

羟自由基氧化对海鲈鱼肌原纤维蛋白生化特性及其乳化的影响

岳开华^{1,2}, 张业辉¹, 黄永春², 张友胜¹, 刘学铭¹, 李健雄¹, 汪靖瑜¹

(1. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 农业部功能食品重点实验室, 广东省农产品加工重点实验室, 广东广州 510610) (2. 广西科技大学生物与化学工程学院, 广西柳州 545006)

摘要: 采用羟自由基氧化体系对海鲈鱼肌原纤维蛋白进行体外模拟氧化, 研究羟自由基氧化对肌原纤维蛋白生化特性和乳化性能影响。结果显示: 随氧化时间的延长, 羰基含量、表面疏水性和肌原纤维蛋白(MPI)平均粒径增加, 总巯基和活性巯基含量下降, 生色氨基酸含量减少, 二聚酪氨酸含量在4 h达到最大值。 H_2O_2 浓度在1 mmol/L时上述指标变化显著, H_2O_2 浓度在5 mmol/L和10 mmol/L条件下, 前4 h乳化活性和乳化稳定性显著下降, 活性巯基含量较对照组分别下降了51.93%和65.88%, MPI平均粒径较对照组分别增加了47.87%和72.38%, 4 h后变化不明显, 且不同氧化剂浓度之间差异性显著。SDS-PAGE电泳图谱表明经羟自由基氧化后蛋白质发生交联, 形成大量高分子凝集体, 在200 ku上方区域堆积, 肌球蛋白重链含量减少。结果表明, 羟自由基氧化体系能使海鲈鱼肌原纤维蛋白结构发生改变, 导致其乳化性能下降。

关键词: 羟自由基; 海鲈鱼; 肌原纤维蛋白; 蛋白质氧化; 乳化性能

文章编号: 1673-9078(2016)10-143-150

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.10.023

Effects of Hydroxyl Radical Oxidation on the Biochemical Characteristics and Emulsifying Properties of Myofibrillar Proteins from Sea Bass

YUE Kai-hua^{1,2}, ZHANG Ye-hui¹, HUANG Yong-chun², ZHANG You-sheng¹, LIU Xue-ming¹, LI Jian-xiong¹, WANG Jing-yu¹

(1. Sericultural & Agri-Food Research Institute Guangdong Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Functional Foods, Ministry of Agriculture/Guangdong Key Laboratory of Agricultural Products Processing, Guangzhou 510610, China) (2. College of Biological and Chemical Engineering, Guangxi University of Science and Technology, Liuzhou 545006, China)

Abstract: The effect of hydroxyl radical oxidation on the biochemical characteristics and emulsifying properties of myofibrillar proteins were investigated by *in vitro* simulant oxidation experiments. The results showed that with increasing oxidation time, the carbonyl content, surface hydrophobicity, and average particle size of myofibrillar protein isolate from sea bass were increased, the content of total sulfhydryl group, active sulfhydryl group, and chromophore amino acids were decreased, and the content of tyrosine dimer reached a maximum value at 4 h. These indicators changed significantly when the H_2O_2 concentration was 1 mM. When the H_2O_2 concentrations were 5 and 10 mM, during the first 4 h, emulsifying activity and emulsifying stability were significantly decreased; the active sulfhydryl group content were decreased by 51.93% and 65.88%, respectively, compared to that in the control group; the average particle sizes of myofibrillar protein isolate were increased by 47.87% and 72.38%, respectively, compared to the control group. After 4 h, no significant changes were observed, but significant differences were detected among different oxidant concentrations. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis revealed that after hydroxyl radical oxidation, the proteins were cross-linked to form a large number of high-molecular-weight aggregates, which were accumulated in the region of over 200 ku. The content of myosin heavy chain was reduced. These results show that the hydroxyl radical oxidation system can change the structure of myofibrillar proteins in sea bass, leading to a decline in their emulsifying capacities.

Key words: hydroxyl radical; sea bass; myofibrillar protein; protein oxidation

收稿日期: 2015-11-09

基金项目: 国家“863”子课题项目(2013AA102201-3); 广东省农科院院长基金项目(201415); 广东省科技项目(2015B020206001); 广州市对外合作项目(201603)

作者简介: 岳开华(1990-), 男, 硕士, 研究方向: 蛋白质化学; 通讯作者: 张业辉(1979-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 蛋白质化学

活鱼体内存在着一套内源性抗氧化防御系统,它可以维持体内自由基代谢的平衡,当鱼死亡后,细胞内的氧化防御系统被破坏,自由基大量累积,导致体内的蛋白和脂质发生氧化,而脂质氧化的次生产物(如氢过氧化物、活性醛类等)也能引起蛋白的氧化^[1]。对于鱼类产品加工而言,蛋白质是鱼肉的主要组成成分,蛋白的氧化会严重影响鱼肉的品质特性、营养价值以及加工性能^[2]。海鲈鱼(Sea bass)分布比较广,太平洋水域和大西洋水域均有分布,是我国大力推展发展海水养殖的品种。海鲈鱼营养丰富,富含多种人体必需的氨基酸,且具有补肝肾、益脾胃、化痰止咳、安胎催乳等功效。目前海鲈鱼大多以冰鲜销为主,但运储过程中的贮藏条件对其品质有较大的影响。

