

利安隆是一家全球领先的生物化学平台型公司，公司秉承以创新驱动发展的经营理念，通过全球化布局实现生产与运营的高效协同，聚焦化学和生物领域前瞻、高效、成熟的新技术，为客户提供高品质的产品和服务，做细分行业的领导者。

为实现百年利安隆品牌的愿景，公司规划布局了第一生命曲线——高分子材料抗老化业务、第二生命曲线——润滑油添加剂业务、第三生命曲线——生命科学业务，基于三条业务曲线扎实的基本盘，公司持续扩展新业务的管理能力、实体经济运营能力和全球营销能力，我们又拓展布局了新兴业务——聚酰亚胺 (PI) 等新材料领域，持续推动公司高质量发展。

利安隆坚持以“客户至上、奋斗为本，创新驱动、追求卓越，简单高效、开放包容”的核心价值观，践行“用化学和生物创造多彩生活”的企业使命，力争成为客户信赖、员工自豪、社会尊重、可持续发展的世界一流企业。



天津汉沽基地 TIANJIN HANGU



宁夏中卫基地 NINGXIA ZHONGWEI



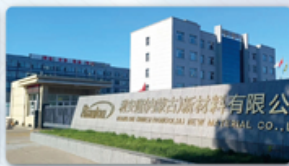
浙江常山基地 ZHEJIANG CHANGSHAN



河北衡水基地 HEBEI HENGSHUI



广东珠海基地 GUANGDONG ZHUHAI



内蒙古赤峰基地 NEIMENGGU CHIFENG



辽宁锦州基地 LIAONING JINZHOU

全球认证



全球客户

通过近三十年的积累和发展，公司客户遍及全球，几乎涵盖所有高分子材料及各个应用领域全球著名的高分子材料公司。



全球化工50强



TFS 57家



全球涂料10强

天津利安隆新材料股份有限公司

地址:天津华苑产业区开华道20号智慧山西塔20层 邮编:300384

电话:022-83718769

邮箱:market@rianlon.com

公司网址:www.rianlon.com



外源性羟基自由基氧化对银杏果分离蛋白凝胶特性的影响

程巧¹, 葛慧芳², 秦佳伟¹, 王耀松^{1*}

(1. 南京林业大学 轻工与食品学院, 江苏 南京 210037; 2. 安徽农业大学 茶树生物学与资源利用国家重点实验室, 安徽 合肥 230036)

摘要: 采用 Fenton 反应 (质量浓度 0.016 g/L FeCl₃+质量浓度 0.018 g/L 抗坏血酸+质量浓度 0~0.680 g/L H₂O₂) 模拟羟基自由基生成体系, 对银杏果分离蛋白 (GSPI) 进行氧化, 制备了 GSPI 溶胶和热诱导凝胶。通过物化分析法、聚丙烯酰胺凝胶电泳、SEM、拉曼光谱探究了 H₂O₂ 质量浓度对 GSPI 物化特性及其热诱导凝胶性能的影响。结果表明, 羟基自由基存在下, GSPI 表面的疏水性氨基酸残基暴露, 巯基氧化形成分子内或分子间二硫键, 疏水相互作用和二硫键的变化会导致 GSPI 不同程度的展开和交联, 适当的氧化能够引起 α -螺旋去卷积, β -折叠增加, 促进了蛋白质分子交联, 形成了纠缠凝胶网络, 提高了蛋白凝胶的机械强度、流变学性能。当 H₂O₂ 质量浓度为 0.340 g/L 时, GSPI 凝胶的硬度、胶黏性和咀嚼性分别达到最大, 与未氧化 (未加 H₂O₂) GSPI 凝胶相比, 分别增至 2.08、2.53 和 3.01 倍。而过度氧化 (H₂O₂ 质量浓度 \geq 0.680 g/L) 虽然会提高 GSPI 凝胶持水性能, 但破坏了蛋白分子中氢键, 产生过量的二硫键, 阻碍了其他活性基团的相互作用, 抑制了凝胶网络的形成, 降低了凝胶强度。

关键词: 银杏果分离蛋白; 羟基自由基氧化; 凝胶性; 硬度; 胶黏性; 咀嚼性; 食品化学品

中图分类号: TS201.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214 (2025) 08-1815-08

Effect of exogenous hydroxyl radical-induced oxidation on gelation properties of ginkgo seed protein isolate gels

CHENG Qiao¹, GE Huifang², QIN Jiawei¹, WANG Yaosong^{1*}

(1. College of Light Industry and Food Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China; 2. State Key Laboratory of Tea Plant Biology and Utilization, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, Anhui, China)

Abstract: Ginkgo seed protein isolate (GSPI) was oxidized using Fenton reaction (mass concentration 0.016 g/L FeCl₃ + mass concentration 0.018 g/L ascorbic acid + mass concentration 0~0.680 g/L H₂O₂) as simulated hydroxyl radical generation system to prepare GSPI sols and heat induced gels. The effects of H₂O₂ mass concentration on the physicochemical properties of GSPI and its heat-induced gel properties were investigated through physicochemical analysis, polyacrylamide gel electrophoresis, SEM and Raman spectroscopy. The results indicated that in the presence of hydroxyl radical, hydrophobic amino acid residues on the surface of the proteins were exposed, with the sulfhydryl groups oxidized to form intramolecular/intermolecular disulfide bonds. Hydrophobic interactions and disulfide bonds formed led to protein unfolding and cross-linking to various degrees. Moderate oxidation could lead to deconvolution of α -helix and increase in β -sheets, which promoted the protein crosslinking, formation of an entangled gel network, and consequently improvement in the mechanical strength and rheological properties of the resulting protein gel. When H₂O₂ mass concentration was 0.340 g/L, the hardness, gumminess, and chewiness of the GSPI gel reached the maximum, to 2.08, 2.53, and 3.01 folds that of the unoxidized gel,

收稿日期: 2024-06-20; 定用日期: 2024-07-29; DOI: 10.13550/j.jxhg.20240492

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (31401530); 安徽农业大学茶树生物学与资源利用国家重点实验室开放基金资助项目 (SKLT0F20230108)

作者简介: 程巧 (2000—), 女, 硕士生, E-mail: chengqiao@njfu.edu.cn. 联系人: 王耀松 (1981—), 男, 副教授, E-mail: yaosongwang@njfu.edu.cn.

respectively. Excessive oxidation (H_2O_2 mass concentration ≥ 0.680 g/L) improved water holding capacity of the gels, but the oxidation impaired hydrogen bond formation, resulted in excessive disulfide bonds, hindered the interaction of other active groups, inhibited the formation of gel networks, and reduced gel strength.

