

DOI: 10.16210/j.cnki.1007-7561.2022.05.011

苗向硕, 常城铭, 和东芹. 表没食子儿茶素没食子酸酯和小米谷糠蛋白的相互作用研究[J]. 粮油食品科技, 2022, 30(5): 158-166.

MIAO X S, CHANG C M, HE D Q. Research on the interaction between epigallocatechin gallate and millet bran protein[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2022, 30(5): 158-166.

表没食子儿茶素没食子酸酯和小米谷糠蛋白的相互作用研究

苗向硕^{1,2}, 常城铭¹, 和东芹^{1,2}✉

(1. 邯郸职业技术学院 食品与生物工程系, 河北 邯郸 056001;

2. 河北省高水平实训基地, 河北 邯郸 056001)

摘 要: 采用内源荧光光谱、同步荧光光谱、三维荧光光谱和紫外-可见光谱法研究表没食子儿茶素没食子酸酯 (Epigallocatechin gallate, EGCG) 和小米谷糠蛋白在模拟人体生理状态条件下的相互作用。结果表明: EGCG 可以大幅度淬灭小米谷糠蛋白的内源荧光, 淬灭机制为静态和动态混合淬灭; 同步荧光光谱、紫外-可见光谱和三维荧光光谱表明 EGCG 影响小米谷糠蛋白肽链骨架结构和芳香族氨基酸残基的微环境; 同步荧光结果表明 EGCG 主要影响色氨酸残基周围微环境, 降低其周围微环境疏水性。在 290、298、310 K 时, EGCG 与小米谷糠蛋白相互作用的表现结合常数 (K_A) 为 8.6916×10^4 、 1.3170×10^6 、 7.8686×10^6 L/mol, 对应的结合位点数(n)为 1.084 8、1.300 9、1.489 3。热力学参数表明 EGCG 与小米谷糠蛋白以疏水相互作用结合形成复合物。根据 Förster 非辐射转移理论计算了 EGCG 与小米谷糠蛋白结合距离 (r) 为 2.341 8 nm; 构建了 EGCG 与小米谷糠蛋白在不同温度条件下结合率的理论模型, 表明随着 EGCG 浓度增大, 两者的结合率逐渐减小, 温度变化影响两者的结合率。

关键词: 表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG); 小米谷糠蛋白; 相互作用; 荧光光谱; 紫外-可见光谱

中图分类号: TS201.1 文献标识码: A 文章编号: 1007-7561(2022)05-0158-09

网络首发时间: 2022-09-05 09:21:11

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3863.TS.20220902.1700.011.html>

Research on the Interaction between Epigallocatechin Gallate and Millet Bran Protein

MIAO Xiang-shuo^{1,2}, CHANG Cheng-ming¹, HE Dong-qin^{1,2}✉

(1. Department of Food and Bioengineering, Handan Polytechnic College, Handan, Hebei 056001, China;

2. Hebei Province High-level Training Base, Handan, Hebei 056001, China)

Abstract: Interaction between epigallocatechin gallate (EGCG) and millet bran protein under conditions that simulate human physiological conditions was investigated by Endogenous fluorescence spectroscopy

收稿日期: 2022-07-06

基金项目: 河北省科学技术厅项目大中学生科技创新能力培育专项项目 (2021H040303)

Supported by: Project of Hebei Provincial Department of Science and Technology, Special Project for the Cultivation of Scientific and Technological Innovation Ability of College and High School Students (No. 2021H040303)

作者简介: 苗向硕, 女, 1994 年出生, 硕士, 研究方向为粮食、油脂及植物蛋白工程。E-mail: miaoxiangshuo@126.com.

通讯作者: 和东芹, 女, 1973 年出生, 博士, 副教授, 研究方向为食品科学。E-mail: 549054886@qq.com.

synchronous fluorescence spectroscopy, Three-dimensional fluorescence spectroscopy and ultraviolet-visible spectroscopy. The results indicated that EGCG can greatly quench the endogenous fluorescence of millet bran protein in the mixed of static mode and dynamic mode. Synchronous fluorescence spectroscopy, ultraviolet-visible spectroscopy and three-dimensional fluorescence spectroscopy indicated that EGCG changed the protein peptide backbone and microenvironment of aromatic amino acid residues of millet bran protein. The synchronous fluorescence results showed that they mainly affected the microenvironment around tryptophan residues and reduced the hydrophobicity of the surrounding microenvironment. The binding constants (K_A) and site numbers (n) between EGCG and millet bran protein obtained at different temperatures were $8.691\ 6\times 10^4$ L/mol, 1.084 8 (290 K); $1.317\ 0\times 10^6$ L/mol, 1.300 9 (298 K); $7.868\ 6\times 10^6$ L/mol, 1.489 3 (310 K), respectively. According to the thermodynamic parameters, EGCG and millet bran protein were combined by hydrophobic interaction to form a complex. The binding distance (r) between EGCG and millet bran protein was calculated to be about 2.341 8 nm based on the theory of Förster's non-radiation energy transfer. The theoretical model of the binding ratio between EGCG and millet bran protein at different temperatures was established, and the binding ratio between EGCG and millet bran protein decreased as concentration of EGCG increased, while the temperature had effect on the binding ratio.

