

海藻糖对冻藏过程中鳙肌原纤维蛋白冷冻变性的影响

薛勇, 薛长湖, 李兆杰, 刘艺杰, 王进勉

(中国海洋大学 食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003)

摘要:从鳙(*Aristichthys nobilis*)肌肉中提取肌原纤维蛋白,在蛋白溶液中加入10%(W/V)蔗糖、山梨醇混合物(质量比1:1)或10%(W/V)海藻糖。蛋白溶液在-18℃下冻藏30 d,测定冻藏过程中肌原纤维蛋白盐溶性、 Ca^{2+} -ATPase活性、活性巯基含量、总巯基含量、表面疏水性变化和冻藏结束时的SDS-PAGE。测定结果表明,蔗糖、山梨醇混合物和海藻糖都抑制了冻藏过程中肌原纤维蛋白盐溶性、 Ca^{2+} -ATPase活性、巯基含量的降低和表面疏水性的升高,延缓了肌原纤维蛋白的冷冻变性。海藻糖比蔗糖、山梨醇混合物有更好的抗冷冻变性效果。[中国水产科学,2006,13(4):637-641]

关键词:海藻糖;冷冻变性;肌原纤维蛋白;鳙

中图分类号:S983 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2006)04-0637-05

低温贮藏是水产品中广泛采用的长期冷藏方法。但是,鱼肉蛋白在冻藏过程中容易发生冷冻变性,导致鱼肉品质劣化和鱼肉蛋白功能性降低,如鱼肉变硬、持水性下降、蛋白可溶性和凝胶能力下降等。为了抑制鱼肉蛋白的冷冻变性,通常在冻藏的鱼肉和鱼糜中添加抗冷冻变性剂。工业上常用的抗冻变性剂为蔗糖和山梨醇混合物,尽管二者在抑制鱼肉蛋白冷冻变性方面十分有效,但由于甜味较重和热量高,影响了产品的口味和营养价值。因此,长期以来研究人员仍在开发低甜味低热量的抗冻剂。到目前为止,已广泛研究了乳糖醇、聚葡萄糖、麦芽糊精、谷氨酸钠、水解蛋白等的抗冷冻变性效果^[1-4]。

海藻糖(D-glucopyranosyl- α (1 $\rightarrow$ 1)-D-glucopyranoside)为非还原性二糖,广泛存在于生物界,既是一种贮藏性糖类,又是应激代谢的重要产物。它具有保护生物细胞和生物活性物质在脱水、干旱、高温、冷冻、高渗透压及有毒试剂等不良环境条件下免遭破坏的功能^[5]。海藻糖还可以作为蛋白稳定剂,其效果与多元醇、蔗糖、氨基酸等蛋白稳定剂相似或更好。海藻糖化学性质非常稳定,不会发生焦糖化,且热量低,甜度仅为蔗糖的45%^[6],有着广阔的应用前景。目前,海藻糖的制备工艺已基本成熟,而且

Tabuchi^[7]等利用酶处理,可以把淀粉转化成海藻糖,从而大大降低了海藻糖的价格,为海藻糖的广泛应用奠定了基础,其应用范围正在日益扩大。

鳙(*Aristichthys nobilis*)是中国大规模养殖的淡水鱼类,产量大、价格低,属于低值淡水鱼。目前其鲜销问题日益突出,有必要开展有效的加工利用。鳙鱼肉不耐冻,如何防止蛋白质冷冻变性是亟待解决的问题之一,是解决其深加工问题的关键。

本研究采用鳙肌原纤维蛋白溶液体系研究海藻糖对鱼肉蛋白的抗冷冻变性作用,并与蔗糖、山梨醇混合物的效果进行比较,以期获得低甜度低热量的新型抗冻剂。

1 材料与方法

1.1 材料

海藻糖购于南宁中诺生物工程公司,纯度 $\geq 98\%$ 。蔗糖和山梨醇为分析纯试剂。鲜活鳙购于青岛水产品市场。

1.2 鳙鱼肌原纤维蛋白溶液及样品的制备

取一定质量的鱼肉,加入10倍体积20 mmol Tris-maleate缓冲液(50 mmol KCl-20 mmol Tris-maleate, pH 7),匀浆,离心10 min (9 000 g, 4℃),弃去上清液,重复洗涤2次。沉淀与Tris-maleate缓冲液(0.6 mol KCl-20 mmol Tris-maleate, pH 7)匀浆,

收稿日期:2005-10-14; 修订日期:2005-12-23.

