

羟基- α -山椒素与肌原纤维蛋白互作及其麻味感知机制

王帅谦¹, 姜典典¹, 唐洁^{1,2}, 蒋珍菊^{1,2}, 赵婕^{1,2*}

¹ 西华大学食品与生物工程学院 成都 610039

² 川渝共建特色食品重庆市重点实验室 成都 610039

摘要 花椒中的酰胺类物质羟基- α -山椒素(α -SOH)与蛋白质的相互作用可增强川菜中肉类菜肴的麻味。为明晰肉类加工中二者的结构变化及附着情况,探究热诱导(60,70,90 °C)的猪肉肌原纤维蛋白(MPs)与 α -SOH的互作机制,并通过分子对接解析 α -SOH的麻味激活机制。结果表明, α -SOH可增加 α -SOH/MPs复合物的表面疏水性,促进热处理MPs的解聚。 α -SOH酰胺基团中的N-H键易与氨基酸残基之间形成稳定氢键,改变蛋白的亚基聚集状态,从而显著减弱SDS-PAGE上大于45 ku的条带。荧光光谱和圆二色谱结果证实 α -SOH导致蛋白二级结构由规则向无序状态转变。适度热处理(60 °C和70 °C)的MPs更易与 α -SOH形成复合物,从而降低游离 α -SOH含量。分子对接结果显示, α -SOH激活麻味是通过与TRPV1受体上的L681结合产生。本试验阐明MPs与 α -SOH的互作机制以及激活麻味的机理,可为肉制品加工中的麻味调控提供理论依据。

关键词 肌原纤维蛋白; 羟基- α -山椒素; 互作机制; TRPV1; 麻味

文章编号 1009-7848(2024)04-0080-10 **DOI**: 10.16429/j.1009-7848.2024.04.008

花椒(*Zanthoxylum bungeanum*)是肉制品加工中常见的香辛料,被誉为“八大调味品”之一^[1]。其特殊的香味和独有的麻味,赋予川菜鲜明的地方特色风味。有研究表明,花椒中的麻味物质主要是一系列链状不饱和脂肪酸酰胺类物质,其中羟基- α -山椒素(Hydroxy- α -Sanshool, α -SOH)含量最多且具有强烈刺激性,被视为花椒中的主要麻味物质^[2]。目前,国内外对花椒的研究主要集中在花椒的化学组成及其生理功能方面^[3],鲜少有人关注花椒麻味物质对肉制品食用品质的影响。贺文杰^[4]发现花椒中的 β -山椒素能抑制肌肉蛋白的热降解和卤制过程中肌纤维断裂,从而显著改善卤鸭腿的嫩度和保水性,然而其具体作用机制不明确。

在川菜加工中,花椒不仅具有调味^[5]、抗氧化^[6]、抑菌^[7]的功效,其麻味物质还能与肉蛋白相互作用改善其风味。在肉类食品风味形成过程中,肌肉蛋白对风味的贡献主要表现在2个方面:一是蛋白质降解生成风味前体化合物^[8],二是蛋白质通

过物理或者化学方式实现对风味成分的吸附与交互作用^[9-10]。Guichard^[11]发现疏水作用是维持蛋白与风味物质相互作用的主要作用力。蛋白质构象与其风味吸附能力密切相关。Shen等^[12]发现,pH诱导的蛋白结构变化,可通过改变结合位点而影响其对风味物质的吸附。此外,蛋白质的浓度与种类^[13]、温度^[14]都会影响肌肉蛋白与挥发性风味化合物的结合。热处理是肉制品加工中最常见的处理方式,热诱导引起的肌原纤维蛋白(Myofibrillar proteins,MPs)构象变化会影响其与 α -SOH相互作用,从而改变肉制品风味。TRPV1是重要的麻味感知受体,香草酸类化合物能有效激活TRPV1受体,从而引起各种感知信号^[15]。目前针对辣椒素和胡椒碱等化合物激活TRPV1受体的研究已较为详细,而对于香草酸类中的 α -SOH激活受体机制还尚不明确。

本试验以猪肉MPs和花椒中的麻味物质 α -SOH为研究对象,从表面疏水性、粒径、Zeta电位、内源荧光、圆二色谱和游离山椒素含量等6个方面,考察热诱导MPs与 α -SOH的作用规律。随后借助分子对接模拟 α -SOH对TRPV1受体的激活,旨在从分子角度提出纯体系下可能存在的麻味感知机制。本文探究花椒麻味物质与热诱导MPs的作用规律和分子机制,明晰激活麻味的机

收稿日期: 2023-08-19

基金项目: 四川省科技厅自然科学基金项目(2023NSFSC1210);四川省科技厅重点研发项目(2023YFN0015,2020YFN0151)

第一作者: 王帅谦,男,硕士生

通信作者: 赵婕 E-mail: zhaojie@mail.xhu.edu.cn

理,对特定风味肉制品的加工调控及麻味产品的开发具有重要的理论指导意义。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

新鲜的猪肉背长肌,购自成都永辉超市。 α -SOH、EGTA、EDTA、甘氨酸、Tris,上海麦克林生化科技有限公司;溴酚蓝、二硫苏糖醇(DTT)、十二烷基硫酸钠(SDS),上海阿拉丁试剂有限公司。电泳预制胶,碧云天生物技术有限公司。其它试剂均购自源叶生物技术有限公司;所有化学品和试剂均为分析纯级。

1.2 设备与仪器

绞肉机 LD-KM202,广东龙的集团有限公司;高速分散均质机 FJ300-SH,上海沪析实业有限公司;高速离心机 Avanti J-30I,美国贝克曼库尔特公司;紫外-可见分光光度计 UV-2600A,尤尼柯(上海)仪器有限公司;纳米粒度仪 ZEN3600,英国马尔文仪器有限公司;电泳仪 DY CZ-24DN,北京六一生物科技有限公司;荧光分光光度计 FLUOROMAX-4,成都世纪方舟科技有限公司;圆二色谱仪 Chirascan,英国 Applied Photophysics 公司。

