

芦丁—酪蛋白复合物的制备及特性研究

张楠¹ 刘丽莉^{1,2,3,4} 杨乐¹ 李思思¹ 张鑫源¹

(1. 河南科技大学食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471023; 2. 河南科技大学食品加工与安全国家级教学示范中心, 河南 洛阳 471023; 3. 河南省食品加工与质量安全控制河南省国际联合实验室, 河南 洛阳 471023; 4. 食品微生物河南省工程技术研究中心, 河南 洛阳 471023)

摘要: [目的] 研究蛋白质和多酚相互作用形成的复合物对多酚和蛋白质的生物利用度的影响。[方法] 以芦丁和酪蛋白为原料, 制备芦丁—酪蛋白复合物, 并分析其理化性质和结构特性。[结果] 芦丁—酪蛋白复合物的最佳制备工艺条件为 $m_{\text{芦丁}}:m_{\text{酪蛋白}}=1.89:1.00$ 、反应时间 5.94 h, pH 8.5, 反应温度 50 °C, 此条件下复合物结合度为 40.23%。与酪蛋白相比, 复合物的乳化活性指数降低了 8.47 m²/g, 乳化稳定性降低了 9.39%, 溶解性增加了 5.11%, 表面疏水性显著提高, 抗氧化性显著升高 ($P<0.05$)。扫描电镜结果表明, 芦丁—酪蛋白复合物呈片状, 表面平滑, 这有助于发挥复合物的功能特性; 红外光谱结果显示, 复合物在酰胺 I 带和酰胺 II 带峰变宽, 发生红移, 荧光强度和同步荧光的荧光强度下降, 发生荧光淬灭, 芦丁对酪蛋白的二级结构产生影响, 蛋白质的构象发生改变。[结论] 与未复合的酪蛋白相比, 芦丁—酪蛋白复合物的溶解性、表面疏水性及抗氧化活性增强。

关键词: 芦丁; 酪蛋白; 复合物; 制备工艺; 功能特性

Preparation and properties of rutin-casein complexes

ZHANG Nan¹ LIU Lili^{1,2,3,4} YANG Le¹ LI Sisi¹ ZHANG Xinyuan¹

(1. College of Food and Bioengineer, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471023, China; 2. National Experimental Teaching Demonstration Center for Food Processing and Security, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471023, China; 3. Henan International Joint Laboratory of Food Processing and Quality and Safety Control, Luoyang, Henan 471023, China; 4. Research and Utilization of Functional Food Resources Science and Technology Innovation Team of Henan Provincial Department of Education, Luoyang, Henan 471023, China)

Abstract: [Objective] To investigate the effect of complexes produced by protein-polyphenol interaction on the bioavailability of polyphenols and proteins. [Methods] Rutin-casein complexes are prepared using rutin and casein as raw materials. Their physicochemical and structural properties are analyzed. [Results] The optimal preparation conditions for the rutin-casein complexes are determined as follows: mass ratio of rutin to casein=1.89:1.00, reaction time of 5.94 h, pH 8.5, and temperature of 50 °C. Under such conditions, the binding degree is 40.23%. Compared with casein, the complexes exhibit a decrease in emulsifying activity index (8.47 m²/g) and emulsifying stability (9.39%). The solubility increases by 5.11%, surface hydrophobicity is significantly enhanced, and antioxidant activity markedly improves ($P<0.05$). Scanning electron microscopy reveals that the rutin-casein complexes display a lamellar structure with smooth surfaces, which may contribute to its functional properties. Infrared spectroscopy demonstrates peak broadening and redshifts in the amide I and II bands, and fluorescence intensity (including synchronous fluorescence) decreases due to fluorescence quenching. It indicates that rutin alters the secondary structure and conformational arrangement of casein. [Conclusion] Compared with the uncomplexed casein, the rutin-casein complexes are enhanced in solubility, surface hydrophobicity, and antioxidant activity.

基金项目: 河南省科技攻关 (编号: 242102110092); 河南科技大学 SRTF (编号: 2024221); 河南科技大学校特聘教授科研经费 (编号: 13510004)

通信作者: 刘丽莉 (1974—), 女, 河南科技大学教授, 博士。E-mail: yangliuyilang@126.com

收稿日期: 2024-10-30 **改回日期:** 2025-04-30

引用格式: 张楠, 刘丽莉, 杨乐, 等. 芦丁—酪蛋白复合物的制备及特性研究[J]. 食品与机械, 2025, 41(7): 9-17.

Citation: ZHANG Nan, LIU Lili, YANG Le, et al. Preparation and properties of rutin-casein complexes[J]. Food & Machinery, 2025, 41(7): 9-17.

Keywords: rutin; casein; complex; preparation process; functional property

蛋白质是人体六大营养素之一,广泛存在于各种肉类、蛋类、谷类及奶制品中。酪蛋白,又称乳酪素、干酪素等,是哺乳动物乳汁中含量最多、营养价值最高的蛋白质组分,其分子特性各异,可分为 α s1-CN、 α s2-CN、 β -CN和 κ -CN 4类。酪蛋白中含有 8 种必需氨基酸,在体系内具有稳定的螯合特性,且易在蛋白酶的作用下被水解为小分子活性肽,近年来被广泛应用于食品、医药等领域^[1]。此外,酪蛋白不仅对阿尔兹海默症等疾病有改善和治疗作用,还能通过与其他物质结合实现分子递送的功能,增强其稳定性和生物利用度^[2]。

