

# 冻融循环对秘鲁鱿鱼蛋白及肌肉品质的影响

姜晴晴, 李珊, 刘文娟, 鲁璐, 陈士国, 叶兴乾, 胡亚芹

(浙江大学食品与营养系馥莉食品研究院, 浙江省农产品加工技术研究重点实验室, 浙江省食品加工技术与装备工程中心, 浙江杭州 310058)

**摘要:** 研究反复冻融对秘鲁鱿鱼肌原纤维蛋白及肌肉品质的影响, 为水产品保鲜提供理论依据。将鱿鱼肌肉分别进行 0、1、3、5、7 次冻融处理, 测定蛋白羰基、总巯基、表面疏水性、蛋白的聚集情况及蛋白浊度、乳化活性、乳化稳定性等, 并结合感官评价对肌肉品质如解冻损失、蒸煮损失、色泽、嫩度、质构特性及肌肉脂肪氧化程度等进行分析。结果发现经过冻融处理后, 蛋白羰基含量和表面疏水性增加, 总巯基含量下降, 蛋白出现一定程度的聚集, 肌原纤维蛋白的浊度增加, 乳化活性和乳化稳定性降低。随着冻融次数的增加, 鱿鱼肌肉脂肪氧化程度、解冻损失、蒸煮损失、b\* 等显著增加 ( $p < 0.05$ ), 而 L\*、a\*、W、嫩度、弹性和硬度等下降, 同时感官评价结果和仪器分析结果保持一致。因此, 反复冻融促进蛋白和脂肪发生氧化, 导致鱿鱼肌肉品质下降。

**关键词:** 冻融循环; 蛋白氧化; 肌肉品质; 秘鲁鱿鱼

文章编号: 1673-9078(2014)7-171-178

## Effect of Freeze-thaw Cycles on Proteins and Muscle Quality of *Dosidicus gigas*

JIANG Qing-qing, LI Shan, LIU Wen-juan, LU Jun, CHEN Shi-guo, YE Xing-qian, HU Ya-qin

(Department of Food Science and Nutrition, Fuli Institute of Food Science, Zhejiang Key Laboratory for Agro-Food Processing, Zhejiang R & D Center for Food Technology and Equipment, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

**Abstract:** Effects of different freeze-thaw cycles on proteins and muscle quality of *Dosidicus gigas* were studied to provide a theoretical basis for the preservation of aquatic products. Protein carbonyl content, total sulfhydryl content, surface hydrophobicity, sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) pattern, turbidity, emulsifying activity index (EAI) and emulsifying stability index (ESI) of the treated samples were measured after 0, 1, 3, 5 and 7 freeze-thaw cycles. And the thawing loss, cooking loss, color, tenderness, texture and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) of squid muscle were analyzed combined with organoleptic evaluation. With increasing the number of freeze-thaw cycles, protein carbonyl content and surface hydrophobicity increased but total sulfhydryl content of myofibrillar proteins exhibited the opposite trend. Aggregation of proteins was found during the process and EAI and ESI dropped markedly. Moreover, TBARS, thawing loss, cooking loss and b\* significantly increased ( $p < 0.05$ ), while L\*, a\*, whiteness, tenderness, springiness and hardness decreased. Results from organoleptic evaluation were in consistence with the instrumental ones. In summary, repeated freeze-thaw cycles promotes oxidation of protein and lipid and has a detrimental effect on the qualities of squid muscle.

**Key words:** freeze-thaw cycles; protein oxidation; muscle qualities; *Dosidicus gigas*

虽然在过去的几十年, 人们研究了许多新兴的保鲜保藏技术, 冻藏仍然是目前为止肉制品保鲜贮藏的最主要方式, 冻藏在肉制品进出口贸易中的安全保证方面起着极其重要的作用。在低温条件下微生物和酶活性受到抑制, 但是肌肉品质的劣变, 如质构、色泽、风味等的变化是不可避免的。影响冻藏品质的因

收稿日期: 2014-02-20

基金项目: 国家科技支撑计划课题 (2012BAD38B09)

作者简介: 姜晴晴 (1990-), 女, 硕士, 研究方向: 水产品贮藏与保鲜

通讯作者: 胡亚芹 (1972-), 女, 副教授, 博士生导师, 研究方向: 水产化学

素有很多, 包括温度条件、冷冻和解冻速度、温度的波动等等。我国冷藏链技术目前尚不完善, 在水产品的长途运输、贮藏及消费过程中, 由于温度波动不可避免地出现反复冻融过程。反复冻融会引起重结晶现象的发生, 致使冰晶数量减少但体积增大, 破坏细胞膜结构, 损伤细胞组织结构, 加速脂肪氧化和蛋白变性。水产品经反复冻融以后不仅会使营养物质流失, 产品品质下降, 还会造成一定的经济损失, 因此研究反复冻融对肌肉品质的影响对水产品的物流保鲜具有重要的现实意义。

