

# 碱性蛋白酶对鲢肌原纤维蛋白凝胶特性的影响

仪淑敏 谿 艳 李睿智 张智铭 刘 瑞 李学鹏 励建荣

渤海大学食品科学与工程学院/生鲜农产品贮藏加工及安全控制技术国家地方联合工程研究中心/  
国家鱼糜及鱼糜制品加工技术研发分中心, 锦州 121013

**摘要** 以鲢肌原纤维蛋白为研究对象,通过测定碱性蛋白酶处理前后鲢肌原纤维的降解率、巯基含量、表面疏水性、Ca<sup>2+</sup>-ATPase活性、凝胶特性等的变化,研究在不同的贮藏条件下(25℃和4℃)碱性蛋白酶对鲢鱼肉中肌原纤维蛋白的降解情况及凝胶特性的影响。结果发现,经过碱性蛋白酶处理后,在不同温度下,鲢肌原纤维蛋白的降解率均随着时间的延长而增大;表面疏水性、Ca<sup>2+</sup>-ATPase活性、总巯基及活性巯基含量均先增高后降低;在反应温度25℃、酶解时间2.0h以及反应温度4℃、酶解时间2.5h处理条件下,鲢肌原纤维蛋白的表面疏水性、总巯基及活性巯基含量均达到最高值;在反应温度25℃和4℃下,酶解时间0.5h时, Ca<sup>2+</sup>-ATPase活性达到最高值;蛋白凝胶的持水力与凝胶强度均呈下降趋势;凝胶白度值先降低后增加;扫描电镜结果显示,碱性蛋白酶对鲢肌原纤维蛋白凝胶网络结构产生了一定的破坏作用。

**关键词** 鲢; 肌原纤维蛋白; 碱性蛋白酶; 凝胶性质; 巯基含量; 表面疏水性; Ca<sup>2+</sup>-ATPase活性

**中图分类号** TS 254.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2019)06-0018-07

鲢是“四大家鱼”之一,2018年鲢年产量385.89万t<sup>[1]</sup>。鲢鱼肉中蛋白质含量较高,各类氨基酸较为均衡,尤其是必需氨基酸<sup>[2]</sup>。肌原纤维蛋白是鲢鱼肌肉中的主要蛋白质,在鱼糜的加工贮存中起到关键作用,如常见的鱼丸等加工产品主要是由肌原纤维蛋白组成<sup>[3]</sup>。但由鲢制成的鱼糜制品贮藏期较短。Mori<sup>[4]</sup>和Coton等<sup>[5]</sup>认为鱼糜制品在贮藏中期将会出现芽孢杆菌,并推测可能是这些芽孢杆菌使鱼糜制品的食用品质下降。同时也会造成鱼糜制品巨大的经济损失<sup>[6]</sup>。

地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)是一种常见的革兰氏阳性细菌,主要生长在泥土和腐败有机物中,最佳生长温度为(35±1)℃,最佳生长pH为7.0<sup>[7]</sup>。地衣芽孢杆菌也是鱼糜制品的优势腐败菌之一<sup>[8]</sup>,可生成丰富的胞外酶系,如碱性蛋白酶等,能够有效分解各种大分子物质。碱性蛋白酶在碱性条件下能够水解蛋白质肽键,可催化蛋白质水解为氨基酸<sup>[9]</sup>。微生物产生的酶类分解食品中蛋白质等组分是引起食品腐败的原因之一,将产生具有挥发性气味的氨、二甲胺、硫化氢等产物<sup>[10-11]</sup>,造成

在贮藏过程中鱼糜制品的品质逐渐降低。

本试验以鲢肌原纤维蛋白为研究对象,探讨在不同的贮藏条件下,地衣芽孢杆菌生成的碱性蛋白酶对鲢鱼肉中肌原纤维蛋白的降解情况,根据鲢肌原纤维蛋白凝胶特性的变化来分析鲢肌原纤维蛋白及其鱼糜制品在贮藏过程中的变化,旨在为提高鲢及其制品在贮藏期的品质提供一定的参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*),购于锦州市林西路水产市场;碱性蛋白酶(20万U/g),购于江苏锐阳生物技术有限公司;三羟甲基氨基甲烷(Tris)、苯甲基磺酰氟(PMSF)、乙二胺四乙酸二钠(EDTA)、2-硝基苯甲酸(DTNB)、8-苯胺-1-萘磺酸(ANS)、钼酸铵、对苯二酚、亚硫酸钠,均为国产分析纯。

### 1.2 仪器与设备

Biofuge Stratus 冷冻高速离心机,美国 Thermo Scientific 公司;MS105DU 电子天平,梅特勒-托利

收稿日期: 2019-07-09

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31571868); 中央引导地方科技发展专项(2018107005), 辽宁省重点研发计划指导计划项目(2017205004); 辽宁省自然科学基金项目(辽科发[2018]25号)

