

冰藏奥尼罗非鱼片组织蛋白酶与品质变化的相关性分析

李来好^{1*}, 孙蕾蕾^{1,2}, 黄卉¹, 杨贤庆¹, 郝淑贤¹, 魏涯¹, 马海霞¹

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 农业部水产品加工重点实验室,
国家水产品加工技术研发中心, 广东 广州 510300;
2. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306)

摘要: 为探究奥尼罗非鱼片在冰藏期间组织蛋白酶活性与质构及肌原纤维蛋白降解的相关性, 实验测定了冰藏期间的组织蛋白酶 B、H、L、D 的活性、鱼片质构和肌原纤维蛋白随冰藏时间的变化趋势及其相关性。结果显示, 组织蛋白酶 B、D 的活性整体呈波动式上升趋势, 组织蛋白酶 L、B+L 活性均呈先下降后上升的变化趋势, 组织蛋白酶 B、B+L 的活性与冰藏时间呈显著正相关。组织蛋白酶 H 的活性在贮藏期间变化较小。肌原纤维蛋白含量在冰藏第 2 天最高, 整体变化趋势与冰藏时间呈显著负相关; SDS-PAGE 图谱表明肌球蛋白重链发生了显著的降解, 肌动蛋白和原肌球蛋白变化不显著, α -辅肌动蛋白在冰藏前 4 d 逐渐降解; 质构指标硬度、胶黏性、咀嚼性 3 者整体均呈波动变化趋势, 凝聚性和弹性在整个冰藏期间变化不显著, 黏附性和黏附力在冰藏 2 d 后逐渐上升。组织蛋白酶活性与质构和肌原纤维蛋白含量的相关性分析表明, 组织蛋白酶 B 活性与弹性和肌原纤维蛋白含量显著相关, 组织蛋白酶 L、D 与硬度、胶黏性和咀嚼性呈显著相关性, 组织蛋白酶 L 和 D 是最有可能直接参与宰后冰藏期间奥尼罗非鱼片肌肉软化的组织蛋白酶。溶酶体组织蛋白酶可能共同参与鱼肉的自溶。

关键词: 奥尼罗非鱼片; 组织蛋白酶; 肌原纤维蛋白; 质构

中图分类号: S 983

文献标志码: A

罗非鱼是我国南方重要的养殖鱼类, 近年来产业发展迅速, 2013 年产量已达 150 万 t, 出口量高达 37 万 t^[1-3]。罗非鱼肉水分含量多, 在冰藏初期易发生由内源性蛋白酶催化的肌原纤维蛋白降解导致的品质变化^[4-5], 主要表现在溶酶体组织蛋白酶引起肌肉蛋白的结构变化、降解、聚合及变性而导致的肌肉软化^[6-13]。

关于造成鱼体死后品质变化的特定蛋白酶存在很多争论。通常认为涉及到肌原纤维等蛋白降解的 2 种主要路径是钙激活蛋白酶-钙蛋白酶抑制蛋白系统和溶酶体组织蛋白酶-胱蛋白酶抑制系统^[14-17]。但鱼体死后这 2 种酶在鱼肉蛋白质水解中的作用受到了有限的关注。另外, 自从提出了钙激活蛋白酶可诱导肌原纤维蛋白降解这一理

论以来, 国内外对溶酶体组织蛋白酶的研究也逐渐减少, 事实上组织蛋白酶对宰杀后鱼肉品质有显著影响。溶酶体组织蛋白酶在活的肌肉组织中活性不高, 但在宰杀后贮藏过程中会释放出来, 其主要包括半胱氨酸蛋白酶(组织蛋白酶 B、C、F、H、K、L、O、S、T、U、V、W 和 X)、丝氨酸蛋白酶(组织蛋白酶 A 和 G)和天冬氨酸蛋白酶(组织蛋白酶 D 和 E)^[18-20], 鱼体组织蛋白降解中起主要作用的是组织蛋白酶 B、D、H 和 L。不同的组织蛋白酶具有不同的水解特异性, 组织蛋白酶 B 降解肌球蛋白重链和肌钙蛋白 T, 并缓慢降解原肌球蛋白和肌钙蛋白 I; 组织蛋白酶 D 降解肌球蛋白、肌联蛋白、C-蛋白和 M-蛋白, 并缓慢降解肌动蛋白、原肌球蛋白和肌钙蛋白^[21-22]; 组织蛋白酶

收稿日期: 2014-11-15 修回日期: 2015-01-25

资助项目: 国家现代农业(罗非鱼)产业技术体系建设专项(CARS-49); 广州市珠江科技新星项目(2012J2200075); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2012TS22); 国家自然科学基金(30671631, 31401563); 国家科技支撑计划(2012BAD28B00); 广西科学研究与技术开发计划(11107005-2)

通信作者: 李来好, E-mail: laihao@163.com

H 兼有内切酶和外切酶特性,主要降解肌钙蛋白 T;组织蛋白酶 L 降解除了原肌球蛋白和肌钙蛋白 C 以外的大部分肌原纤维蛋白^[23]。

本实验以奥尼罗非鱼(*Oreochromis aureus* ♂ × *O. niloticus* ♀) 片为研究对象,探讨冰藏条件下鱼肉溶酶体组织蛋白酶 B、D、H、L 活性以及肌原纤维蛋白含量和质构的变化规律,并通过 SDS-PAGE 观察肌球蛋白重链、肌动蛋白等肌原纤维蛋白降解情况,分析鱼肉质构等品质变化与蛋白降解以及溶酶体组织蛋白酶活性之间的相关性,为奥尼罗非鱼的贮藏品质变化机理提供理论参考,同时为构建奥尼罗非鱼品质评价体系提供依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验动物 鲜活奥尼罗非鱼,购自广州市海珠区大江苑市场,每条鱼体质量约为 0.6~0.8 kg,致死 后切鱼片,去皮,冲洗,沥水,装入封口袋中,于冰中贮藏。

