

花青素对大豆蛋白质二级结构影响的多重光谱分析

朱 颖 王中江 李 杨 齐宝坤 隋晓楠 江连洲

(东北农业大学食品学院, 哈尔滨 150030)

摘要: 以大豆分离蛋白-花青素复合体系为研究对象,综合利用多重光谱技术对其进行分析。利用荧光光谱探究大豆分离蛋白和花青素间的相互作用方式,采用同步荧光光谱和紫外-可见光谱探究花青素对大豆分离蛋白氨基酸残基微环境的影响,从而得出花青素对大豆分离蛋白构象的影响,再采用傅里叶变换红外光谱法和圆二色谱法研究花青素对大豆分离蛋白二级结构的影响。结果表明:花青素对大豆分离蛋白有较强的荧光猝灭作用且为静态猝灭,其中,花青素与大豆分离蛋白在 298、306、314 K 时相互作用的表现结合常数分别为 3.343×10^4 、 4.507×10^4 、 5.525×10^4 L/mol,对应的结合位点数分别为 0.917 8、0.954 6、0.938 1。热力学数据分析结果表明:花青素与大豆分离蛋白反应的作用力主要是疏水相互作用;同步荧光光谱和紫外-可见光谱结果表明花青素改变了芳香氨基酸残基在空间结构中所处的微环境,使大豆分离蛋白的分子构象发生改变,且同步荧光光谱显示花青素与大豆分离蛋白中色氨酸残基发生相互作用,使其周围的疏水作用减少。傅里叶变换红外光谱和圆二色谱结果表明花青素引起大豆分离蛋白的二级结构发生改变。

关键词: 大豆分离蛋白; 花青素; 荧光光谱; 紫外-可见光谱; 傅里叶变换红外光谱; 圆二色谱

中图分类号: TS201.2⁺1; O433.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2018)06-0368-07

Effects of Anthocyanins on the Secondary Structure of Soybean Protein Isolate by Multiplex Spectroscopy

ZHU Ying WANG Zhongjiang LI Yang QI Baokun SUI Xiaonan JIANG Lianzhou
(College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: Soybean protein isolate – anthocyanin complex system was used as the object of study. The interaction between soybean protein and anthocyanin was explored by fluorescence spectroscopy, UV – Vis spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy and circular dichroism. The effect of anthocyanins on the structure of soybean protein isolate was studied by Fourier transform infrared spectroscopy and circular dichroism. The effect of anthocyanin on the structure of soybean protein isolate was studied by Fourier transform infrared spectroscopy and circular dichroism. The results showed that anthocyanin had strong fluorescence quenching effect on soybean protein isolate in a static mode. The apparent binding constants of anthocyanin and soybean protein isolate at 298 K, 306 K and 314 K were 3.343×10^4 L/mol, 4.507×10^4 L/mol and 5.525×10^4 L/mol, the corresponding binding sites were 0.917 8, 0.954 6 and 0.938 1, respectively. The results of thermodynamic data showed that the interaction between anthocyanin and soybean protein isolate was mainly hydrophobic interaction. Synchronous fluorescence spectroscopy and UV – Vis spectra showed that anthocyanins changed the microenvironment of aromatic amino acid residues in the spatial structure and the conformation of soy protein isolate, and the synchronous fluorescence spectrum showed that the anthocyanin interacted with the tryptophan residue in the soybean protein isolate and reduced the hydrophobic interaction. Fourier transform infrared spectroscopy and circular dichroism showed that the secondary structure of soybean protein was changed by anthocyanin.

Key words: soybean protein isolates; anthocyanins; fluorescence spectra; UV – Vis spectra; Fourier transform infrared spectroscopy; circular dichroism

收稿日期: 2017 – 12 – 21 修回日期: 2018 – 01 – 05

基金项目: 国家自然科学基金项目(31671807、31601475)和国家重点研发计划项目(2016YFD0400700、2016YFD0400402)

作者简介: 朱颖(1992—),女,博士生,主要从事粮食、油脂及植物蛋白工程研究,E-mail: 13258512068@163.com

通信作者: 江连洲(1960—),男,教授,博士生导师,主要从事粮食、油脂及植物蛋白工程研究,E-mail: jlzname@163.com

0 引言

大豆分离蛋白(SPI)作为一种营养价值丰富的食用蛋白资源,由于其较高的蛋白含量以及优良的功能特性,目前已经被广泛地应用于食品加工中^[1]。为拓宽其应用前景与开发价值,大豆分离蛋白的天然改性已经成为学者们的研究热点^[2-3]。花青素作为一种黄酮类含量丰富、广泛应用于食品中的植物色素^[4],由于其可清除 DPPH 自由基,具有很强的抗氧化作用^[5],因而可以延缓衰老。此外花青素还具有抑菌、预防癌症、抗心血管疾病等多种功能^[6-8]。由于花青素是一种小分子活性物质,并且具有较强的蛋白亲和性,因此可以通过渗入到蛋白微原纤间,与多肽链形成多种交联点^[9]。在食品的生产加工过程中,蛋白质不可避免地会受到这类小分子的影响,研究表明蛋白可与多酚类发生交互作用^[10],由于蛋白、多酚结构的差异性,蛋白与多酚交互作用可形成氢键、疏水作用、范德华力、离子作用力及共价键等^[11-12]。

