

黑豆 β -伴大豆球蛋白和大豆球蛋白与矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷相互作用的光谱特征及分子对接研究

刘金杰, 马梦瑶, 谢岩黎*, 杨玉辉, 孙淑敏, 马卫宾, 李倩

(河南工业大学 粮油食品学院/河南省粮油食品安全检验与控制重点实验室, 河南 郑州 450001)

摘要: 矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷 (C3G) 在不同 pH 值环境中的主要存在形式不同, 其抗氧化能力也有所差异。黑豆蛋白作为一种常见的膳食蛋白, 具有作为不稳定生物活性化合物载体的潜力, 了解黑豆蛋白与 C3G 的相互作用机制有利于它们在食品体系中的应用。通过多种光谱学分析和分子对接实验研究了在 pH 值为 2.0、5.0 和 7.0 条件下黑豆 β -伴大豆球蛋白 (7S) 和大豆球蛋白 (11S) 与 C3G 的相互作用及其对 C3G 氧化稳定性和抗氧化能力的影响。研究表明, 在 pH 值为 2.0 和 5.0 条件下, C3G 与 7S 和 11S 结合不仅导致 Tyr 残基周围的疏水环境减少, 极性增加, 而且使 7S 和 11S 中 α -螺旋增加, β -折叠比例下降。在 pH 值为 7.0 条件下, C3G 的存在使 7S 和 11S 中 α -螺旋和 β -折叠的百分比呈增加趋势, 但 β -转角比例降低。此外, C3G 与 7S 和 11S 结合是一个放热过程, 在不同 pH 值条件下, C3G 与 7S 和 11S 主要通过氢键和范德华力相互作用使 7S 和 11S 静态荧光猝灭。7S 和 11S 均在 pH 值为 7.0 条件下对 C3G 亲和力最强。分子对接结果表明, 7S 上的 GLU229、ARG356 和 PRO101 残基, 11S 上的 ARG161、VAL162、ILE171 和 THR176 残基在与 C3G 结合中起关键作用。在不同 pH 值条件下, 7S、11S 与 C3G 结合后均显著增强了 C3G 的氧化稳定性和抗氧化能力。

关键词: 矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷; β -伴大豆球蛋白; 大豆球蛋白; 相互作用; 分子模拟
中图分类号: TS214.2

Interaction of β -conglycinin and glycinin with cyanidin-3-*O*-glucoside: spectroscopic characteristics and molecular docking study

LIU Jinjie, MA Mengyao, XIE Yanli*, YANG Yuhui, SUN Shumin, MA Weibin, LI Qian

(School of Food Science and Technology /Henan Key Laboratory of Cereal and Oil Food Safety Inspection and Control, Henan University of Technology, Zhengzhou Henan, 450001, China;)

Abstract: Cyanidin-3-*O*-glucoside (C3G) exists in different forms in various pH environments, leading to differences in its antioxidant capacity. Black bean protein, a common dietary protein, has the potential to serve as a carrier for unstable bioactive compounds. Understanding the interaction mechanism between black bean protein and C3G is beneficial for their application in food systems. Interactions between β -conglycinin (7S) and glycinin (11S) soybean proteins with C3G and their effects on the oxidative stability and antioxidant capacity of C3G at pH 2.0, 5.0, and 7.0 were investigated using various spectroscopic analyses and molecular docking experiments. The results showed that binding of C3G with 7S and 11S at pH 2.0 and 5.0 not only reduced the hydrophobic environment around Tyr residues but also increased their polarity, while α -helical content increased and β -sheet content decreased in both 7S and 11S. Under pH 7.0 condition, the presence of C3G led to an increase in both α -helical and β -sheet content in 7S and 11S except for β -turns. Furthermore, the binding of C3G with 7S and 11S was an exothermic process, and at different pH conditions, hydrogen bonding and van der Waals forces were the main driving forces for the interaction between C3G and 7S/11S, resulting in static fluorescence quenching of 7S and 11S. Both 7S and

收稿日期: 2024-08-15

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 31972003); 河南省高校科技创新团队项目 (No. 20IRTSTHN023)。

Foundation: the National Natural Science Foundation of China (No. 31972003); Innovative Research Team (in Science & Technology) at the University of Henan Province (No. 20IRTSTHN023)

第一作者: 刘金杰, 男, 硕士研究生, 研究方向为食品营养与安全。

*通信作者: 谢岩黎, 女, 教授, 博士, 主要从事食品营养与安全方面的研究。

11S exhibited the highest affinity for C3G at pH 7.0. Molecular docking revealed that GLU229, ARG356, and PRO101 residues on 7S, and ARG161, VAL162, ILE171, and THR176 residues on 11S played key roles in the binding with C3G. Moreover, the binding of 7S and 11S with C3G significantly enhanced the oxidative stability and antioxidant capacity of C3G at different pH conditions.

Keywords: cyanidin-3-O-glucoside; 7S globulin; 11S globulin; mechanism analysis; molecular simulation

矢车菊素-3-O-葡萄糖 (C3G) 是谷物中普遍存在的一种花青素, 具有较强的抗氧化、抗炎、抗菌等有益活性^[1]。然而, 由于 C3G 的稳定性易受到 pH 值、温度、氧、光、酶、糖和矿物质等多种环境因素的影响^[2], 限制了其在食品中的使用范围。近年来, 有研究表明花青素与蛋白质结合可以提高花青素的稳定性^[3-4]。Fu 等^[5]研究发现在酸性和中性条件下, 卵清蛋白均能不同程度地增强花青素的热稳定性。Attaribo 等^[6]研究发现 C3G 的加入降低了预热蚕蛹蛋白中 α -螺旋的含量, 增加了 β -折叠和 β -转角的数量。而添加质量分数为 0.1% 的多肽 (ϵ -聚赖氨酸) 也显著提高了花青素的颜色稳定性^[7]。

豆类是人类获取优质植物性蛋白质的重要资源。黑豆中的蛋白质被认为是完全蛋白质, 因为它含有 8 种必需氨基酸。黑豆的总氨基酸含量高达 36%, 其中有约 13% 是必需氨基酸。在黑豆的蛋白质中, 主要成分有 7S 和 11S 球蛋白, 它们分别约占黑豆总蛋白的 30% 和 40%^[8]。黑豆皮中富含花青素, C3G 含量约占总花青素含量的 98%^[9]。前期研究结果表明, 黑豆皮中的花青素可以通过与黑豆分离蛋白相互作用来增强其稳定性^[10]。然而, 关于不同 pH 值环境下黑豆表皮 C3G 与 7S 和 11S 相互作用的研究相对缺乏, 且大多数蛋白质和花青素相互作用的研究都是在中性环境中进行的, 这可能不能代表完整的食品加工条件。因此, 本研究以 C3G (黑豆外皮花青素) 和黑豆蛋白 (7S 和 11S) 为实验材料, 研究了 7S 和 11S 对 C3G 氧化稳定性的保护作用以及 7S 和 11S 与 C3G 的结合机制, 希望为理解不同 pH 值条件下花青素与黑豆蛋白的相互作用提供理论依据。

1. 材料与方法

1.1 实验材料

乌皮青仁黑豆, 产自黑龙江省双鸭山市, 购自上海亿升农产品有限公司。ABTS (纯度 98%)、DPPH (纯度 98%), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 其余试剂均为分析纯, 天津科米尔化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

GDA-20 型凯氏定氮仪, 山东格林凯瑞公司; UV-6100s 型紫外分光光度计, 上海美谱达公司; F-7100 型荧光光谱仪, 日本日立公司; ALPHA 型傅里叶变换红外光谱仪, 德国布鲁克公司。

1.3 实验方法

1.3.1 β -伴大豆球蛋白、大豆球蛋白和矢车菊素-3-O-葡萄糖苷的提取

β -伴大豆球蛋白 (7S) 和大豆球蛋白 (11S) 的分离提取参照 Wu 等^[11]的方法。首先, 将 40 g 脱脂黑豆粉与 600 mL 超纯水混合。然后添加 3.12g NaHSO₃ 和适量的 NaOH, 使混合溶液的 pH 值达到 8.65。室温下搅拌蛋白质溶液 2 h 后, 离心去除沉淀物并收集上清液。将上清液的 pH 值调整至 6.40, 并在 4℃、8000r/min 的条件下离心 20 min, 得到沉淀。将沉淀物在 pH 值为 7.0 的超纯水中室温搅拌 2 h 使其溶解, 然后在 4℃、10000 r/min 的条件下离心 30 min, 得到 11S 沉淀物。收集上清液后, 将其 pH 值调整至 5.5, 并添加少量 NaCl 使其浓度达到 0.25 mol/L。然后, 在室温下搅拌 20 min, 4℃、9000 r/min 的条件下离心 15 min。离心后, 用相同体积的超纯水稀释上清液并将其 pH 值调整至 4.80。在相同条件下, 继续离心 20 min, 收集到的沉淀为 7S 蛋白。将得到的 7S 和 11S 沉淀物溶解在 10 倍体积的超纯水中, 并将溶液的 pH 值调节至 7.20。使用分子质量为 7 kDa 的透析袋, 在 4℃ 的冰箱中透析溶液, 每 12 h 更换一次透析液。透析结束后, 将溶液冷冻干燥 36 h, 即可获得 7S 和 11S 蛋白粉。采用凯氏定氮法测定 7S 和 11S 的蛋白质质量分数分别为 97.4%±0.5% 和 95.6%±0.3%。

