

# 添加不同分子量酶解魔芋葡甘聚糖的冻藏肌原纤维蛋白氧化和结构特性变化

郭兵兵<sup>1,2</sup>, 胡澳<sup>1,2</sup>, 阙凤<sup>2</sup>, 吴文锦<sup>2</sup>, 熊光权<sup>2</sup>, 石柳<sup>2</sup>, 陈胜<sup>2</sup>, 郭晓嘉<sup>2</sup>, 汪超<sup>1</sup>, 汪兰<sup>2</sup>, 李玮<sup>1\*</sup>

(1. 湖北工业大学生物工程与食品学院, 湖北武汉 430068)

(2. 农业农村部农产品冷链物流技术重点实验室, 湖北省农业科学院农产品加工与核农技术研究所, 湖北省农业科技创新中心农产品加工研究分中心, 湖北武汉 430064)

**摘要:** 该研究比较了添加三种分子量分别为 149.03、118.75 和 36.48 ku 的魔芋葡甘聚糖酶解产物 EK1、EK2 和 EK3 对草鱼肌原纤维蛋白在 -18 ℃ 冻藏过程中物理、化学和结构特性的变化, 通过盐溶性蛋白含量、Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性、总巯基、表面疏水性、粒径、Zeta 电位、SDS-PAGE、紫外和荧光光谱分析其变化特征。研究结果表明, 与空白对照组、商业抗冻剂、EK1 和 EK2 相比, 冻藏 20 d, EK3 组的盐溶性蛋白浓度和总巯基含量最大, 分别为 1.51 mg/mL 和 19.76 × 10<sup>-5</sup> mol/g。与此同时, 冻藏 30 d, EK3 组的 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性含量最大, 且表面疏水性和 Zeta 电位最小, 分别为 1.31 μmol Pi/(mg prot·h)、8 689.07 和 -13.35 mV。冻藏 30 d, SDS-PAGE 结果表明 EK3 组的肌球蛋白和肌动蛋白降解程度最小, 有利于抑制肌原纤维蛋白的氧化。冻藏 30 d, 紫外和荧光光谱结果表明 EK3 组的色氨酸和酪氨酸残基的暴露程度减小, 有利于维持蛋白空间结构稳定性。因此, 该实验添加小分子量的魔芋葡甘聚糖酶解产物 EK3 (36.48 ku) 对肌原纤维蛋白冷冻保护作用最佳, 这为水产品冷冻过程中使用小分子多糖作为抗冻剂提供了理论支持。

**关键词:** 魔芋葡甘聚糖酶解产物; 肌原纤维蛋白; 冻藏; 蛋白特性; 小分子量

文章编号: 1673-9078(2024)06-158-168

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.6.0659

## Effect of Enzymatic Digestion Products of Konjac Glucomannan with Different Molecular Weights on Oxidation and Structural Properties of Myofibrillar Protein during Frozen Storage

GUO Bingbing<sup>1,2</sup>, HU Ao<sup>1,2</sup>, QUE Feng<sup>2</sup>, WU Wenjin<sup>2</sup>, XIONG Guangquan<sup>2</sup>, SHI Liu<sup>2</sup>, CHEN Sheng<sup>2</sup>,  
GUO Xiaojia<sup>2</sup>, WANG Chao<sup>1</sup>, WANG Lan<sup>2</sup>, LI Wei<sup>1\*</sup>

(1.School of Biological Engineering and Food, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China)(2.Institute of Agricultural Products Processing and Nuclear Agricultural Technology, Hubei Academy of Agricultural Sciences,

引文格式:

郭兵兵,胡澳,阙凤,等.添加不同分子量酶解魔芋葡甘聚糖的冻藏肌原纤维蛋白氧化和结构特性变化[J].现代食品科技,2024,40(6):158-168.

GUO Bingbing, HU Ao, QUE Feng, et al. Effect of enzymatic digestion products of konjac glucomannan with different molecular weights on oxidation and structural properties of myofibrillar protein during frozen storage [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(6): 158-168.

收稿日期: 2023-06-20

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31871870)

作者简介: 郭兵兵 (1999-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 水产品加工, E-mail: 15172595971@163.com

通讯作者: 李玮 (1985-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 农产品加工与贮藏, E-mail: wesleyi@163.com

Key Laboratory of Cold Chain Logistics Technology for Agro-product, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Hubei Province Agricultural Science and Technology Innovation Center Agricultural Products Processing Research Sub-center, P.R. China, Wuhan 430064, China)

**Abstract:** Changes in the physical, chemical, and structural properties of myofibrillar protein of grass carp caused by adding konjac glucomannan enzymatic products EK1, EK2 and EK3 with molecular weights of 149.03, 118.75 and 36.48 ku, respectively, during the frozen storage at  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ , were compared. The samples were analyzed for salt-soluble protein content,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity, total sulfhydryl groups, surface hydrophobicity, particle size, Zeta potential, SDS-PAGE, and UV and fluorescence spectra. The results manifested that the salt-soluble protein content and total sulfhydryl content in the EK3 group were at maximum at 1.51 mg/mL and  $19.76 \times 10^{-5}$  mol/g, respectively, after 20 d of freezing, compared with the blank control, commercial antifreeze, EK1, and EK2. At same time, the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity, in the EK3, were at maximum at 1.31  $\mu\text{mol Pi}/(\text{mg prot} \cdot \text{h})$ , while the Zeta potential were at minimum at 8 689.07 and  $-13.35$  mV, respectively, after 30 d of freezing. After 30 d of freezing, the SDS-PAGE results showed that the EK3 group had the least degradation of myosin and actin, which inhibited the oxidation of myogenic fibronectin. Furthermore, the exposure of tryptophan and tyrosine residues was reduced in the EK3 group, which indicated that the stability of the protein spatial structure was maintained. Therefore, it was concluded that the addition of small molecular weight konjac glucomannan enzymatic digestion product EK3 (36.48 ku) had the best cryoprotective effect on myofibrillar protein in this experiment, which supports the use of small molecule polysaccharides as antifreeze agents for aquatic products.

**Key words:** konjac glucomannan enzymatic digestion product; myofibrillar protein; frozen storage; protein properties; small molecular weight

草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 是我国著名的淡水食用鱼之一, 其产量在全国各地都有所增长, 经加工后获得的鱼糜制品受到广大消费者的青睐。相比于白鲢鱼糜, 草鱼鱼糜凝胶强度更高, 品质更好, 因此, 草鱼常用来制备高档鱼糜制品<sup>[1]</sup>。鱼糜是肌原纤维蛋白的湿浓缩物, 其较高的营养价值和令人愉悦的口感受到公众的广泛欢迎<sup>[2]</sup>。鱼糜在冻藏过程中, 因蛋白聚集变性, 蛋白质的功能特性, 如持水性和蛋白溶解度, 受到了显著的影响, 从而导致凝胶能力下降, 鱼糜品质劣化<sup>[3]</sup>。通常添加蔗糖、多聚磷酸盐和山梨糖醇等商业抗冻剂来延缓肌原纤维蛋白的变性, 从而提高鱼糜的贮藏品质<sup>[5]</sup>。据报道, 魔芋葡甘聚糖 (Konjac Glucomannan, KGM) 在降低鱼糜产品的甜味效果上优于商业抗冻剂<sup>[6]</sup>, KGM 是魔芋块茎中提取的水溶性非离子多糖, 并含有丰富的基团与肌原纤维蛋白相互交联, 如羟基、葡萄糖和甘露糖残基, 有效防止水分渗出, 从而形成良的肌原纤维蛋白凝胶网络<sup>[2]</sup>。KGM 不能被人体上消化道的消化酶水解, 因此被认为是一种无热量的不可消化膳食纤维, 并且在减轻体重和改变碳水化合物代谢方面发挥了重要作用<sup>[7]</sup>。而 KGM 分子量的大小会影响肌原纤维蛋白的理化和结构特性, 进而影响肌原纤维蛋白的功能特性<sup>[9]</sup>。贾娜丽等<sup>[11]</sup>研究发现, 特定分子量的 KGM 在特定 pH 值环境中