目前已有文献对多酚类物质与蛋白质的相互作用进行了部分研究。KANAKIS 等^[13]研究发现茶多酚可以与牛奶蛋白通过疏水作用发生反应,并且茶多酚的加入会改变牛奶蛋白的结构构象,使牛奶蛋白结构更加稳定。WANG 等^[14]研究发现橘皮苷对牛血清白蛋白的猝灭机制为静态猝灭,并且通过疏水相互作用与牛血清白蛋白发生作用。HE 等^[15]研究发现锦葵色素-3-葡萄糖苷可诱导 β -乳球蛋白通过疏水作用与其发生交联,这些相互作用会影响蛋白质的二级结构,同时提高锦葵色素-3-葡萄糖苷的稳定性。刘勤勤等^[16]研究发现大豆分离蛋白与茶多酚通过范德华力和氢键发生相互作用,且茶多酚的加入导致大豆分离蛋白的二级结构发生改变。但相关研究尚未涉及大豆分离蛋白与花青素的交互作用。

黑米花青素的主要成分为矢车菊素-3-葡萄糖苷和芍药色素-3-葡萄糖苷^[17],本文利用多重光谱技术研究大豆分离蛋白(SPI)与纯化黑米花青素(AN)的相互作用,通过荧光光谱研究黑米花青素对大豆分离蛋白的猝灭类型,判断花青素与大豆分离蛋白是否存在相互作用,并计算花青素与大豆分离蛋白的结合常数、结合位点数以及相应的热力学参数,探讨花青素与大豆分离蛋白间的相互作用机制。使用同步荧光光谱、紫外光谱研究花青素对大豆分离蛋白构象变化的影响,探究花青素对大豆分离蛋白中酪氨酸、色氨酸所处微环境的极性的影响。使用多重光谱探究花青素对大豆分离蛋白二级结构组

成的影响,进一步验证花青素与大豆分离蛋白间相互作用的存在,为开发新的大豆蛋白产品提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大豆(*Glycine max* L.),东北大豆;黑米(*Oryza sativa* L., indica Black rice)花青素质量分数为35%;盐酸、氢氧化钠、磷酸二氢钠,北京新光化工试剂厂;正己烷、乙酸乙酯、甲醇,天津北科化学品有限责任公司;其他化学试剂均为分析纯试剂。

1.2 仪器与设备

F-4500 型荧光分光光度计,日本 HITACHI 公司;Nicolet 6700 型傅里叶变换红外光谱仪,美国 Thermo Nicolet 公司;Jasco J-815 型圆二色光谱仪,日本分光公司;Cary 50 型紫外光谱仪,美国 Varian 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 大豆分离蛋白制备

参考 MEINLSCHMIDT 等^[18]的方法。将新鲜大豆碾碎成粉后,与正己烷按照液料比 3 mL/g 混合,室温(20℃)下搅拌 2 h 进行 3 次脱脂。将脱脂豆粉与去离子水按照液料比 10 mL/g 混合后,用 NaOH (2 mol/L)将溶液的 pH 值调节至 8.5,室温下搅拌 2 h 后,溶液 9 000 g 离心 20 min,取上清液用 HCl (2 mol/L)将溶液 pH 值调节至 4.5。溶液静置 2 h 后 6 000 g 离心 20 min 得到蛋白沉淀,最后将蛋白沉淀溶于去离子水,用 NaOH (2 mol/L)将蛋白质 pH 值调节至 7.0。将蛋白溶液冷冻干燥后得粉末状大豆分离蛋白。

1.3.2 花青素提纯

参照 SUI 等^[19]的方法,将富含花青素的黑米提取物粉末溶于去离子水,使用固相萃取技术去除黑米提取物中的杂质。具体纯化步骤为:首先用 2 倍体积的酸化水去除不溶性成分,如糖、酸等,然后用 2 倍体积的乙酸乙酯去除多酚类化合物,如酚酸、黄酮等,最后用甲醇洗脱吸附在吸附柱上的花青素。使用旋转蒸发器在 40℃ 的条件下除去甲醇,即可得纯化后的花青素(AN),在 -20℃ 条件下贮存,直至使用。在 280 nm 处使用高效液相色谱法(HPLC-DAD)检测花青素的纯度。

1.3.3 大豆蛋白-花青素溶液制备

将大豆分离蛋白(SPI)粉末用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 值 7.4)配置成 0.01 g/mL 的大豆分离蛋白溶液,为 SPI 对照样品。按照大豆蛋白与纯化后花青素的质量比 100:1、80:1、60:1、40:1、20:1

将纯化后的花青素(质量分数约为 20%)加入到大豆分离蛋白溶液中,室温下磁力搅拌 90 min 制成大豆分离蛋白-花青素复合体系,分别表示为 SPI-AN-1~SPI-AN-5。

1.3.4 荧光光谱测定

向 10 mL 大豆分离蛋白溶液(1.0×10^{-6} mol/L)中分别逐滴加入 100 μ L 2.0×10^{-6} 、 4.0×10^{-6} 、 6.0×10^{-6} 、 8.0×10^{-6} 、 1.0×10^{-5} mol/L 浓度的花青素溶液,漩涡震荡后,分别在 25、33、41℃ 恒温水浴锅中保温 5 min。选择激发波长为 280 nm、激发狭缝为 5 nm、扫描速率为 12 000 nm/min,连续扫描,记录发射波长为 300~500 nm。样品的同步荧光光谱测定条件如下:室温条件下,分别固定 $\Delta\lambda = 15$ nm 和 $\Delta\lambda = 60$ nm, $\Delta\lambda$ 表示两波长差,进行同步荧光光谱扫描。

1.3.5 紫外-可见光谱分析

移取 3 mL 的大豆分离蛋白溶液于石英比色池中,扫描 250~350 nm 波长范围内的吸收光谱。扫描完毕后,将 SPI-AN-1~SPI-AN-5 分别于石英比色池中扫描吸收光谱。以相同质量浓度的大豆分离蛋白溶液作空白,记录大豆分离蛋白溶液的紫外-可见吸收光谱。