氧化是导致鱼肉品质变化的重要因素之一,关于鱼类蛋白氧化的研究已渐成热点,Stadtman等^[3]发现蛋白质的氧化可导致芳香族氨基酸和脂肪族氨基酸侧链破坏转换为羰基衍生物,而半胱氨酸残基中的巯基易氧化为二硫键,酪氨酸易氧化为二酪氨酸。蒋晴晴等^[4]研究发现,带鱼经氧化后肌球蛋白重链发生交联聚集,TBARS值和蛋白羰基含量显著增加,蛋白盐溶性显著降低。Timm-Heinrich等^[5]发现蛋白质经氧化后蛋白构象发生变化,疏水集团大量暴露,导致蛋白内部交联形成大分子凝集体。但是,鱼蛋白作为精深加工的原料,蛋白的乳化活性是其加工利用的重要评价指标之一。

鉴于海鲈鱼深加工的快速发展,本文以海鲈鱼为原料,采用羟自由基氧化体系对海鲈鱼肌原纤维蛋白(MPI)进行模拟氧化,探究氧化对海鲈鱼MPI结构及功能性的影响规律,以期鱼类产品的加工和贮藏提供依据和参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

海水养殖的鲜活黑海鲈鱼购于广州天河区世纪联华超市,26条,体重在750±50g之间,样品采于8月份。宰杀后取背部肌肉备用。

三氯乙酸(TCA)、丁基羟基茴香醚(BHA)、Trolox、盐酸胍、乙酸乙酯、乙醇,天津市光复精细化工研究所;乙二胺四乙酸(EDTA)、二硫二硝基苯甲酸(DTNB)、2,4-二硝基苯肼(DNPH)、2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS),上海化学试剂有限公司;三氯化铁、过氧化氢、抗坏血酸(Asc)、尿素等,国药集团化学试剂有限公司。上述试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

紫外-可见分光光度计(UV-2450),日本岛津公司;高速冷冻离心机(CR22GIII),日本日立公司;激光粒度仪(WJL-628),上海申光仪器仪表有限公司;数显pH计(pHS-25),上海精密科学仪器有限公司;荧光分光光度计(970CRT),上海精密科学仪器有限公司;电热恒温水浴锅(DK-98-1),天津泰斯特仪器有限公司;恒温加热磁力搅拌器(DF-101S),上海精密科学仪器有限公司;分散均质机(FW 2000),上海弗鲁克流体机械制造有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 肌原纤维蛋白(MPI)的提取及氧化

MPI的提取参照Lefevre等^[6]的方法,MPI浓度用双缩脲法测定,以牛血清蛋白作标准曲线。MPI的氧化:将样品溶解在pH 6.0、50 mmol/L磷酸盐缓冲液中,置于不同浓度的模拟氧化体系中(FeCl₃、Asc浓度均为0.1 mmol/L,H₂O₂浓度分别为1、5、10 mmol/L)使其最终浓度为10 mg/mL,分别于4℃下氧化2、4、6 h。通过添加BHA-Trolox-EDTA溶液体系(使其最终浓度为1 mmol/L)终止氧化反应。

1.3.2 羰基含量测定

参照Oliver等^[7]的方法进行测定。

1.3.3 总巯基和活性巯基含量测定

参考Yongsawatdigul等^[8]的方法并作修改。取1 mL、5 mg/mL MPI,加入9 mL、50 mmol/L磷酸盐缓冲液(包括0.6 mol/L KCl,10 mmol/L EDTA,8 mol/L 尿素,pH 7.0)。混匀后取4 mL混合液,加入0.4 mL 0.2 mmol/L DTNB(用0.1 mol/L、pH 7.0的磷酸盐缓冲液配制),在25℃保温25 min,在波长412 nm处测定吸光度,即总巯基的吸光度。活性巯基的测定过程中,磷酸盐缓冲液中不含尿素,将反应混合液在4℃反应1.5 h,然后在波长412 nm处测定吸光度,即活性巯基的吸光度。蛋白总巯基的含量用公式计算:

$$SH(\text{mol/g pro}) = \frac{A \times D}{C \times B}$$

式中A表示吸光度;B表示样品蛋白质浓度(mg/mL);C表示分子吸光系数13600 L/(mol·cm);D为稀释倍数。

1.3.4 二聚酪氨酸含量的测定

参照孙妍等^[9]的测定方法。

1.3.5 UV吸收光谱分析

参照李银^[10]的试验方法进行分析。

1.3.6 蛋白凝胶(SDS-PAGE)电泳

参照 Laemmli^[11]的电泳方法稍作修改, 分离胶10%, 浓缩胶5%, 上样量15 μL ; 开始电流80 V, 待样品进入分离胶后改为110 V。

1.3.7 蛋白质粒径测定

将氧化后的蛋白液磁力搅拌1 h后离心去除不溶性沉淀, 将蛋白质质量浓度调整到5 mg/mL, 采用激光粒度仪测定肌原纤维蛋白的粒径分布。

1.3.8 表面疏水性测定

依据 Chelh 等^[12]的方法。

1.3.9 肌原纤维蛋白乳化活力和乳化稳定性的测定

将氧化后的蛋白离心, 取沉淀溶解在0.1 M (pH 6.5) 磷酸盐缓冲液中使蛋白浓度为1 mg/mL, 取2 mL大豆油和8 mL蛋白溶液于离心管中匀浆1 min后, 从距离离心管底0.5 cm处取50 μL 溶液加入到5 mL、0.1% SDS溶液中, 震荡均匀后在500 nm处测吸光值记作 A_0 。匀浆10 min后重复上述操作, 测得的吸光值记作 A_{10} , 用0.1% SDS溶液作对照。肌原纤维蛋白的乳化活力EAI (m^2/g)和乳化稳定性ESI (%)分别由下面公式计算:

