

# 成熟过程中活性氧簇 (ROS) 对肌原纤维蛋白结构的影响

张玉林<sup>1</sup>, 曹锦轩<sup>1</sup>, 潘道东<sup>1</sup>, 欧昌荣<sup>1</sup>, 沈建良<sup>2</sup>

(1. 宁波大学食品科学与工程系, 浙江宁波 315211) (2. 浙江卓旺农业科技有限公司, 浙江湖州 313014)

**摘要:** 以拉曼光谱为主要技术手段, 观测了鹅肉成熟过程中, 肌原纤维蛋白在 ROS 诱导剂双氧水 ( $H_2O_2$ ) 与 ROS 清除剂 N-乙酰半胱氨酸 (NAC) 的对照处理下, 其主链构象及氨基酸残基微环境的变化。经 10 mmol  $H_2O_2$  处理后的鹅肉组织中, ROS 的相对含量明显高于 10 mmol NAC 处理组 ( $p < 0.05$ )。伴随着 ROS 含量的升高,  $H_2O_2$  处理组  $\alpha$ -螺旋的含量显著下降 ( $p < 0.05$ ),  $\beta$ -折叠的含量显著上升 ( $p < 0.05$ ); 而在 NAC 处理组,  $\alpha$ -螺旋的含量显著下降 ( $p < 0.05$ ), 无规则卷曲显著上升 ( $p < 0.05$ ); 蛋白质二级结构的变化, 特别是  $\alpha$ -螺旋与  $\beta$ -折叠之间的转化与蛋白质的凝胶特性密切相关。 $H_2O_2$  处理组骨架 C-C、C-N 的伸缩振动强度下降幅度明显高于 NAC 处理组, 说明 ROS 攻击骨架肽链使蛋白发生降解;  $H_2O_2$  处理组  $760\text{ cm}^{-1}$  的归一化强度的下降趋势也明显高于 NAC 处理组, 表明氧化增强了蛋白质的表面疏水性。

**关键词:** ROS; 拉曼光谱; 肌原纤维蛋白; 二级结构 疏水性

文章编号: 1673-9078(2014)9-26-32

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.09.005

## Effect of Reactive Oxygen Species (ROS) on Structural Changes in Meat Myofibrillar Protein during Ageing

ZHANG Yu-lin<sup>1</sup>, CAO Jin-xuan<sup>1</sup>, PAN Dao-dong<sup>1</sup>, OU Chang-rong<sup>1</sup>, SHEN Jian-liang<sup>2</sup>

(1. Department of Food Science and Engineering, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

(2. Zhuowang Agricultural technological company of Jiangsu Province, Huzhou 313014, China)

**Abstract:** In this study, Raman spectroscopy was used to analyze changes in the main chain of myofibrillar protein and the microenvironment of amino acid residues in goose meat while ageing. The observations were conducted in a controlled experiment using the ROS inducer, hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), and N-acetyl cysteine (NAC), a ROS scavenger. After treatment with 10 mmol  $H_2O_2$  solution for 96 h, the relative content of ROS in goose muscle tissues was visibly higher than that in the NAC group ( $p < 0.05$ ). With increasing ROS concentration, the  $\alpha$ -helix content decreased significantly ( $p < 0.05$ ), where as the  $\beta$ -sheet content increased significantly ( $p < 0.05$ ) in the  $H_2O_2$  group. While in the NAC group, the  $\alpha$ -helix content decreased significantly ( $p < 0.05$ ), but the content of random coils increased significantly ( $p < 0.05$ ). Changes in secondary protein structure, especially the transformation between  $\alpha$ -helix and  $\beta$ -sheet forms, are closely related to gelling properties of the protein. The decline in intensity of C-C/C-N skeletal stretching vibrations was greater in the  $H_2O_2$  group than in the NAC group, indicating that ROS could target the skeletal peptide bond and induce protein degradation. The normalized decline in intensity of the Raman band at  $760\text{ cm}^{-1}$  was more pronounced in the  $H_2O_2$  group than in the NAC group, suggesting that oxidation could enhance the surface hydrophobicity of proteins.

**Key words:** reactive oxygen species; Raman spectroscopy; myofibrillar protein; secondary structure; hydrophobicity

活性氧簇 (ROS) 是细胞有氧代谢过程中产生的化学性质活泼的氧自由基和能转化为自由基的物质, 主要包括羟自由基 ( $\cdot OH$ )、超氧阴离子基 ( $O_2^{\cdot -}$ )、过

收稿日期: 2014-03-06

基金项目: 国家农业部成果转化项目 (2013GB2G200191); 国家现代农业产业体系 (GARS-43-17); 浙江省重大科技专项 (2012C12016-1)

作者简介: 张玉林 (1989-), 女, 硕士生, 研究方向: 肉品加工与质量控制

通讯作者: 曹锦轩 (1982-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 肉品加工与质量控制

氧游离基 ( $ROO\cdot$ ) 等氧自由基和过氧化氢 ( $H_2O_2$ )、氢过氧化物 ( $ROOH$ ) 等某些非自由基物质, 其中  $O_2^{\cdot -}$ 、 $\cdot OH$ 、 $H_2O_2$  最活泼, 是作用于蛋白的主要活性氧。蛋白质氧化对食品的感官品质具有重要影响, Martinaud<sup>[1]</sup>发现在肉的成熟储存过程中, 活性氧能够作用于肌原纤维蛋白引起肉品质的变化。一方面, 活性氧通过修饰蛋白质骨架肽链及氨基酸的侧链来改变蛋白质的交联或降解状况, 影响蛋白质的溶解性、疏水性、持水力、凝胶特性等理化性质, 进一步决定着肉品的

