酸溶条件及高强度超声波对鲢鱼肉分离蛋白的提取及凝胶特性的影响

田金河[1]，张艳芳[1]，王艳婕[2]，李文明[1]，张雨[3]
（1.新乡学院生命科学技术学院，河南新乡 453003）（2.河南科技学院生命科技学院，河南新乡 453003）
（3.湖北工业大学生物工程与食品学院，湖北武汉 430068）

摘要：研究了不同酸溶条件（鱼肉匀浆液的 pH 值）和高强度超声波（High Intensity Ultrasonic treatment, HIU）对酸溶等电点沉淀法鲢鱼肉分离蛋白（protein isolate, PI）的提取、蛋白组成以及凝胶特性的影响。数据显示：降低 pH 能显著提高蛋白回收率（由 pH 4.0 到 3.0，提高了 21.11%），但 pH<3.0 时，进一步降低 pH 对蛋白回收率不再有提高作用；HIU 显著提高了蛋白回收率（pH 3.0 时，提高了 3.77%）；PI 中以肌原纤维蛋白为主，pH 降低能够显著减少等电点处可溶性中等分子蛋白种类及浓度，而 HIU 对此影响不大。pH 降低和 HIU 均会增加 PI 凝胶亮度（89.24→94.25）和白度（83.24→88.45）。HIU 显著提高了 PI 凝胶硬度（1531.74→1756.24 g），降低 pH 能够提高 PI 凝胶硬度（1162.55→1683.41 g），但当 3.0 后，作用不显著。pH 低于 4.0 时，pH 变化和 HIU 对 PI 凝胶弹性无显著影响（0.792~0.823）。降低 pH 和 HIU 引起 PI 凝胶蒸煮损失率的显著增加（2.05%→4.43%）。结论：极酸 pH（pH<3.0）并不会提高蛋白回收率，且对 PI 凝胶特性无益。采用 pH 3.0 的酸溶条件并辅以 HIU，能够得到最高的蛋白回收率及最优的 PI 凝胶特性。

关键词：酸溶等电点沉淀法；超声波；提取；蛋白；凝胶
文章篇号：1673-9078(2019)12-232-240 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.12.030

Recovery and Gelation Property of Protein Isolate from Silver Carps (*Hypophthal michthys molitrix*) as Affected by pH and High Intensity Ultrasonic Treatment

TIAN Jin-he[1], ZHANG Yan-fang[1], WANG Yan-jie[2], LI Wen-ming[1], ZHANG Yu[3]
(1.School of Life Science and Technology, Xinxiang University, Xinxiang 453003, China)
(2.School of Life Science and Technology, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China)
(3.School of Food and Biological Engineering, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China）

Abstract: Effects of Gradient acid pH and high intensity ultrasonic treatment (HIU) were combined with isoelectric solubilization/ precipitation (ISP) process on the extraction process, protein profile and functionality of the protein isolate (PI) from gutted silver carps without head were investigated. The pH reduction significantly raised the protein recovery of PI by 21.11% from pH 4.0 to 3.0, but further decrease did not affect any more. HIU could significantly increase the protein recovery by 3.77% at pH 3.0. PIs from all extraction combination methods were primarily composed of myofibril protein, and pH reduction significantly decreased the small molecular protein amount and type in supernatant of the 2nd centrifugation, but HIU showed little effect on it. The pH reduction or HIU increased the lightness (from 89.24 to 94.25) and whiteness (from 83.24 to 88.45) of PI gel. HIU significantly increased the PI gel hardness (from 1531.74 to 1756.24 g). The pH reduction from 4.0 to 3.0 elevated the gel hardness (from 1162.55 to 1683.41 g) significantly, but further decrease did not show any effect. The springiness of the PI gel decreased when solubilization pH decreased from 4.0 to 3.5, but further decease had no effect on this index (0.792~0.823), and HIU did not show any effect on it. The cooking loss of the PI gel increased significantly as solubilization pH decreasing and HIU aiding (from 2.05% to 4.43%). Conclusion: over acid pH (pH<3.0) did not increase the protein recovery and improve the gel property. Aided by HIU, highest protein recovery and best gel property could be obtained by solubilization of pH 3.0 in ISP process.

收稿日期：2019-09-01
基金项目：农业部大宗粮食加工重点实验室开放基金（DZLS201710）；新乡学院科技创新团队（XXUTD20170107）；新乡学院博士科研启动基金（1366020058）
作者简介：田金河（1977-），男，博士，讲师，研究方向：肉类分离蛋白

Key words: isoelectric solubilization/precipitation; ultrasonic; protein; recovery; gelation

鲢鱼（Silver Carp，*Hypophthal michthys molitrix*）具有抗病能力强，繁殖快等特征[1]，是目前人类饲养量最大的淡水鱼类。但鲢鱼肉刺多，腥味重，这使其鲜销受到严重影响，目前多用作鱼糜生产的原料[2]。由于鱼糜生产工艺繁琐，耗费淡水并产生大量废水，且浪费可溶性蛋白，因而应用前景不佳[3]。近年来出现的酸碱溶解/等电点沉淀（Isoelectric solubilization/precipitation，ISP）法，工艺简单，蛋白回收率高，环境友好，所提取分离蛋白保持了良好的凝胶特性，引起了国内外水产界的广泛关注[3,4]。Taskaya 等人采用碱溶 ISP 法获得了纯度达到 95%的鲢鱼肉分离蛋白（Protein Isolate，PI），并且可将原料中 97%的脂肪分离[5]。Shi 等人利用碱溶 ISP 法可将鲢鱼原料中的约 55%的蛋白提取回收，并将约 96%的脂肪分离[6]。Fu 等[7]人的研究结果表明，ISP 法鲢鱼肉 PI 保持了良好的凝胶形成能力，其制备的凝胶硬度和变形度均优于传统水洗法鱼糜。Paker 等人研究了两种有机酸作为调酸手段对 ISP 法鲢鱼肉 PI 提取的影响，发现乙酸或蚁酸乳酸混合酸均能够有效地将蛋白提取回收和将脂肪分离，并且与鲢鱼原料相比，所得 PI 中的钠元素含量会有所增加，而钙、磷、锰及铁元素的含量会显著降低[8]。付湘晋等人研究发现碱溶 ISP 法所得鲢鱼肉 PI 在碱性条件下的水溶性与盐溶特性均优于传统水洗法鱼糜，而酸溶 ISP 法 PI 的盐溶特性则低于传统水洗法鱼糜，但其乳化稳定性则优于其它两种蛋白[9]。孙月娥等人对比了酸溶和碱溶 ISP 法鲢鱼肉 PI 以及传统水洗法鱼糜蛋白的凝胶功能特性，发现碱溶 ISP 法 PI 具有最优的凝胶功能特性，其次是鱼糜蛋白，酸溶 ISP 法 PI 最差[10]。虽然上述研究都是围绕着 ISP 法 PI 的提取、组成及功能特性进行研究，但多是针对固定的溶解条件（鱼肉匀浆液的 pH 值）条件进行，忽略了不同的 pH 对 PI 的提取效率以及功能特性影响。

