

## 未漂洗鱼糜冻藏过程中晚期糖化终末产物形成及机制

李佳艺<sup>1,2</sup>, 苏 婕<sup>1</sup>, 王发祥<sup>1\*</sup>, 李向红<sup>1</sup>, 俞 健<sup>1</sup>, 刘永乐<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>长沙理工大学食品与生物工程学院 湖南省水生资源食品加工工程技术研究中心 长沙 410114

<sup>2</sup>山东华宇工学院 山东德州 253034)

**摘要** 为探讨未漂洗鱼糜冻藏过程中晚期糖化终末产物(AGEs)的形成规律,将鱼糜样品在不同温度(-18℃和-60℃)下冻藏,于第0,15,30,45,60天测定其AGEs含量及脂肪氧化指标(TBA值)、蛋白质氧化指标(羰基含量、活性和总巯基含量、Ca<sup>2+</sup>-ATPase活性),分析其变化规律和相关性。结果表明:鱼糜样品在-18℃冻藏60d,其Nε-羧甲基赖氨酸(CML)和Nε-羧乙基赖氨酸(CEL)含量分别较第0天增加了71.67%和88.24%,而在-60℃冻藏60d仅增加了59.62%和62.11%,表明超低温(-60℃)冻藏有利于抑制AGEs形成;加热后,鱼糜样品AGEs(CML和CEL)含量增加了约1.05~1.23倍。冻藏过程中样品的TBA值呈先增后降趋势;蛋白质羰基和活性巯基含量逐渐上升,总巯基含量和Ca<sup>2+</sup>-ATPase活性逐渐降低,且与AGEs含量显著相关( $P<0.05$ )。相对于-18℃冻藏组,-60℃冻藏抑制上述脂质和蛋白质氧化指标的变化,与抑制AGEs形成的趋势一致。说明冻藏温度和时间均对未漂洗鱼糜AGEs的形成有重要影响,而冻藏过程中脂肪和蛋白质氧化是AGEs形成的重要原因。

**关键词** 未漂洗鱼糜;冻藏;晚期糖化终末产物;蛋白质;氧化

**文章编号** 1009-7848(2023)09-0233-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.09.024

鱼糜是一种基于鱼肉凝胶的精加工鱼类产品,由于营养好、味道鲜美、成本低和易于生产、储存和运输等特点,因此在世界各地深受欢迎<sup>[1]</sup>。漂洗是传统鱼糜加工技术的重要工序,通过漂洗纯化和浓缩鱼肌纤维蛋白,使其具有良好的凝胶形成能力<sup>[2]</sup>。同时漂洗还可去除多余的脂肪、血液和色素,从而提高鱼糜的感官质量,并减缓其氧化劣变<sup>[3]</sup>。然而,漂洗过程不仅带来额外的水消耗和废物处理问题,还导致营养和风味物质的巨大损失<sup>[4]</sup>。此外,漂洗过程中丢失的水溶性蛋白质对延缓鱼糜冷冻收缩和蛋白质交联具有重要作用<sup>[5]</sup>。为解决这些问题,研究未漂洗鱼糜成为一个替代方案,然而其加工技术目前在基础理论研究和实际应用中仍存在诸多问题,如凝胶形成能力较差,贮藏过程中易氧化劣变、潜在危害物形成等<sup>[6]</sup>,有待进一步研究解决。

近年来,随着淡水鱼养殖产量的增加以及海洋渔业资源的不断减少,淡水鱼逐渐成为鱼糜加

工的主要原料之一。鲢鱼价格低廉,每年养殖产量约400万t,是最典型的大宗低值淡水鱼,加工成鱼糜是其最有竞争力的利用途径<sup>[7]</sup>。利用鲢鱼为原料加工未漂洗鱼糜已有一些研究报道,主要集中在其制作工艺<sup>[8]</sup>、凝胶增强技术<sup>[9]</sup>、抗冻和抗氧化<sup>[10]</sup>等方面,而关于其加工和冻藏过程中潜在危害物的形成规律的研究比较缺乏。

晚期糖化终末产物(advanced glycation end-products, AGEs)是一组广泛存在于肉类食品的潜在危害物质,长期摄入会对人体产生伤害,增加多种慢性疾病的发生率<sup>[11]</sup>。食品中AGEs形成的途径和影响因素复杂,主要在美拉德反应的初期和末期通过多种途径产生,也与食品中蛋白质、脂肪等组分的氧化反应有关<sup>[12]</sup>。AGEs种类繁多,其中Nε-羧甲基赖氨酸(Nε-carboxymethyllysine, CML)、Nε-羧乙基赖氨酸(Nε-carboxyethyllysine, CEL)被认为是最典型的两种AGEs。未漂洗鲢鱼鱼糜中含有丰富的蛋白质和不饱和脂肪酸,其在斩拌、加热和冻藏过程中易发生氧化等化学反应<sup>[13]</sup>,十分有利于AGEs的形成。然而,尽管存在高AGEs含量的潜在安全隐患,目前关于未漂洗鱼糜产品AGEs的基础研究还十分薄弱,尤其是有关冻藏温度和冻藏过程对AGEs形成的影响研究接

收稿日期: 2022-09-23

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31972106);湖南省重点研发计划项目(2022NK2038)

第一作者: 李佳艺,女,硕士

通信作者: 王发祥 E-mail: wfx@csust.edu.cn

近空白。本研究探讨不同温度(-18,-60℃)下未漂洗鲢鱼鱼糜冻藏过程中 AGEs 含量与其蛋白质、脂肪氧化的关系,揭示 AGEs 的形成机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

