

多酚与蛋白质相互作用研究方法进展

张莉,刘倩倩,吴长玲,王鹏*,徐幸莲,韩敏义

(肉品加工与质量控制教育部重点实验室,南京农业大学食品科技学院,江苏南京 210095)

摘要:多酚因其独特的化学结构而具有抗氧化、抗肿瘤、抑菌等多种生理功效,在食药领域得到广泛应用。多酚与蛋白相结合形成复合物,改变了两者的营养特性与功能结构,利用不同的实验方法和技术可以获得两者之间的结合常数、结合部位、作用力类型、结合位点数、多酚与蛋白结合后引起蛋白构象与生理功能变化以及外界条件对多酚-蛋白结合的影响等信息。本文主要综述了多酚与蛋白质相互作用研究方法进展,包括分子对接技术、紫外-可见吸收光谱法、荧光光谱法、圆二色谱法、傅里叶变换红外光谱法、等温滴定量热法、拉曼光谱法和核磁共振波谱法。综述发现每种方法都有一定的优势与局限性,使用多种方法结合分析可以更加全面的了解多酚与蛋白质的相互作用关系。

关键词:多酚,蛋白质,相互作用,研究方法

Progress in Research Methods for the Interaction between Polyphenols and Proteins

ZHANG Li, LIU Qian-qian, WU Chang-ling, WANG Peng*, XU Xing-lian, HAN Min-yi

(Key Laboratory of Meat Processing and Quality Control, Ministry of Education, College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Due to its unique chemical structure, polyphenols have many physiological effects such as anti-oxidation, anti-tumor, antibacterial and so on, and are widely used in the field of food and medicine. Polyphenols and proteins combine to form complexes, which change the nutritional characteristics and functional structures of the two. A variety of experimental methods and techniques can be used to determine the binding constants, binding sites, types of interaction force, binding-site number, and polyphenol binding to proteins changes in protein conformation and physiological function as well as the influence of external conditions on polyphenol-protein binding. This review summarized the progress of research on the interaction between polyphenols and proteins, including molecular docking, UV-Vis absorption spectroscopy, fluorescence spectroscopy, circular dichroism, fourier transform infrared spectroscopy, isothermal titration calorimetry, raman spectroscopy and nuclear magnetic resonance spectroscopy. The review found that each method has some advantages and limitations. Using a variety of methods combined with analysis can more fully understand the interaction between polyphenols and proteins.

Key words: polyphenol; protein; interaction; research methods

中图分类号:TS255.1

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2018)24-0340-06

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2018.24.058

引文格式:张莉,刘倩倩,吴长玲,等.多酚与蛋白质相互作用研究方法进展[J].食品工业科技,2018,39(24):340-345.

多酚是植物体内复杂酚类的次生代谢产物,广泛存在于各种植物中,具有抗氧化、降血压、抗癌、抑菌消炎、抗辐射、预防动脉粥样硬化等生理功能^[1-4],现已成为科学界研究热点。研究表明:多酚能与多糖、蛋白质、生物碱等多种化合物结合,其中蛋白质作为生命活动的物质基础,是生物体内功能性高分子物质,几乎在所有的生命活动中都发挥着重要作用。因此,多酚与蛋白质相互作用来调控食品营养^[5-7]、风味^[8-9]和品质^[10-12]等方面的研究逐步升温,而且随着科学技术的发展,不断有新的技术应用到此方面的研究。

目前,多酚与蛋白质相互作用主要测定指标有结合常数、结合部位、作用力类型、结合位点数、多酚与蛋白结合后引起蛋白构象和生理功能变化以及外界条件对多酚-蛋白结合的影响等,进而研究多酚与蛋白结合机制。多酚与蛋白相互作用研究方法多种多样,如平衡透析法^[13]、电化学方法^[14]、光谱法、液相色谱法^[15]、原子力显微镜技术^[16]等。随着实验技术和仪器设备的不断发展,分子对接、质谱^[17]、核磁共振波谱法、毛细管电泳^[18]等方法也逐渐运用到此研究领域,这不仅有利于开展小分子物质作用机理的研究,且在改进蛋白质-多酚复合物检测、药物代谢

收稿日期:2018-02-25

作者简介:张莉(1996-),女,硕士研究生,研究方向:肉品加工与质量安全,E-mail:2917212071@qq.com。

*通讯作者:王鹏(1979-),男,博士,副教授,研究方向:功能化肉制品加工技术及机理,E-mail:wpeng@njau.edu.cn。

基金项目:中央高校基本科研业务费自主创新重点项目(KYZ201652);大学生创新训练计划(1718C12)。

动力学等方面的研究都有十分重大的作用。本文主要介绍分子对接、紫外-可见吸收光谱、荧光光谱、圆二色谱、傅里叶变换红外光谱、等温微量热法、拉曼光谱、核磁共振波谱对多酚和蛋白质相互作用的研究,旨在为多酚与蛋白质相互作用的后续研究提供方法借鉴,也为食品加工中多酚-蛋白质对产品品质影响的分析提供指导。

