

绿原酸对肌原纤维蛋白-葡萄糖模拟体系中荧光性晚期糖基化终末产物生成的影响

申广, 庞英, 张晓悦, 王静, 尉立刚*
(山西大学生命科学学院, 山西太原 030006)

摘要: 该研究以鸡胸肉为研究对象, 提取肌原纤维蛋白 (Myofibrillar Protein, MP), 随后以 MP 和葡萄糖为反应原料构建模拟体系, 利用荧光光谱仪来调查不同质量浓度绿原酸 (0、20、40、80 和 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 对模拟体系中 MP 氧化和荧光性晚期糖基化终末产物 (Fluorescent Advanced Glycation End Products, fAGEs) 生成的影响。结果显示: 随绿原酸质量浓度的增加 (从 0 增加到 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$), fAGEs 的荧光强度从 14.29 显著降至 8.89 ($P<0.05$)。同时, 在高质量浓度的绿原酸条件下 (160 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 羰基含量也出现明显的下降 (从 30.34 降至 22.30 $\text{nmol}/\text{mg pro}$) ($P<0.05$); 硫代巴比妥酸 (Thiobarbituric Acid Reactive Substances, TBARS) 值从 17.11 降至 0.08 $\text{mg}/\text{kg pro}$ ($P<0.05$), 因此, 绿原酸的添加可有效抑制 MP 和肌内脂肪的氧化。此外, 绿原酸与 MP 的分子对接结果表明绿原酸可通过与 MP 中赖氨酸和精氨酸结合的方式来抑制 fAGEs 的生成。因此, 绿原酸在预防肉制品中 fAGEs 的生成有着巨大的应用前景, 该研究期望为鸡肉中 MP 氧化和 fAGEs 形成提供一种新的抑制方法。

关键词: 晚期糖基化终末产物; 绿原酸; 肌原纤维蛋白; 氧化; 分子对接

文章编号: 1673-9078(2025)02-357-365

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.2.0061

Effects of Chlorogenic Acid on Formation of Fluorescent Advanced Glycation End Products in a Myofibrillar Protein-Glucose Model System

SHEN Guang, PANG Ying, ZHANG Xiaoyue, WANG Jing, YU Ligang*

(College of Life Sciences, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: A model system was constructed using chicken myofibrillar protein (MP) and glucose. The study investigated the effects of different mass concentrations (0, 20, 40, 80, and 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of chlorogenic acid on MP oxidation and formation of fluorescent advanced glycation end products (fAGEs) in the model system. The fluorescence intensity of fAGEs remarkably decreased from 14.29 to 8.89 ($P<0.05$) as the mass concentration of chlorogenic acid increased from 0 to 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Meanwhile, the carbonyl content significantly decreased from 30.34 to 22.30 $\text{nmol}/\text{mg-pro}$ ($P<0.05$) at a high mass concentration of chlorogenic acid (160 $\mu\text{g}/\text{mL}$), while the thio barbituric acid reactive substances reduced from 17.11 to

引文格式:

申广, 庞英, 张晓悦, 等. 绿原酸对肌原纤维蛋白-葡萄糖模拟体系中荧光性晚期糖基化终末产物生成的影响[J]. 现代食品科技, 2025, 41(2): 357-365.

SHEN Guang, PANG Ying, ZHANG Xiaoyue, et al. Effects of chlorogenic acid on formation of fluorescent advanced glycation end products in a myofibrillar protein-glucose model system [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(2): 357-365.

收稿日期: 2024-01-13

基金项目: 山西省基础研究计划 (自由探索类) 面上项目 (202203021211311)

作者简介: 申广 (1999-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工与组分变化, E-mail: 202123118028@email.sxu.edu.cn

通讯作者: 尉立刚 (1983-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品加工与组分变化, E-mail: yuligang@sxu.edu.cn

0.08 mg/kg pro ($P < 0.05$). Consequently, the chlorogenic acid prevented oxidation of MP and intramuscular fat. In addition, molecular docking results showed that chlorogenic acid inhibited fAGE formation by binding with lysine and arginine in MP. In short, chlorogenic acid shows great prospects for application in preventing fAGE formation in meat products. This study demonstrated a new method to inhibit MP oxidation and fAGE formation in chicken meat.

Key words: advanced glycation end products; chlorogenic acid; myofibrillar protein; oxidation; molecular docking

晚期糖基化终末产物 (Advanced Glycation End Products, AGEs) 是食品加工过程中还原糖和蛋白质 (或氨基酸) 分子内重排和氧化形成的^[1]。目前, AGEs 有两种类型, 即荧光 AGEs (Fluorescent AGEs, fAGEs) (如戊糖素) 和非荧光 AGEs (如羧甲基赖氨酸、羧乙基赖氨酸和吡咯素)^[2]。戊糖素作为食品体系中稳定的 fAGEs, 经常被用作食品研究中 fAGEs 的标志产物。这些化合物被认为与多种慢性疾病有关, 如糖尿病、阿尔茨海默病、动脉粥样硬化等^[3]。因此, 膳食 AGEs 对人类健康和食品科学的影响备受关注。

肉类是人们日常摄入蛋白质的重要来源之一。鸡肉是一种具有高蛋白、低脂肪的白色肉类, 在其生产加工工艺中, 因蛋白质和脂肪的氧化, 不可避免地导致了 AGEs 的生成。如何有效的控制 AGEs 的生成成为了人们关心的问题。绿原酸, 作为一种绿色、安全的天然植物多酚, 广泛存在于花椒和茴香等香辛料当中。目前, 研究显示绿原酸有着诸多的生物活性, 在抗氧化、抗炎、抗肿瘤、降血压、降血糖、降血脂、抗白血病等方面有着巨大的潜力^[4]。目前, 关于绿原酸的研究主要集中在生物活性和临床治疗等方面。如: Ihara 等^[5]的发现绿原酸可减轻 2 型糖尿病发病, 改善胰岛 β 细胞的功能不全; Delfanian 等^[6]证明绿原酸对小鼠肝损伤有一定的保护作用。绿原酸对 fAGEs 的抑制研究主要以植物提取物为研究对象, Tsuji-Naito 等^[7]研究了菊花提取物对 AGEs 的影响; Zhao 等^[8]研究了黑枸杞多酚对 AGEs 的抑制作用。然而, 关于绿原酸对肉制品中肌原纤维蛋白氧化和 fAGEs 生成的抑制还鲜有报道。

