



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20140088

自由基氧化对乳蛋白聚集行为和持水性的影响

汪建明, 谭瑶瑶, 于景华, 陈立红, 李 阳
(天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

摘要: 乳蛋白的氧化会使其蛋白质品质发生劣变. 为了研究乳蛋白氧化聚集行为与其性质的关系, 采用铁/过氧化氢/抗坏血酸(Fe/H₂O₂/Asc)羟自由基氧化系统诱导浓缩乳蛋白(MPC80)和酪蛋白氧化, 对其聚集行为和持水性进行了分析和比较. 实验证明, 乳蛋白氧化聚集体分为大粒度(约1 000 nm)和小粒度(约100 nm)两个部分, 氧化会使小粒度部分发生聚合, 同时大粒度部分发生断裂. 随着氧化值增加, MPC80和酪蛋白的持水力分别提高了0.43倍和1.73倍, 酪蛋白的持水力整体高于MPC80. 以上结果表明, 氧化改变了乳蛋白的聚集行为, 影响其凝胶网络, 在宏观上改变了乳蛋白的持水性.

关键词: 乳蛋白; 氧化聚集; 粒度分析; 持水性

中图分类号: TS252.59

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2015)02-0025-04

Effect of Protein Oxidation on the Aggregation Behavior and Water Binding Capacity of Milk Protein

WANG Jianming, TAN Yaoyao, YU Jinghua, CHEN Lihong, LI Yang

(College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Protein oxidation will result in the quality deterioration of milk protein. The changes in aggregation behavior and water binding capacity of milk protein concentrate (MPC80) and casein oxidated in a Fe/H₂O₂/Asc hydroxyl free radical generation system (HRGS) were investigated. The results showed that the oxidated aggregation of milk protein fell into two parts: the big particle size (1 000 nm) group and the small particle size (100 nm) group. The aggregation of the latter and the fracture of the former occurred simultaneously. The waterbinding capacity of casein was greater than that of MPC80, which increased by 0.43 and 1.73 times respectively with the increase of oxidation. Thus, HRGS-mediated oxidation altered the aggregation of milk protein, which may lead to modifications of protein functionalities.

Key words: milk protein; oxidation; particle size analysis; water binding capacity

蛋白质的氧化行为是使蛋白质性质改变的主要原因之一, 其对蛋白质引发的品质劣变仅次于微生物腐败. 乳蛋白会受到游离基的影响, 对氧化非常敏感, 乳及乳制品中含有的不饱和脂肪酸、金属离子、氧化酶类以及其他内源性促氧化成分或在加工中引入的外源性促氧化成分, 都会引发乳蛋白的氧化, 造成乳品味道、颜色和营养成分的改变, 甚至产生有毒化合物.

目前, 对蛋白质氧化机理的解释主要来自医学研究. 在食品科学领域, 人们对大豆蛋白氧化的了解多

于乳蛋白. 这些研究^[1]证实, 在模拟氧化体系中对蛋白质进行氧化处理, 可以引发大豆蛋白的交联聚合和降解作用, 多肽链和许多氨基酸侧链都易于氧化, 造成蛋白质结构的改变. 这些改变可能包括: 氨基酸的破坏、肽链的断裂、肽链的交联、羰基的形成、蛋白质的聚合等. 这些结构的变化进一步导致蛋白质功能性质的改变. 在对乳蛋白的研究中, 氧化对乳蛋白的分子状态和聚集程度产生的影响存在不同结论. Færgemand 等^[2]发现, 乳清蛋白由不同的氧化酶引发氧化后, 交联聚合能力增加. Østdal 等^[3]报道了

收稿日期: 2014-06-05; 修回日期: 2014-09-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31271904)

作者简介: 汪建明(1972—), 女, 新疆人, 教授, wangjianming@tust.edu.cn.

乳过氧化酶可以使乳蛋白聚合并产生蛋白质游离基. Wiking 等^[4]对原料乳蛋白水解的研究表明 H_2O_2 的添加可以提高蛋白质的水解度. 但是以上研究并没有深入揭示氧化对乳蛋白聚集状态的改变及其与功能性质之间的关系.

