

羟自由基导致肉类肌原纤维蛋白氧化和凝胶性降低

李 银, 李 侠, 张春晖*, 孙红梅, 董宪兵

(中国农业科学院农产品加工研究所/农业部农产品加工综合性重点实验室, 北京 100193)

摘 要: 为研究羟自由基($\cdot\text{OH}$)氧化体系中肌原纤维蛋白(myofibrillar protein, MP)氧化及其凝胶特性的变化, 试验分析了羟自由基氧化体系中不同 H_2O_2 浓度对蛋白氧化程度及MP凝胶白度、持水力、质构特性(texture profiles analysis, TPA)与弹性模量等特征指标的影响。结果表明: 随 H_2O_2 浓度的增加, MP中羰基值上升, 蛋白氧化程度加剧, 凝胶白度、保水性、硬度、咀嚼性及弹性模量则与 H_2O_2 浓度呈显著负相关。与对照组相比, 当 H_2O_2 浓度增加至20 mmol/L时, 羰基含量增加至2.82 nmol/mg 蛋白($p < 0.05$), 凝胶白度、持水性及硬度则分别下降了2.83%、14.65%及52.77%($p < 0.05$)。扫描电镜(scanning electron micrograph, SEM)观察表明, MP氧化导致凝胶微观结构破坏, 形成空隙较大且分布不均的网络; 低场核磁共振分析(nuclear magnetic resonance, NMR)结果显示, 随 H_2O_2 浓度的增加, MP凝胶中的一部分不易流动水“态变”为自由水, 凝胶持水力降低。综上所述, $\cdot\text{OH}$ 氧化体系中肌原纤维蛋白氧化会影响其凝胶形成, 破坏蛋白凝胶结构, 降低凝胶功能, 这为肉类生产加工过程中蛋白氧化控制提供理论参考。

关键词: 蛋白质, 核磁共振, 肉, 羟自由基氧化体系, 肌原纤维蛋白, 微观结构

doi: 10.3969/j.issn.1002-6819.2013.12.036

中图分类号: TS251.5⁺1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6819(2013)-12-0286-07

李 银, 李 侠, 张春晖, 等. 羟自由基导致肉类肌原纤维蛋白氧化和凝胶性降低[J]. 农业工程学报, 2013, 29(12): 286-292.

Li Yin, Li Xia, Zhang Chunhui, et al. Oxidation and decrease of gelling properties for meat myofibrillar protein induced by hydroxyl radical[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2013, 29(12): 286-292. (in Chinese with English abstract)

0 引 言

畜禽宰后加工与贮藏过程中脂肪氧化、金属离子及内源氧化剂等引起的氧化反应会对肉与肉制品中的蛋白质造成氧化损伤^[1]。蛋白氧化会导致其结构与功能的显著变化, 如发生交联聚合、降解及氨基酸侧链的改变等^[2-3]。这些氧化效应会造成肉品色泽、口感劣变, 保水、保油性降低, 影响了肉品的可接受性, 缩短了产品的货架期^[4]。肌原纤维蛋白(myofibrillar protein, MP)是肌肉中最重要的一类功能性蛋白, 主要包括肌球蛋白、肌动蛋白、肌球蛋白、原肌球蛋白和肌钙蛋白等, 在热诱导作用下这类蛋白可以形成三维网络结构, 能赋予肉制品尤其是凝胶类产品良好的感官、质构及保水、保油性^[5]。

肌肉蛋白的凝胶特性作为肉与肉制品加工中最重要的功能特性之一, 近年来关于肌原纤维蛋白凝胶特性影响因素研究多集中在pH值、离子强度及不同的添加剂等方面^[6-9], 关于肌原纤维蛋白氧化对其凝胶特性的影响研究虽在国外有一些相关报道, 但影响机制尚不完全清楚, 而国内关于此方面的研究并不多, 结合低场核磁共振技术(low-field, nuclear magnetic resonance, NMR)分析氧化对蛋白水合力影响及对凝胶中水分从不易流动水向自由水的“态变”研究也较少。本文通过测定凝胶保水性、白度、硬度、贮藏模量(G')等凝胶特征指标, 并借助扫描电镜及低场核磁共振技术分析氧化对凝胶微观结构及其水分组成与分布的影响, 多角度分析羟自由基($\cdot\text{OH}$)氧化体系中 $\cdot\text{OH}$ 介导的肌原纤维蛋白氧化及其对凝胶特性的影响效应, 探讨 $\cdot\text{OH}$ 介导的蛋白氧化及对蛋白凝胶特性的影响机制。

本研究借助铁-抗坏血酸-过氧化氢($\text{Fe}^{3+}\text{-Vc-H}_2\text{O}_2$)之间的化学反应, 构建羟基自由基氧化模型体系。通过分析模型体系条件下 H_2O_2 浓度对肌原纤维蛋白凝胶特性的影响, 探讨肉与肉制品贮藏加工过程中蛋白氧化效应, 以期肉类生产加工过程中蛋白氧化控制提供理论参考。

收稿日期: 2013-02-03 修订日期: 2013-05-15

基金项目: 国家自然科学基金(31271902); 农业(行业)科技资助项目(200903012, 201303083, 201303082)

作者简介: 李 银(1988-), 女, 湖北咸宁人, 北京 中国农业科学院农产品加工研究所/农业部农产品加工综合性重点实验室, 100193。

Email: yin198802@163.com

*通信作者: 张春晖(1971-), 男, 河南固始人, 研究员, 研究方向为肉品科学。北京 中国农业科学院农产品加工研究所/农业部农产品加工综合性重点实验室, 100193。Email: dr_zch@yahoo.com.cn

