

文章编号: 1000-0615(2018)08-1307-08

DOI: 10.11964/jfc.20170410824

## EGCG对尼罗罗非鱼肌原纤维蛋白降解的抑制作用

赵永强<sup>1</sup>, 杨贤庆<sup>1</sup>, 李来好<sup>1\*</sup>, 吴燕燕<sup>1</sup>, 魏涯<sup>1</sup>,  
岑剑伟<sup>1</sup>, 孙祖莉<sup>2</sup>, 张红杰<sup>1,3</sup>

(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. 烟台大学生命科学学院, 山东 烟台 264005;

3. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306)

**摘要:** 为研究表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)对尼罗罗非鱼肌原纤维蛋白在贮藏过程中降解的抑制作用, 实验采用质量分数为0.002 5%、0.01%、0.02%、0.03%的EGCG对罗非鱼肌肉进行处理, 考察不同浓度EGCG对贮藏过程中罗非鱼肌肉肌原纤维蛋白盐溶性的影响, 并采用SDS-PAGE凝胶电泳结合质谱技术筛选EGCG抑制降解靶向蛋白质。结果显示, 实验条件下不同浓度的EGCG对肌原纤维蛋白降解均有抑制作用, 质量分数为0.01%的EGCG抑制效果最佳, 肌原纤维蛋白含量由贮藏初期的(82.42±0.65)降至第12天的(51.89±0.68) mg/g(下降率37.0%), 而对照组由(80.86±1.18)降至(35.33±1.16) mg/g(下降率56.3%)。研究表明, 通过SDS-PAGE凝胶电泳及质谱技术鉴定, EGCG对尼罗罗非鱼肌原纤维蛋白降解的抑制作用靶向蛋白质分别为MHC、MLC与肌动蛋白, 本结果对罗非鱼冷藏保鲜研究具有一定指导意义。

**关键词:** 尼罗罗非鱼; EGCG; 肌原纤维蛋白; 降解; 抑制

**中图分类号:** TS 254.4

**文献标志码:** A

作为水产品肌肉主要组成成分, 蛋白质在贮藏过程中变化是影响水产品品质变化的主要因素。有研究表明, 水产品蛋白质在贮藏过程中会发生氧化降解作用, 导致蛋白酶活性及蛋白质溶解性降低、氨基酸被破坏并产生羰基类化合物; 另外由蛋白质氧化导致的蛋白质结构变化, 会使蛋白质易发生水解、聚合、交联作用, 加速蛋白质降解<sup>[1-4]</sup>。蛋白质氧化降解对水产品品质变化的影响主要表现为蛋白质凝胶性降低、疏水性、乳化性改变、营养成分损失等。亦有研究表明, 贮藏过程中肌肉软化、持水能力和纹理变化可能与肌肉肌原纤维蛋白氧化有关<sup>[5-6]</sup>。因此, 抑制水产品贮藏过程中蛋白

质氧化引起的肌原纤维蛋白降解, 对维持水产品品质及营养价值具有重要意义。

目前, 多酚类物质广泛地应用于水产品脂质氧化抑制<sup>[7]</sup>, 但是对水产品蛋白质氧化降解相关的研究较少。作为绿茶中最有效的抗氧化多酚类物质, 表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)具有多个酚羟基, 可以提供质子, 能够有效地清除自由基。因此, 可将EGCG应用于水产品蛋白质降解抑制研究, 结合电泳及质谱技术, 筛选出其对水产品具有保护作用的潜在差异蛋白质。作为我国淡水鱼主要养殖品种, 罗非鱼具有生长速率快、肌间刺少、肉质厚等优点, 深受国内外消费者喜爱<sup>[8]</sup>。本

收稿日期: 2017-04-30 修回日期: 2017-09-27

资助项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-46); 国家自然科学基金(31401563, 31601533); “十二五”国家科技支撑计划(2015BAK36B06, 2015BAD17B03); 广州市珠江科技新星专项(201710010167); “扬帆计划”引进创新创业团队专项(2015YT02H109)

通信作者: 李来好, E-mail: laihaoli@163.com

研究以冷藏尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)为对象,分析了EGCG对肌原纤维蛋白盐溶性变化的影响,结合SDS-PAGE凝胶电泳及质谱技术研究不同浓度EGCG处理对尼罗罗非鱼肉肌原纤维蛋白降解的抑制作用,并鉴定作用靶向蛋白质种类,对尼罗罗非鱼的冷藏保鲜具有一定指导意义。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验仪器与材料

