

羟自由基氧化对鲢鱼糜凝胶品质的影响

方海砚^{1,2} 苑 歆¹ 刘友明^{1,2} 熊善柏^{1,2}

1.华中农业大学食品科学技术学院,武汉 430070;
2.国家大宗淡水鱼加工技术研发分中心(武汉),武汉 430070

摘要 以冷冻鲢鱼糜为研究对象,用芬顿体系(H_2O_2 的浓度分别为 0.1,1.0,5.0,10.0 和 50.0 mmol/L)产生不同浓度的羟基自由基对其进行模拟氧化,研究冷冻鱼糜贮藏过程中氧化程度对鱼糜品质的影响。结果表明:随着 H_2O_2 浓度的增大,鱼糜的破断力、凹陷深度、凝胶强度和持水性都呈现先增加后降低的趋势,在 H_2O_2 浓度为 1.0 mmol/L 时均达到最大值;鱼糜凝胶水分状态分布中 T_{22} 峰面积也在 H_2O_2 浓度为 1.0 mmol/L 时达到最大值; Ca^{2+} -ATPase 活性随着 H_2O_2 浓度的增大呈现先显著增大后降低的趋势;鱼糜凝胶的扫描电镜图片显示,适度氧化(H_2O_2 浓度为 0.1~1.0 mmol/L)的鱼糜凝胶拥有更加致密的网络结构,具有较小的孔隙,而过度氧化(H_2O_2 浓度为 10~50 mmol/L)又会导致网络结构的破坏。

关键词 鲢;鱼糜;冷冻贮藏;羟自由基;氧化;凝胶特性;微观结构

中图分类号 TS 254.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2019)06-0009-09

鱼糜制品是一种典型的水产深加工制品,2018 年全国总产量达到 145.55 万 t^[1]。冷冻鱼糜是生产鱼糜制品的主要原料,它是将鱼体经过前处理、清洗、采肉、漂洗、精滤、脱水、混合和速冻等工序加工而成,然后再进行冷冻贮藏。由于海洋鱼类资源的衰退以及国家对近海捕捞的限制,海水鱼糜的供应持续减少,淡水鱼糜作为替代品逐渐受到企业重视。鲢具有生产繁殖快、价格低、鱼肉凝胶性能较好等优点,是目前生产冷冻淡水鱼糜的主要原料。

在食品安全国家标准 GB/T 36187—2018《冷冻鱼糜》中没有规定冷冻鱼糜中脂肪的含量^[2]。在冷冻鱼糜贮藏过程中,漂洗后残留的脂肪容易发生氧化反应,可导致冷冻鱼糜发生褐变^[3-4];同时,脂肪氧化反应的自由基等中间产物(例如羟自由基等)会引起鱼糜蛋白发生氧化^[3],从而对鱼糜品质产生影响。已有的研究表明,适度氧化能够改变肌球蛋白的聚集方式从而改善肌原纤维蛋白凝胶特性^[5];Lu 等^[6]发现适度的羟基自由基氧化处理可提高鳙肌原纤维蛋白凝胶质构特性和持水性,而草鱼肌原纤维蛋白经过羟自由基氧化处理后其凝胶强度和凝胶持水性却呈现显著降低趋势^[7],造成以上研究结果差

异的原因可能与鱼种有关,而目前氧化对鲢鱼糜品质影响的研究报道较少。

脂肪初级氧化代表产物是氢过氧化物,而氢过氧化物分解能够产生羟自由基^[8]。为研究鲢鱼糜在贮藏过程中脂肪氧化初级产物对其品质的影响,以鲢鱼糜为对象,采用不同浓度的羟自由基进行模拟氧化,视为不同贮藏时间的鱼糜,通过测定鱼糜凝胶白度、凝胶强度、持水性、水分状态分布、流变学性质、鱼糜 Ca^{2+} -ATPase 活性和微观结构,研究脂肪氧化程度对鲢鱼糜品质的影响,以期对鲢鱼糜品质变化和调控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料与主要试剂

试验材料:鲜活鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*),于春季购于华中农业大学农贸市场,每尾体质量 1.5~2.0 kg,30 min 内通过充氧运输运回实验室,立即宰杀取肉。

主要试剂:NaCl、FeCl₃、 H_2O_2 、Na₂HPO₄、NaH₂PO₄、(NH₄)₂SO₄、CaCl₂、三氯乙酸(TCA)、三磷酸腺苷(ATP)、马来酸、盐酸、乙醇、冰乙酸、戊

收稿日期:2019-07-20
基金项目:国家自然科学基金面上项目(31871835);现代农业产业技术体系(CARS-45-27);中央高校基本科研业务费专项(2662017JC041)
方海砚,硕士研究生,研究方向:水产品加工及贮藏工程. E-mail: 13026117029@163.com
通信作者:刘友明,博士,副教授,研究方向:水产品加工及贮藏工程. E-mail: lym@mail.hzau.edu.cn

二醛、醋酸异戊酯、乙二胺四乙酸(EDTA)、二硫苏糖醇(DTT)、N,N-二甲基酪蛋白(DMC)、丹黄尸胺(MDC)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)等,均为分析纯,购于国药集团化学试剂有限公司。

1.2 试验仪器

AUY220 分析天平,日本岛津公司;HH-6 数显恒温水浴锅,国华电器有限公司;K600(3205)食物调理机,博朗电器(德国)公司;722 型分光光度计,上海舜宇恒平精密科学仪器有限公司;FJ-200 高速分散均质机,上海标本模型厂;Ultrascan XE 型色度仪,美国 Hunter Lab 公司;TA-XTPlus 质构仪,英国 Stable Micro Surrey 公司;AVANTI J-26 高速冷冻离心机,美国贝克曼公司;RF-5301 荧光分光光度计,日本岛津公司;NMI20 核磁共振成像仪,上海纽迈电子科技有限公司;JSM-6390LV 扫描电镜,日本 NTC 公司;AR2000ex 型动态流变仪,美国 TA Instruments Lat。

