

草鱼肉冷藏条件下肌肉蛋白的变化

刘大松¹, 姜启兴², 梁丽¹, 夏文水^{1,2}, 周鹏^{1,2}

(1. 江南大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122;

2. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要:采用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和差示扫描量热法(DSC),研究了草鱼肉在4℃冷藏过程中肌肉蛋白的变化.结果表明:汁液流失随贮藏时间的延长而逐渐增加;SDS-PAGE表明草鱼肌肉主要蛋白没有发生显著性的降解,但盐溶性蛋白的提取率呈先增加、然后保持稳定、最后减少的趋势,而不溶性蛋白提取率的变化趋势正好与盐溶性蛋白相反;DSC表明随着贮藏时间的延长,草鱼肌肉中肌球蛋白的变性峰变得越来越尖锐,肌浆蛋白的变性峰逐渐消失,而肌动蛋白的变性峰无显著性的变化.

关键词:草鱼;肌肉蛋白;冷藏;聚丙烯酰胺凝胶电泳;差示扫描量热法

中图分类号:TS201.2 **文献标志码:**A **DOI:**10.3969/j.issn.2095-476X.2013.01.005

Changes in grass carp muscle proteins during chilled storage

LIU Da-song¹, JIANG Qi-xing², LIANG Li¹, XIA Wen-shui^{1,2}, ZHOU Peng^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract:The changes in grass carp muscle proteins during storage at 4℃ were investigated by SDS-PAGE and DSC. The results showed that the drip loss increased gradually during storage. As shown by SDS-PAGE, no significant degradation of muscle proteins were observed, however, the extractability of salt soluble proteins initially increased, then remained stable, and finally decreased, the tendency of which was contrary to that of insoluble proteins. As demonstrated by DSC, the myosin peak became more and more sharp during storage and the sarcoplasmic protein peak disappeared gradually, while the actin peak remained almost unchanged.

Key words:grass carp; muscle protein; chilled storage; PAGE; DSC

0 引言

水产品的结缔组织含量少、肉质细嫩、营养成分和水分含量高、体表黏液多、内源酶活性较强,因

而相比陆生动物而言,水产品致死,在物理、化学和微生物等方面更容易发生劣变,最终导致产品的腐败变质.近年来,随着生活水平的提高,消费者对水产品鲜度和安全性等的要求也越来越高.因此,

收稿日期:2012-07-01

基金项目:国家自然科学基金项目(30901123);现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-46-22)

作者简介:刘大松(1986—),男,四川省眉山市人,江南大学硕士研究生,主要研究方向为食品加工与组分变化.

通信作者:周鹏(1975—),男,山东省青岛市人,江南大学教授,主要研究方向为食品加工与组分变化.

水产品捕获或致死之后,必须立即采用有效的保鲜方法.鲜度是评价鱼类和鱼类产品的一个重要质量指标,由其外观形态、理化特性、安全性等共同决定.其保鲜机理是利用物理或化学的方法,来延缓或抑制微生物的繁殖和内源酶的作用,保持水产品的鲜度,推迟腐败变质的过程^[1-3].

我国草鱼主要以鲜活销售为主,但随着养殖业和销售冷链的迅速发展以及国民消费习惯的改变,将生鲜水产品加工成鱼片、鱼段、鱼排等方便小包装产品的销售方式也日益增长.目前,草鱼肉冷藏条件下的研究主要集中在感官和微生物指标上,而较少集中在生化指标上,尤其是蛋白质的降解及其空间结构的变化.

本文以淡水经济鱼类草鱼为对象,研究在4℃冷藏条件下鱼体肌肉的汁液流失,总蛋白、水溶性蛋白、盐溶性蛋白、不溶性蛋白和蛋白结构的变化,旨在为鱼类加工保鲜提供参考.

1 实验

1.1 材料与设备

材料:草鱼(3.50±0.25) kg,购自无锡市滨湖区雪浪镇农贸市场;聚丙烯酰胺凝胶电泳 SDS-PAGE 所用标准蛋白为美国 Bio-rad 公司产品,其他试剂均为国药集团分析纯品.