Transsonic T1-H-10型超声波清洗仪,德国ELMA公司; Milli-Q去离子水纯化系统,美国Millipore公司; T50型均质机,德国IKA公司; FM 400A型制冰机,美国Grant公司; S124S型电子天平,德国Sartorius公司; HWS 24型电热恒温水浴锅,上海一恒科学仪器有限公司; Ultraflex III型质谱仪,德国Bruker公司; pH-10 pH计,德国Sartorius公司; UV2550型紫外—可见分光光度计,日本SHIMADZU公司; 3K30型台式高速冷冻离心机,德国Sigma公司。

蛋白质定量试剂盒(考马斯亮蓝法)、SDS-PAGE上样缓冲液,南京建成生物科技有限公司; 彩色预染蛋白Marker(11-245 ku),广州碳六生物技术有限公司; SDS-PAGE凝胶制备试剂盒,北京康为世纪生物科技有限公司; 二硫苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺(IAA)、三氟乙酸(TFA)、乙腈,上海生工生物工程有限公司; 苯甲基磺酰氟(PMSF)、四甲基乙二胺(TEMED)、胰蛋白酶,美国Sigma公司; 考马斯亮蓝、 $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 及其他常见试剂均为分析纯,广州化学试剂厂。

鲜活尼罗罗非鱼,体质量( $500\pm 100$ )g,购于广州当地超市。

### 1.2 实验方法

**样品处理** 鲜活尼罗罗非鱼清水洗净,经击昏、放血、去鳞、剖片、冲洗和沥水后得到罗非鱼片,将鱼片剪碎,等量分为5组,每组称取鱼肉100.0 g。分别为空白对照组,质量分数为0.002 5%、0.01%、0.02%与0.03%的EGCG实验组。将5组样品分别在绞肉机中搅碎,搅拌均匀,取出每组鱼糜依次装入5个塑料杯中,敞口置于4 °C冰箱中冷藏,备用。

**肌原纤维蛋白的提取** 参考Pazos等<sup>[3]</sup>的方法并略作修改,在贮藏的第0、3、6、9、12天,

分别从5组塑料杯中各取罗非鱼肉2.0 g,加入10 mL预先冰浴冷却的缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.2, 5 mmol/L PMSF),冰浴条件下10 000 r/min均质2 min,为防过热,每均质10 s停10 s。均质后分散液于4 °C下15 000 r/min离心15 min,弃上清液后,向含肌原纤维蛋白的沉淀中加入10倍体积的盐溶液(0.6 mol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl缓冲液, 5 mmol/L PMSF, pH 7.2)后均质混匀。冰浴条件下放置20 min后于4 °C下15 000 r/min离心15 min,离心后所得上清液即为肌原纤维蛋白溶液。将肌原纤维蛋白存放于-80 °C冰箱中备用。

**肌原纤维蛋白盐溶性的测定** 具体测定方法参照南京建成生物科技有限公司蛋白质定量测试盒(考马斯亮蓝法)指导方法进行。

**肌原纤维蛋白SDS-PAGE凝胶电泳** 分别配制12%分离胶和5%浓缩胶,将浓缩胶溶液加至分离胶的上方,直至凝胶溶液到达前玻璃板的顶端。将梳子插入凝胶内,避免产生气泡,静置20 min左右,等待浓缩胶聚合。待凝胶聚合后,小心地拔出梳子,以免破坏加样孔。将贮藏第6天各组提取的肌原纤维蛋白样品,取7  $\mu\text{L}$ 上样,于80 V/胶恒压条件下电泳20 min,随后再于120 V/胶稳压条件下电泳至溴酚蓝指示剂离开胶的底缘。电泳后剥离凝胶,用考马斯亮蓝R-250染色约3 h,用脱色缓冲液脱色过夜后,通过凝胶成像系统对脱色后的凝胶进行照相处理。

**差异蛋白的质谱鉴定** 酶解方法按以下步骤进行: ①挖点清洗: 用200  $\mu\text{L}$  MilliQ振荡清洗2次,每次10 min; ②脱色: 加200  $\mu\text{L}$ 考染胶色液(25 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 50%乙腈),在37 °C下脱色20 min后吸干,重复脱色1次,至蓝色褪去; ③脱水: 加100  $\mu\text{L}$ 乙腈溶液脱水至胶粒变白,吸弃乙腈溶液; ④加100  $\mu\text{L}$  10 mmol/L的DTT, 60 °C下水浴1 h; ⑤加100  $\mu\text{L}$  30 mmol/L的IAA, 常温避光45 min; ⑥纯水清洗2次,每次10 min; ⑦脱水: 加100  $\mu\text{L}$ 乙腈脱水至胶粒变白,吸弃乙腈; ⑧用25 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 稀释胰蛋白酶至20 mg/mL,每管加20  $\mu\text{L}$ ,让酶液与胶粒充分接触,4 °C放置50 min,待酶液被胶粒完全吸收后吸弃多余的酶液,加20  $\mu\text{L}$  25 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 37 °C下静置16 h; ⑨12 000 r/min离心1 min后振荡15 min。