矢车菊素-3-O-葡萄糖苷 (C3G) 的提取参考文献^[9], 纯度为 97%。

1.3.2 7S、11S 和 C3G 复合溶液的配制

参考 Nagy 等^[12]的方法并稍加修改。7S、11S 粉末分散在 pH 值为 2.0、5.0 和 7.0 的磷酸盐缓冲液

(0.2 mol/L) 中, 室温下充分搅拌 2 h 使黑豆蛋白的最终质量浓度为 1.0 mg/mL, 在 4℃ 冰箱静置 12 h 使蛋白质彻底水化。C3G 样品同样分散在 pH 值为 2.0、5.0 和 7.0 的磷酸盐缓冲液 (0.2 mol/L) 中充分搅拌使其终质量浓度为 0.4 mg/mL。将配好的 7S、11S 溶液与 C3G 溶液混合, 在黑暗环境中搅拌 30 min (150 r/min), 得到 7S、11S 与 C3G 的复合溶液, 复合溶液现配现用。

1.3.3 紫外可见光谱测定

参考 Chen 等^[1]方法并稍加修改。稀释 1.3.2 节配制的蛋白质溶液和 C3G 溶液, 配制蛋白溶液质量浓度为 0.1 mg/mL, C3G 溶液质量浓度为 0、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05 mg/mL 的复合溶液, 使用紫外分光光度计在 200~400 nm 扫描 7S-C3G、11S-C3G 复合物的紫外光谱。

1.3.4 荧光光谱测定

采用荧光光谱仪测定黑豆球蛋白的荧光光谱。7S 和 11S 的狭缝宽度分别设置为 10 nm 和 5 nm, 在激发波长 280 nm 和发射波长 300~450 nm 采集光谱。进行相互作用和数据分析之前, 对荧光强度进行内滤和稀释效应的校正^[13]。同步荧光光谱波长为 200~400 nm, 以 $\Delta\lambda = 15$ nm 或 $\Delta\lambda = 60$ nm 的分辨率进行测量。7S-C3G 和 11S-C3G 复合物中蛋白质和 C3G 含量分别为 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 和 0~60 $\mu\text{mol/L}$ 。

1.3.5 红外光谱测定

红外光谱采用傅里叶变换红外光谱法。红外光谱波长为 4000~400 cm^{-1} , 分辨率为 32 cm^{-1} , 扫描 16 次。7S-C3G 和 11S-C3G 复合物中的蛋白质质量浓度为 0.1 mg/mL, C3G 质量浓度为 0.05 mg/mL, 蛋白质二级结构含量由积分面积计算得出。

1.3.6 分子对接研究

7S (PDB ID:3AUP) 和 11S (PDB ID:1OD5) 结构从蛋白质数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 下载, 使用 Discovery Studio 4.0 (Biovia, 美国) 中的 Clean 和 Prepare 模块对下载的晶体结构进行处理, 以完成加氢、去水、补全不完整残基等操作。C3G 的结构从 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载, 不同 pH 值条件下 C3G 的结构由欧洲分子生物学实验室的 ChEMBL 数据库 (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>) 构建得到。通过 DS4.0 将小分子的 2D 结构进行 Ligand Prepare 得到 3D 结构, 以便与晶体对接测试。

1.3.7 C3G 保留率的测定

通过测定 C3G 的含量, 考察了 C3G 在不同 pH 值条件 (pH=2.0、5.0、7.0) 下的氧化稳定性。实验通过向样品中加入不同浓度的 H_2O_2 , 混合搅拌 30min^[6]。7S-C3G 和 11S-C3G 复合物中蛋白质和 C3G 质量浓度分别为 0.3 mg/mL 和 0.05 mg/mL。用 0.2 mol/L 盐酸-氯化钾和 0.2 mol/L 乙酸-乙酸钠分别制备 pH 值为 1.0 和 4.5 的缓冲液, 然后将 0.4 mL 样品溶液与 3.2 mL 缓冲溶液混合, 在 510 nm 和 700 nm 处暗置 20 min 后测定吸光度, 用 pH 示差法测定 C3G 的含量。C3G 的保留率按式 (1) 计算^[14]。

$$C3G_{\text{保留率}} = \frac{(A_{\text{pH}1.0} - A_{\text{pH}4.5}) \times M \times DF \times 1000}{C \times \epsilon \times D} \times 100\% \quad (1)$$

式 (1) 中, $A_{\text{pH}1.0}$, pH 值为 1.0 时, 溶液 510nm 和 710nm 的吸光度差; $A_{\text{pH}4.5}$, pH 值为 4.5 时, 溶液 510nm 和 710nm 的吸光度差; M , C3G 的摩尔质量, 449.2 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$; DF , 稀释因子, 10; C , C3G 的质量浓度, 0.05mg/mL; ϵ , C3G 的吸收系数, 26900 $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; D , 光程, 1cm。

1.3.8 自由基清除率测定

1) ABTS⁺自由基。参考 Pellegrini 等^[5]的方法并稍加修改。将 7 mmol/L ABTS 原液与 2.45 mmol/L 过硫酸钾按体积比 1:1 混合放置黑暗环境中产生 ABTS⁺自由基, 然后将 0.3mL 样品溶液与 2.7mL 的 ABTS⁺溶液均匀混合后在黑暗环境中静置 20 min, 之后测定样品在 734 nm 处的吸光度。

2) DPPH 自由基。参考 Brand-Williams 等^[6]的方法并稍加修改。将 0.3 mL 样品溶液与 2.7 mL 的 80 $\mu\text{mol/L}$ 的 DPPH 溶液均匀混合后在黑暗环境中静置 30 min, 测定样品在 515 nm 处的吸光度。

ABTS⁺自由基和 DPPH 自由基清除率按式 (2) 计算。

$$\text{自由基清除率} = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\% \quad (2)$$

式(2)中, A_0 为 ABTS⁺、DPPH 空白对照的吸光度; A_1 为样品溶液的吸光度; A_2 为不含 ABTS⁺、DPPH 的样品溶液的吸光度。

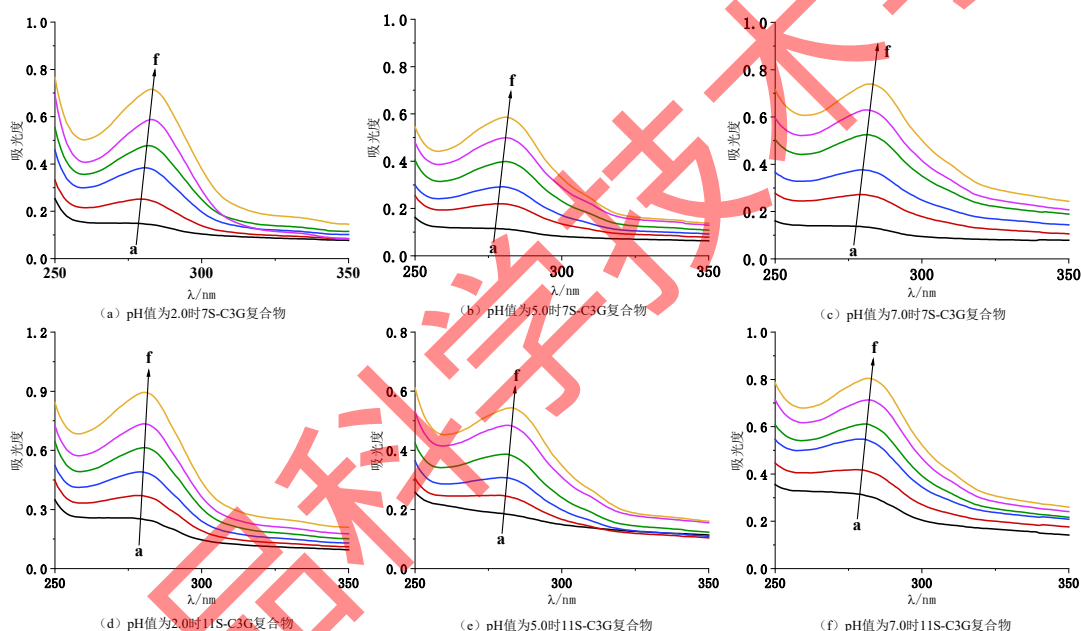
1.4 数据处理

所有实验均重复 3 次, 数据以平均值±标准偏差表示。 $P < 0.05$ 为差异显著。使用 Microsoft Office Excel 2003 对数据进行整理, IBM SPSS Statistics 19.0 对数据进行统计分析。

