

羟自由基氧化对牦牛肉肌原纤维蛋白生化特性的影响

崔文斌 王惠惠 刘小波 马纪兵 张丽* 余群力 郭兆斌

(甘肃农业大学食品科学与工程学院,甘肃 兰州 730070)

摘要:为探究羟自由基($\cdot\text{OH}$)氧化处理对宰后牦牛肉成熟过程中肌原纤维蛋白氧化特性的影响,以经不同浓度(0、0.5、1、5、10、20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)羟自由基氧化体系氧化不同时间(0、0.5、1、12、24、48 h)的牦牛肉为研究对象,以未经处理的牦牛肉为空白对照,测定不同浓度不同氧化时间下肉样肌原纤维蛋白的羰基含量、巯基含量、二硫键含量、表面疏水性、Ca/K-ATPase 活性等指标的变化规律。结果表明,随着 H_2O_2 浓度的增加及氧化时间的延长,不同处理组间牦牛肉肌原纤维蛋白均表现出不同程度的氧化水平,其中羰基含量、二硫键含量和 Ca-ATPase 活性均呈显著增加趋势($P<0.01$),而表面疏水性呈先上升后下降的趋势,巯基含量和 K-ATPase 活性则显著降低($P<0.01$)。 H_2O_2 浓度增加至 20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,与空白对照组相比,羟自由基处理组羰基含量升高 46.03%,而巯基含量下降 79.79%。综上,羟自由基促使宰后牦牛肉成熟过程中肌原纤维蛋白发生了显著氧化,增加了蛋白的氧化程度。本研究结果为牦牛肉生产加工过程中蛋白氧化控制提供了一定的参考。

关键词:羟自由基氧化体系;牦牛肉;肌原纤维蛋白;蛋白质

DOI:10.11869/j.issn.100-8551.2019.06.1165

畜禽宰后加工与贮藏过程中脂肪氧化对肌肉品质的影响是众所周知的,但随着对宰后肉品成熟研究的深入,蛋白质的变化逐渐成为关注的另一个目标。蛋白质是肉及肉制品中的主要成分,其对肉品的营养品质和感官风味有着至关重要的作用^[1]。金属离子及内源氧化剂等会导致肉与肉制品中的蛋白质发生氧化反应^[2]。蛋白氧化会引起肉及肉制品中蛋白质结构的显著变化,如蛋白质交联聚合、降解及氨基酸侧链的改变等^[3]。肌肉蛋白是肉类食品中的重要结构组成,可影响肉类食品质构、持水能力、风味及营养等多方面的品质特性^[4]。

活畜体内本身存在着内源性抗氧化防御系统,该系统维持着体内自由基代谢的平衡,而屠宰后的畜禽肌肉的氧化防御系统被破坏,自由基大量累积,导致肌肉中的蛋白和脂质同时发生氧化,且脂质氧化的次生产物同样能引起蛋白质发生氧化^[5]。由于肌肉组织中含有大量的不饱和脂肪酸、亚铁血红素、金属离子及

其他促进氧化因子^[6],活性氧的产生会造成蛋白质氧化,而在大多数情况下启动蛋白质氧化的是羟自由基($\cdot\text{OH}$)^[7]。羟自由基成为直接诱导蛋白质氧化的催化剂,从而使肉类或肉制品的品质恶化^[8]。Timm-Heinrich 等^[9]发现虹鳟鱼在冷冻储藏过程中蛋白质氧化后蛋白构象发生变化,暴露出大量的疏水基团,进而导致蛋白内部交联产生大分子凝聚体。Decker 等^[10]对火鸡白肌肌原纤维蛋白的研究表明,金属离子($\text{Fe}^{3+}/\text{Cu}^{2+}$)与抗坏血酸可在体外试验中诱发肌肉蛋白的羰基化,同时还发现,对于肌肉而言,少量的 H_2O_2 就可通过与 O_2 反应产生活性氧自由基,这其中抗坏血酸起到了还原金属离子的作用,从而形成了金属催化氧化系统的一个循环反应。Park 等^[11]以猪肉肌原纤维蛋白为原料,在模拟羟自由基氧化体系研究中发现,猪肉肌原纤维蛋白氧化后导致羰基、硫代巴比妥酸及 Ca-ATPase 活性发生改变。陈霞霞等^[12]研究了羟自由基氧化体系对银鲟肌原纤维蛋白生化特性及其构象

收稿日期:2018-09-07 接受日期:2019-01-27

基金项目:国家自然科学基金地区基金(31660469),霍英东教育基金(151106),甘肃省自然科学基金(17JR5RA155),中国国家现代农业(肉牛牦牛)产业技术体系资助项目(CARS-37)

作者简介:崔文斌,男,主要从事动物性食品营养与工程研究。E-mail:1005885651@qq.com

*通讯作者:张丽,女,教授,主要从事动物性食品营养与工程研究。E-mail:zhanglwubd@163.com

单元的影响,发现在羟基自由基氧化体系中,银鲳各项生理生化指标发生了明显的改变;周景丽等^[13]证明了虾蛄盐溶蛋白结构对羟自由基氧化体系有很大的敏感性,各项指标均因氧化发生了明显的变化。研究表明,适度蛋白氧化有利于提高肌原纤维蛋白的功能特性和肉制品质构特性,但过度氧化会破坏其功能特性^[14]。相关研究显示,蛋白氧化主要由羟自由基、肌红蛋白自由基或者脂类次级氧化产物(如丙二醛)等引发。从已知的研究结果来看,活性氧(reactive oxygen species, ROS)可引起肌肉蛋白质氧化生成蛋白交联集体和羰基^[15]。目前,关于牦牛肉的研究主要集中在牦牛肉营养品质及食用品质方面,而有关其肌肉蛋白的氧化鲜见报道。