新鲜鲢鱼:购于长沙本地菜市场,每尾重(2.0±0.2)kg。

d<sub>4</sub>-CML 和 d<sub>4</sub>-CEL 标样(纯度>98%),购自加拿大 TRC 公司;氯化钠、三氯乙酸、EDTA、2,4-二硝基苯胍(DNPH)、5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)、2-硫代巴比妥酸(TBA)、盐酸胍均为国产分析纯。

### 1.2 仪器与设备

ZB-20 型斩拌机,山东省诸城市华钢机械有限公司;TU-1901 紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;T10-BASIC 手持式均质机,德国 IKA 仪器有限公司;Altus A-30 UPLC 色谱仪和 Qtrap 4500 三重四级杆质谱仪,德国 PerkinElmer 公司。

### 1.3 试验方法

1.3.1 未漂洗生鱼糜样品制备 参考暴伊芮等<sup>[14]</sup>的方法,将新鲜鲢鱼宰杀后采背部肌肉,放入斩拌机中于 0~4℃条件下预斩 1 min,按每 100 g 鱼肉加入 2.5 g 食盐继续斩拌 5 min,即为生鱼糜。将生鱼糜分装于若干带盖塑料盒中,每盒 25 g,分别置于-18℃和-60℃冰箱冻藏,在第 0,15,30,45,60 d 取出,于 4℃解冻 12 h 进行后续试验。

1.3.2 未漂洗熟鱼糜样品制备 生鱼糜样品解冻后,称取 12.5 g 置于特制铝盒中,加盖密封后于 90℃水浴加热 30 min,立即取出后冰水冷却 15 min,即为熟鱼糜样品。

1.3.3 AGEs 含量测定 生/熟鱼糜样品中的两种 AGEs(CML 和 CEL)参照 Niu 等<sup>[15]</sup>的方法提取和 HPLC-MS/MS 分析。不同冻藏周期的鱼糜样品真空干燥成粉末,取一定量用 0.2 mol/L 的硼酸缓冲液(pH 9.2)和 2 mol/L 的硼氢化钠还原 8 h,然后与甲醇-氯仿(体积比 2:1)混合,离心脱脂沉淀蛋白质。在沉淀中加入 6 mol/L HCl,110℃水解 24 h,水解液稀释后加入内标(d<sub>4</sub>-CML 和 d<sub>4</sub>-CEL),真空干燥后以超纯水重悬浮,SPE 固相萃取纯化,

洗脱液在 60℃下氮吹干燥,并溶解在 80%甲醇水溶液中;最后经 0.22 μm 膜过滤后进行 HPLC-MS/MS 分析<sup>[15]</sup>,最终含量换算为每 kg 鱼糜湿重中 CML 和 CEL 的含量。

1.3.4 鱼糜蛋白质样品制备 参照 Shen 等<sup>[16]</sup>的方法,称取 2 g 解冻后生鱼糜样品,加入 40 mL 磷酸缓冲液(pH 为 7.0,含 0.5 mol/L NaCl-15.6 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>),充分匀浆后于 4℃静置提取 1 h,4℃、6 000 r/min 离心 10 min,上清液即为鱼糜蛋白质提取液,以福林酚试剂法测定其蛋白含量。

1.3.5 蛋白质羰基含量测定 羰基含量参照 Pan 等<sup>[17]</sup>的方法以 DNPH 法测定。

1.3.6 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性测定 参照 Benjakul 等<sup>[18]</sup>的方法,取 2 mL 的鱼糜蛋白样品与 0.5 mL Tris-HCl 缓冲液(0.5 mol/L,pH 7.0),8 mL CaCl<sub>2</sub> 溶液(10 mmol/L)和 0.5 mL ATP(20 mmol/L,pH 7.0)反应 8 min;立即加入 5 mL 15%三氯乙酸(TCA,4℃)终止反应,混合物以 6 000 r/min 离心 5 min,通过钼酸铵比色法测量上清液中的无机磷含量。

1.3.7 总巯基和活性巯基的测定 采用 Ellman's 试剂法,参照 Olver 等<sup>[19]</sup>的方法稍作修改。0.5 mL 鱼糜蛋白样品与 2.5 mL Tris-Gly 缓冲液(0.086 mol/L Tris,0.09 mol/L 甘氨酸,8 mol/L 尿素,4 mmol/L EDTA,pH 8.0)和 0.02 mL DTNB 混合,25℃下保温 1 h 后,在 412 nm 处测定溶液吸光度,使用 13 600 L/mol/cm 的消光系数计算总巯基含量;测定活性巯基时 Tris-Gly 缓冲液除不含 8 mol/L 尿素外,其余操作与总巯基测定相同。

1.3.8 硫代巴比妥酸(TBA 值)的测定 生/熟鱼糜样品中的脂肪氧化情况以 TBA 监测,TBA 值参照 Witte 等<sup>[20]</sup>的方法测定,以每克鱼糜样品中丙二醛(MDA)的毫克数表示。

### 1.4 数据处理

所有试验均重复 3 次,试验结果以平均值±标准差来表示,使用 SPSS 23 软件进行方差分析和 Pearson 相关性分析,均值在 α=0.05 水平进行显著性检验。

## 2 结果分析

### 2.1 冻藏过程对鱼糜 AGEs 形成的影响

CML 和 CEL 是食品中最典型的两种 AGEs,

鱼糜中在不同温度下冻藏及热处理后 CML 和 CEL 的含量变化如图 1 所示。可见,无论是在常规温度(-18 ℃)还是超低温(-60 ℃)冻藏,两种 AGEs 的含量均随着冻藏时间的延长而显著增加( $P<0.05$ ),说明冻藏过程对鱼糜中 AGEs 的形成有较大影响。研究表明,食品中 AGEs 主要是在美拉德反应过程中形成的,而脂肪氧化、蛋白质氧化等反应也会产生 AGEs 的前体物,如具有很强活性的乙二醛和丙酮醛<sup>[20]</sup>,这些  $\alpha$ -二羰基前体物与游离氨基酸或蛋白质以共价键形式结合,形成游离态或结合态 AGEs(如 CML、CEL 等)<sup>[21]</sup>。在相同冻藏周期,-18 ℃冻藏组样品中的 CML 和 CEL 含量均明显高于-60 ℃冻藏组,如生鱼糜在-18 ℃冻藏 60 d 后,CML 和 CEL 的含量分别由 12.53 mg/kg

