

# 傅里叶红外结合拉曼分析卡拉胶寡糖对南美白对虾蛋白结构影响

蓝蔚青<sup>1, 2, 3</sup>, 胡潇予<sup>3</sup>, 阮东娜<sup>1\*</sup>, 刘书成<sup>2</sup>, 谢晶<sup>3\*</sup>

1. 农业农村部冷冻调理水产品加工重点实验室, 福建安井食品股份有限公司, 福建 厦门 361022
2. 广东海洋大学食品科技学院, 广东省水产品加工与安全重点实验室, 广东 湛江 524088
3. 上海海洋大学食品学院, 上海水产品加工贮藏工程技术研究中心, 上海 201306

**摘要** 为深入研究卡拉胶寡糖对反复冻融南美白对虾样品品质与蛋白变化影响, 采用傅里叶变换中红外(Fourier transform infrared, FTIR)互补结合激光显微拉曼(micro Raman)光谱技术, 以不同预处理方式(无菌蒸馏水、三聚磷酸盐溶液与卡拉胶寡糖溶液)下反复冻融南美白对虾肌原纤维蛋白为研究对象, 深入研究了卡拉胶寡糖预处理对不同冻融阶段南美白对虾肌肉品质和蛋白的影响机制。分别对三种预处理方式下经0, 2, 4和6次冻融循环后的南美白对虾肌原纤维蛋白进行FTIR和拉曼光谱分析。FTIR和拉曼一阶谱图中各特征峰强度变化谱图可得出, 随冻融次数增加, 南美白对虾肌肉的蛋白损失和结构破坏明显加剧。样品肌肉蛋白二级结构的主链构象主要由酰胺I带( $1600\sim 1700\text{ cm}^{-1}$ )表征, FTIR分析显示新鲜虾肉蛋白二级结构以 $\beta$ 转角为主, 其次为 $\beta$ 折叠, 其弥补了拉曼光谱对 $\beta$ -折叠和 $\beta$ -转角的不敏感。FTIR与拉曼光谱酰胺I带高斯拟合后谱图可定性定量显示冻融过程中样品的蛋白二级结构变化主要是 $\alpha$ -螺旋结构的减少与无规卷曲结构的增加, 而卡拉胶寡糖预处理能明显抑制冻融过程中 $\alpha$ -螺旋结构的损失。FTIR对蛋白表面氨基酸变化不敏感, 拉曼光谱则可互补显示样品蛋白侧链的构象变化。其特征酪氨酸残基的谱带出现在 $850$ 和 $830\text{ cm}^{-1}$ , 峰强比表征了样品中酪氨酸的暴露程度在冻融期间呈增长趋势; 脂肪族侧链氨基酸残基的C—H弯曲与伸缩振动分别在 $1440\sim 1465$ 和 $2800\sim 3100\text{ cm}^{-1}$ 区间,  $1448$ 和 $2935\text{ cm}^{-1}$ 处峰强变化表征了样品侧链氨基酸的疏水相互作用在冻融过程中逐渐增强。拉曼光谱中蛋白侧链的特征谱带变化表明冻融过程使虾肉蛋白中分子内、分子间氢键断裂和侧链酪氨酸、脂肪族氨基酸残基暴露, 而卡拉胶寡糖处理后明显延缓了该变化。因此, 卡拉胶寡糖可延缓反复冻融虾肉蛋白中氢键断裂、侧链疏水基暴露, 进一步稳定蛋白二级结构, 维持其蛋白功能特性, 从而起到对反复冻融南美白对虾肌肉品质的保护作用。同时, 本研究将FTIR与拉曼光谱技术结合应用在卡拉胶寡糖对冻融南美白对虾肌肉品质保护机制研究上, 发现FTIR在南美白对虾蛋白二级结构的表征上更敏感, 拉曼光谱则能为样品蛋白侧链构象变化提供参考, 二者结合可通过提供互补信息, 更好表征样品经处理后蛋白的结构变化。

**关键词** 傅里叶变换中红外; 激光显微拉曼光谱; 南美白对虾; 蛋白结构

**中图分类号:** O657.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2019)08-2507-08

## 引言

振动光谱是研究蛋白质、碳水化合物、核酸、细胞膜、细胞组织等化学组成与分子结构变化的主要方法。然而, 单一光谱通常会导致谱带重叠严重。因此, 将几种振动光谱技术相结合开展分析研究逐渐引起人们的关注<sup>[1]</sup>。傅里叶变换

红外吸收光谱(Fourier transform infrared absorption spectroscopy, FTIR)与拉曼光谱(Raman spectroscopy)可作为互补分析技术用于大分子物质结构变化研究<sup>[2-3]</sup>。分子振动过程中由于分子偶极矩变化而具有红外活性, 分子极化性变化而产生拉曼活性<sup>[4]</sup>。傅里叶变换红外光谱目前常用于食品、药材检测和辨伪<sup>[5]</sup>, 如Hu等<sup>[6]</sup>通过红外光谱结合主成分分析技术成功鉴别了白姑鱼、带鱼与金线鱼的鱼糜制品; 拉曼

收稿日期: 2018-06-21, 修订日期: 2018-11-02

基金项目: 农业农村部海水鱼产业体系(CARS-47), 农业农村部冷冻调理水产品加工重点实验室开放课题(KLRCAPP2018-11), 广东海洋大学广东省水产品加工与安全重点实验室开放课题(GDPKLAPPS1802)资助

作者简介: 蓝蔚青, 1977年生, 上海海洋大学高级工程师 e-mail: wqlan@shou.edu.cn

\* 通讯联系人 e-mail: ruandongna@anjoyfood.com; jxie@shou.edu.cn

光谱目前多用于药物与残留物检测,其在评价水产品蛋白变性的研究较少。其中,高瑞昌等<sup>[7]</sup>基于拉曼光谱研究了冷藏过程中凡纳滨对虾肌球蛋白的构象变化。少数研究表明,两种光谱技术同时使用,可增加结果分析的准确性<sup>[2]</sup>。其中,Yuka等<sup>[4]</sup>在研究不同研磨条件对罗非鱼鱼糜和分离蛋白结构影响时,通过两种光谱的互补作用进行分析。