高强度超声波（High Intensity Ultrasonics treatment，HIU）是一种的无毒、环保、安全的工程技术，该技术基于其空化和微射流效应[11]，能够促进溶液中物质与能量的交换效率。许多研究发现 HIU 能有效提高食品功能性成分的提取效率[12-15]，但未见 HIU 对 PI 提取影响的相关研究。

因此，本文以去头去内脏鲢鱼（含骨、刺、皮、鳞、鳍及尾）作为原料，采用不同 pH 和 HIU 组合的酸溶 ISP 法提取 PI，对提取参数以及所得 PI 的蛋白组成、颜色及凝胶特性进行研究，以期为 ISP 法 PI 产业化提供理论数据支持。

1 材料与方法

1.1 原料、试剂与仪器

去头去内脏鲢鱼，新乡市洪门农贸市场；所有涉及化学试剂均为分析纯。

HLQ-8 斩拌机/HFM 型绞肉机，安徽华菱西厨装备股份有限公司；新芝 JN-IID 超声波细胞破碎机，宁波新芝生物科技股份有限公司；Neofuge18R 台式高速冷冻离心机，上海力申科学仪器有限公司；FJ-200 高速分散均质机，上海标本模型厂；FiveEasy Plus pH 计/LE438 电极，瑞士 METTLER TOLEDO 公司；Invitrogen 电泳分离系统，美国 ThermoFisher Scientific 公司；T6 紫外可见分光光度计，北京普析通用仪器有限责任公司；NH310 色差计，深圳市三恩时科技有限公司；TA.XTC 质构仪，上海保圣实业发展有限公司。

1.2 原材料处理

取新鲜活鲢鱼（2000~2500 g/条）宰杀后，去除鱼头及内脏并清洗干净，之后利用斩拌机将鱼体斩碎，得到粒径小于 1 cm 的肉碎。对于肉碎中无法斩碎的脊柱大骨，手工取出。所得肉碎再通过绞肉机（配备ϕ3 mm 孔板）处理成为均匀的肉糜（含普通鱼骨、刺、皮、鳞、鳍、尾等），再将肉糜分装进小袋，速冻（0.5 h 内降温至-18 ℃），之后于-18 ℃保存。肉糜样品保存时间不超过 3 个月。

1.3 HIU 辅助酸溶 ISP 法提取 PI 步骤

提取方法参照田金河[16]等人的方法稍作修改。冷冻肉糜于室温解冻 20 min 后，加入 9 倍体积的 0 ℃去离子水，均质 120 s（探头ϕ 20 mm，转速 20000 r/min）获得肉糜匀浆液。之后，在聚四氟乙烯搅拌头（ϕ 50 mm）搅拌条件下（200 r/min），向匀浆液中加入 HCl 溶液（2 mol/L，下同），将其 pH 分别调节至 2.0，2.5，3.0，3.5 或 4.0，之后继续搅拌 5 min。搅拌结束后，将匀浆液放入超声波细胞破碎机内进行 3 min HIU（ϕ18 mm 变幅杆，3/2 s 工作/间歇，频率 20 kHz，振幅 60%，功率 900 W）。之后将匀浆液在 12000 g 离心力，4 ℃条件下离心 10 min。离心后将上层脂肪及下层沉淀（此为一次沉淀）分离，用 NaOH 溶液（2 mol/L，下同）将处于中间层的酸溶蛋白质溶液 pH 调节至等电点（pH 5.5），之后将所得到的等电点蛋白质悬浊液离心，所得沉淀即为 PI。

对于不进行 HIU 的提取条件，则在匀浆液 pH 调节至 2.0，2.5，3.0，3.5 或 4.0 并搅拌 5 min 后，将匀浆液直接离心 10 min（12000 g，4 ℃）。离心后将上层脂肪及一次沉淀分离，用 NaOH 溶液（2 mol/L，下同）将处于中间层的酸溶蛋白质溶液 pH 调节至等电点（pH 5.5），之后将所得到的等电点蛋白质悬浊液离心，得到 PI。

根据不同的酸溶条件以及是否 HIU，将提取条件分别编为 1~10 号，具体见表 1。整个提取过程中，样品温度控制在 0~5 ℃，每种样品的提取重复三次。

1.4 水分含量的测定

一次沉淀的水分含量和 PI 的水分含量利用烘干法（GB/T 5497-1985）测定。

1.5 蛋白含量的测定

本研究对溶液中蛋白质含量测定均采用 Lowry 法[17]，鱼肉肉糜、一次沉淀及 PI 中蛋白含量均采用凯氏定氮法测定（GB 5009.5-2016）。

表 1 不同的 PI 提取条件编号及其关键参数

Table 1 The code and condition variation of the PI extraction methods

条件编号	酸溶条件、是否 HIU 辅助
1	pH 2.0 无 HIU
2	pH 2.0+HIU
3	pH 2.5 无 HIU
4	pH 2.5+HIU
5	pH 3.0 无 HIU
6	pH 3.0+HIU
7	pH 3.5 无 HIU
8	pH 3.5+HIU
9	pH 4.0 无 HIU
10	pH 4.0+HIU

