doi:10.6041/j.issn.1000-1298.2020.09.037

不同 Ca^{2+} 浓度下猪肉肌球蛋白的热聚集体机制研究

潘　腾[1,2]　陈　星[3]　沈清武[3]　张　炎[4]　罗　洁[3]

(1.新希望六和股份有限公司,北京 100102;2.农业农村部饲料及畜禽产品质量安全控制重点实验室,北京 100102;
3.湖南农业大学食品科学技术学院,长沙 410128;4.中国农业大学食品科学与营养工程学院,北京 100083)

摘要:为探究不同 Ca^{2+} 浓度下肌球蛋白的热聚集行为,以猪背最长肌为原料,提取其肌球蛋白,加入不同浓度的氯化钙(0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.075、0.1 mol/L),通过热变性动力学分析,研究加热过程中聚集体形态结构的变化和凝胶特性,探究猪肉肌球蛋白热聚集形成机制。结果表明,氯化钙浓度由 0.01 mol/L 升至 0.1 mol/L,蛋白变性温度由 40.2、52.4℃降至 36.5、50.8℃,显著($p<0.05$)降低了肌球蛋白的热稳定性;随着温度的升高、氯化钙浓度的增加,肌球蛋白浊度、粒度、变性率逐步增大;显著($p<0.05$)提高了肌球蛋白初始状态的 Ca^{2+}-ATP 酶活性,降低了肌球蛋白互相结合形成聚集体的温度;电镜观察发现,Ca^{2+} 浓度越高,聚集速率越快,0.1 mol/L 处理下,蛋白聚集体体积显著增大,形成无序聚集体;80℃、0.1 mol/L 处理组凝胶强度显著($p<0.05$)高于其他处理组,氯化钙浓度由 0.01 mol/L 升高至 0.1 mol/L,凝胶强度由 4.58 N 升至 5.28 N。因此,随着温度升高、氯化钙浓度增加,易形成猪肉肌球蛋白聚集体,且凝胶强度增加。

关键词:猪肉肌球蛋白;氯化钙浓度;聚集机制

中图分类号:TS251.5　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1000-1298(2020)09-0329-08　　**OSID**:

Effects of Different Ca^{2+} Concentrations on Heat-induced Aggregation of Pork Myosin

PAN Teng[1,2]　CHEN Xing[3]　SHEN Qingwu[3]　ZHANG Yan[4]　LUO Jie[3]

(1. *Newhope Liuhe Co., Ltd., Beijing* 100102, *China*
2. *Key Laboratory of Feed and Livestock and Poultry Products Quality & Safety Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing* 100102, *China*
3. *College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha* 410128, *China*
4. *College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing* 100083, *China*)

Abstract: In order to investigate the thermal aggregation behavior of myosin at different Ca^{2+} concentrations, the myosin was extracted from *longissimus dorsi* muscle of pigs. By adding different concentrations of calcium chloride (0.01 mol/L, 0.02 mol/L, 0.03 mol/L, 0.04 mol/L, 0.05 mol/L, 0.075 mol/L and 0.1 mol/L), the changes of morphology and structure of aggregates during the heating process and gel properties were studied by means of thermal denaturation kinetics, differential fluorescence scanning instrument and negative staining transmission electron microscope. The aim was to elucidate the mechanism of myosin thermal aggregation in pork. The results showed that the concentration of Ca^{2+} was increased from 0.01 mol/L to 0.1 mol/L, the denaturation temperature of protein was decreased from 40.2℃ and 52.4℃ to 36.5℃ and 50.8℃, the thermal stability of myosin was decreased significantly ($p<0.05$); with the increase of temperature and calcium chloride concentration, the turbidity, particle size and denaturation rate of myosin were increased gradually; the activity of Ca^{2+}-ATPase was increased significantly ($p<0.05$) at the initial state of myosin, and the temperature of myosin binding to form aggregates was decreased. Electron microscope observation showed that the higher the concentration of Ca^{2+} was, the faster the aggregation rate was. Under the concentration of 0.1 mol/L $CaCl_2$, the volume of protein aggregates was increased significantly to form disordered aggregates. The

收稿日期:2019-12-03　修回日期:2019-12-30

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(31801572)、国家重点研发计划项目(2018YFD0401205)和现代农业产业技术体系北京市生猪产业创新团队项目(BAIC02-2019)

作者简介:潘腾(1988—),男,助理研究员,主要从事畜产品加工方面的研究,E-mail:noahpan99@163.com

通信作者:罗洁(1987—),女,副教授,主要从事畜产品加工与工程方面的研究,E-mail:luojie@hunau.edu.cn

concentration of Ca^{2+} was increased from 0.01 mol/L to 0.1 mol/L, and the gel strength was increased from 4.58 N to 5.28 N. Gel strength of 80℃ and 0.1 mol/L calcium chloride treatment group was significantly ($p<0.05$) higher than other treatment groups. Therefore, with the increase of temperature and calcium chloride concentration, pork myosin aggregates were easy to form and the gel strength was increased.

