

冻融与冻藏对乌鳢肌原纤维蛋白与酸菜鱼汤中特征风味物质结合特性的影响

袁 丽, 苏 凯, 刘 璐, 冷伟军, 张 昊, 李梦哲, 石 彤, 包玉龙*, 高瑞昌*
(江苏大学食品与生物工程学院, 江苏 镇江 212013)

摘 要: 为探究冷冻处理对于鱼片与酸菜鱼汤中风味物质的结合特性影响, 以乌鳢的肌原纤维蛋白为对象, 研究冻融及冻藏处理对其理化特性及与己醛、辛醛、芳樟醇、月桂烯结合能力的变化。结果表明经过7 d贮藏后, 冻融组肌原纤维蛋白溶解度降低了约26%, 相较于冻藏组, 蛋白质氧化和三级结构变化程度更高, 产生了更多可溶性聚集体; 冻藏组溶解度降低了约33%, 相较于冻融组, 溶解度降低更加显著 ($P < 0.05$), 产生了更多不溶性聚集体。影响肌原纤维蛋白冷冻聚集的主要作用力是非共价键。分子对接结果表明, 芳樟醇、己醛和辛醛通过疏水作用和氢键与蛋白质结合, 月桂烯与蛋白结合的主要驱动力为疏水相互作用。冷冻处理通过减少蛋白质与醛类化合物结合的巯基基团和氢键, 降低了对己醛和辛醛的结合能力, 蛋白质表面疏水性的提高, 增加了对月桂烯和芳樟醇的结合能力, 冻融处理后蛋白质对于月桂烯的结合能力强于冻藏处理组。研究结果可以为冷冻酸菜鱼预制品的风味控制提供理论依据和参考。

关键词: 肌原纤维蛋白; 风味物质; 冷冻处理; 蛋白质聚集; 结合能力

Effects of Freeze-Thaw Treatment and Freeze Storage on the Binding Characteristics of Snakehead Myofibrillar Protein to Characteristic Flavor Substances in Fish Soup with Pickled Mustard Greens

YUAN Li, SU Kai, LIU Lu, LENG Weijun, ZHANG Hao, LI Mengzhe, SHI Tong, BAO Yulong*, GAO Ruichang*
(School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: The purpose of this study was to explore the effect of freeze treatment on the binding characteristics of fillets to flavor substances in fish soup with pickled mustard greens. The study focused on the effects of freeze-thaw treatment and freeze storage on the physicochemical properties of snakehead myofibrillar protein and its binding characteristics to hexanal, octanal, linalool and myrcene. The results showed that after 7 days of storage, the solubility of myofibrillar protein decreased by about 26% in the freeze-thaw group. Compared with the freeze storage group, the oxidation degree and tertiary structural changes of myofibrillar protein were higher and more soluble aggregates were formed in the freeze-thaw group. The solubility of myofibrillar protein decreased by about 33% in the freeze storage group, which showed a more significant decrease compared to the freeze-thaw treatment ($P < 0.05$), resulting in more insoluble aggregates. The major force for the aggregation of myofibrillar proteins after freezing was non-covalent bonding. Molecular docking results indicated that linalool, hexanal and octanal could bind to myofibrillar proteins through hydrophobic interactions and hydrogen bonds, while the major driving force for the binding of myrcene to myofibrillar proteins was hydrophobic interaction. Freeze treatment reduced the binding capacity of hexanal and octanal to sulfhydryl groups in myofibrillar proteins through hydrogen bonds, improved the surface hydrophobicity of myofibrillar proteins, but increased the binding ability of myrcene and linalool to myofibrillar proteins. Freeze-thaw treatment increased the binding capacity of myofibrillar proteins to myrcene compared

收稿日期: 2024-03-02

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-46)

第一作者简介: 袁丽 (1978—) (ORCID: 0000-0002-7622-2342), 女, 教授, 博士, 研究方向为水产品加工。

E-mail: yuanli24@163.com

*通信作者简介: 包玉龙 (1988—) (ORCID: 0000-0003-2911-7483), 男, 教授, 博士, 研究方向为水产品加工。

E-mail: yulong@ujs.edu.cn

高瑞昌 (1976—) (ORCID: 0000-0001-5742-5446), 男, 教授, 博士, 研究方向为水产品加工与综合利用。

E-mail: xiyuan2008@ujs.edu.cn

with freeze storage treatment. The results of this research provide a theoretical basis and reference for flavor control of frozen prepared fish soup with pickled mustard greens.

Keywords: myofibrillar protein; flavor compounds; freeze treatment; protein aggregation; binding ability

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240302-002

中图分类号: TS254.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2024) 21-0121-09

引文格式:

袁丽, 苏凯, 刘璐, 等. 冻融与冻藏对乌鳢肌原纤维蛋白与酸菜鱼汤中特征风味物质结合特性的影响[J]. 食品科学, 2024, 45(21): 121-129. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240302-002. <http://www.spkx.net.cn>

YUAN Li, SU Kai, LIU Lu, et al. Effects of freeze-thaw treatment and freeze storage on the binding characteristics of snakehead myofibrillar protein to characteristic flavor substances in fish soup with pickled mustard greens[J]. Food Science, 2024, 45(21): 121-129. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240302-002. <http://www.spkx.net.cn>

食品的气味是消费者判断食品质量好坏和可接受程度的重要感官属性, 气味感知取决于挥发性风味的物质种类和在食物基质中的释放或保留程度^[1]。食品基质中充当气味物质吸附的载体主要包括蛋白质、脂质及碳水化合物等^[2], 其中蛋白质因其重要的营养价值、功能特性和与风味物质结合的复杂机制, 长久以来备受学者们的关注。肌原纤维蛋白在肉制品中占比较高, 与风味物质之间的作用机制表现出复杂多样的特点^[2]。此外, 在产品加工和贮藏过程中, 外在因素会使肌原纤维蛋白结构发生展开或聚集, 导致其与气味物质的结合位点发生改变, 进而影响产品的风味^[3]。Xu Yongxia等^[4]研究显示, 草鱼肌原纤维蛋白其在加热前期结构展开, 疏水氨基酸和巯基的暴露会导致其风味结合能力增加, 而在加热后期由于肌原纤维蛋白的聚集减少了结合位点, 从而与醛类物质的结合能力下降。Cao Jinxuan等^[5]研究表明, 低氧化程度处理会增强G-肌动蛋白通过氢键与醇类的结合, 二级结构的变化和活性巯基的降低促进了醛类的释放。高子武等^[6]综述了肌原纤维蛋白与风味物质的相互作用机制, 表明蛋白质本身的相互作用和外源添加物竞争性结合风味化合物的结合位点, 是影响肌原纤维蛋白对风味化合物的吸附差异的主要原因。Zhang Jian等^[7]系统地比较了动物蛋白和植物蛋白的风味结合能力, 阐明影响蛋白质与风味物质结合的外在因素, 包括蛋白质氧化和pH值的变化等。

