

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. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020070099

WANG Kewen, LIAO Xiaojun, XU Zhenzhen. Advances in Analytical Techniques of Polyphenol-Protein Interaction [J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(14): 371-379. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020070099

· 专题综述 ·

多酚-蛋白质相互作用分析技术研究进展

王珂雯^{1,2}, 廖小军¹, 徐贞贞^{2,*}

(1. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083;

2. 中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 农业农村部农产品
质量安全重点实验室, 北京 100081)

摘要: 食品组分间的相互作用是食品科学研究领域的核心问题之一。本文按照直接和间接方式分类总结了多酚-蛋白质相互作用的分析方法, 详细介绍了紫外-可见吸收光谱法、傅里叶变换红外光谱法、拉曼光谱、原子力显微镜、等温滴定量热法、分子对接、分子动态模拟等多种分析方法, 并列出了这些技术在研究多酚-蛋白质相互作用中的特点和实例, 以期食品科学领域中多酚-蛋白质相互作用的相关研究工作提供参考, 为食品其它组分间的相互作用提供借鉴。最后, 本文探讨了多酚-蛋白质相互作用的研究思路与发展方向, 探讨了开展此类相互作用研究的食物加工学意义。

关键词: 多酚, 蛋白质, 相互作用, 分析技术

中图分类号: TS550.10

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2021)14-0371-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2020070099

Advances in Analytical Techniques of Polyphenol-Protein Interaction

WANG Kewen^{1,2}, LIAO Xiaojun¹, XU Zhenzhen^{2,*}

(1. College of Food Science & Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;

2. Institute of Quality Standard & Testing Technology for Agro-Products, Key Laboratory of Agro-food Safety and Quality, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

)

Abstract: The interaction between food compounds is one of the core issues in the field of food science. In this work, various analytical techniques of polyphenol-protein interaction classified by direct and indirect way are reviewed, including UV-Vis absorption spectrometry, Fourier transform infrared spectroscopy, Raman spectroscopy, atomic force microscopy, isothermal titration calorimetry, molecular docking, molecular dynamic simulation and so on. Features and examples of these analytical techniques are summarized to provide technical support for the research of polyphenol-protein interaction, as well as the other food compounds interaction. Finally, this work puts forward the strategy and future work for the study of the polyphenol-protein interaction, and discusses the practical significance of such interaction studies in food processing.

Key words: polyphenols; protein; interaction; analytical techniques

食品的组成成分复杂, 既包括碳水化合物、脂肪、蛋白质、矿物质、维生素等营养素, 还包括多酚、多糖、萜类等活性成分^[1]。各组分之间在生产、加工和贮藏等过程中时刻发生着相互作用, 这些作用对食品的颜色、香气、味道、形态、营养等属性有较大影响, 因此, 食品组分间的相互作用是食品科学研究领

域的核心问题之一^[2]。目前, 国内外学术界对食品组分的相互作用尚未明确的定义, 研究人员往往针对不同的食品组分开展研究^[3]。本研究以“Food compound”、“Interaction”、“Polyphenol”、“Protein”、“Lipid”、“Carbohydrate”、“Polysaccharide”、“Oligose”、“食品组分”、“相互作用”、“食品成分”、“多酚”、“蛋白质”、

收稿日期: 2020-07-09

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32072234); 中央高校基本科研业务费专项资金资助(2021TC113)。

作者简介: 王珂雯(1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学, E-mail: wangkewen@cau.edu.cn。

* 通信作者: 徐贞贞(1985-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 食品质量与安全, E-mail: xuzhenzhen@caas.cn。

“脂质”、“碳水化合物”、“多糖”、“寡糖”为关键词,在 Google Scholar、Web of Science、中国知网、万方数据库检索近五年(2016~2020年)的文献,其中158篇文献研究了食品组分间的相互作用,具体为“多酚-蛋白质”、“多酚-多糖”、“风味物质-蛋白质”、“多糖-蛋白质”等的相互作用,其中研究多酚-蛋白质相互作用的文献数目占比达三分之一以上,是目前食品组分间相互作用的研究热点(图1)^[4]。

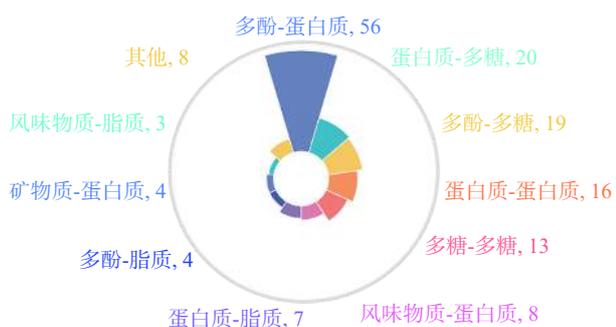


图1 近五年食品组分相互作用文献数目

Fig.1 Number of literatures on food compound interaction in the past five years

就分子相互作用而言,可按照分子量大小(分子量小于1000 Da的为小分子,大于1000 Da的为大分子^[5]),将研究对象体系分为小分子和小分子、小分

子和大分子、大分子和大分子三类;也可按照相互作用力的类型,分为非共价作用力(氢键、疏水相互作用、范德华力、静电相互作用等)和共价作用力(σ 键、 π 键、肽键、二硫键等)^[6]。多酚-蛋白质的相互作用属于小分子和大分子的相互作用,且同时存在非共价作用力和共价作用力,其中,非共价作用力是由氢键、疏水相互作用、静电相互作用、范德华力等形成,对应的是可逆过程^[7-9];共价作用力主要是肽键和二硫键,对应的是不可逆过程^[10-11]。对于多酚-蛋白质相互作用的研究,可以采用直接和间接两种方式进行(图2):直接方式包括使用荧光发射光谱法、傅里叶变换红外光谱法、圆二色光谱法、核磁共振光谱法等分析多酚-蛋白质形成的复合物,或直接测定蛋白质^[12]和多酚的含量变化^[13];间接方式包括使用等温量热滴定法、差示扫描量热法计算多酚-蛋白质结合过程中的热力学参数,或使用小角度散射、浊度法、动态光散射法等研究多酚使蛋白质性质发生改变的过程,或使用分子对接、分子动态模拟的方法,预测多酚-蛋白质结合模式,从而间接证明相互作用的存在^[14-15]。单独使用某一种分析方法只能为研究多酚-蛋白质的相互作用提供补充证据,针对相互作用机制的研究常集合多种方法系统解析多酚-蛋白质的相互作用^[15-16]。

