

文章编号: 1000- 0615(2001)04- 0363- 04

## 鲮在冷冻过程中蛋白质的变性

李来好, 陈培基, 李刘冬, 杨贤庆, 吴燕燕, 刁石强

(中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300)

**摘要:** 通过研究鲮在冷冻过程中  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 的活性、挥发性盐基氮和凝胶强度的变化, 为鲮鱼的冷冻加工提供理论依据。结果表明, 抗冻剂能有效地抑制鲮鱼在冷冻过程中  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性的下降, 同时能提高鲮鱼糜的凝胶强度且防止鲮鱼糜在冷冻过程中凝胶强度的下降。抗冻剂在鲮鱼冷冻加工中的应用是行之有效的。

**关键词:** 鲮; 蛋白质变性; 抗冻剂;  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性; 挥发性盐基氮; 凝胶强度

中图分类号: S984.1 文献标识码: A

## Protein denaturation of *Mugil cephalus* in refrigeration

LI Lai-hao, CHEN Pei-ji, LI Liu-dong, YANG Xian-qing, WU Yan-yan, DIAO Shi-qiang

(South China Sea Fisheries Institute, CAFS, Guangzhou 510300, China)

**Abstract:** Activity of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, TVB-N and jelly strength of *Mugil cephalus* were studied in refrigeration for providing theoretical basis for processing. The results showed that addition against freezing could efficiently control decreasing of activity of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of *Mugil cephalus* in refrigeration, and increase jelly strength of surimi of it and control decreasing of it. Therefore application of addition against freezing was practicable and efficient in processing *Mugil cephalus*.

**Key words:** *Mugil cephalus*; protein denaturation; addition against freezing; activity of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase; total volatility basis nitrogen; jelly strength

鲮(*Mugil cephalus*) 隶属于鲮科(*Mugilidae*)、鲮属、广温、广盐性鱼类。对温度的适应范围为 3~35℃, 适宜水温为 12~32℃, 对盐度的适应范围为 0~40, 可在淡水、咸淡水和咸水中生活, 喜欢栖息在沿海近岸、海湾和江河入海口处, 是我国南方沿海咸淡水养殖的最主要的经济鱼类之一, 也是世界上分布最广的重要经济鱼类之一<sup>[1]</sup>。目前广东鲮鱼养殖面积已达 6500 ha, 随着鲮鱼养殖面积的扩大和养殖技术的提高, 鲮鱼产量也在不断的增长, 但是鲮鱼的加工技术跟不上养殖业的发展, 主要原因是鲮鱼容易发生冷冻变性, 所以鲮鱼的销售只停留在鲜销, 这样大大抑制了鲮鱼养殖业的发展。目前应用  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性来研究鱼糜蛋白质冷冻变性的报道不少, 但以  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性作为冷冻变性的指标来研究鲮鱼蛋白质的冷冻变性, 几乎未见报道。本文借鉴前人在研究鱼糜蛋白质冷冻变性方面的工作<sup>[2]</sup>, 通过研究鲮鱼在冷冻过程中  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 的活性、挥发性盐基氮(TVB-N) 和凝胶强度的变化, 探讨鲮鱼冷冻加工的可行性, 为鲮鱼的冷冻加工提供理论依据和工艺技术。

收稿日期: 2000-02-02

基金项目: 中国水产科学研究院“九五”基金资助项目(99-04-01)

第一作者: 李来好(1963-), 男, 广东潮阳人, 副研究员, 硕士生导师, 从事水产品加工与综合利用。Tel: 020-84195166, E-mail: jgs@

gz.cngh.com

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

原辅料: 鲮鱼购于广东省东莞市鲮鱼养殖场养殖的鲜活鲮鱼, 运回广州时仍保持鲜活状。添加剂为蔗糖、山梨醇和复合磷酸盐, 购于广州市食品研究所。底物采用中国科学院上海生物化学研究所生产的 ATP 二钠盐。

主要试剂: 高离子强度盐溶液(0.1M KCl+ 0.01M NaCO<sub>3</sub>+ 0.04M NaHCO<sub>3</sub>); 20mM 三羟甲基氨基甲烷盐酸(Tris-HCl)缓冲溶液(pH7.0); 50mM CaCl<sub>2</sub>; 4M KCl; 6.7mM 三磷酸腺苷二钠盐(ATP-Na<sub>2</sub>); 15% 三氯醋酸(CCl<sub>3</sub>COOH)。

