

丙烯醛氧化对大黄鱼肌肉组织和肌原纤维蛋白结构性质的影响

李学鹏, 王祺, 周凯, 渠宏燕, 高艳蕾, 张晓琳, 刘裕, 励建荣

(渤海大学食品科学研究院, 化学化工与食品安全学院, 辽宁锦州 121013)

摘要: 采用不同浓度(0~10 mmol/L)的丙烯醛溶液对大黄鱼肌肉进行体外模拟氧化, 研究脂质次生氧化产物中的小分子醛类对大黄鱼肌肉组织和肌原纤维蛋白结构性质的影响。结果显示: 丙烯醛处理会导致大黄鱼肌纤维缝隙变大, 浓度达 10 mmol/L 时肌纤维发生断裂和小片化, 达 0.1 mmol/L 以上可导致肌肉持水性的下降。当丙烯醛浓度大于 0.1 mmol/L 时, 随着浓度增加, 肌原纤维蛋白羰基含量、二聚酪氨酸含量、表面疏水性显著增高, 总巯基含量显著减少; 活性巯基对丙烯醛较为敏感, 丙烯醛浓度为 0.01 mmol/L 时其含量比对照组减少了 40.8%。SDS-PAGE 电泳表明丙烯醛氧化能使蛋白质亚基发生交联, 在 200 ku 上方区域形成聚集体。此外, 氧化还能破坏肌原纤维蛋白的凝胶性质, 使其凝胶强度、凝胶持水性、凝胶白度降低。上述结果表明, 丙烯醛能够破坏大黄鱼肌肉组织结构, 并能引起肌原纤维蛋白氧化, 从而破坏其结构和功能性质。

关键词: 丙烯醛; 大黄鱼; 蛋白质氧化; 肌原纤维蛋白; 结构性质

文章编号: 1673-9078(2014)10-1-7

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.10.001

Effects of Acrolein Oxidization on Muscle Structure and Myofibrillar Protein Structural Properties in Large Yellow Croaker (*Pseudosciaena crocea*)

LI Xue-peng, WANG Qi, ZHOU Kai, QU Hong-yan, GAO Yan-lei, ZHANG Xiao-lin, LIU Yu, LI Jian-rong
(Research Institute of Food Science, Bohai University, Food Safety Key Lab of Liaoning Province, Jinzhou 121013, China)

Abstract: In order to investigate the effects of small molecular aldehydes (among secondary lipid oxidation products) on the muscle structure and structural properties of myofibrillar proteins in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*), the fish muscle was treated with different concentrations (0~10 mmol/L) of acrolein in an ex vivo oxidation experiment. The results showed that treatment with acrolein could lead to increased gaps between myofibers in large yellow croaker. Muscle fiber fracture and fragmentation occurred when the acrolein concentration reached 10 mmol/L, and the water-holding capacity of the fish muscle decreased when the acrolein concentration was greater than 0.1 mmol/L. The carbonyl content, tyrosine content, and surface hydrophobicity of the myofibrillar proteins increased significantly with an increase in the acrolein concentration above 0.1 mmol/L, whereas the contents of total sulfhydryl groups decreased significantly. Active sulfhydryl groups were sensitive to acrolein, and their contents decreased by 40.8% compared with the control at an acrolein concentration of 0.01 mmol/L. The SDS-PAGE results showed that acrolein oxidation could cause conjunction of some protein subunits, which formed aggregates in the area above 200 ku. In addition, the oxidation caused damage of the gel properties of the myofibrillar proteins, including decreases in the gel strength, water-holding capacity, and gel whiteness. All these results indicate that acrolein can damage the muscle structure of large yellow croaker and cause oxidation of the myofibrillar protein, thus damaging the structure and functional properties of the protein.

Key words: acrolein; large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*); protein oxidation; myofibrillar protein; structural property

收稿日期: 2014-05-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31301569); “十二五”国家科技支撑计划项目 (2012BAD29B06); 高等学校博士学科点优先发展领域专项科研基金 (20113326130001)

作者简介: 李学鹏 (1982-), 男, 博士, 讲师, 主要研究方向: 水产品贮藏加工; 通讯作者: 励建荣 (1964-), 男, 博士, 教授, 主要研究方向: 水产品贮藏加工与食品安全

大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 俗称大黄花, 属鲈形目 (*Perciformes*)、石首鱼科 (*Sciaenidae*)、黄鱼属 (*Pseudosciaena*), 是我国特有的重要海水经济鱼类之一, 在我国海洋渔业中占有重要的地位^[1]。然而, 由于大黄鱼属多脂鱼类, 脂肪含量较高 (11%左右), 尤其含有较多长链多不饱和脂肪酸和过渡态金属离子 (Fe^{2+} 等), 极易发生由脂质氧化引起的腐败^[2]。研究表明, 脂质氧化的次生产物 (包括氢过氧化物、活性醛类等) 能引起蛋白质氧化, 形成蛋白质羰基衍生物和共价交联物, 从而使蛋白质结构和功能性质发生改变^[3]。

