

酶解褐藻寡糖对鲢肌原纤维蛋白在模拟口腔消化中的影响

丛海花¹, 周倩^{2,3}, 吴酉芝¹, 逯晓燕², 杨天⁴

1. 上海中侨职业技术大学 食品药品学院, 上海 201319
2. 大连海洋大学 食品科学与工程学院, 辽宁 大连 116023
3. 晓东宜健(苏州) 仪器设备有限公司, 江苏 苏州 215152
4. 单县自然资源和规划局, 山东 菏泽 274300

摘要: 将鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix*) 加工成肉糜制品能增加消费者的接受度从而提高其经济价值, 酶解褐藻寡糖 (Enzymolysis alginate oligosaccharide, EAO) 能与鲢肌原纤维蛋白 (Myofibrillar protein, MP) 快速反应, 提高食品的功能特性。食物经口腔加工后会发生明显的物理、化学变化。为了解肌原纤维蛋白在鲢消化过程中的结构变化, 明确口腔消化对褐藻寡糖修饰后的肌原纤维蛋白的影响, 从新鲜鲢中提取了肌原纤维蛋白, 并向其中添加 0.45 mg·mL⁻¹ 的酶解褐藻寡糖获得寡糖-蛋白复合物 (EAO-MP), 考察了鲢肌原纤维蛋白 (M组) 与寡糖-蛋白复合物 (A组) 在模拟口腔消化中的傅里叶红外光谱、内源性荧光光谱、紫外吸收光谱、巯基含量、氢键含量、表面疏水性的变化差异。结果显示: 经过模拟口腔消化后, M组无规卷曲结构、总巯基含量增加, 表面疏水性显著降低 ($P < 0.05$), 说明肌原纤维蛋白由于模拟口腔消化液的作用, 二级、三级结构发生了改变; 添加酶解褐藻寡糖后的A组无规卷曲结构下降了 2.97%, A组在 3 个不同消化时间点 (0、5、15 s) α -螺旋结构相比M组分别增加了 7.29%、2.73%、5.55%; 氢键含量显著增加 ($P < 0.05$), 说明肌原纤维蛋白与酶解褐藻寡糖通过氢键作用结合为共价聚合物; 巯基含量显著降低, 表面疏水性呈升高趋势, 说明酶解褐藻寡糖的加入促进肌原纤维蛋白在模拟口腔消化液中展开蛋白结构。综上, 酶解褐藻寡糖的添加能促使鲢肌原纤维蛋白分子结构在模拟口腔消化液中展开, 推测这可能有利于蛋白后续的消化吸收。

关键词: 鲢肌原纤维蛋白; 酶解褐藻寡糖; 模拟口腔消化; 光谱

中图分类号: TS 254.4

文献标志码: A

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



Effect of enzymolysis alginate oligosaccharide on myofibrillar protein in simulated oral digestion

CONG Haihua¹, ZHOU Qian^{2,3}, WU Youzhi¹, LU Xiaoyan², YANG Tian⁴

1. College of Food and Drug, Shanghai Zhongqiao University of Vocational Technology, Shanghai 201319, China
2. College of Food Science and Engineering, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China
3. Xiao Dong Pro-health (Suzhou) Instrumentation Co., Ltd., Suzhou 215152, China
4. Shandong Shanxian Bureau of Natural Resources and Planning, Heze 274300, China

Abstract: Processing silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) into surimi products can improve consumers' acceptance and its economic value. Enzymolysis alginate oligosaccharide (EAO) can quickly react with myofibrillar protein (MP) extracted from silver carp to improve functional characteristics. Food will undergo physical and chemical changes after oral processing. To better understand the effects of oral digestion on the EAO-modified MP, we extracted the MP from fresh silver carp which was ad-

收稿日期: 2022-07-23; 修回日期: 2022-10-19

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (31701630); 辽宁省教育厅 2021 年度高等学校基本科研项目 (LJKZ0715); 上海市高等教育人才揽蓄计划科研项目; 大连市高层次人才创新支持计划 (2018RQ67); 农业部水产品加工重点实验室开放基金 (NYJG201502)

通信作者: 丛海花 (1983—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为水产品加工。E-mail: conghh@shzq.edu.cn

ded 0.45 mg·mL⁻¹ EAO to create a complex (EAO-MP). Then we investigated the variations of Fourier infrared spectroscopy, endogenous fluorescence spectroscopy, UV absorption spectroscopy, contents of sulfhydryl and active sulfhydryl, surface hydrophobicity, and hydrogen bonds in the simulated oral digestion of silver carp MP (Group M) and EAO-MP (Group A). The results show that, after the simulated oral digestion, the random coil structure and total sulfhydryl content increased, while the surface hydrophobicity decreased significantly in Group M ($P < 0.05$), which demonstrates that the secondary and tertiary structures of MP had changed due to the effect of simulated oral digestive fluid. Besides, the random coil in Group A decreased by 2.97% after adding EAO. At three different digestion times, the α -helix increased by 7.29%, 2.73% and 5.55%, respectively, compared with Group M. Additionally, the hydrogen bond content increased significantly in Group A ($P < 0.05$), revealing that MP and EAO were bonded to a covalent polymer by the hydrogen bond force. The significant increase in surface hydrophobicity and decrease in sulfhydryl content show that the addition of EAO promotes the expansion of the protein structure of MP in simulated oral digestive fluid. In conclusion, the addition of EAO can promote the molecular structure of silver carp MP to expand in the simulated oral digestive fluid, which may be conducive to the subsequent digestion and absorption of protein.