### 1.2 方法

肌原纤维蛋白的制备: 按照参考文献[2]有关提取肌原纤维蛋白的方法, 并作了一些改动。

取鲮鱼的肌肉(背肌) 2g, 放在玻璃研钵中并置于冰箱急冻室冷冻 5~10min, 取出研碎, 在冻水浴中边研磨边加入 20 mL 预冷的高离子强度盐溶液, 研磨 15min。然后加 10 倍冰水稀释, 搅匀放在 4000 r/min 的离心机中离心 10min, 倒去上层清液, 取出沉淀物。再重复上面洗净处理 3 次, 最后得到的肌原纤维沉淀物用玻璃匀浆器加 Tris-HCl 缓冲溶液(pH7.0) 匀浆搅匀, 然后定容至 100 mL, 所得的肌原纤维悬浊液供 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性和蛋白质含量测定用。

Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性的测定: 在试管中加入 20mM Tris-HCl 2.5 mL、50mM CaCl<sub>2</sub> 1.0 mL、4MKCl 1.0 mL、6.67mM ATP-Na<sub>2</sub> 1.5 mL 和 4.0 mL 肌原纤维蛋白酶液, 置于 28℃ 的水浴中保温 30min, 以加入酶液开始反应, 反应体积为 10 mL, 最后加入 1.0 mL 15% 的三氯醋酸终止反应。空白对照组自反应开始即加 1.0 mL 15% 的三氯醋酸。反应终止后用滤纸过滤, 滤液定容至 100 mL。用钼酸铵法在 690nm 波长(国产 722 型分光光度计) 比色测定磷含量。

Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性单位, 是在一定的条件下, 以每分钟每毫克肌原纤维蛋白酶分解 ATP 所释放的磷酸根中磷微克分子量来计算( $\mu\text{mol Pi}/\text{min}\cdot\text{mg pro.}$ )<sup>[3]</sup>。

蛋白质含量测定: 半微量凯氏定氮法<sup>[4]</sup>。

挥发性盐基氮的测定: 半微量蒸馏法<sup>[4]</sup>。

凝胶强度的测定: 取绞碎后的鲮鱼糜加 2.5% 的食盐和 8% 的淀粉擂溃 30min。然后用塑料肠衣灌肠, 在 85~90℃ 的温度下加热 40min, 在 5℃ 恒温箱中放置 1 夜后, 切成直径 30mm, 高 25mm 的小圆柱体, 放在流变仪上进行测定, 从探头压入凝胶体时开始至凝胶体破裂时测得的破裂强度乘以破裂时探头压入的深度来计算凝胶强度, 单位为 g×cm。每个样品重复测量 10 次, 取平均值<sup>[5,6]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 鲮鱼在冷冻过程中 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性和 TVB-N 值的变化

将鲜活鲮鱼击毙后取鱼片并分成两份, 一份作为空白对照组, 另一份在抗冻液<sup>[6]</sup>(6% 蔗糖、6% 山梨醇和 0.6% 复合磷酸盐) 中浸泡 10min 后, 置于 -18℃ 条件下贮藏 90d, 每隔 30d 测一次 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性和 TVB-N 值(其中 0d 为未经冷冻的样品), 观察鲮鱼在冷冻过程中 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性和 TVB-N 的变化, 结果见表 1。

表 1 结果可见, 鲮鱼经过 30d 的低温冷冻, Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性由 0.297 降至为 0.085, 下降幅度达 71.38%, 并随着冷冻时间的延长, Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性继续下降; 而鲮鱼经抗冻剂浸泡后经过 30d 的冷冻, Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性由 0.303 降为 0.245, 下降幅度仅为 19.14%, 并随着冷冻时间的延长, Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性趋向稳定。

由表 1 显示, 无论是空白对照组还是加抗冻剂的试验组, 随着冷冻时间的延长, 鲮鱼的 TVB-N 值也

随着增大,但远远未达到初期腐败的指标。

表 1 鲮鱼在冷冻过程中  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性和 TVB-N 值的变化

Tab. 1 The change of activity of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase and value of TVB-N of *M. cephalus* in refrigeration

冷冻时间 (d)	空白对照组		抗冻剂处理组	
	$\text{Ca}^{2+}$ -ATPase	TVB-N	$\text{Ca}^{2+}$ -ATPase	TVB-N
	( $\mu\text{mol Pi}/\text{min}\cdot\text{mg pro.}$ )	( $\text{mg}/100\text{g}$ )	( $\mu\text{mol Pi}/\text{min}\cdot\text{mg pro.}$ )	( $\text{mg}/100\text{g}$ )
0	0.297	10.84	0.303	10.96
30	0.085	11.91	0.245	11.93
60	0.049	13.32	0.228	12.88
90	0.026	16.46	0.222	15.79