$$EAI(\text{m}^2/\text{g}) = \frac{2 \times 2.303}{C \times (1 - \phi) \times 10^4} \times A_0 \times N$$

$$ESI(\%) = \frac{A_{10}}{A_0} \times 100$$

式中: ϕ 为油相体积分数 (V/V) ($\phi=0.2$); C 为蛋白浓度; N 为稀释倍数; A_0 、 A_{10} 为乳状液在0 min、10 min的吸光值。

1.4 数据统计分析方法

本实验除电泳实验, 均为3次独立的重复试验。数据分析及作图采用SPSS 17.0和Origin 9.0软件, Duncan多重比较检验法进行显著性分析 ($p<0.05$)。

2 结果与分析

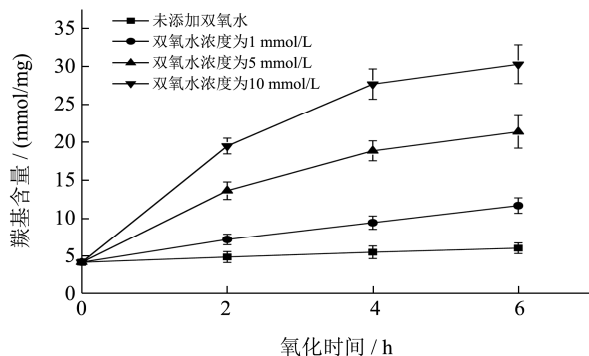


图1 羟自由基氧化体系对海鲈鱼MPI羰基含量的影响

Fig.1 Effect of hydroxyl radical oxidation on carbonyl group content of sea bass MPI

2.1 羟自由基对肌原纤维蛋白羰基含量的影响

蛋白质羰基化是蛋白发生氧化的一个显著性标志, 可以用蛋白中羰基含量衡量肉制品中蛋白氧化的程度。蛋白骨架侧链上带有NH-或NH₂-容易与·OH发生反应, 转化为羰基基团。

由图1可知, 随氧化时间的延长和氧化剂浓度的增加, 海鲈鱼MPI的羰基含量增加, 海鲈鱼MPI在1、5、10 mmol/L H₂O₂浓度下氧化6 h后, 羰基含量较对照组分别增加了0.87、2.56、4.06倍。在1 mmol/L H₂O₂浓度下羰基含量一直处于显著增加趋势 ($p<0.05$), 当H₂O₂浓度超过5 mmol/L时, 在4 h内羰基含量一直处于呈明显增加趋势 ($p<0.05$), 4 h后羰基含量增加趋势减缓 ($p>0.05$)。蛋白质的羰基主要通过氨基酸侧链的直接氧化、肽骨架的断裂、还原糖反应以及结合非蛋白羰基化合物产生; 另外通过电子转移、加成和脱氢等方式使脂肪族氨基酸侧链基团转化成为烷氧自由基 (RO·), 并可以直接分解为羰基化合物, 导致蛋白质肽链断裂, 也可经过分子重排直接形成羰基化合物^[13]。在高浓度氧化剂下生成的大量羰基基团会加速与亲核物质 (如NH₂-) 的反应, 生成希夫碱, 促进蛋白质的聚合作用, 使得氧化后期羰基含量的增加速度逐渐减缓^[14]。

2.2 羟自由基对肌原纤维蛋白总巯基和活性巯基的影响

半胱氨酸是对氧化修饰最敏感的氨基酸之一, 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。巯基有较强的亲核性和还原性, 容易发生氧化, 蛋白质中巯基 (-SH) 经过氧化会生成二硫键 (-S-S-), 并且在高浓度氧化剂存在下还会生成亚砷等氧化产物, 蛋白质中巯基含量常作为蛋白氧化程度的一个重要指标^[15]。

海鲈鱼MPI巯基含量的变化如图2所示, 与对照组相比海鲈鱼MPI在不同浓度氧化剂下随氧化时间的延长, 总巯基的含量下降。这与李艳青等^[16]的研究结果一致。由图2b可知, 在1 mmol/L H₂O₂浓度下氧化2~6 h海鲈鱼MPI中活性巯基的含量下降最明显, 在5 mmol/L和10 mmol/L H₂O₂浓度下0~4 h下降最明显, 4 h后活性巯基的含量较对照组相比分别下降了51.93%和65.88%。氧化时间相同条件下, 巯基含量随氧化剂浓度的增加而降低, 这说明海鲈鱼巯基含量对

