

# ·OH对肌原纤维蛋白中敏感氨基酸的氧化效应分析

李 银, 张春晖\*, 李 侠, 孙红梅, 董宪兵, 谢小雷, 王春青

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

**摘 要:** 借助  $Fe^{3+} - H_2O_2 - Vc$  氧化模型体系, 通过测定不同  $H_2O_2$  浓度条件下, 氧化对肌原纤维蛋白中的氨基酸及氧化衍生物含量的影响, 分析了羟自由基( $\cdot OH$ )对肌原纤维蛋白中敏感氨基酸的氧化效应。结果表明:  $\cdot OH$ 对构成肌原纤维蛋白氨基酸的氧化具有选择性, 门冬氨酸(Asp)、甘氨酸(Gly)及亮氨酸(Leu)等对氧化作用不敏感, 其含量变化不显著, 而半胱氨酸(Cys)、蛋氨酸(Met)及酪氨酸(Tyr)对氧化敏感, 随着  $H_2O_2$  浓度增加, 模型体系中  $\cdot OH$  的生成量也逐渐增加, 导致3种敏感氨基酸含量呈下降趋势; 对蛋白的羰基、总巯基及二酪氨酸等氧化衍生物含量的测定结果显示, 氧化会导致蛋白的羰基及二酪氨酸含量增加, 总巯基含量下降; 进一步研究表明, 氨基酸氧化存在明显的浓度效应, 随着  $H_2O_2$  浓度升高, 模型体系中  $\cdot OH$  的生成量逐渐增加, 氨基酸氧化程度加重, 与未氧化的肌原纤维蛋白相比, 当  $H_2O_2$  浓度达到 20.0 mmol/L 时, Cys、Met 及 Tyr 的含量分别下降了 13.3%、11.6%、20.5%。综上所述, 氧化引起的含有活性基团敏感型氨基酸的结构改变是导致蛋白氧化的主要原因。

**关键词:** 羟自由基( $\cdot OH$ ); 肌原纤维蛋白; 敏感氨基酸; 氧化

中图分类号: O657.3; O629.7 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2013)09-1038-06

doi: 10.3969/j.issn.1004-4957.2013.09.002

## Analysis of Oxidation Effect of $\cdot OH$ on Sensitive Amino Acids in Myofibrillar Protein

LI Yin, ZHANG Chun-hui\*, LI Xia, SUN Hong-mei, DONG Xian-bing, XIE Xiao-lei, WANG Chun-qing

(CAAS/Comprehensive Key Laboratory of Agro-Products Processing, Institute of Agro-Products Processing Science & Technology, Ministry of Agriculture, Beijing 100193, China)

**Abstract:** Oxidation effect of  $\cdot OH$  on sensitive amino acids in myofibrillar protein (MP) was studied based on  $Fe^{3+} - H_2O_2 - Vc$  oxidation system. The results showed that the oxidation effect of  $\cdot OH$  on amino acids in MP was selective. Among these amino acids, aspartic acid (Asp), glycine (Gly) and leucine (Leu) were insensitive to oxidation, in which their contents did not change significantly after being oxidized. But cysteine (Cys), methionine (Met) and tyrosine (Tyr) were sensitive to oxidation, and their contents reduced gradually with the increase of  $H_2O_2$  concentration, which resulted in the increase of  $\cdot OH$  generated in the  $Fe^{3+} - H_2O_2 - Vc$  oxidation system. The results also showed that the oxidation of MP could lead to the contents of protein carbonyl and bityrosine increasing, and sulfhydryl decreasing. Further study showed that amino acids oxidation was concentration-dependent. The degree of oxidation increased with concentration of  $H_2O_2$ , and after being oxidized with 20.0 mmol/L  $H_2O_2$  for 24 h, the contents of Cys, Met and Tyr decreased 13.3%, 11.6% and 20.5%, respectively, compared with the control sample. Therefore, the oxidation-mediated structure changes of sensitive amino acids containing reactive groups were the major cause of protein oxidation.

