

doi:10.6041/j.issn.1000-1298.2015.06.031

冻藏对牦牛肉蛋白质、脂质氧化和保水性的影响*

李儒仁¹ 韩玲¹ 余群力¹ 荣良燕² 李洪波³

(1. 甘肃农业大学食品科学与工程学院, 兰州 730070; 2. 甘肃省草原技术推广总站, 兰州 730010;
3. 陇西中天清真食品有限责任公司, 陇西 748100)

摘要: 通过测定蛋白质氧化产物(α -氨基己二酸半醛、 γ -谷氨酸半醛、 α -氨基己二酸、希夫碱)以及脂质氧化产物(硫代巴比妥酸、己醛)的含量,研究不同部位牦牛肉(腰肌、股四头肌、背最长肌)在冷冻贮藏期间(-18°C , 0~140 d)蛋白质、脂质氧化规律及其对保水性的影响。结果表明:血红素铁和超氧化物歧化酶在背最长肌冻藏阶段的脂质氧化进程中发挥着重要作用,较低的血色素铁含量以及较高的超氧化物歧化酶是背最长肌脂质氧化程度较低的主要原因。冻藏显著影响腰肌和股四头肌蛋白质的氧化,血红素铁与超氧化物歧化酶、过氧化氢酶共同调控氧化反应的发生;冻藏140 d后,血红素铁的促氧化作用使腰肌和股四头肌中的 α -氨基己二酸半醛、 γ -谷氨酸半醛含量均显著增加($P < 0.05$),尽管腰肌中的血红素铁显著高于股四头肌($P < 0.05$),但腰肌中相对较高的超氧化物歧化酶和过氧化氢酶使腰肌与股四头肌的 α -氨基己二酸半醛、 γ -谷氨酸半醛含量并无显著性差异;血红素铁含量更高的腰肌容易使其产生更多的 α -氨基己二酸,但腰肌中相对较高的超氧化物歧化酶与过氧化氢酶协同作用使腰肌中的 α -氨基己二酸含量极显著低于股四头肌($P < 0.05$)。此外,冻藏引起的蛋白质羰基化反应显著影响牦牛肉的保水性,抗氧化酶活力最低、血红素铁含量相对较高的股四头肌保水性最差,其解冻汁液流失率是背最长肌的3.55倍。

关键词: 牦牛肉 冻藏 血红素铁 抗氧化酶 氧化 保水性

中图分类号: TS251.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2015)06-0218-08

Impact of Frozen Storage on Protein, Lipid Oxidation and Water Holding Capacity of Yak Meat

Li Ruren¹ Han Ling¹ Yu Qunli¹ Rong Liangyan² Li Hongbo³

(1. College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China
2. Station of Grassland Technology Extension, Lanzhou 730010, China
3. Longxi Zhongtian Halal Food Company Limited, Longxi 748100, China)

Abstract: The aim of this paper was to investigate the changes of protein, lipid oxidation and its impact on water holding capacity of *Psoas major*, *Quadriceps femoris* and *Longissimus dorsi* from yak during 140 d of frozen storage (-18°C). Samples were analyzed at sampling times upon thawing (0, 28, 56, 84 and 140 d) for lipid (TBARS, hexanal) and protein oxidation products (α -amino adipic and γ -glutamic semialdehydes, α -amino adipic acid, Schiff bases). During the frozen storage, heme-iron and superoxide dismutase played an important role in the lipid oxidation process of *Longissimus dorsi*. Owing to a lower content of heme-iron and a relatively higher content of superoxide dismutase, *Longissimus dorsi* had a lower content of TBARS and hexanal. Frozen storage significantly influenced the oxidative stability of proteins in *Psoas major* and *Quadriceps femoris*. The protein oxidation process of PM and QF was co-regulated by heme-iron, superoxide dismutase and catalase. Because of the promoting oxidation of

收稿日期: 2014-06-30 修回日期: 2014-09-05

* 国家自然科学基金资助项目(31260380)、“十二五”国家科技支撑计划资助项目(2012BAD28B01)和国家现代农业产业(肉牛牦牛)技术体系资助项目(CARS-38)

作者简介: 李儒仁, 博士生, 主要从事畜产品加工研究, E-mail: liruren@126.com

通讯作者: 韩玲, 教授, 博士生导师, 主要从事畜产品加工研究, E-mail: yuqunlihl@163.com

heme-iron, the content of α -amino adipic and γ -glutamic semialdehydes were also significantly improved. However, the content of heme-iron in *Psoas major* was significantly higher than *Quadriceps femoris*, the content of α -amino adipic and γ -glutamic semialdehydes in *Psoas major* and *Quadriceps femoris* had no significant differences due to the higher content of superoxide dismutase and catalase. The content of α -amino adipic acid was relatively higher because of the higher content of heme-iron in *Psoas major*, but the content of α -amino adipic acid in *Psoas major* was significantly lower than *Quadriceps femoris* ($P < 0.05$). Furthermore, the water holding capacity of yak meat was significantly affected by protein carbonylation reaction during the frozen storage. Owing to the lowest antioxidant enzyme activity and the highest heme-iron, the water holding capacity of *Quadriceps femoris* was the worst in three kinds of yak meat. The purge of *Quadriceps femoris* was higher than *Longissimus dorsi* for 3.55 times.