形成的内部结构数量和凝胶能力不同。王玉良<sup>[12]</sup>研究发现, 中等分子量的 KGM 对鱼糜凝胶强度、白度、持水力有显著的提高, 且小分子量 KGM 有利于填充在蛋白的间隙, 使得凝胶强度一定程度上有所增高。另外, 汪兰等<sup>[13]</sup>研究发现, 添加 KGM 酶解产物能够维持草鱼肌原纤维蛋白二级结构的稳定性。因此, 研究不同分子量魔芋葡甘聚糖酶解产物 (Enzymatic Hydrolysis of Konjac Glucomannan, EK) 对肌原纤维蛋白的冷冻保护效果具有十分重要的意义。

本研究通过比较不同分子量 EK 和商业抗冻剂 (4% 蔗糖 + 4% 山梨糖醇) 对冻藏过程中草鱼肌原纤维蛋白的盐溶性蛋白含量、 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性、总巯基、表面疏水性、粒径及 Zeta 电位、SDS-PAGE、紫外和荧光光谱的分析, 探讨其对蛋白的冷冻保护作用, 并进一步阐明 EK 的冷冻保护机理。有助于 EK 在食品加工中的应用, 进而发挥 KGM 在鱼糜冷冻贮藏中的作用, 为 KGM 的工业应用提供了理论指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 原料

新鲜草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*), 重约 3 kg,

购于湖北省武汉市白沙洲水产市场；魔芋葡甘聚糖购自湖北康盛魔芋有限公司； $\beta$ -葡聚糖酶（50 000 U/g）购自上海源叶生物有限公司；且所有试剂均为分析纯。

## 1.2 仪器

PL 2002 电子天平，梅特勒托利多仪器（上海）有限公司；L5S 紫外可见分光光度计，上海仪电分析仪器有限公司；IKA 均质机，广州东南科创科技有限公司；GL-21M 高速冷冻离心机，湖南湘仪实验室仪器开发有限公司；Nano ZS+MPT-2 纳米粒度及电位分析仪，英国马尔文仪器有限公司；UV-UH 500 紫外分光光度计，日本日立公司；VERTEX 70 傅里叶变换红外光谱仪，德国 Bruker Optics 公司；GPC-MALLS 凝胶渗透色谱-多角激光光散射仪，美国怀雅特技术公司。

## 1.3 方法

### 1.3.1 $\beta$ -葡聚糖酶降解KGM产物的制备及分子量的测定

将 5 g 魔芋精粉与 80 倍的蒸馏水拌匀，然后将 1 mol/L 的盐酸溶液添加到溶液中，以确保 pH 值达到 5.5。然后在 50 °C 的恒温水浴中加热，并向其加入质量分数为 0.06% 的  $\beta$ -葡聚糖酶，降解时间为 90 和 150 min 的分别标记为 EK1、EK2；加入质量分数为 0.3% 的  $\beta$ -葡聚糖酶，降解时间为 120 min 的标记为 EK3。沸水浴灭酶活，使用 1 mol/L 的 NaOH 溶液酸碱中和处理后冷冻干燥备用。最后，使用 GPC-MALLS 进行分子量分析，在此过程中，在 0.1 mol/L  $\text{NaNO}_3$  中，以 0.4 mL/min 的流速进行混合，以达到最佳的混合效果，温度为 25 °C。分析结果表明：EK1、EK2 和 EK3 的分子量分别为 149.03、118.75 和 36.48 ku。

### 1.3.2 草鱼鱼糜的制备

参考阙凤等<sup>[14]</sup>的方法略作改动，从新鲜草鱼的背部取出白肉，将其绞碎，然后用 5 倍体积的预冷水进行两次漂洗，接着，再用质量分数为 1.5% NaCl 溶液一次漂洗，最后，将鱼肉碎末经过 4 层 300 目纱布过滤，并经过 2 次脱水处理，以获得最佳的口感和营养价值，以制备鱼糜。真空包装后置于 4 °C 冰箱中冷藏，备用。本试验所有工序均保持在低温环境操作（10 °C 以下）。

### 1.3.3 草鱼肌原纤维蛋白的提取

参考 Xiong 等<sup>[15]</sup>的方法，取 200 g 鱼糜与预

冷的 20 mmol Tris-马来酸缓冲液（含 0.05 mol/L NaCl，pH 值为 7.0）10 倍体积混合，混合后高速均质（6 000 r/min，60 s），随后匀浆液用纱布过滤，将所得沉淀与相同处理条件的 20 mmol/L Tris-马来酸缓冲液（含 0.6 mol/L NaCl，pH 值为 7.0）5 倍体积混合，在 6 000 r/min 下均质 1 min。将匀浆液静置 1 h（温度于 4 °C），然后低温在 10 000 r/min、4 °C 下离心 15 min，所得上清液即为试验用肌原纤维蛋白溶液。将其浓度调整至 2.4 mg/mL，分别与不同分子量 KGM 酶解产物和商业抗冻剂（4% 山梨糖醇+4% 蔗糖）混合，得到 2 mg/mL 的蛋白溶液体系，混合溶液分别标记为 EK1、EK2、EK3 和 S。以未添加 KGM 酶解产物和商业抗冻剂的肌原纤维蛋白为对照组（C）。肌原纤维蛋白混合溶液在 -18 °C 下保存 30 d。

### 1.3.4 盐溶性蛋白浓度的测定

参考李志江<sup>[16]</sup>的方法，在 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液中，将肌原纤维蛋白溶液稀释到 0.2 mg/mL，然后从每个样品中取出 1 mL，与 5 mL 的考马斯亮蓝 G-250 溶液进行完全混合，接着在 595 nm 波长下进行比色，通过对蛋白质的吸光度进行精确测量，并结合相应的标准曲线，可以精确地估算其含量。对于每一份样本，都进行了 3 次测量。

