

DOI: 10.12161/j.issn.1005-6521.2025.06.008

羧基化纤维素纳米纤维对金线鱼鱼糜冻融稳定性的影响

米红波¹, 郑传海¹, 赵育茗¹, 陈敬鑫^{1*}, 李学鹏¹, 励建荣^{1,2}

(1. 渤海大学 食品科学与工程学院, 国家鱼糜及鱼糜制品加工技术研发分中心, 生鲜农产品贮藏加工及安全控制技术国家地方联合工程研究中心, 辽宁 锦州 121013; 2. 海洋食品精深加工关键技术省部共建协同创新中心, 大连工业大学, 辽宁 大连 116034)

摘要: 该文研究添加不同浓度的羧基化纤维素纳米纤维(0%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%)的金线鱼鱼糜在5次冻融循环过程中pH值、巯基含量、羰基含量、Ca²⁺-三磷酸腺苷酶活性、硫代巴比妥酸反应物(thiobarbituric acid reactive substances, TBARS)值、蛋白质二级结构和十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳的变化,以明确羧基化纤维素纳米纤维对金线鱼鱼糜冻融稳定性的影响。结果表明,羧基化纤维素纳米纤维可有效降低冻融过程中鱼糜蛋白的变性聚集程度,其中添加1.0%羧基化纤维素纳米纤维可抑制冻融期间总巯基、活性巯基含量和Ca²⁺-三磷酸腺苷酶活性的下降,且能有效减缓pH值、TBARS值及羰基含量的上升,最接近商业抗冻剂对鱼糜的保护作用。同时,羧基化纤维素纳米纤维可稳定冻融过程中鱼糜肌原纤维蛋白的二级结构并抑制肌球蛋白重链的交联。因此,羧基化纤维素纳米纤维可作为新型抗冻剂用于提高金线鱼鱼糜的冻融稳定性,且1.0%羧基化纤维素纳米纤维对鱼糜肌原纤维蛋白的冻融保护效果与商业抗冻剂最接近。

关键词: 羧基化纤维素纳米纤维; 鱼糜; 商业抗冻剂; 肌原纤维蛋白; 冻融循环

Effect of Carboxylated Cellulose Nanofibers on Freeze-Thaw Stability of *Nemipterus virgatus* Surimi

MI Hongbo¹, ZHENG Chuanhai¹, ZHAO Yuming¹, CHEN Jingxin^{1*}, LI Xuepeng¹, LI Jianrong^{1,2}

(1. College of Food Science and Engineering, Bohai University, National R&D Branch Center of Surimi and Surimi Products Processing, National & Local Joint Engineering Research Center of Storage, Processing and Safety Control Technology for Fresh Agricultural and Aquatic Products, Jinzhou 121013, Liaoning, China; 2. Collaborative Innovation Center of Seafood Deep Processing, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning, China)

Abstract: In order to clarify the effect of carboxylated cellulose nanofibers on the freeze-thaw stability of *Nemipterus virgatus* surimi, the changes in pH value, sulfhydryl content, carbonyl content, Ca²⁺-adenosine triphosphate ase activity, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), secondary structure of the protein, and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of *Nemipterus virgatus* surimi with different concentrations of carboxylated cellulose nanofibers (0%, 0.5%, 1.0%, 1.5%, and 2.0%) during five freeze-thaw cycles were investigated. The results showed that carboxylated cellulose nanofibers could effectively reduce the degree of denaturation and aggregation of protein in surimi during freeze-thaw cycles. The addition of 1.0% carboxylated cellulose nanofibers could significantly inhibit the decrease in total sulfhydryl content, active sulfhydryl content, and Ca²⁺-adenosine triphosphate ase activity during freeze-thaw cycles and effectively slow down the increase in pH value, TBARS value, and carbonyl content, which showed the closest preservation effect of commercial antifreeze on surimi. At the same time, carboxylated cellulose nanofibers could stabilize the secondary structure of the myofibrillar protein of surimi and inhibit the crosslinking of heavy myosin chains during freeze-thaw cycles. Therefore, carboxylated cellulose nanofibers could be used as new antifreeze to improve the freeze-thaw stability of *Nemipterus virgatus* surimi, and the protection effect of 1.0% car-

基金项目: 辽宁省教育厅 2021 年度科学研究经费面上项目(LJKZ1018)

作者简介: 米红波(1986—), 女(汉), 副教授, 博士, 研究方向: 水产品加工及贮藏。

*通信作者: 陈敬鑫(1985—), 男, 副教授, 博士, 研究方向: 农产品贮藏与加工。

boxylated cellulose nanofibers during freeze-thaw cycles on the myofibrillar protein of surimi was the closest to that of commercial antifreeze.

Key words: carboxylated cellulose nanofibers; surimi; commercial antifreeze; myofibrillar protein; freeze-thaw cycle

引文格式:

米红波,郑传海,赵育茗,等.羧基化纤维素纳米纤维对金线鱼鱼糜冻融稳定性的影响[J].食品研究与开发,2025,46(6):57-64.

MI Hongbo, ZHENG Chuanhai, ZHAO Yuming, et al. Effect of Carboxylated Cellulose Nanofibers on Freeze-Thaw Stability of *Nemipterus virgatus* Surimi[J]. Food Research and Development, 2025, 46(6): 57-64.

