

鲢鱼背肌肌原纤维蛋白自溶与内源组织蛋白酶 B,L,H 的关系

李树红 张楠 刘欢 马长伟

(中国农业大学 食品科学与营养工程学院,北京 100083)

摘要 鲢鱼鱼糜制品在加工过程中容易发生热诱导(50~70)的鱼糜凝胶软化(modori),导致鱼糜制品品质下降。为探明原因,本研究比较了在加工过程中漂洗前后鲢鱼鱼肉糜中组织蛋白酶 B,L,H 活性的变化,结果表明漂洗后仍残留了组织蛋白酶 B,L,H 活性,其中组织蛋白酶 L 活性的残留率最高,为 25.61% ±0.82%。用 SDS-PAGE 分析了有无 E-64 存在下,鲢鱼背肌肌原纤维蛋白自溶过程中(pH 6.5, 50)肌球蛋白重链相对含量的差异,结果显示肌球蛋白重链相对含量的下降趋势与残留的组织蛋白酶活性变化趋势吻合;而且 E-64 部分抑制了肌球蛋白重链的自溶。上述结果表明溶酶体半胱氨酸组织蛋白酶在鲢鱼鱼糜凝胶软化中起一定作用,而且组织蛋白酶 L 可能是重要的蛋白水解酶。

关键词 鲢鱼;组织蛋白酶;鱼糜凝胶软化;漂洗

中图分类号 TS 254

文章编号 1007-4333(2004)05-0071-05

文献标识码 A

Preliminary study of the relationship between autolysis of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) myofibrillar proteins and endogenous cathepsins B,L and H

Li Shuhong, Zhang Nan, Liu Huan, Ma Changwei

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract During silver carp surimi processing, considerable gel softening often occurs due to heating, and results in poor textural quality of surimi products. This study was an attempt to investigate the reason through comparing the activities of cathepsin B,L,H in the silver carp mince before and after washing. Our results showed that there were still some cathepsin B, L, H activities after washing, 11.30% ±1.27%, 25.61% ±0.82% and 6.89% ±0.44% respectively. The SDS-PAGE analysis with and without E-64 indicated that the reduction of the relative quantity of myosin high chain (MHC) was consistent with the rudimentary catheptic activities during autolysis (pH 6.5, 50) of silver carp dorsal muscle. E-64 partly inhibited the autolysis of myosin high chain (MHC). It was suggested that the modori of silver carp surimi was partly induced by the thiol cathepsins in muscle lysosome, especially cathepsin L.

Key words silver carp; cathepsin; surimi gel softening; washing

我国鲢鱼(*Hypophthalmichthys molitrix*)资源十分丰富,开发利用潜力巨大,其中以鲢鱼白肌为原料生产色白、低脂、高蛋白的鱼糜制品前景看好。但是,鲢鱼鱼糜制品在加工过程中容易发生热(50~70)诱导的凝胶软化现象(modori),从而导致鱼糜制品的品质下降^[1]。国外研究表明,鱼糜制品的软化

是因内源热稳定蛋白酶水解了肌球蛋白的作用,这些蛋白酶包括溶酶体半胱氨酸组织蛋白酶 B,L 或类 L(L-like),H 等蛋白酶^[2-4]。然而至今,鲢鱼鱼糜制品凝胶软化现象与内源热稳定组织蛋白酶的关系尚不清楚。因此,本实验结合鱼糜制品加工过程中常用的漂洗方法,研究了漂洗后鲢鱼鱼糜中组织

收稿日期:2004-05-26

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371122)

作者简介:李树红,博士研究生;马长伟,教授,博士生导师,通讯作者,主要从事畜水产品加工理论与技术研究。

蛋白酶的残留情况,并通过鲢鱼肌原纤维蛋白在 50 ℃ 自溶过程中肌球蛋白相对含量的变化,试图探明内源热稳定组织蛋白酶 B、L、H 与鲢鱼鱼糜凝胶软化的关系。

1 材料与方法

1.1 实验材料

鲢鱼 (*Hypophthalmichthys molitrix*), 市售活鱼, 每条 900~1 200 g。

1.2 实验方法

1) 鱼肉糜和漂洗鱼肉糜的制备(在 4 ℃ 下进行)。活鲢鱼宰杀后,立即去头、去内脏、清洗去皮、剖片、取背部白肌,采得 3~6 mm³ 的鱼肉糜颗粒。然后经 2 次清水漂洗和 1 次 0.15% (质量分数) 食盐水漂洗,离心脱水后称重,得漂洗鱼肉糜。