和 5.78 mg/kg 增加至 21.51 mg/kg 和 10.88 mg/kg,显著高于-60 ℃冻藏组的 20.0 mg/kg 和 9.37 mg/kg。这可能是因为在-18 ℃冻藏过程中发生了更多的蛋白质变性和脂质氧化,从而促进了 AGEs 形成,在其它食品的研究中也有类似的结果<sup>[22]</sup>。

此外,熟鱼糜样品中 CML 和 CEL 含量随冻藏时间的变化趋势与生鱼糜样品一致,但其含量分别达到 14.83~24.31 mg/kg 和 6.52~12.99 mg/kg,较其相应的生鱼糜样品增加了约 1.05~1.23 倍,表明热处理促进了鱼糜中 AGEs 的生成。这与 Niu 等<sup>[15]</sup>的研究结果相似。在高温条件下,鱼糜中的美拉德反应、蛋白质和脂质氧化反应加速,促进了活性前体物质的生成,从而增加了 AGEs 的含量<sup>[23-24]</sup>。

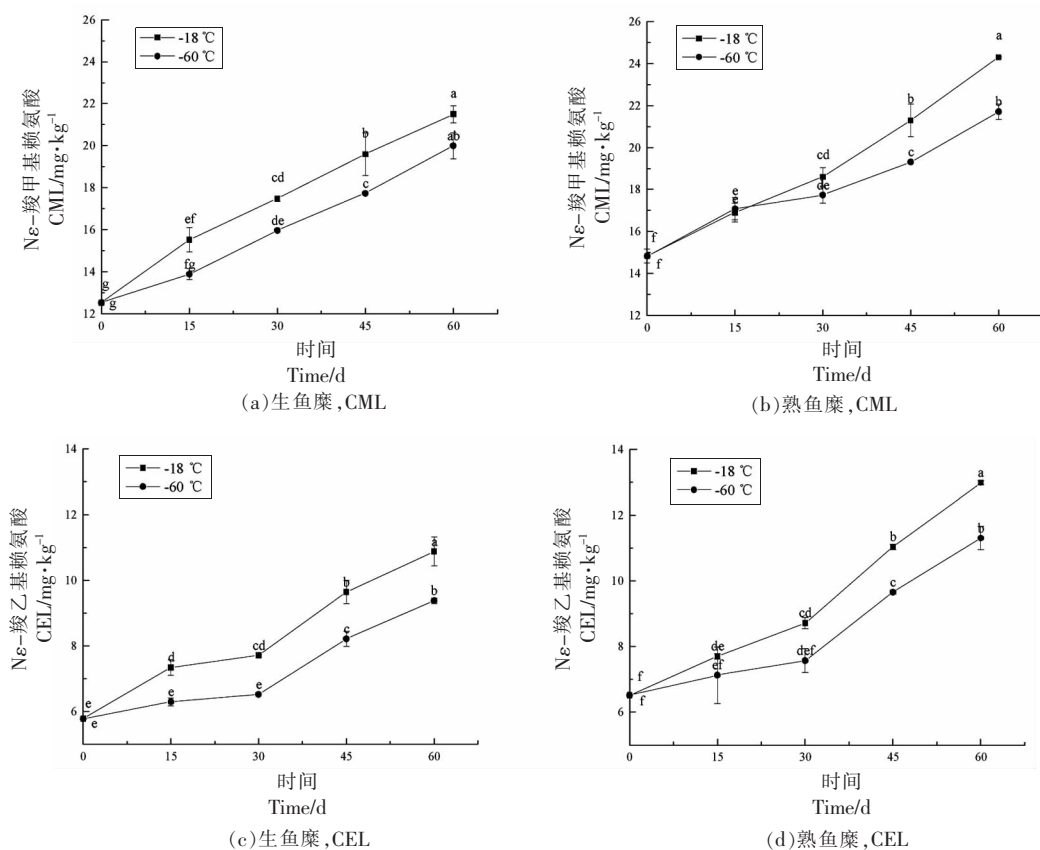


图 1 不同冻藏温度下冻藏过程中未漂洗鱼糜中 CML 和 CEL 的变化

Fig.1 Changes in the content of CML and CEL of unwashed surimi during frozen storage at different freezing temperatures

## 2.2 冻藏过程对鱼糜脂肪氧化影响

未漂洗鱼糜中含有较高含量的不饱和脂肪

酸,在加热和贮藏过程中易发生氧化反应。TBA 值反映了脂质氧化过氧化物降解产物丙二醛(MDA)

的水平,是表征食品脂肪氧化程度的常用指标<sup>[25]</sup>,未漂洗鱼糜样品在冻藏过程中TBA值的变化如图2所示。随着冻藏时间的延长,生鱼糜样品的TBA值均呈现先增加后降低的趋势,这与蔡秋杏等<sup>[26]</sup>研究厦门白姑鱼腌制加工过程中TBA值的变化趋势类似。冻藏前期TBA值上升主要是因为鱼糜冻藏过程中脂肪氧化程度不断加剧导致产生了更多的氢过氧化物降解产物(如MDA);-18℃冻藏组样品的TBA值显著高于-60℃冻藏组,说明超低温冻藏可以有效抑制脂质氧化,与武华等<sup>[27]</sup>