氧化剂浓度的变化非常敏感。

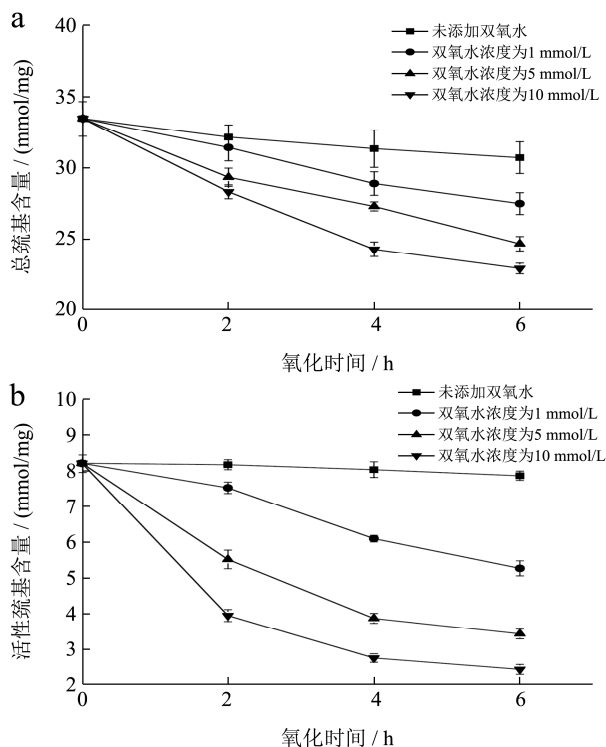


图2 羟自由基氧化体系对海鲈鱼 MPI 巯基含量的影响

Fig.2 Effect of hydroxyl radical oxidation on sulfhydryl group contents of sea bass MPI

氧化过程中海鲈鱼蛋白巯基含量的下降主要是由于游离的 OH· 可以迅速将暴露在外面的巯基氧化为二硫键，而内部的巯基则需要随着进一步的氧化使蛋白质分子发生变性延伸、肽键断裂等结构变化，使蛋白内部巯基暴露进而被氧化^[17]。通常半胱氨酸中巯基会被氧化为二硫键，而在高浓度剂存在下可以进一步氧化为磺酸类或其它氧化产物。

2.3 肌原纤维蛋白二聚酪氨酸含量的变化

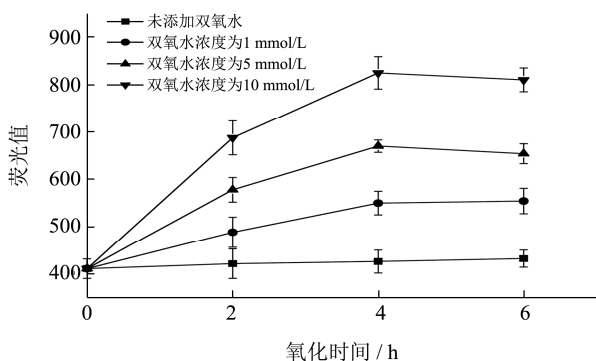


图3 羟自由基氧化体系对海鲈鱼 MPI 二聚酪氨酸含量的影响

Fig.3 Effect of hydroxyl radical oxidation on tyrosine dimer content of sea bass MPI

酪氨酸对·OH 自由基非常敏感，受到氧化攻击容易发生聚合生成二聚酪氨酸，其含量可以作为蛋白氧

化程度的一个重要指标。图3显示，对照组的二聚酪氨酸含量较少，经过6h后二聚酪氨酸含量只增加了5.13%，变化幅度较小 ($p>0.05$)。加入氧化剂后，二聚酪氨酸含量随氧化剂浓度的增加和氧化时间的延长而不断增加 ($p<0.05$)，在4h达到最大值，当氧化时间超过4h后 MPI 二聚酪氨酸的含量有所下降，且氧化剂浓度越高，下降幅度越大。这与李学鹏等^[18]研究六线鱼氧化得到的结论类似。

蛋白氧化引起二聚酪氨酸含量的增加，主要是因为氨基酸残基侧链受到·OH 攻击，与相邻的活性氨基酸残基产生共价交联，其中包括两个酪氨酸之间的络合作用生成二聚酪氨酸，因此造成二聚酪氨酸含量的升高^[19]。氧化时间过长引起二聚酪氨酸含量下降可能有两个原因，一是二聚酪氨酸本身发生了分子内重排，导致结构发生变化，二聚酪氨酸含量下降；二是蛋白质经过氧化会发生聚集，大量二聚酪氨酸被包埋，在离心过程中被过滤，导致可以检测出的二聚酪氨酸含量较少。

