

羟基自由基氧化体系对带鱼蛋白理化性质的影响

姜晴晴, 鲁珺, 胡玥, 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: 采用国标法测定新鲜带鱼基本营养成分和氨基酸组成, 并进行营养评价分析。新鲜带鱼中, 粗蛋白含量占干重的 88.19%, 各氨基酸评分 (AAS) 较高, 必需氨基酸指数 (EAAI) 为 1.64, 具有较高的营养价值。在模拟体系中测定脂肪氧化指标 2-硫代巴比妥酸 (TBARS) 值及蛋白氧化指标蛋白羰基、巯基含量等, 并通过凝胶电泳分析阐明脂肪氧化和蛋白氧化对蛋白质溶解性及消化性影响。随着氧化时间的延长, TBARS 值及蛋白羰基含量显著增加 ($p < 0.05$), 巯基含量先增加后减少, 氧化 1 h 时达到最大值。电泳图谱显示, 氧化后带鱼肌球蛋白重链发生交联聚集。随着氧化程度增加, 其蛋白盐溶性显著降低 ($p < 0.05$), 但带鱼蛋白体外消化率在氧化 1 h 后达到最大值 92.09%, 随后逐渐降低。羟基自由基氧化体系促进带鱼脂肪和蛋白质发生氧化, 蛋白盐溶性降低, 但适度氧化可提高蛋白质的体外消化率。

关键词: 营养评价; 蛋白氧化; 羟基自由基氧化体系; 带鱼

文章编号: 1673-9078(2015)5-116-123

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.5.019

Effect of a Hydroxyl Radical-generating System on the Characteristics of Proteins from Hairtail (*Trichiurus haumela*)

JIANG Qing-qing, LU Jun, HU Yue, 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: General nutritional components and amino acid composition from fresh hairtails were investigated by national standard methods. The results showed that in fresh hairtails, crude protein accounted for 88.19% of dry weight, the essential amino acid index (EAAI) was 1.64, and the amino acid score (AAS) was relatively high, implying high nutritional value. In the simulated system, the value of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), which is an indicator of lipid oxidation, as well as carbonyl and sulfhydryl content, which are indicators of protein oxidation, were measured. Additionally, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was used to explore the effect of lipid oxidation and protein oxidation on protein solubility and digestibility. With prolonged oxidation time, TBARS value and carbonyl content of myofibrillar proteins increased significantly ($p < 0.05$), while those of sulfhydryl content dropped after the initial increase and the peak value was reached after 1 h oxidation. The SDS-PAGE pattern showed that aggregation of myosin heavy chains occurred after oxidation. With increasing degree of oxidation, the solubility of proteinates decreased significantly ($p < 0.05$), while the *in vitro* protein digestibility of hairtail reached the highest value (92.09%) after 1 h of oxidation and then decreased gradually. The results indicated that the hydroxyl radical-generating system promoted lipid and protein oxidation in hairtail, and caused a decline in the solubility of proteinates, but moderate oxidation enhanced *in vitro* protein digestibility.

Key words: nutritional evaluation; protein oxidation; hydroxyl radical-generating system; hairtail

在过去几十年, 人们对脂类等食品组分的氧化进行了深入研究, 却忽视了蛋白质氧化在食品体系中的产生和可能造成的影响, 直至二十世纪九十年代中期

收稿日期: 2014-08-31

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: 水产化学方向

研究者才认识到蛋白质发生氧化后可能对肉品品质和人类健康产生影响^[1]。蛋白氧化会导致蛋白主链和氨基酸残基侧链的变化, 如肽主链的断裂, 氨基酸残基侧链的氧化修饰 (羰基化、羟基化等) 以及蛋白分子间交联物的形成等, 进而会引起营养品质及功能性质的下降, 降低了肉制品的品质及消费者的可接受性^[2]。Park 等^[3-4]比较分析了三种模拟体系中猪肉肌原纤维蛋白的变化, 发现在不同的氧化体系下肌原纤维蛋白

发生不同程度的变化,主要表现为羰基的形成,蛋白热稳定性下降以及蛋白交联聚集等,并且羟基自由基体系下蛋白更容易发生氧化,在羟基自由基氧化体系中随着氧化剂浓度的增加,半胱氨酸、甲硫氨酸以及酪氨酸含量显著下降。Ooizumi^[5]研究发现鸡胸蛋白氧化后肌球蛋白尾部易受羟基自由基的氧化,但 Xiong 等^[6]发现氧化的猪腹中肌球蛋白的头部和尾部都会受到氧化攻击而发生交联,而氧化对头部的影响相对较小。由于肌球蛋白交联类型的转变,适度氧化后猪肉肌原纤维蛋白的凝胶形成能力加强,但是研究发现形成的凝胶结构多孔,其持水性明显下降^[7]。

