

河蚬酶解物美拉德反应产物抗氧化活性研究

徐浩¹, 林琳^{1,2}, 刘东旭¹, 陆剑锋^{1,2}, 姜绍通^{1,2}

(1. 合肥工业大学食品与生物工程学院, 安徽合肥 230009)

(2. 安徽省农产品精深加工重点实验室, 安徽合肥 230009)

摘要: 将河蚬软体经酶解制得的河蚬酶解液 (*Corbicula fluminea* hydrolysates, CFH) 用超滤法分离得到分子量 >10 ku、5 ku~10 ku 和 <5 ku 三个组分。三种分子量范围酶解液分别与 D-木糖进行美拉德反应制备河蚬酶解物美拉德反应产物 (CFH-MRP), 测定反应前后河蚬酶解物抗氧化能力, pH 值、接枝度和褐变程度变化, 并对美拉德产物结构进行初步分析。结果表明, 通过美拉德反应能够显著提高河蚬酶解物的抗氧化能力, 其中 5 ku~10 ku 的 CFH-MRP 具有最高的羟基自由基清除率 (增加 31%)、超氧离子自由基清除率 (增加 33%) 和总还原能力 (增加 152%), >10 ku 的 CFH-MRP 具有最高的 DPPH 自由基清除能力 (增加 106%)。同时, 美拉德反应使 CFH 的 pH 值降低, 酶解液褐变程度增加。傅里叶红外光谱 (FT-IR) 表明 CFH 和 D-木糖发生共价交联, 反应产物氨基含量减少; GC-MS 分析结果显示反应生成了酮类、酯类、醇类、烯烃、酚类和杂环类物质, 在一定程度上提高了反应产物的抗氧化活性。

关键词: 河蚬酶解液; 超滤分离; 美拉德反应; 抗氧化; 结构

文章编号: 1673-9078(2019)01-189-197

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.1.027

Antioxidant Activity of Maillard Reaction Products Derived from *Corbicula fluminea* Hydrolysates

XU Hao¹, LIN Lin^{1,2}, LIU Dong-xu¹, LU Jian-feng^{1,2}, JIANG Shao-tong^{1,2}

(1. School of Food and Biology Engineering, Hefei University of Technology, Anhui Province, Hefei 230009, China)

(2. Key Laboratory for Agriculture Products Processing of Anhui Province, Anhui Province, Hefei 230009, China)

Abstract: The hydrolysates were prepared from soft part of *Corbicula fluminea*, and three fractions of *Corbicula fluminea* hydrolysates (CFH) (>10 ku, 5 ku to 10 ku, <5 ku) were isolated with ultrafiltration. Then, the 3 fractions of CFH were reacted with D-xylose respectively to obtain the Maillard reaction products (CFH-MRP). The CFH-MRP's antioxidant capacities, pH values, grafting degrees and browning degrees of CFH-MRP before and after the reaction were measured and the structure of CFH-MRP was analyzed. The results showed that the antioxidant capacity of CFH-MRP was enhanced through Maillard reaction. The CFH-MRP with the molecular weights range from 5 ku to 10 ku had the highest scavenging rate of hydroxyl (an increase of 31%), superoxide free radical scavenging capacity (an increase of 33%) and total reducibility (an increase of 152%), and the CFH-MRP with the molecular weights more than 10 ku had the highest DPPH scavenging ability (an increase of 106%). At the same time, Maillard reaction reduced the pH value and increased the browning degree of CFH. Fourier transform infrared spectra (FT-IR) indicated that covalent crosslinking between CFH and D-xylose occurred, and the amino content of reaction products reduced. GC-MS analysis showed that some new compounds generated from Maillard reaction including ketones, esters, alcohols, olefins, phenols and heterocyclic substances, which could increase the antioxidant activity of CFH-MRP in some cases.

Key words: *Corbicula fluminea* hydrolysates (CFH); ultrafiltration; Maillard reaction; antioxidant; structure

氧化反应是生物体在新陈代谢过程中常发生的活动, 活性氧 (ROS) 和活性氮 (RN) 作为其主要产物, 在生理功能中起着双重作用^[1], 抗氧化剂也因此成为

收稿日期: 2018-09-17

基金项目: 江苏省“双创计划”科技副总项目; 安徽省水产产业技术体系项目 (AHGYJSTX-08)

作者简介: 徐浩 (1991-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 水产品加工与贮藏

通讯作者: 林琳 (1978-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 水产品加工与贮藏

近年来的研究热点。由于化学合成的抗氧化剂 (如二丁基羟基甲苯、特丁基对苯二酚) 本身具有一定的毒副作用, 使用上存在限制^[2,3], 所以从食物中获取具有较高安全性的天然抗氧化剂具有重要意义^[4]。天然抗氧化剂中, 有一部分是以蛋白质为原料经酶解制备的多肽类物质, 如大豆肽、鱼皮胶原肽、乳清蛋白肽等。然而, 不同蛋白来源的抗氧化肽面临产率低、储存不稳定和抗氧化性能不强等问题, 效果弱于人工合成抗氧化剂, 因此通过改性和修饰抗氧化肽, 高效获得强

抗氧化肽已成为研究热点问题^[5]。

美拉德反应多存在于食品贮藏和加工期间氨基酸、多肽、蛋白质与含羰基化合物之间的非酶促褐变中,该反应会产生大量类黑精、还原酮以及含有 N、S 的杂环化合物^[6,7]。研究表明,这类物质具有良好的抗氧化活性,其中某些物质的抗氧化强度可以与食品中常用的抗氧化剂相媲美^[8]。Zeng 等人^[9]使用蛋白酶水解金枪鱼骨并与不同种类的乙酮糖进行美拉德反应,发现其 DPPH 自由基清除能力显著提高。孟艳丽等人^[10]构建葡萄糖与鲢鱼肽反应体系,发现美拉德反应能够显著提高其抗氧化活性并拥有巨大的市场价值。Sun 等^[11]研究表明木糖与猪血红蛋白酶解液的美拉德反应产物抗氧化活性强于猪血红蛋白酶解液。Kim^[12]发现不同分子量肽类物质与葡萄糖发生美拉德反应的产物抗氧化能力和抑制脂质氧化能力存在差异,这可能是与聚合形成的高分子褐色物质有关。

