

# 超声促进美拉德反应对金带细鲷鱼肉蛋白酶解物的修饰及潜在危害物形成的影响

王忠合<sup>1</sup>, 王军<sup>1</sup>, 傅力<sup>1</sup>, 卢彬<sup>2</sup>

(1. 韩山师范学院生命科学与食品科技学院, 广东潮州 521041)

(2. 新疆农业大学食品科学与药学院, 新疆乌鲁木齐 830052)

**摘要:** 本文采用超声波法促进金带细鲷鱼肉蛋白酶解物与葡萄糖间的美拉德修饰反应, 研究美拉德反应对酶解物功能特性、抗氧化性及潜在危害物形成的影响。结果表明: 超声功率或反应时间越高, 修饰产物中游离氨基含量越低, 接枝度越大, 超声处理能加快美拉德反应的速率, 且减少丙烯酰胺等美拉德反应潜在危害物的形成。功能特性分析表明, 超声处理能显著提高酶解物的溶解性和乳化性 ( $p < 0.05$ ), 同时, 体外模拟消化分析表明, 超声处理降低了酶解物的消化性。修饰产物的 DPPH 自由基清除力、羟自由基清除力、还原力和  $Fe^{2+}$  螯合力显著提高 ( $p < 0.05$ ), 而且超声修饰的能力和修饰物的特性均优于水浴法处理组。超声波促进美拉德修饰反应可提高金带细鲷鱼肉蛋白酶解物的功能特性和抗氧化活性, 并减少丙烯酰胺等美拉德反应潜在危害物的形成。

**关键词:** 金带细鲷; 美拉德反应; 超声波; 功能特性; 抗氧化性

文章编号: 1673-9078(2017)3-162-170

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.3.025

## Effect of Ultrasound-induced Maillard Reaction on Modification of Protein Hydrolysate from Yellow Stripe Trevally (*Selaroides leptolepis*) Fish Meat and Potential Hazards

WANG Zhong-he<sup>1</sup>, WANG Jun<sup>1</sup>, FU Li<sup>1</sup>, LU Bin<sup>2</sup>

(1. School of Life Science and Food Technology, Hanshan Normal University, Chaozhou 521041, China)

(2. College of Food Science and Pharmacy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

**Abstract:** Ultrasound was used to promote the Maillard reaction between protein hydrolysates of *Selaroides leptolepis* and glucose. The effect of the Maillard reaction on the functional properties and antioxidant activities of hydrolysates as well as formation of potentially harmful compounds were evaluated. The results showed that free amino group content decreased while grafting degree correspondingly increased with increasing ultrasound power or reaction time. Moreover, ultrasound treatment promoted the Maillard reaction and decreased the formation of potentially harmful compounds, such as acrylamide. Analysis of functional properties indicated that the ultrasound-induced Maillard reaction significantly enhanced the solubility and emulsifying capacity of hydrolysates ( $p < 0.05$ ). Additionally, *in vitro* digestion experiments showed that ultrasound treatment reduced the digestibility of hydrolysates. The 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl scavenging ability, reducing power, and  $Fe^{2+}$ -chelating ability of the modified products were significantly increased ( $p < 0.05$ ), and the modification capability of ultrasound and properties of modified products were better than those of the conventional water bath group. These results showed that the ultrasound-induced Maillard reaction could enhance the functional properties and antioxidant activity of protein hydrolysates of yellow stripe trevally and decrease the formation of acrylamide and other potentially harmful compounds.

**Key words:** *Selaroides leptolepis*; Maillard reaction; ultrasound; functional property; antioxidant activity

收稿日期: 2016-02-28

基金项目: 广东省教育厅特色创新项目 (2015KTSX088); 广东省高校优秀青年创新人才培养计划项目 (2013LYM0056); 韩山师范学院博士启动项目 (QD20140324); 韩山师范学院一般项目 (LY201306); 潮州市科技计划项目 (2013X05&2013X06)

作者简介: 王忠合 (1980-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 食品安全检测

通讯作者: 王军 (1981-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品加工与安全控制技术

美拉德反应可充分利用蛋白质的表面性能(空气/水或油/水界面的吸附能力)与还原糖较好的持水和增稠性能,改善蛋白质或酶解物的溶解性、乳化性、起泡性及热稳定性等功能特性,并提高其清除自由基能力、还原力和抑菌性等生物活性,是一种具有发展潜力的蛋白质改性技术<sup>[1,2]</sup>。但有研究指出蛋白质与糖的接枝反应效率并不高,并伴有副反应发生形成潜在危害物(如丙烯酰胺、5-羟甲基糠醛和 N<sup>ε</sup>-羧甲基赖氨酸或晚期糖基化终产物 AGEs 等)而影响接枝产物的安全性,丙烯酰胺是一种具有神经毒性的小分子化合物,在许多热加工的高淀粉类食品中的含量较高,常采用控制加工条件、消除前体物或加入添加剂等方法来降低其在食品中的形成量<sup>[3]</sup>。5-羟甲基糠醛(HMF)广泛存在于热加工食品、高含糖量的植物和焦糖色素中,主要来源于焦糖化反应和美拉德反应,据估计其日平均摄入量为 4~30 mg/人,体外实验表明高浓度的 HMF 在磺基转移酶的作用下转变为毒性更大的 5-磺基甲基糠醛而引起 DNA 损失。由于 HMF 广泛存在于日常饮食中和摄入量较高而其安全性引起了广泛关注,动物实验表明每天摄入量在 80~100 mg/kg 体重范围内无不利影响<sup>[4]</sup>,因此一般食品中 HMF 的最大暴露量低于 0.5 mg/kg 体重,其安全系数大于 100,但是焦糖色素中 HMF 的含量高达 3.37%,安全系数较小,其安全风险需深入分析。另外,美拉德接枝反应会降低蛋白质消化性和赖氨酸生物利用率,从而导致食品营养价值的损失<sup>[5]</sup>。

