



超声时间对鲢鱼糜凝胶特性和蛋白结构的影响及其相关性

姜昕¹, 陈晴¹, 田志航¹, 冯倩¹,
苏采薇¹, 王锡昌¹, 施文正^{1,2*}

(1. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306;

2. 上海海洋大学, 国家淡水水产品加工技术研发分中心, 上海 201306)

摘要: 为探究超声预处理对鱼糜凝胶特性的影响, 并进一步阐明凝胶特性变化与蛋白二级结构之间的相关性规律, 本实验对鲢鱼糜进行超声预处理, 探究超声过程中 (0~50 min) 凝胶强度、色泽、水分分布、微观结构、蛋白分子量以及二级结构的变化。结果显示, 超声波处理 10 min, 鱼糜凝胶强度显著提高, 束缚水的能力增强, 凝胶网络结构更为致密; 但随超声时间的增加, 凝胶劣化, 不易流动水转变为自由水。凝胶电泳及红外光谱结果显示, 随着超声时间增加, 鱼糜中蛋白未发生降解或聚集; 二级结构中 α -螺旋相对含量降低, β -折叠、无规则卷曲和 β -转角相对含量增加。通过皮尔逊相关性分析可知, 超声预处理促进蛋白质结构展开, 更利于鱼糜在加工过程中形成均匀的网络结构, 提高凝胶强度以及保水能力。研究表明, 适量超声预处理可以通过改变鱼糜蛋白结构, 改善鱼糜凝胶特性。本研究可为超声波技术在鱼糜制品加工中的应用提供参考。

关键词: 鲢; 鱼糜; 超声波; 弛豫时间; 二级结构; 相关性分析

中图分类号: TS 254.4

文献标志码: A

鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix*) 是我国主要的淡水养殖鱼类, 鱼刺较多, 商业价值较低, 可以通过深加工生产鱼糜制品实现其高值化利用^[1]。然而, 鲢鱼糜凝胶化程度低, 并且易凝胶劣化, 不利于形成紧实的鱼糜凝胶。因此, 如何改善鲢鱼糜的凝胶特性成为人们所关注的重点^[2]。目前, 可以通过外源物的添加或物化方法改变蛋白结构来改善鱼糜凝胶特性^[3]。

超声波技术是一种检测食品品质和改善食品特性的新兴物理技术, 操作简单, 在食品工业中有着许多潜在的应用。按照频率及强度大小可分为高频低强度超声和低频高强度超声。其中, 低

频高强度超声 (16~100 kHz) 通过空化作用诱导产生机械、物理、化学变化, 可用于提取、冷冻、干燥、乳化、灭活病原菌等食品加工中^[4]。低频高强度超声波改性机理产生的空化效应可以改变物质的空间结构, 从而对物化特性有一定影响; 同时, 因其产生的瞬态空化气泡数量相对较少, 尺寸较大, 使得物理效应比化学效应更容易发生, 利于营养物质的保留, 安全性较高^[5]。目前, 超声技术已应用于动植物蛋白改性中, 对动植物蛋白凝胶具有良好的改善效果^[6]。但因单一蛋白与鱼糜混合物的组成成分存在差异, 因此超声改性技术对鱼糜凝胶特性的影响需要进一步研究。

收稿日期: 2021-04-26 修回日期: 2021-08-27

资助项目: 国家重点研发计划 (2019YFD0902003)

第一作者: 姜昕 (照片), 从事水产品加工与贮藏研究, E-mail: 13053523375@163.com

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



本研究对鲢鱼糜进行超声波预处理, 并利用质构仪及核磁共振仪研究其凝胶特性以及水合特性在超声处理过程中的变化, 扫描电镜、电泳仪和傅里叶变换红外光谱仪观察鱼糜微观结构以及蛋白质分子量、二级结构的变化过程, 通过相关性分析来解释凝胶特性改善以及劣变的原因, 以此为鱼糜制品凝胶特性改善, 以及创新鱼糜制品开发提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

鲢鱼糜 (AAA 级, 水质量分数 76.66%), 洪湖市井力水产食品股份有限公司; 食盐, 中盐上海市盐业有限公司; 戊二醛固定液 (2.5%, 电镜专用), 上海源叶生物科技有限公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒, 上海碧云天生物技术有限公司; R21148-30T SDS-PAGE 凝胶快速配制试剂盒, 上海兰拓生物科技有限公司; 3597A 预混蛋白标品, 宝日医生物技术 (北京) 有限公司; 十二烷基硫酸氢钠, 北京索莱宝科技有限公司; β -巯基乙醇, 优级纯, 上海麦克林生化科技有限公司; 溴化钾, 光谱纯, 上海麦克林生化科技有限公司; 其他试剂均为分析纯, 国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

SB-400DTY 超声波多频清洗机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; AM-CG108 厨师机, 北美电器 (珠海) 有限公司; SCIENTZ-10N 冷冻干燥机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; HWS-24 双列四孔恒温水浴锅, 上海慧泰仪器制造有限公司; TA.XT Plus 质构仪, 英国 Stable Micro System 公司; CR-400 色差仪, 日本柯尼卡美能达公司; 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; 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; Mini-PROTEAN Tetra Cell 电泳槽, 美国伯乐公司; Nicolet iS5 傅里叶变换红外光谱仪, 美国赛默飞世尔科技公司。

1.3 实验方法

低频超声波处理 将储存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的鲢鱼

糜取出, 置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下解冻 12 h。取解冻后的鱼糜 200 g 平铺于自封袋中, 放置于超声波输出设备底部, 使其尽量靠近超声波换能器。鱼糜样品分别超声处理 0、10、20、30、40 和 50 min, 标记为 US0、US10、US20、US30、US40 和 US50, 超声波处理后放置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。超声波输出设备参数设置为频率 40 kHz、功率 360 W, 利用冰水控制水温在 $(10\pm 3)\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

鱼糜凝胶制备 将未超声及超声处理的 200 g 鱼糜置于搅拌机中分别搅拌 2、4 和 4 min, 搅拌过程中加入 24.7% 冰水、2% 食盐, 控制鱼糜温度不高于 $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, 并使鱼糜水分调至 78%。搅拌后将鱼糜灌入直径 25 mm 的肠衣中, 进行二段式加热 ($40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 凝胶化 60 min, $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高温加热 30 min), 加热结束后将鱼糜凝胶置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境中冷藏 12~24 h。

