

加热温度对混合肉肌原纤维蛋白质结构的影响

桂萍 罗永康 冯力更*

(中国农业大学 食品科学与营养工程学院,北京 100083)

摘要 为更好地了解鲢鱼(*Hypophthalmichthys molitrix*)肉、鸡胸肉和混合肉(鲢鱼肉与鸡肉质量比1:1)中肌原纤维蛋白质在加热过程中理化特性的变化,对不同温度条件下盐溶性蛋白质质量浓度、巯基质量摩尔浓度以及蛋白质构象变化和分子量分布(SDS-PAGE)进行研究。结果表明:随温度升高,3种肉蛋白质质量浓度均下降至1.00 mg/mL以下,巯基质量摩尔浓度均下降60%以上,色氨酸荧光强度与 α 螺旋含量均降低至某一水平后基本保持不变。混合肉肌原纤维蛋白质与鸡胸肉盐溶性蛋白质质量浓度、巯基质量摩尔浓度,以及色氨酸荧光强度与 α 螺旋含量的下降趋势类似,0~40℃基本保持不变,而后剧烈下降,50℃时下降到最低;鲢鱼肌原纤维蛋白质则在0~30℃变化缓慢,之后迅速下降,40℃时下降到最低。变性温度和SDS-PAGE结果显示:鲢鱼肉、混合肉和鸡胸肉肌球蛋白重链分别在40、50和50℃时减少,这表明在加热过程中,3种肉蛋白质在变性温度附近,肌球蛋白重链聚集、蛋白质分子构象发生变化;另外,混合肉肌原纤维蛋白质的热变性规律与单一蛋白质略有差异,能够结合单一蛋白质的优点,改善温度对蛋白质结构的影响。

关键词 肌原纤维蛋白质; 鲢鱼; 鸡胸肉; 混合肉; 热变性温度

中图分类号 TS251.1

文章编号 1007-4333(2018)05-0093-09

文献标志码 A

Effects of temperature on the structure of myofibrillar protein in blended meat

GUI Ping, LUO Yongkang, FENG Ligeng*

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

Abstract The physicochemical changes of myofibrillar protein from silver carp, chicken breast and their mixture ($m(\text{silver carp}) : m(\text{chicken}) = 1 : 1$) were investigated by measuring the content of salt-soluble protein and sulfhydryl group, and the changes of protein conformation and SDS-PAGE during heating also analyzed. The results showed that: The content of salt-soluble protein decreased to 1.00 mg/mL, and the total content of sulfhydryls decreased over 60%, and the fluorescence intensity of the tryptophan and the content of the α -helix decreased to a stable level with temperature for three proteins. The changes of the blended myofibrillar protein were similar to chicken breast myofibrillar, which was previously expected to be constant from 0 to 40℃, then dropped dramatically to the lowest at 50℃. However, the changes of the myofibril from silver carp basically kept the same at the range of 0 to 30℃, and then reached a low point at 40℃. The thermal denaturation and SDS-PAGE results displayed that the myofibrillar of the silver carp denatured at 40℃ and the mixed meat and chicken protein denatured at 50℃. Above results indicated that the accumulation of myosin heavy chains led to changes in the molecular conformation of the protein at denatured temperature during the heating process. In addition, there were differences between the blended protein and single protein, which improved gel properties of blended protein by combining the advantage of single protein.

Keywords myofibrillar protein; silver carp; chicken breast; blended meat; thermal denatured temperature

收稿日期: 2017-07-20

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目(2015BAD28B00); 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-46)

第一作者: 桂萍, 硕士研究生, E-mail: guiping2017@cau.edu.cn

通讯作者: 冯力更, 副教授, 主要从事食品安全与质量保证研究, E-mail: fengligeng@cau.edu.cn

鲢鱼是我国广泛养殖的淡水鱼品种之一。2016年,我国鲢鱼养殖总产量达435.4万t,仅次于草鱼,位居第二^[1]。鲢鱼产量大,富含不饱和脂肪酸,营养丰富^[2],以鲜食为主,市场价格不高,为提高其经济价值,将鲢鱼进行工业加工可增加其附加值。肌原纤维蛋白质(盐溶性蛋白质)不仅是鱼肉中主要蛋白质,也是其他肌肉蛋白质中的主要成分,约占总蛋白质含量的50%~55%,是由肌球蛋白、肌动球蛋白、肌动球蛋白质,以及调节蛋白质(原肌球蛋白、肌钙蛋白质)等形成的复合体^[3]。肌原纤维蛋白质作为一类具有重要生物学功能的结构蛋白质群,其作用除参与肌肉的收缩、影响肌肉嫩度外,还与肉制品的流变学特性、黏结性、保水性、弹性和质地等都有着密切的关系^[3]。而加热作为食品生产过程中主要的单元操作,能够导致蛋白质分子变性、分解或聚集,从而影响蛋白质水合特性、凝胶特性等功能特性。因此,研究加热温度对蛋白质理化特性的影响有利于掌握蛋白质的热变性规律,探讨这种热变性与蛋白质凝胶特性的联系,指导肉制品的工业生产。

蛋白质的热变性对肌肉品质有很大影响,能够改变肌肉的持水性和凝胶强度。已有研究对马鲛鲷^[4]、鲢鱼^[5]、鸡胸肉^[6]肌原纤维蛋白质的热变性影响提出蛋白质在热变性温度时从液态溶胶转变为固态凝胶,有助于蛋白质凝胶结构的提高。改善肉的凝胶特性除了研究加热温度对蛋白质结构的影响,还可以研究复合肉中蛋白质与蛋白质的交联增强单一肉的凝胶特性。李清正等^[7]研究温度对鲢鱼和猪肉及其混合肉肌原纤维蛋白质结构特性的影响,结果证实复合肌原纤维蛋白质能够结合单一蛋白质的优点,并使得蛋白质之间发生交互作用。Liu等^[8]研究鱼肉与猪肉的混合肉糜凝胶,指出鱼肉与猪肉质量比为3:7时,混合肉糜凝胶强度最好。Liu等^[9]发现鲢鱼和白姑鱼复合鱼糜凝胶强度要强于单一鱼糜凝胶强度,推测蛋白质之间发生相互作用。康建波等^[10]研究猪肉鸡肉复合肌原纤维蛋白质凝胶特性,推测鸡肉与猪肉质量比为3:7时,混合肉糜蛋白质凝胶特性最好。国内外关于水产鱼类和畜产肉类复合的研究比较多,但是对于鲢鱼肉和鸡肉的复合则鲜有研究。

