

臭氧氧化对鲢肌球蛋白热聚集的影响

尤娟^{1,2} 郑文栋¹ 王敏君¹ 尹涛^{1,2} 胡杨^{1,2} 刘茹^{1,2} 熊善柏^{1,2}

1.华中农业大学食品科学技术学院,武汉 430070;

2.国家大宗淡水鱼研发分中心(武汉),武汉 430070

摘要 以鲢肌球蛋白为对象,测定臭氧处理后肌球蛋白在加热过程中的疏水性、浊度、粒径和分子质量分布变化,研究臭氧氧化对鲢肌球蛋白热聚集过程的影响。结果发现,肌球蛋白表面疏水性和浊度均随着加热时间的延长显著增加,随后上升趋势减缓;臭氧氧化 15~60 s 的肌球蛋白表面疏水性和浊度显著大于未氧化的肌球蛋白,但臭氧氧化 15~60 s 的肌球蛋白样品之间没有显著性差异,臭氧氧化 5 min 的肌球蛋白的表面疏水性显著下降。加热前 30 min,随加热时间延长,大粒径的肌球蛋白聚集体相对含量逐渐增加,加热最后 30 min,其含量下降。臭氧氧化的肌球蛋白粒径分布的峰值随氧化时间的增加向大粒径方向偏移。臭氧氧化加速肌球蛋白的热聚集,轻度臭氧氧化与未氧化肌球蛋白的热聚集过程相似,但轻度氧化的肌球蛋白聚集较快;而重度臭氧氧化使肌球蛋白在加热前已形成不规则聚集体,加热后使肌球蛋白迅速产生不溶性蛋白聚集体。

关键词 鲢;肌球蛋白;臭氧;氧化;热聚集;表面疏水性;浊度;粒径分布

中图分类号 TS 254.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2019)06-0001-08

鲢 2018 年的总产量为 385.89 万 t^[1]。鲢具有生长速度快、价格低廉、人工养殖技术成熟等特点,可为鱼糜生产提供充足且成本低的原料。但鲢鱼糜白度低且带有土腥味,凝胶品质不佳,因此,目前鱼糜生产者将臭氧应用于鱼糜生产中来解决这一问题。臭氧是一种具有强氧化性的物质,在水中发生氧化还原反应,可作用于蛋白质进而引发氧化效应,最终导致半胱氨酸、色氨酸、酪氨酸等氨基酸侧链修饰、蛋白质构象变化、蛋白质交联或降解等变化^[2]。随着臭氧在食品加工中的应用越来越广泛,臭氧引起的蛋白质氧化对食品中蛋白质结构和功能性质的影响也逐渐被关注。Zhang 等^[3]对臭氧处理的鳙鱼肉的理化特性及凝胶特性进行了分析,发现适度臭氧处理可以提高肌原纤维蛋白羰基含量和凝胶强度。笔者所在团队前期也分析了轻度臭氧处理对鲢肌球蛋白结构的影响,发现轻度臭氧处理后肌球蛋白羰基含量、表面疏水性增加,巯基含量减少, α -螺旋显著减少,蛋白质结构小幅度地展开并发生一定的交联^[4],而氧化后的蛋白在加工过程中如何受热聚集、再形成凝胶等相关研究比较有限。

蛋白质聚集是目前食品加工方面的研究热点,几乎所有蛋白质都会发生聚集,聚集程度和聚集方式可能存在差异^[5]。近年来,研究者们通过对不同类型的蛋白质的热聚集进行研究后得出^[6-9],外界环境条件(热、pH、离子强度或化学试剂等)的变化将会导致蛋白质结构改变,使包埋在其内部的基团暴露出来,在共价键或非共价键相互作用下形成拥有更高分子质量的寡聚体或多聚体。Mahler 等^[10]也指出蛋白质形成聚集体的形式,遵循的机理与蛋白质的类型以及外界环境有关。目前研究认为肌球蛋白的头部或颈部首先通过二硫键等相互作用形成低聚物,随后尾部相互交联形成更大的聚集体^[11]。但是目前对氧化蛋白质热聚集行为的研究还较少。因此,以鲢肌球蛋白为研究对象,通过测定臭氧处理后的肌球蛋白在加热过程中的疏水性、浊度、粒径及其分子质量分布的变化,研究臭氧对鲢肌球蛋白热聚集行为的影响,为臭氧在水产品生产工业中的应用提供理论支持。

收稿日期: 2019-08-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(31501517);华中农业大学大北农青年学者提升专项(2017DBN012);国家现代农业产业技术体系专项(CARS-45-27)

尤娟,博士,讲师.研究方向:水产品加工及贮藏. E-mail: juanyou@mail.hzau.edu.cn

通信作者: 熊善柏,博士,教授.研究方向:水产品加工及贮藏. E-mail: xionsb@mail.hzau.edu.cn

1 材料与amp;方法

1.1 材料、试剂和仪器

新鲜鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*), 2.0~3.0 kg/条, 购于华中农业大学农贸市场, 在实验室宰杀, 取鱼肉, 备用。

