

槲皮素、芦丁与大豆分离蛋白非共价作用机制 及其功能性和消化性研究

赵钜阳¹, 袁惠萍², 孙昕萌³, 金聪⁴

(1. 哈尔滨商业大学 药物研究所博士后科研工作站, 黑龙江 哈尔滨 150030;

2. 郑州科技学院 食品科学与工程学院, 河南 郑州 450064;

3. 江苏旅游职业学院 烹饪科技学院, 江苏 扬州 225000;

4. 哈尔滨商业大学 旅游烹饪学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 黄酮具有较强的抗氧化、抑菌等作用, 但其溶解性差, 消化率较低, 限制了其应用范围。本文分析了槲皮素-大豆分离蛋白与芦丁-大豆分离蛋白复合物功能性(溶解性、乳化性、凝胶性)和消化性的变化, 并利用紫外可见光谱法、荧光光谱法研究互作机理, 解析了其荧光淬灭类型、结合位点数以及热力学参数。结果发现两种黄酮均可提高 SPI 的功能性质, 随着槲皮素(除添加量 8%外)和芦丁添加量的增加, 分别呈现对 SPI 凝胶性的影响无显著性差异 ($P < 0.05$) 及先增加后下降的趋势, 槲皮素与芦丁添加量分别为 8%时, SPI 凝胶强度可分别提高 23.23%及 187.18%; 随着槲皮素和芦丁添加量的增加, SPI 的 EAI 和 ESI 分别呈现先增加后趋于平缓的趋势及先增加后略有下降的趋势, 槲皮素与芦丁添加量分别为 6%和 4%时, SPI 乳化活性可分别提高 20.84%及 26.17%; 随着槲皮素和芦丁添加量的增加, SPI 溶解性分别呈现先增加后趋于平缓的趋势及先增加后下降的趋势, 槲皮素与芦丁添加量分别为 4%和 6%时, SPI 溶解性可提高 10.06%和 19.27%。此外槲皮素、芦丁分别与 SPI 相互作用后还可提高蛋白的生物利用度, 进一步研究两种黄酮多酚与 SPI 互作机制表明, 两种互作复合物的荧光光谱均发生蓝移现象, 槲皮素、芦丁与 SPI 自发结合, 并主要通过氢键和范德华力方式作用, 其中槲皮素、芦丁与 SPI 互作机制分别为动态淬灭及静态淬灭。

关键词 槲皮素; 芦丁; 溶解性; 乳化性; 凝胶性; 消化特性; 非共价作用

Effects of Quercetin and Rutin on the Functional and Digestive Properties of Soy Protein Isolate

Zhao Juyang¹, Yuan Huiping², Sun Xinmeng³, Jin Cong⁴

(1. Postdoctoral Programme of Meteria Medical Institute, Harbin University of Commerce, Harbin 150030, China;

2. School of Food Science and Engineering, Zhengzhou University of Science and Technology, Zhengzhou 450064,

China;

3. Institute of Culinary Technology, Jiangsu Vocational College of Tourism, Jiangsu Yangzhou 225000, China;

4. College of Tourism and Cuisine, Harbin University of Commerce, Harbin 150030, China)

Abstract: Flavonoids has been well recognized to possess biological and pharmacological properties, including antioxidant, anti-inflammatory. However, the extremely low solubility in water and low bioavailability of curcumin greatly limit its application in food or drug formulations. The changes of function (solubility, emulsification, gelation) and digestibility of soybean protein isolate were analyzed. The interaction mechanism was studied by UV-vis spectroscopy and fluorescence spectroscopy. Then, the interaction information of fluorescence quenching type, binding site number and thermodynamic parameters were analyzed. It was found that two types of flavonoid could improve the functional properties of SPI. With the increase of quercetin (except addition of 8%), the gel properties of SPI had no significant difference ($P < 0.05$). With the increase of rutin addition, SPI gel increased first and then decreased. When the addition of quercetin and rutin were added at 8%, the SPI gel strength could be increased by 23.23% and 187.18% respectively. With the increase of quercetin, the EAI and ESI of SPI increased first and then tended to be flat. With the increase of rutin, the EAI and ESI of SPI increased first and then decreased slightly. When quercetin was added at 6% and rutin were added at 4%, the emulsifying activity of SPI increased by 20.84% and 26.17%, respectively. With the increase of quercetin, the solubility of SPI increased first and then tended to be flat. With the increase of rutin, the solubility of SPI increased first and then decreased. When quercetin was added at 4% and rutin were added at 6%, the solubility of SPI could be increased by 10.06% and 19.27%, respectively. In addition, the interaction of quercetin and rutin interacts with SPI can also improve the bioavailability of protein. The fluorescence spectra of the two interaction complexes had a slight blue shift of the maximum wavelength. The interaction mechanism between two types of flavonoid polyphenols and SPI were studied. Quercetin and rutin spontaneously combine with SPI were mainly driven by hydrogen bond and van der Waals force. The interaction mechanisms between rutin and SPI were a dynamic quenching and a static quenching, respectively.

Keywords: quercetin; rutin; solubility; emulsification; gelation; digestibility; non-covalent interaction

黄酮类多酚具有较强的抗氧化^[1]、抑菌^[2]、抗衰老^[3]等功效，并参与癌症、炎症、糖尿病等疾病的治疗^[4]。蛋白质是食物的重要组成成分，而多酚作为次级代谢产物大量存在于植物中。蛋白质和多酚是多种食品中共存的重要成分，食品系统的成分多种多样，成分之间的相互作用对食品的生产、加工和营养价值起着至关重要的作用。

