



# 苷元型异黄酮与大豆分离蛋白相互作用研究

任云芃<sup>1</sup>, 吕思瑶<sup>1</sup>, 朱登兆<sup>1</sup>, 谷春梅<sup>1</sup>, 于寒松<sup>1,2</sup>

(1. 吉林农业大学 食品科学与工程学院, 吉林 长春 130118; 2. 国家大豆产业技术体系加工研究室, 吉林 长春 130118)

**摘要:**为促进苷元型异黄酮的开发和利用,采用光谱学手段研究大豆素/染料木素与大豆分离蛋白之间的作用机制。荧光和紫外光谱表明,大豆素/染料木素会使大豆分离蛋白色氨酸残基的微环境疏水性增强,造成蛋白质结构改变。大豆素/染料木素对大豆分离蛋白的猝灭机制为静态猝灭,主要作用力为范德华力和氢键,结合位点数为1;红外光谱表明,大豆素/染料木素的加入导致大豆分离蛋白的二级结构发生改变,随大豆素/染料木素质量浓度的增加,具体表现为, $\alpha$ -螺旋含量增多, $\beta$ -折叠含量减少, $\beta$ -转角含量增多,无规则卷曲含量增多。综合结果表明,染料木素与大豆分离蛋白的亲合力强于大豆素。

**关键词:**苷元型异黄酮;大豆分离蛋白;互作

## Interaction Between Aglycone Isoflavones and Soy Protein Isolate

REN Yun-peng<sup>1</sup>, LYU Si-yao<sup>1</sup>, ZHU Deng-zhao<sup>1</sup>, GU Chun-mei<sup>1</sup>, YU Han-song<sup>1,2</sup>

(1. School of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 2. Division of Soybean Processing Soybean Research & Development Center, Chinese Agricultural Research System, Changchun 130118, China)

**Abstract:** In order to promote the development and utilization of aglycone-type isoflavones, the interaction mechanism between daidzein/genistein and soy protein isolate was studied by spectroscopy in this study. The fluorescence and UV spectrum showed that daidzein/genistein could enhanced the microenvironment hydrophobicity of tryptophan residues of SPI, and caused changes of protein structure. The quenching mechanism of daidzein/genistein on SPI was static quenching, the main forces were Van der Waals force and hydrogen bond, the number of binding sites was one. FTIR analysis showed that the addition of daidzein/genistein changed the secondary structure of SPI. With the increase of daidzein/genistein mass concentration, the content of  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -turn and irregular curl increased, and the content of  $\beta$ -fold decreased. Comprehensive experimental results showed that, the affinity between genistein and SPI was stronger than that of daidzein.

**Keywords:** Aglycone isoflavones; Soy protein isolate; Interaction

大豆分离蛋白(SPI)作为一种植物蛋白<sup>[1]</sup>,因其优良的功能性被广泛应用到食品加工行业,以满足人们的健康需求。但目前大豆蛋白产品过于单一,本身的功能性质与某些动物蛋白相比仍有一定的差距<sup>[2]</sup>,无法满足一些特定的营养需求,因此为丰富其功能性质,可以通过添加一些易于蛋白质结合的小分子物质(例如异黄酮、皂甙和植酸)对SPI分子结构进行调控<sup>[3]</sup>,从而达到使其功能性质和营养价值得到改善和增强的目的<sup>[4]</sup>。染料木素和大豆素作为苷元型异黄酮最主要的两种成分<sup>[5]</sup>,具有优良的药理功效<sup>[6]</sup>和较高的生物利用率。并且苷元型异黄酮作为一种天然的小分子活性物质,可以与大豆蛋白发生相互作用,进而改变蛋白质的结构及功能<sup>[4]</sup>。蛋白质-异黄酮复合物的形成一方面

会影响蛋白质的结构和营养功能,另一方面可以对异黄酮的抗氧化能力和生物利用度产生积极的影响<sup>[7-8]</sup>。程爱青等<sup>[9]</sup>研究表明,鹰嘴豆异黄酮会引发HSA二级结构的改变,使 $\alpha$ -螺旋减小,无规则卷曲增加。杨娟<sup>[8]</sup>经过药代动力学试验表明,与大豆异黄酮相比SPI-ISO更利于大鼠的口服,使相对生物利用度提高。近几年尽管已有部分研究对异黄酮与蛋白质的互作进行了探究,但大多研究集中于蛋白质与异黄酮混合物的互作,缺乏其单体成分与大豆蛋白的互作机制的系统研究,因此本研究旨在从分子层面系统分析大豆素/染料木素与SPI之间的互作对大豆蛋白结构的影响。

小分子活性物质和蛋白质相互作用的研究多采取光谱学方法。例如,荧光光谱法可以对蛋白质

收稿日期:2020-12-02

基金项目:吉林省教育厅“十三五”科学技术项目(JJKH20180655KJ)。

第一作者:任云芃(1996—),男,在读硕士,主要从事农产品加工及营养调控研究。E-mail:957879250@qq.com。

通讯作者:谷春梅(1976—),女,博士,副教授,主要从事农产品加工及营养调控研究。E-mail:jjnong2008@126.com;

于寒松(1979—),男,博士,教授,主要从事大豆精深加工及综合利用。E-mail:yuhansong@163.com。

内源荧光进行分析,得到发射光谱及荧光强度等参数,通过对这些参数的研究可以预测结合过程中蛋白质结构发生的变化<sup>[9]</sup>和结合机理。紫外-可见吸收光谱法<sup>[10]</sup>可分析芳香族氨基酸紫外吸收光谱的变化,体现两者之间相互作用的情况,但其给出的信息量有限,一般为辅助方法。傅立叶变换红外光谱<sup>[11]</sup>一般用来分析蛋白质的二级结构。

