

单宁酸对酪蛋白酸钠的作用方式分析

李艳, 巩世磊, 高焕园, 曹青, 靳利娥

(太原理工大学化学化工学院, 山西太原 030024)

摘要: 单宁酸能使食物中的蛋白质变成不易消化的凝固物质, 影响人体对蛋白质的吸收利用, 为了阐明二者之间的作用方式, 实验利用差热-热重分析、傅里叶红外光谱和荧光光谱研究了单宁酸 (Tannic acid, T) 对酪蛋白酸钠 (Sodium Caseinate, SC) 结构的影响。红外光谱表明, 酪蛋白酸钠和单宁酸相互作用后, 其二级结构发生了改变, β -折叠和 β -转角含量相应地减少, α -螺旋、无规则卷曲结构增多; 荧光光谱说明, T 的加入可以使 SC 的荧光发生静态猝灭, 由荧光强度变化速率和单宁酸的浓度的双对数回归曲线得出了 T 和 SC 的结合常数 $K_A=1.30 \times 10^3 \text{ L/mol}$, 结合位点数 $n=1.20$; 热重和差热分析表明, 单宁酸-酪蛋白酸钠复合物 (T-SC) 的玻璃化温度升高了 20°C , 变性温度升高了 86°C 。分析实验结果: 单宁酸的存在使酪蛋白酸钠分子链之间的作用力增大, 链段移动受阻, 形成更大的立体网状结构, 稳定性增加。

关键词: 单宁酸, 酪蛋白酸钠, 二级结构, 荧光猝灭, 热稳定性

文章编号: 1673-9078(2015)6-111-115

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.6.018

Analysis of the Interactions between Tannic Acid and Sodium Caseinate

LI Yan, GONG Shi-lei, GAO Huan-yuan, CAO Qing, JIN Li-e

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, China)

Abstract: The digestion and absorption of protein by the human body can be affected by a solidified material formed through the interaction between tannic acid (TA) and sodium caseinate (SC) in food. In order to clarify this interaction, the effects of TA on SC were investigated by thermogravimetry/differential thermal analysis (TG-DTA), Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), and fluorescence spectrophotometry. The results showed that TA has an important effect on the structure of SC. FT-IR demonstrated that the secondary structure of SC was modified in the presence of TA. The contents of β -sheets and β -turns decreased, while those of α -helices and random coil structures increased. Fluorescence spectra also confirmed that there was static quenching of SC fluorescence. The double logarithmic regression curve plotted using the fluorescence intensity rate of change and the TA concentration was used to obtain the binding constant and the number of binding sites, which were $1.30 \times 10^3 \text{ L/mol}$ and 1.20, respectively. TG-DTA showed that the temperatures of glass transition and thermal denaturation of TA-SC increased by 20°C and 86°C , respectively. Analysis of the experimental results showed that the presence of TA enhanced the force between SC molecular chains, which impeded the movement of the chains and formed a larger three-dimensional network structure, thereby increasing stability.

Key words: tannins acid; sodium caseinate; secondary structure; fluorescence quenching; thermostability

单宁酸 (Tannic acid, T) 是广泛存在于蔬菜和水果的皮、根、叶、果中的一类复杂的高分子化合物^[1], 其结构中含有酚羟基、羧基、羰基等活性官能团, 可以与蛋白质、多糖、生物碱等多种物质结合, 具有独特的生理活性和一定的药用价值, 如止血、抑制微生物、抗过敏、抗突变、抗癌、抗肿瘤、抗衰老等^[2-3]。其中, 单宁酸与蛋白质结合能力很强, 高浓度的单宁酸能同蛋白质相互作用变成不易消化的凝固性物质, 会降低

收稿日期: 2014-09-24

基金项目: 国家自然科学基金项目 (51174144)

