DOI:10.13652/j.spjx.1003.5788.2022.81095 [文章编号] 1003-5788(2023)06-0134-09

干冰冻结对大黄鱼冻藏期间冰晶及品质的影响

Effects of dry ice freezing on ice crystal and quality of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) during frozen storage

贾世亮[1,2] 杨 月[1,2] 郑雅丹[3] 杨 鹏[3] 丁玉庭[1,2]

JIA Shi-liang[1,2] *YANG Yue*[1,2] *ZHENG Ya-dan*[3] *YANG Peng*[3] *DING Yu-ting*[1,2]

(1. 浙江工业大学食品科学与工程学院,浙江 杭州 310014;2. 浙江省深蓝渔业资源高效开发利用重点实验室,浙江 杭州 310014;3. 杭州衡美食品科技有限公司,浙江 杭州 311100)

(1. *College of Food Science and Technology, Zhejiang University of Technology, Hangzhou, Zhejiang* 310014, *China*; 2. *Key Laboratory of Marine Fishery Resources Exploitment & Utilization of Zhejiang Province, Hangzhou, Zhejiang* 310014, *China*; 3. *Hangzhou Hengmei Food Science & Technology Co., Ltd., Hangzhou, Zhejiang* 311100, *China*)

摘要:目的:考察冻结方式及冻藏温度对大黄鱼贮藏过程中品质的影响。**方法:**采用干冰冻结和-40 ℃空气冻结新鲜大黄鱼鱼片至中心温度-18 ℃,然后分别置于-40,-18 ℃冰柜贮藏。测定大黄鱼冻结后和冻藏过程中冻结曲线、冰晶形态、pH 值、挥发性盐基氮、K 值、Ca^{2+}-ATP 酶活性、总巯基、羰基、蛋白降解、质构特性等理化指标。**结果:**干冰冻结通过最大冰晶生成带的时间为 40 min,是-40 ℃空气冻结的 1/6,干冰冻结鱼肉样品初始冰晶横截面积和当量直径分别为(96.12±1.61) μm^2 和(11.06±1.43) μm,显著低于空气冻结的鱼肉样品。**结论:**冻藏温度对鱼肉肌原纤维蛋白的影响要大于冻结温度,且冻藏温度越低,鱼肉肌原纤维蛋白降解程度越低。干冰冻结后-40 ℃贮藏有利于保持大黄鱼的鲜度和品质稳定性。

关键词:干冰冻结;大黄鱼;冻藏;冰晶;品质

Abstract: Objective: The effects of freezing method and storage temperature on the quality of large yellow croaker during storage were investigated. **Methods:** Fresh large yellow croaker fillets were frozen with dry ice and air freezing (-40 ℃) to the central temperature of -18 ℃, and then stored at -40 ℃ and -18 ℃, respectively. Physical and chemical indexes such as freezing curve, ice crystal morphology, pH value, volatile base nitrogen, K value, Ca^{2+}-ATPase activity, total sulfhydryl group, carbonyl group, protein degradation and texture characteristics of large yellow croaks were determined after freezing and during freezing storage. **Results:** The time of dry ice freezing through the maximum ice crystal formation zone was 40 min, which is 1/6 of that of air freezing at -40 ℃. The initial ice crystal cross-section area and equivalent diameter of dry ice frozen fish samples were (96.12±1.61) μm^2 and (11.06±1.43) μm, respectively, which is significantly lower than that of air frozen fish samples. **Conclusion:** The effect of freezing temperature on fish myofibrillator protein was greater than that of freezing temperature, and a lower freezing temperature can result in a lower degradation degree of fish myofibrillator protein. Storage at -40 ℃ after dry ice freezing is beneficial to maintain freshness and quality stability of large yellow croaker.

Keywords: dry ice freezing; large yellow croaker; frozen storage; ice crystal; quality

大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)作为一种高价值海鱼,在中国渔业经济中占据重要的地位,除一部分鲜销外,冻藏是其最主要的加工销售途径。

冷冻作为目前最常用的食品保藏方法,可实现食品的营养、风味和感官特性长时间高保真保存[1]。但传统冻结方式,如鼓风冻结、平板接触冻结等,热传导速率低,冻结速度慢,致使水产品形成体积大、形状不规则的冰晶体,最终导致产品品质的劣变,如汁液流失和营养物质流失等。空气作为冷冻介质,具有成本低,无任何毒副作用的优点。但由于空气的导热性能差,需要的冷冻时间长,效率低。有研究[2]指出,冻结速率是影响冷冻水产品品

基金项目:"十三五"国家重点研发计划专项(编号:2019YFD0901603)

作者简介:贾世亮,男,浙江工业大学讲师,博士。

通信作者:丁玉庭(1963—),男,浙江工业大学教授,博士。E-mail: dingyt@zjut.edu.cn

收稿日期:2022-11-24 **改回日期:**2023-03-15

质的关键因素,因此,新型高效、节能、环保型速冻技术的研发成为当前的研究热点。

干冰具有释冷量大、安全无毒、成本低廉的优点,可作为食品冷冻的冷源,但目前对干冰应用于水产品冻结的研究较少。因此,研究主要对干冰冻结及空气冻结大黄鱼鱼片冻结速率、冰晶大小及冻藏期间鱼肉 pH 值、K 值、Ca^{2+}-ATP 酶活性、总巯基含量、羰基含量、肌原纤维蛋白降解、质构特性等品质指标进行评价,旨在探究干冰冻结及冻藏温度对大黄鱼冻藏过程中(0～150 d)冰晶形成及品质的影响,以期为大黄鱼的冻结新技术研发提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

1.1.1　材料与试剂

鲜活大黄鱼:平均体重(500±55.0) g,体长(35±5) cm,活鱼放入海水中置于充氧的泡沫箱中,30 min 内运回实验室进行后续处理,市售;

三氯乙酸、盐酸、氧化镁、尿素等:分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2　仪器设备

高速台式冷冻离心机:TG16W-S 型,上海卢湘仪离心机仪器公司;

医用低温保存箱:MDF-U548D-C 型,青岛海尔特种电器有限公司;

pH 计:雷磁 PHS-3E 型,上海仪电科学仪器股份有限公司;

质构仪:TA-XT plus 型,英国 Stable Micro Sytem 公司;

自动凯氏定氮仪:K9840 型,济南海能仪器股份有限公司;

