

鼠曲草提取物对·OH诱导的肌原纤维蛋白氧化及结构的影响

熊杰, 伯朝英, 常海军, 周文斌, 朱建飞

Effects of the Extract of *Gnaphalium affine* on the Oxidation and Structure of Myofibrillar Protein Induced by ·OH

XIONG Jie, BO Zhaoying, CHANG Haijun, ZHOU Wenbin, and ZHU Jianfei

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021050021>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

氧化对肌原纤维蛋白流变学特性及结构的影响

Effect of Oxidation on Rheological Properties and Structure of Myofibrillar Protein

食品工业科技. 2019, 40(9): 29–33

鼠曲草提取物对食用油脂贮藏过程中氧化酸败的抑制及机理研究

Inhibition and mechanism of *Gnaphalium affine* extract on the oxidation of edible oil during storage

食品工业科技. 2017(04): 148–151

羟自由基氧化对鲢鱼肌原纤维蛋白结构的影响

Effect of Hydroxyl Radical Oxidation on the Structure of Silver Carp Myofibrillar Protein

食品工业科技. 2020, 41(4): 6–12

羟自由基氧化体系对大黄鱼肌原纤维蛋白结构的影响

Effect of Hydroxyl Radical Oxidation System on Structure of Myofibrillar Protein in Cultured *Pseudosciaena crocea*

食品工业科技. 2019, 40(1): 29–33

氧化对兔肉肌原纤维蛋白结构、乳化性和凝胶性的影响研究

Effect of Oxidation on the Structure, Emulsification and Gelability of Rabbit Meat Myofibrillar Protein

食品工业科技. 2020, 41(24): 22–30

自由基氧化对中国对虾肌原纤维蛋白的影响

Effects of free radical oxidation on Chinese Penaeus myofibrillar protein

食品工业科技. 2017(24): 75–78



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

熊杰, 伯朝英, 常海军, 等. 鼠曲草提取物对·OH 诱导的肌原纤维蛋白氧化及结构的影响 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(3): 72–80.
doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021050021

XIONG Jie, BO Zhaoying, CHANG Haijun, et al. Effects of the Extract of *Gnaphalium affine* on the Oxidation and Structure of Myofibrillar Protein Induced by ·OH[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(3): 72–80. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021050021

· 研究与探讨 ·

鼠曲草提取物对·OH 诱导的肌原纤维蛋白氧化及结构的影响

熊 杰, 伯朝英, 常海军*, 周文斌, 朱建飞

(重庆工商大学环境与资源学院, 重庆市特色农产品加工储运工程技术研究中心, 重庆 400067)

摘要: 利用 Fenton 氧化体系模拟实际肉品氧化环境, 研究添加不同浓度水平 (0、1.2、6、30 mg/g 蛋白) 茶多酚 (Tea polyphenols, TP) 和鼠曲草提取物 (*Gnaphalium affine* extract, GAE) 对猪肉肌原纤维蛋白 (MPs) 氧化和结构变化的影响。结果表明: GAE 具有较强的自由基清除能力, 与 TP 均可显著抑制蛋白羰基的形成并促进蛋白巯基损失 ($P<0.05$), 尤其在高浓度条件下, TP 和 GAE 分别抑制了 36.89%、38.93% 的羰基生成, 分别促进了 28.89%、27.40% 的巯基损失。TP 和 GAE 均对肌原纤维蛋白的内源荧光具有较强的猝灭作用, 均促进蛋白结构进一步展开, 加剧了氧化引起的 α -螺旋构象的丧失, 暴露更多的活性基团, 显著增加了蛋白表面的疏水性和不溶性 ($P<0.05$)。TP 和 GAE 浓度越高, 对肌原纤维蛋白的氧化和结构变化的影响越大, 但 GAE 对 MPs 氧化调控及与蛋白的相互作用程度不及 TP。

关键词: 鼠曲草提取物, 肌原纤维蛋白, 氧化, 相互作用, 理化特性

中图分类号: TS251.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)03-0072-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021050021

本文网刊: 

Effects of the Extract of *Gnaphalium affine* on the Oxidation and Structure of Myofibrillar Protein Induced by ·OH

XIONG Jie, BO Zhaoying, CHANG Haijun*, ZHOU Wenbin, ZHU Jianfei

(Chongqing Engineering Research Center for Processing, Storage and Transportation of Characterized Agro-Products, College of Environment and Resources, Chongqing Technology and Business University, Chongqing 400067, China)

Abstract: The effects of tea polyphenols (TP) and *Gnaphalium affine* extract (GAE) at different concentrations (0, 1.2, 6, 30 mg/g protein) on the oxidation and structural changes of porcine myofibrillar proteins (MPs) were studied using Fenton oxidation system to simulate the actual meat oxidation environment. The results showed that GAE had a strong ability to scavenging free radicals, which could significantly inhibit the formation of carbonyl group and promote the loss of sulphydryl group ($P<0.05$), as did TP. Especially under high concentration, TP and GAE inhibited 36.89% and 38.93% carbonyl formation, and promoted 28.89% and 27.40% sulphydryl loss, respectively. In addition, TP and GAE both had strong quenching effect on the endogenous fluorescence of MPs, promoted the further expansion of the protein structure, aggravated the loss of α -helical conformation caused by oxidation, exposed more active groups, and significantly increased the hydrophobicity on the protein surface and protein insolubility ($P<0.05$). The higher the concentration of TP and GAE, the greater the effect on the oxidation and structural changes of MPs, but GAE was not as effective as TP in regulating the oxidation of MPs and its interaction with proteins.

Key words: *Gnaphalium affine* extract (GAE); myofibrillar proteins (MPs); oxidation; interaction; physical and chemical properties

收稿日期: 2021-05-08

基金项目: 重庆市自然科学基金面上项目 (基础研究与前沿探索专项) (cstc2019jcyj-msxmX0472); 重庆市教委科学技术研究计划项目 (KJQN202000817); 重庆工商大学研究生创新型科研项目 (yjscxx2020-094-29, yjscxx2021-112-51)。

作者简介: 熊杰 (1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 肉制品加工与质量控制, E-mail: luckyjier3@163.com。

* 通信作者: 常海军 (1980-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 畜产品加工理论与技术, E-mail: changhj909@163.com。

肌原纤维蛋白(Myofibrillar proteins, MPs)是肌肉中含量最高的蛋白, 占肌肉总蛋白含量的 55%~60%, 是形成肌纤维的盐溶性结构蛋白群, 主要包括肌球蛋白、肌动蛋白、原肌球蛋白、肌钙蛋白等^[1], 这类蛋白质不仅参与肌肉收缩、影响肉的嫩度, 还决定着肉制品热诱导凝胶三维网络的形成, 对肉制品的流变学特性、保水性、乳化性、质构、感官等品质起着至关重要的作用^[2]。然而肌肉在加工过程中蛋白质极易受到活性氧自由基(ROS)中·OH 的攻击而发生氧化变性, 最终导致肉品质量变差。因此, 肉蛋白的抗氧化是保障肉品质量的关键。然而出于对传统抗氧化剂化学合成毒性的担忧, 目前, 发掘同样具有抗氧化潜能的天然提取物用于肉蛋白抗氧化, 成为肉品行业研究热点。

