

超高压对秘鲁鱿鱼肌原纤维蛋白凝胶特性的影响

陆海霞, 张蕾, 李学鹏, 励建荣

(浙江工商大学 食品与生物工程学院, 浙江省食品安全重点实验室, 浙江 杭州 310035)

摘要: 秘鲁鱿鱼 (*Dosidicus gigas*) 是一种高产量、低价格、低品质的海洋渔业资源, 由于其肉质粗糙, 还有酸、苦、涩等不良风味, 使秘鲁鱿鱼的资源化利用成为一个难点问题。本研究以秘鲁鱿鱼为研究对象, 通过测定肌原纤维蛋白凝胶的硬度、弹性、电泳图谱等, 研究了超高压对其凝胶特性的影响, 并比较了其与热诱导凝胶的差异。结果表明, 超高压 300 MPa、10 min 时, 秘鲁鱿鱼肌原纤维蛋白凝胶弹性达到最大值 1.43; 超高压 300 MPa、25 min 时凝胶弹性为 1.42; 超高压 400 MPa、25 min 时凝胶硬度达到最大值 52.5 g; 300 MPa、保压 25 min 时凝胶强度达到最高值 68.4 g。不添加 TG-B 型谷氨酰胺转氨酶 (TGase) 时, 秘鲁鱿鱼肌原纤维难以形成热诱导凝胶; 添加了 2% TGase 的热诱导凝胶硬度较高, 可达到 74.74 g, 但凝胶弹性仅为 0.90, 凝胶强度为 67.0 g, 与超高压诱导凝胶的强度相近。研究表明, 超高压具有促进凝胶形成和改善凝胶特性尤其是凝胶弹性的作用, 可以成为替代热处理的一种秘鲁鱿鱼鱼糜制品生产的新技术。[中国水产科学, 2010, 17 (5): 1107-1114]

关键词: 超高压; 秘鲁鱿鱼; 肌原纤维蛋白; 凝胶特性

中图分类号: S98

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2010)05-1107-08

超高压 (UHP) 处理技术指在常温或较低温度下, 将 100 MPa 以上的静态液体压力施加于食品物料上并保持一定时间, 起到杀菌、灭酶、物料改性等作用的物理技术。用该技术处理过的食品其天然风味、色泽和营养不受或很少受到影响, 并可能产生新的质构特性。与热处理不同, 超高压不影响分子的共价键, 不破坏维生素、色素、风味物质等低分子量物质, 可最大限度地保护产品的色香味, 减少蛋白质、淀粉等高分子物质的凝胶劣化。很多国家将其作为 21 世纪重点研究和开发的技术之一^[1-4]。

超高压在食品中的应用问题已有较多研究^[1-5], 但凝胶过程及调控凝胶产生的温度、压力条件等方面较少被关注。鱼肉中的肌原纤维蛋白是形成凝胶的主要成分, 与制品的流变学特性有密切的关系。高压影响分子间相互作用和蛋白质构象, 随处

理压力增大, 首先使肌球蛋白变性, 同时使分子中二硫键部分断裂, 巯基含量增加, 改善蛋白质凝胶性能^[6-10]。

秘鲁鱿鱼 (*Dosidicus gigas*) 是个体最大、资源最丰富的鱿鱼种类之一, 但其肉质粗糙, 有酸、苦、涩味, 不宜烹制食用。如将秘鲁鱿鱼制成冷冻鱼糜, 既可解决原料大量积压的问题, 又能创造出巨大的经济效益。但秘鲁鱿鱼肌肉凝胶形成能力较差, 目前较多的研究是利用 TG-B 型谷氨酰胺转氨酶 (TGase)、鸡蛋蛋白等物质改善鱼糜的凝胶特性, 本研究以秘鲁鱿鱼肌原纤维蛋白为研究对象, 通过对热诱导和超高压诱导凝胶的对比, 揭示超高压诱导凝胶与热诱导凝胶作用机制的差异, 为超高压技术在秘鲁鱿鱼鱼糜制品和重组制品生产中的应用提供理论基础和应用指导。

收稿日期: 2009-10-18; 修订日期: 2009-12-22.