2) 组织蛋白酶 B、L、H 活性的测定。组织蛋白酶 B、L、H 活性的测定参考 Barrett 等^[5,6]的方法,并略加改动,操作过程如下:

鱼肉糜或漂洗鱼肉糜用 4 倍体积的 50 mmol·L⁻¹ pH 5.0 的乙酸盐缓冲液匀浆,12 000 ×g 离心 20 min,取上清,作为粗提酶液(在 4 ℃ 下进行)。

分别以组织蛋白酶 B、L 的特异性荧光合成肽底物 Z-Arg-Arg-MCA (Benzylloxycarbonyl-arginylarginine-4-methyl-7-coumarylamide, 苄氧羰基-精氨酸-精氨酸-酰胺-甲基香豆素)、Z-Phe-Arg-MCA (Benzylloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-arginyl-4-methyl-7-coumarylamide, 苄氧羰基-苯丙氨酸-精氨酸-酰胺-甲基香豆素) 测定粗提液中组织蛋白酶 B、L 的肽水解活性。取适量的粗提酶液,用 Brij35 (Polyoxyethylene 23 lauryl ether, 聚环氧乙烷 23 月桂醚) 稀释至 500 μL,然后加入 250 μL 0.4 mol·L⁻¹ 的磷酸盐反应缓冲液(B:pH 6.0; H:pH 6.8; L:pH 5.5),40 ℃ 预热 2 min,然后加入底物(最终浓度为 5 μmol·L⁻¹)。40 ℃ 准确反应 10 min 后加入 1 mL 终止液。用荧光分光光度计 RF-5300PC(岛津)于激发波长 380 nm、发射波长 460 nm 下测定 AMC (7-amino-4-methylcoumarin, 酰氨基甲基香豆素) 的释放量。对照管中先加入终止液。

以 L-Arg-MCA (L-arginyl-4-methyl-7-coumarylamide, 精氨酸-酰胺-甲基香豆素) 为底物测定组织蛋白酶 H 活性,方法同上,但以 L-Arg-MCA 为底物测得的酶活性实际为氨肽酶和组织蛋白酶 H 共同作用的结果(肌肉中的氨肽酶也可以水解 L-

Arg-MCA,对 H 酶活测定产生影响);故为获得组织蛋白酶 H 的真实活性,本实验向反应体系中添加了半胱氨酸蛋白酶专一不可逆抑制剂 E-64 (Trans-epoxysuccinyl-L-leucyl-amido(4-guanidino)butane, 反式环琥珀酰-亮氨酸氨-胍基丁酮),最终浓度为 50 μmol·L⁻¹ 进行抑制处理(E-64 对氨肽酶无作用),处理后降低的活性即为组织蛋白酶 H 的活性。

一个酶活单位定义为在反应温度(40 ℃)及反应 pH 下,1 min 内能够水解底物并释放出 1 nmol AMC 的酶的物质。

3) 鲢鱼背肌肌原纤维蛋白的制备及自溶反应。鲢鱼背肌肌原纤维蛋白的制备参考 Ogata 等^[7]。

鲢鱼肉糜颗粒经 4 倍体积的磷酸盐缓冲液 A (50 mmol·L⁻¹ pH 7.0) 漂洗 3 次后,再用 4 倍体积的磷酸盐缓冲液 B (50 mmol·L⁻¹ pH 7.0, 0.1 mol·L⁻¹ NaCl, 0.2% (质量分数) TritonX-100) 匀浆,3 000 ×g 离心 15 min,沉淀后用等体积的磷酸盐缓冲液 C (50 mmol·L⁻¹ pH 7.5) 匀浆,20 ℃ 静置 30 min,再次离心(3 000 ×g, 15 min),收集沉淀,作为鲢鱼肌原纤维蛋白(MF)于 -80 ℃ 保存备用。