蛋白质和多酚之间的相互作用可生成“蛋白质-多酚复合物”，在大多数食品系统中自发进行。多酚与蛋白质相互作用方式主要分为非共价和共价相互作用^[5]，其中非共价相互作用具有作用方式简便，无副产物等优势，主要通过氢键、范德华力和疏水力等方式作用。目前已有相关学者研究发现，多酚/蛋白相互作用会影响蛋白质的部分功能性质，如蛋白质与多酚相互作用会导致蛋白质分子的净电荷发生变化，从而影响蛋白质的溶解性^[6]。由于蛋白质的溶解性是其其他功能性质的前提，研究也发现多酚与蛋白非共价相互作用还可提高蛋白的乳化能力及凝胶能力，如表没食子儿茶素没食子酸酯^[7]与乳清蛋白互作可提高乳清蛋白乳化活性，裘乐芸等^[8]研究发现添加表没食子儿茶素没食子酸并微波加热后肌原纤维蛋白的凝胶强度可提高 89.8%。但另一方面，研究也发现多酚/蛋白复合后，蛋白质消化特性会受到负面影响，如 Petzke 等^[9]研究发现绿原酸与乳清蛋白相互作用后会降低乳清蛋白的消化率，刘勤勤等^[10]研究表明茶多酚的添加不利于大豆分离蛋白在胃肠道里的消化吸收。然而诸如槲皮素、芦丁等此类黄酮多酚与 SPI 互作后，对 SPI 功能特性的影响及其机制研究还不明晰。

因此本文通过构建两种黄酮（槲皮素、芦丁）与 SPI 复合物，分别考察槲皮素、芦丁对 SPI 部分功能性与体外模拟胃肠道消化性的影响，以期开发新型多功能黄酮类多酚的蛋白型包合物，为 SPI、槲皮素和芦丁的应用范围提供新思路 and 基础依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

大豆分离蛋白 纯度 98.54%，实验室自提；槲皮素 纯度>98%，酷尔化学科技有限公司；芦丁， 纯度>98%，合肥博美生物科技有限公司；胃蛋白酶 酶活力 1: 3000、胰脂肪酶 酶活力 30000 u/g、胰酶 酶活力 1: 4000、胆盐 纯度≥60%，均来自于上海源叶生物科技有限公司。

TMS-Touch 250N 质构仪， Food Technology Corporation；H1850R 高速离心机， 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司；UV-800 紫外可见分光光度计， 上海元析仪器有限公司；K9860 全自动凯氏定氮仪， 山东海能科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 大豆分离蛋白提取

根据 Speroni 等^[11]研究方法, 采用碱溶酸沉法提取大豆分离蛋白。400 g 脱脂豆粕加入 6 L 蒸馏水中, 用 2 mol/L NaOH 调节至 pH 7.8, 搅拌 2 h 后, 将溶液于 4000 g 离心 15 min, 取其上清液用 2 mol/L 盐酸调节至 pH 4.5, 于 4 °C 环境静置 2 h, 倒去上清液, 将剩余的沉淀于 8000 g 下离心 10 min, 离心后取底部沉淀, 用 5 倍体积蒸馏水水洗后, 于 4000 g 离心 10 min, 用 2 mol/L NaOH 溶液调节至蛋白溶液 pH 7 即可, 溶液预先冷冻并真空干燥 48 h 研磨备用, 即可获得大豆分离蛋白。

1.2.2 SPI-槲皮素和 SPI-芦丁复合物制备

SPI-槲皮素和 SPI-芦丁复合物是通过非共价作用制备的^[12], 制备方法稍作修改如下: 将 1 g SPI 溶解在 49 mL 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲盐 (PBS, pH 7.0) 中, 向该混合物中添加不同比例 (0%、2%、4%、6%、8%、10%) 的芦丁和槲皮素于 25 °C 磁力搅拌器搅拌 2 h。将反应样品透析 48 h (分子量截止值: 8000–14000 Da), 每 6 h 更换一次水以确保完全透析, 使用紫外分光光度计记录透析液在槲皮素 374 nm, 芦丁 266 nm 处有没有吸收峰, 所有未反应的多酚被完全去除, 透析液预先冷冻并真空干燥 48 h 备用。

1.2.3 复合物功能性的测定

1.2.3.1 溶解性的测定

称取适量槲皮素、芦丁与 SPI 复合物溶于 pH 7.0 的 0.01 mol/L PBS, 保证 SPI 浓度为 10 mg/mL, 于 8000×g, 15 min 离心, 取 0.1 mL 离心后的上清液, 加入 5 mL 考马斯亮蓝试剂, 充分混合, 放置 10 min, 以试剂空白为对照, 测定波长 595 nm 处的吸光度, 平行三次。根据上述所得标准蛋白浓度曲线公式 ($y=0.0788x-0.1063$, $R^2=0.9930$), 求得添加不同浓度槲皮素或芦丁下 SPI 的蛋白浓度^[13]。

1.2.3.2 乳化性和乳化稳定性测定

根据 Pan 等^[14]方法测定大豆蛋白乳化性和乳化稳定性。称取适量槲皮素、芦丁与 SPI 复合物, 保证 SPI 浓度为 10 mg/mL, 取 8 mL 配制好的样品加入 2 mL 的大豆油, 以 12000 r/min 高速匀浆 1 min 后, 立刻在试管底部取 50 μ L 样品, 然后加入到 5 mL 0.1% SDS 溶液中, 于 500 nm 处测定其吸光值, 后将取样后的样品于室温下静置 10 min, 再次取样, 测定方法同上, 实验平行三次。

乳化活性 (EAI) 及乳化稳定性 (ESI) 分别根据公式 (1) 及 (2) 进行计算:

$$\text{EAI} \left(\frac{\text{m}^2}{\text{g}} \right) = \frac{2 \times 2.303}{C \times (1 - \varphi) \times 10^4} \times A_0 \times \text{dilution} \quad (1)$$

$$\text{ESI} (\%) = \frac{A_{10}}{A_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中：EAI：1 g 蛋白质的乳化区域，单位为 m^2/g ，C:蛋白质浓度单位为 g/mL ； Φ ：油相体积分数 (v/v)，即油相占的比例，本实验中油相占 1/4，故 $\phi=0.25$ ；dilution：稀释倍数； A_0 ：500 nm 处 0 min 的吸光值； A_{10} ：500 nm 处 10 min 的吸光值。

