

超声复合碱处理大豆蛋白与 EGCG 复合物功能特性研究

李 杨^{1,2} 闫世长¹ 徐静雯¹ 谢凤英¹ 武利春¹ 齐宝坤^{1,2}

(1. 东北农业大学食品学院, 哈尔滨 150030; 2. 国家大豆工程技术研究中心, 哈尔滨 150030)

摘要: 大豆分离蛋白(SPI)经超声复合碱处理后与表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)进行复合形成复合物。采用傅里叶变换红外光谱和荧光光谱对超声复合碱处理及 EGCG 改性的 SPI 结构及构象进行解析,以粒径、Zeta 电位、浊度及乳化特性为指标,分析该复合体系中 SPI 构象改变与功能特性之间的关系。结果表明:超声复合碱处理使 SPI 的粒径减小、溶液电位绝对值增加、乳化性显著提高。超声复合碱处理的 SPI 与 EGCG 复合后,SPI 的 Zeta 电位绝对值进一步显著增加,其粒径明显减小,乳化特性显著提高。光谱分析显示,超声复合碱处理以及 EGCG 可以改变 SPI 的二级结构,使蛋白链解折叠,并且改变蛋白芳香族氨基酸残基所处的微环境,使蛋白的构象发生改变。通过荧光淬灭光谱分析发现,EGCG 对 SPI 的荧光猝灭机制为静态猝灭,SPI 与 EGCG 之间形成了结合位点数近似于 1 的复合物。

关键词: 大豆分离蛋白; 表没食子儿茶素没食子酸酯; 超声复合碱处理; 结构; 功能特性

中图分类号: TS214.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2021)02-0364-07

OSID:



Effects of Complexation with EGCG on Structural and Functional Properties of Soybean Protein Treated by Ultrasound-assisted Alkali

LI Yang^{1,2} YAN Shizhang¹ XU Jingwen¹ XIE Fengying¹ WU Lichun¹ QI Baokun^{1,2}

(1. College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

2. National Research Center of Soybean Engineering and Technology, Harbin 150030, China)

Abstract: Focusing on the effect of interaction with Epigallocatechin gallate (EGCG) on the structure and function of denatured soybean protein isolate (SPI). Fourier transforms infrared (FT - IR) spectroscopy and fluorescence spectroscopy were used to analyze the structure and conformation of the SPI - EGCG conjugates. The relationship between structural change and functional properties was analyzed through the determination of turbidity, emulsifying ability, emulsifying stability, particle size analysis, and Zeta potential analysis. The results showed that the absolute value of Zeta potential, turbidity as well as emulsifying activity and emulsion stability of denatured soybean protein were increased significantly, whereas its particle size was decreased. After complexation with EGCG, the functional properties of the protein were further improved. The secondary structure of SPI was changed and the protein was unfolded after EGCG were linked to it, which decreased the content of α -helix and increased the content of a random coil. Ultrasound combined alkali treatment also changed the structure of the protein. And the microenvironment around the aromatic amino acid residues in the protein was also changed, resulting in its conformational change. In addition, the fluorescence spectra showed that the fluorescence quenching of ultrasonic-assisted alkali treatment soybean protein by EGCG was a static quenching process with the formation of binding sites close to 1.

Key words: soybean protein isolate; EGCG; ultrasound-assisted alkali treatment; structure; functional properties

收稿日期: 2020-04-20 修回日期: 2020-05-21

基金项目: 黑龙江省自然科学基金杰出青年基金项目(JC2018009)和黑龙江省自然科学基金联合引导项目(LH2019C032)

作者简介: 李杨(1981—),男,教授,主要从事粮食油脂及植物蛋白工程研究,E-mail: yangli@neau.edu.cn

通信作者: 齐宝坤(1986—),男,讲师,博士,主要从事粮食油脂及植物蛋白工程研究,E-mail: qibaokun22@163.com

0 引言

大豆分离蛋白(Soybean protein isolate, SPI)具有加工性能好、营养价值高、成本低等优点,在食品工业中得到了广泛的应用。SPI在特定食品中的应用形式因其性质而不同,如乳化性、溶解性、凝胶性、分散性以及粘度等。在天然状态下,大豆蛋白的主要成分是储藏蛋白,即7S和11S球蛋白,占总蛋白的65%~80%,蛋白质的致密球状结构与低分子柔性以及不良的界面和乳化特性有关^[1]。因此,研究者尝试采用许多技术来修饰和改变大豆蛋白的结构和聚集状态。

