

糖基化反应改善鲢鱼鱼肉肌原纤维蛋白功能特性

芦晶¹ 沈慧星² 张爱荣¹ 罗永康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 糖基化反应可以改善蛋白质的某些功能特性。为了提高鲢鱼肉蛋白质的功能特性,扩大其综合利用率,采用三因素二次正交旋转组合设计,研究了用鲢鱼肌原纤维蛋白(Mf)通过美拉德反应制备肌原纤维乳糖蛋白时,糖基化反应条件(温度、反应时间、乳糖与 Mf 质量比)对肌原纤维乳糖蛋白的溶解性、乳化性、热稳定性的影响,分别建立了肌原纤维乳糖蛋白的溶解性、乳化性、热稳定性与糖基化反应条件的定量关系。结果表明:肌原纤维乳糖蛋白溶解性的最优反应条件是温度 50℃,反应时间 18.5 h,乳糖与 Mf 质量比 1.5;肌原纤维乳糖蛋白乳化活性的最优反应条件是温度 50℃,反应时间 18.5 h,乳糖与 Mf 质量比 2.15;肌原纤维乳糖蛋白热稳定性的最优反应条件是温度 55℃,反应时间 13 h,乳糖与 Mf 质量比 1.5。乳糖与 Mf 通过糖基化反应可以有效改善鲢鱼肉肌原纤维蛋白的功能特性。

关键词 鲢鱼肌原纤维蛋白;乳糖;糖蛋白;溶解性;乳化活性;热稳定性

中图分类号 TQ 93

文章编号 1007-4333(2007)04-0019-06

文献标识码 A

Improved functional properties of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) myofibrillar proteins by glycosylation reaction

Lu Jing¹, Shen Huixing², Zhang Airong¹, Luo Yongkang¹

(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 Functional properties of proteins can be improved by mailard reaction. In order to improve Myofibrillar's functional properties and maximize the efficiency of its use, Myofibrillar was conjugated to lactose by the means of Mailard reaction. The conditions for preparing myofibrillar-lactose with better functional properties, using glycosylation reaction were optimized by RSM as follows: for solubility, temperature 50℃, reaction time 18.5 h, weigh of lactose to Mf 1.5; for emulsifying activities, temperature 50℃, reaction time 18.5 h, weigh of lactose to Mf, 2.15; for heat stability, temperature 55℃, reaction time 13 h, weigh of lactose to Mf 1.5. These results suggest that functional properties of glycated proteins were effectively improved by Maillard reaction.

Key words myofibrillar protein; lactose; glycoprotein; solubility; emulsifying activity; heat stability

鱼肉蛋白质主要由肌原纤维蛋白(myofibrillar protein, Mf)组成,Mf 主要分为肌球蛋白(相对分子质量为 $5 \times 10^5 \sim 6 \times 10^5$)和肌动蛋白(相对分子质量为 4.2×10^4)。尽管 Mf 是一种营养较完全的蛋白质,有良好的功能特性如凝胶性、保水性等,但其化学性质和热稳定性则明显不如脊椎动物蛋白,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]、-乳球蛋白^[4-5]、牛血清蛋白、鱼精蛋白、酪蛋白、酶^[6]等蛋白质经美拉德等化学反应合成的糖蛋白的研究表明,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上都有不同程度的提高。

通过糖基化反应改善鱼肉 Mf 功能特性也有报道。以葡萄糖为糖基供体与鲤鱼的 Mf 进行糖基化

收稿日期: 2006-11-20

基金项目: 北京市自然科学基金资助项目(6032015)

作者简介: 芦晶,硕士研究生;罗永康,教授,博士生导师,通讯作者,主要从事畜水产品加工技术研究,

E-mail: luoyongkang@263.net

反应,生成的肌原纤维葡萄糖蛋白在 0.1 mol/L 和 0.5 mol/L NaCl 溶液中有较高的溶解性,而且 Mf 的乳化性也比糖基化反应前有较大提高^[7-8]。将葡聚糖通过美拉德反应引入鲤鱼的 Mf,结果表明,在 50 ℃ 反应 6 h 条件下制备的肌原纤维葡聚糖蛋白的溶解性变化不大,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 Mf 的功能特性进行改善,结果表明,肌原纤维海藻多糖蛋白在低离子强度溶液 (NaCl 0.16 mol/L 溶液) 中溶解性有很大提高,而且其溶解性随着反应时间的延长逐渐提高^[10]。由此可见,糖基化反应可有效改善鲤鱼 Mf 的某些功能特性。

