

低温等离子体杀菌对虹鳟肌球蛋白降解及相关组织蛋白酶活性的影响

孙协军, 陈笑俏, 李秀霞, 励建荣

Effect of Low Temperature Plasma Sterilization on Myosin Degradation and Related Cathepsin Activity of *Oncorhynchus mykiss*

SUN Xiejun, CHEN Xiaoqiao, LI Xiuxia, and LI Jianrong

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024060181>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

低温贮藏中华管鞭虾肌肉品质及组织蛋白酶H活性变化

Influence of Cold Storage on the Quality of Muscle and the Activity of Cathepsin H in Red Shrimp(*Solenocera crassicornis*)

食品工业科技. 2021, 42(22): 306–313 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021030091>

低温等离子体处理加速罗非鱼肌原纤维蛋白的氧化及结构改变

Cold Plasma Treatment Accelerated the Oxidation and Structural Changes of Myofibrillar in Tilapia

食品工业科技. 2023, 44(4): 88–95 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022050196>

低温等离子体对糙米蒸煮品质和物化特性的影响

Effects of Low Temperature Plasma on Cooking Quality and Physicochemical Properties of Brown Rice

食品工业科技. 2020, 41(2): 9–15 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.02.002>

青鱼和鲢鱼肌球蛋白热诱导凝胶特性的比较

Comparison of the Properties of Heat-induced Gel of Black Carp and Silver Carp Myosin

食品工业科技. 2021, 42(3): 1–5,12 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020030335>

低温等离子体技术在食品杀菌中应用的研究进展

Advances in the Application of Cold Plasma Technology in Food Sterilization

食品工业科技. 2022, 43(12): 417–426 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021060170>

大豆分离蛋白与金线鱼肌球蛋白的相互作用对其凝胶特性的影响

Effect of Interaction between Soy Protein Isolate and *Nemipterus virgatus* Myosin on Its Gel Properties

食品工业科技. 2023, 44(16): 122–130 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022110207>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

孙协军, 陈笑俏, 李秀霞, 等. 低温等离子体杀菌对虹鳟肌球蛋白降解及相关组织蛋白酶活性的影响 [J]. 食品工业科技, 2025, 46(12): 50–59. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024060181

SUN Xiejun, CHEN Xiaoqiao, LI Xiuxia, et al. Effect of Low Temperature Plasma Sterilization on Myosin Degradation and Related Cathepsin Activity of *Oncorhynchus mykiss*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(12): 50–59. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024060181

· 研究与探讨 ·

低温等离子体杀菌对虹鳟肌球蛋白降解及 相关组织蛋白酶活性的影响

孙协军, 陈笑俏, 李秀霞, 励建荣*

(渤海大学食品科学与工程学院, 生鲜农产品贮藏加工及安全控制技术国家地方
联合工程研究中心, 辽宁锦州 121013)

摘要: 为明确低温等离子体杀菌对虹鳟肌球蛋白降解及相关组织蛋白酶活性的影响, 在经过 70 kV 介质阻挡放电低温等离子体 (Dielectric barrier discharge, DBD) 杀菌处理并冰温贮藏 8 d 后, 分析不同贮藏时间的处理组和对照组虹鳟鱼肉质构特性、TCA-可溶性肽、氨基酸态氮、肌原纤维小片化指数 (Myofibrillar fragmentation index, MFI) 的变化, 并对鱼肉中的组织蛋白酶 B、D、L 活性以及它们对肌球蛋白的降解作用进行探究, 进一步通过分子动力学模拟的方法分析了 DBD 处理产生的主要活性物质 NO_3^- 与组织蛋白酶的结合情况。结果表明, 70 kV DBD 处理对贮藏初期的鱼肉硬度、弹性无显著影响 ($P>0.05$), 能够延缓鱼肉硬度和弹性的降低程度, 且延缓了 TCA-可溶性肽、肌原纤维小片化指数 (MFI)、氨基酸态氮含量的增加, 显著抑制组织蛋白酶 B、L 活性 ($P<0.05$), 并减缓肌球蛋白轻链 MLC-2 片段的降解。DBD 处理显著降低了组织蛋白酶 B、D 和 L 的活性 ($P<0.05$), 分子动力学 (Molecular dynamics, MD) 模拟结果显示, 组织蛋白酶 B、D 和 L 与 NO_3^- 的结合自由能分别为: -10.937、-5.0555、-19.112 kcal/mol, 组织蛋白酶 B、D、L 与 NO_3^- 的氢键出现频率分别为 13.56%、15.02% 和 31.23%, 说明 NO_3^- 与组织蛋白酶 L 的氢键作用较强。DBD 处理能延缓鱼肉蛋白质降解, 降低鱼体内组织蛋白酶的活性, 保持鱼肉良好的质地, 其产生的活性成分中的 NO_3^- 对组织蛋白酶 L 的作用效果最大, 能够在其活性中心中稳定存在且具有较低的结合自由能。

关键词: 低温等离子体杀菌, 虹鳟, 肌球蛋白, 组织蛋白酶, 质构

中图分类号: TS254.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2025)12-0050-10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2024060181

本文网刊:



Effect of Low Temperature Plasma Sterilization on Myosin Degradation and Related Cathepsin Activity of *Oncorhynchus mykiss*

SUN Xiejun, CHEN Xiaoqiao, LI Xiuxia, LI Jianrong*

(College of Food Science and Technology, Bohai University, National & Local Joint Engineering Research Center for Storage, Processing and Safety Control Technology of Fresh Agricultural Products, Jinzhou 121013, China)

Abstract: To clarify the mechanism of the effect of low temperature plasma sterilization on the degradation of *Oncorhynchus mykiss* and related cathepsin activity, *Oncorhynchus mykiss* fillets were treated with 70 kV dielectric barrier discharge low temperature plasma (DBD) sterilization and storage under ice temperature for 8 d. Changes in texture, TCA soluble peptides, amino acid nitrogen, myofibrillar fragmentation index (MFI) of *Oncorhynchus mykiss* fillets from different storage days were analyzed, and the activities of cathepsin B, D, and L in the fillets and their degradation effects on myosin were explored. The binding of the main active substance NO_3^- produced by DBD sterilization with cathepsin was further analyzed through molecular dynamics simulation. The results showed that 70 kV DBD treatment had no significant effect

收稿日期: 2024-06-13

基金项目: 国家重点研发计划项目课题 (2019YFD0901702); 渤海大学海洋研究院开放课题 (BDHYYJY2023001)。

作者简介: 孙协军 (1969-), 男, 本科, 高级实验师, 研究方向: 水产品贮藏加工, Email: 405471762@qq.com。

* 通信作者: 励建荣 (1964-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 水产品贮藏加工及质量安全控制, Email: lijr6491@163.com。

on the hardness and elasticity of *Oncorhynchus mykiss* fillets during early storage ($P>0.05$), and the reduction of hardness and elasticity was delayed during the storage. It also delayed the increase of TCA soluble peptides, myofibrillar fragmentation index (MFI), and amino acid nitrogen content. The activity of cathepsins B and L were significantly inhibited ($P<0.05$), and the degradation of myosin light chain MLC-2 fragment was slowed. The activity of cathepsin B, D and L was significantly reduced after DBD sterilization ($P<0.05$). Molecular dynamics simulations showed that the binding free energies of cathepsin B, D and L with NO_3^- were -10.937 , -5.0555 , and -19.112 kcal/mol, respectively, and the hydrogen bonding frequencies of cathepsin B, D, and L with NO_3^- were 13.56%, 15.02%, and 31.23%, respectively, indicating stronger hydrogen bonding between NO_3^- and cathepsin L. The degradation of fish protein and activity of cathepsin could be delayed by DBD sterilization, and the texture of fish fillet was maintained. The greatest effect on cathepsin L was shown by the active ingredient NO_3^- produced by DBD sterilization, which could exist in a stable way in its active center and had low binding free energy.

