

温度对金带细鲐鱼肉水解物美拉德反应及其产物抗氧化性的影响

Effect of temperature on maillard reaction and antioxidant activity of the maillard reaction products derived from yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) fish hydrolysates

卢彬¹ 王忠合² 王军² 邹敏¹ 傅力²

LU Bin¹ WANG Zhong-he² WANG Jun² ZOU Min¹ FU Li²

(1. 新疆农业大学食品科学与药学学院, 新疆 乌鲁木齐 830052; 2. 韩山师范学院生物系, 广东 潮州 521041)

(1. College of Food Science and Pharmaceutical Sciences, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang 830052, China; 2. Department of Biology, Hanshan Normal University, Chaozhou, Guangdong 521041, China)

摘要:采用金带细鲐鱼肉蛋白为研究对象,以 pH 值、中间产物、褐变程度、游离氨基酸含量及抗氧化活性为检测指标,研究温度(100, 120 °C)对金带细鲐鱼肉蛋白水解物美拉德反应及其产物抗氧化活性的影响。结果表明:当反应温度为 120 °C 时,反应体系的 pH 值、中间产物($A_{294\text{nm}}$)、褐变程度($A_{420\text{nm}}$)及游离氨基酸含量,随着美拉德反应时间的延长与 100 °C 相比变化更加显著,反应产物的还原力和 DPPH 自由基清除率大幅度提高,而羟自由基清除率和 Fe^{2+} 螯合能力下降明显。

关键词:金带细鲐; 鱼肉蛋白水解物; 美拉德反应; 抗氧化活性

Abstract: The pH value, intermediate ($A_{294\text{nm}}$), browning intensity ($A_{420\text{nm}}$), free amino group content and antioxidant activity as detection index. The effect of temperature (100 °C, 120 °C) on Maillard reaction and antioxidant activity of the Maillard reaction products (MRPs) derived from yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) fish protein hydrolysates was investigated. The results were as follows: when reaction temperature was 120 °C, the pH value, intermediate ($A_{294\text{nm}}$), browning intensity ($A_{420\text{nm}}$) and free amino group content of the systems during the Maillard reaction were more significant,

and the reducing power and DPPH radical scavenging activity of MRPs were enhanced greatly, however, the hydroxyl radical scavenging activity and Fe^{2+} chelating activity of MRPs were decreased significantly, compared with 100 °C.

Keywords: yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*); fish protein hydrolysates; maillard reaction; antioxidant activity

近年来,有关鱼类蛋白酶水解物抗氧化活性的研究引起了人们的广泛关注,如鲢鱼蛋白^[1]、罗非鱼内脏蛋白^[2]、金带细鲐鱼肉蛋白^[3]、金枪鱼肝脏蛋白^[4]等。虽然酶水解产物具有一定的抗氧化活性,但远不如人工合成的抗氧化剂活性高^[5]。美拉德反应是食品中羰基和氨基之间的非酶促褐变反应^[6]。美拉德反应不仅能使食品具有独特的风味和诱人的色泽,而且美拉德反应产物(maillard reaction products, MRPs)中的类黑素、还原酮及一些含氮硫的杂环化合物均具有较强的抗氧化活性^[7]。刘蒙蒙等^[8]研究表明,罗非鱼鱼皮胶原肽与葡萄糖发生美拉德反应后,产物的抗氧化性相较于原胶原肽有显著提高。尤娟等^[9]发现,鲢鱼鱼肉蛋白酶水解物与葡萄糖在 60 °C 下,以 1:4(m:m)的比例进行糖基化反应,得到的 MRPs 清除 DPPH 自由基能力较强。

金带细鲐(*Selaroides leptolepis*)为近海暖水性鱼类,体长可达 18 cm,中国产于南海、台湾海峡,摄食浮游动物和底栖动物,含有丰富的蛋白质、维生素类、钙等营养元素,且价格相对较低。作为原料加工的产品多为一些脱水鱼干、鱼粉等低附加值产品,也是一种未充分利用的大宗低值鱼。本研究拟以金带细鲐鱼肉蛋白为原料,研究温度对金带细鲐鱼肉蛋白水解物美拉德反应及其 MRPs 抗氧化活性的影响,进一步分析 MRPs 中具有抗氧化活性组分的产生过程、在整个反