1.6 蛋白溶解度的计算

一次离心后中层溶液的蛋白浓度（mg/mL）与离心前匀浆液蛋白浓度的比值记为酸溶蛋白溶解度（%），二次离心后上清液中蛋白浓度与离心前匀浆液蛋白浓度的比值记为等电点蛋白溶解度（%）。其中，离心前匀浆液蛋白浓度通过肉糜中蛋白含量及 1.3 中对应匀浆液体积（200 mL）计算获得。

1.7 沉淀比计算

一次离心后，下层沉淀质量（g）与匀浆液体积（mL）比值计为沉淀比（%，*m/V*）。

1.8 蛋白回收率计算

蛋白回收率通过 PI 中蛋白含量与原料中蛋白含量之比（%）计算。

1.9 蛋白组成分析（SDS-PAGE）

参照 Tian 等[15]人的方法进行 SDS-PAGE 测试，稍作修改。样品蛋白用尿素缓冲溶液密封过夜震荡溶解后备用。采用 NuPAGE™ 4%~12% Bis-tris 预制梯度胶板，在 Invitrogen™ Mini Gel Tank 上以 160 V 恒压模式进行电泳分离。一次沉淀及 PI 样品蛋白电泳上样量为 15 μg/泳道，二次离心上清液蛋白电泳上样量为 5 μg/泳道，采用 NuPAGE™ MOPS（一次沉淀和 PI）和 MES（二次离心上清液）电泳缓冲液，以 PageRuler Plus™ 预染蛋白作为标准蛋白。

1.10 PI 凝胶制备、蒸煮损失率、凝胶硬度及弹性测定方法

凝胶制备参考 Zhao 等人[18]的方法稍做修改：PI 提取后，用 NaOH 溶液、NaCl 和 0 ℃去离子水将其调节为 pH 7.0、蛋白含量 100 mg/mL、NaCl 含量 2% 的蛋白溶液，均质处理后加入到 50 mL 离心管中离心（500 g，3 min），排出蛋白中气体。排气后，将离心管于 80 ℃水浴加热 30 min 形成凝胶，冷却后过夜冷藏平衡。

制备凝胶前后计算凝胶蒸煮损失率。计算方法：蛋白加热前称取质量（m_1），加热形成凝胶后，以滤纸吸取表面水份后称取质量（m_2）。蒸煮损失率=$[(m_1-m_2)\times100\%]/m_1$。

凝胶过夜平衡后，切成ϕ 20 mm，高 1 mm 的圆柱体，用质构仪 TPA 模式测定样品的硬度和弹性。测试条件为：P/50（ϕ 50 mm 柱形）探头，两次 50%的压缩，压缩间隔 1 s，测前、测中探头运行速度 1 mm/s，测后 5 mm/s。以压缩过程中，探头受到的最大阻力为凝胶硬度（g），以两次压缩样品高度之比作为弹性指数。每次样品测试 3 次，取平均值。

1.11 PI 凝胶颜色测定

蛋白凝胶颜色的测定包括 L 值（亮度）、a 值（红绿色调）、b 值（黄蓝色调）以及白度值（W），使用色差仪进行测定。测定之前使用标准白板进行校正。白度值使用下面公式计算：

$$W = 100 - \sqrt{(100-L)^2 + a^2 + b^2}$$

1.12 统计分析方法

每种提取条件重复三次，提取过程中的测试指标及 PI 相关参数均平行测定三次，取平均值，之后将三个平均值再次取平均值和标准偏差作为实验结果。利用 SAS（8.1）软件对数据进行统计分析。采用 Duncan 多线程检测法对不同样品平均值之间的差异进行显著性方差分析（p<0.05）。

2 结果与讨论

2.1 pH 及 HIU 对蛋白溶解度的影响

由图 1 可知，降低 pH 能够显著提高酸溶蛋白溶解度（60.82%→75.64%），显著降低等电点蛋白溶解度（9.28%→4.66%），但当 pH<3.0 时，则无显著影响。HIU 在不同 pH 条件下均能显著提高酸溶蛋白溶解度（pH 4.0：60.82%→71.26%，pH 2.5：75.45%→81.55%），但 HIU 对等电点蛋白溶解度影响不大。Tian 等人[15]的研究表明，在碱性条件下，HIU 也能够有效促进鱼肉肌原纤维蛋白的溶解。

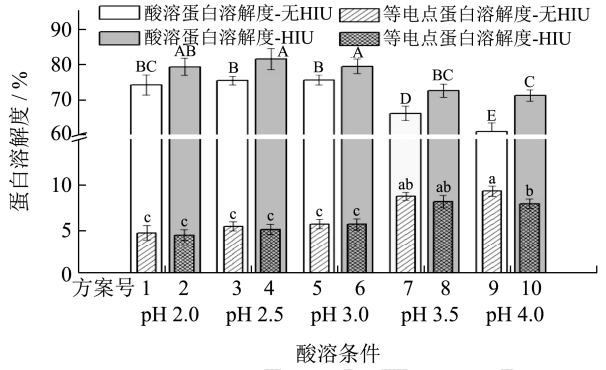


图 1 PI 提取过程中的酸溶蛋白溶解度及等电点处（pH=5. 5）蛋白溶解度

Fig.1 Protein solubility at the solubilization pH and pI in different treatment combination

注：不同大写字母表示组间具有显著性差异（p<0.05）；不同小写字母表示组间具有显著性差异（p<0.05）。

根据 Undeland 等人的解释[19]，降低 pH 会使大量的 H^+进入到肌原纤维的各种蛋白之间，引起肌原纤维蛋白结构溶胀，使蛋白结构变得疏松，并使蛋白单体或寡聚体脱离原来的肌原纤维原始结构而溶出，与此同时肌浆蛋白的构象也会展开。本文中的结果也表明，pH 的降低，更多的肌原纤维蛋白由一次沉淀中溶解出来，表现为溶解度增加。当 pH 回调至等电点时，不仅肌原纤维蛋白大部分聚集沉淀，构象展开（变性）的中等分子量蛋白（肌浆蛋白）也因 pH 的降低而发生更多聚集沉淀[20]，引起等电点蛋白浓度降低。

