

李晓贞, 陈旭, 杨傅佳, 等. 白鲢鱼鳞抗冻多肽的制备及对冻融鱼糜凝胶特性的改善作用 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(1): 242–252.
doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022040039

LI Xiaozhen, CHEN Xu, YANG Fujia, et al. Preparation of Silver Carp Scale Antifreeze Peptides and Its Improvement Effect on Gel Properties of Frozen-thawed Surimi[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(1): 242–252. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022040039

· 工艺技术 ·

白鲢鱼鳞抗冻多肽的制备及对冻融鱼糜凝胶特性的改善作用

李晓贞^{1,2,3}, 陈旭¹, 杨傅佳¹, 黄丹^{3,4}, 黄建联^{3,4}, 刘永乐⁵, 汪少芸^{1,2,*}

(1.福州大学生物科学与工程学院, 福建福州 350108;

2.福州海洋研究院食品研发中心, 福建福州 350108;

3.福建省冷冻调理水产品加工重点实验室, 福建厦门 361022;

4.安井食品集团股份有限公司, 福建厦门 361022;

5.长沙理工大学食品与生物工程学院, 湖南长沙 410114)

摘要:本研究以白鲢鱼鳞为原料, 通过生物酶解制备白鲢鱼鳞抗冻多肽 (ScAFPs)。以嗜热链球菌冻融存活率为主要指标, 以水解度为辅助指标, 通过单因素实验及响应面试验优化, 得到 ScAFPs 最佳酶解制备工艺; 同时进行 ScAFPs 的基本性质及其对鱼糜凝胶稳定性影响的研究。结果表明, 选用的酶制剂为胰蛋白酶、底物浓度 5.0%、酶底比 3.8%、酶解温度 37 °C、酶解时间 3.5 h, 此条件下制备的 ScAFPs 对嗜热链球菌冷冻存活率为 82.19%±1.03%, 水解度为 7.54%±0.43%。ScAFPs 相对分子量主要集中于 180~3000 Da 之间, 等电点在 4.2 左右, 且具有极强的亲水性和较好的热稳定性, 能有效降低体系冰晶含量。ScAFPs 对冻融鱼糜的凝胶特性的影响结果表明, 经过 5 次冻融循环后, ScAFPs 处理组鱼糜凝胶白度、硬度、咀嚼性、凝胶强度等指标下降幅度均显著 ($P<0.05$) 低于未添加低温保护剂的鱼糜组, 且当 ScAFPs 添加量超过 2% 时, ScAFPs 对鱼糜的冻融保护效果优于商业抗冻剂 (4% 蔗糖与 4% 山梨醇混合物)。本研究为利用白鲢鱼鳞加工副产物开发新型低温保护剂并探索在冷冻鱼糜及凝胶制品的应用奠定理论基础。

关键词: 白鲢鱼鳞, 抗冻多肽, 鱼糜, 冻融循环, 凝胶特性

中图分类号: S985.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2023)01-0242-11

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022040039



本文网刊:

Preparation of Silver Carp Scale Antifreeze Peptides and Its Improvement Effect on Gel Properties of Frozen-thawed Surimi

LI Xiaozhen^{1,2,3}, CHEN Xu¹, YANG Fujia¹, HUANG Dan^{3,4}, HUANG Jianlian^{3,4},

LIU Yongle⁵, WANG Shaoyun^{1,2,*}

(1.College of Biological Science and Engineering, Fuzhou University, Fuzhou 350108, China;

2.Food R & D Center of Fuzhou Ocean Research Institute, Fuzhou 350108, China;

3.Fujian Provincial Key Laboratory of Frozen Processed Aquatic Products, Xiamen 361022, China;

4.Anjing Food Group Co., Ltd., Xiamen 361022, China;

5.School of Food and Biological Engineering, Changsha University of Science and Technology, Changsha 410114, China)

Abstract: In this study, silver carp scale antifreeze peptides (ScAFPs) were prepared by enzymatic hydrolysis. Taking the freeze-thawing survival rate of *Streptococcus thermophilus* as the main index and the degree of hydrolysis as the auxiliary index, the optimal enzymolysis preparation process of ScAFPs was obtained through single factor and response surface optimization. At the same time, the basic properties of ScAFPs and their influence on the gel stability of surimi were

收稿日期: 2022-04-07

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (U1905202, 32201965); 福州海洋研究院科技项目 (2021F03)。

作者简介: 李晓贞 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: 1012120590@qq.com。

* 通信作者: 汪少芸 (1970-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物化学, E-mail: shywang@fzu.edu.cn。

studied. The results showed that the selected enzyme preparation was trypsin, substrate concentration of 5.0%, enzyme dosage of 3.8%, enzymolysis temperature of 37 °C, enzymolysis time of 3.5 h. Under these conditions, the frozen survival rate of ScAFPs against *Streptococcus thermophilus* was 82.19%±1.03% and the degree of hydrolysis was 7.54%±0.43%. The relative molecular weight of ScAFPs was mainly in the range of 180~3000 Da, and its isoelectric point was around 4.2. Moreover, ScAFPs had strong hydrophilicity and good thermal stability, which could effectively reduce the ice crystal content in the system. The effect of ScAFPs on gel properties of freezing-thawing surimi showed that after five freezing-thawing cycles, the decrease of gel whiteness, hardness, chewiness and gel strength of surimi treated by ScAFPs was significantly ($P<0.05$) lower than that of surimi without cryoprotectant. When the addition of ScAFPs exceeded 2%, the freeze-thaw protection effect of ScAFPs on surimi was better than that of commercial antifreeze agents (4% sucrose and 4% sorbitol mixture). This study lays a theoretical foundation for the high-value utilization of silver carp scales and the application of ScAFPs as a new type of cryoprotectant in frozen surimi and its gel products.

Key words: silver carp scales; antifreeze peptides; surimi; freeze-thaw cycles; gel properties

冷冻贮藏技术被广泛用于鱼糜制品的长期储存^[1-2],但在实际生产中,冷冻设备不稳定、运输步骤多等因素可能导致鱼糜在运输和储存过程中出现反复冻融现象^[3],该现象会加速鱼糜品质劣变,严重破坏鱼糜制品风味、质地和功能特性^[1]。添加低温保护剂可最大限度降低鱼糜冻藏品质的劣变,食品行业中的低温保护剂主要包括蔗糖、山梨醇、磷酸盐等^[4],其中,4%蔗糖和4%山梨醇的组合被称为商业抗冻剂(SUSO),因其价格低廉、抗冻效果好,成为冷冻鱼糜中最常用的抗冻剂^[5],但过量摄入添加了商业抗冻剂的冷冻鱼糜会使消费者间接摄入过量糖分,给消费者的健康带来隐患^[4,6],因此,需寻找可替代商业抗冻剂的低温保护剂。

研究表明,鱼糜冻藏品质劣变的根本原因是冻藏过程中冰晶导致鱼糜蛋白质的冷冻变性^[1,7],因此,抑制鱼糜冷冻过程中的冰晶生长和重结晶,是提升鱼糜及鱼糜制品加工与贮藏品质的关键。抗冻多肽在抑制冰晶生长和重结晶方面具有良好效果^[8-10],且安全、营养价值高,有望成为鱼糜及鱼糜制品冷冻加工与贮藏更为理想的新型冷冻保护剂。抗冻多肽多以食用胶原蛋白、明胶^[11]或动物皮^[10,12-14]、鱼鳞^[15]、动物肌腱等加工副产物通过生物酶解技术获取具有特异性的高活性多肽片段。白鲢鱼作为四大家鱼之一,也是养殖产量最高的淡水鱼之一,2020年全国白鲢鱼养殖产量为381.03万吨,占全国淡水养殖产量12.6%^[16]。在其精加工过程中,会产生大量的鱼鳞废弃物,约占鱼体总重2%~5%^[17],造成严重的资源浪费与环境污染,而白鲢鱼鳞自身富含50%~80%优质蛋白质^[18],正是制备抗冻多肽良好的来源。因此,本研究利用生物酶解技术制备白鲢鱼鳞抗冻多肽(ScAFPs),通过单因素、响应面优化试验研究其最佳制备工艺,表征ScAFPs基本性质并将其应用于冻融鱼糜的低温保护中,探究ScAFPs对冻融鱼糜凝胶特性的影响,为ScAFPs作为低温保护剂应用于鱼糜及鱼糜制品冷冻贮藏奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

白鲢鱼鳞 安井食品集团股份有限公司提供;

体重约1.5 kg左右新鲜草鱼 购自福建永辉超市;嗜热链球菌 上海交通大学农业与生物学院提供;复合风味蛋白酶(20 U/mg) 广州市华琪生物技术有限公司;木瓜蛋白酶(2000 U/mg) 北京博奥拓达科技有限公司;胰蛋白酶(250 U/mg) 上海源叶生物科技有限公司;中性蛋白酶(100 U/mg) 诺维信(中国)生物技术有限公司;碱性蛋白酶(200 U/mg) 大连美仑生物技术有限公司;其余试剂均为国产分析纯。

