

硒代蛋氨酸对珍珠龙胆石斑鱼肌原纤维蛋白体外消化特性的影响

徐愉聪¹, 何圣琪¹, 栾宏伟¹, 步营¹, 朱文慧¹, 励建荣^{1, 2}, 李学鹏^{1, 3}

1. 渤海大学 食品科学与工程学院/生鲜农产品贮藏加工与安全控制技术国家地方联合工程研究中心, 辽宁 锦州 121013;
2. 大连工业大学 海洋食品精深加工关键技术省部共建协同创新中心, 辽宁 大连 116034;
3. 渤海大学 海洋研究院, 辽宁 锦州 121013

摘要:以珍珠龙胆石斑鱼为研究对象,采用静态体外消化模型模拟胃肠道消化,研究硒代蛋氨酸对珍珠龙胆石斑鱼肌原纤维蛋白体外消化特性的影响。结果表明:经模拟胃、肠消化后,高水平硒代蛋氨酸组(Y2组)的硒含量(0.130 mg/kg、0.072 mg/kg)显著高于对照组(C组)和低水平硒代蛋氨酸组(Y1组)($P<0.05$),而羰基含量(2.02 nmol/mg、2.59 nmol/mg)、二聚酪氨酸含量(3962 a.u、4062 a.u、硫代巴比妥酸(TBA)值(0.31 mg/kg、0.32 mg/kg)和粒径(365 nm、357 nm)显著低于C组和Y1组($P<0.05$),且其紫外吸收峰值和内源荧光强度更高,说明高水平硒代蛋氨酸延缓了肌原纤维蛋白的氧化变性过程,更好地维持了肌原纤维蛋白消化过程中的结构稳定性。Y1组的体外消化率(62.19%、67.25%)和水解度(0.31 mmol/g、0.34 mmol/g)显著高于C组和Y2组($P<0.05$)。因此,硒代蛋氨酸的添加不仅能显著提升珍珠龙胆石斑鱼肌原纤维蛋白的抗氧化能力,还可有效改善其体外消化特性,即硒代蛋氨酸在提高鱼类蛋白营养品质和稳定性方面具有潜在的应用价值。

关键词:珍珠龙胆石斑鱼;硒代蛋氨酸;肌原纤维蛋白;体外消化特性;模拟胃肠道消化

中图分类号:TS254.4 **文献标识码:**A

0 引言

珍珠龙胆石斑鱼(♀ *Epinephelus fuscoguttatus* × ♂ *Epinephelus lanceolatus*)不仅生长迅速,环境适应性和抗病能力强,而且肉质纤维细腻,蛋白质含量

高,脂肪含量低,具有较高的市场价值^[1]。珍珠龙胆石斑鱼的肌肉中富含人体必需氨基酸,可作为优质蛋白质的食物来源^[2],同时,还含有丰富的不饱和脂肪酸,有助于促进脑细胞生长发育、增强记忆力等^[3]。

收稿日期:2024-08-17;修回日期:2024-12-19

基金项目:辽宁省教育厅基本科研项目面上项目(LJKMZ20221486);辽宁省自然科学基金面上项目(2023-MS-297);渤海大学海洋研究院开放课题资助项目(BDHYYJY2024012)

作者简介:徐愉聪(2000—),女,陕西省西安市人,渤海大学硕士研究生,主要研究方向为水产品加工与贮藏。E-mail: xuyucong0719@163.com

通信作者:步营(1981—),男,山东省曲阜市人,渤海大学副教授,博士,主要研究方向为水产品加工与贮藏。E-mail: buying130@126.com

硒代蛋氨酸是一种生物学利用率极高的有机硒化合物,具有缓解石斑鱼运输过程中的应激反应及抗癌、抑制病毒复制等作用;另外,其毒性小且易被吸收利用,是一种理想的硒补充剂^[4-7],可替代蛋氨酸融入蛋白质中,而不影响蛋白质的结构和功能。李圆泽等^[8]使用硒代蛋氨酸(有机硒)和亚硒酸钠(无机硒)作为不同类型的硒源,对异育银鲫进行了养殖实验,研究表明高剂量的硒代蛋氨酸能够显著提高异育银鲫的生长性能和硒的生物蓄积。丛海花等^[9]研究了酶解褐藻寡糖对扇贝肌原纤维蛋白(Myofibrillar Protein, MP)在体外模拟消化过程中的影响,发现酶解褐藻寡糖显著改变了MP的消化特性,该研究为通过外源物质调节水产蛋白质消化特性提供了一种有效的分析方法,也为硒代蛋氨酸在水产蛋白质体外消化特性研究中的应用提供了思路。目前,关于硒代蛋氨酸的研究主要集中在功能活性方面,而其对石斑鱼MP体外消化特性的影响鲜有研究。静态体外消化模型因具有价格低廉、简单通用、快速高效、可再生等特点,可用于分析食物的消化稳定性、肠道运输和代谢、生物利用度等,已被广泛应用于食品和药品分析领域^[10]。因此,研究硒代蛋氨酸对珍珠龙胆石斑鱼MP体外消化特性的影响,对于揭示硒代蛋氨酸在水产动物营养和人体健康中的作用机制具有重要的科学意义和广阔的应用前景。

基于此,本研究拟以珍珠龙胆石斑鱼为研究对象,在暂养期间投喂添加硒代蛋氨酸的饲料后,采用低温麻醉法诱导其休眠并进行充氧保活处理,通过静态体外消化模型模拟胃肠道消化过程,研究硒代蛋氨酸对石斑鱼MP体外消化特性的影响,以期对硒代蛋氨酸在水产品中的高效利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

珍珠龙胆石斑鱼,购于辽宁省锦州市林西路农贸海鲜综合市场。硒代蛋氨酸,西安本丰生物科技有限公司;胆盐、胰蛋白酶(效价1:250)、胃蛋白酶(效价1:10000)、甘氨酸、L-丝氨酸,北京索莱宝科技有限公司;邻苯二甲醛(OPA)、三羟甲基氨基甲

烷(Tris)、2,4-二硝基苯肼(DNPH)、5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)、CaCl₂、K₂SO₄,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;三氯乙酸(TCA)、盐酸胍、尿素、HCl,国药集团化学试剂有限公司;NaCl、NaHCO₃,北京伊诺凯科技有限公司;CuSO₄、无水乙醇,天津市风船化学试剂科技有限公司;H₂SO₄,锦州古城化学试剂有限公司;NaOH,福晨(天津)化学试剂有限公司;HBO₃、乙酸乙酯、硫代巴比妥酸(TBA),上海麦克林生化科技股份有限公司。以上试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器与设备

