

# 超高压对罗非鱼肌动球蛋白物化特性的影响

郭宝颜, 梁燕, 周爱梅, 肖苏尧, 刘欣, 曹庸

(华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)

**摘要:** 本文研究了超高压(100、300、500 MPa 处理 15、30、45 min)作用下罗非鱼肌动球蛋白物化特性的变化。结果发现, 随着压力的增加和保压时间的延长, 罗非鱼肌动球蛋白的溶解度降低, 其中 500 MPa 处理 45 min 降至最低, 为 89.17%, 表明超高压有利于蛋白质的聚集变性。超高压作用下罗非鱼肌动球蛋白的  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性消失, 表明肌球蛋白发生了变性。随压力与保压时间的增加, 肌动球蛋白的表面疏水性增加, 且 300 MPa 处理 45 min 增至最大, 表明超高压作用使更多的疏水性基团暴露。随压力的增加, 肌动球蛋白的总巯基含量降低, 且 500 MPa 处理 30 min 降为最低值, 二硫键含量升高, 在 300 MPa 处理 45 min 增至最高, 表明肌动球蛋白中巯基发生氧化形成了二硫键。以上物化特性的改变表明经过超高压处理的罗非鱼肌动球蛋白构象发生了改变。

**关键词:** 超高压; 罗非鱼; 肌动球蛋白; 物化特性

文章编号: 1673-9078(2015)6-259-263

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.6.041

## Effect of Ultra-high Pressure on the Physicochemical Properties of Tilapia Actomyosin

GUO Bao-yan, LIANG Yan, ZHOU Ai-mei, XIAO Su-yao, LIU Xin, CAO Yong

(College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** Changes in the physicochemical properties of tilapia actomyosin under ultra-high pressure (100, 300, and 500 MPa for 15, 30, and 45 min) were investigated. The results revealed that an increasing pressure and a longer holding time could reduce the solubility of tilapia actomyosin, and the lowest solubility (89.17%) was observed with 500 MPa treatment for 45 min, indicating that ultra-high pressure could promote protein accumulation and denaturation. The  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity of tilapia actomyosin was lost under ultra-high pressure, suggesting the degeneration of myosin. As the pressure and holding time increased, the surface hydrophobicity of actomyosin also increased, and the highest hydrophobicity was achieved with 300 MPa treatment for 45 min, indicating that ultra-high pressure allowed more hydrophobic groups to be exposed. The total sulfhydryl content of actomyosin was reduced with increasing pressure, and the lowest value was reached with the 500 MPa treatment for 30 min; the disulfide bond content increased, and the highest level was achieved with the 300 MPa treatment for 45 min, indicating that the sulfhydryl group of actomyosin underwent oxidation to form disulfide bonds. These changes in the physicochemical properties demonstrate that the conformation of tilapia actomyosin changes after ultra-high pressure processing.

**Key words:** ultra-high pressure; tilapia; actomyosin; physicochemical properties

罗非鱼(Tilapia, 学名: *Oreochromis mossambicus*), 原产非洲, 属热带性鱼类, 是第一个全球性的水产养殖品种<sup>[1]</sup>。罗非鱼因其肉质鲜美、细嫩、无细刺、含丰富蛋白质, 不饱和脂肪酸等, 深受人们的喜爱, 素有“白肉三文鱼”之称<sup>[2]</sup>。罗非鱼自 60 年代在我国开始养殖, 其养殖量飞速增长, 但其大部分个体偏小, 加工层次较低, 这是罗非鱼深加工产业链发展的瓶颈问题<sup>[3]</sup>。开发鱼糜制品成为其加工的重要出路。但与

收稿日期: 2014-09-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31101311)

作者简介: 郭宝颜(1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 水产品加工; 梁燕: 并列第一作者