本文以羟基自由基产生体系为模拟氧化体系, 以浓缩乳蛋白(MPC80)和酪蛋白为原料制备氧化蛋白, 研究比较不同氧化强度的乳蛋白其聚集行为及持水性产生的变化, 以期从聚集行为与功能性质的角度揭示羟基自由基氧化对乳蛋白结构和性质的影响, 揭示乳蛋白氧化的机制.

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

酪蛋白、浓缩乳蛋白(MPC80), 宁夏塞尚乳业有限公司.

氯化钠、氯化铁($FeCl_3$)、盐酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、2,4-二硝基苯肼(DNPH)、盐酸胍、过氧化氢(H_2O_2)、三氯乙酸、抗坏血酸(Asc), 以上试剂均为分析纯. 牛血清蛋白(BSA), 国药集团上海化学试剂公司.

1.2 仪器与设备

UV-VIS 型紫外可见分光光度计, 天津普瑞斯仪器有限公司; TGL-16C 型高速离心机, 上海安亭科学仪器厂; BT-90 型激光粒度分析仪, 百特仪器有限公司.

1.3 实验方法

1.3.1 羟基自由基产生系统(hydroxyl free radical generation system, HRGS)的构建

在 pH 6.0 的磷酸盐缓冲液中加入 $FeCl_3$ 、Asc、 H_2O_2 , 使其浓度分别为 0.1、0.1、20 mmol/L. 铁/过氧化氢/抗坏血酸($Fe/H_2O_2/Asc$)氧化系统可以产生活性氧自由基, 主要由 $FeCl_3$ 、Asc 和 H_2O_2 通过铁的氧化还原反应而产生^[5]. 通过改变氧化时间来控制对乳蛋白的氧化强度.

1.3.2 MPC80 和酪蛋白的氧化反应

在上述氧化体系中分别加入 MPC80 和酪蛋白, 使蛋白的最终质量浓度为 20 mg/mL. 在 80 °C 水浴中使样品进行恒温氧化, 氧化时间分别为 1、2、3、4 h, 使其达到不同的氧化强度. 添加 EDTA (使其浓度为 1 mmol/L) 终止氧化反应. 氧化后的产物用磷酸盐缓冲液洗涤后进行过滤、离心、冻干处理. 所得氧化乳蛋白样品备用.

1.4 测定方法

1.4.1 蛋白质氧化值测定

采用改进的 DNPH 比色法^[6]进行蛋白质氧化值的测定. 将制备的氧化蛋白分散在去离子水中, 采用双缩脲法以牛血清蛋白为标准测定上清液中蛋白浓度, 随后稀释上清液使得每 0.35 mL 上清液中含有 1.0 ~ 1.5 mg 蛋白质.

在 2.0 mL 具盖的聚乙烯离心管中, 将 0.35 mL 蛋白质溶液与 1 mL 含有 10 mmol/L 2,4-二硝基苯肼的 2 mol/L HCl 混合, 在 20 °C 条件下水浴 2 h. 另取 0.35 mL 蛋白质溶液与 1 mL 不含有 2,4-二硝基苯肼的 2 mol/L HCl 混合, 同样在 20 °C 条件下水浴 2 h, 作为空白对照.

在每个离心管中加入 0.45 mL 质量分数 40% 的三氯乙酸, 剧烈振摇均匀后静置 20 min, 10 000 g 离心 20 min 后弃去上清液, 随后采用 1.5 mL 体积比为 1:1 的乙醇-乙酸乙酯混合溶液洗涤沉淀, 然后 10 000 g 离心 10 min 后弃去洗涤液, 如此重复洗涤蛋白质沉淀 3 次. 将蛋白质悬浮于 1.0 mL 含 6 mol/L 盐酸胍 pH 为 7.0 的磷酸盐缓冲液中, 在 37 °C 条件下水浴 20 min, 每 5 min 剧烈振摇一次. 以空白为对照在 367 nm 处作校正, 以 $22\,000\text{ mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ 消光系数计算每毫克蛋白质羰基衍生物的量.

