

## 鲢鱼糜凝胶形成过程中化学作用力及蛋白质构象的变化

刘海梅<sup>1,2</sup>, 熊善柏<sup>1,3</sup>, 谢笔钧<sup>1</sup>, 施星杰<sup>1</sup>

(1. 华中农业大学 食品科技学院, 湖北 武汉 430070; 2. 鲁东大学 应用技术学院, 山东 烟台 264025; 3. 湖北省水产品加工工程技术研究中心, 湖北 武汉 430070)

**摘要:** 采用化学法、激光拉曼光谱、圆二色谱等先进的现代检测分析手段, 研究鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix*) 鱼糜凝胶形成过程中离子键、氢键、疏水相互作用、二硫键、非二硫共价键等化学作用力对鱼糜凝胶形成的作用, 并对蛋白质构象进行了表征, 探索化学作用力及蛋白质构象对鲢鱼糜凝胶网络结构形成的作用。结果表明, 在鱼糜凝胶形成过程中, 离子键、氢键显著减少, 而疏水相互作用、二硫键、非二硫共价键显著增加。疏水相互作用、二硫键、非二硫共价键是维持鲢鱼糜凝胶稳定结构的主要化学作用力。40 °C 和 90 °C 两段加热过程中, 鲢肌球蛋白的  $\alpha$ -螺旋结构部分转变成转角和无规卷曲结构, 以无规卷曲结构为主。鲢鱼糜凝胶中肌球蛋白的二级结构单元  $\alpha$ -螺旋、转角、无规卷曲结构的百分含量分别为 33.70%、12.40%、53.90%, 其中  $\alpha$ -螺旋和无规卷曲结构是维持鲢鱼糜凝胶网络结构的主要蛋白质构象。维持鲢鱼糜凝胶稳定结构的主要化学作用力为疏水相互作用、二硫键、非二硫共价键, 主要蛋白质构象为  $\alpha$ -螺旋和无规卷曲结构。[中国水产科学, 2008, 15(3): 469-475]

**关键词:** 凝胶化; 化学作用力; 蛋白质构象; 拉曼光谱; 圆二色谱

**中图分类号:** TS254

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8737-(2008)03-0469-07

肌肉蛋白的构象是通过氢键、二硫键、离子键、疏水相互作用、范德华力等化学作用力来维持的<sup>[1]</sup>。蛋白质变性形成聚集体的过程中, 这些化学作用力对蛋白质构象的作用会发生变化<sup>[2]</sup>。鱼糜凝胶 (Surimi gel) 形成过程实际也是天然肌原纤维蛋白变性聚集的过程, 上述化学作用力在肌原纤维蛋白凝胶网络中发挥不同的作用。研究鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix*) 鱼糜凝胶形成过程中化学作用力的变化可为鲢鱼糜凝胶形成机理奠定理论基础。

在鱼糜凝胶形成过程中化学作用力变化的同时, 鱼糜 (Surimi) 蛋白质的构象也发生改变, 鱼糜凝胶中蛋白质的构象决定鱼糜凝胶特性。目前尚未见鲢鱼糜蛋白质构象在凝胶形成过程中的变化及维持鱼糜凝胶网络结构的主要蛋白质构象的有关报道<sup>[3-4]</sup>。IR、Raman、CD 等是研究蛋白质构象的重要手段<sup>[5-7]</sup>。IR 可以提供关于蛋白质二级结构的谱学信息, 但由于水的强烈吸收而限制了红外光谱法对鱼糜凝胶的研究<sup>[8]</sup>。而拉曼光谱受水溶剂的影响较小

且对分子振动具有指纹式的分辨率, 是研究鱼糜凝胶中蛋白质构象的一种较为有效的技术<sup>[8]</sup>。圆二色谱对非对称分子的结构十分敏感, 可反映出非对称分子内部结构的一些信息, 是测定蛋白质分子构象及其变化较为有效的方法<sup>[8]</sup>。因此, 本研究拟在测定鲢鱼糜凝胶形成过程中化学作用力变化基础上, 采用 Laser-Raman 和 CD 光谱法检测蛋白质构象的变化, 研究化学作用力、蛋白质构象对鲢鱼糜凝胶网络结构的贡献。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 鱼糜、凝胶化鱼糜 (suwari) 和鱼糜凝胶的制备** 新鲜鲢去头、去骨、去内脏、采肉, 用冷却的自来水漂洗 3 次, 并沥水制成鱼糜。将鱼糜空擂 2 min 后加入 2.5% 食盐并继续擂溃 2 min, 将鱼糜空擂后加入 2.5% 食盐进行盐擂, 将盐擂后的鱼糜溶胶灌入肠衣中, 分别于 40 °C 加热 30 min、60 min、90 min、120 min 后制得凝胶化鱼糜, 再于 90 °C 加热

收稿日期: 2007-10-10; 修订日期: 2007-11-22.