Key words: pork myosin; $CaCl_2$ concentrations; aggregation mechanism

0 引言

肌球蛋白是肌肉组织中的重要蛋白质,占盐溶性蛋白组分的 55% ~60%[1],其热诱导凝胶特性不仅影响肉制品硬度、黏度等质构特性,同时对肉制品中水分、脂肪及风味物质的保持也有显著影响[2]。近年来,随着消费者健康意识的增强,低脂肉制品的开发成为肉品工业的发展方向。不少学者利用肌球蛋白凝胶构建低脂肉制品模拟体系,通过研究肌球蛋白凝胶机制,探索低脂肉制品品质的改善方法[3-4]。

肌球蛋白的凝胶过程实质上是肌球蛋白的变性与聚集[5]。研究发现,肌球蛋白的变性速率与聚集速率决定了肌球蛋白凝胶的特性。当变性速率小于聚集速率时,肌球蛋白未充分展开,功能基团未充分暴露,多形成粗糙、无序的凝胶网络;当变性速率大于聚集速率时,蛋白结构充分展开,分子间结合充分,可形成均一、有序的凝胶网络。另外,蛋白质聚集体结构与形成的方式显著影响蛋白质凝胶体的形成能力和凝胶特性[6-7]。蛋白质聚集速率主要取决于加热温度,聚集体结构的改变主要取决于蛋白质溶液体系中的离子种类以及溶液 pH 值[8]。

溶液中 Ca^{2+} 的存在主要促进疏水性氨基酸基团的暴露,影响蛋白质聚集行为的发生程度[9]。研究发现[10-11],Ca^{2+} 浓度较低时,可以形成适宜的蛋白交联程度,凝胶体质构等凝胶特性得到提高;Ca^{2+} 浓度较高时,引起蛋白质二级结构发生显著改变,蛋白质聚集体稳定结构被打破,形成大的聚集体,导致蛋白凝胶性能降低。目前,相关研究多针对兔肉、鸡肉以及鱼肉中提取的肌球蛋白,且多集中在对蛋白凝胶形成特性的影响方面。探究 Ca^{2+} 浓度对猪肉肌球蛋白热聚集过程中聚集体结构改变的影响机制,有利于实现对猪肉肌球蛋白热聚集行为的调控,从而达到良好的蛋白凝胶状态。

本文以猪肉肌球蛋白为研究对象,通过测定肌球蛋白浊度、粒径、变性率、蛋白结构稳定性、Ca^{2+}-ATP 酶活、聚集体形态以及凝胶强度,研究不同 Ca^{2+} 浓度下猪肉肌球蛋白的热聚集行为,及其在热聚集过程中聚集体结构的改变,以揭示猪肉肌球蛋白热聚集形成机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

猪通脊肉:北京资源亚太食品有限公司,猪宰后立即取样液氮冷冻,于 -80℃冻藏备用。

蛋白 Marker(#26630),美国 Thermo 公司;三磷酸腺苷二钠(ATP·Na_2)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、乙二胺四乙酸(EDTA)、乙二醇双(2-氨基乙基醚)四乙酸(EGTA)等均购于美国 Amresco 公司;氯化钾、焦磷酸钠、氯化镁、氯化钾等均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

Prometheus NT.48 型差示荧光扫描仪,美国 Quantum Design 公司;HT7700 型透射电子显微镜,日本日立公司;Zetasizer Nano ZS 型纳米粒度分析仪,英国马尔文仪器有限公司;LabRam HR800 型显微激光共聚焦拉曼光谱仪,法国 HORIBA JobinYvon 公司;UV-2102PC 型紫外可见分光光度计,上海 UNICO 公司;DELTA 320 型酸度计,瑞士梅特勒-托利多公司;Tecan M200 PRO 型酶标仪,瑞士 Tecan 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 样品制备

肌球蛋白提取:取刚宰杀猪的通脊肉,剔除脂肪和结缔组织,绞碎,用液氮速冻,之后放于 -80℃冰箱贮存备用。肌球蛋白的解离纯化参照文献[12-13]的方法。

试验样品制备:将所得肌球蛋白沉淀溶于 0.02 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 值 6.5)中,并以此缓冲液作为透析液透析 24 h,中间透析液更换两次。将透析所得蛋白溶液 7 等分,各组均加入氯化钠与氯化钙使蛋白溶液中氯化钠浓度均为 0.6 mol/L,氯化钙浓度分别为 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.075、0.1 mol/L,同时配置含有相应氯化钠浓度和氯化钙浓度的 0.02 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 值 6.5),将蛋白溶液中蛋白质量浓度调至 20 mg/mL,放于 0 ~4℃贮存,7 d 内完成指标测定。

1.3.2 浊度的测定

参照文献[8]的方法,将蛋白溶液稀释到 2 mg/mL,由 20℃升温至 80℃,每 10℃收集样品一次,以其 320 nm 处的吸光度来表示蛋白质溶液的浊

度。每个样品测定 3 次平行，取平均值。

1.3.3 粒径的测定

参照文献[14]的方法，将蛋白溶液稀释到 0.5 mg/mL，由 20℃升温至 80℃，每 10℃收集样品一次，放于 1 cm 光程的石英比色皿中，散射角为 173°。将样品放入纳米粒度分析仪，采用 He－Ne 激光在 633 nm 波长条件下进行测定，并用仪器自带软件进行数据分析。每个样品测定 3 次平行，取平均值。

1.3.4 变性率测定及热变性动力学描述

参照文献[15]的方法，将蛋白溶液稀释到 5 mg/mL，分别置于 30、40、50、60、70、80℃条件下水浴加热 1、2、5、10、20、30 min，取出后迅速冰浴放于 4℃贮存。取热处理后的样品 10 000 r/min 离心 10 min，取上清液，测定上清液中蛋白浓度，每个样品测定 3 次平行，取平均值。肌球蛋白热变性率计算公式为

$$A = (B - C)/B \times 100\%$$

式中　B——热处理前溶液中蛋白质量浓度，mg/mL

C——热处理后样品上清液中蛋白质量浓度，mg/mL

以不同温度、不同时间下肌球蛋白的热变性率为试验数据，进行肌球蛋白热变性动力学描述。

1.3.5 蛋白结构稳定性分析

参照文献[16]的方法，利用差示荧光扫描仪进行蛋白结构稳定性的测定，将蛋白溶液稀释到 0.5 mg/mL，各组样品 10 μL 吸入毛细管进行测定，温度范围 20～80℃，升温速率 1℃/min，测定升温过程中蛋白溶液 $F_{350\ nm}/F_{330\ nm}$（$F_{350\ nm}$、$F_{330\ nm}$ 分别表示 350、330 nm 处的荧光强度）的变化，利用仪器自带软件分析蛋白升温过程中变性温度 T_m。