仪淑敏, 博士, 教授, 研究方向: 水产品贮藏加工与食品安全的研究. E-mail: yishumin@163.com

通信作者: 励建荣, 博士, 教授, 研究方向: 水产品贮藏加工与食品安全的研究. E-mail: lijr6491@163.com

多仪器(上海)有限公司;UV2550 紫外可见分光光度计,日本岛津公司;970CRT 荧光分光光度计,上海精密科学仪器有限公司制造;TA.XT.PLUS 质构仪,英国 Stable Micro System 公司;CR-400 色彩色差计,日本 Minolta 公司;E-1045 镀金仪,日本日立公司;S4800 发射扫描电镜,日本 Minolta 公司;DF-101S 恒温加热磁力搅拌器,巩义市予华仪器有限责任公司。

### 1.3 试验方法

1) 鲢肌原纤维蛋白提取。参考周凯等<sup>[12]</sup>的方法。取鱼肉 20 g 并绞碎,加入 5 倍体积的 10 mmol/L 的 Tris-HCl(pH 7.2),高速均质 2 min,每隔 30 s,停 30 s。离心 15 min(4 °C, 5 000 r/min),取沉淀,将 3 倍体积的 Tris-HCl(含 0.6 mol/L NaCl, 10 mmol/L Tris, pH 7.2)缓冲液加入沉淀中,高速均质后离心 15 min(4 °C, 4 500 r/min),双缩脲法测定其浓度。取上清液贮藏在 -80 °C 冰箱中备用。

2) 碱性蛋白酶水解处理。将干酶粉用 pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液稀释至 0.01 g/mL。取 20 mL 肌原纤维蛋白溶液,添加相当于蛋白质质量 0.1% 的碱性蛋白酶溶液,置于磁力搅拌器上,分别在 4 °C 和 25 °C 下反应 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、4.0、5.0 h。反应结束后立即加入适量 50 mmol/L PMSF 抑制酶活。

3) 肌原纤维蛋白浓度的测定。采用双缩脲法测定蛋白质浓度,以牛血清白蛋白(BSA)作为标准蛋白,制作标准曲线。单位时间内肌原纤维蛋白含量的变化量的百分数即为降解率。

4) 总巯基与活性巯基含量的测定。参考 Simplicio 等<sup>[13]</sup>的方法并略有修改。用 10 mmol/L 的 Tris-HCl(含 0.6 mol/L NaCl, pH 7.2)缓冲液将蛋白稀释至 5 mg/mL。向试管中加入 1 mL 稀释过的蛋白溶液,再加入 9 mL 50 mmol/L 磷酸缓冲液(其中包含 0.6 mol/L KCl, 10 mmol/L EDTA, 8 mol/L 尿素, pH 7.0)。混合均匀后,取 5 mL 上述混合液加入 0.5 mL DTNB(0.1%, 用 50 mmol/L pH 7.0 的磷酸缓冲液配制),然后将混合液在 25 °C 水浴 25 min,在 412 nm 下测定吸光度,即为总巯基的吸光度,以空白组蛋白液为对照。同时,在不加入尿素的情况下进行活性巯基的测定,将混合液放置于 4 °C 反应 1 h,然后在 412 nm 处测定其吸光度。

根据所得的总巯基和活性巯基的吸光度,按照公式(1),计算总巯基及活性巯基含量,单位是 nmol/mg。

$$\text{巯基含量} = \frac{A \times V_1}{\epsilon \times b \times V_2 \times C} \times 10^9 \quad (1)$$

式(1)中:A 为吸光值;V<sub>1</sub> 为磷酸盐缓冲液体积,0.005 L;ε 为 13 600 L/(mol · cm);b 为光程,1 cm;V<sub>2</sub> 为取样蛋白质的体积,mL;C 为取样蛋白质的质量浓度,mg/mL。

5) 表面疏水性的测定。依据 Kato 等<sup>[14]</sup>的方法,采取 ANS 荧光探针法测定表面疏水性。将蛋白溶液用 20 mmol/L 含 0.6 mol/L KCl 的磷酸盐缓冲液(pH 7.0)稀释至 1 mg/mL,加入 25 μL 8 mmol/L 的 ANS(用 20 mmol/L, pH 7.0 的磷酸盐缓冲液配制)后混合均匀,置于暗处反应 10 min,而后用荧光分光光度计测定其荧光强度。测定条件:激发波长 374 nm,狭缝 5 nm,灵敏度 2,扫描范围 250~500 nm。

6) Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性的测定。参考 Thanonkaew 等<sup>[15]</sup>的方法,并稍作修改。Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性表示为 μmol/(mg · h)。计算公式如下:

$$\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase 活性} = \frac{\text{生成无机磷量}}{\text{反应时间} \times \text{肌原纤维蛋白量}} \quad (2)$$