的研究结论一致。冻藏后期TBA值下降可能是由于鱼糜中脂肪氧化速率接近峰值但其次级氧化产物醛、酮类物质进一步降解成了挥发性物质<sup>[28]</sup>,也可能是醛类与鱼糜中其它成分(如蛋白质)结合导致其与TBA反应的量减少<sup>[29]</sup>。熟鱼糜样品的TBA值变化趋势与生鱼糜一致,但全部-60℃冻藏组以及-18℃冻藏组30d前样品的TBA值明显高于其对应的生鱼糜样品,说明热处理促进了鱼糜中的脂肪氧化反应,这与李晓燕等<sup>[30]</sup>的研究结果相符。

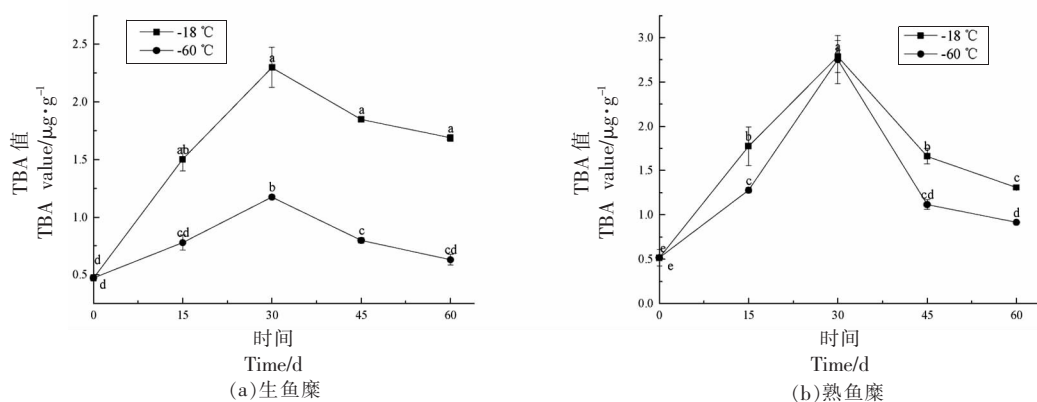


图2 不同冻藏温度下冻藏过程中未漂洗鱼糜中TBA值的变化

Fig.2 Changes in the TBA value of unwashed surimi during frozen storage at different freezing temperatures

### 2.3 冻藏过程中鱼糜蛋白质羰基含量的变化

蛋白羰基含量是蛋白质氧化损伤的敏感指标,羰基的形成是蛋白质分子被机体产生的氧自由基修饰的重要产物,是判断蛋白质氧化程度的重要指标之一<sup>[31]</sup>。生鱼糜冻藏过程中蛋白质羰基含量的变化如图3所示。可见,无论在-18℃还是-60℃条件下冻藏,鱼糜蛋白质羰基含量均随冻藏时间增加而显著上升( $P<0.05$ ),表明冻藏过程中鱼糜蛋白质持续发生了不同程度的氧化。在相同的冻藏周期,-18℃冻藏组样品的羰基含量均高于-60℃组,表明冻藏温度也对鱼糜蛋白质氧化有重要影响,超低温冻藏能一定程度上抑制蛋白质氧化,这可能是由于传统冻藏温度(-18℃)诱导了更多的蛋白质变性或去折叠<sup>[32]</sup>,与-60℃相比更有利于形成席夫碱等反应,从而使胺与羰基之间的反应速度更快<sup>[33]</sup>。

### 2.4 冻藏过程中鱼糜蛋白质Ca<sup>2+</sup>-ATPase活性的变化

Ca<sup>2+</sup>-ATPase活性通常可作为蛋白质分子完

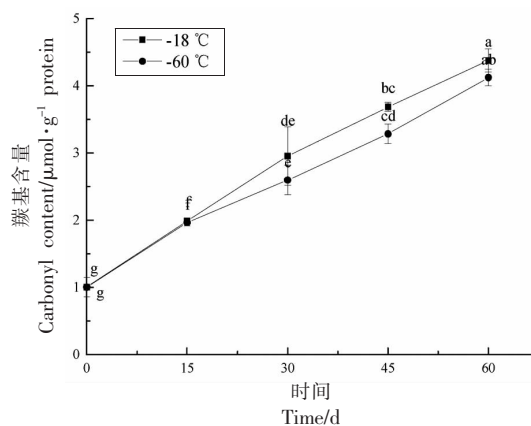


图3 不同冻藏温度下冻藏过程中未漂洗鱼糜蛋白质羰基含量的变化

Fig.3 Changes in the protein carbonyl content of unwashed surimi during frozen storage at different freezing temperatures

整性的指标,其活性下降被视为是肌球蛋白头部巯基氧化和蛋白交联引起的蛋白质变性<sup>[7]</sup>。由图4可知,两种冻藏温度下的鱼糜蛋白质Ca<sup>2+</sup>-ATPase

活性均随冻藏时间的延长呈下降趋势,表明冻藏过程中蛋白质变性程度不断增加;鱼糜在 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻藏条件下 15 d,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性为  $0.040\text{ }\mu\text{mol Pi/mg/min}$ , 较第 0 天样品 ( $0.129\text{ }\mu\text{mol Pi/mg/min}$ ) 显著下降了 69.0%, 而 $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 组样品仍为  $0.125\text{ }\mu\text{mol Pi/mg/min}$ , 变化不显著;冻藏 60 d 后, $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻藏组样品的  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性降低了 84.9%至  $0.019\text{ }\mu\text{mol Pi/mg/min}$ , 而 $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 组 ( $0.093\text{ }\mu\text{mol Pi/mg/min}$ ) 仅降低了 27.9%。说明 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻藏条件下鱼糜蛋白质发生了较多的变性或去折叠<sup>[34]</sup>, 从而更容易被氧化, 这与其巯基含量检测的结果一致(图 3)。柴智等<sup>[35]</sup>研究也发现鳕鱼在不同冻藏温度下冻藏过程中  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性逐渐降低, 且冻藏温度越高, 下降趋势越明显。

