

干燥加热磷酸化修饰对鸭蛋清蛋白结构和抗氧化活性影响的研究

刘自单¹,殷春雁¹,李灿鹏^{2,*}

(1. 红河卫生职业学院, 云南 红河 661199; 2. 云南大学 化学科学与工程学院, 云南 昆明 650091)

摘要:干燥加热磷酸化修饰鸭蛋清蛋白(duck egg white protein, DEWP)。通过 ABTS⁺自由基清除能力、超氧阴离子自由基清除能力和二价铁离子整合能力综合评价鸭蛋清蛋白在干燥加热磷酸化前后的抗氧化性。通过荧光光谱、红外光谱和圆二色谱法鉴定干燥加热磷酸化修饰对鸭蛋清蛋白结构的影响。结果表明,在干燥加热磷酸化修饰作用下,鸭蛋清蛋白二级结构和溶解性几乎不受影响,但它的抗氧化活性、热稳定性显著增强。干燥加热磷酸化修饰之后抗氧化性提高主要是由于蛋白中磷酸基团的引入和表面巯基含量的增加。

关键词:鸭蛋清蛋白;干燥加热磷酸化;抗氧化活性;结构

Phosphorylation of Duck Egg White Protein by Dry-heating in the Presence of Pyrophosphate: Effect on Protein Structure and Antioxidant Activity

LIU Zi-dan¹, YIN Chun-yan¹, LI Can-peng^{2,*}

(1. Honghe Health Vocational College, Honghe 661199, Yunnan, China; 2. School of Chemistry Science and Technology, Yunnan University, Kunming 650091, Yunnan, China)

Abstract: Duck egg white protein (DEWP) was phosphorylated by dry-heating in the presence of pyrophosphate. The antioxidant activity of DEWP, including ABTS⁺ free-radical scavenging capacity, superoxide anion radical scavenging activity and Fe²⁺ chelating capacity, was then investigated before and after phosphorylation by dry-heating in the presence of pyrophosphate. Furthermore, the effects of phosphorylation on structure of DEWP were identified by spectra fluorescence, infrared spectra and circular dichroism spectra. The results showed that the antioxidant activity of DEWP was slightly increased after heating in a dry state. The results showed that the secondary structure and solubility of DEWP were almost unaffected under the effect of dry-heating phosphorylation, but its antioxidant activity and heat stability were significantly enhanced. The increased antioxidant activity of DEWP after dry-heating phosphorylation was mainly due to the introduction of phosphate groups and the increase of the surface SH content.

Key words: duck egg white protein; phosphorylation by dry-heating in the presence of pyrophosphate; antioxidant activity; structure

基金项目:云南省教育厅科学研究基金(2018JS 695)

作者简介:刘自单(1986—),男(汉),讲师,硕士,研究方向:功能性食品开发研究。

* 通信作者:李灿鹏(1974—),男,教授,博士,研究方向:电化学/荧光传感器、食品安全与检测、功能性食品等。

[18] 许佳妮,张剑飞,袁娅,等.不同培养基对平菇香气成分的影响[J].食品科学,2015,36(4):86-91

[19] 汪海波,罗莉,汪海玲,等.SAS统计分析与应用从入门到精通[M].北京:人民邮电出版社,2010:295-296

[20] 刘伟,张群,李志坚,等.不同品种黄花菜游离氨基酸组成的主成分分析及聚类分析[J].食品科学,2019,40(10):243-250

[21] 张晓云,赵艳,吴文彬,等.高压脉冲电场对普洱生茶香气和陈化时间的影响[J].食品科学,2020,41(9):43-49

[22] 汪冬冬,唐焱,陈功,等.不同发酵方式盐渍萝卜挥发性成分动态分析[J].食品科学,2020,41(6):146-154

收稿日期:2020-02-04

引文格式:

刘自单,殷春雁,李灿鹏.干燥加热磷酸化修饰对鸭蛋清蛋白结构和抗氧化活性影响的研究[J].食品研究与开发,2020,41(24):23-30

LIU Zidan, YIN Chunyan, LI Canpeng. Phosphorylation of Duck Egg White Protein by Dry-heating in the Presence of Pyrophosphate: Effect on Protein Structure and Antioxidant Activity[J]. Food Research and Development, 2020, 41(24):23-30

机体的抗氧化能力依赖于抗氧化物质对氧自由基的清除能力^[1]。正常情况下,抗氧化物质与自由基之间的作用处于平衡状态,平衡破坏可能导致细胞或组织损伤,甚至导致心血管疾病和癌症^[2]。因此,迫切需要寻找一种安全、易吸收、营养、可食用,并具有很好抗氧化性的食品。鸭蛋是中国食品生产中最常用的蛋类之一,鸭蛋清蛋白(duck egg white protein, DEWP)容易被人体肠道所吸收^[3]。目前,食品抗氧化性研究主要集中在从植物和动物资源中提取蛋白质^[4]及筛选抗氧化肽,例如鱼类蛋白^[5]、海产品^[6]、牛奶^[7]等,并且多集中在采用酶解法筛选抗氧化多肽^[8-9]。

