

焦磷酸钠改性对中华鳖明胶性质和结构的影响

尹朝阳¹, 刘杨柳¹, 陈智慧², 韩军¹, 王圆圆³, 闫立君³, 孙纪录^{1*}

¹河北农业大学食品科技学院 河北保定 071000

²云南省曲靖农业学校生物技术学部 云南曲靖 655000

³石家庄水产技术推广站 石家庄 050000

摘要 用焦磷酸钠(SPP)改性中华鳖明胶(CTG),研究磷酸化改性对 CTG 颜色、凝胶特性、流变学特性、结构以及 Pickering 乳液稳定性的影响。结果表明,磷酸化改性显著降低了 CTG 的亮度,使其颜色变黄。低浓度的 SPP(40:1)改性改善了 CTG 的凝胶特性,凝胶强度升高至 252 g,胶凝时间降低至 96 s,对其流变学特性并无显著影响。随着 SPP 浓度的增加,CTG 的凝胶强度、黏度、胶凝和熔化温度降低,分别降低至 196 g,25 mPa·s,18.6 °C,27.5 °C,而其抗剪切能力增强。结构分析表明,SPP 改性使磷酸基团与 CTG 共价结合,增加了 CTG 的分子质量,改变了 CTG 的 α 、 β 链的含量和二、三级结构。微观结构显示,CTG 改性后的凝胶网络发生变化。SPP 改性改善了 CTG 的乳化特性,降低了 CTG 稳定的 Pickering 乳液的液滴尺寸,使其呈现更良好的液滴状态。其中,CTG/40:2 稳定的乳液液滴最小,降低至(4.13±2.47) μ m,而 CTG/40:6 稳定的乳液具有更优秀的乳化和液滴稳定性,其第 5 天开始分层,且贮藏 28 d 后的 CI 值最低,为 11.2%。本研究可为开发具有优良特性的新型水产源食品明胶提供技术参考。

关键词 中华鳖;明胶;磷酸化;改性;理化性质;结构;Pickering 乳液

文章编号 1009-7848(2025)01-0072-13 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2025.01.007

明胶是一种亲水性纤维蛋白,来源于动物皮肤和骨骼中的胶原蛋白的部分水解^[1-3]。在食品工业中,明胶作为乳液稳定剂^[4]、包封支撑剂^[5]、生物活性膜^[6]和凝胶剂^[7]等被研究探索和广泛应用。目前,商业食品明胶主要来源于哺乳动物,如猪和牛的皮肤或骨头,其应用受到宗教信仰和牛海绵状脑风险等方面限制^[8]。与之相比,来源于水生动物的明胶可较好地规避这些问题,成为传统商品化明胶的优良替代品。然而,水生动物来源的明胶在凝胶强度、乳化特性等方面通常不及哺乳动物明胶,因而有必要通过合理的蛋白改性,使其理化和功能特性得到进一步提升。

食品蛋白改性的常见方法包括单宁酸^[9]、谷氨酰胺转氨酶^[10]、酸酐^[11]和磷酸化改性^[12]等,其中,磷酸化改性是一种较为成熟的改性方法。Ai 等^[13]通过磷酸化改性改善了碱性鸭蛋清的凝胶特性。Jia 等^[14]用低离子强度的 KCl 对虾肌纤维蛋白进行磷酸化改性,提高了虾肌纤维蛋白的溶解度、凝胶强度

和乳化特性。Hu 等^[15]通过超声辅助磷酸化对鹅肝蛋白进行改性,提升了鹅肝蛋白的溶解性和乳化特性。目前,磷酸化改性已被用于明胶的改性,如 Kaewruang 等^[16]对单角革鲀鱼皮明胶进行磷酸化改性,提高其凝胶强度。Huang 等^[17]探究磷酸化改性时间对鱼明胶性质的影响,结果表明,0.5 h 的磷酸化可以改善鱼明胶的凝胶和乳化特性。由此可知,磷酸化改性对明胶的一些性质确有改善效果。然而,因原料及磷酸盐种类不同,故明胶改性效果也存在较大差异。现有关于三聚磷酸钠和三偏磷酸钠改性的研究已较为深入^[13-16],而焦磷酸钠(Sodium pyrophosphate, SPP)在明胶磷酸化改性中应用较少。对于焦磷酸钠盐对中华鳖的明胶结构、凝胶特性、流变学特性及乳化性等特性的影响尚不明晰,磷酸化改性明胶的结构与性质的相关性研究也有待深入。

中华鳖副产物是一种十分优质的明胶制备材料,而目前鲜有相关研究报道。本课题组前期从中华鳖副产物中成功制备中华鳖明胶(Chinese soft-shelled turtle gelatin, CTG),并对其理化性质和结构进行系统表征,结果发现,与哺乳动物明胶相比,CTG 的凝胶特性和乳化特性较差。为进一步改

收稿日期: 2024-01-28

基金项目: 河北省重点研发计划项目(21327107D)

第一作者: 尹朝阳,男,硕士

通信作者: 孙纪录 E-mail: fm1311sun@163.com

善 CTG 的特性,本研究采用 SPP 对 CTG 改性,系统研究磷酸化改性过程中 SPP 对 CTG 凝胶特性、流变学特性以及 Pickering 乳液贮藏稳定性的影响,并从结构角度探究 SPP 对 CTG 磷酸化改性的机理,以期为促进中华鳖副产物再利用,开发具有优良特性的新型水产源食品明胶提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

中华鳖明胶,中华鳖副产物购于河北农业大学科技市场,脱杂蛋白、脱脂后使用乙酸预处理,最后在 55 °C 水浴中提取 6 h,冷冻干燥得到中华鳖明胶。

焦磷酸钠、溴化钾,上海麦克林生化科技有限公司;HCl、NaOH,国药集团化学试剂有限公司;钼酸铵、无水亚硫酸钠,天津市天力化学试剂有限公司;磷酸二氢钾标准品,广州亮亮化工有限公司。

1.2 仪器与设备

PHS-3DW 型 pH 计,合肥桥斯仪器设备有限公司;WSC-2B 型便携式精密色差仪,上海仪电物理光学仪器有限公司;IRTracer-100 型傅里叶变换红外光谱仪,日本岛津公司;捷克 TESCAN MIRA LMS 扫描电子显微镜,北京亚科晨旭科技有限公司;MDS-15 型微波消解仪,苏州新仪科学仪器有限公司;721G 型紫外-可见分光光度计,上海仪电分析仪器有限公司;Tanon 4600SF 型照胶仪,北京原平皓生物技术有限公司;MCR92 型流变仪,安东帕贸易有限公司;TA.GEL 型质构仪,上海保圣实业发展有限公司;SHA-C 型水浴恒温振荡器,常州国宇仪器制造有限公司;LGJ-12A 型真空冷冻干燥机,北京四环起航科技有限公司;FSH-2 型可调高速匀浆机,常州国华电器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 磷酸化改性 CTG 的制备 根据 Cen 等^[12]的方法并略微修改,CTG:SPP 按照比例为 40:0,40:1,40:2,40:4,40:6,将 SPP 添加到 CTG 溶液(质量分数 6%)中。均质后,使用 1 mol/L NaOH 和 HCl 将溶液 pH 值调节至 7.0,并将混合物在 50 °C 加热 30 min 磷酸化后,样品使用去离子水透析 48 h,每 8 h 换 1 次蒸馏水,冷冻干燥。

1.3.2 磷含量的测定 根据严春俊^[18]的方法并稍微修改,称取约 0.1 g 改性 CTG(精确至 0.001 g)于消化管中,加入 10 mL 硝酸,1 mL 双氧水,置于微波消解仪中消化,条件为:120 °C 10 min,150 °C 15 min 和 190 °C 25 min。转移冷却后消化液于烧杯中,加 20 mL 水,赶酸,冷却后加水定容至 100 mL 作为试样测定溶液。同时做试剂空白试验。

准确吸取试样溶液 2 mL 及等量的空白溶液,分别置于 25 mL 具塞试管中,加入 2 mL 质量浓度为 50 g/L 钼酸铵溶液,摇匀后静置。再加入 1 mL 亚硫酸钠溶液(200 g/L)、1 mL 对苯二酚溶液(5 g/L),摇匀。加水至刻度,混匀。静置 0.5 h 后,用 1 cm 比色杯,在 660 nm 波长处,测定其吸光度,与标准系列比较定量。

