

单宁和芦丁氧化前、后对河鲢鱼皮明胶特性的影响

金文刚¹, 王 勇², 尚美君², 潘锦锋^{2*}

(¹陕西理工大学生物科学与工程学院 陕西省资源生物重点实验室 陕西汉中 723001

²大连工业大学食品学院 海洋食品加工与安全控制全国重点实验室 辽宁大连 116034)

摘要 为改善鱼皮明胶性能,通过添加不同比例的单宁、芦丁及其氧化态(0%,0.5%,1%,2%,4%),探究其对河鲢鱼皮明胶性质、颜色、水分分布、蛋白结构和蛋白条带的效应。结果表明,添加单宁、氧化单宁和芦丁,显著提高了河鲢鱼皮明胶强度、凝胶和融胶温度($P<0.05$),而氧化芦丁的作用不显著。单宁酸、氧化单宁酸对河鲢鱼皮明胶的颜色影响不显著,而芦丁、氧化芦丁有显著影响,尤其是氧化芦丁,导致胶冻样品的 L^* 值显著降低(6.07%~8.26%),提高了 a^* 值(88.89%~93.88%)和 b^* 值(85.94%~91.67%)。低场核磁共振结果显示,加入两种多酚及其氧化态,缩短了 T_2 弛豫时间,促进了明胶与水分子的结合。冷场电镜显示,添加单宁、芦丁及其氧化态,有利于形成致密的凝胶网络结构。SDS-PAGE结果显示,明胶的蛋白条带无明显变化,多酚与明胶分子共价交联不显著,主要通过非共价方式相互作用。红外光谱显示,酰胺-A带和酰胺-I带均向蓝移,表明形成氢键数量增加。综合分析,单宁、芦丁及其氧化态可能通过非共价方式(氢键)与明胶分子结合,从而提高河鲢鱼皮明胶凝胶特性。本研究为提升河鲢鱼皮明胶性能贡献了一定依据。

关键词 河鲢; 鱼明胶; 单宁; 芦丁; 凝胶强度

文章编号 1009-7848(2024)09-0205-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.09.019

明胶是动物胶原通过热、酸、碱、酶等方式适度降解得到的高分子天然多肽聚合物,不含脂肪和胆固醇^[1]。由于其具有优良的凝胶性能(热可逆凝胶),以及良好的乳化性和起泡性,常以食品添加剂的形式广泛应用于食品加工业^[2-4]。目前食用明胶主要来源于猪、牛等哺乳动物,然而因哺乳动物疫病(疯牛病、口蹄疫)的爆发,以及宗教文化信仰的差异,而导致其在食品加工业的应用受到限制^[5]。与之相比,鱼类明胶凭借安全性高,应用不受宗教限制,开发利用价值高等优点,逐渐成为哺乳动物明胶的优良替代品。鱼类明胶与哺乳动物明胶在氨基酸组成上存在差异,如鱼类明胶中亚氨酸(Pro和Hyp)的比例相对较少,使其具有较差的凝胶特性,在一定程度上制约了鱼皮明胶的实际应用范围^[6-8]。

多酚类化合物在水果和草本植物组织中含量丰富,显示了良好的生物活性及功能,而被广泛用于食品之中^[9-10]。酚类化合物上的酚羟基以及芳香环可以通过非共价键(氢键、疏水相互作用)和共

价键相互作用,增强鱼皮明胶的功能特性^[11-12]。此外,酚类物质还能够被氧化生成醌类物质,而醌类物质同样可与明胶分子的氨基酸单元或侧链含有巯基的氨基酸发生反应,促进明胶分子交联^[6,13]。Yan等^[14]发现通过添加没食子酸和芦丁可以提高鱼明胶的凝胶强度。Bedis等^[15]和Kaewdang等^[16]发现从农业废弃物中提取的酚类物质,对鱼明胶的凝胶强度、流变学特性有积极影响。Anvari等^[9]发现单宁酸和氧化单宁酸能够改善鱼明胶-阿拉伯胶耦合凝胶流变特性和微观结构特性。

河鲢也称“河豚”,滋味鲜美、营养丰富,深受人们的喜爱。目前,我国养殖品种主要是红旗东方鲀和暗纹东方鲀,随着人工养殖、控毒手段的发展,养殖规模和效益、加工与储运均呈现蓬勃发展势头^[4]。随着河豚加工利用范围的扩展,产生了大量副产物,如鱼皮、鱼骨和内脏等。河鲢鱼皮无鳞且富含胶原蛋白,是提取明胶的优质原料,前期已对河鲢鱼皮明胶的提取和除臭方法进行研究,发现其凝胶特性相对较弱^[4,8],因此改善凝胶性能成为急需解决的问题。目前关于多酚类物质改善河鲢鱼皮明胶特性的研究鲜有报道。本研究以河鲢鱼皮明胶为原料,分析不同添加比例的单宁、芦丁及其氧化态对河鲢鱼皮明胶特性的影响。

收稿日期: 2023-09-11

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32072167)

第一作者: 金文刚,男,博士,副教授

通信作者: 潘锦锋 E-mail: panjf@dlpu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

冷冻河鲢鱼皮,由大连富谷食品公司提供。单宁酸、芦丁(分析纯),上海生工生物工程公司;NaOH、磷酸(分析纯),天津大茂化学试剂厂。

1.2 仪器与设备

物性分析仪,英国 SMS 公司;核磁共振成像分析仪,上海纽迈公司;DHR-2 流变仪,美国 TA 公司;UltraScan PRO 测色仪,美国 HunterLab 公司;ATTO 垂直电泳仪,日本 ATTO 公司;BIO-RAD 化学发光成像系统,美国 Bio-Rad Laboratories 公司;SU8010 冷扫描电子显微镜,日本 Hitach 公司。

1.3 方法

1.3.1 多酚溶液和明胶胶冻的制备 多酚溶液根据金文刚等^[17]的方法进行制备。取质量相同的单宁(tannin, T)与芦丁(rutin, R)各 2 份,在 60 ℃左右的去离子水中充分溶解,并将溶液 pH 值调节至 8,得到未氧化多酚溶液;另一份吹入氧气进行氧化,氧化时间 1 h,温度 40 ℃,氧气流速 0.5 L/min,得到氧化多酚溶液(oxidized tannin acid, OT 和 oxidized rutin, OR)。