基金项目: “十一五” 国家科技支撑计划项目 (2006BAD05A18); 鲁东大学科研基金 (LY20076201); 武汉市重大科技攻关计划 (20062002096)。

作者简介: 刘海梅 (1979-), 女, 博士, 研究方向为水产品加工及贮藏工程。E-mail: hellen20080808@yahoo.com.cn

通讯作者: 熊善柏。Tel: 027-87288375; E-mail: xionsb@mail.hzau.edu.cn

30 min,在流水下冷却制得鱼糜凝胶,贮藏于4℃冰箱中备用。

**1.1.2 肌球蛋白的提取** 按 Park and Lanier<sup>[9]</sup>的方法提取白鲢鱼肉肌球蛋白。

## 1.2 方法

**1.2.1 化学作用力的测定** 参考 Gómez-Guillén 等方法<sup>[10]</sup>。分别取 1.1 中已制得各时间段的凝胶化鱼糜及上述各时间段凝胶化鱼糜在 90℃ 加热 30 min 的鱼糜凝胶样品各 2 g(4 个平行),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)(原子比 2:5)和 0.6 mol/L NaCl+8 mol/L 尿素(SD)(原子比 3:40)混合并均质,4℃ 静置 1 h,10 000 g 离心 15 min。用 Lowry 法<sup>[12]</sup>测定上清液中蛋白质的含量。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来表示;氢键的贡献以溶解于 SC 溶液与 SB 溶液中蛋白质含量之差来表示;疏水性相互作用的贡献以溶解于 SD 溶液与 SC 溶液中蛋白质含量之差来表示。

**1.2.2 二硫键(S-S)含量的测定** 参考 Gómez-Guillén 等方法<sup>[10]</sup>。在 0.5 mL 肌动球蛋白溶液(1 mg/mL)中加入 3.0 mL 新配制的 NTSB 检测溶液(pH 9.5),混匀后在暗处于室温(25~27℃)放置 25 min,测定其在 412 nm 处的吸光度值,其中摩尔消光系数为 13 900 mol<sup>-1</sup>•cm<sup>-1</sup>。二硫键含量以 mol/10<sup>6</sup>g 蛋白质计,其中摩尔消光系数为 13 900 mol<sup>-1</sup>•cm<sup>-1</sup>。

**1.2.3 鱼糜凝胶溶解率的测定** 参考 Benjakul 等方法<sup>[11]</sup>。取 1 g 鱼糜凝胶样品,加入 20 mL 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液[(含 1% (W/V) SDS,8 mol/L 尿素和 2% (V/V) β-巯基乙醇,pH 8.0)]并均质,混合物于 100℃ 加热 2 min 后,于室温搅拌 4 h,10 kg 离心 30 min。取上清液 10 mL,添加 50% (W/V) 的冷 TCA 至终质量分数为 10%,混合液于 4℃ 放置 18 h,10 kg 离心 30 min,沉淀物用 10% TCA 冲洗并溶解于 0.5 mol/L NaOH 中。总蛋白含量为凝胶直接溶解于 0.5 mol/L NaOH 中测得的蛋白质含量。蛋白质含量用 Lowry 法<sup>[12]</sup>测定。溶解率表示为溶解于溶剂中的蛋白质占总蛋白含量的百分比。

**1.2.4 鱼糜蛋白激光拉曼光谱的测定** 激光拉曼光谱仪为英国 REN-ISAW 公司生产的 Renishaw inVia Raman Microscope。激光光源为 Coherent 公司的 Innova 70 型氩离子激光器。激光波长 514.5 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<sup>-1</sup>,拉曼位移范围 300~3 800 cm<sup>-1</sup>。

**1.2.5 肌球蛋白圆二色谱的测定** 采用 J-810 圆二色光谱仪(日本 JASCO 公司),选用光径为 0.1 cm 的石英样品池,在远紫外区(190~240 nm)对 0.119 0 mg/mL(pH 7.5)肌球蛋白进行扫描,得出远紫外 CD 谱后,用计算机模拟得出 α-螺旋、β-折叠、转角和无规卷曲二级结构单元的百分比。圆二色性用平均残基椭圆值[θ]表示,单位为 deg•cm<sup>2</sup>/dmol。

## 1.3 统计分析方法

实验重复 3 次。采用 SAS V8.1 软件(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2000)进行统计分析,用 ANOVA 进行方差分析,LSD 进行显著性检验(检测限为 0.05)。用 Excel 2003 作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 鱼糜凝胶形成过程中化学作用力的变化

