

鲢鱼肉肌原纤维乳糖蛋白的制备及其溶解性

张爱荣¹ 沈慧星² 罗永康¹ 周琼¹

(1. 中国农业大学 食品科学与营养工程学院,北京 100083; 2. 中国农业大学 理学院,北京 100083)

摘要 研究了乳糖与鲢鱼肉肌原纤维蛋白(Mf)在不同反应条件下通过美拉德反应制备的肌原纤维乳糖蛋白的功能特性,测定了其在0.1 mol/L NaCl溶液中的溶解性,并对其进行了SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。乳糖与Mf以1:1、2:1、4:1和6:1的质量比混合,冷冻干燥后,在50和55℃,相对湿度为65%的条件下反应0~48 h制备的肌原纤维乳糖蛋白,其溶解性较Mf有不同程度的提高。乳糖与Mf质量比为1:1,50℃反应48 h后,肌原纤维乳糖蛋白在0.1 mol/L NaCl溶液中的溶解性从反应前的18%提高到63%;55℃反应24 h,其溶解性达到89%。结果表明,乳糖与鲢鱼肉Mf发生美拉德反应后生成的肌原纤维乳糖蛋白在低离子强度溶液中的溶解性得到了有效提高,乳糖能有选择性地与肌球蛋白重链相结合。

关键词 鲢鱼肌原纤维蛋白;乳糖;肌原纤维乳糖蛋白;溶解性

中图分类号 TS 254

文章编号 1007-4333(2005)03-0095-04

文献标识码 A

Preparation of neoglycoprotein from silver carp myofibrillar protein with lactose and its solubility

Zhang Airong¹, Shen Huixing², Luo Yongkang¹, Zhou Qiong¹

(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;

2. College of Science, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract Neoglycoprotein was prepared from silver carp myofibrillar protein by using the Maillard reaction with lactose, and its solubility in a low ionic strength medium was investigated. The lyophilized protein mixed lactose (the weight ratios of lactose and myofibrillar are 1:1, 2:1, 4:1 and 6:1 respectively) was incubated at 50℃ (0-48 h) and 55℃ (0-48 h) respectively under 65% RH. Their conjugation dot was researched by SDS-PAGE analysis. After the lyophilized myofibrillar mixed with lactose (the weight ratio 1:1) was incubated in 50℃ (48 h), 55℃ (24 h) respectively, and its solubility of glycoprotein increased from 18% to 63% (50℃) and to 89% (55℃) respectively. These results indicated that the solubility of myofibrillar proteins in low ionic strength medium was improved by the Maillard reaction, and the myosin heavy chain was selectively conjugated with lactose.

Key words silver carp myofibrillar protein; lactose; myofibrillar glycoprotein; solubility

鱼肉蛋白质主要由肌原纤维蛋白(Mf)组成,其中主要是肌球蛋白(相对分子质量 $5 \times 10^5 \sim 6 \times 10^5$)和肌动蛋白(相对分子质量约为 4.2×10^4)。尽管鱼肉蛋白质是一种营养较完全的蛋白质,有良好的功能特性,如凝胶、保水特性等,但其Mf的化学和热稳定性明显不如脊椎动物,当Mf发生变性时,其功能特性也很快降低^[1]。目前国际上对卵清蛋白^[2-3]、 β -乳球蛋白^[4-5]、牛血清蛋白、鱼精蛋白、酪

蛋白、酶^[6]等蛋白质与糖基化合物经美拉德反应合成的糖蛋白的研究结果表明,新合成的糖蛋白在乳化性、溶解性、热稳定性、抗菌性、抗氧化性等功能特性方面都较原蛋白质有不同程度的提高。以葡萄糖为糖基供体与鲤鱼肉Mf经美拉德反应生成的肌原纤维葡萄糖蛋白,在0.1和0.5 mol/L NaCl溶液中都有较高的溶解性,乳化性也比糖基化反应前的Mf有较大提高^[7-8];葡聚糖与鲤鱼肉的Mf经美拉德反

收稿日期:2004-12-07

基金项目:北京市自然科学基金资助项目(6032015)