质构、风味、颜色等消费品质及蛋白质的组成、体外消化率等营养品质<sup>[2-7]</sup>。蛋白质结构也决定了风味化合物与蛋白质的结合程度,尤其是其表面有效的疏水结合部位的数目<sup>[8]</sup>,氧化能使包埋的氨基酸侧链展开,降低蛋白的热稳定性,从而改变蛋白质的表面疏水性及构象<sup>[9]</sup>。另一方面,ROS也可以间接介导蛋白质氧化,主要是诱导脂质过氧化和加速非酶糖基化生成活性羰基化合物,使蛋白质糖基化和蛋白质-蛋白质的交联,再利用其活性中间产物间接介导蛋白质氧化,使正常蛋白的活性增强或减弱<sup>[10]</sup>。

目前关于蛋白质氧化的研究多集中在临床医学,肉品学中关于宰后肌肉蛋白氧化的数据较少,特别是有关成熟过程中氧化对肌原纤维蛋白结构的影响机制研究鲜有报道。N-乙酰半胱氨酸(NAC)为谷胱甘肽的前体,是一种含有巯基的抗氧化剂,其分子中的巯基可以打开二硫键,具有清除自由基,调节细胞代谢,预防DNA损失等功能,在医学领域有广泛的应用。过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)本身就是ROS的一种,它可与很多无机或有机化合物反应生成新的过氧化物。本文将利用的拉曼光谱技术观测成熟过程中,鹅肉肌原纤维蛋白在ROS诱导剂双氧水(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)与ROS清除剂N-乙酰半胱氨酸(NAC)的对照处理下结构变化的规律,以期探求蛋白氧化改变肉食品质的实质机理,丰富和发展肉的成熟理论,为充分发挥肉的成熟潜能和成熟工艺的改进提供新的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

浙东大白鹅,象山文杰大白鹅养殖有限公司白鹅基地。氯化钠、亚硝酸钠,国药集团生物有限公司;活性氧荧光探针DCFH-DA,美国sigma公司;其它化学分析试剂均为分析纯。

GF-1型高速分散器,江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司;美国贝克曼Allerga高速冷冻离心机,贝克曼库尔特有限公司;M200全波长酶标仪,美国Tecan公司;inVia-Reflex拉曼光谱仪,法国Renishaw公司。

### 1.2 鹅肉样本的制备

选取5只体重相同,日龄为90d的浙东大白鹅,将其电击晕厥后宰杀放血(动物实验许可证号:SYXK(浙)2008-0111),迅速取下每只鹅的整块胸脯肉作为试验样本。每个样本平均分成7份,将其中1份作为0h的样本,取5g鲜肉用于活性氧含量的测定,剩下的立刻放入液氮中冷冻,用于后续的测定。剩余

的6份分成3组,分别为对照组,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理组和NAC处理组。对照组即对鹅肉不做任何其他处理,仅在4℃条件下,暴露于空气中自然成熟;而处理组则分别将鹅肉浸泡在用10mmol的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和NAC溶液中,同样4℃条件下成熟。当贮存时间分别到达24h与96h时,参照0h的处理方法,取5g未经冷冻的鹅肉用于活性氧的测定,剩余的样本迅速放入液氮中冷冻以用于后续蛋白结构的测定。

### 1.3 活性氧ROS相对含量的测定

荧光探针DCFH-DA在细胞酯酶的作用下水解生成DCFH,继而又被组织中的活性氧氧化生成有荧光的DCF,因此,检测DCF的荧光就可以知道细胞内活性氧的水平。组织匀浆液的提取及ROS含量的测定参考刘宁等<sup>[11]</sup>的方法稍加改进:将0.5g不带肌腱、脂肪的鹅肉放入3mL的Tri-HCl缓冲液(10mmol/L Tri-HCl, 0.8% (m/v) NaCl, 0.1mmol/L EDTA-2Na, 10mmol/L sucrose, pH 7.4)中剪碎,在冰上匀浆1min,3000g冷冻离心15min收集上清,并用双缩脲法测定上清蛋白浓度。ROS荧光值的测定方法如下:将100μl的上清液与100μL的反应缓冲液(10mmol/L Tris-HCl buffer, 0.8% (m/v) NaCl, 0.1mmol/L EDTA-2Na, 10mmol/L sucrose, 10μmol/L DCFH-DA, pH 7.4)在酶标板内混合,并迅速用酶标仪测出孵育前的荧光值。在37℃下孵育30min后测出孵育后的荧光值,ROS的相对含量即为:

ROS 相对含量=(孵育后的荧光值-孵育前的荧光值)/孵育时间/蛋白浓度

### 1.4 肌原纤维蛋白的制备

肌原纤维蛋白的提取参照曹锦轩等的方法<sup>[12]</sup>。将蛋白原液稀释为40mg/mL,置于4℃短期保存,用于拉曼光谱分析。

### 1.5 拉曼光谱分析

拉曼光谱的测定参照曹锦轩等的方法<sup>[12]</sup>。蛋白质二级结构(α-螺旋、无规则卷曲、β-折叠、β-转角及其他结构)含量计算参考Susi等的方法<sup>[13]</sup>。

