

超声处理对鲢鱼鱼肉蛋白结构的影响

胡爱军, 卢秀丽, 郑捷, 田方圆, 李洪艳, 陈琼希, 王思思

(天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

摘要: 本论文以鲢鱼为原料, 研究了超声处理对鲢鱼鱼肉蛋白结构的影响。结果表明: 超声作用 15 min, 表面疏水性 (H_0) 随超声功率(160 W~320 W)的提高先增大后减小, 功率 280 W 时达到最大, 为对照组的 4.34 倍。超声处理后, 鱼肉蛋白的表面-SH 含量均低于对照组, 且随超声功率的增大, 表面-SH 含量先升高后降低, 在 240 W 时达到最高; 160 W 超声作用后, 鱼肉蛋白的表面疏水性和表面-SH 含量均随超声作用时间 (5 min~25 min) 的延长而增大。此外, 红外分析表明, 超声处理后的鱼肉蛋白的 α -螺旋和 β -转角的内容分别下降了 54.5% 和 21.9%; β -折叠结构含量略有上升; 而无规则卷曲结构含量上升了 8.2 倍。

关键词: 超声; 鲢鱼鱼肉蛋白; 结构

文章编号: 1673-9078(2012)8-894-897

Effect of Ultrasonic Treatment on Protein Structures of Silver Carp

HU Ai-jun, LU Xiu-li, ZHENG Jie, TIAN Fang-yuan, LI Hong-yan, CHEN Qiong-xi, WANG Si-si

(College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: This work used silver carp as raw material and mainly studied on ultrasonic treatment effects on structural properties of silver carp protein. The results indicated that the hydrophobicity (H_0) of silver carp protein increased firstly and then decreased with the rise of ultrasonic power when fish protein was treated for 15min with ultrasonic (160 W~320 W). The highest H_0 value was 4.34 times higher than that of the control when the power reached 280 W. The amount of surface -SH treated with ultrasonic was less than that of untreated samples. The amount of surface -SH increased to the maximum at 240 W and then decreased. When fish protein was treated with 160 W ultrasonic for 5 min~25min, its H_0 value and amount of surface -SH increased gradually. In addition, IR analysis showed that the content of α -helix and β -turn in fish protein decreased by 54.5% and 21.9%, respectively, while the amount of β -sheet did not rise obviously and free curl increased in the ultrasonic group by 8.2 times.

Key words: ultrasonic; silver carp protein; structure

我国是世界上淡水资源养殖水面最多的国家之一, 其中鲢鱼的产量非常高, 是世界上捕捞量最大的十大类鱼种之一。鲢鱼具有易饲养、成长快、成本低等特点, 但鲢鱼由于其肉薄、刺多, 而且风味不及其他淡水鱼, 在市场上不很受欢迎。可是其蛋白质中各种氨基酸较平衡, 其生物学效价也较高。因此如何对淡水鱼进行深加工, 尤其是对低价淡水鱼如鲢鱼, 已成为亟待解决的问题^[1]。蛋白质的功能特性对食品或食品成分在制造、加工或保藏中的理化性质起重要作用。而蛋白质的结构是蛋白质行使其功能的物质基础, 蛋白质的各种功能又是其结构的表现。蛋白质结构性质在整个食品工业的各个环节以及满足人们的消费需求

方面发挥着重要作用^[2]。但不少天然蛋白质的功能特性尚不突出, 不能满足现代食品开发与加工的需要, 往往通过特定的方法来提高其功能特性, 使其应用领域更广阔。蛋白质经改性后, 其功能特性得到了显著地提高, 一方面拓宽了蛋白质的应用领域, 另一方面可以作为一些昂贵原材料的替代品, 因此在食品工业中具有广阔的应用前景^[3]。

目前常用的蛋白质改性技术有物理改性、化学改性、酶法改性和基因工程改性等。酶改性存在酶解过程的随机性以及酶解产物的易变性、多样性、复杂性等缺点; 目前, 酶解速度慢、水解不彻底、水解液味苦、目标成分含量低且难以分离等问题仍然存在^[4]。化学改性因其反应条件苛刻、反应特异性差、残余物质去除困难等缺点, 而且可能造成食品安全性问题, 有可能损害食品蛋白质的营养价值等, 不容易被消费者所接受。基因工程改性潜力巨大, 但技术周期长、见效慢, 而且安全性有待研究, 难以短期内实现, 目前仍处于实验室阶段^[5]。超声波技术具有作用时间短、

