

过氧自由基氧化修饰对大米蛋白功能性质的影响

Effect of oxidative modification by peroxy radical on functional properties of rice protein

吴伟^{1,2} 吴晓娟^{1,2} 蔡勇建^{1,2} 李彤^{1,2}

WU Wei^{1,2} WU Xiao-juan^{1,2} CAI Yong-jian^{1,2} LI TONG^{1,2}

(1. 中南林业科技大学食品科学与工程学院, 湖南 长沙 410004;

2. 稻谷及副产物深加工国家工程实验室, 湖南 长沙 410004)

(1. College of Food Science and Engineering, Center South University of Forestry and Technology, Changsha, Hunan 410004, China;

2. National Engineering Laboratory for Rice and By-product Deep Processing, Changsha, Hunan 410004, China)

摘要:采用不同浓度 2, 2'-盐酸脒基丙烷(AAPH)热降解形成的过氧自由基氧化大米蛋白,研究过氧自由基氧化对大米蛋白功能性质的影响。结果表明:大米蛋白羰基含量随 AAPH 浓度的增加而上升,表明过氧自由基诱使大米蛋白发生了氧化;随着 AAPH 浓度的增加,大米蛋白 Zeta 电位绝对值、溶解性、持水性、起泡性和乳化性下降,持油性上升,其中 Zeta 电位绝对值下降 45.70%,溶解性下降 28.04%,持水性下降 58.02%,起泡能力下降 14.61%,泡沫稳定性下降 9.66%,乳化性下降 16.85%,乳化稳定性下降 9.23%,持油性上升 34.84%,表明过氧自由基氧化使得大米蛋白功能性质发生了显著变化。

关键词:过氧自由基;大米蛋白;蛋白质氧化;功能性质

Abstract: Peroxyl radical which derived from thermal decomposition of different concentration of 2, 2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) was used to oxidize rice protein, and effect of oxidative modification by peroxy radical on functional properties of rice protein was investigated. The results indicated that rice protein carbonyl content increased as concentration of AAPH increased, which indicated that incubation with AAPH lead to oxidation of rice protein. As the concentrations of AAPH increased, absolute value of zeta potential, solubility, water holding capacity, foaming properties, emulsion properties of rice protein decreased, and oil holding capacity increased. Absolute value of zeta potential of rice

protein decreased by 45.70%, solubility decreased by 28.04%, water holding capacity decreased by 58.02%, foaming capacity decreased by 14.61%, foaming stability decreased by 9.66%, emulsion activity decreased by 16.85%, emulsion stability decreased by 9.23%, and oil holding capacity increased by 34.84%. The results indicated that oxidation of rice protein induced by peroxy radical changed significantly functional properties of rice protein.

Keywords: peroxy radical; rice protein; protein oxidation; functional properties

中国稻谷年产量 2 亿 t 左右,每年约有 40% 稻谷入库储藏,平均储藏时间 5 个季度以上^[1]。储藏期间稻谷中淀粉、蛋白质及脂质等组分发生复杂变化,导致稻谷营养成分流失,食用品质下降^[1-2]。稻谷中淀粉含量最多,但稻谷储藏期间淀粉变化幅度较小,对储藏稻谷食用品质影响有限^[1-2]。相比之下,含量较少的脂质和蛋白质在稻谷储藏过程中变化较为显著。脂质易降解产生游离脂肪酸,一方面游离脂肪酸与直链淀粉形成复合物,限制淀粉颗粒的膨胀和糊化^[1-2];另一方面,游离脂肪酸极不稳定,容易氧化生成活性脂质氧化产物和脂质自由基,这些活性脂质氧化产物和脂质自由基是诱使蛋白质氧化的重要媒介^[3-6]。已有研究^[4]发现,大米蛋白可被活性脂质氧化产物氧化修饰,进而影响大米蛋白功能性质。但目前还没有脂质自由基氧化大米蛋白的报道。

AAPH 是一种水溶性偶氮类的自由基引发剂,有氧条件下会热降解形成过氧自由基^[5-6],本研究拟采用 AAPH 热降解产生的过氧自由基代表脂质自由基,研究过氧自由基氧化对大米蛋白功能性质的影响,旨在为进一步分析蛋白质氧化对稻谷储藏品质的影响提供理论依据。