Key words: low temperature plasma sterilization; *Oncorhynchus mykiss*; myosin; cathepsin; texture

鱼类较其他肉类具有更丰富的内源酶和嗜冷微生物, 这些内源酶和微生物在低温贮藏过程中会不断发挥作用, 使鱼肉品质发生改变, 其中, 鱼肉的质地是影响鱼肉商品价值最重要的因素。贮藏过程中结缔组织恶化、水分流失、肌原纤维蛋白降解等最终导致鱼肉质地软化^[1-2]。鱼肉中的内源蛋白酶, 尤其是钙激活蛋白酶、组织蛋白酶和细胞凋亡酶加速了肌肉蛋白质的降解, 这是造成鱼肉贮藏过程中质地变化的根本原因^[3]。鱼肉中的主要蛋白质是肌原纤维蛋白, 肌原纤维蛋白由肌球蛋白和肌动蛋白组成, 其中前者约占比 50%~55%, 由于肌球蛋白具有 ATP 酶活性, 因此能够为肌肉的拉伸和收缩提供动力。近年来, 关于低温贮藏过程中水产品品质变化的研究大多集中在肌原纤维蛋白, 但关于肌球蛋白贮藏过程中的氧化变性情况研究较少, 大多是由贮藏过程中肌原纤维蛋白的变化来推测肌球蛋白的变性机制, 缺乏专一性。如 Ge 等^[4]向贮藏期间草鱼肌原纤维蛋白添加重组组织蛋白酶 B、D、L 和钙激活蛋白酶进行水解, 通过肌原纤维蛋白降解后的分子量判断降解情况。

低温等离子体(Cold plasma, CP)是一种新型的非热杀菌方式, 包括介质阻挡放电低温等离子体(DBD)、等离子体射流(Atmospheric pressure plasma jet, APPJ)等, 可应用于食品保鲜过程, 具有较好的杀菌效果。但由于食品中化学成分复杂, CP 处理产生的活性物质可能会对其他成分发挥作用。例如, 使用一定处理参数的 CP 能够控制微生物生长及酶活性的变化, 如多酚氧化酶、过氧化物酶和碱性磷酸酶暴露于 CP 后, 均能观察到酶活性降低^[5], 这可能与 CP 产生的羟基自由基($\cdot\text{OH}$)、超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)和一氧化氮(NO)等与酶的氨基酸侧链(包括半胱氨酸、芳香烃环)发生化学反应, 导致酶活性变化^[6]。

紫外-分光光度法、三维荧光光谱法、圆二色谱法等光谱学方法常用于探究酶的分子构象变化及抑制剂与酶之间的作用类型^[7]。上述方法能够探究小分子物质使酶失活的机制, 除此之外, 分子对接和分子动力学(MD)模拟等方法也可以从理论层面解释酶的失活机制, 能够揭示小分子物质对酶的作用位点、成键方式、复合物稳定性等作用机制。MD 模拟

是在分子力场下, 对生物分子随时间变化的行为进行追踪并能够获得一段时间内分子动态变化的技术, 即根据牛顿第二定律模拟体系中粒子的运动轨迹, 采用统计力学的方法对其中的各种相互作用力进行计算, 最终得到复合物的结构、性质信息^[8]。Song 等^[9]采用分子对接和 MD 模拟技术研究儿茶素对酪氨酸酶的抑制作用, 发现儿茶素能够稳定地结合到酪氨酸酶活性位点, 并诱导其二级结构改变, 影响左旋多巴与酪氨酸酶的结合亲和力, 导致酪氨酸酶活性降低。Mohseni 等^[10]采用荧光光谱和 MD 模拟研究了胃蛋白酶与日落黄的相互作用, 分子动力学模拟表明, 结合位点主要位于胃蛋白酶活性位点入口的酪氨酸残基上, 日落黄与胃蛋白酶的结合可以抑制胃蛋白酶的活性。

本文以虹鳟为研究对象, 将低温等离子体用于鱼肉杀菌保鲜过程, 在前期实验最优 DBD 处理条件下, 对贮藏期间鱼肉中组织蛋白酶活性进行检测, 联合 MD 模拟对 DBD 产生的活性物质 NO_3^- 与组织蛋白酶 B、D、L 的结合情况进行深入研究, 为鱼肉低温贮藏过程中的内源酶活性控制提供理论依据, 促进杀菌保鲜技术与食品产业更加深入的结合与应用。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

鲜活虹鳟 辽宁省锦州市林西路水产批发市场; Z-Phe-Arg-AMC, Z-Arg-Arg-AMC、DMSO Sigma 公司; 福林酚、牛血清白蛋白、考马斯亮蓝 G-250、7-氨基-4-甲基香豆素(AMC)标准品、牛血红蛋白、SDS-PAGE 凝胶电泳试剂盒、上样缓冲液北京索莱宝科技有限公司; 蛋白快速染色液 Biosharp 公司; 其余试剂均为分析纯。

F-7000 荧光分光光度计 日立高新技术公司; Biofuge Stratos 高速冷冻离心机 美国 Thermo 公司; Mini Protean 3 凝胶电泳仪 美国 Bio-Rad 公司; ZD-2 自动电位滴定仪 上海仪电科学仪器股份有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 虹鳟鱼片的处理 将鲜活的虹鳟击昏后去

头、内脏和皮，取鱼体两侧背脊肉，用无菌水清洗鱼肉后，用滤纸擦干表面水分。将鱼肉切成 $1\text{ cm} \times 5\text{ cm} \times 10\text{ cm}$ 的小片，放置于已灭菌的蒸煮袋中，并向其中充入空气后密封。将虹鳟鱼片在 70 kV, 50 Hz, 极板间距 30 mm 的介质阻挡放电等离子体设备中处理 2 min，对照组鱼片不处理，将两组鱼片放置于 0 ℃ 恒温箱进行保鲜实验，在 0、2、4、6、8 d 分别取鱼肉并提取肌球蛋白进行相关指标的测定。

1.2.2 虹鳟鱼片质构特性的测定 将鱼肉切成约为 $1\text{ cm} \times 1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$ 的立方体，选用 P/50 柱形探头，采用质构仪测定鱼肉质构指标。参数设置：压缩 50%，两次时间间隔为 5 s，测前速率 1 mm/s，测中速率 1 mm/s，测后速率 1 mm/s，5 g 触发力。每个样本检测 8 次，取平均值。

1.2.3 虹鳟鱼片 TCA-可溶性肽的测定 参考贾胜男^[11]的方法，稍加修改。称取 4 g 鱼肉样品，切碎后向其中加入 36 mL 预冷的 5% TCA 溶液，均质 2 min，于 4 ℃ 条件下静置 2 h，在 4 ℃, 10000×g 条件下离心 10 min，取上清液，采用福林酚法测定鱼肉中 TCA-可溶性肽含量，结果用 $\mu\text{mol Tyr/g 肉}$ 表示。

1.2.4 虹鳟鱼片肌原纤维小片化指数(MFI)的测定 参照葛黎红^[12]的方法并作适当修改。将鱼肉中的所有可见的脂肪和结缔组织去除后，取 2 g 鱼肉与 40 mL 预冷的 MFI 提取缓冲液(100 mmol/L KCl, 11.2 mmol/L K_2HPO_4 , 8.8 mmol/L KH_2PO_4 , 1 mmol/L EGTA, 1 mmol/L MgCl_2)混合并均质，用纱布过滤后将混合液在 4 ℃, 4000×g 条件下离心 10 min，取沉淀加入 20 倍体积的预冷 MFI 提取缓冲液，将其充分混合制成悬浮液，后重复上述离心操作两次，所得沉淀用 MFI 提取缓冲液制成浓度为 $(0.5 \pm 0.05)\text{ mg/mL}$ 的悬浊液，使用式(1)计算肌原纤维小片化指数。

$$\text{肌原纤维小片化指数(MFI)} = A_{540} \times 200 \quad \text{式 (1)}$$

式中： A_{540} 为肌原纤维在 540 nm 的吸光度。

1.2.5 虹鳟鱼片氨基酸态氮的测定 参照 GB 5009.235-2016《食品安全国家标准 食品中氨基酸态氮的测定》方法^[13] 测定，称取 5 g 鱼肉，切碎后加入预冷的纯水，均质，控制其终体积为 35 mL，用滤纸过滤后取 10 mL 滤液加入 60 mL 预冷的纯水，滴加 0.05 mol/L NaOH 标准溶液至混合液 pH 为 8.2。加入 10.0 mL 中性甲醛，混匀后继续使用 0.05 mol/L NaOH 标准溶液将混合液的 pH 滴定至 9.2，记下所消耗的 NaOH 标准溶液的体积(V_1)。将 70 mL 去离子水滴定至 pH 为 8.2，加入 10.0 mL 中性甲醛后用 NaOH 标准滴定溶液将 pH 调节至 9.2，记下所消耗的体积(V_0)，做试剂空白。使用式(2)计算氨基酸态氮含量。

$$\text{氨基酸态氮含量(g/100 g)} = \frac{(V_1 - V_0) \times 0.05 \times 0.014}{5 \times 10/35} \times 100 \quad \text{式 (2)}$$

式中：0.05 为氢氧化钠标准滴定溶液浓度， mol/L ；5 为称取试样的质量， g ；10 为试样稀释液的取用量， mL ；35 为试样稀释液的定容体积， mL ；0.014 为与 1.00 mL 氢氧化钠标准滴定溶液 [$c(\text{NaOH})=1.000 \text{ mol/L}$] 相当的氮的质量， g 。