河鲢鱼皮明胶的提取按照实验室建立的方法^[3]进行。首先将河鲢鱼皮进行解冻、清洗,然后用 0.05 mol/L 氢氧化钠碱洗,0.1 mol/L 磷酸溶胀,置于 55 ℃去离子水中浸提 3 h。提取液经过滤、离心后进行冷冻干燥,得到干燥的河鲢鱼皮明胶。用分析天平准确称取冻干明胶,于 36 ℃去离子水中充分溶解,加入制备的多酚溶液,其浓度为明胶干质量的 0.5%,1%,2%,4%(质量分数),将明胶浓度调节为 6.67%(质量分数),转移至 5 mL 小烧杯中,置于 4 ℃层析柜中 24 h,得到胶冻样品。

1.3.2 明胶胶冻凝胶强度测定 参考 Pan 等^[4]报道的方法,通过物性分析仪对鱼明胶胶冻凝胶强度进行测定。测定参数如下:探头选择 P/5,测前、测试中和测后速度分别为 1.0,0.5,10 mm/s,穿透和测试距离分别为 4 mm 和 15 mm。

1.3.3 明胶凝胶和融胶温度测定 按照 Wang 等^[18]报道的方法,胶冻样品在 36 ℃下充分缓化并混匀,吸取 1 mL 明胶溶液置于 DHR-2 流变仪样品台上进行测定,参数如下:夹具 35 mm 平行板,

振荡频率 1 Hz,振荡作用力 3 Pa,升温或降温速率 0.5 ℃/min。在测定融胶温度时,起始温度 5 ℃,结束温度 35 ℃;测定凝胶温度时,温度设定与测定融胶温度时相反。当 $\tan\delta=1$ 时即为凝胶温度和融胶温度。

1.3.4 明胶胶冻色差测定 按照 Pang 等^[19]的方法采用测色仪对胶冻样品的颜色进行测定。首先使用标准白板和标准黑板对仪器进行校准,然后进行测定,结果由 L^* (亮度)、 a^* (红-绿)和 b^* (黄-蓝)表示。

1.3.5 明胶胶冻水分分布测定 参照 Pang 等^[20]的方法,采用低场核磁共振分析仪测定明胶胶冻的水分分布。将凝胶成熟的样品置于圆桶形状的玻璃管(直径 25 mm)中,然后将玻璃管转移至核磁共振探头,其温度恒定为 4 ℃,采集 Carr-Purcell-Meiboom-Cill(CPMG)衰变信号,对自旋弛豫时间(T_2)进行分析。样本扫描次数为 4,回声数据为 5 000 次。通过仪器软件反演得到弛豫时间 T_{21} 、 T_{22} 、 T_{23} 。

1.3.6 明胶胶冻微观结构分析 胶冻样品的微观结构采用冷场电镜进行观察。将胶冻样品于室温下缓化并混匀,吸取适量明胶溶液样品置于样品台,并采用液氮雪泥冷冻,将样品传入制备仓进行淬断,升华,喷金处理,结束后使用传输杆将样品传送到电镜仓进行微观结构观察,拍照。

1.3.7 明胶胶冻 SDS-PAGE 蛋白条带分析 根据尚美君^[21]的方法并适当修改,采用 SDS-PAGE 电泳对明胶的蛋白条带进行分析。取相同质量的胶冻样品于室温下缓化并混匀,用去离子水稀释 10 倍,85 ℃水浴 1 h,离心取上清与上样缓冲液(含 25%甘油,0.5 mol/L Tris-HCl,2% SDS,pH 6.8)按照 1:1(V/V)混合,煮沸 4 min。具体电泳条件如下:10%分离胶,5%浓缩胶,上样量 10 μ L,起始电流 15 mA,当到达分离胶时,电流调节为 30 mA,直至电泳结束。电泳结束后进行染色、脱色,最后由凝胶成像仪进行拍照分析。

1.3.8 明胶胶冻红外光谱分析 明胶的结构特征还采用红外光谱进行测定。将 1.3.1 节制备的胶冻样品进行冷冻干燥,然后将样品与溴化钾按照 1:100(质量比)的比例进行充分混匀并研磨成粉,用压片机制成薄片,转移至红外光谱仪中进行测量。

扫描波段 400~4 000 cm^{-1} ,扫描 32 次,分辨率 4 cm^{-1} ,测试温度 25 $^{\circ}\text{C}$ ^[22]。

1.4 统计分析

数据均以至少 3 次平行测试的平均值 \pm 标准偏差(SD)形式表示,数据通过 SPSS 16.0 软件进行显著性分析,采用 Origin 9.0 以及 Excel 软件进行绘图。

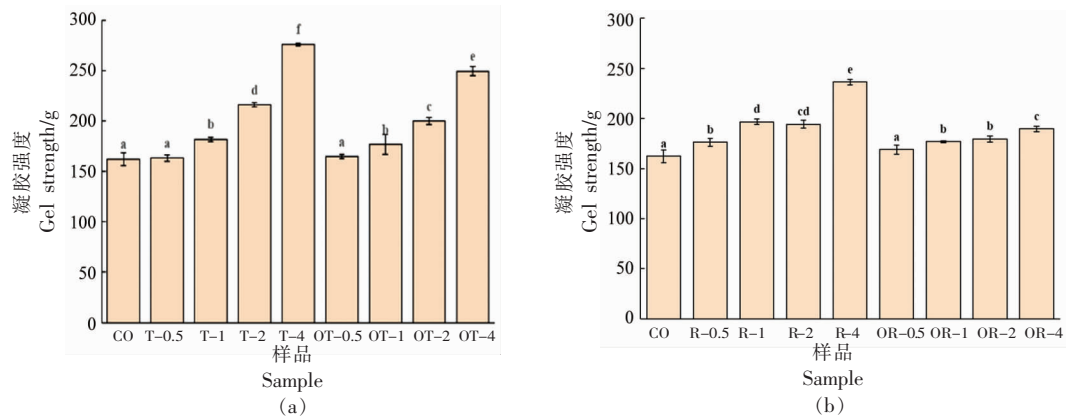
2 结果与分析

2.1 明胶胶冻的凝胶强度

图 1a 显示的是不同添加比例的单宁(T)和氧化单宁(OT)对河鲀鱼皮明胶胶冻凝胶强度的影响。与空白对照相比,单宁的添加可以使胶冻的凝胶强度提高,但是当添加比例较低时,其凝胶强度未发生显著变化,而随着添加比例的提高凝胶强度呈现显著上升的趋势,在 T-4 时值最高,为 276 g,提高了 70%。Maqsood 等^[23]表明多酚类可作为蛋白网络的有效交联剂。单宁含有较多的酚羟基,能够和明胶分子之间形成氢键,增强了明胶的空间结构^[24],促进凝胶网络的交联,而伴随单宁质量分数的上升,形成氢键数量也增多,更有利于凝胶网络的形成。Kaewdang 等^[16]也指出一定浓度的单宁能够通过非共价作用(氢键和疏水相互作用)诱导黄鳍金枪鱼鱼鳔明胶分子交联,形成更强的凝胶网络。氧化单宁对明胶胶冻的效应与单宁相似,同

