

—20℃下鳙鱼肉中组织蛋白酶B 及L对其肌纤维微结构及持水力的影响

卢 涵

河北经贸大学生物科学与工程学院, 石家庄 050061

摘要 以鳙鱼肉为研究对象,测定-20℃下鳙鱼肉的肌原纤维、肌浆中的组织蛋白酶B及组织蛋白酶B+L活性、肌原纤维蛋白及肌浆蛋白的SDS-PAGE条带以及扫描电镜和透射电镜下的肌原纤维显微结构、质构、持水力(汁液损失及LF-NMR数据)随贮藏时间的变化。结果显示,鳙鱼片在-20℃下冻藏不同时间后再解冻,其组织蛋白酶仍具有较高的活性,肌球蛋白重链、肌动蛋白、肌钙蛋白T及原肌球蛋白随着冻藏时间的延长而降解,且出现了有可能是组织蛋白酶L酶解产物的20 ku肌浆蛋白条带。扫描电镜及透射电镜的结果显示,在冻藏112 d,肌纤维遭到了严重破坏,肌节中的A带及I带已经不能被清楚地辨别出来,M线几乎消失,同时鳙鱼肉的硬度及弹性随冻藏时间延长而大幅下降。鳙鱼肉的汁液损失、水分的 T_{21} 、 T_{22} 、 P_{22} 均随着冻藏时间延长而显著上升,水分的 P_{21} 随冻藏时间延长而显著下降。研究结果表明,鳙鱼肉在冻藏过程中,组织蛋白酶B及B+L参与了肌原纤维蛋白及肌浆蛋白的降解,从而破坏了鱼肉肌纤维微结构的完整,并造成了鳙鱼肉质构及持水力的劣化。

关键词 鳙; 冻藏; 组织蛋白酶B; 肌纤维微结构; 鱼肉质构; 鱼肉持水力; LF-NMR; 低温贮藏; 机械损伤

中图分类号 TS 254.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2019)05-0122-08

鱼类水分含量高,营养物质丰富,十分容易发生腐败变质。冻藏是一种最常用的保持鱼肉品质及鲜度的贮藏方法^[1]。由于低温的作用,冻藏能够抑制微生物的生长和繁殖及某些内源酶的活力,但是即使在低温下,鱼肉中的某些生化变化仍在缓慢进行,比如内源酶的酶解作用^[2],其不仅导致鱼肉的组织结构及持水力发生劣变,还会大大降低鱼肉的嫩度及多汁性,不利于后续的加工,从而影响到鱼肉的经济价值^[3]。

组织蛋白酶是一种存在于溶酶体中的热稳定性很强的内切酶。当溶酶体被破坏时,组织蛋白酶就会释放至细胞的其他部位,发挥水解蛋白的作用。已有的研究显示,溶酶体中存在13种组织蛋白酶,除组织蛋白酶D以外,其他组织蛋白酶均为半胱氨酸蛋白酶,组织蛋白酶B、H、L及L-like是许多鱼类死后肌肉中最活跃的溶酶体蛋白酶,因此,与鱼肉的嫩度、持水力等加工特性密不可分^[4]。冻藏过程中组织蛋白酶活性变化可能有两种情况,一是冻藏时的低温有可能使组织蛋白酶活性下降,减缓组织

蛋白酶对蛋白质的降解作用;二是冻结形成的冰晶会刺破溶酶体膜,导致组织蛋白酶更容易从溶酶体中释放至肌原纤维及肌浆中,从而促进组织蛋白酶对蛋白的降解作用。

本研究测定-20℃下冻藏不同时间再解冻的鳙鱼肉的肌原纤维及肌浆中的组织蛋白酶B及组织蛋白酶B+L活性、肌原纤维蛋白及肌浆蛋白的SDS-PAGE条带、质构、扫描电镜及透射电镜下的肌原纤维显微结构、持水力随贮藏时间的变化,探究冻藏再解冻对上述指标的影响及上述指标之间的内在联系,明确冻藏条件下鳙鱼肉的质构及持水力变化规律,从组织蛋白酶活的角度考察冻藏对鳙鱼肉质构及持水力的影响机制,为后续持续改进鳙鱼肉的低温贮藏方法提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

大小相似的养殖鳙购于北京市海淀区小月河农贸市场,运输袋中放水充氧活体运输至实验室,每尾

鲮的平均体质量为 $(1\,703 \pm 171)$ g,平均体长为 (45 ± 1) cm。击打鲮头部致晕,去鳞去头去内脏,片成鱼片,洗干净鱼片表面血液及粘液,沥干表面水分并记录每片鱼片的质量。之后立即取3片鱼片进行指标测定,作为新鲜值,即冻藏第1天的结果。将其他30片鱼片分别装入不同的聚乙烯保鲜袋中,平铺于 (-20 ± 1) ℃冰箱中,大约经过11 h鱼片降至 (-20 ± 1) ℃,记录冻藏时间,分别在冻藏第7、56、112天随机各取出3片鱼片,提前放入4℃冰箱解冻12 h,然后进行指标测定。