**Key words:** hydroxyl radical ( $\cdot OH$ ); myofibrillar protein (MP); sensitive amino acids; oxidation

肉及肉制品由于含有较高的不饱和脂肪酸、金属催化剂、血红素及其他氧化剂等, 使得其中的蛋白质在生产加工过程中非常容易发生氧化<sup>[1]</sup>。氧化会引起蛋白质发生显著的变化, 如蛋白质高聚物的产生、蛋白质结构的伸展、氨基酸侧链的改变等<sup>[2-3]</sup>。这些变化均会造成肉制品的品质劣变, 如风味下降、变色、营养的损失及有毒有害物质的产生, 降低肉制品的可接受性<sup>[4]</sup>。蛋白氧化引起的这些变

收稿日期: 2013-04-08; 修回日期: 2013-05-13

基金项目: 国家自然科学基金(31371797, 31301511); 农业(行业)科技专项(200903012, 201303082, 201303083)

\* 通讯作者: 张春晖, 博士, 研究员, 研究方向: 肉类科学研究, Tel: 010-62819469, E-mail: dr\_zch@yahoo.com.cn

化通常是由于氨基酸的破坏、肽链的伸展、断裂及羰基、二硫键的形成,进而导致蛋白理化性质及功能性质的改变<sup>[5]</sup>。目前关于氧化对肌原纤维蛋白的影响研究多集中在蛋白高级结构表现出的凝胶性、乳化性及持水性等表观指标方面,关于氧化对肌原纤维蛋白中氨基酸结构的影响研究较少<sup>[6]</sup>。理论上,肌原纤维蛋白的所有氨基酸侧链都易遭受活性氧自由基(ROS)的氧化攻击,但是各氨基酸对ROS氧化敏感不尽相同,氧化对肌原纤维蛋白理化功能性质的影响主要是由某些氧化敏感型氨基酸的改变所引起<sup>[7-9]</sup>。因此本文旨在研究羟自由基( $\cdot\text{OH}$ )氧化模型体系下, $\cdot\text{OH}$ 对肌原纤维蛋白中一些敏感氨基酸的氧化效应,为进一步揭示氧化对肉蛋白功能性影响机制及氧化控制提供理论依据。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

实验用新鲜猪背最长肌(*Longissimus*)肉样由北京五肉联有限公司提供,用于提取肌原纤维蛋白,构建 $\text{Fe}^{3+}-\text{H}_2\text{O}_2-\text{Vc}$ 羟自由基( $\cdot\text{OH}$ )氧化模型体系。乙二醇-双-(2-氨基乙醚)四乙酸(EGTA)购于美国Amresco公司;牛血清蛋白(BSA)、哌嗪-N,N'-2-乙磺酸(PIPES)及5,5-二硫代双(2-乙磺酸)(DTNB)购于美国Sigma公司;其它试剂均购于国药集团化学试剂有限公司。实验所用试剂最低为分析纯。UV-1800紫外可见分光光度计(日本岛津公司);Blender 7012G搅拌机(美国Waring公司);CR22G II高速冷冻离心机、F-2500荧光分光光度计、L-8900氨基酸自动分析仪(日本日立公司);电子天平(赛多利斯科学仪器(北京)有限公司);PHS-3C雷磁pH计(上海仪电科学仪器股份有限公司)。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 肌原纤维蛋白提取** 参考Wu等<sup>[10]</sup>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  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , 2 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 1 mmol/L EGTA, pH 7.0)混合匀浆后离心(4 °C, 2 000 g, 15 min),所得沉淀重复洗涤、离心两次。再按上述操作用4倍体积0.1 mol/L NaCl溶液洗涤、离心两次,并在最后一次离心前用两层纱布过滤再用0.1 mol/L HCl溶液将其pH值调至6.0,最后得到的蛋白用于构建羟自由基氧化模型体系。蛋白质浓度用双缩脲法测定,采用牛血清蛋白作为标准蛋白。

**1.2.2  $\text{Fe}^{3+}-\text{H}_2\text{O}_2-\text{Vc}$ 氧化体系构建** 参考Park等<sup>[11]</sup>的方法构建 $\text{Fe}^{3+}-\text{H}_2\text{O}_2-\text{Vc}$ 氧化体系,其反应历程为: $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$  (抗坏血酸, Vc) +  $2\text{Fe}^{3+} \rightarrow 2\text{Fe}^{2+} + 2\text{H}^+ + \text{C}_6\text{H}_6\text{O}_6$  (脱氢抗坏血酸),  $\text{Fe}^{2+} + \text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \cdot\text{OH} + \text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O}$ 。 $\text{FeCl}_3$ 浓度为0.01 mmol/L, Vc浓度为0.1 mmol/L,  $\text{H}_2\text{O}_2$ 浓度分别为0.5、1、5、10、20 mmol/L。提取的肌原纤维蛋白分散于上述氧化体系中(最终浓度为40 mg/mL),在4 °C条件下氧化24 h后用EDTA终止。以上的氧化反应均在15 mmol/L 哌嗪-N,N'-双(2-乙磺酸)(PIPES)缓冲溶液(pH 6.0, 离子强度0.6)中进行。新鲜猪背最长肌中提取出来的肌原纤维蛋白设为空白对照。

