

组织蛋白酶与鱼类自溶作用

吴永沛

(厦门水产学院)

收稿日期: 1988年10月19日

鱼类肌肉组织蛋白酶 (Cathepsins), 是指存在于鱼类肌肉组织中, 能够水解蛋白质、多肽或人工合成底物的酶类。其种类繁多、性质各异、作用效果也各不相同。根据酶呈现最大活力时的 pH 值(称为最适 pH 值)的不同, 通常将组织蛋白酶分为酸性蛋白酶 (Acid Proteinases)、中性蛋白酶 (Neutral Proteinases)、碱性蛋白酶 (Alkaline Proteinases) 三类。鱼类肌肉组织中的蛋白酶, 在鱼类肌肉中普遍存在且活力高, 是鱼类死亡后肌肉降解的主要因素, 与自溶作用关系密切, 这种研究受到广泛的重视。鱼类肌肉组织蛋白酶作用条件及性质的阐明, 将有助于了解鱼类自溶作用的化学变化, 从而了解自溶作用的实质, 为鱼类保鲜和加工利用提供坚实的理论基础。

I. 鱼类肌肉自溶与组织蛋白酶

太平洋无须鳕 (Pacific hake) 是一种典型的鱼类, 其组织极容易发生自溶而影响销售和加工, 必须在捕捞后迅速冷藏并且在 4d 内加工利用, 否则鱼体组织自溶而无法加工或销售^[2]。该鱼类冷冻后即使在室温下解冻, 也会出现肉眼可见的组织自溶现象。由于这种原因, 尽管太平洋无须鳕在美国每年捕捞量可达 130000~260000t 的潜在能力, 但仍未被作为主要的捕捞对象, 仅被列为开发利用鱼类^[1]。太平洋无须鳕由于自溶作用严重, 因此是研究自溶作用与组织蛋白酶的好材料。而这方面的研究反过来将为该鱼类的加工利用提供科学依据。

太平洋无须鳕的近亲——鳕鱼 (Truecod), 是极不易自溶的鱼类。通过比较这两种鱼类肌肉所存在的组织蛋白酶活力, 能够阐明某种组织蛋白酶在自溶作用中所起的作用。Erickson^[3] 采用太平洋无须鳕及鳕鱼的肉块, 在 3000 × g 的离心力作用下, 分离出鱼肉块中的细胞质流出液, 然后测定流出液中组织蛋白酶的活力。结果见图 1。

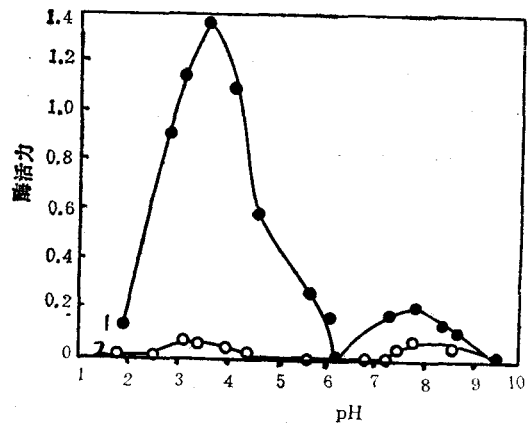


图1 两种鱼类肌肉组织蛋白酶活力比较
1. 鳕鱼; 2. 太平洋无须鳕

两种鱼类的蛋白酶活力是极不相同的。在酸性范围 (pH 2.5~4.5), 太平洋无须鳕的酶活力出现明显的高峰。说明起自溶作用的酶属于酸性蛋白酶。Konagaya^[4] 对旗鱼 (Swordfish) 进行了研究。通过小心的提取, 在发生分解的组织中, 分离出组织蛋白酶组分, 证明其最适 pH 值在酸性范围。pH 值对酶活力的影响见图 2。该酶的最适 pH 值为 3.7, 最适温度为 45°C,

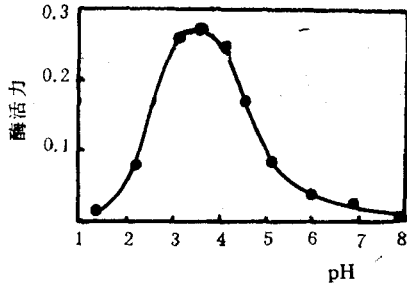


图2 pH 值对旗鱼组织蛋白酶活力的影响

是一种典型的酸性蛋白酶。在 30℃ 的条件下，该酶仍然具有最大活力的 60% (见图 3)。因此该酶在室温条件下仍然保持相当高的酶活力。这一性质解释了为什么冷冻鱼在室温条件下解冻，肌肉仍然会发生肉眼可见的自溶的原因。