1.2 试剂及仪器设备

1)试剂。组织蛋白酶B及组织蛋白酶B+L底物均购于Sigma-Aldrich公司,其他试剂均为分析纯。

2)仪器设备。紫外可见分光光度计(UV-2600),购于上海尤尼柯仪器有限公司;荧光分光光度计(RF-5301PC),购于日本岛津公司;质构仪(CT-3),购于博勒飞(北京)有限公司;电泳装置(165-8001),购于美国伯乐公司;透射电镜(S-3400N),购于日本日立公司;扫描电镜(S-3400),购于日本日立公司。

1.3 亚细胞结构的分离

参照Ertbjerg等^[5]的方法并稍加调整。将鲮鱼肉与粗酶提取液混合匀浆后离心(1 100 r/min, 20 min),取得的沉淀为肌原纤维部分,剩下的上清液连续离心2次(3 000 r/min, 20 min; 16 000 r/min, 30 min),最后得到的上清液为肌浆部分。将肌原纤维和肌浆部分与一定体积的乙酸盐缓冲液混合,2 h之内使用,测定组织蛋白酶活性。

1.4 组织蛋白酶活性的测定

参照李树红等^[6]的方法。反应过程中,组织蛋白酶B、组织蛋白酶B+L分别对应各自的底物、反应缓冲液及pH。一个酶活单位被定义为40℃下能够在1 min内水解底物并释放出1 nmol AMC产物的酶活性量(1 nmol AMC/min)。

1.5 肌浆蛋白及肌原纤维蛋白的制备

参照Yin等^[7]的方法。

1.6 SDS-PAGE电泳分析

参照Wang等^[8]的方法。

1.7 鱼肉质构的测定

参照Zhu等^[9]的方法。

1.8 鱼肉肌纤维微结构的观察

1)扫描电镜的观察。参照田甲春^[10]的方法,

1 mm×1 mm×1 mm大小的鱼肉小块经过固定、脱水、冷冻干燥、喷金后制成符合扫描电镜观察要求的样品,电镜加速电压为20 kV,放大倍数为10 000。

2)透射电镜的观察。参照Castejón等^[11]的方法并稍加改动。沿着肌原纤维方向将鱼肉切成1 mm×1 mm×1 mm小块,分别用2.5%戊二醛溶液、2%四氧化锇溶液固定,再用梯度乙醇溶液脱水。之后鱼肉小块再经过环氧树脂包埋、切片、乙酸铀酰和柠檬酸铅染色,制成符合透射电镜观察要求的样品,电镜加速电压为80 kV,放大倍数为20 000。

1.9 鱼肉汁液损失的测定

参照Lu等^[12]的方法,用滤纸擦去鱼片表面的粘液及水分后称质量,记为冻藏后鱼肉的质量。汁液损失=(冻藏前鱼肉质量-冻藏后鱼肉质量)/冻藏前鱼肉质量×100%。

1.10 低场核磁共振-自旋弛豫时间(T_2)及峰面积比例(P_2)测定

参照Qin等^[13]的方法。最后进行数据反演得到3个弛豫时间 T_{2b} 、 T_{21} 、 T_{22} 及各自对应的峰面积比例 P_{2b} 、 P_{21} 及 P_{22} 。

1.11 统计分析

采用Excel(2010)和SPSS(20.0)软件处理实验数据,结果采用“平均值±标准差”形式。不同冻藏时间下的平均值比较采用ANOVA中的Duncan's法比较,取95%置信度($P < 0.05$)。

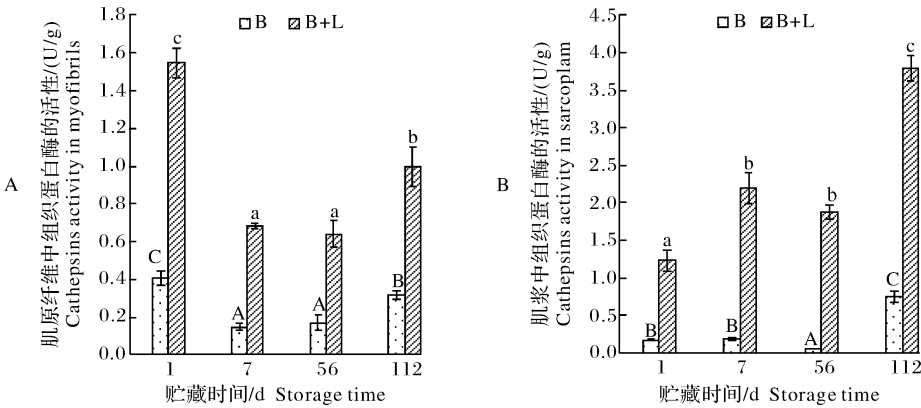
2 结果与分析

2.1 组织蛋白酶B及B+L活性在肌原纤维及肌浆中的分布

如图1A所示,在冻藏的第1~7天,肌原纤维中的组织蛋白酶活性随冻藏时间延长而下降($P < 0.05$)。类似地,Nagaraj等^[14]发现-15℃下,羊肉Longissimus dorsi部位中的组织蛋白酶B及组织蛋白酶B+L活性在0~6 d内随冻藏时间有所下降。基于此情况,推断在冻藏的第1~7天,低温抑制肌原纤维中组织蛋白酶的活性;而在第1~7天,如图1B所示,肌浆中的组织蛋白酶活性随冻藏时间延长而上升($P < 0.05$)。由此可判断,在冻藏的第1~7天,由于冻结再解冻,冰晶已经刺破溶酶体膜,造成组织蛋白酶从溶酶体中释放至肌浆中,且此影响要大于低温对肌浆中的组织蛋白酶活性的抑制作用。与肌原纤维中组织蛋白酶活性变化趋势不