**AnchorChip靶点样** 取酶解液6  $\mu\text{L}$ 点

AnchorChip靶, 晾干; 取0.1 μL基质溶液(溶剂为50%乙腈, 0.1% TFA)点在晾干的样品上。用配好的基质溶液稀释标准品25倍后, 点0.1 μL, 晾干。

质谱采集数据以及数据库检索 使用Ultraflex III型质谱仪进行分析, 获得样品的肽质量指纹图谱, 胰酶自降解峰和污染物质的峰自动剔除, 利用LIFT软件进行串级质谱分析。所获得图谱使用Biotoools软件检索, 以Mascot(Matrix Science, London, UK)为搜索引擎。搜索参数设置: 数据库为SwissProt; 数据检索的方式为combined; 最大允许漏切位点为1; 酶为胰蛋白酶。质量误差范围设置: PMF 100 ppm(peptide mass tolerance), MS/MS 为0.7 u。

### 1.3 数据处理

实验数据采用Microsoft® Excel 2016和IBM® SPSS® Statistics Version 19进行分析。单因素方差(One-Way ANOVA)分析, 采用LSD检验组内的差异, 实验组与对照组数据采用配对样本t检验进行差异比较分析, P<0.05作为差异显著的标志。各组计算数据均以平均值±标准差(mean±SD)表示。

## 2 结果

### 2.1 EGCG对冷藏罗非鱼肉肌原纤维蛋白盐溶性的影响

随着贮藏时间的延长, 5组罗非鱼肉肌原纤维蛋白盐溶性均呈显著下降趋势(P<0.05)。其中, 对照组、添加质量分数为0.002 5%、0.01%、0.02%与0.03%的EGCG处理组鱼肉肌纤维蛋白盐溶性分别从贮藏第0天的(80.86±1.18)、(81.48±0.95)、(82.42±0.65)、(80.34±1.18)与(80.23±0.95) mg/g降至贮藏第12天的(35.33±1.46)、(41.55±1.53)、(51.89±0.68)、(42.56±1.11)与(42.45±1.13) mg/g (P<0.05), 下降率分别为56.3%、49.0%、37.0%、47.0%与47.1%(图1)。

### 2.2 SDS-PAGE电泳分析

利用SDS-PAGE对冷藏第6天不同浓度EGCG处理后尼罗罗非鱼肉肌原纤维蛋白进行电泳分析, 结果显示, 尼罗罗非鱼肉肌原纤维蛋白条带较多, 分子量主要分布在11~200 ku, 含量较高的有分子量约为200 ku的肌球蛋白重链(myosin heavy chain, MHC)、分子量约为43 ku的

