

基于不同提取方式的鱼皮胶原蛋白对重组鱼肉品质的影响

赵利, 温慧芳, 袁美兰, 陈丽丽, 苏伟, 江勇, 刘华

(江西科技师范大学生命科学学院, 国家淡水鱼加工研发技术分中心, 江西南昌 330013)

摘要: 为了提高淡水鱼糜制品的品质, 本研究以草鱼为原料, 用盐法、酸法和碱法提取鲰鱼皮中的胶原蛋白, 探究其对重组鱼肉品质的影响及作用机制。通过对重组鱼肉的凝胶强度、TPA 质地特性(硬度和咀嚼性)、析水率以及白度值的分析变化, 综合评判胶原蛋白对重组鱼肉品质的影响, 并通过化合作用力、蛋白质溶解率和 TCA 可溶肽含量, 以及石蜡组织切片和 SDS-PAGE 探究了鱼皮胶原蛋白在重组鱼肉中的作用机制。结果发现: 胶原蛋白显著提升了重组鱼肉的品质特性, 提升效果为碱法>酸法>盐法; 而其作用机制也有差异: 碱溶性胶原蛋白与鱼糜凝胶的过程中不仅形成二硫键, 且活化了内源转谷氨酰胺酶(TG)生成较多非二硫共价键, 增强了凝胶网络结构; 酸溶性胶原蛋白在凝胶时形成了二硫键, 增强凝胶作用力; 而盐溶性胶原蛋白与鱼肉蛋白形成的高分子物质增强了凝胶网络结构。

关键词: 鱼皮胶原蛋白; 提取方式; 鱼肉重组; 凝胶特性; 机理

文章编号: 1673-9078(2015)3-220-227

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.3.037

The Effect of Fish Skin Collagen Extraction Method on Restructured Fish Products

ZHAO Li, WEN Hui-fang, YUAN Mei-lan, CHEN Li-li, SU Wei, JIANG Yong, LIU Hua

(School of Life Science, Jiangxi Normal University of Science and Technology, Branch of National Research and Development on Freshwater fish Processing Technology, Nanchang 330013, China)

Abstract: To improve the quality of minced freshwater fish products, restructured fish products were prepared using grass carp as a raw material, and the effects of extraction method, and particularly of salt, acid, and alkaline solutions, were examined. Gel strength, textural characteristics (hardness and chewiness), syneresis rate, and change in whiteness of the restructured fish were examined to comprehensively evaluate the effects of extraction method on collagen properties and the quality of restructured fish. Furthermore, the chemical bonding force, trichloroacetic acid (TCA) soluble peptide content, paraffin tissue sections, and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) were used to study the collagen properties of restructured fish. The quality of restructured meat with respect to collagen quality was optimal for extraction with the alkaline solution, intermediate for acid, and lowest for the salt solution. Furthermore, alkali-soluble collagen not only formed disulfide bonds during the gelation of minced fish, but also formed non-disulfide bonds via the activation of endogenous transglutaminase (TG), strengthening the gel network structure. Acid-soluble collagen formed disulfide bonds during the gelation of minced fish and had increased gelation force. Salt-soluble collagen formed more macromolecules, thus enhancing the gel network.

Key words: fish skin collagen; extraction method; restructured fish; gel characteristics; mechanism of action

近年来, 重组鱼肉制品以其方便性和营养性深受消费者的喜爱, 全国的年产量从 1999 年的 9 万 t 增长到 2009 年的近 90 万 t^[1]。但淡水鱼采肉率低、凝胶形成能力差, 导致淡水鱼糜未能进行深入开发, 因此高

收稿日期: 2014-07-12

基金项目: 江西省高等学校科技落地计划项目(KJLD12009); 江西省现代农业产业技术体系建设专项资金资助

作者简介: 温慧芳(1989-), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品化学

通讯作者: 赵利(1967-), 女, 博士, 教授

效利用淡水鱼资源、开发新型重组鱼肉制品成为水产品发展的必然趋势。鱼肉重组技术将低值鱼经剔肉, 用单一或复合粘合剂将肌肉重组粘接, 或经过如高压、微波和挤压膨化等特殊加工技术, 生产出具有不同质构特点的重组鱼肉制品^[2]。鱼肉重组技术改变了鱼肉原来的组织结构, 使其肌肉组织、脂肪组织和结缔组织重新得到合理分布及转化^[3], 不仅提升了鱼肉的营养价值, 还赋予鱼肉良好的口感, 满足不同的消费需求。改善重组肉品质的添加剂主要有多糖、有机酸、

无机盐和蛋白质等,其中蛋白质类又分为蛋白粘合剂和蛋白填充物。

我国是淡水鱼生产大国,随着中国水产品的发展,产生了大量的鱼鳞、鱼皮和鱼骨等加工下脚料,而鱼下脚料中含有丰富的胶原蛋白。江西省的冷冻鲰鱼片出口量较大,是江西水产行业的主要创汇产品。鲰鱼皮中胶原蛋白的含量达到28%,远高于鳙鱼皮和草鱼皮,最高可占鱼皮粗蛋白总量的80%之多^[4-5],故从鱼皮中提取胶原蛋白具有可行性,且鲰鱼皮的高胶原蛋白含量以及其重要的理化性质使其代替猪皮和牛皮等胶原蛋白成为可能^[6-7]。作为蛋白质类改良剂,鱼皮胶原蛋白还可能是一种改善重组鱼肉性质的优质添加剂。目前利用鱼皮胶原蛋白改善鱼糜性质的研究仅局限在用酸法和酶法这2种方式提取的胶原蛋白^[8]。将酸法和酶法提取的鱼皮胶原蛋白用于加工鱼糜,结果发现胶原蛋白能起到比黄原胶更好的粘连作用^[8]。