同,可能是由于肌原纤维表面有肌内膜附着,从溶酶体释放出来的组织蛋白酶还没来得及通过肌内膜进入肌原纤维中。另外,本研究中肌浆中的组织蛋白酶 B 在冻藏第 56 天才发生显著变化。类似地, Duun 等^[15] 研究显示,在 -40 ℃ 下冻藏 0~37 d 的大西洋鲑的肌浆中组织蛋白酶的活性变化不大。在第 56~112 天,肌原纤维及肌浆中的组织蛋白酶活

性均呈现显著上升趋势($P<0.05$),这说明随着冻藏时间的延长,冰晶体积有可能逐渐增大,使得在冻藏后期冻结再解冻后机械损伤造成的酶释放要远远大于低温对酶活的抑制作用,因此,组织蛋白酶活性才会显著上升。另外发现组织蛋白酶 L 的活性高于组织蛋白酶 B,这说明组织蛋白酶 L 比冻藏组织蛋白酶 B 发挥着更重要的作用。



A:肌原纤维 Myofibrils; B:肌浆 Sarcoplasm;不同的大写字母代表不同冻藏时间下的鱼肉组织蛋白酶 B 之间具有显著性差异 ($P<0.05$);不同的小写字母代表不同冻藏时间下的鱼肉组织蛋白酶 B+L 之间具有显著性差异 ($P<0.05$)。Different capital letter indicated significant differences of cathepsin B activity between samples at different storage time ($P<0.05$); Different lowercase letter indicated significant differences of cathepsin B+L activity between different samples at storage time ($P<0.05$).

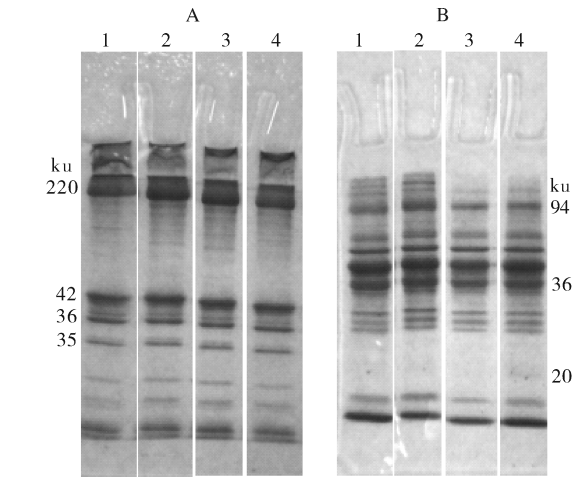
图 1 -20 ℃ 下鳙鱼肉中组织蛋白酶 B 及组织蛋白酶 B+L 活性随冻藏时间的变化

Fig.1 Changes of cathepsin B and cathepsin B+L activity in subcellular fractions of bighead carp fillets at -20 ℃

2.2 肌浆蛋白及肌原纤维蛋白的 SDS-PAGE 条带变化

如图 2A 所示,鳙鱼肉的肌原纤维蛋白中主要的条带是 220、42、36 及 35 ku,它们分别代表肌球蛋白重链、肌动蛋白、肌钙蛋白 T 及原肌球蛋白,如图 2 所示。在冻藏第 112 天,这些蛋白条带比冻藏第 7 天时变细,这说明这些蛋白均随着冻藏时间的延长被降解了。Saeed 等^[16] 发现 -20 ℃ 下大西洋马鲛的肌球蛋白重链条带在冻藏第 9 个月时严重降解。肌球蛋白重链、肌动蛋白、肌钙蛋白及原肌球蛋白均能够被组织蛋白酶 B 及 L 体外降解^[10],这与上文中冻藏第 112 天时肌原纤维中具有较高的组织蛋白酶活性相呼应。

如图 2B 所示,鳙鱼肉肌浆蛋白主要发生变化的是 94、36 及 20 ku 所在的条带。94 ku 及 36 ku 分别代表磷酸化酶^[17] 及甘油醛-3-磷酸脱氢酶^[18]。与冻藏第 1 天鳙鱼肉的肌浆蛋白条带相比,冻藏第 56 及 112 天时的磷酸化酶及甘油醛-3-磷酸脱氢酶所代表的条带颜色变浅。与冻藏第 1、7、56 天不同,在冻藏第 112 天鳙鱼肉的肌浆蛋白中 20 ku 位置出



A:肌原纤维蛋白 Myofibrillar protein; B:肌浆蛋白 Sarcoplasmic protein;泳道 1~4:冻藏第 1 天、第 7 天、第 56 天、第 112 天下各样品蛋白。Lane 1-4: Samples stored at day 1, 7, 56 and 112, respectively.