近年来, 蛋白质氧化成为食品化学领域的热点研究问题之一, 它是指蛋白质分子在活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) (包括羟基自由基·OH、超氧阴离子自由基 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 等) 的直接作用下, 或通过次生氧化产物 (主要指脂质氧化副产物中的氢过氧化物、活性醛类等) 间接作用于蛋白质, 进而引起蛋白质结构和功能性质的变化^[4]。相比自由基和脂质氢过氧化物, 活性醛类 (丙烯醛、丙二醛等) 更为稳定, 能够在更大范围内造成蛋白质的氧化。丙烯醛是迄今为止所有 α 、 β -不饱和醛中反应活性最强的脂质过氧化产物。丙烯醛分子中含有不饱和双键, 可与蛋白质肽链中的亲核基团发生迈克尔加成反应, 同时丙烯醛所含羰基还可与蛋白质氨基反应形成希夫碱, 使得蛋白质发生共价交联^[5]。

目前国内外有关食品蛋白质氧化的研究多集中在畜禽肉、大豆蛋白等方面^[6-7], 对鱼肉等水产品中蛋白质氧化的关注较少, 仅有 Li 等^[8]在羟自由基对鲤鱼肌原纤维蛋白氧化方面的少量报道, 而脂质次生氧化产物对鱼肉蛋白质结构和性质的影响研究至今鲜见报道。研究水产品肌肉蛋白质氧化规律, 对深层次揭示水产品品质变化机制, 针对性开发贮藏保鲜技术, 从而进一步提高水产品质量具有重要意义。

鉴于此, 本文以丙烯醛为代表, 采用不同浓度的丙烯醛溶液作为氧化体系, 对大黄鱼肌肉进行模拟氧化, 通过分析氧化前后大黄鱼肌肉组织和肌原纤维蛋白结构和性质指标, 探究脂质次生氧化产物中的小分子醛类对鱼肉蛋白质结构和性质的影响规律, 以期对鱼肉蛋白质氧化机制研究及鱼类保鲜加工提供依据和参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

原料及预处理: 鲜活大黄鱼购于杭州市文二路农

贸市场, 平均体长 32 ± 5 cm、体重 480 ± 50 g。冰水致死后宰杀去皮, 取背部肌肉切成厚度约 1.0 cm 的肉片, 再轻轻刮取直径约 2.5 cm 的小块, 将肉块进行真空包装, 并于 -80 °C 超低温冰箱冻藏备用。

主要试剂: 丙烯醛, 分析纯, 购于国药集团化学试剂有限公司; 盐酸胍、乙酸乙酯、乙醇、三氯乙酸 (TCA)、乙醚、5,5'-二硫代双 (2-硝基苯甲酸) (DTNB)、2,4-二硝基苯肼 (DNPH)、2,4,6-三硝基苯磺酸 (TNBS)、乙二胺四乙酸 (EDTA) 等, 均为分析纯, 购于锦州药业集团器化玻有限公司。

1.2 仪器设备

MS105DU 分析天平, 梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司; BHT-312 显微镜, 日本 Olympus 公司; Mini Protean 3 凝胶电泳仪, 美国 Bio-Rad 公司; UV-2550 紫外可见分光光度计, 日本 Shimadzu 公司; 970CRT 荧光分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司; CR-400 色彩色差计, 日本 Minolta 公司; TA-XT plus 型质构分析仪, 英国 Stable MicroSystem 公司; SORVALL Stratos 冷冻高速离心机, 美国 Thermo 公司; DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器, 郑州长城科工贸有限公司; MDF-382E (CN) 医用低温箱, 大连三洋冷链有限公司; JHG-Q60-P100 型实验室均质机, 上海融合机械设备有限公司; THZ-D 台式恒温振荡器, 太仓市实验设备厂。

1.3 试验方法

1.3.1 丙烯醛模拟氧化和肌原纤维蛋白提取

将大黄鱼肌肉块分别置于浓度为 0、0.01、0.10、1、5、10 mmol/L 的丙烯醛溶液中, 密封避光条件下在 25 °C 恒温水浴中孵化 24 h。反应结束后将反应液置于冰浴中使之温度迅速降到 4 °C 以下, 样品取出、沥水后绞碎, 加入 5 倍体积的 10 mmol/L 的 Tris-HCl (pH 7.2), 高速均质, 在 5000 r/min、 4 °C 条件下离心 10 min, 取沉淀, 上述过程反复 3 次, 在最后一次沉淀中加入 5 倍体积的 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (含 0.6 mol/L NaCl, pH 7.2), 高速均质, 在 4500 r/min、 4 °C 条件下离心 10 min, 取上清液贮藏在 -80 °C 冰箱中备用。