近年来酸菜鱼预制菜受到广大消费者的欢迎, 市场销量在2021年迎来爆发式增长, 线上线下市场总规模达到67.1亿元, 预计2025年将达到204.7亿元^[8]。酸菜主要选用芥菜, 其主要挥发性物质为2-乙基己醇、异长叶烯等^[9], 经过乳酸菌发酵会形成独特的风味。王浩文等^[10]利用气相色谱-质谱联用技术分析得出酸菜鱼汤中的主要风味物质有芳樟醇、月桂烯、草蒿脑、己醛等。乌鳢(*Channa argus*)又称黑鱼, 因其肉质鲜美、口感脆嫩、营养价值丰富, 成为制作酸菜鱼的最佳用料之一^[11], 常搭配酸菜鱼料理包进行运输和销售, 在此过程中鱼肉通

常要经历冻藏和冻融过程。冷冻和冻融会引起肌肉中的主要成分肌原纤维蛋白变性, 导致不可逆聚集^[12-13]。但是, 关于乌鳢等鱼肉肌原纤维蛋白在低温冷冻处理后与挥发性风味物质结合能力的变化研究较少。因此, 本研究根据王浩文等^[10]的研究选取酸菜鱼汤中4种特征风味物质(己醛、辛醛、月桂烯、芳樟醇), 提取新鲜乌鳢的肌原纤维蛋白, 经过冻融与冻藏处理后, 探究其与4种风味物质结合能力变化的关系, 以期为酸菜鱼预制菜的风味调控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜乌鳢(*Channa argus*)购于江苏镇江市京口区吉麦隆超市, 平均体长(41.6±2.0)cm, 体质量(0.74±0.19)kg。

8-苯胺基萘-1-磺酸盐(8-anilino-1-naphthalene sulfonic acid, ANS)、氯化钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、盐酸、三氯乙酸、乙醇、己醛、辛醛、月桂烯、芳樟醇(色谱级) 国药集团化学试剂有限公司; A016-2-2 ATP酶测试盒 南京建成生物工程研究所。

1.2 仪器与设备

Cary Eclipse荧光分光光度计 美国Varian公司; Avanti J-26XP超高速冷冻离心机 德国贝克曼库尔特有限公司; T18分散仪 德国IKA公司; Zsu3100激光粒度分析仪 英国马尔文仪器公司; PHS-3C pH计 上海仪电科学技术有限公司; UV 1600紫外-可见分光光度计 北京瑞利分析仪器; 7890B气相色谱仪、DB-WAX毛细管柱 美国安捷伦公司。

1.3 方法

1.3.1 肌原纤维蛋白的提取

参考Sun Fengyuan等^[14]的方法并稍作修改。将鲜活的乌鳢敲打头部致死后去除内脏, 置于冰袋中, 于15 min内运送到实验室, 去除鱼鳞、鱼皮并清洗干净,

取背部鱼肉并切碎,与4倍体积的预冷磷酸盐缓冲液(20 mmol/L、pH 7.0,含0.1 mol/L NaCl)混合,在冰水浴中以8 600 r/min均质1 min。将所得匀浆液以10 000 r/min在4℃条件下离心15 min,去除上清液,重复上述操作2次。最后加入4倍体积的预冷磷酸盐缓冲液(20 mmol/L、pH 7.0,含0.6 mol/L NaCl)并在相同条件下均质和离心,用4层纱布(1 mm×1 mm)过滤,所得滤液即为肌原纤维蛋白溶液,置于4℃冰箱保存备用,并使用双缩脲法测定蛋白质质量浓度。

1.3.2 肌原纤维蛋白的冷冻处理

使用磷酸盐缓冲液(20 mmol/L、pH 7.0,含0.6 mol/L NaCl)将上述所得的肌原纤维蛋白溶液稀释至5 mg/mL,分装到50 mL离心管中,每支加入40 mL,然后在-18℃的冰箱中冷冻23 h,随后,将冷冻样品在保持在4℃左右的水中解冻1 h,此24 h为一个冻融循环。按上述方法依次完成第3、5、7个冻融循环,冻融实验组以FT表示;另设冻藏组,在-18℃的冰箱分别保存3、5、7 d,冻藏实验组以FS表示,提取鲜活乌鳢鱼肉的肌原纤维蛋白溶液作为对照组。

1.3.3 肌原纤维蛋白的表观现象观察

取30 mL经过不同冷冻处理后的样品置于试管,密封保存在4℃冰箱,静置12 h,观察肌原纤维蛋白的表观变化情况,取鲜活乌鳢鱼肉的肌原纤维蛋白溶液作为对照组。

1.3.4 溶解度的测定

参考Dai Hongjie等^[15]的方法。将肌原纤维蛋白样品在10 000 r/min、4℃条件下离心15 min,用双缩脲法测定上清液蛋白质质量浓度。样品的蛋白溶解度计算公式为:

$$\text{蛋白溶解度}/\% = \frac{\text{上清液蛋白质量浓度}}{\text{冷冻前蛋白质量浓度}} \times 100 \quad (1)$$

1.3.5 浊度的测定

用20 mmol/mL磷酸钠缓冲液(pH 7.0)稀释不同冷冻处理后的肌原纤维蛋白样品至1 mg/mL,使用紫外-可见分光光度计测定样品在340 nm的吸光度,以 $A_{340\text{ nm}}$ 表示对应样品的浊度,每个样品设3个平行。

1.3.6 粒径的测定

参考Fang Bowen等^[16]的方法,将处理后的肌原纤维蛋白在5 000 r/min、4℃条件下离心20 min,取上清液,用20 mmol/mL磷酸钠缓冲液(pH 7.0,含0.6 mol/L NaCl)稀释到质量浓度为0.5 mg/mL,使用激光粒度分析仪对蛋白溶液的粒径分布进行测定。

1.3.7 肌原纤维蛋白的氧化变性程度测定

1.3.7.1 总巯基含量和活性巯基含量的测定

参考Wan Wei等^[17]的方法并作适当修改。总巯基含量的测定:取1 mL蛋白质样品,加入5 mL 8 mol/L的Tris-Gly尿素缓冲液(pH 8.0),再加入40 μL 5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid),

DTNB)溶液(10 mmol/L),涡旋混匀并在25℃黑暗中反应30 min,然后于412 nm波长处测定吸光度,以缓冲液作为空白对照。

活性巯基含量的测定:取1 mL稀释后的蛋白悬浮液,加入5 mL的Tris-Gly缓冲液(pH 8.0),再加入40 μL DTNB溶液(10 mmol/L),加样结束后涡旋混匀并在25℃反应30 min,然后于412 nm波长处测定吸光度,以缓冲液作为对照。

总巯基含量和活性巯基含量的计算公式如下:

$$\text{巯基含量}/(\mu\text{mol/g}) = \frac{A \times 10^6 \times D}{\epsilon \times C} \quad (2)$$

式中: ϵ 为摩尔消光系数(13 600 L/(mol·cm)); A 为吸光度; C 为样品蛋白的质量浓度/(mg/mL); D 为稀释倍数。

1.3.7.2 Ca^{2+} -ATP酶活性的测定

使用20 mmol/L、pH 7.0的Tris-HCl溶液(含0.6 mol/L NaCl),将肌原纤维蛋白的质量浓度稀释到0.3 mg/mL,采用超微量 Ca^{2+} -ATP酶活性试剂盒测定样品的肌原纤维蛋白 Ca^{2+} -ATP酶活性。定义:每小时含1 mg蛋白的组织中ATP酶分解ATP产生1 μmol无机磷的量为一个ATP酶活性单位,结果表示为U/mg。