基金项目: 国家 863 计划重点项目 (2007AA091806); 浙江省科技厅海洋生物资源综合加工与利用优先主题项目 (2009C03017-5); 浙江省教育厅项目 (20070637); 浙江省教育厅项目 (Y200804586)。

作者简介: 陆海霞 (1977-), 女, 讲师, 博士, 主要研究方向为水产品加工. Tel: 0571-88071024 转 7588; E-mail: luhaixia@mail.zjgsu.edu.cn

通讯作者: 励建荣, 教授. Tel: 0571-88056656; E-mail: lijianrong@zjgsu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 实验材料

秘鲁大鱿鱼,胴体质量>6 kg, -70℃冷冻贮藏,由浙江舟山兴业集团公司提供。

1.2 主要试剂和溶液

TG-B型谷氨酰胺转氨酶(TGase)(纯度1%,泰州一鸣生物制品有限公司);标准蛋白质(吴天生物工程有限公司);聚乙二醇辛基苯基醚[Triton-X 100,生工生物工程(上海)有限公司];三羟甲基氨基甲烷(Tris),十二烷基硫酸钠(SDS),丙烯酰胺(Acr),N,N'-甲叉双丙烯酰胺(Bis),过硫酸铵(APS),四甲基二乙胺(TEMED),甘氨酸(Gly)均购自北京易博瑞技术有限公司。

1.3 主要仪器和设备

电泳系统Mini-PROTEAN 3(美国Bio-rad公司);质构仪TA-XT2i(英国Stable Micro System);匀浆机T25 basic(德国IKA);超低温冰箱Thermo Forma 702(美国Forma);高速冷冻离心机Sigma 3K30(德国Sigma);pH计DELTA 320[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];电子天平JA2003(上海精科天平);电热恒温水槽DK-8D(上海精宏设备有限公司);超高压设备HPB.A2-600/0.6(天津市华泰森森生物工程技术有限公司);封口机FR-900 Multi-purpose(Membrane Sealing Machine)。

1.4 实验方法

1.4.1 肌原纤维蛋白的提取 取一定质量的鱼肉加6倍体积的A液(0.1 mol/L KCl、0.02 mol/L Tris-HCl, pH 7.5)和2倍体积的B液(1% Triton、0.1 mol/L KCl、0.02 mol/L Tris-HCl缓冲液, pH 7.5),匀浆机匀浆(9 600 r/min、30 s、5次),纱布过滤,除去结缔组织,冷冻离心机离心(8 000 r/min、10 min),去上清液,沉淀用8倍体积的A液离心,重复3次。最后用A液清洗沉淀稀释至300 mL,分装于10 mL的塑料离心管中,贮存在-70℃超低温冰箱中,备用。

1.4.2 热处理和超高压作用诱导秘鲁鱿鱼肌原纤维蛋白凝胶的条件

(1)超高压诱导秘鲁鱿鱼肌原纤维蛋白凝胶

的条件 将肌原纤维蛋白装入肠衣内,外包装袋真空封口后超高压处理,作用的压力水平分别为200 MPa、300 MPa、400 MPa和500 MPa,每一压力分别作用10 min、15 min、20 min、25 min和30 min,超高压作用后冰浴冷却,然后置于4℃冰箱,过夜,测定凝胶硬度和弹性。

(2)热处理诱导秘鲁鱿鱼肌原纤维蛋白凝胶的条件 解冻后的肌原纤维蛋白称取5.0 g置于10 mL小烧杯内,分别加0%和2%的TGase,置于40℃的水浴保温1.5 h,再90℃水浴保温0.5 h,冷却至室温,放置于4℃冰箱内过夜,测定凝胶硬度和弹性。

1.4.3 凝胶硬度和弹性的测定 应用质构仪的Texture Profile Analysis(TPA)模式测定凝胶硬度和弹性^[11-13]。美国食品质构资深研究者Bourne的论著中对TPA质构特性参数进行了明确定义^[14-15]。

(1)测量参数设定 探头型号:P5;测前速度:3 mm/s;测试速度:0.5 mm/s,测后速度:3 mm/s;穿刺测试距离:5 mm;2次挤压之间的时间间隔为5 s,感应力:5 g。用质构仪自带的软件Texture Expert English中的TPAFRAC.MAC过程进行分析,凝胶强度=硬度×弹性。每项测试重复6次。

(2)硬度和弹性的定义 硬度(Hardness):对产品实施2次挤压实验时,第1个峰的峰值H1,定义为产品的硬度,即产品发生一定程度形变时产生的最大应力,单位为g;弹性(Springiness):食品2次挤压,第2次挤压所检测到的长度L2与第1次挤压所检测长度L1的比值。