1.3.3 理化性质的测定

1.3.3.1 色值的测定 取冷冻干燥后的明胶样品,放置在白板上,采用便携式精密色差仪读取样品 L^* , a^* , b^* 值,每个明胶样品测定 6 次,取平均值。

1.3.3.2 凝胶强度的测定 配制质量分数 6.67% 的改性 CTG 溶液,加入凝胶冻力瓶,在 4 °C 熟化 16~18 h 后,通过质构仪进行测定。测定条件为:探头型号为 p/0.5,下压深度为 4 mm,下压速度为 0.5 mm/s^[19]。凝胶强度为下压至 4 mm 处是的最大反作用力(g)。

1.3.3.3 胶凝时间的测定 配制质量分数 6.67% 的改性 CTG 溶液,将其分别放置在 4 °C 和 25 °C 下。手动将牙签插入明胶溶液并每隔 5 s 提起 1 次,直至牙签无法与明胶溶液分离,该时间即为明胶的胶凝时间^[19]。

1.3.3.4 动力学黏度的测定 配制质量分数 6.67% 的改性 CTG 溶液,使用流变仪对其进行动力学黏度测试。恒定测试温度为 25 °C,剪切速率变化范围为 10~1 000 s⁻¹,观察黏度随剪切速率的变化。

1.3.3.5 胶凝温度和熔化温度的测定 配制质量分数 6.67% 的改性 CTG 溶液,通过流变仪对其进行动态温度扫描流动试验。测试条件为:固定应变为 5%,固定频率为 60 rad/s,扫描温度范围为 5 °C ~ -45 °C ~ 5 °C,升温速率为 2 °C/min^[20]。观察弹性模

量(G')、黏性模量(G'')随温度的变化。

1.3.4 乳化性能

1.3.4.1 CTG 稳定的鱼油载乳液的制备及观察

根据 Yang 等^[21]的研究方法并略微修改,制备不同质量浓度(2,4,6,8,10 mg/mL)的 CTG 溶液,并将 pH 值调节为 9.0。将 6 mL CTG 溶液与 3 mL 鱼油混合,用高速匀浆机以 11 500 r/min 转速匀浆 2 min,得到 CTG 稳定的鱼油载乳液。乳液在 4 °C 保存。在特定的测量时间点(0,3 h 和 3,28 d),使用数码相机拍摄玻璃小瓶中的乳液。采用直立式光学显微镜,物镜倍率为 40 倍进行液滴分析。统计汇总 5~7 张独立图像中约 600~700 个液滴,通过高斯峰拟合测量液滴大小。乳化指数(CI)由式(1)计算:

$$CI(\%) = \frac{\text{血清层高度}}{\text{乳液高度}} \times 100 \quad (1)$$

1.3.4.2 乳液活性指数和乳液稳定性指数的测定

根据 Yang 等^[22]的方法,将 5 μ L 明胶稳定的鱼油乳液分别加入到 4.95 mL 0.1% 十二烷基硫酸钠(SDS)溶液中,分别在 0 min 和 10 min 时涡旋 10 s,使其混合均匀。采用紫外-可见光分光光度计测定其在波长 500 nm 处的吸光度。乳液活性指数(Emulsion activity index, EAI)和乳液稳定性指数(Emulsion stability index, ESI)由下式计算:

$$EAI(\text{m}^2/\text{g}) = \frac{2 \times 2.303 \times A_0 \times N}{\varphi \times C \times 10000} \quad (2)$$

$$ESI(\text{min}) = \frac{A_0 \times \Delta t}{A_0 - A_{10}} \quad (3)$$

式中: A_0 为 0 min 时的吸光度; A_{10} 为 10 min 时的吸光度; N 为乳液的稀释倍数,100; φ 为油相的体积分数,0.33; C 为明胶溶液的质量浓度,g/mL; Δt 为保存时间,10 min。

1.3.5 结构分析

1.3.5.1 SDS-PAGE 分析 分离胶浓度为 8%,浓缩胶浓度为 5%。将 0.2 g 改性 CTG 样品溶解在 10 mL 10% 十二烷基硫酸钠中,45 °C 下孵育 30 min。然后,将溶液以 1:1 的体积比与 5 \times 样品缓冲液混合,煮沸 5 min。再将 10 μ L 混合物加入样品孔中,80 kV 电压电泳 30 min 后,120 kV 电压电泳 2 h。电泳结束后,用考马斯亮蓝染色液染色,然后脱色至蛋白条带清晰。

1.3.5.2 傅里叶变换红外光谱分析 取 1 mg 改性

CTG 样品与 150 mg 溴化钾于玛瑙研钵中充分研磨、压片,通过傅里叶变换红外光谱仪进行扫描,扫描范围为 4 000~400 cm^{-1} 。

1.3.5.3 内源性荧光分析 参考杨梅^[23]的方法并加以修改,采用配备有 1 cm 路径长度石英池的荧光分光光度计进行荧光测量。当激发波长为 295 nm 时,在 290~480 nm 的发射波长下,记录所有 CTG 样品(2 mg/mL)的荧光强度。扫描速度为 12 000 nm/min, PMT 电压为 400 V。

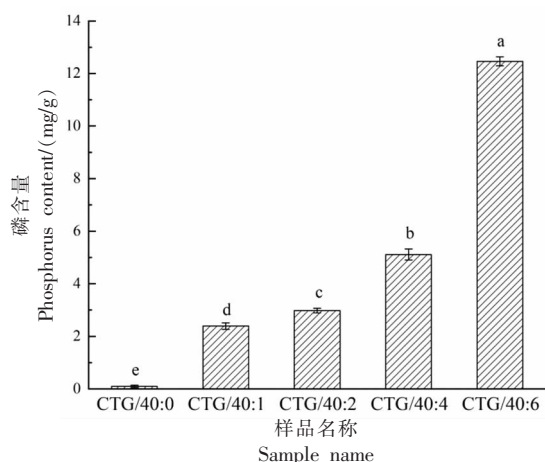
1.3.5.4 扫描电子显微镜分析 取冷冻干燥后的 CTG 样品直接粘到导电胶上,并使用 Oxford Quorum SC7620 溅射镀膜仪喷金 45 s,喷金为 10 mA。使用 TESCAN MIRA LMS 扫描电子显微镜(Scanning electron microscope, SEM)对明胶样品的微观结构进行观察,并拍摄明胶 100 \times 的照片,拍摄时加速电压为 3 kV。

1.3.6 数据统计及处理 以上试验均做 3 个平行,数据以“平均值 \pm 标准偏差”表示,使用 SPSS 23 对试验数据进行分析和处理, $P < 0.05$ 表示具有显著性差异;采用 Origin 2021 软件进行数据处理及图表绘制。

2 结果与分析

2.1 改性中华鳖明胶磷含量

为了证明磷酸化反应成功,并探究磷酸基团与 CTG 的结合率,本研究测定了不同改性 CTG 的 P 含量如图 1 所示。随着 SPP 浓度的增加,改性 CTG 中的 P 含量也显著增加,CTG/40:6 的 P 含量最高为(12.46 mg/g),表明磷酸化反应发生,且高浓度的 SPP 会提高磷酸基团在 CTG 上结合率。Cen 等^[12]的研究也表明鱼明胶的 P 含量会随着 SPP 浓度的增加而升高。在磷酸化改性中,磷酸盐通常会与蛋白质中丝氨酸和苏氨酸残基的游离-OH、赖氨酸的 ϵ -NH₂、组氨酸咪唑环的 1,3 号位氮原子以及精氨酸胍基的氮原子发生诱导结合^[24]。由于磷酸盐的分子构象、磷酸基团分布和磷化合物的活性等差异,在实际反应中可能产生不同的磷酸化结果^[25]。因此,在后面的研究中,对 CTG 的理化性质、结构以及 Pickering 乳液稳定性进行了表征,以探究 SPP 改性对 CTG 的影响。



注:CTG/40:0、CTG/40:1、CTG/40:2、CTG/40:4 和 CTG/40:6 分别代表 CTG:SPP 比例为 40:0,40:1,40:2,40:4,40:6 改性的中华鳖明胶;不同字母表示样品之间存在显著性差异, $P<0.05$ 。

图 1 不同改性中华鳖明胶的磷含量

Fig.1 Phosphorus content of different modified Chinese soft-shelled turtle gelatins