8-苯胺萘磺-1-盐酸(ANS)、三羟甲基氨基甲烷(Tris), 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司; β -巯基乙醇、叠氮钠, 美国 Amresco 公司; 盐酸, 武汉亚泰化工试剂有限公司; 碳酸氢钾, 上海化学试剂有限公司; 二硫二硝基苯甲酸(DTNB)、氯化镁、腺苷-5'-三磷酸二钠盐、乙二胺四乙酸(EDTA)、酒石酸钾钠、氯化钠、氯化钾、牛血清白蛋白、氢氧化钠等试剂, 国药集团化学试剂有限公司。以上试剂均为分析纯。

DF-101S 型恒温磁力搅拌器, 郑州长城科工贸有限公司; GCQJ-1-3 电解式高浓度臭氧气机, 武汉威蒙环保科技有限公司; HH-6 型恒温水浴锅, 国华电器有限公司; RF-5301 荧光分光光度计, 日本岛津公司; 1750 型紫外分光光度计, 日本岛津公司; NanoZS 型 Zeta 电位分析仪, 英国马尔文仪器有限公司。

1.2 试验方法

1) 肌球蛋白的提取。参考 Park 等^[12]的方法, 制备肌球蛋白溶液, 存放于 4 °C 冰箱, 备用, 并在 1 周内使用完毕。

2) 鲢肌球蛋白含量测定。采用福林酚(Lowry)法^[4]进行肌球蛋白含量测定。

3) 样品预处理。①臭氧处理: 取本文“1.2 1)”中 50 mL 肌球蛋白溶液(2 mg/mL)置于带双口塞的锥形瓶中, 锥形瓶置于恒温磁力搅拌器中, 控制温度 0 °C, 臭氧气体从一端口进入, 从另一端口逸出, 同时搅拌蛋白溶液, 使溶液与臭氧气体充分混合均匀, 分别氧化蛋白溶液 0 s、15 s、30 s、45 s、60 s、5 min。控制臭氧气体流量 10 g/h, 氧化后蛋白质溶液保存在 4 °C 下备用; ②加热处理: 将氧化后的肌球蛋白置于 40 °C 恒温水浴锅中, 分别加热 0、5、30、45、60 min。制备的样品置于 4 °C 的冰箱中保存备用。

1.3 肌球蛋白表面疏水性测定

参考 Yongsawatdigul 等^[13]的方法, 略作修改。用缓冲液(0.6 mol/L NaCl、20 mmol/L Tris-HCl、pH 7.0)将本文“1.2 3)”中处理好的肌球蛋白溶液分别稀释为 0.05、0.10、0.15 和 0.20 mg/mL, 然后

将 20 μ L ANS 试剂(10 mmol/L ANS、20 mmol/L Tris-maleate 缓冲液, pH 7.0)加入到 4 mL 已稀释的蛋白质缓冲液中, 混合液室温下避光反应 30 min。使用荧光分光光度计测量时激发波长 364 nm, 发生波长 534 nm, 以相对荧光强度对蛋白质浓度的斜率作为表面疏水性(S_0 -ANS)。

1.4 肌球蛋白浊度测定

浊度的测定参照陈铮等^[14]的方法, 用缓冲液(0.6 mol/L NaCl、20 mmol/L Tris-HCl、pH 7.0)将本文“1.2 3)”中处理好的肌球蛋白溶液浓度调整至 2 mg/mL, 使用紫外分光光度计, 调整波长为 350 nm, 测定蛋白质溶液的吸光值即为蛋白质样品的浊度, 用 A_{350} 表示。所有样品平行测 3 次, 取平均值为测定结果。

1.5 肌球蛋白粒径分布测定

适当调整本文“1.2 3)”中处理好的肌球蛋白溶液浓度, 使用纳米粒度及 Zeta 电位分析仪测定肌球蛋白粒径分布。

1.6 SDS-PAGE 分析

参考李春强^[15]的方法, 略作修改。不同氧化程度及热处理的肌球蛋白与含(不含)5% β -ME 的样品缓冲液(4% SDS、10% β -ME、2% 甘油、0.5% 溴酚兰, pH 6.8)混合, 将本文“1.2 3)”中处理好的蛋白溶液质量浓度调至 0.5 mg/mL。用 12% 的分离胶、4% 浓缩胶(Mini-PROTEAN, 购买于美国 Bio-rad)配制 Tris-甘氨酸缓冲液(pH 8.3, 含 0.1% SDS)作为电泳缓冲液, 染色液使用 0.25% 的考马斯亮兰 R-250-乙醇冰醋酸溶液, 脱色液使用水-乙醇-冰醋酸溶液(体积比 8:1:1)。

1.7 数据统计与分析

试验重复 3 次, 每次 3 个平行。用 Origin 2017 软件(OriginLab Corporation, Northampton, USA)和 Excel 2007 作图。使用 SAS 8.0(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)对采集的数据进行显著性分析和方差分析。

2 结果与分析

2.1 臭氧氧化和热处理对鲢肌球蛋白表面疏水性的影响

表面疏水性是蛋白质分子表面相关特性的一种, 蛋白质表面疏水性的变化与蛋白质结构的展开密切相关。如图 1 所示, 对加热相同时间的样品, 臭氧氧化后的肌球蛋白表面疏水性显著高于未经臭氧