尽管国外对鲤鱼 Mf 糖基化后的功能特性进行了较多研究,但对鲢鱼鱼肉 Mf 的糖基化反应却未见报道。鲢鱼是我国淡水鱼的主要品种之一,产量较大,但肉质较差。为了提高鲢鱼鱼肉的综合利用,本研究将乳糖引入鲢鱼鱼肉 Mf 并对其糖基化反应条件进行优化,为通过糖基化反应提高鲢鱼鱼肉功能性质提供理论依据。

1 试验材料与方法

1.1 鲢鱼肌原纤维蛋白(Mf)的提取

鲢鱼,购于北京市健翔桥农贸市场,低温下将活鱼运到实验室。其体长 (42.4 ± 2.3) cm,体重 (1 200.6 ± 30.6) g。将鲢鱼去头、鳞、内脏、皮,采其白肉,参照 Saeki^[7]法进行,用刀将鲢鱼的白色肌肉切碎,在 3 倍于鱼肉体积的 50 mmol/L NaCl、0.5% (质量分数,下同) Triton X-100 溶液中漂洗 10 min,倾去悬浮物。漂洗后的碎肉浸在 8 倍于鱼肉体积的 50 mmol/L NaCl、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,然后 8 000 r/min 冷冻离心 10 min,取沉淀物,再经 50 mmol/L 的 NaCl 溶液漂洗并离心,反复漂洗离心 4 次,即获得较纯的 Mf。所有的操作均在 8 ℃ 以下进行。

1.2 肌原纤维乳糖蛋白的制备

采用三因素二次正交旋转组合设计如表 1, X_1 代表反应温度, X_2 代表反应时间, X_3 代表乳糖与 Mf 的质量比。将 Mf 溶解在 50 mmol/L 的 NaCl 溶液中,使其最终质量浓度为 6 mg/mL,加入乳糖,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糖基化反应,相对湿度保持在

65%,反应温度和反应时间见表 1,制备肌原纤维乳糖蛋白。数据统计分析采用 SAS 软件 (SAS 软件公司,9.0 版)。

表 1 肌原纤维乳糖蛋白制备因素水平编码表

Table 1 Coded and uncoded settings of the process parameters for reaction conditions according to RSM

| 编码值 | 实际值 | | |
|--------|--------------------|---------------------|-------------------------|
| | 反应温度 (X_1)/ | 反应时间 (X_2)/h | 乳糖与 Mf 质量比 (X_3) |
| 1.682 | 55.0 | 24.0 | 2.800 |
| 1 | 50.9 | 19.5 | 2.273 |
| 0 | 45.0 | 13.0 | 1.500 |
| -1 | 39.1 | 6.5 | 0.727 |
| -1.682 | 35.0 | 2.0 | 0.200 |

1.3 肌原纤维乳糖蛋白溶解性的测定

蛋白质含量用双缩脲法测定^[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 mol/L NaCl 溶液中,使蛋白质最终质量浓度为 2.0 ~ 2.5 mg/mL,然后用均质乳化机 12 000 r/min 均质 1 min,4 ℃ 下在相应质量浓度的 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 g 离心 30 min。Mf 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百分比表示。

1.4 肌原纤维乳糖蛋白热稳定性的测定

参照 Fujiwara K 等的方法^[9],取反应后糖蛋白粉末溶解在 0.5 mol/L NaCl 溶液中,用 40 mmol/L Tris 缓冲液和 1 mol/L HCl 将蛋白溶液 pH 调整到 7.5,4 ℃ 透析 16 h,4 ℃ 15 000 g 离心 30 min。取上清液 63 ℃ 水浴加热 0.5 h。将经过加热处理的蛋白质溶液放在冰水中冷却,4 ℃ 15 000 g 离心 30 min,测定上清液中蛋白质含量,肌原纤维乳糖蛋白的热稳定性用热处理后与热处理前上清液中蛋白质质量浓度的百分比表示。