Key words: ginkgo seed protein isolated; hydroxyl radical-induced oxidation; gelation; hardness; gumminess; chewiness; food chemicals

银杏果是一种传统的药食同源果实,既可以作为一种中药材入药,又可以作为食品添加到甜点、饮料中^[1]。银杏果中蛋白质质量分数可达 10%~15%,并富含人体必需的氨基酸,被认为是一种优质蛋白质。银杏果蛋白中不含限制性氨基酸,但富含在其他植物源蛋白中普遍不存在的甲硫氨酸、半胱氨酸等氨基酸,还大量含有谷氨酸、天冬氨酸和精氨酸^[2]。然而,银杏果蛋白存在水溶解度小、乳化性低、凝胶性差等问题^[3],限制了其在食品工业中的应用,降低了银杏果资源的利用程度。对植物源蛋白的挖掘也符合当下国家大食物观下食物种类来源多样性的践行要求。因此,对银杏果分离蛋白进行功能改性,提高其凝胶性以满足食品对质地的要求,充分利用其营养价值具有现实意义。

对食物物料中各类内源性氧化现象的研究认为,羟基自由基($\cdot\text{OH}$)是最强的氧化剂,其在生物组织内通过 Fenton 反应(H_2O_2 与还原性过渡金属间的反应)形成^[4]。 $\cdot\text{OH}$ 能够对蛋白质结构进行有效修饰,通过蛋白侧链修饰、主链断裂作用以及基于二硫键、双酪氨酸或羰氨反应等形成共价交联,从而改变蛋白分子构象,进而改变蛋白物化性质和分子行为^[5]。因此,通过外源性 $\cdot\text{OH}$ 氧化反应修饰蛋白,也可达到修饰蛋白结构的目的,进而可能提升蛋白的食品加工功能性。当前,大量的动物源蛋白研究发现, $\cdot\text{OH}$ 氧化能够显著提升动物源蛋白凝胶功能性^[6-7],其提升得益于氧化改变了蛋白构象、重整了蛋白分子间的相互作用。目前,在大豆蛋白方面利用 $\cdot\text{OH}$ 氧化对植物蛋白功能性的提升研究发现,轻度 $\cdot\text{OH}$ 氧化可以促进大豆蛋白乳化性能^[8],对大豆蛋白组分之一 7S 的溶解性和乳化性也有提升作用,并可以降低其过敏原物质含量^[9]。但利用 $\cdot\text{OH}$ 氧化来提升植物蛋白凝胶功能性的案例较少,其机理尚不清楚^[10]。银杏果蛋白巯基含量相对丰富,为在氧化条件下形成二硫键交联蛋白提供了重要的分子结构基础。采用 $\cdot\text{OH}$ 氧化是一种高效共价交联食品蛋白质分子的简单手段,适当的交联能够有效提升蛋白凝胶性;此外,外源性氧化也可为内源性氧化对蛋白功能性的影响提供验证,并进一步为调控蛋白质功能性提供理论基础。然而,目前鲜有对

银杏果分离蛋白氧化方面的研究。

本文拟以银杏果分离蛋白热诱导凝胶为研究对象,探究在含有抗坏血酸、 Fe^{3+} 和不同浓度 H_2O_2 的 $\cdot\text{OH}$ 生成模拟体系中氧化后的银杏果分离蛋白凝胶特性;分析理化特性、质构特性、水合特性、微观结构以及分子间作用力等方面特征,探讨 $\cdot\text{OH}$ 氧化对银杏果蛋白凝胶性能提升的影响。以期 $\cdot\text{OH}$ 氧化提高银杏果分离蛋白凝胶性能提供理论依据和技术参考。

1 实验部分

1.1 材料、试剂与仪器

新鲜银杏果(邳州大佛指),购于江苏徐州。

磷酸氢二钠、柠檬酸、氢氧化钠、硫酸铜、酒石酸钾钠、正己烷、 FeCl_3 、抗坏血酸、丁基羟基茴香醚,分析纯,国药集团化学试剂有限公司;5,5'-二巯基(2-硝基苯甲酸)(DTNB)、1-苯氨基萘-8-磺酸(ANS)、罗丹明 B,分析纯,上海麦克林生化科技股份有限公司;丙烯酰胺、*N,N'*-甲叉双丙烯酰胺(MBA)、甘油、过硫酸铵、四甲基乙二胺、溴酚蓝、*N*-乙基马来酰亚胺(NEM)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、 β -巯基乙醇(β -ME)、丁基羟基茴香醚(BHA),分析纯,美国 Sigma-Aldrich 公司;实验用水均为去离子水。

Avanti JXN-26 型高速冷冻离心机,贝克曼库尔特国际贸易(上海)有限公司;SpectraMax®i3x 型多功能酶标仪,美谷分子仪器(上海)有限公司;MARS60 型显微红外联用流变仪、DXR532 型激光共聚焦显微拉曼光谱仪(Raman),美国 Thermo Fisher Scientific 公司;A.XT Plus 型物性测试仪,北京微讯超技仪器技术有限公司;Quanta 200 FEG 型扫描电子显微镜(SEM),美国 FEI 公司;Leica SP8 型激光扫描共聚焦显微镜,徕卡显微系统(上海)贸易有限公司。

1.2 方法

1.2.1 银杏果分离蛋白的制备

参照文献[11]方法提取银杏果分离蛋白(GSPI)。首先,将新鲜银杏果去壳脱皮,干燥后磨成粉过 80 目筛;然后,将其用正己烷以料液比(g:mL)1:8

脱脂 2~3 次, 得到脱脂粉; 将脱脂粉以料液比 (g : mL) 1 : 9 分散在去离子水中, 并用 1 mol/L 的氢氧化钠溶液调节 pH 至 9.0, 10000 × g 离心 15 min 后取上清液; 再用 1 mol/L 的盐酸将上清液 pH 调至 4.4, 10000 × g 离心 15 min, 收集沉淀; 最后, 将沉淀物的 pH 调至 7.0, 在 -80 °C 下真空冷冻干燥 48 h 后得到 GSPI, 冻干后的 GSPI 呈棕黄色细腻粉末, 便于分散, 4 °C 下保存备用。