金线鱼是我国重要的鱼类资源之一,常用来加工鱼糜及鱼糜制品^[1]。然而,鱼糜在冻藏与销售过程中温度波动是难以避免的,温度的波动将会导致鱼糜中冰晶的结构与大小发生变化,破坏组织结构,加速蛋白质变性与脂质氧化,对鱼糜品质产生负面影响,缩短产品的货架期^[2],而添加抗冻剂可有效减缓鱼糜在冻藏过程中品质的降低。目前常用的商业抗冻剂是由蔗糖与山梨糖醇复配而成,但会给鱼糜制品带来一定的甜度和热量,不适合糖尿病患者食用^[3]。近年来出现的一些新型抗冻剂,在保证鱼糜冻藏品质的前提下,还具有更低的甜味和热量,例如大豆多糖^[4]、菊粉^[5]、蛋白水解物^[6]等。

纤维素是由葡萄糖组成的大分子多糖,是自然界中分布最广、含量最多的一种天然多糖,主要来源于棉花、甘蔗等植物^[7]。纳米纤维素是通过物理、化学或生物等手段处理纤维得到的直径小于100 nm、长度为几百纳米的纤维聚集体,含有羟基和C—H键,具有很好的两亲性^[8]。Li等^[9]研究表明,纳米纤维素在蔗糖溶液中具有很好的冰重结晶抑制活性。从竹笋中提取的纳米晶纤维素可有效保护金线鱼鱼糜冻藏期间的稳定性^[10]。张燕洁等^[11]通过对纤维素纳米晶表面进行羧基化改性,提高了其在蒸馏水以及磷酸盐溶液中的分散性。同时,羧基能通过氢键与水分子结合,从而保持冰晶形态的稳定性^[12]。因此认为羧基化纤维素纳米纤维(carboxylated cellulose nanofibers, CNF)具有作为鱼糜抗冻剂的潜力。

本文比较不同浓度的羧基化纤维素纳米纤维与商业抗冻剂对不同冻融循环次数下金线鱼鱼糜的pH值、脂质氧化、蛋白氧化、蛋白二级结构和分子量分布等的影响,以期开发安全、高效的新型抗冻剂提供依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料和试剂

金线鱼:市售,平均质量约1.5 kg;羧基化纤维素纳米纤维(直径:4~10 nm,长度:200 nm):上海麦克林生化科技股份有限公司;山梨糖醇、蔗糖:河南万邦化

工科技有限公司;乙二胺四乙酸(ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA)、三氯乙酸(trichloroacetic acid, TCA)、2-硝基苯甲酸(2-nitrobenzoic acid, DTNB)、盐酸胍、2,4-二硝基苯肼(2,4-dinitrophenylhydrazine, DNPH)(均为分析纯):上海阿拉丁试剂有限公司;酒石酸钾钠、硫酸铜、无水乙醇、尿素(均为分析纯):天津市风船化学试剂有限公司;盐酸、氯化钠、氢氧化钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、乙酸乙酯(均为分析纯):国药集团化学试剂有限公司;考马斯亮蓝:上海碧云天生物技术有限公司;超微量Ca²⁺-三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)酶试剂盒(A070-4-2):南京建成生物工程研究所;三羟甲基氨基甲烷(Tris)碱(分析纯)、甘氨酸(分析纯)、电泳试剂盒:北京索莱宝科技有限公司。

1.2 仪器与amp;设备

采肉机(YC200型)、精滤机(XJT-JL200型):诸城市凯成良才食品机械精滤机厂;脱水机(T100-100型):慈溪樱花家电制造有限公司;高速冷冻离心机(5804R型):德国艾本德公司;高速台式冷冻离心机(HT1909型):湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;紫外可见光分光光度计(UV-2550型):岛津仪器(苏州)有限公司;傅里叶变换红外光谱仪(Varian 640-IR型):德国瓦瑞安公司。

1.3 方法

1.3.1 鱼糜的制备

将金线鱼去头、去鳍、去内脏后劈成两半,清洗干净后投入采肉机中采肉,加入4倍体积的去离子水漂洗1次,再用含0.15% NaCl的盐水漂洗2次,脱水至水分含量78%,制得的鱼糜分成6组,分别添加0%(CK组)、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%的CNF组、商业抗冻剂(4%蔗糖+4%山梨糖醇,S组)。每组再分为6份填充到密封袋中,每份30 g,密封。将样品置于-18℃冻藏3 d后再转入4℃冰箱冷藏1 d为一个冻融循环。本试验共设置了5次冻融循环。

1.3.2 pH值的测定

取5 g鱼糜加入45 mL蒸馏水,3 000 r/min均质30 s,然后放在4℃下静置30 min,再用pH计测量鱼

糜的 pH 值。

1.3.3 硫代巴比妥酸反应物(thiobarbituric acid reactive substances, TBARS)值的测定

参考 Liu 等^[3]的方法并稍作修改,将 10 g 鱼糜切碎,与 25 mL 三氯乙酸(5%)和 25 mL 蒸馏水混合、均质,8 000 r/min 下离心 50 min。取上清液 10 mL,加入 10 mL 的三氯乙酸溶液(5%),80 °C 下水浴 40 min,冷却后在 532 nm 下测量吸光度。使用 0~10 mg/L 的 1,1,3,3-四甲氧丙烷制备标准曲线。

1.3.4 肌原纤维蛋白的提取

取 5 g 鱼糜加入 4 倍体积的 Tris-HCl 缓冲液(20 mmol/L, pH7.2),6 000 r/min 均质 30 s,4 °C 下 5 000 r/min 离心 15 min。取沉淀重复 3 次,加入 4 倍体积的 Tris-HCl-NaCl 缓冲液(20 mmol/L, pH7.2; NaCl 0.6 mol/L),6 000 r/min 均质 30 s,4 °C 下 5 000 r/min 离心 15 min。上清液即为肌原纤维蛋白溶液,用双缩脲法测定蛋白浓度^[13]。