基金项目:国家“863”高技术研究发展项目(2004AA625010);国家科技攻关项目(2001BA201A26).

作者简介:薛勇(1976-),男,博士研究生,从事水产化学方面的研究. E-mail: xueyong77@sina.com

通讯作者:薛长湖. E-mail: xuech@mail.ccit.edu.cn

4 ℃提取 60 min, 离心 30 min (9 000 g, 4 ℃), 所得上清液为实验用肌原纤维蛋白溶液。

在肌原纤维蛋白溶液中加入 10% (W/V) 海藻糖或 10% 蔗糖、山梨醇混合物 (质量比 1:1), 分装, -18 ℃冻藏 30 d, 在冻藏的不同阶段取样测定各项指标。

1.3 肌原纤维蛋白盐溶性和 Ca^{2+} -ATPase 活性测定

不同冻藏阶段的肌原纤维蛋白溶液离心 (9 000 g, 4 ℃) 50 min, Biuret 法测定上清液中的蛋白浓度, 溶液中蛋白浓度占初始蛋白浓度的百分比记为肌原纤维蛋白的盐溶性。 Ca^{2+} -ATPase 活性能够反映冻藏过程中肌原纤维蛋白的变性情况, 通常作为评价蛋白质变性的指标。肌原纤维蛋白 Ca^{2+} -ATPase 活性测定参考万建荣等^[8]的方法。

1.4 肌原纤维蛋白的活性巯基和总巯基含量测定

肌原纤维蛋白中活性巯基和总巯基含量测定参考 Suvanich 等^[9]的方法。巯基含量 [$\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ (Pro)] 按以下公式计算: $-\text{SH} = A \times D / \epsilon \cdot C$ 。式中 A 表示 412 nm 处的吸光度, D 表示稀释倍数, ϵ 表示分子吸光系数 13 600 ($\text{mol} \cdot \text{cm} / \text{L}$), C 表示蛋白质浓度 (mg / mL)。

1.5 肌原纤维蛋白的表面疏水性的测定

表面疏水性测定参考 Benjakul 等^[10]的方法。使用 8-苯胺基-1-萘磺酸钠 (ANS) 作为荧光探针, 测定不同浓度蛋白 ANS 复合物在激发波长为 390 nm, 发射波长为 468 nm 时的荧光吸收强度, 以荧光吸收值与蛋白浓度作图, 直线斜率用以表示蛋白表面疏水性。

1.6 SDS-PAGE

使用 SDS-PAGE 分析冻藏结束时的肌原纤维蛋白, 堆积胶浓度为 5%, 分离胶浓度为 10%。样品处理参考 Yongsawatidigul^[11]的方法 (2% SDS, 5% 巯基乙醇和 0.02% 溴酚蓝), 100 ℃加热 5 min, 9 000 g 离心 1 min。等量的 (20 μL) 浓度 3 mg / mL 样品用于电泳分析, 100 V 恒压电泳。

2 结果

2.1 冻藏过程中肌原纤维蛋白盐溶性变化

鲮鱼肌原纤维蛋白在冻藏过程中盐溶性变化情况见图 1。随着冻藏时间的延长, 样品中盐溶性蛋白含量逐渐下降。对照组在冻藏开始阶段迅速下降, 冻藏 3 d 后, 盐溶性蛋白含量下降到 66.1%, 之

后下降速度减缓, 直到冻藏 30 d (50.4%), 表现为较明显的两段变性模式。两种抗冻剂都有效抑制了蛋白溶解度的迅速下降, 冻藏 3 d 后, 添加海藻糖和蔗糖山梨醇样品中的盐溶性蛋白含量分别为 93% 和 88%。含抗冻剂样品在冻藏过程中同样呈两段变性模式, 海藻糖样品比蔗糖山梨醇样品盐溶性蛋白含量降低得慢, 在冻藏 30 d 时, 蔗糖山梨醇样品和海藻糖样品盐溶性蛋白含量分别为 75% 和 85%。因此, 两种抗冻剂延缓了蛋白在冻藏过程中的冷冻变性, 海藻糖比蔗糖、山梨醇混合物有更好的效果。