1.3.6 傅里叶变换红外光谱分析

将大豆分离蛋白溶液和大豆分离蛋白溶液与花青素的混合溶液 SPI-AN-1~SPI-AN-5 冷冻干燥,按样品粉末与溴化钾粉末质量比 1:100 的比例混合,研细均匀后,置于模具中压片,在 32 cm^{-1} 分辨率条件下扫描 32 次,4 000~400 cm^{-1} 波数范围内扫描红外光谱。

1.3.7 圆二色谱分析

将样品在 190~250 nm 远紫外区进行扫描,扫描速度为 60 nm/min,光谱分辨率为 0.2 nm,响应时间为 0.25 s,狭缝宽度为 1 nm。采用 Origin 8.0 作图,并使用 CDpro 软件拟合蛋白质二级结构的组成与含量。

1.3.8 数据统计与分析

每组数据均重复 3 次,利用 Origin 8.5 软件处理数据作图。利用 SPSS V17.0 软件对数据进行 ANOVA 差异显著性分析及相关性分析。

2 结果与讨论

首先采用荧光光谱法,测定大豆分离蛋白和花青素间的相互作用方式,再通过同步荧光光谱法、紫外-可见光谱探究花青素对大豆分离蛋白氨基酸残基微环境的影响,进而得出花青素对大豆分离蛋白构象的影响,最后通过傅里叶变换红外光谱法和圆二色谱法分析花青素对复合物中大豆分离蛋白二级

结构组成的变化。荧光光谱分析可以明确花青素与大豆分离蛋白的作用方式,同步荧光光谱和紫外-可见光谱的测定是通过测量发射波长偏移来直观反映花青素对大豆分离蛋白构象的影响。红外光谱法和圆二色谱法可直接测量计算出蛋白质各类型二级结构的含量,可以定量测定加入花青素前后大豆蛋白二级结构含量的变化,直观地分析花青素对互作体系中蛋白质二级结构的影响,进一步验证花青素与大豆分离蛋白的相互作用。

2.1 荧光分析

2.1.1 花青素对大豆分离蛋白内源荧光光谱的影响

蛋白质的内源荧光主要依赖于色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)和苯丙氨酸(Phe),在激发波长为 280 nm 时,只考虑色氨酸和酪氨酸,苯丙氨酸可以忽略^[13]。图 1 表示在 25℃、pH 值 7.4 的条件下,固定激发波长为 280 nm,扫描 300~500 nm 波长范围内随花青素的增加内源荧光发射光谱的变化。从图 1 可以看出,固定 SPI 溶液浓度,随着花青素的不断加入,SPI 荧光强度逐渐降低,说明花青素对 SPI 的内源荧光产生了猝灭作用。同时发现 SPI 的最大荧光发射波长发生了红移,SPI 从 342 nm 红移至 352.8 nm,红移了 10.8 nm,这说明花青素与大豆分离蛋白发生了结合,从而改变了 SPI 的结构构象,Trp 和 Tyr 的微环境发生改变,由疏水环境变为亲水环境,肽链结构舒展^[14]。

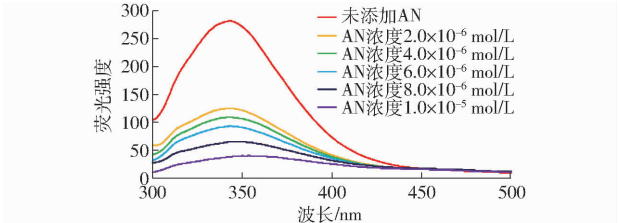


图 1 花青素对 SPI 荧光光谱的影响

Fig. 1 Effect of AN on fluorescence spectrum of SPI solutions

2.1.2 表观结合常数和结合位点数

荧光猝灭一般可分为动态猝灭和静态猝灭两种作用机制。可以应用 Stern-Volmer 方程判断猝灭类型^[20],公式为

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}Q = 1 + K_q\tau_0Q \tag{1}$$

式中 F_0 、 F ——未加入和加入猝灭剂花青素时 SPI 溶液的荧光强度

Q ——花青素的浓度, mol/L

K_q ——双分子猝灭速率常数, L/(mol·s)

K_{sv} ——动态猝灭常数, L/mol

τ_0 ——猝灭剂不存在时荧光体的寿命,生物大分子的平均寿命约为 10^{-8} s^[21]

根据 Stern - Volmer 方程,以 Q 为自变量, F_0/F 为因变量,作图 2,根据图中直线的斜率可以计算出花青素 - SPI 复合物的 K_{sv} 和 K_q ,结果见表 1。对于动态猝灭,随着温度的升高,猝灭常数增大,即 Stern - Volmer 曲线斜率增大。如果是静态猝灭则相反。通过图 2 和表 1 可以看出,随着温度的升高,大豆分离蛋白的 Stern - Volmer 曲线斜率逐渐变小,说明花青素对 SPI 的荧光猝灭机制是静态猝灭。猝灭剂对于生物大分子最大猝灭速率常数一般为 $2 \times 10^{10} \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$,而花青素对 SPI 的荧光猝灭速率数量级均为 10^{12} ,这进一步表明花青素对 SPI 的作用机制为静态猝灭。

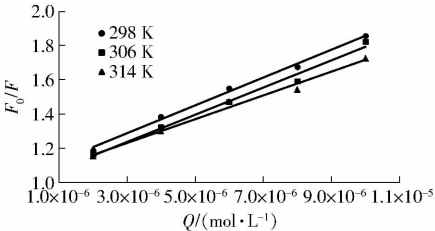


图 2 不同温度条件下花青素猝灭 SPI 的 Stern - Volmer 图
Fig. 2 Stern - Volmer plot for quenching on SPI by AN at different temperatures