温度是影响蛋白质理化特性的主要因素,研究加热温度对混合肉肌原纤维蛋白质理化特性的影响十分重要。本试验拟将低附加值的鲢鱼肉与高营养

价值的鸡肉进行复合,通过研究温度对鲢鱼肉、混合肉(等量鱼肉与鸡肉混合),以及鸡胸肉的盐溶性蛋白质质量浓度、巯基质量摩尔浓度(b (巯基))、内源荧光特性、圆二色性等蛋白质结构变化,结合分子量分布和蛋白质热变性,探索温度对蛋白质结构的影响,以期为鱼/鸡复合肉糜凝胶的研究提供更高层次的理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鸡脯肉,华都冷鲜鸡,购自北京美廉美超市学院路店;鲢鱼购自北京健翔桥农贸市场,活运至实验室。

所有试剂均为分析纯,购买于北京化学试剂公司。

1.2 试验方法

活鲢鱼敲击头部致晕后,去鳞和内脏,洗净、沥干后,取背部白肉切片备用。鸡胸肉去结缔组织和粘膜,切碎后备用。

1.2.1 肌原纤维蛋白质的提取

参考Liu等^[11]的方法,稍作改动,制备肌原纤维蛋白质。

1.2.2 蛋白质溶液质量浓度的测定

参照杨建雄^[12]的方法,采用双缩脲法测定蛋白质溶液的质量浓度。用50 mmol/L磷酸盐缓冲液(0.6 mol/L NaCl, pH 6.0)调整到所需的蛋白质溶液质量浓度。

1.2.3 肌原纤维蛋白质的加热处理

取250 mL蛋白质溶液(4、2和0.5 mg/mL)置于控温水浴锅内,并用锡箔纸盖在500 mL的烧杯上,用电动搅拌器进行持续搅拌,插入温度计进行实时监控,以1 °C/min的速率将蛋白质溶液从25 °C加热到90 °C,在25、30、40、50、60、70、80和90 °C这几个温度点分别取5 mL样品于离心管内,并迅速置于冰水浴中。将所得的样品在10 000 r/min下离心5 min,所得上清液分别进行盐溶性蛋白质质量浓度、巯基质量摩尔浓度(b (巯基))以及SDS-PAGE分析。

1.2.4 盐溶性蛋白质质量浓度测定

取1.2.3加热处理后的蛋白质溶液,冷却至室温并离心,用上清液测定加热后盐溶性蛋白质质量浓度。

1.2.5 巯基质量摩尔浓度测定

肌原纤维蛋白质溶液质量浓度调整至4 mg/mL,

加热方法同 1.2.3, 取离心后的上清液测定巯基质量摩尔浓度, 参考 Benjakul 等^[13] 方法。空白组用 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液(0.6 mol/L NaCl, pH 6.0) 代替。巯基质量摩尔浓度(b (巯基))用 412 nm 下的吸光度计算, 计算公式为:

$$b(\text{巯基}) = AD/(\epsilon\rho)$$

式中: A 表示吸光值; ρ 表示蛋白质质量浓度, mg/mL; ϵ 表示摩尔吸光系数, 为 13 600 L/(mol·cm); D 为稀释倍数, 本试验为 11.25。

1.2.6 色氨酸荧光性的测定

调整蛋白质溶液质量浓度为 0.05 mg/mL。参数设置为: 激发波长 295 nm, 激发和发射狭缝宽度均为 2.5 nm, 波长扫描范围为 300~400 nm, 扫描速度为 1 000 nm/min^[14]。

1.2.7 圆二色谱的测定

1) 全谱扫描。蛋白质溶液质量浓度调为 0.2 mg/mL, 以 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液(0.6 mol/L NaCl, pH 6.0) 作为空白进行扫描。参数设定参考 Zhang 等^[15] 方法略作修改: 扫描波长范围为 200~260 nm, 采用光径为 0.1 cm 的石英比色皿, 扫描速率 100 nm/min, 累计扫描 3 次。

2) 变性温度的测定。蛋白质溶液质量浓度为 0.05 mg/mL, 设置特定波长为 222 nm, 升温速率为 2 °C/min, 温度扫描范围 25~90 °C, 采用光径为 0.1 cm 的石英比色皿, 累计扫描 3 次。

1.2.8 SDS-PAGE 分析

蛋白质溶液的质量浓度为 2 mg/mL, 将经过处理的样品与样品缓冲液以体积比为 1:1 进行混合, 并沸水浴 5 min, 样品缓冲液一份加 DTT 具有还原性, 另一份不加 DTT 具有非还原性。电泳分别用含 10% 丙烯酰胺的分离胶和含 4% 丙烯酰胺的浓缩胶, 初始电压为 80 V, 至样品完全被压成 1 条直线刚好进入分离胶后, 将电压提高到 120 V, 电泳时间约为 1.5 h, 之后再继续进行固定、染色和脱色直至出现明显的条带。

1.3 数据处理

试验数据均为 3 个重复。采用 Excel 处理数据, 显著性分析采用 SPSS 19.0 ($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 温度对盐溶性蛋白质质量浓度的影响