1.4.2 蛋白质粒度测定

蛋白质粒度测定采用激光粒度分析仪. 将氧化处理后的乳蛋白样品用 0.12 mol/L 的氯化钠溶液稀释至蛋白质量分数为 0.2% 的溶液, 于 18 °C 下进行测定. 散射角度 90.00°, 测量时间 60.00 s, 分布类型为光强分布.

1.4.3 蛋白质持水力测定

称取 0.2 g 蛋白于 15 mL 离心管中, 加入 4 g 去离子水, 记录此时蛋白和离心管总质量, 漩涡振荡 2 min 后静置 5 h, 8 800 r/min 离心 30 min (20 °C), 将水倒出后, 记录此时离心管和蛋白及水的总质量, 持水力用每克蛋白吸附的水的质量来计算.

1.5 数据统计分析方法

本研究采用两次独立的重复实验, 每次进行 3 个平行实验. 数据分析采用 Excel 和 Origin 8.6 软件进行分析.

2 结果与讨论

2.1 氧化对乳蛋白氧化值的影响

在羟基自由基氧化体系中不同强度的氧化后,

MPC80 和酪蛋白聚集体中羰基含量变化见表 1. 由表 1 可知: 羟自由基氧化体系使所有样品中的羰基含量均明显增加. 相同样品的羰基含量随着氧化时间的增加而增加. 氧化 4 h 与 1 h 相比, MPC80 和酪蛋白的氧化值分别提高了 1.48 倍和 1.06 倍. 3 h 以内的氧化使酪蛋白的羰基含量显著增加 ($P \leq 0.05$), 但是氧化时间 3 h 和 4 h 比较, 羰基含量增加不显著 ($P > 0.05$).

表 1 自由基产生体系对乳蛋白羰基含量的影响

Tab. 1 Effect of HRGS on the carbonyl content of milk protein

氧化时间/h	蛋白质氧化值(羰基含量)/(mmol·mg ⁻¹)	
	MPC80	酪蛋白
0	8.00 ± 0.29 ^a	6.27 ± 0.16 ^b
1	12.27 ± 0.33 ^c	10.08 ± 0.50 ^d
2	14.09 ± 0.48 ^e	16.72 ± 0.31 ^f
3	17.73 ± 0.85 ^f	19.09 ± 0.62 ^g
4	30.45 ± 0.51 ^h	20.73 ± 0.34 ^g

注: 表中不同小写字母标注表示差异显著 ($P \leq 0.05$).

在羟自由基氧化系统中, 所有样品的氧化值均随着氧化时间的增加而增加, 通过对氧化时间的控制可以实现对乳蛋白氧化值的改变.

2.2 氧化对乳蛋白粒度的影响

在蛋白质聚集过程中, 粒度是常用来表征蛋白聚集程度的重要指标. 在羟自由基氧化体系中不同强度的氧化后, MPC80 和酪蛋白聚集体粒度测定结果见表 2 和表 3, 粒度光强分布图见图 1 和图 2.

表 2 MPC80 聚集体粒度测定结果

Tab. 2 Results of size measurement by intensity of MPC80

氧化时间/h	中位径/nm	平均值/nm	比表面积/(m ² ·g ⁻¹)	PDI
0	1 327	461	23.53	0.057
1	976	693	15.95	0.043
2	929	1 237	2.40	0.029
3	583	1 082	4.03	0.029
4	1 624	827	18.84	0.087

表 3 酪蛋白聚集体粒度测定结果

Tab. 3 Results of size measurement by intensity of casein

氧化时间/h	中位径/nm	平均值/nm	比表面积/(m ² ·g ⁻¹)	PDI
0	1 288	528	151	0.204
1	1 318	465	86	0.304
2	814	338	183	0.147
3	655	443	41.85	0.076
4	504	347	18.84	0.069

如表 2 和图 1 所示, 氧化使 MPC80 的粒度发生改变, 分为大粒度(约 1 000 nm)和小粒度(约 100 nm)两个部分. MPC80 的平均粒度随着氧化时间

的增加先升高后降低, 氧化时间为 2 h 的 MPC80 平均粒度达到 1 237 nm, 比表面积达到最低. 氧化时间为 2 h 和 3 h 的 MPC80, 其 PDI(多分散指数, polydisperse index)值最低, 为 0.029, 粒度分散的均匀性较高, 氧化 3 h 的样品粒度整体低于氧化 2 h 的样品. 氧化时间 0 h(对照组)、1 h 和 4 h 的 MPC80 中存在部分小粒度的颗粒, 氧化 4 h 的样品 PDI 值最高, 说明粒度差异最大. MPC80 中粒度大的部分, 其粒径随氧化时间先降低后增加. 氧化 4 h 后, MPC80 中的两部分蛋白质粒度分别降低为 28.1 ~ 44.5 nm 和 397 ~ 706 nm, 平均粒度降低.