1.3.7.3 表面疏水性的测定

参考Chelh等^[18]的方法,用荧光探针ANS测定肌原纤维蛋白表面疏水性。用20 mmol/mL磷酸钠缓冲液(pH 7.0,含0.6 mol/L NaCl)稀释蛋白的质量浓度至0.125、0.25、0.5 mg/mL和1.0 mg/mL,随后取稀释后的蛋白溶液3 mL与30 μL 8 mmol/L ANS溶液(用20 mmol/L pH 7.0磷酸钠缓冲液制备)混合,室温避光静置10 min,用荧光分光光度计测定混合物的相对荧光强度。测定条件为:激发和发射波长分别为395 nm和475 nm,狭缝宽度为5 nm,光电倍增管(photomultiplier tube, PMT)电压为600 V。肌原纤维蛋白的表面疏水性以荧光强度与肌原纤维蛋白质量浓度对应曲线的斜率表示。

1.3.8 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)

将肌原纤维悬浮液与样品缓冲液(2% SDS、20%甘油、0.016%溴酚蓝溶液)按4:1(V/V)混合,然后在95℃加热10 min,冷却后在电泳胶(5%的浓缩胶和10%的分离胶)中进行电泳。将蛋白质样品(10 μL)加载到样品孔上,并在80 V电压条件下电泳30 min,然后在120 V电压条件下电泳90 min。电泳结束后,用0.1%考马斯亮蓝R-250对凝胶进行30 min染色,然后使用含45%甲醇和10%乙酸的溶液进行脱色,直到蛋白质条带清晰。

1.3.9 内源荧光光谱的测定

使用20 mmol/mL磷酸钠缓冲液(pH 7.0,含0.6 mol/L NaCl)将肌原纤维蛋白溶液稀释至0.25 mg/mL,然后在

荧光分光光度计中扫描, 发射波长为295 nm, 光谱范围为300~370 nm, 激发和发射狭缝宽度均为5 nm, 扫描速率为60 nm/min, PMT电压为800 V。

1.3.10 分子对接

选取蛋白质中肌球蛋白为模型^[19], 探究其与香味化合物的相互作用机制。在Uniprot网站下载乌鳢肌球蛋白的氨基酸序列(ID: 13-634), 通过SWISS-MODEL工具(<https://swissmodel.expasy.org/>)搜索, 以高同源性蛋白2v26.1.A(同源性83.41%)为模板进行同源建模。4种香味化合物月桂烯(ID: 31253)、芳樟醇(ID: 6549)、己醛(ID: 6184)、辛醛(ID: 454)的三维结构从PubChem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)得到。采用Autodock4.0软件进行分子对接, 选择自由结合能最低的构象。

1.3.11 风味化合物结合能力的测定

参考王浩文等^[10]对不同青菜品种对老坛酸菜鱼调料风味影响的研究, 从酸菜鱼汤的特征风味物质中选取阈值较低的芳樟醇、月桂烯、己醛、辛醛, 用于探究不同冷冻处理方式对肌原纤维蛋白与风味物质相互作用的影响。将己醛、辛醛和月桂烯、芳樟醇分别溶解于少量甲醇中, 用蒸馏水稀释, 最终获得800 mg/kg的风味储备液。取10 mL处理后的肌原纤维蛋白样品, 放置于20 mL顶空萃取瓶中, 每组加入上述风味化合物储备液, 根据前期预实验的结果, 肌原纤维蛋白对己醛和辛醛的结合能力较强, 过低的浓度导致结合后无法被检测, 因此选择己醛和辛醛含量为5 mg/kg, 芳樟醇和月桂烯的含量为1 mg/kg。混合样品旋涡振荡10 s, 4℃条件下冷藏吸附12 h, 用于后续分析。

参考Pérez-Juan等^[20]的方法, 采用50/30 μm CAR/PDMS/DVB SPME萃取纤维, 暴露于顶空瓶中, 在30℃条件下萃取30 min, 使用装有火焰离子化检测器的7890B气相色谱仪进行分析。将萃取后的纤维迅速插入气相色谱仪进样口, 进样口温度设定为220℃, 以无分裂模式进行5 min的解吸附。风味化合物在DB-WAX毛细管柱(30 m×0.25 mm, 0.25 μm)中分离, 以氮气为载气, 线速度为20.4 cm/s, 烘箱温度设置在38℃, 保持6 min, 以6℃/min的速率将温度升高到105℃, 然后以15℃/min的速率将温度升高到220℃, 并保持5 min, 检测器温度设定在240℃。肌原纤维蛋白与挥发性风味物质的结合能力计算公式如下:

$$\text{风味化合物自由比例}/\% = \frac{\text{样品组峰面积}}{\text{对照组峰面积}} \times 100 \quad (3)$$

$$\text{结合能力}/\% = 1 - \text{风味化合物自由比例} \quad (4)$$

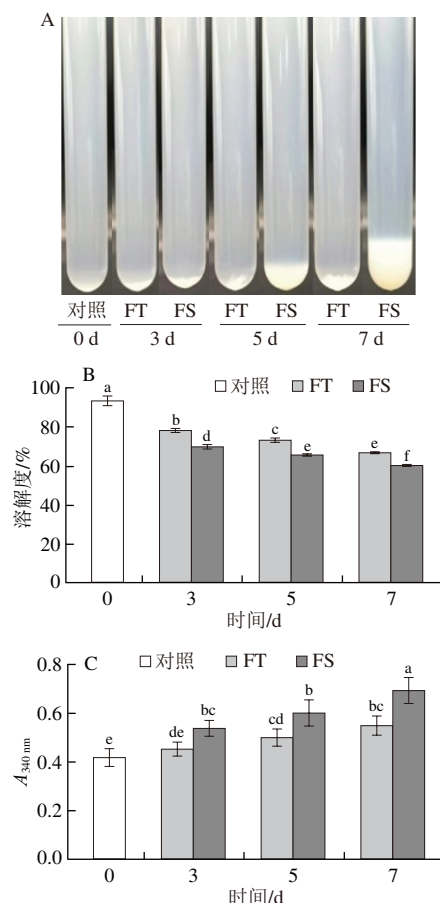
1.4 数据处理

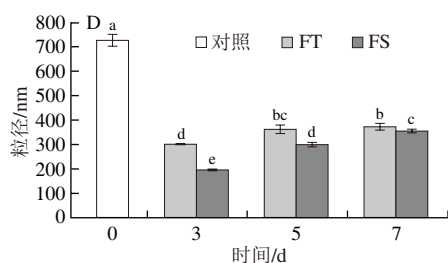
实验每个指标平行测定3次, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。SPSS Statistics 17.0进行显著性差异分析($P < 0.05$), Origin 8.0进行图形绘制。

