

冻结速率和冻藏温度对文蛤蛋白质冷冻变性的影响*

关志强¹ 蒋小强¹ 李 敏¹ 章超桦² 洪鹏志²

1(广东海洋大学工程学院, 湛江, 524025) 2(广东海洋大学食品科技学院, 湛江, 524025)

摘 要 利用 IMP 热电偶测温系统, 对文蛤分别在 -18°C 和 -30°C 冻结温度下的冻结过程进行了测量, 对 -18°C 和 -30°C 下 3 种贮藏形态的贝肉冻结样品和冻藏样品肌原纤维蛋白的 Ca^{2+} -ATPase 活性、 Mg^{2+} -ATPase 活性、盐溶性蛋白溶解度及添加抗冻剂后防止其冷冻变性的影响进行了研究。结果发现, 冻结对贝肉蛋白质变性影响不大, 冻藏使蛋白质发生显著的变性, 温度低的变性小; 在贮藏贝肉的 3 种形态中, 无完整细胞形态的贝糜的变性幅度最大, 碎贝肉次之, 贝肌肉形态的保持得较好; 添加抗冻剂能有效防止贝肉蛋白质冷冻变性, 尤其能使贝糜形态贝肉蛋白质的稳定性大大提高。

关键词 蛋白质冷冻变性, 冻结速率, 冻藏温度

文蛤 (*Meretrix Linnaeus*) 被誉为“天下第一鲜”, 营养丰富、肉味鲜美, 同时具有很高的食疗药用价值^[1]。日本的福田裕等人^[2]展开了冷冻对鱼肉品质影响的研究, 仲夫等人^[3]对肉类食品在冻藏中 ATPase 活性变化进行了研究; 在国内, 汪之和等人^[4,5]对链鱼蛋白质冷冻变性以及防止白鲢鱼糜蛋白质冷冻变性进行了探讨, 林洪等人^[6,7]在对对虾蛋白质变性方面也做了许多工作。这些研究主要集中在鱼虾和其他肉类的食品上, 对贝类方面的相关研究一直未见报道, 而鱼与贝的肌肉结构有诸多不同, 其受冻结温度和贮藏温度等的影响也会有差异。本文以南海产文蛤为研究对象, 采用盐溶性蛋白、ATPase 活性为蛋白质变性指标, 对文蛤肉的蛋白质冷冻变性及其防止进行探讨, 为提高冷冻贝类食品的品质提供参考。

1 材料和方法

1.1 材 料

文蛤, 购于湛江霞山区东风市场, 静养吐沙后活体开壳取肉。用于测量冻结速率实验的样品, 整贝肉直接进行冻结。用于测量蛋白质变性样品, 贝肉分 3 种形态, 贝肌肉、碎碎肉、贝糜; 贝肌肉即为整蛤肉, 去壳即得, 碎贝肉直接用菜刀斩碎, 贝糜用 DS-1 高速组织捣碎机绞成肉糜。各取 25g 分装于封口袋中密封后, 分别进行冻结及冻藏。

添加抗冻剂样品: 在 3 种形态的贝肉加入相当于样品质量 8.3% 的抗冻剂, 4% 蔗糖、4% 山梨醇、0.1% 焦聚磷酸钠、0.2% 三聚磷酸钠。每个样品做 2

个平行。

1.2 方 法

1.2.1 冻结及冻藏方法

冻结: -18°C (华凌冰箱, 空气强制对流循环冻结^[9]); -30°C (Sanyo Kelon 低温柜, 空气自然对流循环冻结)。

冻藏: 样品分别在 -18°C 和 -30°C 的温度下贮藏 2 个月。

1.2.2 温度测量

利用铜-康铜热电偶, IMP 温度数据采集系统, 对材料中心进行测量。

1.2.3 蛋白质变性指标的测量方法

盐溶性蛋白溶解度的测量方法: 采用高盐溶液 (0.5 mol/L KCl-0.01 mol/L NaH_2PO_4 -0.03 mol/L Na_2HPO_4) 中的蛋白质溶解度减去低盐溶液 (0.025 mol/L NaH_2PO_4 -0.025 mol/L Na_2HPO_4) 中蛋白质溶解度即为盐溶性蛋白^[7]; 肌动球蛋白的提取及其 Ca^{2+} -ATPase 活性和 Mg^{2+} -ATPase 活性的测量方法: 按万建荣等人^[9]方法; 测定蛋白质浓度的测量方法: 双缩脲法^[10]。

