

姜黄素对羟自由基诱导的肌原纤维蛋白氧化及结构的影响

常海军, 伯朝英, 石源伟, 熊杰, 胡渝

(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 以猪肉肌原纤维蛋白(MP)为主要研究材料,使用芬顿氧化体系来模拟肉制品的氧化环境,并在其中加入不同浓度(0,5,10,15,20 $\mu\text{mol/L}$)的姜黄素,通过分析蛋白质氨基酸侧链、二级结构、三级结构以及溶解度的变化,探究不同浓度姜黄素对猪肉肌原纤维蛋白氧化的抑制作用,以及对蛋白质结构的影响。研究结果表明,姜黄素在清除自由基方面表现出良好的效能,能抑制羟自由基引发的蛋白质氧化和结构的改变,并在特定的浓度区间(5~20 $\mu\text{mol/L}$)内,这种抑制作用与姜黄素的浓度成正比。与氧化组(ox组)相比,姜黄素处理组不仅可以显著抑制羰基的生成和表面疏水性的升高[20 $\mu\text{mol/L}$ 的姜黄素处理组对两者的抑制率分别为 2.62%,51.78% ($P<0.05$)],也可显著缓解巯基、自由氨基以及溶解度的下降[抑制率分别为 80.02%,59.34%,70.84% ($P<0.05$)];添加姜黄素可以促进 MP 三级结构的展开,对羟自由基引起的二级结构的变化也起到缓解作用。结论:姜黄素可与 MP 相互作用,从而缓解其氧化变质与结构的变化,对肉制品品质与保鲜有良好的作用。

关键词 姜黄素;肌原纤维蛋白;氧化;羟自由基

文章编号 1009-7848(2023)11-0074-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.11.008

我国食品加工业中肉制品加工业已占有举足轻重的位置。然而,肉及肉制品加工与储藏过程中其成分的氧化却是一种不可避免的自然现象。研究表明,肉类产品品质降低主要是由于脂肪和蛋白质的氧化作用^[1]。此外,肌肉中含量最高的蛋白——肌原纤维蛋白(Myofibrillar protein, MP),占据总蛋白的 55%~60%^[2],具备不可或缺的生物化学功能,这种蛋白不仅参与肌肉的收缩过程,而且对肉制品的嫩度也会产生显著的影响,对于保持和提高肉制品品质具有重要意义^[3]。然而,在肉品的加工和储存过程中,蛋白质极易受到分子氧自由基或活性氧(Reactive oxygen species, ROS)的侵害,导致其发生氧化变质,从而影响其功能特性及消化率,进而损坏其品质特性。肉蛋白抗氧化成为业界亟需解决的技术难题。目前合成抗氧化剂如丁基羟基茴香醚(BHA)、没食子酸丙酯(PG)、特丁基对苯二酚(TBHQ)、二丁基羟基甲苯(BHT)等广泛应用于肉类工业中脂肪和蛋白的抗氧化^[4],然

而由于这些合成类抗氧化剂具有潜在的毒理学作用,选择天然抗氧化剂代替合成类抗氧化剂成为必然的趋势。

姜黄素是一种天然的、具备多重生物活性的化学物质,它具有出色的抗氧化、抗炎、抗菌和抗癌特性。同时,姜黄素还具有抗糖尿病、抗骨质疏松等作用,是一种备受瞩目的天然食药同源物质,该结构不仅包含基础的碳链,还拥有酚羟基和 β -二酮这两个活跃部分,特别是二酮部分,它还展现烯醇式结构的变化^[5-6]。宋立敏^[7]对姜黄素类化合物在体外的抗氧化效果进行了研究,并探讨了其对 CCl_4 引发的肝匀浆脂质过氧化的抗氧化作用,研究结果表明姜黄素类化合物具有较好的抗氧化活性,并呈良好的剂量关系。李瑞化^[8]报道姜黄素对脂多糖诱导牛乳腺上皮细胞氧化损伤导致的炎症具有较好的保护作用。虽然姜黄素在许多方面的生物活性得到广泛的研究,但是在肉蛋白抗氧化或与蛋白相互作用方面的研究仍较少。

本文选择猪肉肌原纤维蛋白作为主要研究材料,并构建一个芬顿(Fenton)氧化系统来模拟肉制品的氧化过程,探究姜黄素对肌原纤维蛋白氨基酸侧链基团、蛋白结构、溶解度的影响,旨在为肉制品中天然植物多酚类化合物的抗氧化应用提供理论依据。

收稿日期: 2022-11-09

基金项目: 重庆市教委科学技术研究计划项目(KJQN202000817, KJZD-K202200806);重庆市自然科学基金项目(cstc2019jcyj-msxmX0472);重庆市研究生科研创新项目(CYS23553)

第一作者: 常海军,男,博士,副教授

E-mail: changhj909@163.com

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

新鲜猪背最长肌,购于重庆市南岸区人人乐超市;姜黄素(纯度为 99%),上海阿拉丁试剂公司。

牛血清蛋白(BSA)、水溶性维生素 E(Trolox)、哌嗪-1,4-二乙磺酸(PIPES)、L-抗坏血酸、L-亮氨酸、乙二醇二乙醚二胺四乙酸(EGTA),上海阿拉丁试剂公司;5,5-二硫代双-(2-硝基苯甲酸)(DTNB)、溴化钾、2,4-二硝基苯肼(DNPH)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、ABTS⁺·、过氧化氢(H₂O₂,30%)、结晶紫、三氯化铁等,上海阿达玛斯试剂有限公司。所用试剂均为分析纯级。

TGL-20 高速冷冻离心机,四川蜀科仪器有限公司;UV-1900 紫外-可见分光光度计,上海翱艺仪器有限公司;日立 F-7000 荧光分光光度仪,日本日立公司;IRPrestige-21 傅里叶变换红外光谱仪,日本岛津公司;多功能养生破壁机,广东顺德多蒙电器有限公司;Ultra-Turrax T25 高速均质匀浆机,德国 IKA-WERKE;pHS-3C⁺酸度计,成都世纪方舟科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 姜黄素清除自由基能力测定