### 1.6 数据分析

采用SAS 8.0进行方差分析,差异显著性分析采用Duncan multiple range test模式,显著性水平选定P<0.05。

## 2 结果与分析

## 2.1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 NAC 对 ROS 的生成量的影响

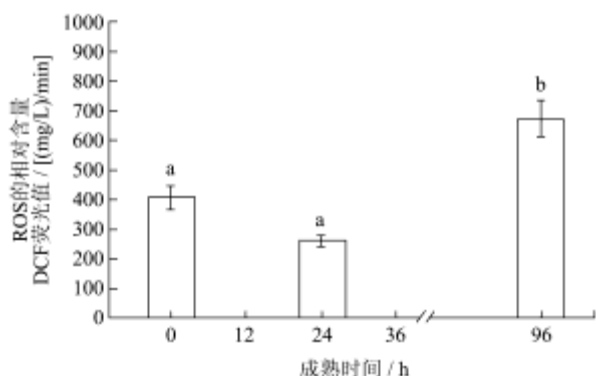


图 1 鹅肉在自然成熟过程中 ROS 的相对含量的变化

Fig.1 ROS relative content values of geese muscle during the mature process

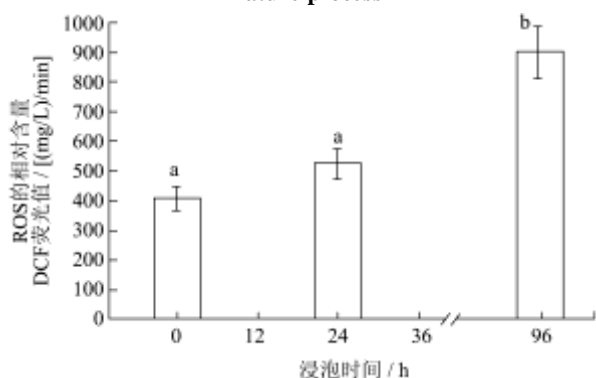


图 2 鹅肉成熟过程中经过 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 水溶液浸泡处理后 ROS 的相对含量的变化

Fig.2 ROS relative content values of geese muscle soaking in hydrogen peroxide solution during the mature process

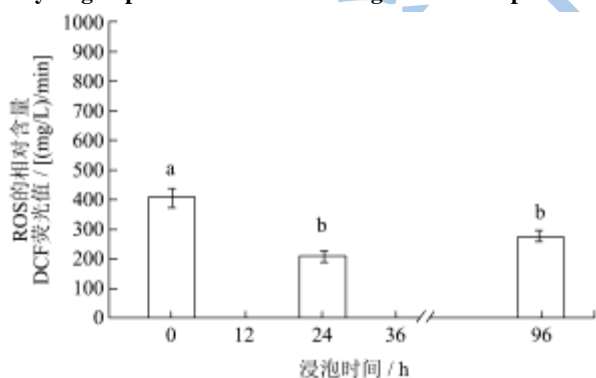


图 3 鹅肉成熟过程中经过 NAC 浸泡处理后 ROS 的相对含量的变化

Fig.3 ROS relative content values of geese muscle soaking in N-acetyl cysteine solution during the mature process

从图 1 中可知, 鹅肉在自然成熟过程中, 活性氧的相对含量在 24 h 内下降, 96 h 显著升高 ( $p < 0.05$ ); 经过 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浸泡处理后, 活性氧的含量一直呈上升趋势, 且最终活性氧的相对含量比对照组的高出 33.63% (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浸泡处理: 898, 对照组: 672, 图 2 所示);

鹅肉经过 NAC 浸泡处理后, 其活性氧的相对含量明显低于对照组和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理组 (图 3 所示), 这说明 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作为活性氧的诱导剂确实促进了活性氧的生成, 而 NAC 作为抑制剂也明显抑制了活性氧的产生。

## 2.2 通过拉曼光谱分析氧化对蛋白结构的影响

### 2.2.1 鹅肉肌原纤维蛋白拉曼光谱条带的指认

拉曼谱带可以提供肽的骨架构象信息, 其中酰胺 I 和酰胺 III 的骨架振动模式与二级结构的含量变化有密切关系。氨基酸侧链振动引起各个频率拉曼条带强度变化, 反应了酪氨酸、色氨酸以及苯丙氨酸等芳香族氨基酸残基周围的微环境。图 4 是鹅肉肌原纤维蛋白拉曼光谱, 蛋白质相关谱带的指认与分析工作曾经有系统研究报道<sup>[14-15]</sup>, 相关谱带指认见表 1。

表 1 鹅肉肌原纤维蛋白条带指认

Table 1 Tentative assignment of some bands of myofibrillar proteins from geese

波数/cm <sup>-1</sup>	峰的来源及峰的指认
760	色氨酸伸缩振动
830, 850	酪氨酸的基频和泛频费米共振
937	酰胺 III C=C 伸缩振动
1003	苯丙氨酸环的呼吸振动
1066	骨架 C-C、C-N 的伸缩振动
1127	骨架 C-N 的伸缩振动
1206	酪氨酸或苯丙氨酸
1246	酰胺 III 多肽骨架振动 β-折叠
1304	酰胺 III α-螺旋或 C-H 弯曲振动
1340	色氨酸或脂肪族 CH 弯曲振动
1452	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> , CH 的弯曲振动
1600~1700	酰胺 I (α-螺旋 1650-1665 cm <sup>-1</sup> ; β-折叠 1620-1632, 1670-1680 cm <sup>-1</sup> ; β-转角 1635-1639, 1680-1690 cm <sup>-1</sup> ; 无规则卷曲 1640-1645, 1666-1670 cm <sup>-1</sup> )
2935	脂肪族 C-H 伸缩振动