取一定量的 MF 沉淀,按 1:2.5 的比例悬浮于含 2 mmol·L⁻¹ DTT (DL-dithiothreitol, 二硫苏糖醇) 的 100 mmol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液 (pH 6.5) 中,于 50 ℃ 进行自溶反应,作为对照组。E-64 实验组为向 MF 溶液中加入最终浓度为 50 μmol·L⁻¹ 的半胱氨酸蛋白酶专一不可逆抑制剂 E-64,以便充分抑制 MF 溶液中残留的组织蛋白酶 B、L、H 活性。不同时间间隔,分别从对照组和实验组中取样 10 μL,然后与等体积的终止液(质量分数为 2% 的 SDS, 8 mol·L⁻¹ 脲, 体积分数为 5% 的 β-巯基乙醇, 质量分数为 0.005% 的溴酚蓝, 体积分数为 20% 的甘油, 62.5 mmol·L⁻¹ pH 6.8 Tris-HCl) 混合,煮沸 5 min,作为电泳样品。同时,对照组额外取样 400 μL,监测自溶过程中残留组织蛋白酶 B、L、H 活性的变化。

4) SDS-PAGE。SDS-PAGE 参照 Laemmli 等^[8]的方法。分离胶质量分数为 7.5%, 浓缩胶质量分数为 4%。上样量为 20 μL,约含 15 μg 蛋白质。样品在浓缩胶中采用稳流(1 mA/泳道)方式;待样品进入分离胶后,采用稳压(120 V)方式。电泳结束后,固定染色、脱色参照 Neuhoff 等^[9]方法。电泳胶片经凝胶成像系统扫描,用 Quantity One 电泳图象分析软件(BIO-RAD),分析肌原纤维蛋白自溶过程中肌球蛋白重链相对含量的变化。

5) 蛋白质含量的测定。蛋白质含量测定参照 Lowry 等^[10]方法, 以牛血清白蛋白为标准蛋白质。

2 结果与讨论

2.1 漂洗前后鱼肉糜中组织蛋白酶 B, L, H 活性的变化

漂洗前后鲢鱼肉糜中组织蛋白酶 B, L, H 及氨肽酶 + H 活性变化见表 1。

表 1 漂洗前后鱼肉糜中组织蛋白酶活性的变化 ($n=3$)

Table 1 Change of catheptic activities in silver carp mince before and after washing of the meat ($n=3$)

项 目	蛋白酶			
	B	L	H	氨肽酶 + H
漂洗前酶活性/ (U · g ⁻¹)	4.89 ± 0.42 *	3.81 ± 0.026	5.88 ± 0.26***	17.20 ± 0.03
漂洗后酶活性/ (U · g ⁻¹)	0.55 ± 0.02***	0.98 ± 0.04	0.40 ± 0.01***	1.61 ± 0.063
残留率/ %	11.30 ± 1.27***	25.61 ± 0.82	6.89 ± 0.44***	9.33 ± 0.04

注: 与 L 组比较 * $P < 0.1$ ** $P < 0.05$ *** $P < 0.01$

生产中一直采用漂洗工艺去除存在于鱼肉肌浆部分的凝胶软化诱导蛋白酶, 以提高鱼糜制品的品质^[10], 但是许多研究都证明, 漂洗工艺并不能完全去除组织蛋白酶 B, L, L-like 及 H, 尤其是组织蛋白酶 L^[2, 11~13]。本实验采用鱼糜制品加工中常用的漂洗方法(2 次清水, 1 次盐水), 漂洗后的鲢鱼鱼肉糜中也残留了 B, L, H 活性, 与上述研究结果一致; 因此, 在鲢鱼鱼糜制品的加工过程中同样存在组织蛋白酶参与热诱导鱼糜凝胶软化的可能性。组织蛋白酶 L 活性的残留率最高, 这可能是因为鲢鱼组织蛋白酶 L 与肌球蛋白的亲合力较高, 不易被漂洗去除。这与海水鱼太平洋牙鲷(*Merluccius productus*) 中组织蛋白酶 L 的性质相似^[13]。