**1.2.3 氨基酸分析** 除半胱氨酸需经甲酸氧化法处理后测定含量外,其余氨基酸的测定均在水解管中加入10 mL 6 mol/L 盐酸后氮气吹干并封口,将水解管置于110 °C的恒温箱内水解24 h后冷却至室温,过滤,滤液定容至50 mL后用氨基酸自动分析仪测定氨基酸。用微量凯氏定氮仪测定蛋白质含量,保证所有待测样品蛋白含量与空白对照组一致。

**1.2.4 羰基含量测定** 参考Levine等<sup>[12]</sup>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HCl溶液,在25 °C下反应40 min,空白样品中不加2,4-二硝基苯肼。然后加入0.5 mL 20%的三氯乙酸(TCA),振荡后离心(11 000 × g, 5 min)弃上清,蛋白沉淀用1 mL 乙醇-乙酸乙酯溶液(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 °C条件下水浴保温30 min。以空白溶液为对照,370 nm下测其吸光值,蛋白质羰基衍生物的含量(nmol/mg 蛋白)用摩尔吸光系数22 000  $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 进行计算。

**1.2.5 总巯基含量测定** 总巯基含量的测定使用Ellman<sup>[13]</sup>试剂法。蛋白溶液与1 mL含有6 mol/L 盐酸胍、1 mmol/L EDTA的50 mmol/L Tris-HCl缓冲液(pH 8.3)以及含10  $\mu\text{L}$  10 mmol/L 5,5-二硫代双(2-硝基苯甲酸,DTNB)的100 mmol/L Tris-HCl溶液(pH 7.6)混合,在25 °C下静置25 min,并在412 nm测定其吸光值,巯基含量(nmol/mg 蛋白)使用摩尔吸光系数13 600  $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 计算。

**1.2.6 二酪氨酸含量测定** 参考Davies等<sup>[14]</sup>的方法并略加修改测定样品中二酪氨酸含量,将含有10

mg 肌原纤维蛋白的悬浮液溶于 3 mL 高离子强度缓冲液(0.6 mol/L KCl, pH 6.0, 20 mmol/L 磷酸缓冲液)中, 滤纸过滤除去残留脂肪和不溶性物质。双缩脲法测定滤液蛋白含量。荧光光度法测定滤液中二酪氨酸含量, 测定条件为: 发射波长 420 nm(狭缝 5 nm), 激发波长 325 nm(狭缝 5 nm)。测定结果用荧光强度除以蛋白浓度, 表示为相对荧光值(Arbitrary Units, AU)。

1.2.7 数据分析 采用 SAS9.2 软件进行方差分析, 采用多重比较分析法进行显著性分析。所有实验除氨基酸分析为 2 个重复外其它均最少为 3 次重复, 结果均以“平均值 ± 标准差”表示。

## 2 结果与讨论

### 2.1 氨基酸分析

本研究测定的是除色氨酸之外的其他 17 种氨基酸含量(图 1、表 1)。由表 1 可知, 在氧化模拟体系中,  $\cdot\text{OH}$  对构成肌原纤维蛋白氨基酸的氧化具有选择性, 门冬氨酸(Asp)、甘氨酸(Gly)及亮氨酸(Leu)等对氧化作用不敏感, 在氧化前后其含量变化不显著; 大多氨基酸的含量均随  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度的增加而呈轻微下降趋势, 氨基酸总量也逐渐下降; 而半胱氨酸(Cys)、蛋氨酸(Met)及酪氨酸(Tyr)对氧化作用非常敏感, 随  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度增加, 模型体系中的  $\cdot\text{OH}$  含量相应增加, 3 种敏感氨基酸含量呈显著下降趋势, 当  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度增加至 5 mmol/L 时, 这 3 种氨基酸的含量显著低于对照组的相应含量, 当  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度达到 20 mmol/L 时, Cys、Met 及 Tyr 的含量分别下降了 13.3%、11.6%、20.5% ( $P < 0.05$ )。Cys、Met 及 Tyr 都含有易受  $\cdot\text{OH}$  攻击的氧化活性基团, 其中 Cys 的巯基易受氧化攻击而形成二硫键, 这与 Hu 等<sup>[15]</sup>的研究结果相一致, Park 等<sup>[11]</sup>的研究也表明氧化会导致肌原纤维蛋白产生二硫键交联; Met 为含硫氨基酸, 易被氧化而生成蛋氨酸亚砷<sup>[16]</sup>; Tyr 的芳香环易受  $\cdot\text{OH}$  氧化生成二酪氨酸, 其含量会随氧化程度的升高而下降, 导致二酪氨酸含量升高。