1 分子对接

分子对接的最初思想起源于 E.Fisher 提出的“钥匙-锁模型”,即受体与配体相互识别的首要条件是空间结构的匹配。分子对接技术是通过不断优化小分子化合物的位置(取向)以及分子内部柔性键的二面角(构象),计算其相互作用及结合能,寻找出小分子化合物与靶标大分子作用的最佳构象^[19],可以利用计算机模拟代替试验操作,短时间内能够处理大量的试验组数据,可以有效提高科研效率,但因无法考虑离子强度、温度等因素对相互作用的实际影响,还需结合实验结果进行验证分析。

通过对多酚与蛋白质分子对接结果进行分析,可以得出多酚与蛋白质之间的结合自由能、结合位点和相互作用力等,从理论上模拟相互作用的可行性和作用情况。Ayah 等^[20]对牛 α -乳白蛋白(α -LA)与表没食子儿茶素-3-没食子酸酯(EGCG)进行分子对接研究,结果阐述了 EGCG 淬灭 α -LA 固有荧光的原因。Motokazu 等^[21]对 EGCG 和外膜通道蛋白 OmpG 进行分子对接分析,发现 EGCG 通过氢键与孔道中心的 Arg 残基发生作用,从而阻塞外膜通道,抑制通道蛋白功能,因此可以根据 EGCG 通过外膜孔蛋白进入周质层的量,来阐明 EGCG 是否抑制细胞分裂,可以为 EGCG 在革兰氏阳性细菌中的抗菌机理提供研究方向。金建昌等^[22]利用分子对接技术得出 EGCG 与 β -乳球蛋白(β -LG)之间作用力主要为疏水作用,同时也与 β -LG 中的氨基酸残基形成的氢键和静电作用,结果经验证与荧光淬灭的结果基本吻合;杨荣荣^[23]研究槲皮素与牛血清白蛋白(BSA)的结合特性,分子对接得出两者作用力为疏水作用,同时存在氢键与静电作用,与光谱试验的结果对应一致;而张丽娇^[24]通过光谱技术和分子对接技术对 6 组不同类型的小分子与 FTO 蛋白的相互作用进行研究,得出 FTO 蛋白与各类型小分子的相互作用机理。以上试验均验证了分子对接模拟结果的有效性与可靠性。

2 紫外-可见吸收光谱

紫外-可见吸收光谱法是研究 200~800 nm 波长光区内物质分子由于电磁辐射作用导致价电子跃迁而产生的吸收光谱,其光谱图可以反映出分子内共轭体系的结构信息^[25]。其机理是蛋白质中含有多种生色基团具有各种微环境,微环境的性质由蛋白质分子的整个构象所决定,当多酚与蛋白发生相互作用时,必定会对分子的微观结构产生影响,则微环境随之改变,生色基团的紫外吸收谱图可显示相应的变化^[26]。因此,可根据谱图变化的信息对分子间相互作用的机理、作用部位、作用程度等进行判断和分

析。紫外-可见吸收光谱法是目前研究多酚与蛋白质相互作用较基础的方法且简单、快捷,检出限低。

紫外-可见吸收光谱法用于研究小分子与蛋白相互作用,判断复合型形成以及蛋白质构象变化的一种简单有效的方法。杨荣荣^[23]发现槲皮素与 BSA 分子发生相互作用形成基态配合物引起 BSA 吸收峰发生蓝移,最大波长 $\lambda_{\max}$ 和吸收强度均发生改变,说明槲皮素可以与 BSA 发生作用,对食品加工中提高脂溶性多酚利用率提供指导。Mohd 等^[27]研究表明添加鞣酸(TA)后,人血清白蛋白(HSA)的最大吸收峰和吸收强度受到轻微影响,主要是靠近色氨酸残基的蛋白质构象发生了变化。紫外-可见吸收光谱还可辅助判断多酚与蛋白质的荧光淬灭机理,计算出两者结合常数。薛斐^[28]发现随着黄酮类化合物的加入,与肥胖蛋白 FTO 发生作用,FTO 的构象发生了改变,生成新的复合物,且初步判断出三种黄酮类化合物对 FTO 的淬灭机制为静态淬灭。Imed Hasni 等^[29]通过紫外-可见吸收光谱计算酪蛋白与不同茶多酚的结合常数来分析复合物的稳定性,与荧光法计算结果相比没有明显的差异。申炳俊等^[30]研究柚皮素与 HSA 的结合模型,其结果同样表明紫外与荧光光谱法结果相符,无明显差异。由此可知,利用紫外-可见吸收光谱法可以有效研究蛋白质构象变化,与其他方法相结合可以得出多酚与蛋白质的作用机理。