超声波作为一种新型的食品加工技术,具有空化作用,可产生机械性断键作用和机械剪切力而强化提取过程或加速反应,不仅可以改变蛋白质的构象和特性<sup>[6,7]</sup>,而且还可以改善反应条件,加快反应速度,提高反应产率,较好地保留食品自身特性等优点。目前有关超声促进美拉德反应的研究,主要集中于反应工艺条件的优化及结构变化分析<sup>[8]</sup>,然而有关超声促进美拉德反应产物的特性研究及潜在危害物形成方面的研究较少。本文以金带细鲈鱼肉蛋白酶解物与葡萄糖反应体系为研究对象,探讨超声波促进美拉德修饰反应对酶解物功能特性及抗氧化性的影响,研究超声处理对体系中 HMF 和丙烯酰胺等美拉德反应潜在危害物形成的影响,以期超声波技术在蛋白质或多肽改性方面的应用提供一定的理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

金带细鲈:购于当地市场,去除鱼头和内脏,洗

净沥干后用搅碎机搅成肉糜,贮存于-20℃冰箱备用;大豆色拉油:购于当地超市;胰蛋白酶(4000 U/g):广东恒凯生物试剂有限公司;胃蛋白酶(3000~3500 NFU/mg)、胰酶(5×USP)、亚硝基铁氰化钾、十二烷基硫酸钠:生工生物工程(上海)有限公司;菲洛嗪、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)、丙烯酰胺、5-羟甲基糠醛(HMF)、色谱级甲醇和 L-亮氨酸:美国 Sigma 公司;葡萄糖、三氯乙酸、铁氰化钾、水杨酸、三氯化铁、氯化亚铁和乙醇等试剂均为分析纯。

### 1.2 主要仪器和设备

JY99-2D 型超声波细胞粉碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司;UV-2800 型紫外可见分光光度计,尤尼科(上海)仪器有限公司;FD-1D-50 型冷冻干燥机,北京博医康实验仪器有限公司;2-16P 型离心机,美国 Sigma 公司;PHSJ-4A 型 pH 计,上海仪电科学仪器股份有限公司;DF-101S 型恒温加热磁力搅拌器,天津予华仪器有限公司;DE-100LB 型高剪切分散乳化机,南通克莱尔混合设备有限公司;KQ-300GVDV 型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;Waters Sep-pak C<sub>18</sub> 固相萃取柱,沃特世科技(上海)有限公司;Agilent 1200 型高效液相色谱仪、Agilent 1200 型 UV-Vis 检测器和 Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 型色谱柱均为安捷伦科技(中国)有限公司。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 鱼肉蛋白酶解物的制备

取鱼糜按质量比 1:3 的比例与水混合后,调节溶液 pH 和温度至胰蛋白酶的最适条件(pH 为 7.0,温度为 50℃),加入 1%的胰蛋白酶(E/S=1:100)酶解 30 min 后取样,在 100℃灭酶 10 min,将酶解液于 10000 r/min 下离心 10 min,取上清液冷冻干燥,备用。采用 TNBS 法<sup>[10]</sup>测得鱼肉蛋白酶解物的水解度为 10.8%。

#### 1.3.2 超声促进美拉德反应修饰酶解物

将制备好的酶解物溶于蒸馏水中制成浓度为 25 mg/mL 的溶液,按酶解物与葡萄糖质量比 1:2 加入葡萄糖,用 1 mol/L NaOH 溶液调节 pH 至 9.0,最后取 30 mL 混合物置于烧杯中,超声探头深入液面 0.5 cm 处,分别在超声输出功率为 200 W 和 400 W 下处理 0、30、60、90、120、180 和 240 min,温度设定在 60±2℃,采用循环式 4℃水浴控温。反应完毕后,取出立即置于冰水浴中冷却至室温,测定 pH 值,然后置于-18℃冷冻备用。同时按上述条件制备酶解物和葡萄糖的混合物,以 60℃和 100℃水浴未超声处理作为对照。以

MRPs-200 和 MRPs-400 分别表示在 200 W 和 400 W 超声下处理所得的美拉德反应产物, 对照-60 和对照-100 分别表示在 60 °C 和 100 °C 水浴中处理鱼肉蛋白酶解物和葡萄糖的产物。

### 1.3.3 接枝度(DG)的测定

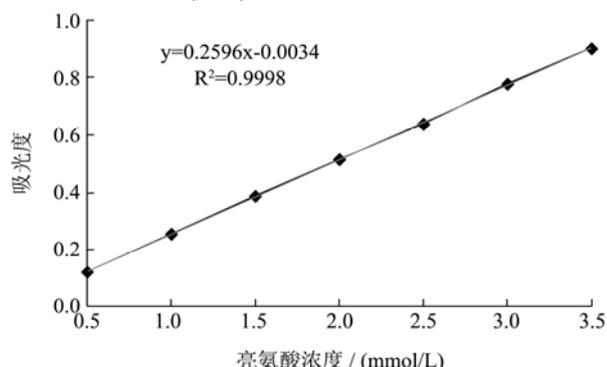


图1 游离氨基含量测定的标准曲线

Fig.1 Standard curve for determination of free amino groups

取样液 125 μL, 加入 0.2125 mol/L、pH 8.2 的磷酸盐缓冲液 2.0 mL 和 0.01% 的 TNBS 溶液 1.0 mL, 混匀, 置于 50 °C 水浴中暗处反应 30 min。反应后加入 0.1 mol/L 的亚硫酸钠溶液 2.0 mL 终止反应, 室温下冷却 15 min, 于 420 nm 处测定吸光度。以 L-亮氨酸为标准品使用外标法绘制标准曲线 (如图 1), 浓度梯度为: 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 和 3.5 mmol/L, 求得游离氨基的含量, 按照下式<sup>[8]</sup>计算接枝度 DG:

$$DG(\%) = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100$$

式中,  $C_0$  和  $C_1$  分别为接枝反应前后溶液中游离氨基的含量, mol/L。

### 1.3.4 丙烯酰胺和 HMF 的测定

HMF 的测定: 根据 Rufián-Henares<sup>[9]</sup>的方法, 略作修改。将样品过 0.45 μm 滤膜后, 用高效液相色谱法测量, 色谱条件: Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 型色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温 30 °C, 流动相为 90% 水+10% 甲醇, 流速为 1.0 mL/min, 检测波长 280 nm, 进样体积 20 μL。使用外标法绘制标准曲线, 浓度梯度为: 9.94、29.83、49.72、69.61 和 89.50 μg/mL, 标准曲线和色谱图如图 2 所示。

