

组织蛋白酶D对哈氏仿对虾肌肉蛋白质功能特性的作用效果

杨榕琳¹, 郑文雄¹, 水珊珊^{1*}, 周婷¹, 房传栋¹, 李川², 张宾¹

(1. 浙江海洋大学食品与药学学院, 比萨海洋研究生学院, 浙江舟山 316022)

(2. 海南大学食品科学与工程学院, 海南海口 570228)

摘要: 以哈氏仿对虾为研究对象, 通过构建体外模拟, 探究其经组织蛋白酶D处理后肌肉蛋白质功能特性和微观结构的变化。提取哈氏仿对虾肌肉肌原纤维蛋白、肌动蛋白和肌浆蛋白, 分别添加(实验组)或不添加(对照组)组织蛋白酶D, 50℃孵育30 min, 测定其浊度、表面疏水性、内源荧光性、游离氨基酸含量和粒径等指标。结果表明, 与对照组相比, 实验组呈现较高的浊度和表面疏水性($P<0.05$), 较低的内源荧光性、游离氨基酸含量和粒径。其中, 实验组三类蛋白的浊度为0.45、0.45和0.42, 溴酚蓝结合量分别为9.66、56.30和2.34 μg , 均高于对照组。同时, 实验组中三类蛋白粒径分别比对照组小819.8、3 230.3和1 459.8 nm, 且实验组三类蛋白的Gly、Ala等部分具有抗氧化性的氨基酸显著低于对照组。研究表明: 组织蛋白酶D可显著降解哈氏仿对虾肌肉肌原纤维蛋白、肌动蛋白和肌浆蛋白, 破坏三种蛋白的功能特性, 促使虾肉软化自溶。该本文为组织蛋白酶D体外模拟研究及哈氏仿对虾贮藏品质保障提供理论基础。

关键词: 哈氏仿对虾; 组织蛋白酶D; 体外模拟; 蛋白质功能特性; 贮藏品质

文章编号: 1673-9078(2025)06-86-94

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.6.0616

Effects of Cathepsin D on the Functional Properties of Muscle Proteins in *Parapenaeopsis hardwickii*

YANG Ronglin¹, ZHENG Wenxiong¹, SHUI Shanshan^{1*}, ZHOU Ting¹, FANG Chuandong¹, LI Chuan²,
ZHANG Bin¹

(1. College of Food Science and Pharmacy, Pisa Marine Graduate School, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China) (2. College of Food Science and Engineering, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: Cathepsin D plays a potential role in the degradation of muscle proteins, thereby influencing their functional properties and structural integrity. The changes in functional properties and microstructure of muscle proteins in *Parapenaeopsis hardwickii* treated with cathepsin D were investigated through *in vitro* simulation. Myofibrillar, actin, and myosin were extracted from the muscle of *Parapenaeopsis hardwickii*. The changes in functional properties and microstructure of muscle proteins were determined by measuring turbidity, surface hydrophobicity, endogenous fluorescence, free amino acid content, and particle size. The results showed that compared with the control group, the experimental group presented higher turbidity and surface hydrophobicity ($P<0.05$), lower endogenous fluorescence, free amino acid content, and particle size. Among them, the turbidity of the three proteins in the experimental group was 0.45, 0.45, and 0.42, the bromophenol blue binding amount was 9.66, 56.30, and 2.34 μg , all of which were higher than the control group. At the same time, the particle size of the three proteins in the experimental group was 819.8, 3 230.3, and 1 459.8 nm smaller than the control group, and the amino acids Gly, Ala, etc. in the experimental group had significantly lower antioxidant properties than the control group. The study showed that cathepsin D could significantly degrade the myofibrillar protein, actin, and myosin of *Parapenaeopsis hardwickii*, destroy the functional properties of the three proteins, and promote the softening and self-dissolution of the shrimp meat. This article provides a theoretical basis for the *in vitro* simulation research and storage quality guarantee of *Parapenaeopsis hardwickii*.

引文格式:
杨榕琳, 郑文雄, 水珊珊, 等. 组织蛋白酶D对哈氏仿对虾肌肉蛋白质功能特性的作用效果[J]. 现代食品科技, 2025, 41(6): 86-94.

YANG Ronglin, ZHENG Wenxiong, SHUI Shanshan, et al. Effects of cathepsin D on the functional properties of muscle proteins in *Parapenaeopsis hardwickii* [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(6): 86-94.

收稿日期: 2024-05-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(32301972&U23A20263); 国家重点研发计划项目(2021YFD2100504); 浙江省教育厅科研项目(Y202352894); 浙江省省属高校科研院所基本科研业务费(2024J003)

作者简介: 杨榕琳(1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 水产食品分子营养、水产品加工及贮藏, E-mail: 1025333166@qq.com

通讯作者: 水珊珊(1989-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 水产食品分子营养, E-mail: shuiss@zjou.edu.cn

and sarcoplasmic proteins were extracted from *P. hardwickii* muscles and were divided into the experimental (treated with cathepsin D) and control (which received no enzyme treatment) groups. All samples were incubated at 50 °C for 30 min. The turbidity, surface hydrophobicity, endogenous fluorescence, free amino acid content, and particle size were measured. Compared with the control groups, the experimental groups exhibited significantly higher turbidity and surface hydrophobicity ($P<0.05$) but lower endogenous fluorescence, free amino acid content, and particle size. Turbidity values of the three proteins in the experimental groups were 0.45, 0.45, and 0.42, respectively. The amounts of bound bromophenol blue were 9.66, 56.30, and 2.34 μg , respectively, exceeding those noted in the control groups. Furthermore, the particle sizes of the three proteins in the experimental groups were 819.8, 3 230.3, and 1 459.8 nm smaller than those of the control groups. The levels of antioxidant amino acids (such as glycine and alanine) in the three protein types within the experimental groups were also significantly lower than those in the control group. These results indicate that cathepsin D effectively degrades myofibrillar, actin, and sarcoplasmic proteins in the muscles of *P. hardwickii*, thereby disrupting their functional properties and promoting muscle softening and autolysis. These findings provide a theoretical basis for *in vitro* simulation of cathepsin D and storage quality control of *P. hardwickii*.

