

鲫肌原纤维蛋白加热过程中理化特性变化规律

姚磊¹, 罗永康^{1*}, 沈慧星², 孙云云¹

(1. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083;

2. 中国农业大学理学院, 北京 100083)

摘要: 通过对鲫肌原纤维蛋白加热过程中浊度、粘度、 Ca^{2+} -ATPase 活性以及总巯基含量的测定, 结合 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析了鲫肌原纤维蛋白在加热过程中理化特性的变化。结果表明: 鲫肌原纤维蛋白在加热过程中浊度随着溶液温度的升高而上升, 在 36 °C、42 °C 和 48 °C 条件下变化显著; 粘度在 20 ~ 47 °C 期间下降, 在 35 °C 和 47 °C 出现显著的变化。 Ca^{2+} -ATPase 活性 28 ~ 40 °C 间显著下降, 并且在 36 °C 条件下变化显著。总巯基含量结合 SDS-PAGE 电泳显示, 当溶液温度在 40 °C 以上时, 蛋白质分子间通过二硫键产生了肌球蛋白重链聚合物以及其它大分子物质。

关键词: 鲫; 肌原纤维蛋白; 理化特性; 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳

中图分类号: TS 201

文献标识码: A

鲫(*Carassius auratus*), 又称鲢鱼、鲫鱼、鲫鱼皮子、肚米鱼, 属鲤形目、鲤科、鲫属, 全国各地水域常年均有生产, 是我国分布最广的淡水鱼类之一^[1], 肉质细嫩鲜美, 深受消费者的欢迎。

食品物料学是开展食品原料物理化学和生物学特性研究的学科, 为产品的开发和生产技术的改善提供理论依据和指导。原料特性的研究在食品科学发达的国家都很受重视, 美国食品工程学会一直把食品物料学研究作为食品研究的重点之一。对于鱼蛋白的物料学研究而言, 加热是最为普遍的加工方法, 因此, 研究鲫肌原纤维蛋白加热过程中理化特性的变化规律对于鲫蛋白质的有效利用具有一定的应用价值。

肌原纤维蛋白主要由肌球蛋白、肌动球蛋白以及肌动蛋白组成。Belibagli 等^[2]通过差式量热扫描仪(DSC)发现银鲑和鲭鱼鱼糜在加热过程中出现 3 个吸热峰, 分别对应肌球蛋白、肌动球蛋白以及肌动蛋白的变性温度。潘锦锋等^[3]研究了加热对鲢(*Hypophthalmichthys moritrix*)肌原纤维蛋白 Ca^{2+} -ATPase 活性的影响。但关于鲫肌原纤维蛋白加热过程中理化特性的变化规律的研究

还未见报导。

本实验通过对鲫肌原纤维蛋白在加热过程中理化特性变化规律的研究, 探寻鲫的热加工特性, 以求为鲫蛋白的有效利用和相关产品的开发提供理论依据和技术指导。

1 材料与方 法

1.1 仪器和材料

仪器 SG250II 搅拌机: 浙江苏泊尔股份有限公司; FW2000 分散均质机: 上海弗鲁克流体机械制造有限公司; TGL-16A 冷冻离心机: 长沙仪器仪表公司; UV-2600 分光光度计: 上海优尼科仪器公司; BG-Power300 迷你垂直电泳仪: 北京百晶生物技术有限公司; DV-1 旋转粘度计: 上海越平科学仪器有限公司; DK-8D 电热恒温水槽: 上海一恒科技有限公司; FE20 实验室 pH 计: 梅特勒-托利多仪器有限公司。

材料 鲫购于中国农业大学家属区农贸市场, 活体运至实验室。

1.2 试验方法

鲫肌原纤维蛋白提取工艺流程 用潘锦锋

收稿日期: 2010-04-14 修回日期: 2010-06-12

资助项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金资助(nycytx-49); 国家自然科学基金项目(30871946)