LDZF-50L 立式压力蒸汽灭菌器 上海申安医疗器械厂;YC-S30 水浴恒温振荡摇床、SY-550B 全温型恒温培养摇床 天津市泰斯特仪器有限公司;752 紫外可见分光光度计 上海安亭科学仪器厂;Waters 1525 高效液相色谱仪 美国 Waters 公司;ZEN3600 纳米粒度电位仪 英国 Malvern 公司;Fluoro Max-4 荧光分光光度计 美国 HORIBA 公司;DSC214 差示扫描量热仪 德国耐驰仪器制造公司;ADCI-60-C 色差仪 北京辰泰克仪器技术有限公司;TA.XT PLUS 型质构仪 英国 SMS 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 白鲢鱼鳞预处理及基本成分测定 新鲜的白鲢鱼鳞经清水洗净,沥干水分后置于50 °C电热鼓风干燥箱中烘6~8 h,然后用粉碎机将鱼鳞粉碎过80目筛后备用。白鲢鱼鳞水分、粗灰分、粗蛋白、粗脂肪含量分别参照GB 5009.3-2016、GB 5009.4-2016、GB 5009.5-2016、GB 5009.6-2016进行测定。

1.2.2 ScAFPs的制备工艺优化

1.2.2.1 白鲢鱼鳞酶解液制备 粉碎后的白鲢鱼鳞中加入适量蒸馏水,将其超声(50 °C,200 W)处理90 min后再进行60 min高温高压处理(121 °C,0.1 MPa),待混合液冷却至室温后调节其pH至相应蛋白酶最适pH,添加适量蛋白酶混合均匀,迅速放置于水浴恒温振荡摇床中酶解一定时长后进行沸水浴灭酶10 min,最后待酶解液冷却至室温后离心(4 °C,10000 r/min)10 min,取上清液,上清液即为白鲢鱼鳞酶解液。

1.2.2.2 单因素实验 以嗜热链球菌低温存活率为主指标,水解度(DH)为辅助指标,对ScAFPs酶解工

艺进行单因素实验,依次按照蛋白酶、底物浓度、酶底比、酶解时间的筛选顺序进行实验,每次实验严格控制单一变量。筛选蛋白酶时,设置酶解初始条件为:底物浓度 3%(w/v),酶底比 5%(w/w),酶解时间 6 h,随后根据每次筛选结果对初始条件中的相应因素条件替换后,再进行下一因素的筛选。各因素变量分别为:蛋白酶种类选取复合风味蛋白酶、木瓜蛋白酶、胰蛋白酶、中性蛋白酶和碱性蛋白酶,这 5 种蛋白酶最适 pH 与温度分别为:7.0, 50 °C; 8.0, 37 °C; 8.0, 37 °C; 7.0, 50 °C; 8.0, 50 °C; 底物浓度选取 1%、2%、3%、4%、5%(w/v); 酶底比选取 1%、3%、5%、7%、9%(w/w); 酶解时间选取 1、2、3、4、5、6、7 h。

1.2.2.3 响应面优化试验 在单因素实验结果的基础上,对 ScAFPs 酶解制备工艺进行响应面优化试验。选择 A:底物浓度(%); B:酶底比(%); C:酶解时间(h)三个因素,以嗜热链球菌存活率为响应值,利用 Design-Expert 8.0.6 软件的 Box-Behnken design 模型设计响应面优化试验方案,其因素水平表如表 1 所示。

表 1 因素水平编码表
Table 1 Factor level coding table

因素	编码水平		
	-1	0	1
A 底物浓度(%)	3	4	5
B 酶底比(%)	1	3	5
C 酶解时间(h)	1	3	5

1.2.2.4 嗜热链球菌存活率测定 取 200 μ L 二次活化的嗜热链球菌菌液至 20 mL M17 液体培养基中,培养 4 h 后取 4 mL 菌液离心(4 °C, 5000 r/min)10 min,去除上清液,再加入 4 mL 生理盐水洗涤离心(4 °C, 5000 r/min)10 min 后保留菌泥,该步骤重复两次,最后将菌泥重悬于 8 mL 生理盐水中。取 60 μ L 重悬的菌液分别与 540 μ L 的生理盐水(空白对照组)和鱼鳞酶解液混合均匀,鱼鳞酶解液预先使用 0.22 μ m 滤菌膜过滤,然后吸取 50 μ L 于 4 mL M17 液体培养基中培养 7 h,利用紫外分光光度计检测 600 nm 处的吸光值 A_0 。将剩余混合菌液放入-20 °C 冰箱冷冻 24 h,在冷冻的前 4 h 内,每隔 2 h 进行一次冻融循环(37 °C 水浴,10 min)。冷冻 24 h 后将菌液水浴解冻(37 °C, 10 min),再次取 50 μ L 接种培养 7 h 后测吸光值 A_1 。嗜热链球菌的低温存活率计算公式为:

$$\text{嗜热链球菌低温存活率(\%)} = \frac{A_1}{A_0} \times 100$$

式中: A_0 : 冷冻前菌液 600 nm 处的 OD 值; A_1 : 冷冻后菌液 600 nm 处的 OD 值。

1.2.2.5 水解度(DH)的测定 采用甲醛滴定法,首先在 100 mL 烧杯中加入 2.5 mL 酶解液和 30 mL 蒸馏水混合均匀,将混合液与甲醛溶液的 pH 均调至 8.2,往混合液中加入 10 mL 甲醛溶液,然后用 0.02 mol/L 氢氧化钠标准溶液将所混合的溶液滴定

至 9.2,记录下所消耗氢氧化钠的体积 ΔV ,参照 LIN 等^[19]的方法计算 DH。

1.2.3 白鲢鱼鳞抗冻多肽基本性质表征 根据响应面优化试验优化的 ScAFPs 最佳制备工艺条件,制备得到液态 ScAFPs,将其冻干后置于-20 °C 冰箱中备用。

1.2.3.1 肽基本成分的测定 ScAFPs 中的多肽含量参照刘聘等^[20]的方法稍作修改后测定,首先向酶解制备所得的 ScAFPs 溶液中按照 1:1 的比例添加 10% 三氯乙酸溶液(去离子水配制),混合均匀后静置 10 min,离心(4 °C, 10000 r/min)10 min 后,取上清液冻干成粉末,参照 GB 5009.5-2016 中的凯氏定氮法测定多肽含量。ScAFPs 中水分与粗灰分含量测定分别参照 GB 5009.3-2016 中直接干燥法和 GB 5009.4-2016 中食品总灰分的测定。

1.2.3.2 分子量分布 将 ScAFPs 配制成 20 mg/mL 的水溶液,选用 TSK-Gel-G2000SWXL 凝胶色谱柱,进样量为 10 μ L,流速为 0.5 mL/min,利用 WatersTM650E 高级蛋白质纯化系统的高效液相色谱仪进行分子量分布测定^[19]。

1.2.3.3 表面疏水性测定 通过 8-苯胺基-1-萘磺酸铵(ANS)荧光探针测定 ScAFPs 的表面疏水性,具体测定方法参照曾茂茂等^[21]的方法稍作修改。利用 PBS (0.1 mol/L, pH7.0),分别配制 8 mmol/L ANS 溶液、100 μ g/mL BSA 溶液和 100 μ g/mL ScAFPs 溶液。以牛血清蛋白(BSA)为对照,利用 PBS 分别将 BSA 与 ScAFPs 溶液稀释成梯度浓度为 100、50、25、12.5、6.25 μ g/mL 的样品溶液。各取梯度稀释后的样品溶液 4 mL,加入 20 μ L ANS 溶液混合均匀后,立即使用荧光分光光度计测定其荧光强度。仪器参数条件设置为:激发波长 374 nm、狭缝校正宽度 5 nm;发射波长 485 nm、狭缝校正宽度 5 nm;灵敏度为 2。样品表面疏水性值以样品浓度(横坐标)和荧光强度(纵坐标)拟合的线性方程的斜率表示。

1.2.3.4 等电点测定 ScAFPs 的等电点利用纳米粒度电位仪进行测定。首先使用去离子水配制 1 mg/mL ScAFPs 溶液,用 0.1 mol/L 盐酸将其 pH 分别调节至 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 与 8.0 后在 25 °C 下测定其 Zeta 电位,上样量为 1 mL。将各 pH 与相对应的 Zeta 电位值绘制成折线图,当多肽样品溶液 Zeta 电位为 0 时,说明此时溶液的 pH 在等电点附近。

1.2.3.5 热稳定性测定 称取适量 ScAFPs 样品,使用无菌水配制 15 mg/mL ScAFPs 溶液,用 0.22 μ m 滤菌膜过滤后分装 4 份于玻璃试管中,将其用封口膜封口后置于沸水浴中分别加热 0、10、20、30 min,冷却至室温后,按照实验方法 1.2.2.4 测定其嗜热链球菌低温存活率。

1.2.3.6 热滞活性(THA)测定 ScAFPs 的 THA 测定参照 WU 等^[22]的方法稍作变化,用去离子水配制 15 mg/mL BSA 溶液(对照组)与 ScAFPs 溶液,使用

