

# 牦牛肉肌原纤维蛋白在不同 pH 值条件下的分子结构变化

屈莎, 胡婷, 唐善虎, 李思宁, 郝刚\*

(西南民族大学食品科学与技术学院, 四川成都 610000)

**摘要:** 该研究以不同 pH 值下不同  $H_2O_2$  浓度的羟自由基氧化体系孵育 24 h 的牦牛肉肌原纤维蛋白为研究对象, 通过对羰基、巯基、二级结构、三级结构、十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳等指标分析, 探究不同 pH 值下氧化对牦牛肉肌原纤维蛋白分子结构的影响。结果表明: 不同 pH 值下随着  $H_2O_2$  浓度的增加, 羰基含量从最初的 27.2 nmol/mg 升至 36.44 nmol/mg (pH 值 5.0)、36.98 nmol/mg (pH 值 6.0)、33.64 nmol/mg (pH 值 7.0)、34.53 nmol/mg (pH 值 8.0), 表面疏水性从 383.64 (pH 值 5.0)、275.58 (pH 值 6.0)、245.21 (pH 值 7.0)、238.99 上升至 484.23、410.92、306.69、291.13, 总巯基含量从最初的 92.1 nmol/mg 左右降至 80.68 nmol/mg (pH 值 5.0)、78.72 nmol/mg (pH 值 6.0)、87.6 nmol/mg (pH 值 7.0)、86.28 nmol/mg (pH 值 8.0), 溶解度下降了 1.8 倍左右、内源荧光强度降低, 二级结构比例下降, 氧化后蛋白分子内部发生交联。随着 pH 值远离等电点, 羰基上升速率降低, 巯基、游离氨基下降速率降低, 溶解度、内源荧光强度增加, 疏水性降低, 靠近等电点的肌原纤维蛋白质具有较高的  $\beta$ -折叠结构和较低的  $\alpha$ -螺旋结构。试验表明在等电点附近, 肌原纤维蛋白的氧化程度更高。

**关键词:** 牦牛肉肌原纤维蛋白; 蛋白氧化; pH 值; 理化特性; 分子结构

文章编号: 1673-9078(2023)08-85-93

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.8.0904

## Molecular Structure Changes of Yak Myofibrillar Proteins via Protein Oxidation at Different pH Values

QU Sha, HU Ting, TANG Shanhu, LI Sining, HAO Gang\*

(College of Food Science and Engineering, Southwest Minzu University, Chengdu 610000, China)

**Abstract:** Myofibrillar proteins from yak meat were incubated for 24 h in a hydroxyl radical oxidation system with different  $H_2O_2$  concentrations at various pH values. By analyzing carbonyl, mercapto, secondary structure, tertiary structure, SDS-PAGE separation, and other indicators, the effects of oxidation at different pH values on the molecular structure of yak muscle myofibrillar proteins were investigated. The results show that with the increase of  $H_2O_2$  concentration at different pH values, the carbonyl content increases from the initial level of 27.2 nmol/mg to 36.44 nmol/mg (5.0), 36.98 nmol/mg (6.0), 33.64 nmol/mg (7.0), and 34.53 nmol/mg (8.0), whereas the surface hydrophobicity increases from 383.64 (5.0), 275.58 (6.0), 245.21 (7.0), and 238.99 to 484.23, 410.92, 306.69, and 291.13, respectively. Moreover, the total mercapto content decreases from the initial level of 92.1 nmol/mg to 80.68 nmol/mg (5.0), 78.72 nmol/mg (6.0), 87.6 nmol/mg (7.0), and 86.28 nmol/mg (8.0). The solubility was reduced by 1.8 times, and the endogenous fluorescence intensity dropped. The proportion of secondary structures decreased. After oxidation, cross-linking was observed within the protein molecules. As the pH value is farther away from the isoelectric point, the increased rate of the carbonyl content was reduced, whereas the decline rate of the sulfhydryl and free amino contents decreased. Meanwhile, the solubility and endogenous fluorescence intensity increased, and the hydrophobicity decreased. Myofibril proteins close to the isoelectric point have more  $\beta$ -pleated sheet structures and fewer  $\alpha$ -helix structures. The results

引文格式:

屈莎, 胡婷, 唐善虎, 等. 牦牛肉肌原纤维蛋白在不同 pH 值条件下的分子结构变化[J]. 现代食品科技, 2023, 39(8): 85-93

QU Sha, HU Ting, TANG Shanhu, et al. Molecular structure changes of yak myofibrillar proteins via protein oxidation at different pH values [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(8): 85-93

收稿日期: 2022-07-18

基金项目: 西南民族大学研究生创新型科研项目 (ZD2022381)

作者简介: 屈莎 (1997-), 女, 硕士生, 研究方向: 畜产品加工与安全, E-mail: 2227514816@qq.com

通讯作者: 郝刚 (1978-), 博士, 副教授, 研究方向: 蛋白质化学研究, E-mail: indianahg@hotmail.com

demonstrate that myofibrillar proteins have a higher degree of oxidation near the isoelectric point.

**Key words:** yak meat myofibrillar proteins; protein oxidation; pH value; physical and chemical properties; molecular structure

蛋白质氧化被认为是食品变质的原因之一,它对食品质量的影响包括嫩度降低、变色和风味劣变,普遍存在于肉及肉制品加工与储藏过程中。蛋白氧化不仅会导致蛋白分子间和分子内的共价交联,还会引起蛋白主链断裂和氨基酸残基侧链基团的修饰,进而引起蛋白质功能性质如凝胶特性、界面性质及保水性发生改变<sup>[1]</sup>。肉及肉制品中的蛋白质氧化反应主要由活性促氧化物质(如活性氧物质、活性氮物质、脂类次级氧化产物及内源性氧化酶等)直接或间接地诱导发生。从而导致蛋白质结构性质的改变,包括通过非共价和共价分子间相互作用的断裂、交联聚集。活性氧(ROS)倾向于攻击蛋白质,以促进功能和巯基的丧失。氧化蛋白的其他变化包括羰基衍生物的形成、蛋白质的去折叠、表面疏水性的增加和构象的变化。在ROS中,羟基自由基分子量子小,易于扩散,氧化能力强,是引起肌肉中脂肪和蛋白氧化的主要发起者,它是在过氧化氢、还原过渡金属和细胞还原剂存在下通过羟自由基(Fenton)反应形成的<sup>[2]</sup>。

pH值不仅是影响肌原纤维蛋白(MP)萃取效率的因素,也是引起蛋白构象改变的主要条件之一。pH值可以通过改变氨基酸侧链电荷的数量及分布,改变蛋白质分子间的相互作用及蛋白质分子的折叠状态,从而引起蛋白质空间结构的改变,最终影响着蛋白质的各种功能性质<sup>[3]</sup>。