3 荧光光谱

某些物质被一定波长的光照射(或者吸收电磁辐射)后会受到激发,被激发的分子或原子从第一激发单重态的最低振动能级回到基态各振动能级时所产生的光辐射称为荧光。荧光分析法灵敏度高,选择性好,尤其在有机物检测分析方面,其灵敏度通常比其他微量分析法高两三个数量级。此外,该方法操作简便、重复性好、线性范围宽,但该方法对环境极为敏感,酸度、污染物及温度等干扰会限制此方法的使用。荧光光谱分析法可以通过记录荧光的强度、波长、偏振和寿命等荧光特性参数来做定性检测和定量测定,还可以作为一种表征技术研究体系的物理、化学性质及其变化情况^[31]。

通过对多酚与蛋白的荧光分析可以判断荧光淬灭类型,确定结合位置和作用力,测定结合常数和结合位点数,定性描述蛋白质的构象变化等。乔华等^[32]采用荧光光谱法研究高良姜素与 BSA 的结合作用,发现高良姜素对 BSA 有较强的荧光淬灭作用,且为静态淬灭,两者通过范德华力和氢键产生了较强的结合作用,结合常数在 10^6 数量级,结合位点数约为 1,结合位点为 BSA 疏水空腔的 Site I。Hu 等^[33]利用荧光光谱研究生理条件下绿原酸(CGA)与 HSA 的特异性结合,得到了 CGA 对 HSA 的荧光淬灭机理与结合常数,并结合热力学参数研究判断该结合反应是自发的,静电相互作用在反应中起主要作用。Marija 等^[34]应用 Stern-Volmer 方程分析可知 pH 的变化会引起 β -LG 构象转变位点附近的结合参数发生改变,并且蛋白质发射光谱中 340 nm 峰强度降

低,这是 Trp19 的二聚诱导的自猝灭的结果。周瑞等^[35]利用荧光光谱分析不同溶液对 BSA 与花青素相互作用的影响,结果显示溶液的改变没有影响两者的相互作用方式,依然为氢键和范德华力,但随着溶液离子强度的变化,两者之间的结合常数和结合距离会发生变化。刘建奎等^[36]通过荧光光谱分析得到 BSA 与槲皮素(QUE)及花青素(ACN)相互作用方式及纳米颗粒特征,进而可以得出其颗粒的稳定性等参数。利用荧光光谱法可以判断出多酚与蛋白质结合发生的荧光猝灭类型,结合热力学参数等方法可以判断该结合反应是否自发进行,并确定多酚与蛋白质相互作用的结合常数和作用力。

4 圆二色谱

蛋白质的圆二色谱分为两段^[37]:一段是 185~245 nm,称为远紫外区;另一段是 245~320 nm,称为近紫外区。远紫外区是肽键的吸收峰范围,反映蛋白质主链的构象,包括蛋白质二级结构的类型(α -螺旋、 β -折叠、 β -转角、无规卷曲)及相对含量^[38]。在近紫外区,蛋白质的圆二色性主要由侧链基团所贡献,此区域的谱峰可以敏感地反映出蛋白质构象的细微变化。这种方法简单、快速、准确,而且干扰较少,但价格昂贵。

多酚与蛋白的结合具有选择性,通过圆二色谱法可以研究不同多酚对不同蛋白的亲合力的差异性。Akiko 等^[39]使用圆二色谱研究 EGCG 与 HAS 和 BSA 的结合,发现 EGCG 对 HSA 上的位点 I 和 II 具有亲和力,而在 BSA 上观察到三个位点的竞争性结合。配体结合蛋白导致二级结构变化也可用圆二色谱表征。Liu 等^[40]发现玉米醇溶蛋白与槲皮素偶联后, α -螺旋和 β -折叠减少, β -转角和无序卷曲增加,然而玉米醇溶蛋白与 EGCG 或绿原酸结合后没有观察到二级结构的变化,这表明化学反应引起的构象变化受多酚类型的影响。薛燕斌等^[41]研究高良姜素与人血清白蛋白之间的相互作用发现不同浓度的高良姜素与 HSA 结合时会改变 HSA 的二级结构,但改变幅度不大。Kanakakis 等^[42]利用圆二色谱研究发现茶多酚的结合导致 β -乳球蛋白的 α -螺旋和 β -折叠含量上升,说明茶多酚结合起到稳定 β -乳球蛋白结构的作用。Hao 等^[43]研究表明顺式和反式白藜芦醇分别对 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白和 BSA 的二级结构没有显著影响。张冬^[44]利用圆二色谱法研究矢车菊素-3-O-葡萄糖苷与 BSA 的相互作用,得出随着矢车菊素-3-O-葡萄糖苷的增多,BSA 中 α -螺旋结构含量减少,这与红外光谱反应的结果一致。由此可知,圆二色谱法可以有效的用于分析多酚与蛋白质相互作用导致的蛋白质结构的变化。