基金项目:广东省自然科学基金项目(编号:S2013040015478);广东省高校优秀青年创新人才培养计划项目(编号:2013LYM0056);韩山师范学院青年基金项目(编号:LQ201202);韩山师范学院博士启动项目(编号:QD20130516,QD20140324);韩山师范学院一般项目(编号:LY201306);潮州市科技计划项目(编号:2013X05,2013X06)

作者简介:卢彬(1989-),男,新疆农业大学在读硕士研究生。

E-mail: lubin0425@sina.com

通讯作者:傅力

收稿日期:2014-10-26

应过程中的变化趋势以及抗氧化形成机理,旨在为金带细鲈鱼高值化利用提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

金带细鲈:购于广东省潮州市枫春市场;

胰蛋白酶:3 000~3 500 NFU/mg,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):分析纯,美国 Sigma 公司;

葡萄糖:分析纯,广东光华化学厂有限公司;

其他试剂均为国产分析纯。

1.1.2 主要仪器设备

紫外可见分光光度计:UV-2800 型,尤尼科(上海)仪器有限公司;

冷冻干燥机:FD-1D-50 型,北京博医康实验仪器有限公司;

离心机:2-16P 型,美国 Sigma 公司;

pH 计:PHSJ-4A 型,上海仪电科学仪器股份有限公司;

电子恒温水浴锅:B056028 型,深圳市国华电子有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 鱼肉蛋白水解物的制备 鱼肉糜按质量比 1:3 的比例与水混合,用 6 mol/L NaOH 调节 pH 至 8.0,酶解温度为 50 ℃,加 1%(m/m)的胰蛋白酶([E]/[S]=1:100)酶解 3 h,在酶解过程中用 2 mol/L NaOH 调节溶液 pH 不变。酶解结束后 100 ℃灭酶 10 min,将酶解液在 10 000 r/min 离心 10 min,上清液冷冻干燥 24 h 后,将制备好的水解物置于密封袋中,在 -18 ℃下保存备用。

1.2.2 不同条件下美拉德反应体系的制备 将制备好的水解物溶解在蒸馏水中,按鱼肉蛋白水解物与葡萄糖质量比 1:2 加入葡萄糖,用 1 mol/L NaOH 调节 pH 至 9.0,最后将鱼肉蛋白水解物浓度为 25 mg/mL 的溶液置于 20 mL 具塞密闭试管中分别在 100,120 ℃下反应 0,1,2,3,4,5,6 h (MRP_s-100、MRP_s-120 分别表示 100,120 ℃下所得的反应产物)。反应完毕后,立即取出置于冰水冷却至室温,测定 pH 值,然后置于 -18 ℃冷冻备用。同时按上述相同试验条件,以不加葡萄糖的作为对照(对照-100、对照-120 分别表示在 100,120 ℃单独加热的鱼肉蛋白水解物)。

1.2.3 中间产物和褐变程度的测定 根据文献[10]修改如下:反应样液用蒸馏水稀释 100 倍和 50 倍,以蒸馏水做参比,分别在 294 nm 和 420 nm 下测定吸光度。

1.2.4 游离氨基含量的测定 根据文献[11]修改如下:取用蒸馏水稀释 25 倍后的样液 125 μL,加入 0.212 5 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 ℃水浴中暗处反应 30 min。反应后加入 0.1 mol/L 的亚硫酸钠 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-亮氨酸为标样绘制标准曲线。游离氨基含量表示为处理后的样液的游离氨基数占处理前样液游离氨基数的百分比。

1.2.5 美拉德反应产物抗氧化活性的测定

(1) DPPH 自由基清除率:根据文献[12]修改如下:称取一定量的 DPPH,用无水乙醇配制成 0.15 mmol/L 的溶液。取 2 mL 用蒸馏水稀释 25 倍后的样品溶液与 2 mL DPPH 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_2 。同时测定 2 mL DPPH 与 2 mL 无水乙醇溶液混合后的吸光度 A_0 ;2 mL 样液与 2 mL 无水乙醇溶液混合后吸光度 A_1 。DPPH 自由基的清除率用式(1)计算:

$$R = \left(1 - \frac{A_2 - A_1}{A_0}\right) \times 100\% \quad (1)$$

式中:

