

酸碱处理对鲢鱼肌原纤维蛋白热变性、聚集、胶凝性质的影响

付湘晋¹, 许时婴^{1,2,*}, 王 璋¹, JINMOON Kim¹

(1. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122;

2. 江南大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘 要: 酸碱法(pH-shifting)提取鱼蛋白是鱼糜加工新工艺, 能提高蛋白得率。酸碱法中极端 pH(2.3 和 11.8)对肌原纤维热变性、热聚集、热致胶凝特性有很大影响。酸碱处理使肌原纤维部分变性, 其中酸处理使肌原纤维肌球蛋白完全变性, 肌动蛋白变性温度下降(从 81℃降低到 77.6℃), 碱处理使肌动和肌球蛋白变性温度都下降; 酸碱处理使肌原纤维发生聚集, 酸处理肌原纤维发生聚集最严重; 酸碱处理使肌原纤维胶凝过程发生明显变化, 凝胶强度明显降低, 其中酸处理肌原纤维凝胶强度最低(最大储能模量分别为 1150、25、135Pa)。所以, 鱼糜 pH-shifting 工艺用碱法更合适。

关键词: 酸碱处理; 肌原纤维; 热变性; 热聚集; 胶凝

Effect of Extreme pH Treatment on Heat-induced Denaturation, Aggregation, and Gelling Properties of Myofibril from Silver Carp

FU Xiang-jin¹, XU Shi-ying^{1,2,*}, WANG Zhang¹, JINMOON Kim¹

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The pH-shifting process is a new method for extracting fish protein of surimi, and the new method can increase the protein recovery rate, but the extreme pH (2.3 and 11.8) conditions in the pH-shifting process affect the thermal properties of myofibril. Understanding this kind of effect can provide theory support to the new process. Extreme pH treatment causes the part denaturation of myofibril, after the acid treatment the myosin denatures entirely, and the denaturation temperature of actin decreases from 81 °C to 77.6 °C; Alkali treatment decreases the denaturation temperature of myosin and actin. Both acid and alkali treatments cause aggregation of myofibril, but the acid treatment more obviously. Correspondingly, the thermal gelling behavior changes, and gel strength decreases markedly. Myofibril treated by acid has the lowest gel strength. Therefore, alkali treatment is more suitable than acid treatment in the pH-shifting process.

Key words: extreme pH treatment; myofibril; thermal denaturation; thermal aggregation; gelling

中图分类号: TS201.21

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)06-0100-04

白鲢(silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix*), 抗病、生长快、成本低, 是我国淡水养殖鱼中产量最高的鱼种。然而因为肉薄刺多、腥味重, 鲜食价值评分较低。加工成鱼糜是提高其附加值的途径之一, 也是解决鱼糜原料短缺的途径之一。

鱼糜工艺有水洗法和酸碱法(pH-shifting)。酸碱法(pH-shifting)先在极端 pH 值条件(小于 2.5 或大于 10.5)下使绝大部分蛋白质溶解, 去掉不溶解物(骨刺、皮、鳞

等), 再调 pH 值至蛋白质的等电点沉淀回收。与传统鱼糜加工的水洗法相比, 酸碱法的蛋白质得率从 60% 左右升高到 70%~90%, 废水中的蛋白含量降低, 减少了环境污染和废水处理成本。已经有酸碱法从太平洋牙鳕^[1]、Herring^[2]、Rockfish^[3]、Catfish^[4]等鱼提取蛋白的报道。陈申如^[5]应用酸法提取鲢鱼鱼肉蛋白, 所得鱼肉蛋白无腥味, 色泽洁白, 蛋白质产率可达 90% 左右。

酸碱环境使蛋白的分子结构和功能性质都发生了一

收稿日期: 2007-06-30

作者简介: 付湘晋(1980-), 男, 博士研究生, 主要从事食品蛋白质研究。E-mail: yangtzfu@yahoo.com.cn

* 通讯作者: 许时婴(1941-), 女, 教授, 主要从事高新技术在食品加工中的应用研究。E-mail: syxu@jiangnan.edu.cn

定变化^[6-7]。Choi^[1]报道酸性 pH 使太平洋牙鲆肌原纤维蛋白凝胶强度降低；但 Kristinsson^[6]报道酸处理使鳕鱼(Cod)肌原纤维蛋白凝胶强度略微升高。酸碱法对鲢鱼肌原纤维蛋白的影响还不见有研究报道。