紫外—可见分光光度计:UV-9000 型,上海元析仪器有限公司。

1.2　试验方法

1.2.1　样品的前处理　将鲜活大黄鱼击晕头部致死后去头、尾、刮鳞、去内脏,均匀切成两片。用流动水清洗干净后沥干并用纱布擦去表面多余水分,随机分为 4 组,每组 18 片,每 3 片鱼片置于自封袋中。进行不同的冻结处理,T1、T2 组冻结:将装好的鱼片放入－40 ℃冰箱中进行冻结;T3、T4 组冻结:将装好的鱼片放入干冰中(一层干冰一层鱼片)进行冻结。将温度计探头插入鱼片的几何中心,冻结至中心温度为－18 ℃时拔出探头,同时记录温度随时间的变化。T1、T3 组鱼片冻结结束后分别放入－18 ℃冰箱中贮藏;T2、T4 组冻结好的鱼片分别放入－40 ℃冰箱中贮藏。每个月随机取样进行指标的测定,试验周期为 5 个月。为保证整个贮藏过程的温度恒定,使用的冻藏冰箱为专用冰箱,并在研究前已对冰箱的温度稳定性进行检测,确定温度恒定,同时试验期间全程对冰箱进行上锁管理。

1.2.2　冻结曲线的测定　将温度记录仪的探头插入大黄鱼鱼片的几何中心,自动采集鱼片冻结过程中温度随时间的变化,每隔 1 min 记录一次温度数值,直至中心温度达到－18 ℃,绘制时间—温度冻结曲线。

1.2.3　冰晶组织切片观察　用提前预冷的手术刀片取冷冻的背部肌肉,切成 1 cm×1 cm×1 cm 规则的立方体,浸泡于卡诺氏固定液中,在－18 ℃固定 8 h。将固定好的样品取出用石蜡包埋,然后切成 7 μm 的薄片,苏木精—伊红染色后甲醛固定 30 min。最后用扫描电镜进行观察。冰晶的横截面积(S)和当量直径(d)以及圆度等利用 ImageJ 图像分析软件进行分析和计算。

1.2.4　TVB-N 值测定　按 GB 5009.228—2016《食品安全国家标准　食品中挥发性盐基氮的测定》执行。

1.2.5　pH 值测定　根据 Li 等[3]的方法,修改如下:称取 5 g 解冻搅碎后的鱼肉置于盛有 50 mL 蒸馏水的烧杯中,高速剪切机(5 000 r/min)均质 1 min 后静置 30 min,随后过滤出上清液,用 PHS-3E 数字 pH 计测定上清液的 pH 值。每组样品进行 3 次平行试验。

1.2.6　K 值及 ATP 关联物测定　将冻结的鱼解冻后,准确称取 1.00 g 鱼肉样品置于 10 mL 离心管中加入 2 mL 4 ℃预冷的 10% $HClO_4$ 溶液,匀浆 15 s,然后在 5 000 r/min(4 ℃)下离心 5 min,收集上清液。残渣加入 2 mL 5% $HClO_4$ 溶液,按上述方法离心 2 次,合并 3 次上清液,用 1 mol/L KOH 溶液中和至 pH 6.4 后过滤定容至 10 mL。所有的操作均在冰上进行,以防止 ATP 关联物的降解。定容后的溶液经孔径为 0.45 μm 的水系滤膜后进液相色谱分析。根据样品的峰面积和标准物质的标准曲线计算样品中 ATP 关联物的浓度。

液相色谱条件:Xbridge C_{18} 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相为 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 pH 7.0,流速 1.0 mL/min,检测波长 254 nm,柱温 28 ℃,进样量 10 μL。K 值按式(1)计算。

$$X = \frac{M_{HxR}+M_{Hx}}{M_{ATP}+M_{ADP}+M_{AMP}+M_{IMP}+M_{HxR}+M_{Hx}} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

X——K 值,%;

M_{ATP}——样品中腺苷三磷酸含量,μmol/g;

M_{ADP}——样品中腺苷二磷酸含量,μmol/g;

M_{AMP}——样品中腺苷酸含量,μmol/g;

M_{IMP}——样品中肌苷酸含量,μmol/g;

M_{HxR}——样品中次黄嘌呤核苷含量，μmol/g；

M_{Hx}——样品中次黄嘌呤含量，μmol/g。

1.2.7　肌原纤维蛋白的提取　取 2 g 解冻后的鱼肉，加入 0.05 mol/L NaCl—20 mmol/L Tris—马来酸(pH 7.0)缓冲溶液 20 mL 后匀浆，10 000 r/min(4 ℃)离心 10 min，静置 0.5 h，离心 2 次取沉淀，再加入 20 mL 预冷的 0.6 mol/L NaCl—20 mmol/L Tris—马来酸(pH 7.0)缓冲溶液，匀浆 10 s，4 ℃静置 1 h。然后重复以上离心操作，取上清液搅拌均匀，在 540 nm 处测定吸光值[4]。肌原纤维蛋白含量用双缩脲法测定，以 10 mg/mL 的牛血清蛋白作为标准溶液。

1.2.8　总巯基含量测定　根据周大鹏等[5]的方法，修改如下：将肌原纤维蛋白质量浓度调整到 4 mg/mL，准确吸取 0.5 mL 稀释后的肌原纤维蛋白溶液加到 4.5 mL 缓冲液 A(8 mol/L 尿素、3 mmol/L EDTA、1% SDS、0.2 mol/L Tris-HCl，pH 8.0)中，充分混匀，取 4 mL 混合液，加入 0.5 mL 缓冲液 B(10 mmol/L DTNB、0.2 mol/L Tris-HCl，pH 8.0)，于 40 ℃下温水水浴 25 min，412 nm 下测其吸光值。空白组用 pH 为 7.0，0.6 mol/L NaCl 代替样品，每组样品重复测定 3 次，取平均值。按式(2)计算巯基含量。

$$X=\frac{ad}{bc}, \tag{2}$$

式中：

X——巯基含量，mol/10^5 g 蛋白；

a——吸光值；

b——待测液蛋白质量浓度，mg/mL；

c——分子吸光系数，13 600 L/(mol·cm)；

d——稀释倍数，11.25。

1.2.9　羰基含量测定　根据 Thannhauser 等[6]的方法，修改如下：准确吸取 2 mg/mL 肌原纤维蛋白液 1 mL，加入 1 mL 10 mmol/L 的 DNPH 溶液，暗室反应 1 h，每隔 15 min 涡旋振荡一次。加入 1 mL 20% TCA 溶液，10 000 r/min 离心 5 min，弃去上清液；1 mL 洗涤液(乙酸乙酯和乙醇等比例混合)清洗沉淀 3 次，向沉淀中加入 3 mL 6 mol/L 盐酸胍，37 ℃水浴 15 min 后 10 000 r/min 离心 3 min，除去不溶物质。370 nm 测定上清液吸光度值。

