

基于荧光猝灭法的复合 GA/EGCG 与热变性乳清蛋白相互作用机制

Mechanism of interaction between composite GA/EGCG and heat-denatured whey protein by fluorescence quenching

林金瓯^{1,2} 曹艳芸¹ 韩剑众¹

LIN Jinou^{1,2} CAO Yanyun¹ HAN Jianzhong¹

(1. 浙江工商大学食品与生物工程学院, 浙江 杭州 310018;

2. 温州科技职业学院农业与生物技术学院, 浙江 温州 325006)

(1. College of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou, Zhejiang 310018, China; 2. College of Agriculture and Biotechnology, Wenzhou Vocational College of Science and Technology, Wenzhou, Zhejiang 325006, China)

摘要:目的: 开发新型食品功能因子载体, 有效调控载体在加工、运输和储存过程中功能因子的释放特性。方法: 在不同温度(298.2, 304.2, 310.2 K)下, 采用不同摩尔比(1:0, 3:1, 1:1, 1:3, 0:1)复配的没食子酸(GA)和表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)与热变性乳清蛋白(HWPI)之间相互作用, 利用荧光猝灭法探究其相互作用机制。结果: 与 GA 相比, EGCG 与 HWPI 的亲性和更强, 二者共存时, 互相抑制彼此与 HWPI 的结合, 结合常数均减小, 亲和性降低; EGCG 与 HWPI 的预先结合会促进低浓度、却抑制高浓度 GA 与 HWPI 的结合, 而 GA 与 HWPI 的预先结合会抑制 EGCG 与 HWPI 的进一步结合。GA、EGCG 与 HWPI 结合主要驱动力为离子作用力和疏水作用力。与单一多酚体系相比, GA/EGCG(3:1)与 HWPI 反应后, 体系内离子作用力和疏水作用力增强; GA/EGCG(1:1)和 GA/EGCG(1:3)与 HWPI 的体系内主要以疏水相互作用为驱动力。结论: GA 和 EGCG 与 HWPI 三者之间发生竞争关系; GA/EGCG 与 HWPI 的主要相互作用力与多酚复配比例有关, 与二元体系相比, GA/EGCG(3:1)与 HWPI 的三元体系内离子作用力和疏水作用力最大。

关键词: 乳清蛋白; 没食子酸; 表没食子儿茶素没食子酸酯; 相互作用; 荧光猝灭

Abstract: Objective: This study aimed to develop a new carrier system for food functional factors that can effectively regulate the release characteristics during processing, transportation, and storage. **Methods:** The interaction mechanism between gallic acid (GA) and epigallocatechin gallate (EGCG), which were combined at different molar ratios (1:0, 3:1, 1:1, 1:3, 0:1), with heat-denatured whey protein isolate (HWPI) was investigated at various temperatures (298.2, 304.2, 310.2 K) using a fluorescence quenching method. **Results:** The results showed that compared with GA, EGCG had a stronger affinity for HWPI, and when they coexisted, they inhibited each other's binding to HWPI, resulting in decreased binding constants and reduced affinity. Pre-binding of EGCG to HWPI promoted the binding of low concentrations of GA to HWPI, but inhibited the binding of high concentrations of GA to HWPI, pre-binding of GA to HWPI inhibited further binding of EGCG to HWPI. The primary driving forces for binding GA, EGCG, and HWPI were ionic and hydrophobic forces. Compared with the single polyphenol system, the GA/EGCG (3:1) system had increased ionic and hydrophobic forces in the HWPI reaction, while the GA/EGCG (1:1) and GA/EGCG (1:3) systems mainly used hydrophobic interactions as the driving force in the HWPI system. **Conclusion:** This study demonstrates a competitive relationship among GA, EGCG, and HWPI. The main interaction forces between GA/EGCG and HWPI depend on the composition ratio of the polyphenol complex. Compared to the binary system, the ternary system of GA/EGCG (3:1) with HWPI exhibits the highest magnitude of ionic and hydrophobic interactions.

基金项目: 浙江省自然科学基金(编号: LQ20C200003)

作者简介: 林金瓯, 男, 温州科技职业学院助教, 硕士。

通信作者: 曹艳芸(1989—), 女, 浙江工商大学助理研究员, 博士。

E-mail: yyciao@zjsu.edu.cn

收稿日期: 2023-01-26 改回日期: 2023-07-21

Keywords: whey protein; gallic acid; epigallocatechin gallate; interaction; fluorescence quenching

乳清蛋白是奶酪或酪蛋白生产加工过程中产生的副产物^[1],具有良好的溶解性、乳化和凝胶特性,以及参与多种生理代谢的功效^[2],是构建乳液和凝胶传递体系的良好蛋白质壁材。天然植物多酚是食品加工中广泛应用抗氧化剂^[3]和生理活性物质,能够与蛋白质发生相互作用,从而有效提高食品体系的氧化稳定性和营养价值。现有研究大多利用多酚单体^[4-5]或多酚提取物(混合物)^[6-7]改变蛋白质结构与功能性质。

目前,有关多酚单体与蛋白质的相互作用机制研究进展的报道^[8-9]很多,然而,多酚提取物中不同多酚单体与蛋白质的相互作用机制研究却鲜有报道。复合多酚中,不同种类多酚化合物与蛋白质之间的相互作用是否相互影响尚不明确。

