

文章编号: 1004-7271(2001)01-0044-05

冻结条件与冻藏温度对鲢鱼肉肌原纤维蛋白 冷冻变性的影响

袁春红¹, 陈舜胜¹, 程裕东¹, 周培根¹, 于克锋¹, 福田裕²

(1. 上海水产大学食品学院, 上海 200090; 2. 日本水产厅养殖研究所 日本 516-0193 三重县度会郡南势町中津浜浦 422-1)

摘要:本研究探讨了不同冻结终温、冻结速率以及冻结贮藏温度下鲢鱼肉肌原纤维蛋白 ATPase 活性的变化。结果表明,冻结终温和冻结速率对肌球蛋白变性的影响较小,即使在慢速冻结(从 0℃ 经过 72h 冻结到 -40℃)下,样品肌原纤维蛋白的 Ca^{2+} - Mg^{2+} - EDTA - ATPase 活性的变化都很小。在贮藏过程中,贮藏温度越低肌原纤维蛋白越稳定,而慢冻和快冻对于其后冻藏过程中肌原纤维蛋白变性的差异也不显著。与冻结速率和冻结终温相比,冻结贮藏温度的影响明显。

关键词:鲢; 肌原纤维蛋白; 变性; 冻结贮藏温度; ATPase 活性

中图分类号: S983.2 文献标识码: A

Effects of freezing and frozen storage temperature on myofibrillar protein freeze denaturation of silver carp muscle

YUAN Chun-hong¹, CHEN Shun-sheng¹, CHENG Yu-dong¹,
ZHOU Pei-gen¹, Yu Ke-feng¹, FUKUDA Yutaka²

(1. College of Food Science, SFU, Shanghai 200090, China; 2. National Research Institute of Aquaculture, 422-1 Naka Tsubanaura, Nansei-cho, Mie 516-0193, Japan)

Abstract: The effects of final freezing temperature, freezing rate and frozen storage temperature on myofibrillar protein of silver carp muscle were studied, monitoring changes in the Ca^{2+} - Mg^{2+} - EDTA - ATPase activities as the indexes of protein denaturation in the present study. The results showed that (1) different final freezing ultimate temperatures and freezing rates had no remarkable effect on the denaturation of myosin, even if the sample was frozen from 0℃ to -40℃ after 72 hours(3 day), the changes of Ca^{2+} - Mg^{2+} - EDTA - ATPase activities were not obvious. Moreover, the difference between quick freezing and slow freezing was also not found during the subsequent frozen storage. (2) The lower frozen storage temperature, the more stable the myofibrillar protein; moreover, it can be concluded that frozen storage temperature has great effect on protein denaturation, compared with the effect of freezing rate and final freezing temperature.

Key words: silver carp; myofibrillar protein; denaturation; frozen storage temperature; ATPase activity

国内外学者对鱼类蛋白质冷冻变性研究开展了大量的工作,一般认为冻结速率和冻结贮藏温度是

收稿日期: 2000-10-24

基金项目: 上海水产大学与日本国际农林水产产业研究中心合作研究项目“中国淡水渔业利用技术开发”的组成部分

第一作者: 袁春红(1974-), 女, 江西樟树人, 讲师, 工学硕士, 从事水产品贮藏与加工方面研究

影响蛋白质冷冻变性的主要因素,但由于实验材料和实验设计方法不同,得出的结论也不尽相同,有必要进行更深入的研究^[1-3]。通常认为淡水鱼蛋白质易于变性,而对其加以深入研究的报道并不多见^[4]。长期以来在水产品冻结加工中,人们很注重冻结速率对冻品质量的影响而相对忽视冻藏温度的管理。究竟两者哪一个的影响程度更大,还需要经过实验的证明。另外,不同鱼种耐冻性不同,其对贮藏温度的要求也有所不同^[5]。肌原纤维蛋白是鱼肉蛋白质的重要组成部分,主要由肌球蛋白和肌动蛋白组成。 Ca^{2+} -ATPase 活性表征其肌球蛋白头部 S-1 的性质^[6]。 Mg^{2+} -ATPase、EDTA-ATPase 活性则主要反映肌球蛋白和肌动蛋白之间的相互作用,当其相互作用加强时 Mg^{2+} -ATPase 活性被激活而 EDTA-ATPase 活性则受到抑制^[7,8]。ATPase 活性与水产加工品质量有很大关系, Ca^{2+} -ATPase 和 Mg^{2+} -ATPase 活性与鱼糜的凝胶强度成较好的线性正相关作用^[9]。