天然提取物中含有丰富的植物多酚, 具有抗氧化、抗菌、抗癌、防治心血管疾病且无毒无害、来源广泛等特性^[3]。鼠曲草(*Gnaphalium affine* D. Don, 清明草)作为我国传统野菜和药食同源植物, 其富含黄酮类化合物(如槲皮素、芦丁、木犀草素等)与酚类物质(如没食子酸、绿原酸等), 具有优良的抗菌、抗炎和抗氧化等生理功效^[4]。现有研究表明, 鼠曲草提取物是一种优良的自由基清除剂, 具有较强的还原能力与良好的抗氧化效果, 可抑制油脂氧化酸败^[5]。但鼠曲草提取物对肉蛋白的影响非常复杂, 直接将鼠曲草提取物应用于肉蛋白抗氧化和探究其与肉蛋白相互作用机制的研究甚少。

因此, 本实验采用 Fenton 氧化体系模拟实际肌肉加工过程中存在的·OH, 选用购买的茶多酚(Tea polyphenols, TP)和自提的鼠曲草提取物(*Gnaphalium affine* extract, GAE)作为植物提取物代表, 用于肌肉蛋白抗氧化, 以探讨·OH 诱导的氧化对 MPs 理化特性的影响、TP/GAE 与 MPs 相互作用对 MPs 理化特性及构象的影响, 并阐明相关机理。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新鲜猪背最长肌 重庆市南岸区人人乐超市(4 °C 冷藏); 茶多酚(纯度 97%) 上海阿拉丁试剂公司; 干鼠曲草 四川省广安市; 2,4,6-三硝基苯磺酸水溶液(5%, TNBS) 北京偶合科技有限公司; 水溶性维生素 E(Trolox)、牛血清蛋白(BSA)、芦丁(标准品)、L-抗坏血酸、甘氨酸、L-亮氨酸、乙二醇二乙醚二胺四乙酸(EGTA)、哌嗪-1,4-二乙磺酸(PIPES) 均为分析纯, 上海阿拉丁试剂公司; 5,5-二硫代双-(2-硝基苯甲酸)(DTNB)、溴酚蓝、溴化钾、2,4-二硝基苯肼(DNPH)、结晶紫、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、ABTS、过氧化氢(H₂O₂, 30%)、三氯化铁 均为分析纯, 上海阿达玛斯试剂有限公司。

UV-1900 紫外可见分光光度计 上海翱艺仪器有限公司; V2000 可见分光光度计 上海舜宇恒平科学仪器有限公司; KQ3200DE 数控超声波清洗机

昆山市超声仪器有限公司; TDZ5-WS 多管架自动平衡离心机、TDZ4-WS 低速台式离心机 长沙湘仪离心机仪器有限公司; TGL-20 高速冷冻离心机 四川蜀科仪器有限公司; Ultra-Turrax T25 高速均质匀浆机 德国 IKA-WERKE; RE-52AA 旋转蒸发仪 上海贤德实验仪器有限公司; 日立 F-7000 荧光分光光度仪 日本日立公司; IR Prestige-21 傅立叶变换红外光谱仪 日本岛津公司; DGG-9076A 电热恒温鼓风干燥箱 上海齐欣科学仪器有限公司; pHs-3C+酸度计 成都世纪方舟科技有限公司; MM12B 绞肉机 广东省韶关市大金食品机械厂; LGJ-10 冷冻干燥机 北京松源华兴科技发展有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 鼠曲草提取物的制备 参照高浩祥等^[5]的提取方法。干鼠曲草经 60 °C 电热恒温鼓风干燥箱烘干 4 h 后粉碎, 过 100 目筛后获得干鼠曲草粉。取干鼠曲草粉 50 g 与 1000 mL 乙醇溶液(70%, v/v)混合, 45 °C 下超声波(300 W)辅助提取 80 min, 提取液减压抽滤, 滤液经 60 °C 真空浓缩至 100 mL, 浓缩液经冷冻干燥 48 h 得鼠曲草提取物, 所得提取物保存于棕色干燥皿中备用。

1.2.2 肌原纤维蛋白的提取 以猪背最长肌为实验原材料, 参照 PARK 等^[6]描述的方法提取肌原纤维蛋白。取 50 g 猪肉解冻(4 °C, 4 h), 切条剁碎后置于绞肉机中于低档位运行 30 s, 肉泥使用 5 倍体积的僵直缓冲液(10 mmol/L 磷酸钠, 0.1 mol/L NaCl, 2 mmol/L MgCl₂ 和 1 mmol/L EGTA, pH7.0)稀释后使用高速均质匀浆机分散 1 min。匀浆经冷冻离心(10000 r/min, 10 min, 4 °C)后倾去上清液, 所得沉淀再次加入 5 倍体积僵直缓冲液, 重复上次步骤共三次。此后所得沉淀加入 5 倍体积 0.1 mol/L NaCl 溶液, 匀浆后过滤除去残余结缔组织, 用 0.1 mol/L HCl 调 pH 为 7.0 后离心(10000 r/min, 10 min, 4 °C), 所得白色膏状沉淀即为肌原纤维蛋白。整个提取过程在 0~4 °C 条件下进行, 所得肌原纤维蛋白膏置于碎冰中保存并于 48 h 内使用。以 BSA 作为标准蛋白, 采用双缩脲法测定其蛋白含量^[7], 测得肌原纤维蛋白膏蛋白含量为 40% 左右。

1.2.3 TP/GAE 添加及氧化处理 参照曹云刚^[8]的样品处理方法并加以改进。称取适量 MPs 蛋白膏, 分别加入不同体积的 TP/GAE 溶液(6 mg/mL, 溶解于 15 mmol/L PIPES 缓冲液(含 0.6 mol/L NaCl, pH6.25)), 搅拌均匀后加入 Fenton 氧化体系于 4 °C 下氧化 12 h。最终蛋白浓度为 40 mg/mL, 氧化体系浓度为(30 μmol/L FeCl₃, 100 μmol/L 抗坏血酸, 3 mmol/L H₂O₂), TP/GAE 含量分别为: 0(OX), 1.2(TP-L/GAE-L), 6(TP-M/GAE-M), 30(TP-H/GAE-H) mg/g 蛋白质。氧化反应通过添加 Trolox(1 mmol/L, 终浓度)终止。未添加任何物质及氧化剂但含有 Trolox 的蛋白溶液作为未氧化对照(Blank)。

1.2.4 鼠曲草提取物的主成分含量及自由基清除能力测定

1.2.4.1 总黄酮、总酚含量的测定 参考陈红梅等^[9]的方法测定总黄酮含量。首先制作芦丁标准曲线,准确称取芦丁标品 20 mg 溶于 40% 乙醇溶液并定容至 50 mL 容量瓶中,得到质量浓度为 0.4 mg/mL 的芦丁标液。分别吸取 0、1、2、3、4、5 mL 标液于 25 mL 容量瓶中,加 40% 乙醇溶液补至 12.5 mL 摆匀后依次加入 5% NaNO₂ 溶液 0.5 mL, 摆匀静置 6 min, 加入 10% 硝酸铝溶液 0.5 mL, 摆匀静置 6 min, 加入 4% NaOH 溶液 5 mL, 用 40% 乙醇溶液定容至刻度摇匀静置 15 min 后于 510 nm 处测定吸光度。以芦丁标液的质量浓度(mg/mL)为横坐标,吸光度(A)为纵坐标,得到的标准曲线方程: $y=11.2125x+0.00767$, $R^2=0.9995$ 。准确称取 100 mg 鼠曲草提取物溶于 40% 乙醇溶液并定容至 100 mL, 吸取 1 mL 样液于 25 mL 容量瓶按以上操作测定黄酮含量。鼠曲草提取物中总黄酮含量计算公式如下:

$$\text{提取物总黄酮含量}(\%) = \frac{m \cdot V_1 \cdot V_0}{V_2 \cdot W \cdot 1000} \times 100$$