在凝胶形成过程中稳定鲢鱼糜蛋白构象的化学作用力中,离子键、氢键、疏水相互作用的变化见图 1,二硫键的变化见图 2,非二硫共价键的变化见图 3。

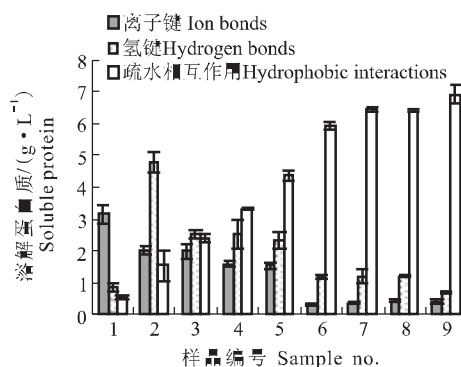


图 1 离子键、氢键、疏水相互作用在鲢鱼糜(40℃)和鲢鱼糜凝胶(90℃)形成过程中的变化

1- 鱼糜; 2- 凝胶化 30 min 的凝胶化鱼糜; 3- 凝胶化 60 min 的凝胶化鱼糜; 4- 凝胶化 90 min 的凝胶化鱼糜; 5- 凝胶化 120 min 的凝胶化鱼糜; 6- 凝胶化 30 min 的鱼糜凝胶; 7- 凝胶化 60 min 的鱼糜凝胶; 8- 凝胶化 90 min 的鱼糜凝胶; 9- 凝胶化 120 min 的鱼糜凝胶

Fig. 1 Variations of ionic bonds, hydrogen bonds and hydrophobic interactions during the formation of silver carp surimi (40 °C) and surimigel (90 °C)

1- surimi; 2- suwari set for 30 min; 3- suwari set for 60 min; 4- suwari set for 90 min; 5- suwari set for 120 min; 6- surimi gel set for 30 min; 7- surimi gel set for 60 min; 8- surimi gel set for 90 min; 9- surimi gel set for 120 min

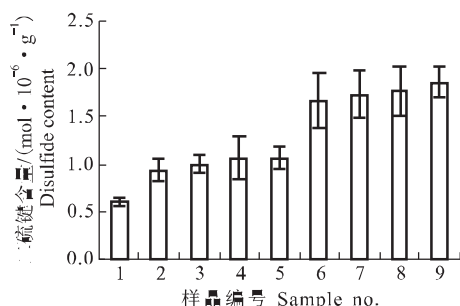


图2 鲢鱼糜凝胶形成过程中二硫键的变化 (40 °C)

1- 鱼糜; 2- 凝胶化 30 min 的凝胶化鱼糜; 3- 凝胶化 60 min 的凝胶化鱼糜; 4- 凝胶化 90 min 的凝胶化鱼糜; 5- 凝胶化 120 min 的凝胶化鱼糜; 6- 凝胶化 30 min 的鱼糜凝胶; 7- 凝胶化 60 min 的鱼糜凝胶; 8- 凝胶化 90 min 的鱼糜凝胶; 9- 凝胶化 120 min 的鱼糜凝胶

Fig. 2 Variations of disulfide bond during the gel formation of silver carp surimi (40 °C)

1 surimi; 2 suwari set for 30 min; 3 suwari set for 60 min; 4 suwari set for 90 min; 5 suwari set for 120 min; 6 surimi gel set for 30 min; 7- surimi gel set for 60 min; 8- surimi gel set for 90 min; 9- surimi gel set for 120 min

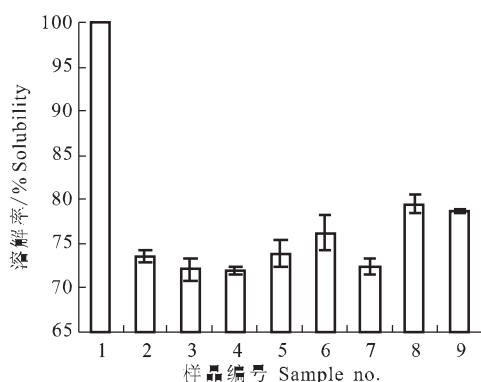


图3 鲢鱼糜 (40 °C) 与鱼糜凝胶 (90 °C) 形成过程中溶解率的变化

1- 鱼糜; 2- 凝胶化 30 min 的凝胶化鱼糜; 3- 凝胶化 60 min 的凝胶化鱼糜; 4- 凝胶化 90 min 的凝胶化鱼糜; 5- 凝胶化 120 min 的凝胶化鱼糜; 6- 凝胶化 30 min 的鱼糜凝胶; 7- 凝胶化 60 min 的鱼糜凝胶; 8- 凝胶化 90 min 的鱼糜凝胶; 9- 凝胶化 120 min 的鱼糜凝胶

Fig. 3 The change of solubility during the formation of silver carp surimi (40 °C) and surimigel (90 °C)

1 surimi; 2 suwari set for 30 min; 3 suwari set for 60 min; 4 suwari set for 90 min; 5 suwari set for 120 min; 6 surimi gel set for 30 min; 7 surimi gel set for 60 min; 8 surimi gel set for 90 min; 9 surimi gel set for 120 min.