Key words: *Parapenaeopsis hardwickii*; cathepsin D; *in vitro* simulation; functional characteristics of proteins; storage quality

哈氏仿对虾 (*Parapenaeopsis hardwickii*), 又称滑皮虾, 是十足目 (Decapoda) 仿对虾属的甲壳类动物。该虾生长在水深 5~90 m 范围内的近岸海底, 为暖水性虾类, 主要分布在马来西亚、印度、日本和新加坡, 以及我国黄海南岸, 东海和南海等海域^[1], 是浙江舟山群岛外海域秋季优势种之一。哈氏仿对虾肉质鲜美, 富含蛋白质、脂肪酸和矿物质等营养物质, 可以生食, 也可被加工成虾干等各类水产制品。哈氏仿对虾在运输、贮藏和销售过程中, 常用低温贮藏方式以保持其产品品质, 但仍会出现肌肉自溶等劣变现象, 从而降低经济效益。因此, 解决哈氏仿对虾在贮运过程中出现的品质问题, 对保障虾类制品经济效益有着重要意义。

内源性蛋白酶是肌肉组织中典型的水解酶, 能催化肌肉蛋白质肽键水解, 导致水产品品质下降。相关研究表明: 虾体自溶现象的出现主要是由虾体自身内源性蛋白酶催化肌肉蛋白质降解反应引起的^[2]。Pornrat 等^[3]研究发现, 罗氏沼虾内源性蛋白酶加快蛋白质降解, 致其冷藏 3 d 后肌肉硬度下降。Zhou 等^[4]亦印证了哈氏仿对虾中的内源蛋白酶会破坏肌肉蛋白功能特性。其中, 位于肌肉组织的组织蛋白酶在虾类肌肉降解过程中发挥的作用不容小觑。水产品中的组织蛋白酶种类大致为半胱氨酸蛋白酶 (组织蛋白酶 B、H 和 L)、天冬

氨酸蛋白酶 (组织蛋白酶 D、E) 和丝氨酸蛋白酶 (组织蛋白酶 A、G), 这三类酶的蛋白水解活性中心各不相同^[5]。

组织蛋白酶 D 是溶酶体内的一种肽链内肽酶, 在虾体内参与溶酶体消化, 激活组织蛋白酶 B 和 L 的酶原以及调节细胞的程序性死亡等多种生理活动^[6,7]。课题组前期检测了哈氏仿对虾死后肌肉中四种主要组织蛋白酶 (组织蛋白酶 B、D、H 及 L) 的活性, 结果表明, 组织蛋白酶 D 的活性最高^[1]。目前, 对于水产品组织蛋白酶 D 的研究也有相关报道。Jiang 等^[8]研究发现: 罗非鱼肌肉组织蛋白酶 D 于 37 °C 下活性最高, 其最适 pH 值为 3.5。王玲等^[9]的研究表明: 刺参的组织蛋白酶 D 的最适温度为 60 °C, 最适 pH 值为 5.0。由此可知, 组织蛋白酶 D 最适 pH 值和最适温度因其来源不同而存在差异。然而, 关于组织蛋白酶 D 对哈氏仿对虾肌肉蛋白质功能特性的研究, 仍鲜有报道。

该文以哈氏仿对虾为对象, 将从虾体中提取的组织蛋白酶 D 分别与肌原纤维蛋白、肌动蛋白和肌浆蛋白于 50 °C 进行恒温孵育, 构建体外模拟体系, 测定该体系中蛋白质浊度、表面疏水性、内源荧光性、游离氨基酸以及粒径等指标, 以探究组织蛋白酶 D 对其肌肉微观结构和蛋白质功能特性的影响, 为后续哈氏仿对虾的品质保障提供理论借鉴和参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验原料

哈氏仿对虾(体长8 cm左右),购自舟山国际水产城。哈氏仿对虾由捕捞船捕捞后置于碎冰中运输至岸,将其当天购买后,置于装有碎冰的保温箱内,并于30 min内运回实验室,备用。

1.1.2 主要试剂

三氯乙酸(TCA)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、磷酸氢二钾(K_2HPO_4)、磷酸二氢钾(KH_2PO_4)、乙二醇双四乙酸(EGTA)、Tris-马来酸缓冲液、溴酚蓝溶液(BPB)、氯化钾(KCl)以及甘氨酸-盐酸缓冲溶液(Gly-HCl)等,国药集团化学试剂有限公司;乙二胺四乙酸(EDTA)、氯化钠(NaCl)等,美国Sigma公司;以上所用试剂均为分析纯(AR)。

1.1.3 主要仪器

FJ200-S型数显高速均质机,湖南力辰仪器科技有限公司;751UVGD型紫外-可见分光光度计,上海第三分析仪器厂;DiRECT-Q型超纯水装置,美国Millipore公司;MDF-U53V型超低温冰箱,日本Sanyo公司;HHS-21-4型电热恒温水浴锅,上海博迅实业有限公司医疗设备;RF-5301PC型荧光光谱仪,美国Pe公司;Zetasizer Nano ZS型纳米粒度仪,上海思百吉仪器系统有限公司;LA8080型高速氨基酸分析仪,日本株式会社日立高新技术科学那珂事业所。