1.3.6 Ca^{2+}－ATP 酶活测定

参照文献[17－18]的方法，略做修改。将蛋白溶液调至 4 mg/mL，分别选取 4、20、30、40、50、60、70℃进行样品收集，按照表 1 配置反应混合液，配置时先将除 ATP 以外的溶液加入混匀，将反应混合液放于 25℃水浴锅中恒温。之后加入 ATP 溶液，立即开始计时。反应进行 3 min，加入 2 mL 15% TCA（三氯乙酸）终止反应，之后 10 000 g 离心 2 min，取上清。空白组首先加入 TCA，之后加入 ATP。吸取 4 mL 上清液，分别加入 3 mL 0.05 mol/L Tris－马来酸缓冲液（pH 值 7.0），振荡混匀，之后加入 3 mL 定磷试剂（20% 维生素 c，3 mmol/L H_2SO_4，3% 钼酸铵以等体积混合），放于 45℃水浴锅中恒温 30 min，取出冷却，测定各组溶液 640 nm 波长处吸光度。每个样品测定 3 次平行，通过磷酸标准曲线计算无机磷酸量，取平均值。

Ca^{2+}－ATP 酶活性定义为 1 mg 酶蛋白在 1 min 内生成的无机磷酸量（μmol）。

表 1　反应混合液的配置组成

Tab.1　Components of mixed reaction solution

溶液	加入量/mL	终浓度/（mmol·L^{-1}）
0.5 mol/L Tris－马来酸（pH 值 7.0）	0.2	25
0.1 mol/L 氯化钙	0.2	5
肌球蛋白样品	0.4	60
超纯水	3.0	
20 mmol/L ATP（pH 值 7.0）	0.2	1
总计	4.0	

1.3.7 肌球蛋白聚集体的形态观察

参照文献[14,19]的方法，利用负染透射电镜技术观察蛋白聚集体形态。将蛋白溶液稀释到 0.5 mg/mL，用于负染透射电镜的样品制备。吸取 5 μL 热处理后蛋白样品滴于镀碳膜铜网，静置 1 min，之后超纯水冲洗 3 次，滤纸吸干。吸取 3.5 μL 乙酸铀染液滴于铜网，预染两次，滤纸吸干，之后染色 45 s，滤纸吸干，干燥后用于透射电镜观察（加速电压：80 kV）。

1.3.8 凝胶强度测定

对经过不同 Ca^{2+} 浓度处理后的肌球蛋白溶液进行加热处理，选取加热温度 60、70、80℃条件下制得的蛋白凝胶进行凝胶强度的测定，将凝胶样品分切为直径 2 cm、高 1 cm 的圆柱体，采用 P/50 型探头进行两次压缩，压缩比为 50%，压缩速度 1.0 mm/s。每个处理测定 6 个平行，记录样品的硬度。

1.4 数据统计与分析

结果表示为平均数 ± 标准差。统计分析均采用软件 SPSS 17.0 进行。各组间的数值用 ANOVA 和 Duncan 多重比较分析，当 $p < 0.05$ 认为具有显著性差异。

2　结果与分析

2.1　肌球蛋白热聚集过程中浊度的改变

浊度的改变可以用于监测溶液中蛋白质聚集的程度，聚集程度越高，光散射越强，溶液吸光度越高，即溶液的浊度越大[15]。氯化钙浓度对肌球蛋白加热过程中浊度的影响如图 1 所示。研究发现，在 20℃时，氯化钙并未对肌球蛋白浊度产生显著影响（$p > 0.05$）。随着温度逐渐升高，各处理组浊度均逐渐上升，各组趋势一致。其中，相同温度条件下氯化钙浓度 0.05、0.075、0.1 mol/L 处理组浊度高于其他处理组。氯化钙处理条件下，肌球蛋白浊度均

在 60℃时升高幅度最为显著。当温度升至 80℃时，氯化钙浓度 0.075 mol/L 与 0.1 mol/L 处理组中肌球蛋白浊度显著高于其他处理组（$p < 0.05$）。文献[9]的研究也表明了不同氯化钙浓度引起体系浊度的改变。

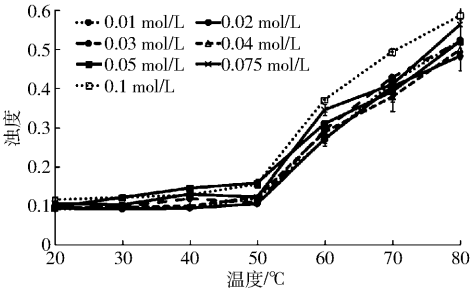


图 1 不同氯化钙浓度条件下肌球蛋白加热过程中浊度的改变

Fig. 1 Effects of $CaCl_2$ concentrations on turbility of porcine myosin during heating