带有 Proteus 热分析软件的差示扫描量热仪测定其 THA, 上样量为 5 μ L。a: 选取测定过程中的保留温度: 将样品置于 10 $^{\circ}$ C 中保温 5 min 后, 以-2 $^{\circ}$ C/min 的速率使样品由 10 $^{\circ}$ C 降至-30 $^{\circ}$ C, 平衡 5 min, 使样品全部结冰, 然后根据 DSC 曲线选取保留温度 (Th1: -0.5 $^{\circ}$ C、Th2: 0 $^{\circ}$ C 和 Th3: 0.3 $^{\circ}$ C); b: 测定过程的温度梯度流程设定为: 以-2 $^{\circ}$ C/min 速率降温至-30 $^{\circ}$ C, 平衡 5 min, 样品全部结冰; 以 2 $^{\circ}$ C/min 升温/降温速率在保留温度与-10 $^{\circ}$ C 之间冻融循环, 每个保留温度下恒温 5 min。使用 Proteus 热分析软件计算样品的熔化焓(ΔH_m)、结晶开始温度(T_0)和放热焓(ΔH_f), THA 与样品中冰的含量(φ)计算公式如下:

$$THA = Th - T_0$$

$$\varphi(\%) = \left(1 - \frac{\Delta H_f}{\Delta H_m}\right) \times 100$$

式中: Th: 保留温度, $^{\circ}$ C; T_0 : 结晶开始温度, $^{\circ}$ C; ΔH_f : 样品放热焓, J/g; ΔH_m : 样品熔化焓, J/g。

1.2.4 鱼糜的制备 新鲜草鱼击晕后, 去除头部、鱼鳞、内脏、鱼皮与红肉, 取白色鱼肉冲洗干净, 用绞肉机将其粉碎成鱼糜。按照 LIN 等^[23]所描述的方法洗涤鱼糜, 以 1:3(w/v)的比例往鱼糜中加入去离子水(4 $^{\circ}$ C), 用电动搅拌器匀速搅拌 10 min, 然后离心(4 $^{\circ}$ C, 6000 r/min)5 min, 倒出上清液, 该清洗过程重复两次。将洗涤两遍后的鱼糜重新分散在 3 倍体积的 0.5% 氯化钠溶液中(4 $^{\circ}$ C), 搅拌 10 min, 离心(4 $^{\circ}$ C, 6000 r/min)15 min 脱水后即得到草鱼鱼糜。

1.2.5 鱼糜样品的处理及冻融循环处理 将制备所得的草鱼鱼糜平均分为六部分, 分别在鱼糜中加入 0%、2%、4%、6%、8% ScAFPs 和 8% SUSO(w/w), 其中, 0% ScAFPs 鱼糜组为空白对照组, 8% SUSO 作为阳性对照组。每组样品用手动搅拌器匀速搅拌 5 min 以确保添加剂和鱼糜混合均匀。各鱼糜样品组均经过 5 次冻融循环, 每次循环在-20 $^{\circ}$ C 冷冻 72 h 后于 25 $^{\circ}$ C 解冻 1 h。新鲜未冻藏样品立即进行指标测定, 经过冷冻的样品于每次解冻后进行指标测定。

1.2.6 鱼糜凝胶的制备 在新鲜或解冻后的鱼糜样品中加入 2% 氯化钠(w/w), 利用研钵研磨 3 min, 搅拌均匀, 制得鱼糜溶胶, 将鱼糜溶胶塞进预先切掉头部的 5 mL 注射器, 避免鱼糜溶胶在注射器中产生空隙而影响后续实验, 然后用保鲜膜将注射器两端封紧, 利用两段加热法(40 $^{\circ}$ C 30 min, 90 $^{\circ}$ C 30 min)制备鱼糜凝胶。加热结束后的鱼糜凝胶立即放置于冰水中冷却 15 min, 并在 4 $^{\circ}$ C 保存以供进一步分析。分析鱼糜凝胶特性前, 将制备所得的鱼糜凝胶切成 1 cm 高的圆柱体。

1.2.7 白度的测定 在室温中利用色差仪测定鱼糜凝胶 L^* 、 a^* 、 b^* 值, 每组样品测 4 次平行, 结果取平均

值, 白度计算公式如下^[24]:

$$W = 100 - \sqrt{(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}}$$

式中: W: 样品的白度; L^* : 样品的亮度; a^* : 样品颜色的红绿值; b^* : 样品颜色的黄蓝值。

1.2.8 质构特性(TPA)的测定 参照 YE 等^[24]的方法稍作修改。利用质构仪测定鱼糜凝胶 TPA, 设定参数为: 探头 P/36R, 测前速度 5.00 mm/s, 测中速度 1.00 mm/s, 测后速度 10.00 mm/s, 触发力 5.0 g, 压缩比 40.0%。选择硬度、咀嚼性、弹性与粘黏性作为检测指标。

1.2.9 凝胶强度的测定 参照 LIU 等^[25]的方法稍作修改。利用质构仪测定鱼糜凝胶强度, 参数设定为: 探头 P/0.5, 测前速度 5.00 mm/s, 测中速度 1.00 mm/s, 测后速度 10.00 mm/s, 触发力 20.0 g, 压缩比 50.0%。凝胶强度试验曲线上第一个峰对应的力和距离分别是破断力与断裂距离, 破断力可反映凝胶硬度, 断裂距离则反映凝胶弹性, 凝胶强度大小为二者乘积。

1.3 数据处理

利用 Origin 2021 软件作图, 实验数据结果均以平均值 $\pm$ 标准差表示, 采用 SPSS 20.0 软件进行单因素方差分析(ANOVA), 以 $P < 0.05$ 作为差异显著。DSC 数据利用 NETZSCH Proteus Analysis 软件进行分析处理。使用 Origin 2021 软件的 Principal Component Analysis、Multivariate Analysis 对鱼糜凝胶白度、质构特性(硬度、咀嚼性、弹性、粘黏性)与凝胶强度指标进行 PCA 主成分分析与聚类分析。

2 结果与分析

2.1 白鲢鱼鳞基本成分

由表 2 可知, 白鲢鱼鳞富含蛋白质, 脂肪含量较低。白鲢鱼鳞主要由蛋白质和灰分组成, 占鱼鳞干重的 87.51% 左右, 其中粗蛋白含量为 64.78% $\pm$ 0.15%, 该结果表明白鲢鱼鳞是制备胶原基多肽的理想原料。

表 2 白鲢鱼鳞的基本成分(% , w/w, 干基)
Table 2 The basic components of sliver carp scales (% , w/w, dry basis)

成分名称	水分	粗灰分	粗蛋白	粗脂肪
含量	11.93 $\pm$ 0.22	22.73 $\pm$ 0.39	64.78 $\pm$ 0.15	0.37 $\pm$ 0.00

2.2 ScAFPs 的制备工艺优化

2.2.1 单因素实验分析 以嗜热链球菌冻融存活率和 DH 为双指标, 对 ScAFPs 酶解制备工艺中常见蛋白酶制剂种类、底物浓度、酶底比及酶解时间这 4 个因素进行筛选, 其筛选结果如图 1 所示。图 1a 所示, 利用胰蛋白酶制备的酶解液抗冻活性最强, 其嗜热链球菌冻融胁迫后存活率为 81.56% $\pm$ 4.50%; 因此选取胰蛋白酶进行后续实验。在确定酶种类后, 依次对底物浓度、酶底比、酶解时间进行分析, 其结果分别如图 1b、1c、1d 所示。酶解液的抗冻活性随着底物浓度、酶底比以及酶解时间的变化而变化, 总体呈

现先上升后下降的趋势,根据以嗜热链球菌低温存活率为主指标的原则,选取底物浓度 4%(w/v)、酶底比 3%、酶解时间 3 h 进行后续实验,因为此时嗜热链球菌存活率最高,酶解液的抗冻活性最强。

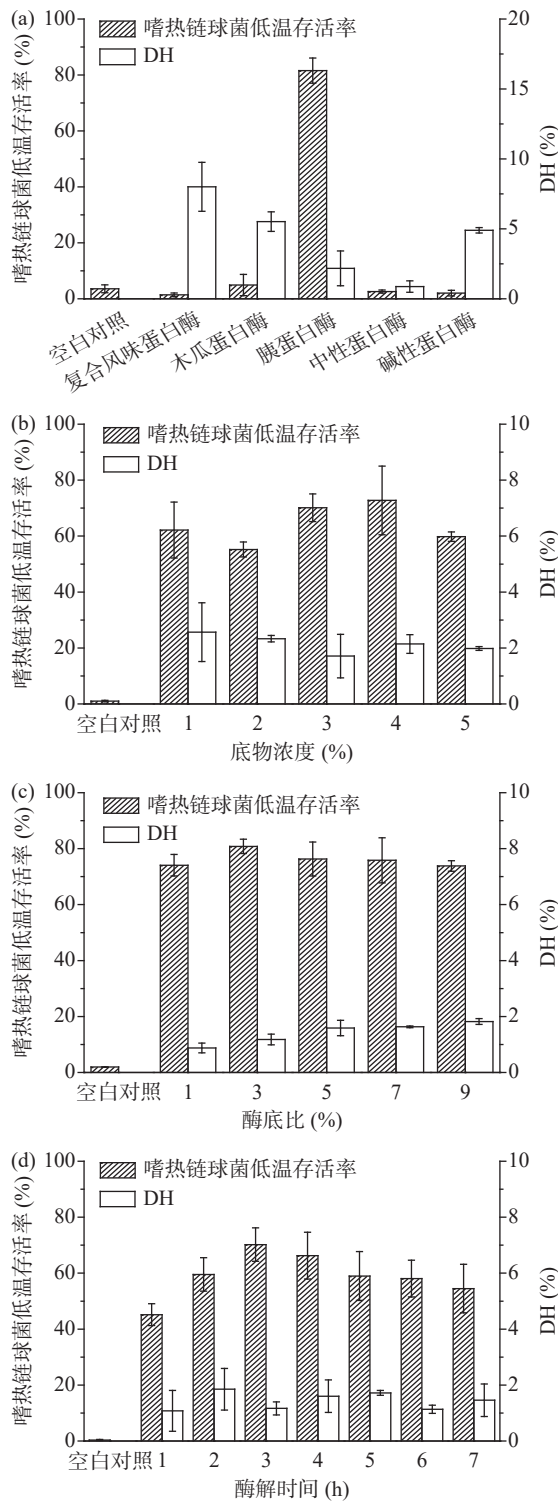


图1 各因素对嗜热链球菌低温存活率和DH的影响
Fig.1 Effects of various factors on low temperature survival rate of *S. thermophilus* and DH
注: a: 酶种类; b: 底物浓度; c: 酶底比; d: 酶解时间。

