

磷酸盐对草鱼肌原纤维蛋白结构的影响

曾淑薇, 李吉, 熊善柏, 黄琪琳*

(华中农业大学食品科学技术学院, 国家大宗淡水鱼加工技术研发分中心(武汉), 湖北 武汉 430070)

摘要:以草鱼肌原纤维蛋白为对象, 研究三聚磷酸钠(sodium tripolyphosphate, TPP)和焦磷酸钠(sodium pyrophosphate, SPP)的添加量对肌原纤维蛋白溶解度和浊度、二级结构和表面疏水性、总巯基和活性巯基含量的影响。结果表明:随着磷酸盐添加量的增加, 肌原纤维蛋白溶解度升高, 浊度下降; 蛋白链伸展使得 α -螺旋含量有所降低, β -转角含量升高; 同时稳定蛋白二级结构的作用力如表面疏水性、总巯基以及活性巯基含量也均增加。结论:磷酸盐可以改变蛋白质的结构特性, 且SPP相对TPP而言, 对肌原纤维蛋白结构的影响更为显著。

关键词:肌原纤维蛋白; 磷酸盐; 巯基; 疏水性; 二级结构

Effects of Phosphates on the Structure of Myofibrillar Proteins from Grass Carp Muscle

ZENG Shu-wei, LI Ji, XIONG Shan-bai, HUANG Qi-lin*

(National R&D Branch Center for Conventional Freshwater Fish Processing (Wuhan), College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: The effects of sodium tripolyphosphate (TPP) and sodium pyrophosphate (SPP) at various concentrations on the structure of myofibrillar proteins from grass carp muscle were studied. With an increase in the amount of two phosphates, the solubility of myofibrillar proteins increased obviously, while the turbidity decreased. The total and active sulfhydryl contents as well as the hydrophobicity of myofibrillar proteins increased with increasing concentration of phosphates. The secondary structure of myofibrillar proteins was studied by circular dichroism, and the content of α -helix decreased accompanied by a final increase in β -sheet due to the change of the interaction force that maintained the structural stability. These results indicated that the two phosphates could influence the structure of myofibrillar proteins mainly through the increase in solubility, ionic strength and interaction force, which induced unfolding of the protein chain and expansion of the spatial distance of protein so as to alter the properties of myofibrillar proteins. In addition, SPP had more obvious effect on the protein structure than TPP when added to the myofibrillar proteins.

Key words: myofibrillar proteins; phosphate; sulfhydryl; hydrophobicity; secondary structure

中图分类号: TS254.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2014)23-0048-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201423010

草鱼是一种典型的植食性鱼类, 是我国重要的淡水鱼鱼糜原料之一。草鱼肌原纤维蛋白是鱼肉蛋白质的重要组成部分, 占肌肉蛋白质的60%~75%, 是鱼糜制品弹性凝胶体的主要成分, 肌原纤维蛋白的性质会直接影响鱼肌肉的加工适性。

磷酸盐是肉制品加工中常用的品质改良剂, 影响肉的加工性质以及肉制品的质构、持水等特性, 其中碱性磷酸盐应用较为广泛, 如三聚磷酸盐、焦磷酸盐等^[1]。研究发现, 磷酸盐不仅能够提高产品的乳化稳定性和保水性、降低产品的蒸煮损失, 在加工中还可用于部分替代

氯化钠以降低食盐的用量。因此, 磷酸盐常与其他添加剂进行复配以提高肉制品的品质, 同时还可增加肉制品的黏着性, 在维持低盐肉肠的凝胶强度和保水性方面具有独到的作用^[2-3]。但是, 添加过多的磷酸盐会降低肉制品的食用品质, 甚至还会危害人体健康^[4-5]。在实际生产中, 由于不同磷酸盐的作用机理不完全相同, 其对产品加工的影响也不同^[5]。

