

绿原酸对蓝鳍金枪鱼肌肉品质及肌红蛋白构象的影响

朱文慧, 范茂梅, 韩梦琳, 步营*, 李学鹏, 励建荣

(渤海大学食品科学与工程学院 辽宁省高校重大科技平台

“食品贮藏加工及质量安全控制工程技术研究中心” 辽宁锦州 121013)

摘要 以蓝鳍金枪鱼为对象,研究低温贮藏过程中不同质量浓度的绿原酸(200 mg/kg 样品,400 mg/kg 样品)对金枪鱼肉质、蛋白及脂肪氧化、新鲜度、水分分布及肌肉微观结构等品质特性的影响。通过拉曼光谱及荧光光谱等技术探究绿原酸对肌红蛋白结构及微环境的影响。结果表明,加入绿原酸能够有效延缓金枪鱼肉的褐变情况,抑制蛋白氧化及脂肪氧化的发生,维持样品的新鲜度。与处理组相比,对照组样品的肌纤维束收缩、间隙变大,产生不同程度的断裂。综合来看,低浓度的绿原酸的效果优于高浓度处理组。多光谱结果显示绿原酸对肌红蛋白有荧光猝灭效果。而对照组、绿原酸处理组样品的 α -螺旋比例的下降率分别为 39.2%,28.0%,说明绿原酸能够较好地稳定肌红蛋白的二级结构。

关键词 蓝鳍金枪鱼; 绿原酸; 肌红蛋白; 色泽; 品质

文章编号 1009-7848(2024)09-0398-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.09.037

金枪鱼属于大洋暖水性洄游鱼类,其产量高,质地和颜色较好,同时具有高档、美味、安全、健康等特点,有较高的经济效益和丰富的资源储备,是渔业发展的关注重点^[1]。色泽是决定金枪鱼在市场上可接受性的一个重要品质性状,而血红素蛋白是金枪鱼肌肉中主要的呈色物质,包括血红蛋白和肌红蛋白。肌红蛋白(Myoglobin, Mb)存在于肌肉纤维细胞中,是金枪鱼体内最重要的色素物质。一般来说,金枪鱼肌肉的鲜红色主要与红色色素的存在有关,尤其是氧合肌红蛋白(OxyMyoglobin, OxyMb),其在存储过程中极易被氧化为棕色的高铁肌红蛋白(MetMyoglobin, MetMb)^[2],从而导致金枪鱼的肉质发生褐变,极大地降低了其经济价值。由于金枪鱼富含不饱和脂肪酸,因此在储存过程中容易发生脂质氧化^[3]。有研究表明脂肪氧化与肌红蛋白氧化之间的关系是相互促进的,一方面,铁离子可以在肌红蛋白变性后从血红素中释放出来,促进脂质氧化;另一方面,脂质氧化的中间产物(如自由基)也可以破坏肌肉中的色素,使其易于褐变^[4]。研究显示,牛肉的红度值与 OxyMb 含量及脂质的氧化程度有关^[5]。如何有效抑制蛋白氧化和脂肪氧化以稳定金枪鱼的色泽变化,一直是研

究的热点问题。

天然抗氧化剂是从植物中提取的具有抗氧化活性的物质,如植物多酚。近年来,植物多酚被广泛用作抗氧化剂以减缓因氧化而导致的产品品质劣化问题。作为天然抗氧化剂,加强对植物多酚抗氧化机理的研究,解决红肉和某些红肉鱼类的褐变问题是十分必要的^[6]。有研究表明,添加植物多酚可以有效地调控肌原纤维蛋白、抑制脂肪氧化,从而改善鱼类或鱼类产品的整体质量,尤其是血红素含量高的鱼类^[7]。酚酸类化合物对肌肉蛋白质的调节高度依赖于其类型和浓度等因素,结构和羟基数量的不同也使其具有不同的抗氧化性能。绿原酸(Chlorogenic acid, CA)是植物多酚中重要的酚酸类化合物,可以通过清除自由基而达到抗氧化的效果,同时还具有抗菌抗炎等功能^[7]。目前,绿原酸对金枪鱼的抗氧化机制尚未见过系统的研究报告。

基于此,以蓝鳍金枪鱼(*Thunnus maccoyii*)为研究对象,分析在低温贮藏过程中绿原酸对其品质特性的影响,进而通过多光谱技术探究绿原酸对肌红蛋白构象的影响,揭示绿原酸对金枪鱼品质的影响及其肉质稳定性的保护机制。

收稿日期: 2023-09-03

基金项目: 辽宁省科技厅面上项目(2023-MS-297)

第一作者: 朱文慧,女,博士,副教授

通信作者: 步营 E-mail: buying130@126.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

冷冻的蓝鳍金枪鱼(*Thunnus maccoyii*),山东

蓝润有限公司;绿原酸,上海源叶生物科技有限公司;磷酸氢二钠(AR),国药集团试剂有限公司;硫酸铜(AR),国药集团试剂有限公司;乙酸乙酯(AR),国药集团试剂有限公司;无水乙醇(AR),国药集团试剂有限公司;氯化钠(AR),国药集团试剂有限公司。

1.2 主要仪器与设备

CR-400 色彩色差计,日本 Konica-Minolta 公司;FiveEasy Plus pH 计,上海梅特勒托利多有限公司;K9840 自动凯氏定氮仪,山东海能科学仪器有限公司;Biofuge Stratos 台式高速冷冻离心机,美国 Thermo 公司;UV-2550 紫外-可见分光光度计,苏州岛津仪器有限公司;90CRT 荧光分光光度计,上海精密科学仪器有限公司;JA4103 分析天平,上海舜宇恒平科学仪器有限公司;DK-8D 电热恒温水槽,上海一恒科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 样品制备 试验前,将金枪鱼肉在 4℃ 条件下解冻,将解冻后的样品切成统一大小的形状,分别用不同浓度的绿原酸(200 mg/kg 样品-CA, 400 mg/kg 样品-CA2)对样品进行涂抹处理,然后放入包装袋中在 4℃ 条件下贮藏,分别在第 0, 2, 4, 6, 8 天测定其品质特性的变化。

1.3.2 金枪鱼肉品质特性的测定

1.3.2.1 色差的测定 将色差仪进行黑白板校正后,根据 CIEL*a*b* 系统获得色泽指标(L^* 值、 a^* 值和 b^* 值),平行测量 3 次,以其平均值表示肉色。