本研究以苷元型异黄酮即染料木素和大豆素为研究对象,通过荧光光谱法、紫外光谱法和红外光谱法研究不同质量浓度苷元型异黄酮与大豆分离蛋白的相互作用,确定苷元型异黄酮与 SPI 互作机制及二者对 SPI 结构的影响,为苷元型异黄酮与 SPI 相互作用研究提供一些可参考的基础数据,并为苷元型异黄酮在大豆蛋白产品中的开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料包括脱脂豆粕(山松生物科技有限公司)、染料木素(合肥博美生物科技有限公司)和大豆素(成都埃法生物科技有限公司),其他试剂均为国产分析纯。

主要仪器包括冷冻干燥机(YTLG-10A,上海叶拓科技有限公司)、冷冻离心机(H2050R,青岛正恒试验设备公司)、荧光光度计(970CRT,上海仪电分析仪器有限公司)、傅里叶变换红外光谱仪(日本岛津)、pH 计(力辰科技有限公司)及紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限公司)等。

1.2 方法

1.2.1 大豆分离蛋白制备 将豆粕粉与水按照 1:10(W:V, g·mL<sup>-1</sup>)混合,用 2 mol·L<sup>-1</sup>NaOH 将溶液调至 pH8.5,室温下搅拌 2 h,9 000 g 离心 20 min,上清液用 2 mol·L<sup>-1</sup>HCl 调至 pH4.5,静置 2 h,6 000 g 离心 20 min,得到蛋白沉淀。

将蛋白沉淀加水搅拌溶解,用 2 mol·L<sup>-1</sup>NaOH 将溶液调至 pH7.0,将部分蛋白溶液在-40℃的条件下进行 24 h 的预冻处理,放入冷冻干燥机中进行干燥后得到粉末状的大豆分离蛋白,储藏备用<sup>[12]</sup>。

1.2.2 溶液配制 Tris-HCl 缓冲液 将 3.03 g Tris 粉末溶于去离子水,定容至 250 mL 容量瓶,用 1 mol·L<sup>-1</sup>HCl 调至 pH7.4,加入 2.925 g NaCl,将混合溶液用水定容至 500 mL<sup>[14]</sup>。大豆分离蛋白(SPI)贮备液(2%,W:V):蛋白缓慢加入 Tris-HCl 缓冲液中,磁力搅拌 2 h 配制而成。大豆素(Da)/染料木素(Ge)溶液:分别取 0.1,0.15 和 0.2 g 大豆素/染料木素

溶于 100 mL Tris-HCl 缓冲液,配置前用少量甲醇助溶,配置后冷藏保存。

1.2.3 大豆分离蛋白-大豆素/染料木素复合体系制备 将大豆分离蛋白溶液与大豆素/染料木素溶液均匀混合,并加入 NaN<sub>3</sub>(0.02%,W:V)以抑制细菌的生长,调至 pH7.0,于 25℃反应 2 h。使最终样品含有 1%(W:V)大豆分离蛋白和 0.05%、0.075%或 0.1%(W:V)的大豆素/染料木素,单独的大豆分离蛋白(1%,W:V)为对照,详见表 1。将部分溶液进行冻干,冻干后的样品置于干燥器中保存。

表 1 试验处理  
Table 1 Experiment treatments (%)

处理 Treatment	大豆分离蛋白 SPI	大豆素 Daidzein	染料木素 Genistein
Da-1	1	0.050	-
Da-2	1	0.075	
Da-3	1	0.100	
Ge-1	1	-	0.050
Ge-2	1	-	0.075
Ge-3	1	-	0.100

1.3 测定项目与方法

1.3.1 荧光光谱分析 参照李杨等<sup>[13]</sup>的方法,将复合样品配制成蛋白终浓度为 0.3 mg·mL<sup>-1</sup>的溶液,于 298,304,310 K 恒温水浴锅中温育 30 min。使用 F97Pro 型荧光分光光度计扫描大豆素/染料木素与 SPI 复合体系的荧光光谱,设置激发波长 290 nm,发散波长 300~500 nm,激发和发射狭缝宽度为 5 nm。通过加入大豆素/染料木素前后 SPI 荧光光谱的变化来判断两者与 SPI 是否发生作用。

1.3.2 结合机理研究 根据 Stern-Volmer 方程<sup>[14]</sup>判断苷元型异黄酮对 SPI 的静态或动态猝灭过程。

Stern-Volmer 方程:

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

式中: $F_0$ -大豆素/染料木素加入前 SPI 的荧光强度; $F$ -大豆素/染料木素加入后 SPI 的荧光强度; $K_{sv}$ -动态猝灭常数(L·mol<sup>-1</sup>); $K_q$ -猝灭速率常数(L·mol<sup>-1</sup>·s<sup>-1</sup>); $Q$ -大豆素/染料木素的浓度; $\tau_0$ -不存在大豆素/染料木素时荧光体的寿命,取 10<sup>-8</sup> s<sup>-1</sup><sup>[15]</sup>。

通过  $F_0/F$  对  $[Q]$  做线性拟合作图,可得到  $K_{sv}$  值(斜率),进而解出  $K_q$ 。

如果上述结果确认大豆素/染料木素对大豆分离蛋白内源性荧光的猝灭是静态猝灭,则大豆素/

染料木素与大豆分离蛋白的结合常数  $K_a$  和结合位点数  $n$  满足公式(2)

