

doi:10.6041/j.issn.1000-1298.2020.01.037

# 基于光谱技术的维生素 B<sub>12</sub> 与大豆分离蛋白相互作用分析

李 杨 李明达 王中江 郑 丽 滕 飞

(东北农业大学食品学院, 哈尔滨 150030)

**摘要:** 为了提高维生素 B<sub>12</sub> 稳定性和开发维生素 B<sub>12</sub> 营养强化食品,以维生素 B<sub>12</sub>-大豆分离蛋白复合体系为研究对象,利用光谱技术(荧光光谱、紫外-可见吸收光谱、红外光谱、圆二色谱)分析维生素 B<sub>12</sub> 与大豆分离蛋白的相互作用对蛋白质结构的影响。荧光光谱分析表明,随着维生素 B<sub>12</sub> 质量浓度的增大,大豆分离蛋白的荧光强度不断降低,通过 Stern-Volmer 方程计算可得,维生素 B<sub>12</sub> 对大豆分离蛋白的猝灭方式属于静态猝灭,二者主要通过范德华力和氢键作用结合,结合位点数为 1;同步荧光光谱分析表明,维生素 B<sub>12</sub> 与大豆分离蛋白结合位点位于色氨酸附近;紫外光谱分析表明,维生素 B<sub>12</sub> 诱导色氨酸残基附近的微环境疏水性增强,蛋白分子的结构发生改变;红外光谱和圆二色谱分析表明,维生素 B<sub>12</sub> 的加入导致大豆分离蛋白的二级结构发生改变,具体表现为  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -转角相对含量增加、 $\beta$ -折叠和无规则卷曲相对含量减少。

**关键词:** 大豆分离蛋白; 维生素 B<sub>12</sub>; 荧光光谱; 紫外-可见吸收光谱; 红外光谱; 圆二色谱

中图分类号: TS214.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2020)01-0341-08

OSID:



## Spectroscopy Analysis of Interaction between Vitamin B<sub>12</sub> and Soybean Protein Isolate

LI Yang LI Mingda WANG Zhongjiang ZHENG Li TENG Fei

(College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

**Abstract:** The vitamin B<sub>12</sub> is an essential vitamin and participates in the biochemical reaction of the human body, including folic acid conversion and methionine synthesis. However, it is easy to lose its nutrition and function in the food processing process and storage such as light, heating and pH value. In order to improve the stability of the vitamin B<sub>12</sub> and the vitamin B<sub>12</sub> nutrition fortified food, the interaction between vitamin B<sub>12</sub> and soybean protein isolate and the effect of vitamin B<sub>12</sub> on protein structure were studied by using spectroscopic techniques (fluorescence spectrum, ultraviolet spectrum, infrared spectrum and circular dichroism spectrum). The result of fluorescence spectrum showed that the fluorescence intensity of soybean protein isolate was decreased with the increase of vitamin B<sub>12</sub> concentration. The quenching mode of vitamin B<sub>12</sub> on soybean protein isolate was static quenching by calculating the Stern-Volmer equation. Soybean protein isolate and vitamin B<sub>12</sub> were bound by Van der Waals force and hydrogen bonding and binding site was one. Synchronous fluorescence spectrum indicated that the binding site of vitamin B<sub>12</sub> and soybean protein isolate was located near tryptophan. Ultraviolet absorption spectrum presented that vitamin B<sub>12</sub> enhanced hydrophobicity of the microenvironment near the tryptophan residue and changed the structure of protein molecules. The results of infrared spectrum and circular dichroism spectrum showed that the secondary structure of soybean protein isolate was changed with the addition of vitamin B<sub>12</sub>, which represented that the contents of  $\alpha$ -helix and  $\beta$ -rotation were increased, and the contents of  $\beta$ -fold and irregular curl were decreased.

**Key words:** soybean protein isolate; vitamin B<sub>12</sub>; fluorescence spectrum; UV-absorption spectrum; infrared spectrum; circular dichroism spectrum

收稿日期: 2019-04-25 修回日期: 2019-05-15

基金项目: 东农学者计划青年才俊项目(17QC18)、黑龙江省创新人才项目(UNPYSCT-2017015)和国家重点研发计划项目(2017YFD0400202-04)

作者简介: 李杨(1981—),男,教授,主要从事粮食、油脂及植物蛋白工程研究,E-mail: liyanghuangyu@163.com

通信作者: 滕飞(1986—),女,讲师,主要从事粮食、油脂及植物蛋白工程研究,E-mail: tengfei@neau.edu.cn

## 0 引言

维生素 B<sub>12</sub> 又被称为钴胺素,是唯一含有金属元素的水溶性维生素,也是 B 族中最晚发现的一种。作为一种重要的营养因子,维生素 B<sub>12</sub> 参与叶酸转化、蛋氨酸合成等生化反应,维生素 B<sub>12</sub> 缺乏会导致恶性贫血和神经疾病等<sup>[1]</sup>。维生素 B<sub>12</sub> 的稳定性主要受到光、热、溶液 pH 值的影响,在食品加工过程中常转变为各种类似物<sup>[2]</sup>。根据《中国居民膳食营养素参考摄入量》<sup>[3]</sup>,成人维生素 B<sub>12</sub> 推荐摄入量为 2.4 μg/d,该营养素人体自身不能合成,必须从食物中摄取,动物性产品(如鱼或贝类、鸡蛋、动物肝脏等)是其主要摄取源<sup>[4]</sup>。由于维生素 B<sub>12</sub> 易损失、不稳定,构建天然保护机制是防止其被破坏的最直接手段,也是高效利用维生素 B<sub>12</sub>、开发强化食品、防止维生素 B<sub>12</sub> 缺乏症的关键。