基金项目:国家自然科学基金(编号:31201319);公益性行业(农业)科研专项(编号:201303071);粮油深加工与品质控制 2011 湖南省协同创新项目(编号:湘教通[2013]448 号)

作者简介:吴伟(1981—),男,中南林业科技大学副教授,博士。

E-mail: foodwuwei@126.com

收稿日期:2015-12-14

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新收获金优 207(籼米)、大豆油;湖南粮食集团有限责任公司;

2,2'-偶氮二(2-脒基丙烷)二盐酸(AAPH):纯度 97%,日本和光纯药公司;

2,4-二硝基苯肼、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氢氧化钠、盐酸:分析纯,国药集团(上海)化学试剂有限公司。

1.2 主要仪器与设备

高速冷冻离心机: Sorvall Lynx 6000 型,美国 Thermo Fisher 公司;

冻干机: Fd5-4 型,美国 Gold-sim 公司;

恒温水浴振荡器: Sha-2a 型,北京中兴伟业仪器有限公司;

纳米电位分析仪: Nano ZS 型,英国 Malvern 公司;

高速分散均质机: Fa25 型,上海弗鲁克流体机械制造有限公司;

分光光度计: 722 型,上海精密科学仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 大米蛋白的制备 参照文献[7]。

1.3.2 过氧自由基氧化大米蛋白的制备 参考文献[5]和[6]。将大米蛋白溶解于 0.01 mol/L pH 7.4 的磷酸盐缓冲液中(含 0.5 mg/mL NaN_3),蛋白浓度为 10 mg/mL。将一定质量的 AAPH 溶解于大米蛋白溶液中,以大米在高温高湿加速陈化试验过程中的羰基含量为参照确定 AAPH 的浓度范围, AAPH 最终浓度分别为 0, 0.04, 0.2, 1, 5, 25 mmol/L,在 37℃避光条件下反应 24 h。反应结束后将反应液于 10 000 r/min 离心 30 min 收集上清液,除去少量不溶性物质(非蛋白质沉淀)。最后将上清液透析 72 h 除去未反应的 AAPH,最后冷冻干燥得到过氧自由基氧化大米蛋白。

1.3.3 过氧自由基氧化大米蛋白羰基含量的测定 参考文献[8]。

1.3.4 Zeta 电位的测定 将大米蛋白置于磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L pH 7.0)中,搅拌后离心收集上清液,采用纳米电位分析仪测定上清液 Zeta 电位。

1.3.5 过氧自由基氧化大米蛋白溶解性、持水性、持油性的测定 参考文献[4]。

1.3.6 过氧自由基氧化大米蛋白起泡能力、泡沫稳定性的测定 参考文献[9]。

1.3.7 过氧自由基氧化大米蛋白乳化性、乳化稳定性的测定 参考文献[10]。

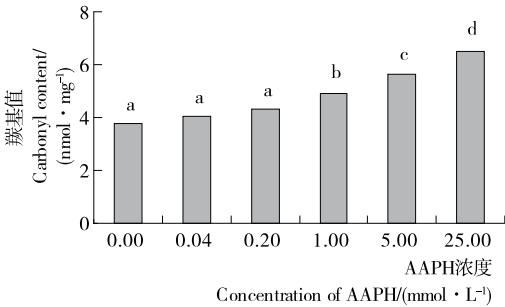
1.4 数据处理与统计分析

采用 Origin 7.5 进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 过氧自由基氧化大米蛋白羰基含量的变化

目前表征蛋白质氧化最常用的指标是蛋白质的羰基含量^[6,11]。由图 1 可知,大米蛋白羰基含量随着 APPH 浓度增加而上升,表明大米蛋白发生了氧化。AAPH 降解形成的过



不同字母表示差异显著, $P < 0.05$

图 1 过氧自由基氧化大米蛋白羰基含量的变化

Figure 1 Changes of carbonyl content of rice protein which oxidized by peroxyl radical

