

饲料中添加适宜水平铁对建鲤肉质、鱼糜稳定性及组织蛋白酶 B/L 的影响

李冉, 钟海霞, 李树红*, 杨娟, 胡强, 柯勤勤, 白稚子, 林灵, 李美良
(四川农业大学 食品学院, 四川 雅安 625014)

摘要: 探讨饲料中添加适量铁对建鲤肉质、鱼糜品质及其肌肉中组织蛋白酶 B/L 的影响。以添加适宜水平铁的饲料饲喂 90 d 的建鲤(适宜组,铁实测质量分数 146.1 mg/kg)为研究对象,同时以未添加铁组(缺乏组,铁实测质量分数 53.9 mg/kg)作为对照。采样后测定鱼肉品质指标及肌肉中组织蛋白酶 B/L 活性,并采用免疫组化法进行蛋白表达定量;而后将 2 组鱼肉加工为鱼糜,并测定其稳定性指标。结果表明,与缺乏组相比,适宜组肌原纤维耐折力、断裂指数分别稍有上升及下降,但差异不显著($P>0.05$);剪切力极显著增加 31.80%($P<0.01$),可溶胶原蛋白含量、不溶胶原蛋白含量和总胶原蛋白含量均分别极显著增加 305.45%、180.98%、219.35%($P<0.01$)。适宜组鱼肉 pH 及失水率略呈下降趋势,差异无统计学意义($P>0.05$)。适宜组组织蛋白酶 B/L 活性分别极显著($P<0.01$)及显著($0.01<P<0.05$)低于缺乏组,免疫组化显示两种酶在建鲤肌肉中均有表达,且适宜组表达量均极显著低于缺乏组($P<0.01$)。适宜水平铁能极显著提高鱼糜肌动球蛋白初始 Ca^{2+} -ATPase 活性、总巯基含量($P<0.01$),降低二硫键含量($0.01<P<0.05$)、表面疏水性($P<0.01$)及 TBA 值($P<0.01$)。饲料中添加适宜水平铁下调了建鲤肌肉 CAT B/L 的活性及表达量,改善了建鲤鱼肉的硬度品质,并且提高了加工鱼糜的稳定性。

关键词: 铁;建鲤;组织蛋白酶 B/L;鱼肉品质;鱼糜稳定性

中图分类号:S 986.1 文章编号:1673-1689(2019)04-0127-09 DOI:10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.04.019

Effect of Suitable Dietary Iron Supplement on the Fillet Quality, Surimi Stability and Cathepsin B/L of Jian Carp (*Cyprinus carpio* var Jian)

LI Ran, ZHONG Haixia, LI Shuhong*, YANG Juan, HU Qiang,
KE Qinqin, BAI Zhizi, LIN Ling, LI Meiliang

(College of Food Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: To study the effect of suitable dietary iron supplement on the quality of fillet, surimi and Cathepsin B/L (CAT B/L) of Jian carp (*Cyprinus carpio* var Jian). The fish fed for 90 days with the supplemented diets containing iron of 146.1 mg/kg (suitable group) was collected as experimental

收稿日期: 2016-09-22

基金项目: 四川省科技支撑计划项目(2014NZ0003);四川省教育厅自然科学基金重点项目(10ZA052)。

* 通信作者: 李树红(1975—),女,博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事水产品加工理论与技术的研究。E-mail:lish@sicau.edu.cn

引用本文: 李冉,钟海霞,李树红,等. 饲料中添加适宜水平铁对建鲤肉质、鱼糜稳定性及组织蛋白酶 B/L 的影响[J]. 食品与生物技术学报,2019,38(04):127-135.

group, and those fed without supplemented diets containing iron of 53.9 mg/kg (lacking group) was the control. After sampling, the quality indexes of fillets and the activities of CAT B/L were detected. Then the protein expression level of CAT B/L was quantified by immunohistochemical analysis. Further, the fillet was processed into surimi, and its stability of each group was measured. The results indicated that the MBF and MFI in suitable group increased or declined slightly ($P>0.05$) when compared to lacking group. While the shear force of suitable group increased 31.80% ($P<0.01$); the contents of soluble collagen, insoluble collagen and the total collagen increased 305.45%, 180.98%, 219.35% respectively ($P<0.01$). The pH and water loss rate of suitable group was in the trend of decline ($P>0.05$). Moreover, the CAT B/L activities of suitable group was less than the lacking group to the degree of extreme significance ($P<0.01$) and significance ($P<0.05$) respectively. Meanwhile, the immunohistochemical analysis indicated that in both groups, CAT B/L were expressed in the muscle tissue and the expression level of suitable group was less than the lacking group extremely significantly ($P<0.01$). Additionally it was found that suitable dietary iron supplement could increase the initial CA, TSH ($P<0.01$), and decrease the initial DB ($0.01<P<0.05$), PSH and TBA ($P<0.01$) of Jian carp surimi. In conclusion, the suitable dietary iron supplement could lower the activities and expression level of CAT B/L in muscle of Jian carp; especially, it improved the hardness quality of fillet and the stability of surimi.