1.3.5 总巯基与活性巯基含量的测定

总巯基:将蛋白浓度调至 5 mg/mL,取 0.5 mL 蛋白稀释液溶解于 4.5 mL Tris-甘氨酸缓冲液中,振荡后加入 0.5 mL 10 mmol/L 的 DTNB(以 50 mmol/L 的磷酸盐缓冲液 pH7 配制),25 °C 下保温 30 min,以 0.5 mL Tris-HCl-NaCl 缓冲液+4.5 mL Tris-甘氨酸缓冲液+0.5 mL 10 mmol/L 的 DTNB 为空白。用紫外可见分光光度计测定 412 nm 波长处的吸光度^[14]。

活性巯基:取 1 mL 蛋白稀释液溶解于 9 mL Tris-甘氨酸缓冲液中,振荡后加入 1 mL 10 mmol/L 的 DTNB(以 50 mmol/L 的磷酸盐缓冲液 pH7 配制),在 4 °C 保存 1 h 后,10 000 r/min、4 °C 离心 10 min,以 0.5 mL Tris-HCl-NaCl 缓冲液+4.5 mL Tris-甘氨酸缓冲液+0.5 mL 10 mmol/L 的 DTNB 为空白,用紫外可见分光光度计测定 412 nm 波长处的吸光度^[14]。巯基含量按下式计算,以 10⁻⁵ mol/g 蛋白质计。

$$X = \frac{A \times D}{\varepsilon \times C}$$

式中: X 为巯基含量,10⁻⁵ mol/g; A 为样品在 412 nm 处的吸光度; D 为蛋白稀释倍数; ε 为摩尔吸光系数,13 600 L/(mol·cm); C 为蛋白质浓度,mg/mL。

1.3.6 羰基含量的测定

用 DNPH 衍生法测定蛋白质羰基含量^[15]。取 3 mL 浓度为 5 mg/mL 的蛋白液于离心管中,加入 3 mL DNPH(10 mmol/L),室温避光反应 1 h。反应结束后,加入 9 mL 20% 三氯乙酸溶液,4 °C、10 000 r/min 离心 15 min,弃去上清液,将得到的沉淀用乙酸乙酯-乙醇(体积比为 1:1)混合液进行洗涤(顺着壁洗去黄色,不要冲散沉淀)。洗涤完成后,将沉淀溶解于 9 mL 6 mol/L 的盐酸胍(溶于 20 mmol/L 的磷酸盐缓冲液中,

pH7.0)中,并于 37 °C 下水浴加热 30 min,使沉淀溶解。4 °C、10 000 r/min 离心 10 min,将得到的上清液转移至干净离心管中,在 370 nm 波长下测定吸光度,空白为盐酸胍溶液,羰基含量的计算公式如下。

$$X = A/(\varepsilon \times C \times L) \times 10^6$$

式中: X 为羰基含量,nmol/mg; A 为样品在 370 nm 波长处的吸光度; ε 为摩尔吸光系数,22 000 L/(mol·cm); C 为蛋白质浓度,mg/mL; L 为比色皿厚度,cm。

1.3.7 Ca²⁺-ATP 酶活性的测定

按照 Ca²⁺-ATP 酶试剂盒说明书进行操作,通过测定鱼糜规定时间内无机磷的生成量来计算 Ca²⁺-ATP 酶活性。

1.3.8 傅里叶变换红外光谱

将肌原纤维蛋白与溴化钾以 1:100 的质量比混合并研磨均匀。测量范围为 4 000~400 cm⁻¹,以 4 cm⁻¹ 的分辨率进行 4 次扫描。使用 Peak Fit v 4.12 软件对肌原纤维蛋白的二级结构进行定量分析。酰胺 I 区中单个指定条带的相对面积(1 600~1 700 cm⁻¹)用于计算蛋白质二级结构(α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规则卷曲)的相对含量。

1.3.9 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)

在 12% 分离胶和 4% 浓缩胶上进行 SDS-PAGE 分析。将鱼糜肌原纤维蛋白(3 mg/mL)与上样缓冲液以 1:1 的体积比混合,100 °C 下加热 5 min。每条条带加入 20 μ L 的混合样品。电泳结束后,用考马斯亮蓝染液对凝胶染色 30 min,用 50% 甲醇和 10% 乙酸的混合液进行脱色^[16]。

1.4 数据处理

每组数据至少平行测定 3 次,结果以平均值 \pm 标准差的形式表示。用 SPSS 17.0 软件对数据进行分析,所有图形均使用 Origin 9.0 软件绘制。

2 结果与分析

2.1 鱼糜 pH 值的变化

羧基化纤维素纳米纤维对不同冻融循环次数下的鱼糜 pH 值的影响见图 1。

由图 1 可知,CNF 的添加使鱼糜 pH 值的上升趋势减缓,且添加量越大,鱼糜的初始 pH 值越低,可能是因为 CNF 本身的 pH 值(6.8)较低。第 1 次冻融循环后,所有处理组鱼糜的 pH 值均明显升高。随着冻融循环次数的增加,鱼糜的 pH 值均呈上升趋势,这与 Walayat 等^[16]的研究结果一致。鱼糜 pH 值的上升可能是鱼糜中的微生物和鱼糜本身自溶反应使蛋白质降解产生挥发性化合物和氨类化合物所导致的^[13]。在第 4 次冻融循环后各组的 pH 值均发生了轻微下降,可能

