

日本鲟肌动球蛋白热变性和冷冻变性

刘庆慧 孙耀 王采理

(中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

殷丽

(山东省海洋开发处, 青岛 266071)

摘要 研究了日本鲟肌动球蛋白经变性和冷冻后 ATPase 活性、总巯基数和不饱和巯基数及蛋白质浓度的变化。结果表明,热变性后肌动球蛋白 Ca^{2+} —ATPase 和 Mg^{2+} —ATPase 活性下降,且 Ca^{2+} —ATPase 活性有明显转折。低温热变性后对总巯基数影响较小,温度增高时,巯基数逐渐下降,而不饱和巯基数在 30°C 之前,呈动态变化,之后又逐渐减少。热变性后,肌动球蛋白浓度也降低。冷冻变性后,肌动球蛋白 ATPase 活性和总巯基数随冷藏时间而明显下降,冷藏温度越低,ATPase 活性下降越慢。

关键词 日本鲟,肌动球蛋白,热变性,冷冻变性

中图分类号 S984.1

肌动球蛋白(actomyosin, AM)(ATPase)活性是广泛用于评估蛋白质冷藏稳定性的指标 [Arai 1974, Arai 和 Takashi 1977]。肌动球蛋白在水产动物肌肉中含量较多,且其性质重要,因此,有关鱼类肌动球蛋白稳定性有过不少的研究报道。随着蟹类养殖量的增加,蟹的冷冻变性成为影响蟹类加工一个难题。有关蟹类肌动球蛋白稳定性的变化几乎未见报道。本文从蟹类肌动球蛋白稳定性方面,对日本鲟肌动球蛋白 ATPase 性质作了初步的研究。

1 材料与方 法

1.1 材 料

市购活蟹,取肌肉剪碎混合,精确称量备用。

缓冲液 A, 20mmol/L 三羟甲基氨基甲烷—马来酸缓冲液,内含 0.05mol/L KCL。

缓冲液 B, 20mmol/L 三羟甲基氨基甲烷—马来酸缓冲液,内含 0.5mol/L KCL。

Folin—酚试剂 AB 液,氯化钙,氯化镁,硫酸钼酸,Elon 试剂等均为分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 肌动球蛋白的制备

0~4℃下,蟹肉以4倍缓冲液A匀浆,离心弃去上清液,重复两次,沉淀以5倍缓冲液B洗涤,离心,重复两次,上清液收集静置1h后,纱布过滤,滤液为AM样品,冷藏备用。

1.2.2 肌动球蛋白的热变性

将肌动球蛋白样品液分装于若干个离心管中,置于不同温度的恒温浴中,恒温5min,迅速取出样品置于冰浴中冷却。将变性样品在10,000rpm/min下离心5min,上清液测定其ATPase活性,同时测蛋白质浓度。

1.2.3 肌动球蛋白冷冻变性

将日本鲟速冻置于-18℃、-30℃,定期取样,0℃解冻后,提取肌动球蛋白,并测定ATPase活性。

1.2.4 蛋白质浓度的测定

以牛血清蛋白为标准品,按Lorry等[1951]的方法测定。

1.2.5 Ca²⁺-ATPase活性的测定

按万建荣等[1993]的方法。

1.2.6 Mg²⁺-ATPase活性的测定

按万建荣等[1993]的方法。

1.2.7 蛋白质浓度变化的测定

测活性的与未加热样品浓度之比为蛋白质的变化。

1.2.8 总巯基数(Total-SH)的测定

适量肌动球蛋白用磷酸盐缓冲液(pH 8.0, I=0.025, 0.5molKCL)稀释至3ml,加入3ml8M尿素,混合后取出3ml,加20μlDTNB(39.6mgDTNB溶于10ml磷酸缓冲液,pH 7.0, I=0.1)显色20min,以剩下的混合液加20μlH₂O为空白,412nm测吸光度。