因此, 本研究拟将不同浓度的绿原酸 (0、20、40、80 和 160 $\mu\text{g/mL}$) 加入肌原纤维蛋白 (Myofibrillar Protein, MP)-葡萄糖模拟体系, 利用 Fenton 体系分别对其氧化处理 0、3 和 5 h, 随后对模拟体系中 fAGEs、硫代巴比妥酸物质 (Thiobarbituric Acid Reactive Substances, TBARS)、羰基、巯基、表面疏水性和内源性色氨酸荧光进行测定, 利用分子对接

模拟技术来预测绿原酸与肌原纤维蛋白可能的结合位点, 从而探明绿原酸对 MP 氧化及 fAGEs 生成的影响, 为绿原酸在食品生产加工过程中的应用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 原料

新鲜的鸡胸肉, 山西省太原市美特好超市, 置于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的冰箱保存。乙二醇二乙醚二胺四乙酸 (EGTA), 上海罗恩试剂有限公司; 1,4-哌嗪二乙磺酸 (Piperazine-1,4-bisethanesulfonic acid, PIPES, 纯度 $\geq 99\%$)、绿原酸、盐酸胍、溴酚蓝 (Bromophenol Blue, BPB), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 乙二胺四乙酸 (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid, EDTA)、5,5'-二硫双 (2-硝基苯甲酸) (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid), DTNB)、十二烷基硫酸钠 (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS)、三氯乙酸 (Trichloroacetic Acid, TCA)、2,4-二硝基苯肼 (2,4-Dinitrophenylhydrazine, DNPH)、硫代巴比妥酸 (Thiobarbituric Acid, TBA)、尿素, 均为分析纯, 北京索莱宝科技有限公司。

1.2 主要仪器设备

LS-55 荧光分光光度计, 铂金埃尔默仪器有限公司; UV-2550 紫外可见光分光光度计, 日本日立公司; TMS-PRO 质构仪, 北京盈盛恒泰科技有限责任公司; HH-2 数显恒温水浴锅, 常州越新仪器有限公司; NS800 型分光测色仪, 深圳市三恩时科技有限公司; PH-20WB 笔式酸度计, 杭州齐威仪器有限公司; QT-1 型涡旋振荡器, 上海琪特分析仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 MP的提取

蛋白质提取的方法依据 Feng 等^[9]的描述, 并做出一些修改。鸡肉在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下解冻, 切割成条状, 与四倍

体积的僵直液 (10 mmol/L Na₂HPO₄, 0.1 mol/L NaCl, 2 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L EGTA, pH 值 7.0) 混合后, 用搅拌机搅拌 1 min。随后, 在 3 340 r/min 条件下离心 15 min, 弃上清液, 上述操作重复三次。所得沉淀加入四倍质量体积比的 NaCl 溶液 (0.1 mol/L), 用 0.1 mol/L HCl 调节 pH 值至 6.25。溶液用 100 目纱布过滤, 离心 (3 340 r/min, 20 min) 后弃上清液, 得到 MP。以 BSA 为标准品, 双缩脲法测定 MP 质量浓度, 4 °C 冰箱保存备用。

1.3.2 模拟体系的构建

依据 Niu 等^[10]和 Sery 等^[11]的描述来构建模拟体系, 并作出一定的修改。MP 和葡萄糖用 15 mmol/L PIPES 缓冲液溶解, 质量浓度比为 1:2。加入不同量的绿原酸溶液 (1 mg/mL), 使其最终质量浓度为 0、20、40、80 和 160 μg/mL。混合均匀后滴加 FeCl₃, 抗坏血酸和 H₂O₂, 构建 Fenton 氧化体系, 在 4 °C 环境下氧化 0、3 和 5 h, 对其蛋白质氧化指标及 fAGEs 的荧光强度进行测定。

1.3.3 模拟体系中 fAGEs 的测定

参照 Robaszkiewicz 等^[12]的研究, 利用荧光分光光度计对 fAGEs 进行测定。用 PIPES 缓冲液使样品的质量浓度降至 0.5 mg/mL, 仪器参数设置为: 狭缝宽度 5 nm, 激发波长 340 nm, 发射波长 430 nm。以得到的荧光强度表示 fAGEs 的含量。

1.3.4 羰基含量的测定

根据 Levine 等^[13]的描述并做出一些修改, 取 100 μL 样品与 4 mL 的 10 mmol/L DNPH (用 2 mol/L HCl 溶解) 混匀。以 2 mol/L HCl 为空白对照组。样品在黑暗条件下反应 1 h, 每隔 10 min 旋涡一次。用 1 mL 20% TCA 将蛋白质沉淀。在 4 °C 下, 离心 (9 000 r/min) 15 min。用 3 mL 6 mol/L 的盐酸胍将沉淀溶解。溶液在 50 °C 条件下水浴 30 min。记录样品在 370 nm 的吸光值, 羰基含量按如下公式计算:

$$D = \frac{A_{370}}{\varepsilon} \times \frac{10^6}{C} \quad (1)$$

式中:

D —蛋白质的羰基含量, nmol/mg pro;

A_{370} —样品的吸光值;

ε —22 400 L/(mol·cm);