牦牛分布在中国青藏高原海拔3 000 m以上地区,被誉为“高原之舟”,具有高蛋白、低脂肪、丰富的氨基酸等优点,但在其加工储藏运输过程中受环境影响易发生蛋白氧化。pH值是影响蛋白质变化最为重要的因素之一,但目前研究多是pH值对大豆分离蛋白<sup>[4]</sup>、乳清蛋白<sup>[5]</sup>、羔羊<sup>[6]</sup>、猪肉<sup>[7]</sup>等特性的研究,对于牦牛肉的研究甚少,因此本研究在之前研究的基础上模拟酸性、中性、碱性条件下,建立了羟基自由基氧化体系(Fenton体系),从分子结构方面探究在不同pH值下不同H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度对牦牛肉MP理化特性的影响,充分挖掘蛋白氧化机理及本质,以期为进一步研究肉及肉制品中蛋白质氧化的相关性提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

牦牛肉购于四川省阿坝州,宰杀后冷却排酸,快速冷冻后低温运回实验室-20℃保存。

EGTA(乙二醇双(2-氨基乙基酸)四乙酸)、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O、2,4-二硝基苯肼(DNPH)、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O、抗坏血酸、EDTA(乙二胺四乙酸)、三氯乙酸,成都科隆化学品有限公司;盐酸胍、Tris,德国BioFroxx公司;5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB),上海源叶生物;2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS),成都化夏化学;所有试剂都为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

5804R冷冻离心机,德国Eppendorf公司;T-25高速匀浆机,德国IKA公司;UV1810S紫外分光光度计,上海佑科仪器仪表有限公司;F-4700型荧光分光光度计,日本那珂事务所;ASD Field Spec Pro FR傅里叶变换红外色谱,美国Boulder公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 肌原纤维蛋白(MP)的提取

参考Park等<sup>[8]</sup>的方法从牦牛背最长肌中分离提取肌原纤维蛋白,最终得到的沉淀MP于4℃冰箱中保存,48 h内使用。蛋白质质量浓度用双缩脲法进行测定,牛血清白蛋白为标准蛋白( $y=0.0481x+0.0012$ ,  $R^2=0.9997$ )。

#### 1.3.2 肌原纤维蛋白氧化模型构建

参考Xiong等<sup>[9]</sup>的方法略作修改,将肌原纤维蛋白用15 mmol/L PIPES(0.6 mol/L NaCl, pH值6.0)溶解后质量浓度为10 mg/mL的MP分散于Fenton氧化体系(0.01 mmol/L FeCl<sub>3</sub>, 0.1 mmol/L 抗坏血酸, 5、10、15、20、40、60 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)中,用NaOH和HCl调节所需pH值(5.0、6.0、7.0、8.0),于4℃下氧化24 h,以1 mmol/L EDTA(最终浓度)终止氧化。对照组用去离子水代替H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。氧化结束后确定MP的pH值为5.0、6.0、7.0、8.0。

#### 1.3.3 羰基的测定

羰基含量的测定参照Oliver等<sup>[10]</sup>的方法,使用2,4-二硝基苯肼(DNPH)反应方法进行测定。羰基含量表示为nmol/mg pro。

$$C = \frac{A_1}{c \times D \times 22000} \times 10^6 \times n \quad (1)$$

式中:

C——羰基含量, nmol/mg pro;

A<sub>1</sub>——样品吸光值;

c——MP质量浓度, mg/mL;



$D$ ——比色光径, cm;

$n$ ——稀释倍数。

### 1.3.4 巯基的测定

总巯基和游离巯基参考 Ellman<sup>[11]</sup>的方法, 采用 DTNB 法进行测定。巯基含量 (nmol/mg pro) 使用摩尔吸光系数 13 600 L/(mol·cm) 计算。

$$S = \frac{A_2}{c \times 13600} \times 10^6 \times n \quad (2)$$

式中:

$S$ ——巯基含量, nmol/mg pro;

$A_2$ ——样品吸光度;

$c$ ——MP 质量浓度, mg/mL;

$n$ ——稀释倍数。

### 1.3.5 游离氨基测定

参考吴伟<sup>[12]</sup>的方法, 略作修改。将一定量的肌原纤维蛋白液分散于含 1% (m/V) SDS, 0.1 mol/L pH 值 9.3 的四氢硼酸钠缓冲液中, 搅拌 1 h 后 8 000 g 离心 20 min, 取 2 mL 上清液与 100  $\mu$ L 0.03 mol/L TNBS 混匀后在 37  $^{\circ}$ C 保温 1 h, 反应结束后加入 0.5 mol/L HCl 调节 pH 值至 4.0, 在 335 nm 波长下测定其吸光度值, 代入甘氨酸标准曲线 ( $y=0.0095x-0.0012$ ,  $R^2=0.9992$ ), 求其游离氨基。

### 1.3.6 溶解度的测定

参考 Peyrano 等<sup>[13]</sup>的方法, 将 1 mg/mL 的 MP 样液离心 (4  $^{\circ}$ C, 5 000 g, 10 min), 用双缩脲法测定其上清液的蛋白浓度。溶解度表示以离心前后蛋白质质量浓度的比值来表示。

### 1.3.7 表面疏水性的测定

表面疏水性测定参考简华君<sup>[14]</sup>的方法, 用 1-苯氨基萘-8-磺酸 (ANS) 作为荧光探针对表面疏水性进行测定的, 在激发波长 374 nm, 发射波长 484 nm 条件下测定荧光强度。后以相对荧光强度为纵坐标, 蛋白浓度为横坐标作图, 初始斜率即为肌原纤维蛋白质溶液的表面疏水指数。

### 1.3.8 内源荧光测定

参考 Jiang 等<sup>[15]</sup>的方法适当修改测定蛋白内源荧光光谱。用与蛋白 pH 值相对应的磷酸盐缓冲液 (20 mmol/L, pH 值 5.0、6.0、7.0、8.0) 调节肌原纤维蛋白浓度至 0.5 mg/mL, 在激发波长 295 nm 条件下, 测定色氨酸在 300~400 nm 间的荧光光谱。