## 2.5 冻藏过程中鱼糜蛋白质巯基含量的变化

肌肉食品中蛋白质氧化的另一个标志是 SH 基团的丢失, 因为它们很容易通过脱氢形成二硫键。由图 5 可知, 随着冻藏时间的延长, 鱼糜蛋白质的总巯基含量呈下降趋势, 而活性巯基含量呈上升趋势。活性巯基含量上升可能是因为冻藏过程中蛋白质变性和去折叠导致原来包埋在分子内部的巯基暴露出来, 而总巯基含量下降则可能是因为活性巯基对氧化反应敏感, 导致形成了分子内或分子间二硫键<sup>[22]</sup>; 有研究表明, 肌红蛋白氧

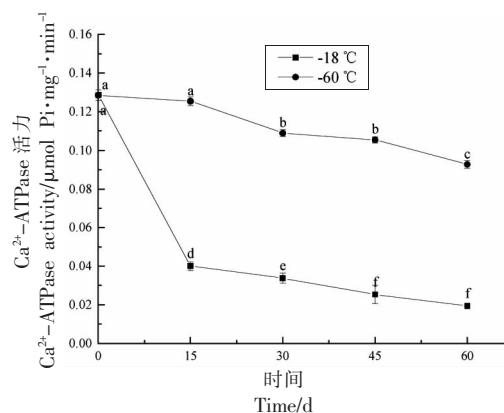


图 4 不同冻藏温度下冻藏过程中未漂洗鱼糜蛋白质  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性的变化

Fig.4 Changes in  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity of unwashed surimi during frozen storage at different freezing temperatures

化、脂肪氧化和冰晶形成对组织的损伤是巯基向二硫键转化的重要原因<sup>[36]</sup>。冻藏 60 d 后, $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻藏组样品的活性巯基和总巯基含量分别较第 0 天时 ( $28.5\text{ }\mu\text{mol/g}$ ) 上升和下降了 21.5% 和 10.0%, 显著低于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻藏组的 38.3% 和 21.9% ( $P<0.05$ ), 说明 $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻藏对鱼糜蛋白质巯基变化影响较小, 可能是因为超低温条件下产生的冰晶较小, 对鱼糜蛋白质的空间结构的破坏较小, 从而减轻了其变性和氧化程度。

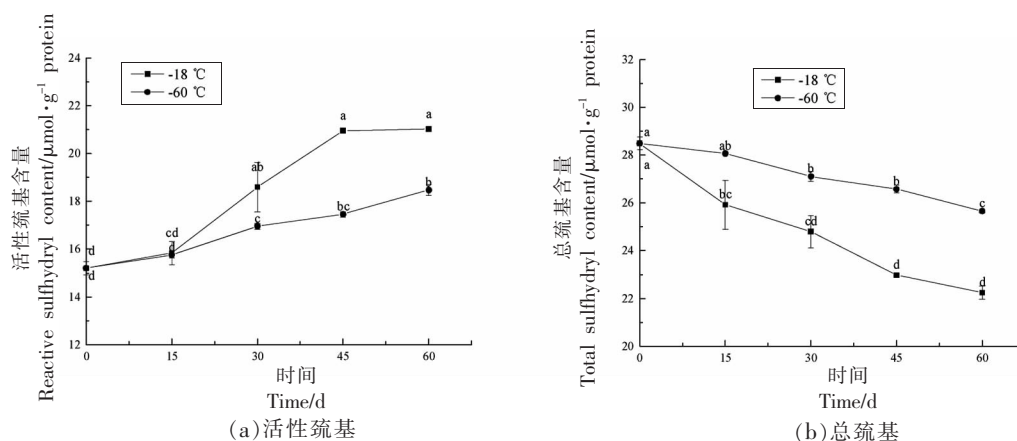


图 5 不同冻藏温度下冻藏过程中鱼糜中 (a) 活性巯基和 (b) 总巯基含量变化

Fig.5 Changes in the content of (a) reactive sulfhydryl and (b) total sulfhydryl groups of unwashed surimi during frozen storage at different freezing temperatures

## 2.6 AGE 形成与脂肪、蛋白质氧化的相关性

研究表明, 食品中的 AGEs 主要通过美拉德

反应途径产生, 也可以在蛋白质、脂肪等组分的氧化反应过程中形成<sup>[12]</sup>。分析冻藏过程中未漂洗鱼

糜中 AGEs(CML 和 CEL)含量与鱼糜蛋白质和脂肪氧化指标之间的相关性,结果见表 1。可见,无论是生鱼糜还是熟鱼糜样品,其两种 AGEs 含量均与冻藏时间呈极显著正相关( $P<0.01$ ),说明冻藏过程是影响未漂洗鱼糜 AGEs 形成的重要因素,这与 Niu 等<sup>[15]</sup>和 Yu 等<sup>[33]</sup>的结论一致。羰基、活性巯基、总巯基含量和  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活力均是能表征生鱼糜蛋白质氧化的指标,其中羰基含量和活性巯基含量在冻藏过程中升高(图 3、图 5a),与鱼糜 AGEs 含量呈极显著正相关( $P<0.01$ ),而总巯基含量和  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活力在冻藏过程中下降(图 5b、图 4),与鱼糜 AGEs 含量呈极显著负相关( $P<0.01$ ),表明蛋白质氧化导致的蛋白结构损伤、部分基因暴露和氧化产物增加是未漂洗鱼糜冻藏过程中 AGEs 形成的主要原因。TBA 值是表征鱼糜脂质氧化的指标,冻藏过程中生熟鱼糜的 TBA 值