食品级蛋白质是生物活性化合物的潜在载体,大豆蛋白是目前唯一含有人体所需 8 种氨基酸、且含量满足人体需求的植物蛋白,因其高营养价值和良好的消化性和功能性能(乳化性、凝胶性、起泡性等)而被广泛应用于食品加工中<sup>[5]</sup>。同时,大豆蛋白分子肽链中含有丰富的疏水氨基酸残基和带电氨基酸残基,可通过疏水相互作用、静电作用和氢键作用等与水溶性营养成分结合,不仅能很好地传递和运载水溶性活性物质,还能够提高营养成分的生物利用率,甚至可以提高蛋白的某些功能特性<sup>[6]</sup>。文献[7]研究发现,热处理的大豆蛋白与花青素通过疏水作用结合后,提高了蛋白的消化率。文献[8]将大豆蛋白与叶酸复合制备纳米凝胶,可使叶酸维持天然结构及生物活性,并在肠道环境中迅速释放。文献[9]研究发现,季铵盐改性后的大豆蛋白与抗坏血酸复合,水溶性维生素表现出较高结合率,同时改善大豆蛋白的溶解性。

食品中的维生素 B<sub>12</sub> 以蛋白结合型存在,研究食源蛋白与维生素 B<sub>12</sub> 的相互作用对提高维生素 B<sub>12</sub> 稳定性至关重要。已有文献对维生素 B<sub>12</sub> 与蛋白质的相互作用进行了研究。文献[10]研究了维生素 B<sub>12</sub> 和牛血清白蛋白(BSA)复合物在不同 pH 值条件下的结合亲和性,结果表明:维生素 B<sub>12</sub> 在酸性和碱性(pH 值 2.5、3.5、5.0 和 9.0)条件下与 BSA 的结合能力低于模拟生理条件(pH 值 7.4),并且相互作用使 BSA 的二级和三级结构发生了显著的变化。文献[11]通过荧光光谱法和紫外吸收光谱法研究了生理条件下维生素 B<sub>12</sub> 与牛血清白蛋白之间的相互作用,结果表明,维生素 B<sub>12</sub> 对牛血清白蛋白的荧光

有猝灭作用,其猝灭过程属于静态猝灭并且二者的结合位点位于色氨酸附近。文献[12]将乳清蛋白与维生素 B<sub>12</sub> 复合,维生素 B<sub>12</sub> 的光热稳定性提高了 10%~30%。可见,通过维生素 B<sub>12</sub> 与蛋白结合可提高维生素 B<sub>12</sub> 的稳定性,但具有代表性的食源蛋白(大豆分离蛋白)与维生素 B<sub>12</sub> 的相互作用研究尚未见相关报道。

本文利用光谱技术(荧光光谱、紫外光谱、红外光谱、圆二色谱)研究大豆分离蛋白与维生素 B<sub>12</sub> 的相互作用对大豆分离蛋白结构的影响,以期为提高维生素 B<sub>12</sub> 稳定性、开发维生素 B<sub>12</sub> 营养强化食品提供理论基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

低温脱脂豆粕,山东禹王生态食业有限公司;维生素 B<sub>12</sub>,美国 Sigma 试剂公司;氢氧化钠、盐酸等为国产分析纯试剂。

### 1.2 仪器与设备

FD-1C 型冷冻干燥机,北京德天佑科技发展有限公司;FJ-200 型高速分散均质机,上海标本模型厂;LGR20-W 型台式高速冷冻离心机,北京京立离心机有限公司;F-4500 型荧光分光光度计,日本 HITACHI 公司;TU-1800 型紫外可见分光光度计。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 大豆分离蛋白制备

参照文献[13]的方法并稍作修改,将低温脱脂豆粕与去离子水按照液料比 10 mL/g 混合后,用 2 mol/L NaOH 溶液调 pH 值至 8.0,室温(20℃)搅拌 2 h 后,溶液于 9 000 g 离心 30 min,取上清液用 2 mol/L HCl 溶液调 pH 值至 4.5。溶液静置 2 h 后于 7 500 g 离心 30 min 得到蛋白沉淀,将蛋白沉淀溶于去离子水后洗涤 3 次,用 2 mol/L NaOH 调溶液的 pH 值至 7.0。最后将蛋白溶液倒入平皿中冷冻干燥后得粉末状大豆分离蛋白,储藏备用。

#### 1.3.2 大豆分离蛋白-维生素 B<sub>12</sub> 复合物制备

参照文献[12]的方法并稍作修改,取 1.2 mg 大豆分离蛋白溶于磷酸盐缓冲溶液中(0.01 mol/L, pH 值 7.4),配制质量浓度为 12 mg/mL 的大豆分离蛋白溶液,于 4℃ 下储存。取 16 mg 维生素 B<sub>12</sub> 溶于磷酸盐缓冲溶液中(0.01 mol/L, pH 值 7.4),配制质量浓度为 0.4 mg/mL 的维生素 B<sub>12</sub> 溶液,于 4℃ 下储存。将大豆分离蛋白溶液稀释至 300 μg/mL,分别与不同质量浓度的维生素 B<sub>12</sub> (0、10、20、28、40、

50 μg/mL) 混合, 室温下黑暗搅拌 1 h, 得到大豆分离蛋白-维生素 B<sub>12</sub> 复合物。

### 1.3.3 荧光光谱测定

参照文献[14]的测定方法并稍作修改, 大豆分离蛋白-维生素 B<sub>12</sub> 复合物的内源性荧光光谱采用 F-4500 型荧光分光光度计进行扫描。将复合物样品用 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH 值 7.4) 配制质量浓度为 0.15 mg/mL 的溶液。激发波长设定为 290 nm, 发散波长扫描范围为 300 ~ 500 nm, 激发狭缝宽度为 5 nm, 发射狭缝宽度也为 5 nm, 扫描速度为 240 nm/min。同步荧光光谱: 室温下, 分别固定  $\Delta\lambda = 15$  nm 和  $\Delta\lambda = 60$  nm, 其中  $\Delta\lambda$  表示激发波长和发射波长彼此间保持固定的波长间隔。

### 1.3.4 荧光猝灭机理

参照文献[15]的测定方法并稍作修改, 将大豆分离蛋白-维生素 B<sub>12</sub> 复合物样品等分为 3 份, 分别置于 25、33、41℃ 的恒温水浴锅中保温 10 min, 利用荧光光谱仪连续扫描并记录测定样品的荧光强度。光谱参数同上, 重复扫描 3 次。