1.3.2.2 pH 值的测定 根据 GB 5009.237-2016 测定样品的 pH 值^[8]。在 50 mL 去离子水中加入 5 g 切碎的样品并均质(10 000 r/min, 15 s),而后在 4℃、2 991×g 条件下离心 10 min,用 pH 计测定上清液的 pH 值。

1.3.2.3 肌红蛋白含量及高铁肌红蛋白相对含量的测定 根据 Benjakul 和 Bauer 的方法^[9],对金枪鱼中的肌红蛋白含量进行测定。将 2 g 金枪鱼样品和 20 mL 磷酸钠缓冲液(40 mmol/L, pH 6.8)在 10 000 r/min 条件下匀浆 30 s,然后将匀浆在 4℃ 条件下离心 15 min(11 963×g),在 525 nm(A_{525})下测定上清液的吸光度值。结果用以下公式表示:

$$\text{Mb}(\text{mg/kg 样品}) = A_{525} \times 7.6 \times 16000 \times 10 \quad (1)$$

$$C_{\text{MetMb}} = -0.010A_{555} - 0.057A_{540} + 0.150A_{500} \quad (2)$$

$$C_{\text{DeoMb}} = 0.173A_{555} - 0.109A_{540} - 0.003A_{500} \quad (3)$$

$$C_{\text{OxyMb}} = -0.116A_{555} + 0.165A_{540} - 0.052A_{500} \quad (4)$$

$$C_{\text{Total}} = C_{\text{MetMb}} + C_{\text{DeoMb}} + C_{\text{OxyMb}} \quad (5)$$

结果由 MetMb、OxyMb 和 DeoMb 的百分比来描述。

1.3.2.4 硫代巴比妥酸含量的测定 根据 Kim 等^[10]的方法测定硫代巴比妥酸反应物质(TBARS)的含量。将 5 g 样品与 25 mL 50 g/L 三氯乙酸(TCA)溶液在 10 000 r/min 下均质 1 min,取等体积的上清液与 0.02 mol/L 硫代巴比妥酸(Thiobarbituric acid, TBA)混合。将溶液在 80℃ 条件下水浴 20 min,冷却至室温后在 532 nm 处测定其吸光度。

1.3.2.5 总挥发性盐基氮含量(TVBN)的测定 根据 GB 5009.228-2016 中的自动凯氏定氮法测定样品的 TVBN 值^[11]。称取 10 g 金枪鱼肉切碎与 75 mL 蒸馏水混合,均质 2 min 后倒入蒸馏管中进行测定。测定结束后,用 0.1 mol/L 的盐酸标准溶液滴定接收瓶中的溶液,并记录下所用盐酸标准溶液的体积用于计算。

1.3.2.6 菌落总数的测定 根据 GB 4789.2-2022 测定金枪鱼肉在低温贮藏条件下的菌落总数(Total viable count, TVC)^[12]。将 5 g 金枪鱼肉与 45 mL 0.85% 生理盐水混合并拍打 60 s。在平板计数琼脂上进行倒板,并在 30℃ 条件下培养 72 h,统计数据以 lg(CFU/g)表示。

1.3.2.7 水分状态分布的测定 采用低场核磁共振(Low-field nuclear magnetic resonance, LF-NMR)对水分状态分布进行测定。将贮藏过程中的金枪鱼肉切成 1 cm×1 cm×2 cm 大小的鱼块装入核磁管中,采用 Carr-Purcell-Meiboom-Gill(CP-MG)脉冲序列进行自旋-自旋弛豫时间 T_2 的测定。参数设定:SF1:22 MHz;TD:90016;SW:100 kHz;D3:80 μs;TR:2 000 ms;RG1:30 db;RG2:3;NS:8;P90:n μs;P180:2 n μs;τ:150.00 μs;EchoCnt:3000。样品测试完毕后使用仪器自带的软件进行 T_2 反演。

1.3.2.8 核磁共振成像 磁共振成像(Magnetic Resonance Imaging, MRI)是通过多旋回波成像序列获得的,图像中的质子密度分布通过图像处理计算机软件进行分析。

1.3.2.9 肌肉微观结构的观察 将样品切成1.5~2 cm的立方体,用固定液将其固定在冷冻切片托上后置于-80℃冰箱中冷冻30 min,用冷冻切片机将样品切成5~10 μm的薄片固定在载玻片上,采用HE试剂盒进行对肌肉组织染色,在光学显微镜下放大40倍观察。

1.3.3 肌红蛋白结构及微环境的变化分析

1.3.3.1 肌红蛋白的提取 肌红蛋白的提取参照徐群英等^[13]的描述并稍作修改。取100 g经不同浓度的绿原酸处理后的样品,加入3倍体积的浓度为10 mmol/L的Tris-HCl缓冲液(pH 8.2,含EDTA)后均质1 min(10 000 r/min)。于4℃冰箱静置1.5 h,随后离心(9 600 r/min)10 min得滤液。在滤液中加入固体硫酸铵至盐析液饱和度为90%,于4℃静置30 min后再次离心(9 600×g)30 min得到肌红蛋白沉淀,用2倍体积的Tris-HCl缓冲液(10 mmol/L,pH 8.5)溶解,置于透析袋中,使用相同缓冲液在0~4℃条件下搅拌并透析24 h,期间缓冲液置换10次。将粗提得到的肌红蛋白样品冻干以备后续使用。

1.3.3.2 肌红蛋白二级结构的测定 采用拉曼光谱仪对样品的二级结构进行测定,取适量冻干后的肌红蛋白粉末置于载玻片中央,设置激发波长为532 nm,功率为120 mW,曝光时间为60 s,采用动波长扫描,扫描范围为400~4 000 cm⁻¹;使用Al-ix公式计算肌红蛋白的二级结构。

1.3.3.3 内源色氨酸荧光的测定 将肌红蛋白溶液的质量浓度调整到0.4 mg/mL,激发波长为283 nm,激发和发射狭缝宽度均设为5 nm,数据收集速率为1 200 nm/min,记录其在290~450 nm范围的发射光谱以供后续分析。

1.3.3.4 同步荧光光谱的测定 将样品稀释至0.4 mg/mL,选择激发波长 λ_{ex} =280 nm,激发和发射狭缝宽度均设为5 nm,数据收集速率为1 200 nm/min的条件下测定Mb溶液的荧光强度,反应体系中激发波长和发射波长的间隔($\Delta\lambda$)分别为15 nm和60 nm,记录肌红蛋白在240~310 nm处的光谱数据。