随着温度的升高, 鲢鱼肉、鸡胸肉及其混合肉盐溶性蛋白质质量浓度均随温度的升高而降低

(图 1)。鲢鱼肉蛋白质在 0~30 °C 间盐溶性蛋白质质量浓度在 2.49 mg/mL 左右, 在 30~40 °C 时急剧降低, 而当温度高于 40 °C 后, 盐溶性蛋白质质量浓度基本维持在 1.00 mg/mL 以下。鸡胸肉和混合肉盐溶性蛋白质质量浓度初始分别为 2.00 和 2.78 mg/mL, 0~40 °C 时基本保持不变, 随着温度升高, 质量浓度骤然降低, 当温度高于 50 °C, 蛋白质质量浓度均低于 1.00 mg/mL, 且均显著 ($P < 0.05$) 低于纯鱼肉盐溶性蛋白质质量浓度。You 等^[16] 研究鳙鱼肌球蛋白在加热过程中的变化, 认为 45 °C 是鳙鱼盐溶性蛋白质质量浓度发生显著 ($P < 0.05$) 变化的突变温度点, 这一结果与本试验鲢鱼蛋白质的变化趋势基本一致。吴兵^[17] 研究表明鸡肉蛋白质随温度升高发生显著 ($P < 0.05$) 不可逆变化, 并且当温度高于 65 °C, 盐溶性蛋白质质量浓度下降缓慢, 与本试验鸡肉蛋白质含量的变化类似。加热后盐溶性蛋白质质量浓度的多少可用来表征蛋白质在加热过程中的变化, 即反映蛋白质热变性。加热过程中蛋白质变性聚集, 溶液中可溶性蛋白质含量降低。

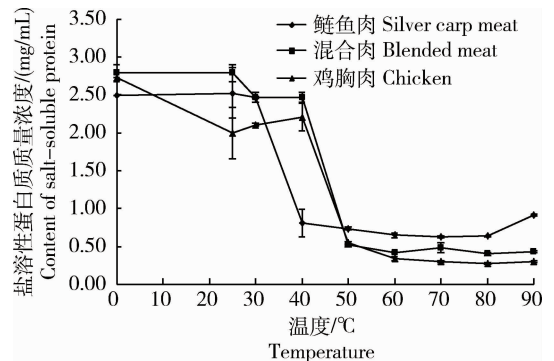


图 1 温度对盐溶性蛋白质质量浓度的影响

Fig. 1 Effects of temperature on the content of salt-soluble protein

2.2 温度对肌原纤维蛋白质巯基质量摩尔浓度的影响

鲢鱼肉、鸡胸肉及其混合肉肌原纤维蛋白质的 b (巯基) 均随温度的升高而下降, 呈反 S 型曲线 (图 2)。鲢鱼蛋白质 b (巯基) 初始为 4.53 mol/10⁵ g, 在 30 °C 时 b (巯基) 下降了 62.36% (与初始 b (巯基) 相比, 下同), 高于 40 °C 后 b (巯基) 在 1.00 mol/10⁵ g 左右; 而混合肉与鸡胸肉蛋白质的 b (巯基) 变化基本类似, 均在 50 °C 时下降显著 ($P < 0.05$), 分别下降了 67.34% 和 82.41%。在 40~50 °C 温度范围

内,蛋白质 *b*(巯基)急剧减少,随着温度的上升, *b*(巯基)变化不显著 ($P > 0.05$), 90 °C 时分别为 0.73 和 0.44 mol/10⁵ g, 但鱼肉和混合肉蛋白质 *b*(巯基)均高于鸡肉蛋白质,这可能与鱼肉和鸡肉蛋白质凝胶特性有关。

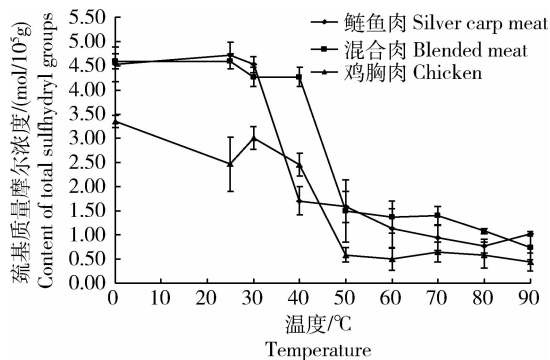


图2 温度对肌原纤维蛋白质巯基质量摩尔浓度的影响

Fig. 2 Effects of temperature on the content of total sulfhydryl groups of myofibrillar protein

蛋白质在加热过程中由于分子间的各种作用力被破坏,使得巯基暴露,同时被氧化成二硫键,导致其变性和聚集。潘锦锋等^[18]研究草鱼肌原纤维蛋白质加热过程中理化特性的变化,发现草鱼蛋白质

在 40 °C 附近 *b*(巯基)显著 ($P < 0.05$) 下降,说明草鱼蛋白质在 40 °C 附近变性,巯基被迅速氧化成二硫键,导致其分子作用增强,蛋白质变性。这一结果与本试验 3 种肉蛋白质在不同的温度时 *b*(巯基)下降趋势类似,由此推测,本试验中鲢鱼和其他 2 种肉蛋白质分别在 40 和 50 °C 附近变性,蛋白质巯基被氧化成二硫键,从而导致蛋白质聚集变性^[19]。而二硫键与蛋白质凝胶形成作用力有关,二硫键含量越高,更有利于凝胶网络结构的稳定。

2.3 内源性荧光测定

内源荧光光谱技术可用来监测蛋白质分子三级结构,并检测色氨酸残基微环境变化。采用 295 nm 作为激发波长可只激发色氨酸残基,排除酪氨酸残基的干扰,将此时的内源荧光全部归于色氨酸残基的贡献^[20]。蛋白质的变性会使得内部色氨酸残基暴露,而蛋白质分子聚集会使得更多色氨酸残基被包裹,从而表现为内源荧光强度下降^[14]。

