

DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20210209

不同氧化/冷冻条件对乳清蛋白结构的影响

张楠, 杨晨, 张伟伟, 张紫艺, 夏大莹, 汪建明
(天津科技大学食品科学与工程学院, 天津 300457)

摘要: 为了研究不同氧化/冷冻条件对乳清蛋白结构的影响,将乳清蛋白分别在羟自由基氧化体系中氧化 2 h 和 4 h 后再分别置于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下冷冻 2 d 和 4 d,结果表明:乳清蛋白经过先氧化再冷冻处理,其羰基和巯基含量增加,粒径变大,浊度和表面疏水性指数上升.结合多种表征结果来看,氧化 2 h 的乳清蛋白在 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻 2 d 后的变化最大;红外光谱结果显示,此条件下蛋白质的二级结构由无规则卷曲向 α -螺旋转变,且发现在 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻条件下蛋白质结构的打开度比在 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻条件下更小.这说明低温速冻对氧化后的乳清蛋白的结构起到保护作用,这也与扫描电子显微镜表征乳清蛋白的微观结构结果一致.本研究为含乳清蛋白食品先氧化再冷冻后的组织结构变化及品质优化提供了理论参考.

关键词: 蛋白质氧化; 蛋白质冷冻; 乳清蛋白; 蛋白质结构

中图分类号: TS252 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-6510(2022)04-0001-08

Effect of Different Oxidation/Freezing Conditions on the Structure of Whey Protein

ZHANG Nan, YANG Chen, ZHANG Weiwei, ZHANG Ziyi, XIA Daying, WANG Jianming
(College of Food Science and Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: In order to study the effects of different oxidation and freezing conditions on the structure of whey protein, whey protein was oxidized in a hydroxyl radical oxidation system for 2 h and 4 h, and then frozen at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 2 d and 4 d. The results showed that after whey protein was oxidized and then frozen, its carbonyl content and sulfhydryl content increased, particle size became larger, and turbidity and surface hydrophobicity index increased. Combined with various characterization results, whey protein oxidized for 2 h had the biggest change after freezing at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 2 d. The results of infrared spectra showed that the secondary structure of whey protein changed from irregular coil to α -helix under this condition, and the degree of opening of the protein structure at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ was higher than that at $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. These results indicate that low-temperature quick freezing protects the structure of oxidized whey protein, which is consistent with the microstructure results of whey protein characterized by electron microscopy. The study provides a theoretical reference for the structural changes and quality optimization of food containing whey protein after being oxidized and then frozen.

Key words: protein oxidation; protein freezing; whey protein; protein structure

乳清蛋白约占乳蛋白的 20%,包括 β -乳球蛋白、 α -乳白蛋白、免疫球蛋白、血清白蛋白、乳铁蛋白、糖巨肽以及酶和生物活性因子等^[1],常用于冷冻甜品及香肠等各类食品加工中^[2].由于在加工过程中受到许多促氧化剂及受光、热等自然条件的影响,所以乳清蛋白非常容易被氧化,发生断裂和交联及形成碳中心

自由基等变化,使其结构性质发生改变.然而这并不是终点,如在冷冻甜品中,氧化后的乳清蛋白又在冷冻条件下进行贮藏、运输,低温诱导下冰晶的形成会进一步改变乳清蛋白的结构及性质,致使食品结构、质地等发生变化^[3].因此,探究冷冻对氧化乳清蛋白结构和性质的影响非常必要.

收稿日期: 2021-10-21; 修回日期: 2022-03-03

基金项目: 天津市高等学校大学生创新创业训练计划项目(202110057219); 山东省自然科学基金项目(ZR2020KC029)

作者简介: 张楠(1997—),女,河北人,硕士研究生; 通信作者: 汪建明,教授, wangjianming@tust.edu.cn

马思丽等^[4]研究不同羟自由基氧化体系强度下的牛肌原纤维蛋白结构,发现随着过氧化氢浓度的增加,其羰基含量、二聚酪氨酸含量和表面疏水性指数逐渐增加,而总巯基含量和 α -螺旋含量呈下降趋势。Zhang 等^[5]同样发现了随着羟自由基对肌原纤维蛋白氧化修饰的增强,羰基和二聚酪氨酸的含量以及表面疏水性指数均增加,而总巯基含量和色氨酸荧光强度逐渐降低,二硫键和其他共价键导致蛋白质的交联和聚集, α -螺旋含量减少, β -折叠含量增加。Dorta 等^[6]发现,超氧自由基诱导肌原纤维蛋白氧化修饰形成羰基和二硫键,导致蛋白质交联和聚合。3 mmol/L 超氧自由基会诱导蛋白质交联,而 5 ~ 10 mmol/L 超氧自由基会诱导肌原纤维蛋白的解折叠和聚集,赖氨酸残基的消耗也证实了这一点。

Yang 等^[7]研究发现,冷冻过程中形成的冰晶会破坏面团蛋白质中的二硫键和氢键,快速冷冻可以诱导微冰晶的形成,从而减少对蛋白质结构造成的破坏;在缓慢冷冻的面团中观察到更多被破坏的和薄弱的结构,且伴随着 β -折叠含量的增加和 α -螺旋含量的减少。Wang 等^[8]研究发现,冷冻加强了蛋黄蛋白质中的二硫键、氢键和疏水相互作用,促进聚集,导致其粒径增大;弛豫时间显示,冷冻使蛋黄中蛋白质的固定水含量增加,游离水含量减少;红外光谱结果表明,冷冻增强了蛋黄内的氢键;扫描电子显微镜结果表明,冷冻促进了蛋黄中蛋白质颗粒的解离。