### 1.3.9 傅里叶红外光谱测定

参考 Kang 等<sup>[16]</sup>的方法, 略作修改。将氧化后的蛋白真空冷冻干燥机中冷冻干燥后, 用傅立叶红外光谱仪测定。结果用 Peak fit 4.0 软件分析 1 600~1 700  $\text{cm}^{-1}$  的图谱。

### 1.3.10 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

参考 Xiong 等<sup>[17]</sup>的方法, 略作修改。将蛋白质量浓度调至 1.0 mg/mL, 与 5 $\times$ 上样缓冲液混合 (蛋白: 上样缓冲液=4:1, V/V), 水浴 5 min 冷却至室温, 离心 (10 000 g, 10 min), 取上清液用于电泳分析。样品上样体积 10  $\mu$ L, 分离胶浓度 12%, 浓缩胶浓度 5%, 电极缓冲液为 Tris-甘氨酸缓冲液 (0.05 mol/L Tris, 0.384 mol/L 甘氨酸, 0.1% SDS (V/V, pH 值 8.3))。电泳结束后用考马斯亮蓝 R-250 染色, 用洗脱液 (10% 乙醇, 10% 冰醋酸, V/V) 进行脱色。

### 1.3.11 数据分析

数据处理和差异显著性分析分别采用 Excel 进行数据分析, SPSS 软件中的 Duncan 比较进行显著性水平分析, 绘图采用 Origin 软件进行, 所有实验均进行三次平行。

## 2 结果与分析

### 2.1 蛋白氧化对牦牛肉 MP 羰基含量的影响

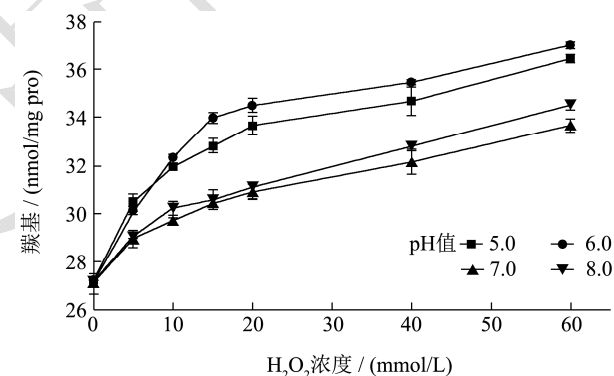


图1 不同 pH 值 (5.0、6.0、7.0、8.0) 下不同 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度对 MP 羰基含量的影响

Fig.1 Effect of different H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration on carbonyl of MP at different pH values (5.0, 6.0, 7.0, 8.0)

如图 1 所示, 随着 MP 中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度的升高, 羰基含量增加, 与对照组相比, 羰基含量增加显著 ( $P<0.05$ ), 但 10~15 mmol/L、15~20 mmol/L、40~60 mmol/L 之间羰基含量不显著 ( $P>0.05$ ), 蛋白氧化产生的羰基可与其他蛋白分子的氨基 (赖氨酸残基的  $\epsilon$ -氨基) 发生席夫碱反应使蛋白间产生共价交联, 因此蛋白氧化过程中羰基在不断产生的同时也在一定程度上消耗<sup>[18]</sup>。pH 值对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度为 5 mmol/L 的 MP 羰基含量无显著影响 ( $P>0.05$ ), 随着 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度的加深, pH 值 7.0、8.0 时 (远离肌原纤维蛋白等电点 (pI, 5.0~5.5)<sup>[19]</sup>) 羰基含量上升速率明显低于 pH 值 5.0、6.0 (pI 附近) 的羰基增速, 尤其是 pH 值 6.0, 说明

在同等氧化条件下,等电点附近的 MP 更易受羟自由基 ( $\cdot\text{OH}$ ) 攻击导致蛋白主肽链断裂。

## 2.2 蛋白氧化对牦牛肉 MP 巯基的影响

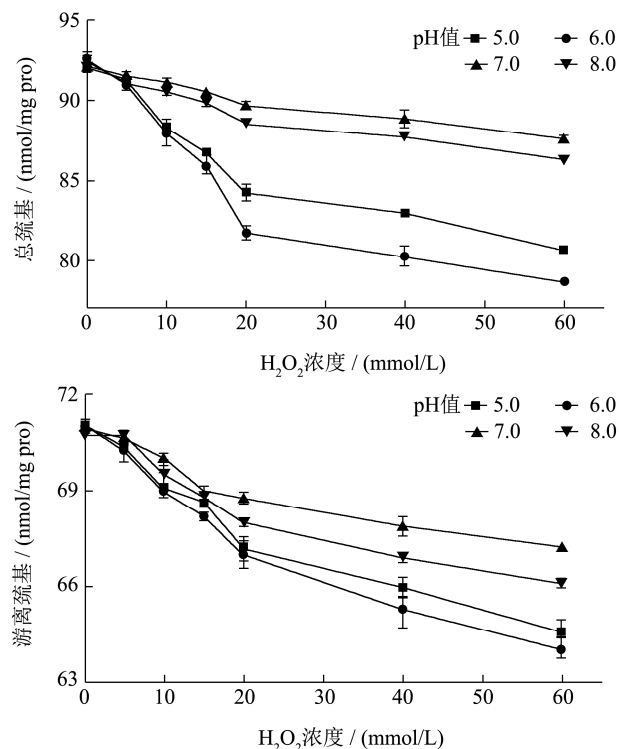


图2 不同 pH 值下不同  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度对 MP 于巯基含量的影响

Fig.2 Effect of different  $\text{H}_2\text{O}_2$  degree on MP sulfhydryl under different pH values

半胱氨酸的巯基是对氧化最敏感的蛋白侧链基团之一,是 MP 中一个关键的活性官能团,微环境的变化诱导蛋白质结构的展开可以暴露半胱氨酸残基,最终导致二硫键的形成进一步导致蛋白分子聚集,因此巯基是除羰基外另一个衡量蛋白氧化的重要指标<sup>[20]</sup>。如图 2 所示,随着蛋白氧化程度的加深,总巯基含量降低显著 ( $P<0.05$ ),同时,随着  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度的增加,游离巯基显著降低 ( $P<0.05$ )。氧化后,总巯基和游离巯基显著低于对照组,表明牦牛肉 MP 巯基对羟基自由基敏感。巯基氧化可分为可逆状态(二硫键结合和次磺酸)和不可逆状态(亚硫酸盐和磺酸)<sup>[12]</sup>,在同等氧化条件下,pH 值为 7.0、8.0 时(远离 pI),MP 总巯基下降的绝对值大于游离巯基下降的绝对值,表明蛋白氧化使得 MP 二硫键含量下降,即 MP 巯基被氧化成不可逆状态,形成了含硫化合物。而 pH 值为 5.0、6.0 时(pI 附近),MP 游离巯基下降的绝对值大于总巯基下降的绝对值,表明蛋白氧化使得 MP 二硫键含量上升,说明游离巯基氧化成二硫键的量大于二硫键转化成不可逆氧化状态的量。在酸性条件下巯基下降速率大于在碱性条件下,这表明酸处理的蛋白更容易通过硫醇