2. 结果与分析

2.1 紫外可见光谱分析

7S、11S 与 C3G 相互作用的紫外光谱如图 1。由图 1 可以看出, 7S 和 11S 在 280 nm 左右有一个较强的吸收峰, 主要来自色氨酸、酪氨酸和一些酚羟基的吸收^[17]。与 C3G 复合后, 7S 和 11S 的吸收强度都逐渐增加, 且随着 C3G 质量浓度的增加, 7S 和 11S 的紫外吸光度有规律的增加, 出现明显的吸光效应, 最大吸收波长略有偏移, 说明 C3G 改变了蛋白质氨基酸残基的微环境, 证实了 C3G 与 7S 和 11S 之间的相互作用。此外, 在不同 pH 值条件下, 7S 和 11S 在 280 nm 左右的吸收强度由高到低依次为 pH 值 2.0、pH 值 7.0、pH 值 5.0, 这可能是由于酸性条件下蛋白质变性, 暴露出更多的发光氨基酸残基, 增加了吸收强度; 而 pH 值 5.0 接近蛋白质的等电点, 导致蛋白质沉淀, 吸收强度降低, 这与 Yang 等^[18]的研究结果一致。



a-f 分别代表 C3G 质量浓度为 0、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05 mg/mL 时蛋白质的紫外光谱

图 1 不同 pH 值时 7S-C3G 和 11S-C3G 复合物的紫外光谱

Fig.1 UV-vis spectra of 7S-C3G and 11S-C3G complexes at different pH

2.2 荧光光谱分析

荧光光谱是研究蛋白质-小分子相互作用的一种简单、灵敏的方法。在 280 nm 激发波长下, 7S 和 11S 的荧光强度主要来源于酪氨酸 (Tyr)、色氨酸 (Trp) 和苯丙氨酸 (Phe) 残基^[17]。图 2 显示了加入 C3G 后 7S 和 11S 的荧光光谱。随着 C3G 浓度的增加, 7S 和 11S 的荧光强度都逐渐降低, 这可能与氨基酸残基的猝灭有关。在 pH 值为 2.0、5.0 和 7.0 时, 7S 蛋白的最大发射波长分别为 315、314、342 nm, 可以推测在酸性条件下, 7S 蛋白质的荧光主要来自于酪氨酸 (Tyr) 残基, 而在中性条件下, 主要来自于色氨酸 (Trp) 残基^[19]。相比之下, 酸碱条件对 11S 的最大发射波长似乎影响不大, 这与以往的研究一致^[20]。此外, 即使添加过量的 C3G (60 μmol/L), 7S、11S 只有部分荧光猝灭, 说明有一部分荧光基团是 C3G 无法接近的^[21]。荧光猝灭一般可分为静态猝灭、动态猝灭和动静结合猝灭 3 种。为了解猝灭机理, 采用 Stern-Volmer 方程[式(3)]对荧光数据进行分析^[22]。

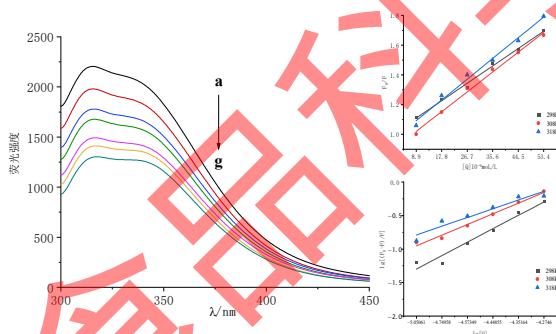
$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}[Q] = 1 + K_q\tau_0[Q] \quad (3)$$

式(3)中, F_0 为7S和11S的荧光强度; F 为7S-C3G和11S-C3G复合物的荧光强度; K_{sv} 为 F_0/F 的值和 $[Q]$ 的线性方程的斜率; $[Q]$ 为猝灭剂浓度; K_q 为双分子荧光猝灭速率常数; τ_0 是材料在没有猝灭剂的情况下的荧光平均寿命, 一般生物分子的荧光平均寿命为 1×10^{-8} s。

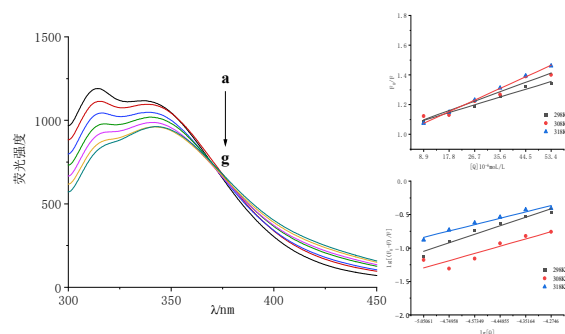
C3G 诱导的 7S 和 11S 荧光猝灭的 Stern-Volmer 曲线均呈线性, 见图 2 右图。7S-C3G/11S-C3G 体系在 pH 值为 2.0、5.0 和 7.0 时的猝灭常数 (K_{sv} 、 K_q 和 K_a) 和结合位点数 (n) 见表 1。C3G 对 7S 和 11S 的猝灭速率常数 K_q 在 $5.64 \times 10^{11} \sim 1.608 \times 10^{12}$, 说明所有反应都属于静态猝灭模式。在相同 pH 值条件下, 7S-C3G 和 11S-C3G 复合物的 K_{sv} 随温度升高而降低, 说明 C3G 与蛋白质之间能形成一定量的复合物。根据 2.1 节紫外光谱结果 (图 1), 波形没有变化, 但蛋白质构象发生了变化, 这说明猝灭是静态的。因为静态猝灭只影响猝灭分子的激发态, 对猝灭物质的吸收光谱没有影响^[23]。从这三个方面, 得出了 7S、11S 和 C3G 之间的猝灭机制为静态猝灭。静态猝灭中的结合常数 (K_a) 和结合位点 (n) 由式 (4) 计算^[24]。

$$\lg\left(\frac{F_0-F}{F}\right) = \lg K_a + n \lg[Q] \quad (4)$$

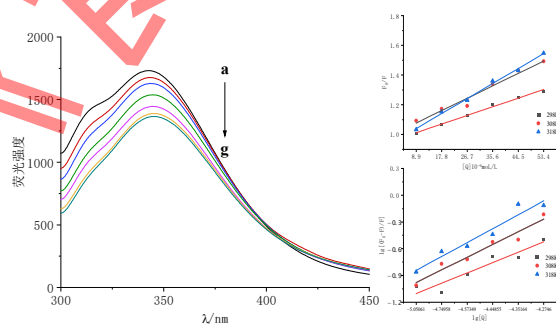
K_a 表示蛋白质与猝灭剂结合的亲和力, 而 K_{sv} 则是反映荧光基团对猝灭剂的敏感性。从表 1 的结果可以看出, 在 298K, 3 种 pH 值条件下的 K_a 由大到小依次为 11S-C3G (pH 7.0)、7S-C3G (pH 7.0)、7S-C3G (pH 2.0)、11S-C3G (pH 2.0)、7S-C3G (pH 5.0)、11S-C3G (pH 5.0), 说明 pH 值和蛋白质种类都影响蛋白质与 C3G 的相互作用。Yang 等^[25] 研究报道, 当 pH 值接近等电点时, 乳清蛋白对原花青素的亲和力增强。然而, 7S-C3G 在 pH 值为 2.0 时也具有较高的结合, 这可能是由于酸性条件使 7S 变性并暴露出更多的结合位点。同样 pH 值条件下, 7S-C3G 和 11S-C3G 的 K_a 值均随温度的升高而降低, 这表明 7S、11S 与 C3G 的相互作用是一个放热过程。此外, 7S、11S 和 C3G 在 3 种 pH 值条件下的结合位点都是 1 左右, 表明 7S、11S 和 C3G 倾向于形成 1:1 的复合物, 这与 Ma 等^[26] 的结果一致。