1.2.3.3 凝胶性测定

称取适量槲皮素、芦丁与 SPI 复合物，保证 SPI 浓度为 $120 \text{ mg}/\text{mL}$ ，每组样品 90°C 水浴加热 30 min，冷却后放置于 4°C 冰箱中贮藏 12 h。测量前将样品取出，室温下稳定恢复 30 min，室温下用质构仪进行测量，选用 P/0.5 的探头，以凝胶强度进行测定，测前速度：60 mm/min，测试速度：120 mm/min，测后速度：300 mm/min，压缩型变量：40%，记录测试峰的顶点，即为测定凝胶的硬度 (N)。重复三次平行实验，取平均值^[15]。

1.2.4 消化特性测定

称取适量槲皮素、芦丁与 SPI 复合物，保证 SPI 浓度为 $10 \text{ mg}/\text{mL}$ ，采用模拟体外消化模型来测定大豆分离蛋白消化特性，参考 Brodkorb 等^[16]的消化模型，参考 Mao 等^[17]的方法制备模拟消化液，适当修改。胃液（包含 $2 \text{ g}/\text{L}$ NaCl、 $7 \text{ mL}/\text{L}$ HCl 和 $3.2 \text{ g}/\text{L}$ 胃蛋白酶）用 $1 \text{ mol}/\text{L}$ HCl 调节至 pH 1.2，预热至 37°C 后，与预热至 37°C 的样品以 1:1 的体积比混合，采用 $1 \text{ mol}/\text{L}$ NaOH 将混合体系 pH 迅速调节至 2.0，于 37°C 震荡 ($100 \text{ r}/\text{min}$) 消化 2 h。在胃消化 0 min、30 min、60 min、90 min、120 min 处各取消化样品，于 8000 g ，15 min 离心后分别测定其在 520 nm 条件下的吸光值。取 30.0 mL 胃消化后的食糜，用 $2 \text{ mol}/\text{L}$ NaOH 迅速将混合后的体系调至 pH 6.8，分别与 1.5 mL 电解质溶液（二水氯化钙 $36.70 \text{ mg}/\text{mL}$ 、氯化钠 $218.70 \text{ mg}/\text{mL}$ ），2.5 mL 胆盐溶液（胆盐 $0.08 \text{ mg}/\text{mL}$ ）和 3.5 mL 酶溶液（胰酶 $0.02 \text{ mg}/\text{mL}$ 、胰脂肪酶 $0.02 \text{ mg}/\text{mL}$ ）混合均匀，采用 $1 \text{ mol}/\text{L}$ NaOH 将混合体系 pH 迅速调节至 7.0，于 37°C 恒温震荡 ($100 \text{ r}/\text{min}$) 消化 2 h，分别在肠消化 0 min、30 min、60 min、90 min、120 min 处分别取消化样品，测定其在 520 nm 条件下的吸光值。

$$\text{生物利用度} = \frac{\text{已消化的蛋白质含量}}{\text{未消化的样品蛋白质含量}} \times 100\%$$

将各个时间点的样品离心后，已消化的蛋白质含量通过上清液的吸光值代入蛋白质含量标准曲线得出蛋白质含量。

1.2.5 紫外吸收光谱测定

用 10 mM ，pH 7.0 PBS 稀释至样品中蛋白质浓度为 $1 \text{ mg}/\text{mL}$ ，用紫外分光光度计扫描

其紫外吸收谱图，扫描波长范围为 200 nm 到 400 nm，扫描间隔 $\lambda=1$ nm，扫描速度：100 nm/min，其中用磷酸盐缓冲溶液作为空白调零^[18]。

1.2.6 荧光光谱测定

用 10 mM, pH 7.0 PBS 稀释至样品中蛋白质浓度为 0.1 mg/mL，测定样品的荧光光谱，设置激发波长 295 nm，扫描范围为 300 nm 到 500 nm，激发和发射狭缝宽为 5 nm，扫描速度为 500 nm/min，分别在 293 K 和 310 K 的恒温条件下收集荧光光谱信息，每组样品重复测定三次^[19]。

$$F_0 / F = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + k_{sv} [Q] \quad (3)$$

其中， F_0 为不添加槲皮素/芦丁时 SPI 的荧光强度； F 为添加槲皮素/芦丁时 SPI 荧光强度； k_q 为分子淬灭常数； k_{sv} 为 Stern-Volmer 淬灭常数； τ_0 为不添加槲皮素/芦丁时荧光物质的平均寿命（对于蛋白质等生物大分子，荧光寿命一般为 10^{-8} s）。将 Stern-Volmer 方程转化为公式（3）可进一步分析出儿茶素与 SPI 相互作用的结合位点数和结合常数。

$$\log \frac{(F_0 - F)}{F} = \log K_b + n \log [Q] \quad (4)$$

式中 K_b 为 SPI 与槲皮素/芦丁的结合常数， n 为二者结合的位点数，根据数据结果可绘制 $\log \frac{F_0 - F}{F}$ 与 $\log [Q]$ 的关系，并确定截距 K_b 和斜率 n 。

根据热力学参数的评估槲皮素/芦丁与 SPI 之间的相互作用力，由公式（5）、（6）和（7）推算槲皮素/芦丁与 SPI 结合的吉布斯自由能（ ΔG ）、焓变（ ΔH ）和熵变（ ΔS ）。

$$\Delta G = -RT \ln K_b \quad (5)$$

$$\ln \frac{K_{b1}}{K_{b2}} = \frac{\Delta H}{R} \left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1} \right) \quad (6)$$