Keywords: iron, Jian carp, cathepsin B/L, fillet quality, surimi stability

铁是生命体必须的微量元素,参与了机体许多重要的生理过程^[1]。饲料中适宜的铁水平,对于维持鱼类正常生理代谢同样是必不可少的。虽然鱼类可通过其肠黏膜和鳃膜吸收可溶性铁,但在自然状态下,水中可溶性铁的浓度较低,在商业化的精养体系中,饲料几乎是鱼类唯一的铁源。饲料中铁含量若未得到科学合理的控制,鱼类极易出现缺铁,进而造成饲料利用率下降,生长受阻,贫血等^[2]。然而铁过量也可引起鱼类中毒,并抑制锌等其他微量营养元素的吸收^[3],严重影响鱼类生长发育,降低经济效益。已有研究表明,饲料中添加适宜水平的铁,可以促进罗非鱼^[2]、斑点叉尾鲷^[4]、真鲷^[5]等鱼类的生长。

建鲤(*Cyprinus carpio* var. jian)是人工育成的水产品种,具有遗传性状稳定、生长快(比普通鲤鱼生长快 30%~40%)、体型优、肉质厚、肉味鲜等特点^[6]。团队在前期研究工作中,通过以含不同水平铁的饲料饲喂幼建鲤,已经确定:当以血清铁为标示时,其最适宜铁需要量为 147.4 mg/kg^[7],并且还发现该水平下,可提高建鲤幼鱼的饲料利用效率,增强幼建鲤的消化吸收能力、免疫能力,以及肠道、肌肉抗氧化能力^[8]。但饲料中铁的水平对建鲤鱼肉品质及鱼

糜品质的影响尚少见报道。

目前对于饲料中各营养素水平对鱼类肉质影响的研究主要侧重于肌肉组织学特性^[9]、肌肉常规物理特性品质及化学营养成分的变化^[10-11]等,研究尚不充分。而关于饲料营养素水平对鱼肉风味品质和酶活特性影响的研究,特别对于鱼类加工制品品质的研究很少。铁对鱼肉品质的影响的研究较少。ZHANG 等^[12]研究了饲料中铁对生长中期草鱼肉质的影响,结果表明铁可提高草鱼肌肉蛋白和脂肪含量,降低其水分和灰分含量,降低剪切力和羟脯氨酸含量,提高肌肉保水性,但对肌肉 pH 无显著影响。

鱼糜是将原料鱼肉经过采肉、漂洗、精滤等步骤加工而成的肉糜状产品,进一步经擂溃、成型等工序可加工成富有凝胶弹性的鱼糜制品^[13]。目前,我国鱼糜产量达到了 1.45×10^6 吨,鱼糜及其制品行业产值规模已经超过了 200 亿元^[14],能够显著提高水产品的经济附加值。以建鲤为原料开发鱼糜及鱼糜制品等精深加工前景看好。凝胶性能是评价鱼糜制品的主要指标,而鱼糜蛋白的稳定性直接决定了其凝胶性能。关于饲料中营养素铁水平与鱼糜品质的关系,尚少见进一步的研究报道。

组织蛋白酶 B (Cathepsin B, CAT B) 及组织蛋

白酶 L(Cathepsin L, CAT L)是影响鱼类肉质的重要蛋白酶,能够破坏肌肉蛋白结构完整性,加速宰后鱼肉片的软化^[15]。CAT B/L 在漂洗后的鱼糜^[16]及鱼糜的冻藏期间^[17]仍残留显著的活性,进而在后续的鱼糜制品加工过程中,可水解鱼糜凝胶的关键结构蛋白——肌球蛋白,是导致鱼糜制品品质劣变的主要原因之一^[18]。另一方面,有研究表明,饲料中脂肪酸的种类与含量,可影响大西洋鲑鱼体内 CAT B 的活性或其基因表达水平,同时其鱼肉质构发生改变^[19]。因此,研究建鲤鱼肉中 CAT B/L 的活性或表达量,可为科学全面评估饲料中铁水平对其肉质及鱼糜品质的影响提供全面的评估信息。

本研究中以适宜铁水平(146.1 mg/kg)饲料饲喂后的建鲤为对象,同时与铁缺乏水平(53.9 mg/kg)下饲喂的建鲤进行鱼肉品质、鱼糜品质、CAT B/L 活性及表达的比较。结果从肉质、产品品质角度,更全面地评价该铁水平(147.4 mg/kg)对建鲤的适宜性,以期能够为深入探讨“铁调控与鲤科鱼肉品质变化关系,进而获得更优质水产食品加工原料”提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 动物性实验材料 建鲤及采样:以铁水平为 146.1 mg/kg(适宜组)及 53.9 mg/kg(缺乏组)的半纯合饲料饲喂 90 d 的建鲤幼鱼[初始体质量分别为(11.34±0.94) g 及(11.37±0.91) g,采样时体质量分别为(148.10±24.69) g 及(222.32±34.52) g],由四川农业大学动物营养所水生动物饲料与营养实验室饲养并提供。其饲料配方组成、饲料铁含量测定及饲养过程参见 LING 等^[7]的方法。饲养时每个处理组 3 个重复,每个重复 50 尾,即每个处理组 150 尾。饲养结束后,每组随机采样 30 尾鱼。用 3% 的乌来糖麻醉后处死,去皮,在背鳍第一硬棘下方、脊椎骨上方部位取背肌样品,用于指标测定,每个指标 5 尾鱼,取样过程在 4℃ 下完成。

1.1.2 建鲤 CAT B/L 多克隆抗体及背肌组织切片 由四川农业大学食品学院水产品加工与理论实验室制备保存,其制备过程参见陈秀华^[20]的方法。其中 CAT B 多克隆抗体效价为 1:256 000, CAT L 多克隆抗体效价为 1:512 000。