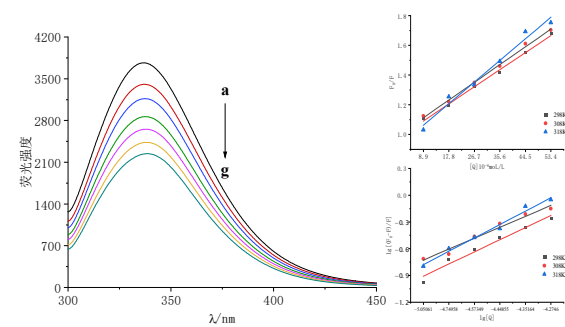
(a) pH 值为 2.0 时 7S-C3G 复合物



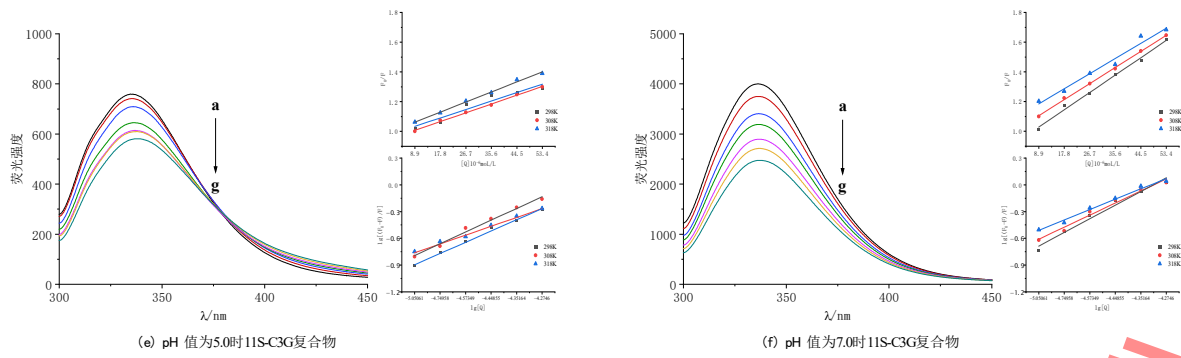
(b) pH 值为 5.0 时 7S-C3G 复合物



(c) pH 值为 7.0 时 7S-C3G 复合物



(d) pH 值为 2.0 时 11S-C3G 复合物



a~g 分别代表 C3G 浓度 0、10、20、30、40、50、60 μ M 时蛋白质的荧光光谱。

图 2 7S-C3G、11S-C3G 复合物的荧光光谱和淬灭机理分析

Fig.2 Fluorescence spectra and quenching mechanism analysis of 7S-C3G and 11S-C3G complexes

表 1 不同 pH 值时 7S-C3G 和 11S-C3G 复合物的淬灭常数和结合位点数

Tab.1 Quenching constants and number of binding sites for the 7S-C3G and 11S-C3G complexes at different pH

pH	T/ (K)	K_{sv} / ($\times 10^4 L \cdot mol^{-1}$)	K_q		R^2	K_a / ($\times 10^4$ $L \cdot mol^{-1}$)	n	R^2
			/	($\times 10^{12} L \cdot mol^{-1} \cdot S^{-1}$)				
7S-C3G	2.0	298	1.462 \pm 0.032	1.462 \pm 0.032	0.9994	1143 \pm 38.35	1.69	0.9825
		308	1.347 \pm 0.101	1.347 \pm 0.101	0.9995	10.28 \pm 2.053	1.20	0.9986
	5.0	318	1.059 \pm 0.013	1.059 \pm 0.013	0.9986	6.538 \pm 0.893	1.15	0.9791
		298	0.728 \pm 0.215	0.728 \pm 0.215	0.9998	12.12 \pm 1.382	1.31	0.9083
	7.0	308	0.675 \pm 0.043	0.675 \pm 0.043	0.9998	1.218 \pm 0.018	1.05	0.9902
		318	0.564 \pm 0.010	0.564 \pm 0.010	0.9994	0.736 \pm 0.052	1.01	0.9507
11S-C3G	2.0	298	1.255 \pm 0.120	1.255 \pm 0.120	0.9973	1342 \pm 56.99	1.49	0.9258
		308	0.794 \pm 0.205	0.794 \pm 0.205	0.9996	500.7 \pm 19.23	1.33	0.9351
	5.0	318	0.798 \pm 0.194	0.798 \pm 0.194	0.9999	5.789 \pm 0.326	1.19	0.9712
		298	1.357 \pm 0.039	1.357 \pm 0.039	0.9881	842.2 \pm 41.52	1.64	0.9756
	7.0	308	1.253 \pm 0.056	1.253 \pm 0.056	0.9991	82.13 \pm 9.397	1.42	0.9984
		318	1.142 \pm 0.093	1.142 \pm 0.093	0.9987	14.57 \pm 1.399	1.24	0.9977
	5.0	298	0.777 \pm 0.152	0.777 \pm 0.152	0.9995	3.643 \pm 0.038	1.18	0.9990
		308	0.594 \pm 0.017	0.594 \pm 0.017	0.9999	3.191 \pm 0.031	1.17	0.9921
	7.0	318	0.565 \pm 0.021	0.565 \pm 0.021	0.9998	0.070 \pm 0.013	0.77	0.8883
		298	1.068 \pm 0.146	1.068 \pm 0.146	0.9998	2750 \pm 103.9	1.36	0.9627
7.0	308	1.123 \pm 0.098	1.123 \pm 0.098	0.9979	364.0 \pm 18.77	1.27	0.9960	
	318	1.264 \pm 0.176	1.264 \pm 0.176	0.9985	3.179 \pm 0.152	1.07	0.9988	

2.3 热力学参数分析

复合物的热力学参数由范特霍夫方程[式 (5)、式 (6)]计算。

$$\Delta G = -RT \ln K_a \quad ; \quad (5)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad . \quad (6)$$

式 (5)、式 (6) 中, R 为气体常数 8.314 J/mol; T 为实验温度; ΔG 、 ΔH 、 ΔS 分别为吉布斯自由能变化、焓变、熵变。

ΔH 和 ΔS 的正负关系表征 3 种相互作用力：1) $\Delta H > 0$ 和 $\Delta S > 0$ ，为疏水相互作用；2) $\Delta H < 0$ 和 $\Delta S < 0$ ，范德华力和氢键；3) $\Delta H < 0$ ， $\Delta S > 0$ ，静电相互作用^[27]。7S-C3G、11S-C3G 复合物在 pH 值为 2.0、5.0、7.0 时的热力学参数见表 2。由表 2 可以看出，7S、11S 和 C3G 在 3 种 pH 条件下相互作用的 ΔG 为负，说明它们之间的相互作用为自发过程。在 pH 值为 5.0 时，7S、11S 与 C3G 主要通过静电相互作用形成 7S-C3G 和 11S-C3G 复合物，在 pH 值为 2.0 和 7.0 时，7S、11S 与 C3G 主要通过范德华力和氢键相互作用形成 7S-C3G 和 11S-C3G 复合物。

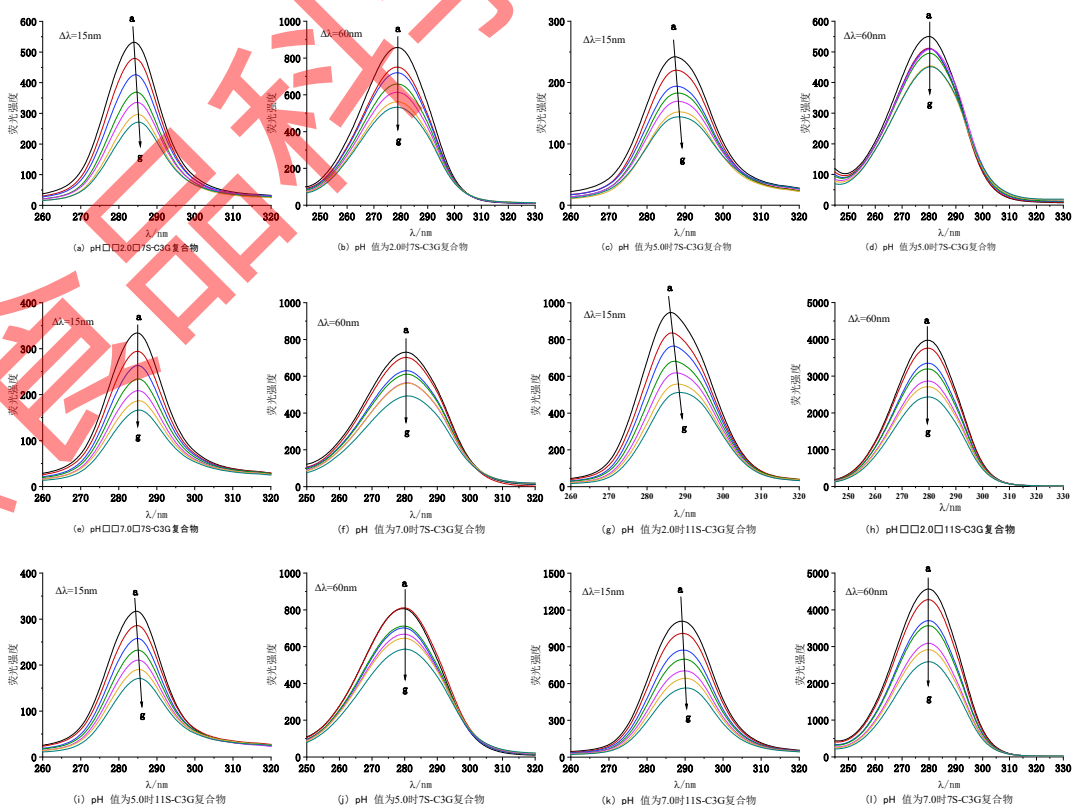
表 2 不同 pH 值时 7S-C3G、11S-C3G 复合物的热力学参数

Tab.2 Thermodynamic parameters of 7S-C3G and 11S-C3G complexes at different pH				
	pH	$\Delta G / (\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	$\Delta H / (\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	$\Delta S / (\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1})$
7S	2.0	-40.36±0.12 ^a	-52.24±1.30 ^a	-547.46±8.01 ^a
	5.0	-33.73±0.97 ^b	-20.77±0.67 ^c	42.09±3.33 ^c
	7.0	-29.05±0.58 ^c	-32.82±1.21 ^b	-206.31±7.15 ^b
11S	2.0	-25.76±1.64 ^c	-38.05±0.98 ^b	-418.59±0.91 ^c
	5.0	-27.21±0.60 ^b	-8.32±0.74 ^c	811.34±7.47 ^a
	7.0	-42.46±1.80 ^a	-62.56±2.3 ^a	-751.55±5.75 ^b