2 结果与讨论

2.1 冻结温度曲线

对文蛤肉在冻结中的中心温度进行的测量结果如图 1 所示。在 -18°C 和 -30°C 的冻结温度下, 通过最大冰晶生成带的时间分别为 20 min 和 6 min, 同时可以清晰看出此区域水分冻结放出潜热, 导致温度下降速度变慢。

2.2 冻结温度对贝肉蛋白质冷冻变性的影响

2.2.1 冻结温度对贝肉盐溶性蛋白的影响

第一作者: 硕士, 副教授。

* 广东省科技厅资助项目 (No. 2004B20401011)

收稿日期: 2005-07-28, 改回日期: 2005-10-24

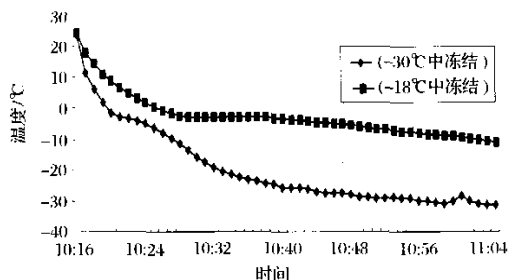


图1 冻结温度变化示意图

为了研究冻结温度对文蛤肉盐溶性蛋白变性的影响,本实验测定了3种形态的贝肉分别在 -18°C 和 -30°C 的环境中冻结前后的盐溶性蛋白。结果如图2所示。贝肌肉形态在 -18°C 冻结条件下变性最大,其蛋白溶解度下降了17.5%,贝糜形态的盐溶性蛋白在 -30°C 变性最小,其溶解度下降了13.8%,最佳情况和最差情况仅相差3.7%,说明不同形态的贝肉在冻结过程产生的区别并不大。

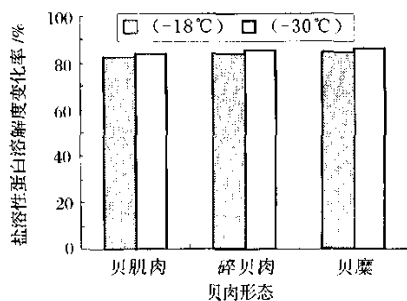


图2 冻结速率对贝肉盐溶性蛋白的影响

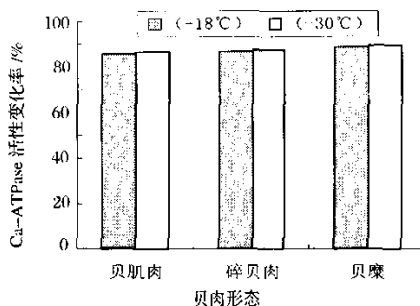
2.2.2 冻结温度对贝肉肌原纤维蛋白 Ca^{2+} -ATPase 的影响

图3是贝肉在冻结后测得的肌原纤维蛋白 Ca^{2+} -ATPase 活性的实验结果。冻结后其活性相对未冻样品的活性略有下降,变性最大的是贝肌肉形态,在 -18°C 冻结条件下下降了14.6%;变性小的是贝糜形态的贝肉,在 -30°C 的冻结温度下活性下降到鲜活状态下的10.8%,其下降幅度比贝肉相应状况下的盐溶性蛋白下降幅度要小。

盐溶性蛋白溶解度和 Ca^{2+} -ATPase 活性分别反映肌球蛋白2种不同方式的变性^[11]。盐溶性蛋白反映肌球蛋白杆部的性质,而 Ca^{2+} -ATPase 来源于肌球蛋白头部,表征其S-1的性质。上述结果表明,肌球蛋白杆部比肌球蛋白头部更容易发生变性。这与汪之和等人^[3]对淡水鱼的研究结论一致。

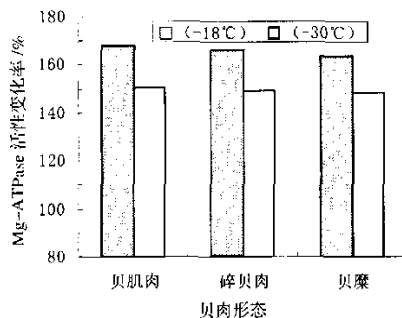
冻结时贝肉组织中的水分形成冰晶对肌肉细胞组织结构产生影响。冻结温度不同,影响不同:快速