宰后牦牛肉蛋白质易发生氧化,导致其品质下降,且氧化对牦牛肉蛋白的影响越发突显,因此研究牦牛肉氧化后肌原纤维蛋白的变化十分有必要。本研究选取甘南公牦牛背最长肌为原料,采用羟自由基氧化体系作用于牦牛肉肌原纤维蛋白(myofibrillar protein, MP),通过肌原纤维蛋白羰基含量、巯基含量、二硫键含量、表面疏水性、Ca/K-ATPase活性等指标的变化规律及相互关系比较不同处理组牦牛肉宰后成熟过程中肌原纤维蛋白氧化特性的变化,探究羟自由基氧化对牦牛肉肌原纤维蛋白生化特性的影响规律,以期对牦牛肉生产加工过程中蛋白氧化控制提供理论参考。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

随机选取甘肃甘南藏族自治州同一牧场健康无病的36±6月龄公牦牛6头,平均体重250±50 kg。牦牛按照伊斯兰方式进行屠宰。宰后在其左、右半胴体现场采集背最长肌,在0~4℃条件下现场分割成2 cm×2 cm×3 cm长条状肉样,锡箔纸包装,置于液氮罐运输至实验室,于超低温冰箱-80℃冻藏备用。

三氯乙酸(trichloroacetic acid solution, TCA)、盐酸胍、乙酸乙酯、乙醇、KH₂PO₄、KCl、K₂HPO₄、Na₂CO₃、HCl、FeCl₃、H₂O₂、抗坏血酸、溴酚蓝、甘氨酸、KOH、CuSO₄·5H₂O、四水合酒石酸钾钠、牛血清白蛋白(bovine albumin, BSA)、2,4-二硝基苯肼(2,4-Dinitrophenylhydrazine, DNPH)、哌嗪-N,N'-双(2-乙磺酸)均购自天津市光复科技发展有限公司;十二烷基磺酸钠(sodium laurylsulfonate, SDS)、Tris、乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)、5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)[5,5'-Dithiobis-(2-

nitrobenzoic acid), DTNB], 购自美国 Sigma 公司。

1.2 主要仪器与设备

XH-B型涡旋混合器,江苏康健医疗用品有限公司;PHS-3 C型pH计,上海仪电科学仪器股份有限公司;756 P紫外分光光度计,上海光谱仪器有限公司;TGL-16 M高速台式冷冻离心机,长沙湘仪有限公司;XHF-D型高速分散器,宁波新芝生物科技股份有限公司;HX202T电子天平,慈溪市天东衡器厂。

1.3 试验方法

1.3.1 肌原纤维蛋白的提取 参照 Park 等^[5]的方法,并略作修改。称取5 g肉样,加入10倍体积(v/w)标准盐溶液(20 mmol·L⁻¹磷酸钾缓冲液:0.1 mol·L⁻¹ KCl+2 mmol·L⁻¹ MgCl₂+2 mmol·L⁻¹ EGTA, pH值6.8), 13 000 r·min⁻¹匀浆10 s,离心(4℃, 1 000×g, 10 min)并弃去上清液。沉淀用8倍体积(v/w)标准盐溶液溶解后4℃离心10 min(1 000×g),弃去上清液,重复操作2次。沉淀用8倍体积(v/w)的100 mmol·L⁻¹ KCl溶液溶解,然后4℃离心10 min(1 000×g),并弃去上清液,重复2次。最终所得沉淀中加入4 mL 25 mmol·L⁻¹磷酸钾缓冲液(pH值6.25),用双缩脲法测定其蛋白质含量,并绘制牛血清白蛋白标准曲线。

1.3.2 FeCl₃/Vc/H₂O₂(氯化铁/抗坏血酸/过氧化氢)氧化体系的构建 参考 Xiong 等^[2]的方法。固定FeCl₃浓度0.01 mmol·L⁻¹、抗坏血酸浓度0.1 mmol·L⁻¹,共设置5个H₂O₂浓度,分别为0.5、1、5、10、20 mmol·L⁻¹,构建氧化体系。将5 g肌原纤维蛋白均匀分散于构建的氧化体系中,4℃条件下氧化24 h,然后用1 mmol·L⁻¹乙二胺四乙酸终止反应,并将终止后的肌原纤维蛋白浆置于离心机中离心(4 000 r·min⁻¹)10 min,备用。上述氧化反应在15 mmol·L⁻¹哌嗪-N,N'-双(2-乙磺酸)缓冲溶液(pH值6.0,离子强度0.6 mmol·L⁻¹)中进行。空白对照为未加氧化剂直接于4℃放置24 h的肌原纤维蛋白。

1.3.3 羰基含量的测定 参考 Levine 等^[16]的方法,并略作修改。在10 mL离心管中加入0.5 mL终止氧化后的蛋白质溶液与2 mL含有2,4-二硝基苯肼的HCl溶液,置于25℃下反应40 min,空白样品中不加2,4-二硝基苯肼。然后加入2 mL 20%三氯乙酸,震荡后离心(11 000×g, 5 min),弃上清。蛋白质沉淀用1 mL的乙醇-乙酸乙酯溶液(1:1, v/v)洗涤3次,挥发完溶剂后将蛋白质悬浮于3 mL 6 mol·L⁻¹盐酸胍溶液中,于37℃条件下水浴保温30 min,370 nm波长下测定其吸光度值。以空白为对照,采用分子吸光系数22 000 M⁻¹·cm⁻¹计算羰基含量。