典型TPA测试曲线如图1所示,样品的硬度为H1,样品的弹性为L2/L1,凝胶强度为H1×L2/L1。

1.4.4 SDS-PAGE电泳测定 称取1 g肌原纤维凝胶,加入9 mL 5%的SDS溶液,用IKA匀浆机(10 000 r/min, 5 min)均质后在85℃水浴中保温1 h,使蛋白质充分溶解出来。然后用离心机离心(10 000 g, 10 min)除去不溶物。取一定量的上清液1:1(V/V)加入样品缓冲液,煮沸3~5 min。样品冷至室温后,立即使用或贮放于-20℃。SDS-PAGE电泳测定方法参考文献[16],电泳的缓冲系统参考Laemmli^[17]的Tris-甘氨酸缓冲系统。

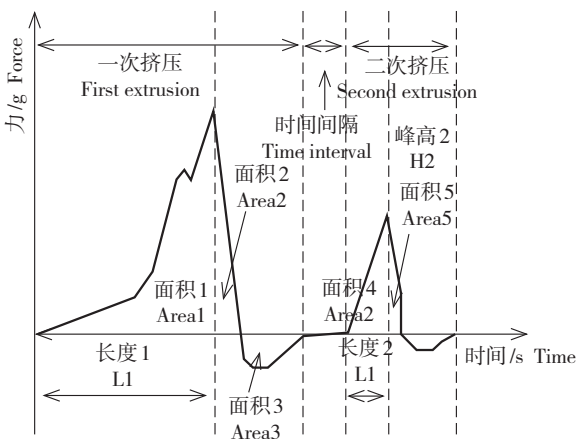


图1 食品典型的TPA测试曲线
Fig. 1 Typical TPA test curve in food

2 结果与讨论

2.1 加热和超高压对秘鲁鱿鱼肌原纤维蛋白凝胶质构特性的影响

2.1.1 超高压处理的时间和压力对凝胶特性的影响 超高压作用时间和压力对秘鲁鱿鱼肌原纤维凝胶弹性的影响如图2所示,200 MPa下凝胶弹性波动较小,在1.0左右;300 MPa下波动较大,分别在10 min和25 min出现峰值;而400 MPa则在20 min时出现峰值;500 MPa在25 min时达到峰值,但仍略

低于300 MPa和400 MPa的弹性峰值。
超高压作用时间和压力对秘鲁鱿鱼肌原纤维凝胶硬度的影响如图3所示,200 MPa作用下硬度随保压时间的延长增加较小,并在15 min时出现峰值;在5~25 min作用时间范围内,300 MPa、400 MPa作用下肌原纤维蛋白凝胶的硬度随保压时间的延长逐步升高,并且在400 MPa下保压25 min凝胶硬度达到最大值,延长保压时间反而使凝胶硬度下降;500 MPa作用下凝胶硬度同样在25 min时达到最大值,但是其并不随保压时间的延长而呈现规律性变化。

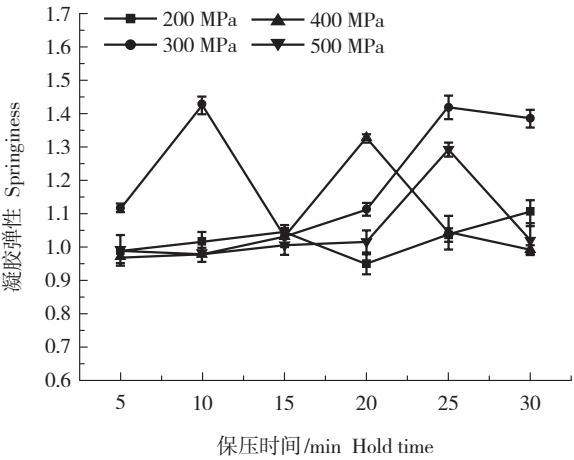


图2 凝胶弹性随超高压处理压力和作用时间的变化
Fig. 2 Effects of intensity and treatment time of ultra-high pressure on gel springiness of squid myofibrils

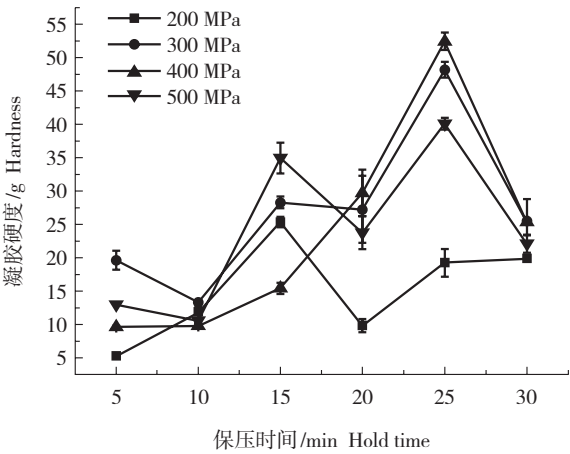


图3 凝胶硬度随超高压处理压力和作用时间的变化
Fig. 3 Effects of intensity and treatment time of ultra-high pressure on gel hardness of squid myofibrils