1.2 方法

1.2.1 建鲤鱼肉品质指标测定 参考任泽林等^[21]的实验方法进行肌原纤维耐折力(myofibril break-resisting force, MBF)的测定,取背肌样品(5.0±0.5) g,加 100 mL A 液(KCl 14.9 g、EDTA-2Na 3.44 g 和硼酸 4.78 g,定容至 2 L,用四硼酸钠调解 pH=7.0),22 000 r/min 匀浆 15 s,取样于 10×40 倍显微镜下测量肌原纤维长度,每个样随机记录 50 个观测数据,重复 10 次。计算公式如式(1):

$$\text{肌原纤维耐折力} = \sum L_i \times 10 / A \times B \times n \quad (1)$$

式(1)中, L_i 为每次测定肌原纤维长度(cm); A 为显微镜放大倍数,为 400; B 为为扩印倍数,为 3.7; n 为测定次数。

肌原纤维断裂指数(myofibril fragmentation index, MFI)测定,参考 Hopkins 等^[22]方法,稍有改动。取背肌样品 5.0 g,加 30 mL 缓冲液(100 mmol/L KCl, 20 mmol/L K_2HPO_4 , 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L $MgCl_2$, 1 mmol/L 叠氮钠),均质机均质 15 s 后,用 4 层纱布过滤,10 mL 缓冲液冲洗滤渣,收集滤液在 2℃ 下离心(1 000 g, 10 min),沉淀用 10 mL 缓冲液悬浮,再次离心,重复 2 次。最后将沉淀用 10 mL 缓冲液悬浮,稀释 20 倍后,测定 540 nm 处吸光值。每尾鱼 3 次重复,取平均值后乘以 200 即为 MFI。

剪切力用公斤力值(kg·f)表示,测定方法参考李池陶等^[23]的方法,将背肌样品置于冰上沿体测线方向,用锋利的刀片切取长×宽为 6 cm×2 cm,厚度(1 cm)一致的肉样,每尾鱼取 1 个肉样,每个肉样剪切 3 次。将所得 15 次测定值取其平均数。评定标准为剪切力值越小硬度越小。

pH 测定:每尾鱼取背部肌肉(5±0.5) g,剪碎,加蒸馏水 50 mL,匀浆管匀浆,用酸度计测量其匀浆液 pH 值。3 次重复,取平均值。

肌肉失水率的测定参考任泽林等^[21]的方法。每尾鱼取(5±0.5) g 背肌,记录数据为 W_0 ,置于沸水中煮沸 2.5 min 后,冷却,用滤纸吸干鱼肉表面水分,再次称质量记录为 W_1 。取失水率的平均值。计算公式如式(2):

$$\text{失水率} = \frac{W_0 - W_1}{W_0} \times 100\% \quad (2)$$

胶原蛋白质量浓度测定参考任泽林等^[21]的方法。称取 1 g 肉样置于匀浆管中,加 10 倍体积的蒸馏水,充分匀浆 2 min,移至离心管中,在 10 000 r/min

转速下离心 20 min, 弃去上清液。再加入 20 倍体积的 0.1 mol/L NaOH 溶液, 磁力搅拌器搅拌过夜, 在 10 000 r/min 转速下离心 20 min, 弃去上清液, 如此重复 2 次。之后加入 10 倍体积的 0.5 mol/L 冰醋酸, 磁力搅拌器搅拌过夜, 于 10 000 r/min 转速下离心 20 min, 重复 1 次, 将上述上清液合并作为可溶性胶原蛋白提取液。沉淀中加入 5 倍体积蒸馏水放入高压灭菌锅内, 在 120 °C 条件下加热 1 h, 然后在 10 000 r/min 转速下离心 20 min, 上清液作为不溶性胶原蛋白提取液。分离的可溶性和不可溶性胶原蛋白, 分别采用 Bradford 法测定其蛋白质质量浓度。

1.2.2 建鲤肌肉中 CAT B/L 酶活性及蛋白表达量测定 建鲤肌肉 CAT B/L 粗提液制备过程参考李树红^[24]的方法。CAT B/L 活性测定基本参照 BARRETT 等^[25]的方法。分别以荧光合成肽 Z-Arg-Arg-AMC 和 Z-Phe-Arg-AMC 为底物, 采用荧光酶标仪测定。激发波长 380 nm, 发射波长 460 nm。一个酶活单位定义为在反应条件下, 能够在 1 min 内水解底物并释放出 1 nmol AMC 产物的酶活性量(1 nmol/min)。

采用免疫组织化学法对两个处理组建鲤背肌中的 CAT B/L 进行蛋白水平定量, 具体操作参考李松等^[26]的方法。

1.2.3 建鲤鱼糜稳定性相关品质指标测定 建鲤鱼糜的制备参考陈秀华等^[27]的方法。建鲤用 10 °C 以下自来水清洗, 去除内脏, 再次清洗, 在 4 °C 下进行鱼糜的制备。具体操作如下, 采肉: 去皮、去除红肉, 取背部的白肉, 充分绞碎至 3~6 mm³; 漂洗: 将鱼肉糜与 5 倍体积的 4 °C 去离子水混合, 缓慢搅拌 10 min, 使水溶性蛋白等成分充分溶出, 静置 8~10 min 使鱼肉充分沉淀, 倾去漂洗液, 再用冷却水先后漂洗两次, 最后一次用 0.15% 食盐水漂洗; 离心脱水: 7 000 r/min, 4 °C 离心 15 min。

