

兔骨骼肌肌球蛋白分子形成凝胶过程的负染观察

黄鸿兵, 徐幸莲, 周光宏

(南京农业大学 农业部农畜产品加工与质量控制重点开放实验室, 江苏 南京 210095)

摘 要: 肌球蛋白凝胶形成是肉制品粘结的基础。试验通过电子显微镜对兔骨骼肌肌球蛋白经不同温度加热处理后形态变化的负染观察, 以探寻凝胶形成的过程。肌球蛋白经加热后, 在加热温度低于 40℃时, 变性凝聚程度较低; 而在高于 40℃时, 蛋白质变性凝聚成聚合体。并且, 随着温度的升高, 聚合程度加深; 在 60℃时分子已经形成直径大于 500nm 的聚合体。头头连接似乎是主要的连接方式。而尾尾相连在本试验中没有出现。

关键词: 兔; 骨骼肌; 肌球蛋白; 分子; 凝胶; 电子显微镜; 加热

收稿日期: 2003-08-04

基金项目: 江苏省“十五”攻关项目(BE2001400)

作者简介: 黄鸿兵(1979-), 男, 硕士研究生, 研究方向畜产品加工与质量控制。

及时的信息有利于提高顾客对于食品感官评价的正确性和可靠性, 从而通过提高顾客的忠诚度来获得超额利润。
3.4 在所有因素中, 感知价值的影响最为强烈。这说明价值是顾客满意的主要因素, 尤其是通过各种超值和个性化服务, 让顾客感受到获得了更加多的让渡价值, 从而提高顾客对于食品的满意程度。

3.5 顾客的食品感官质量评价好坏与企业的声誉、顾客的忠诚度显著正相关, 也就是说, 存在一种经营方式, 可以达到一个双赢的效果。

参考文献:

- [1] Kristen K, Martensen A, Gronholdt L. Customer satisfaction measurement at post denmark: results of application of european customer satisfaction index methodology[J]. Total Quality Management, 2000, 11(7): 544-355.
- [2] 张新安, 田澎, 张列平. 上海顾客满意指数测评模型研究[J]. 工业工程与管理, 2002, (5): 29-33.
- [3] David Bovet, Joseph Martha, R Kirk Kramer. 价值网——打破供应链 挖掘隐利润[M]. 人民邮电出版社, 2001.
- [4] B Joseph Pine II, James H Gilmore. 体验经济[M]. 机械工业出版社, 2002.
- [5] 李蔚蓝. CS管理——管理革命[M]. 中国经济出版社, 1998.
- [6] 翟旭龙. 顺序法感官检验结果的统计分析[J]. 酿酒科技, 2000, (3): 99.
- [7] Cliff Bowman, Veronique Ambrosini. Value creative versus value capture: towards a coherent definition of value in strategy[J]. British Journal of Management, 2000, (11): 1-15.
- [8] 杨纶标. 模糊数学及应用[M]. 广州: 华南理工大学出版社, 2001.
- [9] 王莲芬. 层次分析法引论[M]. 中国人民大学出版社, 1989.
- [10] 吴伟东. 利用层次分析法的标度进行功能评价分析[J]. 天津城市学院学报, 2002, 8(1): 52-54.
- [11] 杨凤翔, 陆君良. 数值分析[M]. 天津大学出版社, 1985. 47-50.
- [12] Fornell C, Bookstein F A. Two structure equation models with unobservable variable measurement error[J]. Journal of Marketing, 1981, 18: 39-50.
- [13] 韩立德, 盖钧益, 邱家驹. 应用模糊数学方法评定菜用大豆感官品质[J]. 大豆科学, 2002, 21(4): 274-277.
- [14] 赵风芹, 张淑贞, 张和远. 模糊评价食品的感官质量方法[J]. 食品科学, 1998, 19(4): 43-45.

Observation of Gel Formation from Rabbit Striated Muscle Myosin Molecules

HUANG Hong-bing, XU Xing-lian, ZHOU Guang-hong

(Key Laboratory of Agricultural and Animal Products Processing and Quality Control, Ministry of Agriculture, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Heat induced gels of myosin formed and basis of the adhesiveness in meat products. In our experiment, the manner in which a gel network was formed from rabbit striated muscle myosin molecules was investigated when myosin solution was heated at different temperatures between 30 and 60°C. The aggregates were examined by transmission electron microscopy after negative staining. Molecules after heated at lower temperature (<40°C) denatured and aggregated only slightly; and when heated at higher temperature (>40°C), molecules began to denature and aggregate sharply. Following the higher temperature, it formed from dimer to large aggregations (>500nm). It seemed that head-head linkage predominated the aggregation, whereas tail-tail linkage did not appear in the experiment.

