

脂质过氧自由基对蛋黄蛋白结构和加工性能的影响

叶依林, 刘 钰, 朱庆香, 李扬扬, 刘雅芝, 王庆玲

Effect of Lipid Peroxyl Radicals on the Structure and Processing Properties of Egg Yolk Protein

YE Yilin, LIU Yu, ZHU Qingxiang, LI Yangyang, LIU Yazhi, and WANG Qingling

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023110330>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

羟自由基氧化对鲢鱼肌原纤维蛋白结构的影响

Effect of Hydroxyl Radical Oxidation on the Structure of Silver Carp Myofibrillar Protein

食品工业科技. 2020, 41(4): 6-12 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.04.002>

沙棘多糖清除自由基及抗脂质过氧化作用研究

Study on Free Radical Scavenging and Anti-lipid Peroxidation of Seabuckthorn Polysaccharide

食品工业科技. 2019, 40(8): 272-277 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.08.046>

羟自由基氧化体系对大黄鱼肌原纤维蛋白结构的影响

Effect of Hydroxyl Radical Oxidation System on Structure of Myofibrillar Protein in Cultured *Pseudosciaena crocea*

食品工业科技. 2019, 40(1): 29-33 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.01.006>

腌制条件对熟制咸鸭蛋蛋黄组织形态及组成的影响

Effects of Salting Conditions on the Morphology and Composition of Cooked Salted Duck Eggs Yolk

食品工业科技. 2023, 44(11): 80-87 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022060301>

中长链结构脂质MLCT的研究进展

Research Progress of Medium and Long Chain Structured Lipids MLCT

食品工业科技. 2021, 42(5): 322-327 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020040207>

自由基接枝改性对乳清分离蛋白乳化稳定性的影响

Effect of Radical Graft Modification on Emulsifying Stability of Whey Protein Isolate

食品工业科技. 2022, 43(14): 94-100 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021110006>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

叶依林, 刘钰, 朱庆香, 等. 脂质过氧自由基对蛋黄蛋白结构和加工性能的影响 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(20): 98–104. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110330

YE Yilin, LIU Yu, ZHU Qingxiang, et al. Effect of Lipid Peroxyl Radicals on the Structure and Processing Properties of Egg Yolk Protein[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(20): 98–104. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110330

· 研究与探讨 ·

脂质过氧自由基对蛋黄蛋白结构和加工性能的影响

叶依林, 刘钰, 朱庆香, 李扬扬, 刘雅芝, 王庆玲*
(石河子大学食品学院, 新疆石河子 832003)

摘要: 为明确脂质过氧自由基 (ROO·) 对蛋黄蛋白结构和加工性能的影响, 在有氧条件下分别以 0、0.04、0.2、0.5、1、5、10 mmol/L 2,2'-偶氮二 (2-甲基丙基咪) 二盐酸盐 (2,2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride, AAPH) 产生的 ROO· 作用于蛋黄蛋白, 研究蛋黄蛋白结构、理化性质以及功能特性的变化。结果表明: 随 AAPH 浓度增加, 蛋黄蛋白的羰基含量显著增加 ($P<0.05$), 总巯基含量显著减少 ($P<0.05$); 随着氧化反应加剧, 蛋黄蛋白的二、三级结构明显改变, 蛋白质发生了聚集; 表面疏水性表现出先增强后减弱的趋势; Zeta 电位的绝对值呈现先减少后增加随后递减的趋势; 此外, 持续的氧化导致蛋黄蛋白溶解度下降, 乳化性能分析发现 0.5 mmol/L 的 AAPH 可实现蛋黄蛋白的最佳乳化性能。主成分分析 (Principal component analysis, PCA) 发现, 不同氧化程度下产生的 ROO· 对蛋黄蛋白的影响差异明显。本研究深入揭示了蛋黄蛋白在 AAPH 氧化体系下的变化规律, 为鸡蛋加工过程中的氧化控制、品质调控提供一定的参考依据。

关键词: 蛋黄蛋白, 过氧自由基, 脂质氧化, 结构, 加工性能

中图分类号: TS253.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)20-0098-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110330



本文网刊:

Effect of Lipid Peroxyl Radicals on the Structure and Processing Properties of Egg Yolk Protein

YE Yilin, LIU Yu, ZHU Qingxiang, LI Yangyang, LIU Yazhi, WANG Qingling*

(Food College, Shihezi University, Shihezi 832003, China)

Abstract: To clarify the effect of lipid peroxyl radicals on the structure and processing properties of egg yolk protein, peroxyl radicals produced at different concentrations of 2,2'-Azobis (2-methylpropylimide) dihydrochloride (AAPH) was applied to egg yolk proteins under aerobic conditions to study the changes of structure, physicochemical properties and functional properties of egg yolk protein. The results showed that the carbonyl content of egg yolk protein was significantly increased ($P<0.05$) and the total number of sulfhydryl groups was significantly reduced ($P<0.05$) with increasing AAPH concentration. Meanwhile, the secondary and tertiary structure of egg yolk protein changed obviously, and protein aggregation occurred with the intensification of oxidation reaction. The surface hydrophobicity showed apparent increased and then decreased. The absolute value of zeta potential showed a tendency to decrease firstly and then increasing, and finally decreasing. In addition, the continuous oxidation resulted in the decrease of solubility of yolk protein, and the emulsification performance analysis indicated that 0.5 mmol/L of AAPH could achieve the best emulsification performance of yolk protein. Principal component analysis (PCA) showed that the effects of peroxy radical produced under different oxidation degrees on egg yolk protein varied obviously. This study revealed the changes of egg yolk protein under AAPH oxidation system, which would provide a certain reference basis for the oxidation control and quality control in egg processing.