Keywords: Silver carp myofibrillar protein; Enzymolysis alginate oligosaccharide; Simulated oral digestion; Spectrum

鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix*) 是一种产量高、价格低的淡水鱼, 但因其肉薄刺多、腥味浓重, 导致其各种加工制品如鱼片、鱼粉等经济效益不高。将鲢加工成肉糜制品能提高其经济价值, 也更易为消费者接受^[1]。鲢鱼肉的蛋白质具有营养较完全、功能性良好的优点, 因此, 通过增加鲢的消费空间、提高其经济价值, 防止资源浪费很有必要。鱼肉蛋白中最主要的部分是肌原纤维蛋白 (Myofibrillar protein, MP), 它是一种盐溶性蛋白, 是鱼肉的功能性蛋白成分。相较于脊椎动物蛋白, 鲢鱼肉蛋白的化学性质和热稳定性较低, 蛋白功能特性更容易在蛋白变性过程中随之降低^[2]。

褐藻寡糖 (Alginate oligosaccharides, AO) 是由褐藻酸盐降解得来的低分子量聚合物, 其分子量根据来源及降解方法的不同而有所差异, 通常可通过酸解法得到。最近的研究发现, 可以通过条件更温和、对环境更友好的酶解法得到酶解褐藻寡糖 (Enzymolysis alginate oligosaccharide, EAO), 其平均相对分子质量为 1.2 kD^[3]。褐藻寡糖具有抗炎、抗肿瘤、抗氧化、免疫调节等多种生物活性, 还可吸附重金属等从而有助于排出此类有害物质^[3]。在功能特性上也存在一定优势: 由于低分子量的褐藻寡糖具有更好的水溶性, 能和肌原纤维蛋白快速反应, 提高肌原纤维蛋白的亲水能力^[4]; 褐藻寡糖存在大量亲水性羟基, 能减轻紫贻贝 (*Mytilus edulis*) 肌肉蛋白质在冻结过程中的变性^[5]。此外, 褐藻寡糖还能从基因水平上调节动物的消化功能, 增强十二指肠和空肠黏膜中麦芽糖酶和蔗糖酶的活力, 从而改善动物的生长性能^[6]。

已有学者针对寡糖或水产肌原纤维蛋白或两者

复合物在体外模拟消化条件下的功能特性或结构变化进行了研究。壳聚糖具有良好的水溶性和生理活性, 但在消化过程中可能会导致聚合度以及含量变化, 经过体外动态消化模型研究发现聚合度为 2~5 的壳寡糖经过胃和肠消化后能保持原来的结构和含量^[7]; 鸢乌贼 (*Symplectoteuthis oualaniensis*) 肌原纤维蛋白与褐藻寡糖的接枝产物及经模拟胃肠消化后的产物都具有良好的抗氧化性^[8]; 鲑鱼肌原纤维蛋白与褐藻寡糖在山梨醇存在的情况下, 体外消化产物有抗炎作用^[9]。然而, 当前对动物蛋白在口腔消化中的结构变化的相关研究却很少。

人体消化食物是从口腔消化开始, 通过牙齿和舌头再加上唾液酶的作用, 食物被分解转化成一团, 通过食道输送到胃中进一步消化。食物经口腔加工后特别是与唾液润湿混合后, 会发生明显的物理、化学性质变化, 因此, 口腔消化研究很有必要^[10]。在前期研究中, 笔者团队探讨了不同来源的褐藻寡糖包括使用酸解法获得的酸解甘露糖醛酸寡糖、酸解古罗糖醛酸寡糖和使用酶解法获得的酶解褐藻寡糖对鲢肌原纤维蛋白分子结构的影响^[11], 得出酶解褐藻寡糖能提高鱼糜热稳定性、保护肌原纤维蛋白离子键等结论。本研究选取鲢肌原纤维蛋白和相对分子质量为 400~1 500 D 的酶解褐藻寡糖为研究对象, 通过加热制备二者复合物, 再进行体外模拟口腔消化, 观察鲢肌原纤维蛋白与寡糖-蛋白复合物的模拟消化产物的二级、三级结构变化, 探究了酶解褐藻寡糖对鱼肉肌原纤维蛋白在口腔消化中的影响, 提高对肌原纤维蛋白在消化过程中结构变化的认识, 为蛋白-寡糖类高品质蛋白营养型食品的开发和制备以及人体对蛋白营养型食品的消化利用

研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鲢购于大连市生熟食市场, 迅速运至实验室宰杀, 去掉头和内脏, 用去离子水冲洗干净, 于4℃冰箱保存备用。酶解褐藻寡糖由中国科学院过程工程研究所提供, 通过酶解法降解褐藻胶获得, 寡糖的相对分子质量为400~1 500 D, 聚合度为3~7, 纯度为90%以上。

试剂: 三羟甲基氨基甲烷(Tris)、8-苯胺基-1-萘磺酸钠(ANS)、乙二酸四乙酸二钠(EDTA)、2-硝基苯甲酸(DTNB)等为分析纯, 溴化钾为光谱纯。

Tris-HCl缓冲液: 0.2 mol·L⁻¹ Tris, 8 mol·L⁻¹ 尿素, 2% (质量分数) SDS, 10 mmol·L⁻¹ EDTA, pH 6.8; Tris-HCl缓冲液(含0.6 mol·L⁻¹ NaCl, pH 7.2); 活硫缓冲液(0.2 mol·L⁻¹ Tris-HCl, 10 mmol·L⁻¹ EDTA, pH 6.8)。

模拟口腔消化液(Simulated saliva fluid, SSF): 包括无机组分(10 mL 89.6 g·L⁻¹的KCl、10 mL 20 g·L⁻¹的KSCN、10 mL 88.8 g·L⁻¹的NaH₂PO₄、10 mL 57 g·L⁻¹的NaSO₄、1.7 mL 175.3 g·L⁻¹的NaCl、20 mL 84.7 g·L⁻¹的NaHCO₃)、有机组分(8 mL 25 g·L⁻¹的尿素、15 mg 尿酸)和酶(290 mg α-淀粉酶), pH调至6.9, 消化液提前配置, 于4℃冰箱保存, 正式消化时先预热至37℃再加入酶。

1.2 仪器与设备

JJ-2高速组织捣碎机(杭州旌斐仪器科技有限公司); TG16G高速冷冻离心机(盐城市安信实验仪器有限公司); NEXUS670型红外光谱仪(合肥原位科技有限公司); XWK-V108S酶标仪(南京德铁实验设备有限公司); 970CRT荧光分光光度计(上海微谱检测科技集团股份有限公司); 754N紫外可见分光光度计(上海菁华仪器有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 鲢肌原纤维蛋白的提取

根据仪淑敏等^[12]的提取方法, 略作修改。剔取材料脊部白肉, 粉碎至糊状, 以体积比1:5加入pH 7.2的10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl缓冲液, 均质后, 4℃、5 000 r·min⁻¹离心15 min, 取沉淀, 以体积比1:5加入相同pH和浓度的含0.6 mol·L⁻¹ NaCl的Tris-HCl缓冲液悬浮, 均质30 s后, 4℃、4 500 r·min⁻¹离心20 min, 取上清, 测蛋白