$$SH = A \times D \times C_{pr} / \epsilon$$

上式中,A-412nm处的吸光度,D-稀释倍数,ε-分子吸光系数13600/(mol,cm/L),C_{pr}-蛋白质浓度。

1.2.9 不饱和巯基数(Un-SH)数的测定

以3mL H₂O代替变性用尿素,其余步骤及计算同总巯基数的测定。

2 结果与讨论

2.1 肌动球蛋白热变性后ATPase活性

肌动球蛋白变性与冷冻蛋白的稳定性有关[Jiang等1991],ATPase活性为评定储藏过程中蛋白质稳定性的一个广泛运用的指标。ATPase活性受pH值影响较大,一般在6以下或9以上急剧增加[桥本和新井1985],中性条件下较稳定。本文采用中性缓冲液以排除pH值的影响。不同温度下Ca²⁺-ATPase活性和Mg²⁺-ATPase活性见图1。由图1可见,Ca²⁺-ATPase活性在25℃之前变化较慢,至25℃后,活性迅速下降,形成转折,50℃以后,活性趋于零,这与草虾在25℃有一转折点相类似[Jiang等1991],而与中国对虾在35℃有一拐点不同[林洪等1996]。而Mg²⁺-ATPase活性在40℃之前,呈直线下降,无明显拐点,至50℃后,活性渐趋于零。多数低温水域鱼类热变性后Ca²⁺-ATPase活性无明显拐点,30℃基本失活[新井等

1973, Kariya 等 1986], 而日本鲟在45℃以后, 逐渐失活, 说明不同种类蛋白质之间的差异性。一般 Ca 离子激活 ATPase 活性, Mg 离子只有在低离子强度下才能激活 ATPase 活性[万建荣 1993]。比较图1和图2, 肌动球蛋白在同一温度下 Ca^{2+} -ATPase 活性比 Mg^{2+} -ATPase 活性高, 说明在本实验条件下, Mg 离子激活能力比 Ca 离子弱, 这与中国对虾肌动球蛋白热变性后 Ca^{2+} -ATPase 活性比 Mg^{2+} -ATPase 活性强相一致[林洪等 1996]。

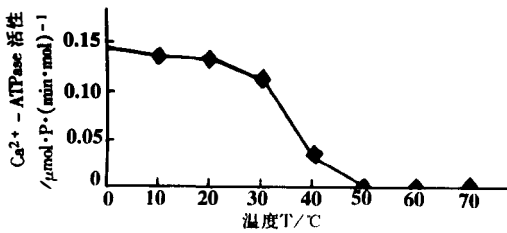


图1 不同温度处理 Ca^{2+} -ATPase 活性变化

Fig. 1 The Ca^{2+} -ATPase activity of AM at different temperatures

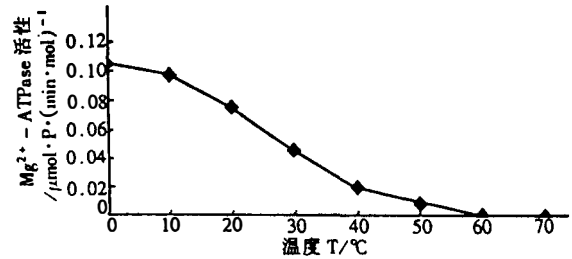


图2 不同温度处理 Mg^{2+} -ATPase 活性变化

Fig. 2 The Mg^{2+} -ATPase activity of AM at different temperatures

2.2 肌动球蛋白的热变性后巯基数的变化

图3分别为肌动球蛋白总和不饱和巯基数的变化曲线。蛋白质结构稳定, 易变性及酶的催化作用与巯基变化密切相关。不饱和巯基位于蛋白质分子的表面, 易与试剂反应, 而蛋白质分子内部巯基不易反应, 需用变性剂破坏蛋白质分子的结构, 使其反应性增加。从图中可看出, 低温热变性后对巯基数影响较小, 温度增高时, 巯基数逐渐下降。总巯基数在15℃之前下降, 至30℃略有增加, 30℃以后明显下降, 而不饱和巯基数在30℃之前, 呈动态变化, 之后又逐渐减少, 这可能是在低温时, 蛋白质分子结构解旋, 分子构象松散, 使得蛋白质分子内巯基与试剂