### 1.3.5 紫外光谱测定

参照文献[16]的测定方法并稍作修改, 采用紫外分光光度计扫描大豆分离蛋白-维生素 B<sub>12</sub> 复合物的紫外光谱。用 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH 值 7.4) 将复合物样品稀释为 0.15 mg/mL 后, 于室温条件下进行紫外光谱扫描, 扫描范围 250 ~ 350 nm, 扫描速度为 200 nm/min, 分辨率为 2 nm。

### 1.3.6 红外光谱测定

参照文献[17]的测定方法并稍作修改, 称取大豆分离蛋白-维生素 B<sub>12</sub> 复合物 1 mg, 加入溴化钾 100 mg, 充分混匀压片后于室温进行红外光谱扫描。设定波谱的扫描范围: 400 ~ 4 000 cm<sup>-1</sup>, 分辨率: 4 cm<sup>-1</sup>, 扫描 64 次, 利用 Peakfit 4.2.0 软件处理谱图并通过积分面积计算各二级结构的相对含量。

### 1.3.7 圆二色谱测定

将大豆分离蛋白-维生素 B<sub>12</sub> 复合物溶解在磷酸盐缓冲溶液中, 将蛋白质量浓度配制为 0.5 mg/mL, 将样品溶液在 190 ~ 250 nm 远紫外区进行扫描, 扫描速度为 60 nm/min, 分辨率为 0.2 nm, 响应时间为 0.25 s, 狭缝宽度为 1 nm。使用 CDpro 软件拟合蛋白质二级结构的组成与含量。

## 1.4 数据处理

图表制作采用 Origin Pro 8.5 软件, 使用 SPSS 19.0 进行 ANOVA 差异显著性分析和方差分析 ( $P < 0.05$  为显著性差异)。每个试验重复 3 次, 结果表示为平均值 ± 标准差。

## 2 结果与分析

### 2.1 荧光光谱分析

大豆蛋白内部因含有不同的发色基团如色氨酸 (Trp), 酪氨酸 (Tyr) 和苯丙氨酸 (Phe) 而表现出内源荧光特性<sup>[18]</sup>。在激发波长为 290 nm 时, 主要考虑色氨酸和酪氨酸。文献[19]指出, 蛋白的最大发射波长  $\lambda_{\max}$  与色氨酸等残基所处的微环境密切相关, 当最大发射波长  $\lambda_{\max}$  超过 330 nm 时, 残基处于外部极性环境中, 相反, 则表示残基处于内部非极性环境。大豆分离蛋白与维生素 B<sub>12</sub> 复合体系的荧光光谱如图 1 所示, 当蛋白浓度固定时, 随着维生素 B<sub>12</sub> 添加量的增大, 大豆分离蛋白的荧光强度逐步降低, 说明维生素 B<sub>12</sub> 对大豆蛋白的内源荧光产生了猝灭作用。并且大豆分离蛋白的最大发射波长  $\lambda_{\max}$  由 340.6 nm 蓝移至 334.6 nm, 蓝移了 6 nm, 以上现象说明维生素 B<sub>12</sub> 与大豆分离蛋白发生了结合, 使其构象发生了变化, 色氨酸和酪氨酸的内部微环境也趋向改变, 表现出一种由极性环境向非极性环境转变的趋势, 可能是由于维生素 B<sub>12</sub> 与蛋白表面的亲水性侧链残基相互作用, 降低荧光强度, 从而改变了色氨酸残基的微环境<sup>[20]</sup>。文献[21]在研究维生素 B<sub>12</sub> 与牛血清白蛋白 (BSA) 结合机理时也发现了最大发射波长蓝移现象, 可能的原因为维生素 B<sub>12</sub> 与牛血清白蛋白表面第 134 位的色氨酸残基结合改变了其所处微环境的极性。而文献[22]报道花青素与大豆分离蛋白结合后, 蛋白的最大发射波长  $\lambda_{\max}$  发生红移, 肽链趋于伸展。这可能是由于维生素 B<sub>12</sub> 含有一个咕啉大环, 分子量较大, 结构复杂, 与蛋白的结合方式不同, 从而导致蛋白分子的结构变化差别较大。

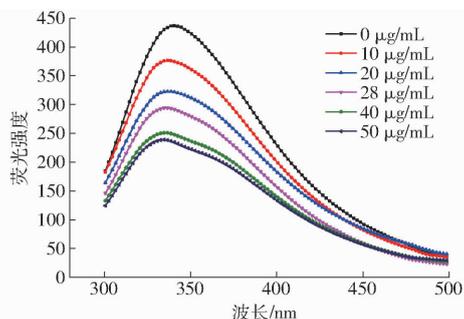


图 1 不同维生素 B<sub>12</sub> 质量浓度下大豆分离蛋白与维生素 B<sub>12</sub> 复合体系的荧光光谱谱图

Fig. 1 Fluorescence spectra of soybean protein isolate and vitamin B<sub>12</sub> composite system

### 2.2 荧光猝灭机理

荧光猝灭机理一般可以分为静态猝灭和动态猝灭两种作用形式。静态猝灭主要是指猝灭剂与荧光

物质之间相互作用形成复合物而导致荧光强度下降, 温度升高后, 猝灭常数(即 Stern - Volmer 曲线斜率) 下降; 动态猝灭则相反, 主要是指猝灭剂与荧光物质 间相互碰撞产生一定程度的电子转移或能量转移, 导致荧光强度减弱, 该过程与扩散效应相关, 温度上升 促进了分子碰撞的剧烈程度, 因此随着温度上升, 动 态猝灭常数增大<sup>[23]</sup>。根据 Stern - Volmer 方程<sup>[24]</sup> 计算不同温度条件下的猝灭常数, 从而可以初步判断该 反应的荧光猝灭机制<sup>[25]</sup>为

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}Q = 1 + K_q\tau_0Q \quad (1)$$

式中  $F_0$ ——大豆分离蛋白中未加入猝灭剂(维生 素  $B_{12}$ )时的荧光强度  
 $F$ ——加入猝灭剂时的荧光强度  
 $K_q$ ——双分子猝灭速率常数,  $L/(mol \cdot s)$   
 $K_{sv}$ ——猝灭常数,  $L/mol$   
 $Q$ ——猝灭剂浓度,  $mol/L$   
 $\tau_0$ ——无猝灭剂时生物大分子的平均荧光寿 命, 取  $10^{-8} s$