氧化的肌球蛋白($P < 0.05$)。臭氧氧化 15~60 s 肌球蛋白表面疏水性不具有显著性差异($P > 0.05$), 臭氧氧化 5 min 与氧化 0~60 s 的肌球蛋白表面疏水性有显著性差异($P < 0.05$)。臭氧氧化的前 60 s 使肌球蛋白结构伸展, 但不剧烈。Jiang 等^[4]报道臭氧氧化前 60 s 为轻度氧化, 轻度氧化促进肌球蛋白在加热过程中表面疏水性基团的暴露, 因此, 臭氧氧化 15~60 s 肌球蛋白的表面疏水性较未经臭氧氧化的增加。随着臭氧氧化时间的延长, 肌球蛋白形成了不溶性聚集体。Wang 等^[16]研究发现可溶性或不可溶性聚集物的形成可能导致表面疏水性下降。本研究中发现, 臭氧氧化 0~60 s 后, 肌球蛋白表面疏水性变化具有相似的变化趋势, 均随加热时间延长, 其表面疏水性显著增加($P < 0.05$), 当加热 30 min 后表面疏水性变化趋于稳定, 但没有显著性差异($P > 0.05$)。加热会使包埋在蛋白质内部的疏水性基团暴露出来, 从而使肌球蛋白表面疏水性随加热时间延长而增加^[17]; 40 °C 加热 30 min, 肌球蛋白结构展开程度已达最大, 疏水性基团暴露, 或肌球蛋白结构展开, 与蛋白聚集速率达到平衡, 因而样品的表面疏水性趋于稳定。臭氧氧化 5 min 的肌球蛋白表面疏水性变化则与臭氧氧化 0~60 s 肌球蛋白的变化趋势不一致, 刚开始略有下降, 加热 15 min 后略有上升, 加热 30 min 后达到最大值, 随后趋于稳定。这可能是因为臭氧氧化 5 min 为重度臭氧氧化, 使蛋白质聚集形成蛋白聚集体-簇, 导致疏水基团被包埋在蛋白聚集体-簇中, 抑制表面疏水性继续变化。

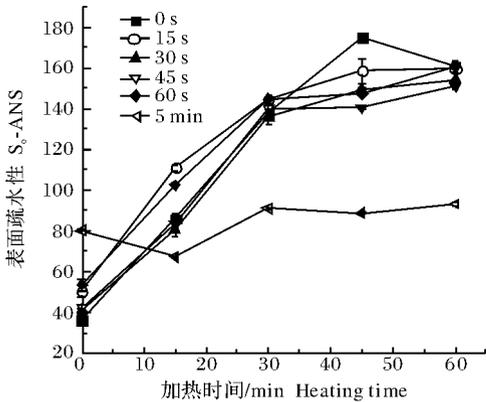


图 1 不同臭氧氧化时间下鲢肌球蛋白在加热过程中表面疏水性的变化

Fig.1 Changes in surface hydrophobicity of silver myosin for different ozone oxidation time during heating

2.2 臭氧氧化和热处理对鲢肌球蛋白浊度的影响

浊度的变化通常可以用来表示蛋白质聚集程度^[18]。如图 2 所示, 不同臭氧氧化时间的肌球蛋白随加热时间延长其浊度变化具有相似的趋势。随着加热时间延长, 肌球蛋白溶液的浊度显著性增大($P < 0.05$), 可能是由于在加热过程中蛋白质发生热变性程度逐渐增加, 二级结构及分子间的化学键遭到破坏, 隐藏在分子内部的疏水基团暴露在表面, 彼此相互作用使得蛋白质分子之间发生聚集^[19]。在前 30 min 加热时肌球蛋白溶液浊度变化迅速, 随后变化速率减缓, 与肌球蛋白溶液表面疏水性变化具有一致性。表明肌球蛋白分子聚集在热处理起始阶段, 蛋白质分子间迅速聚集, 浊度快速增加; 随着加热时间延长, 浊度增大趋势变缓, 可能是因为大部分肌球蛋白已经聚集并迅速沉淀。加热相同时间, 臭氧氧化较未经臭氧氧化肌球蛋白的浊度变化有显著性上升($P < 0.05$), 臭氧氧化 15~60 s 的肌球蛋白溶液浊度没有显著性差异($P > 0.05$), 臭氧氧化 5 min 较氧化 15~60 s 的样品有显著性下降趋势($P < 0.05$)。这表明臭氧氧化促进肌球蛋白热聚集, 臭氧氧化 60 s 以内, 其热聚集程度相似, 臭氧氧化 5 min 后产生不溶性聚集体, 导致浊度下降。

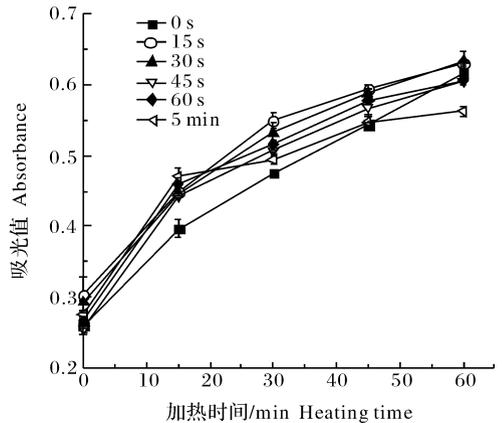


图 2 不同臭氧氧化时间下鲢肌球蛋白溶液在加热过程中浊度的变化

Fig.2 Changes in turbidity of silver carp myosin for different ozone oxidation time during heating