图 2 -20 ℃ 下鳙鱼肉蛋白的 SDS-PAGE 随冻藏时间的变化

Fig.2 SDS-PAGE profiles of proteins from bighead carp fillets under -20 ℃ with storage time 现了模糊的条带。研究表明,组织蛋白酶 L 酶解水

溶性蛋白时会出现 24.5 ku 及 20.5 ku 大小的条带^[19],因此,20 ku 条带有可能是组织蛋白酶 L 的酶解蛋白产物,这与上文中冻藏第 112 天时肌浆中具有较高的组织蛋白酶活性相对应。

2.3 鱼肉肌原纤维微观结构变化

1)扫描电镜。如图 3 所示,在冻藏第 1~7 天,鲮鱼肉的肌(原)纤维在肌内膜和肌束膜的紧密包裹下有序排列,肌纤维之间几乎没有明显空隙。从第 56 天开始,鲮鱼肉肌纤维有所变化,最明显的就是肌纤维之间出现了明显的分离和空隙,虽然排列仍旧整齐有序,但是不再紧密相连。推测这些空隙可能是在鱼肉冻结再解冻过程中随着鱼肉的汁液损失而出现的^[20],鱼肉肌束之间的水分结冰后体积膨

胀,会挤压内部肌纤维。解冻后,肌束之间的冰变成水分流出,但是挤压造成的空隙不可恢复。在冻藏第 112 天,与前面相比,鲮鱼肉肌纤维发生了巨大的变化。扫描电镜图上已经不能辨别出肌纤维的形状及界限,且肌纤维表面呈现颗粒状,这暗示着肌内膜及肌束膜已经破裂,并互相分离,不再包裹肌纤维,肌纤维也遭到了严重的破坏。Schaller 等^[21]报道,肌纤维表面的颗粒状物质有可能是鱼肉中的肌浆蛋白或结缔组织。推测可能是鱼肉中破裂的肌内膜肌束膜以及流出的肌浆液覆盖在肌纤维表面所形成的。这预示着冻藏再解冻过程中,肌原纤维蛋白和肌浆蛋白被组织蛋白酶水解,造成了鱼肉肌纤维结构的破坏。

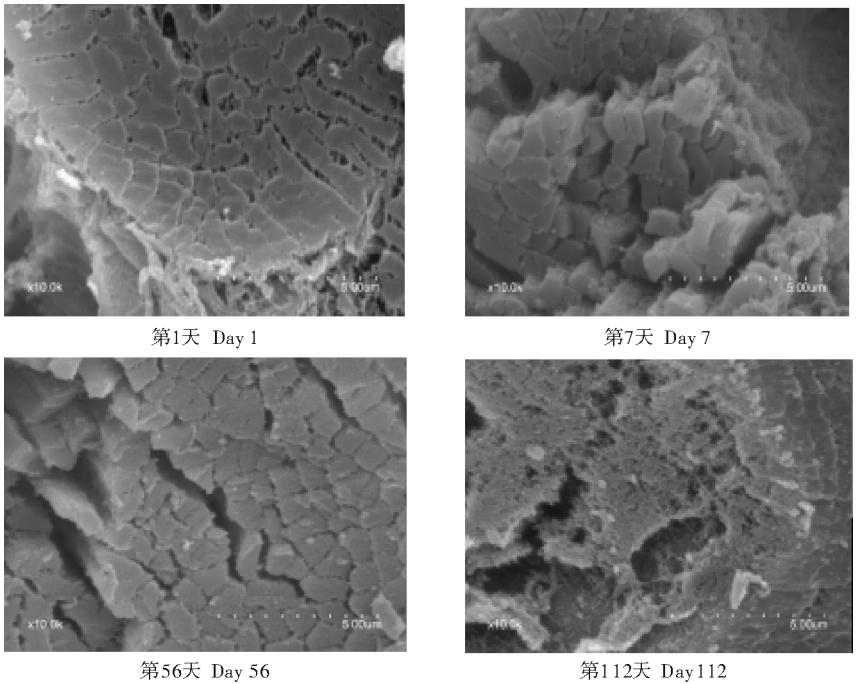
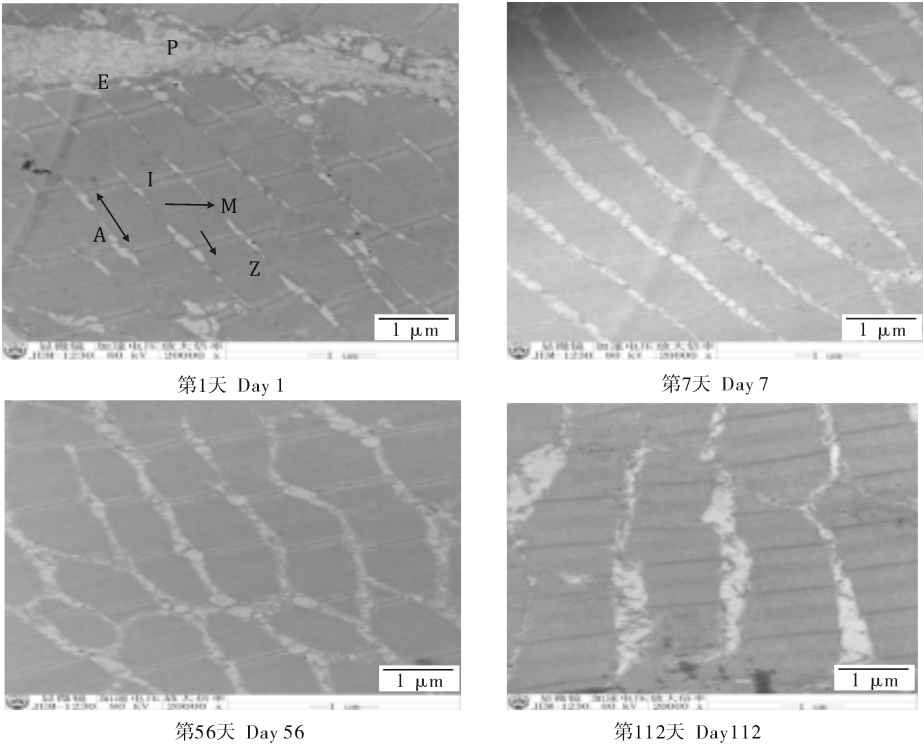