1.3.4 巯基含量的测定 参考 Korchak 等^[17]的方法,并略作修改。1 mL 蛋白质溶液与 1 mL 含有 6 mol·L⁻¹ 盐酸胍、1 mmol·L⁻¹ EDTA 的 50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液(pH 值 8.3)和 10 μL 含 10 mmol·L⁻¹ 5,5-二硫代双(2-硝基苯甲酸)的 100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl 溶液(pH 值 7.6)混合,然后于 25℃ 下静置 25 min,并在 412 nm 波长处测定其吸光度值。巯基含量(nmol·mg⁻¹ 蛋白)的摩尔吸光系数采用 13 600 M⁻¹·cm⁻¹。

1.3.5 二硫键含量的测定 参考 Thannhauser 等^[18]的方法并略作修改,调整蛋白质浓度为 5 mg·mL⁻¹。取 100 μL 稀释后的蛋白液与 3 mL 新鲜配制的 NTSB 溶液混合,在室温避光反应 25 min,然后在 412 nm 波长下测定吸光度值(A)。以 100 μL 25 mmol·L⁻¹ 磷酸钾缓冲液(pH 值 6.25)作空白对照。采用分子吸光系数 13 600 M⁻¹·cm⁻¹ 进行计算:

$$\text{二硫键含量}(\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\text{蛋白}) = \frac{A \times 3\,000\,000\,000}{\varepsilon \times 2500} \quad (1)$$

式中,A:溶液吸光度值;ε:摩尔消光系数。

1.3.6 Ca/K-ATPase 活性测定 参考 Wells 等^[19]的方法。反应液 A:0.18 mol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液(0.15 mmol·L⁻¹ KCl,15 mmol·L⁻¹ CaCl₂,7.6 mmol·L⁻¹ ATP,pH 值 7.4),测定 Ca-ATPase 活性。反应液 B:0.18 mol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液(7.6 mmol·L⁻¹ ATP、0.3 mol·L⁻¹ KCl,5.0 mmol·L⁻¹ EDTA,pH 值 7.4),测定 K-ATPase 活性。用 15 mmol·L⁻¹ PIPES(0.6 mol·L⁻¹ NaCl,pH 值 6.25)将蛋白液稀释为 2 mg·mL⁻¹,取 0.2 mL 稀释液分别与 2 mL 反应液 A 或 B 在 25℃ 下培养 10 min 后,加入 1 mL 10% 三氯乙酸,然后 4℃ 离心 5 min(2 500×g),取 1 mL 上清液,加入 3.0 mL 0.66% 钼酸铵(溶解在 0.75 mol·L⁻¹ 硫酸溶液)和 0.5 mL 新鲜配制的 10% FeSO₄ 溶液(溶解在 0.15 mol·L⁻¹ 硫酸溶液),反应 2 min 后于 700 nm 波长下读数。单位为 μmol Pi·mg⁻¹ protein·10 min⁻¹,用 0~1.0 mmol·L⁻¹ NaH₂PO₄ 溶液制作标准曲线并计算 Ca/K-ATPase 活性,活性大小用磷酸盐含量表示,单位为 μmol Pi·mg⁻¹ protein·10 min⁻¹。

1.3.7 表面疏水性的测定 参考 Chelh 等^[20]的方法,并略作修改。将肌原纤维蛋白溶于 20 mmol·L⁻¹ pH 值 6.0 的磷酸盐缓冲液中,使蛋白质量浓度为 5 mg·mL⁻¹。取 1 mL 蛋白溶液,加入 200 μL 1 mg·mL⁻¹ 溴酚蓝,以无肌原纤维蛋白的磷酸盐溶液为对照,6 000 r·min⁻¹ 条件下离心 15 min,取上清液并稀释 10 倍,在 595 nm 波长

处测定吸光度值。表面疏水性以溴酚蓝可结合的最终暴露出埋藏在蛋白质构象内部的疏水性氨基酸残基的量来表示,按照公式计算溴酚蓝结合量:

$$\text{溴酚蓝结合量}(\mu\text{g}) = \frac{(A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}})}{A_{\text{对照}}} \times 200 \quad (2)$$