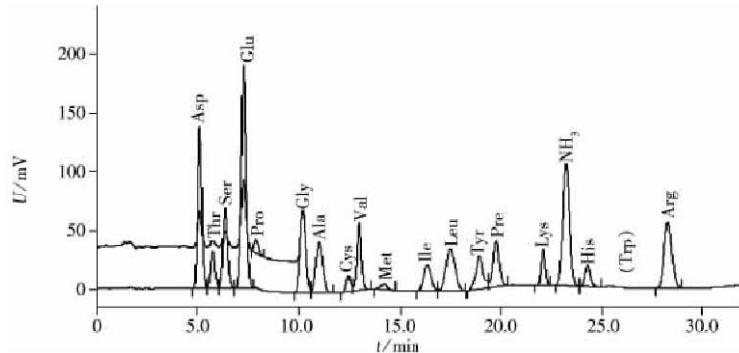


图 1 氨基酸的分析图谱

Fig. 1 Analysis spectrum of amino acids

表 1 不同浓度的  $\cdot\text{OH}$  产生体系对氨基酸含量的影响

Table 1 Effect of different concentrations of  $\cdot\text{OH}$  - generating system on amino acids content

Amino acid ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )	Control	$c_{\text{H}_2\text{O}_2}/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$				
		0.5	1.0	5.0	10.0	20.0
Asp	90.09 <sup>a</sup>	90.40 <sup>a</sup>	84.84 <sup>a</sup>	85.56 <sup>a</sup>	84.54 <sup>a</sup>	84.48 <sup>a</sup>
Thr	48.11 <sup>a</sup>	47.44 <sup>a</sup>	42.77 <sup>ab</sup>	43.52 <sup>ab</sup>	43.10 <sup>ab</sup>	40.74 <sup>b</sup>
Ser	40.74 <sup>a</sup>	39.03 <sup>ab</sup>	36.28 <sup>ab</sup>	36.28 <sup>ab</sup>	35.89 <sup>ab</sup>	34.46 <sup>b</sup>
Glu	197.89 <sup>a</sup>	191.55 <sup>ab</sup>	180.52 <sup>ab</sup>	183.31 <sup>ab</sup>	180.56 <sup>ab</sup>	170.99 <sup>b</sup>
Gly	39.74 <sup>a</sup>	39.47 <sup>a</sup>	37.25 <sup>a</sup>	37.36 <sup>a</sup>	36.91 <sup>a</sup>	37.39 <sup>a</sup>
Ala	57.84 <sup>a</sup>	55.19 <sup>ab</sup>	52.20 <sup>ab</sup>	53.52 <sup>ab</sup>	51.84 <sup>ab</sup>	48.91 <sup>b</sup>
Cys	21.62 <sup>a</sup>	21.11 <sup>ab</sup>	20.68 <sup>ab</sup>	20.18 <sup>abc</sup>	19.68 <sup>bc</sup>	18.75 <sup>c</sup>
Val	46.32 <sup>a</sup>	46.36 <sup>a</sup>	43.87 <sup>ab</sup>	43.96 <sup>ab</sup>	43.43 <sup>ab</sup>	40.25 <sup>b</sup>
Met	27.96 <sup>a</sup>	27.42 <sup>ab</sup>	27.40 <sup>ab</sup>	26.87 <sup>abc</sup>	26.75 <sup>bc</sup>	24.72 <sup>c</sup>
Ile	47.19 <sup>a</sup>	46.32 <sup>a</sup>	43.64 <sup>ab</sup>	44.41 <sup>ab</sup>	43.81 <sup>ab</sup>	40.80 <sup>b</sup>
Leu	82.92 <sup>a</sup>	82.03 <sup>a</sup>	77.75 <sup>a</sup>	78.25 <sup>a</sup>	77.13 <sup>a</sup>	72.60 <sup>a</sup>
Tyr	41.70 <sup>a</sup>	37.91 <sup>ab</sup>	36.46 <sup>ab</sup>	35.83 <sup>bc</sup>	33.88 <sup>c</sup>	33.17 <sup>c</sup>
Phe	42.14 <sup>a</sup>	41.72 <sup>ab</sup>	40.42 <sup>ab</sup>	39.29 <sup>ab</sup>	38.92 <sup>ab</sup>	36.31 <sup>ab</sup>
Lys	91.99 <sup>a</sup>	89.86 <sup>ab</sup>	85.20 <sup>ab</sup>	85.62 <sup>ab</sup>	84.37 <sup>ab</sup>	79.63 <sup>b</sup>
His	24.13 <sup>a</sup>	21.43 <sup>ab</sup>	20.07 <sup>ab</sup>	20.49 <sup>ab</sup>	20.13 <sup>ab</sup>	19.05 <sup>b</sup>