凝胶强度 参考张花^[7]的方法作适当修改, 选用 TA.XT Plus 质构仪测定鱼糜凝胶的凝胶强度。鱼糜凝胶置于室温环境下平衡温度 30 min 后, 切成高 25 mm 的圆柱体, 用 P/5S 球形探头进行穿刺实验。测定参数: 测前速率 2.00 mm/s, 测试速率 1.00 mm/s, 测后速率 10.00 mm/s, 下压距离 15 mm, 触发力 10 g。凝胶强度计算公式:

凝胶强度 (g·cm) = 破断力 (g) × 破断距离 (cm)

白度 参考张花^[7]的方法作适当修改, 鱼糜凝胶置于室温环境下平衡温度 30 min 后, 切成厚度 10 mm 的切片, 用 CR-400 色差计分别测定 L^* (亮度)、 a^* (红绿度) 和 b^* (黄蓝色) 值。白度的计算公式:

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

横向弛豫时间 T_2 及核磁成像 参考熊泽语等^[8]的处理方法作适当修改, 使用 MesoMR23-060H-I 纽迈脉冲核磁共振分析仪进行测定。将样品切成高 20 mm 的圆柱体, 用保鲜膜包好放入核磁管中, 采用 CPMG 脉冲序列采集样品信号、SIRT1000000 进行反演。测定参数: 质子共振频率 (SF) 21 MHz, 接收机带宽 (SW) 200 kHz, 开始采样时间的控制参数 (RFD) 0.08 ms, 模拟增益 (RG1) 10 db, 数字增益 (DRG1) 3, 前置放大增益 (PRG) 1, 90° 脉宽 (P1) 20 μs , 180° 脉宽 (P2) 39.04

μs , 重复采样等待时间 (Tw) 2 500 ms, 回波时间 (TE) 0.3 ms, 回波个数 (NECH) 8 000, 重复采样次数 (NS) 8。用迈拓核磁共振软件进行成像分析。测定参数: 翻转角 (flip angle) 90° , 等待时间 (TR) 500 ms, 回波时间 (TE) 20 ms, 累加次数 (Average) 2, 相位编码 (phase size) 192, 读取大小 (read size) 256, 选层层数 (slices) 1, 选层厚度 (slice width) 3.0 mm。将成像得到的质子密度加权像进行统一映像处理, 而后输出为伪彩图。

微观结构 参考张花^[7]的方法作适当修改, 选用日立 SU5000 热场发射扫描电镜进行观察。将样品切成 3.0 mm×3.0 mm×1.5 mm 的小块, 用 10 倍体积的 2.5% 戊二醛溶液在 4 °C 下固定 4 h; 固定后用磷酸盐缓冲液 (PBS, 0.1 mol/L, pH=7.3) 冲洗 3 次, 冲洗样品时要确保样品充分浸泡在液体中, 每次冲洗时间为 15 min。用乙醇溶液进行梯度洗脱 (30%、50%、70%、80%、90%、100%), 每步 15 min; 洗脱后冷冻干燥 48 h, 得到的扫描电镜样品置于 -20 °C 下保存。扫描电镜观察前, 进行离子溅射仪喷金, 加速电压设定为 4 kV。

十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 参考 Kudre 等^[9]的方法作适当修改, 分别取超声处理后鱼糜样品 2.00 g, 与 18 mL 5% SDS 溶液混合后 5 000 r/min 均质 1 min, 85 °C 水浴加热 1 h。冷却至室温后, 10 000 r/min 离心 20 min, 取上清液, 利用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度, 稀释至 5 mg/mL。取 0.5 mL 稀释后的蛋白溶液与 0.5 mL 2×蛋白上样缓冲液 (25% 0.5 mol/L Tris-HCl、20% 甘油, 40% 质量浓度 10% SDS、5% 质量浓度 0.1% 溴酚蓝、10% β -巯基乙醇) 充分混合, 100 °C 水浴加热 5 min, 冷却至室温后, 8 000 r/min 离心 2 min, 取上清液存于 -20 °C。上样前沸水加热 5 min 变性并冷却至室温。利用凝胶快速配制试剂盒配置 10% 分离胶、5% 浓缩胶, 上样量为 3.5 μL , 电压 100 V。电泳结束后用染色液 (0.25% 考马斯亮蓝 R-250、45.5% 甲醇、9% 冰乙酸) 染色 30 min, 立即用脱色液 (5% 甲醇、7.5% 冰乙酸) 脱色至背景无色。

二级结构 参考 Han 等^[10]的方法作适当修改, 选用傅里叶变换红外光谱仪进行蛋白二级结构测定。未超声及超声处理的鱼糜于 -80 °C 下预冻 4 h 后, 置于真空冷冻干燥机中冷冻干燥 48 h。

冷冻干燥后的样品研磨成粉末, 于 -20 °C 环境中存放。分别将 150 mg KBr 与 15 mg 不同处理条件的鱼糜混合研磨, 在红外灯下制成薄而均匀的压片进行扫描, 扫描范围为 400~4 000 cm^{-1} , 扫描次数 32 次, 分辨率 4 cm^{-1} 。用 Omnic 和 Peak-Fit 4.12 软件进行处理, 拟合得到红外图谱并计算各二级结构百分比。

1.4 数据分析

本实验每组数据平行测定 3 次, 采用 IBM SPSS Statistics 23.0 软件进行数据统计处理及皮尔逊相关性分析, 采用 Origin 2018 绘图软件作图。

2 结果

2.1 凝胶强度

凝胶强度是评判鱼糜凝胶特性最基本的指标, 凝胶强度由破断力与破断距离乘积得到, 表示为凝胶的坚实程度^[11]。其中, 破断力可以表征凝胶硬度, 即紧密程度; 破断距离则表征凝胶柔韧性和弹性, 即结合性^[12]。鲢鱼糜凝胶强度在超声处理过程中呈先上升后下降的趋势, 10 min 时达到 (285.13±5.96) g·cm, 相比于未超声鱼糜凝胶提高 9.32% (图 1-c); 但随着超声时间的增加, 凝胶强度逐渐降低, 且低于未超声样品; 超声 30 min 后凝胶强度无显著差异 ($P>0.05$)。超声诱导凝胶破断力的变化趋势与凝胶强度相近, 通过 Pearson 相关性分析也得到证实 ($r=0.998$, $P<0.01$), 而破断距离在超声过程中无显著变化 ($P>0.05$)。

2.2 白度

超声处理鱼糜对其白度值的影响见图 2, 未超声样品白度值为 72.31±0.06, 相比于超声样品数值显著偏低 ($P<0.05$)。超声处理 10 min 的凝胶白度值达到 72.74±0.13, 但随着超声时间增加, 白度值降低, 且 20~50 min 超声后的凝胶白度值无显著差异 ($P>0.05$)。