浓度。

1.3.2 样品的制备

将上述肌原纤维蛋白再用相同浓度和pH的Tris-HCl缓冲液调节浓度至20 mg·mL⁻¹, 置于离心管中备用, 以体积比1:1添加0.9 mg·mL⁻¹的酶解褐藻寡糖溶液(前期实验证明该质量浓度酶解褐藻寡糖溶液可提高鲢肌原纤维蛋白的热稳定性), 制成0.45 mg·mL⁻¹寡糖-蛋白复合物溶液; 不添加酶解褐藻寡糖溶液的肌原纤维蛋白用上述缓冲液稀释至质量浓度为10 mg·mL⁻¹。摇匀后, 90℃孵育10 min。

1.3.3 模拟口腔消化

根据Minekus等^[13]的方法, 对鲢肌原纤维蛋白及鲢肌原纤维蛋白-寡糖复合物进行模拟口腔消化: 分别取各样品5 mL置于试管, 再向试管中加入5 mL模拟口腔消化液(pH 6.8), 置于37℃水浴锅中加热, 加热时间分别为0、5、15 s, 即模拟消化0、5、15 s。停止消化后立即将各组样品置于离心管并放置冰水中停止消化, 保存直至使用。消化组别及名称见表1。

1.3.4 傅里叶红外光谱的测定

根据Xu等^[14]的方法, 略作修改。将经过消化后的各组肌原纤维蛋白溶液进行冷冻干燥后, 取2 mg肌原纤维蛋白粉末, 按照质量比1:50添加无水溴化钾混合均匀, 通过压片法获得红外光谱图。采集样品之前先采集背景, 消除空气对实验结果的影响。用红外光谱仪以4 cm⁻¹分辨率500~4 000 cm⁻¹进行扫描。

1.3.5 内源性荧光光谱的测定

取适量样品溶液于比色皿中, 激发波长280 nm, 扫描范围300~450 nm, 用荧光分光光度计测吸光度^[15]。

1.3.6 紫外吸收光谱的测定

以上述Tris-HCl缓冲液为对照, 利用紫外分光光度计测吸收光谱, 并使用Origin 2018软件绘制二阶导数光谱。

1.3.7 总巯基、活性巯基的测定

根据哈斯等^[16]的方法测定总巯基质量摩尔浓度, 略作修改。取稀释后的肌原纤维蛋白溶液0.5 mL, 加入4.5 mL pH为6.8的Tris-HCl缓冲液, 空白组加入等量去离子水混合均匀。取出80%溶液, 加入0.5 mL相同浓度的DTNB溶液。40℃孵育25 min, 412 nm测吸光度。

表1 口腔消化组别
Table 1 Oral digestion group

组别 Group	名称 Name
未消化鲢肌原纤维蛋白 Undigested silver carp myofibrillar protein	M0
鲢肌原纤维蛋白模拟口腔消化5 s Silver carp myofibrillar protein after simulated oral digestion for 5 s	M5
鲢肌原纤维蛋白模拟口腔消化15 s Silver carp myofibrillar protein after simulated oral digestion for 15 s	M15
未消化鲢肌原纤维蛋白-寡糖复合物 Undigested silver carp myofibrillar protein-alginate oligosaccharide complex	A0
鲢肌原纤维蛋白-寡糖复合物模拟口腔消化5 s Silver carp myofibrillar protein-alginate oligosaccharide complex after simulated oral digestion for 5 s	A5
鲢肌原纤维蛋白-寡糖复合物模拟口腔消化15 s Silver carp myofibrillar protein-alginate oligosaccharide complex after simulated oral digestion for 15 s	A15

活性巯基根据 Yildiz 等^[17]的方法测定, 略作修改。取 10 mg·mL⁻¹ 肌原纤维蛋白 0.5 mL, 加入 4.5 mL 活硫缓冲液, 空白组加入等量去离子水。摇匀后加入 0.5 mL 的 DTNB (10 mol·L⁻¹) 溶液, 置于 4 °C 冰箱中反应 1 h 后, 于 412 nm 下测定吸光度。巯基 (SH) 的计算公式如下:

$$b_{SH} = \frac{10^5 \times a \times d}{13\ 600 \times c} \quad (1)$$

式中: b_{SH} 为巯基的质量摩尔浓度 (10 mmol·kg⁻¹); a 为减去空白样品吸光度; d 为稀释倍数; c 为蛋白质质量浓度 (mg·mL⁻¹)。

1.3.8 氢键的测定

根据 Li 等^[18]的方法, 稍作修改, 取 2 mL 样品分别与 5 倍体积的 0.6 mol·L⁻¹ NaCl (SB) 和 0.6 mol·L⁻¹ NaCl、1.5 mol·L⁻¹ 尿素 (SC) 混合, 均质后放于 4 °C 层析柜静置 1 h, 离心 (8 000 r·min⁻¹, 4 °C, 10 min)。考马斯亮蓝法测定上清液蛋白浓度, 氢键的质量浓度 (mg·mL⁻¹) 为溶解于上述两种溶液中的蛋白质质量浓度 (mg·mL⁻¹) 之差。

1.3.9 表面疏水性的测定

根据 Zhang 等^[19]的方法, 略作修改。将 10 mg·mL⁻¹ 样品用缓冲液 Tris-HCl (pH 6.8) 稀释至 0.1~0.5 mg·mL⁻¹, 取各肌原纤维蛋白溶液 2 mL, 再加 10 μL ANS 溶液 (pH 7.5) 摇匀, 避光存放 20 min。利用酶标仪 (激发波长 375 nm, 发射波长 485 nm, 增益 50) 测量荧光强度, 再以荧光强度为纵坐标, 肌原纤维蛋白浓度为横坐标作图, 直线斜率即为所测指标。

1.3.10 数据处理与统计学分析

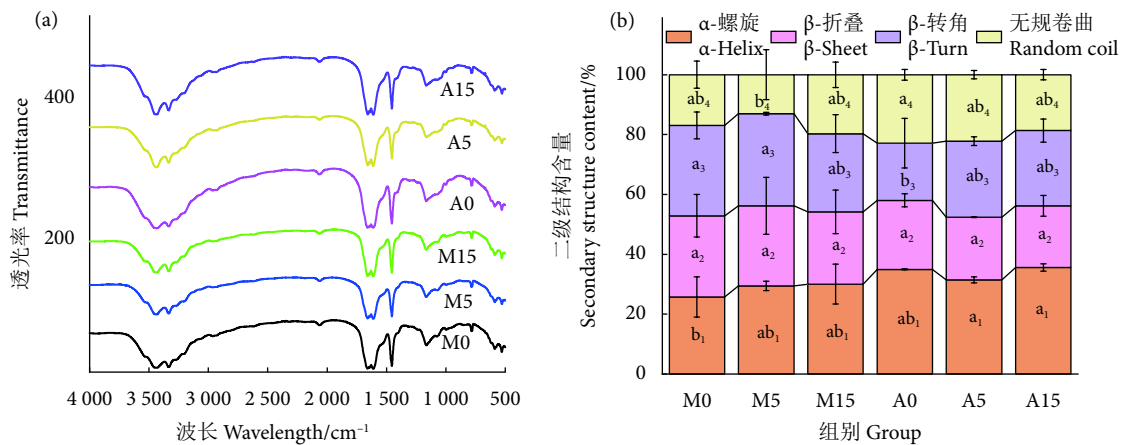
采用 Excel 2010 软件处理数据, 用 Origin 2018 软件绘图, 通过 SPSS 20.0 软件分析数据显著性, 表中结果以“平均值±标准差 ($\bar{X} \pm SD$)”表示。