### 2.2.2 从酰胺 I 分析氧化对肌原纤维蛋白二级结构的影响

-CO-NH-(肽键)在拉曼光谱的几个特征振动模式中, 1650 cm<sup>-1</sup> 附近的酰胺 I 带是分析蛋白质二级结构最有用且最常用的谱带, 酰胺 I 主要源于肽键 C=O 的面内伸缩振动, C-N 的伸缩振动、C<sub>α</sub>-C-N 的弯曲振动及 N-H 的面内弯曲振动对其也有微弱的贡献<sup>[16]</sup>。根据 Susi 和 Byler 的方法, 利用 Peakfit 软件对 1600~1700 cm<sup>-1</sup> 范围内的拉曼光谱进行傅里叶去卷积处理后再进

行曲线拟合, 得到代表不同二级结构的特征峰及其面积所占总面积的百分比, 从而估算出不同二级结构的含量。

从图 5d、e、f 中可知, 0 h 鹅肉肌原纤维蛋白的主导峰出现在  $1658\text{ cm}^{-1}$ , NAC 处理 24 h 后主导峰偏移至  $1646\text{ cm}^{-1}$ , 表明  $\alpha$ -螺旋解旋向无规则卷曲构象变化, 96 h 主峰继续向左偏移至  $1641\text{ cm}^{-1}$ , 说明 NAC 浸泡处理能促进  $\alpha$ -螺旋向无规则卷曲转变。 $\text{H}_2\text{O}_2$  浸泡 24 h 后, 肌原纤维蛋白的主导峰位移至  $1655\text{ cm}^{-1}$ , 与 NAC 处理组相比, 左移不明显, 说明  $\text{H}_2\text{O}_2$  能阻止  $\alpha$ -螺旋进一步紧密缠绕, 96 h 主导峰重新向右位移至  $1658\text{ cm}^{-1}$ , 表明  $\alpha$ -螺旋在逐渐展开。

对去卷积后的谱图进行拟合, 相应的定量信息如图 6、7 所示, 经过  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理后, 肌原纤维蛋白  $\alpha$ -螺旋的含量呈明显的下降趋势, 而  $\beta$ -折叠的含量却呈上升趋势, 特别是在 24 h 到 96 h 之间上升显著, 说明此期间主导峰右移是  $\alpha$ -螺旋逐渐展开形成了  $\beta$ -折叠。经 NAC 处理后, 肌原纤维蛋白  $\beta$ -折叠的含量与  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理组呈现相反的变化趋势, 与 0 h 相比在 96 h 显著下降 ( $p < 0.05$ );  $\alpha$ -螺旋的含量在 24 h 也显著下降 ( $p < 0.05$ ), 但在 96 h 变化不明显; 无规则卷曲结构的含量在 0 至 24 h 显著上升 ( $p < 0.05$ ), 这说明 NAC 浸泡后肌原纤维蛋白中,  $\alpha$ -螺旋与  $\beta$ -折叠结构与向无规则卷曲结构转化。两组中  $\beta$ -转角结构的含量变化趋势相同, 可能氧化对其影响不大。

以上的实验结果表明, 蛋白氧化期间蛋白质二级结构发生的最主要的变化即为  $\alpha$ -螺旋构象转化为  $\beta$ -折叠构象, 这一现象也广泛存在于肉制品的生产加工过程中<sup>[12, 17-18]</sup>。早期的研究者认为鱼肉肌动球蛋白凝胶的形成需要  $\alpha$ -螺旋的缓慢展开, 低温凝胶现象与  $\alpha$ -螺旋结构的解旋密不可分<sup>[19]</sup>, 后来的研究发现  $\alpha$ -螺旋结构的减少一般都伴随着  $\beta$ -折叠结构的增加, 而  $\beta$ -折叠结构的形成可能才是形成凝胶和交联网络的真正原因<sup>[20]</sup>。加工过程中, 加热处理和盐离子 (如  $\text{NaCl}$ 、 $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{MgCl}_2$  等) 能够促进  $\alpha$ -螺旋展开形成  $\beta$ -折叠<sup>[21-22]</sup>。Feng 等<sup>[23]</sup>在  $\alpha$ -螺旋向  $\beta$ -回折转变机制的研究中发现削弱氢键的能量与氨基酸侧链间的相互作用可以促使  $\alpha$ -螺旋结构转变成  $\beta$ -回折 (两条反平行  $\beta$ -折叠环相链接构成的超二级结构), 而活性氧则具有削弱氢键, 破坏蛋白的能力<sup>[24]</sup>。此外, 值得一提的是, NAC 处理组在 24 h 并没有出现  $\alpha$ -螺旋构象转化为  $\beta$ -折叠的现象, 而是无规则卷曲的含量显著升高, Feng 等还发现  $\alpha$ -螺旋转变为  $\beta$ -折叠时需经历一个无规则卷曲的过程, NAC 的处理没有阻止  $\alpha$ -螺旋向无规则卷曲过渡,