R ——DPPH 自由基清除率,%;

A_0 ——乙醇加 DPPH 溶液的吸光度;

A_1 ——乙醇加样液的吸光度;

A_2 ——样液加 DPPH 溶液的吸光度。

(2) 还原力:根据文献[13]修改如下:在 10 mL 离心管中分别加入 0.2 mol/L pH 6.6 的磷酸盐缓冲液 2 mL 和用蒸馏水稀释 25 倍后的样品溶液 2 mL,加入 1% 铁氰化钾 2 mL,混合均匀后于 50 ℃反应 20 min。取出加入 2 mL 10% 三氯乙酸终止反应,5 000 r/min 离心 10 min。取上清液 2 mL,加入去离子水 2 mL 和 FeCl₃ 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。

(3) 羟自由基清除率:根据文献[14]修改如下:取用蒸馏水稀释 25 倍后的样品溶液 1 mL,加入 9 mmol/L FeSO₄ 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 H₂O₂ 启动反应,在 37 ℃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_2 。以 1 mL 蒸馏水代替样液,测定在 510 nm 处的吸光度 A_0 ;以 1 mL 蒸馏水代替 H₂O₂,测定在 510 nm 处的吸光度 A_1 。按式(2)计算羟自由基清除率:

$$R = \left(1 - \frac{A_2 - A_1}{A_0}\right) \times 100\% \quad (2)$$

式中:

R ——羟自由基清除率,%;

A_0 ——蒸馏水代替样液后在 510 nm 处的吸光度;

A_1 ——蒸馏水代替 H₂O₂ 后在 510 nm 处的吸光度;

A_2 ——加入样液后在 510 nm 处的吸光度。

(4) Fe²⁺ 整合力的测定:根据文献[15]修改如下:取用去离子水稀释 25 倍后的样品溶液 1 mL,加入去离子水 1.85 mL 和 2 mmol/L 的 FeCl₂ 溶液 0.05 mL,混合均匀室温静置 30 s,再加入 5 mmol/L 的菲洛嗪溶液 0.1 mL,室温下静置 10 min,3 000 r/min 离心 5 min 后于 562 nm 处测定其吸光度 A_2 。以 1 mL 去离子水代替样液,测定在 562 nm 处

的吸光度 A_0 ; 以 0.1 mL 去离子水代替菲洛嗪, 测定 562 nm 处的吸光度 A_1 。按照式(3)计算整合力:

$$R = \left(1 - \frac{A_2 - A_1}{A_0}\right) \times 100\% \quad (3)$$

式中:

R —— Fe^{2+} 整合力, %;

A_0 ——去离子水代替样液后在 562 nm 处的吸光度;

A_1 ——去离子水代替菲洛嗪后在 562 nm 处的吸光度;

A_2 ——加入样液后在 562 nm 处的吸光度。

1.3 数据分析

试验重复测定 3 次, 结果表示为平均值 \pm 标准偏差 SD。数据统计分析采用 SPSS 19.0 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 结果与分析

2.1 鱼肉水解物水解度的测定

前期试验发现, 采用胰蛋白酶水解金带细鲈鱼肉 3 h 后, 水解物的抗氧化性和功能特性较好, 测定水解度为 20.18%。

2.2 反应产物 pH 值的变化

由图 1 可知, MRP_s-100 的 pH 值随着反应时间的延长缓慢降低 ($P < 0.05$)。MRP_s-120 的 pH 值在前 4 h 急剧降低 ($P < 0.05$), 4 h 后 pH 值趋于平缓。pH 值的降低主要是因为美拉德反应过程中糖和水解产物受热发生降解生成一些有机酸, 包括甲酸和乙酸以及其他可能形成的乳酸、丙酮酸、柠檬酸和糖精酸等^[13]。对照组 pH 值无显著变化 ($P > 0.05$)。