带鱼 (*Trichiurus haumela*) 又叫刀鱼、牙带鱼,是鱼纲鲈形目带鱼科动物,广泛分布于印度洋、太平洋沿岸,我国以东海分布居多。带鱼是我国沿海产量最高的一种经济鱼类,上个世纪,与小黄鱼、大黄鱼、乌贼一起,被称为“四大海产鱼类”。带鱼肉质细腻,口感鲜嫩,具有较高的营养价值,也是鱼糜制品的原料之一,因此蛋白品质对其商品价值有重要的影响。但由于其直立游泳的独特性,无法进行养殖,国外关于带鱼的研究相对较少。我国因东海、南海的资源优势,对带鱼的研究较国外多,但国内关于带鱼的研究多集中在带鱼的保鲜方式及贮藏条件等的比较方面^[8-11],关于氧化对带鱼蛋白影响的研究尚未见报道。本研究对新鲜带鱼进行营养评价,并在羟基自由基模拟体系中研究氧化对带鱼蛋白的影响,以期对带鱼资源进一步利用及其保鲜贮藏提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 原料

新鲜带鱼(重 400~425 g/条,体长 70~75 cm),2014 年 4 月购于浙江舟山水产码头。冰浴条件 30 min 内运至实验室,液氮喷淋快速冻结后于 -80 °C 贮藏。

1.2 主要仪器设备

L-8900 全自动氨基酸分析仪,日立公司;TGL20M 台式低速冷冻离心机,湖南凯达科学仪器有限公司;UV-2550 紫外分光光度计,日本岛津公司;MDF-382E (N) 三洋超低温冰箱,日本三洋电机株式会社;液氮喷淋装置,空气化工公司;EPS300 电泳仪,上海天能科技有限公司;HP-18 陶瓷封闭式恒温电炉,上海学森仪器有限公司;SRJX-4-13 马弗炉,上海沪粤明科学仪器有限公司;FSH-2 可调高速匀浆机,金坛市鸿科仪器厂;凯氏定氮装置,郑州市中原科技玻璃仪器厂,等。

1.3 试验方法

1.3.1 带鱼营养成分分析

1.3.1.1 水分、蛋白质、脂肪、灰分含量测定

水分含量按照 GB 5009.3-2010 中直接干燥法测定,在 105 °C 下干燥至恒重;蛋白质含量按照 GB 5009.5-2010 中凯氏定氮法测定,蛋白质换算系数为 6.25;脂肪含量按照 GB/T 5009.6-2003 中酸解法测定;灰分含量按照 GB 5009.4-2010 测定。以上测定每组至少重复三次。

1.3.1.2 氨基酸组成测定

采用盐酸水解法对样品进行预处理,用氨基酸自动分析仪测定。

1.3.1.3 蛋白质营养评价^[12]

参照 FAO/WHO (1973) 人体氨基酸需求模式计算氨基酸评分 (AAS) 和必需氨基酸指数 (EAAI)。由于色氨酸在检测过程中被破坏,因此未将其计算在内。AAS 与 EAAI 计算公式如下:

$$AAS = \frac{\text{样品中某必需氨基酸含量}}{\text{FAO/WHO 模式中该必需氨基酸含量}} \times 100$$

$$EAAI = (aa^1/AA^1 \times aa^2/AA^2 \times \dots \times aa^8/AA^8)^{1/8}$$

其中, aa^1, aa^2, \dots, aa^8 为样品中各必需氨基酸的含量; AA^1, AA^2, \dots, AA^8 为对应 FAO/WHO 模式参比蛋白中该必需氨基酸的含量。

1.3.2 带鱼模拟氧化探究

1.3.2.1 模拟氧化体系建立

模拟氧化体系由 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 和 H_2O_2 组成,该体系可产生羟基自由基。采用 0.05 mmol/L Fe^{2+} 和 1 mmol H_2O_2 研究不同氧化时间 (0、1、3、5 h, 37 °C 水浴)^[13] 对带鱼蛋白的影响。氧化结束后,加入 2,6-二叔丁基对甲酚 (BHT, 终浓度 0.02%) 终止反应,立即进行试验分析或者真空包装后 -80 °C 贮藏,一周内进行试验分析。

1.3.2.2 硫代巴比妥酸 (TBARS) 值测定

脂肪氧化程度根据 Vyncke^[14] 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 60 s, 冰浴静置 10 min。6000 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 分钟。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) 值表示为 mg MDA/kg 样品。

1.3.2.3 肌原纤维蛋白提取

肌原纤维蛋白提取按照 Lefever 等^[15]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, 6000 r/min, 4 °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。