1.3 试验方法

1)鱼糜的制备及其氧化。参考 GB/T 36395—2018《冷冻鱼糜加工规范》并略作修改,新鲜鲢宰杀,“三去”后用采肉机采肉,用传统漂洗方式(即 2 次冰水、1 次盐水漂洗)漂洗,之后用三足式离心机 3 000 r/min 离心 20 min,获得鱼糜^[9]。得到的鱼糜脂肪含量为 1.14%。将鱼糜用不同浓度的芬顿(Fenton)体系(其中,FeCl₃、抗坏血酸浓度均为 0.1 mmol/L, H₂O₂ 浓度分别为 0、0.1、1.0、5.0、10.0 和 50.0 mmol/L)氧化,每 200 g 鱼糜加入 25 mL Fenton 体系溶液(抗坏血酸、FeCl₃ 和 H₂O₂ 的体积比=1:1:3),将鱼糜放在 4℃ 冰箱氧化 40 h。

2)鱼糜凝胶的制备。参考谢青青等^[10]方法制作鱼糜凝胶,调节鱼糜水分含量至 80%,加质量分数 2.5% 的 NaCl 溶液,斩拌 3 min。将鱼糜灌成鱼肠(直径 25 mm),封口。采用两段加热法制作鱼糜凝胶,即 40℃ 加热处理 1 h、90℃ 加热处理 0.5 h,冷却,于 4℃ 冷藏 24 h。

1.4 鱼糜凝胶白度的测定

参考 Benjakul 等^[11]方法,将鱼糜凝胶切成厚度 5 mm 的圆片,采用色度仪测定白度(W),平行测量 10 次,白度计算公式见式(1):

$$W=100-[(100-L^*)^2+a^{*2}+b^{*2}]^{1/2} \quad (1)$$

1.5 鱼糜凝胶强度的测定

将鱼糜凝胶切成高度 20 mm 的圆柱体。在室温条件下用质构仪进行测定,具体参数如下:探头型

号为 P/0.25S,测前、测后速度均为 5 mm/s,测试速度 1 mm/s^[12]。

1.6 鱼糜凝胶持水性的测定

采用离心法测量^[13],将鱼糜凝胶切成厚 3 mm 的圆片,取 3 片称质量(m_1),用滤纸包裹 2 层,4 000 r/min 离心 15 min,将离心后样品称质量(m_2)。持水性按式(2)计算:

$$\text{持水性} = m_2/m_1 \times 100\% \quad (2)$$

1.7 鱼糜凝胶水分状态分布的测定

样品在室温下放置 30 min 后,切成 10 mm×10 mm×20 mm 的长方体并置于核磁管中,采用 Carr-Purcell-Meiboom-Gill(CPMG)脉冲序列进行自旋-自旋弛豫时间 T_2 、 T_2 峰面积比的测定。参数设定:质子共振频率 22 MHz,测定温度 32℃,90°脉冲宽度 14 μs,采样宽度 100 kHz,τ-值 200 μs,重复扫描 8 次,重复采样时间间隔 4 500 ms。所得 CPMG 指数衰减曲线用纽迈含油含水率核磁共振测量软件 Ver2.0 进行反演得到 T_2 峰位置和 T_2 峰面积比^[14]。

1.8 鱼糜流变学性质的测定

1)鱼糜动态流变学性质的测定。参考 Yoon 等^[12]的方法并做修改,采用 AR2000ex 型动态流变仪测定,选用直径为 40 mm 的平板。以 2℃/min 的升温速率从 20℃ 升到 90℃,用涂有 3-甲基硅油的密封盖封住样品以防止加热过程中水分的蒸发。参数设定为:间隙为 1 000 μm,频率 0.1 Hz,剪切应力 100 Pa。记录升温过程中弹性模量(G')、损耗模量(G'')的变化。

2)鱼糜凝胶化温度的计算。参考 Yoon 等^[12]的方法进行计算,计算出在温度 40~60℃ 内 dG'/dT 的函数关系, T_{gel} 为 $dG'/dT=0$ 时对应的温度。弹性模量 G' 和温度 T 之间的关系用式(3)进行描述。

$$G' = \beta + \alpha_1 T^1 + \alpha_2 T^2 + \alpha_3 T^3 \quad (3)$$

式(3)中: G' 为弹性模量,Pa; T 为绝对温度,K; β 、 α_1 、 α_2 和 α_3 为方程系数。

3)鱼糜凝胶活化能的计算。参考 Yoon 等^[12]的方法进行计算,对非等温动力学模型经过进一步运算可得式(4):

$$\ln \left[\left(\frac{1}{G'_n} \right) \left(\frac{dG'}{dt} \right) \right] = \ln k_0 - \left(\frac{E_a}{RT} \right) \quad (4)$$

式(4)中: G' 为弹性模量; n 为反应级数; t 为时间; k_0 为频率因子; E_a 为活化能,J/mol; T 为绝对温度,K; R 为摩尔气体常数,8.314 J/(mol·K)。

取 $n=2$,用 SPSS 对 $\ln \left[\left(\frac{1}{G'^2} \right) \left(\frac{dG'}{dt} \right) \right]$ 和 $1/T$

进行线性拟合,通过计算出斜率可得凝胶活化能。

1.9 鱼糜 Ca²⁺-ATPase 活性的测定

蛋白提取:称取 2 g 鱼糜样品于离心管中,用 10 倍高盐磷酸缓冲液(0.5 mol/L NaCl-0.01 mol/L NaH₂PO₄-0.03 mol/L Na₂HPO₄, pH=7.0)溶解,均质,于 5℃浸提 20 h,12 000 r/min,离心 10 min,取上清液,然后用福林酚比色法测定蛋白质含量^[15]。

Ca²⁺-ATPase 活性的测定:参考 Benjakul 等^[16]的方法并作了改进。吸取已提取的肌原纤维蛋白溶液 1 mL(质量浓度 2.5~4.0 mg/mL)与 0.6 mL 0.5 mol/L 的 Tris-马来酸缓冲液(pH 7.0)混匀,然后加入 1 mL 0.1 mol/L 的 CaCl₂ 溶液。最后加入双蒸水使最终体积达到 9.5 mL。加入 0.5 mL 20 mmol/L 的 ATP 溶液(pH 7.0)引发反应,反应温度为 25℃,以 5 mL 质量分数 15% TCA 溶液终止该反应。最终反应液在 25℃和 4 000 r/min 条件下离心 5 min,上清液中无机磷含量的测定用钼蓝比色法。Ca²⁺-ATPase 活性表示为 μmol/(mg·min)。空白组以溶解肌原纤维蛋白的相应的缓冲液代替蛋白样液。