反复冻融对肌肉蛋白及品质的影响已经受到国

外一些学者的关注。Benjakul 等<sup>[1]</sup>在研究反复冻融对鳕鱼肌肉蛋白理化性质及酶活性的影响时发现,随着冻融次数的增加,鳕鱼的  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性降低,但  $\alpha$ -糖苷酶和  $\beta$ -乙酰基-氨基葡萄糖苷酶活性却显著增加,说明反复冻融造成细胞结构破坏,一些线粒体和溶酶体中的酶释放到肌浆中。Thanonkaew 等<sup>[2]</sup>研究了反复冻融对乌贼肌肉脂肪氧化程度、色泽及蛋白生化性质的影响,发现反复冻融会促进脂肪氧化和蛋白聚集。Sriket 等<sup>[3]</sup>发现反复冻融会使虾肉蛋白发生变性,溶解性降低,细胞结构完整性被破坏,肌纤维发生径向收缩,Z-盘遭到破坏,肌纤维间出现较大孔隙。然而,国内在该领域的研究则比较少,夏秀芳等<sup>[4]</sup>研究了反复冷冻-解冻对猪肉品质特性和微观结构的影响,发现反复冻融能够使肌细胞发生破裂,肌纤维结构完整性遭到破坏,自身的抗氧化体系下降,外界及自身促氧化因素增加,结果导致肌肉品质下降,脂肪氧化程度增加。自 20 世纪 90 年代以来,研究者对肉制品中蛋白氧化所产生的影响及其机理进行探索,发现蛋白氧化会引起营养品质及功能性质的下降,降低肉制品的品质及消费者的可接受性<sup>[5]</sup>。Xia 等<sup>[6]</sup>研究反复冻融处理对猪肉蛋白的影响,指出反复的冻融处理能够促进脂肪及蛋白氧化进而对肌肉的品质产生不良的影响。然而,关于冻融循环对水产品蛋白氧化的影响还未见报道。

秘鲁鱿鱼 (*Docidicus gigas*) 是资源最丰富的鱿鱼种类之一,产量高、价格低、营养丰富,深受消费者喜爱。然而在贮藏加工过程中,鱿鱼肌肉品质变化直接影响其消费价值,其中肌原纤维蛋白对其产品的保水性、粘弹性,质地等品质都起着决定性的作用。因此本研究以秘鲁鱿鱼为对象,研究反复冻融处理对肌原纤维蛋白及肌肉品质变化进行研究,探索冻融循环处理对鱿鱼蛋白及肌肉品质的影响规律。

## 1 材料与方法

### 1.1 原料

冷冻秘鲁鱿鱼 (*Docidicus gigas*), 购于浙江舟山水产码头,冻结状态下运回实验室后,隔水流水解冻,去皮去内脏,沿体轴切成约长宽高为 4 cm×4 cm×1 cm 的鱿鱼片,放入聚乙烯自封袋(5 份,每份约 200 g), -20 °C 冰箱贮藏。

### 1.2 主要仪器设备

TGL20M 台式低速冷冻离心机,湖南凯达科学仪器有限公司; TA: XT2i 质构仪,英国 Stable Micro

System; UV-2550 紫外分光光度计,日本岛津公司; SC-80C 全自动色差计,北京康光仪器有限公司; PHS-3BW 酸度计,上海般特仪器有限公司; EPS300 电泳仪,上海天能科技有限公司; FSH-2 可调高速匀浆机,金坛市鸿科仪器厂; 等。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 冻融循环处理

取冻结在 -20 °C 的鱿鱼片,室温解冻至其中心温度为 0 °C,然后放回 -20 °C 冰箱中贮藏,作为一个冻融处理。5 d 一个循环,五组分别进行 0、1、3、5、7 次冻融处理,待全部处理完成后进行实验分析。

#### 1.3.2 肌原纤维蛋白提取

肌原纤维蛋白提取按照 Lefever 等<sup>[7]</sup>的方法,并进行适当修改。称取 10.00 g 样品,按质量体积比 1:10 与缓冲液 A (20 mmol/L 磷酸盐缓冲液,含有 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, pH 7.0) 混合均匀, 15000 r/min 匀浆 60 s, 5000 r/min, 2 °C, 离心 10 min 取沉淀。再加入 5 倍体积缓冲液 A, 相同条件下离心取沉淀。重复以上操作两次,最后沉淀中加入缓冲液 B (25 mmol/L 磷酸盐缓冲液,含有 0.6 mol/L NaCl, pH 7.0), 匀浆后冰浴溶解 2 h, 过滤去除不溶性部分,滤液即为肌原纤维蛋白溶液。以牛血清蛋白作标准曲线,双缩脲法测定蛋白质浓度,并用缓冲液 B 调节蛋白浓度。

#### 1.3.3 冻融处理对蛋白氧化的影响

##### 1.3.3.1 蛋白羰基测定

蛋白羰基含量根据 Oliver 等<sup>[8]</sup>的方法进行测定,并略加改动。取 1 mL 质量浓度约为 5.0 mg/mL 氧化蛋白溶液放入离心管中,每管中加入 1 mL 10 mmol/L 的 2,4-二硝基苯肼(对照组加入 2 mol/L HCl, 其余操作相同),室温下黑暗处静置 1 h (每隔 10 min 漩涡 1 次),然后加入 1 mL 质量分数为 20% 的三氯乙酸, 10000 r/min 离心 15 min, 弃上清液,用 1 mL 乙酸乙酯:乙醇 (V/V=1:1) 洗涤沉淀 3 次,去除未反应的试剂,加入 4 mL 盐酸胍溶液 (6 mol/L, 溶于 20 mM 磷酸钠缓冲液, pH 6.5), 37 °C 下溶解沉淀 20 min, 10000 r/min 离心 5 min, 去除不溶性部分。蛋白浓度测定以牛血清蛋白(盐酸胍溶解)为标准 280 nm 处测定吸光度绘制标准曲线,羰基吸光值测定在 370 nm 处,摩尔吸光系数为 21000 L/(mol·cm),羰基含量表示为 nmol/mg 蛋白 (MP)。

##### 1.3.3.2 总巯基含量测定

根据 Benjakul 等<sup>[9]</sup>的方法,1 mL 肌原纤维蛋白溶液中加入 9 mL 0.2 mmol/L Tris-HCl (内含 10 mmol/L