本课题组一直致力于采用干燥加热磷酸化修饰法对蛋清蛋白理化性质和功能进行研究,例如热稳定性^[10-14]、起泡性和乳化性^[11,14-16]、吸油性^[14]、凝胶特性和胶体保水性^[11,13]、被消化性^[11]、磷酸钙可溶性^[10-13]和抗氧化性^[17]。干燥加热磷酸化过程中未加入有机试剂,是一种比较安全、简单、环保且容易实现工业化的食品改性方法。目前,已经报道了鸭蛋清蛋白具有抗氧化性^[4],但鸭蛋清蛋白经磷酸化修饰后是否能影响其抗氧化性的研究尚未报道。本研究旨在确定干燥加热磷酸化修饰对鸭蛋清蛋白抗氧化的影响,为抗氧化性功能食品的开发提供一条新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料

鸭蛋清蛋白的制备参照 Naknukool 等^[3]的方法略作修改。具体为:取出新鲜鸭蛋蛋清,用 1 mol/L HCl 调节 pH 值至 6.0,6 000 r/min 离心 20 min。取出上清液用 10 kDa 的透析袋透析 1 d。冻干后获得鸭蛋清蛋白(native-duck egg white protein, N-DEWP)样品。

1.1.2 试剂

2,2-二氮-双-(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)-二铵盐(ABTS)、乙二胺四乙酸二钠:上海伊卡生物科技有限公司;1,1-二苯基-2-苦基肼(DPPH):上海源叶生物科技有限公司;亚铁啉:Sigma;重硫酸钾:天津市

风船化学试剂科技有限公司。其余试剂均为分析纯试剂。

1.1.3 仪器

UV-1800 PC 型紫外-可见分光光度计:上海美谱达仪器有限公司;PHS-25 型 pH 计:上海仪电科学仪器股份有限公司;FD-1-50 真空冷冻干燥机:北京博医康实验仪器有限公司;FA 2004 型电子天平:上海舜宇恒平科学仪器有限公司;实验室超纯水机:重庆圣德利医疗器械研究有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 干燥加热磷酸化鸭蛋清蛋白(phosphorylation of duck egg white protein, PP-DEWP)的制备

干燥加热磷酸化鸭蛋清蛋白的制备采用 Li 等^[10]的方法。称取 1 g N-DEWP 样品,用焦磷酸钠溶液(100 mL, 0.1 mol/L)溶解,调节 pH 值为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0,冻干,然后 85 ℃干燥加热 1 d 和 3 d。用适量去离子水溶解干燥加热之后的样品,装入透析袋中透析 2 d,再次冷冻干燥,得到干燥加热磷酸化鸭蛋清蛋白(PP-DEWP)样品。干燥加热鸭蛋清蛋白(dry-heating of duck egg white protein, DH-DEWP)样品的制备除不加入焦磷酸钠溶液外,同以上步骤。

1.2.2 磷含量的测定

样品中磷含量采用 Chen 等^[18]的方法。总磷含量(P_t)的测定:在分解瓶中用 2 mL 60%的高氯酸溶解 10 mg 蛋白样品,然后在电炉上加热至溶液澄清,继续加热 30 min。冷却后加入 10 mL 去离子水,沸水浴 20 min,冷却后定容到 100 mL。配制混合液,混合液包括:(1)3 mol/L 稀 H_2SO_4 , (2)2.5%钼酸铵溶液, (3)10%的抗坏血酸,按照体积比(1):(2):(3):蒸馏水=1:1:1:2 混合。分别取 2 mL 不同浓度的磷酸二氢钾标准溶液和定容后的 PP-DEWP 溶液,加入等体积的混合液,50 ℃水浴 1 h,冷却后测定吸光度(820 nm)。根据磷标准曲线求出总磷含量。无机磷含量(P_i)的测定:在分解瓶中加入 20 mg 左右的 PP-DEWP 样品,加入 5 mL 水,再加入 5 mL 10%三氯乙酸。3 000 r/min 离心 2 h,取上清液 1 mL 定容到 10 mL。分别取 2 mL 不同浓度

的磷酸二氢钾标准溶液和 PP-DEWP 样品稀释液,加入等体积的混合液,混匀后在 50 ℃ 水浴中加热 1 h,冷却后在 820 nm 处测定吸光度值。

$$\text{有机磷含量}(P_o): P_o = P_t - P_i$$

式中: P_o 为磷酸化修饰后样品中的磷含量,%; P_t 为样品中总磷含量,%; P_i 为样品中无机磷含量,%。

1.2.3 溶解性测定

样品的溶解性采用 Lowry 等方法^[19]测定。将 N-DEWP、DH-DEWP 和 PP-DEWP 样品分别溶解在 Tris-HCl (50 mmol/L, pH=7.0) 的缓冲溶液中,调节浓度为 1 mg/mL。3 000 r/min 离心 30 min 得上清。配制 0、0.05%、0.15%、0.20%、0.25%、0.30% 的牛血清蛋白标准溶液。配制混合液,混合液中各成分为(1)含 10% Na_2CO_3 的 0.5 mol/L 氢氧化钠(NaOH)溶液,(2)1% 的五水硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)溶液,(3)2% 的酒石酸钾钠溶液,体积比为(1):(2):(3)=20:1:1。取 0.5 mL 不同浓度的牛血清蛋白标准液和 0.5 mL 待测样品液,各加入混合液 1 mL,25 ℃ 放置 10 min,分别加入 2 mL 1 mol/L Folin-酚试剂,50 ℃ 水浴加热 15 min,冷却后,在 500 nm 处测定溶液的吸光度。