2.2 肌球蛋白聚集体的粒度表征

马尔文粒度分析仪利用动态光散射技术通过测量样品散射光强度起伏的变化得出样品颗粒大小[20]，可用于表征蛋白聚集程度。如图 2 所示，初始温度时，各处理组间平均粒径无显著差异（$p > 0.05$）。随着温度升高，各处理组粒径均逐步上升，氯化钙浓度 0.05、0.075、0.1 mol/L 处理组平均粒径在升温过程中均高于其他氯化钙处理组。当温度为 70～80℃时，氯化钙浓度 0.01、0.02、0.03 mol/L 处理组平均粒径变化不显著，但是氯化钙浓度 0.04、0.05、0.075、0.1 mol/L 处理组平均粒径仍在升高，最终粒径分布为 1 300～1 400 nm。

2.3 肌球蛋白热变性动力学分析

对蛋白质热变性动力学进行分析可以明确蛋白受热变化规律，从而更好地利用其热变机能，有利于凝胶制备与品质提升。选取浓度为 0.02、0.05 mol/L氯化钙处理组进行肌球蛋白热变性动力学分析。

如图 3a 所示，0.02 mol/L 氯化钙处理下，不同温度处理组随着加热时间的延长，热变性率上升速率均先升高后趋于平缓，当加热时间达到 10 min

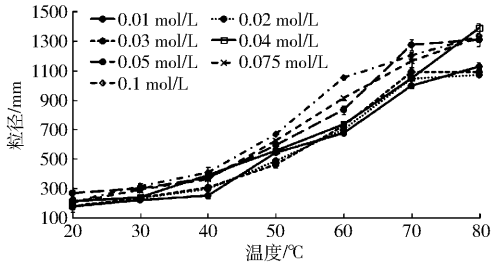


图 2 不同氯化钙浓度条件下肌球蛋白加热过程中粒径的改变

Fig. 2 Effects of $CaCl_2$ concentrations on particle size of porcine myosin during heating

时，随着加热时间的延长，各组热变性率上升速率变化不显著（$p > 0.05$）。当加热时间达到 30 min 时，70℃与 80℃处理组肌球蛋白变性率均达到 98%，加热温度 60℃处理组肌球蛋白变性率达到 89%，加热温度 30℃和 40℃处理组中蛋白变性率显著低于其他处理组（$p < 0.05$）。0.05 mol/L 氯化钙处理下，肌球蛋白变性率随着加热温度和加热时间的变化趋势与 0.02 mol/L 氯化钙条件下变化规律类似。但是，肌球蛋白热变性率升高速率高于 0.02 mol/L 氯化钙处理组，其中，加热温度 80℃条件下，加热时间 5 min 时肌球蛋白蛋白热变性率即已经达到 95%，显著高于其他温度处理组（$p < 0.05$）。0.1 mol/L 氯化钙条件下，各组肌球蛋白变性率上升速率高于 0.02 mol/L 氯化钙处理组，其中，加热温度 70℃条件下，加热时间 5 min 变性率即已经达到 75%，高于其他氯化钙处理组。加热温度 50℃条件下，当加热时间达到 10 min 后，变性率上升速率高于相同条件下 0.02 mol/L 氯化钙处理组。因此，氯化钙浓度升高，肌球蛋白变性率升高速率逐步提高。

D 值表征某一恒定温度下 90% 肌球蛋白变性所需的时间，以某一温度下热处理时间 t 时刻时蛋白质浓度 C_t 的对数为纵坐标，以热处理时间 t 为横坐标，进行作图，所得拟合直线回归方程的斜率取负倒数可得 D 值[21]。Z 值作为一个温差值，表征 D 值降低 90% 时温度的变化，可以得出温度对 D 值的影响，是体现蛋白质热稳定性的重要指标[22]。同样，以某一温度下的 D 值取对数为纵坐标，以该温度所

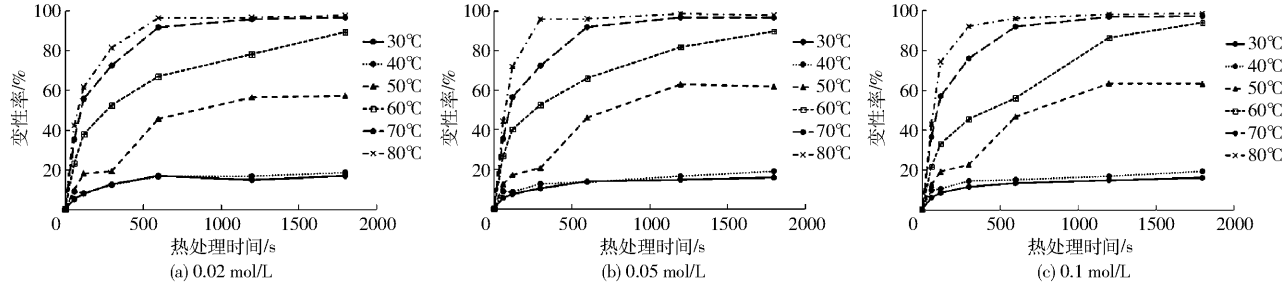
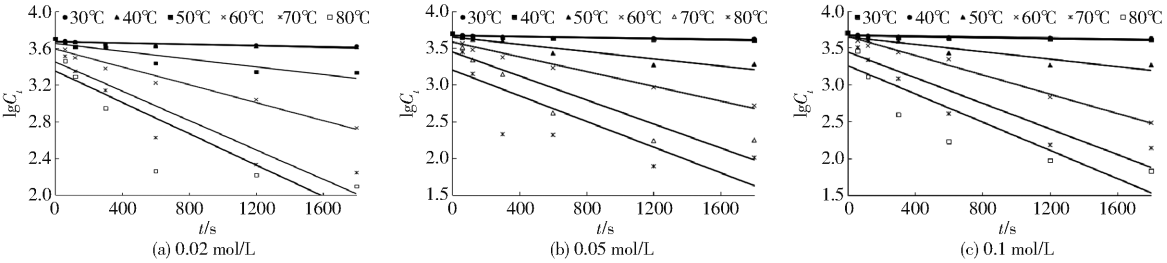