1.2.2 氧化 GSPI 凝胶的制备

配制质量浓度为 240 g/L 的 GSPI 储备液, 在 4 °C 下水化 12 h; 然后, 将储备液调至 pH=6.0, 并向其中加入 Fenton 试剂氧化 GSPI, 使溶液最终含有质量浓度为 120 g/L 的 GSPI、质量浓度为 0.016 g/L 的 FeCl₃、质量浓度为 0.018 g/L 抗坏血酸, 并分别含有质量浓度为 0、0.034、0.340、0.680 g/L 的 H₂O₂, 将样品在室温下搅拌 4 h 以充分氧化; 最后, 加入质量浓度为 0.180 g/L 的丁基羟基茴香醚终止氧化, 得到氧化 GSPI 溶胶样品。以未氧化的 GSPI 制备的溶胶为对照样品。将所有溶胶样品在 90 °C 下加热 30 min 后, 自然冷却至室温, 在 4 °C 下放置 12 h, 得到 GSPI 凝胶样品。

1.3 表征方法和性能测试

1.3.1 溶解度的测定

采用双缩脲法^[11]测量溶解度。将样品用柠檬酸-磷酸钠缓冲液 (CPB, 50 mmol/L, pH=6.0) 稀释至质量浓度为 10 g/L, 然后 5000 × g 离心 20 min, 取 1 mL 上清液与 4 mL 双缩脲试剂混匀, 然后在 30 °C 水浴 25 min, 测定其在 540 nm 处的吸光度。用牛血清蛋白制备标准溶液, 根据得到的拟合曲线方程 $y=33.3333x-2.4198$, $R^2=0.9973$, 计算上清液中的蛋白质量浓度。根据式 (1) 计算蛋白的溶解度 (%):

$$\text{溶解度}/\% = m/m_t \times 100 \quad (1)$$

式中: m 和 m_t 分别为上清液中的蛋白和总蛋白质量, g。

通过双缩脲法测得 GSPI 中蛋白质量分数 >90%。

1.3.2 巯基含量的测定

参考文献[12]方法, 将 GSPI 溶胶样品用 CPB 稀释至质量浓度为 2 g/L, 向 2 mL 稀释样品中加入 50 μL 质量浓度为 3.963 g/L 的 DTNB 溶液。避光反应 15 min 后在 412 nm 下测定其吸光度。以 13600 L/(mol·cm) 的消光系数, 根据式 (2) 计算样品的自由巯基含量:

$$\text{SH} = A \times 10^6 / (\rho \times \varepsilon \times l) \quad (2)$$

式中: SH 为自由巯基含量, μmol/g; A 为溶液在 412 nm 下的吸光度; ρ 为溶液稀释后的蛋白质量浓度, g/L; ε 为消光系数, 为 13600 L/(mol·cm); l 为光程, 1 cm。

1.3.3 表面疏水性的测定

参考文献[13]方法测定表面疏水性。用 CPB 缓冲液稀释 GSPI 溶胶样品至蛋白质质量浓度为 0.01~0.05 g/L。将 2 mL 稀释后的溶液与 20 μL 质量浓度为 2.39 g/L 的 ANS 溶液混合均匀, 避光反应 15 min。在激发波长 365 nm、发射波长 484 nm 下测定其荧光强度。所得荧光强度与蛋白质质量浓度的曲线斜率为蛋白质的表面疏水性指数。

1.3.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳测试

参考文献[14]方法进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 测试。用质量浓度为 55.5 g/L 的 β-ME 溶液制备还原样品, 用质量浓度为 0.125 g/L 的 NEM 溶液制备非还原样品, 煮沸 3 min。使用质量浓度为 50 g/L 聚丙烯酰胺堆积凝胶, 质量浓度为 125 g/L 聚丙烯酰胺分离凝胶, 每个样品上样量为 15 μL, 采用恒流法电泳。使用考马斯亮蓝 R250 染色、体积分数为 7.5% 的稀醋酸和体积分数 5.0% 的甲醇水溶液脱色, 直至条带清晰可见, 无背景色。

1.3.5 质构特性的测定

参考文献[15]方法, 制备高 20 mm、直径 15 mm 的凝胶样品, 将其放置在平行板上, 选取 P/0.5 探头进行测量, 压缩速率测试前为 1.0 mm/s, 测试中为 2.0 mm/s, 测试后为 5.0 mm/s, 压缩距离为 7 mm, 触发力为 5 × g。在此参数下进行二次压缩实验, 并根据 BOURNE 定义计算其硬度、弹性、黏聚性、胶黏性、咀嚼性和回复性。

1.3.6 凝胶流变学特性的测试

参考文献[16]方法, 使用流变仪分析凝胶的流变学特性。使用直径为 40 mm 的平板和 1 mm 的间隙进行测量, 将凝胶样品 (约 3 mm) 置于平行板上, 平行 120 s, 各参数设置为: 应变为 1.0%, 角速率 0.5~100 rad/s, 在 25 °C 下进行振荡剪切频率扫描实验。

1.3.7 SEM 和 Raman 测试

SEM 测试: 制备新鲜凝胶样品, 使用双面胶带将凝胶样品固定在铜板上, 进行喷金处理以确保导电性, 在 25 kV 的加速电压下使用 SEM 观察凝胶的微观形貌。

拉曼测试 (参考文献[17]方法测定拉曼光谱, 并稍作修改): 用配备 785 nm 激光光源的拉曼光谱仪进行测定, 将 0.5 g 样品置于载玻片上, 在位移 800~1800 cm⁻¹ 采集凝胶样品的拉曼光谱, 每次扫描时间 120 s, 每个样本扫描 3 次。使用 LabSpec 5.0 软件对获得的光谱进行平滑归一化。

1.3.8 持水性和溶胀比的测定

取适量 (m_0 , g) 的凝胶样品置于离心管中, 3000 × g 离心 20 min 后将分离出的水倒出。记录离心后的凝胶质量 (m_1 , g)。按照式 (3) 计算持水性 (%):

$$\text{持水性}/\% = m_1/m_0 \times 100 \quad (3)$$

参照文献[18]方法,测定高 5 mm、直径 8 mm 的凝胶样品的溶胀性。取适量 (m'_0 , g) 的凝胶样品,室温下在去离子水中浸泡 30 min,然后用镊子取出凝胶,用滤纸吸干表面水分,记录此时凝胶质量 (m'_1 , g)。按照式 (4) 计算溶胀比 (%):

$$\text{溶胀比}/\% = m'_1/m'_0 \times 100 \quad (4)$$

1.3.9 分子间作用力的测定

参照文献[19]方法,用不同的化学物质处理凝胶,以切割不同类型的键。分别配制 5 种溶剂: S1 (去离子水)、S2 (含质量浓度为 10.42 g/L 的 Tris、质量浓度为 6.76 g/L 甘氨酸、质量浓度为 34.00 g/L 的 Na_2EDTA 溶液, $\text{pH}=8.0$)、S3 (S2+质量浓度为 5.00 g/L 的 SDS)、S4 (S3+质量浓度为 480.48 g/L 尿素) 和 S5 (S4+质量浓度为 20.00 g/L 的 β -ME)。将 0.5 g 凝胶样品分别混合在 10 mL 上述 5 种溶剂中,充分混匀后在 25 °C 水浴 2 h; 然后,将混合物在 6000×g 离心 20 min。用牛血清蛋白制备标准溶液,根据得到的拟合曲线方程 $y=39.3701x-2.8858$, $R^2=0.9998$, 计算上清液中的蛋白质量浓度。静电相互作用、疏水相互作用、氢键和二硫键的含量分别是 S2 与 S1、S3 与 S2、S4 与 S3、S5 与 S4 的溶解度差异。