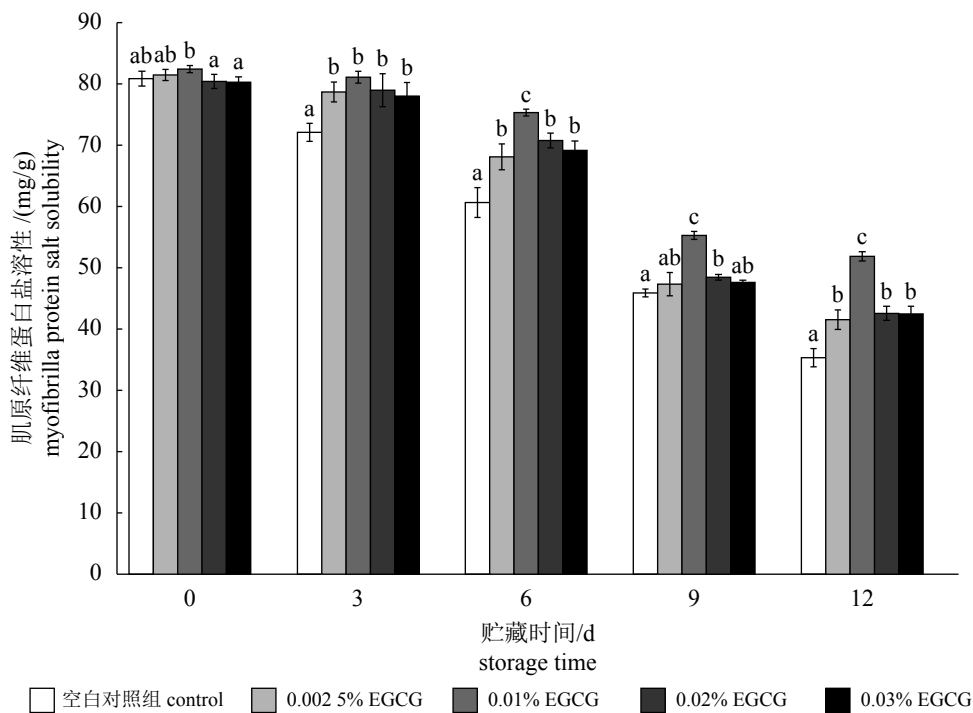


图1 冷藏过程中不同浓度EGCG处理罗非鱼肉组织中肌原纤维蛋白盐溶性变化规律

相同贮藏时间下, 不同字母代表差异显著(P<0.05)

Fig. 1 Changes in myofibrillar protein salt solubility of EGCG treated *O. niloticus* muscle during the storage at 4 °C Data within the same storage time with different letters are significantly different (P<0.05)

肌动蛋白、分子量约为35 ku的肌原蛋白的一个结合亚基及分子量约为15 ku的肌球蛋白轻链(myosin light chain, MLC)等条带(图2-a)。经0.002 5%和0.01% EGCG处理的罗非鱼肉肌原纤维蛋白和对照组间电泳条带存多处明显差异, 主要表现为贮藏第6天EGCG处理MHC、肌动蛋白、分子

量为35 ku肌原蛋白的结合亚基及分子量为17~20 ku的V号条带均明显较对照组更宽, 而I号、II号、III号、IV号和VI号蛋白质条带较对照组浅(图2-b)。

### 2.3 差异蛋白条带的质谱分析与鉴定

从冷藏第6天不同浓度EGCG处理罗非鱼肉肌原纤维蛋白电泳凝胶中切出用于质谱鉴定的6个差异蛋白质条带(I、II、III、IV、V和VI号)(图2-b)。设置数据库为SwissProt时, 经过BioTools检索, 6种待鉴定蛋白质检测结果见表1。

编号为V的蛋白质条带mascot score为33, 匹配同源蛋白的分子量也与SDS-PAGE凝胶电泳结果不符, 该研究中未鉴定出条带V, 尚需在将来的研究中通过尝试进一步分离纯化、不同酶切等手段进行鉴定。编号为I与II的蛋白质条带可能是肌球蛋白重链快速收缩骨骼肌。肌动蛋白是细丝的主要组成成分, 约占肌原纤维蛋白的20%, 分子量约为42 ku, 可与肌球蛋白结合, 经数据库检索, 蛋白质条带III与IV可能为肌动蛋白的降解产物。蛋白质条带VI可能为肌球蛋白轻链, 理论分子质量为20 054 u, 与SDS-PAGE凝胶电泳结果相符。肌球蛋白可解离为2条重链与4条轻链碱, 一般的, 肌球蛋白头部重链部分存在3种不同的轻链LC1、LC2和LC3, LC1与LC3可在碱性条件下解离, 分别称为碱轻链A1、A2, A1、A2是肌球蛋白ATPase作用时的必须成分, 与肌肉能量代谢和蛋白质完整性有关<sup>[9]</sup>。

## 3 讨论

作为优质天然抗氧化剂, 多酚类物质用于水产品保鲜已有报道, 如花鲈(*Lateolabrax japonicus*)<sup>[10]</sup>、大黄鱼(*Larimichthys crocea*)<sup>[11]</sup>及黑鲷(*Sparus macrocephalus*)<sup>[12]</sup>等。蛋白质分子的聚集或展开变性会引起其溶解性、表面疏水性等物化性质变化, 这些变化必然会改变蛋白质的凝胶特性。鱼肉中蛋白质大致可分为含量约为20%~50%的水溶性蛋白质(肌浆蛋白)、50%~70%的盐溶性蛋白质(肌原纤维蛋白)与含量<10%的不溶性蛋白质(肌基质蛋白), 鱼肉蛋白质发生冷冻变性时, 盐溶性的肌原纤维蛋白分子间由于氢键、二硫键、疏水键等的形成而聚集变性, 导致其盐溶性下降, 而且鱼肉蛋白的冷冻变性越严重, 其肌原纤维蛋白的盐溶性越低<sup>[13]</sup>,