5 傅里叶变换红外光谱

傅里叶红外光谱法(FTIR)创建于 20 世纪 70 年代,属于第三代红外光谱仪,其原理是基于光相干性进行设计,光谱是由于分子振动能级跃迁而产生的。该技术具有分辨率高、灵敏度高、波数精度高、扫描速度极快(一般在 1 s 内可完成全谱扫描)、光谱范围宽等优点,特别适用于弱红外光谱测定、红外光谱的

快速测定等,但制样程序复杂。利用红外光谱图吸收峰位置与形状可以进行定性分析,进而推测出未知物的结构;而根据吸收峰的强度可以进行定量分析^[45]。此外,还可以利用红外光谱在催化、高聚物、络合物等领域进行结构、聚合过程、反应机理、动力学等方面的研究。

多酚与蛋白质的结合会改变蛋白的二级结构,从而影响蛋白的功能性质,利用 FTIR 光谱可以定性的分析蛋白质结构变化。Jia 等^[46]通过酰胺 I 带峰值拟合观察到绿原酸、阿魏酸和表没食子儿茶素没食子酸酯分别与 β -乳球蛋白结合后,诱导 α -螺旋向 β -结构转变,改变了 β -乳球蛋白的二级结构。Yang 等^[47]通过 FTIR 将纯乳铁蛋白(LF)和 EGCG 的红外光谱与复合物 LF-EGCG 的红外光谱进行比较,由于酚羟基伸缩,在 3476、3365 cm^{-1} 和 3273 cm^{-1} 附近发现了三个典型的 EGCG 峰,然而在配合物中没有找到这些高峰,而且在 500~1000 cm^{-1} 区域的特征带也有一些变化;定量分析可以发现,随着 EGCG 浓度的增加,LF 的二级结构组成发生显著变化。Tang 等^[48]利用蛋白质红外酰胺带 I 对结构变化的敏感性检测绿原酸(CA)及其两种位置异构体新绿原酸(NCA)和隐原酸(CCA)对 HSA 二级结构的影响,发现分子结构的差异对蛋白质构象产生的变化不同,NCA 与 CA 分子的化学结构高度相似,可以诱导生物大分子发生类似的结构变化,具有 4-酯基结构的 CCA 分子表现出具有更大改变 HSA 构象的能力。薛瑾^[49]利用 FTIR 分析茶多酚-蛋白纳米复合物的二级结构,以探究 EGCG 结构中的多羟基与蛋白的作用位点及作用类型。在多酚与蛋白质相互作用的研究中,傅里叶红外光谱法被广泛应用于蛋白质二级结构变化的分析。

6 等温滴定量热法

等温滴定量热法(ITC)是近年来发展起来的一种研究生物分子间生物热力学与生物动力学的重要方法,也是唯一一种能在一次实验中同时确定所有结合参数的技术,在相关模型生物系统的建立和验证中起到重要作用。不仅可以测定结合亲和力(K_A 或 K_D)、化学结合计量比(n)、焓变(ΔH)及熵变(ΔS)等信息^[50],还能透过热力学数据阐明潜在的分子间作用机制,便于更加深入的了解结构-功能的关系。且该技术是以热效应为基础,与溶液的性质无关,对被研究体系的溶剂性质、光谱性质和电学性质等没有任何限制条件,因此可以广泛应于与非水溶液、胶体溶液与浆状体系等溶液体系中,可以提供完全无标记且液相的分析环境,同时无需配体或靶点的固定,具有非特异性的独特优势,而且还具备了样品用量小、仪器使用方便、检测耗时短、方法灵敏度和精确度高等特点,但是对于粒径较大的蛋白质,难以确定结合位点。

多酚与蛋白质的非共价作用主要源于弱结合,Zerrin 等^[51]使用荧光探针结合方法和 ITC 分析来表征绿茶类黄酮和乳蛋白结合的相互作用,ITC 数据显示发生非共价作用,反应是吸热过程,其疏水作用为

主要作用力。Richard 等^[52]通过 ITC 进行单宁与 BSA 和明胶结合的比较,数据表明与 BSA 相比,缩合单宁与明胶的结合常数大 1 至 2 个数量级,氢键是缩合单宁与明胶结合的主要作用力,缩合单宁缺乏结构灵活性可能是其对 BSA 低亲和力的一个因素。Elaine 等^[53]利用 ITC 研究离子强度和温度对鞣酸(TA)和植酸(PA)与 BSA 结合的影响,结果表明高离子强度条件可以促进 TA 与 BSA 之间具有更高的亲和力,而对于植酸和 BSA 却相反,BSA 变性点以上的温度上升有利于其与 PA 的相互作用,并且不利于 TA 的作用,这可能是由于蛋白质暴露的结合位点不同。Zhan 等^[54]通过 ITC 表明在 pH7.0 时酪蛋白酸钠(SC)和 TA 之间的相互作用是自发放热过程,并且主要是氢键促进自组装过程。Rudradip 等^[55]利用 ITC 研究表明鞣花酸(EA)与 HAS 两者相互作用是焓驱动和自发结合的模式,且主要是疏水作用和氢键对稳定 HSA-EA 复合体起着重要作用。由此可知,等温滴定量热法可以得出多种结合参数,近几年被广泛用于多酚与蛋白质相互作用的研究。