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

式中： $F_0$ 、 $F$  和  $Q$  与上式相同。以  $\lg[(F_0 - F)/F]$  对  $\lg Q$  进行线性拟合作图。

可根据 Vant Hoff 方程计算热力学参数来判断作用力<sup>[17]</sup>。当  $\Delta H > 0$  且  $\Delta S > 0$  时,为疏水作用力;  $\Delta H < 0$  且  $\Delta S < 0$  时,为范德华力和氢键作用;  $\Delta H < 0$  且  $\Delta S > 0$  时,为静电相互作用<sup>[18]</sup>。本研究温度变化不大,  $\Delta H$  看作常数<sup>[19]</sup>。

Vant Hoff 方程:

$$\ln \frac{K_{a2}}{K_{a1}} = \left( \frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right) \times \frac{\Delta H}{R} \tag{3}$$

$$\Delta G = -RT \ln K_a = \Delta H - T \Delta S \tag{4}$$

式中:  $\Delta H$  - 焓变 ( $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ );  $\Delta S$  - 熵变 ( $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ );  $\Delta G$  - 生成自由能变 ( $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ );  $R$  - 气体常数,取  $8.314 \text{ J} \cdot (\text{K} \cdot \text{mol})^{-1}$ ;  $T$  - 温度(K)。

1.3.3 紫外-可见吸收光谱分析 将复合样品配制成蛋白终浓度为  $0.3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液。使用 T6 紫外分光光度计记录复合体系 200 ~ 400 nm 范围内 298 K 时的紫外吸收光谱。通过加入大豆素/染料木素前后 SPI 紫外吸收光谱的变化来判断两者对 SPI 构象的影响。

1.3.4 红外光谱分析 参照 Zhang 等<sup>[21]</sup>的方法,将 1 mg 复合样品与 150 mg 溴化钾粉末混合,压片后

在室温下检测  $500 \sim 4\,000 \text{ cm}^{-1}$  波段的红外光谱<sup>[13]</sup>。通过红外光谱研究大豆素/染料木素对蛋白质二级结构变化的影响。

1.4 数据处理

使用 SPSS 13.0 和 Origin 8.5 软件分析绘图,蛋白质二级结构定量分析用 Peak. fit 4.12 软件进行。

2 结果与分析

2.1 大豆素/染料木素与 SPI 复合体系荧光光谱分析

如图 1 所示,随添加大豆素/染料木素质量浓度的增加,大豆分离蛋白内源荧光强度逐渐降低。且随大豆素及染料木素质量浓度的增加降低幅度越来越小。这表明两种苷元型异黄酮均与大豆分离蛋白发生相互作用,且随大豆素及染料木素质量浓度的增加与大豆分离蛋白的结合趋向饱和。另外随着大豆素/染料木素质量浓度的增大,大豆分离蛋白的最大发射波长发生红移,分别由 345 nm 红移到 355 和 360 nm 左右,说明蛋白质结构改变,色氨酸残基附近的环境由疏水性环境转变为亲水性环境,使得肽链展开<sup>[22]</sup>。进一步说明大豆素/染料木素与 SPI 发生结合,致使蛋白质构象发生变化。此外同一质量浓度下染料木素降低大豆分离蛋白内源性荧光强度的幅度相对较大,说明染料木素与色氨酸残基更接近。

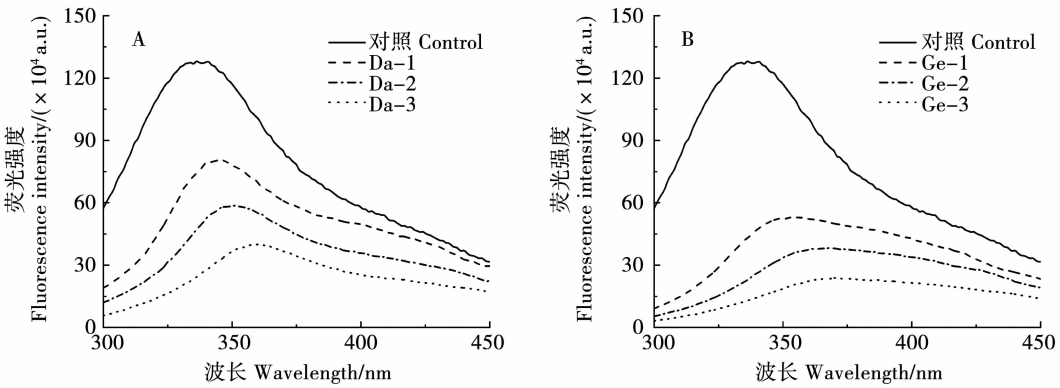


图 1 添加不同质量浓度大豆素(A)/染料木素(B)对大豆分离蛋白荧光光谱的影响  
Fig. 1 The effects of different mass concentrations of daidzein(A)/genistein(B) addition on fluorescence spectra of soy protein isolate

2.2 大豆素/染料木素与 SPI 荧光猝灭机理

由图 2 可知,Stern-Volmer 方程曲线的斜率随着温度的升高而降低,可以判断大豆素/染料木素对 SPI 的猝灭为静态猝灭。散射碰撞猝灭速率常数最高值  $K_q$  为  $2 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ <sup>[23]</sup>。由表 2 可知不

