



王倩楠,朱宗帅,黄天然,等. 冻藏时间对不同热处理方式鸭胸肉中羧甲基赖氨酸形成的影响[J]. 南京农业大学学报,2024,47(2):359-368.
WANG Qiannan,ZHU Zongshuai,HUANG Tianran,et al. Effect of frozen storage time on the N^e -carboxymethyllysine formation in duck breast meat with different thermal treatments[J]. Journal of Nanjing Agricultural University,2024,47(2):359-368.

冻藏时间对不同热处理方式鸭胸肉中羧甲基赖氨酸形成的影响

王倩楠¹,朱宗帅¹,黄天然²,黄继超³,黄明^{1*}

(1.南京农业大学食品科技学院,江苏 南京 210095;2.南京黄教授食品科技有限公司/江苏省畜禽产品加工工程技术研究中心/国家禽肉加工技术研发专业中心,江苏 南京 211225;3.南京农业大学工学院,江苏 南京 210031)

摘要:[目的] 本文旨在阐明不同热处理方式(烤制、炸制、煮制、煎制、高压炖煮)鸭胸肉经不同时间冻藏(-20℃,分别贮藏0、10、20、30、40 d)后,氧化(脂质和蛋白质氧化)与蛋白质结构改变对羧甲基赖氨酸(CML)形成的影响。[方法] 采用酶联免疫、多光谱分析、相关分析等技术方法测定经热/非热处理鸭胸肉冻藏期间的脂质氧化、游离氨基、表面疏水性、内源性色氨酸和蛋白质氧化等指标,探究冷冻贮藏对鸭胸肉肌原纤维蛋白(MP)结构修饰及CML形成的关联机制。[结果] 在40 d、-20℃的冻藏条件下,各组冻藏过程中游离态和结合态CML生成量不同,主要受到蛋白质氧化聚集和脂质氧化的影响。在冻藏过程中CML生成量主要与羰基含量、总巯基含量、脂质氧化显著相关($P<0.05$)。与其他组相比,高压炖煮组在冻藏期间CML含量最高,炸制与高压炖煮促进鸭胸肉蛋白质羰基化并导致其结构改变,烤制和煮制组促进脂质氧化进程。[结论] 热加工肉经冻藏后促进蛋白质分子降解、二次聚集、开链等行为,从而影响CML生成量。

关键词: 鸭胸肉;冻藏;羧甲基赖氨酸;氧化;结构修饰

中图分类号:TS251.1

文献标志码:A

文章编号:1000-2030(2024)02-0359-10

Effect of frozen storage time on the N^e -carboxymethyllysine formation in duck breast meat with different thermal treatments

WANG Qiannan¹,ZHU Zongshuai¹,HUANG Tianran²,HUANG Jichao³,HUANG Ming^{1*}

(1.College of Food Science and Technology,Nanjing Agricultural University,Nanjing 210095,China;
2.Nanjing Huangjiaoshou Food Science and Technology Co.,Ltd./Jiangsu Research Center for Livestock and Poultry Products Processing Engineering Technology/National R&D Center for Poultry Processing,Nanjing 211225,China;
3.College of Engineering,Nanjing Agricultural University,Nanjing 210031,China)

Abstract:[Objectives] This paper aimed to elucidate the effects of oxidation (lipid and protein oxidation) and protein structural modification on the formation of N^e -carboxymethyllysine (CML) in duck breast meat with different thermal treatments (roasting, deep-frying, boiling, pan-frying and high-pressure stewing) after different frozen storage conditions (-20℃, stored for 0, 10, 20, 30, 40 d). [Methods] Enzymatic linked immunoassay, multispectrum analysis, correlation analysis, and other techniques were used to determine the lipid oxidation, free amino group, surface hydrophobicity, endogenous tryptophan and protein oxidation of thermal/non-thermal treated duck breast, and to explore the correlation mechanism of freezing storage on the structural modification of myofibrillar protein (MP) and the formation of CML. [Results] Under the freezing-preservation conditions of 40 d and -20℃, the free and protein-bound CML levels in each group were different during the freezing-preservation process, which was mainly affected by protein oxidative aggregation and lipid oxidation. During the freezing-preservation process, the CML production was mainly significantly correlated with carbonyl content, total sulfhydryl content, and lipid oxidation ($P<0.05$). Compared with other groups, the highest CML content was observed during the cryopreservation period in the high-pressure stewing group. Frying and high-pressure stewing promoted the carbonylation of duck breast protein and led to the change of its structure, roasting and boiling promoted the lipid oxidation process. [Conclusions] Hot processed meat after freezing-preservation could promote the degradation, secondary aggregation, and chain opening of protein molecules, thus affecting the CML production.

Keywords: duck breast meat; frozen storage; N^e -carboxymethyllysine; oxidation; structure modification

收稿日期:2023-03-01

基金项目:国家自然科学基金项目(32272251);江苏省农业科技自主创新资金项目[CX(22)3194];南京市科技计划项目(202212003)

*通信作者:黄明,教授,博导,研究方向为畜产品加工和质量控制,E-mail:mhuang@njau.edu.cn.

我国是鸭肉生产和消费大国,鸭肉的产量和消费量均居世界第一,鸭肉是日常饮食中不可或缺的禽肉,与其他肉类相比,鸭肉中蛋白质含量丰富,脂肪含量低^[1],与其他禽肉相比,鸭肉中B族维生素含量高。鸭肉制品是满足低脂高蛋白健康饮食方式的另一途径^[2]。热处理会增强鸭肉风味,保证其食用品质,促进营养素的消化吸收,但在热加工中会导致晚期糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGE)、杂环胺和多环芳烃等有害物的产生。AGE是一类由蛋白质、脂质或核酸等生物大分子与还原糖在非酶条件下结合生成的异质性化合物,在人体中会与组织细胞的特异性受体相结合并破坏细胞的功能特性,易引发多种慢性疾病,如动脉粥样硬化、阿尔兹海默症、冠心病等。羧甲基赖氨酸(*N*^ε-carboxymethyllysine, CML)是AGE的主要生物标志物,外源性CML主要由食物摄入,通过美拉德反应途径中还原糖与蛋白质上的糖基化结合位点(赖氨酸、精氨酸)反应生成,这类有害物在人体内代谢率较低,长期积累会威胁人体健康^[3]。

AGE主要经热处理快速形成,但在冷冻贮藏过程中也会缓慢形成。例如吴兴阁等^[4]通过研究猪肉冻藏和冻融循环过程中肌原纤维蛋白凝胶特性变化与AGE生成的关系,发现猪肉冻藏过程促进了蛋白质变性和氧化聚集,溶解度降低,同时AGE大量生成,但蛋白质在冻藏过程结构特征变化和AGE生成的关联机制尚不明确。相关研究表明,冷冻贮藏对肉类蛋白质的结构与功能特性有显著影响^[5]。在低温贮藏过程中,肉类蛋白质的结构和构象逐渐发生变化。活性巯基暴露导致二硫键产生,从而使蛋白质出现交联聚集等现象^[6]。此外,随着冷冻时间的延长,蛋白质分子如肌球蛋白重链和肌动蛋白均有不同程度的降解^[7]。蛋白质氧化也会受到许多因素的影响,当活性氧攻击蛋白质时更易形成蛋白质聚集体,导致其在冷冻储存期间易被氧化,使肉质嫩度降低,保水力下降并发生变色等现象^[8],在此过程中生成一系列羰基化合物、过氧化物等^[9]。蛋白质肽链的展开导致蛋白质表面疏水性增加、结构改变^[10],这些改变都会影响蛋白质糖基化结合位点的变化,导致AGE的生成^[11]。