却阻止了无规则卷曲向  $\beta$ -折叠转化, 目前在肉品研究领域未见有相似的有趣现象的报道。

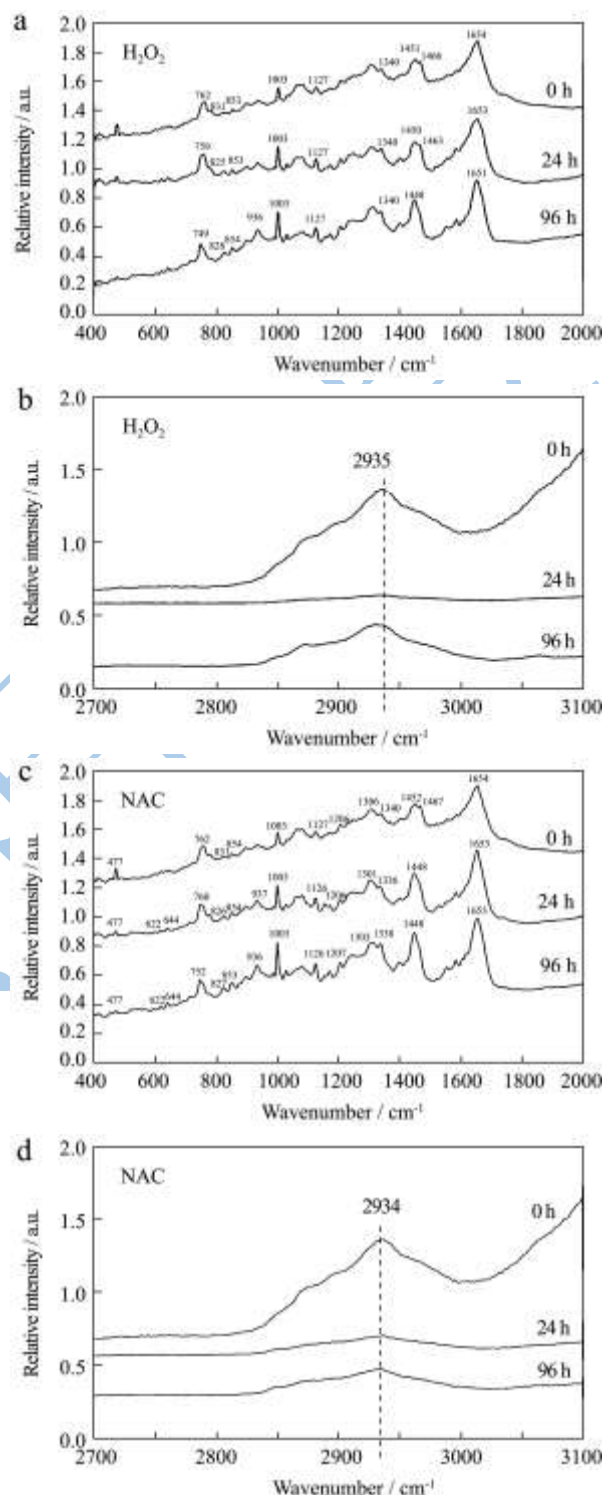


图 4 经过  $\text{H}_2\text{O}_2$  和 NAC 浸泡处理后的鹅肉肌原纤维蛋白拉曼光谱 ( $500\sim 2100\text{ cm}^{-1}$  和  $2700\sim 3100\text{ cm}^{-1}$ )

Fig.4 Raman spectrum in the  $400\sim 1800\text{ cm}^{-1}$  and  $2700\sim 3100\text{ cm}^{-1}$  wave number region of myofibrillar protein from geese muscle soaking in hydrogen peroxide solution and N-acetyl cysteine solution respectively

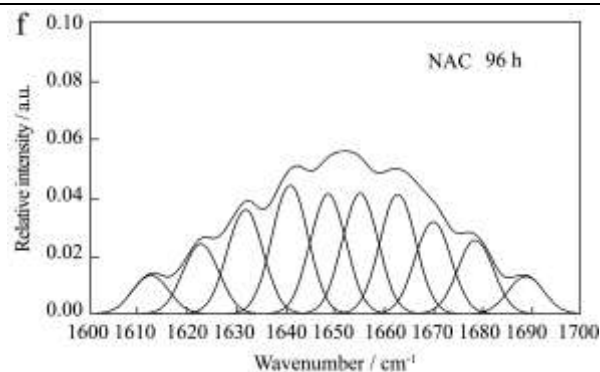
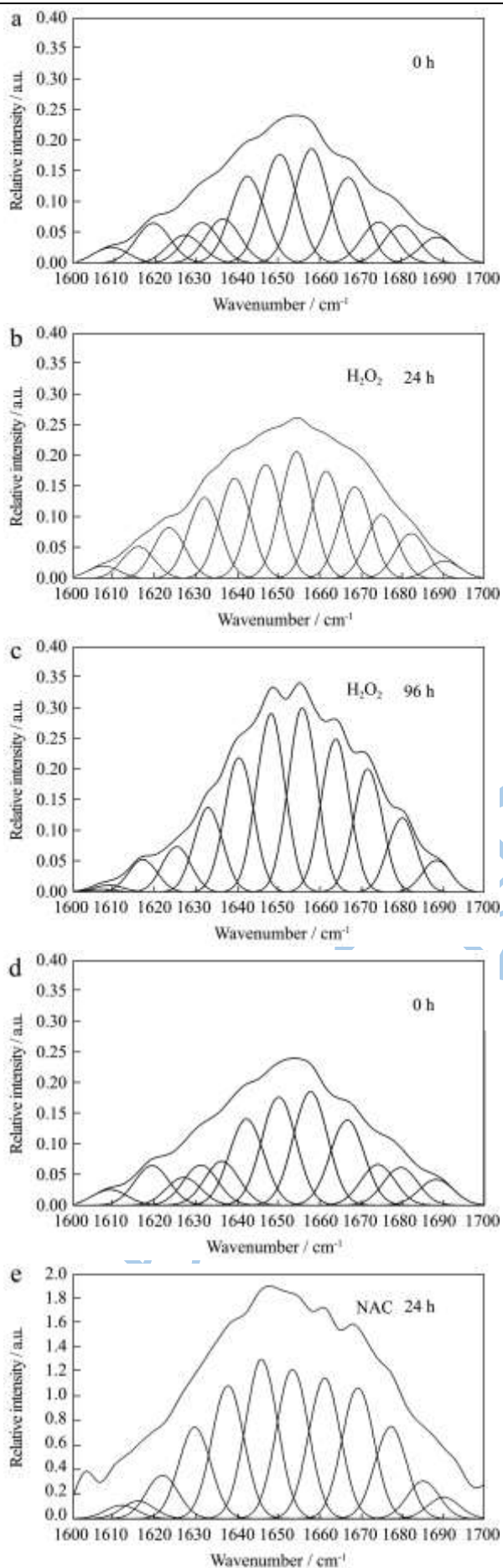


