

冻融次数对镜鲤鱼肌原纤维蛋白功能和结构特性变化的影响

邓思杨, 王 博, 李海静, 钟 强, 董春晖, 夏秀芳*

(东北农业大学食品学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘 要: 本实验通过测定肌原纤维蛋白溶解性、乳化性、 δ -电势、巯基含量、自由氨基酸含量、二聚酪氨酸含量、表面疏水性和 α -螺旋含量的变化, 探究反复冻融过程引起镜鲤鱼肌原纤维蛋白功能特性和结构特性的变化。结果表明: 当冻融次数增加到5次时, 肌原纤维蛋白的溶解度、乳化活性、乳化稳定性分别显著下降至62.85%、20.67 m²/g、34.83% ($P < 0.05$); 在冻融过程中随着冻融次数的增加, 蛋白质的 δ -电势、表面疏水性和二聚酪氨酸含量不断增加, 而巯基、自由氨基酸和 α -螺旋含量不断下降。蛋白质的这些变化表明, 冷冻-解冻循环破坏了镜鲤鱼肌原纤维蛋白的完整结构, 降低了蛋白质的功能特性。

关键词: 冷冻-解冻循环; 镜鲤鱼; 肌原纤维蛋白; 功能特性; 结构

Effect of Freeze-Thaw Cycles on Changes in Functional and Structural Properties of Myofibrillar Protein from Mirror Carp (*Cyprinus carpio* var. *specularis*)

DENG Siyang, WANG Bo, LI Haijing, ZHONG Qiang, DONG Chunhui, XIA Xiufang*

(School of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: The effect of freeze-thaw cycles on the functional and structural properties of myofibrillar protein from mirror carp (*Cyprinus carpio* var. *specularis*) was investigated by measuring the changes in the emulsifying properties, solubility, δ -potential, surface hydrophobicity and content of sulfhydryl, free amino acids, dityrosine, surface hydrophobicity and α -helix. The results indicated that the solubility, emulsifying activity and emulsion stability of myofibrillar protein decreased to 62.85%, 20.67 m²/g and 34.83%, respectively after five freeze-thaw cycles ($P < 0.05$). The δ -potential, surface hydrophobicity and dityrosine content increased constantly with the increase of freeze-thaw cycles, while the sulfhydryl, free amino acid and α -helical contents decreased gradually. These changes suggested that freeze-thaw cycles damaged the structural integrity and functional properties of fish myofibrillar protein.

Keywords: freeze-thaw cycle; *Cyprinus carpio* var. *specularis*; myofibrillar protein; functional properties; structure

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180606-079

中图分类号: TS254.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2019) 11-0095-07

引文格式:

邓思杨, 王博, 李海静, 等. 冻融次数对镜鲤鱼肌原纤维蛋白功能和结构特性变化的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(11): 95-101. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180606-079. <http://www.spkx.net.cn>

DENG Siyang, WANG Bo, LI Haijing, et al. Effect of freeze-thaw cycles on changes in functional and structural properties of myofibrillar protein from mirror carp (*Cyprinus carpio* var. *specularis*)[J]. Food Science, 2019, 40(11): 95-101. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180606-079. <http://www.spkx.net.cn>

镜鲤鱼又名三道鳞, 是2010年由黑龙江水产研究所从西德引入的欧洲鲤鱼的变种, 其典型特点是鳞片少、肉质嫩滑、生

长繁殖周期短、蛋白质含量高(17.6%)、不饱和脂肪酸含量高。因此在运输、加工和贮藏期间极易发生腐败变质。

收稿日期: 2018-06-06

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31571859)

第一作者简介: 邓思杨(1993—)(ORCID: 0000-0002-5189-9920), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品科学。

E-mail: dsy0826@163.com

*通信作者简介: 夏秀芳(1973—)(ORCID: 0000-0003-3780-3707), 女, 教授, 博士, 研究方向为食品科学。

E-mail: Xxfang524@163.com

冷冻是镜鲤鱼最常见的贮藏方式,能有效地保持鱼肉新鲜度,但冻藏期间因冷链技术不健全,在运输、消费过程中以及在餐馆、家庭和零售环境中极易引起贮存期间温度波动和多次冻融循环的发生,引起鱼肉品质和物理化学特性变化^[1]。在冷冻和冻藏过程中,鱼肉内冰晶的大小及所处位置可能破坏肌肉细胞,并导致线粒体和溶酶体释放进入肌浆,导致机械损伤和肌肉组织质量的损失^[2]。冷冻-解冻循环会加剧由脂质氧化和蛋白氧化诱发的蛋白质变性,这些蛋白的变性可能与下列因素有关,包括 Ca^{2+} -ATP酶活性的下降、蛋白质的氧化和蛋白质结构的变化^[1]。Sriket等^[3]已经证实冷冻-解冻会引起鱼肉组织破坏、蛋白质变性和肌肉纤维的损伤。Turhan等^[4]发现随着冻融循环次数的增加,鲤鱼和鲑鱼鱼片内的总铁和血红素铁的含量均明显下降。Benjakul等^[5]指出冷冻-解冻循环影响了鲶鱼鱼片的蛋白质理化和生物化学特性。