多酚是一类来源于植物性食物的天然产物,具有抗氧化、抗炎、抗癌^[3]等生物活性,对多种复杂疾病有一定的治疗潜力^[4]。芦丁,又名维生素 P、芸香苷等,是一种广泛存在于植物中的天然黄酮类化合物,具有抗氧化、抗炎、抗菌、调节血糖^[5]、抗衰老^[6]等生物学功能。作为一种饮食化合物,芦丁可以应用于功能性食品、膳食补充剂,以及预防和治疗癌症的药物中^[7]。同时,适量添加芦丁也能改善食品的感官品质和持水力^[8]。然而,芦丁作为槲皮素的 3-*O*-芸香糖苷,水溶性和稳定性差以及膜通透性有限的特性导致芦丁的生物利用率低^[9],限制了其在食品工业中的应用。有研究证实,蛋白质可以通过共价键或非共价键与多酚类物质相互作用,成为多酚的优秀保护剂和载体,避免其在肠胃的消化过程中被酶解或氧化降解,提高多酚类物质的生物学活性和生物利用度^[10],从而解决多酚稳定性、溶解性和生物利用度差等问题^[11]。不同多酚与不同蛋白质的相互作用方式存在一定差异,且受溶液 pH 值^[12]、反应温度、离子浓度等因素影响;多酚-蛋白质复合物不仅能保留植物多酚的性质赋予蛋白质分子新的功能^[13],同时还可能影响蛋白质的溶解性、凝胶性、热稳定性、乳化性、致敏性和氧化活性^[14]。张生鹏等^[15]研究表明,采用羟丙基- β -环糊精(HPCD)包埋芦丁可以提高其水溶性、抗氧化性和稳定性,这有利于芦丁在不同环境中发挥保健功能。虾青素可以通过分子间相互作用力与酪蛋白的肽键键合,产生静态荧光淬灭,且形成的复合物可以提高虾青素的生物利用率^[16]。酪蛋白可以与甘草多糖(GP)以静电相互作用为主要作用力形成复合物,且添加甘草多糖可以提高乳液的乳化活性、稳定性和贮藏稳定性^[17]。

不同酚类化合物对酪蛋白的功能特性及影响程度不同。Ke 等^[18]发现酪蛋白与槲皮素相互作用后结构发生变化,在共价相互作用中改善了酪蛋白的溶解度,提高了酪蛋白的起泡性、乳化性和抗氧化活性;刘雪梅等^[19]发现橙皮苷、柚皮苷对酪蛋白的淬灭均为静态淬灭,两种多酚与酪蛋白的结合主要是疏水作用力,但橙皮苷与酪蛋白存

在更多的氢键作用,因此结合得更加稳定。芦丁与不同蛋白质在不同条件下形成的复合物的功能特性也不同,Friesen 等^[20]发现添加芦丁可以改善大豆蛋白制备的膜的特性,降低其水蒸气透过性。李春翼等^[21]揭示了热处理对芦丁与麦醇溶蛋白间疏水相互作用的增强效应,进而诱导麦醇溶蛋白二级结构的转变,这为该复合物稳定的 Pickering 乳液产品开发奠定了理论基础;而超声处理芦丁-麦醇溶蛋白可以改变复合物的微观结构,使其形成疏松多孔的结构,这一过程还能增强复合物的热稳定性^[22]。Guo 等^[23]发现芦丁和乳清蛋白之间可以形成相互作用,利用超声处理会使得复合物的二级结构更加有序,同时提高复合物的溶解度和结合量,降低复合物的粒径和表面疏水性。然而,有关芦丁-酪蛋白复合物的制备及其特性研究仍处于起步阶段。研究拟利用芦丁和酪蛋白的独特性质,将芦丁与酪蛋白结合,形成既具有芦丁生物活性又具有酪蛋白特性的复合物,以期为新型功能性食品配料提供更多选择,拓展多酚-蛋白质复合物在食品工业领域的应用前景。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

芦丁、福林酚试剂:分析纯,上海麦克林生化科技股份有限公司;

酪蛋白:生化试剂,上海麦克林生化科技股份有限公司;

无水乙醇:分析纯,天津德恩化学试剂有限公司;

氢氧化钠:分析纯,广东西陇化工股份有限公司;

热恒温水浴锅:AMTD-4000 型,北京市永光明医疗仪器有限公司;

电子天平:AR214 型,美国 Mettler Toledo 公司;

数显 pH 计:SHYC-pHB-100 型,北京中西远大科技有限公司;

紫外分光光度计:UV-2600 型,日本日立公司;

荧光分光光度计:Cary eclipse 型,安捷伦科技有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 芦丁-酪蛋白复合物制备工艺 用 10% 乙醇将芦丁配成 1 mg/mL 的溶液,用 0.01 mol/L 的 NaOH 溶液配制 1 mg/mL 的酪蛋白。将二者以一定比例混合并进行磁力搅拌,透析 24 h,取透析外液测定结合度。

1.2.2 结合度测定 取 1 mL 透析外液,测定 510 nm 处吸光度,根据芦丁溶液标准曲线确定剩余芦丁质量,计算结合度。

1.2.3 芦丁-酪蛋白复合物制备工艺优化

(1) 单因素试验:固定 $m_{\text{芦丁}}:m_{\text{酪蛋白}}=1:2$, pH 7, 反应温度 50 °C, 反应时间 5 h。分别考察 $m_{\text{芦丁}}:m_{\text{酪蛋白}}$ (1:2, 1:3, 1:1, 2:1, 3:1)、反应时间 (3, 4, 5, 6, 7 h)、pH 值 (5.8, 6.8, 7.8, 8.8, 9.8) 和反应温度 (20, 30, 40, 50, 60 °C) 对复合物结合度的影响。

(2) 正交旋转试验:在单因素试验的基础上,以结合度为评价指标,通过三因素正交旋转试验,确定 $m_{\text{芦丁}}:m_{\text{酪蛋白}}$ 、pH 值和反应时间的最佳参数组合。

1.2.4 芦丁-酪蛋白复合物的功能特性分析

(1) 乳化特性:参照迟云峰等^[24]的方法略作修改。将 0.1 g 样品溶于 100 mL 溶剂中,取 30 mL 配制好的溶液加入 10 mL 大豆油,8 000 r/min 均质 1 min,取 100 μ L 底层溶液,用 0.1% 的十二烷基硫酸钠溶液 (SDS) 稀释 100 倍,测定 500 nm 处吸光值,静止 30 min 后再次测定吸光值,分别按式(1)、式(2)计算乳化活性和乳化稳定性。

$$E_{\text{AI}} = \frac{2 \times 2.303 \times A_1 \times DF}{C\varphi L \times 10^4}, \quad (1)$$

$$E_{\text{SI}} = \frac{A_1 \times A_2}{A_1 - A_2}, \quad (2)$$

式中:

E_{AI} ——乳化活性, m^2/g ;

E_{SI} ——乳化稳定性, %;

C ——样品质量浓度, g/mL ;

φ ——乳化液中油相比例,取 0.25;

L ——比色杯的光径, cm ;