从图4可知,300~500 MPa超高压作用下,前25 min,肌原纤维蛋白凝胶强度(弹性×硬度)随着时间的延长呈上升趋势,并在25 min时达到最高值,继续延长保压时间会使凝胶强度下降;500 MPa作

用15 min时肌原纤维蛋白凝胶强度达到第2高峰。而200 MPa下则在保压15 min时便达到最大的强度,延长保压时间至20 min时强度降低至接近保压5 min时的水平,之后凝胶强度又逐渐升高。

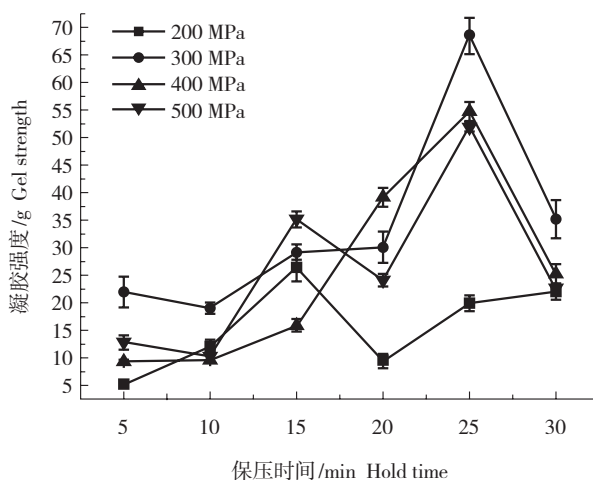


图4 凝胶强度随超高压处理压力和作用时间的变化

Fig. 4 Effects of intensity and treatment time of ultra-high pressure on gel strength of squid myofibrils

总之,300 MPa保压25 min时秘鲁鱿鱼肌原纤维蛋白凝胶强度达到最高值。200 MPa时蛋白质变性程度较小,凝胶程度较低,因此凝胶强度都较小。总体来看,300 MPa和400 MPa压力下处理25 min形成的肌原纤维蛋白凝胶硬度和弹性都较高,说明在此中等压力下使肌原纤维蛋白形成了均匀的网络结构(图5),而进一步延长保压时间或提高处理压力则会破坏已经形成的网络结构,或由于凝胶聚集过快导致凝胶强度下降。蛋白质凝胶交联的紧密程度和蛋白质凝集体随着处理压力的增大而增大,200 MPa下的微观结构虽然也比较致密,但联结力(弹性和硬度)明显不如300 MPa、400 MPa作用后的效果;500 MPa下形成了更大的凝结块,蛋白质间形成的联结更为明显,但同时空洞也变大了。

2.1.2 加热处理与超高压处理效果的比较 由图6可以看出,添加2%TG酶后加热处理形成的肌原纤维蛋白凝胶的硬度最高为74.74 g,比超高压诱导的凝胶硬度高,这与Ko等^[1]的研究结果一样,但是高压形成的凝胶弹性更好,热诱导凝胶的弹性仅为

0.90,所以其强度为67.0 g。热诱导凝胶的强度与超高压的凝胶强度相近,添加2%TGase的热诱导凝胶与300 MPa作用25 min形成的凝胶强度相近,高压诱导的凝胶强度略高。而500 MPa形成的凝胶强度低于300 MPa的凝胶,但是仍高于未添加TGase时的热诱导凝胶强度。

2.2 不同处理方式下秘鲁鱿鱼肌原纤维蛋白凝胶SDS-PAGE电泳图谱

2.2.1 不同压力超高压作用的影响 高压会影响分子间的相互作用键(氢键、疏水相互作用、静电力)和蛋白质的构象,导致蛋白质变性、聚集或凝集,由图7可见,超高压处理之后,肌球蛋白重链带消失,并且随压力的升高,肌动蛋白带和副肌球蛋白带都减弱,说明在高压处理下肌动蛋白、肌球蛋白重链和副肌球蛋白按照一定的比例聚集交联形成凝胶。在较高压力(500 MPa)下,超高压在促进凝胶形成的同时也有一定的解聚和降解作用,在电泳图谱上分子量大约45 000 D的蛋白条带增加可能是肌球蛋白重链或副肌球蛋白降解而成。