7) 凝胶制备。将未处理的肌原纤维蛋白置于超纯水中透析,4 °C 下静置 24 h 后,5 000 r/min,4 °C 离心 10 min,取沉淀,冷冻干燥成粉备用。向 10 mL 小烧杯中添加肌原纤维蛋白粉,根据降解率将酶处理后的蛋白溶液质量浓度控制在 120 mg/mL,加入 10 mL 的磷酸盐缓冲液(20 mmol/L, pH 7.0),加入质量分数 2.5% 的 NaCl 溶液,按本文“1.3 2)”酶解的方法添加酶,搅拌均匀后分别置于 4 °C 和 25 °C 环境中反应,反应结束后,90 °C 水浴 30 min,于 4 °C 冷藏过夜后进行凝胶性质测定,每次测定前需将蛋白凝胶平衡至室温。

8) 持水性的测定。将蛋白凝胶切成厚度为 5 mm 的薄片,准确称质量(m<sub>1</sub>)后,用 3 层滤纸将样品包裹,离心 15 min(6 465 r/min, 4 °C),取出样品并再次称量即为 m<sub>2</sub>。持水性的计算公式如下:

$$\text{持水性} = \frac{m_2}{m_1} \times 100\% \quad (3)$$

9) 凝胶强度的测定。利用 TA.XT.PLUS (SMS)型质构仪 P/5S 探头测定凝胶强度。将样品切成直径和高度均为 20 mm 的圆柱体,测试条件:

测试速度 1.0 mm/s, 下压距离 15.0 mm, 触发力 10 g。凝胶强度计算公式见公式 (4), 单位为  $\text{g} \cdot \text{mm}$ :

$$\text{凝胶强度} = \text{破断力} \times \text{凹陷距离} \quad (4)$$

10) 凝胶白度的测定。利用 CR-400 色差计测定凝胶白度, 得  $L^*$ 、 $a^*$  和  $b^*$  值, 每组样品平行测定 3 次。按如下公式计算白度:

$$\text{白度} = 100 - \sqrt{(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}} \quad (5)$$

11) 凝胶微观结构。参考 Oujifard 等<sup>[16]</sup> 的方法并稍作修改。将样品切成  $2 \text{ mm} \times 2 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$  薄片, 用 2.5% 戊二醛溶液 (含 0.2 mol/L, pH 7.2 磷酸盐缓冲液) 固定 24 h, 用磷酸盐缓冲液漂洗 3 次, 每次 15 min, 再用体积分数 50%、70%、90% 和 100% 的乙醇溶液依次进行脱水处理, 冷冻干燥 24 h, 离子喷金 8 min, 并进行扫描电镜观察。

#### 1.4 数据分析

所有数据为 3 次平行试验的平均值。采用 Origin9.0 绘图, SPSS 19.0 进行显著性检验, 多重比较采用 Duncan's 检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 鲢肌原纤维蛋白的降解率

从图 1 可以看出, 在不同温度下, 鲢肌原纤维蛋白的降解率均随着时间的延长而增大, 且同一时间下,  $25^\circ\text{C}$  组的降解率始终大于  $4^\circ\text{C}$  组。这可能与处理温度有关, 在达到最适温度之前, 温度越高, 酶活越大, 其分解肌原纤维蛋白的能力也就越强。同时, 酶解时间超过 3.0 h 后, 不同温度下, 碱性蛋白酶对肌原纤维蛋白的降解速率均逐渐变缓, 这可能是随着酶解时间的延长, 可供碱性蛋白酶分解的底物逐渐减少。

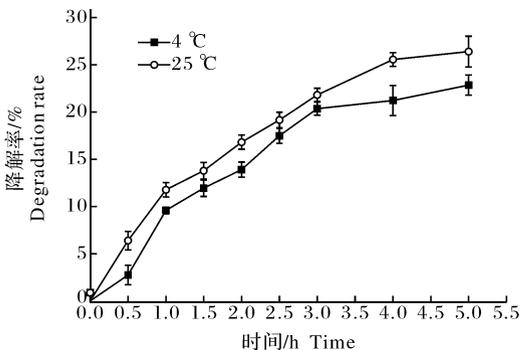


图 1 鲢肌原纤维蛋白的降解率

Fig.1 The degradation rate for myofibrillar protein of silver carp

### 2.2 活性巯基与总巯基

巯基含量的变化可以用来反映肌肉蛋白质变性的程度。如图 2 所示, 在不同温度下, 活性巯基含量均出现先上升后下降的趋势, 不同之处在于,  $25^\circ\text{C}$  处理下, 2.0 h 活性巯基含量达最高值, 较  $4^\circ\text{C}$  早出现 0.5 h。这种先升高又降低的变化趋势在很大程度上反映出, 鲢肌原纤维蛋白被碱性蛋白酶分解是一个蛋白质分子结构变化的过程: 鲢肌原纤维蛋白首先在碱性蛋白酶的作用下, 蛋白质聚合体打开, 二硫键被打断, 进而有利于蛋白质分子被逐渐分解, 活性巯基不断暴露, 其含量上升; 而后随着贮藏时间的延长, 蛋白质发生降解, 分子构象也随之变化, 暴露的活性巯基又会被破坏或氧化成二硫键, 从而导致活性巯基含量的下降<sup>[17]</sup>。同时较高的温度会使酶活性增强, 对鲢肌原纤维蛋白的降解作用也会加强。

