

虾夷扇贝贝糜冻藏过程中部分理化性质的变化

王小利¹, 朱蓓薇¹, 董秀萍^{1,*}, 郑杰², 陈昭¹, 刘贵洋¹

(1. 大连工业大学食品学院, 国家农产品加工技术研发贝类专业分中心, 辽宁 大连 116034;

2. 江苏大学食品与生物工程学院, 江苏 镇江 212013)

摘要: 研究虾夷扇贝贝糜在不同温度冻藏过程中(−18℃和−35℃)肌动球蛋白的盐溶性、Ca²⁺-ATPase和Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase活性及活性巯基与总巯基含量的变化。结果显示: −18℃条件下冻藏5个月时, 贝糜蛋白已严重变性, 其各指标值分别降至新鲜样品的11.28%、20.31%、30.36%、68.49%和83.67%。−35℃条件下冻藏10个月时, 相应指标分别降至新鲜样品的60.01%、45.25%、48.17%、82.80%和88.71%。两种冻藏温度条件下, 贝糜的各个指标均随冻藏时间的延长而呈下降趋势, 且−35℃冻藏时, 各指标值相对于−18℃冻藏时下降幅度较小, 表明−35℃冻藏效果优于−18℃冻藏。

关键词: 虾夷扇贝贝糜; 冻藏; 理化性质

Partial Biochemical Properties of Scallop (*Patinopecten yessoensis*) Mince during Frozen Storage

WANG Xiao-li¹, ZHU Bei-wei¹, DONG Xiu-ping^{1,*}, ZHENG Jie², CHEN Zhao¹, LIU Gui-yang¹

(1. Special Sub-center of Shellfish of National Research and Development Center of Agriculture Product Processing Technology,

School of Food Science and Technology, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China;

2. School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: The changes of biochemical properties, including the salt extractable protein content, Ca²⁺-ATPase activity, Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase activity and the contents of total and active sulfhydryl groups, of scallop (*Patinopecten yessoensis*) mince during frozen storage (−18 or −35 °C) were investigated. The results showed that the protein denaturation was very serious after 5 months of storage at −18 °C. The solubility in salt solutions, Ca²⁺-ATPase and Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase activity, total and sulfhydryl group contents of actomyosin decreased to 11.28%, 20.31%, 30.36%, 68.49% and 83.67% of their original values after 5 months of storage at −18 °C and to 60.01%, 45.25%, 48.17%, 82.80% and 88.71% after 10 months of storage at −35 °C, respectively. Under each temperature condition, all the parameters showed a downward trend with prolonged storage period and decreased less at −35 °C than at −18 °C. Therefore, −35 °C was more suitable for storing scallop mince than −18 °C.

Key words: scallop mince; frozen storage; biochemical properties

中图分类号: TS254.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)04-0267-04

虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)属大型冷水性双壳贝类, 原主产于日本北海道及俄罗斯远东地区^[1], 于20世纪80年代初期引入我国, 目前已在辽宁、山东等海域形成了较大的养殖规模, 年产量约6万吨, 是我国北方水产品的主要养殖品种之一^[2]。鱼、贝等水产品的品质与其所含蛋白质的生化特性息息相关。水产品在冻藏过程中会发生一系列物理化学变化, 导致蛋白质发生不同程度的变性, 从而使其在食用时失去原有的弹性及鲜味, 严重者甚至变质并失去食用价值^[3]。有研究表

明, 冻藏温度是影响冻藏过程中肌肉蛋白质变性的重要因素^[4]。水产品在低温贮藏过程中蛋白质的变性主要表现为肌原纤维蛋白溶解性的变化、肌动球蛋白的ATPase活性变化和肌原纤维蛋白巯基含量的变化等^[5]。贝柱为扇贝的主要食用部位, 味道鲜美、营养丰富, 冻藏是其目前出口和内销的主要加工方式之一。目前, 已有学者分别对欧洲大扇贝^[6]和巴塔哥尼亚扇贝^[7]在低温冻藏过程中理化性质的变化进行了研究, 发现肌动球蛋白的盐溶性和Ca²⁺-ATPase活性等指标均随冻藏时间的延长而

收稿日期: 2011-01-27

基金项目: 国家“863”计划项目(2011AA100803; 007AA091804)

作者简介: 王小利(1983—), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产品加工与贮藏。E-mail: feixiang7511@163.com

* 通信作者: 董秀萍(1977—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为水产品加工与贮藏。E-mail: dxiuping@163.com

