

## 加热温度对牡荆素-绿豆蛋白互作物结构和功能性的影响

刁静静<sup>1,2</sup>, 陶阳<sup>3</sup>, 国慧<sup>3</sup>, 陈洪生<sup>3\*</sup>, 王长远<sup>3</sup>, 张东杰<sup>3</sup>, 朱永胜<sup>4</sup>

(<sup>1</sup>黑龙江八一农垦大学 农业农村部农产品加工品质质量监督检验测试中心 黑龙江大庆 163319

<sup>2</sup>黑龙江八一农垦大学 国家杂粮工程技术研究中心 黑龙江大庆 163319

<sup>3</sup>黑龙江八一农垦大学食品学院 黑龙江大庆 163319

<sup>4</sup>黑龙江九阳豆业有限公司 黑龙江大庆 163319)

**摘要** 为了探明在加工过程中,不同温度下牡荆素与绿豆蛋白作用形成的复合物结构和功能的变化。采用傅里叶红外光谱、扫描电镜、荧光光谱和 SDS-PAGE 等方法研究加热温度对牡荆素-绿豆蛋白互作物(VT-MBP)大分子结构的影响,分析 VT-MBP 在不同温度条件下的溶解性、乳化性、起泡性和抗氧化性等特性功能的变化。结果表明:加热温度改变了互作物的分子结构,随着温度的升高互作物二级结构中的  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠含量降低。荧光光谱分析发现 VT 与 MBP 的相互作用机制为静态猝灭,且通过非共价的疏水相互作用结合。此外,在加热温度 90 °C 时 VT-MBP 具有良好的乳化性、起泡性及泡沫稳定性。结论:加热温度对 VT-MBP 的结构和功能性具有显著影响。本研究结果为确定绿豆食品的最适加工温度以及开发功能型绿豆蛋白饮料提供理论依据。

**关键词** 绿豆蛋白; 牡荆素; 加热温度; 结构; 功能性质

**文章编号** 1009-7848(2023)08-0197-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.08.021

绿豆是一种食用价值很高的豆科杂粮作物,其营养物质丰富且含有多种生物活性成分<sup>[1]</sup>。绿豆蛋白(Mung bean protein, MBP)是一种优质的天然植物蛋白,因优良的功能性而常被应用到食品中,目前大多绿豆蛋白被加工成功能性饮料产品<sup>[2]</sup>。Liu 等<sup>[3]</sup>以绿豆蛋白为原料,开发了抗氧化绿豆肽保健饮料,具有自由基清除能力。葛驰宇等<sup>[4]</sup>研究并制备了具有解酒功能的绿豆多肽橘红复合饮料,感官品质较好。

本课题组前期研究发现牡荆素(Vitexin, VT)是绿豆抗氧化活性物质中含量最高的黄酮类化合物(占 4%)。Hou 等<sup>[5]</sup>利用树脂纯化绿豆黄酮,并对纯化物进行分析,发现绿豆皮中黄酮的主要成分为牡荆素及异牡荆素。其中,牡荆素不仅具有抗肿瘤<sup>[2]</sup>、抗炎的作用,还具有治疗急性心肌缺血损伤,保护心血管,降血糖等多种生理功能<sup>[6]</sup>。在加工食用绿豆时,一般需要去皮、水洗、蒸制等处理过程,这会使绿豆中的黄酮溶出<sup>[1]</sup>,并与绿豆蛋白发生相互作用形成互作物,使绿豆蛋白的结构和功能特

性发生变化<sup>[5]</sup>,从而影响绿豆产品的品质。

热处理是食品加工过程的重要环节,对食品品质有显著影响。热处理中,多酚与蛋白会发生不同程度的改变。Sastry 等<sup>[7]</sup>研究发现,葵花籽蛋白与绿原酸的结合亲和力随温度的上升而降低,50 °C 时,非共价作用力消失,随之二者的结合率下降。绿豆在热加工过程中也会发生类似的反应。Zhong 等<sup>[8]</sup>发现在高温下处理绿豆蛋白会引起其二级结构的变化,促进新的可溶性聚集体形成。热加工下绿豆蛋白是否会与牡荆素发生相互作用,以及绿豆蛋白与牡荆素复合物的功能性质以及作用机制还不清楚。

本课题组前期研究发现牡荆素能与绿豆蛋白发生相互作用,且在一定浓度下二者相互作用的产物能够改变 MBP 的理化性质。然而,加热对其产物的影响鲜有研究报道。本试验探讨不同温度下牡荆素与绿豆蛋白作用形成的牡荆素-绿豆蛋白互作物(VT-MBP)的结构和功能的变化,为开发功能型绿豆蛋白饮料提供理论依据。

**收稿日期:** 2022-08-15

**基金项目:** 国家重点研发计划项目(2018YFE0206300);黑龙江省“百千万”工程科技重大专项(2021ZX12B06)

**第一作者:** 刁静静,女,博士,研究员

**通信作者:** 陈洪生 E-mail: hsch0608@163.com

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料、仪器与amp;设备

山西明绿豆,大庆萨尔图区博微物资经销处。

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)、2,2'-联氨-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸 (2,2'-Azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid, ABTS)、牡荆素 [(Vitexin), 纯度为 98.5%], 上海 Macklin 公司; 总抗氧化能力 (total antioxidative capability, TCOA) 试剂盒、羟自由基 (hydroxyl radical) 测定试剂盒、SDS-PAGE 凝胶试剂盒, 南京建成生物工程研究所; 蛋白 Marker (SM0431), 立陶宛 Fermentas Life Sciences 公司; 考马斯亮蓝 G250, 天津市科密欧化学试剂厂;  $\beta$ -巯基乙醇 ( $\beta$ -Mercaptoethanol,  $\beta$ -ME), 美国 Amersco 试剂公司。

MAGNA-IR560 傅里叶变换红外光谱系统, 美国尼高力公司; DYY-8C 型垂直电泳仪, 北京市六一仪器厂; UV757CRT 紫外-可见分光光度计, 上海分析仪器厂; SU3400 扫描电子显微镜, 日立科学仪器 (北京) 有限公司; Accumet AB15 pH 计, 美国 Fisher 公司; TG16-WS 离心机, 长沙湘仪有限责任公司; Alpha 1-2 LD plus 冷冻干燥机, 德国 Christ 公司。