均呈先增加后降低趋势(图 2),生鱼糜的 TBA 值与其 CML 和 CEL 含量呈极显著正相关( $P<0.01$ ),而与熟鱼糜的 CML 和 CEL 含量也呈显著正相关( $r=0.408\sim 0.526, P<0.05$ ),表明脂质氧化也是促进鱼糜 AGEs 形成的重要因素。Yu 等<sup>[33]</sup>的研究结果表明脂质氧化促进了 CML 和 CEL 的生成,这与本研究的结果一致。然而,熟鱼糜的 TBA 值与所有样品的 CML 和 CEL 含量均无显著性相关性( $P>0.05$ ),可能与热处理促进了脂肪氧化产物进一步降解或转化有关<sup>[28]</sup>,而脂肪氧化进一步影响蛋白质氧化,从而间接影响 AGEs 的生成。总之,未漂洗鱼糜冻藏过程中 AGEs 形成与其脂肪和蛋白质密切相关,由于蛋白质的冷冻变性和结构损伤,导致氨基酸残基的暴露<sup>[33]</sup>,加之脂质氧化形成的醛酮类产物,不可避免地会诱发蛋白质氧化,从而促进了 AGEs 的形成。

表 1 未漂洗鲢鱼鱼糜 AGEs 含量与脂肪和蛋白质氧化指标间的相关性

Table 1 Correlation analysis of AGEs and oxidation indexes of fat and protein in unwashed silver carp surimi

	冻藏时间	生鱼糜 TBA 值	熟鱼糜 TBA 值	羰基含量	游离巯基 含量	总巯基含量	$\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性
生鱼糜 CML	0.953**	0.526**	0.228	0.962**	0.917**	-0.881**	-0.701**
熟鱼糜 CML	0.943**	0.433*	0.144	0.948**	0.905**	-0.841**	-0.632**
生鱼糜 CEL	0.912**	0.480**	0.076	0.921**	0.905**	-0.892**	-0.723**
熟鱼糜 CEL	0.898**	0.408*	-0.018	0.914**	0.881**	-0.853**	-0.651**

注:\*\*表示在  $P<0.01$  水平显著,\*表示在  $P<0.05$  水平显著。

### 3 结论

未漂洗鲢鱼鱼糜在冻藏过程中 AGEs(CML 和 CEL)的含量显著增加,超低温( $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ )冻藏有利于抑制 AGEs 形成,而加热促进了 AGEs 形成。冻藏过程中鱼糜样品的蛋白质羰基和活性巯基含量逐渐上升,且与 AGEs 含量显著正相关;蛋白质总巯基含量和  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性逐渐降低,且与 AGEs 含量显著负相关,说明蛋白质的变性和氧化是鱼糜冻藏过程 AGEs 形成的主要原因。此外,超低温冻藏有利于抑制脂质和蛋白质的氧化,从而抑制了 AGEs 形成。

### 参 考 文 献

[1] 张婷,李茜雅,唐欢,等. 鱼糜及鱼糜制品加工工艺研究进展[J]. 中国调味品, 2018, 43(3):

185-191.

ZHANG T, LI Q Y, TANG H, et al. Recent investigations on processing of surimi and surimi products[J]. China Condiment, 2018, 43(3): 185-191.

[2] 乔翠平,仪淑敏,余永名,等. 漂洗过程中锌离子对鲢鱼鱼糜凝胶特性的影响[J]. 食品科学, 2017, 38(19): 12-17.

QIAO C P, YI S M, YU Y M, et al. Effect of zinc ions in rinsing solution on gel properties of silver carp surimi[J]. Food Science, 2017, 38(19): 12-17.

[3] 王玉凤,李八方,张朝辉. 漂洗对鲢鱼鱼糜凝胶和质构特性的影响[J]. 食品科学, 2013, 34(14): 122-125.

WANG Y F, LI B F, ZHANG Z H. Effect of rinsing on gel strength and texture properties of silver carp surimi[J]. Food Science, 2013, 34(14): 122-125.