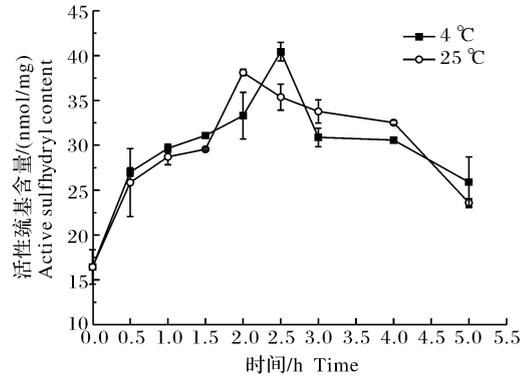


图 2 鲢肌原纤维蛋白活性巯基含量变化

Fig.2 The changes of active sulfhydryl content for myofibrillar protein of silver carp

如图 3 所示, 鲢肌原纤维蛋白在不同温度下总巯基含量的变化类似于活性巯基的变化, 同样,  $25^\circ\text{C}$  下 2.0 h 总巯基含量达最高值, 较  $4^\circ\text{C}$  早出现 0.5 h。巯基氧化形成二硫键会使总巯基含量下降<sup>[18]</sup>。贮藏初期主要是表面的活性巯基逐步被氧化为二硫键, 贮藏过程中因鱼肉肌原纤维蛋白变性、分解, 蛋白质三级结构发生变化, 隐藏的巯基逐步暴露<sup>[18]</sup>, 导致总巯基含量上升, 而随着贮藏时间延长, 巯基逐渐氧化成二硫键, 最终导致总巯基含量随之下降。

### 2.3 表面疏水性

表面疏水性是评价蛋白质变性、聚集程度的指标之一。如图 4 所示, 在不同处理温度下, 鲢肌原纤维蛋白的表面疏水性呈现先上升后下降的趋势。二者区别在于,  $25^\circ\text{C}$  下, 表面疏水性的最高值较早出

现,为2.0 h。表面疏水性急剧增加,可能是因为蛋白质的变性和聚集体的打开。肌球蛋白是肌原纤维蛋白中重要的功能性蛋白。Benjakul等<sup>[19]</sup>发现太平洋鲑冰藏2 d后,其肌球蛋白的表面疏水性增加2倍多。肌球蛋白分子中存在一个包含疏水性氨基酸的疏水内核,当肌球蛋白的结构被破坏后,肌球蛋白展开,疏水内核暴露出来,引起蛋白质的展开和疏水性脂肪族及芳香族氨基酸的暴露,疏水性上升;随后,可能由于发生大分子蛋白质的降解以及小分子蛋白质的重折叠,疏水性指数又有所降低<sup>[20-21]</sup>。在贮藏的过程中,鲢肌原纤维蛋白的表面疏水性的变化趋势与巯基和活性巯基的变化相一致。

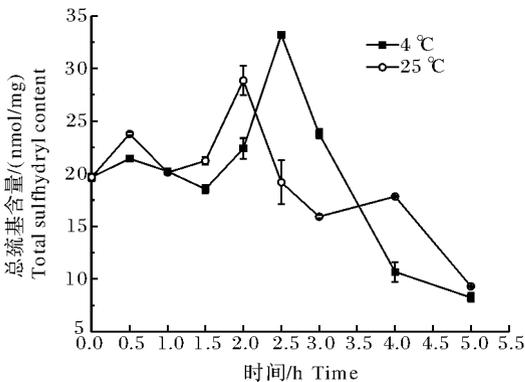


图3 鲢肌原纤维蛋白总巯基含量变化

Fig.3 The changes of total sulfhydryl content for myofibrillar protein of silver carp

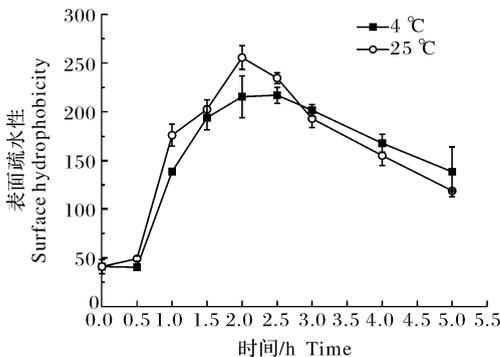


图4 鲢肌原纤维蛋白表面疏水性变化

Fig.4 The changes of surface hydrophobicity for myofibrillar protein of silver carp

## 2.4 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性

肌球蛋白是组成肌原纤维蛋白的主要蛋白质。肌球蛋白的球状头部是Ca<sup>2+</sup>-ATPase的活性中心,Ca<sup>2+</sup>-ATPase活性是评价肌球蛋白分子完整性的良好指标<sup>[22-23]</sup>。如图5所示,在降解初期,不同温度下肌原纤维蛋白Ca<sup>2+</sup>-ATPase活性均出现先上升后下降的趋势。此外,闫利国等<sup>[24]</sup>研究发现冷冻贮