Key words: epigallocatechin gallate (EGCG); millet bran protein; interaction; fluorescence spectroscopy; ultraviolet-visible spectroscopy

小米谷糠是小米加工过程中产生的副产物。小米谷糠中蛋白质组分含量约占 15%，小米谷糠蛋白是人们广泛食用的优质谷物蛋白，小米谷糠蛋白氨基酸组成合理，比较接近世界卫生组织推荐的蛋白质的氨基酸比例，小米谷糠蛋白消化率高并且具有很低的过敏性，非常适合开发特殊人群及婴幼儿营养食品。小米谷糠蛋白还具有保健及抑制肿瘤细胞的作用^[1]。

表没食子儿茶素没食子酸酯(Epigallocatechin gallate, EGCG)在绿茶儿茶素成分中占比最高，EGCG 含有多个酚羟基，具有抗菌、抗氧化、抗炎及抗病毒等特性^[2]。由于 EGCG 安全性高且生物活性强，能够提高食品中蛋白质的营养价值或赋予食品更好的性能，延长食品保质期，因而广泛应用于各类食品^[3]。

在食品体系中，EGCG 会和蛋白质发生相互作用，进而改变食品体系中蛋白质的结构、功能，并进一步影响蛋白质的消化性质。因此 EGCG 与食品蛋白质相互作用的研究成为热点。近年来富含小米谷糠蛋白和 EGCG 的相关食品已有报道^[4-6]，而并没有 EGCG 与小米谷糠蛋白相互作用的研究，本文采用内源荧光光谱、同步荧光光谱、三维荧光光谱和紫外-可见光谱法研究 EGCG 与小

米谷糠蛋白的相互作用，为开发含有 EGCG 和小米谷糠蛋白天然成分的复合食品及改善其品质提供相应的理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

小米谷糠：河北威县保荣米业有限公司；EGCG（纯度 $\geq 98\%$ ）：上海源纯生物科技有限公司；其它试剂均为分析纯：国药集团化学试剂有限公司等。

1.2 主要仪器与设备

Sorvall LYNX 6000 高速落地离心机：美国 Thermo Fisher 公司；真空冷冻干燥机：北京亚星仪科科技发展有限公司；F4700 荧光分光光度计：日本日立公司；T6 紫外可见分光光度计：北京普析通用仪器有限责任公司。

1.3 实验方法

1.3.1 小米谷糠蛋白提取

参考曹阔^[7]的方法并稍作修改。以小米谷糠为原料，磨粉过 80 目筛，然后用正己烷充分浸泡小米谷糠，料液比为 1 : 5 (w/v)，然后密封置于 35 °C 的恒温箱中浸泡 12 h，后倒出上层溶剂，

重复进行上述操作。抽滤后自然晾干就可得到脱脂小米谷糠。将小米谷糠与去离子水混合,料液比为 1 : 10 (w/v),超声 30 min 后,将料液置于 45 °C 的恒温搅拌器中充分搅拌 4 h,搅拌期间不断用 1 mol/L NaOH 调整料液 pH,并使得 pH 值始终保持在 9.0,然后在 4 °C, 8 500 r/min 的条件下,将悬浮液离心 15 min,并将上清液用 1 mol/L HCL 调 pH 至 4,静置 20 min,然后在 4 °C, 8 000 r/min 的条件下将料液离心 20 min,沉淀用水洗 3 次,加入适量的去离子水,将蛋白沉淀分散均匀,并用 1 mol/L NaOH 将蛋白调 pH 至 7.0,冷冻干燥后得到实验用小米谷糠蛋白。

1.3.2 内源荧光光谱测定

用 pH 7.4 的 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液配制小米谷糠蛋白溶液浓度至 1.5 mg/mL,将 2 mL 小米谷糠蛋白溶液加入 10 mL 试管中,随后加入不同体积浓度为 2 mg/mL 的 EGCG 溶液,再用 pH 7.4 的 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液将体积定容至 3 mL,使得小米谷糠蛋白最终浓度为 1 mg/mL,得到质量比为 (1 : 0、1 : 0.005、1 : 0.01、1 : 0.02、1 : 0.04、1 : 0.06、1 : 0.08、1 : 0.10,小米谷糠蛋白 : EGCG, w/w) 的小米谷糠蛋白-EGCG 混合液,并将两者充分混合均匀,扫描前将样品置于 17、25、37 °C 的恒温水浴锅中保温 5 min。激发波长设置为 290 nm,发射波长设置为 300~450 nm,激发和发射狭缝宽度依次设置为 5 和 10 nm,扫描速度设置为 1 200 nm/min,在上述条件下测定小米谷糠蛋白的内源荧光光谱。

1.3.3 同步荧光光谱测定

样品制备方式同 1.3.2,测定温度条件为 298 K,分别设置 $\Delta\lambda = 15$ nm 和 $\Delta\lambda = 60$ nm,激发狭缝宽度为 5 nm,发射狭缝宽度为 10 nm,扫描速度设置为 1 200 nm/min,扫描波长范围为 250~450 nm 的小米谷糠蛋白同步荧光光谱。

1.3.4 三维荧光光谱测定

样品制备方式同 1.3.2,测定温度条件为 298 K,起始激发波长设置为 200 nm,激发波长范围为 200~350 nm,发射波长范围为 300~500 nm,激发狭缝宽度为 5 nm,发射狭缝宽度为 10 nm,扫描速度设置为 1 200 nm/min,每间隔 10 nm 记

录 1 次,共扫描 21 次。

1.3.5 紫外-可见光谱测定

配置浓度为 1 mg/mL 的小米谷糠蛋白溶液,取 3 mL 上述蛋白溶液于石英比色池中,扫描波长范围为 250~500 nm 内的吸收光谱,测定温度条件为 298 K,扫描完毕后,将不同质量浓度的小米谷糠蛋白-EGCG 混合液充分混匀后静置 5 min 加入到比色池中,在温度条件为 298 K 时扫描吸收光谱。将浓度为 1 mg/mL 的小米谷糠蛋白溶液作为空白,记录小米谷糠蛋白溶液的紫外-可见吸收差谱。