本文以草鱼鱼糜为原料,利用鲰鱼皮提取胶原蛋白,探讨比较由酸法、碱法和盐法提取的鱼皮胶原蛋白对重组鱼肉制品性能的影响,并将几种胶原蛋白对重组鱼肉制品品质的影响机理进行探究,以期选取最优鱼皮胶原蛋白种类和最优添加量作为提升重组鱼肉品质的工业技术参考。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

草鱼,活鱼,购于南昌市下罗乐买家超市;鲰鱼皮,江西海浩鄱阳湖水产有限公司提供,平板冻结保藏;加碘食盐,购于南昌市下罗乐买家超市;异丙醇、NaCl、36%乙酸、NaOH,西陇化工有限股份公司出品;Ca(OH)₂和Na₂SO₄,大茂化学试剂厂生产,均为分析纯;胃蛋白酶(EC3.4.23.3000 U/mg dry matter)和SDS,美国Sigma公司出品;Tris和考马斯亮蓝R-250, Solarbio公司制造;尿素和95%乙醇,β-Me: Amresco公司产品;过硫酸铵,夏斯生物有限公司生产;甘氨酸, Sanland-chem International Inc 产品;冰醋酸,西陇化工化学试剂厂生产;30%甲叉双丙烯酰胺和TEMED, Beyotime 出品;250 KDa 标准蛋白, BIO-RAD 出品;三氯乙酸,天津市福晨化学试剂厂生产。

1.2 仪器与设备

TJ12-H型绞肉机,广东恒联食品机械有限公司制造;JJ1000型精密电子天平,常熟双杰仪器厂生产;HZF-A1000型电子天平,美国康州电子科技有限公司

出品;RW20型悬臂搅拌器,德国IKA制造;TDL-5A台式低速离心机,上海菲恰尔分析仪器有限公司产品;Centrifuge 5804R型高速离心机, Eppendorf 出品;HH-4型数显恒温水浴锅,江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司生产;WSC-S测色色差计,上海精密科学仪器有限公司出品;CT3-4500质构仪,美国 Brookfield 公司产品。

1.3 鱼皮胶原蛋白的提取

1.3.1 鱼皮的预处理

鲰鱼皮剪成10 mm×20 mm的形状,用10%异丙醇在4℃条件下浸泡24 h,清洗干净后用5%的NaCl溶液在4℃条件下浸泡24 h,洗净后冷冻保藏。

1.3.2 碱溶性胶原蛋白的提取

参考位绍红^[9]的方法略做改动。将处理后的鱼皮用0.7%的Ca(OH)₂溶液以1:50的料液比于80℃提取4.5 h,最后通过离心、过滤和冷冻干燥,得到碱溶性胶原蛋白。

1.3.3 酸溶性胶原蛋白的提取工艺

将预处理好的鲰鱼皮置于0.5 mol/L的乙酸中,以1:50的料液比,在15℃提取72 h,最后通过离心、过滤和冷冻干燥得到酸溶性胶原蛋白^[8]。

1.3.4 盐溶性胶原蛋白的提取工艺

根据位绍红^[9]的盐碱法提取工艺略作改动。将处理好的鲰鱼皮用Na₂SO₄ 0.6 mol/L和NaOH 0.5 mol/L脱色2~3 h,洗净后加热60℃提取4 h,最后通过离心、过滤和冷冻干燥得到盐溶性胶原蛋白。

1.4 重组鱼肉的加工工艺

将新鲜草鱼经去鱼头、鱼鳞、鱼皮以及内脏,用清水清洗血污,绞碎鱼肉后再次用清水洗涤以去除色素、气味等物质。将漂洗后的鱼糜加盐斩拌5 min,加入胶原蛋白斩拌10 min后置于圆形容器内,加热之后冷藏于4℃的冰箱24 h^[8]。

1.5 重组鱼肉凝胶强度的测定

将重组鱼肉制品切成高30 mm,直径25 mm的圆柱体,用CT3型质构仪测定其凝胶强度。选取TA50探头,检测速度为1.0 mm/s,触发点负载4.5 g,探头压缩距离15 mm,探头测试速度1.0 mm/s,记录凝胶的破裂强度和凹陷度,破裂强度(g)与凹陷度(mm)的乘积即是凝胶强度(g·mm)。

1.6 重组鱼肉TPA质构分析

将重组鱼肉制品切成直径25 mm,高20 mm的圆

柱体,用作 TPA 质构分析。质构仪测试条件设置如下:采用直径 50 mm 的圆柱形探头(TA25/1000),压缩距离 5 mm,触发点负载 4.5 g,测试速度 1 mm/s,数据频率 50 点/秒。

1.7 重组鱼肉白度的测定

将重组鱼肉样品切成直径 20 mm、厚 2 mm 的薄片,用测色色差计测定样品白度。采用亨氏白度计算方法^[11]:

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

1.8 重组鱼肉析水率的测定

将重组鱼肉切成 5 mm 厚的片段并称其质量为,在其上下各铺 3 层滤纸,用 5 kg 的质量压 2 min,压完后取出再称其质量为,按以下公式计算析出水分^[12]。析出水分越多说明重组鱼肉制品的持水力越差。

$$\text{析水率} / \% = \frac{(m_1 - m_2)}{m_1} \times 100$$

注: m_1 为鱼糜压之前的质量; m_2 为鱼糜压之后的质量。

1.9 化学结合力的测定

分别取 2 g 鱼糜样品与 10 mL A (0.05 mol/L NaCl)、B (0.6 mol/L NaCl)、C (0.6 mol/L NaCl+1.5 mol/L 尿素)、D (0.6 mol/L NaCl+8 mol/L 尿素)、E (0.6 mol/L NaCl+8 mol/L 尿素+0.05 mol/L β -Me) 5 种溶液混合。均质后 4 °C 静止放置 1 h,然后 10000 r/min 离心 15 min,用 Lowry 法测定上清液中蛋白质的含量。离子键的含量以溶解于 A、B 溶液中蛋白质含量之差来表示;氢键以溶解于 B、C 溶液中蛋白质的含量之差来表示;疏水性相互作用以溶解于 C、D 溶液中蛋白质的含量之差来表示;二硫键用溶解于 E、D 溶液中蛋白质的含量之差来表示^[13]。

