

草鱼细胞微粒体脂肪氧化的研究

胡亚芹 薛长湖 谢江碧 姜凤英 林洪

(青岛海洋大学水产学院, 266003)

摘要 在草鱼红、白色肉分离出的微粒体中,同时存在脂肪的酶氧化和非酶氧化两种体系。酶氧化体系需要ATP或ADP和 Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 等因子的参与。高浓度的ADP对脂质氧化有抑制作用。 Fe^{2+} 比 Fe^{3+} 的催化作用强。红、白色肉细胞微粒体脂肪氧化最适pH值在6.0~7.0之间。高铁血红蛋白和肌红蛋白被过氧化氢激活后,能催化非酶氧化。在过氧化氢与血红素摩尔比为1:1时,催化效果最佳。

关键词 酶氧化,非酶氧化,微粒体,活化高铁血红蛋白

脂肪氧化是水产品发生腐败变质的主要原因之一。脂肪氧化会改变水产品质地、色泽和风味,降低其营养价值,甚至会产生有害人体的物质。现已测得,鱼死后,体内脂肪氧化一级产物为过氧化物,很不稳定,会继续氧化产生较为稳定的二级产物。通常以丙二醛含量(MDA值)来判断鱼体死后的脂肪氧化程度。

鱼肉细胞微粒体脂肪氧化机制目前研究较多的有两种:酶体系催化氧化和非酶体系催化氧化(以下简称“酶氧化”和“非酶氧化”)。酶氧化起主导作用的是还原型辅酶I(NADH)或还原型辅酶II(NADPH),辅助因子包括 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 及ADP等[Mcdonald和Hultin 1987]。非酶氧化主要是离体肌红蛋白和血红蛋白在过氧化氢的激发下,成为活化态,催化脂肪氧化[Decker和Hultin 1990],Lin和Hultin[1976],Player和Hultin[1977]。对鸡肉提取的细胞微粒体这一单层脂质膜体系的研究表明,酶氧化和非酶氧化同时存在,而且pH值和时间对脂肪氧化有着直接影响。他们同时发现沙丁鱼、鲑鱼等鱼肉微粒体的脂肪氧化体系。但对淡水鱼肉细胞微粒体的脂肪氧化还未见有报道。

本实验分别以草鱼红色肉、白色肉提取细胞微粒体作为实验对象,测定在酶氧化和非酶氧化条件下,脂肪氧化产生丙二醛的量,作为判定氧化程度的标准。实验目的是:(1)探讨草鱼红、白肉提取微粒体中是否同时存在酶氧化和非酶氧化两种机制;(2)研究两种氧化条件下各种因子的影响作用。

1 材料和方法

1.1 材料

市售活草鱼,体长 (30 ± 2) cm, (750 ± 50) g。

收稿日期:1997-03-28

1.2 细胞微粒体制备

将活鱼迅速处死, 去头、去皮、去内脏, 分别取红色肉、白色肉各 100g, 加 4 倍量缓冲液 A (0.12mol KCl+5mmol His pH6.8), 匀浆 90s, 于 4℃、17 600g 条件下离心 30min, 得上清液于 2℃、105 000g 条件下高速离心 60min, 沉淀用缓冲液 B (0.6mmol KCl+5mmol His pH6.8) 溶解, 于 105 000g 条件下再次离心 60min, 沉淀用缓冲液 A 溶解, 用考马氏亮蓝法比色测蛋白浓度[Marion 1976]。将微粒体浓度调至 0.5mg/mL 作为实验样品使用。

1.3 TBA 储备液的制备

以 0.25mol HCl 配制含 15% 三氯乙酸(TCA)+0.37% 硫代巴比妥酸(TBA)+0.06% 抗氧化剂(BHT), 用于中止脂肪氧化反应的进行[Buege 和 Aust 1987]。

1.4 草鱼肌肉细胞微粒体酶氧化产生 MDA 值的测定[Rhee 等 1984]