1.3.6 EGCG 与小米谷糠蛋白结合距离的测定

配制浓度均为 2×10^{-5} mol/L 的小米谷糠蛋白和 EGCG 溶液,在 25 °C 的条件下恒温水浴保温 5 min。EGCG 的紫外光谱测定:移取 2×10^{-5} mol/L 的 EGCG 溶液 3 mL 于石英比色池中,扫描 300~400 nm 的紫外吸收光谱。小米谷糠蛋白溶液荧光光谱测定:移取 3 mL 小米谷糠蛋白溶液于石英比色池中,激发波长设置为 290 nm,发射波长范围为 300~400 nm,激发狭缝宽度为 5 nm,发射狭缝宽度为 10 nm,扫描速度设置为 1 200 nm/min,测定温度条件为 298 K。

1.4 数据分析

所有实验平行测定 3 次。采用 Microsoft Excel 2010 和 Origin Pro 8 处理数据和绘制图形。

2 结果与分析

2.1 EGCG 与小米谷糠蛋白相互作用的荧光光谱

2.1.1 EGCG 浓度对小米谷糠蛋白内源荧光光谱的影响

小米谷糠蛋白的内源荧光光谱可以反映蛋白中色氨酸、酪氨酸及苯丙氨酸残基附近微环境的改变。在本实验条件下,由于 EGCG 的浓度很小,所产生的荧光发射信号很弱,可以忽略 EGCG 对小米谷糠蛋白荧光信号的干扰,因而不考虑文中“内滤光效应”的干扰问题^[8]。图 1 表明,随着 EGCG 浓度的增大,小米谷糠蛋白的荧光强度显著降低,说明 EGCG 大幅度淬灭了小米谷糠蛋白的内源荧光;同时,小米谷糠蛋白最大荧光发射波长由 345 nm 红移至 368 nm,表明随着 EGCG

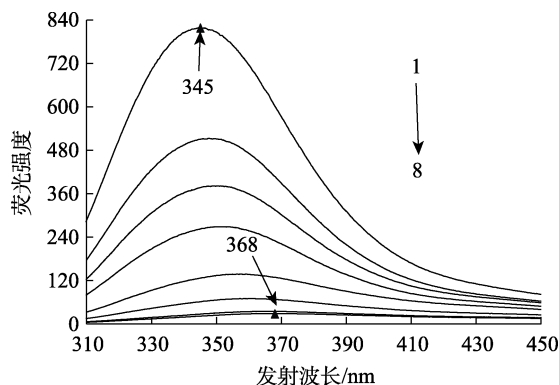


图1 不同浓度 EGCG 对小米谷糠蛋白内源荧光光谱的影响

Fig.1 Endogenous fluorescence spectra of millet bran protein at different concentrations of EGCG

注：小米谷糠蛋白质量浓度为 1 mg/mL；1~8：EGCG 质量浓度分别为 0、0.005、0.01、0.02、0.04、0.06、0.08、0.10 mg/mL。图 2、图 4 同。

Note: The mass concentration of millet gluten protein is 1 mg/mL; 1-8: the mass concentration of EGCG is 0, 0.005, 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10 mg/mL for curves 1 to 8. Figures 2 and 4 are the same as this one.

浓度的逐渐增大，小米谷糠蛋白的芳香族氨基酸残基微环境疏水性降低，极性增强，小米谷糠蛋白空间结构逐渐变得更加延伸^[9]。

2.1.2 EGCG 浓度对小米谷糠蛋白同步荧光光谱的影响

同步荧光光谱不仅可以区分开小米谷糠蛋白酪氨酸残基和色氨酸残基特征光谱，还可进一步判断 EGCG 与小米谷糠蛋白相互作用位点更接近酪氨酸残基或色氨酸残基。 $\Delta\lambda=15$ nm 和 $\Delta\lambda=60$ nm 时分别显示酪氨酸残基和色氨酸残基的光谱特征^[10]。由图 2 可以看出， $\Delta\lambda=15$ 时，小米谷糠蛋白酪氨酸残基的同步荧光强度随着 EGCG 浓度的增加而降低，最大发射波长由 359.4 nm 红移

至 367.4 nm，当 $\Delta\lambda=60$ nm 时，小米谷糠蛋白色氨酸残基的同步荧光强度随着 EGCG 浓度的增加降低，最大发射波长由 289.4 nm 红移至 292.2 nm，随着 EGCG 浓度的升高，色氨酸残基的同步荧光强度降低程度更明显，表明 EGCG 和小米谷糠蛋白相互作用同时影响酪氨酸残基和色氨酸残基微环境的疏水性，但对色氨酸残基周围微环境影响程度更大，EGCG 在小米谷糠蛋白上的结合位点更靠近色氨酸残基，小米谷糠蛋白结构变得疏松，与内源荧光光谱结果一致。由于不考虑“内滤光效应”的干扰， $\Delta\lambda=15$ nm 的光谱峰型出现锯齿状，笔者认为其与灵敏度参数设置有关，具体原因有待进一步研究。

2.1.3 EGCG 浓度对小米谷糠蛋白三维荧光光谱的影响

三维荧光光谱中的峰位、颜色和指纹信息可以反映蛋白质的荧光强度和构象变化。如图 3 所示，峰 a ($E_x=E_m$) 为瑞利散射峰，峰 b ($E_m=2E_x$) 为二级散射峰，峰 1 为小米谷糠蛋白色氨酸和酪氨酸残基特征峰，峰 2 代表多肽链主链上的 C=O 结构的 $\pi\rightarrow\pi^*$ 跃迁产生的荧光峰^[9]。如图 3 所示，加入 EGCG 后，峰 1 颜色明显变浅，等高线变得明显稀疏，表明 EGCG 能淬灭小米谷糠蛋白荧光，EGCG 与小米谷糠蛋白之间存在相互作用。峰 2 颜色变浅，面积发生改变，表明小米谷糠蛋白质多肽链骨架结构发生改变。表 1 中的峰 1 数据显示，小米谷糠蛋白的色氨酸和酪氨酸残基的最大发射波长出现了红移，说明小米谷糠蛋白色氨酸和酪氨酸残基周围的微环境极性增强，疏水性降

