

鲢肌球蛋白热诱导的凝胶化温度

刘海梅^{1,2}, 熊善柏^{2*}, 张丽³, 彭鸽¹

(1. 鲁东大学食品工程学院, 山东 烟台 264025;

2. 华中农业大学食品科技学院, 湖北 武汉 430070;

3. 鲁东大学生命科学学院, 山东 烟台 264025)

摘要:为了研究鲢鱼糜凝胶化温度与肌球蛋白热稳定性的关系,测定经不同凝胶化温度处理的鱼糜凝胶特性,利用浊度法检测鲢肌球蛋白溶液聚集体的形成过程,并采用圆二色谱仪、差式量热扫描仪分别对鲢肌球蛋白溶液的 α -helix结构变化和热变性温度进行测定。结果表明,鲢鱼糜的适宜凝胶化温度为40℃,肌球蛋白的聚集速率在39℃、51℃、54℃3个温度点时出现大幅度增加,其中39℃时聚集速率最快;肌球蛋白 α -helix在40℃、55℃时大量解旋成无规卷曲结构,40℃时解旋速率最快;肌球蛋白存在两个变性温度43.32℃和51.59℃。鲢鱼糜凝胶化温度与肌球蛋白 α -helix的第一个解旋温度和第一个变性峰值温度点相对应,凝胶化温度实质上是肌球蛋白的第一个变性峰值温度点。

关键词:鲢;肌球蛋白;凝胶化温度;变性;构象

中图分类号:TS 254; S 917

文献标识码:A

凝胶化温度是影响鱼糜凝胶形成的关键因素,既可以激活转谷氨酰胺酶(TGase)催化肌球蛋白重链(myosin heavy chain, MHC)交联引发凝胶化,又可以激活组织蛋白酶引发凝胶劣化^[1-7]。Kamath等^[7]认为TGase对MHC的交联作用依赖于一定温度下肌球蛋白的构象。因此,凝胶化温度与肌球蛋白构象的变化存在一定对应关系。不同鱼种的凝胶化温度不同,太平洋梅童鱼和阿拉斯加狭鳕的适宜凝胶化温度分别为40℃、25℃^[8]。Benjakul^[9]比较了不同环境温度下生长鱼种的鱼糜凝胶化温度,提出鱼糜的凝胶化温度是由肌球蛋白的热稳定性决定的。由此可见,研究肌球蛋白的构象变化及其热稳定性可为鱼糜凝胶化温度的确立提供理论依据。

为此,本文在确定鲢鱼糜最适宜凝胶化温度的基础上,对其肌球蛋白的构象变化及热变性温度进行研究,以期获得凝胶化温度与肌球蛋白热稳定性之间的关系。

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂

新鲜鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)购于农贸市场,体重(1 500±100)g,体长(56±5)cm。

KCl(上海科昌精细化学品公司);NaN₃(Amresco分装); β -巯基乙醇(上海化学试剂总厂);醋酸镁(天津市双船化学试剂厂);乙二醇-双-(2-氨基乙基)四乙酸(国药集团化学试剂有限公司);ATP(Amresco分装)。

1.2 主要实验仪器

204F1 Phoenix[®]型差示扫描量热仪:德国耐驰公司;J-810圆二色光谱仪:日本分光(JASCO)公司。

1.3 实验方法

鲢肌球蛋白的提取 按照参考文献[10]的方法。

鱼糜凝胶的制备 按照参考文献[11]的方法制备。

鱼糜凝胶特性的测定 在室温下用 TA-XTPplus 质构分析仪 (Stable Micro System, Surrey, UK) 进行破断测试。采用直径为 1/2 英寸的球型探头穿刺样品 (20 mm 直径 × 20 mm 长) 至 15 mm 处, 穿刺曲线上的第一个峰值即为破断强度。凝胶强度为破断强度与破断距离之积。

肌球蛋白溶液浊度的测定 按照参考文献[12]测定。将肌球蛋白溶液稀释到 2 mg/mL, 进行程序升温处理, 测定不同温度下肌球蛋白溶液在 320 nm 处的吸光度值 (OD_{320nm}), 即为肌球蛋白溶液的浊度。