2.4 肌原纤维蛋白 UV 吸收光谱的变化

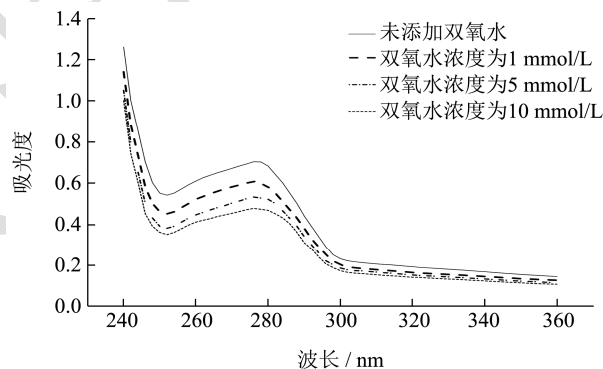


图4 羟自由基氧化体系对海鲈鱼 MPI 氧化6h后的UV吸收光谱图

Fig.4 UV spectra of the sea bass MPI after 6 h of hydroxyl radical oxidation

UV 吸收光谱可以反映肌原纤维蛋白内生色氨酸的含量，被广泛应用于评价氧化引起的蛋白结构变化。羟自由基氧化对海鲈鱼 MPI 的 UV 吸收光谱的影响如图4所示，可以看出海鲈鱼 MPI 在 220~360 nm 范围内的 UV 吸收光谱特征峰值随 H₂O₂ 浓度的增加而下降，其中在 240~300 nm 范围内更加明显。这是因为海鲈鱼 MPI 中的生色氨基酸，如色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸等与·OH 发生反应，使生色氨基酸氧化猝灭，生色氨基酸含量大量减少，导致海鲈鱼 MPI 的 UV 吸收峰值下降^[20-21]。另外，蛋白质氧化后会发生聚集使得生色氨基酸残基被包埋，也会导致吸收峰值下降；在氧化初期，包埋程度会受到氧化剂浓度的影响较大，

随氧化时间的延长, 包埋的效率会逐渐降低^[18]。

2.5 SDS-PAGE 凝胶电泳图谱

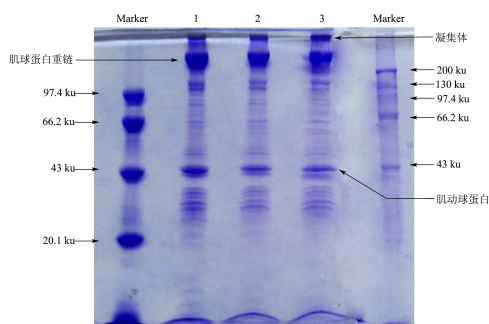


图5 羟自由基氧化体系中海鲈鱼 MPI 氧化 6 h 的 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig.5 SDS-PAGE pattern of sea bass MPI subjected to hydroxyl radical oxidation for 3 h

注: 1~3, H₂O₂ 浓度分别为 1、5、10 mmol/L。

蛋白经过氧化后, 会产生一些高分子质量的聚集

表 1 羟自由基氧化体系对海鲈鱼 MPI 平均粒径的影响

Table 1 Effect of hydroxyl radical oxidation on average particle size in sea bass MPI

氧化时间/h	平均粒径/nm			
	H ₂ O ₂ 浓度 0 mmol/L	H ₂ O ₂ 浓度 1 mmol/L	H ₂ O ₂ 浓度 5 mmol/L	H ₂ O ₂ 浓度 10 mmol/L
0	220.17±1.06 ^b	220.17±1.06 ^d	220.17±1.06 ^c	220.17±1.06 ^c
2	222.54±1.12 ^{ab}	248.47±3.24 ^c	286.54±6.65 ^b	320.78±5.41 ^b
4	223.79±1.47 ^a	272.68±5.67 ^b	330.91±4.17 ^a	385.78±4.73 ^a
6	224.54±1.12 ^a	287.36±3.74 ^a	336.79±4.70 ^a	390.47±4.54 ^a

注: 不同字母间表示同一浓度氧化剂的差异显著 (a=0.05)。

蛋白质粒径大小与蛋白质水合性质有密切联系, 直接影响着鱼肉蛋白的加工特性, 蛋白质氧化后最显著的表现蛋白质分子粒径变大。由表 1 可以看出, 经过氧化后海鲈鱼 MPI 平均粒径会增大, 且相同氧化时间不同氧化剂浓度之间蛋白质平均粒径差异性显著 ($p<0.05$)。对照组的蛋白质平均粒径变化幅度较小, H₂O₂ 浓度达到 1 mmol/L 时, 蛋白质平均粒径随氧化时间的延长显著增大 ($p<0.05$), H₂O₂ 浓度在 5 mmol/L、10 mmol/L 时, 氧化 4 h 后蛋白质平均粒径较对照组相比分别增加了 47.87%和 72.38%, 且蛋白质平均粒径的增加主要集中在前 4 h ($p<0.05$), 这与前面得到的羰基的变化趋势相似。

海鲈鱼 MPI 经过氧化后蛋白结构改变, 疏水基团大量暴露使疏水相互作用发生变化, 分子内发生交联和聚集, 导致蛋白质平均粒径的变化^[24]。在高浓度氧化剂条件下, 分子内二硫键和二聚酪氨酸等大量生成, 导致大量高分子量凝聚体形成, 蛋白质分子平均粒径明显增大, 经过一段氧化时间后蛋白质内部的交联和聚集大大减少, 同时蛋白质还会发生不同程度的降解,

堆积在分离胶的顶部。由图可以看出, 在凝胶顶部存在一些条带, 其分子质量超过了 200 ku, 且不同氧化剂浓度的凝胶顶部蛋白条带强度不同, 氧化剂浓度越高, 其顶部条带强度越强, 但肌球蛋白重链条带的强度变弱了, 43 ku 附近的肌动球蛋白条带强度也有减弱趋势, 这可能是由于肌球蛋白重链比肌球蛋白更容易氧化, 且氧化后分子凝集变大, 不能通过凝胶网络, 导致在凝胶顶层凝集, 使得凝胶顶层条带强度增强, 肌球蛋白重链及肌动球蛋白条带强度减弱。这与李学鹏等^[22]对大黄鱼进行氧化所得的结果一致。这些高分子质量聚集体可能主要是二硫键的交联形成, 其次还有二聚酪氨酸的交联和蛋白质自由基之间的聚集等原因引起^[23]。