## 1.2 试验方法

**1.2.1 MBP 的制备** 参考乔宁等<sup>[9]</sup>的方法并稍作改动。去除绿豆种皮, 用 40 °C 烘箱将去皮后的绿豆烘干至恒重, 并粉碎, 过 80 目筛, 脱脂后晾干, 装入封闭袋中。用碱提酸沉的方法提取 MBP。将上述脱脂的绿豆粉配制为 7% 的样品溶液, 加入 1 mol/L NaOH 溶液调 pH 9.5, 用电动搅拌桨搅拌 4 h 后将混合物离心 (25 min, 4 000 r/min), 取上层液体, 加入 0.5 mol/L HCl, 调 pH 4.6, 放置 30 min, 产生明显分层后去除上清液, 将底部沉淀离心 (25 min, 4 000 r/min), 得到的蛋白沉淀用去离子水清洗, 再次离心 (25 min, 4 000 r/min), 重复以上操作使其最终 pH 值为中性。将得到的蛋白在 -80 °C 条件下预冻处理 24 h, 最后放入冷冻干燥机中干燥得到 MBP 粉末。

**1.2.2 不同温度下 VT-MBP 的制备** 基于王启明等<sup>[10]</sup>的方法并作改进。将 MBP 粉末均匀分散于去离子水中 (10%), 室温磁力搅拌 2 h, 4 °C 保存过夜, 使蛋白质分子充分水合。将水合后的蛋白溶解在 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 中, 质量分数为 1%, 用磁力搅拌器搅拌 30 min, 保证 MBP

充分溶解。

根据本课题组前期测定绿豆中牡荆素与蛋白含量, 参照杨君等<sup>[11]</sup>的研究结果, 确定本研究中 VT 与 MBP 的互作比例为 60  $\mu$ mol VT/g MBP。按比例进行 VT-MBP 溶液的配制, 分别置 25, 80, 90, 100 °C (试验温度按常温与绿豆熟制温度进行设计) 下磁力搅拌 2 h, 制成 VT-MBP 互作物, 置于 0~4 °C 冰箱中, 备用, 48 h 内完成指标测定。

**1.2.3 红外光谱测定** 参照 Zhao 等<sup>[12]</sup>的方法。傅里叶变换红外 (FTIR) 光谱在 400~4 000  $\text{cm}^{-1}$  的波数范围以 4  $\text{cm}^{-1}$  的分辨率扫描样品 64 次, 波数精度设为 0.01  $\text{cm}^{-1}$ , 获得样品的 FTIR 光谱。

**1.2.4 荧光光谱测定** 根据赵思明等<sup>[13]</sup>的方法。测定不同温度下 VT-MBP 互作物的荧光强度, 对所得荧光数据用 Stern-Volmer 方程分析:

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

本试验的荧光猝灭剂为牡荆素。式中,  $F_0$ ——加入 VT 之前 MBP 的荧光强度, cps;  $F$ ——加入 VT 后蛋白的荧光强度, cps;  $K_q$ ——由扩散过程控制的生物大分子动态猝灭速率常数,  $\text{L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$ ;  $\tau_0$ ——没有猝灭剂时 HSA 的平均荧光寿命, 生物大分子的平均寿命约为  $10^{-8} \text{ s}^{-1}$ ;  $[Q]$  代表荧光猝灭剂牡荆素的浓度, mol/L。  $K_{sv}$ ——斯特恩-沃尔默动态猝灭常数, 通过  $F_0/F$  值与  $[Q]$  的线性回归来确定, 线性斜率即为  $K_{sv}$ ,  $\text{mol}^{-1}$ 。

配制 60  $\mu$ mol VT/g MBP 的 VT-MBP 溶液, 用磁力搅拌器对溶液进行振荡、混匀, 分别对其体系进行加热, 温度为 25, 80, 90, 100 °C。测定荧光强度, 对所得荧光数据用 Van't Hoff 方程计算, 可得出 3 个热力学参数值, 焓变 ( $\Delta H$ )、熵变 ( $\Delta S$ ) 和吉布斯自由能变 ( $\Delta G$ ), 以此判断牡荆素与 MBP 结合的作用力。

$$\ln K_2/K_1 = (1/T_1 - 1/T_2) \Delta H/R \quad (2)$$

$$\Delta G = -RT \ln K = \Delta H - T \Delta S \quad (3)$$

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

式中,  $T$ ——温度, K;  $K$ ——结合常数,  $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ ;  $R$ ——气体常数 0.008314  $\text{kJ}/\text{mol} \cdot \text{K}$ 。

**1.2.5 SDS-PAGE 电泳测定** 参照曹云刚<sup>[14]</sup>的方法。将样品分为两组, 分别溶解于 NaOH 溶液中, 使其最终质量浓度为 0.5  $\text{mg}/\text{mL}$ 。其中一组的上样缓冲液中加入 1 mL  $\beta$ -ME, 另一组不加; 上样体

积为 10  $\mu\text{L}$ , 上层浓缩胶和下层分离胶的质量分数分别为 4% 和 12%。电泳后, 对凝胶进行染色脱色处理。

1.2.6 溶解性测定 根据 Liu 等<sup>[15]</sup>的方法。将样品溶解于蒸馏水中, 分别配成 5 mg/mL 的溶液, 静置水化 30 min 后搅拌 30 min, 离心 (25 min, 4 000 r/min), 测定沉淀物的质量。

$$\text{溶解度}(\%) = \frac{\text{样品质量} - \text{沉淀物质量}}{\text{样品质量}} \times 100 \quad (5)$$

1.2.7 乳化性和乳化稳定性测定 参照张舒等<sup>[16]</sup>的方法测定乳化性和乳化稳定性。将样品进行油和水乳化, 向其中加入 SDS 溶液混合, 测定吸光度。精确称取 MBP 和 VT-MBP 样品 0.2 g, 将其放入烧杯中, 加入 100 mL 蒸馏水使其溶解。将 8 mL 样品溶液与 2 mL 大豆油置于离心管中, 室温下以 10 000 $\times g$  均质 1 min, 在离心管底部 0.5 cm 处取样 50  $\mu\text{L}$ , 加入 5 mL 0.1% SDS。混合后在波长 500 nm 处测定吸光度, 记为  $A_0$ 。将混合物静置 10 min 后取 50  $\mu\text{L}$  样液, 测定吸光度, 记为  $A_e$ ; 以 SDS 溶液 (0.1%) 作空白对照, 乳化性和乳化稳定性计算公式:

$$\text{乳化性}(m^2/g) = \frac{2 \times 2.303}{c \times \varphi \times 10^4} \times A_0 \times 50 \quad (6)$$

$$\text{乳化稳定性}(\%) = \frac{A_e}{A_0} \times 100 \quad (7)$$

式中:  $c$ ——蛋白质溶液质量浓度, g/mL;  $\varphi$ ——油相体积分数, %。

1.2.8 起泡性和起泡稳定性测定 参照覃思等<sup>[17]</sup>的方法测定起泡性和起泡稳定性。精确称取样品 1 g, 放入小烧杯, 溶解于 40 mL 蒸馏水中, 用磁力搅拌器搅拌样品溶液 15 min, 使样品充分溶解。将处理后的样品溶液转移到刻度离心管中, 均质 15 s, 使样品充分分散于水中, 激起样品的泡沫。均质完成后, 迅速记录溶液均质出的泡沫体积 ( $V_1$ ), 平稳放置, 室温静止 20 min 后, 再次测定离心管中溶液的泡沫体积 ( $V_2$ ), 体系总体积 ( $V_{\text{总}}$ )。分别按照公式 (8)、(9) 计算溶液的起泡性及泡沫稳定性。