式中: m 表示标曲上查得的质量浓度, mg·mL⁻¹; V₁ 表示反应体积, mL; V₀ 表示配制的溶液体积, mL; V₂ 表示取样量, mL; W 表示提取物质量, g。

参考 SYMONS 等^[10]的方法测定总酚含量。首先制作没食子酸标准曲线,配制 1 mg/mL 没食子酸标准液 100 mL, 分别吸取 0、1、2、3、4、5 mL 标液于 100 mL 容量瓶并用水定容至刻度。分别取各浓度梯度标液 1 mL 于刻度试管内,依次加入福林酚试剂 5 mL, 摆匀静置 5 min, 加入 20 mg/mL 碳酸钠溶液 4 mL, 加水定容至刻度, 摆匀静置 30 min 后于 765 nm 处测定吸光度。以没食子酸标液的质量浓度(μg/mL)为横坐标,吸光度(A)为纵坐标,得到的标准曲线方程: $y=0.0069x+0.0066$, $R^2=0.9993$ 。准确称取 25 mg 鼠曲草提取物溶解于水并定容至 25 mL, 吸取 1 mL 样液于刻度试管按以上操作测定总酚含量。鼠曲草提取物中总酚含量的计算公式与总黄酮计算公式一致。

1.2.4.2 自由基清除能力测定 a.OH 自由基清除能力^[11]。首先使用 30% 乙醇溶液分别配制 1.0 mg/mL 的 GAE 和 V_C 储备液,并将储备液稀释为 0.05 mg/mL。分别取 0.5 mL 结晶紫溶液(0.4 mmol/L)、0.7 mL H₂O₂ 溶液(5.0 mmol/L) 和 0.7 mL FeSO₄ 溶液(10.0 mmol/L)于一系列 10 mL 比色管中,各管用磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(pH4.0)定容至 10 mL, 摆匀放置 30 min 后于 580 nm 处测吸光度 A_b, 同时测定不加 H₂O₂ 吸光度 A₀。再按上述步骤在加 H₂O₂ 之前分别加入不同量稀释储备液,测得吸光度 A_s。以样品浓度(mg/mL)为横坐标,清除率(%)为纵坐标拟合曲线,计算半抑制浓度(IC₅₀)。

$$\text{OH自由基清除率}(\%) = \frac{A_s - A_b}{A_0 - A_b} \times 100$$

b. DPPH 自由基清除能力^[11]。同时取不同浓度梯度的 GAE(0.063、0.125、0.250、0.500、1.000 mg/mL) 和 V_C(0.016、0.031、0.047、0.063、0.125 mg/mL) 样液 0.5 mL 于 10 mL 比色管中,加入 4.5 mL DPPH 溶液(0.04 mg/mL), 摆匀放置 30 min 后测定 517 nm 下的吸光度 A₀。以 30% 乙醇溶液作为对照,其他操作同样品组,测其吸光度值 A。以样品浓度(mg/mL)为横坐标,清除率(%)为纵坐标拟合曲线,计算半抑制浓度(IC₅₀)。

$$\text{DPPH自由基清除率}(\%) = \frac{A - A_0}{A} \times 100$$

c. ABTS 自由基清除能力^[8]。准确称取 0.0960 g ABTS 和 0.0116 g 过硫酸钾,无水乙醇溶解并定容于 25 mL 棕色容量瓶中,摇匀室温避光反应 12 h,形成 ABTS⁺·储备液。使用前再次使用无水乙醇稀释,使其在 734 nm 处吸光度为 0.800 左右,为 ABTS⁺·工作液。样品的测定:同时取不同浓度梯度 GAE (0.016、0.020、0.031、0.063、0.125 mg/mL) 和 V_C(0.004、0.008、0.012、0.016、0.020 mg/mL) 样液 1.0 mL 于 10 mL 比色管中,加入 4 mL ABTS⁺工作液,混匀避光 6 min 后于 734 nm 处测吸光度(A₀),以无水乙醇溶液作为对照,其他操作同样品组,测其吸光度值 A。以样品浓度(mg/mL)为横坐标,清除率(%)为纵坐标拟合曲线,计算半抑制浓度(IC₅₀)。此处 ABTS 自由基的清除率计算公式同 DPPH 自由基。

1.2.5 羰基含量测定 MP 的羰基含量采用 2,4-二硝基苯肼(DNPH)法进行测定。参照段丽菊等^[12]的方法,并略作修改。取摇匀后的样液 2 mL 置于 20 mL 离心管,加入 4 mL 10 mmol/L DNPH(用 2 mol/L HCl 溶解),漩涡混匀,37 °C 避光反应 1 h,每隔 10 min 漩涡 1 次,此后加入 5 mL 20% TCA 溶液充分漩涡以沉淀蛋白并终止反应,离心(4000 r/min, 10 min)。倾去上清液,所得沉淀用 10 mL 洗色液(乙醇/乙酸乙酯, 1:1, v/v)充分洗涤并离心(4000 r/min, 10 min),重复三次,以除去未反应的 DNPH。三次洗涤后挥干有机溶剂,加入 10 mL 6 mol/L 盐酸胍溶液(溶解于 20 mmol/L NaH₂PO₄, pH2.3), 37 °C 温育 15 min,离心(4000 r/min, 10 min)。上清液于 370 nm 处测定羰基含量,使用 6 mol/L 盐酸胍调零。样品空白中加入 4 mL 2 mol/L HCl,其余步骤同上。羰基浓度用摩尔消光系数 22.0 mmol/(L·cm)来计算。羰基含量用每毫克蛋白中含有多少 nmol 的羰基来表示。

$$\text{羰基含量}(\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \text{蛋白}) = \frac{\Delta A}{\varepsilon \cdot d \cdot C} \frac{V_{\text{反总}}}{V_{\text{样}}} \times 10^3$$

式中: ΔA 表示反应管吸光度减去对照管吸光度; ε 表示摩尔消光系数, 22.0 mmol/(L·cm); d 表示比色光径, cm; C 表示蛋白质量浓度, mg·mL⁻¹; $V_{\text{反总}}$ 表示盐酸胍体积, mL; $V_{\text{样}}$ 表示样液体积, mL。

1.2.6 总巯基含量测定 MP 的总巯基含量参照 GUO 等^[13] 的测定方法, 使用 DTNB 试剂进行测定。使用 Tris-甘氨酸缓冲液(10.4 g/L Tris, 6.9 g/L 甘氨酸, 1.2 g/L EDTA, pH8.0)配制 1% NaCl 溶液将 40 mg/mL 的肌原纤维蛋白分散液稀释为 5 mg/mL。准确吸取蛋白稀释液 0.5 mL, 先后加入使用 Tris-甘氨酸缓冲液配制的 1.5% SDS 溶液 5 mL 及 0.5 mL Ellman's 试剂(使用 Tris-甘氨酸缓冲液配制的 4 mg/mL DTNB 溶液), 室温避光反应 15 min 后于 412 nm 波长处测其吸光度。以 Tris-甘氨酸缓冲液代替蛋白液作为试剂空白。

$$\text{总巯基}(\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{蛋白}) = \frac{73.53 \cdot A_{412} \cdot D}{C}$$