藏过程中,耗牛肉中Ca<sup>2+</sup>-ATPase活性也出现先上升后下降的趋势。降解初期,Ca<sup>2+</sup>-ATPase活性升高可能与此过程中酶的分解作用相关,也就是说,这时肌原纤维中肌动蛋白和肌球蛋白的结合可能是较强的,在酶的作用下,蛋白质的空间构象发生了轻微的变化,使ATPase的活性部位更加突出,从而致使Ca<sup>2+</sup>-ATPase活性出现上升<sup>[25]</sup>。0.5 h后,Ca<sup>2+</sup>-ATPase活性呈现下降趋势,这可能是由于随着酶解程度的加深,肌球蛋白分子被破坏导致,此外,在2.5 h后Ca<sup>2+</sup>-ATPase活性的变化趋势与巯基和活性巯基含量的变化趋势相一致,这可能是由于蛋白质之间相互作用导致蛋白质分子重排,而分子聚合是由肌球蛋白活性部位的巯基氧化成为二硫键导致的,这都将引起肌球蛋白Ca<sup>2+</sup>-ATPase活性下降<sup>[26]</sup>。Ca<sup>2+</sup>-ATPase活性下降与蛋白降解程度相关,其与蛋白降解率的变化呈负相关。

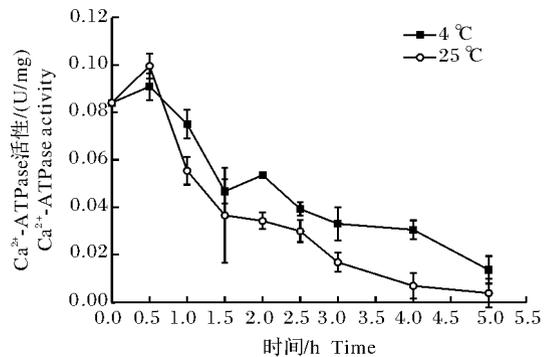


图5 鲢肌原纤维蛋白Ca<sup>2+</sup>-ATPase活性变化

Fig.5 The changes of Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity for myofibrillar protein of silver carp

## 2.5 凝胶持水力

持水力能够反映凝胶对水分的保持能力,持水力越大,凝胶内部水分越易保持,当凝胶受到外力挤压时失水率越小。如图6所示,随着降解的进行,鲢肌原纤维蛋白凝胶的持水力显著降低( $P < 0.05$ ),且温度越高,凝胶持水力越低。说明随着碱性蛋白酶的作用,蛋白降解率变大,肌原纤维蛋白凝胶的结构被破坏的程度加深,其对水的束缚力逐渐降低,这与前面降解率变化呈负相关。

## 2.6 凝胶强度

凝胶强度是衡量凝胶特性的一个重要指标。如图7所示,在碱性蛋白酶处理过程中,鲢肌原纤维蛋白的凝胶强度适中,呈现显著下降趋势( $P < 0.05$ ),且同一时间,温度越高,凝胶强度越低。凝胶强度与蛋白凝胶结构有着密切的关系<sup>[27]</sup>。这可能是由于

在碱性蛋白酶处理时,肌原纤维蛋白结构被破坏,分子间作用力和氢键的作用被减弱,从而导致其形成的三维网状结构不致密,进而导致凝胶强度下降。凝胶强度值越高,肌原纤维中的主要蛋白肌球蛋白的完整性越好, $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性越大<sup>[23]</sup>,蛋白空间网络结构越好,对水的保留能力越强,反之越差,这与  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性和持水力的变化相一致。

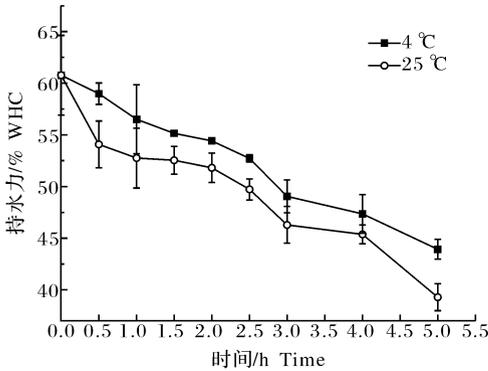


图 6 鲢肌原纤维蛋白凝胶持水力的变化

Fig.6 The changes of water-holding capacity(WHC) for myofibrillar protein gel of silver carp