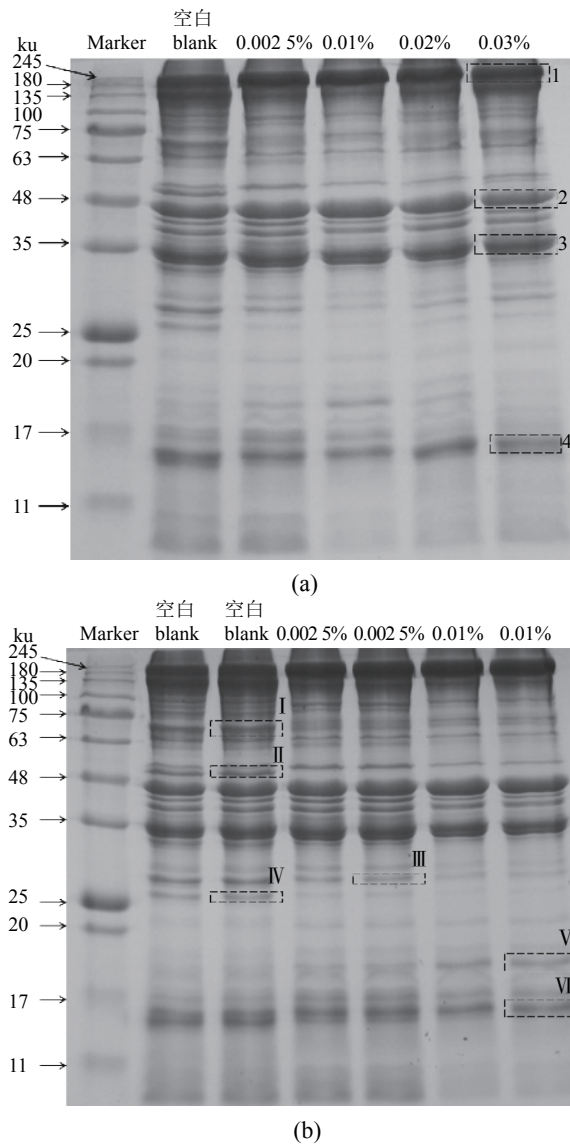


图2 冷藏第6天不同浓度EGCG处理尼罗罗非鱼肉肌原纤维蛋白电泳结果

(a)中标记为1、2、3与4的蛋白质分别为肌球蛋白重链、肌动蛋白、原肌球蛋白与肌球蛋白轻链; (b)中EGCG质量分数为0.0025%和0.01%, 平行2次, 用于质谱分析扣点

Fig. 2 SDS-PAGE photographs of myofibrillar protein of *O. niloticus* muscle treated on day 6

1-4 in (a): MHC, actin, tropomyosin and MLC respectively. The concentrations of EGCG in (b) are 0.0025% and 0.01% respectively, n=2, and the protein I to VI were used to MS analysis

表 1 差异蛋白条带的肽指纹图谱SwissProt数据库检索结果

Tab. 1 Mascot search results using SwissProt database of differentially expressed protein band

编号 number	同源蛋白 homolog protein	物种 species	得分 mascot score	检索号 accession number	理论分子量/u theoretical molecular weight
I	myosin heavy chain, fast skeletal muscle (MYSS_CYPCA)	鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	98	Q90339.2	222 318
II	myosin heavy chain, fast skeletal muscle (MYSS_CYPCA)	鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	90	Q90339.2	222 318
III	actin, alpha skeletal muscle 2 (ACT2_XENLA)	非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	119	P10995.1	42 304
IV	actin, alpha skeletal muscle 2 (ACT2_XENLA)	非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	154	P10995.1	42 304
V	probable inactive receptor kinase At4g23740 (Y4374_ARATH)	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	33	Q9SUQ3.1	71 210
VI	myosin light chain I, skeletal muscle isoform(MLE1_LIZRA)	贫食鲛 <i>Liza ramada</i>	99	P82159.1	20 054

因此肌原纤维蛋白质盐溶性的变化是检测蛋白质冷冻变性程度的重要指标。

尼罗罗非鱼在冷藏过程中添加EGCG后, 其肌原纤维蛋白降解速率低于空白对照组, 而当EGCG质量分数为0.01%时, 尼罗罗非鱼肉肌原纤维蛋白盐溶性下降率最低, 因此EGCG的添加能有效抑制尼罗罗非鱼冷藏过程中肌原纤维蛋白质的降解, 有助于提高其贮藏品质, 因此考虑在尼罗罗非鱼片或冷冻鱼糜贮藏时添加0.01%的EGCG, 可显著改善因肌原纤维蛋白质盐溶性降低导致的品质劣变与凝胶能力下降。