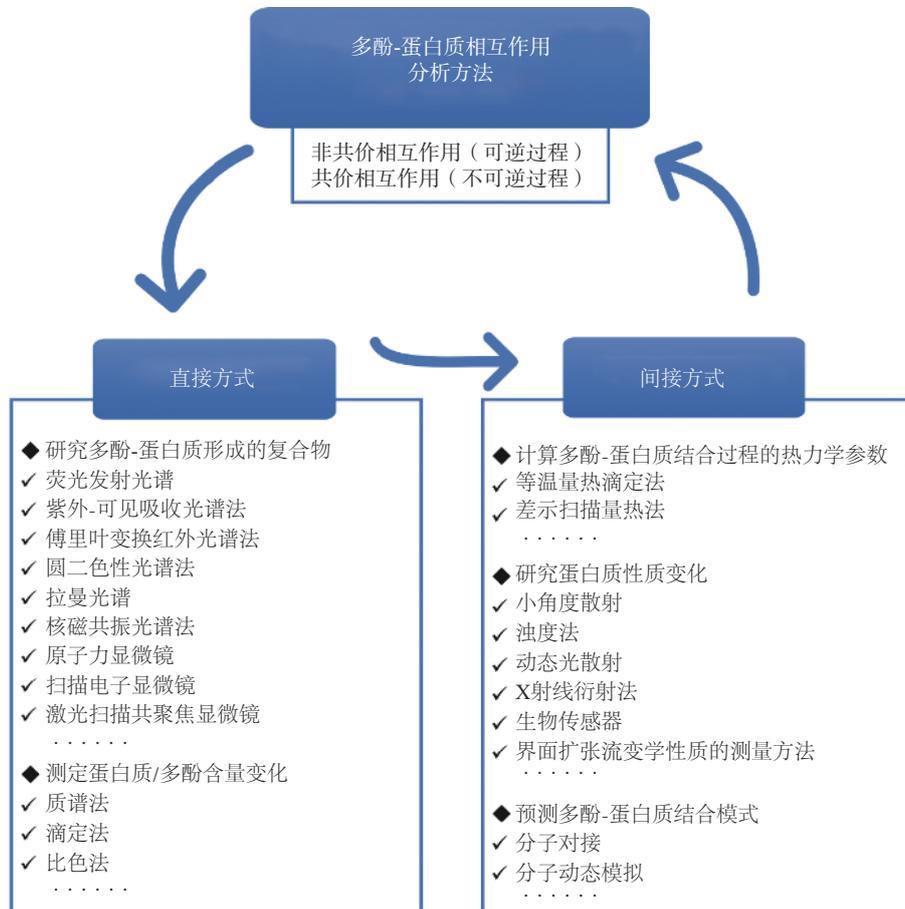


图2 多酚-蛋白质相互作用分析方法

Fig.2 Analysis methods of polyphenol-protein interaction

本文按照直接和间接方式归纳了目前应用于多酚-蛋白质相互作用的研究方法,并列举了这些技术在研究多酚-蛋白质相互作用中的特点和实例,以期在食品科学领域中多酚-蛋白质相互作用的相关研究工作提供技术支撑,为研究其它食品组分间的相互作用提供参考。

1 多酚-蛋白质相互作用的直接分析方式

1.1 荧光光谱法

荧光光谱法广泛用于研究多酚-蛋白质的相互作用。蛋白质含有色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸残基,具有固有的发射荧光^[17],当多酚与蛋白质结合后,会造成蛋白质固有荧光的淬灭,通过 Stern-Volmer 公式计算出淬灭类型,结合位点数,进一步通过 Van't Hoff 公式计算出焓变和熵变,判断作用力类型。Dai 等^[18]借助该方法研究了 B 型-原花青素二聚体和水稻谷蛋白的相互作用,发现当 B 型-原花青素二聚体水平增加时,水稻谷蛋白的荧光强度明显降低,并且最大峰对应的波长只有轻微的变化(约 2 nm),这些结果表明, B 型-原花青素二聚体淬灭了水稻谷蛋白的固有荧光,表明两者发生相互作用。在小分子-蛋白质相互作用的研究领域,同步荧光光谱经常用来研究环境对荧光基团微观结构和蛋白质构象的影响^[18]。当 $\Delta\lambda=15$ nm 时,同步荧光光谱显示酪氨酸残基的特征荧光;当 $\Delta\lambda=60$ nm 时,同步荧光光谱显示色氨酸残基特征荧光,而蛋白质的氨基酸残基的最大发射波长与其所处的微环境有关,因此,通过同步荧光光谱可以考察蛋白质所处微环境的情况^[19]。

1.2 紫外-可见吸收光谱法

紫外-可见吸收光谱法技术简便,用于探索蛋白质的结构变化和复合物的形成。蛋白质吸收光谱主要有两个吸收峰:200 nm 处反映蛋白质骨架构象,280 nm 处反映芳香族氨基酸,通过关注这两个波长对应的峰形的变化帮助了解蛋白质结构的变化,多酚也会对紫外-可见光发生吸收作用,获得吸收光谱,从而获得复合物的信息^[17]。

原花青素 B3 和溶菌酶相互作用的研究使用了紫外-可见吸收光谱法,其中原花青素 B3 在 200 nm 有较强的光吸收。与溶菌酶相互作用后,在 200 nm 处的光吸收强度显著降低,最大吸收波长红移。结果表明,由于原花青素 B3 与溶菌酶的强结合,肽主链的构象展开,微环境的疏水性发生变化^[20]。进一步的研究表明,280 nm 处的吸光度略有下降,证实了原花青素 B3 与溶菌酶的相互作用形成了络合物^[20]。两个实验表明,利用吸光度的变化探究多酚-蛋白质的相互作用具有较高的可重复性和准确性。Liu 等^[21]发现在玉米醇溶蛋白-表没食子儿茶素没食子酸酯(Epigallocatechin gallate, EGCG)体系中,多酚和蛋白质化学结合后产物的吸光度比它们的混合物的吸光度显著升高,这一现象被认为是共价复合物的形成