EDTA, 0.6 mol/L KCl, 8 mol/L 尿素, 2 %SDS, pH=6.8), 混合均匀。取上述混合液 4 mL 加入 0.4 mL 0.1% 5, 5'-二硫代双(2-硝基)苯甲酸 (DTNB), 将反应混合液在 40 °C 保温 25 min, 波长 412 nm 处测定吸光度, 空白用 0.6 mol/L KCl 溶液代替。每组样品测量 3 个平行, 结果取平均值。巯基含量按以下公式计算:

$$-\text{SH 含量}/(\text{nmol}/\text{mg pro})=(A \times n)/(\epsilon \times \rho) \times 10^6$$

式中: A 表示 412 nm 波长处的吸光度; n 表示稀释倍数;  $\epsilon$  表示摩尔吸光系数 13600 L/(mol·cm);  $\rho$  表示蛋白质质量浓度/(mg/mL)。

### 1.3.3.3 表面疏水性测定

根据 Chelh 等<sup>[10]</sup>的方法测定蛋白表面疏水性, 略有改动。取 1 mL 肌原纤维蛋白悬浊液 (20 mM 磷酸盐缓冲液, pH 6.0) 中加入 200  $\mu$ L 1 mg/mL 溴酚蓝钠 (BPB, 去离子水溶解) 混匀。对照用磷酸盐缓冲液替代肌原纤维蛋白溶液。室温搅拌 10 min, 5000 r/min 离心 15 min。取上清液稀释十倍, 595 nm 波长处测吸光度, 磷酸盐缓冲液作空白, 结果用肌原纤维蛋白结合的 BPB 表示。

$$\text{BPB 结合量} (\mu\text{g}) = 200 \times (A_0 - A) / A_0$$

式中:  $A_0$  表示对照溶液在 595 nm 处的吸光值; A 表示肌原纤维蛋白溶液在 595 nm 处的吸光值。

### 1.3.3.4 蛋白质凝胶电泳 (SDS-PAGE)

参照 Laemmli 方法<sup>[11]</sup>, 采用 SDS-PAGE 分析鱼肉经反复冷冻-解冻后蛋白的变化。采用 10% 的分离胶浓度, 3% 的浓缩胶浓度。考马斯亮蓝染色, 脱色后观察蛋白条带变化。

## 1.3.4 冻融循环对蛋白功能性质的影响

### 1.3.4.1 浊度测定

根据 Benjakul 等<sup>[12]</sup>的方法并经过一定的修改。分别取肌原纤维蛋白溶液 (1 mg/mL) 溶液 5 mL, 在 80 °C 的水浴锅中加热 30 min, 冷却后在 600 nm 处测定吸光值。以不加蛋白的空白溶液为对照, 以 600 nm 处的吸光值表示其热聚集程度。

### 1.3.4.2 乳化性质测定

参考 Pearce 等<sup>[13]</sup>及 Xia 等<sup>[14]</sup>的方法, 并经过适当的修改。2 mL 大豆油加入到 8 mL 蛋白溶液 (1 mg/mL) 中混匀 (室温), 15000 r/min 匀浆 1 min, 分别在 0、10 min 时在距底部 0.5 cm 处取 100  $\mu$ L, 加入到 5 mL 0.1% SDS 溶液中, 以 0.1% SDS 为空白, 500 nm 处测定吸光度。乳化活性 (EAI)、乳化稳定性 (ESI) 分别用下述公式计算:

$$\text{EAI} (\text{m}^2/\text{g}) = (2 \times 2.303) / (C \times (1 - \psi) \times 10) \times A_{500} \times n$$

式中:  $A_{500}$  表示 500 nm 处的吸光值; C 表示蛋白浓度

(mg/mL);  $\psi$  表示在乳化前大豆油所占体系的体积比 (0.20); n 表示稀释倍数。

$$\text{ESI} (\%) = A_{10} / A_0 \times 100$$

式中:  $A_0$ 、 $A_{10}$  分别表示在 0、10 min 时 500 nm 处的吸光值。

### 1.3.5 冻融循环对脂肪氧化的影响

脂肪氧化程度的根据 Vyncke<sup>[15]</sup>的方法测定, 并适当修改。取 3.00 g 样品加入 30 mL 7.5% (m/V) 的三氯乙酸 (含 0.1% EDTA), 15000 r/min 匀浆 1 min, 冰浴静置 10 min。5000 r/min, 4 °C 离心 10 min, 滤纸过滤。取滤液 5 mL 加入 5 mL 0.02 mol/L 2-硫代巴比妥酸 (TBA) 溶液, 沸水浴 40 min。冰水冷却, 532 nm 处测吸光度。以 1, 1, 3, 3-四乙氧基丙烷 (TEP) 做标准曲线, 2-硫代巴比妥酸值 (TBARS) 表示为 mgMDA/kg 样品。

### 1.3.6 冻融循环对鱿鱼肌肉品质的影响

#### 1.3.6.1 解冻损失及蒸煮损失测定

将处理样品称重后在室温下解冻至中心温度 0 °C, 吸水纸擦去表面水分, 称重, 并按以下公式进行计算:

$$\text{解冻损失} (\%) = (M_0 - M_1) / M_0 \times 100$$

式中:  $M_1$ 、 $M_0$  分别表示解冻后、解冻前样品质量。

解冻后的样品沸水煮 1 min 后冷却至室温后, 吸水纸擦去表面水分, 称重, 并按以下公式进行计算:

$$\text{蒸煮损失} (\%) = (M_2 - M_1) / M_1 \times 100$$

式中:  $M_2$ 、 $M_1$  分别表示蒸煮后和解冻后样品质量。

#### 1.3.6.2 色泽测定

将经过冻融处理的鱿鱼片中间剖开, 使用色差计测定样品剖面的  $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$  值, 并计算其白度值。白度计算公式:  $W = 100 - [(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}]^{1/2}$ 。  $L^*$  表示明度,  $a^*$  和  $b^*$  表示色度。  $a^*$  正值表示偏红, 负值表示偏绿;  $b^*$  正值表示偏黄, 负值表示偏蓝。每组样品测 10 次, 取平均值进行计算。

