

# 关于鱼糜在冷藏过程中 蛋白质变性的研究

## ——冷藏过程中 $\text{Ca}^{++}$ -ATPase 活性变化的探讨

陈焕铨 韩名竹 陶江萍\* 金中林\*

(江苏省淡水水产研究所)

(浙江水产学院)

### 提 要

本文就草鱼鱼糜在冷藏过程中肌原纤维蛋白  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase 活性的变化及几种因素对其活性的影响作了初步探讨。并与 VBN 值的变化作了比较。冷藏过程中, 鱼糜的肌原纤维蛋白  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase 活性变化明显, 而 VBN 值变化不大, 因此可用肌原纤维蛋白  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase 活性的大小来鉴别冷藏前期鱼糜蛋白质的变性程度。几种因素对蛋白质变性具有不同程度的影响。对于已腐败的鱼糜, 不宜用鱼糜肌原纤维蛋白  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase 活性来鉴定其品质的优劣。

鱼糜在冷藏过程中蛋白质的变性是造成鱼糜制品弹性差的重要因素。鱼类肌肉中的肌原纤维蛋白(主要由肌动球蛋白和肌球蛋白所组成)在低温保藏中存在着蛋白质变性的问题<sup>[1]</sup>。这类蛋白质在发生变性时, 它的亲水性和形成凝胶的能力就随之降低, 结果就会影响鱼糜制品的弹性和质量。因此, 通过研究贮藏过程中蛋白质的变性问题, 来鉴定原料质量的方法, 近年来已引起了人们的重视。早在 1959 年, Saito 等人<sup>[18]</sup>提议以鱼类鲜度常数 K 值作为鉴定标准。尽管这种方法是行之有效的, 但 K 值只是一个指标, 并不是一个很充分的指标<sup>[4]</sup>。现已知, 腺苷三磷酸酶(ATPase)存在于肌球蛋白的头部<sup>[11]</sup>。当肌动球蛋白和肌球蛋白发生变性时, ATPase 活性即行消失。川岛等人<sup>[6]</sup>提出把鱼糜肌动球蛋白  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase 全活性作为冷冻鱼糜的质量鉴定法。加藤登等人<sup>[6]</sup>报导了, 用测定肌原纤维蛋白  $\text{Mg}^{++}$ -ATPase 活性的方法作为狭鳕冷冻鱼糜质量的简易鉴定法。江平重男等人<sup>[4]</sup>对冰藏鱼类的鲜度下降与其肌原纤维蛋白变性之间的关系也作了研究。然而, 国内有关这方面的研究尚未见报导。

为了获得冷冻鱼糜的简易质量鉴定法, 我们对草鱼鱼糜在冷藏过程中肌原纤维蛋白  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase 活性的变化作了研究, 并对添加剂、致死原因等因素对其活性的影响也作了初步探讨, 与此同时, 对其挥发性盐基氮(VBN)值的变化进行了测定比较。

\* 系浙江水产学院加工系 1981 届毕业生, 在毕业实习期间参加了本研究工作。

(1) 韩名竹、陈焕铨, 1980。提高冷冻鱼糜(半制品)保藏效果的研究。江苏水产科学(试刊号), 15—20。

## 材料和方法

### 1. 材料的来源

本试验采用江苏省淡水水产研究所试验场养殖的鲜活草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 为原料。

为了研究添加剂对鱼糜在冷藏中肌原纤维蛋白  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase 的影响, 选用生产上常用的添加剂: 蔗糖、食盐、丙三醇和焦磷酸钠。

底物是采用中国科学院上海生物化学研究所生产的 ATP 二钠盐。

### 2. 试验方法

(1) 鱼糜制备 草鱼捕获后, 分别使其自然(疲劳)死亡和斩头立即死亡。然后, 去头、去鳞、去皮、去内脏, 洗净取其肌肉。用小型绞肉机绞碎成粗制鱼糜。然后, 放入玻璃皿里, 用聚乙烯袋包装, 置于  $-14^{\circ}\text{C}$  的冰箱冻结室内冻结贮藏(全部处理过程控制在 15—20 分钟以内)。

另外, 取疲劳致死草鱼的鱼糜, 分别添加 5% 蔗糖、2% 的食盐、2% 丙三醇和 0.2% 的焦磷酸钠拌匀, 装入玻璃皿内, 用聚乙烯袋包装, 置于  $-14^{\circ}\text{C}$  冰箱冻结室冻结冷藏。

