

碱性 pH 对马鲛鱼肌球蛋白热聚集行为的影响

哈斯, 韩玲钰, 许喆, 马堃, 李婷婷*

(大连民族大学生命科学学院, 辽宁大连 116600)

摘要: 为探究碱性条件下 pH 对马鲛鱼肌球蛋白热聚集行为的影响, 以马鲛鱼肌球蛋白为研究对象, 探究在加热条件下 pH (7.0、8.0、9.0) 对肌球蛋白的结构和理化性质 (溶解度、浊度、二级结构、总巯基含量、表面疏水性) 的影响, 未加热组作为空白对照组。结果表明: 对照组肌球蛋白在 pH (7.0、8.0、9.0) 下溶解度从 68.00% 升高到 82.00%、浊度变化不明显; 加热组则有较大差异, 溶解度从 30.00% 增加到 94.00%, 浊度吸光值从 0.49 降低到 0.23; 加热组 pH 9.0 的肌球蛋白 α -螺旋含量减少, 在所有组中含量最低, 为 45.60%, β -折叠含量增加, 为 10.60%; 加热组的巯基含量呈下降趋势, 由 70.45 nmol/mg 减少到 50.11 nmol/mg, 碱性 pH 下的蛋白质有助于巯基向分子间和分子内二硫键的转化; 随着 pH 值的增加, 对照组肌球蛋白的表面疏水性系数依次增加, 而加热组下降, 但加热组肌球蛋白的表面疏水性系数仍然远高于对照组。综上所述, 通过探究碱性条件下肌球蛋白热聚集体的性质, 有助于对其热聚集进行调控, 获得一种热稳定性较好的肌球蛋白溶液, 对以后研究其作为乳化剂添加到食品中有重要意义。

关键词: 马鲛鱼; 肌球蛋白; 热聚集

文章篇号: 1673-9078(2022)04-114-120

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.4.0719

Effect of Alkaline pH on the Thermal Aggregation Behavior of Mackerel

Myosin

HA Si, HAN Lingyu, XU Zhe, MA Kun, LI Tingting*

(School of Life Sciences, Dalian Minzu University, Dalian 116600, China)

Abstract: In order to explore the effect of alkaline pH on the thermal aggregation behavior of mackerel myosin, mackerel myosin was used to explore the effect of pH (7.0, 8.0, 9.0) on the structure and structure of myosin under heating conditions. For the influence of physical and chemical properties (solubility, turbidity, secondary structure, total sulfhydryl content, surface hydrophobicity), the unheated group was used as a blank control group. The results showed that the solubility of myosin in the control group increased from 68.00% to 82.00% at pH (7.0, 8.0, 9.0), and the turbidity did not change significantly; there was a big difference in the heating group, and the solubility increased from 30.00% to 94.00%, The turbidity absorbance value decreased from 0.49 to 0.23; the content of myosin α -helix at pH 9.0 in the heating group decreased, and the content was the lowest among all groups, at 45.60%, and the β -sheet content increased at 10.60%; the sulfhydryl group content of the heating group showed a downward trend, from 70.45 nmol/mg to 50.11 nmol/mg. The protein at alkaline pH facilitates the conversion of sulfhydryl groups into intermolecular and intramolecular disulfide bonds; as the pH value increases, for the myospheroids of the control group, the surface hydrophobicity coefficient of the protein increased successively, while the heating group decreased, but the surface hydrophobicity coefficient of myosin in the heating group was still much higher than that of the control group. In summary, by exploring the properties of myosin thermal aggregates under alkaline conditions, it will conducive to regulate their thermal aggregation and obtain a myosin solution with better thermal stability. The addition of emulsifiers to food is of great significance.

引文格式:

哈斯, 韩玲钰, 许喆, 等. 碱性 pH 对马鲛鱼肌球蛋白热聚集行为的影响[J]. 现代食品科技, 2022, 38(4): 114-120, +61

HA Si, HAN Lingyu, XU Zhe, et al. Effect of alkaline pH on the thermal aggregation behavior of mackerel myosin [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(4): 114-120, +61

收稿日期: 2021-07-10

基金项目: 辽宁省自然科学基金项目 (2021-MS-147); 国家重点研发计划重点专项 (2018YFD0400600)

作者简介: 哈斯 (1996-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 水产品加工贮藏及质量安全, E-mail: 1187393553@qq.com; 共同第一作者: 韩玲钰 (1986-) 女, 博士, 讲师, 研究方向: 天然高分子及胶体化学, E-mail: hly@dlmu.edu.cn

通讯作者: 李婷婷 (1978-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 水产品加工贮藏及质量安全, E-mail: tingting780612@163.com