2.2 改性中华鳖明胶理化性质

2.2.1 色值 不同改性 CTG 的色值如表 1 所示。随着 SPP 浓度的增加,改性 CTG 的 L^* 降低, b^* 值增加,这意味着其亮度下降,颜色变黄。 a^* 值的变化并无规律。这可能是因为改性使 CTGs 三级结构去折叠,暴露出更多的显色基团,从而导致其亮度降低,黄色加重。

表 1 不同改性中华鳖明胶的 L^* 、 a^* 、 b^* 值

Table 1 L^* , a^* , b^* values of different modified Chinese soft-shelled turtle gelatins

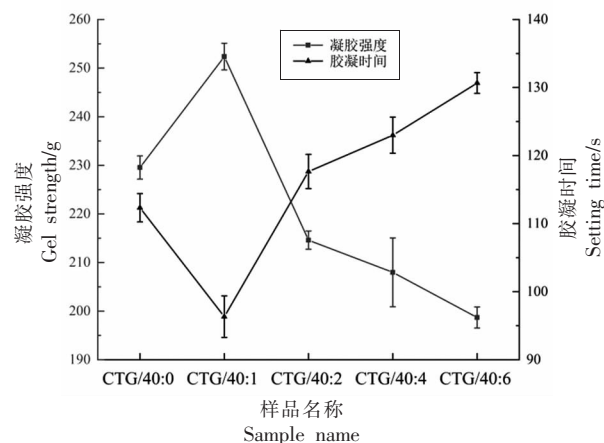
明胶种类	L^*	a^*	b^*
CTG/40:0	88.41 ± 0.22^a	1.22 ± 0.02^e	6.39 ± 0.21^e
CTG/40:1	86.43 ± 0.11^b	1.35 ± 0.01^b	7.46 ± 0.10^d
CTG/40:2	85.65 ± 0.04^c	1.46 ± 0.05^a	7.98 ± 0.12^c
CTG/40:4	84.57 ± 0.02^d	0.84 ± 0.01^d	8.42 ± 0.02^b
CTG/40:6	81.36 ± 0.04^e	0.82 ± 0.01^d	10.51 ± 0.01^a

注:不同字母表示样品间有显著性差异 ($P<0.05$);CTG/40:0、CTG/40:1、CTG/40:2、CTG/40:4 和 CTG/40:6 分别代表 CTG:SPP 比例为 40:0,40:1,40:2,40:4,40:6 改性的中华鳖明胶。

2.2.2 凝胶强度 如图 2 所示,随 SPP 浓度增加,改性 CTG 的凝胶强度先增加后降低。其中,CTG/40:1 的凝胶强度最高,达到 252 g,高于未改性和其它改性 CTG。这可能是由于 SPP 改性向 CTG 中

引入了磷酸基团,磷酸基团与明胶氨基酸残基中的 NH_3^+ 之间的离子相互作用增强了凝胶化过程中的蛋白质聚集^[16]。然而,过量的磷酸基团会增加蛋白质分子之间的静电排斥,形成更大的蛋白束,导致形成更粗糙和不均匀的凝胶网络,降低凝胶强度^[17]。由此可见,低浓度 SPP 可以改进 CTG 的凝胶强度,高浓度的 SPP 对 CTG 的凝胶性能具有一定负面影响。

2.2.3 胶凝时间 不同改性中华鳖明胶的胶凝时间如图 2 所示。随着 SPP 浓度增加,改性 CTG 的胶凝时间先降低后升高。其中 CTG/40:1 的胶凝时间最短,为 96 s。胶凝时间与凝胶强度呈负相关,明胶的凝胶性能越强,胶凝时间越短。高含量的磷酸基团增加了静电排斥,阻止凝胶网络的形成^[13]。

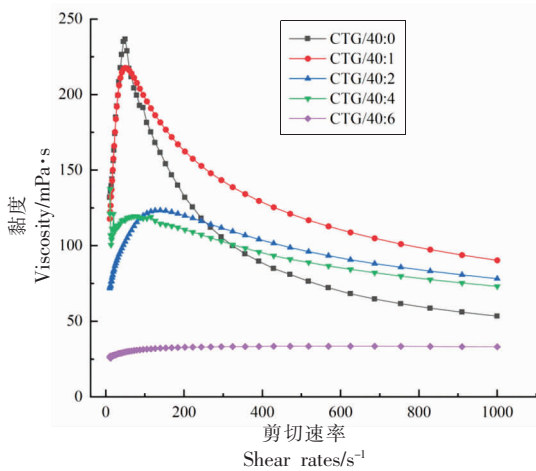


注:CTG/40:0、CTG/40:1、CTG/40:2、CTG/40:4 和 CTG/40:6 分别代表 CTG:SPP 比例为 40:0,40:1,40:2,40:4,40:6 改性的中华鳖明胶。

图 2 不同改性中华鳖明胶的凝胶强度和胶凝时间

Fig.2 Gel strength and setting time of different modified Chinese soft-shelled turtle gelatins

2.2.4 动力学黏度 不同改性 CTG 的动力学黏度如图 3 所示。随着剪切速率的增加,除 CTG/40:6 以外,其它 CTG 的黏度先增加后降低。其中 CTG/40:0 的初始黏度最大,CTG/40:6 的初始黏度最小,这可能是因为 SPP 改性引入了磷酸基团,磷酸基团破坏了 CTG 分子间的氢键相互作用,削弱了网络凝胶之间的相互作用力^[17]。然而,值得注意的是,改性 CTG 的抗剪切能力显著提升,CTG/40:1、CTG/40:2、CTG/40:4 在高的剪切速率下具有更高的黏度,这可能因为 CTG 上的磷酸基团与水形成



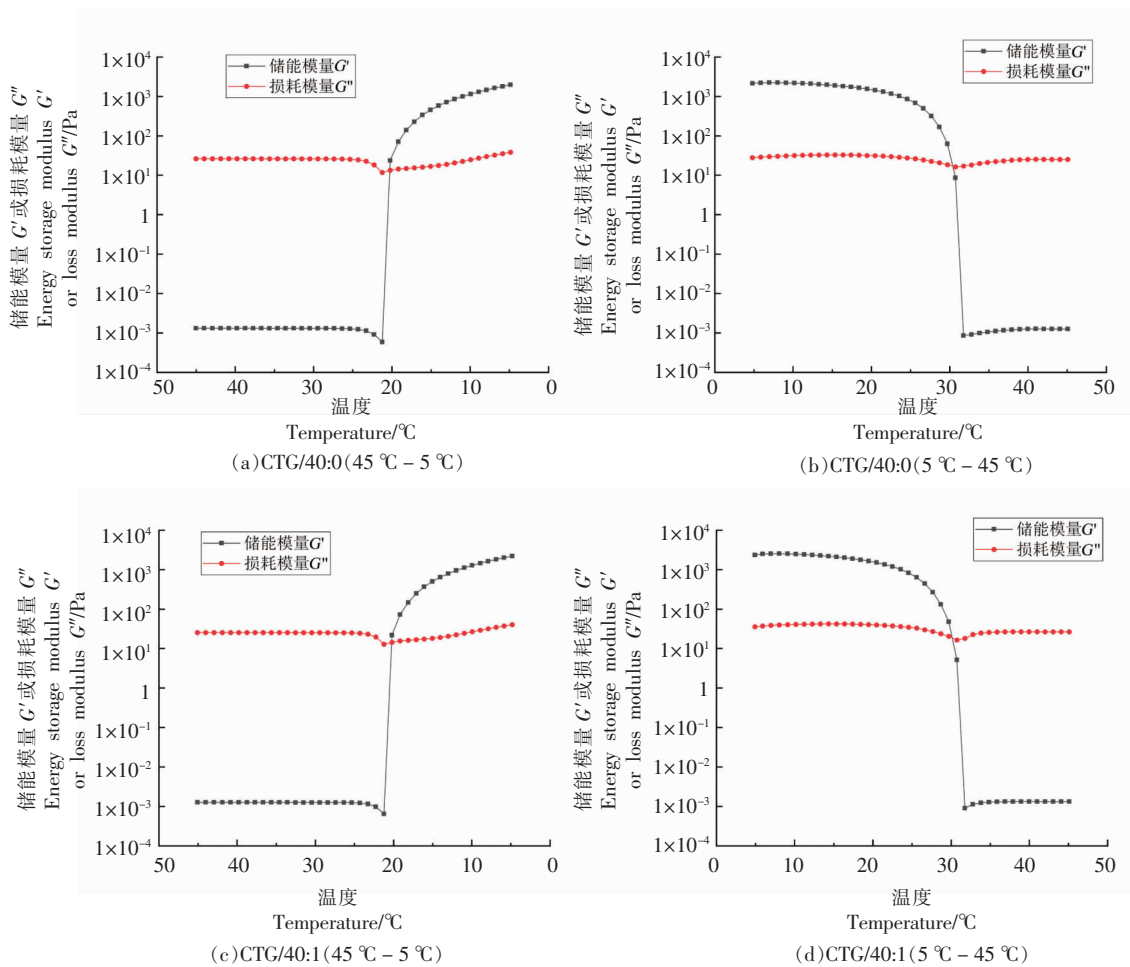
注:CTG/40:0、CTG/40:1、CTG/40:2、CTG/40:4 和 CTG/40:6 分别代表 CTG:SPP 比例为 40:0,40:1,40:2,40:4,40:6 改性的中华鳖明胶。