### 1.3.5 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase的测定

采用南京建成生物公司的超微量 ATP 酶（ $\text{Ca}^{2+}$ ）测试盒，通过测定酶解 ATP 产生的无机磷含量来确定 ATP 活力的高低。

### 1.3.6 总巯基的测定

参考石钢鹏等<sup>[17]</sup>的方法，取 0.5 mL 蛋白样品溶液（4 mg/mL），加入 4.5 mL 0.2 mol/L Tris-HCl 缓冲液中（其中含 8 mol/L 尿素，10 mol/L EDTA，质量分数为 2% SDS，pH 值为 7.0），加入 0.5 mL 质量分数为 0.1% DTNB（含 0.2 mol/L Tris-HCl，pH 值为 8.0），于 40 °C 避光反应 25 min，412 nm 处测量吸光度，使用 20 mmol/L Tris-马来酸缓冲液（含 0.6 mol/L KCl，pH 值为 7.0）来代替样品。计算公式如下：

$$X = \frac{A \times D}{\epsilon \times C_0} \quad (1)$$

式中：

X——总巯基摩尔浓度，mol/g；

$C_0$ ——蛋白质质量浓度，mg/mL；

A——吸光值；

$D$ —稀释倍数;

$\epsilon$ —摩尔消光系数, 13 600 L/(mol·cm)。

### 1.3.7 表面疏水性的测定

参考鲁耀彬等<sup>[18]</sup>的方法, 用 Tris- 马来酸缓冲液 (含 0.6 mol/L NaCl, pH 值为 7.0) 将蛋白浓度分别稀释至体积分数为 0.1%、0.2%、0.3% 和 0.5%, 通过使用荧光光谱仪, 测量蛋白质样品在不同条件下的荧光强度。具体来说, 使用 10  $\mu$ L 的 8 mmol/L ANS、0.1 mol/L、pH 值为 7.0 磷酸盐缓冲液和 2 mL 蛋白溶液来进行测定。用荧光强度对蛋白质浓度的斜率表示蛋白质的表面疏水性  $S_0$ 。

### 1.3.8 SDS-PAGE

参考 Laemmli 等<sup>[19]</sup>的方法适当修改。使用 0.6 mol/L NaCl-20 mmol/L Tris-HCl 溶液对蛋白质进行稀释, 使其质量浓度达到 1.5 mg/mL, 然后将其与上样缓冲液以 2:1 的比例混合, 再次将其浓度调节到 1 mg/mL, 放入沸水中浸泡 3 min, 最后取出, 放置于室温, 即可得到 SDS-PAGE 待测样品。在 60 V 和 60 V 的电压下, 分别添加质量分数为 4% 的浓缩胶和 10% 的分离胶, 在溴酚蓝到达底部之前, 将胶从玻璃板上取下, 倒入玻璃容器内, 分别添加体积分数为 10% 乙酸、50% 甲醇和质量分数为 0.1% 的考马斯亮蓝 R-250 染色液, 染色一晚, 然后使用洗脱液 (体积分数分别为 50% 甲醇、10% 乙酸和 40% 纯水) 脱色 4 h, 最终收集图像。

### 1.3.9 粒径及 Zeta 电位的测定

通过调节肌原纤维蛋白的质量浓度到 0.1 mg/mL, 并采用动态光散射技术测量蛋白质的大小, 以 173° 的角度和 633 nm 的输出波长, 并对其进行反射散射校正, 最终将测量温度调节到 25  $^{\circ}$ C。调节肌原纤维蛋白浓度至 0.01 mg/mL, 采用电位仪测定蛋白样品的电位, 检测温度为 25  $^{\circ}$ C。

### 1.3.10 紫外光谱的测定

参考汪兰等<sup>[13]</sup>的方法。将肌原纤维蛋白溶液的浓度调节至 0.3 mg/mL, 然后使用紫外-可见分光光度计, 在 230~400 nm 波长范围内, 对不同样品进行光谱扫描, 以获取其特征信息。

### 1.3.11 荧光光谱的测定

参考石钢鹏等<sup>[20]</sup>的方法, 将肌原纤维蛋白溶液稀释至 0.1 mg/mL, 装入到石英四通比色皿中, 比色皿的光程为 1 cm。发射光谱的操作条件为: 扫描范围为 290~440 nm, 激发和发射狭缝宽度均为 5 nm,

电压为 400 V, 响应时间为 1 s, 并且记录下每个波长之间的数据。

## 1.4 数据处理

每次试验重复做 3 次平行, 并计算出平均值和标准方差以表示试验结果, 所得数据均采用 Origin 2021、IBM SPSS Statistics 27 和 Microsoft Excel 2019 软件进行统计处理及绘图, 采用 ANOVA 法分析测验显著性水平为  $P < 0.05$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 盐溶性蛋白含量

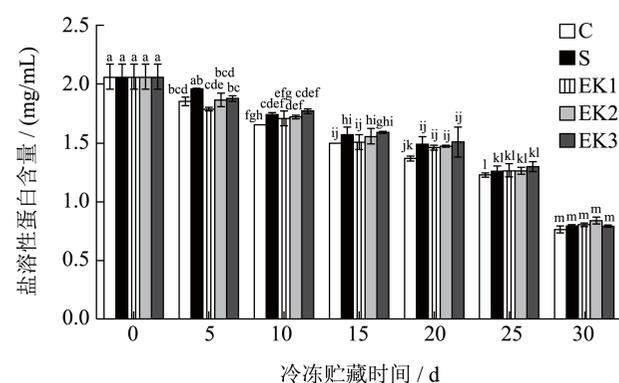


图 1 添加不同分子量酶解魔芋葡甘聚糖对肌原纤维蛋白盐溶性蛋白含量的影响

Fig1 Effects of enzymatic digestion products of konjac glucomannan with different molecular weights on salt soluble protein content of myofibrillar protein

注: 不同的小写字母表示具有显著差异 ( $P < 0.05$ ), 下同。

冻藏过程中肌原纤维蛋白的变性显著增加, 从图 1 可以看出, 在冻藏 30 d 期间, 所有样品的盐溶性蛋白含量总体上呈现出下降趋势 ( $P < 0.05$ ), 而且, 这种变化与 EK 分子量成反比。冻藏 30 d, C、S、EK1、EK2 和 EK3 组盐溶性蛋白的含量分别是 0.76、0.80、0.81、0.84 和 0.79 mg/mL, 分别下降了 63.25%、61.08%、60.79%、59.41% 和 61.88%。结果表明: 与空白组相比, S、EK1、EK2 和 EK3 处理组都能够抑制盐溶性蛋白浓度的下降, 这与 Wang 等<sup>[21]</sup>研究添加魔芋葡甘聚糖水解产物能够抑制草鱼肌原纤维蛋白溶解度下降的结论相似。KGM 的存在可以有效地阻止蛋白质分子的聚集变性, 由于它们能够与蛋白质反应基团结合, 使得蛋白质分子达到最大的饱和度, 从而实现结构的稳定性。KGM 中的游离羟基能够与鱼肉组织中的水分子形成紧密的结合, 促使自由水向结合水转化, 晶点温