XO-120 L-II型超声辅助速冻冰柜,南京先欧仪器制造有限公司;THERMO型冷冻高速离心机,赛默飞世尔科技公司;RCD-1A型高速均质乳化机,常州越新仪器制造有限公司;WHY-2型水浴恒温振荡器,常州国宇仪器制造有限公司;K9840型自动凯氏定氮仪,山东海能科学仪器有限公司;UV-2550型紫外-可见分光光度计,尤尼柯(上海)仪器有限公司;F-7000型荧光分光光度计,日立仪器(上海)有限公司;Testo 106型高精度食品温度计,德图仪器国际贸易(上海)有限公司;90Plus Zeta型Zeta电位及粒度分析仪,美国布鲁克海文仪器公司。

1.3 实验方法

1.3.1 实验样品制备 挑选健康、体表完好、体重为(800 ± 50)g的珍珠龙胆石斑鱼,充氧运输至实验室,于人工海水((21 ± 0.5)℃)中暂养24 h,溶氧量维持在6 mg/mL以上,盐度控制在27‰左右,以消除运输过程中产生的应激反应;每日饱食投喂饲料2次,其中,含0.5 mg/kg(低水平)硒代蛋氨酸的饲料组为Y1组,含1.1 mg/kg(高水平)硒代蛋氨酸的饲料组为Y2组,不含硒代蛋氨酸的饲料组为对照组(C组),投喂时间分别为8:00和16:00,记录投喂量和水温,养殖周期为7 d;养殖结束后,进行无水保活运输模拟,以2℃/h的速率匀速降温至12℃,充入O₂,置于13℃下保存12 h^[4]。取鱼背部肌肉,用高速绞肉机搅碎并混匀,即得实验样品,备用。

1.3.2 MP提取 参考W. H. Zhu等^[11]的方法,并稍作修改。将实验样品与4倍体积的20 mmol/L

Tris-HCl 缓冲液(pH 值为 7.5)混合,于 5000 r/min 条件下均质 30 s,再于 7000 r/min 条件下离心 20 min,重复上述操作提取沉淀 3 次;向沉淀中加入 4 倍体积的 Tris-HCl-NaCl 溶液(含 20 mmol/L Tris-HCl 和 0.6 mol/L NaCl,pH 值为 7.5),均质和离心操作同上,得到上清液,即 MP。所有操作均在 4 ℃ 条件下进行,所得 MP 需在 72 h 内使用。

1.3.3 模拟体外消化 模拟胃消化阶段:取 10 g MP,加入 10 mL 蒸馏水并摇匀,与 20 mL 模拟胃液(含 0.3 mg CaCl₂ 和 60 mg 胃蛋白酶)混合均匀,调节 pH 值为 2.0,于 37 ℃、100 r/min 的水浴恒温振荡器中反应 2 h 后,用 0.5 mol/L NaHCO₃ 溶液调节 pH 值至 7.0,以终止胃消化反应^[12-14]。

模拟肠消化阶段:取 40 mL 上述胃消化液,与 40 mL 模拟肠液(含 32 mg 胰蛋白酶、327 mg 胆盐和 0.6 mg CaCl₂)混合均匀,于 37 ℃、100 r/min 的水浴恒温振荡器中反应 2 h 后,用 6 mol/L HCl 溶液调节 pH 值至 2.0,以终止肠消化反应^[12]。

1.3.4 硒含量测定 采用《食品安全国家标准 食品中硒的测定》(GB 5009.93—2017)^[15] 中的荧光分光光度法测定模拟体外消化后 MP 的硒含量。将处理好的样品注入荧光分光光度计中,通过检测样品中硒元素产生的荧光强度,并与标准曲线进行比较,定量分析样品中的硒含量。

1.3.5 MP 体外消化率测定 采用凯氏定氮法^[16] 测定模拟体外消化前后 MP 的蛋白质含量,将 1 g 样品与 0.4 g CuSO₄、6 g K₂SO₄ 和 20 mL H₂SO₄ 混合于定氮瓶中,加热消解至溶液呈透明的蓝绿色,冷却后定容至 100 mL。使用定氮设备时,在水蒸气发生器中加入 3 mL H₂SO₄ 以维持体系的 pH 值,加热至沸腾并保持稳定沸腾状态。移取 10 mL 消化液到反应室,用蒸馏水冲洗干净,立即加入 10 mL NaOH 溶液,并以 10 mL H₃BO₃ 作为吸收液,收集蒸馏液 10 min 后,将接收容器移离液面,继续蒸馏 1 min。收集所有馏出液,用 0.05 mol/L 的标准 HCl 溶液滴定至溶液呈蓝紫色,记录滴定终点时消耗的 HCl 体积。体外消化率的计算公式如下:

$$\text{体外消化率} = \frac{P_1 \times M_1 - P_2 \times M_2}{P_1 \times M_1} \times 100\%$$

式中, P_1 为 MP 的蛋白质质量/g, M_1 为 MP 的干重/g, P_2 为 MP 消化后的蛋白质质量/g, M_2 为 MP 消化后的干重/g。

1.3.6 MP 水解度测定 参考 P. Duque-Estrada 等^[17] 的方法,并稍作修改。采用邻苯二甲醛(OPA)法测定模拟体外消化后 MP 中游离氨基的含量。将消化产物于 9000 r/min 条件下离心 10 min,取 400 μL 上清液与 3 mL OPA 试剂混匀,避光反应 2 min 后,于 340 nm 波长处测定吸光度。利用 L-丝氨酸标准品制作标准曲线,得到吸光度(y)与游离氨基含量(x)的关系曲线: $y = 0.684 4x + 0.072 4$ ($R^2 = 0.992 5$)。根据标准曲线计算游离氨基含量,结果以每 g 蛋白质中含有的游离氨基物质的量表示,单位为 mmol/g。

1.3.7 MP 和脂质氧化程度测定 1) 羰基含量测定。将模拟体外消化后 MP 的质量浓度调节至 1 mg/mL,根据羰基与 DNPH 反应生成蛋白胨的原理测定羰基含量。取 1 mL 1 mg/mL 蛋白溶液与 1 mL 10 mmol/L DNPH 混合均匀后,在黑暗条件下反应 40 min,再加入 1 mL 体积分数为 20%的三氯乙酸溶液,于 4 ℃、5000 r/min 条件下离心 5 min,收集沉淀,用乙醇-乙酸乙酯混合液($V(\text{乙醇}):V(\text{乙酸乙酯}) = 1:1$)清洗沉淀,重复洗涤 3 次。向沉淀中加入 4 mL 6 mol/L 的盐酸胍,于 37 ℃条件下反应 15 min 后,离心,取上清液,于 370 nm 处测定吸光度^[18]。