收稿日期: 2012-05-06

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31071608); 福建省科技计划项目 (2010N3026); 天津东丽区科技创新专项基金项目 (2010312); 天津科技大学科学研究基金资助项目 (20110104)

作者简介: 胡爱军 (1968-), 男, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要研究水产品与食品加工技术和工程

操作简单、易控制及能耗较低等优点。本研究在超声处理对鲢鱼鱼肉性质的影响^[6]基础上进一步研究了超声波对鲢鱼鱼肉蛋白结构的影响,为研究鱼肉蛋白及蛋白食品的开发利用提供理论及技术参考。

1 材料与方法

1.1 原料及设备

鲜活鲢鱼(购于天津市塘沽区第三大街人人乐超市)。

盐酸、磷酸、Tris、考马斯亮蓝 G-250、1-苯胺基-8-萘磺酸(ANS)、5,5'-二硫代-2-硝基苯甲酸(DTNB)、甘氨酸、溴化钾等,以上试剂均为分析纯。

电子天平、凯氏定氮仪、PHS-3BW 型 pH 计、MODULYOD-230 型冷冻干燥机、752 型紫外可见分光光度计、D66-101-1 型电热鼓风干燥箱、低速台式离心机、HW·SY21-K 型电热恒温水浴锅、VECTOR 22 型傅立叶变换红外光谱分析仪、KQ-400KDB 型数控超声清洗机等。

1.2 试验方法

1.2.1 鲢鱼鱼肉组分的测定

水分采用直接干燥法(GB 5009.3-2010)测定;蛋白质采用 GB 5009.5-2010 凯氏定氮法测定;脂肪采用索氏抽提法(GB/T 5009.6-2003)测定;灰分采用 GB 5009.4-2010 中的方法测定。

1.2.2 鲢鱼鱼肉蛋白的提取

低温下,将活鱼运到实验室,去头、鳞、内脏、皮,采其白肉,将一定量的纯鱼肉用绞肉机搅碎、称重,在 pH 值为 10、时间 60 min、料液比 1:9 的条件下提取鱼肉蛋白,接着在 5000 r/min 离心 30 min,取上清液,将上清液 pH 值调节到 5.9,置于 4 °C 冰箱静置一夜,然后在 3400 r/min 离心 15 min,取沉淀于蒸馏水中透析 2 d,冻干备用。

1.2.3 超声处理鱼肉蛋白

用 pH 值 7.0 缓冲液(2 倍鱼肉重量的体积)均匀溶解鱼肉蛋白。将溶液分成 6 份,分别设置不同的功率和时间参数,在室温下对样品进行超声处理。

1.2.4 鱼肉蛋白的表面疏水性变化

鱼肉蛋白表面疏水性的测定参考 Benjakul 等人的方法^[7]。在激发波长和吸收波长分别为 355 nm 和 460 nm 测定荧光强度。以蛋白浓度对荧光强度作图,采用最小二乘法进行曲线拟合,直线的斜率即为蛋白质的表面疏水性(H_0)。

1.2.5 鱼肉蛋白表面巯基含量的测定

参照 Beveridge 等人^[8]的 Ellman 试剂分析方法,加 4 mg DTNB 试剂于 1 mL 的 Tris-甘氨酸缓冲液中,

配成 Ellman 试剂。分别称取 15 mg 样品溶于 5 mL 的 Tris-甘氨酸缓冲液中,漩涡震荡,加入 50 μ L Ellman 试剂,将悬浮液置于室温(25 °C \pm 1 °C)下保温 1 h,10000 g 离心 15 min,以未加蛋白混合液做空白,测定 412 nm 处吸光值(A412),从而计算表面-SH 含量。

1.2.6 傅立叶变换红外光谱测定蛋白质二级结构

准确称取 2 mg 的蛋白质粉末,再加入溴化钾至 200 mg,将其研磨并压制成透明薄片。使用红外光谱仪对其进行全波段扫描(400~4000 cm^{-1}),用 OPUS4.0 (Bruker Optics) 软件对所得图谱进行分析,再采用 Peakfit 软件进行二阶导数峰拟合,最后计算各二级结构的相对百分含量。