通讯作者: 罗永康, E-mail: luoyongkang@263.net

等^[3]的方法制备鲫鱼鱼糜并提取肌原纤维蛋白。

用以测定 Ca^{2+} -ATPase 酶活和巯基的肌原纤维蛋白还须经以下纯化过程。取 10 mL 上清液,用 50 mL 冰冷去离子水稀释沉淀肌动球蛋白,10 000 r/min 离心 5 min,所得沉淀用 0.6 mol/L KCl 溶解,不溶部分再次离心 10 000 r/min,2 min 去除。所得肌原纤维蛋白溶液用 0.6 mol/L KCl 调节至浓度 4 mg/mL。

蛋白质含量测定 采用双缩脲法测定鲫肌原纤维蛋白溶液的蛋白质含量^[4]。

肌原纤维蛋白溶液浊度的测定 将肌原纤维蛋白溶液调整至 2 mg/mL,取该溶液 100 mL 于烧杯中加热,按照实验设计的要求,取不同加热温度或加热时间的样液各 3 mL,在 350 nm 下测定吸光度,实验重复 3 次取平均值。

肌原纤维蛋白溶液粘度的测定 将肌原纤维蛋白溶液调整至 8 mg/mL,取该溶液 500 mL 于烧杯中加热,取加热过程中特定加热温度或加热时间下的 10 mL 样液用粘度计测定粘度值,实验重复 3 次取平均值。

肌原纤维蛋白溶液 Ca^{2+} -ATPase 活性的测定 将肌原纤维蛋白调整至 4 mg/mL,取该溶液 100 mL 于烧杯中加热,按照试验设计的要求,取不同加热温度或加热时间的样液各 5 mL,采用 Benjakul 等^[5]使用的方法,测定 Ca^{2+} -ATPase 活性,活性表示方法为 1 mg 酶蛋白在 1 min 内生成的无机磷酸量,实验重复 3 次取平均值。

变化率计算方法 某温度下浊度变化率 = (后一温度下浊度值 - 该温度下浊度值) / 相邻点温度差值

某温度下粘度变化率 = (前一温度下粘度值 - 该温度下粘度值) / 相邻点温度差值

某温度下 Ca^{2+} -ATPase 活性变化率 = (前一温度下 Ca^{2+} -ATPase 活性值 - 该温度下 Ca^{2+} -ATPase 活性值) / 相邻点温度差值

肌原纤维蛋白溶液总巯基含量的测定 取肌原纤维蛋白溶液 100 mL 于烧杯中加热,按照试验设计的要求,取不同加热温度或加热时间的样液各 5 mL,采用 DTNB 法测定总巯基含量。取 0.5 mL 肌原纤维蛋白溶液加到 4.5 mL pH 6.8, 0.2 mol/L Tris-HCl 缓冲液中(内含 8 mol/L 尿素,2% SDS 和 10 mmol/L EDTA),充分混匀。取 4 mL 混合液,加入 0.5 mL 0.2 mol/L Tris-HCl

(含 0.1% DTNB),pH 8.0 溶液,于 40 °C 下温育 25 min,412 nm 下测定其吸光度。空白组用 pH 7.0,6 mol/L KCl 代替样品。重复 3 次。巯基含量用吸光度计算,采用摩尔吸光 13 600 mol/cm,用 mol/g 蛋白表示。巯基含量计算公式:

$$-SH(\text{mol/g}) = A \cdot D / C \cdot B$$

式中,A 表示吸光值,B 表示待测液蛋白浓度 mg/mL,C 表示分子吸光系数,其值为 13 600 mol/(cm · L),D 为稀释倍数,实验重复 3 次取平均值。

SDS-PAGE 电泳 电泳采用不连续体系 SDS-PAGE 凝胶电泳,上样前将样品与样品缓冲液以 1:1 的比例混合沸水浴 4 min,样品缓冲液一份为还原,一份为非还原,即加与不加 β -巯基乙醇。电泳采用含 10% 丙烯酰胺的分离胶和含 4% 丙烯酰胺的浓缩胶,初始电压为 90 V,至样品前沿刚好进入分离胶后,把电压提高到 130 V,电泳时间约 3 h。