2) 游离巯基含量测定。将模拟体外消化后 MP 的质量浓度调节至 1 mg/mL,取 1 mL 稀释后的 MP 溶液,加入 8 mL Tris-甘氨酸缓冲液,于 10 000 r/min 条件下离心 15 min;取 4.5 mL 上清液,与 0.5 mL DTNB 混合均匀,于 37 ℃条件下反应 30 min 后,于 412 nm 处测定吸光度^[19]。

3) 二聚酪氨酸含量测定。将模拟体外消化后 MP 的质量浓度调节至 1 mg/mL,用荧光分光光度法测定二聚酪氨酸含量。测试条件为:激发波长 325 nm,发射波长 420 nm,狭缝宽度 2.5 nm。荧光强度与蛋白质质量浓度的比值即为最终的二聚酪氨酸含量^[20-21]。

4) TBA 值测定。参考 E. Rasinska 等^[22] 的方法,将 5 g 模拟体外消化后的 MP 与 25 mL 质量分数

为 5% 的 TCA 溶液在 10 000 r/min 条件下均质 1 min, 取适量上清液, 与等体积的 0.02 mol/L TBA 混合后, 在 80 ℃ 条件下水浴 20 min, 冷却至室温, 于 532 nm 处测定吸光度。

1.3.8 MP 变性程度测定 1) 浊度测定。将模拟体外消化后 MP 的质量浓度调节至 1 mg/mL, 在 25 ℃ 条件下保温 20 min 后, 于 340 nm 波长处测定吸光度, 以此表征 MP 溶液的浊度。

2) 粒径测定。将模拟体外消化后 MP 的质量浓度调节至 1 mg/mL, 取 2 mL MP 溶液于样品池中, 使用 Zeta 电位及粒度分析仪测定 MP 的粒径^[23]。

1.3.9 MP 构象测定 1) 紫外吸收光谱测定。将模拟体外消化后 MP 的质量浓度调节至 0.4 mg/mL, 使用紫外-可见分光光度计对样品进行检测, 设置图谱扫描速率为 10 nm/s, 扫描波长区间为 220~360 nm。

2) 内源荧光光谱测定。将模拟体外消化后 MP 的质量浓度调节至 0.1 mg/mL, 使用荧光分光光度计对样品进行检测, 设置激发波长为 280 nm, 扫描范围 320~460 nm。

1.3.10 综合评价 为了消除评价指标不同维度的影响, 通过计算其变异系数来衡量各指标值的差异, 公式如下:

$$V_i = \frac{\sigma_i}{\bar{X}_i}$$

式中, V_i 、 σ_i 、 $\bar{X}_i$ 分别为第 i 项的变异系数、标准差和算术平均值。

每个指标的权重为:

$$W_i = \frac{V_i}{\sum_{i=1}^n V_i}$$

式中, W_i 为第 i 项的权重。

1.4 数据分析

采用 SPSS 19.0 对实验数据进行统计, 通过单因素方差分析 (Analysis of Variance, ANOVA) 和 Duncan 检验进行差异显著性分析, 使用 Origin 2022 软件进行绘图。每个指标至少测定 3 次, 实验结果以 (平均值±标准差) 表示。显著性水平设定为 95% ($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 硒代蛋氨酸对 MP 模拟体外消化后硒含量的影响

硒代蛋氨酸对珍珠龙胆石斑鱼 MP 模拟体外消化后硒含量的影响如图 1 所示, 其中 *** 表示相同组别不同消化过程之间差异极其显著 ($P<0.001$), 不同小写字母表示不同组别相同消化过程之间差异显著 ($P<0.05$), 下同。由图 1 可知, 经模拟胃消化后, 3 组样品的硒含量均显著高于模拟肠消化 ($P<0.05$), 这表明在胃消化阶段, 硒代蛋氨酸的释放和利用较为有效, 而在肠消化阶段, 硒的吸收和利用可能受到其他因素的影响, 如肠道环境的 pH 值变化、硒代蛋氨酸与其他营养素的相互作用等。经模拟肠消化后, Y2 组的硒含量显著高于 C 组和 Y1 组 ($P<0.05$), 分别提高了 38.46% 和 7.46%。因此, 硒代蛋氨酸是一种有效的硒补充剂, 且相较于低水平硒代蛋氨酸, 高水平的硒代蛋氨酸能更有效地提高硒含量, 这可能是因为高水平的硒代蛋氨酸提供了更多的硒源, 从而增强了硒的吸收和保留。

2.2 硒代蛋氨酸对 MP 体外消化率的影响

体外消化率是评估蛋白质生物利用度的重要指标之一^[24]。硒代蛋氨酸对珍珠龙胆石斑鱼 MP 体外消化率的影响如图 2 所示, 其中 ns 表示相同组别不同消化过程之间无显著性差异 ($P>0.05$), 下同。由图 2 可知, 经模拟胃、肠消化后, Y1 组的体外消化率均显著高于其他处理组 ($P<0.05$), 这可能是因为低水平的硒代蛋氨酸更易于被珍珠龙胆石斑鱼的消化系统利用。经模拟肠消化后, MP 体外消化率从高到低依次为 Y1 组 (67.25%)、Y2 组 (59.17%) 和 C 组 (54.39%), 且 Y1 组和 Y2 组分别比 C 组提高了 23.64% 和 8.79%。因此, 在饲料中添加硒代蛋氨酸可提高消化产物的体外消化率, 且低水平硒代蛋氨酸的作用效果优于高水平硒代蛋氨酸。

2.3 硒代蛋氨酸对 MP 水解度的影响

蛋白质体外消化产物中的游离氨基含量可反映蛋白质的水解度^[25]。硒代蛋氨酸对珍珠龙胆石斑鱼模拟体外消化后 MP 水解度的影响如图 3 所示。由图 3 可知, 经模拟胃、肠消化后, Y1 组的水解度均显

著高于其他处理组($P<0.05$)。其中,经模拟肠消化后,Y1组的水解度比C组和Y2组分别提高了41.67%和21.43%。因此,硒代蛋氨酸作为一种有机硒形式,对蛋白质的水解具有促进作用,这可能是由于硒代蛋氨酸改变了蛋白质的结构,使其更容易被消化酶作用,从而提高了水解度;低水平硒代蛋氨酸作用效果优于高水平硒代蛋氨酸,说明在一定范围内,硒代蛋氨酸的添加可以优化蛋白质的水解过程。

2.4 硒代蛋氨酸对 MP 和脂质氧化程度的影响

2.4.1 对羰基含量的影响 蛋白质羰基衍生物的

形成可反映蛋白质的氧化情况,羰基含量越高,表明蛋白质的氧化程度越严重^[26-27]。硒代蛋氨酸对珍珠龙胆石斑鱼 MP 模拟体外消化后羰基含量的影响如图 4 所示,其中 * 表示相同组别不同消化过程之间差异显著($P<0.05$),下同。由图 4 可知,经模拟肠消化后,3 组样品的羰基含量均显著高于模拟胃消化($P<0.05$);经模拟胃、肠消化后,Y2 组的羰基含量(2.02 nmol/mg、2.59 nmol/mg)均显著低于 C 组(4.23 nmol/mg、4.45 nmol/mg)和 Y1 组(3.12 nmol/mg、3.27 nmol/mg) ($P<0.05$)。因此,