实验试剂 考马斯亮蓝总蛋白含量测试盒、电极缓冲液、上样缓冲液、考马斯染色液、脱色液购自南京建成生物技术公司;SDS-PAGE 凝胶快速配制试剂盒、Protein Ladder 非预染蛋白质分子量标准购自碧云天生物技术研究 所;Z-Arg-Arg-AMC、Z-Phe-Arg-AMC、L-Arg-AMC、AMC、E-64、DMSO 购自 Sigma-Aldrich 公司;其余试剂均为国产分析纯。

实验仪器 PRO200 型细胞破碎仪(美国 Pro Scientific 公司)、PowerPac HV 等电聚焦电泳仪(美国 Bio-rad 公司)、Tanon 1600 凝胶成像系统(上海天能科技有限公司)、Cary Eclipse 荧光分光光度计(美国 Varian 公司)、3K30 型高速冷冻离心机(美国 Sigma 公司)、Ultra Turrax T25B 型均质机(德国 IKA 工业设备公司)、UV-3000PC 型紫外分光光度计(上海美谱达仪器有限公司)、QTS-25 型质构仪(美国 Brookfield 公司)等。

1.2 实验方法

溶酶体组织蛋白酶 B、H、L 粗酶液的提取及活力测定 分别以 B、H、B+L 各自的荧光合成肽底物 Z-Arg-Arg-AMC、L-Arg-AMC、Z-Phe-Arg-AMC 测定其水解活性。

粗酶液的提取^[24-25]:准确称取 5.0 g 碎鱼

肉,加入 20 mL 预冷缓冲液[50 mmol/L NaAc, 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 0.2% (V/V) 聚乙二醇辛基苯基醚(TritonX-100), pH 5.0],于细胞破碎仪中处理 2 min,冷冻离心(10 000 r/min, 20 min, 4 ℃),用纱布过滤除去上浮的脂肪,得上清液即为组织蛋白酶 B、H、L 粗酶液。

组织蛋白酶 B、B+L 的活力测定:取粗酶液 0.5 mL,加入 0.25 mL 反应缓冲液^[26](B:352 mmol/L KH₂PO₄, 48 mmol/L Na₂HPO₄, 4 mmol/L Na₂EDTA, pH 6.0,使用前配制成含 8 mmol/L L-Cys 的新鲜溶液;B+L:340 mmol/L NaAc, 60 mmol/L HAc, 4 mmol/L Na₂EDTA, pH 5.5,使用前配制成含 8 mmol/L DTT 的新鲜溶液),于 40 ℃水浴中预热 5 min,然后加入预热 5 min 的 20 μmol/L 荧光合成肽底物 0.5 mL,混合均匀后于 40 ℃孵化 30 min,加入 2 mL 终止试剂(100 mmol/L ClCH₂COONa, 30 mmol/L NaAc, 70 mmol/L HAc, pH 4.3)终止反应,离心(10 000 r/min, 10 min),取上清液用荧光分光光度计于激发波长 340 nm,发射波长 440 nm 下测定荧光值,对照组为先加入终止试剂再加入粗酶液和底物。组织蛋白酶 L 的活力为组织蛋白酶 B+L 的活力与组织蛋白酶 B 的活力的差值。

组织蛋白酶 H 的活力测定:由于氨肽酶也可以水解 L-Arg-AMC,以 L-Arg-AMC 为底物测得的酶活实际为组织蛋白酶 H 和氨肽酶的总活力,因此向反应体系中加入半胱氨酸蛋白酶专一不可逆抑制剂(E-64)抑制组织蛋白酶 H,降低的活性即为组织蛋白酶 H 的真实活性。具体操作步骤:(1)添加 E-64 组:取粗酶液 0.5 mL,加入 20 μL E-64(1 mmol/L)和 0.25 mL 反应缓冲液(200 mmol/L KH₂PO₄, 200 mmol/L Na₂HPO₄, 4 mmol/L Na₂EDTA, pH 6.8,使用前配制成含 8 mmol/L L-Cys 的新鲜溶液),于 40 ℃水浴中预先孵育 60 min;(2)未添加 E-64 组:取粗酶液 0.5 mL,加入 0.25 mL 反应缓冲液,于 40 ℃水浴中预热 5 min,然后分别于添加 E-64 组和未添加 E-64 组中加入预热 5 min 后的 20 μmol/L 荧光合成肽底物 0.5 mL,按上述方法孵化 10 min,并测定其荧光值^[27-28]。

AMC 标准曲线的绘制:分别取 1 μmol/L 的 AMC 标准溶液 0、0.5、1.0、2.0、3.0、3.5 和 4.0 mL,加蒸馏水至总体积 4 mL,以 AMC 浓度(μmol/L)为

横坐标,荧光值为纵坐标,绘制标准曲线。

溶酶体组织蛋白酶 D 粗酶液的提取及活力测定 粗酶液的提取^[29]:准确称取 15 g 碎鱼肉,加入 135 mL 预冷至 -30 ℃ 的丙酮,均质,匀浆通过布氏漏斗过滤,再用 90 mL 的预冷丙酮分 2 次清洗。滤液在室温下风干过夜,制成丙酮粉。向丙酮粉中加入 20 mL KCl(2%)溶液,均质,离心(11 000 r/min,30 min,4 ℃),所得上清液即为组织蛋白酶 D 粗酶液。

