

田童童, 巩子路, 朱新荣, 等. 蛋白质氧化对乳清蛋白理化性质变化的影响[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(11): 301–303.

蛋白质氧化对乳清蛋白理化性质变化的影响

田童童¹, 巩子路¹, 朱新荣¹, 邹圣东², 张 建^{1,2}

(1. 石河子大学食品学院, 新疆石河子 832003; 2. 新疆生产建设兵团特色果蔬工程研究中心, 新疆石河子 832003)

摘要:通过比较不同氧化体系对乳清蛋白理化性质的影响发现, 在铁/过氧化氢/抗坏血酸氧化系统, 亚油酸脂肪及氧化系统、氧化酶氧化系统中乳清蛋白对 FeCl_3 氧化系统较为敏感。在铁/过氧化氢/抗坏血酸氧化系统中, 羰基和二聚酪氨酸的含量均随氧化剂浓度的增加以及氧化时间的延长而增加。巯基和游离氨基酸含量均随氧化剂浓度的增加以及氧化时间的延长而降低。由此可见, 氧化极大地改变了蛋白的理化性质, 并可能导致蛋白结构的改变, 进而影响其功能性质。因此, 在实际生产中应尽可能地控制蛋白氧化的发生。

关键词:蛋白氧化, 乳清蛋白, 理化性质

中图分类号: TS201.2⁺1

文献标志码: A

文章编号: 1002–1302(2013)11–0301–03

在乳与乳品加工及贮藏过程中, 由于乳及乳制品中含有较高的不饱和脂肪酸、风味物质、金属催化剂、氧化酶以及其他乳中本身含有的或在加工中加入的一些成分, 使得原料乳及乳制品非常容易发生氧化, 进而引起乳品变味、变色、营养成分破坏, 并且会产生有毒化合物, 所以氧化已经被认为是引起乳与乳品质量劣变的一个主要因素, 仅次于微生物腐败^[1–5]。关于乳品中脂类物质的氧化已经进行了大量的研究, 但对于蛋白质氧化引起乳品质量变化的研究直到最近几年才被科学家关注。

由于乳中含有较高浓度的不饱和脂肪酸以及一些促进氧化的物质, 使得乳蛋白质发生氧化。同时研究发现, 乳品加工中的机械作用也会降低乳本身具有的抗氧化能力, 而且使乳中本身含有的促进氧化的物质直接同蛋白质接触, 在有氧的

情况下使得蛋白质更容易受到氧自由的攻击而发生蛋白质的氧化。还有研究发现, 一般脂肪氧化会引起蛋白质的氧化, 且脂肪的氧化会促进蛋白质氧化的发生^[6–10]。然而目前对乳清蛋白质氧化方面的研究鲜有报道。

本试验以乳中的乳清蛋白为研究对象, 采用乳中本身存在的 3 种氧化系统(羟基自由基氧化系统、亚油酸脂肪氧化系统和氧化酶氧化系统)对乳清蛋白质进行氧化, 分析其对乳清蛋白理化性质的影响, 为乳品生产中通过抑制或适当控制氧化, 提高蛋白质功能提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

乳清分离蛋白, 购买于美国 Davisco 食品公司; 盐酸、氯化钠、己二胺四乙酸、氯化铁、过氧化氢、抗坏血酸均为分析纯。脂肪氧化酶(Sigma)、乳过氧化物酶(Sigma)、亚油酸(Sigma)为市售。

超纯水系统(Milli-Q Grandient, 美国), 紫外可见分光光度计(Cary 50 spectrophotometer, 美国 Varian 公司), 荧光分光光度计(Eclipse spectrofluorimeter, 美国 Cary 公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 $\text{Fe}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{Asc}$ (铁/过氧化氢/抗坏血酸)氧化系统的

使溶液颜色变浅。因此在百脉根花色素的提取、加工、储存、使用过程中, 应尽可能在酸性、低温条件下进行, 避免和 H_2O_2 、抗坏血酸、 Zn^{2+} 等接触。本研究建立的百脉根花色素超声波辅助提取方法操作简单, 提取效率高, 对百脉根花色素的开发和研究具有重要意义。

参考文献:

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草: 第 4 卷[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 551.
- [2] 刘 平, 李云雁. 板栗壳色素超声波提取方法研究[J]. 江苏农业科学, 2007(4): 196–198.
- [3] 姜洪芳, 张卫明, 张 玖. 樱桃水色素提取及稳定性研究[J]. 中国野生植物资源, 2008, 27(5): 56–59.