1.3.2 肌肉组织观察和肌肉持水性的测定

肌肉组织观察: 将氧化处理的鱼肉切成 $5 \times 5 \times 5$ mm 的小块, -20 °C 冷藏 20 min, 用冷冻切片机切成 $8 \mu\text{m}$ 薄片, 置于载玻片上, 采用苏木素-伊红 (HE) 染色法染色, 在光学显微镜下放大 40 倍观察。

鱼肉持水性的测定: 将鱼肉 (约 5 g, 精确记重

W₀/g)置于底部垫有纱布的50 mL离心管中,在4000 g,4 °C下离心10 min后称重(W₁/g),持水率由(1)式计算得到。

$$\text{WHC} / \% = \left(\frac{W_0 - W_1}{W_0} \right) \times 100\% \quad (1)$$

1.3.3 肌原纤维蛋白羰基含量的测定

取1 mL蛋白溶液(浓度为5 mg/mL)放入塑料离心管并加入1 mL DNPH溶液(10 mmol/L含2 mol/L HCl),室温条件下避光静置1 h(每15 min,振荡一次),添加3 mL 20%的TCA后10000 r/min离心5 min,弃上清液,用乙酸乙酯-乙醇(体积比1:1)清洗沉淀3次后,加入6 mol/L盐酸胍溶液5 mL,37 °C保温15 min使沉淀溶解,10000 r/min离心3 min去除不溶物,所得溶液于370 nm波长下测定吸光度。使用分子吸光系数22000 L/(mol·cm)计算每mg蛋白中羰基含量。

1.3.4 肌原纤维蛋白结构性质的表征

总巯基和活性巯基的含量测定:取1 mL蛋白溶液(浓度为5 mg/mL)于试管中并添加9 mL、50 mmol/L磷酸盐缓冲液(含0.6 mol/L KCl,10 mmol/L EDTA,8 mol/L尿素,pH 7.0)。取5 mL上述混合液加入0.5 mL 0.1% DTNB,25 °C保温25 min,412 nm波长下所测吸光度即为总巯基的吸光度。而活性巯基的测定是在不含尿素的情况下,4 °C反应1h。使用分子吸光系数13600 L/(mol·cm)计算每mg蛋白中总巯基的含量(nmol)。

二聚酪氨酸含量的测定:将氧化后提取的蛋白液用浓度为20 mmol/L的磷酸盐缓冲液(含0.6 mol/L KCl,pH 6.0)稀释到1 mg/mL。溶液经过滤除去不溶性物质。采用荧光分光光度计测定二聚酪氨酸含量,激发波长325 nm,发射波长420 nm,狭缝宽度10 nm。最终的二聚酪氨酸含量利用所测得吸光度除以蛋白浓度获得,用相对荧光值表示。

表面疏水性的测定:ANS荧光探针法测定表面疏水性,将样品用20 mmol/L含0.6 mol/L KCl的磷酸盐缓冲液(pH 7.0)稀释至0~1 mg/mL,加入25 μL 8 mmol/L ANS(用20 mmol/L pH 7.0的磷酸盐缓冲液配)后混合均匀,避光静置10 min,然后用荧光分光光度计测定其荧光强度。测定条件为:激发波长374 nm,狭缝5 nm,扫描范围250~500 nm。以荧光强度对蛋白浓度作图,曲线初始斜率即为蛋白质分子的表面疏水性指数。

SDS-PAGE凝胶电泳:参考Xiong等人的方法略做修改^[9]:分离胶12%,浓缩胶4%,还原剂为DTT,

运用Quantity One软件进行分析和处理。

1.3.5 肌原纤维蛋白凝胶性的测定

凝胶的制备:将1.3.1中得到的蛋白冷冻干燥,用磷酸盐缓冲液将蛋白质浓度稀释到80 mg/mL,加2.5% (m/V)的NaCl,搅拌均匀后置于10 mL小烧杯中,40 °C水浴30 min后转入85 °C水浴30 min,于4 °C冷藏过夜。

凝胶强度的测定:用TA.XT plus质构仪对蛋白凝胶强度进行测定,采用P/5S探头,参数设定为下压距离8.0 mm,触发力为10.0 g。

凝胶持水性的测定:准确称取凝胶样品M₁(约5 g),用滤纸包好固定在50 mL离心管(底部垫棉花)中,3000 r/min离心6 min后称量凝胶质量M₂。凝胶持水性利用(2)式计算。

$$\text{WHC} / \% = \frac{M_1}{M_2} \times 100\% \quad (2)$$

凝胶白度的测定:测量前取出样品,在室温条件下恢复30 min,采用色差计测定L*、a*和b*值。白度由(3)式计算得到。

$$W = 100 - \sqrt{(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}} \quad (3)$$