活力测定^[30]:以 5% 酸变性的血红蛋白作为底物(制备方法参考 Jiang 等^[31])。取 0.5 mL 粗酶液,加入 0.5 mL 酸变性血红蛋白(5%)和 1.5 mL 麦基尔文缓冲液(pH 3.0),在 37 ℃ 下孵化 1 h,加入 2.5 mL TCA(5%)终止反应。在室温放置 45 min,离心(7 000 r/min,15 min),上清液中的非蛋白氮测定通过参考 Lowry 等^[32]的方法略有改动。

肌原纤维蛋白含量 精确称取白色肉 5 g,加入 50 mL 磷酸盐缓冲液 A(0.05 mol/L,pH 7.4),均质,在 4 ℃ 浸提 30 min,离心(10 000 r/min,10 min,4 ℃),弃去上清液,向沉淀中再加入 50 mL 磷酸盐缓冲液 A(0.05 mol/L,pH 7.4),重复上述操作,弃去上清液,再向沉淀中加入 50 mL 磷酸盐缓冲液 B(0.1 mol/L,pH 7.4,含 1.1 mol/L NaCl),均质,在 4 ℃ 浸提 90 min,离心(10 000 r/min,10 min,4 ℃),收集上清液,即为肌原纤维蛋白样品^[33]。用南京建成生物技术公司提供的考马斯亮蓝总蛋白含量测定试剂盒测定蛋白含量。

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 选取 10% 的分离胶和 5% 的浓缩胶对冰藏奥尼罗非鱼片肌原纤维蛋白进行 SDS-PAGE 分析^[34]。

质构 使用 QTS-25 型质构仪对冰藏奥尼罗非鱼片进行质构分析,采用质地剖面分析(TPA)模式测定样品各参数^[35-36]。取背部鱼肉,切成 1.5 cm × 1.5 cm × 1.5 cm 大小的正方体,置于质构仪探头的正下方,选用直径为 6 mm 的平底柱形探头,进行正反 2 次轴向压缩,设定参数:触发力值:5 g;针入距离:3 mm;测试速度:30 mm/min。分别读取以下参数:硬度、胶黏性、黏附性、凝聚性、咀嚼性、弹性及黏附力。

1.3 数据处理

质构平行测定 16 次,其余指标平行测定 3 次,所得实验数据均以平均值 ± 标准差(mean ±

SD)表示,采用 SPSS 19.0 统计软件对实验数据进行统计分析,计算皮尔逊(Pearson)相关系数。

2 结果与分析

2.1 组织蛋白酶活性

组织蛋白酶 L、B + L 活性均呈先下降后上升的变化趋势,组织蛋白酶 L 在刚宰杀后活性最大,为 0.168 7 U/g 鱼肉,在冰藏第 4 天降至最低值,仅占初始值的 16%,在冰藏后期其活性逐渐增大,这可能是由于组织蛋白酶 L 与组织蛋白酶 B 部分底物相同,而组织蛋白酶 B 活性的升高对其产生部分抑制作用,在冰藏后期伴随着肌肉组织的 pH 逐渐降低,溶酶体发生破裂,组织蛋白酶 L 被释放,其活力又逐渐增大。组织蛋白酶 B 活性整体呈波动式上升趋势。通过 Pearson's 线性系数测定组织蛋白酶 B、B + L 的活性随冰藏时间的变化趋势,发现酶活性与冰藏时间呈显著正相关($P \leq 0.01, r = 0.814; P \leq 0.05, r = 0.728$),这可能与溶酶体随冰藏时间延长逐渐破裂而溶出组织蛋白酶 B 有关(图 1)。组织蛋白酶 H 活性在冰藏前期缓慢上升,在第 6 天活性达到最高,为 1.504 5 U/g 鱼肉,相比于初始值上升了 52%,第 8 天降至接近初始值,而后活性直线上升。虽然组织蛋白酶 H 的活性数值高于组织蛋白酶 B 和组织蛋白酶 L,但其活性整体变化幅度较小(图 2)。组织蛋白酶 D 活性呈波动式上升的变化趋势,在冰藏第 2 天和第 10 天活性较高,在冰藏第 2 ~ 8 天活性下降了 26%(图 3)。

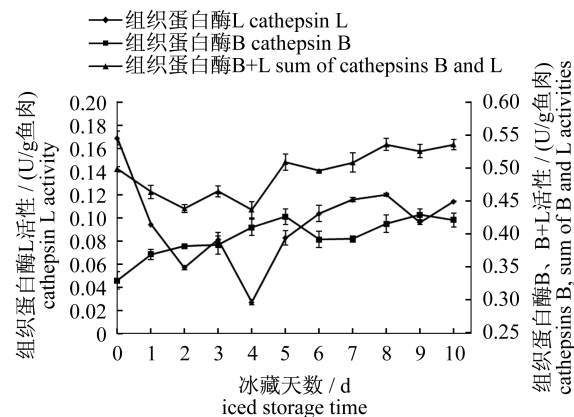


图 1 冰藏期间溶酶体组织蛋白酶 B、L、B + L 的活力变化

Fig. 1 Changes in activities of cathepsins B, L, sum of B and L of tilapia fillets during iced storage