1.5 肌原纤维乳糖蛋白乳化活性的测定

乳化特性是食品蛋白质的重要特性。糖基化前后 Mf 的乳化活性变化,参照 Pearce 和 Kinsella 法^[12],通过以下方法测得。蛋白质溶解在含有 40 mmol/L Tris-HCl 的 0.5 mol/L NaCl (pH7.5) 溶液中,取 2.1 mL 蛋白质溶液 (1.0 mg/mL) 与 0.7 mL 玉米油放入直径 10.5 mm 的试管中,在冰水中进行乳化,13 500 r/min,1 min,在试管底部取 0.15 mL

乳状液,用 25 的 0.1% SDS 溶液 2.85 mL 稀释。1 min 后在 500 nm 下测定稀释液的吸光值(乳化活性用在 500 nm 下的吸光值 A_{500} 表示)。

2 结果与讨论

不同温度、反应时间、乳糖与 Mf 功能特性 (Y_1

代表乳化活性, Y_2 代表热稳定性)的影响见表 2, 回归分析见表 3。

2.1 溶解性

图 1(a) 示出乳糖与 Mf 质量比为 1.5 时, 温度-反应时间对 Mf 溶解性的影响。在一定的温度范围内, Mf 的溶解性随着反应时间的延长几乎呈线性增

表 2 三因素二次正交旋转组合设计试验结果

Table 2 Response of dependent variables to the functional properties of myofibrillar protein

| 序号 | 反应温度 (X_1)/ | 反应时间 (X_2)/h | 乳糖与 Mf 质量比(X_3) | 溶解性 (Y_1)/% | 乳化活性 (Y_2) | 热稳定性 (Y_3)/% |
|----|--------------------|---------------------|------------------------|--------------------|-------------------|---------------------|
| 1 | 39.1 | 6.5 | 0.7 | 40.6 | 1.618 | 54.1 |
| 2 | 39.1 | 6.5 | 2.3 | 45.1 | 1.778 | 60.2 |
| 3 | 39.1 | 19.5 | 0.7 | 45.3 | 1.834 | 64.1 |
| 4 | 39.1 | 19.5 | 2.3 | 44.3 | 1.865 | 68.2 |
| 5 | 50.9 | 6.5 | 0.7 | 47.6 | 1.885 | 67.3 |
| 6 | 50.9 | 6.5 | 2.3 | 48.5 | 1.989 | 69.1 |
| 7 | 50.9 | 19.5 | 0.7 | 55.6 | 1.999 | 72.2 |
| 8 | 50.9 | 19.5 | 2.3 | 58.5 | 2.071 | 74.2 |
| 9 | 35.0 | 13.0 | 1.5 | 46.9 | 1.732 | 56.3 |
| 10 | 55.0 | 13.0 | 1.5 | 55.9 | 2.006 | 77.0 |
| 11 | 45.0 | 2.0 | 1.5 | 38.5 | 1.825 | 63.3 |
| 12 | 45.0 | 24.0 | 1.5 | 51.9 | 2.025 | 69.1 |
| 13 | 45.0 | 13.0 | 0.2 | 44.1 | 1.822 | 64.4 |
| 14 | 45.0 | 13.0 | 2.8 | 45.7 | 1.988 | 72.2 |
| 15 | 45.0 | 13.0 | 1.5 | 61.6 | 1.977 | 70.1 |
| 16 | 45.0 | 13.0 | 1.5 | 61.2 | 1.982 | 73.0 |
| 17 | 45.0 | 13.0 | 1.5 | 61.1 | 1.989 | 69.9 |
| 18 | 45.0 | 13.0 | 1.5 | 62.9 | 1.960 | 69.8 |
| 19 | 45.0 | 13.0 | 1.5 | 62.5 | 1.975 | 70.1 |
| 20 | 45.0 | 13.0 | 1.5 | 61.2 | 1.963 | 70.0 |
| 21 | 45.0 | 13.0 | 1.5 | 62.0 | 1.971 | 69.9 |
| 22 | 45.0 | 13.0 | 1.5 | 62.8 | 1.985 | 70.2 |
| 23 | 45.0 | 13.0 | 1.5 | 61.5 | 1.973 | 70.1 |