1.3.6 数据统计与归纳

每个实验重复三次,采用SPSS statistics 19分析软件中的ANOVA程序进行显著性分析,数据绘图采用Origin软件。

2 结果与讨论

2.1 丙烯醛氧化处理对大黄鱼肌肉组织结构和肌肉持水性的影响

2.1.1 大黄鱼肌肉组织结构的变化

丙烯醛氧化处理对大黄鱼肌肉组织结构的影响结果如图1所示。由图可知,未氧化处理(对照组)的大黄鱼肌肉组织呈紧密连接的网状结构,缝隙较小,纤维内的原生质分布均匀。经过不同浓度是丙烯醛氧化处理后,大黄鱼肌肉组织间隙明显增大、肌纤维结构由致密趋于疏松。随着丙烯醛浓度的增加,大黄鱼肌肉纤维发生不同程度的扭曲,肌肉纤维发生断裂,在丙烯醛浓度为10 mmol/L时产生明显的肌纤维小片化现象。由此可见,丙烯醛处理能够显著破坏大黄鱼肌肉组织结构,而组织结构劣变是导致肌肉质地软化和品质下降的主要原因。

2.1.2 鱼肉持水性的变化

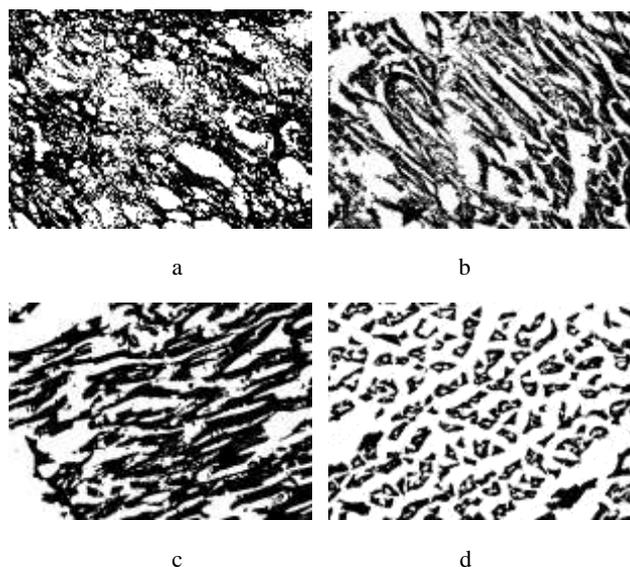


图1 丙烯醛氧化体系对大黄鱼肌肉组织结构的影响(纵切, ×40)

Fig.1 Effects of acrolein oxidation on the muscle tissue structure of *Pseudosciaena crocea* (longitudinal section, ×40)

注: a: 对照组; b: 0.1 mM 丙烯醛处理组; c: 1 mM 丙烯醛处理组; d: 10mM 丙烯醛处理组。

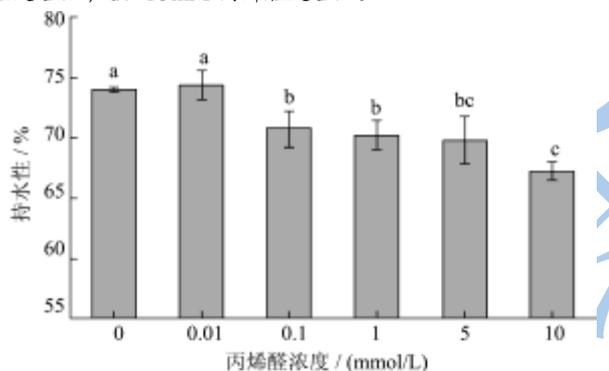


图2 丙烯醛氧化体系对大黄鱼肌肉持水性的影响

Fig.2 Effect of acrolein oxidation on the water-holding capacity of *Pseudosciaena crocea* muscle

注: 图中不同字母表示在 $P=0.05$ 水平上差异显著, 下同。

持水性是衡量肉品品质的主要指标之一, 肌肉持水性不仅影响肉品的营养成分、多汁性和嫩度等食用品质, 同时也决定着肉品的最终感官质量。图2为大黄鱼肌肉经丙烯醛氧化处理后持水性的变化情况。由图可知, 低浓度的丙烯醛(0.01 mmol/L)氧化对持水性无显著影响($P>0.05$)。随着丙烯醛浓度的增加, 大黄鱼肌肉持水性呈显著下降趋势($P<0.05$)。分析其原因可能是: 一方面, 氧化使得蛋白质氨基酸侧链和肽键会发生不同程度的破坏或导致一些蛋白质通过共价交联形成聚集体, 从而影响了肌原纤维蛋白的水合能力, 使一部分结合水变成自由水逸出; 另一方面, 从2.1.1肌肉组织结构观察可知, 丙烯醛氧化处理使肌

纤维间隙变大并产生小片化, 破坏了肌肉组织的网状结构, 从而使大量储存于肌肉组织间隙的自由水难以被束缚而被排出, 最终导致肌肉持水力的下降^[10], 从而降低鱼肉的营养品质和加工品质。