Key words: Yak meat Frozen storage Heme-iron Antioxidant enzymes Oxidation Water holding capacity

引言

肉制品氧化酸败主要原因是活性氧介导对食品中蛋白质和脂质的氧化损伤。活性氧可以直接修饰蛋白质,也可以通过来源于脂肪氧化产物或其他途径的羰基化合物再次修饰蛋白质。蛋白质氧化修饰容易造成半胱氨酸、色氨酸、组氨酸等发生降解,而且会形成组织蛋白交联,导致细胞功能障碍。脂质氧化导致肉制品色泽、质地、风味变差,也有可能产生有毒有害物质^[1]。

通过特定氨基酸的具体氧化产物分析蛋白质氧化状况要比传统非特异性的 DNPH 法更有价值^[2]。研究发现, α -氨基己二酸半醛和 γ -谷氨酸半醛含量占到了蛋白质羰基化合物总量的 70%,可作为监测鲜肉和其他加工肉制品蛋白质氧化的指标^[3]。

冻藏对肌肉蛋白质羰基化有显著影响,并且影响肉的保水性^[4]。除外在加工条件影响,许多内在因素也是造成肌肉蛋白质发生氧化的重要原因,例如:蛋白质与脂质的组成、铁离子含量、肌肉新陈代谢状况以及肌肉中的抗氧化酶类等^[2,4-5]。然而,冻藏期间,以上内在因素对蛋白质氧化的影响以及蛋白质氧化对牦牛肉保水性影响的研究还很少。Estévez 等认为,较高的铁含量是蛋白质羰基化的根本原因^[6],与发生糖酵解类型的肌肉相比,参与有氧代谢的肌肉其氧化稳定性更差。许多研究人员发现,将猪肉冷冻贮藏,由于大量铁离子的存在,参与有氧代谢的肌肉其羰基化易感性更高^[7]。此外,其他因素,例如脂肪含量、还原糖含量以及抗氧化酶的活性都会影响肌肉的代谢状况。因此,有必要深入研究这些因素对蛋白质氧化的影响。研究冻藏期间牦牛肉的蛋白质氧化规律及其对品质造成的影响将有助于了解冻藏与肌肉蛋白质氧化之间的相互关系,这对于改进冻藏方法,开发新型抗氧化剂,减少

蛋白质氧化损伤以及保护牦牛肉品质具有重要意义。本文通过分析冻藏过程中不同部位牦牛肉新型蛋白质氧化标记物、脂质氧化产物的含量,以评价它们在冻藏条件下的氧化稳定性,同时研究氧化损伤对不同部位牦牛肉保水性的影响。

1 材料方法

1.1 肉样采集和处理

随机选取自然放牧条件下,健康无病的 3~4 岁牦牛,屠宰、冷却排酸后分别采集腰肌、股四头肌、背最长肌,采用透氧聚乙烯包装袋包装后于 -18°C 黑暗条件下冻藏 140 d。分别在冻藏第 0、28、56、84、140 天每个部位取出 4 份样品, 4°C 解冻 10 h 后备用。

1.2 主要设备

Autosystem XL/TurboMass 型气相色谱-质谱联用仪 (GC/MS),美国 PE 公司;HPLC Prominence LC-20A 型高效液相色谱仪,日本岛津公司;DVB-CAR-PDMS (Divinylbenzene-Carboxen-Polydimethylsiloxane),固相微萃取头 ($50/30\ \mu\text{m}$),美国 Supelco 公司。

1.3 测定指标与方法

1.3.1 理化指标

含水率、蛋白质、脂肪质量分数测定分别参照 GB 5009.3-2010、GB 5009.5-2010、GB/T 14772-2008;血红素铁含量测定参照 Hornsey 等^[8]的方法。还原糖含量的测定采用 3,5-二硝基水杨酸法^[9]。

1.3.2 抗氧化酶活力

取 5 g 肉样切碎,用 25 mL 磷酸缓冲液 (浓度 $0.05\ \text{mol/L}$, pH 值 7.0) 均质, 4°C 离心 2 min ($3\ 200\ \text{g}$),上清液过滤后备用。

过氧化氢酶活力测定参照 Hernández 等^[10]的方法。具体如下:室温条件下,取制备好的上清液

50 μL , 11 mmol/L H_2O_2 1.95 mL, 二者在磷酸缓冲液中发生反应, 于 240 nm 测定 2 min 之内吸光度变化情况。过氧化氢酶活力单位(U)定义: 提取液 1 min 内分解 1 mmol/L H_2O_2 的量为一个酶活力单位。

超氧化物歧化酶活力测定参照 Mercier 等^[11]的方法。具体如下: 25 $^\circ\text{C}$ 条件下, 将 50 μL 提取液和 50 μL 邻苯三酚(10 mmol/L)与 1.9 mL Tris-HCl 缓冲液(50 mmol/L)充分混合, 在 340 nm 测定 2 min 内吸光度变化, 以 50 μL 磷酸提取缓冲液作空白试验。超氧化物歧化酶活力单位(U)定义: 抑制 50% 邻苯三酚自氧化反应所需的活力为一个酶活单位。

谷胱甘肽还原酶活力测定参照 Cribb 等的方法^[12]。具体如下: 96 孔板中加入 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 值 7.5)和 1 mmol/L EDTA, 并加入 150 μL 0.1 mmol/L DTNB、10 μL 12 mmol/L NADPH、20 μL 还原酶标品(0.025~0.50 U/mL)或 20 μL 样品, 最后加入 10 μL 3.25 mmol/L GSSG, 室温下测定 3 min 内 415 nm 吸光度变化, 每隔 30 s 测定一次。空白试验不加 GSSG。谷胱甘肽还原酶活力通过还原酶标品绘制的标准曲线来计算, 结果以 U/mL 表示。