2 结果与分析

2.1 冻融和冻藏处理对肌原纤维蛋白聚集程度的影响

从图1A可以观察到, 随着处理时间的延长, FT组和FS组蛋白质聚集的沉淀不断增多, 其中FS组相较于FT组聚集程度更大, 蛋白质沉淀更加明显。溶解度被认为是反映蛋白质功能的一个指标^[21], 如蛋白质变性和聚集程度。如图1B所示, 经过相同的处理时间, FT组和FS组肌原纤维蛋白的溶解度均逐渐降低, 第7天时分别显著下降约26%、33% ($P < 0.05$)。冷冻处理使肌原纤维蛋白发生变性, 导致蛋白分子内部结构展开暴露出疏水基团, 促使蛋白质分子间通过疏水作用等相互聚集, 形成聚集体, 使肌原纤维蛋白溶解度下降^[22]。第3、5、7天, FS组肌原纤维蛋白的溶解度比FT组更低 ($P < 0.05$), 表明相较于FT组, FS组肌原纤维蛋白产生更多的沉淀, 更易发生沉降, 与图1A的蛋白表观变化一致。





A. 外观; B. 溶解度; C. 浊度; D. 粒径。小写字母不同表示差异显著, $P < 0.05$, 下同。

图1 冻融和冻藏对肌原纤维蛋白聚集程度的影响

Fig. 1 Effects of freeze-thaw and freeze storage on the aggregation degree of myofibrillar proteins

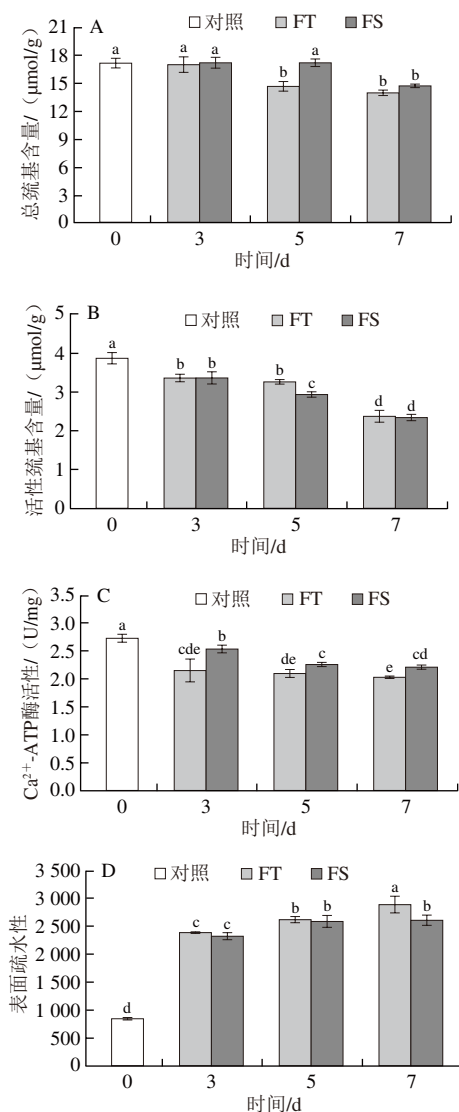
浊度可以反映蛋白质聚集的程度^[22]。如图1C所示, FT组与FS组肌原纤维蛋白的浊度随时间延长均不断增加, FT组浊度最终增加了约23% ($P < 0.05$), FS组增加了约39% ($P < 0.05$)。结果表明, 冷冻处理中冰晶的形成会破坏蛋白质结构, 暴露埋藏在蛋白质分子内部的疏水基团, 使蛋白质发生聚集进而增加浊度, 与Du Xin等^[23]对镜鲤鱼肉冻藏后的研究结果相一致。相较于FT组, FS组的蛋白浊度升高更加显著 ($P < 0.05$), 表明冻藏处理对蛋白质的聚集程度有更大影响。

粒径是描述蛋白质聚集的最常见的方法^[24], 通常定义为: 可见聚集体: $> 100 \mu\text{m}$; 微米 (亚可见颗粒): $1 \sim 100 \mu\text{m}$; 亚微米 (可溶性聚集体): $100 \sim 1\,000 \text{ nm}$; 纳米: $< 100 \text{ nm}$ 。如图1D所示, 在第3天时, 上清液可溶性蛋白的粒径显著降低 ($P < 0.05$), FT组和FS组从725 nm分别降低到300 nm和200 nm左右。蛋白质粒径的降低可能是经过冷冻后发生了显著的变性和聚集, 离心后较大的不溶性聚集体 (亚可见颗粒和可见聚集体) 易发生沉降, 粒径较小的可溶性蛋白质聚集体被保留到上清液中^[25]。此外, 随着处理时间的延长, 可溶性聚集体的粒径均不断增加, 表明持续的冻融和冻藏处理使上清液中的可溶性聚集体不断聚集。Fang Bowen等^[16]在研究冷冻处理对于鸡蛋液中蛋白质聚集时观察到相似结果, 即蛋白溶液冷冻后蛋白质发生聚集, 形成不溶性聚集体, 离心后上清液中蛋白的粒径先降低, 然后随冷冻时间延长而增大。Fang Bowen等^[26]还研究了酪蛋白酸钠在冻融条件下的聚集状态, 发现在冻融前期, 上清液中蛋白粒径降低, 冻融后期蛋白粒径不断增加。此外, 在本实验中, FT组上清液的蛋白粒径显著大于FS组 ($P < 0.05$), 可能是FS组聚集程度较大, 离心后表现出上清液中的蛋白质粒径较小。浊度和粒径的结果均表明相较于冻融处理, 冻藏处理的肌原纤维蛋白聚集程度更大, 产生的不溶性聚集体更多。

2.2 冻融和冻藏处理对肌原纤维蛋白氧化变性的影响

肌原纤维蛋白中巯基基团的数量较多, 其中肌球蛋白含有约42个巯基^[27], 巯基是蛋白质中最活跃的官能团

之一, 易被氧化形成二硫键, 诱导蛋白质交联和聚集, 导致蛋白质构象发生变化^[28]。由图2A、B可知, 在7 d处理过程中, 两个实验组总巯基和活性巯基均不断降低, FT组最终分别显著下降约18%和38% ($P < 0.05$), FS组显著下降约14%和39% ($P < 0.05$)。实验结果表明, 在蛋白质冻融和冻藏过程中, 总巯基和活性巯基均发生了显著氧化, 其中蛋白表面的活性巯基氧化程度高于总巯基, 与Jommark等^[29]的研究结果一致。第5天时, FT组总巯基含量显著性低于FS组 ($P < 0.05$), 可能是FT组蛋白质发生了更剧烈的变性, 导致总巯基发生更严重的氧化而降低; 活性巯基含量显著高于FS组 ($P < 0.05$), 可能是FT组蛋白质结构发生变化导致内部的巯基发生暴露, 也可能由于FS组蛋白质发生聚集导致活性巯基被包埋。



A. 总巯基; B. 活性巯基; C. Ca^{2+} -ATP酶活性; D. 表面疏水性。

图2 冻融和冻藏对肌原纤维蛋白氧化变性的影响

Fig. 2 Effects of freeze-thaw treatment and freeze storage on the oxidative denaturation of myofibrillar proteins