南美白对虾(*Litopenaeus vannamei*)又名凡纳滨对虾,为对虾科对虾属甲壳类水产品,其凭借营养价值高、肉质鲜美等特点深受消费者欢迎。冷冻贮藏是南美白对虾保鲜中常用的方法之一,据调查,我国仅有 20% 的水产品通过规范的冷链系统流通。一旦冷链措施不完善,其在贮运、零售或消费过程中会产生较大的温度波动,导致原料历经多次冷冻—解冻(Freeze-Thaw, F-T)过程,易造成细胞机械损伤、蛋白氧化变性等,影响其口感和营养价值<sup>[8]</sup>。高蛋白类海产品在贮运过程中的冻融循环会破坏用来稳定蛋白构象和维持其功能的蛋白间相互作用,造成肌原纤维蛋白功能丧失,保水性、溶解度与必需营养素等损失<sup>[9]</sup>。为减少贮运过程中冻融造成的蛋白氧化变性、营养损失,具抗氧化作用的抗冻保水剂被广泛应用。

三聚磷酸钠通常作为抗冻保水剂、品质改良剂等被广泛应用于肉类食品中。其通常用于对虾冷冻前处理,可明显改变其解冻后的化学组成和理化性质,改善其肌肉持水性和品质<sup>[9]</sup>。然而,近年来,三聚磷酸盐导致钙磷缺乏,诱发皮肤过敏等问题层出不穷,使消费者对其有所避讳。而作为卡拉胶的降解产物,卡拉胶寡糖的甜度更低、热量更小,在抗氧化、防辐射与抗肿瘤等方面表现出良好的生理活性<sup>[8, 10-11]</sup>。此外,其溶解性、安全性与稳定性均有所改善,在生物医药领域也有较好的应用前景<sup>[12]</sup>。目前,卡拉胶寡糖已被部分学者应用于冷冻虾仁研究。如 Zhang 等<sup>[12]</sup>用卡拉胶寡糖处理南美白对虾虾仁后进行冻藏处理,发现其对虾仁蛋白质氧化保护作用显著,能维持肌肉保水性及综合品质。而将卡拉胶寡糖用于南美白对虾反复冻融过程,研究其对原料蛋白结构影响还未见报道。

本文以南美白对虾为研究对象,分别使用三聚磷酸钠与卡拉胶寡糖溶液处理南美白对虾,以无菌蒸馏水处理的样品为对照组,通过傅里叶变换红外与拉曼光谱技术相结合,分析三种方式处理后的南美白对虾,经不同次数的反复冻融后,其对虾肉肌原纤维蛋白二级结构及构象变化的影响,并对卡拉胶寡糖的蛋白保护机制予以推测,以期今后水产品中卡拉胶寡糖和光谱检测技术的应用提供理论参考。

## 1 实验部分

### 1.1 药品试剂

卡拉胶寡糖(500~1 000 Da, 食品级)、三聚磷酸钠(食品级)购自青岛博智汇力生物科技有限公司;磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氯化钠、溴化钾等购自国药集团化学试剂有限公司,均为国产分析纯。

### 1.2 仪器设备

Nicolet iS-5 型傅里叶变换红外光谱仪(美国 Thermo

Fisher Scientific 公司); Nicolet Almega XR 型激光共聚焦显微拉曼光谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Alpha 2-4 LD plus 型冷冻干燥机(德国 Christ 公司等)。

### 1.3 原料处理

南美白对虾购自上海市浦东新区临港农工商超市,选取体重(27±1) g、体长(17±1) cm 的鲜活样品,冰水猝死,将其迅速分为三组,处理方式如表 1 所示。

表 1 南美白对虾的处理方式

Table 1 *Litopenaeus Vannamei* with different treatments

组别	处理方式
空白对照组(CK)	4 °C 浸渍于无菌蒸馏水中 2 h, 隔 20 min 搅拌一次
三聚磷酸钠组(ST)	4 °C 浸渍于 3% (m/v) 三聚磷酸钠溶液中 2 h, 隔 20 min 搅拌一次
卡拉胶寡糖组(CO)	4 °C 浸渍于 3% (m/v) 卡拉胶寡糖溶液中 2 h, 隔 20 min 搅拌一次

注:三聚磷酸钠与卡拉胶寡糖的最佳处理浓度、浸渍时间与处理方式由前期预实验获得。

将各组处理后的样品分装至 PE 保鲜袋中,置于-20 °C 冰箱中冻藏 12 h,取出后将样品平铺在碎冰上置于 4 °C 冷藏解冻 12 h,视为一次冻融循环,重复此操作,分别在第 2, 4 和 6 次冻融循环结束后分别作傅里叶变换红外与拉曼光谱分析。

### 1.4 肌原纤维蛋白提取

样品经去头、去尾、去壳后,参考 Ma 等<sup>[8]</sup>法进行南美白对虾肌原纤维蛋白的提取,稍作修改。提取液采用 20 mmol·L<sup>-1</sup> pH 7.5 的磷酸盐缓冲溶液,漂洗液采用 0.1 mol·L<sup>-1</sup> NaCl。虾糜用 4 倍体积冰提取液匀浆,6 700 r·min<sup>-1</sup> 冷冻离心 15 min,去上清液液重复 2 次;沉淀加入 4 倍体积冰洗液匀浆,6 700 r·min<sup>-1</sup> 冷冻离心 15 min,去上清液重复 1 次;沉淀加入冰洗液,匀浆后 4 层纱布过滤,滤液 6 700 r·min<sup>-1</sup> 冷冻离心 15 min,沉淀为肌原纤维蛋白。将肌原纤维蛋白于-80 °C 冷冻 24 h 后取出,置于冻干机中干燥 72 h,于密闭瓶中-20 °C 保存备用。

### 1.5 傅里叶变换红外光谱分析

在(20±2) °C 室温条件下,取适量已冷冻干燥的南美白对虾肌原纤维蛋白与 KBr 混合、研磨与压片。参数设置参考相关文献,使用傅里叶变换红外光谱仪在 400~4 000 cm<sup>-1</sup> 波长范围进行扫描。