荧光光谱法是一种灵敏度高、选择性强、操作简便、成本低的检测方法^[10-11],其原理是利用蛋白质与多酚相互作用后最大荧光强度的改变,探究蛋白质与多酚相互作用机制。范金波等^[12]通过荧光光谱法结合分子对接研究 5 种多酚类物质和 Ama 与 β -乳球蛋白(β -Lg)结合的竞争作用,发现在酸性条件下 Ama 与 5 种多酚结合均不存在竞争性,中性条件下 Ama 与 5 种多酚结合受配体添加顺序影响其竞争作用;岳鑫等^[13]通过荧光光谱法研究发现,红松种鳞多酚对乳清蛋白有较强的荧光猝灭作用且猝灭类型为静态猝灭作用,反应过程吸热,反应主要驱动力为疏水作用力;Dufour 等^[14]通过多酚引起色氨酸荧光猝灭的现象来研究多酚与蛋白质之间的相互作用。

没食子酸(GA)和表没儿茶素没食子酸酯(EGCG)是茶多酚中含量最高的酚酸和黄酮类物质,具有良好的水溶性与抗氧化性^[3]。课题组^[15]前期采用该两种多酚,分别探究其对乳液凝胶体系的影响,发现 GA 和 EGCG 对蛋白质的交联效果和凝胶强度的影响效果不同。乳清蛋白热处理是制备蛋白质乳液凝胶的第一步,并且有研究^[16]表明,热处理乳清蛋白可以使蛋白质内部疏水基团暴露,提高乳液稳定性,有利于蛋白质胶凝。

研究拟采用 GA 和 EGCG 两种多酚单体在不同复配施用模式下,应用荧光猝灭法研究复配多酚与热变性乳清蛋白之间相互作用机制,以期开发新型食品功能因子载体、有效调控载体在加工、运输和贮藏过程中功能因子的释放特性提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 仪器

磁力搅拌器:MS100 型,上海达姆实业有限公司;
集热式恒温加热磁力搅拌器:DF-101S 型,巩义市予

华仪器有限责任公司;

高速剪切机:T-18-D-S25 型,德国 IKA 公司;

荧光分光光度计:F-4700 型,日本 Itachi 公司;

离心机;Sorvall primo R 型,美国 Thermo 公司。

1.2 试剂

乳清蛋白 BiPRO:93%,美国 Davisco 公司;

氢氧化钠:分析纯,美国 Sigma 公司;

盐酸:37%,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;

金龙鱼玉米油:益海嘉里金龙鱼粮油食品股份有限公司;

没食子酸(GA):98%,南京春秋生物工程有限公司;

表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG):98%,南京春秋生物工程有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 多酚对蛋白质修饰 乳清蛋白粉末(NWPI)均匀地溶解于去离子水中得到质量浓度 100 g/L 的 NWPI 溶液。在室温下,用磁力搅拌器(300 r/min)搅拌 1 h,再置于 4 ℃ 冰箱中保存过夜。用 1 mol/L 的 NaOH 或 HCl 调节蛋白溶液 pH 至 7.0 后将其置于 85 ℃ 的水浴锅中加热 20 min 得到热变性乳清蛋白(HWPI)溶液。乳清蛋白经热处理后,内部疏水基团暴露,有利于蛋白质胶凝,是制备蛋白质冷凝胶的重要步骤。HWPI 溶液冷却至室温后与多酚溶液进行下一步反应。

GA 和 EGCG 贮液(10 mmol/L)为新鲜配制并冷藏,使用前稀释至适当浓度。

在中性(pH 7.0)条件下,HWPI 溶液与 GA、EGCG 溶液均匀混合,轻微震荡后在室温反应 2 h。在 HWPI-多酚溶液中,GA 与 EGCG 采用摩尔比(1:0.3:1,1:1:1,1:3.0:1)。

1.3.2 二元体系中 GA 或 EGCG 与 HWPI 相互作用研究

考察单一 GA 或 EGCG 对 HWPI 的荧光猝灭机制。用磷酸钠缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.0)将 HWPI-多酚溶液稀释至蛋白质终质量浓度为 0.2 mg/mL,使最终反应溶液中 GA 浓度分别为 0,30,60,90,120,150 μ mol/L,或 EGCG 分别为 0,10,20,30,40,50 μ mol/L,测定不同温度(298.2,304.2,310.2 K)下蛋白质的荧光光谱图。

1.3.3 三元体系中(GA/EGCG 与 HWPI)相互作用研究

(1) 探究 GA、EGC 与 HWPI 之间的相互作用力:GA 和 EGCG 贮液按照摩尔比 3:1,1:1,1:3 配制成 3 种混合多酚溶液。3 种混合多酚溶液按照一定的浓度梯度分别与蛋白质量浓度为 0.2 mg/mL 的 HWPI 溶液反应 2 h,蛋白多酚溶液中总酚浓度梯度为 0,30,60,90,120,150 μ mol/L。测定 298.2,304.2,310.2 K 3 种温度下蛋白质的荧光光谱图,分析相互作用力。

(2) 探究 HWPI、GA 和 EGCG 三元共存体系中竞争性关系:用磷酸钠缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.0)将 HWPI-

多酚溶液稀释至蛋白质终质量浓度为 0.2 mg/mL。用新鲜配制的 GA 和 EGCG 贮液分别与 HWPI 溶液反应,得到 HWPI-GA 溶液(GA 浓度 90 $\mu\text{mol/L}$)和 HWPI-EGCG 溶液(EGCG 浓度 30 $\mu\text{mol/L}$)。然后,将 GA 贮液按照浓度梯度(0, 30, 60, 90, 120, 150 $\mu\text{mol/L}$)加入 HWPI-EGCG 溶液,反应 2 h;EGCG 贮液按浓度梯度(0, 10, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{mol/L}$)加入 HWPI-GA 溶液中,反应 2 h。测定温度 298.2 K 时的蛋白质荧光光谱图,分析探究在乳清蛋白、GA 和 EGCG 三元共存体系中,两种多酚与蛋白质的相互作用机制。