肌原纤维蛋白主要由肌球蛋白(myosin)、肌动蛋白(actin)及其他一些小调节蛋白[如肌钙蛋白(troponin)、辅肌动蛋白(actinin)及原肌球蛋白(tropomyosin)]等组成, 其中, 肌球蛋白和肌动蛋白是构成肌原纤维蛋白的最主要成分, 二者约占肌原纤维蛋白的70%, 分别主要构成了肌原纤维粗丝和细丝<sup>[14]</sup>。每个肌球蛋白分子由2个MHC(分子量约为200 ku)和4个轻链MLC(分子量15~30 ku)组成, 其分子量约为470 ku<sup>[15]</sup>。

EGCG处理的罗非鱼肉肌原纤维蛋白和对照组间电泳条带存在的多处明显差异表明, 未添加EGCG组在尼罗罗非鱼贮藏期间, MHC、肌动蛋白及肌原蛋白结合亚基及V号蛋白质的降解作用较为显著, MHC降解程度与水产品蛋白质冷冻变性程度成正相关<sup>[16]</sup>, 而经过不同浓度EGCG处理对以上4种蛋白质具有明显的保护作用。相反, 标记为I、II、III、IV和VI的蛋白质条带较空白对照组浅, 可能是由于EGCG对这5种蛋白有破坏作用, 加剧了其降解, 亦有可能是EGCG的保护作用抑制了蛋白质的降解, 使这5种分子量相对较小的蛋白质更好地与其他蛋白

结合, 从而导致这些条带变弱。对照组尼罗罗非鱼肉肌原纤维蛋白降解速率明显较EGCG处理组快(图2-a), 这表明EGCG处理对罗非鱼肉肌原纤维蛋白降解有明显的抑制作用, 且质量分数为0.01%的EGCG处理对肌原纤维蛋白降解抑制效果最佳, 这与本文前述肌原纤维蛋白盐溶性变化研究结果一致。

目前, 这些差异蛋白质在罗非鱼贮藏过程中所起到的具体作用还有待更深入研究。但是, 冷藏过程中EGCG处理能影响这些蛋白的活性及完整性, 今后可采用二维电泳的方法<sup>[17]</sup>获取高分辨率的尼罗罗非鱼肌肉蛋白质二维电泳图谱, 在此基础上对EGCG处理前后的鱼肉蛋白质进行更为深入的差异蛋白质组学分析, 以从蛋白质降解角度分析EGCG对水产品的保鲜作用机理。

本研究中, 从图2-b可知EGCG处理后VI条带变浅, 碱轻链蛋白含量降低, 因此推测, EGCG处理是通过抑制肌球蛋白解离为碱轻链, 降低ATPase催化的ATP降解程度来实现水产品保鲜作用的。而黄旭镇<sup>[18]</sup>的研究表明, EGCG可显著抑制大黄鱼贮藏过程中三甲胺(TMA)的产生, 从而达到保鲜目的, 此外还有EGCG抑制水产品脂质氧化与抑菌作用机制的研究报道<sup>[19]</sup>。

吕卫金等<sup>[20]</sup>关于茶多酚延缓冷藏大黄鱼肌原纤维蛋白变性降解的研究中指出, 茶多酚所含大量的羟基可促使肌原纤维蛋白质溶液中的自由水转化为蛋白质分子内和分子间结合水, 从而降低肌原纤维蛋白的共晶点温度、减少冰晶体的数量, 形成不完全冻结区, 从而减弱蛋白质分子的聚集性, 降低蛋白质变性速率及程度。此外, 亦有学者认为多酚类物质可与蛋白质之间形成共价键和非共价键相互作用, 其作用程度

依赖于酚类化合物的含量、化学状态以及蛋白质的大小与总电荷数<sup>[21]</sup>,因此可以推测,EGCG含有的8个羟基可能会通过共价键或非共价键的作用与蛋白质疏水基团结合,延缓疏水基团的释放,从而抑制肌原纤维蛋白降解。在贮藏过程中鱼肉蛋白质会发生氧化羰基化作用,从而降低蛋白质的溶解性,Pazos等<sup>[3]</sup>的研究表明,儿茶素可显著抑制冷藏大西洋鲭(*Scomber scombrus*)肌动蛋白的氧化羰基化,从而达到抑制肌原纤维蛋白发生降解作用的效果。

综上,本研究中EGCG表现出对尼罗罗非鱼肌肉肌原纤维蛋白质降解的抑制作用可能主要是通过促进肌原纤维蛋白中自由水向结合水转变、延缓疏水基团释放与降低肌动蛋白氧化羰基化作用等方面实现的。