2.3 中间产物和褐变程度的变化

如图 2 所示, MRP_s-120 的 $A_{294\text{nm}}$ 和 $A_{420\text{nm}}$ 显著高于 MRP_s-100 下的吸光值 ($P < 0.05$)。此结果与 Yilmaz 等^[16] 的研究相一致, MRP_s-120 的颜色与 MRP_s-100 相比, 变为更

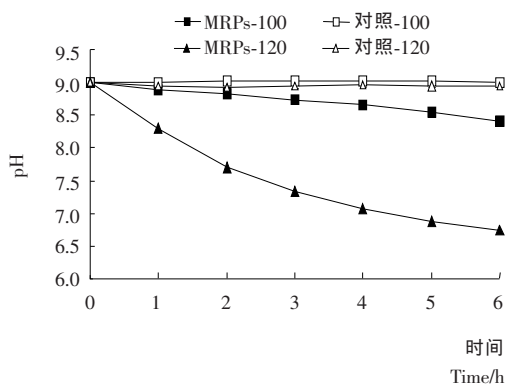
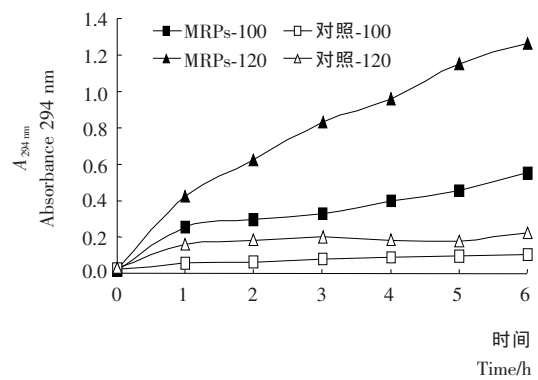
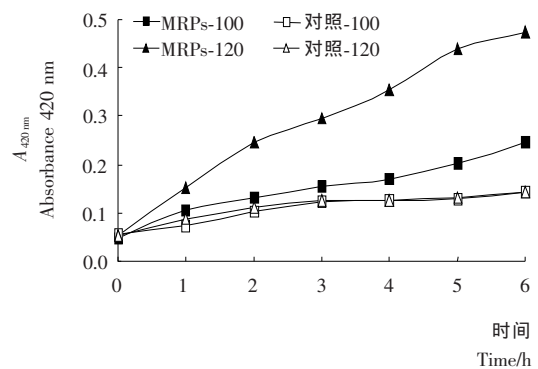


图 1 美拉德反应产物的 pH 值随时间的变化

Figure 1 Changes in pH value of MRPs as a function of reaction times



(a) 中间产物



(b) 褐变程度

图 2 美拉德反应产物的中间产物和褐变程度随时间的变化

Figure 2 Changes in the intermediate compounds and the browning intensity of MRPs as a function of reaction times

深的深褐色。对照 (100, 120 °C) 的 $A_{294\text{nm}}$ 无明显变化, 而 $A_{420\text{nm}}$ 略有升高, 原因可能是金带细鲈水解产物中含有少量的还原糖, 加热导致还原糖的焦糖化反应或者糖与肽之间的美拉德反应。

2.4 游离氨基含量的变化

游离氨基的含量变化是用来比较美拉德反应程度的指标^[17]。如图 3 所示, 反应最初 2 h 游离氨基的含量迅速下降, 反应 2 h 时 MRP_s-120 的游离氨基的损失速率是 MRP_s-100 的 2.88 倍, 反应 2 h 之后游离氨基的含量变化不显著 ($P > 0.05$)。在美拉德反应的初期阶段, 肽类或者蛋白质的 α -氨基和赖氨酸残基的 ϵ -氨基与葡萄糖的羰基发生反应, 造成这些高活性游离氨基大量减少, 而其它氨基难以被利用, 因而加热处理后后期游离氨基含量变化不明显^[18]。对照组游离氨基酸的含量无显著变化 ($P > 0.05$)。