2 结果与分析

2.1 加热对鲫肌原纤维蛋白浊度的影响

温度对鲫肌原纤维蛋白浊度的影响由图 1 可以看出,鲫肌原纤维蛋白溶液的浊度随着温度的升高而增大,整体呈现出 S 型曲线的趋势,在 20 ~ 34 °C 之间溶液浊度基本不变,36 °C 浊度开始增加,36 ~ 70 °C 浊度显著增加,70 °C 之后,浊度基本不变。图 2 中有 3 个较大的峰值分别是 36 °C、42 °C 和 48 °C,表明在这 3 个温度下浊度变化较大,尤其是 36 °C,浊度增加最快。

加热过程中鲫肌原纤维蛋白溶液浊度的升高表明了蛋白质的聚集体已经足够巨大以至于阻挡或削弱了光线的传播^[6],那么,36 °C、42 °C 和 48 °C 条件下溶液浊度变化最大,表明在这些温度条件下鲫肌原纤维蛋白大量聚集,发生了严重的变性。

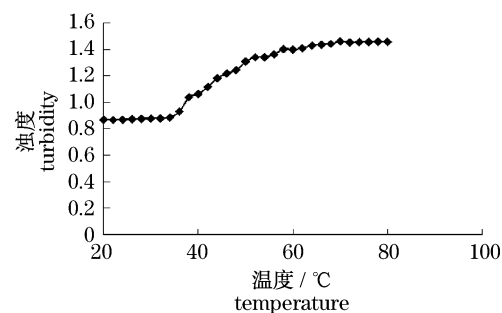


图 1 鲫肌原纤维蛋白浊度随温度的变化

Fig. 1 Changes in turbidity of myofibrillar protein from crucian carp during heating

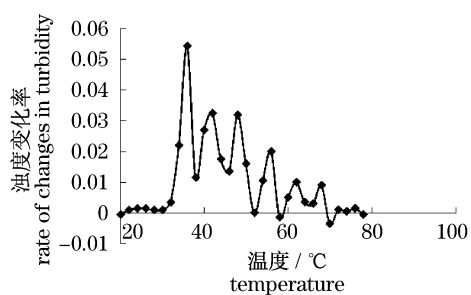


图2 鲫肌原纤维蛋白浊度随温度的变化率
Fig.2 Rate of changes in turbidity of myofibrillar protein from crucian carp during heating

一定温度下加热时间对鲫肌原纤维蛋白浊度的影响由图3可知,鲫肌原纤维蛋白在两种条件下浊度变化曲线均为S型曲线,整个加热过程中50℃的浊度始终高于同时段下40℃的浊度,且差距较大。可知温度越高,溶液的浊度提升越快。两种温度下加热时,刚开始溶液的浊度都略微下降,可能是此阶段温度较低,蛋白质并未聚集变性,随着温度的升高,蛋白质构象发生改变而导致的。50℃条件下溶液浊度在16 min时数值达到最大值,最终其浊度都在1.3以下,40℃条件下溶液浊度在18 min时数值达到最大值,最终其浊度都在1.1以下,可见两种温度下鲫肌原纤维蛋白的变性情况差异较大。

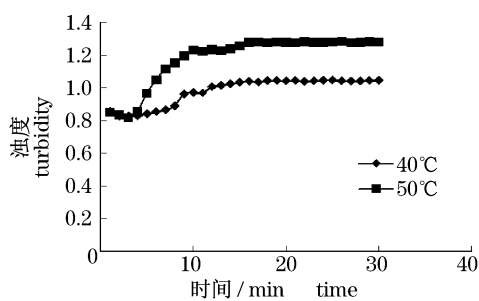


图3 鲫肌原纤维蛋白恒温加热下浊度的变化
Fig.3 Changes in turbidity of myofibrillar protein from crucian carp under stable temperatures as time prolonged

2.2 加热对鲫肌原纤维蛋白粘度的影响

蛋白质溶液的粘度主要来源于水合蛋白质分子间的相互作用^[7],同时受到蛋白质分子本身的形状、表面电荷以及pH等外在因素的影响^[8]。当蛋白质分子间的相互作用占主导地位时,溶液粘度与蛋白质的聚集状态呈线性关系^[9],也就是说,当外在因素确定的情况下,溶液的蛋白质聚集