1.3.2.4 蛋白羰基测定

蛋白羰基含量根据 Oliver 等^[16]的方法进行测定, 并略加改动。取 2 mL 质量浓度约为 5.0 mg/mL 蛋白溶液放入离心管中, 每管中加入 2 mL 10 mmol/L 的 2,4-二硝基苯肼 (DNPH, 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 2 mL 质量分数为 20% 的三氯乙酸, 10000 r/min 离心 15 min, 弃上清液, 用 2 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 5 mL 盐酸胍溶液 (6 mol/L, 溶于 20 mmol/L 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 肌原纤维蛋白(MP)。

1.3.2.5 蛋白巯基测定

根据 Benjakul 等^[17]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, 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。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:

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

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

1.3.2.6 蛋白凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析

参照 Laemmli 方法^[18], 采用 SDS-PAGE 分析鱼肉经氧化后蛋白的变化。采用 10% 的分离胶浓度, 3%

的浓缩胶浓度。电泳结束后, 将凝胶用考马斯亮蓝染色, 脱色后观察蛋白条带变化。

1.3.2.7 蛋白溶解性测定

蛋白溶解性根据 Sylvie 等^[19]的方法, 并略作修改。取 1.00 g 肉加入 19 mL 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (含 0.6 mol/L KCl, pH 7.4), 15000 r/min 匀浆 60 s, 6000 r/min, 5 °C 离心 15 min。取上清液, 双缩脲法测蛋白浓度。蛋白质的溶解性表示为 mg 可溶性蛋白/g 样品。

1.3.2.8 蛋白体外消化性测定

参照 Monsoor 等^[20]的方法并经过适当的修改, 采用胃蛋白酶 (猪源)-胰蛋白酶和 α -糜蛋白酶 (来源于牛胰腺) 两步酶分析法测定带鱼蛋白体外消化性。取 1.5 g 待测样品, 加入含有 15 mg 胃蛋白酶的 0.1 mol/L HCl 15 mL, 37 °C 消化 3 h。加入 7.5 mL 0.2 mol/L NaOH 溶液, 混匀后加入含有 24 mg 胰蛋白酶和 4 mg α -糜蛋白酶的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 8) 7.5 mL, 混匀后 37 °C 消化 24 h。经过上述的两步酶法消化之后的溶液中, 加入三氯乙酸 (终浓度为 10%) 使未被消化的蛋白质的沉淀下来, 用无灰滤纸把未被消化的蛋白质沉淀分离。未被消化的蛋白质通过凯氏定氮法来测定。空白加入 1.5 mL 蒸馏水, 其余操作相同。蛋白体外消化率计算方法如下:

$$\text{蛋白体外消化率}(\%) = (a-b)/a \times 100$$

式中: a 表示样品中粗蛋白含量; b 表示样品经两步酶法消化后残渣的蛋白含量 (已扣除空白)。

1.4 数据统计分析方法

数据分析及作图使用 origin 8.5 软件, 差异显著性 ($P < 0.05$) 分析使用 Tukey 程序。

2 结果与讨论

2.1 带鱼营养成分分析

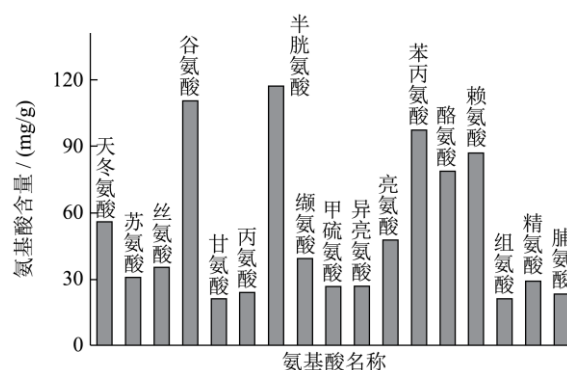


图 1 带鱼氨基酸组成

Fig.1 Amino acid analysis of *Trichiurus haumela*
新鲜带鱼中, 水分含量为 $81.45 \pm 0.29\%$, 粗蛋白

质为 16.36±0.28% (湿重), 脂肪为 0.43±0.04% (湿重), 灰分为 0.94±0.03% (湿重)。带鱼中粗蛋白含量占干重的 88.19%, 是带鱼的主要营养成分之一。而测定结果脂肪含量只占干重的 2.32%, 与其他报道^[12]相比较, 可能是季节及个体差异引起。由图 1 和表 1 可以看出, 带鱼中氨基酸种类齐全, 并且各种必需氨基酸的评分除亮氨酸外均大于 100。带鱼 EAAI>1, EAAI 对所有必需氨基酸进行了计算, 能够更全面的评价蛋白质的营养价值。因此, 综合分析带鱼是一种极具营养价值的动物蛋白来源。