1.3 方法

1.3.1 样品制备

1.3.1.1 MPs 的提取 参考 Zhao 等^[16]的方法并适当修改。取新鲜的猪肉背长肌经搅碎后,与 10 mmol/L 的磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L NaCl, 2 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L EGTA, pH 7.0) 混合(1:4, *m/V*),均质 2 次后,离心(4 000×*g*, 15 min, 4 °C),收集沉淀并重复洗涤 3 次。随后采用 0.1 mol/L NaCl 洗涤 3 次,经纱布过滤、离心后的沉淀即为 MPs。

1.3.1.2 α -SOH/MPs 复合物的制备 取 10 mg 的 α -SOH 溶于 50 mL 体积分数 30% 的乙醇,置于 4 °C 冰箱密封避光保存,得到 α -SOH 母液。将 MPs 溶液分别置于 60, 70, 90 °C 下水浴加热 10 min,取出、冷却至室温后,调节蛋白溶液质量浓度为 5 mg/mL。吸取 10 mL 上述蛋白溶液,加入 0.5 mL α -SOH 母液并置于 4 °C 下以 200 r/min 搅拌 1 h, 4 °C 冰箱孵育 16 h 后得到 α -SOH/MPs 复合物。具体试验分组与命名见表 1。

1.3.2 表面疏水性 参照 Shi 等^[17]的方法并适当

表 1 样品处理与命名

样品处理	未加入 α -SOH	加入 α -SOH
常温	Control	Control+
60 °C 水浴加热	60 °C	60 °C+
70 °C 水浴加热	70 °C	70 °C+
90 °C 水浴加热	90 °C	90 °C+

修改。吸取 1 mL 样品溶液(5 mg/mL),加入 200 μ L 溴酚蓝溶液(1 mg/mL)混匀,置于室温下反应 10 min,离心 15 min(4 000×*g*)后取上清液,10 倍稀释后测定其在波长 595 nm 处的吸光度值,记为 Abs_{样品},并以磷酸盐缓冲液(10 mmol/L, 0.1 mol/L NaCl, pH 7.0)作为空白对照组,记为 Abs_{空白}。表面疏水性以溴酚蓝结合量(BPB bound, μ g)表示:

$$\text{BPB bound } (\mu\text{g}) = 200 (\mu\text{g}) \times (\text{Abs}_{\text{空白}} - \text{Abs}_{\text{样品}}) / \text{Abs}_{\text{空白}} \quad (1)$$

1.3.3 粒径与 Zeta 电位 参考申辉^[18]的方法并适当修改。将样品溶液稀释至 1 mg/mL,分别吸取 1 mL 和 0.75 mL 样品置于粒径和 Zeta 电位的样品池中。分散剂折射率设为 1.33,颗粒折射率设为 1.57,颗粒吸收率设为 0.001,平衡时间 120 s,每次重复测量 3 次。

1.3.4 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 将样品溶液稀释至 0.2 mg/mL,取 400 μ L 的样品加入 100 μ L 的还原性缓冲液(含 DTT),煮沸 5 min 后离心(12 000×*g*, 5 min)。取 15 μ L 上清液加到 4%~20% Tris-Gly 梯度凝胶上,并在 25 mA 的恒定电流下电泳。电泳完成后,取下凝胶并用考马斯 R-250 染色 30 min,然后用体积分数 10% 的冰醋酸和体积分数 10% 的乙醇进行脱色。

1.3.5 内源荧光 将样品溶液稀释至 0.5 mg/mL 置于荧光比色皿中,设置激发波长和发射波长的狭缝宽度为 5 nm,激发电压为 500 V,扫描速度为 300 nm/min;在激发波长 280 nm 条件下,采集 300~500 nm 范围内的荧光光谱。每组重复测量 3 次。

1.3.6 圆二色谱 将蛋白质量浓度稀释至 0.2 mg/mL,并转移到光程为 1 mm 的石英池中。在 20 °C 下,以氮气为保护气体,扫描范围为 180~260 nm,扫描速度为 120 nm/min,扫描间隔 1 nm 进行圆二

色谱分析。用 CDNN 软件计算蛋白质二级结构含量。

1.3.7 游离山椒素含量 在波长 254 nm 下,测定不同质量浓度(0~25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) α -SOH 溶液的吸光值并绘制标准曲线^[9]。将 α -SOH/MPs 复合物离心处理(4 000 $\times g$,5 min),吸取上清液;测定其在波长 254 nm 处的吸光值并根据标准曲线计算游离山椒素的含量。

1.3.8 分子对接 麻味受体 TRPV1 分子的蛋白数据库信息获取自 <https://www.rcsb.org/>(PDB ID: 3J5R)。 α -SOH 的 3D 结构从 PubChem 数据库下载(CID: 10084135)。利用 Autodock Vina 软件对 TRPV1 与 α -SOH 进行模拟对接。在对 α -SOH 配体和 TRPV1 受体进行对接前,加入了极性氢和力场参数,并且利用蛋白在线分析网址(<https://proteins.plus/>) 预测活性位点,建立了一个 60 \times 60 \times 60 的 Grid Box,中心坐标为 $X=1.639, Y=0.694, Z=-23.750$ 。最后获得 50 种对接姿势,并选择能量最低的一组进行对接分析。通过 Pymol 软件对接结果进行可视化处理。

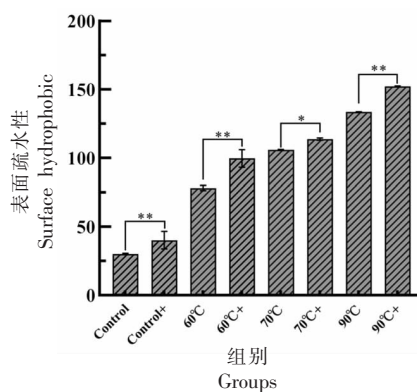
1.4 数据处理与分析

试验至少重复 3 次,数据以“平均值 \pm 标准差”呈现。通过 SPSS 24.0 软件对数据进行 ANOVA 分析;在置信水平为 0.05 的条件下,采用邓肯多重极差检验进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 表面疏水性分析