$$\text{起泡性}(\%) = \frac{V_1}{V_{\text{总}}} \times 100 \quad (8)$$

$$\text{泡沫稳定性}(\%) = \frac{V_2}{V_1} \times 100 \quad (9)$$

## 1.2.9 抗氧化能力测定

1.2.9.1 DPPH·自由基清除能力 参照陈青青等<sup>[18]</sup>的方法并稍作改动。配制 30  $\mu\text{mol/L}$  DPPH 乙醇溶液, 使用时用乙醇溶液进行稀释, 得到 DPPH·工作液 (在 517 nm 处吸光度为  $0.70 \pm 0.02$ )。将 VT-MBP 复合物溶解于磷酸盐缓冲液 (0.01 mol/L, pH 7.0) 中, 配制为 5% 样品溶液。取 0.5 mL 样品溶液和 5 mL DPPH·工作溶液, 室温避光反应 30 min, 以磷酸盐缓冲液为空白, 在 517 nm 处测定  $A_1$ 。若有混浊絮状物产生, 则离心后再测定 (3 min, 500 r/min)。DPPH·清除率计算公式:

$$\text{DPPH} \cdot \text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_3}{A_2}\right) \times 100 \quad (10)$$

式中:  $A_1$ ——乙醇 DPPH 溶液和样品的吸光度;  $A_2$ ——乙醇溶液吸光度;  $A_3$ ——样品在乙醇溶液中的吸光度。

1.2.9.2 ABTS<sup>+</sup>·自由基清除能力 参考 Lou 等<sup>[19]</sup>的方法。制备 ABTS<sup>+</sup>·贮备液, 将 ABTS<sup>+</sup>·工作液用乙醇稀释直至吸光度为  $0.70 \pm 0.02$  ( $A_{734\text{nm}}$ )。处理样品方法同上, ABTS<sup>+</sup>·清除率计算公式:

$$\text{ABTS}^+ \cdot \text{清除率}(\%) = \frac{A_s - A_m}{A_s} \times 100 \quad (11)$$

式中:  $A_s$ ——乙醇对照组吸光度;  $A_m$ ——样品吸光度。

1.2.9.3 羟自由基清除能力 采用·OH 检测试剂盒测定, 设置标准品孔和样本孔。取 10  $\mu\text{L}$  样品溶液, 放入 50  $\mu\text{L}$  终止液 (0.5 mol/L 硫酸), 在波长 450 nm 处测定样品的 OD 值。

1.2.9.4 T-AOC 的测定 采用 T-AOC 检测试剂盒测定, 方法同 1.2.9.3 节)。

1.2.10 扫描电镜分析 参照王丽颖<sup>[20]</sup>的方法, 使用 SU3400 扫描电子显微镜观察。取适量样品溶液以 3 000 r/min 离心后冷冻干燥, 将粉末样品轻放于样品台上, 将表面粉末均匀吹开、铺平。喷金处理后, 于 200 倍放大倍数下观察样品结构, 加速电压为 5 kV。

## 1.3 数据统计分析

所有试验重复 3 次, 数据使用 Statistix 8.0 软件包 (分析软件, St Paul, MN) 进行统计学分析, 通过 Turkey HSD 检验比较样本间的平均值 ( $P < 0.05$ )。所有数据均使用 SigmaPlot 12.5 (绘图软



件, San Jose, CA)作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同温度下 MBP 和 VT-MBP 互作物的红外光谱分析

图 1 是不同温度下 VT-MBP 的红外光谱图,蛋白的相互作用通过监测在  $1600\sim 1700\text{ cm}^{-1}$  范围的酰胺 I 带对应的 C=O 拉伸振动,以及  $1480\sim 1580\text{ cm}^{-1}$  范围的酰胺 II 带对应的 N-H 弯曲与 C-N 伸缩所导致的光谱位移和强度变化,推测蛋白质二级结构的变化。25 °C 时 VT-MBP 与 MBP 的 FTIR 光谱没有显著差异,表明此时二者间没有较强的亲和力,该结果与绿原酸对牛乳中蛋白质的作用一致<sup>[21]</sup>。当温度升高后,VT-MBP 和 MBP 在酰胺 I 和酰胺 II 的位置均发生显著改变,推测蛋白质可能与 VT 通过 C=O、C-N 和 N-H 官能团的相互作用而结合。

对图 1 中酰胺 I 带傅里叶去卷积光谱进行拟合分析,得到表 1,可知 VT-MBP 和 MBP 的  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠含量均占比较高。随着温度的升高 VT-MBP 样品中  $\alpha$ -螺旋含量降低,这与 Renard 等<sup>[22]</sup>研究  $\beta$ -乳糖蛋白二级结构的结果相同,这是

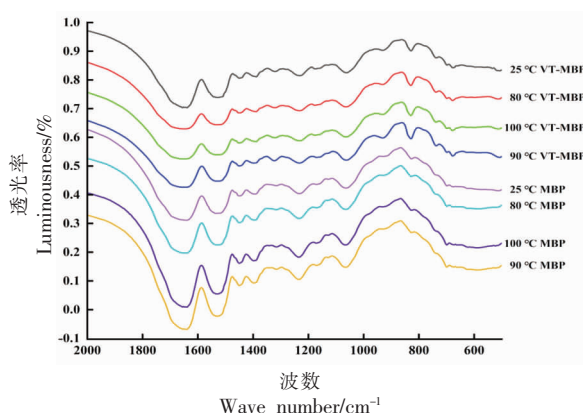


图 1 不同温度下 MBP 和 VT-MBP 互作物的 FTIR 图谱

Fig.1 FTIR spectra of MBP and VT-MBP at different temperatures

因为多酚与蛋白互作,加之升温均会使蛋白结构展开,从而使这两种结构含量下降。温度升高使  $\alpha$ -螺旋结构中的氢键断裂,导致解螺旋,因此  $\alpha$ -螺旋结构的含量下降。另外,在加热过程中 R 基基团发生聚合,R 基过大也会破坏  $\alpha$ -螺旋结构的稳定性,造成其比例下降<sup>[23]</sup>。 $\beta$ -折叠含量下降,进一步表明加热使蛋白质二级结构展开,让更多的基团暴露于溶液中。

表 1 不同温度下 MBP 和 VT-MBP 互作物二级结构组成比例

Table 1 The secondary structure composition ratio of MBP and VT-MBP at different temperatures