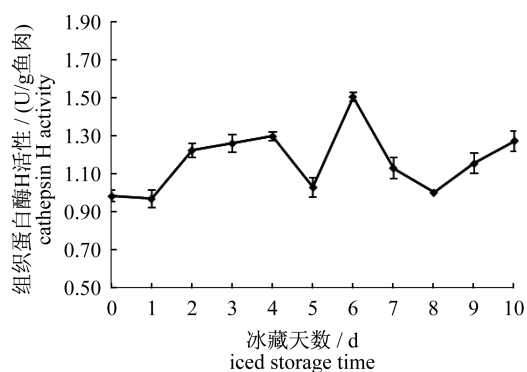


图2 冰藏期间溶酶体组织蛋白酶H的活力变化
Fig. 2 Change in activity of cathepsin H of tilapia fillets during iced storage

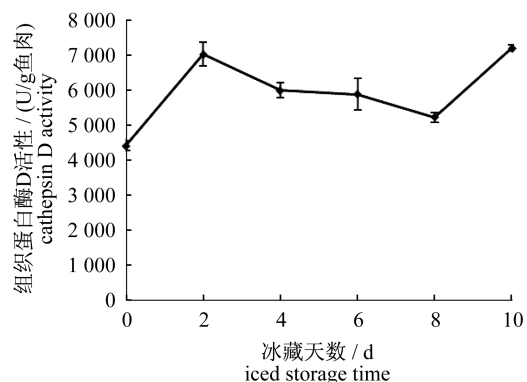


图3 冰藏期间溶酶体组织蛋白酶D的活力变化
Fig. 3 Changes in activity of cathepsin D of tilapia fillets during iced storage

2.2 肌原纤维蛋白含量

奥尼罗非鱼片肌原纤维蛋白含量随冰藏时间的延长呈先升后降的变化趋势(图4)。新鲜奥尼罗非鱼片的肌原纤维蛋白含量并不是最高的,而是在冰藏第2天达到最大值9.13 mg/mL,这可能是由于奥尼罗非鱼刚宰杀后肌肉内ATP发生快速降解,同时伴随着肌球蛋白分子和肌动蛋白分子相互结合成分子量较大的致密的肌动球蛋白复合体,导致在提取过程中离心时沉降至沉淀部分而使提取率降低,这与Wang等^[37]指出大西洋鲑(*Salmo salar*)在贮藏初期盐溶性蛋白的提取率较低,而当鱼体解僵后,盐溶性蛋白的提取率逐渐升高的结果相一致。冰藏第2~7天肌原纤维蛋白含量呈现迅速下降的趋势,贮藏末期趋于平缓。肌原纤维蛋白含量随冰藏时间的延长而逐渐降低主要是由于冰藏过程中蛋白质变性发生交联反应以及巯基氧化形成的二硫键导致肌球蛋白重链发

生聚合。通过Pearson's线性系数测定肌原纤维蛋白含量随冰藏时间的变化趋势,发现蛋白含量与冰藏时间呈显著负相关($P \leq 0.01$, $r = -0.762$)。

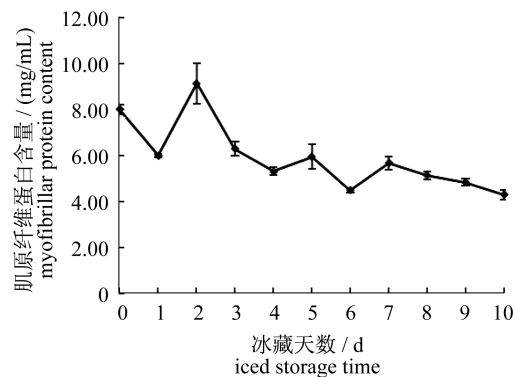


图4 冰藏对奥尼罗非鱼片肌原纤维蛋白含量的影响
Fig. 4 Effect of iced storage on content of myofibrillar protein from tilapia fillets

2.3 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

SDS-PAGE图谱中高分子量蛋白条带的模糊、弱化和消失以及低分子量蛋白条带的出现是肌原纤维蛋白不断降解的直观表现。从图5中可以看出肌原纤维蛋白条带主要有肌球蛋白重链(myosin heavy chain, MHC)、肌动蛋白和原肌球蛋白等。由蛋白条带可以看出,冰藏第1天肌球蛋白重链和肌动蛋白含量最高,随冰藏时间的延长肌球蛋白重链发生了明显降解,肌动蛋白在冰藏后期变化不显著,而原肌球蛋白在整个冰藏期间未发生明显变化, α -辅肌动蛋白条带在冰藏前4d逐渐变淡,主要是由于在冰藏期间Z线不断降解,因此其作为肌肉Z盘上连接邻近肌节的形成关键成分也发生了相应程度的降解并导致形成更疏松的结构和更软化的质地,而组织蛋白酶B、D、L均能降解 α -辅肌动蛋白。总体而言,SDS-PAGE图谱能直观地呈现鱼肉肌原纤维蛋白的降解和变性情况,但如何有效地判断某些特异性蛋白条带的消失和出现与鱼肉新鲜度之间的关系、蛋白降解程度与货架期的关系仍需要结合特异性和灵敏度较高的免疫印迹等方法作进一步的深入研究。