越严重其粘度越低。

温度对鲫肌原纤维蛋白粘度的影响 由图4可知,鲫肌原纤维蛋白在加热过程中粘度逐渐下降,刚开始时粘度下降较为缓慢,从29~38℃溶液粘度快速下降,这也说明此阶段鲫肌原纤维蛋白快速聚集变性;38~47℃粘度下降趋于平缓,47℃后溶液粘度基本不变,此时鲫肌原纤维蛋白的聚集程度达到最大,鲫肌原纤维蛋白完全变性。图5中有两个较大的峰值,分别在35℃、47℃,在这两个温度下,蛋白质聚集尤其迅速。

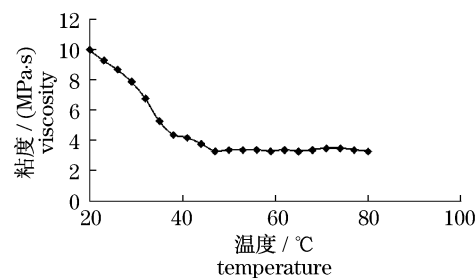


图4 鲫肌原纤维蛋白粘度随温度的变化
Fig.4 Changes in viscosity of myofibrillar protein from crucian carp during heating

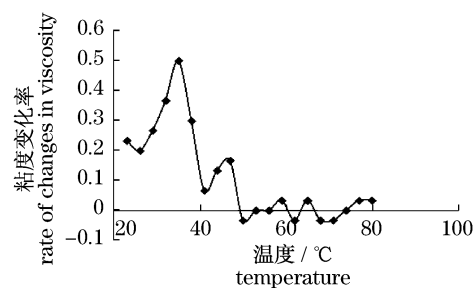


图5 鲫肌原纤维蛋白粘度随温度的变化率
Fig.5 Rate of changes in viscosity of myofibrillar protein from crucian carp during heating

一定温度下加热时间对鲫肌原纤维蛋白粘度的影响 由图6可知,鲫肌原纤维蛋白恒温加热下,溶液粘度刚开始缓慢下降,随后快速降低,最终基本不变。50℃溶液的粘度变化曲线始终在另一条曲线的下方,并且在50℃条件下加热的溶液在第10分钟后粘度即基本维持不变,而在40℃下加热的溶液其粘度在第13分钟后才基本降到最低点。这说明在两种温度下鲫肌原纤维蛋白的变性情况有较大差异,50℃变性较快,蛋白质聚集也较为严重。

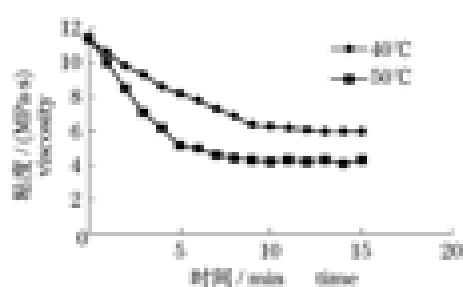


图6 鲫肌原纤维蛋白恒温加热下粘度的变化
Fig.6 Changes in viscosity of myofibrillar protein from crucian carp under stable temperatures as time prolonged

2.3 加热对鲫肌原纤维蛋白 Ca^{2+} -ATPase 活性的影响

Ca^{2+} -ATPase 活性是评估蛋白质品质的重要指标,它与蛋白质的凝胶特性有关^[10]。 Ca^{2+} -ATPase 活性的大小受到肌球蛋白构象改变的影响^[11]。由图 7 可知,鲫肌原纤维蛋白 Ca^{2+} -ATPase 活性在 20~28 °C 基本不变,28~34 °C 缓慢下降,从 34 °C 开始, Ca^{2+} -ATPase 活性急剧下降,40 °C 以后,活性几乎为 0。24 °C 时 Ca^{2+} -ATPase 活性有一个较小的峰值,可能是因为该温度条件下肌原纤维蛋白发生了构象上的变化导致的,类似的现象在 Liu 等^[12]的文章中也有所提及。Sankar 等^[13]考察了 catla、rohu 和 mrigal 3 种鱼的肌原纤维蛋白的热稳定性,发现从 45~50 °C Ca^{2+} -ATPase 活性迅速下降,并进一步指出疏水氨基酸和巯基的相互作用导致了蛋白酶活的下降。图 8 中在 36 °C 有一个明显的峰值,表明在该温度条件下 Ca^{2+} -ATPase 活性变化最为剧烈, Ca^{2+} -ATPase 活性源于肌球蛋白的球状头部结构^[14],加热会导致肌球蛋白的头部结构发生改变从而使 Ca^{2+} -ATPase 活性下降。