河蚬是一种双壳贝类,原产于亚洲,广泛分布于我国内陆水域,具有很高的营养价值^[13]。据报道,河蚬提取物具有多种生物活性,包括较强的抗氧化能力^[14]。然而,目前关于河蚬肽美拉德反应改性的研究鲜有报道,这为河蚬肽抗氧化活性的研究提供了新思路。本文以河蚬为原料,通过酶解获得河蚬酶解液(CFH),采用超滤法获得三种分子量 CFH,使用 D-木糖与之发生美拉德反应,研究美拉德反应前后河蚬酶解液抗氧化能力的变化和美拉德反应程度,同时采用 GC-MS 和傅里叶红外光谱技术对不同分子量酶解液的美拉德反应产物(CFH-MRP)的结构进行分析,旨在为制备新型高效天然抗氧化剂提供依据,充分利用河蚬资源并提高其附加值。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

去壳冷冻河蚬,由江苏宿迁楠景水产食品有限公司提供, -18℃ 冷冻贮藏,使用前置于 4℃ 解冻;胰蛋白酶、盐酸、无水乙醇(分析纯),购于国药集团化学试剂有限公司;D-木糖,购于上海源叶生物科技有限公司;1,1-二苯基-2-苦肟基自由基和 β -巯基乙醇,购于(梯希爱)上海化成工业发展有限公司;无水甲醇、无水乙醚(色谱纯),购于西陇科学股份有限公司。

1.2 仪器与设备

可见分光光度计,上海光谱仪器有限公司;超滤杯,Millipore;冷冻干燥机,北京博医康实验仪器有

限公司;GC-MS 气相色谱-质谱联用仪,美国 Thermofisher 公司; Nicolet 67 傅里叶红外光谱仪,美国 Thermo Nicolet。

1.3 实验方法

1.3.1 河蚬酶解液(CFH)的制备

称取一定量的河蚬软体按 1:9 (W/V) 的料液比加入去离子水,使用均质机匀浆,调节 pH 到 7.5,加入胰蛋白酶 2000 U/g,在 45℃ 的水浴中恒温酶解 4 h,反应结束后加热到 100℃ 使酶失去活力,在 4000 r/min 转速下离心 10 min,上清液即为河蚬酶解液。

1.3.2 超滤法分级河蚬酶解液

将酶解液经 0.45 μm 孔径的膜预处理,除去色素等杂质。使用截留量为 10 ku 和 5 ku 的超滤膜,有效过滤面积为 45 cm^2 ,通过氮气的压力将上清液压到膜表面,收集滤液作为下一个超滤的进料溶液。输入压力 0.18 MPa,料液温度 35℃,进料溶液 pH 7.5。将截留物和透过液回收冻干,得到三种分子量(>10 ku、5~10 ku、<5 ku)的河蚬酶解物(CFH)。

1.3.3 美拉德反应产物(CFH-MRP)的制备

根据预实验结果,按照各分子量 CFH 与 D-木糖 1:1 (W/W) 配制成 8 mg/mL 的溶液,放置在 81℃ 水浴中反应 90 min,获得不同分子量河蚬酶解物美拉德反应产物用冰水快速冷却至室温,储存在 -4℃ 下进行下一步的化学分析。

1.3.4 美拉德反应产物抗氧化能力分析

1.3.4.1 DPPH 自由基清除能力

根据 Chen 等人^[15]的方法稍加修改。将 1 mL 各分子量 CFH 和 CFH-MRP 与 2 mL 磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L, pH 8)以及 2 mL DPPH 溶液混合,在室温下放入无光环境中反应 30 min。离心取上清液,在 517 nm 处测量吸光值。以维生素 C (Vc) 作为对照,浓度为 8 mg/mL。

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = [A_0 - (A_i - A_j)] / A_0 \times 100\%$$

其中: A_i 为样品溶液测定的 DPPH 吸光值; A_j 为用乙醇代替 DPPH 测得的吸光值; A_0 为未加样品测定的 DPPH 吸光值。

1.3.4.2 羟基自由基(-OH)清除能力

用 Jang MH 等人^[16]的方法对 -OH 清除活性进行计算,并稍加修改。在 10 mL 带塞试管中,加入 1 mL 各分子量 CFH 和 CFH-MRP、0.5 mL 9 mM FeSO_4 和 0.5 mL 水杨酸-乙醇溶液,最后加入 0.5 mL 6 mM H_2O_2 , 37℃ 水浴反应 30 min。在测定波长为 510 nm 下测得吸光度。以维生素 C (Vc) 作为对照,浓度为 8 mg/mL。

羟基自由基清除率(%)=($A_i-A_j-A_f$)/(A_e-A_i) $\times$ 100%

其中: A_i 为样品溶液测得的吸光值; A_e 为未加样品的吸光值; A_j 为空白管吸光值; A_f 为无 H_2O_2 的样品溶液吸光值。

1.3.4.3 超氧离子自由基($O_2^{\cdot-}$)清除能力

在该测定中, $O_2^{\cdot-}$ 由邻苯三酚的自氧化反应产生^[17]。分别将 1 mL 各分子量 CFH 和 CFH-MRP 与 4.5 mL 0.1 M Trise-HCl 缓冲溶液 (pH 8.2) 和 2.4 mL 去离子水依次加入到试管中。反应 3 min 后, 加入 0.1 mL 10 mM 盐酸溶液停止反应。以维生素 C (Vc) 作为对照, 浓度为 8 mg/mL。