C —MP 质量浓度, mg/mL。

1.3.5 总巯基的测定

总巯基采用 Beveridge 等^[14]的方法。蛋白样品用 pH 值 6.0 的 20 mmol/L 磷酸缓冲液调整至 2 mg/mL。1 mL 蛋白质稀释液与 4 mL 含 8 mol/L 尿素, 3% SDS 的磷酸缓冲液均匀混合。随后, 加入 1 mL DTNB 溶液, 涡旋震荡 30 s 后, 黑暗反应条件下放置 30 min。对照组以磷酸缓冲液代替反应样品, 记录其在 412 nm 处的吸光值。按下列公式计算总巯基含量:

$$Q = \frac{73.53 \times A \times D}{C} \quad (2)$$

式中:

Q —蛋白质的巯基含量, nmol/mg pro;

A —样品在 412 nm 处的吸光值;

D —稀释倍数;

C —MP 质量浓度, mg/mL。

1.3.6 残留脂肪氧化的测定

TBARS 的测定参考 Cao 等^[15]的描述, 并略作修改。取 5 mL 反应液, 与 3 mL 1 wt.% TBA (溶于 0.075 mol/L NaOH 溶液) 和 17 mL 2.5 wt.% TCA (溶于 0.036 mol/L HCl 溶液) 在 50 mL 具塞试管中混匀。混合物于 100 °C 水浴中反应 30 min 后, 冷水浴冷却。10 mL 上清液与 10 mL 氯仿充分混合后, 4 500 r/min 离心 15 min。6 mL 上层液体与 3 mL 石油醚密封混匀, 4 500 r/min 离心 15 min。记录下层液体在 532 nm 的吸光值。空白对照组为 15 mmol/L PIPES 溶液, 计算公式如下:

$$T = \frac{A_1 - A_2}{m} \times 9.48 \quad (3)$$

式中:

T —样品的 TBARS, mg/kg pro;

A_1 —样品在 532 nm 处的吸光值;

A_2 —空白组在 532 nm 处的吸光值;

m —样品质量, mg。

1.3.7 表面疏水性的测定

表面疏水性参考 Chelh 等^[16]的描述。用 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 值 6.0) 使样品的质量浓度降至 5 mg/mL, 1 mL 蛋白稀释液与 200 μL 溴酚蓝溶液 (1 mg/mL) 搅拌混匀后, 于 4 000 r/min 离心 20 min。吸取 0.5 mL 上清液定容至 5 mL, 记录样品在 595 nm 处的吸光值。以不含蛋白的反应液

设置空白对照组, 表面疏水性表达为BPB结合量:

$$S = \frac{A_3 - A_4}{A_3} \times 200 \quad (4)$$

式中:

S —BPB结合量, μg ;

A_3 —空白的吸光值;

A_4 —样品的吸光值。

1.3.8 内源性色氨酸的测定

用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (含 0.6 mol/L NaCl, pH 值 6.25) 使样品的质量浓度降至 0.4 mg/mL。荧光分光光度计参数设置: 狭缝宽度 5 nm, 激发波长 279 nm, 发射波长 304.5~460.0 nm。绘制蛋白样品溶液的发射荧光曲线。

1.3.9 分子对接模拟

利用鸡肉 MP (UniProt-P14105) 和绿原酸进行分子对接研究, 鸡肉 MP 的 3D 结构来自于蛋白质数据库 (<https://www.uniprot.org/>), 绿原酸的 3D 结构来自于 PubChem。利用 AutoDock 4.2 软件对 MP 和绿原酸进行分子对接模拟, 所得结果利用 PYMOL 绘制。

1.3.10 数据分析

试验均设三个平行实验组, 结果用均值 \pm 标准偏差的形式表示。利用 IBM SPSS Statistics 25 软件对实验数据进行方差分析和显著性分析 (LSD 法), Origin 2023b 被用来描绘实验结果, 实验结果中的不同字母代表差异显著 ($P < 0.05$)。使用 AutoDock 4.2.6 进行分子对接模拟, 并利用 PYMOL 对结果进行绘制。

2 结果与讨论

2.1 绿原酸对 fAGEs 的影响

如表 1, 在不含绿原酸的氧化组内, 随着氧化时间的延长, fAGEs 的荧光强度由 13.98 升至 14.29, 总体呈现上升趋势。这意味着随着氧化时间的延长, fAGEs 被不断地合成。在氧化 5 h 的体系中, 随着绿原酸质量浓度从 0 $\mu\text{g/mL}$ 到 160 $\mu\text{g/mL}$, fAGEs 的荧光强度从 14.29 下降至 8.89, 下降率为 37.79%, 下降趋势明显 ($P < 0.05$)。这些结果表明在高质量浓度绿原酸条件下, fAGEs 的生成得到了有效的抑制。在 Liu 等^[17]的研究中, 绿原酸在以葡萄糖为还原糖的环境中, 可以抑制 AGEs 的生成。

表 1 氧化时间和绿原酸质量浓度对 fAGEs 的影响

氧化时间/h	绿原酸质量浓度/($\mu\text{g/mL}$)				
	0	20	40	80	160
0	13.99 \pm 0.02 ^{Ca}	12.54 \pm 0.03 ^{Bb}	11.41 \pm 0.01 ^{Cc}	11.28 \pm 0.01 ^{Bd}	9.14 \pm 0.01 ^{Ac}
3	14.63 \pm 0.03 ^{Aa}	12.68 \pm 0.05 ^{Ab}	11.67 \pm 0.00 ^{Bc}	11.59 \pm 0.01 ^{Ad}	9.08 \pm 0.01 ^{Bc}
5	14.29 \pm 0.06 ^{Ba}	12.23 \pm 0.02 ^{Cb}	11.77 \pm 0.01 ^{Ac}	11.26 \pm 0.01 ^{Bd}	8.89 \pm 0.00 ^{Ca}