1.2.1.1 ·OH 清除能力 参考 Wang 等^[9]的方法并稍作修改,先用 95%乙醇配制 100 μmol/L 的姜黄素与 VC 储备液。分别按顺序加入 2 mL FeSO₄(9 mmol/L)、乙醇-水杨酸(9 mmol/L)和适量的姜黄素或 VC(0.25,0.5,1.0,2.0,4.0 mL)于 15 mL 离心管中,再加入适量的去离子水,保证反应溶液的总体积为 15 mL。最后再加入 1 mL 的 H₂O₂,摇匀。37 °C 水浴加热 15 min 后取出,测其吸光度,参比溶液为不加 H₂O₂ 的体系,空白组为不加样品的体系。·OH 清除效率计算方法见式(1)。

$$\cdot\text{OH 清除率}(\%) = \frac{A_0 - (A_x - A_{x0})}{A_0} \times 100 \quad (1)$$

式中, A_0 ——空白组吸光度(不加样品); A_x ——样品组吸光度; A_{x0} ——背景组的吸光度(不加显色剂 H₂O₂)。

1.2.1.2 ABTS⁺·清除能力 参考王钰等^[10]的方法并稍作修改,先用 95%乙醇配制 1 μmol/mL 姜黄素及 0.2 μmol/mL VC 储备液。取 0.8 mL ABTS⁺·

工作液于试管中,分别加入适量的姜黄素(0.125,0.25,0.5,1.0,2.0 mL),再加入适量 95%乙醇,保证每管总反应液为 2.8 mL,振荡摇匀,静置反应 6 min,于最大吸收波长 734 nm 处测定吸光度并记录为 $A_{\text{样品}}$,以 2 mL 95%乙醇溶液代替样品溶液测定吸光度为 $A_{\text{空}}$ 。用 VC 作为阳性对照。ABTS⁺·清除效率见式(2)。

$$\text{ABTS}^+\cdot\text{清除率}(\%) = \frac{A_{\text{空}} - A_{\text{样品}}}{A_{\text{空}}} \times 100 \quad (2)$$

式中, $A_{\text{空}}$ ——乙醇代替样品液的吸光度; $A_{\text{样品}}$ ——样品溶液的吸光度。

1.2.1.3 DPPH·清除能力 参考常相娜等^[11]报道的方法并稍作修改,先用 95%乙醇配制 0.1 μmol/mL 姜黄素及 0.1 μmol/mL VC 储备液,用 95%乙醇将 DPPH 溶成 0.004%溶液避光放置备用,取适量的样品液于试管中(0.125,0.25,0.5,1.0,2.0 mL),添加适量 95%乙醇,已确保每管加入的样液体积为 2.0 mL,再加入 4.0 mL 0.004% DPPH 乙醇溶液,混合摇匀后室温下避光反应 30 min,用 95%乙醇调零,在波长 517 nm 处测得吸光度 A_1 ,用 95%乙醇替代 DPPH 乙醇溶液与样品混匀后,在波长 517 nm 处测得 A_2 ;最后用 95%乙醇替代样品与 4.0 mL DPPH 无水乙醇溶液混合,在 517 nm 处测得 A_3 ,同时用 VC 做阳性对照。DPPH·清除效率见式(3)。

$$\text{DPPH}\cdot\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3}\right) \times 100 \quad (3)$$

1.2.2 肌原纤维蛋白的提取 以猪背最长肌肉为原材料,参照 Cao 等^[12]的方法略作调整,具体操作如下:低温下配制 pH=7.0 肌原纤维蛋白提取液,其中包含 0.1 mol/L NaCl、2 mmol/L MgCl₂、1 mmol/L EGTA 和 10 mmol/L 磷酸钠,将冷藏的猪背最长肌肉室温下自然解冻,切成小块(约 1 cm×1 cm×1 cm),然后置于绞肉机中。向绞肉机中加入 4 倍体积的肌原纤维蛋白提取液,先以低档位运行 30 s,再以高档位运行 1 min,使肌肉块充分破碎并匀浆化。将匀浆的肌肉提取液放入离心管中离心(8 000×g,10 min,4 °C)。弃上清液,所得沉淀再加入 4 倍体积的肌原纤维蛋白提取液,重复提取 3 次,最后为了除去蛋白中残留的结缔组织,将离心后得到的沉淀再次加入 4 倍体积的 0.1 mol/L Na-

Cl 溶液中,充分搅拌均匀后过滤(3层纱布),接着调整 pH=6.25,并离心(参数同上),得到白色膏状沉淀,称为肌原纤维蛋白沉淀。试验过程中要保持低温环境(0~4℃),避免蛋白质变性影响试验结果,同时蛋白膏需在 48 h 内使用。

1.2.3 肌原纤维蛋白的氧化处理 参照熊杰等^[13]报道的样品处理方法,略加改动。称取一定量的 MP 蛋白膏,各自加入不同体积的姜黄素溶液(5 μmol/mL,溶解于芬顿氧化体系:5 mmol/L H₂O₂, 30 μmol/L FeCl₃, 100 μmol/L 抗坏血酸),然后加入氧化体系,充分混匀后在 4℃条件下氧化处理 12 h,制得不同浓度姜黄素-蛋白溶液并通过加入 1 mL 水溶性维生素 E 结束氧化反应。添加姜黄素的试验管中姜黄素最后浓度为 5, 10, 15 μmol/mL 和 20 μmol/mL,分别记作 ox+c5, ox+c10, ox+c15 和 ox+c20。最终,体系蛋白质量浓度达到 40 mg/mL。同时还制备了不含抗氧化剂且未氧化的空白对照组(con)和虽不含抗氧化剂但含有氧化因子的氧化对照(ox)。

1.2.4 肌原纤维蛋白的化学和结构变化分析

1.2.4.1 氨基酸侧链修饰 羰基含量参考曹云刚^[14]的描述的方法进行测定。

总巯基含量参考 Guo 等^[15]的描述,采用 DTNB 法进行测定,具体操作如下:将肌原纤维蛋白分散液用 1% NaCl 溶液(溶于 Tris-甘氨酸缓冲液:6.969 g/L 甘氨酸、10.4 g/L Tris、1.2 g/L EDTA, pH=8.0)稀释至蛋白膏质量浓度为 5 mg/mL,取 0.5 mL 蛋白稀释液,加入 5 mL 1.5% SDS 溶液和 0.5 mL Ellman's 试剂(SDS 溶液和 Ellman's 试剂均用 Tris-甘氨酸缓冲液进行配置),在常温条件下进行 15 min 的避光反应,接着在波长 412 nm 处测量了其吸光度,并用 Tris-甘氨酸缓冲液替代样品进行反应作为零值调整。总巯基含量计算方法见式(4)。

$$\text{总巯基含量}(\mu\text{mol/g 蛋白}) = \frac{73.53 \times A_{412\text{nm}} \times D}{C} \quad (4)$$