度降低,有利于阻止冰晶的形成,从而维持稳定的蛋白结构<sup>[22]</sup>。

## 2.2 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase活性

$\text{Ca}^{2+}$ -ATPase的活性与肌球蛋白息息相关,它的下降表明肌球蛋白的结构受到了严重的损害<sup>[23]</sup>。根据图2可知, $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase的最大活性是 $4.99 \mu\text{mol Pi}/(\text{mg prot}\cdot\text{h})$ 。经过冻藏,肌原纤维蛋白的 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase活性大幅度下降( $P<0.05$ ),相比起原始水平,降低了85.93%。另外,在S组和EK处理组中, $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase的活性也有所不同。冻藏30 d时,S、EK1、EK2和EK3处理组 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase活性分别下降了75.87%、79.82%、75.02%、73.84%,均低于空白对照组。结果表明,添加KGM酶解产物均能有效抑制肌原纤维蛋白 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase活性降低,保护肌球蛋白结构,这与Jiang等<sup>[24]</sup>研究表明普鲁兰多糖可以有效抑制草鱼肌原纤维蛋白 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase的活性下降的结论相符。多糖的羟基可能限制水分子的迁移和冰晶的生长,有助于延缓蛋白质变性和聚集<sup>[25]</sup>。KGM酶解产物分子量越小,肌原纤维蛋白 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase活性越高,且EK2和EK3冷冻保护效果与商业抗冻剂S组接近。

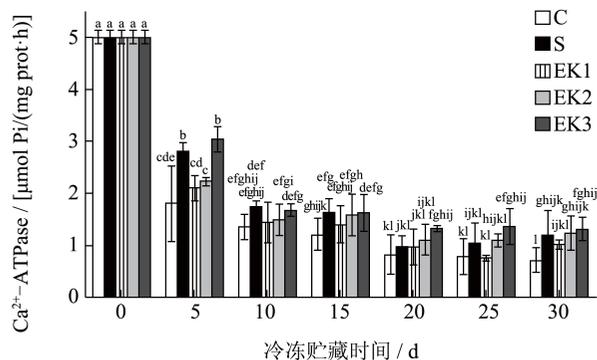


图2 添加不同分子量酶解魔芋葡甘聚糖对肌原纤维蛋白 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase的影响

Fig.2 Effects of enzymatic digestion products of konjac glucomannan with different molecular weights on  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of myofibrillar protein

## 2.3 总巯基

巯基含量可以反映蛋白质氧化程度,在冻藏过程中很容易被氧化形成二硫键,导致总巯基含量下降<sup>[15]</sup>。根据图3可知,冻藏时间与巯基的含量呈反比。冻藏5 d时,对照组的巯基含量下降迅速,说明肌原纤维蛋白已发生变性。冻藏30 d后,C、S、EK1、EK2和EK3组巯基含量依次下降到

$10.42\times 10^{-5}$ 、 $11.55\times 10^{-5}$ 、 $11.31\times 10^{-5}$ 、 $11.79\times 10^{-5}$ 和 $11.15\times 10^{-5} \text{ mol/g}$ ,分别下降了62.85%、58.80%、59.66%、57.95%和60.24%。结果表明:与空白对照组相比,S、EK1、EK2和EK3处理组都能够抑制巯基含量的下降。总巯基含量的下降可能是由于半胱氨酸的变性,半胱氨酸存在于肌球蛋白的催化区域,更容易受到氧化,蛋白质氧化可导致分子间及分子内二硫键的形成,改变肌原纤维蛋白结构性质<sup>[26]</sup>。冻藏20 d后,EK3组巯基含量显著高于EK1( $P<0.05$ ),表明小分子量KGM酶解产物长期抑制蛋白质氧化效果更佳。本结果与盐溶性蛋白浓度、 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase活性变化趋势相似。与现有的研究结果对比分析,黄扬萍等<sup>[9]</sup>研究三种不同分子量的水溶性大豆多糖( $M_w$ 为5 025.24、4 384.77和3 218.14 ku)在冻藏0~12周过程中,随着冻藏时间的延长,分子量越小,蛋白溶解度、 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase活性和总巯基含量越高,防止鳙鱼肌原纤维蛋白变性的效果越好,与本实验研究小分子量抗冻效果相符。

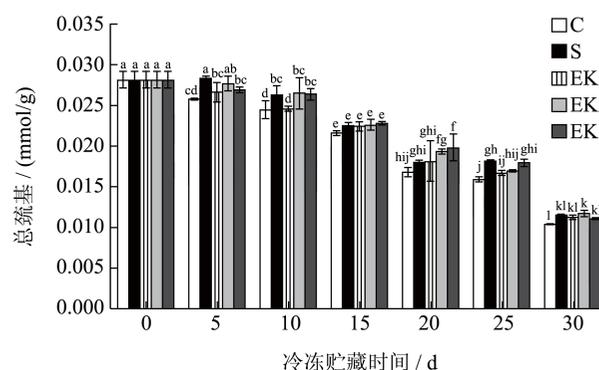


图3 添加不同分子量酶解魔芋葡甘聚糖对肌原纤维蛋白总巯基含量的影响

Fig.3 Effects of enzymatic digestion products of konjac glucomannan with different molecular weights on total sulfhydryl content of myofibrillar protein

## 2.4 表面疏水性

肌原纤维蛋白的表面疏水性反映蛋白质分子内疏水残基的暴露程度,与蛋白的功能性质密切相关<sup>[27]</sup>。表面疏水性增加可能是冻藏过程中蛋白质变性导致肌球蛋白头部构象发生变化,疏水残基的暴露使蛋白分子间相互作用增强,造成蛋白质聚集,从而导致表面疏水性的增加<sup>[28]</sup>。由图4可知,随着冻藏时间的增加,表面疏水性呈上升趋势。冻藏0 d,所有样品的表面疏水性为1 929.47。冻藏30 d后,C、S、EK1、EK2和EK3组表面疏水性分别为9 630.00、8 676.13、9 253.65、8 788.45和

8 689.07, 分别上升了 80.05%、78.16%、78.14%、79.34% 和 78.45%。与空白对照组相比, KGM 酶解产物与商业抗冻剂能够显著抑制表面疏水性的增加 ( $P<0.05$ ), 尤其冻藏后期, KGM 酶解产物的分子量越低, KGM 酶解产物抑制表面疏水性上升的效果越好。这可能是由于 KGM 酶解产物中含有大量羟基、氨基等亲水基团和氢键, 与蛋白质相互作用增强, 避免极性残基周围的水合物层被破坏, 而抑制疏水残基的暴露<sup>[21]</sup>。与现有的研究结果对比分析, 鲁耀彬等<sup>[18]</sup>研究两种不同分子量葡聚糖 ( $M_w$  为 7 ku 和 20 ku) 在冻藏 15~30 d 中, 分子量较小的葡聚糖 ( $M_w$  为 7 ku) 抑制草鱼肌原纤维蛋白表面疏水性增加的效果要优于分子量相对较大的葡聚糖 ( $M_w$  为 20 ku), 与本实验研究小分子量显著抑制表面疏水性增加相符。