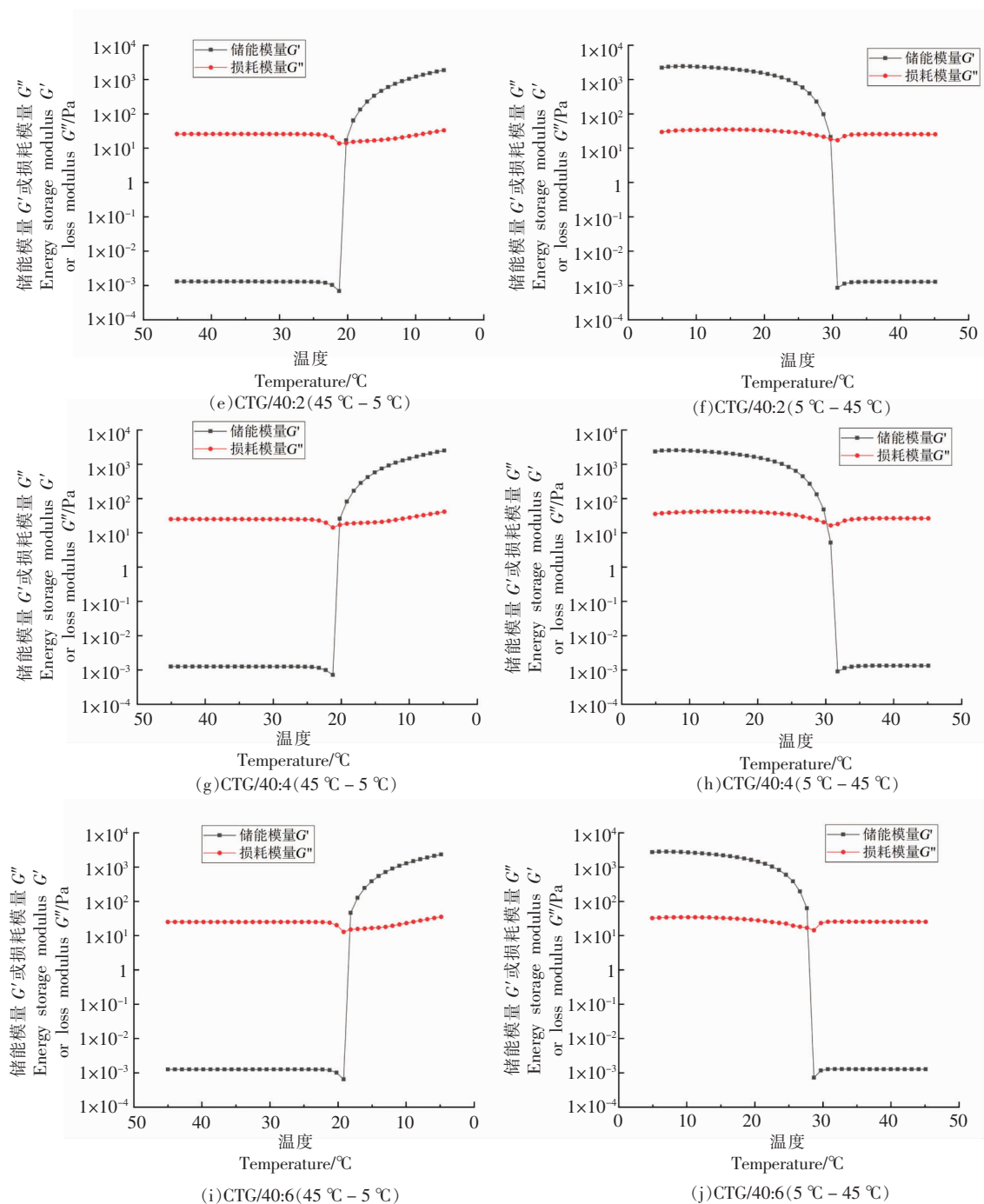
图 3 不同改性中华鳖明胶在不同剪切速率下的动力学黏度

Fig.3 Dynamic viscosity of different modified Chinese soft-shelled turtle gelatins at different shear rates

氢键,增加了 CTG 的抗剪切能力。CTG/40:6 可能由于磷酸基团对其分子间作用力破坏更严重,导致其在任何剪切速率下的黏度显著低于其它 CTGs。

2.2.5 胶凝和熔化温度 由图 4 可知,CTG/40:0 的胶凝温度(20.4 °C)和熔化温度(31.5 °C)最高,CTG/40:6 的胶凝温度(18.4 °C)和熔化温度(27.8 °C)最低。随着 SPP 浓度的增加,改性 CTG 的胶凝和熔化温度随之降低,这可能是由于过量的磷酸基团增加了明胶分子的静电排斥,破坏了 CTG 分子内和分子间氢键的相互作用,削弱了凝胶网络之间的相互作用力^[17]。而较低浓度 SPP(CTG:SPP 为 40:1,40:2,40:4)改性的 CTG 的胶凝和熔化温度降低并不多,对其在实际应用中的影响并不大。





注:CTG/40:0、CTG/40:1、CTG/40:2、CTG/40:4 和 CTG/40:6 分别代表 CTG:SPP 比例为 40:0,40:1,40:2,40:4,40:6 改性的中华鳖明胶。

图 4 不同改性中华鳖明胶在 45 °C~5 °C 和 5 °C~45 °C 过程中的温度扫描

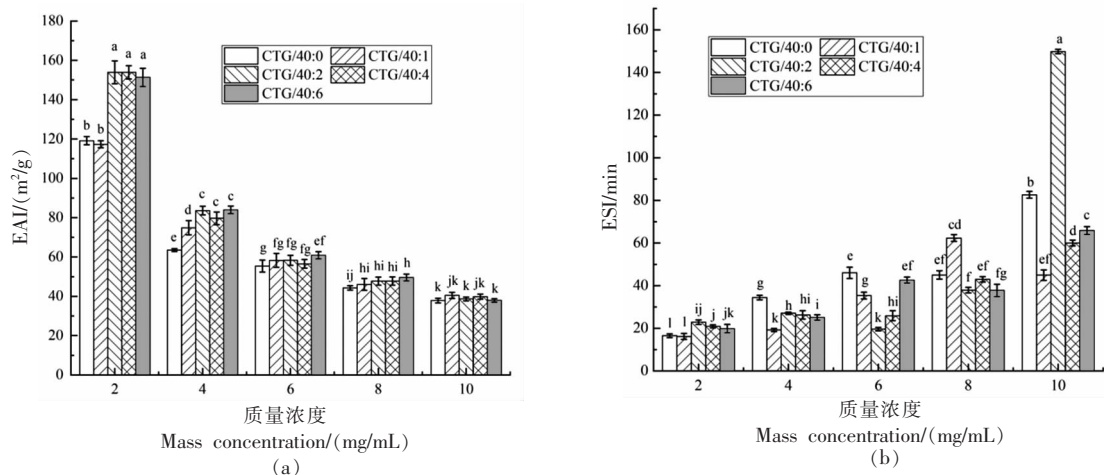
Fig.4 Temperature scans of different modified Chinese soft-shelled turtle gelatins at 45 °C~5 °C and 5 °C~45 °C

2.2.6 乳液活性指数和乳液稳定性指数分析 乳液活性指数(Emulsion activity index,EAI)和乳液稳定性指数(Emulsion stability index,ESI)是评估乳化特性的重要指标。如图 5a 所示,不同改性

CTG 稳定的鱼油载 Pickering 乳液的 EAI 值都随着改性 CTG 质量浓度的增加而降低。当 CTG 的质量浓度为 2,4 mg/mL 时,CTG:SPP 为 40:2,40:4,40:6 改性 CTG 的 EAI 值显著增加。如图 5b 所示,