2.2.2 响应面优化试验分析 在单因素基础上,以嗜热链球菌冻融后存活率为响应值,对底物浓度、酶底比和酶解时间进行响应面优化,结果如表3所示。

表3 响应面试验设计方案与结果
Table 3 Experimental design and results of response surface methodology

试验号	A 底物浓度 (%)	B 酶底比 (%)	C 酶解时间 (h)	Y 嗜热链球菌存活率 (%)
1	4.00	1.00	5.00	40.20
2	5.00	3.00	1.00	68.07
3	5.00	5.00	3.00	83.03
4	4.00	3.00	3.00	76.58
5	3.00	5.00	3.00	86.91
6	5.00	1.00	3.00	61.86
7	4.00	5.00	1.00	61.96
8	4.00	3.00	3.00	67.90
9	5.00	3.00	5.00	79.93
10	3.00	3.00	1.00	67.93
11	4.00	3.00	3.00	71.36
12	4.00	3.00	3.00	72.33
13	4.00	5.00	5.00	64.38
14	4.00	1.00	1.00	30.87
15	3.00	3.00	5.00	58.21
16	4.00	3.00	3.00	74.68
17	3.00	1.00	3.00	46.09

通过回归模拟方差分析结果(表4)可知,底物浓度(A)对响应值嗜热链球菌存活率的影响显著($P<0.01$),酶底比(B)对响应值嗜热链球菌存活率的影响极显著($P<0.001$),而酶解时间(C)对响应值嗜热链球菌存活率的影响不显著($P>0.05$)。嗜热链球菌存活率随着底物浓度、酶底比和酶解时间变化得到拟合回归方程:嗜热链球菌存活率= $72.57+4.22\times A+14.66\times B+1.73\times C-4.91\times AB+5.39\times AC-1.73\times BC+8.04\times A^2-11.14\times B^2-12.08\times C^2$ 。根据表4回归模型的方差分析结果可知,回归模型极显著($P<0.001$),失拟项不显著($P>0.05$), R^2 为0.9795,说明该模型拟合较好,可用于ScAFPs制备工艺参数预测。

表4 回归模型的方差分析(嗜热链球菌存活率为响应值)
Table 4 Variance analysis of the regression mode (survival rate of *S. thermophilus* as response value)

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性水平
模型	3502.44	9	389.16	37.08	<0.0001	***
A 底物浓度	142.31	1	142.31	13.56	0.0078	**
B 酶底比	1718.65	1	1718.65	163.75	<0.0001	***
C 酶解时间	24.07	1	24.07	2.29	0.1737	
AB	96.53	1	96.53	9.20	0.019	*
AC	116.41	1	116.41	11.09	0.0126	*
BC	11.92	1	11.92	1.14	0.3219	
A ²	272.40	1	272.40	25.95	0.0014	**
B ²	522.31	1	522.31	49.76	0.0002	***
C ²	614.12	1	614.12	58.51	0.0001	***
残差	73.47	7	10.50			
失拟项	29.57	3	9.86	0.90	0.5159	不显著
纯误差	43.90	4	10.98			
总和	3575.91	16				

$R^2=0.9795, R^2_{Adj}=0.9530$

注:“***”代表极显著($P<0.001$);“**”代表较显著($P<0.01$);“*”代表显著($P<0.05$)。

响应面试验预测得到理论最佳条件为: 底物浓度 5.0%, 酶底比 3.8%, 酶解时间 3.5 h, 在该条件下预测嗜热链球菌存活率 87.81%。对响应面试验结果得到的理论最佳酶解工艺参数(底物浓度 5.0%, 酶底比 3.8%, 酶解时间 3.5 h)进行验证, 测得该条件下制得的酶解液对嗜热链球菌冷冻存活率为 $82.19\% \pm 1.03\%$, 与理论预测值 87.81% 之间无明显差异, 说明响应面优化结果可靠。因此, 以底物浓度 5.0%, 酶底比 3.8%, 酶解时间 3.5 h 为制备 ScAFPs 最佳酶解工艺参数, 在此条件下的 DH 为 $7.54\% \pm 0.43\%$ 。

2.3 ScAFPs 的基本性质分析

2.3.1 基本成分分析 由表 5 可知, ScAFPs 中多肽含量为 $93.30\% \pm 1.57\%$, 水分和粗灰分含量分别为 $3.50\% \pm 0.00\%$ 和 $2.84\% \pm 0.01\%$, 说明 ScAFPs 的多肽含量超过 90%, 可用于后续研究。

表 5 ScAFPs 基本成分(% , w/w, 干基)

Table 5 The basic components of ScAFPs (% , w/w, dry basis)

成分名称	多肽	水分	粗灰分
含量	93.30±1.57	3.50±0.00	2.84±0.01

2.3.2 分子量分布 利用 HPLC 法测定 ScAFPs 的相对分子质量分布, 其结果如图 2 所示。由图可知 ScAFPs 的相对分子质量主要集中在 180~3000 Da 之间, 占总量的 78.95%, 其中 180~1000 Da 之间占 42.54%。说明 ScAFPs 主要是由 2~10 个氨基酸组成的小肽组成。以上结果与目前国内关于水解抗冻肽分子质量分布趋势一致^[7, 26]。

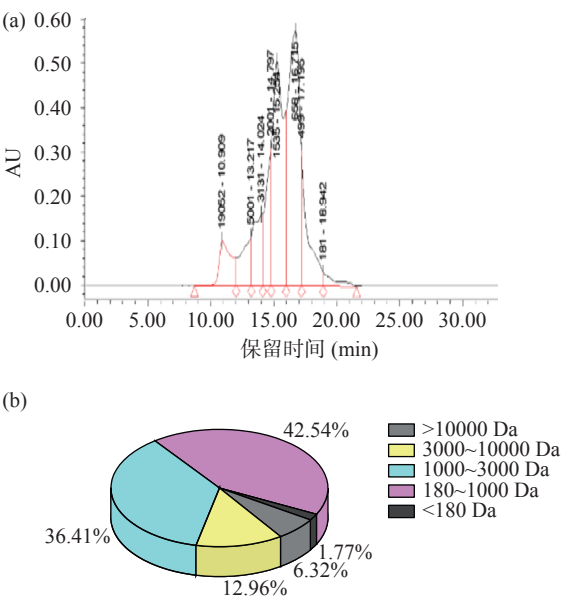


图 2 ScAFPs 的分子量分布
Fig.2 The molecular weight distribution of ScAFPs
注: a: ScAFPs 的 HPLC 洗脱图; b: 分子量分布。

2.3.3 表面疏水性 通过 ANS 法对 ScAFPs 的亲疏水性进行分析, 拟合出来的线性方程的斜率越大表示疏水性越大, 而其亲水性越弱^[27]。图 3 结果表明,

ScAFPs 的疏水性值为 41.1199, 而 BSA 标品的疏水值为 1513.6502, 说明 ScAFPs 较 BSA 标准品是一种具有较强亲水性的多肽。根据 CHEN 等^[7]报道, 食源性抗冻肽通常具有较强的亲水性, 抗冻肽富含的亲水基团可以维持其与冰晶结合的稳定性。此外, 鱼糜在冷冻贮藏过程中由于冰晶生长导致的鱼糜肌原纤维蛋白结合水解离, 造成鱼糜肌原纤维蛋白外部水化层被破坏, 从而影响鱼糜的凝胶性, 而商业抗冻剂主要是通过其富含的亲水基团以维持鱼糜肌原纤维蛋白外部水化层的稳定性, 从而起到对鱼糜的冷冻保护作用^[6]。以上结果说明, ScAFPs 具有与食源性抗冻肽类似的特点, 且其强亲水性特点具有作为冷冻保护剂应用于鱼糜冷冻贮藏的潜质。

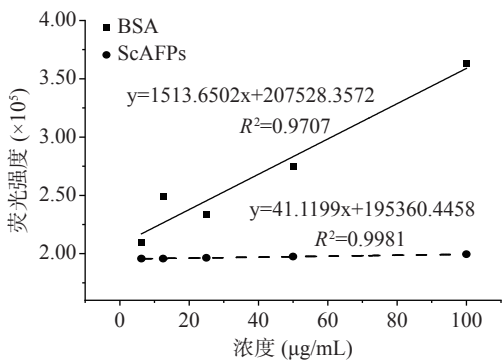


图 3 cAFPs 的表面疏水性
Fig.3 The surface hydrophobicity of ScAFPs

2.3.4 等电点 ScAFPs 的等电点测定结果如图 4 所示。等电点可以反映体系的稳定性, 由图可知, ScAFPs 的等电点在 4.2 左右, 而鱼糜的 pH 通常在 6.0~8.0 之间^[28], 说明 ScAFPs 适用于鱼糜体系, 可以避免多肽的聚集沉淀而影响其抗冻活性。