改变了玉米醇溶蛋白的结构,使得更多酪氨酸和色氨酸残基暴露在周围的溶剂中。

1.3 傅里叶变换红外光谱法

傅里叶变换红外光谱法用于研究多酚-蛋白质相互作用引起的蛋白质二级结构和氢键等的变化,可以为多酚-蛋白质相互作用提供动态的结构变化信息。蛋白质酰胺带的红外光谱可提供其二级结构信息,特征吸收带主要有酰胺 I 带、酰胺 II 带和酰胺 III 带,因酰胺 I 带信号强而被广泛使用^[22]。酰胺 I 带主要集中在 $1600\sim 1700\text{ cm}^{-1}$,展示了蛋白质的 α -螺旋($1650\sim 1658\text{ cm}^{-1}$)、 β -折叠($1610\sim 1640\text{ cm}^{-1}$)、 β -转角($1660\sim 1695\text{ cm}^{-1}$)和无规卷曲($1640\sim 1650\text{ cm}^{-1}$)等结构信息^[23]。用红外光谱法对茶多酚与 β -乳球蛋白络合物的形成进行了表征,Kanakis 等^[24]并未在酰胺 I 带和酰胺 II 带发现明显的峰红移或蓝移,但存在峰高度的变化。Jia 等^[25]通过酰胺 I 带峰值拟合观察绿原酸、阿魏酸和 EGCG 分别与 β -乳球蛋白的结合情况,发现这三种多酚诱导蛋白质 α -螺旋向 β -折叠结构转变,改变了 β -乳球蛋白的二级结构。

1.4 圆二色光谱法

圆二色性是由左右圆偏振光的吸附差异引起的,可以显示蛋白质构象的变化。远紫外圆二色光谱($\leq 250\text{ nm}$)反映蛋白质二级结构的定量信息,包括 α -螺旋、 β -折叠和 β -转角的含量等。蛋白质的近紫外圆二色光谱($>250\text{ nm}$)提供其三级结构信息,主要取决于苯丙氨酸、酪氨酸、半胱氨酸(或 S-S 二硫键)和色氨酸氨基酸残基对偏振光的吸收、偶极取向和周围环境的性质^[26]。圆二色光谱法经常与其他方法结合来研究相互作用,获得结合常数、结合的化学计量数和其他热力学参数,以及洞察这种相互作用引起的复合物结构变化^[16]。Paul 等^[27]使用圆二色光谱观察 β -乳球蛋白与 EGCG 结合前后蛋白质二级结构的变化。远紫外圆二色光谱表明,EGCG 与 β -乳球蛋白结合后,使得 β -乳球蛋白二级结构中的 α -螺旋向 β -折叠转变。多酚与蛋白质结合后会导致蛋白质的可消化性的改变。 β -折叠的增加不利于胃蛋白酶的消化^[28]。这可能是茶、咖啡和可可中的多酚提取物延缓 β -乳球蛋白消化的原因^[29]。

圆二色光谱法和傅里叶变换红外光谱法都广泛用于研究蛋白质的二级结构,并且方法互补,可以实现对蛋白质二级结构的准确描述^[30]。二者的区别在于,圆二色光谱适合预测液体样品的 α -螺旋结构,而傅里叶变换红外光谱法适合分析固体和 β -折叠^[31]。

1.5 拉曼光谱

拉曼光谱作为一种散射光谱,能够提供快速、简单、可重复、且无损伤的定性定量分析,用于获得分子的振动和转动信息,为物质鉴定及结构研究提供补充信息^[32]。谢凤英等^[33]使用拉曼光谱测定荞麦多酚对米糠蛋白的影响,发现了蛋白质 α -螺旋结构含量逐渐降低, β -折叠先增加后降低, β -转角先降低后增

加,而无规则卷曲结构的含量逐渐增大的现象,发现多酚-蛋白质的相互作用破坏了米糠蛋白分子间二硫键,降低了米糠蛋白分子间作用,增强了米糠蛋白结构的稳定性。然而,拉曼光谱在多酚-蛋白质作用研究主要聚焦在蛋白质的二级结构中,当体系只存在多酚时,并没有特征峰的出现。Liu等^[34]对负载白藜芦醇和姜黄素的纳米颗粒进行拉曼光谱分析,并未观察到多酚官能团特征峰。

1.6 核磁共振波谱法

核磁共振波谱法通过检测分子结构中标记的碳元素的化学位移,直接表明多酚与蛋白质是否发生结合作用和相关构象的改变^[35]。核磁共振光谱法可精确识别结合位点信息,解释相互作用机理,分析相互作用构效关系^[36]。Faurie等^[37]使用EGCG滴定,并保持滴定过程中唾液肽浓度恒定,获得了蛋白质质子化学转移的信息,从而得到关于结合位点和聚合体类型的信息。Silva等^[38]利用核磁共振光谱法研究单宁和唾液蛋白之间的相互作用,发现相互作用与单宁结构及疏水性有关;此外,蛋白质结构中某些特定氨基酸,如脯氨酸,起到稳定疏水性堆叠的作用,也会影响单宁与唾液蛋白的相互作用。

1.7 显微镜观察法

关于多酚-蛋白质相互作用的显微观察方法,主要有原子力显微镜、扫描电子显微镜以及激光共聚焦显微镜,这些显微镜观察法为直接观察多酚-蛋白质相互作用提供支持,对样品适应性较强,利于结构解析。

原子力显微镜是在扫描隧道显微镜的基础上研制而成的一种扫描探针显微镜,通过探针与被测样品之间的微相互作用(原子力)获得物质超微结构及表面信息,进而对样品表面结构进行观察,常用于研究分子间的相互作用,如表征多酚与蛋白质间的相互作用^[39]。该方法能提供三维表面图,具有样品制备简单、无需覆盖导电薄膜、成像分辨率高的特点,但是也存在一定的缺陷,如成像范围小、速度慢、受探头影响较大等^[40]。Liu等^[41]使用原子力显微镜观察90℃的热处理前后,绿原酸和EGCG分别与乳铁蛋白的结合情况,发现这两种多酚均可以抵抗加热造成的乳铁蛋白聚集,其中,绿原酸的作用更为明显,这一结果为扩大乳铁蛋白在食品中的应用提供可能。上述结果表明,原子力显微镜是一种有效的跟踪蛋白质聚集现象的方法。

