

复合抗冻剂在暗纹东方鲀冻藏过程中的应用

马妍, 谢晶, 周然*, 刘源

(上海海洋大学 食品学院, 上海 201306)

摘要: 以 pH 值、挥发性盐基氮(TVB-N)、盐溶性蛋白含量和巯基含量为指标,研究了蒸馏水、4 g/dL 海藻糖、4 g/dL 海藻糖+0.4 g/dL 多聚磷酸钠以及 4%海藻糖+0.4 g/dL 多聚磷酸钠+0.05 g/dL ϵ -聚赖氨酸等各不同成分的抗冻剂对暗纹东方鲀在-18℃和-25℃下冻藏 180 d 的抗冻效果。结果表明,两种温度下海藻糖和多聚磷酸钠复合加入都可有效抑制河豚鱼肉蛋白的冷冻变性,其效果要好于单用海藻糖作为抗冻剂,蒸馏水效果最差。-25℃时 ϵ -聚赖氨酸和海藻糖及多聚磷酸钠复合所产生的抗冻效果要比-18℃时要好,能够有效抑制鱼肉蛋白的变性和分解,提高冷冻河豚鱼的品质。

关键词: 河豚鱼;冻藏;复合抗冻剂;蛋白质变性

中图分类号: TS 205.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2012)05-0543-06

Application of Complex Cryoprotectant on Takifugu Obscures during Frozen Storage

MA Yan, XIE Jing, ZHOU Ran*, LIU Yuan

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

Abstract: The cryoprotective effects of distilled water, 4 g/dL trehalose, 4 g/dL trehalose+0.4 g/dL sodium polyphosphate, and 4 g/dL trehalose+0.4 g/dL sodium polyphosphate+0.05 g/dL ϵ -polylysine in puffer fish (Takifugu obscures) were studied during storage at -18℃ and -25℃ for up to 180 d using pH value, total volatile basic nitrogen(TVB-N), salt-extractable protein content and sulfhydryl (SH) content as indicators. The results showed the addition of trehalose and sodium polyphosphate could retard the protein denaturation of frozen puffer fish. This effect was better than that of cryoprotectant only included of trehalose, and the effect of distilled water was the worst. The antifreeze effect of ϵ -polylysine, trehalose and sodium polyphosphate compound produces at -25℃ was better than that at -18℃, which could restrain the protein denaturation and decomposition, and then improve the quality of frozen puffer fish.

Key words: puffer fish, frozen storage, complex cryoprotectant, protein denaturation

河豚鱼味道鲜美,肉质细腻,含有丰富的蛋白质和不饱和脂肪,尤其富含被称为“脑黄金”的二十

五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA),具有极高的营养价值。暗纹东方鲀(Takifugu obscurus)由

收稿日期: 2011-06-07

基金项目: 上海市科委部分地方院校计划项目(08390513900);上海市教育委员会重点学科建设项目(J50704);上海市教育委员会科研创新项目(11YZ160);上海海洋大学校级重点建设项目(A-2600-10-0023)。

*通信作者: 周然(1977-),男,内蒙古赤峰人,工学博士,讲师,主要从事食品质量控制方面的研究。E-mail: rzhou@shou.edu.cn

于其较快的生长率以及肌肉无毒的特点在长江流域的渔场里得到较快的发展^[1]。但由于河豚鱼本身特有的生物、化学特性,含水量高,极容易腐败变质,因而使鱼肉品质降低或失去食用和营养价值,所以河豚鱼的保藏逐渐成为人们关注的问题。在冷冻保藏过程中,由于水产品内部水分形成的冰颗粒,体积膨胀,组织结构遭破坏,发生冷冻变性等现象;解冻后其内部水分析出,表面干燥、肉质劣化、口感变差。