1.2.10　Ca^{2+}-ATPase 酶活性测定　根据 Benjakul 等[7]的方法，修改如下：采用钼酸铵法测定 660 nm 下无机磷标准溶液的吸光度值，以 0.001 mol/L 的无机磷标准液作为标准物。吸取确定浓度的肌原纤维蛋白液 3.5 mL，分别加入 0.5 mL 0.1 mol/L $CaCl_2$ 溶液和 0.3 mL 0.5 mol/L 的中性 Tris-马来酸溶液，置于 25 ℃恒温水浴中，加入 0.25 mL 20 mmol/L 的 ATP 溶液，25 ℃水浴反应 10 min 后加入 15% TCA 溶液，5 000 r/min 离心 5 min，上清液备用。对照组调换 ATP 和 TCA 的添加顺序。2.5 mL 蒸馏水加 0.5 mL 上清液后混匀，加入 2 mL 硫酸亚铁—钼酸铵溶液，25 ℃静置 1 min 后在 660 nm 下测定吸光度。按式(3)计算酶活性。

$$X=\frac{m}{t}\times M, \tag{3}$$

式中：

X——酶活性，μmol Pi/(mg 蛋白·min)；

m——无机磷含量，μmol；

t——反应时间，min；

M——肌原纤维蛋白含量，mg。

1.2.11　SDS-PAGE 电泳　根据 Zhang 等[8]的方法，修改如下：SDS-PAGE 电泳采用 12%的分离胶和 4%的浓缩胶，上样前将肌原纤维蛋白质量浓度调整到 5 mg/mL，经考马斯亮蓝 R-250 染色，与预染蛋白 Marker(10～250 kDa)进行对照，脱色后观察条带变化情况。

1.2.12　质构的测定　根据邱爽[9]的方法，修改如下：用刀片将解冻好的鱼肉切成 2 cm×2 cm×3 cm 的小块，鱼块水平放置于探头底座上进行测定。使用 TA.XT Plus 分析仪进行质构特性测定，并采用全质构分析模式(TPA)。探头型号选择为 P36/R 探头，测前速度 1.0 mm/s，测试速度 1.0 mm/s，测后速度 2.0 mm/s，应变比 75%，测试力 0.05 N，时间间隔 3.0 s。每组样品平行测定 3 次后取平均值。

1.2.13　数据统计分析　试验数据采用 SPSS 20.0 软件处理，结果采用平均值±标准差形式表示。差异水平 $P<0.05$ 为显著水平，采用 Origin 2021 作图表示指标的变化规律。所有试验均做 3 次以上平行试验。

2　结果与分析

2.1　冻结曲线

如图 1 所示，干冰冻结鱼片通过最大冰晶生成带(−1～−5 ℃)的时间为 40 min，而−40 ℃空气冻结鱼片所需时间为 255 min，是干冰冻结的 6 倍多。在鱼体经过最大冰晶生成带的过程中，鱼体内大部分的自由流动水结成冰[10]，通过此区域的时间长短取决于冻结速率，结果显示干冰冻结比−40 ℃空气冻结更快通过最大冰晶生成带形成细小而均匀的冰晶，因此对鱼体肌肉组织的破坏作用更小。

2.2　冻结方式对大黄鱼冰晶的影响

在冷冻贮藏过程中冰晶的尺寸及分布会影响水产品肌肉纤维微结构的完整性，冰晶的膨胀压力会导致鱼肉组织发生不可逆的损害[11]。不同冷冻方法下肌肉的横切面显微图像如图 2 所示。与空气冻结鱼肉样品比较，干冰冻结的鱼肉样品的肌肉纤维排列整齐，冰晶细小且均

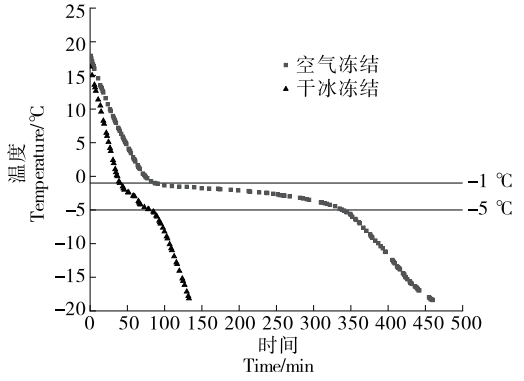

图 1　不同冻结方式下大黄鱼鱼片冻结曲线

Figure 1　Freezing curve of large yellow croaker fillets treated with different freezing methods

匀。由表 1 可知,干冰冻结鱼肉中冰晶的横截面积、当量直径均显著低于空气冻结的,而其冰晶圆度显著高于空气冻结组。从热力学角度来讲,即使温度被充分控制,但在能量方面,冰晶的分布仍然朝着有利于形成单一大晶体的方向发展。研究结果显示,随着贮藏时间的延长,4 组鱼肉样品的冰晶逐渐增大,肌肉组织的完整性被破坏,组织中白色间隙的大小和数量随着冷冻保存时间的延长而增加。有学者[12]认为微观组织中的空隙是长期冻藏过程中细胞内外的冰晶生长或冷冻损伤导致。冷冻贮藏 5 个月后,T1 组样品组织间隙最大,肌肉组织完整性受损严重,这主要是因为 T1 组冻结速率低,通过最大冰晶生成带时间过长,生成的冰晶大且不规则[13],随着贮藏过程中冰晶的生长,导致组织间隙增大。而与其他3组

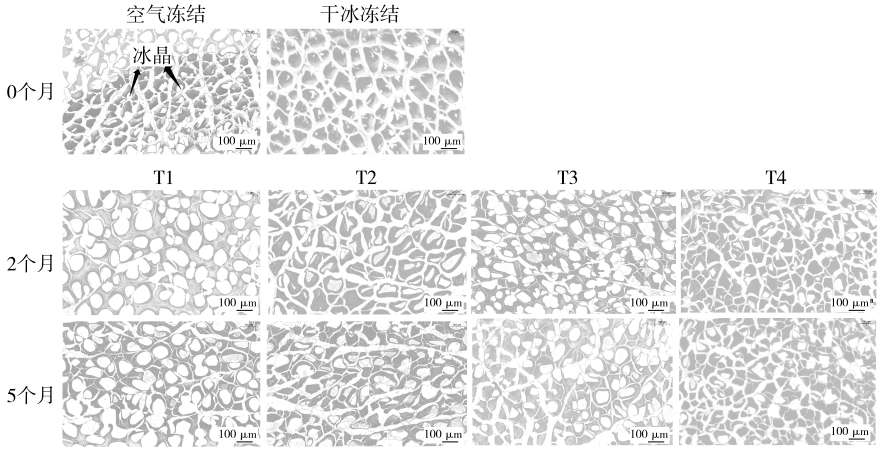

图 2　冻结方式对大黄鱼冰晶显微结构的影响

Figure 2　Effects of different freezing methods on the microstructure of ice crystals of large yellow croaker fillets (×100)

表 1　冻结方式对大黄鱼冰晶尺寸的影响†

Table 1　Effects of different freezing methods on ice crystal size of large yellow croaker fillets