### 1.6 拉曼光谱分析

使用激光共聚焦显微拉曼光谱仪在 100~3 000 cm<sup>-1</sup> 波长范围进行扫描,参考高瑞昌等<sup>[7]</sup>法进行测试参数设置。

### 1.7 数据处理

样品的傅里叶变换红外光谱图通过 OMNIC 9.2. 106 光谱处理软件自动修饰校正。用 PeakFit v4.12 软件对样品的红外图谱和拉曼图谱进行基线校正、二阶导处理和高斯拟合,以利于区分重叠子峰,得到图谱的各特征峰峰强和峰面积,用 Origin 7.5 软件作图。

## 2 结果与讨论

### 2.1 一阶图谱分析

除蛋白侧链构象与肽链空间排列外,蛋白二级结构很大程度上决定了蛋白质的功能特性<sup>[13]</sup>。其主要有 $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠、 $\beta$ -转角和无规卷曲等形式<sup>[14]</sup>。蛋白质在红外和拉曼区有若干特征吸收带,如图 1 与图 2 所示。在一阶谱图上,重叠峰较明显,但可根据峰信号强弱判断各基团含量变化。

#### 2.1.1 傅里叶变换红外一阶谱图分析

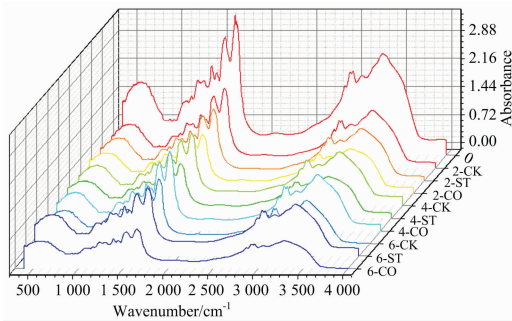


图 1 蒸馏水、三聚磷酸钠与卡拉胶处理下反复冻融南美白对虾肌原纤维蛋白红外谱图

0, 2-CK, 4-CK, 6-CK, 2-ST, 4-ST, 6-ST, 2-CO, 4-CO, 6-CO 分别代表新鲜样品组,蒸馏水处理冻融 2 次、4 次、6 次,三聚磷酸钠处理冻融 2 次、4 次、6 次,卡拉胶寡糖处理冻融 2 次、4 次、6 次

Fig. 1 FTIR spectra of myofibrillar proteins in shrimp muscle during distilled water, sodium triphosphate and carrageenan oligosaccharide treatments on 0 F-T cycle (0), 2 F-T cycles (2-CK, 2-ST, 2-CO), 4 F-T cycles (4-CK, 4-ST, 4-CO) and 6 F-T cycles (6-CK, 6-ST, 6-CO)

由图 1 可以看出,红外特征峰的变化主要包括 1 500~1 600  $\text{cm}^{-1}$  的酰胺 II 带、1 600~1 700  $\text{cm}^{-1}$  的酰胺 I 带、2 929  $\text{cm}^{-1}$  处—CH 的特征吸收峰和 3 296  $\text{cm}^{-1}$  处的单强峰,分别是由 C—N 伸缩和 N—H 弯曲振动、羰基 C=O 和双键伸缩振动、C—H 伸缩振动、O—H 伸缩振动引起。位于 1 600~1 700  $\text{cm}^{-1}$  的酰胺 I 带可反映蛋白质二级结构的变化,其吸收最强<sup>[13]</sup>。对比新鲜南美白对虾肌肉蛋白的红外谱图,随冻融次数的增加,经不同预处理(CK, ST, CO)的虾肉蛋白,其红外光谱中特征峰峰强明显减弱,表明反复冻融造成肌肉肌原纤维蛋白结构破坏和二级结构的转化和改变。

#### 2.1.2 拉曼光谱一阶谱图分析

利用蛋白质分子中 C—N 键和 C=O 键伸缩振动的拉曼活性可得到其拉曼波谱(图 2)。

由图 2 可知,不同预处理下的南美白对虾经不同次数冻融后,其拉曼图谱中发生的变化主要包括 C=O 伸缩结合部分 C—N 伸缩和 N—H 弯曲振动引起的 1 645~1 685  $\text{cm}^{-1}$  酰胺 I 带、C—N、C—C 伸缩振动和 N—H 弯曲振动的 1 220~1 350  $\text{cm}^{-1}$  酰胺 III 带、C—H 弯曲振动产生的 1 440~1 465  $\text{cm}^{-1}$  谱带及 C—H 伸缩振动产生的 2 940  $\text{cm}^{-1}$  附近的

谱带。蛋白质主链构象的各种二级结构变化可由该拉曼图谱中酰胺 I 带和 III 带的谱峰强度变化来表征,说明冻融循环和不同预处理使虾肉肌原纤维蛋白结构发生了不同程度变化<sup>[16]</sup>。

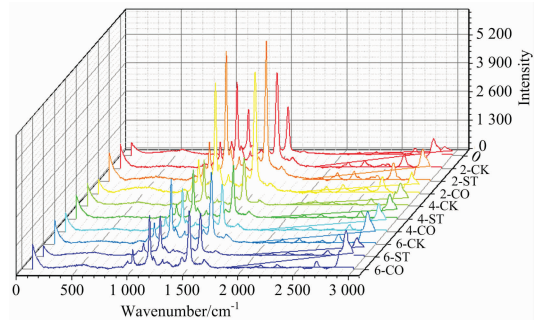


图 2 蒸馏水、三聚磷酸钠与卡拉胶处理下反复冻融南美白对虾肌原纤维蛋白拉曼谱图

0, 2-CK, 4-CK, 6-CK, 2-ST, 4-ST, 6-ST, 2-CO, 4-CO, 6-CO 分别代表新鲜样品组,蒸馏水处理冻融 2 次、4 次、6 次,三聚磷酸钠处理冻融 2 次、4 次、6 次,卡拉胶寡糖处理冻融 2 次、4 次、6 次

Fig. 2 Raman spectra of myofibrillar proteins in shrimp muscle during distilled water, sodium triphosphate and carrageenan oligosaccharide treatments on 0 F-T cycle (0), 2 F-T cycles (2-CK, 2-ST, 2-CO), 4 F-T cycles (4-CK, 4-ST, 4-CO) and 6 F-T cycles (6-CK, 6-ST, 6-CO)