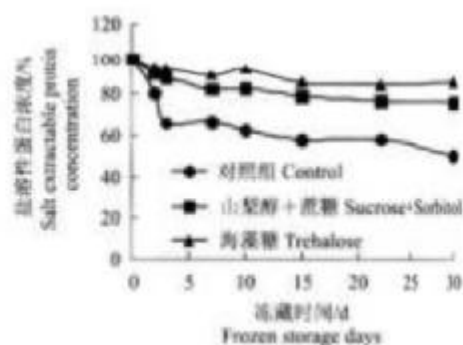


图 1 冻藏过程中盐溶性蛋白含量变化曲线

Fig. 1 Salt extractable protein content change in myofibrillar protein during frozen storage

2.2 冻藏过程中肌原纤维蛋白 Ca^{2+} -ATPase 活性变化

图 2 为冻藏过程中蛋白 Ca^{2+} -ATPase 活性的变化。冻藏开始时, 对照组酶活快速下降, 冻藏 2 d 后, 酶活由 0.31 $\mu\text{mol}(\text{Pi}) \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 下降到

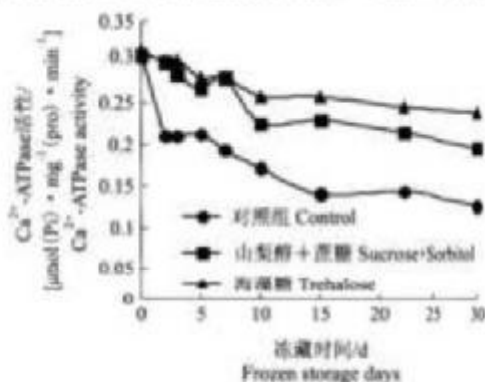


图 2 冻藏过程中肌原纤维蛋白 Ca^{2+} -ATPase 活性的变化

Fig. 2 Ca^{2+} -ATPase activity change in myofibrillar protein during frozen storage

$0.21 \mu\text{mol}(\text{Pi}) \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$,下降了约30%,在第3天到第15天的冻藏中,酶活降低速度也较快,冻藏15 d时,降低到初始值的50%。添加抗冻剂样品的 Ca^{2+} -ATPase活性降低速度受到抑制,酶活都比同期对照组高,第10 d时,海藻糖和蔗糖山梨醇样品的酶活分别为初始值的82%和73%。蔗糖山梨醇样品和海藻糖样品有相似的变化趋势,在冻藏前10 d,样品酶活降低较快,随后降低速度减慢,海藻糖的效果优于蔗糖山梨醇。

2.3 冻藏过程中肌原纤维蛋白活性巯基和总巯基含量变化

对照组肌原纤维蛋白活性巯基和总巯基含量变化和抗冻剂组有很大差异(图3)。冻藏7 d时,各样品总巯基含量变化很小,在随后7~15 d的冻藏期间,对照组总巯基含量明显下降,从 $8.4 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ 降低到 $7.4 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$,而含有抗冻剂的样品下降不明显,在冻藏30 d时空白、海藻糖和蔗糖山梨醇样品的总巯基含量分别为 $7.2 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ 、 $8.3 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $8.2 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

冻藏过程中蛋白活性巯基含量的变化趋势和总巯基相似,在30 d的冻藏期内,含抗冻剂样品的活性巯基含量缓慢下降,海藻糖和蔗糖山梨醇样品活性巯基含量分别从 $5.8 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ 降低到 $5.5 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $5.3 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ 。对照组样品在冻藏10 d时,活性巯基含量和抗冻剂组相似,变化不显著,随后出现较快下降,冻藏30 d时,活性巯基含量下降为 $4.1 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ 。这些结果表明,海藻糖和蔗糖山梨醇的加入抑制了冻藏过程中蛋白质中巯基的氧化和二硫键的形成,海藻糖和蔗糖山梨醇有相似的抑制效果。