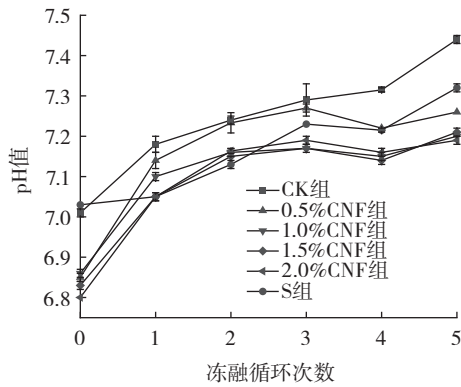


图1 羧基化纤维素纳米纤维对不同冻融循环次数下的鱼糜 pH 值的影响

Fig.1 Effect of carboxylated cellulose nanofibers on pH value of surimi during different freeze-thaw cycles

与鱼糜中糖原厌氧型发酵产生乳酸和三磷酸腺苷降解释放无机磷酸盐有关^[17]。商业抗冻剂与羧基化纤维素纳米纤维都可以抑制冻融时期大冰晶的形成,抑制肌原纤维蛋白变性,减缓 pH 值的上升。经过 5 次冻融循环后,S 组的鱼糜 pH 值上升最少,其次是添加 1.0% 的 CNF 组,CK 组 pH 值上升幅度最大,且明显高于其它组。表明添加 CNF 可有效抑制金线鱼鱼糜冻融期间 pH 值的上升。

2.2 鱼糜硫代巴比妥酸反应物(TBARS)值的变化

鱼糜冻藏过程中脂肪氧化生成丙二醛,可与硫代巴比妥酸发生反应导致颜色变化,因此,可用 TBARS 值来反映鱼糜脂肪氧化的程度^[3]。羧基化纤维素纳米纤维对不同冻融循环次数下的鱼糜 TBARS 值的影响见图 2。

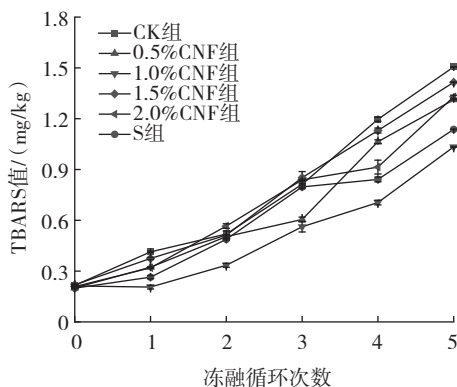


图2 羧基化纤维素纳米纤维对不同冻融循环次数下的鱼糜 TBARS 值的影响

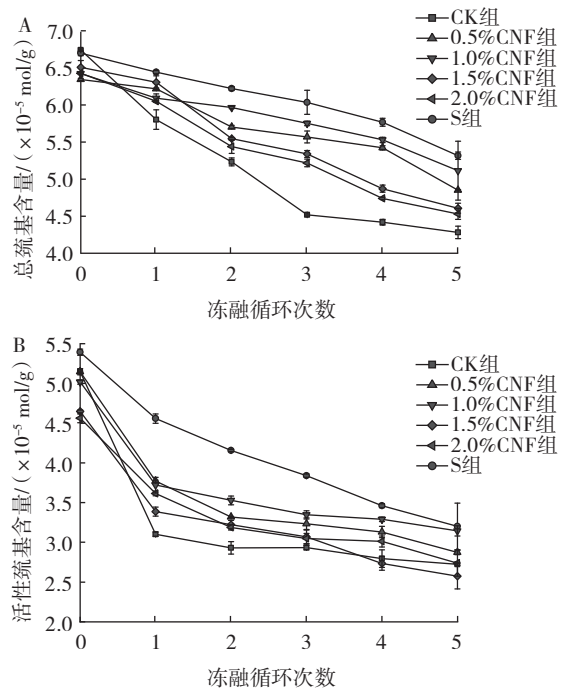
Fig.2 Effect of carboxylated cellulose nanofibers on TBARS value of surimi during different freeze-thaw cycles

由图 2 可知,各组鱼糜的 TBARS 值均随着冻融循环次数的增加而升高,说明鱼糜中的脂肪发生了氧化。在反复的冻融循环中,大冰晶不断地形成、消失和重组,对肌肉细胞造成损伤,释放脂氧化物酶和血红素铁等催化剂以促进脂质氧化^[18]。在前 3 次冻融循环中,1.0% CNF 表现出很好的抑制脂肪氧化的特性。和新

鲜的鱼糜相比,添加 0%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0% CNF 和商业抗冻剂的鱼糜在第 5 次冻融循环结束后 TBARS 值分别上升了 596.51%、554.16%、386.69%、546.69%、537.97% 和 470.31%,且添加 CNF 的鱼糜 TBARS 值均明显低于 CK 组,说明 CNF 可有效延缓鱼糜脂质的氧化。这可能是因为 CNF 具有冰重结晶抑制活性,通过减少冻融期间大冰晶的生成来降低肌肉细胞受到的机械损伤,从而降低鱼糜脂肪的氧化程度。此外,CNF 拥有丰富的羟基与羧基,可以与水分子形成强氢键来降低鱼糜体系的水分活度,减少脂质氧化的发生。而过多的 CNF (添加量>1.0% 时)会在鱼糜体系中聚集,不能很好地分散,导致其抗冻作用下降,且会吸收过多水分导致鱼糜体系内孔洞的形成加速脂质氧化。脂质的氧化不是单独进行的,它是与蛋白的氧化相互影响的^[19],主要有两个方面,氨基酸与丙二醛的相互作用以及氧化亚油酸与鱼糜蛋白的交联导致脂蛋白聚集^[20]。