收稿日期: 2023-11-30

基金项目: 兵团科技创新人才计划 (2023CB013); 兵团指导性科技计划 (2022ZD061)。

作者简介: 叶依林 (2002-), 女, 本科, 研究方向: 畜产品加工及质量控制, E-mail: yy120020206@163.com。

* 通信作者: 王庆玲 (1981-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 畜产品加工及质量控制, E-mail: qingling1100@163.com。

Key words: egg yolk protein; peroxy radical; lipid oxidation; structure; processing performance

鸡蛋蛋黄是一个复杂的脂质-蛋白质体系,具有极高的营养价值。其中,蛋黄蛋白质具备优良的溶解性、乳化性和凝胶性等功能特性,是一种极具发展前景的动物性蛋白质^[1]。研究发现,受贮藏时间、温度、湿度等因素的影响^[2],鸡蛋蛋黄在贮藏过程中发生显著变化,如 pH 增大、蛋黄指数减小、水分含量增加等,导致鸡蛋品质下降。

脂质氧化和蛋白质氧化是鸡蛋质量和营养价值下降的主要原因^[3]。研究表明,脂质氧化和蛋白质氧化在食品体系中是相辅相成的,都可以通过自由基链式反应来实现^[4],且可以在脂质和蛋白质之间相互转移^[5-6]。然而也有研究证明,食品体系中脂质氧化先于蛋白质氧化。因此,在脂质和蛋白质介导的氧化过程中,脂质氧化产生的自由基和氢过氧化物可能会促进蛋白质氧化^[7],并且促使蛋白质结构产生变化发生共价交联,一旦蛋白质的结构改变,其功能特性也将改变^[8]。

目前关于蛋黄脂质氧化产物对卵黄蛋白影响的研究较少,本研究利用过氧化自由基构建脂质氧化产物-蛋黄蛋白质体系,以探究脂质氧化产物对蛋黄蛋白质理化性质与功能特性的影响,明确脂质氧化产物对蛋白质的作用,为鸡蛋加工过程中的氧化控制、品质调控提供相应的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新鲜鸡蛋 石河子市宏鑫生物有限公司提供; 2,2'-偶氮二(2-甲基丙基咪)二盐酸盐(AAPH)、5,5'-二硫代-双(硝基苯甲酸)(5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid), DTNB)、2,4-二硝基苯肼(2,4-Dinitrophenylhydrazine, DNPH)、1-苯氨基萘-8-磺酸(8-Anilino-1-naphthalenesulfonic acid, ANS) 上海麦克林生化科技有限公司; 三羟甲基氨基甲烷(Tris(hydroxymethyl) aminomethane, Tris) 天津市渤化化学试剂有限公司; R-250 考马斯亮蓝 电泳纯, 武汉华翔科洁生物技术有限公司; 溴酚蓝 武汉华翔科洁生物技术有限公司; 盐酸胍、甘氨酸 天津市精细化工有限公司; 其余试剂均为分析纯。

Bench Top Pro 冷冻干燥机 美国 SP Scientific; 150SD 恒温恒湿培养箱 上海一恒科学仪器有限公司; KH19A 冷冻离心机 湖南凯达科学仪器有限公司; X7 酶标仪 上海闪谱生物科技有限公司; SH21-1 恒温磁力搅拌器 上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司; T2A 凝胶成像仪 Bio-Red 公司; DYY-8C 电泳仪 北京市六一仪器厂; Bruker Senterra 拉曼光谱仪 德国 Bruker Technology 公司; Nano-ZS 型激光光散射仪 英国 nanoZS 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 蛋黄蛋白提取 使用 Liu 等^[9]描述的方法提

取蛋黄蛋白,并稍作修改。鸡蛋去壳后,留取蛋黄置于滤纸上,用超纯水缓慢冲洗残留的蛋清及系带,冲净后缓缓转移到另一张干净的滤纸上,用滴管划破蛋黄膜,取蛋黄液于烧杯中,并在冰水浴下涡旋混合 10 min,于 4 ℃ 下避光保存,备用。用 9 倍体积去离子水稀释蛋黄,取一定量稀释蛋黄液,用盐酸将蛋黄液 pH 调至 5,冰浴条件下搅拌 1 h,然后在 4 ℃ 下离心 30 min(6000 r/min)。所得上清液为蛋黄蛋白质,随后使用冷冻干燥机进行冻干,并保存。

1.2.2 ROO·体系构建 根据 Cheng 等^[10]的方法,稍作修改。用 10 mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH7.4)配制蛋黄蛋白溶液(10 mg/mL),向蛋白溶液中加入 AAPH,使其溶液中的 AAPH 终浓度分别为 0、0.04、0.2、0.5、1、5、10 mmol/L。将制备出的溶液于 37 ℃ 在黑暗中连续振荡培养 24 h,迅速冰浴(0~4 ℃)停止反应。随后在 4 ℃ 下离心 15 min(转速为 6000 r/min),以除去少量不溶性物质,得到的上清液在 4 ℃ 下透析(10000 Da)48 h,以除去残留的 AAPH,冷冻干燥并储存在 4 ℃ 下,保存备用。

1.2.3 指标测定

1.2.3.1 羰基含量测定 羰基含量的测量方法如 Yuan 等^[11]所述,并稍作修改。取 1 mg 氧化后的蛋黄蛋白冻干粉溶解于磷酸钠缓冲液(10 mmol/L, pH 7.4, 1 mg/mL)作为样品溶液备用。取 1 mL 的样品溶液(1 mg/mL)与 3 mL 10 mmol/L DNPH 溶液充分混匀,于暗室静置 1 h。随后加入 4 mL 20% 的三氯乙酸,搅拌 1 min,静置 10 min 后离心(5000 r/min, 10 min),弃上清液收集沉淀,用 1 mL 的乙酸乙酯-乙醇混合溶液(v/v=1:1)充分洗涤,离心并收集沉淀,去除残留试剂。沉淀加入 3 mL 6 mol 盐酸胍,37 ℃ 条件下水浴 15 min 后 5000 r/min 离心 10 min,取上清液于 370 nm 波长下测定溶液吸光度^[12],并根据以下公式计算:

$$\text{羰基含量(nmol/mg)} = \frac{A_{370} \times 10^6}{22000 \times C}$$

式中: A_{370} 为 370 nm 下的吸光度; 10^6 为摩尔基础单位; C 为测得的蛋白浓度, mmol/L。

1.2.3.2 总巯基含量测定 参照 Wang 等^[13]的方法,取 1 mL 样品溶液(1 mg/mL)加入到 2 mL Tris-Gly 缓冲液(含尿素, pH 为 8),并加入 20 μ L DTNB 溶液,涡旋混匀,在室温下静置 25 min 后,于 412 nm 下测定其吸光值,并根据以下公式计算:

$$\text{巯基含量(nmol/mg)} = \frac{A_{412} \times 10^6}{13600 \times C}$$

式中: A_{412} 为 412 nm 下的吸光度; 10^6 为摩尔基础单位; C 为测得的蛋白浓度, mmol/L。

1.2.3.3 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gelelectrophoresis, SDS-PAGE) 分析 参照袁湖川等^[14]的方法,并稍作修改。用 SDS-PAGE 缓冲液将样品溶解,沸水加热 10 min,均质,上样量为 10 μ L。采用恒电流凝胶电泳,在 120 V 的起始电压下,待条带跑至分离胶再调整到 160 V,直至染料的前端移动到胶体的底部,完成电泳。

1.2.3.4 拉曼光谱分析 参照 Wang 等^[15]的方法,采用 Bruker Senterra 拉曼光谱仪对样品进行测定,工作波长为 532 nm,激光功率为 50 mw,每个样品扫三遍,并用软件记录下位移范围在 1600~1700 cm^{-1} 的拉曼光谱。

1.2.3.5 内源荧光性测定 根据 Bao 等^[16]的方法,稍作修改。用 10 mmol/L pH7.4 的磷酸盐缓冲液溶解 1 mg 氧化后的蛋黄蛋白冻干粉,配制出样品溶液 (1 mg/mL)。测量参数为:激发波长:295 nm,扫描范围:300~400 nm,激发和发射狭缝宽度:5 nm。

1.2.3.6 表面疏水性测定 选用荧光探针法进行测定。参照 Bao 等^[16]的方法,稍作修改。使用 10 mmol/L pH7.4 磷酸盐缓冲液将样品溶液 (1 mg/mL) 分别稀释成浓度为 0.0001、0.001、0.002、0.01、0.1 mg/mL 的蛋白质溶液。随后将 20 μ L ANS 分别添加至 4 mL 不同浓度的蛋白质稀释液中,涡旋振荡 10 s,于室温黑暗处反应 30 min,将激发和发射波长分别设定为 395、475 nm,狭缝设定为 5 nm,进行测定,用蛋白质浓度(x 轴)与荧光强度(y 轴)做回归曲线,以初始斜率表示 S_0 。

1.2.3.7 Zeta 电位测定 参照 Zhang 等^[17]的方法,并稍作修改。采用 Nano-ZS 型激光光散射仪在常温下对蛋黄蛋白 Zeta 电位进行测定,具体操作如下。取 1 mg 氧化后的蛋黄蛋白冻干粉溶解于磷酸钠缓冲液 (10 mmol/L, pH 7.4, 1 mg/mL) 作为样品溶液。取 1 mL 样品溶液置于室温下的样品池中 60 s 进行测定。

1.2.3.8 溶解度测定 蛋黄蛋白溶解度根据 Yuan 等^[11]的方法进行测定,蛋白溶液于 6000 r/min 离心 15 min 后,根据离心前后蛋白浓度计算蛋黄蛋白溶解度。

$$\text{溶解度}(\%) = \frac{\text{离心后上清液中的蛋白浓度}}{\text{离心前样品溶液中的蛋白浓度}} \times 100$$

1.2.3.9 乳化性能的测定 参照 Yuan 等^[11]的方法,并稍作更改。取 9 mL 蛋白溶液加入 3 mL 大豆油 (水相与油相体积比为 3:1) 一起转移到 100 mL 离心管中,使用高速均质器 (10000 r/min) 高速混合 1 min。分别于 0 min 与 15 min 时取底部乳液 50 μ L,用加 25 mL 1 g/L SDS 溶液稀释后测定 500 nm 处吸光度。根据以下公式计算出样品的乳化活性 (Emulsifying activity, EA) 和乳化稳定性 (Emulsi-

fication Stability, ES):

$$EA = A_0$$

$$ES = \frac{A_0 \times \Delta T}{A_0 - A_{15}}$$

式中: ΔT 为时间间隔,其中时间间隔为 15 min; A_0 为 0 min 的吸光度值; A_{15} 为 15 min 的吸光度值。

1.3 数据处理

每个指标测定三组平行。显著水平为 $P < 0.05$, 数据采用 Microsoft excel 2016、SPSS19.0、Origin 2022 进行分析及图表绘制,结果用平均值 \pm 标准差来表示。用化学计量学软件 Pirouette 4.5 对蛋黄蛋白进行主成分分析 (Principal component analysis, PCA) 分析。

2 结果与分析

2.1 ROO·氧化对蛋黄蛋白羰基含量和总巯基含量的影响

羰基含量与氧化损伤程度密切相关,可用其含量的高低来表示蛋黄蛋白受氧化损伤程度的大小^[18]。巯基则在保持蛋白质的结构中起着关键作用。

由图 1 可知,蛋黄蛋白羰基含量随 AAPH 浓度的增加而逐渐增大,但在 AAPH 浓度为 0~5 mmol/L 时,蛋黄蛋白的羰基含量变化不显著 ($P > 0.05$),这可能是由于 ROO·对蛋黄蛋白产生的氧化反应强度低,暴露在空气中的氨基酸残基相对较少,故而羰基化反应不够剧烈^[19]。当浓度达到 10 mmol/L 时,蛋黄蛋白羰基含量达到最大值为 0.8007 nmol/mg,相比 0 mmol/L 时增加了 0.8 倍且变化显著 ($P < 0.05$)。说明蛋黄蛋白在此浓度下遭受了剧烈的氧化,且羰基衍生物不断累积^[19]。王兆明等^[20]通过对兔肉肌浆蛋白进行氧化,发现随着 AAPH 浓度的增大,肌浆蛋白羰基含量显著增加 ($P < 0.05$),并呈现出线性增长趋势,支持了本研究结果。而蛋黄蛋白的总巯基含量随 AAPH 浓度的增加而显著下降 ($P < 0.05$),此趋势与羰基含量所呈现的趋势相反,可能因为 ROO·氧化诱导使得蛋黄蛋白质中的部分巯基基团转变为二硫键,