Key words: mackerel; myosin; thermal aggregation

马鲛鱼 (*Scomberomorus niphonius*) 又被称作鲭鱼, 它是东海、南海、黄海和北太平洋渔业中的重要物种, 在中国的消费者和生产者中广受欢迎^[1]。马鲛鱼含有许多有益于健康饮食的营养物质, 包括优质蛋白质 (23%)、多不饱和脂肪酸 (占其总脂肪酸含量的 71.1%~80.9%)、必需氨基酸、维生素和矿物质^[2]。马鲛鱼主要分为食用生鲜、鱼糜制品、鱼罐头等几类, 其中鱼糜制品占较大比重^[3]。鱼糜经过热处理形成凝胶, 肌球蛋白 (myosin) 是最重要的功能性蛋白, 加热可使肌球蛋白变性, 暴露的活性基团间相互作用形成凝胶网状结构^[4,5]。有研究发现在肉蛋白热聚集过程中, 肌球蛋白发挥着十分重要的作用, 作为肉蛋白中含量高达 50% 的蛋白质, 它的热聚集很容易受到 pH、盐浓度和温度的影响, 通常用浊度、溶解度、表面疏水性、总巯基含量、 α -螺旋含量等探究其热聚集性质^[6]。作为一种盐溶性蛋白质, 肌球蛋白形状如“Y”字, 头部是两个球形结构, 尾巴是杆状, 其中两个头部对碱处理很敏感^[7]。肌球蛋白分子头部与肌动蛋白相连, 杆状尾部暴露在外^[8], 对鲤鱼^[9]、马鲛鱼^[10]的肌动球蛋白热变性机制相关研究中发现肌球蛋白在加热的过程倾向于变性聚集是由于肌球蛋白暴露在外的尾部; 从新鲜鲢鳙和冷藏 9 d 的鲢鳙中提取肌球蛋白, 对其浊度、表面疏水性和二硫键等指标进行比较, 发现新鲜的鲢鳙在 35~75 °C 范围内聚集程度更高^[11]。因此, 进一步研究碱性 pH 下热处理对肌球蛋白功能性质的影响具有很大的潜力。

植物源和乳源蛋白质在食品加工中已作为乳化剂广泛应用, 是由于它们在加工和贮藏过程中具有很好的稳定性。虽然肉蛋白也具有较好的乳化性, 但是由于加热可以使其聚集变性, 致使肉蛋白形成的乳液稳定性较差。在食品加工生产过程中加热处理是十分常见的操作流程, 因此, 研究肉蛋白的热聚集性质可以更好的了解蛋白质结构与功能性质之间的关系, 通过不同 pH 环境改变蛋白质的结构和功能, 从而改善其乳化性, 扩大应用范围。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

马鲛鱼购于大连乐购超市, 运至实验室, 对鱼进行处理, 取其背部白肉, 用榨汁机制成肉糜状, 用去离子水清洗, 4 °C 冷藏备用。

腺苷-5'-三磷酸二钠盐水合物 (ATP), 上海麦克

林有限公司; 三 (羟甲基) 氨基甲烷 (TRIS)、乙二醇双 (2-氨基乙基醚) 四乙酸 (EGTA)、马来酸, 北京索莱宝有限公司; β -巯基乙醇, 上海阿拉丁有限公司, 其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

紫外/可见分光光度计, 上海美谱达仪器有限公司; IKA T18 高速均质机, 德国 ULTRA-TURRAX 公司; Synergy H1 酶标仪, 美国伯腾仪器有限公司; 圆二色光谱仪 (Chirascan), 英国应用光物理公司; IR Affinity-1 傅里叶变换红外光谱仪, 日本岛津 SHIMADZU。

1.3 方法

1.3.1 肌球蛋白提取

提取肌球蛋白依据盖静^[12]的方法并稍作修改, 实验过程中反应均在 4 °C 下进行, 离心机设置为 4 °C。将提前准备好的肉糜加入 10 倍体积的试剂一 (0.1 mol/L KCl, 20 mmol/L Tris, 盐酸调 pH 至 7.0), 冰水浴下用 IKA T18 在转速为 11000 r/min 下均质 5 min, 反应 15 min 后 5320 r/min 离心 5 min; 将沉淀物与试剂二 (0.45 mol/L KCl, 0.2 mol/L 乙酸镁, 1 mmol/L EGTA, 20 mmol/L Tris, 5 mmol/L β -巯基乙醇, 马来酸调 pH 至 6.8) 1:5 混合, 将 ATP 加入向上述溶液中, 调节终浓度为 10 mmol/L, 充分混合后静置 90 min; 然后在 10180 r/min 离心 13 min; 将 5 倍体积的 1 mmol/L KHCO₃ 加入离心后的上清液中, 放置 20 min, 10180 r/min 离心 13 min, 将在沉淀物与试剂三 (0.5 mol/L KCl, 20 mmol/L Tris, 5 mmol/L β -巯基乙醇, pH 用盐酸调至 7.5) 1:2.5 混合, 反应 10 min 后再加入 5 倍体积的 1 mmol/L KHCO₃, 将 MgCl₂ 加入溶液中, 最终浓度为 10 mmol/L, 在 4 °C 冰箱过夜反应, 次日 10180 r/min 离心 25 min, 得到肌球蛋白沉淀。使用缓冲液 [0.5 mol/L NaCl-20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.0)] 对肌球蛋白进行溶解, 6860 r/min 离心 10 min, 上清液于 4 °C 待用。测定肌球蛋白纯度使用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳。