1.10 蛋白质溶解率的测定

取 1 g 鱼糜凝胶样品,加入 20 mL pH8.0 Tris-HCl 缓冲液 (20 mmol/L) 并均质,于 100 °C 条件下加热 2 min,放入振荡器中震荡 4 h,取出 10000 r/min 离心 30 min。然后取上清液 10 mL,常温添加 50 g/100 mL 的冷三氯乙酸 (TCA) 溶液至终质量浓度为 10 g/100 mL,将混合液于 4 °C 放置 18 h 后于 10000 r/min 离心 30 min,沉淀物用质量浓度 10 g/100 mL TCA 溶液冲洗并溶解于 0.5 mol/L NaOH 中。总蛋白含量为鱼糜凝胶样品直接溶解于 0.5 mol/L NaOH 中测得的溶解蛋白质的含量。蛋白质含量用 Lowry

法进行测定。溶解率以溶解于溶剂中的蛋白质含量占直接溶解于 0.5 mol/L NaOH 中总蛋白含量的百分比^[14]。

1.11 TCA 溶解肽含量测定

取 2 g 凝胶样品,加入 18 mL TCA (5 g/100 mL),10000 r/min 均质 2 min,4 °C 静置 1 h 后 10000 r/min 离心 5 min,用 Lowry 法测定上清液中肽的含量。多肽含量的多少可直接反应鱼糜在凝胶过程中的蛋白质降解程度。鱼糜凝胶蛋白的降解度以 mg 肽/g 表示^[15]。

1.12 鱼糜石蜡组织切片

鱼糜凝胶切成 5×5×2 mm 的块状,在 10% 甲醛溶液固定 24 h,然后用不同浓度的乙醇脱水。脱水完毕后用二甲苯浸泡两次,每次 30 min。浸泡后用三种熔点分别在 52~54 °C、54~58 °C 和 58~60 °C 之间的石蜡浸蜡,之后用熔点为 58~60 °C 进行石蜡包埋,包埋在 65 °C 的水浴锅中进行。包埋时先把石蜡填满于 1×1 cm 的方形纸盒中,然后快速将组织放入纸盒的石蜡中。包埋好的组织在 4 °C 冰箱冷藏一段时间后,利用组织切片机切成 5 μ m 的薄片铺展于载玻片上,将附有组织的载玻片在 65 °C 的烘箱中融化 15 min,然后在染色缸中进行脱蜡,之后利用树脂封片。最后利用光学显微镜观察鱼糜凝胶的组织结构并拍照^[7]。

1.13 SDS-PAGE 电泳

取 0.5 g 鱼糜凝胶溶解到 3 mL Tris-HCl (20 mM, 2% SDS, 8.0 尿素, 2% β -Me, pH8.0) 缓冲液中,与 0.1% 的溴酚蓝等体积混合,沸水浴 3 min,室温放置 24 h,离心后取上清液进行电泳。电泳分离胶为 7.5%,浓缩胶为 4%,采用 80 V 恒压进行电泳分离。用考马斯亮蓝 R250 染色 1 h,然后脱色至背景透明,利用凝胶成像系统拍照并分析电泳条带^[16]。

1.14 数据分析

实验数据用 Microsoft Office 2003, SPSS19.0 软件进行处理。

2 结果与分析

2.1 碱法、酸法和盐法提取的胶原蛋白对重组鱼肉品质的影响

凝胶强度、TPA 质构特性 (硬度和咀嚼度)、白度和析水率几个指标相结合的分析方法已成为重组鱼

肉制品品质评价的重要表达方法^[17]。由于胶原蛋白不同的添加量对各项指标的影响各不相同，故综合分析多指标实验结果的数据，得到一个最优添加量，以探讨该胶原蛋白对重组鱼肉制品的最大作用。数据分析中引用公式评分法，其加权系数由指标的重要程度决

定^[18]，考虑到凝胶强度值在品质评定中较重要，故设其加权系数为 2，其余指标为 1。公式评分法评分公式为：综合评分 = 凝胶强度 × 2 + (硬度 + 持水率 + 咀嚼性) × 1。各评分水平按照从高到低分别为 6、5、4、3、2、1。评分完毕后代入综合评分公式中计算各组得分。

表 1 不同胶原蛋白对重组鱼肉制品品质的影响

Table 1 The effect of various fish collagens on the properties of restructured fish products