表 1 不同温度 SPI - AN 复合物的荧光猝灭常数及其决定系数

Tab. 1 Fluorescence quenching constants and chromatographic correlation coefficients of soybean protein isolate-anthocyanin (SPI - AN) complexes at different temperatures			
温度/K	$K_{sv}/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	$K_q/(\text{L} \cdot (\text{mol} \cdot \text{s})^{-1})$	R^2
298	8.11×10^4	8.11×10^{12}	0.994 5
306	7.89×10^4	7.89×10^{12}	0.990 5
314	6.89×10^4	6.89×10^{12}	0.988 3

对于静态猝灭过程,结合位点数 n 满足公式

$$\lg \frac{F_0 - F}{F} = \lg K_s + n \lg Q \tag{2}$$

式中 K_s ——表观结合常数, L/mol

以 $\lg((F_0 - F)/F)$ 对 $\lg Q$ 作图得图 3,根据直线斜率和截距可以得到花青素与热处理 SPI 间的表观结合常数 K_s 和结合位点数 n (表 2)。从表 2 可以看出,花青素与 SPI 间的表观结合常数 K_s 数量级为 10^4 ,说明花青素与大豆分离蛋白发生了紧密的结合,且均形成了结合位点数接近于 1 的复合物。

2.1.3 热力学参数和作用力

生物小分子和蛋白质之间的相互作用力包括氢键、静电作用、范德华力和疏水作用力 4 种。研究表明,蛋白质和配体之间的作用力可根据热力学参数来进行表征:当焓变 $\Delta H > 0$ 、熵变 $\Delta S < 0$ 时,分子间作用力主要是静电引力和疏水作用力;当 $\Delta H > 0$ 、

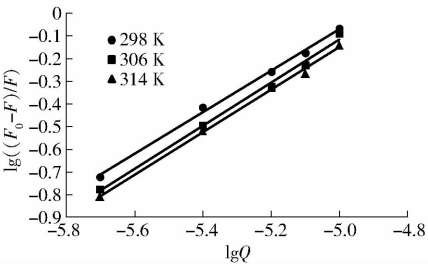


图 3 不同温度条件下花青素猝灭热处理 SPI 的双对数图
Fig. 3 Double logarithmic curves of SPI quenched by AN at different temperatures

表 2 不同温度 SPI - AN 复合物的结合位点数、表观结合常数及其决定系数

Tab. 2 Apparent binding constants, binding sites numbers and correlation coefficients of SPI - AN complex at different temperatures			
温度/K	$K_s/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	n	R^2
298	3.343×10^4	0.917 8	0.997 3
306	4.507×10^4	0.954 6	0.994 3
314	5.525×10^4	0.938 1	0.997 6

$\Delta S > 0$ 时,分子间作用力主要是疏水作用力;当 $\Delta H < 0$ 、 $\Delta S < 0$ 时,分子间作用力主要是范德华力、氢键或质子化等作用;当 $\Delta H < 0$ 、 $\Delta S > 0$ 时,分子间作用力主要是静电引力^[22-23]。假设在测定温度范围内焓变变化不大,则计算公式为

$$\ln \frac{K_2}{K_1} = -\frac{\Delta H}{R} \left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1} \right) \tag{3}$$

$$\Delta G = -RT \ln K \tag{4}$$

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \tag{5}$$

式中 K ——在相应温度下体系的结合常数

R ——理想气体常数^[24]

ΔG ——吉布斯自由能

通过计算得大豆蛋白与花青素相互作用的焓变 ΔH 、熵变 ΔS 和吉布斯自由能 ΔG ,如表 3 所示。

表 3 不同温度下 SPI - AN 结合的热力学参数

Tab. 3 Thermodynamic parameters of SPI - AN binding at different temperatures			
温度/K	$\Delta H/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta S/(\text{J} \cdot (\text{mol} \cdot \text{K})^{-1})$	$\Delta G/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$
298	28.18	134.46	-11.89
306	28.18	142.15	-15.32
314	28.18	146.56	-17.84

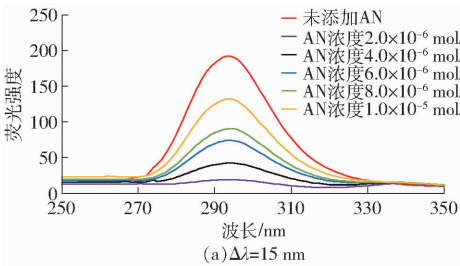
由表 3 可知, $\Delta G < 0$,说明花青素与大豆蛋白的结合可以自发进行。该反应的 $\Delta H > 0$,表明花青素与大豆分离蛋白之间的相互作用为吸热反应,升温有利于反应的进行,这与表观结合常数 K_s 随着温度的升高而逐渐升高相吻合。由体系的 $\Delta H > 0$ 和 $\Delta S > 0$ 可说明花青素与大豆分离蛋白之间的作用力主要是疏水作用力。

2.2 花青素对大豆分离蛋白构象的影响

2.2.1 同步荧光光谱分析

同步荧光光谱法用于反映对应氨基酸附近环境的极性情况,广泛应用于小分子和生物大分子相互作用的研究领域中。同步荧光光谱法是一种广泛应用的通过测量发射波长偏移来研究氨基酸残基微环境的方法,能够反映花青素对大豆分离蛋白构象的影响。固定激发和发射单色器的波长差($\Delta\lambda$),以固定的 $\Delta\lambda$ 得到同步荧光光谱,从而获得关于生色团分子周围环境的信息。当 $\Delta\lambda = 15\text{ nm}$ 时,只显示酪氨酸残基的特征荧光光谱;当 $\Delta\lambda = 60\text{ nm}$ 时,只显示色氨酸残基的特征荧光光谱,由此可判断大豆分离蛋白中酪氨酸残基和色氨酸残基微环境的极性变化^[25]。

