

刘小莉,张金振,胡彦新,等. 冻藏期间河蟹蟹黄蛋白质和脂肪的氧化稳定性[J]. 江苏农业科学,2017,45(24):183-185.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.24.049

冻藏期间河蟹蟹黄蛋白质和脂肪的氧化稳定性

刘小莉¹, 张金振², 胡彦新¹, 刘 源³, 周剑忠¹

(1. 江苏省农业科学院农产品加工研究所, 江苏南京 210014; 2. 中国农业科学院蜜蜂研究所, 北京 100093;
3. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306)

摘要:采用不同浓度的茶多酚和二丁基羟基甲苯(BHT)对蟹黄进行抗氧化处理,测定蟹黄在冻藏过程中蛋白质和脂肪氧化相关指标的变化情况,包括蛋白总巯基含量、表面疏水性指数、过氧化值、丙二醛(MDA)含量等。结果表明,抗氧化剂的使用对延缓蛋白质和脂肪氧化指标的变化有明显的作用,0.2 g/kg BHT 对蛋白总巯基含量、表面疏水性指数、过氧化值变化的抑制作用最强,而对生成 MDA 的抑制作用不及 0.2 g/kg 茶多酚,0.2 g/kg 茶多酚的综合效果最佳,可用于替代人工合成抗氧化剂 BHT。

关键词:冻藏;河蟹蟹黄;蛋白质;脂肪;氧化指标;抗氧化剂;丙二醛;茶多酚;二丁基羟基甲苯

中图分类号: TS254.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)24-0183-03

河蟹营养丰富,味道鲜美,深受广大消费者的喜爱,特别是蟹黄中含有丰富的脂肪与蛋白质,可用于制作各种美味菜肴。因此,近年来河蟹养殖业发展迅速,成为特种水产品中最具代表性和最有影响力的主导产业^[1]。

但河蟹的生产季节性非常强,有研究表明,蟹黄的风味在 10 月份左右达到最佳,脂肪酸的含量在 11 月份左右达到最大值,具有最佳食用价值。在河蟹集中上市的季节,市场不能及时消化掉的大量的积压鲜活蟹及残次蟹一旦失去食用价值,也将造成很大的浪费^[2]。目前,国内少数小型水产加工企业将鲜销剩余的断足螃蟹或小规格蟹经洗净、蒸煮,人工掏出蟹黄、蟹肉,包装、速冻后出售。越来越多的研究表明,冷冻水产品的货架期较长,可以有效抑制微生物和酶的作用,但即使在低温下,水产类脂质中含有的大量高度不饱和脂肪酸及蛋白质也会发生氧化或分解变质,改变水产品的组织、色泽、水合能力、风味等一系列特性,对其保存、销售和食用产生不良影响^[3-4]。与蟹肉相比,蟹黄中含有更丰富的蛋白质和脂肪,因此在冷冻储藏过程中更易发生一系列影响品质的生化特性的改变。

茶多酚作为一种天然抗氧化剂,具有天然、高效、低毒的特点,能有效抑制脂质氧化,防止油脂哈败,并能在一定程度上抑制蛋白质的氧化变性,是化学合成抗氧化剂二丁基羟基甲苯(BHT)的有效替代物质。本研究采用茶多酚作为抗氧化剂,并以 BHT 作为阳性对照,考察在冻藏期间蟹黄蛋白质、脂肪氧化相关指标的变化,筛选合适的抗氧化剂,以期工业生产实践提供理论依据,提高冻藏产品的品质,为蟹黄进一步的加工利用提供原料保障。

1 材料与方法

收稿日期:2016-07-20

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(15)1011]。

作者简介:刘小莉(1981—),女,江苏泰兴人,博士,副研究员,研究方向为水产加工。E-mail:liuxljaas@hotmail.com。

1.1 试验材料

1.1.1 材料与试剂 鲜活河蟹,购自南京市玄武区孝陵卫菜市场,体质量(150±15)g,经江苏省淡水水产研究所鉴定为中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis* H. Milne-Edwards)。