2.3 弛豫时间 (T_2) 及不同水分比例

横向弛豫时间 T_2 是指原子核从激发状态到平衡状态的过程的所需时间^[13], 可反映不同水分与凝胶结合的紧密程度。弛豫时间越小, 水分稳定性越高。不同超声处理时间下, 鱼糜弛豫时间 T_2

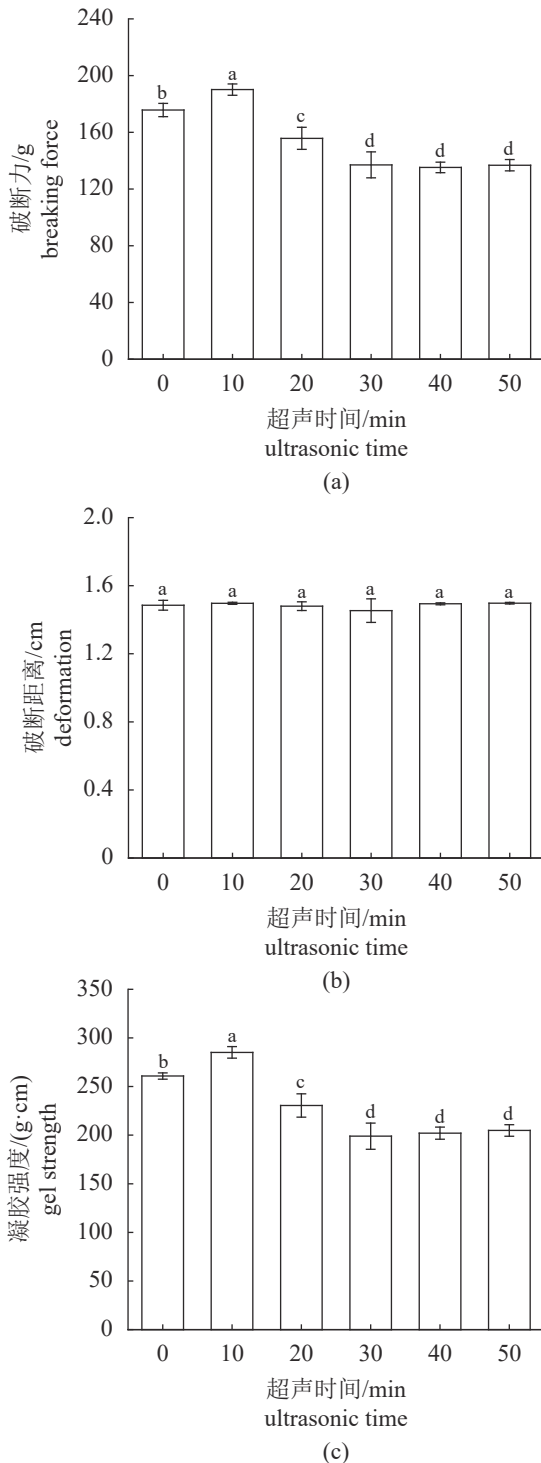


图1 超声处理时间对鱼糜凝胶破断力 (a)、破断距离 (b) 及凝胶强度 (c) 的影响

不同小写字母表示不同超声处理样品间差异显著 ($P < 0.05$), 下同。

Fig. 1 Effect of ultrasonic treatment time on the breaking force (a), deformation (b) and gel strength (c) of surimi gel

Different lowercases indicate significant differences between samples under different ultrasonic processing ($P < 0.05$), the same below.

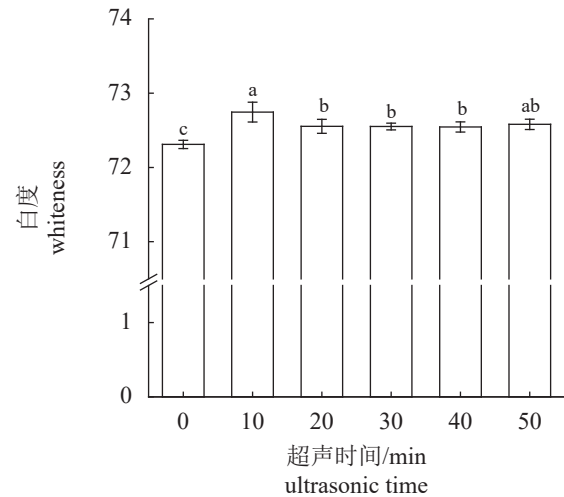


图2 超声处理时间对鱼糜凝胶白度的影响

Fig. 2 Effect of ultrasonic treatment time on the whiteness of surimi gel

出现 3~4 个峰, 其中, 不易流动水 T_{21} (20~200 ms) 和自由水 T_{22} (200~1 000 ms) 峰较为明显; 但结合水 T_{2b} 在 0.1~10.0 ms 内的峰面积相对较小, 即与蛋白结合的单层水和多层水的量较少 (图 3-a)。超声处理对各水分弛豫时间的影响较小, 峰起始时间、峰顶时间变化没有明显的迁移, 但对不同水分的影响较为明显。

不同水分横向弛豫峰面积百分比, 可代表结合水、不易流动水和自由水在鱼糜凝胶中的相对含量 (图 3-b)。超声预处理可以提高鲢鱼糜凝胶中结合水占比, 超声处理 0~50 min 结合水占比 PT_{2b} 分别为 1.66%、1.81%、2.28%、2.19%、2.29% 和 2.24%, 其中未超声凝胶结合水占比最小。因不易流动水相对含量 PT_{21} 与持水力有一定的相关性^[14], 可利用核磁观察不易流动水分的微小变化, 间接判断凝胶持水能力的强弱, 从而表征凝胶特性的变化。在超声 10 min 后, PT_{21} 由 91.32% 增加至 92.09%, 优于其他处理组 (US20~50: 91.30%、90.22%、90.03% 和 90.75%); 而自由水占比 PT_{22} 的变化趋势与不易流动水相反, 分别为 7.01%、6.10%、6.42%、7.59%、7.68% 和 7.01%。

2.4 质子密度伪彩图

核磁共振生成的质子密度伪彩图 (伪彩值范围为 0~255) 可以观察鱼糜凝胶网络内部的水分分布及水分含量, 图像中红色区域氢质子密度高, 代表该区域水分含量较高, 蓝色区域氢质子密度低, 则代表水分含量较低^[13]。随着超声处理时间增加, 伪彩图中红色区域的面积逐渐减少, 青色