1.3.4 数据分析 试验数据使用SPSS 19.0进行统计,采用ANOVA和Duncan进行检验分析,由Origin 2023作图。每个指标至少测定3次,且每

个测试都是独立试验,结果用平均值±标准差来表示,显著水平为0.05%。

2 结果与讨论

2.1 品质特性分析

2.1.1 色差分析 金枪鱼肉的色泽是衡量其品质的一个重要指标,其色泽变化主要表现为红度值降低,白度和黄度略有增加。Ochiai等^[14]指出,对于蓝鳍或黄鳍金枪鱼肉的红色度值来说, a^*/b^* 值比 a^* 值更恰当,因此本研究选 a^*/b^* 作为红色度值。图1为蓝鳍金枪鱼在低温贮藏过程中的红色度值(a^*/b^*)及亮度 L^* 的变化。由图1可知,在整个贮藏期内,经绿原酸处理后的金枪鱼肉亮度逐渐升高,未处理组样品的亮度无显著变化,且低于绿原酸处理组。由图1可看出各组样品的红色度值随贮藏期时间推移均呈下降趋势,但绿原酸处理组较空白对照组(CK)来说均显示出较高的红色度值,尤其是贮藏8 d后,绿原酸处理的样品红色度值仍大于1,显著高于对照组红色度值0.54($P<0.05$),说明绿原酸可以有效延缓金枪鱼肉的褐变。

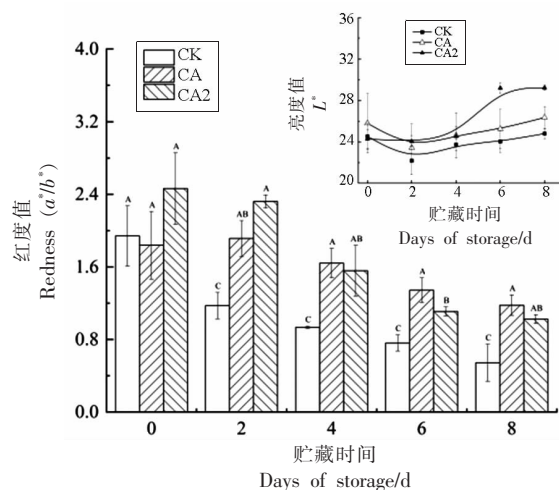


图1 低温贮藏过程中蓝鳍金枪鱼的色泽变化

Fig.1 Color change of bluefin tuna during low temperature storage

2.1.2 pH值的变化分析 如表1所示,各组样品的pH值呈现出先下降后上升的趋势,整体在5.8~6.1左右变化,且有无绿原酸处理对金枪鱼肉的pH值均无显著影响。原因可能是金枪鱼属于洄游性红肉鱼类,在鱼体死后由于糖原的酵解、乳

酸的积聚和 ATP 酶活力的增强,使鱼肉的 pH 值降低;同时,在贮藏过程中微生物的生长繁殖会引

起其鱼肉中蛋白质的分解和氨类物质的产生,由此导致 pH 值升高^[15]。

表 1 低温贮藏过程中蓝鳍金枪鱼的 pH 值变化

Table 1 pH change of bluefin tuna during low temperature storage

	贮藏时间/d				
	0	2	4	6	8
CK	6.107 ± 0.032 ^A	5.970 ± 0.017 ^{AB}	5.870 ± 0.010 ^C	6.037 ± 0.025 ^A	6.067 ± 0.015 ^B
CA	6.087 ± 0.021 ^{AB}	5.983 ± 0.023 ^A	5.933 ± 0.015 ^A	6.040 ± 0.030 ^A	6.103 ± 0.021 ^A
CA2	6.067 ± 0.023 ^{AB}	5.960 ± 0.010 ^{AB}	5.910 ± 0.010 ^B	6.027 ± 0.006 ^A	6.070 ± 0.020 ^{AB}

注:同列字母 A-C 表示组间具有显著差异 ($P < 0.05$)。

2.1.3 高铁肌红蛋白相对含量的变化分析 由图 2 可知, MetMb 相对含量在低温贮藏条件下逐渐升高, 说明在贮藏过程中 OxyMb 被氧化为 MetMb。在贮藏 2~8 d 内, 对照组的 MetMb 相对含量最高, 达到 67.9%, 且在第 8 天时显著高于绿原酸处理组 ($P < 0.05$)。经绿原酸处理后肌红蛋白的氧化最慢, 说明绿原酸对肌红蛋白氧化有较好的抑制作用, 且低质量浓度 (200 mg/kg 样品) 的效果更佳。酚类物质中的邻位酚羟基易被氧化成醌类结构, 消耗环境中氧气的同时对活性氧等自由基也具有很强的捕捉能力, 这就使多酚具有较强的抗氧化性能以及自由基清除能力。绿原酸的抗氧化机制可能是酚羟基作用于自由基, 与 H⁺ 结合从而达到抗氧化的效果^[16]。对于高浓度的多酚的作用效果不如低浓度的作用效果, 原因可能是结合活性强的多酚在空气中很容易被氧化成醌, 这些多酚的醌衍生物具有促进氧化的性质, 反而会加速 OxyMb 氧化为 MetMb^[17]。

2.1.4 硫代巴比妥酸含量的变化分析 在食品氧化过程中自动氧化的最后阶段, 由于过氧化物氧化成醛和酮而形成的 TBA 的反应性物质是主要产物^[18]。根据图 3 可以看出, 各处理组的脂肪氧化程度随着贮藏天数的增加而增加, 当样品暴露于 ·OH 形成体系时, 对照组的 TBARS 含量迅速升高, 且显著高于绿原酸处理组。原因可能是在脂肪氧化和微生物的作用下, 金枪鱼肉的品质发生劣变。低温贮藏 8 d 时, 金枪鱼肉表面已有变黏迹象, 说明微生物已大量繁殖; 对照组的 TBARS 值为 3.21 mg MDA/kg 样品, 明显高于绿原酸处理组 ($P < 0.05$); 当绿原酸添加量为 400 mg/kg 时, 其对