表 1 带鱼氨基酸得分、必需氨基酸指数

Table 1 Amino acid score and essential amino acid index values

of *Trichiurus haumela*

氨基酸名称	FAO/WHO 模式 (mg/g 蛋白质)	AAS /%	EAAI
组氨酸	19	126.59	1.64
异亮氨酸	28	109.18	
亮氨酸	66	81.73	
赖氨酸	58	169.37	
甲硫氨酸+半胱氨酸	25	651.07	
苯丙氨酸+酪氨酸	63	316.13	
苏氨酸	34	102.23	
缬氨酸	35	127.31	

2.2 羟基自由基氧化体系对带鱼脂肪氧化的影响

影响

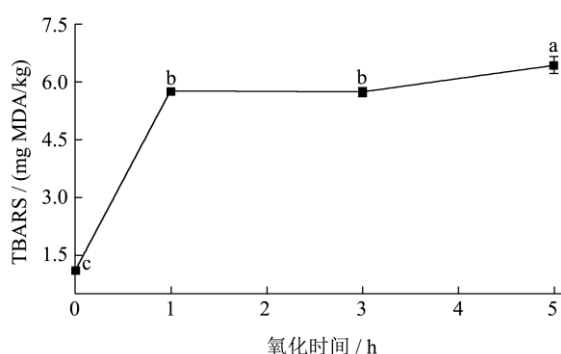


图 2 羟基自由基氧化体系对带鱼脂肪氧化的影响

Fig.2 Effect of hydroxyl-free radical oxidation system on lipid oxidation in *Trichiurus haumela*

注: 图中字母表示差异的显著性(p<0.05), 氧化温度为 37 °C。

2-硫代巴比妥酸 (TBARS) 值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。脂肪氧化是肉制品腐臭、变色等不良现象发生的重要因素之一^[21], 其机理是自由基链式反

应。在模拟体系中, Fe²⁺和 H₂O₂ 发生芬顿反应产生羟基自由基^[21], 促进脂肪氧化的发生。由图 2 可以看出, 随着氧化时间延长, 脂肪氧化程度显著增加 (p<0.05)。氧化 1 h 后, TBARS 值由 1.13 mg MDA/kg 增加到 5.76 mg MDA/kg, 氧化时间由 1 h 增加至 3 h, TBARS 值变化不显著 (p>0.05)。氧化 5 h 后, TBARS 值是对照样品的 5.24 倍。Tokur 等^[13]研究铁离子催化的氧化体系对几种鱼肉脂肪氧化的影响, 发现随着氧化时间的延长, 沙丁鱼和凤尾鱼的 TBARS 值显著增加, 而大西洋鲑鱼和竹荚鱼却在氧化 3 h 后达到最大值, 随后则不再变化。Saeed 等^[23]研究发现鳕鱼 TBARS 值在模拟体系中先迅速增加, 其后增加缓慢, 与本研究结果一致。然而, 不同种类的鱼在氧化体系中脂肪氧化程度并不相同, 取决于很多因素, 如不饱和脂肪酸的含量, 其他促氧化成分的种类和含量等。

2.3 羟基自由基氧化体系对蛋白氧化的影响

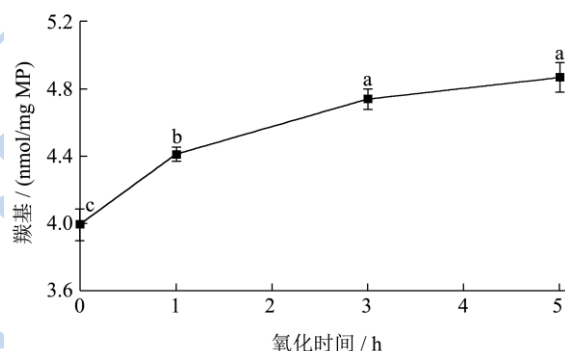


图 3 羟基自由基氧化体系对带鱼蛋白羰基含量的影响

Fig.3 Effect of hydroxyl free radical oxidation system on protein carbonyl content of *Trichiurus haumela*

注: 图中字母表示差异的显著性(p<0.05), 氧化温度为 37 °C。

铁离子催化的氧化体系引起的带鱼肌原纤维蛋白羰基含量变化结果如图 3。随着氧化时间的延长, 羰基含量在前 3 h 内显著增加 (p<0.05), 后增加缓慢, 氧化 5 h 后蛋白羰基含量增加 22.11%。这与 Tokur 等^[13]在大西洋鲑鱼中的研究结果一致。蛋白质羰基化是蛋白质发生氧化的一个显著性指标, 国内外广泛采用蛋白羰基含量衡量肌肉制品中蛋白氧化程度。羰基化合物的形成有很多途径, 直接作用包括赖氨酸、苏氨酸、精氨酸、脯氨酸等侧链的直接氧化^[24]和肽主链的直接断裂^[25-26], 间接作用包括和还原糖的非酶催化反应即美拉德反应^[27]以及与非蛋白羰基化合物如 4-羟基-2-壬烯醛、丙二醛等共价结合^[28]。Mercier 等^[29]研究发现牛肉中的羰基含量在氧化时间为 30 min 时达