1.10 鱼糜凝胶微观结构

将制备的样品切成宽度约 2~3 mm 的正方形小块,厚度 1 mm,然后用 2.5%戊二醛固定 2~7 h 后,用乙醇梯度洗脱(体积分数分别为 30%、50%、

70%、80%、95%、100%、100%)15 min,再用醋酸异戊酯溶液洗脱(乙醇:醋酸异戊酯体积比为 1:1)20 min。处理好的样品立即冷冻干燥,干燥好后对样品进行喷金处理,用扫描电镜在加速电压为 3 kV 条件下观测^[17]。

1.11 数据处理与统计分析

采用 SAS 9.2 分析软件中的 ANOVA 程序进行显著性分析,数据绘图采用 Origin 8.5 软件。

2 结果与分析

2.1 羟基自由基氧化对鱼糜凝胶白度的影响

随 H₂O₂ 浓度的增加,鱼糜凝胶的亮度(L*)、红/绿(+a*/-a*)度、黄/蓝(+b*/-b*)度及白度(W)的变化如表 1 所示。与未氧化的空白对照组相比,H₂O₂ 浓度在 0.1~10.0 mmol/L 时,羟自由基氧化对凝胶白度的影响不大,而当 H₂O₂ 浓度为 50 mmol/L 时,羟自由基又使凝胶白度显著降低(P<0.05),这可能是此时蛋白质氧化变性严重而导致凝胶白度降低^[18]。随着 H₂O₂ 浓度的增加,a* 呈下降趋势,这可能与鱼糜中残留的肌红蛋白被氧化有关。Wongwichian 等^[19]研究发现,肌红蛋白易被羟自由基氧化从而导致红度下降。羟自由基氧化可使鱼糜凝胶亮度(L*)降低,这可能是由于凝胶形成过程中蛋白质氨基酸侧链与脂肪氧化产物发生了美拉德反应^[20]。

表 1 羟基自由基氧化对鱼糜凝胶白度的影响

Table 1 Effect of hydroxyl radical oxidation on gel whiteness

H ₂ O ₂ 浓度/(mmol/L) H ₂ O ₂ concentration	L*	a*	b*	W
0	82.14±0.44a	-2.93±0.06a	4.40±0.31a	81.37±0.43ab
0.1	82.02±0.52a	-2.99±0.04a	2.19±0.33b	81.64±0.52a
1.0	81.19±0.83bc	-2.93±0.07a	1.56±0.20c	80.90±0.82bc
5.0	81.74±0.91ab	-3.09±0.12b	2.17±0.24b	81.35±0.89ab
10.0	81.58±0.51b	-3.07±0.09b	2.04±0.27b	81.21±0.51ab
50.0	80.78±0.55c	-3.16±0.06c	1.94±0.30b	80.43±0.54c

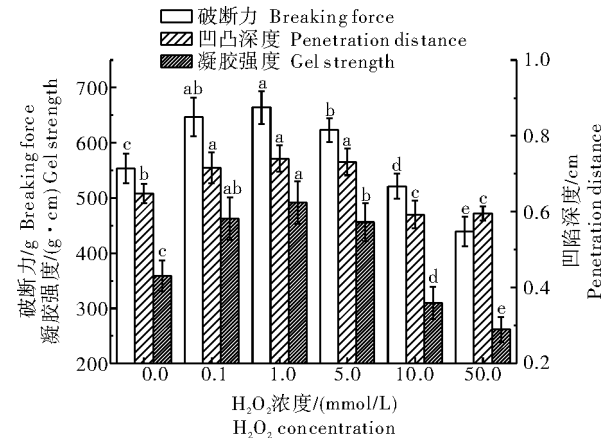
注:同一列不同字母表示相关性显著(P<0.05)。下表同。Note: different letters in the same column indicate significant difference at P<0.05. The same as below.

2.2 羟基自由基氧化对鱼糜凝胶质构特性的影响

羟基自由基氧化对鱼糜凝胶质构特性的影响如图 1 所示,破断力、凹陷深度和凝胶强度都随着 H₂O₂ 浓度的升高呈现先上升后下降的趋势,并在 H₂O₂ 浓度为 1.0 mmol/L 时达到最大值。与对照组相比,破断力、凹陷深度和凝胶强度分别增加了 19.88%、14.37%和 36.95%。其中破断力和凹陷深度分别体现凝胶的硬度和弹性。试验结果表明适度

的氧化(H₂O₂ 浓度为 0.1~1.0 mmol/L 时)能够提高鱼糜凝胶硬度、弹性和凝胶强度,而过度的氧化(H₂O₂ 浓度为 10~50 mmol/L 时)则会造成鱼糜凝胶硬度、弹性和凝胶强度的降低。这可能是由于适度氧化可促进蛋白质的展开,使部分蛋白通过二硫键和二聚酪氨酸等方式发生交联和聚集,增强凝胶网络结构,从而改善鱼糜凝胶品质^[21],而过度氧化一方面会严重改变蛋白质的结构,会影响蛋白在

正常凝胶过程中的有序聚集^[22];另一方面过度氧化会使蛋白质内部的疏水性基团暴露而使分子间疏水相互作用增加,不利于凝胶的形成^[23],导致凝胶性能的劣化。Lu 等^[6]在研究鳙肌原纤维蛋白凝胶也有类似发现。



不同字母表示相关性显著 ($P<0.05$)。下图同。Different letters indicate significant difference at $P<0.05$. The same as below.