超声已被引入来改变食品的功能特性,可依靠产生的空化作用或机械剪切应力破坏蛋白的肽键以及非共价相互作用,改变蛋白的二级结构和疏水性^[2]。超声与一些技术相结合可以改善蛋白质的功能特性。pH变换技术简单、易操作,且可以利用静电排斥作用使蛋白解折叠与亚基解离,尤其是在远离蛋白等电点的pH值下,因此,超声常与pH变换相结合来改善蛋白的功能特性^[3]。文献[4]报道了超声联合pH处理可使豌豆蛋白结构发生改变,进而改善其功能特性。文献[2]研究发现,超声复合酸处理可以改变SPI的结构,使蛋白聚集体粒径减小、乳化性增强。文献[3]阐明了超声复合碱处理对Oleosin蛋白的结构及功能性的影响,超声复合碱处理可改善蛋白结构,提高其乳化性。文献[5]研究发现,超声复合碱处理较单独处理技术更能改善乳蛋白的结构与乳化特性。然而,超声等物理改性虽可提高蛋白的功能特性,但产生的自由基却可能加速蛋白的氧化^[6],从而限制了其在工业中的高值化应用。

表没食子儿茶素没食子酸酯(Epigallocatechin gallate, EGCG)具有抗菌、抗氧化、抗炎以及抗肿瘤作用^[7-9],且具有较强的蛋白亲和性,可以与蛋白复合成具有功能性质的复合体系^[10]。文献[11]研究发现,EGCG与SPI相互作用,可改变蛋白的结构,复合物的乳化性与抗氧化性均得到改善。文献[12]研究发现,EGCG与卵清蛋白相互作用,降低了蛋白的致敏性,提高了蛋白的乳化性。一些学者还研究了改性蛋白与多酚的相互作用。文献[13]研究发现,热与花青素改性SPI使蛋白复合物乳化性得到改善。文献[14]研究发现,超声改性的大豆蛋白与花青素的相互作用使乳化性能明显提高。文献[15]利用超声辅助大蒜素来改善乳清蛋白的结构,进而提高蛋白的溶解度与乳化特性。文献[16]利用碱处理辅助EGCG改性乳清蛋白,复合物的乳

化性与抗氧化性得到增强。由此可知,多酚类成分与蛋白相互作用可以用来改善蛋白的结构与功能,且可以清除氧化自由基,这拓展了蛋白在功能性食品中的应用。然而,关于超声复合碱处理SPI与EGCG复合对蛋白的结构与功能的影响尚未见报道。

本文主要采用荧光光谱、红外光谱探究超声复合碱处理SPI和EGCG复合体系对蛋白结构的影响,通过粒度分析、Zeta电位、浊度、乳化性及乳化稳定性探究超声复合碱处理SPI与EGCG复合体系对蛋白功能性质的影响及变化规律。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大豆,市售;EGCG(纯度99%以上),上海源叶生物科技有限公司;盐酸、氢氧化钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、甲醇,均为分析纯,北京新光化工试剂厂;其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

AL204型分析天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;PHS-3C型实验室pH计,中国上海雷磁公司;F-6000型荧光分光光度计,日本Hitachi公司;TU-1800型紫外-可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;JJ-1型增力电动搅拌器,江苏金城国胜仪器厂;Allegra64R型台式高速冷冻离心机,美国贝克曼公司;IRTracer-100型傅里叶变换红外光谱分光光度计,日本岛津公司。

1.3 方法

1.3.1 样品制备

(1)大豆分离蛋白制备
根据文献[13]的方法,将大豆磨粉,过60目筛,用正己烷脱脂,将脱脂豆粉分散于去离子水中,液料比10 mL/g,用2 mol/L NaOH溶液调节pH值至9.0,搅拌1 h,9 000 r/min离心30 min,取其上清液,然后用2 mol/L HCl溶液调节pH值至4.5,得到蛋白沉淀物,将蛋白沉淀物水洗3次,6 500 r/min离心30 min得到沉淀物,将该沉淀物溶解后,用2 mol/L NaOH溶液调节pH值至中性,冻干,即得大豆分离蛋白,使用凯氏定氮法测定蛋白含量,蛋白质量分数为(92.28±0.31)%。

(2)超声复合碱处理SPI和EGCG复合物制备
SPI的处理方法参照文献[2,16]的方法进行。

对照组(SPI):称取大豆蛋白1.0 g,溶解到100 mL的去离子水中,在25℃下搅拌1 h,搅拌过程中利用0.1 mol/L NaOH维持pH值为7.0,然后在5 000 r/min的条件下离心15 min,得上清液,然后

冻干。

超声复合碱处理 (UHSPI): 称取大豆蛋白 1.0 g,溶解到 100 mL 的去离子水中,25℃ 下搅拌 1 h,搅拌过程中利用 0.1 mol/L NaOH 维持 pH 值 7.0,200 W 超声处理 5 min(工作 5 s、间隔 5 s),随后调节 pH 值至 12,保持 1 h,随后再调节 pH 值至 7.0,然后在 5 000 r/min 条件下离心 15 min,得上清液,然后冻干。

根据文献[17]的方法进行 SPI 和 EGCG 复合物的制备,将 SPI 和 UHSPI 粉末溶解在 10 mmol/L 的 PBS(磷酸盐缓冲液,pH 值 7.0)中,在室温(20℃)下连续搅拌 30 min,加入 EGCG 粉末,蛋白与 EGCG 质量比为 100:1,连续搅拌 90 min。络合后,将混合溶液冻干进行后续分析。