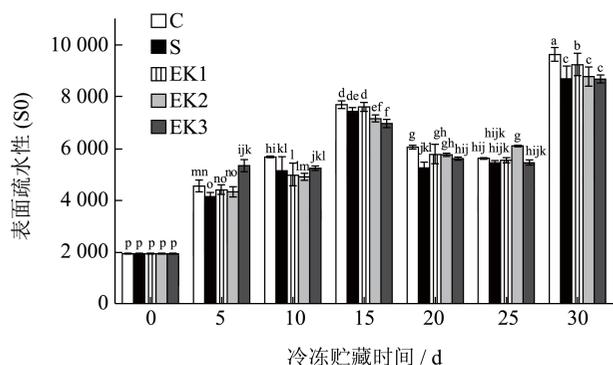


图 4 添加不同分子量酶解魔芋葡甘聚糖对肌原纤维蛋白表面疏水性的影响

Fig.4 Effects of enzymatic digestion products of konjac glucomannan with different molecular weights on surface hydrophobicity of myofibrillar protein

### 2.5 粒径及Zeta电位

肌原纤维蛋白在贮藏过程中会发生自聚集, 稳定性降低, 表现为粒径增大, Zeta 电位降低<sup>[29]</sup>。如图 5a 所示, 所有肌原纤维蛋白样品的粒径随着冷冻贮藏时间的延长均显著上升 ( $P<0.05$ )。在冻藏 30 d 后, 空白对照组的粒径增加了 66%, 由于肌原纤维蛋白的氧化和变性, 在冷冻保存过程中, 蛋白质会形成聚集体, 从而影响其功能性。与空白对照相比, 商业抗冻剂的粒径显著降低, 可能是因为小分子多糖使蛋白质均匀分散<sup>[30]</sup>; EK1、EK2 和 EK3 组肌原纤维蛋白的粒径显著增加, 可能是由于 KGM 酶

解产物与蛋白质之间发生相互作用, 以“桥梁作用”使蛋白质分子间相连, 从而引起粒径增大<sup>[31]</sup>。

通常而言, Zeta 电位绝对值减小, 意味着肌原纤维蛋白中相邻的悬浮粒子之间静电相互作用变小, 聚集程度增加<sup>[32]</sup>。如图 5b 所示, 经 C、S、EK1、EK2 和 EK3 处理后的肌原纤维蛋白样品的 Zeta 电位绝对值随着冷冻贮藏时间 (除第 10 天) 的增加均显著下降 ( $P<0.05$ )。在冻藏初期, 空白对照组表现出较高的净负电荷 (18.03 mV)。冻藏至 30 d 后, 净电位值显著降低到 10.08 mV ( $P<0.05$ ), 这可能是由于低温冻藏过程中蛋白质内部的一些带电荷的基团暴露在表面, 导致肌原纤维蛋白悬浮液的净电荷更低<sup>[33]</sup>。与此同时, S、EK1、EK2 和 EK3 组 Zeta 电位分别增加到 -11.7、-11.5、-12.95 和 -13.35 mV, 可能是因为 KGM 酶解产物与肌原纤维蛋白的相互作用, 影响了肌原纤维蛋白的自聚集。其中 EK3 组的肌原纤维蛋白的静电斥力最大, 在冻藏后期表现出更好的稳定性。

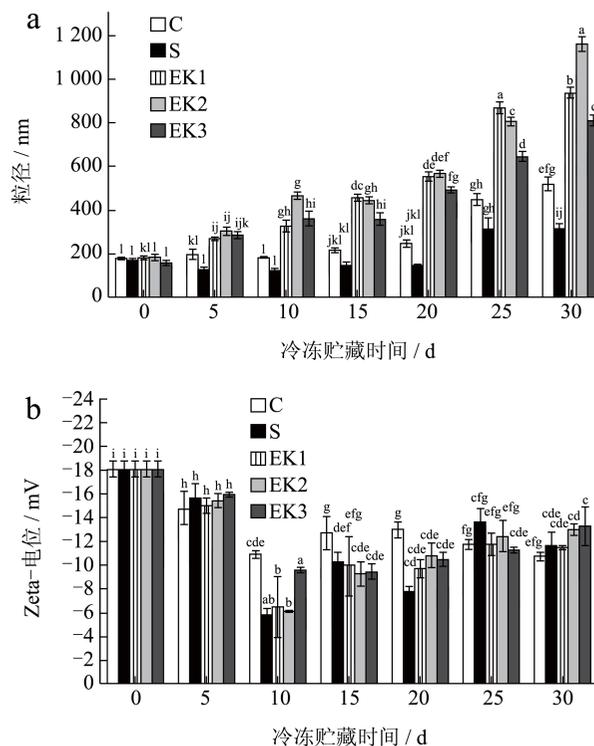


图 5 添加不同分子量酶解魔芋葡甘聚糖对肌原纤维蛋白粒径及 Zeta 电位的影响

Fig.5 Effects of enzymatic digestion products of konjac glucomannan with different molecular weights on particle size and Zeta potential of myofibrillar protein

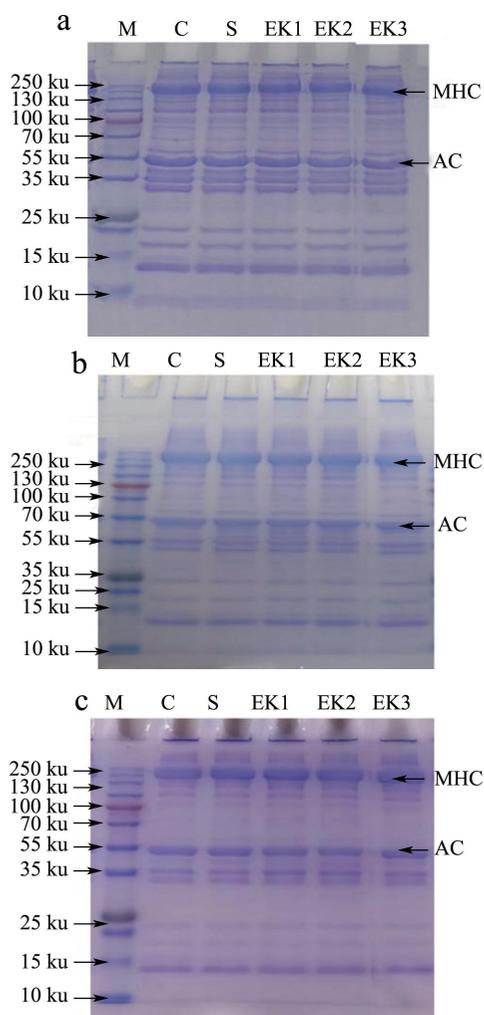


图6 添加不同分子量酶解魔芋葡甘聚糖对肌原纤维蛋白 SDS-PAGE 的影响

Fig.6 Effects of enzymatic digestion products of konjac glucomannan with different molecular weights on SDS-PAGE of myofibrillar protein

注: a、b 和 c 分别表示添加  $\beta$ - 巯基乙醇的 0 d、10 d 和 30 d。

表 1 肌球蛋白重链 (MHC) 和肌动蛋白 (AC) 相对含量的变化

Table 1 Changes in the relative content of myosin heavy chain (MHC) and actin (AC)

处理 条件	冻藏 时间/d	MHC			AC		
		0	15	30	0	15	30
还原 SDS	C	22 022	22 803	19 417	21 802	17 861	15 410
	S	18 265	22 191	22 577	19 552	16 787	16 394
	EK1	19 642	22 448	22 618	17 502	18 232	14 526
	EK2	19 147	22 482	21 126	17 939	19 588	15 884
	EK3	19 512	26 615	25 165	20 143	23 615	18 482

