

不同频率超声对鲢鱼肌原纤维蛋白结构的影响

胡爱军^{1,2}, 卢秀丽¹, 郑捷¹, 田方圆¹, 孙本进¹, 王云¹, 廖少华²

(1. 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457) (2. 天津龙威粮油工业有限公司, 天津 300457)

摘要: 以鲢鱼为原料, 采用单频、双频和三频超声分别处理鲢鱼肌原纤维蛋白, 研究不同频率超声处理对肌原纤维蛋白表面疏水性和表面巯基含量的影响。结果表明: 经不同超声处理后, 随着超声时间的延长, 肌原纤维蛋白的表面疏水性和表面巯基含量均呈现先增大后减小的趋势。单频和三频超声在分别处理肌原纤维蛋白 15 min 和 10 min 后, 其表面疏水性和表面巯基含量达到最高值。与未超声处理蛋白的表面疏水性相比, 80 kHz 超声处理 15 min 后的蛋白表面疏水性提高了 56.88%, 三频超声处理 10 min 的蛋白表面疏水性提高了 65.34%。与未超声处理蛋白的表面巯基含量相比, 80 kHz 超声处理 15 min 后的蛋白表面巯基含量提高了 11.19%, 三频超声处理 10 min 的蛋白表面巯基含量提高了 13.32%。双频超声对蛋白表面疏水性和表面巯基的影响作用介于单频和三频超声处理之间。

关键词: 超声处理; 鲢鱼; 肌原纤维蛋白; 结构

文章编号: 1673-9078(2014)3-23-27

Effect of Different Frequency Ultrasonic Treatments on the Structures of Silver Carp Myofibrillar Protein

HU Ai-jun^{1,2}, LU Xiu-li¹, ZHENG Jie¹, TIAN Fang-yuan¹, SUN Ben-jin¹, WANG Yun¹, LIAO Shao-hua²

(1. College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China) (2. Tianjin Longwit Oils & Grains Industrial Co., Ltd, Tianjin 300457, China)

Abstract: Silver carp was treated by using single frequency ultrasound, dual-frequency ultrasound and tri-frequency ultrasound respectively, and the surface hydrophobicity and surface sulfhydryl amount of silver carp myofibrillar protein were studied. The results indicated that surface hydrophobicity and surface sulfhydryl amount increased firstly and then decreased as ultrasonic time extended. The surface hydrophobicity and surface sulfhydryl amount increased to the maximum when the protein was treated with single frequency ultrasound and tri-frequency ultrasound respectively for 15 min and 10 min. The surface hydrophobicity of the protein treated with 80 kHz ultrasonic for 15 min and tri-frequency ultrasound increased by 56.88% and 65.34% individually compared to protein without ultrasound treatment. Meanwhile, surface sulfhydryl amount increased by 11.19% and 13.32%, respectively. The effect of dual-frequency ultrasound on the surface hydrophobicity and surface sulfhydryl amount was higher than the effect of single ultrasound but lower than that of the tri-frequency.

Key words: Ultrasonic treatment; Silver carp; myofibrillar protein; structures

我国是世界水产品生产大国, 淡水渔业资源丰富, 淡水总面积约 1760 万公顷, 占国土面积的 1.8%^[1]。在淡水鱼中, 鲢鱼的产量非常高, 且鲢鱼具有易饲养、成长快、成本低等特点。但由于鲢鱼肉薄刺多, 土腥味也重, 使其销量受到限制。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

收稿日期: 2013-10-17

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31071608); 中国博士后科学基金面上资助项目 (2013M540211); 天津科技大学科学研究基金资助项目 (20110104); 天津东丽区科技创新专项基金项目 (2010312)

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

急待解决的问题^[2]。鲢鱼肌原纤维蛋白是鱼肉的重要组成部分, 也是鱼肉中最主要的蛋白, 在肉的加工贮存中起到非常重要的作用。鲢鱼肌原纤维蛋白是肌肉中最重要的蛋白质, 约占总蛋白含量 50~55%^[3-4]。