### 2.2 酰胺 I 带的二阶(2DCOS-IR)高斯拟合图谱分析

通常,红外和拉曼光谱一阶图谱中极易出现重叠峰,通过二阶导数和各种曲线拟合可放大一些细小峰变化,得到单个谱带的信息<sup>[7,17]</sup>。本研究特对各组样品红外和拉曼图谱的酰胺 I 带作高斯曲线(Gauss formula)拟合,得到各子峰<sup>[18]</sup>。

#### 2.2.1 傅里叶变换红外酰胺 I 带高斯拟合图谱分析

图 3 显示了不同预处理条件下,南美白对虾肌肉蛋白经反复冻融后红外光谱中酰胺 I 带高斯拟合结果,各特征峰峰强顶点横坐标为该峰的位置,纵坐标为该峰的峰强。图中 1 600~1 640, 1 640~1 650, 1 650~1 660 及 1 660~1 700  $\text{cm}^{-1}$  波数处谱峰分别表征 $\beta$ -折叠、无规卷曲、 $\alpha$ -螺旋和 $\beta$ -转角结构<sup>[14]</sup>。

图 3 中根据各特征峰的纵坐标峰强度变化可明显看出,随冻融次数增加,不同预处理的虾肉蛋白酰胺 I 带的谱峰强度出现不同程度减弱。三聚磷酸钠处理虽在一定程度上延缓了其峰强减弱进程,但其在冻融后期与 CK 组样品差异不显著,而 CO 组样品峰强在整个冻融过程中明显高于其余两组。表明样品经冻融处理,其蛋白二级结构已遭到破坏,蛋白氧化变性加剧。卡拉胶寡糖处理对样品蛋白二级结构的保护作用比三聚磷酸钠处理更持久、更明显,能较好延缓样品中的蛋白损失。

#### 2.2.2 拉曼酰胺 I 带高斯拟合图谱分析

图 4 显示了南美白对虾经 3 种方式处理后,其肌原纤维蛋白酰胺 I 带的高斯拟合拉曼图谱。研究发现,若酰胺 I 带中谱峰集中于 1 650~1 660  $\text{cm}^{-1}$  处,表明该样品蛋白中含有

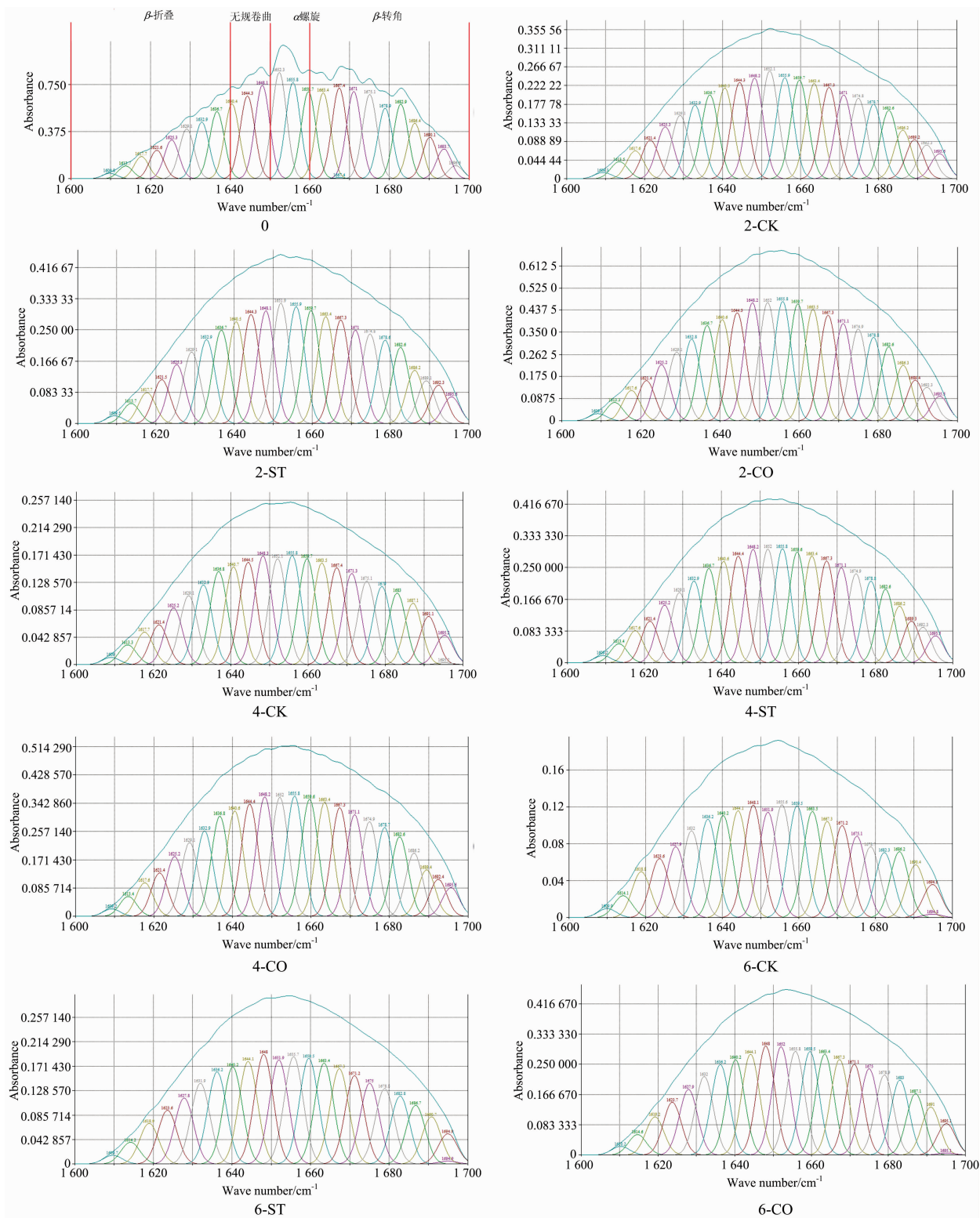


图 3 蒸馏水、三聚磷酸钠与卡拉胶处理下反复冻融南美白对虾肌原纤维蛋白酰胺 I 带(1 600~1 700  $\text{cm}^{-1}$ )高斯拟合红外谱图 0, 2-CK, 4-CK, 6-CK, 2-ST, 4-ST, 6-ST, 2-CO, 4-CO, 6-CO 分别代表新鲜样品组, 蒸馏水处理冻融 2 次、4 次、6 次, 三聚磷酸钠处理冻融 2 次、4 次、6 次, 卡拉胶寡糖处理冻融 2 次、4 次、6 次