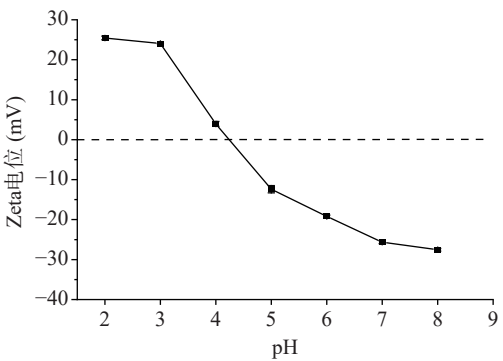


图 4 cAFPs 的 Zeta 电位分析
Fig.4 Zeta potential analysis of ScAFPs

2.3.5 热稳定性 ScAFPs 的热稳定性测定结果如表 6 所示。经过沸水处理 30 min 后, ScAFPs 对嗜热链球菌冻融后的存活率为 $73.85\% \pm 4.22\%$ 与未经过沸水处理组的 $76.57\% \pm 1.91\%$ 无显著性差异($P > 0.05$)。说明 ScAFPs 具有良好的热稳定性。

2.3.6 热滞活性 当 AFPs 吸附于冰水界面时, 造成冰晶生长轨迹发生改变, 导致冰水界面蒸汽压升高使得溶液冰点与熔点之间形成差值, 而 THA 的高低可

表 6 ScAFPs 的热稳定性分析

Table 6 Thermal stability analysis of ScAFPs

加热时间(min)	嗜热链球菌存活率(%)
0	76.57±1.91 ^a
10	70.13±2.70 ^a
20	70.26±0.87 ^a
30	73.85±4.22 ^a

注: 同列相同字母表示各组之间无显著性差异($P>0.05$)。

以通过这个温度差值体现^[8-10]。通过 DSC 对 ScAFPs 的 THA 及不同保留温度下冻融过程的冰晶含量进行分析。由图 5 可知, 与标准蛋白 BSA 组相比, ScAFPs 组在相同保留温度下降温过程中的热流图出现一定的滞后现象。进一步通过 NETZSCH Proteus Analysis 软件对热流图进行积分计算, 得到表 7 数据。由表可以发现, 在较低的保留温度下, 虽然 BSA 组与 ScAFPs 组的 THA 均较低, 但是含有 ScAFPs 的体系中冰晶含量显著降低。且当保留温度为 0.3 °C 时, ScAFPs 组的 THA 为 1.1 °C, 显著高于 BSA

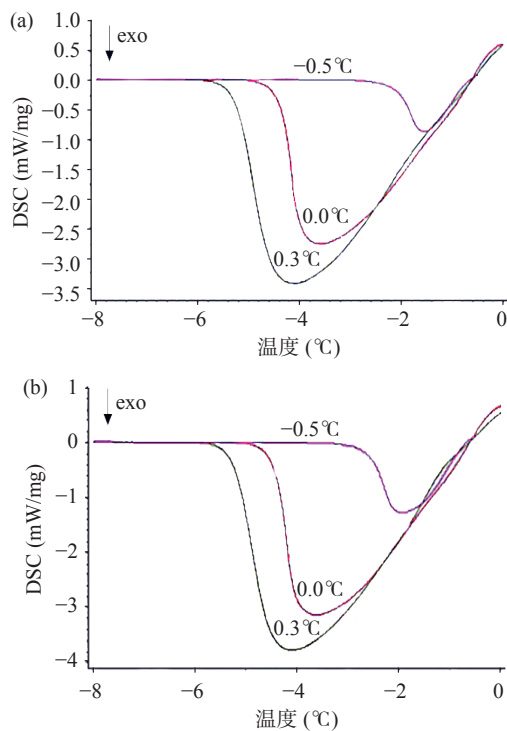


图 5 ScAFPs 在不同保留温度下的 DSC 热流图

Fig.5 DSC curves of ScAFPs at different retention temperatures

注: a: 牛血清白蛋白; b: 抗冻多肽。

表 7 ScAFPs 在不同保留温度下的热力学特性

Table 7 Thermodynamic characteristics of ScAFPs at different retention temperatures

样品名	Th (°C)	ΔH_m (J/g)	ΔH_f (J/g)	ϕ (%)	T_0 (°C)	THA (°C)
BSA	-0.5	-302.2	-23.57	92.20	-0.7	0.2
	0.0	-302.2	-234.9	22.27	-0.3	0.3
	0.3	-302.2	-344.2	-	0.0	0.3
ScAFPs	-0.5	-315.8	-48.51	84.62	-0.7	0.2
	0.0	-315.8	-273.0	13.50	-0.3	0.3
	0.3	-315.8	-364.2	-	-0.8	1.1

组的 0.3 °C。以上结果表明, 虽然 ScAFPs 在较低的保留温度下其 THA 较低, 但是能显著降低体系中的冰晶含量, 从而发挥抗冻效果。

2.4 ScAFPs 对冻融鱼糜凝胶特性的影响

2.4.1 白度 白度作为衡量冷冻鱼糜色泽的重要依据, 是判定鱼糜品质好坏最直观的指标之一。不同添加量 ScAFPs 对冻融鱼糜凝胶白度的影响如表 8 所示。由表 8 可知, 空白对照组的鱼糜凝胶初始白度值略高于其余各组处理组鱼糜, 这是由于 ScAFPs 与商业抗冻剂自身的白度值略差于新鲜鱼糜的白度, 其中 2%、4% ScAFPs 处理组鱼糜的凝胶白度值与空白对照组相比无显著性差异($P>0.05$), 6%、8% ScAFPs 处理组鱼糜的凝胶白度值与商业抗冻剂处理组相比无显著性差异($P>0.05$), 这说明 2%~8% ScAFPs 添加量对鱼糜凝胶初始白度值的影响在可接受范围内。在冻融循环过程中, 鱼糜的色泽会逐渐变差, 仅经历 1 次冻融循环处理, 空白对照组的白度值便低于 2%、4% ScAFPs 处理组鱼糜; 经过 5 次冻融循环后, 空白对照组的鱼糜白度值较初始值下降 7.52%, 变化幅度最大, 商业抗冻剂组的鱼糜白度值较初始值下降 4.95%, 而 2%、4% ScAFPs 处理组鱼糜仅下降 2.84% 与 2.80%, 6% 与 8% ScAFPs 处理组鱼糜的白度值与初始值相比均无显著变化($P>0.05$)。以上结果证明了 ScAFPs 可以有效保护鱼糜的白度, 并且与商业抗冻剂相比, ScAFPs 对鱼糜初始白度值影响更小, 保护效果更佳, 说明 ScAFPs 对鱼糜制品的后续深加工应用前景更广阔。

2.4.2 TPA 为了评估 ScAFPs 对冻融鱼糜凝胶结构的保护作用, 测定了鱼糜凝胶的质构特性, 选取硬度、咀嚼性、弹性和粘黏性四个指标进行分析(表 9)。由表可知, 添加 ScAFPs 或商业抗冻剂处理组的鱼糜凝胶初始硬度、咀嚼性、粘黏性较空白对照组有所下降($P<0.05$), JITTINANDANA 等^[29]与 KORZENIOWSKA 等^[30]研究均指出添加商业抗冻剂可以导致鱼糜凝胶硬度下降而使其质地变得更柔软, 这说明 ScAFPs 与商业抗冻剂一样具有提高鱼糜质地柔软度与弹性的作用。经过 1 次冻融时, 空白对照组的鱼糜凝胶咀嚼性与粘黏性突增, 弹性值突降, 这有可能是鱼糜在冷冻过程中冰晶对蛋白质的损伤与蛋白质聚集、变性所导致的^[31], 相较于空白对照组, ScAFPs 与商业抗冻剂处理组的添加使鱼糜质构在冻融处理条件下表现更稳定。而经过 5 次冻融后, 空白对照组鱼糜所制备的凝胶硬度、咀嚼性、粘黏性均下降最多, 与初始值相比, 分别下降了 36.86%、40.13% 与 6.45%, 添加了 2%~8% ScAFPs 与商业抗冻剂处理组鱼糜的凝胶硬度及咀嚼性与各自初始值相比, 分别下降了 27.62%、32.52%、31.16%、28.55%、32.06% 和 22.69%、31.07%、29.79%、26.02%、26.94%。以上结果说明, ScAFPs 与商业抗冻剂对鱼糜凝胶硬度与咀嚼性的下降具有抑制作用。

表 8 冻融循环中 ScAFPs 对鱼糜凝胶白度的影响
Table 8 Effects of ScAFPs on whiteness of surimi gel during freeze-thaw cycles