1.3.4 荧光猝灭测定 根据 Umesha 等^[17]方法修改如下:在激发波长 280 nm 下,收集蛋白质 300~450 nm 波长范围内的发射光谱,选取发射光谱中最大的荧光强度值作为 HPWI 荧光强度测量值。

(1) 荧光猝灭常数:对荧光强度数据用 Stern-Volmer 方程[见式(1)]进一步分析得到不同温度下多酚对蛋白质的猝灭参数。

$$F_0/F = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q], \quad (1)$$

式中:

F_0 ——未添加猝灭剂(多酚)的蛋白荧光强度;

F ——添加了多酚后的蛋白荧光强度;

K_{sv} ——Stern-Volmer 方程的猝灭常数, L/mol;

K_q ——Stern-Volmer 方程的猝灭速率常数, L/(mol·s);

τ_0 ——未加入多酚时蛋白质的荧光寿命, 10^{-8} s^[18];

$[Q]$ ——荧光猝灭剂的浓度, mol/L。

(2) 结合位点和表观结合常数的分析计算:

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

式中:

F_0 ——未添加猝灭剂(多酚)的蛋白荧光强度;

F ——添加了多酚后的蛋白荧光强度;

$[Q]$ ——荧光猝灭剂的浓度, mol/L;

K_a ——蛋白质与多酚的结合常数, L/mol;

n ——蛋白质与多酚的结合位点个数。

(3) 多酚和蛋白质相互作用力分析:根据 Van't Hoff 方程[式(3)]分析多酚和蛋白质之间的相互作用驱动力^[19]。

$$\ln K_a = -\Delta H_0/RT + \Delta S_0/R, \quad (3)$$

吉布斯自由能变化(ΔG_0)由如式(4)表示^[20]。

$$\Delta G_0 = \Delta H_0 - T\Delta S_0 = -RT \ln K_a, \quad (4)$$

式中:

K_a ——蛋白质与多酚的结合常数, L/mol;

R ——气体常数, 8.314 J/(mol·K)。

通过 $\ln K_a$ 比 $1/T$ 求得基本的热力学参数 H_0 (焓)和 S_0 (熵)的变化,分析获得蛋白质与多酚结合过程中起重要作用的相互作用力类型,如静电作用力、疏水作用力、

氢键和范德华作用力。

1.3.5 数据分析 试验均设置 3 组平行对照,且重复 3 次,结果表示为平均值士标准偏差。试验数据采用 Statistix9.0 进行方差分析,用 LSD 程序检验是否存在显著性差异($P < 0.05$)。

2 结果与讨论

2.1 复合 GA/EGCG 与 HWPI 反应驱动力分析

多酚分子与 HWPI 的结合主要由静电作用力、疏水作用力、氢键和范德华力等相互作用力的驱动。可以通过基本的热力学参数焓变(ΔH_0)和熵变(ΔS_0)来分析获得结合过程中的主要驱动力。根据经典的 Van't Hoff 方程中 $\ln K_a$ 与 $1/T$ 的关系,计算出其斜率和截距来确定结合过程中焓变和熵变的数值。试验中,部分样品的 $\ln K_a$ 与 $1/T$ 先后呈现出两种线性关系,298.2, 304.2 K 之间斜率记为 ΔH_1 ,截距记为 ΔS_1 ;304.2, 310.2 K 之间斜率记为 ΔH_2 ,截距记为 ΔS_2 。298.2, 304.2, 310.2 K 条件下,反应焓变、熵变和吉布斯自由能见表 1。

由表 1 可知,单一多酚和复合多酚与 HWPI 反应时的 ΔG 均小于 0,说明反应自发进行。GA、EGCG 与 HWPI 的相互作用力主要有两种。第一种是以离子键为主导驱动力, $\Delta H_1 < 0$,这是由于 GA 和 EGCG 与蛋白质带正电的氨基酸残基之间形成离子键,此外,根据 Li 等^[21]报道,GA、EGCG 与 HWPI 之间的氢键和范德华力对 ΔH_1 也具有负贡献。 $\Delta S_1 < 0$ 说明多酚与 HWPI 体系中,游离多酚减少,这与多酚与蛋白质之间的离子键有关。第二种是以疏水相互作用为主要驱动力。 $\Delta H_2 > 0$, $\Delta S_2 > 0$,说明蛋白质与多酚结合时的疏水相互作用促使蛋白和多酚分子周围的水分子从有序状态变为无序状态,该疏水相互作用主要发生于多酚的疏水苯环结构与 HWPI 的疏水基团之间,同时,疏水相互作用对 ΔH_2 亦做出了正贡献^[22-23]。

与单一多酚组相比,GA/EGCG(3:1)与 HWPI 反应后,体系 ΔH_1 绝对值增大,说明复合多酚 GA/EGCG(3:1)与 HWPI 之间的离子力更强, ΔS 绝对值增大,说明 GA/EGCG(3:1)与 HWPI 的疏水作用增强。GA/EGCG(1:1)和 GA/EGCG(1:3)与 HWPI 的相互作用主要以疏水相互作用为驱动力。

2.2 多酚与蛋白质相互作用竞争性分析

2.2.1 不同多酚添加顺序下蛋白质的荧光猝灭机制 如图 1 所示,未与多酚作用的 HWPI 的荧光强度在 336 nm 处呈现出峰值,当与多酚反应后,其荧光强度降低,且多酚浓度越高,其荧光强度降低程度越大。EGCG 浓度达到 30 $\mu\text{mol/L}$ 或者 GA 浓度达到 90 $\mu\text{mol/L}$ 时,对 HWPI 的荧光猝灭率达到约 50%,由此可知,EGCG 对 HWPI 的荧光猝灭效果强于 GA。另外,随着 GA 浓度升高,