Fig. 3 Gauss formula curve-fitting FTIR spectra of the amide I (1 600~1 700  $\text{cm}^{-1}$ ) region on myofibrillar proteins in shrimp muscle during distilled water, sodium tripolyphosphate and carrageenan oligosaccharide treatments on 0 F-T cycle (0), 2 F-T cycles (2-CK, 2-ST, 2-CO), 4 F-T cycles (4-CK, 4-ST, 4-CO) and 6 F-T cycles (6-CK, 6-ST, 6-CO)



大量的  $\alpha$ -螺旋结构;若集中于  $1\ 665\sim 1\ 680\ \text{cm}^{-1}$ ,表明含大量  $\beta$ -折叠结构;若集中于  $1\ 660\sim 1\ 665\ \text{cm}^{-1}$ ,则表明含大量无规卷曲或无序结构<sup>[18]</sup>。同 FTIR 结果一致,对比新鲜虾肉肌原纤维蛋白酰胺 I 带谱峰强度,三组蛋白酰胺 I 带各谱峰强度随冻融次数增加呈不同程度减弱,表明蛋白发生氧化变性,二级结构受到不同程度破坏;且对比  $1\ 660\sim 1\ 665$  与  $1\ 665\sim 1\ 680\ \text{cm}^{-1}$ ,  $1\ 650\sim 1\ 660\ \text{cm}^{-1}$  处谱峰强度减弱更明显,表明在冻融过程中可能发生了  $\alpha$ -螺旋向  $\beta$ -折叠或无规卷曲转化。CO 组样品的谱峰强度直到第 6 次冻融时才出现明

显减弱,表明卡拉胶寡糖处理能延缓样品蛋白结构的解螺旋与再折叠,该结果进一步证实了红外光谱的分析结论。

### 2.3 酰胺 I 带谱图高斯拟合定量分析

依据红外和拉曼酰胺 I 带高斯曲线拟合后各特征峰的峰面积,可得到南美白对虾肌原纤维蛋白对应二级结构的百分比变化,结果由表 2 所示。

表 2 中拉曼光谱谱带并不能明显区分  $\beta$ -折叠和  $\beta$ -转角,而由红外数据可知,南美白对虾肌原纤维蛋白二级结构主要是  $\beta$ -转角,其次为  $\beta$ -折叠、 $\alpha$ -螺旋和无规卷曲结构的含量相