2.6 羟自由基对肌原纤维蛋白平均粒径的影响

导致蛋白质分子平均粒径变化不大^[25]。

2.7 羟自由基对肌原纤维蛋白表面疏水性的影响

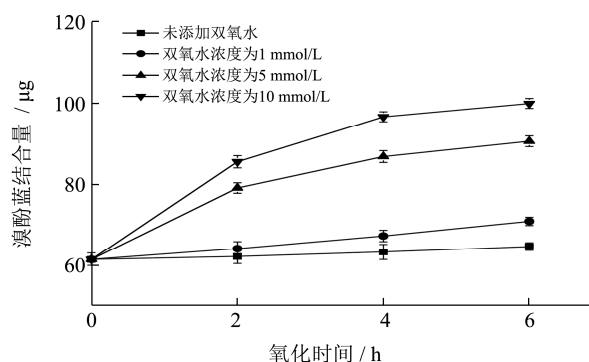


图6 羟自由基氧化体系对海鲈鱼 MPI 表面疏水性的影响

Fig.6 Effect of hydroxyl radical oxidation on surface hydrophobicity of sea bass MPI

蛋白质表面疏水性可以反映出蛋白质表面疏水性氨基酸的相对含量, 可以用来衡量蛋白质变性程度,

是影响蛋白质理化性质和功能特性的一项重要指标，也是蛋白促进分子间交联能力的一个指标^[26]。由图 6 看出，与对照组相比海鲈鱼 MPI 的表面疏水性随着 H₂O₂ 浓度的增加和氧化时间的延长显著增加 ($p < 0.05$)，且不同氧化剂浓度之间的表面疏水性差异性显著。在整个氧化期间，氨基酸侧链被氧化，蛋白质内部结构逐渐被破坏，氧化时间越长，蛋白分子内部集团暴露越多，蛋白的表面疏水性大大增加。李艳青等^[16]认为在氧化体系中蛋白构象发生变化，蛋白质解折叠，蛋白内部一些疏水性的脂肪族与芳香族氨基酸侧链基团暴露，促进了蛋白折叠的发生，导致了疏水值的增加。

2.8 羟自由基对肌原纤维蛋白乳化活性 (EAI)

和乳化稳定性 (ESI) 的影响

蛋白质乳化性质的评价指标一般用乳化活性指数 (EAI) 和乳化稳定性指数 (ESI)。它们可以反映蛋白质帮助形成乳化体系及其稳定乳化体系的能力大小。氧化对肌原纤维蛋白乳化活性和乳化稳定性的影响如图 7 所示。可以看出，在氧化过程中，蛋白的乳化活性和乳化稳定性呈相似的下落趋势，氧化剂浓度越高，下降趋势越明显，且不同氧化剂浓度之间差异性显著。在 H₂O₂ 浓度为 1 mmol/L 的氧化条件下，蛋白乳化活力和乳化稳定性一直处于显著下降趋势 ($p < 0.05$)。当 H₂O₂ 浓度超过 5 mmol/L，氧化时间超过 4 h 后，蛋白乳化活力和乳化稳定性下降速度减缓 ($p > 0.05$)，这与前面得出的羰基含量和活性巯基含量的变化趋势一致。

蛋白乳化活力和乳化稳定性的下降说明氧化破坏了蛋白结构的完整性，蛋白发生变性，导致较大的蛋白聚集体产生，蛋白不能再形成稳定的界膜，蛋白与

脂肪交联的能力下降，从而使其乳化性及乳化稳定性下降^[27]。田童童等^[28]认为氧化剂的加入破坏了蛋白质在界面吸附的功能结构，造成蛋白质于界面的作用力减弱，降低了蛋白膜的粘度，从而导致蛋白溶液稳定性的下降。在高氧化剂浓度下，氧化时间超过 4 h 后，蛋白变性速度减缓，蛋白聚集体的含量变化较小，所以蛋白乳化活力和乳化稳定性变化不明显。

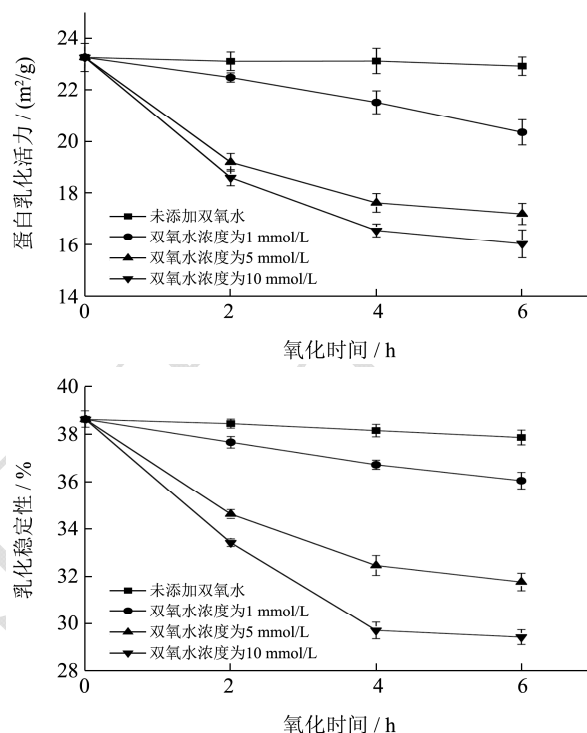


图 7 羟自由基氧化对海鲈鱼 MPI EAI 和 ESI 的影响

Fig.7 Effect of hydroxyl radical oxidation on EAI and ESI of sea bass MPI

2.9 不同浓度氧化剂条件下各指标之间的相关性分析

表 2 1 mmol/L H₂O₂ 浓度的氧化条件下各指标之间的皮尔逊相关系数

Table 2 Pearson correlation coefficients among different indicators under an oxidizing condition of 1 mM H₂O₂