图 3 不同氯化钙浓度下热处理对肌球蛋白变性率的影响

Fig. 3 Effects of heat treatment on denaturation rate of porcine myosin with different $CaCl_2$ concentrations

对应的绝对温度 T 为横坐标作图，所得拟合直线回归方程的斜率取负倒数可得 Z 值。不同氯化钙浓度条件下热处理对肌球蛋白热变性的影响如图 4，根据所得拟合直线回归方程计算 D 值，之后肌球蛋白的 lg$D$ − T 曲线如图 5，并根据所得拟合直线回归方程计算 Z 值，计算所得 D 值如表 2 所示，$CaCl_2$ 浓度 0.02、0.05、0.10 mol/L 所对应的 Z 值分别为 29.94、29.94、29.07℃。



(a) 0.02 mol/L　(b) 0.05 mol/L　(c) 0.1 mol/L

图 4　不同氯化钙浓度条件下热处理对肌球蛋白热变性的影响

Fig. 4　Effects of heat treatment on thermal denaturation of porcine myosin with different $CaCl_2$ concentrations

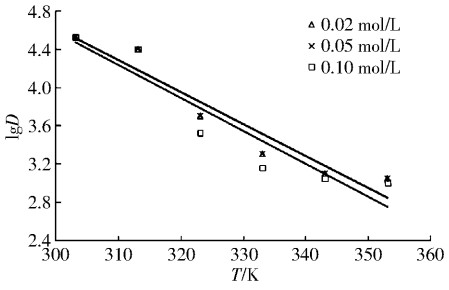


图 5　肌球蛋白 lg$D$ − T 曲线

Fig. 5　lg$D$ − T curves of porcine myosin

氯化钙的加入造成肌球蛋白 D 值降低，本研究中氯化钙浓度 0.02 mol/L 与 0.05 mol/L 处理组间 D 值无显著差异，但是氯化钙浓度达到 0.10 mol/L 时，肌球蛋白 D 值显著小于其他氯化钙处理组，说明随着氯化钙浓度的升高，在 0.10 mol/L 的氯化钙浓度下，降低了肌球蛋白的热稳定性。因此，氯化钙的加入降低了肌球蛋白的热稳定性。该结果与文献[23]的研究相一致。

表 2　不同处理条件下肌球蛋白热变性反应的 D 值

Tab. 2　Thermal denaturation D values of porcine myosin with different $CaCl_2$ concentrations　s

氯化钙浓度/(mol·L^{-1})	温度/℃					
	30	40	50	60	70	80
0.02	33 333.33	25 000.00	5 000.00	2 000.00	1 250.00	1 111.11
0.05	33 333.33	25 000.00	5 000.00	2 000.00	1 250.00	1 111.11
0.10	33 333.33	25 000.00	3 333.33	1 428.57	1 111.11	1 000.00

2.4　肌球蛋白热聚集过程中蛋白结构稳定性分析

对加热过程中肌球蛋白在 350 nm 与 330 nm 波长处荧光强度的比值进行测定绘图后，对其曲线进行一阶导数计算，确定肌球蛋白热处理过程中的变性温度 T_m，从而可以判断热处理过程中肌球蛋白不同结构域变性行为的发生，确定不同结构域的变性温度，对比不同处理条件下肌球蛋白结构热稳定性。

从图 6 和表 3 可知，在钙离子存在条件下肌球蛋白热处理过程中主要有两个结构域发生了解折叠行为，并且两个结构域解折叠行为发生温度不同。研究发现，随着氯化钙浓度的升高，T_{m1} 与 T_{m2} 均逐渐下降，其中，当氯化钙浓度由 0.01 mol/L 升高至 0.1 mol/L 时，T_{m1} 由 40.2℃ 降至 36.5℃，T_{m2} 由 52.4℃ 降至 50.8℃，T_{m1} 下降程度大于 T_{m2}，说明 Ca^{2+} 的加入主要对肌球蛋白中首先发生解折叠行为的结构域产生影响。因此，氯化钙的加入降低了肌球蛋白结构的稳定性，使得肌球蛋白在 35 ~ 40℃ 即

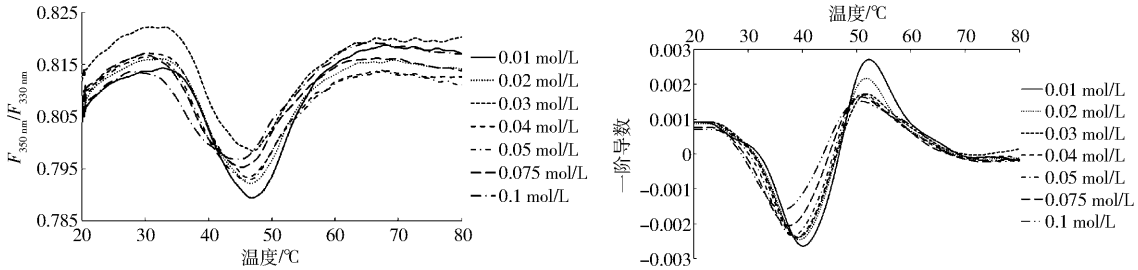


图 6　不同氯化钙浓度条件下肌球蛋白荧光曲线及其一阶导数

Fig. 6　DSF curves of porcine myosin and the first derivative of DSF curves at different $CaCl_2$ concentrations