氧化修饰可以使氨基酸残基侧链和蛋白质多肽主链发生变化,从而导致蛋白质交联^[9]、断裂^[10-11]、解折叠^[12]和构象变化;而蛋白质在冷冻过程中,冰晶也会破坏蛋白质和水的结合而使蛋白质分子间发生相互作用^[13],从而导致其构象变化^[14]。目前文献仅有单纯对蛋白质的氧化现象^[15]或是冷冻现象^[16]的研究,且主要集中于蛋白质功能性质的表征^[17]和优化^[18]。本文将乳清蛋白先进行不同时间的氧化处理,然后再进行不同温度和时间的冷冻处理,通过测定其羰基含量分析其氧化程度和结构变化,利用傅里叶变换红外光谱分析其二级结构的变化,利用扫描电子显微镜再结合浊度、粒径、表面疏水性指数和巯基含量的测定共同表征分析乳清蛋白先氧化再冷冻后的结构和性质变化,旨在为含有或是添加乳清蛋白的食品在加工和低温储运过程中的品质优化提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

乳清浓缩蛋白(WPC-70)由山东天博食品配料

有限公司提供。

磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、无水乙醇、乙二胺四乙酸(EDTA)、盐酸胍,北京鼎国生物技术有限公司;抗坏血酸(Asc)、浓盐酸、三氯化铁、过氧化氢,天津市北方天医化学试剂厂;尿素、2-硝基苯甲酸(DTNB)、2,4-二硝基苯肼(DNPH)、甘氨酸、三氯乙酸,美国 Sigma 公司;8-苯胺-1-萘磺酸盐(ANS)荧光探针(优级纯),上海源叶生物科技有限公司。所有试剂均为分析纯试剂。

TG16-WS 型高速离心机,长沙湘仪离心机有限公司;SU1510 型扫描电子显微镜,日本日立公司;Evolution 300 型紫外-可见分光光度计,赛默飞世尔科技公司;iS50 型傅里叶变换红外光谱仪,美国尼高利公司;FD-1A-50 型冷冻干燥机,北京博医康实验仪器有限公司;RF5301 型荧光分光光度计,日本岛津公司;BT-2001 型激光粒度仪,丹东百特仪器有限公司;DW-40L92 型医用低温保存箱,青岛海尔特种电器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 氧化乳清蛋白的制备及其冷冻条件

文章涉及符号及其含义见表 1。

表 1 文章涉及符号及其含义

Tab. 1 Symbols in the article and their meanings

符号	含义
2 h	乳清蛋白氧化 2 h
2 h/2 d, -18 °C	氧化 2 h 的乳清蛋白在 -18 °C 冷冻 2 d
2 h/2 d, -40 °C	氧化 2 h 的乳清蛋白在 -40 °C 冷冻 2 d
2 h/4 d, -18 °C	氧化 2 h 的乳清蛋白在 -18 °C 冷冻 4 d
2 h/4 d, -40 °C	氧化 2 h 的乳清蛋白在 -40 °C 冷冻 4 d
4 h	乳清蛋白氧化 4 h
4 h/2 d, -18 °C	氧化 4 h 的乳清蛋白在 -18 °C 冷冻 2 d
4 h/2 d, -40 °C	氧化 4 h 的乳清蛋白在 -40 °C 冷冻 2 d
4 h/4 d, -18 °C	氧化 4 h 的乳清蛋白在 -18 °C 冷冻 4 d
4 h/4 d, -40 °C	氧化 4 h 的乳清蛋白在 -40 °C 冷冻 4 d

乳清蛋白氧化体系参考孔保华等^[19]的羟自由基氧化体系($H_2O_2/FeCl_3/Asc$)并加以改进。将乳清蛋白置于由 20 mmol/L H_2O_2 、0.1 mmol/L $FeCl_3$ 和 0.1 mmol/L Asc 组成的氧化体系中,配制成质量浓度为 20 mg/mL 的蛋白质溶液;用磁力搅拌器混匀后调节转速为 150 r/min,在室温下(23 °C)分别氧化 2 h 和 4 h,结束后加入 1 mmol/L EDTA 终止氧化;10 000g 离心 10 min 后弃去上清液,再用蒸馏水洗涤沉淀后离心以除去残余试剂;将沉淀均匀分散在与氧化体系等量的蒸馏水中,分别于 -18 °C 和 -40 °C 下冷冻 2 d 和 4 d。将乳清蛋白置于 35 °C 水浴中解冻,然后在转

速为 250 r/min 的条件下搅拌 1 h, 10 000g 离心 10 min, 取上清液进行冷冻干燥, 4 °C 干燥环境中保存。

1.2.2 乳清蛋白的羰基含量测定

测定方法依照 Yang 等^[20]的 DNPH 比色法并加以改进。将冻干的改性乳清蛋白溶于 pH 7 的磷酸盐缓冲液, 使其质量浓度为 5 mg/mL; 取 0.35 mL 溶液置于 2.0 mL 离心管内, 加入 1 mL 用 2 mol/L 盐酸溶解的 10 mmol DNPH 溶液, 室温避光反应 14 h; 加入 0.45 mL 质量分数为 40% 的三氯乙酸溶液反应 1 h, 10 000g 离心 5 min, 弃去上清液。用 1.4 mL 体积比为 1:1 的乙醇-乙酸乙酯溶液洗涤蛋白质沉淀 2 次, 每次 10 000g 离心 5 min。将沉淀溶解于 0.7 mL 盐酸胍-磷酸盐缓冲液(盐酸胍 6 mol/L, 磷酸盐缓冲液 pH 7), 37 °C 水浴 25 min, 剧烈振荡使其溶解, 在 368 nm 波长下测定吸光度, 每个样品均用不含 DNPH 的改性蛋白质溶液经上述步骤处理作为空白对照, 以消除盐酸等对实验结果的影响。羰基含量(nmol/mg)按照式(1)计算。