冻藏时间/月	组别	横截面积 $S/\mu m^2$	当量直径 $d/\mu m$	圆度
0	空气冻结	328.36±43.2^b	20.45±7.42^b	0.69±0.05^a
	干冰冻结	96.12±1.61^a	11.06±1.43^a	0.84±0.09^b
2	T1	557.78±27.77^d	26.64±0.67^c	0.68±0.02^a
	T2	387.38±43.97^c	22.21±7.48^b	0.70±0.01^a
	T3	279.39±20.90^b	18.86±5.16^a	0.76±0.04^b
	T4	123.33±13.89^a	12.53±4.21^a	0.79±0.03^b
5	T1	643.26±69.74^c	28.61±9.42^c	0.61±0.05^a
	T2	441.39±14.59^b	23.71±4.31^b	0.66±0.04^a
	T3	430.13±40.56^b	23.40±7.19^b	0.68±0.05^a
	T4	297.92±39.08^a	19.48±7.05^a	0.75±0.02^b

† 同一列同一贮藏时间点小写字母不同代表差异显著($P<0.05$)。

比较,T4 组肌肉组织间隙相对较小。该结果表明,冻结和贮藏温度越低,冰晶越小且冰晶增长越慢,进而对肌肉组织的损伤越小。冻藏 5 个月后,4 组样品(T1、T2、T3、T4)的冰晶横截面积分别为 643.26,441.39,430.13,297.92 μm^2,当量直径为 28.61,23.71,23.40,19.48 μm,冰晶横截面积和当量直径的大小顺序为:T1>T2>T3>T4,另外,T4 组样品的冰晶圆度均显著高于其他 3 组,进一步表明干冰冻结能够使鱼肉形成细小且均匀的冰晶,虽然后期冰晶也会增长,但是与传统空气冻结比较,干冰冻结后−40 ℃贮藏能有效控制冰晶的增长进而保护鱼肉组织结构的完整性,延缓鱼肉的品质劣化。

2.3　冻结方式对大黄鱼贮藏过程中 pH 及 TVB-N 值的影响

由图 3 可知,4 组样品的 pH 值均呈先下降后上升的趋势。前期鱼肉 pH 值降低主要是因为在鱼宰杀后,鱼体内的糖原在无氧呼吸的作用下分解产生乳酸,并且肌肉中的ATP及其关联物进一步分解生成磷酸[14]。而后期

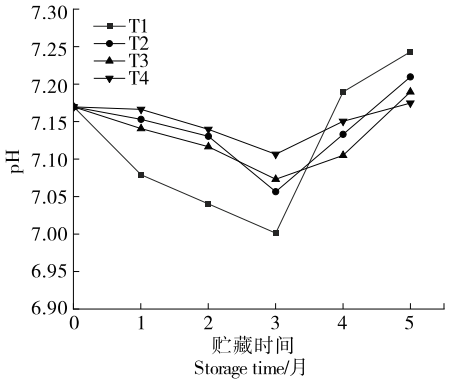

图 3　冻结方式对大黄鱼鱼片 pH 值的影响

Figure 3　Effects of different freezing methods on pH value of large yellow croaker fillets

pH 值升高，主要是由于鱼肉在内源性酶及微生物的作用下，蛋白质、氨基酸和其他含氮物质逐渐被分解成胺类物质[15]。与初始值相比，T4 组样品的 pH 值在贮藏前3 个月的下降幅度最小，随后的上升幅度也最为缓慢，贮藏 5 个月后的鱼肉 pH 值为 7.16。结果表明干冰冻结后－40 ℃贮藏有效抑制微生物生长和酶的活性，减缓鱼体生化反应，抑制鱼肉 pH 值的升高，并最终延缓鱼肉的品质劣化。

图 4 显示，新鲜样品的 TVB-N 值为 7.92 mg/100 g，各组鱼片 TVB-N 值随贮藏时间的延长而逐渐增大。冻藏过程中，T1 和 T3 组样品 TVB-N 值增加较快，T2 和 T4 组增加缓慢。从贮藏第 2 个月开始，T4 组样品的 TVB-N 值显著低于其他 3 组，可能是因为干冰冻结和低温贮藏抑制了微生物的生长繁殖，降低了内源酶的活性，从而保持了鱼肉的新鲜度。冻藏 5 个月后，4 组样品 TVB-N 值的含量排序为 T4＜T2＜T3＜T1，但值得注意的是，4 组样品 TVB-N 含量值在整个贮藏过程中均低于国家标准（GB 2733—2015）规定的冷冻鱼类含量限值（20 mg/100 g）。

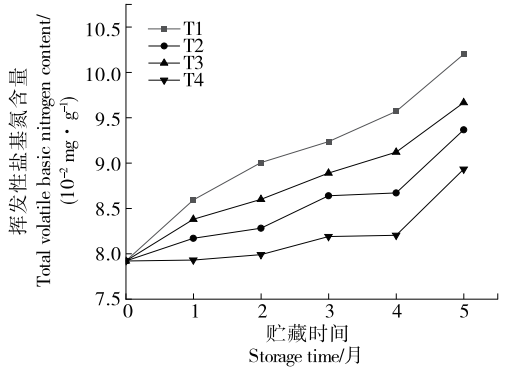

图 4　冻结方式对大黄鱼鱼片 TVB-N 值的影响

Figure 4　Effects of different freezing methods on TVB-N value of large yellow croaker fillets

2.4　冻结方式对大黄鱼贮藏过程中 K 值及 ATP 关联物的影响

不同冻结方式对大黄鱼 ATP 关联物及 K 值的影响见图 5。鱼肉冻藏过程中 ATP 降解顺序依次为：ATP→ADP→AMP→IMP→HxR→Hx。样品的 ATP、IMP、HxR 和 Hx 的初始含量分别为 0.68，4.76，0.44，0.34 μmol/g。在贮藏过程中，鱼肉 ATP 的含量呈下降趋势，IMP 的含量呈先上升后下降的趋势，而 HxR 和 Hx 的含量逐渐上升。结果显示，在贮藏过程中 T1、T2 和 T3 组样品 ATP 含量下降趋势基本一致。T4 组样品的 ATP 含量始终高于其他 3 组，且整个贮藏过程中下降幅度最小。贮藏 5 个月后 T1、T2、T3 组样品的 ATP 含量下降至 0.1 μmol/g 左右，而 T4 组样品的 ATP 含量下降至 0.3 μmol/g，出现该结果的原因可能是干冰冻结后－40 ℃低温贮藏抑制了鱼体内 ATP 代谢相关酶类的活性，进而抑制 ATP 的降解。