肌球蛋白圆二色谱的测定 采用 J-810 圆二色光谱仪 (日本 JASCO 公司), 选用光径为 0.1 cm 的石英样品池, 在远紫外区 (190 ~ 240 nm) 对

浓度为 0.119 0 mg/mL (pH 7.5) 的肌球蛋白进行扫描, 得出远紫外 CD 光谱后, 用计算机模拟得出 α -螺旋、 β -折叠、转角和无规卷曲二级结构单元的百分含量。圆二色性用平均残基椭圆值 [θ] 表示, 单位为度·平方厘米/分摩尔 ($deg \cdot cm^2/dmol$)。

肌球蛋白热特性 (DSC) 的测定 称取 7.2 mg 肌球蛋白溶液, 置于铝坩锅中, 铝坩锅液压密封, 以空铝坩锅作为空白, 在差示扫描量热仪 (德国耐驰公司) 中对样品进行差示量热扫描。扫描速率为 3 $^{\circ}C/min$ 。

2 结果

2.1 鲢鱼糜的凝胶化温度

选取 30 $^{\circ}C$ 、40 $^{\circ}C$ 、50 $^{\circ}C$ 作为鲢鱼糜的凝胶化温度。经不同凝胶化温度处理制得鱼糜凝胶的凝胶特性及方差分析结果见表 1。

表 1 凝胶化温度对鲢鱼糜凝胶特性的影响

Tab. 1 Effect of setting temperature on surimi gel properties from silver carp

凝胶化温度 ($^{\circ}C$) setting temperature	鲢鱼糜凝胶特性 surimi gel properties from silver carp		
	破断强度 (g) breaking force	凹陷深度 (mm) deformation	凝胶强度 (g·mm) gel strength
30	428.67 \pm 27.13 ^b	8.24 \pm 0.25 ^a	3 900.27 \pm 311.47 ^b
40	554.29 \pm 65.84 ^a	9.10 \pm 0.50 ^a	4 570.71 \pm 562.44 ^a
50	463.60 \pm 8.80 ^b	8.80 \pm 0.93 ^a	4 069.48 \pm 414.60 ^b

注: 同一列中字母不同者表示有显著性差异 ($P \leq 0.05$)。

Notes: Different letters in same column indicate significant differences ($P \leq 0.05$).

由表 1 可知, 40 $^{\circ}C$ 下鲢鱼糜凝胶的破断强度和凝胶强度显著高于 30 $^{\circ}C$ 、50 $^{\circ}C$ 的 ($P \leq 0.05$), 而凹陷深度与 30 $^{\circ}C$ 、50 $^{\circ}C$ 的差异不大 ($P > 0.05$)。经 40 $^{\circ}C$ 凝胶化制得的鲢鱼糜凝胶的破断强度、凝胶强度分别高达 554.29、4 570.71 g·mm。由以上结果可知, 在选定的 3 个温度下, 鲢鱼糜的最适宜凝胶化温度为 40 $^{\circ}C$ 。

2.2 鲢肌球蛋白溶液浊度的变化

将鲢肌球蛋白溶液由 20 $^{\circ}C$ 程序升温至 80 $^{\circ}C$, 肌球蛋白溶液的浊度随温度变化的曲线及浊度的增长速率曲线如图 1 所示。

由图 1 可以看出, 肌球蛋白溶液的浊度在 30 ~ 80 $^{\circ}C$ 温度区间内逐渐增加, 表明肌球蛋白的聚集程度不断增加。肌球蛋白溶液的浊度分别在 39 $^{\circ}C$ 、51 $^{\circ}C$ 、54 $^{\circ}C$ 3 个温度点出现大幅度增加, 其中 39 $^{\circ}C$ 时增加速率最快, 其浊度增长速率为其余两个浊度突变温度点的 3 倍, 说明 39 $^{\circ}C$ 时肌球