#### 1.3.6.3 剪切力及质构测定

将蒸煮过后的样品冷却至室温后采用质构仪进行剪切力测定, 生鱼片解冻后进行质构测定。剪切力采用刀片式探头 (HDP/BSW) 连接 25 kg 的测压原件, 垂直于肌原纤维方向进行测定。测前速度为 1.50 mm/s, 测试速度为 1.50 mm/s, 测试距离 25 mm, 结果以剪切力 (N) 表示。全质构测定探头型号为 P5, 测前速率为 1.00 mm/s, 测试速率为 1.00 mm/s, 测定距离为鱼片形变量的 50%, 间隔时间为 5.00 s。

### 1.3.7 鱿鱼感官评价 (模糊数学法)

参照 Sallam<sup>[16]</sup>的方法, 经过感官评定培训 10 人 (3 男 7 女) 组成感官评定小组, 参考胡庆兰等<sup>[17]</sup>的感官评

价标准表对处理后的鱿鱼片从色泽、组织、口感和滋味四个方面利用模糊数学综合评价法对样品进行综合

表 1 鱿鱼片感官评价标准表

Table 1 Criteria of sensory evaluation of squid slice

描述	极好 $v_1$	比较好 $v_2$	一般 $v_3$	不合格 $v_4$
色泽	均匀, 呈现淡黄色或者黄白色	略深, 自然光泽	较深或者偏白, 暗淡	很深或很白, 无光泽
组织	纹理清晰可见, 边缘切口细腻	纹理较细腻, 清晰可见	粗糙	极度粗糙, 触感不佳
口感	软硬适口, 富有弹性, 咀嚼性好	咀嚼性较好, 弹性较好	弹性较差, 嚼劲差	弹性很差, 坚硬的, 很难咀嚼
滋味	滋味鲜美, 回味无穷	鲜味十足, 但不纯正	一般	滋味极差

### 1.4 数据统计分析方法

数据分析使用 Origin 8.5 软件, 差异显著性 ( $P < 0.05$ ) 分析使用 Turkey HSD 程序。

## 2 结果与讨论

### 2.1 冻融循环处理对鱿鱼肌原纤维蛋白氧化的影响

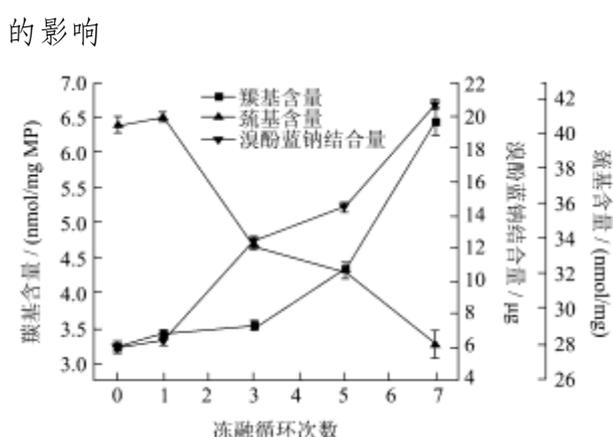


图 1 冻融循环次数对鱿鱼肌原纤维蛋白羰基含量、总巯基含量及表面疏水性的影响

Fig.1 Effect of freeze-thaw cycles on carbonyl content, total sulfhydryl content and surface hydrophobicity of myofibrillar proteins from *Dosidicus gigas*

羰基化作为蛋白氧化的一个显著性指标, 目前国内外广泛用作肌肉制品中蛋白氧化的测量指标, 一般采用 2, 4-二硝基苯肼法测定羰基化合物的含量。羰基可能通过以下四种途径产生: (1) 碱性氨基酸 (精氨酸、赖氨酸等) 侧链直接氧化; (2) 通过  $\alpha$ -酰胺化作用肽骨架的直接断裂; (3) 和还原糖反应; (4) 与非蛋白羰基化合物 (4-羟基-2-壬烯醛、丙二醛等) 结合<sup>[18]</sup>。经不同的冻融次数处理后鱿鱼肌原纤维蛋白羰基含量的变化如图 1 所示, 经过冻融处理后, 蛋白羰基含量增加, 尤其是在反复冻融 7 次后未经冻融的鱿鱼蛋白羰基含量增加了 1.01 倍 ( $p < 0.05$ )。可能是因为鱿鱼反复冻融的处理过程中, 肌肉中产生各种促氧

化成分如自由基等对蛋白分子进行攻击, 导致其羰基含量明显增加, 这与 Xia 等<sup>[6]</sup>在猪肉中的研究结果一致。

蛋白质发生氧化可使巯基 (-SH) 形成二硫键 (-S-S-), 随着氧化条件的增强还会生成亚砷等氧化产物<sup>[19]</sup>, 所以巯基含量可以作为蛋白氧化的一个重要指标。由图可知冻融处理对肌原纤维蛋白巯基含量的影响同羰基变化趋势恰好相反。鱿鱼肌肉经过 1 次冻结-解冻过程, 巯基含量变化不显著 ( $p > 0.05$ )。冻融处理 3、5、7 次后蛋白总巯基的含量由 40.60 nmol/mg MP 分别下降至 33.68、32.25、28.06 nmol/mg MP。鱿鱼肌肉经过一次冻融处理后, 肌原纤维蛋白的结构发生变化, 能够检测到的巯基含量有少量增加。继续冻融处理, 蛋白氧化程度加大使巯基含量显著降低。总体而言, 随着冻融次数的增加, 蛋白巯基含量损失越多。本研究中总巯基含量变化趋势与 Benjskul 等<sup>[9]</sup>在大西洋白鲑冰藏过程中研究结果相似, 其研究发现冰藏 2 d 后大西洋白鲑肌肉蛋白巯基含量略有升高, 随后降低。