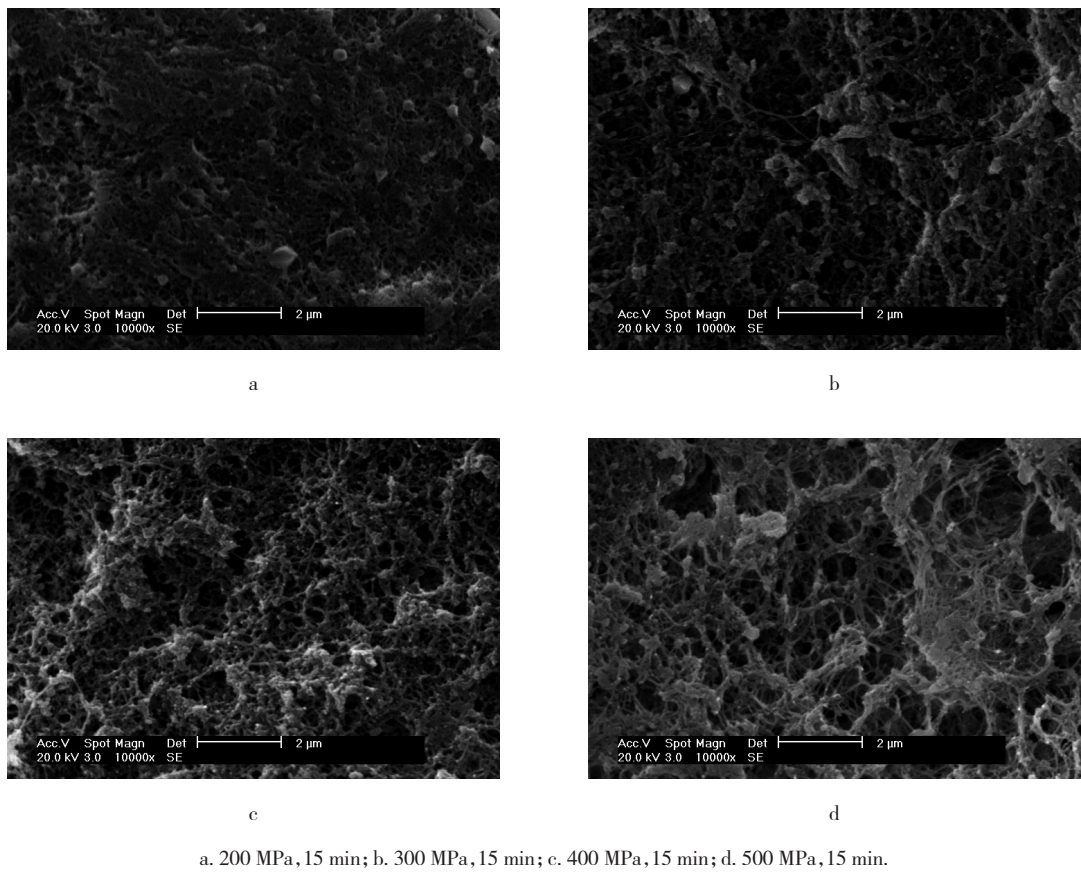


图5 鱿鱼肌原纤维凝胶经过不同压力和作用时间超高压处理后的环境扫描电镜图片

Fig. 5 Scanning electron microscopy images of squid myofibril gel after ultra-high pressure inducement

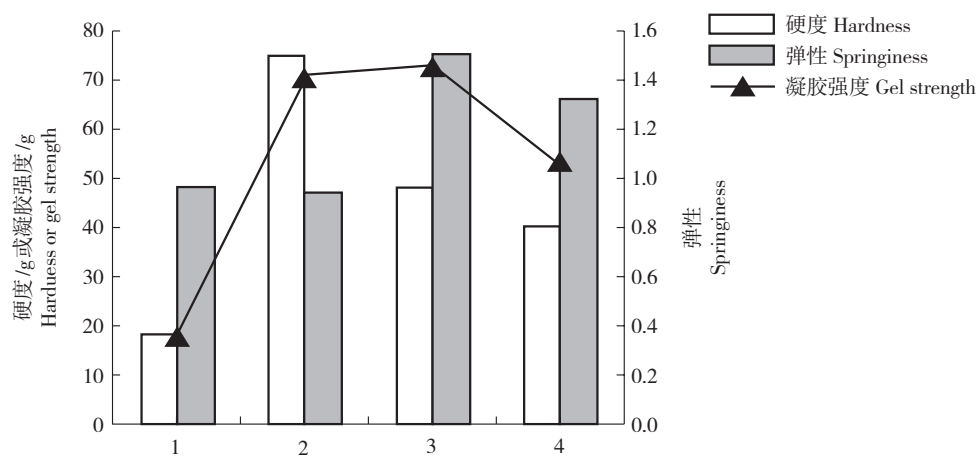


图6 加热与超高压处理鱿鱼肌原纤维凝胶的效果对比

1. 加热处理; 2. 添加2%TGase加热处理; 3. 超高压300 MPa, 25 min; 4. 超高压500 MPa, 25 min.