1.2 实验方法

1.2.1 组织蛋白酶D提取与制备

参照郭晓坤等^[10]方法。选取多只虾第二腹节,按料液比1:6(g/mL)加入Gly-HCl缓冲溶液(50 mmol/L, pH值为3.0),于6 000 r/min匀浆3 min后,浸提1 h。将混合液离心30 min(8 500 r/min),粗酶液即为所取上清液,上述过程均在4℃环境下进行。

1.2.2 肌原纤维蛋白提取与制备

参照贾世亮等^[11]报道并稍作修改。称取第二腹节虾肉2.0 g(精确到 ± 0.001 g),加入9倍体积的20 mmol/L Tris-马来酸缓冲液(含50 mmol/L KCl, pH值为7.0)后进行均质20 s,10 000 r/min条件下离心15 min,弃去上清液。取沉淀用上述缓冲液重复洗涤2次;收集沉淀,加入9倍体积的20 mmol/L

Tris-马来酸缓冲液(含0.6 mol/L KCl, pH值为7.0)混匀均质20 s,静置提取1 h,10 000 r/min离心15 min,取上清液,即为肌原纤维蛋白,上述过程均于4℃环境下进行,用双缩脲法测定其浓度。

1.2.3 肌动蛋白提取与制备

参照Dai等^[12]方法并稍作修改。取2.0 g第二腹节虾肉(精确到 ± 0.001 g),加入10倍体积预冷的0.6 mol/L KCl匀浆后,浸提1.5 h。将混合物5 000 r/min离心30 min,取10 mL上清液,加入30 mL去离子水,5 000 r/min离心20 min。取沉淀加入30 mL 1.2 mol/L KCl溶液,放置30 min,每隔10 min搅拌一次,不溶部分再次离心(5 000 r/min, 20 min)。最终所得上清液即为肌动蛋白,上述过程均在4℃环境下进行,用双缩脲法测定其浓度。

1.2.4 肌浆蛋白提取与制备

参照左硕静等^[13]方法并稍作修改。称取2.0 g第二腹节虾肉(精确到 ± 0.001 g),加入20 mL 0.02 mol/L的磷酸盐缓冲液(pH值为6.5,含100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA),高速匀浆后(6 000 r/min, 3 min)。4℃10 000 r/min离心20 min,上清液即为肌浆蛋白,用双缩脲法测定其浓度。

1.2.5 体外模拟体系构建

参照刘丽媛等^[14]方法并稍作修改。将上述操作所得肌原纤维蛋白溶液、肌球蛋白溶液和肌浆蛋白溶液的质量浓度调节为2 mg/mL,取1倍体积蛋白溶液,用1 mol/L的盐酸调节pH值至3.0,而后加入5倍体积上述组织蛋白酶D粗酶溶液,适度搅拌,水浴加热至50℃后恒温孵育2 h,再置于沸水浴中灭酶15 min,为实验组样品。另取相同浓度的1倍体积蛋白溶液和5倍体积的Gly-HCl缓冲溶液(不含组织蛋白酶D)进行混合后相同处理,为对照组样品。用上述蛋白提取液将实验组和对照组蛋白溶液稀释至2 mg/mL,以用于后续指标测定。

1.2.6 指标测定

1.2.6.1 浊度测定

参考郑文雄等^[15]方法并略作修改。分别取上述对照组和实验组的蛋白溶液2 mL,室温下恒温20 min后,于340 nm波长下分别测定以上溶液吸光度值,测定值即为蛋白溶液浊度。

1.2.6.2 表面疏水性测定

参考Chelh等^[16]方法并稍作修改。取对照组和实验组的三类蛋白溶液各2 mL,加入200 μ L 1 mg/mL溴

酚蓝 (BPB) 溶液, 室温下搅拌 10 min 后, 8 000 r/min 离心 15 min, 在 595 nm 处测定其吸光度值, 记为 D_{595} 。使用 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 值为 6.0) 加 BPB 作为对照组, 在 595 nm 处测定上清液的吸光度值 D_0 。

1.2.6.3 内源荧光性测定

参考 Sun 等^[17]方法并稍加修改。将对照组和实验组的蛋白溶液分别稀释到 0.5 mg/mL, 以 0.6 mol/L NaCl 溶液作为空白对照, 通过荧光光谱仪对样品进行光谱测定 (扫描范围为 300~500 nm, 发射范围为 300~400 nm, 激发波长 295 nm, 激发狭缝设为 15 nm), 用荧光分光光度计测定, 并记录内源荧光光谱的最大荧光发射波长 ($\lambda_{\max}$) 以用于分析。

1.2.6.4 游离氨基酸含量测定

参考董诗瑜等^[18]报道并稍加修改, 精确量取对照组和实验组的蛋白溶液 0.5 mL, 加入 15 mL 5% TCA 溶液匀浆后, 超声处理 5 min。静置 1 h 后, 离心 (15 000 r/min, 10 min)。取 5 mL 上清液 (pH 值为 2.0) 定容至 10 mL, 经 0.22 μm 水系微孔滤膜过滤后, 置于高速氨基酸分析仪上机测定。

1.2.6.5 粒径分析测定

参考 Zhan 等^[19]方法并略加修改。将从将对照组和实验组的蛋白溶液置于石英比色皿中, 用激光束照射, 于室温下采用动态光散射法测定, 测定范围为 0.3~10.0 μm 。