收稿日期: 2013–04–06

基金项目: 新疆生产建设兵团科技支疆专项计划(编号: 2010ZJ13);

石河子大学高层次人才科研启动资金(编号: RCZX201127); 石河子大学青年骨干教师培训项目(编号: 3152SPXY01027)。

作者简介: 田童童(1990—), 男, 硕士研究生, 主要从事食品生物化学研究。E-mail: 1075284322@qq.com。

通信作者: 张 建, 博士, 副教授。E-mail: zhangjian0411@163.com。

化; 加入 Zn^{2+} 对色素溶液的吸光度值影响较大, 且使溶液颜色变浅。

3 结论与讨论

百脉根花色素外观呈黄色, 为水溶性天然色素。研究表明, 百脉根花色素最佳提取工艺条件为: 料液比 1:20, 超声波时间 20 min, 超声波温度 60℃; 百脉根花色素对光照比较稳定; 在溶液 pH 值 3~6 时百脉根花色素稳定, 在碱性条件下颜色发生改变; 强氧化性的 H_2O_2 对百脉根花色素的稳定性有较大影响, 色素吸光度值有减小趋势, 且颜色变浅; 抗坏血酸对百脉根花色素有较弱的降解作用; 蔗糖、氯化钠对百脉根花色素影响较小; 金属离子 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Na^{+} 、 Al^{3+} 、 Cu^{2+} 对百脉根花色素无明显影响, Zn^{2+} 对百脉根花色素影响显著,

制备 该系统为羟基自由基($\cdot\text{OH}$)产生氧化系统(A hydroxyl radical - generating system, 简称为 HRGS), 主要由 FeCl_3 、Asc 和 H_2O_2 通过铁的氧化还原反应而产生。本试验主要设计 H_2O_2 氧化体系和 FeCl_3 氧化体系, 这 2 种氧化体系均在浓度为 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液中(pH 值为 6.0)进行。

1.2.1.1 H_2O_2 氧化体系 固定体系中 FeCl_3 和 Asc 浓度, 改变 H_2O_2 浓度, 即浓度为 0.1 mmol/L FeCl_3 和 0.1 mmol/L Asc, H_2O_2 浓度分别选择 1、5、10、15、20 mmol/L。

1.2.1.2 FeCl_3 氧化体系 固定体系中 H_2O_2 和 Asc 浓度, 改变 FeCl_3 浓度, 即浓度为 10 mmol/L 的 H_2O_2 和 1 mmol/L Asc, FeCl_3 浓度分别选择 0.1、0.2、0.4、0.5 和 1 mmol/L。

1.2.2 亚油酸脂肪氧化系统 由不同活性的脂肪氧化酶(5 000、8 000、10 000、15 000 和 20 000 U)使 100 μmol 亚油酸氧化。

1.2.3 氧化酶氧化系统 通过不同浓度氧化剂 H_2O_2 (50、80、100、120 和 150 μmol) 激活的乳过氧化物酶(100 μmol) 氧化系统。

1.2.4 乳清蛋白的氧化反应 在上述氧化体系中分别加入乳清分离蛋白, 使得蛋白的最终质量浓度为 20 g/L。然后所有样品均在 80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中恒温氧化, 分别培养 1、3、5 h, 使乳清分离蛋白发生不同程度的氧化。通过添加 BHA/Trolox/EDTA (使其最终浓度为 1 mmol/L) 来中止氧化反应。