2.3 鱼糜肌原纤维蛋白总巯基与活性巯基的变化

巯基基团是蛋白质中反应性最强的官能团之一,可通过自由基攻击转变为分子间和分子内二硫键,促进蛋白质交联和聚集^[21]。在鱼糜冻藏过程中巯基会被氧化为二硫键,导致巯基的含量降低,因此,巯基的下降程度可表现出蛋白质的变性程度^[22]。羧基化纤维素纳米纤维对不同冻融循环次数下的鱼糜总巯基与活性巯基含量的影响见图 3。



A. 鱼糜总巯基含量; B. 鱼糜活性巯基含量。

图3 羧基化纤维素纳米纤维对不同冻融循环次数下的鱼糜巯基含量的影响

Fig.3 Effect of carboxylated cellulose nanofibers on sulfhydryl content of surimi during different freeze-thaw cycles

由图3可知,随着冻融循环次数的增加,所有处理组鱼糜的总巯基和活性巯基含量均呈下降趋势,可能是冻融导致蛋白中的巯基不断暴露,随后被氧化导致的。未经冻藏时由于蔗糖与山梨糖醇能提高蛋白溶出率,所以会导致初始巯基含量增加,而CNF会吸附蛋白质所以会使初始巯基含量降低。5次冻融结束后,添加0%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0% CNF和商业抗冻剂的鱼糜总巯基含量分别下降了33.51%、23.56%、20.67%、30.62%、25.53%和20.65%,活性巯基含量分别下降了47.08%、44.21%、37.32%、44.60%、39.97%和40.66%,表明CNF可在一定程度上抑制金线鱼鱼糜肌原纤维蛋白的氧化。朱士臣等^[23]研究结果表明,鱼鳞明胶通过对水的约束效应在一定程度上抑制冰晶的破坏作用,来稳定蛋白质结构从而抑制巯基的降低。而CNF中含有大量的羧基,通过氢键与水分子结合,从而保持冰晶形态的稳定性,减少了因温度波动导致冰晶对蛋白质结构的损伤^[12]。当CNF添加量为1.0%或1.5%时,CNF可最大程度地结合鱼糜中的水分,保证鱼糜蛋白结构的稳定。而CNF添加量为2.0%时,CNF之间会发生聚集,不能很好地分散到鱼糜体系中,从而降低了其对水分的结合能力,冰晶生成量的增加破坏了鱼糜的组织结构。商业抗冻剂对比CNF拥有更高的添加量和更多的羟基,羟基含量的增加可以使肌原纤维蛋白结合得更加紧密,减少蛋白质之间发生聚集,这就是对比添加CNF来说商业抗冻剂的活性巯基下降缓慢的原因。

2.4 鱼糜肌原纤维蛋白羰基含量的变化

羰基化是蛋白质氧化过程中最显著的变化之一,羰基含量越高说明蛋白质被氧化程度越高^[24]。冻融循环会加速蛋白质的破碎、聚集以及溶解性和功能特性的丧失^[25]。羧基化纤维素纳米纤维对不同冻融循环次数下的鱼糜羰基含量的影响见图4。

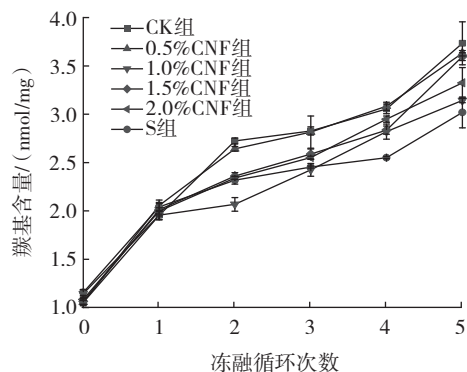


图4 羧基化纤维素纳米纤维对不同冻融循环次数下的鱼糜羰基含量的影响

Fig.4 Effect of carboxylated cellulose nanofibers on carbonyl content of surimi during different freeze-thaw cycles

由图4可知,在经过第1次冻融循环后所有处理

组的羰基含量均明显升高,所有组均上升80%左右,第2次冻融结束后所有组羰基生成速率开始下降。5次冻融循环结束后,添加0%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0% CNF和商业抗冻剂的鱼糜羰基含量分别上升了254.60%、245.10%、181.05%、238.67%、205.12%和161.19%。在冻融过程中,CK组的鱼糜蛋白质被氧化的程度最大,添加抗冻剂组的羰基含量上升幅度均明显低于CK组。鱼糜副产物水解物可以抑制鱼糜细胞内形成较大的冰晶,减少对细胞的破坏,抑制鱼糜羰基的形成^[26]。而CNF具有很好的冰重结晶抑制活性,同样可以抑制鱼糜冻融期间细胞内大冰晶的生成。同时,CNF之间具有强烈的静电排斥力,有助于稳定蛋白质构象^[12],可有效地减少羰基的形成,抑制肌原纤维蛋白的变性,这与总巯基与活性巯基含量的变化相一致。

2.5 鱼糜肌原纤维蛋白Ca²⁺-ATP酶活性的变化

在鱼糜冷冻贮藏过程中,由于冰晶的形成和反复冻融对蛋白质的损伤,肌原纤维蛋白中的球状肌球蛋白头部发生构象的变化和聚集,导致Ca²⁺-ATP酶活性降低^[27]。另外,在冻融过程中巯基基团暴露发生氧化也会导致Ca²⁺-ATP酶活性的降低^[28]。羧基化纤维素纳米纤维对不同冻融循环次数下的鱼糜Ca²⁺-ATP酶活性的影响如图5所示。