本实验应用差示扫描量热仪(DSC)、紫外分光光度计、流变仪等比较经酸碱处理后鲢鱼肌原纤维蛋白的热变性、热聚集、热致胶凝性质的影响，为酸碱法鱼糜工艺提供理论依据，对于理解蛋白质在极端条件下的性质也有参考价值。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

白鲢鱼购自无锡青山湾市场，平均重 1 kg。

化学试剂均为分析纯。

DS-1 高速匀浆机 上海样品模型厂；4K15 冷冻离心机 美国 Sigma 公司；DSC-7 扫描量热仪(DSC) 美国 Perkin-Elmer 公司；AR-1000 型流变仪 美国 AR 公司。

1.2 方法

1.2.1 肌原纤维蛋白提取^[7]

鲜活鲢鱼宰杀后，去头、内脏，用冰水洗净，手工剔取白色鱼肉。1 份鱼肉加 9 倍(g/ml, W/V)的冰蒸馏水，用匀浆机匀浆(10000r/min, 30s)，滤布过滤去结缔组织，滤液冷冻离心(4℃, 10000 × g, 20min)。沉淀用 3 倍(g/ml, W/V) 0.1mol/L KCl-20mmol/L Tris-HCl (pH7.0)缓冲液(4℃)悬浮，再均质(600r/min, 30s)，冷冻离心(4℃, 10000 × g, 10min)，均质、冷冻离心重复 4 次。最后一次离心所得沉淀即为肌原纤维蛋白(myofibril, M)。

1.2.2 酸碱处理鲢鱼肌原纤维蛋白^[7]

鲢鱼肌原纤维蛋白转入磁力搅拌器冰浴缓慢搅拌，用 2N 的盐酸或 NaOH 调整 pH 值(酸性：pH2.3；碱性：pH11.8)；pH 调好后继续搅拌 30min；再调 pH 值到 5.5，离心(4℃, 10000 × g, 20min)，所得沉淀即酸、碱处理肌原纤维蛋白，分别记为 ACM、AKM。

1.2.3 差示扫描量热(DSC)分析蛋白变性^[9]

应用 Perkin-Elmer DSC-7 差示扫描量热仪分析蛋白的热性质。以空盒为对照，以 5℃/min 速率 30~85℃内扫描。

1.2.4 蛋白热聚集与浊度

肌原纤维蛋白用 4℃ 0.6mol/L KCl-20mmol/L Tris-HCl (pH7.0)缓冲液悬浮，使蛋白浓度为 1mg/ml。然后 600r/min 下均质 2min。肌原纤维蛋白溶液分别在 40、45、50℃水浴，定时取样测定其在 350nm 处吸光度，以蒸馏水为空白。以浊度-时间曲线初始段的斜率为聚集速度^[10]。

1.2.5 蛋白热致胶凝特性研究

用 4℃ 0.6mol/L KCl-0.02mol/L Tris-HCl (pH7.0)缓冲液稀释肌原纤维蛋白到蛋白浓度 35mg/ml，10000r/min 下均质 30s，真空脱气。

