

不同 pH 值下草鱼血红蛋白稳定性 以及促氧化能力的比较

于五美^{1,2}, 朱惠², 刘友明^{2*}, 熊善柏²

(1. 浙江商业职业技术学院旅游烹饪学院, 浙江杭州 310058) (2. 华中农业大学食品科学技术学院, 国家大宗淡水鱼加工技术研发分中心(武汉), 湖北武汉 430070)

摘要: 以草鱼血红蛋白(Grass Carp Hemoglobin, GCH)为对象, 研究在 pH 值 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 环境中, GCH 稳定性以及对脂肪氧化和蛋白质氧化的影响。在 pH 值为 6.0 和 6.5 时, 氧合血红蛋白(OxygenatedHb, OxyHb)含量减少, 相对氧合率在 96 h 时分别降低 30% 和 14%, 显著低于 pH 值 7.0~8.0 环境 ($P<0.05$), 而高铁血红蛋白(MetHemoglobin, MetHb)生成量在 72 h 时分别达到 4.92 $\mu\text{mol/L}$ (6 $\mu\text{mol/L}$) 和 4.3 $\mu\text{mol/L}$ (6 $\mu\text{mol/L}$), 显著高于中性与碱性环境 ($P<0.05$), 酸性环境中血红蛋白的氧气结合能力减弱更易自动氧化为 MetHb。在酸性环境中, GCH 组 POV 最大值分别达到 16.1 $\mu\text{mol/Kg}$ 和 16.2 $\mu\text{mol/Kg}$, TBARs 最大值分别达到 4.9 mgMAD/Kg 和 4.5 mgMAD/Kg, 显著高于中性与碱性环境 ($P<0.05$)。在酸性环境中, GCH 组总巯基含量低于碱性环境, 而 GCH 组羰基和二聚酪氨酸含量高于碱性环境和空白组, 酸性环境中 GCH 加速了蛋白质氧化, 结果表明, 在酸性环境中 GCH 自动氧化生成 MetHb 是加速鱼肉中的脂肪和蛋白质氧化的关键, 而碱性环境中血红蛋白介导的脂肪和蛋白质氧化被抑制, 提高鱼肉加工环境的 pH 值, 对鱼类产品的保鲜贮藏有一定的促进作用。

关键词: pH 值; 草鱼血红蛋白; 自动氧化; 脂肪氧化; 蛋白质氧化

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.9.1038

Characteristics of Hemoglobin and Its Mediated Oxidation in Washed Mince from Grass Carp (*Ctenopharyngodon Idella*) as Affected by Different pH

YU Wumei^{1,2}, ZHU Hui², LIU Youming^{2*}, XIONG Shanbai²

(1.School of Tourism and Culinary Arts, Zhejiang Business College, Hangzhou 310058, China)

(2.College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University/National R & D Branch Center for Conventional Freshwater Fish Processing (Wuhan), Wuhan 430070, China)

Abstract: The stability of Grass Carp Hemoglobin (GCH) and its impact on lipid oxidation and protein oxidation were investigated across pH environments (pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0). With increasing storage time, in acidic environments (pH 6.0, 6.5), Oxygenated Hemoglobin (OxyHb) decreased significantly, with a 30% and 14% reduction in relative oxygenation rate at 96 hours, respectively, which was lower compared to neutral and alkaline conditions (pH 7.0~8.0). Production of MetHemoglobin (MetHb) reached 4.92 $\mu\text{mol/L}$ (6 $\mu\text{mol/L}$) and 4.3 $\mu\text{mol/L}$ (6 $\mu\text{mol/L}$) at 72 hours, significantly higher than in neutral and alkaline conditions ($P<0.05$). It was observed that hemoglobin's oxygen-binding capacity weakened in acidic environments, leading to easier auto-oxidation to MetHb. In acidic environments, the maximum POV values in the GCH group reached 16.1 $\mu\text{mol/kg}$ and 16.2 $\mu\text{mol/kg}$, and the maximum TBARs values were 4.9 mgMAD/kg and 4.5 mgMAD/kg, significantly higher than in neutral and alkaline conditions ($P<0.05$). Under acidic conditions, the total sulfhydryl content in the GCH group was found to be lower than in alkaline environments, while the carbonyl and dimerized tyrosine content was higher than in both alkaline environments and the control group. These findings indicate that protein oxidation is accelerated by GCH under acidic conditions. The results suggest that the auto-oxidation of GCH to form MetHb in acidic environments is key to accelerating lipid and protein oxidation in fish,

收稿日期: 2024-06-25; 修回日期: 2024-09-15; 接受日期: 2024-09-26

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31871835); 财政部和农业部国家现代农业产业技术体系 (CARS-45-28)

作者简介: 于五美 (1990-), 女, 硕士, 实验师, 研究方向: 农产品加工与贮藏, E-mail: yuwumei629@163.com

通讯作者: 刘友明 (1975-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 水产品加工与贮藏, E-mail: lym@mail.hzau.edu.cn

whereas hemoglobin-mediated lipid and protein oxidation is inhibited in alkaline environments. It is further suggested that increasing the pH of the fish processing environment could promote the preservation and storage of fish products.

Key words: pH value; Grass Carp Hemoglobin (GCH); autooxidation; lipid oxidation; protein oxidation

草鱼是我国四大养殖淡水鱼之一，因其独特的口感，较高的营养价值以及良好的加工适用性而常被加工为鱼糜制品、冷鲜草鱼片等^[1,2]。据统计，2022年草鱼产量为590.5万t，位居淡水鱼养殖第一^[3]。脂肪氧化是鱼肉品质下降的主要原因，而脂肪氧化次级产物与游离氨基酸反应，会加速蛋白质氧化，进而降低产品货架期^[4,5]。在鱼类产品加工过程中经过放血和清洗，可以去除50%的血液^[6]，残留的血红蛋白是脂肪氧化的有效催化剂。自动氧化是血红蛋白加速脂肪氧化的关键步骤，血红蛋白通过自动氧化生成高铁血红蛋白（MetHemoglobin, MetHb）、超氧阴离子自由基和ferry/Hb(Hb-Fe⁴⁺)自由基，并通过裂解脂质氢过氧化物或者直接攻击不饱和脂肪酸分子进而加速脂肪氧化^[7,8]。