天然状态下肌原纤维蛋白质内源性荧光峰的最大发射波长 λ_{max} 在 335 nm 附近(图 3)。随着温度的升高,3 种肌原纤维蛋白质的荧光强度均出现逐渐降低的趋势,即出现荧光淬灭现象(图 3)。鲢鱼蛋白质在 0~30 °C 间荧光强度逐渐降低,由 4 826.0

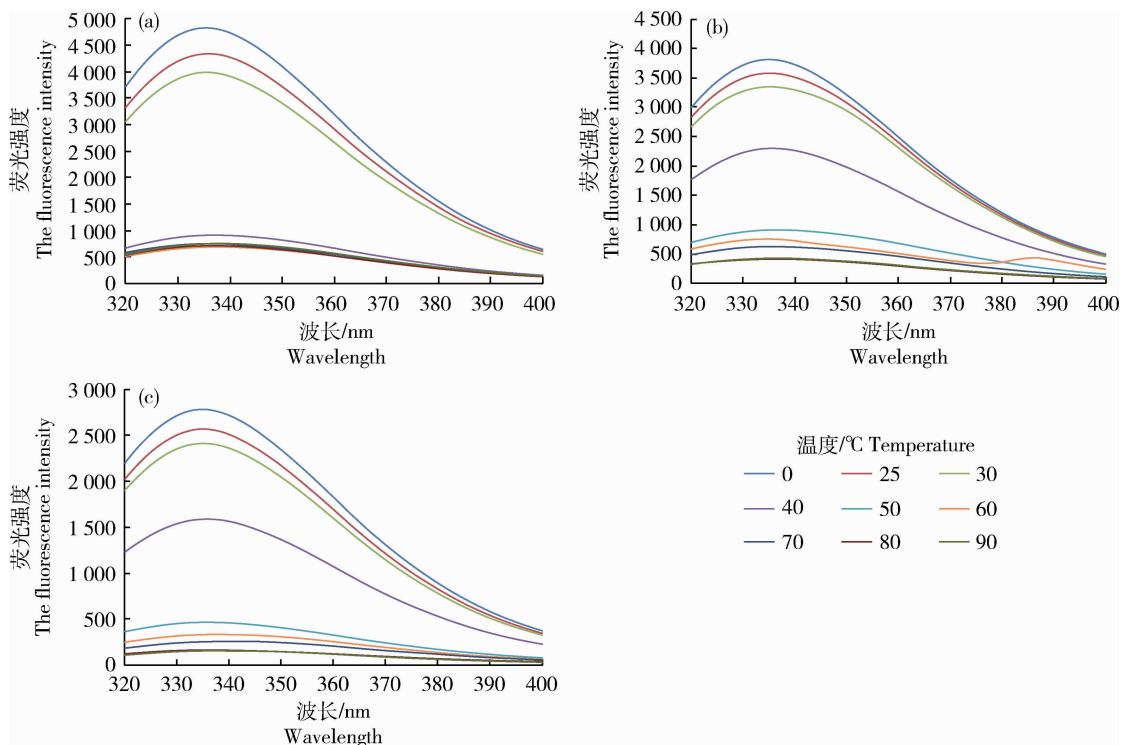


图3 温度对鲢鱼肉(a)、混合肉(b)和鸡肉(c)肌原纤维蛋白质构象的影响

Fig. 3 Effects of temperature on conformation of myofibrillar from silver carp (a), blended meat (b) and chicken (c)

降低到 3 988.0,但 λ_{max} 位置基本不变;在 40 °C 时荧光强度急剧降低,且峰位置明显红移,由 335.7 nm 增加到 337 nm,而红移程度越大,表明蛋白质在变性过程中构象变化程度越大;当温度高于 40 °C 后,荧光持续淬灭,但峰位置基本不变(表 1)。混合肉蛋白质则在 0~30 °C 时,荧光强度缓慢减少,但最大发射波长基本不变;40 °C 时,荧光强度急剧减少,蛋白质分子聚集,而最大发射波长增大趋势不明显;在 50 °C 时,荧光强度进一步发生猝灭,蛋白质 λ_{max} 显著 ($P<0.05$) 红移;当温度高于 50 °C 之后,荧光强度缓慢降低,且峰位置也基本不变。对于鸡胸肉蛋白质,其变化趋势基本和混合肉蛋白质一致,但其 λ_{max}

则是在 60 °C 时才出现显著 ($P<0.05$) 红移的(表 1)。由此,加热过程中,鲢鱼肉(>40 °C)、混合肉和鸡肉(>50 °C)蛋白质荧光强度降低,最大发射波长红移,表明蛋白质分子聚集,蛋白质构象发生变化,而蛋白质构象变化会影响凝胶网络结构的形成,进而影响肉制品的凝胶特性。混合肉肌原纤维蛋白质与单一鱼肉和鸡肉蛋白质构象变化不完全一致,这可能是由于蛋白质之间发生了相互作用,从一定程度上改变了色氨酸对环境的敏感程度,从而影响构象变化,这对后续研究复合肉制品凝胶品质具有一定的意义,但对不同蛋白质凝胶特性具体变化仍需继续研究。

表 1 温度对不同肌原纤维蛋白质的最大发射波长和内源性荧光强度的影响

Table 1 Effects of temperature on the maximum emission wavelength and endogenous fluorescence intensity of different myofibrillar proteins