1.2.6 蛋白酶活力测定

1.2.6.1 粗酶液的提取 粗酶液的提取参考 Chen 等^[14]的方法并略有改动。称取 5 g 虹鳟鱼肉，加入 20 mL Tris-HCl 缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, pH7.5)，均质 1 min 后于 4 ℃ 静置 10 min。将混合液于 10000×g, 4 ℃ 条件下离心 20 min，取上清液，用双层纱布过滤，置于-80 ℃ 下储存，备用。

1.2.6.2 7-氨基-4-甲基香豆素(AMC)标准曲线绘制

将 AMC 标品配制浓度为 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的溶液，取 100 μL AMC 溶液加入 200 μL 反应缓冲液和 3 mL 终止液，10 min 内对 AMC 释放的荧光强度进行测定。测定参数：激发波长 $\lambda_{\text{ex}}=360 \text{ nm}$ ，发射波长 $\lambda_{\text{em}}=460 \text{ nm}$ ，狭缝宽度 EX/EM=5 nm。以 AMC 浓度($\mu\text{mol/L}$)为横坐标，荧光强度为纵坐标，得到标准曲线： $y=2485.8x+155.24$ ， $R^2=0.9932$ 。

1.2.6.3 组织蛋白酶 D 活性测定 参照 Zhu 等^[15]的方法并略加修改。取 0.4 mL 粗酶液，加入 1.2 mL 组织蛋白酶 D 缓冲液，于 37 ℃ 预热 10 min 后加入 0.4 mL 30 mg/mL 酸化牛血红蛋白作为底物，在 37 ℃ 下水浴反应 1 h，反应结束后向混合液中加入 2 mL 10% TCA 终止反应，10000×g 离心 10 min。采用福林酚 Lowry 法测定上清液中的多肽含量，每个酶活单位定义为 37 ℃ 下每分钟释放 1 $\mu\text{mol/L L-酪氨酸}$ 所需要的酶量。

1.2.6.4 组织蛋白酶 B、B+L 活性测定 取 100 μL 粗酶液，加入 100 μL 对应的反应缓冲液，于 37 ℃ 预热 10 min，加入 100 μL 20 $\mu\text{mol/L}$ 的底物溶液，其中组织蛋白酶 B 和 L 的特异性底物分别为 Z-Arg-Arg-AMC 和 Z-Phe-Arg-AMC。将混合液在 37 ℃ 下准确反应 15 min 后立刻加入终止液，并置于冰浴中，10 min 内对粗酶液中的蛋白酶与底物反应所释放的 AMC 进行测定，测定参数与 AMC 标准曲线一致，酶活单位定义为 37 ℃ 下每分钟释放 1 nmol AMC 所需要的酶量。

1.2.6.5 反应缓冲液配制 组织蛋白酶 D 缓冲液：100 mmol/L Glycine-HCl(pH3.0)；组织蛋白酶 B 缓冲液：352 mmol/L KH_2PO_4 +48 mmol/L Na_2HPO_4 +4 mmol/L Na_2EDTA (pH6.0)，使用前加入 8 mmol/L DTT；组织蛋白酶 L 缓冲液：340 mmol/L 乙酸钠+60 mmol/L 乙酸+4 mmol/L Na_2EDTA (pH5.5)，使用前加入 8 mmol/L DTT；终止液：Tris-HCl(50 mmol/L) 缓冲液，含 1% SDS, pH 7.0；底物溶液先溶于 DMSO 配制成浓度为 10 mmol/L 的母液，置于-80 ℃ 保存，

用时取出加入纯水稀释至 20 μmol/L。

1.2.7 组织蛋白酶对肌球蛋白内外降解程度的测定

1.2.7.1 肌球蛋白提取及浓度测定 虹鳟鱼片肌球蛋白参照王海生等^[16]的方法提取和纯化, 提纯后肌球蛋白放置于-80 ℃ 冰箱备用, 采用双缩脲法测定肌球蛋白浓度。分别取浓度为 0、1、2、3、4、5、6、7、8 mg/mL 的 BSA 溶液 1 mL 加入 4 mL 双缩脲试剂, 置于暗处反应 30 min 后, 在 540 nm 下测定吸光值, 得到标准曲线: $y=0.0494x+0.1054$, $R^2=0.9973$ 。样品蛋白浓度测定同标准曲线测定, 根据标准曲线计算样品肌球蛋白浓度。

1.2.7.2 组织蛋白酶对肌球蛋白的体内降解作用

将对照组和 DBD 处理组在贮藏 0、2、4、6、8 d 后提取的肌球蛋白稀释至 3 mg/mL, 将蛋白样品与上样缓冲液等体积混合后煮沸 10 min, 于 4000×g 条件下离心 5 min, 并配制 4% 分离胶和 12% 浓缩胶。取 10 μL 样品加入浓缩胶上样孔(Marker 4 μL), 样品在浓缩胶时控制电压为 80 kV, 至分离胶后控制电压为 120 kV, 电泳结束后将凝胶取出并放置于快速染色液中染色 30 min, 用超纯水清洗后对凝胶进行扫描分析。

1.2.7.3 组织蛋白酶对肌球蛋白的体外降解作用

取对照组和 DBD 处理组的粗酶液 300 μL 加入 3 mg/mL 4mL 新鲜虹鳟肌球蛋白样品中, 混匀后将溶液置于 37 ℃ 下孵育 48 h, 分别于 0、3、6、12、24、36、48 h 取 100 μL 样品, 加入等体积上样缓冲液, 煮沸 10 min 后置于-20 ℃ 保存。待孵育结束, 将所得样品进行电泳操作, 电泳条件与 1.2.7.2 所述相同。

1.2.8 分子对接及分子动力学(MD)模拟

1.2.8.1 分子对接 首先在 NCBI 数据库中获取虹鳟组织蛋白酶 B、D 和 L 的序列(Accession: XP_036810413.1; XP_021413174.1; NP_001158584.1), 通过 SWISS-MODEL 在线网站进行同源建模, 综合评估模板的同源性、序列相似性、一致性等并选出最优模板 3AI8、6QBG 和 2YJB 构建虹鳟组织蛋白酶 B、D、L 三维结构。 NO_3^- 配体分子在 PubChem 中查找并下载得到。在 Gaussian09 中使用 HF/6-31G* 方法将 NO_3^- 能量最小化, 并在 AMBER20 中使用 RESP 拟合技术将 Gaussian 产生的静电势拟合以获得原子部分电荷, 使用 antechamber 程序获得 NO_3^- 的力场参数并产生原子部分电荷。

将 3AI8、6QBG、2YJB 分别和 Cathepsin B、D、L 的三维结构重叠, 根据蛋白数据库(Protein data bank, PDB)中配体的位置确定活性位点, 将 NO_3^- 分子分别放入 Cathepsin B、D、L 中相应的活性位点中, 分别构成 Cathepsin B- NO_3^- 复合物、Cathepsin D- NO_3^- 复合物、Cathepsin L- NO_3^- 复合物 PDB。使

用 Discovery Studio 2016 软件对三种复合物模型中受体蛋白中的酸碱氨基酸的 pKa 值进行预测, 结果表明受体蛋白中各酸碱氨基酸的 pKa 值在 pH7.4 的溶液中均为正常质子化, 故根据 Amber 力场的命名规则, 氨基酸名无需修改。在后续的分子力学(Molecular mechanics, MM)最小化和 MD 模拟中, 蛋白质的势(potential)采用 AMBER ff19SB 力场得到, 抑制剂的势(potential)采用 AMBER 力场(gaff)确定, 并向体系中添加 11 个 Na^+ 抗衡离子至电中性。对于每个系统, 使用 AMBER20 的 Sander 模块执行能耗最小化和 MD 模拟。最后, 整个系统在 TIP3P 水盒中显式溶剂化, 设置与溶质的最接近原子之间的距离至少为 15 Å 的水盒。为了避免边缘效应, 应用周期性边界条件对整个 MD 模拟过程进行控制。