由图4可知,随着花青素浓度的增加,大豆分离



蛋白中酪氨酸残基($\Delta\lambda = 15\text{ nm}$)和色氨酸残基($\Delta\lambda = 60\text{ nm}$)的特征荧光吸收峰不断猝灭, $\Delta\lambda = 15\text{ nm}$ 和 $\Delta\lambda = 60\text{ nm}$ 的最大发射峰均有红移,表明加入花青素后,大豆分离蛋白中色氨酸和酪氨酸附近的微环境有所改变,极性增加。色氨酸最大发射峰红移5 nm(从286 nm红移至291 nm)(图4b),酪氨酸最大发射峰红移2 nm(从293 nm红移至295 nm)(图4a),说明花青素与大豆分离蛋白作用的结合位点更接近于色氨酸残基^[26]。酪氨酸、色氨酸残基所处微环境的改变可能部分归因于蛋白质结构发生部分变化,因此花青素造成蛋白构象的变化。刘勤勤等^[16]研究茶多酚与大豆蛋白的相互作用发现茶多酚的加入导致大豆蛋白结构发生变化,与本实验研究结果一致。

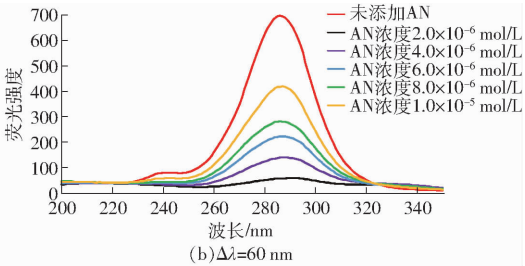


图4 SPI-AN复合体系的同步荧光光谱

Fig.4 Synchronous fluorescence spectra of SPI-AN complex system

2.2.2 紫外-可见吸收光谱分析

紫外-可见光谱广泛应用于小分子与生物大分子作用的研究中。一般来说,峰的变化是两者相互作用强弱的标志,而峰位的改变通常认为是由蛋白质大分子疏水氨基酸残基微环境变化引起构象变化导致的。大多数蛋白质分子由于色氨酸(Trp)和酪氨酸(Tyr)等氨基酸中芳香杂环对光的吸收,故在270 nm波长附近有一个吸收峰。蛋白质分子中芳香族氨基酸残基所处微环境发生改变,会引起蛋白质吸收波长变化,因而可以利用蛋白质的紫外-可见吸收光谱初步探讨蛋白质结构的变化^[27-28]。

图5显示了不同浓度花青素对大豆分离蛋白紫外-可见吸收光谱的影响。从图中可以看出,随着花青素浓度增加,大豆分离蛋白的紫外-可见吸收光谱峰值依次升高,并且发生蓝移,最大吸收峰波长由277 nm蓝移至271 nm,说明花青素诱导大豆分离蛋白分子肽链伸展,使得深埋在大豆分离蛋白分子内部酪氨酸残基和色氨酸残基中的芳香杂环疏水基团裸露出来,造成了大豆分离蛋白构象发生改变,进而增强了吸光度。这种构象的改变更有利于大豆分离蛋白分子中色氨酸残基和酪氨酸残基中芳香杂环的 $\pi-\pi^*$ 跃迁。

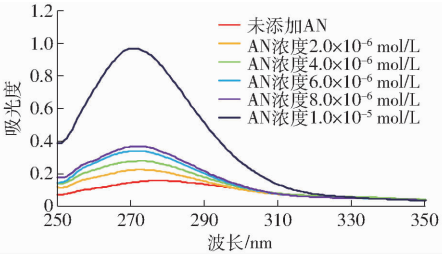


图5 不同浓度花青素对SPI溶液紫外-可见吸收光谱的影响

Fig.5 Effect of AN concentration on UV-Vis absorption spectrum of SPI

2.2.3 红外光谱分析

红外光谱是物质定性重要方法之一^[29]。通过红外光谱来进一步考察蛋白质构象的变化,蛋白质酰胺I带在 $1\,700\sim1\,600\text{ cm}^{-1}$ 范围内(主要是 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动)有吸收;酰胺II带在 $1\,600\sim1\,500\text{ cm}^{-1}$ 范围内(主要是 $\text{C}-\text{N}$ 伸缩振动和 $\text{N}-\text{H}$ 弯曲振动)有吸收^[30]。酰胺I带和酰胺II带红外吸收峰的变化反映了蛋白质二级结构的变化。加入不同浓度花青素的大豆分离蛋白的红外光谱如图6所示,由图6可知,花青素的加入引起了大豆分离蛋白酰胺I带 $1\,632.93\text{ cm}^{-1}$ 红移至 $1\,637.75\text{ cm}^{-1}$,酰胺II带从 $1\,530.24\text{ cm}^{-1}$ 红移至 $1\,533.61\text{ cm}^{-1}$,说明花青素引起大豆分离蛋白二级结构的变化。同时,花青素的

加入引起大豆分离蛋白的酰胺 I 带、II 带强度出现减弱,这可能是由于花青素上的氧原子、羟基与大豆蛋白上 C=O、C—N 基团通过疏水相互作用等结合形成复合物^[31],导致大豆蛋白肽链重排,最终引起大豆分离蛋白二级结构的改变^[32]。这也可以通过 3 300 ~ 3 400 cm⁻¹ 酰胺 A 带(N—H 伸缩振动)的改变来辅证^[33]。在加入花青素后,大豆分离蛋白的酰胺 A 带从 3 320.05 cm⁻¹ 红移至 3 311.74 cm⁻¹。SHEN 等^[34]研究卵清蛋白和茶多酚的相互作用发现,在 pH 值为 7.5 的条件下加入茶多酚后卵清蛋白的酰胺 I、II 带发生蓝移,这可能是由蛋白与多酚类型和结构的不同导致的。