鱼糜肌动球蛋白的提取参考 BENJAKUL^[28]的方法。

肌动球蛋白稳定性测定参考 JERVIS 等^[29-30]的方法, 测定肌动球蛋白的 Ca²⁺-ATPase 活性 (Ca²⁺-ATPase activity, CA)、蛋白表面疏水性 (protein surface hydrophobicity, PSH)、总巯基质量摩尔浓度 (total sulfhydryl content, TSH)、二硫键质量摩尔浓度 (disulfide bonds content, DB), 各指标均重复测定

3 次。一个 CA 活力单位定义为 25 °C 下每毫克蛋白质在 1 min 内水解底物并产生的无机磷的量 (μmol·min⁻¹·mg⁻¹)。PSH 指数为测得的荧光强度对蛋白质质量浓度绘制线性回归曲线的最初的曲线斜率值。

TSH 含量按以下公式计算:

$$\text{总 SH 量浓度} = \frac{A_{412}}{\varepsilon} \times n \quad (3)$$

$$\text{总 SH 质量摩尔浓度}/(\mu\text{mol/g}) = \frac{\text{总 SH 量浓度}}{\rho} \quad (4)$$

式(3)(4)中: A_{412} 为 412 nm 波长处的吸光度; n 为稀释倍数; ε 为量吸光系数 13 600/(L·mol⁻¹·cm⁻¹); ρ 为蛋白质 (mg/mL)。

DB 含量按以下公式计算:

$$\text{二硫键量浓度} = \frac{A_{412}}{\varepsilon} \times n \quad (5)$$

$$\text{二硫键质量摩尔浓度}/(\mu\text{mol/g}) = \frac{0.5 \text{ mL} \times \text{二硫键量浓度}}{\rho} \quad (6)$$

式(4)(5)中, A_{412} 为 412 nm 波长处的吸光度; n 为稀释倍数; ε 为量吸光系数 13 900/(L·mol⁻¹·cm⁻¹); ρ 为蛋白质 (mg/mL)。

硫代巴比妥酸 (thiobarbituric acid, TBA) 值测定参考陈慧斌等^[31]的方法, 采用硫代巴比妥酸法测定鱼糜中脂肪氧化产生丙二醛量, 重复 3 次。计算公式为:

$$\text{TBA}/(\text{mg/kg}) = \frac{A \times 0.05 \times 72.06 \times 1\,000}{155W} \quad (7)$$

式(7)中, A 为 532 nm 波长处与 600 nm 波长吸光值的差值; W 为肉样质量。

1.3 数据处理及统计分析

采用 SPSS 22.0 统计软件, 计算各指标的平均值和标准差, 采用单因素方差分析进行差异显著性分析。免疫组化光密度采用 IPP 6.0 软件进行分析。

2 结果与讨论

2.1 饲料中添加适宜水平铁对建鲤鱼肉品质的影响

饲料中适宜水平铁对建鲤肌纤维物理特性相关品质指标 MBF 及 MFI、剪切力、胶原蛋白质量浓度的影响见表 1。与缺乏组相比, 适宜组的 MBF 有所提升, MFI 值降低, 但差异均不显著 ($P>0.05$), 适宜组的剪切力、可溶胶原蛋白质量浓度、不溶胶原蛋白质量浓度和总胶原蛋白质量浓度均极显著上

表 1 饲料中适宜水平铁对建鲤肌纤维物理特性的影响($\bar{x}\pm s$)
Table 1 Effect of suitable dietary iron supplement on muscle fiber property($\bar{x}\pm s$)

组别	MBF/ μm	MFI/ A_{540}	剪切力/($\text{kg}\cdot\text{f}$)	可溶胶原蛋白 质量浓度/ (mg/mL)	不溶胶原蛋白 质量浓度/ (mg/mL)	总胶原蛋白 质量浓度/ (mg/mL)
适宜组	0.100 6 $\pm$ 0.012 7	56.54 $\pm$ 4.40	0.126 0 $\pm$ 0.006 8**	0.238 0 $\pm$ 0.038 5**	0.370 9 $\pm$ 0.118 3**	0.609 0 $\pm$ 0.153 6**
缺乏组	0.099 6 $\pm$ 0.097 8	57.48 $\pm$ 4.12	0.095 6 $\pm$ 0.014 1	0.058 7 $\pm$ 0.013 2	0.132 0 $\pm$ 0.039 6	0.190 7 $\pm$ 0.045 2

注:同列数据肩标*表示差异显著($0.01<P<0.05$),**表示差异极显著($P<0.01$)。

升($P<0.01$),分别增加 31.80%、305.45%、180.98%、219.35%。

嫩度/硬度是肉类食用品质的一个重要感官特征,两者是从同一问题的两个不同侧面对肉质构特征的描述。鱼肉与畜禽肉不同,其本身质地非常柔软,且鱼死后的自溶速度明显快于畜禽动物,因此鱼肉片不需要嫩化,保持其硬度品质才能保证商品价值,也更符合消费者的需求。肌纤维的物理特性——MBF 和 MFI 值能够间接反应肌肉的硬度品质,而剪切力直接反应了肉质的硬度值,其值越高,硬度越强。研究表明 MBF 与肌肉组织的剪切力值成正比^[32],MFI 值与剪切力值成反比^[33]。本研究中,经添加适宜水平铁的饲料饲喂后,建鲤肌肉 MBF 提高,MFI 值降低,剪切力显著增加,说明肉质硬度提高。因此,饲料中适宜水平铁改善了建鲤鱼肉的硬度品质。