1.3.2 肌球蛋白溶液制备

取 1.3.1 制备的溶液, 分为三组调节 pH, 各组在时间上保持一致, 同时为了检测肌球蛋白的热聚集性质, 上述三组蛋白液均置于 75 °C 水浴锅中水浴加热 30 min, 对照组作为对照。加热前后的肌球蛋白溶液放置于 4 °C 恒温冷库中保留待用。

1.3.3 蛋白浓度测定

蛋白质浓度测定采用双缩脲法,使用 BSA 制作标准曲线。将 1 mL 肌球蛋白溶液与 4 mL 双缩脲试剂并混合反应,30 min 后于 540 nm 下测定吸光值,通过标准曲线计算肌球蛋白浓度。

1.3.4 溶解度测定

肌球蛋白溶液的溶解度参考李婷^[13]的方法,并稍作修改,对 1.3.1 中肌球蛋白溶液进行溶解度测定。

1.3.5 浊度测定

参考韩敏义等^[14]的方法略有修改,肌球蛋白浓度为 1 mg/mL,混匀静置 10 min,在 350 nm 测定其吸光度。

1.3.6 圆二色谱测定

用缓冲液(0.5 mol/L NaCl-20 mmol/L Tris-HCl)稀释未经过和经过热处理的 pH 肌球蛋白溶液至浓度为 0.2 mg/mL,比色皿光径 1 mm,扫描波段为 190~250 nm,缓冲液作为空白^[15]。肌球蛋白二级结构用仪器自带软件 CDNN 2.1 分析。

1.3.7 傅里叶红外光谱(FT-IR)测定

根据 Liu 等^[16]的方法,将不同组的肌球蛋白溶液使用冷冻干燥机冷冻干燥,将溴化钾与冻干后的肌球蛋白粉末混合(50:1),压力为 18 MPa,时间 2 min,扫描范围为 450~4000 cm^{-1} 。

1.3.8 总巯基含量测定

根据朱东宏等^[17]的方法,进行了一定的修改,将 1 mL 蛋白溶液(5 mg/mL)与 9 mL 缓冲液(50 mmol/L 磷酸盐缓冲液、0.6 mol/L KCl、10 mmol/L EDTA, pH 7.0)均匀混合。取 0.5 mL DTNB (0.1%) 与上述溶液 4.5 mL 与混合,4 °C 静置 30 min,在 412 nm 测定吸光值。通过下式计算:

$$C_0 = \frac{A}{\epsilon \times c} \times D$$

式中:

C_0 ——巯基含量;

A ——412 nm 处吸光值;

D ——稀释倍数;

c ——蛋白溶液浓度;

ϵ ——摩尔消光系数 13600 $\text{mol} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。

1.3.9 表面疏水性

根据 Benjakul 等^[18]的方法,将 1 mg/mL 肌球蛋白溶液稀释成 0.125、0.25、0.5 mg/mL。将 4 mL 肌球蛋白溶液分别加入 20 μL ANS 溶液,ANS 溶液配制为 10 mmol/L ANS、20 mmol/L Tris, pH 调至 7.5,混合避光 10 min。用酶标仪在激发波 303 nm,发射波 485 nm 测定上述溶液的荧光强度,以蛋白质浓度为横坐

标,荧光强度为纵坐标作图,直线斜率即为肌球蛋白的表面疏水性。

1.3.10 数据处理与统计分析

实验做三次平行,图形绘制: Origin 2018; 数据进行整理: Microsoft Excel 2019; 数据显著性分析: SPSS 26, 图中不同字母为差异显著 ($p < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 SDS-PAGE 结果分析

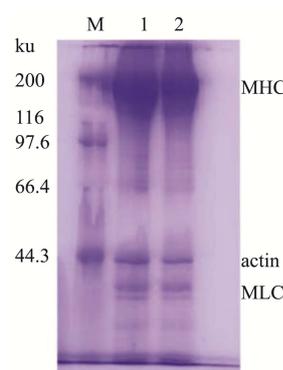


图1 马鲛鱼肌球蛋白 SDS-PAGE 图谱

Fig.1 SDS-PAGE profile of Spanish mackerel myosin

如图 1 所示, SDS 电泳图谱可以显示肌球蛋白纯度,提取的肌球蛋白分子量是由 44.3 ku 以下的肌动蛋白、肌球蛋白轻链和 200 ku 的肌球蛋白重链组成,通过 Gel-pro analyzer 定量分析软件肌球蛋白的纯度在 80%以上。