图 4 进一步比较了发生分解和不发生自溶的两种旗鱼肌肉中蛋白酶的活力。从图中可以看出，发生自溶的肌肉中，组织蛋白酶的活力明显高得多，并且其最大活力出现在酸性范围。

在鱼类自溶作用中关于其它酶类的作用问题，Taneda^[10] 从鲤鱼肌肉中提取到一种典型的中性蛋白酶，其最适 pH 值为 7.0，最适温度为 25~30℃。能够水解鱼类肌原纤维，显微摄影发现在中性蛋白酶作用下，肌原纤维的长链显著变短。定量的统计说明，在中性蛋白酶的作用下，短肌原纤维(长度为 1~4 节)占肌原纤维总数的百分比随着时间的延长而逐渐提高。肌原纤维蛋白是形成鱼糜制品弹性的关键性物质，其长度的变短将会大大降低制品的弹性。

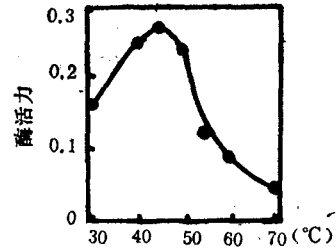
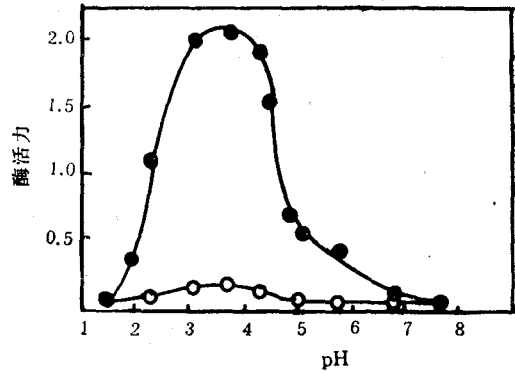


图3 温度对旗鱼组织蛋白酶活力的影响

图4 两种旗鱼肌肉中蛋白酶的活力比较
1. 不发生自溶的旗鱼; 2. 发生自溶的旗鱼

上述实验结果解释了自溶作用降低鱼类肌肉凝胶形成能力的原因。

II. pH 值和温度对组织蛋白酶活力的影响

pH 值和温度是影响酶活力的两个重要因素，阐明其因素能够了解酶的作用性质，也有助于人为控制酶的活力。

表1 几种鱼类肌肉组织蛋白酶

测定项目	鱼类					
	鲤鱼	鲭鱼	鳕鱼	竹荚鱼	沙丁鱼	马鲛
最适 pH 值	3.5	2.5	4.5	6~7	8.5	8.0
最适温度(°C)	35	37	37	30	35	60
所属酶类	酸性	酸性	酸性	中性	碱性	碱性
研究者及研究时间	Saito (1958)	Groninger (1964)	Seibert (1965)	Hata (1960)	Fujii (1951)	Makinodan (1963)

早期对鱼类肌肉组织蛋白酶的研究, 主要是通过制取鱼肉匀浆提取液, 对提取液中的某一种酶进行研究。关于 pH 值和温度对鱼类肌肉组织蛋白酶活力的影响^[5]见表 1。这是不同研究者对不同鱼类的研究, 他们一般都是局限于某一种鱼类中的某一种酶的研究, 由于研究的时间各不相同, 因而不便于对不同鱼类或同一鱼类的不同酶进行比较。Makiondan^[6]较系统地研究了 12 种鱼类的酸性、碱性蛋白酶的最适 pH 值和最适温度(见表 2)。

表 2 12 种鱼类的酸性及碱性蛋白酶

测值 鱼类	测定项目	酸性蛋白酶		碱性蛋白酶	
		最适 pH 值	最适温度 (°C)	最适 pH 值	最适温度 (°C)
长鳍金枪鱼		2.6	40	8.5	60
舵 鳀		3.4	45	8.0	60
鲭 鱼		3.4	50	—	—
沙 丁 鱼		3.2	50	—	—
鳕 鱼		3.5	50	—	—
鳕 鱼		3.6	40	—	—
金 枪 鱼		3.2	50	8.5	50
真 鲷		3.2	50	8.0	60
梭 鱼		3.5	50	8.5	60
鳕 鱼		3.2	50	8.0	60
白 菇 鱼		3.2	50	8.0	65
鲤 鱼		3.0	50	8.0	65