1.2.5 羰基含量的测定 参考 Oliver 报道的方法^[11]测定。

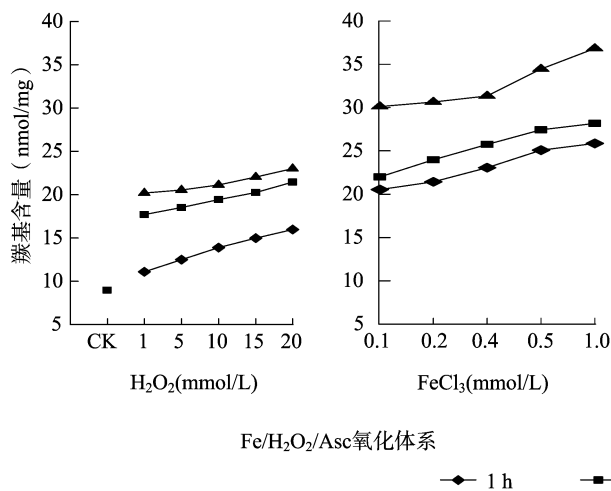


图1 不同氧化系统对乳清蛋白羰基含量的影响

2.2 氧化对乳清蛋白总巯基含量的影响

由图 2 可知, 氧化系统对总巯基的含量随着氧化时间的延长而逐渐下降, 在相同氧化时间内, 总巯基含量随着氧化剂浓度的增加而降低, 这与羰基变化模式恰好相反。如在图 2A 中, 最初未氧化蛋白的总巯基含量是 32.84 $\mu\text{mol/g}$, 在不同浓度的 H_2O_2 下, 所有样品经 1、3、5 h 的氧化处理后, 同对照样品相比, 总巯基含量显著降低($P < 0.01$)。3 h 氧化同 1 h 氧化相比, 在对应浓度上所有样品总巯基损失约 18%; 但是在高浓度 H_2O_2 条件下, 总巯基降低速度减慢, 推测可能是因为此时巯基降低趋于结束。在图 2B 中, 总巯基含量有着类似的变化。

2.3 氧化对乳清蛋白二聚酪氨酸含量的影响

二聚酪氨酸的形成是蛋白在自由基氧化体系中发生氧化

1.2.6 总巯基含量的测定 参考 Simplicio 等报道的方法^[12]测定。

1.2.7 二聚酪氨酸含量的测定 参考 Davies 等报道的方法^[13]测定。

1.2.8 游离氨基的测定 参考 Brands 等报道的方法^[14]测定。

1.2.9 数据分析 用 Origin 7.5 软件进行数据处理, 并且用 SAS 9.0 统计软件进行差异显著性分析($P < 0.05$), 所有处理重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 氧化对乳清蛋白羰基含量的影响

由图 1 可知, 所有样品中羰基含量在经过氧化处理后均增加。在相同的氧化体系中, 羰基含量随着氧化时间的增加而增加。例如, 在图 1 的 $\text{Fe}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{Asc}$ 氧化系统中在 1 mmol/L 的 H_2O_2 条件下氧化 5 h 和 1 h 比较, 羰基含量约增加了 1.8 倍, 达到 20.12 nmol/mg。3 h 和 5 h 氧化显著高于 1 h 氧化($P < 0.05$)。在相同的氧化时间, 羰基含量随着氧化剂浓度的增加而明显增加。但从图 1 可以发现, 在 3 种氧化系统中, $\text{Fe}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{Asc}$ 氧化系统中的羰基含量显著高于其他 2 个氧化系统($P < 0.05$), 说明乳清蛋白对 $\text{Fe}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{Asc}$ 氧化系统更敏感, 因此本试验后续研究选用 $\text{Fe}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{Asc}$ 氧化系统。