随着食品工业飞速发展, 迫切需要大量具有功能特性和营养特性的蛋白质, 作为食品原料成分或添加基料。因此, 一方面要大力开发具有优良特性的蛋白质资源, 另一方面要通过特定的方法对现有的蛋白质进行改性, 以满足现代食品开发与加工的需要, 使其应用领域更广阔。蛋白质的功能特性对食品在加工和制造中的理化性质有着很大的影响, 也常被用来评价食品的质量特性^[5]。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。蛋白质的改性就是人为地对蛋白质结构进行修饰,通过适当的改性技术以提高蛋白质的功能特性,拓宽蛋白质在食品工业中的应用范围。蛋白质的改性方法主要有物理改性、化学改性、酶法改性和基因工程改性等。化学法主要有糖基化^[6-7]、酰化、磷酸化、脱酰胺、共价交联、水解及氧化等^[8],酶法主要采用某些蛋白酶处理蛋白质,物理法主要集中在蛋白质的热处理、挤压、蒸煮等作用,基因工程法是通过重组蛋白质的合成基因来改善蛋白质的功能性质^[9],这些改性方法存在不同程度的缺陷和不足。超声波改性是一种物理改性方法,它具有作用时间短、操作简单、易控制及能耗较低等优点。

本论文在前期研究超声处理对鲢鱼鱼肉蛋白结构和性质影响^[10-12]的基础上进一步研究了超声波对鲢鱼鱼肉肌原纤维蛋白结构的影响,为进一步深入研究鲢鱼肌原纤维蛋白奠定一定的基础,也为研究鱼肉蛋白及新的优质蛋白质资源和蛋白食品的开发利用提供较好的理论及技术参考。

1 材料与方法

1.1 原料及设备

1.1.1 原料

鲢鱼,天津市塘沽区第三大街人人乐超市。

1.1.2 试剂

盐酸,分析纯,北京化工厂;氢氧化钠,分析纯,天津市化学试剂一厂;氯化钠,分析纯,天津市化学试剂一厂;磷酸二氢钾,分析纯,天津市江天化工技术有限公司;Tris,分析纯,天津市博迪化工有限公司;甘氨酸,分析纯,北京鼎国生物技术有限责任公司;溴酚蓝,分析纯,Amresco公司;5,5'-二硫代-2-硝基苯甲酸(DTNB),上海华蓝化学科技有限公司;乙二胺四乙酸(EDTA),分析纯,天津市江天化工技术有限公司。

1.1.3 仪器设备

电子天平,深圳华恒仪器有限公司;凯氏定氮仪,天津玻璃仪器厂;pH计,上海理达仪器厂;MODULY OD-230型冷冻干燥机,美国热电公司;752型紫外可见分光光度计,上海菁华科技仪器有限公司;D66-101-1型电热鼓风干燥箱,天津市天宇实验仪器有限公司;TDZ5-WS多管架自动平衡离心机,湘仪离心机仪器有限公司;SB-1680DTY三频超声波装置,宁波新芝生物科技有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 鲢鱼鱼肉组分的测定

水分含量的测定:常压直接干燥法,按照GB 5009.3-2010中的水分测定方法;灰分含量的测定:马福炉法,按照GB 5009.4-2010中的灰分测定方法;脂肪含量的测定:索氏抽提法,按照GB/T 5009.6-2003中的脂肪测定方法;蛋白质含量的测定:微量凯氏定氮法,按照GB 5009.5-2010中的蛋白质测定方法。

1.2.2 鲢鱼肌原纤维蛋白的提取

鲜活鲢鱼宰杀后,去头、尾、鳞、皮、内脏,用冰水洗净,手工剔取白色鱼肉,绞碎,取一定质量鱼糜与4倍体积的pH 7.5的磷酸盐缓冲液混合,匀浆,离心,弃去上清液,所得沉淀再加入上述磷酸盐缓冲液匀浆、离心,重复3~4次。将最后的沉淀取出,在4℃下按试验设计要求在一定离子强度的氯化钠、pH溶液下溶解,于4℃静置一定时间后,纱布初滤,滤液经离心后得到上清液即为肌原纤维蛋白溶液,再将其透析、冻干即得肌原纤维蛋白。