疏水性残基的暴露是蛋白质聚集发生的先决条件,也是表征蛋白质变性程度的指标^[25]。如图2D所示,第3天时,两组蛋白质的表面疏水性均显著增加($P<0.05$),随着处理时间的延长,蛋白质表面疏水性继续显著升高($P<0.05$)。Arsiccio等^[30]发现在冷冻过程中,样品中的自由水与肌原纤维蛋白中的结合水会先后结冰,使蛋白质的立体结构发生改变,并导致未冷冻水相中的溶质出现浓缩和pH值下降,最终导致蛋白质变性,被埋在内部结构的非极性氨基酸暴露使蛋白质表面疏水性增强。此外,第7天FT组蛋白质表面疏水性显著高于FS组($P<0.05$),可能是冰晶的形成更容易破坏极性残基周围的水合层,使更多的疏水残基暴露在极性环境中,从而增加表面疏水性^[31],也可能是FS组蛋白质发生了聚集,疏水残基被包埋导致蛋白质表面疏水性低于FT组^[32]。

在冷冻和融化过程中,肌原纤维蛋白,特别是肌球蛋白头部的巯基,易受到氧化、pH值和温度等因素的影响导致 Ca^{2+} -ATP酶活性降低^[33]。如图2C所示,FT组和FS组蛋白质的 Ca^{2+} -ATP酶活性均不断下降,在第7天时分别显著降低约26%、19%($P<0.05$),FT组 Ca^{2+} -ATP酶活性显著低于FS组($P<0.05$),表明相较于冻藏处理,冻融处理使肌球蛋白的头部级变性程度更大。通常肌球蛋白头部变性程度决定 Ca^{2+} -ATP酶活性,尾部变性程度决定肌球蛋白的盐溶性^[34],Erzini等^[35]通过测定鲤鱼肌原纤维蛋白加热和冻藏过程中肌球蛋白的各种性质,发现加热过程中肌球蛋白尾部变性程度高于头部,而冻藏过程中肌球蛋白的变性从头部开始。有文献报道肌原纤维蛋白在冻藏过程中肌动蛋白易发生变性,肌球蛋白失去肌动蛋白的保护并发生分离,暴露的头部易发生变性导致 Ca^{2+} -ATP酶活性降低,尾部的完整性使变性的肌球蛋白依旧保持较高的盐溶性^[34,36]。因此FT组蛋白的溶解度和可溶性蛋白含量高于FS组可能与肌原纤维蛋白对冷冻和冷藏微环境响应不同有关^[35-37]。

2.3 SDS-PAGE分析

冻融与冻藏对肌原纤维蛋白溶液SDS-PAGE图谱的影响如图3所示,经过冻融与冻藏处理后,未观察到各个条带颜色的显著差异,表明冻融和冻藏处理后蛋白质没有发生显著性降解,Jommark等^[29]发现在冻融条件下虾肌原纤维蛋白电泳条带未发生显著变化,与本研究结果相一致。此外,SDS可破坏蛋白质非共价键并诱导蛋白质解折叠^[37],未观察到聚集体电泳条带,表明冷冻造成蛋白质聚集的主要作用力是非共价键,Sarciaux等^[38]在研究冻融对免疫球蛋白聚集的影响时也观察到相似现象。

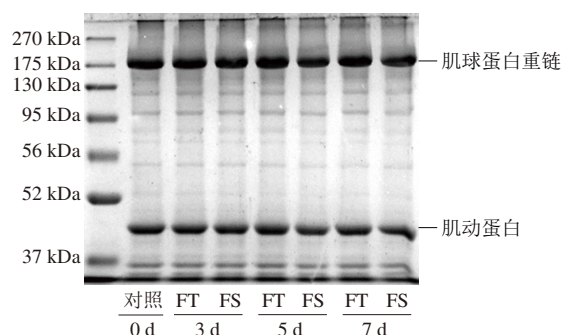


图3 冻融与冻藏过程中的肌原纤维蛋白SDS-PAGE图

Fig. 3 SDS-PAGE patterns of myofibrillar proteins during freeze-thaw treatment and freeze storage

2.4 内源荧光光谱的变化

色氨酸荧光强度的变化通常被用来表征蛋白质三级结构的变化^[17]。如图4所示,对照组肌原纤维蛋白表现出最高的荧光强度,随着处理时间的延长,FT组和FS组蛋白的内源荧光强度均不断降低,表明肌原纤维蛋白的天然结构在冷冻的过程中发生改变,内部色氨酸残基暴露,荧光强度下降,这与台瑞瑞^[39]研究冷冻和冻融对鲈鱼的影响结果一致。在两种不同冷冻方式中,FT组荧光强度下降幅度高于FS组,表明冻融处理后蛋白质三级结构变化程度更大。可能是由于溶液中冰晶的生长产生的准液态层,在内部形成高压和高离子浓度环境,分子的运动速度显著减慢,与蛋白质非极性基团形成大量的氢键,从而促进了疏水残基暴露^[40]。同时pH值的改变、冰表面气泡的积累,都会促使蛋白质三级结构改变,降低色氨酸的荧光强度^[30]。Bhatnagar等^[41]研究也表明冰的形成是冷冻造成蛋白质变性的关键因素,因此相较于冻藏处理,冻融处理中冰的反复形成导致蛋白质荧光强度降低更加显著,变性程度更大,与图2D表面疏水性的结果一致。