1.3.2 红外光谱

用 IRTTracer-100 型傅里叶变换红外光谱分光光度计在室温下记录样品的红外光谱。将样品与 KBr 混合,然后压片。在 500~4 000 cm⁻¹ 范围内记录光谱,分辨率为 4 cm⁻¹。采用 Peakfit 4.12 软件,利用高斯曲线拟合方法拟合 α-螺旋、β-折叠、β-转角和无规则卷曲的特征峰^[17],分析其含量。

1.3.3 荧光光谱

向 10 mL 的 SPI 溶液(0.5 mg/mL, 10 mmol/L PBS, pH 值 7.0)中分别逐滴加入 100 μL 浓度为 2.5、5.0、7.5、10.0、12.5、15.0、17.5、20.0 μmol/L 的 EGCG 溶液,旋涡振荡后应用 F-6000 型荧光分光光度计测定样品的荧光淬灭光谱^[17]。光谱测定条件设置为:激发波长 280 nm,扫描波长为 300~450 nm,激发狭缝、发射狭缝为 5 nm,扫描速率为 600 nm/min。蛋白及复合物的荧光测定条件为,室温条件下,以 280 nm 为激发波长,扫描波长为 300~450 nm。荧光淬灭机制可分为动态淬灭与静态淬灭两种机制,应用 Stern-Volmer 方程判断淬灭类型,公式为

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv} Q \times 10^6 = 1 + K_q \tau_0 Q \quad (1)$$

式中 F_0 、 F ——未加入、加入 EGCG 时 SPI 溶液的荧光强度

Q ——EGCG 的浓度, mol/L

K_q ——双分子淬灭常数, L/mol

K_{sv} ——动态淬灭速率常数, L/(mol·s)

τ_0 ——淬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

一般情况下,淬灭剂对于生物大分子最大动态淬灭速率常数为 2×10¹⁰ L/(mol·s),当大于这一速率时,则为静态淬灭,静态淬灭满足公式

$$\lg((F_0 - F)/F) = \lg K_a + n \lg Q \quad (2)$$

式中 K_a ——表观结合常数

n ——结合位点数

1.3.4 粒径

利用 Zetasize Nano ZS90 型纳米粒度及 Zeta 电位分析仪对样品溶液进行粒径分布测定。颗粒折射率 1.45,分散剂折射率 1.33,吸附率 0.001。实验采用体积平均直径 $D_{[4,3]}$ 表征粒径大小并记录溶液粒径的 PDI(多分散指数)^[13]。

1.3.5 电位

采用 Zeta 电位仪测定样品的 Zeta 电位,对样品溶液进行适度稀释(样品质量浓度为 1 mg/mL),上样量为 1 mL,测定温度为 25℃,温度平衡时间为 2 min^[18]。

1.3.6 浊度

将待测样品适当稀释后(样品质量浓度为 5 mg/mL)倒入石英比色皿中,并利用紫外分光光度计在波长 600 nm 处测定样品吸光度,用吸光度表示其浊度^[19]。

1.3.7 乳化特性

参照文献[13]的方法稍作修改。将样品溶在 PBS(10 mmol/L, pH 值 7.0)中至蛋白质质量浓度为 1 mg/mL,向稀释的样品中加入葵花油,水相与油相体积比为 3:1,使用高剪切均质机以 10 000 r/min 均质 3 min 形成乳状液,立即从其乳状液底部提取 50 μL 的乳液分散于 0.1% 的十二烷基硫酸钠溶液稀释 100 倍。经旋涡振荡后用分光光度法在波长 500 nm 处测定样品的吸光度 A_{500nm} ,用相同浓度十二烷基硫酸钠溶液作为空白对照,经 10 min 后再次测量其吸光度。乳化活性指数直接用乳液吸光度表示,乳化稳定性指数计算公式为

$$E_{st} = \frac{100A_0}{A_0 - A_{10}} \quad (3)$$

式中 A_0 、 A_{10} ——乳状液在 0、10 min 时的吸光度

E_{st} ——乳化稳定性指数, min

1.4 数据统计

所有实验重复 3 次,实验结果采用平均值±标准差表示。利用 SPSS 20 软件进行 ANOVA 差异显著性分析及相关分析,当 $P < 0.05$ 差异性显著。利用 Origin 2020 进行制图。

2 结果与分析

2.1 红外光谱分析

通过红外光谱可以分析蛋白二级结构的变化,其光谱与二级结构相对含量变化如图 1 与表 1 所示,与 SPI 相比,UHSPI 酰胺 I 带与酰胺 II 带的光谱

强度均发生变化,蛋白的 α -螺旋、 β -折叠相对含量显著下降($P < 0.05$), β -转角相对含量显著增加。这可能是因为超声引起的空化作用加速大豆分离蛋白的机械运动,使分子相互撞击,蛋白质的立体二级结构向不定型结构转变^[14],碱诱导产生的静电斥力使蛋白多肽链发生重排,蛋白解折叠,进而改变蛋白的结构^[4-5,20]。此外,相应复合物中,UHSPI 与 EGCG 复合之后 α -螺旋相对含量(13.33%)减少最多,无规则卷曲相对含量(17.89%)增加最显著,这可能是因为超声及碱处理使蛋白结构改变,疏水基团暴露,EGCG 分子中的氧原子、羟基与蛋白分子中 $C=O$ 、 $C-N$ 基团通过疏水作用力结合,使 SPI 的二级结构改变^[21]。文献[22]研究发现超声处理的蛋