式中, D ——稀释倍数; C ——样品质量浓度, mg/mL; $A_{412\text{nm}}$ ——波长 412 nm 处吸光度。

自由氨基含量参照臧学丽等^[16]描述的方式并稍作修改。取 200 μL 稀释的蛋白膏样液于 5 mL 的试管中(稀释于 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液, pH=

8.2),接着加入 2 mL SDS(1%)和 1 mL TNBS(0.01%)。充分摇匀后,在 50℃的水浴中避光反应 30 min。然后,加入试剂进行终止反应(2 mL 0.1 mol/L Na₂SO₃)。终止反应后在室温下冷却 15 min。最后,在波长 420 nm 处测量其吸光度。在相同的条件下,使用蒸馏水替代样品液作为零值调整。同时在试验中,分别配制 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mmol/L 的亮氨酸溶液,并按照前述方法测量不同浓度下的亮氨酸吸光度,据此绘制标准曲线。根据标准曲线计算样品自由氨基含量,计算方法见式(5)。

$$\text{自由氨基含量}(\text{nmol/g 蛋白}) = \frac{C}{m} \times 10^3 \quad (5)$$

式中, C ——根据标准曲线计算出的样品浓度, mmol/L; m ——蛋白质量浓度, mg/mL。

1.2.4.2 蛋白的构象变化

1) 二级结构变化 蛋白质的二级结构参照 Li 等^[17]描述的方式并稍作修改。将氧化后的肌原纤维蛋白悬浮液冷冻干燥后与干燥的溴化钾按 1:200 的质量比充分混合,并用玛瑙研磨至无反光点为止,然后将研碎的粉末倒入压片机中压成透明薄片。用傅里叶红外光谱采集光谱数据,参数设置分别为:分辨率为 4 cm⁻¹,扫描次数为 32 次,扫描区间为 400~4 000 cm⁻¹。进行样品扫描之前先用溴化钾进行背景扫描。利用 OMNIC 软件获得 1 700~1 600 cm⁻¹ 的吸收光谱,用于酰胺 I 带分析,再利用 PeakFit4.12 软件对酰胺 I 带光谱图进行基线校正、傅里叶去卷积和二阶导数峰拟合,从而通过各峰相对面积计算出各种构象的相对含量。

2) 三级结构变化 使用荧光分光光度仪来分析蛋白的三级结构,并参考 Cao 等^[18]的方法进行适当的调整。用缓冲溶液 PIPES(含 0.6 mol/L NaCl, pH=6.25)将蛋白样液稀释至 0.4 mg/mL,并使用 1 cm 光程的荧光比色皿,在 283 nm 的激发波长下,记录 300~400 nm 的发射光谱。参数设置分别为:扫描速度达到 1 200 nm/min、激发和发射光谱狭缝均为 5 nm、电压为 700 V。同时在同试验条件下,记录溶剂的发射光谱,并从样本的发射光谱中减去了溶剂的背景成分。

3) 表面疏水性测定 参照贾娜等^[19]描述的技术并进行适当的调整,量取 5 mg/mL 的蛋白稀

释液 5 mL (稀释于 20 mmol/L 的磷酸盐缓冲溶液中) 于 10 mL 的离心管中, 随后加入 1 mg/mL 的 BPB 溶液 50 μ L, 并进行充分的涡旋混合。于 4 000 r/min 下进行离心 10 min, 放弃沉淀物, 转移上清液, 再次进行离心, 吸取上清液于波长 595 nm 处测其吸光度 $A_{\text{样品}}$, 并用 5 mL 的磷酸盐缓冲溶液替代样品, 通过相同的方法, 测量其吸光度作为 $A_{\text{对照}}$, 并用 BPB 的结合量来表示其表面的疏水性, 计算方法见式(6)。

$$\text{BPB 结合量}(\mu\text{g}) = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}}}{A_{\text{对照}}} \quad (6)$$

1.2.5 溶解度测定 根据 Cao 等^[12]的描述, 使用 PIPES 缓冲液将蛋白原液稀释到 8 mg/mL, 然后进行冷冻离心(4 $^{\circ}$ C、8 000 \times g、20 min), 测定其上清液的蛋白质量浓度, 同时也测量未离心前的蛋白质量浓度。蛋白溶解度计算方法见式(7)。

$$\text{溶解度}(\%) = \frac{\text{离心前蛋白质量浓度}}{\text{离心后蛋白质量浓度}} \times 100 \quad (7)$$

1.3 数据分析及处理

每组试验重复 3 次, 结果表示为结果表示为 ($\bar{x} \pm s$)。所有的数据分析包括显著性分析 ($P < 0.05$) 都是通过 SPSS 23.0 软件来完成的, 作图使用 Origin 8.0 软件。

2 结果与分析

2.1 清除自由基能力

姜黄素在其结构中包含酚羟基和 β -二酮这 2 个具有活性的部分, 这 2 个部分在化学反应中都能提供 1 个质子, 同时在碳链的核心位置, CH_2 基团上氢原子的转移对于姜黄素和酚羟基基团的抗氧化作用都具有显著的影响^[9], 因此通过测定姜黄素对自由基的清除能力可以初步了解其抗氧化能力。从图 1~3 可以看出除了对 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 的清除效果姜黄素不如 VC 外, 清除 DPPH \cdot 以及 $\cdot\text{OH}$ 的能力都优于 VC, 因此姜黄素对于清除自由基能力具有一定的效果, 可以将其应用于调控蛋白质的氧化。宋立敏^[1]曾研究过姜黄素对自由基的清除能力, 并将其应用于小鼠肝脏抗脂质氧化的实验中, 结果表明姜黄素类化合物抗脂质过氧化能力与 VE 相当, 可以有效减小肝脏的氧化应激损伤。