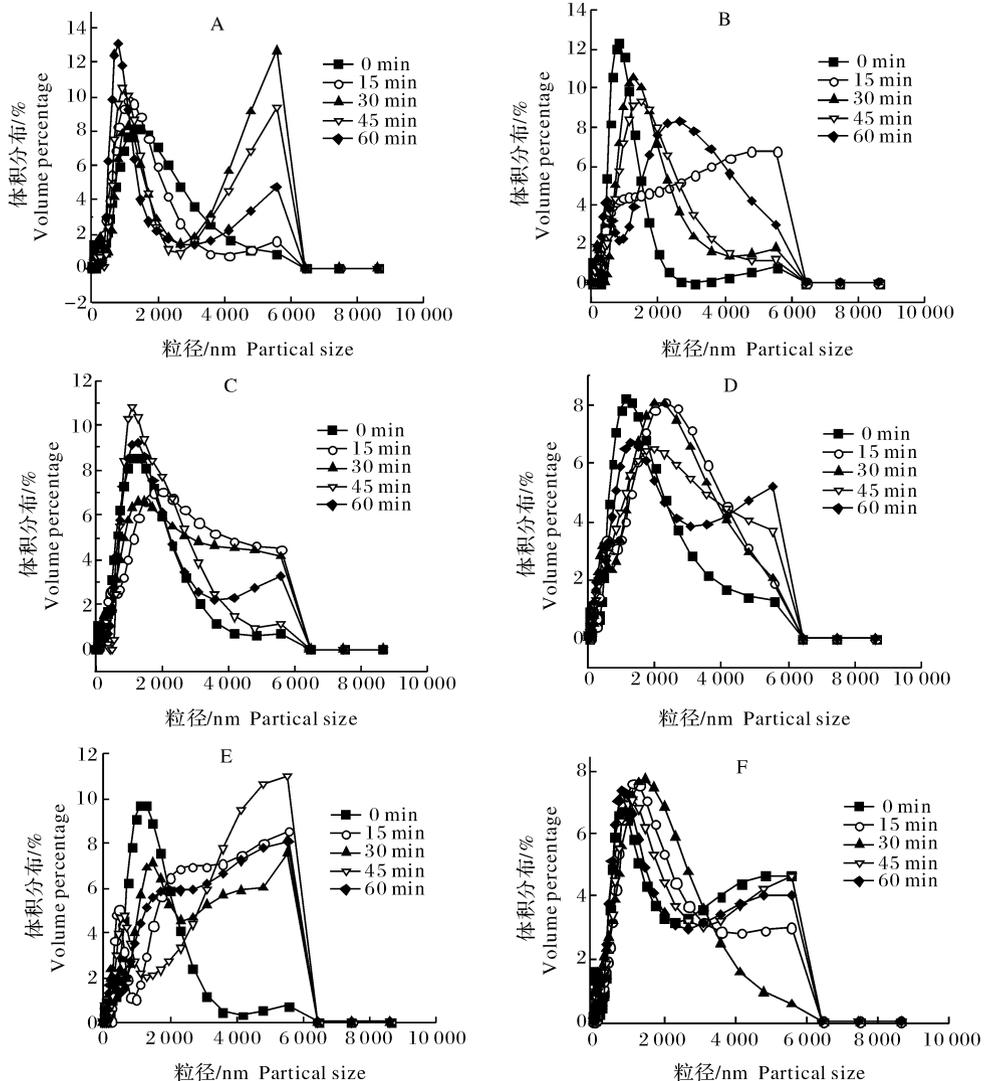
2.3 臭氧氧化和热处理对鲢肌球蛋白粒径分布的影响

由图 3A 可以看出, 未经臭氧氧化的鲢肌球蛋白在该溶剂中的粒径分布呈现出一个较大的峰, 在 200~6 000 nm, 可能主要是由肌球蛋白单体及肌球蛋白组装体组成。李春强^[15]报道了肌球蛋白样品

的粒径主要分布在 50~100 nm 和 100~1 000 nm 这 2 个峰;Jiang 等^[4]得到了肌球蛋白样品的粒径分布由 200~300 nm 和 30~40 nm 这 2 个峰组成;胡忠良^[20]报道了鸡肉的肌原纤维样品的粒径分布在 2 800~4 000 nm 这个较大的峰。由此可见,肌球蛋白样品粒径分布差异较大,可能是因为肌球蛋白在不同的溶液和环境里中组装或聚集的单个肌球蛋白分子数量有差异。随着加热时间延长,肌球蛋白的粒径分布向更大的粒径方向移动,逐渐变为 2 个峰。这表明加热导致肌球蛋白分子聚集,形成了粒径更大的颗粒;同时未氧化的肌球蛋白在 40 °C 加热过程中随着加热时间延长逐渐聚集。