图 1 显示了不同热诱导后 MPs 和 α -SOH/MPs 复合物的表面疏水性。由图可知,随着温度升高,表面疏水性呈增加趋势,这是由于加热导致蛋白质变性,使其结构逐渐展开,从而导致包埋在蛋白内部的疏水性残基暴露^[20]。与未加热的阴性对照组相比,加入 α -SOH 后复合物的表面疏水性均显著增加,其中 Control 组、60 $^{\circ}\text{C}$ 组、90 $^{\circ}\text{C}$ 组的差异极显著($P < 0.01$),70 $^{\circ}\text{C}$ 组差异显著($P < 0.05$)。这是因为 α -SOH 具有疏水性的长碳链和酰胺基团^[2],当 α -SOH 与 MPs 非共价结合时,使得 MPs 的表面更具非极性^[21]。随着疏水基团的过度暴露,蛋白分子间会通过疏水作用力而聚集^[22],这一过程可能掩埋了与 α -SOH 发生非共价结合的潜在



注:**. 差异极显著($P < 0.01$);*. 差异显著($P < 0.05$)。

图 1 不同温度的 MPs 和 α -SOH/MPs 复合物的表面疏水性

Fig.1 Surface hydrophobicity of MPs and α -SOH/MPs complexes at different temperatures

位点,因此 70 $^{\circ}\text{C}$ 组的差异显著性不同于其它组别。而 90 $^{\circ}\text{C}$ 加热后会导致蛋白解聚,MPs 与 α -SOH 发生非共价结合的位点会重新暴露,因此 90 $^{\circ}\text{C}$ 组的表面疏水性呈现极显著增加。

2.2 粒径分析

图 2 为不同热诱导 MPs 和 α -SOH/MPs 复合物的粒径分布图。由图可知,加热后(60 $^{\circ}\text{C}$)蛋白的粒径由(1 878 \pm 38.66)nm 增大到(2 578.44 \pm 67.83)nm,当持续加热至 90 $^{\circ}\text{C}$ 后粒径则会逐渐减小至(1 203.665 \pm 35.13)nm。这是由于适度加热会诱导蛋白质变性,暴露的疏水基团经疏水相互作用而产生热聚集^[23]。而过度加热(90 $^{\circ}\text{C}$)则会导致 MPs 发生解聚,使其粒径降低、重新暴露出更多疏水基团,这与表面疏水性结果相一致。万红兵等^[20]在对牛肉 MPs 的热处理中也观察到了类似现象。此外,对于 α -SOH/MPs 复合物而言,Control+组的粒径有轻微增加,而加热组(60 $^{\circ}\text{C}$ +组、70 $^{\circ}\text{C}$ +组、90 $^{\circ}\text{C}$ +组)的粒径均显著降低。这可能是由于加热后 MPs 的二、三级结构变化, α -SOH 的酰胺基团易与氨基酸残基之间形成氢键^[24],导致原来氨基酸残基之间用于稳定 MPs 结构的氢键更倾向于与 α -SOH 结合,最终使得蛋白质趋向非稳状态,呈现较小的粒径分布。而对于未加热的 MPs, α -SOH 则是更多的附着在蛋白表面,其疏水性的长碳链使得疏水作用力大于亲水作用力,从而在一定程度上促进了蛋白的聚集,导致较大的粒径分布。

2.3 Zeta 电位分析

Zeta 电位能反映体系的稳定性, 当电位值为负值时, 表明带负电的氨基酸较多^[25]。图 3 为不同温度的 MPs 和 α -SOH/MPs 复合物的 Zeta 电位图。对 MPs 而言, 当温度升高到 60 °C 时, Zeta 电位从 Control 组的 (-8.2 ± 0.34) mV 升高至 (-2.6 ± 0.26) mV; 继续加热后 Zeta 电位值持续降低至 (-11.35 ± 0.95) mV (90 °C)。这一结果与表面疏水性和粒径分布一致, 表明 60 °C 时 MPs 由于疏水作用力产生了热聚集现象, 从而屏蔽了大部分带负电氨基酸, 导致电位值升高^[26]。随后电位值的降低则是由于 MPs 开始解聚, 使带负电氨基酸重新暴露。此外, 与 MPs 相比, α -SOH/MPs 复合物的 Zeta 电位值均有一定程度的增加, Zeta 电位值的增加表明静电斥力的减小。其中 Control+ 组显著增加 ($P < 0.05$), 70 °C+ 组和 90 °C+ 组变化极显著 ($P < 0.01$), 60 °C+ 组变化不显著 ($P > 0.05$)。导致该现象的原因可能是由于具有疏水性的 α -SOH 与 MPs 的疏水性氨基酸更易产生疏水作用力, 这不利于静电斥力的产生^[27]。从稳定性的角度分析, 静电斥力越小, 体系越趋于不稳定状态。结果显示经热处理后, 蛋白发生氧化, 稳定性降低。此外, α -SOH 的加入同样降低了体系稳定性, 因此应全面考虑静电斥力、疏水作用力、氢键等作用力对体系稳定性的影响。

2.4 SDS-PAGE 分析

图 4 为不同温度条件下 MPs 和 α -SOH/MPs 复合物的凝胶电泳图。由图可知, 当加热温度升高至 60 °C 时, 分离胶顶部的大分子条带 (>170 ku) 有轻微加深, 表明加热使得 MPs 发生了热聚集, 从而呈现较大的粒径分布 (图 2)。继续加热至 90 °C, 100~170 ku 之间的条带逐渐减弱, 说明蛋白发生了不同程度的解聚, 这与粒径结果相一致。同时, 与阴性对照组 (60 °C 组、70 °C 组、90 °C 组) 相比, 加入 α -SOH 后大于 45 ku 的条带显著减弱, 尤其是 70 °C+ 组和 90 °C+ 组, 其大于 170 ku 部分完全消失。这表明 MPs 热处理后再加入 α -SOH 会促进蛋白的解聚。何蜀峰等^[28]在加热条件下用酶水解鸭肉蛋白, 同样发现 220 ku 条带附近的肌球蛋白重链含量明显减少, 而 40 ku 附近的肌动蛋白无明显变化。因此推测 α -SOH 溶液可能同样具备水