式中: A_{412} 表示吸光度; D 表示稀释倍数; C 表示样品浓度, $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.2.7 自由氨基含量测定 MP 中的自由氨基含量按照褚千千等^[14] 的描述进行测定。准确吸取 200 μL 稀释后的蛋白样品(4 mg/mL)置于玻璃试管中, 加入 2 mL 1% SDS 溶液(溶于 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液, pH8.2)和 1 mL 0.01% TNBS, 振荡混匀后于 50 °C 水浴锅中避光反应 30 min, 再加入 2 mL 0.1 mol/L Na_2SO_3 终止反应, 15 min 冷却至室温后, 测定 420 nm 处吸光度值。相同操作下用蒸馏水代替 TNBS 反应液作为样品空白。同时分别配制 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mmol/L 的 L-亮氨酸溶液, 并分别按以上测定方法测定各浓度梯度 L-亮氨酸溶液的吸光度, 以 L-亮氨酸浓度(mmol/L)为横坐标, 吸光度(A)为纵坐标, 得到标准曲线方程: $y=0.5091x+0.0816$, $R^2=0.9995$ 。样品自由氨基含量依据所绘标准曲线来确定, 计算公式如下:

$$\text{自由氨基含量}(\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \text{蛋白}) = \frac{C}{c} \times 10^3$$

式中: C 表示样品吸光度对应标曲查得的浓度, mmol/L ; c 表示样品蛋白质量浓度, $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.2.8 肌原纤维蛋白结构分析

1.2.8.1 二级结构测定 采用傅立叶变换红外光谱仪分析 MPs 的二级结构, 参考 ZHANG 等^[15] 的方法, 准确称量冻干样品粉末 2 mg, 溴化钾 200 mg, 混合移至玛瑙研钵研磨至无反光点, 使用压片机压制透明薄片, 在红外光谱仪上扫描, 扫描范围为 400~4000 cm^{-1} , 分辨率为 4 cm^{-1} , 扫描次数为 32。使用 PeakFit4.12 软件提取蛋白质酰胺 I 带 1700~1600 cm^{-1} 波段图谱, 对其进行基线校正、傅里叶去卷积和二阶导数拟合处理, 进而根据各指认峰及面积分析蛋白质二级结构变化。

1.2.8.2 内源性色氨酸荧光光谱分析 参考 CAO 等^[16] 的测定方法。用 15 mmol/L PIPES 缓冲液(含 0.6 mol/L NaCl, pH6.25)将样品稀释为蛋白浓度 0.4 mg/mL, 吸取 3 mL 置于光程为 1 cm 的石英比色皿中, 经

283 nm 波长激发, 记录下 300~450 nm 的发射光谱, 激发和发射狭缝均为 10 nm, 电压设为 400 V, 扫描速度为 240 nm/min。相同条件下记录溶剂发射光谱, 并从样品发射光谱中扣除以排除干扰。

1.2.8.3 表面疏水性测定 参考熊杰等^[17] 文中所述的方法并加以改进。用 20 mmol/L 的磷酸盐缓冲液(pH6.0)将样品稀释为蛋白浓度为 5 mg/mL 的溶液。吸取 5 mL 于 10 mL 的塑料离心管中, 加入 50 μL 1 mg/mL BPB 溶液涡旋混匀, 离心(4000 r/min, 10 min)。转移上清液于另一套干净的离心管, 再次离心后于 595 nm 处测定吸光度值(A)。作为对照(A_0), 以磷酸盐缓冲液取代样品溶液, 其他操作相同。以蛋白绑定结合的 BPB 含量作为疏水性指标:

$$\text{BPB结合量}(\mu\text{g}) = 50 \mu\text{g} \times \frac{A_0 - A}{A_0}$$

1.2.9 溶解度测定 参照周扬等^[18] 的方法, 并略作修改。将 40 mg/mL 的 MPs 蛋白液稀释 10 倍后经冷冻离心(4 °C, 10000 r/min, 15 min), 测上清液的蛋白质量浓度, 上清液和原液中蛋白质量浓度均采用双缩脲试剂法。蛋白溶解度计算公式如下:

$$\text{溶解度}(\%) = \frac{\text{上清液蛋白质量浓度}}{\text{原蛋白液蛋白质量浓度}} \times 100$$

1.3 数据处理

每组数据设计三次重复, 利用软件 Origin8.0 整理数据并作图分析, 所有数据的显著性差异由软件 SPSS 19.0 进行 ANOVA 分析所得, 差异显著水平 P 为 0.05。

2 结果与分析

2.1 鼠曲草提取物的主成分含量及其清除自由基的能力

蛋白质氧化机制与脂肪氧化机制类似, 都是自由基链式反应, 尤其是活性氧所携带的·OH 氧化能力最强, 最易引发蛋白氧化^[19]。因此测定 GAE 中总黄酮与总酚含量以及清除自由基的能力可初步了解其抗氧化性能。经测定 GAE 中总黄酮含量为 37.09%, 总酚含量为 67.50%, 说明 GAE 富含黄酮及酚类物质, 具有潜在的抗氧化能力。就清除自由基而言, 半抑制浓度越低, 表明清除半数自由基所需的量越少, 清除效果越佳。如表 1 所示, GAE 清除三种自由基中·OH 所需的半抑制浓度最低, 其次是 ABTS 自由

表 1 鼠曲草提取物对自由基的半抑制浓度

Table 1 Semi-inhibitory concentration of free radical in the extract of *Gnaphalium affine*

成分	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)		
	OH自由基清除率	DPPH自由基清除率	ABTS自由基清除率
V _C	1.29±0.13 ^b	44.75±1.29 ^b	13.80±0.45 ^b
GAE	3.59±0.36 ^a	445.45±3.14 ^a	91.46±1.85 ^a

注: 同列不同字母表示不同成分对同一自由基清除率间差异显著, $P<0.05$ 。

基和 DPPH 自由基。与 V_C 的抑制效果相比, GAE 对 OH、DPPH、ABTS 三种自由基的抑制效果分别约为 V_C 的 $1/3$ 、 $1/10$ 、 $1/7$ 。由图 1 也可看出, 与 V_C 相比, GAE 清除 OH 自由基的斜率与 V_C 最接近、ABTS 自由基次之, DPPH 自由基相差最大。由此表明, GAE 清除 OH 和 ABTS 自由基的能力较强, 清除 DPPH 自由基的能力相对较弱。总的来说, 鼠曲草提取物具有一定清除自由基的效果, 可干预调控蛋白质的氧化。高浩祥等^[5]也曾验证过 GAE 对自由基的清除效果, 并将其应用于油脂抗氧化, 能有效改善油脂氧化酸败。