由图1可知, 鲢鱼糜蛋白质间的离子键和氢键在40 °C凝胶化到90 °C高温蒸煮过程中显著降低 ( $P \leq 0.05$ ), 并随凝胶化时间延长, 两种作用力呈现降低趋势, 而凝胶化鱼糜的凝胶强度显著低于鱼糜凝胶的 (数据未列出), 由此可见, 离子键和氢键不是维持鲢鱼糜凝胶稳定构象的主要化学作用力。而由图1和图2可知, 鲢鱼糜蛋白质间的疏水相互作用和二硫键在40 °C凝胶化到90 °C高温蒸煮过程中显著增加 ( $P \leq 0.05$ ), 并随凝胶化时间延长和蒸煮温度升高而呈递增趋势。由此可见, 加热过程中疏水相互作用和二硫键的不断增强是引起鱼糜凝胶的凝胶强度显著高于凝胶化鱼糜的主要原因, 这两种作用力是维持鲢鱼糜凝胶稳定构象的主要化学作用力<sup>[13]</sup>。但是鲢鱼糜凝胶的凝胶强度随凝胶化时间的延长呈现先增加后减小的趋势 (数据未列出), 与疏水相互作用和二硫键随凝胶化时间延长一直呈现增加的趋势不同。由此可见, 疏水相互作用和二硫键作用的增强虽然可以增强鲢鱼糜凝胶的凝胶强度, 但是当凝胶化时间超过60 min后, 由于组织蛋白酶的水解作用占主导, 鱼糜中的大量蛋白质被水解, 支撑凝胶网络骨架的蛋白质大分子链断裂, 降低了鱼糜凝胶的凝胶强度, 此时再增加疏水相互作用和二硫键不能再改善凝胶特性<sup>[14]</sup>。

含SDS、尿素和 $\beta$ -巯基乙醇的混合溶剂能够断裂鱼糜凝胶中除了非二硫共价键 [尤其是 $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)-Lys共价键] 外的所有化学键<sup>[15]</sup>, 由此混合试剂测得溶解率的高低, 可以反映形成 $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)-Lys非二硫共价键的多少及蛋白酶的降解程度。内源性的转谷氨酰胺酶 (TGase) 存在于多种鱼类中, 可以催化肌球蛋白重链交联形成非二硫共价键, 而使溶解率降低<sup>[16]</sup>。由图3可知, 相对于鲢鱼糜而言 (溶解率为100%), 凝胶化鱼糜与鱼糜凝胶的溶解率均有不同程度的降低, 说明在加热过程中形成了非二硫共价键。由此可知, 非二硫共价键也是参与鲢鱼糜凝胶网络结构形成的主要化学作用力之一。

由以上分析可知, 疏水相互作用、二硫键、非二硫共价键是维持鲢鱼糜凝胶稳定构象的主要化学作用力。

## 2.2 鱼糜凝胶形成过程中蛋白质构象的变化

前期试验发现 (尚未发表), 通过40 °C凝胶化60 min, 然后90 °C蒸煮30 min的二段加热方式制

作的鲢鱼糜的凝胶特性最好。因此本研究采用此二段加热方式制备鱼糜凝胶,在加热过程中鱼糜蛋白的激光拉曼光谱图见图 4(1 800~3 800 cm<sup>-1</sup> 范围内的图谱省略),各谱带的归属见表 1。

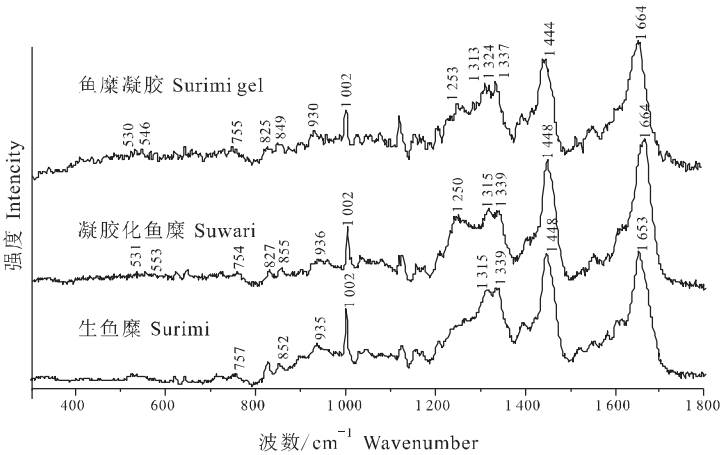


图 4 鲢鱼糜、凝胶化鱼糜、鱼糜凝胶的拉曼光谱  
Fig. 4 Raman spectropy of surimi, suwari and surimi gel from silver carp