式中,A_{对照}为溴酚蓝吸光值;A_{样品}为样品吸光值。

1.4 数据分析

本试验每个处理重复 3 次。采用 Microsoft Excel 2010 进行数据统计分析,用 SPSS 19.0 Duncan 法进行数据的显著性分析。

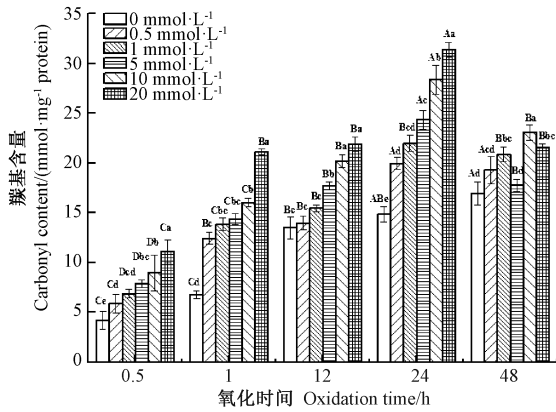
2 结果与分析

2.1 羰基含量的变化

由图 1 可知,在成熟过程中,经羟自由基氧化系统氧化的肌原纤维蛋白羰基含量总体呈先增加后减少趋势,且氧化处理的牦牛肉肌原纤维蛋白羰基含量增加速度较快,变化差异显著(P<0.01)。氧化 0~24 h,随着氧化剂浓度的增加,羰基含量呈现增加趋势,当氧化至 48 h,不同浓度氧化剂下羰基含量均有所降低,这可能是由于一些不稳定羰基化合物的降解引起的。低浓度(0.5 mmol·L⁻¹)氧化初期,空白对照组(0 mmol·L⁻¹)羰基含量为 4.20 nmol·mg⁻¹ 蛋白,氧化至 48 h 时,羰基含量极显著增加至 16.93 nmol·mg⁻¹ 蛋白(P<0.01)。高浓度(20 mmol·L⁻¹)氧化初期,空白对照组(0 mmol·L⁻¹)羰基含量为 11.13 nmol·mg⁻¹ 蛋白,氧化至 24 h 时,羰基含量为 31.36 nmol·mg⁻¹ 蛋白(P<0.01)。羰基是蛋白发生氧化的标志性产物,随着氧化时间及氧化剂浓度的增加,牦牛肉肌原纤维蛋白氧化程度加剧。

2.2 巯基含量的变化

由图 2 可知,随着氧化时间的延长和氧化剂浓度的增加,经羟自由基氧化系统氧化和未经氧化的肌原纤维蛋白巯基含量总体呈下降趋势,且氧化处理的牦牛肉肌原纤维蛋白巯基下降速度较快,变化差异显著(P<0.01)。低浓度(0.5 mmol·L⁻¹)氧化初期,空白对照组(0 mmol·L⁻¹)巯基含量为 100.23 nmol·mg⁻¹ 蛋白,氧化至 48 h,巯基含量极显著降低至 22.67 nmol·mg⁻¹ 蛋白(P<0.01)。高浓度(20 mmol·L⁻¹)氧化初期,空白对照组(0 mmol·L⁻¹)巯基含量为 84.80 nmol·mg⁻¹ 蛋白,氧化至 48 h,巯基含量为 20.71 nmol·mg⁻¹ 蛋白(P<0.01)。此外,经羟自由基氧化后的总巯基含量明显低于空白对照组,说明牦牛肉肌原纤维蛋白总巯基对羟自由基比较敏感。



注:不同大写字母表示相同浓度不同氧化时间间差异显著 ($P < 0.01$);不同小写字母表示相同氧化时间不同浓度间差异显著 ($P < 0.01$)。下同。

Note: Different capital letters indicate significant difference at 0.01 level in the same oxidation concentration at different oxidation time. Different lowercase letters indicate significant difference at 0.01 level in the different concentration at the same oxidation time. The same as following.

图1 牦牛肉肌原纤维蛋白羰基含量的变化

Fig.1 Changes of carbonyl content of myofibrillar protein in yak meat

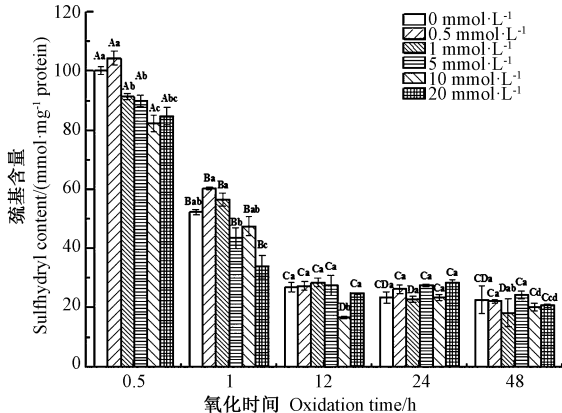


图2 牦牛肉肌原纤维蛋白巯基含量的变化

Fig.2 Changes of sulfhydryls content of myofibrillar protein in yak meat

2.3 二硫键含量的变化

由图3可知,随着氧化时间的延长和氧化剂浓度的增加,经羟自由基氧化系统和未经氧化的肌原纤维蛋白二硫键含量总体呈增加趋势,且氧化处理的牦牛肉肌原纤维蛋白二硫键含量减少速度较快,变化差异显著 ($P < 0.01$)。低浓度 ($0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 氧化初期,空白对照组 ($0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 二硫键含量为 $2.353 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$ 蛋白,氧化 48 h 时,二硫键含量极显著增加至 $11.471 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$ 蛋白 ($P < 0.01$)。高浓度 (20

$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 氧化初期,空白对照组 ($0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 二硫键含量为 $8.353 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$ 蛋白,氧化至 48 h,二硫键含量为 $16.971 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$ 蛋白,增加了 50.78% ($P < 0.01$)。肌原纤维蛋白含有大量自由巯基,这些巯基很容易被氧化而转化成分子内或分子间的二硫键,这也是氧化过程中肌原纤维蛋白聚合的主要途径,随着氧化时间及氧化剂浓度的增加,肌原纤维蛋白中大量巯基转换成二硫键,蛋白氧化程度加深。