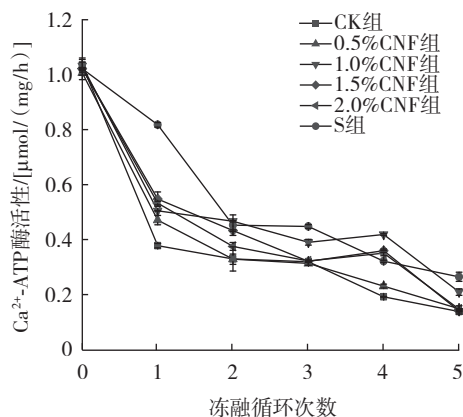


图5 羧基化纤维素纳米纤维对不同冻融循环次数下的鱼糜Ca²⁺-ATP酶活性影响

Fig.5 Effect of carboxylated cellulose nanofibers on Ca²⁺-ATPase activity of surimi during different freeze-thaw cycles

由图5可知,随着冻融循环次数的增加,Ca²⁺-ATP酶活性整体呈下降趋势。第1次冻融循环结束后,除S组外其余组的Ca²⁺-ATP酶活性下降剧烈,第2次冻融结束后,Ca²⁺-ATP酶活性下降速率降低,从前3次冻融循环结果来看,商业抗冻剂可以有效地减缓金线鱼鱼糜Ca²⁺-ATP酶活性的下降,这是由于蔗糖与山梨糖醇上丰富的羟基结合氨基酸残基从而稳定了蛋白质的构象。5次冻融循环结束后,添加0%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0% CNF和商业抗冻剂的鱼糜Ca²⁺-ATP酶活性分别下降了86.67%、85.31%、79.76%、86.31%、

85.65% 和 74.09%。对比商业抗冻剂来看, CNF 主要通过与水分子相互作用来减弱冻融循环过程中冰重结晶作用^[9,12],从而减少冰晶对蛋白质的进一步损伤,抑制了 Ca^{2+} -ATP 酶活性的降低。Li 等^[10]研究也表明竹笋纳米晶纤维素表面的羟基与鱼糜中的水分子相互作用,可有效抑制金线鱼鱼糜在冻藏时期 Ca^{2+} -ATP 酶活性的降低。

2.6 鱼糜肌原纤维蛋白二级结构的变化

羧基化纤维素纳米纤维对不同冻融循环次数下的鱼糜蛋白质二级结构的影响见图 6。

由图 6 可知,蛋白质二级结构主要由 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规则卷曲组成,所有处理组鱼糜在 5 次冻融循环结束后 α -螺旋结构的相对含量均显著下降,其它 3 种二级结构的相对含量上升。经过 5 次冻融循环后,添加 CNF 组的鱼糜蛋白 α -螺旋含量均明显高于 CK 组。Tan 等^[12]发现 CNF 可有效抑制冻融循环期间大黄鱼鱼片蛋白中 α -螺旋结构的降低。由于温度波动导致冰晶发生重结晶,破坏了稳定的蛋白质结构,蛋白质内部的疏水性残基暴露会导致 α -螺旋含量的下降。此外,二硫键的形成也可能是肌球蛋白氧化的关键原因,从而导致蛋白质二级结构发生变化^[29]。而 CNF 可通过氢键与水分子水合,增加冰晶的数量和