仪器:Q2000 差示扫描量热仪(DSC),美国 TA 公司产;Mini-PROTEAN Tetra Cell 小型垂直电泳系统,美国 Bio-Rad 公司产;T18 Basic ULTRA-TUR-RAX 高速分散机,德国 IKA 公司产;Heraeus Multifuge X1R 台式高速冷冻离心机 and Sorvall Legend Micro 17 微量离心机,德国 Thermo Electron 公司产;SF-400 台式快速塑料封口机,福州市兴业机械设备有限公司产.

1.2 实验方法

1.2.1 草鱼的处理与冷藏 用木棍敲击草鱼头部使其猝死,去内脏、头、皮,预冷水冲洗干净,取草鱼侧线上方、背鳍附近的白肉切成鱼块(4 cm×3 cm×2 cm),并随机取4块置于封口袋(20 cm×15 cm)中,封口机密封.所有操作都在温控为4℃的冷室中完成.密封包装好的鱼肉置于4℃冰箱中,贮藏时间为11 d.

1.2.2 草鱼肌肉汁液流失的测定 取出贮藏的包

装鱼肉,称量包装袋、鱼肉和渗出汁液的总质量 W_1 ,剪开包装袋,倒出汁液,用厨房用纸吸干包装袋与鱼肉上沾的水分,称量包装袋和鱼肉的总质量 W_2 ,以及包装袋的质量 W_3 ^[4].汁液流失率按以下公式计算:

$$\text{汁液流失率} = (W_1 - W_2) / (W_1 - W_3) \times 100\%$$

1.2.3 草鱼肌肉总蛋白的提取 准确称量 1.25 g 鱼肉,加入 25 mL 5% 十二烷基磺酸钠(SDS),均质 1 min,85℃水浴加热 1 h,自来水冷却,即为总蛋白^[5].

1.2.4 草鱼肌肉水溶性蛋白、盐溶性蛋白和不溶性蛋白的提取 准确称量 1.50 g 鱼肉,加入 30 mL 预冷的 50 mmol·L⁻¹ 磷酸缓冲液(pH=7.5),均质 1 min.10 000 g 离心 15 min,温控为 4℃,收集上清液.所得沉淀重复以上操作步骤,将 2 次所得的上清液混合,即为水溶性蛋白^[6].

收集水溶性蛋白提取后所剩余的沉淀,加入 30 mL 预冷的含 0.6 mol/L NaCl 的 50 mmol/L 磷酸缓冲液(pH=7.5),均质 1 min.10 000 g 离心 15 min,温控为 4℃,收集上清液.所得沉淀重复以上操作步骤,将 2 次所得的上清液混合,即为盐溶性蛋白^[7].

收集盐溶性蛋白提取后所剩余的沉淀,加入 10 mL 5% SDS,85℃水浴加热 1 h,自来水冷却,即为不溶性蛋白.

1.2.5 SDS-PAGE 取总蛋白、水溶性蛋白、盐溶性蛋白和不溶性蛋白的提取液各 100 μL,分别加入 100 μL SDS 样品缓冲液(0.5 M Tris-HCl,pH=6.8,4% SDS,20% 甘油,5% β-巯基乙醇,0.01% 溴酚蓝),沸水浴 3 min,冰浴冷却,10 000 g 离心 3 min,收集上清液.总蛋白、水溶性蛋白、盐溶性蛋白和不溶性蛋白上样量分别为 6 μL,30 μL,12 μL 和 15 μL.凝胶电泳胶板浓缩胶浓度为 4%,分离胶浓度为 10%.采用恒电流的模式,浓缩胶电流为 10 mA/胶板,分离胶电流为 20 mA/胶板.电泳结束后,用含 0.1% 考马斯亮蓝 R 250,50% 甲醇和 6.8% 乙酸的染液染色 6 h.然后用含 7.5% 乙酸和 5% 甲醇的脱色液脱色 3 次,每次 3 h.