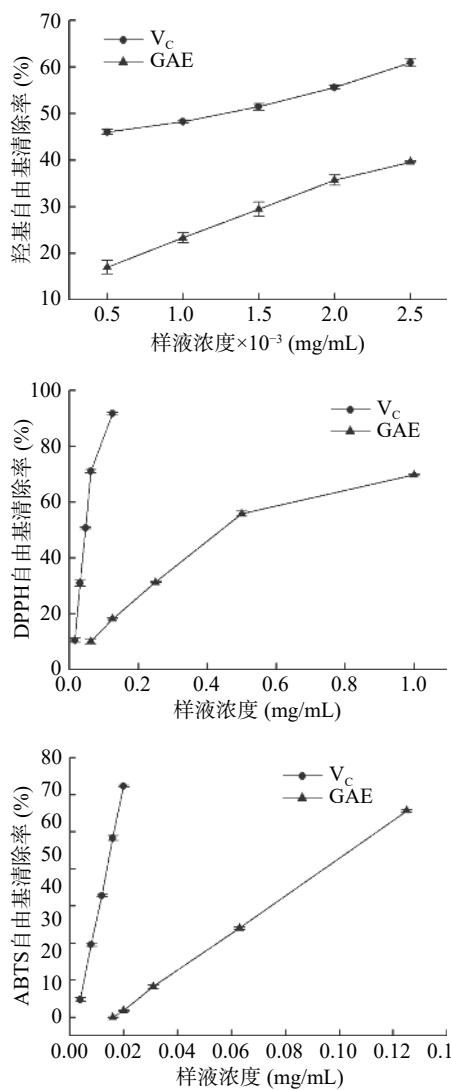


图 1 不同浓度鼠曲草提取物的清除自由基能力
Fig.1 Radical scavenging activity of GAE at various concentrations

2.2 不同浓度 TP/GAE 对 MPs 中羰基含量的影响

蛋白质中带有 NH 或 NH_2 的侧链氨基酸官能团遇到 ROS 极易被氧化生产羰基衍生物, 因此羰基含量普遍被认为是判断蛋白质氧化程度的重要指标之一^[19]。通常认为羰基含量越高, 蛋白氧化越严重。如图 2 所示, 未氧化 MPs 的羰基含量为 1.24 nmol/mg , 经·OH 氧化体系氧化 12 h 后, MPs 羰基含量显著升

高至 2.30 nmol/mg ($P < 0.05$)。在氧化对照基础上, TP 和 GAE 的存在均显著降低了 MPs 羰基含量 ($P < 0.05$), 尤其在高浓度条件下, TP 和 GAE 对羰基的抑制效果分别高达 36.89% 、 38.93% , 由此表明 TP 和 GAE 均能明显抑制蛋白氧化, 且抑制效果对其浓度具有依赖性, 但低浓度条件下 TP 的抑制效果不及 GAE。TP 和 GAE 的添加对 MPs 羰基含量的影响可能主要归因于黄酮类、酚类物质是良好的氢供体, 具有极强清除自由基的能力^[20]。此外, 富含黄酮及酚类的物质对 MPs 羰基化的干预效能, 前人已有类似报道: 绿茶提取物和迷迭香提取物可有效抑制猪肉香肠中蛋白羰基的生成^[21]; 桑葚多酚可有效抑制广东香肠中蛋白羰基生成^[22]; 甘草提取物可有效抑制猪肉^[8]或鸡肉^[17]贮藏过程中羰基衍生物的产生, 因此 GAE 与众多天然提取物一样具有阻碍蛋白羰基化、防止蛋白氧化的潜能。

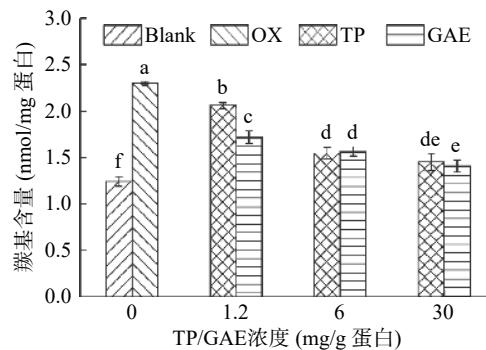


图 2 氧化及不同浓度 TP/GAE 对 MPs 羰基含量的影响
Fig.2 Effects of oxidation and different concentrations of TP/GAE on the carbonyl content of MPs

注: 不同小写字母表示差异显著, $P < 0.05$; 图 3~图 4, 图 7~图 8 同。

2.3 不同浓度 TP/GAE 对 MPs 中总巯基含量的影响

半胱氨酸中的巯基同样容易被 ROS 氧化转化成二硫键, 因此巯基的损失也可作为蛋白氧化的标志。如图 3 所示, 未氧化 MPs 总巯基含量为 $9.529 \mu\text{mol/g}$, 经·OH 氧化体系氧化 12 h 后, 其总巯基含量显著降低了 16.66% ($P < 0.05$)。这是由于氧化导致蛋白质结构部分展开, 半胱氨酸中的活性巯基暴露, 受·OH 攻击后形成二硫键或进一步被氧化为磺酸类或其他氧化产物, 从而导致巯基损失^[23]。在 1.2 mg/g 和 6 mg/g 浓度下, TP 和 GAE 的添加所导致 MPs 巯基损失程度与氧化对照无显著性差异 ($P > 0.05$)。当 TP 和 GAE 的添加量高达 30 mg/g 时, 均显著降低了 MPs 巯基含量 ($P < 0.05$)。高浓度 TP/GAE 在氧化的基础上进一步促进 MPs 巯基损失, 在 OX 处理组的基础上 TP、GAE 分别损失 28.89% 、 27.40% , 可能原因是 TP 和 GAE 中的酚类物质与蛋白质相互作用形成“巯基-醌”加合物^[24]。酚类物质造成氧化后蛋白巯基的进一步损失也存在类似报道, GUO 等^[13]研究的六种酚类物质(没食子酸、绿原酸、没食子酸丙酯、槲皮素、儿茶素和表没食子儿茶

素没食子酸酯)在氧化基础上均进一步显著降低 MPs 疏基含量($P<0.05$)。

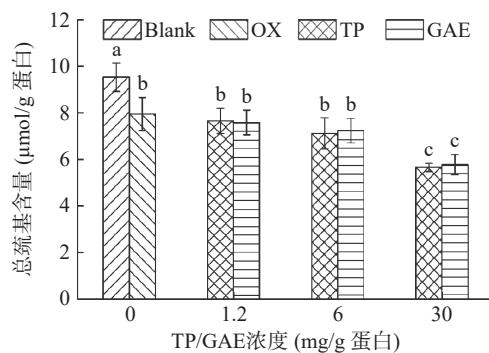


图 3 氧化及不同浓度 TP/GAE 对 MPs 总巯基含量的影响

Fig.3 Effects of oxidation and different concentrations of TP/GAE on the content of total sulfhydryl groups of MPs