$$\text{超氧离子自由基清除率(}\%) = \frac{A_0 - (A_e - A_f)}{A_0} \times 100\%$$

其中: A_0 为去离子水代替样品测定的吸光值; A_e 为添加样品时的吸光值; A_f 为不加邻苯三酚时样品测得的吸光值。

1.3.4.4 总还原能力测定

采用 Oyaizu 等人^[18]的方法并稍作修改。取 0.5 mL CFH-MRP, 加入 2.5 mL 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 6.6) 和 2.5 mL 1% $K_3[Fe(CN)_6]$, 充分混合。将混合物在 50 °C 水浴中反应 20 min, 加入 2.5 mL 10% TCA 溶液, 然后将混合物 3000 g 离心 10 min。取 2.5 mL 上层清液, 加入 2.5 mL 蒸馏水和 0.5 mL 0.1% $FeCl_3$, 混合均匀, 适当稀释, 在波长 700 nm 处测定其吸光值。以维生素 C (Vc) 作为对照, 浓度为 8 mg/mL。

1.3.5 pH 值测定

使用 pH 计分别测定不同分子量 CFP 和 CFP-MRPs 溶液的 pH 值。

1.3.6 接枝度测定

采用邻苯二甲醛 (OPA) 法测定接枝度^[19]。称取 40 mg 的 OPA 溶解于 1 mL 的甲醇中, 分别加入 200 g/L 的十二烷基磺酸钠 (SDS) 2.5 mL、0.1 mol/L 的硼砂 25 mL、100 μ L β -巯基乙醇, 最后用蒸馏水定容至 50 mL, 此为 OPA 试剂。取 OPA 试剂 4 mL 于试管中, 分别注入 200 μ L 样品液, 混匀后于 35 °C 反应 2 min。在 340 nm 下测其吸光值 A_0 , 并在 340 nm 下测定吸光值 A_1 , 两者之差 ΔA_{340} 即为样品净吸光值, 以 OPA 试剂为空白。产物接枝度为反应体系中反应前后游离氨基含量的变化率(DG)。

$$\text{接枝度(}\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\%$$

其中: A_0 为接枝反应前样品吸光值; A_1 为接枝反应后样品吸光值。

1.3.7 褐变程度测定

以 294 nm 处吸光值作为未着色中间产物判断指数, 此为美拉德反应重要的前体物质^[20], 在 420 nm 处可测得美拉德反应后期产生的棕色化合物^[21]。通过

分光光度计分别测定不同分子量 CFH、加热河蚬肽 (H-CFH) 以及 CFH-MRP 的褐变强度, 294 nm 下样品用蒸馏水稀释 120 倍, 在 420 nm 下样品用蒸馏水稀释 15 倍。

1.3.8 GC-MS 分析

参考徐象华, 章银良等人^[22,23]的方法, 稍作修改。

色谱条件: 色谱柱为 HP-5 (30 mm $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μ m) 弹性石英毛细管柱; 柱温采用程序升温, 初温 50 °C 保持 2 min, 然后以 4 °C/min 升温至 220 °C, 保持 15 min; 进样量 1 μ L; 载气 N_2 , 流量 1 mL/min; 分流比 10:1。

质谱条件: 传输线温度: 280 °C; 电子轰击 (EI) 离子源 70 eV, 离子源温度 230 °C, 扫描质量范围 m/z: 301-450 AMU; 四极杆温度: 150 °C; 检索的图谱数据库为 Willey 和 NIST 标准质谱图库。

1.3.9 红外光谱分析

采用冷冻干燥的方法制得各分子量 CFH 和 CFH-MRP 粉末, 通过红外光谱衰减全反射法 (ATR-FT-IR) 分别测定 D-木糖、各分子量 CFH 和 CFH-MRPs 的红外光谱图^[24-26], 测试窗口为金刚石, 红外光谱范围是 500~3950 cm^{-1} 。

1.4 统计分析

所有实验至少进行三次独立实验, 结果以平均值 $\pm$ 标准偏差表示, 结果由 Excel 2010 和 Origin 8.0 进行计算、作图和方差分析, $p < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 河蚬酶解物 (CFH) 超滤组分分析

选择具有不同孔径的膜以获得不同分子量范围的酶解物, 在 0.45 μ m 微孔滤膜预处理后, 分子量 < 5 ku 的多肽获得率最高 (68%), 分子量 > 10 ku 的多肽获得率次之 (17%), 分子量 5 ku-10 ku 的多肽获得率最少 (15%)。

2.2 河蚬酶解物美拉德反应产物抗氧化能力

表 1 为不同分子量 CFH 和 CFH-MRP 以及对照 Vc 清除自由基能力和总还原力的比较。从表中可以看出, 对照 Vc 具有最高的 DPPH 自由基清除能力; CFH-MRP 较其相同分子量 CFH 的 DPPH 自由基清除能力均有提高。其中分子量 > 10 ku 的 CFH-MRP 具有最高的 DPPH 自由基清除率 (增加 106%), 5~10 ku 分子量范围的 CFH-MRP 次之 (增加 33%), 分子量 < 5 ku CFH-MRP 最低 (增加 11%), 且三组呈显著性

差异 ($p<0.05$), 表明美拉德反应对不同分子量河蚬水解物 DPPH 自由基清除能力具有显著影响。研究标明, CFH-MRP 一般能够通过提供氢原子的方式与 DPPH 自由基结合, 提高其清除能力^[21]。表中对照 Vc 的羟基自由基清除率达到 99.91%; 各分子量 CFH 经美拉德反应后, 羟基自由基清除能力均显著增强, 且 5~10 ku 分子量范围的 CFH-MRP 活性最高, 其清除率由 67.27% 升至 88.07% (增加 31%), 而分子量 >10 ku 的 CFH-MRP 羟基自由基清除率提高最多 (增加 56%)。超氧离子自由基是生物体内产生其他活性氧自由基的中间物, 对其清除能力可作为抗氧化活性的重要指标^[27]。由表 1 可知, 美拉德反应产物均能够提高河蚬酶解物超氧离子自由基的清除率, 不同分子量组分超氧离子自由基清除能力具有显著性差异 ($p<0.05$), 清除率由大到小依次为 5~10 ku CFH-MRP (增加 33%)、<5 ku CFH-MRP (2%)、>10 ku CFH-MRP (增加 37%), 对照 Vc 具有最高的超氧离子自由基清除能力