下降。但是, 尚未有关于冻藏温度对大连虾夷扇贝品质影响研究的报道。本实验以大连海域虾夷扇贝为对象, 分别考察-18℃和-35℃冻藏过程中其理化性质的变化, 以期揭示贝类在冻藏过程中理化性质的变化规律, 为虾夷扇贝冷冻制品品质的提升提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鲜活虾夷扇贝(捕获于2010年1月, 壳长为95~110mm) 大连海洋岛水产集团有限公司。

DTNB(二硫代二硝基苯甲酸)、Metol(甲氨基粉)、ATP(三磷酸腺苷)和Tris(三羟甲基氨基甲烷) 加拿大Bio Basic Inc公司; 其他所用试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

T6新世纪紫外可见光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司; T25匀浆机 德国IKA公司; AB204-N电子分析天平 瑞士梅特勒-托利多有限公司; 冷冻离心机 德国Hermle公司; HH-4数显恒温水浴锅 江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司; 202-3-S型电热恒温干燥箱 上海跃进医疗器械厂; PHS-3C型精密级数字式酸度计 上海虹益仪器仪表有限公司; DW-FL90型冰箱 中科美菱低温科技有限责任公司。

1.3 方法

1.3.1 原料预处理

鲜活虾夷扇贝, 分离取贝柱, 用3%盐溶液清洗后于冰水混合物中隔水平衡12h^[8]。用绞肉机将贝柱制成贝糜, 每份称取5g, 分装于塑料离心管中, 然后置于速冻仓(-35~-40℃)速冻3h, 分别放入-18℃和-35℃冰箱中贮藏待用。所有的样品及操作均作3次重复。

1.3.2 肌动球蛋白的提取

参照Paredi等^[9]的方法, 并稍作修改。取冷冻贝糜样品5g, 4℃冰箱中解冻后, 加入30~40倍体积预冷的磷酸缓冲液I(5mmol/L, 含40mmol/L NaCl、1mmol/L 巯基乙醇和0.1mmol/L EGTA), 15000r/min匀浆30s, 匀浆液10000×g离心5min, 沉淀用上述磷酸缓冲液再次溶解, 重复离心两次, 所得沉淀用磷酸缓冲液II(5mmol/L, 含0.6mol/L NaCl和5mmol/L ATP)配制成5~10mg/mL的蛋白悬浮液。蛋白悬浮液搅拌75min后, 10000×g离心20min, 取上清液。搅拌过程中采用0.5mol/L Na₂HPO₄使pH值维持在7.0。上清液用纱布过滤后, 滤液中加入2倍体积预冷的双蒸水, 静置30min后离心。沉淀用Tris-maleate缓冲溶液(20mmol/L, 含0.6mol/L KCl, pH6.8)溶解, 搅拌75min后, 10000×g离心10min, 上清液即为肌动球蛋白溶液。所有操作除特殊注明外均在2~4℃进行。

1.3.3 肌动球蛋白含量的测定

以牛血清蛋白作标准蛋白, 采用Folin-酚法^[10]测定肌动球蛋白的含量。

1.3.4 肌动球蛋白ATPase活性的测定

参照Benjakul^[11]和Paredi^[7]的方法, 并稍作改进。

1.3.4.1 Ca²⁺-ATPase活性的测定

将0.2mL Tris-maleate(0.5mol/L, pH6.8)、0.5mL CaCl₂(0.1mol/L)和0.5mL蛋白液混合均匀后加入3.425mL双蒸水和0.375mL ATP溶液(20mmol/L), 于25℃水浴反应5min后加入1mL 30g/100mL TCA溶液终止反应。反应前加TCA溶液使酶失活做空白实验。取1mL上述反应液, 分别加入1mL 硫酸钼酸、0.5mL 米吐尔试剂和2.5mL 双蒸水, 充分混匀后, 室温发色45min, 于640nm测定其吸光度。

1.3.4.2 Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase活性的测定

以0.1mL MgCl₂溶液(0.1mmol/L)和5μL CaCl₂溶液(0.1mmol/L)代替1.3.4.1节中的CaCl₂溶液, 所差体积以双蒸水补齐后按照上述方法测定活性。

将上述所测得吸光度代入磷酸标准曲线得到无机磷含量, ATPase活性以在一定的条件下, 每分钟每毫克肌动球蛋白分解ATP所释放的磷酸根中磷的物质的量计算, 即:

$$\text{ATPase 活性}/(\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})) = \frac{A-B}{mt}$$