2.4 不同浓度 TP/GAE 对 MPs 中自由氨基含量的影响

赖氨酸中的 ϵ -NH₂ 基团非常容易受到自由基攻击, 通过脱氨基过程转化为羰基, 而形成的羰基又可能与 NH₂ 共价结合进一步降低自由氨基的含量^[25]。如图 4 所示, 未氧化 MPs 的自由氨基含量为 3.08 nmol/mg, 经·OH 氧化体系氧化 12 h 后, 其自由氨基含量显著降低了 11.69%($P<0.05$)。GAE 的添加对 MPs 自由氨基的影响较小, 与未氧化 MPs 氨基含量相当。TP 的添加并不能有效阻止自由氨基的损失, 其损失程度接近氧化空白组, 相反高浓度 TP 的存在进一步加剧了自由氨基的损失, 在氧化对照基础下降低了 8.42%。可能原因是测定自由氨基过程中所添加的 SDS 破坏了非共价相互作用, 导致 TP 的氧化产物醌类或半醌类物质与氨基共价结合生成“氨基-醌”加合物^[26]。彭林等^[27] 的报道表明酚类物质与自由基反应后会转变为半醌自由基结构或醌类物质, 易与暴露在氧化环境中的蛋白巯基和氨基发生加成反应, 生成“巯基-醌”和“氨基-醌”加合物。

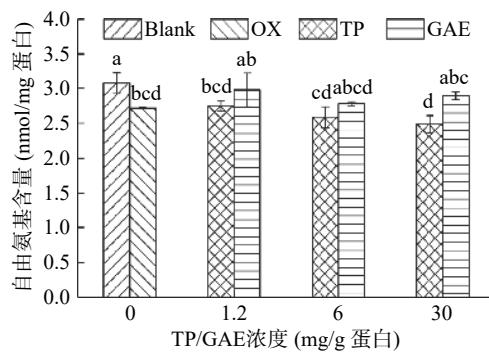


图 4 氧化及不同浓度 TP/GAE 对 MPs 自由氨基含量的影响

Fig.4 Effects of oxidation and different concentrations of TP/GAE on the free amino content of MPs

2.5 不同浓度 TP/GAE 对肌原纤维蛋白结构的影响

2.5.1 不同浓度 TP/GAE 对 MPs 二级结构的影响

如图 5 所示, 氧化后 MPs 的 α -螺旋结构明显减少, 无规则卷曲结构增多。ZHANG 等^[28] 也曾报道蛋白

氧化会促使 α -螺旋结构向 β -结构或无规则卷曲结构转变, 导致 α -螺旋结构损失。与氧化对照相比, 低浓度 TP 会导致部分 β -折叠损失, α -螺旋增加。中、高浓度 TP 的 α -螺旋结构恢复与氧化对照无明显差异, 且 α -螺旋向 β -折叠或无规则卷曲结构转变。 α -螺旋解旋可能是因为酚类物质所含酚羟基破坏了可维持 α -螺旋结构稳定的碳基氧(C=O)和氨基氢(NH)之间形成的氢键。与氧化对照相比, 低浓度 GAE 对 α -螺旋结构无显著影响; 中浓度 GAE 进一步促进 α -螺旋转变为 β -折叠且 α -螺旋解旋率为 31.78%, β -折叠增加了 20.65%。高浓度 GAE 促使 β -转角损失, 转变为无规则卷曲结构。这与 JIA 等^[29] 发现绿原酸、阿魏酸、表没食子儿茶素没食子酸酯三种酚类物质与 β -乳球蛋白结合均会诱导 α -螺旋结构向 β -结构转变和 TANG 等^[30] 发现 MP 的 α -螺旋解旋对迷迭香酸具有浓度依赖性, 浓度越高, α -螺旋结构越少的结论大体一致。 α -螺旋结构解旋和 β -结构损失表明 TP/GAE 会与蛋白质相互作用, 会促使部分蛋白质二级结构无序与松散, 有利于促进蛋白质交联。

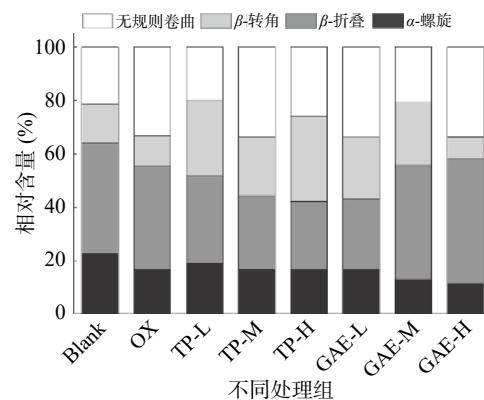


图 5 氧化及不同浓度 TP/GAE 对 MPs 二级结构的影响

Fig.5 Effects of oxidation and different concentrations of TP/GAE on the secondary structure of MPs

2.5.2 不同浓度 TP/GAE 对 MPs 内源性色氨酸荧光的影响

蛋白质所含色氨酸与酪氨酸残基是蛋白质内源荧光的主要来源^[31]。一般来说, 当蛋白质处于折叠状态时, 色氨酸及酪氨酸残基被包埋在蛋白内核, 蛋白质荧光强度较高; 而当蛋白质结构展开时, 色氨酸及酪氨酸残基暴露在蛋白质表面被溶剂的极性环境屏蔽了部分荧光, 则会导致色氨酸荧光猝灭。因此, 蛋白质的三级结构的变化常用内源性色氨酸荧光强度进行表征分析^[8]。如图 6 所示, 与未氧化的 MPs 相比, 氧化 12 h 后 MPs 的荧光强度降低且出现不太明显的红移现象, 最大荧光发射值 λ_m 从 336 nm 红移到 337 nm。TP 和 GAE 的添加均进一步导致 MPs 荧光强度的降低且出现蓝移现象。与 OX 相比, TP 的 λ_m 从 337 nm 蓝移到 334~336 nm, GAE 的 λ_m 从 337 nm 蓝移到 334~335 nm。TP 和 GAE 两种物质的加入引起了 MPs 的 λ_m 蓝移, 表明 Trap 的微环境变得更加疏水。此处与邵晓等^[32] 所研究槲皮素和芦丁

对MPs的影响结果一致。在氧化对照基础上,色氨酸荧光强度随着TP和GAE两种物质浓度的升高而急剧降低。可能原因是氧化后蛋白质三级结构展开,TP和GAE与色氨酸及酪氨酸残基结合部分屏蔽了荧光发射,或是TP和GAE中含有水溶性酚类,提高了色氨酸微环境极性^[33]。

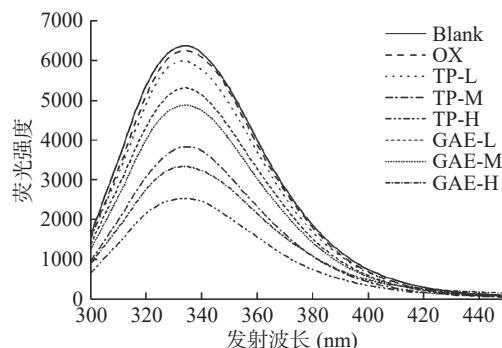


图6 氧化及不同浓度TP/GAE对MPs内源性色氨酸荧光的影响

Fig.6 Effects of oxidation and different concentrations of TP/GAE on endogenous tryptophan fluorescence of MPs