1.2.4 表面巯基含量测定

表面巯基含量测定采用 Ellman 等^[20]的方法。将 N-DEWP、DH-DEWP、PP-DEWP 样品分别溶解在 0.1 mol/L Tris-甘氨酸(pH=8.0)缓冲液中,使其浓度为 1 mg/mL。在 1.0 mL 蛋白溶液中加入 1.0 mL 0.1 mol/L Tris-甘氨酸(pH=8.0)的缓冲液(含 0.01 mol/L 的乙二醇四乙酸二钠盐溶液),在 40 ℃ 加热 30 min,再加入 50 μL 5,5'-二硫代双(二硝基苯甲酸)[5,5'-二硫代双(二硝基苯甲酸)溶液(浓度为 1 mol/L)用 0.1 mol/L pH 8.0 的 Tris-甘氨酸的缓冲液溶解],在 25 ℃ 水浴中加热 10 min,在 412 nm 处测定其吸光度。计算公式: $SH = A \times 1.9539$ 。

1.2.5 浊度和吸光度测定

浊度测定采用 Li 等^[11]的方法。配制 2 mg/mL 的 N-DEWP、DH-DEWP 和 PP-DEWP 溶液,在 595 nm 处测定吸光度值即为浊度。配制 1 mg/mL 的 N-DEWP、DH-DEWP 和 PP-DEWP 蛋白溶液,在 280 nm 处测定吸光度值。

1.2.6 热稳定性测定

蛋白质热稳定性测定参考 Li 等^[12]的方法,配制 50 mmol/L Tris-HCl (pH7.0) 的缓冲溶液,称取一定量的 N-DEWP、DH-DEWP 和 PP-DEWP 样品溶解于上述缓冲液中配成 1 mg/mL 的样品溶液,分别在 60、70、80、90、100 ℃ 水浴加热 10 min,3 000 r/min 离心 30 min,

取上清液用 Lowry 法测定蛋白质浓度。离心前先用相机拍摄图片作为定性对比。

1.2.7 ABTS⁺自由基清除能力

ABTS⁺自由基清除能力根据 Zhang 等^[21]的方法测定。7 mmol/L ABTS 溶液:称取 38.41 mg ABTS 溶解在 5 mL 去离子水中;2.45 mmol/L 重硫酸钾:称取 6.61 mg 重硫酸钾溶解在 5 mL 去离子水中;两溶液混合均匀,避光条件下放置 16 h~24 h (让其充分氧化)。使用时用 100 mmol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲溶液按照体积比 1:70 稀释使用,现配现用。取稀释好的 ABTS 溶液 4 mL,加入用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline,PBS)配制好的 0.5、1.0、2.0、3.0、5.0、10.0 mg/mL 样品溶液各 80 μL 混匀,37 ℃ 水浴放置 10 min,测定 734 nm 处的吸光度。平行 3 次,空白不加样品,以等量的磷酸盐缓冲液代替,样品抗氧化率计算如下。

$$\text{抗氧化率}/\% = \frac{A - A_s}{A} \times 100$$

式中: A_s 为样品的吸光度; A 为空白的吸光度。

1.2.8 超氧阴离子自由基清除能力

超氧阴离子自由基清除能力根据 Zhang 等^[22]的方法测定。称取一定量蛋白,用 50 mmol/L pH 8.2 Tris-HCl 缓冲液溶解蛋白质使其浓度为 1 mg/mL。移取 3 mL 样品溶液,加入在 25 ℃ 水浴中恒温的 0.14 mL 5 mmol/L 邻苯三酚溶液(用 10 mmol/L HCl 溶液配制),混匀,快速倒入比色皿中,每 30 s 测定 325 nm 处的吸光度,测定 4 min。空白组以等量的 10 mmol/L HCl 代替邻苯三酚溶液;对照组以等量去离子水代替样品。做吸光度随时间变化的曲线回归方程,求出其斜率即为邻苯三酚的自氧化速率和样品组对邻苯三酚的自氧化速率,计算如下。

$$\text{清除率}/\% = (V_{\text{对照}} - V_{\text{样品}}) / V_{\text{对照}} \times 100$$

式中: $V_{\text{样品}}$ 为样品组对邻苯三酚的自氧化速度; $V_{\text{对照}}$ 为邻苯三酚的自氧化速率。

1.2.9 二价铁离子的螯合能力

二价铁离子螯合能力采用 Wu 等^[23]的方法测定。配制 0.1、1.0、5.0、10.0 mg/mL 的样品溶液,各取 1 mL 加入 3.7 mL 水,再加入 2.0 mmol/L 的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶液 0.2 mL,混匀,25 ℃ 下水浴 60 min。加入 5 mmol/L 的亚铁啉溶液 0.2 mL,混匀,25 ℃ 下水浴 10 min,在 562 nm 处测定吸光度。平行 3 次,空白不加样品,以等量的去离子水代替,蛋白对二价铁离子的螯合能力计算如下。

$$\text{螯合率}/\% = \frac{A - A_s}{A} \times 100$$

式中: A_s 为样品的吸光度; A 为空白的吸光度。

1.2.10 色氨酸的荧光强度

色氨酸荧光强度采用 Li 等^[24]的方法测定。用磷酸盐缓冲液(50 mmol/L,pH7.0)配置浓度为 1.5 mg/mL 的样品溶液。离心后取上清,用 Lowry 法准确测定上层液中样品的浓度,然后用磷酸盐缓冲液(50 mmol/L,pH 7.0)稀释为 0.1 g/L。在激发波长为 280 nm,测定波长为 300 nm~450 nm 的条件下,用荧光光度计(F4500 型)测定色氨酸的荧光强度。