表 1 鲢鱼肉、凝胶化鱼糜、鱼糜凝胶拉曼光谱中谱带的归属

| Tab.1 Tentative assignment of selected bands in the Raman spectra of surimi, suwari, or surimi gel from silver carp |                               |                                                                                        |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| 波数 /cm <sup>-1</sup> Wave number <sup>[17]</sup>                                                                    | 归属 Assignment <sup>[17]</sup> | 结构信息 Structural information                                                            |
| 510                                                                                                                 | S-S 伸展 S-S stretch            | 扭式 - 扭式 - 扭式 Gauche-gauche-gauche                                                      |
| 525                                                                                                                 |                               | 扭式 - 扭式 - 反式 Gauche-gauche-Trans                                                       |
| 540                                                                                                                 |                               | 反式 - 扭式 - 反式 Trans-gauche-Trans                                                        |
| 830,850                                                                                                             | 酪氨酸 Tyrosine                  | 酚羟基的状态 (暴露或埋藏, H 供体或受体)<br>State of phenol-OH (exposed or buried, H donor or acceptor) |
| 936                                                                                                                 | C-C 振动 C-C vibration          | $\alpha$ -螺旋 $\alpha$ -Helix                                                           |
| >1275                                                                                                               | 酰胺 III Amide III              | $\alpha$ -螺旋 $\alpha$ -Helix                                                           |
| 1241 $\pm$ 4                                                                                                        | 酰胺 III Amide III              | 反平行 $\beta$ -折叠 Antiparallel $\beta$ -sheet                                            |
| 1246 $\pm$ 4                                                                                                        | 酰胺 III Amide III              | 无规卷曲 Random coil                                                                       |
| 1650 $\pm$ 5                                                                                                        | 酰胺 I Amide I                  | $\alpha$ -螺旋 $\alpha$ -Helix                                                           |
| 1665 $\pm$ 3                                                                                                        | 酰胺 I Amide I                  | 无规卷曲 Random coil                                                                       |

Amide III 区 (1 230~1 320 cm<sup>-1</sup>) 附近出现的谱带是构象灵敏的谱带。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。生鱼糜仅在 1 315 cm<sup>-1</sup> 处出现  $\alpha$ -螺旋特征谱带,而凝胶化鱼糜、鱼糜凝胶不仅在 1 315 cm<sup>-1</sup> 附近出现  $\alpha$ -螺旋的特征谱带,还分别在 1 250 cm<sup>-1</sup> 和 1 253 cm<sup>-1</sup> 处出现无规卷曲的特征谱带<sup>[18-19]</sup>,说明加热后鱼糜蛋白的  $\alpha$ -螺旋结构部分转变成了无规卷曲结构。

Amide I 区的谱带 (1 600~1 700 cm<sup>-1</sup>) 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<sup>[20]</sup>。生鱼糜在 1 653 cm<sup>-1</sup> 出现  $\alpha$ -螺旋特征谱带,而凝胶化鱼糜和鱼糜凝胶在

1 664 cm<sup>-1</sup> 出现无规卷曲,进一步说明鱼糜蛋白的  $\alpha$ -螺旋结构加热后部分转变成无规卷曲。

936 cm<sup>-1</sup> 附近中强度的谱带来自于 C-C 骨架振动,是  $\alpha$ -螺旋结构的一个特征谱带,其消失或减弱说明  $\alpha$ -螺旋结构转化成了  $\beta$ -折叠或无规卷曲结构<sup>[18,21]</sup>。由图 3 可知,凝胶化鱼糜和鱼糜凝胶在 936 cm<sup>-1</sup> 附近中强度的谱带峰强度弱于鱼糜蛋白的峰强度。此谱带峰强度的减弱也表明,加热后鱼糜蛋白的  $\alpha$ -螺旋结构转化成了无规卷曲。

500~550 cm<sup>-1</sup> 是二硫键在拉曼光谱图中的特征频率。生鱼糜中二硫键的特征频率谱带很弱,凝胶化后变强,鱼糜凝胶在此区域内的吸收峰强度最

大,表明凝胶化和蒸煮过程中鱼糜蛋白中的活性巯基氧化形成了二硫键。此结果与化学法测定结果一致。

830  $\text{cm}^{-1}$  和 850  $\text{cm}^{-1}$  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。 $I_{850}/I_{830}$  比值可判明酪氨酸在蛋白质分子中所处的状态<sup>[22-24]</sup>  $I$  为拉曼光谱强度。生鱼糜在 826  $\text{cm}^{-1}$ 、852  $\text{cm}^{-1}$  附近出现酪氨酸残基的双峰,对比两峰的强度可以发现, $I_{852}/I_{826}$  比值为 0.98,说明酪氨酸残基位于蛋白质分子的内部;经凝胶化后,酪氨酸残基的双峰出现在 827  $\text{cm}^{-1}$ 、855  $\text{cm}^{-1}$  附近, $I_{855}/I_{827}$  比值为 1.01,说明凝胶化后