7 拉曼光谱

拉曼光谱是基于频率为 ν_0 光与分子间发生非弹性碰撞的一种散射光谱,会伴随分子内部的运动(如转动、振动等)而改变,其本质仍属于分子光谱。蛋白质在 $500\sim 1750\text{ cm}^{-1}$ 区域的拉曼峰归属于主体结构(酰胺键链接的链)和氨基酸侧链,以及环状结构的特定氨基酸,如酪氨酸、苯丙氨酸和色氨酸。低于 700 cm^{-1} 的拉曼光谱谱带是由含硫基团 C-S 和 S-S 拉伸模式引起^[56]。拉曼光谱提供快速、简单、可重复且无损伤的定性定量分析,可用于估计蛋白质的二级结构,通过曲线拟合技术得到成分谱带峰对应于特定结构的基序,但拉曼散射强度和不同振动峰重叠容易受光学系统参数等因素的影响,而且任何一种物质的引入对被测体系会带来某种程度的污染,进而对分析的结果产生一定的影响。

Susmita 等^[57]采用拉曼光谱研究了 EGCG 对 HSA 纤维化的影响,当与 EGCG 结合后,螺旋部分随着无序结构的增加而减少, 1340 cm^{-1} 处 Trp 带的强度增加,表明 HSA-EGCG 复合物形成后 Trp 环境的疏水性增加,且纤颤的模式发生改变。Zuzana 等^[58]采用拉曼光谱法对木犀草素(LUT)与 HSA 的结合进行了研究,发现结合后蛋白 α -螺旋减少和 β -转角结构增加,蛋白质二级结构中许多二硫桥中至少有两个二硫键的构型发生改变,通过对复合物 $1630\sim 1540\text{ cm}^{-1}$ 拉曼光谱范围进行曲线拟合分析,发现色氨酸在强度和位置上略有改变,与荧光结果一致。谢凤英等^[59]利用拉曼光谱分析荞麦多酚对米糠蛋白结构的影响,发现荞麦多酚与米糠蛋白的交互作用可部分破坏米糠蛋白分子间的二硫键,降低米糠蛋白分子间的作用,增强米糠蛋白的稳定性。然而 Liu 等^[60]发现在负载白藜芦醇和姜黄素的纳米颗粒的拉曼光谱中未观察到多酚官能团特征峰,可能是由于最终传递系统中多酚的浓度相对较低或者它们与周围基质发生相互作用。由此可知,拉曼光谱

在多酚与蛋白质相互作用的研究中主要用以研究蛋白质的二级结构,但易于受到干扰,影响结果的可靠性。

8 核磁共振波谱

核磁共振波谱法(NMR)是处于强磁场中的原子核自旋对无线电波辐射产生吸收,致使核自旋能级发生跃迁的一种吸收光谱。高分辨率 NMR 技术在蛋白质、核酸等生物大分子的结构和生物大分子与小分子相互作用研究中的应用已成为化学、生物、医药和食品等领域的研究热点。通过核磁共振波谱法可以精确地识别结合位点,用于结构或性质的关系分析,得到接近生理条件下的多酚-蛋白质复合物构象及动力学(如化学位移、弛豫时间、偶合常数及谱峰强度等参数)等信息,但受溶剂性质的影响且分析复杂,在对蛋白质二级结构研究中具有一定的局限性。

Joshua 等^[61]用 NMR 和 ITC 法测定在生理条件下 EGCG 对 HSA 的亲性和。NMR 显示两个结合事件:强结合($n_1 = 1.8 \pm 0.2$; $K_{d1} = (19 \pm 12)\text{ }\mu\text{mol/L}$)和弱结合($n_2 \sim 20$; $K_{d2} = (40 \pm 20)\text{ mmol/L}$),这与 ITC 数据是一致的。Liu 等^[62]人使用核磁共振波谱显示 GA 与 α -突触核蛋白发生瞬时相互作用,蛋白保持大部分展开状态,主要是 N-和 C-末端区域中 Leu 8, Ser 9, Ser 129 和 Lys 130 四个残基附近发生局部微妙的构象变化引起暂时地相互作用。Huang 等^[63]通过 NMR 研究 EGCG 对人降钙素(hCT)原纤维化的影响,发现 EGCG 的芳香环与肽的芳香族侧链之间的相互作用在抑制 hCT 的原纤维形成中起重要作用,可以在纤维形成之前阻止 hCT 的初始缔合,有效抑制 hCT 的原纤维形成。Susana 等^[64]利用 NMR 研究唾液蛋白(SP)和单宁之间的相互作用,发现不同单宁与 SP 相互作用的能力与单宁结构及疏水性相关,同时蛋白结构中某些特定氨基酸如脯氨酸能够稳定疏水性堆叠也是影响与单宁相互作用的主要因素。核磁共振波谱法是研究多酚与蛋白质相互作用的新方法,可以有效得出多酚-蛋白质复合物构象及动力学信息。