冷冻-解冻循环次数对鱼肉质量方面的研究主要集中在对鱼肉品质和蛋白质氧化方面,而在冻融次数对鱼肉蛋白结构和功能特性影响方面的研究尚不深入。因此,本研究以镜鲤鱼为原料,探究冷冻-解冻循环对镜鲤鱼肌原纤维蛋白结构和功能特性变化的影响,为冷冻-解冻循环引起鱼肉品质下降机理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

镜鲤鱼(约1 kg) 哈尔滨地利生鲜超市。

氯化钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、氯化镁、甘氨酸、尿素(均为分析纯) 太仓市亿鑫化工有限公司;乙二醇双(2-氨基乙基醚)四乙酸(glycol-bis-(2-aminoethylether)- N,N,N',N' -tetraacetic acid, EGTA)、三羟甲基氨基甲烷(tris(hydroxymethyl)aminomethane, Tris) 上海谱振生物科技有限公司;2,4-二硝基苯肼(2,4-dinitrophenylhydrazine, DTNB)、2,4,6-三硝基苯磺酸(2,4,6-trinitro-benzenesulfonic acid, TNBS)、8-苯胺-1-萘磺酸(8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid, ANS)、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS) 美国Sigma公司。

1.2 仪器与设备

AL-104型精密电子天平、DELTA 320 pH计 梅特勒-托利多仪器设备(上海)有限公司;JD500-2电子天平 郑州南北仪器设备有限公司;UT-1800紫外-可见分光光度计 翱艺仪器(上海)有限公司;GL-21M冷冻离心机 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;F-4500荧光分光光度计 日本日立公司;Malvern激光粒度仪 英国马尔文

仪器有限公司;圆二色光谱(circular dichroism, CD)仪 英国应用光物理公司。

1.3 方法

1.3.1 原料肉的处理

新鲜镜鲤鱼在0~4℃条件下(冷库中)经击晕、宰杀后去除鱼鳞、内脏、鱼骨、鱼鳍和鱼皮,随后置于在4℃的冰箱中至尸僵,然后对镜鲤鱼肉进行处理。选取尸僵后镜鲤鱼的背部肉制成3 cm×3 cm×1 cm的肉块,混匀。将所有切好的肉块放于-25℃冰箱中进行冷冻,7 d为一个冻结周期,随后取出置于4℃条件下解冻,直至中心温度达到0~4℃,即第1次冷冻-解冻过程完成。随后依次完成3、5次冷冻-解冻后备用。

1.3.2 鱼肉肌原纤维蛋白的提取

参考Xiong Youling L.等^[6]的方法进行鲤鱼肌原纤维蛋白的提取。鲤鱼肌原纤维蛋白的提取过程在4℃条件下操作,提取的肌原纤维蛋白放置于4℃的冰箱内备用。

1.3.3 蛋白质量浓度的测定

选择双缩脲法进行蛋白质量浓度的测定,标准曲线公式为: $y=0.0479x-0.0061$ ($R^2=0.9998$)。

1.3.4 镜鲤鱼肌原纤维蛋白功能特性指标的测定

1.3.4.1 溶解度的测定

参考Añón等^[7]的方法进行溶解度的测定,并在此基础上稍作修改。吸取5 mL肌原纤维蛋白溶液(1 mg/mL)放入离心管中,10 000×g离心20 min,收集上清液并通过双缩脲法测定上清液的蛋白质量浓度(mg/mL),该上清液蛋白质量浓度与离心前蛋白原始质量浓度的比值即为蛋白的溶解度。

1.3.4.2 乳化性的测定

根据Pearce等^[8]的方法,进行鲤鱼肌原纤维蛋白匀浆液的制备和乳化性的测定。肌原纤维蛋白匀浆液的乳化活性(emulsification activity index, EAI)和乳化稳定性(emulsification stability index, ESI)分别按公式(1)、(2)进行计算。

$$\text{EAI}/(\text{m}^2/\text{g}) = \frac{2 \times 2.303}{\rho \times (1 - \varphi) \times 10^4} \times A_0 \times D \quad (1)$$

$$\text{ESI}/\% = \frac{A_{10}}{A_0} \times 100 \quad (2)$$

式中: A_0 、 A_{10} 分别为乳状液0、10 min时在500 nm波长处的吸光度; φ 为油相体积分数(20%); ρ 为样品初始蛋白质量浓度/(mg/mL); D 为稀释倍数。

1.3.4.3 δ -电势的测定

将蛋白样品用磷酸盐缓冲液(10 mmol/L、pH 7.0)稀释至相同质量浓度(1 mg/mL),注入到弯曲的毛细管样品池内,使用激光粒度仪在常温条件下测定其 δ -电势。

1.3.5 镜鲤肌原纤维蛋白结构变化指标的测定

1.3.5.1 巯基含量的测定

参考Xia Xiufang等^[9]的方法进行活性巯基含量的测定。取1 mL肌原纤维蛋白溶液(2 mg/mL)用8 mL Tris-甘氨酸溶液(pH 8, 每升中含有10.4 g Tris、6.9 g甘氨酸、1.2 g乙二胺四乙酸)处理,然后经均质和离心(10 000 r/min、15 min)除去不溶性蛋白。取4.5 mL上清液和0.5 mL 10 mmol/L Ellman试剂反应(用pH 8.0 Tris-甘氨酸缓冲液配制,含有4 mg/mL DTNB),空白中含有4.5 mL pH 8.0的Tris-甘氨酸缓冲液和0.5 mL 10 mmol/L Ellman试剂,反应30 min,使用紫外-可见分光光度计在412 nm波长处测定吸光度。