Fig. 6 Comparison of heat induced and ultra-high pressure induced squid myofibril gel's properties

1. Heat without TGase; 2. Heat with 2% TGase; 3. 300 MPa, 25 min; 4. 500 MPa, 25 min.

2.2.2 超高压和加热作用效果的对比 由图8可知,单纯热处理比超高压处理后肌动蛋白(AC)含量高,而肌球蛋白重链含量较低,说明超高压诱导形成的凝胶中有较多的肌动蛋白,而热诱导凝胶中肌动蛋白比例较小,主要是肌球蛋白重链和副肌球蛋白的凝胶,特别是添加了TGase之后,热诱导比超高压更能促进肌球蛋白重链交联。一些学者认为,在鲤(*Cyprinus carpio* Linnaeus)、鲇(*Pneumatophorus japonicus*)和鳕(*Gadus macrocephalus* Tilesus)鱼糜中添加TGase或MTGase可促使MHC形成交联键,而对肌动蛋白无影响^[18-20]。但如图8所示,添加2% TGase后肌动蛋白带、肌球蛋白重链带和副肌球蛋白带强度均减弱,说明TGase不仅促使肌球蛋白重链形成交联键,同时也可以促使肌动蛋白和副肌球蛋白与之交联;而超高压对肌动蛋白、肌球蛋白重链和副肌球蛋白有解聚作用,对蛋白质的聚集和凝集等变性也有影响。由图8可以发现,超高压300 MPa,30 min使秘鲁鱿鱼肌原纤维蛋白中分子量为130 000 D的蛋白成分

大大减少,而由于小分子量蛋白并未增加,因此可推测此蛋白在300 MPa压力下也发生聚集或交联,与500 MPa,30 min和热处理的样品相比均有较大差异。图8中肌球蛋白重链量减少,说明热处理和超高压处理都使肌球蛋白重链通过分子间的共价键交联或聚集形成了不溶性蛋白。

3 结论

运用多次分离提纯法提取肌原纤维蛋白,在300~400 MPa压力下,有利于肌原纤维蛋白形成弹性较好的凝胶,且超高压凝胶化时间仅为典型热力凝胶化时间的1/5。

本研究发现利用超高压可改善秘鲁鱿鱼肌原纤维凝胶特性,验证了开发秘鲁鱿鱼鱼糜制品具有可行性。超高压诱导的凝胶其强度与添加了TGase的热诱导凝胶强度相当,超高压凝胶化再后热处理可以作为传统热处理方法的替代方法用于鱼糜加工中鱼糜凝胶特性的改善。