图5 不同处理组酰胺 I 去卷积变化图

Fig.5 Deconvoluted and curve fitted Raman bands of amide I of myofibrillar proteins from geese muscle with different treatments

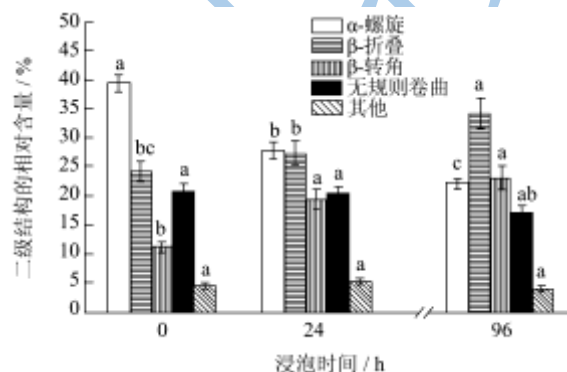


图6 成熟过程中经H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浸泡处理后鹅肉肌原纤维蛋白二级结构的变化

Fig.6 Secondary structure fractions estimated from the amide I band of myofibrillar proteins from geese muscle soaking in hydrogen peroxide solution

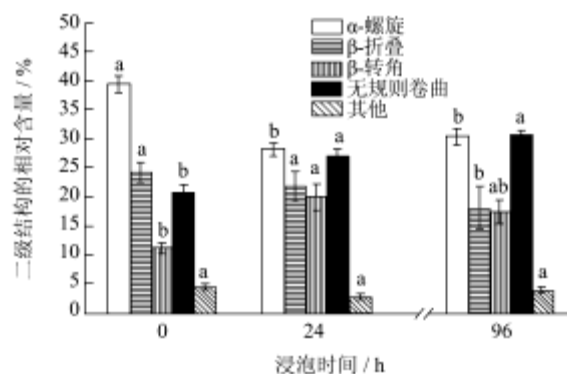


图7 成熟过程中经NAC浸泡处理后鹅肉肌原纤维蛋白二级结构的变化

Fig.7 Secondary structure fractions estimated from the amide I band of myofibrillar proteins from geese muscle soaking in N-acetyl cysteine solution

### 2.2.3 色氨酸和酪氨酸残基微环境的变化

芳香族侧链氨基酸显示了几个拉曼条带，其中一些可以反映微环境的极性，或是否参与了氢键。760 cm<sup>-1</sup>附近的拉曼光谱被认为色氨酸环的伸缩振动，

从表 2 中可知,  $I_{760}$  在两组中都呈下降趋势, 但  $H_2O_2$  处理组的下降幅度更显著。Li-Chan 曾经报道当色氨酸残基从包埋的疏水环境变成极性环境时,  $760\text{ cm}^{-1}$  的相对强度就会下降<sup>[14]</sup>。 $H_2O_2$  处理组的下降幅度更大说明  $H_2O_2$  处理能促进色氨酸残基逐渐从包埋的疏水环境中暴露出来, 由于色氨酸残基是疏水性很强的氨基酸残基, 它的暴露会增加蛋白质的表面疏水性, 因此, 我们可以推测色氨酸残基的暴露是氧化增加蛋白质表面疏水性的重要原因之一, 这一推论在其他研究中也有所体现<sup>[7, 25]</sup>。

表 2  $H_2O_2$  处理与 NAC 处理过程中肌原纤维蛋白拉曼光谱归一化强度的变化

Table 2 Normalized intensities of myofibrillar proteins from geese muscle soaking in hydrogen peroxide solution and N-acetyl cysteine solution respectively

		$I_{760}$	$I_{850}/I_{830}$	$I_{1066}$	$I_{2935}$
$H_2O_2$	0 h	$0.89 \pm 0.02^a$	$1.02 \pm 0.11^a$	$1.01 \pm 0.11^a$	$0.95 \pm 0.09^a$
	24 h	$0.83 \pm 0.01^a$	$1.02 \pm 0.09^a$	$0.91 \pm 0.05^b$	$0.15 \pm 0.01^c$
	96 h	$0.72 \pm 0.02^c$	$1.04 \pm 0.08^a$	$0.82 \pm 0.04^c$	$0.39 \pm 0.09^b$
NAC	24 h	$0.84 \pm 0.01^b$	$1.02 \pm 0.10^a$	$0.99 \pm 0.08^a$	$0.17 \pm 0.01^c$
	96 h	$0.83 \pm 0.02^b$	$1.01 \pm 0.11^a$	$0.92 \pm 0.11^{ab}$	$0.12 \pm 0.01^c$