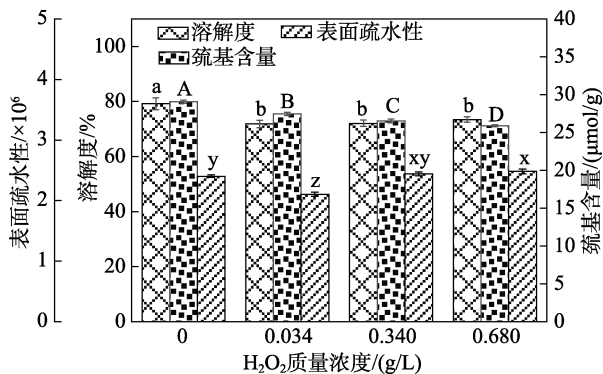
1.4 数据分析

每个实验至少重复 3 次,结果以“平均值 ± 标准差”表示。使用 Statistix 9.0 软件处理数据。采用方差分析 (ANOVA), Fisher 最小显著性差异 (LSD) 检验分析各组间差异。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 GSPI 溶解度、巯基含量和表面疏水性分析

图 1 为 GSPI 暴露于不同 $\cdot\text{OH}$ 氧化体系时的溶解度、巯基含量和表面疏水性的变化。



同一指标中,无相同字母的表示差异显著 ($P < 0.05$),下同
图 1 H_2O_2 质量浓度对 GSPI 的溶解度、巯基含量和表面疏水性的影响
Fig. 1 Effect of H_2O_2 mass concentration on protein solubility, free sulfhydryl and surface hydrophobic of ginkgo seed protein isolate

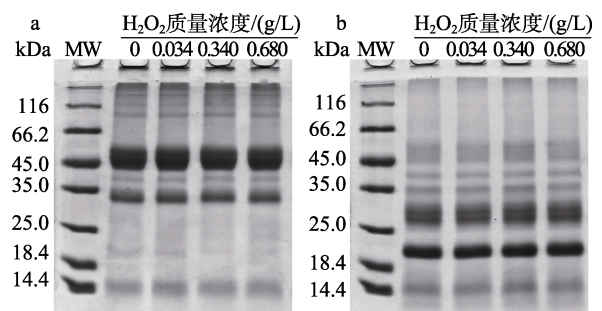
蛋白质的溶解度是蛋白质分子与水分子之间平衡相互作用的结果。从图 1 可以看出,未氧化 GSPI 溶解度为 79.2%,接触 $\cdot\text{OH}$ 后最低降至 71.9% (H_2O_2 质量浓度 0.034 g/L),表明氧化处理显著 ($P < 0.05$) 诱导了巯基的损失,促进了蛋白质交联和聚集^[20]。

巯基含量的变化可以评估蛋白质的氧化程度。从图 1 可以看出,随着 H_2O_2 质量浓度的增加,GSPI 中的巯基含量逐渐减少,从氧化前的 29.1 $\mu\text{mol/g}$ 下降到 (H_2O_2 质量浓度 0.680 g/L) 的 25.9 $\mu\text{mol/g}$ 。这是因为,氧化诱导了 GSPI 结构的展开,从而使相邻的巯基基团形成分子间或分子内二硫键;同时,GSPI 分子中大量的半胱氨酸残基也非常容易被 $\cdot\text{OH}$ 氧化,从而导致巯基含量的降低^[21]。ZHANG 等^[22]也观察到了类似的现象,猪肉肌原纤维蛋白的巯基含量随着氧化程度的增加而降低。

表面疏水性的变化可以用来评估蛋白质氧化后的展开程度及分子的大小、形状和交联程度等^[23]。从图 1 可以看出,与未氧化 GSPI 相比,低质量浓度 (0.034 g/L) 的 H_2O_2 略微降低了蛋白的表面疏水性,这可能是由于,轻微的氧化作用导致蛋白质中的极性基团暴露在表面。当 H_2O_2 质量浓度 > 0.034 g/L 后,氧化程度提高,蛋白质分子构象发生变化,蛋白质通过二硫键分子间形成了共价交联,蛋白表面疏水基团氧化消耗,进而导致蛋白质分子内部的疏水基团暴露,从而增加了蛋白质的表面疏水性。也表明蛋白质的去折叠随着氧化程度的增加而增加,疏水基团逐渐暴露^[24]。

2.2 SDS-PAGE 分析

图 2 为非还原和还原条件下,不同氧化程度处理的 GSPI 的 SDS-PAGE 图。



a—非还原条件 ($-\beta\text{ME}$); b—还原条件 ($+\beta\text{ME}$)
图 2 不同质量浓度 H_2O_2 氧化的 GSPI 在非还原和还原条件下的 SDS-PAGE 图
Fig. 2 SDS-PAGE patterns of GSPI oxidized by H_2O_2 with various mass concentrations under non-reducing and reducing conditions

从图 2a 可以看出,在非还原条件下,随着 H_2O_2 质量浓度的增加,更多的聚合物堆叠在分离凝胶的顶部 (相对分子质量 45.0 kDa 处),条带随着 H_2O_2

质量浓度的增加而逐渐变深, 表明氧化加速了蛋白质交联, 引起了大分子聚集^[25]。从图 2b 可以看出, 在还原条件下, 二硫键断裂, GSPI 被还原成较小的单体, 分离凝胶的相对分子质量集中在 18.4~35.0 kDa, 与未氧化 GSPI 相比, 氧化后 GSPI 具有更深的条带, 证实氧化促进了二硫键的形成。且凝胶顶部仍存在部分条带, 这可能是因为, 氧化导致 GSPI 中形成了一些非还原性共价键^[26]。

