

pH 值对碱溶法罗非鱼鱼糜制备及凝胶性质的影响

田金河¹, 王艳婕², 朱志伟¹, 曾庆孝¹

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640) (2. 河南科技学院生命科技学院, 河南新乡 453003)

摘要: 在 pH 0.5~12.5 的范围内, 采用碱溶法制备了罗非鱼鱼糜 (TS)。研究表明, 随着 pH 值的升高, TS 蛋白回收率得到显著提高, 但在 pH 值由 11.5 升至 12.5 时, 得率仅提高 11.56%, 而碱液耗费却增加了 77.65%; pH 值的升高使溶解蛋白的 ATP 酶活性急剧降低 (51.80%→0%), 而表现疏水性则表现出增强趋势, 表明 pH 值的升高促进了肌球蛋白的构象展开。电泳结果显示, pH 值升高并未使等电点处可溶性蛋白及 TS 中蛋白组分发生明显变化。pH 值的升高使 TS 白度先升高 (75.40→80.50), 之后下降 (→76.20); TS 凝胶破断力也表现出先升高后下降的趋势 (290.00→335.20→278.80 g), 表明极端的碱性条件 (>pH12.0) 会对 TS 凝胶品质产生负面影响。TS 凝胶的电泳结果表明, 不同 pH 值条件下提取的 TS 所制备的凝胶蛋白组分之间没有明显差别, 并且 TS 凝胶形成过程中没有显著的肌球蛋白交联发生, 意味着 TS 中内源谷氨酰胺转胺酶 (TG 酶) 活性相对于传统鱼糜变得很低, 这可能是由于在等电点处离心时 TG 酶与 TS 发生了分离。

关键词: 碱溶法; 罗非鱼; 鱼糜; 溶解 pH 值

文章编号: 1673-9078(2014)11-163-169

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.11.029

Effect of pH on the Preparation and Gelation Characteristics of Tilapia Surimi in Alkaline Solubilization/Isoelectric Precipitation

TIAN Jin-he¹, WANG Yan-jie², ZHU Zhi-wei¹, ZENG Qing-xiao¹

(1. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China)

Abstract: Tilapia surimi (TS) was prepared by alkaline solubilization/isoelectric precipitation (pH-shift) in the pH range 10.5~12.5. On increasing the pH values, the protein recovery from TS significantly increased. However, when the pH value was increased from 11.5 to 12.5, the protein recovery only increased by 11.56%, while the alkali consumption increased by 77.65%. The increased pH values sharply decreased the ATPase activity of solubilized proteins (51.80→0%), but increased the surface hydrophobicity, indicating that increasing the pH values promoted the unfolding of myosin. The electrophoresis results showed that increasing the pH values did not cause significant differences in the composition of soluble protein at the isoelectric point (pI). As the pH value increased, the whiteness of TS first increased from 75.40 to 80.50, and then decreased to 76.20; the breaking force of the TS gel also decreased after an initial increase (290.00 → 335.20 → 278.80 g). Both the aforementioned results suggested that treatment under extreme alkaline conditions (pH >12.0) produced a negative effect on the quality of the TS gel. The electrophoresis results of the TS gel suggested that no significant differences were found in the protein compositions of gel proteins prepared at different pH values. In addition, no significant cross-linking occurred in myosin during the formation of the TS gel, indicating that the activity of endogenous transglutaminase (TGase) was very low compared to that in traditional surimi. This was probably due to the separation between TGase and TS at the pI during the second centrifugation.

Key words: alkaline solubilization/isoelectric precipitation process; tilapia; surimi; dissolution pH value

罗非鱼生长适应性强, 繁殖快, 产量高, 并且肉质鲜美, 营养平衡, 是我国重要的水产养殖及加工贸易品之一^[1]。近年来罗非鱼鱼糜加工业得到发展, 其加工技术主要涉及: 采肉、漂洗、精滤和离心等程序, 处理过程需要大量的水洗, 导致大部分肌浆蛋白被冲走, 降低了蛋白利用率, 并带来大量高生物耗氧量的废水, 而且某些鱼种由于尺寸以及色泽原因难以用作传统鱼糜加工方法的原料^[2]。Hultin 等于 2000 年提出了新型鱼糜制备方法, 主要原理是利用极端碱性条件将鱼肉蛋白溶解, 并与鱼皮、骨以及脂质等杂质分离,

收稿日期: 2014-07-25

基金项目: 中央农业科技专项 (粤财农[2012]480 号); 广东省海洋渔业科技专项 (A201301C07)