通讯作者: 周爱梅副教授

优质海水鱼比起来, 罗非鱼的鱼糜加工特性差, 表现在凝胶形成能力较低。因此研究罗非鱼鱼糜的凝胶特性对实际的生产加工有着非常重要的作用。

鱼糜制品要求有良好的弹性、风味和色泽, 其中最主要的是弹性。鱼糜制品的弹性主要取决于鱼糜蛋白质的凝胶情况, 而蛋白质的凝胶性能又与其理化性质和功能特性密切相关。肌原纤维蛋白是鱼糜中的主要蛋白质, 而肌动球蛋白又是肌原纤维中的主要蛋白质。热处理是目前鱼糜凝胶化的主要方法, 但其对于凝胶的改善作用尚不够理想。超高压对蛋白质分子有独特的物理改性作用, 它能影响蛋白质分子中的氢键、疏水相互作用、静电相互作用等, 从而改变蛋白质的空间结构和功能特性, 进而导致蛋白质变性、聚集或

凝胶化<sup>[4]</sup>。众多研究表明,超高压诱导的凝胶比热诱导凝胶具有更好的光滑度,柔软度及弹性<sup>[4]</sup>,且高压可缩短凝胶时间,改善凝胶特性,减少热敏性物质损失及不良风味的形成。但在超高压作用下,鱼糜肌原纤维蛋白的物化特性会发生怎样的变化,其与凝胶形成的关系如何则未见系统的研究。因此,本研究从罗非鱼肌肉中提取肌动球蛋白,从低(100 MPa)、中(300 MPa)和高(500 MPa)三个水平的超高压上研究超高压对其物化特性的影响,为科学阐明超高压的凝胶机理提供一定的参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与设备

新鲜罗非鱼,购于华南农业大学附近南天超市;其他试剂均为分析纯。

FX-20DU 超高压设备,英国 Stansted fluid power 公司; T25 高速分散均质机,马来西亚 Ultra turrax 公司; Debver 15 精密 pH 计,美国 Scientific 公司; Mini-Protein II 稳压稳流型电泳仪,美国 Bio-Rad 公司; Dura-TopTM $\mu$ P 高速台式冷冻离心机,美国 FTS systems。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 罗非鱼肌动球蛋白的提取

参考 Balange<sup>[5]</sup>的方法提取。

#### 1.2.2 罗非鱼肌动球蛋白的超高压处理

将肌动球蛋白灌入至肠衣中,于 100 MPa、300 MPa、500 MPa 下分别保压 15 min、30 min、45 min,取出后迅速冰水冷却,进行物化特性分析。

### 1.3 测定方法

#### 1.3.1 罗非鱼肌动球蛋白溶解度的测定<sup>[6]</sup>

取 5 mL 肌动球蛋白溶液 8000 r/min 离心 15 min,除去不溶物,用双缩脲法测定蛋白质浓度。处理后的蛋白浓度与处理前的蛋白浓度的百分比为蛋白溶解度。

#### 1.3.2 罗非鱼肌动球蛋白 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性的测定<sup>[6]</sup>

取 0.5 mL 蛋白溶液加入 0.3 mL 0.5 mol/L、pH7.0 Tris-马来酸溶液、0.5 mL 0.1 mol  $\text{CaCl}_2$  溶液、3.45 mL 蒸馏水和 0.25 mL 20 mmol/L ATP 溶液,在 25 °C 反应 10 min 后用 2.5 mL 15% 三氯乙酸阻断反应。反应完后,反应液在 8000 r/min 离心 5 min 得上清液,采用钼酸铵法测定反应中释放出来的无机磷含量。