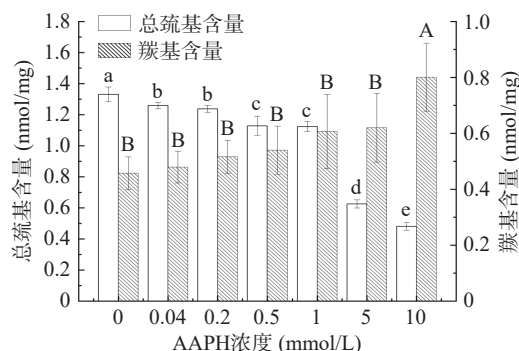


图 1 ROO·氧化对蛋黄蛋白羰基含量和总巯基含量的影响
Fig.1 Effect of ROO· on carbonyl content and total sulfhydryl group content of egg yolk protein

注: 相同指标不同字母表示数据差异显著 ($P < 0.05$); 图 4~图 5。

与此同时 $\text{ROO}\cdot$ 会使蛋白质发生变性聚集,产生的聚集体又能促进巯基基团的相互作用,最终导致其含量减少^[21]。此外,与对照组相比发现,在较低浓度下(0.04 mmol/L)时, $\text{ROO}\cdot$ 也会对于蛋黄蛋白总巯基含量产生显著影响($P<0.05$)。在 10 mmol/L 时,总巯基含量为最小值 0.4813 nmol/mg,相比 0 mmol/L 时降低了 1.8 倍,表明 $\text{ROO}\cdot$ 使蛋黄蛋白结构发生了改变。

2.2 SDS-PAGE 分析

如图 2 所示,蛋黄蛋白在不同浓度 AAPH 下的分子质量主要分布在 20~90 kDa 之间,分别为 80 kDa (卵转铁蛋白、HDL 载脂蛋白片段等)、66 kDa(γ -球蛋白重链、 α -卵黄球蛋白)、38 kDa(卵黄高磷蛋白、 β -卵黄球蛋白、HDL 载脂蛋白片段等)、31.5 kDa (LDL 载脂蛋白片段)、28 kDa、26 kDa(γ -球蛋白轻链)、22 kDa^[22-24]。随着 AAPH 浓度的加深,部分条带颜色变浅(66、38、31.5 kDa),包含 α -卵黄球蛋白、卵黄高磷蛋白、HDL 载脂蛋白等蛋黄蛋白,其原因可能是随着氧化加剧而发生了降解。在 25~35 kDa 之间,相较于 0 mmol/L 时,高浓度下的蛋黄蛋白条带明显减少,这可能是因为随着 $\text{ROO}\cdot$ 浓度升高氧化反应加剧,使蛋白质发生了聚集。此外, AAPH 浓度为 10 mmol/L 时蛋白质总含量与低浓度相比略低。

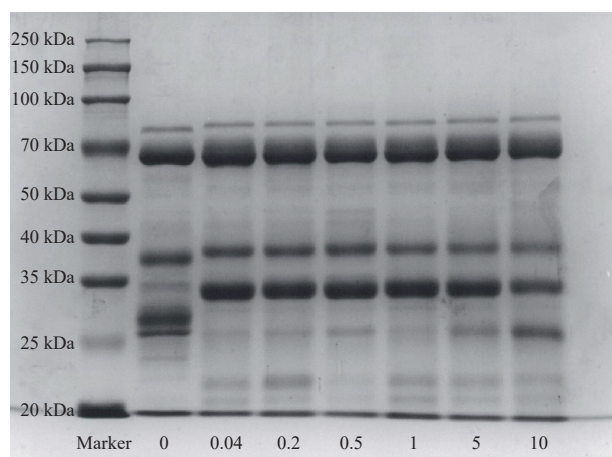


图 2 不同浓度 AAPH 蛋黄蛋白 SDS-PAGE 分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis of egg yolk protein of different concentrations of AAPH

2.3 $\text{ROO}\cdot$ 氧化对蛋黄蛋白二、三级结构的影响

拉曼光谱中的酰胺 I 带($1600\sim 1700\text{ cm}^{-1}$)可以准确反映出蛋白质主链结构的变化,也可用于蛋白质二级结构相对含量的定量分析^[25]。由图 3A 可知,随着 AAPH 浓度的增加, β -折叠和无规卷曲结构总体表现出增多的趋势, α -螺旋和 β -转角结构总体表现出减少的趋势,说明 $\text{ROO}\cdot$ 氧化使蛋黄蛋白的二级结构发生了改变。与对照组相比, AAPH 的浓度为 10 mmol/L 时, β -折叠和无规卷曲结构含量分别增加了 16.33%、5.78%,而 α -螺旋和 β -转角结构含量减

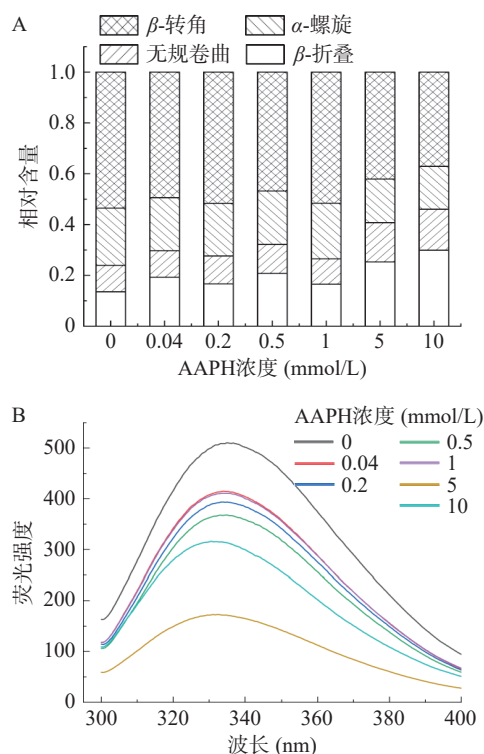


图 3 $\text{ROO}\cdot$ 氧化对蛋黄蛋白二级结构(A)、三级结构(B)的影响

Fig.3 Effects of peroxyl radical oxidation on secondary structure (A) and tertiary structure (B) of egg yolk protein