到最大值,随后降低至 5 h,此现象也在其他氧化体系中发现^[30],这可能由一些不稳定羰基化合物的降解而引起的。

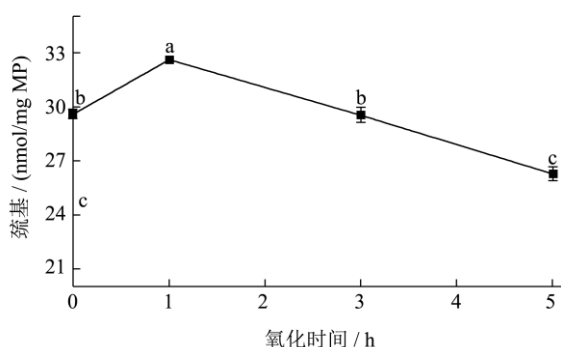


图4 羟基自由基氧化体系对带鱼蛋白巯基含量的影响

Fig.4 Effect of hydroxyl free radical oxidation system on protein sulfhydryl content of *Trichiurus haumela*

注: 图中字母表示差异的显著性($p < 0.05$), 氧化温度为 37 °C。

蛋白质中巯基(-SH)可氧化形成二硫键(-S-S-),并且随着氧化条件的增强还会生成亚砷等氧化产物^[31],所以巯基含量也可以作为蛋白氧化的一个重要指标。如图 4,随着氧化时间的延长,蛋白巯基含量先增加,巯基含量在氧化 1 h 后达到最大值,后显著降低 ($p < 0.05$)。可能是在氧化时间较短时肌原纤维蛋白的结构发生变化,能够检测到的巯基含量增加^[32]。而随着氧化时间的积累,巯基发生氧化,巯基含量降低。本研究中总巯基含量变化趋势与 Benjakul 等^[33]在大西洋白鲳冰藏过程中研究结果相似,其研究发现冰藏 2 d 后大西洋白鲳肌肉蛋白巯基含量略有升高,随后降低。姜晴晴等^[34]在研究反复冻融对秘鲁鱿鱼影响时也发现巯基含量呈现先增加后下降的趋势。

2.4 羟基自由基氧化体系对带鱼蛋白组成的影响

图 5 为不同氧化时间下带鱼肌肉蛋白 SDS-PAGE 电泳图谱。在非还原状态下(图 5a),肌球蛋白重链迅速减少,其他蛋白条带没有明显变化。可能是因为蛋白分子间形成交联,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^[35]。经过加入 β -巯基乙醇后,肌球蛋白重链条带增加但并没有完全恢复(图 5b),可能是因为肌肉蛋白不仅以二硫键进行交联而且以非二硫键的形式进行了交联^[13,36]。蛋白交联聚集形成的机理有很多,如通过二硫键、二酪氨酸等交联,以及蛋白分子间通过碳-碳共价交联等^[2]。Liu 等^[37]研究发现,肌球蛋白在氧化的过程中会部

断裂形成碎片,但在本研究中未有发现,这可能与氧化条件和肌肉种类等有关。此外,在整个处理过程中,肌动蛋白条带变化不明显,说明带鱼蛋白中肌球蛋白比肌动蛋白更容易发生变性。本研究结果与 Ooizumi 等^[38]在研究羟基自由基氧化体系对鸡肉肌球蛋白影响时的结果一致,随着氧化程度的增加,肌球蛋白重链形成交联聚集,电泳条带逐渐变细甚至消失,而肌动蛋白条带无明显变化。

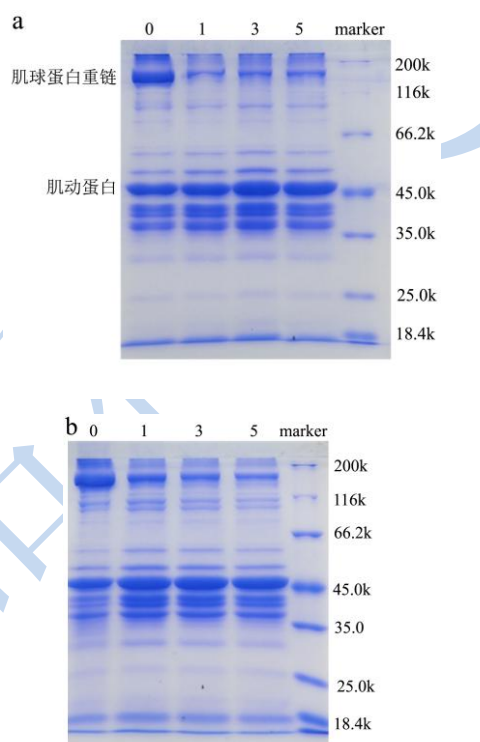


图5 带鱼肌原纤维蛋白 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig.5 SDS-PAGE patterns of myofibrillar proteins from *Trichiurus haumela*