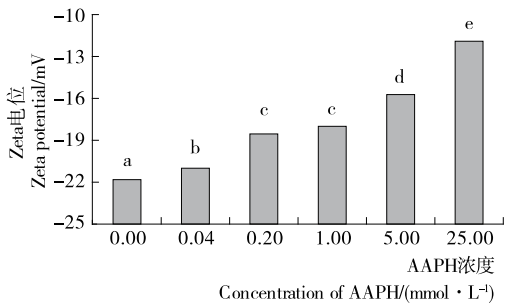
氧自由基可通过夺氢反应将蛋白质主肽链和侧链基团转化成为碳中心自由基,碳中心自由基与氧气反应形成过氧自由基,蛋白质主肽链过氧自由基通过 α -胺基化反应导致蛋白质羰基化,蛋白质侧链过氧自由基的进一步氧化反应也可蛋白质引入羰基^[6,11]。AAPH 产生的过氧自由基可能通过 α -胺基化断裂大米蛋白的主肽链使之羰基化,或者诱使大米蛋白侧链基团羰基化,导致大米蛋白氧化。蔡勇建等^[6]发现 AAPH 降解形成的过氧自由基可导致大豆蛋白羰基化;叶林等^[5,11]发现 AAPH 热降解形成的过氧自由基可氧化修饰花生蛋白,使得花生蛋白羰基含量增加。

2.2 过氧自由基氧化大米蛋白 Zeta 电位的变化

Zeta 电位是表征溶液稳定性的重要指标,Zeta 电位绝对值越大,体系越稳定;反之稳定性下降,溶液出现凝结或聚集^[12]。由图 2 可知,随着 AAPH 浓度的增加,大米蛋白 Zeta 电位绝对值显著下降($P < 0.05$)。这可能是过氧自由基改变了大米蛋白表面电荷和氨基酸残基的分布,使得蛋白表面作用力失衡,体系稳定性降低。Chen Nan-nan 等^[8]发现过氧自由基氧化可改变大豆蛋白表面电荷、氨基酸残基的分布,使得 Zeta 电位绝对值下降;Ye Lin 等^[11]发现过氧自由基氧化可改变花生蛋白表面吸引力/排斥力的分布,使得 Zeta 电位绝对值下降。

2.3 过氧自由基氧化大米蛋白溶解性的变化

由图 3 可知,随着 AAPH 浓度的增加,大米蛋白溶解性



不同字母表示差异显著, $P < 0.05$

图 2 过氧自由基氧化大米蛋白 Zeta 电位的变化

Figure 2 Changes of Zeta potential of rice protein which oxidized by peroxyl radical

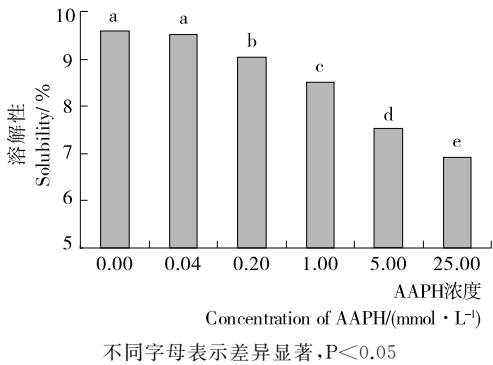


图 3 过氧自由基氧化大米蛋白溶解性的变化

Figure 3 Changes of solution of rice protein which oxidized by peroxy radical

显著下降($P<0.05$)。大米蛋白中 80% 以上为谷蛋白^[4],本试验测定的是大米蛋白在去离子水中的溶解度,因而溶解性较差,均低于 10%。蛋白质溶解性与蛋白结构、共价交联及聚集体有关^[9,13]。大米蛋白溶解性下降可能是脂质自由基诱使大米蛋白氧化,发生共价交联,形成了不可溶性聚集体。Chen Nan-nan 等^[8]发现 AAPH 产生的过氧自由基诱使大豆蛋白逐渐形成不可溶聚集体;蔡勇建等^[6]发现过氧自由基诱使大豆蛋白发生共价交联形成不可溶性聚集体,使得大豆蛋白溶解性降低。