由图 3A-F 可以看出,在未加热的条件下,臭氧

氧化后的肌球蛋白粒径分布也朝着粒径增大的方向移动,但是臭氧氧化 15~60 s 的样品粒径分布差异不显著($P>0.05$),表明臭氧氧化前 60 s 引起肌球蛋白轻度氧化,可能导致蛋白结构转变为熔球状构象。Hu 等^[21]研究了氧化对免疫球蛋白轻链构象稳定性的影响,结果显示甲硫氨酸被氧化导致蛋白质构象转变为熔球状构象。而本研究中,臭氧氧化 5 min 的样品粒径分布显著性向分子质量大的方向偏移,表明过度氧化的肌球蛋白形成的聚集体较大,甚至形成不溶性的沉淀。氧化后的肌球蛋白经过 40 °C 加热,随着加热时间延长,同样也呈现出粒径分布朝着粒径增大的方向移动的趋势。但是臭氧氧化 15~60 s 后的肌球蛋白粒径分布变化在加热 15 min



A-F 分别代表不同氧化时间(0 s、15 s、30 s、45 s、60 s、5 min)的鲢肌球蛋白样品。A-F represent myosin of different ozone oxidation time (0 s、15 s、30 s、45 s、60 s、5 min), respectively.

图 3 不同臭氧氧化时间下鲢肌球蛋白在加热过程中粒径分布的变化

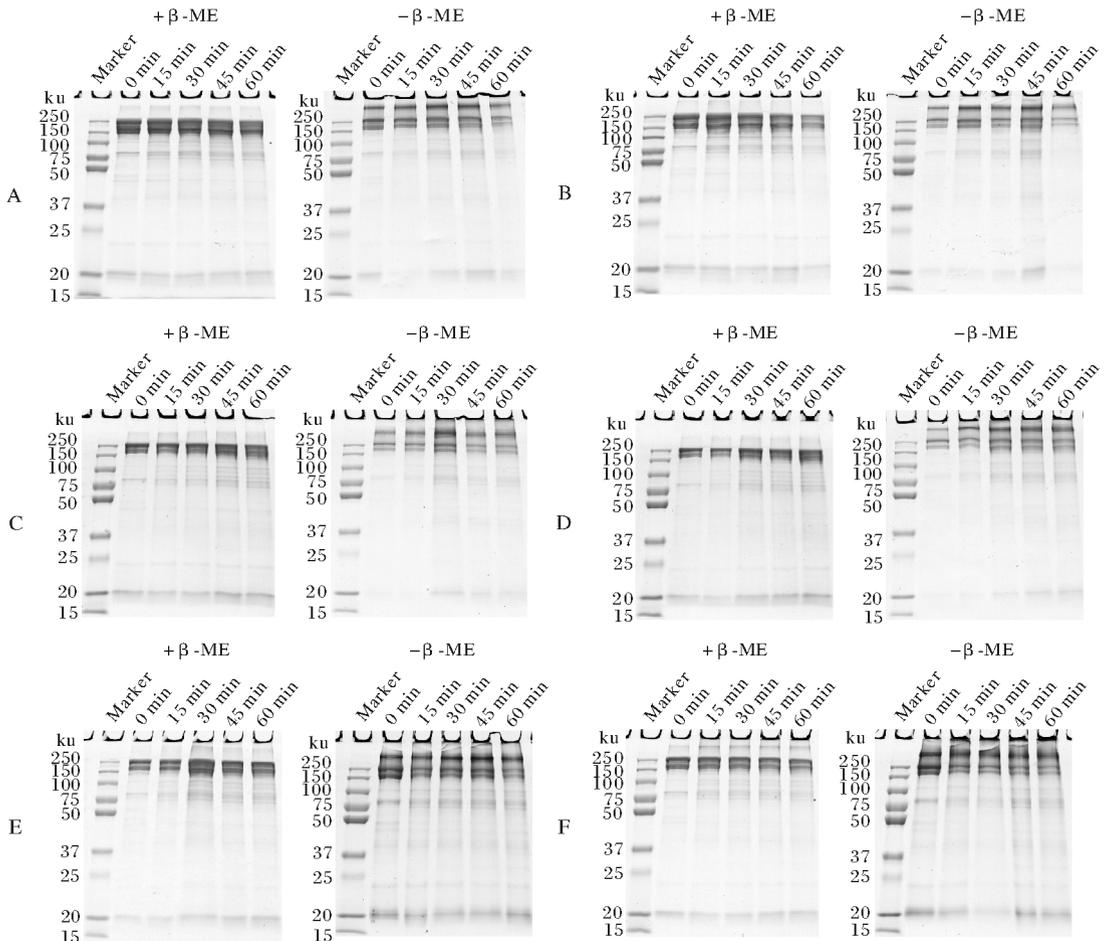
Fig.3 Changes in particle size distribution of silver carp myosin for different ozone oxidation time during heating

后并出现没有如上规律的变化,表明氧化后的蛋白在 40 °C 加热过程中比未氧化的肌球蛋白更容易形成聚集,且在加热 15 min 时已经形成较大粒径的颗粒,结果与图 2 中肌球蛋白浊度变化相一致。如图 3F 所示,臭氧氧化 5 min 的肌球蛋白在 0~6 000 nm 内的粒径分布随着加热时间延长也呈现出粒径增大的变化,但变化趋势不显著,可能是因为臭氧氧化 5 min 的肌球蛋白已经氧化而形成粒径超过 6 000 nm 且较稳定的沉淀聚集体。