有学者曾研究发现糖类可有效保持冷冻猕猴桃的色泽^[2],而早在1959年日本学者首先提出了蔗糖对冷冻鱼糜的低温保护作用,其后有许多学者在这方面进行了研究^[3-4]。Uijttenboogart等人^[5]认为蔗糖和山梨醇与多聚磷酸盐一起使用,其效果比蔗糖或山梨醇单独使用效果更佳。国外虽对蛋白质低温变性保护剂研究较多,但主要集中在海水鱼和一些畜禽中,对淡水鱼尤其是河豚鱼的研究还未见专门报道,我国在这方面的研究还是空白。海藻糖在食品加工中具有防止淀粉老化,防止蛋白质变性,稳定组织细胞结构和抑制脂肪酸分解等功能特性,而且甜度是蔗糖的45%,其低甜度的特点在食品加工中更能体现食品的原味^[6]。ε-聚赖氨酸目前一般作为食品防腐剂,用于食品保鲜,具有广谱、高效、无毒、受pH值影响小等特点,在食品冻藏中极少使用。本文选用海藻糖、多聚磷酸钠及ε-聚赖氨酸作为复合抗冻剂材料,对河豚鱼进行涂膜处理,研究其在河豚鱼冻藏期间对鱼肉的抗冻作用,为提高河豚鱼冷冻品的品质提供理论依据和技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

暗纹东方鲀:由上海能正渔业科技开发有限公司提供;海藻糖、多聚磷酸钠、ε-聚赖氨酸 国药集团化学试剂有限公司。

1.2 方法

1.2.1 原料处理 新鲜河豚鱼去头去内脏,用冰水洗净,沥干,分块。

1.2.2 防冻剂的制备 A:蒸馏水;B:4 g/dL 海藻糖;C:4 g/dL 海藻糖+0.4 g/dL 多聚磷酸钠;D:4 g/dL 海藻糖+0.4 g/dL 多聚磷酸钠+0.05 g/dL ε-聚赖氨酸;

1.2.3 工艺流程 处理过的鱼块→装袋→置于-10℃温度下速冻→取出后浸于各组溶液中20s→待各溶液在鱼肉表面结成冰衣→分别置于-18℃和-25℃冰箱中冷冻保藏→每隔30d进行一次生化指标的测定。

1.2.4 指标测定

1) pH值 将样品鱼肉剁碎后,去5g于烧杯中,加入45mL中性蒸馏水,搅拌均匀,静置30min,然后用精密数显酸度计测定pH值^[7]。

2) 挥发性盐基氮 利用半微量凯氏定氮的原理,准确称取绞碎的河豚鱼肉5g于350mL消化管中,设置吸收液为30mL,自动加蒸馏水为30mL,加碱量为0mL,模式为delay,蒸馏体积,在装有样品的消化管瓶中加入5g氧化镁粉末,迅速放入自动定氮仪,关上安全门,仪器自动蒸馏、吸收、滴定和计算,采用Kjeltec2300自动凯氏定氮仪测定^[8]。

3) 盐溶性蛋白含量 取鱼肉加0.6 mol/L氯化钾30mL,在4℃下离心(3000 r/min,10 min),取上清液采用双缩脲法^[9]测定蛋白含量。

4) 巯基含量 参照 Benjakul 等的方法^[10],取1mL的试样(0.4 g/dL)加入9mL 0.2 mol/L的Tris-HCl缓冲液,混匀后取4mL混合溶液,加入0.4 mL 1g/dL DTNB,在40℃下培养25min后用分光光度计在412 nm测吸光度A,空白对照用0.6 mol/L KCl,pH 7.0代替样品。

1.3 数据统计

采用SPSS17.0软件的Duncan法进行多重比较和方差分析,差异显著性: $P<0.05$,为差异显著; $P>0.05$,为差异不显著。利用Excel2007绘制曲线。

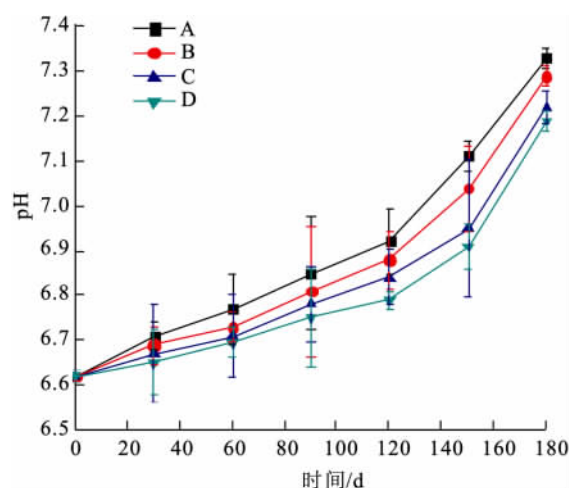
2 结果与分析

2.1 抗冻保鲜剂对河豚鱼 pH 值的影响

鱼体在贮藏过程中,肌肉中的一部分蛋白质在微生物及酶的共同作用下,分解成一些呈碱性的含氮小分子,致使鱼肉pH值逐渐上升。图1和图2反映了在-18℃和-25℃的冻藏条件下,经不同成分的抗冻剂处理后的鱼肉pH变化情况。