温度/°C Temperature	最大发射波长/nm Maximum emission wavelength			荧光强度 Fluorescence intensity		
	鲢鱼肉 Silver carp meat	混合肉 Blended meat	鸡胸肉 Chicken	鲢鱼肉 Silver carp meat	混合肉 Blended meat	鸡胸肉 Chicken
0	335.3±0.6 a	335.0±0.0 a	335.0±0.0 a	4 826.0±101.8 a	3 810.0±214.1 a	2 782.0±12.5 a
25	336.3±0.6 abc	335.0±0.0 a	335.0±0.0 a	4 338.3±87.4 b	3 810.0±210.1 a	2 568.7±20.4 b
30	335.7±0.6 ab	335.7±1.2 a	335.0±0.0 a	3 988.0±346.7 c	3 349.0±52.9 b	2 411.5±36.1 c
40	337.0±0.0 abc	335.7±0.6 a	336.0±0.0 a	912.0±50.2 d	2 298.0±41.1c	1 587.3±45.5 d
50	338.7±1.2 bcd	337.0±0.0 b	336.0±0.0 a	750.60±62.4 d	911.0±40.0 d	464.5±5.0 e
60	337.7±0.6 abc	337.7±0.6 bc	338.7±1.2 b	688.23±35.5 d	748.6±108.1 de	349.1±18.7 f
70	341.5±0.7 d	338.3±0.6 c	339.7±2.9 b	734.4±62.9 d	621.9±39.5 ef	260.9±3.0 g
80	339.0±4.4 cd	337.3±0.6 bc	339.0±0.0 b	717.9±44.4 d	414.6±38.5 g	162.1±2.9 h
90	338.0±0.0 abc	337.3±0.6 bc	338.3±2.1 b	751.70±10.0 d	430.2±18.6 fg	121.3±2.7 i

注:同一列中不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

Note: Different small letters indicate significant differences in the same column ($P<0.05$).

2.4 圆二色谱测定

天然状态肌原纤维蛋白质在 208 和 222 nm 附近有 2 个强负吸收峰(图 4),这是 α 螺旋结构作为二级结构主要部分的典型图谱。随着温度的升高,3 种肌原纤维蛋白质在 208 nm 负吸收峰的负槽均逐渐减少甚至消失,其在 222 nm 附近出现的较强负吸收峰的负槽也不断减少,逐渐变为只在 222 nm 附近有 1 个强负吸收峰(图 4),这是 β 螺旋结构作为二级结构主要部分的典型图谱^[21]。 α 螺旋的含量与负吸收峰负槽成负相关,故鲢鱼和混合肉肌原

纤维蛋白质在 25 °C 时 α 螺旋含量最高,40 °C 附近,其在 208 和 222 nm 附近的 2 个负吸收峰负槽显著降低($P<0.05$),90 °C 时 α 螺旋的含量分别减少了 68.00% 和 75.91% (相对于初始值,下同);而鸡胸肉蛋白质则是在 50 °C 附近 2 个负吸收峰变化比较明显,90 °C α 螺旋的含量减少了 64.82%。以上研究结果表明,随着温度的升高, α 螺旋结构逐渐展开,蛋白质空间结构发生变化。其 α 螺旋含量变化的转折点是由肌原纤维蛋白质的热变性决定。Liu 等^[22] 研究鱼肉和猪肉肌原纤维蛋白质随温度变化

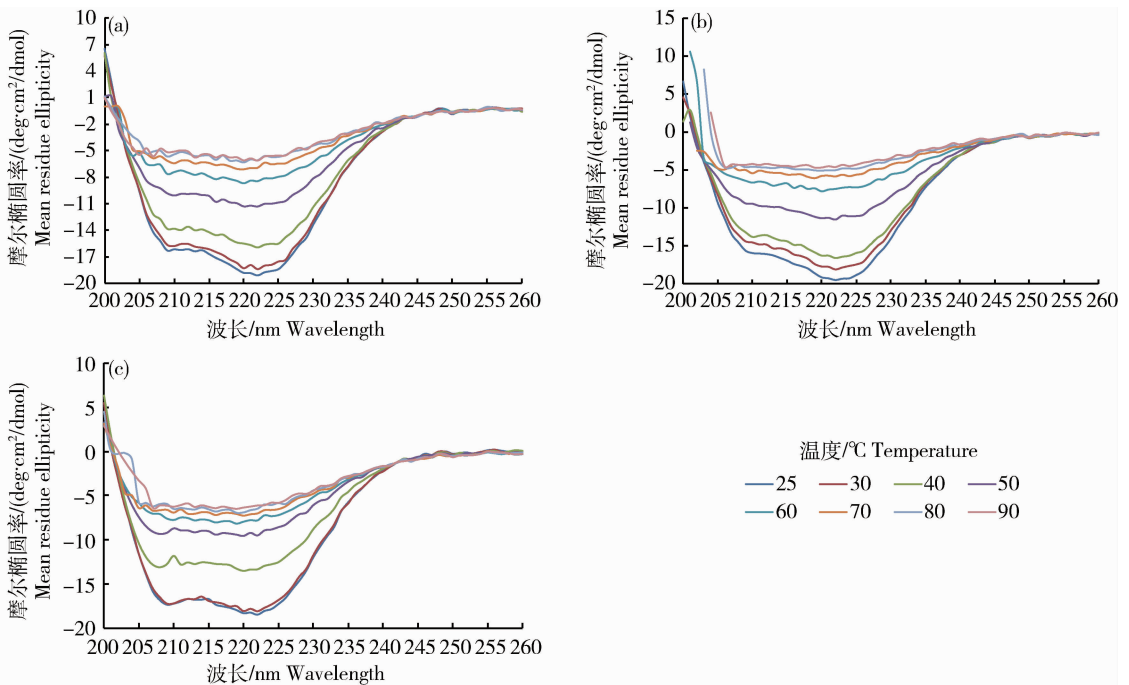


图4 不同温度条件下鲢鱼肉(a)、混合肉(b)和鸡肉(c)肌原纤维蛋白质的圆二色谱图

Fig. 4 Circular dichroism spectroscopy of myofibrillar from silver carp meat (a), blended meat (b) and chicken (c) during different temperature

的圆二色性,发现40℃时,鲢鱼蛋白质变性,肌球蛋白 α 螺旋结构展开,而 α 螺旋结构的展开对凝胶的形成是有益的。由此,本试验推断,鲢鱼蛋白质和鸡肉、混合肉蛋白质分别在40和50℃有利于蛋白质凝胶结构的形成。