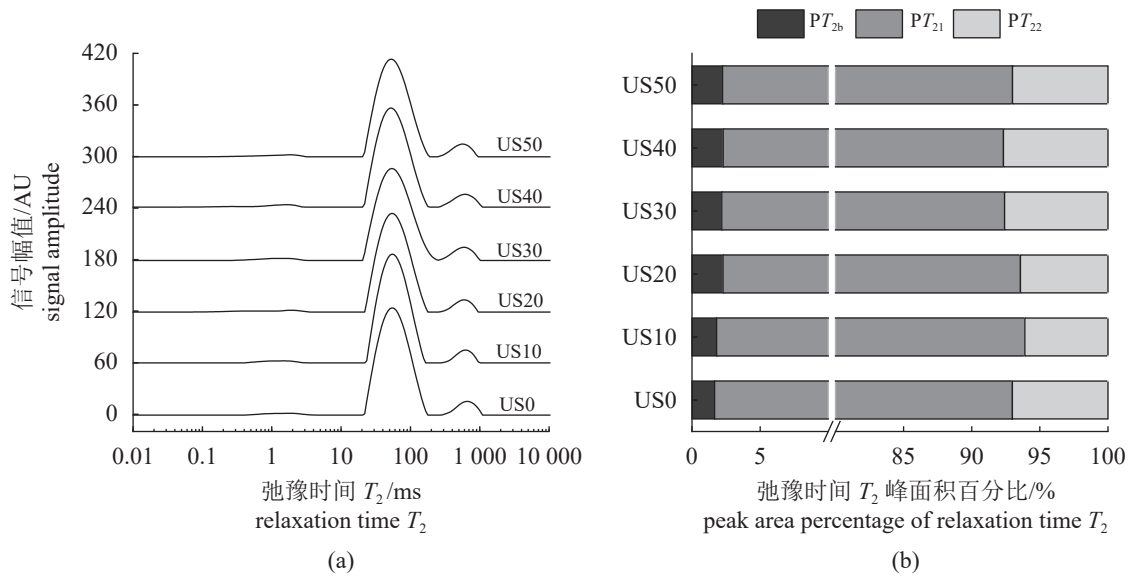
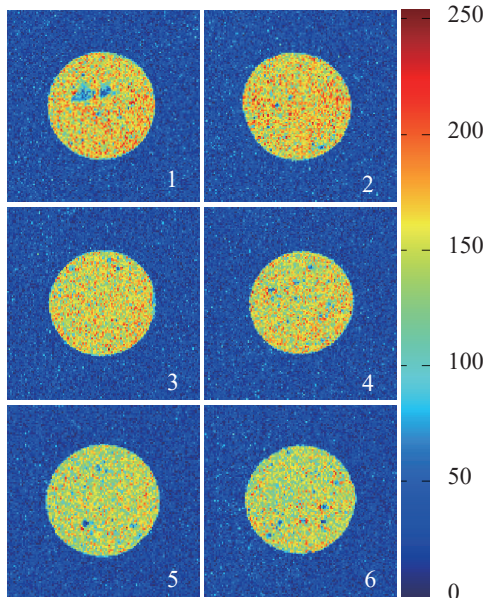


图3 超声处理时间对鱼糜凝胶弛豫时间 T_2 (a) 以及峰面积所占百分比 (b) 的影响

Fig. 3 Effects of ultrasonic treatment time on relaxation time T_2 (a) and peak area percentage (b) of surimi gel

区域面积增加。其中, 超声处理 0 与 10 min 的图像较为接近, 且红色区域面积较大; 而超声 20 和 30 min 质子密度减少且低于未超声组, 40 与 50 min 氢质子密度减少更为明显 (图版 I)。



图版 I 不同超声处理时间鱼糜凝胶核磁共振伪彩图
1-6. 超声分别处理 0、10、20、30、40 和 50 min; 下同。

Plate I NMR pseudo color images of surimi gel treated with different ultrasonic treatment time

1-6. Ultrasound treatment for 0, 10, 20, 30, 40 and 50 min, respectively; the same below.

2.5 微观结构

扫描电镜可观察到凝胶体系内部微观结构的

变化, 并解释三维网络结构与凝胶性能 (凝胶强度/水分分布) 的密切关系。图版 II 可观察 2 000 倍数下鱼糜凝胶内部孔径及分布情况, 以及 7 000 倍数下鱼糜的致密程度。与未超声鱼糜凝胶相比, 超声处理 10 min 后鱼糜结构紧密, 但超声处理 50 min 后, 凝胶内部平整程度下降, 切面出现大的孔洞, 孔径分布不均 (图版 II)。

2.6 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳

图 4 为超声处理后鱼糜蛋白分子量的变化, 其中预混蛋白标品分别为肌球蛋白 (200 ku)、 β 半乳糖苷酶 (116 ku)、磷酸酶 b (97.2 ku)、牛血清蛋白 (66.4 ku)、卵清蛋白 (44.3 ku)、碳酸苷酶 (29.0 ku) 电泳条带。鱼糜中主要蛋白为肌球蛋白、肌动蛋白以及原肌球蛋白^[15]。对比未超声对照组, 经过超声处理后, 肌球蛋白以及肌动蛋白等主要蛋白未发生降解或聚集。

2.7 二级结构

超声处理作用于鱼糜, 可以改变其中蛋白的二级结构, 而其中含量较多的肌原纤维蛋白, 在鱼糜凝胶三维网络的形成过程中起重要作用, 其二级结构的改变可能影响鱼糜的凝胶特性。通过傅里叶变换红外光谱观察酰胺 I 带 ($1\ 600\sim 1\ 700\ \text{cm}^{-1}$) 可以确定蛋白二级结构的变化, 酰胺 I 带包括 α -螺旋 ($1\ 650\sim 1\ 660\ \text{cm}^{-1}$)、无规则卷曲 ($1\ 660\sim 1\ 665\ \text{cm}^{-1}$)、 β -折叠 ($1\ 665\sim 1\ 680\ \text{cm}^{-1}$) 和 β -转角 ($\sim 1\ 680\ \text{cm}^{-1}$)^[16]。 α -螺旋的形成主要由羰基氧 ($-\text{CO}$)