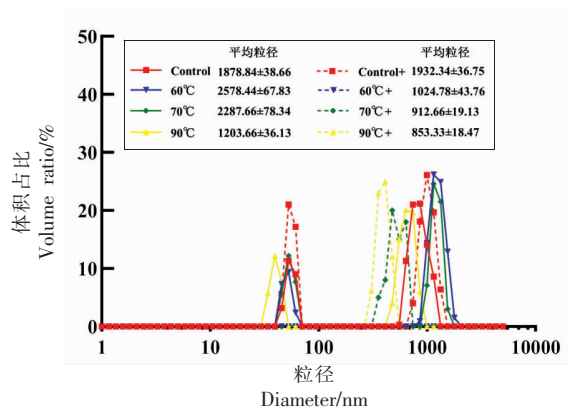
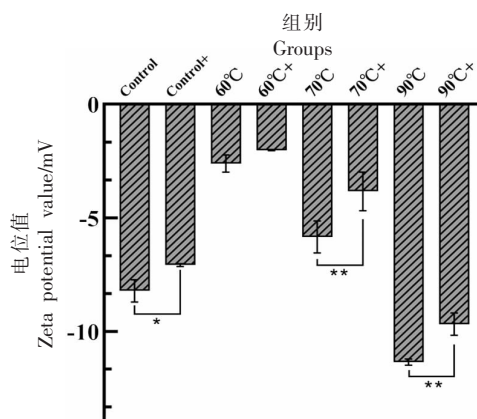


图 2 不同温度的 MPs 和 α -SOH/MPs 复合物的粒径分布图

Fig.2 Particle size distribution of MPs and α -SOH/MPs complexes at different temperatures



注: **. 差异极显著 ($P < 0.01$); *. 差异显著 ($P < 0.05$)。

图 3 不同温度的 MPs 和 α -SOH/MPs 复合物的 Zeta 电位图

Fig.3 Zeta potential of MPs and α -SOH/MPs complexes at different temperatures

解蛋白的能力。此外, Zhang 等^[29]在研究 α -SOH 的结构类似物——辣椒素与 β -乳球蛋白相互作用中同样也发现, 常温下加入辣椒素未能破坏蛋白质的多聚体状态。

2.5 荧光图谱分析

图 5 为不同温度的 MPs 和 α -SOH/MPs 复合物的内源荧光图谱。由图可知, 与阴性对照组相比, 加入 α -SOH 后复合物的荧光强度均显著减弱, 其中 Control+ 组荧光强度下降最明显。这是由于 α -SOH 小分子加入后, 在蛋白质分子内发生碰撞引起的猝灭现象^[30]。此外, 最大吸收波长 (λ_{max}) 的红移与蓝移同样能反映 MPs 的三级结构

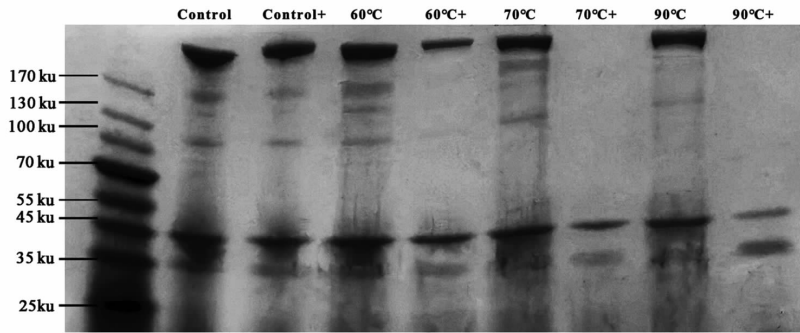


图4 不同温度的MPs和 α -SOH/MPs复合物的凝胶电泳图

Fig.4 Gel electrophoresis of MPs and α -SOH/MPs complexes at different temperatures

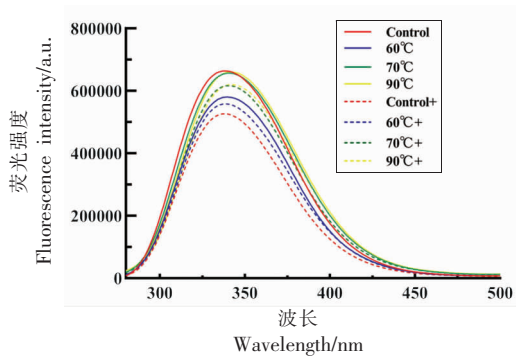


图5 不同温度的MPs和 α -SOH/MPs复合物的内源荧光图谱

Fig.5 Endogenous fluorescence profiles of MPs and α -SOH/MPs complexes at different temperatures

变化, λ_{\max} 的蓝移表明荧光基团处于更加疏水环境中, 蛋白质结构趋于收缩状态; λ_{\max} 的红移表明荧光基团暴露于极性环境, 蛋白质结构趋于舒展^[31-32]。随着温度的升高, MPs组的 λ_{\max} 由338

nm 轻微蓝移至 337 nm (60 °C), 继续加热至 90 °C 后红移至 342 nm。 α -SOH/MPs复合物的 λ_{\max} 由336 nm先轻微蓝移至335 nm (60 °C)后红移至342 nm (90 °C), 这表明加热到60 °C时, MPs之间发生热聚集从而将荧光基团包裹, 继续加热后蛋白聚集体开始解聚, 该过程会重新暴露荧光基团^[23]。

2.6 圆二色谱分析

蛋白质二级结构中的肽键是具有一定规律排列的, 不同的二级结构排列所产生的圆二色谱谱带、位置峰的强度均不同^[33]。图6a为不同温度的MPs和 α -SOH/MPs复合物的圆二光谱图, 图6b为经拟合计算后得到的二级结构含量。由图可知, 与Control组(7.7%)相比, MPs经60 °C和70 °C加热后, 其 α -螺旋含量分别增加至9.1%和8.0%; 继续加热至90 °C后, α -螺旋含量转变为 β -折叠, 其含量降低至7.1%。这表明60 °C和70 °C加热有助于稳定MPs的规则结构; 而90 °C加热后MPs的