丙二醛(MDA)测定试剂盒、二喹啉甲酸(bicinchoninic acid,BCA)法蛋白定量测试盒,均购自南京建成生物工程研究所;5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)[5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid),DTNB]、8-苯胺基-1-萘磺酸铵(1-anilino-naphthalene-8-sulfonic acid,ANS),均购自 Sigma-Aldrich 公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.1.2 仪器与设备 低温试验箱,购自南京泰斯特试验设备有限公司;医用低温保存箱,购自海尔集团;多功能酶标仪,购自美国 BioTek 仪器有限公司;高速匀浆机,购自德国 IKA;pH 计,购自上海雷磁仪器厂;蟹黄吸附机,购自山东省诸城市兴和机械有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 蟹黄采集和预处理 采用蟹黄吸附机通过真空吸附的方式采集新鲜河蟹的蟹黄,分别加入不同种类、不同终浓度的抗氧化剂。抗氧化剂包括终浓度为 0.1、0.2 g/kg 的 BHT 和终浓度为 0.1、0.2、0.3、0.4 g/kg 的茶多酚,另外以不添加任何抗氧化剂的蟹黄作为对照,-20℃速冻后冻藏待用。

1.2.2 蟹黄油脂的提取 称取蟹黄样品,4℃解冻。加入 10 倍体积的石油醚(沸程 60~90℃),超声波处理 40~60 min,静置分层,收集上层有机溶剂相,下层水相样品再加入石油醚重复提取 2 次,合并有机相,40℃旋转蒸发挥发干有机溶剂,得到蟹黄油脂粗提物。

1.2.3 过氧化值的测定 取“1.2.2”节中提取的蟹黄油脂粗提物,按照 GB/T 5009.37—2003《食用植物油卫生标准的分析方法》^[5]中过氧化值第二法测定过氧化值。

1.2.4 丙二醛含量的测定 称取一定量的蟹黄样品,加入 5 倍体积去离子水,10 000 r/min 匀浆 1 min,用于丙二醛含量的检测。依据硫代巴比妥酸(TBA)法原理采用试剂盒检测,结果以 1 mg 样品蛋白质中丙二醛的含量(nmol/mg)表示。

1.2.5 肌原纤维蛋白的提取 参照 Yang 等的方法^[6]提取肌原纤维蛋白。向 10 g 蟹肉样品中加入 20 mL、4 ℃ 预冷的去离子水, 12 000 r/min 匀浆 30 s, 10 000 r/min、4 ℃ 离心 20 min, 弃去上清液, 沉淀中加入去离子水, 再重复提取 1 次。沉淀中再加入 20 mL、4 ℃ 预冷的 0.05 mol/L 磷酸缓冲液(pH 值 7.2) (其中补充 0.6 mol/L NaCl), 12 000 r/min 匀浆 30 s, 10 000 r/min、4 ℃ 离心 20 min, 收集上清液。沉淀用上述含有 NaCl 的磷酸缓冲液再重复提取 1 次, 合并上清液。蛋白质含量采用 BCA 试剂盒测定。

1.2.6 总巯基含量的测定 参考 Benjakul 等的方法^[7]测定总巯基的含量。调节“1.2.5”节中提取的肌原纤维蛋白溶液浓度至 4 mg/mL, 取 0.5 mL 加入 4.5 mL 0.2 mol/L Tris-HCl buffer[pH 值为 6.8, 含有 8 mol/L 尿素、2% 十二烷基磺酸钠(SDS)、10 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)]。取 1 mL 上述混合液, 加入 0.1 mL 0.1% DTNB, 40 ℃ 温育 25 min, 测定其 $D_{412\text{ nm}}$ 。空白对照以 0.6 mol/L KCl 溶液(pH 值 7.0)代替样品。总巯基含量的计算公式如下:

$$\text{总巯基含量}(\text{nmol/mg}) = [(D \times n) / (\varepsilon \times \rho)] \times 10^6$$

式中: D 为 412 nm 波长处的吸光度; n 为稀释倍数; ε 为摩尔吸光系数, 取值为 13 600 L/(mol · cm); ρ 为蛋白质质量浓度, mg/mL。

1.2.7 蛋白表面疏水性的测定 用 ANS 作为荧光探针测定表面疏水性^[7]。用 10 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 值 6.0, 含 0.6 mol/L NaCl)将提取的肌原纤维蛋白溶液稀释至不同浓度(0.125、0.250、0.500、1.000 mg/mL), 取 4 mL 各浓度的肌原纤维蛋白溶液, 与 30 μL ANS(用 0.1 mol/L、pH 值为 7.0 的磷酸盐缓冲液溶解, 浓度为 8 mmol/L)混合。测定 ANS-蛋白结合体的荧光强度, 激发波长 374 nm、发射波长 485 nm。以荧光强度对肌原纤维蛋白浓度做图, 所得到的曲线斜率即为蛋白表面疏水性指数。