同温度下大豆素/染料木素对大豆分离蛋白的  $K_q$  值分别为  $3.5 \times 10^{12}$ ,  $2.9 \times 10^{12}$ ,  $2.4 \times 10^{12} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  和  $5.3 \times 10^{12}$ ,  $4.3 \times 10^{12}$ ,  $3.8 \times 10^{12} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 。各组猝灭速率常数均高于  $2 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ,更加证明大豆素/染料木素对 SPI 的猝灭是静态猝灭。

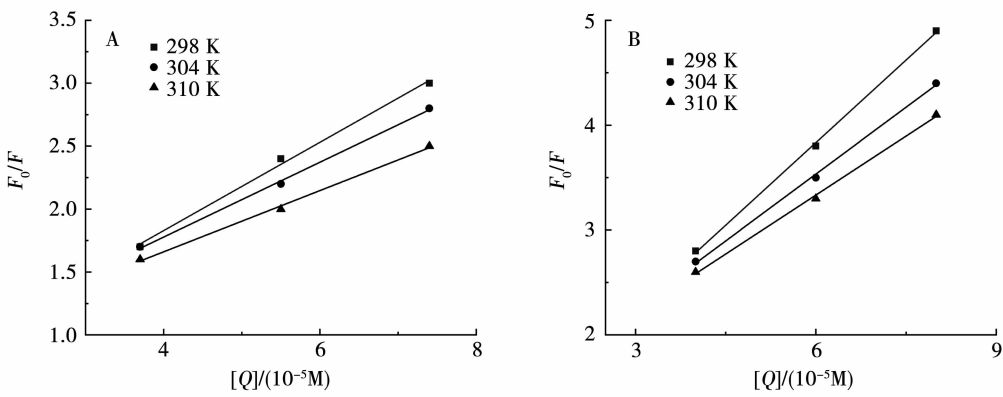


图 2 不同温度下大豆素(A)/染料木素(B)猝灭大豆分离蛋白的 Stern-Volmer 图

Fig. 2 The Stern-Volmer plot of daidzein(A) / genistein(B) quenching soy protein isolate under different temperatures

表 2 大豆素/染料木素与大豆分离蛋白复合物的荧光猝灭速率常数及线性相关系数

Table 2 The quenching rate constants and correlation coefficients of SPI and daidzein orgenistein compound				
异黄酮	温度	$K_{sv}$	$K_q$	$R^2$
Isoflavone	Temperature/K	$/(L \cdot mol^{-1})$	$/(L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1})$	
大豆素	298	$3.5 \times 10^4$	$3.5 \times 10^{12}$	0.99647
	304	$2.9 \times 10^4$	$2.9 \times 10^{12}$	0.99864
	310	$2.4 \times 10^4$	$2.4 \times 10^{12}$	0.99531
染料木素	298	$5.3 \times 10^4$	$5.3 \times 10^{12}$	0.99924
	304	$4.3 \times 10^4$	$4.3 \times 10^{12}$	0.99885
	310	$3.8 \times 10^4$	$3.8 \times 10^{12}$	0.99852

2.3 大豆素/染料木素与 SPI 的结合常数和结合位点数

由图 3 可知,lg[Q] 与 lg[(F<sub>0</sub> - F)/F] 之间呈良好线性关系。根据表 3 可知,各处理 R<sup>2</sup> 大于 0.99,说明此数学模型可用于研究 Da 和 Ge 与 SPI 的相互作用。由表 3 可知,大豆素/染料木素与 SPI 在 298,304 和 310 K 下结合常数分别为 3.9 × 10<sup>5</sup>,

1.3 × 10<sup>5</sup>,3.9 × 10<sup>4</sup> L·mol<sup>-1</sup> 和 5.0 × 10<sup>5</sup>,2.5 × 10<sup>5</sup>,6.3 × 10<sup>4</sup> L·mol<sup>-1</sup>,结合常数 K<sub>a</sub> 都为 10<sup>4</sup> ~ 10<sup>5</sup> 数量级,表明大豆素/染料木素与大豆分离蛋白均存在较强的互作。而苷元型异黄酮即大豆素/染料木素与大豆分离蛋白在 3 种不同温度下的结合位点数为 1.35,1.25,1.15 和 1.25,1.21,1.01,说明苷元型异黄酮与 SPI 之间结合位点数约为 1。

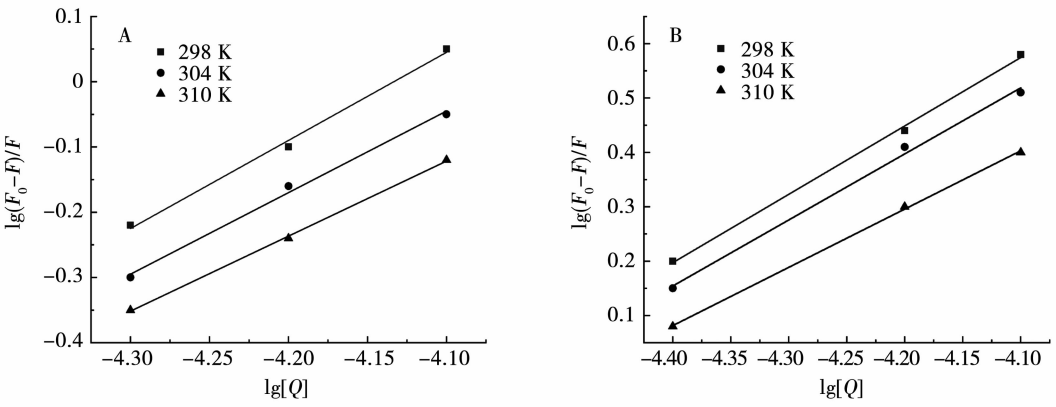


图 3 不同温度下大豆素(A)/染料木素(B)猝灭大豆分离蛋白的双对数曲线

Fig. 3 The double logarithmic plot of daidzein(A)/genistein(B) quenching soy protein isolate under different temperatures