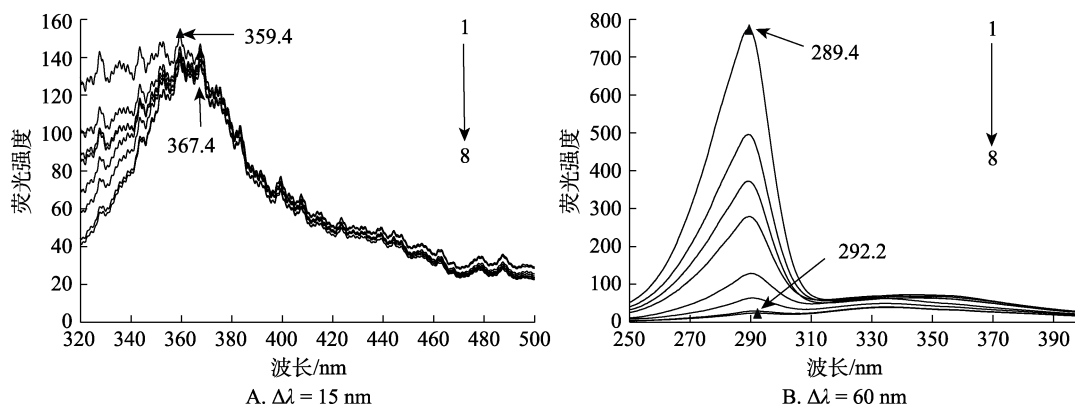


图2 不同浓度 EGCG 对小米谷糠蛋白同步荧光光谱的影响

Fig.2 Synchronous fluorescence spectra of millet bran protein with different concentrations of EGCG

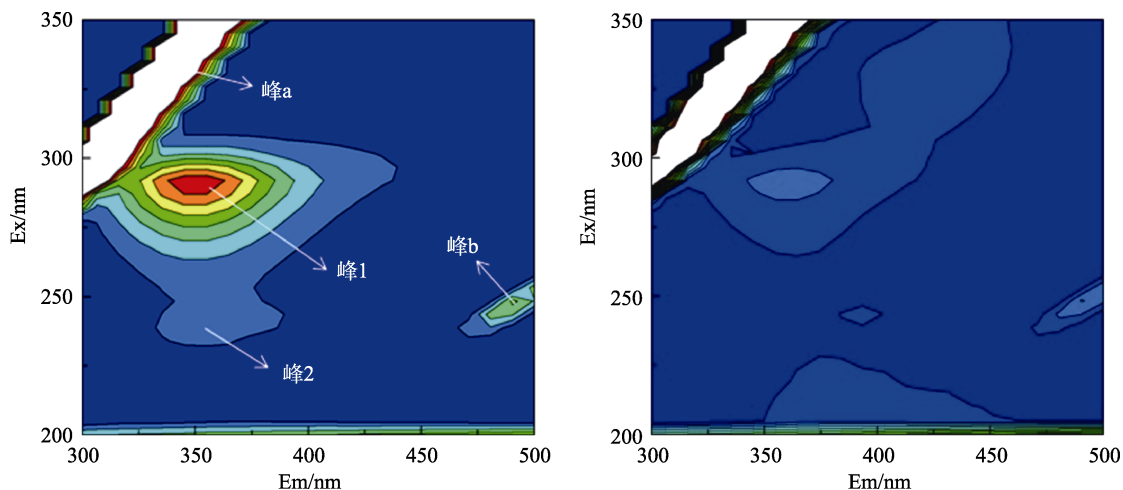


图 3 未添加 EGCG 和 EGCG 浓度为 0.04 mg/mL 的小米谷糠蛋白等高线图
 Fig.3 Contour map of millet bran protein and EGCG-millet bran protein system (0.04 mg/mL)

低, 与小米谷糠蛋白的内源荧光和同步荧光光谱变化结果一致。峰 b 的荧光强度下降的原因可能是两者相互作用使小米谷糠蛋白表面的保护水层受到破坏, 小米谷糠蛋白更加分散, 导致小米谷糠蛋白粒径变小, 降低了小米谷糠蛋白的光散射作用, 从而降低二级散射峰的荧光强度, 表明 EGCG 和小米谷糠蛋白相互作用形成不发光基态复合物。

表 1 EGCG-小米谷糠蛋白体系三维荧光光谱特征参数
 Table 1 Characteristic parameters for the three-dimensional fluorescence spectra of EGCG and millet bran protein system

体系	峰类型	峰位置 $\lambda_{Ex}/\lambda_{Em}/(nm/nm)$	荧光强度
小米谷糠蛋白	峰 1	290/350	778.5
	峰 2	235/350	121.5
	峰 a	290/290→350/350	9 999.9→9 999.9
	峰 b	200/400→250/500	82.76→356.5
EGCG (0.04 mg/mL) + 小米谷糠蛋白	峰 1	290/360	122.4
	峰 2	240/390	53.5
	峰 a	310/310→350/350	9 999.9→9 999.9
	峰 b	200/400→250/500	78.95→146.2

2.2 EGCG 与小米谷糠蛋白相互作用的紫外-可见吸收光谱

紫外-可见吸收光谱是研究复合物形成和蛋白质结构变化的简单而有效的方法^[11]。动态猝灭只影响到蛋白分子的激发态, 不会改变蛋白的紫外吸收光谱, 静态猝灭由于生成新的基态复合物