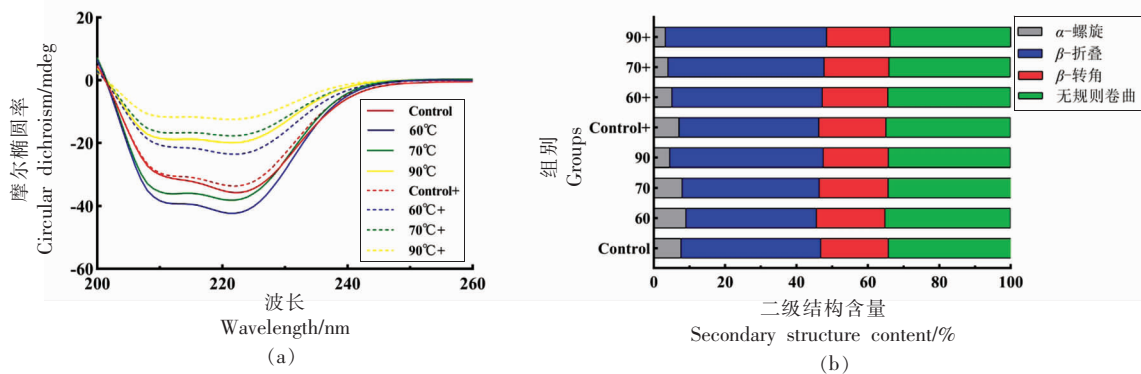


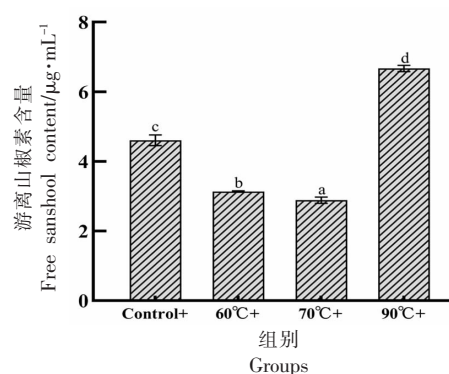
图6 不同温度的MPs和 α -SOH/MPs复合物的圆二光谱图(a)和二级结构含量(b)

Fig.6 Circular dichroism (a) and secondary structure distribution (b) of MPs and α -SOH/MPs complexes at different temperatures

结构更趋于无序状态^[34]。在同一加热温度条件下,加入 α -SOH 后 α -螺旋含量均有显著降低, β -折叠和 β -转角含量增加。这可能是由于加热改变了 MPs 结构并增强了体系能量,这促进了 α -SOH 与氨基酸残基的相互作用,而 α -SOH 酰基基团中的 N-H 键具有较强极性,容易与羧基、羟基等形成稳定氢键^[35],使得原本用于稳定蛋白质 α -螺旋结构的氢键会转而与 α -SOH 结合,这一结果与粒径和 SDS-PAGE 的结论一致。

2.7 游离山椒素含量分析

为了探究热诱导引起的 MPs 构象变化对 α -SOH 吸附作用的影响,分析了不同温度下 α -SOH/MPs 复合物的游离山椒素含量变化(图 7)。由图可知,与 Control+组相比,60℃+组和 70℃+组的游离山椒素含量均显著下降($P < 0.05$);继续加热至 90℃时,游离山椒素含量又显著升高($P < 0.05$)。该现象与 α -SOH 的附着位置和结合程度有关。加热后的 MPs 与 α -SOH 孵育时, α -SOH 一部分附着在 MPs 表面,一部分则被包裹在 MPs 内部。就 α -SOH 与 MPs 结合的驱动力而言,由于 α -SOH 酰胺基团的氨基氮附着在脂肪族烷基 RCH₂-上,对氨基氮产生电子排斥效应,导致氮原子上的电子云密度增加,其孤电子对难以与其它原子结合形成共价键^[36-37],因此 α -SOH 与 MPs 之间主要以疏水作用力和氢键等非共价键为主。结合内源荧光与表面疏水性分析,热处理后 MPs 结构先展开,随后在疏水作用力下会发生聚集,在这一过程中 α -SOH 容易被包裹至 MPs 或蛋白聚集体内部,因此 60℃组和 70℃组所检测出的游离 α -SOH 含量较少。当加热至 90℃时,蛋白聚集体会发生解聚, α -SOH 未能得到有效包裹,且与 MPs 结合的作用



注:不同字母表示组间具有显著差异($P < 0.05$)。

图 7 不同温度的 α -SOH/MPs 复合物的游离山椒素含量
Fig.7 Free sanshool content of α -SOH/MPs complexes at different temperatures

力较弱,离心之后便会重新进入游离状态。

2.8 分子对接

TRPV1 受体的激活需要配体、质子或热刺激^[38]。如图 8 所示,TRPV1 每段亚基主要由 S1-S6 六块结构域组成,S6 末端形成中心孔道,3 处最窄点的残基为 M644、G643 和 I679^[39]。在激活 TRPV1 受体后, Ca^{2+} 等阳离子则会通过通道流入细胞引起电信号从而形成风味感知。Yang 等^[40]通过分子对接模拟了辣椒素与 TRPV1 受体对接情况,发现其“头部”和“尾部”分别与 E571 和 T551 形成稳定氢键。Dong 等^[41]则发现胡椒碱不同于辣椒素,它是直接与 S6 上的 T670 对接从而打开通道。本文通过分子对接模拟方式来验证 α -SOH 激活 TRPV1 受体的方式,结果如图 9 和图 10 所示。 α -SOH 与 TRPV1 受体对接位置位于 4 条链所形成的空腔位置,对 α -SOH 形成了良好的包裹。图 10 呈现了 α -SOH 与 TRPV1 受体局部对接情况,可以发现