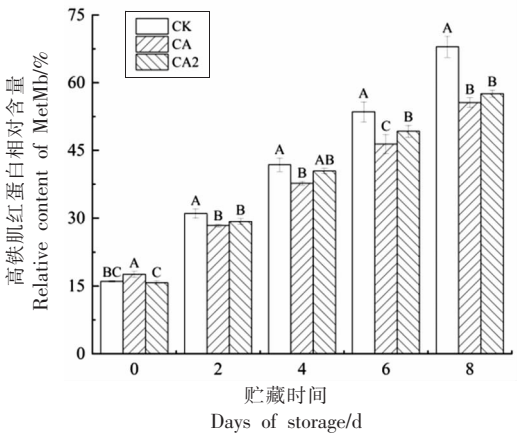


图 2 低温贮藏过程中蓝鳍金枪鱼 MetMb 相对含量的变化

Fig.2 MetMb relative content change of bluefin tuna during low temperature storage

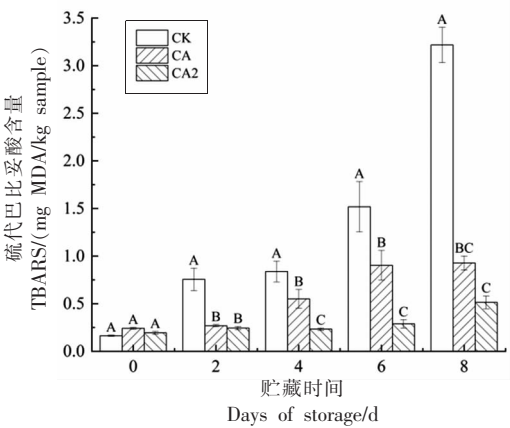


图 3 低温贮藏过程中蓝鳍金枪鱼硫代巴比妥酸含量的变化

Fig.3 TBARS change of bluefin tuna during low temperature storage

脂肪氧化的抑制率为 83.8%。上述结果表明, 绿原酸作为保护屏障可以通过防止与氧气接触, 自由

基清除和游离铁螯合来延缓脂质的氧化。酚类物质的酚羟基具有供氢体活性,把氢原子供给不饱和脂肪酸氧化游离基形成氢过氧化物,不再从另一不饱和脂肪酸分子中获得氢原子及形成新的烃游离基,促使自由基形成连锁反应终端,从而达到防止脂质氧化的目的^[19]。

2.1.5 TVBN 含量及菌落总数分析 根据 GB 2733-2015《食品安全国家标准 鲜、冻动物性水产品》规定,可食用海水鱼的 TVBN 含量不应超过 30 mg/100 g。由图 4a 显示了绿原酸对金枪鱼 TVBN 含量的影响。在贮藏初期阶段,各处理组的 TVBN 含量在贮藏期间持续升高,且对照组增长较为迅速,这与 TBARS 值的趋势基本一致。在贮藏 8 d 后,对照组的 TVBN 含量达到 30.26 mg/100 g,已超出可食用标准;而经不同浓度的绿原酸处理后的金枪鱼肉的 TVBN 含量显著低于对照组,

且所有处理组都保持在可接受的阈值以下(25 mg/100 g)。有研究表明,在贮藏期间绿原酸能抑制南美白对虾 TVBN 含量的升高,延缓蛋白质降解,延长样品的保鲜期^[20],这与本研究结果相似。

由图 4b 所示,在第 0 天,对照组和绿原酸处理组样品的菌落总数均在 (1.25~2.29) lg (CFU/g) 的范围内。一般来说,TVN 低于 4 lg (CFU/g) 的样品表明鱼的食用质量良好,当 TVN 达到 7 lg (CFU/g) 时,海鱼则不能食用^[21]。在贮藏第 6 天时,未处理组样品的细菌数显著高于其它处理组,为 7.55 lg (CFU/g),而其它处理组的细菌数在 (6.17~6.58) lg (CFU/g) 之间,其中高浓度绿原酸(400 mg/kg 样品)的抑菌效果最好。这可能是因为绿原酸的羟基和磷脂的极性头基形成氢键,脂质体的膜表面之间产生氢键关系,引起细菌膜通透性的变化从而导致细菌死亡。