1.3 数据分析

以上样品测定均平行三次 ($n=3$)。采用 SPSS 20 和 Origin 2021 进行统计分析, 结果均表示为平均值 $\pm$ 标准差。比较平均值采用单因素 ANOVA 检验中的最小显著差异法 (LSD) 和沃勒-邓肯 (W), $P<0.05$ 视为显著差异。

2 结果与分析

2.1 组织蛋白酶D处理对蛋白质浊度的影响

浊度反映了整个蛋白质溶液体系中悬浮颗粒对于可见光的散射情况, 浊度大小受溶液中颗粒含量、尺寸和散射特性等因素影响, 可用于表征蛋白质聚集程度^[15]。由图 1 可知, 实验组哈氏仿对虾的肌原纤维蛋白、肌动蛋白和肌浆蛋白浊度均显著大于对照组 ($P<0.05$), 其中, 肌浆蛋白浊度与对照组差异最显著 ($P<0.05$), 比对照组高出 0.30。而肌原纤维蛋白和肌动蛋白的浊度分别比对照组高 0.21 和

0.18, 与对照组存在显著性差异 ($P<0.05$)。其原因可能是组织蛋白酶 D 破坏了蛋白质结构, 引起其内部基团暴露和蛋白质聚集程度增加, 导致浊度上升。这与李志鹏等^[20]研究结果相似, 即胰蛋白酶作用下中华管鞭虾肌原纤维蛋白浊度是对照组的 1.53 倍, 可知胰蛋白酶的添加可导致中华管鞭虾肌原纤维蛋白浊度显著增大。

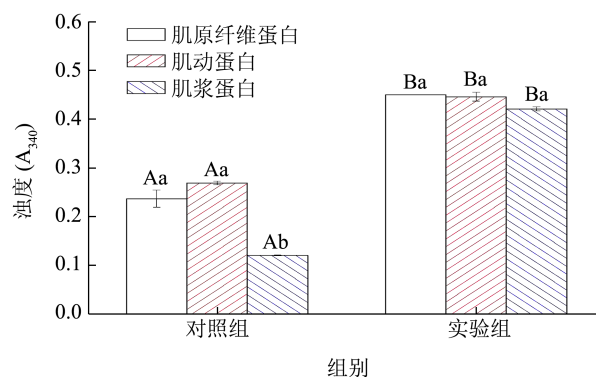


图 1 体外模拟中肌原纤维蛋白、肌动蛋白和肌浆蛋白浊度的变化

Fig.1 Changes in turbidity of myofibrillar protein, actin, and sarcoplasmic protein *in vitro* simulation

注: 不同大写字母表示对照组与实验组之间存在显著性差异, 不同小写字母表示同个组别不同蛋白之间存在显著性差异 ($P<0.05$), 下同。

2.2 组织蛋白酶D处理对蛋白质表面疏水性的影响

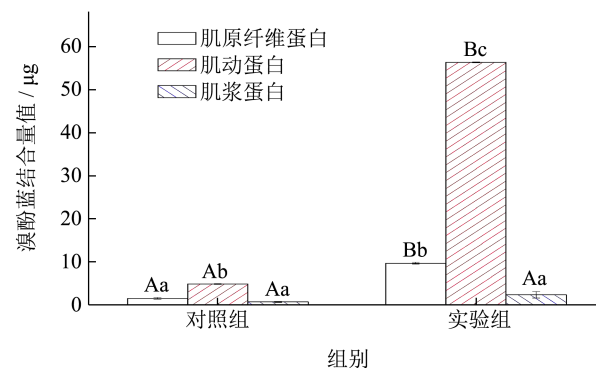


图 2 体外模拟中肌原纤维蛋白、肌动蛋白和肌浆蛋白表面疏水性的变化

Fig.2 Changes in surface hydrophobicity of myofibrillar protein, actin and sarcoplasmic protein *in vitro* simulation

溴酚蓝 (Bromophenol Blue, BPB) 结合能力 (量值) 是用于评估和表征蛋白质的表面疏水性、表示氨基酸相对含量、衡量蛋白质变性的重要指标^[21]。由图 2 可得, 与对照组相比, 实验组哈氏仿

对虾肌原纤维蛋白、肌动蛋白和肌浆蛋白的溴酚蓝结合量均增加，其中肌动蛋白的溴酚蓝结合量变化最为明显，高于对照组 11.6 倍 ($P<0.05$)，肌原纤维蛋白的溴酚蓝结合量比对照组高 8.16 μg ，肌浆蛋白变化不明显 ($P>0.05$)，仅比对照组高 1.64 μg 。这可能是因为组织蛋白酶 D 加速了肌原纤维蛋白和肌动蛋白氧化，破坏了蛋白质中的氢键及其内部疏水结合力，引起其蛋白结构展开，最终导致表面疏水性增加，蛋白质变性加剧^[22]。李志鹏等^[20]亦证实了这个观点，通过研究胰蛋白酶处理对中华管鞭虾肌肉品质的影响，发现对照组和胰蛋白酶处理组的表面疏水性均不断上升，其中胰蛋白酶处理组溴酚蓝结合量的增长速度显著大于对照组 ($P<0.05$)，表明酶处理破坏了蛋白间疏水基之间的相互作用，从而降低了虾的持水性。

2.3 组织蛋白酶D处理对蛋白质内源荧光性的影响

内源荧光光谱能够检测蛋白质中色氨酸残基氧化程度及其微环境变化，可用于表征蛋白质氧化对蛋白质结构的影响^[17]。组织蛋白酶 D 对哈氏仿对虾肌原纤维蛋白、肌动蛋白和肌浆蛋白内源荧光性的影响如图 3 所示。结果可知，实验组哈氏仿对虾中的三类蛋白质内源荧光强度均低于对照组，可能