(1) 在 4mL 微粒体中添加 0.1mmol NADH、0.015mmol FeCl₃, 分别与 0、0.1、0.2、0.4、0.6mmol ADP 行成不同体系, 在 4℃ 放置反应 30min。各取 1mL 样品, 加 2mL TBA 储备液中中止反应, 置于沸水中, 加热 15min, 冷却后于 6 000g 条件下离心 7~8min, 取上清液在 532nm 处比色, 测其吸光值(吸光系数为 $E_{532}=1.56 \times 10^5 M^{-1} \cdot cm^{-1}$)。

(2) 在 4mL 微粒体中添加 0.1mmol NADH、0.1mmol ADP 分别与 0、0.01、0.015、0.02、0.03 mmol Fe³⁺ 形成不同体系, 测定方法同 1.4 中(1)。

(3) 在 4mL 微粒体中添加 0.1mmol NADH、0.1mmol ADP, 分别与 0、0.01、0.02、0.03、0.05 mmol Fe²⁺ 形成不同体系, 测定方法同 1.4 中(1)。

1.5 pH 值对草鱼细胞微粒体脂肪氧化影响的测定

在 4mL 微粒体中添加 0.1mmol NADH、0.1mmol ADP、0.015mmol Fe³⁺ 调节体系 pH 分别为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5。在 4℃ 放置反应 30min。取样测定, 方法同 1.4 中(1)。

1.6 草鱼肌肉细胞微粒体非酶氧化产生 MDA 值测定[Decker 和 Hultin 1990]

(1) 在 6mL 微粒体中, 添加 0.03mmol H₂O₂, 37℃ 恒温水浴保温, 于 0、5、10、20、30min 处, 分别取样 1mL, 加入 2mL TBA 储备液中中止反应, 置于沸水中, 加热 15min。冷却后, 于 6 000g 条件下离心 7~8min, 得上清液于波长 532nm 处比色, 测吸光值(吸光系数为 $E_{532}=1.56 \times 10^5 M^{-1} \cdot cm^{-1}$)。

(2) 在 6mL 微粒体中添加 0.03mmol H₂O₂, 0.03mmol Mb(肌红蛋白)37℃ 条件下保温一定时间, 测定方法同 1.6 中(1)。

(3) 在 6mL 微粒体中添加 0.03mmol H₂O₂, 0.03mmol MetHb(高铁血红蛋白)37℃ 条件下保温一定时间, 测定方法同 1.6 中(1)。

2 结果与讨论

本实验证实了草鱼肌肉细胞微粒体中存在着酶氧化和非酶氧化两种机制。据 Rhee 等 [1984] 研究表明, 酶氧化体系起主导作用的是 NADH 或 NADPH, 且 NADPH 比 NADH 的

催化效果要强得多。辅助因子包括 ADP、 Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 等。本实验着重研究了三类辅助因子的具体影响作用。

ADP 浓度对草鱼肌肉微粒体脂肪氧化影响的实验结果如图 1 所表示。将 ADP 浓度增加至 0.2mmol, MDA 值呈增加趋势, 表明脂肪氧化速率增强; 将 ADP 浓度从 0.2mmol 增至 0.4mmol, 则 MDA 值呈下降趋势, 表明脂肪氧化速率下降。这与 Slabyi 和 Hultin[1982] 从鲑鱼体内分离出的微粒体脂肪氧化相似。高浓度的 ADP 使氧化速率下降, 可能是由于铁离子和 ADP 浓度失衡所致。众所周知, EDTA 与铁离子的螯合物可产生自由基作为一种脂肪非酶催化因子, 而高浓度的 EDTA 则用来抑制脂肪氧化[Rhee 等 1984]。同样可以推测, ADP 与铁离子形成螯合物, 参与脂肪氧化, 高浓度的 ADP 与铁离子浓度失衡, 则对脂肪氧化产生相对抑制作用。