1.2.11 红外光谱

红外光谱测定参照 Wu 等^[25]的方法。取适量样品粉末和一定量的 KBr 晶体在研钵中研碎,压片,用傅立叶红外光谱仪(Nicolet AVATAR 360 FT-IR)测定红外光谱。

1.2.12 圆二色谱测定

圆二色谱测定参照 Wu 等^[25]的方法,用 50 mmol/L pH 7.0 的磷酸盐缓冲液配制 1 mg/mL 的样品溶液,用 0.45 μ m 的滤头过滤,用 Lowry 法测定样品的准确浓度,调节为 0.1 mg/mL。20 $^{\circ}$ C 下扫描,扫描的相关参数为波长范围:190 nm~250 nm;谱带宽度:1 nm。

2 结果与分析

2.1 干燥加热磷酸化鸭蛋清蛋白的特性

2.1.1 磷酸化鸭蛋清蛋白中的磷含量

磷含量是干燥加热磷酸化后接在蛋白质上的有机磷含量,即有机磷含量=总磷含量-无机磷含量。磷含量与 pH 值、干燥加热时间和温度等因素有关,本试验采用 Li 等^[10]的方法成功制备磷酸化鸭蛋清蛋白样品并优化了影响样品磷酸化的条件^[16],pH 值对磷含量的

影响结果见图 1。

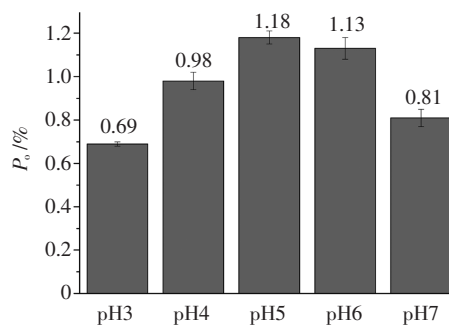


图1 pH 值对磷酸化鸭蛋清蛋白中磷含量的影响
Fig.1 Effect of pH on the phosphorus content in duck egg white protein phosphorylated by dry-heating in the presence of pyrophosphate(PP-DEWP)

从图 1 中可以看出,pH 值不同,即使加热时间都是 1 d,磷含量也不同,pH 值为 5.0、85 $^{\circ}$ C 干燥加热 1 d 获得的样品有机磷含量达到 1.18%。同时研究了加热天数 1 d 和 3 d,发现随着加热天数增加,磷含量增加,pH 值为 5.0、85 $^{\circ}$ C 干燥加热 3 d 获得的样品有机磷含量为 1.22%。因此磷酸化样品条件确定为:pH 值为 5.0、85 $^{\circ}$ C 干燥加热 3 d。Li 等^[11]采用干燥加热磷酸化法修饰鸡蛋卵白蛋白样品,在 pH 值为 4、85 $^{\circ}$ C 干燥加热 5 d 条件下测定有机磷含量为 1.01%。研究表明蛋白质中磷的含量能够提高其功能特性,如热稳定性,Kita-batake 等^[26]报道了当卵白蛋白含有两个磷酸基团,测定磷含量为 0.14%,热稳定性比去磷酸化的卵白蛋白更好。

2.1.2 磷酸化鸭蛋清蛋白溶解度测定

本试验采用 Lowry 等^[19]方法测定样品溶解度,结果见表 1。

表 1 磷酸化鸭蛋清蛋白的特性

Table 1 Some characteristics of PP-DEWP

项目	有机磷含量/%	表面巯基含量/(mol/mol)	溶解度/%	浑浊度(595 nm)	吸光度(280 nm)
N-DEWP	0.12 $\pm$ 0.02	0.144	100 ^a	0.046	0.759
DH-DEWP	0.12 $\pm$ 0.02	0.156	97.4 $\pm$ 1.3	0.061	0.831
PP-DEWP	1.22 $\pm$ 0.03	0.164	99.2 $\pm$ 1.2	0.043	0.820

注:不同小写字母表示差异显著($p < 0.05$)。

如表 1 所示,与未经过任何处理的鸭蛋清蛋白(N-DEWP)相比,未加入焦磷酸盐干燥加热的鸭蛋清蛋白(DH-DEWP)溶解度有所下降。但在焦磷酸盐存在条件下干燥加热的鸭蛋清蛋白(PP-DEWP)溶解度达到 99.2%,与 N-DEWP 溶解度相当。表明干燥加热磷酸化改善了鸭蛋清蛋白的溶解性。这些结果与前期报道一致^[10-11,17]。研究表明平均疏水性越低,静电荷越

多,蛋白质溶解性越高^[27]。干燥加热磷酸化使鸭蛋清蛋白溶解度增高可能是由于引入的磷酸基团亲水作用的结果。

2.1.3 磷酸化鸭蛋清蛋白巯基含量测定

表面巯基含量的测定采用 Ellman 等^[20]的方法。如表 1 所示,N-DEWP、DH-DEWP 和 PP-DEWP 的表面巯基含量分别为 0.144、0.156 mol/mol 和 0.164 mol/mol。

这是因为干燥加热使 N-DEWP 的结构展开,表面巯基含量增加^[28],干燥加热磷酸化后结构展开的更多,表面巯基进一步增加^[13]。有研究表明蛋白质的表面巯基增加会使抗氧化性提高^[29]。