磷酸化改性后的 CTGs 的 ESI 值发生显著变化,而其变化并无明显规律。值得注意的是,8 mg/mL 质量浓度的 40:1 的改性 CTG 和 10 mg/mL 的 40:2 的改性 CTG 的 ESI 值显著提高($P<0.05$)。综上所述

述,SPP 改性可以改变 CTG 的乳化性能,通过添加不同质量浓度的 SPP 对 CTG 进行改性,从而得到具有不同乳化特性的 CTG,以满足食品工业中的不同需要。



注:CTG/40:0、CTG/40:1、CTG/40:2、CTG/40:4 和 CTG/40:6 分别代表 CTG:SPP 比例为 40:0,40:1,40:2,40:4,40:6 改性的中华鳖明胶;不同字母表示样品之间存在显著性差异, $P<0.05$ 。

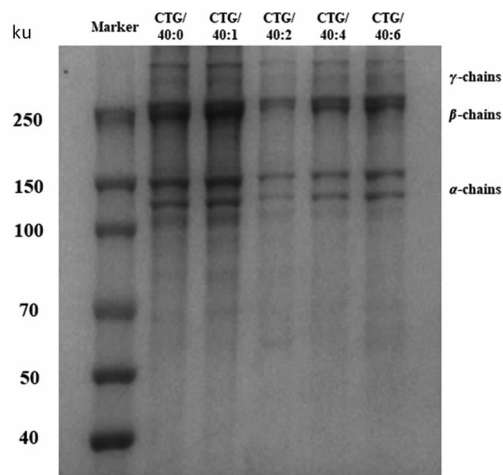
图 5 不同改性中华鳖明胶的 EAI 值(a)和 ESI 值(b)

Fig.5 EAI (a) and ESI (b) values of different modified Chinese soft-shelled turtle gelatins

2.3 改性中华鳖明胶的结构表征

2.3.1 蛋白质模式 为了探究改性 CTG 的蛋白质模式及其与 CTG 性质的关系,通过 SDS-PAGE 得到 CTG 的分子质量分布图谱。如图 6 所示,不同 SPP 浓度改性的 CTG 具有相似的分子质量分布,都是由 1 条 250 ku 的 β 链、2 条 100~150 ku 之间的 α 链以及少量高于 250 ku 的 γ 链组成。然而不同改性 CTG 各组分的含量具有一定差异,CTG/40:1 的含量最高,其它 CTG 各组分的含量相比未改性 CTG 都有减少。据报道, α 和 β 链含量的数量与明胶的凝胶强度呈正相关^[21]。SDS-PAGE 图谱的结果在一定程度上解释了 CTG/40:1 凝胶强度较高的原因。CTG/40:2、CTG/40:4 和 CTG/40:6 的 α 链和 β 链的分子质量略有增加,可能是过多磷酸基团的结合导致 CTG 的分子质量上升。

2.3.2 傅里叶变换红外光谱 不同改性 CTG 的红外光谱图如图 7a 所示。5 种 CTG 的光谱模式相似,而吸收峰的波长略有不同。这表明 5 种 CTG 的结构有一定差异。酰胺 A 是一个宽吸收带,通常出现在 $3400\sim 3440\text{ cm}^{-1}$,由 N-H 伸缩振动引起,当该基团形成氢键时,吸收峰会蓝移,吸收波长为



注:CTG/40:0、CTG/40:1、CTG/40:2、CTG/40:4 和 CTG/40:6 分别代表 CTG:SPP 比例为 40:0,40:1,40:2,40:4,40:6 改性的中华鳖明胶。

图 6 不同改性中华鳖明胶的 SDS-PAGE 图谱

Fig.6 SDS-PAGE profiles of different modified Chinese soft-shelled turtle gelatins

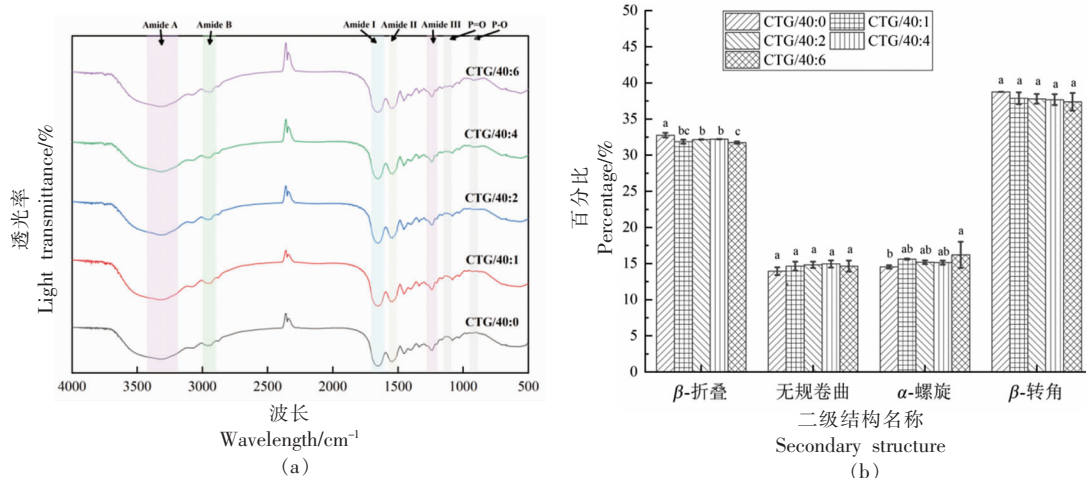
3300 cm^{-1} 左右^[26]。与 CTG/40:0 相比,CTG/40:2、CTG/40:4、CTG/40:6 的吸收波长降低,表明这 3 种明胶有更多的 NH 基团与其它基团形成氢键,这也可能意味着更多磷酸基团与明胶结合^[1]。酰胺 B

带通常出现在 2930 cm^{-1} , 代表 C-H 和 -NH_3^+ 的伸缩振动。CTG/40:6 的酰胺 B 带波数最低, 这表明肽链中存在更多与 NH_3 基团的相互作用^[27-28]。酰胺 II 带通常出现在 $1540\sim 1545\text{ cm}^{-1}$, 代表 N-H 的弯曲振动和 C-N 的伸缩振动。相比于 CTG/40:0, CTG/40:2、CTG/40:4、CTG/40:6 的波长红移, 可能是磷酸基团的引入在一定程度上破坏了 CTG 的二级结构^[20]。酰胺 III 带代表 CN 的伸缩振动和酰胺键中的 NH 变形, 以及甘氨酸主链和脯氨酸侧链的 CH_2 振动^[27]。酰胺 III 带吸收峰波长与 1450 cm^{-1} 的比值越接近 1, 表明三螺旋结构越完整; 比值越低, 表明三螺旋结构被破坏越严重^[29]。CTG/40:0、CTG/40:1、CTG/40:2、CTG/40:4、CTG/40:6 的酰胺 III 带吸收峰分别出现在 $1238.98, 1239.21, 1239.19,$

$1239.06, 1238.88\text{ cm}^{-1}$ 。随着的 SPP 浓度的增加, CTG 的波长先增加后降低, 代表 SPP 改性诱导了三螺旋结构的形成, 然而随着 SPP 浓度增加, 静电排斥增大, 破坏了三螺旋结构, 导致吸收峰波长降低。在 1120 cm^{-1} 和 905 cm^{-1} 附近分别出现了 P=O 和 P-O 的吸收峰, 代表磷酸基团的结合^[13,15]。

通过 Peakfit v4.12 软件对酰胺 I 带 ($1600\sim 1700\text{ cm}^{-1}$) 拟合分析, 得到不同改性 CTG 的二级结构含量如图 7b 所示。经过 SPP 改性后, CTG 的 β -折叠含量显著降低。改性 CTG 的无规卷曲、 α -螺旋和 β -转角含量并无显著变化, 这与卢星星^[30] 的研究具有相似结果。

综上所述, SPP 改性改变了 CTG 的二级结构, 且不同 SPP 浓度对 CTG 二级结构的影响不同。



注: CTG/40:0、CTG/40:1、CTG/40:2、CTG/40:4 和 CTG/40:6 分别代表 CTG:SPP 比例为 40:0、40:1、40:2、40:4、40:6 改性的中华鳖明胶; 不同字母表示样品之间存在显著性差异, $P < 0.05$ 。