1.3.3 TBARS 含量

TBARS 含量测定参照 Ganhão 等^[13]和迟海等^[14]的方法并作如下调整: 取 5 g 肉样加入 15 mL 高氯酸(3.86%) 和 0.5 mL 4.2% BHT(乙醇配制)均质, 过滤后离心 4 min(1 500 g), 取离心后的上清液 2 mL 与 2 mL 0.02 mol/L 硫代巴比妥酸混合, 沸水浴 45 min, 冷却至室温, 在 532 nm 测定吸光度。TBARS 含量通过标准曲线来计算, 丙二醛二乙缩醛标准溶液质量浓度为 280~1 130 mg/mL, 由 3.86% 高氯酸配制。

1.3.4 己醛含量

参照 Estévez 等^[15]、师希雄等^[16]、葛武鹏等^[17]的方法, 采用顶空固相萃取和气质联用仪分析己醛含量。取 1 g 肉样放入 2.5 mL 小瓶中, 样品在 37 $^\circ\text{C}$ 条件下水浴 30 min, 气液达到平衡状态后, 将固相萃取纤维头置于顶空部位进行萃取。通过 Autosystem XL/TurboMass 测定己醛含量。挥发性成分通过 5% 苯基-95% 二甲基聚硅氧烷的色谱柱进行分离。通过与标准品对比其质谱图和保留时间对己醛准确定量。GC/MS 条件: OV1701 型色谱柱(50 m \times 0.2 mm, 0.33 μm); 载气: 高纯 He; 流速: 0.8 mL/min; 分流比: 1:20; 进样解析温度 250 $^\circ\text{C}$, 时间 2 min。电子轰击电离源(EI): 电子能量 70 eV, 离子源温度 200 $^\circ\text{C}$; 质荷比扫描范围 10~400; 升温程序(初始温度 50 $^\circ\text{C}$, 保持 2 min, 以 3 $^\circ\text{C}/\text{min}$ 升至 225 $^\circ\text{C}$, 保持

1 min。

1.3.5 α -氨基己二酸半醛、 γ -谷氨酸半醛(AAS、GGS)含量

参照 Utrera 等^[18]的方法, 样品经 50 mmol/L 氨基苯甲酸(ABA)衍生化处理, 然后用 6 mol/L HCl 水解。水解产物真空干燥, 加入 20 μL 超纯水, 经 0.45 μm PVDF 滤膜过滤后备用。采用 HPLC Prominence LC-20A 型高效液相色谱仪分离样品, RF-10A XL 型荧光检测器检测。高效液相色谱条件: Cosmosil C18-AR-II RP-HPLC 色谱柱(150 mm \times 4.6 mm, 5 μm)以及相同填料的保护柱(10 mm \times 4.6 mm); 流动相 A: 50 mmol/L 乙酸钠缓冲液(pH 值 5.4); 流动相 B: 乙腈。采用低压梯度洗脱, 流动相 B 的体积分数在 20 min 内由 0 上升至 8%; (洗脱液 B 体积分数为 0~8%, 洗脱时间 20 min); 进样体积: 1 μL ; 洗脱流速: 1 mL/min; 柱温 30 $^\circ\text{C}$, 保持恒定; 荧光检测器的激发波长和发射波长分别为 283 nm 和 350 nm。在上述色谱条件下, 通过与标准品保留时间的对比来鉴定衍生化后的半醛。在 FLD 色谱图中找出对应的 AAS-ABA 和 GGS-ABA 峰面积进行手动积分, 并且绘制 ABA 标准曲线(浓度为 0.1~0.5 mmol/L)。结果表示为每克蛋白质中 AAS 或 GGS 的物质的量。

1.3.6 α -氨基己二酸(AAA)含量

参照 Utrera 等^[18]的方法, 肉样经 6 mol/L HCl 水解后采用 9-氯甲酸苄基酯(FMoc)衍生化, 衍生样品经亲水性聚丙烯过滤器(0.45 μm)过滤后供 HPLC 分析, 分析方法同 1.3.5 节。色谱条件: Zorbax Eclipse AAA 氨基酸色谱柱(150 mm \times 4.6 mm, 3.5 μm)以及相同填料的保护柱(10 mm \times 4.6 mm); 流动相 A: 20 mmol/L 乙酸铵缓冲液(pH 值 6.5), 15% 甲醇; 流动相 B: 90% 乙腈; 流速 1.0 mL/min; 柱温: 35 $^\circ\text{C}$ 。荧光检测器的激发波长和发射波长分别为 263 nm 和 313 nm。在上述色谱条件下, 通过与标准品保留时间的对比来鉴定衍生化后的 AAA。在 FLD 色谱图中对 AAA-FMoc 峰面积进行手动积分, 并且绘制 AAA-FMoc 标准曲线(浓度为 0.4~5 pmol/L)。结果表示为每克蛋白质中 AAA 的物质的量。

1.3.7 希夫碱(SB)含量

希夫碱含量的测定参照 Estévez 等^[7]的方法。将 1 mL 提取液与 20 mL 20 mmol/L 磷酸缓冲液混匀, 加入 4 mL 石英比色皿待测, 激发波长 350 nm, 记录 400~500 nm 范围内待测溶液发射的荧光光谱。激发和发射狭缝宽度均为 10 nm; 结果表示为 460 nm 处发射的荧光强度单位。

1.3.8 保水性

蒸煮损失测定参照田甲春等^[19]的方法。解冻汁液流失率测定参照 Honikel 等^[20]的方法。

1.3.9 统计分析

试验结果均采用平均数 ± 标准差表示,采用 SPSS 19.0 对数据进行方差分析,Duncan 法进行多重比较。

2 结果与讨论

2.1 理化指标

从表 1 可以看出,牦牛肉腰肌(PM)、股四头肌(QF)、背最长肌(LD)中的蛋白质质量分数在 20.19% ~ 21.23% 之间,三者的蛋白质含量无显著性差异($P < 0.05$)。受不同肌纤维类型以及不同肌肉化学组成的影响^[21],PM、QF、LD 中的其他理化指标均存在显著差异($P < 0.05$)。PM 中的脂肪质量分数(2.78%)分别为 QF 和 LD 的 1.68 倍和 1.82