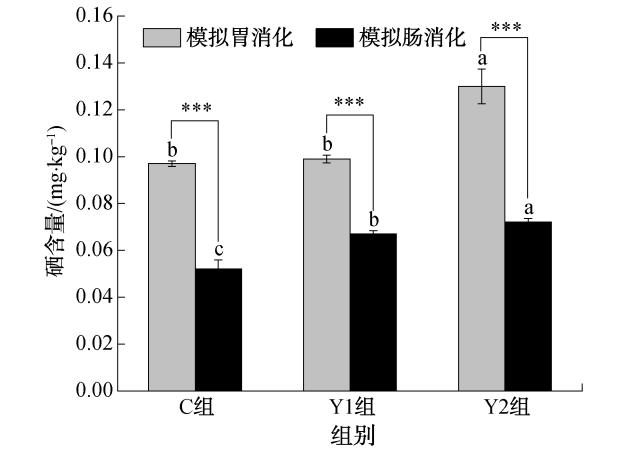


图 1 硒代蛋氨酸对珍珠龙胆石斑鱼 MP 模拟体外消化后硒含量的影响

Fig. 1 Effect of selenomethionine on the selenium content of MP after simulated *in vitro* digestion in pearl gentian grouper

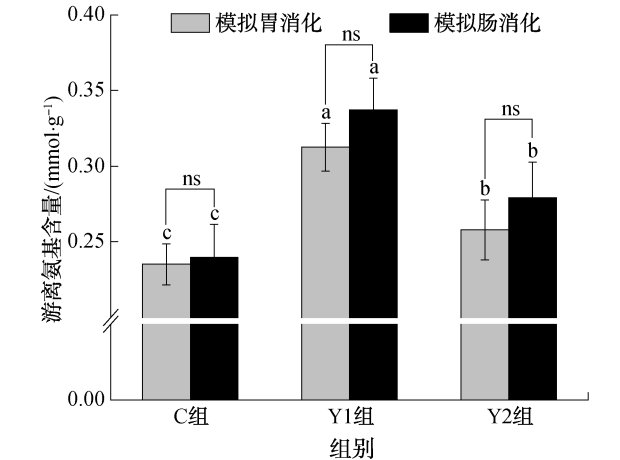


图 3 硒代蛋氨酸对珍珠龙胆石斑鱼 MP 模拟体外消化后水解度的影响

Fig. 3 Effect of selenomethionine on the degree of hydrolysis of MP after simulated *in vitro* digestion in pearl gentian grouper

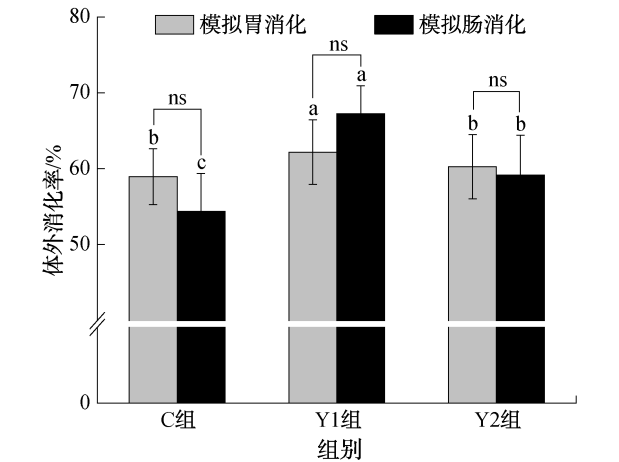


图 2 硒代蛋氨酸对珍珠龙胆石斑鱼 MP 体外消化率的影响

Fig. 2 Effect of selenomethionine on MP *in vitro* digestibility of pearl gentian grouper

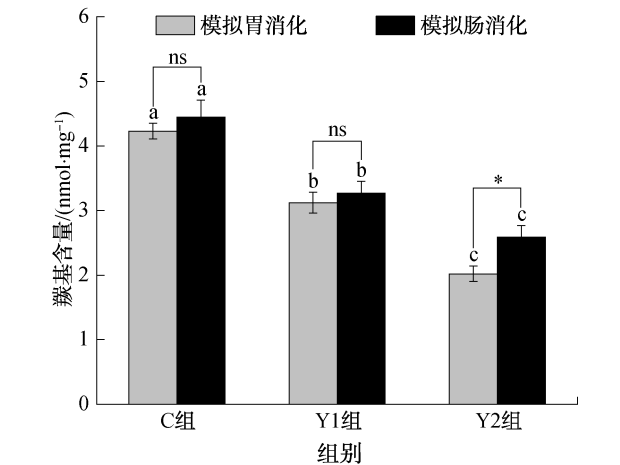


图 4 硒代蛋氨酸对珍珠龙胆石斑鱼 MP 模拟体外消化后羰基含量的影响

Fig. 4 Effect of selenomethionine on the carbonyl content of MP after simulated *in vitro* digestion in pearl gentian grouper

硒代蛋氨酸具有显著的抗氧化特性,且高水平硒代蛋氨酸能更有效地延缓 MP 消化产物中蛋白质的氧化。

2.4.2 对游离巯基含量的影响 巯基是蛋白质中常见的一种功能基团,在鱼肉贮藏过程中易被氧化为二硫键,可反映蛋白质的氧化程度^[28]。研究^[29]发现,游离巯基含量可反映石斑鱼 MP 空间结构的变化情况。硒代蛋氨酸对珍珠龙胆石斑鱼 MP 模拟体外消化后游离巯基含量的影响如图 5 所示。由图 5 可知,经模拟胃、肠消化后,Y2 组的游离巯基含量(169.87 nmol/mg、179.36 nmol/mg)均显著高于 C 组(123.60 nmol/mg、165.82 nmol/mg)和 Y1 组(163.58 nmol/mg、169.35 nmol/mg)。因此,补充硒代蛋氨酸有利于组织中硒的保留及抗氧化能力的提升,进而影响 MP 中的游离巯基含量,且高水平硒代蛋氨酸更能有效地保护蛋白质中的游离巯基,并减少氧化应激对游离巯基的损害。