2℃锥板，剪切频率 0.1Hz，剪切应变 0.02，1.5℃/min，20~90℃扫描。

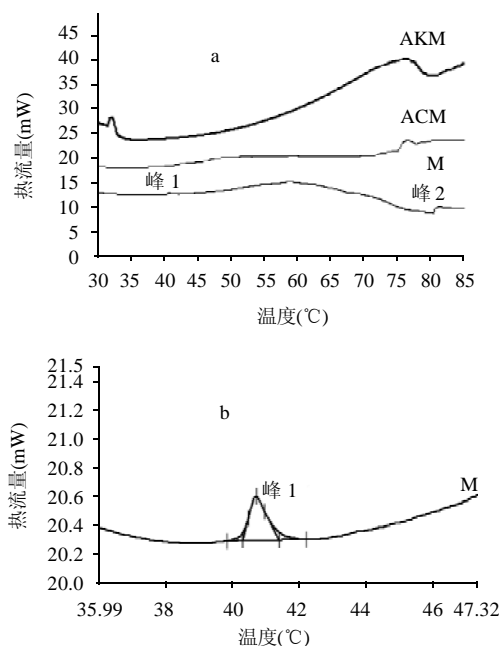
1.2.6 理化测定

蛋白质含量：Lorry 法；水分含量：100~105℃，干燥 18h 到恒重，进行测定计算。pH 值：复合电极法。

2 结果与分析

2.1 酸碱处理对鲢鱼肌原纤维蛋白分子热稳定性的影响

差示扫描量热仪(DSC)通过测量蛋白变性时的热量，直观反映蛋白的变性过程。只要条件一定，蛋白在 DSC 图上有固定的吸热峰。如果蛋白在测定前已经变性，则在 DSC 图上，蛋白的吸热峰变小、位移或消失。肌原纤维由肌球蛋白和肌动蛋白组成，在鲢鱼肌肉中，它们的变性温度分别是 43.6℃和 73.6℃^[11]。



a. DSC 图；b. M 的峰 1 放大图。

图 1 酸碱处理肌原纤维蛋白差示扫描量热 (DSC)

Fig.1 Differential scanning calorimetry (DSC) thermograms of myofibril

表 1 酸碱处理肌原纤维蛋白热变性峰温
Table 1 Peak maximum temperature (T_{max}) for myofibril denaturation

蛋白种类	变性温度(℃)		
	M	ACM	AKM
肌球蛋白	40.727	—	32.443
肌动蛋白	81.104	77.621	78.577

从图1、表1中可以看出,ACM肌动蛋白变性温度明显降低(77.621℃ vs. 81.104℃),这与Kristinsson^[4]报道肌动蛋白在低pH下不稳定的结论一致。AKM的肌球蛋白变性温度(32.443℃)明显降低,而ACM的肌球蛋白峰消失。这说明酸处理造成鲢鱼肌球蛋白完全变性。

2.2 酸碱处理对肌原纤维蛋白热聚集和浊度的影响

浊度反映了溶液中不溶悬浮粒子的大小和数量,在蛋白研究中,常作为蛋白聚集的指标,蛋白聚集后,颗粒直径变大,浊度升高^[10]。

蛋白的天然状态是尽量把疏水残基埋在分子内部,但在极端pH环境中,蛋白分子由于静电斥力而展开,疏水残基暴露通过疏水相互作用引起聚集。由图2~4可看出,初始浊度ACM、AKM比M高,特别是ACM,这说明,酸碱处理造成肌原纤维蛋白聚集。

肌原纤维蛋白在40℃时的聚集过程(图2)包括三个阶段;在初始2min内,浊度基本保持恒定;然后迅速升高;20min后,升高缓慢。但在45℃(图3)、50℃(图4)时,蛋白聚集速度太快,只包括两个阶段,浊度恒定的初始阶段观察不到。45℃时,浊度在10min左右后升高缓慢;50℃时,浊度在5min左右后升高缓慢。

但最大聚集速度却在45℃时,且最终浊度最高,即聚集最彻底,可见肌原纤维蛋白聚集时并不是温度越高速度越快,也不是温度越高,聚集越彻底。因为聚集包括多个步骤,蛋白单体在高温下展开,然后多个蛋白分子相互作用聚合;不同温度下,两个步骤的相对速度不同;蛋白展开是吸热反应,高温下易进行;聚合是放热反应,低温下易进行;温度低,蛋白展开太慢,温度高,聚合速度太慢,都不能达到最大聚集程度。在本实验中,40℃时,聚集速度由蛋白展开速度决定,M是没有经过酸碱处理的,蛋白折叠最紧密,展开速度最慢,所以M聚集速度慢,与ACM、AKM聚集