冷冻贮藏与其他肉制品贮藏方法相比,长期储存期间虽然可以保护蛋白质的持水力,延缓肉类贮藏过程中不良的生化反应,并且有效抑制酶活性和微生物生长^[12],但在冻藏过程中由于冰晶的形成,这种现象会引起肌肉细胞和纤维结构的破坏^[13-15]。Soyer等^[16]探究了鸡胸肉和鸡腿肉在不同冷冻条件(-7、-12和-18℃)下贮藏6个月对脂质和蛋白质氧化情况的影响,发现蛋白氧化和脂质氧化会相互促进,并受到氧自由基的直接影响。

为了解蛋白质在冷冻储存过程中的变化与CML形成的关系,本研究以鸭肉为研究对象,通过将炸制、煎制、烤制、煮制、高压炖煮后的鸭胸肉于-20℃条件下分别贮藏0、10、20、30、40 d,以阐明鸭胸肉制品在冻藏期间的蛋白质和脂质氧化、结构修饰对CML的生成机制。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器设备

冷冻去皮樱桃谷鸭胸肉和大豆油购自江苏省南京某苏果超市。盐酸(HCl)、氯化钾(KCl)、三氯乙酸(TCA)、5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸,DTNB)、1,1,3,3-四氧基丙烷、邻苯二甲醛(OPA)、1-苯胺萘-8-磺酸盐(8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid,ANS)、β-巯基乙醇、十二烷基硫酸钠、正己烷、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、乙二胺四乙酸、丙二醛(MDA)、盐酸胍、2,4-二硝基苯肼(DNPH)、十水合四硼酸钠、硼氢化钠、硼酸等试剂均为分析纯。台式pH计购自瑞士Mettler Toledo公司;高速匀浆机购自德国IKA公司;多功能酶标仪购自奥地利Tecan Austria公司;立式压力蒸汽灭菌锅购自中国雅玛拓科技贸易有限公司;真空包装机购自西班牙ULMA公司;氮吹仪购自中国上海安谱科学仪器有限公司;恒温水浴锅购自中国金坛市城西富威实验仪器厂;电热恒温鼓风干燥箱购自中国上海森信实验仪器有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 鸭胸肉的热处理和贮藏 鸭胸肉解冻后去除血水和筋膜,切成5 cm×5 cm×1 cm的小块,每组随机选取3小块鸭胸肉进行如下热处理:1)烤制(T1):鸭胸肉平铺在食品用烤盘纸上,烤箱温度达到(200±2)℃时放入并焙烤15 min;2)炸制(T2):按照鸭胸肉与大豆油质量比为1:9进行油炸,炸锅温度和油温达到(180±2)℃时放入肉块,炸制10 min后捞出沥干油脂;3)煮制(T3):水浴锅加热至(95±2)℃后放入鸭胸肉,煮制15 min;4)煎制(T4):在鸭胸肉煎制面涂抹1 mL大豆油,平底锅温度达到(160±2)℃时,放入肉块煎10 min,每30 s翻面1次;5)高压炖煮(T5):高压蒸汽灭菌锅达到(121±2)℃、0.15 MPa时放入鸭胸

肉加热 15 min。加工后的鸭胸肉于 4 °C 冷却、称重分为 2 部分:一部分立即搅碎用于各项指标的测定和肌原纤维蛋白的提取;另一部分真空包装,于 -20 °C 冰箱中分别冻藏 10、20、30、40 d 后进行指标检测。以同一批次、相同贮藏条件的生鸭胸肉(CK)作为对照组。

1.2.2 肌原纤维蛋白(MP)提取 根据 Liu 等^[17]的方法提取 MP 并稍作修改。将冷冻鸭胸肉解冻后去除血水和筋膜,于 4 °C 条件下搅碎成肉糜,然后用磷酸盐缓冲液(PBS, pH6.5)提取 MP,肉糜与提取液的质量比为 1:4,将混合液在 5 000 g、4 °C 条件下离心 10 min,重复 3 次得到 MP 粗提物。最后,用 0.1 mol·L⁻¹ KCl 洗涤 2 次,得到 MP,将蛋白浓度调节为 4 mg·mL⁻¹ 待用。

1.2.3 羧基含量测定 蛋白质羧基采用 Zhu 等^[18]的方法测定,将 0.2 mL 蛋白质溶液与 1 mL DNPH 溶液(10 mmol·L⁻¹ DNPH 溶解于 2 mol·L⁻¹ HCl)混合,避光反应 1 h,混合物于 8 000 g 离心后取沉淀物,加入 2 mL 乙酸乙酯和乙醇溶液(体积比为 1:1)反复清洗 3 次,最后溶解于 2 mL 盐酸胍(6 mol·L⁻¹, pH2.3)中,37 °C 水浴 30 min 后测定 370 nm 的吸光值(A_{370})。

1.2.4 总巯基含量测定 巯基含量采用 Zhu 等^[19]的方法测定,将 0.5 mL 蛋白质溶液与尿素缓冲液(8 mol·L⁻¹)和 DTNB 溶液[10 mmol·L⁻¹ DTNB 溶解于 20 mmol·L⁻¹ PBS(pH6.5)中]混合。于 4 °C 避光反应 15 min,在 412 nm 波长处测定吸光值(A_{412})。

1.2.5 游离氨基含量测定 采用 OPA 法^[20]测定游离氨基含量。将 100 μL 蛋白溶液与 2 mL OPA 试剂混合,在 37 °C 孵育 2 min,在 340 nm 处测得吸光值(A_{340})。

1.2.6 肌原纤维蛋白表面疏水性测定 采用 ANS 法^[20]检测肌原纤维蛋白表面疏水性。用 20 mmol·L⁻¹ PBS 缓冲液(pH8.7)将蛋白溶液分别稀释至 0.08、0.06、0.04、0.02 和 0.01 mg·mL⁻¹,将稀释样品(290 μL)与 10 μL ANS 溶液(8 mmol·L⁻¹ ANS 溶解于 20 mmol·L⁻¹ PBS 缓冲液)混合,避光反应 5 min,混合溶液在发射波长为 390 nm、激发波长为 488 nm 处进行荧光强度的测定。

1.2.7 内源性色氨酸荧光测定 参照李倩等^[20]的方法,将蛋白浓度调节为 0.4 mg·mL⁻¹,利用多功能酶标仪在激发波长为 279 nm、300~600 nm 发射光谱下进行荧光扫描,狭缝宽度设置为 10 nm。

1.2.8 脂质氧化程度测定 硫代巴比妥酸反应物质(TBAR)的测定采用 Huang 等^[21]的方法并略作修改。将 0.5 g 搅碎的样品与 3.5 mL TCA 溶液(7.5%)混合于离心管中,进行均质(转速为 10 000 r·min⁻¹, 1 min)和离心(5 000 g、4 °C 条件下离心 10 min),将 2 mL 上清液与 2 mL TBA(0.02 mol·L⁻¹)溶液混合,避光涡旋后于 95 °C 水浴加热,冷却后在 532 nm 波长处测得吸光值(A_{532})。