作者简介:张爱荣,硕士研究生;罗永康,博士,教授,通讯作者,主要从事畜水产品加工研究。

应(50 ℃ 6 h)制备的肌原纤维葡聚糖蛋白的溶解性虽变化不大,但其乳化特性却有很大程度的提高^[9];以海藻多糖(alginate oligosaccharide, AO)为糖基供体对鲤鱼肉的 Mf 功能特性进行改善,结果表明,生成的肌原纤维海藻多糖蛋白在低离子强度溶液(0.16 mol/L NaCl 溶液)中溶解性较 Mf 有很大提高,而且随着反应时间的延长其溶解性逐渐增高^[10]。由此可见,糖基化反应可有效改善鲤鱼肉 Mf 的某些功能特性。尽管国外对鲤鱼肉 Mf 糖基化后的功能特性进行了较多的研究,但对鲢鱼肉 Mf 的糖基化反应却未见报道。鲢鱼是我国淡水鱼主要品种之一,产量较高但肉质较差。为了提高对鲢鱼鱼肉的综合利用,笔者将鲢鱼肉 Mf 与乳糖在不同条件下进行糖基化反应,对反应后肌原纤维乳糖蛋白的功能特性的变化进行了研究。

1 试验材料与方法

1.1 鲢鱼肉肌原纤维蛋白的提取

鲢鱼,购于北京市健翔桥农贸市场,体长(42.4 ±2.3)cm,体质量(1100.6 ±30.6)g。低温下将活鱼运到实验室。采其白肉,参照文献[7]法,用刀将鲢鱼的白色肌肉切碎,在3倍鱼肉体积的50 mmol/L NaCl、质量分数0.5%的 Triton X-100 溶液中漂洗10 min,倾去悬浮物。漂洗后的碎肉浸在8倍鱼肉体积的50 mmol/L NaCl、质量分数0.5% Triton X-100 溶液中,用高速组织捣碎机12 000 r/min 匀浆2 min,用棉纱布过滤除去结缔组织,8 000 r/min 冷冻离心10 min,取沉淀物,再经50 mmol/L NaCl 溶液漂洗并离心,反复进行4次,获得较纯的 Mf。所有操作均在8 ℃以下进行。

1.2 肌原纤维乳糖蛋白的制备

将 Mf 溶解在50 mmol/L NaCl 溶液中,使其最终质量浓度为6 mg/mL;加入不同比例的乳糖,使乳糖与 Mf 的质量比分别为1:1、2:1、4:1和6:1;进行冷冻干燥,冻干粉在-20 ℃下冻藏。称取一定量的冻干粉混合物进行美拉德反应,相对湿度保持在65%,温度分别为50和55 ℃,反应时间为0、6、12、24、36和48 h,制备肌原纤维乳糖蛋白。

1.3 肌原纤维乳糖蛋白溶解性的测定

蛋白质浓度用双缩脲法测定^[11]。取一定量反应后的糖蛋白粉末溶解在含有40 mmol/L Tris-HCl (pH7.5)的0.1和0.5 mol/L NaCl 溶液中,使其最终质量浓度为2.0~2.5 mg/mL,然后用均质乳

机12 000 r/min 均质1 min,4 ℃下在相应浓度的 NaCl 溶液中透析16 h,以除去未反应的乳糖。取10 mL 透析过的溶液放入15 mL 试管中,4 ℃ 5 000 r/min 离心30 min。肌原纤维乳糖蛋白的溶解性用上清液蛋白质质量浓度与离心前溶液蛋白质质量浓度之比的百分数表示。

1.4 SDS-PAGE 电泳分析

糖基化反应后肌原纤维乳糖蛋白的变化用 SDS-PAGE 检测。SDS-PAGE 参照文献[12]的方法准备,浓缩胶和分离胶丙烯酰胺质量分数分别为5%和7.5%。样品处理:将0.2 mL 蛋白质溶液加入到0.8 mL 含质量分数2% SDS、8 mol/L 尿素和20 mmol/L HCl 的混合溶液中,并在沸水浴中加热2 min;取25 μL 样品进行电泳,考马斯亮蓝染色。