## 2.2 不同抗冻剂对鲮鱼蛋白质冷冻变性的影响

为了进一步验证不同抗冻剂对鲮鱼蛋白质冷冻变性的特殊性,将鲮鱼分别用 6% 蔗糖、6% 山梨醇和 0.6% 磷酸盐及 12.6% 复合抗冻剂(蔗糖:山梨醇:磷酸盐之比为 6:6:0.6)溶液浸泡 10min,置于  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下贮藏 30d,分别在 0d(未经冷冻)、1d、3d、10d、30d 测定  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性,结果见表 2。

表 2 不同抗冻剂对鲮鱼蛋白质冷冻变性的影响

Tab. 2 The effect of different additions against freezing on protein denaturation of *M. cephalus*

冷冻时间 (d)	空白对照	蔗糖	山梨醇	磷酸盐	复合 抗冻剂
0	0.297	0.296	0.293	0.301	0.303
1	0.378	0.403	0.398	0.385	0.427
3	0.335	0.364	0.369	0.344	0.381
10	0.136	0.269	0.241	0.217	0.298
30	0.085	0.189	0.170	0.160	0.245

由表 2 可见,鲮鱼在冷冻 1d 的  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性不但没有下降,而且还上升,这与陈焕铨等<sup>[2]</sup>、林洪等<sup>[7]</sup>的研究结果是一致的。此后,随着冷冻时间的延长,鲮鱼的  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性随着下降。4 种抗冻剂对防止鲮鱼在冷冻过程中蛋白质的变性均有作用,且效果十分明显,其中复合抗冻剂的效果最好,蔗糖、山梨醇和磷酸盐次之,但后三者的差别并不太大。

## 2.3 鲮鱼糜在冷冻过程中凝胶强度的变化

为了探讨以鲮鱼为原料生产鱼糜制品的可行性,将鲮鱼制成鱼糜后添加抗冻剂<sup>[6,8-10]</sup>(3% 蔗糖、3% 山梨醇和 0.3% 复合磷酸盐),并于  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下贮藏 90d,每隔 30d 测一次凝胶强度(其中 0d 为未经冷冻的样品),观察鲮鱼糜在冷冻过程中凝胶强度的变化,结果见表 3。

表 3 结果可见,随着冷冻时间的延长,鲮鱼糜的凝胶强度也随着下降,但空白对照组的下降幅度较大,而加抗冻剂试验组在冷冻 30d 后的凝胶强度趋向稳定;在同一冷冻时间下,添加抗冻剂的鱼糜凝胶强度比空白对照组明显提高,说明抗冻剂对鲮鱼蛋白质的冷冻变性具有明显的作用,这结果与上面  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性试验结果是一致的。

表 3 鲮鱼在冷冻过程中凝胶强度的变化

Tab. 3 The change of gely strength of *M. cephalus* surimi in refrigeration

冷冻时间 (d)	凝胶强度( $\text{g}\times\text{cm}$ )	
	空白对照组	添加抗冻剂
0	525	756
30	258	628
60	212	602
90	186	589

## 3 讨论

从鲮鱼在冷冻过程中肌原纤维蛋白  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性的变化来看,鲮鱼在冷冻过程中同样存在着蛋白质变性的问题,但加入适当的抗冻剂可以抑制鲮鱼在冷冻过程中蛋白质的变性。本研究结果表明,

鲮鱼在冷冻初期  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性具有上升一段而后下降的二相性(表2),这一点与陈焕铨等<sup>[2]</sup>的结果是一致的,可能与鲮鱼死后僵硬期及冷冻过程中酶的部分解聚作用相关。随着冷冻时间的延长,由于蛋白质分子与结合水的结合状态被破坏,使蛋白质分子内部有些键被破坏,有些键又重新结合,这种旧键的断裂和新键的生成必然涉及到蛋白质分子的内部结构,从而导致蛋白质变性,使鲮鱼肌原纤维蛋白  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性下降。在鲮鱼冷冻过程中加入适当的抗冻剂,如蔗糖、山梨醇、磷酸盐和复合抗冻剂都能抑制鲮鱼在冷冻过程中  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性的下降(表2),也就是能防止鲮鱼在冷冻过程中蛋白质的变性。其中糖类是通过改变蛋白质中存在的水的状态和性质间接地对蛋白质起作用<sup>[6,9]</sup>;磷酸盐的添加可以使鱼肉的 pH 值保持中性,引起鱼肉离子强度的增加而防止蛋白质的冷冻变性<sup>[6]</sup>。而复合抗冻剂对抑制鲮鱼肌原纤维蛋白冷冻变性的效果最好,蔗糖、山梨醇和磷酸盐次之,这说明蔗糖、山梨醇和磷酸盐三者具有协同作用,且效果比单独添加好,因此选择复合抗冻剂作为抑制鲮鱼蛋白质的冷冻变性为佳。