作者简介: 李艳 (1990-), 女, 硕士, 研究方向: 食品化学

通讯作者: 靳利娥 (1964-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品添加剂的平价

蛋白质的营养价值, 进而影响人体对蛋白质的吸收和利用, 造成富含多酚食品的营养损失^[4], 因此, 从分子相互作用的水平认识并阐明单宁酸与蛋白质作用的模式和作用力类型, 更能合理利用和处理二者之间的作用关系, 以便调整和改善膳食结构。

牛奶是膳食中主要摄取蛋白质的日常食品。酪蛋白是牛奶的主要成分, 其含量是牛奶中总蛋白含量的 80%, 且含有全部蛋白质氨基酸, 人体必需的 8 种氨基酸含量很高, 是营养价值很高的蛋白质之一^[5]。正因为如此, 酪蛋白在食品工业中常作为食品组分或添加剂^[6], 如果在膳食中酪蛋白和单宁酸相互作用, 将会影响食物的营养价值。为了认识二者的相互作用规律和合理利用二者之间的作用关系, 本实验从新鲜牛

奶中提取酪蛋白,在碱性条件下将酪蛋白水解成酪蛋白酸钠(Sodium Caseinate, SC),添加单宁酸制成单宁酸-酪蛋白酸钠复合物,测定其光谱特性,根据光谱特性从分子的角度考察单宁酸与酪蛋白酸钠的作用方式。通过热重分析其热稳定性,为单宁酸影响食物的营养提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

F-280荧光分光光度计,天津港东科技有限公司, TENSO-27傅里叶红外光谱仪,德国BRUKER公司 Netzsch/STA409C型热分析仪,德国;纯牛奶,山西古城乳业集团有限公司制造;其他试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 样品制备

按照参考文献[7],从新鲜牛奶中提取酪蛋白备用。取1.0 g提取的酪蛋白,加入25 mL、0.5 mol/L的NaOH溶液,加热至95 ℃,水解3 h,冷却,制得SC。将上述制备的酪蛋白酸钠溶液,加入一定质量比的单宁酸加热到50 ℃,恒温1 h脱气。在温度为45 ℃、真空干燥14 h得单宁酸-酪蛋白酸钠复合物(T-SC)。

1.2.2 傅里叶红外光谱测定

准确称取100 mg的溴化钾,添加1 mg样品,用研钵研磨成均匀的粉末,压制成薄片,用TENSO-27傅里叶红外光谱仪(德国BRUKER公司)全波段扫描(400~4000 cm^{-1}),扫描次数16次。红外光谱仪自带的OPUS软件和Origin8.0软件处理谱图。

1.2.3 荧光光谱测定

在室温条件下,将研磨均匀的样品完全覆盖在荧光仪载物台,采用激发波长280 nm,狭缝宽度5 nm,用F-280荧光分光光度计(天津港东科技有限公司)在300~750 nm范围内测定样品的荧光发射光谱。

1.2.4 差热-热重分析

室温条件下,使用Netzsch/STA409C型热分析仪(德国)分别测定SC和T-SC质量随温度变化的曲线。称取10 mg左右已烘干磨成粉末的样品,装进热重天平的坩埚中,在氮气气氛下,设置加热速率为10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$,在温度为30~700 $^{\circ}\text{C}$ 范围内扫描样品的质量随温度变化的曲线。

2 结果与讨论

2.1 单宁酸对酪蛋白酸钠红外光谱图的影响

图1为SC和T-SC的红外光谱图。

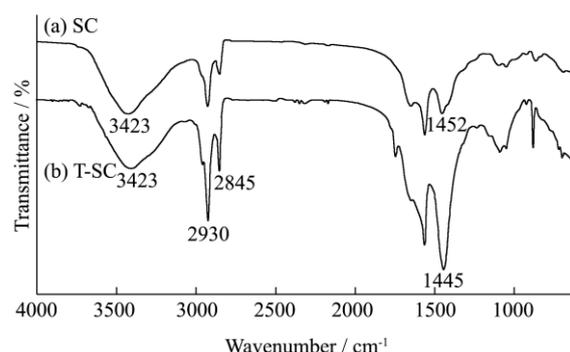


图1 酪蛋白酸钠和单宁酸酪蛋白酸钠复合物的红外光谱图
Fig.1 FT-IR spectra of sodium caseinate (a) and tannin acid-sodium caseinate (b)