根据 Stern - Volmer 方程, 以  $Q$  为自变量, 以  $F_0/F$  为因变量拟合一次函数方程, 如图 2 所示。曲 线斜率代表猝灭常数  $K_{sv}$ , 进一步求解可得  $K_q$ 。

表 1 维生素  $B_{12}$  与大豆分离蛋白复合物的荧光猝灭速率常数、结合位点数、结合常数

Tab.1 Fluorescence quenching constants, binding sites and apparent binding constants of vitamin  $B_{12}$ -SPI complex

| 温度/K | $K_{sv}/(L \cdot mol^{-1})$        | $K_q/(L \cdot (mol \cdot s)^{-1})$  | $R^2$   | 结合常数 $K_a/(L \cdot mol^{-1})$   | 结合位点数 $n$         | $R^2$   |
|------|------------------------------------|-------------------------------------|---------|---------------------------------|-------------------|---------|
| 298  | $(2.404 \pm 0.118) \times 10^{4a}$ | $(2.404 \pm 0.118) \times 10^{12a}$ | 0.997 0 | $(4.121 \pm 0.033) \times 10^5$ | $1.279 \pm 0.002$ | 0.984 7 |
| 306  | $(1.803 \pm 0.052) \times 10^{4b}$ | $(1.803 \pm 0.052) \times 10^{12b}$ | 0.987 5 | $(1.256 \pm 0.011) \times 10^5$ | $1.192 \pm 0.001$ | 0.994 3 |
| 314  | $(1.532 \pm 0.092) \times 10^{4c}$ | $(1.532 \pm 0.092) \times 10^{12c}$ | 0.985 3 | $(1.806 \pm 0.039) \times 10^5$ | $1.242 \pm 0.003$ | 0.996 2 |

注: 同列不同字母表示差异显著, 下同。

由图 2 和表 1 已知维生素  $B_{12}$  对大豆分离蛋白 的猝灭机制为静态猝灭, 二者的结合常数  $K_a$  和结合 位点数  $n$  满足公式

$$\lg \frac{F_0 - F}{F} = \lg K_a + n \lg Q \quad (2)$$

以  $\lg((F_0 - F)/F)$  对  $\lg Q$  作图, 不同温度下维 生素  $B_{12}$  猝灭大豆分离蛋白的双对数曲线如图 3 所 示。所得的曲线斜率为维生素  $B_{12}$  与大豆分离蛋白 的结合位点数  $n$ , 将截距换算为结合常数  $K_a$ 。根据 表 1 数据显示, 维生素  $B_{12}$  与大豆分离蛋白在 298、 306、314 K 温度下作用时, 二者间的结合常数为  $4.121 \times 10^5$ 、 $1.256 \times 10^5$ 、 $1.806 \times 10^5 L/mol$ , 表明二 者存在较强的相互作用。并且维生素  $B_{12}$  与大豆分 离蛋白在 3 种不同温度下的结合位点数都接近于 1, 说明维生素  $B_{12}$  与大豆分离蛋白之间存在一个结 合位点。文献[21]证明了维生素  $B_{12}$  与牛血清白蛋

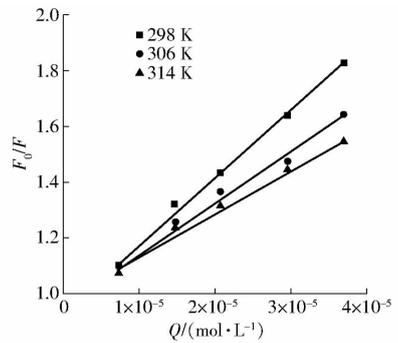


图 2 不同温度条件下大豆分离蛋白与维生素  $B_{12}$  复合物的 Stern - Volmer 曲线

Fig.2 Stern - Volmer plots of SPI interacting with vitamin  $B_{12}$  at three temperatures

由图 2 可知, Stern - Volmer 方程的曲线斜率随 着温度的上升而逐渐降低, 可以推断维生素  $B_{12}$  对大 豆分离蛋白的荧光猝灭机理属于静态猝灭, 一般来 说, 各类猝灭剂对生物大分子的最大猝灭速率常数  $K_q$  为  $2 \times 10^{10} L/(mol \cdot s)$ , 而表 1 中维生素  $B_{12}$  对大 豆分离蛋白的荧光猝灭速率常数均大于  $2 \times 10^{10} L/(mol \cdot s)$ , 并且随着温度上升,  $K_q$  逐渐降低, 更 有力地证明了维生素  $B_{12}$  对大豆分离蛋白的猝灭方 式是由于维生素  $B_{12}$  与大豆分离蛋白相互作用形成 了基态配合物而引发了静态猝灭<sup>[26]</sup>。

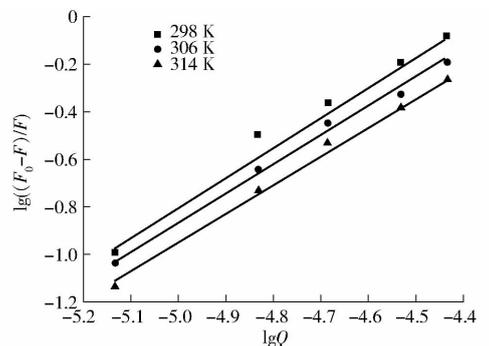


图 3 不同温度下维生素  $B_{12}$  猝灭大豆分离蛋白的 双对数曲线

Fig.3 Double logarithmic curves of vitamin  $B_{12}$  quenched soybean protein isolate at different temperatures

白也存在一个结合位点。

小分子物质与蛋白质之间的作用力主要为疏水 作用力、静电相互作用、氢键以及范德华力。通过 Vant Hoff 方程, 可计算出热力学参数值。维生素

B<sub>12</sub>与大豆分离蛋白之间的相互作用符合热力学公式

$$\ln \frac{K_{a2}}{K_{a1}} = \left( \frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right) \frac{\Delta H}{R} \quad (3)$$

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

式中  $\Delta H$ ——焓变, kJ/mol

$\Delta S$ ——熵变, kJ/(mol·K)