$$\text{羰基含量} = \frac{A_{368} \times 10^6}{22\,000 \times \rho} \quad (1)$$

式中: A_{368} 为样品在 368 nm 波长下的吸光度; ρ 为样品溶液质量浓度, mg/mL; 22 000 为摩尔吸光系数, L/(mol·cm)。

1.2.3 乳清蛋白的巯基含量测定

乳清蛋白巯基含量的测定采用 Ellman 试剂法, 参考 DTNB 比色法^[21]并加以改进。

将 5 μ L 的 Ellman 试剂 [0.008 g DNTB 溶于 2 mL Tris-Gly 缓冲液(0.52 g Tris、0.345 g 甘氨酸和 0.06 g EDTA 溶于 50 mL pH 7.8 的磷酸盐缓冲液)] 加到 0.1 mL 的 5 mg/mL 乳清蛋白样品溶液中, 在 22 °C 条件下反应 50 min 后于 412 nm 处测定吸光度, 以不含乳清蛋白样品溶液的试剂作为空白对照。巯基含量(nmol/mg)按照式(2)计算。

$$\text{巯基含量} = 73.53 \times A \times \frac{D}{\rho} \quad (2)$$

式中: 73.53 为 $1 \times 10^6 / (1.36 \times 10^4)$, 其中 1.36×10^4 是 Ellman 试剂的摩尔吸光系数, L/(mol·cm); A 为除去试剂空白后样品的吸光度; D 为稀释倍数, 15.1; ρ 为样品溶液质量浓度, mg/mL。

1.2.4 乳清蛋白的傅里叶变换红外光谱测定

采用 KBr 压片法^[22]进行测定。将 1 mg 冷冻干燥的乳清蛋白改性产物与 150 mg KBr 结晶混合, 快速研磨成均一细粉, 在压片机上以 8×10^7 Pa 的压力压制 30 s, 取出压好的透明薄片; 以空气作为采集背

景, 在傅里叶变换红外光谱仪中进行全波段扫描 ($400 \sim 4\,000 \text{ cm}^{-1}$), 分辨率为 4 cm^{-1} , 扫描次数为 16 次, 利用 OMNIC 软件对酰胺 I 带 ($1\,600 \sim 1\,700 \text{ cm}^{-1}$) 的红外光谱进行分析处理, 得到乳清蛋白改性产物二级结构单元含量的变化。

1.2.5 乳清蛋白的粒径测定

乳清蛋白的粒径分布采用 BT-2001 型激光粒度仪测定。取 5 mg/mL 制备的乳清蛋白样品溶液进行测定, 散射角度为 90°, 测定时间为 60 s。

1.2.6 乳清蛋白的微观结构

用导电胶将制备好的乳清蛋白样品粘在样品台上, 置于离子溅射仪中, 使样品表面镀导电金膜, 用 SU1510 型扫描电子显微镜观察。

1.2.7 乳清蛋白的表面疏水性指数测定

采用 ANS 荧光探针法^[23]测定蛋白质的表面疏水性指数。取 1 mg 制备好的乳清蛋白样品均匀分散在 0.01 mol/L、pH 7 的磷酸盐缓冲液中使其溶解, 分别配制成质量浓度为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/mL 的乳清蛋白待测液; 将 ANS 溶于上述磷酸盐缓冲液中, 配制成浓度为 8 mmol/L 的 ANS 溶液。将 4 mL 乳清蛋白待测液和 50 μ L ANS 溶液混合, 置于黑暗条件下 30 min 使其充分反应; 在激发波长 390 nm 和发射波长 470 nm 的条件下测定荧光强度, 狭缝设置为 5, 灵敏度设置为 2。将荧光强度的测定结果与乳清蛋白质量浓度绘制成曲线图, 曲线初始斜率即为乳清蛋白的表面疏水性指数。

1.2.8 乳清蛋白的浊度测定

将 0.05 g 的乳清蛋白冻干粉溶解在 10 mL、pH 7 的磷酸盐缓冲液中, 在 600 nm 处测定其吸光度, 用此吸光度表示浊度。

2 结果与分析

2.1 不同氧化/冷冻条件对乳清蛋白羰基及巯基含量的影响

因羰基含量与蛋白质氧化程度相关, 实验中常用其作为表征蛋白质受氧化影响程度的标志性常规指标^[24]; 而蛋白质中的半胱氨酸残基主要以巯基或二硫键的状态存在, 二硫键有着稳定蛋白质天然构象的重要作用, 使蛋白质肽链空间结构更为紧密。已有实验证明^[25], 当蛋白质的二硫键还原成巯基时, 蛋白质构象变得松散。因此, 通过对先氧化后冷冻的乳清蛋白的羰基含量及巯基含量进行分析, 辅助表征其结构、性质的变化(图 1)。