注:溶解性以其上清液的蛋白质质量浓度与离心前溶液的蛋白质质量浓度的百分比表示;乳化活性以 500 nm 下吸光值表示;热稳定性以热处理(63 °C, 0.5 h)后的上清液中蛋白质质量浓度与热处理前上清液中蛋白质质量浓度的百分比表示。下同。

大趋势,但当温度超过 50 °C 后,其溶解性随着反应时间的延长逐渐降低。温度与反应时间的交互作用对 Mf 溶解性影响极显著。图 1(b) 示出反应时间 13 h 时,温度-乳糖与 Mf 质量比对 Mf 溶解性的影响。当温度一定时, Mf 溶解性呈先增大后减小的趋势;乳糖与 Mf 质量比一定时,其溶解性随温度变化也呈先增大后减小趋势、在试验范围内,适当的温度

-乳糖与 Mf 质量比使溶解性出现峰值。两者的交互作用对 Mf 溶解性的影响不显著。图 1(c) 示出反应温度 45 °C 时,反应时间-乳糖与 Mf 质量比对 Mf 溶解性的影响。反应时间一定时, Mf 溶解性随着乳糖与 Mf 质量比的增大而逐渐增大;乳糖与 Mf 质量比 1.5 时,溶解性出现最大值。反应时间与乳糖与 Mf 质量比的交互作用对 Mf 溶解性的影响不显著。由

试验结果可知,通过糖基化反应改善鲢鱼肉 Mf,温度和反应时间对 Mf 溶解性的影响比乳糖与 Mf 质量比对 Mf 的影响大;因此在操作的过程中要注意对温度和反应时间的控制。

表 3 二次正交旋转组合设计回归系数的分析

Table 3 Regression coefficients and analysis of variance of the second order polynomials for two response variables

| 回归系数 | 溶解性 (Y_1)/ % | 乳化活性 (Y_2) | 热稳定性 (Y_3)/ % |
|----------|---------------------|-------------------|----------------------|
| 常数相 | | | |
| b_0 | - 180.530 | - 1.790 0 | - 98.47 |
| 线性系数 | | | |
| b_1 | 8.430 ** | 0.120 0 ** | 5.15 ** |
| b_2 | 1.930 ** | 0.040 0 ** | 2.62 ** |
| b_3 | 29.830 | 0.270 0 ** | 15.31 ** |
| 二次相系数 | | | |
| b_{11} | - 0.090 ** | - 0.001 0 ** | - 0.04 ** |
| b_{22} | - 0.130 ** | - 0.000 5 ** | - 0.04 ** |
| b_{33} | - 9.360 ** | - 0.050 0 ** | - 1.44 * |
| 因素间交互系数 | | | |
| b_{12} | 0.050 ** | - 0.000 3 | - 0.03 |
| b_{13} | 0.008 | - 0.000 4 | - 0.17 |
| b_{23} | - 0.090 | - 0.004 0 * | - 0.04 |
| R^2 | 0.98 | 0.98 | 0.95 |

注: *表示差异显著($P < 0.05$), **表示差异极显著($P < 0.01$)。各相应值与各因素的回归方程为:

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^3 b_i X_i + \sum_{i=1}^3 b_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j} b_{ij} X_i X_j$$

2.2 乳化活性

乳糖与 Mf 质量比为 1.5 时,温度-反应时间对 Mf 乳化活性的影响见图 1(d)。当温度较高时,Mf-lactose 的乳化活性随着反应时间的增大而逐渐增大,但当反应时间达到一定值后,又随温度的增高而略有下降,但仍保持在较高水平。当反应时间较短时,Mf-lactose 的乳化活性随着温度的增高而逐渐增大;反应时间较长时,Mf-lactose 的乳化活性随着反应温度的增大而逐渐增大,当反应时间增大到一定值后,又略有降低。当二者的编码值水平都在 0.84 附近时,乳化活性处于最大值。图 1(e) 示出反应时间 13 h 时,温度-乳糖与 Mf 质量比对 Mf 乳化活性的影响。当温度一定时,随着乳糖与 Mf 质量比的