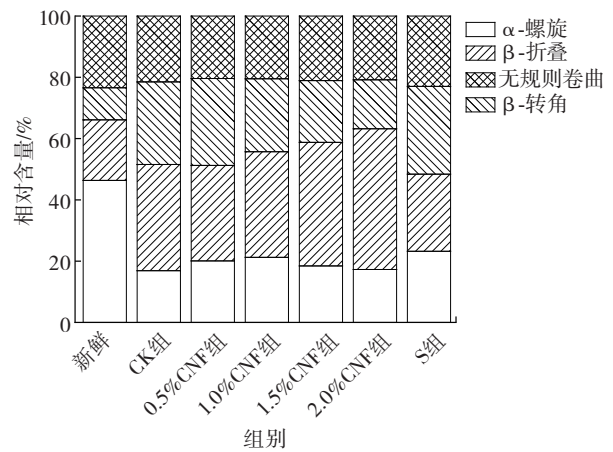


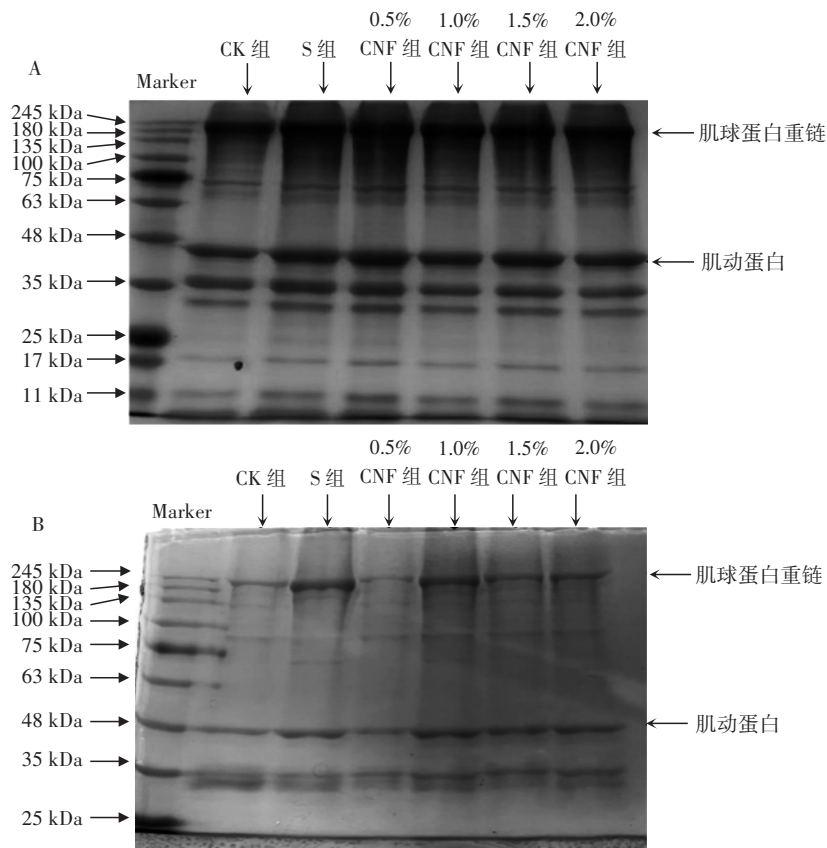
图 6 羧基化纤维素纳米纤维对不同冻融循环次数下的鱼糜蛋白质二级结构的影响

Fig.6 Effect of carboxylated cellulose nanofibers on secondary structure of surimi protein during different freeze-thaw cycles

选择性地限制了冰晶生长来减少对蛋白质结构的破坏。从总巯基与活性巯基结果来看,添加 CNF 可以通过抑制总巯基与活性巯基氧化,抑制二硫键的生成。

2.7 鱼糜肌原纤维蛋白 SDS-PAGE 电泳

未冻融前与 5 次冻融循环后鱼糜肌原纤维蛋白 SDS-PAGE 电泳见图 7。



Marker. 蛋白分子量标准;A. 未冻融时鱼糜肌原纤维蛋白;B. 冻融循环 5 次后鱼糜肌原纤维蛋白。

图 7 鱼糜肌原纤维蛋白 SDS-PAGE 电泳图

Fig.7 SDS-PAGE electrophoresis of myofibrillar protein of surimi

由图7可知,添加不同浓度CNF(0.5%~2.0%)和商业抗冻剂的鱼糜肌原纤维蛋白电泳条带与CK组基本一致,主要包含肌球蛋白重链(myosin heavy chain, MHC, 205 kDa)和肌动蛋白(actin, 42 kDa),表明抗冻剂的添加不会对鱼糜肌原纤维蛋白产生影响。5次冻融循环结束后,所有组鱼糜的MHC和肌动蛋白条带均发生不同程度的降解(图7B),主要是鱼糜在冻融过程中肌原纤维蛋白发生氧化、降解导致的^[30]。5次冻融循环后,添加1.0% CNF和S组的鱼糜肌球蛋白重链与肌动蛋白条带颜色较深,说明商业抗冻剂和1.0% CNF可较好地维持鱼糜蛋白在冻融阶段的稳定性。Tan等^[12]的研究结果也表明CNF可有效地抑制经多次冻融循环后大黄鱼鱼片蛋白质的降解。竹笋纳米晶纤维素可有效防止金线鱼鱼糜肌球蛋白和肌动蛋白在冷冻储存过程中的降解,从而保护肌原纤维蛋白的结构完整性和功能^[10]。CNF对冻融循环过程中鱼糜蛋白的稳定性表现出明显的保护作用,这也与蛋白质总巯基、活性巯基和羰基含量、Ca²⁺-ATP酶活性变化相一致。

3 结论

金线鱼鱼糜在冻融循环过程中肌原纤维蛋白会发生变性、聚集,导致鱼糜品质下降。添加CNF可有效地减缓鱼糜在冻融循环过程中pH值的上升和蛋白总巯基、活性巯基含量与Ca²⁺-ATP酶活性的下降,抑制羰基与丙二醛的生成。通过SDS-PAGE和蛋白质二级结构分析表明CNF的添加可有效地保护鱼糜肌原纤维蛋白在冻融过程中的完整性。CNF主要是通过鱼糜中的水分子结合,抑制冰的重结晶作用来提高鱼糜的冻融稳定性。在相同冻融循环下,随着CNF添加量的增加,鱼糜中TBARS值、羰基含量和Ca²⁺-ATP酶活性先升高后降低,表明CNF对鱼糜的冻融保护作用呈先上升后下降的趋势,其中添加量为1.0%时效果最好,但不如商业抗冻剂抗冻效果,这为后续研究提供了新的目标。

参考文献:

- [1] ZHANG C, LU M X, AI C, et al. Ultrasonic treatment combined with curdlan improves the gelation properties of low-salt *Nemipterus virgatus* surimi[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 248: 125899.
- [2] YU Y J, YANG S P, LIN T, et al. Effect of cold chain logistic interruptions on lipid oxidation and volatile organic compounds of salmon (*Salmo salar*) and their correlations with water dynamics[J]. Frontiers in Nutrition, 2020, 7: 155.
- [3] LIU J H, FANG C, LUO 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.
- [4] 张霞. 大豆低聚糖对淡水鱼糜的冷冻保护作用及其机制[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2022: 19-32.
- [5] ZHANG Xia. Cryo-protective effect of soybean oligosaccharide on freshwater surimi and its mechanism[D]. Changsha: Central South University of Forestry & Technology, 2022: 19-32.
- [6] CAO Y, ZHAO L Y, HUANG Q L, 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.
- [7] ZHANG X D, ZHANG Y Q, DONG Y, et al. Study on the mechanism of protein hydrolysate delaying quality deterioration of frozen surimi[J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 167: 113767.
- [8] 胡建雪. 纳米纤维素纤维的制备及其在食品中的应用[D]. 无锡: 江南大学, 2015.
- [9] HU Jianxue. Preparation and application of nanofibrillated cellulose in food[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2015.
- [10] 霍倩, 刘姝瑞, 谭艳君, 等. 纳米纤维素的制备及应用研究进展[J]. 纺织科学与工程学报, 2020, 37(3): 94-101.
- [11] HUO Qian, LIU Shurui, TAN Yanjun, et al. Preparation and application research progress of nano-cellulose[J]. Journal of Textile Science and Engineering, 2020, 37(3): 94-101.
- [12] LI M, DIA V P, WU T. Ice recrystallization inhibition effect of cellulose nanocrystals: Influence of sucrose concentration[J]. Food Hydrocolloids, 2021, 121: 107011.
- [13] LI Z Y, WANG Q, LI S T, et al. Usage of nanocrystalline cellulose as a novel cryoprotective substance for the *Nemipterus virgatus* surimi during frozen storage[J]. Food Chemistry: X, 2022, 16: 100506.
- [14] 张燕洁, 黄进, 马小舟. 多羧基纤维素纳米晶的制备与性能研究[J]. 中国造纸学报, 2019, 34(3): 6-12.
- [15] ZHANG Yanjie, HUANG Jin, MA Xiaozhou. Preparation and properties of multi-carboxyl cellulose nanocrystal[J]. Transactions of China Pulp and Paper, 2019, 34(3): 6-12.
- [16] TAN M T, DING Z Y, YANG D Z, et al. The quality properties of frozen large yellow croaker fillets during temperature fluctuation cycles: Improvement by cellobiose and carboxylated cellulose nanofibers[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 194: 499-509.
- [17] 高文宏, 侯睿, 曾新安. 水溶性大豆多糖改善浸渍冷冻鱼糜蛋白的变性[J]. 现代食品科技, 2019, 35(2): 134-140.
- [18] GAO Wenhong, HOU Rui, ZENG Xin'an. Mitigating protein denaturation of surimi via immersion-freezing using water-soluble soybean polysaccharide(s)[J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 35(2): 134-140.
- [19] ZHANG T, WANG J, FENG J Q, et al. Effects of ultrasonic-micro-wave combination treatment on the physicochemical, structure and gel properties of myofibrillar protein in *Penaeus vannamei* (*Litopenaeus vannamei*) surimi[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2022, 90: 106218.
- [20] ZHANG B, FANG C D, HAO G J, et al. Effect of kappa-carrageenan oligosaccharides on myofibrillar protein oxidation in peeled shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during long-term frozen storage[J]. Food Chemistry, 2018, 245: 254-261.
- [21] 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-Food Science and Technology, 2022, 164: 113641.
- [22] LIU D S, LIANG L, XIA W S, et al. Biochemical and physical changes of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fillets stored at -3 and 0 °C[J]. Food Chemistry, 2013, 140(1/2): 105-114.
- [23] WALAYAT N, XIONG Z Y, XIONG H G, et al. The effect of egg white protein and β -cyclodextrin mixture on structural and functional properties of silver carp myofibrillar proteins during frozen

- storage[J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 135: 109975.
- [19] TIAN J, WALAYAT N, DING Y T, et al. The role of trifunctional cryoprotectants in the frozen storage of aquatic foods: Recent developments and future recommendations[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2022, 21(1): 321-339.
- [20] SECCI G, PARISI G. From farm to fork: Lipid oxidation in fish products. A review[J]. Italian Journal of Animal Science, 2016, 15(1): 124-136.
- [21] SAKI N, GHAFFARI M, NIKOO M. Effect of active ice nucleation bacteria on freezing and the properties of surimi during frozen storage[J]. LWT-Food Science and Technology, 2023, 176: 114548.
- [22] WALAYAT N, TANG W, WANG X, et al. Effective role of konjac oligosaccharide against oxidative changes in silver carp proteins during fluctuated frozen storage[J]. Food Hydrocolloids, 2022, 131: 107761.
- [23] 朱士臣, 俞杰航, 金燕, 等. 鱼鳞明胶对鱼糜肌原纤维蛋白的冷冻保护作用及其机制[J]. 食品科学, 2022, 43(24): 16-24.
ZHU Shichen, YU Jiehang, JIN Yan, et al. Cryoprotective effect and mechanism of fish scale gelatin on surimi myofibrillar proteins [J]. Food Science, 2022, 43(24): 16-24.
- [24] LIU Q, CHEN Q, KONG B H, 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.
- [25] 胡潇予. 卡拉胶寡糖对反复冻融南美白对虾肌肉品质及微生物多样性的影响[D]. 上海: 上海海洋大学, 2019: 18-19.
- HU Xiaoyu. Litopenaeus vannamei and its microbial diversity during repeated freeze-thaw[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2019: 18-19.
- [26] 张晓嶂. 鱼糜加工副产物水解物改善鱼糜品质及机制研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2022: 121-135.
- ZHANG Xiaodi, Study on the improving the surimi quality and mechanism by-product protein hydrolysate[D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2022: 121-135.
- [27] TAO L, TIAN L, ZHANG X S, et al. Effects of γ -polyglutamic acid on the physicochemical properties and microstructure of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) surimi during frozen storage[J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 134: 109960.
- [28] BENJAKUL S, SEYMOUR T A, MORRISSEY M, et al. Physicochemical changes in Pacific whiting muscle proteins during iced storage[J]. Journal of Food Science, 1997, 62(4): 729-733.
- [29] ZHANG Z L, XIONG Z Y, LU S F, 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.
- [30] ZHENG Y, SHI Y Z, YANG X, et al. Flammulina velutipes polysaccharide improves the water-holding capacity in the dorsal muscle of freeze-thawed cultured large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) [J]. Food Chemistry, 2023, 403: 134401.

加工编辑:王雪
收稿日期:2024-04-15