2.4 过氧自由基氧化大米蛋白持水性的变化

由图 4 可知,随着 AAPH 浓度的增加,大米蛋白持水性显著下降($P<0.05$)。谷物蛋白的持水、持油能力与其亲水/疏水基团分布有关^[9,13]。大米蛋白持水性下降可能是过氧自由基诱使大米蛋白结构改变,更多疏水基团暴露,降低了大米蛋白的持水能力。蔡勇建等^[3]发现蛋白质氧化会改变米糠蛋白的分子结构,使得蛋白分子亲水/疏水基团分布发生变化的同时暴露出更多疏水基团,米糠蛋白持水性下降。

2.5 过氧自由基氧化大米蛋白持油性的变化

由图 5 可知,随着 AAPH 浓度的增加,大米蛋白持油性显著增加($P<0.05$)。过氧自由基诱使植物蛋白氧化,氧化后蛋白质内部疏水基团暴露^[6,8,11]。大米蛋白在过氧自由基作用下发生氧化,原本位于蛋白分子内部的疏水基团暴露,增加了大米蛋白对脂质的吸附能力。吴伟等^[9]发现米糠谷

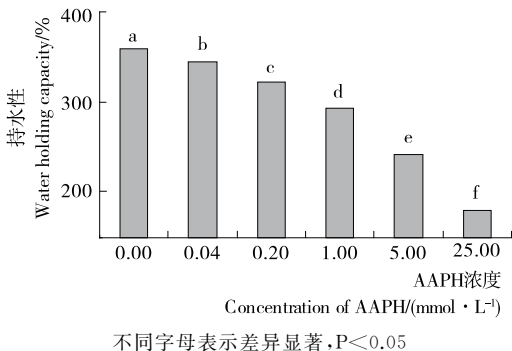


图 4 过氧自由基氧化大米蛋白持水性的变化

Figure 4 Changes of water holding capacity of rice protein which oxidized by peroxy radical

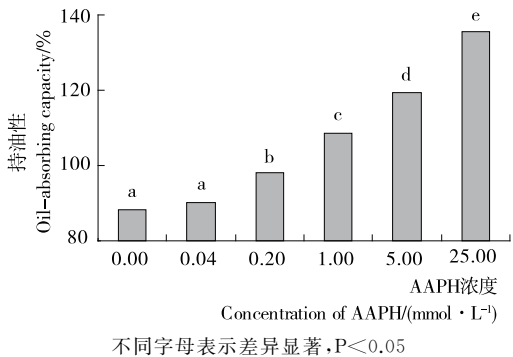


图 5 过氧自由基氧化大米蛋白持油性的变化

Figure 5 Changes of oil holding capacity of rice protein oxidized by peroxy radical

蛋白疏水基团的暴露会增加蛋白分子对脂质的吸附能力,米糠谷蛋白持油性增加。

2.6 过氧自由基氧化大米蛋白起泡能力和泡沫稳定性的变化

由图 6 可知,随着 AAPH 浓度的增加,大米蛋白起泡能力和泡沫稳定性显著降低($P<0.05$)。溶解性和结构稳定性良好的蛋白质更易在气—液界面展开,此时蛋白分子表面张力更小,更易形成粘弹性良好的连续蛋白膜,展现出良好的起泡性质^[9-10]。大米蛋白起泡性质下降可能是大米蛋白结构在过氧自由基作用下逐渐展开,暴露的疏水基团逐渐形成聚集体,降低了大米蛋白的溶解性和结构稳定性,引起大米蛋白起泡性质下降。吴伟等^[9]发现脂质氧化产物氧化米糠谷蛋白形成聚集体,造成米糠谷蛋白在气—液界面的稳定性下降。

2.7 过氧自由基氧化大米蛋白乳化性和乳化稳定性的变化

由图 7 可知,随着 AAPH 浓度的增加,大米蛋白乳化性和乳化稳定性显著降低($P<0.05$)。蛋白乳化性质与蛋白分子亲水亲油基团的分布、油—水界面稳定性有关^[8,10]。大米蛋白乳化性质下降可能是过氧自由基氧化大米蛋白形成的聚集体在破坏大米蛋白分子表面亲水亲油基团平衡的同时,也降低了油—水界面稳定性。尤梦圆等^[10]发现米糠蛋白乳化活性与蛋白分子的亲水亲油基团、油—水界面稳定性有关;