磷酸盐是具有缓冲作用的碱性物质, 对改善肌肉蛋白质功能的作用主要在于提高pH值、增加离子强度以及磷酸盐和蛋白之间的相互作用, 并通过协助肌球

收稿日期: 2014-06-30

基金项目: 国家现代农业(鱼)产业技术体系建设专项(CARS-46-23); 武汉市应用基础研究计划项目(2014020101010068)

作者简介: 曾淑薇(1990—), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产品蛋白结构与功能特性。E-mail: zsw_hzau@126.com

*通信作者: 黄琪琳(1974—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为蛋白质多糖等食品大分子的结构和功能特性。

E-mail: hql@mail.hzau.edu.cn

蛋白和肌动蛋白溶解以及提高肉的保水性来改善肌肉的嫩度^[6]。目前,关于磷酸盐改善肉及其制品品质的研究已经很多,但对磷酸盐在鱼肉加工中的作用机理少有报道。本研究拟通过磷酸盐对草鱼肌原纤维蛋白溶胶结构性质的影响分析,考察蛋白浊度和溶解性、二级结构以及表面疏水性、巯基的变化,探讨鱼肉制品品质改良剂的作用机理。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

草鱼,体质量1 500 g左右,购于华中农业大学菜市场。

焦磷酸钠(sodium pyrophosphate, SPP) 上海国药集团化学试剂有限公司;三聚磷酸钠(sodium tripolyphosphate, TPP) 天津光复精细化工研究所;Tris 中国医药集团上海化学试剂公司;5,5-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid, DTNB) 上海生物工程公司;1-苯胺萘-8-萘磺酸盐(8-naphthylamine-1-sulfonic acid, ANS) 美国Sigma公司;实验所用试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

Avanti J-26 型高速离心机 美国贝克曼库尔特有限公司;F-4600荧光分光光度计 日本日立高新技术公司;J-1500圆二色谱仪 日本Jasco公司。

1.3 方法

1.3.1 肌原纤维蛋白的提取与磷酸盐-蛋白复合样品制备

参照Sun Fengyuan等^[7]的提取方法,取新鲜绞碎的草鱼鱼糜用5倍体积的低盐缓冲液(0.05 mol/L NaCl和20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5)搅拌均匀,于4 500 r/min离心10 min,重复漂洗3次;然后用4倍体积的高盐缓冲液(0.45 mol/L NaCl和20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5)在4℃条件下浸提22 h,然后于12 000 r/min离心15 min,除去上清液,用10倍体积的冷却水稀释沉淀30 min左右,除去上清液,于12 000 r/min离心15 min,得到的沉淀即为肌原纤维蛋白。用Lowry法^[8]测定蛋白质质量浓度。

称取质量分数为0.3%、0.6%、0.9%、1.2%、1.5%的焦磷酸钠和三聚磷酸钠溶于NaCl溶液中,然后加入到肌原纤维蛋白,使NaCl的最终浓度为0.6 mol/L,于4℃条件下保存备用。

1.3.2 溶解度的测定

参考Xiong Youling等^[9]的方法,用0.6 mol/L NaCl将肌原纤维蛋白稀释到0.25 mg/mL,8 000 r/min离心10 min后去上清液。测定离心前后蛋白溶液的蛋白质质量浓度。溶解度按公式(1)计算。

$$\text{溶解度}/\% = \frac{\text{离心后上清液中蛋白质质量浓度}/(\text{mg/mL})}{\text{离心前蛋白质质量浓度}/(\text{mg/mL})} \times 100 \quad (1)$$

1.3.3 浊度的测定

参考Xiong Youling等^[9]的方法,用0.6 mol/L NaCl溶液将肌原纤维蛋白稀释到1 mg/mL,40℃保温30 min,快速冷却后测定肌原纤维蛋白溶液在320 nm波长处的吸光度,即为肌原纤维蛋白溶液的浊度。