但当 pH 低于 3.0 后，进一步增强溶液酸性对蛋白溶出影响不显著，可能是由于肌原纤维蛋白与基质蛋白（如结缔组织中的胶原蛋白和弹性蛋白）仍然有一定吸附力或纠缠而无法形成肽链单体或寡聚体，也可能是由于肌节结构本身的稳定因素（如连接蛋白、伴肌动蛋白对肌节中粗丝及细丝结构的保持）无法完全消除。在 20 kHz 的频率下，HIU 产生的空化和微射流的尺度大约在 40~80 nm[21]，这一尺度小于且接近肌球蛋白的长度（160 nm）[22]，因而其产生的物理剪切作用有可能导致肌球蛋白与基质蛋白或肌节稳定蛋白发生分离而溶解。但 HIU 的剪切作用对中等分子量的构象并不能产生显著影响（球形蛋白尺度小于微射流尺度），无法促使其更大程度解构（变性），因而对等电点处蛋白的溶解度没有显著影响。

Undeland 等[19]人的研究发现，鲱鱼（herring）白肌匀浆液在 pH 2.7 时蛋白溶解度为 76.00%，而 Kristinsson 等人[23]对鲇鱼（channel catfish）肉的研究结果则为 88.30%（pH 2.5），二者使用的都是纯鱼肉（无皮无骨），但前者使用的是经过冷冻（-18 摄氏度）18 天后的鱼肉，而后者采用的是新鲜鱼肉。本文中的原料也是冷冻后的原料，但并非纯鱼肉，在经 HIU 辅助下，溶解度可达 81.55%（pH 2.5），表明 HIU 能够有效的促进原料中的肌原纤维蛋白的溶解。Marmon 等人[24]的研究结果显示，经过 pH 2.7 的处理，鲱鱼（herring）肉蛋白溶液在等电点处蛋白溶解度为 9.30%，显著高于本文结果 5.39%（pH 2.5），表明鲢鱼肉经过酸溶处理后，等电点处残留可溶性蛋白更少，这一点有利于 PI 的提取及废水处理。

2.2 pH 及 HIU 对沉淀比及一次沉淀的水分含量的影响

由图 2 可知，一次沉淀中水分含量随着 pH 降低而增大（92.99%→94.99%），而沉淀比则随着 pH 的降低而减小（18.10%→11.69%），但当 pH<3.0 之后，则没有显著变化。HIU 使一次沉淀水分含量显著减小（pH 3.0，94.58%→93.98%），同时沉淀比也显著降低（pH 3.0，11.69%→7.4%），降幅随着 pH 降低而减小，其中在 pH 4.0 处降幅最大（18.10%→7.65%）。ISP 法过程中，减小沉淀比可以增加一次离心蛋白溶液体积，这对后续蛋白回收率具有提升作用。一次沉淀主要由鱼皮鱼鳞、鱼骨、细胞膜、结缔组织以及溶胀但未溶解的肌原纤维构成，其中能够吸附水分的主要物质是溶胀但尚未解离的肌原纤维[19]。而胶原蛋白在酸性条件下会有一定程度的吸水溶胀[14]。HIU 显著降低一次

沉淀的水分含量和沉淀比，可能是由于其促进了沉淀中肌原纤维蛋白发生溶解，这一结果与 2.1 中的结果相符，而 pH 降低引起水分含量升高则可能是因为更强的酸性使胶原蛋白更大程度发生溶胀。Tian 等人[15]的研究表明，HIU 对罗非鱼肉碱溶 ISP 分离蛋白提取中沉淀比也有显著的降低作用（最低达到 3.60%），但其降低效果优于本文（最低仅达到 6.64%），可能是由于本文所用原料中杂质更多。Taskaya[5]等人的研究中，以去内脏处理的鲢鱼作为原料，经 pH 2.0 和 3.0 处理所得到的一次沉淀水分含量分别为 94.94%和 94.72%，本文中对应数据分别为 94.99%和 94.58%，这表明在酸溶条件处理后，一次沉淀中仍含有较多亲水性物质，可能是胶原蛋白或肌原纤维蛋白。

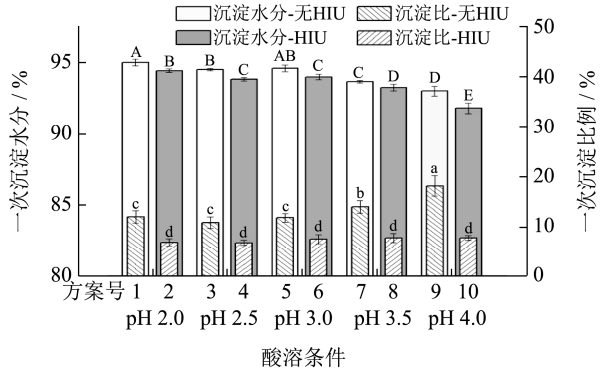


图 2 PI 提取过程中的沉淀比及一次沉淀的水分含量

Fig.2 Sediment ratio and moisture of the sediment after the 1st centrifugation in different treatment combination

注：不同大写字母表示组间具有显著性差异（p<0.05）；不同小写字母表示组间具有显著性差异（p<0.05）。

2.3 pH 及 HIU 对 PI 蛋白回收率及其水分含量的影响

图 3 中 PI 水分含量结果显示，不同提取条件所得 PI 的水分含量在 89.49%（pH 2.5）到 92.16%（pH 4.0）之间，随着 pH 的降低，PI 水分含量逐渐减小，但 pH 低于 2.5 之后，PI 水分含量没有显著变化。Taskaya 等人采用酸溶 ISP 法提取的鲢鱼分离蛋白水分含量为 89.86%和 91.01%（pH 2.0 和 pH 3.0）[5]，而 Chen 等人从虹鳟鱼副产品所提取的分离蛋白的水分分别为 80.50%和 78.07%（pH 3.0 和 2.5，）[25]，上述结果均表明，更强的酸性条件处理会使分离蛋白的持水能力下降。但过于极端的酸性条件不会继续引起 PI 水分下降。引起这一结果的原因可能在于极端酸性引起蛋白更大程度的变性，暴露出更多疏水性基团[22]，这些疏水性基团一方面引起蛋白亲水性区域相对减少，另一方面，它们引起的蛋白分子间的疏水作用也导致了蛋白以更为致密的形式聚集。而当蛋白构象展开到一定程度后，继续增强溶液酸性，构象变化不大，因而等电点处聚集程度不再有显著变化。另外，PI 水分结果还表明，HIU 对 PI 水分含量的影响并不显著，可能是 HIU 对蛋白构象影响不大所致。