1.2.9 CML 含量测定 CML 含量采用酶联免疫法测定,操作按照试剂盒(南京迈博生物科技有限公司)说明书进行。根据 Niu 等^[22]和 Sun 等^[23]的方法测定结合态和游离态 CML 含量。

1.3 数据分析

数据采用 SAS 8.1 软件进行统计分析,用 ANOVA 进行单因素方差分析。采用 Duncan's 多重比较法进行多重比较($P < 0.05$),采用 Origin 9.0 软件绘图。每组试验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 冻藏期间生肉和热处理鸭胸肉羧基和总巯基含量变化

由图 1-A 可知:对照组和处理组中鸭胸肉肌原纤维蛋白羧基含量均随冻藏时间的延长而升高,冻藏前,生肉蛋白质中羧基含量最低,说明热加工促进了蛋白质氧化进程。冻藏开始后,处理组中 T2 组的羧基含量在冻藏 0 和 40 d 均最高;与对照组相比, T5 组在冻藏 0~30 d 羧基含量显著增加($P < 0.05$),其余各组在 20~30 d 羧基含量显著上升($P < 0.05$)。

由图 1-B 可以看出:对照组的总巯基含量和处理组情况不同,冻藏初始,处理组的总巯基含量均低于对照组,其中 T2、T5 两组总巯基含量较低。冻藏后,对照组的总巯基含量随冻藏时间延长下降,而 T2、T4 和 T5 组的总巯基含量在 0~30 d 呈下降趋势, T1 和 T3 组的总巯基含量在 0~20 d 呈下降趋势,然后均有小幅度上升。

2.2 冻藏期间生肉和热处理鸭胸肉游离氨基含量和表面疏水性分析

由图 2-A 可知:冻藏初始对照组的游离氨基含量高于各处理组, T2 组中游离氨基初始含量最低, T3 处理组中初始游离氨基含量最高;随着冻藏时间的延长,各组游离氨基的含量下降。 T5 组在 40 d 冻藏期间游离氨基损失率为 28.58%, T3 组损失率为 16.31%,这两组的游离氨基损失率较低。而对照组、T2、T4

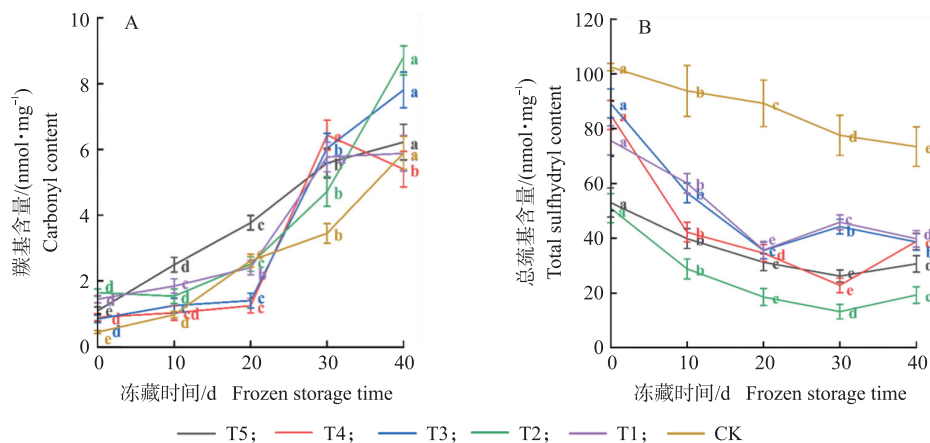


图1 冻藏过程中鸭胸肉肌原纤维蛋白的羰基(A)和总巯基含量(B)

Fig. 1 The contents of carbonyl(A) and total sulfhydryl(B) of duck breast myofibrillar protein during frozen storage

CK;对照 Control;T1:烤制 Roasting;T2:炸制 Deep-frying;T3:煮制 Boiling;T4:煎制 Pan-frying;T5:高压炖煮 High-pressure stewing. 不同小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$)。Different lowercase letters mean significantly different among treatments($P<0.05$). 下同。The same as follows.

组中游离氨基损失率高,并且T2和T4两组在冻藏过程中的羰基含量高,氧化反应产生的羰基可以和游离氨基发生加成、脱水等反应,加剧游离氨基的损失,表明糖基化程度的增加^[24]。

由图2-B可以看出:冻藏初始,对照组的荧光强度即表面疏水性低于处理组,T1和T2组表面疏水性最大。随着冻藏时间的延长,对照组的表面疏水性下降,处理组的表面疏水性先下降后上升,T2、T4和T5组表面疏水性在0~20 d下降,T1和T3组在0~30 d表面疏水性下降。

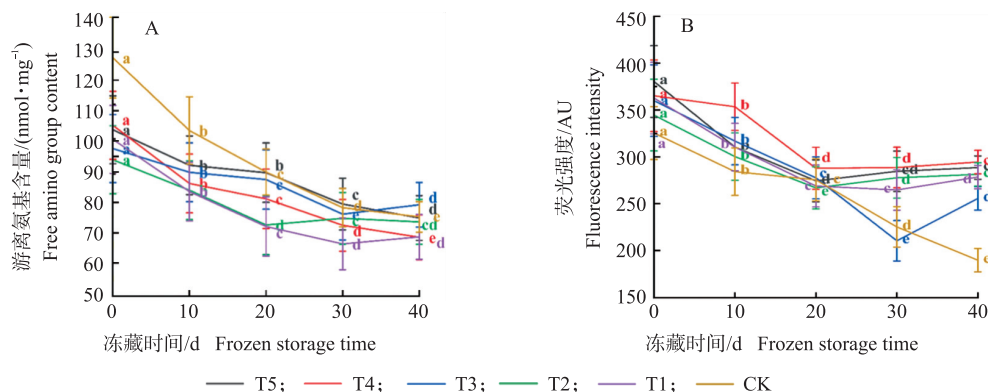


图2 冻藏过程中鸭胸肉肌原纤维蛋白的游离氨基含量(A)和表面疏水性(B)

Fig. 2 Free amino group content(A) and surface hydrophobicity(B) of duck breast myofibrillar protein during frozen storage

2.3 冻藏期间生肉和热处理鸭胸肉内源性色氨酸荧光变化

由图3可知:冻藏初始生肉的荧光强度最高,T2组荧光强度最低。随着冻藏时间的延长,各组荧光强度下降,处理组色氨酸荧光强度的下降程度大于对照组,在各处理组中,荧光强度在0~30 d下降幅度较大,对照组则在0~10 d荧光强度下降幅度较大。

2.4 冻藏期间生肉和热处理鸭胸肉脂质氧化分析

由图4可见:随着冻藏时间延长,各组TBAR含量升高。冻藏后生肉TBAR含量最低,且在30~40 d TBAR含量显著上升,从 $1.87 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 增加到 $2.76 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。T1和T3组TBAR含量较高,T2组在冻藏后TBAR含量显著上升,增加了51%。