是由于组织蛋白酶 D 的催化作用引发蛋白质变性和空间结构部分展开，促使蛋白质内部的色氨酸残基暴露和三级结构变化，最终导致内源荧光强度降低^[23]。胡学佳等^[24]通过添加不同蛋白酶至红娘鱼鱼肉粉中，发现碱性蛋白酶水解液的荧光强度高于其他组（中性蛋白酶组、木瓜蛋白酶组、风味蛋白酶组、复合蛋白酶组以及未处理组），表明碱性蛋白酶水解物有更多的蛋白分子结构展开并将包埋在蛋白中的色氨酸残基暴露在水解液中，这与该研究内容相似。

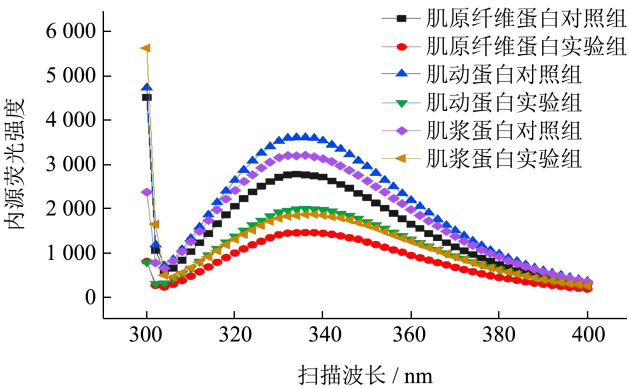


图 3 体外模拟中肌原纤维蛋白、肌动蛋白和肌浆蛋白内源荧光性的变化

Fig.3 Changes in endogenous fluorescence of myofibrillar protein, actin, and sarcoplasmic protein in vitro simulation

表 1 体外模拟中肌原纤维蛋白、肌动蛋白和肌浆蛋白游离氨基酸成分的变化 (mg/100 mL)

Table 1 Changes in free amino acid components of myofibrillar protein, actin, and sarcoplasmic protein in vitro simulation

游离氨基酸	对照组			实验组		
	肌原纤维蛋白	肌动蛋白	肌浆蛋白	肌原纤维蛋白	肌动蛋白	肌浆蛋白
天门冬氨酸 (Asp)	0.28	0.27	0.77	ND	ND	0.50
苏氨酸 (Thr)	8.45	8.25	22.00	ND	0.36	19.50
丝氨酸 (Ser)	2.55	2.40	8.90	ND	ND	8.60
谷氨酸 (Glu)	1.25	1.30	4.05	ND	ND	3.10
甘氨酸 (Gly)	140.00	130.00	150.00	ND	2.25	45.00
丙氨酸 (Ala)	5.25	5.35	12.00	ND	ND	7.10
半胱氨酸 (Cys)	ND	ND	0.22	ND	ND	ND
缬氨酸 (Val)	1.60	1.50	4.40	ND	ND	4.40
蛋氨酸 (Met)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
异亮氨酸 (Ile)	ND	ND	1.90	ND	ND	1.65
亮氨酸 (Leu)	ND	ND	4.10	ND	ND	3.50
酪氨酸 (Tyr)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
苯丙氨酸 (Phe)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
赖氨酸 (Lys)	1.00	0.98	4.05	ND	ND	3.90
组氨酸 (His)	0.95	0.92	2.50	ND	ND	1.80
精氨酸 (Arg)	29.00	28.00	57.00	ND	ND	44.00