丙烯酰胺的测定: 根据文献<sup>[10]</sup>的方法, 略作修改。取 1 mL 样液以 1 滴/s 加入固相萃取柱 (使用前依次用 1 mL 甲醇和 1 mL 水活化) 中, 收集除第一滴外的流出液, 用氮气吹干后再用 1 mL 水溶解, 过 0.45 μm 滤膜后用高效液相色谱系统测定含量。色谱条件: Agilent 1200 型高效液相系统, Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 型色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温 20 °C,

流动相为水-甲醇 (体积比 90:10), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长 210 nm, 进样体积 15 μL。质谱条件: 阳离子电喷雾电离源 (ESI<sup>+</sup>), 质谱扫描方式为多反应监测 (Multiple Reaction Monitor, MRM) 方式, 毛细管电压 1.0 kV, 锥孔电压 20 V; 离子源温度 110 °C; 射频透镜 1 (RF Lens 1) 的电压为 30.8 V; 脱溶剂气温度 400 °C, 脱溶剂气流量 600 L/h; 锥孔气流量 50 L/h; 碰撞室入口电压 2.0 V, 出口电压 3 V; 碰撞能量 20 eV; 碰撞腔真空度  $2.2 \times 10^{-3}$  Torr。监测离子为 AA 母离子  $m/z$  71.7, 子离子  $m/z$  54.8; 定量离子  $m/z$  54.8。以峰面积与丙烯酰胺的质量浓度作标准曲线, 如图 3 所示, 以保留时间和各对离子的响应强度的比例作为定性标准。

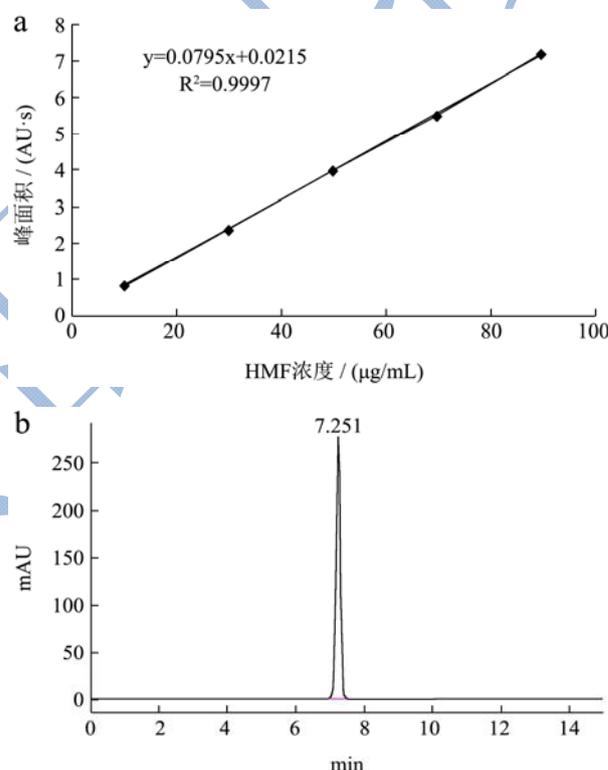
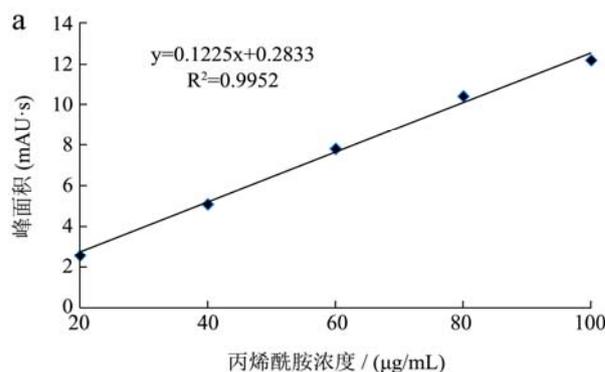


图2 5-羟甲基糠醛(HMF)测定的标准曲线(a)和液质色谱图(b)

Fig.2 Standard curve (a) and LC-MS chromatograms (b) for determination of 5-hydroxymethylfurfural (HMF)



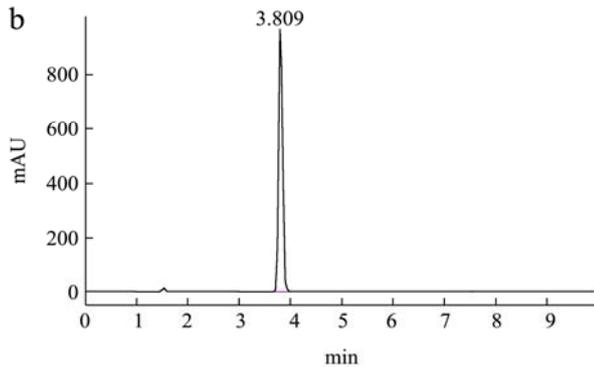


图3 丙烯酰胺测定标准曲线(a)和液质色谱图(b)

Fig.3 Standard curve (a) and LC-MS chromatograms (b) for determination of acrylamide

### 1.3.5 功能特性分析

**溶解性:** 分别取各组样品溶液 15 mL, 在 30 °C 水浴中搅拌 30 min(搅拌过程中测定并保持 pH), 于 6000 r/min 的转速离心 20 min, 取上清液采用微量凯氏定氮法消化-水杨酸比色法<sup>[11]</sup>测定上清液中蛋白质的含量, 根据总蛋白的含量计算溶解性, 结果表示为上清液中蛋白浓度占相应的总蛋白浓度的百分比。

**乳化性:** 采用经典的比浊法<sup>[12]</sup>测定乳化特性, 分别取各组样品溶液 15 mL, 加入 0.6 mL 大豆色拉油, 经高速搅拌器于 10000 r/min 下处理 1 min, 分别在搅拌后从测试管底部取样 50 μL, 与 5.0 mL、0.1% SDS 溶液混匀, 在波长 500 nm 处测定吸光度, 以 0.1% SDS 溶液作空白。乳化性指数 (EAI, m<sup>2</sup>/g) 的计算公式如下:

$$EAI(m^2/g) = \frac{2 \times 2.303 \times A_0 \times DF}{C \times \varphi \times (1 - \theta) \times 10000}$$