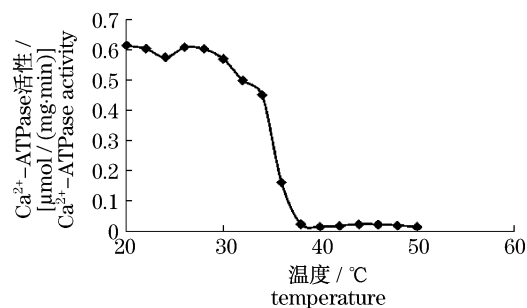


图7 鲫肌原纤维蛋白 Ca^{2+} -ATPase 活性随温度的变化
Fig.7 Changes in Ca^{2+} -ATPase activity of myofibrillar protein from crucian carp during heating

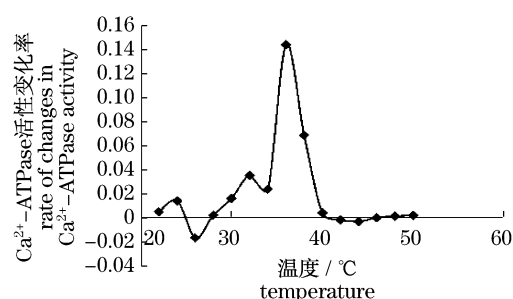


图8 鲫肌原纤维蛋白 Ca^{2+} -ATPase 活性随温度的变化率
Fig.8 Rate of changes in Ca^{2+} -ATPase activity of myofibrillar protein from crucian carp during heating

2.4 加热对鲫肌原纤维蛋白总巯基含量的影响

由图 9 可知,鲫肌原纤维蛋白在加热过程中总巯基含量从 20~40 °C 先缓慢下降然后又逐渐上升这可能是在该温度范围内,鲫肌原纤维蛋白发生构象上的改变导致的。40~60 °C,溶液总巯基含量较为快速的下降,60~68 °C 总巯基含量的下降尤其显著,之后趋于稳定。

结合 SDS-PAGE 分析图谱来看,鲫肌原纤维蛋白溶液从 40 °C 开始有大分子物质产生,而溶液的总巯基含量也恰好在 40 °C 开始显著下降,Yongsawatdigu 等^[15]在马鲛的肌动球蛋白的热变性研究中发现总巯基含量出现下降,同时他还发现活性巯基会暂时性的增加,然后下降,并氧化成二硫键。由本实验结果可以推断,从 40 °C 开始,鲫肌原纤维蛋白开始通过二硫键产生大分子物质。

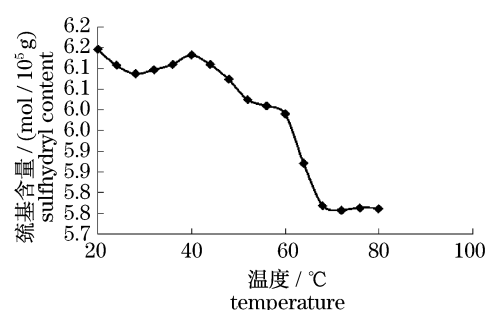


图9 鲫肌原纤维蛋白巯基含量随温度的变化
Fig.9 Changes in total SH groups of myofibrillar protein from crucian carp during heating

2.5 鲫肌原纤维蛋白热变性中的 SDS-PAGE 研究

将肌原纤维蛋白溶液调整至 2 mg/mL,取该溶液 100 mL 于烧杯中加热,分别取 25 °C、40 °C、55 °C、70 °C、85 °C 的样液 4 mL 进行电泳分析(图 10)。