2.5 DPPH 自由基清除活性

如图 4 所示, 反应时间前 3 h 内, MRP_s-120 的 DPPH 清除率显著增大, 在 4~6 h 时趋于平缓。而 MRP_s-100 的 DPPH 自由基清除率显著低于 MRP_s-120 ($P < 0.05$)。MRP_s-100、MRP_s-120 对 DPPH 自由基清除率最大值分别为 26.12% 和 82.70%。对照组 DPPH 自由基清除活性随着反

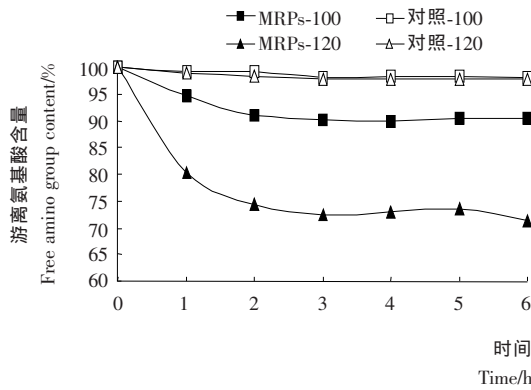


图 3 美拉德反应产物的游离氨基含量随时间的变化

Figure 3 Changes in free amino group content of MRPs as a function of reaction times

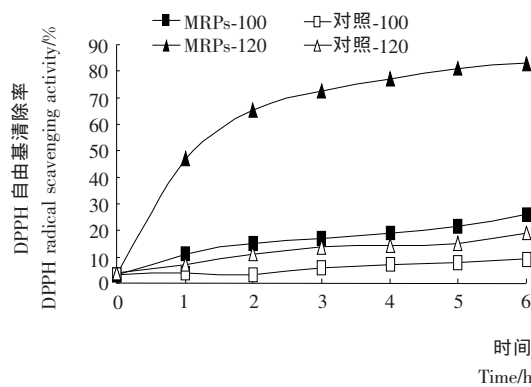


图 4 美拉德反应产物的 DPPH 自由基清除率随时间的变化

Figure 4 Changes in DPPH radical scavenging activity of MRPs as a function of reaction times

应时间延长略微增大,当在 6 h 时,对照-120 的 DPPH 自由基清除率只达到 19.04%。研究发现 MRPs 的 DPPH 自由基清除活性在一定程度上与褐变程度有关,这可能是因为美拉德反应在高级阶段会形成褐色高分子聚合物类黑精,此类物质具有显著的抗氧化性^[19]。

2.6 还原力

如图 5 所示,随着反应时间的延长,MRPs-100 和 MRPs-120 的还原力都显著增大($P < 0.05$),相比于 MRPs-100,MRPs-120 表现出了较强的还原力。反应 6 h 后,MRPs-120 的还原力是 MRPs-100 的 2.16 倍,是对照-120 的 7.19 倍。Jiang 等^[20]也发现,在整个美拉德反应过程中,MRPs 的还原能力随反应时间的增加而增加。对照组反应 6 h 后其还原力无明显变化($P > 0.05$)。

2.7 羟基清除活性

由图 6 可知,随着反应时间的延长,MRPs-100 和 MRPs-120 的羟基清除率逐渐降低,相比未反应前分别降低 11.81% 和 17.27%。而对照组羟基清除率基本没有变化($P > 0.05$)。结果说明美拉德反应使金带细鲐鱼肌肉水解产物