图 3 中蛋白回收率的结果显示，pH 降低能够显著提高 PI 蛋白回收率（pH 4.0 到 pH 3.0，提高了 21.22%），但当 pH<3.0 后则无显著影响，这一点与 2.1，2.2 的结果相对应。HIU 在各个 pH 条件下均能显著提高蛋白回收率（pH 4.0 时提高了 10.9%，pH3.0 时提高了 3.77%）。Álvarez 等[12]人采用酸溶 ISP 法提取马鲛鱼分离蛋白的蛋白回收率为 49.48%，在不同强度 HIU 作用下，回收率可显著提高至 60.31%~74.66%，Tian 等人[15]的研究发现，HIU 可将碱溶条件下，罗非鱼蛋白溶解度由 85.30%提高至 97.00%（pH 10.5）。以上结果表明，HIU 对不同原料鱼肉匀浆液，在酸性或碱性条件下均有促进肌原纤维蛋白溶解的作用。根据 2.1 和 2.2 的结果，推断降低 pH 可以提高蛋白回收率的原因：第一，酸溶蛋白溶解度提高；第二，沉淀比减小，一次离心蛋白溶液体积增加；第三：等电点蛋白溶解度减小。而 HIU 能够提高蛋白回收率的原因则在于上述的第一和第二条。

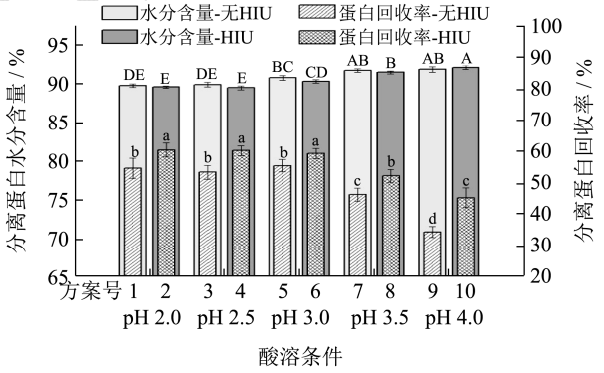


图 3 PI 水分含量及蛋白回收率

Fig.3 Moisture of PI and protein recovery in different treatment combination

注：不同大写字母表示组间具有显著性差异（p<0.05）；不同小写字母表示组间具有显著性差异（p<0.05）。

2.4 PI 提取过程中蛋白组分的分配（SDS-PAGE）

参照 Tian 等人[15]的研究结果，观察 SDS-PAGE 结果（图 4）可知，一次沉淀中的蛋白主要包括伴肌动蛋白、胶原蛋白、肌球蛋白重链以及肌动蛋白，其中后两种仅占较少部分。Kristinsson 等人对 ISP 法提取鲇鱼（catfish）分离蛋白的研究中，一次沉淀中的

蛋白也含有较多的肌球蛋白重链以及肌动蛋白，但伴肌动蛋白和胶原蛋白含量较少，原因可能在于其所用原料为无骨鱼排，而本文原料中含有大部分的鱼骨、鱼皮，这些杂质含较多的胶原蛋白和伴肌动蛋白[23]。

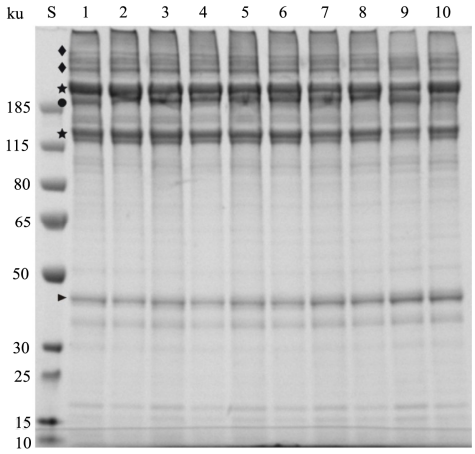


图 4 一次沉淀中蛋白组分

Fig.4 The protein profile in the sediment of the first centrifugation

注：S：蛋白标准样；1~10 泳道号分别为对应的提取条件编号；♦标示伴肌动蛋白（nebulins，600~900 ku）；★标示胶原蛋白（collagen）β 链、α1 和 α2 链（~250 ku 以及~120 ku），●标示肌原纤维蛋白重链（myosin heavy chain，MHC，205 ku），▸标示肌动蛋白（actin，41 ku）。

对比发现，pH 4.0 条件下，一次沉淀中 MHC 和 actin 的相对比例最高，其次是 pH 3.5，而 pH 3.0、2.5 及 2.0 中 MHC 和 actin 相对比例较低，且它们之间没有明显差别，这与 2.2 中的结果相一致。HIU 均会使 MHC 和 actin 的比例减小，特别是 pH 4.0 条件下（9→10 泳道），MHC 比例明显减少，而 pH 2.0 条件下经 HIU 后（2 号泳道），MHC 和 actin 的比例最小，充分说明了 HIU 能够有效促进一次沉淀中肌原纤维蛋白溶解。

由图 5 可知，PI 中含量最多的是 MHC、actin 以及原肌球蛋白[26]，这表明，PI 中的主要构成蛋白是肌原纤维蛋白。在 MHC 下面还有较为明显的重酶解肌球蛋白[22]，这表明酸溶条件下鲢鱼肉肌球蛋白 MHC 在酸性条件下发生了一定程度的酶解[27]。在不同的提取条件下，pH 和 HIU 对所得 PI 中蛋白的种类并未产生显著影响。值得注意的是，位于泳道最顶端的连接蛋白[28]在没有 HIU 处理时，均有明显的条带出现，而经过 HIU 后，这一蛋白条带明显发生降解，Tian 等人在 HIU 辅助碱溶条件下提取罗非鱼蛋白时也发现有连接蛋白的降解现象，反映出 HIU 的空化及微射流作用在一定的酸碱条件下对于尺寸较大蛋白均具有物理降解作用[15]。另外，经过 HIU，胶原蛋白（β 链、α1 和 α2 链）在 PI 中比例也有所增加，这表明 HIU 会使部分胶原蛋白发生溶解，进入到 PI 中，其原因也可能是由于 HIU 的物理效应导致大分子胶原蛋白链发生部分降解所致。上述结果表明，经 HIU 后，PI 中连接蛋白均已发生降解，且含有更多的胶原蛋白，主要成分是肌原纤维蛋白。