DF ——稀释倍数;

A_1 ——乳化液的吸光值;

A_2 ——30 min 后的吸光值。

(2) 溶解性:参照迟云峰等^[24]的方法略作修改。样液以 10 000 r/min 离心 30 min。取 5 mL G-250 试剂与 1 mL 蛋白溶液混匀,300 K 反应 15 min,测定 595 nm 处吸光度。取 10 mg BSA 溶于蒸馏水中并定容至 100 mL,制成 0.1 mg/mL 的标准品母液,BSA 质量浓度范围为 0.02~0.10 mg/mL。按式(3)计算样品溶解度。

$$S = \frac{C_1}{G_1} \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

S ——溶解度, %;

C_1 ——上清液中剩余的酪蛋白质量浓度, mg/mL ;

C_2 ——溶解时酪蛋白质量浓度, mg/mL 。

(3) 表面疏水性:参照 Tian 等^[25]的方法略作修改。取 1 mL 质量浓度为 1 mg/mL 的芦丁-酪蛋白溶液与 200 μ L 溴酚蓝 (1 mg/mL) 混合,室温下振荡混匀,10 000 r/min 离心 10 min,上清液稀释 10 倍,测定 595 nm 处吸光度。同时在 0.02 mol/L Tris-HCl 缓冲液中加入 1 mL 溴酚蓝

(1 mg/mL) 作为空白样。按式(4)计算表面疏水性。

$$H_0 = \frac{200 \times (A_0 - A_1)}{A_0}, \quad (4)$$

式中:

H_0 ——表面疏水性, $\mu\text{g}/\text{mg}$;

A_0 ——空白样品的吸光度;

A_1 ——样品的吸光度。

(4) 抗氧化性:参照杜艳^[26]的方法略作修改。取 6.5 mg DPPH 粉末,用无水乙醇定容至 100 mL,避光反应 20 min,将 517 nm 处吸光度调至 1 附近。吸取 0.3 mL 样品溶液,加入 2.7 mL DPPH 溶液。同时,以无水乙醇与 DPPH 混合作为空白组,避光反应 20 min 后,测定 517 nm 处吸光值,并按式(5)计算 DPPH 自由基清除能力。

$$S_c = \frac{1 - A_{\text{样品}}}{A_{\text{空白}}} \times 100\%, \quad (5)$$

式中:

S_c ——DPPH 自由基清除能力, %;

$A_{\text{样}}$ ——加入样品溶液后的吸光度;

$A_{\text{空白}}$ ——空白对照的吸光度。

1.2.5 芦丁-酪蛋白复合物结构特性分析

(1) 扫描电镜:取适量酪蛋白、芦丁、芦丁-酪蛋白复合物粉末,用导电胶粘在样品台上,通过扫描电镜观察 500 $\times$ 下样品的微观结构。

(2) 傅里叶红外光谱:将干燥的酪蛋白、芦丁-酪蛋白复合物样品与溴化钾粉按质量 1:100 混匀,傅里叶红外光谱扫描范围 500~4 000 cm^{-1} 。

(3) 荧光光谱:在激发波长 280 nm、激发发射狭缝 10 nm、扫描范围 280~400 nm 下测定酪蛋白、芦丁-酪蛋白复合物的荧光光谱。

(4) 同步荧光光谱:固定激发波长 280 nm,测定同步荧光。固定荧光发射与激发的波长差 ($\Delta\lambda$) 为 60 nm,测定二者的同步荧光光谱。

1.3 数据处理

各试验均平行 3 次,结果以平均值 $\pm$ SD 表示。利用 Origin 2022 软件绘图,利用 SPSS 软件进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 芦丁-酪蛋白复合物制备工艺优化

2.1.1 单因素试验 由图 1(a)可知,芦丁-酪蛋白复合物的结合度随着 $m_{\text{芦丁}}:m_{\text{酪蛋白}}$ 的增加先升高后下降,可能是因为芦丁与酪蛋白的结合位点是一定的,相互作用时,结合度在合适的比例才能达到最优^[27]。因此,选择 $m_{\text{芦丁}}:m_{\text{酪蛋白}}$ 为 1:2。