样品	温度/°C	$\alpha$ -螺旋结构	$\beta$ -折叠结构	$\beta$ -转角结构	无规则卷曲结构
VT-MBP	25	29.12	29.62	18.57	22.69
	80	28.31	28.01	18.84	24.84
	90	27.67	27.76	19.26	25.31
	100	27.74	27.03	21.05	24.18
MBP	25	31.09	33.76	18.71	16.44
	80	30.54	32.42	17.24	19.80
	90	29.37	31.06	18.07	21.50
	100	30.21	28.70	17.27	23.82

### 2.2 不同温度下 MBP 和 VT-MBP 互作物的荧光光谱分析

2.2.1 荧光猝灭常数和猝灭机理的判断 荧光光谱可以通过监测蛋白质疏水氨基酸微环境的极性变化来反映蛋白质的三级结构变化。向上弯曲的 Stern-Volmer 曲线图可以指示静态和动态猝灭,当温度升高时曲线斜率减小,VT 对 MBP 的猝灭

方式为静态猝灭,否则为动态猝灭。由图 2 可知,不同温度下,VT-MBP 结合性能的 Stern-Volmer 猝灭常数下降,其为荧光静态猝灭类型。猝灭剂与生物大分子的最大散射碰撞猝灭常数为  $2\times 10^{10}\text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{s})$ <sup>[15]</sup>。由表 2 可知,VT 对 MBP 的荧光猝灭速率数量级均为  $10^{12}$ ,远高于  $2\times 10^{10}\text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{s})$ ,这说明 VT 的猝灭方式为静态猝灭。

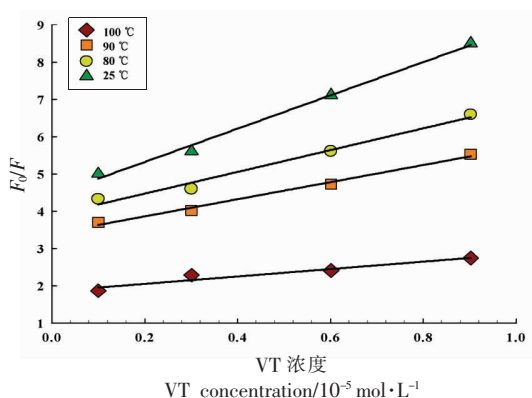


图 2 不同温度 VT 与 MBP 相互作用下 MBP 荧光猝灭图

Fig.2 Fluorescence quenching diagram of MBP under the interaction of VT and MBP at different temperatures

2.2.2 结合常数和结合位点的计算 以图 2 中的  $\lg[(F_0-F)/F]$  对  $\lg[Q]$  曲线的斜率和截距计算  $K_s$  (结合常数) 和  $n$  (结合位点的数量), 结果见表 3。

VT 与 MBP 之间的表观结合常数  $K_s$  为  $10^4$  (表 3), 形成两个结合位点, 说明 VT 与 MBP 间互

作关系较强, 且温度升高有利于二者的结合<sup>[24]</sup>。

2.2.3 结合方式 表 4 是由公式 (2)~(4) 计算得出的 VT 与 MBP 相互作用的  $\Delta H$ 、 $\Delta G$  及  $\Delta S$  值。蛋白质与小分子物质的相互作用力可以通过焓变与熵变来判断<sup>[25]</sup>。当  $\Delta S > 0$  时, 为疏水和静电作用力; 当  $\Delta S < 0$  时, 蛋白质与小分子物质之间的相互作用力为氢键和范德华力; 当  $\Delta H > 0$  且  $\Delta S > 0$  时, 以疏水力为主; 当  $\Delta H < 0$  且  $\Delta S < 0$  时, 作用力以氢键和范德华力为主;  $\Delta H \approx 0$  且  $\Delta S > 0$  时, 作用力为静电力;  $\Delta H < 0$  时, 静电作用为主要作用力<sup>[24]</sup>。由表 4 热力学参数值可知, VT-MBP 互作物的  $\Delta G$  小于 0, 说明 VT 与 MBP 作用力为疏水作用力, 结合方式以疏水作用为主。

2.3 不同温度下 MBP 和 VT-MBP 互作物的 SDS-PAGE 电泳分析

如图 3 所示, VT-MBP 与 MBP 对照组主要有 6 个亚基条带, 分子质量分别为 98.7, 61.5, 50.1, 32.1, 25.6 ku 和 19.5 ku。VT-MBP 处理组样品

表 2 不同温度下 VT 与 MBP 相互作用的猝灭速率常数 ( $K_q$ ) 和猝灭常数 ( $K_{sv}$ )Table 2 Quenching rate constants ( $K_q$ ) and quenching content ( $K_{sv}$ ) of the interaction between VT and MBP at different temperatures

样品	温度/°C	$K_q / 10^{12} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	$K_{sv} / 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$	$R^2$
VT-MBP	25	$2.60 \pm 0.05$	$2.6 \pm 0.04$	0.99
	80	$2.30 \pm 0.03$	$2.3 \pm 0.03$	0.99
	90	$2.20 \pm 0.04$	$2.2 \pm 0.02$	0.99
	100	$2.10 \pm 0.02$	$2.1 \pm 0.04$	0.99

表 3 MBP 与 VT-MBP 的荧光猝灭常数、结合位点数及表观结合常数

Table 3 Fluorescence quenching constant, number of binding sites and apparent binding constant of MBP and VT-MBP

样品	温度/°C	$K_s / 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$	$n$	$R^2$
VT-MBP	25	$148.17 \pm 4.60$	1.68	0.93
	80	$15.10 \pm 1.10$	1.71	0.95
	90	$7.10 \pm 0.32$	2.05	0.97
	100	$4.70 \pm 0.31$	2.14	0.95

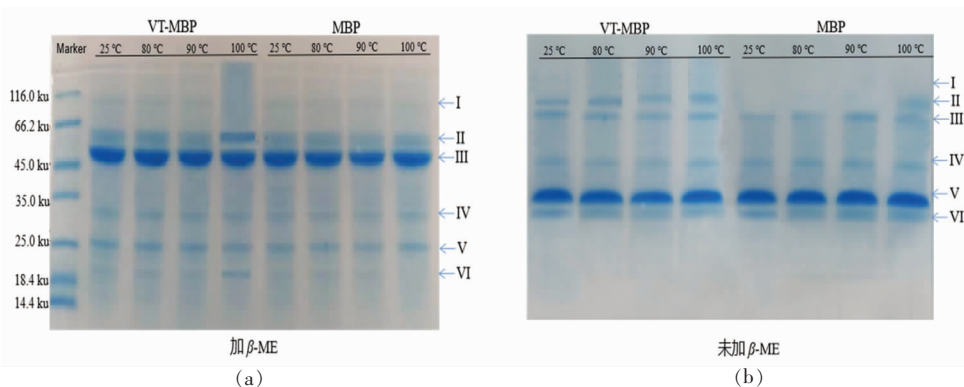
表 4 热力学参数

Table 4 Thermodynamic parameter value

样品	温度/K	$\Delta G / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	$\Delta H / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	$\Delta S / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$
VT-MBP	353	-7.90	258.90	0.76
	363	-5.70	80.80	0.24
	373	-4.70	6.60	0.03