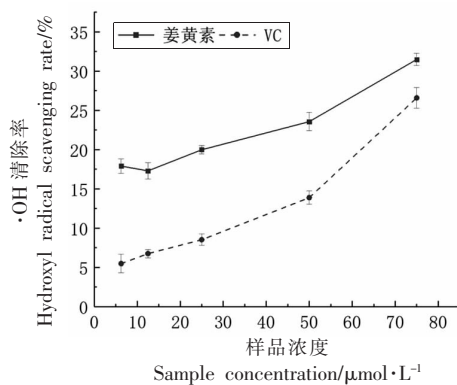


图 1 姜黄素、VC 对 $\cdot\text{OH}$ 清除能力

Fig.1 Scavenging ability of curcumin and VC on $\cdot\text{OH}$

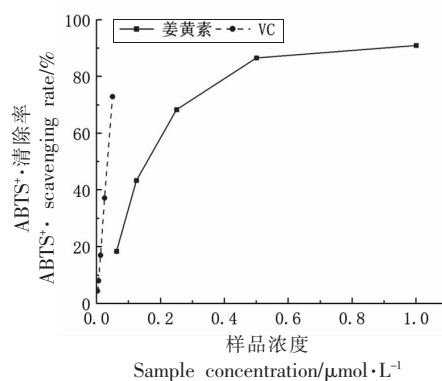


图 2 姜黄素、VC 对 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 清除能力

Fig.2 Scavenging ability of curcumin and VC on $\text{ABTS}^{\cdot+}$

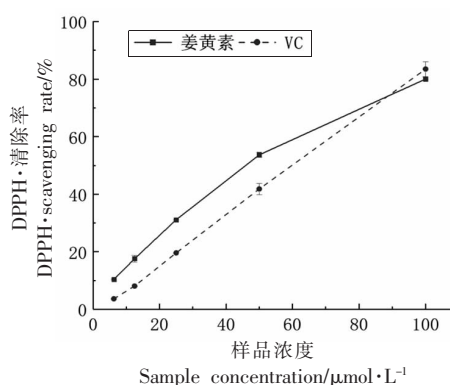


图 3 姜黄素、VC 对 DPPH 自由基清除能力

Fig.3 Scavenging ability of curcumin and VC on DPPH free radical

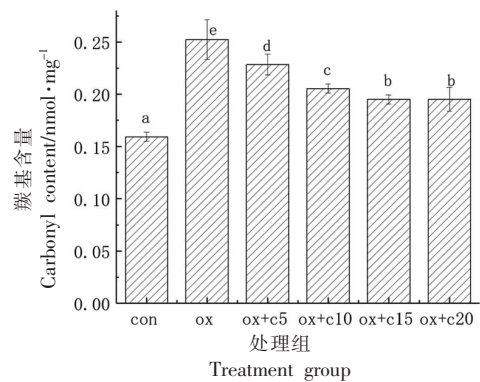
2.2 不同处理对肌原纤维蛋白氨基酸侧链修饰的影响

2.2.1 蛋白羰基含量 蛋白质的氨基酸侧链基团在氧化过程中极易受到 ROS 的攻击形成羰基衍生物^[20-21], 羰基的浓度已经变成了衡量蛋白质氧化

损害的关键指标。通常,人们认为蛋白质的氧化损伤程度越高,其分子结构中的羰基浓度也就越高。采用紫外-可见光谱对不同条件下制得的蛋白质进行了测定。如图4所示,con组的MP的羰基含量约为0.16 nmol/mg,氧化12 h之后的ox组的羰基含量显著性上升约为0.25 nmol/mg,而姜黄素的加入显著性的降低了羰基含量的上升,并且抑制效率呈浓度依赖性,高浓度20 $\mu\text{mol/L}$ 的姜黄素抑制效率约达23%,由此可以说明姜黄素可以有效的抑制肉蛋白的氧化。这可能归功于姜黄素的结构中含有多个酚羟基以及 β -二酮结构,两者均展现出了出色的清除自由基的能力^[22]。

2.2.2 总巯基含量 MP的总巯基主要有2种类型:一种是埋藏在蛋白质内部的巯基,另外一种是在蛋白质表面的活性巯基^[23]。MP主要包括肌动蛋白与肌球蛋白,二者都含有巯基,没有二硫键,其中肌球蛋白的巯基最多^[2],巯基对活性羟基很敏感,容易被氧化成二硫键,引起蛋白质的交联聚集反应,因此,巯基的缺失经常被用作评估蛋白质氧化损失。由图5可见,con组中MP的巯基含量大约是7.88 $\mu\text{mol/g}$,而在氧化12 h后,ox组MP的巯基含量显著降低至4.12 $\mu\text{mol/g}$,约下降了48%,在芬顿氧化的复杂体系中,由铁催化的氧自由基(如 $\text{O}_2\cdot$ 、 $\text{HO}_2\cdot$ 、 $\text{HO}\cdot$ 、 $\text{O}\cdot$ 等)可能涉及巯基的氧化过程,另外脂质氧化产生的自由基($\text{L}\cdot$ 、 $\text{LO}\cdot$ 和 $\text{LOO}\cdot$)也可能通过二硫键的形成导致巯基含量的损失^[24],此外,在脂质氧化过程中生成的二级醛类物质与SH基团的反应也会阻止DTNB探针检测到SH^[25]。然而,姜黄素的加入显著性抑制了巯基的损失($P<0.05$),且姜黄素的浓度与其抑制效果之间存在正向关联。高浓度姜黄素(20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素)组的MP的巯基含量为7.411 $\mu\text{mol/g}$,巯基损失率仅为6.0%左右。试验结果表明姜黄素有助于减少巯基的流失。这可能是因为姜黄素具有酚羟基结构和 β -二酮结构,这些都能为质子与自由基的反应提供支持,从而降低了巯基与自由基之间的化学反应。过去Barclay等^[26]研究了姜黄素的抗氧化活性,认为姜黄素酚羟基上的氢质子对抗氧化活性起到决定性作用。

2.2.3 自由氨基含量 在蛋白质结构中,赖氨酸侧链的 ϵ - NH_2 基团极易受到自由基的侵害,进而



注:小写字母不同表示差异显著($P<0.05$),con空白对照组(未氧化),ox.氧化对照组,ox+c5.氧化体系中姜黄素浓度5 $\mu\text{mol/L}$,ox+c10.氧化体系中姜黄素浓度10 $\mu\text{mol/L}$,ox+c15.氧化体系中姜黄素浓度15 $\mu\text{mol/L}$,ox+c20.氧化体系中姜黄素浓度20 $\mu\text{mol/L}$;下同。