图 1 羟基自由基氧化对鱼糜凝胶强度的影响
Fig.1 Effect of hydroxyl radical oxidation on gel strength

2.3 羟基自由基氧化对鱼糜凝胶持水性的影响

羟基自由基氧化对鱼糜凝胶持水性的影响如图 2 所示。由图 2 可知,持水性在 H₂O₂ 浓度为 1.0 mmol/L 达到最大值。适度氧化 (H₂O₂ 浓度为 0.1~1.0 mmol/L 时)能够改善鱼糜凝胶的质构特性(见图 1),质构性能较好的凝胶拥有更加致密的凝胶网络结构,从而能够截留更多的水分^[24],持水性更好。过度氧化会导致持水性降低,这可能是由于肌原纤维蛋白被羟基自由基所氧化,导致蛋白质的结构和构象发生了改变,水合能力下降,形成凝胶的空间网络结构不再均匀和致密,出现一些较大的

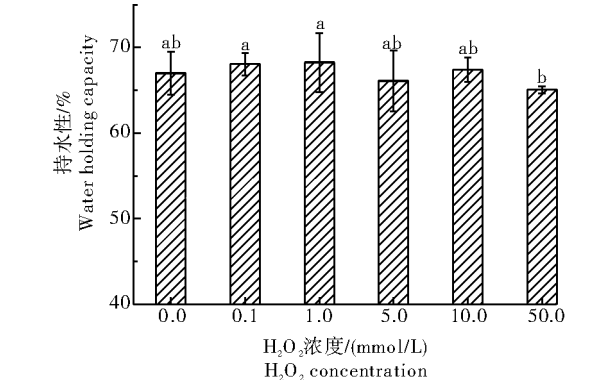


图 2 羟基自由基氧化对鱼糜凝胶持水性的影响
Fig.2 Effect of hydroxyl radical oxidation on gel water-holding capacity

孔隙^[7];另外,凝胶中的水分子被认为是以氢键的形式与蛋白质肽键中的 C=O 和 N—H 基团结合,而氧化会使氢键作用力变弱^[25],从而降低了水分子与蛋白质之间的相互作用,导致持水性下降。

2.4 羟基自由基氧化对鱼糜凝胶水分状态分布的影响

图 3 为不同氧化程度的鲢鱼糜凝胶水分子的 T₂ 弛豫特性。由图 3 可知,鲢鱼糜凝胶中水分状态分布呈 3 种状态,其中 T₂₁ 弛豫时间在 0~1 ms 左右,被认为是结合水,结合水主要是通过共价键等化学作用力结合到蛋白分子上;T₂₂ 弛豫时间在 70 ms 左右,被认为是不易流动水,不易流动水是指被鱼糜凝胶网络结构截留在网络结构内部的水,这部分水含量的高低直接能够反映鱼糜凝胶的持水性能;T₂₃ 弛豫时间在 700 ms 左右,被认为是自由水,自由水是几乎不受束缚、能够自由移动的水^[7]。表 2 是不同氧化程度的鲢鱼糜凝胶水分子 T₂ 弛豫峰面积比例的变化。由表 2 可知,随着 H₂O₂ 浓度的增加, T₂₂ 弛豫峰面积比例呈先增加后下降的趋势,在 H₂O₂ 浓度为 1.0 mmol/L 时达到最大值,而相对的 T₂₃ 弛豫峰面积比例呈先下降后上升的趋势。说明适度氧化使鲢鱼糜凝胶网络结构更加致密,从而使部分自由水截留在凝胶网络结构当中形成不易流动水;而过度氧化会破坏鲢鱼糜凝胶网络结构,网络结构变得疏松且孔隙增大,使部分被截留在凝胶网络结构中的水失去束缚变为自由水。不同氧化程度鱼糜凝胶持水性的变化(图 2)与 T₂ 弛豫峰面积比例变化相一致。

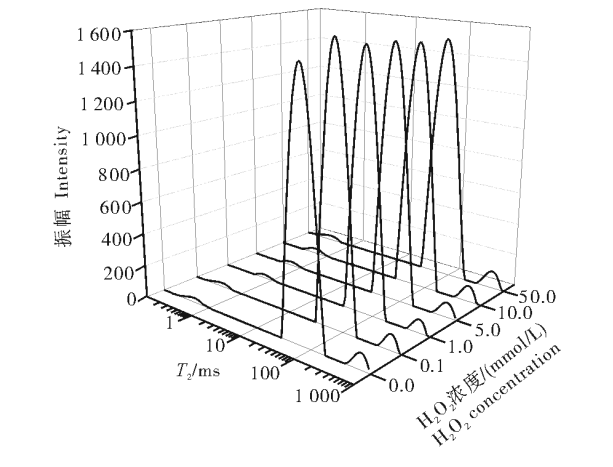


图 3 羟基自由基氧化对鱼糜凝胶水分状态分布的影响
Fig.3 Effect of hydroxyl radical oxidation on moisture distribution of surimi gel

表 2 羟自由基氧化对鱼糜凝胶水分子
 T_2 弛豫峰面积比例的影响

Table 2 Effect of hydroxyl radical oxidation on T_2 peak area fraction of water from surimi gel			
H_2O_2 浓度/ (mmol/L)	峰面积比例/% Peak area ratio		
	T_{21}	T_{22}	T_{23}
H_2O_2 concentration			
0	$1.72 \pm 0.35a$	$95.11 \pm 0.42bc$	$3.17 \pm 0.12b$
0.1	$0.96 \pm 0.21b$	$96.24 \pm 0.21a$	$2.80 \pm 0.07bc$
1.0	$1.05 \pm 0.14b$	$96.49 \pm 0.26a$	$2.46 \pm 0.12c$
5.0	$1.10 \pm 0.07b$	$96.22 \pm 0.27a$	$2.68 \pm 0.31c$
10.0	$1.32 \pm 0.22ab$	$95.56 \pm 0.23b$	$3.12 \pm 0.08b$
50.0	$1.27 \pm 0.34ab$	$94.67 \pm 0.28c$	$4.06 \pm 0.36a$

2.5 羟基自由基氧化对鱼糜流变学性质的影响

羟自由基氧化对升温(20~90 ℃)过程中鲢鱼

糜弹性模量 G' 和损耗模量 G'' 的影响如图 4 所示。由弹性模量 G' 的变化可知,凝胶过程主要分为 3 个阶段:凝胶化阶段(20~39 ℃)、凝胶劣化阶段(40~45 ℃)和鱼糕化阶段(46~70 ℃)。在鱼糕化阶段^[17],当 H_2O_2 浓度为 0.1 和 1.0 mmol/L 时,弹性模量 G' 和损耗模量 G'' 都高于对照组;而 H_2O_2 浓度为 5.0、10.0 和 50.0 mmol/L 时,弹性模量 G' 和损耗模量 G'' 都低于对照组;当 H_2O_2 浓度为 1.0 mmol/L 时,弹性模量 G' 和损耗模量 G'' 都达到最大值。弹性模量的变化表明适度氧化能够提高鱼糜凝胶的黏弹性,改善鱼糜凝胶的品质,过度氧化会导致鱼糜凝胶网络结构的破坏,导致黏弹性降低,使鱼糜品质劣化。