而导致吸收光谱的改变。蛋白的特征吸收峰(大约 280 nm)主要是包括色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸在内的芳香族氨基酸的吸收峰^[12]。由图 4 可得, 随着 EGCG 含量增加, 小米谷糠蛋白吸光度逐渐上升, 表明 EGCG 与小米谷糠蛋白相互作用形成基态复合物。随着 EGCG 浓度的增加, 芳香族氨基酸最大吸收峰波长发生红移, 与同步荧光结果的变化一致, 一方面可能是由于小米谷糠蛋白中色氨酸残基被 EGCG 结合, 另一方面可能是两者相互作用使色氨酸残基位置发生移动, 新的共轭体系由此产生, 使 $\pi-\pi^*$ 跃迁能量增大^[13]。耿子蔚^[12]等研究不同茶汤与乳清蛋白相互作用时紫外-可见吸收光谱峰型也出现锯齿状, 笔者认为其与灵敏度参数设置有关, 具体原因有待进一步研究。

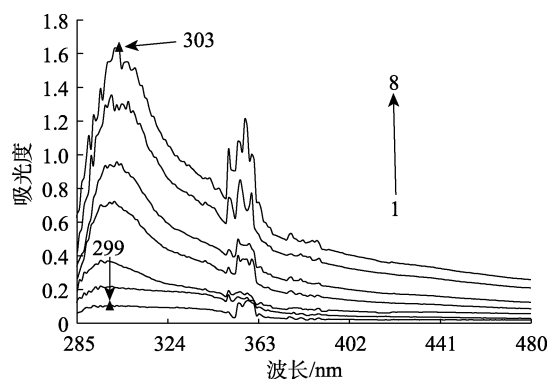


图 4 不同浓度 EGCG 对小米谷糠蛋白紫外-可见吸收光谱的影响

Fig.4 UV-Vis absorption spectra of millet bran protein with different mass concentrations of EGCG

2.3 EGCG 与小米谷糠蛋白相互作用机制

2.3.1 荧光淬灭机制

内源荧光光谱结果表明, EGCG 能显著淬灭小米谷糠蛋白的荧光, 分析它们的淬灭机制可以更准确地判断两者相互作用是否形成了复合物。荧光淬灭机制总共包括 3 类, 分别为静态淬灭机制、动态淬灭机制和动态静态混合淬灭机制。动态淬灭是猝灭剂和处在激发态的荧光物质碰撞而引发, 随着温度升高, 动态淬灭常数增大。静态淬灭是猝灭剂和处于基态的荧光物质形成了复合物, 随着温度升高, 复合物的稳定性下降, 因此猝灭常数随着温度升高而降低^[14]。可采用 Stern-Volmer 方程^[13]计算不同温度下的淬灭常数, 由此判断 EGCG 与小米谷糠蛋白相互作用淬灭机制。

Stern-Volmer 方程如下:

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

式中: F_0 和 F 分别是 EGCG 加入前后的小米谷糠蛋白荧光强度; $[Q]$ 是 EGCG 浓度 (mol/L); K_q 为双分子猝灭速率常数 (L/(mol·s)); K_{sv} 为动态猝灭常数 (L/mol); τ_0 为不存在猝灭剂时荧光体的寿命 (生物大分子的平均寿命约为 10^{-8} s)。

由图 5 中直线的斜率得到 K_{sv} , 由 τ_0 得到 K_q (表 2)。当 R^2 不大于 0.98 时, 表明淬灭机制可能为动态静态混合淬灭^[15]。由图 5 所示, EGCG 浓度较低时, Stern-Volmer 曲线呈现较好的线性关系, EGCG 浓度较高时, Stern-Volmer 曲线逐

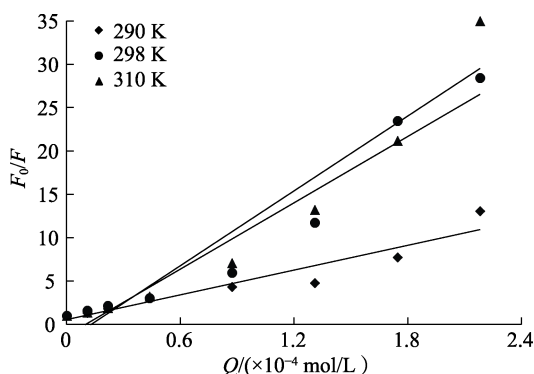


图 5 不同温度条件下 EGCG 对小米谷糠蛋白荧光淬灭的 Stern-Volmer 方程曲线图

Fig.5 Stern-Volmer plots of millet bran protein interacting with EGCG at different temperatures

表 2 EGCG-小米谷糠蛋白复合物的荧光淬灭常数及相关系数

Table 2 Quenching rate constants and correlation coefficients of millet bran protein and EGCG

温度/K	$K_{sv}/(L/mol)$	$K_q/(L/(mol \cdot s))$	相关系数 R^2
290	$4.761 0 \times 10^4$	$4.761 0 \times 10^{12}$	0.910 3
298	$1.276 4 \times 10^5$	$1.276 4 \times 10^{13}$	0.940 0
310	$1.439 7 \times 10^5$	$1.439 7 \times 10^{13}$	0.928 2

渐偏向纵坐标轴, 表明 EGCG 与小米谷糠蛋白相互作用同时存在静态淬灭和动态淬灭^[16], 随着温度升高, K_{sv} 的值不断增大, 表明 EGCG 与小米谷糠蛋白相互作用存在动态淬灭机制。另外, 由于不同温度下 K_q 达到 10^{12} 或 10^{13} , 显著高于最大动态猝灭速率常数 (约为 2×10^{10} L/(mol·s)), 表明 EGCG 对小米谷糠蛋白的猝灭机制也存在静态淬灭, 结合分析荧光光谱和紫外-可见吸收光谱的变化结果, 静态淬灭在 EGCG 淬灭小米谷糠蛋白荧光过程中起主导作用^[17]。

2.3.2 EGCG-小米谷糠蛋白复合物的结合常数、结合位点数

可以采用以下等式确定结合常数 (K_A) 和结合位点数 (n)^[12]:

$$\lg \left(\frac{F_0 - F}{F} \right) = \lg K_A + n \lg [Q] \quad (2)$$

式中: F_0 表示没有加入 EGCG 时的荧光强度; F 表示加入 EGCG 时的荧光强度; K_A 为表观结合常数; n 为结合位点数; $[Q]$ 为 EGCG 的浓度。