图4 不同处理方式对蛋白羰基含量的影响
Fig.4 Effects of different treatments on protein carbonyl content

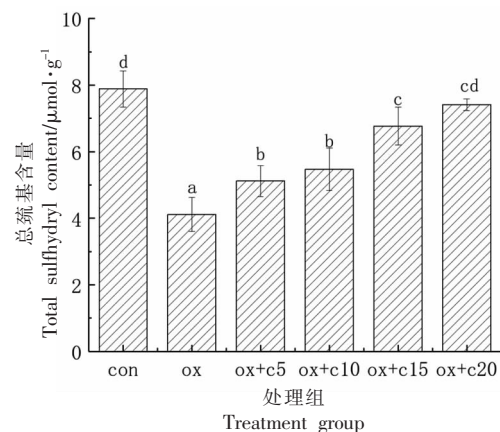


图5 不同处理方式对蛋白总巯基含量的影响
Fig.5 Effects of different treatments on total sulfhydryl group content of protein

生成羰基,这些羰基进一步与 NH_2 反应形成席夫碱,从而对自由氨基产生削弱效果^[27]。因此,自由氨基可以被视为评估蛋白质氧化损害的一个指标。如图6所示,未经氧化的con组MP的自由氨基含量大约为108 nmol/mg。经过12 h的氧化处理后,ox组的自由氨基含量明显下降到62 nmol/mg,减少了大约42.59%。此外,姜黄素的加入显著地延缓了自由氨基含量的减少($P<0.05$),5,10,15,20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素处理组分别自由氨基含量分别下降了29.0%,27.6%,20.3%,6.5%。可能是因为姜

黄素的加入对 MP 的降解有保护作用, 可以有效的抑制自由氨基的下降, 并且其抑制效果与姜黄素浓度也具有显著影响, 浓度越高抑制效果越显著。冉丽丹等^[28]对茶多酚- β 环糊精在羊肚冷藏过程中对肌原纤维蛋白氧化的作用进行了研究, 发现茶多酚- β 环糊精可以有效的保护 MP 的降解, 减缓自由氨基的下降。对蛋白羰基, 巯基和自由氨基进行全面分析, 检测结果证明, 姜黄素加入后, 能有效地抑制羟自由基对蛋白的氧化损伤。

2.3 不同处理对肌原纤维蛋白构象的变化影响

2.3.1 蛋白二级结构 蛋白质的次级结构主要由 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和不规则卷曲组成, 这 4 种次级结构相对比的改变能够从某种程度上反应出蛋白质的氧化稳定性与结构稳定性, 因此四者相对含量的变化常用于评定蛋白质结构的稳定性。如图 7 所示, 氧化后 MP 的 β -转角和 α -螺旋明显增多而 β -折叠和无规卷曲显著下降, 而姜黄素的加入正好调节了各个含量的变化。邓小蓉等^[29]也曾研究过氧化对白斑狗鱼肌原纤维蛋白二级结构的影响, 结果表明, 在一定浓度范围内氧化会导致 α -螺旋的上升。通常情况下, 肽链中的氢键稳定性呈现出 α -螺旋的形态, 而肽链之间的氢键稳定性直接影响 β -折叠, β -转角是由 MP 的有序结构决定的, 而 MP 的高级结构和相关蛋白的适应性则决定了不规则的卷曲结构^[30]。试验结果表明, 5 mmol/L 的羟自由基氧化会导致 MP 的部分有序结构(即 β -折叠)会转向 α -螺旋形态, 从而减少了分子之间的相互作用力, 姜黄素的添加正好可以缓解羟自由基氧化引起的结构变化, 说明姜黄素可以缓解羟自由基氧化引起的 MP 二级结构变化, 对 MP 具有良好的保护作用。

2.3.2 MP 固有色氨酸荧光 非极性氨基酸对蛋白质的极性及其微环境非常的敏感, 因此色氨酸以及酪氨酸固有荧光通常被用于蛋白质的三级结构的检测^[31]。通常, 蛋白质折叠状态的色氨酸位于蛋白质内部的疏水环境中, 此时荧光强度较强, 反之, 蛋白质局部或者全部展开后色氨酸就会与极性环境接触, 溶剂对一部分荧光有轻微屏蔽作用, 使其所拥有荧光强度降低^[32]。由图 8 可见, con 组 MP 最大发射波长下荧光强度达到 5 144 cps 左右; ox 组 MP 氧化 12 h 荧光强度显著降低, 达