冻结时,细胞内外独立存在冰晶,细胞形态基本保持完整即空间结构变化小;而慢速冻结形成的冰晶大,少部分冰晶已连接成块,说明有部分肌细胞已遭破坏,在内压增加和细胞已部分破裂的情况下,空间结构变化大。这就表现为贝肉在 -30°C 冻结时酶的失活和盐溶性蛋白变性比在 -18°C 冻结的要小。不同形态的贝肉,受冻结影响的大小也不同,对于碎贝肉和贝糜,两者被机器的挤压而导致了大部分细胞破裂,既然细胞已经破裂,那么冻结过程中生成冰晶带来的压力对酶活性和盐溶性蛋白的影响反而没有贝肌肉受到的影响大。

图3 冻结速率对贝肉 Ca^{2+} -ATPase 活性的影响

2.2.3 冻结温度对贝肉肌原纤维蛋白 Mg^{2+} -ATPase 的影响

将3种形态的贝肉分别放在 -18°C 和 -30°C 的环境中冻结,对其进行 Mg^{2+} -ATPase 活性情况的测量,发现冻结温度越高,活性上升得越多(见图4)。由于 Mg^{2+} -ATPase 活性反映的是肌球蛋白和肌动蛋白相互作用,贝体死后僵硬过程中,肌质网吸收 Ca^{2+} 能力减弱, Ca^{2+} 浓度升高,使得 Mg^{2+} -ATPase 活性增加,促使两者相互作用加强;慢速冻结时,可能由于在缓慢冻结过程中,在细胞内形成的冰晶使得肌球蛋白和肌动蛋白相互距离缩短,从而使得两者相互作用加强,引起 Mg^{2+} -ATPase 活性的增加。

图4 冻结速率对贝肉 Mg^{2+} -ATPase 活性的影响

2.3 冻藏温度对贝肉蛋白质冷冻变性的影响

2.3.1 冻藏温度对贝肉盐溶性蛋白的影响

3种形态的文蛤肉分别在-18、-30℃的环境中冻藏2个月。图5表明,冻藏后贝肉的盐溶性蛋白发生了严重变性。不同的贮藏温度使之变性程度不同,-18℃的贮藏温度使贝肉所发生的变性比-30℃的贮藏温度的大;同时,对不同的形态,变性程度也有区别,贝糜形态变性得最严重,碎贝肉次之。

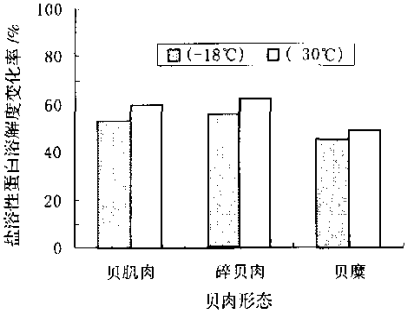


图5 冻藏温度对贝肉盐溶性蛋白的影响

2.3.2 冻藏温度对贝肉肌原纤维蛋白 Ca^{2+} -ATPase 的影响

图6是对冻藏样品进行 Ca^{2+} -ATPase 失活情况进行测量的结果。贝肉的 Ca^{2+} -ATPase 在冻藏过程中失活比较明显,同样是贝糜形态的下降幅度最大,在-18℃的冻藏环境降低了45.7%;与相应条件下盐溶性蛋白下降的54.8%相比要低,其他形态贝肉也可以得到类似的结论。这进一步说明,贝肉在冻结与冻藏中,其盐溶性蛋白比 Ca^{2+} -ATPase 活性更容易受到影响。同时也发现,冻藏中,贝糜碎和贝肉蛋白质冷冻变性的程度都要大于贝肌肉。