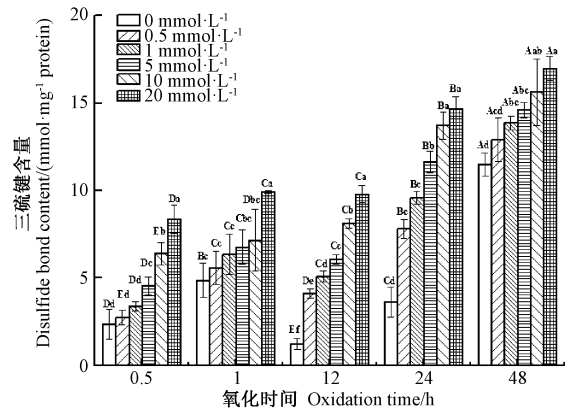


图3 牦牛肉肌原纤维蛋白二硫键含量的变化

Fig.3 Changes of disulfide bond content of myofibrillar protein in yak meat

2.4 Ca/K-ATPase 活性的变化

由图4可知,随着氧化时间的延长和氧化剂浓度的增加,经羟自由基氧化系统和未经氧化的肌原纤维蛋白 Ca-ATPase 活性总体呈上升趋势,且氧化处理的牦牛肉肌原纤维蛋白 Ca-ATPase 活性上升速度较快,同一处理时间不同浓度间变化差异显著 ($P < 0.01$)。低浓度 ($0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 氧化初期,空白对照组 ($0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) Ca-ATPase 活性为 $0.3 \mu\text{mol Pi} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein} \cdot 10 \text{ min}^{-1}$,氧化至 48 h, Ca-ATPase 活性显著增加至 $0.47 \mu\text{mol Pi} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein} \cdot 10 \text{ min}^{-1}$ ($P < 0.01$)。高浓度 ($20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 氧化初期,空白对照组 ($0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) Ca-ATPase 活性为 $0.44 \mu\text{mol Pi} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein} \cdot 10 \text{ min}^{-1}$,氧化至 48 h, Ca-ATPase 活性为 $1.256 \mu\text{mol Pi} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein} \cdot 10 \text{ min}^{-1}$,与空白对照组 ($0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 相比增加了 64.97% ($P < 0.01$)。ATPase 活性是反映肌球蛋白完整性的指标,肌球蛋白头部催化中心有 2 个活性巯基 (SH_1 和 SH_2)。 SH_1 负责 Ca-ATPase 活性,而 SH_1 和 SH_2 同时负责 K-ATPase 活性。综上,在氧化过程中 SH_1 发生了较大程度的变性。

由图5可知,随着氧化时间的延长和氧化剂浓度的增加,经羟自由基氧化系统和未经氧化的肌原纤维蛋白 K-ATPase 活性总体呈下降趋势,且氧化处理

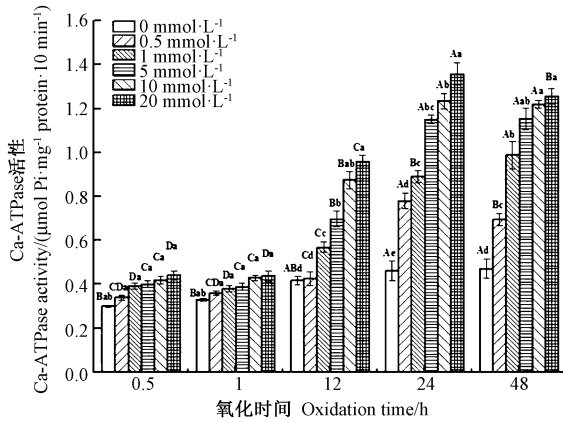


图4 牦牛肉肌原纤维蛋白 Ca-ATPase 活性的变化

Fig.4 Changes of myofibrillar protein Ca-ATPase activity in yak meat

的牦牛肉肌原纤维蛋白 K-ATPase 活性下降速度较快,变化差异显著($P < 0.01$)。低浓度($0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)氧化初期,空白对照组($0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) K-ATPase 活性为 $0.708 \mu\text{mol Pi} \cdot \text{mg}^{-1} \text{protein} \cdot 10 \text{ min}^{-1}$,氧化 48 h 时, K-ATPase 活性显著降低至 $0.674 \mu\text{mol Pi} \cdot \text{mg}^{-1} \text{protein} \cdot 10 \text{ min}^{-1}$ ($P < 0.01$)。高浓度($20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)氧化初期,空白对照组($0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) K-ATPase 活性为 $0.512 \mu\text{mol Pi} \cdot \text{mg}^{-1} \text{protein} \cdot 10 \text{ min}^{-1}$,氧化至 48 h, K-ATPase 活性为 $0.416 \mu\text{mol Pi} \cdot \text{mg}^{-1} \text{protein} \cdot 10 \text{ min}^{-1}$,与空白对照组相($0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)比降低了 18.75% ($P < 0.01$)。肌球蛋白头部催化中心的 2 个活性巯基(SH_1 和 SH_2)同时负责 K-ATPase 活性。综上,在氧化过程中, SH_1 和 SH_2 均严重变性。