增大,Mf 乳化活性逐渐增大;但温度达到一定值时,随着乳糖与 Mf 质量比的增大,其乳化活性有下降趋势,但最终保持较高水平,即当温度达到较高值时,乳糖与 Mf 质量比对 Mf 乳化活性的影响较小。当乳糖与 Mf 质量比一定时,随着反应时间的延长,Mf 乳化活性逐渐增大;同样,当乳糖与 Mf 质量比达到一定值时,Mf 乳化活性达到最高值后,又随着反应时间的延长而有些许降低。图 1(f) 为温度 45 时,反应时间-乳糖与 Mf 质量比对 Mf 乳化活性的影响。当反应时间较短时,乳糖与 Mf 质量比几乎与 Mf 乳化活性呈线性增大,但当反应时间较长时,乳糖与 Mf 质量比 Mf 对乳化活性的影响不明显,始终保持较高水平。当乳糖与 Mf 质量比一定时,Mf 乳化活性随着反应时间的延长而增大,但当乳糖与 Mf 质量比超过 2.15 时,其乳化活性基本维持较高水平,反应时间对其影响不大。这 3 个因素的交互作用中,反应时间-乳糖与 Mf 质量比的交互作用对 Mf 乳化活性的影响显著,其他交互作用对其影响均不显著。

2.3 热稳定性

由图 1(g) 温度-反应时间对 Mf 热稳定性的影响可知,乳糖与 Mf 质量比为 1.5 时,当温度一定时,Mf 的热稳定性随着反应时间的延长而增大,但当温度超过 45 后,随着时间的延长,其热稳定性又呈下降趋势,但趋势不明显。当反应时间一定时,Mf 的热稳定性随着温度的升高几乎呈线性增大趋势。由图 1(h) 温度-乳糖与 Mf 质量比对 Mf 热稳定性的影响可知,反应时间为 13 h 时,当温度一定时,Mf 的热稳定性随着乳糖与 Mf 质量比的增大而逐渐增大,但是在乳糖与 Mf 质量比为大于 1.5 以后,出现微小下降趋势。当乳糖与 Mf 质量比一定时,Mf 的热稳定性随着温度的升高而逐渐增大,并在 55 时出现最大值。图 1(i) 为当温度为 45 时,反应时间-乳糖与 Mf 质量比对 Mf 热稳定性的影响。当反应时间一定时,Mf 的热稳定性随着乳糖与 Mf 质量比的增大而逐渐增大,并在乳糖与 Mf 质量比为 1.5 处出现最大值,当其大于 1.5 时,Mf 的热稳定性没有明显变化,仍保持较高的水平。当乳糖与 Mf 质量比一定时,随着反应时间的延长,Mf 的热稳定性逐渐增大,并在 13 h 处出现最大值,随后略有下降,但仍保持较高水平。这 3 个因素中,两两的交互作用对 Mf 热稳定性的影响均不显著。未糖基化的 Mf 热稳定性很低,经过 63 0.5 h 加热后,