目前关于抑制血红蛋白在鱼类加工过程中介导的脂肪氧化的研究主要包括添加外源抗氧化剂和改变鱼肉加工环境的pH值。有研究发现在鱼肉中添加抗坏血酸、生育酚基及迷迭香提取物等抗氧化剂可以有效延缓鱼肉脂肪氧化进程^[9,10]。Ghirmai等^[8,11]发现当pH值由6.4增加到8.0时，血红蛋白介导的脂肪氧化显著被抑制。反应体系pH值是影响血红蛋白促氧化的重要因素之一^[12]。前期我们已对白鲢血红蛋白进行了研究发现在酸性条件下白鲢血红蛋白脂肪氧化和蛋白质氧化程度显著提高，碱性环境中脂肪和蛋白质氧化被抑制^[13]。鱼类生活习性不同，其血红蛋白的自动氧化和促氧化能力也存在较大差异^[14,15]，且鱼死后其肌体pH值也存在差异。草鱼和白鲢由于生活习性和游动性以及肉质成分存在较大差异^[16,17]，其血红蛋白的自动氧化及催化能力可能存在差异。本实验将草鱼血红蛋白（Grass Carp Hemoglobin, GCH）加入到不同pH值6.0、6.5、7.0、7.5、8.0体系的鱼肉中，通过分析GCH的相对氧合率、自动氧化以及反应体系中过氧化值、硫代巴比妥酸、羰基、总巯基以及二聚酪氨酸的变化，探究pH值对GCH稳定性以及促氧化能力的影响，以期对草鱼鱼肉加工以及贮藏过程中脂肪和蛋白质的氧化控制研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

草鱼（2~3 kg/条）购于华中农业大学菜市场，活鱼放置于足够的水和氧气的装置中半小时内运输到实验室。

NaCl、H₃PO₄、NaOH、二硝基苯肼（Dinitrophenylhydrazine, DNPH）、十二烷基硫酸钠（Sodium dodecyl sulfate, SDS）、二硫二硝基苯甲酸（Dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), DTNB），国药集团化学试剂有限公司；HCl，信阳化学试剂厂；三羟甲基氨基甲烷（Tris），北京浮博生物科技有限公司；以上试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

HZ250 采肉机，厦门英博机械有限公司；BL-220H 电子天平，日本岛津公司；K600 均质均浆机，德国博朗电器有限公司；FE28 pH计，瑞士梅特勒；1750 紫外分光光度计，日本岛津公司；F-4600 荧光光度计，日本日立公司；Avanti J-26XP 冷冻离心机，美国贝克曼公司。

1.3 实验与方法

1.3.1 鱼血采集及血红蛋白提取

参考Richards等^[18]的方法，稍做修改。新鲜草鱼用钝器敲击鱼的头部使其死亡，剁尾取血，用装有5 mL质量浓度为0.03 mg/mL肝素钠溶液的50 mL烧杯收集血液，并不断搅拌以防止血液凝固。向采集的血液中加入4倍体积的含有1.7% NaCl的Tris缓冲液（1 mmol/L，pH值为8.0，4℃），混匀后用冷冻离心机于4℃，1 000 g条件下离心10 min，除去上层血浆，保留基质红细胞。用10倍体积的上述缓冲液重复上述步骤3次。然后用3倍体积的Tris缓冲液（1 mmol/L，pH值为8.0）溶解离心得到的基质红细胞，于4℃条件下静置1 h。然后加入0.1倍体积的1 mmol/L的NaCl溶液，于4℃，28 000 g下离心30 min，去除基质得到血红蛋白粗提液。将制得的血红蛋白粗提取液置于PD-10预装柱中，并用10 mmol/L的Tris（pH值8.5）的缓冲液进行重力洗脱以去除低分

子量化合物, 收集血红蛋白溶液置于-80℃冰箱保存。

1.3.2 血红蛋白浓度测定

参考 Liu 等^[19]的方法, 并作相应修改, 20 μL 血红蛋白提取液加入到 5 mL 文齐氏液(铁氰化钾、碳酸二氢钾、氰化钾和 triton X-100)中混匀, 室温下反应 5 min, 与 540 nm 条件下测定吸光度, 根据标准曲线计算血红蛋白浓度。

1.3.3 血红蛋白相对氧合率的测定

参考 Pazos 等^[20]的实验方法并稍作修改, 将血红蛋白加入到浓度为 0.05 mmol/L 不同 pH 值 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 的磷酸盐缓冲液中, 调整血红蛋白浓度为 6 μmol/L, 测定加入血红蛋白之后溶液 pH 值, 4℃贮藏。每隔 24 h 取样进行实验, 扫描波长为 300~700 nm, 用相对 pH 值的磷酸缓冲液作为空白对照。用波峰(574 nm)和波谷(560 nm)的吸收差值来计算血红蛋白相对氧合率。具体计算公式如下。

$$X = (A_{574} - A_{560}) \times 1000 \quad (1)$$

式中:

X——为血红蛋白相对氧合率, $(A_{574}-A_{560}) \times 1000$;

A_{574} ——为血红蛋白在波长 574 nm 处吸光值;

A_{560} ——为血红蛋白在波长 560 nm 处吸光值。

1.3.4 血红蛋白自动氧化的测定

参考 Maqsood 等^[21]的实验方法测定血红蛋白自动氧化率并稍作修改, 血红蛋白溶液加入在不同 pH 值 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 浓度为 20 mmol/L 的磷酸缓冲液中, 调整血红蛋白浓度为 6 μmol/L, 用相对 pH 值的磷酸缓冲液作为空白对照。记录样品在 576 nm 和 630 nm 处的吸光值, 并根据 Iglesias 等^[22]的公式估算出以 μmol/L 为单位(以血红蛋白为基础)的 MetHb 浓度。

$$Y = \left(\frac{279A_{630} - 3A_{576}}{4} \right) \quad (2)$$

式中:

Y——为 MetHb 的摩尔浓度, μmol/L;

A_{630} ——为血红蛋白在波长 630 nm 处吸光值;