1 试验材料与方法

1.1 试验材料与试剂

试验用肉为北京五肉联有限公司提供的，宰后 0~4℃ 成熟 24 h 的猪肉冷却肉的背最长肌 (*Longissimus*)，去除可见脂肪组织及结缔组织后用于提取肌原纤维蛋白。

试验所用试剂：乙二醇-双-(2-氨基乙醚)四乙酸 (ethylene glycol bis(2-aminoethyl) tetraacetic acid, EGTA) 购于美国 sigma 公司；牛血清清蛋白 (albumin from bovine serum, BSA) 购于北京拜尔迪生物技术有限公司；其他试剂均购于国药集团化学试剂有限公司，均为分析纯。

1.2 主要仪器

CR22GII 高速冷冻离心机(日本 Hitachi 公司)；T6 紫外分光光度计(北京普析通用有限公司)；电子天平(赛多利斯科学仪器(北京)有限公司)；TXF200-S12 可编程恒温循环水浴锅(英国 Grant 公司)；TA-XT2i 质构分析仪(英国 Stable Micro System 公司)；Physica MCR 301 流变仪(奥地利 Anton Paar 有限公司)；CR-400 色差仪(柯尼卡美能达(日本)公司)；Eiko IB-5 型离子溅射喷金仪(日本 Hitachi 公司)；H-7500 型扫描电镜(日本 Hitachi 公司)；NM-2011 低场核磁共振仪(上海纽迈电子科技有限公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 肌原纤维蛋白的提取

参考 Xiong 等^[10]的方法从猪背最长肌中分离提取肌原纤维蛋白，将切碎的肉块与 4 倍体积的分离缓冲液 (0.1 mol/L NaCl, 10 mmol/L Na₃PO₄, 2 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L EGTA, pH 值 7.0) 混合匀浆后离心 (4℃, 2 000×g, 15 min)，所得沉淀再重复洗涤，离心 2 次。随后再按上述操作作用 4 倍体积 0.1 mol/L NaCl 溶液洗涤，离心 2 次，并在最后 1 次离心前用 2 层纱布过滤，再用 0.1 mol/L HCl 溶液将其 pH 值调至 6.0，最后得到的蛋白膏用于构建羟基自由基氧化模型体系。蛋白质浓度用双缩脲法测定，采用牛血清清蛋白作为标准蛋白。

1.3.2 FeCl₃/Vc/H₂O₂ (铁/抗坏血酸/过氧化氢) 氧化体系构建

参考 Xiong^[11]的方法构建以下氧化体系：反应历程为 Vc+Fe³⁺→Fe²⁺，Fe²⁺+H₂O₂→·OH，FeCl₃ 浓度为 0.01 mmol/L，Vc 浓度为 0.1 mmol/L，H₂O₂ 浓度分别为 0.5、1、5、10、20 mmol/L。肌原纤维蛋白分散于上述氧化体系中 (最终质量浓度为 40 mg/mL)，在 4℃ 条件下氧化 24 h 后用 1 mmol/L 乙二胺四乙酸 (ethylene diamine tetraacetic acid,

EDTA) EDTA) 终止。以上的氧化反应均在 15 mmol/L 哌嗪 -N,N'- 双 (2-乙磺酸) (piperazine-1,4-bisethanesulfonic acid, PIPES) 为缓冲溶液 (pH 值 6.0, 离子强度 0.6 mol/L) 中进行。空白对照为新鲜猪背最长肌中提取出来后，未加氧化剂直接于 4℃ 放置 24 h 的肌原纤维蛋白 (在本试验中将 H₂O₂ 浓度定义为 0)。

1.3.3 羰基值测定

参考 Levine^[12]等测定羰基的方法，在 1.5 mL 的离心管中，加入 0.1 mL 的蛋白溶液与 0.5 mL 2,4-二硝基苯肼的 2 mol/L HCl 溶液，在 25℃ 下反应 40 min，空白样品中不含 2,4-二硝基苯肼的 2 mol/L HCl。然后加入 0.5 mL 质量分数为 20% 的三氯乙酸 (trichloroacetic acid, TCA)，震荡后离心 (11 000×g, 5 min) 弃上清，蛋白沉淀用 1 mL 的乙醇-乙酸乙酯溶液 (体积比为 1:1) 洗涤 3 次，挥发完溶剂后将蛋白质悬浮于 1 mL 6 mol/L 盐酸胍溶液中，在 37℃ 条件下水浴保温 30 min。以空白为对照 370 nm 下测吸光值，蛋白质羰基衍生物的含量 (nmol/mg·蛋白) 使用摩尔吸光系数为 22 000 L/(mol·cm) 计算。

1.3.4 蛋白热诱导凝胶制备

将氧化后的肌原纤维蛋白用含有 0.6 mol/L NaCl, 15 mmol/L 哌嗪 -1,4- 二乙磺酸 (piperazine-1,4-bisethanesulfonic acid, PIPES) 的缓冲液 (pH 值 6.0) 将其质量浓度调至 30 mg/mL 后，分别称取 5.0 g 的蛋白反应液于直径约 25 mm，高度约 55 mm 的带盖玻璃瓶中，在程序升温水浴锅中以 1℃/min 线性升温速率从 20℃ 加热至 75℃，并于 75℃ 保温 20 min 后，立即取出冷水浴后，于 4℃ 冰箱中放置 24 h 后，制得高度大约为 12 mm 左右凝胶体，用于测定其白度、保水性、质构、微观结构及低场核磁水分“态变”分析。