- [4] 向晨曦, 徐新星, 刘康, 等. 葡萄糖酸内酯酸化处理对未漂洗鲟鱼糜凝胶特性的影响[J]. 食品工业科技, 2021, 42(22): 99-104.  
XIANG C X, XU X X, LIU K, et al. Effect of glucono- $\delta$ -lactone acidification treatment on the gel properties of unrinsed sturgeon surimi[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(22): 99-104.
- [5] 周俊鹏, 章蔚, 刘茹, 等. 白鲢鱼糜漂洗水蛋白质回收工艺研究[J]. 食品工业科技, 2020, 41(12): 56-61.  
ZHOU J P, ZHANG W, LIU R, et al. Study on protein recovery process of silver carp surimi rinsing water[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(12): 56-61.
- [6] NIKOO M, BENJAKUL S, XU X. Antioxidant and cryoprotective effects of Amur sturgeon skin gelatin hydrolysate in unwashed fish mince[J]. Food Chemistry, 2015, 181: 295-303.
- [7] 仪淑敏, 叶贝贝, 张诗雯, 等. 菊粉对冻藏鲢鱼鱼糜肌原纤维蛋白抗冻性的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(12): 16-21.  
YI S M, YE B B, ZHANG S W, et al. Cryoprotective effect of inulin on myofibrillar protein from silver carp surimi during frozen storage[J]. Food Science, 2019, 40(12): 16-21.
- [8] 刘茹, 钱曼, 雷跃磊, 等. 漂洗方式对鲢鱼鱼糜凝胶劣化性能的影响[J]. 食品科学, 2010, 31(21): 89-93.  
LIU R, QIAN M, LEI Y L, et al. Effect of rinsing mode on modori of silver carp surimi[J]. Food Science, 2010, 31(21): 89-93.
- [9] 孔保华, 耿欣, 高兴华, 等. 不同漂洗方法对鲢鱼糜凝胶特性的影响[J]. 食品工业, 2000, 21(1): 41-43.  
KONG B H, GENG X, GAO X H, et al. Effects of different rinsing methods on gel properties of silver carp surimi[J]. The Food Industry, 2000, 21(1): 41-43.
- [10] 袁凯, 张龙, 谷东陈, 等. 基于漂洗工艺探究白鲢鱼糜加工过程中蛋白质氧化规律[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(12): 30-36.  
YUAN K, ZHANG L, GU D C, et al. Protein oxidation in minced Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) during washing process[J]. Food and Fermentation Industries, 2017, 43(12): 30-36.
- [11] RIGALLEAU V, COUGNARD-GREGOIRE A, NOV S, et al. Association of advanced glycation end products and chronic kidney disease with macroangiopathy in type 2 diabetes[J]. Journal of Diabetes & Its Complications, 2015, 29(2): 270-274.
- [12] MIRANDA L T, RAKOVSKI C, WERE L M. Effect of Maillard reaction products on oxidation products in ground chicken breast[J]. Meat Science, 2012, 90(2): 352-360.
- [13] 余璐涵, 陈旭, 吴金鸿, 等. 不同低温冻融循环对鱼糜品质与加工特性的影响[J]. 食品工业科技, 2022, 43(7): 1-9.  
YU L H, CHEN X, WU J H, et al. Effects of freezing and thawing cycles on quality and processing characteristics of surimi[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(7): 1-9.
- [14] 暴伊芮, 吴燕燕, 赵前程, 等. 钙离子添加量对未漂洗海鲈鱼糜凝胶特性的影响[J]. 渔业现代化, 2021, 48(4): 106-112.  
BAO Y R, WU Y Y, ZHAO Q C, et al. Effect of calcium ion adding on the gel properties of unrinsed minced meat of *Lateolabrax japonicus* [J]. Fishery Modernization, 2021, 48(4): 106-112.
- [15] NIU L H, SUN X H, TANG J M, et al. Free and protein-bound N  $\epsilon$ -carboxymethyllysine and N  $\epsilon$ -carboxyethyllysine in fish muscle: Biological variation and effects of heat treatment[J]. Journal of Food Composition & Analysis, 2017, 57: 56-63.
- [16] SHEN X L, LI T, LI X H, et al. Dual cryoprotective and antioxidant effects of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) protein hydrolysates on unwashed surimi stored at conventional and ultra-low frozen temperatures[J]. LWT- Food Science and Technology, 2022, 153: 112563.
- [17] PAN J F, LIAN H L, JIA H, et al. Dose affected the role of gallic acid on mediating gelling properties of oxidatively stressed Japanese seerfish myofibrillar protein[J]. LWT- Food Science and Technology, 2020, 118: 108849.
- [18] BENJAKUL S, SUTTHIPAN N. Muscle changes in hard and soft shell crabs during frozen storage[J]. LWT- Food Science and Technology, 2009, 42(3): 723-729.
- [19] OLIVER C N, AHN B W, MOERMAN E J, et al. Age-related changes in oxidized proteins[J]. Journal of Biological Chemistry, 1987, 262(12): 5488-5491.