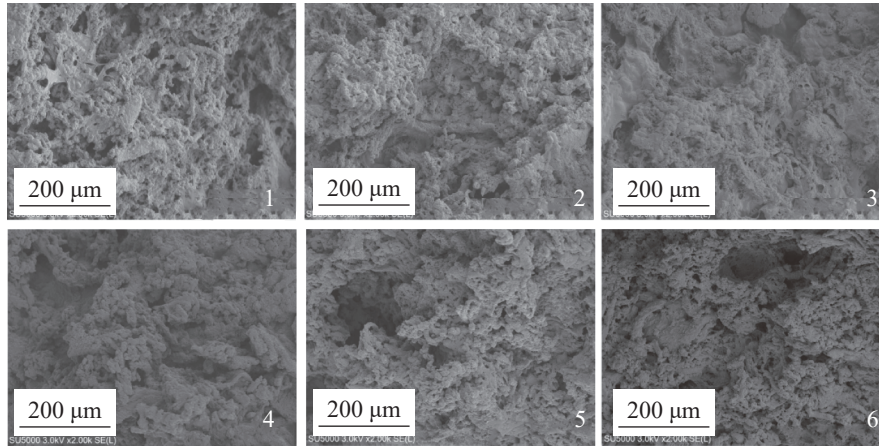
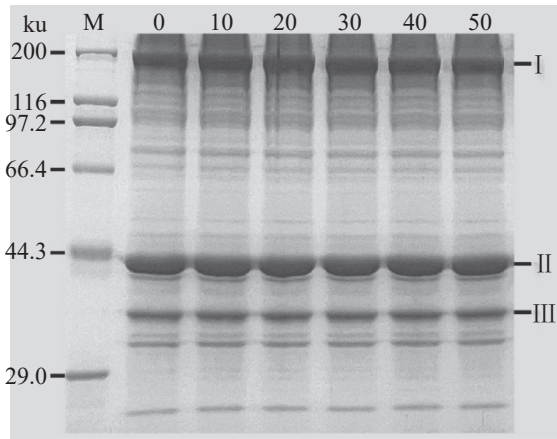
图版 II 不同超声处理时间鱼糜凝胶的微观结构 ($\times 2\ 000$)Plate II Microstructure of surimi gel with different ultrasonic treatment time ($\times 2\ 000$)

图 4 不同超声处理时间鱼糜蛋白分子量

M. 预混蛋白标品; I. 肌球蛋白重链; II. 肌动蛋白; III. 原肌球蛋白。

Fig. 4 Molecular weight of surimi protein in different ultrasonic treatment time

M. premixed protein marker; I. myosin heavy chain, MHC; II. actin; III. tropomyosin.

和氨基氢 (NH-) 之间的分子内氢键稳定; β -折叠则与肽链间的氢键有关; β -转角结构是由弱氢键

结构形成; 而无规则卷曲是无序结构, 与蛋白质的柔韧性有关^[17]。经过超声处理, α -螺旋含量整体呈现下降的趋势, 在 0~10 min 内无显著差异 ($P > 0.05$), 但在 10~20 min 内 α -螺旋比例发生显著变化。 β -折叠在超声过程中出现先升后降的趋势, 与凝胶强度的变化趋势存在线性关系 ($r=0.862$, $P < 0.05$), 在超声处理 10 min 时比例最高, 达到 $31.70\% \pm 0.44\%$ 。而无规则卷曲和 β -转角呈现上升的趋势 (表 1)。通过 Pearson 相关性分析可以得到, α -螺旋与无规则卷曲和 β -转角的 Pearson 相关系数分别为 -0.942 、 -0.972 ($P < 0.01$)。

2.8 相关性分析

Pearson 相关性系数可以判断两个指标之间是否存在线性关系。表 2 对凝胶物理特性和鱼糜蛋白二级结构进行相关性分析, 发现凝胶强度与蛋白二级结构均有相关性。其中, α -螺旋和 β -折叠呈正相关, 无规则卷曲与 β -转角呈负相关。结合水的含量与 α -螺旋呈正相关, 与无规则卷曲呈负相关 (表 2)。

表 1 超声处理时间对鱼糜蛋白二级结构相对含量的影响

Tab. 1 Effect of ultrasonic treatment time on the relative content of secondary structure of surimi protein %

超声时间/min ultrasonic time	α -螺旋 α -helix	无规则卷曲 random coil structure	β -折叠 β -sheet	β -转角 β -turn
0	40.44 \pm 2.20 ^a	15.72 \pm 1.50 ^b	29.62 \pm 1.32 ^b	14.22 \pm 2.22 ^c
10	38.38 \pm 2.01 ^a	14.37 \pm 1.91 ^b	31.70 \pm 0.44 ^a	15.55 \pm 0.27 ^c
20	26.78 \pm 0.50 ^b	20.02 \pm 0.54 ^a	29.60 \pm 0.07 ^b	23.59 \pm 0.10 ^b
30	28.98 \pm 1.07 ^b	20.73 \pm 1.69 ^a	28.32 \pm 0.86 ^b	21.98 \pm 0.27 ^b
40	26.86 \pm 0.17 ^b	20.52 \pm 0.47 ^a	29.51 \pm 0.05 ^b	23.11 \pm 0.24 ^b
50	26.37 \pm 0.50 ^b	20.11 \pm 0.83 ^a	26.81 \pm 0.32 ^c	26.71 \pm 1.32 ^a

注: 同列不同小写字母表示不同超声处理样品间差异显著 ($P < 0.05$), 下同。

Notes: Different lowercases in the same column indicate significant differences between different ultrasonic treatment samples ($P < 0.05$), the same below.

表 2 超声处理诱导鱼糜凝胶特性与蛋白质二级结构变化的 Pearson 相关性分析

指标 index		α -螺旋 α -helix	无规则卷曲 random coil structure	β -折叠 β -sheet	β -转角 β -turn
凝胶强度	gel strength	0.870*	-0.965**	0.862*	-0.847*
白度	whiteness	-0.227	-0.035	-0.008	0.225
	PT _{2b}	-0.994**	0.928**	-0.736	0.944**
	PT ₂₁	0.678	-0.841*	0.662	-0.616
	PT ₂₂	-0.405	0.635	-0.497	0.349

Notes: *. $P < 0.05$, **. $P < 0.01$.

3 讨论

3.1 理化性质

本研究利用超声波技术改变鱼糜中蛋白空间结构, 从而改善其凝胶特性以及保水特性。超声处理 10 min 后, 鱼糜凝胶的凝胶特性显著提高 ($P < 0.05$), 且破断力与凝胶强度为正相关, 说明超声诱导凝胶强度变化与鱼糜凝胶紧密程度的改变有关。Gao 等^[18] 也发现 100 kHz 超声波处理 10 min 可显著提高低盐鱼糜凝胶 (0%~2% NaCl) 的破断力、破断距离和持水力 ($P < 0.05$)。但处理时间增加, 凝胶破断力降低, 说明凝胶紧实程度降低, 可推测与鱼糜中蛋白结构的改变有关。

白度是鱼糜凝胶物理特性, 外源物质的添加以及凝胶网络结构的变化都会影响鱼糜的白度。通过物理方法使鱼糜凝胶中蛋白微观结构致密均匀, 内部大孔隙减少, 使更多的水分子被束缚于三维网络中, 从而提供更好的光泽度和透明度, 相应白度值增加^[19]。凝胶网络结构变化导致白度值的改变, 在蛋白凝胶中的效果明显^[20], 但在鱼糜制品中的呈现效果较低, 对鱼糜白度的影响较小。