作者简介: 田金河 (1977-), 男, 博士研究生, 主要从事食品加工与保藏技术研究

通讯作者: 朱志伟, 男, 博士, 主要从事食品加工与保藏技术研究

易品之一^[1]。近年来罗非鱼鱼糜加工业得到发展, 其加工技术主要涉及: 采肉、漂洗、精滤和离心等程序, 处理过程需要大量的水洗, 导致大部分肌浆蛋白被冲走, 降低了蛋白利用率, 并带来大量高生物耗氧量的废水, 而且某些鱼种由于尺寸以及色泽原因难以用作传统鱼糜加工方法的原料^[2]。Hultin 等于 2000 年提出了新型鱼糜制备方法, 主要原理是利用极端碱性条件将鱼肉蛋白溶解, 并与鱼皮、骨以及脂质等杂质分离,

再于等电点沉淀回收^[3] (又称为 pH-shift 法), 这一新技术充分克服了上述传统加工方法的缺点, 大大提高了蛋白的提取效率, 并且所提取的鱼糜具有良好的凝胶特性, 为下游食品加工提供了新型的原材料^[4]。近年来, 关于 pH-shift 方法的研究多集中于美国、冰岛、瑞典等国, 且多是仅针对一个到两个酸溶或碱溶的 pH 点研究其得率或凝胶特性^[5-6], 并且不同鱼种所选 pH 点也各不相同; 由于不同酸碱强度会导致蛋白产生不同程度的构象展开, 进而可能带来不同的理化及功能特性 (如凝胶特性)^[7], 因此不同研究结果的可比性较差。目前研究不同碱溶 pH 条件对鱼糜理化及凝胶特性影响的报道尚不多见, 而这方面的信息却是 pH-shift 技术应用所亟需的。本文以罗非鱼无骨鱼排作为研究对象, 研究了不同溶解条件 (弱碱性到极端碱性) 下 pH-shift 方法所提取的罗非鱼鱼糜 (Tilapia Surimi, TS) 在理化, 蛋白组分和构象, 以及凝胶特性方面的差异, 以期对水产行业整体技术升级提供基础研究数据。

1 材料与方法

1.1 原料处理

新鲜的罗非鱼 (750~1000 g) 购于广州市黄沙水产批发市场, 宰杀后只取背肌两侧无骨鱼排, 冰水清洗后绞碎、分装、降温冷冻 (2 h) 并于 -40 °C 冷柜内保存备用 (1 个月)。

1.2 pH-shift 提取 TS 的过程

碱溶 pH-shift 法参照 Davenport^[7]的方法稍作修改。冷冻的鱼肉取出后, 室温下解冻 20 min, 加入 9 倍体积的 0 °C 水中 (去离子水), 进行匀浆; 匀浆后以 2 mol/L NaOH 分别调至一定碱性 (pH 10.5、11.0、11.5、12.0 以及 12.5), 之后将鱼肉匀浆在 12000 g, 10 min, 1 °C 的条件下离心 (第 1 次离心); 离心后, 利用筛网 (筛孔 0.5×0.5 mm) 将上层脂肪层和下层沉淀层, 以及中间层蛋白质溶液分离; 将蛋白质溶液以 2 mol/L HCl 调节至等电点 (pH 5.5), 使蛋白沉淀, 并在 12000 g, 10 min, 1 °C 条件下离心 (第 2 次离心), 收集离心后的沉淀 (即为 TS), 并测定重量和水分含量; 整个提取过程采用冰浴措施, 控制样品温度在 0~5 °C, 每个 pH 值处理方法重复 3 次。

1.3 蛋白质浓度及溶解度的测定

本文中所有涉及溶液中蛋白质浓度测定均采用 lowry 法, 用 10~100 μg/mL 浓度的牛血清蛋白 (BSA)

溶液制作标准曲线。TS 中蛋白质含量采用凯式定氮法测量 (GB50095-2010), 蛋白换算系数为 6.25。

第 1 次离心后上清液蛋白浓度与离心前匀浆中蛋白浓度的比例为鱼肉匀浆蛋白溶解度 (%); 第 2 次离心后上清液蛋白浓度与离心前蛋白 (等电点) 浆液中蛋白浓度的比例为等电点蛋白溶解度。每个样品测试重复 3 次, 取平均值。