随着贮藏时间的延长，IMP 降解成有苦味的 HxR 和 Hx，导致鱼的品质下降，风味变差。在贮藏过程中，4 组样品 IMP 含量均呈先升高后下降的规律，贮藏 5 个月后，T4 组 IMP 含量为 6.76 μmol/g，显著高于其他 3 组。有研究[16]指出 IMP 的降解可能与酸性磷酸酶活性有关，但具体作用机制仍需进一步探索。HxR 和 Hx 的产生同样与微生物、内源酶密切相关，微生物和内源酶能加速 HxR 向 Hx 的转化[17]，从而影响鱼肉的口感和新鲜度，导致鱼肉品质劣变。HxR 的初始含量为 0.44 μmol/g，T1 组在贮藏 5 个月后升高至 1.58 μmol/g，显著高于其他 3 组。鱼肉 Hx 初始值为 0.34 μmol/g，随贮藏时间的延长，4 组样品 Hx 含量逐渐升高，5 个月后 T1、T2、T3 和 T4 组样品 Hx 含量分别为 0.80，0.67，0.72，0.55 μmol/g，T2 和 T4 组样品的 Hx 含量保持在较低水平，显著低于其他组，该结果表明相较于冻结温度，贮藏温度更能影响鱼肉 Hx 的生成，且贮藏温度越低，越有利于抑制 Hx 的累积。

鱼类 K 值在 20％以下，为一级鲜度；在 20％～60％时，为二级鲜度[18]。如图 5(e)所示，大黄鱼的初始 K 值为 7.62％，贮藏 5 个月后，4 组样品的 K 值分别达到 14.01％，11.42％，12.00％，10.94％。4 组样品在贮藏结束时的 K 值均小于 20％，仍属于一级鲜度，其中 T4 组样品 K 值明显低于其他 3 组，T2、T3 组 K 值差异不显著。结果表明干冰冻结后贮藏于－40 ℃能更有效减缓大黄鱼 K 值增长，发挥较好的保鲜作用。

2.5　冻结方式对大黄鱼贮藏过程中蛋白氧化的影响

2.5.1　总巯基含量　由图 6 可知，不同冻结方式下大黄鱼鱼肉总巯基含量均呈下降趋势。研究[7]表明，鱼肉冻藏过程中会发生蛋白质聚集，蛋白质的聚集物掩蔽巯基基团会导致巯基含量降低，蛋白质空间结构发生变化等。巯基在稳定蛋白质空间结构、维持蛋白质理化和功能特

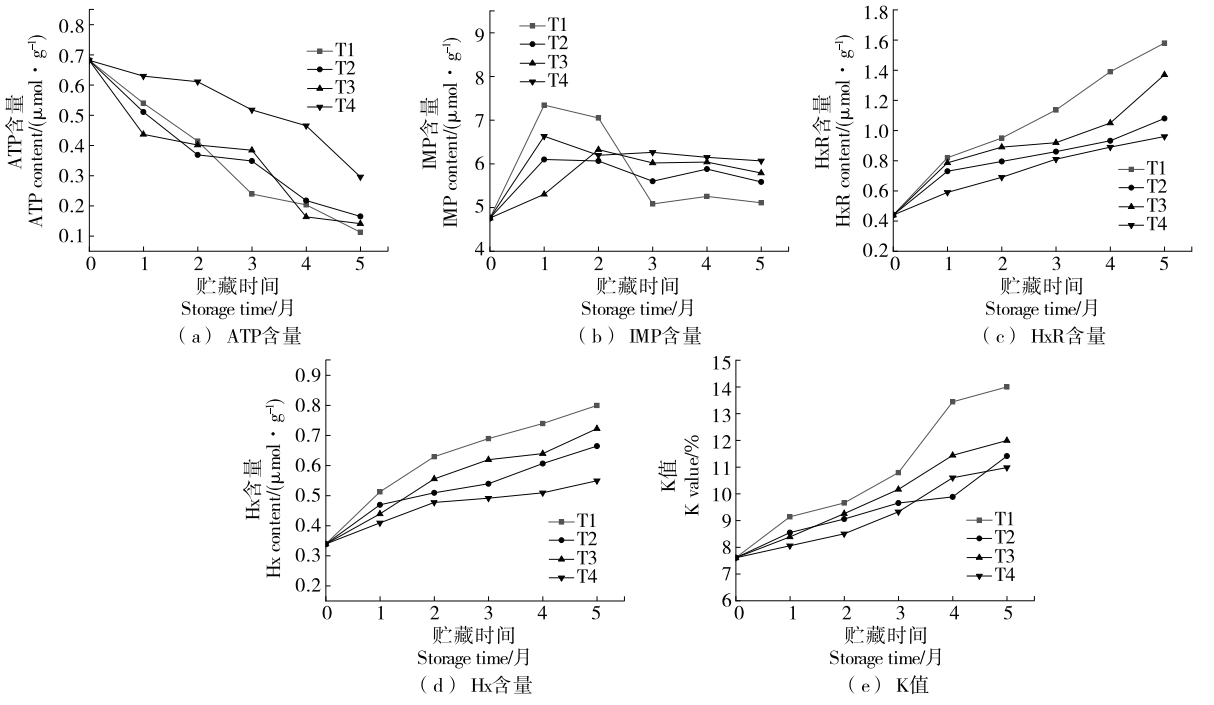

图 5　冻结方式对大黄鱼 ATP 关联物及 K 值的影响

Figure 5　Effects of different freezing methods on ATP-related compounds and K value of large yellow croaker fillets

性方面发挥着重要作用,巯基作为蛋白质基团中最活跃的官能团之一,其反应活性很强,很容易被氧化成二硫键,导致巯基基团含量降低[19]。新鲜大黄鱼的总巯基含量为 3.71 mol/10^5 g 蛋白,随贮藏时间的延长,4 组鱼肉总巯基含量呈下降趋势,贮藏 5 个月后 4 组(T1、T2、T3、T4)样品的总巯基含量分别下降至 2.16,2.29,2.07,3.37 mol/10^5 g 蛋白。T4 组样品的总巯基含量与新鲜值对比无明显变化,且显著高于其他 3 组。研究结果表明,干冰冻结可以抑制鱼肉蛋白质巯基的氧化,有利于维持蛋白质的稳定性,减缓鱼肉蛋白的氧化变性。

2.5.2　羰基含量　如图 7 所示,随冻藏时间的延长,羰基含量逐渐升高。这主要随着低温贮藏时间的延长,鱼类肌原纤维蛋白的一些氨基酸残基(如赖氨酸、脯氨酸等)容易受到活性氧(ROS)的攻击,氧化后形成羰基[3];还有研究[20]认为,蛋白质在氧化过程中一些氨基酸侧链转化成肽链骨架发生了断裂,造成羰基含量上升。随着贮藏时间的延长,4 种处理(T1、T2、T3、T4)的鱼肉样品羰基含量从初始的 0.81 nmol/mg 蛋白分别增长至 1.77,1.92,1.73,1.54 nmol/mg 蛋白。在贮藏前两个月 4 组样品的羰基含量增长相对缓慢,后3个月增长迅速,该结果与巯