倍。表 1 结果显示,LD、QF、PM 中的血红素铁含量依次显著增加($P < 0.05$),与此相反的是,LD、QF、PM 中的还原糖含量依次显著减小($P < 0.05$)。

2.2 抗氧化酶活力

从表 1 可以看出,PM、LD 中超氧化物歧化酶和过氧化氢酶均显著高于 QF($P < 0.01$)。并且 PM 中的过氧化氢酶显著高于 LD,但是,PM 中的超氧化物歧化酶显著低于 LD。此外,LD 中 3 种抗氧化酶的总活力高于 QF,这一结果与 Renerre 等的研究结果相似,即参与有氧代谢的“红肌”中抗氧化酶活力要高于参与糖酵解代谢的“白肌”^[21]。通过表 1 还可以发现,不同部位牦牛肉的血红素铁含量存在极显著差异($P < 0.01$),并且,PM 的总抗氧化酶活力最高,这可能与 PM 中较高的血红素铁含量有很大关联,类似的结果也出现在其他研究中,Promeyrat 等也发现血红素铁含量较高的腰肌中抗氧化酶活力更高^[21]。

表 1 牦牛腰肌、股四头肌、背最长肌中理化指标与抗氧化酶活力测定结果

Tab.1 Chemical composition and antioxidant enzyme activities of *Psoas major*, *Quadriceps femoris* and *Longissimus dorsi* from yak

参数	部位		
	腰肌(PM)	股四头肌(QF)	背最长肌(LD)
含水率/%	73.87 ± 0.26 ^b	75.13 ± 0.12 ^a	75.21 ± 0.35 ^a
脂肪质量分数/%	2.78 ± 0.26 ^a	1.65 ± 0.21 ^b	1.53 ± 0.35 ^b
蛋白质质量分数/%	21.05 ± 0.57 ^a	20.19 ± 0.38 ^a	21.23 ± 1.02 ^a
血红素铁质量比/(mg·kg ⁻¹)	44.31 ± 3.21 ^a	32.18 ± 2.68 ^b	24.15 ± 2.54 ^c
还原糖质量比/(mg·g ⁻¹)	2.45 ± 0.26 ^c	3.81 ± 0.36 ^b	4.22 ± 0.35 ^a
超氧化物歧化酶活力/(U·mL ⁻¹)	7.25 ± 1.32 ^b	4.58 ± 0.25 ^c	9.85 ± 0.45 ^a
过氧化氢酶活力/(U·mL ⁻¹)	20.54 ± 0.35 ^a	2.19 ± 0.35 ^c	5.42 ± 0.19 ^b
谷胱甘肽还原酶活力/(U·mL ⁻¹)	2.53 ± 0.10 ^a	2.47 ± 0.04 ^a	2.35 ± 0.25 ^a

注:同行不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$),下同。

2.3 冻藏期间不同部位牦牛肉的脂质氧化规律

从图 1 可以看出,冷冻贮藏前期(0 ~ 28 d),PM 和 QF 中的硫代巴比妥酸含量明显增长,并且在冻藏 28 d 时达到最高值,随后(28 ~ 56 d),硫代巴比妥酸含量逐渐下降;冷冻贮藏后期(84 ~ 140 d),PM 和 QF 中的硫代巴比妥酸含量也呈现逐渐下降的趋势。硫代巴比妥酸含量下降可能是由于脂质氧化次级代谢产物与其他大分子物质发生的继发反应造成的。然而,整个冻藏期间(0 ~ 140 d),LD 中硫代巴比妥酸含量的变化规律以逐渐增长为主,类似结果还出现在鸡胸肉、腿肉^[23]的研究当中,这可能是由于冻藏期间冰晶体的形成加速了 LD 的氧化变质,冷冻对膜结构和其他刚性结构产生物理损伤,使易感分子更容易暴露给促氧剂,此外,冷冻过程中水分逐渐减少,促氧剂浓度增加也是造成脂质氧化的原因^[24]。

整个冻藏过程中,PM 和 QF 的脂质氧化速率更高,其硫代巴比妥酸含量显著高于 LD($P < 0.05$),并且,PM 和 QF 中血红素铁的含量也显著高于 LD($P < 0.05$)(表 1),血红素铁含量与硫代巴比妥酸含量显著正相关($P < 0.01$),这与 Min 等得到的研究结论一致^[25]。此外,抗氧化酶活力也会对脂质氧化也会产生重要影响^[25],尽管 PM 中血红素铁的含量显著高于 QF($P < 0.05$),但是冷冻贮藏 28 ~ 84 d,对比 PM 与 QF 中的硫代巴比妥酸含量发现差异并不显著($P < 0.05$),这可能是由于超氧化物歧化酶延缓了氧化进程(如表 1 和图 1 所示)。

冷冻贮藏 0 ~ 56 d,可能是由于低温条件促进了 PM 和 QF 中多不饱和脂肪酸的氧化,导致 PM 和 QF 中的己醛含量显著增加(如图 1 所示)。但是,冻藏 84 ~ 140 d,PM 和 QF 中的己醛含量显著下降,这可能是己醛与硫代巴比妥酸发生反应,也可能是己醛