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T} \quad (7)$$

1.3 数据处理

使用 statistix 8.0 软件分析数据的显著性。使用 Excel 和 Sigmaplot 14.0 软件进行表与图的制作。

2 结果与分析

2.1 复合体系溶解性分析

溶解度是蛋白质在复杂食品系统中发挥功能性质（如乳化特性）的先决条件^[20]。图 1

表示了槲皮素-SPI 复合物和芦丁-SPI 复合物中蛋白的溶解度，随着槲皮素添加量的增加，SPI 溶解性呈现先增加后趋于平缓的趋势，不同添加量槲皮素的溶解性显著高于对照组 ($P<0.05$)，槲皮素添加量为 4% 时，SPI 溶解性比对照组可提高 10.06%，这是由于槲皮素中含有羟基基团，通过氢键、疏水及静电吸附等方式与蛋白质结合^[21]，导致 SPI 亲水性增加，增强了 SPI 的水合作用，SPI 的溶解性有所提高。槲皮素添加量为 4%、6%、8% 和 10% 时与其他组之间存在显著性差异 ($P<0.05$)。可能是由于槲皮素的疏水基团数目有限，与 SPI 结合程度已达最大。由图 1 所示，随着芦丁添加量的增加，SPI 溶解性呈现先增加后下降的趋势，芦丁添加量为 6% 时，和对照组相比，SPI 溶解性可提高 19.27%，这是由于芦丁含有羟基基团能与水分子形成氢键，从而增强了蛋白的水合作用，因而 SPI 的溶解性有所提高，但 SPI 溶解度的下降可能是由于芦丁的浓度高，导致其与部分蛋白饱和发生稳定结合后，形成部分的相对稳定网状结构，形成絮状物沉淀^[22]，由此降低了 SPI 在水中的溶解度。已有相关研究人员^[23]发现，由于溶菌酶、核桃蛋白和马铃薯蛋白在内的蛋白质与酚类化合物的相互作用，其溶解度降低，可能由于是蛋白质的诱导交联以及蛋白质分子的净电荷和亲水/疏水性质改变的原因。

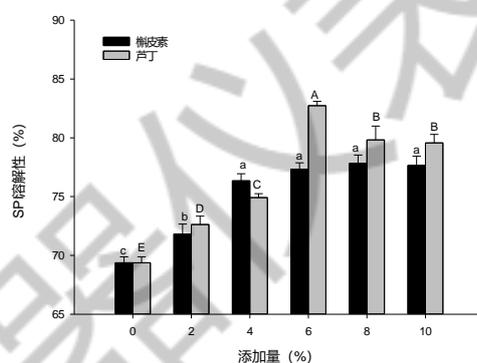


图 1 槲皮素-SPI 复合物和芦丁-SPI 复合物中蛋白的溶解度

2.2 复合体系乳化性的分析

图 a、b 表示了槲皮素-SPI 复合物和芦丁-SPI 复合物中蛋白的 EAI 和 ESI。由图可知，随着槲皮素添加量的增加，SPI 的 EAI 和 ESI 都呈现先增加后趋于平缓的趋势，添加槲皮素的 SPI 的 EAI 和 ESI 显著高于对照组 ($P<0.05$)，并且槲皮素添加量为 4% 时，和对照组相比，SPI 的 EAI 可提高 20.84%。蛋白质的乳化特性取决于其扩散到油/水界面的能力^[24]，SPI 可作为表面活性剂，吸附到油滴表面形成界面膜，稳定乳状液，EAI 的提高是由于暴露的芳香残基增加，从而导致蛋白质对油水界面的亲和力增加，且聚集的 SPI 形成了更厚的蛋白膜，

从而为液滴提供了更好的乳化稳定性^[25]。槲皮素的添加量为 6%、8%、10%时，此时 SPI 的 EAI 无显著性差异 ($P<0.05$)，可能是由于 SPI 暴露的芳香氨基酸数量不再增加。

如图所示 (图 a、b)，随着芦丁添加量的增加，SPI 的 EAI 和 ESI 都呈现先增加后略有下降的趋势，添加芦丁的 SPI 的 EAI 和 ESI 显著高于对照组 ($P<0.05$)，当芦丁添加量为 4% 时，和对照组相比，SPI 的 EAI 可提高 26.17%。SPI 与芦丁相互作用后的构象变化会影响其表面性质，从而形成稳定的乳液系统，因此，SPI-芦丁形成的乳液的稳定性优于 SPI 形成的乳液。后续对结构的研究结果表明槲皮素和芦丁诱导的蛋白质构象发生变化。因此 SPI 表面性质的构象变化导致乳化性能的改善。Li 等^[26]研究发现与花青素结合后，水稻蛋白的 EAI 和 ESI 得到了提高，原因可能是与花青素结合后蛋白质构象和界面行为改变有关。