样能改善胶冻的凝胶强度。有研究表明多酚经过氧化后会生成醌类物质,能够与明胶中的氨基单元或者侧链含巯基的氨基酸反应形成 C-N 键或 C-S 键,产生交联网络^[11]。此外,单宁与氧化单宁酸对胶冻凝胶强度的改善在低添加比例时差异不显著,而当添加比例提高到 2%和 4%时差异明显,单宁对胶冻凝胶性质的提升效果优于氧化单宁。这可能是由于单宁对河鲀鱼皮明胶凝胶性质的提升主要是通过氢键等非共价作用导致的,而共价作用的效果较弱。Anvari 等^[9]也发现,与氧化单宁相比,单宁对鱼明胶-阿拉伯胶复合凝胶的促交联效果更强。

图 1b 显示的是不同添加比例的芦丁(R)和氧化芦丁(OR)对河鲀鱼皮明胶胶冻凝胶强度的影响。结果发现,与对照组相比,河鲀鱼皮明胶的凝胶强度随芦丁添加比例的增加逐渐增强 ($P<0.05$),在 R-4 时最高,为 238 g,提高了约 47%。这与 Yan 等^[14]的研究结果相似,添加 8 mg/g 的芦丁能够显著提高鳕鱼皮明胶胶冻的凝胶强度。与芦丁相比,添加氧化芦丁的胶冻凝胶强度效果较差,OR-4 时最高,为 190 g,仅提高了 17%,一方面可能是由于芦丁经过氧化后,酚羟基数量减少,与明胶分子形成氢键的数量减少,从侧面表明了芦丁主要是通过非共价作用改善鱼皮明胶的凝胶强度;另一方面,可能与氧化酚类化合物的自聚集有



注:空白对照(CO)单宁(T),氧化单宁(OT),芦丁(R),氧化芦丁(OR);0.5%~4%单宁和氧化单宁分别命名为 T-0.5、T-1、T-2、T-4、OT-0.5、OT-1、OT-2 和 OT-4(a);0.5%~4%芦丁和氧化芦丁分别命名为 R-0.5、R-1、R-2、R-4、OR-0.5、OR-1、OR-2 和 OR-4(b);不同小写字母表示具有显著差异($P<0.05$)(下同)。

图 1 不同添加比例的单宁、芦丁及其氧化态对河鲀鱼皮明胶胶冻凝胶性质影响

Fig.1 Impacts of varied addition ratios of tannic acid, rutin and their oxidation states on gel strength of gelatin jelly from tiger puffer fish skin

关,降低了与蛋白质交联能力^[25]。此外,相同添加比例下两种多酚类物质相比,单宁酸的作用效果显著优于芦丁,这或许与两者的化学结构有关,芦丁酚羟基的数量与单宁酸相比相对较少,从而能与明胶分子形成的氢键数量也较少。

2.2 明胶冻凝胶和融胶温度

采用流变仪测定了添加单宁、芦丁及其氧化态后河鲀鱼皮明胶胶冻的凝胶和融胶温度。由图2显示,对添加多酚(对照组)明胶具有最低的凝胶和融胶温度,分别为9.33℃和16.45℃。随着单宁酸以及氧化单宁酸添加比例的增多,凝胶和融胶温度均呈现上升趋势,T-4时凝胶和融胶温度分别为10.9℃和19.47℃;OT-4时的凝胶和融胶

温度分别为11.37℃和19.49℃。与单宁酸相比,芦丁的加入使凝胶和融胶温度略高,R-4时凝胶和融胶温度分别为13.15℃和20.71℃,这可能是由于芦丁的化学特性造成的。但氧化芦丁的凝胶和融胶温度较低,OR-4时的分别为10.86℃和18.24℃。较高的凝胶温度意味着形成凝胶的能力更强,而较高的融胶温度则表明凝胶维持时间较长。一般来说,凝胶和融胶温度的升高是由于酰胺键形成的化学结点数量的增加^[16]。Yan等^[14]和Kaewdang等^[16]同样发现多酚的加入能够增加鱼皮明胶凝胶和融胶温度。以上结果表明,单宁和芦丁的添加可以增加明胶的凝胶和融胶温度,有利于凝胶性能的提高。

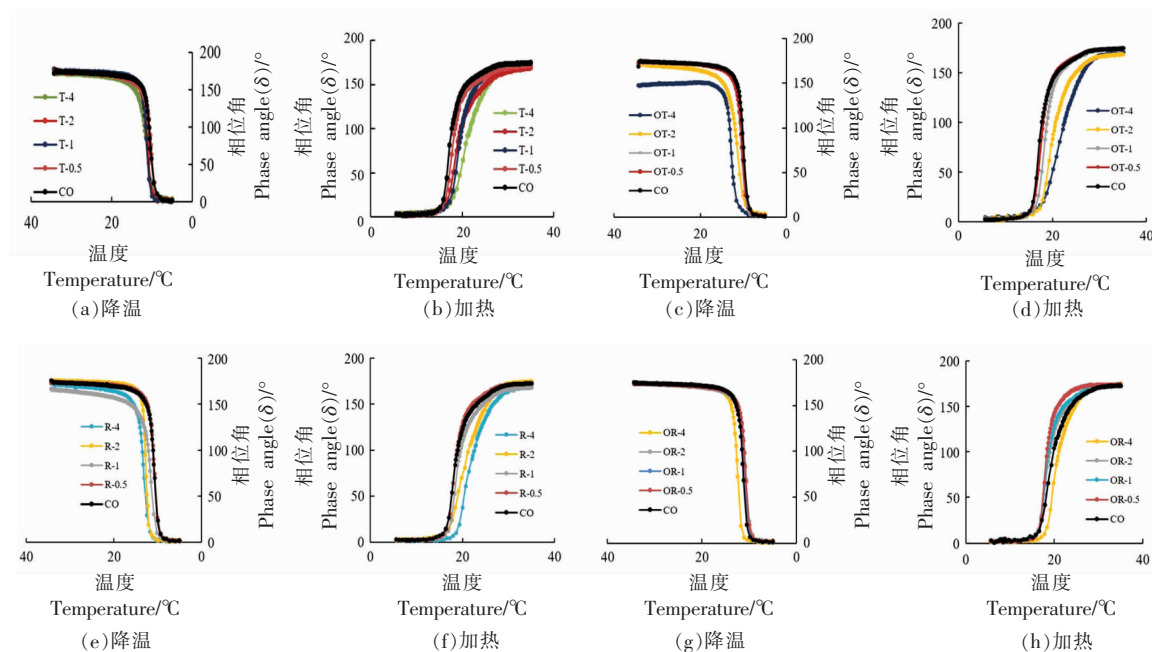


图2 不同添加比例的单宁、芦丁及其氧化态对河鲀鱼皮明胶胶冻降温 and 加热过程中相位角 (δ , °) 效应

Fig.2 Impacts of different addition ratios of tannic, rutin and their oxidation states on the phase angle (δ , °) of gelatin jelly from tiger puffer fish skin during cooling and heating