注: 所有数据表示为平均值 $\pm$ 标准差,  $n=3$ 。同列中标注不同角标者具有显著性差异 ( $P<0.05$ )。

$850\text{ cm}^{-1}$  和  $830\text{ cm}^{-1}$  双峰被认为是一个酚羟基上氢键的信号, 在对酪氨酸的分析上, 则被判定为对羟基苯环呼吸振动和环平面弯曲振动的倍频之间的费米共振<sup>[26]</sup>, 当酪氨酸作为受体中和到弱的氢键供体, 或暴露在水溶液或极性环境中时, 双峰的比值  $I_{850}/I_{830}$  在  $0.90\sim 1.45$  之间<sup>[27]</sup>。肌原纤维蛋白经过氧化与抗氧化处理后,  $I_{850}/I_{830}$  无明显变化, 一直稳定在  $1.02$  左右, 说明成熟过程中酪氨酸残基主要是暴露的或是能够参与中度或弱的氢键, 而 ROS 对其影响不大。

### 2.2.4 骨架 C-C、C-N 的伸缩振动相对强度变化

蛋白质的主链构象除了由肽链引起的振动模式外, 还包括骨架 C-C、C-N 的伸缩振动, 该振动引起的峰在  $1066\text{ cm}^{-1}$  附近。如表 2 所示,  $I_{1066}$  在成熟过程中呈下降趋势, 同样的  $H_2O_2$  处理组的下降幅度更大。这说明 ROS 不仅通过削弱氨基酸侧链间的氢键来改变蛋白的二级构型, 还会攻击骨架肽链。大多数骨架肽链的损坏都是通过  $\cdot\text{OH}$  诱导的抽氢反应来实现的<sup>[28]</sup>, 这个反应首先发生在  $\alpha\text{-C}$  端的氨基酸残基上, 形成以碳原子为中心的自由基, 自由基与  $O_2$ 、 $HO_2\cdot$  的一连串反应生成的氢过氧化物在分解的过程中能劈开肽键<sup>[29]</sup>, 使大分子蛋白降解成小分子片段。NAC 处理

组 C-C、C-N 的伸缩振动强度下降不显著正是由于 NAC 能清除氧自由基, 对肽键起到了保护作用。

### 2.2.5 $2500\sim 3000\text{ cm}^{-1}$ 区域内脂肪族 C-H 的伸缩振动

图 4b、d 显示鹅肉肌原纤维蛋白在  $2935\text{ cm}^{-1}$  有一个明显的拉曼光谱峰, 这个条带对应于各种脂肪酸族残基的 C-H 伸缩振动, 从图中可以看出 24 h 这一峰几近消失, 96 h 后  $H_2O_2$  处理组的峰又重新生成, 与表 2 中  $I_{2935}$  变化规律相吻合。Bourroui 等<sup>[30]</sup>的研究表明, 加热时鱼糜蛋白的这个峰会向高波数方向稍微漂移, 峰高和峰面积会略有下降。在研究猪肉肌原纤维蛋白热诱导凝胶与其结构特性关系时, 韩敏义<sup>[20]</sup>的研究表明, 归一化的 C-H 伸缩振动区域峰高和峰面积随着温度升高而显著下降, 随后又显著升高, 这与本实验  $H_2O_2$  处理组的变化规律相似。韩敏义认为, 导致 C-H 伸缩振动峰的位移和强度降低的原因可能是由于 C-H 基团环境的变化, ROS 的攻击能导致氢键不稳定、 $\alpha$ -螺旋解旋, 从而导致疏水性氨基酸暴露, 造成疏水作用的变化, 而这一变化可能会影响到 C-H 基团的微环境。

## 3 结论

本实验运用拉曼光谱证明, 鹅肉成熟过程中, 氧化能促进肌原纤维蛋白中的  $\alpha$ -螺旋构象转化为  $\beta$ -折叠, 这一转化过程对肉品质和加工特性 (特别是凝胶性) 具有重要的意义;  $\alpha$ -螺旋构象的解旋促使疏水性很强的色氨酸残基暴露出来, 这可能是氧化导致蛋白质的表面疏水性增强的重要原因之一; 活性氧攻击骨架肽链, 使肽键遭到破坏, 导致蛋白降解成小分子片段; 除此之外, ROS 还能影响脂肪族 C-H 基团的微环境, 使蛋白质的构象发生变化, 从而改变蛋白质的功能。

## 参考文献

- [1] Martinaud A, Mercier Y, Marinova P, et al. Comparison of oxidative process on myofibrillar proteins from beef during maturation and by different model oxidation systems [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997, 45: 2481-2487
- [2] Sun W Z, Zhou F B, Sun D W, et al. Effect of oxidation on the emulsifying properties of myofibrillar proteins [J]. Food and Bioprocess Technology, 2012, 6(7): 1703-1712
- [3] Morzel M, Gatellier P H, Sayd T, et al. Chemical oxidation decreases proteolytic susceptibility of skeletal muscle proteins [J]. Meat Science, 2006, 73: 536-543