由图 1(b)可知,随着反应时间的延长,芦丁-酪蛋白复合物的结合度呈先升高后趋于平稳的趋势,当反应时间为 5 h 时,结合度不再增加。因此,选择最佳反应时间

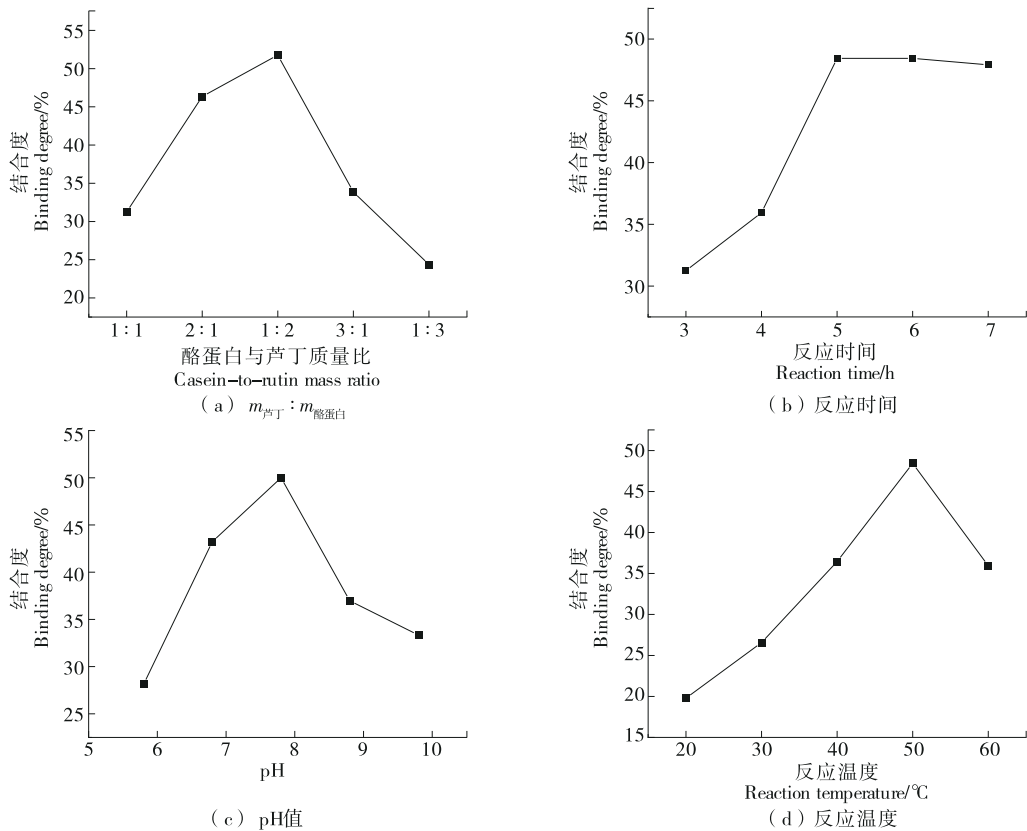


图1 各因素对芦丁—酪蛋白复合物结合度的影响

Figure 1 Effects of binding degree of rutin-casein complexes

为 5 h。

由图 1(c)可知,随着 pH 值的增加,芦丁—酪蛋白复合物的结合度呈先升高后降低趋势。当 pH 值 >7.8 时,结合度明显降低,可能是此时 pH 值过高,酪蛋白电荷变化减少了静电作用,同时溶液环境变化削弱了次级键,导致复合物稳定性下降,结合度降低。因此,选择最佳 pH 为 7.8。

由图 1(d)可知,随着反应温度的升高,芦丁—酪蛋白复合物的结合度呈先升高后下降趋势,当反应温度为 50 °C 时,结合度达到最大值。这可能是反应温度过高,酪蛋白发生部分变性。因此,选择最佳反应温度为 50 °C。

2.1.2 正交旋转试验 正交旋转试验因素水平见表 1,试验设计及结果见表 2。

运用 SPSS 对试验数据进行分析,各因素对结合度的影响顺序为 pH 值 $>m_{\text{芦丁}}:m_{\text{酪蛋白}}>$ 反应时间,三者皆为正效应。在显著水平 $\alpha=0.01$ 下剔除不显著项后,可得简化后的三元二次回归方程:

$$Y=34.898\ 37+1.645\ 43X_1+6.125\ 89X_2+2.688\ 33X_3-6.069\ 85X_1^2-2.824\ 10X_3^2+2.030\ 84X_1X_2。 \quad (6)$$

由表 3 可知, $F_{\text{失拟}}=8.78<F_{0.01(5,5)}=10.97$,说明该回归方程对数据的拟合程度较好,可进行显著性检验。

表 1 因素水平表

Table 1 Factor levels

水平	$X_1\ m_{\text{芦丁}}:m_{\text{酪蛋白}}$	$X_2\ \text{pH 值}$	$X_3\ \text{反应时间/h}$
1.682	3.00	7.00	9.80
1	2.45	6.18	8.98
0	1.65	5.00	7.80
-1	0.85	3.82	6.62
-1.682	0.30	3.00	5.80

$F_{\text{回归}}=9.13>F_{0.01(9,10)}=4.95$,说明方程的总回归关系在 0.01 水平上显著,建立的三元二次回归方程模型可靠度高。其中, X_2 、 X_1^2 对结合度影响极显著($P<0.01$), X_3^2 对结合度影响显著($P<0.05$)。

由图 2 可知,两两因素的交互作用对结合度的影响曲面越陡峭,表明交互作用对芦丁—酪蛋白结合度的影响越大,响应值变化越大,与方差分析结果一致。

2.1.3 验证实验 通过软件分析确定最佳工艺条件为 $m_{\text{芦丁}}:m_{\text{酪蛋白}}=1.89:1.00$ 、反应时间 5.94 h, pH 值 8.5,此时芦丁—酪蛋白复合物的结合度为 40.60%。在最佳条件下进行 3 次验证实验,测得芦丁—酪蛋白复合物的平均结合度为 40.23%,与理论值相差 0.37%,说明该结论合理。

表2 正交旋转试验设计及结果

试验号	X_1	X_2	X_3	结合度/%
1	1	1	1	39.58
2	1	1	-1	37.50
3	1	-1	1	22.92
4	1	-1	-1	20.83
5	-1	1	1	32.21
6	-1	1	-1	30.32
7	-1	-1	1	17.34
8	-1	-1	-1	19.98
9	-1.682	0	0	15.45
10	1.682	0	0	13.67
11	0	-1.682	0	21.81
12	0	1.682	0	40.25
13	0	0	-1.682	16.93
14	0	0	1.682	30.28
15	0	0	0	34.57
16	0	0	0	36.19
17	0	0	0	33.37
18	0	0	0	34.61
19	0	0	0	36.26
20	0	0	0	35.77

2.2 芦丁-酪蛋白复合物的功能特性

2.2.1 乳化性、溶解性、表面疏水性 乳化活力指数(EAI)体现了蛋白质迅速吸附至新生液滴表面,有效降低油水界面张力,进而促成乳液形成并维持其稳定性的能力;乳化稳定性指数(ESI)是对乳化剂贮藏或加热后,仍停留在油水界面的蛋白质的能力评估^[28]。由表4可知,以酪蛋白为对照,芦丁-酪蛋白复合物的乳化活性指数降低了8.47 m²/g,乳化稳定性降低了9.39%,可能是芦丁添加量较大,在酪蛋白的疏水侧链中积聚,使得疏水区难以穿透界面,同时,芦丁还会引起酪蛋白构象改变,造成能量屏障,从而降低乳化活性,且随着多酚添加量的增加,

表3 方差分析表[†]

来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
X_1	40.733 4	1	39.724 8	2.431 7	0.167 3	
X_2	580.279 4	1	552.749 9	32.966 5	0.000 2	**
X_3	102.018 9	1	104.537 9	5.916 9	0.039 9	
X_1^2	645.880 9	1	665.114 7	39.668 1	0.000 1	**
X_2^2	1.913 0	1	1.822 2	0.108 7	0.769 3	
X_3^2	110.203 7	1	112.827 6	6.591 4	0.034 4	*
X_1X_2	36.800 4	1	34.924 5	2.141 9	0.193 5	
X_1X_3	1.872 2	1	1.813 0	0.114 2	0.828 5	
X_2X_3	2.784 3	1	2.835 9	0.165 0	0.740 3	
回归	1 447.688 9	9	161.313 9		0.001 0	
剩余	180.916 0	10	17.974 2			
失拟	161.370 6	5	32.364 4		0.017 4	
误差	17.994 6	5	3.568 1			
总和	1 628.381 8	20				