注: 不同字母 (A~C) 表示在相同质量浓度下不同氧化时间之间存在显著差异 ($P < 0.05$); 不同字母 (a~e) 表示在相同氧化时间下不同质量浓度之间存在显著差异 ($P < 0.05$)。表 2、3 同。

表 2 氧化时间和绿原酸质量浓度对残余脂肪氧化的影响

氧化时间/h	绿原酸质量浓度/($\mu\text{g/mL}$)				
	0	20	40	80	160
0	1.35 \pm 0.07 ^{Ca}	0.42 \pm 0.19 ^{Cb}	1.69 \pm 0.26 ^{Ca}	0.67 \pm 0.19 ^{Bb}	0.63 \pm 0.13 ^{Ab}
3	17.11 \pm 0.19 ^{Aa}	12.98 \pm 0.51 ^{Ab}	8.17 \pm 0.19 ^{Ad}	10.79 \pm 0.48 ^{Ac}	0.08 \pm 0.07 ^{Bc}
5	9.44 \pm 0.26 ^{Ba}	8.38 \pm 0.26 ^{Bb}	4.13 \pm 0.19 ^{Bc}	1.14 \pm 0.25 ^{Bd}	0.42 \pm 0.15 ^{Ac}

表 3 氧化时间和绿原酸质量浓度对羰基、巯基和表面疏水性的影响

Table 3 Effects of oxidation time and chlorogenic acid mass concentration on carbonyl, sulfhydryl and surface hydrophobicity

氧化时间/h	质量浓度/($\mu\text{g/mL}$)	羰基/(nmol/mg-pro)	巯基/(nmol/mg-pro)	表面疏水性/ μg
0	0	$21.41 \pm 0.05^{\text{Cb}}$	$87.65 \pm 0.56^{\text{Ab}}$	$93.07 \pm 0.21^{\text{Ca}}$
	20	$21.61 \pm 0.06^{\text{Ca}}$	$89.05 \pm 0.46^{\text{Aa}}$	$93.56 \pm 0.18^{\text{Ca}}$
	40	$21.65 \pm 0.02^{\text{Ca}}$	$86.40 \pm 0.67^{\text{Ac}}$	$82.83 \pm 0.15^{\text{Cb}}$
	80	$20.13 \pm 0.06^{\text{Cc}}$	$74.71 \pm 0.84^{\text{Ae}}$	$62.46 \pm 0.39^{\text{Bc}}$
	160	$20.16 \pm 0.09^{\text{Cc}}$	$80.22 \pm 0.92^{\text{Ad}}$	$38.18 \pm 0.31^{\text{Bd}}$
	3	0	$26.49 \pm 0.03^{\text{Ba}}$	$77.50 \pm 1.44^{\text{Bc}}$
20		$24.48 \pm 0.03^{\text{Bb}}$	$87.65 \pm 0.78^{\text{Aa}}$	$102.34 \pm 0.32^{\text{Ab}}$
40		$24.39 \pm 0.03^{\text{Bc}}$	$82.87 \pm 1.78^{\text{Bb}}$	$86.73 \pm 0.24^{\text{Bc}}$
80		$21.19 \pm 0.03^{\text{Bc}}$	$67.50 \pm 4.61^{\text{Be}}$	$69.85 \pm 0.32^{\text{Ad}}$
160		$22.13 \pm 0.03^{\text{Bd}}$	$71.77 \pm 0.13^{\text{Bd}}$	$42.29 \pm 0.32^{\text{Ac}}$
5		0	$30.34 \pm 0.10^{\text{Aa}}$	$72.72 \pm 0.92^{\text{Cb}}$
	20	$25.87 \pm 0.04^{\text{Ab}}$	$82.06 \pm 0.66^{\text{Ba}}$	$99.87 \pm 0.24^{\text{Bb}}$
	40	$24.69 \pm 0.03^{\text{Ac}}$	$74.09 \pm 2.08^{\text{Cb}}$	$87.50 \pm 0.09^{\text{Ac}}$
	80	$24.14 \pm 0.06^{\text{Ad}}$	$66.69 \pm 0.51^{\text{Cc}}$	$61.16 \pm 0.24^{\text{Cd}}$
	160	$22.30 \pm 0.03^{\text{Ad}}$	$61.10 \pm 1.01^{\text{Cd}}$	$29.05 \pm 0.24^{\text{Ce}}$

2.2 绿原酸对残余脂肪的影响

如表 2, 在对照组中, 当氧化时间到达 3 h, TBARS 从 1.35 升至 17.11 mg/kg pro。值得注意的是在 5 h 的氧化体系中, TBARS 随着氧化时间的延长, 从 17.11 降至 9.44 mg/kg pro。这可能是由于在强氧化条件下, 脂肪氧化次级产物与蛋白质的氨基酸侧链发生反应^[18]。随着绿原酸的添加, TBARS 总体出现了明显的下降。在氧化 3 h 的体系中, TBARS 从 17.11 降至 0.08 mg/kg pro; 在氧化 5 h 的体系中, TBARS 从 9.44 降至 0.42 mg/kg pro。以上结果显示, 绿原酸可以有效地减缓脂肪的氧化。曹云刚等^[19]在研究中发现多酚类物质对肉制品的脂肪氧化有抑制作用。多酚类物质对脂肪氧化的抑制可以通过清除自由基来阻断脂肪氧化的自由基链传播反应, 也可以通过捕获羰基来抑制脂肪的氧化进程^[20]。

2.3 绿原酸对蛋白质羰基的影响

如表 3 所示, 在无绿原酸的对照组内, 随着不断增加的氧化时间, 蛋白质羰基含量从 21.41 升至 30.34 nmol/mg pro, 出现明显的上升 ($P < 0.05$)。