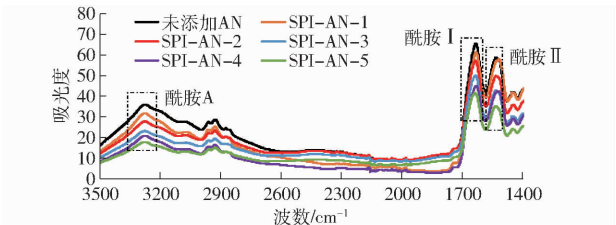


图 6 SPI 和 SPI-AN 的傅里叶变换红外光谱图
Fig.6 Fourier transform infrared spectroscopy of SPI and SPI-AN

2.2.4 圆二色谱分析

圆二色谱是一种测量蛋白二级结构快速、准确且灵敏的技术,可以在水溶性蛋白溶液中直接测量计算出蛋白质各类型二级结构的相对含量^[35]。通过 CD 谱图法可以定量测定加入花青素前后大豆分离蛋白质二级结构含量的变化,进一步验证花青素与大豆分离蛋白的相互作用^[36]。大豆蛋白质在加入花青素前后的 CD 谱图通过 CDpro 软件拟合出的二级结构含量如表 4 所示。

经过不同浓度的花青素复合后,蛋白质中二级结构含量均发生了明显的变化。如表 4 所示,所有样品均表现出 α-螺旋相对含量降低,β-折叠相对含量升高的现象,样品中蛋白质二级结构以 β-结构为主。与 HE 等^[15]的研究一致,可能是花青素结合到大豆蛋白 α-螺旋结构中的疏水性氨基酸区域,从而使蛋白质分子展开改变其空间构象。LIU 等^[37]研究乳铁蛋白与绿原酸、没食子酸相互作用,结果表明

表 4 圆二色谱测定加入花青素后复合物中 SPI 的二级结构相对含量

Tab.4 Secondary structure relative content of SPI in AN complex estimated from circular dichroism spectra

组别	%			
	α-螺旋	β-折叠	β-转角	无规则卷曲
未添加 AN	(19.5 ± 0.2) ^a	(32.3 ± 0.3) ^f	(21.7 ± 0.2) ^{bc}	(26.5 ± 0.1) ^a
SPI-AN-1	(19.0 ± 0.1) ^b	(32.9 ± 0.2) ^e	(22.3 ± 0.4) ^{ab}	(25.8 ± 0.3) ^{bc}
SPI-AN-2	(18.2 ± 0.2) ^c	(33.7 ± 0.1) ^e	(22.0 ± 0.3) ^{abc}	(26.1 ± 0.3) ^{ab}
SPI-AN-3	(17.8 ± 0.3) ^d	(34.4 ± 0.1) ^e	(21.4 ± 0.4) ^c	(26.4 ± 0.2) ^{ab}
SPI-AN-4	(17.1 ± 0.1) ^e	(34.8 ± 0.5) ^b	(21.8 ± 0.5) ^{bc}	(26.3 ± 0.2) ^{ab}
SPI-AN-5	(16.6 ± 0.1) ^f	(35.4 ± 0.2) ^a	(22.6 ± 0.1) ^a	(25.4 ± 0.4) ^c

注:同一列数据后不同字母表示样品间差异显著(P<0.05)。

在乳铁蛋白-绿原酸和乳铁蛋白-没食子酸复合物的二级结构中蛋白质的 α 螺旋结构相对含量均降低,β 折叠相对含量均增加,与本文研究结果一致。

总体来说,圆二色谱结果证明了花青素与大豆蛋白的相互作用导致大豆蛋白二级结构的变化^[38],结果与红外光谱一致。

3 结论

(1)花青素对大豆分离蛋白的荧光猝灭机制属于静态猝灭,大豆蛋白与花青素之间的作用力主要是疏水作用力,通过疏水相互作用大豆蛋白和花青素可以形成结合位点数接近于 1 的复合物。

(2)同步荧光光谱和紫外-可见光谱结果说明花青素的加入导致大豆蛋白中酪氨酸、色氨酸残基所处微环境的改变,从而引起大豆蛋白结构发生部分变化,且花青素与大豆分离蛋白作用的结合位点更接近于色氨酸残基。

(3)红外光谱和圆二色谱结果说明花青素引起大豆蛋白二级结构发生改变,进一步说明大豆蛋白和花青素发生了相互作用。

(4)花青素和大豆蛋白间主要作用力是疏水相互作用,花青素的加入导致大豆蛋白中酪氨酸、色氨酸残基所处微环境的改变,使大豆分离蛋白的分子构象发生改变,从而引起大豆蛋白二级结构发生变化。

参 考 文 献

1 GRAHAM D E, PHILLIPS M C. Proteins at liquid interfaces: Ⅲ. Molecular structures of adsorbed films[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 1979, 70(3): 427-439.

2 王中江,江连洲,魏冬旭,等. pH 值对大豆分离蛋白构象及表面疏水性的影响[J]. 食品科学,2012,33(11):47-51.
WANG Zhongjiang,JIANG Lianzhou,WEI Dongxu, et al. Effect of pH on conformation and surface hydrophobicity of soybean protein isolate[J]. Food Science, 2012,33(11):47-51. (in Chinese)

3 KATO A, OSAKA Y, MATSUDOMI N, et al. Changes in the emulsifying and foaming properties of proteins during heat denaturation [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1983, 47(1): 33-37.