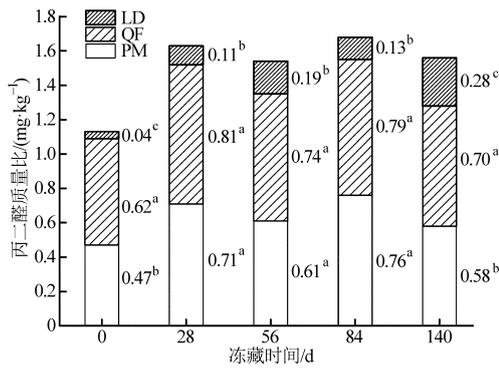


图1 牦牛腰肌、股四头肌、背最长肌冻藏期间脂质氧化产物的含量

Fig. 1 Lipid oxidation products in *Psoas major*, *Quadriceps femoris* and *Longissimus dorsi* from yak during frozen storage

进一步氧化为已酸造成的。此外,PM 和 QF 中的已醛浓度在整个冻藏期间均显著高于 LD ($P < 0.05$), 血红素铁有助于促进脂质氧化以及己醛的生成 ($P < 0.01$), 然而,超氧化物歧化酶对脂质氧化有一定的抑制作用 ($P < 0.01$)。血红素铁和超氧化物歧化酶在 LD 冻藏阶段的脂质氧化进程中发挥着重要作用, 较低的血红素铁含量以及较高的超氧化物歧化酶活力是造成 LD 中硫代巴比妥酸、己醛含量最低的主要原因。

2.4 冻藏期间不同部位牦牛肉蛋白质的氧化规律

冻藏对牦牛肉蛋白质的氧化稳定性具有显著影响, 这体现在蛋白质氧化产物 AAS、GGS 含量的增加。在自由基和过渡态金属存在的条件下, 赖氨酸被分解为 AAS, 精氨酸和脯氨酸残基氧化脱氨后生成 GGS^[6]。从图 2 可以看出, QF 冻藏 0~56 d, 赖氨酸、脯氨酸和精氨酸氧化程度逐渐增加, 56~84 d 氧化程度显著下降。此外, PM 中 AAS、GGS 含量在冻藏 0~84 d 呈递增趋势, 并且在第 84 天浓度最高。冻藏 0~28 d, LD 中 GGS 的生成速率明显高于 AAS, AAS、GGS 含量都在第 28 天和第 56 天出现两个浓度高点(图 2)。血红素铁是肉制品蛋白质羰基化反应的有效促进剂^[6], 冻藏 140 d 后, 具有高浓度 AAS 含量的牦牛肉其血红素铁含量也相对较高(表 1、图 2)。尽管如此, 仅通过血红素铁的单一作

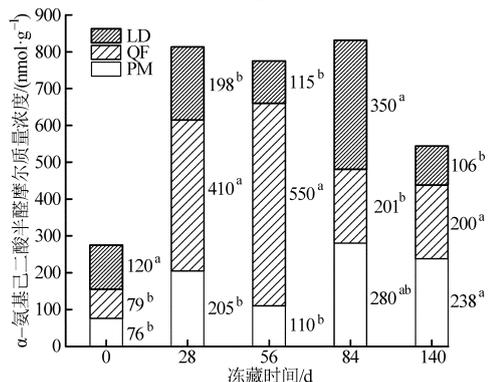
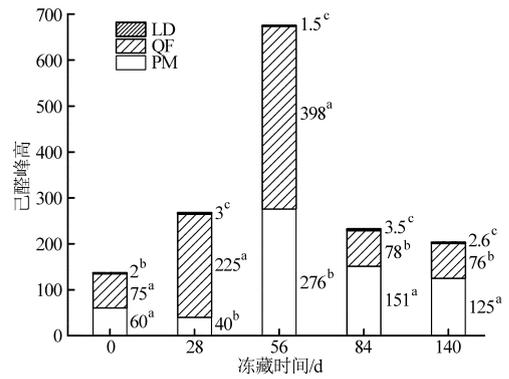


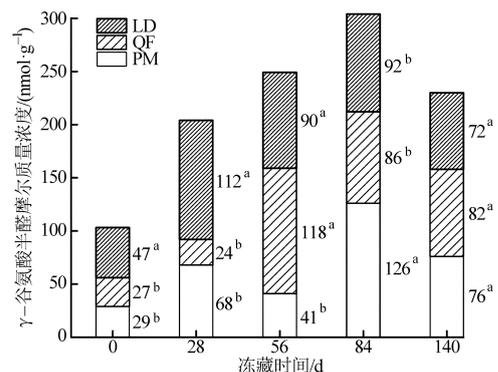
图2 牦牛腰肌、股四头肌、背最长肌冻藏期间蛋白质氧化标记物的含量

Fig. 2 Protein oxidation indexes in *Psoas major*, *Quadriceps femoris* and *Longissimus dorsi* from yak during frozen storage



用还无法解释 PM、QF、LD 蛋白质氧化程度存在差异的根本原因, 抗氧化酶类在调节不同部位牦牛肉的蛋白质氧化过程中同样发挥着重要作用, 尽管 PM 中血红素铁的含量显著高于 QF ($P < 0.05$) (表 1), 但是 PM 氧化产物的生成速率低于 QF, 这可能与 PM 中较高的超氧化物歧化酶、过氧化氢酶活力以及二者对 PM 的保护作用有关。QF 中血红素铁的含量在不同部位牦牛肉中处于中等水平, 而且, QF 的抗氧化酶总活力是三者中最低的, 在这样的条件下, QF 在第 56 天的 AAS 浓度最高, 并且, 蛋白质的羰基化程度与血红素铁含量显著正相关 ($P < 0.05$), 与过氧化氢酶的活力极显著负相关 ($P < 0.01$)。近期研究还发现了包括美拉德反应在内的蛋白质羰基化途径, 这类途径主要发生于肌原纤维蛋白和还原糖共存的条件下^[26]。葡萄糖和核糖发生美拉德反应产生的二羰基化合物(如:乙二醛), 容易诱导氨基酸残基氧化脱氨, 最终生成 AAS 和 GGS, 并且, 只要有一定浓度的还原糖存在, 就可以发生类似反应^[27]。但是本研究并没有发现类似的规律, 不同肌肉组织之间的还原糖浓度与蛋白质羰基化程度之间并没有明显的对应关系。