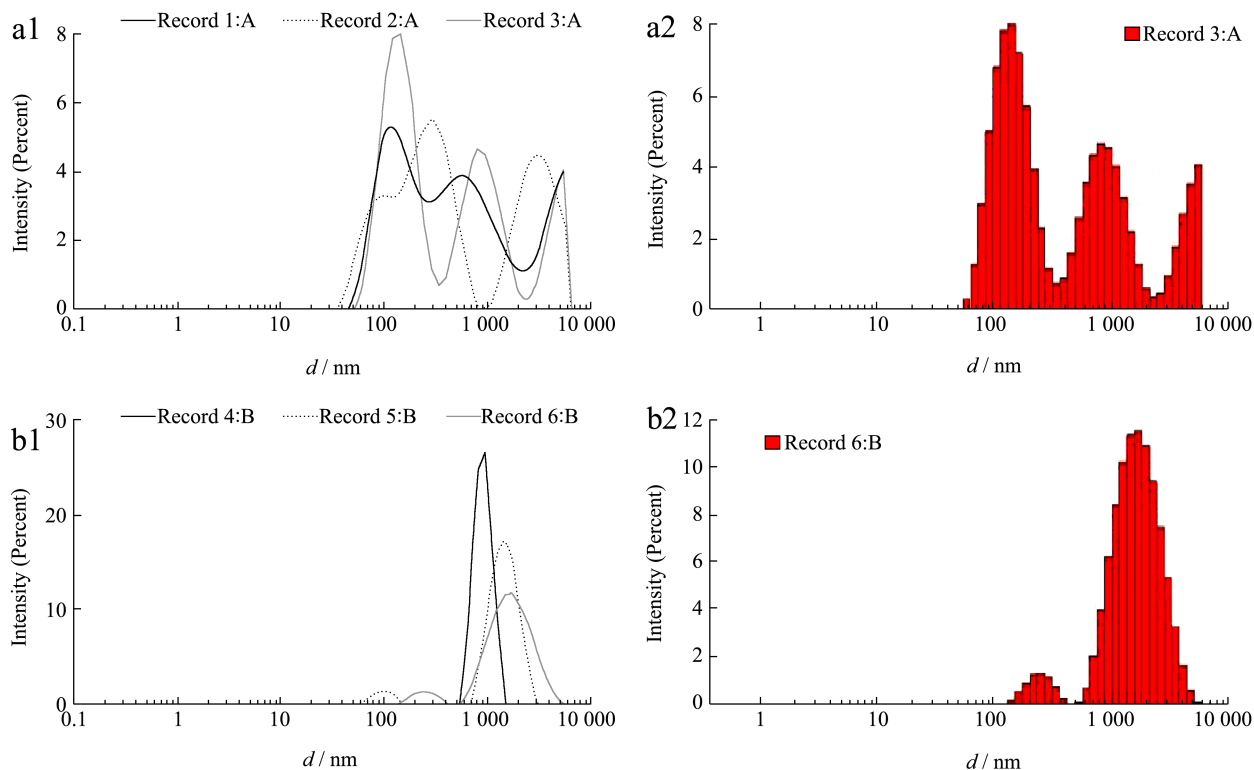
2.4 组织蛋白酶D处理对蛋白质游离氨基酸含量的影响

游离氨基酸是重要的风味活性成分之一,呈现酸、甜、苦等不同的滋味,且其含量会直接影响水产品的口感和品质^[18]。在组织蛋白酶D对哈氏仿对虾肌原纤维蛋白、肌动蛋白以及肌浆蛋白影响的体外模拟中,游离氨基酸成分变化如表1所示。有相关报道显示,Gly、Ala、Cys、Val、Met、Leu以及芳香族氨基酸Phe和Tyr等能通过清除自由基或者提供氢等途径,降低自由基链式反应速率,甚至终止反应^[25-27],从而起到抑制蛋白分解的作用。与对照组相比,实验组中肌原纤维蛋白的Gly、Ala、Val含量分别从140.00、5.25、1.60 mg/100 mL下降至无法检测;肌动蛋白的Gly含量从130 mg/100 mL下降至2.25 mg/100 mL,Ala、Val含量从5.35、1.50 mg/100 mL下降至无法检测;肌浆蛋白Gly、Ala、Leu含量分别从150.00、120.00、4.10 mg/100 mL下降至45.00、7.10、3.50 mg/100 mL,Cys含量从0.22 mg/100 mL下降至无法检测。表明组织蛋白酶D发生催化作用降低了氨基酸对肌肉自由基清除率,加速了肌肉分解和蛋白质氧化,即实验组哈氏仿对虾中的肌原纤维蛋白、肌动蛋白和肌浆蛋白分解速度均加快。李志鹏^[20]在利用体外模拟研究胰蛋白酶对中华管鞭虾虾肉品质的影响实验中,发现经胰蛋

白酶处理后,肌原纤维蛋白中Val、Ala、Lys、Tyr、Glu等具有抗氧化性的氨基酸低于对照组,说明在胰蛋白酶能加速虾肌肉蛋白质的氧化分解,与该研究结果相吻合。

2.5 组织蛋白酶D处理对蛋白质粒径的影响

蛋白质的粒径可以直接反映蛋白质功能特性和蛋白质构象变化,被广泛用于量化肉制品在贮藏过程中蛋白质的破坏程度^[28]。组织蛋白酶D与哈氏仿对虾肌肉蛋白质体外模拟过程的粒径变化如图4所示。其中,图a、c、e分别表示虾肌原纤维蛋白、肌动蛋白、肌浆蛋白未加酶对照组的粒径变化情况;图b、d、f分别代表虾肌原纤维蛋白、肌动蛋白、肌浆蛋白实验组的粒径变化情况。结果可得,组织蛋白酶D处理导致虾肌肉中肌原纤维蛋白、肌动蛋白和肌浆蛋白的粒径减小,与对照组相比分别减少了819.8、3 230.3和1 459.8 nm,这可能是由于组织蛋白酶D处理加速了蛋白质降解,进而导致粒径减小,肌肉品质下降。Zhan等^[19]研究表明:经类胰蛋白酶处理并体外培育6 h的虾肉肌原纤维蛋白粒径降低,小颗粒(<100 μm)占颗粒总数的35%,与该研究结果相符,此外,芦江会等^[29]研究表明粒径的降低还可能与蛋白质分子间的相互作用力被破坏有关。