## 2.6 SDS-PAGE

电泳条带的变化可以用来反映肌原纤维蛋白的聚集和降解程度<sup>[9]</sup>。由图 6 可知, 在不同的处理方式下, 肌原纤维蛋白的 SDS-PAGE 图谱显示出了两种主要的条带: 肌球蛋白重链 (MHC, 220 ku) 和肌动蛋白 (AC, 43 ku)<sup>[34]</sup>。采用 Image J 软件计算 Western Blot 灰度值表征蛋白相对含量 (表 1)。随着冻藏时间的增加, MHC 灰度值呈现上升趋势, AC 灰度值呈现先上升后下降趋势 (C 和 S 处理处呈现持续下降趋势), 表明肌球蛋白在贮藏过程中不断聚集, 而肌动蛋白在贮藏过程中会逐渐降解。在冻藏 0 d 时, S 和 EK (1、2 和 3) 组 MHC 和 AC 的灰度值均明显下降, 而在冻藏 15 d 和 30 d 时, EK3 组的 MHC 和 AC 的灰度值均最大, 表明 EK3 组肌原纤维蛋白变性程度最小, EK3 较好的保护了肌原纤维蛋白的结构。而 S 和 EK1、EK2 组差别不大。

## 2.7 紫外光谱分析

利用紫外吸收光谱分析了不同分子量 KGM 酶解产物在冻藏过程中对肌原纤维蛋白三级结构的影响<sup>[35]</sup>, 结果如图 7 所示。

由图 7 可知, 随着贮藏时间的延长, 空白对照组的紫外最大吸收波长在 272~275 nm 之间, 最大吸收波长呈波动式先蓝移后红移; 商业抗冻剂、EK1 的最大吸收波长均在 272~275 nm 之间, 且最大吸收波长变化相似, 呈先平稳趋势后波动式红移; EK2 的最大吸收波长 272~275 nm 之间, 最大吸收波长变化呈先蓝移后平稳趋势。EK3 的最大吸收波长 270~275 nm 之间, 最大吸收波长变化呈先波动式蓝移, 最后平稳趋势。R 基团的色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸都具有苯环共轭双键, 这些双键在波长分别为 280、275 和 257 nm 时都会产生吸收峰<sup>[13]</sup>。肌原纤维蛋白的紫外吸收峰位于 275 nm 附近, 这可能是由于酪氨酸在蛋白质中的表达量较高所致。随着贮藏时间的延长, 空白、对照、EK1 的最大吸收波长均出现红移, 酪氨酸残基位于蛋白质的表面, 并且在极性条件下存在, 这是显而易见的。而 EK2 和 EK3 使酪氨酸的吸收波长变小, 使酪氨酸更稳定。冷冻贮藏过程中最大吸收波长的波动可能是由于冷冻贮藏过程中的酪氨酸微环境差异造成的<sup>[4]</sup>。

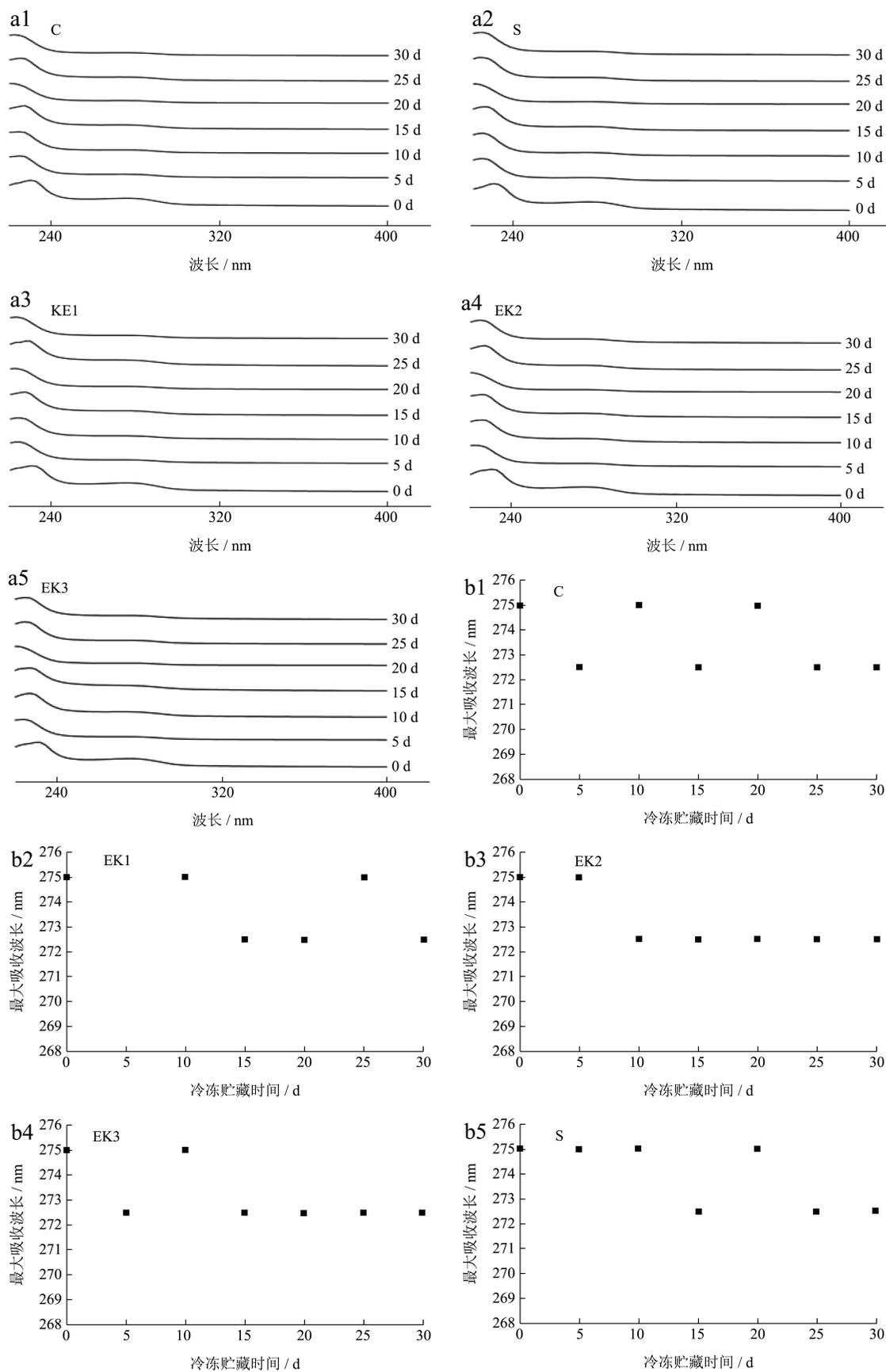


图 7 添加不同分子量酶解魔芋葡甘聚糖对肌原纤维蛋白紫外光谱 (a) 和最大吸收峰 (b)

Fig.7 UV spectrum analysis (a) and maximum absorption peak (b) of myofibrillar protein with enzymatic digestion products of konjac glucomannan with different molecular weights