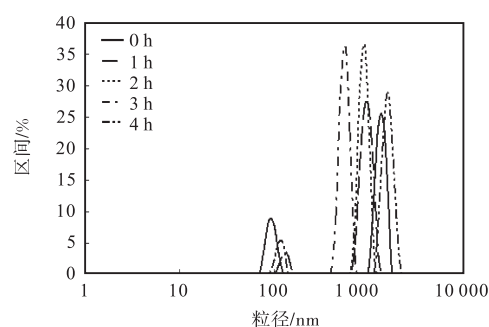


图 1 氧化 MPC80 粒度的光强分布

Fig. 1 Size distribution by intensity of MPC80

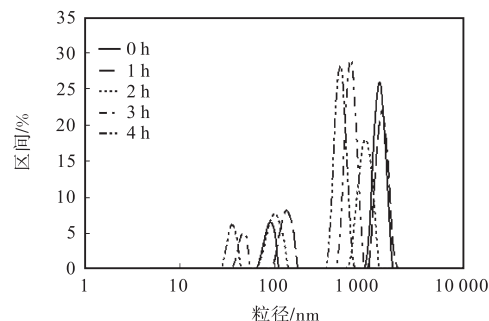


图 2 氧化酪蛋白粒度的光强分布

Fig. 2 Size distribution by intensity of casein

如表 3 和图 2 所示, 酪蛋白的粒度分为大粒度(约 1 000 nm)和小粒度(约 100 nm)两部分, 氧化使酪蛋白的粒度发生改变, 中位径随着氧化时间的增加, 由 1 288 nm 降低至 504 nm. 平均粒度变化趋势不明显. 随着氧化时间的增加, 大粒度部分的粒径降低, 含量先升高后降低; 小粒度部分的粒径先增加后降低, 含量先降低后增加. 酪蛋白中小粒度部分含量显著高于 MPC80.

这说明氧化使乳蛋白产生的聚集和断裂两种作用同时进行. 乳蛋白中本身存在的小分子颗粒随着氧化发生交联, 聚集成为较大的颗粒; 同时, 大分子发生断裂, 其粒度随着分子的断裂而降低, 氧化使蛋

白质大分子的侧链断裂成较小的小颗粒. 当氧化达到一定程度, 小粒度的部分会逐渐增加, 使乳蛋白的平均粒度降低. 此时, PDI 值升高, 说明粒度的均一度差, 两部分粒度差异较高, 而平均粒度与两部分的含量有关, 不再能够描述粒度变化情况. 酪蛋白中的小粒度部分显著高于MPC80, 说明乳蛋白中的其他组分(乳清蛋白等)在氧化过程中与酪蛋白的交联度和敏感度均高于酪蛋白-酪蛋白的交联, 聚合更为紧密.

吴伟^[1]在对大豆蛋白氧化的研究中也发现了蛋白质发生聚集及断裂形成小分子的现象, 与本实验结论相符. 郭建^[7]、蒋将^[8]对蛋白质进行热变性和 pH 偏移等研究, 结果表明蛋白质发生了交联聚集, 但是并没有同时产生高粒度聚集体断裂形成低粒度聚集体的现象. 因此, 蛋白质的聚合与断裂同时发生可能是蛋白质氧化聚集行为的特点, 是否有小粒度部分形成也可以作为对蛋白质聚集行为原因的判断依据之一.

2.3 氧化对乳蛋白持水性的影响

在羟自由基氧化体系中不同强度的氧化后, MPC80 和酪蛋白聚集体的持水力变化如图 3 所示.