在所研究的 12 种鱼类中, 都存在着酸性蛋白酶, 其最适 pH 值范围为 2.6~3.5 之间, 最适温度为 40~50°C。所研究的 12 种鱼类中有 4 种没有发现碱性蛋白酶, 看来碱性蛋白酶的存在不够普遍。碱性蛋白酶除了作用 pH 值碱性范围以外, 其最适温度也较高, 一般比酸性蛋白酶高 10°C 左右。Makinodan^[7]进一步研究了

表 3 三种酶类的最适 pH 值比较

最适 pH 值 鱼类	酶类	酸性蛋白酶	中性蛋白酶	碱性蛋白酶
鲑 鱼		2.8~4.2	7.0	7.8
白 菇 鱼		2.8	7.0	8.0
黑 鳔		3.6	7.1	8.0

种鱼(鲑鱼、白菇鱼、黑鳔)肌肉的酸性、中性、碱性蛋白酶, 它们的最适 pH 值见表 3。

从上述所研究的结果得出, 酸性蛋白酶的最适 pH 值在不同鱼类中变化较大, 一般为 2.3~4.5 之间。中性蛋白酶在不同鱼类的变化较小。酸性蛋白酶的最适 pH 值虽然较低, 但在鱼类肌肉组织中, 却能够在 pH 3~7 范围内起水解作用^[8]。

酸性蛋白酶的热力学性质具有较大特点(见图 5), 从鲤鱼肌肉提取的酸性蛋白酶, 在 35°C 条件下, 仍然具有最大活力的 70%。而在 45°C 以下时, 碱性蛋白酶则已经完全不表现出活力。在 0°C 条件下, 酸性蛋白酶仍然发挥水解作用。0°C 条件下 24h 的蛋白质水解量大约是 18°C 条件下 3h 的水解量。因此认为冰藏鱼质量的下降也与该酶直接作用有关。采用提取的酸性蛋白酶, 加到肌原纤维蛋白质中, 并且在 0°C 条件下保藏, 也证明酸性蛋白酶能够使肌原纤维的长链变短^[9]。

III. 鱼类肌肉组织蛋白酶的理化性质

将酶分离并纯化, 难度较大。Konagaga 采用柱层析的方法, 从旗鱼肌肉分离出 10 种酸性蛋白酶(见表 4)。

所分离的 10 种酸性蛋白酶中, 以第 7 号酶的活力最强, 占总活力的 50%。10 种酶的最适 pH 为 3.0~3.7、温度为 45~55°C, 都十分接

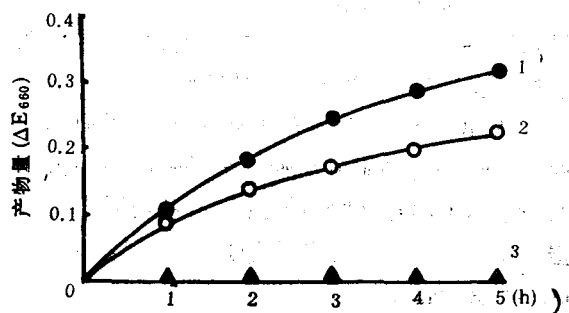


图 5 组织蛋白酶 A, D 的协同作用
1. 组织蛋白酶; 2. 酶 D + 酶 A; 3. 组织蛋白酶 A

表4 酸性蛋白酶各组份的性质

酶编号	相对活力 (%)	最适 pH 值	最适温度 (°C)	分子量	化学试剂对酶活力的影响(%)						
					对照	抑胃肽	抑胰肽	p-CMB ¹⁾	Hg ⁺⁺	DFP ¹⁾	EDTA ¹⁾
1	2	3.0	55	3.3×10 ³	100	102	0	0	0	96	124
2	8	3.0	45	1.3×10 ³	100	100	0	0	0	56	89
3	1	3.2	—	6.9×10 ⁴	100	87	0	0	0	57	—
4	11	3.3	45	4.1×10 ⁴	100	84	0	0	0	54	56
5	6	3.1	—	2.5×10 ⁴	100	84	0	0	0	0	71
6	5	—	—	6.6×10 ⁴	100	96	0	0	0	—	—
7	50	3.7	45	4.7×10 ⁴	100	94	0	0	0	56	107
8	3	—	—	2.4×10 ⁴	100	98	0	0	0	—	—
9	13	3.4	47	5.6×10 ⁴	100	95	0	0	0	71	91
10	3	3.1	50	3.9×10 ⁴	100	4	97	85	82	79	93