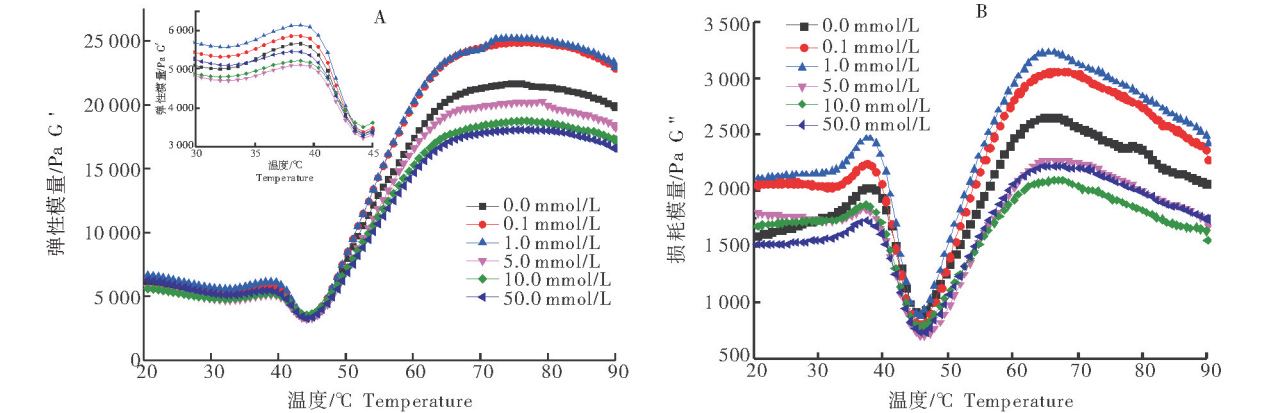


图 4 羟自由基氧化对升温过程中鱼糜弹性模量 G' 和损耗模量 G'' 的影响

Fig.4 Effect of hydroxyl radical oxidation on the elastic modulus G' and loss modulus G'' of surimi during heating process

在 40~60 ℃ 内,通过软件 SPSS25 对不同氧化程度鱼糜的弹性模量和温度进行多元线性拟合,表 3 为拟合的多项式系数、相关系数 R^2 和凝胶化温度 T_{gel} 。由表 3 可知, R^2 均大于 0.96,说明拟合程度较高;随着氧化程度的提高,鱼糜凝胶化温度均在 44.30 ℃ 左右,说明羟自由基氧化肌原纤维蛋白并不

表 3 羟自由氧化对鱼糜凝胶化温度的影响

Table 3 Effect of hydroxyl radical oxidation on gelation temperature of surimi						
H_2O_2 浓度/(mmol/L)	β	α_1	α_2	α_3	R^2	$T_{gel}/^{\circ}C$
H_2O_2 concentration						
0	3.47×10^6	-12 652.4	6 506.8	0.025	0.966	44.23
0.1	4.59×10^6	-16 692.2	6 054.3	0.033	0.971	44.30
1.0	4.91×10^6	-17 818.9	6 213.6	0.035	0.970	44.40
5.0	3.80×10^6	-13 796.8	5 843.8	0.027	0.973	44.33
10.0	3.10×10^6	-11 281.1	5 842.1	0.022	0.973	44.23
50.0	3.26×10^6	-11 827.1	6 248.4	0.023	0.969	44.31

会改变鱼糜凝胶化温度。

凝胶活化能为肌原纤维蛋白分子之间形成凝胶网络结构所需要的能量,可以反映鱼糜凝胶化的难易程度^[15]。在温度 40~60 ℃ 内,通过 SPSS25 软件对 γ 和 $1/T$ 进行线性回归拟合,凝胶活化能可以通过线性拟合方程的斜率算出,图 6 为回归曲线,相关

系数 R^2 和凝胶活化能见表 4。由表 4 可知,不同氧化程度鱼糜的拟合相关系数 R^2 均大于 0.96,说明拟合程度较高。空白组鱼糜凝胶活化能为 182.41 kJ/mol, H_2O_2 浓度为 0.1、1.0、5.0、10.0 和 50.0 mmol/L 时,鱼糜凝胶活化能分别为 198.34、207.28、208.11、186.43、182.75 kJ/mol。鱼糜凝胶

活化能随着氧化程度的增加呈现先增加后降低的趋势,这可能是由于氧化程度不高时,被氧化的肌原纤维蛋白结构发生改变,氧化巯基形成二硫键、暴露疏水性基团,使蛋白分子之间疏水相互作用力增加并形成二硫键^[22],蛋白形成凝胶时需要更多的能量克服这些作用力,从而提高凝胶活化能。而当氧化程度较高时,虽然疏水性相互作用还会增加,但是蛋白质之间会形成不可溶的聚集体^[7],这些聚集体并不会参与凝胶化过程,克服的作用力变小,从而使凝胶活化能降低。

表 4 羟自由基氧化对鱼糜凝胶活化能的影响

Table 4 Effect of hydroxyl radical oxidation on gelation activation of surimi

H ₂ O ₂ 浓度/(mmol/L) H ₂ O ₂ concentration	R ²	凝胶活化能/(kJ/mol) Gel activation energy
0	0.973	182.41
0.1	0.983	198.34
1.0	0.978	207.28
5.0	0.961	208.11
10.0	0.977	186.43
50.0	0.979	182.75

2.6 羟自由基氧化对鱼糜 Ca²⁺-ATPase 活性的影响

Ca²⁺-ATPase 活性反映了肌球蛋白头部结构的完整性,是反映蛋白质变性程度的重要指标。图 5 为羟自由基氧化对鱼糜 Ca²⁺-ATPase 活性的影响。由图 5 可知,随着 H₂O₂ 浓度的增加,鱼糜盐溶性蛋白 Ca²⁺-ATPase 活性先升高后降低,在 H₂O₂ 浓度为 1.0 mmol/L,盐溶性蛋白 Ca²⁺-ATPase 活性达到最大值。这可能是由于低浓度的 H₂O₂ 可使肌球蛋白的头部结构暴露,从而增加 Ca²⁺-ATPase 活性^[26]。Li 等^[27]在研究氧化对微生