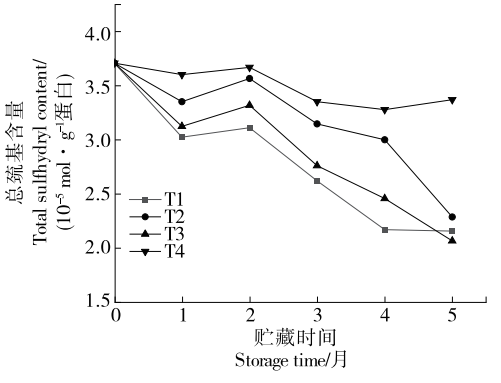

图 6　冻结方式对大黄鱼肌原纤维蛋白总巯基含量的影响

Figure 6　Effects of different freezing methods on total sulfhydryl content myofibrillar protein of large yellow croaker fillets

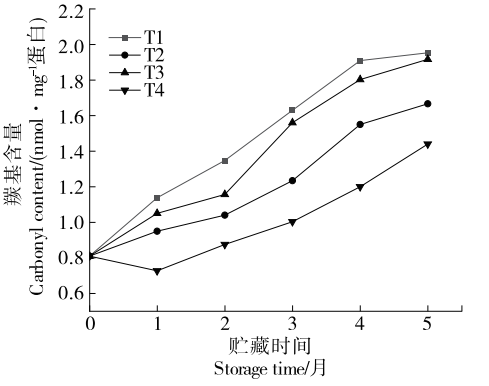

图 7　冻结方式对大黄鱼肌原纤维蛋白羰基含量的影响

Figure 7　Effects of different freezing methods on total carbonyl content myofibrillar protein of large yellow croaker fillets

基的结果一致。贮藏 5 个月后 T1 和 T3 组样品的羰基含量水平相当，T4 组样品的羰基含量保持最低，可能是因为干冰冻结速率高，肌肉蛋白的超微结构被破坏程度小，自由基释放缓慢，延缓了蛋白质侧链的氧化[21]。结果表明，不同冻结方式下的鱼肉在冻藏期均发生了蛋白质的氧化，但干冰冻结能有效抑制鱼肉的蛋白氧化。

2.5.3　Ca^{2+}-ATPase 酶活性　由图 8 可知，不同冻结方式的大黄鱼肌原纤维蛋白的 Ca^{2+}-ATPase 酶活性随冻藏时间的延长而降低。新鲜样品的 Ca^{2+}-ATPase 酶活性为 0.34 μmol·Pi/(mg 蛋白·min)，冻藏 5 个月后 4 组(T1、T2、T3、T4)样品的 Ca^{2+}-ATPase 酶活性分别降低 0.18，0.22，0.21，0.27 μmol Pi/(mg 蛋白·min)，说明即使在低温冻藏条件下，鱼肉肌原纤维蛋白的氧化仍在进行。在冻藏过程中，T4 组样品的 Ca^{2+}-ATPase 酶活性在 4 组样品中保持最高；T2 和 T4 组的 Ca^{2+}-ATPase 酶活性始终高于 T1 和 T3 组。结果表明在相同的冻结温度处理下，鱼肉的冻藏温度越低，越有利于抑制 Ca^{2+}-ATPase 酶活性的降低，降低蛋白质氧化程度，保护肌球蛋白头部结构的完整性。

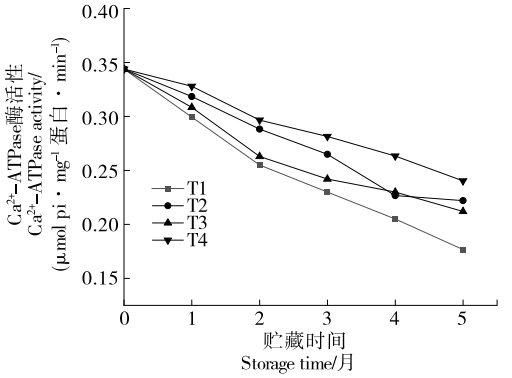

图 8　冻结方式对大黄鱼肌原纤维蛋白 Ca^{2+}-ATPase 酶活性的影响

Figure 8　Effects of different freezing methods on Ca^{2+}-ATPase activity of myofibrillar protein of large yellow croaker fillets

2.6　冻结方式对大黄鱼贮藏过程中蛋白质降解的影响

如图 9 所示，与新鲜样品比较，4 组样品冻藏 2 个月后鱼肉肌原纤维蛋白变化不明显，4 组样品之间也无明显的差异。贮藏 5 个月时，与 T2 和 T4 组比较，T1 和 T3 组鱼肉样品的肌球蛋白重链(MHC)和肌动蛋白(Actin)发生明显的降解，其中肌球蛋白重链条带明显变窄；且 15～25 kDa 的小分子的蛋白条带颜色变浅，说明蛋白轻链也发生部分降解，而原肌球蛋白(TM)在 4 组中未发生明显变化。该结果表明冻藏温度对鱼肉肌原纤维蛋白的影响要大于冻结温度，且冻藏温度越低，鱼肉肌原纤维蛋白降解程度越低。

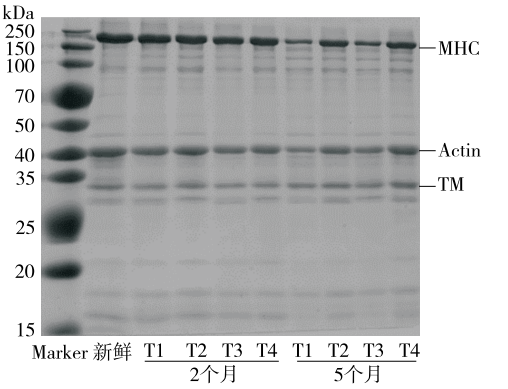

图 9　冻结方式对大黄鱼贮藏过程中蛋白质降解的影响

Figure 9　Effects of different freezing methods on degradation of protein of large yellow croaker fillets during storage

2.7　冻结方式对大黄鱼贮藏过程中质构特性的影响

如表 2 所示，冻结方式对大黄鱼鱼片的硬度、弹性和咀嚼性有显著影响($P<0.05$)，同时，不同冻藏温度下贮

表 2　冻结方式对大黄鱼鱼片质构的影响†

Table 2　Effects of different freezing methods on texture of large yellow croaker fillets