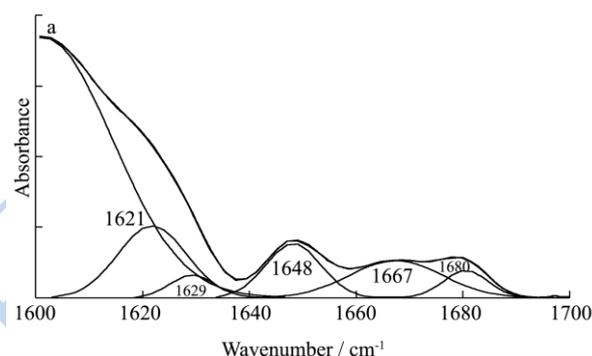


图2 酪蛋白酸钠1600~1700 cm^{-1} 酰胺I带二阶导数和退卷积分
Fig.2 Second derivative and fourier self-deconvolution of sodium caseinate in the 1600~1700 cm^{-1} region (amide I)

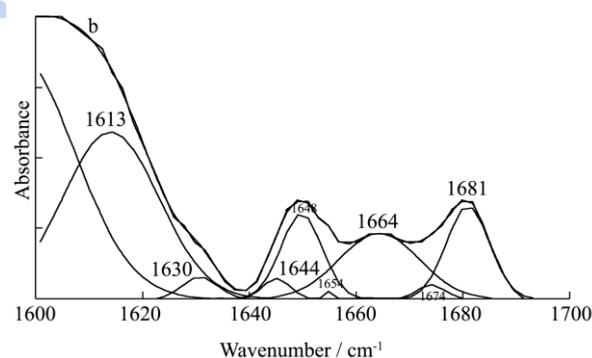


图3 单宁酸-酪蛋白酸钠复合物酪蛋白酸钠1600~1700 cm^{-1} 酰胺I带二阶导数和退卷积分
Fig.3 Second derivative and fourier self-deconvolution of tannin acid-sodium caseinate in the 1600~1700 cm^{-1} region

由图1可知3423 cm^{-1} 为O-H键的伸缩振动;2930、2845 cm^{-1} 为C-H键的伸缩振动峰;1600~1700 cm^{-1} 为蛋白质酰胺I带(C=O的伸缩振动)的吸收峰。1400~1550 cm^{-1} 是酰胺II带(NH变形振动,CN伸缩振动带)^[8],1200~1350 cm^{-1} 是酰胺III带(N-H面内弯曲振动和C-H伸缩振动)。在以上波长附近出现了相应的特征吸收峰,单宁酸的存在酪蛋白酸钠基团震

动发生了改变, T-SC 的吸收峰强度比 SC 吸收强度增大, 但是没有进行红移和蓝移, 可能二者之间没有形成共价键, 而是以弱的作用力结合。

根据文献^[9], 酰胺 I 带的二级结构分布为: 1600~1640 cm⁻¹ 为 β 折叠, 1650~1670 cm⁻¹ 为 α 螺旋, 1640~1650 cm⁻¹ 为无规则卷曲, 1680~1685 cm⁻¹ 为 β 转角结构。通过 OPUS 软件将谱图进行水蒸气补偿、基线校正以及平滑处理, 对酪蛋白酸钠和单宁酸-酪蛋白酸钠复合物 1600~1700 cm⁻¹ 酰胺 I 带谱图二阶导数、退卷积处理, 通过 origin8.0 软件进行 Gaussian 曲线拟合, 结果如图 2、图 3 所示。