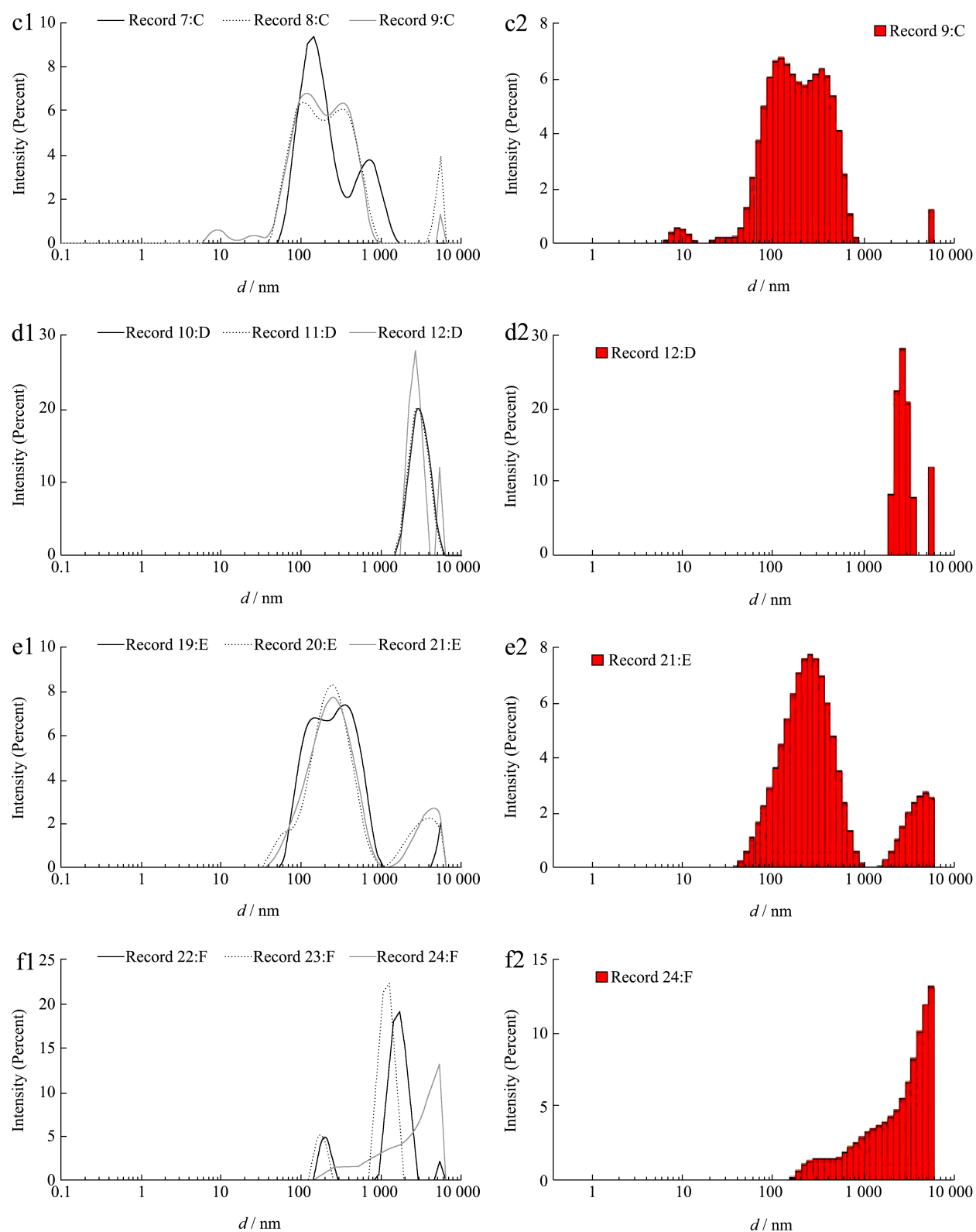


图4 体外模拟中肌原纤维蛋白、肌动蛋白和肌浆蛋白粒径的变化

Fig.4 Changes in particle size of myofibrillar protein, actin, and sarcoplasmic protein *in vitro* simulation

注:a: 肌原纤维蛋白对照组, b: 肌原纤维蛋白实验组, c: 肌动蛋白对照组, d: 肌动蛋白实验组, e: 肌浆蛋白对照组, f: 肌浆蛋白实验组。

3 结论

该文探究了组织蛋白酶 D 对哈氏仿对虾肌肉蛋白质功能特性的影响。实验结果显示,与对照组相比,实验组浊度和表面疏水性较高,内源荧光性及部分氨基酸含量较低(如虾肌原纤维蛋白和肌动蛋白中的 Gly、Ala、Val 以及肌浆蛋白中 Gly、Ala、Leu、Cys 等氨基酸),说明在组织蛋白酶 D 催化下,肌肉蛋白分解和氨基酸氧化加速,功能特性受到损害。在该过程中,肌动蛋白和肌浆蛋白受损最为严重。同时,组织蛋白酶 D 处理的哈氏仿对虾蛋白质粒径显著低于对照组,说明组织蛋白酶 D 破坏了哈氏仿对虾肌肉蛋白质骨架的稳定性和完整性,使得蛋白质粒径变小,小颗粒数目增多,继而导致虾肌肉品质劣变。综合以上结果可知,组织蛋白酶 D 能显著影响哈氏仿对虾肌肉蛋白质的功能特性。

该研究中的体外模拟体系能够直观地呈现出哈氏仿对虾肌肉蛋白质在组织蛋白酶 D 的作用下的劣变情况,为后续其品质保障提供理论依据。然而,该体系采用沸水浴法灭酶,导致哈氏仿对虾中肌原纤维蛋白、肌动蛋白和肌浆蛋白浊度上升和表面疏水性下降,使得组织蛋白酶 D 对肌肉蛋白质真实作用存在争议,因此还存在改进空间。后续课题组将持续优化该实验条件。此外,组织蛋白酶 D 对虾肌肉蛋白质的作用机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] 周婷,水珊珊,李志鹏,等.基于内源酶活性变化的冷藏哈氏仿对虾肌肉品质研究[J].食品工业科技,2022,43(24): 338-346.
- [2] LI Z P, ZHOU T, WU Y R, et al. Investigation of the activity of cathepsin B in red shrimp (*Solenocera crassicornis*) and its relation to the quality of muscle proteins during chilled and frozen storage [J]. Journal of Food Science, 2022, 87(4): 1610-1623.
- [3] PORNROT S, SUMATE T, ROMMANEE S, et al. Changes in the ultrastructure and texture of prawn muscle (*Macrobrachium rosenbergii*) during cold storage [J]. LWT-Food Science and Technology, 2007, 40(10): 1747-1754.
- [4] ZHOU T, DING Y X, BENJAKUL S, et al. Characterization of endogenous enzymes in sword prawn (*Parapenaeopsis hardwickii*) and their effects on the quality of muscle proteins during frozen storage [J]. LWT-Food Science and Technology, 2023, 177: 114563.
- [5] 董训江.杂色鲍组织蛋白酶L及其内源性抑制剂的研

究[D].厦门:集美大学,2012.