2.3 明胶胶冻的颜色

表1显示添加多酚以及氧化多酚对河鲀鱼皮明胶胶冻颜色的影响。结果显示,单宁酸以及氧化单宁对河鲀鱼皮明胶凝胶颜色的效应不显著, L^* 值出现轻微上升。这或许与单宁酸的物理性质有关,单宁酸为淡黄色,易溶于水,低浓度的单宁酸溶液呈现无色,而在pH 8的条件下单宁酸的氧化不剧烈,其氧化单宁酸的颜色变化同样不显著,

添加到明胶溶液中时并不会对胶冻的颜色产生显著影响^[17,21],图3的胶冻颜色外观照片也可相互印证。

与空白组相比,芦丁的加入会使胶冻 L^* 值显著上升,且随着添加比例的增多, L^* 值越大,表明亮度上升; a^* 值呈现显著下降, b^* 值显著上升,说明芦丁的加入增加了胶冻的绿色与黄色。这可能是芦丁溶液呈黄绿色导致的。与对照组相比,氧化

表 1 不同添加比例的单宁、芦丁及其氧化态对河鲀鱼皮明胶的颜色的影响

Table 1 Effects of different addition ratios of tannic acid, rutin and their oxidation states on the color of gelatin jelly from tiger puffer fish skin

| 样品 | L^* | a^* | b^* |
|--------|--------------------|----------------------|----------------------|
| CO | 26.85 ± 0.31^a | 0.06 ± 0.25^a | 0.09 ± 0.16^a |
| T-0.5 | 27.15 ± 0.15^a | 0.07 ± 0.16^a | -0.32 ± 0.32^a |
| T-1 | 27.52 ± 0.71^a | 0.34 ± 0.26^a | 0.39 ± 0.53^a |
| T-2 | 27.04 ± 0.57^a | 0.27 ± 0.20^a | 0.37 ± 0.23^a |
| T-4 | 27.30 ± 0.14^a | 0.06 ± 0.42^a | -0.07 ± 0.32^a |
| OT-0.5 | 26.76 ± 0.43^a | 0.01 ± 0.05^a | -0.08 ± 0.15^a |
| OT-1 | 27.12 ± 0.40^a | 0.30 ± 0.65^a | 0.12 ± 0.78^a |
| OT-2 | 27.65 ± 0.38^a | 0.05 ± 0.29^a | -0.05 ± 0.22^a |
| OT-4 | 27.63 ± 0.73^a | 0.25 ± 0.24^a | -0.23 ± 0.52^a |
| CO | 26.85 ± 0.31^d | 0.06 ± 0.25^d | 0.09 ± 0.16^a |
| R-0.5 | 25.98 ± 0.24^e | 0.09 ± 0.41^{de} | 0.43 ± 0.34^{ab} |
| R-1 | 30.04 ± 0.37^e | -1.51 ± 0.12^e | 0.50 ± 0.29^{bc} |
| R-2 | 37.81 ± 0.38^f | -3.97 ± 0.24^b | 1.63 ± 0.12^c |
| R-4 | 53.25 ± 0.12^g | -7.59 ± 0.33^a | 3.36 ± 0.13^f |
| OR-0.5 | 25.22 ± 0.12^b | 0.10 ± 0.12^{de} | 0.64 ± 0.25^{bc} |
| OR-1 | 25.25 ± 0.40^b | 0.54 ± 0.26^{ef} | 0.87 ± 0.10^{cd} |
| OR-2 | 24.63 ± 0.14^a | 0.78 ± 0.27^f | 1.02 ± 0.14^d |
| OR-4 | 24.65 ± 0.08^a | 0.98 ± 0.14^f | 1.08 ± 0.23^d |

注：同一列不同小写字母表示具有显著差异 ($P<0.05$)。

芦丁的加入降低了胶冻的亮度，增加了红色与黄色，与之相对应，由图 3 可以清晰的看出氧化芦丁使胶冻颜色变深。这可能是芦丁经过氧化后，生成

呈深棕色的醌类物质造成的。Kaewdang 等^[16]和 Temdee 等^[26]同样发现多酚类物质的加入，会引起明胶色泽的变化，但根据多酚类物质和蛋白属性的不同，影响差异也有所不同。以上结果表明，本研究中单宁酸与氧化单宁酸的添加不会对胶冻的颜色产生显著影响，而芦丁与氧化芦丁的添加对胶冻的颜色影响较为显著。

2.4 明胶胶冻水分分布

图 4 显示的是不同添加比例的单宁、芦丁及其氧化态对河鲀鱼皮明胶胶冻水分分布 (T_2 弛豫时间谱图)的影响。所有的胶冻样品均有两个弛豫时间 T_2 , T_{21} 代表的是胶冻网络中紧密结合的水，主峰 T_{22} 则代表胶冻网络结构中的可移动水^[27-28]，且主峰 T_{22} 的峰位值主要在 100~1 000 ms 之间。由于 T_{21} 峰较小，且变化不显著，因此我们主要讨论 T_{22} 峰的变化。与对照组相比，添加多酚后， T_{22} 峰均向更短的弛豫时间移动，其中 T-4 和 OT-4 左移最显著，分别为 265 ms 和 231 ms；而 R-4 和 OR-4 的 T_{22} 峰由对照的 403 ms 左移到 351 ms 左右。有研究表明较短的弛豫时间代表着水的流动性差，明胶分子与水的结合能力强；反之，代表水的流动性强，明胶分子与水的结合能力较弱^[4,29]。因此，以上结果表明单宁、芦丁及其氧化态的添加能够增强河鲀鱼皮明胶分子与水的结合能力，且当单宁和氧化单宁添加比例为 4% 时，作用效果最显著，这与凝胶强度的结果相一致，也从侧面揭示了凝胶性能改善的原因。