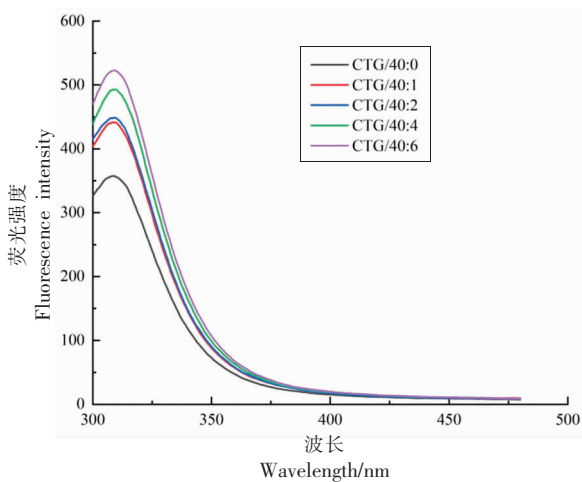
图 7 不同改性中华鳖明胶的傅里叶变换红外光谱 (a) 和二级结构含量 (b)

Fig.7 Fourier transform infrared spectra (a) and secondary structure content (b) of different modified Chinese soft-shelled turtle gelatin

2.3.3 内源性荧光光谱 为研究改性 CTG 三级结构的变化, 考察了不同改性 CTG 的内源性荧光光谱。如图 8 所示, 在波长 310 nm 左右的吸收峰代表了芳香族氨基酸的荧光峰^[12]。磷酸化改性的 CTG 荧光强度高于未改性 CTG, 可能是因为明胶分子表面暴露出更多的芳香族氨基酸残基; 并且, 荧光强度随着 SPP 浓度的增加而增加, 这说明磷酸化改性会改变 CTG 的三级结构并使蛋白质去折叠而松散, 从而使更多的芳香族氨基酸暴露在水中^[12]。三级结构的松散在一定程度上会降低

CTG 的凝胶强度、黏度、胶凝和熔化温度, 然而会改善 CTG 的表面疏水性, 提高其乳化性能^[17]。

2.3.4 微观结构 分子结构的变化直接影响 CTG 的微观结构, 通过 SEM 观察不同改性 CTG 的微观结构。如图 9 所示, 由于冷冻干燥过程中水分升华的影响, 所有 CTG 的表面都伴有小孔。所有 CTG 表面都具有互连网络, CTG/40:1 和 CTG/40:2 的互连网络变得更加明显, CTG/40:4 和 CTG/40:6 的互连网络变化不明显。CTG/40:1 具有最均匀的互连网络, 这解释了 CTG/40:1 具有更好的凝胶性能,



注:CTG/40:0、CTG/40:1、CTG/40:2、CTG/40:4和CTG/40:6分别代表CTG:SPP比例为40:0,40:1,40:2,40:4,40:6改性的中华鳖明胶。

图8 不同改性中华鳖明胶的内源性荧光光谱
Fig.8 Intrinsic fluorescence spectra of different modified Chinese soft-shelled turtle gelatins

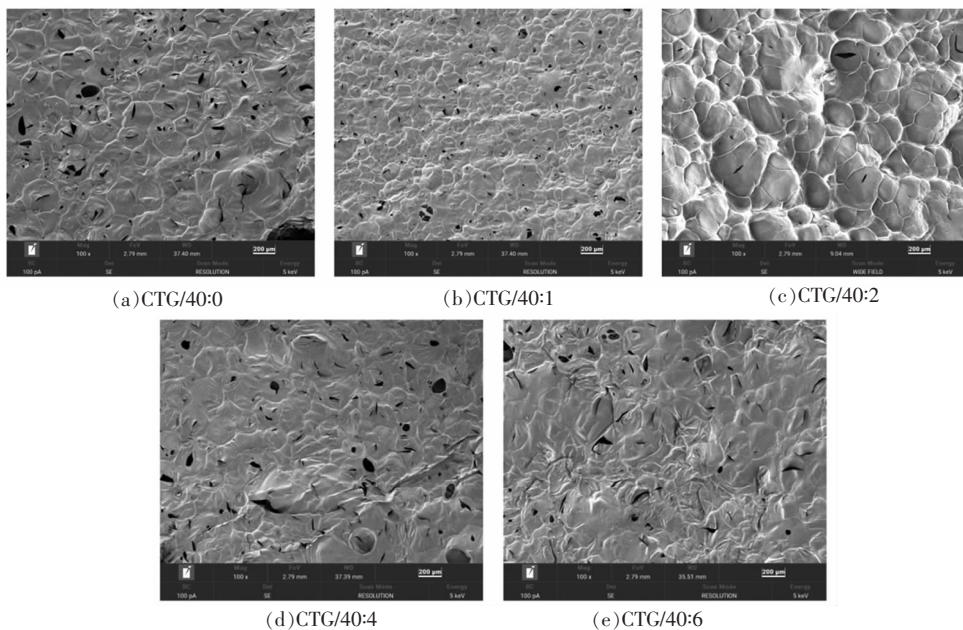
此结果可能归因于分子内交联对亚基组分自组装构象的固定作用^[31]。随着SPP浓度的增加,CTG的互连网络逐渐减弱,网络变得更大甚至消失,可能与分子间的活性交联有关^[31];内源性荧光结果(图8)也显示,SPP改性松散了CTG的三级结构,这些

结果揭示了凝胶强度、黏度、胶凝和熔化温度降低的原因。

2.4 中华鳖明胶稳定的鱼油载 Pickering 乳液的贮藏稳定性

以5种改性CTG制备鱼油载Pickering乳液,分析了磷酸化改性对CTG稳定的鱼油载Pickering乳液在4℃贮藏稳定性的影响。所有新制备的乳液均为乳白色(图10a),由微小的乳液液滴组成(图10e)。乳化液液滴均呈单峰分布(图10f~10j),不同于牛骨明胶^[32]、鲢鱼鱼鳍明胶^[22]、三文鱼皮明胶^[21]和罗非鱼皮明胶^[33]。5种CTG稳定的乳液峰尺寸分布相似(图10g和图10j)。改性后CTG稳定的乳液峰尺寸均小于未改性CTG稳定的乳液峰尺寸(图10i),其中CTG/40:2稳定的乳液的峰尺寸最小,且分布最窄。

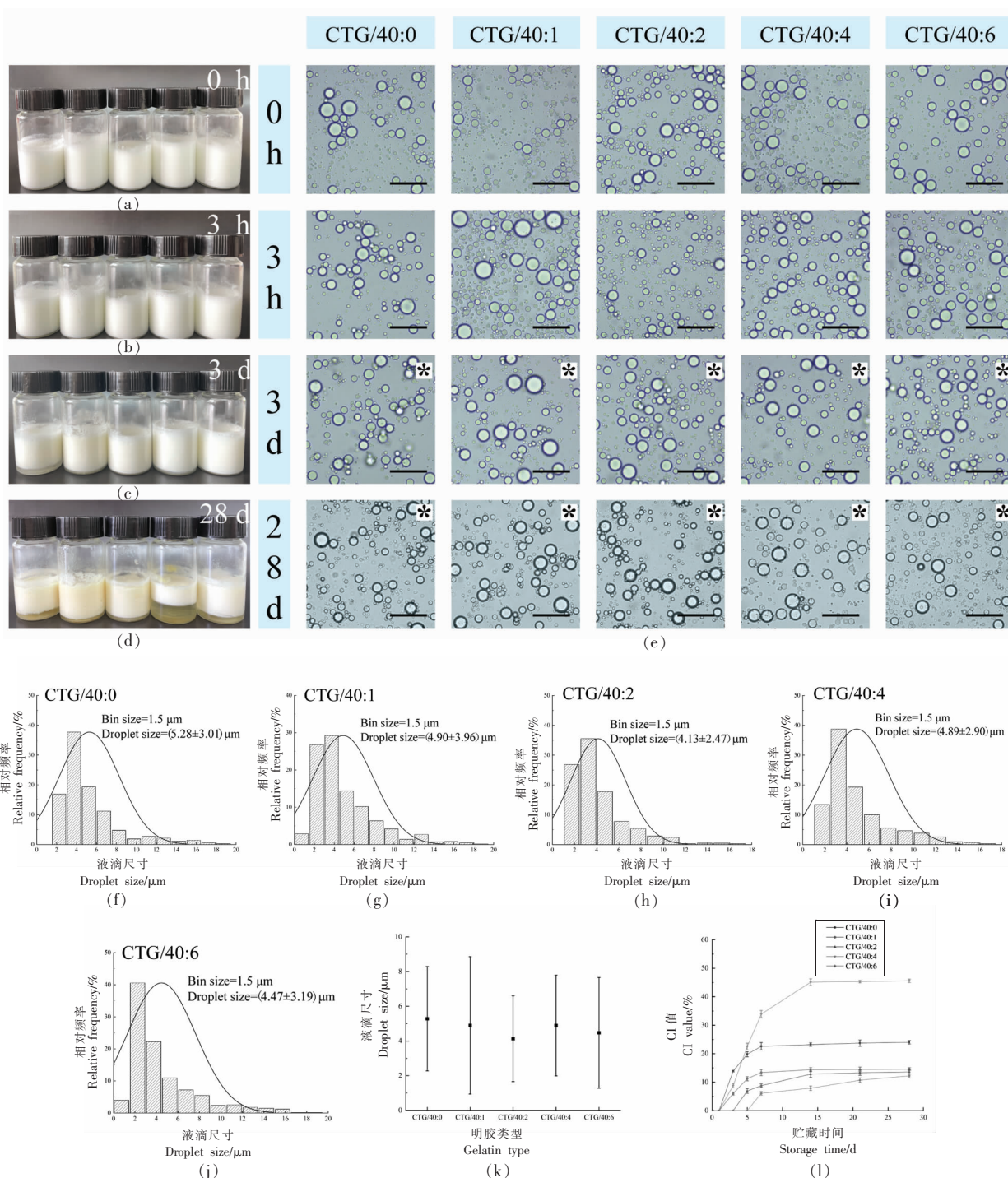
在4℃连续贮藏过程中,Pickering乳液的稳定性也发生了变化。从图10a和图10b可以看出,乳液在0和3h时均为液态,在第3天形成乳状凝胶(图10c和图10d),这种特性在许多食品中具有广阔的应用前景,如酸奶等^[34]。第28天,CTG/40:6稳定的乳液CI值低于其它CTG稳定的乳液(图10l),并且其乳液液滴并未发生聚集和絮凝