与冻藏前相比, 冻藏 140 d 后, 由于血红素铁的促氧化作用使得 PM 和 QF 中 AAS、GGS 的含量均显著增加, 虽然 PM 中的血红素铁显著高于 QF, 但冻



藏 140 d 后,PM 和 QF 中 AAS、GGS 的含量并无显著性差异,这主要是由于抗氧化酶的抑制作用引起的(PM 中的超氧化物歧化酶、过氧化氢酶活力均显著高于 QF)。冻藏条件下,血红素铁与超氧化物歧化酶、过氧化氢酶共同调控着不同部位牦牛肉蛋白质氧化进程的发生。

在过氧化物存在的条件下,AAS 容易进一步氧化降解形成 AAA。冻藏 140 d 内,PM 中 AAA 含量逐渐增加(图 3)。QF 中的 AAA 含量在 0~84 d 没有明显变化,但在 84~140 d 显著快速增长(图 3)。冻藏期间(0~140 d),LD 中的 AAA 含量没有明显变化(图 3)。结合图 3 与表 1 可以看出,AAA 的形成与肌肉中血红素铁含量以及抗氧化酶活力有很大关联。有研究报道指出,血红素铁参与超氧化物阴

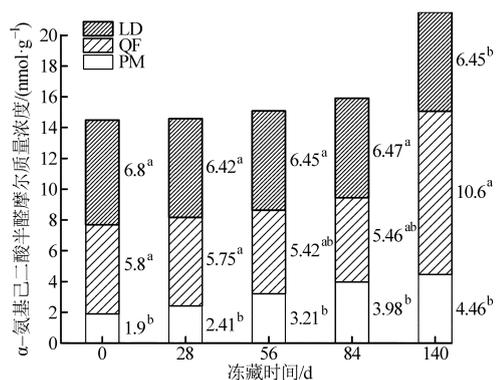


图 3 牦牛腰肌、股四头肌、背最长肌冻藏期间蛋白质氧化标记物的含量

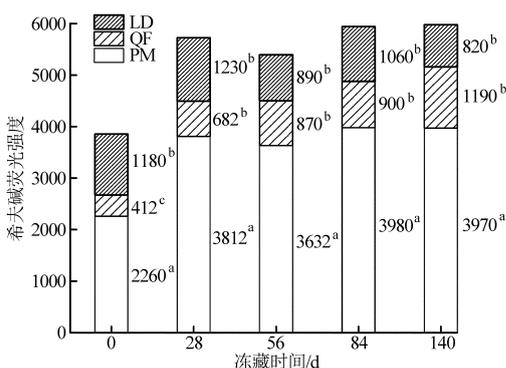
Fig. 3 Protein oxidation indexes in *Psoas major*, *Quadriceps femoris* and *Longissimus dorsi* from yak during frozen storage

蛋白质氧化过程中除形成 AAA 之外,AAS 残基中的羰基部分也会与蛋白质-赖氨酸复合物或与其他 AAS 残基发生反应分别形成希夫碱和羟醛缩合结构^[6]。类似的反应机制也出现在金属离子诱导的肌原纤维蛋白氧化反应当中^[27]。PM 中希夫碱的荧光强度在冷冻贮藏期间逐渐增加,在贮藏前 28 d 增长速率较快,28 d 后增长速率逐渐趋于平缓(图 3)。冻藏期间,QF 中希夫碱荧光强度缓慢增加,然而,LD 冻藏后期(84~140 d),希夫碱荧光强度显著下降(图 3)。以上结果证实,冷冻贮藏显著影响牦牛肉中希夫碱的形成,并且与 QF、LD 相比,PM 中更容易生成希夫碱。QF 在有氧贮藏条件下,可能是其中 AAA 的优先形成限制了希夫碱的生成,另一方面,冻藏期间,LD 中希夫碱荧光强度显著下降,这可能是由于 AAS-赖氨酸或者 AAS-AAS 结构与其他赖氨酸以及 AAS 残基之间发生的连续缩合反应造成的,该反应容易形成非荧光交联结构^[6]。

2.5 不同部位牦牛肉的保水性

从表 2 可以看出,QF 的解冻汁液流失率高达 1.81%,分别为 PM 和 LD 的 2.29 倍和 3.55 倍,这可能是肌肉组织受到冻结/解冻压力的影响,也可能

离子以及过氧化氢的形成,并且,过氧化氢是 AAA 形成必需的前体物质,由此可以推测血红素铁含量更高的 PM 和 QF 肉中将会产生更多的 AAA;另一方面,清除超氧化物阴离子的超氧化物歧化酶常与清除过氧化氢的过氧化氢酶协同发挥作用。PM 中的 AAA 含量极显著低于 QF,这可能与 PM 中较高的抗氧化酶活力有关。LD 中血红素铁含量最低,超氧化物歧化酶和过氧化氢酶的活性都处于中等水平,由此可以推断 LD 对应的 AAA 含量应该处于一个相对较低的水平,但结果显示 LD 中的 AAA 含量是最高的,AAA 含量与血红素铁的含量高度正相关($P < 0.01$),与过氧化氢酶的活力高度负相关($P < 0.01$)。