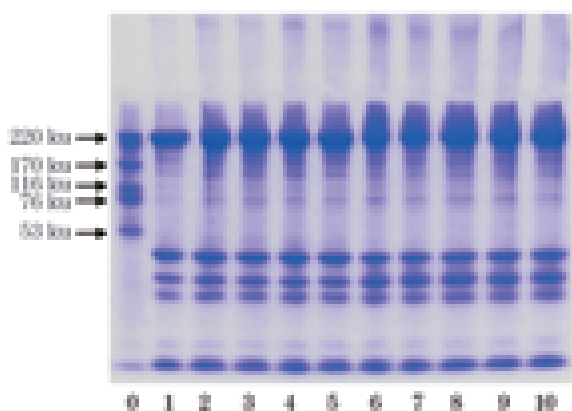


图 10 鲫肌原纤维蛋白在升温过程中的 SDS-PAGE 分析图谱

图中 0 号泳道为 Marker, 第 1~5 泳道分别为 25 °C、40 °C、55 °C、70 °C、85 °C 的鲫肌原纤维蛋白在存在 β -巯基乙醇下的图谱; 第 6~10 泳道分别为 85 °C、70 °C、55 °C、40 °C、25 °C 的鲫肌原纤维蛋白在不存在 β -巯基乙醇下的图谱。

Fig. 10 SDS-PAGE pattern of myofibrillar protein from crucian carp during heating

Lane 0 is marker, lane 1-5 is protein solution heated to 25, 40, 55, 70, 85 °C with addition of β -mercaptoethanol respectively; lane 6-10 is protein solution heated to 85, 70, 55, 40, 25 °C without addition of β -mercaptoethanol, respectively.

由图 10 可知,在存在 β -巯基乙醇的条件下肌球蛋白重链(205 ku)随着温度的升高变化不明显;而在不存在 β -巯基乙醇的条件下,肌球蛋白重链随着温度的升高而减少。肌动蛋白(45 ku)在加热的过程中没有发生显著的变化。无论 β -巯基乙醇的存在与否,随着加热温度的上升,尤其是 40 °C 以后,浓缩胶以及分离胶的最上端颜色都有所加深,但是在 β -巯基乙醇不存在的情况下,随着加热温度的上升,浓缩胶以及分离胶的最上端颜色加深得更为显著,而 β -巯基乙醇的作用是用来打断蛋白中的二硫键,溶液的总巯基含量也是在 40 °C 开始显著降低,这表明加热条件下鲫肌原纤维蛋白会通过产生二硫键来形成肌球蛋白重链聚合物以及其它大分子物质。Lee 等^[14]指出牛半腱肌肌原纤维蛋白在 45 °C 时其肌球蛋白开始变性,55 °C 时肌球蛋白由于产生肌球蛋白重链聚合物而迅速变性。

3 结论

鲫肌原纤维蛋白在加热过程中浊度在 36 °C、42 °C 和 48 °C 条件下变化显著;粘度在 35 °C 和 47 °C 条件下变化显著; Ca^{2+} -ATPase 活性在 36 °C

条件下变化显著,在 36 °C 附近,鲫肌原纤维蛋白的浊度、粘度以及 Ca^{2+} -ATPase 活性均发生显著变化。

通过对鲫肌原纤维蛋白热变性中总巯基含量的测定以及 SDS-PAGE 研究,鲫肌原纤维蛋白在温度超过 40 °C 以后开始通过二硫键产生肌球蛋白重链聚合物以及其它大分子物质。

参考文献:

- [1] 曾名勇,黄海,李玉环,等. 鲫(*Carassius auratus*) 在微冻保鲜过程中的质量变化[J]. 青岛海洋大学学报,2001,31(3):351-355.
- [2] Belibagli K B, Speers R A, Paulson A T. Thermophysical properties of silver hake and mackerel surimi at cooking temperatures[J]. Journal of Food Engineering,2003,60(4):439-448.
- [3] 潘锦峰,沈慧星,尤娟,等. 草鱼肌原纤维蛋白加热过程中理化特性的变化[J]. 中国农业大学学报,2009,14(6):17-22.
- [4] Gornall A G, Bardawill C J, David M M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction [M]. Biological Chemistry, 1949 (177):751-766.
- [5] Benjakul S, Seymour T A, Morrissey M T, et al. Physicochemical changes in Pacific whiting muscle proteins during iced storage [J]. Journal of Food Science,1997,62(4):729-733.
- [6] Wang H H, Pato M, Pietrasik Z, et al. Biochemical and physicochemical properties of thermally treated natural actomyosin extracted from normal and PSE pork *Longissimus* muscle[J]. Food Chemistry,2009, 113(1):21-27.
- [7] Damodaran S. Food proteins: an overview [M] // Food proteins and their applications. New York: Marcel Dekker Inc,1997:1-24.
- [8] Ramachandran D, Mohan M, Sankar T V. Physicochemical characteristics of muscle proteins from barracuda (*Sphyraena jello*) of different weight groups [J]. Swiss Society of Food Science and Technology,2007,40(8):1418-1426.
- [9] Cofrades S, Careche M, Carballo J, et al. Protein concentration, pH and ionic strength affect apparent viscosity of actomyosin [J]. Journal of Food Science,1993,58(6):1269-1272.
- [10] Katoh N, Nozaki H, Komatsu K, et al. A new method for evaluation of the quality of frozen surimi from Alaska pollack. Relationship between