2.4 臭氧氧化和热处理对鲢肌球蛋白 SDS-PAGE 的影响

肌球蛋白的主要片段是肌球蛋白重链(MHC),分子质量为 200 ku 左右^[22-23],除肌球蛋白重链外,还可以发现有少量的轻链 LC₁,分子质量约为 21

ku。由图 4A 可以看出,未氧化的肌球蛋白随着加热时间的延长,分子质量在 220、150 及 75 ku 左右的条带颜色逐渐变浅,说明分子质量在此范围的蛋白质受加热作用而聚集或者降解,同时 75 ku 左右的条带数量增加,到 60 min 时增加至 4 条条带,说明加热会使蛋白质聚集或降解产生新的条带。对比还原型(+β-ME)和非还原型电泳(-β-ME),分子质量大于 250 ku 的地方出现新的条带,且该条带的颜色在 0~45 min 的加热过程中逐渐加深,而加热到 60 min 时,该条带颜色变浅,说明肌球蛋白的 2 条重链是由二硫键的作用连接,且加热会促进肌球蛋白巯基连接形成更多的二硫键,使得肌球蛋白聚集,到加热 60 min 时,形成不可溶解的聚集而被离心除去,所以 60 min 的条带颜色变浅。



A-F 分别代表不同氧化时间(0 s,15 s,30 s,45 s,60 s,5 min)的鲢肌球蛋白样品;(+β-ME)表示添加 β-巯基乙醇,为还原型;(-β-ME)表示没有添加 β-巯基乙醇,为非还原型。A-F represent myosin of different ozone oxidation time (0 s,15 s,30 s,45 s,60 s,5 min), respectively. Samples were prepared in the absence (-β-ME) or presence (+β-ME) of β-ME.

图 4 不同臭氧氧化时间下鲢肌球蛋白在加热过程中 SDS-PAGE 的变化

Fig.4 Changes in SDS-PAGE of silver carp myosin for different ozone oxidation time during heating

肌球蛋白经过臭氧处理后,由图 4A-F 加热 0 min 样品可以看出,臭氧氧化使得肌球蛋白在臭氧氧化前 30 s 蛋白条带的颜色变浅不明显,从臭氧氧化 45 s 开始,条带显著变浅甚至消失,这一结果与 Jiang 等^[4]的研究结果相似,说明臭氧处理使蛋白发生一定程度的聚集,随着臭氧处理时间的延长,氧化聚集程度较大而形成不溶性聚集。对于还原型(+ β -ME)电泳图,经过 40 °C 热处理,随着加热时间的延长,臭氧氧化 15 s 与未氧化样品的变化趋势较相似;而臭氧氧化 30、45、60 s 电泳图变化相似,与未氧化样品主要的差异在于 150~250 ku 的蛋白条带减少,随着加热时间延长,100~150 ku 的蛋白条带逐渐增多,且条带分离不明确,可能是大分子质量的聚集物生成后被巯基乙醇打断二硫键而形成;臭氧氧化 5 min 则与其他有较大区别,主要是出现了分子质量大于 250 ku 的条带,且随着加热时间延长,条带颜色越深,说明 5 min 的臭氧氧化和加热导致了较强烈的聚集。对于还原型(- β -ME)电泳图,可以看出臭氧处理对鲢肌球蛋白的热聚集有一定的影响,前 45 s 的臭氧处理影响不显著,而臭氧氧化 60 s 和 5 min 样品的大于 250 ku 的条带逐渐增多,且条带边界不清晰,臭氧氧化 5 min 的样品甚至在进样口处有较深的颜色,说明臭氧氧化促进蛋白聚集,轻度氧化的肌球蛋白热聚集速率相对慢一点,而重度氧化的肌球蛋白热聚集速率快且易形成不溶性聚集。

150~250 ku 的蛋白条带受影响,随着氧化时间的延长,该分子质量的条带颜色逐渐变浅甚至消失,但

3 讨论

前人的研究结果表明肌球蛋白分子的热聚集过程分 2 步:一是肌球蛋白球状的头部或颈部的 S1 和 Rod 区域通过二硫键等相互作用形成放射状的低聚物;二是低聚物的尾部相互交联形成更大的聚集物^[11,15,24]。而氧化后的蛋白与未氧化的蛋白的热聚集过程有较大差异,Xiong 等^[25]研究羟基自由基和铁离子对肌原纤维蛋白凝胶特性的影响时指出氧化会使肌球蛋白通过尾部轻酶解肌球蛋白的二硫键进行交联,形成尾-尾交联模式。经过加热后,氧化肌球蛋白可能通过头-头交联或者尾-尾交联进一步形成聚集体或网络结构。因此,结合前人对肌球蛋白热聚集的研究和本研究的浊度、表面疏水性、粒径、电泳的结果,推测臭氧氧化肌球蛋白的热聚集过程如图 5 所示。未经臭氧氧化肌球蛋白热聚集过程,在 40 °C 加热 15 min 时,肌球蛋白主要通过头-头进行聚集,形成聚集体粒径较小,而尾部主要是以伸展状态分布在蛋白簇周围,具有进一步交联的能力;加热 30 min 时,聚集体仍然以头-头聚集体为主,同时也有少部分通过尾部进行交联的聚集体出现,这部分聚集体聚集速率快,分子粒径较大;加热 45 min 时,主要是通过尾部交联形成的聚集体,并且聚集体之间也开始聚集,此时聚集体的粒径更大;加热 60