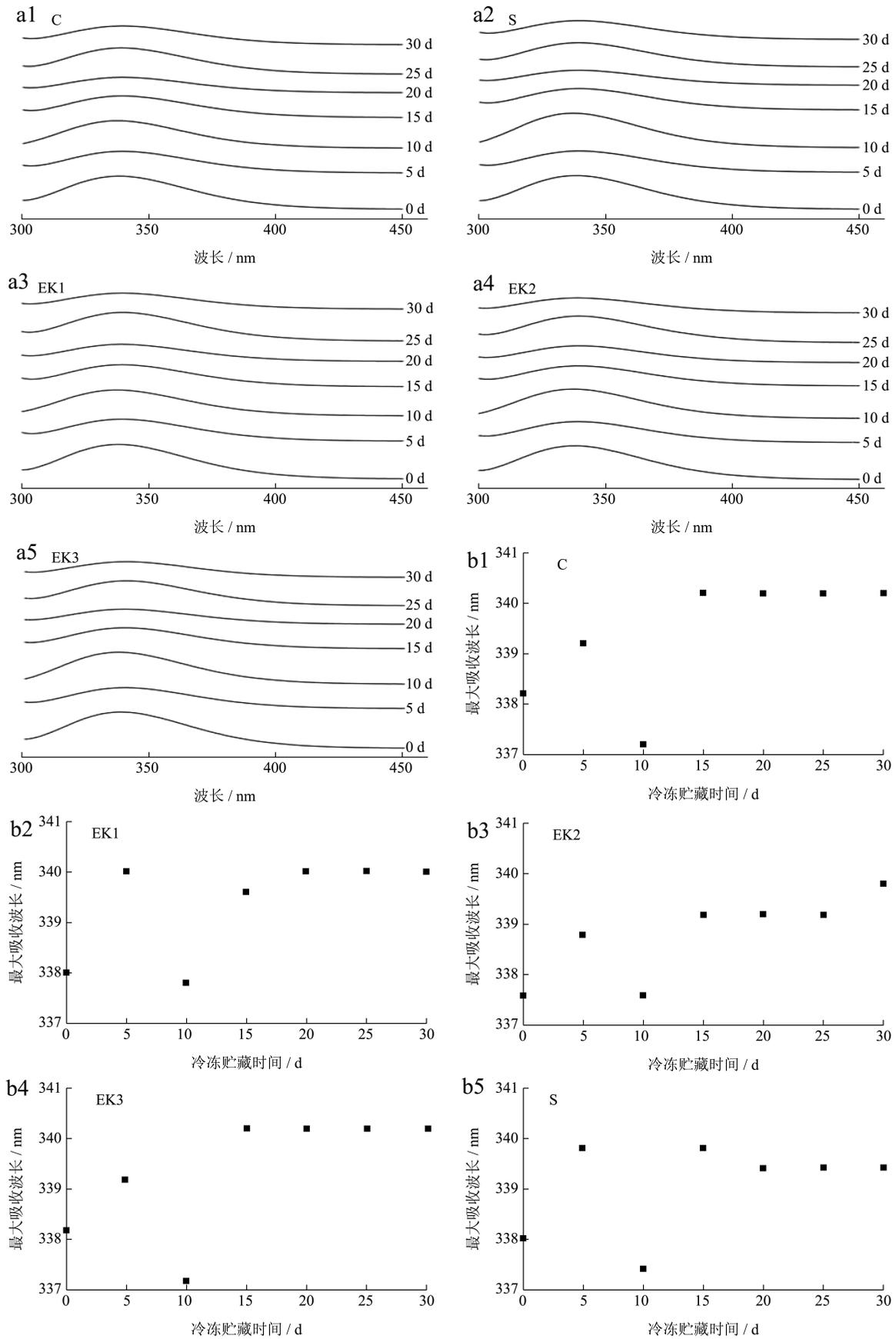


图 8 添加不同分子量酶解魔芋葡甘聚糖对肌原纤维蛋白的荧光光谱 (a) 和最大吸收峰 (b)

Fig.8 Fluorescence spectrum analysis (a) and maximum absorption peak (b) of myofibrillar protein with enzymatic digestion products of konjac glucomannan with different molecular weights

## 2.8 荧光光谱分析

通过荧光光谱分析,可以清晰地观察蛋白质三级结构的变化,通过观察蛋白质中色氨酸残基的最大发射波长变化<sup>[35]</sup>,推断出它们在微环境中的暴露情况,从而更好地了解其功能特性。由图8可知,随着贮藏时间的延长,所有样品的荧光最大吸收波长在337~340 nm之间,空白对照组最大吸收波长变化呈先红移后波动式;商业抗冻剂、EK1和EK2最大吸收波长变化呈先红移后平稳趋势;EK3最大吸收波长变化呈先蓝移后红移的趋势,这可能是色氨酸残基暴露或氧化,埋藏的色氨酸残基暴露在极性的水相环境中,导致疏水相互作用增强,蛋白质分子聚集和构象发生变化<sup>[27]</sup>。在短期贮藏20 d, EK2和EK3色氨酸最大吸收波长第10天明显减小,可能是KGM酶解产物与蛋白之间的相互作用增强。第15天最大吸收波长明显增大,可能是色氨酸的氧化。结果表明,KGM酶解产物对草鱼肌原纤维蛋白色氨酸具有保护作用,但长期贮藏的蛋白溶液,KGM酶解产物冷冻保护作用不明显。Zhang等<sup>[36]</sup>研究发现,添加海藻酸钠的肌原纤维蛋白增加了色氨酸残基的稳定性,这可能是由于多糖与蛋白质的相互作用。

## 3 结论

随着冻藏时间延长,149.03、118.75和36.48 ku酶解魔芋葡甘聚糖均能够延缓肌原纤维蛋白聚集变性,使冻藏肌原纤维蛋白功能特性有效保持,结合盐溶性蛋白含量、Ca<sup>2+</sup>-ATPase活性和总巯基分析,3种酶解魔芋葡甘聚糖均能延缓冻藏15 d以上的肌原纤维蛋白变性,其中36.48 ku酶解魔芋葡甘聚糖的延缓效果更为明显。通过对比3种酶解魔芋葡甘聚糖对肌原纤维蛋白结构的影响,SDS-PAGE分析结果表明36.48 ku酶解魔芋葡甘聚糖在冻藏30 d肌球蛋白和肌动蛋白降解程度最小,紫外和荧光光谱分析结果表明在冻藏30 d色氨酸和酪氨酸残基暴露程度减小,小分子魔芋葡甘聚糖酶解产物含有丰富的亲水基团,如羟基、氨基,以及可以形成氢键的官能团,这些官能团可能增强蛋白质与水之间的亲和力,减少疏水氨基酸残基的暴露,保护了肌原纤维蛋白的结构,防止色氨酸、酪氨酸等芳香族氨基酸残基的暴露。因此,通过肌原纤维蛋白变性和结构特性的变化,说明小分子量的魔芋葡甘聚糖酶解产物具有更强的抗冻效果。