2.1.4 浑浊度和吸光度值

由表 1 可知,N-DEWP(浓度 2 mg/mL)在 595 nm 处的吸光度值为 0.046,此时溶液为澄清透明。DH-DEWP 的浑浊度略微升高,但 PP-DEWP 的浑浊度低于 N-DEWP 和 DH-DEWP,表明干燥加热磷酸化能够抑制干燥加热引起的浑浊增加。这很可能是由于 PP-DEWP 中磷酸基团的静电排斥力引起的^[13]。从表 1 可以看出,N-DEWP、DH-DEWP 和 PP-DEWP(浓度 1 mg/mL)在 280 nm 处的吸光度值为 0.759、0.831 和 0.820。干燥加热和干燥加热磷酸化后吸光度值略微增加。

2.1.5 热稳定性检测

通过定性和定量分析来检测磷酸化作用对鸭蛋清蛋白热稳定性的影响。将 N-DEWP、DH-DEWP 和 PP-DEWP 样品分别置于不同的温度(60 ℃~100 ℃,间隔为 10 ℃)下水浴加热 10 min,离心后用 lowry 法测定上清液中可溶性蛋白的含量,结果见图 2。

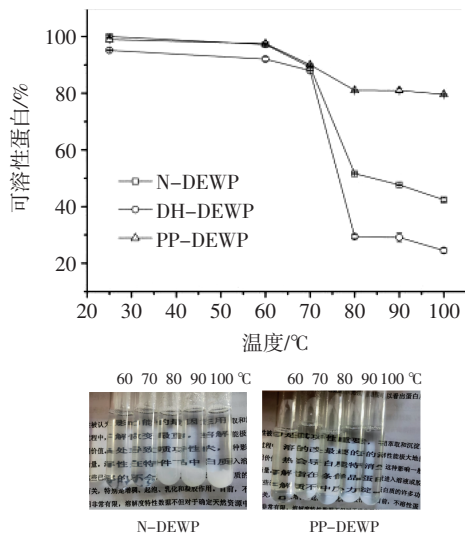


图 2 N-DEWP、DH-DEWP 和 PP-DEWP 样品在不同温度下的热稳定性

Fig.2 Heat stability of N-DEWP, DH-DEWP and PP-DEWP at various temperatures

如图 2 所示,当水浴温度达到 70 ℃以后,随着温度升高,N-DEWP、DH-DEWP 样品溶解度显著降低。而经过干燥加热磷酸化的样品(PP-DEWP)在 70 ℃的溶解度仍大于 90%。如图 2 的照片所示,当温度达到 80 ℃,N-DEWP、DH-DEWP 溶液开始浑浊并沉淀,而 PP-DEWP 溶液在所有温度下(60 ℃~100 ℃)均保持透明(图片文字清晰可见)。表明干燥加热磷酸化作用显

著增强了鸭蛋清蛋白的热稳定性,这可能是由于磷酸基团的引入导致蛋白质分子间排斥力增强的结果。这一结果与 Li 等用鸡蛋清蛋白^[11]和卵白蛋白^[12]研究的结果一致。

2.2 磷酸化对鸭蛋清蛋白结构的影响

2.2.1 色氨酸的荧光强度

为检测干燥加热磷酸化对鸭蛋清蛋白三级结构的影响,测定 N-DEWP、DH-DEWP 和 PP-DEWP 的色氨酸荧光强度,结果见图 3。

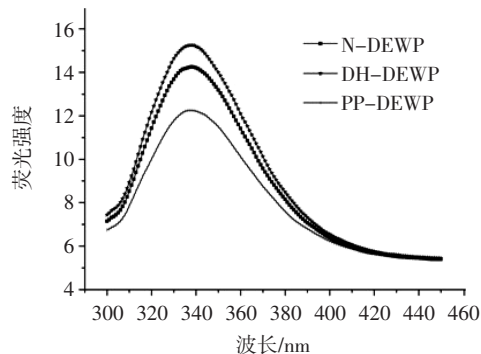


图 3 N-DEWP、DH-DEWP 和 PP-DEWP 的色氨酸荧光光谱
Fig.3 Tryptophan (Trp) fluorescence spectra of N-DEWP, DH-DEWP and PP-DEWP

如图 3 所示,经过干燥加热磷酸化之后,鸭蛋清蛋白的色氨酸荧光强度有所降低。这些结果暗示了干燥加热磷酸化导致鸭蛋清蛋白构象发生变化,使更多的色氨酸残基暴露到溶剂中。与 Enomoto 等^[30]报道的干燥加热对蛋白质三级结构影响不太明显这一结果一致。

2.2.2 圆二色谱(circular dichroism, CD)测定

蛋白质 α -螺旋结构在 192 nm 附近有一正峰,在 208 nm 和 222 nm 处有两个特征性的肩峰,因此可以利用 CD 图谱判断蛋白质的二级结构,结果见图 4。

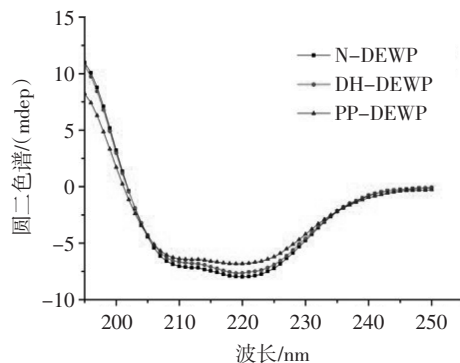


图 4 干燥加热磷酸化修饰对 N-DEWP、DH-DEWP 和 PP-DEWP 二级结构的影响

Fig.4 Effect of phosphorylation on the secondary structure of N-DEWP, DH-DEWP and PP-DEWP