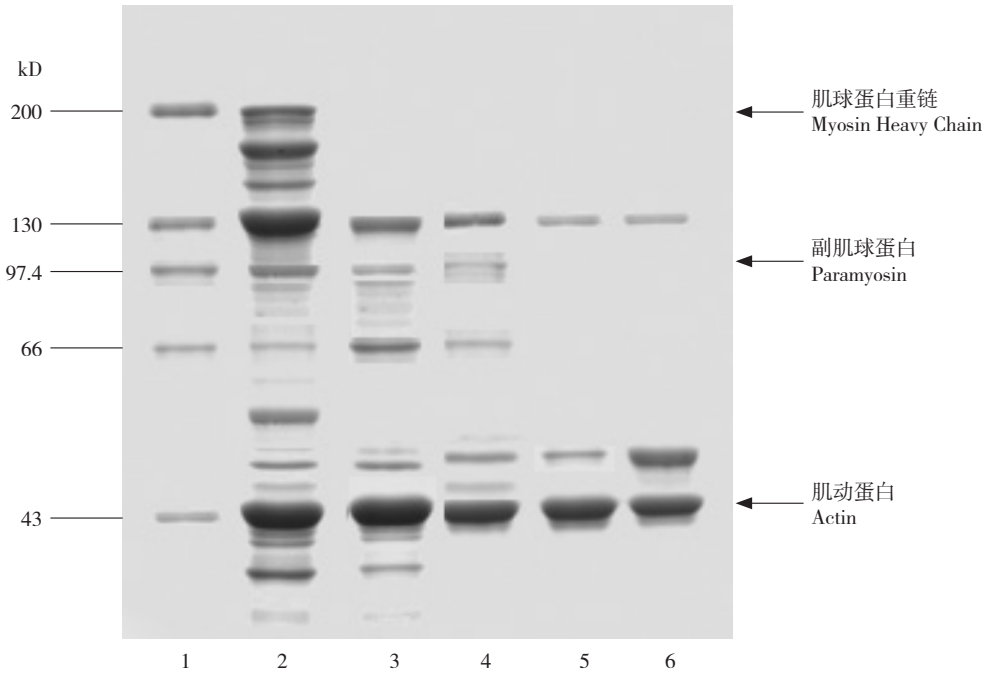


图7 超高压作用15 min产生的秘鲁鱿鱼肌原纤维蛋白凝胶的SDS-PAGE电泳图谱
1. 标准蛋白; 2. 未处理; 3. 200 MPa处理15 min; 4. 300 MPa处理15 min; 5. 400 MPa处理15 min; 6. 500 MPa处理15 min.
Fig. 7 SDS-PAGE patterns of squid myofibril gel induced by ultra-high pressure pressure for 15 min.
1.Marker; 2. Control; 3. 200 MPa, 15 min; 4. 300 MPa, 15 min; 5. 400 MPa, 15 min; 6. 500 MPa, 15 min.

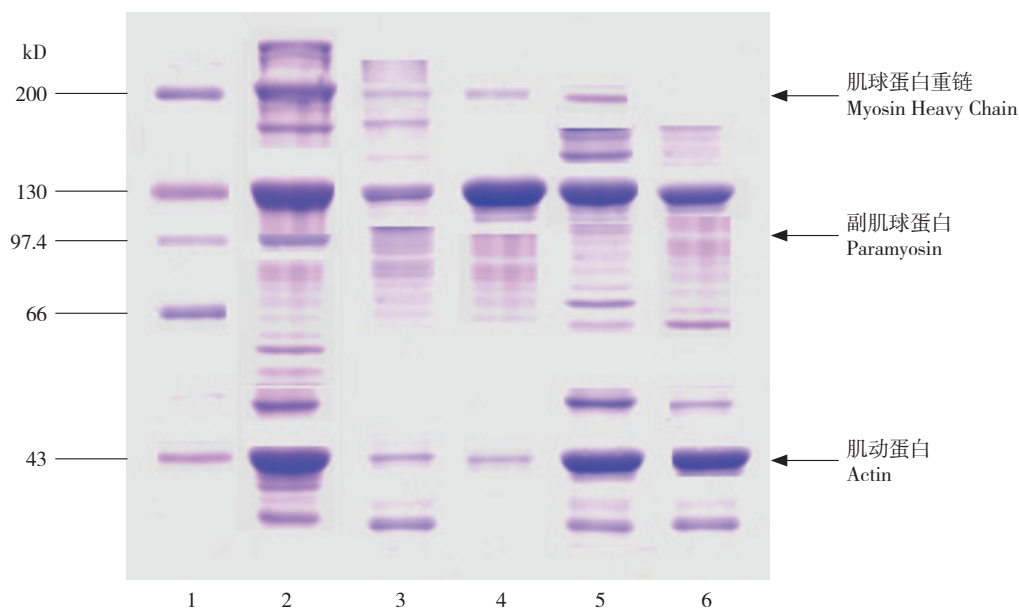


图8 超高压和热处理秘鲁鱿鱼肌原纤维蛋白SDS-PAGE电泳结果对比

1. 标准蛋白; 2. 未处理; 3. 300 MPa, 30 min; 4. 500 MPa, 30 min; 5. 未加TGase热处理; 6. 加2%TGase热处理.

Fig.8 SDS-PAGE patterns of squid myofibril gel induced by heat and ultra-high pressure

1. Marker; 2. Control; 3. 300 MPa, 30 min; 4. 500 MPa, 30 min; 5. Heat without TGase; 6. Heat with 2% TGase.

参考文献:

- [1] Ko W C, Tanaka M, Nagashima Y, et al. Effect of high pressure on the thermal gelation of sardine and Alaska pollack meat and myosin [J]. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 1990, 37: 637-642.
- [2] Macfarlane J J, McKenzie I J, Turner R H. Pressure-heat treatment of meat: Changes in myofibrillar proteins and ultrastructure [J]. *Meat Sci*, 1986, 17: 161 - 176.
- [3] Chung Y C, Gebrehawot A, Farkas, et al. Gelation of surimi by hydrostatic pressure [J]. *J Food Sci*, 1994, 59: 523-524, 543.
- [4] Cofrades S, Fernández P, Carballo J, et al. Cooked pork meat batters pressurized under non-thermal and thermal denaturing conditions [C]. *Proc 44th International Congress of Meat Science Technology*, 1998, Vol. II: 544-545.
- [5] 郝磊勇, 李汴生, 阮征, 等. 高压与热结合处理对鱼糜凝胶质构特性的影响 [J]. *食品与发酵工业*, 2005, 31 (7): 35-38.
- [6] Messens W, Van Camp J, Huyghebaert A. The use of high pressure to modify the functionality of food proteins [J]. *Trend Food Sci Technol*, 1997, 8: 107-112.
- [7] Cheftel J C, Culioli J. Effect of high pressure on meat: A review [J]. *Meat Sci*, 1997, 46: 98-107.
- [8] Sootawat B, Wonnop V, Chakkawat C. Effect of porcine plasma protein and setting on gel properties of surimi produced from fish caught in Thailand [J]. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 2004, 37: 177-185.
- [9] 纪家笙, 黄志斌, 杨运华, 等. 水产品工业手册 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999: 37.
- [10] 杨速攀, 彭增起. 肌原纤维蛋白凝胶研究进展 [J]. *河北农业大学学报*, 2003, 26: 160 - 162, 166.
- [11] 孙哲浩, 赵谋明, 张源等. 明胶与κ-卡拉胶交互作用特性及机理的研究 [J]. *食品科学*, 2001, 22 (1): 14-18.
- [12] Alvarez M D, Canet W, Lopez M E. Influence of deformation rate and degree of compression on textural parameters of potato and apple tissues in texture profile analysis [J]. *Eur Food Res Technol*, 2002, 215: 13-20.
- [13] 李里特. 食品物性学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [14] Bourne M C. *Food texture and viscosity* [M]. 2nd ed. New York: Academic Press, 2002.
- [15] Bourne M C. Texture profile analysis [J]. *Food Technol*, 1978, 32 (7): 62-66, 72.

- [16] 郭晓君. 蛋白质电泳实验技术 [M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [17] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227: 227.
- [18] Seguro K, Kumazawa Y. Transglutaminase and lysis cross-link effect on elastic properties of kamaboko gels [J]. J Food Sci, 1995, 60: 305–311.
- [19] Rawduen S, Benjakul S, Visessanguan W, et al. Chicken plasma protein affects gelation of surimi from bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*) [J]. Food Hydrocolloids, 2004, (18): 259–270.
- [20] Hsieh J, Tsai G, Jiang S, et al. Microbial transglutaminase and recombinant cystatin effects on improving the quality of mackerel surimi [J]. J Food Sci, 2002, 67 (8): 3120–3125.

Effect of ultra-high pressure on Gel properties of myofibril of jumbo squid, *Dosidicus gigas*

LU Haixia, ZHANG Lei, LI Xuepeng, LI Jianrong

(College of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University; Food Safety Key Lab of Zhejiang Province, Hangzhou 310035, China)

Abstract: Ultra-high pressure is a food processing method that can give some new texture characters to finished product. Jumbo squid, *Dosidicus gigas* is a marine fishery resource with high yield, low price and low quality. It's difficult to utilize this resource because its meat is very coarse with some bad flavor such as acid, bitter and acerbity. The effects of ultra-high pressure and heat on gel properties of Jumbo squid myofibril were studied in term of hardness and elasticity by using SDS–PAGE electrophoresis in this study. The results showed gel elasticity of jumbo squid myofibril reached the max of 1.43 when ultra-high pressure were 300 MPa and was kept for 10 min. Gel elasticity was 1.42 when ultra-high pressure was kept for 25 min at the same pressure. Gel hardness reached the max of 52.5 g when ultra-high pressure were kept for 25 min at 400 MPa. Gel strength achieved the max of 68.4 when ultra-high pressure were kept for 25 min at 300 MPa. Heat induced gel were difficult to form without adding transglutaminase (TGase). Gel hardness reached 74.74 g for heat induced gel with 2% TGase addition, while gel elasticity was just 0.90 and gel strength was 67.0 g. The strength of heat induced gel was a little lower than that of ultra-high pressure induced gel. These results indicated that ultra-high pressure could induce gel forming and improve gel properties, which could be a substitute technique for heat inducement in surimi product processing. [Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17 (5): 1107–1114]

Key words: ultra-high pressure; *Dosidicus gigas*; myofibril; gel property

Corresponding author: LI Jianrong. Tel: 0571-88056656; E-mail: lijianrong@zjgsu.edu.cn