9 展望

目前,对于多酚-蛋白相互作用的研究取得一定的成果,但是多酚与蛋白质之间相互作用的确切机制尚不透彻。首先,分子间相互作用受到诸多因素的影响,要注意体系发生作用的具体环境,需要综合考虑各种因素对每种方法测定结果的影响程度;其次,选择的方法不仅能分析结合后蛋白构象的变化,还要关注多酚性质的改变,从多方面研究相互作用机制,合理应用多酚生理功能;再者,每种仪器测定方法对多酚-蛋白相互作用研究都有各自的局限性,应多种测定方法综合利用,从多方面多角度、理论结合实际对同一反应体系进行研究。总之,多酚与蛋白之间的相互作用相当复杂,需从宏观数值和微观角度进行全面分析,使得结果更精确,以便更好的了解多酚与蛋白作用机制,也为多酚与蛋白质的食品加工提供指导。

参考文献

- [1] Rodrigo R, Miranda A, Vergara L. Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2011, 412(5): 410–424.
- [2] Helal A, Tagliazucchi D, Verzelloni E. Gastro-pancreatic release of phenolic compounds incorporated in a polyphenols-enriched cheese-curd[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2015, 60(2): 957–963.
- [3] 刘开华, 刑淑婕. 植物多酚抑菌作用的对比研究[J]. 信阳农业高等专科学校学报, 2011, 21(3): 105–108.
- [4] 李楠, 师俊玲, 王昆. 14种海棠果实多酚种类及体外抗氧化活性分析[J]. 食品科学, 2014, 35(5): 53–58.
- [5] Kanakis C D, Imed Hasni, Philippe Bourasse, et al. Milk β -lactoglobulin complexes with tea polyphenols[J]. *Food Chemistry*, 2011, 127(3): 1046–1055.
- [6] 阚茗铭, 叶发银, 赵国华. 多酚-蛋白质共价作用及其对食品体系的影响研究进展[J]. 食品科学, 2015, 36(1): 245–249.
- [7] Wang X Y, Zhang J, Lei F. Covalent complexation and functional evaluation of (–)-epigallocatechin gallate and α -lactalbumin[J]. *Food Chemistry*, 2014(150): 341–347.
- [8] Xu L, Diosady L L. Interactions between canola proteins and phenolic compounds in aqueous media[J]. *Food Research International*, 2000, 33(9): 725–731.
- [9] 范金波, 周素珍, 郑立红, 等. 果蔬中酚类成分及其与蛋白质相互作用的研究进展[J]. 食品工业科技, 2013, 34(19): 352–357.
- [10] 郭兴凤, 石晶, 薛园园, 等. 茶多酚对大豆蛋白乳化性和泡沫特性影响[J]. 粮食与油脂, 2010(4): 12–15.
- [11] 毕海丹, 崔旭海, 王占一, 等. 茶多酚和乳清蛋白对冷藏鱼糜保鲜效果的影响[J]. 食品科学, 2016, 37(10): 272–277.
- [12] 刘焯, 何志勇, 秦昉, 等. 多酚与蛋白质、消化酶相互作用的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(11): 256–260.
- [13] 程小桂, 居文政, 戴国梁, 等. 平衡透析法测定人体外血浆中原花青素 B₂、表儿茶素蛋白结合率[J]. 中国药理学通报, 2013, 29(10): 1465–1467.
- [14] 王月荣, 刘馥婷, 章弘扬, 等. 丹酚酸 B 与牛血清白蛋白相互作用的电化学研究[J]. 分析测试学报, 2012, 31(3): 267–272.
- [15] Walcher W, Franze T, Weller M G, et al. Liquid- and gas-phase nitration of bovine serum albumin studied by LC-MS and LC-MS/MS using monolithic columns[J]. *Journal of Proteome Research*, 2003, 2(5): 534–542.
- [16] 段爱霞, 陈晶, 刘宏德, 等. 分子对接法的应用与发展[J]. 分析科学与学报, 2009, 25(4): 473–477.
- [17] Takeshi Ishii, Taiki Mori, Tomoko Tanaka, et al. Covalent modification of proteins by green tea polyphenol (–)-epigallocatechin-3-gallate through autoxidation[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2008(45): 1384–1394.
- [18] John D, Trombley Thomas N, Loegel Neil D, et al. Capillary electrophoresis methods for the determination of covalent polyphenol-protein complexes[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2011, 401: 1523–1529.