蛋白质表面疏水性影响蛋白质理化和功能性质, 是表明蛋白结构变化的一项重要指标。在本实验研究过程中发现, 随着冻融次数的增加, 蛋白表面疏水性增加, 尤其是在 3 次冻融处理及以后表面疏水性增加显著 ( $p < 0.05$ )。在经过反复冻融 3、5、7 次后, 与未经冻融处理的鱿鱼肌原纤维蛋白相比分别增加了 1.10、1.45、2.49 倍。可能是因为冻融处理过程中蛋白质天然构像发生变化, 蛋白质解折叠, 一些疏水性的脂肪族与芳香族氨基酸侧链基团从蛋白分子内部暴露, 促进蛋白折叠的发生, 从而导致表面疏水性的增加。Li 等<sup>[20]</sup>研究了鲤鱼肌原纤维蛋白在模拟羟基自由基产生体系中的变化, 研究发现随着蛋白氧化程度的增加, 蛋白表面疏水性增加。蛋白氧化造成的羰基化、肽主链的断裂以及分子间二硫键的形成等是蛋白结构变化的基本机制<sup>[21]</sup>。Benjakul 等<sup>[1]</sup>研究发现鲑鱼经过 3 次冻融后, 表面疏水性增加, 与本文结果一致, 但是经过 5 次冻融后, 表面疏水性却有所下降。可能是因

为经过 5 次冻融后, 肌肉蛋白三级结构发生变化, 一些疏水基团被掩埋, 或者通过疏水作用交联, 使表面疏水性稍有下降, 这可能与鱼的种类有关。

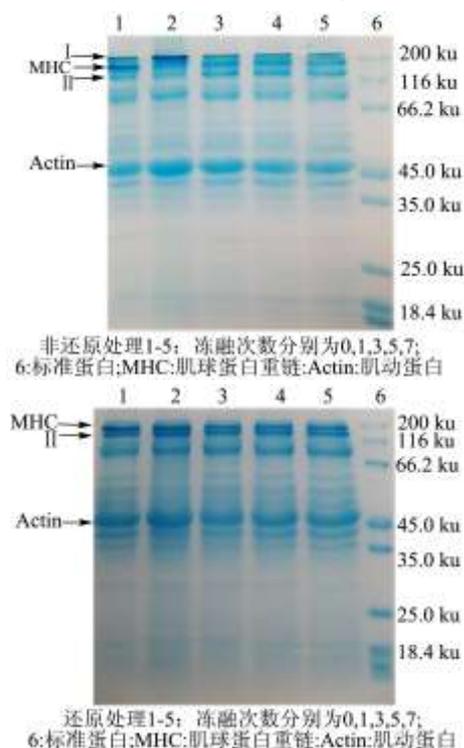


图2 冻融循环次数对鱿鱼肌肉蛋白 SDS-PAGE 电泳图谱的影响  
Fig.2 Effect of freeze-thaw cycles on the SDS-PAGE patterns of protein from *Dosidicus gigas*

为了观察反复冻融对鱿鱼蛋白的影响, 利用 SDS-PAGE 对鱿鱼肌肉蛋白进行分析, 结果如图 2 所示。由非还原处理的电泳图谱可以看出, 经过反复冻融处理后, 肌球蛋白重链条带明显变细, 而肌动蛋白等蛋白条带经过 3 次冻融处理后也变细。与之相对应, 蛋白发生了不同程度的交联, 条带 I 和 II 有不同程度的加深, 经过冻融处理后鱿鱼蛋白形成了大分子量和中分子量的聚集体。经过一次冻融处理后, 分离胶顶部的条带 I 明显变粗, 可能是因为在氧化条件下肌原纤维蛋白分子间二硫键、二酪氨酸的形成导致蛋白的聚集, 堆积在分离胶的顶部, 甚至可能存在于浓缩胶中, 无法进入到分离胶, 冻融次数进一步增加时, 条带 II 加深。这与 Thanonkaew 等<sup>[2]</sup>在研究铜离子对乌贼冻融处理后的影响的结果一致, 出现了不同分子量的蛋白聚集体。经过还原处理后, MHC 条带并没有完全恢复, 可能是因为肌肉蛋白以非二硫键的形式进行了交联<sup>[22]</sup>。

## 2.2 冻融循环处理对蛋白功能性质的影响

蛋白溶液加热后的浊度水平可用来衡量肌原纤维蛋白热诱导聚集的变化情况。经冻融处理后鱿鱼肌原

纤维蛋白在加热时浊度的变化如图 3 所示。由图可以看出, 随着冻融次数的增加, 蛋白越来越容易发生热聚集 ( $p < 0.05$ )。经过冻融处理 3、5、7 次后浊度分别增加 23.06%、26.08%、26.08%。可能是因为经过反复冻融处理后, 巯基氧化形成二硫键以及表面疏水性增加导致其加热时其更容易聚集, 浊度增加。

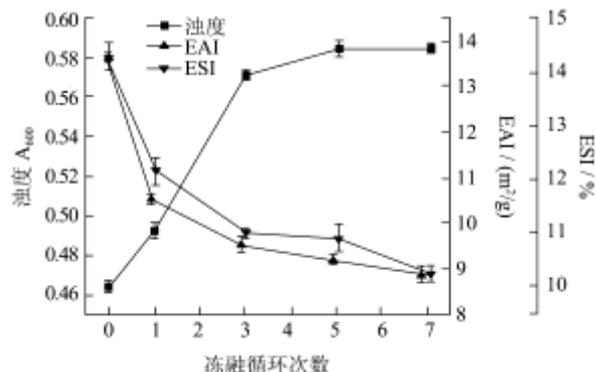


图3 冻融循环次数对鱿鱼肌原纤维蛋白浊度、乳化活性和乳化稳定性的影响  
Fig.3 Effect of freeze-thaw cycles on turbidity, EAI and ESI of myofibrillar proteins from *Dosidicus gigas*