冻融次数	白度					
	空白对照组	8% SUSO	2% ScAFPs	4% ScAFPs	6% ScAFPs	8% ScAFPs
0	71.42±1.73 ^{Aa}	68.86±0.83 ^{Ba}	70.45±0.80 ^{Aa}	70.36±0.52 ^{Aa}	68.49±0.74 ^{Ba}	68.32±0.74 ^{Ba}
1	69.51±1.10 ^{ABab}	68.27±0.79 ^{BCa}	70.60±0.22 ^{Aa}	69.52±1.75 ^{ABab}	68.36±0.62 ^{BCa}	67.12±1.27 ^{Ca}
2	68.49±0.43 ^{ABbc}	68.57±1.15 ^{ABa}	69.47±1.76 ^{Aab}	68.72±0.18 ^{ABb}	68.72±0.25 ^{ABa}	67.63±0.43 ^{Ba}
3	66.87±0.59 ^{Ccd}	66.36±0.36 ^{Cb}	69.50±1.73 ^{Aab}	68.19±0.89 ^{ABCb}	68.85±1.32 ^{ABa}	67.08±0.87 ^{BCa}
4	68.04±0.50 ^{BCbcd}	66.04±0.59 ^{Db}	68.35±0.42 ^{ABCb}	69.44±0.96 ^{Ab}	68.82±0.84 ^{ABa}	67.36±1.07 ^{Ca}
5	66.05±2.25 ^{BCd}	65.45±0.75 ^{Cb}	68.45±1.22 ^{Ab}	68.39±1.22 ^{Ab}	67.79±2.03 ^{ABa}	67.84±0.56 ^{ABa}

注: 不同大写字母表示相同冻融次数内不同处理组间的显著性差异; 不同小写字母表示不同冻融次数内相同处理组间的显著性差异($P<0.05$); 表9、图6同。

表 9 冻融循环中 ScAFPs 对鱼糜凝胶质构特性的影响
Table 9 Effects of ScAFPs on gel texture properties of surimi during freeze-thaw cycles

指标	样品名称	冻融次数					
		0	1	2	3	4	5
硬度(g)	空白对照	532.44±16.04 ^{Aa}	498.68±35.92 ^{Ab}	478.48±19.44 ^{Abc}	452.57±18.42 ^{Ac}	399.51±21.93 ^{ABd}	336.19±19.41 ^{Ae}
	8% SUSO	495.36±20.78 ^{Ba}	436.10±4.41 ^{BCa}	416.70±6.36 ^{BCb}	409.75±19.30 ^{Bbc}	392.68±7.94 ^{ABCc}	336.55±4.87 ^{Ad}
	2% ScAFPs	466.39±12.57 ^{Ca}	456.21±19.43 ^{Bab}	436.84±34.28 ^{Bb}	444.85±16.75 ^{Aab}	411.00±22.71 ^{Ac}	337.58±21.61 ^{Ad}
	4% ScAFPs	461.08±17.71 ^{Ca}	407.59±14.86 ^{Cb}	410.68±12.00 ^{Cb}	391.18±9.57 ^{BCb}	376.88±32.18 ^{BCc}	311.13±7.30 ^{Bd}
	6% ScAFPs	459.28±12.69 ^{Ca}	424.25±32.86 ^{BCb}	427.25±18.32 ^{BCb}	380.36±24.38 ^{Cc}	370.27±14.57 ^{Cc}	316.15±9.04 ^{Bd}
	8% ScAFPs	444.45±25.94 ^{Ca}	405.13±4.18 ^{Cb}	407.71±16.63 ^{Cb}	360.01±9.77 ^{Dc}	368.29±30.99 ^{Cc}	317.56±13.66 ^{Bd}
咀嚼性(g)	空白对照	471.35±17.11 ^{Ab}	511.67±46.52 ^{Aa}	404.50±12.85 ^{Ac}	373.76±17.05 ^{Ac}	351.52±11.35 ^{Ad}	282.17±13.52 ^{Be}
	8% SUSO	409.95±22.05 ^{Ba}	375.73±18.42 ^{Bb}	363.95±11.58 ^{Bc}	349.77±14.22 ^{Bc}	355.48±22.37 ^{Ac}	299.53±26.53 ^{Ad}
	2% ScAFPs	362.49±17.23 ^{Ca}	343.87±15.17 ^{Cb}	335.63±13.91 ^{Cc}	350.03±10.00 ^{Bab}	323.00±16.41 ^{Bc}	280.23±14.67 ^{Bd}
	4% ScAFPs	335.74±15.62 ^{Da}	308.69±15.19 ^{Db}	308.18±8.70 ^{DEb}	277.35±12.36 ^{Cd}	287.35±17.47 ^{Cd}	231.41±7.18 ^{Ce}
	6% ScAFPs	330.58±20.03 ^{Da}	307.90±19.15 ^{Db}	318.53±14.98 ^{Db}	277.10±14.20 ^{Cc}	277.27±14.87 ^{Cc}	232.10±9.82 ^{Cd}
	8% ScAFPs	317.08±18.47 ^{Da}	285.35±15.65 ^{Db}	294.69±10.60 ^{Eb}	253.44±10.08 ^{Dc}	266.12±25.64 ^{Cc}	234.56±11.76 ^{Cd}
弹性	空白对照	0.95±0.01 ^{Ba}	0.92±0.03 ^{Bb}	0.96±0.00 ^{Aa}	0.96±0.01 ^{ABa}	0.95±0.01 ^{Ba}	0.96±0.01 ^{ABa}
	8% SUSO	0.96±0.01 ^{Aab}	0.96±0.01 ^{Abc}	0.96±0.00 ^{Aab}	0.97±0.00 ^{Aa}	0.95±0.02 ^{Bc}	0.96±0.02 ^{ABabc}
	2% ScAFPs	0.96±0.01 ^{ABa}	0.96±0.01 ^{Aa}	0.96±0.03 ^{Aa}	0.95±0.01 ^{Ba}	0.95±0.00 ^{ABa}	0.95±0.02 ^{Ba}
	4% ScAFPs	0.96±0.01 ^{ABa}	0.96±0.01 ^{Aa}	0.96±0.01 ^{Aa}	0.96±0.01 ^{ABa}	0.95±0.01 ^{ABb}	0.97±0.01 ^{Aa}
	6% ScAFPs	0.96±0.01 ^{ABab}	0.96±0.01 ^{Aab}	0.96±0.00 ^{Aab}	0.96±0.01 ^{ABb}	0.95±0.01 ^{ABc}	0.96±0.00 ^{Aa}
	8% ScAFPs	0.96±0.01 ^{ABa}	0.96±0.00 ^{Aa}	0.96±0.00 ^{Aa}	0.96±0.01 ^{ABa}	0.96±0.01 ^{Aa}	0.96±0.01 ^{Ba}
粘黏性(mm)	空白对照	0.93±0.06 ^{Ab}	1.17±0.12 ^{Aa}	0.85±0.02 ^{Bc}	0.86±0.03 ^{ABc}	0.90±0.01 ^{Bbc}	0.87±0.03 ^{Bbc}
	8% SUSO	0.86±0.03 ^{Bc}	0.91±0.03 ^{Babc}	0.87±0.02 ^{Abc}	0.88±0.05 ^{Abc}	0.96±0.08 ^{Aa}	0.93±0.09 ^{Aab}
	2% ScAFPs	0.81±0.04 ^{Cbc}	0.78±0.03 ^{Cc}	0.78±0.01 ^{Cc}	0.83±0.03 ^{Bb}	0.83±0.02 ^{Cb}	0.88±0.07 ^{Ba}
	4% ScAFPs	0.76±0.03 ^{Dbc}	0.79±0.04 ^{Cab}	0.75±0.03 ^{Dbc}	0.74±0.03 ^{Cc}	0.81±0.06 ^{Ca}	0.77±0.03 ^{Cabc}
	6% ScAFPs	0.75±0.04 ^{Dab}	0.76±0.03 ^{Cab}	0.75±0.02 ^{Db}	0.76±0.06 ^{Cab}	0.79±0.03 ^{CDa}	0.76±0.02 ^{Cab}
	8% ScAFPs	0.75±0.03 ^{Dab}	0.73±0.04 ^{Cab}	0.72±0.01 ^{Eab}	0.74±0.04 ^{Cab}	0.74±0.03 ^{Dab}	0.76±0.02 ^{Ca}

2.4.3 凝胶强度 鱼糜凝胶强度可以客观反应凝胶三维网络结构的聚集程度, 从而评价鱼糜制品的品质^[32]。ScAFPs 添加量对冻融鱼糜的凝胶破断力、断裂距离以及凝胶强度的影响如图 6 所示。从图中可以看出, 与空白对照组相比, ScAFPs 或商业抗冻剂的添加对鱼糜凝胶初始破断力、断裂距离以及凝胶强度均无显著影响($P>0.05$), 结合表 9 凝胶质构特性初始值分析, 说明 ScAFPs 与商业抗冻剂仅改变鱼糜凝胶质地的柔软度而不影响鱼糜凝胶的成胶性。随着冻融处理次数的增加, 各组鱼糜样品组的凝胶破断力、凝胶强度整体呈现下降趋势, 断裂距离呈上升趋势, 这意味着冻融使鱼糜蛋白发生冷冻变性, 导致鱼糜凝胶性能变差。经过 5 次冻融处理后, 空白对照组鱼糜的凝胶强度从 2535.43 下降至 1525.07 g·mm,