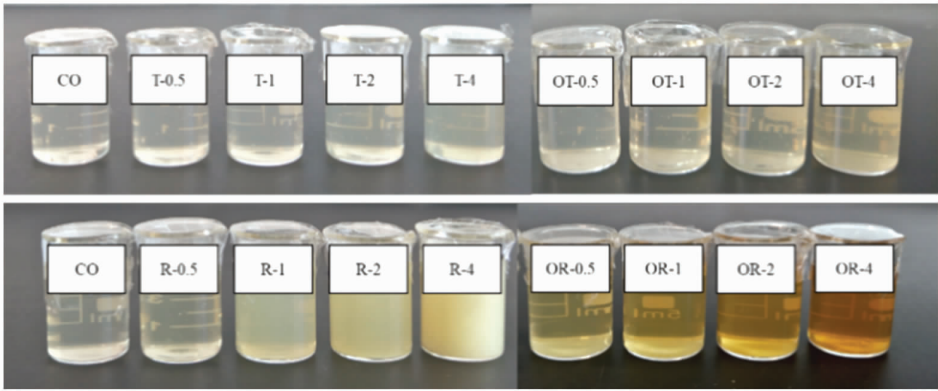


图 3 不同添加比例的单宁、芦丁及其氧化态后河鲀鱼皮明胶胶冻外观颜色图

Fig.3 Appearance and color of gelatin jelly from tiger puffer fish skin after adding different ratios of tannic acid, rutin and its oxidation state

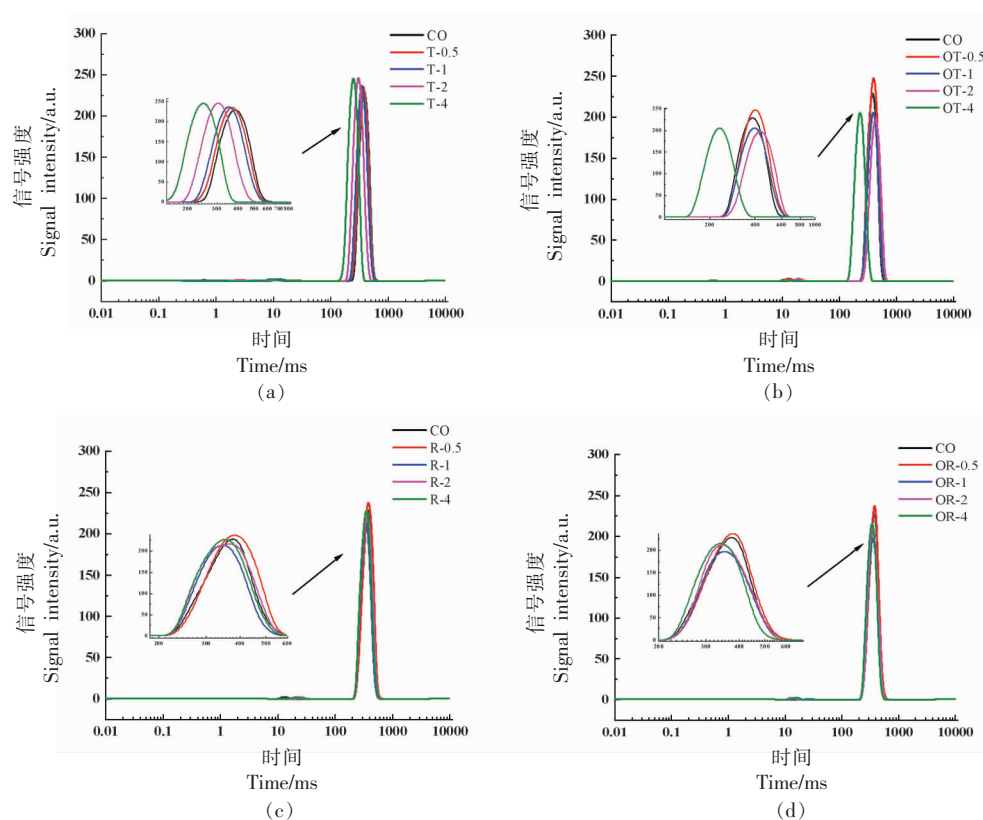


图4 不同添加比例的单宁、芦丁及其氧化态对河鲀鱼皮明胶胶冻水分分布(T_2 弛豫时间谱图)的影响

Fig.4 Effects of different addition ratios of tannic acid, rutin and their oxidation states on the moisture distribution (T_2 relaxation time spectra) of gelatin jelly from tigerpuffer fish skin

2.5 明胶胶冻微观结构

一般来说,凝胶基质中蛋白质分子的排列和结合直接影响明胶的胶冻网络,而胶冻网络的优劣直接决定凝胶强度的高低^[30],因此我们使用冷场电镜分析了代表性胶冻样品(T/OT-0.5、T/OT-4、R/OR-0.5、R/OR-4)的微观图片。由图5可见,所有的胶冻样品都呈现出蜂窝状多孔的网络结构。CO胶冻的孔洞直径最大,平均直径约为3 μm ,T-0.5和OT-0.5时仍然具有较大的孔洞;而当T-4和OT-4时孔洞直径显著减小,平均直径约为1.5 μm 且变得致密,此时对应着最高的凝胶强度。芦丁对胶冻网络的影响与单宁酸的作用效果相似,与对照组相比,R-0.5的变化不显著,R-4时网络孔洞变小且致密,孔洞平均直径约为2 μm ;而氧化芦丁对胶冻网络的改善不显著,孔洞直径变化不明显。Bedis等^[15]和Kaewdang等^[16]也发现了类似的结果,从农业废弃物中提取的酚类物质显著改善了明胶的胶冻网络结构。以上研究结

果表明,单宁酸和芦丁及其氧化态或许能够促进明胶分子链的交联,进而有助于改善微观网络结构,提高凝胶特性。

2.6 明胶胶冻的蛋白条带

通常多酚可与蛋白质通过非共价或共价方式相互作用,非共价方式主要涉及氢键、疏水相互作用等;而共价方式,主要是多酚及其氧化物和蛋白质之间形成共价键^[10,31]。采用SDS-PAGE电泳分析了添加单宁、芦丁及其氧化形态后河鲀鱼皮明胶的蛋白条带,如图6所示。所有胶冻均具有4条清晰的 γ 、 β 、 α_1 和 α_2 链。单宁的加入并没有引起蛋白条带数量和灰度的变化;而与空白对照相比,随着OT添加比例的增加,分离胶顶端蛋白条带的灰度轻微加深,说明氧化单宁与明胶之间存在共价作用,但非共价作用仍起着主导地位。芦丁与氧化芦丁的添加没有使明胶的蛋白条带发生明显变化,说明其对凝胶强度的改善主要是非共价作用导致的。本文结果与Anvari等^[9]和王舒雅等^[32]的试