不同超声时间对各水分的相对含量存在不同的影响。随着超声时间的增加, 结合水比例增加, 说明超声处理促进结构展开, 有利于水分子与蛋白氢键以及酰胺键的结合。Zhang 等^[14] 利用超声处理鸡胸肉肌原纤维蛋白同样发现, 超声功率提高使得更多的水分子与蛋白质分子紧密结合、PT_{2b} 增加。此外, 适量超声处理可以提高 PT₂₁, 且 PT₂₁ 的变化与凝胶强度呈正相关 ($r = 0.929$, $P < 0.05$), 说明超声处理后凝胶更致密紧实, 利于水分被束缚于鱼糜凝胶网络中。王静宇等^[21] 也发现, 短时间超声处理 (0~6 min) 会使更多的水分被束缚在鸡肉肌原纤维蛋白凝胶网络中, 使得凝胶的持

水力显著增强 ($P < 0.05$)。超声处理时间过长使 PT₂₂ 逐渐增加, 而自由水的变化趋势与不易流动水相反 ($r = -0.946$, $P < 0.01$), 说明过度超声处理反而不利于凝胶束缚水分, 使得部分不易流动水变为自由水。Zhang 等^[22] 研究鸡肉肌原纤维得到相似的结论。质子伪彩图中, 随着超声时间的延长, 质子密度降低, 同样说明过度超声使网络结构对水的束缚能力下降。

扫描电镜的实验结果表明, 超声处理有利于形成致密的网络结构, 进而束缚水分和增强凝胶强度, Gao 等^[18] 也发现超声明显改善鱼糜凝胶 (< 3% NaCl) 的微观结构。凝胶网络结构的改变可能与超声预处理过程中蛋白质二级结构改变有关。鱼糜中盐溶性蛋白质在超声的作用下结构发生改变, 分离肌球蛋白自组装, 更利于加热成型过程中形成紧凑的网络结构。

3.2 形成机理

鱼糜中含有的盐溶性蛋白占主要比例, 且经超声处理后未发生明显变化 (图 4), 说明超声时间过长导致凝胶劣化与蛋白降解或大分子聚集物的形成无关。因此, 超声处理 (0~50 min) 并不会引起鱼糜中肌球蛋白的降解或聚集, 这与超声直接作用于肌原纤维蛋白的结果有差异。Liu 等^[23] 超声 (20 kHz、250 W、12 min) 处理肌球蛋白发现, 肌球蛋白重链 (MHC) 带变薄且其下方出现更多的条带。Liu 等^[24] 超声处理 (20 kHz、600 W、15 min) 猪肌原纤维蛋白未出现蛋白降解现象, 但 MHC 带变薄且条带上方出现未知的高分子量可溶性低聚物; 但有研究认为超声处理不会影响肌原纤维蛋白分子量的变化^[25]。因此超声对蛋白分子量的作用与其所处介质以及超声参数有关, 此外不同来源、不同种类蛋白对空化效应的敏感程度也有

一定差异, 这可能导致结果的不一致性。

根据二级结构变化, 可发现超声后蛋白质刚性结构减少, 柔性结构含量增加, 分子结构由有序向无序转变^[26-27]。因此, 超声的空化和机械效应对蛋白空间结构的改变有一定效果。 α -螺旋为有序结构且主要位于内部, 其整体呈现下降的趋势, 说明结构发生解旋, 结果与其他研究一致^[28-29]。超声改性机理为, 超声过程中空化效应产生的高压高温等作用使得有序结构的稳定性降低, 氢键被破坏, 二级结构改变, 蛋白结构展开。Li 等^[30]超声处理鸡肉肌原纤维蛋白 6 min 后, α -螺旋含量由 41.90% 降至 25.21%。对比之下, 本研究处理时间较长, 这与超声波作用于固态物质产生的“表面效应”有关, 在鱼糜内部超声波的强度会随深度增加而降低。在 20 min 后 α -螺旋、无规则卷曲和 β -转角的变化没有显著差异 ($P>0.05$), 因此可推测, 10~20 min 蛋白结构变化的程度较大。

β -折叠结构增加使得肽链与肽链之间的氢键数量增加, 改变肌原纤维蛋白之间的相互作用, 在凝胶的聚集和网络形成中起重要作用。此外, 有研究认为 β -折叠的增加暴露了肌原纤维蛋白的疏水位点, 从而导致表面疏水性和黏弹性能的增加, 以此来改善凝胶网络的物化特性^[31]。超声处理 10 min 后, α -螺旋的有序结构被破坏并转化为 β -折叠; 与 α -螺旋结构相比, β -折叠和无规则卷曲具有相对的柔性和开放性^[24], 说明超声处理导致肌原纤维蛋白二级结构展开。谢亚如等^[32]通过提高超声强度, 同样发现超声破坏维持蛋白质二级结构的氢键, 使相对紧密的 α -螺旋向更为松散的 β -折叠和无规则卷曲结构转变。

依据相关性分析, 鱼糜凝胶强度与 α -螺旋呈现正相关, 但部分研究认为 α -螺旋含量减少与 β -折叠结构的形成, 有助于蛋白质-蛋白质相互作用^[33-35], 这与本研究结果相反。原因可能是鱼糜在超声预处理 10 min 后, 凝胶便发生劣化, 与 α -螺旋不断减少的趋势相近, 呈现正相关。 β -折叠的变化趋势与凝胶强度相近 ($r=0.862$, $P<0.05$), 可以说明超声预处理引起的 β -折叠变化会改善鱼糜的凝胶特性。此外, 超声处理过程中鱼糜中蛋白质由有序变为无序, α -螺旋含量降低、无规则卷曲及 β -转角相对含量增加, 使得蛋白结构展开, 利于水分子与活性基团结合^[14]。

综上所述, 适当时间超声波处理对鱼糜的凝胶特性有积极影响, 且鱼糜中的蛋白二级结构与

凝胶特性存在相关性。短时间超声处理 (10 min), 鱼糜凝胶的凝胶强度以及不易流动水的比例增加, 网络结构均匀致密。经 Pearson 相关性分析, 确定凝胶特性的改善与鱼糜中蛋白二级结构的改变有关, β -折叠相对含量增加可以改善鱼糜凝胶特性。然而, 长时间超声处理使鱼糜在后续加工过程中更容易凝胶劣化, 通过凝胶电泳实验可以排除鱼糜中蛋白发生降解或聚集; 二级结构中 α -螺旋转变为无规则卷曲和 β -转角, 固定水和自由水比例增加, 凝胶内部结构均匀、致密性降低, 不利于束缚水分, 凝胶特性劣化。本研究说明超声波技术可应用于改性鱼糜制品, 可为物理改性技术的实际应用提供参考。