物转谷氨酰胺酶诱导肌球蛋白交联的促进作用中也有类似结论,而高浓度的 H₂O₂ 使肌球蛋白氧化变性严重,这使 Ca²⁺-ATPase 活性显著降低,这可能是由于氧化影响了肌球蛋白头部活性区域的氨基酸残基,从而抑制了肌球蛋白的 ATP 酶活^[28]。

2.7 羟自由基氧化对鱼糜凝胶微观结构的影响

羟自由基氧化对鲢鱼糜凝胶微观结构的影响如图 6 所示。由图 6 可知,不同氧化程度的鱼糜凝胶微观结构有明显区别。未氧化的对照组鱼糜凝胶(图 6A)形成了较均匀的三维网状结构,适度氧化(H₂O₂ 浓度为 0.1~1.0 mmol/L)的鱼糜凝胶(图 6B和 6C)拥有更加致密的网络结构,具有较小的孔隙。这可能是由于适度氧化使蛋白分子结构发生去折叠、伸展,暴露出更多的交联位点^[5,29]。而过度氧化(H₂O₂ 浓度为 10.0~50.0 mmol/L)的鱼糜凝胶(图 6E和 6F)形成的网络结构不均匀并且具有更大的孔隙,这可能是由于过度氧化使蛋白分子之间发生交联和聚集,形成不可溶的聚集体,影响凝胶形成过程中的蛋白分子有序排列^[7,30]。

3 讨 论

研究发现,适度氧化(H₂O₂ 浓度为 0~1.0 mmol/L 时)能够改善鲢鱼糜的凝胶特性,而过度氧化则可使鲢鱼糜的凝胶品质劣化。杨玉玲等^[31]用亚油酸-脂肪氧化酶体系产生自由基对鸡肉肌原纤维蛋白凝胶进行氧化,发现适度氧化能够提高凝胶的保水性和硬度;Lu 等^[6]发现羟自由基氧化对鳙鱼糜凝胶质构特性的影响也呈先增加后减少的趋势。二者的研究结论都与本研究类似。另外,也有研究表明,羟自由基氧化会导致草鱼和猪肉肌原纤维蛋白凝胶品质变差^[7,32]。这种差异的原因可能是肌原纤维蛋白的来源不同,以及氧化处理的时间及其氧化剂量的差异造成的。

蛋白质的氧化修饰一方面导致它们的结构(氨基酸侧链修饰、肽骨架断裂、蛋白质结构空间排列等)发生改变^[33],另一方面是蛋白质发生交联,分子内和分子间交联的蛋白质及各种交联氧化产物的形成,随后蛋白质发生聚合^[3]。蛋白质聚集的前提是折叠态的蛋白质分子首先发生去折叠,去折叠会导致蛋白的疏水相互作用增强^[34]。杨玉玲等^[31]发现疏水相互作用对脂质酶氧化体系下鸡肉肌原纤维蛋白凝胶特性起决定性作用,发现疏水相互作用力最大时,凝胶性能最优。另外,蛋白分子的去折叠还会

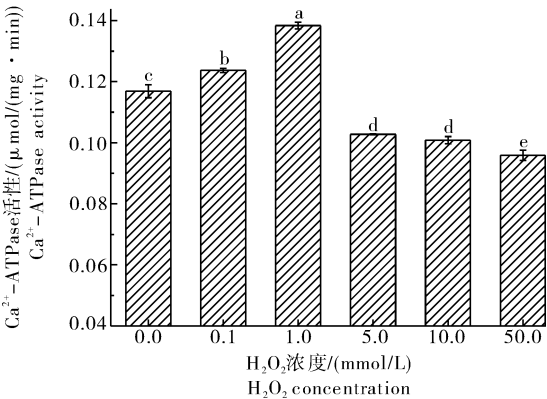
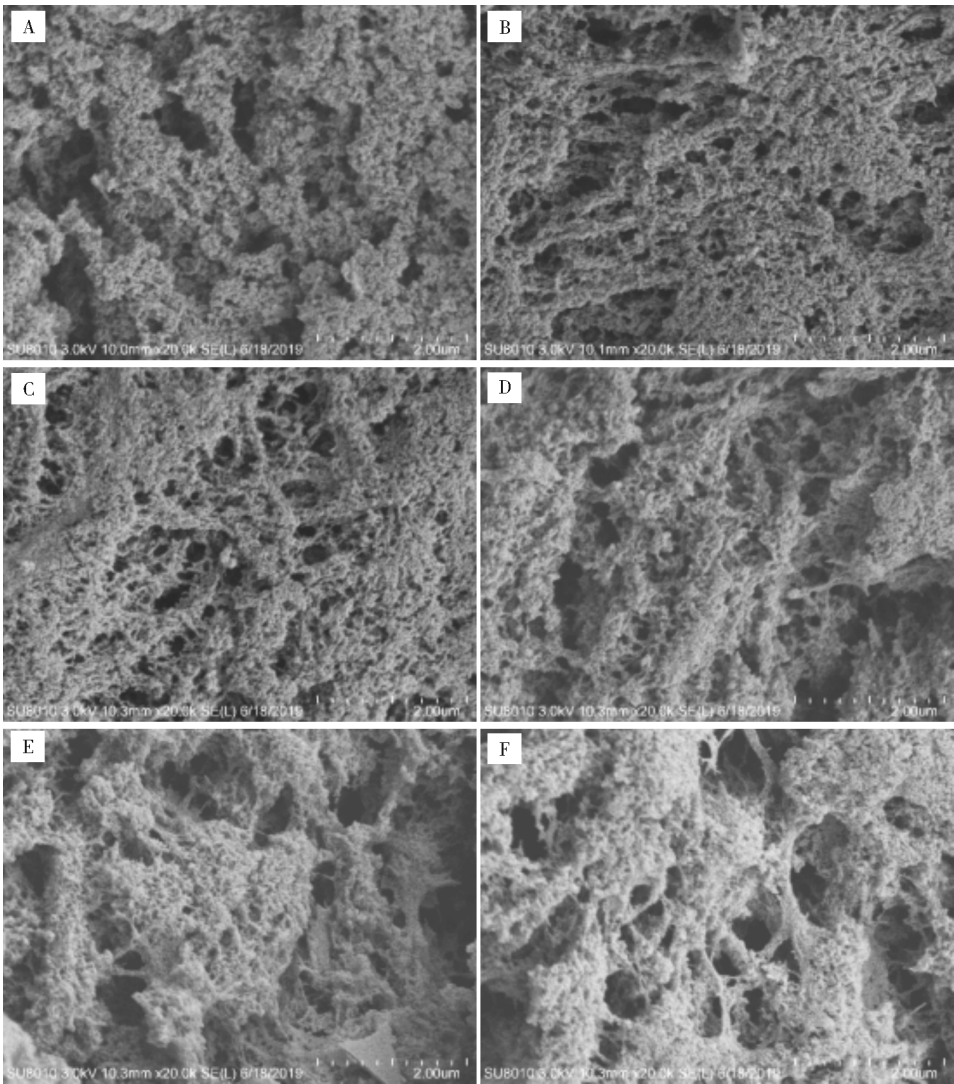