2.3 凝胶流变学特性分析

图 3 为不同氧化程度处理的 GSPI 凝胶的流变学特性。

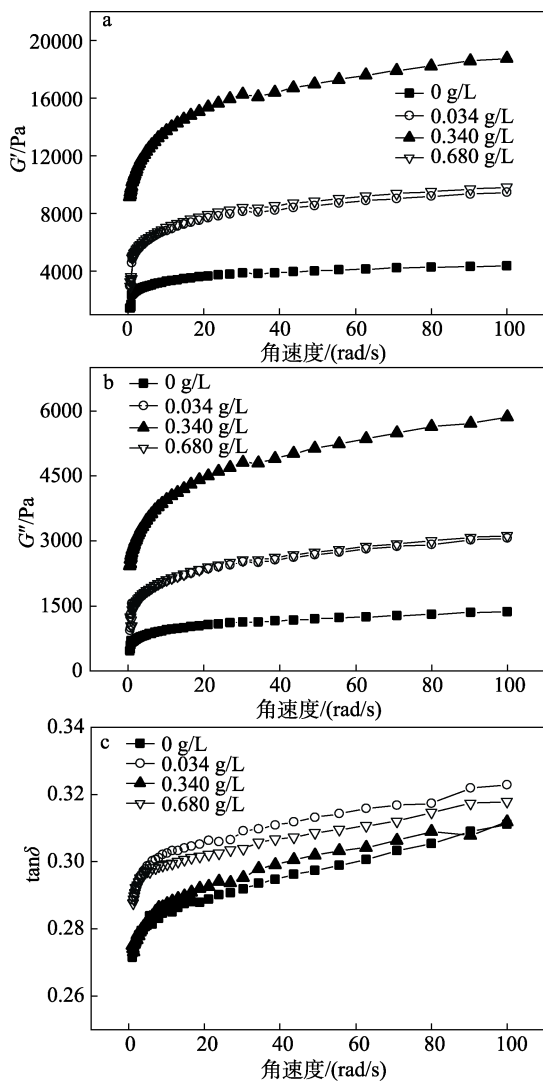


图 3 H₂O₂ 质量浓度对 GSPI 凝胶流变学性能的影响
Fig. 3 Effect of H₂O₂ mass concentrations on rheological properties of GSPI gels

食品的流变学特性不仅影响食物的制备、储存和运输, 而且影响其感官^[27]。从图 3 可以看出, GSPI 凝胶的存储模量 (G' , 图 3a) 和损耗模量 (G'' , 图 3b) 均随着剪切频率的增加而增加, 并且 G' 始终高于 G'' , 表明 GSPI 形成了固体凝胶样行为^[28]。凝胶

的 $\tan\delta$ 始终 <1 (图 3c), 表明凝胶表现出弹性行为, 这是因为, 氧化进一步提升了凝胶的弹性行为^[29]。与未氧化 GSPI 相比, H₂O₂ 孵育 3 h 后, GSPI 凝胶的 G' 和 G'' 在适度氧化 (H₂O₂ 质量浓度 0.034~0.340 g/L) 时显著增加, 如 ZHENG 等^[30] 研究所述, 热诱导凝胶的共价键, 特别是二硫键, 有助于蛋白质的凝胶化行为, 表明氧化会改变 GSPI 的结构, 并适度增加蛋白质的巯基向二硫键的转化。当 H₂O₂ 质量浓度达到 0.680 g/L 时, GSPI 凝胶的 G' 和 G'' 都有所下降, 这可能是因为, 过度氧化使蛋白内的活性官能团的相互作用受到阻碍, 使凝胶网络结构变弱^[7]。

2.4 凝胶的质构分析

图 4 为 GSPI 凝胶的质构特性测定结果。

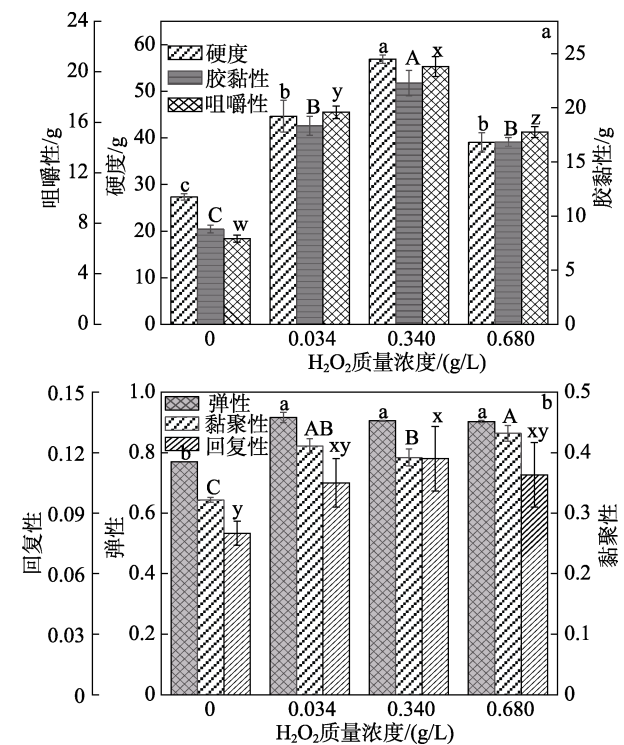


图 4 H₂O₂ 质量浓度对 GSPI 凝胶质构特性的影响
Fig. 4 Effect of H₂O₂ mass concentration on textural characteristics of GSPI gels

凝胶的质构特性是蛋白质结构完整性及其形成凝胶网络能力的指标。从图 4a 可以看出, GSPI 凝胶在硬度、胶黏性和咀嚼性方面显示出相似的趋势: 随着 H₂O₂ 质量浓度的增加先增加后降低, 在 H₂O₂ 质量浓度 0.340 g/L 时分别达到最大, 与未氧化凝胶相比, 硬度、胶黏性、咀嚼性分别增至 2.08 倍、2.53 倍和 3.01 倍, 这与氧化导致的巯基含量降低、二硫键的形成有关, 二硫键交联有利于提高凝胶的硬度, 而氧化 GSPI 中过多的交联可能会阻碍反应官能团的有序相互作用, 并导致蛋白质基质中的氢键减少, 从而降低结合程度^[31]; 此外, $\cdot\text{OH}$ 氧化还提高了