式中, DF: 稀释倍数, DF=100; C: 为样品浓度, g/mL;  $\varphi$ : 光程,  $\varphi=1$  cm;  $\theta$ : 乳液中油相所占比例,  $\theta=0.25$ ;  $A_0$ : 吸光度。

**体外消化性:** 分别取超声处理 3 h 和水浴-60 对照组的溶液各 20 mL, 用 0.02 mol/L 盐酸调至 pH 2.0, 加入 1 mL 胃蛋白酶液(E/S=1/250), 37 °C 水浴中体外模拟胃液消化处理 2 h, 取样采用微量凯氏定氮法消化-水杨酸比色法<sup>[11]</sup>测定蛋白质的含量; 其余部分用 1 mol/L NaOH 溶液将 pH 调至 7.0, 装入透析袋(截留分子量 10 ku)中, 再加入 1 mL 胰酶(E/S=1/50), 将其置于装有 100 mL、0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 8.0) 中进行体外模拟肠液消化 2 h, 每隔 0.5 h 收集消化产物, 采用微量凯氏定氮法消化-水杨酸比色法<sup>[11]</sup>测定蛋白质的含量, 按下式<sup>[13]</sup>计算样品的体外消化率 DR:

$$DR(\%) = \frac{S}{T} \times 100$$

式中, S 为上清液中的蛋白质含量, μg; T 为样品中的蛋

白质总量, μg。

### 1.3.6 抗氧化性分析

将各组修饰产物用蒸馏水稀释 10 倍测定 DPPH 自由基清除力、羟自由基清除力和还原力, 稀释 50 倍测定 Fe<sup>2+</sup>螯合力。

**DPPH 自由基清除率:** 分别取 2 mL 不同浓度的反应物, 与 2 mL 浓度为 0.15 mmol/L 的 DPPH 乙醇溶液混合均匀, 室温暗处反应 30 min 后, 于 517 nm 处测定吸光度  $A_s$ ; 以 2 mL DPPH 与 2 mL 无水乙醇溶液混合后为空白对照组, 测定吸光度  $A_c$ ; 以 2 mL 不同浓度的样液与 2 mL 无水乙醇溶液混合测定吸光度  $A_b$ 。按照下式<sup>[14]</sup>计算 DPPH 的清除率  $P_1$ :

$$P_1(\%) = \left(1 - \frac{A_s - A_b}{A_c}\right) \times 100$$

**羟自由基清除率:** 分别取 1 mL 不同浓度的反应物, 加入 9 mmol/L FeSO<sub>4</sub> 溶液 0.25 mL 和 9 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液 0.25 mL, 混匀后, 加入 1.5 mL 蒸馏水。最后加 1 mL、8.8 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 启动反应, 在 37 °C 反应 30 min, 以蒸馏水为参比, 在 510 nm 下测定各样液的吸光度  $A_s$ ; 以 1 mL 蒸馏水代替样液, 测定在 510 nm 处的吸光度  $A_c$ ; 以 1 mL 蒸馏水代替 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 测定在 510 nm 处的吸光度  $A_b$ 。分别按照下式<sup>[14]</sup>计算羟自由基清除率  $P_2$ :

$$P_2(\%) = \left(1 - \frac{A_s - A_b}{A_c}\right) \times 100$$

**还原力:** 分别取 2 mL 不同浓度的反应物, 与 2 mL 磷酸盐缓冲液 (0.2 mol/L、pH 6.6) 和 2 mL、1% 铁氰化钾溶液, 混合均匀后于 50 °C 反应 20 min。取出加入 2 mL、10% 三氯乙酸终止反应, 5000 r/min 离心 10 min。取上清液 2 mL, 加入去离子水 2 mL 和 FeCl<sub>3</sub> 0.5 mL, 混匀后静置 10 min, 在 700 nm 处检测吸光度, 吸光度的大小表示还原力的强弱<sup>[15]</sup>。

**Fe<sup>2+</sup>螯合力:** 分别取 1 mL 不同浓度的反应物, 与 1.85 mL 去离子水和 0.05 mL、2 mmol/L 的 FeCl<sub>2</sub> 溶液混合均匀, 室温静置 30 s, 再加入 5 mmol/L 菲洛嗪溶液 0.1 mL, 室温下静置 10 min, 3000 r/min 离心 5 min 后于 562 nm 处测定吸光度  $A_s$ 。以 1 mL 去离子水代替样液, 测定在 562 nm 处的吸光度  $A_c$ ; 以 0.1 mL 去离子水代替菲洛嗪, 测定 562 nm 处的吸光度  $A_b$ 。按照下式<sup>[14]</sup>计算螯合力  $P_3$ :

$$P_3(\%) = \left(1 - \frac{A_s - A_b}{A_c}\right) \times 100$$

### 1.4 数据处理

试验重复测定 3 次, 结果表示为平均值±标准偏差 SD。数据统计分析采用 SPSS 17.0 软件进行一维方差分析(one-way ANOVA), 差异显著性采用 Duncan (邓肯) 检验, 检验水平  $p < 0.05$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 超声处理对酶解物功能特性的影响

选用金带细鲈鱼肉蛋白酶解物与葡萄糖反应体系为研究对象, 探讨超声功率和处理时间诱导的美拉德反应对酶解物功能特性的影响, 实验结果如图 4~图 6 所示。

#### 2.1.1 溶解性

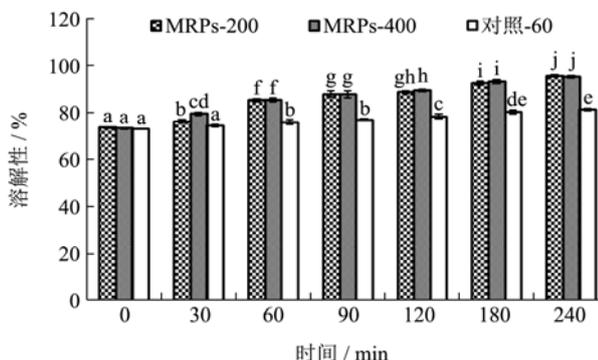


图 4 超声处理和美拉德反应对酶解物溶解性的影响

Fig.4 Effect of ultrasonic treatment and Maillard reaction on solubility of hydrolysates