肌肉组织中存在的氨肽酶, 如可溶性的精氨酸氨肽酶、亮氨酸氨肽酶、芳香基氨肽酶等会影响组织蛋白酶 H 活性的测定^[14]。因此, 若直接以总 L-Arg-MCA 水解活性作为组织蛋白酶 H 的活性, 将使 H 活性和活性残留率的计算值明显偏离真实值(表 1), 从而将严重影响测定结果的准确性。E-64 作为半胱氨酸蛋白酶的专一不可逆抑制剂, 不会抑制非半胱氨酸蛋白酶^[5], 所以并不影响氨肽酶的活性; 因此被 E-64 抑制的 L-Arg-MCA 水解活性即组织蛋白酶 H 活性。本实验测得的未漂洗鱼肉糜中 H 活性只占总 L-Arg-MCA 水解活性的 35% 左右, 与 Rico 等^[14]报道的 95.5% 相差很远, 这可能是生物的种间差异造成的。

由表 1 可知漂洗后的鱼肉糜中仍残留着 B, L, H 活性, 而且尽管漂洗前鱼肉糜中组织蛋白酶 B, H 的活性都高于 L ($P < 0.1$, $P < 0.01$), 漂洗后组织蛋白酶 L 的活性却显著高于 B, H ($P < 0.01$)。其中 L 活性的残留率最高(25.79%), 其次为组织蛋白酶 B (11.46%), 组织蛋白酶 H 活性的残留率最低(6.86%)。

长期以来, 为提高鱼糜的凝胶强度, 人们在实际

2.2 鲢鱼背肌肌原纤维蛋白的自溶过程

通过电泳和电泳图扫描定量分析了鲢鱼背肌肌原纤维蛋白自溶过程中, 肌球蛋白重链(myosin high chain, MHC) 相对含量的变化(图 1, 2)。

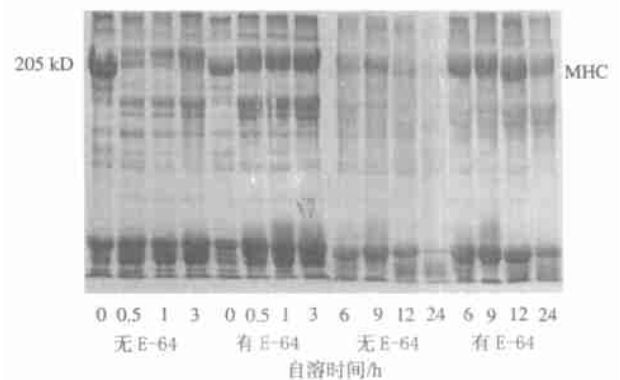
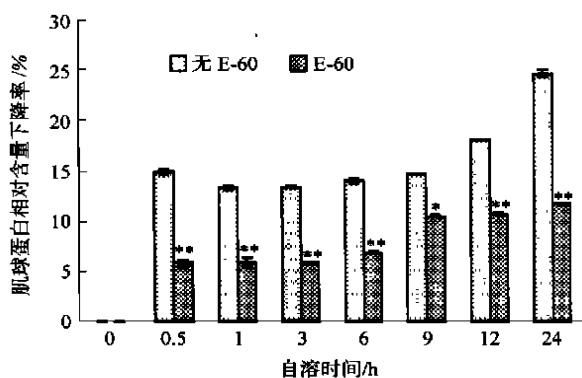


图 1 鲢鱼肌原纤维蛋白的自溶电泳图

Fig. 1 Electrophoresis profile of autolysis of silver carp MF with and without E-64

可见, 在无 E-64 时, 仅放置 30 min, 肌球蛋白重链就发生了明显的自溶, 此后的 9 h 之内自溶速度增加较缓慢, 12 h 以后自溶速度突然加快, 至 24 h 时, 肌球蛋白重链相对含量降低非常明显, 几乎消失。

加 E-64 后的自溶过程中, 肌球蛋白重链的相对含量仍在逐渐降低, 但是其下降幅度明显低于对照组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。这说明, E-64 部分抑制了鲢鱼背肌中肌球蛋白的自溶。