开始出现第 1 个结构域解折叠行为,温度高于 50℃时,肌球蛋白出现第 2 个结构域的解折叠行为。

表 3 氯化钙对肌球蛋白变性温度 T_m 的影响

Tab. 3 Effects of $CaCl_2$ on thermal denaturation temperature of porcine myosin

氯化钙浓度/(mol·L^{-1})	T_{m1}/℃	T_{m2}/℃
0.01	40.2	52.4
0.02	39.5	51.9
0.03	39.2	52.1
0.04	38.9	51.4
0.05	38.3	51.1
0.075	37.6	51.0
0.10	36.5	50.8

2.5 肌球蛋白热聚集过程中 Ca^{2+}-ATP 酶活的变化

Ca^{2+}-ATP 酶活性位点位于肌球蛋白头部,可以通过测定肌球蛋白的 Ca^{2+}-ATP 酶活性变化,来反映肌球蛋白的变性情况[24-25]。Ca^{2+} 是激活 Ca^{2+}-ATP酶活性的关键因素之一[26],如图 7 所示,初始温度 4℃时,氯化钙 0.1 mol/L 处理组 Ca^{2+}-ATP 酶活高于其他氯化钙处理组,说明 Ca^{2+} 浓度的升高可以激活 Ca^{2+}-ATP 酶的活性。文献[27]也报道了 $CaCl_2$(<50 mmol/L)增加了 Ca^{2+}-ATPase 活性。随着加热温度的逐渐上升,Ca^{2+}-ATP 酶活性逐步下降,其中,温度 30~40℃时,Ca^{2+}-ATP 酶活下降速率明显。当温度达到 50℃时,氯化钙处理组 Ca^{2+}-ATP 酶活均降为 0。因此,Ca^{2+} 的加入可以激活 Ca^{2+}-ATP 酶的活性,同时也促进了蛋白解折叠行为的进行,导致肌球蛋白头部之间更易结合,降低了肌球蛋白热聚集行为的发生温度。

2.6 肌球蛋白聚集体的形态观察

根据不同处理组间蛋白粒径及蛋白结构稳定性的差异,选取具有代表性的氯化钙浓度 0.03 mol/L

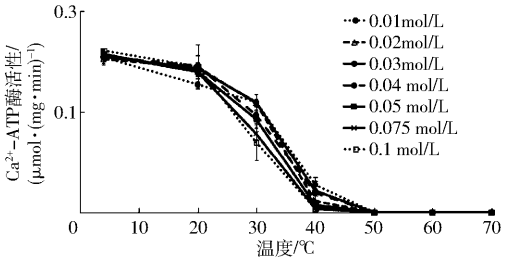


图 7 氯化钙对肌球蛋白热变性的 Ca^{2+}-ATP 酶活性影响

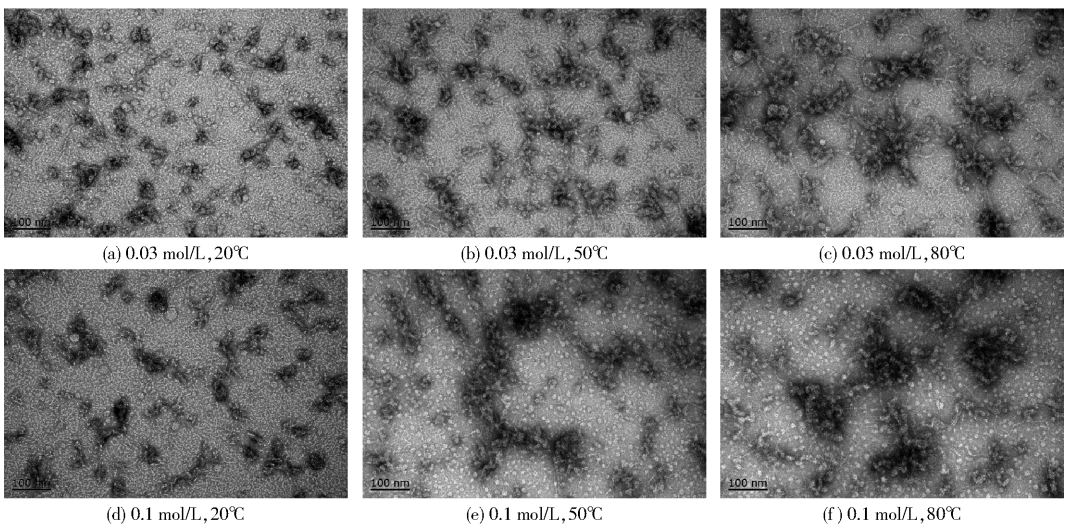
Fig. 7 Effects of $CaCl_2$ on Ca^{2+}-ATPase activity of porcine myosin during heating

和 0.1 mol/L 分别在 20、50、80℃温度条件下,对蛋白聚集体的形态进行观察。

氯化钙浓度 0.03、0.1 mol/L 处理组在加热温度 20、50、80℃条件下蛋白形态如图 8。研究发现,在同一氯化钙浓度条件下,随着温度的升高,蛋白逐渐聚集。氯化钙浓度 0.03 mol/L 处理组中,在 20℃时,肌球蛋白分散于盐溶液中,蛋白之间未发生聚集现象,温度达到 50℃时,蛋白之间互相聚集,大部分蛋白头部聚集在一起,尾部向外散射,当温度达到 80℃时,蛋白小的聚集体利用向外散射的尾部进一步聚集,形成大的聚集体。氯化钙浓度 0.1 mol/L 处理组中,在 20℃时,肌球蛋白形态与氯化钙浓度 0.03 mol/L处理组无显著差异,当温度升高至 50℃时,蛋白聚集程度高于氯化钙浓度 0.03 mol/L 处理组,蛋白除了头部互相聚集,形成聚集体,蛋白尾部也已经开始互相结合,部分蛋白结合成聚集体颗粒链,当温度达到 80℃时,蛋白发生团聚,聚集体体积显著增大。