1.2.3 鲢鱼肌原纤维蛋白表面疏水性的测定

依据Chelh等^[13]的方法。将肌原纤维蛋白溶于pH 7、20 mmol/L的磷酸盐溶液中,使蛋白质量浓度为5 mg/mL。取1 mL蛋白溶液,加入200 μL 1 mg/mL溴酚蓝,以无肌原纤维蛋白的磷酸盐溶液为对照。在3400 r/min离心30 min,取上清液稀释10倍,在595 nm波长处测定吸光度A。表面疏水性以溴酚蓝可结合的最终暴露埋藏在蛋白质构象内部的疏水性氨基酸残基的量来表示,计算公式如下:

$$\text{溴酚蓝}/\mu\text{g}=200\mu\text{g}\times(\text{A}_{\text{对照}}-\text{A}_{\text{样品}})/\text{A}_{\text{对照}}$$

1.2.4 鲢鱼肌原纤维蛋白表面巯基含量的测定

参照Beveridge等人^[14]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(0.086 mol/L Tris, 0.09 mol/L 甘氨酸, 4 mmol/L EDTA, pH 8.0)中,配成Ellman试剂。称取15 mg样品溶于5 mL Tris-甘氨酸缓冲液中,漩涡震荡,加入50 μL Ellman试剂,将悬浮液置于室温(25±1℃)下保温1 h,离心15 min,以未加蛋白混合液做空白,测定412 nm处吸光值(A₄₁₂)。计算公式如下:

$$\text{SH}(\mu\text{mol/g})=73.53\text{A}_{412}/\text{C}$$

注:73.53=10⁶/1.36×10⁴, 1.36×10⁴为摩尔消光系数,C为样品的蛋白质浓度,mg/mL。

2 结果与讨论

2.1 鲢鱼鱼肉基本组分

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 |
|-------|------------|------------|-----------|-----------|
| 百分比/% | 72.77±0.98 | 16.59±1.05 | 1.18±0.06 | 3.81±0.36 |

注：实验数据为 3 次重复试验的平均值，下同。

2.2 超声波对鲢鱼肌原纤维蛋白表面疏水性的影响

的影响

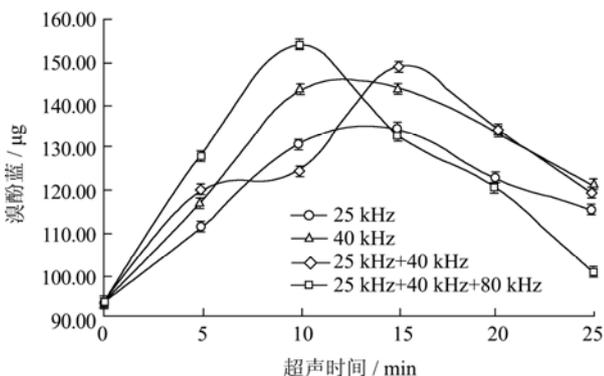


图 1 25 kHz、40 kHz 及多频超声波处理对鲢鱼肌原纤维蛋白表面疏水性的影响

Fig.1 Effects of 25 kHz, 40 kHz and multi-frequency ultrasound on surface hydrophobicity of silver carp myofibrillar protein

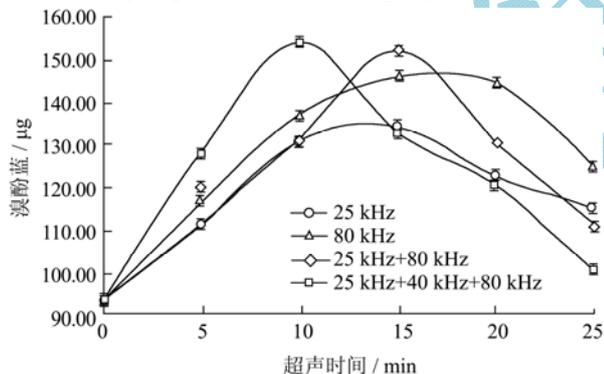


图 2 25 kHz、80 kHz 及多频超声波处理对鲢鱼肌原纤维蛋白表面疏水性的影响

Fig.2 Effects of 25 kHz, 80 kHz and multi-frequency ultrasound on surface hydrophobicity of silver carp myofibrillar protein