2.4 质构

在整个冰藏期间硬度、胶黏性、咀嚼性三者变化趋势接近,仅在冰藏第5天咀嚼性有所差异,整体呈先上升后波动式下降再上升的变化趋势(图

6),这主要是由于鱼体宰杀后发生僵直而后解僵成熟并伴随着蛋白质的降解而导致的肌肉逐步软化造成的,冰藏最后2 d三者指标均上升,可能与冰藏导致的蛋白质的聚合和交联有关,另外也可能与鱼肉随贮藏时间的延长肌肉组织中的水分不断渗出有关。胶黏性是由硬度和凝聚性的乘积来表示的,是一项质构综合评价指标。凝聚性反映了细胞间结合力的大小,是咀嚼鱼肉时,鱼肉抵抗受损并保持完整性的性质,其在整个贮藏期间数值保持平稳,因此胶黏性与硬度表现出相同的变化趋势。咀嚼性在数值上等于胶黏性和弹性的乘积,也是一项质构综合评价指标,它是肌肉硬度、

弹性和细胞间凝聚力的综合作用结果,通过Pearson's线性系数测定质构随冰藏时间的变化趋势,发现弹性与冰藏时间呈显著正相关($P \leq 0.01, r = 0.784$),但与凝聚性一样,弹性在整个冰藏期间变化不显著,因此咀嚼性随冰藏时间的延长与胶黏性有相似的变化趋势。黏附性和黏附力变化趋势接近,仅在冰藏前2 d略有差异。黏附性也是反映细胞间结合力大小的参数,但与凝聚性反映的鱼肉性质恰好相反。冰藏2 d后黏附性和黏附力逐渐上升,可能是由于随贮藏时间的延长蛋白质发生变性、二硫键遭到破坏、持水性下降,造成奥尼罗非鱼肌肉细胞之间的结合力减小。

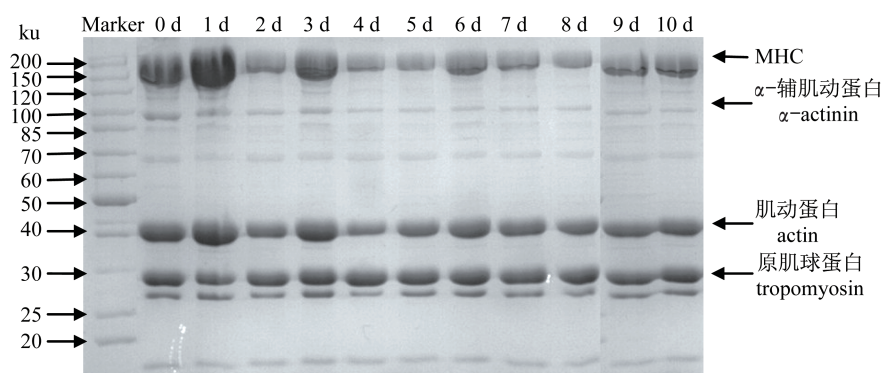


图5 奥尼罗非鱼片冰藏过程中肌原纤维蛋白 SDS-PAGE 图谱

Fig. 5 SDS-PAGE pattern of myofibrillar protein in tilapia fillets during iced storage

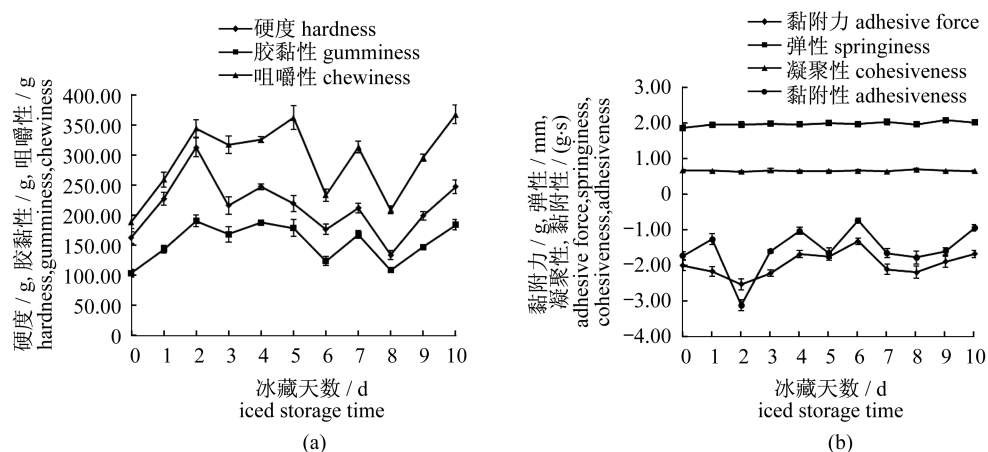


图6 奥尼罗非鱼片硬度、胶黏性、咀嚼性、黏附力、弹性、凝聚性和黏附性的变化

Fig. 6 Changes in hardness, gumminess, chewiness, adhesive force, springiness, cohesiveness and adhesiveness of tilapia fillets

2.5 相关性分析

组织蛋白酶活性与凝聚性、黏附力、黏附性均无显著相关性(表1)。组织蛋白酶B活性与弹性和肌原纤维蛋白含量呈显著相关性。硬度与组织

蛋白酶L、B+L、D活性呈显著相关性,胶黏性和咀嚼性也均与组织蛋白酶L和D活性呈显著相关性,表明组织蛋白酶L和D是最有可能直接参与宰杀后冰藏期间奥尼罗非鱼片肌肉软化的组织

蛋白酶,这与 Yamashita 等^[38]和 Huang 等^[39]的研究结果相一致。这可能与组织蛋白酶 L 能水解最多种类的肌原纤维蛋白有关,同时,也可能是由于组织蛋白酶 D 能直接降解完整的蛋白质且其最适 pH 恰好与鱼肉贮藏过程中的某一段时期的 pH 相同,且这段时期组织蛋白酶 D 的特异性底物不存在。另外,组织蛋白酶在溶酶体中的位置也会影响其在鱼肉软化中的作用。组织蛋白酶 H 活性与质构和肌原纤维蛋白含量均无显著相关