2 结果与讨论

2.1 鱼肉基本组分

表 1 鲢鱼鱼肉基本组分

Table 1 The basic components of silver carp meat

组分	水分	蛋白质	灰分	脂肪
含量/%	80.27 \pm 2.18	16.34 \pm 0.53	1.16 \pm 0.09	2.07 \pm 0.21

注:试验数据为 3 次重复试验的平均值,下同。

2.2 超声处理对鱼肉蛋白表面疏水性的影响

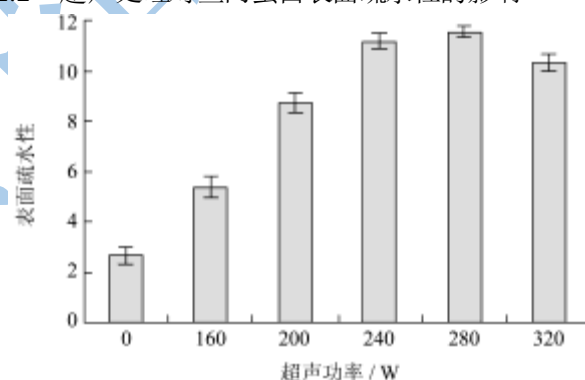


图 1 超声功率对鱼肉蛋白表面疏水性的影响

Fig.1 Effects of ultrasonic power on surface hydrophobicity of

fish protein

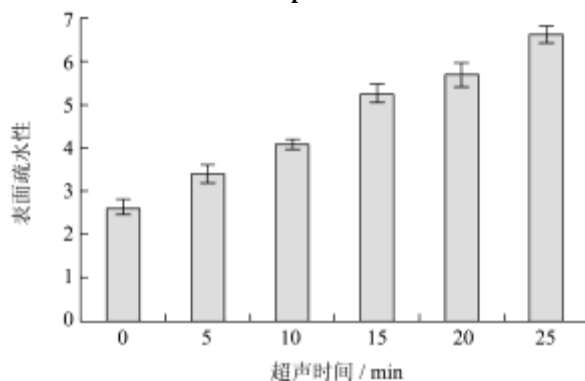


图 2 超声时间对鱼肉蛋白表面疏水性的影响

Fig.2 Effects of ultrasonic time on surface hydrophobicity of

fish protein

蛋白质表面疏水相互作用是维持蛋白质三级结构的主要作用力,它对蛋白质结构的稳定性、构象和功能性质具有重要的作用^[9]。如图 1 所示,超声处理后的鱼肉蛋白表面疏水性远远大于对对照,且随功率的增高而增大,在 280 W 时达最大,增大了 3.3 倍。因为鱼肉蛋白的许多非极性基团(疏水基团)被包埋在分子内部,因而蛋白的疏水性较低,当超声处理后,其疏水基团暴露出来,疏水性增加,但随着超声功率的进一步增大,高能量的超声作用使部分蛋白质分子聚集,因而疏水性下降。图 2 所示,当超声功率为 160 W 时,随着超声处理时间的增加而疏水基团逐渐暴露出来,疏水性逐渐增大。这说明经一定超声处理后,鱼肉蛋白的三级结构发生了一定的变化。