本文以淡水鲢鱼肉作为研究对象,以肌原纤维蛋白 Ca^{2+} -、 Mg^{2+} -、EDTA-ATPase 活性作为蛋白质变性的指标,旨在探明鲢鱼肉在不同冻结速率、冻结终温和冻结贮藏温度下蛋白质冷冻变性的程度,并比较这三种因素的影响大小,为淡水鱼肉的长期稳定冻结贮藏提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

鲜活鲢鱼于 1998 年 4 月至 6 月购自上海市图门路农贸市场。鲢体重范围:900~1 200g。取鲢背部白色肌作样品,用刀斩碎后,得到碎鱼肉,真空包装于复合塑料袋(12cm×14cm)中,压成薄片状,每份(6.5±0.5)g,以供实验。

1.2 主要设备

程序冻结器(FYELA program freezer MPF-1000,松下电工),冻结器以甲醇作为冷媒,可设定温度变化程序。

1.3 方法

1.3.1 冻结和冻结贮藏的条件

样品通过程序冻结器进行冻结,由于实验试样体积很小、呈薄片状,并且直接与冻结器的冷媒甲醇接触,因此可假定样品的温度等同于冷媒甲醇的温度,对冷媒甲醇温度变化程序设定也就相当于设定样品的冻结程序。主要冻结条件为:①样品冻结前的初温为 0℃;②将样品以相同冻结速率(1℃/min)从 0℃ 分别冻结至终温 -10℃、-20℃、-30℃、-40℃;③分别以不同冻结速率冻结到终温(图 1),包括:(1)1℃/min(样品每分钟温度下降 1℃)快速冻结;(2)0.04~0.17℃/min 经过 4h 中速冻结至终温;(3)0.002~0.01℃/min 慢速冻结 72h 至终温。④冻结后样品进一步贮藏于低温冰箱(-10℃和-40℃);⑤测定冻结前后以及冻藏一段时间肌原纤维蛋白 ATPase 活性。

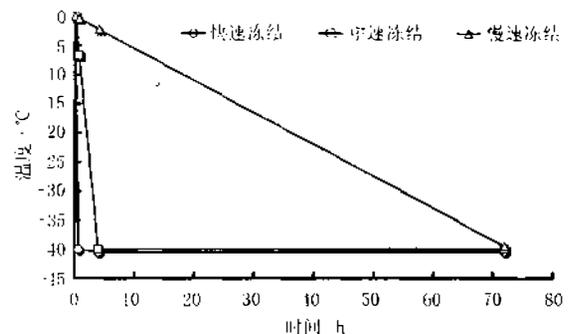


图 1 鲢鱼肉试样的冻结速率曲线

Fig.1 Freezing rate curve of silver carp muscle sample

1.3.2 肌原纤维蛋白的制备

主要参考 Katoh 等^[9]的方法从碎鱼肉中提取肌原纤维蛋白:5g 鱼肉加 6 倍体积 0.1mol/L KCl、20mmol/L Tris-Maleat 缓冲溶液(pH 7.5)均质(12 000r/min 均质 1min,间隔 30s,重复 4 次),离心(3℃, 8 000g, 10min, 去除上清液,重复 5 次)。沉淀用 0.1mol/L KCl、20mmol/L Tris-Maleat 缓冲溶液(pH 7.5)清洗并通过纱布过滤,得到纯肌原纤维蛋白悬浊液。

1.3.3 肌原纤维蛋白 ATPase 活性的测定

取肌原纤维蛋白悬浊液(约 2 mg/mL),测定其在 25℃的条件下 Ca^{2+} -ATPase、 Mg^{2+} -ATPase、EDTA-ATPase 的活性。测定低离子强度 Ca^{2+} -ATPase 活性时,反应液组成为 0.1mol/L KCl、5mmol/L CaCl_2 、25mmol/L Tris-Maleat (pH 7.0)、1mmol/L ATP。 Mg^{2+} -ATPase 活性测定反应液组成为 0.035mol/L KCl、1mmol/L MgCl_2 、0.1mmol/L CaCl_2 、25mmol/L Tris-Maleat (pH 7.0)、1mmol/L ATP。EDTA-ATPase 活性测定反应液组成为 0.5mol/L KCl、5mmol/L EDTA、25mmol/L Tris-Maleat (pH 7.0)、1mmol/L ATP。反应释出的无机磷,用 Fiske 和 Subbarow 的方法测定^[10]。肌原纤维蛋白含量用双缩脲法测得^[11]。ATPase 比活性用 $\mu\text{mol Pi}/\text{min}/\text{mg Mf}$ 表示。每个样品至少平行测定两次,其平均值用来进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 冻结终温对肌原纤维蛋白 ATPase 活性的影响