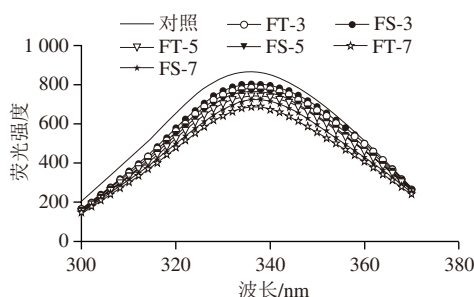


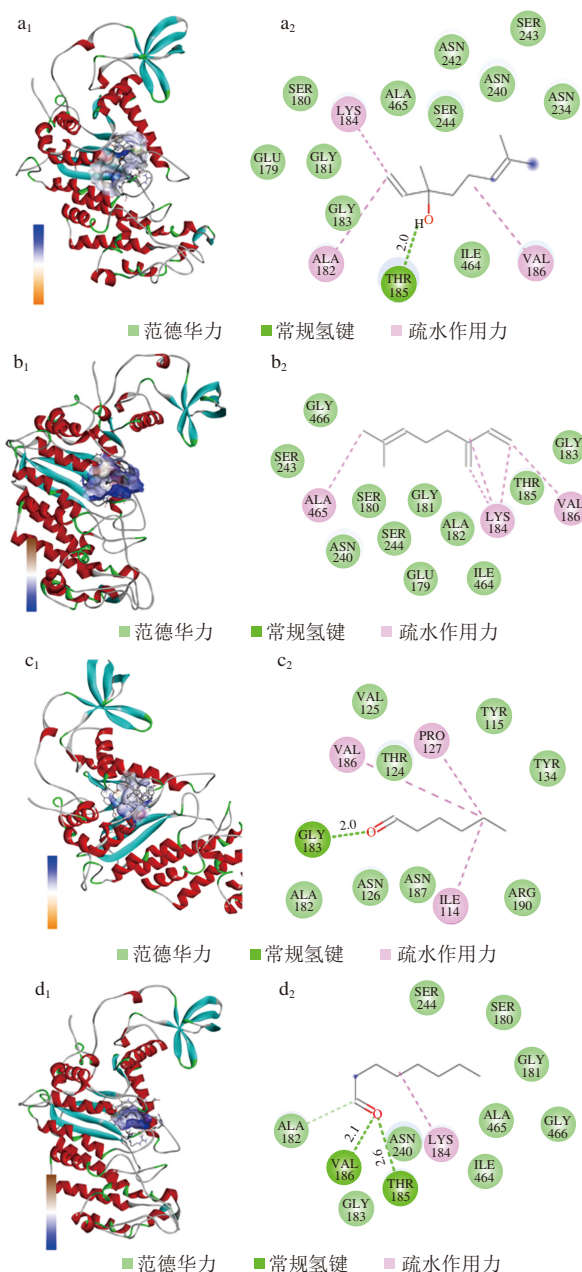
图4 冻融和冻藏对肌原纤维蛋白内源荧光光谱的影响

Fig. 4 Effects of freeze-thaw treatment and freeze storage on the endogenous fluorescence intensity of myofibrillar proteins

2.5 分子对接分析

肌球蛋白作为肌原纤维蛋白的主要成分,已被广泛报道具有与挥发性化合物相互作用的能力,并影响鱼类产品中气味的释放^[42]。有研究表明,肌球蛋白头部是与气味相互作用的主要区域^[19],因此选择肌球蛋白头部作为模型进行分子对接。4种挥发性化合物与肌球蛋白头部的对

接结果如图5所示,对接结果表明芳樟醇、月桂烯、己醛、辛醛主要通过疏水相互作用和氢键被包裹于肌球蛋白的疏水口袋中,并分别与3 (ALA182、LYS184、VAL186)、3 (ALA465、LYS184、VAL186)、3个 (PRO127、VAL186、ILE114) 和1个 (LYS184) 氨基酸之间存在疏水作用力。芳樟醇、己醛和辛醛分别与1 (THR185)、1个 (GLY183) 和2个 (VAL186、THR185) 氨基酸之间存在氢键作用力,这有助于维持风味物质与蛋白质复合物的稳定性,而月桂烯与蛋白质之间只存在疏水作用力。



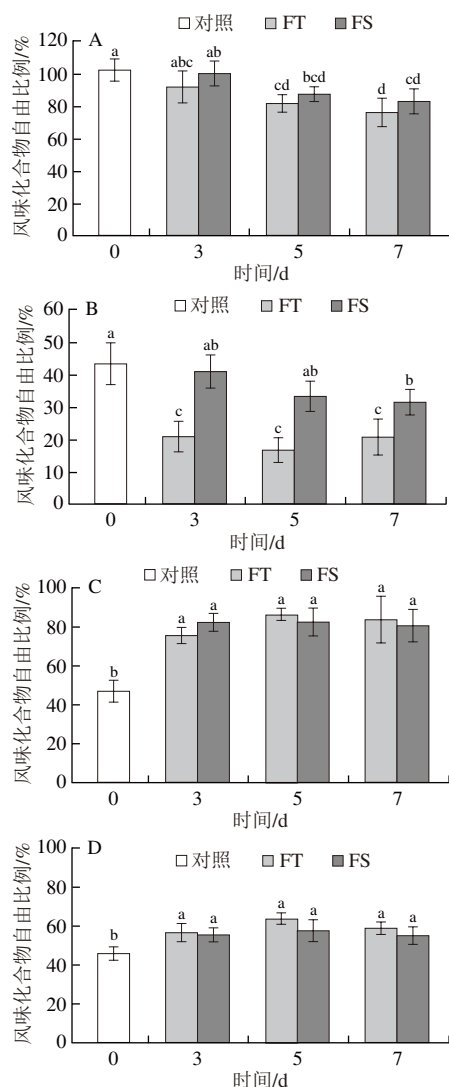
下标a~d.分别表示肌球蛋白与芳樟醇、月桂烯、己醛、辛醛的对接; 1、2.分别表示对接3D图、对接2D图。

图5 肌球蛋白与4种风味化合物的对接构象和对接位点

Fig. 5 Docking conformation and binding sites of four flavor compounds to myosin

2.6 风味物质结合能力的变化

4种风味化合物与肌原纤维蛋白的结合能力变化如图6所示,风味化合物在蛋白样品顶空中自由比例越低,表明肌原纤维蛋白对其结合能力越强。对照组与芳樟醇、月桂烯、己醛、辛醛在顶空的自由比例分别为100%、43%、46%、45%,肌原纤维蛋白对月桂烯、己醛和辛醛表现出较好的结合能力,对芳樟醇无明显结合作用。由于大部分风味化合物在自然状态下疏水,疏水相互作用常被认为是风味物质与蛋白结合的主要驱动力^[43]。由表1可知,月桂烯的疏水系数(3.47)高于芳樟醇(2.66)、辛醛(2.54)和己醛(1.76),易与蛋白质表现出更强的结合能力,己醛和辛醛还可通过共价键增强与蛋白质的相互作用^[6]。在程星光^[44]对牛肉肌原纤维蛋白的研究中也发现,蛋白对醇类风味物质无明显结合作用。可能是因为芳樟醇含有亲水羟基,而水分子可以竞争醇的结合位点,从而降低了蛋白对芳樟醇的结合能力^[45]。



A.芳樟醇; B.月桂烯; C.己醛; D.辛醛。

图6 冻融和冻藏对肌原纤维蛋白与风味物质结合能力的影响

Fig. 6 Effects of freeze-thaw treatment and freeze storage on the binding capacity of myofibrillar proteins to flavor compounds

经过冷冻处理后,肌原纤维蛋白与不同风味物质的结合能力呈现出不同趋势,对于醛类物质,结合能力随时间的延长而减弱,第7天时,蛋白质对己醛的结合能力显著降低约35% ($P<0.05$),对辛醛的结合能力显著降低约10% ($P<0.05$) (图6)。Pérez-Juan等^[46]发现冷冻诱导肌球蛋白变性会降低与己醛的结合能力,与本研究结果相一致。醛类化合物与肌原纤维蛋白的结合方式较复杂,可以通过非共价键的形式与蛋白质结合,也可通过共价键与蛋白质结合,如与蛋白质氨基酸的 α -氨基反应,生成转氨基反应中间产物席夫碱,与巯基反应,生成二硫代缩醛^[47]。因此,在冷冻处理后肌原纤维蛋白对醛类物质结合能力的下降可能与巯基含量的降低(图2A、B)有关,这与Cao Jinxuan等^[5]的研究结果相一致。此外,有研究表明冷冻会降低肌原纤维蛋白氢键含量^[25],分子对接的结果表明己醛和辛醛与蛋白质存在较强的氢键相互作用,Xu Lingxia等^[48]研究也表明氢键是醛类物质与蛋白质相互作用的主要作用力之一,因此氢键含量的降低也可能导致肌原纤维蛋白对醛类物质结合能力下降。综上所述,冷冻处理通过降低肌原纤维蛋白巯基的含量,减弱了蛋白质与己醛、辛醛的共价键结合,氢键含量的降低减弱了蛋白质与己醛、辛醛的非共价结合,造成醛类物质的释放,抵消了疏水作用增加带来的结合作用。肌原纤维蛋白对月桂烯和芳樟醇结合能力随时间延长而增强(图6),第7天时蛋白质对芳樟醇的结合能力显著增加约20% ($P<0.05$),对月桂烯的结合能力显著增加约30% ($P<0.05$),冻融处理后蛋白质对于月桂烯的结合能力强于FS组。分子对接的数据表明,肌原纤维蛋白与月桂烯之间只存在疏水相互作用,同时芳樟醇和月桂烯的疏水系数相较于己醛和辛醛更高(表1)。因此,肌原纤维蛋白对芳樟醇和月桂烯的结合能力增强可能是由于其在冷冻后发生解折叠,蛋白表面疏水性显著性增加(图2D)所致,这与王天泽等^[49]研究猪肉肌原纤维蛋白与芳樟醇和柠檬烯的结合能力的结果一致。