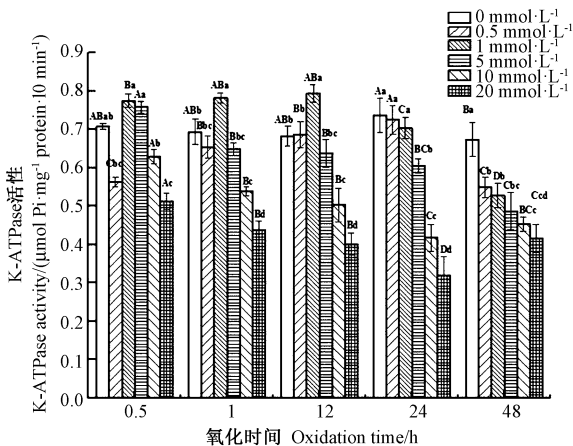


图5 牦牛肉肌原纤维蛋白 K-ATPase 活性的变化

Fig.5 Changes of myofibrillar protein K-ATPase activity in yak meat

2.5 表面疏水性的变化

由图 6 可知,随着氧化剂浓度的增加,经羟自由基氧化系统氧化和未经氧化的肌原纤维蛋白表面疏水性总体呈增大趋势,且氧化处理的牦牛肉肌原纤维蛋白表面疏水性增大速度较快,变化差异显著($P < 0.01$)。低浓度($0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)氧化初期,空白对照组($0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)表面疏水性溴酚蓝结合量为 $46.79 \mu\text{g}$,氧化 48 h 时,溴酚蓝结合量显著降低至 $32.35 \mu\text{g}$ ($P < 0.01$)。肌原纤维蛋白被氧化导致蛋白解折叠,表面疏水性增加,随 H_2O_2 浓度的增加,蛋白聚集解折叠程度大于其再折叠程度,表面疏水性逐渐增大。

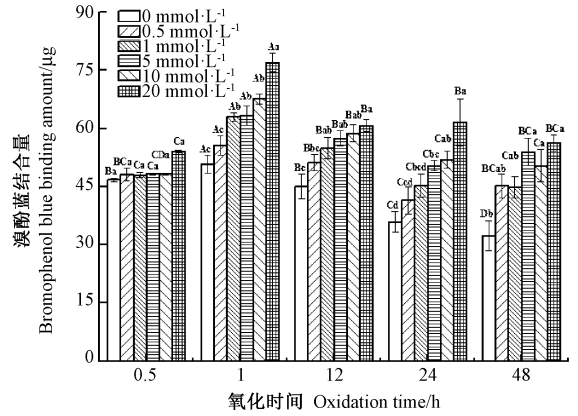


图6 牦牛肉肌原纤维蛋白表面疏水性的变化

Fig.6 Changes of surface hydrophobicity of myofibrillar protein in yak meat

3 讨论

羰基浓度的高低可以评判蛋白质氧化的程度^[21]。羰基含量的增加可能是由于羟自由基($\cdot\text{OH}$)对氨基酸侧链或肽链的氧化攻击造成^[22]。本研究中,在羟自由基氧化体系中,随着 H_2O_2 浓度增加,羰基含量不断增加,进一步反映出蛋白氧化程度的变化。Zhang 等^[23]用 H_2O_2 处理样品时发现,处理后样品的羰基含量显著高于空白对照组,与本试验得出的结果相一致。王汉玲等^[24]通过羟自由基氧化系统对草鱼肌肉蛋白进行研究,发现氧化样品随时间的变化,羰基含量显著增加($P < 0.05$),与本试验结果一致。

巯基($-\text{SH}$)和二硫键($-\text{S}-\text{S}-$)是蛋白质中具有最高反应活性的基团,在蛋白质的结构稳定性、酶的催化作用及在蛋白质的成膜特性等方面具有重要作用^[25]。蛋白质氧化会造成巯基含量减少,因此巯基含量可作为检测蛋白质氧化程度的指标^[26]。本研究结果表明,氧化至 48 h,不同浓度氧化剂下巯基含量均降至最低,

这可能是由于巯基被氧化生成二硫键,或者进一步氧化为磺酸类等产物,从而导致蛋白质结构表面的总巯基含量的下降^[27]。雷叶斯等^[28]研究羟自由基氧化体系对大黄鱼肌原纤维蛋白结构影响时发现,随着氧化时间的延长和 H_2O_2 浓度的增加,活性巯基含量呈降低趋势,这与本试验研究结果一致。蛋白氧化会导致蛋白质中巯基交联形成二硫键,进而造成巯基含量的下降^[29]。本试验中,当氧化 12~24 h 时,随着 H_2O_2 浓度的增加,巯基含量缓慢降低,这可能是因为此时蛋白质分子发生重排,使得暴露出来的基团保持恒定,总巯基含量不再明显降低;也可能是因为羟自由基氧化体系只氧化暴露出来的特定的巯基,在氧化剂浓度较高或反应时间较长的情况下氧化达到了平衡,从而使总巯基趋于恒定^[30]。蛋白质的结构稳定性、酶的催化作用及蛋白质的成膜特性等均与二硫键的变化有很大的关联,因此,在探讨蛋白质的性质时,二硫键的变化是一项重要的测定指标^[31]。本试验结果表明,高浓度 ($20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 氧化期间,二硫键含量上升显著高于其他处理组,这可能是因为在羟自由基氧化蛋白质的过程中,巯基被氧化生成二硫键^[32]。巯基和酪氨酸残基的氧化或者亚硝基化能分别形成二硫键和双酪氨酸键,促使蛋白质内部或分子间发生交联聚合。随着氧化时间和氧化剂浓度的增加,各处理组二硫键含量不断上升,这可能是因为氧化导致蛋白结构伸展,从而使临近的巯基生成二硫键^[33]。肌球蛋白头部的 K-ATP 和 Ca-ATP 活性部位都含有巯基,酶活性的变化可以反映出肌球蛋白氧化后结构的变化^[34]。蛋白质的表面疏水性是维持蛋白质三级结构的主要作用力,对蛋白质结构和功能的稳定具有重要意义^[35]。蛋白质氧化后,蛋白质分子发生折叠,肽键断裂,使蛋白质分子内部的疏水性基团暴露,造成蛋白质表面疏水性增加,因此,蛋白质疏水性也可以反映蛋白质的氧化程度^[36]。本研究中,高浓度 ($20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 氧化过程中,随着氧化时间的延长,溴酚蓝结合量呈先上升后下降的趋势 ($P < 0.01$),蛋白质表面疏水性增加,说明羟自由基的产生可以促进蛋白质氧化作用的进行。Xiong 等^[37]通过对猪肉肌原纤维蛋白氧化研究发现,短时间的氧化使肌原纤维蛋白质发生较低的变性程度,分子结构变化不大,暴露少量的疏水基团,表面疏水性低,这与本试验研究结果相一致。