A_{576} ——为血红蛋白在波长 576 nm 处吸光值。

1.3.5 洗净草鱼肉碎模拟系统的制备

新鲜草鱼去鳞、去头、去内脏后, 采肉, 用冰水漂洗鱼肉(冰水和鱼肉质量比为 4:1), 并置于离心机中 2 000 g 离心 4 min 除去水分, 重复 4 次。在第 5 次漂洗时需添加水质量的 0.5% 的 NaCl 进行漂洗并离心。离心所得的沉淀物与浓度为 40 mmol/L 的磷酸缓冲液(pH=6)以 1:1 (m/V) 进行混合, 并用均质机在 13 000 r/min 转速下均质 2 min。将所得鱼肉用 pH 值 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 的 40 mmol/L 的磷酸缓冲液进行漂洗, 先静止 3 min, 然后 10 000 g, 4℃条件下进行离心, 漂洗重复进行 3 次。最后用浓度为 1 mmol/L 的 HCl 和 1 mmol/L 的 NaOH 调整鱼肉 pH 值至为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0。

1.3.6 血红蛋白的添加

向 500 g 上文制备好的鱼肉中加入血红蛋白使其最终浓度为 10 μmol/kg, 加入 0.2 mg/kg 的硫酸链霉素以并调整鱼肉水分含量至 78%以抑制贮藏期间微生物的生长。用斩拌器将鱼肉和血红蛋白进行混合, 使血红蛋白与鱼肉混合均匀。所得样品一式三份, 装入聚乙烯塑料袋中密封保存, 4℃贮藏以备使用, 在贮藏期间定期检查样品的 pH 值。

1.3.7 脂肪氧化的测定

1.3.7.1 过氧化值(POV)测定

采用氯仿-甲醇法测定样品 POV 值^[23]。取 0.5 g 样品于 50 mL 聚丙烯离心管中, 加入 10 mL 甲醇-氯仿混合液(体积比 1:1), 均质后加入 3 mL 3%的氯化钠溶液, 盖好盖子, 震荡 15 s, 于 2 000 g 离心 20 min。离心后用移液管移取下层氯仿 2.5 mL 于 10 mL 聚丙烯离心管内, 加入甲醇氯仿混合液 2.5 mL, 加入 25 μL 的 3.94 mol/L 的硫

氨酸铵溶液和 25 μL 的 0.02 mol/L 的氯化亚铁溶液 (含 3.5% 的 HCl), 混匀后静置 20 min, 测其 500 nm 处的吸光值。标准曲线用过氧化氢异丙苯标准液确定 (0~10 mg/L)。

1.3.7.2 硫代巴比妥酸 (TBARs) 测定

硫代巴比妥酸值 (TBARs) 的测定参考 Javed 等^[13]的方法, 准确称取 0.4 g 样品, 置于 25 mL 具塞试管内, 加入 17 mL 三氯乙酸混合液, 混匀, 振摇, 加入 3 mL TBA 溶液。沸水浴内保温 30 min, 取出, 冷却 1 h, 取 5 mL 清液移入离心管内, 加入 5 mL 氯仿, 在 3 600 g 条件下离心 20 min, 吸出上清液于 532 nm 波长比色, 由吸光度对照标准曲线方程, 计算鱼肉 TBA 值。

1.3.8 蛋白质氧化的测定

1.3.8.1 总巯基含量的测定

参考蒋伟人等^[5]的方法。测定总巯基含量时, 向 1 mL 的肌原纤维蛋白溶液 (2~4 mg/mL) 中加入 9 mL 0.02 mol/L Tris-HCl 缓冲溶液 (含 8 mol/L 尿素、2% SDS、10 mmol/L EDTA、pH 值为 6.8) 和 1 mL Ellman 试剂混合均匀, 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 25 min, 测其在 412 nm 处的吸光值。

1.3.8.2 羰基含量的测定

参考 He 等^[24]的方法, 分别取 2 mL 蛋白质溶液于 2 个离心管, 各加 1 mL 20% 三氯乙酸 (TCA) (m/V) 沉淀蛋白, 其中一份加 2 mL 2 mol/L HCl, 另一份加 2 mL 含 0.2% DNPH 的 2 mol/L HCl, 分别置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 水浴保温 30 min, 每 5 分钟涡旋均匀, 之后 10 000 g 离心 15 min, 弃上清, 得到的沉淀用乙醇和乙酸乙酯的混合物洗涤, 直到溶剂中橙色消失, 混合物在 10 000 g 离心 15 min, 离心后的沉淀用 2 mL, 6 mol/L HCl (pH 值为 6.5) 溶解, 沸水浴 10 min, 混合物 10 000 g 离心 10 min 除去不溶物质, 在 370 nm 处测吸光值。以消光系数为 22 000 $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ 计算每克蛋白质羰基衍生物的微摩尔数。

1.3.8.3 二聚酪氨酸含量的测定

二聚酪氨酸含量测定参考 Ma 等^[25]的方法, 二聚酪氨酸含量利用荧光分光光度计测定, 发射波长选择 420 nm, 激发波长选择 325 nm, 狭缝宽度均为 10 nm。最终的二聚酪氨酸含量利用所测定的吸光值除以蛋白浓度获得, 为相对荧光值, 单位为 A.U. (arbitrary units)。

1.4 数据分析

本文实验数据均为 3 次重复实验的平均值, 采用 Excel 对数据进行处理, 并用 Origin 2024 进行绘图, 数据以平均值 $\pm$ 标准差 (SD) 表示。运用 SAS 8.0 软件进行显著性分析, 显著性水平设定为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 pH 值对草鱼血红蛋白相对氧合率的影响