式中: A、B分别为反应管和空白管所得的无机磷含量/μmol; m为肌动球蛋白质量/mg; t为反应时间/min。

1.3.5 巯基(-SH)含量的测定

参照Benjakul^[11]、Ellman^[12]及万建荣等^[13]的方法, 并稍作改进。

1.3.5.1 总巯基含量的测定

取肌动球蛋白溶液0.5mL加入到4.5mL Tris-HCl缓冲液中(0.2mol/L, pH6.8, 含8mol/L 尿素、2% SDS和10mmol/L EDTA), 混合均匀后加入0.5mL DTNB溶液(0.1%, pH8.0), 40℃反应25min后, 于412nm测其吸光度。以0.6mol/L KCl溶液代替样品溶液做空白对照。

1.3.5.2 活性巯基含量的测定

除Tris-HCl缓冲液中不含尿素外均与1.3.5.1节方法相同。

$$\text{巯基含量}/(\text{mol}/\text{mg}) = \frac{AD}{\varepsilon C}$$

式中: A为吸光度; ε为分子吸光系数, 此处其值

为 $13600\text{L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$; D 为稀释倍数, 其值为 11; C 为肌动球蛋白溶液质量浓度 $/(\text{mg}/\text{mL})$ 。

2 结果与分析

2.1 冻藏温度对肌动球蛋白盐溶性的影响

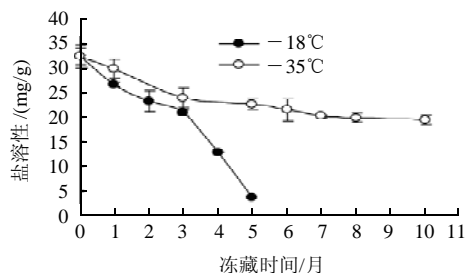


图1 贝糜肌动球蛋白盐溶性的变化

Fig.1 Changes in salt solubility of actomyosin from frozen scallop mince

由图1可知, -18°C 和 -35°C 冻藏过程中, 贝糜肌动球蛋白的盐溶性均随着时间的延长而逐渐下降, 且 -18°C 冻藏时下降幅度相对较大。冻藏初始阶段, 两种温度下肌动球蛋白盐溶性的变化趋势基本一致, 当冻藏时间达到3个月时, 盐溶性分别降至新鲜贝糜的64.40%和73.80%。之后, 随着时间的延长, -18°C 冻藏条件下肌动球蛋白的盐溶性继续大幅度下降, 至5个月时, 盐溶性降至 $3.66\text{mg}/\text{g}$, 仅为新鲜贝糜的11.28%, 此时贝糜蛋白的变性已非常严重。而 -35°C 冻藏条件下, 肌动球蛋白的盐溶性则在3个月之后下降趋势逐渐变缓, 最后趋于稳定。冻藏10个月时, 盐溶性为 $19.44\text{mg}/\text{g}$, 为新鲜贝糜的60.01%。因此, 在相同的冻藏时间时, 冻藏温度越低, 贝糜肌动球蛋白的盐溶性越大, 下降幅度越小, 与夏杏洲等^[14]研究冻藏温度对军曹鱼片品质影响的结果一致, 可能与冻藏过程中二硫键、氢键和盐键等的形成有关^[15-16]。

2.2 冻藏温度对肌动球蛋白ATPase活性的影响

由图2可以看出, -18°C 和 -35°C 冻藏过程中, 贝糜肌动球蛋白的 Ca^{2+} -ATPase活性均随着时间的延长而逐渐下降, 且 -18°C 冻藏时下降幅度相对较大。 -18°C 冻藏时, Ca^{2+} -ATPase活性在冻藏开始的3个月内迅速下降, 由新鲜贝糜的 $1.3320\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$ 下降到冻藏3个月时的 $0.3517\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$, 下降为初始的26.41%。之后随着冻藏时间的延长, Ca^{2+} -ATPase活性继续下降, 但下降趋势有所变缓, 冻藏时间达到5个月时, 其活性仅为初始的20.31%。 -35°C 冻藏时, 在整个冻藏过程中(10个月), Ca^{2+} -ATPase活性下降速率相对稳定, 在冻藏10个月时降至新鲜贝糜的45.25%。同时,

由图3可以看出, 在 -18°C 和 -35°C 冻藏过程中, 贝糜肌动球蛋白 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase活性的变化趋势与相应条件下 Ca^{2+} -ATPase活性的变化趋势基本一致。在冻藏3个月时, -18°C 贝糜肌动球蛋白 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase活性下降为初始的37.21%, 降幅达到最大。