2.5.3 不同浓度TP/GAE对MPs表面疏水性的影响

表面疏水性反映的是蛋白质表面的疏水性氨基酸残基的数量,蛋白质去折叠暴露在表面的疏水性氨基酸越多,表明疏水性越大^[34]。通常BPB用于结合蛋白质分子表面的疏水性结合位点,因此蛋白质表面疏水性常用表征方法是蛋白质与BPB的结合量^[35]。如图7所示,未氧化MPs的BPB结合量为19.99 μg,氧化后其显著增加了14.27%($P<0.05$)。这是因为蛋白质暴露于氧化环境中导致部分蛋白结构展开,暴露在蛋白质表面的疏水性残基与BPB结合使得蛋白质表面疏水性增强^[23]。TP和GAE的添加均引起了蛋白质结构的展开,浓度越高,MP的表面疏水性越大,尤其是浓度为30 mg/g时,与氧化对照相比,两种添加物处理组的BPB结合量分别显著上升了20.01%、10.97%($P<0.05$)。结合色氨酸荧光分析结果,进一步表明TP和GAE的添加均会促进蛋白结构的进一步展开,暴露更多的疏水性残基,从而有利于多酚与

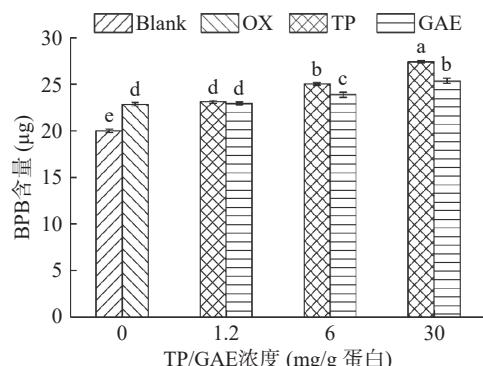


图7 氧化及不同浓度TP/GAE对MPs表面疏水性的影响

Fig.7 Effects of oxidation and different concentrations of TP/GAE on the surface hydrophobicity of MPs

蛋白质发生疏水相互作用。

2.6 不同浓度TP/GAE对MPs溶解度的影响

蛋白质溶解度可从侧面反映其表面疏水情况,通常表面疏水性越大,溶解度便越小^[8]。如图8所示,溶解度的变化趋势正好与表面疏水性相反,与未氧化MPs相比氧化后的MPs溶解度从71.32%显著降低至45.78%($P<0.05$)。TP和GAE的存在均进一步促进MPs溶解度降低,TP处理组更为显著($P<0.05$)。蛋白质溶解度下降的原因可能是蛋白质分子间的静电斥力减弱或疏水基团相互作用导致蛋白分子部分聚集,从而引起溶解度下降^[36]。周扬等^[18]研究的酚类物质迷迭香酸的添加同样会导致肌球蛋白表面疏水性升高且溶解度降低。

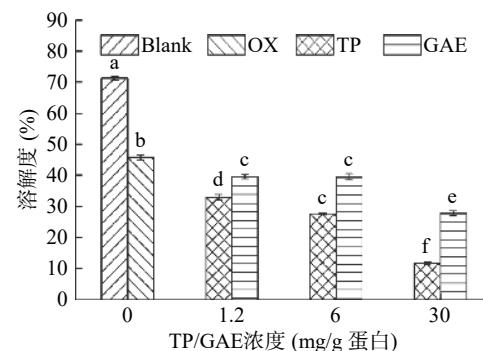


图8 氧化及不同浓度TP/GAE对MPs溶解度的影响

Fig.8 Effects of oxidation and different concentrations of TP/GAE on the solubility of MPs

3 结论

茶多酚和鼠曲草提取物的添加对MPs的氧化状态及结构变化都产生了介导调控作用。GAE清除自由基和羰基含量测定结果表明,GAE清除·OH的能力最强,与TP一样能有效抵抗·OH引发的MPs的氧化,抗氧化效果显著($P<0.05$)。巯基和自由氨基含量的测定结果表明,TP的存在会进一步促进MPs巯基和自由氨基的损失,且高浓度(30 mg/mL)损失更为严重,但GAE的存在仅明显促进MPs巯基损失,对自由氨基的影响较小。傅立叶变换红外光谱、色氨酸荧光、表面疏水性和溶解度表明,TP和GAE的存在促进了MPs结构展开、色氨酸残基暴露,导致α-螺旋含量降低、色氨酸荧光猝灭、表面疏水性增加和溶解度下降。因此,GAE对MPs氧化和结构的介导调控可为植物提取物用于蛋白抗氧化和蛋白结构改性提供理论参考。

参考文献

- [1] 常海军,周文斌.畜禽肉制品加工工艺与技术[M].哈尔滨:哈尔滨工程大学出版社,2018: 56-59. [CHANG Hajun, ZHOU Wenbin. Process and technology of animal and poultry meat products[M]. Harbin: Harbin Engineering University Press, 2018: 56-59.]
- [2] 夏秀芳,孔保华,张宏伟.肌原纤维蛋白凝胶形成机理及影响因素的研究进展[J].食品科学,2009,30(9): 264-268. [XIA