† *为显著($P<0.05$),**为极显著($P<0.01$); $F_1=8.783\ 67$,
 $F_2=9.136\ 67$ 。

乳化能力呈先增后减趋势^[29-30]。因此,利用多酚改善蛋白质乳化特性时,需要特别考虑多酚添加量。此外,乳化活性也与多酚和蛋白质的种类以及环境等因素有关。

蛋白质的溶解度是其在食品或饮料中发挥作用的关键前提^[28]。芦丁-酪蛋白复合物的溶解性相对于酪蛋白提升了5.11%,可能是添加芦丁后,复合物中的酚羟基含量增加,复合物的溶解度随着多酚含量的增加而增大。此外,芦丁还可能与周围水相中的游离蛋白质结合促进其溶解^[31]。芦丁-酪蛋白复合物的表面疏水性相比酪蛋白显著提高,可能是因为芦丁与酪蛋白结合会使酪蛋白构象变化,导致包埋在内部的疏水性氨基酸暴露,从而提高复合物的表面疏水性,与贾娜等^[32]的研究结果类似。

2.2.2 抗氧化性 由图3可知,酪蛋白、芦丁和芦丁-酪蛋白复合物的DPPH自由基清除能力均随着样品质量浓度的升高而增强。芦丁与酪蛋白结合形成的复合物的抗

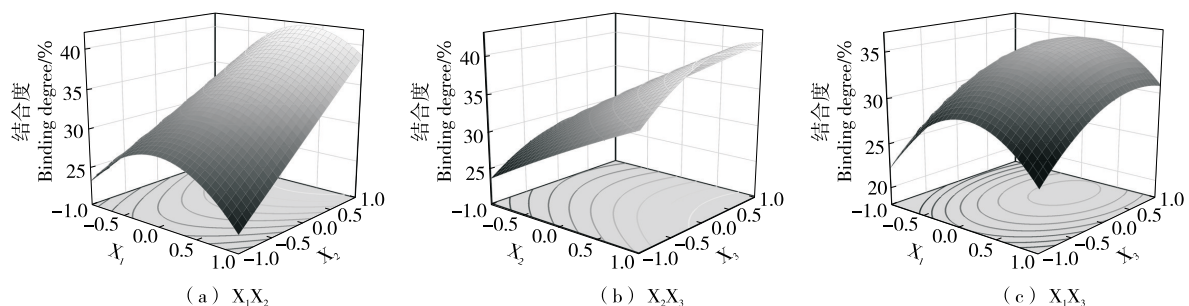


图2 两因素交互作用对结合度影响的响应面图

Figure 2 Response surface plot of effect of two factors interaction on binding degree

表 4 芦丁-酪蛋白复合物的乳化性、溶解性和表面疏水性[†]

Table 4 Emulsification, solubility and surface hydrophobicity of rutin-casein complexes

样品	乳化活性指数/(m ² ·g ⁻¹)	乳化稳定性/%	溶解性/%	表面疏水性
酪蛋白	80.79±2.79	83.61±3.71	83.32±1.68	76.12±0.82
芦丁-酪蛋白复合物	72.32±3.65	74.22±4.32	88.43±2.43	107.58±0.73

氧化性强于芦丁和酪蛋白的,是由于芦丁与酪蛋白的结合引入了更多酚羟基,这些酚羟基增强了复合物的抗氧化性能,改善了食品的氧化稳定性,与黄子林^[33]的研究结果相似。

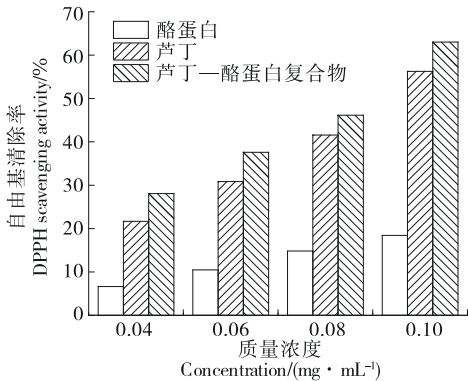


图 3 酪蛋白、芦丁和芦丁-酪蛋白复合物的 DPPH 自由基清除率

Figure 3 DPPH scavenging activity of casein, rutin, and rutin-casein complexes

2.3 芦丁-酪蛋白复合物的结构

2.3.1 扫描电镜 由图 4 可知,酪蛋白为大块状,表面不平;芦丁为碎块状,结构松散;芦丁-酪蛋白复合物呈现片状,表面平滑。复合物的片状形态说明酪蛋白和芦丁成功发生了相互作用,与张生鹏等^[15]制备的芦丁/HPCD 包含物的结论类似。

2.3.2 傅里叶红外光谱 由图 5 可知,芦丁-酪蛋白复合物与酪蛋白峰发生了变化,3 500~3 200 cm⁻¹处属于酰胺 I 带,为 O—H 伸缩出现的特征峰,与酪蛋白相比,复合物的峰形更宽,可能是芦丁和酪蛋白之间形成了氢键,说明相对于酪蛋白来说芦丁-酪蛋白复合物的缔合程度增加。此外,芦丁-酪蛋白复合物的酰胺 I 带和酰胺 II 带相比于酪蛋白峰变宽,并发生红移,酰胺带的变化通常是受酚类化合物影响的结果,其变化主要由于 C=O 的拉伸振动、N—H 的弯曲和 C—H 的拉伸振动;酰胺 II 带吸收峰向低频方向移动,这也证明芦丁可改变酪蛋白的二级结构,与刘丽莉等^[34]的研究结果相似。

由图 6 可知,加入芦丁后,酪蛋白二级结构中的 α -螺旋含量由 1.21% 增至 2.43%, β -折叠含量由 36.37% 提高至 38.27%,无规卷曲含量由 9.45% 下降至 2.43%, β -转角含