2.2 溶解度

溶解度是反应蛋白质聚集状态的重要参数。如图 2 所示,对照组的肌球蛋白溶解度随着 pH 的升高,从 68.00%升高到 82.00%。肌球蛋白的等电点为 5.5, pH 的改变会使蛋白质携带更多的负电荷,致使蛋白质间的静电斥力增加^[19]。pH 越大,静电斥力越高。pH 升高带来的静电电荷将会结合更多的水分子,而且静电斥力也会影响肌球蛋白发生聚集^[20]。NaCl 对肌球蛋白的溶解度也有较大影响,Cl⁻与肌球蛋白相结合,增加蛋白质之间的静电斥力,这会抑制肌球蛋白发生聚集^[21]。Sun 等^[22]在研究 pH 变化对蓝鳍金鱼骨骼肌肌球蛋白构象和凝胶性质的影响时,当 0.5 mol/L NaCl 的存在时,观察到该抛物线形状溶解度曲线, pH > 8.0 或 pH < 3.0 时,观察到溶解度的急剧增加,这与我们对照组结果是一致的。但是,加热组溶解度随 pH 的升高变化较为明显,从 30.00%增加到 94.00% ($p < 0.05$),这可能是因为加热可以给系统带来更多的能量,使蛋白质之间更容易相互碰撞,因此 Cl⁻与肌球蛋白的结合

作用可能就被削弱，而 pH 引起的分子间的静电斥力成为影响肌球蛋白的主要因素。可以看出在 75 °C，30 min 条件下，大量肌球蛋白的热聚集体形成，如图 2 所示，肌球蛋白单体在加热后发生聚集，部分聚集体可以在溶液中溶解，但是部分则变得不溶。因此，加热后 pH 9.0 的肌球蛋白溶液溶解度高于其他组可能是因为生成了更多的可溶性聚集体。

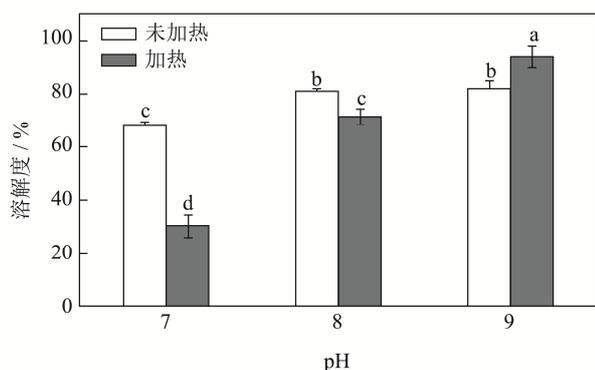


图 2 不同 pH 处理对肌球蛋白加热前后的溶解度的影响

Fig.2 The effect of different pH treatments on the solubility of myosin before and after heating

2.3 浊度

浊度是评价肌球蛋白聚集性的主要指标，浊度的增加表明肌球蛋白聚集体的形成^[23]。如图 3 所示，对照组肌球蛋白的浊度基本上没有变化 ($p>0.05$)，可以表明肌球蛋白在未加热条件下的聚集程度较低。然而，加热组的浊度明显大于对照组，表明肌球蛋白发

生热聚集，但吸光值从 0.49 降低到 0.23，表明有可溶性聚集体产生。Brenner 等^[24]在鱼类肌球蛋白中也有类似的发现，他们的解释是肌球蛋白聚集体的摩尔质量减少了。根据 Ferrone^[25]的研究表明，只有当肌球蛋白单体达到一定浓度时，肌球蛋白溶液才会发生聚集。但是，当 pH 从 7.0 增加到 9.0 时，蛋白质之间的静电斥力增强阻碍了这个浓度的形成，减少了肌球蛋白的热聚集，增强了光散射和透光性，使肌球蛋白的浊度降低，形成了不同摩尔质量的肌球蛋白聚集体。总之，在加热和 pH 9.0 的条件下，肌球蛋白聚集程度更低，而且更加复杂。根据溶解度的结果，在高静电斥力条件下，肌球蛋白可溶性聚集体可能更容易形成。

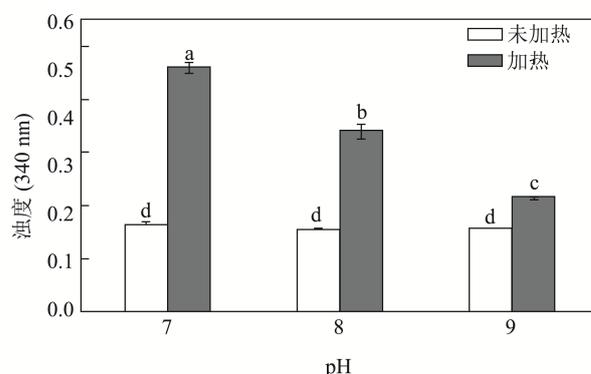


图 3 不同 pH 处理对肌球蛋白加热前后的浊度的影响

Fig.3 The effect of different pH treatments on the turbidity of myosin before and after heating