#### 1.3.3 罗非鱼肌动球蛋白表面疏水性的测定

参考 Yarnpakdee<sup>[7]</sup>的方法测定表面疏水性。

#### 1.3.4 罗非鱼肌动球蛋白总巯基含量的测定

参考 Yarnpakdee<sup>[7]</sup>的方法测定总巯基含量。

#### 1.3.5 罗非鱼肌动球蛋白二硫键含量的测定

参考 Yarnpakdee<sup>[7]</sup>的方法测定二硫键含量。

## 1.4 数据分析方法

采用 SPSS 16.0 统计软件对数据差异的显著性进行分析,  $p < 0.05$  被认为差异有统计学意义。

## 2 结果与讨论

### 2.1 超高压对罗非鱼肌动球蛋白溶解度的影响

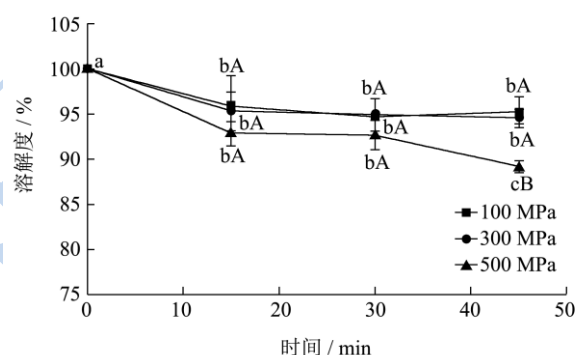


图1 超高压对罗非鱼肌动球蛋白溶解度的影响

Fig.1 Effect of ultra-high pressure on the solubility of tilapia actomyosin

注:实验样本数  $n=3$ ,不同的字母小写表示同压力不同时间有显著性差异 ( $p < 0.05$ ),大写表示同时间不同压力下显著性差异 ( $p < 0.05$ )。

超高压对罗非鱼肌肉肌动球蛋白溶解度的影响如图1所示。由图分析,罗非鱼肌动球蛋白的溶解度随压力和加压时间的增加而逐渐降低,100~300 MPa/15~45 min 样品间无明显差异,下降较缓慢 ( $p > 0.05$ )。但500 MPa作用45 min压力时,下降趋势显著 ( $p < 0.05$ ),此时最低值为89.17%。在相同的加压时间下,高压比低压诱导的肌动球蛋白溶解度更低。蛋白质溶解度随高压变化趋势与 Hsu 等<sup>[8]</sup>, Ko 等<sup>[9-10]</sup>的研究结果一致。Shoichiro 等<sup>[11]</sup>也报道了当压力超过300 MPa时黑枪鱼与竹夹鱼的肌球蛋白溶解性降低。

蛋白质的溶解性可用于检测肌球蛋白单体和聚集的肌球蛋白纤维丝的转变<sup>[12]</sup>。从结果中可知,蛋白的溶解性降低表明肌动球蛋白分子被300 MPa以上的高

压处理后展开, 疏水性残基暴露, 从而降低了水合能力, 产生聚集。一般情况下, 高压所致蛋白分子量降低, 进而导致肌动球蛋白溶解度的降低。这样的高压同时导致蛋白的构象发生变化。

## 2.2 超高压对罗非鱼肌动球蛋白 $Ca^{2+}$ -ATPase 活性的影响

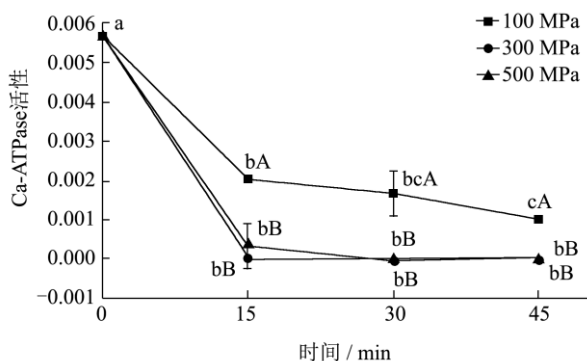


图2 超高压对罗非鱼肌动球蛋白  $Ca^{2+}$ -ATPase 活性的影响

Fig.2 Effect of ultra-high pressure on  $Ca^{2+}$ -ATPase activity of tilapia actomyosin

注: 实验样本数  $n=3$ , 不同的字母小写表示同压力不同时间有显著性差异 ( $p<0.05$ ), 大写表示同时间不同压力下显著性差异 ( $p<0.05$ )。

超高压对罗非鱼肌肉肌动球蛋白  $Ca^{2+}$ -ATPase 活性的影响结果如图2所示。100 MPa 压力下, 其活性明显降低 ( $p<0.05$ ), 15、30、45 min 分别降低了66.67%、66.67%和83.33%, 时间对其影响显著 ( $p<0.05$ )。在较高压力作用下 (大于300 MPa), 罗非鱼肌动球蛋白  $Ca^{2+}$ -ATPase 活性由新鲜罗非鱼肌动球蛋白的  $0.0056 \mu\text{mol Pi}/(\text{min mg})$  下降至零 ( $p<0.05$ ), 活性消失。说明了  $Ca^{2+}$ -ATPase 对超高压敏感, 易失活。