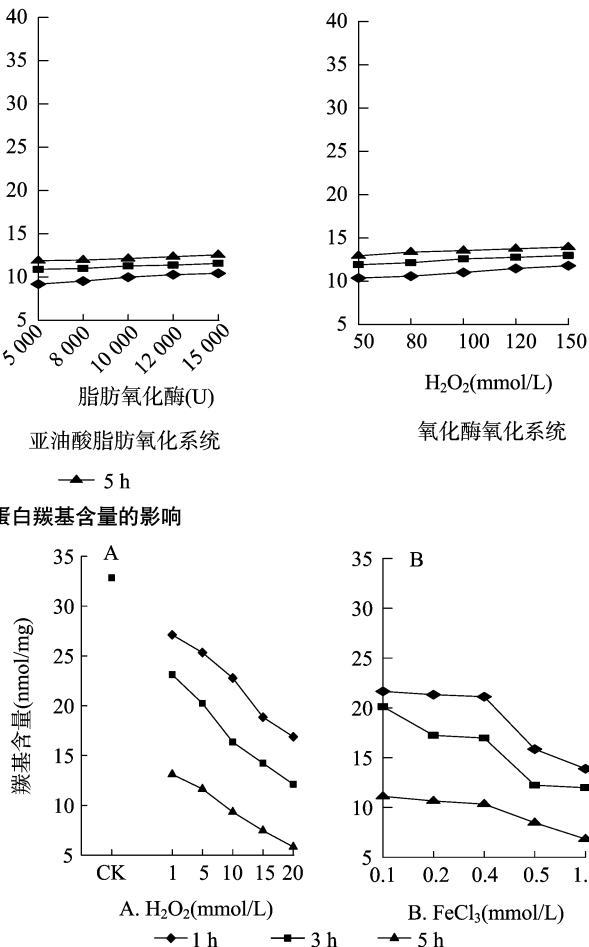


图2 $\text{Fe}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{Asc}$ 氧化系统对乳清蛋白总巯基含量的影响

的一个重要标记。由图 3 可知,二聚酪氨酸的含量无论随氧化剂浓度的增加还是氧化时间的延长,其整体的变化均呈增加趋势,并且同对照相比显著增加($P < 0.05$)。乳清蛋白在 FeCl_3 体系中形成的二聚酪氨酸含量(图 3-B)比在 H_2O_2 体系(图 3-A)中多,这说明乳清蛋白对 FeCl_3 更加敏感,可能是因为乳清蛋白在 FeCl_3 体系中氧化更为剧烈所致。此研究结果与 Hanan 等^[15]和 Morzel 等^[16]的研究结果相类似。

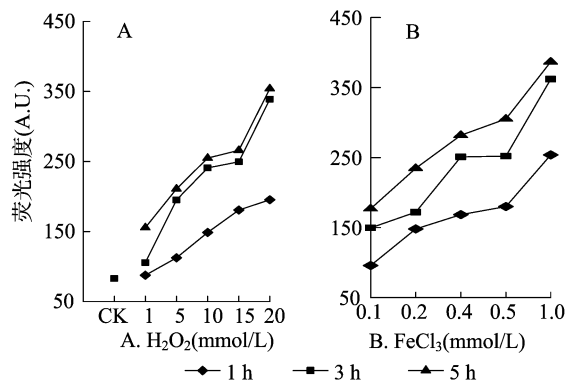


图3 $\text{Fe}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{Asc}$ 氧化系统对乳清蛋白二聚酪氨酸含量的影响

2.4 氧化对游离氨基的影响

蛋白氧化的另一个重要指标是氨基含量。由图 4 可知,在相同氧化时间随着氧化剂浓度的增加,游离氨基含量呈明显的降低趋势,且在相同氧化剂浓度下,随着氧化时间的增加,氨基含量也呈明显下降趋势,这与巯基含量的整体下降趋势一致。在 FeCl_3 体系中经历 3 h 和 5 h 氧化,游离氨基酸含量同 1 h 氧化相比下降更为迅速,而在 H_2O_2 体系中,经历 1、3 h 氧化时游离氨基酸含量变化不大,经历 5 h 氧化时显著下降。表明,游离氨基的降低证实了侧链中带有 NH 或 NH_2 的氨基酸参与了羰基的形成。此结果与 Morzel 等对肌原纤维蛋白氧化后游离氨基的研究结果^[16]相似。