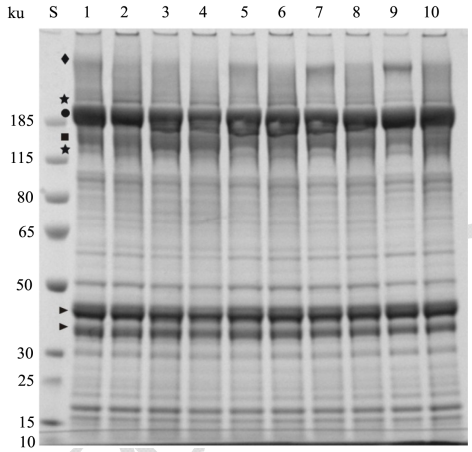


图 5 PI 中蛋白组分

Fig.5 The protein profile in PI

注：S:蛋白标准样；1~10 泳道号分别为对应的提取条件编号。♦标示连接蛋白（titins，~3 Mu）；★标示胶原蛋白（collagen）β 链、α1 和 α2 链（250 ku 以及~120 ku），●标示肌原纤维蛋白重链（myosin heavy chain，MHC，205 ku），□标示重酶解肌球蛋白（Heavy meromyosin，HMM，~170 ku），▸标示肌动蛋白（actin，41 ku）、原肌球蛋白（tropomyosin）37 ku）。

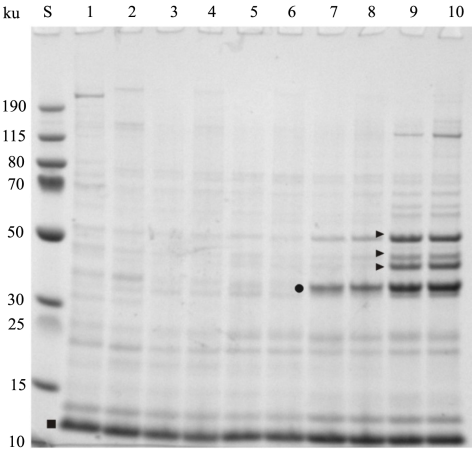


图 6 二次离心上清液（等电点处）中蛋白组分

Fig.6 The protein profile in supernatant of the 2ed centrifugation

注：S：蛋白标准样；1~10 泳道号分别为对应的提取条件编号；▸标示分别标示结蛋白（desmin，51 ku）及其他两种未知蛋白，●标示肌动蛋白（actin，41 ku），□标示 12 ku 的未知蛋白。

由图 6 可知，二次离心上清液中所含大分子量（>51 ku）蛋白非常少，不同处理的区别主要体现在

中等分子量（30~51 ku）蛋白，其中 pH 4.0 处理（9、10 号泳道）的二次离心上清液中所含中等分子量蛋白最多，有三种蛋白在其它提取条件中含量非常少（▶标示，其中包括 51 ku 的结蛋白，desimin[24]）。actin 在 1~6 号提取方法所得样品中含量非常低，在 7、8 号中则含量较高，在 9、10 号中含量更高。经过 pH 2.0、2.5 以及 3.0 处理的样品中，所含蛋白主要是小分子量（~12 ku）蛋白。从上述结果可以看出 pH 是影响这一指标的主要因素，其原因在于不同强度的 pH 引起的肌浆蛋白构象展开程度不同，在调节至等电点处引起的蛋白重新聚集程度不同。HIU 对等电点处可溶性蛋白种类没有显著影响，可能由于 HIU 的空化和微射流作用仅能够对较大的尺寸的蛋白解聚产生作用，但对中等分子量的构象并不能产生显著影响（球形蛋白尺度较小）。

由图 6 的结果推断，1~6 号提取方法所得 PI 中应含有更多的中等分子量蛋白（多为肌浆蛋白（sarcoplasmic protein））[29]。Kristinsson 等人采用酸溶 ISP 法提取鲇鱼（catfish）分离蛋白（pH 2.5）以及罗非鱼（tilapia）分离蛋白（pH 2.2，2.9）后，二次离心上清液中蛋白主要为小分子量（~14 ku）的蛋白，未见类似图 6 中 7~8 泳道的中等分子蛋白[23,30]，表明经过较为缓和的酸性溶解条件（pH 4.0、3.5）下，中等分子量蛋白变性程度较小，回调至等电点处仍保持溶解状态。

2.5 pH 及 HIU 对凝胶特性的影响

由表 2 可知，pH 越低，所得 PI 凝胶的亮度（89.24→92.82）和白度越高（83.24→87.02）。HIU 可显著提高 PI 凝胶的亮度（pH 3.0：91.71→94.25）和白度。pH 降低对 PI 凝胶硬度有显著提升作用（pH 4.0→2.5：1162.55→1683.41 g），但 pH 2.5 与 pH 2.0 所得 PI 凝胶硬度差异不显著。HIU 在不同 pH 条件下均能显著提高 PI 凝胶硬度（pH 3.0:1531.74→1756.24 g），但在 HIU 作用下，pH 3.0，2.5 及 2.0 所得 PI 凝胶硬度无显著差异。pH 降低导致 PI 凝胶弹性有所改善（0.746→0.803），HIU 则对这一参数影响不大。pH 降低会显著引起蒸煮损失率增大（2.05%→3.96%），同时 HIU 会导致蒸煮损失率增加，但仅在 pH 3.0 处有显著影响（2.14%→3.54%）。Chen[25]等人采用 pH 2.5 和 pH 3.0 的 ISP 法从虹鳟鱼（rainbow trout）副产物中提取分离蛋白并制备蛋白凝胶，所得凝胶亮度（pH 2.5：97.58，pH 3.0：97.39）和凝胶强度（pH 2.5：5.48 N，pH 3.0：5.49 N）均无显著差异，而 Davenport[31]等人采用 pH 2.0，2.5 和 3.0 的 ISP 法提取鲇鱼（channel catfish）分离蛋白并制备凝胶，所得凝胶破断力（Punch Force）均为 600~650 g，没有显著差别。综合上述结果可知，pH 降低能够引起 PI 凝胶特性（颜色及强度）改善，但是低于一定的值之后，进一步增强酸性条件，并不能进一步引起凝胶特性的改进。