Key words: rabbit; striated muscle; myosin; molecule; Gel; electron microscopy; heating

中图分类号 Q512.2

文献标识码 A

文章编号 1002-6630(2004)07-0047-05

一般认为,高质量加工肉的结合特性来自于可溶性肌原纤维蛋白质的变性和蛋白质凝胶网络形成。这种凝胶网络在决定肉制品的黏结特性和质地,及对水、脂肪及其它组分的保持中,起了相当大的作用。肌原纤维中主要的收缩蛋白质是肌球蛋白和肌动蛋白。肌球蛋白加热会形成凝胶,这种凝胶展示了与肌肉食品系统有关的许多流变学特性^[1]。而单独的肌动蛋白则既不形成凝胶也不显示任何功能性的结合特性。因此,了解肌球蛋白形成凝胶的相关过程及机理,对进一步明确其对重组肉品质形成的贡献,是非常必要的。

肌球蛋白分子是一豆芽状分子,由六条多肽链组成,相对分子量约为470kDa。这六条多肽链包括两条 M_r 200kDa的重链和两对不同的轻链(每条约为15~30kDa)。重链由N-末端的双头球状结构域(头)(约19nm长,8~11nm宽)和C-末端的杆状结构域(尾)组成,头和尾之间是一个柔性的铰链区(颈)。尾部为右手 α 螺旋多肽相互缠绕形成的左手螺旋,称 α 螺旋卷曲(α -helix coiled coil),约为长150nm,直径2nm。多个肌球蛋白分子通过他们尾结构域离子相互作用装配成骨骼肌粗丝(thick filament)^[3]。

关于肌球蛋白凝胶形成机制有许多研究报道。热诱导蛋白凝胶的形成主要分两个阶段:蛋白质的去折叠,并随之凝聚形成三维网状结构。凝胶结构形成过程中,蛋白质去折叠和解聚分子定向影响凝胶结构^[3]。肌球蛋白是一多结构域的蛋白质,且各个结构域之间是相互独立, Bertazzon and Tsong^[4]发现兔骨骼肌肌球蛋白分子在41°C到60°C之间有一熔解(变性)温度范围。Samijima等^[5]结论则为兔骨骼肌肌球蛋白各亚基热吸收转变温度(T_m)为:53°C(S1亚基);52.3°C和58°C(重酶解肌球蛋白,

HMM);45°C和56°C(轻酶解肌球蛋白,LMM);45°C和56°C(杆结构域)。

Matther Walker等^[6]提供了一个重现性较好的肌球蛋白热凝聚负染观察的方法,其关键在于碳膜必须尽量薄(10nm),以减低背景的电子散射干扰、增大反差;同时必须以紫外光照射碳膜处理。Alan Sharp and Gerald Offer^[7]改进了这个试验并对肌球蛋白热凝聚程度进行了观察。鉴于国内相关实验未见报道,本试验侧重于观察同浓度肌球蛋白溶液在不同温度下加热凝聚的情况,以进一步探询分子凝聚的机理,为重组肉制品的加工提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 肌球蛋白的准备

球蛋白为新西兰大白兔的腰肌或半膜肌中提取所得,提取方法参照Nauss^[8]和韩敏义^[9]。保存于0.6mol/L KCl、pH6.0、20mmol/L磷酸缓冲液(PBS)中,环境温度4°C。取7d内提取的肌球蛋白溶液用于电子显微镜试验。以上述缓冲液稀释到200 μ g/ml,然后分别在35、40、45、50、55、60°C,水浴加热30min,然后,用与相应加热处理相同温度的磷酸缓冲液稀释至20 μ g/ml,负染处理后,立即进行电子显微镜形态观察,并同样观察不进行加热处理的肌球蛋白分子的状态。