图 5 羟自由基氧化对鱼糜 Ca²⁺-ATPase 活性的影响

Fig.5 Effect of hydroxyl radical oxidation on Ca²⁺-ATPase activity of surimi



A-F 分别表示 H_2O_2 浓度为 0、0.1、1.0、5.0、10.0 和 50.0 mmol/L 氧化形成鱼糜凝胶的微观结构。A-F indicates the microstructure of the surimi gel oxidized by H_2O_2 at 0, 0.1, 1.0, 5.0, 10.0 and 50.0 mmol/L, respectively.

图 6 不同氧化程度的鱼糜凝胶扫描电镜微观结构图(20 000×)

Fig.6 Scanning electron microscopy of silver carp surimi gel of different oxidation degree(20 000×)

导致分子内部的巯基和二硫键暴露或局部环境改变,使其反应活性增加^[35]。在本试验中适度氧化改善鱼糜品质的机制可能是:适度氧化使肌原纤维蛋白发生去折叠,蛋白结构伸展,在蛋白内部的疏水性基团暴露的同时,蛋白分子暴露出更多交联位点,同时肌球蛋白头部结构暴露使 Ca^{2+} -ATPase 活性增加。暴露出来的基团由于疏水相互作用和静电相互作用发生氧化聚集^[34,36],而氧化还会导致蛋白之间发生共价交联,从而使可溶性聚集体变为不可溶聚集体。过度氧化会导致鲮和草鱼肌原纤维蛋白发生交联,形成不可溶聚集体^[6-7],导致凝胶特性劣化。本试验中过度氧化导致鲢鱼糜品质劣化的原因可能

是过度氧化使蛋白形成不可溶聚集体,导致凝胶形成过程中聚集体无法发生交联而使品质劣化。

本试验研究发现,羟自由基氧化对鲢鱼糜凝胶品质的影响依据氧化度不同而出现差异。适度氧化(H_2O_2 浓度为 0~1.0 mmol/L 时)能够改善鲢鱼糜的凝胶强度和凝胶持水性,对鱼糜凝胶色泽影响不大,而过度氧化则可使鲢鱼糜的凝胶品质产生显著劣变。通过分析不同氧化度鲢鱼糜的动态流变学特性可发现,适度氧化能够提高鱼糜凝胶形成过程中凝胶的弹性模量 G' 、损耗模量 G'' 和凝胶活化能,过度氧化又会导致其降低,而氧化对鲢鱼糜的凝胶化温度影响不大。此外,本研究发现,适度氧化可显著

提高鱼糜肌原纤维蛋白 Ca^{2+} -ATPase 活性。对鱼糜凝胶的微观结构和水分状态进行分析可知,适度氧化能够使鱼糜凝胶网络结构更加致密,凝胶中的部分自由水转变成不易流动水,从而提高鱼糜凝胶的凝胶强度和持水性;过度氧化则会造成网络结构孔隙增加,自由水含量增加。因此,在冷冻鲢鱼糜贮藏过程中,发生适度氧化有利于提高鱼糜品质,但同时要严格控制鱼糜贮藏时间,以防止鱼肉蛋白过度氧化造成鱼糜品质劣化。