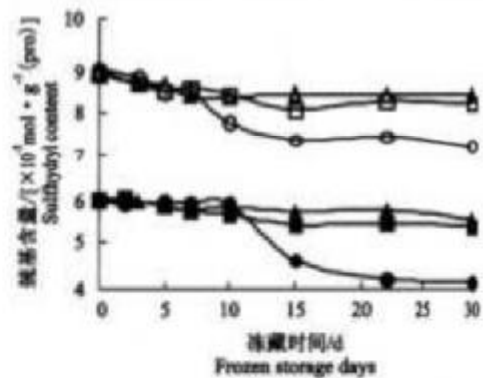


图3 冻藏过程中肌原纤维蛋白巯基含量变化

○ 对照组总巯基含量; ● 对照组活性巯基含量; ■ 蔗糖、山梨醇组总巯基含量; □ 蔗糖、山梨醇组活性巯基含量; ▲ 海藻糖组总巯基含量; △ 海藻糖组活性巯基含量

Fig.3 Sulfhydryl content change in myofibrillar protein during frozen storage

○ Control (total sulfhydryl); ● Control (reactive sulfhydryl); ■ Sucrose + Sorbitol (total sulfhydryl); □ Sucrose + Sorbitol (reactive sulfhydryl); ▲ Trehalose (total sulfhydryl); △ Trehalose (reactive sulfhydryl)

2.4 冻藏过程中肌原纤维蛋白表面疏水性变化

鳕鱼肌原纤维蛋白表面疏水性在冻藏过程中的变化见图4。对照组蛋白表面疏水性在冻藏过程中呈不断上升趋势,从冻藏前的135上升到冻藏结束时的226。含有抗冻剂的样品在冻藏过程中也呈上升趋势,但蔗糖山梨醇样品上升较快,冻藏30 d时表面疏水性值为189。而海藻糖比蔗糖山梨醇有更显著的抑制效果,在整个冻藏期内表面疏水性上升不明显,冻藏30 d时,表面疏水性值为149,表明海藻糖比蔗糖山梨醇更有效地延缓了冻藏过程中蛋白构型的变化。

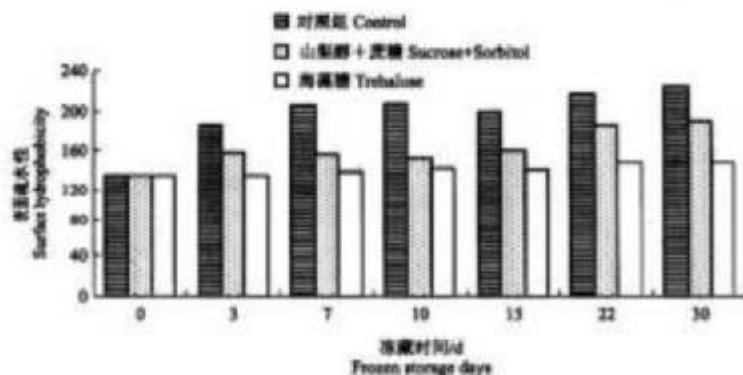


图4 冻藏过程中肌原纤维蛋白表面疏水性的变化

Fig.4 Surface hydrophobicity change in myofibrillar protein during frozen storage

2.5 SDS-PAGE

图5是样品冻藏30 d时,肌原纤维蛋白的SDS-PAGE图谱。不同样品的电泳图谱无明显差别。在变性电泳中,样品缓冲液中含有的SDS、巯基乙醇变性剂能破坏蛋白中的二硫键和疏水键,因此电泳图谱表明,不同样品的蛋白在冻藏过程中未形成共价键。

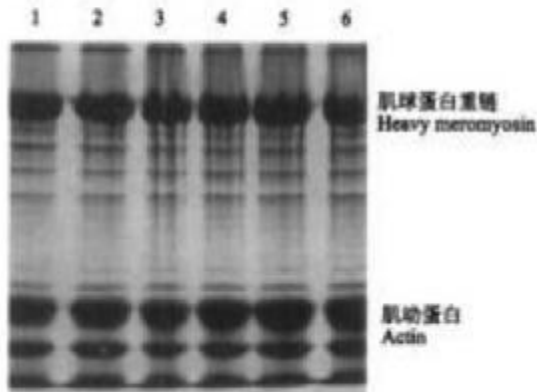


图5 肌原纤维蛋白 SDS-PAGE 图谱
1,2:对照;3,4:蔗糖+山梨醇;5,6:海藻糖
Fig.5 SDS-PAGE pattern of myofibrillar protein
1,2:Control;3,4:Sucrose + Sorbitol;5,6:Trehalose