表3 大豆素/染料木素与大豆分离蛋白复合物的结合常数、结合位点数及线性相关系数

Table 3 The apparent binding constants, correlation coefficients and binding sites numbers of SPI and DA/GE

异黄酮 Isoflavone	温度 Temperature/K	$K_a$ $/(L \cdot mol^{-1})$	结合位点数 Number of binding sites	$R^2$
大豆素 Daidzein	298	$3.9 \times 10^5$	1.35	0.99436
	304	$1.3 \times 10^5$	1.25	0.99535
	310	$3.9 \times 10^4$	1.15	0.99947
染料木素 Genistein	298	$5.0 \times 10^5$	1.25	0.99845
	304	$2.5 \times 10^5$	1.21	0.99628
	310	$6.3 \times 10^4$	1.01	0.99947

2.4 大豆素/染料木素与 SPI 作用过程的热力学参数及作用力类型

豆分离蛋白之间的结合可以自发进行,  $\Delta H < 0$  且  $\Delta S < 0$ ,表明大豆素/染料木素与 SPI 间的相互作用力为氢键和范德华力<sup>[18]</sup>。

由表4可知,  $\Delta G < 0$ ,表明苷元型异黄酮与大

表4 热力学参数值

Table 4 Thermodynamic parameter values

异黄酮 Isoflavone	温度 Temperature/K	$\Delta H$ $/(kJ \cdot mol^{-1})$	$\Delta S$ $/(J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1})$	$\Delta G$ $/(kJ \cdot mol^{-1})$
大豆素 Daidzein	298	-99.768	-227.758	-31.896
	304		-232.217	-29.174
	310		-237.345	-26.191
染料木素 Genistein	298	-88.607	-189.258	-32.208
	304		-208.332	-25.274
	310		-197.509	-27.379

2.5 大豆素/染料木素与 SPI 复合体系紫外光谱分析

由图4可知,SPI在290 nm处存在紫外吸收峰,苷元型异黄酮在340 nm处存在紫外吸收峰。由图5可知,随着苷元型异黄酮质量浓度的增大,大豆分离蛋白的紫外最大吸收峰值逐渐升高,但在同一质量浓度条件下,染料木素比大豆素交联的聚合物峰值高,说明SPI二级结构发生变化且染料木素比大

豆素影响更大。同时大豆素/染料木素的添加导致了大豆分离蛋白峰位发生变化,SPI的紫外最大吸收峰从290 nm蓝移到285 nm,说明蛋白质构象发生改变。构象变化会导致色氨酸残基的微环境发生变化<sup>[24-25]</sup>。可以推断出大豆素/染料木素影响了SPI的肽链伸展,使埋藏于内部的色氨酸暴露出来,与荧光光谱分析一致。

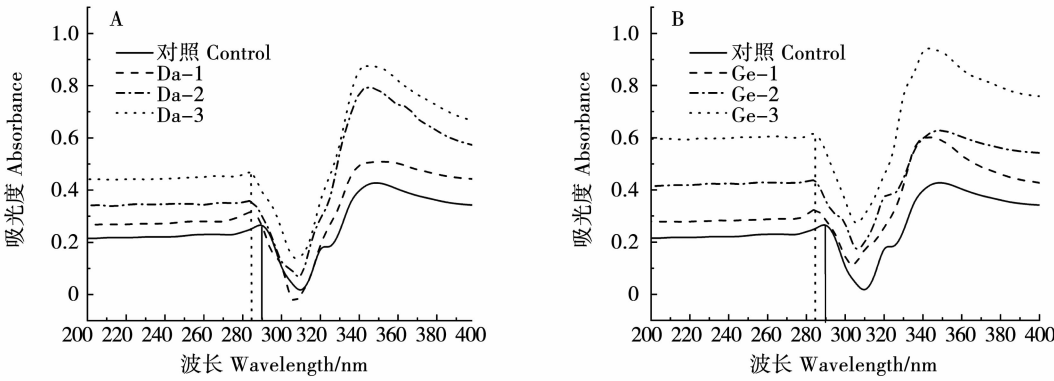


图4 大豆分离蛋白与大豆素(A)/染料木素(B)复合体系的紫外光谱图

Fig. 4 The UV spectra of soy protein isolate and daidzein (A)/genistein (B)

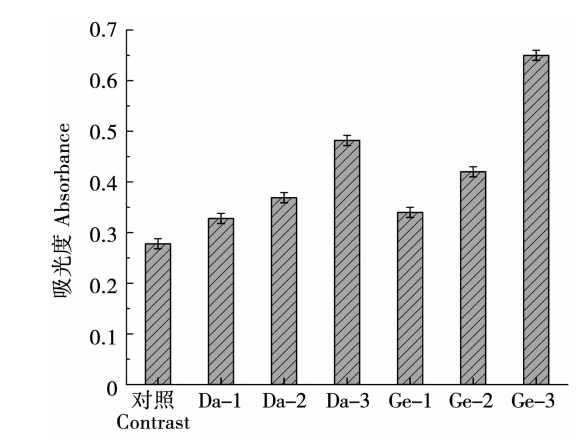


图5 大豆分离蛋白与苷元型异黄酮复合体系的最大吸光度

Fig. 5 The maximum absorbance of soybean protein isolate and aglycone isoflavones