(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-2020[M]. 北京: 中国农业出版社, 2020.
Fishery Administration Bureau of Ministry of Agriculture, National Aquatic Technology Promotion Station, China Fisheries Society. China fishery statistical yearbook 2020[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2020 (in Chinese).
- [2] Yi S M, Ji Y, Guo Z H, *et al.* Gel properties and flavor characteristics of blended anchovy (*Engraulis japonicus*) mince and silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) surimi[J]. *RSC Advances*, 2020, 10(11): 6563-6570.
- [3] Park J W. Surimi and surimi seafood[M]. 3rd ed. New York: CRC Press, 2013.
- [4] Téllez-morales J A, Hernández-Santo B, Rodríguez-Miranda J. Effect of ultrasound on the techno-functional properties of food components/ingredients: a review[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2020, 61: 104787.
- [5] Pingret D, Fabiano-tixier A S, Chemat F. Degradation during application of ultrasound in food processing: a review[J]. *Food Control*, 2013, 31(2): 593-606.
- [6] 姜昕, 王锡昌, 潘凤涛, 等. 物理法改善鱼肉蛋白功能特性研究概述[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(5): 288-295.
Jiang X, Wang X C, Pan F T, *et al.* Research progress of physical methods on modifying functional properties of fish meat protein[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(5): 288-295 (in Chinese).
- [7] 张花. 高温对鱼糜制品品质影响 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2019.

- Zhang H. Effects of high-temperature on quality of surimi products[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2019 (in Chinese).
- [8] 熊泽语, 谢晨, 陈百科, 等. 不同添加物对未漂洗大黄花鱼鱼糜品质的影响[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(10): 151-158.
- Xiong Z Y, Xie C, Chen B K, *et al.* Effects of different additives on the quality of non-rinsed large yellow croaker surimi[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(10): 151-158 (in Chinese).
- [9] Kudre T, Benjakul S, Kishimura H. Effects of protein isolates from black bean and mungbean on proteolysis and gel properties of surimi from sardine (*Sardinella albella*)[J]. LWT-Food Science and Technology, 2013, 50(2): 511-518.
- [10] Han Z Y, Zhang J L, Zheng J Y, *et al.* The study of protein conformation and hydration characteristics of meat batters at various phase transition temperatures combined with low-field nuclear magnetic resonance and Fourier transform infrared spectroscopy[J]. Food Chemistry, 2019, 280: 263-269.
- [11] 张崑, 王卫, 张佳敏. 鱼糜及鱼糜制品质构的评价方法[J]. 成都大学学报(自然科学版), 2010, 29(3): 205-207,210.
- Zhang Y, Wang W, Zhang J M. Evaluation method for texture of surimi and surimi products[J]. Journal of Chengdu University (Natural Science Edition), 2010, 29(3): 205-207,210 (in Chinese).
- [12] 王康宇, 王瑞红, 李钰金, 等. α -生育酚处理与真空包装对复合鲟鱼糜冻藏期间品质的影响[J]. 食品科学, 2021, 42(11): 195-204.
- Wang K Y, Wang R H, Li Y J, *et al.* Effects of α -tocopherol and vacuum packaging on the quality of sturgeon surimi incorporated with chicken meat during frozen storage[J]. Food Science, 2021, 42(11): 195-204 (in Chinese).
- [13] 宋平. 基于低场核磁共振技术的水稻浸种过程种子水分检测研究 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2016.
- Song P. Study of water content detection in the rice seed soaking process based on low field nmr techniques[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [14] Zhang Z Y, Regenstein J M, Zhou P, *et al.* Effects of high intensity ultrasound modification on physicochemical property and water in myofibrillar protein gel[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2017, 34: 960-967.
- [15] 相悦, 孙承锋, 李来好, 等. 花鲈冰藏过程中肌原纤维蛋白生化特性与新鲜度变化的相关性[J]. 水产学报, 2021, 45(2): 283-295.
- Xiang Y, Sun C F, Li L H, *et al.* Correlation between changes in freshness and protein biochemical properties of *Lateolabrax japonicas* during iced storage[J]. Journal of Fisheries of China, 2021, 45(2): 283-295 (in Chinese).
- [16] Yang H J, Zhang W G, Li T, *et al.* Effect of protein structure on water and fat distribution during meat gelling[J]. Food Chemistry, 2016, 204: 239-245.
- [17] Li C, Arakawa T. Feasibility of circular dichroism to study protein structure at extreme concentrations[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 132: 1290-1295.
- [18] Gao X, Xie Y R, Yin T, *et al.* Effect of high intensity ultrasound on gelation properties of silver carp surimi with different salt contents[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2021, 70: 105326.
- [19] Xue S W, Xu X L, Shan H M, *et al.* Effects of high-intensity ultrasound, high-pressure processing, and high-pressure homogenization on the physicochemical and functional properties of myofibrillar proteins[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2018, 45: 354-360.
- [20] Wen Q H, Tu Z C, Zhang L, *et al.* Effect of high intensity ultrasound on the gel and structural properties of *Ctenopharyngodon idellus* myofibrillar protein[J]. Journal of Food Biochemistry, 2017, 41(1): e12288.
- [21] 王静宇, 杨玉玲, 康大成, 等. 超声波对肌原纤维蛋白热诱导凝胶化学作用力与保水性的影响[J]. 中国农业科学, 2017, 50(12): 2349-2358.
- Wang J Y, Yang Y L, Kang D C, *et al.* Effects of ultrasound on chemical forces and water holding capacity study of heat-Induced myofibrillar protein gel[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2017, 50(12): 2349-2358 (in Chinese).
- [22] Zhang C, Liu H T, Xia X F, *et al.* Effect of ultrasound-assisted immersion thawing on emulsifying and gelling properties of chicken myofibrillar protein[J]. LWT, 2021, 142: 111016.
- [23] Liu R, Liu Q, Xiong S B, *et al.* Effects of high intensity ultrasound on structural and physicochemical properties of myosin from silver carp[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2017, 37: 150-157.
- [24] Liu H T, Zhang H, Liu Q, *et al.* Solubilization and stable dispersion of myofibrillar proteins in water through the destruction and inhibition of the assembly of filaments using high-intensity ultrasound[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2020, 67: 105160.
- [25] 常海霞, 石燕, 王辉, 等. 超声波对草鱼肌肉肌原纤维蛋白溶液理化特性的影响[J]. 食品科学, 2015, 36(5): 56-60.
- Chang H X, Shi Y, Wang H, *et al.* Effect of ultrasonic treatment on physico-chemical properties of myofibrillar