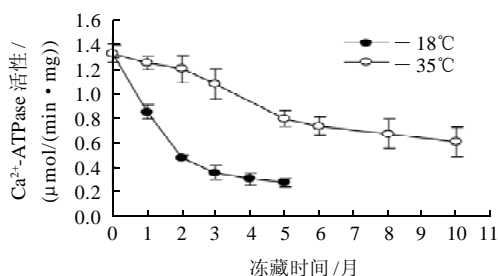


图2 贝糜肌动球蛋白 Ca^{2+} -ATPase活性的变化

Fig.2 Changes in Ca^{2+} -ATPase activity of actomyosin from frozen scallop mince

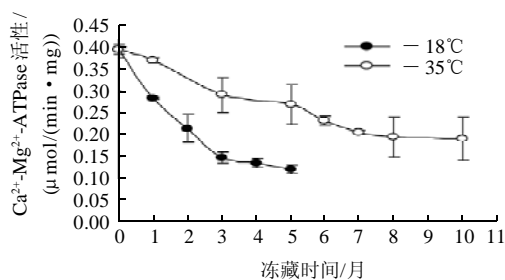


图3 贝糜肌动球蛋白 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase活性的变化

Fig.3 Changes in Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase activity of actomyosin from frozen scallop mince

图2、3结果表明, 冻藏温度越低, 贝糜肌动球蛋白的 Ca^{2+} -ATPase和 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase活性越大, 下降幅度越小。 Ca^{2+} -ATPase活性是评价肌球蛋白分子完整性的良好指标^[3], 而 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase活性则是在无内源 Ca^{2+} 情况下评价肌动球蛋白复合体完整性的良好指标^[3], 因此可看出, 冻藏温度越低, 对贝糜肌球蛋白分子完整性的保护作用和对肌动球蛋白复合体完整性保护作用越好。 Ca^{2+} -ATPase活性源于肌球蛋白球状头部结构^[17], 在冻藏过程中其活性下降可能是由于冰晶的机械作用引起蛋白质的三级结构变化^[18]或者pH值下降而引起的, 也可能是由巯基氧化形成二硫键导致的分子聚合所引起的^[19]。

2.3 冻藏温度对肌动球蛋白巯基含量的影响

由图4可以看出, 在 -18°C 和 -35°C 冻藏时, 贝糜肌动球蛋白的总巯基含量均随着冻藏时间的延长而有所下降, 但是下降幅度很小。 -18°C 冻藏5个月时, 总巯基含量只下降了16.33%, 而 -35°C 冻藏10个月时, 总巯基

含量也仅降低了11.29%。在整个冻藏过程中, -35℃冻藏时的总巯基含量略高于-18℃冻藏相同时间时的总巯基含量。

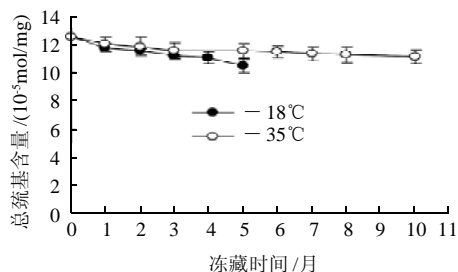


图4 贝类肌动球蛋白总巯基含量的变化

Fig.4 Changes in total sulfhydryl group content of actomyosin from frozen scallop mince

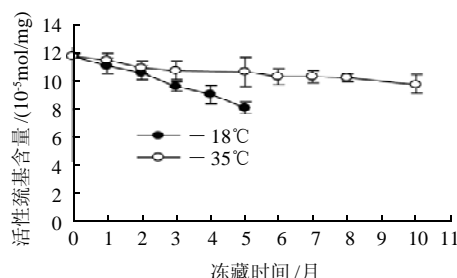


图5 贝类肌动球蛋白活性巯基含量的变化

Fig.5 Changes in active sulfhydryl group content of actomyosin from frozen scallop mince

由图5可知道,相比总巯基而言,活性巯基含量变化受冻藏温度的影响较大。-18℃冻藏时,随冻藏时间的延长,活性巯基含量以相对较稳定的速度逐渐下降,冻藏5个月时,其活性巯基含量仅为新鲜贝类活性巯基含量的68.49%。-35℃冻藏时,活性巯基含量的变化趋势与-18℃冻藏时类似,但下降幅度相对较小,冻藏10个月时活性巯基含量降至82.80%。

冻藏过程中虾夷扇贝贝类肌动球蛋白总巯基与活性巯基含量的变化趋势与Benjakul等^[20]对长蛇鲻、石首鱼、马鲛鱼和大眼海鲈鱼的研究结果一致,其巯基含量减少的原因可能有以下几个方面:蛋白质分子内和分子间巯基形成十字交联;蛋白质中暴露的巯基与添加剂或小分子化合物(如肽)的相互作用;冻藏过程中冰晶的形成使得肌动球蛋白空间结构发生改变,从而使埋藏在分子内部的巯基暴露出来,进而被氧化成二硫键,导致巯基含量的减少。