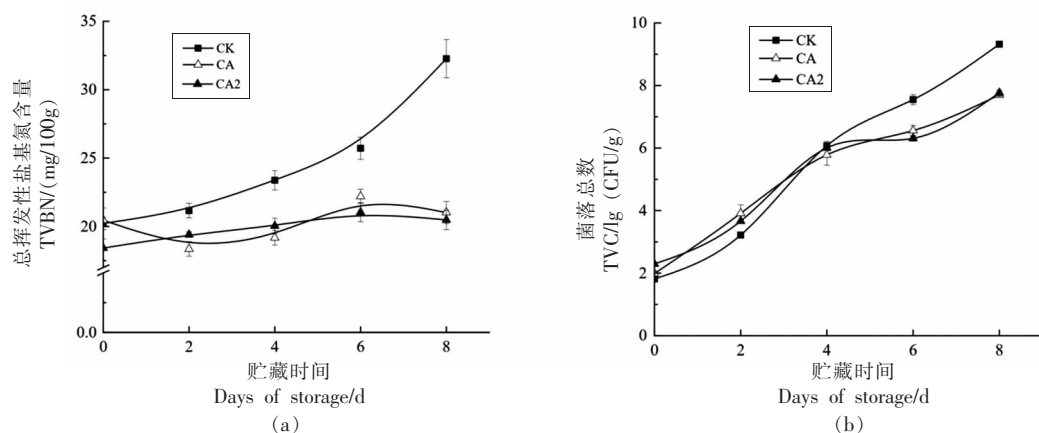


图 4 低温贮藏过程中蓝鳍金枪鱼总挥发性盐基氮含量(a)及菌落总数(b)的变化

Fig.4 TVBN (a) and TVC (b) change of bluefin tuna during low temperature storage

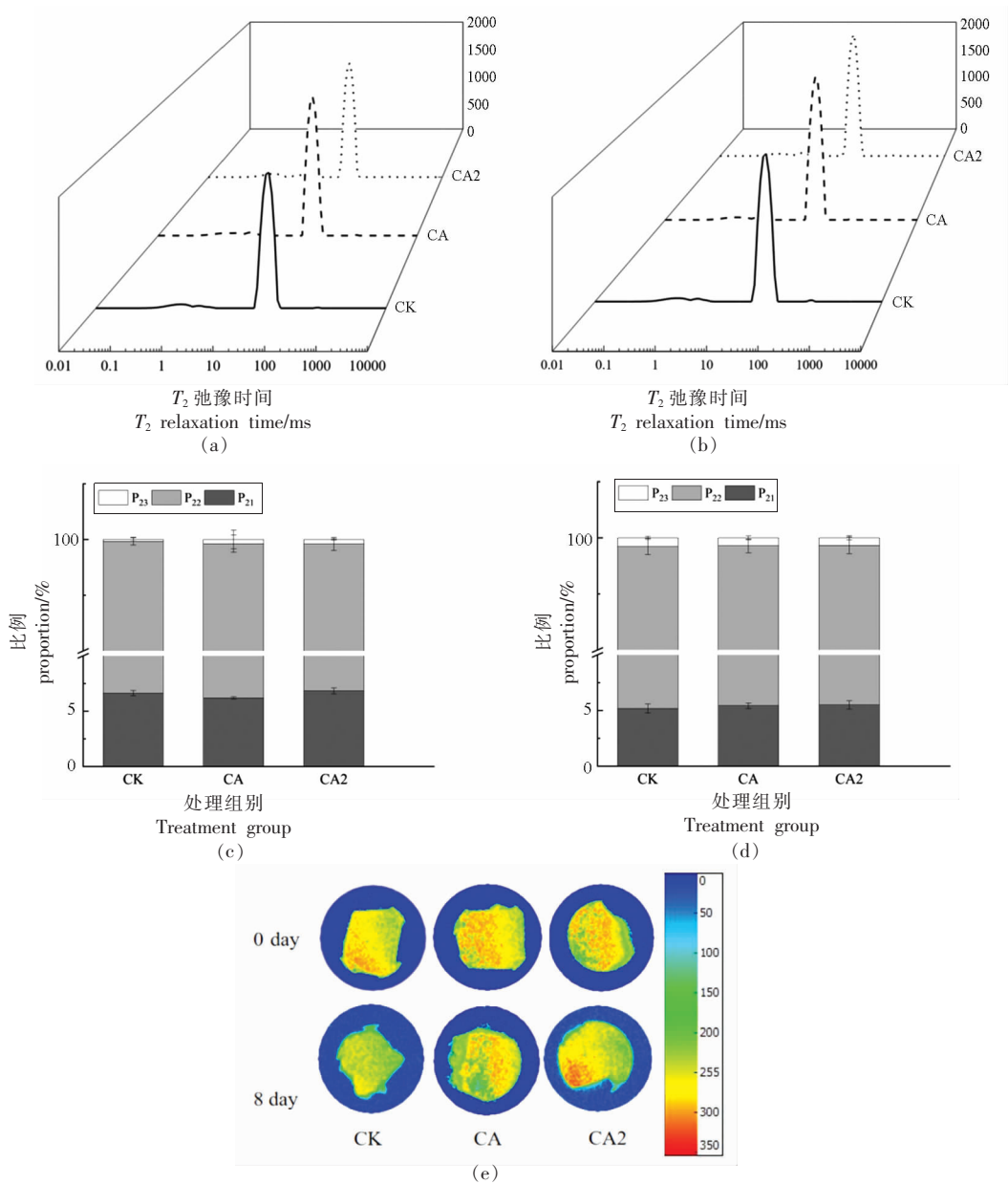
2.1.6 水分分布及核磁共振成像 图 5 为不同浓度的多酚及其复合物处理的金枪鱼 T_2 弛豫时间的分布情况。 T_2 弛豫时间可分为三部分,分别为 T_{21} (1~10 ms)、 T_{22} (40~60 ms)、 T_{23} (100 ms 以上),分别反映结合水、不易流动水和自由水。从图 5a、5b 中可以看出在 4℃条件下,第 0 天时各组的水分分布状态无明显差别,但贮藏 8 d 后水分状态发生变化,不易流动水逐渐变多;对照组的结合水的含量也有所降低,自由水相对含量增多。结合图 5c 及 5d 发现,在 0~8 d 内,各处理组的 T_{22} 峰面积略有降低但无明显变化,均在 93%~94%之间。对

照组的 T_{21} 峰面积有所减少,从 6.63%降至 5.12%,而 T_{23} 的峰面积显著增加,从 0.078%增加到 0.39%,说明对照组结合水减少,自由水含量显著增加。水分分布状态的变化可能与鱼肉蛋白结构的变化及鱼肉组织结构的变化有关,贮藏后期蛋白质结构发生变化、肌肉组织变得不完整,肌肉组织结构的破坏,降低了肌原纤维的持水能力。

T_1 加权成像是反映水分状态变化的主要方法之一,图像的颜色从红色到蓝色表明水的结合程度减弱。从图 5e 中可以看出,第 0 天时各个处理组的红色区域均分布较广,说明金枪鱼样品在新

鲜状态时水分分布较均匀,大部分以结合水的形式存在。在贮藏 8 d 后,样品的水分分布发生了明显的变化:对照组的结合水含量明显低于经绿原酸处理的样品,这说明水分状态发生了变化,水分

产生了迁移。另外,经低浓度(200 mg/kg 样品)绿原酸处理的样品与高浓度处理组相比,对于水分状态的保持效果也更好。这与上述 T_2 分布的变化也类似。



注:(a)和(c)为第 0 天,(b)和(d)为第 8 天,(e)为金枪鱼水分加权成像。

图 5 低温贮藏过程中蓝鳍金枪鱼水分 T_2 分布图

Fig.5 T_2 distribution of bluefin tuna during low temperature storage

2.1.7 肌肉微观结构变化分析 由图 6 可以看出,新鲜金枪鱼肉的肌纤维规则完整,肌纤维之间以及肌纤维与结缔组织排列紧密。在第 0 天时,经高浓度(400 mg/kg 样品)绿原酸处理的鱼肉组织

间稍有分离,在第 8 天时,对照组金枪鱼肉的肌纤维束收缩,间隙变大,肌纤维束产生不同程度的断裂,甚至出现明显的裂痕,从而导致鱼肉质地的软烂。经低浓度(200 mg/kg 样品)绿原酸处理的样品