2.5 变性温度的测定

变性温度表示在某一固定波长下摩尔椭圆率变化一半时的温度。纯鱼肉在30℃处开始发生变性,在50℃附近摩尔椭圆率变化很小,约在40℃摩尔椭圆率降低到原来的一半(图5),因此推断鱼肉的变性温度在40℃左右,纯鸡肉和混合肉蛋白质摩尔椭圆率分别从-5.51和-6.58 deg·cm²/dmol增加到-2.84和-3.25 deg·cm²/dmol,其摩尔椭圆率增加到一半时的温度均在50℃附近。孙京新等^[23]的研究也证实鸡肉比鱼肉具有更高的变性温度。从纯鱼肉到纯鸡肉,随着鸡肉含量的增加,蛋白质的变性温度不断增大,但是混合肉和鸡胸肉的蛋白质变性温度很接近。蛋白质分子在变性温度附近展开,导致蛋白质理化特性发生显著($P < 0.05$)变化。鱼肉蛋白质在凝胶化温度保温一段时间更有利于凝胶网络结构的形成,Benjakul等^[24]比较了不同环境温度下生长鱼种的鱼糜凝胶化温度,提出鱼糜

的凝胶化温度是由肌球蛋白的热稳定性决定的。这一结果也验证了盐溶性蛋白质质量浓度、 b (巯基)以及内源性荧光和圆二色性发生急剧变化是由蛋白质热变性温度引起的。

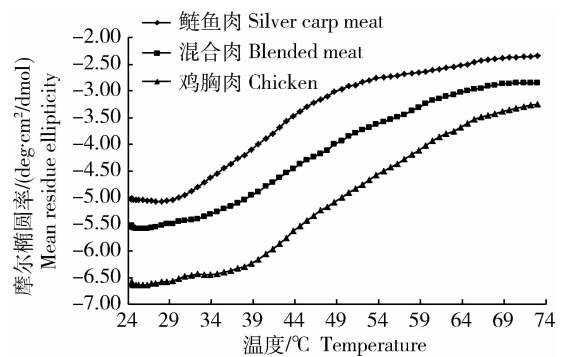


图5 温度对不同肌原纤维蛋白质圆二色性的影响

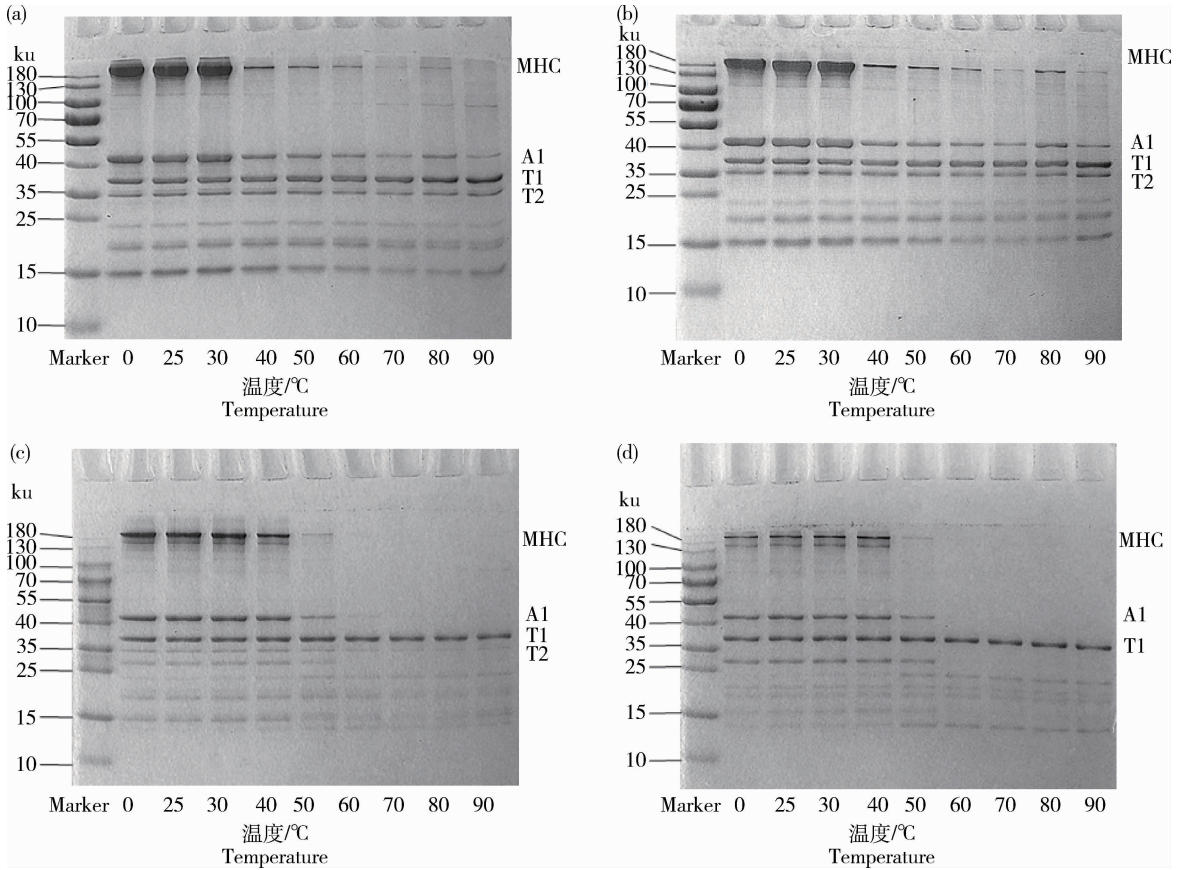
Fig. 5 Effects of temperature on circular dichroism of three kinds of myofibrillar