冻藏时间/月	组别	质构		
		硬度/N	弹性	咀嚼性
0	新鲜样品	35.43 ± 1.67^{a}	0.58 ± 0.07^{a}	515 ± 24^{a}
1	T1	24.77 ± 1.87^{b}	0.37 ± 0.02^{b}	410 ± 11^{b}
	T2	22.35 ± 2.75^{b}	0.45 ± 0.08^{b}	430 ± 18^{b}
	T3	22.86 ± 1.85^{b}	0.43 ± 0.02^{b}	396 ± 16^{b}
	T4	23.32 ± 2.74^{b}	0.44 ± 0.03^{bc}	475 ± 41^{a}
2	T1	21.62 ± 1.32^{b}	0.38 ± 0.03^{b}	286 ± 9^{d}
	T2	21.35 ± 1.78^{b}	0.37 ± 0.03^{b}	399 ± 42^{bc}
	T3	19.41 ± 0.93^{b}	0.34 ± 0.06^{b}	349 ± 73^{cd}
	T4	21.42 ± 2.05^{b}	0.41 ± 0.01^{b}	440 ± 52^{ab}
3	T1	19.52 ± 1.24^{b}	0.38 ± 0.06^{b}	264 ± 43^{b}
	T2	20.56 ± 0.95^{b}	0.35 ± 0.08^{b}	350 ± 16^{b}
	T3	18.65 ± 3.69^{b}	0.34 ± 0.04^{b}	332 ± 23^{b}
	T4	20.14 ± 1.27^{b}	0.38 ± 0.05^{b}	373 ± 118^{b}
4	T1	16.08 ± 1.96^{d}	0.26 ± 0.03^{b}	196 ± 78^{c}
	T2	18.12 ± 3.62^{c}	0.29 ± 0.08^{b}	308 ± 16^{b}
	T3	14.75 ± 3.58^{cd}	0.24 ± 0.02^{b}	262 ± 11^{bc}
	T4	19.44 ± 1.86^{b}	0.33 ± 0.05^{c}	318 ± 93^{b}
5	T1	11.81 ± 1.28^{d}	0.21 ± 0.01^{c}	155 ± 66^{c}
	T2	15.39 ± 1.38^{c}	0.25 ± 0.05^{bc}	253 ± 57^{bc}
	T3	12.53 ± 1.88^{cd}	0.21 ± 0.02^{c}	220 ± 11^{bc}
	T4	18.55 ± 1.79^{b}	0.29 ± 0.03^{b}	304 ± 90^{b}

†　同一列小写字母不同表示差异显著($P<0.05$)。

藏的鱼肉样品间也存在差异。新鲜样品的硬度、弹性和咀嚼性分别为 35.43 N、0.575 和 515,随着贮藏时间的延长,样品的硬度、弹性和咀嚼性均有所下降。鱼肉硬度的降低与冻藏过程中肌纤维的变形和蛋白质的凝聚变性有关,当蛋白凝聚变性后,肌肉蛋白丝会从 M 线和 Z 线上脱离造成肌肉硬度下降[22]。贮藏 5 个月后,T1、T2、T3 和 T4 组样品硬度分别下降了 66.67%,56.56%,64.63%,47.64%,T4 组样品的硬度值显著高于其他 3 组,说明干冰冻结后-40 ℃贮藏可以明显延缓鱼肉的硬性下降,这可能与干冰冻结后-40 ℃贮藏对鱼肉蛋白氧化及降解的抑制有关。弹性主要反映了样品在受到外力作用后变形程度及去力后的回复程度[23],冻藏期间肌肉蛋白质发生降解会导致弹性的下降。研究结果显示,T4 组的弹性变化最为缓慢,可能是因为肌肉蛋白质降解程度较低。咀嚼性主要与胶原蛋白含量有关,同时硬度和弹性也和咀嚼性紧密相关,若鱼肉的硬度和弹性越好,则咀嚼性越好[3]。贮藏 5 个月后,4 组样品的咀嚼性分别下降了 69.90%(T1),50.87%(T2),57.28%(T3),40.97%(T4)。结果表明,冻结温度越低,样品整体的质构特性越好。鱼肉质构特性的劣变还与肌肉失水、肌肉组织破坏等多种因素有关[24]。有研究[19]认为,鱼肉质构变化和冻藏过程中的蛋白质变化有关,蛋白质的结构变化会导致蛋白质水合能力下降和肌肉结构的破坏,最终导致鱼肉硬度降低和质地变软。

3　结论

研究主要探讨了冻结方式(干冰冻结与空气冻结)和贮存温度(-18,-40 ℃)对大黄鱼鱼片品质的影响。结果表明,干冰冻结的大黄鱼鱼片通过最大冰晶生成带的时间为 40 min,显著少于-40 ℃空气冻结处理的样品,可以有效控制鱼体冰晶的大小,使鱼体内形成细小且均匀的冰晶。同时,干冰冻结后-40 ℃贮藏可以有效抑制鱼肉蛋白的氧化与降解,使鱼肉保持更高的鲜度。SDS-PAGE 结果显示,冻藏温度对鱼肉肌原纤维蛋白的影响要大于冻结温度,且冻藏温度越低,鱼肉肌原纤维蛋白降解程度越低。值得注意的是,由于鱼体大小具有一定差异性,导致不同厚度鱼片的冻结时间也有所不同,因此在后续研究中也要继续开展不同冻结方式对不同厚度鱼片品质影响的相关研究。综上,干冰冻结后-40 ℃贮藏有利于保持大黄鱼的鲜度和品质稳定性,可以应用于未来大黄鱼鱼片的冷冻贮藏。

参考文献

[1] 袁海洲, 柯志刚, 徐霞, 等. 空间效应对超声辅助浸渍冻结鱼肉冻藏品质的影响[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(16): 24-33.
YUANH Z, KE Z G, XU X, et al. Effect of ultrasound-assisted immersion freezing at different spatial position on the quality of fish during frozen storage[J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(16): 24-33.

[2] 贾世亮, 丁娇娇, 杨月, 等. 水产品速冻保鲜技术研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(11): 324-331.
JIA S L, DING J J, YANG Y, et al. Research advances in quick-freezing preservation technologies of aquatic products[J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(11): 324-331.

[3] LI F F, ZHONG Q, KONG B H, et al. Deterioration in quality of quick-frozen pork patties induced by changes in protein structure and lipid and protein oxidation during frozen storage[J]. Food Research International, 2020, 133: 109142.

[4] 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.

[5] 周大鹏, 蓝蔚青, 莫雅娴, 等. 超声前处理对冷藏海鲈鱼品质及蛋白质特性的影响[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(17): 204-211.
ZHOU D P, LAN W Q, MO Y X, et al. Effects of ultrasound pretreatment on the quality and protein characteristics in Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicas*) during refrigeration[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(17): 204-211.

[6] THANNHAUSER T W, KONISHI Y, SCHERAGA H A. Analysis for disulfide bonds in peptides and proteins[M]// Methods in Enzymology. New York: Academic Press, 1987: 115-119.

[7] BENJAKUL S, VISESSANGUAN W, THONGKAEW C, et al. Comparative study on physicochemical changes of muscle proteins from some tropical fish during frozen storage[J]. Food Research International, 2003, 36(8): 787-795.