	添加量	凝胶强度	硬度	咀嚼度	白度	析水率
空白	0	2516.11 ± 39 ^a	1321.67 ± 38 ^c	38.44 ± 1.29 ^b	73.60 ± 0.85 ^a	1.85 ± 0.72 ^{ab}
	0.10%	1578.86 ± 33 ^{ab}	1112.91 ± 8 ^a	25.66 ± 7.92 ^a	71.06 ± 0.56 ^c	3.21 ± 0.77 ^{ab}
	0.25%	1821.16 ± 79 ^b	926.85 ± 27 ^a	22.39 ± 5.0 ^{la}	70.93 ± 0.6 ^{2c}	1.70 ± 1.32 ^a
酸法	0.50%	1058.80 ± 35 ^a	1072.88 ± 7 ^a	27.22 ± 2.22 ^a	69.69 ± 0.69 ^{ab}	3.40 ± 0.84 ^b
	0.75%	1261.07 ± 53 ^{ab}	822.88 ± 7 ^{2a}	24.33 ± 3.14 ^d	69.34 ± 1.31 ^{ab}	3.08 ± 0.45 ^{ab}
	1%	1133.76 ± 28 ^{ab}	1160.09 ± 40 ^a	25.64 ± 4.05 ^a	68.73 ± 0.78 ^a	1.65 ± 0.6 ^{3a}
碱法	0.10%	2239.93 ± 82 ^b	1223.28 ± 7 ^{bc}	37.58 ± 5.48 ^b	74.58 ± 0.99 ^d	1.55 ± 0.48 ^a
	0.25%	4732.02 ± 29 ^c	835.54 ± 6 ^a	27.54 ± 1.66 ^d	74.44 ± 1.49 ^{ab}	1.95 ± 0.45 ^{abc}
	0.50%	2139.93 ± 63 ^d	1143.00 ± 135 ^b	34.95 ± 2.82 ^b	73.14 ± 0.90 ^d	2.50 ± 0.33 ^{bc}
	0.75%	3218.97 ± 57 ^c	862.87 ± 62 ^a	28.19 ± 3.96 ^d	72.77 ± 1.16 ^b	2.14 ± 0.56 ^{bc}
	1%	3058.33 ± 74 ^f	778.83 ± 62 ^a	24.90 ± 1.63 ^a	72.13 ± 1.11 ^b	2.38 ± 0.41 ^c
盐法	0.10%	2572.13 ± 18 ^d	1820.50 ± 51 ^b	25.14 ± 3.42 ^d	74.19 ± 0.65 ^{bc}	2.43 ± 0.78 ^a
	0.25%	2431.67 ± 74 ^b	2278.63 ± 13 ^c	30.98 ± 2.75 ^b	73.85 ± 0.32 ^{ab}	3.72 ± 0.84 ^a
	0.50%	2429.73 ± 39 ^c	2107.33 ± 75 ^c	32.43 ± 1.44 ^b	74.75 ± 0.34 ^c	3.04 ± 0.6 ^a
	0.75%	1610.4 ± 85 ^e	1616.30 ± 17 ^a	28.81 ± 0.54 ^b	73.38 ± 0.82 ^{ab}	3.11 ± 0.8 ^a
	1%	1566.57 ± 54 ^a	2185.96 ± 22 ^d	31.52 ± 4.71 ^b	73.02 ± 0.60 ^a	3.01 ± 1.02 ^a

表 2 不同胶原蛋白对重组鱼肉制品品质影响的加权评分值

Table 2 Weighted scores of the properties of restructured fish products with different collagen types

胶原蛋白	添加量	凝胶强度	硬度	咀嚼度	白度	析水率	评分值
酸法	0	6	1	1	6	4	24
	0.10%	4	3	3	5	2	21
	0.25%	5	5	6	4	5	30
	0.50%	1	4	2	3	1	12
	0.75%	3	6	5	2	3	22
	1%	2	2	4	1	6	17
碱法	0	3	1	1	4	4	16
	0.10%	2	2	2	6	6	20
	0.25%	6	5	5	5	5	32
	0.50%	1	3	3	3	1	12
	0.75%	5	4	4	2	3	23
	1%	4	6	6	1	2	23
盐法	0	5	6	1	3	6	26
	0.10%	6	5	6	5	5	31
	0.25%	4	2	4	4	1	19
	0.50%	3	3	2	6	3	20
	0.75%	2	4	5	2	2	17
	1%	1	1	3	1	4	11

从表 1 和表 2 的数据可以发现，添加三种不同提取方式的鱼皮胶原蛋白，均对改善重组鱼肉制品品质起到一定的作用，与空白对比，综合品质提升效果的顺序为碱法>酸法>盐法。其原因分析可能有 2 个，一是胶原蛋白在碱提过程中，胶原分子结合了部分提取液中的 Ca²⁺，而一定浓度的 Ca²⁺在适当的温度下可激活制品中的内源转谷氨酰胺酶 (TG)，催化交联作用，通过共价键形成更牢固的凝胶网状结构^[19-20]；另一方面，胶原蛋白可以起到抑制鱼糜自身蛋白降解的功能，从而达到改善重组鱼肉制品品质构的目的。而酸提法胶原蛋白是由低浓度的酸通过破坏胶原分子间的盐键和 Schiff 碱，引起纤维膨胀溶解而得，作用条件相对温和，得到的胶原蛋白氨基酸组成性质和天然胶原基本相同^[21]，使得天然胶原具有良好的胶粘性，促使重组鱼肉蛋白形成紧凑的凝胶组织结构，得到品质较高的制品。盐溶法胶原蛋白的作用虽然较前 2 种的差些，但还是起到改善重组鱼肉制品品质的作用，原因可能是因为盐溶法胶原蛋白在水溶液中呈弱碱性，而组织蛋白酶 B、H、L 的最适 pH 值分别为 6.5、7.0、5.0~5.5^[22-23]。故盐法胶原蛋白的添加在某种程度上抑制了重组鱼肉制品中的组织蛋白酶的活性^[24]，从而提