参考Ellman^[10]的方法进行总巯基含量的测定。取1 mL 2 mg/mL肌原纤维蛋白溶液加入离心管中,加入8 mL Tris-甘氨酸溶液(pH 8.0, 每升该溶液中含有10.4 g Tris、6.9 g甘氨酸、1.2 g乙二胺四乙酸、8 mol尿素),混匀后离心(10 000 r/min、15 min),收集上清液。取4.5 mL上清液和0.5 mL 10 mmol/L Ellman试剂反应,30 min后使用紫外-可见分光光度计在412 nm波长处测定吸光度,被溶解的蛋白质量浓度使用双缩脲法测定。

1.3.5.2 自由氨基酸含量的测定

自由氨基酸含量的测定参考Adler-Nissen等^[11]的方法。用0.21 mol/L pH 8.2磷酸盐缓冲液(含0.1 g/L SDS)将蛋白质溶液稀释到0.1 mg/mL,然后取0.25 mL的蛋白溶液与2 mL 0.01 g/L TNBS溶液在50 °C条件下避光水浴1 h,加入4.0 mL 0.1 mol/L HCl终止反应。混合溶液在室温条件平衡30 min后,在340 nm波长处测定溶液的吸光度。以L-亮氨酸在蛋白质中的含量表征自由氨基酸的含量。

1.3.5.3 二聚酪氨酸含量的测定

参考Davies等^[12]的方法进行二聚酪氨酸含量的测定,并稍作修改。取2 mg/mL肌原纤维蛋白溶液注入荧光比色杯中,使用F-4500荧光分光光度计测定荧光强度。测定条件:激发波长为325 nm,发射波长为420 nm,激发波长和发射波长狭缝宽均为5 nm。上清液的蛋白质量浓度(2 mg/mL)在540 nm波长处采用双缩脲法测定,以牛血清白蛋白作标准曲线。用测得的荧光强度除以蛋白质量浓度(2 mg/mL)得到相对荧光值表征二聚酪氨酸含量。

1.3.5.4 表面疏水性的测定

表面疏水性使用荧光探针ANS法进行测定(ANS是一种疏水性探针,非极性环境有很好的荧光性)。分别配制0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mol/L肌原纤维蛋白溶液,吸取每个浓度梯度的蛋白溶液5 mL,分别与25 μ L 8 mmol/L ANS溶液(溶剂为pH 6.25 0.1 mol/L KH_2PO_4 缓冲液)混合,室温避光反应20 min。随后将样品注入宽度为10 mm的荧光比色杯中,利用F-4500荧

光分光光度计测量荧光强度。测量条件:激发波长为370 nm,发射波长为470 nm,狭缝宽度10 nm,在室温(20 °C)下测定。以荧光强度值为纵坐标,蛋白质量浓度(mg/mL)为横坐标做标准曲线,标准曲线的斜率即代表蛋白的表面疏水性。

1.3.5.5 α -螺旋含量的测定

参考Liu Qian等^[13]的方法进行蛋白质二级结构含量的测定。配制0.2 mg/mL的肌原纤维蛋白溶液,注入1 mm宽的CD石英比色杯中,使用CD仪进行光谱扫描。扫描速度100 nm/min,响应时间25 s,缝宽1.0 nm,光谱扫描范围200~260 nm。用平均摩尔椭圆率 $[\theta]$ /(deg·cm²)/dmol来表示圆二色性,数据处理通过Yang's方法计算蛋白质 α -螺旋的含量。

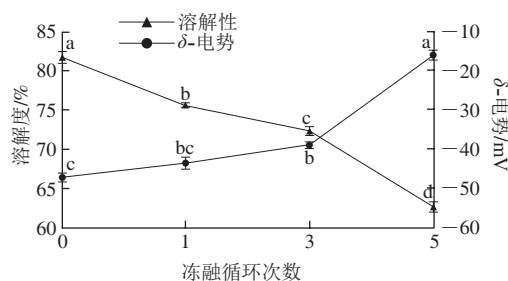
1.4 数据处理与分析

所有实验重复3次,结果取平均值。用Statistix 8.0软件进行数据分析,通过Turkey test程序对平均数之间的差异显著性进行分析,并用Sigmaplot 11.0软件制图。

2 结果与分析

2.1 冷冻-解冻循环对镜鲤肌原纤维蛋白功能特性的影响

2.1.1 对蛋白质溶解度和 δ -电势的影响



同一指标小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$)。下同。

图1 反复冷冻-解冻对镜鲤肌原纤维蛋白溶解度和 δ -电势的影响

Fig. 1 Influence of freeze-thaw cycles on solubility and δ -potential of myofibrillar protein from mirror carp