表 1 不同温度下 GA/EGCG 与 HWPI 结合的热力学参数

Table 1 Thermodynamic parameters of the binding of GA/EGCG with HWPI in binary system and ternary system at different temperatures

多酚体系	T/ K	K_a / ($10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$)	ΔG / ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)	ΔH_1 / ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)	ΔH_2 / ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)	ΔS_1 / ($\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$)	ΔS_2 / ($\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$)
GA	298.2	86.14	-14.62	-152.47	112.20	-462.29	407.70
	304.2	4.80	-11.84				
	310.2	33.58	-14.29				
GA/EGCG(3 : 1)	298.2	1 032.52	-12.83	-183.12	142.07	-555.76	513.20
	304.2	36.07	-11.06				
	310.2	440.15	-12.29				
GA/EGCG(1 : 1)	298.2	12.86	-10.34	42.10	42.10	183.05	183.05
	304.2	17.00	-11.61				
	310.2	57.97	-13.16				
GA/EGCG(1 : 3)	298.2	1.49	-12.67	59.82	59.82	234.83	234.83
	304.2	3.91	-13.23				
	310.2	12.72	-14.86				
EGCG	298.2	10.31	-17.39	-100.38	50.93	-293.61	203.70
	304.2	1.44	-14.05				
	310.2	3.28	-17.13				

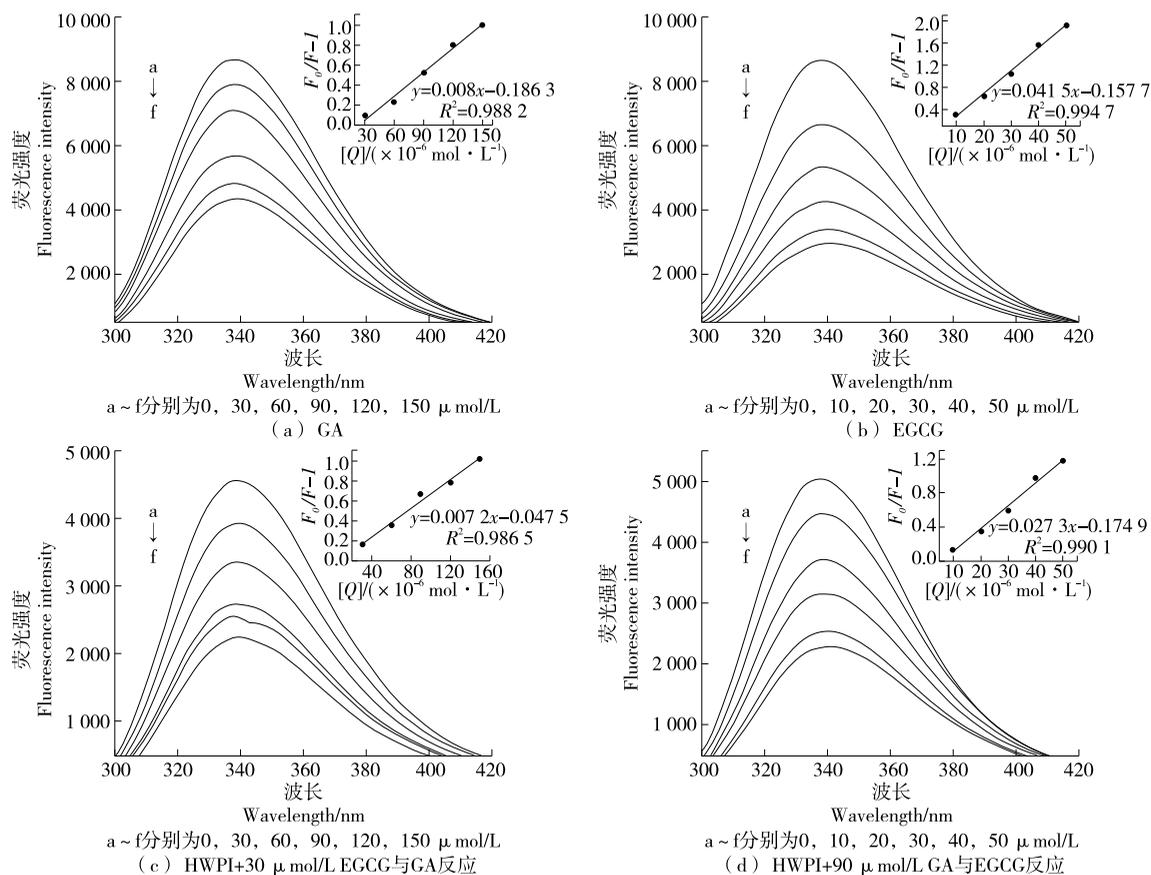


图 1 不同多酚添加模式下 HWPI 的荧光光谱图

Figure 1 Fluorescence spectrum of HWPI treated by different patterns of phenolic compounds

HWPI 最大荧光发射波长逐渐从 338.4 nm 迁移到 338.8 nm; 而随着 EGCG 浓度增加, HWPI 最大荧光发射波长逐渐从 338.6 nm 转变为 340.2 nm, 即 GA 和 EGCG 均引起 HWPI 荧光发射波长红移, 且 EGCG 造成红移现象更加明显。当加入多酚后, 蛋白质内源荧光基团(色氨酸和酪氨酸)由于周围环境的极性增加而荧光强度减弱, 在相同激发光波长下, 蛋白质的最大发射波长会由于能量损失而发生红移^[24]。在 Jia 等^[25]关于 EGCG 与天然乳清蛋白的相互作用机制的研究中, 也曾发现 EGCG 引起蛋白质内源荧光最大发射波长红移的现象。