1.3.4 总巯基和活性巯基含量的测定

参考Yongsawatdigul等^[10]的方法作适当修改。总巯基含量的测定:取4 mg/mL肌原纤维蛋白溶液0.1 mL,依次加入0.9 mL 0.2 mol/L Tris-HCl缓冲液(pH 6.8,含8 mol/L尿素、2%十二烷基磺酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、10 mol/L乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)、0.1 mL 0.1% DTNB,混合均匀后40℃保温25 min,快速冷却后用酶标仪在412 nm波长处测此溶液的吸光度。活性巯基含量的测定:5.5 mL 4 mg/mL肌原纤维蛋白溶液中加入0.1 mL DTNB,在4℃条件下反应1 h,用酶标仪在412 nm波长处测此溶液的吸光度。总巯基和活性巯基的含量按公式(2)计算。

$$c_0 = \frac{A}{\varepsilon} \times D \times \rho \quad (2)$$

式中: c_0 为巯基的浓度/(mol/L); A 为412 nm波长处的吸光度; ε 为摩尔消光系数,此处为13 600 (mol·cm)/L; D 为稀释倍数; ρ 为蛋白质量浓度/(mg/mL)。

1.3.5 表面疏水性的测定

参考Benjakul等^[11]方法作适当修改,将提取的20 mg/mL肌原纤维蛋白溶胶用0.6 mol/L的NaCl缓冲液稀释成1、0.5、0.25、0.125 mg/mL系列的质量浓度,加入20 μL 8 mmol/L ANS的0.1 mol/L Tris-HCl缓冲液(pH 7.0),反应结束后用荧光光谱仪测定其在激发波长为364 nm、发射波长为534 nm处的荧光强度,表面疏水性(S_0 -ANS)以荧光强度与肌原纤维蛋白质量浓度对应曲线的斜率表示。

1.3.6 圆二色谱

采用J-1500圆二色谱仪测定肌原纤维蛋白的圆二色性。将0.1 mg/mL的肌原纤维蛋白样品放入0.1 cm光径的石英样品池中,在远紫外区(195~250 nm波长范围)对肌原纤维蛋白溶液进行扫描,扫描速率为100 nm/min,测定温度为5℃。残基平均摩尔质量取110 g/mol,采用杨氏模量用计算机模拟得出 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规卷曲二级结构单元的含量。圆二色性用平均残基椭圆值 $[\theta]$ 表示(deg·cm²/dmol)。

1.4 数据分析

实验均做3次平行,3次重复,数据用Origin 8.0和GraphPad Prism 5.0进行处理。

2 结果与分析

2.1 肌原纤维蛋白溶解度和浊度的变化

浊度反映了肌原纤维蛋白在蛋白溶胶中的存在状态,可以表征蛋白质的聚集程度。由图1可知,随着SPP和TPP添加量的增加,肌原纤维蛋白溶胶的溶解度逐渐上升,浊度逐渐下降。当添加量为1.5%时,添加TPP的肌原纤维蛋白溶解度达到82%,而添加SPP的蛋白溶解度高达89%,相对空白样品的72%有显著提升;此时,添加TPP与SPP的肌原纤维蛋白浊度值分别为0.44和0.46,明显低于空白的0.54。Yasui^[12]、田锐花^[13]等研究发现,只有焦磷酸盐能够引起肌动球蛋白构象和分子质量大小的改变,促使肌动球蛋白解离,使更多的蛋白溶解,而三聚磷酸盐只有被肌动球蛋白上的三聚磷酸酶水解成磷酸盐二聚体的形式在高离子强度下才能发挥作用,单独的TPP不具备解离肌动球蛋白的作用,故SPP对蛋白溶解性和浊度的影响较TPP更为显著。TPP作用途径与SPP类似,TPP及SPP可以通过改变蛋白质电荷的密度来提高肉体系的离子强度,并使其偏离等电点,电荷之间相互排斥,蛋白质与蛋白质之间的排斥力也随之增加,蛋白质之间产生更大的空间,静电斥力使肌原纤维横向膨胀,减缓了蛋白的凝聚,增加蛋白质的溶解^[14-16]。