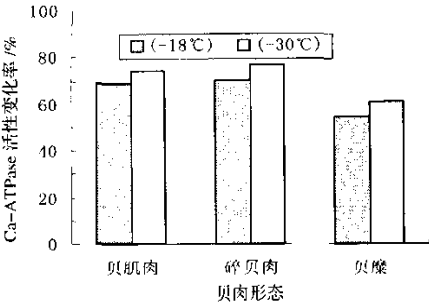


图6 冻藏温度对贝肉 Ca^{2+} -ATPase 活性的影响

在冻藏过程中,蛋白质的自由水较易形成冰晶脱离大分子的束缚,而蛋白质侧链上的结合水侧随冻藏温度、冻藏时间而变化,当结合水从侧基上逐渐移去时,蛋白质侧基发生空间构象的变化,使疏水性基团暴露在分子表面,造成溶解度的下降和其他性质的改变。

2.3.3 冻藏温度对贝肉肌原纤维蛋白 Mg^{2+} -ATPase 的影响

贝肉冻藏2个月后测得 Mg^{2+} -ATPase 活性变化如图7所示。无论是在-18℃还是-30℃的冻藏温度下, Mg^{2+} -ATPase 活性仍存在一定程度的上升。这表明贝肉在冻藏期间,肌球蛋白和肌动蛋白相互作用仍有所加强。

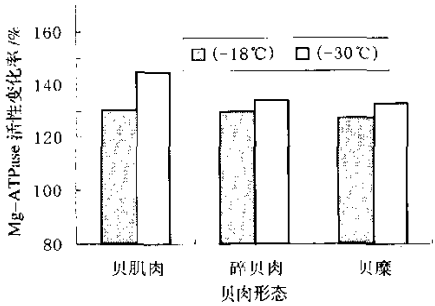


图7 冻藏温度对 Mg^{2+} -ATPase 活性的影响

2.4 添加抗冻剂贝肉蛋白质变性的影响

图8、图9、图10分别是文蛤冻藏样品中加入抗冻剂的盐溶性蛋白、 Ca^{2+} -ATPase 活性、 Mg^{2+} -ATPase 活性的变化情况。

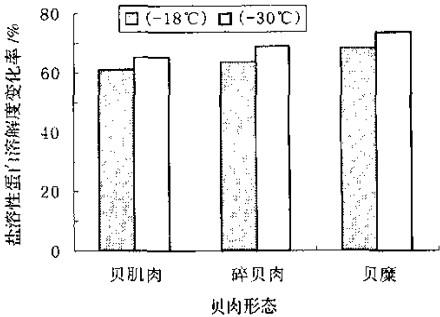


图8 冻藏温度对加抗冻剂后贝肉盐溶性蛋白的影响

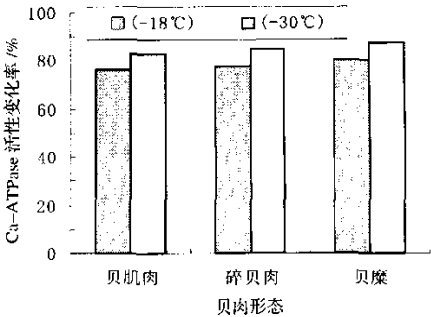


图9 冻藏温度对加抗冻剂贝肉 Ca^{2+} -ATPase 活性的影响

前面的实验结果已表明冻结对贝肉的蛋白质冷冻变性的影响不大,添加抗冻剂后对冻结样品相应指标的测量也表明改善效果非常有限,限于篇幅这里就不表述。添加抗冻剂对冻藏样品的冷冻变性改善效果显著,特别是贝糜形态的贝肉。未加抗冻剂前测得

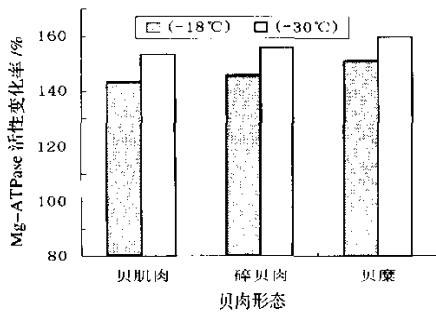


图10 冻藏温度对抗冻剂后贝肉 Mg^{2+} -ATPase 活性的影响

的盐溶性蛋白溶解度在-18、-30℃冻藏温度下分别下降到了未冻样品的45.2%、49.4%，加入抗冻剂后测量相应指标分别提高到68.5%、73.5%；对ATPase活性的变化比较也可以得出相同结论：即添加抗冻剂对贝糜形态的贝肉冷冻变性改善效果最好。这可能是抗冻剂蔗糖和山梨醇的-OH基团能与贝糜肌原纤维蛋白质周围的水分子形成更稳定的结构相关。同时也发现，抗冻剂对相同形态贝肉的盐溶性蛋白变性的改善幅度要比对 Ca^{2+} -ATPase 活性的改善幅度要大，说明抗冻剂能更好地保护肌球蛋白杆部。