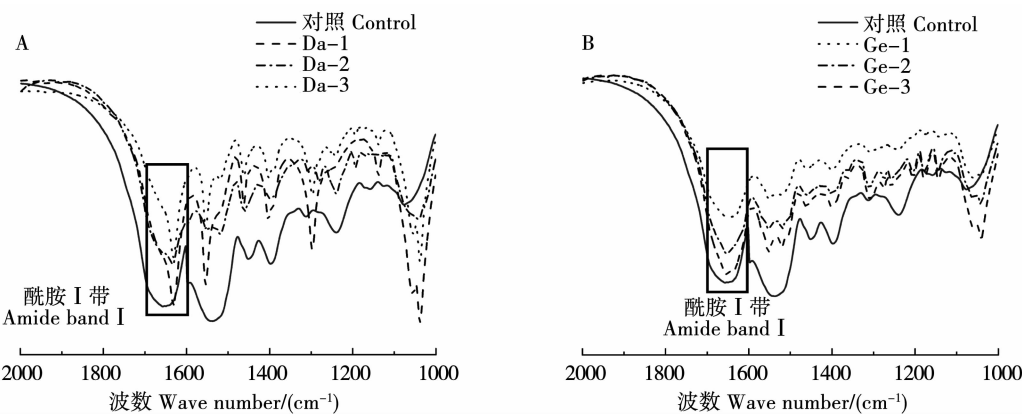


图6 大豆素(A)/染料木素(B)与大豆分离蛋白复合体系的傅里叶变换红外光谱图

Fig. 6 The FTIR spectra of daidzein(A)/genistein(B)-soy protein isolate composite system

表5 大豆素(A)/染料木素(B)与大豆分离蛋白复合体系中大豆分离蛋白二级结构含量

Table 5 The secondary structure content of soy protein isolate in daidzein(A)/genistein(B)-soy protein isolate composite system

样品 Sample	相对含量 Relative content /%			
	$\alpha$ -螺旋	$\beta$ -折叠	$\beta$ -转角	无规则卷曲
	$\alpha$ -helix	$\beta$ -fold	$\beta$ -turn	Irregular curl
对照 Control	15.7 $\pm$ 0.5 c	41.4 $\pm$ 0.4 a	28.8 $\pm$ 0.5 e	13.8 $\pm$ 0.2 e
Da-1	16.1 $\pm$ 0.2 bc	38.4 $\pm$ 0.8 b	25.1 $\pm$ 0.3 f	20.4 $\pm$ 0.8 a
Da-2	17.4 $\pm$ 0.3 a	33.5 $\pm$ 0.6 d	32.0 $\pm$ 0.8 ab	18.1 $\pm$ 0.3 c
Da-3	17.8 $\pm$ 0.3 a	33.2 $\pm$ 0.6 d	32.6 $\pm$ 0.8 a	16.1 $\pm$ 0.3 d
Ge-1	17.2 $\pm$ 0.2 b	35.1 $\pm$ 0.8 c	29.7 $\pm$ 0.3 de	17.7 $\pm$ 0.1 c
Ge-2	17.5 $\pm$ 0.8 a	33.8 $\pm$ 0.1 d	30.4 $\pm$ 0.1 cd	18.3 $\pm$ 0.1 c
Ge-3	17.7 $\pm$ 0.8 a	31.8 $\pm$ 0.1 e	31.2 $\pm$ 0.1 bc	19.4 $\pm$ 0.1 b

不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

Different lowercase indicate significant difference( $P < 0.05$ ).

### 3 讨论

荧光和紫外光谱分析表明,同一质量浓度下,染料木素对比大豆素对 SPI 猝灭程度更大,两者对 SPI 均为静态猝灭。随大豆素/染料木素添加质量浓度的增大, SPI 色氨酸残基的微环境疏水性逐渐增强,造成蛋白质结构改变。结合常数( $K_a$ )常常被用来描述小分子与蛋白质的结合能力,而染料木素与 SPI 的结合常数是大豆素与 SPI 的结合常数的 1.3 倍,表明染料木素相比较大豆素与 SPI 的结合能力更强,推测原因可能是染料木素相较于大豆素在苯甲酰基环多 1 个羟基,稳固了染料木素上羟基与 SPI 表面的极性基团之间的氢键,增强了染料木素和 SPI 的亲合力<sup>[27]</sup>。而通过申利贤<sup>[14]</sup>对黄酮类化合物与牛血清蛋白之间作用的研究可知,两者间的猝灭机制为静态猝灭。程爱青<sup>[9]</sup>研究鹰嘴豆异黄酮与人血清白蛋白结构亲和力关系的结果表明,染料木素衍生物与人血清白蛋白的结合能力与其 A 环的羟基化有关,这与本研究的结果可相互验证。