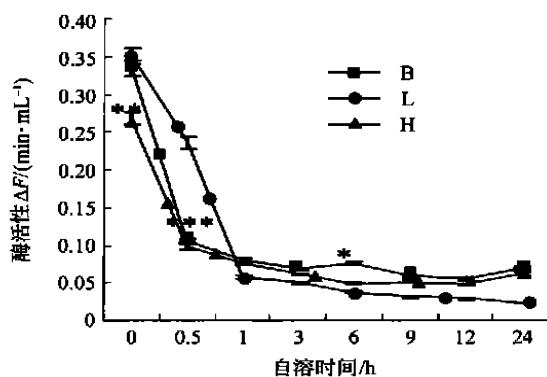


* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 3$

图2 MF自溶过程中肌球蛋白重链相对含量的变化

Fig. 2 Changes of relative quantity of MHC during autolysis of MF with or without E-64

肌原纤维蛋白自溶过程中,残留内源组织蛋白酶B,L,H的活性变化如图3所示。



* $P < 0.1$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$, 与L组比较

图3 MF自溶过程中残留的内源组织蛋白酶B,L,H活性的变化(pH 6.5, 50)

Fig. 3 Change of activities of cathepsin B,L,H during autolysis of MF (pH 6.5, 50)

在自溶的前30 min内B,L,H酶活性均较高,但下降趋势明显,尤其以B酶活性下降最快,L酶活性下降较缓慢。30 min后,B,H酶活性变化不明显,但是L酶活性在自溶的30 min至1 h内继续快速下降,直降至与B,H酶活性相似。此后,B,L,H酶活性均稳定在较低水平。

通过电泳分析和残留酶活性的监测发现,由于自溶的前30 min内B,L,H酶活性都很高,其中尤以L酶活性保持得最高,所以与此对应,对照组30 min内,肌球蛋白重链含量下降得也最快。因此判断,自溶期间,3种酶中,组织蛋白酶L所起的作用更大。Yamashita等^[15]的研究结果也显示,组织蛋白酶L的内肽酶活性远高于组织蛋白酶B,H,水解肌原纤维蛋白的速度显著高于组织蛋白酶B。

此后的自溶时间内B,L,H一直稳定在较低水平,也是导致9 h之内自溶速度增加缓慢的原因。对照组12 h后和加E-64组9 h后,肌球蛋白自溶速度加快可能是其他类型的蛋白水解酶作用的结果,而24 h时自溶仍在进行,与整个自溶时间内B,L,H酶活性均未消失有关。

肌球蛋白重链相对含量的变化规律与残留的组织蛋白酶B,L,H活性的变化趋势基本吻合,E-64部分抑制了肌球蛋白重链的自溶,这些结果说明鱼糜凝胶软化的部分原因是溶酶体半胱氨酸组织蛋白酶水解肌球蛋白重链导致的。同时表明在鲢鱼鱼糜的肌球蛋白上很可能还结合着能够引起自身水解的其他类型的蛋白酶,如肌原纤维结合的丝氨酸蛋白酶(MBSP),这类蛋白酶的存在,在其他鱼种中已经得到证实^[16,17],至于鲢鱼中是否存在这类蛋白酶还有待于研究证实。

参 考 文 献

- [1] 吴汉民,王海洪. 几种淡水鱼鱼糜特性的研究[J]. 食品科学,1999, 9:15~19
- [2] Jiang S T, Lee B L, Tsao C Y, et al. Mackerel cathepsins B and L effects on thermal degradation of surimi[J]. Journal of Food Science, 1997, 62 (2): 310~315
- [3] Ho M L, Chen G H, Jiang S T. Effect of mackerel cathepsins L and L like, and calpain on the degradation of mackerel surimi [J]. Fisheries Science, 2000, 66 (3): 558~568
- [4] Cao M J, Hara K, Osatomi K, et al. Myofibrillar-bound serine proteinase (MBP) and its degradation of myofibrillar proteins[J]. Journal of Food Science, 1999, 64(4): 644~647
- [5] Barrett A J, Kirschke H. Cathepsin B, Cathepsin H and Cathepsin L [J]. Methods of Enzymology, 1981, 80: 353~361
- [6] Barrett A J. Fluorimetric assays for cathepsin B and cathepsin H with methylcoumarylamide substrates [J]. Biochem J, 1980, 187:909~912
- [7] Ogata H, Aranishi F, Hara K, et al. Proteolytic degradation of myofibrillar components by carp cathepsin L[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1998, 76:499~504
- [8] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227: 680~685
- [9] Neuhoff V, Arold N, Taube D, et al. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric

- focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G250 and R-250[J]. *Electrophoresis*, 1988, 9: 255 ~ 262
- [10] 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
- [11] Kinoshita M, Toyohara H, Shimizu Y. Diverse distribution of four distinct types of modori (gel degradation) inducing proteinases among fish species [J]. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1990, 56(9): 1485 ~ 1492
- [12] 孔保华, 南庆贤. 鲢鱼组织蛋白酶活性的研究[J]. *东北农业大学学报*, 2001, 32(2): 105 ~ 110
- [13] An H, Seymour A T, Wu J, et al. Assay systems and characterization of Pacific Whiting (*Merluccius productus*) Protease [J]. *Journal of Food Science*, 1994, 59(2): 277 ~ 281
- [14] Rico E, Toldrà F, Flores J. Aminopeptidase interference in the assay of muscle cathepsin H [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1991, 54: 651 ~ 653
- [15] Yamashita M, Konagaya S. Hydrolytic action of salmon cathepsins B and L to muscle structural proteins in respect of muscle softening [J]. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1991, 57(10): 1917 ~ 1922
- [16] Osatomi K, Sasai H, Cao M J, et al. Purification and characterization of myofibril-bound serine proteinase from carp *Cyprinus carpio* ordinary muscle [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1997, 116B(2): 183 ~ 190
- [17] Cao M J, Osatomi K, Hara K, et al. Identification of a myofibril-bound serine proteinase (MBSP) in the skeletal muscle of lizard fish *Saurida wanieso* which specifically cleaves the arginine site [J]. *Comp Biochem Physiol*, 2000, 125B: 255 ~ 264

· 成果介绍 ·

我校“Mozzarella 干酪加工关键技术与设备研究及产业化开发”达到国内领先水平

2004 年 8 月,由食品科学与营养工程学院任发政教授等主持、多家单位共同完成的“Mozzarella(莫扎瑞拉)干酪加工关键技术与设备研究及产业化开发”通过了鉴定。

Mozzarella 干酪是目前国外产量大、应用广的软质干酪,常用于鲜食、配料和再制干酪的原料。课题组参考国外工作,结合我国奶业现状,系统研究了影响 Mozzarella 干酪品质的因素,包括原料乳、发酵菌种及酶制剂的筛选、关键加工工艺技术参数等;同时开展了 Mozzarella 干酪关键生产设备的研究与开发,通过中试及工业化生产,制定了加工生产标准与产品标准,并建立了我国第一条年产 300 吨 Mozzarella 干酪的生产线,实现了我国干酪的工业化生产。

国家“十五”攻关课题“肉制品加工关键技术研究与新产品开发”的 2 个子项目 2004 年 7 月通过鉴定

食品科学与营养工程学院南庆贤教授主持的子项目“冷却肉加工关键技术研究与新产品开发”针对我国冷却肉加工中存在的货架期短、颜色稳定性差、汁液流失严重及包装落后等问题,对冷却肉生产工艺流程和质量管理体系的建立、冷却肉综合保鲜、护色和包装技术、冷却肉汁液流失控制技术等进行深入系统的研究。专家组认为该项目研究整体上达到了国际先进水平。

马长伟教授主持的子项目“发酵肉制品加工关键技术研究与新产品开发”针对我国发酵肉制品产业化程度低、产品品种单一、质量稳定性差、加工周期长、劳动强度大、不适应规模化、标准化生产的现状,重点开展了肉用优良微生物菌种的筛选、发酵剂的研制与产业化开发及发酵肉制品加工工艺与新产品开发等研究,实现了产业化目标。专家组认为,该项目研究整体处于国内领先地位,新型肉用发酵剂的开发及新型发酵肉制品的研制,达到了国际先进水平。

(科学技术处供稿)