-二硫化物交换反应在分子间形成新的二硫键<sup>[21]</sup>。

## 2.3 蛋白氧化对牦牛肉 MP 游离氨基的影响

游离氨基是用来反映蛋白氧化程度的常用指标。如图 3 所示随着  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度的增加,游离氨基含量显著降低 ( $P<0.05$ ),当 MP 中  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度达到 60 mmol/L 时,游离氨基大约是对照组的一半。蛋白氧化产生的羰基会与蛋白质的氨基反应形成席夫碱,导致蛋白分子中游离氨基下降;肉制品中脂肪氧化产物烯醛类物质可以与半胱氨酸、赖氨酸残基、组氨酸发生迈克尔加成反应,导致蛋白中游离氨基的下降;当氧化引起蛋白共价交联形成聚集体时,由于氨基包裹在聚集体内部而未被试剂检测到,这也会造成游离氨基量的下降<sup>[22]</sup>。随着氧化条件的加强,pH 值 7.0、8.0 时(远离 pI)游离氨基下降速率明显低于 pH 值 5.0、6.0 时(pI 附近),pH 值为 6.0 时 MP 氧化程度最深,这一结果与羰基结果相吻合。

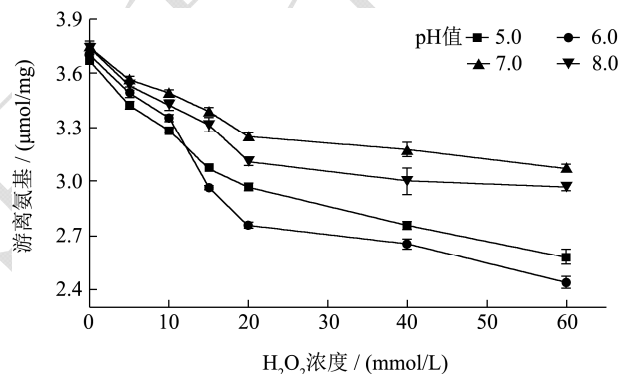


图3 不同 pH 值下不同  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度对 MP 游离氨基的影响

Fig.3 Effects of different  $\text{H}_2\text{O}_2$  levels on MP free amino groups at different pH values

## 2.4 蛋白氧化对牦牛肉 MP 溶解度的影响

蛋白溶解度主要受蛋白质分子间相互作用(如疏水相互作用、二硫键等)与蛋白质-水相互作用(如离子-偶极、偶极-偶极等)两方面作用力的影响<sup>[23]</sup>。蛋白质-水相互作用增强则蛋白溶解度上升,蛋白质-蛋白质相互作用增强则蛋白溶解度下降。不同 pH 值、不同  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度下 MP 溶解度变化如图 4 所示。相同  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度下随着 pH 值的增加蛋白溶解度显著增加 ( $P<0.05$ )。MP 在 pI (5.3 左右)附近所带的电荷最少,蛋白质之间缺乏静电排斥,分子间作用由于疏水相互作用而得到增强,导致蛋白聚集或沉淀。随着 pH 值远离 pI,MP 所带负电荷增加,静电斥力分子间相互作用力减弱,使得蛋白质-水相互作用逐渐增强,导致蛋白溶解度升高。在同一 pH 值下,随着蛋白氧化浓度的增加,MP 溶解度与对照组相比溶显著减低 ( $P<0.05$ )。这主要是由于蛋白氧化引起共价交联,

形成不溶性聚集体,而且随  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度不断上升不溶性聚集体越多,引起蛋白溶解度进一步下降<sup>[22]</sup>。

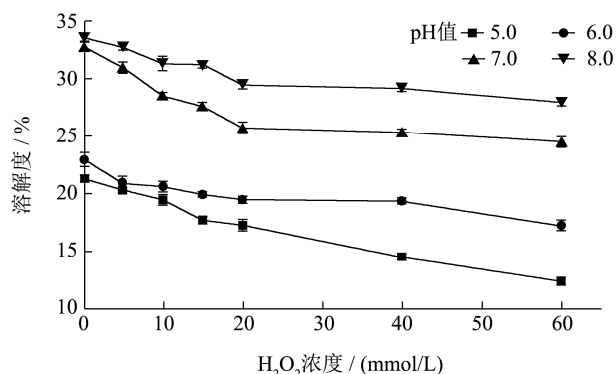


图4 不同 pH 值下不同  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度对 MP 溶解度的影响

Fig.4 Effect of different  $\text{H}_2\text{O}_2$  levels on MP solubility at different pH values

## 2.5 蛋白氧化对牦牛肉 MP 表面疏水性的影响

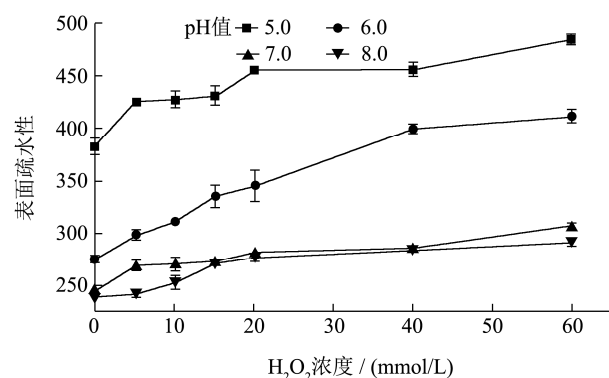


图5 不同 pH 值下不同  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度对 MP 表面疏水性的影响

Fig.5 Effect of different  $\text{H}_2\text{O}_2$  degrees on the hydrophobicity of MP surfaces at different pH values