(80,90,100 °C) 在未添加  $\beta$ -ME 凝胶的上部出现大分子条带,尤其是条带 II 在 MBP(25~90 °C) 对照组中完全消失,说明 VT 存在的条件下可介导 MBP 发生分子交联,形成较大分子的蛋白聚合物,且在高温条件使这种交联加剧。在添加  $\beta$ -ME 凝胶组中,大部分条带均被还原,这些结果与前面红外光谱检测的结构变化是一致的,即 VT 的加入引起绿豆蛋白结构的展开,暴露较多的 SH 基团,

发生 S-S 的二硫键交联。此外,添加 VT 在 100 °C 时出现大分子条带,而对应的 MBP 对照组没有出现这个条带,说明 VT 介导产生了二硫键以外的分子交联,可能是二聚酪氨酸或活性羰基-氨基共价交联<sup>[14]</sup>。因此,VT 存在的情况下,加热温度控制在 90 °C 内,不会产生过多的大分子聚集,而当温度 100 °C 时则会产生较多的非二硫键交联。



注:I~VI:不同温度下 VT 与 MBP 交互产物的亚基条带。

图 3 不同温度下 MBP 和 VT-MBP 交互物的 SDS-PAGE 电泳图

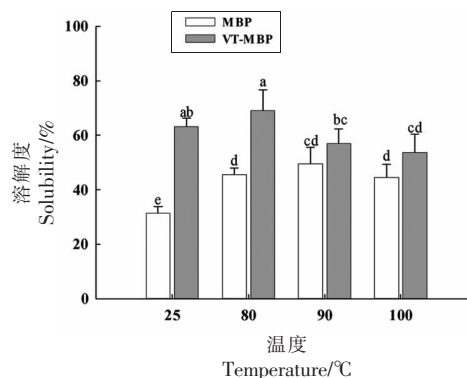
Fig.3 SDS-PAGE electropherograms of MBP and VT-MBP at different temperatures

## 2.4 不同温度下 MBP 和 VT-MBP 交互物的溶解性分析

图 4 反映不同温度下 MBP 和 VT-MBP 复合物的溶解性,其总体呈增加的趋势,且 VT-MBP 的溶解度均高于 MBP 对照组,这说明 VT 与 MBP 的相互作用使 MBP 结构得到展开(红外检测结果),让更多的亲水基团暴露,使溶解度提高。其中,MBP 组在 90 °C 前溶解度逐渐上升,这与 Gotham 等<sup>[23]</sup>研究蛋白聚合物的溶解性一致。这可能是由于 MBP 结构的变化暴露了蛋白质内部的极性基团和肽键,从而增强了蛋白质与水的相互作用,提高了溶解性,然而,温度继续升高会破坏蛋白质上的亲水基团,使其溶解度降低<sup>[26]</sup>。VT-MBP 在温度上升至 80 °C 后溶解度开始下降,这与 Martin 等<sup>[27]</sup>研究温度对油菜籽蛋白溶解性的影响结果一致,其原因是高温会导致 VT-MBP 分子的带电状况改变,从而导致蛋白聚集,使其溶解度降低。

## 2.5 不同温度下 MBP 和 VT-MBP 交互物的乳化性和乳化稳定性的分析

乳化性是蛋白质在油-水界面上吸附形成乳



注:不同小写字母表示不同温度条件下不同处理组间存在显著差异( $P<0.05$ )。

图 4 不同温度下 MBP 和 VT-MBP 交互物的溶解度

Fig.4 The solubility of MBP and VT-MBP at different temperatures

液的能力,而乳化稳定性是指乳液在一定时间内保持其相应结构的能力。由图 5 可知,VT-MBP 及 MBP 的乳化性和乳化稳定性均随温度的变化而变化。这与 Zhang 等<sup>[28]</sup>研究热处理对大豆肽理化性质的影响结果一致。其原因可能是 VT-MBP 体系在加热的情况下吸收热量,使分子内能增加,分子

构型扩大,功能基团暴露,增加了氨基酸的暴露程度,使双电层增厚,乳液带电斥力大,导致乳化性增强<sup>[29]</sup>。然而,在高温处理条件下,VT 会发生氧化裂解,绿豆蛋白的二级结构发生改变,VT 与 MBP 之间形成不可逆的化学键,减少氢键和疏水作用,导致乳化和乳化稳定性均逐渐降低<sup>[26]</sup>。

如图 5 所示,温度为 90 °C 时 VT-MBP 的乳化性最好,为 15.6 m<sup>2</sup>/g。与 MBP 对照组相比,各温度组中 VT-MBP 的乳化性均有显著提高 ( $P<0.05$ ),且乳化稳定性也均优于 MBP 组。这与 Yan 等<sup>[30]</sup>研究酚类化合物与蛋白质相互作用的结果相同。这可能是由于 VT-MBP 互作物提供了更多的羧基,使蛋白质的乳化性得以改善,也可能是因为表面疏水性和溶解性可以相互或单独影响乳化性能,疏水性越大越能增强蛋白质在油水界面的吸附能力。因此,VT 能够显著改善 MBP 的乳化性和乳化稳定性。

## 2.6 不同温度下 MBP 和 VT-MBP 互作物的起

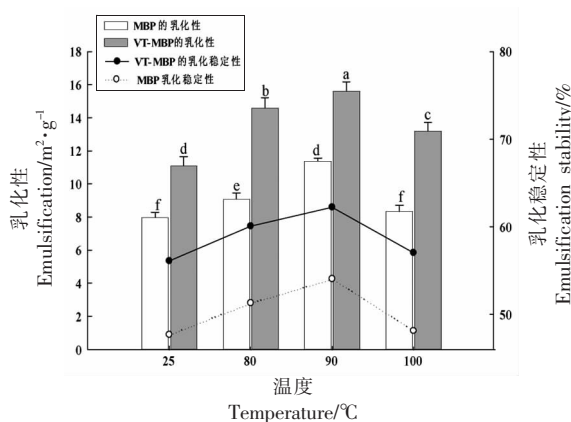


图 5 不同温度下 MBP 和 VT-MBP 互作物的乳化性和乳化稳定性

Fig.5 The emulsification and emulsification stability of MBP and VT-MBP at different temperatures

## 2.7 不同温度下 MBP 和 VT-MBP 互作物的抗氧化能力分析

如图 7a~7d 所示,VT-MBP 各组蛋白质的抗氧化能力均显著 ( $P<0.05$ ) 高于 MBP 对照组,且随着温度的升高,抗氧化能力逐渐降低。当温度 25 °C 时,VT-MBP 的各项抗氧化能力均最强,此结果与罗磊等<sup>[6]</sup>研究绿豆皮中黄酮抗氧化性的结果一致。这可能是由于高温破坏了 VT-MBP 上具有抗氧化