是由于蛋白质氧化程度不同造成的。冻藏条件下,牦牛肉氧化状态的改变使蛋白质容易发生羰基化反应、羧化作用以及形成希夫碱,进而影响蛋白质空间结构以及蛋白质与水分子的相互作用,最终影响肌肉的保水性。Estévez 等也发现,这些化学修饰会导致肌原纤维蛋白构象和功能的改变^[6],肌原纤维蛋白和水分子极性基团之间的相互作用会导致水分流失,保水性下降^[7,28]。此外,QF 的蒸煮损失率(48.15%)在 3 个部位牦牛肉中也是最高的。蛋白质的交联作用容易引起蛋白质的构象发生改变,这会破坏蛋白质分子间以及蛋白质与水分子之间原有的平衡,使保水性下降^[28]。从蛋白质和脂质氧化标记物含量的分析结果来看,AAS 含量与冻藏后的解冻汁液流失率显著正相关($P < 0.01$)。其他研究人

表 2 牦牛腰肌、股四头肌、背最长肌的保水性

参数	部位		
	腰肌	股四头肌	背最长肌
解冻汁液流失率	0.79 ± 0.15 ^b	1.81 ± 0.18 ^a	0.51 ± 0.11 ^c
蒸煮损失率	36.97 ± 3.11 ^b	48.15 ± 4.12 ^a	33.96 ± 3.21 ^b

员也发现了类似的规律,冷冻贮藏期间发生的蛋白质羰基化反应对熟制火腿^[4-5]、猪肉^[7]的保水性能都会造成一定程度的影响。

3 结论

(1)冻藏期间,血红素铁和超氧化物歧化酶在LD的脂质氧化进程中发挥着重要作用,较低的血红素铁含量以及较高的超氧化物歧化酶是造成LD中硫代巴比妥酸、己醛含量较低的主要原因。

(2)冻藏显著影响PM和QF蛋白质的氧化,血红素铁与超氧化物歧化酶、过氧化氢酶共同调控氧化反应的发生:冻藏140 d后,由于血红素铁的促氧

化作用,PM和QF中的AAS、GGS含量均显著增加,虽然PM中的血红素铁显著高于QF,但PM中相对较高的超氧化物歧化酶与过氧化氢酶共同作用使PM与QF的AAS、GGS含量并无显著性差异;血红素铁含量更高的PM容易使其产生更多的AAA,但PM中相对较高的超氧化物歧化酶与过氧化氢酶协同作用使PM中的AAA含量极显著低于QF($P < 0.05$)。

(3)冻藏引起的蛋白质羰基化反应显著影响牦牛肉的保水性,抗氧化酶活力最低、血红素铁含量相对较高的QF保水性最差,其解冻汁液流失率是LD的3.55倍。

参 考 文 献

- Lund M N, Heinonen M, Baron C P, et al. Protein oxidation in muscle foods: a review [J]. *Molecular Nutrition and Food Research*, 2011, 55(1): 83–95.
- 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.
- Requena J, Levine R, Stadtman E. Recent advances in the analysis of oxidized proteins [J]. *Amino Acids*, 2003, 25(3): 221–226.
- Utrera M, Armenteros M, Ventanas S, et al. Pre-freezing raw hams affects quality traits in cooked hams: potential influence of protein oxidation [J]. *Meat Science*, 2012, 92(4): 596–603.
- Utrera M, Rodríguez-Carpena J G, Morcuende D, et al. Formation of lysine-derived oxidation products and loss of tryptophan during processing of porcine patties with added avocado byproducts [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(15): 3917–3926.
- Estévez M. Protein carbonyls in meat systems; a review [J]. *Meat Science*, 2011, 89(3): 259–279.
- Estévez M, Kylli P, Puolanne E, et al. Fluorescence spectroscopy as a novel approach for the assessment of myofibrillar protein oxidation in oil-in-water emulsions [J]. *Meat Science*, 2008, 80(4): 1290–1296.
- Hornsey H. The colour of cooked cured pork. I.—estimation of the nitric oxide-haem pigments [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1956, 7(8): 534–540.
- Freitas S T, Pereira E I P, Gomez A C S, et al. Processing quality of potato tubers produced during autumn and spring and stored at different temperatures [J]. *Horticultura Brasileira*, 2012, 30(1): 91–98.
- Hernández P, Zomeno L, Ariño B, et al. Antioxidant, lipolytic and proteolytic enzyme activities in pork meat from different genotypes [J]. *Meat Science*, 2004, 66(3): 525–529.
- Mercier Y, Gatellier P, Renerre M. Lipid and protein oxidation in vitro, and antioxidant potential in meat from Charolais cows finished on pasture or mixed diet [J]. *Meat Science*, 2004, 66(2): 467–473.
- Cribb A E, Leeder J S, Spielberg S P. Use of a microplate reader in an assay of glutathione reductase using 5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) [J]. *Analytical Biochemistry*, 1989, 183(1): 195–196.
- Ganhão R, Estévez M, Morcuende D. Suitability of the TBA method for assessing lipid oxidation in a meat system with added phenolic-rich materials [J]. *Food Chemistry*, 2011, 126(2): 772–778.
- 迟海, 李学英, 杨宪时, 等. 红酒提取物对南极磷虾贮藏过程中抗氧化效果的影响 [J]. *农业机械学报*, 2013, 44(2): 153–158.
- Chi Hai, Li Xueying, Yang Xianshi, et al. Influences of wine extracted on antioxidant of antarctic krill during storage [J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2013, 44(2): 153–158. (in Chinese)
- Estévez M, Morcuende D, Ventanas S, et al. Analysis of volatiles in meat from Iberian pigs and lean pigs after refrigeration and cooking by using SPME-GC-MS [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51(11): 3429–3435.
- 师希雄, 余群力, 田甲春. 牦牛肉成熟过程中主要挥发性成分的变化 [J]. *农业机械学报*, 2011, 42(11): 144–147.
- Shi Xixiong, Yu Qunli, Tian Jiachun. Changes in main volatile compounds during aging process of yak meat [J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2011, 42(11): 144–147. (in Chinese)
- 葛武鹏, 李元瑞, 陈瑛, 等. 牛羊酸奶挥发性风味物质固相萃取 GC/MS 分析 [J]. *农业机械学报*, 2008, 39(11): 64–75.
- Ge Wupeng, Li Yuanrui, Chen Ying, et al. Analysis of volatile aromatic compounds from cow's and goat's milk yoghurt by SPME-GC/MS [J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2008, 39(11): 64–75. (in Chinese)
- Utrera M, Morcuende D, Rodríguez-Carpena J G, et al. Fluorescent HPLC for the detection of specific protein oxidation