注: 图中标记不同的小写字母表示差异显著,  $p < 0.05$ , 下同。

由图 4 可知, 随着超声处理时间的增加, 酶解物的溶解度逐渐升高并趋于平缓, 超声功率分别为 200 W 和 400 W 下处理 180 min 后酶解物的溶解度各增加了 25.7%和 27.3%, 且不同功率的超声波在相同处理时间内无显著差异 ( $p > 0.05$ )。水浴处理组酶解物的溶解度显著低于在相同时间内超声处理组的溶解度 ( $p < 0.05$ ), 60 °C 水浴中处理 180 min 后酶解物的溶解度仅增加了 9.5%, 这主要是由于相同的反应温度内在超声场的作用下, 超声波产生的空化效应和机械效应促进了酶解物与葡萄糖间的接枝反应, 这与研究报道的超声波可促进模式体系中 2-糠酰甲基赖氨酸等美拉德反应初级产物形成的结论一致<sup>[16]</sup>。美拉德反应可促进蛋白质或多肽的溶解度主要是将糖基通过共价键连接到蛋白质分子中, 所连接的糖基分子中羟基的亲水性能够显著增加蛋白质或多肽的溶解性。

#### 2.1.2 乳化性

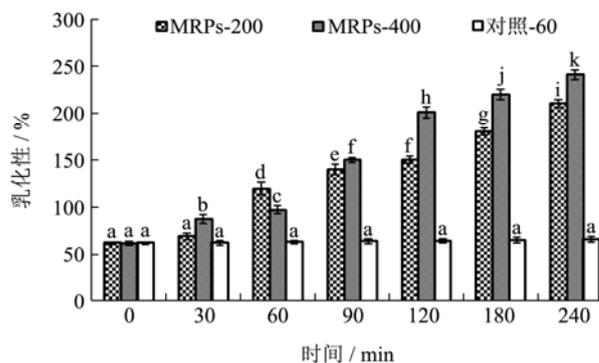


图 5 超声处理和美拉德反应对酶解物乳化性的影响

Fig.5 Effect of ultrasonic treatment and Maillard reaction on emulsifying activity of hydrolysates

由图 5 可知, 随着超声处理时间的增大酶解物的乳化性显著增大 ( $p < 0.05$ ), 且不同功率的超声波在相同处理时间内的产物乳化性也存在显著差异 ( $p < 0.05$ ), 酶解物在功率为 200 W 和 400 W 下超声处理 180 min 后乳化性分别增加 1.9 倍和 2.5 倍。超声诱导美拉德反应促进了酶解物的乳化性, 其原因可能是美拉德反应将亲水性的糖基连接到酶解物上增大了其表面活性, 而且超声波的空化效应破坏了蛋白质的高级结构, 变得疏松, 原来包裹在分子中的疏水基团暴露出来, 表面疏水性增加, 促进蛋白分子与水形成油-水界面膜, 界面张力降低, 从而也可增强其乳化性。水浴法对照组制备的产物乳化性变化不大 ( $p > 0.05$ ), 这可能是由于反应温度较低, 接枝度小, 反应程度较低, 酶解物中接入的糖链有限, 因而乳化性变化也不大。

#### 2.1.3 体外消化性

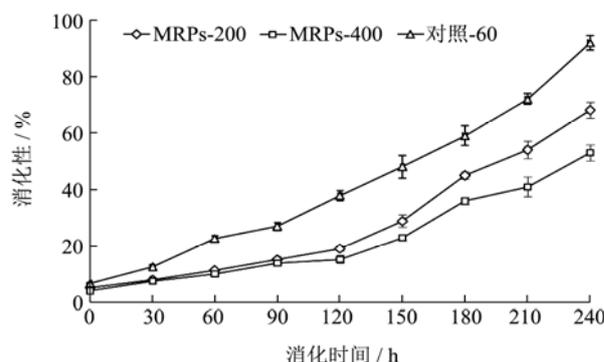


图 6 超声处理和美拉德反应对酶解物体外消化性的影响

Fig.6 Effect of ultrasonic treatment and Maillard reaction on in vitro digestibility of hydrolysates

由图 6 可知, 在模拟胃液消化阶段, 各组产物的消化率逐渐增加, 超声功率分别为 200 W 和 400 W 下处理 3 h 的接枝产物的消化率显著低于水热法处理组的消化率 ( $p < 0.05$ ), 其消化率比水热法处理组的消化率下降 17.18%和 19.93%, 但是不同超声功率处理的

接枝产物的消化率无显著差异 ( $p < 0.05$ ), 这可能是由于超声波处理可促进酶解物与葡萄糖的糖基化接枝反应, 而胃蛋白酶属于肽链内切酶, 其专一性程度较大, 主要作用于芳香族氨基酸的羧基基团形成的肽键, 而无法降解糖基化接枝反应形成的修饰产物, 因而在模拟胃液消化过程中超声波处理的美拉德反应修饰产物的消化率较低。在模拟肠液消化阶段, 水热法处理组的消化率显著高于超声处理组的消化率 ( $p < 0.05$ ), 其消化率比 MRP<sub>s</sub>-200 和 MRP<sub>s</sub>-400 组的消化率高 22.45% 和 36.32%, 这与模拟胃液消化阶段超声处理组接枝产物消化率较低的变化趋势一致, 而超声功率为 400 W 下处理的接枝产物的消化率显著低于 200 W 下处理组的消化率 ( $p < 0.05$ ), 这主要是由于超声功率增加美拉德接枝反应程度增加, 消化性也降低。各组修饰产物的消化率在模拟肠液消化过程中的消化率增加较快, 这主要是由于模拟肠液中的胰酶为多种酶的混合物, 含有内切酶和外切酶, 胰蛋白酶可切断赖氨酸和精氨酸残基中羧基侧的肽键, 胰凝乳蛋白酶可切断侧链具有疏水性氨基酸的肽键, 羧肽酶是可专一性地从肽链 C 端逐个降解释放出游离氨基酸的外切酶<sup>[13]</sup>。