(87.68%)。总还原能力是抗氧化活性评价的重要标准, 在相同稀释倍数下, 吸光值越大则还原能力越强, 从表 1 可以看出, 对照 Vc 的总还原能力为 1.45; 美拉德反应后各分子量酶解物还原能力均显著性增强, 其中 5~10 ku 分子量 CFH-MRP 具有最高还原能力, 较相同分子量 CFH 增加 152%, >10 ku CFH-MRP 还原能力次之, 增加为 173%, <5 ku CFH-MRP 还原能力最低, 但增加比例最大 (273%), 这是因为美拉德反应前期产生的杂环类化合物以及生成醛、酮等还原性中间产物表现出的抗氧化性^[28]。

以上结果表明, 美拉德反应产物较其相同分子量酶解物的自由基清除能力以及总还原能力均有提高, 且 5~10 ku CFH-MRP 具有最高的羟基自由基、超氧离子自由基清除能力和总还原能力, >10 ku CFH-MRP 具有最高的 DPPH 自由基清除能力; 而 >10 ku CFH 组分经美拉德反应后各自由基清除能力增加最多, <5 ku CFH 组分经美拉德反应后还原力增加最多。

表 1 不同分子量 CFH 和 CFH-MRP 的抗氧化活性比较

Table 1 Antioxidant activity of CFH and CFH-MRP with different molecular weight

项目	对照 Vc		多肽分子量		
			>10 ku	5~10 ku	<5 ku
DPPH 自由基清除率/%	91.68±2.17	CFH	34.54±3.95 ^c	40.07±5.97 ^b	44.34±2.69 ^a
		CFH-MRPs	72.20±3.60 ^a	52.99±0.34 ^b	49.38±0.89 ^c
		增加/%	105.71	32.50	11.36
羟基自由基清除率/%	99.91±0.98	CFH	55.21±2.19 ^c	67.27±1.69 ^b	74.54±0.78 ^a
		CFH-MRPs	85.55±2.96 ^b	88.07±1.81 ^a	82.14±3.11 ^c
		增加/%	56.36	31.34	9.33
超氧离子自由基清除率/%	87.68±1.28	CFH	34.97±3.66 ^c	44.54±5.34 ^b	49.77±3.43 ^a
		CFH-MRPs	48.35±2.54 ^c	59.68±1.67 ^a	50.59±2.65 ^b
		增加/%	37.14	33.33	2.00
总还原能力	1.45±0.19	CFH	0.22±0.009 ^b	0.29±0.007 ^a	0.11±0.005 ^c
		CFH-MRPs	0.60±0.007 ^b	0.73±0.035 ^a	0.41±0.015 ^c
		增加/%	172.73	151.72	272.73

注: 同一行的不同字母表示差异显著 ($p<0.05$)。

表 2 不同分子量 CFH-MRP 的 pH 值和接枝度

Table 2 The pH value and grafting degree of CFH-MRP with different molecular weight

多肽 分子量	pH		接枝度/%
	CFH	CFH-MRP	
>10 ku	7.1±0.49 ^{Aa}	5.2±1.01 ^{Aa}	32.87±0.98 ^a
5~10 ku	6.9±0.16 ^{Aa}	5.0±0.86 ^{Aa}	32.85±3.77 ^a
<5 ku	7.2±0.44 ^{Aa}	5.7±0.85 ^{Ba}	22.36±2.15 ^b

注: 不同大写字母 (A, B) 表示同一行数据差异显著 ($p<0.05$); 不同小写字母 (a, b) 表示同一列数据差异显著 ($p<0.05$)。

2.3 河蚬酶解物美拉德反应产物的 pH 值及接枝度

pH 值的变化是评价美拉德反应程度的重要指标^[21], 随着反应的进行, 氨基逐渐减少, pH 值也会逐渐降低^[29]。从表 2 中可以得出, 美拉德反应前各分子量 CFH 的 pH 值无显著性差异, 发生美拉德反应后各分子量 CFH-MR 均下降, 其中 <5 ku CFH-MRP pH 值最高, 5~10 ku CFH-MRP 与 >10 ku CFH-MRPs 无显著性差异。可能是因为羰基和氨基共存反应生成了多种

有机酸,使得氨基减少^[30]。这与大豆蛋白水解物(PHS)美拉德反应 pH 值的变化结果相似^[31]。接枝度的大小能够反映美拉德产物中氨基的含量,产物接枝度越大,表明其美拉德反应程度越高^[32]。如表 2 所示,5~10 ku CFH-MRP 和>10 ku CFH-MRP 具有较高的接枝度,且无显著性差异,<5 ku CFH-MRPs 接枝度最低。这也进一步说明了 5~10 ku 和>10 ku 河蚬酶解物的美拉德反应程度较高,产生较多的糖肽聚合物。