如图4所示,与N-DEWP相比,经过干燥加热和磷酸化后,DH-DEWP和PP-DEWP在222 nm处的特征值略微升高,但蛋白总体结构并未发生较大变化。表明干燥加热磷酸化修饰对鸭蛋清蛋白二级结构影响不大^[13]。

2.2.3 红外光谱

通过红外光谱测定了N-DEWP、DH-DEWP和PP-DEWP,结果见图5。

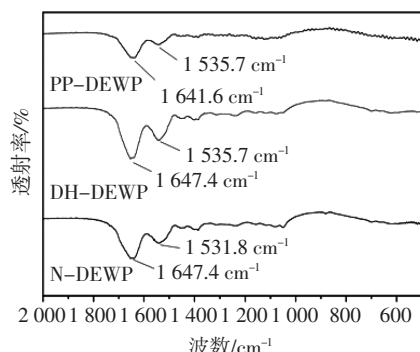


图5 N-DEWP、DH-DEWP和PP-DEWP的红外光谱

Fig. 5 FTIR spectra of N-DEWP, DH-DEWP and PP-DEWP

蛋白质的酰胺I带和酰胺II带都对蛋白质的二级结构有影响,酰胺I带在 $1600\text{ cm}^{-1}\sim 1700\text{ cm}^{-1}$ 处有吸收(主要是C=O),酰胺II带在 1540 cm^{-1} 处有吸收(主要是C-N键和N-H键)^[31]。如图5所示,当干燥加热磷酸化后,鸭蛋清蛋白的酰胺I带的峰值从 1647 cm^{-1} 迁移到 1641 cm^{-1} ,酰胺II带峰值从 1531 cm^{-1} 迁移到 1535 cm^{-1} ,表明干燥加热磷酸化修饰使鸭蛋清蛋白的二级结构受到一定影响。

2.3 磷酸化对鸭蛋清蛋白抗氧化活性的影响

2.3.1 ABTS⁺自由基清除能力

样品中含有的抗氧化成分会与ABTS反应使反应体系褪色,通过测定ABTS⁺自由基在最大吸收波长(734 nm)处的吸光度来进行定量分析^[32],结果见图6。

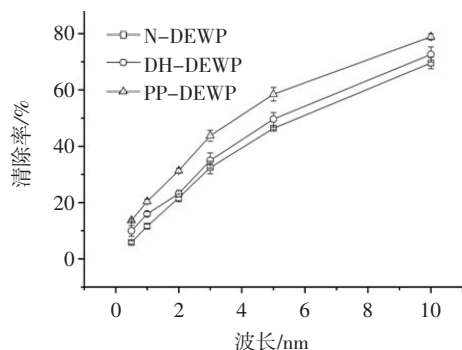


图6 N-DEWP、DH-DEWP和PP-DEWP对ABTS⁺自由基的清除能力

Fig. 6 ABTS⁺ free radical scavenging effects of N-DEWP, DH-DEWP, and PP-DEWP

如图6所示,随着蛋白浓度($0.5\text{ mg/mL}\sim 10\text{ mg/mL}$)的增加,N-DEWP、DH-DEWP和PP-DEWP对ABTS⁺自由基的清除能力逐渐增大。在相同浓度下,N-DEWP和DH-DEWP对ABTS⁺自由基的清除能力均低于PP-DEWP。在 10 mg/mL 蛋白浓度时,PP-DEWP对ABTS⁺自由基的清除能力提高到了77.78%。表明干燥加热磷酸化显著提高了鸭蛋清蛋白对ABTS⁺自由基的清除能力。结果与之前的报道一致^[17]。

2.3.2 超氧阴离子自由基的清除能力

N-DEWP、DH-DEWP和PP-DEWP的超氧阴离子自由基清除能力如图7所示。

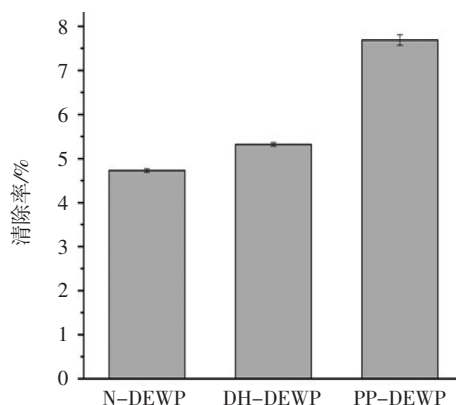


图7 N-DEWP、DH-DEWP和PP-DEWP对超氧阴离子的清除能力

Fig. 7 Superoxide anion scavenging activity of N-DEWP, DH-DEWP, and PP-DEWP

PP-DEWP的超氧阴离子自由基清除能力(7.69%)高于N-DEWP(4.73%)和DH-DEWP(5.32%)。表明干燥加热能够提高鸭蛋清蛋白的超氧阴离子清除能力,干燥加热磷酸化能够进一步提高鸭蛋清蛋白的超氧阴离子清除能力。

2.3.3 二价铁离子的螯合能力

某些蛋白质螯合剂可以通过改变过渡金属的物理位置形成不溶性金属配合物,降低过渡金属的化学反应活性^[33]。对N-DEWP、DH-DEWP和PP-DEWP的二价铁离子螯合能力测定结果如图8所示。