#### 4 结论

本实验研究了不同浓度EGCG处理对尼罗罗非鱼肌肉肌原纤维蛋白降解的抑制作用,结果表明,质量分数0.002 5%、0.01%、0.02%、0.03%的EGCG对肌原纤维蛋白降解均有抑制作用,其中0.01% EGCG处理组效果最佳;通过SDS-PAGE凝胶电泳分析结果表明,贮藏期间对照组的MHC、actin肌原蛋白的结合亚基及V号蛋白这4种蛋白较EGCG处理组降解更为明显,EGCG处理对这4种蛋白具有保护作用。而I号、II号、III号、IV号和VI号蛋白条带较对照组浅,可能是由于EGCG对这5种蛋白有破坏作用,加剧了其降解,也有可能是EGCG的保护作用抑制了蛋白质的降解,使这5种分子量相对较小的蛋白质更好地与其他蛋白结合,从而导致这些条带变弱。采用质谱技术筛对6种潜在差异蛋白进行鉴定,研究表明,EGCG对尼罗罗非鱼肌原纤维蛋白的降解抑制作用的靶向蛋白质为MHC、MLC与肌动蛋白,可显著保护这3种蛋白质的完整性。

#### 参考文献:

- [1] Babakhani A, Sabeena F K H, Jacobsen C. Antioxidative effect of seaweed extracts in chilled storage of minced atlantic mackerel (*Scomber scombrus*): effect on lipid and protein oxidation[J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2016, 9(2): 352-364.
- [2] Kjaersgård I V H, Nørrelykke M R, Baron C P, et al. Identification of carbonylated protein in frozen rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets and development of protein oxidation during frozen storage[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(25): 9437-9446.
- [3] Pazos M, Maestre R, Gallardo J M, et al. Proteomic evaluation of myofibrillar carbonylation in chilled fish mince and its inhibition by catechin[J]. *Food Chemistry*, 2013, 136(1): 64-72.
- [4] 李学鹏, 周凯, 王金厢, 等. 羟自由基对六线鱼肌原纤维蛋白的氧化规律[J]. *中国食品学报*, 2014, 14(6): 19-27.
- Li X P, Zhou K, Wang J X, et al. Effects of hydroxyl radical oxidation system on myofibrillar protein structure and properties in *Hexagrammos otakii*[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2014, 14(6): 19-27(in Chinese).
- [5] Lonergan E H, Zhang W G, Lonergan S M. Biochemistry of postmortem muscle-lessons on mechanisms of meat tenderization[J]. *Meat Science*, 2010, 86(1): 184-195.
- [6] Liu Z L, Xiong Y L, Chen J. Protein oxidation enhances hydration but suppresses water-holding capacity in porcine longissimus muscle[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(19): 10697-10704.
- [7] Eymard S, Jacobsen C, Baron C P. Assessment of washing with antioxidant on the oxidative stability of fatty fish mince during processing and storage[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(10): 6182-6189.
- [8] 李娜, 赵永强, 李来好, 等. 冰藏过程中罗非鱼鱼片肌肉蛋白质变化[J]. *南方水产科学*, 2016, 12(2): 88-94.
- Li N, Zhao Y Q, Li L H, et al. Change of muscle proteins in Nile tilapia fillets during iced storage[J]. *South China Fisheries Science*, 2016, 12(2): 88-94(in Chinese).
- [9] Hirayama Y, Watabe S. Structural differences in the crossbridge head of temperature-associated myosin subfragment-1 isoforms from carp fast skeletal muscle[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1997, 246(2): 380-387.
- [10] 鞠健, 汪超, 李冬生, 等. 茶多酚和迷迭香结合Nisin对冷藏鲈鱼品质的影响[J]. *食品科学技术学报*, 2017, 35(1): 70-75.
- Ju J, Wang C, Li D S, et al. Effects of tea polyphenol