2.4.3 对二聚酪氨酸含量的影响 酪氨酸易被自由基攻击形成二聚酪氨酸,可通过测定二聚酪氨酸含量评估蛋白质氧化过程中酪氨酸的变化,从而间接反映蛋白质初级结构的损伤程度。硒代蛋氨酸对珍珠龙胆石斑鱼 MP 模拟体外消化后二聚酪氨酸含量的影响如图 6 所示,其中 * 表示相同组别不同消化过程之间差异极显著($P<0.01$)。由图 6 可知,经模拟胃、肠消化后,Y2 组的二聚酪氨酸含量均显著低于 C 组和 Y1 组($P<0.05$)。其中,经模拟肠

消化后,Y2 组的二聚酪氨酸含量分别比 C 组和 Y1 组降低了 8.76%和 4.60%。因此,硒代蛋氨酸的添加减少了蛋白质结构中酪氨酸残基的氧化应激,从而有助于保护蛋白质结构的完整性,减少聚集现象的发生,且高水平硒代蛋氨酸的作用效果更显著。

2.4.4 对 TBA 值的影响 TBA 值用于量化多不饱和脂肪酸降解产生的二次氧化产物,可反映珍珠龙胆石斑鱼的脂质氧化情况^[30]。硒代蛋氨酸对珍珠龙胆石斑鱼 MP 模拟体外消化后 TBA 值的影响如图 7 所示。由图 7 可知,经模拟胃、肠消化后,Y2 组

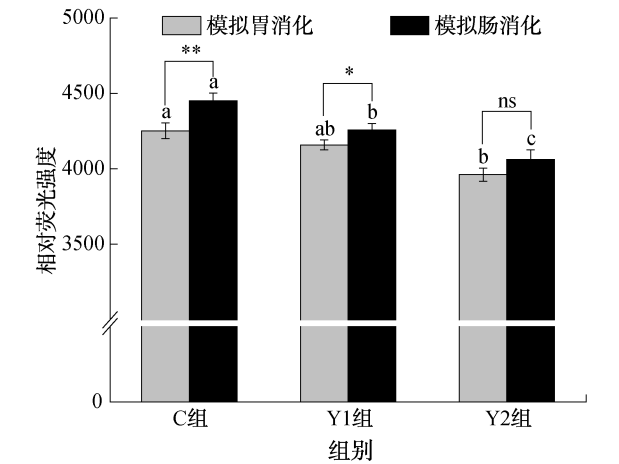


图 6 硒代蛋氨酸对珍珠龙胆石斑鱼 MP 模拟体外消化后二聚酪氨酸含量的影响

Fig. 6 Effect of selenomethionine on the content of dimertirosine in MP after simulated *in vitro* digestion in pearl gentian grouper

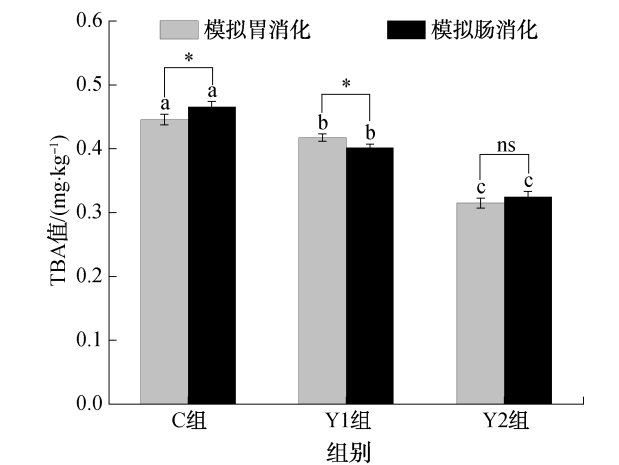


图 7 硒代蛋氨酸对珍珠龙胆石斑鱼 MP 模拟体外消化后 TBA 值的影响

Fig. 7 Effect of selenomethionine on the TBA value of MP after simulated *in vitro* digestion in pearl gentian grouper

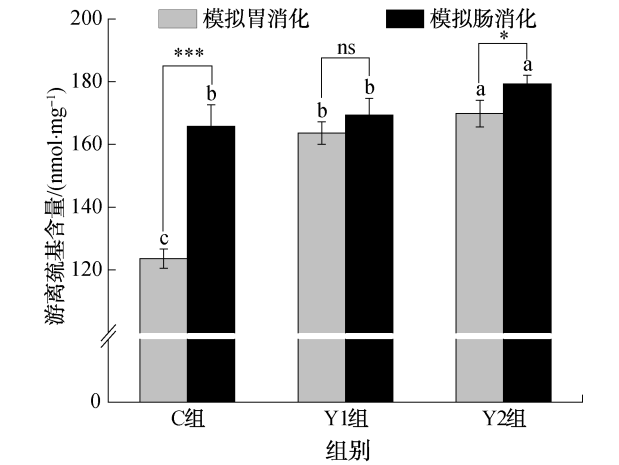


图 5 硒代蛋氨酸对珍珠龙胆石斑鱼 MP 模拟体外消化后游离巯基含量的影响

Fig. 5 Effect of selenomethionine on the content of free sulfhydryl group of MP after simulated *in vitro* digestion in pearl gentian grouper

的TBA值均显著低于C组和Y1组($P<0.05$)。其中,经模拟肠消化后,Y2组的TBA值比C组和Y1组分别降低了30.23%和19.12%。由此可见,硒代蛋氨酸具有显著的抗氧化特性,通过抑制脂质氧化,间接保护了蛋白质免受氧化损伤。特别地,高水平硒代蛋氨酸在抑制MP消化产物脂质氧化方面表现出更显著的效果,这与上述实验中观察到的Y2组蛋白质氧化程度最低的结果一致。

2.5 硒代蛋氨酸对MP变性程度的影响

2.5.1 对浊度的影响 蛋白质的浊度变化能够有效反映其聚集程度,浊度越低,表明蛋白质的聚集程度越小,反之亦然^[31]。硒代蛋氨酸对珍珠龙胆石斑鱼MP模拟体外消化后浊度的影响如图8所示。由图8可知,经模拟肠消化后,MP的浊度从高到低依次为C组(0.55)、Y1组(0.38)和Y2组(0.32),Y2组的浊度比C组和Y1组分别降低了41.82%和15.79%。由此可见,饲料中添加硒代蛋氨酸可以有效降低蛋白质消化后的变性程度,且高水平硒代蛋氨酸的作用效果更显著。此外,C组蛋白质的浊度显著高于Y1组和Y2组($P<0.05$),表明C组蛋白质发生了更严重的聚集。当蛋白质聚集程度足够大时会产生光散射效应^[32],进而导致浊度增加。