表面疏水性是评估蛋白质化学和物理状态变化的一个指标<sup>[24]</sup>。荧光探针 1-苯氨基萘-8-磺酸 (ANS) 处于水相环境时几乎不发射荧光,当处于疏水环境中时,ANS 荧光强度大大增强,因此 ANS 探针的荧光强度变化可反应其所处微环境的疏水性改变。ANS 倾向与蛋白疏水区域结合,采用 ANS 可测定蛋白表面疏水性变化。由图 5 可知,当 pH 值一定时,随着  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度的增加,与对照组相比疏水性显著升高 ( $P < 0.05$ ), $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度越大,蛋白表面疏水性越大。这是因为蛋白氧化导致蛋白构象发生改变,蛋白质去折叠,大量疏水基团暴露。另外,氧化过程中球蛋白表面氨基酸残基被氧化修饰引起的疏水性变化较为复杂,Met 的疏水性侧链转化为亲水基团;Lys 的  $\epsilon$ -氨基氧化成电中性的羰基衍生物,降低了正电荷性,导致亲水性下降;而 Lys、Cys 及 His 能与肉品中脂类的氧化产物  $\alpha,\beta$ -不饱和醛发生迈克尔加成,在蛋白侧链上接上长链烷基,从而使疏水性增加<sup>[25]</sup>。pH 值 5.0 时的疏水性显著高于其他组

( $P < 0.05$ ),在等电点附近时,MP 表面电荷减少,分子间斥力降低,蛋白彼此形成疏水性聚集体,随着 pH 值增加逐渐远离 pI,分子间排斥力增强,靠疏水相互作用驱动的蛋白质聚集行为削弱,疏水性降低<sup>[24]</sup>。

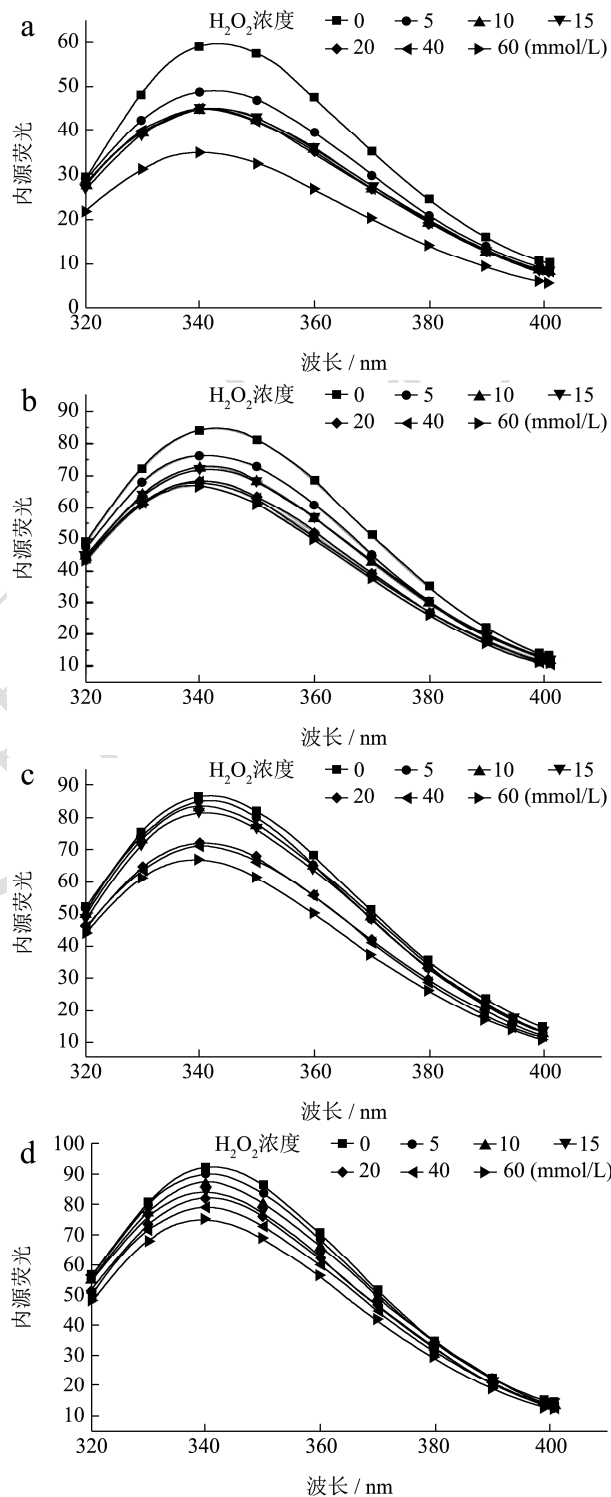


图6 不同 pH 值下不同  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度对 MP 内源荧光的影响

Fig.6 Effect of different  $\text{H}_2\text{O}_2$  levels on endogenous fluorescence of MP at different pH values

注: a、b、c、d 分别表示在 pH 值为 5.0、6.0、7.0、8.0 下不同  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度的 MP 内源荧光值。

## 2.6 蛋白氧化对牦牛肉 MP 内源荧光的影响

色氨酸内源荧光可以反应 MP 色氨酸所处微环境和氧化状态的变化<sup>[26]</sup>, 进而能够表征蛋白氧化对 MP 高级结构的影响。在各 pH 值组中, 随着  $H_2O_2$  浓度的增加各样品的  $\lambda_{max}$  蓝移, 且与对照组相比,  $\lambda_{max}$  蓝移显著 ( $P<0.05$ ), 且荧光强度 (FI) 持续下降, 各处理组间差异显著 ( $P<0.05$ ),  $\lambda_{max}$  从最初的 342 左右蓝移至 339 左右, FI 下降了 1.3 倍, 色氨酸是蛋白质氨基酸中单电子氧化势能最低的氨基酸, 对  $\cdot OH$  较为敏感, 很容易被氧化成色氨酸自由基, 与分子氧结合后形成色氨酸过氧化自由基, 最终形成犬尿氨酸, 引起内源荧光强度下降。 $\lambda_{max}$  与色氨酸所处微环境有关, 当色氨酸残基由水相环境转移到疏水环境时, 其荧光光谱会蓝移, 当色氨酸残基由疏水环境转移到水相环境时, 荧光光谱会红移。Trp 荧光光谱的蓝移表明, 由于氧化引起蛋白质聚集, MP 中最先暴露的色氨酸残基嵌入到了氧化 MP 聚集体的内部<sup>[25]</sup>。pH 值为 5.0 时的  $\lambda_{max}$  显著高于其它 pH 值组 ( $P<0.05$ ), 即随着 pH 值的增加,  $\lambda_{max}$  蓝移, 这一结果是由于当 pH 值在 pI 附近时, 易发生蛋白氧化, 发生去折叠现象, 三级结构展开引起疏水基团暴露<sup>[27]</sup>, 疏水性增强, 这与之之前疏水性研究一致。而 pH 值在 7.0 和 8.0 时 TrpFI 显著高于 pH 值为 5.0 时, 这可能是因为大多数具有酸性或碱性官能团的芳香化合物的荧光与溶液的 pH 值有关。不同的 pH 值、化合物的不同状态、化合物分子和离子的不同电子构型, 使得荧光强度就有了一定差异<sup>[28]</sup>。