1.3 数据分析

本试验数据为 3 次重复的平均值。采用 SPSS 13.0 软件对数据进行统计和方差分析。

2 结果与分析

2.1 冻藏期间蟹黄蛋白总巯基含量的变化

生物体内蛋白质巯基的含量非常丰富, 且对氧化反应比较敏感^[8]。在冻藏加工过程中, 由于冻结处理时冰晶的形成, 以及储藏期间温度波动造成的冰晶大小反复改变, 使肌原纤维蛋白空间结构发生改变, 使埋藏在分子内部的巯基活性基团暴露出来, 进而被氧化成二硫键, 导致巯基含量减少。巯基的含量可以用于表征蛋白质氧化的程度^[9]。由图 1 可知, 6 个月的冻藏期内, 各个处理的蟹黄中蛋白总巯基含量均呈减少趋势, 且 2~3 个月后下降幅度更大, 其中对照组的下降趋势最为明显, 添加抗氧化剂组的下降速度比对照组缓慢, 且最终总巯基的含量均高于对照组。BHT 抑制总巯基下降的作用显著($P < 0.05$), 且所采用的 2 种不同浓度之间的作用差异不显著。而添加茶多酚的 4 组样品中, 使用量为 0.2、0.3、0.4 g/kg 的处理效果显著增强($P < 0.05$), 随着使用量的增加变化不显著, 6 个月储藏期结束后, 0.3、0.4 g/kg 处理组的总巯基含量低于 0.2 g/kg 处理组。茶多酚是目前普遍使用

的 1 种天然高效低毒的抗氧化物质, 是茶叶中多酚类物质的总称, 其抗氧化机制主要有直接清除自由基、作用于与自由基有关的酶、络合金属离子、再生高效抗氧化剂等, 可用于多种食品的保鲜储藏^[10-11]。本研究中茶多酚的抗氧化效果为非浓度依赖型, 这可能是由于茶多酚在储藏过程中发生自身氧化, 其产物影响抗氧化的效果。

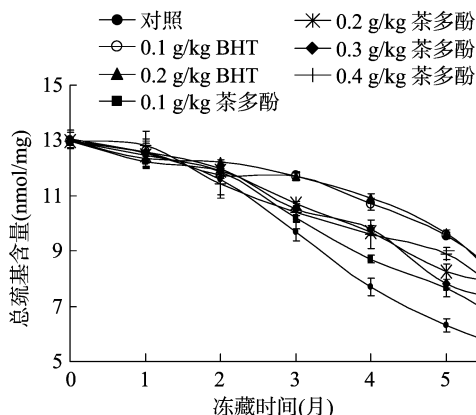


图1 冻藏期内不同处理对蟹黄蛋白总巯基含量的影响

2.2 冻藏期间蟹黄蛋白表面疏水性指数的变化

蛋白质表面疏水性可以反映蛋白质的变性程度。蛋白质溶解在水溶液中时, 由于氨基酸残基的极性不同, 疏水作用力倾向于将疏水性氨基酸包裹于内部, 只有少量疏水性氨基酸能暴露于蛋白表面。在冻藏过程中, 蛋白变性, 其结构发生改变, 部分疏水残基暴露, 并随着冻藏时间的延长及冻藏过程中温度的波动, 疏水残基暴露的数量增多, 表面疏水性增大^[12-13]。由图 2 可知, BHT 的作用效果表现出显著的浓度依赖型, 0.2 g/kg BHT 抑制蟹黄蛋白表面疏水性指数增加的效果显著高于 0.1 g/kg BHT($P < 0.05$)。茶多酚的作用效果与浓度之间的依赖关系没有 BHT 明显, 0.1 g/kg 茶多酚的作用效果与 0.1 g/kg BHT 相当, 随着浓度的增加, 茶多酚对蛋白表面疏水性的抑制效果增强, 0.3 g/kg 茶多酚作用下蟹黄蛋白表面疏水性指数的增加幅度最小, 但随着茶多酚用量的继续增加, 蟹黄蛋白表面疏水性指数的增加趋势反而增强。但即使在茶多酚的最佳作用条件下(0.3 g/kg 茶多酚), 其作用效果也不及 0.2 g/kg BHT。