2.5.2 对粒径的影响 蛋白质的粒径大小是反映其聚集程度的重要参数,粒径增大表明蛋白质发生了聚集和氧化变性^[33]。硒代蛋氨酸对珍珠龙胆石

斑鱼MP模拟体外消化后粒径的影响如图9所示。由图9可知,经模拟胃、肠消化后,Y2组的粒径均显著小于C组和Y1组($P<0.05$)。这可能是由于高水平的硒代蛋氨酸可减少蛋白质的氧化应激和聚集行为,进而影响蛋白质的粒径。因此,饲料中添加硒代蛋氨酸可以降低蛋白质消化后的聚集程度,且高水平硒代蛋氨酸的作用效果更显著。

2.6 硒代蛋氨酸对MP构象的影响

2.6.1 对紫外吸收光谱的影响 紫外吸收光谱通过检测芳香族氨基酸的紫外吸收特性,能够揭示蛋白质的构象变化^[34]。硒代蛋氨酸对珍珠龙胆石斑鱼MP模拟体外消化后紫外吸收光谱的影响如图10所示。在275 nm处观察到特征吸收峰,主要来源于蛋白质中芳香族氨基酸残基,如苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸的紫外吸收特性^[35]。由图10可知,经模拟胃、肠消化后,Y2组在275 nm处的特征吸收峰强度高于C组和Y1组,表明硒代蛋氨酸能够有效抑制消化过程中蛋白质构象的改变,维持蛋白质的三级结构,且高水平硒代蛋氨酸的作用效果更显著。

2.6.2 对内源荧光光谱的影响 蛋白质中芳香族氨基酸,如酪氨酸和色氨酸的荧光信号对微环境的变化高度敏感^[36-37]。因此,内源荧光光谱能够反映蛋白质三级结构的变化^[38]。色氨酸通常存在于蛋白质内部,具有良好的荧光吸收性^[39]。硒代蛋氨酸

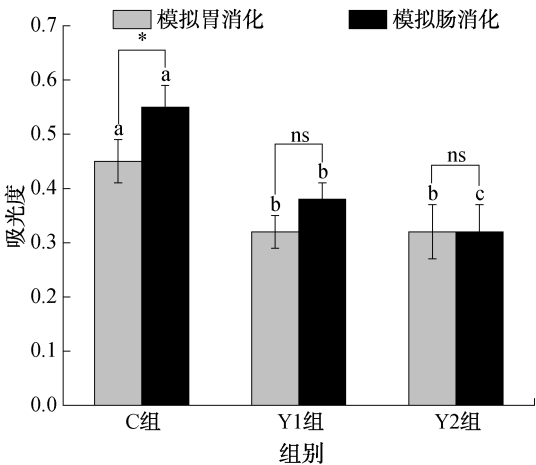


图8 硒代蛋氨酸对珍珠龙胆石斑鱼MP模拟体外消化后浊度的影响

Fig. 8 Effect of selenomethionine on the turbidity of MP after simulated *in vitro* digestion in pearl gentian grouper

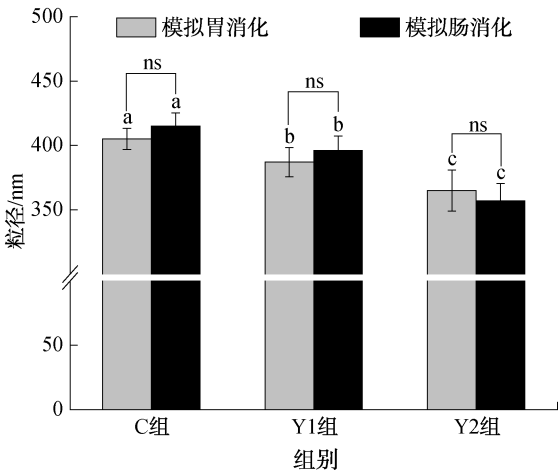


图9 硒代蛋氨酸对珍珠龙胆石斑鱼MP模拟体外消化后粒径的影响

Fig. 9 Effect of selenomethionine on the particle size of MP after simulated *in vitro* digestion in pearl gentian grouper

对珍珠龙胆石斑鱼 MP 模拟体外消化后内源荧光光谱的影响如图 11 所示。由图 11 可知,经模拟胃、肠消化后,Y2 组的荧光强度最高,C 组的荧光强度最低,可能是由于 C 组蛋白质在消化过程中发生了明显的结构破坏和构象改变,导致原本包埋在蛋白质分子内部的色氨酸和其他疏水性氨基酸暴露出来,从而引起荧光强度的下降^[40]。因此,饲料中添加高水平硒代蛋氨酸可有效抑制消化产物的蛋白质发生构象改变。

2.7 硒代蛋氨酸对 MP 体外消化特性影响的综合评价

各指标的平均值、标准差、变异系数和加权值

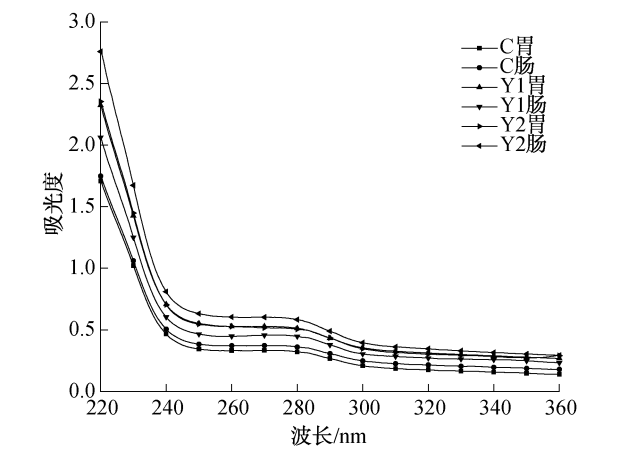


图 10 硒代蛋氨酸对珍珠龙胆石斑鱼 MP 模拟体外消化后紫外吸收光谱的影响

Fig. 10 Effect of selenomethionine on the UV absorption spectrum of MP after simulated *in vitro* digestion in pearl gentian grouper

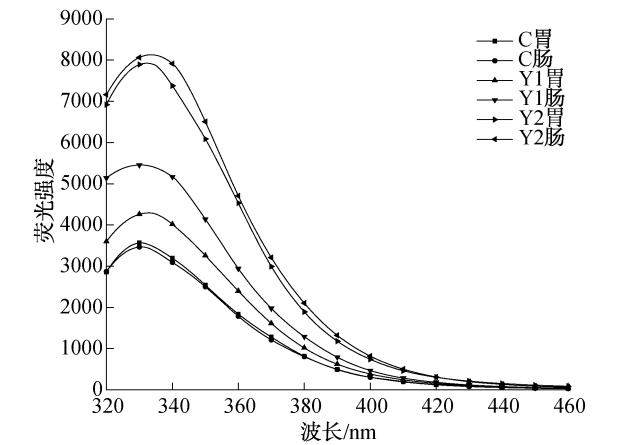


图 11 硒代蛋氨酸对珍珠龙胆石斑鱼 MP 模拟体外消化后内源荧光光谱的影响

Fig. 11 Effect of selenomethionine on endogenous fluorescence spectrum of MP after simulated *in vitro* digestion in pearl gentian grouper