由图1可知,在-18℃下4组鱼肉pH值随着贮藏时间的延长均呈上升趋势,而且冻藏至150d时,几组之间的差异明显($P<0.05$),这意味着多聚磷酸钠和海藻糖复合使用对鱼肉产生一定的抗冻

作用,但C与D组之间差异不是很明显($P>0.05$), ϵ -聚赖氨酸在 -18°C 冻藏条件下没有明显的抗冻效用。至贮藏期结束时,鱼肉pH值分别达到A组:7.32;B组:7.29;C组:7.22;D组:7.19,由原来初始值的6.62上升了10.57%、10.12%、9.06%、8.61%。



注:A组:蒸馏水 B组:4 g/dL 海藻糖 C组:4 g/dL 海藻糖+0.4 g/dL 多聚磷酸钠 D组:4 g/dL 海藻糖+0.4 g/dL 多聚磷酸钠+0.05 g/dL ϵ -聚赖氨酸

图1 -18°C 抗冻保护剂对河豚鱼 pH 值的影响

Fig. 1 Effect of cryoprotectants on pH of puffer fish at -18°C

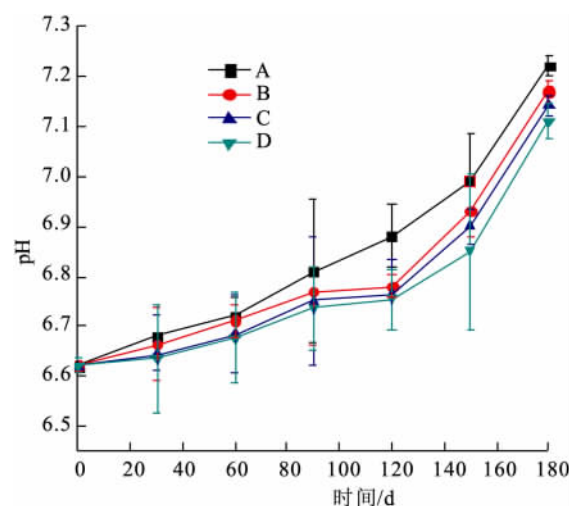
图2为 -25°C 条件下河豚鱼pH值的变化。A组在贮藏60d后急速上升,B、C和D组则在120d后迅速上升,差异明显($P<0.05$),说明海藻糖对鱼肉蛋白产生一定的保护作用。贮藏至150d时,D组与其他几组出现较明显差异,说明 -25°C 的冻藏条件下 ϵ -聚赖氨酸对鱼肉有一定的抗冻作用。在 -25°C 下,几组经过不同抗冻剂处理过的鱼肉pH值上升速率分别为 $3.33\times 10^{-3}/\text{d}$; $3.06\times 10^{-3}/\text{d}$; $2.89\times 10^{-3}/\text{d}$; $2.72\times 10^{-3}/\text{d}$ 。

2.2 抗冻保鲜剂对河豚鱼 TVB-N 值的影响

挥发性盐基氮是在贮藏过程中鱼肉中的蛋白质经酶和微生物的作用分解成氨和胺类等物质,因此在贮藏期间随着时间的延长逐渐上升。图3和4分别是 -18°C 和 -25°C 冷冻条件下河豚鱼肉中TVB-N值的变化情况。