溶解度是与蛋白质功能性有关的一个重要指标,能够直接反映出蛋白质变性和聚集的变化^[14]。从图1中可以看出,随着冻融次数的增加,镜鲤肌原纤维蛋白的溶解度显著下降($P < 0.05$)。新鲜肉样的蛋白溶解度为81.87%,经过1、3、5次冻融循环后,蛋白的溶解度分别降低至75.80%、72.47%、62.85%。经过反复冻融后肌原纤维蛋白溶解度降低,这可能是因为肌原纤维蛋白属于盐溶性蛋白,蛋白质分子能够通过共价或非共价键连接形成较多的高分子聚集物^[15],导致蛋白溶解度下降。反复冷冻-解冻造成肉中水分子形成冰晶,导致组织细胞内尚未冻结的细胞液浓缩,细胞液中溶剂及金属盐离

子浓度增大。离子强度增大造成蛋白质氧化加速,引起蛋白质分子解折叠,疏水性基团暴露出来,促使蛋白质分子间交联形成聚集和沉淀,故肌原纤维蛋白溶解度下降。此外,氧化还会促使巯基基团相互作用形成更多的二硫键,蛋白质聚集程度增大,降低了蛋白的溶解度。Sriket等^[3]发现虾肉蛋白质的溶解度会随着反复冻融次数的增加而降低,冻融5次后黑虾、白虾的蛋白溶解度分别降低了10.75%和12.82%。Srikar等^[16]也曾报道粉红鲈鱼蛋白在冻藏过程中溶解度下降。

从图1中可以看出,新鲜肉样蛋白的 δ -电势为 -47.00 mV,而随着冷冻-解冻次数的增加,蛋白的 δ -电势显著增加($P<0.05$),当冷冻-解冻5次后, δ -电势达到最高,为 -15.67 mV。电势绝对值降低即蛋白质分子间的斥力减弱,同时蛋白质分子间聚集的机率增大。镜鲤鱼经过1次和3次冻融循环后 δ -电势差异不显著($P>0.05$)。蛋白质溶液中主要含有带正电荷的组氨酸、精氨酸和赖氨酸,带负电荷的谷氨酸和天冬氨酸^[17]。 δ -电势的显著上升说明在反复冻融过程中蛋白质分子发生聚集形成大分子,使得 $-\text{COOH}$ 和 $-\text{NH}_2$ 的数目减少,溶液的极性降低,电荷密度减小。这也说明了反复冻融过程引起了大分子的聚集从而降低了蛋白质的溶解性。Mohan等^[18]在研究南亚野鲮蛋白质的功能特性时发现蛋白质聚集会导致肌原纤维蛋白溶解度下降。

2.1.2 对蛋白质乳化特性的影响

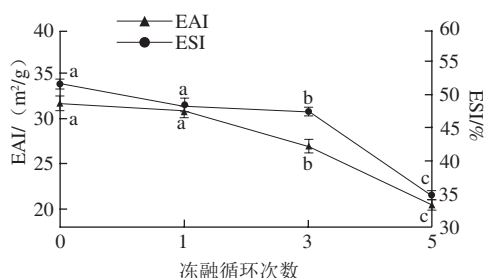


图2 反复冷冻-解冻对镜鲤鱼肌原纤维蛋白乳化性的影响

Fig. 2 Influence of freeze-thaw cycles on emulsifying properties of myofibrillar protein from mirror carp

蛋白质的乳化特性可用来反映蛋白质与蛋白质、蛋白质与脂肪之间的交联能力。通常用EAI和ESI表示乳化能力的大小。从图2可以看出,鲤鱼肌原纤维蛋白的EAI随着冷冻-解冻次数的增加而降低。其中,新鲜样品的EAI最高,乳化性最高,为 31.68 m²/g。与新鲜样品相比,冻融1次之后EAI降低了2.87%,但差异不显著($P>0.05$)。说明在初期冷冻-解冻过程中,冰晶的形成和升华还未对肌肉细胞造成严重的机械损伤,此时蛋白发生轻微氧化,吸附在界面膜上的蛋白质仍然较稳

定。与冻融循环1次相比,经过3次冻融循环后EAI下降至 26.73 m²/g,下降速度明显增大,说明此时蛋白质的变性程度也增大。冻融到第5次,EAI急剧下降至 20.67 m²/g,表明经过5次冷冻-解冻过程后的镜鲤鱼肌肉细胞机械损伤极其严重,蛋白变性剧烈,肌球蛋白的交联程度增大,从而使蛋白丧失了表面吸附脂肪颗粒的能力。EAI指蛋白质在形成乳状液时迅速吸附在水-油界面上,防止絮凝和聚结的能力^[19]。随着镜鲤鱼冻融次数的增加,蛋白发生氧化变性,产生大分子蛋白聚集体,因此能够用来作为表面活性剂的蛋白分子变少,导致蛋白分子表面吸附脂肪颗粒的灵活性下降,故EAI下降^[20]。