4 刘秀英,申健,常庆瑞,等. 基于可见/近红外光谱的牡丹叶片花青素含量预测[J/OL]. 农业机械学报, 2015, 46(9):

- 319–324. http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?file_no=20150947&flag=1. DOI:10.6041/j.issn.1000-1298.2015.09.047.
- LIU Xiuying, SHEN Jian, CHANG Qingrui, et al. Prediction of anthocyanin content in peony leaves based on visible /near-infrared spectra[J/OL]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2015, 46(9):319–324. (in Chinese)
- 5 NIZAMUTDINOVA I T, KIM Y M, CHUNG J I, et al. Anthocyanins from black soybean seed coats preferentially inhibit TNF- α -mediated induction of VCAM-1 over ICAM-1 through the regulation of GATAs and IRF-1[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(16): 7324–7330.
- 6 COLLINS B, HOFFMAN J, MARTINEZ K, et al. A polyphenol-rich fraction obtained from table grapes decreases adiposity, insulin resistance and markers of inflammation and impacts gut microbiota in high-fat-fed mice[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2016, 31: 150–165.
- 7 JENNINGS A, WELCH A A, FAIRWEATHER-TAIT S J, et al. Higher anthocyanin intake is associated with lower arterial stiffness and central blood pressure in women[J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 2012, 96(4): 781–788.
- 8 KONCZAK I, ZHANG W. Anthocyanins—more than nature's colours[J]. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2004(5): 239–240.
- 9 MULAUDZI R B, NDHLALA A R, KULKARNI M G, et al. Pharmacological properties and protein binding capacity of phenolic extracts of some Venda medicinal plants used against cough and fever[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2012, 143(1): 185–193.
- 10 JAKOBEK L. Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins[J]. Food Chemistry, 2015, 175: 556–567.
- 11 RYAN L, SUTHERLAND S. Comparison of the effects of different types of soya milk on the total antioxidant capacity of black tea infusions[J]. Food Research International, 2011, 44(9): 3115–3117.
- 12 LABUCKAS D O, MAESTRI D M, PERELLO M, et al. Phenolics from walnut (*Juglans regia* L.) kernels: antioxidant activity and interactions with proteins[J]. Food Chemistry, 2008, 107(2): 607–612.
- 13 KANAKIS C D, HASNI I, BOURASSA P, et al. Milk β -lactoglobulin complexes with tea polyphenols[J]. Food Chemistry, 2011, 127(3): 1046–1055.
- 14 WANG Y Q, ZHANG H M, ZHANG G C, et al. Interaction of the flavonoid hesperidin with bovine serum albumin: a fluorescence quenching study[J]. Journal of Luminescence, 2007, 126(1): 211–218.
- 15 HE Z, ZHU H, XU M, et al. Complexation of bovine β -lactoglobulin with malvidin-3-*O*-glucoside and its effect on the stability of grape skin anthocyanin extracts[J]. Food Chemistry, 2016, 209: 234–240.
- 16 刘勤勤, 朱科学, 郭晓娜, 等. 茶多酚与大豆分离蛋白的相互作用[J]. 食品科学, 2015, 36(17): 43–47.
- LIU Qinqin, ZHU Kexue, GUO Xiaona, et al. Spectroscopic analysis of interaction between tea polyphenol and soy protein isolate[J]. Food Science, 2015, 36(17): 43–47. (in Chinese)
- 17 HU C, ZAWISTOWSKI J, LING W, et al. Black rice (*Oryza sativa* L. indica) pigmented fraction suppresses both reactive oxygen species and nitric oxide in chemical and biological model systems[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2003, 51(18):5271–5277.
- 18 MEINLSCHMIDT P, SCHWEIGGERT-WEISZ U, BRODE V, et al. Enzyme assisted degradation of potential soy protein allergens with special emphasis on the technofunctionality and the avoidance of a bitter taste formation[J]. LWT—Food Science and Technology, 2016, 68: 707–716.
- 19 SUI X, BARY S, ZHOU W. Changes in the color, chemical stability and antioxidant capacity of thermally treated anthocyanin aqueous solution over storage[J]. Food Chemistry, 2016, 192: 516–524.
- 20 RAWEL H M, MEIDTNER K, KROLL J. Binding of selected phenolic compounds to proteins[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(10): 4228–4235.
- 21 LI C, HUANG X, PENG Q, et al. Physicochemical properties of peanut protein isolate-glucomannan conjugates prepared by ultrasonic treatment[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2014, 21(5): 1722–1727.
- 22 ROSS P D, SUBRAMANIAN S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability[J]. Biochemistry, 1981, 20(11): 3096–3102.
- 23 YAMASAKI K, MARUYAMA T, YOSHIMOTO K, et al. Interactive binding to the two principal ligand binding sites of human serum albumin: effect of the neutral-to-base transition[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Protein Structure and Molecular Enzymology, 1999, 1432(2): 313–323.
- 24 柳全文, 徐慧, 李桂华, 等. 咖啡酸与牛血清白蛋白相互作用的荧光光谱法研究[J]. 食品科学, 2010, 31(1): 24–28.
- LIU Quanwen, XU Hui, LI Guihua, et al. Insight into interaction of caffeic acid with bovine serum albumin[J]. Food Science, 2010, 31(1): 24–28. (in Chinese)
- 25 GUO M, LÜ W J, LI M H, et al. Study on the binding interaction between carnitine optical isomer and bovine serum albumin[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2008, 43(10): 2140–2148.
- 26 卢雁, 高胜华, 王运来, 等. 光谱法研究吡嗪酰胺与人血清白蛋白的作用机制[J]. 科学通报, 2009, 54(14): 2071–2075.
- LU Yan, GAO Shenghua, WANG Yunlai, et al. Study on interaction mechanism between pyrazinamide and human serum albumin by spectroscopic methods[J]. Chinese Science Bulletin, 2009, 54(14): 2071–2075. (in Chinese)

surface method[J]. Journal of Intelligent Material System and Structures, 2014, 25(11): 1352 – 1371.