## 2.3 冻融循环处理对脂肪氧化的影响

蛋白的乳化性质是衡量在一定的条件下一定量蛋白质溶液所能乳化油的量, 是蛋白质的很重要的功能性性质之一。图 3 中我们可以看出, 随着冻融次数的增加, 肌原纤维蛋白的乳化活性和乳化稳定性都下降 ( $p < 0.05$ ), 其中冻融 7 次处理后乳化活性和乳化稳定性分别下降了 34.97% 和 28.07%, 这与 Xia 等<sup>[14]</sup>在猪肉中的研究结果一致。此结果表明, 反复冻融处理破坏肌原纤维蛋白结构的完整性, 导致蛋白与脂肪交联的能力下降, 从而使其乳化性及乳化稳定性下降。

## 2.3 冻融循环处理对脂肪氧化的影响

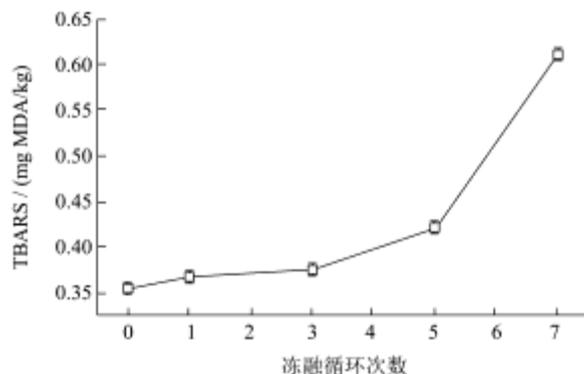


图4 冻融循环次数对鱿鱼脂肪氧化的影响  
Fig.4 Effect of freeze-thaw cycles on lipid oxidation of *Dosidicus gigas*

2-硫代巴比妥酸值 (TBARS) 是判断肉制品中脂肪氧化程度的重要指标, 可用于反映脂肪氧化的次级产物的多少。即使在低温冻藏条件下脂肪氧化仍可发

生, 是肉制品腐臭、变色等不良现象发生重要因素之一<sup>[23]</sup>。如图 4 所示, 鱿鱼中 TBARS 随着冻融循环次数的增加而增加, 尤其是在反复冻融 7 次后, TBARS 增加 72.29%, 脂肪氧化程度增加显著 ( $p < 0.05$ ), 可能是因为在反复冻融过程中结晶与重结晶现象发生, 大的冰晶体生成并对肌肉细胞造成损伤, 一些氧化酶随汁液流出, 促进脂肪氧化的发生。Benjakul 等<sup>[9]</sup>研究发现, 反复的冻融处理破坏细胞的膜结构释放一些促进氧化的组分, 尤其是血红素铁的释放与脂肪氧化的程度有密切关系。当然, 鱿鱼体内流动的为血蓝蛋白, 运输氧的为铜离子, 反复冻融是否对其产生影响尚待研究。

## 2.4 冻融循环处理对鱿鱼肌肉品质的影响

### 2.4.1 冻融循环处理对鱿鱼片解冻损失及蒸煮损失的影响

肌肉中的含水量约为 75%, 肌肉的持水性与最终产品的多汁性等属性密切相关。肉制品失水不仅会造成经济损失, 还会影响肉的颜色、风味和组织状态。在本试验中研究冻融循环处理对鱿鱼解冻损失及蒸煮损失的影响, 结果如图 5 所示。随着冻融次数的增加,

解冻损失及蒸煮损失都显著增加 ( $p < 0.05$ )。反复冻融 7 次处理后, 解冻损失及蒸煮损失分别由 3.34% 增至 5.18% 和 12.83% 增至 15.38%, 由此可见反复冻融也是影响肉品持水性的一个重要因素。可能是冻融处理导致细胞结构破坏, 肌原纤维横向收缩使肌肉的持水性及产品得率下降, 本实验研究结果这与 Xia 等<sup>[6]</sup>在猪肉中的研究结果一致。

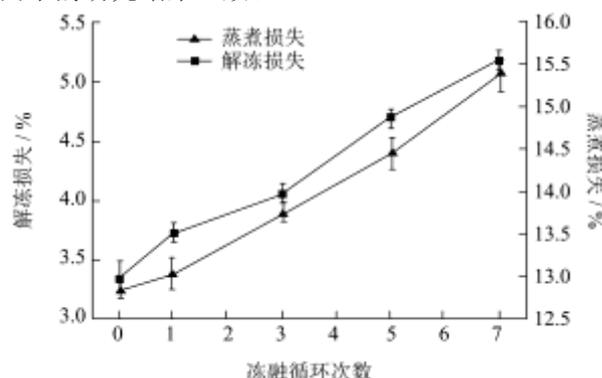


图 5 冻融循环次数对鱿鱼解冻损失及蒸煮损失的影响

Fig.5 Effect of freeze-thaw cycles on thawing loss and cooking loss of *Dosidicus gigas*

### 2.4.2 冻融循环处理对鱿鱼片色泽、嫩度及质构的影响

表 2 冻融循环次数对鱿鱼片色泽、嫩度及质构的影响

Table 2 Effect of freeze-thaw cycles on color, tenderness and texture of *Dosidicus gigas*