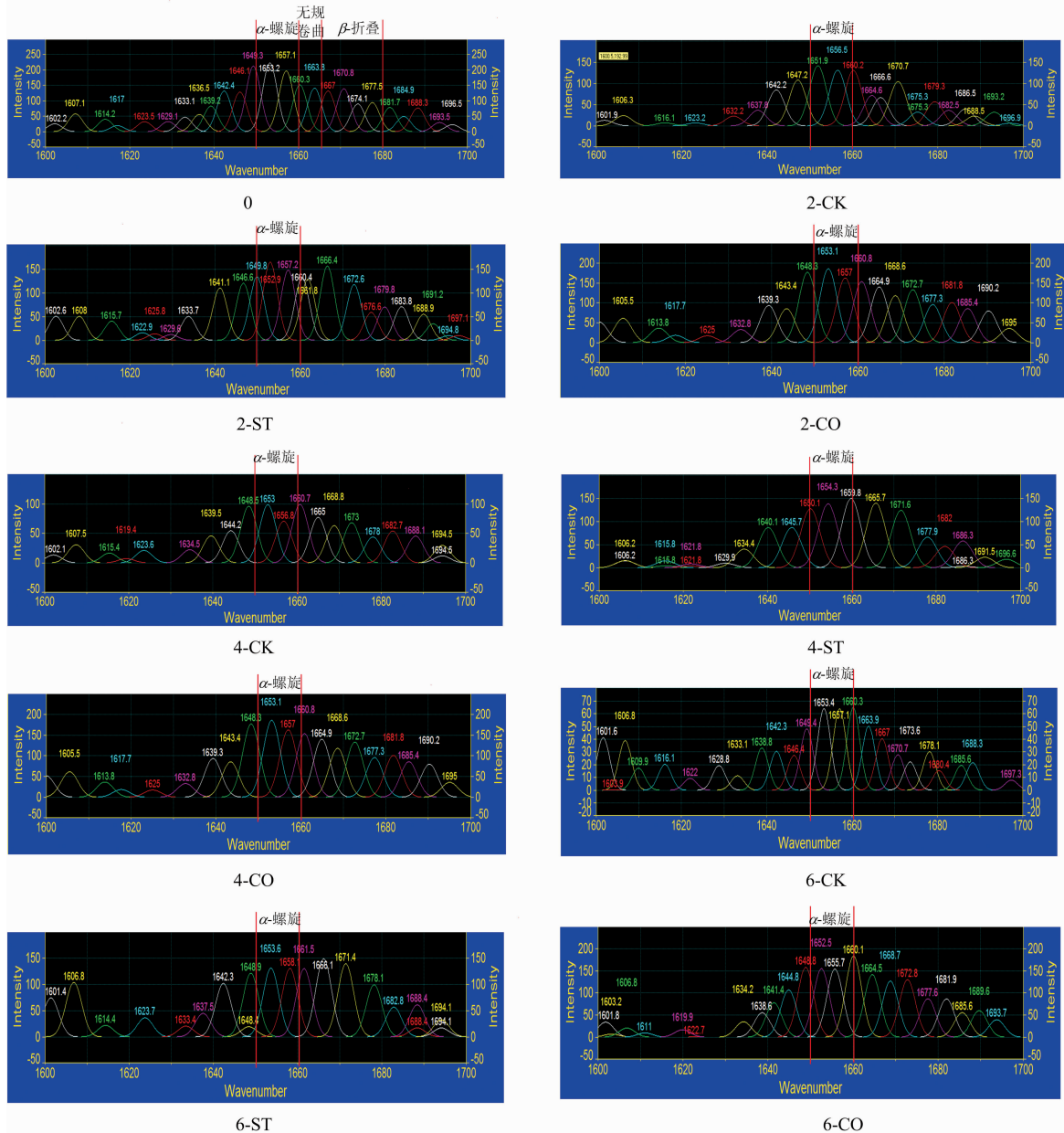


图 4 不同处理下反复冻融南美白对虾肌原纤维蛋白酰胺 I 带 ( $1\ 600\sim 1\ 700\ \text{cm}^{-1}$ ) 高斯拟合拉曼谱图

0, 2-CK, 4-CK, 6-CK, 2-ST, 4-ST, 6-ST, 2-CO, 4-CO, 6-CO 分别代表新鲜样品组,蒸馏水处理冻融 2 次、4 次、6 次,三聚磷酸钠处理冻融 2 次、4 次、6 次,卡拉胶寡糖处理冻融 2 次、4 次、6 次

Fig. 4 Gauss formula curve-fitting Raman spectra of the amide I ( $1\ 600\sim 1\ 700\ \text{cm}^{-1}$ ) region on myofibrillar proteins in shrimp muscle during distilled water, sodium tripolyphosphate and carrageenan oligosaccharide treatments on 0 F-T cycle (0), 2 F-T cycles (2-CK, 2-ST, 2-CO), 4 F-T cycles (4-CK, 4-ST, 4-CO) and 6 F-T cycles (6-CK, 6-ST, 6-CO)

对较少。该结果与王萌等研究结果一致,体现了 FTIR 对拉曼的补充作用。表 2 红外数据显示,新鲜虾肉蛋白中各二级结构的含量分别为 43.22%, 19.32%, 17.24% 与 19.90%, 结合拉曼光谱数据分析得出,随着冻融次数的增加,南美白对虾肌肉蛋白的无规卷曲含量有所增加, $\alpha$ -螺旋结构含量减少,总无规卷曲和总  $\alpha$ -螺旋比值随之增加,表明反复冻融破坏了南美白对虾肌肉蛋白二级结构的稳定性,可能造成蛋白结构中  $\alpha$ -螺旋向  $\beta$ -折叠或无规卷曲转化。此外,对于总无规卷曲与总  $\alpha$ -螺旋的比值,CO 组和 ST 组均低于 CK 组,且

CO 组在中后期最低。表明 ST 和 CO 对蛋白二级结构及维持其结构稳定性的氢键均具有保护作用,CO 对蛋白结构的稳定作用更明显。由于蛋白结构稳定性的破坏与二级结构间和内部氢键的断裂有关,也是蛋白质变性的根本原因<sup>[6]</sup>。因此,结果表明卡拉胶寡糖对南美白对虾肌肉品质和口感的保护可能延缓了反复冻融过程中虾肉蛋白间氢键及二级结构的破坏,维持蛋白在冻融过程中的功能特性,从而延缓其品质劣变。

表 2 不同处理下反复冻融南美白对虾肌原纤维蛋白二级结构含量比例变化 (%)

Table 2 Changes in secondary structure of myofibrillar protein in shrimp with different F-T cycles under different treatments (%)

二级结构	光谱类别	新鲜样品	2 次冻融循环			4 次冻融循环			6 次冻融循环		
			CK	ST	CO	CK	ST	CO	CK	ST	CO
总 $\beta$ -折叠	红外	19.32	22.53	22.80	22.21	22.84	23.52	22.15	21.55	22.7	22.90
	拉曼	16.88	23.03	18.94	26.14	19.94	21.58	27.98	19.85	18.12	19.89
总无规卷曲	红外	17.24	18.13	17.98	17.94	18.52	18.26	18.00	18.89	18.79	18.21
	拉曼	8.77	16.01	12.79	12.71	16.77	16.11	14.89	18.76	18.19	15.96
总 $\alpha$ -螺旋	红外	19.90	19.16	19.30	19.72	18.98	19.23	19.47	18.94	19.09	19.35
	拉曼	22.64	17.84	17.89	22.54	17.63	17.87	19.00	17.25	17.45	18.32
总 $\beta$ -转角	红外	43.22	40.08	39.72	39.55	39.41	38.74	39.92	40.43	39.07	39.01
	拉曼										
总无规卷曲/ 总 $\alpha$ -螺旋	红外	0.87	0.95	0.93	0.91	0.98	0.95	0.92	0.99	0.98	0.94
	拉曼	0.39	0.90	0.71	0.56	0.95	0.90	0.78	1.09	1.04	0.87
总 $\beta$ -折叠/ 总 $\beta$ -转角	红外	0.45	0.56	0.57	0.56	0.58	0.61	0.55	0.53	0.58	0.59
	拉曼										

## 2.4 其他谱带分析

蛋白质分子的氨基酸组成特别是暴露于蛋白质分子表面的氨基酸组成很大程度上影响蛋白质分子二、三级结构<sup>[19]</sup>, 导致功能性质如蛋白质分子疏水性变化。

### 2.4.1 酪氨酸残基相关谱带分析

酪氨酸等疏水芳香族氨基酸侧链参与氢键形成,在拉曼谱图中的特征峰变化可用于检测极性微环境或氢键的活动<sup>[7]</sup>。拉曼谱图中谱带 850 和 830  $\text{cm}^{-1}$  来自于酪氨酸残基的对位取代苯振动,其峰强比可反映酪氨酸在蛋白质中所处的微环境。当其强度比为 0.7~1.0 时,酪氨酸残基完全“埋藏”在疏水环境即未裸露;当强度比为 1.0~1.25 时,酪氨酸残基开始暴露;当强度比高于 1.25 时,酪氨酸残基已逐渐暴露于蛋白分子表面<sup>[7]</sup>。