2.6 不同温度下不同肌原纤维蛋白质的电泳图谱

鲢鱼蛋白质0℃时有表征肌原纤维蛋白质的重要条带(图6(a)),即肌球蛋白重链(220 ku)、肌动蛋白质(45 ku)、肌钙蛋白质(30~37 ku)和原肌球蛋白(34~36 ku),这与任丽娜^[25]曾报道鲢鱼

的全蛋白质电泳条带的组成结果一致。鸡胸肉蛋白质 0 °C 时有肌球蛋白重链、肌动蛋白质以及原肌

球蛋白(图 6(d)),这与陈昌^[26]研究鸡胸肉蛋白质电泳图时未发现肌钙蛋白质条带的结果相符。



MHC-肌球蛋白重链; A1-肌动蛋白质; T1-原肌球蛋白; T2-肌钙蛋白质

MHC-Myosin heavy chain, A1-Actin, T1-Tropomyosin, T2-Troponin

(a) 不加 DTT 的纯鱼肉; (b) 加 DDT 的纯鱼肉; (c) 不加 DTT 的混合肉; (d) 不加 DTT 的纯鸡肉。

(a) Silver carp with addition of DTT; (b) Silver carp without DTT; (c) Blended meat without DTT; (d) Chicken without DTT.

图 6 温度对不同肌原纤维蛋白质电泳的影响

Fig. 6 Effects of temperature on the SDS-PAGE pattern of different myofibrillar protein

DTT(二硫苏糖醇)对鲢鱼蛋白质随温度变化略有影响,加 DTT 的 80 °C 条带相对于不加 DTT 较深(图 6(a)、(b)),这可能是由于 DTT 打断了蛋白质凝胶结构中的二硫键而使得更多分子量小于 180 ku 的蛋白质进入条带,从而使得条带加深,因此二硫键可能是热变性过程中肌原纤维蛋白质聚集的主要作用力。这与盐溶性蛋白质质量浓度和 *b* (巯基)随温度升高而显著 ($P < 0.05$) 降低的结果一致。

随温度的升高,3 种肌球蛋白重链均变浅(图 6(a)、(c)及 (d)),这可能是因为肌球蛋白重链在加热过程中聚集成大分子而被离心去除不能进

入到电泳条带中,故在浓缩胶上界面观察不到大分子蛋白质所形成的条带。鲢鱼肌原纤维蛋白质在 40 °C 附近肌球蛋白重链条带变浅,而混合肉和纯鸡肉肌原纤维蛋白质则基本上是在 50 °C 附近出现肌球蛋白重链变浅,这与加热后可溶性蛋白质质量浓度与 *b*(巯基)下降吻合。Ko 等^[27]利用分子量分布研究罗非鱼肌球蛋白在热变性中产生聚合物,并指出二硫键与形成聚合物的作用力有关。本试验说明,在加热过程中,鲢鱼肉 (>40 °C)、混合肉和鸡肉 (>50 °C) 蛋白质聚集产生二硫键。二硫键作为凝胶形成过程中的主要作用力,这对后续研究混合肉凝胶特性具有参考价值。

3 结 论

温度对鲢鱼肉、混合肉以及鸡肉肌原纤维蛋白质的结构均有显著($P < 0.05$)影响。鲢鱼蛋白质在40℃附近变性严重,混合肉和鸡肉蛋白质则在50℃附近变性剧烈。随温度的升高,鱼肉、混合肉和鸡肉蛋白质 α 螺旋含量急剧降低后稳定, β (巯基)减少,被氧化成二硫键;与此同时,蛋白质的构象也发生变化,色氨酸残基被包裹,荧光强度猝灭,肌球蛋白重链条带变浅,盐溶性蛋白质质量浓度下降。混合肌原纤维蛋白质结构变化规律与单一蛋白质不完全一致,这也许是由于不同蛋白质之间发生了交互作用,从而使得蛋白质在不同的温度下出现结构差异。鱼肉与鸡肉蛋白质复合凝胶特性的作用机制有待进一步研究。

参考文献 References

[1] 农业部渔业渔政管理局. 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2016: 36-39
The Ministry of Agriculture Fishery and Fishery Administration. *China Fishery Statistical Yearbook* [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2016 (in Chinese)

[2] 秦娜, 张月美, 罗永康. 长丰鲢各部位主要营养成分分析及比较[J]. 中国农业大学学报, 2015, 20(1): 129-134
Qi N, Zhang Y M, Luo Y K. Comparison and analysis of major nutritional components in different body parts of Changfeng silver carp [J]. *Journal of China Agricultural University*, 2015, 20(1): 129-134 (in Chinese)

[3] 陈文博. 肌原纤维蛋白热诱导凝胶形成机制研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2010
Chen W B. Study on the mechanism of heat-induced gelatin of myofibrillar proteins [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2010 (in Chinese)

[4] Yongsawatdigul J, Park J W. Thermal denaturation and aggregation of threadfin bream actomyosin[J]. *Food Chemistry*, 2003, 83(3): 409-416

[5] 王玲娣. 大豆蛋白改善鲢鱼肌原纤维蛋白功能特性的研究[D]. 天津: 天津商业大学, 2012
Wang L D. Study on improvement of functional properties of silver carp myofibrillar proteins by soy protein isolate [D]. Tianjin: Tianjin University of Commerce, 2012 (in Chinese)

[6] 胡忠良. 鸡胸肉肌原纤维蛋白氧化对其热诱导凝胶和理化特性的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2012
Hu Z L. Effect of protein oxidation on heat-induction gel and physicochemical properties of chicken breast myofibrillar proteins [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012 (in Chinese)

[7] 李清正, 张顺亮, 罗永康, 冯力更. 温度对复合肌原纤维蛋白结构及其表面疏水性的影响[J]. 肉类研究, 2017, 31(2): 6-10
Li Q Z, Zhang S L, Luo Y K, Feng L G. Effects of temperature on the structure and surface hydrophobicity of mixed myofibrillar proteins [J]. *Meat Research*, 2017, 31(2): 6-10 (in Chinese)