4 结论

随着氧化时间的延长和氧化剂浓度的增加,牦牛

肉肌原纤维蛋白中羰基含量呈显著增加趋势;二硫键含量、表面疏水性和 Ca-ATPase 活性也发生不同程度的增加,且氧化时间越长, H_2O_2 浓度越大,蛋白氧化程度越强。总巯基含量和 K-ATPase 活性均呈现不同程度的降低,总巯基含量在氧化时间 48 h、 H_2O_2 浓度为 $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时下降显著;K-ATPase 活性在高 H_2O_2 浓度时下降更为明显。综上,牦牛肉肌原纤维蛋白对羟自由基较为敏感,在该氧化体系下蛋白质的氧化性质发生了明显的变化,肌原纤维蛋白性质的改变与牦牛肉的加工性能和食用品质有密切关系,所以在牦牛肉及其肉制品的加工与贮藏过程中应尽量控制肌肉蛋白的氧化程度,避免其对肉品品质造成的影响。

参考文献:

- [1] Lund M N, Lametsch R, Hviid M S, Jensen O N, Skibsted L H. High-oxygen packaging atmosphere influences protein oxidation and tenderness of porcine longissimusdorsi during chill storage[J]. *Meat Science*, 2007, 77(3): 295-302
- [2] Xiong Y L, Decker E A. Alterations of muscle protein functionality by oxidative and antioxidative processes [J]. *Journal of Muscle Foods*, 1995, 6(2): 139-160
- [3] Srinivasan S, Hultin H O. Chemical, physical, and functional properties of cod proteins modified by a nonenzymic free-radical-generating system [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 1997, 45(2): 310-320
- [4] 张丽,余群力,孙宝忠. 肌肉蛋白氧化对肉类品质的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2017, 43(5): 268-276
- [5] Park D, Xiong Y L. Oxidative modification of amino acids in porcine myofibrillar protein isolates exposed to three oxidizing systems [J]. *Food Chemistry*, 2007, 103(2): 607-616
- [6] Johns A M, Birkinshaw L H, Ledward D A. Catalyst of lipid oxidation in meat products [J]. *Meat Science*, 1989, 25(3): 209-220
- [7] 李学鹏,周凯,王金厢,高艳蕾,刘裕,张晓琳,励建荣. 羟自由基对六线鱼肌原纤维蛋白的氧化规律 [J]. *中国食品学报*, 2014, 14(6): 19-27
- [8] 崔旭海. 肉蛋白氧化机制及氧化对肉制品品质和功能性的影响 [J]. *食品工业科技*, 2009, 30(6): 337-341
- [9] Timm-Heinrich M, Eymard S, Baron C P, Nielsen H H, Jacobsen C. Oxidative changes during ice storage of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed different ratios of marine and vegetable feed ingredients [J]. *Food Chemistry*, 2013, 136(3/4): 1220-1230
- [10] Decker E A, Xiong Y L, Calvert J T, Crum A D, Blanchard S P. Chemical, physical, and functional properties of oxidized turkey white muscle myofibrillar proteins [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1993, 41(2): 186-189
- [11] Park D, Xiong Y L, Alderton A L. Concentration effects of hydroxyl radical oxidizing systems on biochemical properties of porcine muscle