2.4 圆二色谱

表 1 不同 pH 处理对肌球蛋白加热前后的二级结构分析

Table 1 Analysis of the secondary structure of myosin before and after heating by different pH treatments

二级结构/%	pH 7	pH 8	pH 9	pH 7+75 °C	pH 8+75 °C	pH 9+75 °C
α -螺旋	65.5	66.6	61.6	54.7	52.6	45.6
β -折叠	4.3	4.1	5.1	6.7	7.3	10.6
β -转角	12.7	12.6	13.4	14.3	14.7	16.2
无规则卷曲	11.4	10.5	12.9	16.2	15.6	18.2

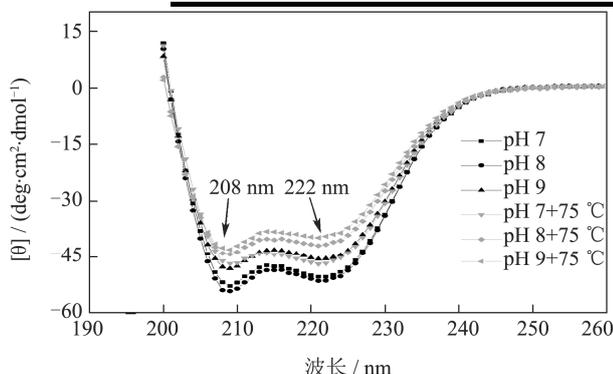


图 4 不同 pH 处理肌球蛋白加热前后的 CD 谱图

Fig.4 CD spectra of myosin before and after heating by different pH treatments

圆二色谱(CD)可以测定肌球蛋白二级结构含量，通过 CD 谱图讨论加热条件下碱性 pH 对马鲛鱼肌球蛋白二级结构的影响，肌球蛋白的“Y”形结构中杆状尾部是由 α -螺旋盘绕而成^[26]。肌球蛋白在 208 nm 和 222 nm 处的负峰通常被人作为 α -螺旋结构区域^[27]。表 1 是不同 pH 处理对肌球蛋白加热前后的二级结构变化，可以看出肌球蛋白经过加热后 α -螺旋含量明显减少， β -折叠含量增加。蛋白质经过热处理后 α -螺旋含量减少，这是由于蛋白质分子展开的程度增加； β -折叠含量增加，是由于蛋白质分子间聚集程度增加^[28]。如图 4 所示，对照组的肌球蛋白 α -螺旋结构在 pH 增加下没有发生明显变化 ($p>0.05$)，这可能因为 α -

螺旋结构主要分布在肌球蛋白的杆状尾部,对 pH 的变化不敏感。但是加热组的变化较为明显, pH 9.0 的 α -螺旋最低,这是因为肌球蛋白在热处理后,蛋白质发生变性,大量 α -螺旋在高温下展开, Liu 等^[29]也得出类似的结果。

2.5 傅里叶红外光谱

傅里叶红外光谱 (FT-IR) 可以通过酰胺 I 带 ($1600\sim 1700\text{ cm}^{-1}$) 对二级结构进行分析,在 1664 cm^{-1} 处出现特征吸收峰是酰胺 I 带 C=O 的伸缩振动。本研究对热聚集过程中涉及的 α -螺旋 β -折叠二级结构组分进行了分析,蛋白质二级结构与峰值有以下的对应关系: $1661\sim 1680\text{ cm}^{-1}$ 表示 α -螺旋结构, $1610\sim 1639\text{ cm}^{-1}$ 表示 β -折叠结构^[30]。从图 5 中可以看出,不同 pH 处理对肌球蛋白加热前后的 FT-IR 峰型基本一致,峰位置也基本一致。Liu 等^[31]发现 α -螺旋的展开和 β -折叠的增加会使猪肌球蛋白凝胶化变的更容易,而且经过加热后的肌球蛋白形成聚集体过程中都会存在 α -螺旋减少、 β -折叠增多的现象,其中肌球蛋白的展开会使 α -螺旋减少^[32]。羰基 (C=O) 和氨基 (-NH₂) 之间的氢键可以使 α -螺旋结构稳定,当温度超过 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$,氢键逐渐被破坏,导致 α -螺旋结构减少^[33],这与圆二色谱得出的结论是一致的。