1.4 TS 蛋白回收率的计算

TS 蛋白回收率按照公式 (1) 计算, 其中, R 代表回收率, W 代表重量, M 代表水分含量; C 代表蛋白含量; $C_{\text{mince}}=87.0\%$; $M_{\text{mince}}=79.6\%$ (mince, 初始鱼肉); 每个样品测试重复 3 次, 取平均值。

$$R = \frac{W_{TPI} \times (1 - M_{TPI}) \times C_{TPI}}{W_{\text{mince}} \times (1 - M_{\text{mince}}) \times C_{\text{mince}}} \times 100\% \quad (1)$$

1.5 沉淀比计算

第 1 次离心后, 沉淀及脂肪层的质量与鱼肉匀浆液初始体积的比值为沉淀比 (% , m/V)。

1.6 TS 白度测定

TS 白度的测定采用 CIE L*a*b* 色差系统, 利用 CR-400 色差计测定样品的 L、a* 和 b* 值, 并根据公式 (2) 计算样品的白度 (W)。

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

测试时, 每个样品平行测试 6 次, 取平均值及标准偏差作为结果。

1.7 ATP 酶活性测定

在第一次离心之后, 利用 2 mol/L HCl 将上清液调至 pH 7.05, 之后测定 ATP 酶活性。测定过程采用超微 Ca²⁺-ATP 酶活性测定试剂盒。ATPase 活性以相对百分比来表示, 以鱼肉匀浆原液中蛋白的 ATP 酶活性为 100% 来计算。每个样品测试重复 3 次, 取平均值。

1.8 表观疏水性测定

取第一次离心后蛋白溶液稀释至 0.025~0.2 mg/mL, 向每个样品 (5 mL) 中加入 25 μL 8 mM 的 8-苯胺基-1-萘磺酸 (ANS) 储备液, 混合均匀后避光反应 15 min, 然后在激发波长 390 nm、发射波长 470 nm 及狭缝宽 5 nm 条件下测定样品的荧光强度值 (FI), 减去各样品溶液未加 ANS 时的荧光强度以及空白样品缓冲溶液和 ANS 混合物的荧光强度即为对

应的相对荧光强度值 (RFI)。以 RFI 对蛋白质浓度作图, 其初始斜率作为样品表面疏水性指标。

1.9 TS 凝胶的制备

利用滤布将 TS 水分降低至质量分数 80% 以下并将其调节至 pH 7.05, 之后加入冰水及 NaCl, 使最终样品水分含量 80%, NaCl 含量 3%。然后在冰浴条件下将其斩拌至形成均匀的粘稠糊状物, 真空抽气后注入 $\Phi 30\text{mm}$ 的样品管内并将两端密封。制备凝胶时采用两种方法: 有 setting ($40\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 min → $90\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 min) 和无 setting ($90\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 min) 的样品。凝胶样品制备后装入样品袋中于 $0\sim 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的冰箱内保存至少 24 h。

1.10 TS 凝胶质构测定

TS 凝胶强度采用穿刺方法测定: 凝胶样品于室温静置 2 h 后切成 25 mm 长的圆柱形, 竖直放置于 TA-XT2i 质构仪样品架上, 采用穿刺模式, P/S5 探头, 以 1 mm/s 的速度刺入样品中心, 刺入距离为 15 mm, 记录刺入过程中第一次最大峰值的力作为样品的破断力 (g)。每个样品平行测试 5 次, 取平均值及标准偏差作为结果。每个样品测试重复 5 次, 取平均值。

1.11 十二烷基磺酸钠-凝胶电泳分析 (SDS-PAGE)

蛋白质电泳分析采用 Invitrogen 立式微量电泳槽及 NuPAGE® Novex® 3~8% Tris-Acetate 和 4-12% Bis-tris 蛋白预制梯度胶板 (1.0 mm 厚, 15 孔) (美国 invitrogen 公司)。样品加入到 pH 8.0 的脲素缓冲溶液中, 密封振荡 3 h 彻底溶解备用; 对于 TS 及 TS 凝胶样品, 电泳上样量为 15 μg /泳道; 第 2 次离心上清液蛋白上样量为 10 μg /泳道。

1.12 数据分析

利用 SAS 软件, 采用邓肯多线程测试 (Duncan Multiple Range) 进行不同样品平均值之间的方差分析, 确定差异显著性, 方差分析置信度为 95%。