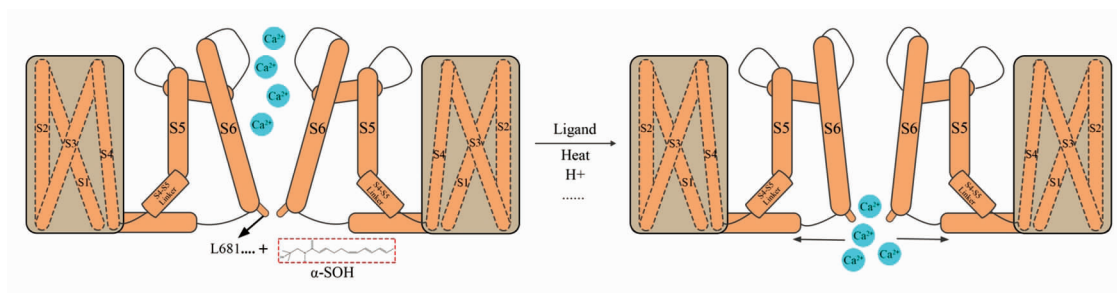


图 8 TRPV1 通道激活示意图^[15]

Fig.8 Schematic diagram of TRPV1 channel activation^[15]

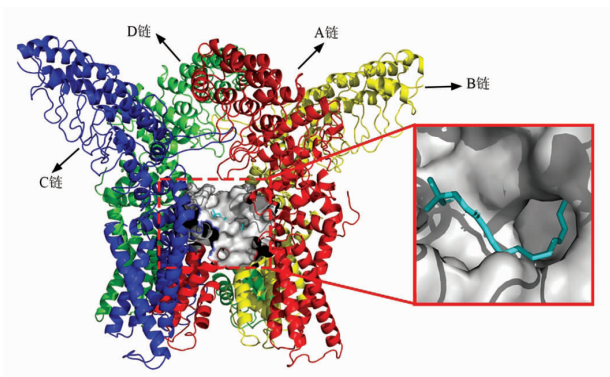


图9 α -SOH与TRPV1受体对接整体图
Fig.9 Overall diagram of α -SOH docking with TRPV1 receptor

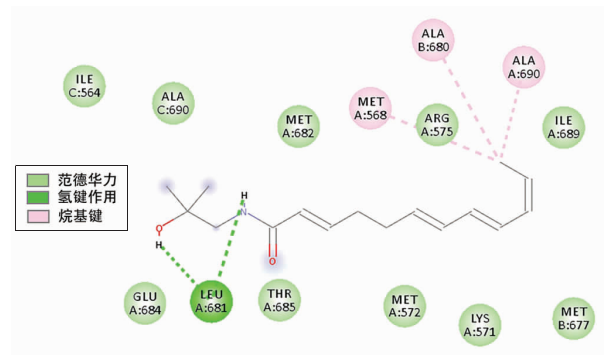
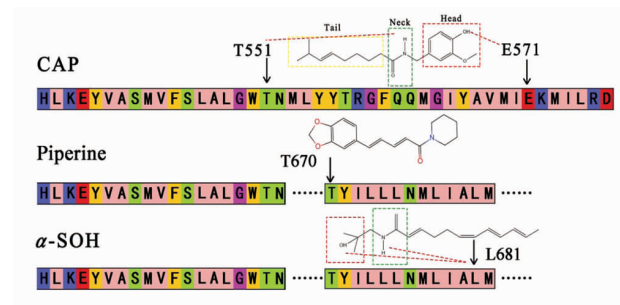


图10 α -SOH与TRPV1受体对接平面图
Fig.10 Plan view of α -SOH docking with TRPV1 receptors

TRPV1的4条链均有参与 α -SOH的作用,这可能有助于二者之间形成稳定的结合。其中 α -SOH的“头部”-OH和“颈部”酰胺基团均与L681氨基酸各形成1条氢键,为稳定对接结构提供较强作用力。相对于“头部”与“颈部”的极性基团,“尾部”疏水性长碳链难以与氨基酸之间形成较多的作用力。因此可见,与其它酰胺类物质辣椒素(CAP)和胡椒碱(Piperine)相比, α -SOH激活TRPV1受体方式更接近于胡椒碱(图11),通过直接对接S6末端中心孔道的氨基酸从而打开通道。

3 结论

本试验通过SDS-PAGE、圆二色谱等分析方法,探究了热诱导MPs与 α -SOH的互作机制。随着热处理温度的升高,MPs会因疏水相互作用先发生热聚集而后降解。 α -SOH的加入会促进热处理MPs的降解,使加热后MPs的大分子条带(>170 ku)减弱,诱导蛋白的 α -螺旋结构向 β -折叠和 β -转角转变。热处理MPs结构从规则向无序状态转变的过程中,会改变蛋白对 α -SOH的表面吸附或物理包裹状态,其中60℃或70℃加热的MPs更有利于形成较稳定的 α -SOH/MPs复合物。 α -SOH通过与TRPV1受体的L681结合从而激活麻味。本试验明晰了肉制品热加工过程中蛋白的结构变化及其与 α -SOH的互作机制,探索了 α -SOH引起的麻味感知机理,可为川菜肉类菜肴的麻味吸附和保持提供理论基础。



注:CAP:辣椒素;Piperine:胡椒碱。
图11 CAP、Piperine、 α -SOH对接TRPV1受体氨基酸位点示意图

Fig.11 Schematic diagram of amino acid sites of CAP, Piperine, and α -SOH docked to TRPV1 receptor

参 考 文 献

- [1] ZHUO Z H, XU D P, PU B, et al. Predicting distribution of *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. in China[J]. Bmc Ecology, 2020, 20(1): 1-10.
- [2] LUO J J, HOU X Y, LI S S, et al. Degradation and transformation mechanisms of numbing substances: Hydroxyl- α -sanshool & hydroxyl- β -sanshool from *Zanthoxylum bungeanum* exposed to acid environment[J]. Food Chemistry: X, 2022, 14: 100342.
- [3] XIAO S, ZHANG Y Q, SONG P P, et al. The investigation of allosteric regulation mechanism of analgesic effect using SD rat taste bud tissue biosensor[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2019, 126: 815-823.