计算各子峰面积在总面积中的百分含量得样品二级结构的含量^[10], 结果如表 1 所示。

表 1 酪蛋白酸钠和单宁酸-酪蛋白酸钠复合物的二级结构分析

样本	β -折叠/%	α -螺旋/%	无规则卷曲/%	β -转角/%
酪蛋白酸钠	67.29	9.13	7.61	15.97
单宁酸-酪蛋白酸钠复合物	44.92	36.59	18.47	0.02

由表 1 可以看出酪蛋白酸钠经过单宁酸改性后, 其二级结构发生了改变, β -折叠和 β -转角相应地减少, α -螺旋、无规则卷曲结构增多。这可能是由于单宁酸与酪蛋白酸钠之间存在着复杂的弱相互作用, 包括范德华力, 静电作用力, 以及氢键作用。特别是单宁酸的多羟基结构与酪蛋白酸钠 C=O 和 N-H 基团间形成氢键, 这种弱的相互作用导致酪蛋白酸钠二级结构发生显著变化。

2.2 单宁酸对酪蛋白酸钠的荧光光谱图的影响

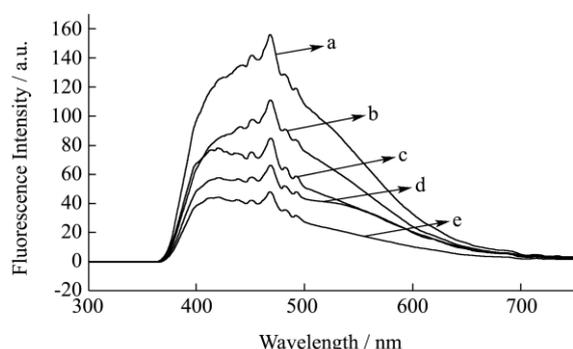


图 4 单宁酸酪蛋白酸钠复合物的荧光猝灭光谱图

Fig.4 Fluorescence quenching spectra of tannin acid-sodium caseinate

注: a-e 分别表示单宁:酪蛋白酸钠=0:1; 0.05:1; 0.10:1;

0.15:1; 0.20:1。

酪蛋白酸钠中存在色氨酸和酪氨酸残基, 受到特定的光激发后会发射一定强度的荧光^[11]。图 4 所示是室温下, 激发光波长为 280 nm 时, 酪蛋白酸钠的荧光发射光谱随单宁酸浓度的变化谱图。

从图 4 可以观察到在 468 nm 处有强的荧光发射峰。单宁酸对酪蛋白酸钠的荧光发射强度有影响, 随着单宁酸含量的增加, 酪蛋白酸钠的荧光强度降低, 表明二者发生了相互作用, 发生了能量转移。单宁酸可以使酪蛋白酸钠发生荧光猝灭, 这可能是由于单宁酸分子的羟基与酪蛋白酸钠分子裸露的活性基团相互作用使酪蛋白酸钠分子中能够产生内源荧光的某种氨基酸残基的微环境发生变化的结果。

用 Stern-Volmer 方程判断猝灭类型:

$$F_0/F = 1 + K_q t_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (1)$$

式中, F_0 和 F 分别表示加入和不加入猝灭剂时体系的荧光强度; $[Q]$ 为猝灭剂浓度 (mol L⁻¹), t_0 为不存在猝灭剂时荧光物质的平均寿命, 生物大分子的荧光平均寿命一般约为 (10⁻⁸ s), K_q 为荧光猝灭速率常数, K_{SV} 为 Stern-Volmer 猝灭常数。

计算结果如表 2 所示。

表 2 单宁酸-酪蛋白酸钠复合物的荧光猝灭类型
Table 2 Fluorescence quenching type of tannin acid-sodium caseinate

	[Q]/(mol/L)	F	F ₀ /F	K _q [L/(mol s)]
L-0.00	0	155.74	-	-
L-0.05	1.18×10 ⁻³	110.80	1.41	3.98×10 ¹⁰
L-0.10	2.35×10 ⁻³	84.61	1.84	3.58×10 ¹⁰
L-0.15	3.53×10 ⁻³	65.87	2.36	3.87×10 ¹⁰
L-0.20	4.70×10 ⁻³	48.10	3.24	4.76×10 ¹⁰