## 2.7 蛋白氧化对牦牛肉 MP 二级结构的影响

蛋白质氧化引起的主肽链断裂和共价交联都会伴随着内部结构的改变, 其中蛋白质二级结构的改变是最为重要的指标之一, 可利用红外光谱 (FT-IR) 进行测量。在酰胺 I 区 ( $1600\sim1700\text{ cm}^{-1}$ ) 可以反映蛋白二级结构的变化。肽链中 N-H 基团的平面弯曲和 C-O 基团的伸缩振动会影响这一区域, 此外, 肽键中 C-N 的伸缩振动也能改变这一区域<sup>[29]</sup>。牦牛肉 MP 的  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠、 $\beta$ -转角以及无规则卷曲变化如图 7 所示, 不同 pH 值条件下, 随着  $H_2O_2$  浓度的增加, 无规则卷曲显著增加 ( $P<0.05$ ), 即二级结构总比例显著下降。其中  $\beta$ -折叠显著增加 ( $P<0.05$ ),  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -转角显著减少 ( $P<0.05$ ), 蛋白二级结构由有序变为无序,

朝着不稳定的方向转变。而与 pH 值 7.0 相比, pH 值 5.0 和 6.0 处理的肌原纤维蛋白质具有较高的  $\beta$ -折叠结构和较低的  $\alpha$ -螺旋。

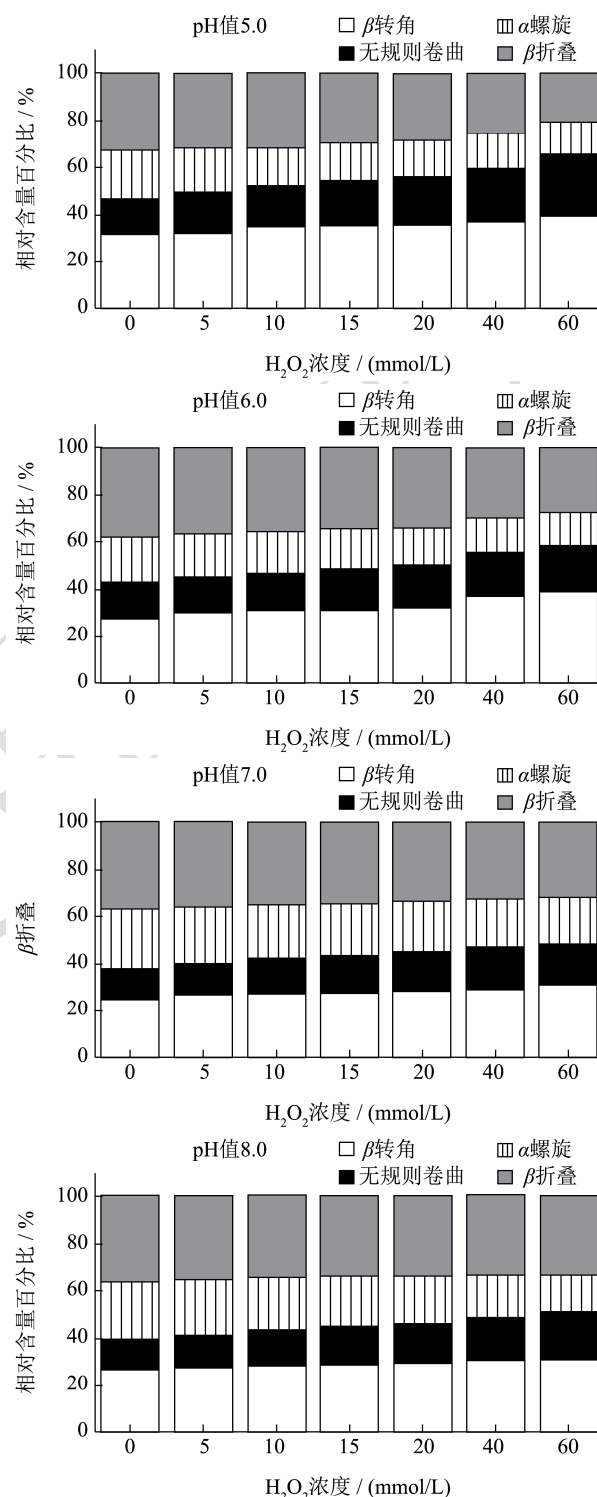
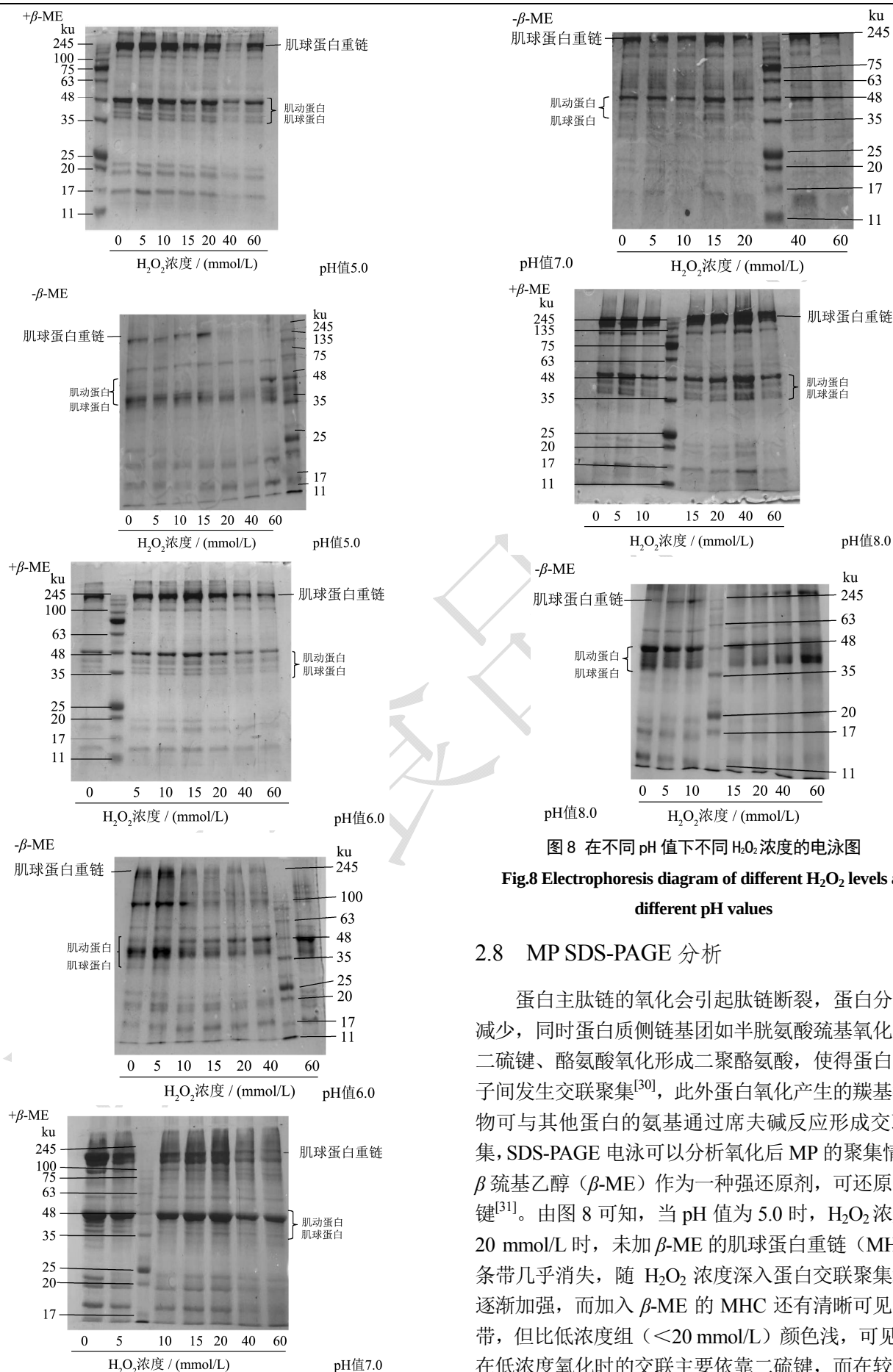