(2) 肌原纤维蛋白的制备 参照《水产食品化学》<sup>[8]</sup> 有关提取肌原纤维蛋白的方法, 并作了一些改动。

取上述粗制鱼糜 2 克, 加 20 ml 冷却 ( $0-5^{\circ}\text{C}$ ) 的高离子强度盐溶液 ( $0.1\text{ M KCl} + 0.01\text{ M NaCO}_3 + 0.04\text{ M NaHCO}_3$ ), 置于玻璃匀浆器中研磨 15 分钟(在冰水浴中进行), 溶出构成肌原纤维与肌原质的蛋白质。将此加水稀释 10 倍, 肌原质溶存溶液中, 而肌原纤维则生成沉淀, 以每分钟 4000 转的速度离心 10 分钟分离, 取沉淀物。再重复上面洗净处理三次, 最后得到的肌原纤维沉淀用玻璃匀浆器加 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7) 匀浆搅匀, 然后定容至 100ml, 所得的肌原纤维悬浊液供  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase 活性和蛋白质含量测定用(以上操作全部在冰浴条件下进行)。

(3)  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase 活性测定 在试管中加入 5 mM Tris-HCl 缓冲液、5 mM  $\text{CaCl}_2$ 、0.4 M KCl、1 mM ATP 和 0.25 ml 肌原纤维蛋白(每毫升约含蛋白 12—15mg)酶液, 置于  $37^{\circ}\text{C}$  超级恒温水浴中保温 30 分钟。以加入酶液开始反应, 反应体积为 10ml, 最后加 1 ml 15% 的三氯醋酸终止反应。对照组自反应开始即加 1 ml 15% 的三氯醋酸。反应终止后用滤纸过滤, 滤液定容至 100 ml。用钼酸铵法在 580 nm 波长(国产 72 型分光光度计)比色测定磷酸根含量。

$\text{Ca}^{++}$ -ATPase 活性单位, 是在一定的条件下, 以每分钟每毫克肌原纤维蛋白酶分解 ATP 所释放的磷酸根微克分子量来计算 ( $\mu\text{M PO}_4^-/\text{min}\cdot\text{mg}$  蛋白)。

(4) 蛋白质含量测定 根据 Biuret (双缩尿) 法, 用国产 72 型分光光度计以 540 毫微米波长进行比色定量。

(3) 挥发性盐基氮 (VBN) 测定 按照半微量蒸馏法进行。

## 结 果

### 1. 冷冻鱼糜在冷藏中肌原纤维蛋白 $\text{Ca}^{++}$ -ATPase 活性与 VBN 值的变化

对在  $-14^{\circ}\text{C}$  温度下的冷藏鱼糜，不同贮藏时间测得的肌原纤维蛋白  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase 活性和 VBN 值的变化情况如图 1 所示。从图 1 可见，其  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase 活性具有上升一段然后下降的二相性。冷藏一天其活性上升 54%，经三天冷藏后便开始迅速下降，43 天后其活性降为  $6.1 \mu\text{M PO}_4^{3-}/\text{min}\cdot\text{mg}$  蛋白。但 VBN 值（动物性食品由于酶和细菌的作用，在腐败的过程中，使蛋白质分解而产生氮以及胺类等碱性含氮物质）则一直缓慢上升，当  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase 活性明显下降 77% 时，其挥发性盐基氮还未到达初期腐败指标。这说明鱼糜在冷藏初期，以它的肌原纤维蛋白  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase 的活性变化作为蛋白质的变性指标较为合适。

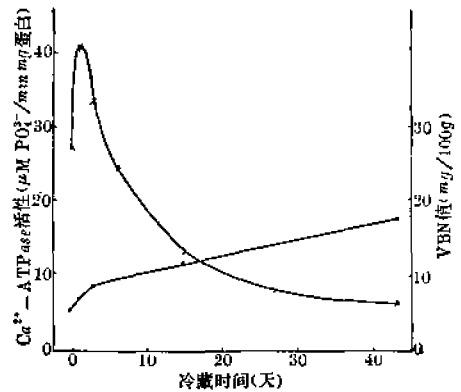


图 1 鱼糜在冷藏过程中肌原纤维蛋白  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase 活性及 VBN 值的变化

$\times$ — $\times$ :  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase 活性变化;

$\bullet$ — $\bullet$ : VBN 值变化。

在  $37^{\circ}\text{C}$ ， $5\text{mM}$  Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.0)， $5\text{mM}$   $\text{CaCl}_2$ ， $0.4\text{M}$  KCl 和  $1\text{mM}$  ATP 条件下测定。