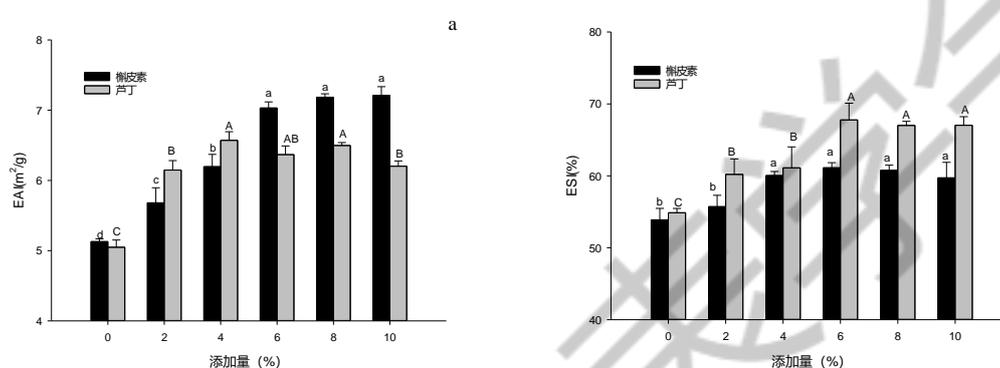


图 2 槲皮素-SPI 复合物和芦丁-SPI 复合物中蛋白的乳化活性及乳化稳定性

2.3 复合体系凝胶性的分析

图 3 表示槲皮素-SPI 复合物和芦丁-SPI 复合物中蛋白的凝胶强度，槲皮素添加量 (除添加量 8% 外) 对 SPI 凝胶性的影响无显著性差异 ($P<0.05$)，槲皮素的添加量在 8% 时，和对照组相比，SPI 凝胶性可提高 23.23%，此时 SPI 的凝胶性显著高于其他组 ($P<0.05$)，这是由于槲皮素酚羟基的数量少，氢键相互作用能力弱，但添加量在 8% 的槲皮素可能增加槲皮素与 SPI 的氢键相互作用力，从而影响凝胶的强度。随着芦丁添加量的增加，SPI 凝胶性呈现先增加后下降的趋势，不同添加量芦丁的 SPI 凝胶强度显著高于对照组，芦丁的添加量在 8% 时，和对照组相比，SPI 凝胶强度 SPI 凝胶性可提高 187.18%。这是由于芦丁与蛋白质相互作用后，蛋白分子间碰撞的机会和结合程度增加，氢键作用能力增加，从而增强了凝胶的强度。随着芦丁浓度的增加，与 SPI 结合的羟基数量逐渐增加，慢慢趋于饱和，多余的羟基与氨基酸残基继续反应，会破坏已形成的凝胶网络结构的稳固性，因此二者复合物的凝胶性降低^[27]。Yan 等^[28]研究表明芦丁和没食子酸可提高凝胶强度，其原因是没食子酸和芦丁分子在凝胶形成过程中主要与明胶分子的骨架和羧基相互作用。

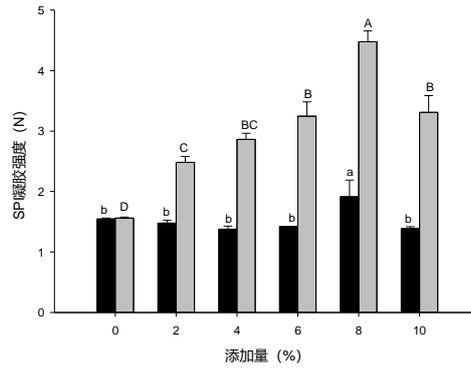


图3 槲皮素-SPI 复合物和芦丁-SPI 复合物中蛋白的凝胶强度

2.4 复合体系消化特性的分析

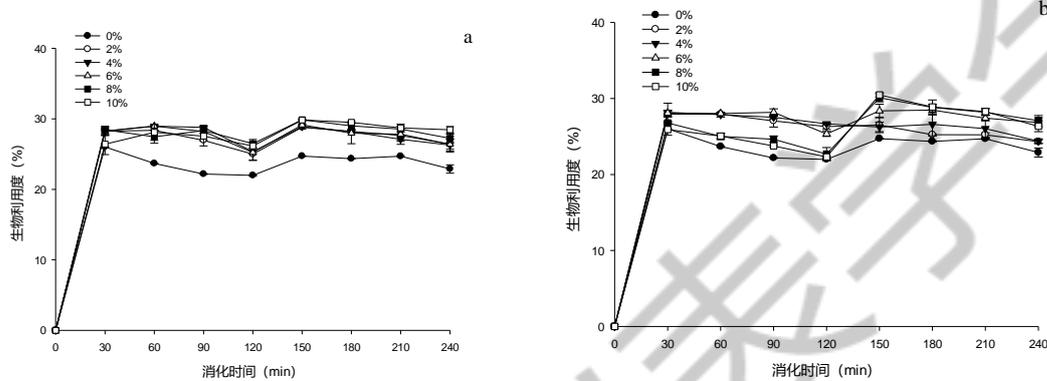


图4 槲皮素-SPI 复合物和芦丁-SPI 复合物中蛋白的胃肠消化

图4代表槲皮素-SPI复合物和芦丁-SPI复合物中蛋白的胃肠消化。添加槲皮素、芦丁的SPI生物利用度显著高于对照样 ($P < 0.05$)，这种现象可以归因于SPI经胰酶消化后可迅速被胆盐降解，槲皮素、芦丁的添加可以保护SPI被胆盐降解，槲皮素、芦丁的添加可以提高SPI的生物利用度。但是不同添加量的槲皮素、芦丁之间生物利用度并没有显著性差异 ($P < 0.05$)。SPI生物利用度在消化30 min时与其他组有显著性差异，这是因为刚开始阶段，胃蛋白酶充足，满足SPI消化的条件，随着消化时间的增加，胃蛋白酶被消化，从而SPI生物利用度略有降低。肠道消化阶段，除肠道消化240 min时，SPI的生物利用度无显著性差异 ($P < 0.05$)。Stojadinovic等^[29]研究发现多酚都能保护蛋白质免受胃蛋白酶消化的影响，从而导致蛋白质的肠道消化出现总体轻微延迟。Ozidal等^[30]研究发现，在含有缩合单宁和原花青素等多酚化合物的情况下，蛋白质的消化率降低，这些多酚化合物对消化酶具有抑制活性。