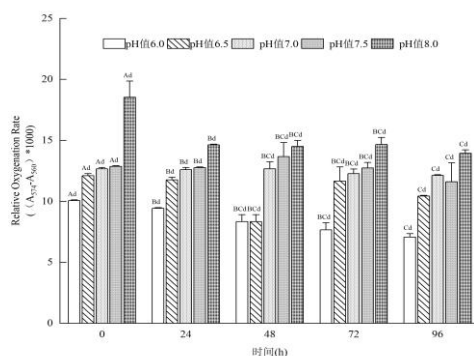


图 1 pH 对 GCH 相对氧合能力的影响

Fig.1 Effect of pH on the relative oxygenation rate of Grass Carp Hemoglobin

注: 大写字母表示时间之间的差异 ($P < 0.05$), 小写字母代表 pH 值之间的差异 ($P < 0.05$)。

如图 1 所示, 在酸性环境 (pH 值为 6.0 和 6.5) 中, GCH 的相对氧合率显著低于碱性环境 ($P < 0.05$)。在酸

性环境中 GCH 相对氧合率随贮藏时间延长显著降低 ($P<0.05$)，贮藏时间从 0 h 至 96 h 相对氧合率分别降低 30% 和 14%。相对氧合率的降低可能是由于 GCH 在酸性环境中与氧气的亲和力降低导致。 H^+ 能够促使血红蛋白分子中 α 链和 β 链之间形成盐桥，有助于血红蛋白脱氧构象的稳定，从而降低血红蛋白与 O_2 的结合能力^[26]。刘培培等^[27]在对 pH 对血红蛋白的影响的研究中也发现，随 pH 值降低，OxyHb 在其特征吸收峰峰强逐渐减弱，血红蛋白的氧气亲和力逐渐越低。

2.2 pH 值对草鱼血红蛋白自动氧化的影响

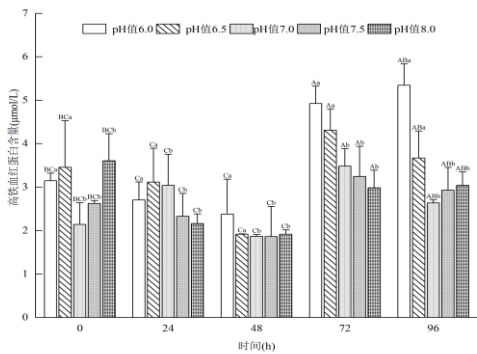


图 2 pH 值对 GCH 自动氧化能力的影响

Fig.2 Effect of pH on the autoxidation of Grass Carp Hemoglobin

注：大写字母表示时间之间的差异 ($P<0.05$)，小写字母代表 pH 值之间的差异 ($P<0.05$)。

血红蛋白自动氧化是促进脂肪氧化的关键步骤，在该过程中 OxyHb 被氧化为 MetHb，同时产生大量的超氧阴离子自由基或超氧自由基。如图 2 所示，MetHb 含量随贮藏时间延长显著增加，酸性环境中 MetHb 显著高于碱性环境 ($P<0.05$)。当贮藏时间为 72 h 时，pH 值 6.0、6.5 环境中的 MetHb 分别达到 $4.92\ \mu\text{mol/L}$ ($6\ \mu\text{mol/L}$)、 $4.3\ \mu\text{mol/L}$ ($6\ \mu\text{mol/L}$)，超过 70% 的血红蛋白自动氧化为 MetHb，说明血红蛋白在酸性环境中更易发生自动氧化生成 MetHb，在对鳟鱼血红蛋白的研究中发现当环境 pH 值由 7.0 降低为 6.0 时，MetHb 形成增加^[28]。在前期对白鲢血红蛋白自动氧化的研究中发现在酸性环境中，当贮藏 72 h 时，MetHb 分别达到 $4.22\ \mu\text{mol/L}$ ($6\ \mu\text{mol/L}$)、 $3.7\ \mu\text{mol/L}$ ($6\ \mu\text{mol/L}$)^[13]，与白鲢血红蛋白相比，草鱼血红蛋白更易发生自动氧化。当 pH 值为酸性时，血红蛋白的氨基酸空间结构改变，使溶剂水分子更易于进入血红蛋白内部，从而促进 MetHb 的形成^[26,27]。

2.3 不同 pH 值下草鱼血红蛋白对脂肪氧化的影响

2.3.1 POV 值变化

POV 值是衡量脂肪初期氧化的重要指标，由于过氧化物不稳定，易降解为醛类或者酮类，随贮藏时间延长氧化程度加深，POV 值会呈现先上升后下降的趋势。由图 3 可知，在酸性环境中鱼肉 POV 值在贮藏前 3 天呈现显著上升 ($P<0.05$)，分别达到最大值 16.1 、 $16.2\ \mu\text{mol/Kg}$ ，然后随着贮藏时间的延长呈下降趋势，GCH 组 POV 值显著高于空白组 ($P<0.05$)。而当 pH 值 ≥ 7.0 时，POV 值在第 7 天达到最大值。在碱性环境中，POV 值达到最大值的时间比酸性环境延迟 4 天。而 GCH 组 POV 值在贮藏第 1 天后高于空白组，说明 GCH 加速了脂肪氧化。同时酸性环境下鱼肉 POV 值高于碱性环境，这是由于在酸性环境中血红蛋白快速自动氧化生成 MetHb 和大量的超氧阴离子自由基，而超氧阴离子歧化生成过氧化氢攻击脂肪酸，生成脂质氢过氧化物和脂质自由基^[7]。同时 MetHb 会加速血红素的释放，进一步诱导脂肪酸发生氧化，生成过氧化物，导致 POV 值的升高^[11,29]。在对亚洲鲈鱼、罗非鱼和石斑鱼血红蛋白促氧化能力研究中发现也有类似发现^[21]。