2.4 褐变程度

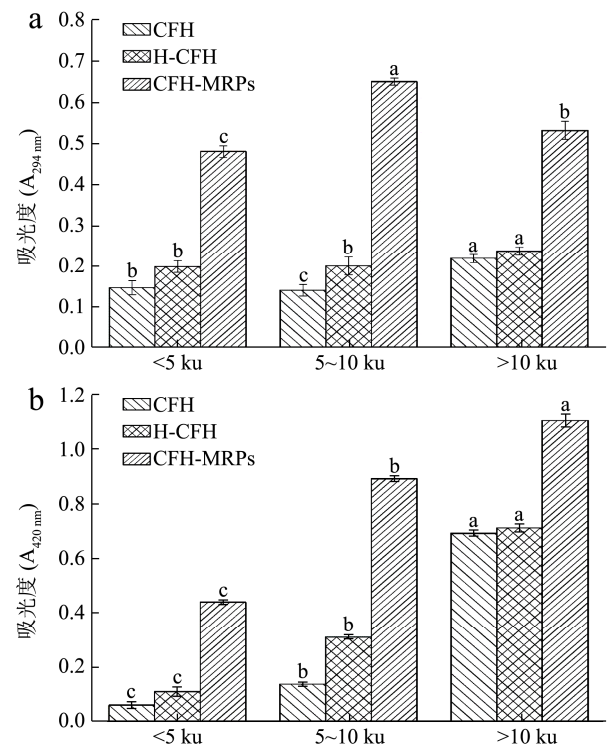


图1 CFH、H-CFH 和 CFH-MRPs 的褐变强度

Fig.1 Browning intensity of CFH, H-CFH and CFH-MRPs

注: a: 294 nm 波长; b: 420 nm 波长。

A_{294 nm} 反映了美拉德反应未着色中间产物的含

量,这些物质主要是糖脱水分解以及糖裂解产生的酮、醛类等小分子^[33]。从图 1a 中可得,经美拉德反应相同时间和温度加热过后的各分子量 CFH 吸光值无显著性变化,表明加热对河蚬酶解物褐变强度的变化没有明显的影响。美拉德反应产物吸光值均显著增大,表明有大量初期 Amadori 分子重排产物产生^[34]。其中 5~10 ku CFH-MRP 的吸光值最大,说明此分子量 CFH-MRP 富集了大量反应中间阶段产物。A_{420 nm} 处吸光值可作为美拉德反应程度的判断标准^[35],由图 1b 可以看出,加热对河蚬酶解物褐变强度影响可以忽略,>10 ku CFH-MRP 吸光值最大,而 5~10 ku CFH-MRP 在 420 nm 处吸光值增加率最大(85%)。这表明随着反应的进行,生成了大量具有抗氧化活性的褐色聚合物-类黑精^[36],提高了河蚬酶解物的抗氧化能力。

2.5 GC-MS 分析

采用 GC-MS 对不同分子量 CFH-MRPs 的挥发性成分进行了分析。由表 3 可知,在相同温度下三种分子量 CFH-MRP 共同产生环庚酮、棕榈酸甲酯、2,6-二-叔-丁基-4-甲基苯酚、2,4-二-叔-丁基苯酚、(Z)-十五碳-9-烯-1-醇、十五烷酸酐等化合物,其总量分别为 89.96%、84.85%和 79.95%。其中环庚酮是还原性酮,具有一定抗氧化活性,2,6-二-叔-丁基-4-甲基苯酚又称防老剂 BHT、抗氧化剂 BHT,是优良的抗氧化剂,其含量分别为 12.49%、19.83%和 9.12%。2,4-二-叔-丁基苯酚可用于合成抗氧化剂的原料。戊基十一烷基亚硫酸酯、邻苯二甲酸二丁酯等酯类化合物稳定不易被氧化^[22]。另外美拉德反应还产生酮类(7-乙基壬烷-4-酮、1-氯十八烷-3-酮等)、1,4-二甲基哌嗪等含 N 的杂环类化合物,这类物质具有良好的抗氧化活性,有些物质甚至与食品中常见的抗氧化剂功效相似^[37]。

表 3 不同分子量 CFH-MRP 挥发性成分分析

Table 3 Volatile compounds of CFH-MRP with different molecular weights

序号	保留时间/min	化合物名称	峰面积百分比/100%			匹配度
			>10 ku	5 ku~10 ku	<5 ku	
1	3.711	邻二甲苯	0.96	1.56	0.78	93
2	4.160	苯乙烯	1.45	2.39	1.18	91
3	6.495	3-乙基-2,2,5,5-四甲基己烷	0.35	0.54	0.22	92
4	7.947	环庚酮	0.75	0.41	0.36	82
5	7.936	2-羟基-3-甲基环戊-2-烯酮	0.41	-	0.17	90
6	8.528	5-丁基壬烷	0.32	0.31	0.2	86
7	8.683	5-甲基-5-丙基壬烷	-	0.12	-	87
8	8.831	尿嘧啶	-	-	0.13	79