1.2.6 DSC 采用 DSC 的扫描曲线,间接反映草鱼肌肉蛋白结构的变化^[8-9].取铝坩埚,准确称取 7.0~9.0 mg 鱼肉,压盖密封.扫描程序为:初温

10 ℃恒温 1 min,以 10 ℃/min 快速升温至 95 ℃. 同一个样品连续扫描 2 次,第 1 次扫描结束后,等仪器恢复平稳,采用相同的程序扫描第 2 次,利用 DSC 附带的软件将第 1 次扫描的曲线减去第 2 次扫描的曲线,得到一条新的曲线,即为草鱼肌肉的 DSC 扫描曲线.

2 结果与讨论

2.1 草鱼肌肉汁液流失

生鲜水产品加工和贮藏过程中的汁液流失,与种类、捕获季节、致死方法、肌体营养状态等有关,会严重影响产品的外观、质构、颜色、风味和口感等,从而严重影响消费者对产品的接受度. 汁液流失还会带走部分蛋白质和其他水溶性的营养物质,在使产品营养价值降低的同时,也使产品的质量降低,从而最终影响产品的商业价值. 此外,汁液中富含水溶性的营养物质,有利于微生物的生长繁殖,并产生不良的气味. 流失汁液对应于鱼体肌肉中结合最弱的水,在不加任何外力的条件下就可以收集到. 草鱼肌肉汁液流失率随贮藏时间的延长而增大,贮藏时间为 5 d 和 11 d 时,汁液流失分别为 (1.3 ± 0.1) g/100 g 鱼肉和 (5.2 ± 0.1) g/100 g 鱼肉.

2.2 草鱼肌肉总蛋白的变化

4 ℃下,冷藏过程中草鱼肌肉总蛋白、水溶性蛋白、盐溶性蛋白和不溶性蛋白变化见图 1—图 4. 图中 MHC 对应于肌球蛋白的重链,Actin 对应于肌动蛋白. 从图 1 可以看出,草鱼肌肉中蛋白种类较多,以肌球蛋白和肌动蛋白为主^[10-11]. 在贮藏过程中,蛋白条带的分布模式基本相似,没有明显的新蛋白条带产生,也没有明显的蛋白条带消失. 这说明,在冷藏过程中,草鱼肉总蛋白没有发生电泳可检出的显著降解.

一方面,草鱼肌肉中蛋白组分较为复杂,而且是以肌球蛋白和肌动蛋白为主;另一方面,总蛋白采用了 5% SDS 加热提取的方式,这会破坏蛋白分子之间潜在的相互作用力,比如疏水相互作用和氢键相互作用等. 上述 2 个因素都会掩盖草鱼肉冷藏过程中肌肉蛋白分子发生的潜在变化. 因此,在接下来的实验中,对总蛋白做分级提取和相应的电泳分析,以进一步揭示草鱼肉在冷藏过程中肌肉蛋白

发生的潜在变化及其变化机理.

2.3 草鱼肌肉水溶性蛋白、盐溶性蛋白和不溶性蛋白的变化

肌肉中的水溶性蛋白又称作肌浆蛋白,主要包括肌清蛋白、肌红蛋白、蛋白酶、糖水解酶、肌酸激酶等^[10-11]. 从图 2 可以看出,在贮藏过程中,蛋白条带的分布模式基本相似,没有明显的新蛋白条带产生,也没有明显的蛋白条带消失. 这说明,在冷藏过程中,草鱼肉水溶性蛋白没有发生电泳可检出的显著降解.