[8] ZHANG R, YOO M J Y, FAROUK M M. Oxidative stability, proteolysis, and in vitro digestibility of fresh and long-term frozen stored in-bag dry-aged lean beef[J]. Food Chemistry, 2021, 344: 128601.

[9] 邱爽. 超声波辅助冷冻对美国红鱼贮藏品质及蛋白质氧化变性的影响[D]. 锦州: 渤海大学, 2020: 27-28.
QIU S. Effect of ultrasound-assisted freezing on the storage quality and the protein oxidation and denaturation of sciaenops ocellatus [D]. Jinzhou: Bohai University, 2020: 27-28.

[10] 胡馨月, 张维, 赵行, 等. 不同冻结方式对沙光鱼品质的影响[J]. 食品工业科技, 2021, 42(9): 313-319.
HU X Y, ZHANG W, ZHAO H, et al. Effects of different freezing methods on the quality of *Synechogobius hasta*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(9): 313-319.

[11] PEÑA R M, BARCIELA J, HERRERO C, et al. Comparison of ultrasound-assisted extraction and direct immersion solid-phase microextraction methods for the analysis of monoterpenoids in wine[J]. Talanta, 2005, 67(1): 129-135.

[12] AURSAND I G, VELIYULIN E, BOCKER U, et al. Water and salt distribution in atlantic salmon (*Salmo salar*) studied by low-field ^{1}H NMR, ^{1}H and ^{23}Na MRI and light microscopy: Effects of raw

material quality and brine salting[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(1): 46-54.

[13] LIU S L, ZENG X H, ZHANG Z Y, et al. Effects of immersion freezing on ice crystal formation and the protein properties of snakehead (*Channa argus*) [J]. Foods, 2020, 9(4): 411.

[14] SHI L, XIONG G, YIN T, et al. Effects of ultra-high pressure treatment on the protein denaturation and water properties of red swamp crayfish (*Procambarus clarkia*) [J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 133: 110124.

[15] JIANG Q, OKAZAKI E, ZHENG J, et al. Structure of northern snakehead (*Channa argus*) meat: Effects of freezing method and frozen storage[J]. International Journal of Food Properties, 2018, 21(1): 1 166-1 179.

[16] LI D, QIN N, ZHANG L, et al. Degradation of adenosine triphosphate, water loss and textural changes in frozen common carp (*Cyprinus carpio*) fillets during storage at different temperatures[J]. International Journal of Refrigeration, 2019, 98: 294-301.

[17] VILAS C, ALONSO A A, HERRERA J R, et al. A mathematical model to predict early quality attributes in hake during storage at low temperature[J]. Journal of Food Engineering, 2018, 222: 11-19.

[18] 张艳霞. 养殖大黄鱼品质评价及冻藏过程中品质变化规律的研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2020: 33-34.
ZHANG Y X. Quality evaluation of cultured *Pseudosciaena crocea* and its quality changes during frozen storage [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2020: 33-34.

[19] PAN S K, WU S J. Effect of *Chitooligosaccharides* on the denaturation of weever myofibrillar protein during frozen storage [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2014, 65: 549-552.

[20] NGUYEN A T, DONALDSON R P. Metal-catalyzed oxidation induces carbonylation of peroxisomal proteins and loss of enzymatic activities[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2005, 439(1): 25-31.

[21] 丘静, 秦德丽, 刘纯友, 等. 低温贮藏过程中水牛肉蛋白质的变化[J]. 食品与机械, 2022, 38(2): 137-142.
QIU J, QIN D L, LIU C Y, et al. Protein changes of buffalo meat during low temperature storage[J]. Food & Machinery, 2022, 38 (2): 137-142.

[22] 张志广. 冷冻对养殖大黄鱼品质影响的研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2010: 28-29.
ZHANG Z G. Study on quality changes of cultured large yellow croaker subjected to different freezing methods [D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2010: 28-29.

[23] 鲁珺. 液氮深冷速冻对带鱼和银鲳品质及其肌肉组织的影响[D]. 杭州: 浙江大学, 2015: 33-36.
LU J. Effect of cryogenic freezing by liquid nitrogen on the quality and microstructure of hairtail and silver pomfret [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2015: 33-36.

[24] BADII F, HOWELL N K. Changes in the texture and structure of cod and haddock fillets during frozen storage [J]. Food Hydrocolloids, 2002, 16(4): 313-319.

(上接第 127 页)

[34] 马晓艳, 王娟, 张海红, 等. 低温等离子体处理对采后黄花菜活性氧代谢和品质的影响[J]. 食品科学, 2021, 42(23): 254-260.
MA X Y, WANG J, ZHANG H H, et al. Effect of low-temperature plasma treatment on reactive oxygen species metabolism and quality of postharvest day lilies[J]. Food Science, 2021, 42(23): 254-260.

[35] DONG T, CAO Y, LI G, et al. A novel aspartic protease inhibitor inhibits the enzymatic browning of potatoes [J]. Postharvest Biology and Technology, 2021, 172: 111353.

[36] 史蔓蔓, 张文, 刘飞翔, 等. 竹笋采后生理生化变化及贮藏保鲜研究进展[J]. 食品科学, 2023, 44(7): 1-20.
SHI M M, ZHANG W, LIU F X, et al. Progress on physiological and biochemical changes and storage and preservation of bamboo shoots after harvest[J]. Food Science, 2023, 44(7): 1-20.

[37] 刘瑶, 郑秋丽, 左进华, 等. 茉莉酸甲酯结合低温预贮对尖椒采后品质及生理特性的影响[J]. 食品科学, 2020, 41(3): 178-184.
LIU Y, ZHENG Q L, ZUO J H, et al. Effects of methyl jasmonate combined with low temperature pre storage on post harvest quality and physiological characteristics of pepper[J]. Food Science, 2020, 41(3): 178-184.

(上接第 133 页)

[22] AMANDA E, CHOO W S. Effect of refrigerated storage on the physicochemical characteristics and viability of *Lactobacillus plantarum* in fermented watermelon juice with or without supplementation with inulin or fructooligosaccharide[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2018, 42(12): e13831.

[23] OLIVEIRA P M D, JUNIOR B R D C L, MARTINS E M F, et al. Mango and carrot mixed juice: A new matrix for the vehicle of probiotic lactobacilli[J]. Journal of Food Science and Technology, 2021, 58(1): 98-109.

[24] 马晓艳, 王娟, 张海红, 等. 低温等离子体处理对采后黄花菜活性氧代谢和品质的影响[J]. 食品科学, 2021, 42(23): 254-260.
MA X Y, WANG J, ZHANG H H, et al. Effect of cold plasma treatment on reactive oxygen species metabolism and quality of postharvest daylily[J]. Food Science, 2021, 42(23): 254-260.

[25] ZHENG X, YU Y S, XIAO G S, et al. Comparing product stability of probiotic beverages using litchi juice treated by high hydrostatic pressure and heat as substrates[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2014, 23: 61-67.