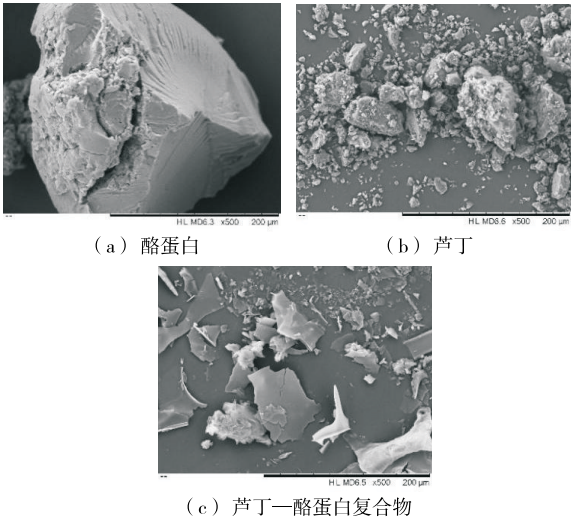


图 4 酪蛋白、芦丁和芦丁-酪蛋白复合物的电镜图
Figure 4 Electron microscopy of casein, rutin and rutin-casein complexes

量由 52.89% 下降至 51.89%。表明芦丁对酪蛋白二级结构产生了影响,表现为 β -折叠和 α -螺旋含量升高,无规卷曲和 β -转角含量降低。 β -折叠升高表明芦丁-酪蛋白复合物之间的氢键增加,酪蛋白分子延伸,结构更加稳定。雷选等^[35]发现芦丁上的某些氧原子和羟基基团与酪蛋白的羰基及碳基基团通过疏水相互作用形成稳定的复合物,使得酪蛋白二级结构发生改变,与试验结果相似。

2.3.3 荧光光谱 由图 7 可知,随着芦丁质量浓度的增大,酪蛋白的峰值降低。发射峰发生位移的原因可能是

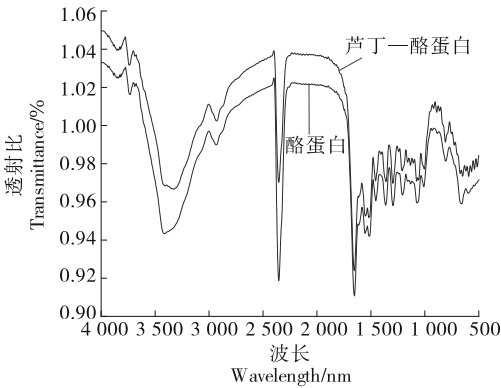


图 5 芦丁-酪蛋白复合物的红外光谱图
Figure 5 Infrared spectra of rutin-casein complexes

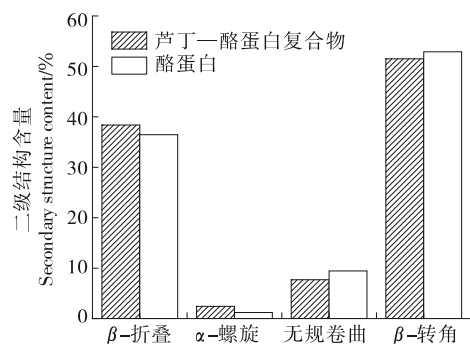
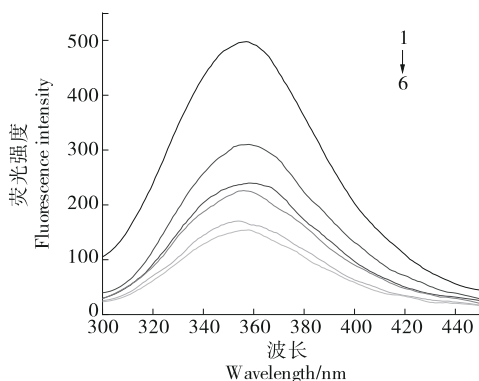


图6 芦丁-酪蛋白复合物和酪蛋白的二级结构

Figure 6 Rutin-casein complexes and casein secondary structure

酪蛋白与芦丁结合,改变了酪蛋白分子的空间构象。加入芦丁后酪蛋白的荧光强度降低,可能是芦丁与酪蛋白中的酪氨酸残基发生了相互作用,使酪蛋白中更多的酪氨酸荧光被阻断,导致荧光猝灭,说明两个分子形成了复合物,与刘丽莉等^[36]的结论类似。



酪蛋白质量浓度为 1 mg/mL; 1→6 分别表示芦丁质量浓度为 0, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05 mg/mL

图7 酪蛋白与芦丁混合的荧光光谱图

Figure 7 Fluorescence spectra of casein mixed with rutin

2.3.4 同步荧光光谱 由图8可知,随着芦丁质量浓度的增加,混合物的同步荧光强度逐渐降低,可能是在酪蛋白溶液中加入芦丁后,酪蛋白的酪氨酸残基荧光发生了淬灭,表明芦丁和酪蛋白结合导致酪蛋白的荧光量子产率降低,芦丁诱导了酪蛋白周围酪氨酸残基的微环境极性变化,与荧光光谱分析结果一致,与张潇丹等^[37]的研究结论相似。

3 结论

芦丁-酪蛋白复合物的最佳制备工艺条件为 pH 8.5, $m_{\text{芦丁}}:m_{\text{酪蛋白}}=1.89:1.00$, 反应温度 50 °C, 反应时间 5.94 h。添加芦丁后,酪蛋白的溶解性、表面疏水性和抗氧化性有了显著提升,主要是芦丁引导了酪蛋白氨基酸展开;芦

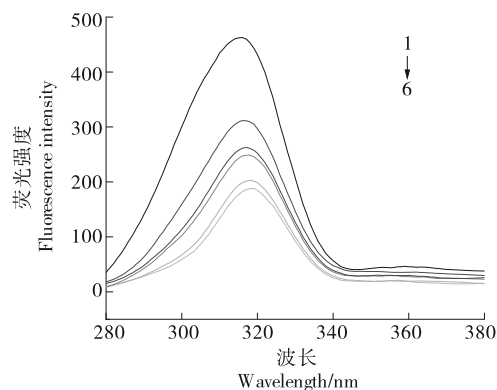


图8 酪蛋白与芦丁混合的同步荧光光谱图

酪蛋白质量浓度为 1 mg/mL; 1→6 分别表示芦丁质量浓度为 0, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05 mg/mL