不同小写字母表示同种蛋白质不同 pH 值时数据差异显著 ($P < 0.05$)。

2.4 同步荧光光谱分析

同步荧光光谱可以通过测量 Tyr ($\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$) 或 Trp ($\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$) 残基的微环境信息来反映蛋白质结构的变化^[28]，见图 3。从图 3 可以看出，随着 C3G 浓度的增加，蛋白质的荧光强度变弱，说明 C3G 与蛋白质发生了相互作用。此外，当 pH 值从 2.0 增加到 7.0 时， $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ 处 7S 的最大发射波长从 284.0 nm 增加到 285.2 nm，11S 的最大发射波长从 286.2 nm 增加到 290.0 nm，而在 $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ 处 7S、11S 的发射波长似乎不受影响，说明 pH 值可以诱导蛋白质中 Tyr 残基的最大发射波长的变化。与 C3G 复合后， $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ 时的 7S-C3G (pH 2.0)、7S-C3G (pH 5.0)、11S-C3G (pH 2.0)、11S-C3G (pH 5.0)、11S-C3G (pH 7.0) 分别红移 1.3、1.2、2.4、0.8、1.0 nm，表明酸性条件下 C3G 与 7S 和 11S 之间复合物的形成导致 Tyr 残基周围的疏水环境减弱，而极性增加^[26]。



a-g 分别代表 C3G 浓度 0、10、20、30、40、50、60 μ M 时蛋白质的同步荧光光谱。

图3 不同 pH 值时 7S-C3G 和 11S-C3G 复合物的同步荧光光谱

Fig.3 Synchronous fluorescence spectra of 7S-C3G and 11S-C3G complexes at different pH

2.5 红外光谱分析

红外光谱可以通过酰胺 I 波段吸光度峰的变化来反映蛋白质的二级结构^[29]。7S 和 11S 含有 4 种二级结构 (α -螺旋结构、 β -折叠结构、 β -转角结构和无规则螺旋结构)，其中 α -螺旋结构含量较低。在 pH 值为 2.0、5.0 和 7.0 时 C3G 与 7S 和 11S 相互作用的二级结构含量见表 3。由表 3 数据可知，在相同的 pH 值变化下，7S 和 11S 二级结构的比例变化趋势几乎一致。此外，pH 值为 2.0 和 5.0 时，所有样品的 α -螺旋含量普遍低于 pH 值为 7.0 时的 α -螺旋含量，这可能是酸性环境会影响氢键的稳定性，从而导致 α -螺旋的损失^[30]。在 pH 值为 2.0 和 5.0 时，C3G 的存在导致 7S 和 11S 中 α -螺旋和无规则螺旋结构的增加，而 β -折叠比例下降，这与 Ren 等^[31]的结果一致。pH 值为 7.0 时，C3G 存在的 7S 和 11S 中 α -螺旋和 β -折叠的含量呈增加趋势，但 β -转角相反^[17]。结果表明，不同 pH 值条件下，C3G 的存在均引起了 7S、11S 二级结构比例的变化。

表3 在不同 pH 值时 C3G 与 7S 和 11S 相互作用的二级结构

Tab.3 Secondary structure of C3G interaction with 7S and 11S at different pH

	α -螺旋			β -折叠			β -转角			无规则卷曲		
	pH2.0	pH5.0	pH7.0	pH2.0	pH5.0	pH7.0	pH2.0	pH5.0	pH7.0	pH2.0	pH5.0	pH7.0
7S	13.51 \pm 0.50 ^{aA}	12.74 \pm 0.54 ^{aA}	16.27 \pm 0.45 ^{aA}	33.09 \pm 0.57 ^{aC}	42.51 \pm 0.43 ^{aB}	37.49 \pm 0.39 ^{aA}	39.42 \pm 0.86 ^{bC}	24.72 \pm 0.86 ^{aA}	25.09 \pm 0.59 ^{aB}	13.98 \pm 0.79 ^{aA}	20.03 \pm 1.17 ^{bB}	21.15 \pm 0.44 ^{bC}
7S-C3G	17.33 \pm 0.59 ^{bB}	14.52 \pm 0.48 ^{bC}	18.62 \pm 0.49 ^{bC}	31.21 \pm 0.26 ^{aB}	39.97 \pm 0.77 ^{bA}	39.26 \pm 0.33 ^{bC}	35.12 \pm 0.86 ^{bA}	26.14 \pm 0.49 ^{bB}	21.33 \pm 1.11 ^{aA}	16.34 \pm 0.67 ^{bB}	19.37 \pm 0.48 ^{bB}	20.79 \pm 1.08 ^{bB}
11S	14.69 \pm 0.38 ^{aA}	13.20 \pm 1.11 ^{aB}	17.35 \pm 0.90 ^{bB}	30.27 \pm 0.62 ^{aB}	40.79 \pm 0.76 ^{bB}	38.21 \pm 0.62 ^{bB}	40.81 \pm 2.52 ^{bC}	27.38 \pm 1.35 ^{aB}	25.44 \pm 0.23 ^{bB}	14.23 \pm 0.99 ^{aA}	18.63 \pm 1.10 ^{bA}	19.02 \pm 0.15 ^{bB}
11S-C3G	16.90 \pm 1.19 ^{bB}	14.63 \pm 0.42 ^{bC}	19.07 \pm 0.34 ^{dD}	26.94 \pm 1.04 ^{aA}	38.63 \pm 0.69 ^{aA}	39.64 \pm 0.40 ^{bC}	37.55 \pm 0.30 ^{bB}	27.72 \pm 1.06 ^{bB}	22.57 \pm 0.64 ^{aA}	18.61 \pm 0.34 ^{bC}	19.02 \pm 0.16 ^{bB}	18.72 \pm 0.56 ^{aA}

不同小写字母表示同一物质不同 pH 值时同种二级结构含量差异显著 ($P < 0.05$)，不同大写字母表示相同 pH 值时不同物质的同种二级结构含量差异显著 ($P < 0.05$)。

2.6 C3G 与 7S、11S 的分子对接结果分析

为进一步从理论上理解 7S-C3G 和 11S-C3G 之间相互作用的本质，使用 Discovery Studio 4.0 (Biovia Inc, 美国) 软件模拟复合物的分子对接。强酸条件下 C3G 的主要结构为黄烺盐阳离子，弱酸及中性条件下的结构主要为甲醇假碱、查尔酮和酞式碱。关于这 4 种物质的基本结构和性质，参考 Fernando Pina 等^[32]的研究。

C3G 与 7S、11S 的分子对接结果见图 4。由图 4 可知，黄烺盐阳离子与 7S 中 9 个氨基酸残基 (LEU96、HIS46、SER98、GLN277、GLY44、GLY228、SER267、PRO101、GLN105) 形成范德华力与 7 个氨基酸残基 (MET97、ASN45、ASN43、ARG356、GLN104、THR106、ASP41) 形成氢键，其中 ASN43 与 A 环上 5-OH 形成氢键，ASP41 与 A 环上 7-OH 形成氢键，氢键距离分别为 1.90 Å 和 2.66 Å；GLN104 与 B 环上的 3'-OH 形成氢键，氢键距离为 1.88 Å；ASN45 与糖基的 6-OH 形成氢键，氢键距离为 2.77 Å；ARG356 与 C 环上的氧离子形成氢键，氢键距离为 2.86 Å。黄烺盐阳离子与 11S 的 MET177、ASN159、PRO160、TYR164、PRO169、ASP170 和 SER203 形成范德华力相互作用，与 THR176、GLU172、HIS173、VAL204 和 GLY202 形成氢键相互作用，其中 GLU172 和 HIS173 与 B 环上的 4'-OH 形成氢键，氢键距离分别为 2.60 Å 和 2.12 Å；GLY202 与 A 环上的 7-OH 形成氢键，氢键距离为 1.95 Å；THR176 与糖基上的 2-OH、3-OH 形成氢键，氢键距离分别为 2.27 Å 和 2.24 Å。