扫描电子显微镜通过电子束射到样品表面产生次级电子,次级电子富集后转变成电信号,从而得到样品表面结构的立体扫描图像、微观形貌放大像、表面组成分布、晶体的晶向和晶格常数、发光性试样的结构缺陷等,该方法样品制备容易,耗时少,可做综合分析,放大倍数范围广,场深大,但是,扫描电子显微镜的分辨率有限,为6~10 nm,不利于较小分子的观察^[42]。Liu等^[21]使用扫描电子显微镜,对六羟黄酮、

绿原酸、EGCG三种多酚与玉米醇溶蛋白结合后的形态进行表征,发现三种多酚诱导玉米醇溶蛋白分子的自组装,并推测多酚改变了多酚和蛋白质之间的吸引和排斥作用的大小和范围,尤其是疏水和静电相互作用。

激光扫描共聚焦显微镜通过共焦光学消除不需要的焦点外散射光,增强样品的焦点内区域的对比度,可对固定的组织或活体样本进行亚细胞水平结构的观测,能够3D成像,但是,分辨率比扫描电子显微镜低,成本更高^[43]。Diaz等^[44]使用激光扫描共聚焦显微镜,观察发现蓝莓汁和草莓汁中的多酚与蛋白质作用形成的颗粒均较小,且形状规则,结合其他实验结果,认为蓝莓汁多酚与蛋白质结合的颗粒可以稳定食物功能性成分。Zou等^[45]制备了一种新型玉米醇溶蛋白/单宁酸复合胶体颗粒,依靠激光扫描共聚焦显微镜直观地观察到油滴被致密的蛋白质网络包围。

1.8 质谱技术

质谱是一种检测和鉴定未知分子的方法,这些未知分子的范围从小分子到纳米颗粒。质谱在研究小分子与蛋白质相互作用时,不是对单个分子进行检测,而是对小分子蛋白质复合物被电离后的产物进行检测,用于确定小分子蛋白质复合物的结合位点,是一种灵敏、快速、样品消耗低、易于自动化,可用于高通量的方法^[46]。Gallo等^[47]使用基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)分析巧克力多酚与 α -乳白蛋白的结合位点,确定结合位点为半胱氨酸的游离巯基,这是首次关于食品多酚与牛奶蛋白共价加和位点的实验研究。

质谱技术作为一种高通量的测量手段,在研究多酚-蛋白质相互作用方面具有巨大的潜力。全自动nano-ESI-MS方法主要用于在短时间内筛选数百种潜在候选药物^[48]。此外,亲和柱与质谱耦合方法有助于找到新的核受体配体^[49]。这类技术在研究多酚-蛋白质相互作用方面也表现出较大的潜力。

2 多酚-蛋白质相互作用的间接分析方式

2.1 等温滴定量热法

等温滴定量热法通过计算多酚与蛋白质反应中的反应热,得到过程中的热力学参数^[16]。该方法具有如下特点:等温滴定量热法的信息在均匀相中产生,没有标注,保证了方法的准确性;目标物质量不影响信号强度,这对于小分子十分有利;缺点在于分析时间长,自动化或高通量筛选能力有限,样品量大^[16]。王宁^[50]使用等温滴定量热法,计算得到了反应的热力学性质,相互作用的化学计量学、亲和力常数、焓变化、熵变化、吉布斯自由能和恒压摩尔热容;通过这些数据推测绿原酸与三种蛋白的结合是自发进行的,结合过程受到熵驱动;计算反应前后自由能变化的大小,确定人血清蛋白与绿原酸的结合能力最强,结合力大小顺序为人血清蛋白>胰蛋白酶>胃蛋白酶。此外,等温滴定量热法常与其他技术结合来研究

小分子与蛋白质的相互作用,如茶儿茶素作为过氧化氢酶的抑制剂的可能机制^[51]。

2.2 差示扫描量热法

差示扫描量热法通过测量样品的比热容,绘制比热容关于温度的函数,实现监测蛋白质构象转变,为评价蛋白质的热稳定性提供了一种客观、全面的方法^[52]。该方法具有灵敏度高,操作简单快速,适用性广,样品使用量少、无需前处理等优点,但也存在着成本高,当样品量少、材料不均匀时不能很好代表整体的问题^[53]。Sun 等^[54]从 3 种茶叶(绿茶、黑茶和乌龙茶)中提取多酚,并将其加入到胰腺淀粉酶中,发现 3 种茶多酚的加入使胰腺淀粉酶的焓变和变性温度降低,且随着茶多酚浓度提高,胰腺淀粉酶热稳定性下降;结合荧光光谱的结果,发现加入茶多酚后,胰腺淀粉酶最大发射波长的红移,说明在多酚与蛋白酶结合时,胰腺淀粉酶的结构伸展。Liu 等^[21]用差示扫描量热法分析了玉米蛋白,玉米蛋白-多酚偶合物及其混合物的热行为,发现蛋白与多酚结合后,热变性温度有所提高。这一结果具有普遍性,之前的结果表明奎宁与蛋白质的相互作用可以提高了蛋白质的热变性温度^[55]。

2.3 散射法

散射法是一类适用于研究多酚与蛋白质聚集作用的方法,主要包括小角度散射、浊度法以及动态光散射法。小角度散射是生物大分子、纳米复合材料、合金和合成聚合物结构分析的基本方法^[56]。小角度散射包括小角度 X 射线散射(Small-angle X-ray scattering, SAXS)和小角度中子散射(Small-angle neutron scattering, SNAS),结构信息的响应随着添加配体或结合物,以及溶剂的物理和/或化学特性而改变,可以提供分子间折叠和组装过程的动力学信息^[57]。涩味是红酒等饮品中最重要的感官品质之一,是单宁和唾液中富含脯氨酸的蛋白质发生相互作用产生的。在水溶液和胶体水平上,Canon 等^[58]使用小角度 X 射线散射对黄烷-3-醇和富含脯氨酸蛋白之间的相互作用进行研究,发现了聚集物具有核状结构。

浊度法(Nephelometry)通过测量一束光通过含有悬浮颗粒的溶液时,产生的散射光来研究多酚与蛋白质的聚集物^[59]。多酚含量与浊度值有直接关系,然而,浊度法的测量受到几个因素的影响。主要是聚集物的尺寸,该方法要求所有的颗粒应该是较小且几乎相同的尺寸。因此,为避免形成较大的团聚体,浊度法测定应在较短的反应时间内进行^[60]。