降低了 39.85%, 而 2%、4%、6%、8% ScAFPs 与商业抗冻剂处理组鱼糜仅分别下降 4.05%、5.01%、4.11%、15.64% 和 14.90%, 由此可见, ScAFPs 比商业抗冻剂对冻融鱼糜的凝胶性能保护效果更佳, 仅添加 2% ScAFPs 就可以很好的保护鱼糜在冻融条件下保持良好的凝胶性, 但 8% ScAFPs 处理组鱼糜对鱼糜凝胶的低温保护效果略微有所下降, 这可能是因为过量的 ScAFPs 会阻碍肌原纤维蛋白交联, ScAFPs 中含有较多小分子游离氨基酸, 过高的添加量会导致鱼糜体系中存在高浓度的游离氨基酸, 这将有所抑制鱼糜蛋白形成凝胶网络结构^[33]。

2.5 PCA 主成分分析

对不同处理组鱼糜的凝胶特性指标进行 PCA 主成分分析, 得到冻融循环期间各处理组鱼糜的鱼糜

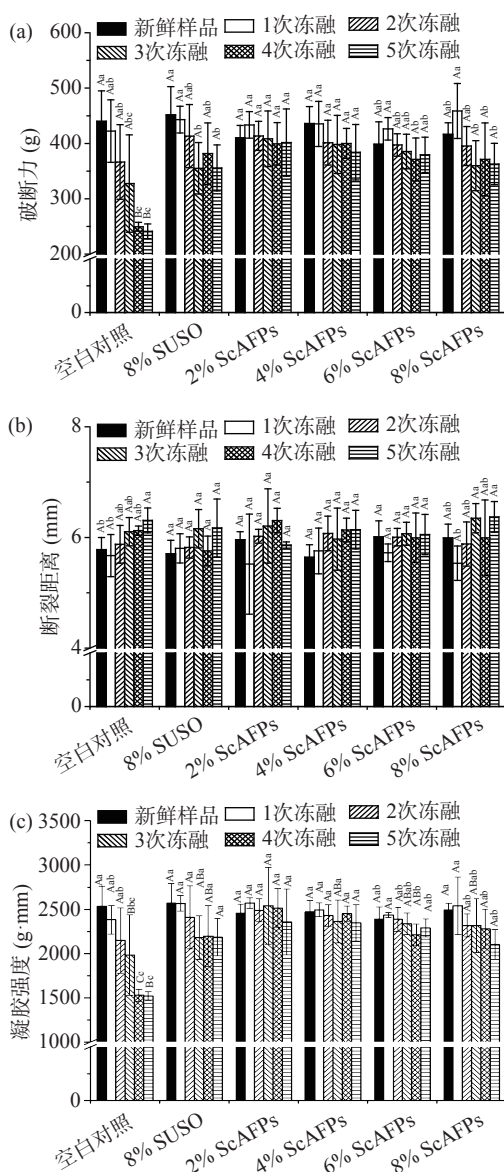


图6 冻融循环中 ScAFPs 对鱼糜凝胶强度的影响

Fig.6 Effects of ScAFPs on gel strength of surimi during freeze-thaw cycles

注: a: 破断力; b: 断裂距离; c: 凝胶强度。

冻藏品质有关指标的线性组合并将其投射到二维平面上(图 7a)。从图中可以看出,第一主成分(PC1)可以解释 50.0% 的总方差,第二主成分(PC2)解释 28.7% 的总方差,表明数据中 78.7% 的总方差由前两个主成分解释。PC1 除了与弹性呈负相关作用,与其余指标均呈正相关作用。PC2 与白度、硬度、弹性、凝胶强度呈正相关关系,与咀嚼性、粘黏性呈负相关关系。

图 7b 显示了在二维空间中使用 PC1 和 PC2 作为负荷因子的不同处理组的预测得分图,将图 7b 中的样品位置映射于图 7a 中,推断位于象限 1、2、3 和 4 的指标与相应象限中的样品相关^[34]。从图中可以看出,空白对照组除了新鲜鱼糜样品(0-0)分布在第 1 象限,一次冻融的样品(0-1)最接近咀嚼性与粘黏性,说明空白对照组鱼糜样品经 1 次冻融后对凝胶的咀嚼性与粘黏性影响较大,其余样品主要分布

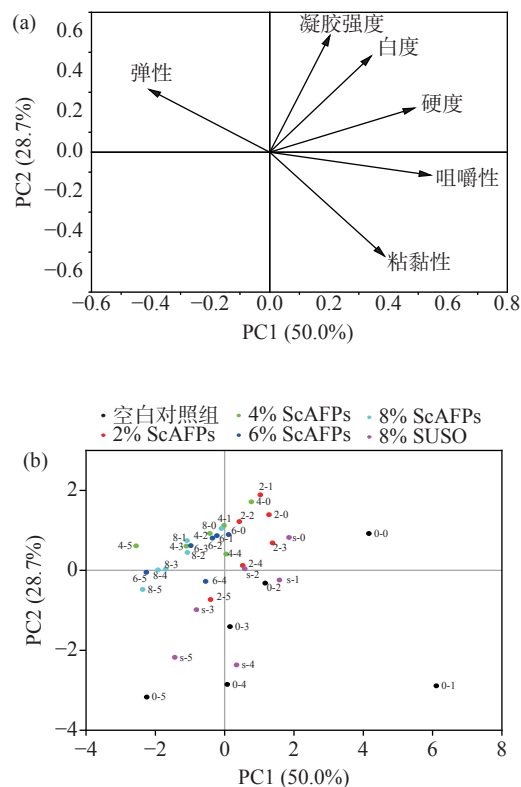


图7 冻融循环中 ScAFPs 对鱼糜凝胶特性的 PCA 分析

Fig.7 PCA analysis of gel characteristics of surimi by ScAFPs during freeze-thaw cycles

注: a: 载荷分布图; b: 负荷因子预测得分图; 0-0、0-1、0-2、0-3、0-4、0-5 为空白对照组鱼糜经过 0~5 次冻融的样品; s-0、s-1、s-2、s-3、s-4、s-5 为商业抗冻剂处理组鱼糜经过 0~5 次冻融的样品; 2-0、2-1、2-2、2-3、2-4、2-5 为 2% ScAFPs 经过 0~5 次冻融的样品,以此类推;图 8 同。

第 4 象限,随着冻融次数的增加,样品远离各项指标距离变大,说明冻融处理对空白对照组鱼糜凝胶特性影响很大。而 ScAFPs 与商业抗冻剂处理组鱼糜样品主要分布于靠近象限中心的第 1、2 象限中,与凝胶特性各指标的直线距离小于空白对照组。基于以上结果,说明冻融循环期间,空白对照组鱼糜凝胶特性被严重破坏,添加 ScAFPs 与商业抗冻剂有效保护鱼糜冻藏期间的凝胶特性。此外,商业抗冻剂与 2% ScAFPs 的位置最接近,说明就整体而言,2% ScAFPs 的抗冻效果就与商业抗冻剂相似。

2.6 聚类分析

将冻融期间的各处理组鱼糜样品进行聚类分析,如图 8 所示。从图中可以看出,鱼糜主要被分为 5 类。第 1 类将 0-0、0-1 聚为一类;2-0、2-1、2-2、2-3、2-4、4-0、4-1、4-2、4-4、6-0、6-1、6-2、8-0、8-1、s-0、s-1、s-2 聚为第 2 类;0-2、2-5、4-3、4-5、6-3、6-4、6-5、8-2、8-3、8-4、8-5、s-3、s-4、s-5 聚为第 3 类;0-3 被单独聚为第 4 类;0-4、0-5 聚为第 5 类,该结果表明空白对照组与添加抗冻剂样品组差异明显。从第 3 类中可以看出,空白对照组仅经过第二次冻融(0-2)的鱼糜凝胶特性与添加 2% ScAFPs 经 5 次冻融、4%、6%、8% ScAFPs 及商业抗冻剂的鱼

糜样品经 2~5 次冻融后的凝胶特性相似, 说明添加 ScAFPs 或商业抗冻剂的冷冻鱼糜可以有效保护冻融鱼糜凝胶特性。此外, 从第 2 类分类中可以得知, ScAFPs 添加量为 2%、4% 对冻融鱼糜的凝胶特性较高添加量 6%、8% 及商业抗冻剂的效果好, 说明在鱼糜低温保护应用中, 不宜添加含量过高的 ScAFPs。