见表 1,消化特性指标的标准化数据与综合评分见表 2。由表 1 可知,硒含量、羰基含量和内源荧光光谱的加权值相对较大,表明硒代蛋氨酸对这 3 个指标的影响较大,在评价中的占比较大。由表 2 可知,不同处理组的 MP 体外消化特性的综合评分从高到低依次为:Y2 组>Y1 组>C 组。因此,高水平硒代蛋氨酸饲喂处理可有效改善珍珠龙胆石斑鱼 MP 的体外消化特性。

表 1 各指标的平均值、标准差、变异系数和加权值
Table 1 Mean, standard deviation, variation coefficient and weighted values of each index

指标	平均值	标准差	变异系数	加权值
硒含量/ (mg · kg ⁻¹)	0.09	0.03	0.29	0.16
消化率/%	60.37	3.87	0.06	0.03
游离氨基含量/ (mmol · g ⁻¹)	0.28	0.04	0.13	0.07
羰基含量/ (nmol · mg ⁻¹)	3.28	0.85	0.26	0.14
游离巯基含量/ (nmol · mg ⁻¹)	161.93	17.84	0.11	0.06
TBA 值/ (mg · kg ⁻¹)	0.39	0.06	0.14	0.08
浊度	0.39	0.09	0.22	0.12
粒径/nm	387.50	20.70	0.05	0.03
吸光度	0.47	0.09	0.19	0.11
荧光强度	5 564.83	1 960.73	0.35	0.19

表 2 消化特性指标的标准化数据与综合评分
Table 2 Standardized data and comprehensive scoring of digestive properties

指标	C 组	Y1 组	Y2 组
硒含量/ (mg · kg ⁻¹)	-1.33	-3.30	-3.29
消化率/%	-1.55	1.78	-0.31
游离氨基含量/ (mmol · g ⁻¹)	-0.99	1.61	0.06
羰基含量/ (nmol · mg ⁻¹)	1.37	-0.01	-0.81
游离巯基含量/ (nmol · mg ⁻¹)	0.22	0.42	0.98
TBA 值/ (mg · kg ⁻¹)	1.24	0.12	-1.23
浊度	1.87	-0.12	-0.82
粒径/nm	1.33	0.41	-1.47
紫外吸收光谱	-0.10	0.53	1.45
内源荧光光谱	0.12	1.29	1.36
综合评分	1 181.15	10 804.72	10 816.19

3 结论

本文通过静态体外消化模型模拟胃肠道消化,深入研究了硒代蛋氨酸对珍珠龙胆石斑鱼 MP 体外消化特性的影响,得到如下结论:向饲料中添加硒代蛋氨酸可以有效提高珍珠龙胆石斑鱼 MP 模拟体外消化后的硒含量、体外消化率和水解度,从而提高其营养价值;高水平硒代蛋氨酸的添加有助于延缓脂质氧化及 MP 氧化、变性过程,并更好地维持 MP 消化过程中的结构稳定性。因此,硒代蛋氨酸的添加不仅提升了珍珠龙胆石斑鱼 MP 的抗氧化能力,还改善了其体外消化特性,有望进一步拓宽硒代蛋氨酸在水产养殖领域的应用范围。

参考文献:

[1] 步营,何圣琪,王飞,等. 珍珠龙胆石斑鱼无水保活过程中肌肉品质变化及近红外光谱模型的构建[J]. 中国食品学报, 2023, 23(7): 392-402.

[2] 陈晓婷,林瑜,路海霞,等. 4 种石斑鱼肌肉中营养成分分析与评价[J]. 渔业研究, 2020, 42(5): 463-472.

[3] 陈星星,柯爱英,潘齐存,等. 珍珠龙胆石斑鱼营养成分分析与品质评价[J]. 海洋湖沼通报, 2018, (1): 90-95.

[4] 范秀萍. 珍珠龙胆石斑鱼低温休眠无水保活的胁迫响应与机制研究[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2019.

[5] 朱乾峰,陈鹏文,范秀萍,等. 珍珠龙胆石斑鱼低温有水保活条件优化[J]. 食品工业科技, 2018, 39(22): 276-282.

[6] 吴波,谢晶. 石斑鱼有水活运工艺中温度、盐度的优化[J]. 食品科学, 2019, 40(16): 235-241.

[7] 唐煌尧,魏浩,张伟,等. 硒代蛋氨酸的生物学功能及其在畜禽生产中的应用[J]. 动物营养学报, 2024, 36(4): 2155-2162.

[8] 李圆泽,刘昊昆,巩玉龙,等. 饲料中添加高剂量有机硒和无机硒对异育银鲫生长性能、组织硒蓄积和血液生化指标的影响[J]. 水生生物学报, 2023, 47(5): 702-712.

[9] 丛海花,常珂欣,朱嘉雯,等. 酶解褐藻寡糖对扇贝肌原纤维蛋白体外消化特性的影响[J]. 肉类研究, 2022, 36(12): 7-14.

[10] 詹光,乐怡,王颖,等. 不同地域典型干腌火腿肌原纤维蛋白的氧化特性及体外消化性对比[J]. 食品科学, 2019, 40(23): 97-103.

[11] ZHU W H, LI Y, BU Y, et al. Effects of nanowarming on water holding capacity, oxidation and protein conformation changes in jumbo squid (*Dosidicus gigas*) mantles[J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 129: 109511.

[12] 徐雯,王振南,蒲仕文,等. 体外消化模型研究进展

及其在食品中的应用[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(10): 321-327.

[13] 钟坦君,洪鹏志,周春霞,等. 没食子酸对金线鱼鱼糜凝胶特性及其体外消化产物活性的影响[J]. 食品科学, 2022, 43(14): 76-84.

[14] 曹阜阳,林晓娟,张宏婧,等. 超高静压和体外消化对芝麻酚类物质、抗氧化活性及结构的影响[J]. 食品工业科技, 2022, 43(3): 33-39.

[15] 国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准食品中硒的测定: GB 5009.93-2017[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.

[16] 国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准食品中蛋白质的测定: GB 5009.5-2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.

[17] DUQUE-ESTRADA P, BERTON-CARABIN C C, NIEUWKOP M, et al. Protein oxidation and in vitro gastric digestion of processed soy-based matrices[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(34): 9591-9600.

[18] WANG Z F, HE Z F, ZHANG D, et al. Antioxidant activity of purslane extract and its inhibitory effect on the lipid and protein oxidation of rabbit meat patties during chilled storage[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2021, 101(5): 1953-1962.