- [19] Atanu Singha Roy, Debi Ranjan Tripathy, Arup Kumar Ghosh, et al. An alternate mode of binding of the polyphenol quercetin with serum albumins when complexed with Cu(II)[J]. *Journal of Luminescence*, 2012, 132: 2943–2951.
- [20] Ayah Al-Hanish, Dragana Stanic-Vucinic, Jelena Mihailovic, et al. Noncovalent interactions of bovine α -lactalbumin with green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate[J]. *Food Hydrocolloids*, 2016, 61: 241–250.
- [21] Motokazu Nakayama, Kanami Shimatani, Tadahiro Ozawa, et al. A study of the antibacterial mechanism of catechins: Isolation and identification of *Escherichia coli* cell surface proteins that interact with epigallocatechin gallate[J]. *Food Control*, 2013, 33: 433–439.
- [22] 金建昌, 王石磊, 刘彩琴, 等. 荧光光谱法和分子对接研究表没食子儿茶素没食子酸酯与牛乳 β -乳球蛋白的相互作用[J]. 江西科学, 2017, 35(3): 343–346.
- [23] 杨荣荣. 应用光谱法及分子对接研究黄酮类化合物与牛血清白蛋白的结合特性[D]. 大连: 大连工业大学, 2014.
- [24] 张丽娇. 光谱法和分子对接技术研究 FTO 蛋白与小分子的相互作用[D]. 郑州: 郑州大学, 2017.
- [25] 魏福祥, 韩菊, 刘宝友. 仪器分析原理及技术[M]. 北京: 中国石化出版社, 2011.
- [26] Shuang Li, Kelong Huang, Ming Zhong, et al. Comparative studies on the interaction of caffeic acid, chlorogenic acid and ferulic acid with bovine serum albumin[J]. *Spectrochimica Acta Part A*, 2010, 77: 680–686.
- [27] Mohd Ishtikhar, Ejaz Ahmad, Zeba Siddiqui, et al. Biophysical insight into the interaction mechanism of plant derived polyphenolic compound tannic acid with homologous mammalian serum albumins[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 107: 2450–2464.
- [28] 薛斐. 香草醛与蛋白质的相互作用研究[D]. 上海: 上海师范大学, 2016.
- [29] Imed Hasni, Philippe Bourassa, Saber Hamdani, et al. Interaction of milk α - and β -caseins with tea polyphenols[J]. *Food Chemistry*, 2011, 126: 630–639.
- [30] 申炳俊, 金丽虹, 田坚. 荧光与紫外光谱法研究柚皮素与入血清白蛋白的结合模型[J]. 分析试验室, 2016, 35(1): 41–46.
- [31] Castelain C, Genot C. Partition of adsorbed and nonadsorbed bovine serum albumin in dodecane-in-water emulsions calculated from front-face intrinsic fluorescence measurements[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1996, 44(7): 1635–1640.
- [32] 乔华, 薛燕斌, 葛林, 等. 高良姜素与牛血清白蛋白作用的光谱研究[J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29: 903–908.
- [33] Hu YJ, Chen CH, Zhou S, et al. The specific binding of chlorogenic acid to human serum albumin[J]. *Molecular Biology Report*, 2012, 39: 2781–2787.
- [34] Marija Stojadinovic, Jelena Radosavljevic, Jana Ognjenovic, et al. Binding affinity between dietary polyphenols and β -lactoglobulin negatively correlates with the protein susceptibility to digestion and total antioxidant activity of complexes formed[J]. *Food Chemistry*, 2013, 136: 1263–1271.