2 结果与分析

2.1 傅里叶红外光谱分析

鲢肌原纤维蛋白在 500~4 000 cm⁻¹ 范围的红外光谱如图 1-a 所示, 存在数个吸收波段, 1 660 cm⁻¹ 处代表 C=O 振动, 是蛋白质最独特的光谱特征; 1 455 cm⁻¹ 处代表 C-H 弯曲振动; 3 435 cm⁻¹ 处代表 O-H 和 N-H 的伸缩; 1 159 cm⁻¹ 处为 C-O 和 C-C 伸缩振动和 C-H 的弯曲模式^[11]。经酶解褐藻寡糖修饰后, 酰胺 A 区在 3 425 cm⁻¹ 处的峰向较低波数移动, 在 1 159 cm⁻¹ 处的吸附较强, 均表明酶解褐藻寡糖和肌原纤维蛋白之间通过氢键结合形成聚合物^[20]。

为了研究肌原纤维蛋白的二级结构, 对其中 1 600~1 700 cm⁻¹ 红外吸收峰经去卷积拟合, 并对得到的特征吸收带进行二级结构的分类, 得到各组肌原纤维蛋白二级结构所占比例^[4], 如图 1-b 所示: 模拟口腔消化完成时, 鲢肌原纤维蛋白 (M 组) 无规卷曲结构增加了约 3%; 与之相反, 鲢肌原纤维蛋白-寡糖复合物 (A 组) 无规卷曲结构下降了 2.97%, α -螺旋结构增加了 2.59%, β -折叠结构稳定; 与 M 组相比, A 组的 α -螺旋结构随模拟口腔消化在 3 个不同的消化时间点 (0、5、15 s) 分别增加 7.29%、2.73%、5.55%, α -螺旋结构比无规



M0. 未消化鲢肌原纤维蛋白; M5. 鲢肌原纤维蛋白模拟口腔消化 5 s; M15. 鲢肌原纤维蛋白模拟口腔消化 15 s; A0. 未消化鲢肌原纤维蛋白-寡糖复合物; A5. 鲢肌原纤维蛋白-寡糖复合物模拟口腔消化 5 s; A15. 鲢肌原纤维蛋白-寡糖复合物模拟口腔消化 15 s。后图同此。

M0. Undigested silver carp myofibrillar protein; M5. Silver carp myofibrillar protein after simulated oral digestion for 5 s; M15. Silver carp myofibrillar protein after simulated oral digestion for 15 s; A0. Undigested silver carp myofibrillar protein-alginate oligosaccharide complex; A5. Silver carp myofibrillar protein-alginate oligosaccharide complex after simulated oral digestion for 5 s; A15. Silver carp myofibrillar protein-alginate oligosaccharide complex after simulated oral digestion for 15 s. The same case in the following figures.

图1 肌原纤维蛋白和寡糖-蛋白复合物口腔消化产物傅里叶红外光谱 (a) 和二级结构含量 (b)

注: 下标 1 是 α -螺旋显著性, 下标 2 是 β -折叠显著性, 下标 3 是 β -转角显著性, 下标 4 是无规卷曲显著性。

Fig. 1 Fourier infrared spectroscopy (a) and secondary structure content (b) of MP and EAO-MP oral digestive products

Note: Endnote subscript 1 is α -helix significance; endnote subscript 2 is β -helix significance; endnote subscript 3 is β -turn significance; endnote subscript 4 is random coil significance.

卷曲结构更稳定。值得注意的是, 本实验中各组样品在加入模拟口腔消化液后蛋白浓度会下降。有研究报道, 再生丝素蛋白溶液浓度的升高会导致蛋白分子间排列紧密, 有序度增加^[21]。综上, 推测经过口腔消化后肌原纤维蛋白结构趋于无序, 而酶解褐藻寡糖能抑制这种作用, 使蛋白质分子结构趋于稳定有序。这与 Zhong 等^[22] 用苹果多酚对羊肉肌

原纤维蛋白进行处理后的结果一致。

2.2 内源性荧光光谱分析

蛋白质三级结构的变化常通过蛋白质荧光团来反映, 而后者能在一定的激发波长下产生^[23]。在口腔消化期间, 随着消化时间的增加, M 组最大吸收波长 (λ_{\max}) 发生蓝移; A 组 λ_{\max} 则先蓝移再红移 (图 2-a)。M 组消化 15 s 时具有最高荧光强度

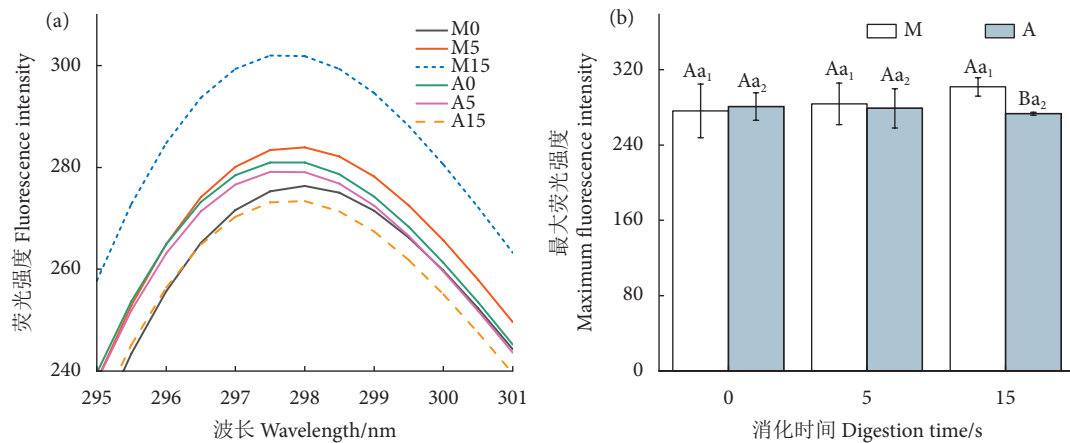


图2 肌原纤维蛋白和寡糖-蛋白复合物口腔消化产物内源荧光光谱 (a) 和最大荧光强度 (b)