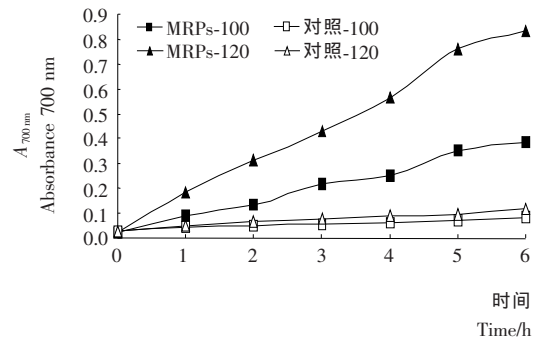


图 5 美拉德反应产物的还原力($A_{700\text{nm}}$)随时间的变化

Figure 5 Changes in Reducing power of MRPs as a function of reaction times

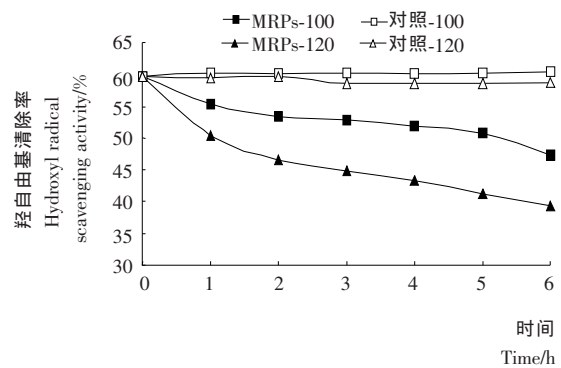


图 6 美拉德反应产物的羟自由基清除率随时间的变化
Figure 6 Changes in Hydroxyl radical scavenging activity of MRPs as a function of reaction times

的羟基清除活性下降。这与刘蒙蒙等^[8]的研究结果不一致。

2.8 Fe^{2+} 螯合能力

如图 6 所示,随着反应时间的延长,对照组 Fe^{2+} 螯合力无显著变化($P > 0.05$),MRPs-100 的 Fe^{2+} 螯合力略有减少,反应 6 h 后其 Fe^{2+} 螯合力相比对照-100 减少 5.60%,而 MRPs-120 的 Fe^{2+} 螯合力显著减少,反应 6 h 后其 Fe^{2+} 螯合力相比未反应前减少 67.37%。其原因可能是因为金带细鲐

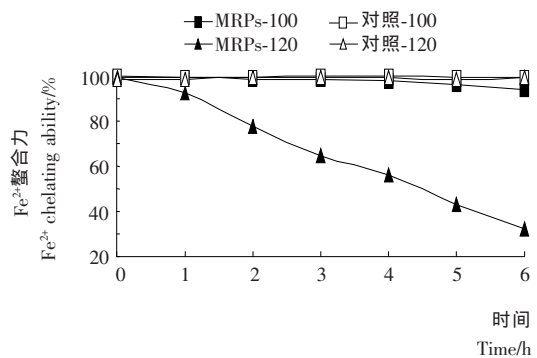


图 7 美拉德反应产物的 Fe^{2+} 螯合率随时间的变化

Figure 7 Changes in Fe^{2+} chelating ability of MRPs as a function of reaction times

鱼肉水解产物中一些游离氨基酸、肽链和蛋白质,其侧链上的氨基和羧基能与 Fe^{2+} 配位,但高温下美拉德反应使这类物质大量减少,导致 Fe^{2+} 螯合能力也随之减弱^[21]。

3 结论

(1) 当反应温度为 120 °C 时,反应体系的 pH 值和游离氨基酸含量与 100 °C 时相比显著降低,中间产物及褐变程度急剧增加,对照组没有显著变化。说明较高的反应温度下,能够促进金带细鲈鱼肉蛋白水解物与葡萄糖美拉德反应的进行。

(2) 当反应温度为 120 °C 时,反应产物的 DPPH 自由基清除率和还原力与 100 °C 时相比大幅度提高,对照组没有显著变化。有研究表明^[19] DPPH 自由基清除率和还原力在一定程度上与褐变程度有关,可能是因为美拉德反应在高级阶段会形成褐色高分子聚合物类黑精,此类物质具有显著的抗氧化性。而羟基清除率和 Fe^{2+} 螯合力的降低,可能是因为某种游离氨基酸或肽的含量大量减少导致,具体原因还有待进一步的研究探讨。

(3) 虽然较高反应温度够促进美拉德反应的进行和抗氧化活性物质的生成,但也会生成一些对人体有害的物质如中级产物羟甲基糠醛、丙烯酰胺和晚期产物羧甲基赖氨酸等。如何抑制此类物质的生成,而又不影响 MRPs 的抗氧化活性,需进一步的分析研究。