- and rosemary extract combined with Nisin on storage quality of weever (*Lateolabrax japonicus*)[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2017, 35(1): 70-75(in Chinese).
- [11] Li T T, Hu W Z, Li J R, *et al.* Coating effects of tea polyphenol and rosemary extract combined with chitosan on the storage quality of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*)[J]. *Food Control*, 2012, 25(1): 101-106.
- [12] Feng L F, Jiang T J, Wang Y B, *et al.* Effects of tea polyphenol coating combined with ozone water washing on the storage quality of black sea bream (*Sparus macrocephalus*)[J]. *Food Chemistry*, 2012, 135(4): 2915-2921.
- [13] Lim H K, Haard N E. Protein insolubilization in frozen greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*)[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 1984, 8(3): 163-187.
- [14] 赵永强. 罗非鱼片臭氧灭菌处理中自由基的产生及其对产品品质与安全性的影响[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013: 16-17.
- Zhao Y Q. Free radical producing in ozone sterilization pretreatment of Nile tilapia fillets and its effects on product quality and safety[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2013: 16-17 (in Chinese).
- [15] Huxley H E. Electron microscope studies on the structure of natural and synthetic protein filaments from striated muscle[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1963, 7(3): 281-308.
- [16] 潘锦锋, 沈慧星, 宋永令, 等. 鱼蛋白冷冻变性及其抗冻剂的研究综述[J]. *肉类研究*, 2009, 23(6): 9-15.
- Pan J F, Shen H X, Song Y L, *et al.* A review of study on freezing denaturation of fish protein and its cryoprotectants[J]. *Meat Research*, 2009, 23(6): 9-15(in Chinese).
- [17] 赵永强, 李娜, 李来好, 等. 尼罗罗非鱼肌肉蛋白质双向电泳体系的建立[J]. *水产学报*, 2016, 40(10): 1648-1656.
- Zhao Y Q, Li N, Li L H, *et al.* Establishment of two-dimensional electrophoresis (2-DE) system in muscle proteome of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(10): 1648-1656(in Chinese).
- [18] 黄旭镇. 大黄鱼特定腐败菌波罗的海希瓦氏菌QS系统的鉴定及茶多酚调控研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2015: 55-57.
- Huang X Z. Identification of quorum sensing system in SSO *Shewanella baltica* from *Pseudosciaena crocea* and interference of its QS-related spoilage by tea polyphenols[D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2015: 55-57 (in Chinese).
- [19] Maqsood S, Benjakul S, Shahidi F. Emerging role of phenolic compounds as natural food additives in fish and fish products[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2013, 53(2): 162-179.
- [20] 吕卫金, 赵进, 汪金林, 等. 茶多酚延缓冷藏大黄鱼肌原纤维蛋白变性降解机理研究[J]. *中国食品学报*, 2014, 14(1): 60-67.
- Lü W J, Zhao J, Wang J L, *et al.* Effects of tea polyphenols on preservation mechanism of myofibrillar protein from large yellow croaker[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2014, 14(1): 60-67(in Chinese).
- [21] Kroll J, Rawel H M. Reactions of plant phenols with myoglobin: Influence of chemical structure of the phenolic compounds[J]. *Journal of Food Science*, 2001, 66(1): 48-58.

## Inhibition of EGCG on myofibrillar protein degradation of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

ZHAO Yongqiang<sup>1</sup>, YANG Xianqing<sup>1</sup>, LI Laihao<sup>1\*</sup>, WU Yanyan<sup>1</sup>, WEI Ya<sup>1</sup>,  
CEN Jianwei<sup>1</sup>, SUN Zuli<sup>2</sup>, ZHANG Hongjie<sup>1,3</sup>

(1. Key Laboratory of Aquatic Product Processing, Ministry of Agriculture; National R & D Center for Aquatic Product Processing; South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;

2. College of Life Science, Yantai University, Yantai 264005;

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

**Abstract:** Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is an important economic fish species and has been farmed widely in south China. In order to study the inhibitory effect of EGCG on the degradation of myofibrillar protein in tilapia, the tilapia muscle was treated with EGCG with the concentrations of 0.002 5%, 0.01%, 0.02% and 0.03% respectively. The effects of different concentrations of EGCG on the myofibrillar protein salt solubility of tilapia muscle were investigated during storage. In addition, the targeted proteins of degradation inhibited by EGCG were studied by SDS-PAGE gel electrophoresis and mass spectrometry. The results showed that all of the different concentrations of EGCG had inhibitory effects on myofibrillar degradation, especially when the concentration of EGCG was 0.01%, the myofibrillar protein content was decreased from (82.42±0.65) mg/g on day 0 to (51.89±0.68) mg/g on day 12 (37.0% of descent rate), while the myofibrillar protein content of control group was decreased from (80.86±1.18) mg/g to (35.33±1.16) mg/g (56.3% of descent rate). The results of SDS-PAGE gel electrophoresis and mass spectrometry identification showed that targeted proteins of degradation inhibited by EGCG were MHC, MLC and actin, respectively. The results of this study have some guiding significance for the preservation research of *O. niloticus*.

**Key words:** *Oreochromis niloticus*; EGCG; myofibrillar protein; degradation; inhibition

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

**Funding projects:** Earmarked Fund for Modern Agro-industry Technology Research System (CARS-46); National Natural Science Foundation of China (31401563, 31601533); National Science & Technology Pillar Program during the Twelfth Five-year Plan Period (2015BAK36B06, 2015BAD17B03); Pearl River S & T Nova Program of Guangzhou (201710010167); “Yang Fan” Innovative and Entrepreneurial Research Team Project (2015YT02H109)