白内部疏水基团暴露,可增强乳蛋白与阿魏酸的结合,进而使蛋白结构发生改变。

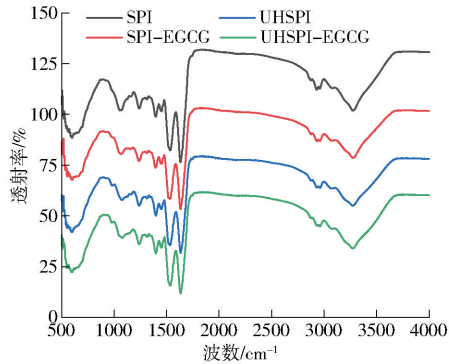


图1 超声复合碱处理及 EGCG 对 SPI 红外光谱的影响
Fig.1 Effect of EGCG and ultrasonic and alkali treatment on FT-IR of SPI

表1 加入 EGCG 前、后 SPI 的二级结构相对含量

Tab.1 Changes in the secondary structure content of SPI before and after adding EGCG				%
样品	α -螺旋	β -折叠	β -转角	无规则卷曲
SPI	(16.00 $\pm$ 0.10) ^a	(41.88 $\pm$ 0.05) ^a	(25.93 $\pm$ 0.10) ^c	(16.18 $\pm$ 0.10) ^c
UHSPI	(14.91 $\pm$ 0.10) ^b	(41.04 $\pm$ 0.04) ^b	(29.07 $\pm$ 0.10) ^a	(14.92 $\pm$ 0.10) ^d
SPI-EGCG	(13.62 $\pm$ 0.10) ^c	(39.52 $\pm$ 0.10) ^d	(29.26 $\pm$ 0.10) ^a	(17.59 $\pm$ 0.10) ^b
UHSPI-EGCG	(13.33 $\pm$ 0.10) ^d	(40.78 $\pm$ 0.10) ^c	(28.01 $\pm$ 0.10) ^b	(17.89 $\pm$ 0.20) ^a

注:同列数据不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$),下同。

2.2 荧光光谱分析

内源性荧光对蛋白质的色氨酸残基所处的微环境变化和蛋白质三级结构变化具有较高的灵敏度,因此常作为检测蛋白质空间结构变化的手段。如图2所示,与 SPI 相比,UHSPI 的荧光强度显著增加且发生明显的红移现象,这可能由于 pH 值 12 远离蛋白等电点(pI 值约为 4.5),提供较多的静电斥力,超声产生的空穴效应及剪切应力作用于 SPI,破坏蛋白分子之间的相互作用,使蛋白分子展开,发色基团暴露^[2,5,16]。此外,与 EGCG 复合之后,复合物的荧光强度均降低,表明 EGCG 对蛋白的荧光起到猝灭作用^[17],同时发现 SPI-EGCG 复合物的最大吸收波长发生了红移,UHSPI 与 EGCG 作用荧光淬灭

最明显,表明 EGCG 与 UHSPI 的结合程度最强,可能是因为超声处理、碱处理与 EGCG 协同改变了 SPI 的结构构象,发色基团的微环境发生改变,由疏水环境变为亲水环境,肽链结构舒展^[14,16]。

2.3 粒径分析

粒径可以直观地表示蛋白聚集体的形成。如图3(图中不同字母表示差异显著)所示,与 SPI 相比,UHSPI 的粒径明显减小,这可能因为超声的空化和机械作用、碱处理产生的静电斥力而最大程度地诱导较大的聚集蛋白塌陷和解离^[2,23],二者协同使蛋白结构展开、蛋白分子间作用减弱、亚基发生解离,粒径变小^[3,5],该结果与文献[5]的研究结果一致。此外,与 SPI 相比,当 SPI 与 EGCG 复合后,其粒径显著减小,且 UHSPI-EGCG 具有更小的粒径,溶液 PDI 最小(0.32),表明颗粒分布最为均一。这可能是由 UHSPI 与 EGCG 形成的复合物具有最强的负电性所致^[13]。此外,文献[24]表示,蛋白与多酚复合后,会较为明显地改变蛋白的性质,使二者内部连接更紧密,从而改善溶液的粒径分布情况。

2.4 电位分析

Zeta 电位可以表征粒子之间的相互吸引能力。通过电位可以表征溶液的稳定性,电位的绝对值越大,产生的静电斥力越大,粒子之间越不容易发生相互碰撞导致聚集,反之,绝对值越小,粒子间越易相