酪氨酸残基暴露于蛋白质分子的表面;鱼糜凝胶的酪氨酸残基的双峰出现在 825  $\text{cm}^{-1}$ 、849  $\text{cm}^{-1}$  附近,且  $I_{849}/I_{825}$  比值为 1.05,说明鱼糜凝胶中酪氨酸残基暴露程度高于凝胶化鱼糜。由此可见,在加热过程中,鲢鱼糜蛋白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一致。

### 2.3 凝胶形成过程中鲢肌球蛋白构象的变化

鲢肌球蛋白溶液先于 40  $^{\circ}\text{C}$  保温 60 min,然后于 90  $^{\circ}\text{C}$  保温 30 min,随后程序降温至室温 (22  $^{\circ}\text{C}$ ) 和 4  $^{\circ}\text{C}$ ,用圆二色谱仪测定整个过程中肌球蛋白二级结构的变化,肌球蛋白的圆二色谱图如图 5 所示。由计算机模拟计算得出肌球蛋白二级结构各构象单元的百分含量 (表 2)。

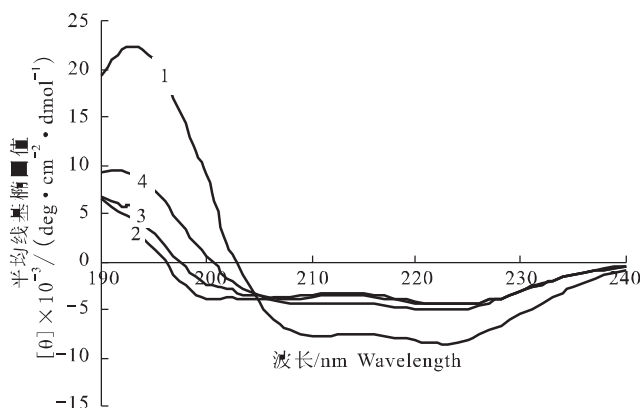


图 4 不同处理方式的加热过程中鲢肌球蛋白的圆二色谱

1: 天然肌球蛋白 (pH7.5); 2: 40  $^{\circ}\text{C}$  加热 60 min; 3: 40  $^{\circ}\text{C}$  加热 60 min, 再于 90  $^{\circ}\text{C}$  加热 30 min, 并降温至 22  $^{\circ}\text{C}$ ; 4: 40  $^{\circ}\text{C}$  加热 60 min, 再于 90  $^{\circ}\text{C}$  加热 30 min, 并降温至 4  $^{\circ}\text{C}$

Fig.4 CD spectra of myosin from silver carp during different heating process

1: native myosin (pH 7.5); 2: heated for 60 min at 40  $^{\circ}\text{C}$ ; 3: heated for 60 min at 40  $^{\circ}\text{C}$ , then 30 min at 90  $^{\circ}\text{C}$ , and temperature decreased to 22  $^{\circ}\text{C}$ ; 4: heated for 60 min at 40  $^{\circ}\text{C}$ , then 30 min at 90  $^{\circ}\text{C}$ , and temperature decreased to 4  $^{\circ}\text{C}$ .

表 2 不同处理方式的鲢肌球蛋白二级结构单元的百分含量

| Tab.2 Percentages of secondary structure units of silver carp myosin in different treating process |              |              |         | %                |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|--------------|---------|------------------|
| 处理方式 *                                                                                             | 结构 Structure |              |         |                  |
|                                                                                                    | α-螺旋 α-helix | β-折叠 β-sheet | 转角 Turn | 无规卷曲 Random coil |
| 1                                                                                                  | 100.00       | 0.00         | 0.00    | 0.00             |
| 2                                                                                                  | 27.00        | 0.00         | 10.40   | 62.60            |
| 3                                                                                                  | 42.20        | 24.00        | 0.00    | 33.80            |
| 4                                                                                                  | 33.70        | 0.00         | 12.40   | 53.90            |

\*1: 天然肌球蛋白 (pH7.5); 2: 40  $^{\circ}\text{C}$  加热 60 min; 3: 40  $^{\circ}\text{C}$  加热 60 min, 再于 90  $^{\circ}\text{C}$  加热 30 min, 并降温至 22  $^{\circ}\text{C}$ ; 4: 40  $^{\circ}\text{C}$  加热 60 min, 再于 90  $^{\circ}\text{C}$  加热 30 min, 并降温至 4  $^{\circ}\text{C}$ .

\*1: native myosin (pH7.5); 2: heated for 60 min at 40  $^{\circ}\text{C}$ ; 3: heated for 60 min at 40  $^{\circ}\text{C}$ , then 30 min at 90  $^{\circ}\text{C}$ , and temperature decreased to 22  $^{\circ}\text{C}$ ; 4: heated for 60 min at 40  $^{\circ}\text{C}$ , then 30 min at 90  $^{\circ}\text{C}$ , and temperature decreased to 4  $^{\circ}\text{C}$ .