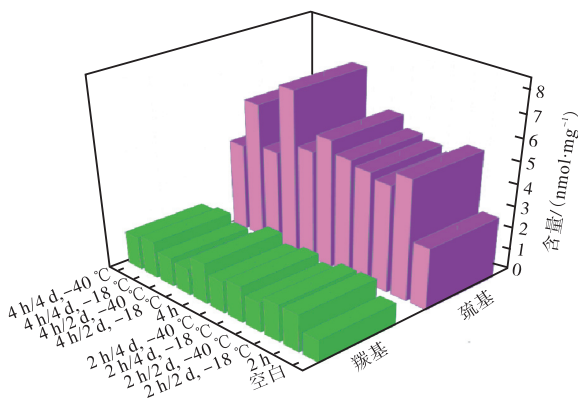


图1 氧化/冷冻条件对乳清蛋白羰基及巯基含量的影响
Fig.1 Effect of oxidation/freezing conditions on the carbonyl and sulfhydryl content of oxidized whey protein

由图1可知:乳清蛋白经过2h和4h氧化后与空白相比其羰基和巯基的含量均上升,表明氧化使乳清蛋白结构解构.乳清蛋白氧化2h再冷冻2d后,与空白相比其羰基含量减少,其中-40℃冷冻条件下乳清蛋白的羰基含量更少.这可能是由于更低的冷冻温度使蛋白质的聚集程度更大,更多的羰基无法与DNPH结合^[25].继续冷冻至第4天时,-18℃条件下乳清蛋白的羰基含量进一步降低,而-40℃条件下其羰基含量略有上升.当乳清蛋白在冷冻之前经过更长时间的氧化后,在-18℃和-40℃条件下随着冷冻时间的增加,羰基含量均呈现先下降后上升的趋势,其中-18℃条件下乳清蛋白羰基含量的变化程度较-40℃条件下的更大.在先氧化再冷冻的情况下,总体来看,无论是-18℃还是-40℃条件下,均是在经过氧化4h和冷冻2d处理的羰基含量最低.这可能是由于高度羰基化的蛋白质倾向于形成高分子聚集体^[26-27],再经过短时间冷冻后进一步聚集,而继续长时间冷冻导致蛋白质部分解聚^[28].

经过4h氧化和-18℃冷冻处理的乳清蛋白的巯基含量增加最多,这可能是由于二硫键的断裂或蛋白质结构松散暴露了内部的巯基;而经过4h氧化和-40℃冷冻处理的乳清蛋白的巯基含量变化不大,说明较低的冷冻温度对蛋白质的结构起到保护作用.

综上所述,氧化后的乳清蛋白再经过冷冻处理,其羰基和巯基的含量与空白组相比均增大.

2.2 不同氧化/冷冻条件对乳清蛋白傅里叶变换红外光谱的影响

在1600~1700 cm⁻¹波数范围内的酰胺I带在表征蛋白质二级结构上应用最为广泛^[29],用OMNIC软件对乳清蛋白样品谱图的酰胺I带进行傅里叶去

卷积、分峰和高斯峰拟合计算,不同氧化/冷冻条件下乳清蛋白的傅里叶变换红外光谱及二级结构单元含量分别见图2和表2.

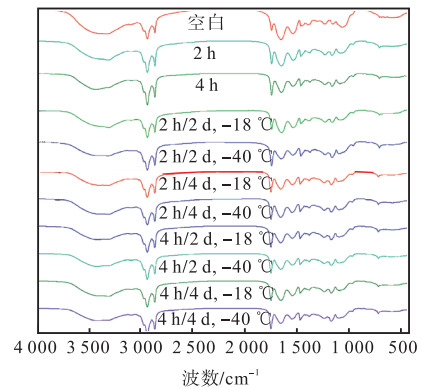


图2 不同氧化/冷冻条件下乳清蛋白的傅里叶变换红外光谱
Fig.2 Fourier transform infrared spectrum of whey proteins with different oxidation/freezing conditions

表2 不同氧化/冷冻条件下乳清蛋白的二级结构单元含量
Tab.2 Secondary structure unit content of whey proteins with different oxidation/freezing conditions

处理条件	含量/%			
	β -折叠	无规则卷曲	α -螺旋	β -转角
空白	23.92	14.82	7.34	53.92
2 h	28.82	14.64	6.02	50.52
4 h	31.46	11.23	5.90	51.42
2 h/2 d, -18 °C	25.03	8.34	17.11	49.52
2 h/2 d, -40 °C	29.69	17.45	5.65	47.21
2 h/4 d, -18 °C	26.15	5.42	5.42	63.02
2 h/4 d, -40 °C	25.36	12.36	17.54	44.74
4 h/2 d, -18 °C	31.80	7.97	7.43	52.80
4 h/2 d, -40 °C	30.13	7.87	7.61	54.40
4 h/4 d, -18 °C	29.44	11.40	6.80	52.37
4 h/4 d, -40 °C	29.44	12.34	8.37	49.84

通过比较经过不同时间氧化处理的乳清蛋白及空白组的二级结构单元可知: β -折叠的含量随氧化时间的增加而增加,而无规则卷曲、 α -螺旋和 β -转角的含量均随氧化时间的增加而减少,说明氧化作用使蛋白质部分侧链变短.氧化2h的乳清蛋白置于-18℃冷冻2d和置于-40℃冷冻4d后,均出现 α -螺旋结构占比增加的现象;而氧化2h的乳清蛋白冷冻4d后,-18℃条件下无规则卷曲结构向 β -转角结构转变,-40℃条件下 β -转角结构向无规则卷曲结构转变.乳清蛋白经过4h氧化后再经过-18℃冷冻2d,同样是无规则卷曲结构向 α -螺旋结构转变,但是比氧化2h的变化量少,冷冻至4d时,无规则卷曲结构数量明显增加;而在-40℃条件下冷冻2d后,无规