不同超声波条件下处理的鲢鱼肌原纤维蛋白的表面疏水性如图 1、图 2 和图 3。溴酚蓝具有结合疏水基团的作用，表面疏水性以溴酚蓝可结合的最终暴露出埋藏在蛋白质构象内部的疏水性氨基酸残基的量来表示。肌原纤维蛋白结合的溴酚蓝的量越大，表面疏水性也越高。表面疏水性说明蛋白质分子内部疏水集团的暴露程度，表面疏水基团暴露的越多，肌原纤维蛋白的表面疏水性越大。由图可以看出，经不同超声

处理后，随超声时间的延长，肌原纤维蛋白的表面疏水性均呈现先增大后减小的趋势，单频超声处理肌原纤维蛋白 15 min 后表面疏水性达到最高，三频超声作用 10 min 后，其肌原纤维蛋白的表面疏水性就达到最好，且高于单频超声和双频超声处理组的表面疏水性。与未超声处理蛋白的表面疏水性相比，80 kHz 超声处理 15 min 后的蛋白表面疏水性提高了 56.88%，三频超声处理 10 min 的蛋白表面疏水性提高了 65.34%。这可能是由于在超声辐射作用下，蛋白折叠的链展开，使得分子内部的疏水性基团暴露出来，表面疏水性增加。随超声时间的进一步延长和超声作用的加强，由于超声产生的机械效应和热效应使蛋白凝沉或聚集，表面疏水性开始下降。三频超声对蛋白表面疏水性产生了更大的影响，而单频超声对蛋白表面疏水性的影响较小，原因可能是多频超声比单频超声产生的作用更均匀、机械作用更强烈。

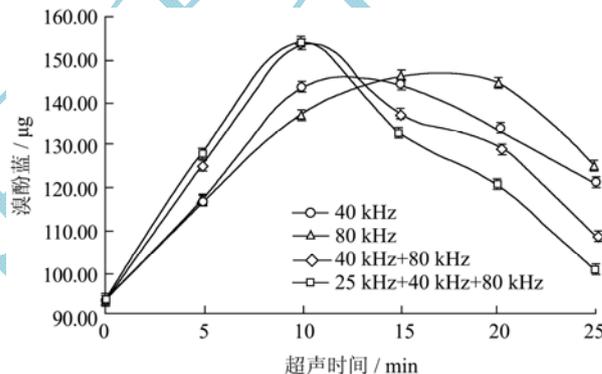


图 3 40 kHz、80 kHz 及多频超声波处理对鲢鱼肌原纤维蛋白表面疏水性的影响

Fig.3 Effects of 40 kHz, 80 kHz and multi-frequency ultrasound on surface hydrophobicity of silver carp myofibrillar protein

2.3 超声波对鲢鱼肌原纤维蛋白表面-SH 的影响

响

不同超声波条件下处理的鲢鱼肌原纤维蛋白的表面巯基含量如图 4、图 5 和图 6。多肽链的构象改变，如包埋及暴露，一定程度上会反映在表面巯基含量的变化上，从表面巯基含量的变化中可以得到关于多肽链的构象的变化信息。

由图可以看出，经不同超声处理后，肌原纤维蛋白的表面巯基含量均呈现先增大后减小的趋势，单频超声处理肌原纤维蛋白 15 min 后巯基含量达到最高，三频超声作用 10 min 后，其肌原纤维蛋白的巯基含量就达到最好。与未超声处理蛋白的表面巯基含量相比，80 kHz 超声处理 15 min 后的蛋白表面巯基含量提高了 11.19%，三频超声处理 10 min 的蛋白表面巯基含