- lar protein from grass carp[J]. *Food Science*, 2015, 36(5): 56-60 (in Chinese).
- [26] 涂宗财, 包中宇, 王辉, 等. 超声波对大豆分离蛋白结构及其形成谷氨酰胺转氨酶改性凝胶性质的影响[J]. *食品科学*, 2015, 36(15): 15-19.
- Tu Z C, Bao Z Y, Wang H, *et al.* Effect of ultrasonic treatment on structure and gel properties induced by transglutaminase of soybean protein isolate[J]. *Food Science*, 2015, 36(15): 15-19 (in Chinese).
- [27] Zhou G W, Liu J N, Wang G R, *et al.* Effect of ultrasonic treatment on freeze-thaw stability of soy protein isolate gel[J]. *Journal of Oleo Science*, 2019, 68(11): 1113-1123.
- [28] Chen X, Zhou R Y, Xu X L, *et al.* Structural modification by high-pressure homogenization for improved functional properties of freeze-dried myofibrillar proteins powder[J]. *Food Research International*, 2017, 100: 193-200.
- [29] Li Z Y, Wang J Y, Zheng B D, *et al.* Impact of combined ultrasound-microwave treatment on structural and functional properties of golden threadfin bream (*Nemipterus virgatus*) myofibrillar proteins and hydrolysates[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2020, 65: 105063.
- [30] Li K, Fu L, Zhao Y Y, *et al.* Use of high-intensity ultrasound to improve emulsifying properties of chicken myofibrillar protein and enhance the rheological properties and stability of the emulsion[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 98: 105275.
- [31] Qin X S, Luo S Z, Cai J, *et al.* Transglutaminase-induced gelation properties of soy protein isolate and wheat gluten mixtures with high intensity ultrasonic pretreatment[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2016, 31: 590-597.
- [32] 谢亚如, 刘庆, 熊善柏, 等. 高强度超声作用下鲢鱼肌球蛋白的结构及流变学特性变化[J]. *食品科学*, 2019, 40(5): 77-84.
- Xie Y R, Liu Q, Xiong S B, *et al.* Effect of high intensity ultrasound on structural and rheological properties of myosin from silver carp[J]. *Food Science*, 2019, 40(5): 77-84 (in Chinese).
- [33] Guo M H, Liu S C, Ismail M, *et al.* Changes in the myosin secondary structure and shrimp surimi gel strength induced by dense phase carbon dioxide[J]. *Food Chemistry*, 2017, 227: 219-226.
- [34] Shao J H, Zou Y F, Xu X L, *et al.* Evaluation of structural changes in raw and heated meat batters prepared with different lipids using Raman spectroscopy[J]. *Food Research International*, 2011, 44(9): 2955-2961.
- [35] Cheng Y, Donkor P O, Ren X F, *et al.* Effect of ultrasound pretreatment with mono-frequency and simultaneous dual frequency on the mechanical properties and microstructure of whey protein emulsion gels[J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 89: 434-442.

Effect of ultrasonic time on gel properties and protein structure of *Hypophthalmichthys molitrix* surimi and correlation analysis

JIANG Xin¹, CHEN Qing¹, TIAN Zhihang¹, FENG Qian¹,
SU Caiwei¹, WANG Xichang¹, SHI Wenzheng^{1,2*}

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

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

Abstract: *Hypophthalmichthys molitrix* is the main freshwater aquaculture fish in China, which belongs to low-value fish due to the less content of fish meat and large amounts of bones. Therefore, it was necessary to produce deep processing food, such as surimi products, to realize high-value utilization of *H. molitrix*. However, the gelatinization of *H. molitrix* surimi was weak, which was not conducive to the formation of dense surimi gels. Currently, exogenous additives and physicochemical technology were usually used to improve the surimi gel properties. Ultrasonic technology is a new non-thermal physical technology to detect food quality and improve food characteristics. In addition, it is simple to operate and has many potential applications in food industry. Commonly, low-frequency and high-intensity ultrasound (16-100 kHz) was used in the modification of plant protein and animal protein which contributed to the cavitation effect. More research focused on the mechanism of protein modification by ultrasonic technology, but few on its practical application. In order to improve the gel properties of *H. molitrix* surimi and realize the practical application of ultrasonic technology, this research explored the physical characteristics of surimi gel and the secondary structure of surimi protein by 0-50 min ultrasonic treatment, as well as the relationship between gel properties and secondary structure. Furthermore, the principle of improvement and deterioration of gel network by ultrasonic technology was explained. Thus, the effects of ultrasonic time on the gel strength, color, relaxation time and microstructure of surimi gels by low-frequency and high intensity ultrasonic technology were studied. Moreover, the changes of protein molecular weight and secondary structure in surimi after ultrasonic treatment were also investigated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Fourier transform infrared spectrometer (FTIR Spectrometer). The results showed that after ultrasonic pretreatment for 10 min, the gel strength of surimi increased significantly from (260.81±3.26) g·cm to (285.13±5.96) g·cm, and the tightness of surimi gel improved. And the gel matrix showed higher whiteness of 72.74±0.13, carried out by ultrasound in 10 min. Additionally, the proportion of immobile water was increased, and the capacity to bind water of gels was enhanced, which made the network structure more compact. However, with the increase of ultrasonic time, the gel strength decreased, and the immobile water was changing into free water. Therefore, the ratio of free water increased, and the internal structure of gels tended to be weak and loose. SDS-PAGE image proved that salt-soluble proteins (myosin, actin, tropomyosin) mainly consisted in surimi, and did not degrade or aggregate with the increase of ultrasonic time. While the relative content of α -helix decreased, β -sheet, random coil structure and β -turn increased after appropriate ultrasonic processing. Through Pearson correlation analysis, ultrasound pretreatment could promote the unfolding of salt soluble protein, which was more conducive to the formation of compact network structure, enhancing gel strength and water holding capacity in surimi processing. In conclusion, proper ultrasonic pretreatment could improve the gel properties of surimi by changing the three-dimensional structure of surimi protein, but excessive ultrasonic time was not beneficial to the formation of dense surimi gel. This research provided an experimental basis for improving the gel properties of surimi products, the practical application of ultrasonic technology and the innovative development of surimi products.

Key words: *Hypophthalmichthys molitrix*; surimi; ultrasound; relaxation time; secondary structure; correlation analysis

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

Funding projects: National Key R & D Program of China (2019YFD0902003)