转下页

接上页						
9	8.833	1,4-二甲基呋喃	-	0.46	-	83
10	9.370	3-乙基-2-羟基环戊-2-烯酮	0.12	-	-	81
11	9.919	2,7,7-三甲基壬烷	0.08	0.13	0.06	87
12	10.063	壬烷醛	-	0.33	-	87
13	10.066	(E)-十七碳-8-烯醛	-	-	0.09	83
14	10.068	(E)-癸-2-烯-1-醇	0.21	-	-	88
15	11.658	聚二甲基硅氧烷	-	-	0.42	86
16	12.847	O-苯基羟胺	0.14	0.2	-	76
17	14.734	对苯二酚	-	0.15	-	74
18	15.482	戊基十一烷基亚硫酸酯	0.23	0.43	0.19	85
19	18.32	7-乙基壬烷-4-酮	-	0.09	-	77
20	19.146	5-乙基-3-甲基辛烷	0.15	0.22	-	86
21	20.252	1,1'-(1,3-亚苯基)二乙醇	-	-	0.07	73
22	21.475	十二烷-1-醇	0.57	1.01	-	88
23	21.735	1-(4-(2-羟基丙烷-2-基)苯基)乙醇	0.15	0.35	0.13	80
24	21.820	3-甲基十四烷-3-醇	0.32	-	-	78
25	22.011	8-甲基十七烷	0.12	0.54	0.23	81
26	22.438	2,6-二叔-丁基-4-甲基苯酚	12.49	19.83	9.12	92
27	22.734	8a-甲基六氢茶-1,8(2H,8aH)-二酮	0.13	1.17	0.37	80
28	22.840	2,4-二叔-丁基苯酚	0.18	0.38	0.14	89
29	23.089	十七烷	-	5.53	-	0.26
30	24.854	N1-十二基-N2-(噻唑-2-基)氧脲酰胺	-	1.14	0.31	87
31	26.505	1-氯十八烷-3-酮	0.15	0.33	0.65	88
32	26.729	1,3,5-三烯丙基-1,3,5-三吡己环-2,4,6-三酮	0.11	0.12	-	83
33	26.924	十四烷基 2-氯乙酸酯	-	0.43	0.75	87
34	27.522	三十六烷	-	0.34	-	83
35	27.898	异丁基(2-异丙基-3-甲基丁基)(4-苯基丁氧基)硅烷	-	-	0.21	67
36	29.472	十六烷酸	3.6	0.25	-	83
37	31.491	邻苯二甲酸二丁酯	1.06	0.254	0.17	93
38	32.359	(E)-甲基十六碳-11-烯酸酯	0.11	-	-	80
39	32.677	五十八烷	-	0.25	-	79
40	32.901	棕榈酸甲酯	0.31	0.5	0.08	85
41	34.301	1,2,3,5-四异丙基环己烷	-	-	6.14	74
42	34.400	(Z)-十四碳-12-烯醛	0.3	-	-	79
43	34.575	8-戊基十五烷	0.17	-	-	74
44	36.249	(E)-二十二碳-10-烯	0.09	-	-	64
45	33.680	(10E,13E)-甲基二十碳-10,13-二烯酸酯	0.71	0.92	0.21	79
46	38.183	(Z)-十五碳-9-烯-1-醇	51.36	39.35	48.24	85
47	38.508	13-溴十四烷酸	0.08	-	-	71
48	38.708	硬脂酸盐异丙基	-	-	1.53	89
49	39.467	十五烷-1,1-二基二环戊烷	0.06	-	-	78
50	40.821	十五烷酸酐	1.66	1.42	1.73	85
51	42.801	二(6-甲基庚基)己二酸盐	0.33	-	0.36	80

转下页

接上页

52	43.237	6,6'-亚甲基二(2-(叔-丁基)-3-甲基苯酚)	0.79	0.73	-	86
53	43.374	(E)-3-羟基丙基十八碳-9-烯酸酯	1.41	1.01	1.56	80
54	43.967	16-羟基十六烷酸	-	0.21	-	63
55	44.209	(Z)-8-甲基十四碳-9-烯-1-基乙酸酯	15.56	11.7	12.74	72
56	44.723	16-羟基十六烷酸	0.42	0.59	0.56	73
57	48.185	丁氧基(环己基)二甲基硅烷	0.11	0.74	1.03	83

2.6 红外光谱分析

图 2 为 500~4950 cm⁻¹ 范围各分子量范围 CFH-MRP 以及 D-木糖的红外光谱图。由图 2a 可知, 三种分子量 CFH-MRP 在 1500 cm⁻¹ 附近均有吸收峰, 此为 C=O 的吸收峰, 表明在美拉德反应的过程中产生了还原酮等物质。在 1240~1140 cm⁻¹ 之间是酯类的特征吸收, 说明反应后有酯类化合物的存在。由上可知 5~10 ku CFH-MRP 具有最强抗氧化活性。如图 2b 所示, 在 3700~3100 cm⁻¹ 区域, CFH-MRP 较 CFH 吸收峰变宽, 由此可见 D-木糖与 CFH 发生了共价交联^[38], 产生了吡嗪 (C-N)、Amadori 重排产物等化合物。1250~950 cm⁻¹ 区域为蛋白质侧链振动吸收峰, CFH-MRP 在该区域大部分吸收峰消失, 说明肽侧链结构发生了变化。

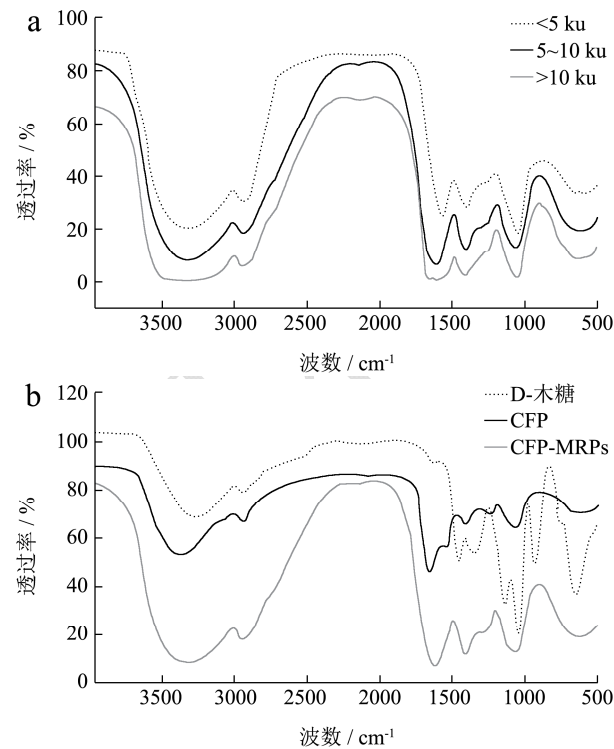


图 2 各物质红外光谱图

Fig.2 FT-IR spectra of various substances

注: a. 各分子量 CFH-MRPs; b. D-木糖、CFH 和 CFH-MRPs。

3 结论

通过超滤法将河蚬酶解液进行分级, 并与 D-木糖进行美拉德反应获得三种分子量 CFH-MRP。结果表明, 美拉德反应能够显著提高 CFH 的抗氧化能力, 其中 5 ku~10 ku CFH-MRP 具有最高抗氧化能力, >10 ku CFH-MRP 抗氧化能力次之。高分子量 CFH-MRP (5 ku~10 ku、>10 ku) 具有更低的 pH 值和更高的接枝度以及褐变程度, 表明其美拉德反应程度更高且生成更多类黑精物质。GC-MS 和傅里叶红外光谱显示河蚬水解物的肽链结构发生改变, 生成酮类、酯类、醇类、烯烃、酚类和杂环类物质。上述结果可为提高天然抗氧化肽活性提供依据, 为河蚬高值化利用提高参考。