在进行 MD 模拟之前, 将整个系统分 3 个阶段进行能量最小化, 目的是消除复合物与溶剂之间的不良接触。首先使用强度 10 kcal·mol Å 的谐波约束条件冻结溶质以将水分子最小化。其次, 对蛋白质主链约束(谐波约束条件: 10 kcal·mol Å), 自由优化溶剂、配体和蛋白质侧链原子。最后, 整个系统不受限制地最小化。每个阶段包括 5000 步最陡下降和 2500 步共轭梯度最小化。在 MD 模拟中, 长距离静电相互作用可通过 PME(Particle-mesh. ewald)算法进行处理。远程静电和范德华相互作用的截止距离设置为 8 Å, 在正则系踪(NVT)中在 40 ps 内由 0 逐渐加热至 310 K。最后, 在设置的具有周期性边界条件的恒温恒压系踪(NPT)中对每个系统进行至少 40 ns 的 MD 模拟, 应用 SHAKE 方法约束所有涉及氢原子的共价键。根据 Langevin 算法, 将每个模拟耦合到 1.0 atm(1 atm=101.3 kPa)、310 K 的热浴条件下, 温度和压力耦合参数设置为 2.0 ps。控制采样过程中每 0.1 ps 保存一次坐标, 并将模拟生成的构象用于进一步的结合自由能计算和分解分析。

1.2.9 模拟轨迹分析 平衡后的生产相模拟轨迹用于进行均方根偏差分析(Root-mean-square deviations, RMSD)、均方根波动分析(Root mean square fluctuations, RMSF)、回旋半径(R_g)、氢键和配体与活性中心距离分析。从 RMSD 平衡后的长度为 30 ns 轨迹中提取了 600 个轨迹, 用于结合自由能计算。使用 AMBER20 中包含的 MM/GBSA 方法和 Nmod 模块, NO_3^- 与 Cathepsin B、D、L 的结合自由能: $\Delta G_b = \Delta E_{\text{MM}} + \Delta G_{\text{sol}} - T\Delta S$ 。其中 ΔE_{MM} 是气相中复合物与每个结合配体之间的分子力学能之差, ΔE_{MM} 由气相中的静电相互作用 ΔE_{intele} 和范德华相互作用能 ΔE_{intvdw} 组成。 ΔG_{sol} 是溶剂化自由能对结合自由能的贡献, $\Delta G_{\text{sol}} = \Delta G_{\text{solele}} + \Delta G_{\text{solnopol}}$, 静电对溶剂化自由能(ΔG_{solele})的贡献由广义波恩(GB)模型计算得到, 疏水相互作用对溶剂化自由能的贡献($\Delta G_{\text{solnopol}}$)通过溶剂可及表面积函数确定:

$\Delta G_{\text{solnopol}} = \gamma_{\text{SASA}} + b$, 溶剂可及的表面积 SASA 由 LCPO 程序计算得出, γ 和 b 的值在计算中分别被设置为 0.005 kcal·mol 和 0 kcal·mol, $T\Delta S$ 表示熵变对结合自由能的贡献。

1.3 数据处理

上述实验均进行 3 次及以上的平行测定和 2 次及以上的重复测定, 测定结果以“平均值±标准偏差”表示。使用 SPSS 26.0 软件中的单因素 ANOVA 的 Duncan 法多重比较检验进行显著性分析, $P<0.05$ 表示差异显著, 并采用 Origin 9.0 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 肌球蛋白构特性分析结果

鱼肉的硬度为鱼肉在第一次被压缩时所需的力量, 反映了鱼肉内部为抵抗自身形状改变的结合力, 弹性反映了鱼肉形变后的恢复程度。由表 1 可以看出, 70 kV DBD 处理对贮藏初期的鱼肉硬度、弹性无显著影响($P>0.05$), 但随着贮藏时间的增加, 各组鱼肉硬度和弹性均显著降低, 这两个质构指标的下降与鱼肉组织中的水分损失、内源酶活性变化和肌肉组织劣化有关^[17]。贮藏 2 d 时, 经 DBD 处理的鱼肉硬度显著高于对照组($P<0.05$), 这可能与产生的等离子体活性物质对鱼肉的杀菌作用有关, 缓解了贮藏过程中微生物产生的外源酶对鱼肉肌纤维的降解程度。贮藏末期对照组的鱼肉硬度仅为初始值的 37.67%, 而 DBD 处理组的鱼肉硬度为初始值的 57.02%, 说明适宜电压的 DBD 处理能有效延缓鱼肉硬度下降程度。这得益于等离子体活性物质对蛋白的氧化、交联作用, 从而达到了更优的质构特性^[18]。在贮藏第 8 d 时, 对照组的弹性比处理组低($P<0.05$), 这可能是由于对照组的鱼肉中的蛋白质二级结构发生改变, 而 DBD 处理能够在微观上延缓其结构改变程度, 从而在宏观上降低了弹性降低程度。

2.2 肌球蛋白 TCA-可溶性肽含量测定结果

TCA-可溶性肽通常用于监测鱼体死后蛋白质的降解情况。如图 1 所示, 虹鳟的鱼片初始 TCA-可溶性肽含量为 0.82 μmol 酪氨酸/g, 而经 DBD 处理后, 其 TCA-可溶性肽含量为 1.07 μmol 酪氨酸/g, 说明 DBD 处理对鱼肉中蛋白质的降解具有推动作用, 这是由于等离子体中的活性物质在杀灭微生物的同时也会使蛋白质发生一定程度的破碎。在贮藏过程中, TCA-可溶性肽含量逐渐升高, 这是由于自溶作用使

鱼肉中的内源酶不断释放, 能够将蛋白质降解形成低分子量的多肽, 说明贮藏过程中, 蛋白质水解在持续进行。在贮藏后期, 对照组的 TCA-可溶性肽含量增速比 DBD 处理组快, 可能的解释为贮藏前期 DBD 对内源酶的抑制作用减缓了 TCA-可溶性肽的积累, 同时, 由于对照组微生物的生长繁殖速度快, 嗜冷假单胞菌和腐败希瓦氏菌这类有较强腐败潜力的微生物代谢产生的外源酶也能够将蛋白质降解为多肽^[19-20]。贮藏末期, 对照组和 DBD 处理组鱼肉中 TCA-可溶性肽含量为新鲜样品的 2.7 倍和 2.3 倍, 说明 DBD 处理能够在一定程度上延缓鱼肉蛋白质降解。

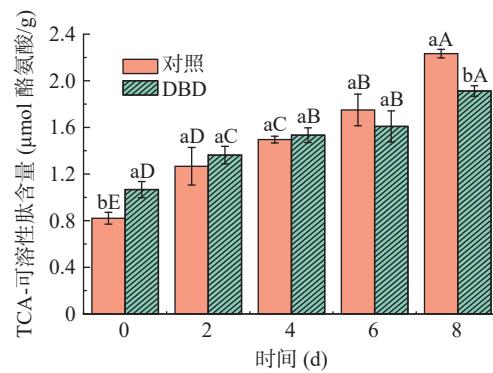


图 1 冰藏过程中虹鳟 TCA-可溶性肽含量的变化

Fig.1 Changes of TCA-soluble peptides in *Oncorhynchus mykiss* fillets during ice temperature storage

注: 不同小写字母代表相同天数组间有显著差异($P<0.05$); 不同大写字母代表不同天数组内有显著差异($P<0.05$), 图 2~图 4 同。

2.3 肌原纤维小片化指数 (MFI) 变化分析

在肉类品质评价中, 肌原纤维小片化指数通常用来评估肉的嫩度, MFI 值越高, 肌肉嫩化程度越高。冰藏过程中虹鳟 MFI 变化情况如图 2 所示, 在经过 70 kV DBD 处理 2 min 后, 鱼肉 MFI 较对照组并无显著差异($P>0.05$)。Luo 等^[21]发现高强度等离子体处理猪肉 5 min, 可加速肌原纤维蛋白降解, 使 MFI 上升。Yong 等^[22]表示在一定强度内的等离子体处理不会对 MFI 有显著影响, 这与本实验结果一致, 说明 70 kV DBD 处理 2 min 对虹鳟肌原纤维蛋白降解无不良影响。当贮藏时间延长时, 可观察到 MFI 显著上升($P<0.05$), 这一结果与 I 带中的肌联蛋白和伴肌动蛋白降解程度升高有关, 加速了鱼肉的软化进程^[23]。由贮藏期间对照组和 DBD 处理组的

表 1 冰藏虹鳟鱼片硬度和弹性的变化

Table 1 Changes in the hardness and spring of *Oncorhynchus mykiss* fillets during ice temperature storage

指标	组别	0 d	2 d	4 d	6 d	8 d
硬度(g)	对照	1245.0±131.1 ^{aA}	804.1±31.6 ^{bB}	506.7±53.0 ^{bC}	484.1±79.9 ^{bC}	469.0±112.8 ^{bC}
	DBD 处理组	1381.6±94.6 ^{aA}	1017.5±100.9 ^{aB}	847.3±75.7 ^{aC}	804.5±102.8 ^{aC}	724.4±70.4 ^{aC}
弹性	对照	0.55±0.02 ^{aA}	0.48±0.01 ^{bB}	0.46±0.01 ^{bB}	0.44±0.01 ^{bC}	0.42±0.02 ^{bC}
	DBD 处理组	0.54±0.04 ^{aA}	0.51±0.01 ^{aB}	0.49±0.01 ^{aBC}	0.48±0.01 ^{aC}	0.47±0.02 ^{aC}