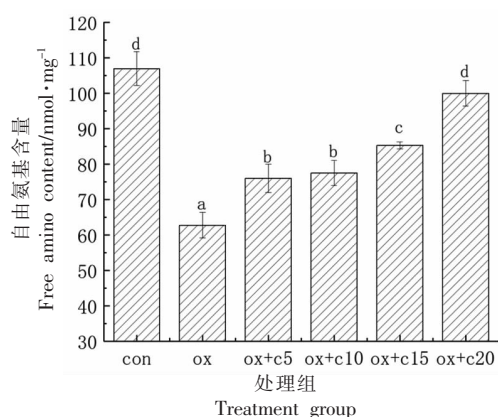


图 6 不同处理方式对蛋白自由氨基含量的影响

Fig.6 Effects of different treatments on free amino content of protein

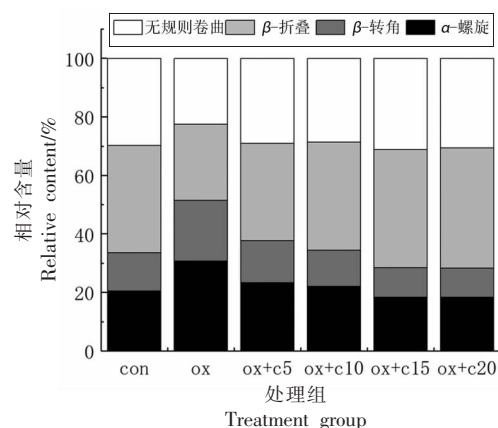


图 7 不同处理方式对 MP 二级结构的影响

Fig.7 Influence of different processing methods on secondary structure of MP

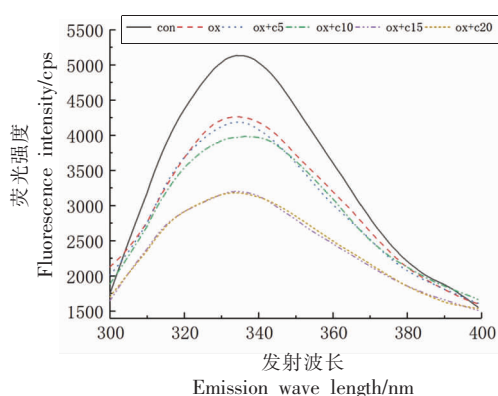


图 8 不同处理方式对 MP 内源性色氨酸荧光的影响

Fig.8 Effects of different treatments on MP endogenous tryptophan fluorescence

到 4 272 cps 左右, 表明氧化使 MP 结构铺展。然而, 加入姜黄素后色氨酸荧光强度再次减弱, 说明

姜黄素的添加使得氧化 MP 的结构进一步展开,并且浓度越大,色氨酸强度降得越明显。这可能是因为姜黄素是含有多个酚羟基的酚酸类物质,这种物质可能增强了色氨酸微环境的极性特性,与此同时姜黄素与色氨酸或者酪氨酸的共价或非共价结合也可能部分掩盖了 MP 的荧光强度。与此类似的有 Cao 等^[12]报道了绿原酸的添加会降低色氨酸荧光强度,Dai 等^[33]研究发现,迷迭香酸的加入,使猪肉肌原纤维蛋白产生了荧光猝灭的现象。

2.3.3 MP 表面疏水性 表面疏水性是一种广泛用于评价疏水氨基酸在蛋白质表面分散程度的技术,对应着蛋白质的三级结构^[23],一般情况下使用 BPB 与蛋白质结合量来表征其表面疏水性的大小^[13]。如图 9 所示,未氧化的 MP 的 BPB 结合量约为 3.54 μg ,氧化后显著性增加到 13.88 μg ($P<0.05$),这是由于蛋白质氧化后,引起其疏水性氨基酸侧链暴露,进而削弱蛋白质分子间的交联结合,从而使得暴露的疏水性氨基酸与 BPB 结合,进而表面疏水性增强^[34]。添加姜黄素的处理组均在氧化的基础上减缓了表面疏水性的增加,姜黄素处理后(5, 10, 15, 20 $\mu\text{mol/L}$)的表面疏水性分别降低了 3.47%, 9.96%, 20.00%, 51.79% ($P<0.05$)。显然姜黄素虽能在一定程度上逆转表面疏水性的增加,但不能恢复到原始状态。Guo 等^[15]曾报道,天然植物多酚和膳食蛋白质共价或非共价结合均能有效地降低表面疏水性,并推测蛋白质表面疏水性改变与 MP 氧化应激和酚-蛋白相互作用相关。

2.4 不同处理对肌原纤维蛋白溶解度的影响

蛋白质溶解度的大小影响着其它功能作用发挥,并且蛋白质溶解度的大小可以侧面反映出其表面疏水性的大小,一般情况下两者呈负相关关系^[14]。如图 10 所示,与空白对照组相比氧化组显著性的降低了蛋白质的溶解度,约降低 50.20% ($P<0.05$),可能是因为包埋在蛋白质内部的疏水性基团的暴露或者是单个的活性基团通过二硫键的聚合作用,从而使其溶解度下降^[35]。加入姜黄素之后,蛋白质的溶解度也得到了显著性提高,与氧化组相比较,添加姜黄素 MP (5, 10, 15, 20 $\mu\text{mol/L}$) 的溶解度分别升高了 26.440%, 33.19%, 53.95%, 70.84%。可能是因为姜黄素的引入减少了氧化引起的 MP 的损伤,可以减少 MP 结构的变

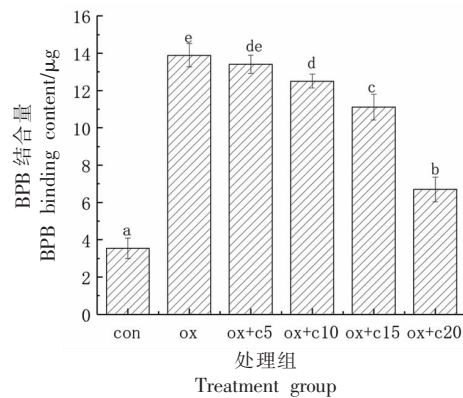


图 9 不同处理方式对 MP 表面疏水性的影响

Fig.9 Influence of different treatment methods on hydrophobicity of MP surface

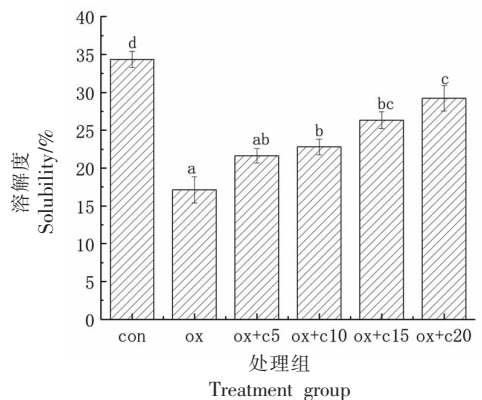


图 10 不同处理方式对 MP 溶解度的影响

Fig.10 Influence of different treatment methods on MP solubility

化,减少聚集。与此结果类似的有陈楷文^[36]研究的没食子酸可以缓解 MP 溶解度由于氧化作用而导致的降低。于晶超^[37]认为低、中等浓度的阿魏酸低聚糖的引入也可以显著性使溶解度增加。

3 结论

姜黄素对 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 、 DPPH^{\cdot} 以及 $\cdot\text{OH}$ 都具有较好地清除能力,其中清除 DPPH^{\cdot} 以及 $\cdot\text{OH}$ 的能力优于 VC。姜黄素的添加可以有效的抑制 $\cdot\text{OH}$ 诱导的蛋白氧化及结构的变化。具体表现在添加姜黄素在一定程度上可以抑制羰基的生成和表面疏水性的升高;可以缓解巯基、自由氨基和溶解度的下降;从傅里叶红外光谱以及色氨酸荧光分析中表明姜黄素对肌原纤维蛋白的结构也起到了一定的积极作用,且在一定的浓度范围内 (5~20 $\mu\text{mol/L}$)