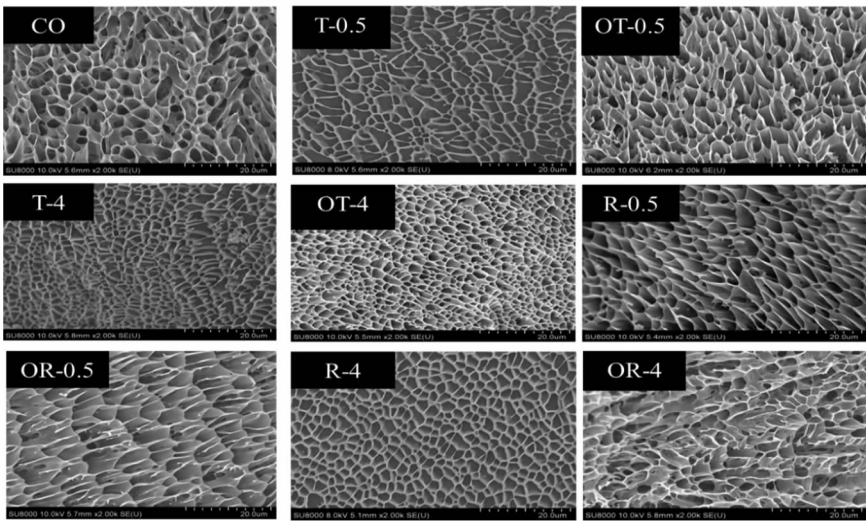


图 5 添加不同比例的单宁、芦丁及其氧化态后河鲀鱼皮明胶胶冻的微观结构图(放大倍数 2 000×)

Fig.5 Microstructure diagrams of gelatin jelly from tiger puffer fish skin after the addition of different ratios of tannic acid, rutin and their oxidation states (magnification 2 000×)

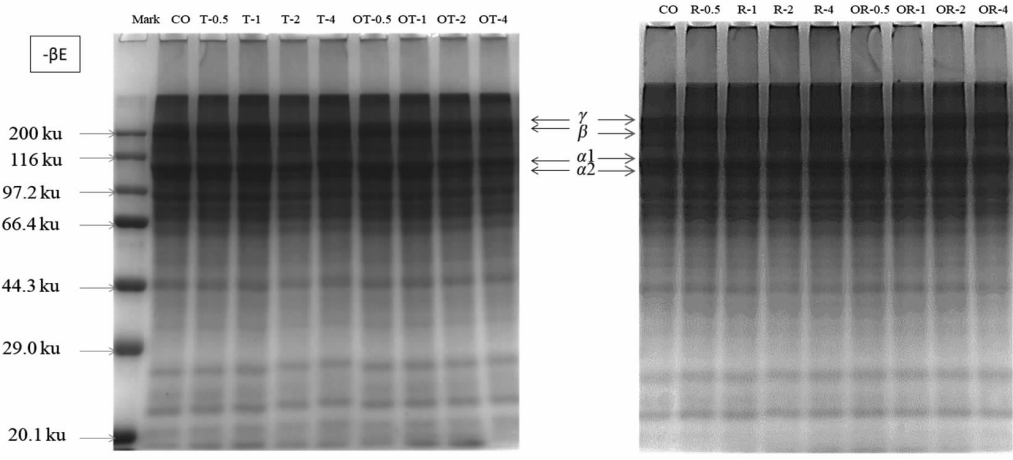


图 6 添加不同比例的单宁酸、芦丁及其氧化态后河鲀鱼皮明胶 SDS-PAGE 电泳图

Fig.6 SDS-PAGE spectrum of gelatin from tiger puffer fish skin gelatin after the addition of different ratios of tannic acid, rutin and their oxidation states

验结果相似。根据电泳和凝胶强度得出结论,单宁主要通过氢键和疏水作用等非共价方式与明胶分子结合,而氧化单宁或许与明胶分子存在共价结合,因此促进明胶分子链之间的交联,有利于凝胶网络的形成,提高凝胶强度。

2.7 明胶的红外光谱

红外光谱可用来揭示植物多酚与蛋白的相互作用^[33]。图 7 显示的是添加不同比例单宁酸、芦丁及其氧化态后河鲀鱼皮明胶的红外光谱图。由图

可以看出所有样品具有相似的红外光谱图,均具有典型的酰胺-I、II、III和酰胺-A、B的特征峰,但对具体的峰位值分析发现,略有不同。酰胺-I带与 C=O 的伸缩振动有关。所有样品的酰胺-I带主要出现在 1 665~1 677 cm⁻¹ 位置处。具体分析发现,多酚的添加使明胶的酰胺-I带发生红移,且添加单宁酸与氧化单宁酸的明胶酰胺-I带红移幅度较大。酰胺-II带可以归因于 C-N 伸缩振动以及 N-H 弯曲振动^[34]。所有添加多酚物质明胶

的酰胺-Ⅱ带位于 $1442\sim 1448\text{ cm}^{-1}$ 处,未发生显著变化,表明单宁酸和芦丁的添加不会影响 α 螺旋的含量。酰胺-A带代表N-H的拉伸振动与氢键的结合^[35]。空白对照组的酰胺-A带出现在 $3358\sim 3360\text{ cm}^{-1}$,而添加多酚后明胶的酰胺-A带主要出现在 $3345\sim 3354\text{ cm}^{-1}$ 处,与对照组相比均

出现了蓝移,表明芦丁与单宁酸的加入可增加样品中氢键的数量^[21]。酰胺-B带反映的是肽链中 CH_2 与 NH_3 基团间的相互作用^[36],所有明胶样品的酰胺-B带均位于 $2943\sim 2948\text{ cm}^{-1}$,未发生明显的偏移。