2 结果与讨论

2.1 pH 值对匀浆液中蛋白溶解度以及沉淀比的影响

随着 pH 值由弱碱性转变为强碱性 (pH 10.5 → 11.5) (图 1), 匀浆液中蛋白溶解度显著提高, 但是

当 pH 值进一步转变至极端碱性 (pH 11.5 → 12.0 → 12.5) 时, 蛋白溶解度没有显著增加, 与此前的相关报道结果相一致^[8]; 沉淀比则随着 pH 值的升高而显著降低, 当 pH 值由 12.0 进一步升高至 12.5 时, 沉淀比没有进一步显著降低, 表明大部分可溶性蛋白已经溶出。在碱性条件下, 高浓度的 $[\text{OH}^-]$ 使肌原纤维蛋白分子中含氨基侧链残基, 如赖氨酸, 酪氨酸及半胱氨酸, 发生去质子化, 从而使整个蛋白分子带负电荷并产生的静电斥力, 中性条件下以不溶解状态存在的蛋白聚集体 (如, 肌原纤维超微结构, 肌节) 分散为蛋白低聚体或单体 (肌球蛋白, 肌动蛋白以及副肌球蛋白), 转变为溶解状态。上述结果表明, pH 值由弱碱性升高至强碱性 (10.5 → 11.5), 能够显著促进蛋白聚集体的解离和溶解, 使更多不溶解的肌原纤维蛋白从原始的肌节结构的束缚中释放出来, 减少沉淀中蛋白含量; 但在 pH 11.5 的条件下, 可能由于大部分肌原纤维蛋白已经溶解 (97.6%), 蛋白溶解度接近极限 (100%), 因而进一步提高 pH 值带来的促进溶解作用变得不再显著。

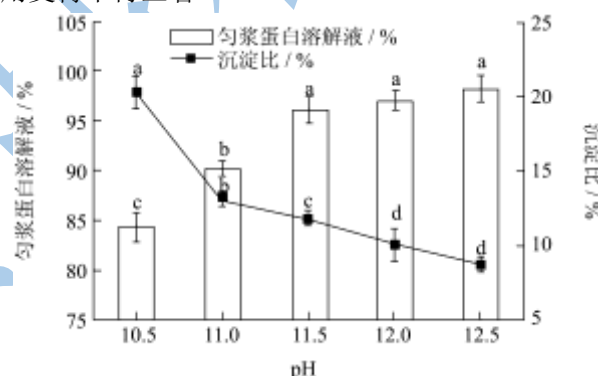


图 1 pH 值对鱼肉匀浆蛋白溶解度及沉淀比的影响

Fig.1 Effects of pH on the solubility and sedimentation coefficient of muscle homogenate protein

2.2 pH 值对碱溶蛋白等电点溶解度以及 TS 蛋白回收率的影响

随着 pH 值的升高, 碱溶蛋白在等电点处的溶解度显著降低 (图 2), 这表明 pH 值的升高会导致更多的蛋白在等电点发生沉淀。引起等电点蛋白溶解度下降的原因可能在于 pH 值的升高, 使蛋白在更大程度上发生解构 (unfolding), 即变性, 因而在等电点处发生聚集 (aggregate) 而沉淀, 导致溶解性降低。其中肌浆蛋白的溶解度降低可能是由于自身受强碱性的影响发生解构 (如表观疏水性) 因而发生变性沉淀, 也可能是由于肌原纤维蛋白, 特别是肌球蛋白, 发生蛋白聚集沉淀时, 与肌浆蛋白发生共沉, 引起溶解度降

低; Krisinsson 的研究结果表明^[8], 碱性条件下引起的肌浆蛋白变性程度很小, 因而引起等电点处蛋白溶解度减小的原因应该主要是由于肌球蛋白在更高的 pH 值处理后, 暴露更多的疏水或二硫键, 这些基团可能和肌浆蛋白发生结合, 引起更多的肌浆蛋白与肌球蛋白发生共沉, 导致等电点处蛋白溶解度降低。

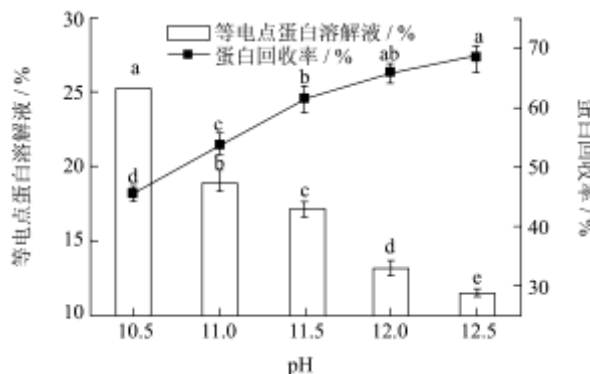


图2 pH 值对碱溶蛋白等电点溶解度及 TS 蛋白回收率的影响
Fig.2 Effects of pH on the solubility of solubilized protein at pI and the recoveries of TS protein