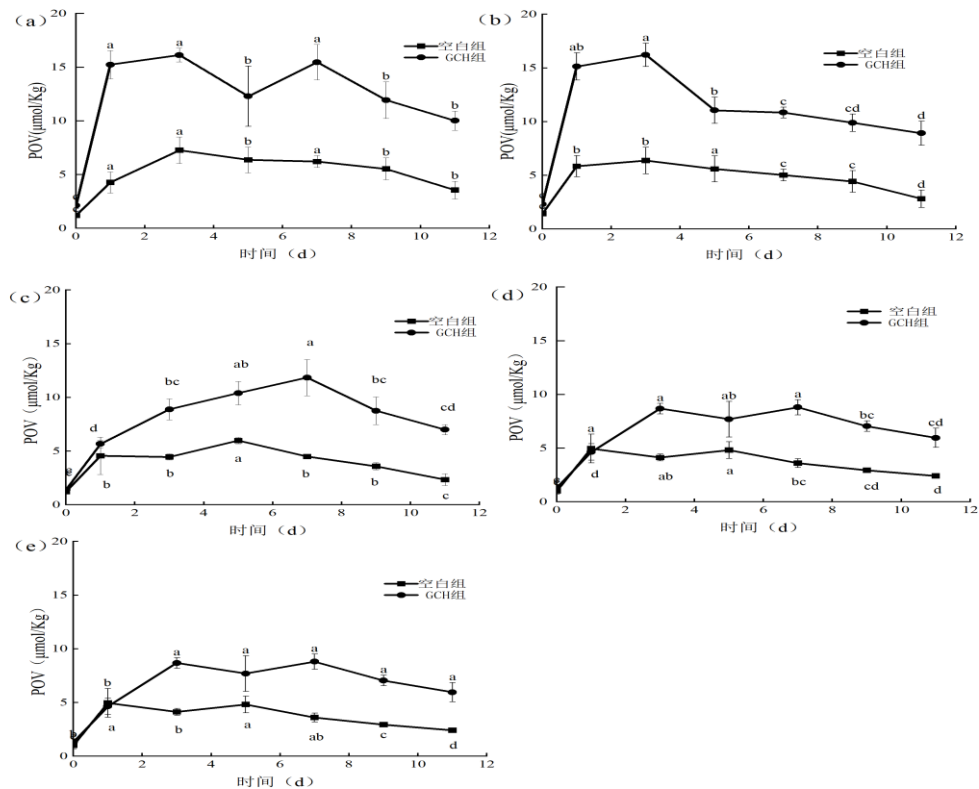


图 3 不同 pH 值下草鱼血红蛋白对鱼肉 POV 值的影响

Fig.3 Effect of GCH on the POV value of washed fish mince at different pHs value

注: (a)pH 值 6.0, (b)pH 值 6.5, (c)pH 值 7.0, (d)pH 值 7.5, (e)pH 值 8.0; 不同字母代表时间之间的差异 ($P<0.05$)。

2.3.2 TBARs 值的变化

TBARs 值是衡量脂肪氧化后期的程度的特征指标。由图 4 可知, 随贮藏时间延长, TBARs 值呈现逐渐上升的趋势。GCH 组在 pH 值为 6.0 和 6.5 时, TBARs 最大值分别达到 4.9 mgMAD/Kg、4.5 mgMAD/Kg。酸性环境中鱼肉 TBARs 值高于中性和碱性环境。由实验 2.2 结果可知, 酸性环境中血红蛋白更易自动氧化为 MetHb, 并伴随着大量的超氧阴离子自由基或超氧自由基的生成, MetHb 与超氧自由基反应, 生成 ferry/Hb(Hb-Fe^{4+})促进脂肪氧化^[11]。在对白鲢血红蛋白的研究中, 也同样发现在酸性环境中 TBARs 高于中性和碱性环境^[13]。当 pH 值 ≥ 7.0 时, GCH 组 TBARs 值在第 3 天出现下降, 然后又显著增加 ($P<0.05$), 其原因可能是脂肪氧化产生的丙二醛等脂质过氧化物在碱性环境中发生反应生成席夫碱和迈克尔加合物, 导致游离的丙二醛降低^[28], 后期随着氧化反应的进行, 脂肪的进一步氧化生成更多的丙二醛等脂质过氧化物的生成, TBARs 值又进一步增加。

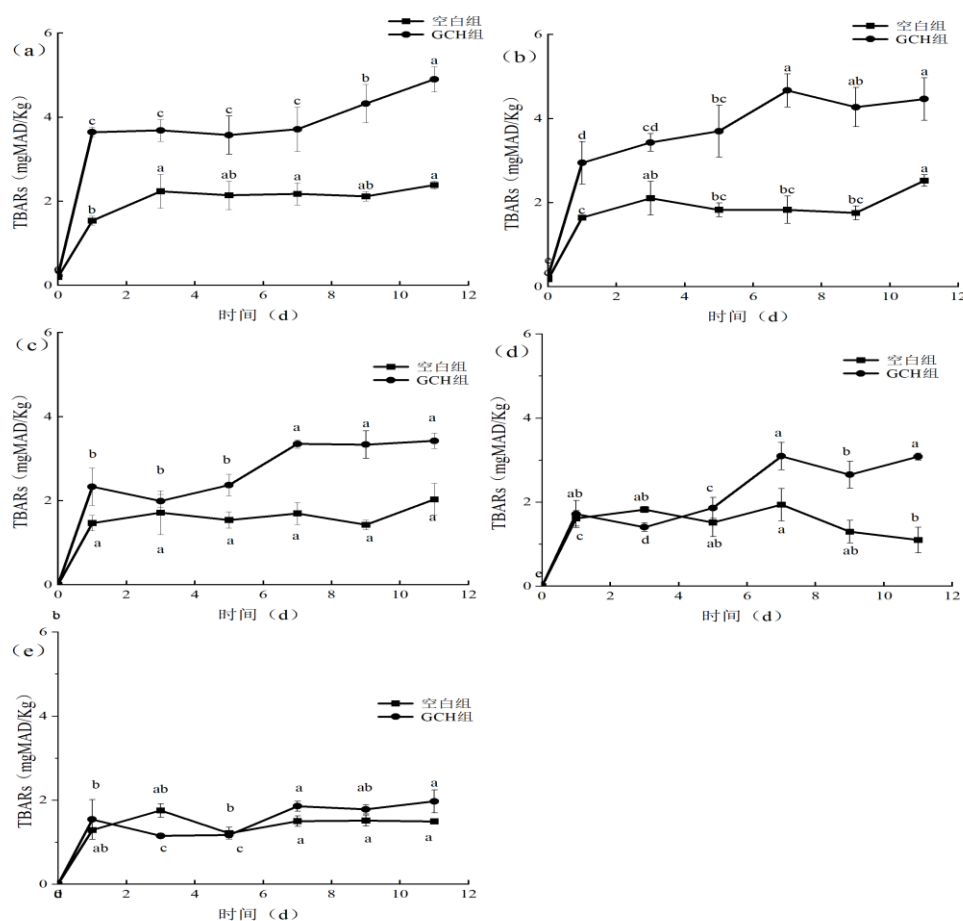


图4 不同pH值下草鱼血红蛋白对鱼肉TBARs值的影响

Fig.4 Effect of GCH on the TBARs value of washed fish mince at different pHs value