2.3 冻藏期间蟹黄过氧化值的变化

河蟹蟹黄的脂含量较高, 且与品种、喂养方式、温度、气候条件等因素密切相关, 汤辰婧等测定了不同阶段中华绒螯蟹的脂含量为 6.85%~14.35%^[14]。在长期的冻藏过程中, 油脂也会发生缓慢的氧化^[4]。油脂初始氧化的产物是过氧化物, 过氧化物易分解产生醛、酮等小分子有害化合物, 常以过氧化物在油脂中的产生作为油脂氧化酸败的开端。

由图 3 可知, 2 个月后蟹黄过氧化值(POV)迅速增加, 与蛋白总巯基含量的变化趋势类似。添加抗氧化剂处理对蟹黄 POV 增加的抑制作用显著($P < 0.05$), 0.2 g/kg BHT 的抑制效果最好, 茶多酚在低浓度(0.1 g/kg)条件下作用效果不明显, 随着浓度的增加, 抑制作用显著增强($P < 0.05$), 0.2 g/kg 茶多酚与 0.1 g/kg BHT 对蟹黄 POV 增加的抑制作用相当, 0.3、0.4 g/kg 茶多酚对蟹黄 POV 增加的抑制作用效果显著低于 0.2 g/kg BHT($P < 0.05$)。在 6 个月冻藏期内, 各个处

理组的蟹黄 POV 均低于 9 meq/kg。武华等研究不同冻藏温度对鳊鱼片脂质特性变化的影响,发现不同冻藏温度下鱼片的过氧化值均在第 4 周达到最大值,−10 ℃ 组的过氧化值最高达 25.48 $\mu\text{mol/kg}$, −30 ℃ 组的过氧化值仅为 10.01 $\mu\text{mol/kg}$,而后随着冻藏时间的延长,作为初级脂肪氧化产物的过氧化物逐渐降解^[15]。不同研究中出现的 POV 不同变化趋势与所测定样品中饱和脂肪酸、不饱和脂肪酸及其他组成有关。

2.4 冻藏期间蟹黄中丙二醛含量的变化

丙二醛是常用的脂质过氧化指标,可与硫代巴比妥酸

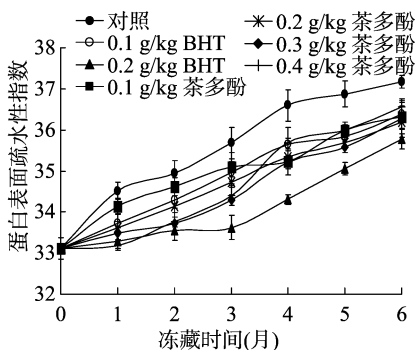


图2 冻藏期内不同处理对蟹黄蛋白表面疏水性的影响

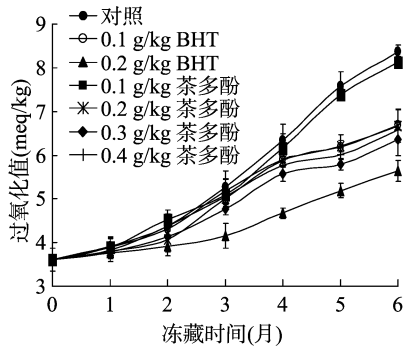


图3 冻藏期内不同处理对蟹黄过氧化值的影响

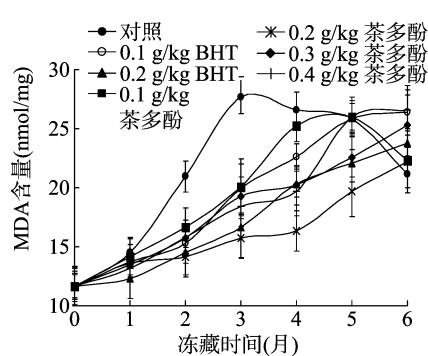


图4 冻藏期内不同处理对蟹黄中丙二醛含量的影响

3 结论

冻藏是水产品运输、储藏中常见的方法之一。相对于其他保藏方式,冻藏能更限度地保持产品的品质,延长保质期。但冷冻处理可以将水产品体内大部分水分冻结成冰晶,体积增大,产生内压,且细胞介质中离子强度增大,引起脂肪和蛋白质的氧化,另外在长期冻藏过程中,由于温度波动,产品常常会经过反复解冻、冻结的过程造成机械损伤,破坏肌肉结构,加速蛋白和脂肪的氧化,造成其营养缺失、风味劣变。