## 2.2 超声处理对酶解物抗氧化性的影响

### 2.2.1 清除 DPPH 自由基能力

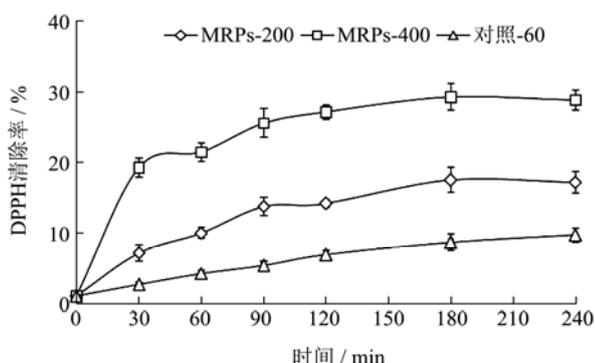


图 7 超声处理和美拉德反应对酶解物清除 DPPH 自由基能力的影响

Fig.7 Effect of ultrasonic treatment and Maillard reaction on DPPH radical-scavenging ability of hydrolysates

由图 7 可知, 随着处理时间的延长, 美拉德反应产物清除 DPPH 自由基的能力逐渐增大后趋于平缓, 超声处理反应产物清除 DPPH 自由基的能力显著高于相同条件下水浴对照组清除 DPPH 自由基的能力 ( $p < 0.05$ ), 在反应时间为 240 min 时 MRP<sub>s</sub>-400、MRP<sub>s</sub>-200 和水浴对照组清除 DPPH 自由基的能力分别达到了 28.78%、17.14% 和 9.68%, 美拉德反应的过程中形成的中间产物可作为氢的供体, 可有效清除自由基, 而超声处理可促进美拉德反应程度, 因而超声

处理可增加接枝产物清除 DPPH 自由基的能力。

### 2.2.2 清除羟自由基的能力

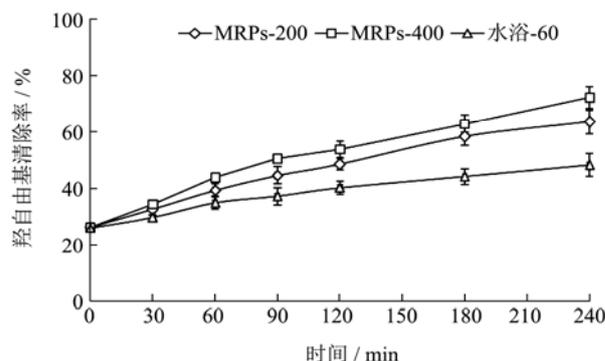


图 8 超声处理和美拉德反应对酶解物清除羟自由基能力的影响

Fig.8 Effect of ultrasonic treatment and Maillard reaction on hydroxyl radical-scavenging activity of hydrolysates

由图 8 可知, 随着反应时间的延长, 各组接枝产物清除羟自由基的能力逐渐增加, 其中反应时间为 240 min 时 MRP<sub>s</sub>-200 和 MRP<sub>s</sub>-400 比水浴对照组的羟自由基清除率分别增加 15.23% 和 23.88%, 其变化趋势和机理与酶解物清除 DPPH 自由基的变化一致。

### 2.2.3 还原力

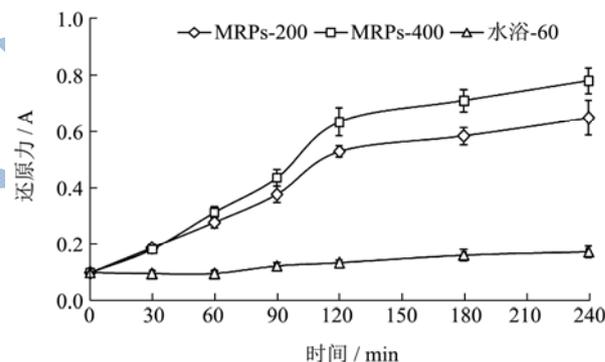


图 9 超声处理和美拉德反应对酶解物还原力的影响

Fig.9 Effect of ultrasonic treatment and Maillard reaction on reducing power of hydrolysates

由图 9 可知, 随着反应时间的延长, MRP<sub>s</sub>-200 和 MRP<sub>s</sub>-400 的还原力显著增大, 在反应时间为 240 min 时, 吸光度值分别达到 0.650 和 0.781, 这主要是由于超声处理可促进酶解物与葡萄糖间的美拉德反应形成较多的活性中间产物, 可螯合金属离子而终止自由基链式反应, 从而具有较强的金属还原力。由于金带细鲑鱼肉蛋白酶解物具有一定的供氢和螯合金属离子的能力, 可终止自由基链式反应, 从而显现出一定的金属还原力<sup>[17]</sup>, 而水浴对照组的反应程度较低, 形成的美拉德反应接枝产物较少, 因而还原力无明显变化 ( $p > 0.05$ )。

### 2.2.4 螯合 Fe<sup>2+</sup> 能力

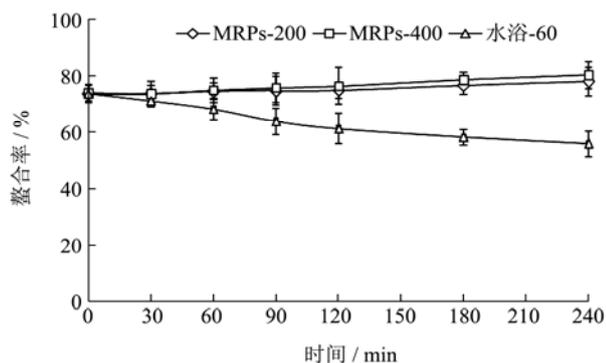


图 10 超声处理和美拉德反应对酶解物螯合 Fe<sup>2+</sup>能力的影响  
Fig.10 Effect of ultrasonic treatment and Maillard reaction on Fe<sup>2+</sup>-chelating ability of hydrolysates

由图 10 可知,随着超声处理时间的延长,接枝产物的 Fe<sup>2+</sup>螯合力呈现逐渐增加的趋势,但其螯合能力变化较小,分别于超声功率 200 W 和 400 W 下处理 240 min 后螯合率仅增加 4.34%和 6.37%,这可能是由于超声促进美拉德反应形成类黑精等具有螯合亚铁离子的反应产物,而水解产物侧链上的氨基和羧基等具有络合能力的活性基团因与糖类反应而影响其螯合能

表 1 超声处理和美拉德反应对接枝度的影响

Table 1 Effect of ultrasonic treatment and Maillard reaction on degree of grafting (%)