由图 1(c)和图 1(d)可知, 在 HWPI-EGCG 和 HWPI-GA 体系中各自添加不同浓度的 GA 和 EGCG, 其荧光强

度都减弱, 荧光发射峰值均发生红移现象, 并随着 GA 和 EGCG 浓度的增大其荧光强度逐渐减弱。说明 EGCG 和 GA 同时存在时能进一步对 HWPI 的三级结构造成影响, 反映出 HWPI 具有多个与 GA 和 EGCG 的结合位点。

运用 Stern-Volmer 公式进一步分析多酚与 HWPI 的相互作用参数(图 2 和表 2), EGCG 的 K_{sv} 随着温度升高逐渐变大, 而 GA 的 K_{sv} 随温度的升高呈先降后升的趋势。通常, 动态猝灭依赖于扩散, 因此荧光物质的猝灭常数随温度升高而增大; 静态猝灭常数随着温度的升高会减小, 这是由于温度升高导致基态配合物稳定性下降。然而, GA 和 EGCG 的 K_q 均远大于最大动态 K_q 值 $[2.0 \times 10^{10} \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})]$ ^[26]。因此, 推断 GA 和 EGCG 与

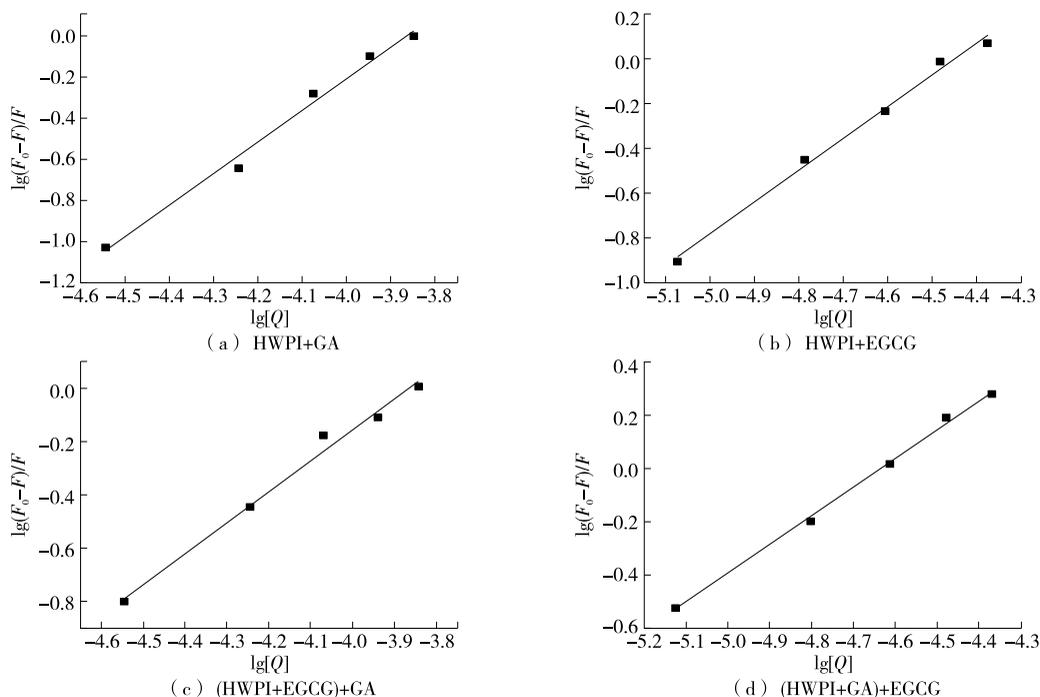


图 2 Stern-Volmer 曲线

Figure 2 Stern-Volmer curve

表 2 不同添加顺序下多酚与 HWPI 相互作用的 Stern-Volmer 猝灭常数 (K_{sv}) 和猝灭速率常数 (K_q)

Table 2 Stern-Volmer quenching constant and quenching rate constant of the interaction between phenolic compounds and HWPI in different addition order

蛋白多酚体系	T/K	$K_{sv}/(\times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1})$	$K_q/(\times 10^{12} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	R^2
HWPI+GA	298.2	0.80	0.80	0.988 2
	304.2	0.65	0.65	0.995 8
	310.2	1.00	1.00	0.985 2
HWPI+EGCG	298.0	4.15	4.15	0.994 7
	304.2	4.62	4.62	0.997 2
	310.2	5.49	5.49	0.996 9
(HWPI+EGCG)+GA	298.0	0.72	0.72	0.986 5
(HWPI+GA)+EGCG	298.0	2.73	2.73	0.990 1

HWPI之间同时存在动态和静态猝灭,静态猝灭占主导。在298.2 K时,HWPI与GA和EGCG的 K_{sv} 分别为 0.8×10^4 , 0.72×10^4 L/mol,可见与GA相比,EGCG与HWPI的亲性更强,这与最大荧光发射波长红移现象、巯基含量、三级结构的分析结果相符合。

当HWPI+GA体系内存在EGCG时,HWPI与GA的 K_{sv} 从 0.8×10^4 L/mol减小至 0.72×10^4 L/mol;当HWPI+EGCG体系内存在GA时,HWPI与EGCG的 K_{sv} 从 4.15×10^4 L/mol减小至 2.73×10^4 L/mol,该现象说明当GA和EGCG共同与HWPI反应时,虽然二者均能改变HWPI的三级结构,但是它们也会互相抑制彼此与HWPI的结合,降低其与HWPI之间的亲性,从而表现出各自的结合常数变小。这也初步表明EGCG和GA共同存在时,它们与HWPI结合时,两种多酚之间存在着一定的竞争关系。