注: 图中a-非还原处理; b-还原处理; 0,1,3,5表示氧化时间(h),氧化温度为37 °C。

2.5 羟基自由基氧化体系对带鱼蛋白盐溶性的影响

肌肉中的盐溶性蛋白主要是肌原纤维蛋白等,对肌肉制品的工艺特性及感官品质具有重要的影响。蛋白盐溶性是肌肉蛋白质重要的功能性质之一,对热凝胶的形成等有重要影响,蛋白溶解性降低是肌肉品质下降的重要标志^[39]。羟基自由基引起的蛋白溶解性的变化如图 6,随着氧化时间的延长,带鱼蛋白溶解性显著下降 ($p < 0.05$),氧化时间为 3 h 时蛋白溶解性降到最低。此结果与 Ooizumi 等^[38]在鸡肉肌原纤维蛋白中的研究结果一致。在羟基自由基作用下,蛋白质的

空间结构发生改变,蛋白质之间的作用增强,蛋白分子以二硫键等方式交联聚集,从而导致蛋白质和水分子间的作用力减弱,蛋白质的溶解度下降^[40]。肌原纤维蛋白还可与脂肪氧化产物如丙二醛等相互作用,进而使蛋白发生变性,形成复合物,降低蛋白溶解性^[21, 23, 41]。

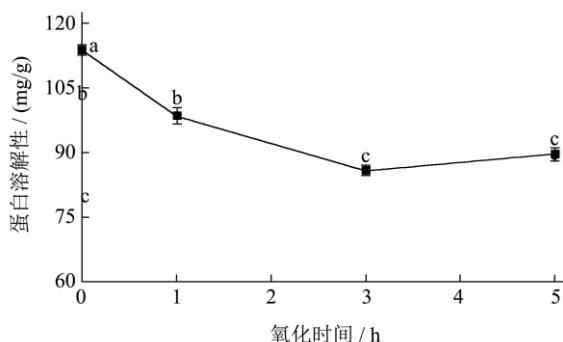


图6 羟基自由基氧化体系对带鱼蛋白溶解性的影响

Fig.6 Effect of hydroxyl free radical oxidation system on protein solubility of *Trichiurus haumela*

注:图中字母表示差异的显著性($p < 0.05$),氧化温度为37℃。

2.6 羟基自由基氧化体系对带鱼蛋白体外消化性的影响

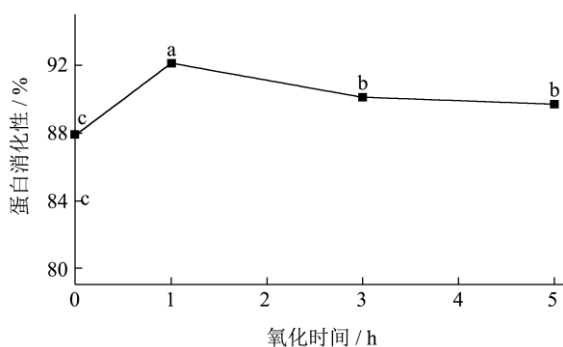


图7 羟基自由基氧化体系对带鱼蛋白消化性的影响

Fig.7 Effect of hydroxyl free radical oxidation system on protein digestion of *Trichiurus haumela*

注:图中字母表示差异的显著性($p < 0.05$),氧化温度为37℃。

肉类及肉制品蛋白含量丰富,是良好的能量和必需氨基酸的来源,更是人们必不可少的食物之一。消化性是评价食物中蛋白质的一个重要指标,蛋白质只有被体内的蛋白酶水解成氨基酸或者小分子的肽才能被机体消化吸收,因此消化性对容易患营养缺乏症的特殊人群如老人、婴儿等显得极其重要。目前国内外研究蛋白消化性主要采用的方法有体外消化模拟技术和动物实验,体外消化模拟技术与动物实验相比具有

成本低廉、视觉直观、操作简便等优点。关于氧化对蛋白体外消化率影响的研究尚未见报道,在本研究中,采用两步酶法对蛋白体外消化率进行评价,结果如图7。随着氧化时间的延长,蛋白体外消化率呈现先增加后降低的趋势,氧化1h后蛋白消化率最大为92.09%,比对照样品消化率增加4.29%。可能是因为早期氧化蛋白分子结构发生变化,暴露出更多消化酶的作用位点,随着氧化的进一步加强以及蛋白交联物的形成,消化酶的作用位点被掩藏,蛋白消化率降低。并且,胃蛋白酶、胰蛋白酶和 α -糜蛋白酶都有固定的作用位点,当作用位点氨基酸发生氧化后,蛋白消化率降低^[42]。关于蛋白体外消化性研究,研究者多采用蛋白水解速率来表示。Sante-Thoutellier等^[42]研究发现,蛋白在胃蛋白酶作用下,蛋白水解速率与其氧化的程度呈现二相性,呈现先增加后减小的趋势,经高浓度氧化的蛋白在胰蛋白酶作用下水解速率显著降低($p < 0.05$)。然而, Morzel等^[36]研究发现蛋白氧化后被木瓜蛋白酶水解的能力显著下降, Liu等^[37]研究通过电泳图谱发现肌球蛋白在蛋白消化酶的作用下,其降解能力随蛋白氧化而降低。由于氧化体系、氧化程度以及蛋白基质的不同,蛋白氧化对消化性的影响并没有统一的定论,今后尚需继续深入研究。