2.5 冻藏期间生肉和热处理鸭胸肉游离态、结合态CML含量变化

由图5可见:冻藏初始对照组结合态和游离态CML含量最低,T2组CML含量最高。随冻藏时间延长,对照组结合态和游离态CML含量在40 d最高;T2、T5组在贮藏20 d时结合态和游离态CML含量最高;T1组在30 d时总CML含量达到峰值;T3组结合态CML含量在30 d最高。整体来看,冻藏过程中T5组结合态和游离态CML含量最高,分别为 3.25 和 $10.54 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

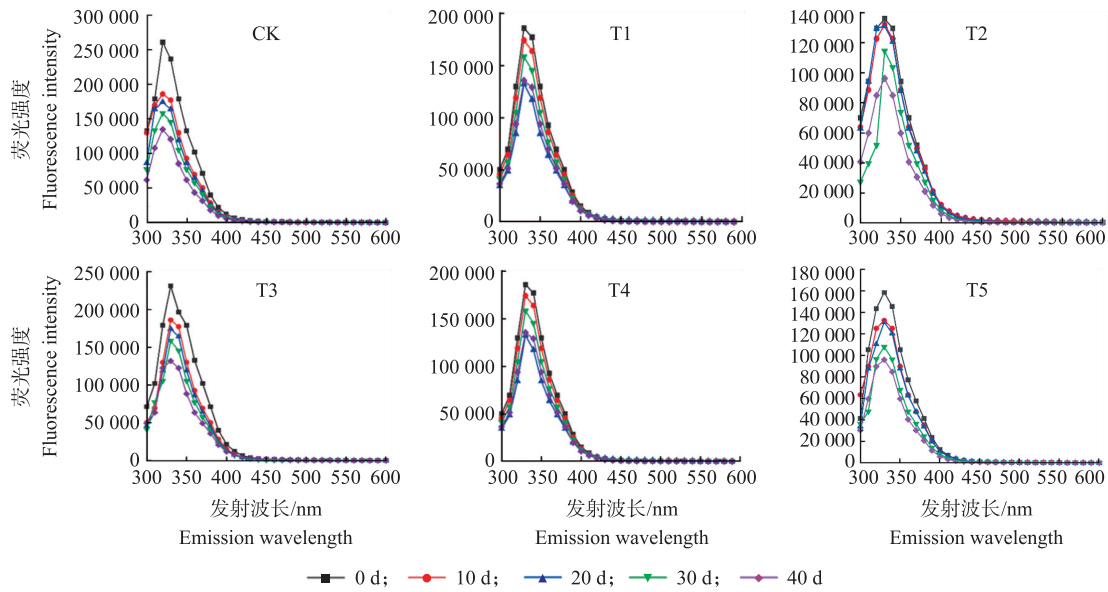


图 3 冻藏过程中鸭胸肉内源性色氨酸荧光强度的变化

Fig. 3 Changes in fluorescence intensity of endogenous tryptophan in duck breast meat during frozen storage

2.6 冻藏期间生肉和热处理鸭胸肉相关指标的相关性分析

相关性分析有利于探究蛋白质结构改变与 CML 含量变化的关系。由图 6 可见:生肉的结合态 CML 主要与羰基含量呈显著正相关 ($P < 0.05$);游离态 CML 主要与羰基、TBAR 含量呈显著正相关,与总巯基含量呈负相关,说明蛋白质氧化聚集促进 CML 生成。T5 组结合态 CML 的生成主要受到蛋白质羰基化、脂质氧化的影响,游离氨基和结合态 CML 呈负相关,这与上述试验结果相一致,游离氨基的减少说明蛋白质分子结构发生变化,在酶的调节下,还原糖与糖基化结合位点反应生成 CML,脂质氧化和蛋白质氧化相互促进,加速了糖基化进程^[25];相比之下,T5 组游离态 CML 含量主要受到蛋白质表面疏水性的影响,两者呈显著负相关。在 T1 组的相关性分析结果中可以看出,

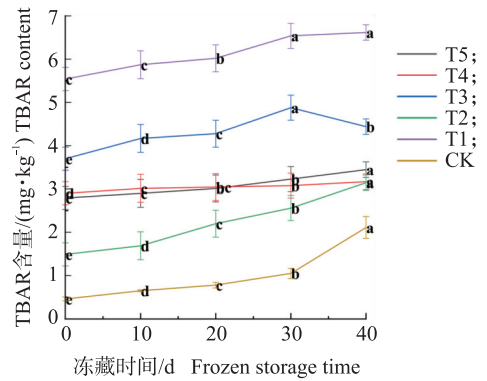


图 4 冻藏过程中鸭胸肉中硫代巴比妥酸反应物质 (TBAR) 含量

Fig. 4 Thiobarbituric acid reacting (TBAR) content in duck breast meat during frozen storage

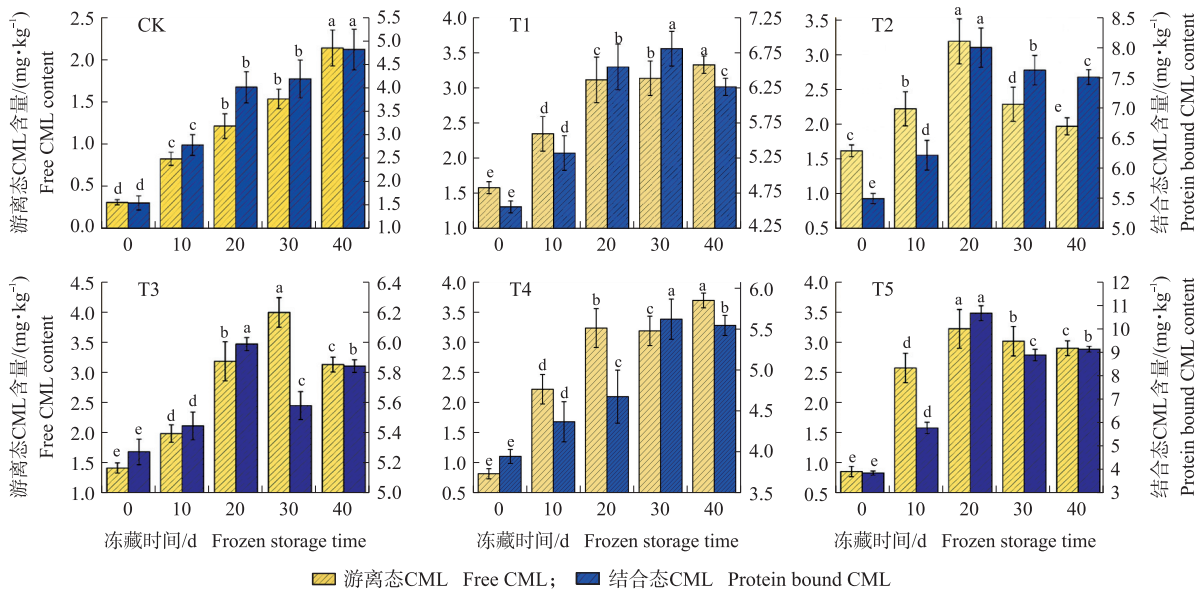


图 5 冻藏过程中鸭胸肉结合态和游离态羧甲基赖氨酸 (CML) 的含量

Fig. 5 Protein bound and free N^{ϵ} -carboxymethyllysine (CML) contents in duck meat during frozen storage