ESI是反映蛋白质保持乳化体系中油水界面稳定状况的重要指标。如图2所示,反复冷冻-解冻后,镜鲤鱼肌原纤维蛋白的ESI显著下降($P<0.05$),样品冻融的次数越多,蛋白乳化液的稳定性越差。与新鲜样品相比,第5次解冻后镜鲤鱼肌原纤维蛋白的ESI由51.57%下降至34.83%。反复冷冻-解冻阻碍了蛋白形成稳定的界面膜,蛋白与脂肪间交联能力下降,进而影响了蛋白的乳化能力。并且被用作表面活性剂的有效蛋白分子也不再形成稳定的界面蛋白膜,故蛋白ESI下降,表现为镜鲤鱼背部肉肌原纤维蛋白EAI和ESI均降低。郭延娜^[21]研究发现,冷冻和解冻过程会造成猪肉肌原纤维蛋白EAI和ESI的下降,与本研究结果趋势一致。此外,本研究中蛋白乳化特性的降低趋势也与表面疏水性的上升和溶解性的下降趋势一致。随着冷冻-解冻次数的增加,鱼肉蛋白的变性程度增大,蛋白的表面疏水性增加,促使蛋白质-蛋白质分子间的相互作用增强聚集形成大分子蛋白,蛋白溶解度随之降低,用于降低界面膜表面张力的乳液微粒直径增大,故蛋白的乳化作用降低。

2.2 冷冻-解冻循环对镜鲤鱼肌原纤维蛋白结构特性的影响

2.2.1 对蛋白质巯基含量的影响

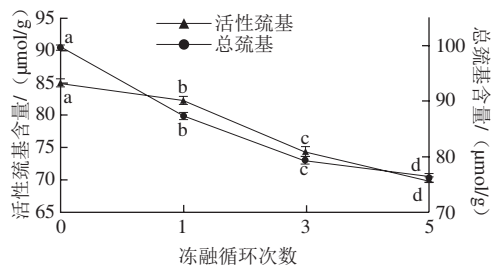


图3 反复冷冻-解冻对镜鲤鱼肌原纤维蛋白巯基含量的影响

Fig. 3 Influence of freeze-thaw cycles on sulfhydryl content of mirror carp myofibrillar protein

总巯基是指蛋白质分子的所有巯基,它包括位于蛋白质分子表面的活性巯基以及包埋于蛋白质分子内部的巯基。活性巯基是指暴露于蛋白质分子表面的巯基。如

图3所示,随着冻融次数的增加,总巯基和活性巯基的含量均显著降低($P<0.05$)。新鲜鱼肉蛋白的活性巯基和总巯基含量分别为84.33 $\mu\text{mol/g}$ 和98.93 $\mu\text{mol/g}$ 。冷冻-解冻5次后分别下降到69.10 $\mu\text{mol/g}$ 和75.40 $\mu\text{mol/g}$,分别下降了18.06%和23.78%。总巯基和活性巯基含量的减少是由于巯基的氧化造成多肽内部或多肽间形成二硫键,或是巯基被进一步氧化成磺酸类或其他氧化产物,引起蛋白质分子间发生聚合、交联,导致巯基含量降低,同时蛋白质的空间结构也发生了改变。此外,巯基含量的变化与 α -螺旋含量及蛋白溶解度的降低也相关。Wu Shengjun等^[14]也发现在冷冻贮存过程中,氧化反应造成花鲢鱼的肌原纤维蛋白巯基含量逐渐降低。反复冻融过程中,冰晶逐渐增长,易刺破细胞促使汁液逐渐外溢,蛋白质周围未冻结溶液的粒子浓度继续增加,促使蛋白质变性加速;因此,蛋白质空间结构不断发生变化,导致巯基基团含量发生改变^[22]。Benjakul等^[23]研究发现,鲮鱼经过冷冻-解冻循环后,其肌肉中表面巯基含量下降,而总巯基含量无显著性变化,这说明冻藏引起蛋白质巯基含量的变化可能还受肌肉类型的影响。

2.2.2 对蛋白质自由氨基酸、二聚酪氨酸含量和表面疏水性的影响

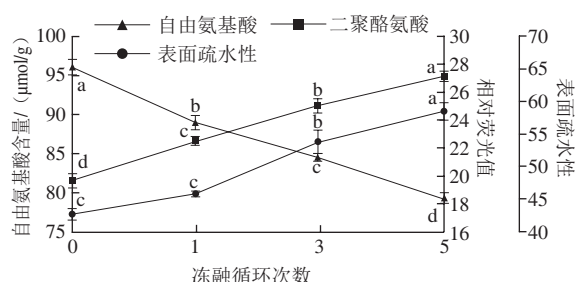


图4 反复冷冻-解冻对镜鲤肌原纤维蛋白自由氨基酸、二聚酪氨酸含量和表面疏水性的影响

Fig. 4 Influence of freeze-thaw cycles on free amino acids, dityrosine content and surface hydrophobicity of mirror carp myofibrillar protein

肌原纤维蛋白的自由氨基酸含量通常用来表征赖氨酸侧链的变化情况^[24],可侧面反映蛋白的结构变化及其氧化变性程度。从图4可以看出,新鲜肉样蛋白的自由氨基酸含量为96.27 $\mu\text{mol/g}$,经过反复冻融1、3、5次后分别下降了7.43%、12.96%和17.43%。在冷冻贮藏期间,肉蛋白的氧化使赖氨酸残基上的 $\epsilon\text{-NH}_2$ 通过脱氨基作用很容易转化为羰基,这些羰基衍生物随即与 -NH_2 反应,从而进一步降低游离氨基酸的含量^[25]。Xia Xiufang等^[9]报道冷冻-解冻循环加速了蛋白的氧化,从而产生了较高含量的羰基。由于自由氨基酸含量是在SDS存在的情况下测定的,SDS能破坏通过非共价键连接的聚合物;因此,自由氨基酸含量的下降可能由赖氨酸的 $\epsilon\text{-NH}_2$ 与羰基衍生物之间的一些共价键被破坏引起的,而这些赖氨酸和羰基