$\Delta G$ ——生成自由能变, kJ/mol

$R$ ——气体常数, 取 8.314 J/(mol·K)

$T$ ——温度, K

当温度变化不大时, 反应的  $\Delta H$  可看作常数。

根据文献[27]总结的小分子与生物大分子反应的热力学参数变化判断二者间主要作用力的类型规律: 当  $\Delta H > 0$  且  $\Delta S > 0$  时, 为疏水作用力;  $\Delta H < 0$  且  $\Delta S < 0$  时, 为范德华力和氢键作用;  $\Delta H < 0$  且  $\Delta S > 0$  时, 为静电相互作用。

由表 2 可知, 维生素 B<sub>12</sub> 与大豆分离蛋白的自由能变小于 0, 说明这是一个自由能降低的自发过程,  $\Delta H < 0$  且  $\Delta S < 0$ , 表明维生素 B<sub>12</sub> 与大豆分离蛋白之间的主要作用力是范德华力和氢键。文献[28]在研究花青素与小麦蛋白的相互作用机理发现, 中性条件下黑豆皮中的花青素(矢车菊素-3-O-葡萄糖苷, C3G)与麦谷蛋白主要通过范德华力和氢键作用结合。

表 2 维生素 B<sub>12</sub> 与大豆分离蛋白复合物的热力学参数值

Tab.2 Thermodynamic parameters of complex of vitamin B<sub>12</sub> and soybean protein isolate

| 温度/K | $\Delta H/(kJ \cdot mol^{-1})$ | $\Delta S/(kJ \cdot (mol \cdot K)^{-1})$ | $\Delta G/(kJ \cdot mol^{-1})$ |
|------|--------------------------------|--|--------------------------------|
| 298  |                                | -0.273                                   | -32.032                        |
| 306  | -113.528                       | -0.273                                   | -29.869                        |
| 314  |                                | -0.261                                   | -31.599                        |

### 2.3 同步荧光光谱分析

同步荧光光谱通常应用于小分子和生物大分子相互作用的研究中, 通过测量发射波长偏移研究对应氨基酸附近环境的极性情况从而反映小分子对生物大分子物质构象变化的影响<sup>[29]</sup>。通过将激发波长和发射波长之差  $\Delta\lambda$  固定在 15 nm 或 60 nm, 分别对大豆分离蛋白中的酪氨酸和色氨酸残基周围的极性变化进行分析<sup>[30]</sup>。

维生素 B<sub>12</sub> 与大豆分离蛋白相互作用的同步荧光光谱如图 4 所示, 随着维生素 B<sub>12</sub> 质量浓度的增加, 酪氨酸残基和色氨酸残基的荧光强度逐渐降低, 在  $\Delta\lambda = 60$  nm 的情况下, 同步荧光峰有轻微的蓝移, 从 282 nm 蓝移至 279 nm, 而在  $\Delta\lambda = 15$  nm 时, 同步荧光峰无明显移动, 可判断维生素 B<sub>12</sub> 对酪氨酸

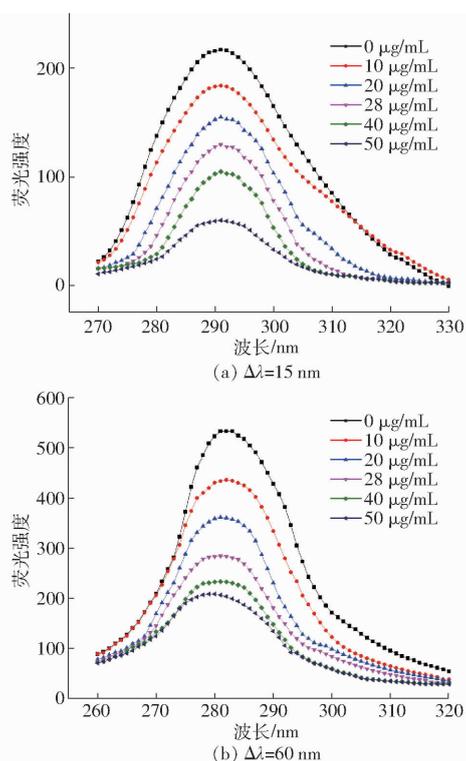


图 4 不同维生素 B<sub>12</sub> 质量浓度下大豆分离蛋白与维生素 B<sub>12</sub> 复合体系的同步荧光光谱

Fig.4 Synchronous fluorescence spectra of soybean protein isolate and vitamin B<sub>12</sub> complex system

残基的微环境无明显改变, 而色氨酸残基所处的微环境疏水性增加, 极性降低, 表明维生素 B<sub>12</sub> 与大豆分离蛋白结合位点更接近于色氨酸残基, 推测可能的原因为维生素 B<sub>12</sub> 与大豆分离蛋白的相互作用可能诱导色氨酸附近的多肽链形成折叠, 从而微环境疏水性进一步增加<sup>[21]</sup>。文献[11]在研究维生素 B<sub>12</sub> 与牛血清白蛋白的相互作用时也得出了相似的结论。

### 2.4 紫外光谱分析

根据蛋白质的色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸残基的紫外吸收峰不同, 可以通过紫外光谱仪分析蛋白三级结构的变化<sup>[18]</sup>。由图 5 可知, 大豆分离蛋白在 280 nm 附近存在紫外吸收峰, 而维生素 B<sub>12</sub> 在 361、520、550 nm 处存在紫外吸收峰, 随着维生素 B<sub>12</sub> 质量浓度的增大, 大豆分离蛋白和维生素 B<sub>12</sub> 复合体系的紫外最大吸收峰由 288 nm 蓝移到 284 nm, 说明维生素 B<sub>12</sub> 对大豆分离蛋白的结构产生了影响, 色氨酸所处的微环境疏水性增强, 这与荧光光谱分析中蛋白结构变化结果一致。并且大豆分离蛋白和维生素 B<sub>12</sub> 均为芳香族化合物, 这种结构变化可能会促使其参与非共价的  $\pi-\pi$  堆积作用, 文献[31]也报道了大豆分离蛋白构象的变化与分子中色氨酸残基和酪氨酸残基芳香杂环的  $\pi-\pi^*$  跃迁有关。