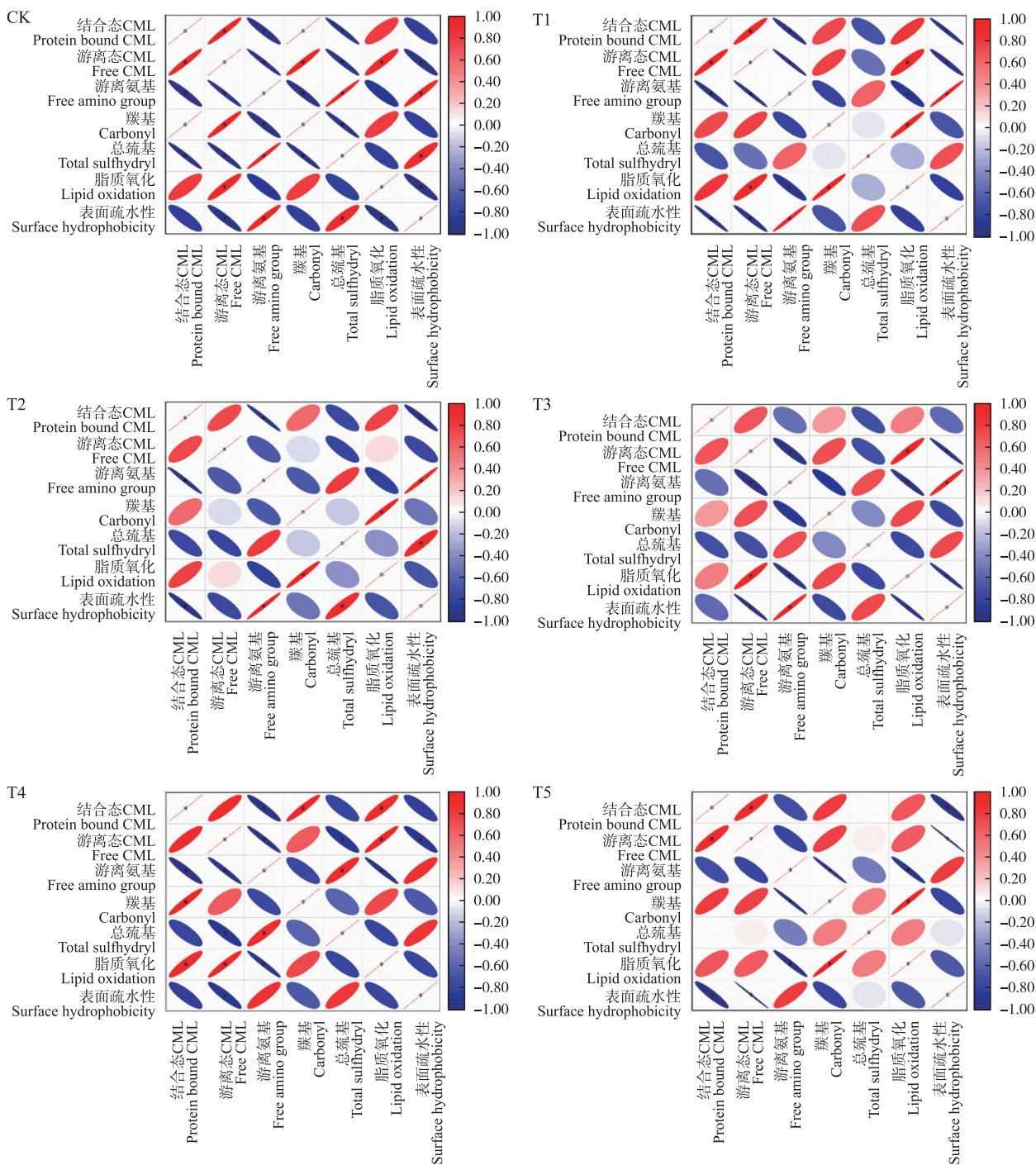


图 6 冻藏过程鸭胸肉中结合态 CML、游离态 CML、TBAR、羰基、总巯基、游离氨基和表面疏水性的相关性

Fig. 6 Correlation between protein bound CML, free CML, TBAR, carbonyl, total sulfhydryl, free amino group, and surface hydrophobicity in duck breast meat during frozen storage

* $P < 0.05$.

结合态 CML 的含量主要受蛋白质分子的游离氨基和表面疏水性的影响,并且随着蛋白质羰基化和脂质氧化的程度增加而升高,蛋白质疏水基团主要存在蛋白质内部,疏水性的降低表示蛋白质分子发生了聚集行为;而游离态 CML 的生成量主要与脂质氧化程度呈显著正相关。T4 组在冻藏过程中的结合态 CML 与羰基含量、脂质氧化呈显著正相关,与游离氨基、表面疏水性呈显著负相关,随着冻藏时间的延长,鸭胸肉中的肌原纤维蛋白发生降解,通过二硫键等发生交联聚集等行为^[26-27];而 T4 组游离态 CML 含量主要随脂质氧化程度增加和蛋白质表面疏水性的降低而升高。从 T3 组的结果来看,结合态 CML 含量主要受总巯基含量的影响,蛋白质聚集程度上升促进了 T3 组在冻藏过程中结合态 CML 的生成,而游离态 CML 主要受到脂质氧化、游离氨基和表面疏水性的影响,其生成量与蛋白质游离氨基、表面疏水性呈显著负相关。

2.7 冻藏期间蛋白质结构改变影响 CML 含量变化分析

在冷冻条件下,蛋白质变性和降解会导致 CML 的生成和蛋白质功能性质的改变,图 7 表示冻藏过程中生肉和熟肉蛋白质结构变化和 CML 生成机制。

生鸭胸肉在冻藏前肌肉纤维中水分含量大,在冻藏初期,肌原纤维结构遭到破坏,水分子从细胞内扩散到细胞外并形成结晶,但仍有一小部分水未冻结。此时细胞外冰晶的形成破坏了细胞内渗透平衡^[28]。水分迁移造成蛋白质的持水能力下降并导致肌肉纤维的横向收缩,使鸭胸肉中肌原纤维蛋白发生降解变性,诱导蛋白质结构展开或聚集,暴露更多的赖氨酸、精氨酸等糖基化结合位点,促进结合态和游离态 CML 的生成。当冻藏时间达到 20 d 时,脂质氧化逐渐受到抑制,但依然会产生大量的自由基并促进蛋白质氧化而加速糖基化进程;在冻藏时间到 30 d 时,CML 生成量达到峰值,此时冻藏时间的延续会对蛋白质氧化变性有抑制作用,但是蛋白质聚集行为仍在进行,蛋白质内部的疏水基团被进一步包裹,导致表面疏水性降低,由于蛋白质聚集行为导致大量的糖基化结合位点被包裹于蛋白质内部,CML 的生成量下降。

熟肉中蛋白质结构变化与 CML 生成的关联机制比生肉复杂,经过热处理的鸭胸肉中肌原纤维蛋白发生热变性,总巯基含量低于对照组,羰基含量、TBAR 值和表面疏水性高于对照组,热处理鸭胸肉冻藏前水分含量低于生肉,而且冻藏前已发生蛋白质氧化、聚集和降解等,CML 含量显著高于生肉。如图 7 所示:0~20 d 冻藏期间,熟肉中肌原纤维收缩,表面疏水性下降,出现蛋白质分子降解、开链;冻藏 20~30 d 时,CML 大量生成,游离氨基含量降低,脂质氧化促进蛋白质羰基含量上升,总巯基含量下降,巯基基团被大量氧化形成二硫键,此时蛋白质出现二次聚集体;冻藏 30~40 d,总巯基含量和表面疏水性上升,聚集体进一步降解,CML 含量下降。