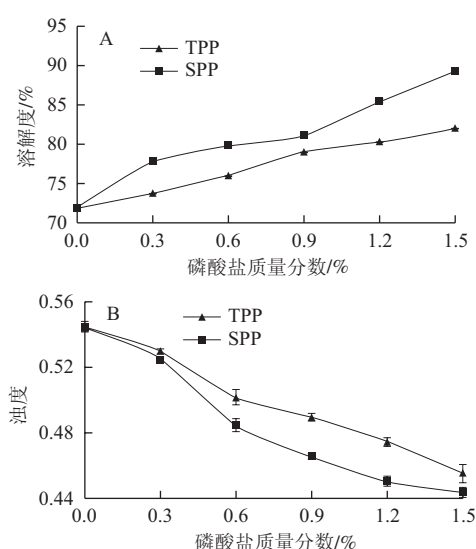


图1 不同TPP和SPP添加量下肌原纤维蛋白溶解度(A)和浊度(B)的变化

Fig.1 Solubility (A) and turbidity (B) of myofibrillar proteins in the presence of TPP and SPP at different concentrations

2.2 二级结构

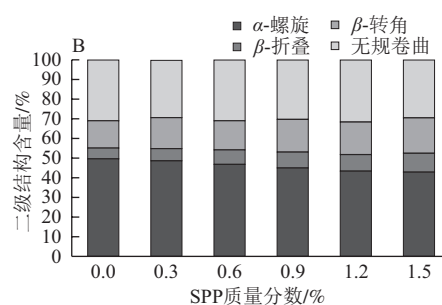
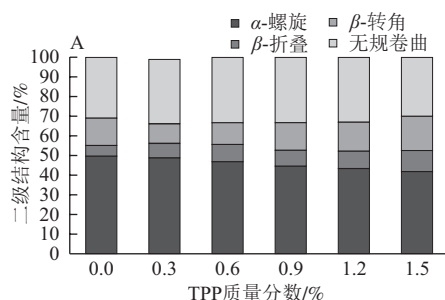


图2 不同TPP (A) 和SPP (B) 添加量下肌原纤维蛋白二级结构的变化
Fig.2 Secondary structure of myofibrillar proteins in the presence of TPP (A) and SPP (B) at different concentrations

圆二色谱法是研究蛋白质二级结构的有效手段。由图2A可知,随着TPP的添加,肌原纤维蛋白的 α -螺旋含量逐渐降低,从49.7%降至41.8%,而 β -折叠的含量由5.6%升至10.8%,无规卷曲的含量变化不大。由图2B可知,SPP的添加使 α -螺旋从49.7%降至42.9%, β -折叠从5.6%升高到9.6%,无规卷曲含量略有下降。磷酸盐的加入会增加肌原纤维蛋白的溶解性,从而增大蛋白质之间的空间距离,分子链的伸展使得肌球蛋白尾部的 α -螺旋链部分解开,同时加强了维持二级结构稳定的作用力,使得肌原纤维蛋白 α -螺旋向 β -折叠和 β -转角转化,蛋白结构更为伸长^[17-19]。

2.3 表面疏水性

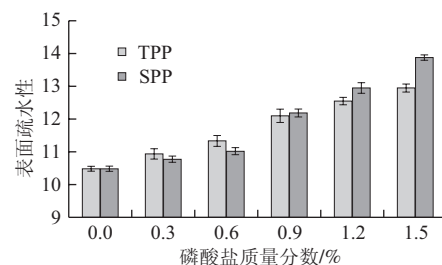


图3 不同TPP和SPP添加量下肌原纤维蛋白表面疏水性的变化
Fig.3 S_0 -ANS of myofibrillar proteins in the presence of TPP and SPP at different concentrations

蛋白质的表面疏水性反映了蛋白质分子表面疏水性氨基酸的相对含量。由图3可知,随着SPP和TPP添加量的增加,肌原纤维蛋白溶胶的表面疏水性逐渐增加。当添加量小于0.9%时,添加TPP的肌原纤维蛋白的疏水性略高于SPP,随着添加量的进一步增加,添加SPP的肌原纤维蛋白的疏水性明显高于TPP。添加磷酸盐后,肌原纤维蛋白表面疏水性的增加主要归因于蛋白质分子链的伸展,从而引起疏水侧链的暴露,主要包括芳香族氨基酸及疏水性脂肪族的暴露,使肽链螺旋结构发生变化^[20-22]。同时磷酸盐的添加提高了蛋白溶胶的离子强度,使蛋白的溶解性增强,更多的自由水进入蛋白内部,水分子的流动性增强,使得疏水基团周围的水的熵值增加,而蛋白溶胶系统熵的增加是疏水相互作用的主要动力^[23]。