注: 不同小写字母代表相同时间组间有显著差异($P<0.05$); 不同大写字母代表不同时间组内有显著差异($P<0.05$)。

MFI 变化可知, DBD 处理能够减缓鱼肉 MFI 的增速, 在贮藏第 6 d 和第 8 d, DBD 处理组和对照组较初始值分别增大了 3.76 倍和 6.01 倍。这说明 DBD 处理可能通过抑制鱼体内源酶的释放及其活性, 保持鱼肉良好的质地, 这与 2.1 中对鱼肉质构变化的测定结果一致。

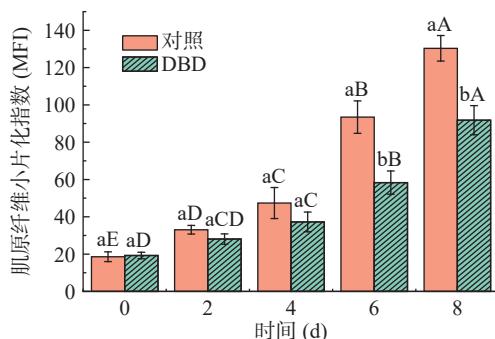


图 2 冰藏过程中虹鳟 MFI 的变化

Fig.2 Changes of MFI of *Oncorhynchus mykiss* fillets during ice temperature storage

2.4 氨基酸态氮变化分析

氨基酸态氮反映了由鱼肉中蛋白质水解所产生的氨基酸状态氮的含量变化情况, 一定程度上可反映鱼类的新鲜度变化。如图 3 所示, 在冰藏过程中, 鱼肉氨基酸态氮含量随贮藏时间延长持续增大, 这是由于外肽酶将鱼肉中蛋白质降解产生游离氨基酸从而检测出氨基酸态氮含量变化, 这些外肽酶主要来源于微生物生长代谢以及鱼肉中的内源蛋白酶^[24]。在贮藏期间, 相比对照组, DBD 处理组减缓了 13.02% 的氨基酸态氮增加, 说明 DBD 处理对氨基酸态氮的抑制效果显著($P<0.05$)。微生物在贮藏过程中不断增殖, 导致鱼肉中蛋白质的持续降解并产生游离氨基酸, 使氨基酸态氮含量增加。而 DBD 处理具有杀菌作用, 这使其微生物代谢产生的外源酶含量低于对照组, 从而在氨基酸态氮含量变化中有所体现, 同时, DBD 处理对内源酶活性也具有抑制作用, 贮藏后期的鱼肉品质劣化主要受到组织蛋白酶的影响^[11]。Zhao 等^[25]也表明了金枪鱼的氨基酸态氮含量上升与内源蛋白酶降解鱼肉蛋白有关。

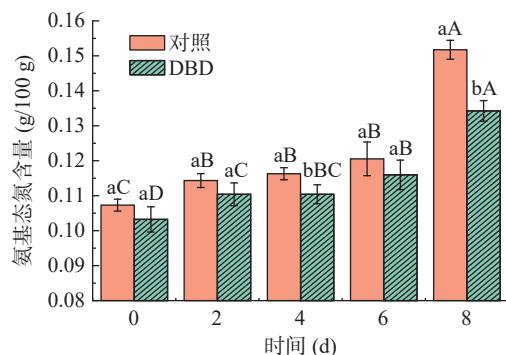


图 3 冰藏过程中虹鳟氨基酸态氮的变化

Fig.3 Changes of amino acid nitrogen in *Oncorhynchus mykiss* fillets during ice temperature storage

2.5 虹鳟组织蛋白酶活性变化分析

经 DBD 处理的虹鳟中组织蛋白酶 B、D 和 L 活性变化如图 4 所示。从图 4 可以看出, DBD 处理显著降低了组织蛋白酶 B、D 和 L 的活性($P<0.05$), 这可能与 DBD 放电过程中产生的能够较长时间发生作用的 O_3 、 H_2O_2 、 NO_3^- 、 NO_2^- 等活性物质有关^[26], 这些活性物质会导致酶结构变化, 从而影响其活性, 也可能与活性物质对鱼肉中的其它蛋白质、酶类、脂肪等的作用有关, 间接地影响了组织蛋白酶的活性。组织蛋白酶 B、D 和 L 活性的持续升高主要源自其数量的增加, 鱼体死亡后组织中的肌细胞启动的细胞凋亡程序, 将溶酶体中的组织蛋白酶释放至肌原纤维中, 这导致了肌球蛋白二级结构在冷藏 4 d 后降解程度产生了较大升幅, 并印证了 2.3 和 2.2 中 MFI 和 TCA-可溶性肽的变化。但组织蛋白酶 D 活性的最佳 pH 为 3~4 左右, 贮藏后期鱼肉蛋白质的降

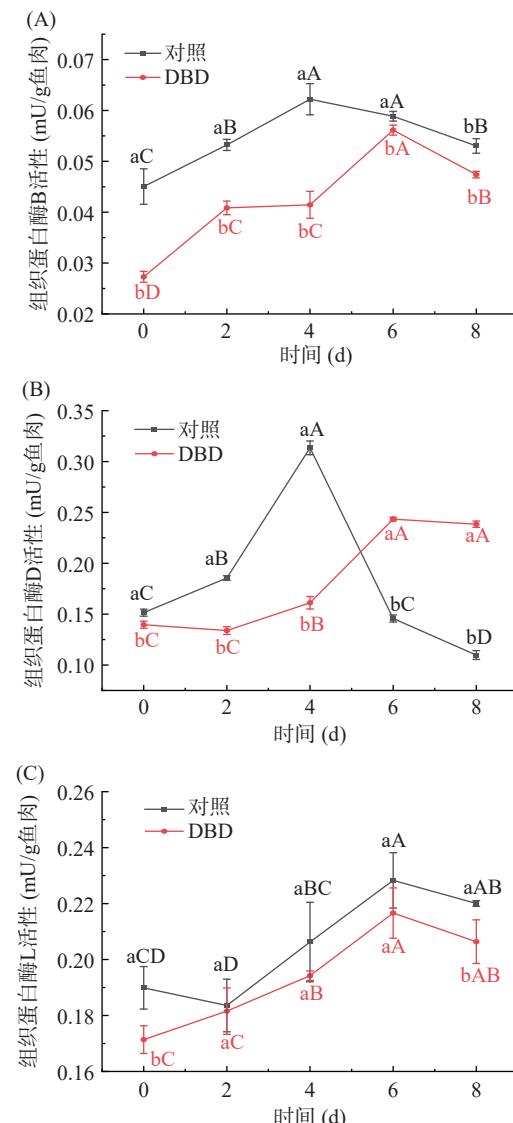


图 4 冰藏过程中虹鳟(A)组织蛋白酶 B、(B)组织蛋白酶 D 和(C)组织蛋白酶 L 的活性变化

Fig.4 Changes in *Oncorhynchus mykiss* (A) cathepsin B, (B) cathepsin D and (C) cathepsin L activity during ice temperature storage

解导致的 pH 升高, 对组织蛋白酶 D 的活性产生较大影响。组织蛋白酶 B 和 L 在冰温贮藏 6 d 后活性也开始降低, 这与 Bahuaud 等^[27]对大西洋鲑鱼片冰藏的结果一致, 这与鱼体自溶有关。Situ 等^[28]报道了相似的结果, 在经过等离子体处理后, 金鲳鱼中的组织蛋白酶 L 活性显著下降, 说明等离子体能够改变组织蛋白酶活性。

2.6 虹鳟肌球蛋白体内外降解程度分析

SDS-PAGE 凝胶电泳图谱可直观地表示肌球蛋白在贮藏期间的交联和降解情况。肌球蛋白受 SDS 作用发生变性, 并释放出肌球蛋白重链(MHC, 约 220 kDa)和肌球蛋白轻链(MLC-1, 25 kDa 和 MLC-2, 18 kDa)^[29]。MHC 被降解时主要产生 150 kDa 和 140 kDa 片段^[30], 因此可以通过 MHC、MLC、150 kDa 片段和 140 kDa 片段对肌球蛋白的变化情况进行分析。

由图 5A 和图 5C 可以看出, 在电泳图谱中仅存在少量肌动蛋白(Actin, 48 kDa), 其含量占总蛋白含量的 2% 以下, 且肌动蛋白与肌球蛋白的存在状态难以使其完全分离, 因此所提取的肌球蛋白纯度较高, 符合研究需要。随着贮藏时间延长, 虹鳟 MHC 谱带变窄, 说明其含量减少, 在贮藏 6 d 时可明显观察到对照组的谱带变窄, 这与同一贮藏时间的组织蛋白酶 B 和 L 的活性呈负相关, 且肌动蛋白及肌球蛋白