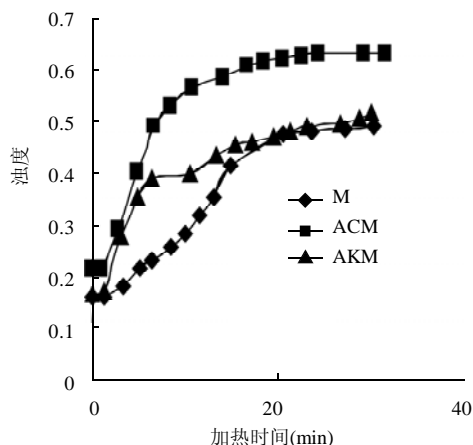


图2 40℃下加热时间对肌原纤维浊度的影响
Fig.2 Turbidity of myofibril at 40 °C

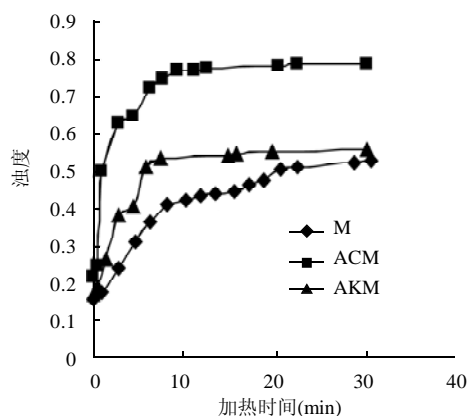


图3 45℃下加热时间对肌原纤维浊度的影响
Fig.3 Turbidity of myofibril at 45 °C

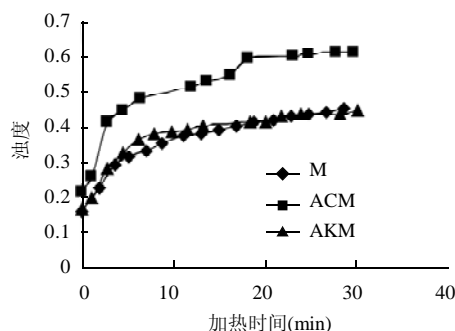


图4 50℃下加热时间的肌原纤维浊度的影响
Fig.4 Turbidity of myofibril at 50 °C

表2 酸碱处理肌原纤维蛋白的聚集速度
Table 2 Aggregation velocity of myofibril treated by acid and alkali

蛋白	40℃	45℃	50℃
M	0.0186	0.0328	0.0377
ACM	0.0479	0.1449	0.0691
AKM	0.0561	0.0545	0.0407

注: * 聚集速度为该温度时浊度由线的斜率。

过程差别较大;在50℃时,聚集速度由蛋白聚合速度决定,所以三种肌原纤维蛋白虽然蛋白折叠程度不一,展开速度有差别,但聚集速度差别不大;特别是AKM和M,40℃时二者聚集过程差别明显,但50℃时二者聚集曲线基本重合。

2.3 酸碱处理对鲢鱼肌原纤维蛋白胶凝特性的影响

肌原纤维蛋白热致胶凝过程由两个阶段组成:第一阶段是蛋白空间定位、展开,即变性阶段;第二阶段是蛋白之间相互作用,包括疏水作用、氢键、-SH生成S-S键等。肌球蛋白有一个球状头部,内部疏水残基较多;肌动蛋白亲水基团较多;它们在热致胶凝过程中体现出不同的性质。肌球蛋白先变性,充分展开,内部疏水基团暴露,蛋白之间形成的疏水力增大,G'升高;然后肌动蛋白变性、展开,其亲水基团干扰疏水

力, 并且高温下, 分子热运动加剧, 流动性增加, G' 降低。从图 5~7 中可知, 三种蛋白都是在 40°C 左右开始胶凝, 这是因为肌球蛋白在 40°C 变性。 40°C 后, G' 随温度升高而升高; M 在 70°C 达最大值, 然后降低, 这是肌动蛋白变性温度区域(图 1); 而 ACM 在 50°C 左右即达最高值, 然后迅速降低; AKM 在 65°C 达最大值, 然后迅速下降; 这是由于酸碱处理造成了肌动蛋白变性, 与 DSC(图 1、表 1)研究结果一致。