少了 5.64%、18.47%。蛋白质二级结构主要靠氢键尤其是 α -螺旋结构来维持稳定^[26]。随着 AAPH 浓度升高, α -螺旋结构含量减少,其原因可能是 $\text{ROO}\cdot$ 攻击蛋黄蛋白分子间的氢键,使得蛋白质分子展开,相互作用逐渐降低,被解开的 α -螺旋结构最终转变为无规则卷曲,使得蛋黄蛋白结构朝着不稳定的方向进行^[27]。Feng 等^[28] 发现脂质氧化过程中形成的 $\text{ROO}\cdot$ 破坏了蛋白质结构内形成的氢键,并展开 α -螺旋结构,产生更多的 β -折叠结构,支持了本研究结果。

内源荧光光谱不仅可以反映蛋白质三级结构和构象的变化,其强度的降低也一定程度上表明了色氨酸的变化程度,进而可表征蛋黄蛋白氧化损伤的程度。由图 3B 所示,0 mmol/L 时,蛋黄蛋白荧光强度最大为 510.47,所对应的波长范围在 330~350 nm 之间。随着浓度增加,内源荧光强度显示出持续降低的趋势,降至 172.82,最大降幅为 82%,荧光强度降低的主要原因可能是蛋黄蛋白被过氧自由基攻击而发生去折叠现象,同时会发生共价交联和聚集。此外,色氨酸的直接氧化会导致荧光强度的下降。其最大峰位逐渐蓝移是因为随着氧化程度的加剧,色氨酸被转移到更加疏水的非极性环境中^[29-30]。王丹丹等^[31] 在研究氧化修饰对核桃蛋白的影响中也得到此规律,并得出暴露在外的色氨酸残基在经过 $\text{ROO}\cdot$ 的氧化后会被掩藏,从而致使蛋白质发生聚集。上述结果都进一步说明了 $\text{ROO}\cdot$ 氧化会导致蛋黄蛋白的聚集及结构的变化。

2.4 ROO·氧化对蛋黄蛋白表面疏水性和 Zeta 电位的影响

表面疏水性反映了蛋白质与水的相互排斥关系,它不仅可以间接地反应蛋白质的构象,还可以反映其溶解度、稳定性和自缔合能力^[32-33]。由图 4A 可知,随着 AAPH 浓度的增加蛋黄蛋白表面疏水性呈现出先上升后显著下降的趋势($P<0.05$)。当浓度从 0 mmol/L 升至 0.04 mmol/L 时,蛋黄蛋白的表面疏水性增加,达到最大值 173.67 μg ,这可能是由于蛋黄蛋白的结构随着氧化程度的增加而逐渐展开所致^[32];当氧化程度进一步加大时(AAPH 浓度超过 0.04 mmol/L),展开的蛋白质分子重新聚集^[31],从而导致蛋白表面疏水性下降。当 AAPH 浓度达到 0.5 mmol/L 时,强氧化导致原先暴露的疏水基团被包埋,并且形成新的亲水组分(例如羧基群),从而致使蛋黄蛋白的表面疏水性显著下降^[34]。此实验结果表明 ROO·氧化改变了蛋黄蛋白的分子构象。范婷婷等^[35]在研究 ROO·对大豆分离蛋白表面疏水性影响时发现,随 AAPH 浓度的增加,大豆分离蛋白表面疏水性呈现先上升后下降的趋势,与本实验研究结果一致。

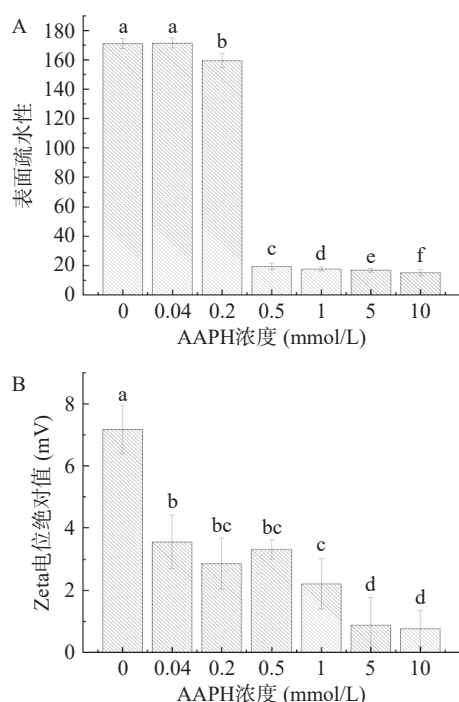


图 4 ROO·氧化对蛋黄蛋白表面疏水性(A)和 Zeta 电位(B)的影响

Fig.4 Effect of peroxic radical oxidation on surface hydrophobicity (A) and zeta potential (B) of egg yolk protein

本研究所测得的蛋黄蛋白的 Zeta 电位均为负值。由图 4B 可知,当 AAPH 浓度为 0 mmol/L 时,蛋黄蛋白 Zeta 电位绝对值为 7.17 mV。随着 AAPH 浓度的增加,Zeta 电位绝对值均呈现先减少后增加随后递减的趋势,这是由于轻微氧化破坏了蛋黄蛋白原有结构,蛋黄蛋白稳定性略微下降,随后 Zeta 电