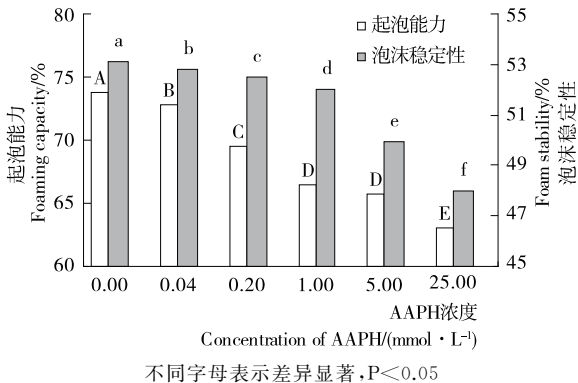
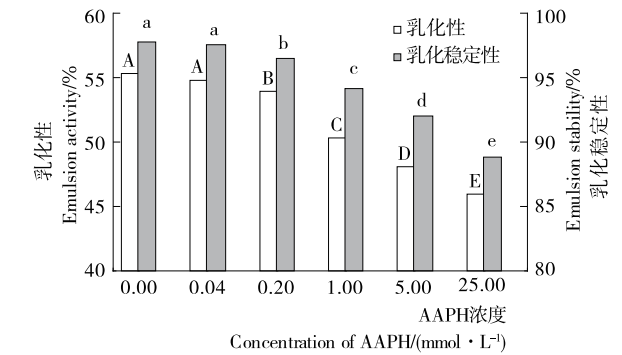


图 6 过氧自由基氧化大米蛋白起泡能力和泡沫稳定性的变化

Figure 6 Changes of foaming capacity and foaming stability of rice protein oxidized by peroxy radical



不同字母表示差异显著, $P < 0.05$

图 7 过氧自由基氧化大米蛋白乳化性和乳化稳定性的变化

Figure 7 Changes of emulsion activity and emulsion stability of rice protein which oxidized by peroxy radical

Chen Nan-nan 等^[8]发现过氧自由基诱使大豆蛋白形成不可溶性聚集体,使得大豆蛋白乳化液油—水界面稳定性下降,大豆蛋白乳化性质降低;吴伟等^[9]发现蛋白质氧化聚集体会限制蛋白分子的脂质吸附能力,降低油—水界面的稳定性,米糠谷蛋白乳化性下降。

3 结论

采用 AAPH 热降解产生的过氧自由基氧化修饰大米蛋白,研究过氧自由基氧化对大米蛋白功能性质的影响。结果发现:AAPH 产生的过氧自由基诱使大米蛋白发生了氧化。随着 AAPH 浓度的增加,大米蛋白溶解性和 Zeta 电位绝对值下降,表明大米蛋白氧化产生了不可溶性聚集体,蛋白溶液稳定性下降。此外,随着 AAPH 浓度的增加,大米蛋白持水性、起泡性质和乳化性质下降,持油性上升,表明过氧自由基氧化导致大米蛋白功能性质发生变化;这些变化可能会增加大米蛋白在加工过程中的溶解难度,制约大米蛋白持水能力的应用,降低大米蛋白在气—液界面和油—水界面的平衡和稳定,却也能在一定程度上促进大米蛋白持油能力的表达。

但过氧自由基氧化大米蛋白结构的变化还有待进一步研究。

参考文献

[1] 陈银基,鞠兴荣,董文,等. 稻谷中脂类及其储藏特性研究进展[J]. 食品科学, 2012, 33(13): 320-323.

[2] ZHOU Zhong-kai, ROBARDS K, HELLIWELL S, et al. Ageing of stored rice: changes in chemical and physical attributes[J]. Journal of Cereal Science, 2002, 35(1): 65-78.

[3] 蔡勇建,叶建芬,吴晓娟,等. 米糠贮藏时间对米糠蛋白功能性质影响[J]. 粮食与油脂, 2015, 28(6): 31-34.

[4] 吴伟,蔡勇建,吴晓娟,等. 丙二醛氧化对大米蛋白功能性质的影响[J]. 食品工业科技, 2015, 36(18): 113-116, 122.