注: (a) pH值 6.0, (b) pH值 6.5, (c) pH值 7.0, (d) pH值 7.5, (e) pH值 8.0; 不同字母代表时间之间的差异 ($P < 0.05$)。

2.4 不同pH下草鱼血红蛋白对蛋白质氧化的影响

2.4.1 总巯基含量的影响

蛋白质中的半胱氨酸残基以游离巯基形式或氧化的半胱氨酸形式存在, 蛋白质被氧化时, 导致总巯基含量下降^[30]。如图5所示, 在贮藏初期, 空白组总巯基含量高于GCH组, 贮藏时间延长, 空白组和GCH组总巯基含量总体呈显著下降 ($P < 0.05$)。GCH组在酸性环境 (pH值为6.0和6.5) 中, 在第9天时, 总巯基含量分别减少2.66、2.02 $\mu\text{mol/g}$ 。巯基氧化形成二硫键是总巯基含量下降的主要原因^[31]。在酸性和碱性环境中, 在第0天时, 总巯基含量最高, 而在中性环境中, 总巯基含量在第5天最高。这可能是由于在酸性和碱性环境中蛋白结构容易由 α -螺旋转化为无规则卷曲, 蛋白结构伸展, 巯基暴露。而在中性环境时, 蛋白结构随贮藏时间的延长其结构缓慢舒展, 部分巯基逐渐暴露并被氧化。空白组在pH值8.0时, 总巯基含量在贮藏第3天出现显著下降 ($P < 0.05$), 然后随着贮藏时间的延长呈现先上升后下降的趋势。原因可能是在高pH值下, 巯基更容易发生氧化反应, 生成二硫键。另外, 在碱性环境中胱氨酸和半胱氨酸残基发生降解生成硫化氢和脱氢丙氨酸, 导致总巯基含量的下降^[32]。随着贮藏时间的延长, 蛋白质结构进一步舒展, 更多巯基暴露, 巯基呈现短暂的上升之后又下降, 在用碱性溶液处理的鲤鱼鱼糜的贮藏实验中, 也有同样发现^[33]。空白组和GCH组对比可知, 在贮藏前7天GCH组总巯基含量低于空白组, 此结果与实验2.3.2脂肪氧化TBARs结果趋势一致, 在酸性环境中, 蛋白质巯基更易暴露且与脂肪氧化次级产物反应, 造成总巯基含量的下降^[34]。

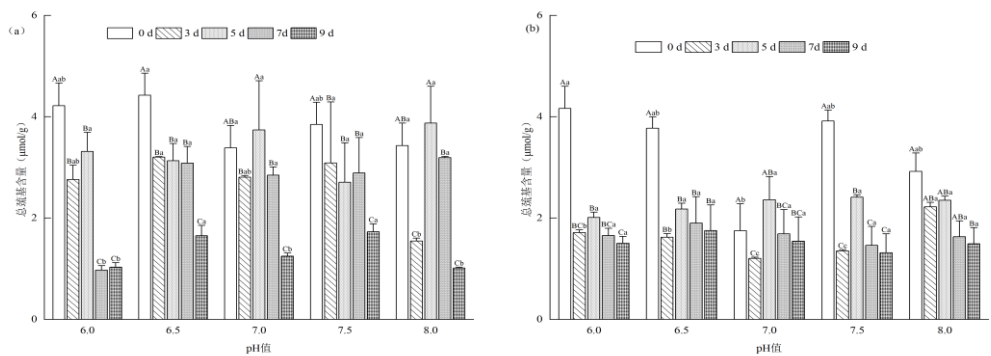


图5 不同pH值下草鱼血红蛋白对鱼肉总巯基含量的影响

Fig.5 Effect of GCH on the total sulfhydryl content of washed fish mince at different pHs value

注：a：空白对照组；b：GCH组；大写字母表示时间之间的差异（ $P<0.05$ ），小写字母代表pH值之间的差异（ $P<0.05$ ）。

2.4.2 羰基含量的影响

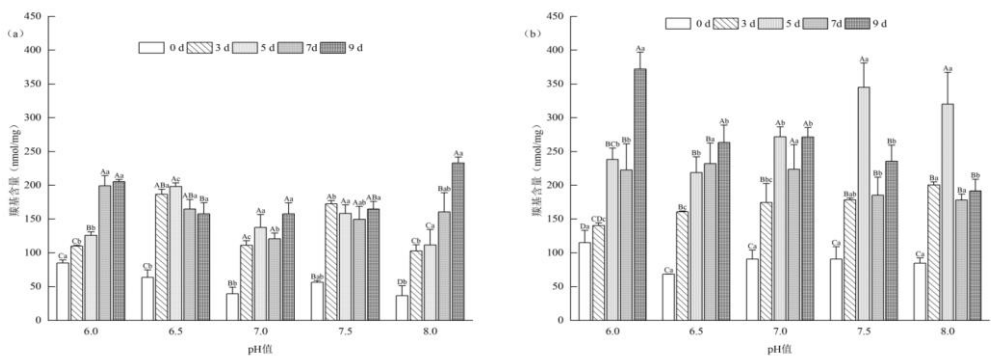


图6 不同pH值下草鱼血红蛋白对鱼肉羰基含量的影响

Fig.6 Effect of GCH on the carbonyl group content of washed fish mince at different pHs value

注：a：空白对照组；b：GCH组；大写字母表示时间之间的差异（ $P<0.05$ ），小写字母代表pH值之间的差异（ $P<0.05$ ）。

羰基的主要产生途径是敏感性氨基酸侧链的氧化以及肽键的断裂^[35]。如图6所示，在酸性环境（pH值为6.0和6.5）中，空白组和GCH组羰基含量随贮藏时间延长呈显著上升，且GCH组羰基含量显著高于空白组（ $P<0.05$ ）。由实验2.2和2.3结果可知，在酸性环境中 Fe^{2+} 氧化为 Fe^{3+} 诱导氨基酸侧链特定定位点发生氧化生成羰基衍生物^[36]。脂肪氧化产生大量的初级和次级氧化产物与蛋白质氨基酸侧链反应，加速羰基的生成。空白组在中性和碱性环境中，羰基含量随贮藏时间延长显著增加，而GCH组在碱性环境中羰基含量在第5天时分别达到最大值345 nmol/mg和320 nmol/mg然后下降，在 $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ 介导的沙丁鱼和牛肉蛋白质氧化体系研究中也类似发现^[36,37]，可能原因是由于，在 $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ 介导的氧化体系中生成的一些较不稳定羰基衍生物在碱性环境中发生沉淀或者降解等。