L), 姜黄素的浓度越高, 对 MP 的抗氧化以及结构保护效果越好。因此姜黄素对 MP 的氧化和结构调控作用在肉制品品质改善中具有较好的应用前景, 可为肉制品货架期的延长提供一定的理论依据。

参 考 文 献

- [1] 伯朝英, 熊杰, 常海军, 等. 马齿苋提取物抑制冷藏猪肉糜脂肪和蛋白氧化及对品质特性的影响[J]. 食品与发酵工业, (2021-12-05)[2022-03-09]. https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=Pk5Eu7Luul5mxKRocLG3l2e24AbDW177gMYW_5POX_uAQsKLtpJ9Va2Pa0jRKtwtXWbf_XRiZgCgXC8DoWujqii_xGInW47IcXKy2H1jdPzVmYkX-HGzpvkjiwkgVY2WSYep5JOLqk=&uniplatform=NZKPT&language=CHS&version=LYDG.
- BO Z Y, XIONG J, CHANG H J, et al. Effects of purslane extract on lipid and protein oxidation and quality characteristics of frozen pork ground[J]. Food and fermentation industries, (2021-12-05)[2022-03-09]. https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=Pk5Eu7Luul5mxKRocLG3l2e24AbDW177gMYW_5POX_uAQsKLtpJ9Va2Pa0jRKtwtXWbf_XRiZgCgXC8DoWujqii_xGInW47IcXKy2H1jdPzVmYkX-HGzpvkjiwkgVY2WSYep5JOLqk=&uniplatform=NZKPT&language=CHS&version=LYDG.
- [2] 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 H J, ZHOU W B. Processing technology and technology of livestock and poultry products[M]. Harbin: Harbin Engineering University Press, 2018: 56-59.
- [3] KANG D C, ZHANG W G, LORENZO JOSE M, et al. Structural and functional modification of food proteins by high power ultrasound and its application in meat processing[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2021, 61(11): 1914-1933.
- [4] WANG Z F, HE Z F, ZHANG D, et al. Antioxidant activity of purslane extract and its inhibitory effect on the lipid and protein oxidation of rabbit meat patties during chilled storage[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2021, 101(5): 1953-1962.
- [5] 黄浩河, 黄崇杏, 张霖雲, 等. 姜黄素在食品保鲜中应用的研究进展[J]. 食品工业科技, 2020, 41(7): 320-324, 331.
- HUANG H H, HUANG C X, ZHANG L Y, et al. Research progress in the application of curcumin in food preservation[J]. Food Industry Science and Technology, 2020, 41(7): 320-324, 331.
- [6] DE ALMEIDA M, DA ROCHA B A, FRANCISCO C R L, et al. Evaluation of the *in vivo* acute anti-inflammatory response of curcumin-loaded nanoparticles[J]. Food Function, 2018, 9(1): 440-449.
- [7] 宋立敏. 姜黄素类化合物体外抗氧化作用及其构效关系研究[D]. 烟台: 烟台大学, 2018.
- SONG L M. Study on antioxidant activity and structure-activity relationship of curcumin compounds *in vitro*[D]. Yantai: Yantai University, 2018.
- [8] 李瑞华. 姜黄素对牛乳腺上皮细胞的抗氧化作用及抑癌机制的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2021.
- LI R H. The effect of curcumin on antioxidant activity and anticancer mechanism of bovine mammary epithelial cells[D]. Changchun: Jilin University, 2021.
- [9] WANG Z C, LIU X Y, BAO Y R, et al. Characterization and anti-inflammation of a polysaccharide produced by *Chaetomium globosum* CGMCC 6882 on LPS-induced RAW264.7 cells[J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 251: 117129.
- [10] 王钰, 周一萍, 汤运嘉, 等. 麻疯树籽仁/壳乙醇提取物的体外抗氧化活性[J]. 中国油脂, 2022, 47(7): 83-87.
- WANG Y, ZHOU Y P, TANG Y J, et al. *In vitro* antioxidant activity of ethanol extracts of *Jatropha curcas* seed kernel and shell[J]. China Oils and Fats, 2022, 47(7): 83-87.
- [11] 常相娜, 陈雪峰, 龚频, 等. 盐胁迫环境下发菜胞外多糖抗氧化作用及镇痛抗炎活性[J]. 食品科学, 2020, 41(17): 133-138.
- CHANG X N, CHEN X F, GONG P, et al. Antioxidant and analgesic and anti-inflammatory activity of extracellular polysaccharide from vegetable vegetable under salt stress[J]. Food Science, 2020, 41(17): 133-138.
- [12] CAO Y G, MA W H, HUANG J R, et al. Effects of sodium pyrophosphate coupled with catechin on the oxidative stability and gelling properties of myofibrillar protein[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 104: 105722.
- [13] 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.
- XIONG J, BO Z Y, CHANG H J, et al. Effects of extracts of *Monascus japonicum* on myofibrin oxidation and structure induced by $\cdot\text{OH}$ [J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(3): 72-80.
- [14] 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.
- CAO Y G. Effects of plant polyphenols on the oxidative stability and functional properties of meat protein[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2016.
- [15] 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.
- [16] 臧学丽, 陈光. 转谷氨酰胺酶交联大豆分离蛋白的结构变化与凝胶强度的相关性[J]. 吉林农业大学学报, 2021, 43(6): 685-689.
- ZANG X L, CHEN G. Structural changes of transglutaminase crosslinked soybean protein isolate and its correlation with gel strength[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2021, 43(6): 685-689.
- [17] LI K, LEI F, ZHAO Y Y, et al. Use of high-intensity ultrasound to improve emulsifying properties of chicken myofibrillar protein and enhance the rheological properties and stability of the emulsion[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 98: 1-11.
- [18] CAO Y, AI N, 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.
- [19] 贾娜, 孙嘉, 王乐田, 等. 没食子酸对猪肉糜脂肪和蛋白氧化的抑制作用及对肉糜品质特性的影响[J]. 肉类研究, 2019, 33(3): 1-6.
- JIA N, SUN J, WANG L T, et al. Effects of gallic acid on lipid and protein oxidation and quality characteristics of pork ground[J]. Meat Research, 2019, 33(3): 1-6.
- [20] 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.
- [21] 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 J, BO Z Y, CHANG H J. Effects of liquorice extract on lipid and protein oxidation and quality characteristics of frozen chicken ground meat[J]. Food Industry Science and Technology, 2021, (1): 75-81, 88.
- [22] MAHMOUD H K, AL-SAGHEER A A, REDA F M, et al. Dietary curcumin supplement influence on growth, immunity, antioxidant status, and resistance to *Aeromonas hydrophila* in *Oreochromis niloticus*[J]. Aquaculture, 2017, 475: 16-23.
- [23] ZHANG Z L, XIONG Z Y, 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.
- [24] XU M F, LIAN Z H, CHEN X Q, et al. Effects of resveratrol on lipid and protein co-oxidation in fish oil-enriched whey protein isolate emulsions[J]. Food Chemistry, 2021, 365: 130525.
- [25] OUESLATI K, DE LA POMELIE D, SANTE-LHOUELLE V, et al. Impact of the Fenton process in meat digestion as assessed using an *in vitro* gastro-intestinal model[J]. Food Chemistry, 2016, 209: 43-49.
- [26] BARCLAY L R C, VINQVIST M R, MUKAI K, et al. On the antioxidant mechanism of curcumin: Classical methods are needed to determine antioxidant mechanism and activity[J]. Organic Letters, 2000, 2(18): 2841-2843.
- [27] 曹云刚, 马文慧, 艾娜丝, 等. 氧化强度对肌原纤维蛋白结构及凝胶性能的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(20): 21-27.
- CAO Y G, MA W H, AI N S, et al. Effects of oxidation intensity on the structure and gel properties of myofibrin[J]. Food Science, 2019, 40(20): 21-27.
- [28] 冉丽丹, 李文慧, 赵超, 等. 茶多酚- β -环糊精包合物对羊肚冷藏期间肌原纤维蛋白氧化的影响[J]. 食品科学, 2021, 42(3): 227-235.
- RAN L D, LI W H, ZHAO C, et al. Effects of tea polyphenol- β -cyclodextrin inclusion complex on myofibrin oxidation during cold storage[J]. Food Science, 2021, 42(3): 227-235.
- [29] 邓小蓉, 雷用东, 刘娟, 等. 芬顿氧化体系处理对白斑狗鱼肌原纤维蛋白结构和功能特性的影响[J].