冻融循环次数	0	1	3	5	7
L*	78.37±1.25 <sup>a</sup>	77.69±0.50 <sup>ab</sup>	77.16±0.95 <sup>b</sup>	76.76±0.90 <sup>c</sup>	74.81±1.32 <sup>d</sup>
a*	5.88±0.49 <sup>a</sup>	2.41±0.81 <sup>b</sup>	2.36±0.88 <sup>b</sup>	2.36±0.88 <sup>b</sup>	1.75±0.83 <sup>b</sup>
b*	-2.82±0.01 <sup>c</sup>	-2.75±0.05 <sup>c</sup>	-0.67±0.02 <sup>b</sup>	0.72±0.02 <sup>a</sup>	0.79±0.04 <sup>a</sup>
W	78.35±0.51 <sup>a</sup>	77.77±0.14 <sup>a</sup>	76.26±0.55 <sup>b</sup>	76.16±0.23 <sup>bc</sup>	75.18±0.39 <sup>c</sup>
剪切力/N	13.33±0.03 <sup>b</sup>	15.92±0.12 <sup>b</sup>	14.00±0.59 <sup>b</sup>	15.38±0.93 <sup>b</sup>	18.95±0.58 <sup>a</sup>
硬度/g	781.26±11.20 <sup>a</sup>	776.29±8.90 <sup>ab</sup>	767.39±15.57 <sup>b</sup>	741.24±15.60 <sup>c</sup>	732.70±11.32 <sup>d</sup>
弹性	1.00±0.01 <sup>a</sup>	0.93±0.00 <sup>b</sup>	0.93±0.00 <sup>b</sup>	0.91±0.00 <sup>c</sup>	0.89±0.01 <sup>d</sup>
内聚性	0.80±0.01 <sup>a</sup>	0.77±0.01 <sup>b</sup>	0.73±0.02 <sup>c</sup>	0.72±0.01 <sup>cd</sup>	0.69±0.01 <sup>d</sup>
胶粘性	695.02±2.20 <sup>a</sup>	691.32±3.94 <sup>a</sup>	608.63±7.12 <sup>b</sup>	532.28±6.16 <sup>c</sup>	498.19±6.04 <sup>d</sup>
咀嚼性	644.53±7.29 <sup>a</sup>	637.57±4.77 <sup>a</sup>	556.33±3.34 <sup>b</sup>	515.47±8.16 <sup>c</sup>	464.54±3.13 <sup>d</sup>
回复性	0.47±0.00 <sup>a</sup>	0.41±0.01 <sup>c</sup>	0.43±0.01 <sup>b</sup>	0.42±0.01 <sup>bc</sup>	0.42±0.01 <sup>bc</sup>

注: a、b、c 等为显著性分析结果。

色泽、嫩度及质构是影响肉制品消费的重要因素。随着冻融次数的增加, 亮度 L\*、红度 a\* 以及白度 W 都有不同程度的下降, 而黄度 b\* 则显著增加 ( $p < 0.05$ ), 这与脂肪氧化程度成正相关。氧化形成的羰基化合物与胺、氨基酸等氨基化合物发生反应生成深色的物质。此外, 鱼类中的铁、铜等催化氧化后也可促进颜色的加深。

剪切力是反映肉类嫩度的一种直观的手段, 剪切力法能够较好的分辨肉样嫩度的差异, 剪切力越小,

肉的嫩度越好。随着冻融次数的增加, 鱿鱼的剪切力呈现增加的趋势, 这与蛋白交联聚集及汁液损失相关。并且随着冻融次数的增加, 鱿鱼片的硬度、弹性、内聚性、胶粘性、咀嚼性、回复性等都有不同程度的降低。在反复冻融过程中, 鱼体内的冰晶反复溶解、冻结, 冰晶体积增大, 对肌细胞形成机械损伤, 蛋白变性加重, 这些都会造成肌肉质构特性 (硬度、弹性、内聚性、胶粘性、咀嚼性、回复性) 下降, 降低消费者的可接受性。

## 2.5 鱿鱼片感官评价分析

肉制品的感官特性是直接衡量肉制品品质的重要标准,也决定着消费者的购买欲。但食品的感官品质如外观、色泽等在描述方面具有模糊性,应用模糊数学综合评价法可以对这些属性进行定量化和数学化。本研究中经过模糊评判矩阵的建立、模糊变换及综合评分等步骤,得到每组样品感官评价极好、较好、一般以及不合格的赞成比率。综合评价结果:

$$R1 = (0.46, 0.3, 0.12, 0.12);$$

$$R2 = (0.375, 0.46, 0.165, 0);$$

$$R3 = (0.34, 0.415, 0.245, 0);$$

$$R4 = (0.305, 0.33, 0.305, 0.06);$$

$$R5 = (0.22, 0.525, 0.23, 0.025)。$$

R1、R2、R3、R4、R5 分别表示冻融循环 0、1、3、5、7 次鱿鱼的感官评价结果。以 R1 为例,没有经过冻融处理的有 46.0% 的感官评定员认为此条件下鱿鱼片品质极好,亦即样品 1 得到极好评价的赞成比率为 46.0%, 30.0% 认为较好, 12.0% 认为一般, 12.0% 认为此鱿鱼片品质不合格。极好赞成比率最大的样品即可认定为风味质量的模糊感官评分最高,即此时的鱿鱼片品质最佳。结果表明随着冻融次数的增加,鱿鱼片品质越来越差,与前面仪器分析结果(汁液流失加重,白度下降,肌肉硬度、弹性等质构特性下降)一致。可能是因为随着冻融次数的增加,汁液损失增加,可溶性的氨基酸、小分子肽、核苷酸等物质流失,并且反复冻融循环处理导致鱿鱼片肌原纤维结构发生变化使其口感滋味变差,鱼片品质变差。