随着蛋白浓度($0.1\text{ mg/mL}\sim 10\text{ mg/mL}$)的增加,N-DEWP、DH-DEWP和PP-DEWP对二价铁离子的螯合能力逐渐增大。PP-DEWP的二价铁离子螯合能力比DH-DEWP显著提高,表明磷酸基团的引入能增加鸭蛋清蛋白对二价铁离子的螯合能力。众所周知,EDTA是很好的螯合剂,被广泛用于食品中。在本试验中,当PP-DEWP的浓度大于 1 mg/mL 时,螯合能力与EDTA基本相等。PP-DEWP的螯合能力表明它是一种很好的抗氧化剂,有望在食品中应用。

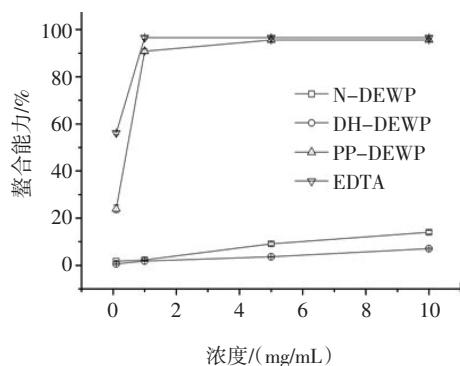


图8 N-DEWP、DH-DEWP 和 PP-DEWP 对二价铁离子的螯合能力

Fig.8 Chelating capacity of N-DEWP, DH-DEWP, and PP-DEWP

3 讨论与结论

鸭蛋清蛋白经过干燥加热磷酸化修饰后抗氧化性显著提高的原因可能包括如下两个方面。第一,干燥加热磷酸化修饰作用引入带负电荷的磷酸基团使鸭蛋清蛋白的静电相互作用增强。第二,干燥加热磷酸化修饰作用增加了鸭蛋清蛋白的表面巯基含量。研究表明表面巯基含量的增加能够提高蛋白质的总体抗氧化性^[29,34], Žilic等^[35]也以玉米蛋白为样品确定了表面巯基的含量和抗氧化性存在正相关。因此,可以肯定本研究中鸭蛋清蛋白抗氧化性的增强是因为干燥加热磷酸化增加了鸭蛋清蛋白的表面巯基含量。

本文采用干燥加热磷酸化法修饰鸭蛋清蛋白,得到干燥加热磷酸化鸭蛋清蛋白(PP-DEWP)样品,通过综合评价干燥加热磷酸化前后鸭蛋清蛋白的抗氧化性,得出结论干燥加热使鸭蛋清蛋白的抗氧化性有所提高,干燥加热磷酸化修饰后其抗氧化性显著提高,尤其是螯合能力与 EDTA 基本相等。通过磷酸化修饰,鸭蛋清蛋白二级结构轻度改变,但表面巯基含量增加且蛋白质的溶解性、浑浊度和吸光度基本未受影响。可以肯定磷酸化修饰之后抗氧化性提高是由于磷酸亲水基团的引入和表面巯基含量的增加。以上结论表明 PP-DEWP 是很好的抗氧化剂,有望用于食品加工行业中的添加剂。

参考文献:

- [1] MATXAIN J M, PADRO D, RISTILA M, et al. Evidence of high center dot OH radical quenching efficiency by vitamin B-6[J]. J Phys Chem B 113, 2009, 113(29):9629-9632
- [2] TENG DK, FANG YUAN, SONF XY, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis parameters for antioxidant capacity of peptide from goat placenta[J]. Food Bioprod Process, 2011, 89(3):202-208

- [3] NAKNUKOO S, HAYAKAWA S, SUN YX, et al. Structural and physicochemical characteristics of novel basic proteins isolated from duck egg white[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2008, 72(8):2082-2091
- [4] 王倩, 贺萍, 林如歌, 等. 鸭蛋卵清蛋白的结构、组分分析及其功能活性研究[J]. 食品工业科技, 2020, 41(8):67-73
- [5] ZHONG SY, MA CW, LIN YC, et al. Antioxidant properties of peptide fractions from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) processing by-product protein hydrolysates evaluated by electron spin resonance spectrometry[J]. Food Chem, 2011, 126(4):1636-1642
- [6] NWOSU F, MORRIS J, LUND V A, et al. Anti-proliferative and potential anti-diabetic effects of phenolic-rich extracts from edible marine algae[J]. Food Chem, 2011, 126(3):1006-1012
- [7] FARVIN KHS, BARON CP, NIELSEN NS, et al. Antioxidant activity of yoghurt peptides: Part 1-in vitro assays and evaluation in ω -3 enriched milk[J]. Food Chem, 2010, 123(4): 1081-1089
- [8] REN YAO, WU HUI, LI XF, et al. A two-step, one-pot enzymatic method for preparation of duck egg white protein hydrolysates with high antioxidant activity[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2014, 172(3): 1227-1240
- [9] DAVALOS A, MIGUEL M, BARTOLOME B, et al. Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis[J]. J Food Protect, 2004, 67(9): 1939-1944
- [10] LI CP, SALVADOR A S, IBRAHIM H R, et al. Phosphorylation of egg white proteins by dry-heating in the presence of phosphate[J]. J Agric Food Chem, 2003, 51(23):6808-6815
- [11] LI CP, IBRAHIM H R, SUGIMOTO Y, et al. Improvement of functional properties of egg white protein through phosphorylation by dry-heating in the presence of pyrophosphate[J]. J Agric Food Chem, 2004, 52(18):5752-5758
- [12] LI CP, HAYASHI Y, SHINOHARA H, et al. Phosphorylation of ovalbumin by dry-heating in the presence of pyrophosphate: effect on protein structure and some properties[J]. J Agric Food Chem, 2005, 53(12):4962-4967
- [13] LI CP, ENOMOTO H, OHKI S, et al. Improvement of functional properties of whey protein isolate through glycation and phosphorylation by dry-heating[J]. J Dairy Sci, 2005, 88(12): 4137-4145
- [14] LI CP, CHEN D, PENG J, et al. Improvement of functional properties of whey soy protein by phosphorylation by dry-heating in the presence of pyrophosphate[J]. LWT-Food Sci & Technol, 2010, 43: 919-925
- [15] HAYASHI Y, LI CP, ENOMOTO H, et al. Improvement of functional properties of ovotransferrin by phosphorylation through dry-heating in the presence of pyrophosphate [J]. Asian-Aust J Anim Sci, 2008, 21(4): 596-602
- [16] HAYASHI Y, NAGANO S, ENOMOTO H, et al. Improvement of foaming property of egg white protein by phosphorylation through dry-heating in the presence of pyrophosphate[J]. J Food Sci, 2009, 74(1): 68-72
- [17] YIN CY, YANG LONG, ZHAO HUI, et al. Improvement of antioxi-