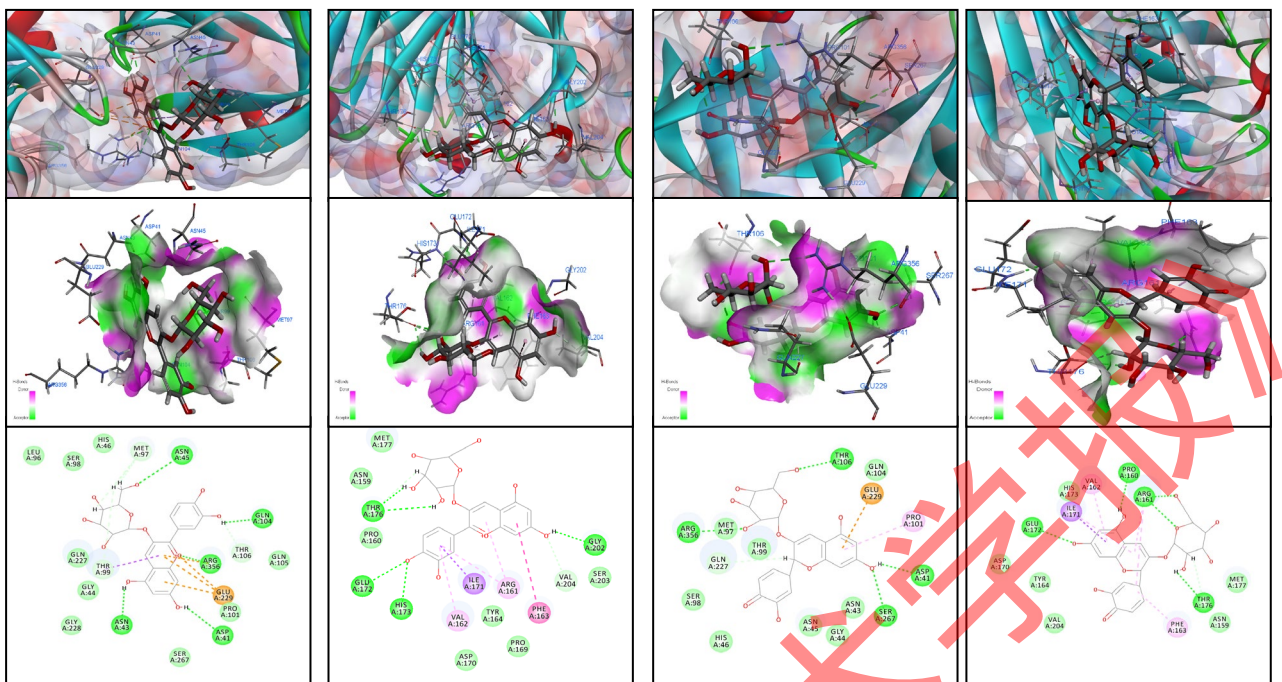
C3G 的甲醇假碱结构与 7S 中的 8 个氨基酸残基 (HIS46、SER98、ASN45、MET97、GLY44、THR99、ASN43 和 GLN104) 形成范德华力相互作用，与 5 个氨基酸残基 (THR106、GLN227、ASP41、

SER267 和 ARG356) 形成氢键相互作用, 与 PRO101 形成疏水相互作用, 与 GLU229 形成静电相互作用。其中 ASP41 和 SER267 与 A 环上的 7-OH 形成氢键, 距离为 1.99 Å 和 2.59 Å; GLN227 与 C 环上的 2-OH 形成氢键, 距离为 1.99 Å; ARG356 和糖基上的 2-OH 形成氢键, 距离为 1.97 Å; TRH 与糖基上的 6-OH 形成氢键, 距离为 1.89 Å。C3G 的甲醇假碱结构与 11S 中的 THR176、VAL162 和 GLY202 形成氢键相互作用, 与 MET177、ILE171 和 ARG161 形成疏水相互作用, 其中 VAL 与 A 环上的 5-OH 形成氢键, 距离为 3.08 Å; THR176 与 A 环上的 7-OH 形成氢键, 距离为 1.96 Å; VAL162 与 A 环上的 6-OH 形成氢键, 距离为 2.14 Å。

C3G 的查尔酮结构与 7S 的 MET97、ASN43、THR99、ARG356 和 GLN104 形成氢键相互作用。其中 ARG356 与 A 环上的 5-OH 形成氢键, 距离为 2.74 Å; ARG356 与糖基上的 6-OH 形成氢键, 距离为 2.06 Å; MET97 与 B 环上的 3'-OH 形成氢键, 距离为 1.88 Å; ASN43 与 C 环开环形成的羟基形成氢键, 距离为 2.10 Å。C3G 的查尔酮结构与 11S 的 ASN159、ILE171、HIS173、PHE163、GLU172、MET177、PRO169 和 GLY201 形成范德华力相互作用, 与 ARG161、PRO160、THR176 和 VAL162 形成氢键相互作用。其中 PRO160 与糖基上的 2-OH 和 3-OH 形成氢键, 距离为 3.03 Å 和 1.99 Å; THR176 与 C 环上开环形成的羟基形成氢键, 距离为 2.07 Å; ARG161 与 C 环上开环形成的羰基形成氢键, 距离为 2.42 Å。

花青素 C3G 在碱性条件下主要以醌式碱结构存在, 醌式碱与 7S 的 MET97、THR99、SER98、HIS46、ASN45、GIY44、ASN43 和 GLN104 形成范德华力相互作用, 与 ARG356、GLN227、SER267、ASP41 和 THR106 形成氢键相互作用。其中 ASP41 和 SER267 与 A 环上的 7-OH 形成氢键, 氢键距离分别为 1.96 Å 和 2.83 Å; ARG356 和糖基上的 2-OH 形成氢键, THR106 和糖基上的 6-OH 形成氢键, 氢键距离分别为 2.65 Å 和 1.91 Å。与 11S 中的 ASP170、TYR164、VAL204、HIS173、MET177 和 ASN159 形成范德华力相互作用, 与 GLU172、PRO160、ARG161 和 THR176 形成氢键相互作用, 与 VAL162、ILE171、ARG161 和 PHE163 形成疏水相互作用。其中 PRO160 与 A 环上 5-OH 形成氢键, 距离为 1.80 Å; GLU172 与 A 环上的 7-OH 形成氢键, 距离为 2.15 Å; THR176 与糖基上的 2-OH 形成氢键, 距离为 2.10 Å; ARG161 与糖基上的氧、6-OH 形成氢键, 距离为 2.84 Å 和 1.78 Å。

结果表明, 在酸性及中性条件下, C3G 与 7S、11S 主要通过范德华力和氢键相互作用, 这与之前的热力学分析结果一致。许多学者利用密度泛函理论研究了 C3G 结构的活性, 研究表明 C3G 结构 A 环和 B 环上的氢氧根是影响花青素抗氧化活性的关键基团^[33-34]。只有特定的氨基酸残基与 C3G 羟基形成氢键。从分子对接结果可以看出, C3G 在不同结构下, 不同的氨基酸残基能与 A 环和 B 环上的羟基相互作用形成氢键。由此可以推断, 在 C3G 与 7S、11S 结合过程中, 酚羟基和氨基酸残基通过氢键相互作用辅助两者结合, 有利于配体分子在蛋白质活性位点上更好地发挥靶向作用。总的来说, 在这 3 种 pH 值条件下, C3G 更容易通过范德华力和氢键与 7S 和 11S 相互作用, 同时也会涉到少量的疏水相互作用和静电相互作用。