升了重组鱼肉制品的凝胶强度。

2.2 鱼皮胶原蛋白对重组鱼肉制品凝胶的化学结合力的影响

学结合力的影响

在重组鱼肉制品的凝胶网络结构中,蛋白之间的相互作用主要通过离子键、氢键、疏水性相互作用、二硫键和非二硫共价键等化学结合力进行维持^[24],而疏水作用、二硫键和非二硫共价键则是形成鱼糜凝胶网络结构的主要作用力^[25]。为了分析不同鱼皮胶原蛋白分子与制品蛋白分子之间的作用力,因此采用不同的蛋白变性溶剂为溶解液,测定制品凝胶的蛋白质溶解度。制品中离子键的含量以溶解于 A、B 溶液中蛋白质含量之差表示;氢键以溶解于 B、C 溶液中蛋白质的含量之差表示;疏水性相互作用以溶解于 C、D 溶液中蛋白质的含量之差表示;二硫键用溶解于 E、D 溶液中蛋白质的含量之差表示。

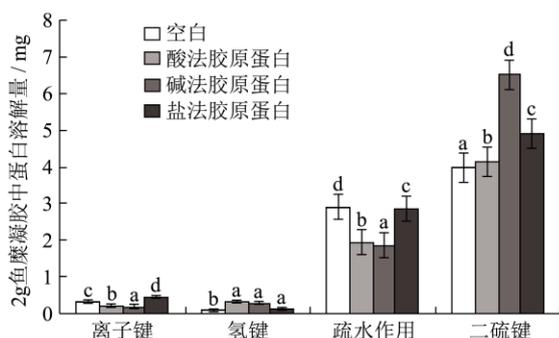


图1 不同胶原蛋白对重组鱼肉制品凝胶化学结合力的影响

Fig.1 The effect of various fish collagen types on the chemical binding force of restructured fish products

由图1可知,不管是否添加胶原蛋白,制品中疏水作用和二硫键都占了主导地位,说明疏水相互作用和二硫键是制品中的主要作用力,而且添加不同的鱼皮胶原蛋白后,除离子键外,其他作用键的含量均呈现不同程度的增长。离子键的含量降低,可能是由于制品凝胶中蛋白质分子中带正电荷的氨基酸与带负电荷的氨基酸之间相互吸引容易形成离子键,因为草鱼重组鱼肉制品的 pH 在 6.5 左右,添加了酸法与碱法胶原蛋白后,制品体系的 pH 值会相应地产生变化从而影响了离子键的含量。此外,蛋白质在加热过程中被包埋的非极性多肽暴露出来^[26],使得疏水相互作用的减弱,二硫键逐渐增多。胶原蛋白的添加不仅增强了临近多肽非极性片段的疏水相互作用,还增加了制品凝胶中氨基酸的含量,在聚集过程中进行交联作用,使得疏水键减少而二硫键含量上升,增强了凝胶网络结构的凝聚力。故在化学结合力的分析中可以认为,

是二硫键含量的增多使得鱼糜凝胶强度增大。

2.3 重组鱼肉制品的蛋白溶解率

重组鱼肉制品凝胶蛋白溶解率的高低可以反映非二硫共价键的多少及 TG 的催化程度^[27]。TG 可催化蛋白质分子内或分子间的谷氨酰胺残基和赖氨酸残基形成一种非二硫共价键,即 ϵ -(γ -谷氨酰)赖氨酸键,使蛋白质分子发生交联,强化制品凝胶的网络结构^[28],此共价键不能被含有 SDS 尿素和 β -巯基乙醇的混合试剂所断裂^[29]。因此,用上述混合试剂测定出的制品凝胶蛋白质的溶解度大小可以反映出凝胶网络结构中形成的非二硫共价键的多少,形成非二硫共价键越多则越有利于提高凝胶强度。

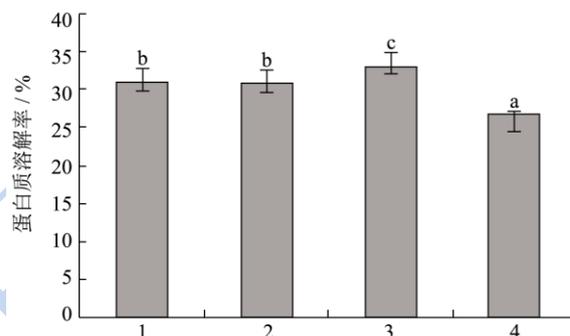


图2 重组鱼肉制品凝胶的蛋白溶解度

Fig.2 The solubility of collagen in restructured fish products

注: 1 为无添加任何辅料的重组鱼肉制品凝胶, 2 为添加酸溶法胶原蛋白的重组鱼肉制品凝胶, 3 为添加碱溶法胶原蛋白的重组鱼肉制品凝胶, 4 为添加盐溶法胶原蛋白的重组鱼肉制品凝胶。

由图2可知,添加盐法胶原蛋白的制品中蛋白质溶解度最低,对 TG 的催化程度最差,催化形成的非二硫共价键最少;添加碱溶性胶原蛋白的制品凝胶中蛋白质溶解度最高,可能是因为碱溶性胶原蛋白中残留了部分 Ca^{2+} ,内源 TG 在 pH 为 8~9 时易被钙离子活化^[30],从而形成较多的非二硫共价键。这可能是因为酸溶性胶原蛋白呈酸性,而内源 TG 在 pH 为 8~9 才表现出较好的活性;盐溶性胶原蛋白呈弱碱性,故可抑制内源 TG 的降解;碱溶法胶原蛋白中的氢氧化钙溶液在提取液离心后大部分被除去,pH 接近中性,抑制 TG 降解的效果较差。所以从蛋白质溶解率的变化可以看出,添加碱溶性胶原蛋白对 TG 的抑制效果最好,从而提高制品凝胶强度。盐溶性胶原蛋白中存在较多 Na^+ ,与 TG 活性部位的巯基有很强的亲和力,对内源 TG 的活性有抑制作用^[31],从而降低了非二硫共价键的形成。不同胶原蛋白对重组鱼肉制品内源 TG 的影响有差异。