- [4] Liu Z, Xiong Y L, Chen J. Protein oxidation enhances hydration but suppresses water-holding capacity in porcine longissimus muscle [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58: 10697-10704
- [5] Lund M N, Lametsch R, Hviid M S, et al. High-oxygen packaging atmosphere influences protein oxidation and tenderness of porcine longissimus dorsi during chill storage [J]. *Meat Science*, 2007, 77: 295-303
- [6] Rowe L J, Maddock K R, Lonergan S M, et al. Influence of early post mortem protein oxidation on beef quality [J]. *Journal of Animal Science*, 2004, 82: 785-793
- [7] Sante-Lhoutellier V, Aubry L, Gatellier P. Effect of oxidation on in vitro digestibility of skeletal muscle myofibrillar proteins [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(13): 5343-5348
- [8] Fennema O R 著. 食品化学[M]. 王璋, 许时婴译. 北京: 中国轻工业出版社, 2003
- [9] Gao J, Yin D H, Yao Y, et al. Loss of conformational stability in calmodulin upon methionine oxidation [J]. *Journal of Biophysic*, 1998, 74(3): 1115-1134
- [10] 秦涛余, 陈志伟. 机体内活性氧生理机能研究进展[J]. *生命科学仪器*, 2008, 6: 12-16  
QIN Tao-yu, CHEN Zhi-wei. Physiological function of relative oxygen species in body: review [J]. *Life Science Instruments*, 2008, 6: 12-16
- [11] 刘宁, 王轲, 赵歌等. 递增负荷运动训练对大鼠血清及部分组织 MDA、ROS 含量和 SOD 活性变化的影响[J]. *青海医学院学报*, 2008, 29(4): 240-244  
LIU Ning, WANG Ke, ZHAO Ge, et al. The influences of incremental load training on serum and MDA, SOD and ROS of some organs of rats [J]. *Journal of Qinghai Medical College*, 2008, 29(4): 240-244
- [12] 曹锦轩, 张玉林. 腊肉加工过程中肌原纤维蛋白结构的变化[J]. *中国农业科学* 2013, 46(18): 3871-3877  
CAO Jin-xuan, ZHANG Yu-lin. The change on the construction of myofibrillar proteins in chinese traditional bacon during process [J]. *Scientia Agricultural Sinica*, 2013, 46(18): 3871-3877
- [13] Susi H, Byler D M. Fourier deconvolution of the Amide I Raman band of proteins as related to conformation [J]. *Journal of Applied Spectroscopy*, 1988, 42: 819-826
- [14] Li-Chan E C Y. The applications of Raman spectroscopy in food science [J]. *Trends in Food Science and Technology*, 1996, 7(11): 361-370
- [15] Herrero A M. Raman spectroscopy a promising technique for quality assessment of meat and fish: A review [J]. *Journal of Food Chemistry*, 2008, 107: 1642-1651
- [16] Bouraoui M, Nakai S, Li-Chan E. In situ investigation of protein structure in Pacific whiting surimi and gels using Raman spectroscopy [J]. *Food Research and International*, 1997, 30: 65-72
- [17] Sun W Z, Zhao Q Z, Zhao M M, et al. Structural evaluation of myofibrillar proteins during processing of cantonese sausage by Raman Spectroscopy [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59: 11070-11077
- [18] Shao J H, Zhou Y F, Xu X L. Evaluation of structural changes in raw and heated meat batters prepared with different lipids using Raman spectroscopy [J]. *Food Research and International*, 2011, 44: 2955-2961
- [19] Ogawa M, Nakamura S, Horimoto Y, et al. Raman Spectroscopic study of changes in fish actomyosin during setting [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, 47: 3309-3318
- [20] 韩敏义. 肌原纤维蛋白结构与热诱导凝胶功能特性关系研究-低场 NMR 和拉曼光谱法[D]. 南京: 南京农业大学, 2009  
HAN Min-yi. Study on Relationship between the pork myofibrillar protein structure and its functionality of heat-induced collation by low field NMR and Raman Spectroscopy [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2009
- [21] Liu R, Zhao S M, Xie B J, et al. Contribution of protein conformation and intermolecular bonds to fish and pork gelation properties [J]. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25: 898-906
- [22] Bocker U, Ofstad R, Bertram H C, et al. Salt-induced changes in pork myofibrillar tissue investigated by FT-IR microspectroscopy and light microscopy [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(18): 6733-6740
- [23] Fang D, Borreguero J M, Buldyrev N V. Mechanism for the  $\alpha$ -helix to  $\beta$ -hairpin transition [J]. *Proteins*, 2003, 53(2): 220-228
- [24] Zhang W, Xiao S, Ahn D U. Protein oxidation: basic principles and implications for meat quality [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2013, 53(11): 1191-1201
- [25] Pacifici R, Kono Y, Davies K. Hydrophobicity as the signal for selective degradation of hydroxyl radical-modified hemoglobin by the multicatalytic proteinase complex, proteasome [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268(21): 15405-15411
- [26] Tu A. Use of raman spectroscopy in biological compounds [J]. *Journal of the Chemical Society*, 2003, 50: 1-10

- [27] Herrero A M. Raman spectroscopy for monitoring protein structure in muscle food systems [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2008, 48(6): 512-523
- [28] Stadtman E R. Protein oxidation in aging and age-related diseases [J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2001, 928(1): 22-38
- [29] Davies M J. The oxidative environment and protein damage [J]. *Biochimica Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2005, 1703(2): 93-109
- [30] Bouraoui M, Nakai S, Li-Chan E C Y. In situ investigation of protein structure in Pacific whiting surimi and gels using Raman Spectroscopy [J]. *Food Research International*, 1997, 3: 65-72

现代食品科技