- myofibrillar protein [J]. Food Chemistry, 2007, 101(3): 1239-1246
- [12] 陈霞霞, 杨文鹤, 吕梁玉, 胡小超, 高喜乐. 羟自由基氧化体系对银鲟肌原纤维蛋白生化特性及其构象单元的影响[J]. 食品科学, 2016, 37(23): 123-128
- [13] 周景丽, 张坤生, 任云霞. 羟自由基氧化系统对虾蛄盐溶蛋白结构和功能性的影响[J]. 食品工业科技, 2016, 37(2): 330-334
- [14] Ma Y, Xiong Y L, Zhai J, Zhu H, Dziubla T. Fractionation and evaluation of radical-scavenging peptides from in vitro digests of buckwheat protein[J]. Food Chemistry, 2010, 118(3): 582-588
- [15] 薛梅. 蛋白质氧化对牛肉成熟过程肌原纤维蛋白降解和食用品质的影响[D]. 南京:南京农业大学, 2012
- [16] Levine R L, Williams J A, Stadtman E R, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins [J]. Methods in Enzymology, 1994, 233: 346-352
- [17] Korchak L I, Speranskaya T A. Effect of some protective substances on change in reactivity of tissue sulfhydryl groups in irradiated animals [J]. Steel Research International, 2009, 80(11): 796-799
- [18] Thannhauser T W, Konishi Y, Scheraga H A. Analysis for disulfide bonds in peptides and proteins[J]. Methods in Enzymology, 1987, 143(1):115-119
- [19] Wells J A, Werber M M, Yount R G. Inactivation of myosin subfragment one by cobalt (II)/cobalt (III) phenanthroline complexes. 2. Cobalt chelation of two critical thiolgroups [J]. Biochemistry, 1979, 18(22): 4800-4805
- [20] Chelh I, Gatellier P, Santé-Lhoutellier V. Technical note: A simplified procedure for myofibril hydrophobicity determination[J]. Meat Science, 2006, 74(4): 681-683
- [21] Stadtman E R. Protein oxidation and aging [J]. Science, 1992, 257(5074): 1220-1224
- [22] Butterfield D A, Stadtman E R. Chapter 7 protein oxidation processes in aging brain[J]. Advances in Cell Aging & Gerontology, 1997, 2: 161-191
- [23] Zhang T, Xue Y. 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
- [24] 王汉玲, 刘彩华, 秦军委, 张建. 羟自由基氧化系统对草鱼肌肉蛋白理化特性及其保水性的影响[J]. 食品科技, 2018, 43(1): 134-140
- [25] Ha A, Gennadios A, Hanna M A, Weller C L, Kuroda N. Physical and molecular properties of egg-white lipid films[J]. Journal of Food Science, 2010, 64(5): 860-864
- [26] 袁凯, 张龙, 谷东陈, 吴娜, 陶宁萍, 王锡昌, 李钰金, 刘远平. 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
- [27] 田其英, 谌卉, 华欲飞. Ellman's 试剂测定脱脂豆粕中巯基含量 [J]. 食品与生物技术学报, 2008, 27(6):107-110
- [28] 雷叶斯, 杨巨鹏, 吕春霞, 陈世达, 张慧恩, 杨华. 羟自由基氧化体系对大黄鱼肌原纤维蛋白结构的影响[J]. 食品工业科技, 2019, 40(1): 29-33
- [29] Wang Y, Xiong Y L, Rentfrow G K, Newman M C. Oxidation promotes cross-linking but impairs film-forming properties of whey proteins[J]. Journal of Food Engineering, 2013, 115(1):11-19
- [30] 章银良, 杨慧, 安巧云. 羟自由基诱导蛋白质氧化损伤的研究 [J]. 食品与生物技术学报, 2012, 31(3): 95-100
- [31] 欧仕益, 郭乾初, 包惠燕, 李爱军. 豆奶蛋白质中巯基含量的测定[J]. 中国食品学报, 2003, 3(2): 59-62
- [32] 谢笔钧. 食品化学[M]. 北京: 科学出版社, 2008:256-258
- [33] Sun W, Zhou F, Sun D W, Zhao M. Effect of oxidation on the emulsifying properties of myofibrillar proteins[J]. Food & Bioprocess Technology, 2013, 6(7):1703-1712
- [34] Huss H H, Gram L. Quality assurance in the fish industry [J]. Agris, 1994, 4(6):45-49
- [35] 张培培. 不同氧化油脂对中式香肠中蛋白质氧化的影响[D]. 扬州: 扬州大学, 2014: 25-31
- [36] 赵冰, 张顺亮, 李素, 周慧敏, 任双, 李家鹏, 陈文华, 赵燕, 王守伟. 脂肪氧化对肌原纤维蛋白氧化及其结构和功能性质的影响[J].食品科学, 2018, 39(5): 40-46
- [37] Xiong Y L, Park D, Oozumi T. Variation in the cross-linking pattern of porcine myofibrillar protein exposed to three oxidative environments[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(1): 153-159

Effect of Hydroxyl Radical Oxidation on the Biochemical Characteristics of Myofibrillar Protein of Yak Meat

CUI Wenbin WANG Huihui LIU Xiaobo MA Jibing ZHANG Li* YU Qunli GUO Zhaobin
(College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Gansu, Lanzhou 730070)

Abstract: To explore the effects of the treatment with the hydroxyl free radical ($\cdot\text{OH}$) on myofibril protein oxidation characteristics during yak meat postmortem. The yak meat oxidized with different concentrations (0, 0.5, 1, 5, 10 and 20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) of hydroxyl free radical oxidation system at different times (0, 0.5, 1, 12, 24 and 48 hours) were as the research objects, and untreated yak meat as the control groups. The change rules of myofibril protein carbonyl, thiol and disulfide bond content, surface hydrophobicity, Ca/K-ATPase activity was measured. The results showed that yak meat myofibrin presented different degrees of oxidation levels among different treatment groups with the increase of H_2O_2 concentration and the extension of oxidation time. Furthermore, the content of carbonyl group, disulfide bond and Ca-ATPase activity all presented a significant increase trend ($P<0.01$), the surface hydrophobicity increased at first but then decreased, and the content of sulfhydryl group and K-ATPase activity decreased significantly ($P<0.01$). When H_2O_2 concentration was increased to 20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, the carbonyl content of the hydroxyl radical treatment group was 46.03%, higher than that of the blank control group, while the sulfhydryl group content was 79.79% lower. In summary, hydroxyl radicals promoted significant oxidation of myofibrillar proteins during the maturation of post-mortem yak meat, increasing the degree of oxidation of the protein. The results of this study provide a reference for protein oxidation control during the production and processing of yak meat.

Keywords: hydroxyl radical oxidation system, yak beef, myofibrillar protein, protein