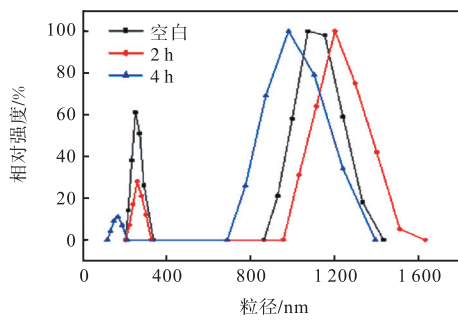
则卷曲结构向 β -转角结构转变,而冷冻至4d时, β -转角结构更大程度地向无规则卷曲结构转变。

2.3 不同氧化/冷冻条件对乳清蛋白粒径的影响

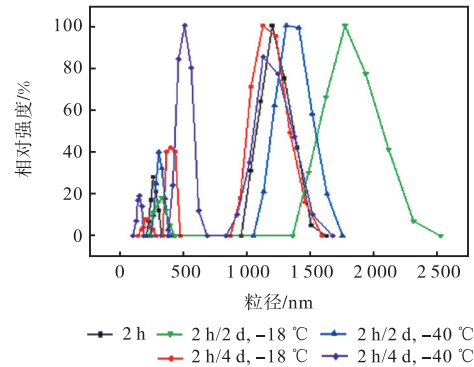
通过对蛋白质粒径的测量分析可以对蛋白质的结构变化进行辅助表征,冷冻对氧化乳清蛋白粒径的影响如图3所示,不同字母表示组间差异显著($P <$

0.05)。

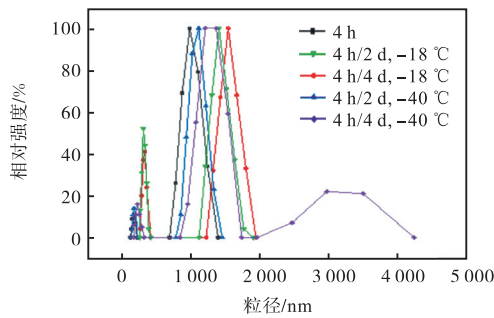
由图3(d)的i、g、k柱形图可知,乳清蛋白在2h和4h氧化处理后,其平均粒径逐步增大;再结合图3(a)可见,随着氧化时间的增加,其大峰逐步变宽,小峰逐步变矮,表明氧化可能使乳清蛋白发生解折叠或交联^[30]。



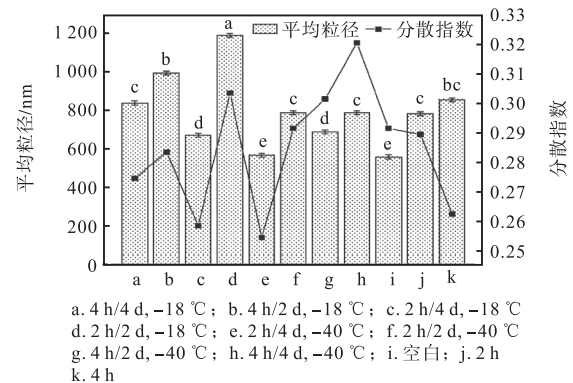
(a) 不同氧化时间对乳清蛋白粒径的影响



(b) 不同冷冻处理条件对经过2h氧化后乳清蛋白粒径的影响



(c) 不同冷冻处理条件对经过4h氧化后乳清蛋白粒径的影响



(d) 所有氧化/冷冻处理后的乳清蛋白平均粒径及其分散指数

图3 冷冻对氧化乳清蛋白粒径的影响

Fig. 3 Effect of freezing on the particle size of the oxidized whey protein

图3(b)为不同温度和时间的冷冻处理对经过2h氧化后乳清蛋白粒径的影响.从冷冻时间来看:乳清蛋白在 -18°C 下冷冻2d后,其大峰右移变宽,小峰变矮,表明分子可能发生解折叠和交联;继续冷冻至4d时,粒径主峰左移变窄且由双峰变为三峰,根据其小峰积分面积变大可以判断蛋白质分子可能发生了裂解.在 -40°C 条件下冷冻2d和4d的乳清蛋白显示出相同的趋势,区别在于冷冻2d后与 -18°C 相比其解折叠程度更小,而冷冻4d后其裂解程度更大.从冷冻温度来看:冷冻2d后的蛋白质粒径均呈现双峰,冷冻4d后的蛋白质粒径均呈现三峰,且无论是冷冻2d还是4d, -40°C 条件下的峰与 -18°C 条件下的峰都向左移,表明更低的温度可能更利于蛋白质结构缩聚。

图3(c)为不同温度和时间的冷冻处理对经过4h氧化后乳清蛋白粒径的影响.总体来看,与氧化2h相比,其粒径变化程度更小,且峰均向右移,粒径变大,说明氧化4h后的乳清蛋白经过不同温度和时间的冷冻处理后其分子构象可能变得松散.氧化4h后在 -18°C 冷冻2d的乳清蛋白的粒径增加最多,可能是由于冷冻过程使蛋白质在冰-液界面或容器表面吸附,使其部分结构展开,因此导致蛋白质聚集^[31]。

由图3(d)可以看出:乳清蛋白经过先氧化再冷冻处理后,平均粒径呈现出增大的趋势,而经过2h氧化处理后再经过 -18°C 冷冻4d的乳清蛋白的平均粒径增加最多.乳清蛋白粒径的分散指数均大于0.25,可以看出其粒径分布基本是双峰甚至三峰分布,较为分散。