不同种类多酚对 SPI 二级结构的影响并不一致<sup>[28]</sup>。例如花青素会导致 SPI 中  $\beta$ -折叠逐渐转换为  $\beta$ -转角与无规则卷曲<sup>[29]</sup>,赵思明等<sup>[4]</sup>研究发现没食子儿茶素没食子酸酯会使 SPI 结构中的  $\beta$ -折叠结构向  $\alpha$ -螺旋结构转换。红外光谱分析可知,大豆素随质量浓度的提高, SPI 中  $\beta$ -转角含量明显增多而无规则卷曲含量明显减少( $P < 0.05$ ),染料木素含量的增高导致 SPI 中  $\beta$ -折叠含量明显减少而无规则卷曲含量明显增多( $P < 0.05$ )。Kanakakis<sup>[30]</sup>认为多酚对蛋白结构的影响主要是由于  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠、 $\beta$ -转角、无规则卷曲 4 种结构之间转换导致的。因此可推断大豆素/染料木素的加入分别使  $\beta$ -折叠、 $\beta$ -转角向无规则卷曲结构转换。这说明常规条件下,苷元型异黄酮的加入会使 SPI 结构变得更加松散和有序化。而在同一质量浓度条件下,相比大豆素,染料木素交联 SPI 得到的复合物中  $\beta$ -转角和无规则卷曲的含量明显更高( $P < 0.05$ ),这表明相比于大豆素,染料木素与 SPI 相互作用对蛋白质二级结构造成的影响更大。

本研究基本总结了苷元型异黄酮和大豆蛋白的互作机制,条件允许下可以增添光谱学(同步荧光光谱、三维荧光光谱)手段和分子对接技术,在本研究的基础上对两者间作用导致的蛋白质具体构象变化做更精确的补充研究。而后续研究内容将侧重于进一步探明苷元型异黄酮与热处理 SPI 的互作机制及对 SPI 功能性质的影响,为大豆蛋白和苷元型异黄酮的开发利用提供进一步指导。

### 4 结论

大豆素/染料木素改变了 SPI 氨基酸残基的微环境,使得 SPI 构象改变,大豆素/染料木素对 SPI 作用的猝灭方式为静态猝灭,作用力为氢键和范德华力,结合位点为 1。红外光谱表明大豆素/染料木素会使 SPI 的二级结构发生不同程度的改变,与天然 SPI 相比,随大豆素/染料木素的添加,蛋白  $\alpha$ -螺旋含量增多、 $\beta$ -折叠含量减少、 $\beta$ -转角含量增多,无规则卷曲含量增多。同一质量浓度下,染料木素较大豆素与 SPI 相互作用更强,对蛋白质的结构变化影响更大。对苷元型异黄酮而言,在苯甲酰基环上的羟基化可以增强其和 SPI 的亲合力,这就是影响两者对 SPI 结构差异化的原因。本研究结果为大豆素/染料木素与 SPI 互作对其结构产生影响的研究提供了参考,可为苷元型异黄酮在大豆蛋白产品中的开发利用提供理论依据。

### 参考文献

- [1] 李杨,王中江,江连洲,等. 工业改性对大豆蛋白结构及大豆蛋白-肌原纤维蛋白复合凝胶的影响[J]. 食品科学,2020,41(4):67-73. (Li Y, Wang Z J, Jiang L Z, et al. Effect of industrial modifications on soybean protein structure and the texture and microstructure of soybean protein-myofibrillar protein hybrid gels [J]. Food Science, 2020, 41(4): 67-73. )
- [2] 葛侠. 大豆分离蛋白的糖基化改性及其凝胶性质的研究[D]. 合肥:合肥工业大学,2019. (Ge X. Study on glycosylation modification of soy protein isolate and its gel properties [D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2019. )
- [3] 王睿桢. 豆乳中植酸、钙镁与蛋白质的相互作用及其对蛋白质聚集的影响[D]. 北京:中国农业大学,2018. (Wang R C. Interactions among phytate, calcium/magnesium and proteins in soymilk and their effects on protein aggregation [D]. Beijing: China Agricultural University, 2018. )
- [4] 赵思明,江连洲,王冬梅,等. EGCG 对大豆蛋白结构的调控机理[J/OL]. 食品科学:1-17[2020-11-30]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20201120.1751.172.html>. (Zhao S M, Jiang L Z, Wang D M, et al. The effect mechanism of EGCG on the structure of soybean protein [J/OL]. Food Science: 1-17 [2020-11-30]. )
- [5] 马玉荣. 加热及模拟胃肠道消化处理对豆浆活性成分和抗氧化能力的影响[D]. 广州:华南理工大学,2014. (Ma Y R. Effect of heat treatment and *in vitro* gastrointestinal digestion on the bioactive compounds contents and antioxidant activity of soymilk [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2012. )
- [6] 文瑞芝,李水芳,曾栋. 染料木素和大豆素的结构分析[J]. 大豆科学,2008,27(1):128-133. (Wen R Z, Li S F, Zeng D. Structure analysis of genistein and daidzein [J]. Soybean Science, 2008, 27(1): 128-133. )
- [7] 李杨,王娜,吴长玲,等. 高压均质对大豆分离蛋白-大豆异黄酮相互作用及其复合物功能性质的影响[J]. 食品科学,