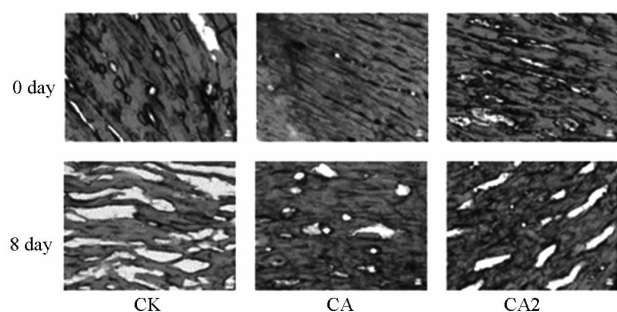


图6 低温贮藏过程中蓝鳍金枪鱼肌肉微观结构变化图

Fig.6 Microstructural changes of bluefin tuna muscle during low temperature storage

在低温贮藏8 d后仍能保持较为完整的肌肉结构,肌纤维束基本保持完整的形态。研究发现,添加绿原酸后可明显改善鸡肉的肌肉品质^[22],与本试验结果相似。

综合上述品质特性分析,可看出低浓度绿原酸(200 mg/kg 样品)对延缓金枪鱼肌肉品质劣变的效果更好,所以选取低浓度绿原酸进行后续试验。

2.2 绿原酸对肌红蛋白构象的影响分析

2.2.1 肌红蛋白二级结构的变化分析 拉曼光谱学是一种新兴且强大的光学技术,它已被广泛用于识别分子结构以及蛋白质的定性和定量分析。图7为肌红蛋白1 000~1 800 cm^{-1} 的拉曼光谱(a)

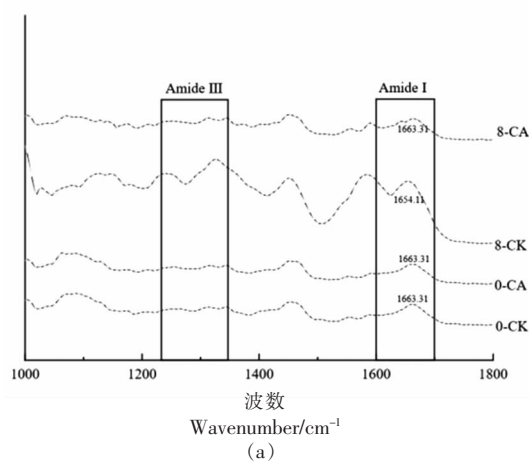


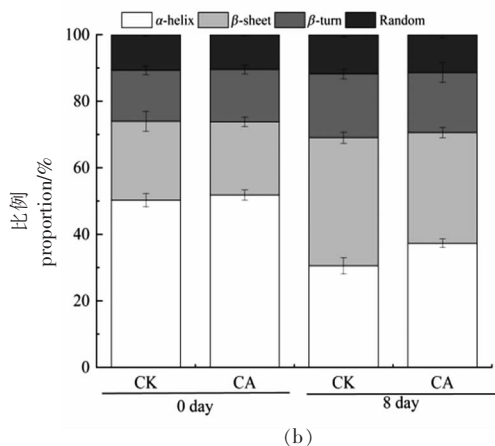
图7 肌红蛋白拉曼光谱(a)与二级结构(b)变化

Fig.7 Changes in the Raman spectrum (a) and secondary structural (b) of myoglobin

2.2.2 内源色氨酸荧光光谱与同步荧光光谱分析 内源性荧光光谱法可以评估蛋白质与外源性添

与二级结构(b)变化图,拉曼带的频率和强度反映了蛋白质的二级结构(α -螺旋、 β -折叠、 β -转角、无规则卷曲)和蛋白的局部环境的变化。一般来说,酰胺I带(Amide I, 1 600~1 700 cm^{-1})中蛋白质二级结构的特征条带分别位于1 645~1 660 cm^{-1} (α -螺旋)、1 670~1 680 cm^{-1} (β -折叠)、1 640~1 645 cm^{-1} ;1 680~1 690 cm^{-1} (β -转角)和1 660~1 665 cm^{-1} (无规则卷曲)处,酰胺I带范围内主要涉及肽基团的C=O伸缩。

蛋白质二级结构中最主要的构象是 α -螺旋,由图7b可知,在第0天时, α -螺旋比例最高,其次为 β -折叠、 β -转角和无规则卷曲,且添加绿原酸处理组与对照组相比无显著差异。经过8 d的贮藏后,各组 α -螺旋的比例显著下降($P < 0.05$),对照组从50.2%下降至30.5%,下降率为39.2%;绿原酸处理组的 α -螺旋比例从51.8%降至37.3%,下降率为28.0%。各组 β -折叠的比例显著增加,对照组、绿原酸处理组分别增加了15%,11%;且 β -转角与无规则卷曲含量也呈现了不同程度的增加趋势。根据上述结果分析绿原酸能够较好地维持蛋白质的二级结构。有研究显示,绿原酸可以稳定胶原蛋白分子,其结构中的酚羟基可以与胶原蛋白的侧链氨基产生共价交联^[25],这与本研究的结果相似。



加剂的相互作用,蛋白质的内源荧光主要来源于芳香族氨基酸(酪氨酸、苯丙氨酸和色氨酸),其中

色氨酸的量子产率最高^[26]。如图8a所示,在283 nm的激发波长下,观察到肌红蛋白在334 nm处有一个强发射峰。在第0天时,各组的荧光强度没有明显差异,当金枪鱼样品贮藏8 d后,可以看出对照组的荧光强度明显高于绿原酸处理组,可能是多酚或是分子之间相互碰撞,使蛋白的内源荧光发生不同程度的猝灭^[27],且绿原酸对肌红蛋白的猝灭效果最好。

同步荧光光谱通常用于揭示小分子对蛋白质和氨基酸微环境的影响,其重复性高、灵敏度好,可以有效降低干扰,是研究蛋白质构象变化的常用方法^[28]。当波长间隔($\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex}$)设定在15 nm时,同步荧光主要反映酪氨酸残基的情况,当 $\Delta\lambda = 60$ nm时,主要反映色氨酸周围的光谱特征;当最大发射波长(λ_{em})发生偏移时表示荧光分子周围的极性发生变化^[29]。

本研究使用同步荧光光谱进一步研究绿原酸对肌红蛋白内部微环境的极性及其蛋白质构象的变化。如图8b、8c所示,在加入绿原酸后,Trp残基($\Delta\lambda = 60$ nm)的荧光强度明显高于Tyr残基($\Delta\lambda = 15$ nm),这说明肌红蛋白自身的荧光主要来自于Trp残基。在第0天时,Trp残基和Tyr残基所对应的最大发射波长 λ_{em} 没有发生明显变化,说明肌红蛋白Trp残基和Tyr残基周围的微环境变化不大。在第8天时,经过绿原酸处理后,Tyr残基所对应的最大吸收波长 λ_{em} 发生轻微的红移,表明Tyr残基周围的疏水性减弱,绿原酸对肌红蛋白的内源荧光发生猝灭。