## 泡性和起泡稳定性的分析

蛋白质的起泡性由分子柔性决定,而泡沫稳定性与所形成黏膜的刚性和弹性有关<sup>[17]</sup>。如图 6 所示,VT-MBP 及 MBP 的起泡性和起泡稳定性均随温度的增加而增加。当温度高于 90 °C,呈下降的趋势。各组 VT-MBP 互作物的起泡性及起泡稳定性都显著高于 MBP 对照组 ( $P<0.05$ ),且在温度 90 °C 时,VT-MBP 的起泡性达到最高值,这与 Zhang 等<sup>[28]</sup>研究热处理对大豆肽理化性质的影响结果一致。这可能与蛋白质分子中平均疏水性基团的比例和蛋白质的发泡能力有关。蛋白质分子的疏水相互作用力在温度升高后逐渐增大,VT 提供的羟基和疏水基共同作用使蛋白质分子构型扩大,更有利于发泡<sup>[17]</sup>。温度过高会导致蛋白结构进一步被破坏,使其柔韧性降低,同时分子间的疏水作用发生改变,体系的黏度下降,从而使起泡特性降低,泡沫稳定性变差。

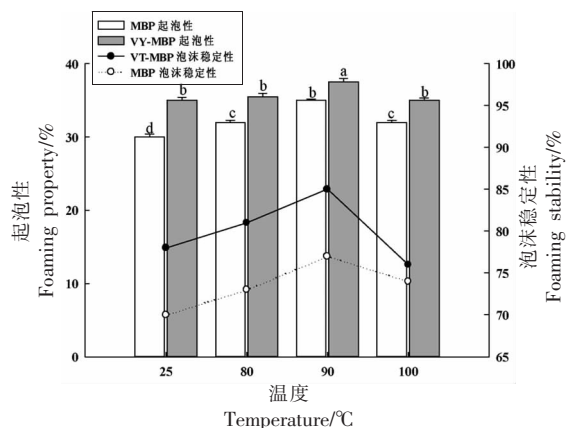


图 6 不同温度下 MBP 和 VT-MBP 互作物的起泡性和起泡稳定性

Fig.6 Foaming property and foaming stability of MBP and VT-MBP at different temperatures

能力的官能团,尤其是 VT 上的酚羟基受高温影响而丧失抗氧化活性。当温度超过一定限值后,复合物分子被破坏,生成不可逆的化学键,使抗氧化能力降低。各组温度下,VT-MBP 的抗氧化能力均高于 MBP 对照组,说明尽管高温破坏了 VT-MBP 互作物的某些具有抗氧化活性的官能团,VT-MBP 还能够保持一定的抗氧化能力。



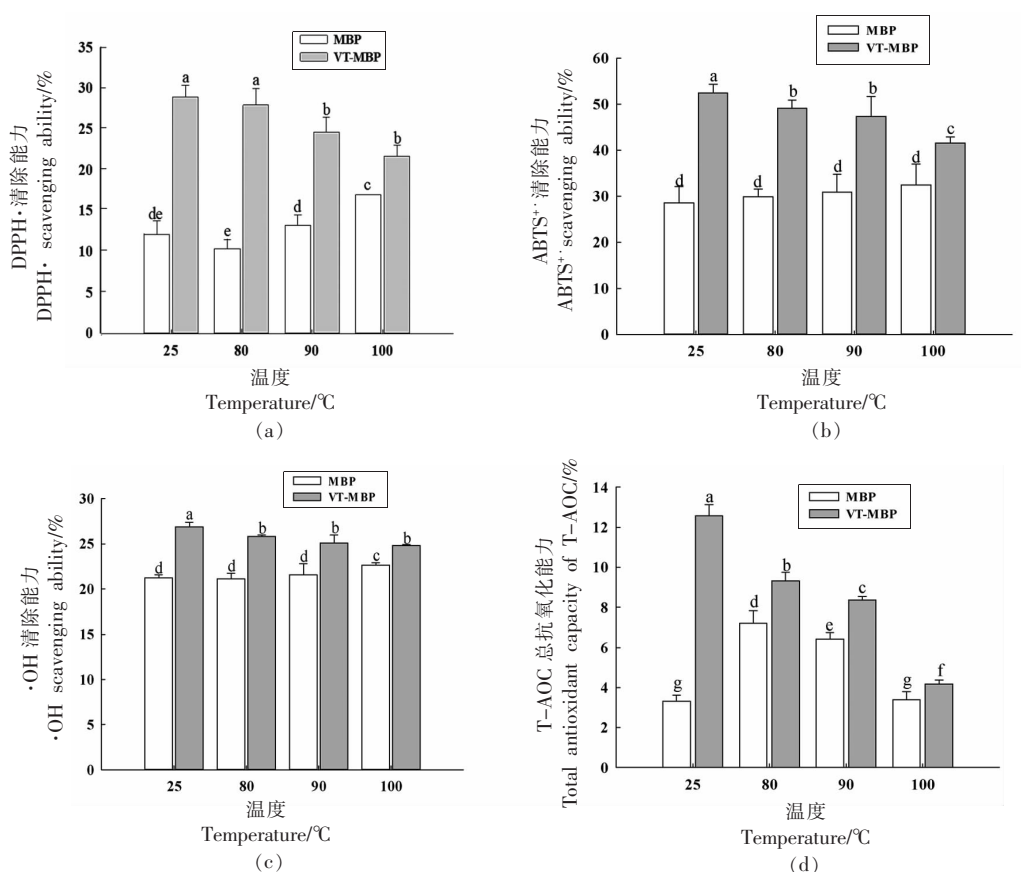


图7 不同温度下 MBP 和 VT-MBP 互作物的抗氧化能力分析

Fig.7 Analysis of antioxidant ability of MBP and VT-MBP at different temperatures

## 2.8 不同温度下 MBP 和 VT-MBP 互作物的微观结构分析

用扫描电镜观察蛋白质的微观结构变化。由图 8 可知, 在 25, 80 °C 和 90 °C 时, MBP 样品颗粒明显大于 VT-MBP 处理组样品, VT-MBP 互作物微观结构较细小, 表面呈纤维状、松散, 易于在水中溶解和分散, 而对照组 MBP 样品颗粒微观结构

较大, 且表面光滑、坚实, 不易于溶解, 且 90 °C 时, VT-MBP 互作物颗粒形成的最小, 这与前面所测的溶解性、乳化性功能特性的研究结果一致。当加热温度为 100 °C 时, 两组样品颗粒的微观结构均较大, 差异不明显, 说明高温导致绿豆蛋白分子发生较强烈的聚集, 形成难于溶解的大颗粒。