3 结论

本文对带鱼肌肉进行营养评价,带鱼中蛋白质含量丰富,必需氨基酸含量较高,是一种营养价值较高的动物蛋白来源。在本试验氧化模拟体系中,带鱼肌肉被羟基自由基攻击后,脂肪发生氧化,蛋白羰基含量增加,巯基含量先增加后减少。肌球蛋白发生交联聚集,蛋白溶解性下降,蛋白体外消化率先增加后降低。虽然适度的氧化有利于提高蛋白消化性,但是蛋白氧化后其必需氨基酸含量变化,以及蛋白氧化后对其食用和加工性质等的影响还需要进一步研究。此外,实际生产消费(如贮藏、加工、烹饪)中蛋白氧化对带鱼肌肉品质的影响亦需深入探究,结果可望为带鱼品质提高及综合利用提供理论支持。

参考文献

- [1] 姜晴晴,鲁珺,叶兴乾,等.肉制品中蛋白质氧化的研究进展[J].食品工业科技,2013,34(23):386-389
JIANG Qing-qing, LU Jun, Ye Xing-qian, et al. Research progress in protein oxidation in muscle foods [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(23): 386-389
- [2] Lund M N, Heinonen M, Baron C P, et al. Protein oxidation in muscle foods: A review [J]. Molecular Nutrition and Food