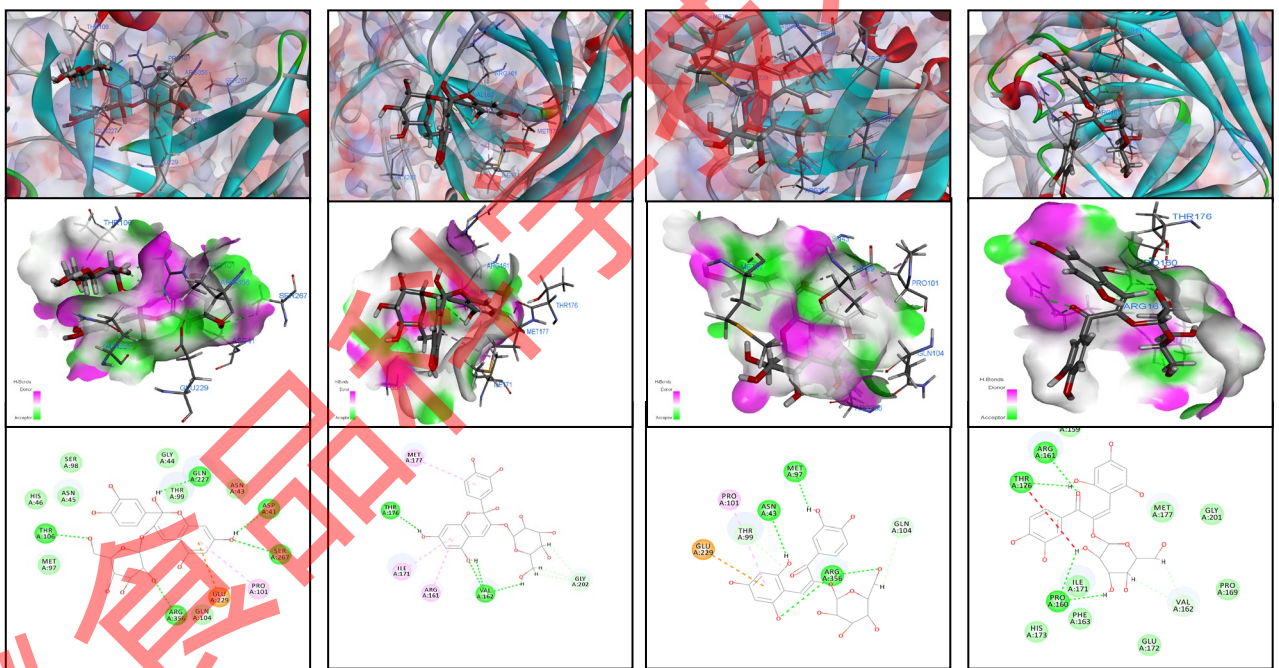


(a) 黄烺盐阳离子与 7S

(b) 黄烺盐阳离子与 11S

(c) 醌式碱与 7S

(d) 醌式碱与 11S



(e) 甲醇假碱与 7S

(f) 甲醇假碱与 11S

(g) 查耳酮与 7S

(h) 查耳酮与 11S

上排图片为 C3G 与 7S、11S 相互作用后的三维对接模式；中排图片为氨基酸残基与 C3G 结合形成的氢键表面，紫色和绿色代表氢键的供体和受体；下排图片为 C3G 与 7S、11S 相互作用的二维原理。

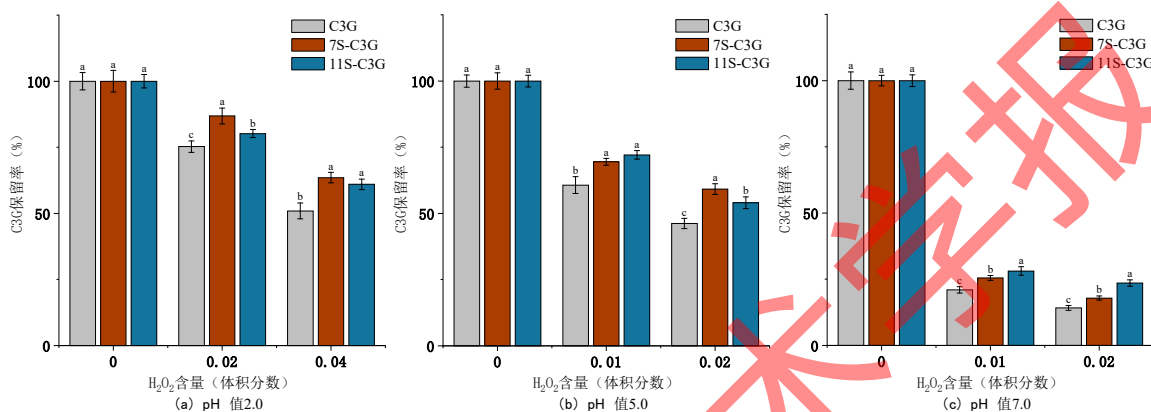
图 4 C3G 不同结构与 7S、11S 的对接结果

Fig. 4 Docking results of C3G with different structures and 7S, 11S

2.7 7S、11S 对氧化环境中 C3G 氧化稳定性的影响

7S、11S 对 C3G 氧化稳定性的保护作用如图 5。实验结果表明，在不同 pH 值条件下，随着 H₂O₂ 体积分数的增加，C3G 残留含量逐渐降低；7S-C3G、11S-C3G 复合物的 C3G 含量显著高于 C3G 对照

组 ($P < 0.05$), C3G 的残留量在 pH 值为 2.0 时最高, 在 pH 值为 7.0 时最低, 说明在酸性条件下, C3G 具有更高的氧化稳定性。这是因为酸性条件下 C3G 主要以黄烊盐阳离子的形式存在, 中性条件下是以黄烊盐阳离子、甲醇假碱、查尔酮和醌式碱共存的形式存在^[35]。在 pH 值为 2.0 时, 0.02% (体积分数) H_2O_2 条件下, 各样品组的 C3G 残留量均大于 75.00%, C3G 对照组、7S-C3G 和 11S-C3G 中 C3G 残留量分别为 75.25%、86.88% 和 80.20%。结果表明, 在 pH 值为 2.0 条件下, 7S 比 11S 更能增强 C3G 的氧化稳定性。相反, 在 pH 值为 7.0 条件下, 各样品组中 C3G 的残留量均小于 30.00%, 并且在 0.01% 和 0.02% H_2O_2 浓度下, 11S-C3G 中 C3G 残留量均高于 7S-C3G, 分别为 28.10% 和 23.60%。实验结果表明, 在 pH 值为 2.0、5.0 和 7.0 时, 7S、11S 与 C3G 的相互作用均可增强 C3G 的氧化稳定性。



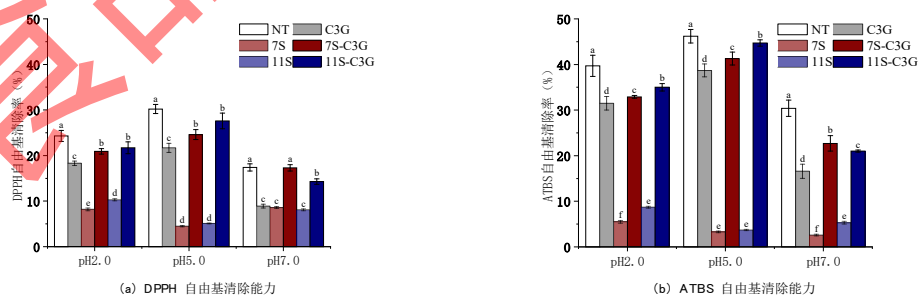
不同小写字母表示相同 H_2O_2 含量时数据差异显著 ($P < 0.05$)。

图 5 不同 pH 值时 7S、11S 对 C3G 氧化稳定性的影响

Fig. 5 Effect of 7S, 11S on the oxidative stability of C3G at different pH

2.8 7S、11S 在氧化环境中对 C3G 抗氧化活性的影响

研究证明, 花青素与蛋白质相互作用有利于提高其抗氧化能力^[36]。以 ABTS⁺和 DPPH 自由基清除率为指标评估了在氧化环境下 7S、11S 对花青素 C3G 抗氧化活性的影响, 见图 6。由图 6 可知, 在不同 pH 值条件下, C3G 与 7S、11S 相互作用均增强了 C3G 的抗氧化能力。在 pH 值为 5.0 的条件下, 样品组均具有最高的自由基清除率, 表明弱酸环境中更有利于发挥 C3G 的抗氧化活性。在 pH 值为 2.0 时, 7S、11S 对 C3G 抗氧化活性的保护作用一方面来源于酸性条件下 C3G 结构的稳定, 另一方面是蛋白质在酸性环境下发生部分变性, 无规则卷曲结构增加更易于 ABTS⁺、DPPH 自由基发生反应^[37]。在 pH 值为 7.0 时, 7S-C3G 复合物的抗氧化活性要强于 11S-C3G 复合物, 这可能是因为 7S 具有更多的疏水区域, 与 C3G 作用力更强。



NT 表示未经过 H_2O_2 处理的 C3G, 不同小写字母表示组间差异显著 ($P < 0.05$)。

图 6 不同 pH 值条件下不同体系在的 ABTS 和 DPPH 自由基清除率

Fig 6 The free radical scavenging rate of ABTS and DPPH in different systems at different pH

3. 结论

本研究利用紫外光谱、荧光色谱、红外色谱等多种光谱学技术结合热力学分析和分子对接技术考察了 pH 值为 2.0、5.0、7.0 时，7S、11S 与 C3G 相互作用的机理及相互作用后对 C3G 氧化稳定性的影响。研究表明，在不同 pH 值条件下，C3G 与 7S、11S 球蛋白的主要结合力不同，在 pH 值为 5.0 时，7S、11S 与 C3G 主要通过静电相互作用形成 7S-C3G 和 11S-C3G 复合物，在 pH 值为 2.0 和 7.0 时，7S、11S 与 C3G 主要通过范德华力和氢键相互作用形成 7S-C3G 和 11S-C3G。C3G 通过静态猝灭模式使 7S、11S 的荧光基团猝灭。C3G 与 7S、11S 复合会改变蛋白质的二级结构，在 pH 值为 2.0 和 5.0 时，C3G 使 7S 和 11S 结构中的部分 β -折叠转化为 α -螺旋，在 pH 值为 7.0 条件下，7S 和 11S 蛋白中的 α -螺旋和 β -折叠的呈现出增加的趋势，但 β -转角相反。此外，分子对接结果表明，C3G 的不同结构与 7S、11S 球蛋白主要通过氢键和范德华力相互作用结合，7S 上的 GLU229、ARG356 和 PRO101 残基，11S 上的 ARG161、VAL162、ILE171 和 THR176 残基在与 C3G 结合中起关键作用，7S、11S 通过与 C3G 的酚羟基结合进一步保护 C3G 的氧化稳定性。