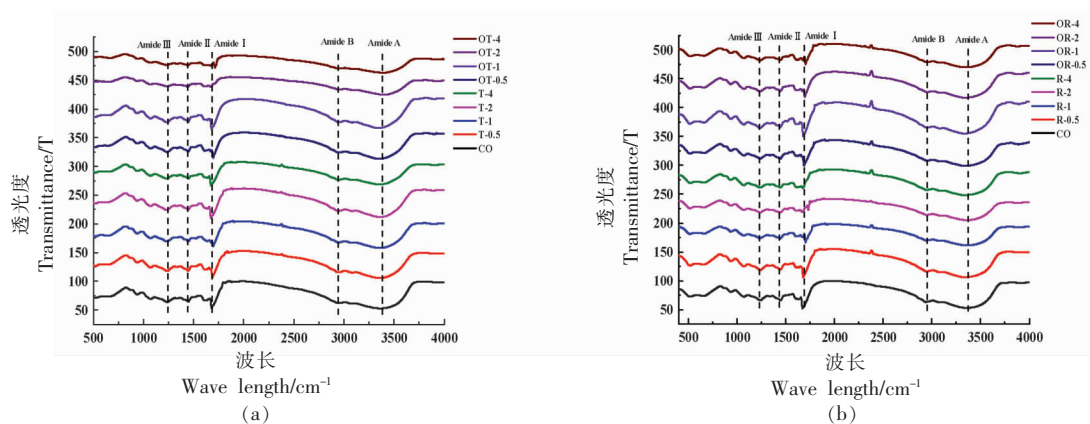


图7 添加不同比例的单宁酸、芦丁及其氧化态后河鲀鱼皮明胶傅里叶变换红外光谱

Fig.7 Fourier transform infrared spectrum of tiger puffer fish skin gelatin after the addition of different ratios of tannic acid, rutin and their oxidation state

3 结论

对比2种多酚氧化前、后对河鲀鱼皮明胶凝胶性能的影响,结果如下:1)单宁、芦丁及其氧化态添加主要以氢键方式和明胶分子结合,促进了明胶分子链之间的交联,形成了致密凝胶网络,增强了凝胶强度。其中单宁以及氧化单宁在0~4%内添加比例越多,增强凝胶强度作用越显著,而氧化芦丁的影响不显著。2)两种多酚的加入缩短了明胶的弛豫时间,促进了明胶与水分子的结合,提高了凝胶和融胶温度。同时,多酚的加入会使河鲀鱼皮明胶胶冻产生颜色变化,芦丁影响比较显著,而单宁影响不显著。3)单宁和芦丁合理添加可以用于改善河鲀鱼皮明胶的凝胶性能,拓展应用范围。

参考文献

- [1] KARIM A A, BHAT R. Fish gelatin: Properties, challenges and prospects as an alternative to mammalian gelatins [J]. Food Hydrocolloids, 2009, 23 (3): 563-576.
- [2] NITSUWAT S, ZHANG P, NG K, et al. Fish gelatin as an alternative to mammalian gelatin for

food industry: A meta-analysis [J]. LWT, 2021, 141: 110899.

- [3] LIU Y, XIA L N, JIA H, et al. Physiochemical and functional properties of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) skin gelatin extracted at different temperatures; Chum salmon skin gelatin extracted at different temperatures [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2017, 97(15): 5406-5413.
- [4] PAN J F, LI Q, JIA H, et al. Physiochemical and functional properties of tiger puffer (*Takifugu rubripes*) skin gelatin as affected by extraction conditions [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 109: 1045-1053.
- [5] 杨慧娟, 赵巧灵, 王萍亚, 等. 鱼明胶替代哺乳动物明胶的研究进展 [J]. 中国食品学报, 2021, 21 (10): 334-342.
- [6] YANG H J, ZHAO Q L, WANG P Y, et al. Research progress of fish gelatin as a substitute for mammalian gelatin [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(10): 334-342.
- [6] HUANG T, TU Z C, SHANGGUAN X C, et al. Fish gelatin modifications: A comprehensive review [J]. Trends in Food Science & Technology, 2019,

- 86; 260–269.
- [7] YANG H J, WANG H F, HUANG M, et al. Repurposing fish waste into gelatin as a potential alternative for mammalian sources: A review[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2022, 21(2): 942–963.
- [8] PAN J F, JIA H, SHANG M J, et al. Effects of deodorization by powdered activated carbon, β -cyclodextrin and yeast on odor and functional properties of tiger puffer (*Takifugu rubripes*) skin gelatin[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 118: 116–123.
- [9] ANVARI M, CHUNG D. Dynamic rheological and structural characterization of fish gelatin – gum arabic coacervate gels cross-linked by tannic acid[J]. Food Hydrocolloids, 2016, 60: 516–524.
- [10] OZDAL T, CAPANOGLU E, ALTAY F. A review on protein–phenolic interactions and associated changes[J]. Food Research International, 2013, 51(2): 954–970.
- [11] 黄涛. 蛋白质修饰技术改善鱼明胶理化特性及其应用的研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2018.
- HUANG T. Study on the protein modification techniques improving the physicochemical properties of fish gelatin and its application[D]. Nanchang: Nanchang University, 2018.
- [12] 潘军辉, 王维亚, 李闯, 等. TG酶与单宁酸对鱼明胶凝胶强度的影响[J]. 南昌大学学报(理科版), 2021, 45(3): 246–250.
- PAN J H, WANG W Y, LI C, et al. Effects of TGase and acid on gelation strength of fish gelatin[J]. Journal of Nanchang University (Natural science), 2021, 45(3): 246–250.
- [13] PAN J F, LIAN H L, JIA H, et al. Ultrasound treatment modified the functional mode of gallic acid on properties of fish myofibrillar protein[J]. Food Chemistry, 2020, 320: 126637.
- [14] YAN M, LI B, ZHAO X, et al. Physicochemical properties of gelatin gels from walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) skin cross-linked by gallic acid and rutin[J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(5): 907–914.
- [15] BEDIS KAYNARCA G, GÜMÜŞ T, DAMLA ALTAN KAMER D. Rheological properties of fish (*Sparus aurata*) skin gelatin modified by agricultural wastes extracts[J]. Food Chemistry, 2022, 393: 133348.
- [16] KAEWDANG O, BENJAKUL S. Effect of ethanolic extract of coconut husk on gel properties of gelatin from swim bladder of yellowfin tuna[J]. LWT – Food Science and Technology, 2015, 62(2): 955–961.
- [17] 金文刚, 尚美君, 刘洋, 等. 单宁酸和芦丁对马哈鱼鱼皮明胶凝胶性质的影响[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(3): 123–129.
- JIN W G, SHANG M J, LIU Y, et al. Effects of tannin acid and rutin on gelling characteristics of chum salmon skin gelatin[J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(3): 123–129.
- [18] WANG Y, JIA H, HAO R Y, et al. Gelling and emulsifying properties of tiger puffer (*Takifugu rubripes*) skin gelatin as manipulated by pH[J]. Journal of Molecular Liquids, 2023, 369: 120886.
- [19] PANG S W, WANG Y, JIA H, et al. The properties of pH-responsive gelatin-based intelligent film as affected by ultrasound power and purple cabbage anthocyanin dose[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 230: 123156.
- [20] PANG S W, WANG Y, HAO R Y, et al. UV irradiation improved gel properties and chill - stored stability of surimi gel[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2022, 57(9): 5973–5981.
- [21] 尚美君. 单宁酸、芦丁对马哈鱼和河鲢鱼鱼皮明胶凝胶特性的改善[D]. 大连: 大连工业大学, 2019.
- SHANG M J. Improvement of gel properties of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) and puffer fish (*Takifugu rubripes*) skin gelatin by tannin and rutin[D]. Dalian: Dalian polytechnic University, 2019.
- [22] CHEN H R, WU D, MA W C, et al. Strong fish gelatin hydrogels enhanced by carrageenan and potassium sulfate[J]. Food Hydrocolloids, 2021, 119: 106841.
- [23] MAQSOOD S, BENJAKUL S, SHAHIDI F. Emerging role of phenolic compounds as natural food additives in fish and fish products[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2013, 53(2): 162–179.
- [24] 王晓婷, 康明丽, 宋丽君, 等. 单宁酸改性明胶脂肪替代物结构及功能性质的研究[J]. 食品工业科技, 2022, 43(11): 104–111.
- WANG X T, KANG M L, SONG L J, et al. Study on structure and functional properties of tannic acid