量提高了 13.32%。

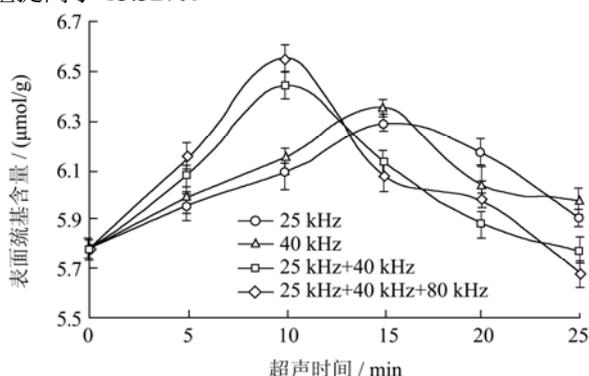


图 4 25 kHz、40 kHz 及多频超声波处理对鲢鱼肌原纤维蛋白表面-SH 的影响

Fig.4 Effects of 25 kHz, 40 kHz and multi-frequency ultrasound on surface sulfhydryl of silver carp myofibrillar protein

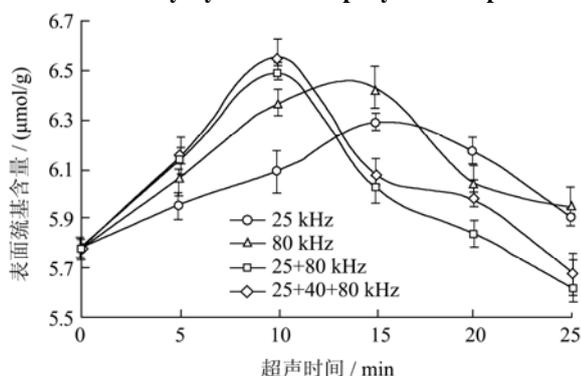


图 5 25 kHz、80 kHz 及多频超声波处理对鲢鱼肌原纤维蛋白表面-SH 的影响

Fig.5 Effects of 25 kHz, 80 kHz and multi-frequency ultrasound on surface sulfhydryl of silver carp myofibrillar protein

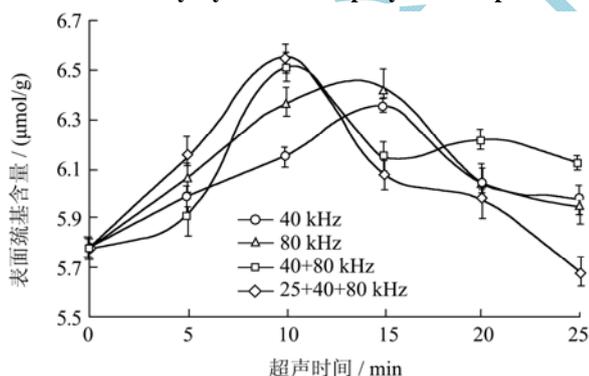


图 6 40 kHz、80 kHz 及多频超声波处理对鲢鱼肌原纤维蛋白表面-SH 的影响

Fig.6 Effects of 40 kHz, 80 kHz and multi-frequency ultrasound on surface sulfhydryl of silver carp myofibrillar protein

超声波作用使蛋白分子发生了机械性振荡,可能破坏了蛋白分子的空间结构,使肽链展开,疏水结合及离子结合的键被切断,埋藏在蛋白结构内部的巯基暴露于蛋白表面,使巯基含量增加。暴露出来的巯基很容易被空气中的 O₂ 氧化,可能生成二硫键、亚磺酸

或磺酸,导致蛋白巯基下降。与双频超声对蛋白表面巯基含量的影响相比,三频超声对蛋白表面巯基含量的影响更大,而单频超声对蛋白表面巯基含量的影响更小,原因可能是多频超声比单频超声产生的作用更强烈,对蛋白质的影响更大。

3 结论

3.1 经不同超声处理后,随超声时间的延长,肌原纤维蛋白的表面疏水性均呈现先增大后减小的趋势。单频和三频超声在分别处理肌原纤维蛋白 15 min 和 10 min 后,其表面疏水性达到最高。与未超声处理蛋白的表面疏水性相比,80 kHz 超声处理 15 min 后的蛋白表面疏水性提高了 56.88%,三频超声处理 10 min 的蛋白表面疏水性提高了 65.34%。