变化趋势与曹云刚等^[21]的研究一致。导致羰基上升的原因一方面是由于蛋白质氨基酸侧链的氧化, 另一方面来自脂肪氧化次级产物 (尤其是丙二醛) 与氨基酸侧链的共价结合^[22]。这也印证了脂肪氧化的结果。在含绿原酸的氧化 (5 h) 体系中, 随着绿原酸质量浓度提高到 160 $\mu\text{g/mL}$, 羰基含量从 30.34 降至 22.30 nmol/mg pro。蛋白质羰基含量随着绿原酸质量浓度的提升而下降, 这表明着绿原酸阻断了蛋白质羰基的合成路径。Qiu 等^[23]的研究中发现绿原酸的加入, 可以有效地抑制蛋白质的氧化, 降低羰基的含量。

2.4 绿原酸对蛋白质总巯基的影响

如表 3 所示, 不含绿原酸的对照组中巯基含量为 87.65 nmol/mg pro。随着氧化进程的延长, 巯基含量在氧化 5 h 后下降了 13.86%。蛋白质的 S-H 基团在氧化过程中转化为了二硫键。在含 20 $\mu\text{g/mL}$ 绿原酸的氧化 (5 h) 体系中, 巯基含量为 82.06 nmol/mg pro, 高于不含绿原酸的氧化 (5 h) 体系。在高质量浓度绿原酸的体系中, 巯基含量出现了明显的降低。在

绿原酸质量浓度达到 80 $\mu\text{g/mL}$ ，未氧化模型、氧化（3 h）模型、氧化（5 h）模型中，巯基含量均出现明显下降，但巯基含量仅下降了 10.73%。这些结果意味着绿原酸对蛋白质的氧化有抑制作用，但可能由于酚酸类物质在氧化条件下与巯基生成硫醇酮类加合物，加剧了巯基的消耗^[24]。Cao 等^[25]的研究中巯基含量降低，蛋白质的巯基因绿原酸的添加呈现明显下降。这些结果表明绿原酸并不能缓解巯基的损失。

2.5 绿原酸对蛋白质内源性色氨酸的影响

如图 1a 所示，随着氧化的发生，蛋白质的荧光强度呈现出明显的降低。这意味由羟基自由基引起的蛋白质氧化使蛋白质的空间结构和极性环境发生改变，从而导致了色氨酸荧光的损失^[26]。同时可观察到分别在未氧化模型（图 1b），氧化（3 h）模型（图 1c），氧化（5 h）模型（图 1d）中，随着绿原酸质量浓度的上升，内源性色氨酸荧光强度降低。这可能是绿原酸和蛋白质发生共价或者非共价结合，改变了蛋白质的空间结构，猝灭了内源性色氨酸的荧光，Cao 等^[25]的研究中蛋白质的空间结构因绿原酸的加入而发生改变。

2.6 绿原酸对蛋白质表面疏水性的影响

如表 3 所示，在对照组中，随着氧化的开始（0~3 h），BPB 结合量从 93.07 升至 107.88 μg ，上升了 15.92%；在氧化 5 h 后，又由 107.88 降至 105.26 μg ，下降了 2.43%。这可能是在氧化胁迫下包裹在蛋白内部的疏水基团暴露出来，从而导致 BPB 的结合量升高；随着氧化程度的不断加深，蛋白质发生分子间结合，交联凝聚，将疏水基团包裹在内部，表面疏水性呈下降趋势。在含绿原酸的模型中，表面疏水性的变化率降低。在含 160 $\mu\text{g/mL}$ 绿原酸的模型中，从未氧化到氧化 3 h，表面疏水性上升了 9.72%，低于不含绿原酸的模型中表面疏水性的上升趋势。Li 等^[27]的研究中发现蛋白在轻度氧化时表面疏水性轻微上升，在强氧化条件下，表面疏水性呈下降趋势。值得注意的是，对照组中绿原酸从 0 到 160 $\mu\text{g/mL}$ ，表面疏水性显著下降了 58.98% ($P < 0.05$)。这可能是由于绿原酸诱导蛋白质交联屏蔽了部分疏水基团。这些结果也印证了绿原酸与蛋白质结合，导致了构象的变化。前人的研究表明，迷迭香酸诱导蛋白质发生交联，导致了表面疏水性的降低^[28]。