此外,胶原蛋白是一种重要的肌肉组织成分,肌原纤维被膜结缔组织中含有大量的胶原蛋白,在肌肉表面形成类似鞘膜结构的连续分布的致密原纤维网,在很大程度上决定着肌肉的持水性能和硬度;胶原蛋白含量越高,肌原纤维被膜韧性越强,从而肌原纤维耐折力越强^[21]。SATO 等^[34]研究表明,鲤鱼肌肉总胶原蛋白含量越高,肌原纤维耐折力和肌肉硬度越高,本研究结果与此相似。

适宜水平铁对建鲤鱼肉 pH 值、失水率的影响见表 2。相对于缺乏组,适宜组肌肉的失水率呈下降趋势,但差异不显著($P>0.05$)。此外,2 组肌肉 pH 值相似,适宜组略低,差异不显著($P>0.05$)。失水率可反映肌肉系水力强弱,是肌原纤维之间及与肌质之间致密性的一个间接指标,对肉质变化具有很大影响^[35]。前期研究表明,饲料中适宜水平的铁极显著提高了建鲤幼鱼体蛋白沉积率^[8],可能是适宜组建鲤的失水率从 24.47%降低到 22.77%的原因之一。建鲤鱼肉的系水能力提高,对改善鱼肉多汁性品质有一定的促进作用。另一方面,pH 值下降可引起肌肉

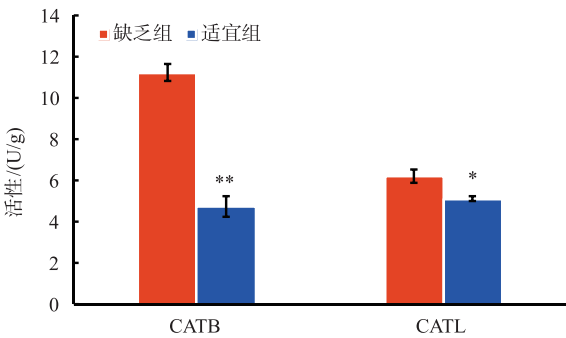
细胞膜受损^[36],从而改变肉的保水性、嫩度、组织状态和颜色等,直接影响肉品的保藏性、蒸煮损失、加工能力等。而本研究中适宜水平营养素铁对肌肉 pH 无显著影响,不会引起宰后鱼肉品质的生化劣变。

2.2 饲料中添加适宜水平铁对建鲤肌肉中 CAT B/L 活性及蛋白表达量的影响

饲料中适宜水平铁对建鲤肌肉组织中 CAT B/L 活性的影响如图 1。适宜组的建鲤肌肉中 CAT B 活性、CAT L 活性分别极显著($P<0.01$)及显著($0.01<P<0.05$)低于缺乏组。

表 2 饲料中适宜水平铁对建鲤肌肉 pH 值和失水率的影响($\bar{x}\pm s$)
Table 2 Effect of suitable dietary iron supplement on muscle pH and rate of water loss($\bar{x}\pm s$)

组别	pH	失水率/%
适宜组	6.50 $\pm$ 0.04	22.77 $\pm$ 1.19
缺乏组	6.65 $\pm$ 0.05	24.47 $\pm$ 1.59



*: $P<0.05$,**: $P<0.01$,与缺乏组比较

图 1 2 组建鲤背肌中的 CAT B/L 活性比较

Fig. 1 CAT B/L activities in dorsal muscle of Jian carp in each group

进一步采用免疫组织化学的方法,利用团队前期制备的 CAT B/L 多克隆抗体,对两组建鲤肌肉中 CAT B/L 进行定位及相对定量。由图 2 可知,经抗体标记、DAB 显色后的 2 组建鲤肌肉,均呈现不同程度的阳性染色,棕色染色部位即为真核表达的 CAT

B/L。采用 IPP 6.0 软件进行光密度数据分析,以进行相对定量,结果见图 3,适宜组的建鲤肌肉中 CAT B/L 蛋白表达量均极显著低于缺乏组 ($P<0.01$)。

CAT B、CAT L 可水解肌原纤维蛋白^[15],且内源 CAT B、CAT L 是引起其鱼糜凝胶软化的关键性蛋白酶^[18]。CAT B 和 CAT L 活性更高的鱼,不仅死后鱼肉蛋白的降解速度加快,而且高酶活亦影响鱼肉的硬度品质,同时还可能进一步影响加工制品如鱼糜制品的质构品质。本研究中,饲喂适宜水平铁

的建鲤肌肉中 CAT B/L 活性及蛋白表达量均降低,推测铁很可能通过某种途径调控了 CAT B/L 的活性及蛋白表达,其具体机制有待深入研究。同时结合适宜组鱼肉剪切力值提高,说明适宜水平铁明显改善鱼肉的硬度品质。因此,通过营养调控进而调节鱼肌肉组织中 Cathepsins 的活性和表达量,对从饲养源头控制鱼肉及加工制品品质,具有重要的研究意义。