由图5和表2可知,天然状态的肌球蛋白在210 nm和222 nm附近存在两个负槽,表明存在 $\alpha$ -螺旋。在40℃凝胶化过程中,肌球蛋白的 $\alpha$ -螺旋结构解旋。当保温60 min时,肌球蛋白的CD谱发生了变化,两个负槽逐渐消失,正柯登效应也减少,此时由天然状态的高 $\alpha$ -螺旋(94.11%)结构快速转变为以无规卷曲为主的二级结构, $\alpha$ -螺旋含量降低至27.00%,降低了67.11%,同时转角、无规卷曲含量增加,分别增加到10.40%、62.60%。在90℃高温蒸煮过程中, $\alpha$ -螺旋含量进一步减少,并出现 $\beta$ -折叠结构,然而随温度的降低, $\alpha$ -螺旋结构的含量增加, $\beta$ -折叠结构的含量减少,当温度降至4℃时, $\beta$ -折叠消失。经加热并冷却至4℃后,肌球蛋白以 $\alpha$ -螺旋(33.70%),转角(12.40%),无规卷曲(53.90%)3种二级结构单元存在,以无规卷曲为主,而无 $\beta$ -折叠结构。

### 3 讨论

#### 3.1 化学作用力对鲢鱼糜凝胶网络结构的贡献

在鲢鱼糜凝胶形成过程中,离子键和氢键逐渐减弱,它们对鲢鱼糜凝胶形成的贡献较小,而疏水相互作用、二硫键、非二硫共价键增加,是维持鲢鱼糜凝胶稳定结构的主要化学作用力。但是不同凝胶化时间下鲢鱼糜凝胶中的疏水相互作用和二硫键没有显著差异,它们不是引起鱼糜凝胶强度存在差异的原因,而溶解率的增加和减少与鱼糜凝胶强度的增强和减弱相对应,溶解率最低的鲢鱼糜的凝胶强度最大,溶解率的大小与形成的非二硫共价键的多少和鱼糜蛋白的降解程度直接相关,因此鲢鱼糜凝胶强度不同主要受TGase对肌球蛋白重链(MHC)的交联及组织蛋白酶对鱼糜蛋白的降解的双重影响。由此可推测,当MHC的交联作用大于鱼糜蛋白的降解作用时,鲢鱼糜凝胶强度增加,反之则导致鲢鱼糜凝胶强度降低。因此,增加TGase对MHC的交联程度,降低组织蛋白酶对鱼糜蛋白的降解作用是显著提高鱼糜凝胶特性的有效措施。

#### 3.2 鱼糜蛋白二级结构的转变

Bouraoui等<sup>[25]</sup>利用激光拉曼光谱仪研究太平洋无须鳕鱼糜蛋白二级结构时发现, $\alpha$ -螺旋部分地转变成反平行 $\beta$ -折叠结构,而本研究在对鱼糜蛋白进行激光拉曼光谱扫描,并对肌球蛋白进行圆二色谱扫描后均未发现鱼糜凝胶中存在反平行 $\beta$ -折叠结构,而是大部分 $\alpha$ -螺旋转变成无规卷曲结构。太

平洋无须鳕为海水鱼,凝胶形成能力强,而鲢鱼为淡水鱼,凝胶形成能力差。凝胶形成能力的差异有可能与肌球蛋白尾部 $\alpha$ -螺旋转变成其他二级结构的类型有关,此关系还有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 菲尼马著,王璋译. 食品化学:第3版[M]. 北京:中国轻工业出版社,2003:4.
- [2] Xiong Y L, Blandchard S P. Myofibrillar protein gelation: viscoelastic changes related to heating procedures[J]. J Food Sci, 1994, 59: 734-738.
- [3] Ogawa M, Kanamaru J, Miyashita H, et al. Alpha-helical structure of fish actomyosin: changes during setting[J]. J Food Sci, 1995, 60(2): 297-298.
- [4] 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]. J Food Sci, 1992, 57: 906-912.
- [5] 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 Res Intern, 2003, 36: 787-795.
- [6] Careche M, Garca M L, Herrero A, et al. Structural properties of aggregates from frozen stored hake muscle proteins[J]. J Food Sci, 2002, 67(8): 2827-2832.
- [7] Greenfield N J. Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data[J]. Analyt Biochem, 1996, 235: 1-10.
- [8] 刘峰,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.
- [9] Park J, Lanier T C. Scanning calorimetric behavior of tilapia myosin and action due to processing of muscle and protein purification[J]. J Food Sci, 1989, 54(1): 49-51.
- [10] Gómez-Guillén M C, Borderías A J, Montero P. Chemical interactions of nonmuscle proteins in the network of sardine (*Sardine pilchardus*) muscle gels[J]. Lebensm-Wiss u-Technol, 1997, 29: 602-608.
- [11] Benjakul S, Visessanguan W, Pecharat S. Suwari gel properties as affected by transglutaminase activator and inhibitors[J]. Food Chem, 2004, 85: 91-99.
- [12] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L et al. Protein measurement with Folin phenol reagent [J]. J Biol Chem, 1951, 193: 256-275.