以冻结后的肌原纤维蛋白 ATPase 活性值和冻结前活性值的比值表示肌原纤维蛋白 ATPase 活性的变化状况。以相同的冻结速率(1℃/min)将样品分别冻结至 -10℃、-20℃、-30℃、-40℃,肌原纤维蛋白 Ca^{2+} -、 Mg^{2+} -、EDTA-ATPase 活性的变化如图 2 所示。冻结终温不同,冻结 3 天后和冻结前相比,肌原纤维蛋白 Ca^{2+} -ATPase 活性比值均接近 100%。这说明对于 -10℃~ -40℃ 不同冻结终温,肌原纤维蛋白在冻结过程中 Ca^{2+} -ATPase 活性都几乎没有变化,表明鲢的肌球蛋白尤其是头部在上述冻结条件下均较稳定。冻结后 Mg^{2+} -、EDTA-ATPase 活性比值均较高,而且不同冻结终温间的活性变化值有所不同,这可能是由于鱼体死前的挣扎状态,肌肉中 ATP 含量,调节蛋白质及 Ca 浓度等的影响所致^[8]。这与福田等^[2]对于鲈鱼(海水鱼)的研究结果相似,即冻结终温不同而贮藏在同一温度下的鲈肌原纤维蛋白的 Ca^{2+} -ATPase 活性和 Mg^{2+} -ATPase 活性几乎没有明显变化。因此,可以认为冻结终温对肌原纤维蛋白的稳定性无显著影响。

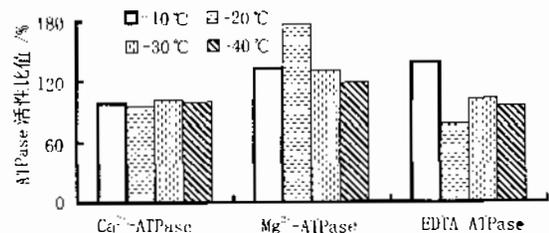


图 2 不同冻结终温下鲢肌原纤维蛋白 ATPase 活性的影响

Fig.2 Changes of silver carp Mf ATPase activities when frozen at different final temperatures

2.2 冻结速率对肌原纤维蛋白 ATPase 活性的影响

通常人们认为冻结速率越快,冻结质量越好、蛋白质变性越小。也有研究表明冻结速率并非越快越好,对于不同样品可能存在最佳的冻结速率^[12]。而 Love^[1]的研究发现以中间速率冻结、贮藏在 -29℃ 390d 以后的鳕鱼盐可溶性蛋白质含量变化最大,即蛋白质变性最为显著。冻结速率究竟如何影响冻结质量呢?福田^[2]分别将置于 -80℃ 快速冻结和 -20℃ 缓慢冻结后的鲈鱼块状鱼肉,再在 -40℃ 和 -20℃ 两种温度分别贮藏 4 个月后测得的 Ca^{2+} -ATPase 活性差别并不大,说明冻结速率对冻结质量影响不大。人们普遍认为淡水鱼易引起冻结变性。本研究以淡水鱼中较有代表性的鲢为对象,旨在探讨冻结速率如何影响鲢鱼肉的冻结质量。以三种不同冻结速率冻结到 -40℃ 后,肌原纤维蛋白 Ca^{2+} -ATPase 活性相对于冻结前的比值如图 3。快冻为 1℃/min,慢冻为 0.01℃/min(相当于样品温度经过 100min 下降 1℃)。尽管冻结速率相差 100 倍,但是 Ca^{2+} -ATPase 活性仍维持在冻结前约 98% 左右,可见鲢肌球蛋白的 Ca^{2+} -ATPase 活