1.3.5 凝胶保水性测定

参考 Kocher 等^[13]的离心法测定凝胶保水性 (water holding capacity, WHC)，将制备好的蛋白凝胶准确称其质量后，于 4℃ 下 6 000×g 离心 15 min，记录离心前后离心管的质量以及空管质量。WHC (%) 计算如下

$$WHC(\%) = \frac{m_1 - m}{m_2 - m} \times 100\%$$

式中， m_1 为离心出液体后离心管与凝胶的质量，g； m_2 为离心前离心管与凝胶的质量，g； m 为空管质量，g。

1.3.6 凝胶白度测定

参考陆剑锋等^[14]的方法测定蛋白凝胶的白度值 (whiteness, W)。用色差仪测定蛋白凝胶的色差值，其中亮度值 L^* ；红度值 a^* (正值表示偏红，

负值表示偏绿)；黄度值 b^* (正值表示偏黄, 负值表示偏蓝)。测前用标准白板 ($L^*=25.60$, $a^*=-0.30$, $b^*=0.27$) 校正色差计。凝胶白度值计算如下

$$W = 100 - \sqrt{(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}}$$

1.3.7 凝胶质构测定

测量前将凝胶从 4℃ 冰箱取出, 室温下放置 30 min 后, 参考高建华等^[15]的方法并做稍加修改进行质构剖面分析 (texture profile analysis, TPA), 测量参数设定: 探头 P/0.5R, 侧前下降速率为 1.0 mm/s, 测试速度 0.5 mm/s, 测后速度 1.0 mm/s, 压缩比 50%, 最小感应力 0.05 N, 数据的采集频率为每秒采集 50 个数据点用质构仪自带软件的 TPAFRAC.MAC 过程进行分析。

1.3.8 凝胶流变学特性测定

参考 Li 等^[16]的方法并略微修改, 氧化后的肌原纤维蛋白用 PIPES 缓冲液 (pH 值 6.0) 将其质量浓度调至 30 mg/mL 后进行测量。测量参数为: 使用直径 25 mm 的平板夹具, 以 1℃/min 的升温速率从 20℃ 加热至 75℃, 振荡频率为 1 Hz, 狭缝为 1 mm。在平板夹具上好保护盖后, 滴加硅油, 防止样品水分蒸发影响测定结果。

1.3.9 扫描电镜观察凝胶微观结构测定 (scanning electron micrograph, SEM)

凝胶微观结构测定参考 Palka 等^[17]的方法并稍加修改。取空白对照组、5 及 20 mmol/L H_2O_2 组的凝胶样品, 用手术刀切成约 3 mm×3 mm×5 mm 的小条, 用体积分数为 3% 的戊二醛浸泡过夜固定, 再用 0.1 mol/L pH 值 7.2 的磷酸缓冲液洗涤 3 次; 然后质量分数 1% 锇酸固定 2 h, 再用体积分数 30%、50%、70%、90%、95% 及 100% 乙醇进行脱水, 每次 10 min 直至除去样品中的水分为止, 再用 100% 乙醇重复脱水 3 次, 保证样品绝对无水; 再经乙酸异戊酯置换后经 CO_2 临界点干燥, 真空离子溅射喷金仪喷金后进行微观结构观察。

1.3.10 凝胶水分分布与组成测定 (low-field NMR)

参考吴焯等^[18]的方法采用低场 NMR 弛豫测定空白对照组、5 mmol/L H_2O_2 及 20 mmol/L H_2O_2 组凝胶样品水分分布及组成, 测定条件: 质子共振频率为 22.6 MHz, 测量温度为 32℃。将大约 1.0 g 样品放入 15 mm 核磁管中, 随后立即放入 NM-2011 核磁共振成像仪中进行分析。采用 Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) 序列测定样品弛豫时间 T_2 值。测量参数为: τ -值 (90° 脉冲与 180° 脉冲之间的时间) 为 100 μs ,

重复扫描 16 次, 重复间隔时间为 3 000 ms 得到 15000 个回波, 所得 CPMG 指数衰减曲线采用仪器自带的 MultiExp Inv Analysis 软件进行反演, 得到 T_2 值。

1.3.11 数据分析

本试验中除电镜试验外, 所有样品均至少设置 3 个重复。用 SAS 9.2 (statistic analysis system, SAS) 对结果进行方差分析, 使用最小显著差异法 (LSD) 进行显著性分析 ($P < 0.05$)。并用 SAS 9.2 进行各指标之间的相关性分析。

2 结果与分析

2.1 H_2O_2 浓度对肌原纤维蛋白中羰基含量的影响

蛋白质中羰基的产生可作为蛋白氧化的重要指标之一, 羰基主要由氨基酸侧链 (通常为易受自由基攻击的带有 NH 或者 NH_2 的氨基酸残基) 及肽键的氧化断裂产生^[19]。羰基含量越高表明蛋白质氧化程度越高^[5,20]。图 1 为羟自由基 ($\cdot OH$) 氧化体系中 H_2O_2 浓度对肌原纤维蛋白羰基含量的影响, 由图可知, 随着 H_2O_2 浓度的增加, 蛋白质羰基含量也呈现上升趋势, 空白对照组肌原纤维蛋白羰基含量为 1.17 nmol/mg 蛋白, 当 H_2O_2 浓度达到 20 mmol/L 时, 羰基含量增加至 2.82 nmol/mg ($P < 0.05$)。羰基含量的增加可能是由于羟自由基 ($\cdot OH$) 对氨基酸侧链或肽键的氧化攻击造成^[21]。在此氧化体系中, H_2O_2 浓度越高, $\cdot OH$ 浓度越高, 导致羰基含量不断增加, 从而较为直观地反映出蛋白的氧化程度。