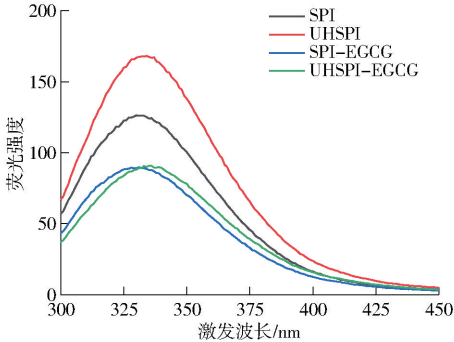


图2 EGCG 对超声复合碱处理的 SPI 荧光光谱的影响
Fig.2 Effect of EGCG on fluorescence spectroscopy of ultrasonic and alkali treated SPI

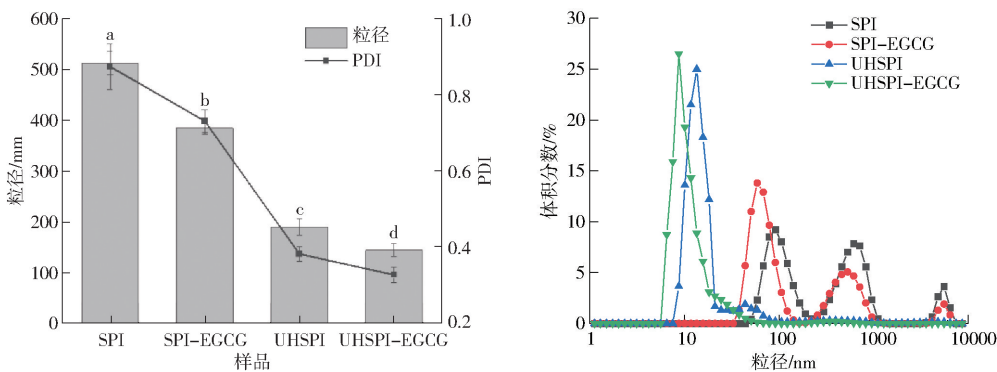


图3 加入 EGCG 前、后超声及碱处理的平均粒径、PDI 及粒径分布

Fig.3 Average particle size, PDI and particle size distribution in alkali and ultrasound treated soybean protein solutions before and after being complexed with EGCG

互碰撞发生聚集形成大颗粒^[13]。与对照 SPI 相比 ((-12.48 ± 0.18) mV), UHSPI 电位 ((-19.69 ± 0.21) mV) 绝对值显著增加 ($P < 0.05$), 这可能是当 pH 值变换 (pH 值由 12 到 7) 时, 蛋白发生了解折叠的结构变化, 带电基团暴露^[4,16]。此外, 超声利用空化作用打开蛋白结构^[2], 超声的空穴效应及机械剪切与碱提供的静电斥力相协同, 导致蛋白结构伸展, 疏水性残基及带电基团暴露, 电位绝对值增加^[5]。

SPI 与 EGCG 复合后, 溶液的电位绝对值均显著增大 ($P < 0.05$), SPI-EGCG 的电位为 (-13.88 ± 0.46) mV, UHSPI-EGCG 的电位 ((-21.08 ± 0.16) mV) 绝对值最大。可能是由于 EGCG 带负电荷, 并且在中性条件下酚羟基可以去质子化, 所产生的氧中心可以输出较高的负电荷密度, 与蛋白的正电基团结合, 使得 SPI 的负电荷相对增加^[13]。此外, 文献^[18]研究表明, 多酚与乳蛋白复合后, 可降低蛋白的等电点, 复合物的负电性增强。

2.5 浊度分析

浊度的变化可以反映粒子的聚集情况, 浊度主要与溶液的颜色、粒子的粒径等有关^[25]。与 SPI (0.26 ± 0.014) 相比, UHSPI 浊度 (0.083 ± 0.013) 明显减小, 这可能是因为超声改变了蛋白的三、四级结构, 以及碱处理提供的静电斥力, 使蛋白与蛋白的相互作用减小, 浊度减小, 从而提高溶液体系的稳定性^[3-5,16]。

SPI 与 EGCG 复合之后, 所有复合物溶液的浊度与单纯蛋白溶液相比均显著增加, SPI-EGCG 的浊度为 0.367 ± 0.012, 且 UHSPI-EGCG 具有最小的浊度 (0.135 ± 0.016), 这可能是由于复合物溶液的粒径减小, PDI 降低, 溶液分散均匀, 导致光发生漫反射, 从而导致浊度的增加^[24,26]。该结果与文献^[19]的研究结论一致, 花青素与 SPI 相互作用, 使蛋白的结构改变, 粒径更加均匀, 光的漫反射增加,