2 结果与讨论

2.1 不同浓度 NaCl 溶液中肌原纤维乳糖蛋白溶解性的变化

由图1(a)可知,当乳糖与 Mf 质量比为1:1,反应温度为50 ℃时,在48 h内,肌原纤维乳糖蛋白在0.1 mol/L NaCl 溶液中的溶解性随着反应时间的延长而逐渐增高,从反应前的18%增大到63%;而反应温度为55 ℃(图2(a)),反应24 h时,其溶解性达到89%,延长反应时间,其变化不明显。此结果表明,当乳糖与 Mf 质量比为1:1时,温度升高能使肌原纤维乳糖蛋白在较短时间内达到较高溶解性。这与文献[7]中当鲤鱼鱼肉 Mf 与葡萄糖质量比为1:9,40 ℃条件下进行糖基化反应12 h,在0.1 mol/L NaCl 溶液中鲤鱼肉 Mf 的溶解性从11%增大到63%的结果相似,说明鲢鱼和鲤鱼肉 Mf 的结构相似,通过糖基化反应可以使其在低离子强度溶液中的溶解性增高,但不同的糖基供体使反应后生成的肌原纤维乳糖蛋白的溶解性有一定差异。

由图2(b)~(d)可见,当乳糖与 Mf 的质量比分别为2:1、4:1、6:1时,反应6 h内,肌原纤维乳糖蛋白在0.1 mol/L NaCl 溶液中的溶解性明显增高,但超过6 h后,其溶解性变化不明显;这可能是乳糖比例增大后,能够在较短时间内达到较完全的反应,所以当反应超过6 h后,反应时间对肌原纤维乳糖蛋白的溶解性影响不大。由于美拉德反应的化学过程比较复杂,具体反应过程尚存在许多疑点。

由图1可知,反应温度为50 ℃时,不同乳糖与 Mf 质量比生成的肌原纤维乳糖蛋白在0.5 mol/L

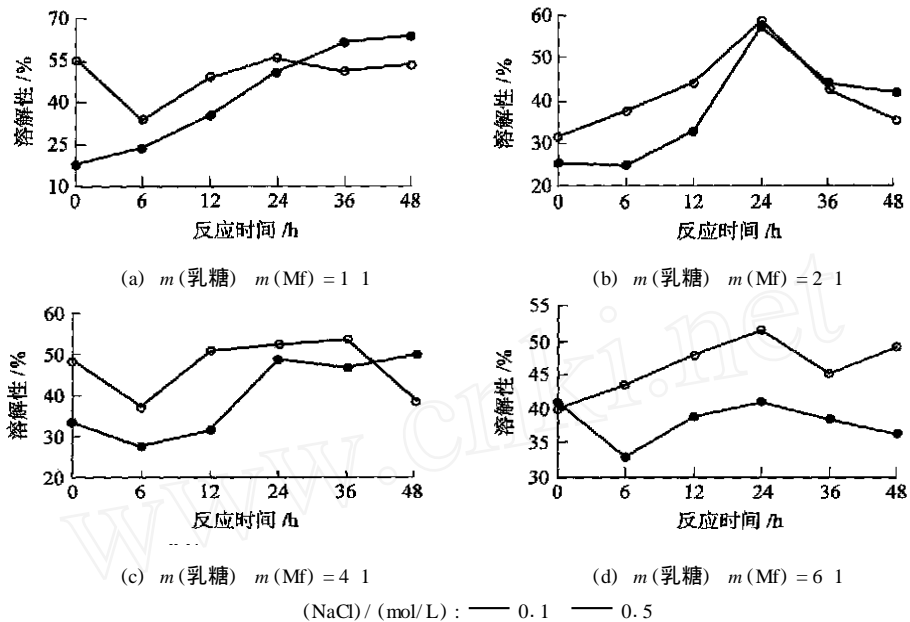


图 1 50 下糖基化反应后肌原纤维乳糖蛋白的溶解性与反应时间的关系

Fig. 1 Relationship between myofibrillar glycoprotein solubility and its reaction time at 50