(续表1)

Amino acid (mg · g <sup>-1</sup> )	Control	c <sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></sub> /(mmol · L <sup>-1</sup> )				
		0.5	1.0	5.0	10.0	20.0
Arg	74.83 <sup>a</sup>	66.90 <sup>ab</sup>	62.90 <sup>ab</sup>	63.45 <sup>ab</sup>	62.31 <sup>ab</sup>	59.09 <sup>b</sup>
Pro	42.10 <sup>a</sup>	34.80 <sup>ab</sup>	32.24 <sup>b</sup>	34.87 <sup>ab</sup>	35.21 <sup>ab</sup>	32.51 <sup>ab</sup>
Total	1 017.31 ± 35.16 <sup>a</sup>	978.93 ± 14.60 <sup>ab</sup>	924.47 ± 6.01 <sup>ab</sup>	931.77 ± 84.75 <sup>ab</sup>	918.46 ± 3.26 <sup>ab</sup>	873.85 ± 69.16 <sup>b</sup>

a - c: different letters in the same row indicate significant differences (同一行的不同字母表示差异显著,  $P < 0.05$ )

氨基酸的分析图谱显示(图1), 氧化前后各氨基酸图谱的保留时间和峰形并未发生改变, 只是氨基酸的含量有所差异, 表明氧化并未改变肌原纤维蛋白氨基酸的种类。蛋白氧化主要是由于·OH对一些敏感氨基酸的选择性破坏, 而导致其含量下降, 并存在·OH浓度效应。

## 2.2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度对肌原纤维蛋白羰基含量的影响

蛋白质中羰基的产生可作为蛋白氧化的重要指标之一, 羰基可由氨基酸侧链(通常为易受自由基攻击的带有NH或者NH<sub>2</sub>的敏感氨基酸残基)及肽键的断裂产生<sup>[17]</sup>; 不同处理组肌原纤维蛋白的羰基含量可反映蛋白质的氧化程度, 通常蛋白氧化程度越高, 羰基含量也越高<sup>[18]</sup>。由图2可知, 随着H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度的增加, ·OH的生成量逐渐增加, 羰基含量逐渐上升。对照组的羰基含量为1.17 nmol/mg蛋白, 当H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度达到20.0 mmol/L时, 羰基含量增加至2.82 nmol/mg蛋白( $P < 0.05$ )。这表明, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度会显著影响羰基含量, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的浓度越高, 肌原纤维蛋白的氧化程度越深, 对氨基酸的破坏程度也越高(图1, 表1), 与崔旭海等<sup>[19]</sup>的研究结果相似。

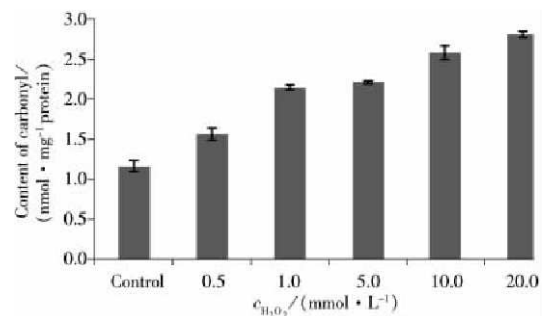


图2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度对肌原纤维蛋白(MP)羰基含量的影响

Fig. 2 Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration on carbonyl content of myofibrillar protein(MP)