GSPI 凝胶的弹性、黏聚性和回复性，但受 H_2O_2 浓度影响较小（图 4b）。

2.5 形貌和微观结构分析

图 5 为不同氧化程度处理的 GSPI 凝胶的实物图和 SEM 图。

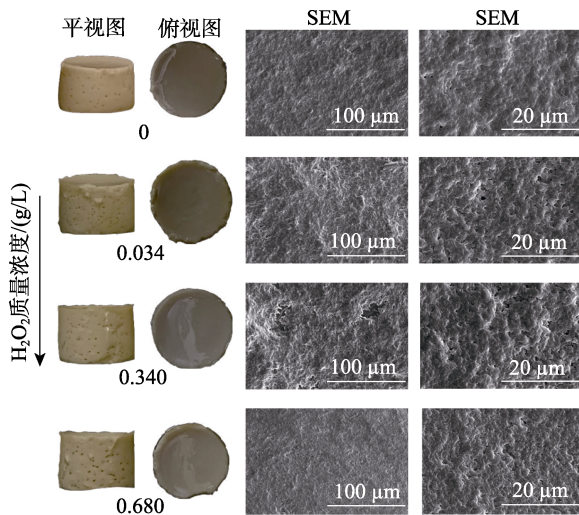


图 5 不同质量浓度 H_2O_2 氧化的 GSPI 凝胶实物图和 SEM 图

Fig. 5 Photos and SEM images of GSPI gels oxidized by H_2O_2 with various mass concentrations

从图 5 可以看出，在外貌和结构组织上，氧化与未氧化的 GSPI 凝胶有明显的差异。未氧化 GSPI 凝胶明显塌陷，而氧化后的 GSPI 凝胶变得更加坚挺，表面有许多小孔，凝胶表面变得更加光滑。从 SEM 图也可以看出，未氧化 GSPI 呈颗粒状，表面光滑有微小孔径。氧化后的 GSPI 颗粒聚集，逐渐变成细链凝胶网络，GSPI 凝胶呈现出明显的团聚和由连续的蛋白质聚集体组成的粗糙表面结构，并且随着 H_2O_2 质量浓度的增加，凝胶孔径结构逐渐变得更致密。这与 ZHANG 等^[32]研究结果一致，即随着 H_2O_2 质量浓度的增加，肌原纤维蛋白凝胶网络的致密度增加。

2.6 持水性和溶胀比分析

图 6 为不同氧化程度处理的 GSPI 凝胶的持水性和溶胀比。

持水性可以评估蛋白质凝胶结构截留水分子的能力，反映蛋白质与水分子之间的相互作用，是凝胶的重要功能特性^[33]。从图 6 可以看出，随着 H_2O_2 质量浓度的增加，GSPI 凝胶的持水性不断增加。这是因为，热诱导凝胶的持水性依赖于化学力，如交联、疏水相互作用和氢键等^[34]， H_2O_2 处理导致 GSPI 结构的去折叠和蛋白质间相互作用的改变，促进了蛋白质交联形成致密的凝胶网络，从而影响 GSPI 凝胶的持水性。

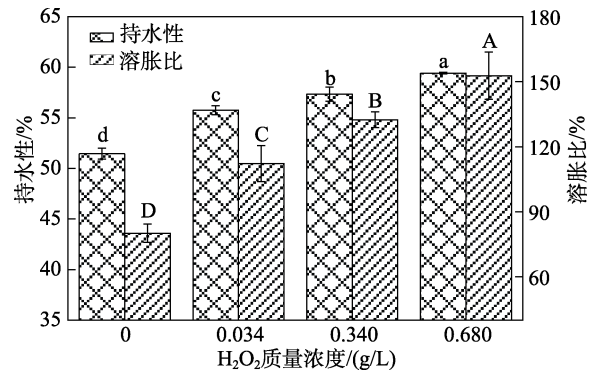


图 6 H_2O_2 质量浓度对 GSPI 凝胶持水性和溶胀比的影响
Fig. 6 Effect of H_2O_2 mass concentration on water holding capacity and swelling ratio of GSPI gels

凝胶是一种三维聚合物网络，具有捕获大量水的能力。从图 6 还可以看出，随着 H_2O_2 质量浓度的增加，凝胶的溶胀比显著增大，表明 $\bullet OH$ 氧化有利于提高凝胶的吸水率。文献^[35]报道，凝胶网络的孔径与体系中聚合物的溶胀特性有关。 H_2O_2 的加入使凝胶网络中的小孔数量增加，水分子渗透性增强，这是导致蛋白凝胶溶胀比提高的主要原因；此外，可能还与蛋白凝胶中氢键作用的弱化有关。

2.7 拉曼光谱分析

图 7 为不同氧化程度处理的 GSPI 凝胶的拉曼光谱和蛋白二级结构占比。

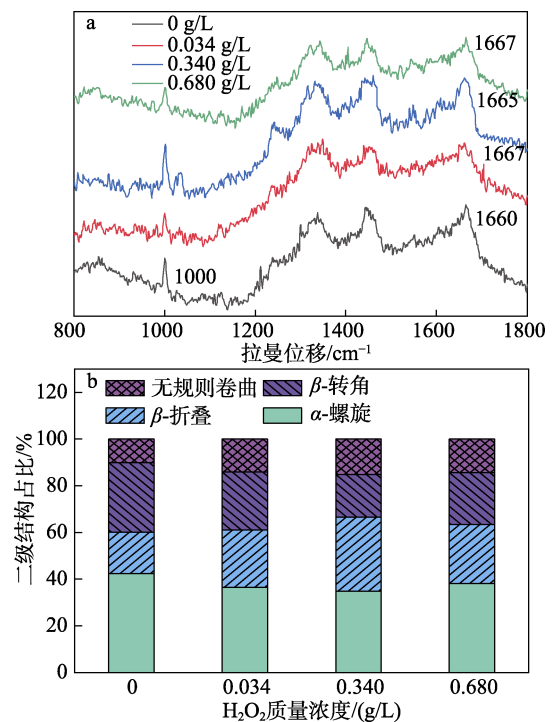


图 7 不同质量浓度 H_2O_2 氧化的 GSPI 凝胶的拉曼光谱 (a) 和蛋白二级结构占比 (b)

Fig. 7 Raman spectra (a) and distribution of secondary structure (b) of GSPI gels oxidized by H_2O_2 with various mass concentrations