在室温 25 °C 下, 当 K_q 大于最大动态扩散猝灭常数 2.00×10¹⁰ L/(mol s) 时, 认为是静态猝灭, 否则为动态猝灭。本实验得到的 K_q 经计算分别为 3.98×10¹⁰ L/(mol s)、3.58×10¹⁰ L/(mol s)、3.87×10¹⁰ L/(mol s) 和 4.76×10¹⁰ L/(mol s), 从而表明单宁酸和酪蛋白酸钠发生的猝灭类型是由于形成复合物所引起的静态猝灭。生物大分子与小分子结合时, 其结合常数与结合位点数可以从下面的方程式^[12]获得:

$$\log(F_0 - F)/F = \log K_A + n \log [Q] \quad (2)$$

式中 $[Q]$ 为溶液中单宁酸的浓度, K_A 为表观结合常数, n 为结合位点数。

将 $\log(F_0 - F)/F$ 和 $\log [Q]$ 做双对数线性拟合, 得到图 5 所示。

通过图 5 中直线的斜率及截距计算可得: $\lg K_A = 3.12$, 则结合常数 $K_A = 1.30 \times 10^3$ L/mol, 结合位点数 $n = 1.20$ 。单宁酸和酪蛋白酸钠的结合常数较小,

数量级在 10^3 , 说明单宁酸和酪蛋白酸钠之间是通过氢键等分子间弱作用力相结合。

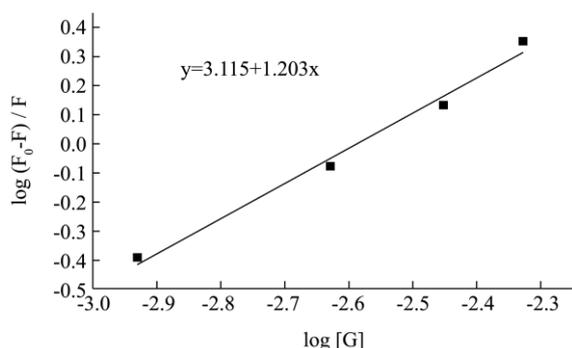


图5 单宁酸酪蛋白酸钠复合物荧光猝灭的双对数曲线
Fig.5 Modified Stern-Volmer plot of tannin acid-sodium caseinate

2.3 单宁酸对酪蛋白酸钠热稳定性的影响

SC 的热重分析结果如图 6 所示, T-SC 的热重分析结果如图 7 所示。

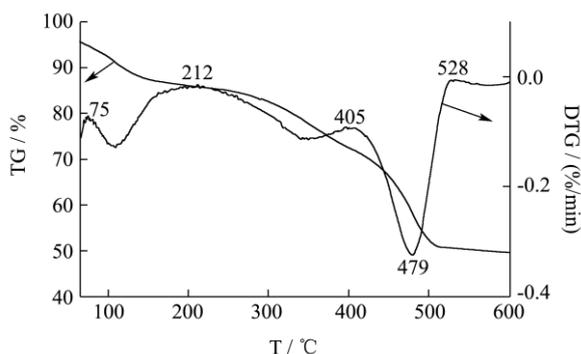


图6 酪蛋白酸钠的热重分析曲线
Fig.6 TG and DTG analysis curve of sodium caseinate

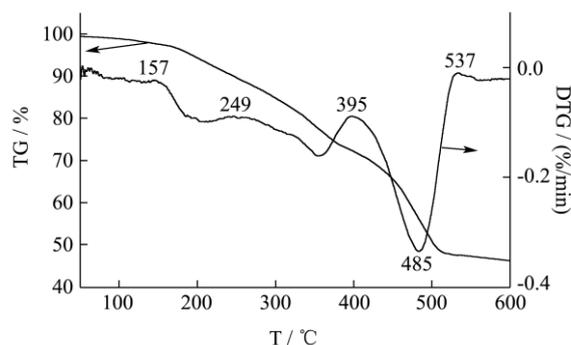


图7 单宁酸-酪蛋白酸钠复合物的热重分析曲线
Fig.7 TG and DTG analysis curve of tannin acid-sodium caseinate