从图 6 和表 3 中可以看出, 结合常数 K_A 的数量级为 10^6 , 相关研究报道 EGCG 与乳清蛋白^[12] 相互作用 K_A 数量级是 10^4 , 表明 EGCG 与小米谷

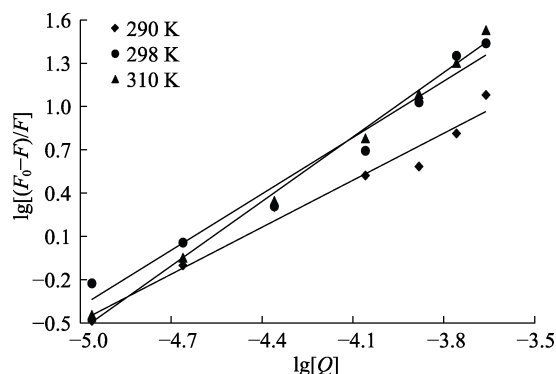


图 6 不同温度条件下 EGCG 荧光淬灭小米谷糠蛋白的双对数曲线

Fig.6 Double logarithmic curves of millet bran protein quenched by EGCG at different temperatures

表 3 EGCG-小米谷糠蛋白复合物的结合位点、表观结合常数及关系系数

Table 3 Apparent binding constants, binding sites numbers, and correlation coefficients of millet bran protein and EGCG

温度/K	K_A /(L/mol)	结合位点 n	相关系数 R^2
290	8.691×10^4	1.084 8	0.973 0
298	1.317×10^6	1.300 9	0.969 9
310	7.868×10^6	1.489 3	0.994 0

糠蛋白之间结合力更强,可能是由于小米谷糠蛋白与乳清蛋白结构不同导致两者数量级出现差异。随着温度升高, K_A 值不断增大,一方面说明 EGCG 对小米谷糠蛋白的淬灭反应是吸热反应,同样也表明其淬灭过程有动态淬灭。在三个不同温度条件下,结合位点数 n 全部约等于 1,表明 EGCG 和小米谷糠蛋白形成 1 个结合位点。

2.3.3 EGCG-小米谷糠蛋白复合物的热力学参数和作用力类型

反应条件相对温和时(如酸性、中性等),多酚类小分子和蛋白质形成复合物的作用力主要包括疏水相互作用、氢键、范德华力、静电引力等非共价结合作用,作用力的主要类型由热力学参数 ΔH 和 ΔS 来判断。当 $\Delta H > 0$ 、 $\Delta S > 0$ 时,作用力主要是疏水相互作用;当 $\Delta H < 0$ 、 $\Delta S < 0$ 时,作用力主要是氢键和范德华力;当 $\Delta H < 0$ 、 $\Delta S > 0$ 时,作用力是静电引力;当 $\Delta H > 0$ 、 $\Delta S < 0$ 时,分子间的作用力类型主要是疏水相互作用和静电引力^[18]。可采用 Van't Hoff 方程^[18]来判断 EGCG 与小米谷糠蛋白的作用力类型。

$$\ln K_A = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (3)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (4)$$

式中: R 为气体常数 $8.314 \text{ J/(K}\cdot\text{mol)}$; T 为实验温度; K_A 为不同温度的结合常数(见表 3)。

如表 4 所示, $\Delta G < 0$, 表明 EGCG 与小米谷

表 4 不同温度下 EGCG 与小米谷糠蛋白相互作用的热力学参数

Table 4 Thermodynamic parameters for interaction between EGCG and millet bran protein

温度/K	ΔH /(kJ/mol)	ΔS /(J/(mol·K))	ΔG /(kJ/mol)
290	164.891 6	665.851 6	-28.205 4
298	164.891 6	665.851 6	-33.534 2
310	164.891 6	665.851 6	-41.522 4

糠蛋白的反应可自发进行。 $\Delta H > 0$, 表明 EGCG 与小米谷糠蛋白之间反应为吸热反应,升温有利于反应进行,这与表 3 计算的 K_A 随温度升高而增大一致。 $\Delta H > 0$ 、 $\Delta S > 0$ 表明 EGCG 与小米谷糠蛋白相互作用力类型主要是疏水相互作用。

2.3.4 EGCG 与小米谷糠蛋白的能量转移和结合距离

根据 Förster's 偶极-偶极非辐射能量转移理论,蛋白质和小分子配体之间发生能量转移需要满足以下条件:蛋白质给体能发射荧光,蛋白荧光发射光谱与小分子配体的紫外吸收光谱有重叠,蛋白质与配体间结合距离小于 7 nm 。由以下公式可计算两者重叠积分 J 、能量转移效率 E 、结合距离 r 及临界能量转移距离 R_0 ^[19]。

$$J = \frac{\sum F(\lambda)\varepsilon(\lambda)\lambda^4\Delta\lambda}{\sum F(\lambda)\Delta\lambda} \quad (5)$$

$$E = 1 - \frac{F}{F_0} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (6)$$

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} K^2 N^{-4} \phi J \quad (7)$$

式中, $F(\lambda)$ 为蛋白质给体在波长 λ 处的荧光强度; E 为能量转移效率; F 和 F_0 分别表示添加淬灭剂前后蛋白荧光强度; $\varepsilon(\lambda)$ 则为小分子配体在波长 λ 处摩尔消光系数; J 是重叠面积积分; R_0 是指能 $E=50\%$ 时的临界距离; r 为结合距离; K^2 为偶极空间取向因子(值为 $2/3$); N 为介质折射指数(值为 1.336); Φ 为给体荧光量子效率(值为 0.118)。