2.4 总巯基和活性巯基

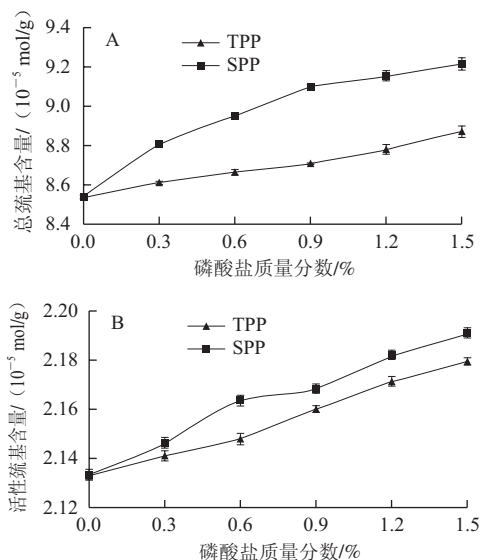


图4 不同TPP和SPP添加量下肌原纤维蛋白总巯基(A)和活性巯基(B)含量的变化

Fig.4 Total SH (A) and active SH (B) contents of myofibrillar proteins in the presence of TPP and SPP at different concentrations

巯基是鱼肌原纤维蛋白中最具反应活性的功能性基团,在稳定肌原纤维蛋白的空间结构中起重要作用。总巯基包括活性巯基和隐藏在分子内部的巯基,而活性巯基主要位于肌球蛋白头部重链。由图4可知,随着SPP和TPP添加量的增加,肌原纤维蛋白溶胶的总巯基和活性巯基含量均呈上升趋势。磷酸盐的加入使得蛋白结构部分展开,二硫键断裂形成巯基暴露,总巯基含量增加。结合图1、4可知,蛋白溶解度和巯基的变化趋势相同,可知蛋白的溶解度提高,使得包埋在分子内部的巯基部分巯基暴露,从而增加活性巯基的含量^[24-25]。

3 结论

TPP和SPP通过静电斥力使肌原纤维横向膨胀,提高离子强度以增加蛋白质的溶解,使蛋白质的分子链伸展,蛋白质与蛋白质之间的排斥力增加、聚集作用力减小即浊度降低。肌球蛋白尾部的 α -螺旋链部分解开, α -螺旋向 β -转角转化,蛋白空间结构更为伸展,这与维持二级结构稳定的相互作用力的变化有直接的关系。蛋白质分子链的伸展使得疏水性脂肪族和包埋在分子内部的巯基的暴露,表面疏水性和活性巯基含量增加。而且加入SPP后肌原纤维蛋白结构的变化相对加入TPP后的更为显著,主要是由于SPP能够促使肌动球蛋白解离,而TPP只有被水解成磷酸盐二聚体的形式才能发挥作用,单独的TPP没有解离肌动球蛋白的作用。磷酸盐对肌原纤维蛋白的作用多归结于它们的pH值和离子强度的变化,进而对

蛋白结构产生影响,但如何将其应用于产品加工与肉类品质改良还需要进一步研究结构与功能特性之间的关系。

参考文献:

- [1] BAUBLITS R T, POHLMAN F W, BROWN J A H, et al. Effects of enhancement with varying phosphate types and concentrations at two different pump rates on beef biceps femoris instrumental color characteristics[J]. Meat Science, 2005, 71(2): 264-276.
- [2] 汪学荣,周维禄. 复合磷酸盐对鱼糜制品的保水效果研究[J]. 食品科技, 2002, 27(9): 50-51.
- [3] ROBE G H, XIONG Youling. Phosphates and muscle fiber type influence thermal transitions porcine salt-soluble protein aggregation[J]. Food Science, 1992, 57(6): 1304-1308.
- [4] 蒋爱民. 畜产食品工艺学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 66-69.
- [5] 韩敏义,李巧玲,陈红叶. 复合磷酸盐在食品中的应用[J]. 中国食品添加剂, 2004(3): 93-96.
- [6] 周光宏. 畜产品加工学[M]. 北京: 农业出版社, 2002: 18-21.
- [7] SUN Fengyuan, HUANG Qilin, HU Ting, et al. Effects and mechanism of modified starches on the gel properties of myofibrillar protein from grass carp[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2014, 64(1): 17-24.
- [8] 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(1): 265-275.
- [9] XIONG Youling, BLANCHARD S P. Myofibrillar protein gelation: viscoelastic changes related to heating procedures[J]. Journal of Food Science, 1994, 59(4): 734-738.
- [10] YONGSAWATDIGUL J, PARK J W. Thermal denaturation and aggregation of threadfin bream actomyosin[J]. Food Chemistry, 2003, 83(3): 409-416.
- [11] BENJAKUL S, VISESSANGUAN W, CHANTARASUWAN C. Effect of high-temperature setting on gelling characteristic of surimi from some tropical fish[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2004, 39(6): 671-680.
- [12] YASUI T, FUKAZAWA T, TAKAHASHI K, et al. Phosphate effects on meat, specific interaction of inorganic polyphosphates with myosin B[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1964, 12(5): 399-404.
- [13] 田锐花,卢桂松,彭增起,等. 三聚磷酸钠水解对肌球蛋白解离和凝胶特性的影响[J]. 食品科学, 2013, 34(5): 126-130.
- [14] 李莹,王鹏,徐幸莲. 超高压处理对低磷酸盐鸡胸肉盐溶蛋白凝胶的影响[J]. 食品科学, 2013, 34(5): 60-66.
- [15] 徐幸莲,王霞,周光宏,等. 磷酸盐对肌球蛋白热凝胶硬度、保水性和超微结构的影响[J]. 食品科学, 2005, 26(3): 42-45.
- [16] 尚永彪,夏杨毅,张彩霞,等. 磷酸盐对PSE猪肉肌原纤维蛋白溶胶及凝胶性质的影响[J]. 食品科学, 2010, 31(1): 38-42.
- [17] 费英,韩敏义,杨凌寒,等. 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.
- [18] 刘海梅,熊善柏,谢笔钧,等. 鲢鱼糜凝胶形成过程中化学作用力及蛋白质构象的变化[J]. 中国水产科学, 2008, 15(3): 469-474.
- [19] LIU Ru, ZHAO Siming, LIU Youming, et al. Effect of pH on the gel properties and secondary structure of fish myosin[J]. Food Chemistry, 2010, 121(1): 196-202.
- [20] 郭园园,孔保华. 冷冻贮藏引起的鱼肉蛋白质变性及其物理化学特性的变化[J]. 食品科学, 2011, 32(7): 335-340.
- [21] RIEBROY S, BENJAKUL S, VISESSANGUAN W, et al. Acid-induced gelation of natural actomyosin from Atlantic cod (*Gadus morhua*) and burbot (*Lota lota*) [J]. Food Hydrocolloids, 2009, 23(1): 26-39.
- [22] 荣建华,甘承露,丁玉琴,等. 低温贮藏对脆肉鲩鱼肉肌动球蛋白特性的影响[J]. 食品科学, 2012, 33(14): 273-276.
- [23] 王镜岩,朱圣庚,徐长法. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002: 197-204.
- [24] 丁玉琴. 鳊的肌肉蛋白质组成及其鱼糜凝胶特性的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2012: 68-72.
- [25] LIU Ru, ZHAO Siming, XIONG Shanbai. Contribution of protein conformation and intermolecular bonds to fish and pork gelation properties [J]. Food Hydrocolloid, 2011, 25(5): 898-906.