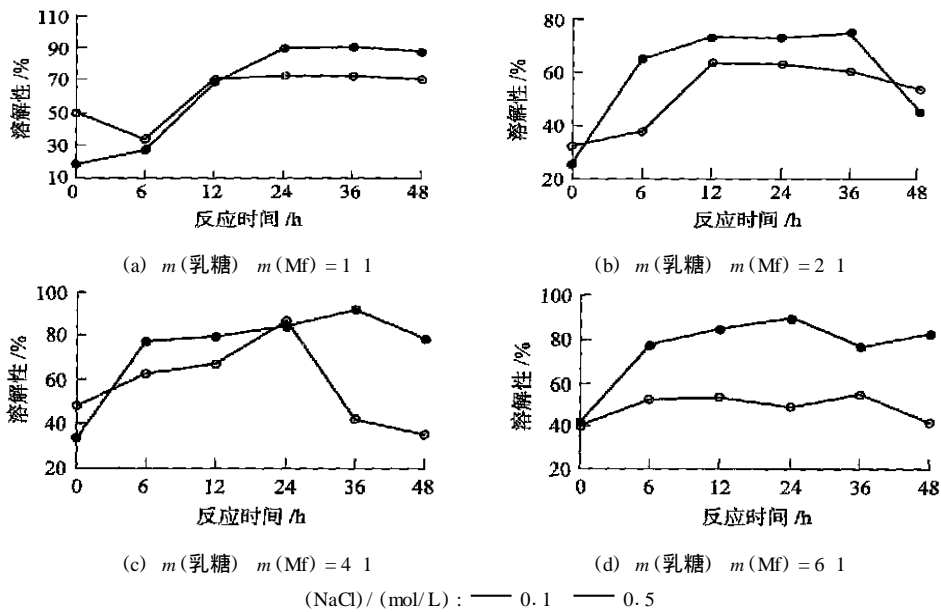


图 2 55 下糖基化反应后肌原纤维乳糖蛋白的溶解性与反应时间的关系

Fig. 2 Relationship between myofibrillar glycoprotein solubility and its reaction time at 55

NaCl 溶液中均保持较高的溶解性,且随着反应时间的延长其溶解性变化不明显。由图 2 可知,反应温度为 55 时,随着反应时间的延长,肌原纤维乳糖蛋白在 0.5 mol/L NaCl 溶液中的溶解性要低于在 0.1 mol/L NaCl 溶液中的溶解性。糖基化反应时,随着乳糖与 Mf 质量比的增大和加热时间的延长,肌原纤维乳糖蛋白的溶解性明显下降(图 2(c)和(d)),这可能是高温下加热时间过长蛋白质发生热

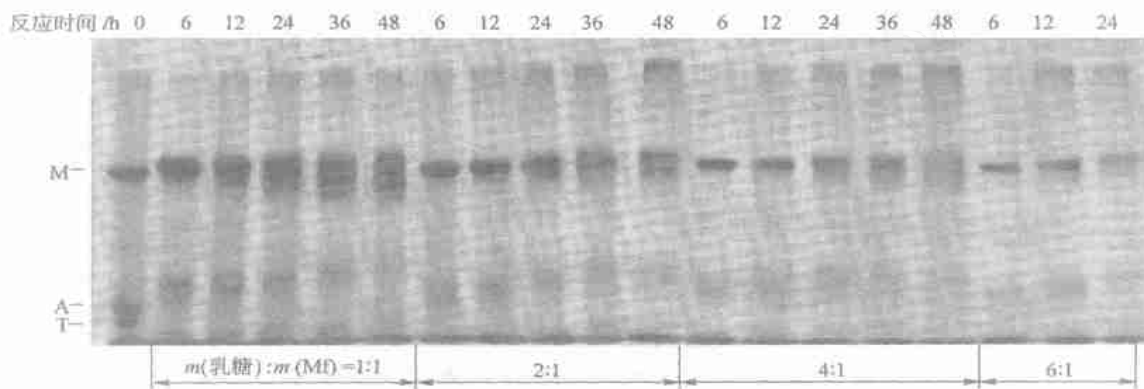
变性而导致的。由此可见,在一定的乳糖与 Mf 质量比和反应条件下,糖基化反应可提高鲢鱼肉 Mf 在低离子强度溶液中的溶解性,并保持其在高离子强度溶液中的溶解性。