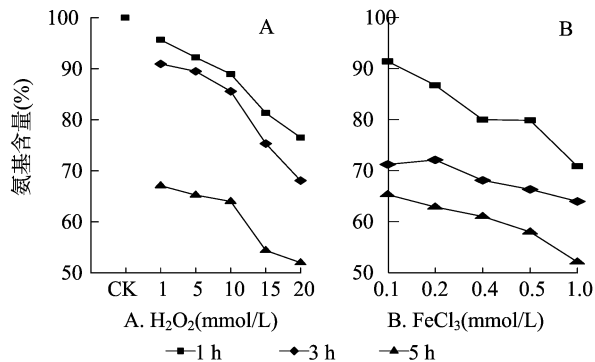


图4 $\text{Fe}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{Asc}$ 氧化系统对乳清蛋白游离氨基含量的影响

3 结论

本研究结果一方面进一步证实了蛋白氧化会引起乳清蛋白理化性质的改变,如羰基和二聚酪氨酸含量的增加、游离氨基和总巯基含量降低;另一方面发现乳清蛋白对铁/过氧化氢/抗坏血酸氧化系统更为敏感。而蛋白理化性质的改变必然对其营养价值、功能性质产生一定的影响,这些都需要进一步的研究。因此,在实际生产中应尽可能地控制蛋白氧化的

发生,以保持蛋白原来的特性,减少其因为氧化所带来的营养损失或者降低其应用价值。

参考文献:

- [1] 凌关庭. 抗氧化食品与健康[M]. 北京:化学工业出版社,2004.
- [2] 崔旭海,孔保华. 蛋白质氧化及其对乳蛋白结构与功能性的影响[J]. 中国乳品工业,2008,36(1):44-47.
- [3] Alderton A L, Faustman C, Liebler DC, et al. Induction of redox instability of bovine myoglobin by adduction with 4-hydroxy-2-nonenal[J]. Biochemistry, 2003, 42(15):4398-4405.
- [4] Oozumi 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.
- [5] Oozumi T, Xiong Y. Identification of cross-linking site(s) of myosin heavy chains in oxidatively stressed chicken myofibrils[J]. Journal of Food Science, 2006, 71(3):196-199.
- [6] Stål H, Bjerrum M J, Pedersen J A, et al. Lactoperoxidase-induced protein oxidation in milk[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(9):3939-3944.
- [7] Park D, Xiong Y, Alderton A L. Concentration effects of hydroxyl radical oxidizing systems on biochemical properties of porcine muscle myofibrillar protein[J]. Food Chemistry, 2006, 101(3):1239-1246.
- [8] Parkington J K, Xiong Y, Blanchard S P, et al. Chemical and functional properties of oxidatively modified beef heart surimi stored at 2 °C[J]. Journal of Food Science, 2000, 65(3):428-433.
- [9] Parkington J K, Xiong Y, Blanchard S P, et al. Functionality changes in oxidatively/antioxidatively washed beef heart surimi during frozen storage[J]. Journal of Food Science, 2000, 65(5):796-800.
- [10] Pocernich C B, La Fontaine M, Butterfield D A. *In vivo* glutathione elevation protects against hydroxyl free radical-induced protein oxidation in rat brain[J]. Neurochemistry International, 2000, 36(3):185-191.
- [11] Oliver C N, Alin B W, Moerman E J, et al. Age-related changes in oxidized proteins[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1987, 262(12):5488-5491.
- [12] Simplicio P, Cheeseman K H, Slater T F. The reactivity of the SH group of bovine serum albumin with free radicals[J]. Free Radical Research Communications, 1991, 14(4):253-262.
- [13] Davies K, Delsignore M E, Lin S W. Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1987, 262(20):9902-9907.
- [14] Brands C M, van Boekel M A. Kinetic modeling of reactions in heated monosaccharide-casein systems[J]. Food Chemistry, 2002, 50(23):6725-6739.
- [15] Hanan T, Shakrai N. The role of H_2O_2 -generated myoglobin radical in crosslinking of myosin[J]. Free Radical Research, 1995, 22(3):215-227.
- [16] Morzel M, Gatellier P, Sayd T, et al. Chemical oxidation decreases proteolytic susceptibility of skeletal muscle myofibrillar proteins[J]. Meat Science, 2006, 73(3):536-543.