轻链谱带也有所变浅。经 DBD 处理的虹鳟肌球蛋白在贮藏过程中的谱带变化趋势更缓, 尤其是 MLC-1 片段, 降解速度明显缓于对照组。

为了更直观地展示组织蛋白酶对肌球蛋白的降解作用, 将粗提得到的混合组织蛋白酶添加至未经处理的新鲜虹鳟肌球蛋白中进行孵育, 结果如图 5B 和图 5D 所示。在进行了 9 h 的孵育后, MHC 逐渐被降解为 150 kDa 和 140 kDa 片段, 这主要是由于组织蛋白酶 B、D 和 L 的降解效果^[31]。由于组织蛋白酶是粗提得来的, 粗提过程中产生的一些小片段分子在 75~48 kDa 出现了部分降解条带。当孵育 24 h 后, 对照组的 MLC 片段几乎完全被水解, 而 DBD 处理组还存在有较为明显的 MLC-2 片段。Godiksen 等^[32]研究虹鳟鱼发现, 相比于组织蛋白酶 D, 组织蛋白酶 B 在肌球蛋白轻链降解过程中起主要推动力作用。这说明 DBD 处理对组织蛋白酶 B、D 和 L 或其一的酶活性有抑制作用, 从而延缓了 MLC-2 条带的降解, 与组织蛋白酶活性测定结果一致。

2.7 分子对接结果

经前期分子对接实验, 比对了 O₃、H₂O₂、NO₃⁻ 和 NO₂⁻四种 DBD 产生的活性物质, 发现 O₃、H₂O₂ 和 NO₂⁻与内源蛋白酶的结合自由能较小, 无法稳定与组织蛋白酶结合并发生作用, 而 NO₃⁻与组织蛋白酶的结合自由能较大, 能够与组织蛋白酶稳定结合,

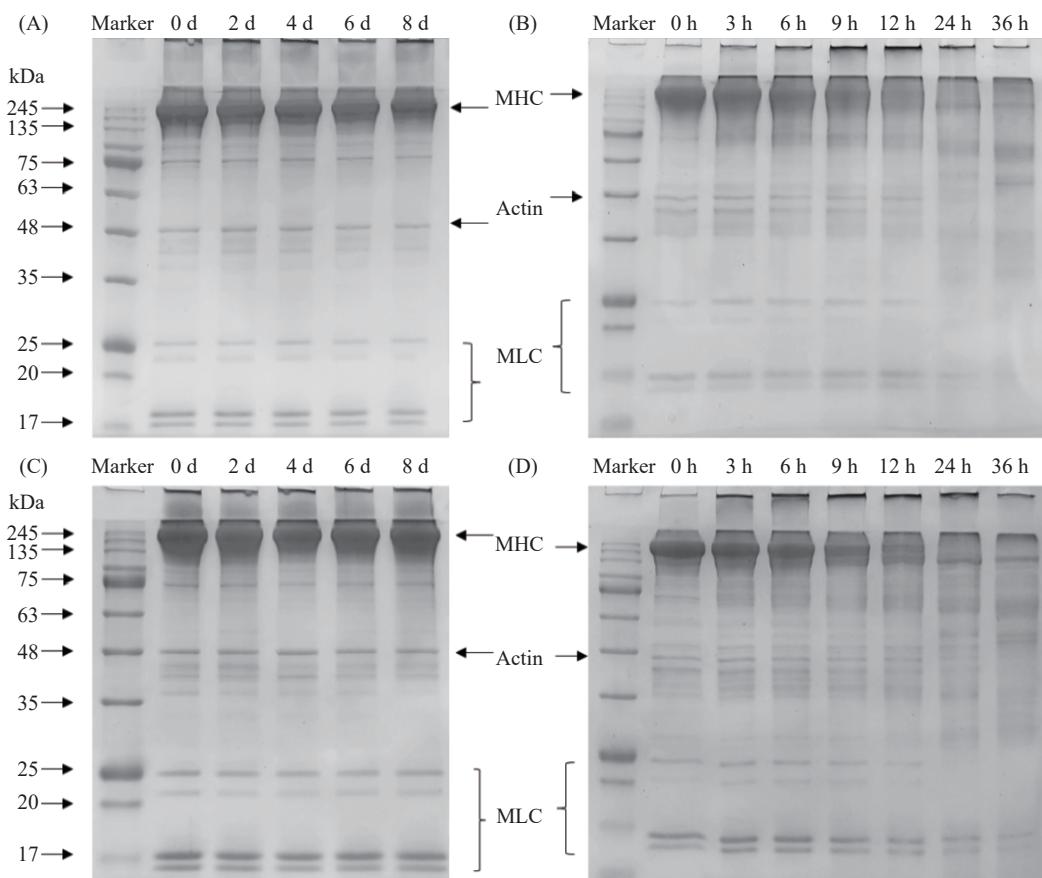


图 5 冰藏过程中虹鳟肌球蛋白体内降解和体外降解 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig.5 SDS-PAGE pattern of myosin in *Oncorhynchus mykiss* fillets during ice temperature storage

注: (A)对照组体内降解; (B)对照组体外降解; (C)DBD 处理组体内降解; (D)DBD 处理组体外降解。

因此后续仅选择 NO_3^- 进行结果分析。

通过 LigPlus 软件分析 NO_3^- 与组织蛋白酶的相互作用, 由图 6 可知, NO_3^- 主要通过与组织蛋白酶 B 中的残基 Ser87、Gly86、Gln82 和 Tyr34 形成氢键相互作用, 通过残基 Phe91、Gly83 和 Cys85 形成疏水相互作用; NO_3^- 与组织蛋白酶 D 能够形成 2 个氢键相互作用(残基 Gly331 和 Val322)和 4 个疏水相互作用(残基 Leu185、Ala333、Phe332 和 Ser321); 与组织蛋白酶 L 可通过残基 Lys187 和 Lys18 形成 2 个氢键相互作用, 通过残基 Ser189、Phe29 和 Val17 形成 3 个疏水相互作用。

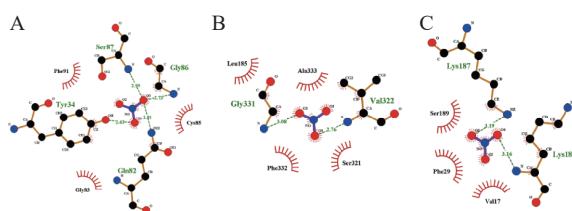


图 6 NO_3^- 与(A)组织蛋白酶 B、(B)组织蛋白酶 D 和(C)组织蛋白酶 L 分子对接结果

Fig.6 Molecular docking results of NO_3^- with (A) cathepsin B, (B) cathepsin D and (C) cathepsin L

2.8 分子动力学(MD) 模拟结果

由于 DBD 处理产生的 NO^{3-} 具有较长的保留时间, 因此选择 NO^{3-} 作为 DBD 处理中的代表性活性物质进行后续研究。MD 模拟可用于分析蛋白质与配体的结合位点、结合能、所涉及的残基及成键情况^[33], 并对两种物质在一段时间内结合发生的构象变化、稳定性以及各种弱相互作用进行分析。通常将 MD 模拟用于补充或验证实验结果, 以达到探究复合物的结构性质及互作机理的目的。

2.8.1 均方根偏差分析(RMSD) 在 MD 模拟中, 均方根偏差分析的变化是衡量蛋白质与配体形成复合物后结构稳定性与时间关系的最有效方法。RMSD 值越高, 说明分子构象变化越大, 即组织蛋白酶结构趋于不稳定^[34]。 NO_3^- 作用下组织蛋白酶 RMSD 的变化如图 7 所示, 结果显示, 组织蛋白酶 B、D、L 与 NO_3^- 的复合物在模拟 20、1 和 40 ns 后均能够达到平衡, 复合物的 RMSD 值分别为 1.75、1.6 和 1.8 Å, 偏差小于 0.75 Å, 能够保持收敛, 说明这三种复合物均具有较好的稳定性, 可用于后续分析。因此基于平衡后 30 ns 提取的轨迹进行结合自由能计算和自由能分解是合理的。组织蛋白酶 L- NO_3^- 复合物的 RMSD 值略大于另外两种复合物, 说明 NO_3^- 对组织