## 3 结论

本文研究冻藏过程中常见的反复冻融现象对鱿鱼肌原纤维蛋白及鱿鱼品质的影响。结果显示经过反复冻融处理,造成肌肉结构完整性破坏,促氧化成分增加,蛋白和脂肪发生氧化,并且肌肉的解冻损失、蒸煮损失及色泽、嫩度、质构等也发生不同程度劣化。蛋白质羰基含量、表面疏水性增加,总巯基含量显著下降,同时蛋白的功能性质(蛋白浊度、乳化活性、乳化稳定性)下降,影响其食用及加工利用品质,降低其商品价值。因此,应完善冷链系统,为冷冻水产品的品质提供技术保障,尽量减少冻融现象的发生,防止蛋白和脂肪发生氧化,减少鱼肉品质劣化及其带来的不必要的经济损失。

## 参考文献

- [1] 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(8): 1143-1150
- [2] Thanonkaew A, Benjakul S, Visessanguan W, et al. The effect of metal ions on lipid oxidation, colour and physicochemical properties of cuttlefish (*Sepia pharaonis*) subjected to multiple freeze-thaw cycles [J]. *Food Chemistry*, 2006, 95(4): 591-599
- [3] Sriket P, Benjakul S, Visessanguan W, et al. Comparative studies on the effect of the freeze-thawing process on the physicochemical properties and microstructures of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and white shrimp (*Penaeus vannamei*) muscle [J]. *Food Chemistry*, 2007, 104(1): 113-121
- [4] 夏秀芳,孔保华,郭园园,等.反复冷冻-解冻对猪肉品质特性和微观结构的影响[J].*中国农业科学*,2009,42(3):982-988  
Xia Xiu-fang, Kong Bao-hua, Guo Yuan-yuan, et al. Effect of freeze-thawing cycles on the quality properties and microstructure of pork muscle [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2009, 42(3): 982-988
- [5] Xiong Y L. Protein oxidation and implications for muscle food quality [M]. In *Antioxidants in Muscle Foods*; Decker E A, Faustman C L, Lopez-Bote C J, Eds.; John Wiley and Sons Inc.: New York, 2000
- [6] Xia X F, Kong B H, Liu Q, et al. Physicochemical change and protein oxidation in porcine longissimus dorsi as influenced by different freeze-thaw cycles [J]. *Meat Science*, 2009, 83(2): 239-245
- [7] Lefevre F, Fauconneau B, Thompson J W, et al. Thermal denaturation and aggregation properties of Atlantic salmon myofibrils and myosin from white and red muscles [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(12): 4761-4770
- [8] Oliver C N, Ahn B, Moerman E J, et al. Age-related changes in oxidized proteins [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1987, 262(12), 5488-5491
- [9] Benjskul S, Seymour T A, Morrissery M T, et al. Physicochemical changes in Pacific whiting muscle proteins during iced storage [J]. *Journal of Food Science*, 1997, 62: 729-733
- [10] Chelh I, Gatellier P, Santé-Lhoutellier V. Technical note: A simplified procedure for myofibril hydrophobicity determination [J]. *Meat Science*, 2006, 74(4): 681-683
- [11] Laemmler U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. *Nature*, 1970, 227: 680-684
- [12] Benjakul S, Visessanguan W, Ishizaki S, et al. Differences in gelation characteristics of natural actomyosin from two species of bigeye snapper, *Priacanthus tayenus* and *Priacanthus*

- macracanthus* [J]. Journal of Food Science, 2001, 66(9): 1311-1318
- [13] Pearce K N, Kinsella J E. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1978, 26(3): 716-723
- [14] Xia X F, Kong B H, Xiong Y L, et al. Decreased gelling and emulsifying properties of myofibrillar protein from repeatedly frozen-thawed porcine longissimus muscle are due to protein denaturation and susceptibility to aggregation [J]. Meat Science, 2010, 85(3): 481-486
- [15] Vyncke W. Evaluation of the direct thiobarbituric acid extraction method for determining oxidative rancidity in mackerel (*Scomber scombrus* L.) [J]. Fette, Seifen, Anstrich Mittel, 1975, 77(6): 239-240
- [16] Sallam K I. Chemical, sensory and shelf life evaluation of sliced salmon treated with salts of organic acids [J]. Food Chemistry, 2007, 101(2): 592-600
- [17] 胡庆兰, 余海霞, 杨水兵, 等. 基于模糊数学法评价超高压处理后鱿鱼的品质[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2013, 39(2): 133-140  
Hu Qing-lan, Yu Hai-xia, Yang Shui-bing, et al. Quality evaluation of squid processed by ultra-high pressure based on fuzzy mathematic method [J]. Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Sciences), 2013, 39(2): 133-140
- [18] Estévez M. Protein carbonyls in meat systems: A review [J]. Meat Science, 2011, 89(3): 259-279
- [19] Stadtman E R, Levine R L. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins [J]. Amino Acids, 2003, 25(3-4): 207-218
- [20] Li Y Q, Kong B H, Xia X F, et al. Structural changes of the myofibrillar proteins in common carp (*Cyprinus carpio*) muscle exposed to a hydroxyl radical-generating system [J]. Process Biochemistry, 2013, 48(5-6): 863-870
- [21] Lund M N, Heinonen M, Baron C P, et al. Protein oxidation in muscle foods: A review [J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2011, 55(1): 83-95
- [22] Morzel M, Gatellier P, Sayd T. Chemical oxidation decreases proteolytic susceptibility of skeletal muscle myofibrillar proteins [J]. Meat Science, 2006, 73(3): 536-543
- [23] Soyer A O, Zalp B, Dalm I C S, et al. Effects of freezing temperature and duration of frozen storage on lipid and protein oxidation in chicken meat [J]. Food Chemistry, 2010, 120(4): 1025-1030