3 结论

3.1 冻藏过程中(-18℃和-35℃), 虾夷扇贝贝类肌动球蛋白的部分理化性质如盐溶性、Ca²⁺-ATPase活

性、Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase活性、总巯基与活性巯基含量均随着冻藏时间的延长而下降。

3.2 冻藏温度对贝类的理化性质具有一定影响。相同冻藏时间时, -35℃冻藏贝类肌动球蛋白的盐溶性、Ca²⁺-ATPase活性、Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase活性、总巯基与活性巯基的含量均高于-18℃冻藏贝类的相应数值,且冻藏过程中其变化幅度相对较小。虾夷扇贝贝类在-35℃的冻藏效果更好,耐贮藏性更强。

参考文献:

- [1] 于运海, 周大勇, 孙黎明, 等. 虾夷扇贝脏器硫酸酯多糖的制备及性质研究[J]. 食品科学, 2009, 30(6): 68-71.
- [2] 徐东, 张继红, 王文琪, 等. 虾夷扇贝的摄食生理研究[J]. 渔业科学进展, 2010, 31(4): 85-91.
- [3] 曲映红, 冯志哲, 毛玉英. 提高冷藏扇贝柱质量的研究[J]. 制冷, 1999, 18(1): 1-8.
- [4] SUVANICH V, JAHNCKE M L, MARSHALL D L. Changes in selected chemical quality characteristics of channel catfish frame mince during chill and frozen storage[J]. Journal of Food Science, 2000, 65(1): 24-29.
- [5] 黄海, 辛荣, 王秀敏. 鱼肉蛋白在低温贮藏时生化特性变化研究进展[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(2): 149-155.
- [6] MAKRI M. The biochemical textural and sensory properties of frozen stored (-22℃) king scallop (*Pecten maximus*) meats[J]. African journal of Biotechnology, 2009, 8(16): 3893-3903.
- [7] PAREDI M E, CRUPKIN M. Biochemical properties of actomyosin and expressible moisture of frozen stored adductor muscles of Patagonian scallop (*Zygochlamys patagonica*) [J]. Journal of Food Biochemistry, 2003, 27(6): 461-470.
- [8] CHUNG S L, MERRITT J H. Physical measures of sensory texture in thawed sea scallop meat[J]. International Journal of Food Science and Technology, 1991, 26(2): 207-210.
- [9] PAREDI M E, de MATTIO N D V, CRUPKIN M. Biochemical properties of actomyosin of cold stored striated adductor muscles of *Aulacomys ater ater* (Molina) [J]. Journal of Food Science, 1990, 55(6): 1567-1570.
- [10] 袁道强, 黄建华. 生物化学实验和技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2006: 186-187.
- [11] BENJAKUL S, SEYMOUR T S, 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.
- [12] ELLMAN G L. Tissue sulfhydryl groups[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1959, 82(1): 70-77.
- [13] 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.
- [14] 夏杏洲, 洪鹏志, 钟灿桦, 等. 不同温度冻藏对军曹鱼片品质的影响[J]. 食品科学, 2010, 31(12): 239-243.
- [15] 章银良. 冷冻保藏对海鳗肌动球蛋白的影响[J]. 食品科学, 2009, 30(2): 250-253.
- [16] SOMPONGSE W, ITOH Y, OBATAKE A. Effect of cryoprotectant and a reducing reagent on the stability of actomyosin during ice storage[J]. Fisheries Science, 1996, 62(1): 73-79.
- [17] 潘锦峰, 沈慧星, 宋永令, 等. 鱼蛋白冷冻变性及其抗冻剂的研究综述[J]. 肉类研究, 2009, 23(6): 9-15.
- [18] SUZUKI T. Freezing denaturation of fish proteins[J]. Refrigeration (Tokyo), 1967, 42: 46-51.
- [19] JIANG S T, HWANG D C, CHEN C S. Effect of storage temperature on the formation of disulfides and denaturation of milkfish actomyosin (*Chanos chanos*) [J]. Journal of Food Science, 1988, 53(5): 1333-1335; 1386.
- [20] BENJAKUL S, VISESSANGUAN W, THONGKAEW C, et al. Comparative study on physicochemical changes of muscle protein from some tropical fish during frozen storage[J]. Food Research International, 2003, 36(8): 787-795.