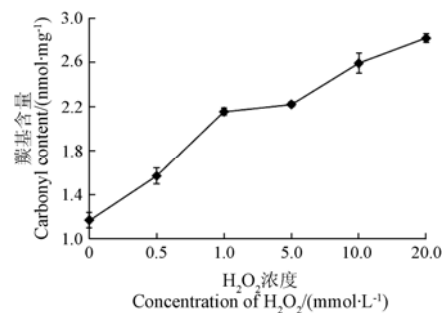


图 1 H_2O_2 浓度对羰基含量的影响

Fig.1 Concentration effect of H_2O_2 on carbonyl content

2.2 蛋白氧化对凝胶白度、质构及保水性的影响

蛋白凝胶的白度反应了蛋白质的变性程度, 白度值越低, 表明蛋白氧化变性程度越严重^[22]。Xia 等^[23]研究报道蛋白凝胶白度值的下降可能是由于氧化产物与蛋白质的氨基酸侧链发生的非酶褐变引起的。表 1 结果显示, 随着 H_2O_2 浓度的增加, 蛋白凝胶的白度值显著下降, 氧化程度加剧, 与对照组的肌原纤维蛋白相比, H_2O_2 浓

度为 20 mmol/L 时, 蛋白凝胶白度值降低了 2.83% ($P<0.05$), 这表明 H_2O_2 浓度越高, 蛋

表 1 H_2O_2 浓度对肌原纤维蛋白凝胶白度、保水性及质构特性的影响
Table 1 Effect of H_2O_2 concentration on whiteness, water holding capacity and texture of gel

H_2O_2 浓度 Concentration of $H_2O_2/(mmol L^{-1})$	白度 Whiteness	硬度 Hardness/g	黏聚性 Gumminess	弹性 Springiness	咀嚼性 Chewiness/g	保水性 Water holding capacity/%
0	89.89±0.16 ^a	226.16±9.22 ^a	0.59±0.02 ^a	0.73±0.02 ^a	96.92±4.55 ^a	64.17±0.93 ^a
0.5	89.03±0.07 ^{ab}	191.00±14.9 ^b	0.55±0.01 ^a	0.67±0.04 ^b	65.32±4.19 ^b	62.78±0.85 ^{ab}
1.0	88.41±0.84 ^{bc}	152.35±12.58 ^c	0.54±0.03 ^a	0.68±0.02 ^{ab}	55.78±2.24 ^b	62.49±1.19 ^b
5.0	87.84±1.37 ^{bc}	137.43±7.88 ^{cd}	0.42±0.03 ^b	0.66±0.03 ^{bc}	40.79±5.31 ^c	58.17±0.59 ^c
10.0	87.81±1.13 ^{bc}	116.03±6.3 ^{de}	0.41±0.05 ^b	0.58±0.05 ^d	27.89±6.36 ^{cd}	54.72±0.38 ^d
20.0	87.35±0.22 ^c	106.89±23.29 ^e	0.39±0.10 ^b	0.60±0.03 ^{cd}	25.07±9.87 ^d	54.77±1.18 ^d

注: 同一列的不同字母表示差异显著 ($P<0.05$), 下同

Note: Different letters in the same column indicate significant differences ($P<0.05$). The same as below.

硬度是蛋白凝胶最重要的功能特性之一, 凝胶的弹性、黏聚性及咀嚼性也影响着凝胶的功能特性^[24]。由表 1 的结果可知, 凝胶的质构特性指标(硬度、黏聚性、弹性及咀嚼性)都随 H_2O_2 浓度的增加而下降。其中, 凝胶的硬度从 226.16 g (空白对照) 降低至 106.89 g (H_2O_2 浓度 20 mmol/L), 降低了 52.7% ($P<0.05$), 崔旭海等的研究也得出了类似的结论^[25]。氧化可能会导致蛋白质溶解度下降, 减少参与成胶的蛋白量, 从而降低凝胶强度^[26], 同时氧化程度越高凝胶保水性越低, 也会导致凝胶强度下降。

与凝胶质构特性结果相似, 蛋白凝胶的保水性也随 H_2O_2 浓度的增加而显著下降(表 1)。与空白对照相比, 当 H_2O_2 浓度增加到 20 mmol/L 时, 蛋白凝胶保水性从 64.17% 下降至 54.77%, 下降了 14.65% ($P<0.05$)。蛋白凝胶中的水分主要是通过蛋白水合作用和毛细管作用束缚在凝胶网络中的, 氧化会使蛋白质结构遭到破坏, 使凝胶中形成很多空隙, 导致蛋白质的水合作用和毛细管作用下降, 随着凝胶网络中空隙的增多, 凝胶的保水力也显著降低^[27]。