肌肉中的盐溶性蛋白又称作肌原纤维蛋白,主要包括肌球蛋白、肌动蛋白、肌原蛋白和肌原球蛋白等^[10-11]. 从图 3 可以看出,在冷藏过程中,蛋白条带的分布模式基本相似,没有明显的新蛋白条带产生,也没有明显的蛋白条带消失. 这说明,在冷藏过

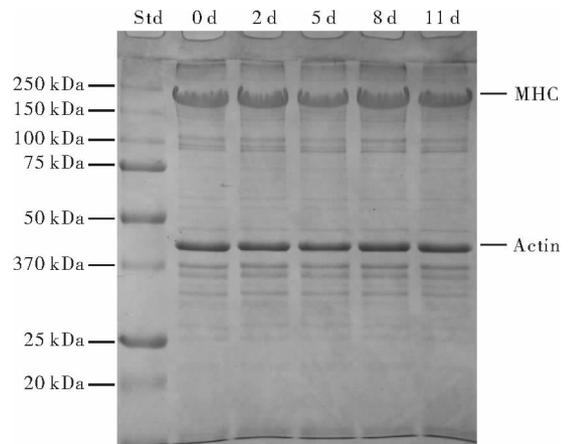


图 1 4 ℃冷藏过程中草鱼肌肉总蛋白的变化

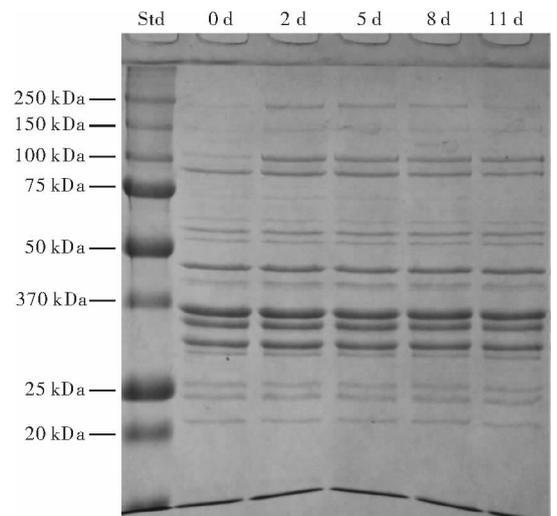


图 2 4 ℃冷藏过程中草鱼肌肉水溶性蛋白的变化

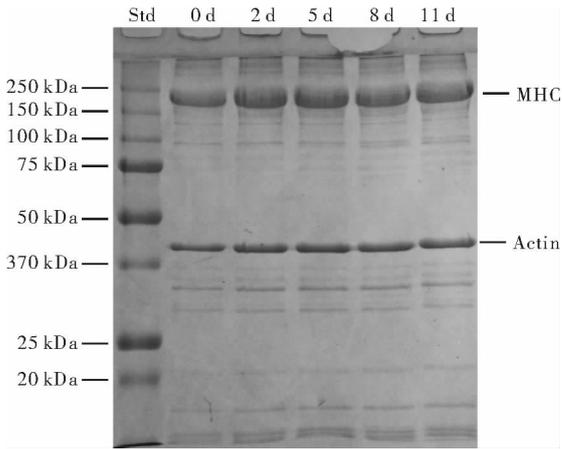


图3 4℃冷藏过程中草鱼肌肉盐溶性蛋白的变化

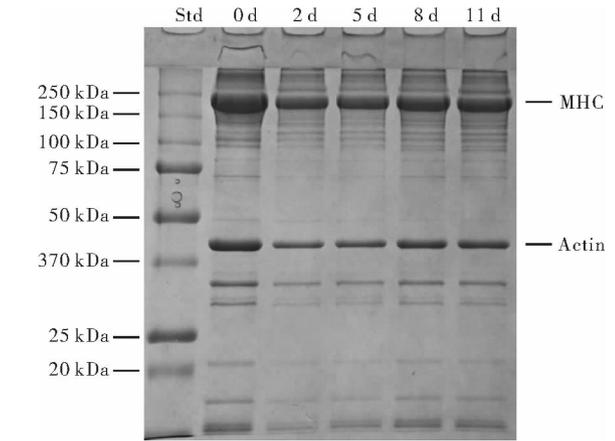


图4 4℃冷藏过程中草鱼肌肉不溶性蛋白的变化

程中,草鱼肉盐溶性蛋白没有发生电泳可检出的显著降解。

从图3还可以看出,单个泳道蛋白条带的整体染色强度随冷藏时间的延长,呈先上升、然后保持稳定、最后下降的趋势。在盐溶性蛋白的提取过程中和上样电泳液的准备过程中,严格控制了样液比。因此,单个泳道蛋白条带整体染色强度的变化,反应了盐溶性蛋白提取率的变化,即盐溶性蛋白的提取率也呈先上升、然后保持稳定、最后下降的趋势。文献报道,大西洋鲑鱼在0℃和4℃冷藏过程中,盐溶性蛋白的提取率也都呈先上升、然后保持稳定、最后下降的趋势。大西洋鲑鱼致死之后,在冷藏初期,鱼体处于僵直前期,此时盐溶性蛋白的提取率较低;在冷藏后期,鱼体逐渐解僵,盐溶性蛋白的提取率逐渐增加^[12]。

比较图3和图4可以发现,草鱼肉不溶性蛋白与盐溶性蛋白的组成相似,以肌球蛋白和肌动蛋白等肌原纤维蛋白为主。在冷藏过程中,不溶性蛋白条带的分布模式基本相似,没有明显的新蛋白条带产生,也没有明显的蛋白条带消失。这说明,在冷藏过程中,草鱼肉不溶性蛋白没有发生电泳可检出的显著降解。