图 3 -20℃下鲮鱼肉的肌纤维横断面随冻藏时间的变化

Fig.3 Changes in cross fracture surface of bighead carp fillets stored at -20℃ (scanning electron microscope for observation,×10 000)

2)透射电镜。如图 4 所示,冻藏第 1 天时鱼肉的肌纤维结构完整清晰,肌纤维在肌内膜的包裹下和肌束膜紧密相连。肌节的基本结构清晰可见,有 A 带、M 线、I 带及 Z 线,且各肌节的 Z 线几乎排列在一条直线上。在冻藏第 7、56 天时,鱼肉肌纤维结构仍旧完整清晰,这与王鸿^[22]所研究的冻藏 1~5 周内的鲢鱼肉肌纤维的结构是相似的。在冻藏第 112 天,鱼肉肌纤维发生了巨大的变化,肌节中的 A

带及 I 带已经不能被清楚地辨别出来,M 线几乎消失,只能勉强看到 Z 线及肌纤维之间的界限。A 带由肌球蛋白和肌动蛋白组成,而 I 带主要是肌动蛋白^[23]。这说明在冻藏期间,肌球蛋白和肌动蛋白均发生了降解,从而破坏了肌纤维中的 A 带及 I 带,使肌纤维微结构不再完整。蛋白的降解有可能是组织蛋白酶的水解造成的,这与前文 SDS-PAGE 的结果也互相呼应。



P:肌束膜 Perimysium; E:肌内膜 Endomysium; I:I带 I band; A:A带 A band; M:M线 M line; Z:Z线 Z line.

图 4 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下鳙鱼肉的肌纤维纵切面随冻藏时间的变化

Fig.4 Changes in myofibrillar microstructure of bighead carp fillets stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
(transmission electron microscope for observation, $\times 20\ 000$)

2.4 鱼肉质构变化

如图 5 所示,鳙鱼肉的硬度随冻藏时间呈现直线下降的趋势,从冻藏第 1 天至第 112 天,从最初的 1 269 g 下降至 498 g,下降了 61% ($P<0.05$)。鳙鱼肉的弹性也随冻藏时间延长而降低,从最初的 3.61 mm 降至 3.06 mm ($P<0.05$)。Barraza 等^[24]研究表明, $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下冻藏的大西洋鲑的硬度随冻藏时间呈下降趋势。质构的劣化可能与肌肉组织的破坏及水分的损失有关^[25]。

2.5 鱼肉的持水力

本研究采用汁液损失以及 LF-NMR 数据(T_2 , P_2)表征了鳙鱼肉的持水力变化。汁液损失越大,表明鱼肉的持水力越差。默认冻藏第 1 天时鱼肉的汁液损失为 0,在冻藏第 7 天,鳙鱼肉的汁液损失急剧上升至 5%左右,这之后从冻藏第 7 天至第 112 天,鳙鱼肉的汁液损失继续显著上升 ($P<0.05$)。这一剧增的原因可能是由于鱼肉经过冷冻再解冻导致的^[26]。

从 LF-NMR 所得的数据来看,从冻藏第 1 天至第 112 天,鱼肉中水分的 T_{2b1} 及 T_{2b2} 呈现显著性上升趋势,这暗示着肉中的结合水变得活泼,这可能是

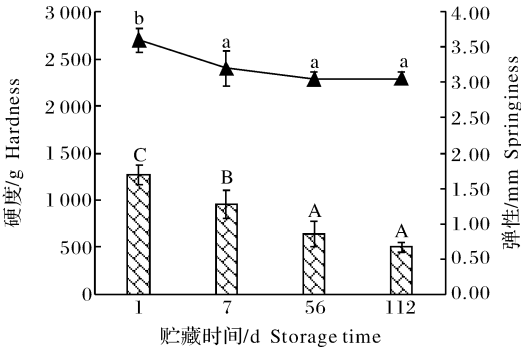


图 5 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下鳙鱼肉硬度(柱状)及弹性(折线)随冻藏时间的变化

Fig.5 The changes of hardness (bar) and springiness (line) of bighead carp fillets under $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ with storage time
由于能够与结合水相互作用的蛋白侧链随着冻藏时间的延长发生了某种变化^[27]。同样地,鱼肉水分的