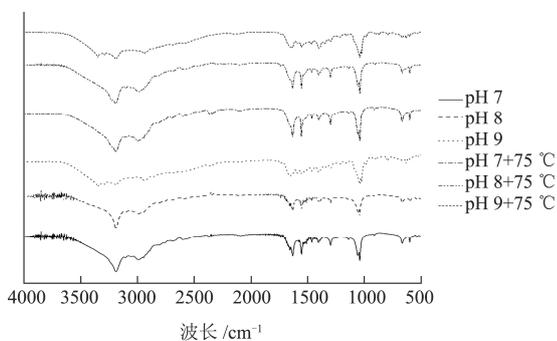


图 5 不同 pH 处理后肌球蛋白加热前后的傅里叶红外光谱
Fig.5 Fourier infrared spectra of myosin before and after heating after different pH treatments

2.6 巯基含量

pH 改变、热处理等因素的变化会改变蛋白质分子的三级和四级结构,而巯基含量的变化则可以被用来表征蛋白质三级和四级结构的变化^[34]。巯基分为活性巯基和隐藏的巯基,活性巯基位于肌球蛋白头部,它是蛋白质最具活性的功能基团,但容易被氧化成二硫键^[35]。不同 pH 处理肌球蛋白加热前后巯基含量如图 6 所示,对照组 pH 7.0 时肌球蛋白的巯基含量低于其他组,随着 pH 的升高其含量增加。但是,经过加热

的肌球蛋白则相反,巯基含量随着 pH 升高而减小。这是由于在碱性条件下,蛋白质展开使其内部大量的基团(包括疏水基团和巯基基团)显露出来,且在此条件下有助于巯基向分子间和分子内二硫键转化^[36]。巯基含量的增加或减少可能是一种动态平衡,加热可以促进这一过程,使巯基更快的向二硫键的转化。因此,加热后 pH 9.0 巯基含量较低可能由于巯基大量转化为二硫键,二硫键的形成致使大分子聚集发生聚集,一些表面的巯基重新被掩盖,导致巯基含量变低。综上所述,二硫键是蛋白质在 pH 9.0 下形成可溶性聚集体的重要因素之一。

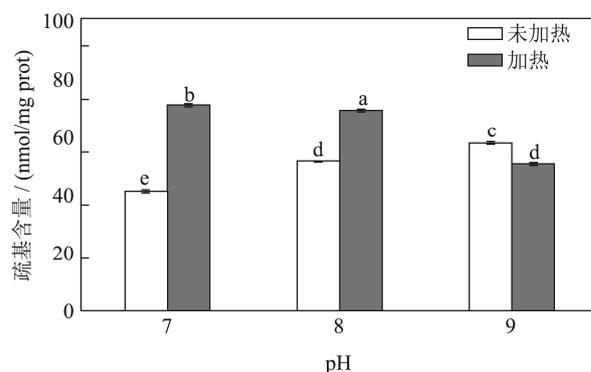


图 6 不同 pH 处理对肌球蛋白加热前后的巯基含量

Fig.6 The sulfhydryl content of myosin before and after heating by different pH treatment

2.7 表面疏水性

表面疏水性和巯基含量一样,也可以用来分析蛋白质三级和四级结构的变化^[37]。蛋白质加热后变性导致二级结构发生改变,双螺旋结构解开使更多的疏水性氨基酸残基暴露出来使表面疏水性增加,同时暴露的疏水氨基酸残基可以促进疏水相互作用从而使蛋白发生聚集^[38]。如图 7 所示,随着 pH 值的增加,对照组肌球蛋白的表面疏水性系数依次增加,而加热组下降。但是加热组肌球蛋白的表面疏水性系数仍高于对照组的 ($p < 0.05$)。事实上,根据报道肌球蛋白的尾部对碱性不敏感^[39]。这就是说肌球蛋白疏水性与 ANS 吸附间的正比例关系反映的主要是肌球蛋白的头部结构的变化。肌球蛋白的头部结构展开,许多内部的疏水基团暴露出来。经过加热,疏水基团变得更加暴露,加速了与 ANS 的结合,使疏水性增加,肌球蛋白疏水性的增加是凝胶形成和大肌球蛋白聚集体形成的必要条件^[40]。长时间加热大大增加了肌球蛋白的表面疏水性,但随着 pH 增加,这种现象逐渐减弱。表面疏水性的降低,在研究 pH 对虾夷扇贝肌球蛋白理化性质和热诱导凝胶性质的影响也有类似的结论^[41]。结合巯基含量的变化我们可以知道,碱性 pH 影响肌球

蛋白头部的三级结构、四级结构和头部一尾部的相互作用,使形成的肌球蛋白聚集体发生改变。由于二硫键和高暴露的疏水性基团可能会为肌球蛋白的聚集提供独特的结构。然后借助静电斥力和其他作用力,使得可溶性聚集体大量存在于 pH 9.0 处理的溶液中。