Figure 8 Simultaneous fluorescence spectra of casein mixed with rutin

丁-酪蛋白复合物呈现片状,表面平滑,有助于发挥复合物的功能特性;酪蛋白中产生了更多稳定的二级结构。综上,芦丁能与酪蛋白发生相互作用,提升复合物的功能特性,使酪蛋白的结构更加稳定。后续可尝试结合新兴的物理技术如超声处理,通过对比不同加工技术,优化复合物的结构和功能特性;同时,需通过体内或体外试验评估长期摄入复合物的安全性,以及在胃肠道中的消化吸收特性,可重点关注复合物与肠道菌群的相互作用。

参考文献

- [1] 刘晶晶, 张薇, 吴锦涛, 等. 酪蛋白结构特性及应用研究进展[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(1): 197-201.
LIU J J, ZHANG W, WU J T, et al. Structural properties and application of casein: a review[J]. Food Research and Development, 2023, 44(1): 197-201.
- [2] 刘正清, 王志坤, 葛鑫, 等. 牛奶中酪蛋白的结构和作用研究进展[J]. 中国奶牛, 2024(5): 38-43.
LIU Z Q, WANG Z K, GE X, et al. Structure and novel roles of casein in milk[J]. China Dairy Cattle, 2024(5): 38-43.
- [3] ZHANG Z H, LI X J, SANG S Y, et al. Polyphenols as plant-based nutraceuticals: health effects, encapsulation, nano-delivery, and application[J]. Foods, 2022, 11(15): 2 189.
- [4] DO VALLE I F, ROWETH H G, MALLOY M W, et al. Network medicine framework shows that proximity of polyphenol targets and disease proteins predicts therapeutic effects of polyphenols[J]. Nature Food, 2021, 2(3): 143-155.
- [5] 卢宁, 张宝. 芦丁的提取工艺、生物学功能及其在动物生产中的应用[J]. 饲料研究, 2023, 46(2): 161-165.
LU N, ZHANG B. Extraction technology, biological function of rutin and its application in animal production[J]. Feed Research, 2023, 46(2): 161-165.

- [6] LIU H X, XU Q X, WUFUER H, et al. Rutin is a potent senomorphic agent to target senescent cells and can improve chemotherapeutic efficacy[J]. *Aging Cell*, 2024, 23(1): e13921.
- [7] FARHA A K, GAN R Y, LI H B, et al. The anticancer potential of the dietary polyphenol rutin: current status, challenges, and perspectives[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2022, 62(3): 832-859.
- [8] 侯彩云, 郭秀兰, 彭家宣, 等. 芦丁对低脂酸奶品质和抗氧化能力的影响[J]. *食品与机械*, 2019, 35(4): 37-41.
- HOU C Y, GUO X L, PENG J X, et al. Effect of supplementing rutin on quality and antioxidant capacity of low-fat yoghurt[J]. *Food & Machinery*, 2019, 35(4): 37-41.
- [9] GULLON B, LÚ-CHAU T A, MOREIRA M T, et al. Rutin: a review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2017, 67: 220-235.
- [10] LI Y T, HE D, LI B, et al. Engineering polyphenols with biological functions via polyphenol-protein interactions as additives for functional foods[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2021, 110: 470-482.
- [11] RASHIDINEJAD A, LOVEDAY S M, JAMESON G B, et al. Rutin-casein co-precipitates as potential delivery vehicles for flavonoid rutin[J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 96: 451-462.
- [12] KIM W, WANG Y, SELOMULYA C. Emerging technologies to improve plant protein functionality with protein-polyphenol interactions[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2024, 147: 104469.
- [13] 杨慧, 曲也直, 高雅然, 等. 植物多酚-蛋白质复合物生物活性及应用研究进展[J]. *食品科学*, 2022, 43(3): 258-266.
- YANG H, QU Y Z, GAO Y R, et al. Recent advances in understanding the biological activities and applications of polyphenol-protein complexes[J]. *Food Science*, 2022, 43(3): 258-266.
- [14] 徐梦婷, 郝艳宾, 齐建勋, 等. 多酚与蛋白相互作用对蛋白特性影响研究进展[J]. *食品与机械*, 2022, 38(10): 224-229.
- XU M T, HAO Y B, QI J X, et al. Interactions between food polyphenols and proteins and their effects on protein characteristics[J]. *Food & Machinery*, 2022, 38(10): 224-229.
- [15] 张生鹏, 张根义. 水溶性芦丁/羟丙基- β -环糊精包合物的制备及其抗氧化活性、稳定性研究[J]. *食品工业科技*, 2024, 45(13): 99-107.
- ZHANG S P, ZHANG G Y. Preparation of water-soluble rutin/hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex and its antioxidant activity and stability studies[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2024, 45(13): 99-107.
- [16] 赵英源, 邓玉程, 汤中义, 等. 虾青素-酪蛋白纳米复合物的制备、表征及稳定性[J]. *食品科技*, 2021, 46(11): 236-243.
- ZHAO Y Y, DENG Y C, TANG Z Y, et al. Preparation, characterization and stability of astaxanthin aggregates and casein nanoparticles[J]. *Food Science and Technology*, 2021, 46(11): 236-243.
- [17] 郭东起, 殷秀秀, 程焕, 等. 甘草多糖与酪蛋白的相互作用及乳化性能[J]. *中国食品学报*, 2023, 23(12): 12-19.
- GUO D Q, YIN X X, CHENG H, et al. The interaction mechanism and emulsifying properties of *Glycyrrhiza* polysaccharide and casein[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2023, 23(12): 12-19.
- [18] KE C X, LIU B S, DUDU O E, et al. Modification of structural and functional characteristics of casein treated with quercetin via two interaction modes: covalent and non-covalent interactions[J]. *Food Hydrocolloids*, 2023, 137: 108394.
- [19] 刘雪梅, 王华敏, 赵利, 等. 橙皮苷、柚皮苷与酪蛋白相互作用机制比较分析[J]. *食品科学*, 2023, 44(4): 162-170.
- LIU X M, WANG H M, ZHAO L, et al. Comparative studies on interaction mechanism of hesperidin and naringin with casein[J]. *Food Science*, 2023, 44(4): 162-170.
- [20] FRIESEN K, CHANG C, NICKERSON M. Incorporation of phenolic compounds, rutin and epicatechin, into soy protein isolate films: mechanical, barrier and cross-linking properties[J]. *Food Chemistry*, 2015, 172: 18-23.
- [21] 李春翼, 王启明, 张驰, 等. 热诱导对麦醇溶蛋白-芦丁相互作用及其乳化特性的影响[J]. *中国食品学报*, 2022, 22(12): 63-71.
- LI C Y, WANG Q M, ZHANG C, et al. Effect of heat induction on the interaction between gliadin and rutin and its emulsifying properties[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2022, 22(12): 63-71.
- [22] 薛艾莲, 李春翼, 王启明, 等. 超声处理对麦醇溶蛋白/芦丁相互作用及结构特性的影响[J]. *食品科学*, 2022, 43(7): 45-51.
- XUE A L, LI C Y, WANG Q M, et al. Effect of ultrasonic treatment on the interaction and structural properties of gliadin-rutin complex[J]. *Food Science*, 2022, 43(7): 45-51.
- [23] GUO N, YE S, ZHOU G H, et al. Effect of ultrasound treatment on interactions of whey protein isolate with rutin[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2023, 95: 106387.
- [24] 迟云峰, 迟治平, 王喜刚, 等. 大豆蛋白-多酚在加工过程中功能特性及抗氧化性的研究[J]. *中国食品添加剂*, 2022, 33(8): 122-128.
- CHI Y F, CHI Z P, WANG X G, et al. Study on functional properties and antioxidant activity of soybean protein-polyphenols during processing[J]. *China Food Additives*, 2022, 33(8): 122-128.
- [25] TIAN R, HAN X E, TIAN B, et al. Effects of covalent binding of different polyphenols on structure, rheology and functional properties of whey protein isolate[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2023, 184: 114968.
- [26] 杜艳. 青稞蛋白-多酚相互作用机制及复合物应用研究[D]. 无锡: 江南大学, 2023: 22-23.