图2 结果还显示, 提高 pH 值能够显著提高 TS 蛋白回收率。结合图 1 的结果, 即匀浆蛋白溶解度及沉淀比在 pH12.0~12.5 区间没有显著性变化, 由强碱性升高至极端碱性过程中 (pH11.5→12.5), TS 蛋白回收率的显著增加更多的是由于等电点蛋白溶解度的降低, 即更多的蛋白被沉淀并进入 TS 中。此前的研究中多以匀浆中蛋白溶解度最大的 pH 点作为 pH-shift 方法的碱溶或酸溶条件^[6]以获取最大的蛋白回收率; 本研究结果表明, 等电点处的蛋白溶解度也应作为选择 pH-shift 方法碱溶或酸溶条件的重要指标。

2.3 调节至不同 pH 值的碱液耗费用量

表 1 调节鱼肉匀浆 pH 值耗碱液量

Table 1 Alkaline consumption upon pH adjustment of fish homogenate

溶解 pH 值	碱液耗用量(2 mol/L NaOH, μL/g 鱼肉)	碱液相对耗费率/% (以调节至 pH 10.5 为基准)
10.5	48.88±0.88	100±1.80
11.0	63.20±1.13	129.30±2.31
11.5	85.00±0.00	173.90±0.00
12.0	111.50±1.25	228.11±2.56
12.5	151.75±1.00	310.45±2.05

表 1 是鱼肉匀浆调至不同 pH 值所耗碱液量。随着 pH 值升高, 耗碱液量也剧增, 这在很大程度上是由于 pH 值与溶液中[H⁺]浓度呈负幂指数相关导致; 当 pH 值由 11.5 升高至 12.5 时, 需要多耗费 66 μL/g 鱼肉的 2 mol/L NaOH, 根据图 2 结果, 这意味着蛋白

回收率由 61.4% 提高到 68.5% (增加 11.56%), 需要多耗费 77.65% 的碱液量, 同时调回等电点所耗费的酸液量也会相应增加。

2.4 pH 值对等电点可溶性蛋白及 TS 组分的影响

第 2 次离心后上清液中的蛋白电泳谱带 (图 3a) 表明, 碱溶蛋白在等电点处仍然可溶的主要是肌浆蛋白 (箭头所示), 如磷酸化酶 (97 kDa), 烯醇酶 (51 kDa), 肌酸激酶和醛缩酶 (39~41 kDa)、血 (肌) 红球蛋白 (17 kDa), 以及中过敏蛋白 (10~13 kDa); 同时仍有一定量的肌原纤维蛋白 (圆点标示), 包括肌动蛋白 (41 kDa) 以及副肌球蛋白 β (37 kDa), 保持可溶; 而肌球蛋白重链 (205 kDa) 完全消失, 表明肌球蛋白完全沉淀。TS 蛋白电泳谱带则显示 (图 3b), 肌球蛋白、肌动蛋白以及副肌球蛋白 (包括 tropomyosin β 和 α, 37 和 33 kDa) 等肌原纤维蛋白 (圆点标示) 是 TS 中的主要成分。

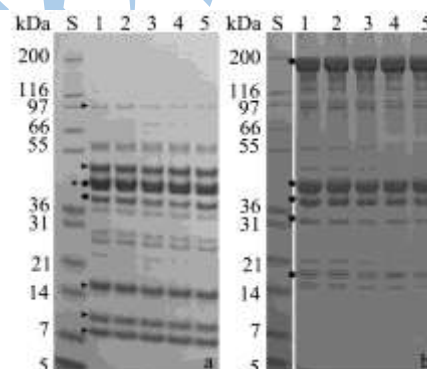


图 3 第二次离心后上清液中蛋白 (a) 以及 TS 蛋白 (b) 谱带
Fig.3 Bands corresponding to proteins in the supernatant of the second centrifugation (a) and TS protein (b)

注: S, 标准蛋白; 泳道 1-5 分别对应经过 pH 10.5、11.0、11.5、12.0 以及 12.5 处理后的样品。

经过不同碱性 pH 值处理后, 等电点处可溶性蛋白组分并未发生明显变化 (图 3a); 这一方面可能是由于等电点处可溶性蛋白多为肌浆蛋白, 其等电点范围与肌原纤维蛋白不同, 没有处于 pH5~6 之间; 另一方面, 碱性的强弱对这些肌浆蛋白的构象变化产生影响较小, 没有引起变性而聚集发生沉淀, 其相互比例也未发生变化^[8], 这印证了我们在前面关于等电点处蛋白溶解度降低的推测, 即肌浆蛋白是由于部分和肌原纤维蛋白发生的共沉而降低了溶解度。图 3b 显示, TS 凝胶中蛋白组分也未发生明显变化; 结合匀浆蛋白溶解度随着 pH 值的升高而增加的结果, 说明肌原纤维蛋白的溶解程度增加, 是以肌原纤维超微结构基本