3 结论

在4℃贮藏期间,金枪鱼的品质特性发生了不同程度的劣变,表现为肉色褐变、红度值降低,脂肪氧化程度、MetMb相对含量升高,新鲜度指标如菌落总数和TVBN也呈上升趋势,水分状态由结合水向自由水转变,肌肉的肌纤维束收缩、间隙变大,产生不同程度的断裂。加入绿原酸后,能有效延缓金枪鱼肉的品质劣变,且低质量浓度(200 mg/kg 样品)的绿原酸效果最好。拉曼光谱结果显示,对照组和绿原酸处理组的 α -螺旋比例的下降率分别为39.2%和28.0%,说明绿原酸能够较好地

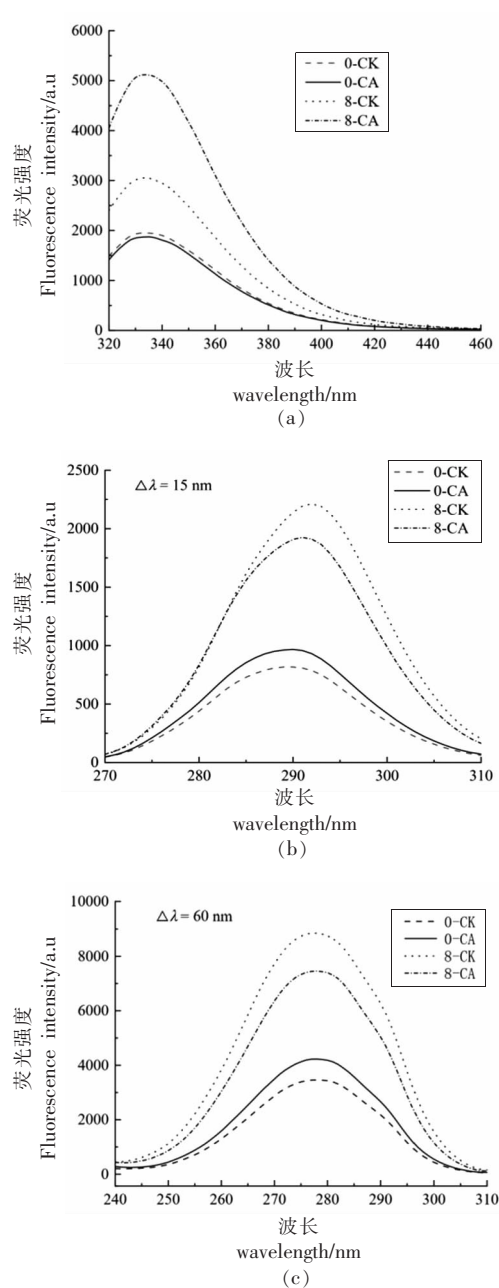


图8 绿原酸对肌红蛋白内源性色氨酸荧光光谱(a)和同步荧光光谱(b)(c)的影响

Fig.8 Effect of chlorogenic acid on endogenous tryptophan fluorescence spectrum (a) and synchronous fluorescence spectrum (b) (c) of myoglobin

稳定肌红蛋白的二级结构。内源荧光、同步荧光及三维荧光光谱显示,绿原酸对肌红蛋白均具有荧光猝灭效果。

参 考 文 献

- [1] NEETHLING N E, HOFFMAN L C, BRITZ T J, et al. Influence of carbon monoxide on the colour stability of defrosted yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) muscle stored under aerobic and anaerobic conditions[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2015, 95(8): 1605–1612.
- [2] HOA V B, CHO S H, SEONG P N, et al. The significant influences of pH, temperature and fatty acids on meat myoglobin oxidation: A model study[J]. Journal of Food Science and Technology, 2021, 58(10): 3972–3980.
- [3] LIU H, LI Q, ZHAO D, et al. Changes in the structure and digestibility of myoglobin treated with sodium chloride[J]. Food Chemistry, 2021, 363: 130284.
- [4] CHAUHAN S S, ENGLAND E M. Postmortem glycolysis and glycogenolysis: Insights from species comparisons[J]. Meat Science, 2018, 144: 118–126.
- [5] HASAN M M, SOOD V, ERKINBAEV C, et al. Principal component analysis of lipid and protein oxidation products and their impact on color stability in bison longissimus lumborum and psoas major muscles[J]. Meat Science, 2021, 178: 108523.
- [6] ZHU W H, HAN M L, BU Y, et al. Plant polyphenols regulating myoglobin oxidation and color stability in red meat and certain fish: A review[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2022, 64(8): 2276–2288.
- [7] 朱文卿, 朱珊珊, 何秋霞, 等. 牛蒡多糖与绿原酸对斑马鱼氧化损伤的协同抗氧化作用[J]. 中国食品学报, 2022, 22(4): 95–103.
- ZHU W Q, ZHU S S, HE Q X, et al. The synergistic antioxidant effect of burdock polysaccharides and chlorogenic acid on oxidative damage in zebrafish[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2022, 22(4): 95–103.
- [8] 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品 pH 值的测定: GB 5009.237–2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- National Health and Family Planning Commission. National food safety standard for determination of pH in food: GB 5009.237–2016[S]. Beijing: China Standard Press, 2016.
- [9] BENJAKUL S, BAUER F. Biochemical and physicochemical changes in catfish (*Silurus glanis linne*) muscle as influenced by different freeze–thaw cycles[J]. Food Chemistry, 2001, 72(2): 207–217.
- [10] KIM H J, YONG H I, PARK S, et al. Effects of dielectric barrier discharge plasma on pathogen inactivation and the physicochemical and sensory characteristics of pork loin[J]. Current Applied Physics, 2013, 13(7): 1420–1425.
- [11] 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品中挥发性盐基氮的测定: GB 5009.228–2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- National Health and Family Planning Commission. National food safety standard for determination of total volatile basic nitrogen in food: GB 5009.228–2016[S]. Beijing: China Standard Press, 2016.
- [12] 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定: GB 4789.2–2022[S]. 北京: 中国标准出版社, 2022.
- National Health and Family Planning Commission. National food safety standard for food microbiological examination determination of aerobic plate count: GB 4789.2–2022[S]. Beijing: China Standard Press, 2022.
- [13] 徐群英, 汪之和, 王立井, 等. 金枪鱼碎鱼肉中肌红蛋白的初步提取和纯化[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(1): 96–98.
- XU Q Y, WANG Z H, WANG L J, et al. Preliminary extraction and purification of myoglobin from minced tuna meat[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2006, 25(1): 96–98.
- [14] OCHIAI Y, CHOW C J, WATABE S, et al. Evaluation of tuna meat discoloration by hunter color difference scale[J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1988, 54(4): 649–653.
- [15] 尚艳丽, 杨金生, 霍健聪, 等. 运输过程中金枪鱼生鱼片色泽变化的模拟[J]. 食品工业, 2012, 33(11): 60–62.
- SHANG Y L, YANG J S, HUO J C, et al. Simulation of color change of tuna sashimi during transportation[J]. Food Industry, 2012, 33(11): 60–62.
- [16] 陈玲玲. 没食子酸对猪肉品质及脂肪沉积能力的影响[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2021.
- CHEN L L. Effects of gallic acid on the quality and fat deposition ability of pork[D]. Yangling: Northwest Agriculture and Forest Science and Technology Uni-