## 2.3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度对肌原纤维蛋白总巯基含量的影响

肌原纤维蛋白中, 肌球蛋白约占50%, 是肌原纤维蛋白的主要组成蛋白, 肌球蛋白分子中含有大量巯基(约42个), 肌动蛋白是组成肌原纤维蛋白的另一主要蛋白, 分子中约含12个巯基, 巯基形成二硫键意味着巯基的氧化和相关共价化合物的产生, 通常蛋白氧化程度越高总巯基含量越低<sup>[20]</sup>。由图3可知, ·OH氧化体系对总巯基含量与羰基含量影响的变化模式不同。对照组的总巯基含量为239.22 nmol/mg蛋白, 当H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度逐渐增加时, ·OH的生成量也逐渐增加, 导致总巯基含量显著下降, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度增至20.0 mmol/L时, 总巯基含量减少为64.09 nmol/mg蛋白( $P < 0.05$ ), 这与羰基含量变化趋势正好相反(图2)。Martinaud等<sup>[21]</sup>在研究不同氧化体系下牛肉肌原纤维蛋白的氧化模式时也得出相似结论。总巯基含量的逐渐下降与上述半胱氨酸和蛋氨酸等含硫氨基酸含量下降的结果相吻合(表1)。

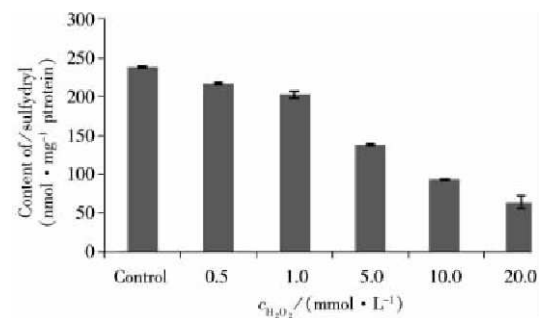


图3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度对肌原纤维蛋白总巯基含量的影响

Fig. 3 Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration on sulfhydryl content of MP

## 2.4 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度对肌原纤维蛋白二酪氨酸含量的影响

酪氨酸也是易受活性氧自由基氧化攻击的敏感型氨基酸, 氧化后生成二聚酪氨酸, 其含量可作为分析蛋白氧化的另一个重要指标<sup>[22]</sup>。图4为不同浓度的·OH产生体系对二酪氨酸含量的影响, 从图可知, 随着H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度的增加, 模型体系中·OH的生成量也逐渐增加, 导致二酪氨酸含量显著上升( $P < 0.05$ ), 这与Kristensen等<sup>[23]</sup>的研究结果相一致。·OH含量越高, 导致更多的酪氨酸氧化交联产生

二酪氨酸, 即表明蛋白氧化程度越高, 这与上述羰基和巯基含量的变化趋势一致(图 2~3)。有研究报道, 在氧化体系中, 随着氧化剂浓度的升高, 会有越来越多的酪氨酸自由基和酪氨酸残基产生, 这些酪氨酸自由基和酪氨酸残基会相互结合生成二酪氨酸, 导致二酪氨酸含量逐渐增加<sup>[24]</sup>。此结论与表 1 中酪氨酸含量下降的变化趋势相吻合。

## 2.5 相关性分析

各指标之间的相关性分析结果显示(见表 2), Cys 含量与  $H_2O_2$  浓度、羰基含量及二酪氨酸含量均呈极显著负相关( $P < 0.01$ ), 与总巯基含量呈极显著正相关( $P < 0.01$ ); Met 含量与  $H_2O_2$  浓度呈极显著负相关( $P < 0.01$ ), 与羰基含量及二酪氨酸含量呈显著负相关( $P < 0.05$ ), 与总巯基含量呈显著正相关( $P < 0.05$ ); Tyr 含量与  $H_2O_2$  浓度及二酪氨酸含量显著负相关( $P < 0.05$ ), 与羰基含量呈极显著负相关( $P < 0.01$ ), 与总巯基含量显著正相关( $P < 0.05$ ); 羰基含量与  $H_2O_2$  浓度显著正相关( $P < 0.05$ ); 巯基含量与  $H_2O_2$  浓度呈极显著负相关( $P < 0.01$ ); 二酪氨酸含量与  $H_2O_2$  浓度极显著正相关( $P < 0.01$ )。

这表明模型体系中  $H_2O_2$  浓度显著影响 Cys、Met、Tyr、羰基、巯基及二酪氨酸含量,  $H_2O_2$  的浓度越高,  $\cdot OH$  的生成量越高, 蛋白羰基含量越高, 总巯基含量越低, 二酪氨酸含量越高, 蛋白氧化程度越严重, 即敏感氨基酸氧化存在显著的  $\cdot OH$  浓度效应。