位绝对值上升的原因可能是 ROO·氧化使蛋黄蛋白变性且结构逐步展开,部分原来就包埋在蛋白质分子内部的带电氨基酸残基逐渐暴露,从而使蛋白质表面电荷增多^[32]。而较高浓度(1~10 mmol/L)的 AAPH 使蛋白质发生聚集,聚集体会将一些带电的氨基酸残基包裹,从而降低了蛋白质表面电荷^[32]。此外,还可以看出蛋黄蛋白被氧化修饰后 Zeta 电位绝对值都比 0 mmol/L 时低,其原因可能是 ROO·氧化改变了蛋黄蛋白表面电荷和氨基酸残基的分布,使得蛋白质表面静电作用力失衡^[32],这一结果与魏娜^[21]研究过氧自由基氧化对鸭肉肌原纤维蛋白 Zeta 电位的影响一致。

2.5 ROO·氧化对蛋黄蛋白功能特性的影响

良好的溶解性是蛋白质发挥其加工特性的基础。蛋白质溶解度的变化可以直接反应蛋白质的结构转变^[36]。如图 5A 所示,蛋黄蛋白的溶解度呈显著下降趋势($P<0.05$)。0~0.5 mmol/L AAPH 所致的低氧化主要使疏水性基团从蛋白内部结构暴露出来,形成可溶性聚集体,而较高的氧化程度(10 mmol/L)可能会使这些可溶性聚集体通过疏水或交联进一步聚集,最终形成不溶性聚集体,导致溶解性下降^[37]。

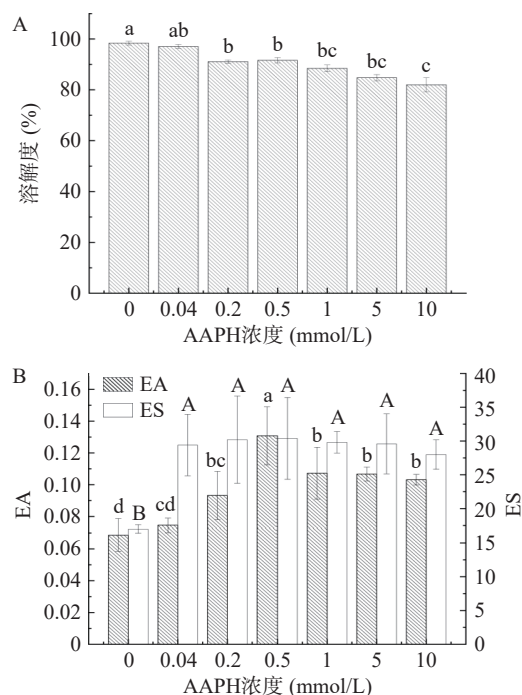


图 5 ROO·氧化对蛋黄蛋白溶解性(A)和乳化特性(B)的影响

Fig.5 Effects of peroxic radical oxidation on solubility (A) and emulsifying activity and stability (B) of yolk protein

蛋白质的乳化性能在食品系统中起着至关重要的作用^[38],乳化性能包括 EA 和 ES^[39-40]。由图 5B 可知,蛋黄蛋白的乳化性能总体呈先上升后下降的趋势,但相较于 EA, AAPH 浓度的变化对蛋黄蛋白的 ES 产生的影响变化趋势略不显著。当 AAPH 的浓度为 0.5 mmol/L 时,蛋黄蛋白的乳化性能达到最高,

分别为 $0.1308 \text{ m}^2/\text{g}(\text{EA})$ 和 $30.3774 \text{ min}(\text{ES})$ 。由此可得, 低浓度的 $\text{ROO}\cdot$ 对蛋黄蛋白乳化性能的改善有益, 但在高浓度下, 蛋黄蛋白的乳化性能会受到抑制。因此, 适当的氧化可以改善蛋黄蛋白的乳化性能。当 AAPH 浓度较低 ($0\sim 0.5 \text{ mmol/L}$) 时, 蛋黄蛋白乳化性能有所上升, 可能是因为氧化形成了聚集体, 使表面积增大, 蛋白质与油滴充分结合, 从而提高其乳化性能^[18]; 而随着浓度升高, $\text{ROO}\cdot$ 强烈攻击使蛋黄蛋白变性, 稳定性变差, 结合油滴的能力也有所减弱, 从而致使乳化性能降低。

2.6 主成分分析

对不同浓度 $\text{ROO}\cdot$ 氧化蛋黄蛋白结构及功能特性进行主成分分析, 在分析过程中, PCA 可以非常直观地看出各个样本之间的相似性。由图 6 可知, 主成分 1 和主成分 2 分别占 47.47% 和 26.37%, 可以解释总变异的 74.20%。这 7 组不同浓度 AAPH 样本所对应的散点在组内呈现相互聚集的情况, 说明同组样本数据较接近, 而组间则具有较好的区分度。在 PC1 与 PC2 轴上以原点为界限可将这七组样本划分为四个部分。PCA 结果表明在不同氧化程度下产生的 $\text{ROO}\cdot$ 对蛋黄蛋白的影响差异显著。

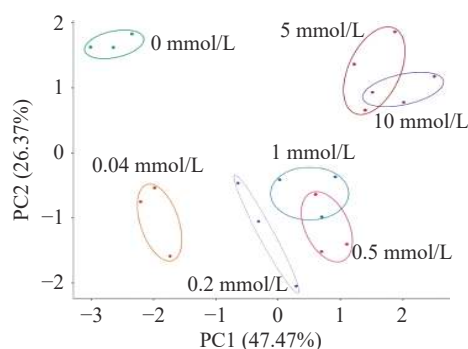


图 6 主成分分析

Fig.6 Principal component analysis

3 结论

本研究发现, AAPH 氧化系统以浓度依赖性的方式改变蛋黄蛋白的结构和理化性质。过氧化自由基氧化使得蛋黄蛋白巯基含量升高总巯基含量减少, 同时蛋黄蛋白结构发生改变, 逐渐向不稳定的方向发展。此外, 随着 AAPH 浓度的增加, 蛋黄蛋白加工性能也发生了改变, 蛋黄蛋白的溶解性下降, 同时发现适度的氧化能提高蛋黄蛋白的乳化性能, 该结果为蛋黄蛋白及其相关产品的加工和品质调控提供了有益的见解。本研究阐明了脂质 $\text{ROO}\cdot$ 对蛋黄蛋白结构和加工性能产生显著的影响, 明确鸡蛋中的脂质氧化产物对蛋白质的作用, 对提高鸡蛋的营养价值和安全性具有借鉴意义。