仅 12 % ,而糖基化反应后的肌原纤维乳糖蛋白经过热处理后,热稳定性可达到 75 %。由此可见,糖基化反应可以有效改善 Mf 的热稳定性。

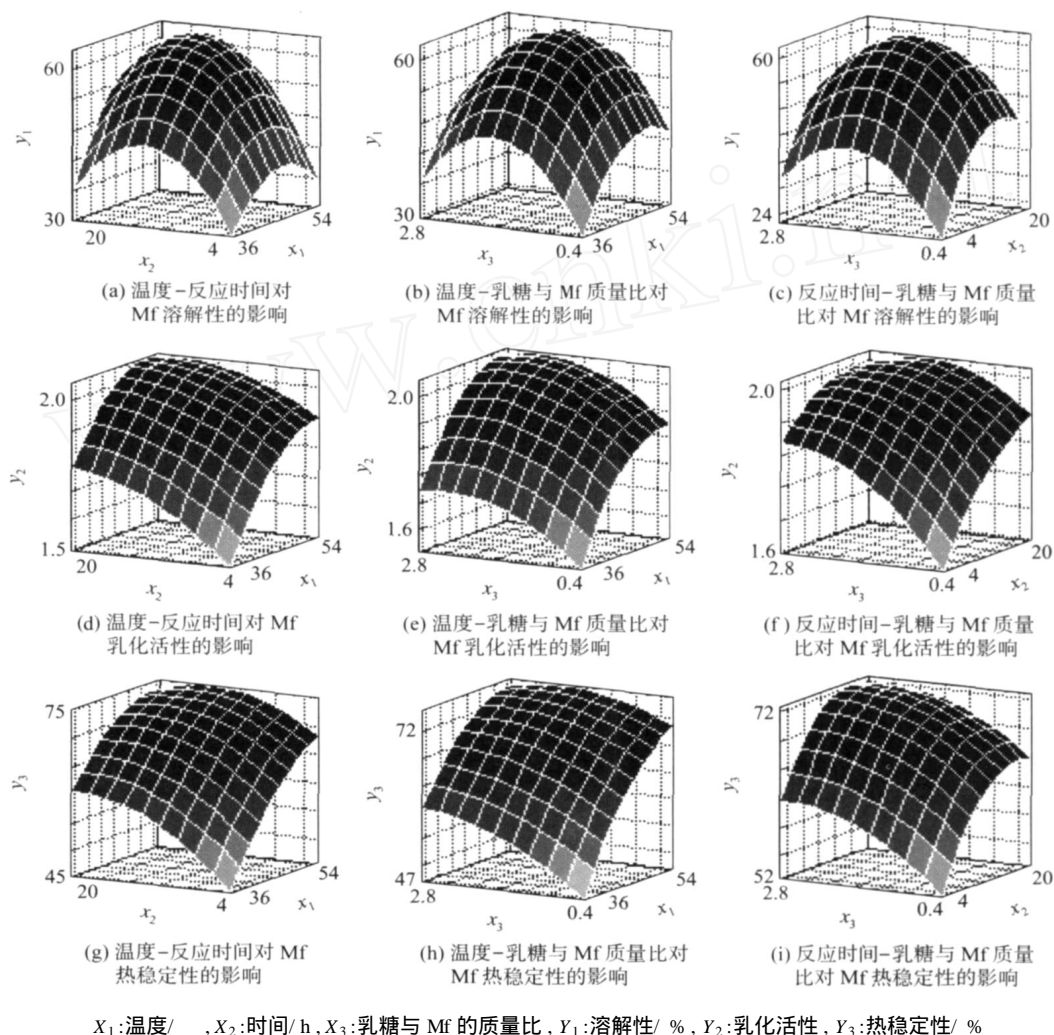


图 1 反应条件对 Mf 功能特性的影响

Fig. 1 Effects of temperature, reaction time and weight ratio of lactose to Mf on functional properties of Mf

3 结 论

1) 乳糖与 Mf 通过糖基化反应可以有效改善鲢鱼肌肉原纤维蛋白的功能特性。

2) 改善 Mf 溶解性的最优条件是温度 50°C , 反应时间 18.5 h, 乳糖与 Mf 质量比 1.5, 预测此条件下 Mf 溶解性为 62.7 %。

3) 改善 Mf 乳化活性的最优条件是温度 50°C , 反应时间 18.5 h, 乳糖与 Mf 质量比 2.15, 预测此条件下 Mf 乳化活性为 2.059。

4) 改善 Mf 热稳定性的最优条件是温度 55°C , 反应时间 13 h, 乳糖与 Mf 质量比 1.5, 预测此条件下 Mf 热稳定性为 75 %。

下 Mf 热稳定性为 75 %。

5) 不同的功能特性需要的反应条件不同, 希望在以后的研究过程中可以找出制备具有各个特性最佳值的肌原纤维乳糖蛋白的最优反应条件。

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 eoglycoprotein 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] Pearce K N, Kinsella J E. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique [J]. *J Agric Food Chem*, 1978, 26:716-723