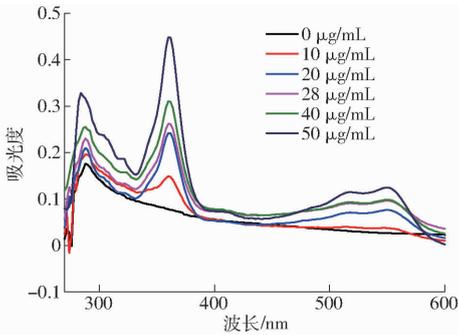


图5 大豆分离蛋白与维生素 B<sub>12</sub>复合体系的紫外光谱图

Fig.5 UV spectra of soybean protein isolate and vitamin B<sub>12</sub> composite system

## 2.5 红外光谱分析

红外光谱是一种分析蛋白质二级结构的光谱技术<sup>[32]</sup>。通过红外光谱可以进一步考察蛋白质构象的变化。加入不同质量浓度维生素 B<sub>12</sub> 的大豆分离蛋白红外光谱如图 6 所示。酰胺 I 带红外吸收峰的变化主要反映了蛋白质二级结构的变化。根据已有的研究表明:蛋白质二级结构与各子峰间的对应关系为:波数 1 646 ~ 1 664 cm<sup>-1</sup>处对应的结构为 α-螺旋;波数 1 615 ~ 1 637 cm<sup>-1</sup>和 1 682 ~ 1 700 cm<sup>-1</sup>处对应的结构为 β-折叠;波数 1 664 ~ 1 681 cm<sup>-1</sup>处对应的结构为 β-转角;波数 1 637 ~ 1 645 cm<sup>-1</sup>处对应的结构为无规则卷曲<sup>[33]</sup>。由图 6 可知,维生素 B<sub>12</sub> 加入后,大豆分离蛋白的酰胺 I 带发生轻微红移(由 1 633.3 cm<sup>-1</sup>红移到 1 635.8 cm<sup>-1</sup>)而酰胺 II 带基本没有移动,可能是因为维生素 B<sub>12</sub> 与大豆蛋白发生了相互作用,通过氢键结合形成复合物,导致大豆分离蛋白肽链重排,最终导致二级结构的变化<sup>[34]</sup>。此外,大豆蛋白酰胺 I 带的强度有所减弱,说明 α-螺旋的含量在加入

维生素 B<sub>12</sub>后明显增加。文献[31]研究大豆分离蛋白与花青素的相互作用发现,蛋白的酰胺 I 带发生了红移引起二级结构发生改变。

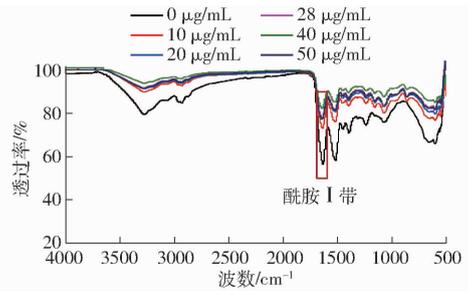


图6 不同维生素 B<sub>12</sub>质量浓度下大豆分离蛋白-维生素 B<sub>12</sub>复合物中大豆分离蛋白的红外光谱图

Fig.6 Infrared spectra of SPI in soybean protein isolate and vitamin B<sub>12</sub> complex

## 2.6 圆二色谱分析

圆二色谱是一种通过检测水溶性蛋白进而计算各种蛋白质二级结构含量的技术。加入维生素 B<sub>12</sub> 前后,大豆蛋白的二级结构含量如表 3 所示。随着维生素 B<sub>12</sub> 质量浓度的增大,大豆蛋白二级结构含量均发生了明显的变化。α-螺旋和 β-转角相对含量逐渐升高,β-折叠和无规则卷曲相对含量逐渐降低,这表明 β-折叠和无规则卷曲结构逐渐向 α-螺旋和 β-转角结构转变,可能是由于维生素 B<sub>12</sub> 与大豆蛋白表面的亲水性侧链结合,改变了蛋白的构象,一定程度上提高了蛋白质聚合程度<sup>[35]</sup>。圆二色谱的结果证明了维生素 B<sub>12</sub> 的结合改变了大豆蛋白的构象,改变了荧光基团周围的局部微环境,形成了更有组织的构象,与红外光谱得出的结果相一致。

表3 大豆分离蛋白-维生素 B<sub>12</sub>复合物中大豆分离蛋白二级结构相对含量

Tab.3 Relative content of SPI secondary structure in soybean protein isolate and vitamin B<sub>12</sub> complex

| 维生素 B <sub>12</sub> 质量浓度/<br>(μg·mL <sup>-1</sup> ) | 相对含量/%                      |                             |                             |                             |
|---|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|   | α-螺旋                        | β-折叠                        | β-转角                        | 无规则卷曲                       |
| 0   | (17.94 ± 0.01) <sup>f</sup> | (31.95 ± 0.01) <sup>a</sup> | (20.92 ± 0.02) <sup>e</sup> | (29.19 ± 0.02) <sup>a</sup> |
| 10  | (19.44 ± 0.02) <sup>e</sup> | (30.51 ± 0.03) <sup>b</sup> | (20.90 ± 0.02) <sup>e</sup> | (29.15 ± 0.01) <sup>b</sup> |
| 20  | (20.43 ± 0.01) <sup>d</sup> | (29.01 ± 0.02) <sup>c</sup> | (21.48 ± 0.01) <sup>d</sup> | (29.08 ± 0.03) <sup>c</sup> |
| 28  | (20.60 ± 0.02) <sup>e</sup> | (28.88 ± 0.01) <sup>d</sup> | (21.50 ± 0.01) <sup>e</sup> | (29.02 ± 0.02) <sup>d</sup> |
| 40  | (20.97 ± 0.01) <sup>b</sup> | (28.43 ± 0.01) <sup>e</sup> | (21.60 ± 0.02) <sup>b</sup> | (29.00 ± 0.01) <sup>d</sup> |
| 50  | (22.06 ± 0.04) <sup>a</sup> | (28.44 ± 0.01) <sup>e</sup> | (21.92 ± 0.02) <sup>a</sup> | (28.98 ± 0.01) <sup>e</sup> |