由图 5 可知,对于新鲜虾肉蛋白,其峰强度比值为 1.101,表明样品蛋白分子内及分子间氢键发生少数断裂,酪氨酸大部分“埋藏”在疏水环境中。在三组中,该比值均随冻融次数增加,总体呈增加趋势。在 CK, ST 及 CO 组冻融 6 次后,该比值升至 2.160, 1.689 和 1.483,表明随冻融次数增加,肌肉蛋白中酪氨酸残基逐渐暴露,且 CO 对其保护作用明显高于 ST,即对蛋白结构具有稳定作用,延缓其蛋白变性。

### 2.4.2 脂肪族残基相关谱带分析

大部分拉曼谱带与多种氨基酸有关,而红外光谱则对此

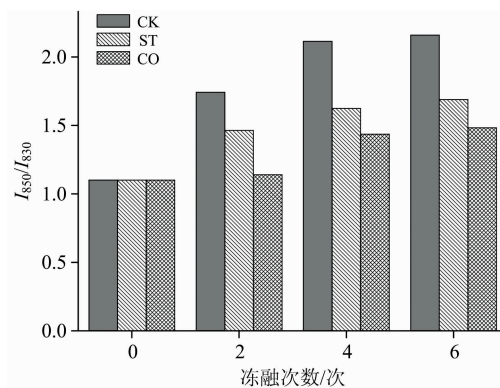


图 5 不同处理下反复冻融南美白对虾蛋白在 850 和 830  $\text{cm}^{-1}$  波数处拉曼强度比

Fig. 5 The ratio of Raman intensity at 850 and 830  $\text{cm}^{-1}$  of shrimp with different treatments during F-T cycles

并不敏感。南美白对虾肌原纤维蛋白中 C—H 键弯曲和伸缩振动在谱图上反映的拉曼谱峰位于 1 435~1 470 与 2 800~3 100  $\text{cm}^{-1}$ , 分别用于监测脂肪族残基间的疏水相互作用和脂肪族疏水侧链的暴露<sup>[20]</sup>。通过计算得到不同处理、冻融次数下 2 935 和 1 448  $\text{cm}^{-1}$  处相对强度,结果见表 3。

由表 3 可知,样品经 6 次冻融后,CO 组 C—H 键 1 448 和 2 935  $\text{cm}^{-1}$  处的相对强度分别由新鲜的 2.625, 1.341 升

表 3 不同处理下反复冻融南美白对虾蛋白在 1 448 和 2 935  $\text{cm}^{-1}$  处相对拉曼强度变化  
Table 3 The changes of  $I_{1\ 448\ \text{cm}^{-1}}$  and  $I_{2\ 935\ \text{cm}^{-1}}$  in shrimps with different treatments during F-T cycles

波数/ $\text{cm}^{-1}$	0 F-T cycles	2 F-T cycles			4 F-T cycles			6 F-T cycles		
		CK	ST	CO	CK	ST	CO	CK	ST	CO
1 448	2. 625	7. 144	6. 327	3. 516	10. 016	7. 939	5. 400	11. 687	8. 395	5. 947
2 935	1. 341	2. 784	2. 490	1. 443	4. 508	3. 075	1. 771	5. 091	3. 634	2. 347

至 5.947, 2.347, ST 组样品则升至 8.395, 3.634, 空白组样品升至 11.687, 5.091。对虾肌肉蛋白同时受处理方式和冻融循环影响, 主要表现在两处谱带不同程度增强。反复冻融过程中蛋白质溶解性下降和疏水性增强主要由于该过程可能造成样品中蛋白质主链变化和侧链疏水氨基酸残基暴露, 使蛋白分子间疏水相互作用增强。由此可知, 卡拉胶寡糖处理可明显延缓疏水侧链的暴露, 保护反复冻融过程中虾肉蛋白结构变化, 维持肌肉蛋白良好的功能特性, 改善其综合品质。

### 3 结 论

傅里叶变换红外和拉曼光谱提供了兼容互补的信息, 可更好地分析样品经处理后蛋白的结构变化。一阶谱图表明反

复冻融次数的增加加速了蛋白含量损失和蛋白结构破坏, 而酰胺 I 带 ( $1\ 600\sim 1\ 700\ \text{cm}^{-1}$ ) 的二阶导高斯曲线拟合可反映在冻融过程中虾肉肌原纤维蛋白二级结构中  $\alpha$ -螺旋的减少和无规卷曲结构的增加, 卡拉胶寡糖和三聚磷酸钠组显示出对样品蛋白二级结构, 特别是对  $\alpha$ -螺旋的保护作用, 其中以卡拉胶寡糖的作用效果更明显, 且红外在反映蛋白二级结构时比拉曼更敏感。由拉曼谱带可看出, 样品在冻融过程中, 由于冰晶的反复形成, 使氢键受到破坏, 酪氨酸与疏水基残基暴露, 蛋白疏水性增加, 而卡拉胶寡糖可明显延缓其变化。综上可知, 卡拉胶寡糖可通过对南美白对虾肌肉蛋白二级结构和分子间、分子内氢键的保护、使侧链酪氨酸残基和脂肪族疏水基暴露进程延缓, 保护样品在冻融过程中蛋白功能特性劣变, 延缓其综合品质下降。