参考文献

[1] Reddy B S, Reddy R K, Reddy B P, et al. Potential *in vitro* antioxidant and protective effects of *Soymida febrifuga* on ethanol induced oxidative damage in HepG2 cells [J]. Food and Chemical Toxicology, 2008, 46(11): 3429-3442

[2] 陈洁,胡晓赞.蛋白水解物的抗氧化性研究与展望[J].中国食品学报,2011,11(9):111-119

CHEN Jie, HU Xiao-yun. Review on the antioxidant properties of protein hydrolysates [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2011, 11(9): 111-119

[3] 毛善勇,周瑞宝,马宇翔,等.美拉德反应产物抗氧化活性[J].粮食与油脂,2003,11:15-16

MAO Shan-yong, ZHOU Rui-bao, MA Yu-xiang, et al. Antioxidative activity of maillard reaction products [J]. Cereals and Oils, 2003, 11: 15-16

[4] Heo S J, Park E J, Lee K W, et al. Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds [J]. European Food Research and Technology, 2005, 221(1-2): 41-47

[5] 裴小平,唐道邦,肖更生,等.抗氧化肽制备的应用现状及趋势[J].食品工业科技,2009,2:319-322

PEI Xiao-ping, TANG Dao-bang, XIAO Geng-sheng, et al. Application status and trends of preparation of anti-oxidation

- peptides [J]. Science and Technology of Food Industry, 2009, 2: 319-322
- [6] Liu S C, Yang D J, Jin S Y, et al. Kinetics of color development, pH decreasing, and anti-oxidative activity reduction of Maillard reaction in galactose/glycine model systems [J]. Food Chemistry, 2008, 108(2): 533-541
- [7] Hao J, Kitts D D. Antioxidant activity of sugar-lysine Maillard reaction products in cell free and cell culture systems [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2004, 429(2): 154-163
- [8] 王延平,赵谋明,彭志英,等.美拉德反应产物研究进展[J].食品科学,1999,20(1):15-19
WANG Yan-ping, ZHAO Mou-ming, PENG Zhi-ying, et al. The progress of Maillard reaction products [J]. Food Science, 1999, 20(1): 15-19
- [9] Zeng Y, Zhang X, Guan Y, et al. Enzymatic hydrolysates from tuna backbone and the subsequent Maillard reaction with different ketohexoses [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2012, 47(6): 1293-1301
- [10] 孟艳丽,董士远.美拉德反应修饰的鲢鱼肽抗氧化活性初探[J].肉类研究,2010,8:26-30
MENG Yan-li, DONG Shi-yuan. Preliminary research on antioxidant activity of silver carp peptides modified by Maillard reaction [J]. Meat Research, 2010, 8: 26-30
- [11] Sun Q, Luo Y. Effect of Maillard reaction conditions on radical scavenging activity of porcine haemoglobin hydrolysate-sugar model system [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2011, 46(2): 358-364
- [12] Jisang K, Youngsoon L. Antioxidant activity of Maillard reaction products derived from aqueous glucose/glycine, diglycine, and triglycine model systems as a function of heating time [J]. Food Chemistry, 2009, 116(1): 227-232
- [13] Liao N, Zhong J, Ye X, et al. Ultrasonic-assisted enzymatic extraction of polysaccharide from *Corbicula fluminea*: Characterization and antioxidant activity [J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 60(2): 1113-1121
- [14] 韩鹏,邱兵兵,李华亮,等.河蚬乙酸乙酯提取物的抗氧化活性及其对人胆管癌细胞的抑制作用[J].厦门大学学报(自然版),2009,48(4):576-580
HAN Peng, QIU Ping-ping, LI Hua-liang, et al. Cholangiocarcinoma cells of *Corbicula fluminea* ethyl acetate extract [J]. Journal of Xiamen University (Natural Science), 2009, 48(4): 576-580
- [15] Chen Y, Wang M, Rosen T R, et al. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical-scavenging active components from *Polygonum multiflorum* Thunb [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47(6): 2226-2228
- [16] Jang M H, Kim H Y, Kang K S, et al. Hydroxyl radical scavenging activities of isoquinoline alkaloids isolated from *Coptis chinensis* [J]. Archives of Pharmacal Research, 2009, 32(3): 341-345
- [17] Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase [J]. European Journal of Biochemistry, 1974, 47(3): 469-474
- [18] Oyaizu M. Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine [J]. Japanese Journal of Nutrition and Dietetics, 1986, 44(6): 307-316
- [19] Bae S H, Suh H J. Antioxidant activities of five different mulberry cultivars in Korea [J]. LWT- Food Science and Technology, 2007, 40(6): 955-962
- [20] Barbanti D, Mastrocola D, Lericci C R. Early indicators of chemical changes in foods due to enzymic or non enzymic browning reactions. II. Colour changes in heat treated model systems [J]. LWT-Food Science and Technology, 1990, 23(6): 494-498
- [21] Morales F J, Jiménez-Pérez S. Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence [J]. Food Chemistry, 2001, 72(1): 119-125
- [22] 章银良,张陆燕,周文权,等.不同温度对酪蛋白-木糖模式美拉德反应产物抗氧化性的影响[J].现代食品科技,2014, 30(4):211-219
ZHANG Yin-liang, ZHANG Lu-yan, ZHOU Wen-quan, et al. Effect of temperature on antioxidation of casein-xylose Maillardf [J]. Modern Food Science and Technolgy, 2014, 30(4): 211-219
- [23] 徐象华,卢涛,胡旭腾,等.瓯柑果皮挥发油成分的提取及GC/MS分析[J].浙江林业科技, 2009,29(5):55-58
XU Xiang-hua, LU Tao, HU Xu-teng, et al. Extraction of essentail oil in skin of *Citrus suavisissima* and analysis by GC/MS [J]. Journal of Zhejiang Forestry Science and Technology, 2009, 29(5): 55-58
- [24] 王冰,柯丽华,田波.抗草鱼出血病病毒多肽的结构分析[J].中国病毒学,1998,13(4):358-363
WANG Bing, KE Li-hua, TIAN Bo. Constructural analysis of antiviral peptide to grass carp hemorrhage virus [J]. Virologica Sinica, 1998, 13(4): 358-363
- [25] 范佳琳,杨芮,王汝沫,等.红外光谱衰减全反射法分析快餐食品包装材料的成分[J].广州化工,2017,45(19):97-98