衍生物是由冷冻-解冻过程中发生的蛋白氧化作用产生。

二聚酪氨酸是两个酪氨酸基团发生络合反应产生的,这两个酪氨酸基团的位置可位于两个不同蛋白质侧链上,也可以位于相同蛋白质侧链的两个不同的位点上^[26]。酪氨酸的含量也常被用来反映蛋白的氧化程度。反复冷冻-解冻对镜鲤肌原纤维蛋白二聚酪氨酸含量的影响如图4所示,随着冷冻-解冻循环次数的增加,二聚酪氨酸的含量逐渐增大,相对荧光值从最初的19.64增加到了27.16。这可能是因为经过多次冷冻-解冻循环后蛋白发生氧化,氨基酸侧链受到自由基的不断攻击,逐渐形成越来越多的酪氨酸残基和酪氨酸酰胺自由基,经过异构化和烯醇化作用后生成了二酪氨酸^[27]。

蛋白质表面疏水性是表征蛋白质分子表面疏水性氨基酸残基分布数量的一个重要指标^[28],可以用它来反映蛋白质的变性程度,表面疏水性越高说明蛋白变性程度越大^[29]。如图4所示,新鲜鱼肉的肌原纤维蛋白表面疏水性为42.67,冷冻-解冻1次后,鲤鱼脊背肌肉肌原纤维蛋白表面疏水性增加了7.27%,但差异不显著($P>0.05$),而经过5次的冷冻-解冻循环后,其表面疏水性增加到58.50,增加了37.10% ($P<0.05$)。表面疏水性增加说明肌原纤维蛋白的构象发生了变化,形成了异于天然结构的状态^[30],埋藏在蛋白质空间构象内部的疏水性氨基酸(如色氨酸和苯丙氨酸)残基暴露。反复进行的冷冻-解冻过程促使蛋白质变性,为荧光探针ANS提供了更多的结合位点,故冻融循环次数的增加使得肌原纤维蛋白表面疏水性的含量不断增加。Korzeniowska等^[31]在研究冻融处理对太平洋鲑鱼天然肌动蛋白的理化性质的影响中发现,冻融循环后蛋白的表面疏水性显著增加,他认为肌球蛋白头部的变化引起了疏水性基团的暴露。Sriket等^[3]研究发现黑虎虾和白虎虾经过反复冷冻-解冻后,其蛋白表面疏水性增加,5次循环后分别增加了21.9%和37.9%。Careche等^[32]在研究冻藏鸡肉时也发现类似的结果,他们认为冻藏鸡肉蛋白表面疏水性的增加可能是肌肉蛋白在冻藏过程中蛋白氧化后轻微变性伸展导致的。此外,蛋白质的表面疏水性还能够侧面反映蛋白质内部结构的变化,随冻融次数的增加,蛋白质内部疏水性基团暴露,蛋白质发生解折叠和相互交联,故进一步印证蛋白溶解度的降低和蛋白稳定性的下降。本研究中,经过反复冻融的镜鲤肌原纤维蛋白表面疏水性的增加与溶解度降低的趋势是一致的。

2.2.3 α -螺旋含量的变化

CD图谱可用来表征蛋白质二级结构的变化,其中 α -螺旋是蛋白质中最典型的二级结构。肌原纤维蛋白的CD图谱通常在波长208 nm和222 nm处出现两个负峰,这两个特征峰即代表肌球蛋白尾部所富含的 α -螺旋结构。未经冷冻处理及经过多次冷冻-解冻后镜鲤肌原纤

维蛋白的CD图谱及 α -螺旋含量如图5所示。可以看出,随着冷冻-解冻循环次数的增加,鱼肉蛋白的CD曲线下移, α -螺旋含量下降。冻融循环1次后, α -螺旋含量从最初的57.58%下降至55.15%,经过3次和5次冻融循环后, α -螺旋含量分别下降了8.67%和15.09%。这意味着随冷冻-解冻循环次数的增加,蛋白质二级结构不断被破坏,部分 α -螺旋结构丧失。Jia Na等^[33]也曾报道过冷冻-解冻处理会破坏猪肉肌原纤维蛋白的 α -螺旋结构并导致其含量下降。 α -螺旋结构主要依靠羰基氧(—CO)和多肽链的亚氨基氢(—NH—)之间的氢键来维系^[34]。而这些氢键很可能会受到冷冻或冻藏过程中物理效应的干扰而被破坏,如水分迁移、冰重结晶以及蛋白质遭受的机械损伤等^[24]。此外,蛋白质在冻藏过程中的加速氧化是肌原纤维蛋白的螺旋结构破坏的另一个原因。Sun Weizheng等^[35]研究发现蛋白质受到氧化会降低 α -螺旋结构的相对含量。