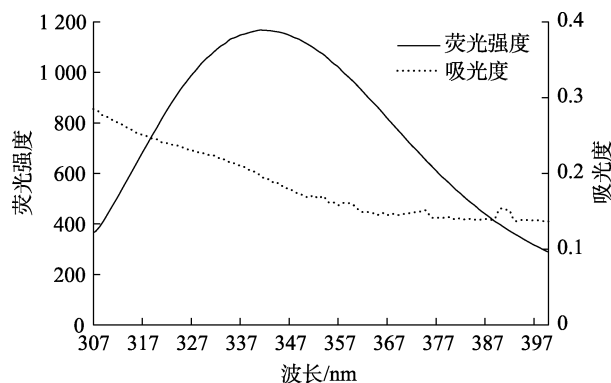


图 7 EGCG 紫外吸收光谱和小米谷糠蛋白荧光发射光谱重叠图

Fig.7 Spectral overlap of EGCG absorption spectrum and millet bran protein fluorescence spectrum

由图 7 根据公式 (7) 计算得 $J=1.207 2 \times 10^{-14} (\text{cm}^3 \cdot \text{L/mol})$, $E=0.602 9$, $R_0=2.530 1 \text{ nm}$, $r=2.341 8 \text{ nm}$ 。结合距离远远小于 7 nm , 而且结合距离符合 $0.5 R_0 < r < 1.5 R_0$, 这表明小米谷糠蛋白与 EGCG 存在非辐射能量转移。EGCG 淬灭小米谷糠蛋白荧光原因可能是两者之间存在非辐射能量转移引起的^[19]。同时, EGCG 与小米谷糠蛋白结合距离 r 值较小同样表明两者之间存在相互作用。

2.3.5 EGCG 与小米谷糠蛋白结合率的预测

EGCG 的小米谷糠蛋白结合率能直观的体现出 EGCG-小米谷糠相互作用强度。当两者相互作用达到动态平衡时, 同时两者结合位点数接近 1 时, 可以建立两者结合率的理论模型。以下公式可表征结合常数 (K_A) 和结合率 (Y) 之间的关系^[20]:

$$Y = \frac{\left(K_A + K_A X + \frac{1}{P} \right) - \sqrt{\left(K_A + K_A X + \frac{1}{P} \right)^2 - 4 K_A^2 X}}{2 K_A X} \quad (8)$$

式中, Y 是结合率; K_A 结合常数; P 是小米谷糠蛋白浓度; X 是 EGCG 与小米谷糠蛋白的浓度比。运用公式 (8) 计算不同温度时 EGCG 的小米谷糠蛋白结合率。

如图 8 所示, EGCG 的小米谷糠蛋白结合率具有明显的浓度依赖性, 随着 EGCG 浓度增大, 结合率逐渐减小, 温度变化对结合率产生影响, 尤其是 290 K 时变化较明显。由图 8 得到温度 290 、 298 、 310 K 时的两者浓度比与结合率曲线方程如下:

$$X = \frac{0.345 2}{(Y-1)} + \frac{1}{Y} \quad (9)$$

$$X = \frac{0.022 78}{(Y-1)} + \frac{1}{Y} \quad (10)$$

$$X = \frac{0.003 813}{(Y-1)} + \frac{1}{Y} \quad (11)$$

由公式可见, 当 EGCG 与小米谷糠蛋白浓度在一定范围内波动时, EGCG 的小米谷糠蛋白结合率可能出现指数级变化, 可以通过测定 EGCG 和小米谷糠蛋白浓度比, 由公式 (9) ~ (11) 计算其结合率。

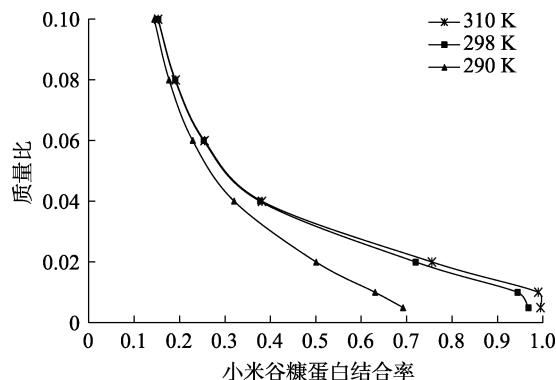


图 8 不同温度条件下 EGCG 与小米谷糠蛋白的结合率

Fig.8 Binding rate of millet bran protein and EGCG at different temperatures

3 结论

通过内源荧光光谱、同步荧光光谱、三维荧光光谱和紫外-可见光谱法研究了 EGCG 与小米谷糠蛋白的相互作用, 内源荧光光谱结果和同步荧光光谱结果均表明 EGCG 与小米谷糠蛋白之间存在相互作用, 主要影响的是色氨酸残基在空间结构中所处的微环境。三维荧光、紫外-可见光谱均证明 EGCG 影响了色氨酸和酪氨酸残基微环境并使小米谷糠蛋白质多肽链的骨架发生变化。EGCG 引起的小米谷糠蛋白荧光淬灭机制是动静态混合淬灭, 但以静态淬灭为主。EGCG 和小米谷糠蛋白结合常数 K_A 的数量级可达 10^6 , 且结合位点数约为 1。热力学参数表明 EGCG 和小米谷糠蛋白主要以疏水相互作用结合形成复合物, 反应可自发进行。同时, EGCG 与小米谷糠蛋白之间结合距离远小于 7 nm , 两者存在能量转移。最后, 建立了 EGCG 与小米谷糠蛋白结合率的理论模型, 发现 EGCG 的小米谷糠蛋白结合率随着 EGCG 浓度的增大而减小, 温度变化对 EGCG 的小米谷糠蛋白结合率产生影响。

参考文献:

- [1] 曹阔, 吴兴雨, 孙凯杨, 等. 响应面分析法优化酶法提取小米谷糠蛋白工艺[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(18): 169-173.
CAO K, WU X Y, SUN K Y, et al. Response surface methodology to optimize enzymatic extraction of millet bran protein[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2021, 49(18): 169-173.
- [2] PANG X H, YANG Y, BIAN X, et al. Hemp (Cannabis sativa L.) seed protein-EGCG conjugates: Covalent bonding and