[8] Liu R, Zhao S, Regenstein J M, Liu Q, Yang H, Xiong S. Gelling properties of fish/pork mince mixtures [J]. *Journal of Food Science*, 2016, 81(2): C301-C307

[9] Liu L, Luo Y K, Song Y L, Shen H X, Hong H. Study on gel properties of silver carp, and white croaker, blended surimi at different setting conditions [J]. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 2013, 22(1): 36-46

[10] 康建波, 李俊霞, 赵晶, 刘妍菊, 马龙彪, 周亚军, 佟月英. 猪肉鸡肉复合肌原纤维蛋白凝胶特性[J]. 农产品加工学刊, 2012(8): 19-22
Kang J B, Jun-Xia L I, Zhao J, Liu Y J, Ma L B, Zhou Y J, Tong Y Y. Gel properties of pork and chicken compound myofibrillar protein [J]. *Academic Periodical of Farm Products Processing*, 2012(8): 19-22 (in Chinese)

[11] Liu R, Zhao S M, Xiong S B, Qiu C, Xie B. Rheological properties of fish actomyosin and pork actomyosin solutions [J]. *Journal of Food Engineering*, 2008, 85(2): 173-179

[12] 杨建雄. 生物化学与分子生物学实验技术教程[M]. 北京: 科学出版社, 2014: 33-34
Yang J X. *Biochemistry and Molecular Biology Laboratory Course* [M]. Beijing: Scientific Publishers, 2014: 33-34 (in Chinese)

[13] Benjakul S, Visessanguan W, Thongkaew C, Tanaka M. Comparative study on physicochemical changes of muscle proteins from some tropical fish during frozen storage [J]. *Food Research International*, 2003, 36(8): 787-795

[14] Siriporn R, Soottawat B, Wonnop V, Ulf E, Turid R. Acid-induced gelation of natural actomyosin from Atlantic cod (*Gadus morhua*) and burbot (*Lota lota*) [J]. *Food Hydrocolloids*, 2009, 23(1): 26-39

[15] Zhang Y, Zhong Q. Probing the binding between norbixin and dairy proteins by spectroscopy methods [J]. *Food Chemistry*, 2013, 139(1-4): 611-616

[16] You J, Pan J F, Shen H X, Luo Y K. Changes in physicochemical properties of bighead carp (*Aristichthys mobilis*) actomyosin by thermal treatment [J]. *International Journal of Food Properties*, 2012, 15(6): 1276-1285

[17] 吴兵. 鸡肉的热致变化研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2011
Wu B. Study on thermal-induced changes of chicken breast [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2011 (in Chinese)

[18] 潘锦锋, 沈慧星, 尤娟, 宋永令, 罗永康. 草鱼肌原纤维蛋白加热过程中理化特性的变化[J]. 中国农业大学学报, 2009, 14(6): 17-22
Pan J F, Shen H X, You J, Song Y L, Luo Y K. Changes in

- physiochemical properties of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) myofibrillar protein during heat-treatment [J]. *Journal of China Agricultural University*, 2009, 14(6): 17-22 (in Chinese)
- [19] Wang L, Xiong G, Peng Y B, Wu W J, Li X, Wang J, Qiao Y, Liao L, Ding A Z. The cryoprotective effect of different konjac glucomannan (KGM) hydrolysates on the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) myofibrillar during frozen storage [J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2014, 7(12): 3398-3406
- [20] Parisi M, Mazzini A, Sorbi R T, Ramoni R, Grolli S, Favilla R. Unfolding and refolding of porcine odorant binding protein in guanidinium hydrochloride: Equilibrium studies at neutral pH [J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2003, 1652(2): 115
- [21] 费英, 韩敏义, 杨凌寒, 周光宏, 徐幸莲, 彭增起. pH对肌原纤维蛋白二级结构及其热诱导凝胶特性的影响[J]. 中国农业科学, 2010, 43(1): 164-170
- Fei Y, Han M Y, Yang L H, Zhou G H, Xu X L, Peng Z Q. Studies on the secondary structure and heat-induced gelation of pork myofibrillar proteins as affected by pH [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, 43(1): 164-170 (in Chinese)
- [22] Liu R, Zhao S M, Xiong S B, Xie B J, Liu H M. Studies on fish and pork paste gelation by dynamic rheology and circular dichroism [J]. *Journal of Food Science*, 2007, 72(7): e399-e403
- [23] 孙京新, 刘功名, 徐幸莲, 黄明, 冯永胜, 乔昌明. 差示扫描量热法测定鸡肉、鱼肉食品加热终点温度[J]. 食品科技, 2015, 40(1): 154-158
- Sun J X, Liu G M, Xu X L, Huang M, Feng Y S, Qiao C M. Detection of endpoint temperature for chicken and fish by differential scanning calorimetry [J]. *Food Science & Technology*, 2015, 40(1): 154-158 (in Chinese)
- [24] Benjakul S, Chantarasuwan C, Visessanguan W. Effect of medium temperature setting on gelling characteristics of surimi from some tropical fish [J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2004, 39(6): 671-680
- [25] 任丽娜. 白鲢鱼肉肌原纤维蛋白冷冻变性的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2014
- Ren L N. Study on frozen denaturation of myofibrillar protein of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) muscle [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2014 (in Chinese)
- [26] 陈昌. 鸡胸肉、腿肉混合肌原纤维蛋白热诱导凝胶特性的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2011
- Chen C. Study on the heat-induced gelatin properties of mixed chicken breast and leg myofibrillar [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2011 (in Chinese)
- [27] Ko W C, Yu C C, Hsu K C. Changes in conformation and sulfhydryl groups of tilapia actomyosin by thermal treatment [J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2007, 40(8): 1316-1320

责任编辑: 刘迎春