2.2 丙烯醛处理对肌原纤维蛋白氧化程度的影响

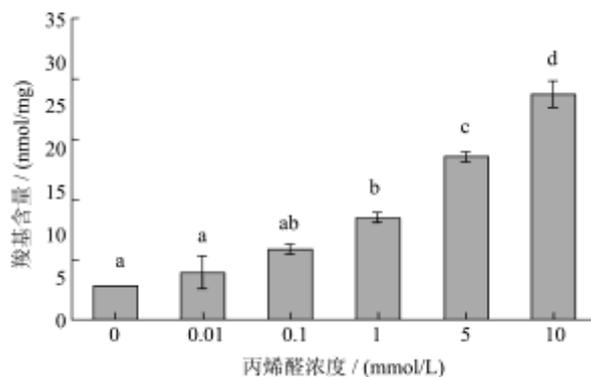


图3 丙烯醛氧化体系对大黄鱼肌原纤维蛋白中羰基含量的影响

Fig.3 Effect of acrolein oxidation on the carbonyl content of *Pseudosciaena crocea* myofibrillar proteins

羰基的形成是蛋白质氧化后最显著的变化之一, 因此羰基含量已经成为衡量蛋白质氧化程度最常用指标。从图3中可以看出, 丙烯醛浓度较低时(≤ 0.1 mmol/L), 羰基含量没有显著的变化, 而浓度超过0.1 mmol/L时, 羰基含量随着丙烯醛浓度的增加而显著增加($P<0.05$), 这表明高浓度的丙烯醛对大黄鱼鱼肉蛋白羰基含量影响较大。作为反应活性最强的 α, β -不饱和醛, 丙烯醛造成蛋白质羰基化的研究时有报道。Uchida等人^[11]研究1 mmol/L丙烯醛在37 °C条件下氧化牛血清白蛋白时发现, 蛋白质羰基值随反应时间的延长而增加, 通过化学和免疫学方法分析发现, 丙烯醛与牛血清白蛋白中的赖氨酸残基和组氨酸残基形成迈克尔加成产物是造成蛋白质羰基化的原因。Pocernich等人^[12]发现室温条件下50 $\mu\text{mol/L}$ 丙烯醛处理蛋白含量为4 mg/mL的突触体30 min使蛋白质羰基值增加了4.5倍。丙烯醛分子中存在的双键可以与蛋白质中组氨酸残基的咪唑基团、赖氨酸残基的 ϵ -氨基以及半胱氨酸残基的巯基等发生亲核加成反应, 从而导致了羰基的形成。

2.3 丙烯醛氧化对肌原纤维蛋白结构性质的影响

2.3.1 巯基含量的变化

半胱氨酸是对氧化修饰最敏感的氨基酸之一，但蛋白质羰基化并不能反映半胱氨酸的氧化状态，可以用总巯基和活性巯基含量来表征半胱氨酸氧化修饰后的情况^[13]。由图4可以看出，随着丙烯醛浓度增加，总巯基和活性巯基含量均呈下降趋势。活性巯基在未被氧化时约占总巯基含量的66.7%，说明大部分的半胱氨酸残基几乎都暴露在外。相比总巯基，活性巯基含量在低浓度丙烯醛时的变化更为显著(P<0.01)，丙烯醛浓度仅仅为0.01 mmol/L时，活性巯基含量相比对照组下降了40.8%。由于丙烯醛是一种软亲电试剂，而蛋白质巯基是一种软亲核试剂，丙烯醛与蛋白质巯基反应活性很高，可迅速与暴露在外的活性巯基发生迈克尔加成反应，而内部的巯基则需要随着进一步氧化使得蛋白质变性伸展而逐渐释放，才能进一步与丙烯醛反应。丙烯醛氧化能使得半胱氨酸中巯基形成二硫键，进一步生成小分子含硫化合物，如次磺酸和亚磺酸等氧化产物。因此，暴露在蛋白质外部的半胱氨酸极容易被丙烯醛氧化修饰，而内部的巯基由于受到蛋白质立体结构的保护氧化较为缓慢。

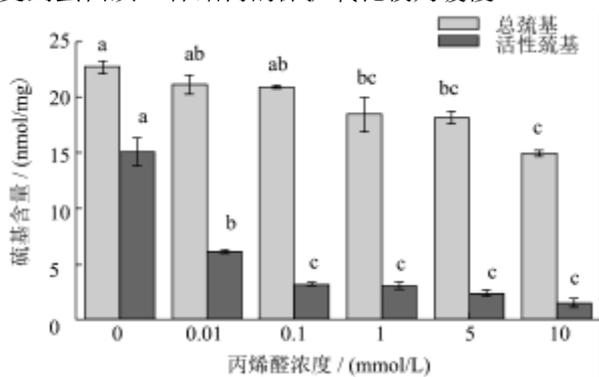


图4 丙烯醛氧化体系对大黄鱼肌原纤维蛋白中巯基含量的影响

Fig.4 Effect of acrolein oxidation on the thiol group content in *Pseudosciaena crocea* myofibrillar proteins