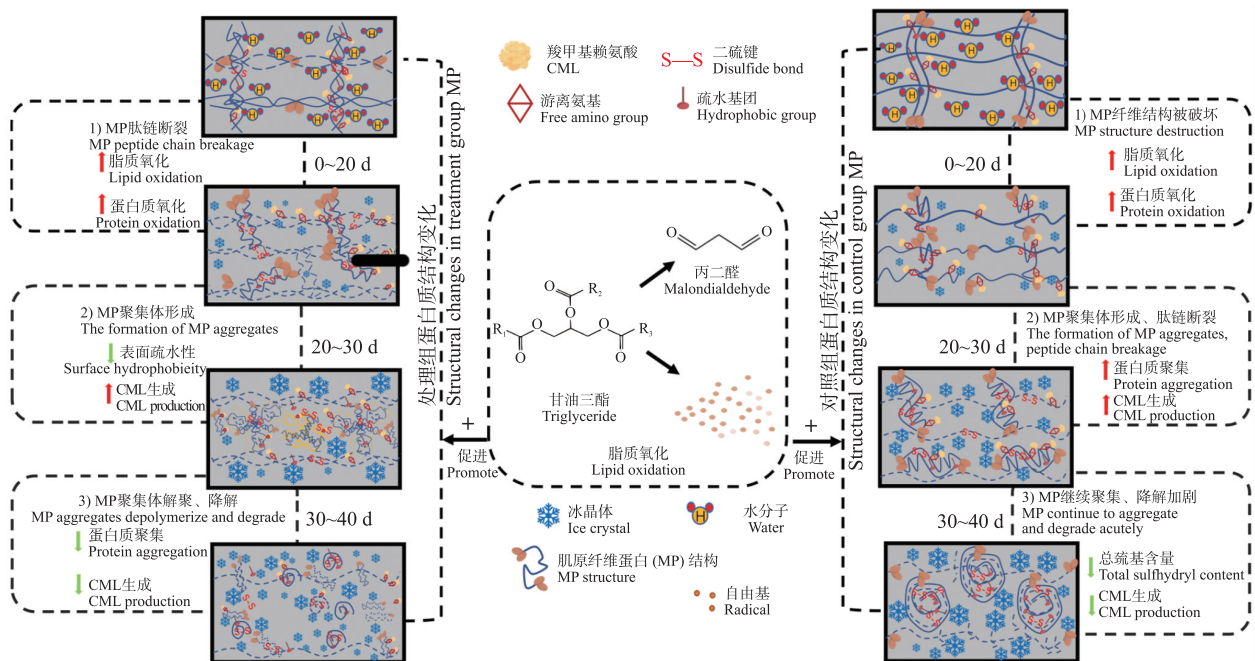


图 7 冻藏过程中生鸭胸肉 CML 生成关联机制

Fig. 7 Mechanism of CML formation in raw duck breast during frozen storage

3 讨论与结论

本研究结果表明,冻藏时间的延长会导致鸭胸肉中形成更多的羰基化合物,在冻藏前期,温度降低有效抑制了蛋白质羰基化程度,在冻藏后期,蛋白质羰基含量上升。Li 等^[29]研究发现,低温冻藏期间鱼肉中脂肪氧化产生的活性氧自由基可能是肌原纤维蛋白氧化的原因。虽然冻藏抑制了蛋白质羰基化程度,但蛋白质的结构展开、聚集和降解程度上升,会暴露更多的糖基化结合位点,导致糖基化水平升高,促进 CML 生成^[30]。

糖基化会将隐藏在蛋白质分子中的巯基基团、二硫键和疏水基团暴露到表面,导致蛋白质分子可能发生两种反应,一种是通过巯基氧化等反应在蛋白质分子之间形成二硫键^[31],另一种是暴露于蛋白质表面

的官能团,如疏水基团、氢键等导致疏水相互作用形成蛋白质聚集体,并通过二硫化物桥的连接进一步加强,二硫化物桥在蛋白质凝胶化中的作用与它们增加蛋白质分子质量和链长的能力有关^[32-33]。在本研究中,炸制、高压炖煮两种热加工方式在冻藏前处理组巯基基团氧化形成二硫键,发生蛋白质聚集。随着冻藏时间的延长,对照组的总巯基含量下降,此结果表明冻藏促进对照组蛋白质聚集;而处理组在冻藏初期,冻藏时间延长促进其蛋白质分子聚集,在冻藏时间达到 20~30 d,处理组的总巯基含量上升,这是由于冻藏时间过长,促进了蛋白质初期聚集体解聚,同时低温对酶或其他生化反应的抑制作用增大,这与 Shi 等^[34]关于鱼肉反复冻融和冷冻储存期间巯基含量的变化研究结果一致。

在蛋白质和多肽发生的反应中,赖氨酸和精氨酸是最具活性的游离氨基,且赖氨酸的活性较高^[35],同时与蛋白质分子之间的交联有关。热加工会促进蛋白质糖基化,炸制使得糖基化程度较高,可能生成更多 CML;煮制过程水分含量高抑制糖基化进程。氧化反应产生的羰基可以和游离氨基发生加成、脱水等反应,加剧游离氨基的损失,表明糖基化程度增加^[24]。

本研究中,从表面疏水性结果可以看出,冻藏初始,热加工导致鸭胸肉 MP 发生热变性,暴露了存在蛋白质内部的疏水基团,高温和长时间加热造成 MP 结构严重破坏,生肉中 MP 结构未被破坏。随着冻藏时间的延长,冻藏促进生鸭胸肉中蛋白质发生聚集;处理组发生了羰氨反应,蛋白质表面暴露的亲水基团增多,蛋白质分子之间发生聚集^[36],包裹了大量的疏水基团,此结论在游离氨基结果中得到印证,随着冻藏时间延长至 30 d,处理组的蛋白质分子之间的反应受到抑制,出现蛋白质降解等现象,暴露了位于蛋白质内部的疏水基团,这与总巯基含量变化结果相一致。

内源性色氨酸荧光可以检测蛋白质中氨基酸残基及其微环境的变化^[37],当蛋白质结构展开时,隐藏在肽链内部的氨基酸会暴露于蛋白质分子表面,在特定波段产生特征性的紫外吸收光谱,可以反映冻藏时间对蛋白结构的影响^[38]。本研究中,冻藏初始,生肉和热加工肉相比,生肉的蛋白质结构完整,炸制导致蛋白质结构严重破坏,随着冻藏时间的延长,生肉中蛋白质变性程度小于处理组,在处理组中,0~30 d 时蛋白质分子结构展开,处于内部的色氨酸等基团暴露出来,因此冻藏使蛋白质分子发生降解、开链或聚合,促进蛋白质分子变性^[39],此结果在表面疏水性结果中得到印证。李倩等^[20]研究发现,在猪肉的冻藏过程中,内源性色氨酸荧光强度在冻藏 7、14 d 时下降,至冻藏 28 d 时显著下降,本研究与之趋势一致。