1) P-CMB: 对氯高汞苯甲酸; DFP: 二异丙基氟磷酸; EDTA: 乙二胺四乙酸

表5 组织蛋白酶的性质

性质 项目	酶类			
	A	B	C	D
作用于合成底物	羧苯甲酸-谷氨酰-酪氨酸	苯甲酸-精氨酸酰胺	甘氨酸-苯丙氨酸酰胺	0
作用类似酶	羧肽酶	胰蛋白酶	胰凝乳蛋白酶	胃蛋白酶
激活剂	0	硫醇, EDTA	硫醇、氯、氰化物	0
特殊抑制剂	0	大豆蛋白酶抑制剂、6-氨基-己酸	巯基试剂	胃蛋白酶抑制剂, DAN
不影响活性物质	巯基试剂	氰化物、DFP、N-乙基-顺丁烯二酰亚胺、大豆胰蛋白酶抑制剂	DFP, 2,4-二硝基苯、对汞-氯苯	有机磷、硫醇
分子量	32000~65000	52000, 25000	210000	300000, 80000
最适 pH 值	2.8~3.5	4~7.0	5~6.4	5.0
其它突出特点	与组织蛋白酶D协同作用进攻血红蛋白	激活胰凝乳蛋白酶	具有二肽氨肽酶、二肽转移酶、多聚肽酶的活力	攻击胶原蛋白及其它蛋白生成多肽片段

近。在各种化学试剂对酶活力的影响中, 1~9号酶属于同一性质, 为巯基酶, 而第10号酶性质有许多特殊点, 为另一性质的酶。

按 Barrgt 的分类方法来划分, 鱼类肌肉酸性蛋白酶的各种组分与哺乳类动物的组织蛋白酶 A, B, C, D 的性质进行比较, 鱼类肌肉组织蛋白酶也可以被划分为组织蛋白酶 A, B, C, D, 它们的理化性质见表 5。

在鱼类的肌肉组织中, 可能是组织蛋白酶 A, B, C, D 互相协调作用将蛋白质分解的。

Makinodan 发现组织蛋白酶 D 与 A 之间的协同作用 (见图 5)。单独的组织蛋白酶 A 对蛋白质底物不发挥水解作用, 而单独的组织蛋白酶 D 也表现出较弱的水解活力, 当两种酶合在一起时, 水解作用将显著提高。这一实验将有助于了解正常鱼体的蛋白质水解现象。

主要参考文献

- [1] Alverson, D. L., 1969. Status of knowledge of the pacific hake resource. California Coop. Oceanic Fish. Invest. Rep. 13:24.

- [2] Dassow J. A., 1970. Characteristics of Pacific hake *merluccius productus*, that affect its suitability for food. *U. S. Fish. Wildl. Serv. Circ.* 332:127.
- [3] Erickson, M. C., 1983. Proteolytic activities in the sarcoplasmic fluids of parasitized pacific whiting and unparasitized. *Ture cod. J. Food Sci.* 48: 1315—1319.
- [4] Konagaya, S., 1983. Protease responsible for jellification of myxosporidia-infected swordfish meat. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 49(6): 919—926.
- [5] Makinodan, Y., 1969(a). Studies on fish muscle protease—I. On the existence of two kinds of proteinase active in acid and in slightly alkaline pH range. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 35(7): 672—676.
- [6] Makinodan, Y., 1969(b). Studies on fish muscle protease—III, Purification and Properties of a proteinase active in acid pH range. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 35(8): 785—766.
- [7] Makinodan, Y., 1983. Combined action of carp muscle cathepsins A and D on proteins. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 49(7): 1153.
- [8] Reddi, P. K., 1972. Catheptic activity of fish muscle. *J. Food. Sci.* 37: 643—648.
- [9] Tokiwa, T., 1969. Fragmentation of fish myofibril. Effect of storage condition and muscle cathepsin. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 35(11): 1099—1109.
- [10] Taneda, T., 1983. Purification and Some Properties of Calpain from Carp Muscle. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 49(2): 219—228.