2.3.2 二聚酪氨酸的变化

二聚酪氨酸形成是因为丙烯醛使蛋白质酪氨酸残基发生氧化，通过共价和非共价作用形成了蛋白质聚合物，因此，考察蛋白质氧化后二聚酪氨酸含量变化可以了解蛋白质的氧化情况^[4]。图5显示了丙烯醛氧化处理前后大黄鱼肌原纤维蛋白中二聚酪氨酸含量的变化情况。由图可知，低浓度丙烯醛(≤0.1 mmol/L)对二聚酪氨酸的含量并没有显著影响，而当浓度大于0.1 mmol/L时，随后丙烯醛浓度的升高二聚酪氨酸含量显著增高(P<0.05)。可能的原因是：丙烯醛浓度很低时，对酪氨酸残基的影响很小，聚合作用较弱且不稳定；随着丙烯醛浓度的增加，对氨基酸侧链的进攻机会更多，酪氨酸单体被丙烯醛氧化的几率更大，

迅速与其周围其他蛋白的酪氨酸残基产生了共价交联，因此形成了较多的酪氨酸二聚体。

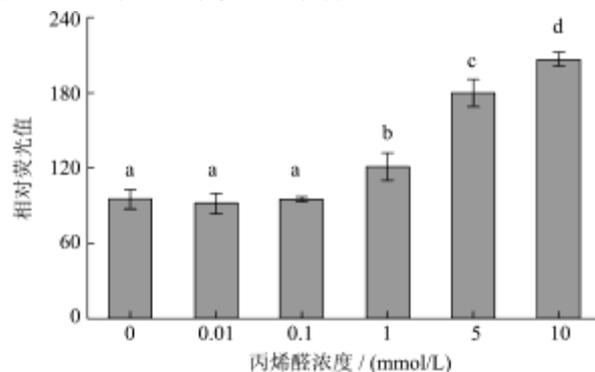


图5 丙烯醛氧化体系对大黄鱼肌原纤维蛋白中二聚酪氨酸含量的影响

Fig.5 Effect of acrolein oxidation on the tyrosine content in *Pseudosciaena crocea* myofibrillar proteins

2.3.3 表面疏水性的变化

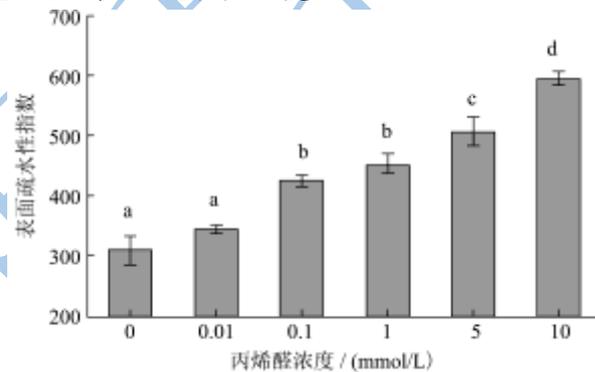


图6 丙烯醛氧化体系对大黄鱼肌原纤维蛋白表面疏水性的影响

Fig.6 Effect of acrolein oxidation on the hydrophobicity of *Pseudosciaena crocea* myofibrillar protein surface

蛋白质的表面疏水性反映蛋白质分子表面疏水性氨基酸的相对含量，其变化情况可以用来衡量蛋白质的变性程度。鉴于它能够观察到蛋白位点在化学上或物理上的微妙变化，疏水性被作为评价蛋白变性的一个重要参数^[15]。蛋白质的疏水性还与蛋白质溶解性和乳化性等性质密切相关，对蛋白质的加工性质有重要影响。ANS 探针是应用最广泛的疏水探针，它通过非共价的形式结合到蛋白质分子的非极性区域，增强了荧光强度，在一定范围内，荧光强度与蛋白质的浓度具有良好的线性关系，因此被广泛用于蛋白质表面疏水性的测定。图6是利用ANS疏水探针法测定丙烯醛氧化前后大黄鱼肌原纤维蛋白表面疏水性的变化情况。由图可知，低浓度丙烯醛对大黄鱼肌原纤维蛋白表面疏水性的影响并不明显，丙烯醛浓度大于0.1 mmol/L时，表面疏水性显著增加(P<0.05)。这可能是因为，在氧化体系中蛋白构象发生变化使蛋白质

解折叠, 一些疏水性的脂肪族与芳香族氨基酸侧链基团从蛋白分子内部暴露到极性的溶液中, 导致了疏水值的增加。表面疏水性增加主要是因为蛋白质变性, 蛋白质的内部结构改变, 使埋藏在蛋白质内部的疏水性氨基酸残基暴露出来。另外, 不同氨基酸间的疏水作用及巯基的氧化也会影响蛋白质的疏水性。相比而言, 高浓度的丙烯醛溶液可以使蛋白质内部结构发生严重破坏, 且对巯基的氧化程度也较大, 从而使表面疏水性显著增加。