动态光散射法(Dynamic light scattering, DLS)可以帮助解决浊度法中遇到的问题,是一种实时、快速、无损的统计学颗粒粒径测量方法,并且相对于电镜法可以对样品进行原位观测^[61]。Mcrae 等^[62]使用动态光散射观察,发现加入 B 型-原花青素三聚体后,观察到蛋白质聚集物生成,并且随着原 B 型-原花青素三聚体的进一步增加,聚集物的粒径缓慢增加,说明 B 型-原花青素三聚体与蛋白质形成了复合物。

2.4 X 射线衍射法

X 射线衍射是测定分子结构的标准技术,可用于解析从几个道尔顿到理论上不受限制的分子量的化学结构,并可用于解析包含不同配合物的分子^[63]。X 射线衍射使用 X 射线照射源来产生光束(也可以使用电子或中子)被目标样本衍射,得到的衍射图样可以用来重建样品的三维结构。此方法对样品要求高,但是要求样品处于结晶状态^[16]。夏雨等^[64]使用 X 射线衍射法研究不同浓度茶多酚对明胶的改性作用,发现不同浓度茶多酚与明胶交联后蛋白质的结晶面距离均变小,其中,2 g/L 的茶多酚与明胶交联后蛋白质结晶面的距离最短,即 2 g/L 的茶多酚对明胶的交联作用最强。

2.5 生物传感器

国际纯粹与应用化学联合会(IUPAC)定义生物传感器是一类将生化信息转换为分析信号的装置^[65]。生物传感器(Biosensor)根据转导的信号不同分为电化学传感器、光学传感器、声学传感器和量热传感器(参考 2.1 等温滴定量热法)。各类传感器通常需要一个存在相互作用的物质,被固定在表面上,用以创造传感元件,这一物质可以是小分子,也可以是蛋白质。虽然所有这些基于传感器的技术只需要少量的蛋白质被固定,但根据小分子-蛋白质相互作用的亲和力,需要的小分子数量可能非常高^[66]。

电化学传感器(Electrochemical transduction sensors)设备简单,信号强度不依赖分子大小,包括安培、电位和阻抗传感器^[66]。目前关于电化学的研究中,大多利用分子间相互作用测定目标物含量。Datta 等^[67]利用酪氨酸酶和金纳米粒子修饰的生物膜,使用电化学传感器检测茶叶和葡萄酒中的多酚含量,线性良好。

光传感器(Optical sensors)中,表面等离子共振生物传感器具有免标记、高灵敏度、实时定量的特点,可以同时动态监测多个生物分子间的相互作用^[68]。当生物分子在表面发生相互作用后,导致敏感层介电常数和折射率变化,使得传感器电磁场变化,最终反映到光电信号的变化上。Guerreiro 等^[69]利用超薄的智能分子印迹聚合物捕获和稳定在等离子体传感器表面的复杂蛋白基质,研究了儿茶素、B 型-原花青素二聚体与唾液蛋白的相互作用,该技术为研究食品中小分子生物利用度提供可能。

在声传感器(Acoustic)中会用到电声装置,其工作原理是检测由化学交互材料与压电材料接触而制成的薄膜的质量密度、弹性、粘弹性、电或介电特性的变化。其中,石英晶体微平衡传感器通过测量石英晶体谐振器的频率变化来测量单位面积的质量。Naoto 等^[70]使用石英晶体微平衡来研究小分子与固定蛋白的结合,显示儿茶素与肌钙蛋白 C(心力衰竭的标志)具有较高的亲和力。

2.6 界面扩张流变学性质的测量方法

界面扩张流变学性质能够反映不同分子在界面上的吸附和分散行为,对于研究复合体系中各组分间的相互作用具有重要意义,该方法通过比较界面粘弹特性、弛豫过程、界面张力等特征参数,建立适合于分析不同类型组分的理论模型,具有灵敏度高、操作简便、稳定性良好等特点,能够直观地反映出相互作用对加工性能的影响^[3]。

Rossetti 等^[71]将界面扩张流变学性质应用于茶多酚与唾液蛋白的相互作用中,发现两者间的相互作用随着多酚的化学结构和酚环的数量发生改变,该研究为揭示食品在口腔中收敛、苦涩等风味的形成机制提供参考。Zou 等^[72]利用单宁与玉米蛋白颗粒在空气-水界面的颗粒相互作用进行研究,发现玉米蛋白颗粒由于吸附速度快、颗粒间作用力大,导致在界面处覆盖面积小,形成了较大的团聚体,单宁的氢键削弱了颗粒的疏水性,从而削弱了流体界面的颗粒间力,可以降低玉米蛋白颗粒在界面上的吸附和组装速率,这也为玉米蛋白颗粒重新排列成有序的界面网络提供了足够的时间。

2.7 分子对接

分子对接(Molecular docking, MD)是一种通过硅计算工具计算,模拟分子间相互识别的方法,可确定配体与靶结合位点的结合构象和结合的最佳位置、方向,补充了多酚和蛋白质结合的实验数据^[73]。分子对接方法允许从蛋白质数据库中可用的结构中选择不同的蛋白质目标进行大规模筛选,具体的蛋白质数据库参考魏冬青等^[74]的文章。分子对接根据分子构象是否可以改变分为三类,即柔性对接、半柔性对接和刚性对接:柔性对接一般用于精确考虑分子间识别情况,计算耗费最大;半柔性对接常用于处理大分子和小分子间的对接,一般小分子构象可变,而大分子构象不可变;刚性对接适合大分子和大分子之间的对接^[75]。为了使每个多酚都能独立于每个蛋白质已知的配体结合位点,找到可能的其他结合位点,可以采用盲对接的方法。在研究苹果多酚和蛋白质相互作用中,Scafuri 等^[76]就使用了盲对接的方法,确定了具有最低结合能的苹果多酚-蛋白质复合物。

2.8 分子动态模拟

分子动态模拟(Molecular simulation docking, MSD)是在原子水平上获取蛋白质的结构信息,具有瞬时清晰度,能够得到构象变化、配体结合以及蛋白质折叠的信息等^[77],用于预测干扰(突变、磷酸化、质子化或配体的添加或去除)对生物分子的影响,但是在模拟过程中共价键不会形成和断裂使得方法具有局限性^[78]。Abdulatif 等^[8]使用分子对接和分子动态模拟方法对芦丁与 β -乳球蛋白结合进行研究。分子对接结果表明,芦丁与 β -乳球蛋白有两个结合位点,并且两个位点均依靠氢键和疏水相互作用。在位点1处,有6个氨基酸残基参与氢键作用,13个氨基酸