2.5 紫外-可见吸收光谱迁移分析

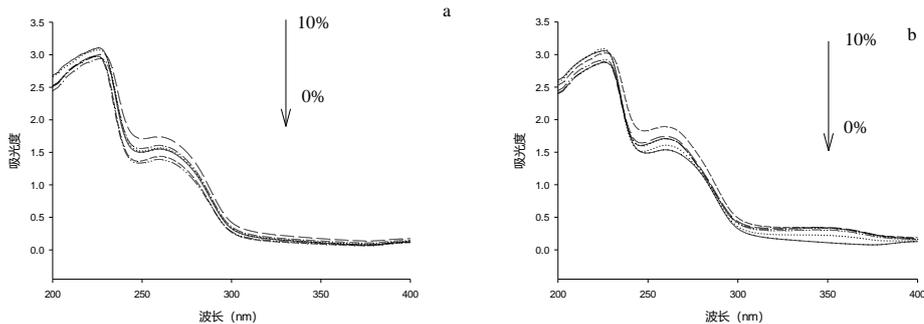


图5 槲皮素、芦丁不同添加量对大豆分离蛋白紫外可见光谱的影响

紫外-可见吸收光谱法是一种非常有效的方法，常被用于探索蛋白质的结构变化和研究配体-蛋白质复合物的形成。SPI 有两个吸收峰:由蛋白质肽键引起的强吸收峰(220 nm)和由芳香族氨基酸引起的弱吸收峰(280 nm)^[31]。图 7 表示了不同槲皮素、芦丁添加量对大豆分离蛋白紫外可见光谱的影响。随着槲皮素、芦丁的添加，SPI 在 280 nm 附近的吸收峰强度逐渐减小，而 SPI 在 220 nm 附近的吸收峰强度逐渐增大，槲皮素、芦丁在 200-300 nm 范围内没有吸收，因此，SPI 吸收强度的降低可能是槲皮素、芦丁与 SPI 相互作用的结果。加入槲皮素、芦丁后，吸收峰在 220 nm 附近增加，推测蛋白质肽键参与了槲皮素、芦丁与 SPI 相互作用的过程，且说明槲皮素、芦丁与 SPI 的结合引起了 SPI 的构象变化。

2.6 荧光淬灭机制分析

图 6 代表不同槲皮素、芦丁添加量对大豆分离蛋白荧光光谱及 Stern-Volmer 图的影响，在温度 298 K, 310K 条件下，随着槲皮素、芦丁的加入，箭头表示槲皮素、芦丁添加量从 0-10%，SPI 的荧光强度有明显减弱，且各温度下都表现出不同程度的蓝移现象，表明槲皮素、芦丁和 SPI 发生了相互作用使得部分色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸残基暴露，疏水环境的极性减弱，疏水性增加，肽链的伸展程度有所减弱^[32]，从而增加了蛋白分子间碰撞的机会和结合程度和氢键作用能力，凝胶的强度得到改善。槲皮素-SPI 复合物、芦丁-SPI 复合物由于疏水性增加且结构发生改变，SPI 溶解性、乳化性、凝胶性得到了提高。

表 1 代表槲皮素、芦丁与 SPI 反应过程淬灭常数及热力学参数信息，由表 1 可知根据不同添加量槲皮素、芦丁的 Stern-Volmer 公式可得到线性回归拟合方程已知动力学机制的最大动态猝灭常数为 $2.0 \times 10^{10} \text{ Lmol}^{-1}\text{s}^{-1}$ ^[33]，槲皮素引起的 SPI 淬灭速率常数小于动态猝灭的速率常数极限，因此，槲皮素对 SPI 的淬灭机制应为动态淬灭，且 K_{sv} 随温度的升高而升高，表明其机制为动态淬灭。而芦丁引起的 SPI 淬灭速率常数远大于动态猝灭的速率常数极限，因此，芦丁对 SPI 的淬灭机制应为静态淬灭，且 K_{sv} 随温度的升高而降低^[34]，表明其机制为静态淬灭。

结合位点结果表明槲皮素、芦丁与 SPI 之间形成比例约为 1: 1 的复合物。 $\Delta H > 0$ 、 $\Delta S > 0$ 主要表现为疏水作用力； $\Delta H < 0$ 、 $\Delta S < 0$ 主要表现为氢键和范德华力； $\Delta H < 0$ ， $\Delta S > 0$ 主要表现为静电作用力^[35]。经计算 $\Delta G < 0$ ，说明二者之间的相互作用自发进行，槲皮素 $\Delta H > 0$ ， $\Delta S > 0$ ，芦丁 $\Delta H > 0$ ， $\Delta S > 0$ ，因此室温状态下槲皮素、芦丁与 SPI 之间的相互作用方式以氢键和范德华力为主，表明槲皮素、芦丁与 SPI 之间是非共价相互作用。由于氢键和范德华力的存在改变了蛋白质的三级结构，同时改变了蛋白质的二级结构^[36]，导致疏水性基团的掩埋，亲水性基团与水相互作用增强，并进而影响蛋白质的溶解性等其他功能性质的变化。李楠等^[37]也得出类似的结论，薰衣草花色苷与牛血清蛋白之间的作用力是氢键和范德华力。