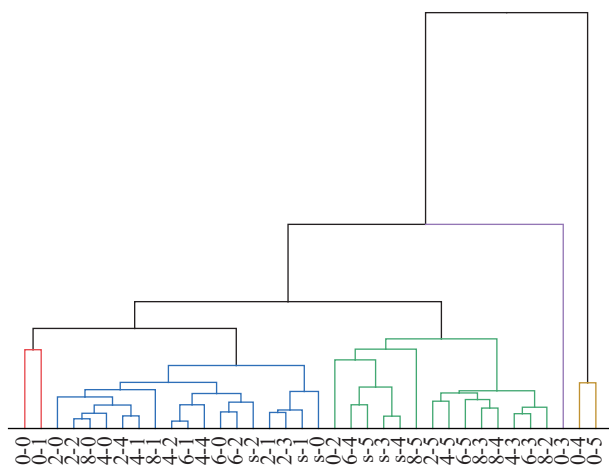


图 8 不同冻融循环鱼糜样品组的聚类分析

Fig.8 Cluster analysis of surimi samples with different freeze-thaw cycles

3 结论

本研究优化得到 ScAFPs 最佳酶解制备工艺, 并探究了 ScAFPs 对冻融鱼糜的凝胶特性的影响。研究表明, 用胰蛋白酶在最佳酶解制备工艺参数(底物浓度 5.0%、酶底比 3.8%、酶解温度 37 °C、酶解时间 3.5 h)下制备得到的 ScAFPs 的多肽含量为 93.30%±1.57%, 等电点为 4.2 左右, 相对分子量在 180~3000 Da 之间的含量占总含量的 78.95%, 且 ScAFPs 还具有极强的亲水性和较好的热稳定性, 并且能有效降低体系冰晶含量。而 ScAFPs 对冻融鱼糜的凝胶特性综合分析, 结果表明对照组(未添加低温保护剂的鱼糜)在经过 5 次冻融循环后, 其色泽、硬度、咀嚼性、凝胶强度较初始值各下降 7.52%、36.86%、40.13% 与 40.05%, 而添加 2% ScAFPs 对冻融鱼糜凝胶特性具有良好保护作用, 较初始值仅下降 2.84%、27.62%、22.69%、4.05%, 且效果优于商业抗冻剂(4.95%、32.06%、26.94%、14.90%)。通过 PCA 与聚类分析, 进一步阐明 ScAFPs 对冻融鱼糜凝胶具有良好的冷冻保护效果。以上研究结论说明, ScAFPs 具有作为新型鱼糜低温保护剂的潜力。

参考文献

[1] BANERJEE R, MAHESWARAPPA N B. Superchilling of muscle foods: Potential alternative for chilling and freezing[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2019, 59(8): 1256–1263.

[2] UTRERA M, MORCUENDE D, GANHÃO R, et al. Role of phenolics extracting from *Rosa canina* L. on meat protein oxidation during frozen storage and beef patties processing[J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2015, 8(4): 854–864.

[3] QI J, LI C B, CHEN Y J, et al. Changes in meat quality of ovine longissimus dorsi muscle in response to repeated freeze and thaw[J]. *Meat Science*, 2012, 92(4): 619–626.

[4] DU L H, BETTI M. Chicken collagen hydrolysate cryoprotection of natural actomyosin: Mechanism studies during freeze-thaw cycles and simulated digestion[J]. *Food Chemistry*, 2016, 211: 791–802.

[5] WALAYAT N, XIONG H G, XIONG Z Y, et al. Role of cryoprotectants in surimi and factors affecting surimi gel properties: A review[J]. *Food Reviews International*, 2020: 1–20.

[6] CHEN X, WU J H, LI X Z, et al. Investigation of the cryoprotective mechanism and effect on quality characteristics of surimi during freezing storage by antifreeze peptides[J]. *Food Chemistry*, 2022, 371: 131054.

[7] CHEN X, WU J H, CAI X X, et al. Production, structure-function relationships, mechanisms, and applications of antifreeze peptides[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2021, 20(1): 542–562.

[8] CHEN X, WU J H, LI L, et al. Cryoprotective activity and action mechanism of antifreeze peptides obtained from tilapia scales on *Streptococcus thermophilus* during cold stress[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(7): 1918–1926.

[9] SONG D H, KIM M, JIN E S, et al. Cryoprotective effect of an antifreeze protein purified from *Tenebrio molitor* larvae on vegetables[J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 94: 585–591.

[10] DAMODARAN S, WANG S Y. Ice crystal growth inhibition by peptides from fish gelatin hydrolysate[J]. *Food Hydrocolloids*, 2017, 70: 46–56.

[11] WANG S Y, DAMODARAN S. Ice-structuring peptides derived from bovine collagen[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(12): 5501–5509.

[12] 汪少芸, 赵立娜, 周焱富, 等. 食源性明胶多肽的制备、分离及其抗冻活性[J]. *食品科学*, 2013, 34(9): 135–139. [WANG S Y, ZHAO L N, ZHOU Y F, et al. Preparation and isolation of food-origin gelatin peptide and ice crystal inhibition[J]. *Food Science*, 2013, 34(9): 135–139.]

[13] 洪晶, 汪少芸, 吴金鸿, 等. 食品源抗冻多肽的制备及冰晶抑制作用研究[J]. *中国食品学报*, 2013, 13(1): 11–18. [HONG J, WANG S Y, WU J H, et al. Preparation of food derived antifreeze peptides and study on ice crystal inhibition[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2013, 13(1): 11–18.]

[14] WANG S Y, ZHAO J, CHEN L, et al. Preparation, isolation and hypothermia protection activity of antifreeze peptides from shark skin collagen[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2014, 55(1): 210–217.

[15] CHEN X, LI L, YANG F J, et al. Effects of gelatin-based antifreeze peptides on cell viability and oxidant stress of *Streptococcus thermophilus* during cold stage[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2020, 136: 111056.

[16] 于秀娟, 徐乐俊, 吴反修. 2020 年中国渔业统计年鉴[M]. 中国农业出版社, 2020, 30–31. [YU X J, XU L J, WU F X. China fishery statistical yearbook 2020[M]. China Agriculture Press, 2020, 30–31.]

- [17] PAL G K, SURESH P V. Comparative assessment of physico-chemical characteristics and fibril formation capacity of thermostable carp scales collagen[J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2017, 70: 32–40.
- [18] 于林. 白鲢鱼鳞胶原蛋白复合膜的制备以及保鲜效果研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2017. [YU L. Study on hypophthalmichthys molitrix scale collagen-chitosan blend film and its preservation effects[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2017.]
- [19] LIN J P, CAI X X, TANG M R, et al. Preparation and evaluation of the chelating nanocomposite fabricated with marine algae *Schizochytrium* sp protein hydrolysate and calcium[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(44): 9704–9714.
- [20] 刘聃, 曾凡坤. 花生蛋白多肽饮料肽含量测定重复性差原因研究[J]. *粮食与油脂*, 2012, 25(6): 24–27. [LIU D, ZENG F K. Study on reason of repeatability bad on determination of peptide content in peanut protein polypeptide beverage[J]. *Cereals & Oils*, 2012, 25(6): 24–27.]
- [21] 曾茂茂, 王霄, 陈洁. 蛋白质疏水性测定方法的相关性及适用性[J]. *食品科学*, 2011, 32(15): 117–120. [ZENG M M, WANG X, CHEN J. Correlation and applicability of different methods for determining protein hydrophobicity[J]. *Food Science*, 2011, 32(15): 117–120.]
- [22] WU J H, RONG Y Z, WANG Z W, et al. Isolation and characterisation of sericin antifreeze peptides and molecular dynamics modelling of their ice-binding interaction[J]. *Food Chemistry*, 2015, 174: 621–629.
- [23] LIN J, HONG H, ZHANG L T, et al. Antioxidant and cryoprotective effects of hydrolysate from gill protein of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) in preventing denaturation of frozen surimi[J]. *Food Chemistry*, 2019, 298: 124868.
- [24] YE Y H, LIU X Y, BAI W D, et al. Effect of microwave-ultrasonic combination treatment on heating-induced gel properties of low-sodium tilapia surimi during gel setting stage and comparative analysis[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2022, 161: 113386.
- [25] LIU C K, LI W X, LIN B Y, et al. Comprehensive analysis of ozone water rinsing on the water-holding capacity of grass carp surimi gel[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2021, 150: 111919.
- [26] LI L, WU J H, ZHANG L, et al. Investigation of the physicochemical properties, cryoprotective activity and possible action mechanisms of sericin peptides derived from membrane separation[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2017, 77: 532–541.
- [27] 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.
- [28] 孟一, 张玉华, 许丽丹, 等. 近红外光谱采集方式与样品形态对带鱼新鲜度检测结果的影响[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(11): 282–287. [MENG Y, ZHANG Y H, XU L D, et al. Effect of different near infrared spectroscopy (NIR) acquisition ways and sample states on the ribbonfish freshness detection results[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2014, 35(11): 282–287.]
- [29] JITTINANDANA S, KENNEY P B, SLIDER S D. Cryoprotectants preserve quality of restructured trout products following freeze-thaw cycling[J]. *Journal of Muscle Foods*, 2005, 16(4): 354–378.
- [30] KORZENIOWSKA M, CHEUNG I W Y, LI CHAN E C Y. Effects of fish protein hydrolysate and freeze-thaw treatment on physicochemical and gel properties of natural actomyosin from pacific cod[J]. *Food Chemistry*, 2013, 138(2): 1967–1975.
- [31] CHEUNG I W Y, LICEAGA A M, LI CHAN E C Y. Pacific hake (*Merluccius productus*) hydrolysates as cryoprotective agents in frozen pacific cod fillet mince[J]. *Journal of Food Science*, 2009, 74(8): 588–594.
- [32] ZHANG Y, DONG M, ZHANG X, et al. Effects of inulin on the gel properties and molecular structure of porcine myosin: A underlying mechanisms study[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 108: 105974.
- [33] 周文娟. 鲢鱼酶解产物在冷冻鱼糜中的抗冻机理及其应用[D]. 长沙: 长沙理工大学, 2019. [ZHOU W J. Antifreeze mechanism of hydrolyzed products of silver carp in frozen surimi and its application[D]. Changsha: Changsha University of Science & Technology.]
- [34] SUN Q X, SUN F D, XIA X F, et al. The comparison of ultrasound-assisted immersion freezing, air freezing and immersion freezing on the muscle quality and physicochemical properties of common carp (*Cyprinus carpio*) during freezing storage[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2019, 51: 281–291.