溶液浊度增加。此外, 由于 EGCG 在中性及碱性条件下不稳定, 易氧化成棕色的醌类物质, 所以, 溶液的颜色加深, 也可能导致浊度增加^[25]。

2.6 乳化特性分析

乳化活性指数 (EAI) 及乳化稳定性指数 (ESI) 可以表征乳状液的乳化特性及稳定状态。EAI 表示乳化剂形成油-水界面的能力; ESI 是指乳状液形成小液滴的抗应变能力^[27]。如图 4 (图中不同小写字母表示乳化活性指数差异显著, 不同大写字母表示乳化稳定性指数差异显著) 所示, 未加入 EGCG 时, 与 SPI 相比, UHSPI 表现出最高的 EAI 和 ESI, 可能由于碱处理产生的静电斥力与超声产生的空化作用相辅相成, 使蛋白的疏水基团暴露, 蛋白的二级、三级结构舒展, 分子柔性增加, 从而提高其乳化性^[2-5]。

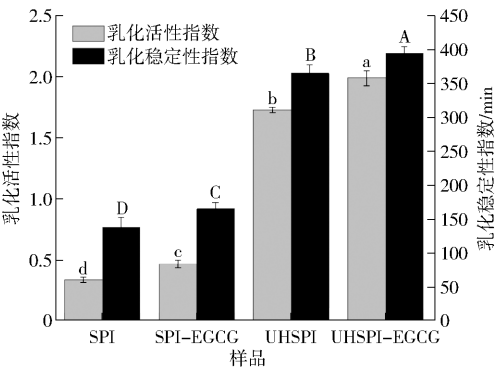


图4 EGCG 对超声及碱处理的 SPI 乳化特性的影响

Fig.4 Effect of EGCG on EAI and ESI of ultrasonic and alkali treated SPI solutions

SPI 与 EGCG 复合后, UHSPI-EGCG 具有最高的 EAI (1.98)、ESI (394.52 min), 可能是由于 EGCG 的加入增强界面薄膜的表面压力和黏弹性, 形成较稳定的界面膜, 增加复合物的 EAI^[10]。另外, SPI 与 EGCG 复合后, 油-水界面层一部分被蛋白质占据, 另一部分被 EGCG 占据, 形成第 1 层乳化膜, 蛋白质的疏水基团充分暴露和 EGCG 通过疏水相互作用形

成第2层的乳化膜,因此 EAI 显著提升^[13]。EGCG 与 SPI 复合后,液滴间空间斥力的增加及表面电荷的变化,导致蛋白的 ESI 增强^[22,24]。

2.7 荧光淬灭光谱分析

通过评估 EGCG 对蛋白内源性荧光的淬灭情况,可分析 EGCG 与蛋白的结合强度^[28]。如图 5 所示,随着 EGCG 浓度的不断增加,SPI 和 UHSPI 荧光

强度均逐渐降低,说明 EGCG 对 SPI 的内源荧光产生了猝灭作用^[17]。同时发现 SPI 的最大荧光发射波长随着 EGCG 浓度的增加,发生了红移,且 UHSPI 的变化程度最为显著,这说明 EGCG 与 SPI 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^[29]。

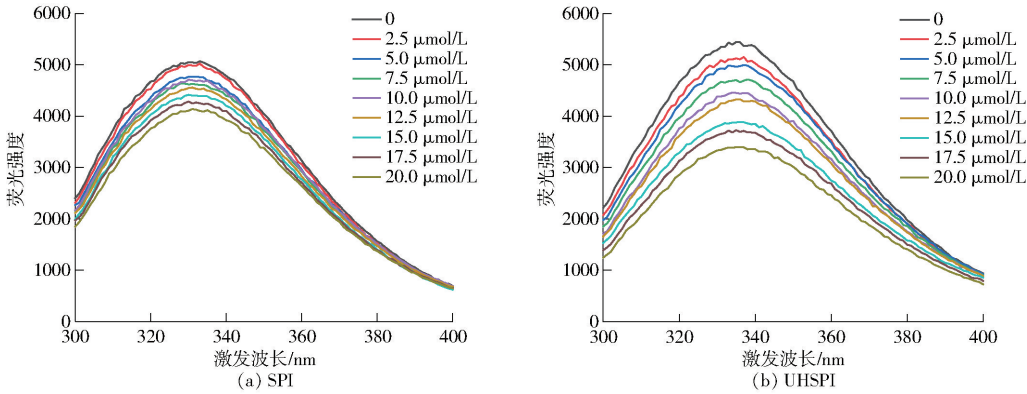


图5 EGCG 对 SPI 的荧光淬灭光谱图

Fig.5 Effect of EGCG on fluorescence quenching of SPI

为评估 EGCG 与 SPI 的结合强度(图 6),根据 Stern - Volmer 方程计算出 SPI - EGCG 复合物的动态猝灭速率常数(K_{sv})和双分子猝灭常数(K_q),如表 2 所示,所有样品的 K_{sv} 均大于最大动态猝灭速率常数 ($2 \times 10^{10} \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{s})$),表明为静态猝

灭^[17],另外, UHSPI 具有最大的 K_{sv} ($3.094 \times 10^{12} \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{s})$),这表明 EGCG 与蛋白的结合强度最大,这可能是由于超声产生的空化作用及碱诱导使蛋白的疏水性基团暴露,EGCG 与蛋白的疏水性结合增强^[16]。