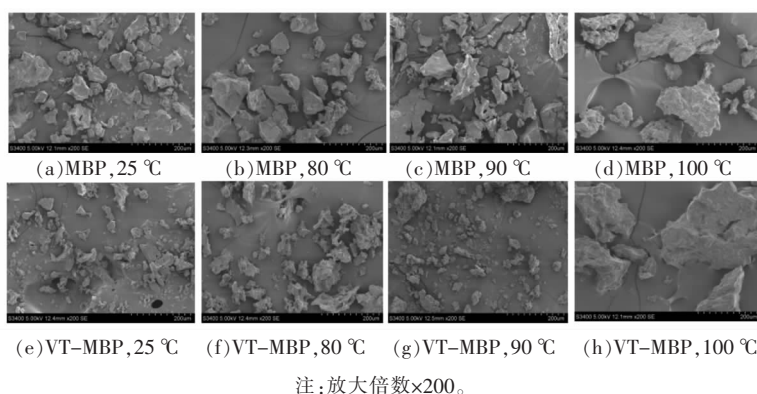


图8 不同温度下 MBP 和 VT-MBP 互作物的微观结构

Fig.8 The microstructure of MBP and VT-MBP at different temperatures



### 3 结论

采用红外光谱、荧光光谱、扫描电子显微镜和电泳等技术探讨牡荆素和绿豆蛋白在不同加热温度条件下的相互作用,及其引起的结构和功能性变。研究表明:1)随着温度的升高,MBP及VT-MBP互作物的分子结构均发生改变, $\alpha$ -螺旋和 $\beta$ -折叠含量均减少,同时,加热促进VT与MBP发生分子间的聚集和交联,且在温度90℃时这些变化最大;此外,VT与MBP的互作机制为静态猝灭,且二者的结合力主要是非共价键的疏水相互作用。2)对VT-MBP互作物功能性的研究表明,加热温度90℃时,互作物比MBP具有更好的乳化性、起泡性、泡沫稳定性和抗氧化性。加热温度是热处理中保证食品品质的重要因素。

本研究结果可为绿豆蛋白饮料热加工中多酚对饮料品质的影响提供理论依据。未来将研究多酚含量对饮料中绿豆蛋白构效关系的影响。

### 参 考 文 献

- [1] XIE J H, DU M X, SHEN M Y, et al. Physico-chemical properties, antioxidant activities and angiotensin-I converting enzyme inhibitory of protein hydrolysates from Mung bean (*Vigna radiate*) [J]. Food Chemistry, 2019, 270(1): 243-250.
- [2] 杨应笑, 任发政. 清热绿豆饮料配方的优化及功能验证[J]. 食品科学, 2006, 27(4): 230-232.  
YANG Y X, REN F Z. Optimization and functional verification of heat-clearing mung bean beverage formula [J]. Food Science, 2006, 27(4): 230-232.
- [3] LIU C Y, MA X M, CHE S, et al. The effect of hydrolysis with neutrase on molecular weight, functional properties, and antioxidant activities of Alaska pollock protein isolate [J]. Journal of Ocean University of China, 2018, 17(6): 1423-1431.
- [4] 葛驰宇, 张君丽, 董书池. 绿豆多肽化橘红复合解酒饮料的制备及其体外解酒作用[J]. 食品工业科技, 2019, 40(8): 151-157.  
GE C Y, ZHANG J L, DONG S C. Preparation of mung bean polypeptide-based orange-red compound hangover drink and its *in vitro* hangover effect [J]. Food Industry Science and Technology, 2019, 40(8): 151-157.
- [5] HOU M Y, HU W Z, XIU Z L, et al. Preparative purification of total flavonoids from *Sophora tonkinensis* Gagnep. by macroporous resin column chromatography and comparative analysis of flavonoid profiles by HPLC-PAD [J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2019, 24(17): 3200.
- [6] 罗磊, 姬青华. 绿豆皮黄酮的提取纯化及其抗氧化研究[J]. 中国粮油学报, 2017, 32(9): 109-115.  
LUO L, JI Q H. Extraction, purification and antioxidant study of flavonoids from mung bean peel [J]. Chinese Journal of Cereals and Oils, 2017, 32(9): 109-115.
- [7] SASTRY M C S, RAO M S N. Binding of chlorogenic acid by the isolated polyphenol-free 11s protein of sunflower (*Helianthus annuus*) seed [J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1990, 38(12): 2103-2110.
- [8] ZHONG Z F, XIONG Y L. Thermosonication-induced structural changes and solution properties of mung bean protein [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2020, 62: 104908.
- [9] 乔宁, 张坤生, 任云霞. 绿豆分离蛋白提取工艺的研究[J]. 农产品加工(学刊), 2013(17): 32-35, 39.  
QIAO N, ZHANG K S, REN Y X. Research on the extraction process of mung bean protein isolate [J]. Agricultural Products Processing (Journal), 2013(17): 32-35, 39.
- [10] 王启明, 唐瑜婉, 杨雅轩, 等. pH值对麦醇溶蛋白-槲皮素相互作用及其Pickering乳液特性的影响[J]. 食品科学, 2020, 41(20): 27-34.  
WANG Q M, TANG Y W, YANG Y X, et al. Effect of pH value on the interaction of gliadin-quercetin and its Pickering emulsion properties [J]. Food Science, 2020, 41(20): 27-34.
- [11] 杨君, 王涛, 黄建, 等. HPLC法测定绿豆中牡荆素的含量[J]. 实用药物与临床, 2019, 22(11): 1175-1177.  
YANG J, WANG T, HUANG J, et al. Determination of vitexin in mung bean by HPLC [J]. Practical Medicine and Clinical, 2019, 22(11): 1175-1177.
- [12] ZHAO J, CUI J K, CHEN R X, et al. Real-time *in-situ* quantification of protein secondary structures in aqueous solution based on ATR-FTIR subtraction spectrum [J]. Biochemical Engineering Journal, 2021, 176: 108225.