表1 4种风味化合物的性质

Table 1 Properties of four flavor compounds

风味化合物	分子量/Da	化学式	疏水系数
己醛	100.16	C ₆ H ₁₂ O	1.76
辛醛	128.21	C ₈ H ₁₆ O	2.54
月桂烯	136.23	C ₁₀ H ₁₆	3.47
芳樟醇	154.24	C ₁₀ H ₁₈ O	2.66

3 结 论

两种冷冻方式使蛋白呈现出不同的聚集状态,相较于冻藏处理,冻融后肌原纤维蛋白产生较多可溶性聚集体,氧化程度和三级结构发生显著改变;而冻藏后,

肌原纤维蛋白产生较多不溶性聚集体,溶解度呈降低趋势显著。两种冷冻处理改变了蛋白质与酸菜汤中的醛类挥发性化合物的反应基团,降低了对己醛和辛醛的结合能力,增加了与芳樟醇和月桂烯的结合能力,因此,冷冻运输和贮藏过程会影响乌鳢肌原纤维蛋白的氧化程度和结构,进而影响其与酸菜鱼汤特征风味物质的结合能力,改变产品风味。

参考文献:

[1] 冀国强,邵秀芝.食品典型组分对其风味的影响研究[J].中国调味品,2009,34(11):28-31. DOI:10.3969/j.issn.1000-9973.2009.11.002.

[2] REINECCIUS G A. Flavor interactions with proteins[J]. Current Opinion in Food Science, 2022, 47: 100884. DOI:10.1016/j.cofs.2022.100884.

[3] 殷小钰,刘昊天,邹汶蓉,等.肌肉蛋白与挥发性风味物质的相互作用机制及影响因素研究进展[J].食品科学,2020,41(15):288-294. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190815-158.

[4] XU Y X, WANG R, ZHAO H L, et al. Binding of aldehydes to myofibrillar proteins as affected by two-step heat treatments[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2020, 100(3): 1195-1203. DOI:10.1002/jsfa.10130.

[5] CAO J X, ZHOU C Y, WANG Y, et al. The effect of oxidation on the structure of G-actin and its binding ability with aroma compounds in carp grass skeletal muscle[J]. Food Chemistry, 2018, 240: 346-353. DOI:10.1016/j.foodchem.2017.07.068.

[6] 高子武,王恒鹏,吴鹏,等.肌原纤维蛋白对挥发性风味物质吸附作用研究进展[J].肉类研究,2020,34(9):105-112. DOI:10.7506/rlyj1001-8123-20200810-191.

[7] ZHANG J, KANG D C, ZHANG W G, et al. Recent advantage of interactions of protein-flavor in foods: perspective of theoretical models, protein properties and extrinsic factors[J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 111: 405-425. DOI:10.1016/j.tifs.2021.02.060.

[8] 王佳仪.酸菜鱼预制菜市场步入增长期[N].中国食品报,2023-10-10(6).

[9] 罗耀华,刘晓鸣,李月,等.不同芥菜的滋味及挥发性成分变化规律[J].食品科技,2018,43(9):90-94.

[10] 王浩文,王传明,王红强,等.不同青菜品种对老坛酸菜鱼调料风味的影响[J].中国调味品,2022,47(4):160-163. DOI:10.3969/j.issn.1000-9973.2022.04.030.

[11] 柯欢,王莉,熊伟.2种酸菜鱼肉营养物质含量比较[J].食品工业,2022,43(12):314-317.

[12] ZHANG Y M, BAI G P, WANG J P, et al. Myofibrillar protein denaturation/oxidation in freezing-thawing impair the heat-induced gelation: mechanisms and control technologies[J]. Trends in Food Science & Technology, 2023, 138: 655-670. DOI:10.1016/j.tifs.2023.06.035.

[13] MACKIE I M. The effects of freezing on flesh proteins[J]. Food Reviews International, 1993, 9(4): 575-610. DOI:10.1080/87559129309540979.

[14] SUN F Y, HUANG Q L, HU T, et al. Effects and mechanism of modified starches on the gel properties of myofibrillar protein from grass carp[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2014, 64: 17-24. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2013.11.019.

[15] DAI H J, CHEN X K, PENG L, et al. The mechanism of improved myosin gel properties by low dose rosmarinic acid addition during gel formation[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 106: 105869. DOI:10.1016/j.foodhyd.2020.105869.

[16] FANG B W, ISOBE K, HANDA A, et al. Microstructure change in whole egg protein aggregates upon freezing: effects of freezing time and sucrose addition[J]. Journal of Food Engineering, 2021, 296: 110452. DOI:10.1016/j.jfoodeng.2020.110452.

[17] WAN W, FENG J, WANG H, et al. Influence of repeated freeze-thaw treatments on the oxidation and degradation of muscle proteins from mirror carp (*Cyprinus carpio* L.), based on myofibrillar protein structural