- carbonyls- α -aminoadipic and γ -glutamic semialdehydes-in meat systems[J]. *Meat Science*, 2011, 89(4): 500 – 506.
- 19 田甲春, 韩玲, 刘昕, 等. 牦牛肉宰后成熟机理与肉用品质研究[J]. *农业机械学报*, 2012, 43(12): 146 – 150.
Tian Jiachun, Han Ling, Liu Xin, et al. Ageing mechanism and meat quality during postmortem ageing of yak meat[J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2012, 43(12): 146 – 150. (in Chinese)
- 20 Honikel K O. Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat[J]. *Meat Science*, 1998, 49(4): 447 – 457.
- 21 Promeprat A, Daudin J, Astruc T, et al. Kinetics of protein physicochemical changes induced by heating in meat using mimetic models: (2) effects of fibre type, peroxides and antioxidants[J]. *Food Chemistry*, 2013, 138(4): 2283 – 2290.
- 22 Renner M, Dumont F, Gatellier P. Antioxidant enzyme activities in beef in relation to oxidation of lipid and myoglobin[J]. *Meat Science*, 1996, 43(2): 111 – 121.
- 23 Soyer A, Özalp B, Dalmış 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.
- 24 Zaritzky N. Handbook of frozen food processing and packaging[M]. Boca Raton, FL: CRC Press, 2011: 3 – 38.
- 25 Min B, Ahn D. Mechanism of lipid peroxidation in meat and meat products—a review[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2005, 14(1): 152 – 163.
- 26 Villaverde A, Estévez M. Carbonylation of myofibrillar proteins through the Maillard pathway: effect of reducing sugars and reaction temperature[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(12): 3140 – 3147.
- 27 Utrera M, Estévez M. Oxidation of myofibrillar proteins and impaired functionality: underlying mechanisms of the carbonylation pathway[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(32): 8002 – 8011.
- 28 Traore S, Aubry L, Gatellier P, et al. Higher drip loss is associated with protein oxidation[J]. *Meat Science*, 2012, 90(4): 917 – 924.
- 29 孙志昶, 冯晓琴, 韩玲, 等. 牦牛肉宰后成熟嫩化与细胞凋亡酶活力变化研究[J]. *农业机械学报*, 2014, 45(1): 191 – 196, 202.
Sun Zhichang, Feng Xiaoqin, Han Ling, et al. Tenderness and apoptotic activity of yak meat during postmortem aging [J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2014, 45(1): 191 – 196, 202. (in Chinese)
-

(上接第 217 页)

- 9 卢晓明, 王静波, 任发政, 等. 乳清蛋白在食品工业中的应用[J]. *食品科学*, 2010, 31(1): 262 – 267.
Lu Xiaoming, Wang Jingbo, Ren Fazheng, et al. Application of whey protein in food industry: a review[J]. *Food Science*, 2010, 31(1): 262 – 267. (in Chinese)
- 10 凌雪萍, 庞广昌, 邢伟. 乳铁蛋白的开发利用及其研究进展[J]. *中国乳品工业*, 2002, 30(4): 18 – 21.
Ling Xueping, Pang Guangchang, Xing Wei. Recent development and progress of lactoferrin[J]. *China Dairy Industry*, 2002, 30(4): 18 – 21. (in Chinese)
- 11 Tokle T, McClements D J. Physicochemical properties of lactoferrin stabilized oil-in-water emulsions: effects of pH, salt and heating[J]. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25(5): 976 – 982.
- 12 Liu F, Sun C, Yang W, et al. Structural characterization and functional evaluation of lactoferrin-polyphenol conjugates formed by free-radical graft copolymerization[J]. *RSC Advances*, 2015, 5(20): 15641 – 15651.
- 13 Lei F, Liu F, Yuan F, et al. Impact of chitosan-EGCG conjugates on physicochemical stability of β -carotene emulsion[J]. *Food Hydrocolloids*, 2014, 39: 163 – 170.
- 14 Kitagawa M, Tokiwa Y. Polymerization of vinyl sugar ester using ascorbic acid and hydrogen peroxide as a redox reagent[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2006, 64(2): 218 – 223.
- 15 You J, Luo Y, Wu J. Conjugation of ovotransferrin with catechin shows improved antioxidant activity[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(12): 2581 – 2587.
- 16 Guo D, Mant C T, Taneja A K, et al. Prediction of peptide retention times in reversed-phase high-performance liquid chromatography I. Determination of retention coefficients of amino acid residues of model synthetic peptides [J]. *Journal of Chromatography A*, 1986, 359: 499 – 518.
- 17 Yuan F, Xu D, Qi X, et al. Impact of high hydrostatic pressure on the emulsifying properties of whey protein isolate-chitosan mixtures[J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2013, 6(4): 1024 – 1031.
- 18 Wang X, Liu F, Liu L, et al. Physicochemical characterisation of β -carotene emulsion stabilised by covalent complexes of α -lactalbumin with (–)-epigallocatechin gallate or chlorogenic acid[J]. *Food Chemistry*, 2015, 173: 564 – 568.