T_{21} 及 T_{22} 也随着储藏时间延长而呈现上升趋势,这表示鱼肉中的水分流动性随着冻藏时间延长而增强^[27],不易流动水转化为自由水,而自由水逐渐向鱼肉表面迁移,形成可见的汁液损失。其原因可能是肌原纤维蛋白在冻藏过程中溶解性下降、疏水基

团暴露,造成蛋白与水分子之间的相互作用减弱。相对应地,我们发现鱼肉的 P_{21} 随冻藏时间的延长而显著下降,而鱼肉的 P_{22} 随冻藏时间延长而显著上升,这种变化趋势说明不易流动水所占比例有所下降,自由水所占比例不断增加。

表 1 -20 ℃ 下鲮鱼肉汁液损失、弛豫时间 T_2 及各弛豫峰面积比例 P_2 随冻藏时间的变化

Table 1 Changes of drip loss,relaxation time and fraction of each relaxation component of bighead carp fillets stored at -20 ℃				
项目 Item	第 1 天 Day 1	第 7 天 Day 7	第 56 天 Day 56	第 112 天 Day 112
汁液损失/% Drip loss	0.00±0.00a	4.96±0.09b	6.49±0.36c	7.34±0.76c
T_{2b1} /ms	0.5±0.1a	0.6±0.2ab	1.1±0.5bc	1.3±0.8c
T_{2b2} /ms	3.0±0.4a	3.3±0.4a	4.2±0.4b	7.2±1.4c
T_{21} /ms	49.8±0.0a	53.4±0.0b	52.5±1.8b	58.3±2.3c
T_{22} /ms	390.1±15.7a	509.7±20.8b	562.6±19.3c	534.3±31.3bc
P_{21} /%	91.8±0.6b	93.7±1.2c	88.7±1.2a	89.3±1.5a
P_{22} /%	4.5±0.6ab	3.1±0.8a	7.5±1.0b	5.0±1.2b

注:相同的小写字母表示在不同冻藏时间之间的样品值无显著性差异($P>0.05$)。Note:The same lowercase on the same row represented that there was no significant difference between the values under different storage time ($P>0.05$).

3 讨 论

本研究结果表明,冻藏再解冻过程中冰晶的机械损伤对组织蛋白酶活性的影响远远大于低温对组织蛋白酶活性的作用,表现为在冻藏第 56~112 天,肌原纤维及肌浆中的组织蛋白酶活性均呈现显著上升趋势。与之对应,图 2A 显示的鲮鱼肉的肌球蛋白重链及肌动蛋白随冻藏时间发生了降解,而作为肌节中 A 带和 I 带的主要成分,肌球蛋白和肌动蛋白的降解直接破坏了肌纤维微结构的完整性,正如图 4 所示。另外,冻藏第 112 天肌浆蛋白组织蛋白酶活性的上升与肌浆蛋白电泳中 20 ku 条带(图 2B)的出现相对应,肌浆蛋白的降解会导致肌纤维横断面上颗粒状物质的出现,正如图 3 所示。而这些肌纤维结构的破坏会造成鱼肉质构的劣化,如图 5 所示。余小颖^[28]采用扫描电镜观察了冻藏 7 个月后的猪肉肌纤维,结果与本研究相似。笔者发现一个有趣的现象,虽然扫描电镜及透射电镜所显示的冻藏第 56 天及第 112 天的鱼肉肌纤维结构差别十分显著,但是冻藏第 56 天及第 112 天下鱼肉的硬度及弹性并无显著性差异。这可能与鱼肉质构的影响因素有关。从内部影响因素,即肌肉的组织结构来看,影响鱼肉质构的因素有肌纤维直径、肌纤维结构、蛋白的结构、胶原交联、结缔组织及肌肉多孔性等^[29]。从电镜中主要观察到的是肌原纤维直径及结构的变化,未涉及到其他影响因素,所以这可能是冻藏第 56 天及第 112 天下鱼肉的硬度及弹性未发

生显著下降的原因。

低场核磁技术(LF-NMR)被广泛应用于研究肉类的持水力和肉中的水分分布。目前,LF-NMR 用于肉与肉制品水分研究主要采用横向弛豫时间(T_2)。LF-NMR 测得肉中水分的横向弛豫时间 T_2 值与传统方法测定的肉的持水力存在较强的相关性,因此,可通过测定肉中水分的 T_2 来预测肉的持水力。根据水分的不同活动状态,LF-NMR 所测得的肉中水分的 T_2 值范围是不同的,从小到大依次是 T_{2b} (1~10 ms)、 T_{21} (10~100 ms)、 T_{22} (100 ms 以上),其中, T_{2b} 对应结合水, T_{21} 对应不易流动水,而 T_{22} 对应自由水^[30-31]。本研究采用了汁液损失和 LF-NMR 数据(T_2 、 P_2)表征鱼肉的持水力。LF-NMR 数据显示鱼肉水分的 T_{21} 及 T_{22} 随着储藏时间延长而呈现上升趋势。栗俊广^[31]也发现鸡肉中 T_{21} 及 T_{22} 随着冻藏时间的延长而上升。同时本研究中鱼肉的 P_{21} 随冻藏时间的延长而显著下降,而鱼肉的 P_{22} 随冻藏时间延长而显著上升,这与 Sánchez-Alonso 等^[32]发现 -10 ℃ 下的鲑鱼肉的 P_{22} 随冻藏时间延长而上升是类似的。这一结果预示着随着冻藏时间的延长,鲮鱼肉的不易流动水向自由水转化,流出鱼肉外转变为汁液损失,这充分表明鱼肉的持水力随冻藏时间而下降。