单元（肌节）的整体解离的方式发生的，即组成粗丝的肌球蛋白和组成细丝的肌动蛋白以及副肌球蛋白同时转变为溶解状态，因而它们之间的相对比例没有明显变化。需要指出的是，等电点蛋白溶解度结果显示（图 2，25.2%→11.5%），pH 值的升高，会使更多的肌浆蛋白发生沉淀；由于等电点处均未发现肌球蛋白重链，可以推测出，极端碱性 pH 值导致更多的肌浆蛋白进入 TS，从而使肌球蛋白在 TS 中的相对比例降低；不过降低的幅度可能较小，在 TS 的蛋白电泳图谱中无法表现出来。

2.5 pH 值对碱溶蛋白表观疏水性的影响

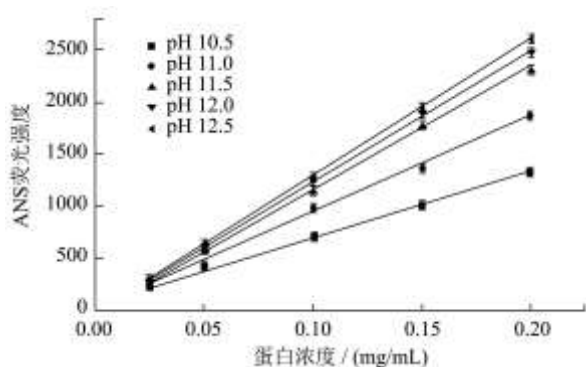


图 4 pH 值对碱溶蛋白表观疏水性的影响

Fig.4 Effect of pH on the surface hydrophobicity of solubilized protein

随着 pH 值的升高，匀浆中溶解蛋白的表观疏水性逐渐升高（图 4）。表观疏水性主要是由于蛋白分子暴露到表面的疏水基团所致，表观疏水性的升高，反映了蛋白分子构象更大程度的展开，特别是肌球蛋白头部的三级结构的展开^[9]。pH 值由 10.5 提高到 11.5 的过程中，表观疏水性的大幅增加，表明碱性增强会使肌球蛋白构象在更大程度上展开；而由 pH 11.5 升高到 12.5 的过程中，表观疏水性变化幅度减小，说明极端碱溶条件对蛋白构象的进一步展开影响不大。

2.6 pH 值对碱溶蛋白 ATP 酶活性及 TS 白度的影响

图 5 的结果显示，pH 值的升高，会导致碱溶蛋白在恢复到中性后的 ATP 酶活性急剧减小，超过 pH11.5 之后，ATP 酶活性接近完全丧失（51.80%→0%）。肌原纤维蛋白的 ATP 酶活性主要由于肌球蛋白重链的头部与两个核心轻链亚基之间所形成的四级蛋白构象所产生^[10]；当肌球蛋白处于碱性环境时，高浓度的[OH⁻]促使轻链与重链发生一定程度的解离，并且这种解离在恢复至中性后无法恢复到原始的构象状态，导致

ATP 酶活性部分丧失^[11]。图 5 的结果表明碱性的强弱会剧烈影响肌球蛋白的轻链与重链的解离程度，当 pH 值升高至 11.5 后，肌球蛋白核心轻链和重链基本上彻底解离。ATP 酶活性的变化从一定程度上反映了 pH 值的变化会导致肌原纤维原始结构在更大程度上被破坏，使肌球蛋白由原始有序的肌原纤维粗丝状态分散为单体肌球蛋白状态。

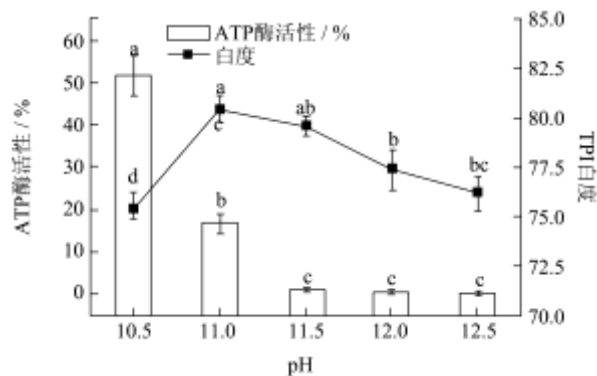


图 5 pH 值对碱溶蛋白恢复至中性后 ATP 酶活性以及 TS 白度的影响

Fig.5 Effect of pH on the ATPase activity of solubilized protein adjusted to neutral and the whiteness of TS