- [4] 贺文杰. 三种常用香辛料的主效成分对卤鸭腿品质影响及机理研究[D]. 武汉: 武汉轻工大学, 2021.
HE W J. Study on the effect and mechanism of main ingredients of three common spices on the quality of braised duck legs [D]. Wuhan: Wuhan Polytechnic University, 2021.
- [5] 徐丹萍, 蒲彪, 叶萌, 等. 花椒中麻味物质的呈味机理及制备方法研究进展[J]. 食品科学, 2018, 39(13): 304-309.
XU D P, PU B, YE M, et al. A review on the mechanism of the perception of pungent compounds in prickly ash and methods for their preparation[J]. Food Science, 2018, 39(13): 304-309.
- [6] BABUSKIN S, BABU P A S, SASIKALA M, et al. Antimicrobial and antioxidant effects of spice extracts on the shelf life extension of raw chicken meat[J]. International Journal of Food Microbiology, 2014, 171: 32-40.
- [7] 阚建全, 陈科伟, 任廷远, 等. 花椒麻味物质的生理作用研究进展[J]. 食品科学技术学报, 2018, 36(1): 11-17.
KAN J Q, CHEN K W, REN T Y, et al. Review on physiological function of alkylamide compounds from *Zanthoxylum bungeanum* [J]. Journal of Food Science and Technology, 2018, 36(1): 11-17.
- [8] CHEN Q A, LIU Q A, SUN Q X, et al. Flavour formation from hydrolysis of pork sarcoplasmic protein extract by a unique LAB culture isolated from Harbin dry sausage[J]. Meat Science, 2015, 100: 110-117.
- [9] GUICHARD E. Interactions between flavor compounds and food ingredients and their influence on flavor perception[J]. Food Reviews International, 2002, 18(1): 49-70.
- [10] WANG H T, ZHU J M, ZHANG H W, et al. Understanding interactions among aldehyde compounds and porcine myofibrillar proteins by spectroscopy and molecular dynamics simulations[J]. Journal of Molecular Liquids, 2022, 349: 118190.
- [11] GUICHARD E. Flavour retention and release from protein solutions[J]. Biotechnology Advances, 2006, 24(2): 226-229.
- [12] SHEN H, ZHAO M M, SUN W Z. Effect of pH on the interaction of porcine myofibrillar proteins with pyrazine compounds[J]. Food Chemistry, 2019, 287: 93-99.
- [13] WANG K, ARNTFIELD S D. Binding of carbonyl flavours to canola, pea and wheat proteins using GC/MS approach [J]. Food Chemistry, 2014, 157: 364-372.
- [14] VENTANAS S, MUSTONEN S, PUOLANNE E, et al. Odour and flavour perception in flavoured model systems: Influence of sodium chloride, umami compounds and serving temperature[J]. Food Quality and Preference, 2010, 21(5): 453-462.
- [15] 魏鑫淼, 杨启帆, 田家豪, 等. TRPV1通道的功能、门控机制及其调节剂在药物研发中的应用[J]. 生物化学与生物物理进展, 2023, 50(3): 421-436.
WEI X M, YANG Q F, TIAN J H, et al. The function and gating mechanism of TRPV1 channel and the application of its modulators in drug research and development[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2023, 50(3): 421-436.
- [16] ZHAO X C, QI J, FAN C X, et al. Ultrasound treatment enhanced the ability of the porcine myofibrillar protein to bind furan compounds: Investigation of underlying mechanisms[J]. Food Chemistry, 2022, 384: 132472.
- [17] SHI H B, KHAN I A, ZHANG R Y, et al. Evaluation of ultrasound-assisted L-histidine marination on beef M. semitendinosus: Insight into meat quality and actomyosin properties[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2022, 85: 105987.
- [18] 申辉. 猪肉肌原纤维蛋白与特定风味化合物的相互作用机制研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2019
SHEN H. The interaction mechanism of porcine myofibrillar proteins with typical flavor compounds [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2019.
- [19] 江燕竹. 花椒麻味物质的分离纯化以及抗氧化性能研究[D]. 成都: 西华大学, 2016.
JIANG Y Z. Isolation, purification and antioxidative properties of numb-taste components from *Zanthoxylum bungeanum* [D]. Chengdu: Xihua University, 2016.
- [20] 万红兵, 李海鹏, 雷元华, 等. 烹饪熟度对牛肉肌原纤维蛋白结构特性和氧化特性的影响[J]. 食品科学, 2021, 42(13): 17-25.
WAN H B, LI H P, LEI Y H, et al. Effect of degree of doneness on structural and oxidation properties of beef myofibrillar protein[J]. Food Science, 2021, 42(13): 17-25.