- DU Y. The interaction mechanism of highland barley proteins-polyphenols and the application of its complexes[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2023: 22-23.
- [27] 赵玉红, 翟亚楠, 许耀鹏, 等. 樟子松多酚和蛋白质的复合反应及产物性质[J]. 北京林业大学学报, 2016, 38(9): 102-107.
- ZHAO Y H, ZHAI Y N, XU Y P, et al. Polymerization and product characteristics of polyphenols of *Pinus sylvestris* var. *mongolica* barks and protein[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2016, 38(9): 102-107.
- [28] 袁麒, 王旭苹, 杨怀谷, 等. 不同 pH 条件下乳清蛋白-桑椹多酚复合营养粉的制备及其理化性质[J]. 现代食品科技, 2023, 39(5): 164-174.
- YUAN Q, WANG X P, YANG H G, et al. Preparation and physicochemical properties of mulberry polyphenol-whey protein complex nutrition powder under different pH conditions[J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(5): 164-174.
- [29] 蔡惠钿, 张逸, 蔡清晖. 氧化茶多酚对水包油型乳液物理稳定性的影响[J]. 粮食与油脂, 2021, 34(1): 27-30.
- CAI H T, ZHANG Y, CAI Q H. Effect of oxidized tea polyphenols on physical stability of oil in water emulsion[J]. Cereals & Oils, 2021, 34(1): 27-30.
- [30] 马会杰, 梁金波, 戴居会. 茶多酚对食品蛋白质乳化功能影响的研究进展[J]. 现代食品, 2021(5): 14-17.
- MA H J, LIANG J B, DAI J H. Research progress on the effect of tea polyphenols on the emulsifying function of food protein [J]. Modern Food, 2021(5): 14-17.
- [31] 李丽萍, 杨雪滢, 单香丽, 等. 芦丁与牛血清蛋白在不同条件下的相互作用研究[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2012, 34(1): 72-76, 83.
- LI L P, YANG X Y, SHAN X L, et al. Study on the interaction between rutin and bovine serum albumin under different conditions[J]. Journal of Yunnan University (Natural Sciences Edition), 2012, 34(1): 72-76, 83.
- [32] 贾娜, 刘丹, 张晓星, 等. 氧化条件下没食子酸对猪肉肌原纤维蛋白结构及凝胶特性的影响[J]. 食品工业科技, 2016, 37(23): 61-66.
- JIA N, LIU D, ZHANG X X, et al. Effect of gallic acid on constructure and gel properties of pork myofibrillar protein under oxidation conditions[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(23): 61-66.
- [33] 黄子林. 核桃多酚对核桃蛋白结构和性质的影响[D]. 无锡: 江南大学, 2022: 35.
- HUANG Z L. Study on the effect of walnut pehnolic compounds on structure and properties of walnut protein[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2022: 35.
- [34] 刘丽莉, 陈卉, 郭净芳, 等. 基于光谱法及分子对接技术的猪血红蛋白与儿茶素相互作用研究[J]. 核农学报, 2024, 38(6): 1117-1124.
- LIU L L, CHEN H, GUO J F, et al. Preliminary study on the interaction between porcine hemoglobin and catechin based on spectroscopy and macromolecular docking technique[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2024, 38(6): 1117-1124.
- [35] 雷选, 王旭苹, 程镜蓉, 等. 芦丁和阿魏酸与酪蛋白的相互作用研究[J]. 食品科学技术学报, 2020, 38(2): 73-80.
- LEI X, WANG X P, CHENG J R, et al. Study on interaction of rutin and ferulic acid with casein[J]. Journal of Food Science and Technology, 2020, 38(2): 73-80.
- [36] 刘丽莉, 于影, 苏克楠, 等. 植物多酚-牛血清白蛋白相互作用及对蛋白质结构的影响[J]. 农业工程学报, 2023, 39(13): 290-298.
- LIU L L, YU Y, SU K N, et al. Polyphenol-bovine serum albumin interaction and its influence on protein structure[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2023, 39(13): 290-298.
- [37] 张潇丹, 刘丽莉, 于影, 等. 表没食子儿茶素没食子酸酯对乙醇脱氢酶的激活作用: 多光谱法和分子对接法研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2023, 43(11): 3622-3628.
- ZHANG X D, LIU L L, YU Y, et al. Activation of epigallocatechin gallate on alcohol dehydrogenase: multispectroscopy and molecular docking methods[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2023, 43(11): 3622-3628.