降低 pH 和 HIU 均会使 PI 颜色得到改善的原因可能有两个：一方面，均匀而致密的结构对光具有更好的反射作用，降低 pH 和 HIU 使 PI 的微观聚集变得更加均匀和致密，更为致密的结构使水分子不易存在蛋白聚集体内部，进一步解释了 PI 中蛋白水分含量的降低；另一方面，更低的 pH 可能会导致肌红蛋白（myoglobin）的构象展开（变性），在回调至等电点处后无法恢复至天然构象[20]，丧失与血红素结合能力，使 PI 颜色更白。

表 2 PI 凝胶特性

Table 2 Gel properties of PI

提取条件编号及关键点	PI 凝胶颜色		凝胶特性		
	L	W	硬度 g	弹性	蒸煮损失率%
1, pH 2.0	92.82±0.32^{b}	86.33±0.56^{bc}	1651.34±52.22^{b}	0.792±0.026^{ab}	3.96±0.36^{a}
2, pH 2.0+HIU	93.78±0.37^{a}	87.85±0.25^{a}	1689.46±69.54^{ab}	0.816±0.028^{a}	4.43±0.38^{a}
3, pH 2.5	92.03±0.28^{bc}	87.02±0.33^{b}	1683.41±32.52^{ab}	0.804±0.017^{a}	3.55±0.42^{b}
4, pH 2.5+HIU	93.83±0.25^{a}	88.09±0.52^{a}	1713.22±42.45^{ab}	0.817±0.027^{a}	3.58±0.67^{ab}
5, pH 3.0	91.71±0.52^{c}	86.32±0.52^{bc}	1531.74±32.12^{c}	0.803±0.026^{a}	2.14±0.38^{c}
6, pH 3.0+HIU	94.25±0.28^{a}	88.45±0.30^{a}	1756.24±43.32^{a}	0.813±0.020^{a}	3.54±0.55^{b}
7, pH 3.5	90.26±0.43^{d}	83.38±0.39^{d}	1345.63±42.35^{d}	0.802±0.021^{a}	2.01±0.21^{c}
8, pH 3.5+HIU	92.21±0.19^{bc}	85.96±0.88^{bc}	1422.33±58.57^{c}	0.823±0.019^{a}	2.69±0.36^{bc}
9, pH 4.0	89.24±0.31^{e}	83.24±0.61^{d}	1162.55±66.45^{f}	0.746±0.023^{b}	2.05±0.35^{c}
10, pH 4.0+HIU	91.56±0.16^{c}	85.34±0.73^{c}	1277.36±47.52^{de}	0.758±0.031^{ab}	2.23±0.28^{c}

注：同一列中不同小写字母表示组间显著性差异（p<0.05）。

肌原纤维蛋白凝胶形成的过程是以肌球蛋白头部的疏水基团发生疏水吸附作用起始的[32]，因而蛋白的表观疏水性增加对蛋白凝胶形成有利。许多研究表明，极端的酸性条件或者 HIU，均会使肌原纤维蛋白溶液的表观疏水性增加，因而所得到的分离蛋白中，有更多的疏水区域[15,33]。本研究中，随着溶解条件的酸性增加以及 HIU 的辅助，PI 的水份含量显著降低（图 3），可反映出 PI 的亲水区域相对减少而疏水性区域相对增加，这解释了 PI 凝胶强度及弹性增强的结果，同时也说明了蒸煮损失率有所增加的结果，因为疏水性增加引起蛋白凝胶亲水能力有所减少。Davenport 等人[31]的研究也发现酸性溶解 pH 的降低会使分离蛋白凝胶强度有所增加，其原因也归于蛋白表观疏水性的增加。当 pH 低于 3.0 后，继续降低 pH 所引起的肌原纤维蛋白构象变化可能不大，因而带来的蛋白表观疏水性变化不大，引起的 PI 凝胶强度及弹性变化不再显著。

3 结论

综上，pH 的降低能够显著增加 PI 蛋白回收率（提高了 21.11%），改善 PI 颜色（白度值 83.24→87.03），并且对凝胶特性有显著改善（1162.55→1683.41 g）。当 pH 低于 2.5 时，继续降低 pH 对蛋白回收率没有提高作用，且引起凝胶特性的改善也不再显著。HIU 能够显著提高蛋白回收率（pH 3.0 时可提高 3.77%），改善 PI 凝胶颜色（pH 3.0：86.32→88.45），且对 PI 凝胶特性产生改善效果（硬度 pH 3.0：1531.74→1756.24 g）。不同提取条件所得 PI 中，绝大部分蛋白为肌原纤维蛋白，但所得 PI 中等分子量蛋白含量会有所不同。当采用酸溶条件为 pH 3.0 并辅以 HIU 的提取条件时，所得 PI 具有最高的蛋白回收率和最优的凝胶特性。

参考文献

[1] 吕顺,王冠,陆剑锋,等.鲢鱼新鲜度对鱼糜凝胶品质的影响[J].食品科学,2015,36(4):241-246
LYU Shun, WANG Guan, LU Jian-feng, et al. Effects of freshness of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) on quality of surimi gel [J]. Food Science, 2015, 36(4): 241-246

[2] 李睿智,王嵬,仪淑敏,等.白鲢鱼鱼糜凝胶过程中水分及凝胶特性的变化[J].现代食品科技,2016,32(5): 91-97,198
LI Rui-zhi, WANG Wei, YI Shu-min, et al. Changes in water and gel properties of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) surimi during gelation process. [J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(5): 91-97,198

[3] Nolsøe H, Undeland I. The acid and alkaline solubilization process for the isolation of muscle proteins: state of the art [J]. Food and Bioprocess Technology, 2009, 2(1): 1-27

[4] Hultin H O, Kelleher S D. Process for isolating a protein composition from a muscle source and protein composition: U.S. Patent 6,005,073, [P] 1999. https://patents.google.com/patent/US6005073A/en