注: 不同大写字母表示在同一模拟口腔消化时间中, 不同消化产物之间存在显著性差异 ($P < 0.05$); 不同小写字母表示在同组消化产物中, 不同模拟口腔消化时间之间存在显著性差异 ($P < 0.05$); 表 2、图 4—图 6 同此。

Fig. 2 Endogenous fluorescence spectra (a) and maximum fluorescence intensity (b) of MP and EAO-MP oral digestive products
Note: Values with different capital letters indicate significant differences among different digestive products at the same simulated oral digestion time ($P < 0.05$); values with different lowercase letters indicate significant differences in the same group of digestion products at different simulated oral digestion time ($P < 0.05$). The same case in Table 2 and Fig. 4—Fig. 6.

(图 2-b), 表明模拟口腔消化完成后, 在三级结构变化的同时, 蛋白质分子聚集, 结构也愈加紧密, 说明随着消化过程的进行, 肌原纤维蛋白处于折叠状态, 色氨酸 (Trp) 被激发, 具有较高荧光强度^[24]; 随着模拟口腔消化的进行, A 组荧光强度逐渐降低, 肌原纤维蛋白部分或完全展开, Trp 残基更多地暴露于肌原纤维蛋白分子表面, 这与 Xu 等^[25]的壳寡糖与大豆蛋白结合导致大豆蛋白结构展开的结果一致。当消化时间达到 15 s 时, A 组的消化产物最大荧光强度显著低于 M 组 ($P < 0.05$), 是由于褐藻多糖链上的阴离子基团能与蛋白质上带正电荷的基团发生强烈的静电相互作用^[26], 由此推测, 正是这种共价作用有利于减少消化导致的蛋白分子聚集, 这与林巍等^[27]的研究结果一致。

2.3 紫外吸收光谱分析

为进一步研究模拟口腔消化中酶解褐藻寡糖对蛋白构象中细微差异的影响, 考察了肌原纤维蛋白分子三级结构的变化。这种变化可在某种程度上由 Trp

或酪氨酸 (Tyr) 等残基微环境的变化反映^[23]。随着消化时间的延长, 肌原纤维蛋白紫外光谱峰型未改变, 但 M 组吸光度降低, A 组吸光度升高 (图 3-a), 吸光强度和最大吸光度波长位置的变化归因于疏水性基团的埋藏或二级结构的修饰^[28]。肌原纤维蛋白紫外吸收二阶导光谱中分别有 2 个正、负吸收峰, 前者在 288 和 296 nm 处, 后者在 284 和 291 nm 处 (图 3-b)。利用二阶导数生成 r 值 ($r = a/b$, a 、 b 分别为正负吸收峰之差)^[11], r 值降低表明蛋白微环境更加疏水, r 值升高则证明肌原纤维蛋白在极性溶剂中 Tyr 更多暴露^[29]。由表 2 可知, 随着模拟口腔消化时间的延长, M 组的 r 值均降低, A 组的 r 值先降低后升高, 可能是因为酶解褐藻寡糖通过大量羟基与 Tyr 形成氢键, 使 Tyr 暴露于分子表面^[11]。相比于 M 组, 同样消化时间下 A 组的 r 值更大, 也说明添加酶解褐藻寡糖会使肌原纤维蛋白分子更加亲水。

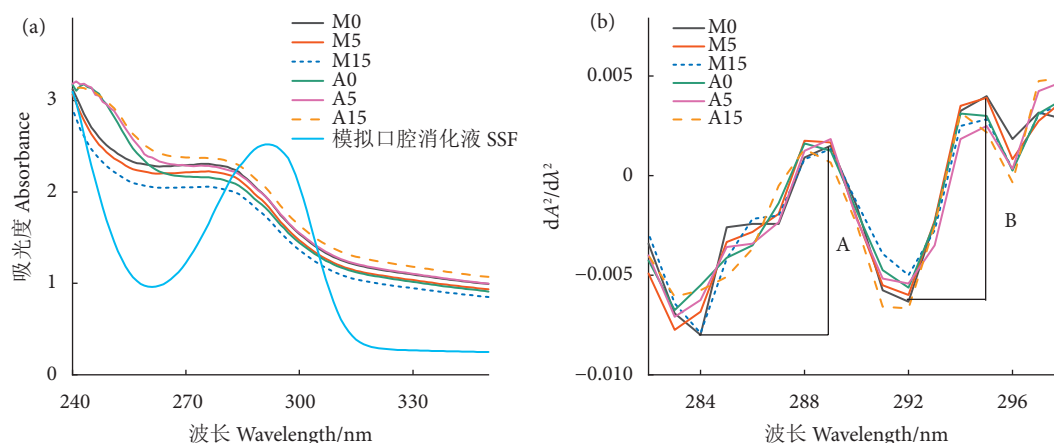


图 b 中 A 为第 1 次正吸收峰与负吸收峰的差值; B 为第 2 次正吸收峰与负吸收峰的差值。

In Fig. b, A is the difference between the first positive absorption peak and the negative absorption peak; B is the difference between the second positive absorption peak and the negative absorption peak.