$Ca^{2+}$ -ATPase 是肌球蛋白分子完整性的一个重要标志。Ko 等<sup>[10]</sup>的研究发现, 当处以100 MPa以上高压时, 罗非鱼肌球蛋白分子的  $Ca^{2+}$ -ATPase 活性急剧减少。随压力处理100 MPa、150 MPa、200 MPa, 活性相应的剩下43%、35%、21%, ATP酶的活性位点在于肌球蛋白分子的亚基-1 (S-1)。Shoichiro 等<sup>[11]</sup>也报道了肌肉组织的压力敏感基团是肌球蛋白分子的亚基-1 (S-1), 当处以高压时, 基团展开, 暴露出疏水组分, 从而伴随其溶解度和 $\alpha$ -螺旋结构的减少。本研究发现, 压力释放后, 其活性发生了不可逆的改变。

## 2.3 超高压对罗非鱼肌动球蛋白表面疏水性

的影响

超高压对罗非鱼肌肉肌动球蛋白表面疏水性的影响如图3所示。由图可知, 新鲜的罗非鱼肌动球蛋白经超高压处理后, 表面疏水性有明显增加 ( $p<0.05$ )。100 MPa、300 MPa、500 MPa 压力下, 随着保压时间的延长, 表面疏水性增大 ( $p<0.05$ )。在相同加压时间下, 表面疏水性随压力的增加逐渐增大, 300 MPa 达到最大值, 而后继续增加压力至500 MPa, 其值下降 ( $p<0.05$ )。由此可知, 在一定的压力范围内, 压力的增加和保压时间的延长有助于罗非鱼肌动球蛋白表面疏水性的增大。Ko 等<sup>[13]</sup>的研究发现罗非鱼肌球蛋白的表面疏水性随压力增加而增大。在50 MPa 加压10 min 到60 min 表面疏水性由58%增加到78%, 当肌球蛋白处于100 MPa 以上压力, 其表面疏水性是对照组的两倍。本研究发现压力增至500 MPa, 其值下降, 可能是跟鱼的种类不同有关。由此可见, 疏水相互作用参加了肌动球蛋白的聚集。

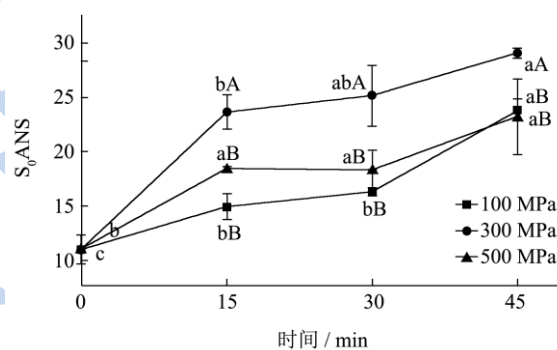


图3 超高压对罗非鱼肌动球蛋白表面疏水性的影响

Fig.3 Effect of ultra-high pressure on the surface hydrophobicity of tilapia actomyosin

注: 实验样本数  $n=3$ , 不同的字母小写表示同压力不同时间有显著性差异 ( $p<0.05$ ), 大写表示同时间不同压力下显著性差异 ( $p<0.05$ )。

由于压力的作用使疏水性氨基酸残基暴露, 从而增加了疏水相互作用。疏水区域的暴露是大量肌球蛋白分子聚集的先决条件。在加压过程中, 蛋白质分子间疏水相互作用的形成是鱼糜凝胶形成的主要机制。

## 2.4 超高压对罗非鱼肌动球蛋白总巯基含量的影响

由图4可以看出, 罗非鱼肌动球蛋白经超高压处理后, 总巯基含量显著下降, 100 MPa 加压15 min、30 min 时, 总巯基含量下降较明显 ( $p<0.05$ ); 300 MPa



加压大于 15 min 时,总巯基含量无显著差异( $p>0.05$ ),当压力增大至 500 MPa 时,其含量显著的降低( $p<0.05$ )。不同压力的巯基含量的不同,可能是因为肌原纤维蛋白对不同的压力的巯基氧化的敏感性不同,因而巯基含量降低的程度也有所不同。