表 2 各指标之间的相关性分析  
Table 2 Correlation analysis between indexes

	$H_2O_2$	Cys	Met	Tyr	Carbonyl	Sulfydryl	Bityrosine
$H_2O_2$	1.0	-0.95**	-0.97**	-0.80*	0.83*	-0.938**	0.94**
Cys		1.0	0.94**	0.93**	-0.96**	0.98**	-0.98**
Met			1.0	0.80	-0.82*	0.88**	-0.88**
Tyr				1.0	-0.98**	0.90*	-0.90*
Carbonyl					1.0	-0.93**	0.93**
Sulfydryl						1.0	-0.99**
Bityrosine							1.0

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

## 3 结论

通过以上研究发现,  $\cdot OH$  对肌原纤维蛋白中氨基酸的氧化具有选择性, 门冬氨酸(Asp)、甘氨酸(Gly)及亮氨酸(Leu)等对氧化作用不敏感, 其含量变化不显著; 而半胱氨酸(Cys)、蛋氨酸(Met)及酪氨酸(Tyr)对氧化敏感, 随着  $H_2O_2$  浓度增加, 模型体系中  $\cdot OH$  生成量逐渐增加, 3 种敏感氨基酸含量呈显著下降趋势; 敏感氨基酸氧化存在显著的  $\cdot OH$  浓度效应, 羰基、巯基及二酪氨酸含量测定结果表明, 在  $\cdot OH$  氧化体系中, 随  $H_2O_2$  浓度的增加, 羰基、二酪氨酸含量升高, 总巯基含量下降, 这些蛋白氧化特征指标的变化表明蛋白氧化程度的加剧。相关性分析的结果也显示, 氧化特征指标的变化与 3 种敏感氨基酸含量的变化存在显著的相关性,  $H_2O_2$  浓度越高, 蛋白羰基含量越高, 总巯基含量越低, 二酪氨酸含量越高, 蛋白氧化程度越严重, Cys、Met 及 Tyr 含量下降越显著。

综上所述, 在模拟氧化体系中,  $\cdot OH$  对肌原纤维蛋白中的敏感氨基酸存在显著的氧化效应, 氧化介导的肌原纤维蛋白中含有的活性基团敏感型氨基酸的结构改变是导致蛋白氧化的主要原因。本研究为进一步揭示氧化对肉蛋白功能性影响机制及氧化控制提供了理论依据。

### 参考文献:

- [1] Johns A M, Birkinshaw L H, Ledward D A. *Meat Sci.*, **1989**, 25: 209-220.
- [2] Srinivasan S, Hultin H O. *J. Agric. Food Chem.*, **1997**, 45: 310-320.
- [3] Li S J, King A J. *J. Agric. Food Chem.*, **1996**, 44: 3080-3084.