通过分析拉曼光谱峰的位置、强度和形状, 可以了解蛋白质的结构特征^[36]。蛋白质的二级结构通过酰胺 I 带 ($1600\sim 1700\text{ cm}^{-1}$) 拉曼光谱进行评估, 主要存在以下 4 种不同的蛋白质二级结构: α -螺旋 ($1646\sim 1664\text{ cm}^{-1}$)、 β -折叠 ($1615\sim 1637$ 和 $1682\sim 1700\text{ cm}^{-1}$)、 β -转角 ($1664\sim 1681\text{ cm}^{-1}$)、无规则卷曲 ($1637\sim 1645\text{ cm}^{-1}$)^[37]。从图 7a 可以看出, $\bullet\text{OH}$ 氧化处理使 GSPI 凝胶光谱的峰值和位置都发生了不同程度的改变, 表明蛋白质-蛋白质和蛋白质-水之间的氢键发生了变化, 导致酰胺 I 区主带的中心向更高的拉曼位移移动。

与未氧化 GSPI 相比, 氧化后的 GSPI 中的 α -螺旋结构降低, β -折叠结构增加。这是因为, 氧化导致了蛋白质中半胱氨酸残基形成二硫键, 这种交联反应可能促使蛋白质之间更倾向于形成稳定的 β -折叠结构。XIAO 等^[17]研究表明, 凝胶的持水性和质构特性与 β -折叠结构呈正相关, 与 α -螺旋结构呈负相关。因此, 结果表明, H_2O_2 处理可以影响 GSPI 的二级结构, 加速蛋白质的变性和展开, 改善凝胶的质构特性, 促进其形成更好的凝胶网络结构^[38]。

2.8 共分子间的相互作用分析

图 8 为不同氧化程度处理对 GSPI 分子间作用力的影响。

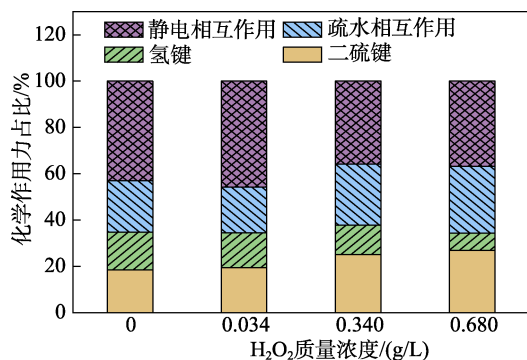


图 8 H_2O_2 质量浓度对 GSPI 凝胶分子间相互作用力的影响
Fig. 8 Effect of H_2O_2 mass concentration on intermolecular interaction of GSPI gels

分子间作用力在凝胶网络的形成和质构特性中起重要作用, 这些特性由 GSPI 在不同溶液中的蛋白溶解度决定^[39]。从图 8 可以看出, 随着 H_2O_2 质量浓度的增加, 氧化作用增强, GSPI 凝胶的疏水相互作用和二硫键含量增加, 而静电相互作用和氢键含量降低。这是因为, $\bullet\text{OH}$ 氧化引起巯基向二硫键的转变, 导致蛋白的聚集和交联, 蛋白质中疏水区域更多地暴露在外部环境中, 更容易形成疏水核心^[40]。同时, $\bullet\text{OH}$ 氧化引起蛋白质中氨基酸残基的氧化或改变, 导致带电残基的减少或丧失, 从而降低了静电相互作用。

3 结论

采用加入不同质量浓度 H_2O_2 的 Fenton 试剂构建 $\bullet\text{OH}$ 生成体系, 探究 GSPI 在此体系处理后的结构和凝胶特性。

(1) 随着 H_2O_2 质量浓度的增加, GSPI 分子中的 α -螺旋在蛋白二级结构中转化为 β -折叠, 分子内的疏水性基团暴露, 疏水相互作用增加, 巯基氧化形成二硫键, 促进蛋白质之间的交联。SDS-PAGE 中可以还原的高相对分子质量条带同样表明蛋白质通过二硫键和部分非还原键交联。

(2) $\bullet\text{OH}$ 氧化引起的微观结构、水化特性及二级结构的变化共同导致了 GSPI 力学性能的变化。适度的氧化 (H_2O_2 质量浓度 $0.034\sim 0.340\text{ g/L}$) 可以促进二硫键的形成, 从而提高 GSPI-HA 凝胶的力学性能和持水性, 但过度氧化 (H_2O_2 质量浓度 $\geq 0.680\text{ g/L}$) 会导致蛋白质的过度交联, 抑制蛋白中其他功能团的作用, 导致凝胶机械强度的下降。

本文为进一步阐明氧化作用对 GSPI 的影响提供了实验基础, 可促进 GSPI 在工业生产中的应用。

参考文献:

- ZHANG W, LIU C Q, ZHAO J, *et al.* Alkali-induced phenolic acid oxidation enhanced gelation of ginkgo seed protein[J]. *Foods*, 2023, 12(7): 1506.
- GORISSEN S H, CROMBAG J J, SENDEN J M, *et al.* Protein content and amino acid composition of commercially available plant-based protein isolates[J]. *Amino Acids*, 2018, 50(12): 1685-1695.
- ZHANG L Y (张露妍), GUO F X (郭凤仙), YOU J Y (尤洁瑜), *et al.* γ -Aminobutyric acid and L-citrulline enhancing the gelation performance of *Ginkgo biloba* seed protein isolate[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2023, 40(12): 2731-2738.
- ABE C, MIYAZAWA T, MIYAZAWA T. Current use of Fenton reaction in drugs and food[J]. *Molecules*, 2022, 27(17): 5451.
- HELLWIG M. The chemistry of protein oxidation in food[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2019, 58(47): 16742-16763.
- XIONG Y L, BLANCHARD S P, OIZUMI 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.
- LI D Y, TAN Z F, LIU Z Q, *et al.* Effect of hydroxyl radical induced oxidation on the physicochemical and gelling properties of shrimp myofibrillar protein and its mechanism[J]. *Food Chemistry*, 2021, 351: 129344.
- 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.
- XU J, CHEN Z J, HAN D, *et al.* Structural and functional properties changes of β -conglycinin exposed to hydroxyl radical-generating systems[J]. *Molecules*, 2017, 22(11): 1893.
- XIONG Y L, GUO A Q. Animal and plant protein oxidation: Chemical and functional property significance[J]. *Foods*, 2020, 10(1): 40.
- ZHANG W W, LIU C Q, ZHAO J, *et al.* Modification of structure and functionalities of ginkgo seed proteins by pH-shifting treatment [J]. *Food Chemistry*, 2021, 358: 129862.
- WANG Y, XIONG Y L, RENTFROW G K, *et al.* Oxidation