残基参与疏水相互作用;在位点2处,有7个氨基酸残基参与氢键作用,3个氨基酸参与疏水相互作用。分子动态模拟结果表明,芦丁与 β -乳球蛋白在位点1处形成了更为稳定的复合物,因此,推断芦丁与 β -乳球蛋白主要在位点1处结合。

3 结语与展望

目前来看,无论是直接分析方式还是间接分析方式,均存在一定的局限性。直接分析方式中,扫描电子显微镜^[79]和激光扫描共聚焦显微镜^[43]分辨率不够高,不利于较小分子的观察,而原子力显微镜分辨率较高,但是成像范围小、速度慢、受探头影响较大^[40];质谱技术研究多酚-蛋白质形成的复合物,存在电离过程破坏多酚-蛋白质之间的相互作用(疏水作用)^[16]、分析中峰展宽和离子抑制^[80]及小分子质量变化被弱化从而影响复合物分析的问题^[81]。间接分析方式中,界面扩张流变学性质测量方法需要可供食品组分发生吸附或扩散作用的界面层,但食品基质的复杂性决定了并不是每种组分都会在这两个界面上表现出吸附行为^[3]。

而针对食品真实体系中多酚-蛋白质相互作用的研究具有重要的食品加工学意义。一方面,多酚-蛋白质的相互作用对食品品质有积极作用:如多酚可通过与蛋白质交联提高啤酒泡沫稳定性^[82];奶茶中的牛奶蛋白可提高茶多酚的抗氧化能力^[83]等。另一方面,多酚-蛋白质相互作用对食品品质有不利影响:如研究发现巧克力中的多酚与牛奶蛋白结合并发生作用后,降低巧克力多酚的消化吸收以及抗氧化活性^[84];油菜籽多酚常与油菜籽蛋白结合,导致油菜籽蛋白提取物色泽变暗,产生异味,感官品质严重下降^[85]。大量的前期探索研究主要还在模拟及推演体系中进行,而真实体系中多酚-蛋白质的相互作用机制尚未完全明确,并且由于此类相互作用极易受到食品加工条件的影响,探究加工环境对相互作用的影响具有较大的实际意义。因此,食品复杂体系相互作用的研究对分析方法的准确性和特异性提出了更高的要求,考虑到食品加工环境的变化,原位检测分析技术亟待突破。

参考文献

- [1] 金泽林,金太花.海藻活性物质在功能性食品中的应用研究[J].粮食科技与经济,2020,45(1):122-124.
- [2] 国家自然科学基金委员会.2020年度国家自然科学基金项目指南[EB/OL].2020[2021-04-07].<http://www.nsf.gov.cn/publish/portal0/xmzn/2020/01/03/info77038.htm>.
- [3] 朱力杰,张馨心,刘秀英,等.界面扩张流变学性质在食品组分相互作用中的研究进展[J].食品工业科技,2017,38(11):363-368.
- [4] Czubinski J, Dwiecki K. A review of methods used for investigation of protein-phenolic compound interactions[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2017, 52(3): 1-13.
- [5] 彭淳容.数据挖掘方法用于参与代谢的小分子生物学功能预测研究[D].上海:上海大学,2012.
- [6] Bissantz C, Kuhn B, Stahl M. A medicinal chemist's guide to

- molecular interactions[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2010, 53(14): 5061–5084.
- [7] Kaspchak E, Marea L I, Mafra M R. 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(30): 1–8.
- [8] Abdulatif A-S N, Masood K J, Ajamaluddin M, et al. Molecular insight into binding behavior of polyphenol (rutin) with beta lactoglobulin: Spectroscopic and molecular docking and MD simulation studies[J]. *Journal of Molecular Liquids*, 2018, 269: 511–520.
- [9] Guo N H, Wang C L, Chao Sh, et al. Integrated study of the mechanism of tyrosinase inhibition by baicalein using kinetic, multispectroscopic and computational simulation analyses[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 118: 57–68.
- [10] Sui X N, Sun H B, Qi B K, et al. Functional and conformational changes to soy proteins accompanying anthocyanins: Focus on covalent and non-covalent interactions[J]. *Food Chemistry*, 2018, 245(15): 871–878.
- [11] Prodpran T, Benjakul S, Phatcharat S. Effect of phenolic compounds on protein cross-linking and properties of film from fish myofibrillar protein[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2012, 51(5): 774–782.
- [12] Rawel H M, Kroll J, Huhl U C. Model studies on reactions of plant phenols with whey proteins[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2001, 45(2): 72–81.
- [13] Rohn S, Rawel H M, Kroll J. Inhibitory Effects of plant phenols on the activity of selected enzymes[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50(12): 3566–3571.
- [14] Bourvellec C L, Renard C M G C. Interactions between polyphenols and macromolecules: Quantification methods and mechanisms[J]. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 2012, 52(3): 213–248.
- [15] Xiao J B, Kai G Y. A Review of dietary polyphenol-plasma protein interactions: Characterization, influence on the bioactivity, and structure-affinity relationship[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2012, 52(1): 85–101.
- [16] Ulrich N P. Analytical techniques for the study of polyphenol-protein interactions[J]. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 2017, 57(10): 2144–2161.
- [17] Liang M, Liu R, Qi W, et al. Interaction between lysozyme and procyanidin: Multilevel structural nature and effect of carbohydrates[J]. *Food Chemistry*, 2013, 138(2-3): 1596–1603.
- [18] Dai T T, Chen J, McClements D J, et al. Protein-polyphenol interactions enhance the antioxidant capacity of phenolics: Analysis of rice glutelin-procyanidin dimer interactions[J]. *Food & Function*, 2019, 10(2): 765–774.
- [19] 赵焕焦. 黑米花色苷与三种蛋白质相互作用的研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2017.
- [20] Glazer A, Smith E. Studies on the ultraviolet difference spectra of proteins and polypeptides[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1961, 236: 2942–2947.
- [21] Liu F G, Ma C C, McClements D J, et al. A comparative study of covalent and non-covalent interactions between zein and polyphenols in ethanol-water solution[J]. *Food Hydrocolloids*, 2017, 63(2): 625–634.
- [22] Al-hanish A, Stanic-vucinic D, Mihailovic J, et al. Noncovalent interactions of bovine α -lactalbumin with green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate[J]. *Food Hydrocolloids*, 2016, 61(2): 41–50.
- [23] Byler D M, Brouillette J N, Susi H. Quantitative studies of protein structure by FTIR deconvolution and curve fitting[J]. *Spectroscopy*, 1986, 1(3): 29–33.
- [24] Kanakis C D, Hashi I, Bourassa P, et al. Milk β -lactoglobulin complexes with tea polyphenols[J]. *Food Chemistry*, 2011, 127(3): 1046–1055.
- [25] Jia J, Gao X, Hao M, et al. Comparison of binding interaction between beta-lactoglobulin and three common polyphenols using multi-spectroscopy and modeling methods[J]. *Food Chemistry*, 2017, 228: 143–151.
- [26] Yao H, Wynendaele E, Xu X L, et al. Circular dichroism in functional quality evaluation of medicines[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2018, 147: 50–64.
- [27] Paul B K, Ghosh N, Mukherjee S. Binding interaction of a prospective chemotherapeutic antibacterial drug with β -lactoglobulin: Results and challenges[J]. *Langmuir*, 2014, 30(20): 5921–5929.
- [28] Chicón R, López-fandio R, Alonso E, et al. Proteolytic pattern, antigenicity, and serum immunoglobulin E binding of β -lactoglobulin hydrolysates obtained by pepsin and high-pressure treatments[J]. *Journal of Dairy Science*, 2008, 91(3): 928–938.
- [29] Stojadinovic M, Radosavljevic J, Ognjenovic J, 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(3-4): 1263–1271.
- [30] Zhang Y, Chen S, Qi B, et al. Complexation of thermally-denatured soybean protein isolate with anthocyanins and its effect on the protein structure and *in vitro* digestibility[J]. *Food Research International*, 2018, 106: 619–625.
- [31] Calero M, Gasset M. Fourier transform infrared and circular dichroism spectroscopies for amyloid studies[M]. Totowa: Humana Press, 2005: 129–151.
- [32] Alula M T, Mengesha Z T, Mwenesongole E. Advances in surface-enhanced Raman spectroscopy for analysis of pharmaceuticals: A review[J]. *Vibrational Spectroscopy*, 2018, 98: 50–63.
- [33] 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): 50–54.
- [34] Liu F, Ma D, Luo X, et al. Fabrication and characterization of protein-phenolic conjugate nanoparticles for co-delivery of curcumin and resveratrol[J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 79: 450–461.
- [35] Judith D, Oliver F, Thomas H, et al. Label-free quantitative ^1H NMR spectroscopy to study low-affinity ligand-protein interactions in solution: A contribution to the mechanism of polyphenol-mediated astringency[J]. *Plos One*, 2017, 12(9): 1–14.