### References

- [1] LIU Yan-de, XIAO Huai-chun, SUN Xu-dong, et al(刘燕德, 肖怀春, 孙旭东, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2018, 38(2): 528.
- [2] Flores-Morales A, Jiménez-Estrada M, Mora-Escobedo R. Carbohydrate Polymers, 2012, 87(1): 61.
- [3] Sivam A S, Sun-Waterhouse D, Perera C O, et al. Food Research International, 2013, 50(2): 574.
- [4] Yuka K, Steven G M, Jae W P. Food Chemistry, 2017, 226: 156.
- [5] Guo X X, Hu W, Liu Y, et al. Journal of Molecular Structure, 2015, 1099: 393.
- [6] Liu Y, Hu W, Guo X X, et al. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2015, 149: 516.
- [7] GAO Rui-chang, GAI Jing, SUN Lu, et al(高瑞昌, 盖静, 孙璐, 等). China Food Journal(中国食品学报), 2016, 16(2): 218.
- [8] Ma L K, Zhang B, Deng S G, et al. Journal of Food Science, 2015, 80(3): 540.
- [9] Nguyen M V, Jonsson J O, Thorkelsson G, et al. LWT-Food Science and Technology, 2012, 47: 126.
- [10] Xie C, Zhang B, Ma L K, et al. Journal of Food Processing and Preservation, 2017, 41(2): e12825.
- [11] Zhang B, Yang H C, Tang H, et al. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(8): 1792.
- [12] Zhang B, Fang C D, Hao G J, et al. Food Chemistry, 2018, 245: 254.
- [13] LIU Chun-lei, SUN Li-bin, LI Xiang-xin, et al(刘春雷, 孙立斌, 李相昕, 等). Food Science(食品科学), 2015, 36(17): 28.
- [14] ZHANG Qiu-hui, HUANG Xian-qing, LI Miao-yun, et al(张秋会, 黄现青, 李苗云, 等). Food and Fermentation Industries(食品与发酵工业), 2015, 41(10): 247.
- [15] Fu L, Chen X, Wang Y. Food Chemistry, 2014, 151: 306.
- [16] Poowakanjana S, Mayer S G, Park J W. Journal of Food Science, 2012, 77(4): 88.
- [17] Hu W, Guo X X, Wang X C, et al. Food Analytical Methods, 2016, 9(4): 831.
- [18] Herrero A M. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2008, 48(6): 512.
- [19] Shuryo N. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1983, 31(4): 676.
- [20] Lin-Vien D, Colthup N B, Fateley W G, et al. Chapter 9-Compounds Containing the Carbonyl Group. Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules. San Diego: Academic Press, 1991: 136.

# Effects of Carrageenan Oligosaccharides on the Protein Structure of *Litopenaeus Vannamei* by Fourier Transform Infrared and Micro-Raman Spectroscopy

LAN Wei-qing<sup>1, 2, 3</sup>, HU Xiao-yu<sup>3</sup>, RUAN Dong-na<sup>1\*</sup>, LIU Shu-cheng<sup>2</sup>, XIE Jing<sup>3\*</sup>

1. Key Laboratory of Refrigeration and Conditioning Aquatic Products Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Fujian Anjoy Foods Co. Ltd., Xiamen 361022, China
2. College of Food Science & Technology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Product Processing and Safety, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China
3. College of Food Science and Technology, Shanghai Aquatic Products Processing and Storage Engineering Technology Research Center, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

**Abstract** In order to study the influencing mechanism of carrageenan oligosaccharide on the muscle quality and protein in *Litopenaeus vannamei* during F-T cycles, the myofibrillar protein of samples during F-T cycles with different pretreatment methods (sterile distilled water, tripolyphosphate and carrageenan oligosaccharide) were measured respectively by Fourier Transform Infrared (FT-IR) and Micro-Raman (M-Raman). The data of FT-IR and M-Raman for myofibrillar protein in *Litopenaeus vannamei* with different pretreatments after 0, 2, 4, 6 F-T cycles were collected respectively. The results showed that the destructive effect of F-T cycles on the protein structure in *Litopenaeus vannamei* could be demonstrated by first-order spectrogram, and the structural changes of protein under different pretreatments could be qualitatively and quantitatively analyzed by second order derivation and gaussian curve fitting. The intensity changes of each characteristic peak at first-order spectrogram in FT-IR and M-Raman were indicated that F-T cycles could aggravate the loss and structural damage of muscle protein in shrimp. The primary chain conformation of secondary structure in the shrimp muscle protein was mainly characterized by amide band I ( $1\ 600\sim 1\ 700\text{ cm}^{-1}$ ). The results of FT-IR showed that the secondary structure of fresh shrimp protein was mainly  $\beta$ -turn, followed by  $\beta$ -sheet. It could compensate for the insensitivity of  $\beta$ -turn and  $\beta$ -sheet by M-Raman. The amide band I of FT-IR and M-Raman spectrum after gaussian fitting qualitatively and quantitatively showed the secondary structure changes of protein during F-T cycles mainly made the decrease of  $\alpha$ -helix and the increase of random coil, and carrageenan oligosaccharide pretreatment could significantly inhibit the loss of  $\alpha$ -helix in shrimp protein during F-T cycles. FT-IR was not sensitive to the changes in the compositions of amino acid exposed to protein surface, while M-Raman spectra could compensate it to show the changes in protein conformation on side chain. The bands represented that tyrosine residues appeared at  $850$  and  $830\text{ cm}^{-1}$ , and the peak intensity ratio indicated the exposure of tyrosine, which showed an increasing trend during F-T cycles. The C—H bending and stretching vibration of aliphatic side chain amino acid residues were in  $1\ 440\sim 1\ 465$  and  $1\ 465\sim 2\ 800\text{ cm}^{-1}$  respectively, and the peak strength changes of  $1\ 448$  and  $2\ 935\text{ cm}^{-1}$  were on behalf of hydrophobic interaction strength of amino acid on side chain, which increased during F-T cycles. The changes in characteristic spectral bands of protein on side chains by M-Raman showed that F-T cycles made the hydrogen bond rupture of protein intramolecular or intermolecular, the exposure of tyrosine or amino acid residues on aliphatic side chain, and carrageenan oligosaccharides pretreatment could slow down the change significantly. Therefore, carrageenan oligosaccharides could delay the rupture of hydrogen bond and exposure of side chain hydrophobic group in muscle protein during F-T cycles, the secondary structure of protein could be further stabilized, the function of protein could be maintained and the quality of shrimp could be improved under F-T cycles. In addition, the innovative combination of FT-IR and M-Raman spectra was applied to the research on the mechanism of carrageenan oligosaccharide for improving the muscle quality under F-T cycles. It was found that FT-IR was more sensitive to the characterization of secondary structure in muscle protein, while M-Raman spectra could provide the theoretical references for the conformation changes of protein on side chains. The combination of them could provide the compatible and complementary information to better analyze the structural changes of protein in samples after different pretreatments.

**Keywords** Fourier transform infrared absorption spectroscopy(FT-IR); Micro-Raman spectroscopy; *Litopenaeus Vannamei*; Protein structure