图3 肌原纤维蛋白和寡糖-蛋白复合物口腔消化产物紫外吸收光谱 (a) 和紫外二阶导数光谱 (b)

Fig. 3 UV absorption spectra (a) and second order derivative spectra (b) of MP and EAO-MP oral digestive products

表2 紫外二阶导数生成 r 值

Table 2 UV second order derivative generated r value

模拟口腔消化时间 Simulated oral digestion time/s	鲢肌原纤维 蛋白组 (M组) MP group	寡糖-蛋白 复合物组 (A组) EAO-MP group
0	1.11±0.18 ^{Aa}	1.62±0.88 ^{Aa}
5	0.98±0.27 ^{Aa}	1.12±0.16 ^{Aa}
15	0.97±0.16 ^{Aa}	1.55±0.31 ^{Aa}

2.4 巯基含量分析

巯基的数量反映了蛋白质变性聚合的水平, 也

可反映其变性程度^[30]。如图 4-a 所示, 随着模拟口腔消化时间的延长, M 组样品总巯基质量摩尔浓度呈下降趋势, 消化 15 s 后尤其显著, 这是因为消化过程中巯基被氧化成二硫键^[31], 也不排除模拟口腔消化液中组分交互作用的影响使肌原纤维蛋白分子相互聚集; A 组样品模拟口腔消化后, 总巯基质量摩尔浓度显著增加, 这与空白组的总巯基下降趋势相反, 表明酶解褐藻寡糖能促进肌原纤维蛋白分子在消化过程中结构展开。两组活性巯基均无

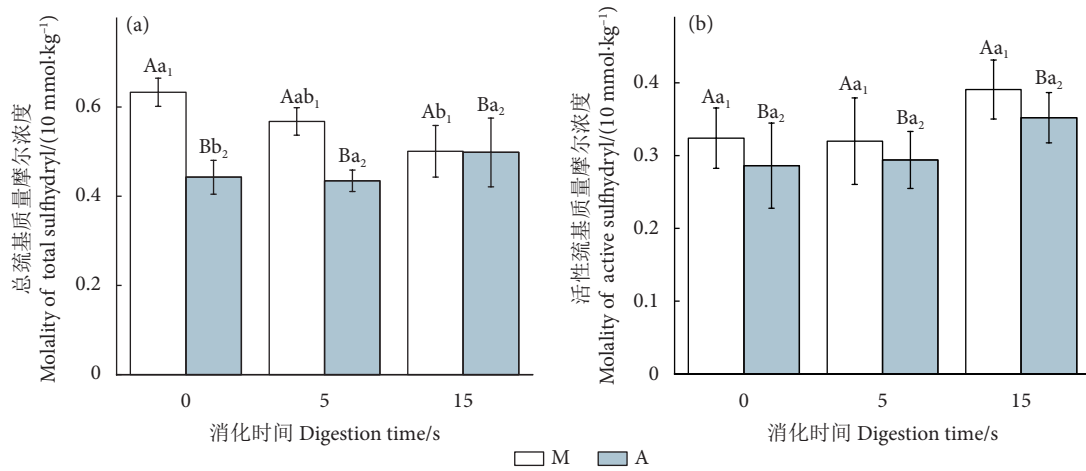


图4 肌原纤维蛋白和寡糖-蛋白复合物口腔消化产物总巯基和活性巯基质量摩尔浓度

Fig. 4 Molality of total sulfhydryl and active sulfhydryl of MP and EAO-MP oral digestive products

显著性差异 ($P>0.05$), 这是由误差所致, 但模拟口腔消化后均出现上升趋势。与 M 组相比, A 组 2 种巯基质量摩尔浓度均显著降低 ($P<0.05$), 有研究表明添加不同浓度的茶多酚会导致肌原纤维蛋白巯基含量出现降低、升高两种不同的结果^[32]。本研究出现这种结果可能是酶解褐藻寡糖的浓度所致, 也可能是由于酶解褐藻寡糖修饰使蛋白质形成高分子多聚体, 导致总巯基转化为二硫键, 致使巯基含量下降^[27]。这些结果说明, 肌原纤维蛋白经过模拟口腔消化液的作用, 其氧化程度会增加, 蛋白分子结构聚集。酶解褐藻寡糖可能使蛋白分子巯基含量降低, 却能促进肌原纤维蛋白分子在模拟口腔消化液中结构的展开。

2.5 氢键含量分析

氢键维持了蛋白质二级结构空间构象的稳定。如图 5 所示, 随着口腔消化时间的延长, M、A 组在整个口腔消化期间, 均无显著性差异 ($P>0.05$), 这是由于误差引起的, 但随着模拟口腔消化时间的延长, M、A 组的氢键质量浓度均呈现逐渐下降的趋势。氢键是维持凝胶稳定构象的主要化学力, 因此模拟口腔消化使蛋白结构呈现不稳定趋势。与 M 组相比, A 组氢键质量浓度均显著升高 ($P<0.05$), 由此推断肌原纤维蛋白经过酶解褐藻寡糖修饰, 增强了蛋白分子的稳定性。这也与前述红外光谱的结果一致, 证实了肌原纤维蛋白经酶解褐藻寡糖修饰后会产生更多的氢键, 并且通过氢键作用结合成为共价聚合物。

2.6 表面疏水性分析

肌原纤维蛋白分子表面疏水性的高低反映了疏

水基团的多少, 对蛋白质的构象、稳定性及其他功能起着重要作用, 可用于检测蛋白质微环境变化。ANS 与蛋白质分子结合越多, 荧光强度越强, 表面疏水性越高。如图 6 所示, 纵向比较 (组内): M 组表面疏水性经过模拟口腔消化 5 s 后无显著性差异, 但 15 s 后显著降低 ($P<0.05$), 由于蛋白质结构聚集会引起更多的疏水性氨基酸被埋藏^[33], 说明模拟口腔消化液中的组分能使蛋白空间结构聚集。A 组表面疏水性经过模拟口腔消化 5 s 后也无显著性差异, 但 15 s 后显著升高 ($P<0.05$), 有研究报道川明参寡糖中的 α -1,4 糖苷键能与 α -淀粉酶通过氢键结合部分降解^[34], 推测具有 α -1,4 糖苷键的酶解褐藻寡糖也能与模拟口腔消化液中的 α -淀粉酶先迅速结合, 然后部分降解从而消解掉部分空间位阻^[35], 导致本实验条件下的模拟口腔消化过程中