2.3 蛋白氧化对凝胶流变学特性的影响

为研究蛋白氧化对其凝胶形成能力的影响, 本试验测定了氧化后肌原纤维蛋白的流变学特性(图 2)。G' 称为弹性模量, 它是描述固体材料抵抗形变能力的物理量, 能够反映蛋白质的弹性品质, 以及蛋白凝胶的转变温度^[23,25]。G' 越大说明凝胶弹性越强, 肌原纤维蛋白的 G' 大体上在起初的升温阶段有一段平稳期(温度低于 45°C); 随着温度的升高, G' 上升至最大值, 随后急剧下降(50°C 附近有最大峰, 该温度为肌球蛋白的变性温度^[28]); 最后 G' 随着温度升高稳步上升, 直至加热终点(75°C), 这与 Liu 等^[5]研究肌原纤维蛋白流变学特性曲线相一致。45~55°C 转变峰的出现主要是由于在该温度

范围内, 蛋白结构打开, 蛋白质相互作用增强, 蛋白开始加速聚集形成凝胶^[29]。随着 H_2O_2 浓度的增加, 肌原纤维蛋白 G' (45~55°C) 的峰值明显下降(图 2), 这表明氧化显著影响了肌原纤维蛋白凝胶弹性, 随着蛋白氧化程度的加剧, 凝胶弹性模量显著下降, 这与本试验对质构的相关结果相吻合。

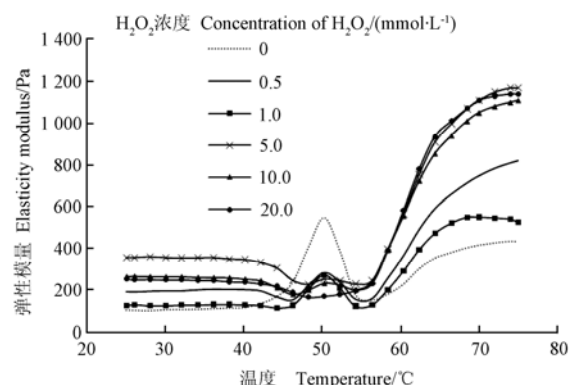


图 2 H_2O_2 浓度对肌原纤维蛋白凝胶弹性模量的影响
Fig.2 Effect of H_2O_2 concentration on G' of gel

2.4 蛋白氧化对凝胶微观结构的影响

由图 3 扫描电镜图可知, 不同氧化程度的肌原纤维蛋白凝胶微观结构存在明显差异。空白对照组蛋白形成的凝胶网状结构致密、形状规则、空隙较小、且分布均匀(图 3a); 而氧化组肌原纤维蛋白则形成结构粗糙, 空隙较大, 且分布不均匀的凝胶网络(图 3b、3c); 氧化剂浓度对最终凝胶的微观结构有很大的影响, 不同氧化程度 MP 凝胶微观结构存在明显的差异, 与 5 mmol/L 的较低 H_2O_2 浓度组相比(图 3b), 20 mmol/L 高 H_2O_2 浓度组凝胶微观结构的网孔更多且孔径更大, 大面积的孔壁发生断裂, 网络结构破坏严重, 蛋白胶束的聚集增加, 且更不均匀(图 3c)。这可能是由于随着 H_2O_2 浓度的增大, 肌原纤维蛋白溶解度下降, 从而导致热诱

导凝胶形成过程中蛋白过度交联，阻止活性功能基团的有序结合，最终阻碍有序凝胶网络的形成^[26]，

进而也会降低凝胶的弹性（图 2），空隙的加大也会显著影响凝胶的保水性及质构特性（表 1）。

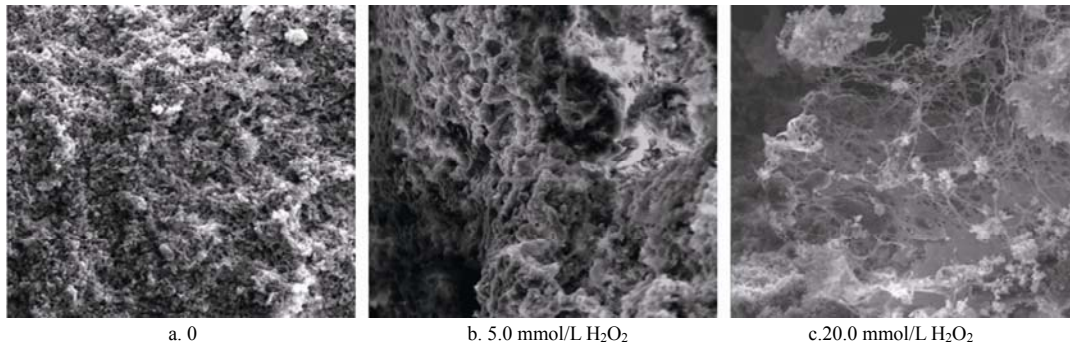
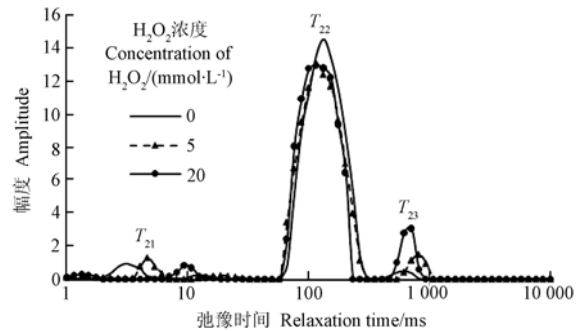