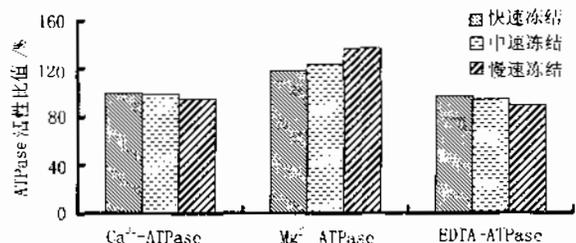


图 3 冻结速率对鲢肌原纤维蛋白 ATPase 活性的影响 (冻结终温: -40℃)

Fig.3 Effect of freezing rates on the silver carp Mf ATPase activities (final freezing temperature: -40℃)

性受冻结速率的影响不显著,也就是说冻结速率对鲢蛋白质变性影响不大。此外以不同速率冻结到其它终温的 Ca^{2+} -ATPase 活性变化皆呈现类似的结果。各种不同冻结速率以及冻结到不同终温的肌原纤维蛋白 Ca^{2+} -ATPase 比活性均在 $0.44 \sim 0.57 \mu\text{mol Pi}/\text{min}/\text{mg}$ 之间,相当于冻结前 Ca^{2+} -ATPase 比活性的 $91\% \sim 118\%$ 。至于冻结后 Ca^{2+} -ATPase 比活性较冻结前有所升高,可能是与鱼死后肌肉僵硬, Ca^{2+} 感受性提高有关^[8]。

以不同冻结速率冻结到 -40°C 后样品 Mg^{2+} -ATPase 和 EDTA-ATPase 活性的变化表明,随着冻结速率的逐渐减慢, Mg^{2+} -ATPase 活性呈现上升的趋势,而 EDTA-ATPase 活性则呈现下降的趋势。这与蛋白质热变性实验中所得到的结果相似^[7],由于肌球蛋白和肌动蛋白的相互作用,表现出 Mg^{2+} -ATPase 活性上升而 EDTA-ATPase 活性下降。在缓慢冻结过程中, Mg^{2+} 、EDTA-ATPase 活性的变化是由于肌球蛋白和肌动蛋白之间的相互作用所致,其机理尚待进一步探讨。

2.3 冻藏温度对肌原纤维蛋白 ATPase 活性的影响

上述文中分析了冻结终温和冻结速率在冻结过程中对鲢蛋白质冻结变性未产生较大的影响,为研究冻藏过程对鲢蛋白质产生的影响,以及冻结终温、冻结速率和冻藏温度三者间对鲢蛋白质冻结变性所起的作用,本研究通过可以设定冻结速率的冻结设备,对冻结和冻藏过程加以区分,分别考察了其对肌原纤维蛋白质变性的影响。

以相同冻结速率 ($1^\circ\text{C}/\text{min}$) 将样品分别冻结到 -10°C 和 -40°C (简称快冻到 -10°C 和 -40°C), 以及以缓慢冻结 ($0.002^\circ\text{C}/\text{min}$) 到 -10°C , 即从 0°C 经过 3d 到达 -10°C (简称慢冻到 -10°C)。然后贮藏在 -40°C 低温冰箱中 2 个月后其肌原纤维蛋白的 Ca^{2+} -、 Mg^{2+} -、EDTA-ATPase 活性变化如图 4。快冻到 -10°C 和 -40°C 两者间 Ca^{2+} -、 Mg^{2+} -、EDTA-ATPase 活性变化无显著差别,基本维持在冻结后的水平,两者 Ca^{2+} -、 Mg^{2+} -、EDTA-ATPase 活性均分别为 89% 、 110% 、 100% 左右。慢冻到 -10°C 再贮藏在 -40°C 的样品其肌原纤维蛋白 Ca^{2+} -、 Mg^{2+} -、EDTA-ATPase 活性均有不同程度的升高变化,表明肌球蛋白与肌动蛋白只是作用有所加强,肌球蛋白并未发生变性。若将经过快冻到 -10°C 和 -40°C 的样品再贮藏在 -10°C 2 个月后,其肌原纤维蛋白 Ca^{2+} -ATPase 活性明显下降为 43% 和 65% ,说明蛋白质已发生变性。以上结果一方面反映低温 (-40°C) 冻藏能较好地避免蛋白质变性,而另一方面也反映冻藏前的冻结终温和冻结速率并不影响此后冻藏中蛋白质的变性,同时也证明贮藏温度比冻结温度和冻结速率重要。