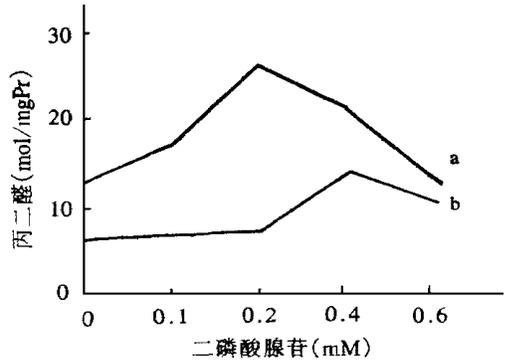


图 1 ADP 浓度对草鱼肌肉微粒体脂肪氧化的影响
Fig.1 Effect of ADP concentration on lipid peroxidation in grass carp muscle microsomes
a: 红色肉 b: 白色肉

Fe^{3+} 与 Fe^{2+} 浓度对草鱼肌肉微粒体氧化影响的实验结果见图 2、图 3。 Fe^{2+} 与 ADP 螯合后迅速介入反应, Fe^{3+} 只有被还原成 Fe^{2+} 后才与 ADP 螯合, 故 Fe^{2+} 比 Fe^{3+} 催化速率要快得多[Rhee 等 1984]。图 3 中, Fe^{2+} 浓度为 0.02mmol, 对应 MDA 值最大, 即脂肪氧化速率降低。 Fe^{2+} 浓度继续增至 0.05mmol 时, MDA 值有所下降, 即脂肪氧化速率降低。高浓度 Fe^{2+} 导致脂肪氧化程度减弱, 这可能是因为 Fe^{2+} 与 ADP 浓度失衡所致。

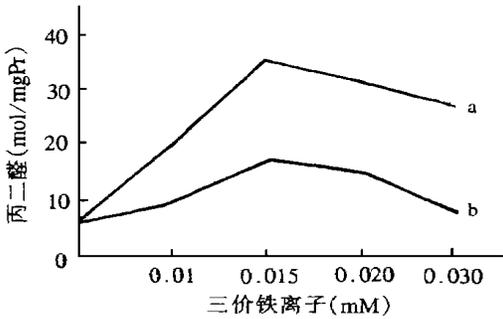


图 2 Fe^{3+} 浓度对草鱼肌肉微粒体脂肪氧化的影响
Fig.2 Effect of ferric ions at different concentrations on lipid peroxidation in grass carp muscle microsomes
a: 红色肉 b: 白色肉

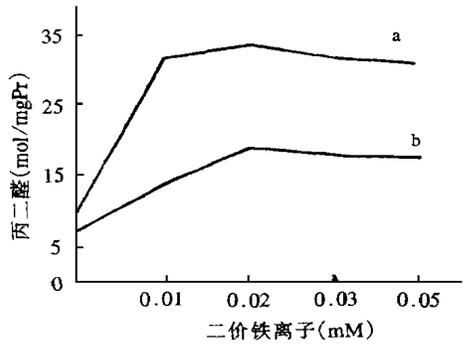


图 3 Fe^{2+} 浓度对草鱼肌肉微粒体脂肪氧化的影响
Fig.3 Effect of ferrous ions at different concentrations on lipid peroxidation in grass carp muscle microsomes
a: 红色肉 b: 白色肉

pH 值对草鱼微粒体脂肪氧化有不可忽视的影响(图 4)。在 pH 6.0~7.0 之间, MDA 值维持较高状态, 约 pH6.5 时达到最大, 表明 pH 6.0~7.0 是草鱼肌肉微粒体脂肪氧化最适范围, 这与牛肉为 pH 5.4~5.8、鸡肉为 pH 5.4~5.9 相差较大, 而与有鳍鱼类 pH 6.0~7.0 [Rhee 等 1984] 相近。