- Research, 2011, 55(1):83-95
- [3] Park D, Xiong Y L, Alderton A L, et al. Biochemical changes in myofibrillar protein isolates exposed to three oxidizing systems [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(12): 4445-4451
- [4] Park D, Xiong Y L. Oxidative modification of amino acids in porcine myofibrillar protein isolates exposed to three oxidizing systems [J]. *Food Chemistry*, 2007, 103(2): 607-616
- [5] Ooizumi T, Xiong Y L. Identification of cross-linking site(s) of myosin heavy chains in oxidatively stressed chicken myofibrils [J]. *Journal of Food Science*, 2006, 71(3): 196-199
- [6] Xiong Y L, Park D, Ooizumi T. Variation in the cross-linking pattern of porcine myofibrillar protein exposed to three oxidative environments [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(1): 153-159
- [7] Xiong Y L, Blanchard S P, Ooizumi T, et al. Hydroxyl radical and ferryl-generating systems promote gel network formation of myofibrillar protein [J]. *Journal of Food Science*, 2010, 75(2): C215-C221
- [8] 胡亚芹,胡庆兰,杨水兵,等.不同冻结方式对带鱼品质影响的研究[J].现代食品科技,2014,30(2):23-30
HU Ya-qin, HU Qing-lan, YANG Shui-bing, et al. Effects of different freezing methods on the quality of *Trichiurus haumela* [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 30(2): 23-30
- [9] 高志立,谢晶,施建兵,等.不同贮藏条件下带鱼品质的变化[J].食品科学,2013,34(16):311-315
GAO Zhi-li, XIE Jing, SHI Jian-bing, et al. Quality changes of *Trichiurus haumela* under different storage conditions [J]. *Food Science*. 2013, 34(16):311-315
- [10] 佟懿,谢晶,鲜带鱼不同贮藏温度的货架期预测模型[J].农业工程学报,2009,25(6):301-305
TONG Yi, XIE Jing. Prediction model for the shelf-life of *Trichiurus haumela* stored at different temperatures [J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2009, 25(6): 301-305
- [11] 佟懿,谢晶,肖红,等.基于电子鼻的带鱼货架期预测模型[J].农业工程学报,2010,26(2):356-360
TONG Yi, XIE Jing, XIAO Hong, et al. Prediction model of shelf life of *Trichiurus haumela* using an electric nose [J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2010, 26(2): 356-360
- [12] 张莹,曾庆孝,朱志伟,等.罗非鱼与四种海水鱼鱼糜比较[J].现代食品科技,2008,24(12):1222-1226
ZHANG Yin, ZENG Qing-xiao, ZHU Zhi-wei, et al. Comparison of surimi of *Tilapia* (*Sarotherodon nilotica*) and other four marine fish [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2008, 24(12): 1222-1226
- [13] Tokur B, Korkmaz K. The effects of an iron-catalyzed oxidation system on lipids and proteins of dark muscle fish [J]. *Food Chemistry*, 2007, 104(2): 754-760
- [14] Vyncke W. Evaluation of the direct thiobarbituric acid extraction method for determining oxidative rancidity in mackerel (*Scomber scombrus* L.) [J]. *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 1975, 77(6): 239-240
- [15] 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
- [16] 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
- [17] Benjakul S, Seymour T A, Morrissy M T, et al. Physicochemical changes in Pacific whiting muscle proteins during iced storage [J]. *Journal of Food Science*, 1997, 62(4): 729-733
- [18] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. *Nature*, 1970, 227: 680-684
- [19] Eymard S, Baron C P, Jacobsen C. Oxidation of lipid and protein in horse mackerel (*Trachurus trachurus*) mince and washed minces during processing and storage [J]. *Food Chemistry*, 2009, 114(1): 57-65
- [20] Monsoor M A, Yusuf H K M. In vitro protein digestibility of lathyrus pea (*Lathyrus sativus*), lentil (*Lens culinaris*), and chickpea (*Cicer arietinum*) [J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 2002, 37(1): 97-99
- [21] Soyer A, Özalp B, Dalmış Ü, 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
- [22] Dunford H B. Free radicals in iron-containing systems [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 1987, 3(6): 405-421
- [23] Saeed S, Fawthrop S A, Howell N K. Electron spin resonance (ESR) study on free radical transfer in fish-protein interaction [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1999, 79(13): 1809-1816
- [24] Requena J R, Chao C C, Levine R L, et al. Glutamic and amino adipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins [J]. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the USA, 2001, 98(1):69-74
- [25] Berlett B S, Stadtman E R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(33): 20313-20316
- [26] Garrison W M. Reaction mechanisms in the radiolysis of peptides, polypeptides, and proteins [J]. *Chemical Reviews*, 1987, 87(2): 381-398
- [27] Akagawa K, Sasaki D, Kurota Y, et al. Formation of α -amino adipic and γ -glutamic semialdehydes in proteins by the Maillard reaction [J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2005, 1043: 129-134
- [28] 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: 85-111
- [29] Mercier Y, Gatellier P, Renner M. Lipid and protein oxidation in vitro, and antioxidant potential in meat from Charolais cows finished on pasture or mixed diet [J]. *Meat Science*, 2004, 66(2): 467-473
- [30] Batifoulier F, Mercier Y, Gatellier P, et al. Influence of vitamin E on lipid and protein oxidation induced by H₂O₂-activated MetMb in microsomal membranes from turkey muscle [J]. *Meat Science*, 2002, 61(4): 389-395
- [31] 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
- [32] 章银良,杨慧,安巧云.羟自由基诱导蛋白质氧化损伤的研究[J].*食品与生物技术学报*,2012,31(03):313-318
ZHANG Yin-liang, YANG Hui, AN Qiao-yun. Study on protein oxidation induced by hydroxyl radicals [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2012, 31(03): 313-318
- [33] Benjakul 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(4): 729-733
- [34] 姜晴晴,李珊,刘文娟,等.冻融循环对秘鲁鱿鱼蛋白及肌肉品质的影响[J].*现代食品科技*,2014,30(7):171-178
JIANG Qing-qing, LI Shan, LIU Wen-juan, et al. Effect of freeze-thaw cycles on proteins and muscle quality of *Dosidicus gigas* [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 30(7): 171-178
- [35] Decker E A, Xiong Y L, Calvert J T, et al. Chemical, physical, and functional-properties of oxidized turkey white muscle myofibrillar proteins [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1993, 41(2):186-189
- [36] Morzel M, Gatellier P, Sayd T. Chemical oxidation decreases proteolytic susceptibility of skeletal muscle myofibrillar proteins [J]. *Meat Science*, 2006, 73(3): 536-543
- [37] Liu G, Xiong Y L. Electrophoretic pattern, thermal denaturation, and in vitro digestibility of oxidized myosin [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48(3): 624-630
- [38] Ooizumi T, Xiong Y L. Biochemical susceptibility of myosin in chicken myofibrils subjected to hydroxyl radical oxidizing systems [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52(13): 4303-4307
- [39] Chan J T Y, Omana D A, Betti M. Effect of ultimate pH and freezing on the biochemical properties of proteins in turkey breast meat [J]. *Food Chemistry*, 2011, 127(1): 109-117
- [40] 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
- [41] Saeed S, Howell N K. Effect of lipid oxidation and frozen storage on muscle proteins of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2002, 82(5): 579-586
- [42] Sante-Thoutellier V, Aubry L, Gatellier P. Effect of oxidation on in vitro digestibility of skeletal muscle myofibrillar proteins [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(13): 5343-5348