15 HU G, LONG M, HUANG M, et al. Design, analysis, prototyping, and experimental evaluation of an efficient double coil magnetorheological valve[J]. Advances in Mechanical Engineering, 2014(8): 1 – 9.

16 HU G, LONG M, YU L, et al. Design and performance evaluation of a novel magnetorheological valve with a tunable resistance gap[J]. Smart Materials and Structures, 2014, 23(12): 127001.

17 HU G, LIAO M, LI W. Analysis of a compact annular-radial-orifice flow magnetorheological valve and evaluation of its performance[J]. Journal of Intelligent Material Systems and Structures, 2017, 28(10): 1322 – 1333.

18 胡国良, 钟芳, 张海云. 两级径向流蜿蜒式磁流变阀结构设计 with 动态性能分析[J/OL]. 农业机械学报, 2016, 47(10): 376 – 382, 389. http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?flag=1&file_no=20161049&journal_id=jcsam. DOI: 10.6041/j.issn.1000-1298.2016.10.049.

HU Guoliang, ZHONG Fang, ZHANG Haiyun. Structure design and dynamic performance analysis of a two-stage radial type magnetorheological valve with meandering fluid flow paths [J/OL]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2016, 47(10): 376 – 382, 389. (in Chinese)

19 胡国良, 李海燕, 李卫华. 径向流和圆环流磁流变阀压降性能分析与试验[J/OL]. 农业机械学报, 2016, 47(4): 364 – 371, 405. http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?flag=1&file_no=20160448&journal_id=jcsam. DOI: 10.6041/j.issn.1000-1298.2016.04.048.

HU Guoliang, LI Haiyan, LI Weihua. Comparison and experiment of pressure drop of radial and annular type magnetorheological valves[J/OL]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2016, 47(4): 364 – 371, 405. (in Chinese)

20 胡国良, 钟芳. 磁场结构对径向流磁流变阀动态性能的影响[J/OL]. 农业机械学报, 2017, 48(9): 411 – 420. http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?flag=1&file_no=20170952&journal_id=jcsam. DOI: 10.6041/j.issn.1000-1298.2017.09.052.

HU Guoliang, ZHONG Fang. Influence of magnetic field structure on dynamic performance of radial magnetorheological valve[J/OL]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2017, 48(9): 411 – 420. (in Chinese)

~~~~~

(上接第 374 页)

27 盛良全, 闫向阳, 徐华杰, 等. 烟碱与牛血清白蛋白相互作用的光谱研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2007, 27(2): 306 – 308.

SHENG Liangquan, YAN Xiangyang, XU Huajie, et al. Study on the interaction between BSA and Nicotine[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2007, 27(2): 306 – 308. (in Chinese)

28 KROLL N G, RAWEL H M, ROHN S. Review: reactions of plant phenolics with food proteins and enzymes under special consideration of covalent bonds[J]. Food Science and Technology Research, 2003, 9(3): 205 – 218.

29 李杨, 王中江, 王瑞, 等. 不同热处理条件下大豆分离蛋白的红外光谱分析[J]. 食品工业科技, 2016(8): 104 – 109.

LI Yang, WANG Zhongjiang, WANG Rui, et al. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of soybean isolate protein at different heat treatment conditions[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016(8): 104 – 109. (in Chinese)

30 LIU Yuan, XIE Mengxia, KANG Juan, et al. Studies on the interaction of total saponins of panax notoginseng and human serum albumin by Fourier transform infrared spectroscopy[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2003, 59(12): 2747 – 2758.

31 NANDA R K, SARKAR N, BANERJEE R. Probing the interaction of ellagic acid with human serum albumin: a fluorescence spectroscopic study[J]. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 2007, 192(2): 152 – 158.

32 PU H L, JIANG H, CHEN R R, et al. Studies on the interaction between vincamine and human serum albumin: a spectroscopic approach [J]. Luminescence, 2014, 29(5): 471 – 479.

33 HASNI I, BOURASSA P, HAMDANI S, et al. Interaction of milk alpha- and beta-caseins with tea polyphenols [J]. Food Chemistry, 2011, 126(2): 630 – 639.

34 SHEN F, NIU F, LI J, et al. Interactions between tea polyphenol and two kinds of typical egg white proteins—ovalbumin and lysozyme: effect on the gastrointestinal digestion of both proteins in vitro[J]. Food Research International, 2014, 59: 100 – 107.

35 罗东辉. 均质改性大豆蛋白功能特性研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2010.

LUO Donghui. Functional properties of modified soy protein by homogenization [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2010. (in Chinese)

36 KAMAULDAOVA E. Interactions of human serum albumin with retinoic acid, retinal and retinyl acetate [J]. Biochemical Pharmacology, 2007, 73(6): 901 – 910.

37 LIU F, WANG D, SUN C, et al. Utilization of interfacial engineering to improve physicochemical stability of  $\beta$ -carotene emulsions: multilayer coatings formed using protein and protein-polyphenol conjugates[J]. Food Chemistry, 2016, 205: 129 – 139.

38 SRIVASTAVA A K, ICONOMIDOU V A, CHRYSIKOS G D, et al. Secondary structure of chorion proteins of the Lepidoptera *Pericallia ricini* and *Ariadne merione* by ATR FT – IR and micro-Raman spectroscopy[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2011, 49(3): 317 – 322.