当 pH 由 10.5 升高至 11.0 时，TS 的白度显著增加（75.40→80.50），但是进一步升高却使 TS 白度降低，并在 pH12.5 时降至最低（76.2）。碱溶蛋白表观疏水性和 ATP 酶活性的变化显示了碱溶后的蛋白在分子构象和肌原纤维的超微结构上发生了变化，包括更多的疏水基团暴露到分子表面以及粗丝和细丝解离为单体的肌球蛋白、肌动蛋白和副肌球蛋白，这些变化可能使得肌原纤维蛋白由碱性溶解状态回调至等电点过程中，不同蛋白之间结合（如疏水相互作用导致的不同肌球蛋白头部之间，以及肌球蛋白与肌动蛋白之间的相互结合）机会增大，形成了区别于原始肌原纤维所具有的高度有序的粗丝和细丝的结构。这种结构从蛋白分子构象的角度来看，是多肽链的无序错乱折叠（misfolding），但是从蛋白分子单体（如肌球蛋白，肌动蛋白以及副肌球蛋白等）角度来看，则是一种比肌原纤维原始结构更为均匀的单体蛋白分子分散结构，这有可能使 TS 具有更为均一和致密的结构，使其形成对光更好的反射，引起了 pH 值由 10.5 升高至 11.0 时的白度增加；而当 pH 值进一步增强时，蛋白分子分散程度的变化减小，而更多的肌浆蛋白在等电点沉淀，特别是血（肌）红球蛋白（图 3，17 kDa），进入到 TS 中，成为影响 TS 白度的主要因素，导致 TS 白度下降。

2.7 pH 值对 TS 凝胶强度的影响

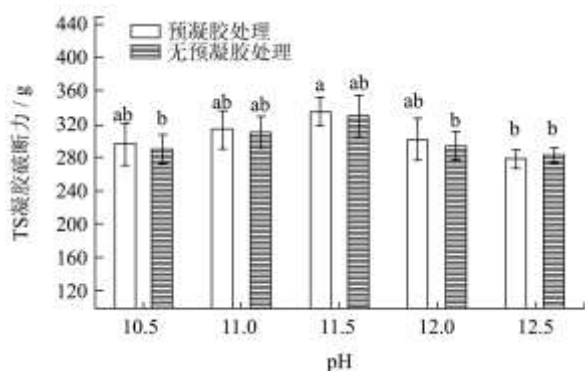


图6 溶解 pH 值对 TS 凝胶破断力的影响

Fig.6 Effect of pH on the breaking force of TS gel

图6显示随着pH值的升高(10.5→11.5), TS凝胶强度得到提高, 虽然提高的幅度并不十分显著。但当pH值由11.5升高至12.0以及12.5时, TS凝胶强度发生显著下降。肌球蛋白是肌肉蛋白形成凝胶过程中的关键组分, 其分散程度是影响蛋白分子间在受热过程中发生相互作用的重要因素; 而肌球蛋白分子间的疏水作用则是形成凝胶强度的重要作用力之一^[12-13]。ATP酶活性以及表观疏水性的变化反映出较高的pH值会增大肌球蛋白分散程度以及疏水基团暴露程度, 这可能是pH值由10.5升高到11.5导致TS凝胶强度升高的原因。但随着溶解pH值进一步升高(pH11.5→12.5), ATP酶和表观疏水性发生的变化不大, 而等电点蛋白溶解度的进一步显著减小(图3)导致更多的肌浆蛋白进入到TS中, 这些可能会对肌球蛋白产生稀释作用, 因而使凝胶强度显著降低^[14]。

对于传统方法制备得到的鱼糜, 由于含有内源谷氨酰胺转氨酶(TGase), 能够催化肌球蛋白发生交链反应, 制备凝胶过程中的setting步骤会显著提高凝胶强度^[13]。而本研究中, setting过程对所有pH值条件下提取的TS都未表现出显著改善凝胶强度的效果, 这可能是由于碱溶pH-shift过程中, 内源TGase在肌原纤维蛋白在等电点处仍然是可溶的, 离心时没有沉淀, 因而与TS发生分离, 无法发挥催化肌球蛋白交链反应的作用。