研究表明,肌浆蛋白、肌原纤维蛋白及细胞骨架蛋白均与肌肉持水力密切相关^[30]。图 2 结果表明,鲮鱼肉的肌浆蛋白和肌原纤维蛋白均随冻藏时间的延长而发生降解。这可能是由于组织蛋白酶的作用

造成的。除了上述蛋白质降解这一影响因素,鱼肉持水力还与肌肉空间结构相关^[3]。肌肉中绝大部分自由水存在于肌纤维中,小部分存在于肌细胞间隙,一般认为主要是肌原纤维赋予了肉的持水性^[33]。本研究中电镜图显示冻藏第56天及第112天的鱼肉肌纤维结构差别十分显著,对应地,冻藏第56天及第112天鱼肉的 T_{2b2} 及 T_{21} 也显著升高,但是冻藏第56天及第112天的鱼肉汁液损失并无显著性差异。这是由于鱼肉中的汁液损失主要是自由水的损失,鱼肉肌纤维在严重破坏的条件下,自由水的损失已逐渐接近最大程度,不可能再明显增长,由冻藏第56天及第112天鱼肉 P_{22} 的下降也可验证这一点,因此,汁液损失的不显著增长也是正常的。

综上所述,鲮鱼肉在冻藏再解冻过程中,冰晶的机械损伤对组织蛋白酶活性的影响远远大于低温对组织蛋白酶活性的作用,它参与了鱼肉中肌原纤维蛋白及肌浆蛋白的降解,从而使鱼肉肌纤维微结构完整性遭到破坏,并导致鱼肉质构及持水力的劣化。

参 考 文 献

- [1] JIANG S T, BAO S H, TSAO C Y. Protein denaturation and changes in nucleotides of fish muscle during frozen storage[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 1987, 35(1): 22-27.
- [2] ZARITZKY N. Physical-chemical principles in freezing[M]// SUN D W. Handbook of frozen food processing and packaging. Boca Raton: CRC Press, 2012: 3-38.
- [3] HUFFLONERGAN E, LONERGAN S M. Mechanisms of water-holding capacity of meat; the role of postmortem biochemical and structural changes[J]. Meat science, 2005, 71(1): 194-204.
- [4] 陈琳, 徐幸莲, 周光宏. 应用于肉品嫩化的组织蛋白酶的研究进展[J]. 食品科学, 2009, 30(1): 273-276.
- [5] ERTBJERG P, LARSEN L M, MOØLLER A J. Effect of prerigor lactic acid treatment on lysosomal enzyme release in bovine muscle[J]. Journal of the science of food and agriculture, 1999, 79(1): 95-100.
- [6] 李树红, 张楠, 刘欢, 等. 鲢鱼背肌肌原纤维蛋白自溶与内源组织蛋白酶B、L、H的关系[J]. 中国农业大学学报, 2004(5): 71-75.
- [7] YIN X, LUO Y, FAN H, et al. Effect of previous frozen storage on quality changes of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) fillets during short-term chilled storage[J]. International journal of food science & technology, 2014, 49(6): 1449-1460.
- [8] WANG H, LUO Y, SHEN H. Effect of frozen storage on thermal stability of sarcoplasmic protein and myofibrillar protein from common carp (*Cyprinus carpio*) muscle[J]. International journal of food science & technology, 2013, 48(9): 1962-1969.
- [9] ZHU S, LUO Y, HONG H, et al. Correlation between electrical conductivity of the gutted fish body and the quality of bighead carp (*Aristichthys nobilis*) heads stored at 0 and 3 °C[J]. Food and bioprocess technology, 2013, 6(11): 3068-3075.
- [10] 田甲春. 牦牛肉宰后成熟过程中组织蛋白酶L、B、H对肉品质及微观结构的影响[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2013.
- [11] CASTEJÓN O J, CARABALLO A J. Application of cryofracture and SEM to the study of human cerebellar cortex[J]. Scanning electron microscopy, 1980(4): 197-207.
- [12] LU F, LIU D H, YE X Q, et al. Alginate-calcium coating incorporating nisin and EDTA maintains the quality of fresh northern snakehead (*Channa argus*) fillets stored at 4 °C[J]. Journal of the science of food and agriculture, 2009, 89(89): 848-854.
- [13] QIN N, ZHANG L, ZHANG J, et al. Influence of lightly salting and sugaring on the quality and water distribution of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) during super-chilled storage[J]. Journal of food engineering, 2017, 215: 104-112.
- [14] NAGARAJ N S, SANTHANAM K. Effect of frozen temperature and storage time on calpains, cathepsins (B, B+L, H and D) and their endogenous inhibitors in goat muscles[J]. Journal of food biochemistry, 2005, 30(2): 155-173.
- [15] DUUN A S, RUSTAD T. Quality of superchilled vacuum packed Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillets stored at -1.4 and -3.6 °C[J]. Food chemistry, 2008, 106(1): 122-131.
- [16] SAEED S, HOWELL N K. Effect of lipid oxidation and frozen storage on muscle proteins of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) [J]. Journal of the science of food and agriculture, 2002, 82(5): 579-586.
- [17] TOYOHARA M, MURATA M, ANDO M, et al. Texture changes associated with insolubilization of sarcoplasmic proteins during salt-vinegar curing of fish[J]. Journal of food science, 1999, 64(5): 804-807.
- [18] YONGSWAWATDIGUL J, PARK J W. Biochemical and conformation changes of actomyosin from threadfin bream stored in ice[J]. Journal of food science, 2002, 67(3): 985-990.
- [19] LADRAT C, VERREZBAGNIS V, NOËL J, et al. *In vitro* proteolysis of myofibrillar and sarcoplasmic proteins of white muscle of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): effects of cathepsins B, D and L[J]. Food chemistry, 2003, 81(4): 517-525.
- [20] JEREMIAH L E. Effect of frozen storage and protective wrap upon the cooking losses, palatability, and rancidity of fresh and cured pork cuts[J]. Journal of food science, 1980, 45(2): 187-192.
- [21] SCHALLER D E, POWRIE W D. Scanning electron microscopy of heated beef, chicken and rainbow trout muscles[J]. Canadian institute of food science & technology journal, 1972, 5(4): 184-190.
- [22] 王鸿. 冻藏、加工对鲢肌肉质特性影响的研究[D]. 上海: 上海水产大学, 2002.
- [23] HAMM R. Functional properties of the myofibrillar system and their measurements[M]// BECHTEL P J. Muscle as food. New