参考文献

- 尹歆,邓放明. 鲢鱼蛋白制备 ACE 抑制肽的工艺优化[J]. 食品与机械, 2012, 28(2): 147~151.
- 郭善广,荣婧,郭利平,等. 罗非鱼内脏蛋白酶解物超滤产物的抗氧化研究[J]. 食品与机械, 2014, 30(1): 179~183.
- Klompong V, Benjakul S, Kantachote D, et al. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type[J]. Food Chemistry, 2007, 102(4): 1317~1327.
- Je J Y, Lee K H, Lee M H, et al. Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis[J]. Food Research International, 2009, 42(9): 1266~1272.
- 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, 10(8): 26~30.
- 鲁伟,黄筱茜,柯季晶,等. 美拉德反应产物的抗氧化活性研究[J]. 食品与机械, 2008, 24(4): 61~64.
- Liu Jian-hua, Ru Qiao-mei, Ding Yu-ting. Glycation a promising method for food protein modification: Physicochemical properties and structure, a review[J]. Food Research International, 2012, 49(1): 170~183.
- 刘蒙蒙,杨美智子,孙云,等. 罗非鱼鱼皮胶原肽-葡萄糖美拉德反应产物的制备及其抗氧化活性[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(3): 158~162.
- 尤娟,沈慧星,罗永康. 糖基化反应条件对鲢鱼鱼肉木瓜蛋白酶酶解产物清除 DPPH 自由基影响[J]. 食品科技, 2011, 36(1): 2~4.
- Sun Wei-zheng, Zhao Mou-ming, Cui Chun, et al. Effect of Maillard reaction products derived from the hydrolysate of mechanically deboned chicken residue on the antioxidant, textural and sensory properties of Cantonese sausages[J]. Meat Science, 2010, 86(2): 276~282.
- Wang Zhong-he, Wang Jun, Guo Shou-jun, et al. Kinetic modeling of Maillard reaction system subjected to pulsed electric field[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2013, 20(1): 121~125.
- Benjakul S, Lertittikul W, Bauer F. Antioxidant activity of Maillard reaction products from a porcine plasma protein - sugar model system[J]. Food Chemistry, 2005, 93(2): 189~196.
- Huang Xiao-qin, Tu Zhong-cai, Xiao Hui, et al. Characteristics and antioxidant activities of ovalbumin glycated with different saccharides under heat moisture treatment[J]. Food Research International, 2012, 48(2): 866~872.
- Vhangani L N, Wyk J V. Antioxidant activity of Maillard reaction products (MRPs) derived from fructose-lysine and ribose-lysine model systems[J]. Food Chemistry, 2013, 137(1~4): 92~98.
- 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.
- Gu Feng-li, Kim J M, Hayat K, et al. Characteristics and antioxidant activity of ultrafiltrated Maillard reaction products from a casein - glucose model system[J]. Food Chemistry, 2009, 117(1): 48~54.
- Yilmaz Y, Toledo R. Antioxidant activity of water-soluble Maillard reaction products[J]. Food Chemistry, 2005, 93(2): 273~278.
- Dong Shi-yuan, Panya A, Zeng Ming-yong, et al. Characteristics and antioxidant activity of hydrolyzed β -lactoglobulin - glucose Maillard reaction products[J]. Food Research International, 2012, 46(1): 55~61.
- Brudzynski K, Miotto D. Honey melanoidins: Analysis of the compositions of the high molecular weight melanoidins exhibiting radical-scavenging activity[J]. Food Chemistry, 2011, 127(3): 1023~1030.
- Jiang Zhan-mei, Wang Li-zhe, Che Hong-xia, et al. Effects of temperature and pH on angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity and physicochemical properties of bovine casein peptide in aqueous Maillard reaction system[J]. LWT -Food Science and Technology, 2014, 59(1): 35~42.
- Farvin K H, Aderson L L, Nielson H H, et al. Antioxidant activity of Cod(*Gadus morhua*) protein hydrolysates: In vitro assays and evaluation in 5% fish oil-in-water emulsion[J]. Food Chemistry, 2014, 149(15): 326~334.