2.4.3 二聚酪氨酸含量的影响

二聚酪氨酸可用于指示蛋白质氧化后的交联聚合程度。如图7所示，随贮藏时间的延长，二聚酪氨酸含量先增加后减少。在酸性环境（pH值为6.0和6.5）中，二聚酪氨酸的含量高于空白对照组，这说明相对荧光强度的增加可能是由酪氨酸和MetHb以及脂质过氧化物发生反应所致。在碱性环境（pH值7.5、8.0）中，二聚酪氨酸含量在第5天达到最大值然后降低（ $P<0.05$ ），原因可能是在脂质过氧化物和MetHb存在的蛋白质氧化体系中，包含二聚酪氨酸和其他荧光物质，而在碱性环境中其他荧光物质会发生降解，二聚酪氨酸则相对稳定^[38]。酸性环境中二聚酪氨酸含量高于碱性环境。二聚酪氨酸产生与pH值和血红蛋白有密切关系，在酸性环境中血红蛋白自动氧化生成大量MetHb，同时脂肪氧化产生的初级和次级产物，催化酪氨酸生成二聚酪氨酸^[39]，使得二聚酪氨酸含量增加。

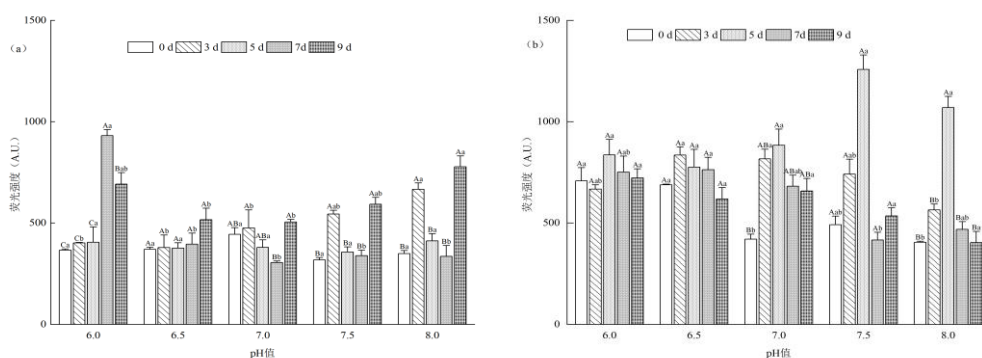


图7 不同pH值下草鱼血红蛋白对鱼肉二聚酪氨酸蛋白含量的影响

Fig.7 Effect of GCH on the tyrosine content of washed fish mince at different pHs value

注: a: 空白对照组; b: GCH 组; 大写字母表示时间之间的差异 ($P<0.05$), 小写字母代表 pH 值之间的差异 ($P<0.05$)。

3 结论

本实验研究了 pH 值对草鱼血红蛋白稳定性以及促脂肪和蛋白质氧化能力的影响。与碱性环境相比, 草鱼血红蛋白在酸性环境中的相对氧合率显著降低 ($P<0.05$), 并极易自动氧化为 MetHb。在 pH 值为 6.0 和 6.5 时, GCH 组鱼肉 POV、TBARS 值显著高于碱性环境和空白组 ($P<0.05$), 二聚酪氨酸和羰基含量增加, 总巯基含量减少, 这与 MetHb 的形成密切相关。酸性环境中血红蛋白加速了鱼肉脂肪和蛋白质氧化进程, 而在微碱性环境中鱼肉脂肪和蛋白质氧化进程较为缓慢。因此在鱼类加工过程中将鱼肉控制在 pH 值高于中性的溶液环境中, 有利于减缓血红蛋白介导的脂肪和蛋白质氧化, 从而保持鱼类产品的质量。

参考文献

- [1] ZHANG S, RAMASWAMY H S, HU L, et al. Effect of pressure-shift freezing treatment on gelling and structural properties of grass carp surimi [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2023, 88: 103456.
- [2] XUE J, WANG D, ZHANG S, et al. Analysis of changes in low-salt conditioned grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fillets during refrigeration in terms of quality and protein stability [J]. Food Science of Animal Products, 2023, 1(3): 9240028.
- [3] 农业部渔业渔政管理局.2023 中国渔业统计年鉴[M].北京:中国农业出版社,2023.
- [4] 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.
- [5] 蒋伟人,李涛,刘友明,等.丙二醛氧化修饰对白鲢肌原纤维蛋白结构性质的影响[J].食品科学, 2020,41(6): 1-7.
- [6] HARRYSSON H, SWOLIN B, AXELSSON M, et al. A trout (*Oncorhynchus mykiss*) perfusion model approach to elucidate the role of blood removal for lipid oxidation and colour changes in ice-stored fish muscle [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2020, 55(6): 2462-2471.
- [7] RICHARDS M. Heme proteins and oxidation in fresh and processed meats [M]. Oxidation in Foods and Beverages and Antioxidant Applications. Elsevier. 2010: 76-104.
- [8] GHIRMAI S, WU H, AXELSSON M, et al. Exploring how plasma-and muscle-related parameters affect trout hemolysis as a route to prevent hemoglobin-mediated lipid oxidation of fish muscle [J]. Scientific Reports, 2022, 12(1): 13446.
- [9] WU H, ABDOLLAHI M, UNDELAND I. Effect of recovery technique, antioxidant addition and compositional features on lipid oxidation in protein enriched products from cod-salmon and herring backbones [J]. Food Chemistry, 2021, 360: 129973.
- [10] SAJIB M, WU H, FRISTEDT R, et al. Hemoglobin-mediated lipid oxidation of herring filleting co-products during ensilaging and its inhibition by pre-incubation in antioxidant solutions [J]. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 2021, 11(1): 19492.
- [11] GHIRMAI S, KRONA A, WU H, et al. Relationship between hemolysis and lipid oxidation in red blood cell-spiked fish muscle; dependance on pH and blood plasma [J]. Scientific Reports, 2024, 14(1): 1943.
- [12] LEE M G, YOON W B, PARK J W. Combined effect of pH and heating conditions on the physical properties of Alaska pollock surimi gels [J]. Journal of Texture Studies, 2017, 48(3): 215-220.