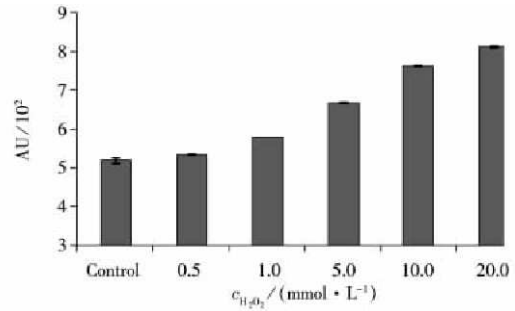


图 4  $H_2O_2$  浓度对肌原纤维蛋白二酪氨酸含量的影响

Fig. 4 Effect of  $H_2O_2$  concentration on bityrosine content of MP

- [4] Kanner J, Hazan B, Doll L. *J. Agric. Food Chem.*, **1988**, 36: 412–415.
- [5] Liu G, Xiong Y L. *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48: 624–630.
- [6] Liu G, Xiong Y L, Butterfield D A. *Food Chem. Toxicol.*, **2000**, 65: 811–818.
- [7] Shacter E. *Drug Metab. Rev.*, **2000**, 32: 307–326.
- [8] Stadtman E R, Levine R L. *Amino Acids*, **2003**, 25: 207–218.
- [9] Sharp J S, Becker J M, Hettich R L. *Anal. Chem.*, **2004**, 76: 672–683.
- [10] Wu M G, Xiong Y L, Chen J. *J. Food Eng.*, **2011**, 106: 318–324.
- [11] Park D, Xiong Y L, Alderton A L. *Food Chem.*, **2006**, 101: 1239–1246.
- [12] Levine R L, Williams J A, Stadtman E R, Shacter E. *Method Enzymol.*, **1994**, 233: 346–357.
- [13] Ellman G L. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1959**, 82: 70–77.
- [14] Davies K J A, Delsignore M E, Lin S W. *Biol. Chem.*, **1987**, 262: 9902–9907.
- [15] Hu M L. *Method Enzymol.*, **1994**, 233: 380–385.
- [16] Vogt W. *Free Radical Biol. Med.*, **1995**, 18: 93–105.
- [17] Stadtman E R. *Protein Oxidation and Aging. Science*, **1992**, 257(5074): 1220–1224.
- [18] Liu G, Xiong Y L, Butterfield D A. *J. Food Sci.*, **2000**, 65(5): 811–818.
- [19] Cui X H, Kong B H. *Sci. Technol. Food Ind.* (崔旭海, 孔保华. 食品工业科技), **2010**, 31(10): 85–88.
- [20] Dean R T, Fu S L, Stocker R, Davies M J. *J. Biol. Chem.*, **1997**, 324: 1–18.
- [21] Martinaud A, Mercier Y, Marinova P, Tassy C, Gatellier P, Renerre M. *J. Agric. Food Chem.*, **1997**, 45: 2481–2487.
- [22] Davies K J A. *J. Biol. Chem.*, **1987**, 262: 9895–9901.
- [23] Kristensen L, Moller A J, Andersen H J. In Proceeding of 43<sup>rd</sup> International Congress of Meat Science and Technology, Auckland, New Zealand, **1997**.
- [24] Cui X H, Kong B H, Xiong Y L. *Radical Ind.* (崔旭海, 孔保华, 熊幼翎. 中国乳品工业), **2008**, 36(9): 31–34.

欢迎订阅 欢迎投稿 欢迎刊登广告

## 《分析测试学报》

国内刊号: CN 44–1318/TH

国际刊名化代码 CODEN: FCEXES

国外代号: BM 6013

国际标准刊号: ISSN 1004–4957

邮发代号: 46–104

广告经营许可证: 440000100186

《分析测试学报》是由中国广州分析测试中心、中国分析测试协会共同主办的全国性学术刊物, 中文核心期刊。刊登质谱学、光谱学、色谱学、波谱学、电化学、电子显微学等方面的分析测试新理论、新方法、新技术的研究成果, 介绍新仪器装置及在生物、医药、化学化工、商检、食品检验等方面实用性强的实验技术。适合科研院所、高等院校、检测机构、医药、卫生以及厂矿企业分析测试工作和管理人员阅读。

经过多年的发展, 本刊已成为国内知名的化学类核心期刊。2011年, 影响因子在全国化学类刊物排名中位列第5名, 被引频次每年递增约30%, 稿源丰富, 基金论文比超过70%。近几年, 本刊发表的论文被CA(美国化学文摘)收录率达94%, 2006年引文频次在CA千种表中国部分中列第38名, 并被国际上其它知名的数据库如日本科技文献速报、俄罗斯文摘、英国分析文摘(AA)、《质谱公报》等收录。在《中文核心期刊要目总览》2011年版的化学类期刊列第9位; 入选2012年度“中国国际影响力优秀学术期刊”; 进入由全国8000种期刊遴选出的500种科技期刊组成的“中国科技期刊精品数据库”; 本刊是中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)统计源期刊; 中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊); 《中国科学引文数据库》来源期刊; 中国期刊全文数据库(CJFD)收录期刊; 《中国核心期刊(遴选)数据库》收录期刊; 《中国学术期刊(光盘版)》全文收录期刊; 《中国期刊网》全文收录期刊; 《中国学术期刊文摘(中、英文版)》源期刊。

本刊为月刊, 国内外公开发行。大16开, 单价: 18.00元/册, 全年216元。请在全国各地邮局订阅。未在邮局订到者可直接向本编辑部补订。补订办法: 请从邮局汇款至广州市先烈中路100号《分析测试学报》编辑部, 邮编: 510070, 写明订户单位、详细地址、收刊人姓名、邮编及补订份数(全年或某期), 电话: (020)87684776 或 37656606, <http://www.fxcsxb.com>(可在线投稿), E-mail: [fxcsxb@china.com](mailto:fxcsxb@china.com)。