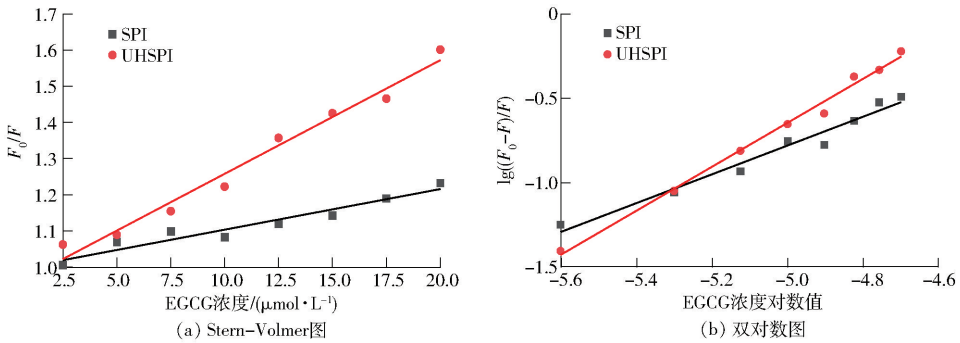


图6 EGCG 猝灭超声及碱处理 SPI 的 Stern - Volmer 图及双对数图

Fig.6 Stern - Volmer diagram and double logarithm diagram of EGCG quenching ultrasound and alkali-treated SPI

表 2 SPI - EGCG 复合物的荧光猝灭常数、结合位点数、表观结合常数

处理方式	$K_q/(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1})$	$K_{sv}/(\text{L}\cdot(\text{mol}\cdot\text{s})^{-1})$	$K_a/(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1})$	n	R^2
对照组	$(1.123 \pm 0.001) \times 10^{4b}$	$(1.123 \pm 0.001) \times 10^{12b}$	$(3.477 \pm 0.308) \times 10^{4b}$	$(0.8514 \pm 0.060)^b$	0.994
超声 + 碱处理	$(3.094 \pm 0.002) \times 10^{4a}$	$(3.094 \pm 0.002) \times 10^{12a}$	$(5.856 \pm 0.239) \times 10^{4a}$	$(1.3 \pm 0.040)^a$	0.995

对于静态猝灭,利用式(2)计算 EGCG 与 SPI 间的表观结合常数 K_a 和结合位点数 n (表 2)。从表 2 可以看出,EGCG 与不同条件处理的 SPI 间的表观结合常数数量级为 10^4 ,说明 EGCG 与 SPI 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,其中,UHSPI - EGCG 的结合位点数最大(1.3),说明 EGCG 与其结合得最为紧密,这与上文讨论的

结果一致。

3 结论

(1)超声复合碱处理可使 SPI 多肽链的骨架伸展、蛋白结构发生改变(α -螺旋相对含量减少,无规则卷曲相对含量增加),改变了蛋白的聚集状态,SPI 乳化性能明显增加。

(2)EGCG 与 SPI 形成复合物,改变了蛋白构象,显著提高蛋白的乳化活性、乳化稳定性,复合物的粒径减小,其中 UHSPI-EGCG 乳化性最强(EAI 为 1.98;ESI 为 394.52 min)。