3 结 论

(1)冻结温度对文蛤肉蛋白质变性的影响不大，而贮藏温度及时间对贝肉蛋白质的影响较大，即贮藏温度比冻结温度重要。在相同的贮藏时间下，贮藏温度低的贝肉蛋白质变性小。

(2)在贝肉蛋白质变性中，盐溶性蛋白变性比ATPase活性变化幅度要大，说明贝肉的肌球蛋白杆部比头部更容易发生变性。这与对鱼类研究结论一致。使用抗冻剂能更好地保护肌球蛋白杆部的冷

冻变性。

(3)在冻结过程中，贝肌肉形态贝肉的蛋白质变性程度较其它形态贝肉变性程度稍大；在冻藏后，贝糜形态的蛋白质冷冻变性最严重。

(4)用抗冻剂后能有效抑制贝肉蛋白质在冻藏过程中发生冷冻变性，但无法恢复到未冻样品的状况，说明部分变性是不可逆的。抗冻剂对不同的贝肉形态效果也有所区别，对贝糜形态的变性改善效果最显著。

参 考 文 献

- 1 王如才,王昭萍,张建中.海水贝类养殖学[M].青岛:青岛海洋大学出版社,1998.318~319
- 2 福田裕.鱼肉的品质に及ぼす冷冻条件的影响[J].冷冻,1986,61(699):18~29
- 3 关仲夫,成田宪弘.コイ肉冰藏中の筋原纤维タンパク質のATPase活性及びその他の性状变化[J].日水志,1980,46(2):207~213
- 4 汪之和,王 糙,苏德福.冻结温度和冻藏温度对鲢肉蛋白质冷冻变性的影响[J].水产学报,2001(12):564~569
- 5 汪之和,王 糙,王箬磊.防止白鲢鱼糜蛋白质冷冻变性的研究[J].水产科学情报,1996(4):173~177
- 6 林 洪,姜凤英,Khalid Jamil,等.对虾冷藏过程中肌肉蛋白特性的变化比较[J].青岛海洋大学学报,1998(10):549~554
- 7 林 洪,王长峰,李兆杰,等.中国对虾肌球蛋白变性后ATPase活性的研究[J].青岛海洋大学学报,1996(10):475~480
- 8 华泽钊,李云飞,刘宝林.食品冷冻冷藏原理与设备[M].北京:机械工业出版社,1999:104~105
- 9 万建荣,洪玉善,奚印慈,等.水产食品化学分析手册[M].上海:上海科技出版社,1993:139~163
- 10 楼书聪,杨玉玲.化学试剂配制手册(第2版)[M].南京:江苏科技出版社,2002
- 11 新井健一等著,万建荣译.冷冻鱼糜[M].上海:上海科学技术出版社,1991

Effects of Freezing Rate and Frozen Stored Temperature on Freeze Denaturation of the *Meretrix linnaeus* Protein

Guan Zhiqiang¹ Jiang Xiaoqiang¹ Li Min¹ Zhang Chaochua² Hong Pengzhi²

1(College of Engineer, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, 524025, China)

2(College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, 524025, China)

ABSTRACT Utilize the IMP system of temperature measurement on the freezing course of the *Meretrix Linnaeus* under -18℃ and -30℃ to study effect of the protein denaturizing with cryoprotectants or the salt-solubility and activity of Ca^{2+} -ATPase and Mg^{2+} -ATPase of myofibrillar protein. The results showed that the freezing rate have little effect on denaturizing of the *Meretrix Linnaeus*. However, the frozen storage temperature had a big influence, the lower the temperautre, the less the extent of freeze denaturizing; among the three forms of the *Meretrix Linnaeus*, minced shellfish or surimi structure destroyed more severly than intact muscle tissue. It was also observed that denaturizing of myofibrillar protein in fish muscle could be efficiently reduced by adding cryoprotectants, especially in surimi.

Key words protein frozen denaturation, freezing rate, storage temperature