- 2020,41(19):146-153. (Li Y, Wang N, Wu C L, et al. Effect of high pressure homogenization on soybean protein isolate-soybean isoflavone interaction and functional properties of their complex [J]. Food Science, 2020, 41(19):146-153. )
- [8] 杨娟. 特殊人群专用大豆蛋白配料制备及其营养功效评价[D]. 广州: 华南理工大学, 2015. (Yang J. Preparation of soy protein ingredients for special populations and evaluation of nutritional benefits [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2015. )
- [9] 程爱青. 三种鹰嘴豆异黄酮与人血清白蛋白相互作用的研究[D]. 天津: 天津大学, 2016. (Cheng A Q. Research on the interaction between three chickpea isoflavones from chickpea and human serum albumin [D]. Tianjin: Tianjin University, 2016. )
- [10] 刘霞, 罗芳, 余银, 等. 黄酮类化合物与食品成分相互作用研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(10):1009-1015. (Liu X, Luo F, She Y, et al. Research process of interaction between flavonoids and food ingredients [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2017, 36(10):1009-1015. )
- [11] 梁会丽. 黄酮类化合物与胃蛋白酶的相互作用及其对酶活性影响的研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2014. (Liang H L. Studies on the interaction between pepsin and flavonoids and their effects on enzyme activity [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2014. )
- [12] Meinschmidt P, Schweiggert-weisz U, Brode V, et al. Enzyme assisted degradation of potential soy protein allergens with special emphasis on the techno functionality and the avoidance of a bitter taste formation[J]. LWT - Food Science and Technology, 2016, 68:707-716.
- [13] 李杨, 李明达, 王中江, 等. 基于光谱技术的维生素 B<sub>12</sub> 与大豆分离蛋白相互作用分析[J]. 农业机械学报, 2020, 51(1):341-348. (Li Y, Li M D, Wang Z J, et al. Spectroscopy analysis of interaction between vitamin B<sub>12</sub> and soybean protein isolate [J]. Journal of Agricultural Machinery, 2020, 51(1):341-348. )
- [14] 申利贤. 黄酮类化合物及衍生物与蛋白质的相互作用及结构—亲和力和关系研究[D]. 衡阳: 南华大学, 2017. (Shen L X. Structure-affinity relationship and mechanism in the interaction of flavonoids and derivatives with protein [D]. Hengyang: Nanhua University, 2017. )
- [15] 刘蓉. 采用光谱法研究几种抗肿瘤药物与蛋白质的相互作用[D]. 南充: 西华师范大学, 2015. (Liu R. Investigation the interaction of several antitumor drugs with proteins by spectroscopic methods [D]. Nanyun: Xihua Normal University, 2015. )
- [16] 陈爽, 王小丹, 李瑞, 等. VD<sub>3</sub> 与大豆分离蛋白相互作用的多重光谱分析与计算[J]. 食品科学, 2019, 40(23):8-13. (Chen S, Wang X D, Li R, et al. Multiple spectroscopy analysis and calculation of the interaction between vitamin D<sub>3</sub> and soy protein isolate [J]. Food Science, 2019, 40(23):8-13. )
- [17] 申炳俊, 柳婷婷. 光谱法和分子对接技术研究胡桃醌与人血清白蛋白的相互作用[J]. 分析化学, 2020, 48(10):1383-1391. (Shen B J, Liu T T. Spectroscopy and molecular docking technique for investigation of interaction between juglone and human serum albumin [J]. Analytical Chemistry, 2020, 48(10):1383-1391. )
- [18] Ross P, Subramanian S. Thermodynamics of protein association reactions: Forces contributing to stability [J]. Biochemistry, 1981, 20(11):3096-3102.
- [19] 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 Q Q, Zhu K X, Guo X N, et al. Spectroscopic analysis of interaction between tea polyphenol and soy protein isolate [J]. Food Science, 2015, 36(17):43-47. )
- [20] Le Bourvellec C, Renard C M G C. Interactions between polyphenols and macromolecules: Quantification methods and mechanisms [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2012, 52:213-248.
- [21] Zhang R H, Pang X Y, Lu J, et al. Effect of high intensity ultrasound pretreatment on functional and structural properties of micellar casein concentrates [J]. Ultrasonics-Sonochemistry, 2018, 47:10-16.
- [22] Callis P R. 1La and 1Lb transitions of tryptophan: Applications of theory and experimental observations to fluorescence of proteins [J]. Methods in Enzymology, 1997, 278:113-150.
- [23] 曹艳芸. 乳清蛋白与多酚在中性 pH 条件下的相互作用对蛋白功能性质的影响研究[D]. 无锡: 江南大学, 2017. (Cao Y Y. Functionality modification of whey proteins in induced by the binding with phytophenolics at neutral pH [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2017. )
- [24] 唐江宏, 连宁, 张国华, 等. 小分子物质与蛋白质相互作用研究方法的现状与进展[J]. 江苏技术师范学院学报, 2010, 16(12):1-7. (Tang J H, Lian N, Zhang G H, et al. Progress in the study of interaction between small molecules and proteins [J]. Journal of Jiangsu Normal University of Technology, 2010, 16(12):1-7. )
- [25] Xiong T, Xiong W F, Ge M T, et al. Effect of high intensity ultrasound on structure and foaming properties of pea protein isolate [J]. Food Research International, 2018, 109:260-267.
- [26] Ma Y R, Huang H H. Characterisation and comparison of phenols, flavonoids and isoflavones of soymilk and their correlations with antioxidant activity [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2014, 49(10):2290-2298.
- [27] Zhao J, Ren F. Influence of hydroxylation and glycosylation in ring A of soybean isoflavones on interaction with BSA [J]. Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2009, 72(3):682-685.
- [28] 隋晓楠, 黄国, 刘贵辰. 大豆蛋白质-植物多酚互作研究进展[J]. 中国食品学报, 2019, 19(7):1-10. (Sui X N, Huang G, Liu G C. A review on the interactions between soy protein-plant polyphenols [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(7):1-10. )
- [29] Sui X, Sun H, Qi B, et al. Functional and conformational changes to soy proteins accompanying anthocyanins: Focus on covalent and non-covalent interactions [J]. Food Chemistry, 2018, 245:871878.
- [30] Kanakis C D, Imed H, Philippe B, et al. Milk  $\beta$ -lactoglobulin complexes with tea polyphenols [J]. Food Chemistry, 2011, 127(3):1046-1055.