2.4 TCA 可溶性肽

针对胶原蛋白对抑制鱼糜蛋白降解的功能上，TCA 可溶性肽含量可以反应出鱼糜蛋白的降解程度。重组鱼肉制品的形成过程主要是两方面互相竞争的过程：一方面是氨酰胺酶参与催化的肌球蛋白之间凝胶的形成；另一方面，鱼肉的内源性蛋白酶会催化肌原纤维的水解，导致肌球蛋白重链被水解，形成凝胶劣化现象。组织蛋白酶 B、H、L 是引起重组鱼肉制品凝胶劣化的主要内源性蛋白酶^[32]，肌球蛋白重链被水解成多肽，故 TCA 可溶性肽的含量反映了重组鱼肉制品在胶凝过程中蛋白质的降解程度，TCA 可溶性肽含量大，说明降解的肌球蛋白含量大，说明该胶原蛋白对组织蛋白酶的抑制作用较弱，故 TCA 的含量可反映胶原蛋白对制品中组织蛋白酶抑制作用的强弱。

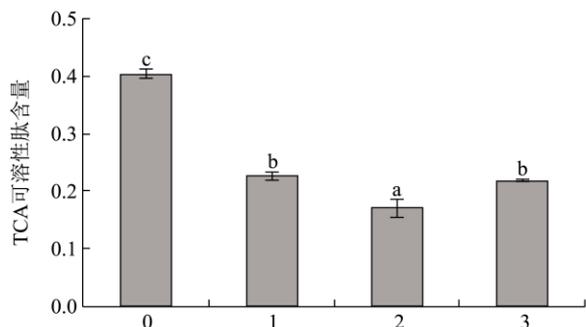


图3 不同胶原蛋白对重组鱼肉制品凝胶的 TCA 可溶解肽含量

Fig.3 The TCA-soluble peptide content in restructured fish products with different collagen types

注：0 为无添加任何辅料的重组鱼肉制品凝胶，1 为添加酸溶性胶原蛋白的重组鱼肉制品凝胶，2 为碱溶性胶原蛋白的重组鱼肉制品凝胶，3 为盐溶性胶原蛋白的重组鱼肉制品凝胶。

由图 3 可知，随着胶原蛋白的添加，与空白相比，重组鱼肉制品中凝胶的 TCA 可溶解肽含量都降低了，说明制品中的组织蛋白酶受到不同程度的抑制，降低了凝胶劣化程度，提升了凝胶强度，这也与吴润锋^[33]早期的研究结果一致。抑制原因可能有 2 个：一是胶原蛋白与组织蛋白酶争结合的能力较强，抑制了组织蛋白酶的活性；二是研究已经发现胶原蛋白加入后引起了鱼糜蛋白之间化学结合力的变化，可能导致部分组织蛋白酶自身结构发生变化，降低了活性^[33]。此外在图 2 中也发现，盐溶性胶原蛋白添加到制品中导致了凝胶中非二硫键含量相对添加其它 2 种胶原蛋白的少，从侧面表现出盐溶性胶原蛋白对组织蛋白酶的抑制效果较差，导致鱼糜蛋白在胶凝过程的降解。

2.5 添加胶原蛋白对重组鱼肉制品中凝胶结

构的影响

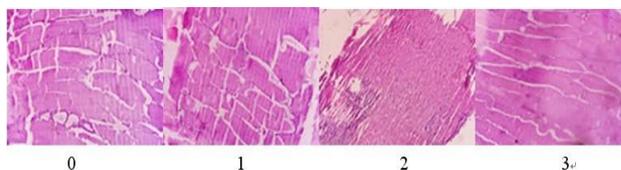


图 4 重组鱼肉制品凝胶的石蜡组织切片图

Fig.4 Paraffin tissue sections of restructured fish product gels

注：0 为无添加任何辅料的制品凝胶，1 为添加酸溶性胶原蛋白的制品凝胶，2 为碱溶性胶原蛋白的制品凝胶，3 为盐溶性胶原蛋白的制品凝胶。

利用石蜡包埋组织切片法观察重组鱼肉制品凝胶的光学微观结构，可以进一步探究不同鱼皮胶原蛋白对制品蛋白的填充效果。从图 4 中可以看出，添加酸溶性胶原蛋白后，凝胶网络结构并没有显著的改变，可能是因为酸溶性胶原蛋白的相对分子质量较大，不易分散到制品蛋白里面，无法填充到制品网络结构中，但添加碱溶性胶原蛋白后制品网络结构变得非常紧密，可能是碱溶性胶原蛋白相对分子质量较小，使得填充效果较好。

2.6 鱼皮胶原蛋白对重组鱼肉制品凝胶中蛋白组分的影响

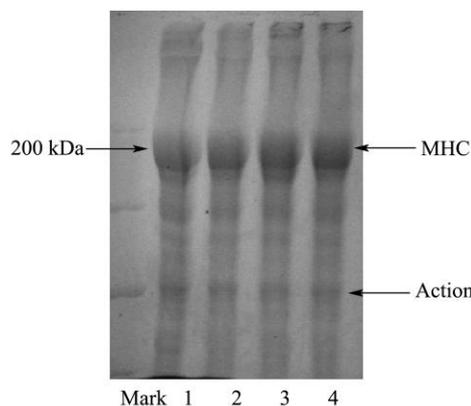


图 5 制品凝胶蛋白质的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.5 SDS-PAGE of the proteins in restructured fish products