[5] Taskaya L, Chen Y-C, Beamer S, et,al. Compositional characteristics of materials recovered from whole gutted silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) using isoelectric solubilization/precipitation [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(10): 4259-4266

[6] Shi L, Beamer S K, Yin T, et al. Mass balance for isoelectric solubilization/precipitation of carp, chicken, menhaden, and krill [J]. LWT-Food Science and Technology, 2017, 81: 26-34

[7] Fu X J, Wu Y, Li Z H. Using pH-shifting process to recover proteins for low salt gel products from silver carp [J]. Advanced Materials Research, 2012, 554-556:1285-1288

[8] Paker I, Beamer S, Jaczynski J, et al. Compositional characteristics of materials recovered from headed gutted silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) by isoelectric solubilization and precipitation using organic acids [J]. Journal of Food Science, 2013, 78(3): 445-451

[9] 付湘晋,许时婴,王璋,等.酸碱提取鲢鱼肉蛋白功能特性的研究[J].食品工业科技,2008,29(4):116-118
FU Xiang-jin, XU Shi-ying, WANG Zhang, et al. Research on the functional propertiese of acid and alkali extracted protein of silver carp [J]. Science and Technology of Food Industry, 2008, 29(4): 116-118

[10] 孙月娥,王卫东,付湘晋.酸碱法提取鲢鱼肌肉蛋白的凝胶特性[J].食品科学,2012,33(6):123-126
SUN Yue-e, WANG Wei-dong, FU Xiang-jin. Gel properties of pH-shift isolated proteins from silver carp muscle [J]. Food Science, 2012, 33(6): 123-126

[11] Hu H, Fan X, Zhou Z, et al. Acid-induced gelation behavior of soybean protein isolate with high intensity ultrasonic pre-treatments [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2013, 20(1): 187-195

[12] Álvarez C, Lelu P, Lynch S A, et al. Optimised protein recovery from mackerel whole fish by using sequential acid/alkaline isoelectric solubilization precipitation (ISP) extraction assisted by ultrasound [J]. LWT-Food Science and Technology, 2018, 88: 210-216

[13] 谢亚茹,刘庆,熊善柏,等.高强度超声作用下鲢鱼肌球蛋白的结构及流变学特性变化[J].现代食品科技,2019,40(5): 77-84

XIE Ya-ru, LIU Qing, XIONG Shan-bai, et al. Effect of high intensity ultrasound on structural and rheological properties of myosin from silver carp [J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 40(5): 77-84

[14] Kim H K, Kim Y H, Park H J, et al. Application of ultrasonic treatment to extraction of collagen from the skins of sea bass *Lateolabrax japonicus* [J]. Fisheri es Science and Technolgoy, 2013, 79(5): 849-856

[15] Tian J, Wang Y, Zhu Z, et al. Recovery of tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein isolate by high-intensity ultrasound-aided alkaline isoelectric solubilization/ precipitation process [J]. Food and Bioprocess Technology, 2015, 8(4): 758-769

[16] 田金河,王艳婕,朱志伟,等.pH值对碱溶法罗非鱼鱼糜制备及凝胶性质的影响[J].现代食品科技,2014,30(11): 163-169
TIAN Jin-he, WANG Yan-jie, ZHU Zhi-wei, et al. Effect of pH on the preparation and gelation characteristics of tilapia surimi in alkaline solubilization/isoelectric precipitation [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(11): 163-169

[17] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent [J]. Journal of Biological Chemistry, 1951, 193: 265-275

[18] Zhao X, Chen X, Han M, et al. Application of isoelectric solubilization/precipitation processing to improve gelation properties of protein isolated from pale, soft, exudative (PSE)-like chicken breast meat [J]. LWT-Food Science and Technology, 2016, 72: 141-148

[19] Undeland I, Kelleher S D, Hultin H O, et al. Consistency and solubility changes in herring (*Clupea harengus*) light muscle homogenates as a function of pH [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(14): 3992-3998

[20] Kristinsson H G, Hultin H O. Changes in trout hemoglobin conformations and solubility after exposure to acid and alkali pH [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(11): 3633-3643

[21] Iida Y, Tuziuti T, Yasui K, et al. Protein release from yeast cells as an evaluation method of physical effects in ultrasonic field [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2008, 15(6): 995-1000

[22] 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 and Food Chemistry, 2003, 51(24): 7187-7196

[23] 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

[24] Marmon S K, Undeland I. Protein isolation from gutted herring (*Clupea harengus*) using pH-shift processes [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(19): 10480-10486

[25] Chen Y-C, Jaczynski J. Protein recovery from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) processing byproducts via isoelectric solubilization/precipitation and its gelation properties as affected by functional additives [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(22): 9079-9088

[26] Abdollahi M, Undeland I. Physicochemical and gel-forming properties of protein isolated from salmon, cod and herring by-products using the pH-shift method [J]. LWT-Food Science and Technology, 2019, 101: 678-684

[27] 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 and Food Chemistry, 2002, 50(25): 7371-7379

[28] Vikhlyantsev I M, Okuneva A D, Shumilina U V, et al. Method for isolation of intact titin (connectin) molecules from mammalian cardiac muscle [J]. Biochemistry. 2013, 78(5): 455-462

[29] Tadpitchayangkoon P, Park J W, Yongsawatdigul J. Conformational changes and dynamic rheological properties of fish sarcoplasmic proteins treated at various pHs [J]. Food Chemistry, 2010, 121(4): 1046-1052

[30] Kristinsson H G, Ingadottir B. Recovery and properties of muscle proteins extracted from tilapia (*Oreochromis niloticus*) light muscle by pH shift processing [J]. Journal of Food Science, 2006, 71(3): 132-141

[31] Davenport M P, Kristinsson H G. Channel catfish (*Ictalurus punctatus*) muscle protein isolate performance processed under different acid and alkali pH values [J]. Journal of Food Science, 2011, 76(3): 240-247

[32] Lanier T C, Yongsawatdigul J, Patricio C R. Surimi Gelation Chemistry [M]. Surimi and Surimi Seafood. Boca Raton: CRC Press, 2013

[33] 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 and Food Chemistry, 2003, 51(17): 5103-5110