- functional research[J]. *Foods*, 2021, 10(7): 1618.
- [3] YANG R, LIU Y Q, XU J J, et al. Interaction between rice bran albumin and epigallocatechin gallate and their physicochemical analysis[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2018, 27(6): 1561-1569.
- [4] 吴茜, 周崇禅, 张任虎, 等. 一种川式泡椒风味特色调味料及其制备方法[P]. 四川省: CN114098043A, 2022-03-01.
WU Q, ZHOU C C, ZHANG R H, et al. A Sichuan-style pickled pepper flavor special seasoning and its preparation method[P]. Sichuan Province: CN114098043A, 2022-03-01.
- [5] 王慕贞. 一种降血脂功能性饮料及其制备方法[P]. 广东省: CN109463595A, 2019-03-15.
WANG M Z. A hypolipidemic functional drink and its preparation method[P]. Guangdong Province: CN109463595A, 2019-03-15.
- [6] 冯翠萍, 常明昌, 孟俊龙, 等. 具有小米风味的食用菌食品及其制备方法[P]. 山西省: CN113907333A, 2022-01-11.
FENG C P, CHANG M C, MENG J L, et al. Edible mushroom food with millet flavor and its preparation method[P]. Shanxi Province: CN113907333A, 2022-01-11.
- [7] 曹阔. 小米谷糠蛋白的分离提取及功能性质研究[D]. 河北北方学院, 2019.
CAO K. Isolation, extraction and functional properties of millet bran protein[D]. Hebei North University, 2019.
- [8] 苗向硕, 吴伟, 吴晓娟. 表没食子儿茶素没食子酸酯和米糠蛋白的相互作用[J]. *中国粮油学报*, 2019, 34(12): 19-26.
MIAO X S, WU W, WU X J. Interaction between epigallocatechin gallate and rice bran protein[J]. *Chinese Journal of Cereals and Oils*, 2019, 34(12): 19-26.
- [9] YOU Y, YANG L, CHEN H, et al. Effects of Epigallocatechin-3-gallate on the functional and structural properties of soybean protein isolate[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(10): 2306-2315.
- [10] 黄渊, 岳世阳, 熊善柏, 等. 2 种天然抗氧化剂与鲢鱼肌球蛋白的相互作用[J]. *食品科学*, 2019, 40(4): 14-20.
HUANG Y, YUE S Y, XIONG S B, et al. Interaction between two natural antioxidants and silver carp myosin[J]. *Food Science*, 2019, 40(4): 14-20.
- [11] 吴云雪, 李娟, 高晴, 等. EGCG 与乳清蛋白相互作用的光谱分析[J]. *食品研究与开发*, 2020, 41(1): 7-13.
WU Y X, LI J, GAO Q, et al. Spectral analysis of the interaction between EGCG and whey protein[J]. *Food Research and Development*, 2020, 41(1): 7-13.
- [12] 耿子蔚, 丁玉婕, 童群义. 不同茶汤与乳清蛋白相互作用的
- 研究[J/OL]. *食品与发酵工业*, 2022: 1-10.
- GENG Z W, DING Y J, TONG Q Y. Study on the interaction between different tea soups and whey protein[J/OL]. *Food and Fermentation Industry*, 2022: 1-10.
- [13] YANG Y X, WANG Q M, LEI L A, et al. Molecular interaction of soybean glycinin and β -conglycinin with -epigallocatechin gallate induced by pH changes-ScienceDirect[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 108: 1-10.
- [14] HE Z Y, CHEN J, MOSER S E, et al. Interaction of β -casein with (-)-epigallocatechin-3-gallate assayed by fluorescence quenching: effect of thermal processing temperature[J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 2016, 51(2): 342-348.
- [15] 李军, 毕艳兰, 孙尚德, 等. 叔丁基对苯二酚及其氧化产物与牛血清蛋白的相互作用[J]. *中国粮油学报*, 2017, 32(4): 133-140.
LI J, BI Y L, SUN S D, et al. Interaction of tert-butyl hydroquinone and its oxidation products with bovine serum albumin[J]. *Chinese Journal of Cereals and Oils*, 2017, 32(4): 133-140.
- [16] BOSE A. Interaction of tea polyphenols with serum albumins: A fluorescence spectroscopic analysis[J]. *Journal of Luminescence*, 2016, 169: 220-226.
- [17] HE Z Y, CHEN Y, MOSER S E, et al. Interaction of beta-casein with (-)-epigallocatechin-3-gallate assayed by fluorescence quenching: effect of thermal processing temperature[J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 2016: 51: 342-348.
- [18] 付珊琳, 钟俊植, 姚文俊, 等. 去折叠态 β -乳球蛋白与表没食子儿茶素没食子酸酯的相互作用[J]. *食品科学*, 2019, 40(4): 7-13.
FU S L, ZHONG J Z, YAO W J, et al. Interaction between unfolded β -lactoglobulin and epigallocatechin gallate[J]. *Food Science*, 2019, 40(4): 7-13.
- [19] JIA J J, GAO X, HAO M H, et al. Comparison of binding interaction between β -lactoglobulin and three common polyphenols using multi-spectroscopy and modeling methods[J]. *Food Chemistry*, 2017, 228: 143-151.
- [20] LIU X, YING X X, LI Y L, et al. Identification differential behavior of Gd@C-82(OH)(22) upon interaction with serum albumin using spectroscopic analysis[J]. *Spectrochimica Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2018, 203: 383-396. ㊞
- 备注: 本文的彩色图表可从本刊官网 (<http://lspkj.ijournal.cn>)、中国知网、万方、维普、超星等数据库下载获取。