2.3 超声处理对鱼肉蛋白表面-SH 的影响

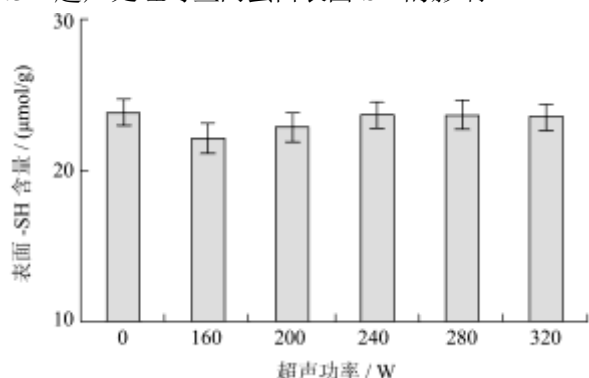


图 3 超声功率对鱼肉蛋白表面-SH 的影响

Fig.3 Effects of ultrasonic power on exposed free -SH contents of fish protein

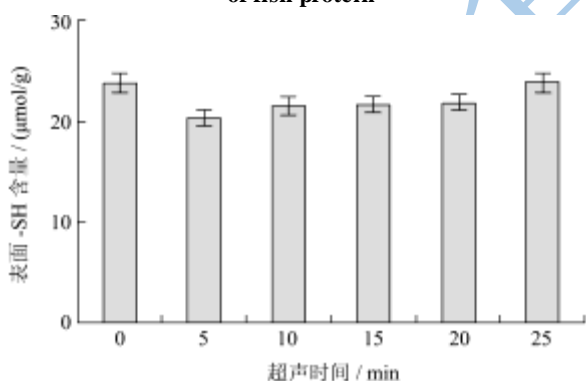


图 4 超声时间对鱼肉蛋白表面-SH 的影响

Fig.4 Effects of ultrasonic time on exposed free-SH contents of fish protein

蛋白质表面巯基含量的变化能够反映出蛋白高级结构的变化。如图 3、图 4 所示,一定的超声功率和时间作用后,鱼肉蛋白的表面-SH 含量均低于对照组。随超声功率的增大,表面-SH 含量先升高后降低,在 240 W 时达到最高;当超声功率为 160 W 时,鱼肉蛋白的表面-SH 含量随超声作用时间(5 min~25 min)的延长而增大。可能是超声处理后,蛋白质中部分-SH

被氧化形成链间或链内 S-S 键,而有些 S-S 键也有可能被超声作用打断。

2.4 超声对鱼肉蛋白二级结构的影响

根据已有文献资料,红外光谱检测拟合曲线各子峰位置与二级结构成分有对应的关系^[10]。

表 2 对照样的酰胺 I 带拟合结果

Table 2 Amide I band fitting results of untreated fish protein

峰位置/cm ⁻¹	对应的结构	二级结构含量/%
1626	β-折叠	7.65±0.44
1633	β-折叠	8.08±0.56
1639	β-折叠	8.68±0.61
1645	无规则卷曲	1.56±0.13
1651	α-螺旋	15.62±0.47
1657	α-螺旋	16.90±0.84
1664	β-转角	12.08±0.70
1670	β-转角	10.95±0.77
1677	β-折叠	9.02±0.72
1683	β-转角	6.35±0.55
1689	β-转角	3.11±0.18

表 3 超声处理蛋白质的酰胺 I 带拟合结果

Table 3 Amide I band fitting results of fish protein treated by ultrasonic

峰位置/cm ⁻¹	对应的结构	二级结构含量/%
1619	β-折叠	9.95±0.76
1630	β-折叠	12.75±0.81
1641	无规则卷曲	14.3±0.89
1653	α-螺旋	14.79±0.78
1664	β-转角	14.05±0.67
1673	β-折叠	8.44±0.59
1678	β-折叠	7.19±0.48
1685	β-转角	8.12±0.61
1692	β-转角	3.22±0.23

表 4 超声处理前后鱼肉蛋白的二级结构变化

Table 4 Changes of secondary structures of fish protein with and without ultrasonic treatment

样品	α-螺旋	β-折叠	β-转角	无规则卷曲
原样品	32.52±2.21 ^a	33.43±1.98 ^a	32.49±2.56 ^a	1.56±0.09 ^a
超声处理	14.79±0.32 ^b	38.33±2.23 ^a	25.39±0.41 ^b	14.3±0.59 ^b

注:表中数据为3次重复的平均值,同列中不同字母表示在P<0.05水平上差异显著。

蛋白质分子的α-螺旋和β-折叠结构通常埋藏在多肽链的内部^[11]。α-螺旋成紧密而无空腔结构,结构过于稳定,β-结构和无规则卷曲的紧密程度和构象稳定性相对于α-螺旋明显变差,但蛋白质的柔韧性明显改善,有利于发挥蛋白质的某种功能特性^[12]。Kato 等人