如图3所示,在贮藏前90d内,各处理组的TVB-N值上升缓慢,差异不明显。90d后,A、B和C组逐渐开始显现差异($P<0.05$),但C和D之间

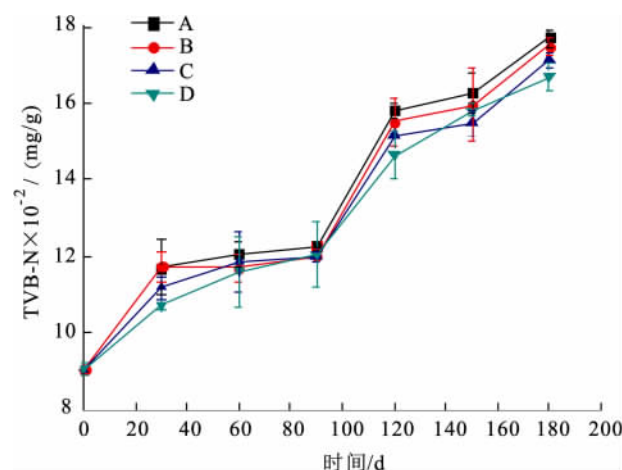
差异仍不显著($P>0.05$),这证明在 -18°C 条件下海藻糖和海藻糖与多聚磷酸钠的复合物均对鱼肉产生抗冻作用,可以一定程度的抑制蛋白质的变性和分解,而且两种物质复合产生的抗冻保护作用更大,但再结合 ϵ -聚赖氨酸则没有太大的区别。至冻藏结束,各组的TVB-N值分别达到新鲜样的1.96倍、1.93倍、1.90倍和1.85倍。



注:A组:蒸馏水 B组:4 g/dL 海藻糖 C组:4 g/dL 海藻糖+0.4 g/dL 多聚磷酸钠 D组:4 g/dL 海藻糖+0.4 g/dL 多聚磷酸钠+0.05 g/dL ϵ -聚赖氨酸

图2 -25°C 抗冻保护剂对河豚鱼 pH 值的影响

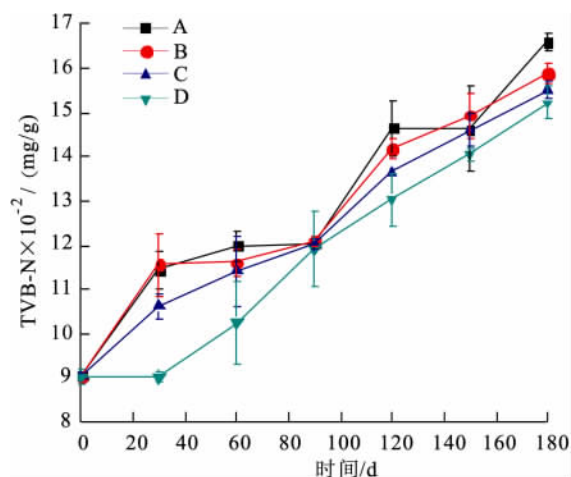
Fig. 2 Effect of cryoprotectants on pH of puffer fish at -25°C



注:A组:蒸馏水 B组:4 g/dL 海藻糖 C组:4 g/dL 海藻糖+0.4 g/dL 多聚磷酸钠 D组:4 g/dL 海藻糖+0.4 g/dL 多聚磷酸钠+0.05 g/dL ϵ -聚赖氨酸

图3 -18°C 抗冻保护剂对河豚鱼 TVB-N 值的影响

Fig. 3 Effect of cryoprotectants on TVB-N of puffer fish at -18°C



注: A 组:蒸馏水 B 组:4 g/dL 海藻糖 C 组:4 g/dL 海藻糖+0.4 g/dL 多聚磷酸钠 D 组:4 g/dL 海藻糖+0.4 g/dL 多聚磷酸钠+0.05 g/dL ϵ -聚赖氨酸

图 4 -25 °C 抗冻保护剂对河豚鱼 TVB-N 值的影响

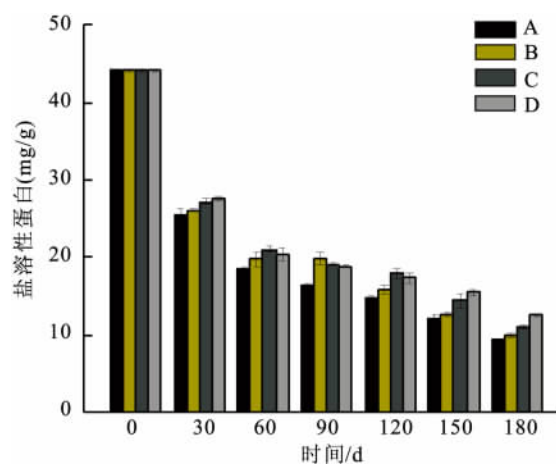
Fig. 4 Effect of cryoprotectants on TVB-N of puffer fish at -25 °C