- myofibrillar ATPase activity and Kamaboko forming ability of frozen surimi [J]. *Bull Jap Soc Sci Fish*, 1979(45):1027-1032.
- [11] Park J D, Yongsawatdigul J, Choi Y J, *et al.* Biochemical and conformational changes of myosin purified from Pacific sardine at various pHs [J]. *Journal of Food Science*, 2008, 73(3):C191-197.
- [12] Liu Y M, Lin T S, Lanier T C. Thermal denaturation and aggregation of actomyosin from Atlantic croaker [J]. *Food Science*, 1982, 47(6):1916-1920.
- [13] Sankar T V, Ramachandran A. Thermal stability of myofibrillar protein from Indian major carps [J]. *Journal of the Science of Food & Agriculture*, 2005, 85(4):56-568.
- [14] Lee E J, Kim Y J, Lee N H, *et al.* Differences in properties of myofibrillar proteins from bovine semitendinosus muscle after hydrostatic pressure or heat treatment [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2007, 87(1):40-46.
- [15] Yongsawatdigul J, Park J W. Thermal denaturation and aggregation of threadfin bream actomyosin [J]. *Food Chemistry*, 2003, 83(3):409-416.

Changes in physiochemical properties of myofibrillar protein from crucian carp during heat-treatment

YAO Lei¹, LUO Yong-kang^{1*}, SHEN Hui-xing², SUN Yun-yun¹

(1. College of Food Science, China Agricultural University, Beijing 100083, China;

2. College of Science, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: The changes in physiochemical properties of myofibrillar protein from crucian carp during heat-treatment were studied through the tests of turbidity, viscosity, Ca²⁺-ATPase activity, total sulfhydryl content and a SDS-PAGE study. Research on changes in physicochemical properties of myofibrillar protein during heat-treatment can help to understand the thermal denaturation of it and provide practical information for crucian carp muscle processing, so as to promote the utilization of huge amount of freshwater fish resources in China. The results showed that turbidity increased as temperature rose. Turbidity did not show a significant increase from 20 to 34 °C. With increasing temperature from 36 to 70 °C, turbidity increased significantly and three peaks of change rate was observed at 36, 42 and 48 °C. No significant shifts were detected when the temperature became above 70 °C; Viscosity declined from 20 to 47 °C, and two peaks of change rate were observed at 35 and 47 °C. No significant shifts were detected when the temperature became above 47 °C. Ca²⁺-ATPase activity decreased from 28 to 40 °C, at the first stage (28-34 °C), Ca²⁺-ATPase activity decreased slowly, then, from 34 to 40 °C, Ca²⁺-ATPase activity decreased significantly and one peak of change rate was observed at 36 °C. At 40 °C Ca²⁺-ATPase activity reduced to zero. Sulphydryl content decreased in ranges 20 to 28 °C and 40 to 68 °C and kept a certain value at 68 °C with a slight increase from 28 to 40 °C. Electrophoretic analysis indicated high temperature (≥40 °C) induced disulfide bonding between myosin chains and other proteins and formed macromolecular substances.

Key words: crucian carp (*Carassius auratus*); myofibrillar; physiochemical properties; SDS-PAGE

Corresponding author: LUO Yong-kang. E-mail: luoyongkang@263.net