3 结论

以上实验结果表明,冻结速率的快慢和冻结终温的不同对鲢鱼肉肌原纤维蛋白的变性影响不大;在缓慢冻结过程中,肌球蛋白和肌动蛋白之间的相互作用可能有所加强。以不同冻结速率和冻结终温冻结再贮藏在 -40°C 2 个月以后,ATPase 活性变化也不显著;即使冻结速率很快、冻结终温很低,若贮藏在 -10°C ,鲢鱼肉蛋白质仍有明显变性。说明贮藏温度越低蛋白质越稳定;与冻结终温和冻结速率的影响相比,冻藏温度对肌原纤维蛋白变性的影响明显。

本研究得到了中日合作研究顾问罗肇光教授的指导,在此表示衷心的感谢。

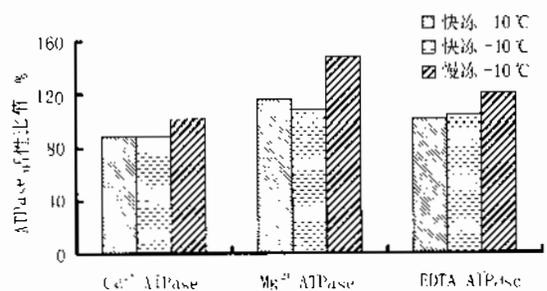


图4 冻结终温和冻结速率对冻藏过程中鲢肌原纤维蛋白 ATPase 活性的影响(贮藏温度 -40°C)
Fig.4 Effect of final freezing temperature and freezing rate on the silver carp Mf ATPase activity during subsequent storage (stored at -40°C)

参考文献:

- [1] Love R M, Ironside J I M. Studies on protein denaturation in frozen fish[J]. *J Sci Food Agric*, 1958, 9(9):604 - 616.
- [2] 福田裕, 柘木田善治, 川村満, ら. 冻结および贮藏によるマサバ肌原纤维タンパク質の変性[J]. *日本水产学会志*, 1982, 48(11): 1627 - 1632.
- [3] Noie F, Kazuma T, Toshihiro M, et al. Effect of storage temperature on the freeze denaturation of fish myosin B[J]. *Bull Jap Sci Soc Fish*, 1992, 58(12):2357 - 2360.
- [4] 陈舜胜, 王锡昌, 周丽萍, 等. 冰藏鲢的鲜度变化对其鱼糜凝胶作用的影响[J]. *上海水产大学学报*, 2000, 9(1):45 - 50.
- [5] 福田裕, 端甲一, 新井健一. 冻结および贮藏による深海性鱼类肌原纤维タンパク質の変性[J]. *日本水产学会志*, 1981, 47(5):663 - 672.
- [6] Yunuko A, Kunihiro K. Freeze denaturation of carp myofibrils compared with thermal denaturation[J]. *Fish Sci*, 1998, 64(2): 287 - 290.
- [7] Takeshi T, Jeng-ren L, Munehiko T, et al. Thermal activation of actomyosin Mg - ATPases from ordinary and dark muscles of tuna and sardine [J]. *J Food Sci*, 1989, 54(6):1521 - 1523.
- [8] Ikeuchi Y, Ito T, Fukazawa T. Change of regulatory activity of tropomyosin and tyoposin on acto-heavy-meromyosin ATPase during postmortem storage of muscle[J]. *J Food Sci*, 1980, 45:13 - 16.
- [9] Katoh N, Nozaki H, Komatsu K, et al. A new method for evaluation of the quality of frozen surimi from Alaska pollack. Relationship between myofibril ATPase activity and kamaboko forming ability of frozen surimi[J]. *Bull Jap Sci Soc Fish*, 1979, 45:1027 - 1032. (In Japanese).
- [10] Fiske C, Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorus[J]. *J Biol Chem*, 1925, 66:375 - 400.
- [11] Cornall A G, Bardwill C J, David M M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction[J]. *J Biol Chem*, 1949, 177:751 - 766.
- [12] Mazer P. The Freezing of the Biological system[J]. *Science*, 1970, 168:939 - 949.
- [13] 福田裕. 鱼肉の品质に及ぼす冷冻条件の影響[J]. *冷冻*, 1986, 61(699):18 - 29.