性,仅在冰藏最后 4 天与硬度和咀嚼性呈显著相关性($P \leq 0.05, r = 0.966, 0.972$),这表明组织蛋白酶 H 在罗非鱼宰杀后鱼肉的品质变化过程中作用不大,与 Ouali 等^[40]报道组织蛋白酶 H 很难降解肌原纤维蛋白以及 García 等^[41]研究表明组织蛋白酶 H 活性与香肠中非蛋白氮的含量几乎没有相关性的结果相一致。肌原纤维蛋白不仅与肌肉收缩有关,还与黏附力和黏附性有着密不可分的联系(表 2)。

表 1 组织蛋白酶活性与质构和肌原纤维蛋白含量的相关性

Tab. 1 The correlation between cathepsins activities and texture as well as myofibrillar protein content

	硬度/g hardness	胶黏性/g gumminess	黏附力/g adhesive force	弹性/mm springiness	凝聚性 cohesiveness	咀嚼性/g chewiness	黏附性/ (g·s) adhesiveness	肌原纤维蛋白含量/ (mg/mL) myofibrillar protein content
组织蛋白酶 B/(U/g 鱼肉) cathepsin B	0.083	0.412	0.326	0.800 **	-0.039	0.541	0.200	-0.651 *
组织蛋白酶 L/(U/g 鱼肉) cathepsin L	-0.668 *	-0.731 *	0.031	-0.254	0.443	-0.615 *	0.104	-0.006
组织蛋白酶 B + L/(U/g 鱼肉) cathepsin B + L	-0.611 *	-0.405	0.298	0.400	0.418	-0.180	0.269	-0.541
组织蛋白酶 H/(U/g 鱼肉) cathepsin H	0.257	0.298	0.516	0.234	-0.309	0.259	0.329	-0.313
组织蛋白酶 D/(U/g 鱼肉) cathepsin D	0.813 *	0.858 *	-0.028	0.790	-0.714	0.925 **	-0.113	-0.109

注:“**”在 0.01 水平(双侧)上显著相关,“*”在 0.05 水平(双侧)上显著相关,下表同

Notes:“**”correlation is significant at the 0.01 level(2-tailed),“*”correlation is significant at the 0.05 level(2-tailed),the same as the following

表 2 肌原纤维蛋白含量与质构的相关性

Tab. 2 The correlation between myofibrillar protein content and texture

	硬度/g hardness	胶黏性/g gumminess	黏附力/g adhesive force	弹性/mm springiness	凝聚性 cohesiveness	咀嚼性/g chewiness	黏附性/(g·s) adhesiveness
肌原纤维蛋白含量/(mg/mL) myofibrillar protein content	0.385	0.068	-0.692 *	-0.594	-0.282	-0.046	-0.821 **

3 结论

组织蛋白酶 L、B + L 活性呈先下降后上升的变化趋势,组织蛋白酶 B 活性整体呈波动式上升趋势,组织蛋白酶 H 活性整体变化幅度较小,组织蛋白酶 D 活性呈波动式上升的变化趋势。组织蛋白酶 B、B + L 的活性与冰藏时间呈显著正相关。

肌原纤维蛋白含量随冰藏时间的延长呈先上升后下降的变化趋势,与冰藏时间呈显著负相关,在冰藏第 2 天肌原纤维蛋白含量最高。

冰藏期间肌球蛋白重链发生了明显降解,肌动蛋白在冰藏后期变化不显著,而原肌球蛋白在整个冰藏期间未发生明显变化, α -辅肌动蛋白条带在冰藏前 4 d 逐渐变淡。

质构指标硬度、胶黏性、咀嚼性三者整体均呈先上升后波动式下降再上升的变化趋势,凝聚性和弹性在整个冰藏期间变化不显著,黏附性和黏附力在冰藏 2 d 后逐渐上升。

组织蛋白酶 B 活性与弹性和肌原纤维蛋白含量呈显著相关性,组织蛋白酶 L、D 与硬度、胶黏性和咀嚼性呈显著相关性,组织蛋白酶 L 和 D

是最有可能直接参与宰杀后冰藏期间奥尼罗非鱼片肌肉软化的组织蛋白酶。溶酶体组织蛋白酶可能共同参与鱼肉的自溶。

参考文献:

- [1] The Ministry of Agriculture of Fisheries Service. China fishery statistical yearbook from 2000 to 2010 [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2010. [农业部渔业局. 2000 - 2010 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2010.]
- [2] Cui H. The present situation and future development at home and abroad market trade of tilapia in 2011 [J]. Ocean and Fishery, 2011 (12): 64 - 68. [崔和. 2011 年罗非鱼国内外市场贸易现状及产业未来发展. 海洋与渔业, 2011 (12): 64 - 68.]
- [3] Huang H, Yin S W, Zhang B, *et al.* Studies on four isozymes from five tissues of hybrid *Tilapia* (*Tilapia nilotica* ♀ × *T. aurea* ♂) [J]. South China Fisheries Science, 2006, 2 (1): 11 - 17. [黄海, 尹绍武, 张本, 等. 奥尼罗非鱼 5 种组织中 4 种同工酶的研究. 南方水产, 2006, 2 (1): 11 - 17.]
- [4] Yang W G. Changes of biochemical properties and freshness evaluation in some maricultured fish-shellfishes stored at low temperature [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2007. [杨文鸽. 几种海水养殖鱼类低温贮藏生化特性的变化及其鲜度评价. 青岛: 中国海洋大学, 2007.]
- [5] Delbarre L C, Chéret R, Taylor R, *et al.* Trends in postmortem aging in fish: Understanding of proteolysis and disorganization of the myofibrillar structure [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2006, 46 (5): 409 - 421.
- [6] Beltrán J A, Jaime I, Santolaria P, *et al.* Effect of stress-induced high post-mortem pH on protease activity and tenderness of beef [J]. Meat Science, 1997, 45 (2): 201 - 207.
- [7] Watanabe A, Daly C C, Devine C E. The effects of the ultimate pH of meat on tenderness changes during ageing [J]. Meat Science, 1996, 42 (1): 67 - 78.
- [8] Bahuaud D, Mrkre T, Langsrud S K, *et al.* Effects of - 1.5 °C super-chilling on quality of Atlantic salmon (*Salmo salar*) prerigor fillets: Cathepsin activity, muscle histology, texture and liquid leakage [J]. Food Chemistry, 2008, 111 (2): 329 - 339.
- [9] Chéret R, Delbarre L C, Lamballerie A M, *et al.* Calpain and cathepsin activities in *Post mortem* fish and meat muscles [J]. Food Chemistry, 2007, 101 (4): 1474 - 1479.
- [10] Yamashita M, Konagaya S. Participation of cathepsin L into extensive softening of the muscle of chum salmon caught during spawning migration [J]. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 1990, 56 (8): 1271 - 1277.
- [11] Geesink G H, Morton J D, Kent M P, *et al.* Partial purification and characterization of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) calpains and an evaluation of their role in postmortem proteolysis [J]. Journal of Food Science, 2000, 65 (8): 1318 - 1324.
- [12] Kjaersgard I V, Jessen F. Proteome analysis elucidating post-mortem changes in cod (*Gadus morhua*) muscle proteins [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51 (14): 3985 - 3991.
- [13] Pacheco A R, Lugo S M E, Robles B M R. Postmortem biochemical and functional characteristic of Monterey sardine muscle stored at 0 °C [J]. Journal of Food Science, 2000, 65 (1): 40 - 47.
- [14] Mikami M, Whiting A M, Taylor M A J, *et al.* Degradation of myofibrils from rabbit, chicken and beef by cathepsin L and lysosomal lysates [J]. Meat Science, 1987, 21 (2): 81 - 97.
- [15] Calkins C R, Seideman S C. Relationship among calcium-dependent protease, cathepsin B and H, and meat tenderness and the response of muscle to aging [J]. Journal of Animal Science, 1988, 66 (1): 1186 - 1194.
- [16] Ouali A. Proteolytic and physiological mechanisms involved in meat texture development [J]. Biochimie, 1992, 74 (1): 251 - 265.
- [17] Toyohara H, Sakata T, Yamashita K, *et al.* Degradation of oval-filefish meat gel caused by myofibrillar proteinase (s) [J]. Journal of Food Science, 1990, 55 (2): 364 - 368.
- [18] Conus S, Simon H U. Cathepsins and their involvement in immune responses [J]. Swiss Medical Weekly, 2010, 140 (1): 13042.
- [19] Dong Z D, Zhang J, Ji X S, *et al.* Molecular cloning, characterization and expression of cathepsin D from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2012, 33 (5): 1207 - 1214.
- [20] Xiong X Y, Lao H H, Ye X, *et al.* Preliminary study on recombinant cystatin protection to the myosin of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) in processing [J]. South China Fisheries Science, 2005, 1 (4): 13 - 17. [熊孝勇, 劳海华, 叶星, 等. 基因重