	羰基含量	总巯基含量	活性巯基含量	二聚酪氨酸	表面疏水性	乳化活性	乳化稳定性
羰基含量							
总巯基含量	-0.994**						
活性巯基含量	-0.982*	0.994**					
二聚酪氨酸	0.962*	-0.969*	-0.939				
表面疏水性	0.990**	-0.988*	-0.991**	0.923			
乳化活性	-0.987*	0.984*	0.990*	-0.914	-0.999**		
乳化稳定性	-0.998**	0.999**	0.989*	-0.969*	-0.990*	0.986*	

注: **在 0.01 水平 (双侧) 上显著相关; *在 0.05 水平 (双侧) 上显著相关, 下同。

表3 5mmol/L H₂O₂浓度的氧化条件下各指标之间的皮尔逊相关系数Table 3 Pearson correlation coefficients among different indicators under an oxidizing condition of 5 mM H₂O₂

	羰基含量	总巯基含量	活性巯基含量	二聚酪氨酸	表面疏水性	乳化活性	乳化稳定性
羰基含量							
总巯基含量	-0.987*						
活性巯基含量	-0.999**	0.977*					
二聚酪氨酸	0.979*	-0.933	-0.987*				
表面疏水性	0.998**	-0.980*	-0.998**	0.985*			
乳化活性	-0.991**	0.963*	0.994**	-0.992**	-0.997**		
乳化稳定性	-0.999**	0.978*	0.999**	-0.988*	-0.999**	0.996**	

表4 10 mmol/L H₂O₂浓度的氧化条件下各指标之间的皮尔逊相关系数Table 4 Pearson correlation coefficients among different indicators under an oxidizing condition of 1 mM H₂O₂

	羰基含量	总巯基含量	活性巯基含量	二聚酪氨酸	表面疏水性	乳化活性	乳化稳定性
羰基含量							
总巯基含量	-0.995**						
活性巯基含量	-0.988*	0.967*					
二聚酪氨酸	0.990*	-0.975*	-0.993**				
表面疏水性	0.999**	-0.990*	-0.994**	0.994**			
乳化活性	-0.998**	0.987*	0.996**	-0.995**	-0.999**		
乳化稳定性	-0.997**	0.994**	0.981*	-0.992**	-0.995**	0.994**	

由表2~4可以看出,除二聚酪氨酸含量指标外,各指标之间都有着显著相关性($p<0.05$),有些指标之间呈极显著的相关性($p<0.01$)。氧化剂浓度在1 mmol/L浓度下,二聚酪氨酸含量与活性巯基含量、表面疏水性和乳化活性之间没有显著相关性($p>0.05$);当氧化剂浓度达到5 mmol/L时,二聚酪氨酸与总巯基含量之间没有显著相关性($p>0.05$);当氧化剂浓度达到10 mmol/L时,二聚酪氨酸与所有指标之间都有着显著相关性($p<0.05$)。由此看见,经氧化后的肌原纤维蛋白各指标的变化是相互联系的。

3 结论

海鲈鱼MPI经羟自由基氧化后,其结构和功能都发生显著变化,具体表现在随着氧化时间的延长和氧化剂浓度的增加,羰基含量和表面疏水性增加,二聚酪氨酸先增加后减少,总巯基含量下降,一些生色氨基酸大量减少。在高浓度氧化剂条件下氧化前期海鲈鱼MPI平均粒径显著变大,活性巯基含量、乳化活性和乳化稳定性显著下降,氧化后期变化不明显。经氧化后海鲈鱼MPI的SDS-PAGE电泳图谱变化明显,氧化后MPI发生交联和聚集,生成大量高分子凝集体,肌球蛋白重链比肌动球蛋白更容易氧化交联。蛋白结构和功能性的改变会严重影响鱼类制品的品质特性、营养价值和加工性能,所以在鱼类制品的加工、贮藏和运输过程中尽量避免被氧化。