- dant activity of egg white protein by phosphorylation and conjugation of epigallocatechin gallate[J]. Food Research International, 2014, 64: 855–863
- [18] CHEN P S, TORIBARA T Y, WARNER H. Microdetermination of phosphorus[J]. Analytical Chemistry, 1956, 28(11): 1756–1758
- [19] LOWERY O H, ROSEBROUGH N J, FARR A L, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent[J]. Biochemistry, 1951, 193: 265–267
- [20] ELLMAN G T. Tissue sulphhydryl groups[J]. Arch Biochemistry and Biophysics, 1959, 82: 70–75
- [21] ZHANG HB, CHEN TF, JIANG JIE, et al. Selenium-containing allophycocyanin purified from selenium-enriched *Spirulina platensis* attenuates AA PH-induced oxidative stress in human erythrocytes through inhibition of ROS generation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(16): 8683–8690
- [22] ZHANG TAO, LI YH, MIAO MING, et al. Purification and characterization of a new antioxidant peptide from chickpea(*Cicer arietinum* L.) protein hydrolysates[J]. Food Chemistry, 2011, 128(1): 28–33
- [23] WU CH, PAN B S, CHE LC, et al. Low-molecular-weight peptides as related to antioxidant properties of chicken essence[J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2005, 13(2): 176–183
- [24] LI CP, HE ZK, WANG XY, et al. Selenization of ovalbumin by dry-heating in the presence of selenite: Effect on protein structure and antioxidant activity[J]. Food Chemistry, 2014, 148: 209–217
- [25] WU XL, WU H, LIU MX, et al. Analysis of binding interaction between(-)-epigallocatechin (EGC) and β -lactoglobulin by multi-spectroscopic method[J]. Spectrochimica Acta Part A, 2011, 82(1): 164–168
- [26] KITABATAKE N, ISHIDA A, DOI E. Physicochemical and functional properties of hen Ovalbumin dephosphorylated by acid phosphate[J]. Agric Biol Chem, 1988, 52(4): 967–973
- [27] 赵新淮, 徐红华, 姜毓. 食品蛋白质-结构, 性质与功能[M]. 北京: 科学出版社, 2009
- [28] GUO H, YOSHIKI K, MASAM Y. Structures and properties of antioxidant peptides derived from royal jelly protein[J]. Food Chemistry, 2009, 113(1): 238–245
- [29] TAYLOR M J, NICHARDSON T. Antioxidant activity of skim milk: Effect of heat and resultant sulfhydryl groups[J]. Journal of Dairy Science, 1980, 63(11): 1783–1795
- [30] ENOMOTO H, LI CP, MORIZANE K, et al. Improvement of functional properties of bovine serum albumin through phosphorylation by dry-heating in the presence of pyrophosphate[J]. J Food Sci, 2008, 73(2): 84–91
- [31] TANTIPOLPHAN R, RADES T, MCQUILLAN A J, et al. Adsorption of bovine serum albumin(BSA) onto lecithin studied by attenuated total reflectance Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2007, 337(1/2): 40–47
- [32] 朱玉昌, 焦必宁. ABTS 法体外测定果蔬类总抗氧化能力的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(8): 77–80
- [33] DIAZ M, DUNN C M, MCCLEMENTS D J, et al. Use of caseinophosphopeptides as natural antioxidants in oil-in-water emulsions[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(8): 2365–2370
- [34] ELIAS R J, KELLERBY S S, DECKER E A. Antioxidant activity of proteins and peptides. Critical Review in Food [J]. Science and Nutrition, 2008, 48(5): 430–441
- [35] Žilić S, Akıllıoğlu G, Serpen A, et al. Effects of isolation, enzymatic hydrolysis, heating, hydration and Maillard reaction on the antioxidant capacity of cereal and legume proteins[J]. Food Research International, 2012, 49: 1–6

收稿日期:2020-01-11

高举中国特色社会主义伟大旗帜，
坚定不移走中国特色社会主义道路。