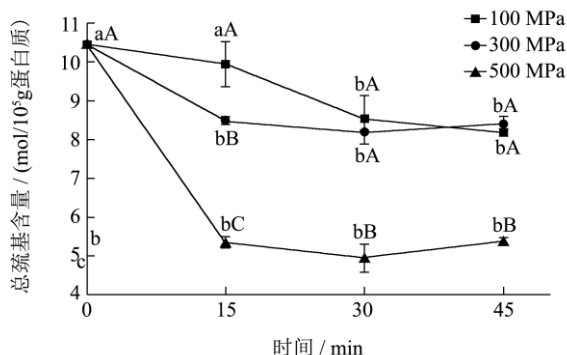


图4 超高压对罗非鱼肌动球蛋白总巯基含量的影响

Fig.4 Effect of ultra-high pressure on the total sulfhydryl content of tilapia actomyosin

注: 实验样本数 n=3, 不同的字母小写表示同压力不同时间有显著性差异 ( $p<0.05$ ), 大写表示同时间不同压力下显著性差异 ( $p<0.05$ )。

Hsu 等<sup>[8]</sup>的研究也发现罗非鱼肌动球蛋白总巯基含量在 200 MPa 以上随压力增加而减少。总巯基含量的减少是由于巯基氧化或二硫化物交换形成了二硫键。结果显示超高压可以诱导分子内或分子外二硫键的形成。

### 2.5 超高压对罗非鱼肌动球蛋白二硫键含量的影响

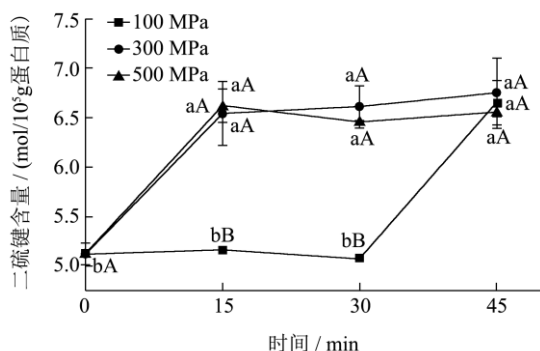


图5 超高压对罗非鱼肌动球蛋白二硫键含量的影响

Fig.5 Effect of ultra-high pressure on the disulfide bond content of tilapia actomyosin

注: 实验样本数 n=3, 不同的字母小写表示同压力不同时间有显著性差异 ( $p<0.05$ ), 大写表示同时间不同压力下显著性差异 ( $p<0.05$ )。

图5 表明, 罗非鱼肌动球蛋白在超高压作用下有

二硫键生成。压力较低时 (100 MPa), 肌动球蛋白结构未全部解聚和伸展, 二硫键的形成较少 ( $p>0.05$ ), 45 min 加压后, 有明显的二硫键含量增长趋势 ( $p<0.05$ )。当加压时间相同时, 二硫键含量随压力升高而增加, 且在 300 MPa 处理 45 min 时达到最大值。而 400 MPa/45 min 二硫键含量下降明显 ( $p<0.05$ )。当采用较高压力值 500 MPa 时, 二硫键的含量反而有所下降, 与 300 MPa 处理相近 ( $p>0.05$ )。较高的压力和加压时间会引起二硫键的断裂, 不利于二硫键的生成和转化, 因而含量降低。这与总巯基含量随压力的变化相一致, 高压致使总巯基含量减少, 氧化形成二硫键, 故其含量增加。二硫键的形成虽然不是凝胶形成的必需条件, 但分子间二硫键的形成, 尤其是由肌球蛋白头部 S-1 部位氧化形成的二硫键, 对凝胶的形成有重要贡献。

### 3 结论

研究发现, 超高压处理的罗非鱼肌动球蛋白, 溶解性随压力和保压时间的增大而降低。肌动球蛋白中, 罗非鱼肌动球蛋白  $Ca^{2+}$ -ATPase 失去活性; 罗非鱼肌动球蛋白总巯基含量随保压时间和压力的增大而降低; 罗非鱼肌动球蛋白表面疏水性随保压时间的增加而增加, 而保压时间相同时, 随压力先增加后降低; 罗非鱼肌动球蛋白二硫键含量随压力的增加而增加, 随保压时间先增加后减少。结果表明, 超高压处理下肌动球蛋白溶解度的降低, 可能与体积的变化有关, 导致蛋白构象的改变, 肌动球蛋白展开、疏水基团暴露, 因此水合能力降低并且发生聚集; 超高压处理可导致  $Ca^{2+}$ -ATPase 失活性, 这可能是因为在超高压处理或热处理下, 可引起肌球蛋白变性, 尤其是肌球蛋白头部结构的变性或者巯基氧化, 故  $Ca^{2+}$ -ATPase 活性降低或消失, 据报道, 肌球蛋白头部结构的巯基氧化导致蛋白分子的聚集是 ATPase 活性的降低的主要原因; 巯基暴露氧化生成二硫键及疏水基团暴露疏水作用加强, 肌球蛋白的疏水基团的暴露, 有利于蛋白质之间的相互作用, 这是蛋白质发生凝聚的主要原因也是促进鱼糜凝胶形成的原因; 二硫键的生成可以增加胶凝的程度和强度。超高压作用引起的罗非鱼肌动球蛋白物化特性的改变, 有利于形成更好的凝胶。