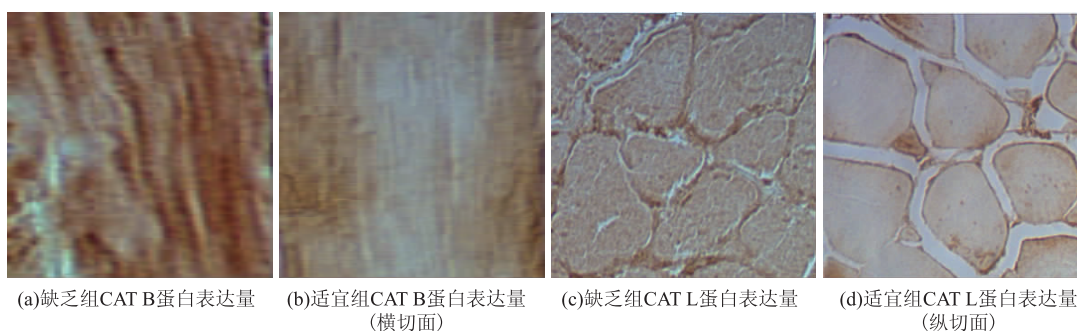
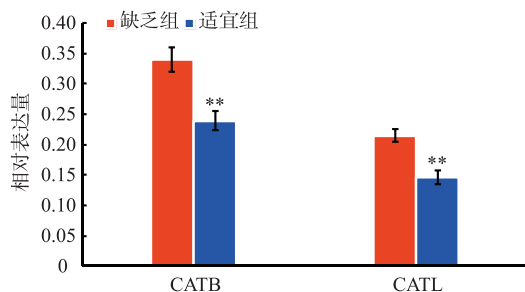


图 2 2 组建鲤背肌中 CAT B/L 蛋白表达量的免疫组化测定

Fig. 2 Immunohistochemistry of CAT B/L expressions in dorsal muscle of Jian carp in each group



注:缺乏组和适宜组间进行方差分析;**: $P<0.01$,与缺乏组比较

图 3 2 组建鲤背肌中 CAT B/L 蛋白表达量比较

Fig. 3 CAT B/L expression levels in dorsal muscle of Jian carp in each group

2.3 饲料中适宜水平铁对建鲤鱼糜稳定性的影响

对 2 种营养素铁水平饲喂后的建鲤背肌进行采肉、加工鱼糜,测定鱼糜肌动球蛋白稳定性及鱼

糜脂肪氧化程度,分析鱼糜稳定性相关指标差异情况,结果如表 3 所示。

与缺乏组相比,适宜组鱼糜肌球蛋白 CA 活性、TSH 质量摩尔浓度分别极显著 ($P<0.01$) 上升了 29.49%、61.10%,同时适宜组 DB 质量摩尔浓度和 PSH 则分别显著 ($0.01<P<0.05$) 及极显著 ($P<0.01$) 下降了 9.17%、54.29%。说明以适宜水平营养素铁饲喂的建鲤加工鱼糜,其肌动球蛋白的 CA 活性损失、巯基氧化损失及蛋白构象改变的程度更小,稳定性明显优于缺乏组。此外,在脂肪氧化相关指标方面,适宜组鱼糜 TBA 值极显著 ($P<0.01$) 低于缺乏组,说明经适宜水平铁饲料饲喂的建鲤加工鱼糜,其 TBA 值可发生明显降低 (37.77%),脂质氧化程度更小,稳定性更佳。

在鱼糜蛋白中,肌动球蛋白是形成鱼糜制品凝胶网状结构的重要蛋白,在鱼糜加工过程中易发生

表 3 饲料中适宜水平铁对建鲤鱼糜稳定性相关指标的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Effect of suitable dietary iron supplement on the stability of Jian carp surimi ($\bar{x}\pm s$)

组别	CA/(($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$))	TSH/($\mu\text{mol/g}$)	DB/($\mu\text{mol/g}$)	PSH/(SoANS)	TBA/(mg/kg)
适宜组	0.162 9 $\pm$ 0.001 1**	169.12 $\pm$ 0.308 8**	53.05 $\pm$ 1.618 8*	130.10 $\pm$ 3.945 7**	0.218 5 $\pm$ 0.013 9**
缺乏组	0.125 8 $\pm$ 0.000 5	104.98 $\pm$ 0.765 5	58.41 $\pm$ 1.510 7	284.63 $\pm$ 2.446 6	0.351 1 $\pm$ 0.008 0

*: $P<0.05$,**: $P<0.01$,与缺乏组比较。

变性,导致其物理、化学特性发生改变,从而使鱼糜制品质量、稳定性下降^[37]。此外,肌原纤维蛋白易于氧化,使其功能性质受到很大的损失^[38],也可降低鱼糜制品的品质。因此,通常将肌动球蛋白的氧化、变性程度作为判断鱼糜性能好坏的指标。而究其根本,鱼糜及其制品品质与原料鱼肉品质之间,也存在很大程度的相关性。目前从营养素水平分析探讨其对鱼肉品质及鱼糜稳定性的影响较少。

CA、PSH、TSH、DB 等 4 个指标从酶活、巯基氧化、蛋白构象等角度,反应了肌动球蛋白的稳定性。本研究中,2 组原料鱼肉经相同工艺加工成鱼糜,但营养素铁水平适宜组的建鲤鱼糜初始 CA 活性、TSH 质量摩尔浓度极显著高于缺乏组,而 DB 质量摩尔浓度和 PSH 则分别明显低于缺乏组,说明饲料中添加适宜水平的铁,更利于维持鱼糜蛋白的稳定性,进而可能会促进鱼糜制品的质构品质。同时,前期研究结果已表明,铁在建鲤机体抗氧化方面具有一定的促进作用,饲料中添加适宜水平的铁,可增强建鲤抗氧化酶系统及非酶抗氧化系统的防御能力^[7]。因此推测,可能是由于适宜组原料鱼肉蛋白本身的氧化还原稳定性更高,使其对在鱼糜加工工序中发生的氧化,抵抗能力更强。正如 ZHANG 等^[12]研究发现饲料中营养素铁能极显著降低草鱼肌肉中