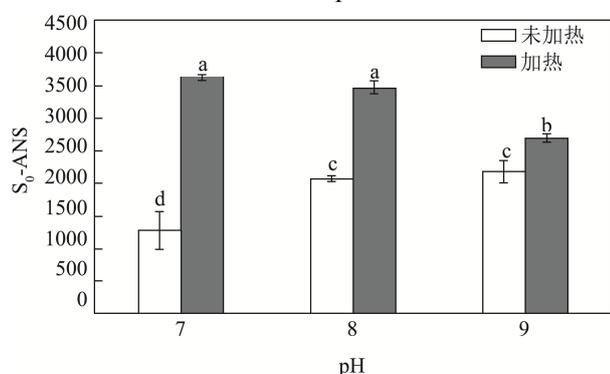


图7 不同 pH 处理对肌球蛋白加热前后的表面疏水性

Fig.7 The surface hydrophobicity of myosin before and after heating on different pH treatments

3 结论

不同 pH (7.0、8.0、9.0) 下肌球蛋白热聚集存在一定差异,通过改变 pH 可以控制蛋白质的热聚集行为,可以改善肌球蛋白溶液溶解度和浊度。肌球蛋白热聚集过程中由于蛋白质变性使其二级结构与对照组相比发生明显变化。结合巯基含量和表面疏水性结果,在碱性 pH 处理下,肌球蛋白变得更加开放,许多内部疏水基暴露。长时间加热可使蛋白质的展开和基团暴露得到进一步加强。加热组 pH 9.0 有大量可溶性聚集体产生,并且显示出了很好的热稳定性。综上所述,通过探究碱性条件下肌球蛋白热聚集体的性质,有助于我们对其热聚集进行调控,获得一种热稳定性较好的肌球蛋白溶液,对以后研究其作为乳化剂添加到食品中有重要意义。

参考文献

- [1] Luo X, Yang R, Zhao W, et al. Gelling properties of Spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*) surimi as affected by washing process and high pressure [J]. International Journal of Food Engineering, 2010, 6(4): 61-64
- [2] Wu S, Yang J, Dong H, et al. Key aroma compounds of Chinese dry-cured Spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*) and their potential metabolic mechanisms [J]. Food Chemistry, 2021, 342(3): 128381
- [3] Wu S. Effect of pullulan on gel properties of *Scomberomorus niphonius* surimi [J]. Int J Biol Macromol, 2016, 93(Pt A): 1118-1120
- [4] Ding Y, Liu Y, Yang H, et al. Effects of CaCl₂ on chemical interactions and gel properties of surimi gels from two species of carps [J]. European Food Research and Technology, 2011, 233(4): 569-576
- [5] Liu R, Zhao S, Regenstein J M, et al. Gelling properties of fish/pork mince mixtures [J]. Journal of Food Science, 2016, 81(2): C301-C307
- [6] McClements D J, Gumus C E. Natural emulsifiers - biosurfactants, phospholipids, biopolymers, and colloidal particles: Molecular and physicochemical basis of functional performance [J]. Advances in Colloid and Interface Science, 2016, 234: 3-26
- [7] Hsu K, Hwang J, Yu C, et al. Changes in conformation and in sulfhydryl groups of actomyosin of tilapia (*Oreochromis niloticus*) on hydrostatic pressure treatment [J]. Food Chemistry, 2007, 103(2): 560-564
- [8] Vetri V, Librizzi F, Leone M, et al. Thermal aggregation of bovine serum albumin at different pH: comparison with human serum albumin [J]. European Biophysics Journal, 2007, 36(7): 717-725
- [9] Sano T, Ohno T, Otsuka F H, et al. Carp natural actomyosin: thermal denaturation mechanism [J]. Journal of Food Science, 2010, 59(5): 1002-1008
- [10] Yongsawatdigul J, Park J W. Thermal denaturation and aggregation of threadfin bream actomyosin [J]. Food Chemistry, 2003, 83: 409-416
- [11] Yarnpakdee S, Benjaskul 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 Hydrocolloids, 2009, 239(7): 1779-1784
- [12] 盖静.不同加热温度对鳙鱼肌球蛋白聚集行为的影响及其机理研究[D].镇江:江苏大学,2016
- [13] 李婷.添加剂对低离子强度下罗非鱼肌球蛋白热变性聚集的抑制及机理[D].湛江:广东海洋大学,2019
- [14] LI Ting. Inhibition of additives on thermal denaturation and aggregation of tilapia myosin under low ionic strength and its mechanism [D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2019
- [14] 韩敏义,徐幸莲,林丽军,等.兔骨骼肌肌球蛋白的纯化及溶液浊度和溶解度研究[J].食品科学,2004,12:50-54
- [14] HAN Minyi, XU Xinglian, LIN Lijun, et al. Extraction and