- Xiufang, KONG Baohua, ZHANG Hongwei. Research progress on the formation mechanism and influencing factors of myofibrillar protein gel[J]. *Food Science*, 2009, 30(9): 264–268.]
- [3] SHAH M A, BOSCO S J, MIR S A. Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products[J]. *Meat Science*, 2014, 98(1): 21–33.
- [4] 王利民, 何春梅, 刘彩玲, 等. 鼠曲草属植物的活性成分及其功效研究进展[J]. 江西农业学报, 2019, 31(10): 63–69. [WANG Limin, HE Chunmei, LIU Cailing, et al. Progress in the research on the active components and efficacy of the plants of the *Gnaphalium* L[J]. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 2019, 31(10): 63–69.]
- [5] 高浩祥, 薛凡, 何强, 等. 鼠曲草提取物对食用油脂贮藏过程中氧化酸败的抑制及机理研究[J]. 食品工业科技, 2017, 38(4): 148–151, 157. [GAO Haoxiang, XUE Fan, HE Qiang, et al. Inhibition and mechanism of rancidity of edible oil during storage by extracts from *Gnaphalium affine*[J]. *Food Industry Science and Technology*, 2017, 38(4): 148–151, 157.]
- [6] 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.
- [7] 周非白. 氧化修饰对猪肉肌原纤维蛋白结构与功能特性的影响研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2016: 35–36. [ZHOU Feibai. Regulation of structural and functional properties of porcine myofibrillar protein by oxidative modification[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2016: 35–36.]
- [8] 曹云刚. 植物多酚对肉蛋白氧化稳定性和功能特性的影响机理及应用[D]. 无锡: 江南大学, 2016: 13–14. [CAO Yungang. Effect mechanism and application of plant polyphenols on oxidative stability and functional properties of meat protein[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2016: 13–14.]
- [9] 陈红梅, 谢翎. 响应面法优化半枝莲黄酮提取工艺及体外抗氧化性分析[J]. *食品科学*, 2016, 37(2): 45–50. [CHEN Hongmei, XIE Ling. Optimization of extraction process and antioxidant activity analysis of flavonoids from *Scutellaria chinensis* by response surface methodology[J]. *Food Science*, 2016, 37(2): 45–50.]
- [10] SYMONS L J, BRENNAN C S. The influence of(13)(14)- β -D-glucan-rich fractions from barley on the physicochemical properties and *in vitro* reducing sugar release of white wheat breads[J]. *Journal of Food Science*, 2004, 69(69): C463–C467.
- [11] 刘骏. 结晶紫分光光度法测定 Fenton 反应产生的羟自由基[J]. 武汉工业学院学报, 2005(2): 53–55. [LIU Jun. Determination of hydroxyl radicals produced by Fenton reaction by crystal violet spectrophotometry[J]. *Journal of Wuhan Polytechnic University*, 2005(2): 53–55.]
- [12] 段丽菊, 刘英帅, 朱燕, 等. DNPH 比色法: 一种简单的蛋白质羰基含量测定方法[J]. *毒理学杂志*, 2005(4): 320–322. [DUAN Liju, LIU Yingshuai, ZHU Yan, et al. DNPH colorimetry: A simple method for the determination of protein carbonyl content[J]. *Journal of Toxicology*, 2005(4): 320–322.]
- [13] GUO A, JIANG J, TRUE A D, et al. Myofibrillar protein cross-linking and gelling behavior modified by structurally relevant phenolic compounds[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(4): 1308–1317.
- [14] 褚千千, 韩秋煜, 陈必文, 等. 一种蛋白质游离氨基含量测定方法的探究—三硝基苯磺酸 (TNBS) 法[J]. 食品与发酵工业, 2020: 1–8. [CHU Qianqian, HAN Qiuyu, CHEN Biwen, et al. A new method for the determination of protein free amino-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) method[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020: 1–8.]
- [15] ZHANG R, PANG X, LU J, et al. Effect of high intensity ultrasound pretreatment on functional and structural properties of micellar casein concentrates[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2018, 47: 10–16.
- [16] CAO Y, AIN, TRUE A D, et al. Effects of (–)-epigallocatechin-3-gallate incorporation on the physicochemical and oxidative stability of myofibrillar protein–soybean oil emulsions[J]. *Food Chemistry*, 2018, 245: 439–445.
- [17] 熊杰, 伯朝英, 常海军. 甘草提取物对冷藏鸡肉糜脂肪和蛋白质氧化及品质特性的影响[J]. 食品工业科技, 2021, 42(1): 75–81, 88. [XIONG Jie, BO Zhaoying, CHANG Haijun. Effects of licorice extract on lipid and protein oxidation and quality characteristics of frozen chicken meat[J]. *Food Industry Science and Technology*, 2021, 42(1): 75–81, 88.]
- [18] 周扬, 陈雪珂, 戴宏杰, 等. 溶液体系中迷迭香酸与肌球蛋白的相互作用及其对蛋白理化特性的影响[J]. *食品科学*, 2020, 41(12): 14–21. [ZHOU Yang, CHEN Xueke, DAI Hongjie, et al. Interaction between rosmarinic acid and myosin in solution system and its effect on physicochemical properties of the protein[J]. *Food Science*, 2020, 41(12): 14–21.]
- [19] BAO Y, ERTBJERG P. Effects of protein oxidation on the texture and water-holding of meat: A review[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2019, 59(22): 3564–3578.
- [20] SHAHIDI F, AMBIGAIPALAN P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review[J]. *Journal of Functional Foods*, 2015, 18: 820–897.
- [21] JONGBERG S, TORNGREN M A, GUNVIG A, et al. Effect of green tea or rosemary extract on protein oxidation in Bologna type sausages prepared from oxidatively stressed pork[J]. *Meat Science*, 2013, 93(3): 538–546.
- [22] XIANG Rong, CHENG Jingrong, ZHU Mingjun, et al. Effect of mulberry (*Morus alba*) polyphenols as antioxidant on physicochemical properties, oxidation and bio-safety in Cantonese sausages[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2019, 116(C): 108504–108504.
- [23] 李银. 蛋白氧化对肌肉保水性的影响机制研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2014: 12–13. [LI Yin. Study on the influence mechanism of protein oxidation on muscle water retention[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2014: 12–13.]
- [24] TANG C B, ZHANGW G, DAI C, et al. Identification and quantification of adducts between oxidized rosmarinic acid and thiol compounds by UHPLC-LTQ-Orbitrap and MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(3): 902–911.

- [25] CAO Y, XIONG Y L. Chlorogenic acid-mediated gel formation of oxidatively stressed myofibrillar protein[J]. *Food Chemistry*, 2015, 180: 235–243.
- [26] OZDAL T, CAPANOGLU E, ALTAY F. A review on protein-phenolic interactions and associated changes[J]. *Food Research International*, 2013, 51(2): 954–970.
- [27] 彭林, 马良, 戴宏杰, 等. 多酚与肌原纤维蛋白相互作用机制及其对蛋白特性的影响研究进展[J]. *食品科学*, 2020, 41(11): 239–246. [PENG Lin, MA Liang, DAI Hongjie, et al. Advances in the study of the interaction mechanism between polyphenols and myofibrillar proteins and their effects on protein properties[J]. *Food Science*, 2020, 41(11): 239–246.]
- [28] ZHANG Z, XIONG Z, LU S, 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.
- [29] JIA J, GAO X, HAO M, et al. Comparison of binding interaction between beta-lactoglobulin and three common polyphenols using multi-spectroscopy and modeling methods[J]. *Food Chemistry*, 2017, 228: 143–151.
- [30] TANG Changbo, ZHANG Wangang, ZOU Yufeng, et al. Influence of RosA-protein adducts formation on myofibrillar protein gelation properties under oxidative stress[J]. *Food Hydrocolloids*, 2017, 67: 197–205.
- [31] 李春翼, 王启明, 唐瑜婉, 等. 热诱导对麦醇溶蛋白/芦丁相互作用及其乳液流变学特性的影响[J]. *食品科学*, 2020, 41(18): 27–34. [LI Chunyi, WANG Qiming, TANG Yuwan, et al. Effect of thermal induction on malt/rutin interaction and rheological properties of emulsions[J]. *Food Science*, 2020, 41(18): 27–34.]
- [32] 邵晓, 张宁, 孙乐彤, 等. 槲皮素和芦丁对猪肉肌原纤维蛋白结构的影响[J]. *食品研究与开发*, 2019, 40(2): 26–30. [SHAO Xiao, ZHANG Ning, SUN Letong, et al. Effects of quercetin and rutin on the structure of pork myofibrillar protein[J]. *Food Research and Development*, 2019, 40(2): 26–30.]
- [33] CAO Y, MA W, HUANG J, et al. Effects of sodium pyrophosphate coupled with catechin on the oxidative stability and gelling properties of myofibrillar protein[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 104(C): 105722–105722.
- [34] 窦川林, 林静, 董唯, 等. 茶多酚处理对泥鳅微冻贮藏过程中肌原纤维蛋白功能性质的影响[J]. *食品科学*, 2018, 39(23): 250–256. [DOU Chuanlin, LIN Jing, DONG Wei, et al. Effects of tea polyphenols on the functional properties of myofibrillar protein during microfrozen storage of loach[J]. *Food Science*, 2018, 39(23): 250–256.]
- [35] CHELH I, GATELLIER P, SANTÉ-LHOUTELLIER V. Technical note: A simplified procedure for myofibril hydrophobicity determination[J]. *Meat Science*, 2006, 74(4): 681–683.
- [36] 贾娜, 谢振峰, 李儒仁, 等. 迷迭香提取物与 NaCl 协同改善肌原纤维蛋白凝胶特性[J]. *食品科学*, 2018, 39(3): 28–33. [JIA Na, XIE Zhenfeng, LI Ruren, et al. The synergistic effect of rosemary extract and NaCl on the gel properties of myofibrillar protein[J]. *Food Science*, 2018, 39(3): 28–33.]