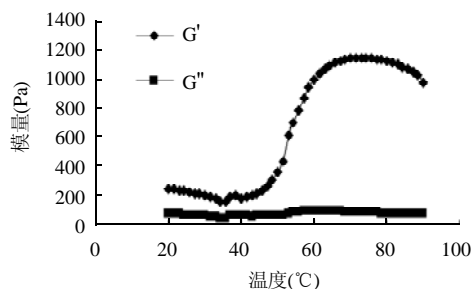


图 5 肌原纤维胶凝过程

Fig.5 Thermal gelling behavior of myofibril

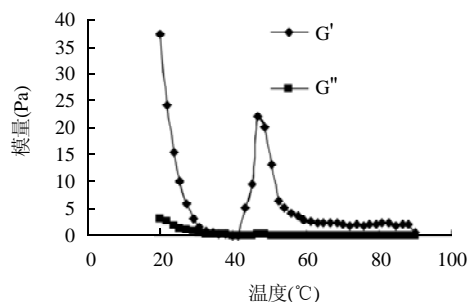


图 6 酸处理肌原纤维胶凝过程

Fig.6 Gelling behavior of myofibril treated by acid

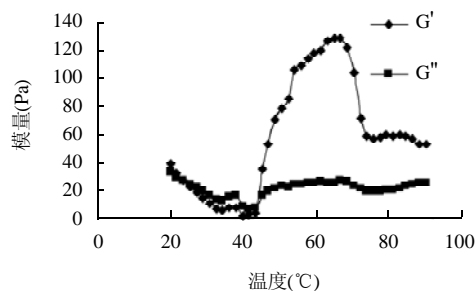


图 7 碱处理肌原纤维蛋白胶凝过程

Fig.7 Gelling behavior of myofibril treated by alkali

在低温下, 氢键是主要作用力, 温度升高, 氢键减弱, G' 降低, 所以在 $20\sim 40^{\circ}\text{C}$, M 和 AKM 的 G' 不断减小。但 ACM 的这一趋势不明显, 这说明 ACM 溶

液中氢键少, 这是由于 ACM 聚集最严重(图 2)。同样, 由于 ACM 聚集(图 2), 蛋白颗粒直径大, 没有形成相互缠绕的三维网络结构, 所以初始 G' 最小。三种蛋白在凝胶强度(最高 G')上有明显差别(图 5~7), M 、 ACM 、 AKM 最大 G' 分别为 1150、25、135 Pa, 这不能全用聚集性质差异来解释, 因为 M 和 AKM 聚集程度差异不大(图 2)。

3 结 论

DSC 和浊度证明酸碱处理引起鲢鱼肌原纤维蛋白分子结构显著变化, 特别是酸处理使肌原纤维的肌球蛋白完全变性, 而碱处理使肌球蛋白变性温度明显降低。酸处理引起的蛋白聚集最严重, 浊度最高。分子结构的变化导致蛋白胶凝性质发生明显变化, 蛋白不能形成相互缠绕的三维网络结构, 凝胶强度降低, 其中酸处理肌原纤维蛋白凝胶强度最低。所以, 鱼糜 pH-shifting 工艺用碱法更佳。

参考文献:

- [1] CHOI Y J, PARK J W. Acid-aided protein recovery from enzyme-rich Pacific whiting[J]. Journal of Food Science, 2002, 67(8): 2962-2967.
- [2] UNDELAND I, KELLEHER S D, HULTIN H O. Recovery of functional proteins from herring (*Clupea harengus*) light muscle by an acid or alkaline solubilization process[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2002, 50: 7371-7379.
- [3] YONGSAWATDIGUL J, PARK J W. Effects of alkali and acid solubilization on gelation characteristics of rockfish muscle proteins[J]. Journal of Food Science, 2004, 69(7): 499-505.
- [4] KRISTINSSON H G, THEODORE A E, DEMIR N, et al. A comparative study between acid- and alkali-aided processing and surimi processing for the recovery of proteins from channel catfish muscle[J]. Journal of Food Science, 2005, 70(4): 298-306.
- [5] 陈申如, 张其标, 倪辉. 酸法提取连鱼肉蛋白质技术的研究[J]. 海洋水产研究, 2004, 25(5): 61-64.
- [6] KRISTINSSON H G, HULTIN H O. Effect of low and high pH treatment on the functional properties of cod muscle proteins[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2003, 51(17): 5103-5110.
- [7] KRISTINSSON H G, HULTIN H O. Changes in conformation and subunit assembly of cod myosin at low and high pH and after subsequent refolding[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2003, 51(24): 7187-7196.
- [8] OGAWA M, EHARA T, TAMIYA T, et al. Thermal stability of fish myosin[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 1993, 106B: 517-521.
- [9] LIU M N, FOEGEDING E A, WANG S f, et al. Denaturation and aggregation of chicken myosin isoforms[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 1996, 44: 1435-1440.
- [10] THORARINSDOTTIR K A, ARASON S, GEIRSDOTTIR M B, et al. Changes in myofibrillar proteins during processing of salted cod (*Gadus morhua*) as determined by electrophoresis and differential scanning calorimetry[J]. Food Chemistry, 2002, 77(3): 377-385.