- York: Academic Press, 1986: 135-199.
- [24] AGUILERA B, FABIÁN A, LEÓN R A Q, et al. Kinetics of protein and textural changes in Atlantic salmon under frozen storage[J]. Food chemistry, 2015, 182: 120-127.
- [25] DELBARRE-LADRAT C, VERREZ-BAGNIS V, NOËL J, et al. Relative contribution of calpain and cathepsins to protein degradation in muscle of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) [J]. Food chemistry, 2004, 88(3): 389-395.
- [26] EINEN O, GUERIN T, FJAERA S O, et al. Freezing of pre-rigor fillets of Atlantic salmon[J]. Aquaculture, 2002, 212(1): 129-140.
- [27] MCDONNELL C K, ALLEN P, DUGGAN E, et al. The effect of salt and fibre direction on water dynamics, distribution and mobility in pork muscle: a low field NMR study[J]. Meat science, 2013, 95(1): 51-58.
- [28] 余小领. 冷冻和解冻工艺对猪肉保水性和组织结构的影响研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2007.
- [29] CHENG J H, SUN D W, HAN Z, et al. Texture and structure measurements and analyses for evaluation of fish and fillet freshness quality: a review[J]. Comprehensive reviews in food science & food safety, 2014, 13(1): 52-61.
- [30] BERTRAM H C, PURSLOW P P, ANDERSEN H J. Relationship between meat structure, water mobility, and distribution: a low-field nuclear magnetic resonance study[J]. Journal of agricultural & food chemistry, 2002, 50(4): 824-829.
- [31] 卢涵. 鲮鱼肉低温贮藏过程中蛋白氧化、组织蛋白酶活性与品质变化规律的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2017.
- [32] 栗俊广. 冰温 and 冷藏对鸡肉肌原纤维蛋白凝胶流变、保水性能和水分状态的影响[J]. 食品科学, 2017, 38(19): 236-240.
- [33] SÁNCHEZ-ALONSO I, HAJI-MALEKI R, BORDERÍAS A J. Effect of wheat fibre in frozen stored fish muscular gels[J]. European food research and technology, 2006, 223(4): 571-576.

Effects of cathepsin B and L on myofibrillar microstructure and water-holding capacity of bighead carp (*Aristichthys nobilis*) fillets stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

LU Han

College of Bioscience and Engineering, Hebei University of Economics and Business, Shijiazhuang 050061, China

Abstract The changes of cathepsin activity in myofibrils and sarcoplasm, degradation of myofibrillar and sarcoplasmic protein by SDS-PAGE, myofibrillar microstructure by scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM), instrumental texture, water-holding capacity (WHC) by drip loss and LF-NMR for bighead carp fillets were measured during $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ storage. The results showed that the cathepsins were still active for thawed fillets stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. The degradation of myosin, actin, troponin T and tropomyosin were observed. A 20 ku sarcoplasmic protein band which might be a proteolysis product of cathepsin L was found. The results of SEM and TEM showed that the muscle fibers were severely damaged at 112 d, which expressed by indistinguishable A band and I band in the sarcomere and almost disappeared M line. The hardness and elasticity of the fish were significantly decreased. The drip loss and T_{21} , T_{22} and P_{22} of fillets increased, but P_{21} decreased significantly with the extension of frozen storage time. Overall the proteolysis of cathepsins on myofibrillar and sarcoplasmic protein during frozen storage led to the great destruction of integrity of myofibrillar microstructure and weakness of fish texture and WHC.

Keywords bighead carp; frozen storage; cathepsins B; myofibrillar microstructure; fish texture; water-holding capacity of fish; LF-NMR; cryogenic storage; mechanical damage

(责任编辑: 陆文昌)