3 讨论

本研究通过测定海藻糖对冻藏过程中鳙鱼肌原纤维蛋白的影响,考察了海藻糖抗蛋白冷冻变性的效果。

很多鱼类的冷冻变性表现为先迅速降低再缓慢降低的两段变性模式^[12-13],本实验使用的鳙鱼肌原纤维蛋白也显示出相似的模式(图1和图2)。添加海藻糖后,蛋白冷冻变性仍表现为两段模式,但其变性速度减慢,变性程度更低,说明海藻糖有效抑制了鳙鱼肌原纤维蛋白的冷冻变性。

蛋白质的高级结构中,存在着相当数量的结合水,这些结合水在稳定蛋白结构中起重要作用。蛋白在冻藏过程中结合水不断冻结,引起结合水和蛋白结合状态的破坏,使维持蛋白质结构的二硫键、疏水键、离子键和氢键等发生变化,有些键又重新结合。这种旧键的断裂和新键的形成使蛋白结构发生变化,从而导致蛋白变性^[14]。本实验结果显示,冻藏中鳙鱼肌原纤维蛋白溶解度和 Ca^{2+} -ATPase 活性的降低与蛋白巯基含量和表面疏水性变化密切相

关。在实验初始阶段,巯基含量(图3)变化不明显,蛋白冷冻变性主要是构型改变引起的,表现为蛋白表面疏水性不断升高(图4)。在冻藏7d以后,蛋白变性则是由巯基氧化和二硫键形成,以及构型变化共同作用引起的。在整个冻藏期间,蛋白冷冻变性未涉及到共价键的形成(图5)。

海藻糖和蔗糖山梨醇分子中含有多个羟基,冻藏过程中可以和水及蛋白形成氢键,影响水的状态,抑制冻藏过程中冰晶增长,从而稳定冻藏过程中的蛋白结构。从实验结果可以看出,抗冻剂延缓了冻藏过程中蛋白构型变化即表面疏水性的增加,巯基氧化和二硫键形成,使蛋白溶解度和酶活降低速度减缓,抑制了冷冻变性。

海藻糖为非还原性二糖,具有对生物脱水的保护作用。Green^[15]等提出了海藻糖的高效力生物保护作用与玻璃态形成有关,认为糖类在生化保护作用中效力的顺序由强到弱依次为海藻糖、麦芽糖、蔗糖、葡萄糖,与它们玻璃态转变温度(T_g)由高到低的顺序一致。海藻糖具有高 T_g 值被认为是它在生物保护作用中比其他糖类具有优越性的原因。Tadanori 等^[16]也通过原位观察证明了海藻糖比蔗糖更有效地抑制冰晶的增长速率和冰晶形态学不稳定性。本实验中,海藻糖比蔗糖山梨醇在冻藏过程中能更好地保持肌原纤维蛋白的稳定性,与其较强的冰晶生长抑制效果有关。因此,本研究的结果表明,海藻糖是比蔗糖山梨醇更有效的鱼肉蛋白抗冷冻变性剂。

参考文献:

- [1] Zhang N, Yamashita Y, Nonaki Y. Effects of protein hydrolysate from the Antarctic krill on the state of water and denaturation of lizardfish myofibrils during frozen storage [J]. Food Sci and Technol Res, 2002, 8(3):200-206.
- [2] Herrero J R, Mackie I M. Cryoprotection of frozen stored actomyosin of farmed rainbow trout by some sugars and polyols[J]. Food Chem, 2004, 84: 91-97.
- [3] Md A H, Abu A, Tadanori I, et al. Effect of proteolytic squid protein hydrolysate on the state of water and denaturation of lizardfish myofibrillar protein during freezing [J]. Innov Food Sci Emerg Technol, 2004, 5:73-79.
- [4] Auh J H, Lee H G, Kim J W, et al. Highly concentrated branched oligosaccharides as cryoprotectant for surimi [J]. J Food Sci, 1999, 64:418-422.
- [5] Ren X Q, Zhuang G, Liao J S, et al. Production, research situation and development of trehalase [J]. Zhengzhou Inst of