1.2 电子显微镜观察

电子显微镜 日本电子JEM-100CX II型透射电子显微镜 负染剂 3%磷钨酸重蒸水溶液(PTA);温度 室温。

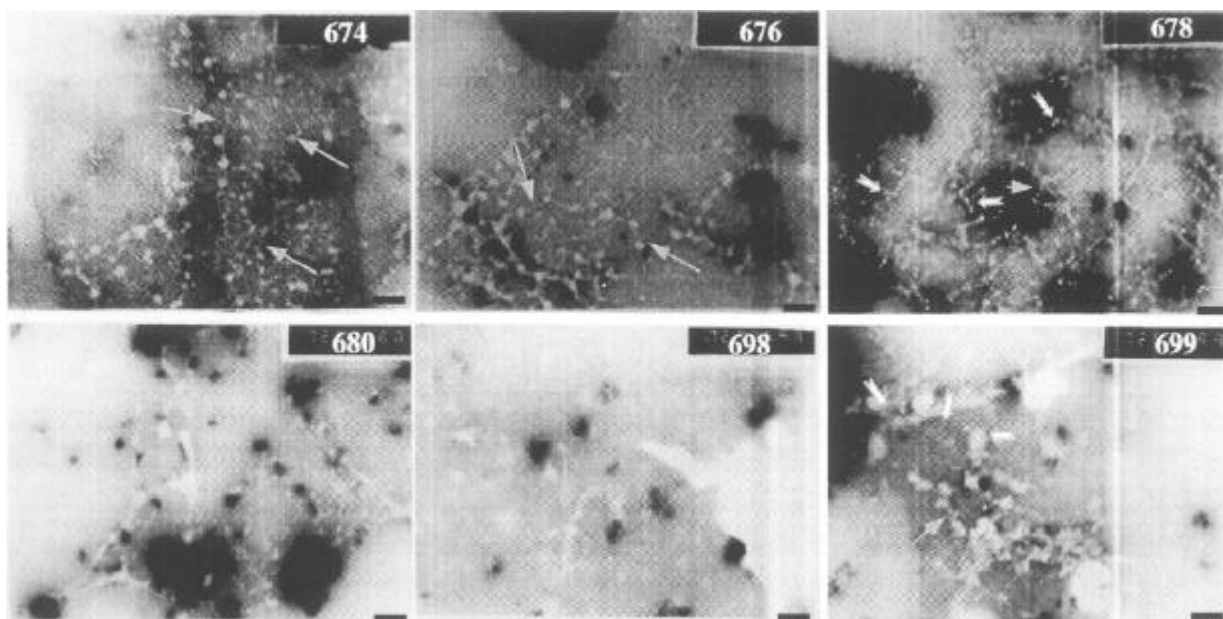
肌球蛋白加热稀释至20 μ g/ml后,采用漂浮法进行负染。首先,滴一滴肌球蛋白样液于蜡板上,立即覆盖铜网(已镀碳膜)于液滴上,具膜的一面接触液滴,时

间30s;用滤纸轻轻接触铜网的边缘,小心吸去多余的液体;稍干后,同法置于PTA液滴上负染2.5min,滤纸吸干多余负染液,置铜网于白炽灯下10min烘干,电镜观察(加速电压:80kV)。

2 结果与分析

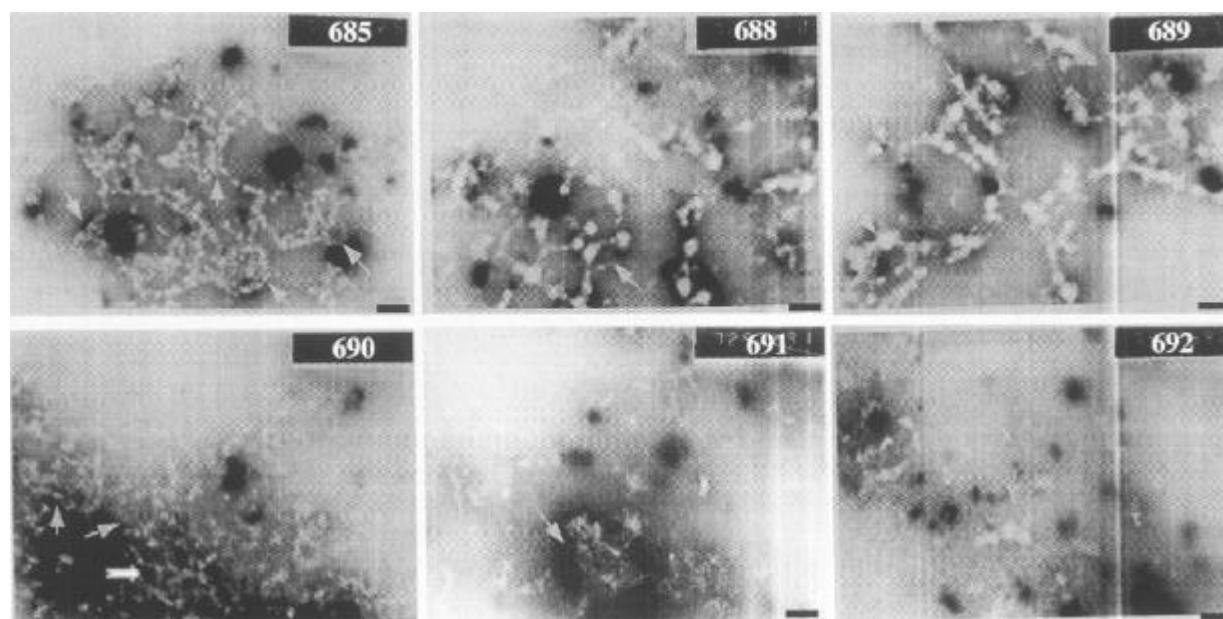
肌球蛋白分子独立存在于缓冲溶液中,头部形状为两个梨形(678)或者两个头合并为一个不规则球状团(674、676、680)。球状团的直径不均匀,总体上显得过大。与此对应的是,尾巴的长度为90~110nm,要小于正常值。