- [13] JAVED M, YU W, YANG H, et al. Characteristics of hemoglobin and its pro-oxidative activity in washed silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) mince as affected by pH [J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2021, 45(6): e15463.
- [14] POWERS D A. Hemoglobin adaptation for fast and slow water habitats in sympatric catostomid fishes [J]. *Science*, 1972, 177(4046): 360-362.
- [15] WILSON JR R R, KNOWLES F C. Temperature adaptation of fish hemoglobins reflected in rates of autoxidation [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1987, 255(1): 210-213.
- [16] 夏文水,罗永康,熊善柏.大宗淡水鱼贮运保鲜与加工技术[M].北京:中国农业出版社, 2014.
- [17] 邓梅,梅强根,谢星,等.七种大宗淡水鱼酶解物抗氧化活性比较及其肽组成鉴定[J].*食品与发酵工业*,2024,50(16):110-117.
- [18] RICHARDS M P, HULTIN H O. Effect of pH on lipid oxidation using trout hemolysate as a catalyst: a possible role for deoxyhemoglobin [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48(8): 3141-3147.
- [19] LIU W, GUO R. The Photostabilization of Hemoglobin in Triton X-100 Aqueous Solution and Triton X-100/n-C5H11OH/H2O Microemulsion [J]. *Photochemistry and Photobiology*, 2010, 86(4): 835-843.
- [20] PAZOS M, MEDINA I, HULTIN H O. Effect of pH on hemoglobin-catalyzed lipid oxidation in cod muscle membranes in vitro and in situ [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53(9): 3605-3612.
- [21] MAQSOOD S, BENJAKUL S. Comparative studies on molecular changes and pro-oxidative activity of haemoglobin from different fish species as influenced by pH [J]. *Food Chemistry*, 2011, 124(3): 875-883.
- [22] IGLESIAS NEIRA J, PAZOS M, MAESTRE R, et al. Galloylated polyphenols as inhibitors of hemoglobin-catalyzed lipid oxidation in fish muscle [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(10): 5684-5691.
- [23] WU H, RICHARDS M P, UNDELAND I. Lipid oxidation and antioxidant delivery systems in muscle food [J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2022, 21(2): 1275-1299.
- [24] HE K, NUKADA H, MCMORRAN P, et al. Protein carbonyl formation and tyrosine nitration as markers of oxidative damage during ischaemia-reperfusion injury to rat sciatic nerve [J]. *Neuroscience*, 1999, 94(3): 909-916.
- [25] MA J, CUI W, ZHANG L, et al. Effects of Oxidative Cross-Linking of its Myofibrillar Protein on Texture during the Processing of Air-Dried Yak Meat [J]. *Meat and Muscle Biology*, 2018, 2(2): 65-66.
- [26] BONAVENTURA C, CRUMBLISS A, WEBER R. New insights into the proton-dependent oxygen affinity of Root effect haemoglobins [J]. *Acta Physiologica Scandinavica*, 2004, 182(3): 245-258.
- [27] 刘培培,关晓月,曾常春,等.氢离子对血红蛋白-氧亲和力影响的拉曼光谱研究[J].*光谱学与光谱分析*,2013,5:1234-1238.
- [28] WU H, TULLBERG C, GHIRMAI S, et al. Pro-oxidative activity of trout and bovine hemoglobin during digestion using a static in vitro gastrointestinal model [J]. *Food Chemistry*, 2022, 393: 133356.
- [29] LEE S K, TATIYABORWORNTHAM N, GRUNWALD E W, et al. Myoglobin and haemoglobin-mediated lipid oxidation in washed muscle: Observations on crosslinking, ferryl formation, porphyrin degradation, and haemin loss rate [J]. *Food Chemistry*, 2015, 167: 258-263.
- [30] 孟粉,秦求思,董禅,等.蛋白质氧化和酶对草鱼重组鱼肉品质及体外模拟消化的影响[J].*中国食品学报*,2021,21(9):288-295.
- [31] 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.
- [32] MONAHAN F J, GERMAN J B, KINSELLA J E. Effect of pH and temperature on protein unfolding and thiol/disulfide interchange reactions during heat-induced gelation of whey proteins [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1995, 43(1): 46-52.
- [33] SHABANPOUR B, ETEMADIAN Y. Chemical changes and shelf-life of conventional surimi and proteins recovered using pH change method from common carp (*Cyprinus carpio*) muscle during 5 months storage at-18 °C [J]. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 2016, 15(1): 311-332.
- [34] WU H, YIN J, ZHANG J, et al. Factors affecting lipid oxidation due to pig and turkey hemolysate [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(36): 8011-8017.
- [35] HEMATYAR N, RUSTAD T, SAMPELS S, et al. Relationship between lipid and protein oxidation in fish [J]. *Aquaculture Research*, 2019, 50(5): 1393-1403.
- [36] TOKUR B, KORKMAZ K. The effects of an iron-catalyzed oxidation system on lipids and proteins of dark muscle fish [J]. *Food*

Chemistry, 2007, 104(2): 754-760.

- [37] MERCIER Y, GATELLIER P, RENERRE M. Lipid and protein oxidation in vitro, and antioxidant potential in meat from Charolais cows finished on pasture or mixed diet [J]. Meat Science, 2004, 66(2): 467-473.
- [38] KIKUGAWA K, KATO T, HAYASAKA A. Formation of dityrosine and other fluorescent amino acids by reaction of amino acids with lipid hydroperoxides [J]. Lipids, 1991, 26(11): 922-929.
- [39] REID L O, VIGNONI M, MARTINS-FROMENT N, et al. Photochemistry of tyrosine dimer: When an oxidative lesion of proteins is able to photoinduce further damage [J]. Photochemical & Photobiological Sciences, 2019, 18: 1732-1741.