HWPI与GA和EGCG的结合常数和结合位点数如表3所示。在同一温度下,单一EGCG与HWPI的结合常数明显小于GA,且EGCG的结合位点明显少于GA。温度是影响化学反应速率的重要因素之一,在蛋白质与多酚的体系中,温度主要会影响氢键和疏水相互作用。当温度升高时,氢键作用力减弱甚至消失,而疏水作用会增强。Sastry等^[27]曾报道葵花籽蛋白11S与绿原酸的相互作用随温度升高而减弱,当温度升高至55℃时,非共价作用力已基本消失;Thomas等^[28]认为BSA与原花青素衍生物的沉淀与温度变化无关。试验中,随着温度的

升高,单一GA和EGCG与HWPI的结合常数均先变小后增大,说明在不同温度下,多酚与HWPI结合的主要驱动力会发生改变。

2.2.2 竞争性分析 在298.2 K条件下,在激发波长280 nm处,考察恒定浓度GA对HWPI-EGCG,以及恒定浓度EGCG对HWPI-GA体系的荧光猝灭情况。并通过对比二元体系(单一多酚)和三元体系(复合多酚)的荧光猝灭曲线来分析GA和EGCG共存时其与HWPI之间的竞争关系。

如图3(a)所示,反应初始阶段,在HWPI+EGCG中加入GA能使HWPI进一步发生荧光猝灭,三元体系荧光猝灭的点(红色)出现在上方,说明EGCG与HWPI的预先结合可以促进低浓度GA与HWPI的相互作用;随着体系中GA浓度的升高,三元体系、二元体系中HWPI的荧光猝灭效果逐渐趋于相同,当添加GA浓度达到 $120 \mu\text{mol/L}$ 时,三元体系的猝灭点出现在二元体系的下方,说明此时三元体系中GA与蛋白质亲和性降低,EGCG的共存阻碍了高浓度GA与HWPI之间的结合。由图3(b)可知,(HWPI+GA)+EGCG的荧光猝灭曲线一直出现在HWPI+EGCG曲线的下方,说明GA的预先结合对EGCG-HWPI相互作用产生负影响(K_{sv} 降低),使三元体系中HWPI的荧光猝灭程度小于二元体系,从而减小了HWPI的荧光猝灭程度,推断出GA与EGCG之间发生竞争性关系。

由结合位点的结果(表3)可知,在298.2 K条件下,

表3 不同添加顺序下多酚与HWPI结合常数(K_a)和结合位点(n)

Table 3 Binding constants and binding sites of GA/EGCG with HWPI in different addition order

多酚体系	$K_a / (\times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1})$			n		
	298.2 K	304.2 K	310.2 K	298.2 K	304.2 K	310.2 K
GA	71.98	4.82	33.58	1.53	1.23	1.41
EGCG	20.84	3.89	10.16	1.17	0.98	1.07
EGCG+GA	3.11			1.17		
GA+EGCG	156.06			1.42		

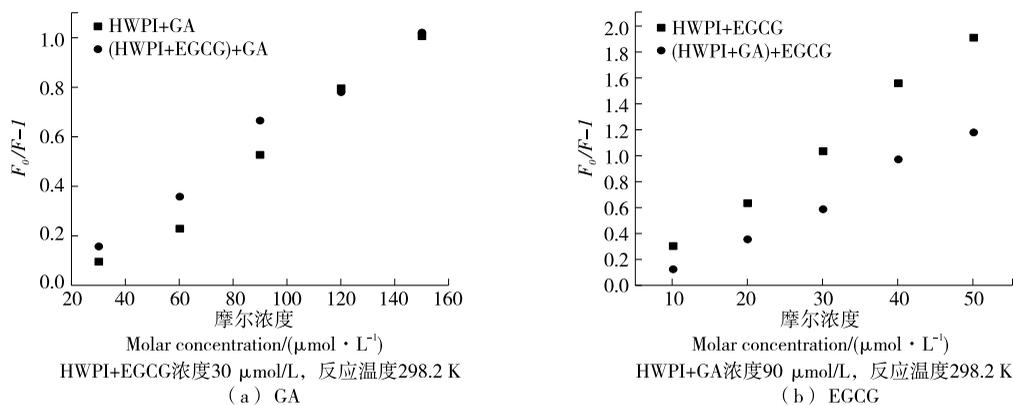


图3 GA和EGCG与HWPI竞争性结合荧光光谱图

Figure 3 Fluorescence spectra of competitive binding of GA and EGCG with HWPI

GA 与 HWPI 的结合位点为 1.53, GA 与 HWPI+EGCG 的结合位点略降低(1.17), 在 HWPI+EGCG 体系中加入 GA 时, GA 浓度较低时, EGCG 的预结合促进 GA 与 HWPI 的结合, GA 与 HWPI 在不同的结合位点发生结合, 使 HWPI 进一步发生荧光猝灭; 然而随着体系中 GA 浓度的升高, EGCG 和 GA 之间逐渐出现竞争, 抑制 GA 的结合。EGCG 与 HWPI 的结合位点为 1.17, 在 HWPI-GA 体系中添加 EGCG 时, EGCG 的结合位点从原先增加为 1.42, 虽然 GA 的预先结合会降低 EGCG 与 HWPI 的 K_{sv} , 但是 GA 的预结合使得最终 EGCG 的结合位点有所增加。