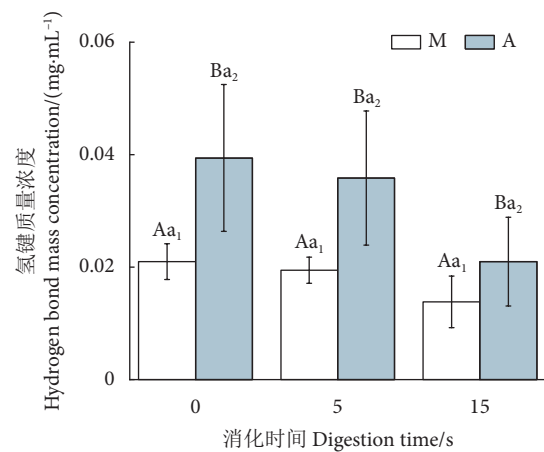


图5 肌原纤维蛋白和寡糖-蛋白复合物口腔消化产物氢键质量浓度

Fig. 5 Hydrogen bond mass concentration of MP and EAO-MP oral digestive products

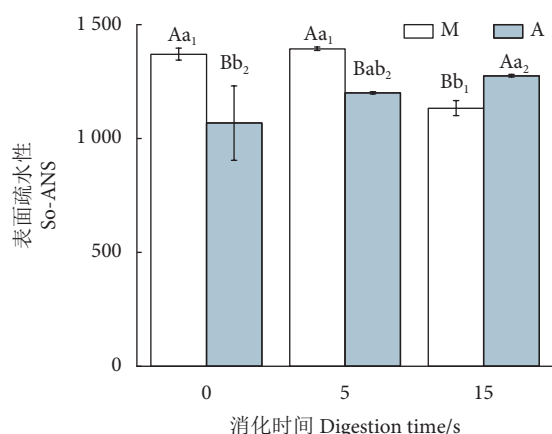


图6 肌原纤维蛋白和寡糖-蛋白复合物口腔消化产物蛋白表面疏水性

Fig. 6 Surface hydrophobicity of MP and EAO-MP oral digestive products

表面疏水性逐渐升高, 在 5 s 时没有显著体现, 但 15 s 后得到了与 M 组相反的结果, 这个结果很有启发性, 一定程度上反映了添加酶解褐藻寡糖会促进肌原纤维蛋白分子的三级结构在模拟口腔消化液中展开。

横向比较 (组间): 0 s 未消化时, A 组的表面疏水性显著低于 M 组, 有研究报道 1% 和 3% 质量分数的魔芋寡糖可以使鲢肌原纤维蛋白在冷冻循环期间的表面疏水性显著降低, 从而抑制蛋白的氧化变性^[36], 这与本研究中加入酶解褐藻寡糖修饰后的肌原纤维蛋白表面疏水性变化结果一致, 一定程度反映了在口腔消化酶未参与之前, 酶解褐藻寡糖有保护和抑制肌原纤维蛋白氧化的潜力, 原因是酶解褐藻寡糖的存在增加了肌原纤维蛋白表面的空间位阻, 使更多表面疏水基团包埋于分子内部^[37]; 后续加入 α -淀粉酶启动模拟口腔消化过程中, 在消化 5 s 时 A 组的表面疏水性仍显著低于 M 组 ($P < 0.05$); 而模拟消化 15 s 后, A 组的表面疏水性却显著高于 M 组 ($P < 0.05$)。后续研究应对 0 s 条件下重复实验, 使统计学结果更为可靠; 或增加模拟口腔消化过程中的时间测量点, 获得更为系统完整的过程数据, 本研究无法排除 0 s 时酶解褐藻寡糖阻挡了蛋白和 ANS 结合, 测得的表面疏水性比实际更低这一可能性。

3 结论

本实验通过对鲢肌原纤维蛋白及其与酶解褐藻寡糖的复合物进行模拟口腔消化, 分析了动物蛋白在消化期间二级、三级结构的变化。模拟口腔消化

后, 鲢肌原纤维蛋白组由于模拟口腔消化液的作用导致无规卷曲结构含量增加, λ_{\max} 蓝移。消化 15 s 后具有最大荧光强度, 蛋白处于疏水微环境中紫外二阶导数 r 值降低, 由于聚集或氧化作用增加使总巯基含量显著降低, 氢键含量逐渐降低, 表面疏水性显著降低。寡糖-蛋白复合物组 α -螺旋结构增加, 无规卷曲含量减少, λ_{\max} 先蓝移再红移, 荧光强度降低, 紫外二阶导数 r 值增加, 总巯基含量显著增加, 氢键含量下降, 表面疏水性显著增加。肌原纤维蛋白经过模拟口腔消化液的作用, 二级、三级结构发生变化, 蛋白空间结构无序, 分子结构聚集。酶解褐藻寡糖与鲢肌原纤维蛋白通过氢键共价结合, 发生静电作用形成聚合物, 促进鲢肌原纤维蛋白分子结构的展开。综上所述, 模拟口腔消化液会改变鲢肌原纤维蛋白的构象, 使蛋白质分子聚集, 内部基团包裹; 与纯鲢肌原纤维蛋白相比, 添加褐藻寡糖修饰后的肌原纤维蛋白减少了分子内的聚集, 促进蛋白分子结构在模拟口腔消化液中展开。因此, 褐藻寡糖能使蛋白分子内部基团接触到更多消化液, 可能会更利于此类蛋白-寡糖复合产品后续在胃肠中的消化吸收, 这亟待进一步实验验证。

参考文献:

- [1] 尹艺霖, 刘学军. 不同超声功率处理对鲢鱼肌原纤维蛋白理化特性及凝胶品质的影响 [J]. 肉类研究, 2019, 33(3): 14-19.
- [2] WALAYAT N, WANG X K, LIU J H, et al. Kappa-carrageenan as an effective cryoprotectant on water mobility and functional properties of grass carp myofibrillar protein gel during frozen storage [J]. LWT, 2022, 154: 112675.
- [3] LU S, NA K, WEI J N, et al. Alginate oligosaccharides: the structure-function relationships and the directional preparation for application [J]. Carbohydr Polym, 2022, 284: 119225.
- [4] 荣婧, 仇超颖, 胡晓, 等. 鸢乌贼肌原纤维蛋白糖基化产物功能特性研究 [J]. 南方水产科学, 2018, 14(1): 68-76.
- [5] 虞铭霞, 张怡, 张宾. 海藻糖和褐藻胶寡糖对冻藏紫贻贝品质的影响 [J]. 现代食品科技, 2019, 35(9): 163-169.
- [6] 张丽, 史洪涛, 李月勤, 等. 褐藻寡糖对断奶仔猪生长性能、抗氧化性能和肠道消化吸收功能的影响 [J]. 中国饲料, 2018, 29(14): 56-61.
- [7] CHEN J Y, CHEN Q M, XIE C Q, et al. Effects of simulated gastric and intestinal digestion on chitooligosaccharides in two *in vitro* models [J]. Int J Food Sci Tech, 2020, 55(5): 1881-90.
- [8] 仇超颖, 荣婧, 胡晓, 等. 糖基化鸢乌贼肌原纤维蛋白体外消化产物抗氧化性研究 [J]. 南方水产科学, 2018, 14(6): 105-112.
- [9] SAIGUSA M, NISHIZAWA M, SHIMIZU Y, et al. *In vitro* and *in*