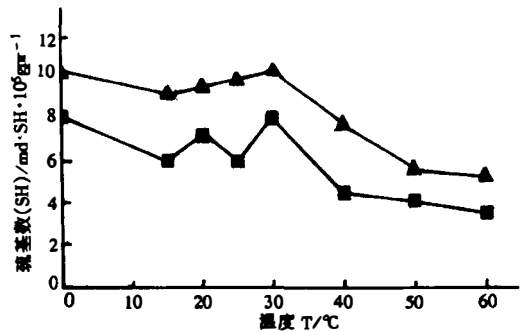


图3 肌肉球蛋白热变性后总巯基数和不饱和巯基数的变化

Fig. 3 Change of total and un-SH of AM due to thermostability

反应性增加, 当温度进一步增高时, 蛋白质发生变性, 巯基被氧化生成二硫键, 致巯基数下降。

2.3 肌动球蛋白热变性后的溶解度变化

肌动球蛋白受热作用后, 蛋白质空间结构受到不同程度的影响, 蛋白质热凝集, 导致蛋白质溶解度的下降。日本鲟肌动球蛋白溶解度随温度而变化(图4)。由图4可见, 温度对蛋白质的溶解度有很大的影响。温度低时, 其变化趋势较慢, 随温度的升高, 蛋白质溶解度迅速降低, 在30℃时, 蛋白质溶解度下降20%, 至40℃下降近40%, 此结果与中国对虾肌动球蛋白热变性后溶解度的变化趋势相类似[林洪等 1996]。此结果也揭示了日本鲟肌动球蛋白对温度变化的敏

感性。从肌动球蛋白活性随温度变化及肌动球蛋白溶解度随温度变化,可以看出两者具有一定的相关性。

2.4 肌动球蛋白冷冻变性后活性变化

冷冻速度、冷藏时间和冷藏温度是影响水产品蛋白质质量的重要因素[Bito 1976, Fukuda 1986]。表1列出肌动球蛋白 ATPase 活性随冷藏时间及温度的变化。由表1可见,ATPase 活性随冷藏时间而明显下降,冷藏温度越低,ATPase 活性下降越慢。由表2可见,巯基数随贮藏时间逐步降低,贮藏温度越低,巯基数下降越慢。Jiang 等[1988]研究了在冷藏期间巯基数的变化发现,总巯基数下降32%~44%时,不再变化,他认为总巯基数下降是由于巯基被氧化成二硫化物,但贮藏期间形成氢键、OH 键和二硫化物,掩盖在分子内巯基逐渐暴露而氧化,当暴露和氧化巯基达到平衡时,巯基数不再变化。Buttkus[1971]研究了兔和虹鳟鱼的蛋白质稳定性,发现 Ca^{2+} -ATPase 活性下降与巯基氧化有关,Hamada 等[1997]的实验进一步证实了 Ca^{2+} -ATPase 活性下降与巯基氧化有关。本实验中热变性及冷冻变性后总巯基数下降表明 Ca^{2+} -ATPase 活性下降可能是由于肌动球蛋白活性部位巯基数的氧化。

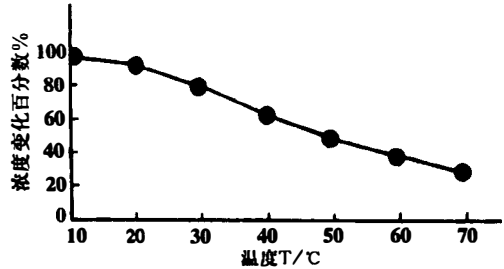


图4 肌肉球蛋白热变性后的浓度变化

Fig. 4 Change of solubility of AM due to denaturation

表1 肌动球蛋白 ATPase 活性随冷藏温度及冷藏时间的变化

Tab. 1 Change of ATPase activity of AM during storage

贮藏温度 (°C)	贮藏时间(W)								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
-18	0.413 (100.0)	0.353 (85.47)	0.334 (80.87)	0.250 (60.53)	0.210 (50.85)	0.203 (49.15)	0.197 (47.70)	0.176 (42.62)	0.154 (37.29)
-30	0.413 (100.0)	0.405 (98.06)	0.376 (91.04)	0.352 (85.23)	0.344 (83.29)	0.341 (82.57)	0.312 (75.74)	0.276 (66.83)	0.245 (59.32)