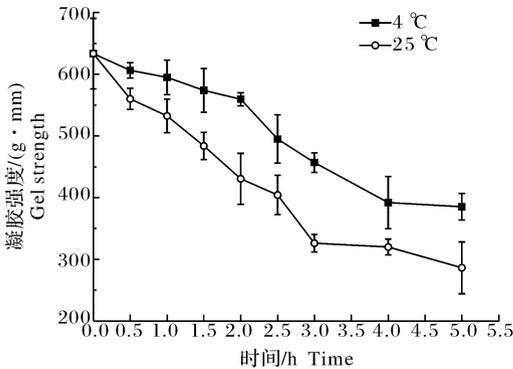


图 7 鲢肌原纤维蛋白凝胶强度变化

Fig.7 The change of gel strengths for myofibrillar protein gel of silver carp

## 2.7 凝胶白度

白度可以反映蛋白质变性、聚合程度以及其表面的光学特性<sup>[28]</sup>。同时,白度与凝胶网络结构的致密程度有关<sup>[29]</sup>。如图 8 所示,在不同温度下,碱性蛋白酶处理后,鲢肌原纤维蛋白的白度呈现先下降后上升的趋势,不同之处在于,4 °C 在处理 2.5 h 处出现拐点,25 °C 在处理 2.0 h 处出现拐点,且 25 °C 下,肌原纤维蛋白凝胶的白度值较 4 °C 稍高一些。这可能是由于在降解初期,碱性蛋白酶对肌原纤维蛋白结构的破坏占据主要地位,肌原纤维蛋白的聚

合程度降低,进而白度降低;而当降解过程进行到一定程度后,由于肌原纤维蛋白结构破坏程度的加深,其对水的束缚力进一步减弱,此时,逃逸至凝胶表面的水分占据主要地位,导致白度上升。

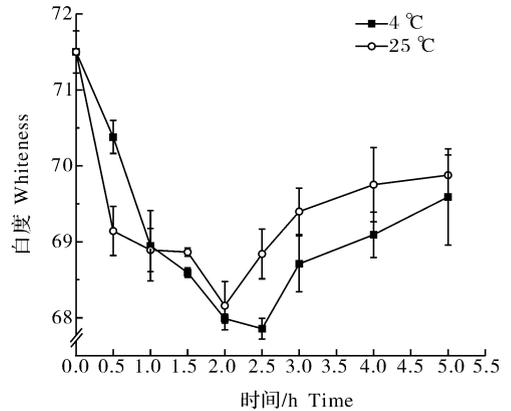


图 8 鲢肌原纤维蛋白凝胶白度变化

Fig.8 The changes of whiteness for myofibrillar protein gel of silver carp

## 2.8 凝胶的微观结构

有序且致密的凝胶网络结构有利于游离水在网络中的保留,蛋白质、水分等物质不易流出,从而使凝胶的持水性和弹性提高。凝胶网络的致密程度和孔径大小与凝胶强度、持水力呈一定的相关性。从图 9 可以看出,经碱性蛋白酶处理,蛋白降解率不断加大,原本平整、均匀、有序的凝胶结构被不断破坏,凝胶的微观结构逐渐变得粗糙,出现较大的空洞乃至断裂。凝胶三维网络结构不断被破坏,导致凝胶性质发生改变,这与持水力和凝胶强度的变化相一致。

## 3 讨论

在 4 °C 和 25 °C 条件下,随着贮藏时间的延长,地衣芽胞杆菌生成的碱性蛋白酶逐渐降解鲢肌原纤维蛋白,在达到最适温度之前,温度越高,酶活越大,其分解肌原纤维蛋白的能力也就越强,降解率逐渐变大, $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性整体呈下降的趋势,活性巯基和二巯基的含量变化均是先升高后降低,且分别在 4 °C、2.0 h 和 25 °C、2.5 h 时达到最大值,巯基含量的变化将影响蛋白结构的变化以及空间结构的稳定性。由于碱性蛋白酶的降解作用,鲢肌原纤维蛋白的构象逐渐被破坏,贮藏初期因蛋白质降解,二巯键被打断,导致其含量减少而活性巯基的含量增多;随着贮藏时间的延长,活性巯基被氧化成二巯键而导致含量也减少。王瑛等<sup>[30]</sup>研究表明巯基含量的

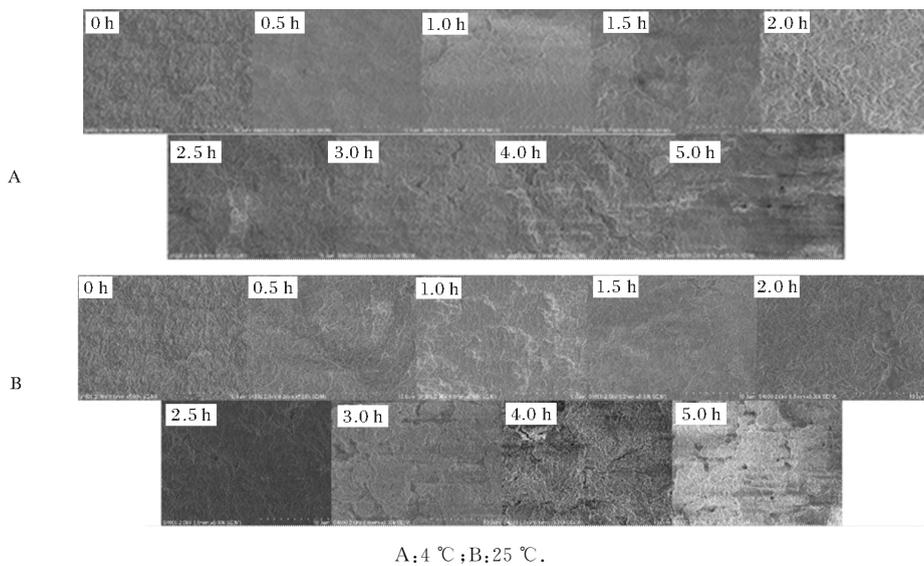


图 9 鲢肌原纤维蛋白凝胶微观结构的变化(5 000×)