注：Mark 为蛋白 ladder，0 为无添加任何辅料的制品凝胶，1 为添加酸溶性胶原蛋白的制品凝胶，2 为添加碱溶性胶原蛋白的制品凝胶，3 为添加盐溶性胶原蛋白的制品凝胶；Mark 的添加量为 10 μ L，他样品的添加量为 5 μ L。

利用 SDS-PAGE 分析了添加鱼皮胶原蛋白对制品凝胶中的蛋白组分的影响。由图 5 可知，制品凝胶的蛋白组分主要由肌球蛋白重链（MHC）、肌动蛋白（Actin）和肌球蛋白轻链（MLC）组成。经过加热制

备成制品凝胶后,出现了未能进入 SDS-PAGE 分离胶的高分子聚合物,由于电泳样品处理液中加入 β -Me,所以不可能是二硫键交联而成的聚合物,可能的情况有 2 个:一是由制品中的 TG 催化 MHC 交联引起的;二是在添加了胶原蛋白后 MHC 的含量并没有显著变化,而肌动蛋白的含量减少了,加之在分离胶最上端出现高分子条带,说明可能是由于肌球蛋白与胶原蛋白分子相互交联而产生大分子物质。从图 5 中还可以发现,加入胶原蛋白后, MHC 的含量有所增多,这表明胶原蛋白可以有效抑制重组鱼肉制品蛋白质在凝胶过程中的降解,从而增强鱼糜的凝胶强度,也进一步论证了胶原蛋白能有效降低蛋白质 TCA-可溶性肽含量,提高制品凝胶能力的结论。

3 结论

3.1 添加不同胶原蛋白的重组鱼肉制品,凝胶强度、硬度和持水力等方面得到不同程度的提升,整体品质提高效果为碱溶性胶原蛋白>酸溶性胶原蛋白>盐溶性胶原蛋白。

3.2 重组鱼肉制品的凝胶强度与二硫键的含量呈正相关,而与疏水相互作用呈负相关,说明在凝胶形成过程中二硫键起到了主要的作用。其中碱溶法胶原蛋白不仅填充到制品中形成了更多二硫键形成结构紧密的网络结构,而且在一定程度上激活了内源 TG 的作用,产生非二硫共价键从而提升了制品的凝胶强度;酸提胶原蛋白虽然因为相对分子质量较大不能很好地填充到制品中,但在制品中形成了二硫键稳固了制品凝胶结构,而盐溶法胶原蛋白与鱼肉蛋白形成高分子物质增强了凝胶网络结构。

参考文献

- [1] 农业部渔业局.中国渔业年鉴 2010[M].北京:中国农业出版社,2010
Ministry of Agriculture, Fisheries Bureau. Chinese Fishery Yearbook 2010 [M] Beijing: Chinese Agriculture Press, 2010
- [2] 杨华. 鱼肉重组技术及其粘合剂的研究[J]. 渔业现代化, 2007, 2: 51-53
YANG Hua. Advances in restructured fish technology and adhesives [J]. Fisheries Modernization, 2007, 2: 51-53
- [3] 苏伟,赵利,袁美兰,等. 鲢鱼纯鱼肉重组制品凝胶工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2013, 3(3): 39-43
SU Wei, ZHAO Li, YUAN Mei-lan, et al. Study on technology of restructured common carp products [J]. Food Research and Development, 2013, 3(3): 39-43
- [4] 宫子慧. 鲢鱼皮胶原蛋白的提取、特性和生物活性的研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2012
GONG Zi-hui. Isolation, characterization and biological activity of collagen extracted from the channel catfish skin [D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2012
- [5] 张培力,周爱梅,刘欣,等. 淡水鱼皮胶原蛋白提取工艺研究[J]. 食品与发酵工业, 2012, 32(12): 150-153
ZHANG Pei-li, ZHOU Ai-mei, LIU Xin, et al. Study on extraction methods of fish skin collagen from freshwater [J]. Food and Fermentation, 2012, 32(12): 150-153
- [6] 吴缙,陈瞬胜. 选择不同提取剂制备斑点叉尾鲴鱼皮胶原蛋白的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(9): 321-325
WU Ti, Chen Shun-sheng. Study on different extraction methods of collagen from channel catfish skin with different solutions [J]. Food Science, 2008, 29(9): 321-325
- [7] 黄玉平. 鱼皮胶原蛋白在淡水鱼糜制品中的应用研究[D]. 厦门: 集美大学, 2012
HUANG Yu-ping. Studies on the application of skin gelatin in fresh-water fish surimi-based products [D]. Xiamen: Jimei University, 2012
- [8] 陈丽丽. 鲢鱼皮中胶原蛋白的提取、性质及应用研究[D]. 南昌: 江西科技师范大学, 2012
CHEN Li-li. Study on the preparation partial characterization and application of collagen from the skin of amirus nebulosus [D]. Nanchang: Jiangxi Science and Technology Normal University, 2012
- [9] 位绍红,许永安,吴靖娜. 罗非鱼鱼鳞提取明胶的工艺研究[J]. 渔业科学进展, 2010, 31(3)
WEI Shao-hong, XU Yong-an, WU Jing-na. Study on the extraction process of gelatin from tilapia fish scale [J]. Process in Fishery Science, 2010, 31(3)
- [10] 林家福,谢福美,易美华,等. 热水提取罗非鱼鱼皮胶原蛋白的研究[J]. 中国热带医学, 2008, 8(8)
LIN Jia-fu, XIE Fu-mei, Yi Mei-hua. The extraction of tilapia skin collagen by using hot water [J]. China Tropical Medicine, 2008, 8(8)
- [11] 沈月新. 水产食品学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001
SHEN Yue-xin. Aquatic food science [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2001
- [12] 曲楠. 优质罗非鱼鱼糜的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011
QU Nan. The study on the high quality tilapia surimi [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2011
- [13] G ómez-Guill ón M C, Borderías A J, Montero P. Chemical interactions of nonmuscle proteins in the network of sardine muscle gels [J]. LWT-Food Science and Technology, 1997, 30(6): 602-608