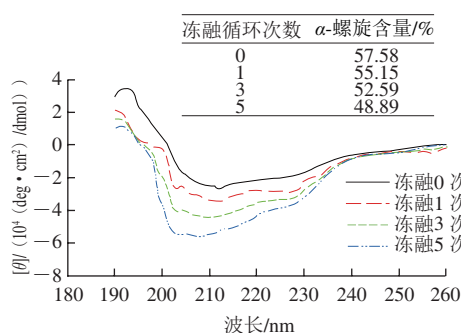


图5 反复冷冻-解冻对镜鲤肌原纤维蛋白CD图谱的影响

Fig. 5 Influence of freeze-thaw cycles on circular dichroism spectrum of mirror carp myofibrillar protein

3 结论

镜鲤鱼经过反复冷冻-解冻循环后,蛋白质的乳化特性和溶解性降低, δ -电势、二聚酪氨酸含量、表面疏水性升高,巯基、自由氨基酸和 α -螺旋含量下降。冷冻解冻循环过程中冰晶的长大和重结晶破坏了蛋白的结构,降低了蛋白质的功能特性。因此镜鲤鱼在运输、冻藏过程中应防止温度波动,以维持蛋白质特有的结构,保持其良好的功能性质。

参考文献:

- [1] LEYGONIE C, BRITZ T J, HOFFMAN L C. Impact of freezing and thawing on the quality of meat: review[J]. Meat Science, 2012, 91(2): 93-98. DOI:10.1016/j.meatsci.2012.01.013.
- [2] UTRERA M, MORCUENDE D, GANHÃO R, et al. Role of phenolics extracting from *Rosa canina* L. on meat protein oxidation during frozen storage and beef patties processing[J]. Food & Bioprocess Technology, 2014, 8(4): 854-864. DOI:10.1007/s11947-014-1450-3.
- [3] SRIKET P, BENJAKUL S, VISESSANGUAN W, et al. Comparative studies on the effect of the freeze-thawing process on the physicochemical properties and microstructures of black tiger

shrimp (*Penaeus monodon*) and white shrimp (*Penaeus vannamei*) muscle[J]. Food Chemistry, 2007, 104(1): 113-121. DOI:10.1016/j.foodchem.2006.11.004.

- [4] TURHAN S, USTUN S N, BANK I. Effect of freeze-thaw cycles on total and heme iron contents of bonito (*Sarda sarda*) and bluefish (*Pomatomus saltator*) fillets[J]. Journal of Food Composition & Analysis, 2006, 19(4): 384-387. DOI:10.1016/j.jfca.2004.10.005.
- [5] BENJAKUL S, BAUER F. Biochemical and physicochemical changes in catfish (*Silurus glanis* Linne) muscle as influenced by different freeze-thaw cycles[J]. Food Chemistry, 2001, 72(2): 207-217. DOI:10.1016/S0308-8146(00)00222-3.
- [6] XIONG Youling L., NOEL D C, MOODY W G. Textural and sensory properties of low-fat beef sausages with added water and polysaccharides as affected by pH and salt[J]. Journal of Food Science, 1999, 64(3): 550-554. DOI:10.1111/j.1365-2621.1999.tb15083.x.
- [7] AÑÓN M C, DE LAMBALLERIE M, SPERONI F. Effect of high pressure on solubility and aggregability of calcium-added soybean proteins[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2012, 16(39): 155-162. DOI:10.1016/j.ifset.2012.05.006.
- [8] PEARCE K N, KINSELLA J E. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1978, 26(3): 716-723. DOI:10.1021/jf60217a041.
- [9] XIA Xiufang, KONG Baohua, LIU Qian, et al. Physicochemical change and protein oxidation in porcine *longissimus dorsi* as influenced by different freeze-thaw cycles[J]. Meat Science, 2009, 83(2): 239-245. DOI:10.1016/j.meatsci.2009.05.003.
- [10] ELLMAN G L. Tissue sulfhydryl groups[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1959, 82(1): 70-77. DOI:10.1016/0003-9861(59)90090-6.
- [11] ADLER-NISSEN J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1979, 27(6): 1256-1262. DOI:10.1021/jf60226a042.
- [12] DAVIES K J, DELSIGNORE M E, LIN S W. Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. modification of amino acids[J]. Journal of Biological Chemistry, 1987, 262(20): 9902-9907.
- [13] LIU Qian, LU Yan, HAN Jianchun, et al. Structure-modification by moderate oxidation in hydroxyl radical-generating systems promote the emulsifying properties of soy protein isolate[J]. Food Structure, 2015, 6(10): 21-28. DOI:10.1016/j.fostr.2015.10.001.
- [14] WU Shengjun, PAN Saikun, WANG Hongbin. Effect of trehalose on *Lateolabrax japonicus*, myofibrillar protein during frozen storage[J]. Food Chemistry, 2014, 160: 281-285. DOI:10.1016/j.foodchem.2014.03.100.
- [15] CHANARAT S, BENJAKUL S. Effect of formaldehyde on protein cross-linking and gel forming ability of surimi from lizardfish induced by microbial transglutaminase[J]. Food Hydrocolloids, 1951, 30(2): 704-711. DOI:10.1016/j.foodhyd.2012.09.001.
- [16] SRIKAR L N, REDDY G V S. Protein solubility and emulsifying capacity in frozen stored fish mince[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1991, 55(3): 447-453. DOI:10.1002/jfca.2740550312.
- [17] MALHOTRA A, COUPLAND J N. The effect of surfactants on the solubility, zeta potential, and viscosity of soy protein isolates[J]. Food Hydrocolloids, 2004, 18(1): 101-108. DOI:10.1016/S0268-005X(03)00047-X.
- [18] MOHAN M, RAMACHANDRAN D, SANKAR T V. Functional properties of Rohu (*Labeo rohita*) proteins during iced storage[J]. Food Research International, 2006, 39(8): 847-854. DOI:10.1016/j.foodres.2006.04.003.