蛋白酶 L 的稳定性影响更大。

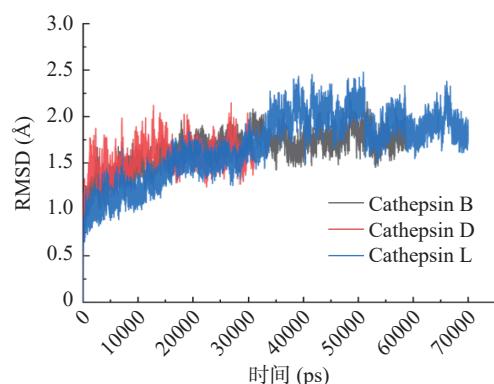


图 7 NO_3^- 作用下组织蛋白酶 RMSD 的变化
Fig.7 Changes of cathepsin RMSD under the action of NO_3^-

2.8.2 结合自由能分析 通过 MM/GBSA 的方法并使用单轨迹方案对 600 个轨迹进行分析可计算 MD 模拟过程中的结合自由能。表 2 列出了由 MM/GBSA 计算的包括结合自由能在内的各项能量贡献计算结果, 这些能量与 NO_3^- 和组织蛋白酶之间的亲和力有关, 能量值越低, 则复合物性质越稳定。由表 2 可知, 组织蛋白酶 B、D 和 L 与 NO_3^- 的结合自由能分别为: -10.937、-5.0555、-19.112 kcal/mol, 结合自由能为负值说明活性位点与小分子配体之间不排斥, 具有亲和性。极性溶剂化能(ΔG_{solele})对结合有重要贡献, 是结合的主要驱动力, 组织蛋白酶 B 和 L 的极性溶剂化能绝对值较大, 说明其对复合体系的结合贡献最大, 且分子间范德华力(ΔE_{intvdw})和对应于 SASA 包埋的非极性溶剂化能 $\Delta G_{\text{solnopol}}$ 对结合有帮助。静电相互作用会阻碍组织蛋白酶和 NO_3^- 的结合, 三种复合物的静电相互作用 ΔE_{intele} 均为正值, 不利于结合, 但总的静电相互作用能 ΔG_{sol} (分子间范德华力 ΔE_{intvdw} +非极性溶剂化能 $\Delta G_{\text{solnopol}}$)是负值的, 利于键合, 这是由于极性基团在溶剂化时能充分抵消静电相互作用能。总静电相互作用能 ΔG_{sol} 的贡献远大于总静电相互作用贡献 ΔG_{ele} (静电势 ΔE_{intele} +极性溶剂化能 ΔG_{solele})。总的来说, NO_3^- 能够更好更稳定地和组织蛋白酶 B 和 L 结合, 与组织蛋白酶 D 的复合物性质稳定性稍差, 这与 2.5 中酶活性变化结果一致。

2.8.3 氢键分析 通过 MD 模拟后的轨迹分析可以得到氢键结果, 复合物的结合亲和力和稳定性与氢键密切相关, 但模拟过程中的氢键出现是瞬时的, 在复合物结合相互作用、结构变化和蛋白质错误折叠过

表 2 MD 过程中 NO_3^- 与组织蛋白酶对接时的结合自由能各能量项(kcal/mol)

Table 2 Binding free energy between NO_3^- and cathepsin during MD (kcal/mol)

能量贡献	ΔE_{intele}	ΔE_{intvdw}	$\Delta G_{\text{solnopol}}$	ΔG_{solele}	ΔG_{sol}	ΔG_{ele}	ΔG_{bind}
Cathepsin B- NO_3^-	107.6951	-8.2717	-1.6957	-108.665	-9.9674	-0.9696	-10.937
Cathepsin D- NO_3^-	27.9337	-3.8105	-0.8507	-28.328	-4.6612	-0.3943	-5.0555
Cathepsin L- NO_3^-	133.77	-5.3093	-1.8229	-145.75	-7.1322	-11.9798	-19.112

表3 MD过程中 NO_3^- 与组织蛋白酶对接时的氢键情况Table 3 Hydrogen bonding of NO_3^- and cathepsin during MD

受体	氢键受体原子	氢键供体	出现帧数	出现频率(%)	氢键距离(Å)	氢键夹角(°)
组织蛋白酶B	MOL_313@O1	CYS_85@N	5453	13.56	2.8842	154.0103
	MOL_313@O3	CYS_85@N	4400	10.95	2.8859	153.7965
	MOL_313@O2	CYS_85@N	4236	10.54	2.8850	154.4888
	MOL_313@O2	GLY_86@N	4028	10.02	2.8770	152.7962
	MOL_313@O1	GLY_86@N	3925	9.76	2.8793	152.9643
	MOL_313@O3	GLY_86@N	3563	8.86	2.8767	152.6339
	MOL_313@O1	TYR_34@OH	3474	8.64	2.7503	160.1530
	MOL_313@O3	TYR_34@OH	2771	6.89	2.7539	160.3120
	MOL_313@O2	SER_87@N	2687	6.68	2.8799	153.0823
	MOL_313@O2	TYR_34@OH	2666	6.63	2.7471	160.5090
	MOL_313@O1	SER_87@N	2651	6.59	2.8793	153.6097
	MOL_313@O3	SER_87@N	2408	5.99	2.8817	153.5859
	MOL_338@O1	VAL_322@N	4657	15.02	2.8724	158.9153
	MOL_338@O1	GLY_331@N	4258	13.74	2.8563	149.7557
组织蛋白酶D	MOL_338@O3	VAL_322@N	3791	12.23	2.8680	159.0352
	MOL_338@O3	GLY_331@N	3614	11.66	2.8558	149.0665
	MOL_338@O1	PHE_332@N	2870	9.26	2.8742	151.0729
	MOL_338@O3	PHE_332@N	2286	7.37	2.8758	151.5351
	MOL_338@O2	VAL_322@N	2260	7.29	2.8655	158.3913
组织蛋白酶L	MOL_338@O2	GLY_331@N	2073	6.69	2.8586	148.6934
	MOL_223@O3	SER_189@OG	26605	31.23	2.7680	159.0273
	MOL_223@O1	SER_189@OG	25795	30.28	2.7692	158.9834
	MOL_223@O2	SER_189@OG	24666	28.96	2.7670	159.0488
	MOL_223@O1	LYS_18@N	14017	16.46	2.8862	160.2537
组织蛋白酶L	MOL_223@O3	LYS_18@N	13223	15.52	2.8854	160.1019
	MOL_223@O2	LYS_18@N	11952	14.03	2.8857	159.7296

程中, 氢键能够快速地形成或断裂, 氢键的数量增加能够使复合物的稳定性增加。表3罗列了MD过程中 NO_3^- 与组织蛋白酶对接时的氢键情况, 通常把氢键定义为受体原子和供体原子距离在3.5 Å以内且夹角大于120°, 氢键距离在2.7~2.9 Å之间, 氢键夹角在150°~160°之间, 在这一范围内。组织蛋白酶B和 NO_3^- 的氢键主要出现在组织蛋白酶B残基CYS85的N和 NO_3^- 的O1之间, 它们之间出现氢键的帧数占总氢键帧数的13.56%; 组织蛋白酶D和 NO_3^- 的氢键主要出现在组织蛋白酶D残基VAL322的N和 NO_3^- 的O1之间, 出现氢键的帧数占总氢键帧数的15.02%; 组织蛋白酶L和 NO_3^- 的氢键主要出现在组织蛋白酶L残基SER189的OG和 NO_3^- 的O3之间, 出现氢键的帧数高达总氢键帧数的31.23%。氢键频率较高可能与周围环境中极性增强有关, 通过氢键出现频率的比较可知, NO_3^- 与组织蛋白酶L的氢键作用较强。

3 结论

为明确基于组织蛋白酶降解肌球蛋白的低温等离子体杀菌在抑制水产品质地软化的作用机制, 本研究采用70 kV介质阻挡放电低温等离子体(DBD)作用2 min处理虹鳟鱼片, 分析鱼肉质构、蛋白质降解指标(TCA-可溶性肽、MFI、氨基酸态氮)和组织蛋白酶活性变化, 并采用分子对接和分子动力学(MD)模拟方法分析了DBD处理产生的活性物质 NO_3^- 与组织蛋白酶B、D、L的结合情况。结果表明,

DBD杀菌降低了组织蛋白酶B、D、L的活性, 延缓了蛋白质的降解进程, 维持了鱼肉的质地, 组织蛋白酶B和L活性受DBD处理的影响较明显, 且组织蛋白酶能够加速肌球蛋白降解, 尤其是肌球蛋白轻链MLC-2。从RMSD、RMSF、Rg、配体与活性中心距离、结合自由能及氢键分析可知, NO_3^- 对组织蛋白酶L作用效果最好, 组织蛋白酶B次之。低温等离子体成分复杂, 由于分子量过小或者性质不稳定等原因, 其他有效成分如 O_3 、 H_2O_2 等与组织蛋白酶对接情况较差, 还需要做进一步对这些成分影响酶活性的作用机制以及体外实验验证研究。