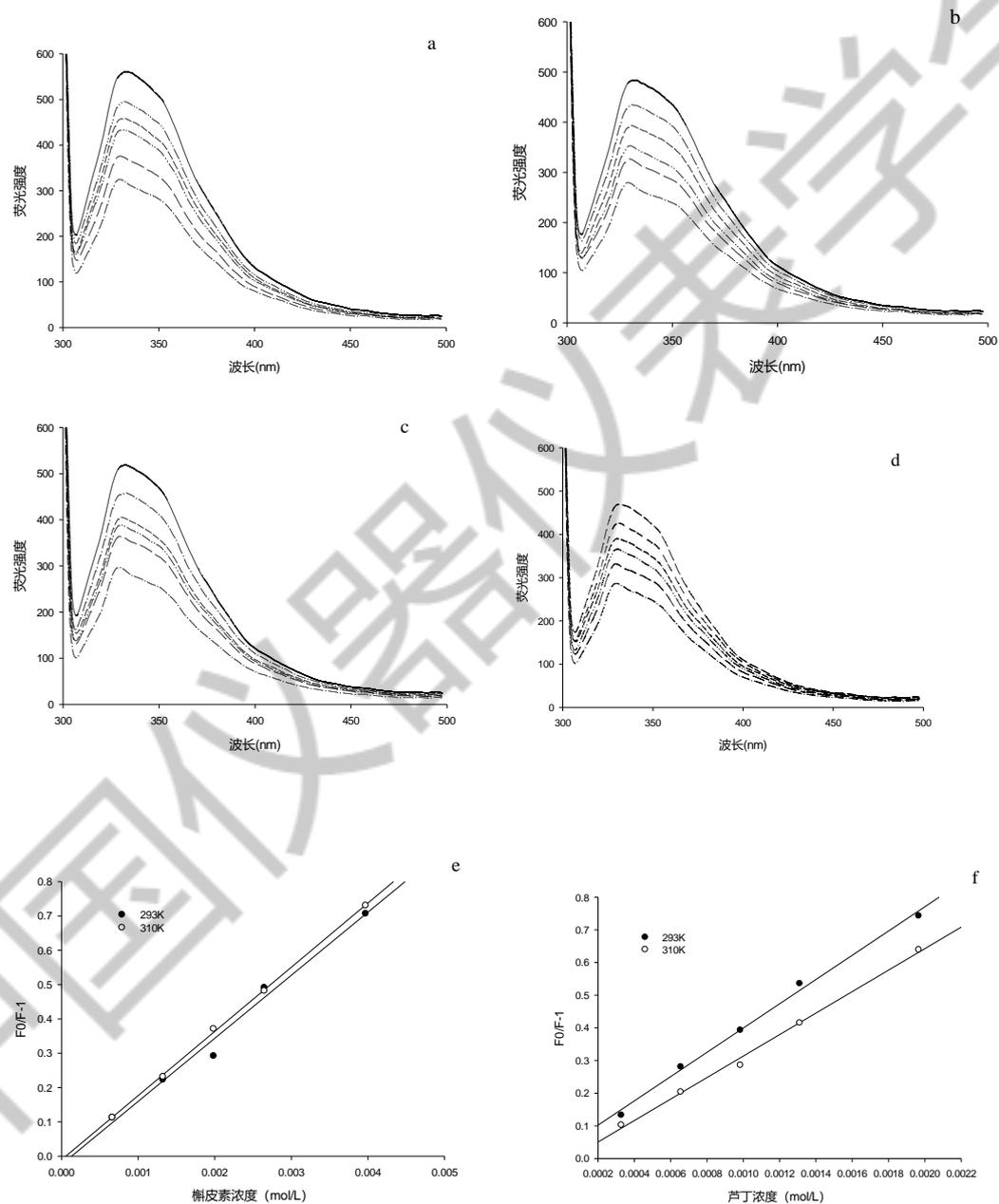


图6 槲皮素、芦丁不同添加量对大豆分离蛋白荧光光谱及 Stern-Volmer 图的影响

表1 槲皮素、芦丁与 SPI 反应过程淬灭常数及热力学参数信息

多酚	T	K_{sv}	K_q	R	K_a	n	ΔH	ΔS
	(K)	(10^2 L/mol)	(10^{10} L/ mol/s)		L/mol		(KJ/mo l)	(J/mol/ K)
槲皮素	293K	1.84	1.84	0.9845	206.87	1.0317	-82.19	-4.27
槲皮素	310K	1.87	1.87	0.9993	242.16	1.0473		
芦丁	293K	3.72	3.72	0.9953	307.75	0.9613	-18.93	-0.68
芦丁	310K	3.29	3.29	0.9961	347.14	1.0155		

3 结论

槲皮素、芦丁可提高 SPI 的功能特性（溶解性、乳化性、凝胶性），当槲皮素添加量适当时，可有效提高 SPI 凝胶强度、乳化活性、乳化稳定性、溶解性功能性质分别提高 23.23%、20.84%、11.44%、10.06%。芦丁也具有类似的作用，当添加量适当时，可使 SPI 凝胶强度、乳化活性、乳化稳定性、溶解性提高 187.18%、26.17%、23.54%、19.27%，此外槲皮素、芦丁还可提高 SPI 的生物利用度，结合 Stern-volmer 分析发现槲皮素、芦丁与 SPI 淬灭机制属于动态淬灭及静态淬灭，且槲皮素-SPI、芦丁-SPI 复合物荧光光谱均发生蓝移现象，疏水环境的极性减弱，疏水性增加，肽链的伸展程度有所减弱。热力学分析表明，槲皮素、芦丁与 SPI 结合是自发进行，两种互作复合物的主要作用力为氢键和范德华力为主。

参考文献:

- [1] FRAGA C G, CROFT K D, KENNEDY D O, et al. The effects of polyphenols and other bioactives on human health[J]. Food Function. 2019, 10(2): 514-528.
- [2] XIE Y, CHEN J, XIAO A P, et al. Antibacterial activity of polyphenols: structure-activity relationship and influence of hyperglycemic condition[J]. Molecules. 2017, 22(11): 1913.
- [3] LEPHART E D. Skin aging and oxidative stress: Equol's anti-aging effects via biochemical and molecular mechanism[J]. Ageing Reserch Reviews. 2016, 31: 36-54.
- [4] KHAN N, MUKHTAR H. Tea polyphenols in promotion of human health[J]. Nutrients. 2018, 11(1):39.
- [5] BOURVELLEC C L, RENARD G C. Interactions between polyphenols and macromolecules:

- quantification methods and mechanisms[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2012, 52(3): 213-248.
- [6] HARSHADRAI M R, DÖRTE C, SASCHA R, et al. Interactions of different phenolic acids and flavonoids with soy proteins[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2002, 30(3): 137-150.
- [7] JIA Z, ZHENG M, TAO F, et al. Effect of covalent modification by (-)-epigallocatechin-3-gallate on physicochemical and functional properties of whey protein isolate[J]. *LWT- Food Science and Technology*, 2016, 66: 305-310.
- [8] 裘乐芸, 邢倩, 邓泽元, 等. 植物多酚与鲢鱼肌球蛋白相互作用及其对肌原纤维蛋白结构和凝胶形成的影响[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(5): 48-56.
- [9] PETZKE K J, SCHUPPE S, ROHN S, et al. Chlorogenic acid moderately decreases the quality of whey proteins in rats[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53(9): 3714-3720.
- [10] 刘勤勤. 豆奶茶的制备、特性及机理研究[D]. 无锡: 江南大学, 2015:47-48.
- [11] SPERONI F, ANON R C, LAMBALLERIE R D. Effects of calcium and high pressure on soybean proteins: A calorimetric study[J]. *Food Research International*, 2010, 43(5): 1347-1355.
- [12] ZHOU S D, LIN Y F, XU X, et al. Effect of non-covalent and covalent complexation of (-)-epigallocatechin gallate with soybean protein isolate on protein structure and in vitro digestion characteristics[J]. *Food Chemistry*, 2020, 309: 1-10.
- [13] NAISARG P, SIDDHARTH J, KUAN Y W, et al. Enhanced colloidal stability, solubility and rapid dissolution of resveratrol by nanocomplexation with soy protein isolate[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2017, 488: 1-16.
- [14] PAN Y, XIE Q T, ZHU J, et al. Study on the fabrication and in vitro digestion behavior of curcumin-loaded emulsions stabilized by succinylated whey protein hydrolysates[J]. *Food Chemistry*, 2019, 287: 76-84.
- [15] ZOU Y, GUO J, YIN S W, et al. Pickering Emulsion Gels Prepared by Hydrogen-Bonded Zein/Tannic Acid Complex Colloidal Particles[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(33): 1-10.
- [16] BRODKORB A, EGGER L, ALMINGER M, et al. INFOGEST static in vitro simulation of

gastrointestinal food digestion[J].*Nature Protocols*, 2019, 14(4): 991-1014.

- [17] MAO Y, MCCLEMENTS D J. Influence of electrostatic heteroaggregation of lipid droplets on their stability and digestibility under simulated gastrointestinal conditions[J].*Food and Function*, 2012, 3(10): 1025-1034.
- [18] CHEN Z Q, WANG C, GAO X, et al. Interaction characterization of preheated soy protein isolate with cyanidin-3-O-glucoside and their effects on the stability of black soybean seed coat anthocyanins extracts[J]. *Food Chemistry*, 2019, 271: 266-273.
- [19] 张传英, 彭鑫, 饶恒军, 等. 丹酚酸 B 与牛血清白蛋白相互作用的光谱学研究[J]. *光谱学与光谱分析*, 2021, 41(6): 1701-1707.
- [20] WEI Z H, YANG W, FAN R, et al. Evaluation of structural and functional properties of protein-EGCG complexes and their ability of stabilizing a model β -carotene emulsion[J]. *Food Hydrocolloids*, 2015, 45: 337-350.
- [21] 贾娜, 孙嘉, 刘丹, 等. 槲皮素对氧化条件下猪肉肌原纤维蛋白结构及凝胶特性的影响[J]. *食品科学*, 2021, 42(10): 45-51.
- [22] 胡思. 茶多酚与面筋蛋白相互作用对生鲜面品质影响的研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2016:41.
- [23] THUMMANOON P, SOOTTAWAT B, SUTTIRUG P. Effect of phenolic compounds on protein cross-linking and properties of film from fish myofibrillar protein[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2012, 51(5): 774-782.
- [24] 许杨杨. 大豆皂苷-蛋白 W/O/W 型双重乳液的构建及其稳定性研究[D]. 渤海: 渤海大学, 2021:56-58.
- [25] 孙迪. 不同脂肪对肌原纤维蛋白乳化液稳定性及肉糜凝胶特性的影响[D]. 渤海: 渤海大学, 2019:7-11.
- [26] LI T, WANG L, CHEN Z X, et al. Functional properties and structural changes of rice proteins with anthocyanins complexation[J]. *Food Chemistry*, 2020, 331:1-11.
- [27] 刘泽宇, 刘焱, 罗灿, 等. 茶多酚对草鱼鱼肉蛋白质流变学特性的影响[J].*现代食品科技*, 2015, 31(6): 50-58.
- [28] YAN M Y, LI B F, ZHAO X, et al. Physicochemical properties of gelatin gels from walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) skin cross-linked by gallic acid and rutin[J]. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25(5): 907-914.

- [29] MARIJA S, JELENA R, JANA O, et al. Binding affinity between dietary polyphenols and β -lactoglobulin negatively correlates with the protein susceptibility to digestion and total antioxidant activity of complexes formed[J]. *Food Chemistry*, 2013, 136(3-4): 1263-1271.
- [30] OZDAL, T, CAPANOGLU, E, ALTAY, F. A review on protein-phenolic interactions and associated changes[J]. *Food Research International*, 2013, 51, 954-970.
- [31] 王菡, 李高华, 陈涛, 等. 基于广谱性单克隆抗体免疫分析有机磷农药残留[J]. *食品安全质量检测学报*, 2015, 6(11): 4399-4408.
- [32] 王启明, 唐瑜婉, 李春翼, 等. NaCl 浓度对麦醇溶蛋白与槲皮素相互作用的影响[J]. *食品科学*, 2021, 42(8): 29-39.
- [33] ZHANG Y Z, XIANG X, PING M, et al. Spectroscopic studies on the interaction of Congo red with bovine serum albumin[J]. *Spectrochim Acta A*, 2009, 72: 907-914.
- [34] 苗向硕, 吴伟, 吴晓娟. 表没食子儿茶素没食子酸酯和米糠蛋白的相互作用[J]. *中国粮油学报*, 2019, 34 (12): 19-26.
- [35] 张超, 傅玉颖, 沈亚丽, 等. 不同带电特性的壳聚糖/酪蛋白相互作用研究[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(2): 63-71.
- [36] CHEN W J, WANG W J, MA X B, et al. Effect of pH-shifting treatment on structural and functional properties of whey protein isolate and its interaction with (-)-epigallo catechin -3-gallate[J]. *Food Chemistry*, 2019, 274: 234-241.
- [37] 李楠, 王国振, 曾永明, 等. 薰衣草花色苷与牛血清蛋白非共价相互作用研究[J]. *化学研究与应用*, 2021, 33(06): 1004-1011.