2.3.4 SDS-PAGE 电泳分析

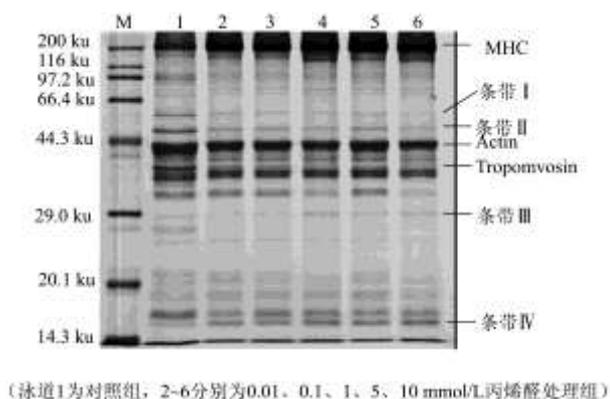


图7 大黄鱼肌原纤维蛋白 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig.7 SDS-PAGE patterns of *Pseudosciaena crocea* myofibrillar proteins

SDS-PAGE 电泳可以直观地看出蛋白质发生氧化后及不同氧化条件下, 蛋白亚基间发生的聚集、断裂或降解等情况。从图7可以看出, 在氧化过程中, 肌球蛋白重链条带(约200 ku)上方区域产生了一些高分子化合物, 形成聚集体, 堆积在分离胶的顶部, 甚至可能存在于浓缩胶中, 且蛋白丰度随着丙烯醛浓度的升高而增加。说明丙烯醛会促使蛋白质分子发生交联或聚集, 可能与分子间二硫键或二聚酪氨酸的形成有关。同时发现, 44.3~66.4 Ku之间的条带I、II和原肌球蛋白条带强度明显减弱, 说明丙烯醛氧化过程中肌原纤维蛋白也可能发生了肽链断裂, 从而引起蛋白质降解。此外, 低分子量蛋白条带(条带III和条带IV)丰度在高浓度丙烯醛氧化后增加, 可能是蛋白质氧化过程中某些蛋白肽键断裂、降解产生的小分子蛋白。

2.4 丙烯醛氧化对肌原纤维蛋白凝胶性质的影响

凝胶性是鱼肉蛋白质最主要的功能性质之一, 对鱼肉加工适用性影响显著。图8为丙烯醛氧化后大黄鱼蛋白凝胶性能的变化情况。可以看出, 丙烯醛对鱼

肉蛋白质凝胶能力有显著破坏作用, 凝胶强度和持水性均发生显著降低($P < 0.05$)。而当丙烯醛达到较高浓度时, 对蛋白质结构性质的氧化破坏作用已经达到一定限度, 对凝胶网络结构形成过程中氢键、疏水和静电相互作用等的破坏趋于饱和, 凝胶强度和持水性不再发生明显变化, 此时凝胶也难以形成。另外, 蛋白质凝胶白度也随着丙烯醛浓度的增加而降低($P < 0.05$), 且与凝胶持水性呈正相关关系。Park^[16]认为水的存在能提高凝胶白度值, 丙烯醛氧化致使蛋白质水合能力和凝胶持水性降低, 从而导致凝胶中截留水分减少, 这可能是凝胶白度降低的主要原因, 此外, Xia等^[17]认为蛋白凝胶白度值的下降还可能和氨基酸侧链与氧化产物在加热形成凝胶时发生非酶褐变有关。

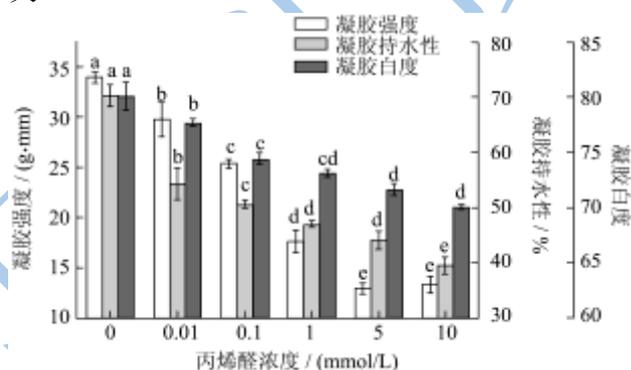


图8 丙烯醛氧化体系对大黄鱼肌原纤维蛋白凝胶性能的影响
Fig.8 Effect of acrolein oxidation on the gel properties of *Pseudosciaena crocea* myofibrillar proteins