2.8 TS凝胶蛋白组分

图7中是不同处理条件提取的TS凝胶蛋白组份电泳谱带。图中显示, 形成TS凝胶的主要蛋白仍然是三种主要的肌原纤维蛋白: 肌球蛋白、肌动蛋白以及副肌球蛋白(圆点标示); 所有样品中均未发现明显的肌球蛋白交链形成的大分子量蛋白, 这印证了我们对TS凝胶强度结果中setting没有发挥作用的原因推测。图7的结果同时表明不同pH值对碱溶法TS形成

的凝胶中蛋白组分没有产生明显影响, 特别是没有TG酶导致形成的交链蛋白, 这意味着, pH值的升高引起的TS凝胶强度的变化可能主要是由于凝胶化过程中凝胶微结构或分子间力的差异所导致的。

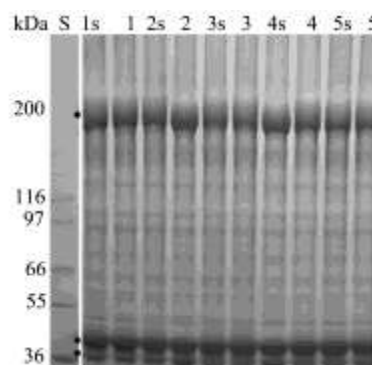


图7 TS凝胶蛋白谱带

Fig.7 Bands for TS gels

注: S, 标准蛋白; 泳道 1-5 分别为 pH 10.5、11.0、11.5、12.0 以及 12.5 溶解后提取的 TS 所得凝胶样品, s, 代表经过预凝胶化处理。

3 结论

提高碱溶pH-shift法的pH值(pH 10.5→pH 12.5), 能够显著提高TS蛋白回收率; 在溶解pH值由10.5提高到11.5过程中, TS蛋白中单体蛋白的分散性和表观疏水性的增加, 使TS凝胶强度和白度得到提高; 但更强碱性的处理(pH 11.5→pH 12.5)会使更多肌浆蛋白进入到TS中, 导致TS凝胶强度及白度表现出减小的趋势, 并且碱液的耗用量也剧增(增加77.65%)。综上所述, 过高的pH值虽然会带来蛋白回收率的进一步提高, 但会给TS品质带来负面影响, 并且需要耗费过多碱液及酸液量, 从成本及环保角度来看都不可取。对于罗非鱼分离蛋白, pH 11.5是一个较为理想的溶解制备pH值。

参考文献

[1] 唐小丹,周春霞,洪鹏志,等.罗非鱼肉盐溶性蛋白的分离及其物化性质分析[J].现代食品科技,2011,27(8):896-900
TANG Xiao-dan, ZHOU Chun-xia, HONG Peng-zhi, et al. Isolation and properties of salt-soluble protein from tilapia muscle [J]. Modern Food Science and Technology, 2011, 27(8): 896-900

[2] Kristinsson H G, Liang Y. Effect of pH-shift processing and surimi processing on atlantic croaker (micropogonias undulates) muscle proteins [J]. Journal of Food Science, 2006, 71(5): C304-C312

- [3] Hultin H O, Kelleher S D. High efficiency alkaline protein extraction [S]. U.S. Patent and Trademark Office Patent 6,136,959
- [4] 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: 1-27
- [5] Ingadottir B, Kristinsson H G. Gelation of protein isolates extracted from tilapia light muscle by pH shift processing [J]. Food Chemistry, 2010, 118(3): 789-798
- [6] 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
- [7] 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): E240-E247
- [8] 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): E132-E141
- [9] Kato S, Konno K. Isolation of carp myosin rod and its structural stability [J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1993, 59: 539-544
- [10] Harrington W F. Contractile proteins of muscle [A]. In: Neurath H; Hill R L. The Proteins. New York, 245-409
- [11] 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
- [12] 黄国宏,沈要林.鱼糜加工过程中凝胶性能的影响因素研究进展[J].现代食品科技,2011,23(1):107-110
HUANG Guo-hong, SHEN Yao-lin. Advances in research of influence factors of gel properties in surimi processing [J]. Modern Food Science and Technology, 2007,23(1): 107-110
- [13] Lanier T C, Yongsawatdigul J, Patricio C-R. Surimi gelation chemistry [A]. In: J.W. Park. Surimi and surimi seafood [M]. Boca Raton: CRC Press, 2013
- [14] 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