注:CTG/40:0、CTG/40:1、CTG/40:2、CTG/40:4和CTG/40:6分别代表CTG:SPP比例为40:0,40:1,40:2,40:4,40:6比例改性的中华鳖明胶。

图9 不同改性中华鳖明胶的微观结构

Fig.9 Microstructures of different modified Chinese soft-shelled turtle gelatins



注：(a~d)乳液照片；(e)光学显微镜图像，黑色星号表示乳液凝胶，其它为液体乳液。黑色刻度条表示 50 μm；(f~j)新制备乳液的乳滴大小分布；(k)中高斯拟合峰最可能的乳液液滴尺寸；(l)乳液的 CI 值。CTG/40:0、CTG/40:1、CTG/40:2、CTG/40:4 和 CTG/40:6 分别代表 CTG:SPP 比例为 40:0、40:1、40:2、40:4、40:6 改性的中华鳖明胶。

图 10 5 种改性中华鳖明胶 (10 mg/mL CTG/40:0、CTG/40:1、CTG/40:2、CTG/40:4 和 CTG/40:6) 稳定的鱼油载 Pickering 乳液在 4 °C 下贮藏不同时间

Fig.10 Storage of fish oil-loaded emulsions stabilized by five types modified Chinese soft-shelled turtle gelatins (10 mg/mL CTG/40:0, CTG/40:1, CTG/40:2, CTG/40:4, CTG/40:6) at 4 °C for different times

(图 10e)。因此,CTG/40:6 稳定的乳液比其它稳定的乳液具有更优秀的乳化和液滴稳定性。磷酸盐化合物可以与蛋白质侧链上的-OH 和-NH₂ 基团反应,改变表面疏水性较低的 CTG 的三级结构^[35]。改性后明胶的表面疏水性上升,促进了界面蛋白质和油滴蛋白质之间的疏水相互作用,从而产生更好的亲水-亲脂性平衡,促进了蛋白质在油水界面层上的吸附以及油滴的分散^[36-37]。戚亭等^[38]的研究结果也表明,磷酸化可以改善南极磷虾的乳化性和乳化稳定性。这样的结果也可能归因于液滴之间静电排斥的增加,以及磷酸基团诱导的负电荷产生的防止液滴聚结作用^[39]。

3 结论

研究了磷酸化改性过程中 SPP 浓度对中华鳖明胶颜色、凝胶特性、流变学特性、结构和 Pickering 乳液稳定性的影响。结果表明,磷酸化改性会降低 CTG 的亮度,增加其黄色。低浓度的 SPP (CTG/40:1)可显著提高 CTG 的凝胶强度,降低其胶凝时间,然而对流变学性质无显著影响;随着 SPP 浓度的增加,CTG 的凝胶强度、黏度、胶凝和熔化温度降低,而抗剪切能力有所提升。SPP 改性使磷酸基团与 CTG 共价结合,提高了 CTG 肽链的分子质量以及二、三级结构,进而影响其凝胶特性、流变性和乳化特性。CTG/40:2 稳定的乳液液滴最小。4℃贮存条件下,CTG/40:6 稳定的鱼油载 Pickering 乳液具有更好的乳化和液滴稳定性。综上所述,磷酸化可以改变 CTG 的结构,适当浓度的 SPP 可以改善 CTG 的凝胶特性和乳化特性,且对 CTG 的流变特性无显著性影响。本研究可为磷酸化改性中华鳖明胶提供一定的理论支持,而更深层的影响机理还需要进一步探索。

参 考 文 献

- [1] AHMAD M, BENJAKUL S. Characteristics of gelatin from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*) as influenced by acid pretreatment and extraction time [J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25 (3): 381-388.
- [2] FENG X, DAI H J, MA L, et al. Effect of freezing temperature on molecular structure and functional properties of gelatin extracted by microwave-freezing-thawing coupling method [J]. LWT - Food Science and Technology, 2021, 149: 101650.
- [3] FENG X, DAI H J, MA L, et al. Effect of microwave extraction temperature on the chemical structure and oil-water interface properties of fish skin gelatin [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2021, 74: 102835.
- [4] XU J M, ZHANG T, ZHANG Y Y, et al. Silver carp scale gelatins for the stabilization of fish oil-loaded emulsions [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 186: 145-154.
- [5] CASTRO-MUÑOZ R, BARRAGÁN-HUERTA B E, YÁÑEZ-FERNÁNDEZ J. Use of gelatin-maltodextrin composite as an encapsulation support for clarified juice from purple cactus pear (*Opuntia stricta*) [J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 62(1): 242-248.
- [6] LIU J, YONG H M, LIU Y P, et al. Preparation and characterization of active and intelligent films based on fish gelatin and haskap berries (*Lonicera caerulea* L.) extract [J]. Food Packaging and Shelf Life, 2019, 22: 100417.
- [7] WANG R C, HARTEL R W. Confectionery gels: Gelling behavior and gel properties of gelatin in concentrated sugar solutions [J]. Food Hydrocolloids, 2022, 124: 107132.
- [8] NITSUWAT S, ZHANG P Z, NG K, et al. Fish gelatin as an alternative to mammalian gelatin for food industry: A meta-analysis [J]. LWT - Food Science and Technology, 2021, 141: 110899.
- [9] SAE-LEAW T, BENJAKUL S, O'BRIEN N M. Effects of defatting and tannic acid incorporation during extraction on properties and fishy odour of gelatin from seabass skin [J]. LWT - Food Science and Technology, 2016, 65: 661-667.
- [10] XU J M, YANG L L, NIE Y H, et al. Effect of transglutaminase crosslinking on the structural, physicochemical, functional, and emulsion stabilization properties of three types of gelatins [J]. LWT - Food Science and Technology, 2022, 163: 113543.
- [11] ZHANG T, XU J M, HUANG S D, et al. Anhydride structures affect the acylation modification and emulsion stabilization ability of mammalian and fish gelatins [J]. Food Chemistry, 2022, 375: 131882.
- [12] CEN S, ZHANG L, LIU L, et al. Phosphorylation