2.2 电泳分析结果

图 3 示出糖基化反应后 0.1 mol/L NaCl 溶液中肌原纤维乳糖蛋白的 SDS-PAGE 图。可以看出,肌球蛋白重链的泳动速率随着反应时间的延长而变

得缓慢,在乳糖与 Mf 质量比为 1:1、2:1、4:1 时,肌球蛋白重链的带宽都随着反应时间的延长而增大。这可能是由于乳糖主要与 Mf 的亚单元——肌球蛋白重链相连,使肌球蛋白重链的分子质量增大,而且随着反应程度的加深而不断增大,从而导致其泳动速率下降。此现象也在乳糖与 Mf 其他质量比和温

度下反应生成的肌原纤维乳糖蛋白的电泳图中出现。由此可见,乳糖与鲢鱼肉 Mf 在一定的条件下发生美拉德反应,并与 Mf 的肌球蛋白重链通过赖氨酸残基相连接,随着糖基化反应时间的延长,Mf 的肌球蛋白重链分子质量逐渐增大。



M 为肌球蛋白重链; A 为肌动蛋白; T 为原肌球蛋白

图 3 50 °C 下乳糖与 Mf 糖基化反应后肌原纤维乳糖蛋白在 0.1 mol/L NaCl 溶液中的电泳图谱

Fig. 3 SDS-PAGE patterns of Mf reacted with lactose at 50 °C (M, Myosin heavy chain; A, Actin; T, Tropomyosin)

3 结 论

乳糖与链鱼肉肌原纤维蛋白发生美拉德反应制备的肌原纤维乳糖蛋白,在低离子强度溶液中的溶解性比原肌原纤维蛋白明显提高,而且在高离子强度溶液中仍保持较高的溶解性;所以通过美拉德反应改善鱼肉蛋白质在低离子强度溶液中的溶解性是比较理想的方法。糖基化反应后生成的肌原纤维乳糖蛋白的乳化特性、热稳定性等功能特性有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 罗永康,张爱荣. 糖基化反应改善蛋白质功能特性的研究进展[J]. 食品科技,2004(7):4-6,10
- [2] 王兰,李新和. 美拉德反应在改进蛋白质功能性质方面的研究进展[J]. 郑州粮食学院学报,1999,20(4):33-39
- [3] Kato A, Sasaki Y, Furuta R, et al. Functional protein-polysaccharide conjugate prepared by controlled dry-heating of ovalbumin-dextran mixtures[J]. J Agriculture Biology Chemistry,1990,54(1):107-112
- [4] Makoto H, Koichi N, Koki O, et al. Reduced immunogenicity of β -lactoglobulin by conjugation with carboxymethyl dextran[J]. J Bioconjugate Chem,2000,11:84-93
- [5] Makoto H, Ken-ichi N, Kazuo K, et al. Functional changes in β -lactoglobulin by conjugation with cationic saccharides[J]. J Agric Food Chem,2000,48:2050-2056
- [6] Akio Kato. Industrial applications of Maillard-type protein-polysaccharide conjugates [J]. Food Science and Technology Research,2002,8(3):193-199
- [7] Saeki H. Preparation of neoglycoprotein from carp myofibrillar protein by maillard reaction with glucose: biochemical properties and emulsifying properties [J]. J Agric Food Chem,1997,45:680-684
- [8] Saeki H, Inoue K. Improved solubility of carp myofibrillar proteins in low ionic strength medium by glycosylation [J]. J Agric Food Chem,1997,45:3419-3422
- [9] Fujiwara K, Oosawa T, Saeki H. Improved thermal stability and emulsifying properties of carp myofibrillar proteins by conjugation with dextran [J]. J Agric Food Chem,1998,46:1257-1261
- [10] Sato R, Sewage T, Kashmir H, et al. Preparation of neoglycoprotein from carp myofibrillar protein and alginate oligosaccharide: improved solubility in low ionic strength medium[J]. J Agric Food Chem,2000,48:17-21
- [11] 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,2002.33-34
- [12] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature,1970,227:680-685