注:括号内数字为肌动球蛋白 ATPase 活性与初始条件下活性之比的百分数

表2 肌动球蛋白总巯基数在冷藏过程中的变化

Tab. 2 Change of total-SH of AM during storage (md.SH/10⁻⁵gpr)

贮藏温度 (°C)	贮藏时间(W)				
	0	2	4	6	8
-18	10.364	10.102	9.566	9.327	7.892
-30	10.364	10.235	9.850	9.773	8.727

青岛食品学校1998届毕业生赵凤初和彭丙芹参加部分测试工作,作者深表谢意。

参 考 文 献

- 林 洪, 王长峰, 李兆杰等. 1996. 中国对虾肌动球蛋白变性后 ATPase 活性的研究. 青岛海洋大学学报, 26(4): 475~480
- 万建荣, 洪玉菁, 莫印慧等(编译). 1993. 水产食品化学分析手册. 上海: 上海科技出版社, 154~172
- 新井健一, 川村久美子, 林千惠子. 1973. 各種魚類肌肉フクトシオシニATPaseの温度安定性について, 日本水産學會志, 39(10): 1077~1085
- 桥本昭彦, 新井健一. 1985. 各種魚類の筋原纖維 Ca^{2+} -ATPaseの變性速度に及ぼすpHよ温度の影響. 日本水産學會志, 51(1): 99~105
- Arai K. 1974. Evaluation of fish quality from the muscle protein studies. In *Sakana no Hinshitsu (Quality of Fish)*; Ko-seisha, ed. Japanese Society of Scientific Fisheries; Tokyo. 55~80
- Arai K, Takashi R. 1977. Studies on muscular proteins of fish. XI. Effect of freezing on denaturation of actomyosin ATPase from carp muscle. *Bull Jap Soc Sci Fish*, 43, 533~541
- Bito M. 1976. Studis on the retention of meat colour of frozen tuna. *Bull Tokai Reg Fish Res Lab*. 84: 51~113
- Buttkus H. 1971. The sulfhydryl content of rabbit and trout myosin in relation to protein stability. *Can J Biochem*. 49: 97~102
- Fukuda Y. 1986. Effect of freezing condition on quality of frozen fish meat. *Refrigeration (Japanese)*, 61, 18~29
- Hamada I, Tsuji K, Nakayama T, ろ. 1977. Oxidative denaturation of actomyosin. *Bull Jap Soc Sci Fish*. 43: 1105~1111
- Jiang S T, Hwang D C, Chen C S. 1988. Denaturation and change in SH group of actomyosin from milkfish (*Chanos chanos*) during storage at $-20^{\circ}C$. *J Agric Food Chem*. 36: 433~437
- Jiang S T, Hwang B S, Moody M W, et al. 1991. Thermostability and freeze denaturation of grass prawn muscle proteins. *J Agric Food Chem*. 39: 1998~2001
- Kariya Yutaka, Yoshihiro Ochiai, Kanehisa Hashimoto. 1986. Protein components and ultrastructure of the arm and mantle muscles of Octopus. *Bull Jap Soc Sci Fish*. 52(1): 131~138
- Lorry O H, Rosebrough N J, Farr A L. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 193: 2665

THERMOSTABILITY AND FREEZE DENATURATION OF *CHARYBDIS JAPONICA*

LIU Qing-Hui, SUN Yao, WANG Cai-Li

(Yellow sea fishery research institute, CAFS, Qingdao 266071)

YIN Li

(Marine division of Shandong Province, Qingdao, 266071)

ABSTRACT The thermostability and freeze denaturation of ATPase activity, total-SH and actomyosin (AM) from *Charybdis japonica* were studied. The results indicate that Ca^{2+} - or Mg^{2+} -ATPase activity of Am decreased due to thermal denaturation and Ca^{2+} -ATPase activity of AM showed an inflecting point. Low temperature made less effect on total-SH which decreased gradually with the increase of incubating temperature. However, Un-SH showed an irregular change curve before $30^{\circ}C$, after then decreased gradually. The concentration of AM (AM solubility) decreased with thermostability. ATPase activity and total-SH of AM decreased with the time of frozen storage. The lower the frozen temperature was, the slower the decrease in ATPase activity would be.

KEYWORDS *Charybdis japonica*, actomyosin, thermostability, freeze denaturation