- Technol, 2001, 22(1):82-92.
- [6] Hu Z L, Xia Y X, Chen G P, et al. The manufacture and application of trehalose [J]. China Biotechnology, 2004, (4):44-48.
- [7] Tabuchi A, Mandai T, Shibuya T, et al. Formation of trehalose from starch by novel enzyme [J]. Oyo Toshitsu Kagaku, 1995, 42:401-406.
- [8] 万建荣,洪玉贵,莫印惠,等. 水产食品化学分析手册[M]. 上海:上海科技出版社, 1993.
- [9] Sovanich V, Jahncke M L, Marshall D L. Changes in selected chemical quality characteristics of channel catfish frame mince during chill and frozen storage[J]. J Food Sci, 2000, 65(1): 24-29.
- [10] Benjakul S, Seymour T A, Morrissey M T. Physicochemical changes in pacific whiting muscle proteins during iced storage [J]. Journal of Food Science, 1997, 62:729-733.
- [11] Yongsewatdigi J, Park J W. Thermal denaturation and aggregation of threadfin bream actomyosin [J]. Food Chem, 2003, 83:409-416.
- [12] Matsumoto I, Ootsumi T, Anai K. Protective effect of sugar on freeze-denaturation of carp myofibrillar protein [J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 1985, 51(5): 833-839.
- [13] Fukuda Y, Tarakita Z, Anai K. Effect of freshness of chub mackerel on the freeze-denaturation of myofibrillar protein [J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1984, 50(5), 845-852.
- [14] 汪之和. 水产品加工利用[M]. 北京:化学工业出版社, 2002.
- [15] Green J L, Angell C A. Phase relations and vitrification in saccharide-water solution and trehalose anomaly[J]. J Phys Chem, 1989, 93:2 880-2 882.
- [16] Tadocori S, Takehiko G, Yoshiyasu A. Growth rate and morphology of ice crystals growing in a solution of trehalose and water [J]. J Crystal Growth, 2002, 240:218-229.

Effects of trehalose on denaturation of bighead carp (*Aristichthys nobilis*) myofibrillar protein during frozen storage

XUE Yong, XUE Chang-hu, LI Zhao-jie, LIU Yi-jie, WANG Jin-mian

(Department of Food Science & Technology, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: During the frozen-storage, fish muscle undergoes some deterioration in edible qualities and functional properties for processing. The deterioration of muscle is mainly attributed to the frozen denaturation of myofibrillar protein. Trehalose is a non-reducing disaccharide with low caloric value and low sweetness. It is very stable in properties and can protect biological cells under adverse circumstances. Trehalose has protective effect against thermal inactivation of enzymes. Hence, the suppressive effect of trehalose on protein frozen denaturation is expected. In this study, the effect of trehalose on denaturation of bighead carp (*Aristichthys nobilis*) myofibrillar protein during frozen storage was studied. Myofibrillar protein was drawn from bighead carp muscle. Protein solution containing 10% (W/V) blend of sucrose and sorbitol (1:1) or 10% (W/V) trehalose was stored at -18°C for up to 30 days. The change of myofibrillar protein salt solubility, Ca^{2+} -ATPase activity, active sulfhydryl content, total sulfhydryl content, surface hydrophobicity and SDS-PAGE was mensurated during frozen storage.

During frozen storage, myofibrillar protein showed a time dependent biphasic denaturation pattern. Addition of Trehalose or mixture of sucrose and sorbitol maintained protein salt solubility, Ca^{2+} -ATPase activity, active sulfhydryl content, total sulfhydryl content and surface hydrophobicity. After 30 days of frozen storage, the protein salt solubility and ATPase activity sharply decreased to 50% and 35%, while the value of protein with trehalose was 85% and 82%. Trehalose exhibited greater protective effect on protein frozen denaturation than the mixture of sucrose and sorbitol. Therefore trehalose appeared to be the promising alternative cryoprotectant owing to its low sweetness and low caloric value. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(4): 637-641]

Key words: trehalose; frozen denaturation; myofibrillar protein; bighead carp

Corresponding author: XUE Chang-hu. E-mail: xuech@mail.ouc.edu.cn