蛋白的聚集最快。

2.3 鲢肌球蛋白 α -helix 结构的变化

加热过程中鲢肌球蛋白 α -helix 结构的变化如图 2 所示。由图 2 可知, 随加热温度的逐渐上升, α -helix 含量逐渐降低, 其中 30 ~ 60 $^{\circ}C$ 温度范围内 α -helix 含量下降速率最大, 其余温度范围内变化缓慢, 表明鲢肌球蛋白二级结构变化的敏感温度区在 30 ~ 60 $^{\circ}C$ 范围。 α -helix 含量由加热前的 94.11% (5 $^{\circ}C$), 减少到 90 $^{\circ}C$ 的 34.55%, α -helix 解旋量达 59.55%, 表明鲢肌球蛋白尾部随温度上升而逐渐伸展。肌球蛋白的 α -helix 有两个明显的转变温度, 分别为 40 $^{\circ}C$ 、55 $^{\circ}C$, 其中 40 $^{\circ}C$ 时 α -helix 含量下降速率最快。鲢肌球蛋白溶液浊度的变化结果表明, 肌球蛋白在 39 $^{\circ}C$ 时聚集速率最快, 由此可知, 肌球蛋白在 39 $^{\circ}C$ 时浊度的快速增加是由肌球蛋白 α -helix 解旋, 肌球蛋白分子相互作用聚集引起的。在 54 $^{\circ}C$ 时肌球蛋白浊

度的较大幅度增加也与肌球蛋白在 55 °C α -helix 的明显下降对应。浊度随 α -helix 解旋而增加表明肌球蛋白的变性和聚集是同时进行的,肌球蛋白的变性伸展引起了肌球蛋白分子的聚集。鲢肌球蛋白 α -helix 的解旋温度在 40 °C 最为明显,与鲢鱼糜的适宜凝胶化温度 40 °C 一致。阿拉斯加狭鳕的 α -helix 结构也有两个转变温度分别为

28.2 °C 和 41.3 °C^[13],其适宜凝胶化温度为 25 °C。金线鱼肌球蛋白 α -helix 的两个解旋温度分别为 36.1 °C、47.9 °C,其适宜凝胶化温度为 40 °C^[14]。由此可以推测,鱼糜凝胶化温度与肌球蛋白 α -helix 的第一个解旋温度相对应,肌球蛋白尾部 α -helix 的第一个解旋温度即为鱼糜的适宜凝胶化温度。

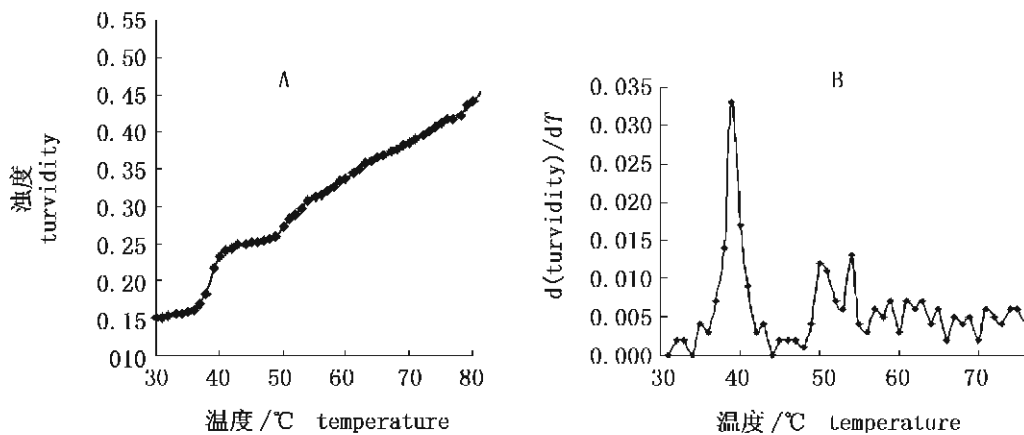


图1 加热温度对肌球蛋白溶液浊度和 d(turbidity)/dT 的影响
Fig.1 Effect of heating temperature on turbidity and d(turbidity)/dT of myosin

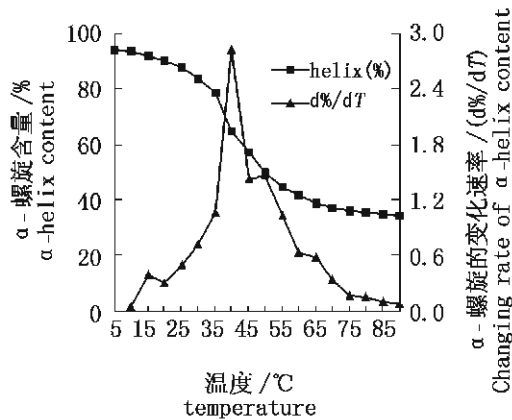


图2 加热过程中肌球蛋白 α -helix 结构的变化
Fig.2 The change of α -helix of myosin during heating