非酶氧化体系中, MetHb 与 Mb 只有被 H_2O_2 激活形成卟啉环阳离子自由基, 才能参与引发脂肪氧化反应。当 MetHb 或 Mb、 H_2O_2 单独作用于体系时, 无此能力[Decker 和 Hultin 1990]。肌红色素 Mb 被 H_2O_2 激活后能够高效催化脂肪氧化, 而 H_2O_2 本身却无此作用, 且随着时间的推移, 活化 Mb 的作用效果也逐渐增强(图 5)。

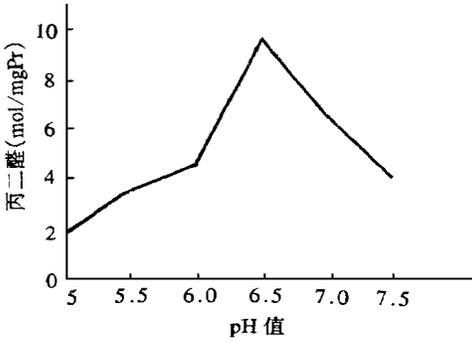


图 4 pH 对草鱼肌肉微粒体脂肪氧化的影响

Fig.4 Effect of pH on lipid peroxidation in grass carp muscle microsomes

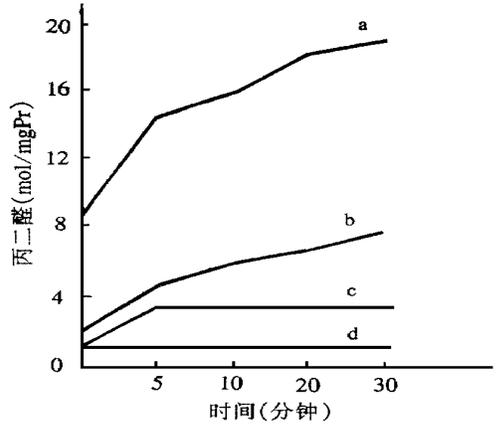


图 5 保温时间对草鱼肌肉微粒体脂肪氧化的影响

Fig.5 Effect of incubation time on lipid peroxidation in grass carp muscle microsomes

a: $H_2O_2 + Mb$ (红色肉) b: $H_2O_2 + Mb$ (白色肉)
 c: H_2O_2 (红色肉) d: H_2O_2 (白色肉)

MetHb 在被 H_2O_2 激活后, 可以催化草鱼微粒体脂肪氧化。在亚铁血红素与 H_2O_2 比大致在 1:1 时, MDA 值达到最高(图 6), 即催化效果达到最高。继续添加 MetHb 则氧化效果减弱, 可见, 并非 MetHb 浓度越高越好。

在草鱼肌肉微粒体体系中, 无论是酶氧化还是非酶氧化机制, 红色肉微粒体比白色肉微粒体的脂肪氧化程度要高。在图 1、2、3、5、6 中表现为红色肉微粒体脂肪氧化后 MDA 值要比同样条件下白色肉微粒体脂肪氧化 MDA 值高。红色肉又称“血合肉”, 比白色肉含有更多的脂肪、肌红色素, 而肌红色素中亚铁血红素卟啉环含量较高。Kanner 和 Harel[1985] 认为卟啉环阳离子自由基能够催化氧化许多分子, 如抗坏血酸、苯酚红、胡萝卜素和不饱和脂肪酸等。这是红色肉比白色肉更易氧化的原因之一。

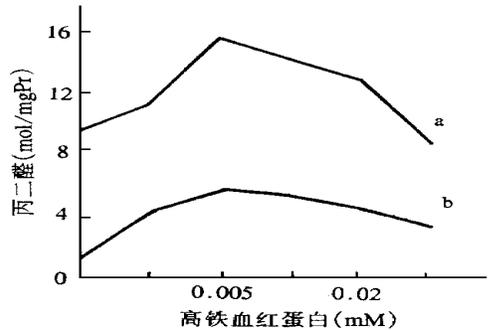


图 6 高铁血红蛋白对草鱼肌肉微粒体脂肪氧化的影响

Fig.6 Effect of MetHb concentrations on lipid peroxidation in grass carp muscle microsomes

a: $H_2O_2 + MetHb$ (红色肉) b: $H_2O_2 + MetHb$ (白色肉)