## 参考文献

- [1] 刘友明. 鲢鱼和草鱼肌原纤维蛋白的聚集及鱼糜凝胶特性的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2010.
- [2] BUDA U, PRIYADARSHINI M B, MAJUMDAR R K, et al. Quality characteristics of fortified silver carp surimi with soluble dietary fiber: Effect of apple pectin and konjac glucomannan [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 175: 123-130.
- [3] CHEN X, WU J, LI X, et al. Investigation of the cryoprotective mechanism and effect on quality characteristics of surimi during freezing storage by antifreeze peptides [J]. Food Chemistry, 2021, 371: 131054.
- [4] WALAYAT N, XIONG Z, XIONG H, et al. Cryoprotective effect of egg white proteins and xylooligosaccharides mixture on oxidative and structural changes in myofibrillar proteins of *Culter alburnus* during frozen storage [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 158: 865-874.
- [5] ZHUANG X, WANG L, JIANG X, et al. Insight into the mechanism of myofibrillar protein gel influenced by konjac glucomannan: moisture stability and phase separation behavior [J]. Food Chemistry, 2020, 339: 127941.
- [6] LIU J, FANG C, LOU Y, et al. Effects of konjac oligo-glucomannan on the physicochemical properties of frozen surimi from red gurnard (*Aspitrigla cuculus*) [J]. Food Hydrocolloids, 2019, 89: 668-673.
- [7] YE S X, ZONGO W S, SHAH B R, et al. Konjac glucomannan (KGM), deacetylated KGM (Da-KGM), and degraded KGM derivatives: a special focus on colloidal nutrition [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(44): 12921-12932.
- [8] 栗俊广, 张旭玥, 王昱, 等. 脱乙酰魔芋葡甘聚糖对猪肉肌原纤维蛋白结构及凝胶特性的影响[J]. 食品科学, 2023, 44(2): 26-31.
- [9] 黄扬萍. 水溶性大豆多糖对鳙鱼鱼糜肌原纤维蛋白抗冻性影响的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2019.
- [10] 王俊, 汪兰, 程薇, 等. 魔芋葡甘聚糖降解产物对肌原纤维蛋白的冷冻保护作用[J]. 食品科学技术学报, 2014, 32(5): 15-20.
- [11] 贾丽娜. 魔芋葡甘聚糖和脂肪影响罗非鱼肌原纤维蛋白凝胶性能的研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2015.
- [12] 王良玉. 魔芋葡甘聚糖与罗非鱼肌原纤维蛋白复合凝胶质构性质的研究[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2019, 41(4): 36-41.
- [13] 汪兰, 吴文锦, 乔宇, 等. 冻藏条件下魔芋葡甘聚糖降解产物对肌原纤维蛋白结构的影响[J]. 食品科学, 2015, 36(22): 244-249.
- [14] 阙凤, 高天麒, 汪超, 等. 不同糖类对草鱼鱼糜凝胶的影响[J]. 食品工业科技, 2022, 43(5): 48-55.

- [15] XIONG G, CHENG W, YE L, et al. Effects of konjac glucomannan on physicochemical properties of myofibrillar protein and surimi gels from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. Food Chemistry, 2009, 116(2): 413-418.
- [16] 李志江.考马斯亮蓝G250染色法测定啤酒中蛋白质含量[J].酿酒,2008,35(1):70-71.
- [17] 石钢鹏,阙凤,高天麒,等.速冻方式对冷冻贮藏中大口黑鲈鱼肉蛋白质特性的影响[J].食品工业科技,2021,42(20):309-319.
- [18] 鲁耀彬,熊光权,李新,等.葡聚糖延缓草鱼肌原纤维蛋白冷冻变性的机理分析[J].食品科学,2016,37(10):289-294.
- [19] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227(5259): 680-685.
- [20] 石钢鹏,周俊鹏,章蔚,等.超高压与热烫预处理对克氏原螯虾肉冻藏品质的影响[J].食品工业科技,2020,41(15):288-296,322.
- [21] WANG L, XIONG G, PENG Y, et al. The cryoprotective effect of different konjac glucomannan (KGM) hydrolysates on the glass carp (*Ctenopharyngodon idella*) myofibrillar during frozen storage [J]. Food and Bioprocess Technology, 2014, 7(12): 3398-3406.
- [22] 邵颖,姚洁玉,江杨阳,等.抗冻剂对鱼肉蛋白质冷冻变性的保护作用[J].食品科学,2018,39(7):291-297.
- [23] CAO Y, ZHAO L, HUANG Q, et al. Water migration, ice crystal formation, and freeze-thaw stability of silver carp surimi as affected by inulin under different additive amounts and polymerization degrees [J]. Food Hydrocolloids, 2022, 124: 107267.
- [24] JIANG L, WU S. Pullulan suppresses the denaturation of myofibrillar protein of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) during frozen storage [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 112(6): 1171-1174.
- [25] ZHU S, YU J, CHEN X, et al. Dual cryoprotective strategies for ice-binding and stabilizing of frozen seafood: A review [J]. Trends in Food Science and Technology, 2021, 111: 223-232.
- [26] ZHANG Z, XIONG Z, LU S, et al. Effects of oxidative modification on the functional, conformational and gelling properties of myofibrillar proteins from *Culter alburnus* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 162: 1442-1452.
- [27] SUN Q, CHEN Q, XIA X, et al. Effects of ultrasound-assisted freezing at different power levels on the structure and thermal stability of common carp (*Cyprinus carpio*) proteins [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2019, 54: 311-320.
- [28] HERRERA J R, MACKIE I M. Cryoprotection of frozen-stored actomyosin of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by some sugars and polyols [J]. Food Chemistry, 2004, 84: 91-97.
- [29] WANG Y Y, RASHID M T, YAN J K, et al. Effect of multi-frequency ultrasound thawing on the structure and rheological properties of myofibrillar proteins from small yellow croaker [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2020, 70: 105352-105352.
- [30] LIU Z, YANG W, WEI H, et al. The mechanisms and applications of cryoprotectants in aquatic products: An overview [J]. Food Chemistry, 2023, 408: 135202.
- [31] ZHAO N, ZOU H, SUN S, et al. The interaction between sodium alginate and myofibrillar proteins: The rheological and emulsifying properties of their mixture [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 161: 1545-1551.
- [32] 唐柏蛟,杨贤庆,潘创,等.坛紫菜多糖对微冻南美白对虾仁肌原纤维蛋白氧化和结构特性的影响[J].食品与发酵工业,2024,50(6):144-151.
- [33] MUKHERJEE D, CHANG S K, ZHANG Y, et al. Effects of ultra-high pressure homogenization and hydrocolloids on physicochemical and storage properties of soymilk [J]. Journal of Food Science, 2017, 82(10): 2313-2320.
- [34] SHI G, ZHOU M, WANG L, et al. The effect of gamma and electron beam irradiation on the structural and physicochemical properties of myofibrillar protein and myosin from grass carp [J]. Journal of Food Biochemistry, 2021, 45(8): 13828.
- [35] WALAYAT N, TANG W, NAWAZ A, et al. Influence of konjac oligo-glucomannan as cryoprotectant on physicochemical and structural properties of silver carp surimi during fluctuated frozen storage [J]. Lwt, 2022, 164: 113641.
- [36] 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, 2018, 276: 147-156.