- promotes cross-linking but impairs film-forming properties of whey proteins[J]. *Journal of Food Engineering*, 2013, 115(1): 11-19.
- [13] ZHANG Y, ZHANG Z, FU Y, *et al.* Effects of different pH on properties of heat-induced *Auricularia auricula-judae* polysaccharide-whey protein isolate composite gels[J]. *Food Structure*, 2023, 36: 100317.
- [14] WANG Y S, LIU C Q, MA T Y, *et al.* Physicochemical and functional properties of γ -aminobutyric acid-treated soy proteins[J]. *Food Chemistry*, 2019, 295: 267-273.
- [15] YOU J Y (尤洁瑜), TANG C B (唐长波), ZHANG L Y (张露妍), *et al.* Effect of ultrasound combined with pH adjustment on gelling properties of ginkgo seed protein isolate/whey protein isolate composite gels[J]. *Food Science (食品科学)*, 2023, 44(21): 90-97.
- [16] MIN C, ZHANG C, CAO Y G, *et al.* Rheological, textural, and water-immobilizing properties of mung bean starch and flaxseed protein composite gels as potential dysphagia food: The effect of *Astragalus* polysaccharide[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 239: 124236
- [17] XIAO Y Q, LI J M, LIU Y N, *et al.* Gel properties and formation mechanism of soy protein isolate gels improved by wheat bran cellulose[J]. *Food Chemistry*, 2020, 324: 126876.
- [18] WANG Y S (王耀松), ZHANG W W (张唯唯), MA T Y (马天怡), *et al.* Functional properties of basic amino acids modified whey protein-based gels[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2020, 37(9): 1883-1889.
- [19] LI Y, CAI M S, MA S Q, *et al.* Heat-induced gel formation by whey protein isolate-deacetylated konjac glucomannan at varying pH conditions[J]. *Food Hydrocolloids*, 2023, 145: 109076.
- [20] MA W H, YUAN F, FENG L, *et al.* *e*-Polylysine-mediated enhancement of the structural stability and gelling properties of myofibrillar protein under oxidative stress[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 220: 1114-1123.
- [21] LI Y, LI X, WANG J Z, *et al.* Effects of oxidation on water distribution and physicochemical properties of porcine myofibrillar protein gel[J]. *Food Biophysics*, 2014, 9: 169-178.
- [22] ZHANG D, LI H J, EMARA A, *et al.* Effect of *in vitro* oxidation on the water retention mechanism of myofibrillar proteins gel from pork muscles[J]. *Food Chemistry*, 2020, 315: 126226.
- [23] LI H, WANG T, SU C X, *et al.* Effect of ionic strength on the sequential adsorption of whey proteins and low methoxy pectin on a hydrophobic surface: A QCM-D study[J]. *Food Hydrocolloids*, 2022, 122: 107074.
- [24] WEN R X, HU Y Y, ZHANG L, *et al.* Effect of NaCl substitutes on lipid and protein oxidation and flavor development of Harbin dry sausage[J]. *Meat Science*, 2019, 156: 33-43.
- [25] MA W H, YANG Q, FAN X, *et al.* Modification of myofibrillar protein gelation under oxidative stress using combined inulin and glutathione[J]. *Food Chemistry: X*, 2022, 14: 100318.
- [26] CHENG J R, LIN Y S, TANG D B, *et al.* Structural and gelation properties of five polyphenols-modified pork myofibrillar protein exposed to hydroxyl radicals[J]. *LWT*, 2022, 156: 113073.
- [27] CAI Q Y, ZHONG Y L, XU M L, *et al.* 3D printed high oil custard cream: Effects of whey protein isolate, hydroxypropylated starch and carrageenan on physicochemical properties and printing performance [J]. *LWT*, 2022, 156: 113039.
- [28] REN Z Y, LI Z M, CHEN Z Z, *et al.* Characteristics and application of fish oil-in-water Pickering emulsions structured with tea water-insoluble proteins/ κ -carrageenan complexes[J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 114: 106562.
- [29] SCHLANGEN M, RIBBERINK M A, TAGHIAN D S, *et al.* Mechanical and rheological effects of transglutaminase treatment on dense plant protein blends[J]. *Food Hydrocolloids*, 2023, 136: 108261.
- [30] ZHENG Y, ZHANG L, QIU Z H, *et al.* Comparison of oxidation extent, structural characteristics, and oxidation sites of myofibrillar protein affected by hydroxyl radicals and lipid-oxidizing system[J]. *Food Chemistry*, 2022, 396: 133710.
- [31] PAN J F, WANG Y J, XIA L N, *et al.* Physicochemical and rheological properties of oxidized Japanese seerfish (*Scomberomorus niphonius*) myofibrillar protein[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2019, 43(12): e13079.
- [32] ZHANG M, HE L C, WANG Y B, *et al.* Excessive free radical grafting interferes with the macromolecular association and crystallization of brined porcine myofibrils during heat-set gelatinization[J]. *Food Research International*, 2024, 175: 113709.
- [33] ZHANG H W (张昊伟), WU J (伍娟), XIN M Y (辛孟瑶), *et al.* Gelation properties of whey protein isolate and potato protein hydrolysate composite gel after ultrasound and transglutaminase treatments[J]. *Modern Food Science and Technology (现代食品科技)*, 2023, 39(8): 148-155.
- [34] JIANG Y, LI D H, TU J C, *et al.* Mechanisms of change in gel water-holding capacity of myofibrillar proteins affected by lipid oxidation: The role of protein unfolding and cross-linking[J]. *Food Chemistry*, 2021, 344: 128587.
- [35] FENG L P, JIA X, ZHU Q M, *et al.* Investigation of the mechanical, rheological and microstructural properties of sugar beet pectin/soy protein isolate-based emulsion-filled gels[J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 89: 813-820.
- [36] ZHU X S, ZHANG J X, LIU S H, *et al.* Relationship between molecular structure and heat-induced gel properties of duck myofibrillar proteins affected by the addition of pea protein isolate [J]. *Foods*, 2022, 11(7): 1040.
- [37] ZHANG S T, HUANG W J, FEIZOLLAHI E, *et al.* Improvement of pea protein gelation at reduced temperature by atmospheric cold plasma and the gelling mechanism study[J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2021, 67: 102567.
- [38] HE M Y, ZHANG M, GAO T, *et al.* Assembly of soy protein-corn starch composite gels by thermal induction: Structure, and properties [J]. *Food Chemistry*, 2024, 434: 137433.
- [39] WANG S N (王思念), WU J (伍娟), LI K F (李堃芳), *et al.* Properties and microstructure of potato/whey protein mixed gels[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2022, 39(12): 2541-2549.
- [40] WAN Y L, LI Y, GUO S T. Characteristics of soy protein isolate gel induced by glucono- δ -lactone: Effects of the protein concentration during preheating[J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 113: 106525.