- vivo* anti-inflammatory activity of digested peptides derived from salmon myofibrillar protein conjugated with a small quantity of alginate oligosaccharide[J]. *Biosci Biotech Bioch*, 2015, 79(9): 1518-1527.
- [10] WANG X M, CHEN J S. Food oral processing: recent developments and challenges[J]. *Curr Opin Colloid Interface Sci*, 2017, 28: 22-30.
- [11] 杨天, 耿文豪, 郑志红, 等. 褐藻寡糖对鲢鱼鱼糜稳定性、分子间作用力及肌原纤维蛋白结构的影响[J]. *肉类研究*, 2021, 35(7): 1-8.
- [12] 仪淑敏, 李睿智, 陈杨, 等. 白鲢鱼肌原纤维蛋白双向电泳分析体系的建立[J]. *食品科学*, 2017, 38(1): 41-46.
- [13] MINEKUS M, ALMINGER M, ALVITO P, et al. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food: an international consensus[J]. *Food Funct*, 2014, 5(6): 1113-1124.
- [14] XU Y J, ZHAO X, BIAN G L, et al. Structural and solubility properties of pale, soft and exudative (PSE)-like chicken breast myofibrillar protein: effect of glycosylation[J]. *Food Sci Technol*, 2018, 95: 209-215.
- [15] WANG Z F, HE Z F, ZHANG D, et al. Effect of multiple freeze-thaw cycles on protein and lipid oxidation in rabbit meat[J]. *Int J Food Sci Technol*, 2021, 56(6): 3004-3015.
- [16] 哈斯, 韩玲钰, 许喆, 等. 碱性 pH 对马鲛鱼肌球蛋白热聚集行为的影响[J]. *现代食品科技*, 2022, 38(4): 114-120, 61.
- [17] YILDIZ G, DING J Z, ANDRADE J, et al. Effect of plant protein-polysaccharide complexes produced by mano-thermo-sonication and pH-shifting on the structure and stability of oil-in-water emulsions[J]. *Innov Food Sci Emerg Technol*, 2018, 47: 317-25.
- [18] LI T F, ZHAO J X, HUANG J, et al. Improvement of the quality of surimi products with over-drying potato starches [J]. *J Food Qual*, 2017: 1417856. Doi: 10.1155/2017/1417856.
- [19] ZHANG Y M, PUOLANNE E, ERTBJERG P. Mimicking myofibrillar protein denaturation in frozen-thawed meat: effect of pH at high ionic strength[J]. *Food Chem*, 2021, 338: 128017.
- [20] XU Y J, DONG M, TANG C B, et al. Glycation-induced structural modification of myofibrillar protein and its relation to emulsifying properties[J]. *LWT*, 2020, 117: 108664.
- [21] XIE F, SHAO H L, HU X C. Effect of storage time and concentration on structure of regenerated silk fibroin solution[J]. *Int J Mod Phys B*, 2006, 20(25n27): 3878-3883.
- [22] ZHONG Y Y, HAN P, SUN S L, et al. Effects of apple polyphenols and hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complexes on the oxidation of myofibrillar proteins and microstructures in lamb during frozen storage[J]. *Food Chem*, 2022, 375: 131874.
- [23] 梁雯雯, 杨天, 郭建, 等. 升温方式对鲢鱼肌球蛋白结构和理化性质的影响[J]. *食品科学*, 2021, 42(21): 24-31.
- [24] 陈金玉, 李彬, 何丽丽, 等. 海藻糖和甘露醇对冻融循环引起的虾蛄肌原纤维蛋白结构和功能特性变化的影响[J]. *食品科学*, 2019, 40(16): 30-37.
- [25] XU Z Z, HUANG G Q, XU T C, et al. Comparative study on the Maillard reaction of chitosan oligosaccharide and glucose with soybean protein isolate[J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 131: 601-607.
- [26] QIU Y J, JIANG H, DONG Y Y, et al. Expression and biochemical characterization of a novel fucoidanase from flavobacterium algicola with the principal product of fucoidan-derived disaccharide[J]. *Foods*, 2022, 11(7): 1025.
- [27] 林巍, 刘晓兰, 任健, 等. 3种还原糖对芸豆清蛋白糖基化改性产物乳化性及结构的影响[J]. *食品与机械*, 2019, 35(10): 170-173.
- [28] YANG X Y, SU Y, LI L. Study of soybean gel induced by *Lactobacillus plantarum*: protein structure and intermolecular interaction[J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2019, 119(2): 108794.
- [29] 杨天, 郑志红, 张紫薇, 等. 酶解海洋壳寡糖和褐藻寡糖对鲢鱼鱼糜热稳定性、化学作用力及蛋白质结构的影响[J]. *大连海洋大学学报*, 2022, 37(1): 157-165.
- [30] LU H, LIANG Y H, ZHANG X M, et al. Effects of cathepsins on gel strength and water-holding capacity of myofibrillar protein gels from bighead carp (*Aristichthys nobilis*) under a hydroxyl radical-generation oxidizing system[J]. *Foods*, 2022, 11(3): 330.
- [31] 毛小雨, 许馨予, 杨鹄隽, 等. 紫花芸豆蛋白体外消化产物的抗氧化活性及结构特征分析[J]. *食品科学*, 2021, 42(3): 56-62.
- [32] LI X P, LIU C K, WANG J X, et al. Tea polyphenols affect oxidative modification and solution stability of myofibrillar protein from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. *Food Biophys*, 2020, 15(4): 397-408.
- [33] SHUI S S, QI H, SHAIMAA H, et al. Kappa-carrageenan and its oligosaccharides maintain the physicochemical properties of myofibrillar proteins in shrimp mud (Xia-Hua) during frozen storage[J]. *J Food Sci*, 2021, 86(1): 140-148.
- [34] 高涛, 罗黄洋, 吴韧, 等. 川明参多糖在体外模拟消化过程中的结构变化及对消化酶活性的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(23): 98-105.
- [35] 刘郁琪, 覃小丽, 阚建全, 等. 酪蛋白与可溶性大豆多糖的酶促糖基化产物制备及其性能分析[J]. *食品科学*, 2020, 41(19): 74-82.
- [36] WALAYAT N, TANG W, WANG X P, et al. Effective role of konjac oligosaccharide against oxidative changes in silver carp proteins during fluctuated frozen storage[J]. *Food Hydrocoll*, 2022, 131: 107761.
- [37] 王伟, 王昱, 陈日新, 等. 海藻酸钠分子质量对低脂乳化肠凝胶特性的影响[J]. *肉类研究*, 2019, 33(6): 1-6.