2.7 肌球蛋白热诱导凝胶强度的差异

凝胶强度是表征蛋白凝胶特性的重要指标之一,与肉制品质构品质密切相关,凝胶强度反映蛋白凝胶网络的结构质量,凝胶强度与蛋白聚集体大小



(a) 0.03 mol/L,20℃ (b) 0.03 mol/L,50℃ (c) 0.03 mol/L,80℃

(d) 0.1 mol/L,20℃ (e) 0.1 mol/L,50℃ (f) 0.1 mol/L,80℃

图 8 不同氯化钙浓度下热处理过程中肌球蛋白的透射电镜图(×200 000)

Fig. 8 Transmission electron microscope of myosin with different $CaCl_2$ concentrations during heating

及蛋白聚集程度密切相关[28]。

不同氯化钙条件下，肌球蛋白加热过程中凝胶强度的变化如图 9。研究发现，同一氯化钙浓度条件下，随着加热温度的升高，肌球蛋白凝胶强度逐渐提高。相同温度条件下，随着氯化钙浓度的升高，蛋白凝胶强度逐渐提高，当加热温度达到 80℃时，氯化钙浓度 0.1 mol/L 处理组凝胶强度显著高于其他处理组，氯化钙浓度由 0.01 mol/L 升高至 0.1 mol/L，凝胶强度由 4.58N 升至 5.28N。分析认为，Ca^{2+} 可以促进 ε-(γ-谷氨酰基)赖氨酸交联的形成，促进蛋白结构伸展，主要通过增强疏水性相互作用力的方式促进蛋白聚集体的形成，氯化钙浓度的提高使得蛋白聚集体体积增大，使得蛋白凝胶网络粗糙同时硬度增大。

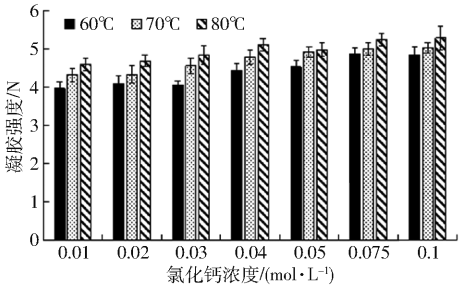


图 9　不同氯化钙浓度条件下肌球蛋白加热过程中凝胶强度的改变

Fig. 9　Effects of $CaCl_2$ concentrations on gel strength of porcine myosin gels during heating

3　结束语

以猪背最长肌中提取的肌球蛋白为研究对象，通过添加不同浓度氯化钙(0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.075、0.1 mol/L)，研究了不同 Ca^{2+} 浓度下肌球蛋白的热聚集行为。对肌球蛋白进行热变性动力学分析，研究加热过程中聚集体形态结构的变化。结果表明，随着温度的升高、氯化钙浓度的增加，肌球蛋白浊度、粒度、变性率逐步增大；Ca^{2+} 浓度增加，降低了肌球蛋白的热稳定性，在温度高于 50℃时，肌球蛋白出现第 2 个结构域的解折叠行为；显著提高肌球蛋白初始状态的 Ca^{2+}－ATP 酶活性；随着 Ca^{2+} 浓度的增加，聚集速率加快，形成大体积无序聚集体；随着温度升高、氯化钙浓度增加，凝胶强度增加。

参　考　文　献

[1] FERRY J D. Protein gels[J]. Advances in Protein Chemistry, 1948,4: 1－78.

[2] 郭秀云. HL-低钠盐及其组分组氨酸和赖氨酸对猪肉肌球蛋白理化特性与热诱导凝胶特性的影响[D]. 南京:南京农业大学, 2016.
GUO Xiuyun. Effect of HL-salt substitute and its components histidine and lysine on the physico-chemical and heat-induced gel properties of pork myosin[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2016. (in Chinese)

[3] 邹玉峰, 钱畅, 韩敏义,等. 凝胶类肉制品加工技术研究进展及趋势[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(11): 232－237.
ZOU Yufeng, QIAN Chang, HAN Minyi, et al. Review on research progress and development of gel-type meat products processing technology[J]. Food and Fermentation Industries, 2017, 43(11): 232－237. (in Chinese)

[4] 史可夫. 超高压与氯化钙对肌球蛋白-海藻酸钠混合凝胶特性的影响及机制[D]. 合肥:合肥工业大学, 2015.
SHI Kefu. Effects of high pressure processing and calcium chloride on the gelling properties of myosin-sodium alginate gel and its mechanism [D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2015. (in Chinese)

[5] 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.
GAI Jing. Study on the aggregation behavior and mechanism of bighead carp (*Aristichthys nobilis*) myosin affected by heating temperature[D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2016. (in Chinese)

[6] BRITTEN M, GIROUX H J. Acid-induced gelation of whey protein polymers: effects of pH and calcium concentration during polymerization[J]. Food Hydrocolloids, 2001, 15(4－6): 609－617.

[7] BOULET M, BRITTEN M, LAMARCHE F. Aggregation of some food proteins in aqueous dispersions: effects of concentration, pH and ionic strength[J]. Food Hydrocolloids, 2000, 14(2): 135－144.