## 3 结论

(1) 荧光光谱分析表明,维生素 B<sub>12</sub> 对大豆分离蛋白具有荧光猝灭作用,猝灭机制为静态猝灭,二者主要通过范德华力和氢键作用结合,结合位点数为 1。

(2) 同步荧光光谱分析表明,维生素 B<sub>12</sub> 与大豆分离蛋白的结合位点更接近色氨酸残基;紫外吸收

光谱分析表明,维生素 B<sub>12</sub> 使得大豆蛋白中色氨酸残基所处微环境发生变化,疏水性增强,改变了大豆蛋白的构象。

(3) 红外光谱和圆二光谱分析表明,维生素 B<sub>12</sub> 的加入改变了大豆分离蛋白的二级结构,具体表现为 β-折叠和无规则卷曲相对含量减少、α-螺旋和 β-转角相对含量增加。

## 参 考 文 献

- [1] BITO T, MATSUNAGA Y, YABUTA Y, et al. Vitamin B<sub>12</sub> deficiency in *Caenorhabditis elegans* results in loss of fertility, extended life cycle, and reduced lifespan[J]. FEBS Open Bio., 2013, 3(1):112 – 117.
- [2] WATANABE F, BITO T. Determination of cobalamin and related compounds in foods[J]. Journal of AOAC International, 2018, 101(5):1308 – 1313.
- [3] 中国营养学会. 中国居民膳食营养素参考摄入量[M]. 北京:中国轻工业出版社, 2010.
- [4] BITO T, BITO M, ASAI Y, et al. Characterization and quantitation of vitamin B<sub>12</sub> compounds in various chlorella supplements [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(45):8516 – 8524.
- [5] GRAHAM D E, PHILLIPS M C. Proteins at liquid interfaces: III. molecular structures of adsorbed films[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 1979, 70(3): 427 – 439.
- [6] JAKOBEK L. Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins[J]. Food Chemistry, 2015, 175:556 – 567.
- [7] 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.
- [8] DING X, YAO P. Soy protein/soy polysaccharide complex nanogels: folic acid loading, protection, and controlled delivery[J]. Langmuir, 2013, 29(27):8636 – 8644.
- [9] NESTERENKO A, ALRIC I, SILVESTRE F, et al. Comparative study of encapsulation of vitamins with native and modified soy protein[J]. Food Hydrocolloids, 2014, 38(6):172 – 179.
- [10] LI D, ZHANG T, XU C, et al. Effect of pH on the interaction of vitamin B<sub>12</sub> with bovine serum albumin by spectroscopic approaches[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2011, 83(1):598 – 608.
- [11] 樊艳华, 冯锋, 陈泽忠, 等. 维生素 B<sub>12</sub> 与牛血清白蛋白相互作用的荧光法研究[J]. 光谱实验室, 2011, 28(3):1331 – 1335.  
FAN Yanhua, FENG Feng, CHEN Zezhong, et al. Studies on interaction between bovine serum albumin and vitamin B<sub>12</sub> by fluorescence spectrometry[J]. Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory, 2011, 28(3): 1331 – 1335. (in Chinese)
- [12] WANG H, SHOU Y, ZHU X, et al. Stability of vitamin B<sub>12</sub> with the protection of whey proteins and their effects on the gut microbiome[J]. Food Chemistry, 2019, 276(1):298 – 306.
- [13] 毕爽, 江连洲, 毛惠婷, 等. 超声波处理对大豆分离蛋白-磷脂相互作用及其复合物功能性质的影响[J]. 食品科学, 2016, 37(17):1 – 6.  
BI Shuang, JIANG Lianzhou, MAO Huiting, et al. Effect of ultrasound on soybean protein isolate-phospholipid interaction and functional properties of their composite system[J]. Food Science, 2016, 37(17):1 – 6. (in Chinese)
- [14] LI S, LI D. Investigation on the pH-dependent binding of benzocaine and lysozyme by fluorescence and absorbance[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2011, 82(1):396 – 405.
- [15] NAGY K, COURTETCOMPONDU 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.
- [16] HE W, DOU H, LI Z, et al. Investigation of the interaction between five alkaloids and human hemoglobin by fluorescence spectroscopy and molecular modeling[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2014, 123: 176 – 186.
- [17] 毕爽, 张巧智, 丁俭, 等. 红外光谱研究超声促聚集作用对大豆蛋白-磷脂结构与功能的影响[J]. 食品科学, 2017, 38(11):25 – 31.  
BI Shuang, ZHANG Qiaozhi, DING Jian, et al. Infrared spectroscopic analysis of the effect of ultrasound-promoted aggregation behavior on structural and functional properties of soybean protein-lecithin system [J]. Food Science, 2017, 38(11): 25 – 31. (in Chinese)
- [18] LI J, LI Y, GUO S. The binding mechanism of lecithin to soybean 11S and 7S globulins using fluorescence spectroscopy[J]. Food Science and Biotechnology, 2014, 23(6):1785 – 1791.
- [19] VIVIAN J T, CALLIS P R. Mechanism of tryptophan fluorescence shifts in proteins[J]. Biophysical Journal, 2001, 80(5): 2093 – 2109.
- [20] TIAN J, ZHAO Y, LIU X, et al. A steady-state and time-resolved fluorescence, circular dichroism study on the binding of myricetin to bovine serum albumin[J]. Luminescence, 2009, 24(6):386 – 393.
- [21] MAKARSKA-BIALOKOZ M. Investigation of the binding affinity in vitamin B<sub>12</sub>-Bovine serum albumin system using various spectroscopic methods[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2017, 184:262 – 269.
- [22] 江连洲, 陈思, 李杨, 等. 大豆分离蛋白-花青素复合物的制备及其蛋白结构与功能性质分析[J]. 食品科学, 2018, 39(10):20 – 27.  
JIANG Lianzhou, CHEN Si, LI Yang, et al. Effects of complexation with anthocyanin on the structural and functional properties of denatured soybean protein[J]. Food Science, 2018, 39(10): 20 – 27. (in Chinese)
- [23] XIE M X, XU X Y, WANG Y D. Interaction between hesperetin and human serum albumin revealed by spectroscopic methods [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2005, 1724(1 – 2):215 – 224.
- [24] SHAHABADI N, MAGHSUDI M, KIANI Z, et al. Multispectroscopic studies on the interaction of 2-tert-butylhydroquinone