(3)EGCG 对 SPI 的淬灭机制为静态淬灭,二者均可形成结合位点数近似于 1 的复合物,其中 UHSPI-EGCG 结合位点数最大(1.3)。

参 考 文 献

- [1] NISHINARI K, FANG Y, GUO S, et al. Soy proteins: a review on composition, aggregation and emulsification[J]. Food Hydrocolloids, 2014, 39: 301-318.
- [2] HUANG L, DING X, LI Y, et al. The aggregation, structures and emulsifying properties of soybean protein isolate induced by ultrasound and acid[J]. Food Chemistry, 2019, 279: 114-119.
- [3] SUN Y, QI B, ZHONG M, et al. Functional characteristics of oleosin affected by ultrasound-assisted alkali treatment[J]. Food Science, 2019, 41(7): 79-85.
- [4] JIANG S, DING J, ANDRADE J, et al. Modifying the physicochemical properties of pea protein by pH-shifting and ultrasound combined treatments[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2017, 38: 835-842.
- [5] GAO H, MA L, LI T, et al. Impact of ultrasonic power on the structure and emulsifying properties of whey protein isolate under various pH conditions[J]. Process Biochemistry, 2019, 81: 113-122.
- [6] LI Q, ZHENG J, GE G, et al. Impact of heating treatments on physical stability and lipid-protein co-oxidation in oil-in-water emulsion prepared with soy protein isolates[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 100: 105167.
- [7] CHEN G, HUANG K, MIAO M, et al. Molecular dynamics simulation for mechanism elucidation of food processing and safety: state of the art[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2019, 18(1): 243-263.
- [8] CURTI V, DI LORENZO A, DACREMA M, et al. In vitro polyphenol effects on apoptosis: an update of literature data[J]. Semin. Cancer Biol., 2017, 46: 119-131.
- [9] JING S, ZHANG X, YAN L J. Antioxidant activity, antitumor effect, and antiaging property of proanthocyanidins extracted from *Kunlun Chrysanthemum* flowers[J/OL]. Oxid. Med. Cell. Longev., 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/983484>.
- [10] QUAN T H, BENJAKUL S, SAE-LEAW T, et al. Protein-polyphenol conjugates: antioxidant property, functionalities and their applications[J]. Trends in Food Science & Technology, 2019, 91(8): 507-517.
- [11] JIN B, ZHOU X, LIU Y, et al. Physicochemical stability and antioxidant activity of soy protein/pectin/tea polyphenol ternary nanoparticles obtained by photocatalysis[J]. Int. J. Biol. Macromol., 2018, 116(2): 1-7.
- [12] HE W, XU H, LU Y, et al. Function, digestibility and allergenicity assessment of ovalbumin-EGCG conjugates[J]. Journal of Functional Foods, 2019, 61: 103490.
- [13] JIANG L Z, CHEN S, LI Y, et al. Effects of complexation with anthocyanin on the structural and functional properties of denatured soybean protein[J]. Food Science, 2018, 39(10): 20-27.
- [14] XUE F, LI C, ADHIKARI B. Physicochemical properties of soy protein isolates-cyanidin-3-galactoside conjugates produced using free radicals induced by ultrasound[J]. Ultrasonic Sonochemistry, 2020, 64: 104990.
- [15] JIANG H, XING Z, WANG Y, et al. Preparation of allicin-whey protein isolate conjugates: allicin extraction by water, conjugates' ultrasound-assisted binding and its stability, solubility and emulsion ability analysis[J]. Ultrasonic Sonochemistry, 2020, 63: 104981.
- [16] CHEN W, WANG W, MA X, et al. Effect of pH-shifting treatment on structural and functional properties of whey protein isolate and its interaction with (-)-epigallocatechin-3-gallate[J]. Food Chemistry, 2019, 274(10): 234-241.
- [17] HE W, MU H, LIU Z, et al. Effect of preheat treatment of milk proteins on their interactions with cyanidin-3-O-glucoside[J]. Food Research International, 2018, 107(1): 394-405.
- [18] RODRÍGUEZ S D, VON STASZEWSKI M, PILOSOFF A M R. Green tea polyphenols-whey proteins nanoparticles: bulk, interfacial and foaming behavior[J]. Food Hydrocolloids, 2015, 50: 108-115.
- [19] SUN H B, LI Y, WANG L M, et al. Analysis of non-covalent and covalent interactions between anthocyanins and soybean protein isolate on protein conformational change[J]. Food Science, 2018, 39(12): 33-39.
- [20] ZHANG Z, WANG Y, DAI C, et al. Alkali extraction of rice residue protein isolates: effects of alkali treatment conditions on lysinoalanine formation and structural characterization of lysinoalanine-containing protein[J]. Food Chemistry, 2018, 261(7): 176-183.
- [21] PU H, JIANG H, CHEN R, et al. Studies on the interaction between vincamine and human serum albumin: a spectroscopic approach[J]. Luminescence, 2014, 29(5): 471-479.
- [22] YUAN X, LI X, ZHANG X, et al. Effect of ultrasound on structure and functional properties of laccase-catalyzed α -lactalbumin[J]. Journal of Food Engineering, 2018, 223(2): 116-123.
- [23] JIANG J, WANG Q, XIONG Y L. A pH shift approach to the improvement of interfacial properties of plant seed proteins[J]. Current Opinion in Food Science, 2018, 19(3): 50-56.
- [24] YUKSEL Z, AVCI E, ERDEM Y K. Characterization of binding interactions between green tea flavanoids and milk proteins[J]. Food Chemistry, 2010, 121(2): 450-456.
- [25] PAN X, FANG Y, WANG L, et al. Covalent interaction between rice protein hydrolysates and chlorogenic acid: improving the stability of oil-in-water emulsions[J]. Journal Agriculture Food Chemistry, 2019, 67(14): 4023-4030.
- [26] FANG W, QING J H, CAI T Y, et al. Effects of different concentrations and ratios of protein and phenolic compound on haze of their mixture system[J]. Food Science, 2008, 29(11): 114-117.
- [27] LIN L, ZHANG G S, YUE X X, et al. Study on affecting factors of emulsification properties of soybean isolated protein[J]. Food Science, 2006, 27(7): 48-51.
- [28] REN C, XIONG W, LI J, et al. Comparison of binding interactions of cyanidin-3-O-glucoside to β -conglycinin and glycinin using multi-spectroscopic and thermodynamic methods[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 92: 155-162.
- [29] CONDUCT L, KAUR J, HUNG A, et al. Combined spectroscopic, molecular docking and quantum mechanics study of β -casein and ferulic acid interactions following UHT-like treatment[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 89: 351-359.