- [36] Purslow J, Khatiwada B, Bayro M, et al. NMR Methods for structural characterization of protein-protein complexes[J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2020, 7: 9.
- [37] Faurie B, Dufourc E J, Laguerre M, et al. Monitoring the interactions of a ternary complex using NMR spectroscopy: The case of sugars, polyphenols, and proteins[J]. *Analytical Chemistry*, 2016, 88(24): 12470–12478.
- [38] Silva M S, García-estévez I, Brandão E, et al. Molecular interaction between salivary proteins and food tannins[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(31): 6415–6424.
- [39] 李春翼, 田勇, 杨雅轩, 等. 植物多酚与蛋白质互作机制表征方法研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(13): 262–268.
- [40] 张曼, 王岸娜, 吴立根. 蛋白质, 多糖和多酚间相互作用及研究方法[J]. *粮食与油脂*, 2015(4): 42–46.
- [41] Liu F G, Wang D, Ma C C, et al. Conjugation of polyphenols prevents lactoferrin from thermal aggregation at neutral pH[J]. *Food Hydrocolloids*, 2016, 58: 49–59.
- [42] Sneddon G C, Trimby P W, Cairney J M. Transmission Kikuchi diffraction in a scanning electron microscope: A review[J]. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 2016, 110: 1–12.
- [43] Merson E, Danilov V, Merson D, et al. Confocal laser scanning microscopy: The technique for quantitative fractographic analysis[J]. *Engineering Fracture Mechanics*, 2017, 183: 147–158.
- [44] Diaz J T, Foegeding E A. Formulation of protein-polyphenol particles for applications in food systems[J]. *Food & Function*, 2020, 9(1): 1–38.
- [45] Zou Y, Guo J, Yin S W, et al. Pickering emulsion gels prepared by hydrogen-bonded zein/tannic acid complex colloidal particles[J]. *J Agric. Food Chem.*, 2015, 63(33): 7405–7414.
- [46] Lim C K, Lord G. Current Developments in LC-MS for Pharmaceutical Analysis[J]. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2002, 25(5): 547–557.
- [47] Gallo M, Vinci G, Graziani G, et al. The interaction of cocoa polyphenols with milk proteins studied by proteomic techniques[J]. *Food Research International*, 2013, 54(1): 406–415.
- [48] Maple H J, Garlish R A, Rigau-Roca L, et al. Automated protein-ligand interaction screening by mass spectrometry[J]. *J Med Chem*, 2012, 55(2): 837–851.
- [49] Riu A, Le Maire A, Grimaldi M, et al. Characterization of novel ligands of ER α , Er β , and PPAR γ : The case of halogenated bisphenol a and their conjugated metabolites[J]. *Toxicol Sci*, 2011, 122(2): 372–382.
- [50] 王宁. 分子光谱和等温滴定量热法研究蛋白与小分子的相互作用[D]. 郑州: 郑州大学, 2019, 80–83.
- [51] Pal S, Dey S K, Saha C. Inhibition of catalase by tea catechins in free and cellular state: A biophysical approach[J]. *Plos One*, 2014, 9(7): e102460.
- [52] Barrett A, Ndou T, Hughey C A, et al. Inhibition of α -amylase and glucoamylase by tannins extracted from cocoa, pomegranates, cranberries, and grapes[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2013, 61(7): 1477–86.
- [53] Farah J S, Silva M C, Cruz A G, et al. Differential calorimetry scanning: Current background and application in authenticity of dairy products[J]. *Current Opinion in Food Science*, 2018, 22: 88–94.
- [54] Sun L J, Gidley M J, Warren F J. The mechanism of interactions between tea polyphenols and porcine pancreatic α -amylase: Analysis by inhibition kinetics, fluorescence quenching, differential scanning calorimetry and isothermal titration calorimetry[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2017: 1700324.
- [55] Prigent S V E, Voragen A G J, Visser A J W G, et al. Covalent interactions between proteins and oxidation products of caffeoylquinic acid (chlorogenic acid)[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2007, 87(13): 2502–2510.
- [56] Li J Q, Geng G Q, Myers R, et al. The chemistry and structure of calcium (aluminosilicate) hydrate: A study by XANES, ptychographic imaging, and wide- and small-angle scattering[J]. *Cement & Concrete Research*, 2019, 115: 367–378.
- [57] Neylon C. Small angle neutron and X-ray scattering in structural biology: Recent examples from the literature[J]. *European Physical Journal*, 2008, 37(5): 531–41.
- [58] Canon F, Paté F, Cheynier V, et al. Aggregation of the salivary proline-rich protein IB5 in the presence of the tannin EgCG[J]. *Langmuir*, 2013, 29(6): 1926–1937.
- [59] García-estévez I, Ramos-pineda A, Escribano T. Interactions between wine phenolic compounds and human saliva in astringency perception[J]. *Food & Function*, 2018, 9(3): 1294–1309.
- [60] Monteleone E, Condelli N, Dinnella C, et al. Prediction of perceived astringency induced by phenolic compounds[J]. *Food Quality and Preference*, 2004, 15: 761–769.
- [61] 贾楠, 顾建飞, 苏明旭. 基于超声谱分析的颗粒粒度测量研究[J]. *计量学报*, 2019, 40(3): 116–121.
- [62] Mcrae J M, Kennedy J A. Wine and grape tannin interactions with salivary proteins and their impact on astringency: A review of current research[J]. *Molecules*, 2011, 16(3): 2348–2364.
- [63] Blundell T L, Jhoti H, Abell C. High-throughput crystallography for lead discovery in drug design[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2002, 1(1): 45–54.
- [64] 夏雨, 焦志华, 刘海英. 茶多酚对明胶的改性作用[J]. *食品与发酵工业*, 2011, 37(10): 40–44.
- [65] Hulanicki A, Glab S, Ingman F. Chemical sensors: definitions and classification[J]. *Pure & Applied Chemistry*, 1991, 63(9): 1247–1250.
- [66] Fechner P, Bleher O, Ewald M, et al. Size does matter! Label-free detection of small molecule-protein interaction[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2014, 406(17): 4033–4051.
- [67] Datta S, Kanjilal B, Sarkar P. Electrochemical sensor for detection of polyphenols in tea and wine with differential pulse voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy utilizing tyrosinase and gold nanoparticles decorated biomembrane[J]. *Journal of The Electrochemical Society*, 2017, 164(4): 118–126.
- [68] 许春华. 表面等离子共振生物传感器在食品检测中的应用现状[J]. *粮食与食品工业*, 2017, 24(4): 55–57.
- [69] Gurreiro J R L, Bochenkov V E, Runager K, et al. Molecular imprinting of complex matrices at localized surface plasmon resonance biosensors for screening of global interactions of