的蛋白羰基(PC)含量,增强机体和组织中主要的抗氧化能力。

TBA 值是测定脂肪氧化的主要指标之一。本研究表明,饲料中添加适宜水平铁饲喂的建鲤,其鱼糜脂肪氧化程度更低。该结果与凌娟^[8]的前期研究结果一致,即铁能够极显著地降低建鲤肌肉组织中丙二醛(MDA)含量。ARMENTEROS 等^[39]的研究证实脂质氧化和蛋白氧化之间呈正相关。脂肪氧化次级产物可引发肌原纤维蛋白或肌动球蛋白的氧化,进而导致结构和功能改变^[40]。因此推测,由于适宜组建鲤鱼糜 TBA 值较低,其鱼糜蛋白的氧化速度会相应减弱,更有利鱼糜加工制品的稳定性。

3 结 语

相对于缺乏组(53.9 mg/kg),建鲤饲料中添加正常水平营养素铁(146.1 mg/kg),可在一定程度上提升建鲤宰后鱼肉片的硬度及胶原蛋白含量,降低肌肉中与自溶相关的 CAT B/L 活性及蛋白表达量,对于避免宰后鱼肉片在贮藏及加工过程中的软化具有正面效果;正常水平营养素铁可有效保持建鲤鱼糜肌球蛋白的稳定性,有利于鱼糜及鱼糜制品的加工品质。

参考文献:

- [1] COAD J, STEWART R, PEDLEY K. Iron: physiology of iron[J]. *Encyclopedia of Food & Health*, 2016: 461-467.
- [2] SHIAU S Y, SU L W. Ferric citrate is half as effective as ferrous sulfate in meeting the iron requirement of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*[J]. *Journal of Nutrition*, 2003, 133(2): 483-488.
- [3] LI Yupei, SHENG Xiaosa, QUAN Heng. Biological function of iron and its research in aquaculture[J]. *Feed Review*, 2008(3): 48-50. (in Chinese)
- [4] III D M G, WILSON R P. Characterization of iron deficiency and the dietary iron requirement of fingerling channel catfish[J]. *Aquaculture*, 1986, 52(3): 191-198.
- [5] SAKAMOTO S, YONE Y. Requirement of red sea bream for dietary iron II[J]. *Nihon-Suisan-Gakkai-Shi*, 1978, 44(3): 223-225.
- [6] ZHU Jian, WANG Jianxin. Status of the studies on the characteristics of Jian carp, *Cyprinus carpio* var. jian[J]. *Journal of Zhejiang Ocean University(Natural Science)*, 2004, 23(1): 52-55. (in Chinese)
- [7] LING J, FENG L, LIU Y, et al. Effect of dietary iron levels on growth, body composition and intestinal enzyme activities of juvenile Jian carp(*Cyprinus carpio* var. Jian)[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2010, 16(6): 616-624.
- [8] 凌娟. 铁对幼建鲤消化吸收功能、免疫功能和抗氧化能力的影响[D]. 雅安: 四川农业大学, 2009.
- [9] ZHU Xuan, CAO Junming, XU Fengmeng, et al. Effect of lysine/methionine on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2009, 28(4): 466-473. (in Chinese)

- [10] DENG Y P, JIANG W D, LIU Y, et al. Dietary leucine improves flesh quality and alters mRNA expressions of Nrf2-mediated antioxidant enzymes in the muscle of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. **Aquaculture**, 2015, 452: 380-387.
- [11] 温静. 磷对中期草鱼生长性能、肌肉品质、抗氧化能力和免疫功能的影响[D]. 雅安: 四川农业大学, 2013.
- [12] ZHANG L, FENG L, JIANG W D, et al. The impaired flesh quality by iron deficiency and excess is associated with increasing oxidative damage and decreasing antioxidant capacity in the muscle of young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. **Aquaculture Nutrition**, 2016, 22(1): 191-201.
- [13] ZHANG Yihuan, XIA Wenshui. Studies on comparison of gel properties of conventional freshwater fish surimi gel [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2012, 31(6): 654-660. (in Chinese)
- [14] 中国渔业统计年鉴[Z]. 北京: 中国农业出版社, 2016.
- [15] GODIKSEN H, MORZEL M, HYLDIG G, et al. Contribution of cathepsins B, L and D to muscle protein profiles correlated with texture in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. **Food Chemistry**, 2009, 113(4): 889-896.
- [16] LI Shuhong, ZHANG Nan, LIU Huan, et al. Preliminary study of the relationship between autolysis of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) myofibrillar proteins and endogenous cathepsins B, L and H [J]. **Journal of China Agricultural University**, 2004, 9(5): 71-75. (in Chinese)
- [17] JIANG S T, LEE B L, TSAO C Y, et al. Mackerel cathepsins B and L effects on thermal degradation of surimi [J]. **Journal of Food Science**, 1997, 62(2): 310-315.
- [18] LIU H, YIN L, ZHANG N, et al. Isolation of cathepsin B from the muscle of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and comparison of cathepsins B and L actions on surimi gel softening [J]. **Food Chemistry**, 2008, 110(2): 310-318.
- [19] BAHUAUD D, ØSTBYE T K, TORSTENSEN B E, et al. Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle structure integrity and lysosomal cathepsins B and L influenced by dietary n-6 and n-3 fatty acids [J]. **Food Chemistry**, 2009, 114(4): 1421-1432.
- [20] 陈秀华. 饲料中添加硫酸素对建鲤鱼肉、鱼糜品质及肌肉 Cystatin/Cathepsins 表达的影响[D]. 雅安: 四川农业大学, 2014.
- [21] REN Zelin, LI Aijie. Influence of dietary composition on the collagen content, the myofibrillae and the water loss in muscle tissue of prawn [J]. **Journal of Fishery Sciences of China**, 1998, 5(2): 40-44. (in Chinese)
- [22] HOPKINS D L, MARTIN L, GILMOUR A R. The impact of homogenizer type and speed on the determination of myofibrillar fragmentation [J]. **Meat Science**, 2004, 67(4): 705-710.
- [23] LI Chitao, GUAN Haihong, HU Xuesong, et al. Comparative study on the flesh quality of hybrid F3 and its parents: Big-head carp, Amur carp and German mirror carp [J]. **Journal of Fisheries of China**, 2008, 32(1): 45-50. (in Chinese)
- [24] 李树红. 鲢鱼背肌组织蛋白酶 B、L 的纯化鉴定及水解肌球蛋白的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2004.
- [25] BARRETT A J, KIRSCHKE H. Cathepsin B, cathepsin H, and cathepsin L [J]. **Methods in Enzymology**, 1981, 80 Pt C (Pt C): 535-561.
- [26] LI Song, YANG Libin, ZHANG Shuyan, et al. Prokaryotic expression and identification of recombinant cystatin of *Cyprinus carpio* var. Jian and preparation of its polyclonal antibody [J]. **Journal of Jilin University (Medicine Edition)**, 2014, 40(1): 204-209. (in Chinese)
- [27] CHEN Xiuhua, LI Song, LI Ran, et al. Effect of different concentrations of vitamin B₁ in rinsing water on the quality of silver carp surimi during refrigeration [J]. **Food Science**, 2014, 35(18): 236-240. (in Chinese)
- [28] BENJAKUL S, SEYMOUR T A, MORRISSEY M T, et al. Physicochemical changes in pacific whiting muscle proteins during iced storage [J]. **Journal of Food Science**, 1997, 62(4): 729-733.
- [29] JERVIS K M, ROBAIRE B. The effects of long-term vitamin E treatment on gene expression and oxidative stress damage in the aging brown norway rat epididymis [J]. **Biology of Reproduction**, 2004, 71(4): 1088-1095.
- [30] 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.