图 3 肌原纤维蛋白凝胶结构扫描电镜图（放大倍数 500×）
Fig.3 Scanning electron microscope of myofibrillar protein gel (magnification 500×)

2.5 蛋白氧化对凝胶水分分布及组成的影响

从低场核磁 NMR T_2 图谱可以看出（图 4），肌原纤维蛋白凝胶 T_2 在 1~10 000 ms 的弛豫时间内分布有 3 个峰，这与 Goetz^[30]用 NMR 研究乳清蛋白与卵蛋白及吴焯^[18]研究兔肌球蛋白热凝胶的结果一致。 T_2 值对应的 3 个峰分别对应凝胶中 3 种状态的水：结合水 T_{21} ，不易流动水 T_{22} 及自由水 T_{23} ，各峰与横坐标面积百分比即为各组分水所占百分含量，分别记为 P_{21} ， P_{22} ， P_{23} 。从各峰面积积分的结果可知， H_2O_2 浓度对结合水含量 P_{21} 影响不大 ($P > 0.05$)；不易流动水含量 P_{22} 随 H_2O_2 浓度增加而下降，与空白对照组 P_{22} (94.03%) 相比， H_2O_2 浓度为 5 mmol/L 及 20 mmol/L 时， P_{22} 分别下降了 2.87% ($p < 0.05$)、5.89% ($p < 0.05$)；自由水含量 P_{23} 随 H_2O_2 浓度增加而增加，从空白对照组的 1.37% 增加至 5 mmol/L 时的 4.25% ($p < 0.05$) 和 20 mmol/L 时的 7.56% ($p < 0.05$)。这表明，随着 H_2O_2 浓度的增大，凝胶中的一部分不易流动水“态变”为自由水，而自由水是凝胶中结合最不紧密的水，也是离心最易损失的水，因此， H_2O_2 浓度越大，自由水含量越高，凝胶保水性越低，这与本试验关于凝胶保水性的研究结果相一致。



注： T_{21} 、 T_{22} 、 T_{23} 分别指凝胶中结合水，不易流动水及自由水的弛豫时间。
Note: T_{21} , T_{22} , T_{23} represent relaxation time of bound water, immobile water and free water of gel.

图 4 H_2O_2 浓度对肌原纤维蛋白凝胶 T_2 弛豫时间的影响
Fig.4 Effect of H_2O_2 concentration on T_2 of myofibrillar protein gel

2.6 相关性分析

相关性分析结果显示， H_2O_2 浓度与肌原纤维蛋白中羰基含量显著正相关 ($r=0.832$, $p < 0.05$)，与凝胶的保水性 ($r=0.884$, $p < 0.05$) 及硬度 ($r=0.819$, $P < 0.05$) 显著负相关；羰基含量与保水性显著负相关 ($r=0.906$, $p < 0.05$)，与白度 ($r=0.969$, $p < 0.01$)，硬度 ($r=0.996$, $p < 0.01$)，及咀嚼性 ($r=0.970$, $p < 0.01$) 极显著负相关。这表明 H_2O_2 浓度越高，蛋白氧化程度越严重，凝胶的白度、保水性、硬度及咀嚼性越差（表 2）。

表 2 各指标相关性分析

Table 2 Correlation analysis between indexes of gel

	H_2O_2 浓度 Concentration of H_2O_2	羰基含量 Carbonyl content	白度 Whiteness	保水性 Water holding capacity	硬度 Hardness	咀嚼性 Chewiness
H_2O_2 浓度 Concentration of H_2O_2	1.000	0.832*	-0.781	-0.884*	-0.819*	-0.783
羰基含量 Carbonyl content		1.000	-0.969**	-0.906*	-0.996**	-0.970**
白度 Whiteness			1.000	0.889*	0.956**	-0.979**
保水性 Water holding capacity				1.000	0.906*	0.920**
硬度 Hardness					1.000	0.975**
咀嚼性 Chewiness						1.000

注：*表示 $p < 0.05$ 水平差异显著；**表示 $p < 0.01$ 水平差异显著。

Note: *represents significantly different at $p < 0.05$; ** represents significantly different at $p < 0.01$.

3 结 论

在羟自由基模型体系中, H_2O_2 浓度 (0~20.0 mmol/L) 越大, 肌原纤维蛋白氧化越严重, 所形成凝胶的白度、硬度、弹性、黏聚性、咀嚼性及保水性越低; 氧化会影响凝胶的形成能力及凝胶的微观结构, 导致疏松多孔且不规则凝胶网络的形成; 同时羟自由基介导的蛋白氧化也会造成凝胶中一部分结合紧密的不易流动水“态变”为自由流动水, 从而降低凝胶的保水力。

综上所述, 在羟自由基氧化体系中, H_2O_2 对蛋白质的氧化存在着明显的浓度效应, 进而显著影响凝胶特性。在肉与肉制品的加工与贮藏过程中, 应尽量控制肌肉蛋白氧化, 避免其对肉品质造成的影响。

[参 考 文 献]