- [35] 周瑞,董学艳,景浩.不同溶液中牛血清白蛋白与花青素相互作用特征及抗氧化性[J].食品科学,2013,34(15):11-16.
- [36] 刘建垒,邢效娟,周瑞,等.牛血清白蛋白与槲皮素及花青素相互作用方式及其纳米颗粒特征的比较[J].食品科学,2017,38(5):7-13.
- [37] 徐香玉,孙祥军,刘敏,等.氧化苦参碱与牛血清白蛋白相互作用的热力学研究[J].化学学报,2009,67(18):2155-2158.
- [38] Adity Bose. Interaction of tea polyphenols with serum albumins: A fluorescence spectroscopic analysis [J]. Journal of Luminescence, 2016, 169: 220-226.
- [39] Akiko NOZAKI, Mami HORI, Toshikuro KIMURA, et al. Interaction of polyphenols with proteins: Binding of (β) - epigallocatechin gallate to serum albumin, estimated by induced circular dichroism [J]. Chemical Pharmaceutical Bulletin, 2009, 57(2): 224-228.
- [40] Fuguo Liu, Cuicui Ma, David Julian McClements, et al. A comparative study of covalent and non-covalent interactions between zein and polyphenols in ethanol-water solution [J]. Food Hydrocolloids, 2017, 63: 625-634.
- [41] 薛燕斌,乔华,李波,等.光谱法研究高良姜素与人血清白蛋白的相互作用[J].食品工业科技,2017,38(18):65-68.
- [42] Kanakis C, Hasni I, Bourassa P, et al. Milk β -lactoglobulin complexes with tea polyphenols [J]. Food chemistry, 2011, 127(3): 1046-1055.
- [43] Hao Cheng, Zheng Fang, Wusigale, et al. Complexation of trans- and cis-resveratrol with bovine serum albumin, β -lactoglobulin or α -lactalbumin [J]. Food Hydrocolloids, 2018, 81: 242-252.
- [44] 张冬.花色苷与蛋白质作用对抗氧化性的影响[D].济南:山东师范大学,2013.
- [45] Bin Tang, Yanmei Huang, Xiangling Ma, et al. Multispectroscopic and docking studies on the binding of chlorogenic acid isomers to human serum albumin: Effects of esteryl position on affinity [J]. Food Chemistry, 2016, 212: 434-442.
- [46] Jingjing Jia, Xin Gao, Minghao Hao, 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.
- [47] Wei Yang, Fuguo Liu, Chenqi Xu, et al. Molecular interaction between (-)-epigallocatechin-3-gallate and bovine lactoferrin using multi-spectroscopic method and isothermal titration calorimetry [J]. Food Research International, 2014, 64: 141-149.
- [48] Bin Tang, Yanmei Huang, Xiangling Ma, et al. Multispectroscopic and docking studies on the binding of chlorogenic acid isomers to human serum albumin: Effects of esteryl position on affinity [J]. Food Chemistry, 2016, 212: 434-442.
- [49] 薛瑾.茶多酚-蛋白纳米复合物的研究[D].无锡:江南大学,2014.
- [50] Rudradip Pattanayak, Pijush Basak, Srikanta Sen, et al. An insight to the binding of ellagic acid with human serum albumin using spectroscopic and isothermal calorimetry studies [J]. Biochemistry and Biophysics Reports, 2017, 10: 88-93.
- [51] Zerrin Yuksel, Elif Avcı, Yasar Kemal Erdem. Characterization of binding interactions between green tea flavanoids and milk proteins [J]. Food Chemistry, 2010, 121: 450-456.
- [52] Richard A. Frazier, Eddie R. Deaville, Rebecca J. Green, et al. Interactions of tea tannins and condensed tannins with proteins [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2010, 51: 490-495.
- [53] Elaine Kaspchak, Luciana Igarashi Mafra, Marcos Rogério Mafra. Effect of heating and ionic strength on the interaction of bovine serum albumin and the antinutrients tannic and phytic acids, and its influence on *in vitro* protein digestibility [J]. Food Chemistry, 2018, 252(3): 1-8.
- [54] Fuchao Zhan, Jinchu Yang, Jing Lia, et al. Characteristics of the interaction mechanism between tannic acid and sodium caseinate using multispectroscopic and thermodynamics methods [J]. Food Hydrocolloids, 2018, 75: 81-87.
- [55] Rudradip Pattanayak, Pijush Basak, Srikanta Sen, et al. An insight to the binding of ellagic acid with human serum albumin using spectroscopic and isothermal calorimetry studies [J]. Biochemistry and Biophysics Reports, 2017(10): 88-93.
- [56] 刘畅,孟庆翔,周振明.拉曼光谱技术在肉品质评价中的应用[J].中国畜牧杂志,2017,53(2):10-14.
- [57] Susmita Bhattacharya, Anushree Roy, Swagata Dasgupta, et al. Effect of (-)-epigallocatechin gallate on the fibrillation of human serum albumin [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2014, 70: 312-319.
- [58] Zuzana Jurasekova, Giancarlo Marconi, Santiago Sanchez-Cortes, et al. Spectroscopic and molecular modeling studies on the binding flavonoid luteolin and human serum albumin [J]. Biopolymers, 2009, 91(11): 917-927.
- [59] 谢凤英,马岩,王晓君,等.拉曼光谱分析荞麦多酚对米糠蛋白结构的影响[J].食品科学,2017,38(3):32-36.
- [60] Fuguo Liu, Xiang Luo, Zhiyun Zhang, et al. Fabrication and characterization of protein-phenolic conjugate nanoparticles for co-delivery of curcumin and resveratrol [J]. Food Hydrocolloids, 2018, 79: 450-461.
- [61] Joshua D. Eaton, Mike P. Williamson. Multi-site binding of epigallocatechin gallate to human serum albumin measured by NMR and isothermal titration calorimetry [J]. Bioscience Reports, 2017, 37: 1-11.
- [62] Yanqin Liu, John A. Carver, Antonio N. Calabrese, et al. Gallic acid interacts with α -synuclein to prevent the structural collapse necessary for its aggregation [J]. Biochimica Et Biophysica Acta, 2014, 1844: 1481-1485.
- [63] Rui Huang, Subramanian Vivekanandan, Jeffrey R. Brender, et al. NMR Characterization of monomeric and oligomeric conformations of human calcitonin and its interaction with EGCG [J]. Journal of Molecular Biology, 2012, 416(1): 108-120.
- [64] Mafalda Santos Silva, Nuno Mateus, Susana Soares, et al. Molecular interaction between salivary proteins and food tannins [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65: 6415-6424.