2.4 不同氧化/冷冻条件对乳清蛋白微观结构的影响

用扫描电子显微镜可以直观地从微观形态上分析不同氧化/冷冻条件对乳清蛋白的影响(图 4)。由图 4 可以看出:未处理的空白组乳清蛋白表面光滑平整,形状规则;经过氧化后结构形态明显改变,并显

示出不规则的交联;再经过冷冻后的蛋白质表面呈现出更多的、大小不一的孔洞。总体来看,经过氧化后再置于-18℃冷冻的乳清蛋白形态较-40℃条件下显示出更大的形变。这可能是由于更大的温差使冷冻速率变快,水分子形成更大的、对蛋白质分子产生破坏作用的冰晶更少。

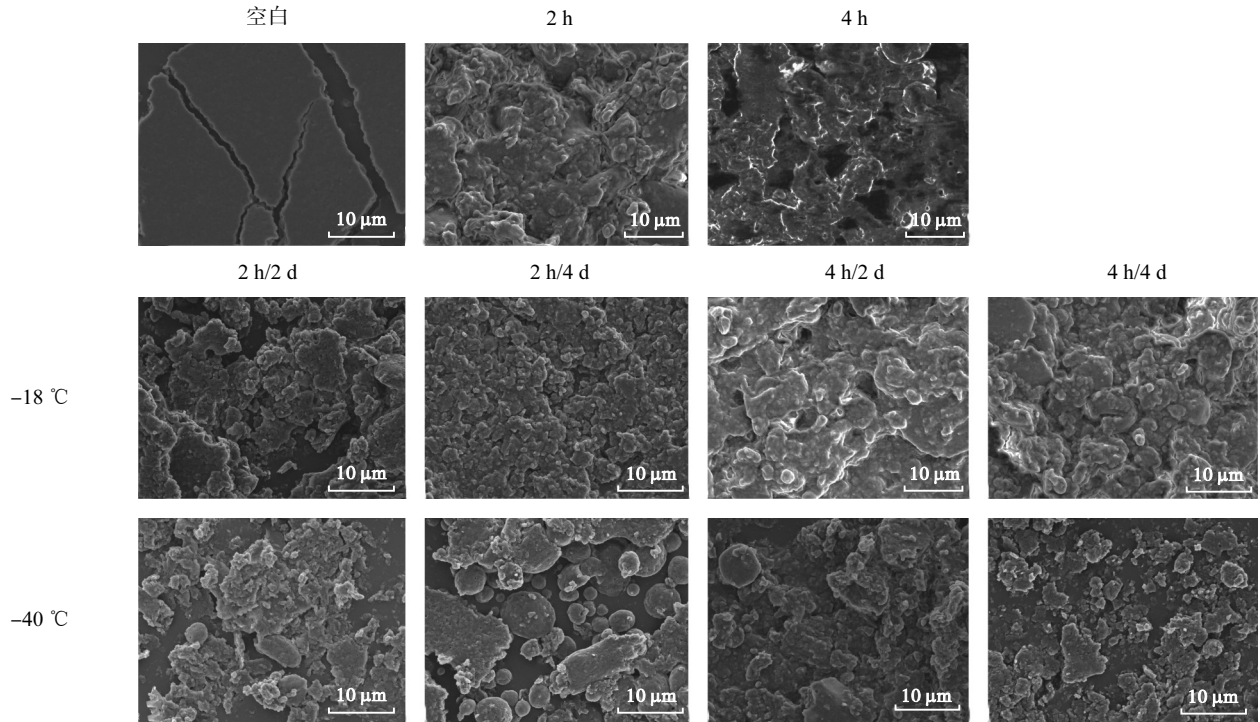


图 4 不同氧化/冷冻条件下乳清蛋白的微观结构

Fig. 4 Microstructure of whey proteins under different oxidation/freezing conditions

2.5 不同氧化/冷冻条件对乳清蛋白表面疏水性指数的影响

表面疏水性指数可以显示出蛋白质的氨基酸残基的分布特点,是表征蛋白质结构变化的重要指标。不同氧化/冷冻条件下乳清蛋白的表面疏水性指数见表 3。

表 3 不同氧化/冷冻条件下乳清蛋白的表面疏水性指数
Tab.3 Surface hydrophobicity index of whey protein under different oxidation/freezing conditions

处理条件	表面疏水性指数	
	2 h	4 h
2 d, -18 °C	1 268.1 ± 15.6 ^a	1 114.5 ± 12.5 ^b
4 d, -18 °C	848.7 ± 10.2 ^a	1 045.7 ± 18.5 ^b
2 d, -40 °C	898.5 ± 16.5 ^c	920.1 ± 12.5 ^c
4 d, -40 °C	880.3 ± 14.8 ^c	877.1 ± 17.9 ^d
未冷冻	1 060.4 ± 11.3 ^b	936.7 ± 10.6 ^c
空白	917.8 ± 14.6 ^c	

注: 不同字母表示组间存在显著差异 (P<0.05)

氧化后再置于-18℃下冷冻 2 d 后的乳清蛋白表面疏水性指数增加较多,结合其粒径大幅度的增加进

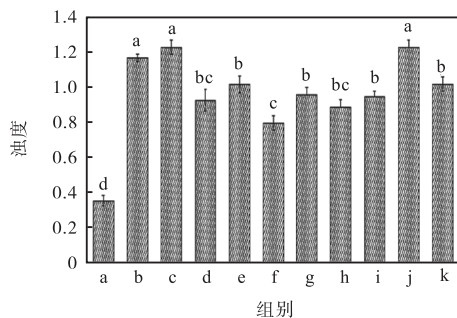
行分析,可能是乳清蛋白经过氧化后再置于-18℃下冷冻 2 d 使其结构松散舒展,内部疏水基团暴露更多^[32]。而其冷冻至 4 d 或是置于-40℃处理后的蛋白质表面疏水性指数降低,结合其粒径减小进行分析,可能是更长时间和更低温度的冷冻使蛋白质结构紧缩变得更加致密^[33],从而减少了表面的疏水基团。