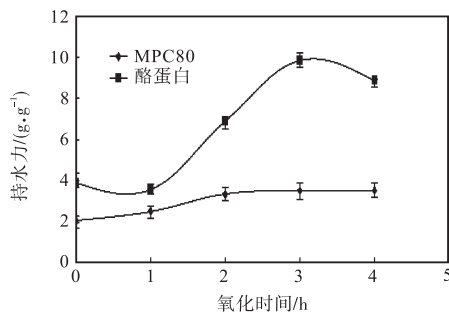


图 3 氧化时间对乳蛋白持水性的影响

Fig. 3 Effect of oxidation time on water binding capacity

由图 3 可知, 氧化处理后, 除氧化 1 h 的酪蛋白外, 所有样品中的持水力均高于对照组. MPC80 的持水力随着氧化时间的增加而增加, 在自由基产生体系中氧化 4 h 与 1 h 的 MPC80 相比, 其持水力增加了 0.43 倍, 达到 3.56 g/g, 氧化 2 h、3 h、4 h 均显著高于氧化 1 h ($P \leq 0.05$), 极显著高于 0 h 对照组 ($P \leq 0.01$), 但氧化 2 h、3 h、4 h 的 MPC80 持水力变化不显著 ($P > 0.05$). 在酪蛋白的氧化中, 持水力变化均为极显著 ($P \leq 0.01$), 氧化时间 3 h 与 1 h 相比, 持水力增加了 1.73 倍, 达到 9.86 g/g. 但是氧化时间超过 3 h 后, 酪蛋白的持水力开始下降 ($P \leq 0.01$). 整体比较, 酪蛋白持水力高于 MPC80 ($P \leq 0.01$), 二者

的变化趋势差异显著.

蛋白质的持水力与其形成的凝胶网络结构有关, 过于松散或过于紧密的网络结构不利于水分的保持, 紧密有序的网络结构可能将水分排出凝胶网络结构之外. 因此, 持水力不仅与乳蛋白的组成有关, 聚集状态的改变也会影响其凝胶网络状态. 与 MPC80 相比, 酪蛋白的网络结构的柔韧开放, 使其持水力整体高于前者. MPC80 中含有酪蛋白和其他组分, 成分更为复杂, 氧化处理后, 各组分交联聚合的紧密度高于酪蛋白-酪蛋白聚集体, 聚合体的粒度更小. 随着氧化时间的增加, 氧化交联引起的粒度范围变化不大, 小粒度部分的含量低, 使持水力变化不显著. 酪蛋白随着氧化分为粒度差异显著的两部分, 聚集体状态改变显著, 这可能是其持水力变化显著的原因. 粒度大的聚集体利于形成网络, 其含量随着氧化时间的增加而降低, 使其持水力也出现了相似的变化趋势, 与粒度分析结果一致.

3 结 语

采用 $\text{Fe}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{Asc}$ 羟自由基氧化系统诱导浓缩乳蛋白 (MPC80) 和酪蛋白氧化, 通过控制氧化时间实现了对乳蛋白氧化值(羰基含量)的改变, 并对其聚集行为(粒度)和持水性进行了分析和比较. 乳蛋白的氧化聚集体分为大粒度(约 1 000 nm)和小粒度(约 100 nm)两个部分, 氧化会使低粒度部分聚合成为高粒度聚集体, 高粒度部分断裂成低粒度颗粒, 两种行为同时进行. 酪蛋白持水力高于 MPC80, 氧化对 MPC80 持水性影响小, 这与乳蛋白的组分、氧化值和聚集状态有关.

氧化还会引起蛋白质结构的其他变化, 进而在宏观上改变蛋白质的功能性质, 这些内容会在进一步的研究中进行探索.

参考文献:

- [1] 吴伟. 蛋白质氧化对大豆蛋白结构和凝胶性质的影响[D]. 无锡: 江南大学, 2010.
- [2] Færgemand M, Otte J, Qvist K B. Cross-linking of whey proteins by enzymatic oxidation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46(4): 1326-1333.
- [3] Østdal H, Bjerrum M J, Pedersen J A, et al. Lactoperoxidase-induced protein oxidation in milk[J]. Journal of

(下转第 42 页)