[19] 熊杰,伯朝英,常海军. 甘草提取物对冷藏鸡肉糜脂肪和蛋白质氧化及品质特性的影响[J]. 食品工业科技, 2021, 42(1): 75-81, 88.

[20] LI X P, LIU C K, WANG J X, et al. Tea polyphenols affect oxidative modification and solution stability of myofibrillar protein from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. Food Biophysics, 2020, 15(4): 397-408.

[21] 贾琴,黄予豫,唐善虎,等. 刺梨水提取物对牦牛肉糜贮藏过程蛋白质和脂质氧化影响的研究[J]. 食品工业科技, 2023, 44(5): 347-355.

[22] RASINSKA E, RUTKOWSKA J, CZARNIECKA-SKUBINA E, et al. Effects of cooking methods on changes in fatty acids contents, lipid oxidation and volatile compounds of rabbit meat [J]. LWT-Food Science and Technology, 2019, 110: 64-70.

[23] LIU H T, LI Y Y, DIAO X P, et al. Effect of porcine bone protein hydrolysates on the emulsifying and oxidative stability of oil-in-water emulsions[J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2018, 538: 757-764.

[24] 马恒甲,徐梦谦,张丽,等. 硒在水产饲料中的研究进展[J]. 饲料研究, 2021, 44(3): 131-134.

[25] 阳倩,冯广鑫,冯炜婷,等. 常见大豆制品中蛋白质的体外消化特性[J]. 食品科学, 2022, 43(9): 39-47.

[26] 钱攀. 液体快速冻结对鳙鱼品质影响的研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2017.

[27] 伯朝英,熊杰,常海军,等. 马齿苋提取物抑制冷藏猪肉糜脂肪和蛋白氧化及对品质特性的影响[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(22): 172-179.

[28] 韩馨蕊,李颖,刘苗苗,等. 安石榴苷与焦磷酸钠对肌原纤维蛋白氧化稳定性及凝胶性能的影响[J]. 食

品科学, 2022, 43(8):15-21.

[29] ZHU X S, SHI X D, LIU S H, et al. Physicochemical properties and gel-forming ability changes of duck myofibrillar protein induced by hydroxyl radical oxidizing systems[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2022, 9: 1029116.

[30] 樊易卓, 张立彦, 杨启月, 等. 表儿茶素对胃肠消化过程中鱼油氧化行为的影响[J]. *食品工业科技*, 2025, 46(13): 1-8.

[31] 张潮, 吴宇桐, 孔保华. 超声辅助冷冻对鸡胸肉肌原纤维蛋白乳化的影响[J]. *食品科学*, 2020, 41(17): 104-110.

[32] 刘书成, 陈亚勋, 郭明慧, 等. 高密度 CO₂ 处理过程中虾肌球蛋白溶液浊度和溶解度的变化[J]. *食品科学*, 2017, 38(19): 42-48.

[33] 齐宝坤, 李杨, 王中江, 等. 不同品种大豆分离蛋白 Zeta 电位和粒径分布与表面疏水性的关系[J]. *食品科学*, 2017, 38(3): 114-118.

[34] ZHANG D, LI H J, EMARA A M, et al. Effect of in vitro oxidation on the water retention mechanism of myofibrillar proteins gel from pork muscles[J]. *Food Chemistry*, 2020: 315, 126226.

[35] WANG K Q, LUO S Z, ZHONG X Y, et al. Changes in chemical interactions and protein conformation during heat-induced wheat gluten gel formation[J]. *Food Chemistry*, 2017, 214: 393-399.

[36] 齐宝坤, 王英, 李子玉, 等. 不同酶解条件下大豆分离蛋白结构特性及起泡性研究[J]. *农业机械学报*, 2024, 55(5): 431-439.

[37] YU M, ZENG M M, QIN F, et al. Physicochemical and functional properties of protein extracts from *Torreyagrandis* seeds[J]. *Food Chemistry*, 2017, 227: 453-460.

[38] 党慧杰, 郑远荣, 刘振民. 超高压处理对乳清分离蛋白结构及致敏蛋白含量的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(6): 56-61.

[39] 张晓, 杨锋, 赵笑蕾. 热处理对卵白蛋白理化性质及其 ACE 抑制活性的影响[J]. *食品研究与开发*, 2020, 41(11): 34-40.

[40] LI F F, WANG B, LIU Q, et al. Changes in myofibrillar protein gel quality of porcine longissimus muscle induced by its structural modification under different thawing methods[J]. *Meat Science*, 2019, 147: 108-115.

Effects of selenomethionine on the *in vitro* digestibility of myofibrillar protein of pearl gentian grouper

XU Yucong¹, HE Shengqi¹, LUAN Hongwei¹, BU Ying¹, ZHU Wenhui¹, LI Jianrong^{1, 2}, LI Xuepeng^{1, 3}

1. College of Food Science and Technology/National & Local Joint Engineering Research Center of Storage, Processing and Safety Control Technology for Fresh Agricultural and Aquatic Products, Bohai University, Jinzhou 121013, China;
2. Collaborative Innovation Center of Seafood Deep Processing, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China;
3. Institute of Ocean Research, Bohai University, Jinzhou 121013, China

Abstract: In this study, the effects of selenomethionine on the *in vitro* digestibility of myofibrillar protein (MP) of pearl gentian grouper were studied by using a static *in vitro* digestion model to simulate gastric and intestinal digestion. The results showed as follows: after simulated gastric and intestinal digestion, the selenium content of high-level selenomethionine group (Y2 group) (0.130 mg/kg, 0.072 mg/kg) was significantly higher than that of control group (C group) and low-level selenomethionine group (Y1 group) ($P<0.05$). However, the carbonyl content (2.02 nmol/mg, 2.59 nmol/mg), dityrosine content (3962 a. u., 4062 a. u.), thiobarbituric acid (TBA) value (0.31 mg/kg, 0.32 mg/kg), and particle size (365 nm, 357 nm) of Y2 group were significantly lower than those in C group and Y1 group ($P<0.05$). Besides, the UV absorption peaks and endogenous fluorescence intensities of the Y2 group were higher. The results showed that high-level selenomethionine delayed MP's oxidation and denaturation process, and better maintained the structure of MP during digestion. The *in vitro* digestibility (62.19%, 67.25%) and the degree of hydrolysis (0.31 mmol/g, 0.34 mmol/g) of the Y1 group were significantly higher than those of the C group and Y2 group ($P<0.05$). In conclusion, the supplementation of selenomethionine not only improves the antioxidant capacity of MP but also improves its *in vitro* digestibility, indicating that selenomethionine has potential application in improving the nutritional quality and stability of fish protein.

Key words: pearl gentian grouper; selenomethionine; myofibrillar protein; *in vitro* digestibility; simulate gastric and intestinal digestion