实验研究的结果不仅有助于理解不同 pH 值条件下 7S-C3G、11S-C3G 的作用机制，而且表明 7S 和 11S 作为 C3G 的载体在功能食品或具有更高营养价值的改性天然色素添加剂的配方中具有广阔的应用前景。未来，将继续进一步研究 7S-C3G、11S-C3G 复合物的活性和稳定性，以最大限度地发挥该复合物在不同食物体系中的生物活性。

参考文献:

- [1] CHEN Z Q, WANG C, GAO X D, et al. Interaction characterization of preheated soy protein isolate with cyanidin-3-O-glucoside and their effects on the stability of black soybean seed coat anthocyanins extracts[J]. Food Chemistry, 2019, 271: 266-273.
- [2] SELIG M J, CELLI G B, TAN C, et al. High pressure processing of beet extract complexed with anionic polysaccharides enhances red color thermal stability at low pH[J]. Food Hydrocolloids, 2018, 80: 292-297.
- [3] CORTEZ R, LUNA-VITAL D A, MARGULIS D, et al. Natural pigments: stabilization methods of anthocyanins for food applications[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2017, 16 (1) : 180-198.
- [4] HE W J, MU H B, LIU Z M, et al. Effect of preheat treatment of milk proteins on their interactions with cyanidin-3-O-glucoside[J]. Food Research International, 2018, 107: 394-405.
- [5] FU X Z, BELWAL T, HE Y H, et al. Interaction and binding mechanism of cyanidin-3-O-glucoside to ovalbumin in varying pH conditions: a spectroscopic and molecular docking study[J]. Food Chemistry, 2020, 320: 126616.
- [6] ATTARIBO T, JIANG X Z, HUANG G Q, et al. Studies on the interactional characterization of preheated silkworm pupae protein (SPP) with anthocyanins (C3G) and their effect on anthocyanin stability[J]. Food Chemistry, 2020, 326: 126904.
- [7] CHUNG C, ROJANASASITHARAT, MUTILANGI W, et al. Stability improvement of natural food colors: impact of amino acid and peptide addition on anthocyanin stability in model beverages[J]. Food Chemistry, 2017, 218: 277-284.
- [8] 徐飞, 葛阳阳, 刘新春, 等. 黑豆营养成分及生物活性的研究进展[J]. 中国食物与营养, 2019, 25 (9) : 55-61.
- XU F, GE Y Y, LIU X C, et al. Research advancement of nutritional composition and biological activity of black soybean[J]. Food and Nutrition in China, 2019, 25 (9) : 55-61.
- [9] XIE Y L, ZHU X L, LI Y, et al. Analysis of the pH-Dependent Fe (III) Ion Chelating Activity of Anthocyanin Extracted from Black Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] Coats[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66 (5) : 1131-1139.
- [10] WANG C, XIE Y L. Interaction of protein isolate with anthocyanin extracted from black soybean and its effect on the anthocyanin stability[J]. Journal of Food Science, 2019, 84 (11) : 3140-3146.
- [11] WU D, TANG L, DUAN R, et al. Interaction mechanisms and structure-affinity relationships between hyperoside and soybean β -conglycinin and glycinin[J]. Food Chemistry, 2021, 347: 129052.
- [12] NAGY K, COURTET-COMPONDU M C, WILLIAMSON G, et al. Non-covalent binding of proteins to polyphenols correlates with their amino acid sequence[J]. Food Chemistry, 2012, 132 (3) : 1333-1339.
- [13] REN C, XIONG W F, LI J, et al. Comparison of binding interactions of cyanidin-3-O-glucoside to β -conglycinin and glycinin using multi-spectroscopic and thermodynamic methods[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 92: 155-162.
- [14] JIANG D Q, GUO Y, XU D H, et al. Antioxidant and anti-fatigue effects of anthocyanins of mulberry juice purification (MJP) and mulberry Marc purification (MMP) from different varieties mulberry fruit in China[J]. Food and Chemical Toxicology: an International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association, 2013, 59: 1-7.
- [15] PELLEGRINI N, VISIOLI F, BURATTI S, et al. Direct analysis of total antioxidant activity of olive oil and studies on the influence of heating[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49 (5) : 2532-2538.
- [16] BRAND-WILLIAMS W, CUVELIER M E, BERSET C. Use of a free radical method to evaluate

antioxidant activity[J]. LWT - Food Science and Technology, 1995, 28 (1) : 25-30.

[17] 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: 625-634.

[18] YANG Y X, WANG Q M, LEI L, et al. Molecular interaction of soybean glycinin and β -conglycinin with (-)-epigallocatechin gallate induced by pH changes[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 108: 106010.

[19] SHAKLAI N, YGUERABIDE J, RANNEY H M. Interaction of hemoglobin with red blood cell membranes as shown by a fluorescent chromophore[J]. Biochemistry, 1977, 16 (25) : 5585-5592.

[20] ZHANG L L, WANG Y M, XU M, et al. Galloyl moieties enhance the binding of (-)-epigallocatechin-3-gallate to β -lactoglobulin: a spectroscopic analysis[J]. Food Chemistry, 2017, 237: 39-45.

[21] CASANOVA F, CHAPEAU A L, HAMON P, et al. pH- and ionic strength-dependent interaction between cyanidin-3-O-glucoside and sodium caseinate[J]. Food Chemistry, 2018, 267: 52-59.

[22] LIU E H, QI L W, LI P. Structural relationship and binding mechanisms of five flavonoids with bovine serum albumin[J]. Molecules, 2010, 15 (12) : 9092-9103.

[23] GAO X, BI H N, JIA J J, et al. Spectroscopic and in silico study of binding mechanism of cyanidin-3-O-glucoside with human serum albumin and glycated human serum albumin[J]. Luminescence, 2017, 32 (4) : 640-651.

[24] ZHANG H M, WU P R, WANG Y Q, et al. Affinity of miriplatin to human serum albumin and its effect on protein structure and stability[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 92: 593-599.

[25] YANG W, XU C Q, LIU F G, et al. Native and thermally modified protein-polyphenol coassemblies: lactoferrin-based nanoparticles and submicrometer particles as protective vehicles for (-)-epigallocatechin-3-gallate[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62 (44) : 10816-10827.

[26] MA Z, CHENG J, JIAO S S, et al. Interaction of mulberry anthocyanins with soybean protein isolate: effect on the stability of anthocyanins and protein *in vitro* digestion characteristics[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2022, 57 (4) : 2267-2276.

[27] CAO X Y, HE Y L, KONG Y C, et al. Elucidating the interaction mechanism of eriocitrin with β -casein by multi-spectroscopic and molecular simulation methods[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 94: 63-70.

[28] GUO M, LÜ W J, LI M H, et al. Study on the binding interaction between carnitine optical isomer and bovine serum albumin[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2008, 43 (10) : 2140-2148.

[29] ZHANG Y, WRIGHT E, ZHONG Q X. Effects of pH on the molecular binding between β -lactoglobulin and bixin[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61 (4) : 947-954.

[30] TOMCZYŃSKA-MLEKO M, KAMYSZ E, SIKORSKA E, et al. Changes of secondary structure and surface tension of whey protein isolate dispersions upon pH and temperature[J]. Czech Journal of Food Sciences, 2014, 32 (1) : 82-89.

[31] REN C, XIONG W F, PENG D F, et al. Effects of thermal sterilization on soy protein isolate/polyphenol complexes: aspects of structure, *in vitro* digestibility and antioxidant activity[J]. Food Research International, 2018, 112: 284-290.

[32] PINA F, OLIVEIRA J, DE FREITAS V. Anthocyanins and derivatives are more than flavylum cations[J]. Tetrahedron, 2015, 71 (20) : 3107-3114.

[33] ALI H M, ALI I H. A DFT and QSAR study of the role of hydroxyl group, charge and unpaired-electron distribution in anthocyanidin radical stabilization and antioxidant activity[J]. Medicinal Chemistry

Research, 2017, 26 (10) : 2666-2674.

[34] SINOPOLI A, CALOGERO G, BARTOLOTTA A. Computational aspects of anthocyanidins and anthocyanins: a review[J]. Food Chemistry, 2019, 297: 124898.

[35] XIE Y L, MA M Y, ZHANG C Y, et al. Experimental and theoretical research on the effect of coupling heat and pH on the structure and antioxidant activity of cyanidin-3-O-glucoside from black soybean coat[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2021, 102 (5) : 1842-1850.

[36] LI J, WANG B X, HE Y, et al. A review of the interaction between anthocyanins and proteins[J]. Food Science and Technology International, 2021, 27 (5) : 470-482.

[37] LIT, WANG L, CHEN Z X, et al. Functional properties and structural changes of rice proteins with anthocyanins complexation[J]. Food Chemistry, 2020, 331: 127336.

《食品科学技术学报》