比较图3和图4还可以发现,草鱼肉在冷藏过程中,不溶性蛋白单个泳道蛋白条带整体染色强度的变化趋势,正好与盐溶性蛋白相反,呈先下降、然后保持稳定、最后上升的趋势。这说明,在冷藏过程中,部分肌原纤维蛋白在盐溶性蛋白和不溶性蛋白之间发生了相互转换,其中不溶性部分在5% SDS加热的条件下能够被提取出来,说明这部分肌原纤

维蛋白之间通过非共价相互作用产生了聚集,比如疏水相互作用或氢键相互作用等。

2.4 草鱼肌肉蛋白结构的变化

DSC是在一定的温度范围内,以一定的速度加热试样,并记录升温过程中试样所产生的细微热量变化,从而得到热流对温度的DSC扫描曲线。蛋白质结构的变化,将导致自身热稳定性的变化,从而引起DSC扫描曲线形状的变化。因此,可以根据DSC扫描曲线形状的变化,来间接反应蛋白质结构的变化。4℃冷藏过程中草鱼肌肉的DSC扫描曲线见图5。从图5中可以看出,新鲜草鱼肉(0d)的DSC扫描曲线上出现了3个峰:峰1对应于肌球蛋白,峰2对应于肌浆蛋白,峰3对应于肌动蛋白。在冷藏过程中,肌球蛋白所对应的吸热峰,变得越来越尖锐;肌浆蛋白所对应的吸热峰,逐渐消失;肌动蛋白所对应的吸热峰,无显著性的变化。文献报道,鲢鳊鲤鱼在冰藏9d之后,肌球蛋白的变性温度和变性热焓值显著降低,而肌动蛋白的变性温度和变

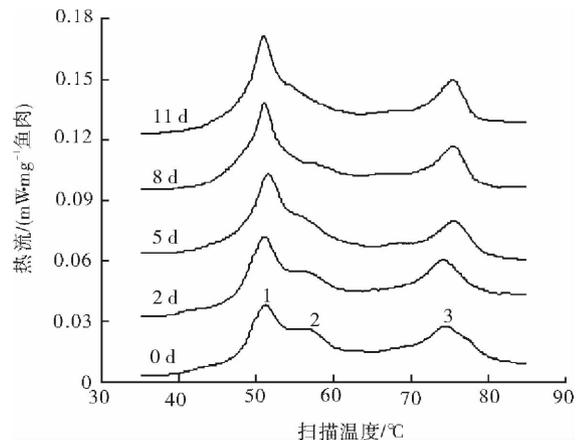


图5 4℃冷藏过程中草鱼肌肉的DSC扫描曲线

性热焓值无显著变化,说明在冷藏过程中,肌动蛋白比肌球蛋白更稳定^[13]。

3 结论

本文以淡水经济鱼类草鱼为对象,研究在4℃冷藏条件下鱼体肌肉的汁液流失和蛋白的变化,结果表明:

1)草鱼肌肉的汁液流失随冷藏时间的延长而逐渐增加。

2)草鱼肌肉总蛋白、水溶性蛋白、盐溶性蛋白与不溶性蛋白的提取液,经SDS-PAGE分析,均未观测到明显的蛋白条带消失或新蛋白条带的形成,说明草鱼肌肉主要蛋白没有发生显著性的降解。

3)草鱼肌肉盐溶性蛋白与不溶性蛋白的组成相似,主要都是肌球蛋白和肌动蛋白等肌原纤维蛋白,其中盐溶性蛋白的提取率呈先增加、然后保持稳定、最后减少的趋势,而不溶性蛋白提取率的变化趋势正好与盐溶性蛋白相反。这说明在冷藏过程中,部分肌原纤维蛋白通过非共价相互作用,在盐溶性蛋白和不溶性蛋白之间发生了相互转换。

4)由DSC观测到,随着冷藏时间的延长,草鱼肌肉中肌球蛋白的变性峰变得越来越尖锐,肌浆蛋白的变性峰逐渐消失,而肌动蛋白的变性峰无显著性的变化。这说明在冷藏过程中,肌动蛋白比肌球蛋白和肌浆蛋白更稳定。

参考文献:

- [1] 熊善柏.水产品保鲜贮运与检验[M].北京:化学工业出版社,2007.
- [2] 刘红英,齐凤生,张辉.水产品加工与贮藏[M].北京:化学工业出版社,2008.
- [3] Ólafsdóttir G, Martinsdóttir E, Oehlenschläger, et al. Methods to evaluate fish freshness in research and industry [J]. Trends Food Sci Tech, 1997, 8(8): 258.
- [4] Wilkinson R J, Paton N, Porter M J R. The effects of pre-harvest stress and harvest method on the stress response, rigor onset, muscle pH and drip loss in Barramundi (*Lates calcarifer*) [J]. Aquaculture, 2008, 282(1-4): 26.
- [5] Benjakul S, Seymour T A, Morrissey M T, et al. Physicochemical changes in Pacific whiting muscle proteins during iced storage [J]. J Food Sci, 1997, 62(4): 729.
- [6] 蔡扬鹏,李前景,张其标,等.几种鱼肌肉蛋白的电泳分析[J].集美大学学报,2006,11(3):193.
- [7] Tironi V, Leball A, Lamballerie M D. Effects of pressure-shift freezing and pressure-assisted thawing on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) quality [J]. J Food Sci, 2007, 72(7): 381.
- [8] Thorarinsdóttir K A, Arason S, Geirsdóttir M, et al. Changes in myofibrillar proteins during processing of salted Cod (*Gadus morhua*) as determined by electrophoresis and differential scanning calorimetry [J]. Food Chem, 2002, 77(3): 377.
- [9] Saeed S, Howell N K. Rheological and differential scanning calorimetry studies on structural and textural changes in frozen Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) [J]. J Sci Food Agric, 2004, 84(10): 1216.
- [10] 夏文水.食品工艺学[M].北京:中国轻工业出版社,2007.
- [11] Du M, McCormic R J. Applied Muscle Biology and Meat Science [M]. Boca Raton: CRC Press, 2009.
- [12] Wang H, Liceaga-Gesualdo A M, Li-Chan E C Y. Biochemical and physicochemical characteristics of muscle and natural actomyosin isolated from young Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillets stored at 0℃ and 4℃ [J]. J Food Sci, 2003, 68(3): 784.
- [13] Yarnpakdee S, Benjakul S, Visessanguan W, et al. Thermal properties and heat-induced aggregation of natural actomyosin extracted from Goatfish (*Mulloidichthys martinicus*) muscle as influenced by iced storage [J]. Food Hydrocolloid, 2009, 23: 1779.