酶氧化机制和非酶氧化机制较为显著的差别在于酶氧化起主导作用的是 NADPH 或 NADH, 而 ADP、 Fe^{3+} 或 Fe^{2+} 等辅助因子共同参与催化脂肪氧化; 非酶氧化主要是由于卟啉环阳离子自由基引发脂肪氧化, 故, 含有卟啉环的如 MetHb 或 Mb 等都可被引发产生卟啉环阳离子自由基, 催化非酶氧化。

3 结论

在草鱼细胞微粒体内,酶氧化和非酶氧化两种机制都存在。非酶氧化体系 Mb 和 MetHb 被 H_2O_2 激活后,对脂肪氧化有催化作用。红色肉比白色肉更易氧化。细胞微粒体酶氧化受 ADP 、 Fe^{2+} 或 Fe^{3+} 的影响, Fe^{2+} 比 Fe^{3+} 催化作用要强。草鱼肌肉细胞微粒体脂肪氧化最适 pH 在 6.0~7.0 之间。

参 考 文 献

- Buege J A, Aust S D. 1987. Microsomal lipid peroxidation in "Methods In Enzymology". In: Fleischer S, Packer L, eds. New York: Academic Press. NY.
- Decker E A, Hultin H O. 1990. Nonenzymic catalysts of lipid oxidation in mackerel ordinary muscle. J Food Sci 55: 951~953.
- Kanner J, Harel S. 1985. Initiation of membranial lipid peroxidation by activated metmyoglobin and methemoglobin. Archives of Biochemistry and Biophysics, 237: 314~321.
- Lin T S, Hultin H O. 1976. Enzymic lipid peroxidation in microsomes of chicken skeletal muscle. J Food Sci 41: 1488~1490.
- Marion M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochem 72: 248~254.
- Medonald R E, Hultin H O. 1987. Some characteristics of the enzymic lipid peroxidation system in the microsomal fraction of flounder skeletal muscle. J Food Sci 52(1): 15~21.
- Player T J, Hultin H O. 1977. Some characteristics of the NAD(P)H-dependent lipid peroxidation system in the microsomal fraction of chicken breast muscle. J Food Biochem 1: 153~160.
- Rhee K S, Dutson T R, Smith G C. 1984. Enzymic Lipid peroxidation in microsomal fraction from beef skeletal muscle. J Food Sci 49: 675~679.
- Slabyi B M, Hultin H O. 1982. Lipid peroxidation by microsomal fractions isolated from light and dark muscles of herring (*Clupea harengus*). J Food Sci 47: 1395~1399.

A STUDY ON LIPID OXIDATION IN MICROSOMAL FRACTIONS OF *CTENOPRYNGODON IDELLUS* MUSCLE

HU Ya-Qin, XUE Chang-Hu, XIE Jiang-Bi, JIANG Feng-Ying, LIN Hong
(College of Fisheries, Ocean University of Qindao, 266003)

ABSTRACT Both enzymic and nonenzymic lipid oxidation existed in the microsomes isolated from muscle of grass carp. The experimental results showed that Fe^{3+} or Fe^{2+} ions were required for the enzymic lipid oxidation. The rate of oxidation was higher with Fe^{2+} than that with Fe^{3+} ions. The optimum pH for the reaction of both red and white muscle microsome was between 6.0 and 7.0. The interaction of H_2O_2 with Hb to form activated MetHb was able to initiate nonenzymic catalysis oxidation of lipid in microsomal fractions of both types of muscle. The strongest effect of peroxidation was observed when the ratio of heme group to H_2O_2 was nearly 1:1.

KEYWORDS Enzymic lipid oxidation, Nonenzymic lipid oxidation, Microsomal fraction, Activated MetHb