- [6] TSUJI H, AKASAKI K. Identification and characterization of lysosomal enzymes involved in the proteolysis of phenobarbital-inducible cytochrome [J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 1994, 17: 568-571.
- [7] BLANCO-LABRA A, MARTINEZ-GALLARDO N A, SANDOVAL-CARDOSO L, et al. Purification and characterization of a digestive cathepsin D proteinase isolated from *Tribolium castaneum*, Larvae (*Herbst*) [J]. Insect Biochemistry & Molecular Biology, 1996, 26(1): 95-100.
- [8] JIANG T S, WANG H J, CHEN S C. Purification and some properties of calpain II from tilapia muscle (*Tilapia nilotica* times *Tilapia aurea*) [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2002, 39(2): 237-241.
- [9] 王玲,年益莹,薛鹏,等.刺参2种天冬氨酸蛋白酶的酶学性质及其对自溶的影响[J].食品科学,2018,39(14):99-105.
- [10] 郭晓坤.刺参肠组织蛋白酶D和分离蛋白的提取及特性研究[D].大连:大连工业大学,2018.
- [11] 贾世亮,杨月,郑雅丹,等.干冰冻结对大黄鱼冻藏期间冰晶及品质的影响[J].食品与机械,2023,39(6):134-142.
- [12] DAI H J, CHEN X K, PENG L, et al. The mechanism of improved myosin gel properties by low dose rosmarinic acid addition during gel formation [J]. Food Hydrocolloids, 2020, 106(publish): 105869.
- [13] 左硕静,李道燕,刘晓涵,等.超声处理对牡蛎肌浆蛋白结构和溶解性的影响[J].食品研究与开发,2023,44(23):29-34,98.
- [14] 刘丽媛,彭晨,赵楠,等.鲫鱼胰脂肪酶抑制活性稳定性的研究[J].食品科技,2013,38(10):245-248.
- [15] 郑文雄,杨榕琳,水珊珊,等.热加工对三种带鱼肌球蛋白功能特性的影响[J].食品科学,2024,45(7):211-217.
- [16] CHELH I, GATELLIER P, LHOUTELLIER V R S. A simplified procedure for myofibril hydrophobicity determination [J]. Meat Science, 2006, 74(4): 681-683.
- [17] SUN W, ZHAO M, YANG B, et al. Oxidation of sarcoplasmic proteins during processing of cantonese sausage in relation to their aggregation behaviour and *in vitro* digestibility [J]. Meat Science, 2011, 88(3): 462-467.
- [18] 董诗瑜,马舒恬,覃静凯,等.小龙虾头营养成分及风味滋味特性分析与评价[J].食品工业科技,2023,44(14):396-405.
- [19] ZHAN F L, LI Z P, PAN D D, et al. Investigating the migration hypothesis: Effects of trypsin-like protease on the quality of muscle proteins of red shrimp (*Solenocera crassicornis*) during cold storage [J]. Food Chemistry: X, 2023, 20: 100906.
- [20] 李志鹏.中华管鞭虾内源酶活性变化及其作用机制研究[D].舟山:浙江海洋大学,2022.
- [21] MITRA B, RINNAN Å, RUIZ-CARRASCAL J. Tracking

- hydrophobicity state, aggregation behaviour and structural modifications of pork proteins under the influence of assorted heat treatments [J]. Food Research International, 2017, 101: 266-273.
- [22] WANG X J, WANG X W, FENG T T, et al. Saltiness perception enhancement of fish meat treated by microwave: the significance of conformational characteristics, water and sodium mobility [J]. Food Chemistry, 2021, 347: 129033.
- [23] 陈冠怡,许陈彩,李佳玲,等.亚油酸介导氧化的金鲳鱼肌原纤维蛋白结构和凝胶特性变化[J].现代食品科技, 2024,40(9):248-256.
- [24] 胡学佳,戴志远,金仁耀,等.不同蛋白酶对红娘鱼蛋白水解物的结构特性和生物活性的影响[J].中国食品学报, 2023,23(10):81-89.
- [25] GIMÉNEZ B, ALEMÁN A, MONTERO P, et al. Antioxidant and functional properties of gelatin hydrolysates obtained from skin of sole and squid [J]. Food Chemistry, 2008, 114(3): 976-983.
- [26] AGRAWAL H, JOSHI R, GUPTA M, et al. Purification, identification and characterization of two novel antioxidant peptides from finger millet (*Eleusine coracana*) protein hydrolysate [J]. Food Research International, 2019, 120: 697-707.
- [27] XIAO Z, LIANG P, CHEN J, et al. A peptide YGDEY from tilapia gelatin hydrolysates inhibits UVB-mediated skin photoaging by regulating MMP-1 and MMP-9 expression in HaCaT cells [J]. Photochemistry and Photobiology, 2019, 95(6): 1424-1432.
- [28] LI H J, HU Y F, ZHAO X H, et al. Effects of different ultrasound powers on the structure and stability of protein from sea cucumber gonad [J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 137: 11043.
- [29] 芦江会,陈跃文,付晶晶,等.超声辅助酶解对龙头鱼蛋白肽理化性质及风味特性的影响[J].食品与机械,2023, 39(11):38-44.