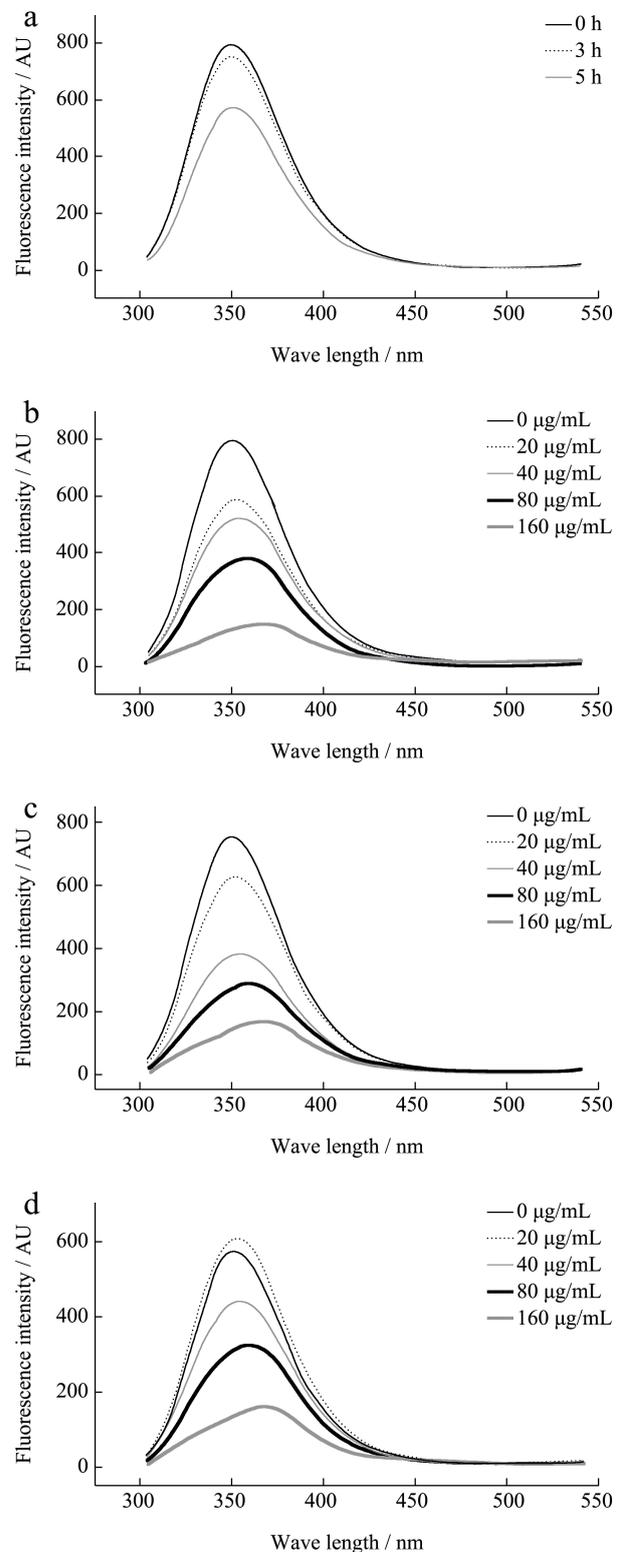


图 1 氧化时间和绿原酸浓度对内源性色氨酸荧光的影响

Fig.1 Effects of oxidation time and chlorogenic acid concentration on the endogenous tryptophan fluorescence

注：(a) 不含绿原酸的模型中荧光曲线谱图；(b) 含绿原酸的未氧化模型中荧光曲线谱图；(c) 含绿原酸的氧化（3 h）模型中荧光曲线谱图；(d) 含绿原酸的氧化（5 h）模型中荧光曲线谱图。

表 4 氧化时间及绿原酸浓度与MP各项指标、fAGEs的相关性分析

Table 4 Correlation analysis between oxidation time and chlorogenic acid concentration and each index of MP and fAGEs

	质量浓度	氧化时间	fAGEs	羰基	巯基	TBARS	表面疏水性
质量浓度	1	0	-0.67**	-0.43**	-0.42**	-0.54**	-0.62**
氧化时间		1	0.25	0.82**	-0.74**	0.09	-0.59**
fAGEs			1	0.66**	0.02	0.58**	0.38*
羰基				1	-0.40**	0.46**	-0.25
巯基					1	-0.00	0.58**
TBARS						1	0.35*
表面疏水性							1

注: *表示差异显著, $P < 0.05$; **表示差异极显著, $P < 0.01$ 。

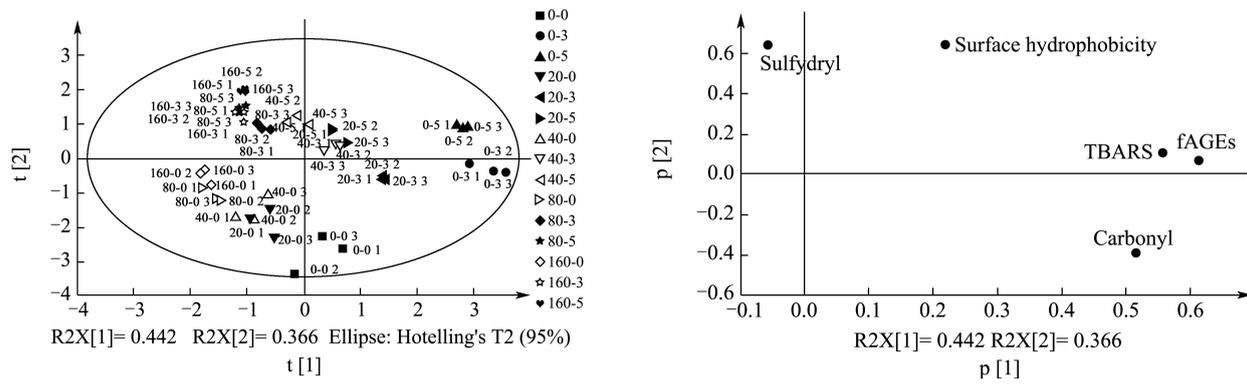


图 2 绿原酸对 MP 的氧化及 fAGEs 影响的主成分分析 (PCA)

Fig. 2 PCA of effects of chlorogenic acid on MP oxidation and fAGEs

注: 0-0: 对照组; 0-3: 氧化 3 h 的对照组; 0-5: 氧化 5 h 的对照组; 20-0: 含 20 $\mu\text{g/mL}$ 绿原酸的未氧化体系; 20-3: 含 20 $\mu\text{g/mL}$ 绿原酸的氧化 (3 h) 体系; 20-5: 含 20 $\mu\text{g/mL}$ 绿原酸的氧化 (5 h) 体系; 40-0: 含 40 $\mu\text{g/mL}$ 绿原酸的未氧化体系; 40-3: 含 40 $\mu\text{g/mL}$ 绿原酸的氧化 (3 h) 体系; 40-5: 含 40 $\mu\text{g/mL}$ 绿原酸的氧化 (5 h) 体系; 80-0: 含 80 $\mu\text{g/mL}$ 绿原酸的未氧化体系; 80-3: 含 80 $\mu\text{g/mL}$ 绿原酸的氧化 (3 h) 体系; 80-5: 含 80 $\mu\text{g/mL}$ 绿原酸的氧化 (5 h) 体系; 160-0: 含 160 $\mu\text{g/mL}$ 绿原酸的未氧化体系; 160-3: 含 160 $\mu\text{g/mL}$ 绿原酸的氧化 (3 h) 体系; 160-5: 含 160 $\mu\text{g/mL}$ 绿原酸的氧化 (5 h) 体系。