### 2. 不同环境因子对冷冻鱼糜肌原纤维蛋白 $\text{Ca}^{++}$ -ATPase 活性的影响

桥本昭彦等<sup>[8]</sup>人认为，捕获后的鱼品因存放的环境（如：温度、pH、共存物等）不同，鱼类肌原纤维的稳定性要受到这些环境因子的复杂影响。为此我们对某些常见因子的影响作了初步探讨，结果如下。

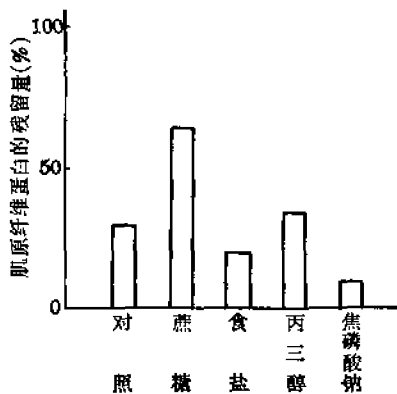


图 2 添加剂对鱼糜在冷藏过程中的作用。贮藏时间 27 天，冷藏温度  $-14^{\circ}\text{C}$ ，测定条件同图 1。

(1) 添加剂对蛋白质变性的影响 鱼糜中分别添加了蔗糖、食盐、丙三醇和焦磷酸钠，经  $-14^{\circ}\text{C}$  冷藏 27 天，测其  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase 活性，计算得到的肌原纤维蛋白的残存量（以刚死鱼糜的  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase 活性为 100% 计）。其结果如图 2 所示。实验证明，蔗糖具有明显防止蛋白质变性的作用，丙三醇效果不明显，而食盐和焦磷酸钠在本实验里显示出蛋白质冷冻变性有促进的效果，尤其是焦磷酸钠的作用更为明显。试验中我们还

表 1 含有各种添加剂的鱼糜在  $-14^{\circ}\text{C}$  冷藏 27 天后的 VBN 值

添加剂名称	无(对照)	蔗 糖	食 盐	丙 三 醇	焦磷酸钠
VBN 值(mg/100g)	25.6	30.60	27.00	22.80	21.40

注：表中样品处理后在  $18.5^{\circ}\text{C}$  室温放置时间较长未能及时测定，故全部 VBN 值偏高。

测定了其VBN值,结果如表1。从VBN值的化学指标来看,对于不同添加剂的鱼糜在冷藏中的变化并无明显差别。

(2) 致死条件不同的草鱼鱼糜,在冷藏过程中肌原纤维蛋白  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase 活性及 VBN 值的变化 我们知道,致死条件不同,鱼死后的变化也不一样。我们的试验结果如表2。

表2 草鱼即死与疲劳死之鱼糜在冷藏过程中  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase 活性及 VBN 值的变化

时间(天)	疲劳死鱼糜		即死鱼糜	
	$\text{Ca}^{++}$ -ATPase	VBN	$\text{Ca}^{++}$ -ATPase	VBN
0	26.7	5.16	20.3	5.16
15	13.2	10.67	41.1	8.89
27	7.8	25.60	6.3	23.40
43	6.1	17.80	0	22.80

注:① 冷藏27天测得的VBN值,由于样品处理后在室温(18.5℃)放置半天,未能及时测定故值偏高。

② ATPase活性单位:  $\mu\text{MPO}_4^2/\text{min}\cdot\text{mg}$  蛋白。

③ VBN值单位:  $\text{mg}/100\text{g}$ 。

试验结果表明,刚死亡时即死鱼糜的肌原纤维蛋白  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase 活性要比疲劳死鱼糜的低24%;冷藏15天后,前者活性显著升高(近1倍左右),此后随冷藏时间的延长而下降。冷藏43天后其活性基本消失。但疲劳致死的鱼糜在冷藏15天后活性下降50%左右但到第43天后活性仍未完全消失,尚有  $6.1\mu\text{MPO}_4^2/\text{min}\cdot\text{mg}$  蛋白。值得注意的是,

两种不同致死的鱼糜在其活性明显变化时,测得的VBN值却变化不大,即使在  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase 活性极低甚至消失时,其VBN值都未达到初期腐败指标。

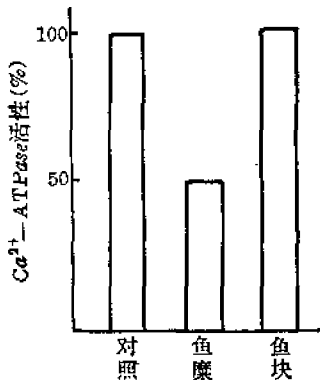


图3 鱼糜、鱼块的  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase 活性%。

在27℃贮藏一天后的活性。  
测定条件同图1

(3) 经不同方法处理的鱼肉肌原纤维蛋白  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase 活性变化的比较及 VBN 值 我们把自然(疲劳)死亡的鱼,分别制成鱼糜和鱼块,放置在相同的温度下贮藏,测得其  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase 活性变化不同(图3)。在27℃时,存放一天后,鱼糜的  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase 活性下降50%,而鱼块的  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase 活性则无明显变化。这一点从VBN值的分析结果也能看出(见表3),但不如肌原纤维蛋白  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase 活性所表示的明显。