- [1] Xiong Y L, Decker E A. Alterations in muscle protein functionality by oxidative and antioxidative processes[J]. *Journal of Muscle Foods*, 1995, 6(2): 139—160.
- [2] Srinivasan S, Hultin H O. Chemical, physical, and functional properties of cod proteins modified by a nonenzymic free-radical-generating system[J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1997, 45(2): 310—320.
- [3] Li S J, King A J. Lipid oxidation and myosin denaturation in dark chicken meat[J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1996, 44(10): 3080—3084.
- [4] Kanner J, Hazan B, Doll L. Catalytic “free” iron ions in muscle foods[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1988, 36(3): 412—415.
- [5] Liu G, Xiong Y L, Butterfield D A. Chemical, physical and gel-forming properties of oxidized myofibrils and whey- and soy-protein isolates[J]. *Food Chemistry and Toxicology*, 2000, 65(5): 811—818.
- [6] 杨速攀, 彭增起. 肌原纤维蛋白凝胶研究进展[J]. *河北农业大学学报*, 2003, 26(增 1): 160—166.
Yang Supan, Peng Zengqi. Study advances on gelation of myofibrils[J]. *Journal of Agricultural University of Hebei*, 2003, 26(supp.1): 160—166. (in Chinese with English abstract)
- [7] Gang Liu, Xiong Y L. Gelation of Chicken muscle myofibrillar proteins treated with protease inhibitors and phosphates[J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1997, 45(9): 3437—3442.
- [8] 王淑杰, 周亚军, 苏丹, 等. 鹿肉盐溶蛋白热诱导凝胶特性影响因素试验[J]. *农业机械学报*, 2010, 9(41): 122—127.
Wang Shujie, Zhou Yajun, Su Dan, et al. Properties of venison protein gelatin and mathematical model[J]. *Transactions of Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2010, 9(41): 122—127. (in Chinese with English abstract)
- [9] 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.
Fei Ying, Han Minyi, Yang Linghan, et al. Studies on the secondary structure and heat-induced gelation of pork myofibrillar proteins as affected by pH[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, 43(1): 164—170. (in Chinese with English abstract)
- [10] Wu M G, Xiong Y L, Chen J. Rheology and microstructure of myofibrillar protein-plant lipid composite gels: Effect of emulsion droplet size and membrane type[J]. *Journal of Food Engineering*, 2011, 106(4): 318—324.
- [11] Park D, Xiong Y L, Alderton A L. Concentration effects of hydroxyl radical oxidizing systems on biochemical properties of muscle myofibrillar protein[J]. *Food Chemistry*, 2007, 101(3): 1239—1246.
- [12] Levine R L, Williams J A, Stadtman E R, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins[J]. *Method in Enzymology*, 1994, 233: 346—357.
- [13] Kocher P N, Foegeding E A. Microcentrifuge-based method for measuring water-holding of protein gels[J]. *Journal of Food Science*, 1993, 58(5): 1040—1046.
- [14] 陆剑锋, 邵明栓, 林琳, 等. 卡拉胶和超高压对鱼糜凝胶性质的影响[J]. *农业机械学报*, 2011, 12(42): 164—170.
Lu Jianfeng, Shao Mingshuan, Lin Lin, et al. Effects of Ultra-high Pressure and carrageenan on gelling properties of surimi from silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix*[J]. *Transactions of Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2011, 12(42): 164—170. (in Chinese with n English abstract)
- [15] 高建华, 戴思齐, 刘家明, 等. 六种果皮原料果胶的理化及凝胶特性比较[J]. *农业工程学报*, 2012, 28(16): 288—292.
Gao Jianhua, Dai Siqi, Liu Jiaming, Li Jiajia, et al. Comparison of physicochemical and gelation properties of pectins extracted from six pericarps[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE)*, 2012, 28(16): 288—292. (in Chinese with English abstract)
- [16] Li J, Ould Eleya M M, Gunasekaran S. Gelation of whey protein and xanthan mixture: Effect of heating rate on rheological properties[J]. *Food Hydrocolloids* 2006, 20(5): 678—686.
- [17] Palka K, Daun H. Changes in texture, cooking losses, and myofibrillar structure of bovine M. semitendinosus during heating[J]. *Meat Science*, 1999, 51(3), 237—243.
- [18] 吴焯, 许柯, 徐幸莲, 等. 低场核磁共振研究 pH 值对兔肌球蛋白热凝胶特性的影响[J]. *食品科学*, 2010, 31(9): 6—11.
Wu Ye, Xu Ke, Xu Xinglian, et al. Effect of pH on gelation properties of rabbit myosin[J]. *Food Science*, 2010, 31(9): 6—11. (in Chinese with English abstract)
- [19] Stadtman E R. Protein oxidation and aging[J]. *Science*, 1992, 257(5074): 1220—1224.
- [20] Dean R T, Fu S L, Stocker R, et al. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation[J]. *Biochemical Journal*, 1997, 324: 1—18.
- [21] Butterfield D A, Stadtman E R. Protein oxidation processes in aging brain. Timiras P S, edit. *Advances in Cell Aging and Gerontology* [M], Elsevier Science Press, Netherlands:1997, 2: 161—191.
- [22] Hwang J S, Lai K M, Hsu K C. Changes in textural and rheological properties of gels from tilapia muscle proteins induced by high pressure and setting[J]. *Food Chemistry*, 2007, 104(2): 746—753.
- [23] Xia Xiufang, Kong Baohua, Xiong Youling, et al. Decreased gelling and emulsifying properties of myofibrillar protein from repeatedly frozen-thawed porcine longissimus muscle are due to protein denaturation and susceptibility to aggregation[J]. *Meat Science*, 2010, 85(3): 481—486.
- [24] 潘君慧. 冻藏方式、猪肉蛋白氧化及猪肉品质关系的研究[D]. 南京: 江南大学, 2011.
Pan Junhui. The Relationships of Frozen Storage Porcine Myofibrillar Protein Oxidation and Quality of Pork Products[D]. NanJing: Jiangnan University, 2011. (in Chinese with English abstract)