3 结论

采用荧光猝灭法, 通过二元体系(没食子酸或表没食子儿茶素没食子酸酯与热变性乳清蛋白)中多酚与热变性乳清蛋白之间的表观结合常数和三元体系(没食子酸/表没食子儿茶素没食子酸酯与热变性乳清蛋白)中没食子酸与表没食子儿茶素没食子酸酯之间竞争相互作用分析, 并结合二元、三元体系中多酚与热变性乳清蛋白的作用力类型, 探究不同复配比例的没食子酸/表没食子儿茶素没食子酸酯与热变性乳清蛋白之间的相互作用机制。研究结果显示, 没食子酸和表没食子儿茶素没食子酸酯与热变性乳清蛋白反应时, 二者互相抑制彼此与热变性乳清蛋白的结合, 从而导致三元体系内两种多酚与热变性乳清蛋白的结合常数减小, 亲和性降低; 三元体系内, 表没食子儿茶素没食子酸酯与热变性乳清蛋白的预先结合会促进低浓度而抑制高浓度没食子酸与热变性乳清蛋白结合, 没食子酸与热变性乳清蛋白的预先结合会抑制表没食子儿茶素没食子酸酯与热变性乳清蛋白的进一步结合, 使三元体系中热变性乳清蛋白的荧光猝灭程度小于二元体系, 说明没食子酸和表没食子儿茶素没食子酸酯与热变性乳清蛋白发生竞争关系。复合没食子酸/表没食子儿茶素没食子酸酯与热变性乳清蛋白的主要相互作用力与多酚复配比例有关。其中, 没食子酸、表没食子儿茶素没食子酸酯、没食子酸/表没食子儿茶素没食子酸酯(3:1)与热变性乳清蛋白之间均存在离子作用力与疏水作用力两种相互作用方式, 与二元体系相比, 复配多酚没食子酸/表没食子儿茶素没食子酸酯(3:1)与热变性乳清蛋白的三元体系内离子作用力和疏水作用力最大。

参考文献

- [1] 王庆卫. 乳清蛋白在乳制品生产中的应用浅析[J]. 养生保健指南, 2019(9): 310.
WANG Q W. A brief analysis of the application of whey protein in dairy product manufacturing[J]. Health and Wellness Guide, 2019 (9): 310.
- [2] ISMAIL B P, SENARATNE-LENAGALA L, STUBE A, et al. Protein demand: Review of plant and animal proteins used in alternative protein product development and production[J]. Animal Frontiers, 2020, 10(4): 53-63.
- [3] GRAF B A, MILBURY P E, BLUMBERG J B. Flavonols, flavones, flavanones, and human health: epidemiological evidence[J]. J Med Food, 2005, 8(3): 281-290.
- [4] MENG Y, LI C. Conformational changes and functional properties of whey protein isolate-polyphenol complexes formed by non-covalent interaction[J]. Food Chemistry, 2021, 364: 129622.
- [5] ZHANG Y, LU Y, CHEN L, et al. Inhibition of epigallocatechin-3-gallate/protein interaction by methyl- β -cyclodextrin in myofibrillar protein emulsion gels under oxidative stress [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(30): 8 094-8 103.
- [6] DJUARDI A U P, YULIANA N D, OGAWA M, et al. Emulsifying properties and antioxidant activity of soy protein isolate conjugated with tea polyphenol extracts [J]. Journal of Food Science and Technology Mysore, 2020(10): 3 591-3 600.
- [7] CHEN Y, JIANG S, CHEN Q, et al. Antioxidant activities and emulsifying properties of porcine plasma protein hydrolysates modified by oxidized tannic acid and oxidized chlorogenic acid[J]. Process Biochemistry, 2019, 79(4): 105-113.
- [8] 宋子悦, 杨杨, 任丽琨, 等. 蛋白质与多酚复合物形成机制及其功能性研究进展[J]. 食品科技, 2022, 47(1): 262-268.
SONG Z Y, YANG Y, REN L K, et al. Mechanism of protein-polyphenol complex formation and research progress on its functionality [J]. Food Science and Technology, 2022, 47(1): 262-268.
- [9] 王珂雯, 廖小军, 徐贞贞. 多酚-蛋白质相互作用分析技术研究进展[J]. 食品工业科技, 2021, 42(14): 371-379.
WANG K W, LIAO X J, XU Z Z. Research progress on analysis techniques of polyphenol-protein interactions [J]. Food Industry Science and Technology, 2021, 42(14): 371-379.
- [10] ISHTIKHAR M, RABBANI G, KHAN S, et al. Biophysical investigation of thymoquinone binding to 'N' and 'B' isoforms of human serum albumin: exploring the interaction mechanism and radical scavenging activity[J]. Rsc Advances, 2015, 5(24): 18 218-18 232.
- [11] KHAN A B, KHAN J M, ALI M S, et al. Spectroscopic approach of the interaction study of amphiphilic drugs with the serum albumins[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2011, 87(2): 447-453.
- [12] 范金波, 麻奥, 周素珍, 等. 荧光光谱法结合分子对接研究多酚和苋菜红与 β -乳球蛋白结合的竞争作用[J]. 中国食品学报, 2023, 23(2): 14-18.
FAN J B, MA A, ZHOU S Z, et al. Competitive binding of polyphenols and amaranth red to β -lactoglobulin studied by fluorescence spectroscopy and molecular docking [J]. Chinese Journal of Food Science, 2023, 23(2): 14-18.
- [13] 岳鑫, 包怡红. 基于荧光及紫外光谱法对红松种鳞多酚与乳清蛋白相互作用的研究[J]. 现代食品科技, 2019, 35(7): 114-120.