- [21] JIA N, WANG L T, SHAO J H, et al. Changes in the structural and gel properties of pork myofibrillar protein induced by catechin modification[J]. *Meat Science*, 2017, 127: 45–50.
- [22] GAO R C, SHI T, SUN Q C, et al. Effects of *L*-arginine and *L*-histidine on heat-induced aggregation of fish myosin; Bighead carp (*Aristichthys nobilis*) [J]. *Food Chemistry*, 2019, 295: 320–326.
- [23] 畅鹏, 杜鑫, 杨东晴, 等. 蛋白质热聚集行为机理及其对蛋白质功能特性影响的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(24): 318–325.
- CHANG P, DU X, YANG D Q, et al. Research progress on the mechanism of protein thermal aggregation behavior and its influence on functional properties of protein[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(24): 318–325.
- [24] LIANG K, ZHAO J B, ZHANG G G, et al. Bio-based cross-linked polyitaconamides synthesized through a Michael ene-amine addition and bulk polycondensation [J]. *Journal of Polymer Research*, 2020, 27(3): 1–10.
- [25] 张旭东, 斯琴其木格, 曾睿, 等. 不同热处理条件下羊血浆蛋白体外模拟消化研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(18): 6049–6056.
- ZHANG X D, SI Q Q M G, ZENG R, et al. Research on *in vitro* digestion of sheep plasma protein under different heat treatment conditions[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2022, 13(18): 6049–6056.
- [26] CHEN Q, KONG B H, HAN Q, et al. The role of bacterial fermentation in the hydrolysis and oxidation of sarcoplasmic and myofibrillar proteins in Harbin dry sausages[J]. *Meat Science*, 2016, 121: 196–206.
- [27] 张兴, 杨玉玲, 马云, 等. pH对肌原纤维蛋白及其热诱导凝胶非共价键作用力与结构的影响[J]. *中国农业科学*, 2017, 50(3): 564–573.
- ZHANG X, YANG Y L, MA Y, et al. Effects of pH on the non-covalent forces and structure of myofibrillar protein and heat induced gel[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2017, 50(3): 564–573.
- [28] 何蜀峰, 李孟孟, 孙杨赢. 水解对低盐猪肉肌原纤维蛋白结构和功能特性的影响[J/OL]. *食品工业科技*: 1–14. (2023–07–05)[2023–08–19]. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023040162>.
- HE S F, LI M M, SUN Y Y. Effect of hydrolysis on structure and properties of duck myofibrillar protein in low-salt condition[J/OL]. *Science and Technology of Food Industry*: 1–14. (2023–07–05)[2023–08–19]. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023040162>.
- [29] ZHANG L, WANG P, YANG Z Y, et al. Molecular dynamics simulation exploration of the interaction between curcumin and myosin combined with the results of spectroscopy techniques[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 101: 105455.
- [30] SHI J H, PAN D Q, WANG X X, et al. Characterizing the binding interaction between antimalarial artemether (AMT) and bovine serum albumin (BSA): Spectroscopic and molecular docking methods[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2016, 162: 14–23.
- [31] ZHANG Z Y, REGENSTEIN J M, ZHOU P, et al. Effects of high intensity ultrasound modification on physicochemical property and water in myofibrillar protein gel[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2017, 34: 960–967.
- [32] 王正雯, 田宏伟, 周富裕, 等. 加热温度对麻鸭肌原纤维蛋白结构与凝胶特性的影响[J]. *食品科学*, 2020, 41(13): 61–68.
- WANG Z W, TIAN H W, ZHOU F Y, et al. Effect of heating temperature on myofibrillar protein structure and gel properties of sheldrake breast muscle[J]. *Food Science*, 2020, 41(13): 61–68.
- [33] 陈怡静, 李萍, 康雨薇, 等. 干热处理对杏鲍菇蛋白质功能和结构的影响[J]. *食品研究与开发*, 2022, 43(19): 103–108.
- CHEN Y J, LI P, KANG Y W, et al. Effect of dry heat treatment on the function and structure of *Pleurotus eryngii* protein[J]. *Food Research and Development*, 2022, 43(19): 103–108.
- [34] QI J, ZHANG W W, FENG X C, et al. Thermal degradation of gelatin enhances its ability to bind aroma compounds: Investigation of underlying mechanisms[J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 83: 497–510.
- [35] SUN X X, ZHANG D, ZHAO L, et al. Antagonistic interaction of phenols and alkaloids in Sichuan pepper (*Zanthoxylum bungeanum*) pericarp[J]. *Industrial Crops and Products*, 2020, 152: 112551.
- [36] BADER M, STARK T D, DAWID C, et al. All-trans-configuration in *Zanthoxylum* alkylamides swaps the tingling with a numbing sensation and diminish-

- es salivation [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(12): 2479–2488.
- [37] KUROKI S, HAGURA N, NISHIDA S, et al. Sanshool on the fingertip interferes with vibration detection in a rapidly-adapting (RA) tactile channel[J]. *PloS One*, 2016, 11(12): e0165842.
- [38] GAO Y, CAO E H, JULIUS D, et al. TRPV1 structures in nanodiscs reveal mechanisms of ligand and lipid action[J]. *Nature*, 2016, 534(7607): 347.
- [39] LIAO M F, CAO E H, JULIUS D, et al. Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy[J]. *Nature*, 2013, 504(7478): 107.
- [40] YANG F, VU S, YAROV-YAROV V, et al. Rational design and validation of a vanilloid-sensitive TRPV2 ion channel[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(26): E3657–E3666.
- [41] DONG Y W, YIN Y, VU S M, et al. A distinct structural mechanism underlies TRPV1 activation by piperine [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2019, 516(2): 365–372.

The Interaction between Hydroxy- α -Sanshool and Myofibrillar Proteins and Its Numbness Taste Perception Mechanism

Wang Shuaiqian¹, Jiang Diandian¹, Tang Jie^{1,2}, Jiang Zhengju^{1,2}, Zhao Jie^{1,2*}

¹*School of Food and Bioengineering, Xihua University, Chengdu 610039*

²*Chongqing Key Laboratory of Speciality Food Co-Built by Sichuan and Chongqing, Chengdu 610039*

Abstract Hydroxy- α -sanshool (α -SOH), an amide in peppercorns, interacts with proteins to enhance the numbness of meat dishes in Sichuan cuisine. In order to clarify the structural changes and attachment of the two in meat processing, this experiment explored the mechanism of heat-induced (60, 70, 90 °C) interactions between pork myofibrillar proteins (MPs) and α -SOH, and resolved the mechanism of numbness activation of α -SOH by molecular docking. The results showed that α -SOH increases the surface hydrophobicity of α -SOH/MPs complexes and promotes the depolymerization of heat-treated MPs. Moreover, the N-H bond in the amide group of α -SOH readily formed stabilizing hydrogen bonds between amino acid residues and altered the subunit aggregation state of the protein, thereby significantly attenuating the bands larger than 45 ku on SDS-PAGE. Fluorescence mapping and circular dichroism results confirmed that α -SOH leads to the transition of protein secondary structure from a regular to a disordered state. Moderately heat-treated (60 °C and 70 °C) MPs were more likely to form complexes with α -SOH, thus reducing the free α -SOH content. The molecular docking results showed that α -SOH activation of hemp flavor was produced by binding to L681 on the TRPV1 receptor. This experiment elucidates the mechanism of interaction between MPs and α -SOH as well as the mechanism of activation of numbness, which can provide a theoretical basis for the regulation of numbness in the processing of meat products.

Keywords myofibrillar proteins; hydroxy- α -sanshool; interaction mechanism; TRPV1; numbness