图 4 反映了在 -25 °C 下河豚鱼 TVB-N 值的变化。在贮藏前 90 d 内, A 与 B 组差异不显著 ($P > 0.05$), C 与 D 则差异明显 ($P < 0.05$), D 组在前 30 d TVB-N 值与新鲜样基本持平, 30 d 后才开始逐渐上升。90 d 直至冻藏期结束, 各组均有较显著的差异 ($P < 0.05$)。这说明在 -25 °C 下将 ϵ -聚赖氨酸与海藻糖和多聚磷酸钠复合会对鱼肉蛋白产生保护作用, 具有一定的抗冻作用。

2.3 抗冻保鲜剂对河豚鱼盐溶性蛋白含量的影响

蛋白质的功能特性主要是由肌肉中的肌原纤维蛋白所决定的, 但在冻藏过程中, 由于变性形成分子间氢键、疏水键、二硫键及盐键等, 往往导致其盐溶性下降, 测定盐溶性蛋白在一定程度上可以反映出蛋白质变性的情况^[11-12]。图 5 与 6 反映了在 -18 °C 和 -25 °C 条件下不同抗冻剂对河豚鱼肉盐溶性蛋白含量的影响状况。从两图中均可看出随着时间的延长, 鱼肉中的盐溶性蛋白呈现下降趋势。

图 5 为 -18 °C 下盐溶性蛋白含量的变化, 贮藏前 60 d 各组差异均不是很显著 ($P > 0.05$), 但在 90 d 时 A 组和其他几组之间出现较明显的差异 ($P < 0.05$), 而其他几组 B、C、D 组则在 150 d 后才出现略微的差别, 至贮藏期结束 B、C、D 各组的盐溶性蛋白含量比 A 组分别高出 6.77%、19.03%、34.62%。

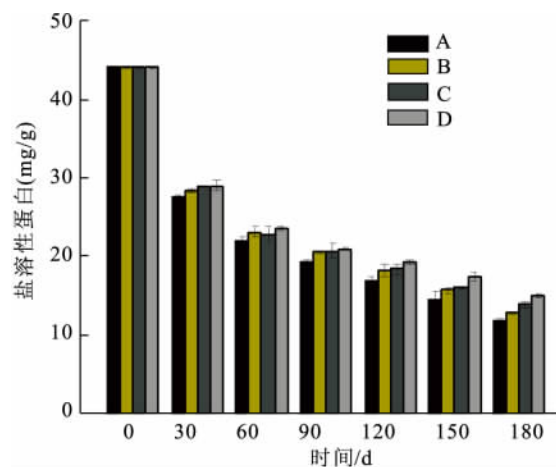


注: A 组:蒸馏水 B 组:4 g/dL 海藻糖 C 组:4 g/dL 海藻糖+0.4 g/dL 多聚磷酸钠 D 组:4 g/dL 海藻糖+0.4 g/dL 多聚磷酸钠+0.05 g/dL ϵ -聚赖氨酸

图 5 -18 °C 抗冻保护剂对河豚鱼盐溶性蛋白含量的影响

Fig. 5 Effect of cryoprotectants on the salt-extractable protein content of puffer fish at -18 °C

图 6 反映了 -25 °C 冻藏条件下经不同抗冻剂处理过的鱼肉盐溶性蛋白含量的变化。如图所示, A 组与其他几组在 90 d 后开始出现略微差异, B 与 C 组在贮藏期结束时出现一定的差别, D 组在 120 d 后与其他各组有较明显的差异 ($P < 0.05$)。冻藏结束时 A、B、C、D 各组鱼肉盐溶性蛋白含量分别降到初始值的 27.01%、29.03%、31.48%、33.95%。



注: A 组:蒸馏水 B 组:4 g/dL 海藻糖 C 组:4 g/dL 海藻糖+0.4 g/dL 多聚磷酸钠 D 组:4 g/dL 海藻糖+0.4 g/dL 多聚磷酸钠+0.05 g/dL ϵ -聚赖氨酸

图 6 -25 °C 抗冻保护剂对河豚鱼盐溶性蛋白含量的影响

Fig. 6 Effect of cryoprotectants on the salt-extractable protein content of puffer fish at -25 °C