[8] XIONG Y L, BLANCHARD S P. Myofibrillar protein gelation: viscoelastic changes related to heating procedures[J]. Journal of Food Science, 1994, 59(4): 734－738.

[9] JIA D, YOU J, HU Y, et al. Effect of $CaCl_2$ on denaturation and aggregation of silver carp myosin during setting[J]. Food Chemistry, 2015, 185: 212－218.

[10] YONGSAWATDIGUL J, SINSUWAN S. Aggregation and conformational changes of tilapia actomyosin as affected by calcium ion during setting[J]. Food Hydrocolloids, 2007, 21(3): 359－367.

[11] HONGSPRABHAS P, BARBUT S. Ca^{2+}-induced cold gelation of whey protein isolate: effect of two-stage gelation[J]. Food Research International, 1997, 30(7): 523－527.

[12] PAN T, GUO H, LI Y, et al. The effects of calcium chloride on the gel properties of porcine myosin-k-carrageenan mixtures [J]. Food Hydrocolloids, 2017, 63: 467－477.

[13] HAN M, WU Y, WANG P, et al. The changes and relationship of structure and functional properties of rabbit myosin during

heat-induced gelation[J]. CyTA—Journal of Food, 2015, 13(1): 63 – 68.

[14] SHIMADA M, TAKAI E, EJIMA D, et al. Heat-induced formation of myosin oligomer-soluble filament complex in high-salt solution[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 73: 17 – 22.

[15] 胡亚丽. 罗非鱼肌肉蛋白热变性聚集行为及其抑制[D]. 湛江:广东海洋大学, 2015.
HU Yali. Behavior of heat-induced denaturation and aggregation of protein from tilapia muscle and its inhibition [D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2015. (in Chinese)

[16] ALEXANDER C G, WANNER R, JOHNSON C M, et al. Novel microscale approaches for easy, rapid determination of protein stability in academic and commercial settings[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Proteins and Proteomics, 2014, 1844(12): 2241 – 2250.

[17] BENJAKUL S, VISESSANGUAN W, THONGKAEW C, et al. Comparative study on physicochemical changes of muscle proteins from some tropical fish during frozen storage[J]. Food Research International, 2003, 36(8): 787 – 795.

[18] 潘锦锋, 沈慧星, 尤娟, 等. 草鱼肌原纤维蛋白加热过程中理化特性的变化[J]. 中国农业大学学报, 2009, 14(6):17 – 22.
PAN Jinfeng, SHEN Huixing, YOU Juan, et al. Changes in physiochemical properties of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) myofibrillar protein during heat-treatment [J]. Journal of China Agricultural University, 2009, 14(6):17 – 22. (in Chinese)

[19] XU X L, HAN M Y, FEI Y, et al. Raman spectroscopic study of heat-induced gelation of pork myofibrillar proteins and its relationship with textural characteristic[J]. Meat Science, 2011, 87(3):159 – 164.

[20] 时娇娇. 蛋白稳定剂对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,2016.
SHI Jiaojiao. Inhibitory effect and mechanism of protein stabilizers for thermal denaturation and aggregation of tilapia myosin [D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2016. (in Chinese)

[21] 郑惠娜, 章超桦, 秦小明, 等. 马氏珠母贝肌肉提取蛋白热变性动力学[J]. 农业工程学报, 2013, 29(5): 237 – 242.
ZHENG Huina, ZHANG Chaohua, QIN Xiaoming, et al. Kinetics of heat denaturation of proteins extracted from *Pinctada martensii* meat[J]. Transactions of the CSAE, 2013,29(5): 237 – 242. (in Chinese)

[22] CAO J, WANG X, ZHENG H. Comparative studies on thermoresistance of protein G-binding region and antigen determinant region of immunoglobulin G in acidic colostral whey[J]. Food and Agricultural Immunology, 2007, 18(1): 17 – 30.

[23] CAO L, SU S, REGENSTEIN J M, et al. Ca^{2+}-induced conformational changes of myosin from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) in gelation[J]. Food Biophysics, 2015, 10(4): 447 – 455.

[24] RIEBROY S, BENJAKUL S, VISESSANGUAN W, et al. Comparative study on acid-induced gelation of myosin from Atlantic cod (*Gardus morhua*) and burbot (*Lota lota*)[J]. Food Chemistry, 2008, 109(1): 42 – 53.

[25] LEELAPONGWATTANA K, BENJAKUL S, VISESSANGUAN W, et al. Physicochemical and biochemical changes during frozen storage of minced flesh of lizardfish (*Saurida micropectoralis*)[J]. Food Chemistry, 2005, 90(1 – 2): 141 – 150.

[26] SANCHEZ G A, DI CROCE D E, CASADOUMECQ A C, et al. Characterization of the sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase from rabbit temporalis muscle[J]. Archives of Oral Biology, 2012, 57(10): 1429 – 1437.

[27] HEMUNG B O, YONGSAWATDIGUL J. Ca^{2+} affects physicochemical and conformational changes of threadfin bream myosin and actin in a setting model[J]. Journal of Food Science, 2005, 70(8): c455 – c460.

[28] 曹云刚,王凡,艾娜丝,等.苹果膳食纤维对猪肉肌原纤维蛋白凝胶性能的影响[J/OL].农业机械学报,2020,51(7):365 – 371.
CAO Yungang, WANG Fan, AI Nasi, et al. Effect of apple dietary fiber on gel properties of porcine myofibrillar protein[J/OL]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery,2020,51(7):365 – 371. http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx? file_no=20200741&flag=1. DOI:10.6041/j.issn.1000-1298.2020.07.041. (in Chinese)