时间/min	30	60	90	120	150	180	240
MRPs-200	4.54±0.18 <sup>aBC</sup>	9.40±0.43 <sup>bB</sup>	11.98±0.29 <sup>cC</sup>	14.23±1.08 <sup>dC</sup>	16.02±0.85 <sup>dC</sup>	17.99±1.59 <sup>eB</sup>	18.03±1.72 <sup>eB</sup>
MRPs-400	5.65±0.20 <sup>dD</sup>	11.09±0.67 <sup>bC</sup>	14.21±0.34 <sup>cD</sup>	17.51±1.45 <sup>dD</sup>	18.93±0.93 <sup>deD</sup>	20.47±1.21 <sup>eC</sup>	20.62±1.06 <sup>eC</sup>
对照-60	3.79±0.12 <sup>aA</sup>	5.11±0.72 <sup>bA</sup>	6.14±0.48 <sup>bcA</sup>	6.52±0.76 <sup>cdA</sup>	7.13±0.38 <sup>cdA</sup>	7.47±0.67 <sup>deA</sup>	8.58±0.96 <sup>eA</sup>
对照-100	5.21±0.81 <sup>aCD</sup>	9.03±0.25 <sup>bB</sup>	9.78±0.31 <sup>bb</sup>	10.23±1.06 <sup>bb</sup>	10.35±0.58 <sup>bb</sup>	9.65±1.16 <sup>ba</sup>	9.71±0.77 <sup>ba</sup>

注:标注不同的小写字母表示同一行中差异显著,  $p < 0.05$ ; 标注不同的大写字母表示同一列中差异显著,  $p < 0.05$ 。

表 2 超声处理和美拉德反应对丙烯酰胺形成量的影响

Table 2 Effect of ultrasonic treatment and Maillard reaction on acrylamide formation (µg/mL)

时间/min	30	60	90	120	150	180	240
MRPs-200	-	-	0.17±0.03 <sup>aA</sup>	0.56±0.03 <sup>ba</sup>	1.35±0.06 <sup>ca</sup>	1.41±0.08 <sup>cb</sup>	1.56±0.07 <sup>db</sup>
MRPs-400	-	0.21±0.02 <sup>aA</sup>	0.43±0.04 <sup>bb</sup>	1.39±0.05 <sup>cb</sup>	1.74±0.06 <sup>db</sup>	1.89±0.09 <sup>cc</sup>	1.94±0.05 <sup>cc</sup>
对照-60	-	-	-	-	-	0.51±0.03 <sup>aA</sup>	0.82±0.06 <sup>ba</sup>
对照-100	0.47±0.05 <sup>a</sup>	0.98±0.06 <sup>bb</sup>	2.75±0.16 <sup>cC</sup>	3.25±0.21 <sup>dC</sup>	3.80±0.10 <sup>eC</sup>	4.25±0.13 <sup>dD</sup>	6.23±0.34 <sup>dD</sup>

注:表中“-”表示未检出;标注不同的小写字母表示同一行中差异显著,  $p < 0.05$ ; 标注不同的大写字母表示同一列中差异显著,  $p < 0.05$ 。

由表 1 可知,超声波处理过程中游离氨基的含量逐渐下降,接枝度逐渐增大,且随着超声时间和超声功率的增加接枝度也增大,超声功率分别为 200 W 和 400 W 下处理后的接枝度差异显著 ( $p < 0.05$ )。而采用水浴法处理的对照组中产物的接枝度随着处理时间的增加呈现先增大后趋于平缓的趋势,且处理时间超过 90min 后接枝度明显低于相同处理时间下超声波组的接枝度 ( $p < 0.05$ ),反应 240 min 后超声波处理组比水浴组的接枝度高 8.32~12.04%,这主要是由于美拉德

力,这几种相反作用的影响下导致接枝产物螯合 Fe<sup>2+</sup>的能力变化不大。水浴对照组的 Fe<sup>2+</sup>螯合力随着处理时间的增加呈现逐渐下降的趋势,这可能是由于水处理影响酶解物的结构和具有络合能力的活性基团,同时,水浴处理组美拉德反应程度低,形成的类黑精等具有一定络合能力的产物较少,因而酶解物螯合 Fe<sup>2+</sup>的能力呈现下降的趋势。

### 2.3 超声处理对酶解物中丙烯酰胺和 HMF 形成的影响

丙烯酰胺和 HMF 是美拉德修饰反应中形成的两种潜在危害物,对消费者的身体健康存在一定的风险,近年来许多研究者采用不同的加工方法或改变加工条件等措施抑制其在食品中的形成,本文采用的超声波促进美拉德修饰反应对金带细鲑鱼肉蛋白酶解物接枝度的影响如表 1 所示,对酶解物中丙烯酰胺和 HMF 形成的影响如表 2 所示。

反应的初期  $\alpha$ -氨基或赖氨酸残基上的  $\epsilon$ -氨基与葡萄糖的羰基发生反应,造成高活性的游离氨基减少,接枝度增大,然而反应进行到一定阶段后可参与反应的游离氨基数不变或下降,从而引起接枝度趋于稳定,但是超声波处理可改变蛋白质的高级结构使得可参与反应的游离氨基增加,同时还可改变反应的活化能,从而提高接枝度<sup>[16]</sup>。

由表 2 可知,随着反应时间的延长,产物中丙烯酰胺的形成量逐渐增大,且随着超声功率和水浴温度

的增加而显著增大 ( $p < 0.05$ ), 采用功率 200 W 的超声处理过程中丙烯酰胺的形成量远低于水浴 100 °C 下的形成量 ( $p < 0.05$ ), 反应初期两种处理方法制备的产物接枝度无显著差异 ( $p > 0.05$ ), 但是处理时间超过 90 min 后 200 W 超声处理组的接枝度远大于水浴 100 °C 组的接枝度 ( $p < 0.05$ ), 这表明超声促进美拉德反应是一种高效并可减少潜在危害物形成的修饰方法。超声处理组和水浴对照组在反应过程中均未检测到 HMF 的形成, 这可能是因为反应温度是影响 HMF 形成的主要因素<sup>[18]</sup>, 而较低的反应温度可减少 HMF 和丙烯酰胺的形成, 从而提高接枝修饰产物的安全性。