(4) 不同原料鱼的肌原纤维蛋白  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase 活性的比较 据报导<sup>[8]</sup>,鱼类的肌原纤维蛋白的稳定性与鱼的不同种类和不同生长环境有很大关系。本文就草鱼等五种即死的鱼肉肌原纤维蛋白  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase 活性进行了测定(图4)。从图中可明显地看出,不同鱼的  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase 活性是不同的,其活性由强到弱的顺序为:黄鳍鱼、草鱼、鳊鱼、鲢鱼和罗非鱼。至于这些鱼类在冷藏过程中  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase 活性变化如何有待以后探讨。

表 3. 鱼糜和鱼块 VBN 值的比较

名称 \ 项目	时 间(天)	温 度(℃)	VBN (mg/100g)
鱼 糜	1	27	88.00
鱼 块	1	27	55.47

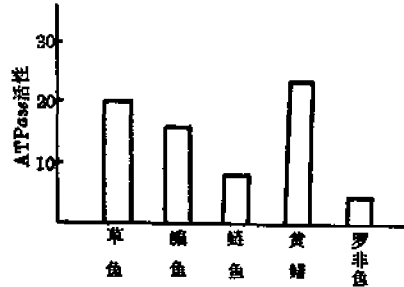


图 4 几种鱼类即死后的  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase 活性。  
ATPase 活性单位为  $\mu\text{MPO}_4^{2-}/\text{min}\cdot\text{mg}$  蛋白, 测定条件同图 1

## 讨 论

从鱼糜在冷藏过程中肌原纤维蛋白  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase 活性的变化来看(图 1), 低温冻结冷藏的鱼糜同样存在着蛋白质变性的问题。试验表明, 在冷藏过程中鱼糜肌原纤维蛋白  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase 活性, 具有上升一段而后下降的二相性(图 1 及表 2 中的即死鱼糜)。使得其  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase 活性上升的原因推测可能有二个: ①与鱼体死后僵硬期有关; ②冷冻使酶发生部分解聚作用(或部分发生聚集)<sup>[6]</sup>。也就是说, 这时其肌动蛋白和肌球蛋白的结合可能是强的<sup>[1]</sup>。随着冷藏时间的延长, 在细胞中形成的冰结晶不断长大, 由于膨胀作用破坏了蛋白质分子的正常空间结构, 由此表现出活性上升之后又明显下降的现象。然而, 这一现象在 0—5℃冰藏过程中则没有发现。Goll 等人<sup>[16]</sup>和 Yang 等人<sup>[15]</sup>认为 ATPase 活性的变化基于肌球蛋白和肌动蛋白相互作用的变化。

实验证明<sup>(4)</sup>, 在冷冻鱼糜中加入适当的添加剂可以明显提高鱼糜及制品的质量, 但对其肌原纤维蛋白的变性机理还不十分清楚。松田由美子<sup>[8]</sup>认为, 加 5% 蔗糖对肌原纤维蛋白的保护效果较好, 这与本试验的结果一致。Günter Vogel 等人<sup>[14]</sup>认为醇类的羟基能在酶外形成一个疏水区, 丙三醇对肌原纤维蛋白冷失活的保护作用可能与此有关。然而, 有人报导, 食盐不仅没有表现出对蛋白质的保护效果, 反而在冷冻中促进蛋白质的变性<sup>[7][12]</sup>。现已证明存在于氯化物里的鱼肉蛋白变性随离子浓度的增加而加快<sup>[10][11]</sup>。至于焦磷酸钠在本实验里如何促进蛋白质变性的原因, 可能与其作用时间有关。我们对冷藏 15 天的鱼糜测定 ATP 酶活性, 发现其活性比冷藏相同天数的对照鱼糜高 71%, 由此认为其单独使用时, 效果在短期内是明显的<sup>[2]</sup>。

另外, 从表 2 可见, 不同致死鱼的鱼糜在冷藏过程中的  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase 活性变化是不