- purification of myosin from rabbit skeletal muscles and its solution turbidity and solubility [J]. *Food Science*, 2004, 12: 50-54
- [15] Wu C C, Yang J T. Reexamination of the conformation of muscle proteins by optical activity [J]. *Biochemistry (Easton)*, 1976, 15(14): 3007-3014
- [16] Liu J, Xu Q, Zhang J, et al. Characterization of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) myosin protein glycosylated with konjac oligo-glucomannan [J]. *Food Hydrocolloids*, 2016, 57: 114-121
- [17] 朱东宏, 兰冬梅, 郑惠娜, 等. 不同种类酸诱导罗非鱼肌球蛋白去折叠行为的研究[J]. *广东农业科学*, 2015, 42(12): 135-140
ZHU Donghong, LAN Dongmei, ZHENG Huina, et al. Unfolding behavior of Tilapia myosin induced by different acids [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2015, 42(12): 135-140
- [18] Benjakul S, Visessanguan W, Ishizaki S, et al. Differences in gelation characteristics of natural actomyosin from two species of bigeye snapper, *Priacanthus tayenus* and *Priacanthus macracanthus* [J]. *Journal of Food Science*, 2001, 66(9): 1311-1318
- [19] Jiang J, Chen J, Xiong Y L. Structural and emulsifying properties of soy protein isolate subjected to acid and alkaline pH-shifting processes [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(16): 7576-7583
- [20] Allcock A L, Watts P C, Thorpe J P. Divergence of nematocysts in two colour morphs of the intertidal beadlet *Anemone actinia* equina [J]. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 1998, 78(3): 821-828
- [21] Hayakawa T, Ito T, Wakamatsu J, et al. Myosin is solubilized in a neutral and low ionic strength solution containing l-histidine [J]. *Meat Science*, 2009, 82(2): 151-154
- [22] Sun L, Lin Y, Liu W, et al. Effect of pH shifting on conformation and gelation properties of myosin from skeletal muscle of blue round scads (*Decapterus maruadsi*) [J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 93: 137-145
- [23] Gill T A, Chan J K, Phonchareon K F, et al. Effect of salt concentration and temperature on heat-induced aggregation and gelation of fish myosin [J]. *Food Research International*, 1992, 25(5): 333-341
- [24] Brenner T, Johannsson R, Nicolai T. Characterization of fish myosin aggregates using static and dynamic light scattering [J]. *Food Hydrocolloids*, 2009, 23(2): 296-305
- [25] Ferrone F. Analysis of protein aggregation kinetics [J]. *Methods in Enzymology*, 1999, 309(1): 256-274
- [26] Harrington W F, Rodgers M E. Myosin [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 1984, 53(1): 35-73
- [27] Cao Y, Xiong Y L. Chlorogenic acid-mediated gel formation of oxidatively stressed myofibrillar protein [J]. *Food Chemistry*, 2015, 180: 235-243
- [28] 杨玉玲, 游远, 彭晓蓓, 等. 加热对鸡胸肌肉原纤维蛋白结构与凝胶特性的影响[J]. *中国农业科学*, 2014, 47(10): 2013-2020
YANG Yuling, YOU Yuan, PENG Xiaobei, et al. Influence of heating on structure and gel properties of myofibrillar proteins from chicken breast muscle [J]. *China Agricultural Sciences*, 2014, 47(10): 2013-2020
- [29] Liu R, Zhao S, Xie B, et al. Contribution of protein conformation and intermolecular bonds to fish and pork gelation properties [J]. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25(5): 898-906
- [30] Pérez-Mateos M, Montero P. Contribution of hydrocolloids to gelling properties of blue whiting muscle [J]. *European Food Research & Technology*, 2000, 210(6): 383-390
- [31] Liu R, Zhao S, Xiong S, et al. Role of secondary structures in the gelation of porcine myosin at different pH values [J]. *Meat Science*, 2008, 80(3): 632-639
- [32] Jia D, You J, Hu Y, et al. Effect of CaCl₂ on denaturation and aggregation of silver carp myosin during setting [J]. *Food Chemistry*, 2015, 185: 212-218
- [33] Guo X Y, Peng Z Q, Zhang Y W, et al. The solubility and conformational characteristics of porcine myosin as affected by the presence of l-lysine and l-histidine [J]. *Food Chemistry*, 2015, 170: 212-217
- [34] Zhang Z, Yang Y, Zhou P, et al. Effects of high pressure modification on conformation and gelation properties of myofibrillar protein [J]. *Food Chemistry*, 2017, 217: 678-686
- [35] Sultanbawa Y, Li-Chan E C Y. Structural changes in natural actomyosin and surimi from ling cod (*Ophiodon elongatus*) during frozen storage in the absence or presence of cryoprotectants [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49(10): 4716-4725
- [36] Tadpitchayangkoon P, Park J W, Yongsawatdigul J. Conformational changes and dynamic rheological properties of fish sarcoplasmic proteins treated at various pHs [J]. *Food Chemistry*, 2010, 121(4): 1046-1052
- [37] Hemung B, Li-Chan E C Y, Yongsawatdigul J. Thermal stability of fish natural actomyosin affects reactivity to cross-linking by microbial and fish transglutaminases [J]. *Food Chemistry*, 2008, 111(2): 439-446