- modification on functional and structural properties of fish gelatin: The effects of phosphate contents[J]. Food Chemistry, 2022, 380: 132209.
- [13] AI M, JIANG A. Phosphorylation modification affects the gelation behavior of alkali-induced duck egg white gels[J]. Food Chem, 2021, 340: 128185.
- [14] JIA B, CHEN J, YANG G, et al. Improvement of solubility, gelation and emulsifying properties of myofibrillar protein from mantis shrimp (*Oratosquilla oratoria*) by phosphorylation modification under low ionic strength of KCl[J]. Food Chemistry, 2023, 403: 134497.
- [15] HU Y Y, WU Z, SUN Y Y, et al. Insight into ultrasound-assisted phosphorylation on the structural and emulsifying properties of goose liver protein[J]. Food Chemistry, 2022, 373(Pt B): 131598.
- [16] KAEWRUANG P, BENJAKUL S, PRODPRAN T. Effect of phosphorylation on gel properties of gelatin from the skin of unicorn leatherjacket[J]. Food Hydrocolloids, 2014, 35: 694-699.
- [17] HUANG T, TU Z C, SHANGGUAN X, et al. Rheological behavior, emulsifying properties and structural characterization of phosphorylated fish gelatin[J]. Food Chemistry, 2018, 246: 428-436.
- [18] 严春俊. 核桃分离蛋白的提取及磷酸化改性研究[D]. 成都: 西华大学, 2021.
- YAN C J. Study on extraction and phosphorylation of walnut protein isolate[D]. Chengdu: Xihua University, 2021.
- [19] LIAO W, ZHU Y J, LU Y P, et al. Effect of extraction variables on the physical and functional properties of tilapia gelatin[J]. LWT - Food Science and Technology, 2021, 146: 111514.
- [20] ABEDINIA A, ARIFFIN F, HUDA N, et al. Extraction and characterization of gelatin from the feet of Pekin duck (*Anas platyrhynchos domestica*) as affected by acid, alkaline, and enzyme pretreatment [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 98: 586-594.
- [21] YANG L L, YANG M Y, XU J M, et al. Structural and emulsion stabilization comparison of four gelatins from two freshwater and two marine fish skins[J]. Food Chemistry, 2022, 371: 131129.
- [22] YANG M Y, YANG L L, XU J M, et al. Comparison of silver carp fin gelatins extracted by three types of methods: Molecular characteristics, structure, function, and pickering emulsion stabilization [J]. Food Chemistry, 2022, 368: 130818.
- [23] 杨梅. 磷酸化改性的鱼鳞明胶乳化特性分析及其应用研究[D]. 石河子: 石河子大学, 2022.
- YANG M. Phosphorylation-induced emulsifying properties of fish scale gelatin and its application [D]. Shihezi: Shihezi University, 2022.
- [24] HU Y Y, DU L H, SUN Y Y, et al. Recent developments in phosphorylation modification on food proteins: Structure characterization, site identification and function [J]. Food Hydrocolloids, 2023, 137: 108390.
- [25] ZHU Y J, NIE Y T, LU Y F, et al. Contribution of phosphorylation modification by sodium tripolyphosphate to the properties of surimi-crabmeat mixed gels[J]. LWT - Food Science and Technology, 2022, 169: 114052.
- [26] ZHANG Q, WANG Q Q, LV S, et al. Comparison of collagen and gelatin extracted from the skins of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. Food Bioscience, 2016, 13: 41-48.
- [27] NAGARAJAN M, BENJAKUL S, PRODPRAN T, et al. Characteristics and functional properties of gelatin from splendid squid (*Loligo formosana*) skin as affected by extraction temperatures[J]. Food Hydrocolloids, 2012, 29(2): 389-397.
- [28] SINTHUSAMRAN S, BENJAKUL S, KISHIMURA H. Characteristics and gel properties of gelatin from skin of seabass (*Lates calcarifer*) as influenced by extraction conditions [J]. Food Chem, 2014, 152: 276-284.
- [29] KITTIHATTANABAWON P, BENJAKUL S, SINTHUSAMRAN S, et al. Gelatin from clown featherback skin: Extraction conditions [J]. LWT - Food Science and Technology, 2016, 66: 186-192.
- [30] 卢星星. 磷酸化大豆分离蛋白乳液的制备和性质研究[D]. 马鞍山: 安徽工业大学, 2022: 29-30.
- LU X X. Study on preparation and properties of emulsion stabilized by phosphorylated soy protein isolate[D]. Ma'anshan: Anhui University of Technology, 2022.
- [31] MAO L, MA L, FU Y, et al. Transglutaminase modified type A gelatin gel: The influence of intramolecular and inter-molecular cross-linking on structure-properties [J]. Food Chemistry, 2022, 395:

- 133578.
- [32] ZHANG T, SUN R, DING M, et al. Commercial cold-water fish skin gelatin and bovine bone gelatin: Structural, functional, and emulsion stability differences[J]. *LWT – Food Science and Technology*, 2020, 125: 109207.
- [33] ZHANG T, SUN R, DING M Z, et al. Effect of extraction methods on the structural characteristics, functional properties, and emulsion stabilization ability of Tilapia skin gelatins[J]. *Food Chemistry*, 2020, 328: 127114.
- [34] DICKINSON E. Emulsion gels: The structuring of soft solids with protein-stabilized oil droplets[J]. *Food Hydrocolloids*, 2012, 28(1): 224–241.
- [35] 李婷婷. 巴氏杀菌鸡蛋清液磷酸化改性及性质研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2017.
- LI T T. Study on phosphorylated modification and properties of pasteurized egg white[D]. Harbin: Harbin University of Commerce, 2017.
- [36] MIEDZIANKA J, PEKSA A. Effect of pH on phosphorylation of potato protein isolate[J]. *Food Chemistry*, 2013, 138(4): 2321–2326.
- [37] ZHANG K S, LI Y Y, REN Y X. Research on the phosphorylation of soy protein isolate with sodium tripoly phosphate[J]. *Journal of Food Engineering*, 2007, 79(4): 1233–1237.
- [38] 戚亭, 刘宝林, 刘志东, 等. 磷酸化改性对南极磷虾蛋白功能特性的影响[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(8): 1829–1833.
- QI T, LIU B L, LIU Z D, et al. Effects of phosphorylation modification on the functional properties of Antarctic krill protein[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2018, 9(8): 1829–1833.
- [39] XIONG Z Y, ZHANG M J, MA M H. Emulsifying properties of ovalbumin: Improvement and mechanism by phosphorylation in the presence of sodium tripolyphosphate[J]. *Food Hydrocolloids*, 2016, 60: 29–37.

Effects of Sodium Pyrophosphate Modification on the Properties and Structure of Chinese Soft-shelled Turtle (*Pelodiscus sinensis*) Gelatin

YIN Zhaoyang¹, LIU Yangliu¹, CHEN Zhihui², HAN Jun¹, WANG Yuanyuan³, YAN Lijun³, SUN Jilu^{1*}

¹College of Food Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071000, Hebei

²Department of Biotechnology, Qujing Agricultural University, Qujing 655000, Yunnan

³Shijiazhuang Aquatic Technology Promotion Station, Shijiazhuang 050000

Abstract In this study, sodium pyrophosphate (SPP) was used to modify Chinese soft-shelled turtle gelatin (CTG). The effects of phosphorylation modification on color, gel properties, rheological properties, structure and Pickering emulsion stability of CTG were studied. The results showed that phosphorylation significantly reduced the brightness of CTG and made it more yellow. Modification with low concentration of SPP (40:1) improved the gel properties of CTG, but had no significant effect on its rheological properties. The gel strength was increased to 252 g and the gelling time was reduced to 96 s. With the increase of SPP concentration, the gel strength, viscosity, gelling and melting temperature of CTG decreased to 196 g, 25 mPa·s, 18.6 °C and 27.5 °C, respectively. But its shear resistance increased. The structural analysis showed that SPP modification made phosphate group covalently bind with CTG, increased the molecular weight of CTG, changed the content of α and β chains, secondary as well as tertiary structures of CTG. The microstructure revealed the change in gel network of CTG after modification. SPP modification improved the emulsifying properties of CTG, reduced the droplet size of Pickering emulsion stabilized by CTG, and made it show a better droplet state. The emulsion stabilized by CTG/40:2 had the smallest droplet, which decreased to (4.13±2.47) μm . While the emulsion stabilized by CTG/40:6 had better creaming and droplet stability, its stratification began on day 5, and it had lowest CI value of 11.2% after 28 days of storage. This study can provide theoretical and technical reference for the development of new aquatic food gelatin with excellent properties.

Keywords Chinese soft-shelled turtle; gelatin; phosphorylation; modification; physicochemical properties; structure; Pickering emulsion