参 考 文 献

- [1] 农业农村部渔业渔政管理局.中国渔业统计年鉴[M].北京:中国农业出版社,2019.
- [2] 全国水产标准化技术委员会水产品加工分技术委员会.冷冻鱼糜:GB/T 36187—2018 [S].北京:中国标准出版社,2018.
- [3] LUND M N, HEINONEN M, BARON C P, et al. Protein oxidation in muscle food: a review[J]. Molecular nutrition & food research, 2011, 55(1): 83-95.
- [4] 程获,李维,杨宏.3种植物多酚对鱼糜制品储藏品质的影响[J].华中农业大学学报,2019,38(1):119-124.
- [5] 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): 215-221.
- [6] LU H, ZHANG L, LI Q, et al. Comparison of gel properties and biochemical characteristics of myofibrillar protein from bighead carp (*Aristichthys nobilis*) affected by frozen storage and a hydroxyl radical-generation oxidizing system[J]. Food chemistry, 2017, 223: 96-103.
- [7] 李学鹏,刘慈坤,周明言,等.羟自由基氧化对草鱼肌原纤维蛋白结构和凝胶性质的影响[J].食品科学,2017,38(21):30-37.
- [8] 谢笔钧.食品化学[M].2版.北京:科学出版社,2004.
- [9] 全国水产标准化技术委员会水产品加工分技术委员会.冷冻鱼糜加工技术规范:GB/T 36395—2018 [S].北京:中国标准出版社,2018.
- [10] 谢青青,杨宏,王玉栋,等.谷氨酸钠和乙醇对鱼糜制品冻融稳定性的影响[J].华中农业大学学报,2019,38(5):114-121.
- [11] BENJAKUL S, BAUER F. Biochemical and physicochemical changes in catfish (*Silurus glanis* Linne) muscle as influenced by different freeze-thaw cycles[J]. Food chemistry, 2001, 72(2): 207-217.
- [12] YOON W B, GUNASEKARAN S, PARK J W. Characterization of thermorheological behavior of alaska pollock and pacific whiting surimi[J]. Journal of food science, 2004, 69(7): 338-343.
- [13] KOCHER P N, FOEGEDING E A. Microcentrifuge-based method for measuring water-holding of protein gels[J]. Journal of food science, 1993, 58(5): 1040-1046.
- [14] 李睿智,王嵬,仪淑敏,等.白鲢鱼鱼糜凝胶过程中水分及凝胶特性的变化[J].现代食品科技,2016,32(5):91-97,198.
- [15] 万建荣.水产食品化学分析手册[M].上海:上海科学技术出版社,1993.
- [16] BENJAKUL S, SEYMOUR T A, MORRISSEY M T, et al. Physicochemical changes in Pacific whiting muscle proteins during iced storage[J]. Food science, 1997, 62(4): 729-733.
- [17] 关宏,丁玉琴,尤娟,等.pH值对添加L-精氨酸的草鱼糜凝胶特性的影响[J].华中农业大学学报,2018,37(5):110-116.
- [18] HWANG J S, LAI K M, HSU K C. Changes in textural and rheological properties of gels from tilapia muscle proteins induced by high pressure and setting[J]. Food chemistry, 2007, 104(2): 746-753.
- [19] WONGWICHIAN C, KLOMKLAO S, PANPIPAT W, et al. Interrelationship between myoglobin and lipid oxidations in oxeye scad (*Selar boops*) muscle during iced storage[J]. Food chemistry, 2015, 174(1): 279-285.
- [20] XIA X, KONG B, XIONG Y L, et al. Decreased gelling and emulsifying properties of myofibrillar protein from repeatedly frozen-thawed porcine longissimus muscle are due to protein denaturation and susceptibility to aggregation[J]. Meat science, 2010, 85(3): 481-486.
- [21] YIN T, PARK J W. Effects of nano-scaled fish bone on the gelation properties of Alaska pollock surimi[J/OL]. Food chemistry, 2014, 150: 463-468 [2019-07-20]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.041>.
- [22] 赵冰,张顺亮,李素,等.脂肪氧化对肌原纤维蛋白氧化及其结构和功能性质的影响[J].食品科学,2018,39(5):40-46.
- [23] 陈霞霞,杨文鸽,楼乔明,等.氧化对银鲳肌原纤维蛋白功能性质的影响[J].食品科学,2017,38(11):135-141.
- [24] 李维,程获,杨宏.二次加热处理对鲢鱼糜制品品质的影响[J].华中农业大学学报,2019,38(2):94-101.
- [25] 李明清,孔保华,王宇,等.菊粉对鲤鱼肌原纤维蛋白凝胶特性的影响[J].食品工业科技,2010,31(10):105-108,112.
- [26] ZHANG Q T, TU Z C, XIAO H, et al. Influence of ultrasonic treatment on the structure and emulsifying properties of peanut protein isolate[J]. Food and bioproducts processing, 2014, 92(1): 30-37.
- [27] LI C Q, XIONG Y L, CHEN J. Oxidation-induced unfolding facilitates myosin cross-linking in myofibrillar protein by microbial transglutaminase[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2012, 60(32): 8020-8027.
- [28] 潘君慧,刘泽龙.冻藏方式对猪肉肌原纤维蛋白氧化及其凝胶特性的影响[J].食品工业科技,2013,34(21):313-316.
- [29] WANG J M, ZHAO Y R, NIU S S, et al. Effect of oxidation induced by hydroxyl radical-mediated model on molecular structural and physical character of egg white powder[J/OL]. International journal of food science and technology, 2018, 53: 2282-2289 [2019-07-20]. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13818>.
- [30] JIANG W X, HE Y F, XIONG S B, et al. Effect of mild ozone oxidation on structural changes of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) myosin[J]. Food and bioprocess technology

gy,2016,10(2):370-378.

[31] 杨玉玲,周磊,游远,等.氧化对肌原纤维蛋白热诱导凝胶质构特性及保水性的影响[J].中国农业科学,2018,51(18):3570-3581.

[32] 李银,李侠,张春晖,等.羟自由基导致肉类肌原纤维蛋白氧化和凝胶性降低[J].农业工程学报,2013,29(12):286-292.

[33] 李艳青.蛋白质氧化对鲤鱼蛋白结构和功能性的影响及其控制技术[D].哈尔滨:东北农业大学,2013.

[34] 吴伟.蛋白质氧化对大豆蛋白结构和凝胶性质的影响[D].无锡:江南大学,2010.

[35] YAGI M, SAKURAI K, KALIDAS C, et al. Reversible unfolding of bovine β -lactoglobulin mutants without a free thiol group[J]. Journal of biological chemistry, 2003, 278(47): 47009-47015.

[36] GRUNE T. Oxidative stress, aging and the proteasomal system[J]. Biogerontology, 2000, 1(1): 31-40.

Effect of hydroxyl radical oxidation on gel properties of surimi from silver carp

FANG Haiyan^{1,2} YUAN Xin¹ LIU Youming^{1,2} XIONG Shanbai^{1,2}

1.College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2.National R&D Branch Center for Conventional Freshwater Fish Processing (Wuhan), Wuhan 430070, China

Abstract Surimi from silver carp were oxidized in a hydroxyl radical-generating systems (the concentration of H_2O_2 were 0.1, 1.0, 5.0, 10.0 and 50.0 mmol/L, respectively), and the effects of oxidation on gel properties of surimi were investigated. The results showed that the breaking force, penetration distance, gel strength and water holding capacity of surimi gels increased firstly and decreased afterwards with the increase of H_2O_2 concentration. The maximum values were obtained at the H_2O_2 concentration of 1.0 mmol/L, indicating that moderate oxidation could improve the gel properties and the water holding capacity. At the same time, the T_{22} peak area in the moisture distribution also reached a maximum at the H_2O_2 concentration of 1.0 mmol/L. In addition, the activity of Ca^{2+} -ATPase significantly increased and followed by a decrease with the increase of H_2O_2 concentration. And the SEM result showed that moderate oxidation (0.1~1.0 mmol/L H_2O_2) could improve surimi gel network structure, whereas excessive oxidation would lead to the destruction of the network structure.

Keywords silver carp; surimi; frozen storage; hydroxyl radicals; oxidation; gel properties; micro-structure

(责任编辑:赵琳琳)