2.6 不同氧化/冷冻条件对乳清蛋白浊度的影响

浊度取决于溶液中不溶性聚集体的含量和大小,可以在一定程度上反映蛋白质分子的聚集情况^[34]。不同氧化/冷冻条件对乳清蛋白浊度的影响如图 5 所示。

由图 5 可知,乳清蛋白经过先氧化再冷冻处理后,浊度均有不同程度的增加。乳清蛋白经过氧化 2 h 或 4 h 处理后,浊度略有下降,结合粒径和表面疏水性指数分析,可能是由于长时间的氧化导致蛋白质分子结构的变化,其粒径更小、表面疏水性指数更低,使蛋白质溶解性增强,进而显示出更低的浊度^[35]。乳清蛋白经过 2 h 氧化处理再置于-18℃冷冻 2 d 后

浊度升高,而在同样条件下 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻的蛋白质溶液浊度降低,这个变化与表面疏水性指数变化一致,随着蛋白质分子表面亲水基团和疏水基团数量的变化而变化;当继续冷冻至4d时,浊度随着冷冻温度的降低而降低,这可能是由于冷冻引发分子聚集效应^[36],从而对光线表现出更多的散射作用.乳清蛋白经过4h氧化处理后再置于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻2d后,浊度变化不大;继续冷冻至4d时,浊度明显增加.其中 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下的蛋白质浊度大幅度上升,表明此条件处理后的乳清蛋白结构可能发生了较大改变.总体来看, $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 比 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 对蛋白质浊度的影响更大.结合上述实验结果可以证实, $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的冷冻条件比 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 对乳清蛋白结构的影响更大,使其分子结构的打开度更大.



a. 空白; b. 2 h; c. 2 h/2 d, $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$; d. 2 h/2 d, $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$; e. 2 h/4 d, $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$; f. 2 h/4 d, $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$; g. 4 h; h. 4 h/2 d, $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$; i. 4 h/2 d, $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$; j. 4 h/4 d, $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$; k. 4 h/4 d, $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$

图5 不同氧化/冷冻条件对乳清蛋白浊度的影响

Fig. 5 Effect of turbidity of whey proteins under different oxidation/freezing conditions

3 结论

通过对不同氧化/冷冻条件下的乳清蛋白进行结构表征和分析发现,乳清蛋白经过先氧化再冷冻处理,其巯基含量、硫基含量和浊度均有所增加,且粒径变大;再结合粒径和表面疏水性指数的结果可知:经过4h氧化再置于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻2d后的处理对乳清蛋白结构的改变最为严重;红外光谱结果显示,此条件处理后的乳清蛋白二级结构中的无规则卷曲结构向 β -折叠结构转变.扫描电子显微镜结果显示,经过氧化再置于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻的乳清蛋白形态较 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下发生了更大的形变;同样, $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下乳清蛋白的浊度也较 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下更大.这说明缓慢冷冻时,冰晶对蛋白质结构的破坏更易导致乳清蛋白结构的打开.

参考文献:

- [1] 汪姣玲. 乳清蛋白美拉德改性及其产物功能特性研究[D]. 无锡:江南大学,2015.
- [2] 刘海燕. 液态乳热处理和贮藏对乳蛋白的稳定性及氧化作用研究[D]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学,2020.
- [3] DE CASTRO R J S, DOMINGUES M A F, OHARA A, et al. Whey protein as a key component in food systems: physicochemical properties, production technologies and applications[J]. Food structure, 2017, 14: 17-29.
- [4] 马思丽,杨波,李亚蕾,等. 羟自由基氧化对牛肌原纤维蛋白结构与乳化性能的影响[J]. 食品科学, 2021: 1-14[2021-10-20]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.ts.20210531.1347.016.html>.
- [5] ZHANG Z, LIU P, DENG X, et al. Effects of hydroxyl radical oxidation on myofibrillar protein and its susceptibility to μ -calpain proteolysis[J]. Food science and technology, 2021, 137: 110453.
- [6] DORTA E, ÁVILA F, FUENTES-LEMUS E, et al. Oxidation of myofibrillar proteins induced by peroxy radicals: role of oxidizable amino acids[J]. Food research international, 2019, 126: 108580.
- [7] YANG J, ZHANG B, ZHANG Y, et al. Effect of freezing rate and frozen storage on the rheological properties and protein structure of non-fermented doughs[J]. Journal of food engineering, 2021, 293: 110377.
- [8] WANG R, MA Y, ZHANG L, et al. Changes in egg yolk gelation behaviour and mechanisms during freezing[J]. Food science and technology, 2021, 151: 112223.
- [9] 牛思思. 氧化对蛋清蛋白结构及功能特性的影响[D]. 天津:天津科技大学,2017.
- [10] POOJARY M M, TIWARI B K, LUND M N. Selective and sensitive UHPLC-ESI-Orbitrap MS method to quantify protein oxidation markers[J]. Talanta, 2021, 234: 122700.
- [11] LI F, WU X, WU W. Effects of protein oxidation induced by rice bran rancidity on the structure and functionality of rice bran glutelin[J]. Food science and technology, 2021, 149: 111874.
- [12] 袁海娜,武美琳,林金鹏,等. 丙二醛氧化对乳清蛋白结构及其抗氧化活性的影响研究[J]. 中国乳品工业, 2021, 49(6): 4-10.
- [13] SUN H, ZHANG M, LIU Y, et al. Improved viability of *Lactobacillus plantarum* embedded in whey protein concentrate/pullulan/trehalose hydrogel during freeze drying[J]. Carbohydrate polymers, 2021, 260: 117843.