### 参考文献

[1] 张李, 曾庆孝, 朱志伟, 等. 罗非鱼与四种海水鱼鱼糜比较[J]. 现代食品科技, 2009, 25(2): 1224-1226  
ZHANG Li, ZENG Qing-xiao, ZHU Zhi-wei, et al. The comparison between Tilapia and four kinds of seawater fish

- surimi [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2009, 25(2): 1224-1226
- [2] 巩育军,郭先霞,李瑞伟,等.罗非鱼营养成分研究进展[J].*中国食物与营养*,2009,11:50-52  
GONG Yu-jun, GUO Xian-xia, LI Rui-wei, et al. The progress of Tilapia nutrition research [J]. *Chinese Food and Nutrition*, 2009, 11: 50-52
- [3] 曾庆孝,朱志伟.广东省罗非鱼加工业分析[J].*水产科技*, 2005, 4:1-4  
ZENG Qing-xiao, ZHU Zhi-wei. Tilapia processing industry in guangdong province [J]. *Aquatic Science and Technology*, 2005, 4: 1-4
- [4] Chung Y C, Gebrehiwot A, Farkas D, et al. Gelation of surimi by high hydrostatic pressure [J]. *Journal of Food Science*, 1994, 59(3): 523-524, 543
- [5] Balange A K, Benjakul S. Cross-linking activity of oxidised tannic acid towards mackerel muscle proteins as affected by protein types and setting temperatures [J]. *Food Chemistry*, 2010, 120: 268-277
- [6] Riebroy S, Benjakul S, Visessanguan W, et al. Acid-induced gelation of natural actomyosin from Atlantic cod (*Gadus morhua*) and burbot (*Lota lota*) [J]. *Journal of Food Hydrocolloids*, 2009, 23: 26-39
- [7] Yampakdee S, Benjakul S, Visessanguan W, et al. Thermal properties and heat-induced aggregation of natural actomyosin extracted from goat fish (*Mulloidichthys martinicus*) muscle as influenced by iced storage [J]. *Journal of Food Hydrocolloids*, 2009, 23: 1779-1784
- [8] Hsu K C, Ko W C. Effect of hydrostatic pressure on aggregation and viscoelastic properties of tilapia (*Oreochromis niloticus*) myosin [J]. *Journal of Food Science*, 2001, 66(8): 1158-1162
- [9] Ko W C, Hwang J S, Jao C L, et al. Denaturation of tilapia myosin fragments by high hydrostatic pressure [J]. *Journal of Food Science*, 2004, 69(8): 604-607
- [10] Ko W C, Jao C L, Hsu K C, et al. Effect of hydrostatic pressure on molecular conformation of tilapia (*Oreochromis niloticus*) myosin [J]. *Journal of Food Science*, 2003, 68(4): 1192-1195
- [11] Shoichiro I, Munehiko T, Rikuo T, et al. Stability of fish myosins and their fragments to high hydrostatic pressure [J]. *Fisheries Science*, 1995, 61(6): 989-992
- [12] Samejima K, Hara S, Yamamoto K, et al. Physicochemical properties and heat-induced gelling of cardiac myosin in model system [J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1985, 49(10): 2975-2983
- [13] Ko W C, Jao C, Hsu K C. Effect of hydrostatic pressure on molecular conformation of tilapia (*Oreochromis niloticus*) myosin [J]. *Journal of Food Science*, 2003, 68(4): 1192-1195