图 7 不同 pH 值下不同  $H_2O_2$  浓度对 MP 二级结构的影响

Fig.7 Effect of different  $H_2O_2$  degree on MP secondary structure at different pH values

图8 在不同 pH 值下不同  $H_2O_2$  浓度的电泳图Fig.8 Electrophoresis diagram of different  $H_2O_2$  levels at different pH values

## 2.8 MP SDS-PAGE 分析

蛋白主肽链的氧化会引起肽链断裂, 蛋白分子量减少, 同时蛋白质侧链基团如半胱氨酸巯基氧化形成二硫键、酪氨酸氧化形成二聚酪氨酸, 使得蛋白质分子间发生交联聚集<sup>[30]</sup>, 此外蛋白氧化产生的羰基衍生物可与其他蛋白的氨基通过席夫碱反应形成交联聚集, SDS-PAGE 电泳可以分析氧化后 MP 的聚集情况。 $\beta$  巯基乙醇 ( $\beta$ -ME) 作为一种强还原剂, 可还原二硫键<sup>[31]</sup>。由图 8 可知, 当 pH 值为 5.0 时,  $H_2O_2$  浓度  $> 20$  mmol/L 时, 未加  $\beta$ -ME 的肌球蛋白重链 (MHC) 条带几乎消失, 随  $H_2O_2$  浓度深入蛋白交联聚集程度逐渐加强, 而加入  $\beta$ -ME 的 MHC 还有清晰可见的条带, 但比低浓度组 ( $< 20$  mmol/L) 颜色浅, 可见 MP 在低浓度氧化时的交联主要依靠二硫键, 而在较高浓

度氧化时, 其他的共价交联占有相当比例。pH 值为 6.0 时, 未加  $\beta$ -ME 的 MHC 条带随着  $H_2O_2$  浓度增加 ( $>5$  mmol/L) 颜色变浅, 60 mmol/L 时条带几乎消失; 而加入  $\beta$ -ME 的条带与 pH 值为 5.0 时的情况类似,  $H_2O_2 > 5$  mmol/L 时, 蛋白已经发生聚集, 且以二硫键交联为主, 高浓度时其他的共价交联形式增多。pH 值 7.0 时, 未加  $\beta$ -ME 的 MHC 条带要在 60 mmol/L 时才开始变浅, 此前蛋白氧化交联程度较低, 较少形成二硫键。pH 值 8.0 时, 无论是否加入  $\beta$ -ME, MHC 条带与对照组相比差别不明显。因此在氧化过程中, MP 在酸性条件下更易发生交联聚集, 在低氧化环境中, 二硫键是导致蛋白发生交联的主要作用力,  $H_2O_2$  浓度增加也会导致其他的共价交联, 这也证明了半胱氨酸的巯基相对于其他蛋白质侧链基团要对氧化更敏感。

### 3 结论

本研究讨论了不同 pH 值下不同  $H_2O_2$  浓度对牦牛肉 MP 在分子水平上的影响。在一定 pH 值条件下随着  $H_2O_2$  浓度的增加羧基、表面疏水性显著增加 ( $P < 0.05$ ), 总巯基、游离巯基、游离氨基、溶解度、内源荧光强度显著下降 ( $P < 0.05$ ),  $\lambda_{max}$  蓝移, 二级结构总比例显著下降 ( $P < 0.05$ ), 其中,  $\beta$ -折叠显著增加 ( $P < 0.05$ ),  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -转角显著减少 ( $P < 0.05$ ), 蛋白分子间发生交联聚合; 在一定氧化条件下, 等电点附近, 肌原纤维蛋白的氧化程度更高, 这是由于等电点附近, 静电荷少, 蛋白之间静电斥力小, 蛋白与水之间相互作用力低, MP 更易受到羟自由基的攻击。随着 pH 值偏离等电点, 表面疏水性显著降低 ( $P < 0.05$ ), 溶解度显著增加 ( $P < 0.05$ ),  $\lambda_{max}$  蓝移, FI 显著增加 ( $P < 0.05$ ),  $\beta$ -折叠结构降低,  $\alpha$ -螺旋结构增加, pH 值在 6.0 时, 蛋白生成的聚集稳定性较好。MP 的氧化伴随着二级结构转变、骨架断裂和交联聚集, 二硫和非二硫共价键都贡献了蛋白的交联, 而 MP 的分子结构的改变进一步影响了其功能, 包括溶解性、凝胶性和乳化性等的变化。