鲮鱼在冷冻初期,不能以 TVB-N 值作为蛋白质的变性指标,应以肌原纤维蛋白  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性作为蛋白质的变性指标较为合适。这是因为 TVB-N 值的上升是由于在腐败过程中酶和微生物的作用,尤其是微生物的作用,使蛋白质分解而产生氮以及胺类等碱性物质<sup>[11,12]</sup>,而酶的活性和微生物的繁殖在冷冻条件下基本得到了抑制,所以 TVB-N 值的变化无显著差别,远远未达到初期腐败的指标,而且在这过程中,用 TVB-N 值也不能说出各种因素对蛋白质变性的影响和作用,这证明了 TVB-N 值不能作为鲮鱼冷冻初期蛋白质变性的衡量指标。而  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性在冷冻 1d 后开始明显下降,尤其以空白对照组的下降最为明显,冷冻 30d 后  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性下降达 71.38%,冷冻 90d 后  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性下降达 90.25%,这说明以肌原纤维蛋白  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性作为鲮鱼在冷冻初期蛋白质的变性指标较为合适。

鲮鱼糜在添加复合抗冻剂后,可以作为生产鱼糜制品的原料,说明了复合抗冻剂在鲮鱼鱼糜制品生产中的应用是行之有效的。凝胶强度是鱼糜凝胶形成能力最重要的指标,研究发现不同的鱼种在相同条件下形成的鱼糜凝胶强度有时存在很大的差异,同一鱼种在不同条件下形成的鱼糜凝胶强度也存在很大的差异<sup>[6,12]</sup>。本研究以相同的凝胶形成条件,研究复合抗冻剂在鲮鱼糜中的作用,结果表明,在鲮鱼糜中添加复合抗冻剂后,凝胶强度从  $525\text{g} \times \text{cm}$  提高到  $756\text{g} \times \text{cm}$ ,有效地提高了鲮鱼糜的凝胶强度;同时鲮鱼糜在冷冻 30d 后,空白组的凝胶强度从  $525\text{g} \times \text{cm}$  下降到  $258\text{g} \times \text{cm}$ ,下降幅度为 50.86%,而添加抗冻剂组的凝胶强度只从  $756\text{g} \times \text{cm}$  下降到  $628\text{g} \times \text{cm}$ ,下降幅度仅为 16.93%,有效地防止了在冷冻过程中鲮鱼糜凝胶强度的下降,这与前面防止  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性的下降是一致的,充分说明了复合抗冻剂能有效地防止鲮鱼糜的冷冻变性。

## 参考文献:

- [1] 吴琴琴. 鲮鱼养殖[M]. 北京: 农业出版社, 1990. 25- 26.
- [2] 陈焕铨, 韩名竹, 陶江萍, 等. 关于鱼糜在冷藏过程中蛋白质变性的研究[J]. 水产学报, 1984, 8(1): 1- 7.
- [3] 万建荣, 洪玉菁, 奚印慈, 等. 水产食品化学分析手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1993. 154- 157.
- [4] 刘福玲, 戴行钧. 食品物理与化学分析方法[M]. 北京: 轻工业出版社, 1987. 278- 284.
- [5] Lee H G, Lanier T C, Hamann D D, et al. Transglutaminase effects on low temperature gelation of fish protein Sols [J]. J Food Sci, 1997, 62 (1): 20- 24.
- [6] 王锡昌, 汪之和. 鱼糜制品加工技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1997. 93- 105.
- [7] 林洪, 王长峰, 李兆杰, 等. 中国对虾肌动球蛋白变性后 ATPase 活性的研究[J]. 青岛海洋大学学报, 1996, 26(4): 475- 480.
- [8] 李来好, 杨贤庆. 冷冻鱼糜生产技术[J]. 制冷, 1996, (3): 35- 40.
- [9] 罗永康. 鲑鱼蛋白质低温变性保护剂的研究[J]. 肉类研究, 1995, (4): 15- 19.
- [10] 杨贤庆. 鱼糜冷冻变性及其防止[J]. 制冷, 1994, (3): 47- 52.
- [11] 何利平, 冯志哲, 王季襄. 鲑在低温冻藏时的生化和质地特性研究[J]. 水产学报, 1999, 14(4): 297- 303.
- [12] 须山三千三, 鸿巢章二. 水产食品学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1992. 177- 179, 343- 345.