① 同第 1 页脚注(1)。

同的,这可能是受到肌肉细胞内的不同 pH 影响结果<sup>[8]</sup>。由于鱼糜的细胞结构遭到破坏,故其蛋白质变性比鱼块快些。然而,值得注意的是,在 27°C 保藏一天后的鱼糜其 VBN 值已升为 88mg/100g,但其肌原纤维蛋白  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase 活性则只下降 50%。酶活性的存在可能是由于短时间内酶蛋白的活性中心尚未全部破坏的缘故。显而易见,肌原纤维蛋白  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase 活性变化是十分复杂的,它受到各种因子的影响。

从以上分析结果来看,在冷藏过程中不管鱼糜肌原纤维蛋白  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase 活性变化如何,但其 VBN 值的变化却无显著差别,而且在这过程中,用 VBN 值也不能说出各种因素对蛋白质变性的影响和作用,这证实了 VBN 值不能作为蛋白质初期变性的衡量指标。本试验结果表明,对鱼糜在冷藏前期(43 天左右),用肌原纤维蛋白  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase 活性的变化大小,来鉴别鱼糜在冷藏过程中蛋白质的变性程度是行之有效的。但对长时间冷藏的鱼糜来说,这种方法就失去了意义。至于如何进一步地应用  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase 作为一种标准来鉴定冷冻鱼糜的质量问题有待今后继续研究。

### 参 考 文 献

- [1] 北京医学院主编,1978. 生物化学, 448—450. 人民卫生出版社。
- [2] 陈修白,1980. 鱼糜加工与鱼糜制品. 水产科技文集,(第一集), 178—191. 农业出版社。
- [3] 陈燕南,1968. 水产食品化学, 24页. 台湾正中书局。
- [4] 江平重男、内山均,1979. 冰藏鱼类的鲜度低下に伴う筋原纖維タンペケの変質——即殺時かう腐敗に至る間の $\text{Ca}^{++}$ -ATPase 活性および抽出性的变化。日本水産学会誌,45(1):121—127。
- [5] 川岛孝省、新井健一、斎藤恒行,1973. 鱼类筋肉構成たんぱく質に関する研究——IX。日本水産学会誌,39(2):207—214。
- [6] 加藤登、野崎恒、小松一宮、新井健一,1979. スケトウダラ冷凍すり身の——新品質判定法——冷凍すり身の筋原纖維 ATPase 活性とかまはて形成能の関係。日本水産学会誌,45(8):1027—1032。
- [7] 太田冬雄、山田哲夫,1978. コイ筋肉アクトシオシンの緩衝磷酸盐中における凍結変性(英文)。日本水産学会誌,44(1):63—65。
- [8] 桥本昭彦、新井健一,1978. 数種の鱼类的筋原纖維  $\text{Ca}$ -ATPase の安定性及び pH と温度の影響。日本水産学会誌,44(12):1389—1393。
- [9] 松田由美子,1979. 凍結乾燥筋原纖維タンペケ質の変性に及ぼすスケロースの影響。日本水産学会誌,45(5):573—579。
- [10] 清水亘、日引重幸,1952. 水产動物肉に関する研究 XI 凍結及び冷蔵による鱼肉蛋白の変性並びにその関連性について。日本水産学会誌,17(10):301—304。
- [11] Connell, J. J., 1960. Studies on the Protein of Fish Skeletal Muscle. *Biochemical Journal*, 75: 530—538.
- [12] Ikeuchi, T. and Simdu, W., 1963. Study on Cold Storage of Brayed Fish Meat for the Material of Kamaboko-I. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 29(2):151—156.
- [13] Saito, T. and Matsuyoshi, M., 1950. A New Method for Estimating Freshness of Fish. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 24(4):749—750.
- [14] Vogel, G. et al., 1976. ATPase of Escherichia Coli: Purification.
- [15] Yang, R., Okitani, A. and Fujimaki, M., 1970. Studies on Myofibrils from the stored Muscle Part I. Post-mortem changes in Adenosine Triphosphatase Activity of Myofibrils from Rabbit Muscle. *Agr. Biol. Chem.* 34: 1765—1772.

## STUDY ON PROTIEN DENATURATION OF MINCED FISH MEAT IN REFRIGERATION

—Examine on the Changes in the  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase  
Activity in Refrigeration

Chen Haunquan and Han Mingzhu

(*Freshwater Fisheries Research Institute, Jiangsu Province*)

Tao Jiangping and Jin Zhonglin

(*Zhejiang Fisheries College*)

### Abstract

The present paper deals with the changes in the  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase activity of myofibrillar protiens from minced fish meat of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) in refrigeration. The effect of several kinds of factor on  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase activity were examined. The  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase activity was considered to be useful in evaluating the quality of minced fish meat in the refrigerating process.