35℃加热30min对肌球蛋白分子的存在状态影响不大(698、699)。观察到肌球蛋白分子完全包围于负染剂



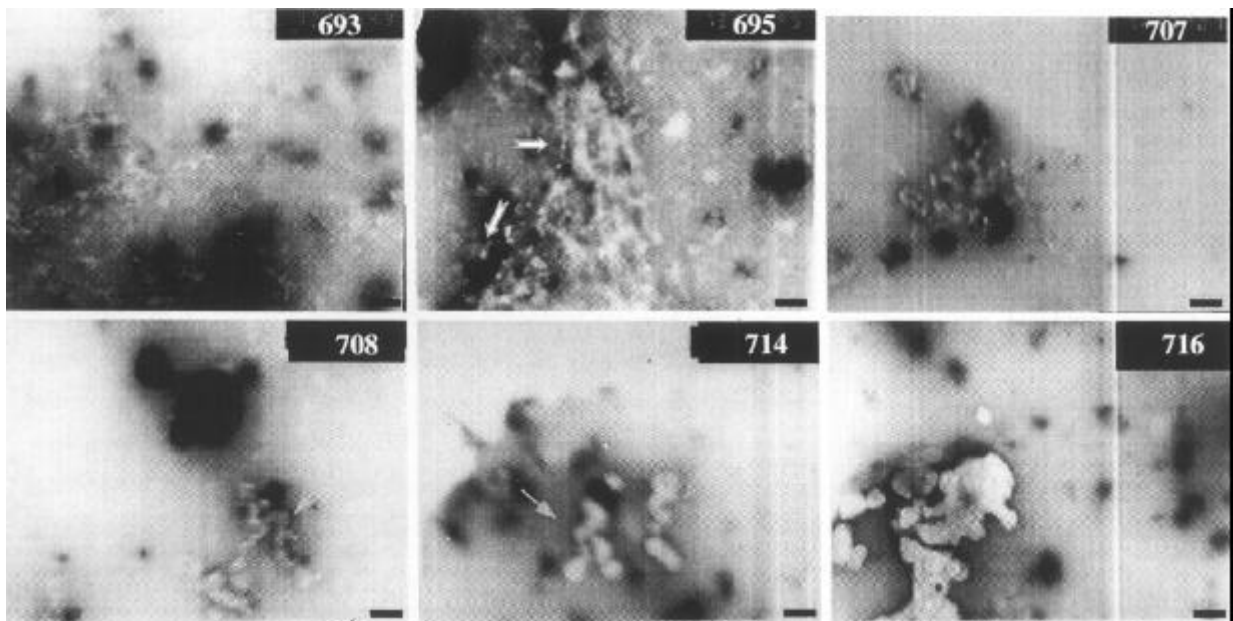
处理条件: 674、676、678、680为不加热组,保存于冰水混合物中;698、699为35℃/30min。单箭头表示两个分子头部连在一起的肌球蛋白分子;双箭头表示具有两个头部的分子。标志条代表100nm。

图1 肌球蛋白分子负染观察



处理条件: 685、688、689为40℃/30min; 690、691、692为45℃/30min。单箭头表示聚合体;双箭头表示两个分子头部连在一起的肌球蛋白分子。标志条代表100nm。