© The Author(s) 2025. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] WEI P Y, ZHU K X, CAO J, et al. The inhibition mechanism of the texture deterioration of tilapia fillets during partial freezing after treatment with polyphenols[J]. *Food Chemistry*, 2021, 335: 127647.
- [2] YANG F, JIA S N, LIU J X, et al. The relationship between degradation of myofibrillar structural proteins and texture of super-chilled grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fillet[J]. *Food Chemistry*, 2019, 301: 125278.
- [3] AHMED Z, DONKOR O, STREET W A, et al. Calpains- and cathepsins-induced myofibrillar changes in post-mortem fish: Impact on structural softening and release of bioactive peptides[J]. *Trends in Food Science and Technology*, 2015, 45(1): 130~146.
- [4] GE L H, XU Y S, XIA W S, et al. Synergistic action of cathe-

- sin B, L, D and calpain in disassembly and degradation of myofibrillar protein of grass carp[J]. *Food Research International*, 2018, 109: 481–488.
- [5] SUROWSKY B, FISCHER A, SCHLUETER O, et al. Cold plasma effects on enzyme activity in a model food system[J]. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2013, 19: 146–152.
- [6] SEGAT A, MISRA N N, CULLEN P J, et al. Effect of atmospheric pressure cold plasma (ACP) on activity and structure of alkaline phosphatase[J]. *Food and Bioproducts Processing*, 2016, 98: 181–188.
- [7] ZHENG Y X, YANG W H, SUN W X, et al. Inhibition of porcine pancreatic α -amylase activity by chlorogenic acid[J]. *Journal of Functional Foods*, 2020, 64: 103587.
- [8] 程李琳. 基于分子动力学模拟的淀粉基复合物的形成和稳定机制[D]. 无锡: 江南大学, 2020. [CHENG L L. Formation and stability mechanism of starchy complexes based on molecular dynamics simulation study[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2020.]
- [9] SONG X, HU X, ZHANG Y, et al. Inhibitory mechanism of epicatechin gallate on tyrosinase: Inhibitory interaction, conformational change and computational simulation[J]. *Food & Function*, 2020, 11(6): 4892–4902.
- [10] MOHSENI S F S, MOEINPOUR F, NOSRATI M. Spectroscopy and molecular dynamics simulation study on the interaction of sunset yellow food additive with pepsin[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 115: 273–280.
- [11] 贾胜男. 骨架蛋白降解对冷鲜草鱼质构影响的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2019. [JIA S N. Effect of degradation in grass carp (Ctenopharyngodon Idella) myofibrillar structural protein on texture at low temperature[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2019.]
- [12] 葛黎红. 内源蛋白酶在低温保鲜草鱼质构劣化中的作用与控制研究[D]. 无锡: 江南大学, 2017. [GE L H. Study on correlation of endogenous proteases with texture deterioration of grass carp (Ctenopharyngodon idella) during chilled storage and quality control[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2017.]
- [13] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 5009.235-2016 食品安全国家标准 食品中氨基酸态氮的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016. [National Health and Family Planning Commission, People's Republic of China. GB 5009.235-2016 National standards for food safety Determination of amino acid nitrogen in food[S]. Beijing: China Standards Press, 2016.]
- [14] CHEN N, GAO P, JIANG Q X, et al. Effects of deheading and rinsing pretreatment on the quality of white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) surimi based on endogenous proteases[J]. *Food Research International*, 2022, 160: 111678.
- [15] ZHU C, JIAO D X, SUN Y, et al. Effects of ultra-high pressure on endogenous enzyme activities, protein properties, and quality characteristics of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during iced storage[J]. *Molecules*, 2022, 27(19): 6302.
- [16] 王海生, 王志勇, 蒋欢欢. 运动对大鼠骨骼肌细胞凋亡及钙离子含量的影响[J]. *动物医学进展*, 2017, 38(9): 78–83. [WANG H S, WANG Z Y, JIANG H H. Effects of exercise on apoptosis and calcium content of skeletal muscle cells in rats[J]. *Advances in veterinary medicine*, 2017, 38(9): 78–83.]
- [17] CHRISTINE D L, ROMUALD C, RICHARD T, et al. Trends in postmortem aging in fish: Understanding of proteolysis and disorganization of the myofibrillar structure[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2006, 46(5): 409–421.
- [18] KODDY J K, MIAO W H, HATAB S, et al. Understanding the role of atmospheric cold plasma (ACP) in maintaining the quality of haitail (*Trichiurus lepturus*) [J]. *Food Chemistry*, 2021, 343: 128418.
- [19] WAN W, FENG J, WANG H, et al. Influence of repeated freeze-thaw treatments on the oxidation and degradation of muscle proteins from mirror carp (*Cyprinus carpio* L.), based on myofibrillar protein structural changes[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 226: 454–462.
- [20] JIA S L, LI Y, ZHUANG S, et al. Biochemical changes induced by dominant bacteria in chill-stored silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and GC-IMS identification of volatile organic compounds[J]. *Food Microbiology*, 2019, 84: 103248.
- [21] LUO J, XU W M, LIU Q, et al. Dielectric barrier discharge cold plasma treatment of pork loin: Effects on muscle physicochemical properties and emulsifying properties of pork myofibrillar protein[J]. *LWT- Food Science and Technology*, 2022, 162: 113484.
- [22] YONG H I, LEE H, PARK S, et al. Flexible thin-layer plasma inactivation of bacteria and mold survival in beef jerky packaging and its effects on the meat's physicochemical properties[J]. *Meat Science*, 2017, 123: 151–156.
- [23] JANG S J, KIM H W, HWANG K E, et al. Effects of replacing sucrose with various sugar alcohols on quality properties of semi-dried jerky[J]. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 2015, 35(5): 622–629.
- [24] BEKHIT A E D A, HOLMAN B W B, GITERO S G, et al. Total volatile basic nitrogen (TVB-N) and its role in meat spoilage: A review[J]. *Trends in Food Science and Technology*, 2021, 109: 280–302.
- [25] ZHAO Q L, SHEN Q, GUO R, et al. Characterization of flavor properties from fish (*Collichthys niveatus*) through enzymatic hydrolysis and the maillard reaction[J]. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 2016, 25(4): 482–495.
- [26] KLOCKOW P A, KEENER K M. Safety and quality assessment of packaged spinach treated with a novel ozone-generation system[J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2009, 42(6): 1047–1053.
- [27] BAHUAUD D, GAARDER M, VEISETH-KENT E, et al. Fillet texture and protease activities in different families of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)[J]. *Aquaculture*, 2010, 310(1-2): 213–220.
- [28] SITU H Y, LI Y M, GAO J L, et al. Effects of cold atmospheric plasma on endogenous enzyme activity and muscle protein oxidation in *Trachinotus ovatus*[J]. *Food Chemistry*, 2023, 407: 135119.
- [29] 年琳玉. 鲱鱼抗冻蛋白对真鲷品质特性的影响及抗冻机制研究[D]. 锦州: 渤海大学, 2019. [NIAN L Y. Effect of herring antifreeze protein on quality characteristics and antifreeze mechanism of red sea bream[D]. Jinzhou: Bohai University, 2019.]
- [30] LADRAT C, VERREZ B V, NOËL J, et al. *In vitro* proteolysis of myofibrillar and sarcoplasmic proteins of white muscle of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): Effects of cathepsins B, D and L[J]. *Food Chemistry*, 2003, 81(4): 517–525.
- [31] VERREZ B V, LADRAT C, NOËLLE J, et al. *In vitro* proteolysis of myofibrillar and sarcoplasmic proteins of European sea bass (*Dicentrarchus Labrax* L) by an endogenous m-calpain[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2002, 82(11): 1256–1262.
- [32] GODIKSEN H, MORZEL M, HYLDIG G, et al. Contribution of cathepsins B, L and D to muscle protein profiles correlated with texture in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Food Chemistry*, 2009, 113(4): 889–896.
- [33] HABIBIAN D S, FARHADIAN S, GHASEMI M. The interaction between the azo dye tartrazine and α -Chymotrypsin enzyme: Molecular dynamics simulation and multi-spectroscopic investigations[J]. *Journal of Molecular Liquids*, 2021, 344: 117931.
- [34] SUN F D, WANG H, WANG H P, et al. Impacts of pH and temperature on the conformation of a protease from *Pediococcus pentosaceus* R1 isolated from Harbin dry sausage[J]. *LWT- Food Science and Technology*, 2021, 142: 111056.