### 3 结论

3.1 功能特性研究表明, 金带细鲈鱼肉蛋白酶解物经超声促进美拉德修饰反应后溶解性和乳化性增大, 且显著高于相同时间处理下水浴对照组的溶解性和乳化性 ( $p < 0.05$ ), 而超声促进美拉德反应修饰的酶解物的体外消化性低于水浴组的消化性 ( $p < 0.05$ )。

3.2 抗氧化性研究表明, 与未糖基化的酶解物相比, 超声促进美拉德修饰反应提高了其 DPPH 自由基清除能力、羟自由基清除能力、还原力和  $Fe^{2+}$  螯合力, 而水浴法处理则降低了酶解物的  $Fe^{2+}$  螯合力。

3.3 随着超声功率和反应时间的增加, 美拉德反应体系中游离氨基含量逐渐下降, 接枝度逐渐增加, 各组样品中均未检测到 HMF 形成, 超声促进美拉德反应修饰的产物中丙烯酰胺的含量也是随着超声功率和反应时间的增加而增大, 低功率的超声处理可显著提高酶解物的接枝度并减少丙烯酰胺等美拉德反应潜在危害物的形成 ( $p < 0.05$ )。

### 参考文献

- [1] Oliver C M, Melton L D, Stanley R A. Creating proteins with novel functionality via the Maillard reaction: A review [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2006, 46(4): 337-350
- [2] 迟玉杰, 张波, 李冰, 等. 超声波辅助 7S-麦芽糊精接枝反应的响应面法优化[J]. *农业机械学报*, 2013, 44(11): 195-223  
CHI Yu-jie, ZHANG Bo, LI Bing, et al. Optimization of ultrasound-assisted 7S-maltodextrin graft reaction by response surface methodology [J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2013, 44(11): 195-223
- [3] Zhang Y, Zhang Y. Formation and reduction of acrylamide in Maillard reaction: A review based on the current state of knowledge [J]. *Critical Reviews in Food Science and*

- Nutrition*, 2007, 47(5): 521-542
- [4] Abraham K, Gürtler R, Berg K, et al. Toxicology and risk assessment of 5-hydroxymethylfurfural in food [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2011, 55(5): 667-678
- [5] Erbersdobler H F, Somoza V. Forty years of furosine-forty years of using Maillard reaction products as indicators of the nutritional quality of foods [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2007, 51(4): 423-430
- [6] Arzeni C, Martinez K, Zema P, et al. Comparative study of high intensity ultrasound effects on food proteins functionality [J]. *Journal of Food Engineering*, 2012, 108(3): 463-472
- [7] Stanic-Vucinic D, Prodic I, Apostolovic D, et al. Structure and antioxidant activity of  $\beta$ -lactoglobulin-glycoconjugates obtained by high-intensity-ultrasound-induced Maillard reaction in aqueous model systems under neutral conditions [J]. *Food Chemistry*, 2013, 138(1): 590-599
- [8] 王忠合, 王军, 陈长流, 等. 超声波辅助酶解豌豆分离蛋白的动力学及酶解物功能特性研究[J]. *中国食品学报*, 2015, 15(4): 103-109  
WANG Zhong-he, WANG Jun, CHEN Chang-liu, et al. Ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis kinetics of pea protein isolate and functional properties of hydrolysates [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2015, 15(4): 103-109
- [9] Rufián-Henares J A, Delgado-Andrade C. Effect of digestive process on Maillard reaction indexes and antioxidant properties of breakfast cereals [J]. *Food Research International*, 2009, 42(3): 394-400
- [10] 赵榕, 邵兵, 赵婕, 等. 液相色谱-电喷雾质谱/质谱法测定高温烹制的淀粉类食品中的丙烯酰胺[J]. *色谱*, 2005, 23(3): 289-291  
ZHAO Rong, SHAO Bing, ZHAO Jie, et al. Determination of acrylamide in heated starchy food by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2005, 23(3): 289-291
- [11] Choi S J, Kim H J, Park K H, et al. Molecular characteristics of ovalbumin-dextran conjugates formed through the Maillard reaction [J]. *Food Chemistry*, 2005, 92(1): 93-99
- [12] Thiansilakul Y, Benjakul S, Shahidi F. Functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from round scad (*Decapterus maruadsi*) [J]. *Food Chemistry*, 2007, 103(4): 1385-1394
- [13] Zheng L, Ren J, Su G, et al. Comparison of *in vitro* digestion

- characteristics and antioxidant activity of hot-and cold-pressed peanut meals [J]. Food Chemistry, 2013, 14(4): 4246-4252
- [14] 王军,王忠合,宋凤艳,等.糖基化反应对鸡蛋清蛋白与低聚麦芽糖交联物活性和功能性的影响[J].现代食品科技, 2014,30(10):22-29,95  
WANG Jun, WANG Zhong-he, SONG Feng-yan, et al. Influence of glycation on biological activity and functional properties of egg white protein-maltooligosaccharide conjugation [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(10): 22-29, 95
- [15] Limsuwanmanee J, Chaijan M, Manurakchinakorn S, et al. Antioxidant activity of Maillard reaction products derived from stingray (*Himantura signifier*) non-protein nitrogenous fraction and sugar model systems [J]. LWT-Food Science and Technology, 2014, 57(2): 718-724
- [16] Corzo-Martínez M, Montilla A, Megias-Pérez R, et al. Impact of high-intensity ultrasound on the formation of lactulose and Maillard reaction glycoconjugates [J]. Food Chemistry, 2014, 157(8): 186-192
- [17] 卢彬,王忠合,傅力,等.金带细鲐鱼肉蛋白酶解物水解度与其抗氧化性和功能特性间的相互关系[J].食品工业科技, 2015,36(7):88-92,96  
LU Bin, WANG Zhong-he, FU Li, et al. Correlation between degree of hydrolysis and antioxidative activity or functional properties of yellow stripe trevally meat protein hydrolysates [J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(7): 88-92, 96
- [18] Ajandouz E H, Desseaux V, Tazi S, et al. Effects of temperature and pH on the kinetics of caramelisation, protein cross-linking and Maillard reactions in aqueous model systems [J]. Food Chemistry, 2008, 107(3): 1244-1252