3.2 经不同超声处理后,肌原纤维蛋白的表面巯基含量均呈现先增大后减小的趋势。单频和三频超声在分别处理肌原纤维蛋白 15 min 和 10 min 后其巯基含量达到最高。与未超声处理蛋白的表面巯基含量相比,80 kHz 超声处理 15min 后的蛋白表面巯基含量提高了 11.19%,三频超声处理 10min 的蛋白表面巯基含量提高了 13.32%。

参考文献

- [1] 于巍.草鱼盐溶蛋白的提取及凝胶保水性和流变性质的研究[D].武汉:武汉工业学院,2008
YU Wei. Study on Abstraction of Carp Salt-soluble Protein Besides Water Holding and Rheological of Gel [D]. Wuhan: Wuhan Polytechnic University, 2008
- [2] 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
ZHANG Ai-rong. Study on Improvement of Functional Properties of Silver Carp Myofibrillar Proteins by Glycosylation Reaction [D]. Beijing: China Agricultural University, 2005
- [3] 周光宏,徐幸莲.肉品学[M].北京:中国农业出版社,1999
ZHOU Guang-hong, XU Xing-lian. Meat Science and Technology [M]. Beijing: China Agriculture Press, 1999
- [4] Foegeding E A, Dayton W R, and Allen C E. Evaluation of molecular interactions in myosin, fibrinogen and myosin fibrinogen gels [J]. J. Agric. Food Chem., 1987, 35(4): 559-563
- [5] Youling L, Xiong. Myofibrillar protein from different muscle fiber types: Implications of biochemical and functional properties in meat processing [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1994, 34(3): 293-320

- [6] Nishimura K, Murakoshi M, Katayama S, et al. Antioxidative ability of chicken myofibrillar protein developed by glycosylation and changes in the solubility and thermal stability [J]. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2011, 75(2): 247-254
- [7] DOU Chao-ran, YU Guo-ping, Jiang Lian Zhou, et al. Optimization of Glycosylating Condition for Soy Protein Isolates and Maltodextrin by Maillard Reaction [J]. *Advanced Materials Research*, 2012, 554-556: 1262-1267
- [8] 魏彦杰,杨斌.食品蛋白质改性研究[J].*肉类研究*,2010,5: 24-27
WEI Yan-jie, YANG Bin. Modification of Food Proteins [J]. *Meat Research*, 2010, 5: 24-27
- [9] 罗云波.食品生物技术导论[M].北京:中国农业大学出版社,2002
LUO Yun-bo. Introduction of Food Biotechnology [M]. Beijing: China Agriculture University Press, 2002
- [10] 胡爱军,陈琼希,郑捷,等.超声波处理对鲢鱼鱼肉蛋白质性质的影响[J].*食品工业*,2012(2):47-49
HU Ai-jun, CHEN Qiong-xi, ZHENG Jie, et al. Effect of Ultrasonic Treatment on the Properties of Silver Carp Protein [J]. *Food Industry*, 2012, 2: 47-49
- [11] 胡爱军,卢秀丽,郑捷,等.超声处理对鲢鱼鱼肉蛋白结构的影响[J].*现代食品科技*,2012,28(8):894-897
HU Ai-jun, LU Xiu-li, ZHENG Jie, et al. Effect of Ultrasonic Treatment on Protein Structures of Silver Carp [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2012, 28(8): 894-897
- [12] 胡爱军,卢秀丽,郑捷,等.不同处理方式对鲢鱼鱼肉蛋白乳化性的影响[J].*食品科学技术学报*,2013,31(3):13-16
HU Ai-jun, LU Xiu-li, ZHENG Jie, et al. Effects of different treatments on emulsification of silver carp protein [J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2013, 31(3): 13-16
- [13] Chelh I, Gatellier P, Sante-Lhoutellier V. Technical note: a simplified procedure for myofibril hydrophobicity determination [J]. *Meat Science*, 2006, 74(4): 681-683
- [14] 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(1): 49-51