- [13] 赵思明, 江连洲, 王冬梅, 等. EGCG 对大豆蛋白结构的调控机理[J]. 食品科学, 2021, 42(12): 67-75.  
ZHAO S M, JIANG L Z, WANG D M, et al. The regulation mechanism of EGCG on soybean protein structure[J]. Food Science, 2021, 42(12): 67-75.
- [14] 曹云刚. 植物多酚对肉蛋白氧化稳定性和功能特性的影响机理及应用[D]. 无锡: 江南大学, 2016.  
CAO Y G. Influence mechanism and application of plant polyphenols on oxidative stability and functional properties of meat protein[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2016.
- [15] LIU D Y, ZHANG L L, WANG Y C, et al. Effect of high hydrostatic pressure on solubility and conformation changes of soybean protein isolate glycosylated with flaxseed gum[J]. Food Chemistry, 2020, 333(15): 127530.
- [16] 张舒, 盛亚男, 冯玉超, 等. 焙烤对绿豆蛋白结构和功能性质的影响[J]. 食品工业科技, 2021, 42(4): 44-49.  
ZHANG S, SHENG Y N, FENG Y C, et al. Effects of roasting on the structure and functional properties of mung bean protein[J]. Food Industry Science and Technology, 2021, 42(4): 44-49.
- [17] 覃思, 吴卫国, 刘焱, 等. 茶多酚及其单体和加工环境对蛋清蛋白起泡性能影响的研究[J]. 食品科学, 2009, 30(1): 90-94.  
QIN S, WU W G, LIU Y, et al. Study on the effects of tea polyphenols and their monomers and processing environment on the foaming performance of egg white protein[J]. Food Science, 2009, 30(1): 90-94.
- [18] 陈青青, 李柯, 唐晓清, 等. 华东覆盆子果、茎与叶的酚类成分及抗氧化活性分析[J]. 食品科学, 2020, 41(24): 209-215.  
CHEN Q Q, LI K, TANG X Q, et al. Analysis of phenolic constituents and antioxidant activity of raspberry fruit, stems and leaves in East China[J]. Food Science, 2020, 41(24): 209-215.
- [19] LOU Z X, CHEN J, YU F H, et al. The antioxidant, antibacterial, antibiofilm activity of essential oil from *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* and its nanoemulsion[J]. LWT-Food Science and Technology, 2017, 80: 371-377.
- [20] 王丽颖. 多酚与麦醇溶蛋白复合物的形成机制及结构表征[D]. 重庆: 西南大学, 2018.  
WANG L Y. Formation mechanism and structural characterization of polyphenols and gliadin complexes [D]. Chongqing: Southwest University, 2018.
- [21] JIANG J, ZHANG Z P, ZHAO J, et al. The effect of non-covalent interaction of chlorogenic acid with whey protein and casein on physicochemical and radical-scavenging activity of *in vitro* protein digests [J]. Food Chemistry, 2018, 268: 334-341.
- [22] RENARD D, LEREBVRE J, GRIFFIN M C, et al. Effects of pH and salt environment on the association of  $\beta$ -lactoglobulin revealed by intrinsic fluorescence studies[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 1998, 147(2/3): 41-49.
- [23] GOTHAM S M, FRYER P J, PRITCHARD A M.  $\beta$ -Lactoglobulin denaturation and aggregation reactions and fouling deposit formation: A DSC study[J]. International Journal of Food Science and Technology, 1992, 27(3): 313-327.
- [24] 郭兴凤, 石晶, 薛园园, 等. 茶多酚对大豆蛋白溶解性影响[J]. 粮食与油脂, 2010(3): 18-20.  
GUO X F, SHI J, XUE Y Y, et al. Effects of tea polyphenols on the solubility of soybean protein[J]. Food and Oil, 2010(3): 18-20.
- [25] 陈小睿, 徐沉思, 王平, 等. 荧光猝灭法研究大黄酚与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2011(6): 999-1004.  
CHEN X R, XU C S, WANG P, et al. Fluorescence quenching method to study the interaction between chrysophanol and bovine serum albumin[J]. World Science and Technology: Modernization of Traditional Chinese Medicine, 2011(6): 999-1004.
- [26] 张娜宁, 丁晓倩, 申姣姣, 等. 温度和 pH 值对茶多酚-紫米蛋白体系功能特性的影响[J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2020, 40(6): 108-113.  
ZHANG N N, DING X Q, SHEN J J, et al. Effects of temperature and pH value on the functional properties of tea polyphenols-purple rice protein system[J]. Journal of Shanxi Agricultural University (Natural Science Edition), 2020, 40(6): 108-113.
- [27] MARTIN A, NAUMANN S, OSEN R, et al. Extrusion processing of rapeseed press cake-starch blends: Effect of starch type and treatment temperature on protein, fiber and starch solubility[J]. Foods (Basel, Switzerland), 2021, 10(6): 1160-1163.
- [28] ZHANG Y Z, XIONG W F, LEI L L, et al. Influence of heat treatment on structure, interfacial rhe-

- ology and emulsifying properties of peanut protein isolate[J]. *Czech Journal of Food Sciences*, 2019, 37(3): 212–220.
- [29] JIANG Y, MOHAMED A, IPEK G. Peanut protein concentrate: Production and functional properties as affected by processing [J]. *Food Chemistry*, 2007, 103(1): 121–129.
- [30] YAN X, LIANG S, PENG T, et al. Influence of phenolic compounds on physicochemical and functional properties of protein isolate from *Cinnamomum camphora* seed kernel[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 102(5): 105612.

### Effect of Heating Temperature on the Structural and Functional Characteristics of Vitexin–Mung Bean Protein

Diao Jingjing<sup>1,2</sup>, Tao Yang<sup>3</sup>, Guo Hui<sup>3</sup>, Chen Hongsheng<sup>3\*</sup>, Wang Changyuan<sup>3</sup>, Zhang Dongjie<sup>3</sup>, Zhu Yongsheng<sup>4</sup>  
(<sup>1</sup>Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing Center of Inspection and Testing for Agricultural Products, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Daqing 163319, Heilongjiang

<sup>2</sup>National Coarse Cereals Engineering Research Center, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, Heilongjiang

<sup>3</sup>College of Food Science, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, Heilongjiang  
<sup>4</sup>Heilongjiang Joyoung Bean Industry Co. Ltd., Daqing 163319, Heilongjiang)

**Abstract** In order to investigate the structural and functional changes of the complex formed by the interaction of vitexin and mung bean protein (VT–MBP) at different temperatures during mung bean food processing. The effects of heating temperature on the macromolecular structure of vitexin–mungbean protein complexes (VT–MBP) was investigated by Fourier infrared spectroscopy, scanning electron microscopy, fluorescence spectroscopy, and SDS–PAGE. The changes on the functional properties such as solubility, emulsification, foaming, and antioxidant properties of VT–MBP were analyzed under different temperatures. The results showed that: Heating temperature changed the molecular structure of VT–MBP, and the content of  $\alpha$ -helix and  $\beta$ -sheet in the secondary structure of VT–MBP decreased with the increase of temperature. Fluorescence spectroscopic results revealed that the interaction mechanism of VT and MBP was static quenching and binding through non-covalent hydrophobic interaction. In addition, VT–MBP had good emulsification, foaming and foam stability when the heating temperature was 90 °C. Conclusion: The heating temperature has a significant impact on the structure and functionality of VT–MBP. The present results provide a theoretical basis for determining the optimal processing temperature of mung bean food and developing functional mung bean protein beverages.

**Keywords** mung bean protein; vitexin; heating temperature; structure; functional properties