- YUE X, BAO Y H. Study of the interaction between polyphenols from red pinecone and whey protein based on fluorescence and UV spectroscopy[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2019, 35(7): 114-120.
- [14] DUFOUR C, DANGLES O. Flavonoid-serum albumin complexation: Determination of binding constants and binding sites by fluorescence spectroscopy[J]. *BBA-General Subjects*, 2005, 1 721(1/2/3): 164-173.
- [15] CAO Y, XIONG Y L, CAO Y, et al. Interfacial properties of whey protein foams as influenced by preheating and phenolic binding at neutral pH[J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 82(9): 379-387.
- [16] MOON B, MANGINO M E. The effect of preheating on solubility and emulsion stability of whey protein concentrates [J]. *Milchwissenschaft-milk Science International*, 2004, 59 (3): 165-169.
- [17] UMESHA K, JALDAPPAGARI S, KALANUR S, et al. Probing the binding of fluoxetine hydrochloride to human serum albumin by multispectroscopic techniques[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2010, 75(1): 314-319.
- [18] LAKOWICZ J R, WEBER G. Quenching of fluorescence by oxygen: A probe for structural fluctuations in macromolecules[J]. *Biochemistry*, 1973, 12(21): 4 161-4 170.
- [19] TU B, WANG Y, MI R, et al. Evaluation of the interaction between naringenin and human serum albumin: Insights from fluorescence spectroscopy, electrochemical measurement and molecular docking [J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2015, 149(5): 536-543.
- [20] LIAO Z, YU X, YAO Q, et al. Interaction between piroxine and bovine serum albumin in aqueous solution[J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2014, 129(15): 314-319.
- [21] LI M, HAGERMAN A E. Role of the Flavan-3-ol and galloyl moieties in the interaction of (–)-epigallocatechin gallate with serum albumin[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2014, 62(17): 3 768-3 775.
- [22] ROSS P D, SUBRAMANIAN S. Thermodynamics of macromolecular association reactions: Analysis of forces contributing to stabilization[J]. *Biophysical Journal*, 1980, 32(1): 79-81.
- [23] LI X, HAO Y. Probing the binding of (+)-catechin to bovine serum albumin by isothermal titration calorimetry and spectroscopic techniques[J]. *Journal of Molecular Structure*, 2015, 1 091: 109-117.
- [24] BOURASSA P, KANAKIS C D, TARANTILIS P, et al. Resveratrol, genistein, and curcumin bind bovine serum albumin [J]. *Journal of Physical Chemistry B*, 2010, 114(9): 3 348-3 354.
- [25] 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: 305-110.
- [26] LANGE D C, KOTHARI R, PATEL R C, et al. Retinol and retinoic acid bind to a surface cleft in bovine β -lactoglobulin: A method of binding site determination using fluorescence resonance energy transfer[J]. *Biophysical Chemistry*, 1998, 74(1): 45-51.
- [27] SASTRY M C S, RAO M S N. Binding of chlorogenic acid by the isolated polyphenol-free 11 S protein of sunflower (*Helianthus annuus*) seed[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 1990, 38(12): 2 103-2 110.
- [28] THOMAS H, ARNE G, BERND S, et al. Protein binding and astringent taste of a polymeric procyanidin, 1, 2, 3, 4, 6-penta-O-galloyl- β -D-glucopyranose, castalagin, and grandinin[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2006, 54(25): 9 503-9 509.
-
- (上接第 33 页)
- [17] 刘宗奇, 武晨剑, 袁学文, 等. 白色和黄色金针菇子实体营养成分与挥发性物质比较[J]. *食用菌学报*, 2021, 28(3): 102-111. LIU Z Q, WU C J, YUAN X W, et al. Comparison of nutrients and volatile compounds between fruiting bodies of white and yellow *Flammulina filiformis* [J]. *Acta Edulis Fungi*, 2021, 28 (3): 102-111.
- [18] WHO/FAO/UNU. Protein and amino acid requirements in human nutrition: Report of a joint WHO/FAO/UNU expert consultation [M]. Geneva: WHO Press, 2007: 276.
- [19] SELIGSON F H, MACKEY L N. Variable predictions of protein quality by chemical score due to amino acid analysis and reference pattern[J]. *Journal of Nutrition*, 1984, 114: 682-691.
- [20] 朱圣陶, 吴坤. 蛋白质营养价值评价: 氨基酸比值系数法[J]. *营养学报*, 1988, 10(2): 187-190. ZHU S T, WU K. Nutritional evaluation of protein-ratio coefficient of amino acid[J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 1988, 10(2): 187-190.
- [21] OSER B. Method for integrating essential amino acid content in the nutritional evaluation of protein[J]. *Journal of the American Dietetic Association*, 1951, 27(5): 396-402.
- [22] IOM. Dietary reference intakes: Energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acid, cholesterol, protein and amino acids[M]. Washington DC: The National Academies Press, 2005: 589-768.
- [23] 李泰, 卢士军, 孙君茂, 等. 26 种常见市售食用菌营养成分分析及评价[J]. *中国食用菌*, 2021, 40(12): 66-72. LI T, LU S J, SUN J M, et al. Analysis and evaluation on nutritional components of 26 common edible fungi in market[J]. *Edible Fungi of China*, 2021, 40(12): 66-72.
- [24] WANG R J, ZHANG Y Y, LU H, et al. Comparative aroma profile analysis and development of a sensory aroma lexicon of seven different varieties of *Flammulina velutipes* [J]. *Frontiers in Nutrition*, 2022, 9: 827825.
- [25] LU H, SONG W, SHANG X D, et al. Expression of terpene synthase-related genes in parents and offspring of *Flammulina filiformis*. based on differences in volatile aroma components[J]. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 2023, 6: 100156.