2.4 鲢肌球蛋白的热变性温度

采用差示量热扫描仪 (differential scanning calorimeter, DSC) 测定鲢肌球蛋白的热变性温度,其 DSC 图谱如图 3 所示。

由图 3 可知,肌球蛋白有两个变性峰,第一个变性峰值温度为 43.32 °C,第二个变性峰值温度为 51.59 °C。第一个变性峰值温度与鲢鱼糜凝胶

化温度 40 °C 相对应。结合肌球蛋白 α -helix 结构的两个解旋温度可知, α -helix 的第一个解旋温度 40 °C 对应于肌球蛋白第一个变性峰值温度点,而第二个解旋温度 55 °C 对应于肌球蛋白第二个变性峰值温度点。由此可知,鲢鱼糜的凝胶化温度实质上为肌球蛋白第一个变性峰值温度点。

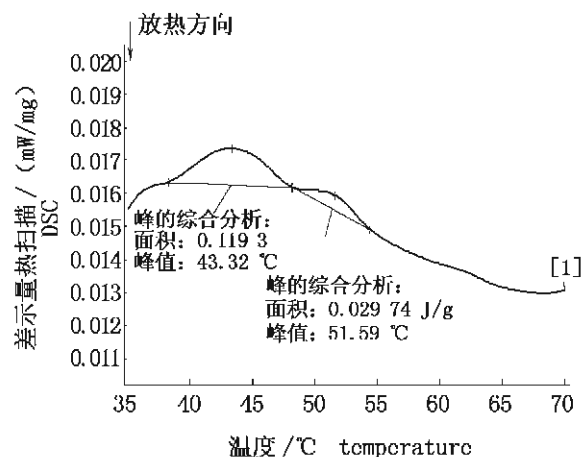


图3 肌球蛋白的 DSC 图谱
Fig.3 DSC graph of myosin

3 讨论

3.1 鲢鱼糜凝胶化温度与肌球蛋白的热稳定性

鲢鱼糜的凝胶化温度为 40 ℃, 实质上是肌球蛋白的第一个变性峰值温度点, 此结果验证了 Benjakul^[9] 等所提出的结论。浊度变化、 α -helix 结构变化及热变性温度均显示, 除了在 40 ℃ 处有一转变温度点外, 在 50 ℃ 以上也存在转变温度点, 而凝胶化温度却在 40 ℃。这可能与组织蛋白酶活性有关, 一般认为 50~65 ℃ 时组织蛋白酶活性较高, 易引发凝胶劣化。因此, 适宜的凝胶化温度出现在 40 ℃ 而不是 50 ℃ 以上。刘海梅等^[11] 研究发现, 经 40 ℃ 凝胶化后内源 TGase 催化 MHC 交联形成非二硫共价键, 且 α -helix 结构转变形成了无规卷曲结构。由此推测, 无规卷曲结构是 TGase 催化 MHC 交联的优势结构。

3.2 肌球蛋白头部和尾部的变性

鲢肌球蛋白由头部和尾部两部分组成, 尾部呈螺旋状, 头部为球状。肌球蛋白轻链(MLC)存在于肌球蛋白三级结构的头部位置, 而 MHC 则分布在头部和尾部。MHC 以 α -helix 结构的形式存在, 而 MLC 主要以无规卷曲结构的形式存在。鲢肌球蛋白两个变性温度 43.32 ℃、51.59 ℃, 与肌球蛋白 α -helix 结构的两个转变温度点分别对应。因此推测肌球蛋白头部和尾部不是同时变性的, 头部和尾部 α -helix 的解旋也不是同时的, 而是存在先后顺序。TGase 催化 MHC 交联的适宜凝胶化温度为 40 ℃, 且 MHC 主要存在于肌球蛋白的尾部, 由此可以推测肌球蛋白的第一个变性峰是由尾部变性引起, 而第二个变性峰是由头部变性引起。

参考文献:

- [1] Folk J E, Chung S I. Molecular and catalytic properties of transglutaminase[J]. *Advances in Enzymology*, 1973, 38:109-191.
- [2] Kimura I M, Sugimoto M, Toyoda K, et al. A study on the cross-links reaction of myosin in kamaboko "suwari" gels [J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1991, 57(7): 1386-1389.
- [3] Kishi, H, Nozawa H, Seki N. Reactivity of muscle transglutaminase on carp myofibrils and myosin B [J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1991, 57(6): 1203-1210.
- [4] Haejung A, Margo Y P, Thomas A S. Roles of endogenous enzymes in surimi gelation[J]. *Trends in food science & Technology*, 1996, 7(10): 321-327.
- [5] Yongsawatdigul J, Piyadhamviboon P. Inhibition of autolytic activity of lizardfish surimi by proteinase inhibitors [J]. *Food Chemistry*, 2004, 87(3): 447-455.
- [6] Hu Y Q, Morioka K, Itoh Y. Hydrolysis of surimi paste from walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) by cysteine proteinase cathepsin L and effect of the proteinase inhibitor (E-64) on gelation[J]. *Food Chemistry*, 2007, 104(2):702-708.
- [7] Kamath G G, Lanier T C, Foegeding E A, et al. Nondisulfide covalent cross-linking of myosin heavy chain in "setting" of Alaska pollock and Atlantic croaker surimi[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 1992, 16(3): 151-172.
- [8] Joseph D, Lanier T C, Hamann D D. Temperature and pH affect transglutaminase-catalyzed "setting" of crude fish actomyosin [J]. *Journal of Food Science*, 1994, 59(5): 1018-1023.
- [9] Benjakul S, Visessanguan W, Chantarasuwan C. Effect of high-temperature setting on gelling characteristic of surimi from some tropical fish[J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 2004, 39(6): 671-680.
- [10] Park J W, Lanier T C. Scanning calorimetric behavior of Tilapia myosin and action due to processing of muscle and protein purification[J]. *Journal of Food Science*, 1989, 54(1): 49-51.
- [11] 刘海梅, 熊善柏, 谢笔钧, 等. 鲢鱼糜凝胶形成过程中化学作用力及蛋白质构象的变化[J]. *中国水产科学*, 2008, 15(3):469-475.
- [12] Xiong Y L, Blanchard S P. Myofibrillar gelation: viscoelastic changes related to heating procedures [J]. *Journal of Food Science*, 1994, 59(4): 734-738.
- [13] Togashi M, Kakinima M, Nakaya M, et al. Differential scanning calorimetry and circular dichroism spectrometry of walleye pollack myosin and light meromyosin [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 50(17): 4803-4811.
- [14] Yongsawatdigul J, Park J W. Thermal denaturation and aggregation of threadfin bream actomyosin [J]. *Food Chemistry*, 2003, 83(3): 409-416.

Studies on heat-induced setting temperature of myosin from silver carp

LIU Hai-mei¹, XIONG Shan-bai^{2*}, ZHANG Li³, PENG Ge¹

(1. College of Food Engineering, Ludong University, Yantai 264025, China;

2. College of Food Science and Technology, Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070, China;

3. College of Life Science, Ludong University, Yantai 264025, China)

Abstract: In order to study the relationship between silver carp surimi gelling temperature and thermal stability of myosin, surimi gel properties treated with different gelling temperature, formation of myosin solution aggregates, α -helix structure change and thermal denaturation temperature of myosin solution were determined respectively. The results were as follows: The suitable gelling temperature of silver carp surimi was 40 °C. The aggregation rate of myosin increased greatly at 39 °C, 51 °C, 54 °C, and the maximum aggregation rate was at 39 °C. Myosin α -helix unwinded largely to random crimp structure at 40 °C and 54 °C, and the maximum unwinding rate was at 40 °C. There are two myosin denaturation temperatures of 43.32 °C and 51.59 °C. Silver carp surimi gelling temperature was relative to the first unwinding temperature and denaturing peak temperature of myosin α -helix. The gelling temperature is essentially the first denaturing peak temperature of myosin.

Key words: *Hypophthalmichthys molitrix*; myosin; setting temperature; denaturation; conformation

Corresponding author: XIONG Shan-bai. E-mail: xiongsb@mail.hzau.edu.cn