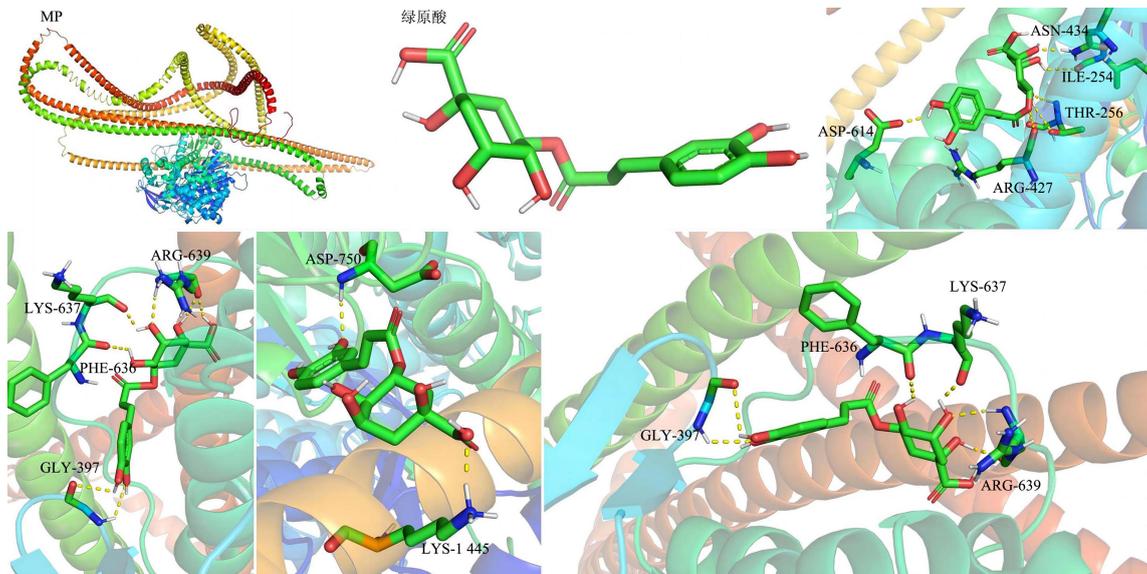


图 3 绿原酸与 MP 的分子对接模拟

Fig.3 Molecular docking simulation of chlorogenic acid and MP

2.7 相关性分析

为了解绿原酸与蛋白氧化及 fAGEs 生成之间的联系, 对其进行了相关性分析。如表 4 所示, 氧化时间与 MP 羰基、TBARS 呈现显著正相关; 与巯基、凝胶强度、白度呈现极显负相关, 这些表明氧化的发生导致了蛋白质羰基衍生物的生成, 同时大量的 S-H 基团转化为二硫键。fAGEs 与羰基、TBARS 呈现极显正相关; 羰基与 TBARS 呈现极显正相关。因此, fAGEs 的生成与模型中蛋白质及脂质的氧化有关, 其可能是羰基和脂肪氧化产物为 fAGEs 的生成提供了重要的前体物质及生成环境, 同时脂肪的氧化也催化了 MP 的氧化。绿原酸与 fAGEs、蛋白质羰基、巯基、TBARS 和表面疏水性呈现极显负相关; 与凝胶强度呈现极显正相关。这些结果表明, 绿原酸对蛋白氧化及 fAGEs 的生成起到了调控作用, 保护了 MP 热诱导形成的网状结构。

为了进一步探明绿原酸与蛋白氧化及 fAGEs 的联系, 对各项指标进行了主成分分析 (PCA)。如图 2, 得分图 (PC1 vs PC2) 占总方差的 80.8%, 各样本点相对独立。含 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 绿原酸的样本点落在得分图的左下角, 氧化对照组的样本点落在得分图的右侧, 这意味着绿原酸的加入会使体系发生显著性变化。载荷图中 fAGEs、TBARS、羰基的矢量位于中心轴的右侧, 与高质量浓度 (160 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的样本点位置相反, 这表明 fAGEs、TBARS、羰基在高质量浓度的绿原酸条件下含量最低。因此, 绿原酸对模拟体系中蛋白氧化及 fAGEs 生成有抑制作用。

基于上述实验结果, 利用分子对接模拟对绿原酸抑制 fAGEs 生成的机制进行研究。一般来说, 分子对接的结合能小于 0 kcal/mol, 这个结合是能够不需要外力影响而发生的^[29]。分子对接展示了绿原酸可以通过氢键连接 MP 上的氨基酸残基, 且结合能低于 0 kcal/mol。如图 3 所示, 绿原酸与 MP 的结合位点有赖氨酸 (Lysine, LYS), 精氨酸 (Arginine, ARG), 天冬氨酸 (Aspartic acid, ASP), 甘氨酸 (Glycine, GLY) 等, 四次对接结果的结合能分别为 -3.93、-3.11、-2.98 和 -2.79 kcal/mol。其中, LYS 和 ARG 是 fAGEs 生成的重要前体物质^[30]。因此, 绿原酸可能通过与 LYS 和 ARG 发生非共价结合来减少游离的 LYS 和 ARG 的含量, 从而抑制 fAGEs 的生成。

3 结论

本文主要研究了绿原酸对模拟体系中蛋白氧化及 fAGEs 生成的抑制。结果表明: 绿原酸的加入可以降低脂肪的氧化程度; 较高质量浓度 (160 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的绿原酸可以有效抑制羰基和 fAGEs 的生成。分子对接结果表明, 绿原酸可能通过与 LYS 和 ARG 的非共价结合, 来抑制 fAGEs 的生成。因此, 在鸡肉中加入绿原酸可以抑制蛋白质的氧化和 fAGEs 的生成, 减少食源性 fAGEs 摄入的风险。