Fig.9 The changes of microstructure for myofibrillar gel protein of silver carp (5 000×)

变化主要是因肌球蛋白降解,蛋白质空间结构发生改变,使埋藏在分子内部的巯基暴露出来被氧化,导致其含量变化。蛋白的构象被破坏将会使肌原纤维蛋白的持水性和凝胶强度值逐渐降低,凝胶结构被蛋白酶逐渐破坏,肌原纤维蛋白形成的网络结构逐步断裂。而白度值反映了鱼糜凝胶表面光反射能量的大小,而能量的大小又取决于凝胶蛋白网络的致密程度<sup>[31]</sup>,凝胶蛋白网络的致密程度又与巯基含量相关,巯基含量越多,表明蛋白的网络结构越松散,在贮藏过程中,白度值的变化与总巯基和活性巯基含量的变化呈负相关。本试验初步探究了碱性蛋白酶对肌原纤维蛋白的降解作用,为今后研究水产品中微生物的腐败机制提供了参考。

### 参 考 文 献

[1] 农业农村部渔业渔政管理局.中国渔业统计年鉴[M].北京:中国农业出版社,2019.

[2] 王邦国.白鲢鱼肌肉脂肪氧合酶构象和酶学特性及其脂肪氧化调控研究[D].合肥:合肥工业大学,2017.

[3] 雷雨.猪血浆蛋白改善鲢鱼鱼糜品质及机理的研究[D].无锡:江南大学,2014:1-5.

[4] MORI K.Studies on the spoilage of fish jelly products- I : softening spoilage of film packaged kamaboko due to *Bacillus licheniformis*[J].Bulletin of the Japanese society for the science of fish,1973,39(10):1063-1069.

[5] COTON M,DENIS C,CADOT P,et al. Biodiversity and characterization of aerobic spore-forming bacteria in surimi seafood products[J]. Food microbiology,2011,28(2):252-260.

[6] STAHL V,NDOYE F T,JABRI M E,et al. Safety and quality assessment of ready-to-eat pork products in the cold chain[J].

Journal of food engineering,2015,148:43-52.

[7] 杨阳,张付云,苍桂璐,等.地衣芽孢杆菌生物活性物质应用研究进展[J].生物技术进展,2013,3(1):22-26.

[8] 仪淑敏,王雪琦,励建荣,等.鱼糜制品细菌菌群多样性的PCR-DGGE方法建立[J].中国食品学报,2014(7):192-198.

[9] SHARMA K M,KUMAR R,PANWAR S,et al. Microbial alkaline proteases: optimization of production parameters and their properties[J]. Journal of genetic engineering and biotechnology,2017,15(1):115-126.

[10] GIUSEPPINA S,UTTER D R,ANDY V,et al. A few pseudomonas oligotypes dominate in the meat and dairy processing environment[J/OL]. Frontiers in microbiology,2017,8:00264 [2019-07-09].https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00264.

[11] TAIT E,PERRY J D,STANFORTH S P,et al. Identification of volatile organic compounds produced by bacteria using HS-SPME-GC-MS[J]. Journal of chromatographic science,2014,52(4):363-373.

[12] 周凯,梁宏燕,王祺,等.丙烯醛氧化对大黄鱼肌肉组织和肌原纤维蛋白结构性质的影响[J].现代食品科技,2014,30(10):1-7.

[13] DI SIMPLICIO P,CHEESEMAN K H,SLATER T F. The reactivity of the Sh group of bovine serum albumin with free radicals[J]. Free radical research,1991,14(4):253-262.

[14] KATO A,NAKAI S. Hydrophobicity determined by a fluorescence probe methods and its correlation with surface properties of proteins[J]. Biochimica et biophysica acta,1980,624(1):13-20.

[15] THANONKAEW A,BENJAKULI S,VISESSANGUAN W,et al. The effect of metal ions on lipid oxidation, colour and physicochemical properties of cuttlefish (*Sepia pharaonis*) subjected to multiple freeze-thaw cycles[J]. Food chemistry,2006,95(4):591-599.

