中蛋白质疏水性残基不断地暴露而使疏水相互作用增加,后因鱼糜蛋白质的降解而使疏水相互作用下降有关。在蛋白质分解酶的作用下,鱼糜蛋白质被分解,化学键相应的被破坏,因此, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 鱼糜的离子键、氢键在不断下降。由此可见,离子键、氢键、疏水相互作用在维持鱼糜蛋白质复杂的高级结构上起着重要的作用。

3.2 鱼糜蛋白质二级结构的变化

从贮藏一个月的鳊鱼鱼糜激光拉曼图谱上可以得出结论, α -螺旋结构是维持鳊鱼鱼糜蛋白质网状结构的主要构象,在 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 贮藏中鱼糜蛋白质的 α -螺旋均有部分转变成无规卷曲。肌球蛋白的尾部主要是 α -螺旋结构,当 α -螺旋解旋而部分转成无规卷曲,在此结构转变中包埋于肌球蛋白分子内的疏水性残基暴露于分子表面,形成疏水区,增加了肌球蛋白分子间的疏水相互作用,从而使鱼糜蛋白质发生变性。

参考文献:

- [1] 周国艳,郭堂鹏. 鲢鱼鱼糜在储藏过程中新鲜度和盐溶性蛋白质变化研究[J]. 食品科学,2008,29(8):241-243.
- [2] 菲尼马著,王璋(译). 食品化学[M]. 第3版. 北京:中国轻工业出版社,2003:4.
- [3] 汪之和. 水产品加工与利用[M]. 北京:化学工业出版社,2003:219-233.
- [4] 周爱梅,曾庆孝,刘欣,等. 冷冻鱼糜蛋白在冻藏中的物理化学变化及其影响因素[J]. 食品科学,2003,24(3):153-157.
- [5] 汪之和,苏德福. 冻结速率和冻结温度对鲢鱼肉蛋白质冷冻变性的影响[J]. 水产学报,2001,25(1):35-41.
- [6] 刘艺杰,薛长湖,李兆杰. 鳊鱼鱼糜在冻藏过程中理化性质变化的研究[J]. 食品工业科技,2006,27(6):70-72.
- [7] 周爱梅,龚杰,邢彩云,等. 罗非鱼与鳊鱼鱼糜蛋白在冻藏中的生化及凝胶特性变化[J]. 华南农业大学学报,2005,26(3):103-107.
- [8] 潘锦锋,罗永康. 鲢鱼鱼糜在冻藏过程中理化特性的变化[J]. 肉类研究,2008,115(9):45-49.
- [9] Careche M, Garca M L, Herrero A, et al. Structural properties of aggregates from frozen stored hake muscle proteins[J]. Journal of Food Science,2002,67(8):2827-2832.
- [10] 刘峥,夏之宁. 光谱法在分子之间相互作用研究中的应用[J]. 激光杂志,2001,22(6):9-11.
- [11] Ogawa M, Kanamaru J, Miyashita H, et al. Alpha-helical structure of fish actomyosin: changes during setting[J]. Journal of Food Science,1995,60(2):297-298.
- [12] Chan J K, Gill T A, Paulson A T. Cross-linking of myosin heavy chains from cod, herring and silver hake during thermal setting[J]. Journal of Food Science,1992,57(4):906-912.
- [13] Benjakul S, Visessanguan W, Thongkaew C, et al. Comparative study on physicochemical changes of muscle proteins from some tropical fish during frozen storage[J]. Food Research International,2003,36(8):787-795.
- [14] Luo Y K, et al. Gel properties of surimi from bighead carp (*Aristichthys nobilis*): Influence of setting and soy protein isolate[J]. Journal of Food Science,2004,69(8):374-378.
- [15] 万建荣,洪玉菁,奚印慈,等. 水产食品化学分析手册上海[M]. 上海:上海科技出版社,1993:154-157.
- [16] 刘海梅,熊善柏,谢笔钧,等. 鲢鱼糜凝胶形成过程中化学作用力及蛋白质构象的变化[J]. 中国水产科学,2008,15(3):469-475.
- [17] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with Folin phenol reagent[J]. J Biol Chem,1951,193(1):265-275.
- [18] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T₄[J]. Nature,1970,227:680-685.
- [19] 杨贤庆. 鱼糜冷冻变性及其防止[J]. 制冷,1994,48(3):36-39.
- [20] Xiong Y L, Blandchard S P. Myofibrillar protein gelation: viscoelastic changes related to heating

- procedures [J]. *Journal of Food Science*, 1994, 59 (4): 734 - 738.
- [21] Greenfield N J. Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data [J]. *Analytical Biochemistry*, 1996, 235: 1 - 10.
- [22] Gomez-Guillen M C, Borderias A J, *et al.* Chemical interactions of nonmuscle proteins in the network of sardine (*Sardina pilchardus*) muscle gels [J]. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 1997, 30(6): 602 - 608.
- [23] Park J, Lanier T C. Scanning calorimetric behavior of Tilapia myosin and action due to processing of muscle and protein purification [J]. *Journal of Food Science*, 1989, 54(1): 49 - 51.
- [24] Benjakul S. Suwari gel properties as affected by transglutaminase activator and inhibitors [J]. *Food Chemistry*, 2004, 85(1): 91 - 99.
- [25] Tu A T. *Proteins* [M]. New York: Wiley Interscience, 1982: 65 - 116.
- [26] Careche M, Garca M L, Herrero A, *et al.* Structural properties of aggregates from frozen stored hake muscle proteins [J]. *Journal of Food Science*, 2002, 67(8): 2827 - 2832.

Studies on the protein structure and characteristics of gel strength of *Parabramis pekinensis* surimi

WANG Zhi-he*, ZHU Kong-hui, SHI Wen-zheng, GUO Feng-hong

(College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Protein plays an important role in the gel-forming of surimi. The effects of protein structure on the gel formation of surimi were studied through the changes of myosin chemical interactions and laser Raman spectroscopy during the *Parabramis pekinensis* surimi storage. The results showed that the myosin contents, ionic bonds, hydrogen bonds and hydrophobic bonds of surimi decreased fast at first and then slowly as well as the changes of gel strength during storage at the temperature of $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. The myosin contents, ionic bonds and hydrogen bonds of surimi declined directly during storage at the temperature of $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $5\text{ }^{\circ}\text{C}$, while the hydrophobic bond increased at first and then decreased. Thus, It can be concluded that myosin contents, ionic bonds and hydrogen bonds play important roles in maintaining the complex high-level structure of surimi. According to the Laser Raman spectroscopy, α -helix structure is the major conformation maintaining protein network structure of *Parabramis pekinensis* surimi. Part of α -helix of myosin changed into random coil structure during the storage. When α -helix structure turned into random coil partly, the hydrophobic residues embedded in myosin molecules were exposed to the surface of molecules as the protein denatured. The higher the storage temperature, the more content of random coil structure and the greater the degree of protein denaturation, which reflected in the gel strength decreased more. The study of surimi protein structural changes during the storage of surimi clarifies the formation mechanism and the prevention of surimi protein denaturation significantly. The correlation of surimi myosin chemical interactions, protein secondary structure and the ability of surimi gel-forming could be continued in the future research.

Key words: *Parabramis pekinensis*; surimi; chemical interactions; protein conformation

Corresponding author: WANG Zhi-he. E-mail: zhwang@shou.edu.cn