- versity, 2021.
- [17] SONNI F, MOORE E G, CLARK A C, et al. Impact of glutathione on the formation of methylmethine and carboxymethine-bridged (+)-catechin dimers in a model wine system[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(13): 7410–7418.
- [18] BAZARGANI-GILANI, BEHNAZ. Activating sodium alginate-based edible coating using a dietary supplement for increasing the shelf life of rainbow trout fillet during refrigerated storage [(4±1)°C][J]. *Journal of Food Safety*, 2018, 38(1): e12395.
- [19] 李双双, 夏松养, 李仁伟. 茶多酚对冻藏金枪鱼的保鲜效果研究[J]. *食品科技*, 2012, 37(12): 126–129.
- LI S S, XIA S Y, LI R W. Study on the preservation effect of tea polyphenols on frozen tuna[J]. *Food Science and Technology*, 2012, 37(12): 126–129.
- [20] 谢伊莎, 傅新鑫, 郑佳楠, 等. 天然保鲜剂对预制冷南美白对虾贮藏品质的影响[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(4): 264–270.
- XIE Y S, FU X X, ZHENG J N, et al. The effect of natural preservatives on the storage quality of pre-fabricated south american white shrimp[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(4): 264–270.
- [21] BU Y, HAN M L, TAN G Z, et al. Changes in quality characteristics of southern bluefin tuna (*Thunnus maccoyii*) during refrigerated storage and their correlation with color stability[J]. *LWT*, 2022, 154(15): 112715.
- [22] WEI P, ZHU K, CAO J, et al. The inhibition mechanism of the texture deterioration of tilapia fillets during partial freezing after treatment with polyphenols[J]. *Food Chemistry*, 2020, 335(15): 127647.
- [23] 王琳焱, 徐彬, 王丁, 等. 金银花提取物对肉鸡生产性能、屠宰性能、肉品质和抗氧化性能的影响[J]. *河南农业科学*, 2022, 51(10): 134–141.
- WANG L Y, XU B, WANG D, et al. Effects of honeysuckle extract on production performance, slaughtering performance, meat quality, and antioxidant performance of broilers[J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2022, 51(10): 134–141.
- [24] QIAN S, LI X, WANG H, et al. Effects of low voltage electrostatic field thawing on the changes in physicochemical properties of myofibrillar proteins of bovine longissimus dorsi muscle[J]. *Journal of Food Engineering*, 2019, 261: 140–149.
- [25] ZHU L, SUN X, FAN Y, et al. Effects of gallic acid and chlorogenic acid on physicochemical, microstructural and thermal degradation properties of ready-to-eat sea cucumber[J]. *Food Chemistry*, 2022, 380: 132186.
- [26] HINDERINK E B A, BERTON-CARABIN C C, SCHROËN K, et al. Conformational changes of whey and pea proteins upon emulsification approached by front-surface fluorescence[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(23): 6601–6612.
- [27] 严新宇. 表儿茶素没食子酸酯和牛血清白蛋白在不同金属离子下的作用[D]. 聊城: 聊城大学, 2018.
- YAN X Y. Effects of epicatechin gallate ester and bovine serum albumin on different metal ions[D]. Liaocheng: Liaocheng University, 2018.
- [28] CHEN C, SUN-WATERHOUSE D, ZHAO J, et al. Soybean protein isolate hydrolysates-liposomes interactions under oxidation: mechanistic insights into system stability[J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 112: 106336.
- [29] MA Y J, WU J H, LI X, et al. Effect of alkyl distribution in pyrazine on pyrazine flavor release in bovine serum albumin solution[J]. *RSC Advances*, 2019, 9(63): 36951–36959.

Effect of Chlorogenic Acid on Quality and Myoglobin Conformation of Bluefin Tuna

Zhu Wenhui, Fan Maomei, Han Menglin, Bu Ying*, Li Xuepeng, Li Jianrong

(Engineering and Technology Research Center of Food Preservation, Processing and Safety Control of Liaoning Province, College of Food Science and Engineering, Bohai University, Jinzhou 121013, Liaoning)

Abstract Taking bluefin tuna as the research object, the effects of different concentrations of chlorogenic acid (200 mg/

kg sample, 400 mg/kg sample) on tuna meat color, protein and fat oxidation, freshness, water distribution, muscle microstructure and other quality characteristics during low-temperature storage were investigated. Based on this, the effects of chlorogenic acid on myoglobin structure and microenvironment were further explored through Raman spectroscopy and fluorescence spectroscopy. The results showed that adding chlorogenic acid effectively delayed the browning of bluefin tuna meat, inhibit protein oxidation and fat oxidation, and maintain the freshness of the sample. Compared with the treatment group, the muscle fiber bundles of the control group samples contracted and the gaps became larger, resulting in varying degrees of breakage. Overall, the effect of low concentration of chlorogenic acid is better than that of high concentration treatment group. The multispectral results showed that chlorogenic acid had a fluorescence quenching effect on myoglobin; and the decrease of α -helix ratio was 39.2% and 28.0% in the control and CA treated groups, respectively, indicating that chlorogenic acid can effectively stabilize the secondary structure of myoglobin.

Keywords bluefin tuna; chlorogenic acid; myoglobin; color; quality