- [13] Benjakul S, Visessanguan W, Chantarasuwan C. Effect of high-temperature setting on gelling characteristic of surimi from some tropical fish[J]. Intern J Food Sci Technol, 2004, 39: 671-680.
- [14] Takeda H, Seki N. Enzyme-catalyzed cross-linking and degradation of myosin heavy chain in walleye Pollack surimi paste during setting[J]. Fish Sci, 1996, 62: 462-467.
- [15] Benjakul S, Visessanguan W, Srivilai C. Porcine plasma proteins as gel enhancer in bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*) surimi[J]. J Food Biochem, 2001, 25: 285-305.
- [16] Kimura I M, Sugimoto M, Toyoda K, et al. A study on the cross-links reaction of myosin in kamaboko 'suwari' gels[J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1991, 57: 1386-1389.
- [17] Meng G, M C-Y, Philips D L. Raman spectroscopic study of globulin from *Phaseolus angularis* (red bean) [J]. Food Chemistry, 2008, 81: 411-420.
- [18] Tu A T. Proteins[M]. New York: Wiley Interscience. 1982: 65-116.
- [19] Chawla S P, Venugopal V, Nair P M. Gelation of proteins from washed muscle of threadfin bream (*Nemipterus japonicus*) under mild acidic conditions [J]. J Food Science. 1996, 61: 362-366, 371.
- [20] Krimm S, Bandekar J. Vibrational spectroscopy of peptides and proteins [J]. Advances in Protein Chemistry, 1986, 38: 181-360.
- [21] Barret T W, Peticolas W L. Laser Raman light scattering observations of conformational changes in myosin induced by inorganic salts[J]. Biophys., 1978, 23: 349-358.
- [22] Li-Chan E C Y, Nakai S. Raman spectroscopy study of thermally and/or Dithiothreitol induced gelation of lysozyme[J]. J Agr Food Chem, 1991, 39: 1238-1245.
- [23] Careche M, Garca M L, Herrero A, et al. Structural properties of aggregates from frozen stored hake muscle proteins [J]. J Food Sci, 2002, 67 (8): 2827-2832.
- [24] Sultanbawa Y, Li-Chan E C Y. Structural changes in natural actomyosin and surimi from Ling cod (*Ophiodon elongates*) during frozen storage in the absence or presence of cryoprotectants [J]. J Agr Food Chem, 2001, 49: 4716-4725.
- [25] Bouraoui M, Nakai S, Li-Chan E. In situ investigation of protein structure in Pacific whiting surimi and gels using Raman spectroscopy[J]. Food Res Intern, 1997, 30 (1): 65-72.

## Changes of chemical interactions and protein conformation during forming of silver carp surimi gel

LIU Hai-mei<sup>1,2</sup>, XIONG Shan-bai<sup>1,3\*</sup>, XIE Bi-jun<sup>1</sup>, SHI Xing-jie<sup>1</sup>

(1. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, 430070, China; 2. College of Application Technology, Ludong University, Yantai 264025, China; 3. Aquatic Products Engineering and Technology Research Center of Hubei Province, Wuhan 4300700, China)

**Abstract:** During the formation of surimi gel, chemical interactions among proteins and protein conformation changed, which played very important roles in maintaining stable surimi gel network. By studying the changes of chemical interactions and protein conformations during the formation of surimi gel from silver carp, we obtained main chemical interactions and protein conformation to maintain surimi gel network. Those interactions and protein conformation were assayed through chemical methods, laser-Raman spectroscopy, circular dichroism (CD). During surimi gel formation, ion bonds and hydrogen bonds decreased significantly. However, hydrophobic interactions, disulfide bonds and non-disulfide covalent bonds increased markedly, which were the main chemical interactions maintaining the stable structure of surimi gel from silver carp. During heating at 40 °C and 90 °C,  $\alpha$ -helix of myosin changed into turn and random coil structures partly, and the content of random coil structure was the highest. The percentages of secondary structures such as  $\alpha$ -helix, turn and random coil were 33.70%, 12.40% and 53.90%, respectively. In conclusion,  $\alpha$ -helix and random coil structures were the main protein conformations maintaining the structure of surimi gel from silver carp. [Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15(3): 469-475]

**Key words:** gelation; chemical interactions; protein conformation; Raman spectrum; Circular Dichroism

**Corresponding author:** XIONG Shan-bai. Tel: 027-87288375; E-mail: [xionsb@mail.hzau.edu.cn](mailto:xionsb@mail.hzau.edu.cn)