参考文献

- [1] LU J, LI M, HUANG Y, et al. A comprehensive review of advanced glycosylation end products and N-Nitrosamines in thermally processed meat products [J]. Food Control, 2022, 131: 108449.
- [2] POULSEN M W, HEDEGAARD R V, ANDERSEN J M, et al. Advanced glycation endproducts in food and their effects on health [J]. Food and Chemical Toxicology, 2013, 60: 10-37.
- [3] 龚频, 裴舒亚, 韩业雯, 等. 食源性晚期糖基化终末产物对人体的健康危害研究进展 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(6): 443-451.
- [4] 李望, 秦佳梅. 绿原酸提取分离及其生物活性研究进展 [J]. 人参研究, 2023, 35(1): 43-50.
- [5] IHARA Y, ASAHARA S I, INOUE H, et al. Chlorogenic acid and caffeine in coffee restore insulin signaling in pancreatic beta cells [J]. The Kobe Journal of Medical Sciences, 2023, 69(1): E1.
- [6] DELFANIAN M, SAHARI M A, BARBA F J. Effect of lipophilized gallic acid on the oxidative stability of omega-3 fatty acids rich soy and cow milk [J]. LWT, 2023, 190: 115475.
- [7] TSUJI-NAITO K, SAEKI H, HAMANO M. Inhibitory effects of Chrysanthemum species extracts on formation of advanced glycation end products [J]. Food Chemistry, 2009, 116(4): 854-859.
- [8] ZHAO W, CAI P, ZHANG N, et al. Inhibitory effects of polyphenols from black chokeberry on advanced glycation end-products (AGEs) formation [J]. Food Chemistry, 2022, 392, 133295.
- [9] FENG X, CHEN L, LEI N, et al. Emulsifying properties of oxidatively stressed myofibrillar protein emulsion gels prepared with (-)-Epigallocatechin-3-gallate and NaCl [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(13): 2816-2826.
- [10] NIU L, LAI K, HUANG Y. Sodium chloride inhibits the heat-induced formation of advanced glycation end-products in

- myofibrillar protein-reducing sugar-oleic acid model systems [J]. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2024, 18(2): 1293-1301.
- [11] SREY C, HULL G L J, CONNOLLY L, et al. Effect of inhibitor compounds on N ϵ -(carboxymethyl) lysine (CML) and N ϵ -(carboxyethyl) lysine (CEL) formation in model foods [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(22): 12036-12041.
- [12] ROBASZKIEWICZ A, BARTOSZ G, SOSZYŃSKI M. N-chloroamino acids cause oxidative protein modifications in the erythrocyte membrane [J]. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2008, 129(10): 572-579.
- [13] LEVINE R L, GARLAND D, OLIVER C N, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins Meth Enzymol [J]. *Methods in Enzymology*, 1990, 186: 464-478.
- [14] BEVERIDGE T, TOMAS J, NAKAI S. Determination of SH- and SS-groups in some food proteins using Ellman's reagent [J]. *Journal of Food Science*, 1974, 39(1): 49-51.
- [15] CA O Y, TRUE A D, CHEN J, et al. Dual role (anti-and pro-oxidant) of gallic acid in mediating myofibrillar protein gelation and gel *in vitro* digestion [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(15): 3054-3061.
- [16] CHELH I, GATELLIER P, SANTÉ-LHOUTELLIER V. A simplified procedure for myofibril hydrophobicity determination [J]. *Meat Science*, 2006, 74(4): 681-683.
- [17] LIU L, HEDEGAARD R V, SKIBSTED L H. Effect of plant polyphenols on the formation of advanced glycation end products from β -lactoglobulin [J]. *Food Science and Biotechnology*, 2017, 26: 389-391.
- [18] CHO C Y. Fish nutrition, feeds, and feeding: with special emphasis on salmonid aquaculture [J]. *Food Reviews International*, 1990, 6(3): 333-357.
- [19] 曹云刚,李颖,李春强,等.石榴皮提取物对猪肉饼冷藏过程中脂肪氧化稳定性的影响[J].*肉类研究*,2018,32(12): 14-18.
- [20] 王颂萍,钟强,杨欣悦,等.多酚抑制脂肪氧化的作用机理及其在肉制品中应用的研究进展[J].*食品工业科技*, 2022,43(10):417-425.
- [21] 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.
- [22] 章银良,安巧云,杨慧.脂肪氧化对蛋白质结构的影响[J].*食品科学*,2012,33(1):25-30.
- [23] QIU X, WU Y, YANG S, et al. Effects of rosemary extract and chlorogenic acid on lipid and protein oxidation in the sous vide processed large yellow croaker fillet product during cold storage [J]. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 2023, 32(6-7): 543-553.
- [24] JONGBERG S, GISLASON N E, LUND M N, et al. Thioloquinone adduct formation in myofibrillar proteins detected by LC-MS [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(13): 6900-6905.
- [25] CAO Y, XIONG Y L. Chlorogenic acid-mediated gel formation of oxidatively stressed myofibrillar protein [J]. *Food Chemistry*, 2015, 180: 235-243.
- [26] 魏娜.羟自由基和过氧自由基氧化对鸭肉肌原纤维蛋白结构及凝胶特性的影响[D].重庆:西南大学,2022.
- [27] LI C, XIONG Y L, CHEN J. Oxidation-induced unfolding facilitates myosin cross-linking in myofibrillar protein by microbial transglutaminase [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(32): 8020-8027.
- [28] WANG S, ZHANG Y, 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, 243: 50-57.
- [29] 张俊霞,晁利芹,王付.基于网络药理学与分子对接技术探讨六味地黄丸治疗抑郁症的作用机制[J].*中医学报*, 2022,37(8):1719-1726.
- [30] LIN J A, WU C H, YEN G C. Perspective of advanced glycation end products on human health [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(9): 2065-2070.