[5] 叶林,廖钰,赵谋明. 花生分离蛋白氧化过程中的结构变化[J]. 食品与机械, 2015, 31(2): 3-6.

[6] 蔡勇建,吴晓娟,吴伟,等. 过氧自由基氧化对大豆蛋白功能性质影响[J]. 粮食与油脂, 2013, 26(8): 13-16.

[7] 王璐,陈月华,许宙,等. 大米免疫活性肽水解酶的筛选[J]. 食品与机械, 2015, 31(2): 38-42.

[8] CHEN Nan-nan, ZHAO Mou-ming, SUN Wei-zheng, et al. Effect of oxidation on the emulsifying properties of soy protein isolate[J]. Food Research International, 2013, 52(1): 26-32.

[9] 吴伟,叶建芬,蔡勇建,等. 贮藏过程中酸败引起的米糠谷蛋白功能性质变化[J]. 食品与机械, 2015, 31(5): 165-168.

[10] 尤梦圆,何东平,邹翀,等. 热稳定米糠粕和米糠低温浸出粕制备米糠蛋白的对比研究[J]. 中国油脂, 2014, 39(6): 45-48.

[11] YE Lin, LIAO Yu, SUN Wei-zheng, et al. Effect of protein oxidation on the stability of peanut beverage[J]. CyTA-Journal of Food, 2015, 13(1): 49-55.

[12] 马梦君,胡文卿,傅丽亚,等. 温度和质量浓度对茶多酚水溶液稳定性的影响[J]. 食品科学, 2014, 35(11): 11-16.

[13] KHAN S H, BUTT M S, SHARIF M K, et al. Functional properties of protein isolates extracted from stabilized rice bran by microwave, dry heat, and parboiling[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(6): 2 416-2 420.

and Food Chemistry, 2013, 61: 1 954-1 967.

[11] ELIAS R, MCCLEMENTS D J, Decker E A. Impact of thermal processing on the antioxidant mechanisms of continuous phase β -lactoglobulin in oil-in-water emulsions [J]. Food Chemistry, 2007, 104(4): 1 402-1 409.

[12] 李旭敏,曹劲松,高建华. 牦牛酪蛋白理化及功能特性的研究[J]. 中国乳品工业, 2005, 33(9): 17-20.

[13] LAWRENCE M T, SASAKI S, MCCLEMENTS D J, et al. Mechanisms of the antioxidant activity of a high molecular weight fraction of whey[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48: 1 473-1 478.

[14] 王仁芳,范令刚,高文远,等. 杏仁化学成分与药理活性研究进展[J]. 现代药物与临床, 2010, 25(6): 426-428.

[15] MARQUEZ A L, MEDRANO A, PANIZZOLO L A, et al. Effect of calcium salts and surfactant concentration on the stability of water-in oil (W/O) emulsions prepared with polyglycerol polyricinoleate[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2010, 341: 101-108.

(上接第 4 页)

[5] FENNEMA O R. 食品化学[M]. 王璋,许时婴,江波,等,译. 北京:中国轻工业出版社, 2003.

[6] 李静娟,易建华,朱振宝,等. 桃仁蛋白与大豆分离蛋白功能特性比较[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(2): 100-104.

[7] 陈从瑾,黄克瀛,李德梁,等. 香椿叶提取物清除 DPPH 自由基能力的测定方法[J]. 林产化学与工业, 2006, 26(3): 69-72.

[8] HU Min, MCCLEMENTS D J, DECKER E A. Lipid oxidation in corn oil-in-water emulsions stabilized by casein, whey protein isolate, and soy protein isolate[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 51: 1 696-1 700.

[9] ELIAS R J, MCCLEMENTS D J, DECKER E A. Antioxidant activity of cysteine, tryptophan, and methionine residues in continuous phase β -lactoglobulin in oil-in-water emulsions[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53: 10 248-10 253.

[10] PHOON P Y, NARSIMBAN G, FERNANDA M. Effect of Thermal behavior of β -lactoglobulin on the oxidative stability of menhaden oil-in-water emulsions [J]. Journal of Agricultural