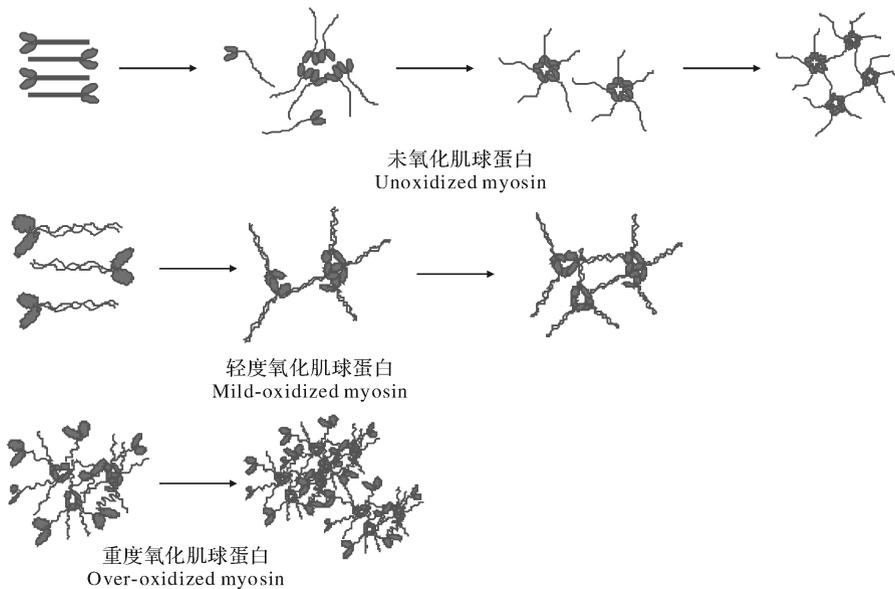


图 5 臭氧氧化肌球蛋白热聚集过程示意图

Fig.5 Thermal aggregation process of myosin with ozone oxidation

min时,主要是形成通过尾部交联的聚集体,并且这些聚集体之间相互交联,最终可能形成不溶性聚集体,导致测定的浊度下降,电泳条带颜色变浅。臭氧氧化前60s为轻度氧化,轻度氧化的肌球蛋白头部已经被臭氧部分氧化,部分结构伸展,但总体结构变化不剧烈,在40℃加热前15min肌球蛋白头部可能会暴露出更多的疏水性基团或巯基等,蛋白可能会因为疏水性相互作用或二硫键形成聚集,其速率比未氧化的肌球蛋白稍快;加热30~45min后,不同氧化时长的肌球蛋白形成较大的聚集体。而臭氧氧化60s后为重度氧化,重度氧化的肌球蛋白的尾部和头部均被臭氧氧化,已经形成了部分聚集,在加热前15min可能就已经形成不规则的较大粒径的聚集或不溶性沉淀。

综上所述,臭氧氧化会加速肌球蛋白热聚集的速率,轻度臭氧氧化使肌球蛋白部分结构展开,促进肌球蛋白的热聚集,但其热聚集与未氧化肌球蛋白的聚集过程和聚集模式差异不显著;而重度臭氧氧化的肌球蛋白可能在加热前就通过尾-尾聚集和头-头聚集形成了不规则的聚集体,加热明显加快了肌球蛋白的聚集过程,从而导致加热后产生大量不溶性蛋白聚集体。因此,适当的臭氧氧化可以加快肌球蛋白聚集速率,形成规则的网络结构,缩短肌球蛋白凝胶化时间,使鱼糜制品的生产效率提高。

参 考 文 献

[1] 农业农村部渔业渔政管理局.中国渔业统计年鉴[M].北京:中国农业出版社,2019.

[2] UZUN H, IBANOGLU E, CATAL H, et al. Effects of ozone on functional properties of proteins[J]. Food chemistry, 2012, 134(2): 647-654.

[3] ZHANG T, XUE Y, LI Z, et al. Effects of ozone-induced oxidation on the physicochemical properties of myofibrillar proteins recovered from bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) [J]. Food & bioprocess technology, 2015, 8(1): 181-190.

[4] JIANG W X, HE Y E, XIONG S B, et al. Effect of mild ozone oxidation on structural changes of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) myosin[J]. Food & bioprocess technology, 2017, 10(2): 370-378.

[5] 郭健.大豆蛋白热聚集行为控制及其结构表征的研究[D].广州:华南理工大学,2012.

[6] BUCCIANTINI M, GIANNONI E, CHITI F, et al. Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases[J]. Nature, 2002, 416(6880): 507-511.

[7] DOBSON C M. Protein folding and misfolding [J]. Nature, 2003, 426(6968): 884-890.

[8] STEFANI M. Protein misfolding and aggregation: new examples in medicine and biology of the dark side of the protein world[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2004, 1739(1): 5-25.

[9] CHITI F, DOBSON C M. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease[J/OL]. Annual review of biochemistry, 2006, 75: 333-360 [2019-08-02]. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.10/304.123901>.