本试验通过对蟹黄进行不同的抗氧化处理,测定每组样品在冻藏过程中蛋白和脂肪氧化相关指标的变化情况,发现随着冻藏时间的延长,蟹黄蛋白的总巯基含量呈下降趋势,表面疏水性、过氧化值、丙二醛含量呈上升趋势。抗氧化剂的使用对延缓上述蛋白质和脂肪氧化指标的变化有明显的作用,且除丙二醛含量外,高浓度的 BHT 对其他蛋白质和脂肪劣变指标的变化表现出了较强的延缓作用。综合而言,不同浓度的茶多酚中,0.2 g/kg 茶多酚的使用量对各项指标的变化均有较好的抑制效果,可代替人工合成抗氧化剂 BHT,有效减缓冻藏过程中蟹黄蛋白和脂肪的氧化进程。

参考文献:

- [1] 刘爱军,杜林华,金黎明. 江苏河蟹消费特征研究[J]. 中国渔业经济,2014,32(6):104-108.
- [2] 车 斌,王倩倩. 江苏省河蟹养殖产业 SWOT 分析及对策[J]. 山西农业科学,2011,39(7):736-739.
- [3] Garcia-Sanchez G, Roberto Sotelo-Romero C A, Carlos Ramirez-Suarez J, et al. Effect of freezing on protein denaturation and gelling capacity of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) mantle muscle [J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 60(2):737-742.
- [4] Tolstorebrov I, Eikevik T M, Bantle M. Effect of low and ultra-low

(TBA) 缩合形成红色产物,在 532 nm 处有最大吸收峰,测定值反映了脂肪二级氧化产物即最终生成物的含量^[16]。由图 4 可知,抗氧化剂的使用有效抑制了蟹黄中丙二醛的生成,对照组在冻藏 3 个月时 MDA 含量达到最大值,随后又进一步降解导致 MDA 含量下降。与蛋白质氧化和过氧化值增加不同的是,0.2 g/kg 茶多酚表现出最强的延缓丙二醛含量增加的作用,效果显著优于 0.2 g/kg BHT ($P < 0.05$),随着茶多酚使用量的进一步提高,其延缓丙二醛含量增加的作用反而下降,与 0.2 g/kg BHT 的作用效果相当。

temperature applications during freezing and frozen storage on quality parameters for fish[J]. International Journal of Refrigeration, 2016, 63:37-47.

- [5] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会. 食用植物油卫生标准的分析方法:GB/T 5009.37—2003[S]. 北京:中国标准出版社,2003.
- [6] Yang F, Rustad T, Xu Y, et al. Endogenous proteolytic enzymes—a study of their impact on cod (*Gadus morhua*) muscle proteins and textural properties in a fermented product[J]. Food Chemistry, 2015, 172:551-558.
- [7] Benjakul S, Sutthiphan N. Muscle changes in hard and soft shell crabs during frozen storage [J]. LWT-Food Science and Technology, 2009, 42(3):723-729.
- [8] 陆玉芹,颜明月,陈德慰,等. 鱼类加工制品蛋白质氧化程度分析[J]. 食品科学,2015,36(19):55-59.
- [9] 屠冰心,娄永江,刘永固. 低温速冻处理对养殖大黄鱼冻藏品质的影响[J]. 渔业科学进展,2014,35(1):55-59.
- [10] 王丹丹,李婷婷,刘 烨,等. 茶多酚对冷藏带鱼品质及抗氧化效果的影响[J]. 食品科学,2015,36(2):210-215.
- [11] 孙 达,张士康,朱跃进,等. 脂溶性茶多酚在油脂体系中抗氧化性能研究[J]. 粮食与油脂,2014,27(1):42-45.
- [12] 李向红,王发祥,张付兰,等. 冷藏过程中草鱼肌原纤维蛋白结构的变化[J]. 食品与发酵工业,2015,41(10):177-181.
- [13] 荣建华,甘承露,丁玉琴,等. 低温贮藏对脆肉鲩肌肉肌球蛋白特性的影响[J]. 食品科学,2012,33(14):273-276.
- [14] 汤辰娟,松前成辉,付 娜,等. 不同阶段中华绒螯蟹脂含量及脂肪酸组成分析[J]. 食品科学,2013,34(22):174-178.
- [15] 武 华,洪 惠,罗永康,等. 冻藏温度对鳊鱼片脂质特性变化的影响[J]. 中国农业大学学报,2014,19(6):173-178.
- [16] 王建辉,刘冬敏,刘永乐,等. 冷藏期间草鱼肌肉脂质降解的影响因素分析[J]. 食品科学,2013,34(18):276-279.