- 组 cystatin 对鲢鱼糜肌球蛋白的保护作用初探. 南方水产, 2005, 1(4): 13 - 17.]
- [21] Green G D J, Kembhavi A A, Davies M E, *et al.* Cystatin-like cysteine proteinase inhibitors from human liver [J]. *Biochemical Journal*, 1984, 218(3): 939 - 946.
- [22] Chen L, Xu X L, Zhou G H. Research progress on lysosomal cathepsins applied in meat tenderization [J]. *Food Science*, 2009, 30(1): 271 - 274. [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. *食品科学*, 2009, 30(1): 271 - 274.]
- [23] Matsukura U, Okitani A, Nishimuro T, *et al.* Mode of degradation of myofibrillar proteins by an endogenous protease, cathepsin L. [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1981, 662(1): 41 - 47.
- [24] Thomas A R, Gondoza H, Hoffman L C, *et al.* The roles of the proteasome, and cathepsins B, L, H and D, in ostrich meat tenderization [J]. *Meat Science*, 2004, 67(1): 113 - 120.
- [25] Zhao G M, Zhou G H, Wang Y L, *et al.* Time-related changes in cathepsin B and L activities during processing of Jinhua ham as a function of PH, salt and temperature [J]. *Meat Science*, 2005, 70(2): 381 - 388.
- [26] Li S H, Zhou X Q, Zhang N, *et al.* Purification and characterization of cathepsin L₂ from dorsal muscle of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) [J]. *Food Chemistry*, 2008, 111(4): 879 - 886.
- [27] Barrett A J. Fluorimetric assays for cathepsin B and cathepsin H with methylcoumarylamide substrates [J]. *Journal of Biochemical*, 1980, 187(3): 909 - 912.
- [28] Barrett A J, Kirschke H. Cathepsin B, cathepsin H, and cathepsin L [J]. *Methods Enzymol*, 1981, 80(1): 535 - 561.
- [29] Jiang S T, Wang Y T, Gau B S, *et al.* Role of pepstatin-sensitive proteases on the postmortem changes of tilapia (*Tilapia nilotica* X *Tilapia aurea*) muscle myofibrils [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1990, 38(7): 1464 - 1468.
- [30] Buckow R, Truong B Q, Versteeg C. Bovine cathepsin D activity under high pressure [J]. *Food Chemistry*, 2010, 120(2): 474 - 481.
- [31] Jiang S, Nei F P, Chen H C, *et al.* Comparative study on the cathepsin D from banded shrimp (*Penaeus japonicus*) and grass shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1992, 40(6): 961 - 966.
- [32] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, *et al.* Protein measurement with Folin phenol reagent [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1951, 193(1): 265 - 275.
- [33] Morioka K, Fujii S, Itoh Y, *et al.* Recovery of amino acid from the protein in the head and viscera of frigate mackerel by autolysis [J]. *Fisheries Science*, 1999, 65(4): 588 - 591.
- [34] Tang X D. Study on separation and properties of protein from tilapia muscle [D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2011. [唐小丹. 罗非鱼肉蛋白的分离及其性质研究. 湛江: 广东海洋大学, 2011.]
- [35] Fang J, Huang H, Li L H, *et al.* Effect of different slaughter methods on quality of *Oreochromis* sp. fillets [J]. *South China Fisheries Science*, 2013, 9(5): 13 - 18. [方静, 黄卉, 李来好, 等. 不同致死方式对罗非鱼鱼片品质的影响. *南方水产科学*, 2013, 9(5): 13 - 18.]
- [36] Qi B, Yang X Q, Li L H, *et al.* Effect of agar-oligosaccharide on quality of frozen shrimp and tilapia fillets [J]. *South China Fisheries Science*, 2012, 8(6): 72 - 79. [戚勃, 杨贤庆, 李来好, 等. 琼胶寡糖对冻虾仁和罗非鱼片品质的影响. *南方水产科学*, 2012, 8(6): 72 - 79.]
- [37] Wang H H, Liceaga G A M, Li C E C Y. Biochemical and physicochemical characteristics of muscle and natural actomyosin isolated from young Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillets stored at 0 and 4 °C [J]. *Journal of Food Science*, 2003, 68(3): 784 - 789.
- [38] Yamashita M, Konagaya S. Hydrolytic action of salmon cathepsins B and L to muscle structural proteins in respect of muscle softening [J]. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1991, 57(10): 1917 - 1922.
- [39] Huang F L, Tappel A L. Action of cathepsins C and D in protein hydrolysis [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1971, 236(3): 739 - 748.
- [40] Ouali A, Garrel N, Obléd A, *et al.* Comparative action of cathepsins D, B, H and L and of a new lysosomal cysteine proteinase on rabbit myofibrils [J]. *Meat Science*, 1987, 19(2): 83 - 100.
- [41] García G J A, Quiles Z R, Tapiador J, *et al.* Activity of cathepsin B, D, H and L in Spanish dry-cured ham of normal and defective texture [J]. *Meat Science*, 2000, 56(1): 1 - 6.

Correlation analysis of cathepsins and quality variations of tilapia (*Oreochromis niloticus* ♂ × *O. aureus* ♀) fillets during iced storage

LI Laihao^{1*}, SUN Leilei^{1,2}, HUANG Hui¹, YANG Xianqing¹, HAO Shuxian¹, WEI Ya¹, MA Haixia¹

(1. Key Lab of Aquatic Product Processing, Ministry of Agriculture; National Research and Development Center for Aquatic Product Processing; South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;

2. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: To inquire the correlation of cathepsins activities and texture and myofibrillar protein degradation of tilapia fillets during iced storage, the changes of cathepsins B, H, L and D activities over a period of iced storage were measured. And these variation trends of texture of fillets as well as myofibrillar protein with iced time and correlation among them were also determined. The results showed that cathepsins B and D activities presented a fluctuatingly upgraded tendency on the whole, and cathepsins L, sum of B and L activities presented a first descending and then upgraded tendency. A highly significant positive correlation was observed between cathepsins B and sum of B and L activities and iced storage period. Through the duration of storage, changing scale of cathepsin H activity was small. Myofibrillar protein had a maximum content on the iced 2nd day, and its overall variation trend showed a significant negative correlation with iced time. The SDS-PAGE pattern showed that myosin heavy chain degraded obviously, while actin and tropomyosin had no remarkable changes, and α -actinin degraded gradually in the first iced four days. Texture indices including hardness, gumminess and chewiness on the whole presented a fluctuating tendency, and cohesiveness as well as springiness did not change remarkably through the iced storage, whereas adhesiveness and adhesive force increased gradually two days after iced storage. The correlation analysis of cathepsins activities and texture as well as myofibrillar protein content indicated that cathepsin B activity was largely related to springiness and myofibrillar protein content, and cathepsins L and D presented a significant correlation with hardness, gumminess and chewiness. Cathepsins L and D were the most likely to be directly involved in the postmortem softening of tilapia fillets muscle during iced storage. Lysosomal cathepsins may have participated jointly in autolysis of fish.

Key words: tilapia (*Oreochromis niloticus* ♂ × *O. aureus* ♀) fillets; cathepsins; myofibrillar protein; texture

Corresponding author: LI Laihao. E-mail: laihaoli@163.com