图2 肌球蛋白分子负染观察



处理条件: 693、695 为 50℃/30min; 707、708 为 55℃/30min; 714、716 为 60℃/30min。单箭头表示聚合体; 双箭头表示两个分子头部连在一起的肌球蛋白分子。标志条代表 100nm。

图3 肌球蛋白分子负染观察

中(699), 具有独立的两个头部, 而尾巴则具有三个弯曲, 这与 Matthew Walker 等^[6]的观察比较一致。没有被负染剂完全包围的肌球蛋白分子则舒展开去, 尾部也没有弯曲(698、699)。观察到两个肌球蛋白分子头部连接在一起的倾向, 而两个尾巴则位于相反的方向(699)。

肌球蛋白在经过 40℃/30min 处理后, 很少再以独立的分子形态存在。负染剂吸附于肌球蛋白分子上显示了其清晰的轮廓(685)。分子比较均匀分布于视野中, 且相互之间有凝聚在一起的趋势。这些分子的尾巴都显得很短, 长度甚至小于头部的直径, 有的伸向空的区域(688), 有的则模糊出现于各个分子之间(685)。头部则相互靠得很近, 有的两个分子的头部连接在一起(685、688、689)。

45℃/30min 处理组中, 肌球蛋白分子的形状得到了较好的展示, 负染剂恰当吸附于分子之上, 头部轮廓很清晰(690)。在经过加热处理后, 肌球蛋白分子之间相互凝聚在一起, 形成几个分子较集中的区域(691、692); 分子的尾巴均位于区域内, 有的尾巴位于其他分子的上部。分子的头部显示了比尾部更好的凝聚倾向。分子分布较稀的区域有独立的分子存在(690), 具有一个球状团头部和弯曲的尾巴。

图 695 较好显示了溶液经 50℃/30min 处理后肌球蛋白分子的存在状况。大部分的肌球蛋白分子凝聚在一起(693、695), 同时也有独立的分子位于聚合体的附近, 也有数个分子头部相互连接在一起, 伴随着尾巴向外散射开去。聚合体内可以观察到分子的头部和清晰的尾巴

(695)。

更高温度处理下, 肌球蛋白分子则进一步倾向于凝聚在一起(707、708、714、716)。在 55℃/30min 处理组中, 分子的存在状态类似于 50℃/30min 处理(693), 但是, 没有独立的分子存在, 他们几乎全部聚集在一个区域内, 以类聚合物的形态存在(708)。而 60℃/30min 处理中, 聚合物的直径达到 500nm 以上, 分子的聚合则显得更彻底, 既没有独立的肌球蛋白分子, 聚合物内的肌球蛋白分子也不再是很松散的状况, 而是很紧密, 甚至有层次结构。肌球蛋白分子的头部由于结构吸附更多的负染剂而显得亮于周围区域, 球状轮廓在聚合物内清晰可见, 但是观察不到尾巴的存在(716)。

3 讨论

在本试验中, 我们的目的是探寻在加热处理后肌球蛋白分子变化的过程。在极稀的溶液中, 肌球蛋白分子能够以单分子层覆盖于铜网碳膜上, 由于负染剂的吸附而被观察到。在 0.6mol/L KCl、pH6.0、20mmol/L 的磷酸缓冲液中, 肌球蛋白以单分子状态存在, 这与 M. Wick^[10]的结论是一致的。以磷钨酸作负染剂, 可以观察到分子有两个独立的梨形头部, 也有分子的头部聚合在一起形成不规则的球状团。负染剂的吸附影响了分子的形态, 使得球状头部显得过大(674、676、680), 尾巴偏小; 同时, 也影响寻找较高温度处理中分子头部之间确切的相互作用。

在 35℃ 的处理中肌球蛋白分子仍能以两个单独头部

存在,而在40℃的处理中则不再存在,这表明:一是头尾连接处的颈可以自由旋转^[11,12],因为在35℃条件下,分子内的作用力还没破坏^[13,14];二是两个头部的ATP酶活力并没有完全失活,尽管ATP酶活力与两个头部的凝聚并没有对等关系,但其影响了头部的存在状态^[14]。即使在图690(45℃/30min处理)中也仍然可以观察到独立的肌球蛋白分子存在,并且其头部并没有非常明显的凝聚倾向,说明分子还没有完全变性。