- [19] LIU Qian, CHEN Qian, KONG Baohua, et al. The influence of superchilling and cryoprotectants on protein oxidation and structural changes in the myofibrillar proteins of common carp (*Cyprinus carpio*) surimi[J]. LWT-Food Science and Technology, 2014, 57(2): 603-611. DOI:10.1016/j.lwt.2014.02.023.
- [20] XIONG Youling L., AGYARE K K, ADDO K. Hydrolyzed wheat gluten suppresses transglutaminase-mediated gelation but improves emulsification of pork myofibrillar protein[J]. Meat Science, 2008, 80(2): 535-544. DOI:10.1016/j.meatsci.2008.02.005.
- [21] 郭延娜. 加工条件和冻结对猪肉肌原纤维蛋白乳化特性的影响研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2009: 47-48.
- [22] SOMPONGSE W, ITOH Y, OBATAKE A. Effect of cryoprotectants and a reducing reagent on the stability of actomyosin during ice storage[J]. Fisheries Science, 1996, 62(1): 220-221. DOI:10.2331/fishsci.62.73.
- [23] BENJAKUL S, BAUER F. Biochemical and physicochemical changes in catfish (*Silurus glanis*, Linne) muscle as influenced by different freeze-thaw cycles[J]. Food Chemistry, 2001, 72(2): 207-217. DOI:10.1016/S0308-8146(00)00222-3.
- [24] ZHANG Mingcheng, LI Fangfei, DIAO Xinping, et al. Moisture migration, microstructure damage and protein structure changes in porcine longissimus muscle as influenced by multiple freeze-thaw cycles[J]. Meat Science, 2017, 133(11): 10-18. DOI:10.1016/j.meatsci.2017.05.019.
- [25] CAO Yungang, XIONG Youling L.. Chlorogenic acid-mediated gel formation of oxidatively stressed myofibrillar protein[J]. Food Chemistry, 2015, 180(1): 235-243. DOI:10.1016/j.foodchem.2015.02.036.
- [26] JIA Guoliang, NIRASAWA S, JI Xiaohua, et al. Physicochemical changes in myofibrillar proteins extracted from pork tenderloin thawed by a high-voltage electrostatic field[J]. Food Chemistry, 2018, 240: 910-916. DOI:10.1016/j.foodchem.2017.07.138.
- [27] CORTÉS-RUIZ J A, PACHECO-AGUILAR R, RAMÍREZ-SUÁREZ J C, et al. Conformational changes in proteins recovered from jumbo squid (*Dosidicus gigas*) muscle through pH shift washing treatments[J]. Food Chemistry, 2016, 196(9): 769-775. DOI:10.1016/j.foodchem.2015.09.054.
- [28] 李侠, 孙圳, 杨方威, 等. 适宜冻结温度保持牛肉蛋白稳定性抑制水分态变[J]. 农业工程学报, 2015, 31(23): 238-245. DOI:10.11975/j.issn.1002-6819.2015.23.032.
- [29] 李艳青. 蛋白质氧化对鲤鱼蛋白结构和功能性的影响及其控制技术[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2013: 77.
- [30] CHEN Xing, ZHOU Ruiyun, XU Xinglian, et al. Structural modification by high-pressure homogenization for improved functional properties of freeze-dried myofibrillar proteins powder[J]. Food Research International, 2017, 100(7): 193-200. DOI:10.1016/j.foodres.2017.07.007.
- [31] KORZENIOWSKA M, CHEUNG I W Y, LI-CHAN E C Y. Effects of fish protein hydrolysate and freeze-thaw treatment on physicochemical and gel properties of natural actomyosin from Pacific cod[J]. Food Chemistry, 2013, 138(2/3): 1967-1975. DOI:10.1016/j.foodchem.2012.09.150.
- [32] CARECHE M, COFRADES S J, CARBALLO A, et al. Emulsifying and gelation properties during freezing and frozen storage of hake, pork, and chicken actomyosins as affected by addition of formaldehyde[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46(3): 813-819. DOI:10.1021/jf9705173.
- [33] JIA Na, WANG Letian, SHAO Junhua, et al. Changes in the structural and gel properties of pork myofibrillar protein induced by catechin modification[J]. Meat Science, 2017, 127(1): 45-74. DOI:10.1016/j.meatsci.2017.01.004.
- [34] LIU R, ZHAO S M, XIONG S B, et al. Role of secondary structures in the gelation of porcine myosin at different pH values[J]. Meat Science, 2008, 80(3): 632-639. DOI:10.1016/j.meatsci.2008.02.014.
- [35] SUN Weizheng, ZHOU Feibai, SUN Da-Wen, et al. Effect of oxidation on the emulsifying properties of myofibrillar proteins[J]. Food and Bioprocess Technology, 2013, 6(7): 1703-1712. DOI:10.1007/s11947-012-0823-8.