- FAN Jia-lin, YANG Rui, WANG Ru-mo, et al. ATR-FT-IR study on composition of fast food packaging materials [J]. Guangzhou Chemical Industry, 2017, 45(19): 97-98
- [26] 徐文杰,刘茹,洪响声,等.基于近红外光谱技术的淡水鱼品种快速鉴别[J].农业工程学报,2014,30(1):253-261
- XU Wen-jie, LIU Ru, HONG Xiang-sheng, et al. Discrimination of freshwater fish varieties based on near-infrared spectra [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2014, 30(1): 253-261
- [27] Peng X, Xiong Y L, Kong B. Antioxidant activity of peptide fractions from whey protein hydrolysates as measured by electron spin resonance [J]. Food Chemistry, 2009, 113(1): 196-201
- [28] Yoshimura Y, Iijima T, Watanabe T, et al. Antioxidative effect of Maillard reaction products using glucose-glycine model system [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997, 45(10): 4106-4109
- [29] Eric K, Raymond L V, Abbas S, et al. Temperature and cysteine addition effect on formation of sunflower hydrolysate Maillard reaction products and corresponding influence on sensory characteristics assessed by partial least square regression [J]. Food Research International, 2014, 57(1): 242-258
- [30] Brands C M, van Boekel M A. Kinetic modeling of reactions in heated monosaccharide-casein systems [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(23): 6725-6739
- [31] Yu M, He S, Tang M, et al. Antioxidant activity and sensory characteristics of Maillard reaction products derived from different peptide fractions of soybean meal hydrolysate [J]. Food Chemistry, 2017, 243: 249-257
- [32] 杨锋,陈锦屏,林心怡.美拉德反应对醋蛋多肽抗氧化活性的影响[J].食品科学,2013,34(3):137-140
- YANG Feng, CHEN Jin-ping, LIN Xin-yi. Effect of Maillard reaction on antioxidation activity of peptides from vinegar eggs [J]. Food Science, 2013, 34(3): 137-140
- [33] 孙丽平,庄永亮,张莉,等.酶解小麦蛋白产物-还原糖美拉德反应的光谱研究[J].分析化学,2009,37(9):1359-1362
- SUN Li-ping, ZHUANG Yong-liang, ZHANG Li, et al. Spectroscopic studies on Maillard reaction of wheat protein hydrolysates and reducing sugars [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2009, 37(9): 1359-1362
- [34] Lertittikul W, Benjakul S, Tanaka M. Characteristics and antioxidative activity of Maillard reaction products from a porcine plasma protein-glucose model system as influenced by pH [J]. Food Chemistry, 2007, 99(2): 669-677
- [35] 沈军卫,樊金玲,朱文学,等.模式美拉德反应产物的抗氧化性与反应进程的关系研究[J].食品科技,2010,35(3):253-257
- SHEN Jun-wei, FAN Jin-ling, ZHU Wen-xue, et al. Antioxidant activity of Maillard reaction products as related to the processing of Maillard reaction [J]. Food Science and Technology, 2010, 35(4): 253-257
- [36] 项惠丹,许时婴,王璋.蛋白质与还原糖美拉德反应产物的抗氧化活性[J].食品科学,2008,29(7):52-57
- XIANG Hui-dan, XU Shi-ying, WANG Zhang. Antioxidant activities of Maillard reaction products of protein and reducing sugar [J]. Food Science, 2008, 29(7): 52-57
- [37] 赵谋明,刘洋,张佳男,等.木糖-草鱼肽美拉德反应产物的抗氧化性[J].农业工程学报,2014,30(9):279-286
- ZHAO Mou-ming, LIU Yang, ZHANG Jia-nan, et al. Antioxidant activity of Maillard reaction products derived from xylose and *Ctenopharyngodon idellus* peptide [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2014, 30(9): 279-286
- [38] Wang W Q, Bao Y H, Chen Y. Characteristics and antioxidant activity of water-soluble Maillard reaction products from interactions in a whey protein isolate and sugars system [J]. Food Chemistry, 2013, 139(1-4): 355-361

(上接第 50 页)

- [35] Al-Dagal M M, Bazaraa W A. Extension of shelf life of whole and peeled shrimp with organic acid salts and bifidobacteria [J]. Journal of Food Protection, 1999, 62(1): 51-56
- [36] 凌萍华,谢晶,赵海鹏,等.冰温贮藏对南美白对虾保鲜效果的影响[J].江苏农业学报,2010,26(4):828-832
- LENG Ping-Hua, XIE Jing, ZHAO Hai-Peng, et al. Effects of super-chilling treatment on fresh-keeping of *Litopenaeus vannamei* [J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2010, 26(4): 828-832
- [37] 吴佩君,唐树平,彭名军,等.南美白对虾的冷藏特性及生物保鲜剂对腐败菌的抑制作用[J].食品工业科技,2017,38(10):341-344
- WU Pei-Jun, TANG Shu-Ping, PENG Ming-Jun, et al. Refrigerated characteristics of *Penaeus vannamei* and effects of biological preservatives against the spoilage bacteria [J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(10): 341-344

现代食品科技