[16] OUJIFARD A,BENJAKULI S,AHMAD M,et al. Effect of

- bambara groundnut protein isolate on autolysis and gel properties of surimi from threadfin bream (*Nemipterus bleekeri*)[J]. LWT-food science and technology, 2012, 47(2): 261-266.
- [17] 胡佳慧, 熊光权, 乔宇, 等. 微冻贮藏过程中能量代谢酶活性和蛋白质氧化降解对鲈鱼质构特性的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(23): 227-234.
- [18] 史策, 罗永康, 宋永令, 等. 鲢鱼鱼肉冷藏过程中理化性质的变化[J]. 食品科技, 2011, 36(10): 116-119.
- [19] BENJAKUL S, SEYMOUR T A, MORRISSEY M T, et al. Physicochemical changes in Pacific whiting muscle proteins during iced storage [J]. Journal of food science, 1997, 62(4): 729-733.
- [20] BETTS M J, RUSSELL R B. Amino acid properties and consequences of substitutions[M]. Bioinformatics for geneticists: a bioinformatics primer for the analysis of genetic data, 2003: 291-314.
- [21] REED Z H. Immunological and physicochemical characterization of fish myosins[D]. Corvallis, USA: Oregon State University, 2010: 28-29.
- [22] BENJAKUL S, VISESSANGUAN W C, TANAKA M. Comparative study on physicochemical changes of muscle proteins from some tropical fish during frozen storage[J]. Food research international, 2003, 36(8): 787-795.
- [23] LANDERIA-FERNANDEZ A M, CASTILHO P C, BLOCK B A. Thermal dependence of cardiac SR  $Ca^{2+}$ -ATPase from fish and mammals[J]. Journal of thermal biology, 2012, 37(3): 217-223.
- [24] 闫利国, 唐善虎, 王柳, 等. 冷冻贮藏过程中氧化诱导牦牛肉肌原纤维蛋白结构的变化[J]. 食品科学, 2015, 36(24): 337-342.
- [25] BENJAKUL S, VISESSANGUAN W, TUEKSUBAN J. Changes in physico-chemical properties and gel-forming ability of lizardfish (*Saurida tumbil*) during post-mortem storage in ice [J]. Food chemistry, 2003, 80(4): 535-544.
- [26] 周爱梅, 龚杰, 邢彩云, 等. 罗非鱼与鲮鱼鱼糜蛋白在冻藏中的生化及凝胶特性变化[J]. 华南农业大学学报, 2005, 26(3): 103-107.
- [27] 迟玉杰. 蛋清蛋白质的糖基化产物结构与凝胶强度关系的探究[J]. 食品科学, 2009, 30(21): 485-488.
- [28] BAJOVIC B, BOLUMAR T, HEINZ V. Quality considerations with high pressure processing of fresh and value added meat products[J]. Meat science, 2012, 92(3): 280-289.
- [29] KANG G H, YANG H S, JEONG J Y, et al. Gelcolor and texture of surimi-likepork from muscles at different rigor states post-mortem[J]. Asian Australasian journal of animal sciences, 2007, 20(7): 1127-1134.
- [30] 王瑛, 周春霞, 洪鹏志, 等. 碎冰冷藏对罗非鱼肌原纤维蛋白理化特性的影响[J]. 食品工业科技, 2013, 34(10): 120-123.
- [31] 谢青青, 杨宏, 王玉栋, 等. 谷氨酸钠和乙醇对鱼糜制品冻融稳定性的影响[J]. 华中农业大学学报, 2019, 38(5): 114-121.

## Effect of alkali protease on gel properties of sliver carp myofibrillar protein

YI Shumin HUO Yan LI Ruizhi ZHANG Zhiming LIU Rui LI Xuepeng LI Jianrong

College of Food Science and Technology, Bohai University/National & Local Joint Engineering Research Center of Storage, Processing and Safety Control Technology for Fresh Agricultural and Aquatic Products/National R&D Branch Center of Surimi and Surimi Products Processing, Jinzhou 121013, China

**Abstract** Myofibrillar proteins were prepared and stored at 25 °C and 4 °C. The effects of alkaline protease on the degradation and gel properties of myofibrillar protein were studied using the degradation rate, sulfhydryl content, surface hydrophobicity,  $Ca^{2+}$ -ATPase activity and gel properties as indexes. For the myofibrillar proteins with alkaline protease, the degradation rate increased with prolonging storage time at different temperatures. The surface hydrophobicity,  $Ca^{2+}$ -ATPase activity, contents of total and active sulfhydryl groups increased followed by a decrease, and reached the maximum under the conditions of 25 °C and 2.0 h, or 4 °C and 2.5 h. In addition, the  $Ca^{2+}$ -ATPase activity reached the maximum at 0.5 h. As the storage time prolonged, the water-holding capacity and gel strength decreased, and the whiteness decreased followed by an increase. The SEM showed that the protease destroyed the three-dimensional network structure of the gel to an extent.

**Keywords** sliver carp; myofibrillar protein; alkali protease; gel property; sulfhydryl content; surface hydrophobicity;  $Ca^{2+}$ -ATPase activity

(责任编辑:赵琳琳)