参考文献

- [1] 李学鹏,王祺,周凯,等.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[J].现代食品科技,2014,30(10): 1-7
LI Xue-peng, WANG Qi, ZHOU Kai, et al. Effects of acrolein oxidation on muscle structure and myofibrillar protein structural properties in large yellow croaker (*pseudosciaena crocea*) [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(10): 1-7
- [2] 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
- [3] Stadtman E R, Levine R L. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in Proteins [J]. Amino Acids, 2003, 25(3-4): 207-218
- [4] 姜晴晴,鲁珺,胡玥,等.羟基自由基氧化体系对带鱼蛋白理化性质的影响[J].现代食品科技,2015,5:116-123
JIANG Qing-qing, LU Jun, HU Yue, et al. Effect of a hydroxyl radical-generating system on the characteristics of proteins from hairtail (*trichiurus haumela*) [J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 5: 116-123
- [5] 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
- [6] Lefevre F, Fauconneau B, Thompson J W, et al. Thermal denaturation and aggregation properties of Atlantic salmon myofibrils and myosin from white and red muscles [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(12): 4761-4770
- [7] 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
- [8] Yongsawatdigul J, Park J W. Thermal denaturation and aggregation of threadfin bream actomyosin [J]. Food Chemistry, 2003, 83(3): 409-416
- [9] 孙妍,孔保华,刘骞.羟基自由基氧化体系对乳清蛋白、 β -乳球蛋白化学结构的影响[J].食品科学,2009,30(11):17-21
SUN Yan, KONG Bao-hua, LIU Qian. Effect of hydroxyl radical oxidation system on alterations of chemical structure of whey protein isolate and β -lactoglobulin [J]. Food Science, 2009, 30(11): 17-21
- [10] 李银.蛋白氧化对肌肉保水性的影响机制研究[D].北京:中国农业科学院,2014
LI Yin. Effect-mechanism of protein oxidation on water-holding capacity of muscle [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2014
- [11] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227(5259): 680-685
- [12] Chelh I, Gatellier P, Santé-Lhoutellier V. Technical note: A simplified procedure for myofibril hydrophobicity determination [J]. Meat Science, 2006, 74(4): 681-683
- [13] Höhn A, König J, Grune T. Protein oxidation in aging and the removal of oxidized proteins [J]. Journal of Proteomics, 2013, 92: 132-159
- [14] Estévez M. Protein carbonyls in meat systems: a review [J]. Meat Science, 2011, 89: 259-79
- [15] Stadtman E R, Levine R L. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in Proteins [J]. Amino Acids, 2003, 25(3-4): 207-218
- [16] 李艳青,孔保华,杨赫鸿,等.自由基氧化引起鲤鱼肌原纤维蛋白结构的变化[J].食品科学,2012:70-74
LI Yan-qing, KONG Bao-hua, YANG He-hong, et al. Structural changes of common carp myofibrillar (MPI) influenced by hydroxyl radical system [J]. Food Science, 2012: 70-74
- [17] Liu Z, Xiong Y L, Chen J. Protein oxidation enhances hydration but suppresses water-holding capacity in porcine longissimus muscle [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2010, 58(19):10697-10704
- [18] 李学鹏,周凯,王金厢,等.羟基自由基对六线鱼肌原纤维蛋白的氧化规律[J].中国食品学报,2014,14:19-27
LI Xue-peng, ZHOU Kai, WANG Jin-xiang, et al. Effects of hydroxyl radical oxidation system on myofibrillar protein structure and properties in hexagrammos otakii [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2014, 14: 19-27
- [19] 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(5-6): 863-870
- [20] Bian C, Xiong H, Zhang X, et al. Electrochemical detection of BSA damage induced by Fenton reagents in room temperature ionic liquid [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2012, 169: 368-373
- [21] Utrera M, Estévez M. Analysis of tryptophan oxidation by fluorescence spectroscopy: Effect of metal-catalyzed oxidation and selected phenolic compounds [J]. Food Chemistry, 2012, 135(1): 88-93
- [22] 李学鹏,周凯,周明言,等.自由基氧化对大黄鱼肌原纤维蛋白交联和聚集的影响[J].中国食品学报,2015,4:13-21
LI Xue-peng, ZHOU Kai, ZHOU Ming-yan, et al. Effects of radical oxidation on the cross-linking pattern of myofibrillar protein in large yellow croaker (*pseudosciaena crocea*) [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2015, 4: 13-21
- [23] Ooizumi T, Xiong Y L. Biochemical susceptibility of myosin in chicken myofibrils subjected to hydroxyl radical oxidizing systems [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(13): 4303-4307
- [24] Promeprat A, Gatellier P, Lebret B, et al. Evaluation of protein aggregation in cooked meat [J]. Food Chemistry, 2010, 121(2): 412-417
- [25] 孙为正.广式腊肠加工过程中脂质水解,蛋白质降解及风味成分变化研究[D].广州:华南理工大学,2011
SUN Wei-zheng. Studies on lipolysis, proteolysis and flavor compounds during processing of Cantonese sausage [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2011
- [26] Wang J, Zhao M, Yang X, et al. Improvement on functional properties of wheat gluten by enzymatic hydrolysis and ultrafiltration [J]. Journal of Cereal Science, 2006, 44(1): 93-100

- [27] 李艳青.蛋白质氧化对鲤鱼蛋白结构和功能性的影响及其控制技术[D].哈尔滨:东北农业大学,2013
LI Yan-qing. Protein oxidation-induced structure and function changes of common carp (*cyprinus carpio*) protein and its control technology [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2013
- [28] 田童童,巩子路,朱新荣,等.蛋白质氧化对乳清分离蛋白功能性质的影响[J].现代食品科技,2014,30(7):110-116
TIAN Tong-tong, GONG Zi-Lu, ZHU Xin-rong, et al. Effect of protein oxidation on functional properties of whey protein isolates [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(7): 110-116

现代食品科技