- [14] Benjakul S, Visessanguan W, Pecharat S. Suwari gel properties as affected by transglutaminase activator and inhibitors [J]. Food Chemistry, 2004, 85(1): 91-99
- [15] Phatcharat S, Benjakul S, Visessanguan W. Effects of washing with oxidizing agents on the gel-forming ability and physicochemical properties of surimi produced from big eye snapper [J]. Food Chemistry, 2006, 98(3): 431-439
- [16] 袁道强,黄建华.生物化学实验和技术[M].北京:中国轻工业出版社,2006:196-198
YUAN Dao-qiang, HUANG Jian-hua. Biochemistry experiments and techniques [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2006: 196-198
- [17] 殷俊,梅灿辉,陈斌,等.肉丸品质的质构与感官分析[J].现代食品科技,2011,27(1):50-55
YIN Jun, MEI Can-hui, CHEN Bin, et al. Sensory evaluation and instrumental measurement of meatballs [J]. Modern Food Science and Technology, 2011, 27(1): 50-55
- [18] 张彬.低钠盐白鲢鱼鱼糜制品的制备及其凝胶特性的研究[D].合肥:合肥工业大学,2012
ZHANG Bing. Preparation of low sodium surimi product and research on its gel properties from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) [D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2012
- [19] 何松,孙远民,孟凌华,等.钙与热处理对鱼糜凝胶强度的影响[J].食品科学,2000,21(2):30-32
HE Yuan, SUN Yuan-min, MENG Ling-hua, et al. Effect of calcium and heating on the strength of surimi gel [J]. Food Science, 2000, 21(2): 30-32
- [20] Skierka E, Sadowska M. The influence of different acids and pepsin on the extractability of collagen from the skin of baltic cod (*gadus morhua*) [J]. Food Chemistry, 2007, 105(3): 1302-1306
- [21] 候鲁娜,陈学云,聂小华,等.鱼糜凝胶劣化相关组织蛋白酶的研究进展[J].食品科技,2010,35(9):164-167
HOU Lu-na, CHEN Xue-yun, NIE Xiao-hua, et al. Advance on cathepsins related to gel softening in surimi [J]. Food Science and Technology, 2010, 35(9): 164-167
- [22] J Shann-Tzong, L Jai-Jaan, C Hsing-Chen. Purification and characterization of cathepsin b from ordinary muscle of mackerel (*scombera australasicus*) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1994a, 42(5): 1073-1079
- [23] W Visessanguan, S Benjakul, H An. Purification and characterization of cathepsin l in arrowtooth flounder (*atheresthes stomias*) muscle [J]. Comparative Biochemistry and Physiology B: Biochemistry and Molecular Biology, 2003, 134B: 447-487
- [24] Fennema R,王璋,等译.食品化学[M].北京:中国轻工业出版社,2003:1-50
Fennema R, WANG Zhang, et al. translate. Food Chemistry [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2003: 1-50
- [25] 刘海梅.鲢鱼糜凝胶及形成机理[D].武汉:华中农业大学,2007
LIU Hai-mei. Studies on silver carp surimi gel and gel-forming mechanism [D]. Wu Han: Hua Zhong Agriculture University, 2007
- [26] Sano T, Noguchi S F, Tshchiya T. Thermal gelatin characteristic of myosin [J]. Food Science, 1990, 55: 55-58
- [27] 李杰.草鱼鱼糜凝胶及形成机理的研究[D].上海:上海海洋大学,2011
LI Jie. Studies on carp surimi gel and gel-forming mechanism [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2011
- [28] 周爱梅,张祥刚,龚翠,等.内源性转氨酶对淡水鱼糜凝胶化的影响[J].食品科技,2009,34(2):130-135
ZHOU Ai-mei, ZHANG Xiang-gang, GONG Cui, et al. Effect of endogenous transglutaminase on setting of surimi from fresh water fishes [J]. Food Science and Technology, 2009, 34(2): 130-135
- [29] Benjakul S, Visessanguan W, Srivilai C. Porcine plasma protein as proteinase inhibitor in big eye snapper (*priacanthus tayenus*) muscle and surimi [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2001, 81(10): 1039-1046
- [30] 孙静静,罗自生,吴翔,等.草鱼中内源性转谷氨酰胺酶特性的研究[J].中国食品学报,2012,12(9):67-72
SUN Jing-jing, LUO Zi-sheng, WU Xiang, et al. Research on endogenous enzyme characteristic turn of glutamine in carp [J]. Chinese Institute of Food Science, 2012, 12(9) :67-72
- [31] Worratao A, Yongsawatdigul J. Purification and characterization of transglutaminase from Tropical tilapia [J]. Food Chemistry, 2005, 93(4): 651-658
- [32] 吴润锋.草鱼鱼肉中组织蛋白酶对鱼糜品质影响的研究[D].南昌:江西科技师范大学,2013
WU Run-feng. Effects of cathepsins on the quality of carp surimi [D]. Nanchang: Science and Technology Normal University, 2013
- [33] Suttirug Phatcharat, Soottawat Benjakul, Wonnop Visessanguan. Effects of washing with oxidizing agents on the gel-forming ability and physicochemical properties of surimi produced from big eye snapper (*Priacanthus tayenus*) [J]. Food Chemistry, 2006, 98: 431-439

现代食品科技