图5、6表明在-18℃时 ϵ -聚赖氨酸和其他抗冻剂复合所起到的抗冻效果比-25℃时要差,但二者产生的抗冻效用都不是非常显著。而将海藻糖与多聚磷酸钠复合后的抗冻作用要比单用海藻糖效果好,蒸馏水效果最差。

2.4 抗冻保鲜剂对河豚鱼巯基含量的影响

巯基是蛋白质分子中最具反应活性的基团^[13]。

表1表示两种冻藏温度-18℃和-25℃下不同抗冻剂对鱼肉巯基含量的影响。根据表中各数据变化可知,在冻藏期间鱼肉巯基含量呈下降趋势。巯基含量下降的趋势,可能是由于冻藏过程中肌原纤维蛋白空间结构发生改变,分子内部的巯基暴露出来,进而被氧化成二硫键所致^[14]。

表1 两个温度下抗冻保护剂对河豚鱼巯基含量($\mu\text{mol/g}$)的影响

Tab.1 Effect of cryoprotectants on -SH of puffer fish at two different temperatures ($\mu\text{mol/g}$)

温度/ ℃	组别	时间/d						
		0	30	60	90	120	150	180
-18	A	0.535± 0.011 ^a	0.417± 0.004 ^a	0.287± 0.086 ^a	0.224± 0.038 ^a	0.177± 0.002 ^a	0.131± 0.006 ^a	0.094± 0.021 ^a
	B	0.535± 0.011 ^a	0.397± 0.007 ^a	0.291± 0.081 ^a	0.253± 0.012 ^b	0.223± 0.031 ^b	0.144± 0.027 ^a	0.118± 0.002 ^b
	C	0.535± 0.011 ^a	0.411± 0.010 ^a	0.315± 0.006 ^a	0.301± 0.016 ^c	0.262± 0.002 ^c	0.188± 0.009 ^b	0.135± 0.012 ^{bc}
	D	0.535± 0.011 ^a	0.450± 0.045 ^b	0.329± 0.016 ^a	0.334± 0.025 ^d	0.308± 0.002 ^d	0.195± 0.002 ^b	0.156± 0.034 ^c
-25	A	0.535± 0.011 ^a	0.432± 0.010 ^a	0.341± 0.006 ^a	0.259± 0.016 ^a	0.236± 0.002 ^a	0.148± 0.009 ^a	0.115± 0.012 ^a
	B	0.535± 0.011 ^a	0.441± 0.045 ^a	0.397± 0.016 ^{ab}	0.265± 0.025 ^{ab}	0.253± 0.002 ^b	0.146± 0.002 ^a	0.128± 0.034 ^{ab}
	C	0.535± 0.011 ^a	0.450± 0.004 ^{ab}	0.411± 0.086 ^b	0.291± 0.038 ^b	0.287± 0.002 ^c	0.198± 0.006 ^b	0.149± 0.021 ^b
	D	0.535± 0.011 ^a	0.472± 0.007 ^b	0.433± 0.081 ^b	0.336± 0.012 ^c	0.329± 0.031 ^d	0.247± 0.027 ^c	0.185± 0.002 ^c

注:A组:蒸馏水 B组:4 g/dL 海藻糖 C组:4 g/dL 海藻糖+0.4 g/dL 多聚磷酸钠 D组:4 g/dL 海藻糖+0.4 g/dL 多聚磷酸钠+0.05 g/dL ϵ -聚赖氨酸;同一列中不同的字母表示差异显著($P<0.05$)

-18℃条件冻藏时,在贮藏30 d时D组与其他几组出现明显差异($P<0.05$),而其他几组A、B、C组在前60 d都没有显著差异($P>0.05$),贮藏至90~120 d,4组都出现显著差别($P<0.05$)。至冻藏结束,B、C、D组两两之间差异都不显著,但都与A组差异明显($P<0.05$),分别是A组冰衣的1.26倍、1.44倍、1.66倍。

-25℃冻藏时,在90 d后D组与其他各组出现明显差异($P<0.05$);而C组与A、B组在120 d后开始出现差别($P<0.05$)。说明在-25℃下海藻糖和多聚磷酸钠复合对鱼肉蛋白有一定的保护作用,而加入 ϵ -聚赖氨酸的复合抗冻剂效果要更好一点。在贮藏结束时,4组鱼肉的巯基质量分数分别下降了78.50%、76.07%、72.15%、65.42%。