当加热温度升高到40℃以上,开始出现分子之间凝聚形成的聚合体。聚合体主要是以分子间头部连接形成的。这说明分子已经部分变性,由于疏水区域的暴露而团聚,尾巴参与了聚合体的形成,可见数目减少,长度变得更短,这也可能与有关轻链脱离有关^[15]。肌球蛋白分子有四个独立的协作热吸收转变温度(T_m)47、54、57、63℃,且凝聚的温度范围为50~70℃^[3]。处理温度升高至50℃以上后,聚合体形成加剧,形成高密度的区域。同时,聚合体之间有了进一步团聚的倾向,它们或是相距很近或是已经连接在一起。这与Alan Sharp and Gerald Offer^[7]结果有一定的一致性。

根据Anne B. Smyth^[3]等的结果,肌球蛋白分子在高于60℃的温度下仍有变化,但对凝聚并不会起到促进作用。在60℃下分子的变性凝聚似乎已经完成,更高的温度带来的是聚合物和聚合物之间形成更大的聚合物,或者是更多分子的参与形成更大的聚合体。另一方面,加热温度过高,肌球蛋白分子各结构域会解离,对凝胶网络的形成则起相反的作用。

关于尾部在肌球蛋白网络形成中的作用,还有待进一步的研究探索,以确定分子之间是如何形成三维网络结构,参与肉制品品质形成的。

参考文献:

- [1] Choe I Morita, J Yamamoto, et al. Heat induced gelation of myosins/subfragments from chicken leg and breast muscles at high ionic strength and low pH[J]. J Food Sci, 1991, 56: 884-889.
- [2] 王镜岩,朱圣庚,徐长法. 生物化学[M]. 北京:高等教育出版社,2002. 218-220.
- [3] Anne B Smyth, Deise M Smith, Virginia Vega-Warner, et al. Thermal denaturation and aggregation of chicken breast muscle myosin and subfragments[J]. J Agric Food Chem, 1996, 44: 1005-1010.
- [4] Bertazzon A, Tsong TY. High resolution differential scanning calorimetric study of myosin, functional domains and supramolecular structures[J]. Biochemistry, 1989, 28: 9784-9790.
- [5] Samejima K, Ishioroshi M, Yasui T. Scanning calorimetric studies on thermal denaturation of myosin and its subfragments[J]. Agric Boil Chem, 1983, 47: 2373-2389.
- [6] Matthew Walker, Pete Knight, John Trinick. Negative staining of myosin molecules[J]. J Mol Biol, 1985, 184: 535-542.
- [7] Alan Sharp, Gerald Offer. The mechanism of formation of gels from myosin molecules[J]. J Sci Food Agric, 1992, 58: 63-73.
- [8] Nauss KM, Kitagawa, S Gergely J. Pyrophosphate binding to and adenosine triphosphate activity of myosin and its proteolytic fragments[J]. J Biol Chem, 1969, 244(3): 755-765.
- [9] 韩敏义. 兔骨骼肌肌球蛋白浊度、溶解度及热诱导凝交强度研究[D]. 南京农业大学硕士学位论文, 2003, 11-18.
- [10] M Wick. Filament assembly properties of the sarcomeric myosin heavy chain, research and review: meat, special circular[M]. Bulletin of the Ohio State University Department of Animal Science, 172-199.
- [11] Arthur Elliott, Gerald Offer. Shape and flexibility of the myosin molecule[J]. J Mol Biol, 1978, 123: 505-519.
- [12] Peter Knight, John Trinick. Structure of the myosin projection on native thick filaments from vertebrate skeletal muscle[J]. J Mol Biol, 1984, 177: 461-482.
- [13] 天野庆. 肉制品加工手册[M]. 金辅妍, 薛西, 译. 北京: 中国轻工业出版社, 2000. 344-347.
- [14] Offer G, Purslow P, Almond R, et al. The structural basis of Water-holding, toughness and appearance of meat[J]. Food Microstructure, 1989, (8): 151-170.
- [15] Dreizen P, Richards DH. Studies on the role of light and heavy chains in myosin adenosine triphosphatase[J]. Cold Spring Harbor Symp Quant Bio, 1973, 37: 29-45.

英国发现鉴别香米真伪的新方法

英国雷丁科学服务公司(RSSL)的科学家找到了一种可靠的DNA检测方法,可以鉴别巴斯马蒂白香米的真伪。

巴斯马蒂白香米的米粒中含有百万分之零点零九的化学物质乙酰基吡咯啉(2-acetyl-1-pyrroline),其含量比非香型稻米品种高大约12倍,所以使巴斯马蒂白香米具有独特的香味。

新方法可以用来鉴别所有巴斯马蒂白香米的商业品种,并能够保证大米标签的准确度,使供应商和消费者都放心。