- polyphenols and proteins[J]. *ACS Sensors*, 2016, 1(3): 258–264.
- [70] Naoto T, Du Ch K, Fumiaki Y, et al. Biological actions of green tea catechins on cardiac troponin C[J]. *British Journal of Pharmacology*, 2010, 161(5): 1034–1043.
- [71] Rossetti D, Ravera F, Liggieri L. Effect of tea polyphenols on the dilational rheology of human whole saliva (HWS): Part 2, polyphenols-HWS interaction[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2013, 110: 474–479.
- [72] Zou Y, W Zh L, Guo Jian, et al. Tunable assembly of hydrophobic protein nanoparticle at fluid interfaces with tannic acid[J]. *Food Hydrocolloids*, 2017, 63: 364–371.
- [73] 庄绪静,曹雅忠,李克斌,等. 同源建模和分子对接方法的应用与发展 [C]// 中国植物保护学会学术年会. 2011.
- [74] 魏冬青,连鹏,顾若需. 分子模拟与计算机辅助药物设计[J]. *上海管理科学*, 2012(7): 89–93.
- [75] Gupta M, Sharma R, Singh M, et al. Docking techniques in pharmacology: How much promising?[J]. *Computational Biology & Chemistry*, 2018, 76: 210–217.
- [76] Scafuri B, Marabotti A, Carbone V, et al. A theoretical study on predicted protein targets of apple polyphenols and possible mechanisms of chemoprevention in colorectal cancer[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 32516.
- [77] Hollingsworth S A, Dror R O. Molecular dynamics simulation for all[J]. *Neuron*, 2018, 99(6): 1129–1143.
- [78] Mitsutake A, Takano H. Relaxation mode analysis for molecular dynamics simulations of proteins[J]. *Biophysical Reviews*, 2018, 10(2): 375–389.
- [79] 祝琳,吴龙,陈小强,等. 茶多酚与多糖的相互作用:作用机理及功能特性变化研究进展[J]. *茶叶科学*, 2019, 39(2): 93–100.
- [80] Annesley T M. Ion suppression in mass spectrometry[J]. *Clinical Chemistry*, 2003, 49(7): 1041–1044.
- [81] Kitova E N, El-Hawiet A, Schnier P D, et al. Reliable determinations of protein-ligand interactions by direct ESI-MS measurements. Are we there yet?[J]. *Journal of Mass Spectrometry*, 2012, 23(3): 431–441.
- [82] 田金凤,王金晶,郑飞云,等. 啤酒主要组分在泡沫中的富集及其对泡持性的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2017, 43(9): 22–27.
- [83] Dubeau S, Samson G, Tajmir-Riahi H-A. Dual effect of milk on the antioxidant capacity of green, Darjeeling, and English breakfast teas[J]. *Food Chemistry*, 2010, 122(3): 539–545.
- [84] Serafini M, Bugianesi R, Maiani G, et al. Plasma antioxidants from chocolate[J]. *Nature*, 2003, 424(6952): 1013–1013.
- [85] Xu L, Diosady L L. Interactions between canola proteins and phenolic compounds in aqueous media[J]. *Food Research International*, 2000, 33(9): 725–731.