- [14] 张潮,吴宇桐,孔保华. 超声辅助冷冻对鸡胸肉肌原纤维蛋白乳化稳定性的影响[J]. 食品科学, 2020, 41(17):104-110.
- [15] 杜宇凡,姜晴晴,施文正,等. 冷冻水产品脂肪和蛋白质氧化及其控制措施研究进展[J]. 食品工业科技, 2021: 1-11[2021-10-20]. <https://doi.org/10.13386/j.isn1002-0306.2021030282>.
- [16] HEMATYAR N, MRAZ J, STEJSKAL V, et al. Comparison of quality changes in eurasian perch (*Perca fluviatilis* L.) fillets originated from two different rearing systems during frozen and refrigerated storage[J]. Foods, 2021, 10(6): 1405.
- [17] 孙常雁. 乳清蛋白肽美拉德反应产物的制备及其抗氧化作用机理研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学, 2014.
- [18] 赵爱迪. 微波加热对牛乳清蛋白结构及功能的影响[D]. 沈阳:沈阳农业大学, 2017.
- [19] 孔保华,孙妍,熊幼翎. 抗氧化剂对羟自由基引起的乳清分离蛋白氧化抑制效果的研究[J]. 食品科学, 2010, 31(3): 5-10.
- [20] YANG J, XIONG Y L. Comparative time-course of lipid and myofibrillar protein oxidation in different biphasic systems under hydroxyl radical stress[J]. Food chemistry, 2018, 243: 231-238.
- [21] OU S, KWOK K C, WANG Y, et al. An improved method to determine SH and —S—S— group content in soymilk protein[J]. Food chemistry, 2004, 88(2): 317-320.
- [22] 石彦国,郭庆启,杨晓婉,等. 大豆蛋白-酪蛋白复合物结构的红外光谱分析[J]. 中国食品学报, 2018, 18(11): 225-231.
- [23] CARDAMONE M, PURI N K. Spectrofluorimetric assessment of the surface hydrophobicity of proteins[J]. Biochemical journal, 1992, 282: 589-593.
- [24] GEORGIU C D, ZISIMOPOULOS D, ARGYROPOULOU V, et al. Protein and cell wall polysaccharide carbonyl determination by a neutral pH 2, 4-dinitrophenylhydrazine-based photometric assay[J]. Redox biology, 2018, 17: 128-142.
- [25] LI T, HU J, TIAN R, et al. Citric acid promotes disulfide bond formation of whey protein isolate in non-acidic aqueous system[J]. Food chemistry, 2021, 338: 127819.
- [26] 段丽菊,刘英帅,朱燕,等. DNPH 比色法:一种简单的蛋白质羰基含量测定方法[J]. 毒理学杂志, 2005, 19(4): 320-322.
- [27] HAMAD M S, DASONG L, KGALALELO K, et al. Effects of UV induced photo-oxidation on the physico-chemical properties of milk protein concentrate[J]. Food research international, 2014, 62: 580-588.
- [28] GONG W, GUO X L, HUANG H B, et al. Structural characterization of modified whey protein isolates using cold plasma treatment and its applications in emulsion oleogels[J]. Food chemistry, 2021, 356: 129703.
- [29] WANG L, CAO C, ZUO S. Protein secondary structure assignment using pc-polyline and convolutional neural network[J]. Proteins: structure, function, and bioinformatics, 2021, 89(8): 26079.
- [30] DAVIES M J. The oxidative environment and protein damage[J]. Biochimica et biophysica acta, 2005, 1703(2): 93-109.
- [31] GUAN E, PANG J, YANG Y, et al. Effects of wheat flour particle size on physicochemical properties and quality of noodles[J]. Journal of food science, 2020, 85(12): 4209-4214.
- [32] LEE S G, KOH H Y, LEE J H, et al. Cryopreservative effects of the recombinant ice-binding protein from the arctic yeast *Leucosporidium* sp. on red blood cells[J]. Applied biochemistry and biotechnology, 2012, 167(4): 824-834.
- [33] LI M, YU R, FU R, et al. Limited hydrolysis of glycosylated whey protein isolate ameliorates the oxidative and physical stabilities of conjugated linoleic acid oil-in-water emulsions[J]. Food chemistry, 2021, 362: 130212.
- [34] JIANG Q, NAKAZAWA N, HU Y, et al. Evolution of tissue microstructure, protein properties, and oxidative stability of salted bigeye tuna (*Thunnus obesus*) meat during frozen storage[J]. Food science and technology, 2021, 149: 111848.
- [35] RELKIN P, SOURDET S, SMITH A K, et al. Effects of whey protein aggregation on fat globule microstructure in whipped-frozen emulsions[J]. Food hydrocolloids, 2005, 20(7): 1050-1056.
- [36] WANG Y, ZHANG A, WANG X, et al. The radiation assisted-Maillard reaction comprehensively improves the freeze-thaw stability of soy protein-stabilized oil-in-water emulsions[J]. Food hydrocolloids, 2020, 103: 105684.

责任编辑: 郎婧