- 食品科学, 2022, 43(6): 27-33.
- DENG X R, LEI Y D, LIU J, et al. Effects of Fenton oxidation system on the structure and functional characteristics of myofibrin in white spot dogfish[J]. Food Science, 2022, 43(6): 27-33.
- [30] ZHANG Z Y, YANG Y L, ZHOU P, et al. Effects of high pressure modification on conformation and gelation properties of myofibrillar protein [J]. Food Chemistry, 2017, 217: 678-686.
- [31] ZHANG D, LI H, EMARA A M, et al. Effect of *in vitro* oxidation on the water retention mechanism of myofibrillar proteins gel from pork muscles [J]. Food Chemistry, 2020, 315: 126226.
- [32] 韩馨蕊, 李颖, 刘苗苗, 等. 安石榴昔与焦磷酸钠对肌原纤维蛋白氧化稳定性及凝胶性能的影响[J]. 食品科学, 2022, 43(8): 15-21.
- HAN X R, LI Y, LIU M M, et al. Effects of an-garnet and sodium pyrophosphate on oxidative stability and gel properties of myofibrin[J]. Food Science, 2022, 43(8): 15-21.
- [33] DAI H J, CHEN X K, PENG L, et al. The mechanism of improved myosin gel properties by low dose rosmarinic acid addition during gel formation[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 106: 105869.
- [34] WANG Z M, HE Z F, GAN X, et al. Effect of peroxy radicals on the structure and gel properties of isolated rabbit meat myofibrillar proteins[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2018, 53(12): 2687-2696.
- [35] WANG S X, ZHANG Y M, CHEN L, et al. Dose-dependent effects of rosmarinic acid on formation of oxidatively stressed myofibrillar protein emulsion gel at different NaCl concentrations[J]. Food Chemistry, 2018, 24(15): 50-57.
- [36] 陈楷文. 没食子酸介导的肌原纤维蛋白可溶性低聚物及其特性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2021.
- CHEN K W. Study on the soluble oligomer of myofibrin mediated by gallic acid and its properties[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2021.
- [37] 于晶超. 阿魏酸低聚糖对肌原纤维蛋白结构和功能特性的调控机理研究[D]. 烟台: 烟台大学, 2021.
- YU J C. Study on the effect of ferulic acid oligosaccharides on the structure and functional properties of myofibrin[D]. Yantai: Yantai University, 2021.

Effects of Curcumin on Oxidation and Structure of Myofibrillar Protein Induced by Hydroxyl Radical

Chang Haijun, Bo Zhaoying, Shi Yuanwei, Xiong Jie, Hu Yu

(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)

Abstract Pork myofibrillar protein (MP) was selected as the main research material. The Fenton oxidation system was employed to replicate the oxidation conditions of meat items, and curcumin with different concentrations (0, 5, 10, 15, 20 $\mu\text{mol/L}$) was added to it. Changes in amino acid side chain, secondary structure, tertiary structure and solubility of protein were analyzed. To explore the inhibitory effect of curcumin on the oxidation of pork myofibrillar protein at different concentrations and its specific effect on protein structure. The results showed that curcumin had good free radical scavenging performance and could effectively slow the protein oxidation and structural changes caused by hydroxyl radicals, and this inhibition was proportional to the concentration of curcumin in a specific concentration range (5-20 $\mu\text{mol/L}$). Compared with the oxidation group, the curcumin treatment group significantly inhibited the formation of carbonyl groups and the increase of surface hydrophobicity, the curcumin treatment group of 20 $\mu\text{mol/L}$ had the inhibition rates of 2.62% and 51.78%, respectively ($P<0.05$), can also significantly alleviate the decline of sulfhydryl, free amino and solubility ($P<0.05$), the inhibition rates were 80.02%, 59.34%, 70.84%, respectively, and the addition of curcumin can promote the MP tertiary structure unfolding, can also alleviate the secondary structure changes caused by hydroxyl radicals. Therefore, curcumin can interact with MP to alleviate its oxidative deterioration and structural changes, and has a good effect on the quality and preservation of meat products.

Keywords curcumin; myofibrillar protein; oxidation; hydroxyl radical