- changes[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 226: 454-462. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2022.12.082.
- [18] CHELH I, GATELLIER P, SANTÉ-LHOUTELLIER V. Technical note: a simplified procedure for myofibril hydrophobicity determination[J]. Meat Science, 2006, 74(4): 681-683. DOI:10.1016/j.meatsci.2006.05.019.
- [19] XUE C, YOU J, XIONG S B, et al. Myosin head as the main off-odors binding region: key binding residues and conformational changes in the binding process[J]. Food Chemistry, 2023, 403: 134437. DOI:10.1016/j.foodchem.2022.134437.
- [20] PÉREZ-JUAN M, FLORES M, TOLDRÁ F. Model studies on the efficacy of protein homogenates from raw pork muscle and dry-cured ham in binding selected flavor compounds[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(13): 4802-4808. DOI:10.1021/jf060374x.
- [21] EKEZIE F G C, CHENG J H, SUN D W. Effects of atmospheric pressure plasma jet on the conformation and physicochemical properties of myofibrillar proteins from king prawn (*Litopenaeus vannamei*)[J]. Food Chemistry, 2019, 276: 147-156. DOI:10.1016/j.foodchem.2018.09.113.
- [22] DU X, ZHAO M N, PAN N, et al. Tracking aggregation behaviour and gel properties induced by structural alterations in myofibrillar protein in mirror carp (*Cyprinus carpio*) under the synergistic effects of pH and heating[J]. Food Chemistry, 2021, 362: 130222. DOI:10.1016/j.foodchem.2021.130222.
- [23] DU X, LI H J, PAN N, et al. Effectiveness of ice structuring protein on the myofibrillar protein from mirror carp (*Cyprinus carpio* L.) during cryopreservation: reduction of aggregation and improvement of emulsifying properties[J]. International Journal of Refrigeration, 2022, 133: 1-8. DOI:10.1016/j.ijrefrig.2021.10.003.
- [24] NARHI L O, SCHMIT J, BECHTOLD-PETERS K, et al. Classification of protein aggregates I[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2012, 101(2): 493-498. DOI:10.1002/jps.22790.
- [25] TAN M T, DING Z Y, MEI J, et al. Effect of cellobiose on the myofibrillar protein denaturation induced by pH changes during freeze-thaw cycles[J]. Food Chemistry, 2022, 373: 131511. DOI:10.1016/j.foodchem.2021.131511.
- [26] FANG B W, NAKAGAWA K. Modification of casein aggregate microstructures under frozen conditions: a study using tunable resistive pulse sensing[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 98: 105259. DOI:10.1016/j.foodhyd.2019.105259.
- [27] HOFMANN K, HAMM R. Sulfhydryl and disulfide groups in meats[M]//CHICHESTER C O, MRAK E M, STEWART G F. Advances in food research. Amsterdam: Elsevier, 1978: 1-111. DOI:10.1016/s0065-2628(08)60156-1.
- [28] MEHTA N K, CHOUKSEY M K, BALANGE A K, et al. Physicochemical and gel properties of myofibrillar protein from sin croaker (*Johnius dussumieri*) fish during ice storage[J]. Journal of Aquatic Food Product Technology, 2017, 26(1): 71-85. DOI:10.1080/10498850.2015.1092485.
- [29] JOMMARK N, RUNGLERDKRIANGKRAI J, KONNO K, et al. Effect of cryoprotectants on suppression of protein structure deterioration induced by freeze-thaw cycle in Pacific white shrimp[J]. Journal of Aquatic Food Product Technology, 2018, 27(1): 91-106. DOI:10.1080/10498850.2017.1404532.
- [30] ARSICCIO A, PISANO R. The ice-water interface and protein stability: a review[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2020, 109(7): 2116-2130. DOI:10.1016/j.xphs.2020.03.022.
- [31] ZHANG G P, ZHU C Y, WALAYAT N, et al. Recent development in evaluation methods, influencing factors and control measures for freeze denaturation of food protein[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2023, 63(22): 5874-5889. DOI:10.1080/10408398.2022.2025534.
- [32] HAN Y R, SHEN H, ZHAO M M, et al. Changes in structural and gel properties of myofibrillar proteins induced by sodium chloride and hydroxyl radical[J]. Food Science and Technology Research, 2019, 25(1): 97-106. DOI:10.3136/fstr.25.97.
- [33] SHEN H, ZHAO M M, SUN W Z. Effect of pH on the interaction of porcine myofibrillar proteins with pyrazine compounds[J]. Food Chemistry, 2019, 287: 93-99. DOI:10.1016/j.foodchem.2019.02.060.
- [34] THAVAROJ W, SAKAMOTO M, KONNO Y, et al. Preceding actin denaturation accelerates myosin denaturation in tilapia myofibrils in frozen storage[J]. Fisheries Science, 2016, 82(5): 843-850. DOI:10.1007/s12562-016-1010-z.
- [35] ERZINI K, CASTRO M. An alternative methodology for fitting selectivity curves to pre-defined distributions[J]. Fisheries Research, 1998, 34(3): 307-313. DOI:10.1016/S0165-7836(97)00103-3.
- [36] JANTAKOSON T, THAVAROJ W, KONNO K. Myosin and actin denaturation in frozen stored kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* myofibrils[J]. Fisheries Science, 2013, 79(2): 341-347. DOI:10.1007/s12562-012-0589-y.
- [37] ZHENG K, REN D Y, WANG Y J, et al. Monoclonal antibody aggregation associated with free radical induced oxidation[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(8): 3952. DOI:10.3390/ijms22083952.
- [38] SARCIAUX J M, MANSOUR S, HAGEMAN M J, et al. Effects of buffer composition and processing conditions on aggregation of bovine IgG during freeze-drying[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1999, 88(12): 1354-1361. DOI:10.1021/jps980383n.
- [39] 台瑞瑞. 冷冻-反复冻融对大口黑鲈品质的影响[D]. 锦州: 渤海大学, 2019: 20-40.
- [40] DAO H M, SAHAKIPIJARN S, CHROSTOWSKI R, et al. Entrapment of air microbubbles by ice crystals during freezing exacerbates freeze-induced denaturation of proteins[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2022, 628: 122306. DOI:10.1016/j.ijpharm.2022.122306.
- [41] BHATNAGAR B S, PIKAL M J, BOGNER R H. Study of the individual contributions of ice formation and freeze-concentration on isothermal stability of lactate dehydrogenase during freezing[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2008, 97(2): 798-814. DOI:10.1002/jps.21017.
- [42] GU S Q, DAI W L, CHONG Y Q, et al. The binding of key fishy off-flavor compounds to silver carp proteins: a thermodynamic analysis[J]. RSC Advances, 2020, 10(19): 11292-11299. DOI:10.1039/d0ra01365j.
- [43] DAMODARAN S, KINSELLA J E. Flavor protein interactions. binding of carbonyls to bovine serum albumin: thermodynamic and conformational effects[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1980, 28(3): 567-571. DOI:10.1021/jf60229a019.
- [44] 程星光. 牛肉肌原纤维蛋白糖基化对风味物质吸附的机制研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2019: 40-45.
- [45] ZHANG B, ZHANG J W, YU X B, et al. Evaluation of the adsorption capacity and mechanism of soy protein isolate for volatile flavor compounds: role of different oxygen-containing functional groups[J]. Food Chemistry, 2022, 386: 132745. DOI:10.1016/j.foodchem.2022.132745.
- [46] PÉREZ-JUAN M, FLORES M, TOLDRÁ F. Effect of pork meat proteins on the binding of volatile compounds[J]. Food Chemistry, 2008, 108(4): 1226-1233. DOI:10.1016/j.foodchem.2007.04.037.
- [47] KUBO I, KINST-HORI I. Tyrosinase inhibitors from cumin[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46(12): 5338-5341. DOI:10.1021/jf980226+.
- [48] XU L X, WAN Y L, LIU X X, et al. Insights on the binding mechanism between specified aldehydes and flaxseed protein using multispectral image and molecular docking[J]. Food Chemistry, 2023, 422: 136256. DOI:10.1016/j.foodchem.2023.136256.
- [49] 王天泽, 杨平, 黄峰, 等. 热处理过程中肌肉蛋白与萜类化合物相互作用机制[J]. 农业工程学报, 2023, 39(17): 286-294. DOI:10.11975/j.issn.1002-6819.202305248.