参考文献

- [1] 尤翔宇, 黄慧敏, 吴晓娟, 等. 过氧自由基氧化对米糠蛋白结构和功能性质的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(4): 34-41. [YOU X Y, HUANG H M, WU X J, et al. Effects of oxidative modification by peroxy radicals on the structural and functional properties of rice bran protein[J]. Food Science, 2019, 40(4): 34-41.]
- [2] 刘钰, 赵孟斌, 于浩坤, 等. 鸡蛋贮藏过程中脂质氧化与内源酶活性的相关性[J]. 食品科学, 2020, 41(7): 198-202. [LIU Y, ZHAO M B, YU H K, et al. Correlation between lipid oxidation and the activity of endogenous enzymes during egg storage[J]. Food Science, 2020, 41(7): 198-202.]
- [3] MAO X Y, WANG D D, SUN L G, et al. Effect of Peroxyl-Radicals-Induced oxidative modification in the physicochemical and emulsifying properties of walnut protein[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2021, 98(9): 903-910.
- [4] 颜廷旋, 余霞, 邹莉芳, 等. 药食同源植物提取物对肉制品品质影响研究进展[J]. 肉类研究, 2021, 35(11): 57-63. [YAN T X, YU X, ZOU L F, et al. Progress in research on the effect from edible and medicinal plants on the quality of meat products[J]. Meat Research, 2021, 35(11): 57-63.]
- [5] 尤翔宇. 过氧自由基和丙二醛氧化对米糠蛋白结构、功能性质和消化性质的影响[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2019. [YOU X Y. Effect of oxidative modification on structural functional properties and digestibility of rice bran protein by peroxy radicals and malondialdehyde[D]. Changsha: Central South University of Forestry and Technology, 2019.]
- [6] 王兆明, 贺雅非, 李洪军. 脂质和蛋白质氧化对肉制品品质影响及交互氧化机制研究进展[J]. 食品科学, 2018, 39(11): 295-301. [WANG Z M, HE Z F, LI H J. A review of the effect of lipid and protein oxidation on meat quality and their interrelationship[J]. Food Science, 2018, 39(11): 295-301.]
- [7] LIU Q, LU Y, HAN J C, et al. Structure-modification by moderate oxidation in hydroxyl radical-generating systems promote the emulsifying properties of soy protein isolate[J]. Food Structure, 2015, 6: 21-28.
- [8] YANG Y, ZHAO Y, XU M S, et al. Effects of strong alkali treatment on the physicochemical properties, microstructure, protein structures, and intermolecular forces in egg yolks, plasma, and granules[J]. Food Chemistry, 2020, 311: 125998.
- [9] LIU Y, SHENG L, MA M, et al. Proteome-based identification of chicken egg yolk proteins associated with antioxidant activity on the Qinghai-Tibetan Plateau[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 150: 1093-1103.
- [10] CHENG Y, CHI Y, GENG X H, et al. Effect of 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) induced oxidation on the physicochemical properties, *in vitro* digestibility, and nutritional value of egg white protein[J]. LWT, 2021, 143: 111103.
- [11] YUAN H C, LIU Y, LUO R F, et al. Effects of lutein-phospholipids emulsion on oxidatively stressed egg yolk protein[J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 152: 112187.
- [12] 孙慧琳, 代媛媛, 孟兰奇, 等. 牛肉低温储藏过程中水分迁移与蛋白质氧化的相关性研究[J]. 保鲜与加工, 2021, 21(5): 28-33, 46. [SUN H L, DAI Y Y, MENG L Q, et al. Correlation research between water migration and protein oxidation of beef under cryopreservation[J]. Storage and Process, 2021, 21(5): 28-33, 46.]
- [13] WANG Z M, HE Z F, GAN X, et al. Interrelationship among ferrous myoglobin, lipid and protein oxidations in rabbit meat during refrigerated and superchilled storage[J]. Meat Science, 2018, 146: 131-139.
- [14] 袁湖川, 刘钰, 冉丽丹, 等. 鸡蛋贮藏过程中蛋黄内源抗氧化组分与氧化进程的关系[J]. 食品科学, 2021, 42(13): 233-240.