- (TBHQ), a food additive, with bovine serum albumin[J]. *Food Chemistry*, 2011, 124(3): 1063 – 1068.
- [25] LI C, HUANG X, PENG Q, et al. Physicochemical properties of peanut protein isolate-glucomannan conjugates prepared by ultrasonic treatment[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2014, 21(5): 1722 – 1727.
- [26] CHANGYUN C, MEIHUA M, JUNQI Z, et al. Spectroscopic investigation of the interaction of bovine serum albumin with a novel cardiac agent V-09[J]. *Spectroscopy*, 2008, 22(1): 43 – 50.
- [27] ROSS P D, SUBRAMANIAN S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability [J]. *Biochemistry*, 1981, 20(11): 3096 – 3102.
- [28] 王晨, 谢岩黎, 范亭亭. 花青素与小麦蛋白相互作用及对蛋白质结构的影响[J]. *食品科学*, 2019, 40(20): 60 – 66.  
WANG Chen, XIE Yanli, FAN Tingting. Interaction of cyanidin-3-O-glucoside with gliadin and glutenin and their effect on protein structure[J]. *Food Science*, 2019, 40(20): 60 – 66. (in Chinese)
- [29] HU Y J, LIU Y, PI Z B, et al. Interaction of cromolyn sodium with human serum albumin: a fluorescence quenching study [J]. *Bioorg. Med. Chem.*, 2005, 13(24): 6609 – 6614.
- [30] TENG Y, LIU R, YAN S, et al. Spectroscopic investigation on the toxicological interactions of 4-aminoantipyrine with bovine hemoglobin[J]. *Journal of Fluorescence*, 2010, 20(1): 381 – 387.
- [31] 朱颖, 王中江, 李杨, 等. 花青素对大豆蛋白质二级结构影响的多重光谱分析[J/OL]. *农业机械学报*, 2018, 49(6): 368 – 374, 426.  
ZHU Ying, WANG Zhongjiang, LI Yang, et al. Effects of anthocyanins on the secondary structure of soybean protein isolate by multiplex spectroscopy[J/OL]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2018, 49(6): 368 – 374, 426. [http://www.jcsam.org/jcsam/ch/reader/view\\_abstract.aspx?flag=1&file\\_no=20180644&journal\\_id=jcsam](http://www.jcsam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?flag=1&file_no=20180644&journal_id=jcsam). DOI: 10.6041/j.issn.1000-1298.2018.06.044. (in Chinese)
- [32] 李杨, 王中江, 王瑞, 等. 不同热处理条件下大豆分离蛋白的红外光谱分析[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(8): 104 – 109.  
LI Yang, WANG Zhongjiang, WANG Rui, et al. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of soybean isolate protein at different heat treatment conditions[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2016, 37(8): 104 – 109. (in Chinese)
- [33] LIU Y, XIE M X, KANG J, et al. Studies on the interaction of total saponins of *Panax notoginseng* and human albumin by Fourier transform infrared spectroscopy [J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2003, 59(12): 2747 – 2758.
- [34] PU H, JIANG H, CHEN R, et al. Studies on the interaction between vincamine and human serum albumin: a spectroscopic approach [J]. *Luminescence*, 2014, 29(5): 471 – 479.
- [35] MAUERER A, LEE G. Changes in the amide I FT-IR bands of poly-L-lysine on spray-drying from  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -sheet or random coil conformations [J]. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2006, 62(2): 131 – 142.

(上接第 354 页)

- [21] 郭嘉明. 荔枝气调保鲜热质耦合机理与优化研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2016.  
GUO Jiaming. Research on the regulation and control mechanism of the coupling in heat and mass transfer and optimization of fresh-keeping environment with controlled atmosphere for litchi fruit [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2016. (in Chinese)
- [22] 庞红丽, 潘亮, 胡坚勇. 冷氨换热器传热设计及试验研究[J]. *导弹与航天运载技术*, 2018, 47(1): 57 – 61.  
PANG Hongli, PAN Liang, HU Jianyong. Heat transfer design and experimental study of cold delium heat exchanger [J]. *Missiles and Space Vehicles*, 2018, 47(1): 57 – 61. (in Chinese)
- [23] 贾洪伟, 张鹏, 郭涛, 等. 微通道热沉内液氮的流动沸腾换热实验[J]. *上海交通大学学报*, 2014, 48(9): 64 – 68.  
JIA Hongwei, ZHANG Peng, GUO Tao, et al. Experimental investigation of heat transfer characteristics of flow boiling of liquid nitrogen in micro-channels heat sin [J]. *Journal of Shanghai Jiaotong University*, 2014, 48(9): 64 – 68. (in Chinese)
- [24] 赵成. 低温紧凑型换热器的传热机理分析及实验研究[D]. 保定: 华北电力大学, 2010.  
ZHAO Cheng. Theoretical analysis and experimental research on heat transfer of the compact heat exchangers in cryogenic engineering [D]. Baoding: North China Electric Power University, 2010. (in Chinese)
- [25] 黄磊, 裴红珍, 白金山. 循环水加热汽化器的设计分析[J]. *中国化工装备*, 2014, 16(6): 21 – 25.  
HUANG Lei, PEI Hongzhen, BAI Jinshan. Design and analysis of circulating water heating carburetor [J]. *China Chemical Industry Equipment*, 2014, 16(6): 21 – 25. (in Chinese)
- [26] 李长有, 钱东平. *工程热力学与传热学* [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2014.
- [27] MAHAJAN P V, GOSWAMI T K. Use of liquid nitrogen in CA storage: theoretical analysis and experimental validation [J]. *Journal of Food Engineering*, 2007, 82(1): 77 – 83.
- [28] 邹春阳. 自然冷资源利用中贮冰蓄冷试验研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2012.  
ZOU Chunyang. Research of ice storage test in utilizing natural cooling resource [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2012. (in Chinese)