[13]研究表明蛋白质分子的柔性与其蛋白质表面的功能性质之间存在一定的关系,分子柔性越大,乳化性越好。

表2是未经处理的对照样的酰胺I带拟合结果;表3是经过160 W超声处理15 min后的鱼肉蛋白的二级结构分析结果。由表4可看出,与对照样相比,超声处理后的鱼肉蛋白的 α -螺旋结构和 β -转角结构的含量分别下降了54.5%和21.9%; β -折叠结构含量略有上升;超声处理过的鱼肉蛋白的无规则卷曲结构含量上升了8.2倍。 α -螺旋含量的降幅为54.5%,这与刘斌等研究的牛血清蛋白经超声处理后 α -螺旋含量的降幅在43.0%~61.5%的结果一致^[4]。超声对蛋白结构含量变化的影响研究表明,超声作用下,蛋白的二级结构发生着 α -螺旋和 β -转角向无规则结构转化的趋势。这是因为超声破坏了蛋白的网络结构,致使氢键断裂, α -螺旋和 β -转角转变为较为伸展的无规卷曲结构。宋国胜等^[15]在用拉曼光谱研究超声辅助冷冻对面筋蛋白二级结构的影响时发现,超声辅助冷冻后面筋蛋白中 α -螺旋结构减少,相应的转化为 β -折叠结构或无规则卷曲。这与本研究的结果一致。由二级结构变化结果分析可看出,经超声处理后的鱼肉蛋白的结构变得相对松散,柔韧性得到改善。

3 结论

3.1 用160 W~320 W超声处理鱼肉蛋白15 min,其表面疏水性(H_0)随超声功率的提高呈先增后减的趋势,且在280 W时达到最大,增大了3.3倍。160 W超声作用5 min~25 min,鱼肉蛋白的 H_0 随功率的增高而增大。

3.2 超声处理后,鱼肉蛋白的表面-SH含量均低于对照组。随超声功率的增大,表面-SH含量先升高后降低,在240 W时达最高;当超声功率为160 W时,鱼肉蛋白的表面-SH含量随超声作用时间(5 min~25 min)的延长而增大。

3.3 红外分析表明,超声处理后的鱼肉蛋白的 α -螺旋和 β -转角的含量分别下降了54.5%和21.9%; β -折叠结构含量略有上升;而无规则卷曲结构含量上升了8.2倍。

参考文献

- [1] 张爱荣.糖基化反应改善鲢鱼肌肉原纤维蛋白功能特性的研究[D].北京:中国农业大学,2005
- [2] 张雪梅,蒋雨.食品中蛋白质的功能(二)蛋白质结构与食品功能性质的关系研究[J].肉类研究,2009,5:71-75
- [3] 莫文敏,曾庆孝.蛋白质改性研究进展[J].食品科学,2000,1(21):6-10
- [4] Jinshui Wang, Rui Guo, Ke Bian. Application status and development trend of enzyme in modification of food proteins [A]. 2010 First International Conference on Cellular, Molecular Biology, Biophysics and Bioengineering (CMBB) [C]. 2010
- [5] 金哲,崔成哲,郭晓玉,等.蛋白质的改性技术及应用进展[J].民营科技,2007,9:31
- [6] 胡爱军,陈琼希,郑捷,等.超声波处理对鲢鱼鱼肉蛋白性质的影响[J].食品工业,2012,2:47-49
- [7] Kato A, Nakai S. Hydrophobicity determined by a fluorescence probe methods and its correlation with surface properties of proteins [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1980, 624: 13-20
- [8] Beveridge T, Toma S J, Nakai S. Determination of SH-and SS-groups in some food proteins using Ellman's reagent [J]. Journal of Food Science, 1974, 39: 49-51
- [9] 乔立文,杨严俊.热处理对于鸡蛋全蛋液功能性的影响[EB/OL].中国科技论文在线,2010-09-27
- [10] Byler D M, Susi H. Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra [J]. Biopolymers, 1986, 25(3): 469-487
- [11] Hopp T P, Woods K R. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences [J]. Proceedings of the National Academy Science, 1982, 78(6): 3824-3828
- [12] 穆利霞.大豆蛋白-糖接枝改性及其结构与功能特性研究[D].广州:华南理工大学,2010
- [13] Kato H, Tsuchida H. Estimation of Melanoidin structure by pyrolysis and oxidation [J]. Progress in Food and Nutritional Science, 1981, 5(1-6): 147-156
- [14] 刘斌,马海乐,李树君,等.应用 FTIR 研究超声对牛血清白蛋白二级结构的影响[J].光谱学与光谱分析,2010,30(8): 2072-2076
- [15] 宋国胜,胡娟,沈兴,等.超声辅助冷冻对面筋蛋白二级结构的影响[J].现代食品科技,2009,25(8): 860-864