- [25] 崔旭海, 孔保华. 自由基引起的氧化对牛乳清蛋白凝胶特性的影响[J]. 农业工程学报, 2009, 25(增 1): 222—228. Cui Xuhai, Kong Baohua. Effects of protein oxidation by a free radical-generating system on gel characteristics of bovine whey protein[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2009, 25(supp.1): 222—228. (in Chinese with English abstract)
- [26] Smyth A B, Smith D M, O'Neill E. Disulfide bonds influences the heat-induced gel properties of chicken breast muscle myosin[J]. Journal of Food Science, 1998, 63(4): 584—588.
- [27] Martinaud A, Mercier Y, Marinova P, et al. Comparison of oxidative processes on myofibrillar proteins from beef during maturation and by different model oxidation systems[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997, 45(7): 2481—2487.
- [28] Deng Y, Rosenvold K, Karlsson A H, et al. Relationship between thermal denaturation of porcine muscle proteins and water-holding capacity[J]. Journal of Food Science, 2002, 67(5): 1642—1648.
- [29] Xiong Y L, Blanchard S P. Myofibrillar protein gelation: Viscoelastic changes related to heating procedures[J]. Journal of Food Science, 1994, 59(4): 734—738.
- [30] Goetz J, Koehler P. Study of the thermal denaturation of selected proteins of whey and egg by low resolution NMR[J]. Journal of Food Science and Technology, 2005, 38(5): 501—512.

Oxidation and decrease of gelling properties for meat myofibrillar protein induced by hydroxyl radical

Li Yin, Li Xia, Zhang Chunhui^{*}, Sun Hongmei, Dong Xianbing

(Comprehensive Key Laboratory of Agro-Products Processing, Ministry of Agriculture, Institute of Agro-Products Processing Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: Oxidation and changes of gelling properties of myofibrillar protein (MP) induced by the hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) were studied in this paper. Pork myofibrillar protein was suspended in 15 mmol/L piperazine-N, N-bis(2-ethane sulfonic acid) (PIPES) buffer (pH 6.0), and 0.6 mol/L NaCl, and incubated at 4°C for 24 h with ferric ion (Fe^{3+}) and ascorbic acid (Vc) at six concentrations of hydrogen peroxide (0, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 20.0 mmol/L H_2O_2). The indexes including protein carbonyl content and whiteness, water-holding capacity (WHC), and texture profile analysis (TPA) of MP gel were measured. The ability of MP to form a fine gel network was described in terms of shear storage modulus (G'), and it was analyzed by small strain oscillatory rheological testing. The microstructure of MP gel was observed by scanning electric microscopy (SEM). The transverse relaxation time (T_2) and water distribution of MP gel were analyzed by low-field nuclear magnetic resonance (low-field NMR). Correlation analysis between indexes of MP gel was also performed to establish possible linkages between concentration of H_2O_2 and different parameters of MP gel in this study. The results showed that carbonyl content steadily increased with H_2O_2 concentration, increased from 1.17 nmol/mg protein (non-oxidized MP) to 2.82 nmol/mg protein (20.0 mmol/L H_2O_2). With increasing H_2O_2 concentration, the whiteness and WHC of MP gel decreased significantly ($p < 0.05$) (89.89, 64.17% respectively for non-oxidized MP gel, 87.35, 54.77% respectively for 20.0 mmol/L H_2O_2). The texture (hardness, springiness, cohesiveness and chewiness) and shear storage modulus (G') also attenuated with increasing H_2O_2 concentration. The SEM results demonstrated that oxidation of protein could significantly affect the microstructure of MP gel. The non-oxidized MP gel exhibited a compact and homogeneous fine network microstructure, whereas the oxidation process produced empty spaces and changed the compact and fine gel structure to a coarser network, and the effect increased with higher H_2O_2 concentration. The low-field NMR relaxation measurement results indicated that the oxidation degree of protein had no effect on the bound water (T_{21}) of MP gel but had significant effects on immobile water (T_{22}) and free water (T_{23}) of MP gel. T_{22} water content (P_{22}) decreased with increasing H_2O_2 concentration (94.03% for non-oxidized MP gel, 91.16% for 5 mmol/L H_2O_2 , 88.14% for 20 mmol/L H_2O_2). T_{23} water content (P_{23}) increased with H_2O_2 concentration (1.37% for non-oxidized MP gel, 4.25% for 5 mmol/L H_2O_2 , 7.56% for 20 mmol/L H_2O_2). Taken together, these results demonstrate that with increasing H_2O_2 concentration, some part of the immobile water of MP gel shifts to free water, and the free water would become the potential centrifuge drip loss. Correlation analysis results showed that concentration of H_2O_2 was highly negatively correlated with whiteness, WHC, hardness and chewiness ($p < 0.05$). Based on the synthetic evaluation on the testing results of the MP gel, it can be concluded that the $\cdot\text{OH}$ will result in oxidation of MP, and have detrimental effects on the gelling property of porcine MP. Therefore, it is imperative to inhibit the oxidation of MP during storage and processing of meat to avoid losing the functional properties of porcine MP.

Key words: proteins, nuclear magnetic resonance (NMR), meats, hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) oxidizing system, myofibrillar protein (MP), microstructure