- [YUAN H C, LIU Y, RAN L D, et al. Potential relationship between endogenous antioxidant components and egg yolk oxidation process during hen egg storage[J]. *Food Science*, 2021, 42(13): 233–240.]
- [15] WANG Y Y, WANG C Y, WANG S T, et al. Physicochemical properties and antioxidant activities of tree peony (*Paonia suffruticosa* Andr.) seed protein hydrolysates obtained with different proteases[J]. *Food Chemistry*, 2021, 345: 128765.
- [16] BAO Z, KANG D, XU X, et al. Variation in the structure and emulsification of egg yolk high-density lipoprotein by lipid peroxide[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2019, 43(11): e13019.
- [17] ZHANG Y L, CHEN Y, XIONG Y T, et al. Preparation of high internal phase Pickering emulsions stabilized by egg yolk high density lipoprotein; Stabilizing mechanism under different pH values and protein concentrations[J]. *LWT*, 2022, 157: 113091.
- [18] 徐笑. 添加茯砖茶促进糯米发酵及抗氧化活性的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2018. [XU X. The effect of Fu Brick Tea addition on fermentation characteristics and functional activities of fermented glutinous rice[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2018.]
- [19] 杨曦, 程群, 常陆望, 等. 羟自由基和过氧自由基氧化对美藤果蛋白功能性质的影响[J]. *中国油脂*, 2020, 45(10): 35–40. [YANG X, CHENG Q, CHANG L W, et al. Effect of hydroxyl radical and peroxy radical oxidation on functional properties of sacha inchi protein[J]. *China Oils and Fats*, 2020, 45(10): 35–40.]
- [20] 王兆明, 徐宝才, 李洪军. 脂质过氧自由基诱导兔肉肌浆蛋白聚集机制[J]. *食品科学*, 2021, 42(19): 28–35. [WANG Z M, XU B C, LI H J. Mechanism underlying the aggregation of rabbit meat sarcoplasmic proteins induced by lipid peroxyl radicals[J]. *Food Science*, 2021, 42(19): 28–35.]
- [21] 魏娜. 羟自由基和过氧自由基氧化对鸭肉肌原纤维蛋白结构及凝胶特性的影响[D]. 重庆: 西南大学, 2021. [WEI N. Effects of hydroxyl radical and peroxy radical oxidation on the structure and gel properties of duck myofibrillar protein[D]. Chongqing: Xi'an University, 2021.]
- [22] 郝丽芳. 鸡蛋贮藏期间蛋黄比较蛋白质组学研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2014. [HAO L F. Study on the egg yolk comparative proteomics during egg storage[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2014.]
- [23] 王宁. 鸡蛋 LDL 结构、脂质组分析及对小鼠血脂代谢的影响研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2018. [WANG N. Structure and lipidomics analysis of hen egg LDL and its effect on mice lipid metabolism[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2018.]
- [24] 于智慧. 鸡蛋高密度脂蛋白对脂质代谢的影响及机制研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2019. [YU Z H. Effect on lipid metabolism of high-density lipoprotein from egg yolk and its regulation mechanism[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2019.]
- [25] 徐楠, 赵英, 迟玉杰. 热处理对酶改性蛋黄液乳化性的影响及拉曼光谱分析[J]. *食品科学*, 2019, 40(21): 28–34. [XU N, ZHAO Y, CHI Y J. Effect of heat treatment on emulsifying properties and raman spectroscopic characteristics of enzymatically modified egg yolk liquid[J]. *Food Science*, 2019, 40(21): 28–34.]
- [26] 刘芳芳, 林婉玲, 李来好, 等. 海鲈鱼糜加工及凝胶形成过程中蛋白质的变化机理[J]. *食品科学*, 2020, 41(14): 15–22. [LIU F F, LIN W L, LI L H, et al. Mechanism underlying protein changes during processing and gelation of sea bass surimi[J]. *Food Science*, 2020, 41(14): 15–22.]
- [27] LI C Q, XIONG Y L. Disruption of secondary structure by oxidative stress alters the cross-linking pattern of myosin by microbial transglutaminase[J]. *Meat Science*, 2015, 108: 97–105.
- [28] FENG X, WU D, YANG K, et al. Effect of sarcoplasmic proteins oxidation on the gel properties of myofibrillar proteins from pork muscles[J]. *Journal of Food Science*, 2021, 86(5): 1835–1844.
- [29] GE X Y, XU Y, CHEN D, et al. Effects of AAPH on structure, allergenicity and physicochemical properties of shrimp myofibrillar protein[J]. *LWT*, 2023, 187: 115306.
- [30] 曾谦, 黄星雨, 何嘉敏, 等. 羟自由基氧化对鹰嘴豆蛋白的结构及溶解性的影响研究[J]. *农产品加工*, 2021(19): 1–5, 8. [ZENG Q, HAUNG X Y, HE J M, et al. Effect of hydroxyl radical oxidation on the structure and solubility of chickpea protein[J]. *Farm Products Processing*, 2021(19): 1–5, 8.]
- [31] 王丹丹, 毛晓英, 孙领鸽, 等. 氢过氧化物氧化对核桃蛋白结构和乳化特性的影响[J]. *中国食品学报*, 2019, 19(12): 60–68. [WANG D D, MAO X Y, SUN L G, et al. Effect of oxidation by hydrogen peroxide on the structure and emulsifying properties of walnut protein[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2019, 19(12): 60–68.]
- [32] 李学鹏, 刘慈坤, 王金厢, 等. 烷过氧自由基氧化对草鱼肌原纤维蛋白热聚集行为的影响[J]. *食品科学*, 2020, 41(17): 9–16. [LI X P, LIU C K, WANG J X, et al. Effect of alkylperoxyl radical oxidation on heat-induced aggregation behavior of myofibrillar protein from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. *Food Science*, 2020, 41(17): 9–16.]
- [33] 叶风凌, 池玉阁, 周敏之, 等. 氧化对兔肉肌原纤维蛋白结构、乳化性和凝胶性的影响研究[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(24): 22–30. [YE F L, CHI Y M, ZHOU Minzhi, et al. Effect of oxidation on the structure, emulsification and gelability of rabbit meat myofibrillar protein[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(24): 22–30.]
- [34] WANG J M, TAN Y Y, XU H, et al. Effect of 2, 2-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride oxidized casein on the microstructure and microrheology properties of emulsions[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2016, 25(5): 1283–1290.
- [35] 范婷, 赵强, 赵小莉, 等. 脂质自由基 AAPH 体外氧化对富硒大豆分离蛋白性质和结构的影响[J]. *现代食品科技*, 2016, 32(2): 100–106, 92. [FAN T, ZHAO Q, ZHAO X L, et al. Effect of peroxyl radical produced by *in vitro* oxidation by lipid radical AAPH on properties and structure of selenium-enriched SPI[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2016, 32(2): 100–106, 92.]
- [36] MIRZAEI H, REGNIER F. Protein: Protein aggregation induced by protein oxidation[J]. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2008, 873(1): 8–14.
- [37] SUN J, ZENG Q, YANG X, et al. Effects of peroxyl radicals on the structural characteristics and fatty acid composition of high-density lipoprotein from duck egg yolk[J]. *Foods*, 2022, 11(11): 1634.
- [38] TIAN L J, HU S T, JIA J, et al. Effects of short-term fermentation with lactic acid bacteria on the characterization, rheological and emulsifying properties of egg yolk[J]. *Food Chemistry*, 2021, 341: 128163.
- [39] 盖晴晴. 水酶法提取牡丹籽油工艺改进及水相蛋白特性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2020. [GAI Q Q. Process improvement on aqueous enzymatic extraction of peony seed oil and investigation on protein properties[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2020.]
- [40] LI W W, HU Q, CHAN W. Mass Spectrometric and spectrofluorometric studies of the interaction of aristolochic acids with proteins[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5(1): 15192.