### 参考文献

- [1] Bao Y, Boeren S, Per E. Myofibrillar protein oxidation affects filament charges, aggregation and water-holding [J]. Meat Science, 2018, 135: 102-108.
- [2] Zhang L, Li Q, Shiliang J, et al. Effect of different stunning methods on antioxidant status, *in vivo* myofibrillar protein oxidation, and the susceptibility to oxidation of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) fillets during 72 h postmortem [J]. Food Chemistry, 2018, 246: 121-128.
- [3] Du X, Zhao M, Pan N, et al. Tracking aggregation behaviour and gel properties induced by structural alterations in myofibrillar protein in mirror carp (*Cyprinus carpio*) under the synergistic effects of pH and heating [J]. Food Chemistry, 2021, 362: 130222.
- [4] Jiang J, Xiong Y L. Extreme pH treatments enhance the structure-reinforcement role of soy protein isolate and its emulsions in pork myofibrillar protein gels in the presence of microbial transglutaminase [J]. Meat Science, 2013, 93(3): 469-476.
- [5] Wang W, Sheng H, Zhou J Y, et al. The effect of a variable initial pH on the structure and rheological properties of whey protein and monosaccharide gelation via the Maillard reaction [J]. International Dairy Journal, 2021, 113: 104896.
- [6] Liu Q, Chen Q, Baohua K, et al. The influence of superchilling and cryoprotectants on protein oxidation and structural changes in the myofibrillar proteins of common carp (*Cyprinus carpio*) surimi [J]. LWT - Food Science and Technology, 2014, 57(2): 603-611.
- [7] Niu H, Li Y, Jianchun H, et al. Gelation and rheological properties of myofibrillar proteins influenced by the addition of soybean protein isolates subjected to an acidic pH treatment combined with a mild heating [J]. Food Hydrocolloids, 2017, 70: 269-276.
- [8] Donkeun P, Youling L X. Oxidative modification of amino acids in porcine myofibrillar protein isolates exposed to three oxidizing systems [J]. Food Chemistry, 2006, 103(2): 607-616.
- [9] Xiong Y L, Blanchard S P, Oozumi T, et al. Hydroxyl radical and ferryl-generating systems promote gel network formation of myofibrillar protein [J]. Journal of Food Science, 2010, 75(2): C215-C221.
- [10] Oliver C N, Ahn B W, Moerman E J, et al. Age-related changes in oxidized proteins [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1987, 262(12): 5488-5491.
- [11] Ellman G L. Tissue sulfhydryl groups [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1959, 82(1): 70-77.
- [12] 吴伟. 蛋白质氧化对大豆蛋白结构和凝胶性质的影响[D]. 无锡: 江南大学, 2010.
- [13] F P, F S, M V A P. Physicochemical and functional properties of cowpea protein isolates treated with temperature or high hydrostatic pressure [J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2016, 33: 38-46.
- [14] 简华君. 大豆蛋白对肌纤维复合蛋白凝胶性质的影响[D]. 无锡: 江南大学, 2014.

- [15] Jiang W, He Y, Shanbai X, et al. Effect of mild ozone oxidation on structural changes of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) myosin [J]. Food and Bioprocess Technology, 2017, 10(2): 370-378.
- [16] Kang D, Zou Y, Yu P C, et al. Effects of power ultrasound on oxidation and structure of beef proteins during curing processing [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2016, 33: 47-53.
- [17] Chi Y, Kumar T K, Wang H M, et al. Thermodynamic characterization of the human acidic fibroblast growth factor: evidence for cold denaturation [J]. Biochemistry, 2001, 40(25): 7746-7753.
- [18] Chan J T Y, Omana D A, Betti M, et al. Effect of ultimate pH and freezing on the biochemical properties of proteins in turkey breast meat [J]. Food Chemistry, 2011, 127(1): 109-117.
- [19] 费英,韩敏义,杨凌寒,等,pH 对肌原纤维蛋白二级结构及其热诱导凝胶特性的影响[J].中国农业科学,2010,43(1):164-170.
- [20] 袁凯,张龙,谷东陈,等.肉品中的蛋白质氧化机制及其影响因素[J].食品科学,2018,39(5):329-335.
- [21] Li K, Zhong Q. Aggregation and gelation properties of preheated whey protein and pectin mixtures at pH 1.0-4.0 [J]. Food Hydrocolloids, 2016, 60: 11-20.
- [22] Li X, Liu C. Effect of hydroxyl radicals on biochemical and functional characteristics of myofibrillar protein from large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) [J]. Journal of Food Biochemistry, 2020, 44(1): e13084.
- [23] Zhang Z, Xiong Z, Sufang Lu, et al. Effects of oxidative modification on the functional, conformational and gelling properties of myofibrillar proteins from *Culter alburnus* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 162: 1442-1452.
- [24] Shen H, Zhao M, Sun W Z, et al. Effect of pH on the interaction of porcine myofibrillar proteins with pyrazine compounds [J]. Food Chemistry, 2019, 287: 93-99.
- [25] Wu W, Wu X, Hua Y F. Structural modification of soy protein by the lipid peroxidation product acrolein [J]. LWT - Food Sciences and Technology, 2010, 43(1): 133-140.
- [26] Li F, Wang B, Qian L, et al. Changes in myofibrillar protein gel quality of porcine longissimus muscle induced by its structural modification under different thawing methods [J]. Meat Science, 2019, 147: 108-115.
- [27] 畅鹏.pH 和温度对镜鲤肌原纤维蛋白热聚集行为影响的研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2020.
- [28] Yan S, Xu J, Zhang X Y, et al. Effect of pH-shifting treatment on the structural and functional properties of soybean protein isolate and its interactions with (-)-epigallocatechin-3-gallate [J]. Process Biochemistry, 2021, 101: 190-198.
- [29] Sharifian A, Soltanizadeh N, Abbaszadeh R E. Effects of dielectric barrier discharge plasma on the physicochemical and functional properties of myofibrillar proteins [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2019, 54: 1-8.
- [30] Xia M, Chen Y, Guo J J, et al. Effects of oxidative modification on textural properties and gel structure of pork myofibrillar proteins [J]. Food Research International, 2019, 121: 678-683.
- [31] Li Q, Zhang L, Han L, et al. Comparison of postmortem changes in ATP-related compounds, protein degradation and endogenous enzyme activity of white muscle and dark muscle from common carp (*Cyprinus carpio*) stored at 4 degrees C [J]. LWT - Food Science and Technology, 2017, 78: 317-324.