3 结 语

在常用的抗冻剂中,糖类可通过改变鱼肉蛋白中所存在的水的状态及性质来间接对蛋白质起保护作用。在两种常用的冻藏温度-18℃和-25℃下,研究发现海藻糖对河豚鱼肉蛋白的变性具有一定的抑制作用,而将海藻糖和多聚磷酸钠复合后所表现出的保护效果更好,表现在这2种物质的加入能较好的维持冻藏河豚鱼蛋白的功能特性(如盐溶性蛋白、巯基含量),并在一定程度上阻止了蛋白质的分解(如pH值、挥发性盐基氮)。

在海藻糖和多聚磷酸钠复合基础上加入一定量的 ϵ -聚赖氨酸,-18℃冻藏过程中,和只有海藻

糖和多聚磷酸钠复合所产生的抗冻效力差不多,没有明显差异($P>0.05$)。但在 -25°C 贮藏时,加入 ϵ -聚赖氨酸的复合抗冻剂要比只有2种成分的抗冻

剂对鱼肉蛋白的抗冻保护作用稍好一些($P<0.05$),表现出较好的冻藏稳定性。

参考文献(References):

- [1] 阳清发. 河豚养殖与利用[M]. 北京: 金盾出版社, 2005.
- [2] 李淑媛, 张慇. 糖处理对冷冻猕猴桃块品质的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2005, 24(4): 81-96.
LI Shuyuan, ZHANG Min. The effect of sugar treatment on frozen kiwifruit slices quality[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2005, 24(4): 81-96. (in Chinese)
- [3] Park J W, Lanier T C, Green D P. Cryoprotective effects of sugar, polyols and lor phosphates on Alaska pollack surimi [J]. **Journal of Food Science**, 1988, 53: 1-3.
- [4] JOHN F, CARPENTER J F, CROWE J H. The mechanism of cryoprotectants of protein by solutes[J]. **Cryobiology**, 1988, 25: 244-255.
- [5] Uijttenboogart T G, Trziszke T L. Cryoprotectant effects during short-time frozen storage of chicken myofibril protein isolates[J]. **Journal of Food Science**, 1993, 58: 274.
- [6] 蒙健宗, 秦小明, 赵文报, 等. 海藻糖对冷冻罗非鱼片蛋白质变性作用的影响[J]. 食品工业科技, 2007, 28(2): 214-216.
MENG Jian-zong, QIN Xiao-ming, ZHAO Wen-bao, et al. The effects of trehalose on the protein freezing denaturation of frozen tilapia fillet during the storage at low temperature[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2007, 28(2): 214-216. (in Chinese)
- [7] 黄伟坤. 食品检验与分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1989. 393-400.
- [8] 邓辉萍, 林凯, 张红宇等. 肉类中的挥发性盐基氮的自动定氮仪快速测定法[J]. 职业与健康, 2005, 21(6): 838-839.
DENG Hui-ping, LINKai, ZHANG Hong-yu, et al. The determination of total volatile basic nitrogen in meat products by nitrogen auto analyzer[J]. **Occupation and Health**, 2005, 21(6): 838-839. (in Chinese)
- [9] 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: 198-202.
- [10] Benjakul S, Seymour T A, Morrissey M T, et al. Physicochemical changes in pacific whiting muscle proteins during iced storage[J]. **Journal of Food Science**, 1997, 62(4): 729-733.
- [11] Auh J H, Lee H G, Kim J W, et al. Highly concentrated branched oligosaccharides as cryoprotectant for surimi[J]. **Journal of Food Science**, 1999, 64: 418-422.
- [12] Benjakul S, Bauer F. Physicochemical and enzymatic changes of cod muscle proteins subjected to different freeze-thaw cycles[J]. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2000, 80: 1143-1150.
- [13] Sultanbawa Y, LI-CHAN E C Y. Structural changes in natural actomyosin and surimi from Ling cod (*Ophiodon elongatus*) during frozen storage in the absence or presence of cryoprotectants[J]. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 2001, 49: 4716-4725.
- [14] Farah B, Nazlin K H. Changes in the texture and structure of cod and haddock fillets during frozen storage[J]. **Food Hydrocolloids**, 2002, (16): 313-319.