脂质氧化是自由基诱导的链式反应,在脂质氧化的链传递阶段会产生戊醛、丙二醛等醛类化合物,丙二醛(MDA)含量(TBAR 值)可以衡量脂质氧化程度^[40]。随着冻藏时间延长,各组均发生脂质氧化,相较于热加工组,生肉的脂质氧化程度较低。Yu 等^[41]在中式香肠贮藏过程中 CML 含量变化的研究中发现,香肠中含水量降低易导致 CML 大量生成;Wang 等^[42]在炸制、煎制鸡胸肉饼和鱼饼过程中发现炸制组肉品水分大量流失,油脂吸收率高,水分损失和油脂吸收促进了脂质氧化,鱼饼和鸡胸肉饼中的 CML 大量产生。炸制组加工过程中油脂含量高于其他组,更易导致鸭肉中油脂吸收量高,促进脂质氧化。冻藏抑制了内源性脂氧合酶(LOX)的活性,但其仍然会促进脂质氧化进程,脂质氧化产生的活性氧自由基不仅可以进一步促进脂质氧化的链式反应,还会促进蛋白质氧化过程,这在整个冻藏过程中会导致蛋白质功能特性和结构发生改变,持水能力下降,肉质变硬,随着冻藏时间延长,肉制品新鲜程度降低,营养物质流失,感官品质下降^[43]。

本研究结果表明,随着冻藏时间的延长,不同热处理方式下鸭胸肉中 CML 含量的变化趋势不同,生成 CML 的含量不同。冻藏初始对照组结合态和游离态 CML 生成量最低,热处理和脂质氧化促进鸭肉中 CML 生成。冻藏促使鸭肉中出现了一系列复杂的生化反应,蛋白质分子结构改变,糖基化结合位点大量暴露^[31-32,44],生成了更多的 CML 等糖基化产物;冻藏后期蛋白质分子发生不可逆的冷冻变性,生化反应能力受到抑制,冻藏过程中脂质氧化和蛋白氧化聚集共同作用导致生鸭胸肉和不同热处理下鸭胸肉蛋白质的分子结构改变和 CML 含量变化^[45]。

本研究初步揭示了不同冻藏时间 MP 的结构修饰与 CML 含量变化规律,对控制鸭肉及其制品在冻藏期间 CML 的形成有重要的理论和现实意义。由试验结果和相关分析得出以下结论:热处理和未热处理(生肉)的鸭胸肉在冻藏期间蛋白质结构变化对 CML 形成的影响不同。先热处理再冷冻贮藏时,MP 结构已被破坏,冻藏期间蛋白和脂质氧化会加速 MP 的二次降解和聚集,导致游离态和结合态 CML 含量改变,在 20~30 d 时含量最高。炸制、高压炖煮加工使得总 CML 含量较大(炸制,11.15 mg·kg⁻¹;高压炖煮,13.79 mg·kg⁻¹),煮制加工中总 CML 含量最低(8.95 mg·kg⁻¹)。在生肉冷冻贮藏过程中,冷冻时间延长,

MP 的结构被破坏,蛋白质氧化和脂质氧化促进 MP 聚集,结合态和游离态 CML 含量持续增加。因此在实际肉制品生产和贮藏中要选择合适的加工方式,严格控制贮藏时间,减少有害物的生成。肉制品在加工贮藏过程中 CML 生成的关联机制仍需深入探究。

参考文献 References:

- [1] Khan M A, Ali S, Yang H J, et al. Improvement of color, texture and food safety of ready-to-eat high pressure-heat treated duck breast[J]. *Food Chemistry*, 2019, 277: 646–654.
- [2] Naveen Z, Naik B R, Subramanyam B V, et al. Studies on the quality of duck meat sausage during refrigeration[J]. *SpringerPlus*, 2016, 5(1): 2061.
- [3] Huang S H, Dong X L, Zhang Y L, et al. Effects of oxidation and precursors (lysine, glyoxal and Schiff base) on the formation of N^{ϵ} -carboxymethyl-lysine in aged, stored and thermally treated chicken meat[J]. *Food Science and Human Wellness*, 2022, 11(5): 1252–1258.
- [4] 吴兴阁. 预调理猪肉糜冻藏过程中品质劣变及控制途径研究[D]. 无锡: 江南大学, 2021.
Wu X G. Study on quality deterioration and control pathway during freezing and storage of preconditioned pork mince[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2021 (in Chinese with English abstract).
- [5] Wen D L, Liu Y, Yu Q. Metabolomic approach to measuring quality of chilled chicken meat during storage[J]. *Poultry Science*, 2020, 99(5): 2543–2554.
- [6] Benjakul S, Visessanguan W, Thongkaew C, et al. Comparative study on physicochemical changes of muscle proteins from some tropical fish during frozen storage[J]. *Food Research International*, 2003, 36(8): 787–795.
- [7] Lan Y, Shang Y B, Song Y, et al. Changes in the quality of superchilled rabbit meat stored at different temperatures[J]. *Meat Science*, 2016, 117: 173–181.
- [8] Akamittath J G, Brekke C J, Schanus E G. Lipid oxidation and color stability in restructured meat systems during frozen storage[J]. *Journal of Food Science*, 1990, 55(6): 1513–1517.
- [9] Pinheiro R S B, Francisco C L, Lino D M, et al. Meat quality of Santa Inês lamb chilled-then-frozen storage up to 12 months[J]. *Meat Science*, 2019, 148: 72–78.
- [10] Leygonie C, Britz T J, Hoffman L C. Impact of freezing and thawing on the quality of meat: review[J]. *Meat Science*, 2012, 91(2): 93–98.
- [11] Crouse J D, Koohmaraie M. Effect of freezing of beef on subsequent postmortem aging and shear force[J]. *Journal of Food Science*, 1990, 55(2): 573–574.
- [12] de Paula Paseto Fernandes R, de Alvarenga Freire M T, Freire M T, Guerra C C, et al. Estabilidade físico-química, microbiológica e sensorial de carne ovina embalada a vácuo estocada sob refrigeração[J]. *Ciência Rural*, 2012, 42(4): 724–729.
- [13] Stanisławczyk R, Rudy M, Gil M. The influence of frozen storage and selected substances on the quality of horse meat[J]. *Meat Science*, 2019, 155: 74–78.
- [14] Estévez M, Ventanas S, Heinonen M, et al. Protein carbonylation and water-holding capacity of pork subjected to frozen storage: effect of muscle type, premincing, and packaging[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(10): 5435–5443.
- [15] Bax M L, Sayd T, Aubry L, et al. Muscle composition slightly affects *in vitro* digestion of aged and cooked meat; identification of associated proteomic markers[J]. *Food Chemistry*, 2013, 136(3/4): 1249–1262.
- [16] Soyer A, Özalp B, Dalmiş 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.
- [17] Liu J H, Fang C H, Xu X, et al. Physico-chemical and functional properties of silver carp myosin glycosylated with konjac oligo-glucomannan; effects of deacetylation[J]. *Food Chemistry*, 2019, 291: 223–230.
- [18] Zhu Z S, Huang S H, Ali Khan I A, et al. The effect of oxidation and Maillard reaction on formation of N^{ϵ} -carboxymethyllysine and N^{ϵ} -carboxyethyllysine in prepared chicken breast[J]. *CyTA: Journal of Food*, 2019, 17(1): 685–694.
- [19] Zhu Z S, Yang J, Zhou X H, et al. Comparison of two kinds of peroxy radical pretreatment at chicken myofibrillar proteins glycation on the formation of N^{ϵ} -epsilon-carboxymethyllysine and N^{ϵ} -epsilon-carboxyethyllysine[J]. *Food Chemistry*, 2021, 353: 129487.
- [20] 李倩, 尉立刚, 杨钰昆, 等. 冻藏时间对猪肉中肌原纤维蛋白氧化程度的影响[J]. *食品与机械*, 2020, 36(1): 157–160, 165.
Li Q, Yu L G, Yang Y K, et al. Effect of frozen storage time on the oxidation degree of porcine myofibrillar protein[J]. *Food and Machinery*, 2020, 36(1): 157–160, 165 (in Chinese with English abstract).
- [21] Huang S H, Huang M, Dong X L. Advanced glycation end products in meat during processing and storage: a review[J]. *Food Reviews International*, 2023, 39(3): 1716–1732.
- [22] Niu L H, Sun X H, Tang J M, et al. Free and protein-bound N^{ϵ} -carboxymethyllysine and N^{ϵ} -carboxyethyllysine in fish muscle; biological variation and effects of heat treatment[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2017, 57: 56–63.
- [23] Sun X H, Li X J, Tang J M, et al. Formation of protein-bound N^{ϵ} -carboxymethyllysine and N^{ϵ} -carboxyethyllysine in ground pork during commercial sterilization as affected by the type and concentration of sugars[J]. *Food Chemistry*, 2021, 336: 127706.
- [24] Qu W J, Zhang X X, Han X, et al. Structure and functional characteristics of rapeseed protein isolate-dextran conjugates[J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 82: 329–337.