- [20] WITTE V C, KRAUSE G F, BAILEY M E. A new extraction method for determining 2 - thiobarbituric acid values of pork and beef during storage[J]. *Journal of Food Science*, 2010, 35(5): 582-585.
- [21] 刘芹邑, 张琪, 安婧, 等. 添加糖与酱油对油炸鲟鱼晚期糖化终末产物形成的影响研究[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(22): 30-36.  
LIU Q Y, ZHANG Q, AN J, et al. Effect of soft white sugar and soy sauce addition on the formation of advanced glycation end products in fried sturgeon patties[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(22): 30-36.
- [22] 岳开华, 张业辉, 刘学铭, 等. 冻藏温度对海鲈鱼鱼糜蛋白生化指标及其凝胶特性的影响[J]. *现代食品科技*, 2016, 32(6): 225-232.  
YUE K H, ZHANG Y H, LIU X M, et al. Effect of storage temperature on biochemical indicators and gel properties of sea bass surimi[J]. *Modern Food Science & Technology*, 2016, 32(6): 225-232.
- [23] BHASKAR M, RENE L, INES G, et al. Advanced glycation end products, protein crosslinks and post translational modifications in pork subjected to different heat treatments[J]. *Meat Science*, 2018, 145: 415-424.
- [24] SUN X H, TANG J M, WANG J, et al. Formation of advanced glycation endproducts in ground beef under pasteurisation conditions[J]. *Food Chemistry*, 2015, 172: 802-807.
- [25] 王钰, 倪继龙, 李敏杰, 等. 鲈鱼低温冻藏过程中脂肪氧化特性[J]. *肉类研究*, 2021, 35(6): 63-68.  
WANG Y, NI J L, LI M J, et al. Oxidation characteristics of lipids in mackerel during cryopreservation[J]. *Meat Research*, 2021, 35(6): 63-68.
- [26] 蔡秋杏, 吴燕燕, 李来好, 等. 厦门白姑鱼腌制加工过程中的脂肪酸变化分析[J]. *食品科学*, 2015, 36(12): 76-81.  
CAI Q X, WU Y Y, LI L H, et al. Changes in fatty acids during salting and drying of white croaker (*Argyrosomus amoyensis*)[J]. *Food Science*, 2015, 36(12): 76-81.
- [27] 武华, 洪惠, 罗永康, 等. 冻藏温度对鳙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.  
WU H, HONG H, LUO Y K, et al. Effect of frozen storage temperatures on lipids changes of big-head carp fillets[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2014, 19(6): 173-178.
- [28] 李梦琪, 孙思远, 刘敏, 等. 加热温度和时间对真空低温烹饪鸡胸肉脂肪与蛋白质氧化的影响[J]. *肉类研究*, 2018, 32(10): 6-11.  
LI M Q, SUN S Y, LIU M, et al. Effect of different temperature-time combinations on lipid and protein oxidation of sous-vide cooked chicken breast[J]. *Meat Research*, 2018, 32(10): 6-11.
- [29] 何晓娜, 杨晓玲, 王宏博, 等. 羊肉冷藏期间蛋白与脂质氧化及风味变化分析[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(19): 36-42.  
HE X N, YANG X L, WANG H B, et al. Analysis of change of protein and lipid oxidation and flavor in mutton during refrigeration storage[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(19): 36-42.
- [30] 李晓燕, 郝淑贤, 李来好, 等. 热熏鲟鱼加工过程中的品质变化[J]. *食品工业科技*, 2015, 36(19): 73-77.  
LI X Y, HAO S X, LI L H, et al. Study on quality changes during processing of hot smoked sturgeon[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2015, 36(19): 73-77.
- [31] 方海砚, 苑歆, 刘友明, 等. 羟自由基氧化对鲢鱼肌原纤维蛋白结构的影响[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(4): 6-12.  
FANG H Y, YUAN X, LIU Y M, et al. Effect of hydroxyl radical oxidation on the structure of silver carp myofibrillar protein[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(4): 6-12.
- [32] WANG B, LI F F, PAN N, et al. Effect of ice structuring protein on the quality of quick-frozen patties subjected to multiple freeze-thaw cycles[J]. *Meat Science*, 2020, 172: 108335.
- [33] YU L G, LI Q, LI Y, et al. Impact of frozen storage duration of raw pork on the formation of advanced glycation end-products in meatballs[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2021, 146: 111481.
- [34] 刘小莉, 彭欢欢, 李莹, 等. 冻藏温度对斑点叉尾鲟鱼片蛋白质特性和感官品质的影响[J]. *中国食品学报*, 2019, 19(1): 141-147.  
LIU X L, PENG H H, LI Y, et al. Effect of storage temperature on protein characteristics and sensory quality of frozen catfish fillets[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2019, 19(1): 141-147.



- [35] 柴智, 黄琼, 冯进, 等. 不同冻藏温度对鳊鱼鱼肉品质变化的影响[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(13): 228-235.
- CHAI Z, HUANG Q, FENG J, et al. Effects of different freezing temperatures on the quality changes of *Siniperca chuatsi*[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2020, 48(13): 228-235.
- [36] 王琳琳, 陈炼红, 李璐倩, 等. 解冻方式对牦牛肉蛋白氧化、功能特性及新鲜度的影响[J]. 农业机械学报, 2021, 52(5): 342-349.
- WANG L L, CHEN L H, LI L Q, et al. Effects of thawing methods on protein oxidation, protein functional properties and freshness of yak meat [J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2021, 52(5): 342-349.

## The Formation of Advanced Glycation End-products of Unwashed Surimi during Frozen Storage and Its Underlying Mechanism

Li Jiayi<sup>1,2</sup>, Su Jie<sup>1</sup>, Wang Faxiang<sup>1\*</sup>, Li Xianghong<sup>1</sup>, Yu Jian<sup>1</sup>, Liu Yongle<sup>1</sup>

*(<sup>1</sup>Hunan Provincial Engineering Technology Research Center of Aquatic Food Resources Processing, School of Food Science and Bioengineering, Changsha University of Science and Technology, Changsha 410114*

*<sup>2</sup>Shandong Huayu University of Technology, Dezhou 253034, Shandong)*

**Abstract** In order to explore the formation and underlying mechanism of advanced glycation end products (AGEs) of unwashed surimi during frozen storage, the contents of advanced glycation end-products (AGEs), lipid oxidation (TBA value) and protein oxidation (the content of protein carbonyl groups, reactive and total sulfhydryl groups) of unwashed silver carps were measured at 0, 15, 30, 45 and 60 days of frozen storage at different temperatures ( $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  /  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), and their varying regularity and correlation were analyzed. The results showed that the levels of N $\epsilon$ -carboxymethyllysine (CML) and N $\epsilon$ -carboxyethyllysine (CEL) for samples stored at  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  increased by 71.67% and 88.24% at the 60th day compared to those for fresh samples (0 day), while those for samples stored at  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$  increased by 59.62% and 62.11%, indicating ultra-low temperature ( $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) was conducive to the inhibition of AGEs formation. Moreover, the levels of AGEs in surimi samples were increased by about 1.05-1.23 times after being heat-treated. During frozen storage, the TBA values of surimi increased firstly and then decreased, and the content of protein carbonyl and active sulfhydryl groups gradually increased, while the content of total sulfhydryl groups and Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity gradually decreased, which was significantly correlated to the change in AGEs content ( $P<0.05$ ). Compared with  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  frozen storage group, frozen storage at  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$  inhibited the changes of above lipid and protein oxidation indexes, which was consistent with its inhibition on AGEs formation. These results revealed that AGEs formation in unwashed surimi samples was affected by frozen storage temperature and time, and lipid and protein oxidation during frozen storage was an important cause to their AGEs formation.

**Keywords** unwashed surimi; frozen storage; AGEs; protein; oxidation