- [31] CHEN Huibin, WANG Meiying, WANG Zejin, et al. Study on the factors affecting oyster fat oxidation during frozen storage[J]. **Journal of Southwest University (Natural Science Edition)**, 2008, 30(8): 96-101. (in Chinese)
- [32] ZHENG Haibo. The myofibril fragmentation index and its relationship to meat tenderness[J]. **Meat Research**, 2007(5): 13-16, 42. (in Chinese)
- [33] GEESINK G H, TAYLOR R G, BEKHIT A E D, et al. Evidence against the non-enzymatic calcium theory of tenderization[J]. **Meat Science**, 2001, 59(4): 417-422.
- [34] SATO K, YOSHINAKA R, SATO M, et al. Collagen content of muscle of fishes in association with their swimming movement and meat texture. **Bull Japan Soc Sci Fish**[J]. **Nihon-suisan-gakkai-shi**, 1986, 52(9): 1595-1600.
- [35] TANG Y K, YU J H, XU P, et al. Identification of housekeeping genes suitable for gene expression analysis in Jian carp (*Cyprinus carpio* var. jian)[J]. **Fish & Shellfish Immunology**, 2012, 33(4): 775-779.
- [36] XIE Hongbing, CHANG Xinyao, WANG Yongqiang, et al. Effects of vitamin E and vitamin C in dietary on growth performance and meat quality in broiler chicks[J]. **China Feed**, 2011(1): 13-17. (in Chinese)
- [37] ZHOU Aimei, ZENG Qingxiao, LIU Xin, et al. Physicochemical changes of fish muscle protein during frozen storage and its affecting factors[J]. **Food Science**, 2003, 24(3): 153-157. (in Chinese)
- [38] Erasto Mlyuka. 冷冻储藏与氧化对鲢鱼肌原纤维蛋白功能性质的影响[D]. 无锡: 江南大学, 2010.
- [39] ARMENTEROS M, HEINONEN M, OLLILAINEN V, et al. Analysis of protein carbonyls in meat products by using the DNPH-method, fluorescence spectroscopy and liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry (LC-ESI-MS) [J]. **Meat Science**, 2009, 83(1): 104-112.
- [40] ZHANG Yinliang, AN Qiaoyun, YANG Hui. Effect of lipid oxidation on protein structure[J]. **Food Science**, 2012, 33(1): 25-30. (in Chinese)

科 技 信 息

欧盟评估二水钼酸钠作为绵羊饲料添加剂的安全性和有效性

2019年2月27日,据欧盟食品安全局(EFSA)消息,应欧盟委员会要求,欧盟动物饲料添加剂和产品(FEEDAP)研究小组被要求就二水钼酸钠(sodium molybdate dihydrate)作为绵羊饲料添加剂的安全性和有效性发表科学意见。

经过评估,FEEDAP小组得出的结论是,在绵羊全价饲料中铜与钼的最佳比例为3~10,铜含量最高为15 mg/Kg, 2.5 mg total Mo/kg 全价饲料对绵羊来说是安全的。铜与钼的比例为3~10时,补充钼被认为是有效的。

[信息来源]食品伙伴网. 欧盟评估二水钼酸钠作为绵羊饲料添加剂的安全性和有效性 [EB/OL]. (2019-3-1). <http://news.foodmate.net/2019/02/508166.html>