- [25] Zhao D, He J, Zou X, et al. Influence of salting process on the structure and *in vitro* digestibility of actomyosin[J]. Journal of Food Science and Technology, 2020, 57(5): 1763–1773.
- [26] Jagusiak A, Chłopaś K, Zemanek G, et al. Interaction of supramolecular congo red and congo red-doxorubicin complexes with proteins for drug carrier design[J]. Pharmaceutics, 2021, 13(12): 2027.
- [27] Jedermann R, Nicometo M, Uysal I, et al. Reducing food losses by intelligent food logistics[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences, 2014, 372: 20130302.
- [28] Jiang Q Q, Nakazawa N, Hu Y Q, et al. Changes in quality properties and tissue histology of lightly salted tuna meat subjected to multiple freeze-thaw cycles[J]. Food Chemistry, 2019, 293: 178–186.
- [29] Li J, Niu L, Yu J, et al. Effects of frozen temperature and multiple freeze-thaw cycles on gel structure, protein and lipid oxidation and formation of advanced glycation end-products in unwashed silver carp surimi [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2022, 57(9): 6191–6200.
- [30] Ruiz G A, Xi B Y, Minor M, et al. High-pressure-high-temperature processing reduces maillard reaction and viscosity in whey protein-sugar solutions[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(38): 7208–7215.
- [31] Zhao D, Li L, Xu D, et al. Heat-induced amyloid-like aggregation of β -lactoglobulin regulated by glycation; a comparison of five kinds of reducing saccharides[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 120: 302–309.
- [32] Zhu Z S, Fang R, Ali I, et al. Impact of methylglyoxal modification of chicken sarcoplasmic protein emulsions on emulsifying properties, rheological behavior and advanced glycation end products[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2020, 100(11): 4208–4216.
- [33] Xu Y J, Zhao Y Q, Wei Z X, et al. Modification of myofibrillar protein via glycation; physicochemical characterization, rheological behavior and solubility property[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 105: 105852.
- [34] Shi L, Yang T, Xiong G Q, et al. Influence of frozen storage temperature on the microstructures and physicochemical properties of pre-frozen perch (*Micropterus salmoides*) [J]. LWT: Food Science and Technology, 2018, 92: 471–476.
- [35] Mercier Y, Gatellier P, Viau M, et al. Effect of dietary fat and vitamin E on colour stability and on lipid and protein oxidation in Turkey meat during storage[J]. Meat Science, 1998, 48(3/4): 301–318.
- [36] Zhao D, Le T T, Larsen L B, et al. Effect of glycation derived from α -dicarbonyl compounds on the *in vitro* digestibility of β -casein and β -lactoglobulin; a model study with glyoxal, methylglyoxal and butanedione[J]. Food Research International, 2017, 102: 313–322.
- [37] 熊杰. 鼠曲草提取物对猪肉肌原纤维蛋白氧化、结构及凝胶特性影响研究[D]. 重庆: 重庆工商大学, 2022.
Xiong J. Effects of Salvia extract on oxidation, structure and gel properties of pork myofibrillar protein[D]. Chongqing: Chongqing Technology and Business University, 2022 (in Chinese with English abstract).
- [38] 汪少芸, 李晓贞, 陈旭, 等. 鱼糜抗冻多肽对鱼糜肌原纤维蛋白的冻融保护作用[J]. 广东海洋大学学报, 2023, 43(1): 78–86.
Wang S Y, Li X Z, Chen X, et al. Freeze-thaw protection of fish-derived antifreeze polypeptides against surimi myofibrillar protein[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2023, 43(1): 78–86 (in Chinese with English abstract).
- [39] 朱东宏. pH 值调节诱导罗非鱼肌球蛋白分子去折叠/重折叠行为的研究[D]. 广州: 广东海洋大学, 2015.
Zhu D H. Study on defolding/refolding behavior of tilapia myosin molecules induced by pH adjustment[D]. Guangzhou: Guangdong Ocean University, 2015 (in Chinese with English abstract).
- [40] Huang X Q, Tu Z C, Wang H, et al. Increase of ovalbumin glycation by the maillard reaction after disruption of the disulfide bridge evaluated by liquid chromatography and high resolution mass spectrometry[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(9): 2253–2262.
- [41] Yu L G, Chai M, Zeng M M, et al. Effect of lipid oxidation on the formation of N^{ϵ} -carboxymethyl-lysine and N^{ϵ} -carboxyethyl-lysine in Chinese-style sausage during storage[J]. Food Chemistry, 2018, 269: 466–472.
- [42] Wang R H, Gao R C, Xiao F, et al. Effect of chicken breast on the physicochemical properties of unwashed sturgeon surimi gels[J]. LWT: Food Science and Technology, 2019, 113: 108306.
- [43] Cao S M, Wang Y, Xing L J, et al. Structure and physical properties of gelatin from bovine bone collagen influenced by acid pretreatment and pepsin[J]. Food and Bioprocess Technology, 2020, 121: 213–223.
- [44] Zhao S S, Hu H Y, Xie J H, et al. Investigation into the contents of nutrients, N^{ϵ} -carboxymethyllysine and N^{ϵ} -carboxyethyllysine in various commercially canned fishes to find the correlation between them[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2021, 96: 103737.
- [45] Zhao D, Xu D, Sheng B L, et al. Application of preheating treatment in up- and down-regulating the glycation process of dietary proteins[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 98: 105264.

责任编辑: 范雪梅