3 结论

- 3.1 丙烯醛处理对大黄鱼肌肉组织具有显著破坏作用, 会导致肌纤维间隙明显增大、结构变疏松, 并逐步出现肌纤维小片化, 同时会使鱼肉的持水性降低。
- 3.2 丙烯醛处理能使大黄鱼肌原纤维蛋白发生显著氧化, 从而引起其结构和性质发生明显改变, 主要表现在: 蛋白质羰基含量随丙烯醛浓度的升高显著增加; 半胱氨酸被丙烯醛氧化修饰导致总巯基和活性巯基含量显著降低; 丙烯醛氧化使酪氨酸发生了聚集, 形成了酪氨酸二聚体, 使得二聚酪氨酸含量增加; 丙烯醛氧化同时使蛋白质内部的疏水性氨基酸残基暴露出来, 表面疏水性显著增加。丙烯醛氧化使肌原纤维蛋白某些亚基发生交联或聚集, 在肌球蛋白重链条带上方区域产生了高分子化合物, 同时也会引起原肌球蛋白等蛋白质肽键的断裂而发生降解。丙烯醛氧化对肌原纤维蛋白的凝胶性具有破坏作用, 会导致凝胶强度、凝胶持水性和凝胶白度值的下降。
- 3.3 脂质氧化产生的小分子醛类能够破坏大黄鱼肌

肉组织结构, 并引起肌原纤维蛋白发生氧化, 破坏肌原纤维的结构和功能性质, 从而导致鱼肉品质劣变, 影响其加工适用性。

参考文献

- [1] 杨华, 娄永江. 养殖大黄鱼营养成分及组织结构分析[J]. 中国食品学报, 2013, 13(6): 240-248
YANG Hua, LOU Yong-jiang. Analysis of nutrient composition and configuration in cultured pseudosciaea crocea's muscle [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2013, 13(6): 240-248
- [2] Timm-Heinrich M, Eymard S, Baron C P, et al. Oxidative changes during ice storage of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed different ratios of marine and vegetable feed ingredients [J]. Food Chemistry, 2013, 136(3-4): 1220-1230
- [3] Lund M N, Heinonen M, Baron C P, et al. Protein oxidation in muscle foods: A review [J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2011, 55(1): 83-95
- [4] Estévez M. Protein carbonyls in meat systems: A review [J]. Meat Science, 2011, 89(3): 259-279
- [5] Wu W, Wu X J, Hua Y F. Structural modification of soy protein by the lipid peroxidation product acrolein [J]. LWT-Food Science and Technology, 2010, 43: 133-140
- [6] Rebecca M Delles, Xiong Youling. The effect of protein oxidation on hydration and water-binding in pork packaged in an oxygen-enriched atmosphere [J]. Meat Science, 2014, 97: 181-188
- [7] Wu W, Wu X J, Hua Y F. Effects of oxidative modification on thermal aggregation and gel properties of soy protein by peroxy radicals [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2011, 46(9): 1891-1897
- [8] Li Y, Kong B, Xia X, et al. Structural changes of the myofibrillar proteins in common carp (*Cyprinus carpio*) muscle exposed to a hydroxyl radical-generating system [J]. Process Biochemistry, 2013, 48: 863-870
- [9] Xiong Y L, Park D, Oozumi T. Variation in the cross-linking pattern of porcine myofibrillar protein exposed to three oxidative environments [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57: 153-159
- [10] 刘泽龙. 蛋白质氧化对肉及肉制品持水与水合特性的影响机理研究[D]. 无锡: 江南大学, 2012
LIU Ze-Long. Mechanism of the alterations of water-holding capacity and hydration in meat and meat products induced by protein oxidation [D]. Wuxi, Jiangnan University, 2012
- [11] Uchida K, Kanematsu M, Sakai K, et al. Protein-bound acrolein: potential markers for oxidative stress [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95(9): 4882-4887
- [12] Pocernich C B, Cardin A L, Racine C L, et al. Glutathione elevation and its protective role in acrolein-induced protein damage in synaptosomal membranes: relevance to brain lipid peroxidation in neurodegenerative disease [J]. Neurochemistry International, 2001, 39(2): 141-149
- [13] 朱卫星, 王远亮, 李宗军. 蛋白质氧化机制及其评价技术研究进展[J]. 食品工业科技, 2011, 32(11): 483-486
ZHU Wei-xing, WANG Yuan-liang, LI Zong-jun. Research progress of protein oxidation mechanism and evaluation technology [J]. Science and Technology of Food Industry, 2011, 32(11): 483-486
- [14] Morzel M, Gatellier P, SsydT, et al. Chemical oxidation decreases proteolytic susceptibility of skeletal muscle myofibrillar proteins [J]. Meat Science, 2006, 73(3): 536-543
- [15] Chelh I, Gatellier P, Sante-lhoutellier V. Technical note: a simplified procedure for myofibril hydrophobicity determination [J]. Meat Science, 2006, 74(4): 681-683
- [16] Park J W. Surimi gel colors as affected by moisture content and physical conditions [J]. Journal of Food science, 1995, 60(1): 15-18
- [17] Xia X F, Kong B H, Xiong Y L, et al. Decreased gelling and emulsifying properties of myofibrillar protein from repeatedly frozen-thawed porcine longissimus muscle are due to protein denaturation and susceptibility to aggregation [J]. Meat Science, 2010, 85(3): 481-486