- modified gelatin fat substitute[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(11): 104–111.
- [25] 詹丽, 陈雪岚. 鱼明胶特性及改性对其品质影响的研究进展[J]. 食品工业科技, 2021, 42(23): 385–393.
- ZHAN L, CHEN X L. Research progress on the properties and modification of fish gelatin[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(23): 385–393.
- [26] TEMDEE W, BENJAKUL S. Effect of oxidized kiam wood and cashew bark extracts on gel properties of gelatin from cuttlefish skins [J]. Food Bioscience, 2014, 7: 95–104.
- [27] MUYONGA J H, COLE C G B, DUODU K G. Extraction and physico-chemical characterisation of Nile perch (*Lates niloticus*) skin and bone gelatin [J]. Food Hydrocolloids, 2004, 18(4): 581–592.
- [28] ARNESEN J, GILDBERG A. Extraction and characterisation of gelatine from Atlantic salmon (*Salmo salar*) skin [J]. Bioresource Technology, 2007, 98(1): 53–57.
- [29] HAN M Y, WANG P, XU X L, et al. Low-field NMR study of heat-induced gelation of pork myofibrillar proteins and its relationship with microstructural characteristics[J]. Food Research International, 2014, 62: 1175–1182.
- [30] BENJAKUL S, OUNGBHO K, VISESSANGUAN W, et al. Characteristics of gelatin from the skins of bigeye snapper, *Priacanthus tayenus* and *Priacanthus macracanthus* [J]. Food Chemistry, 2009, 116(2): 445–451.
- [31] LE BOURVELLEC C, RENARD C M G C. Interactions between polyphenols and macromolecules: Quantification methods and mechanisms [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2012, 52(3): 213–248.
- [32] 王舒雅, 赵靖昀, 代亚磊, 等. 鱼皮明胶和多酚组装行为与相互作用[J]. 食品科学, 2021, 42(14): 1–8.
- WANG S Y, ZHAO J Y, DAI Y L, et al. Assembly behavior and interaction between fish skin gelatin and polyphenols[J]. Food Science, 2021, 42(14): 1–8.
- [33] 李春翼, 田勇, 杨雅轩, 等. 植物多酚与蛋白质相互作用机制表征方法研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(13): 262–268.
- LI C Y, TIAN Y, YANG Y X, et al. Characterization methods for investigating interaction mechanisms between plant polyphenols and proteins: A review[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(13): 262–268.
- [34] BARTH A. Infrared spectroscopy of proteins [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics, 2007, 1767(9): 1073–1101.
- [35] KAEWRUANG P, BENJAKUL S, PRODPRAN T. Characteristics and gelling property of phosphorylated gelatin from the skin of unicorn leatherjacket [J]. Food Chemistry, 2014, 146: 591–596.
- [36] 刘洋, 夏俪宁, 贾慧, 等. 马哈鱼鱼皮明胶提取温度和甘油质量浓度对其成膜特性的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(7): 236–242.
- LIU Y, XIA L N, JIA H, et al. Effects of extraction temperature of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) skin gelatin and glycerol content on its film-forming properties[J]. Food Science, 2018, 39(7): 236–242.

Impacts of Tannin and Lutein before and after Oxidization on Gelatin Properties of Tiger Puffer (*Takifugu rubripes*) Skin Gelatin

Jin Wengang¹, Wang Yong², Shang Meijun², Pan Jinfeng^{2*}

(¹Bio-resources Key Laboratory of Shaanxi Province, School of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723001, Shaanxi)

(²State Key Laboratory of Marine Food Processing & Safety Control, School of Food Science and Technology, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning)

Abstract In order to improve the properties of fish skin gelatin, different proportions of tannins, rutin and their oxidation states (0%, 0.5%, 1%, 2%, 4%) were added to investigate their impacts on the properties, color, water distribu-

tion, protein structure, and protein banding of puffer (*Takifugu rubripes*) skin gelatin. The results showed that the addition of tannin, oxidized tannin and rutin significantly increased the gelatin strength, gelling and melting temperature of the skin gelatin ($P < 0.05$), while the effect of oxidized rutin was not obvious. Tannin and oxidized tannin demonstrate no significant effect on the gelatin color, while rutin and oxidized rutin have a significant effect, especially oxidized rutin, which results in a significant decrease in the L^* value (6.07%–8.26%) of the gelatin, improvement of a^* value (88.89%–93.88%) and b^* value (85.94%–91.67%). Low-field nuclear magnetic resonance results showed that the addition of two polyphenols and their oxidation states shortened the T_2 relaxation time and promoted the combination of gelatin and water molecules. Cold field electron microscopy showed that addition of tannin, rutin and their oxidation states is beneficial to the formation of a dense gel network structure. SDS-PAGE results indicated that there was no obvious change in the protein bands of gelatin, and the covalent cross-linking between polyphenols and gelatin molecules was not significant, and they mainly interacted through non-covalent interactions. The infrared spectrum shows that both the amide-A band and the amide-I band shift to blue, indicating that the number of hydrogen bonds formed increases. Overall, tannin, rutin and their oxidation states may be combined with gelatin molecules through non-covalent interactions (especially hydrogen bonds), thereby improving the gel properties of puffer skin gelatin. These findings contribute certain evidences for property improvement of puffer skin gelatin.

Keywords tiger puffer; fish gelatin; tannin; lutein; gel property