[10] MAHLER H C, FRIESS W, GRAUSCHOPF U, et al. Protein aggregation: pathways, induction factors and analysis [J]. Journal of pharmaceutical sciences, 2009, 98(9): 2909-2934.

[11] 盖静.不同加热温度对鲢鱼肌球蛋白聚集行为的影响及其机理研究[D].镇江:江苏大学,2016.

[12] PARK J W, LANIER T C. Scanning calorimetric behavior of tilapia myosin and actin due to processing of muscle and protein purification[J]. Journal of food science, 1989, 54(1): 49-51.

[13] YONGSAWATDIGUL J, PARK J. Thermal denaturation and aggregation of threadfin bream actomyosin[J]. Food chemistry, 2003, 83(3): 409-416.

[14] 陈铮,朱蓓薇,李冬梅,等.热处理过程中牡蛎闭壳肌肌原纤维蛋白部分理化特性的变化[J].食品与发酵工业,2012,38(7): 53-57.

[15] 李春强.肌原纤维蛋白的氧化程度对谷氨酰胺转移酶催化交联作用的影响及其机理研究[D].无锡:江南大学,2013.

[16] WANG Z J, LI Y, JIANG L Z, et al. Relationship between secondary structure and surface hydrophobicity of soybean protein isolate subjected to heat treatment[J/OL]. Journal of chemistry, 2014, 2014: 1-10 [2019-08-02]. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/475389>.

[17] JIA D, YOU J, HU Y, et al. Effect of CaCl₂ on denaturation and aggregation of silver carp myosin during setting[J/OL]. Food chemistry, 2015, 185: 212-218 [2019-08-02]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.130>.

[18] MARTHA N L, FOEGEDING E A, SHUEFUNG WANG, et al. Denaturation and aggregation of chicken myosin isoforms [J]. Journal of agricultural and food chemistry, 1996, 44(6): 1435-1440.

[19] PANOUILLE M, NICOLAI T, DURAND D. Heat induced aggregation and gelation of casein submicelles[J]. International dairy journal, 2004, 14(4): 297-303.

[20] 胡忠良.鸡胸肉肌原纤维蛋白质氧化对其热诱导凝胶和理化特性的影响[D].南京:南京农业大学,2012.

[21] HU D M, QIN Z J, XUE B, et al. Effect of methionine oxidation on the structural properties, conformational stability, and aggregation of immunoglobulin light chain LEN[J]. Biochemistry, 2008, 47(33): 8665-8677.

[22] WENG W Y, ZHENG W X. Effect of setting temperature on glucono-δ-lactone induced gelation of silver carp surimi [J].

- Journal of the science of food and agriculture, 2014, 95(7): 1528-1534.
- [23] HOSSAIN M I, MORIOKA K, SHIKHA F H, et al. Effect of preheating temperature on the microstructure of walleye pollock surimi gels under the inhibition of the polymerisation and degradation of myosin heavy chain[J]. Journal of the science of food and agriculture, 2011, 91(2): 247-252.
- [24] SHARP A, OFFER G. The mechanism of formation of gels from myosin molecules[J]. Journal of the science of food and agriculture, 1992, 58(1): 63-73.
- [25] XIONG Y L, BLANCHARD S P, OOIZUMI T, et al. Hydroxyl radical and ferryl-generating systems promote gel network formation of myofibrillar protein[J]. Journal of food science, 2010, 75(2): 215-221.

Effect of ozone oxidation on thermal aggregation of myosin from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*)

YOU Juan^{1,2} ZHENG Wendong¹ WANG Minjun¹ YIN Tao^{1,2}
HU Yang^{1,2} LIU Ru^{1,2} XIONG Shanbai^{1,2}

1. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University,
Wuhan 430070, China;

2. National R&D Branch Center for Conventional Freshwater Fish Processing (Wuhan),
Wuhan 430070, China

Abstract The myosin was prepared from silver carp. The thermal aggregation process of ozone oxidized myosin was studied using the surface hydrophobicity, turbidity, particle size and molecular weight distribution as indexes. The results showed that the surface hydrophobicity and turbidity of myosin significantly increased with the prolongation of heating time, and then the upward trend slowed down. The surface hydrophobicity and turbidity of myosin with ozone-oxidation for 15-60 s was significantly higher than those of unoxidized myosin. However, there was no significant difference between the myosin samples with ozone oxidation for 15-60 s, and the surface hydrophobicity of myosin with ozone oxidation for 5 min decreased significantly. The relative content of the large-sized myosin aggregates gradually increased with the heating time prolonged, and the content decreased after 30 min of heating time. The peak of particle size distribution of ozone oxidized myosin shifted toward the large particle size direction as the oxidation time increases. Ozone oxidation accelerated the thermal aggregation of myosin. The thermal aggregation process of mildly oxidized myosin was similar to that of unoxidized myosin, but mildly oxidized myosin aggregates faster. Severe ozone oxidation caused myosin to form irregular aggregates before heating, and rapidly produce insoluble protein aggregates after heating.

Keywords silver carp; myosin; ozone; oxidation; thermal aggregation; surface hydrophobicity; turbidity; particle size distribution

(责任编辑:赵琳琳)