如图 6、7 所示: 两种物质受热均有明显失重, 失重区发生在一个比较宽的温度带 50~550 °C 内, 主要的热裂解区域相对较窄, 集中在 160~540 °C。失重主要分为三个阶段。干燥阶段 (50 °C~160 °C), 失重率

为 17.7%; 故此阶段物质质量的减少主要是由水分的蒸发和分子间脱水引起的, 大约 102 °C 处水分蒸发的速度最快; 挥发分析出阶段 (160~540 °C), 此温度段内薄片的热裂解反应比较剧烈, 是主要的失重区, 原因是酪蛋白酸钠在此段发生了裂解反应生成了一些易挥发的小分子气体如: 二氧化碳、水等失重率可达到 80%。炭化阶段 (>540 °C) 为复合膜热解过程的残留物的缓慢分解过程, 并在最后生成焦炭^[13]。

图 6 表明 SC 在 405 °C 出现较快的失重速率, 在 480 °C 达到最大值; 图 7 表明 T-SC 在 395 °C 出现较快的失重速率, 在 485 °C 达到最大值; 添加了单宁酸后酪蛋白酸钠的热稳定性变化不明显。说明单宁酸的多羟基基团与酪蛋白酸钠没有形成共价键, 而是通过氢键等分子间的相互作用部分填充到酪蛋白酸钠中, 不影响酪蛋白酸钠的化学性质。

玻璃态转化温度是材料的一个重要特性参数, 材料的许多特性都在玻璃化转变温度附近发生急剧的变化^[14]。SC 的 DTA 分析曲线如图 8 所示, T-SC 的 DTA 分析曲线如图 9 所示。

由图 8 可以看出 SC 璃化转变温度 114 °C, 变性温度为 285 °C。由图 9 可以看出: T-SC 的玻璃化温度为 134 °C, 变性温度为 371 °C。

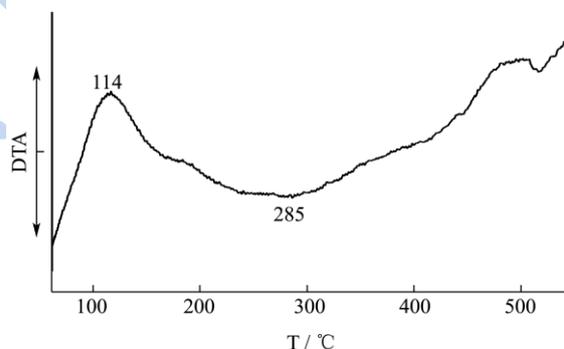


图8 酪蛋白酸钠的差热分析曲线
Fig.8 DTA/T curve of sodium caseinate

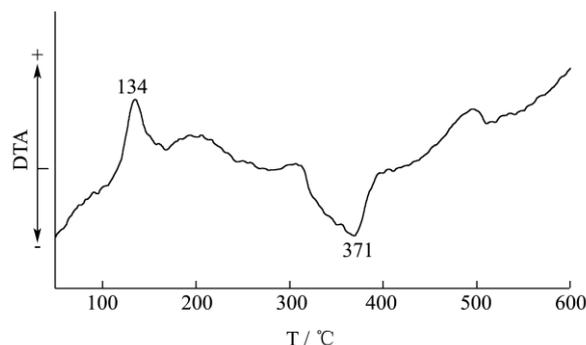


图9 单宁酸-酪蛋白酸钠复合物的差热分析曲线
Fig.9 DTA/T curve of tannin acid-sodium caseinate
与 SC 相比, T-SC 的玻璃化温度升高了 20 °C,

变性温度升高了 86 °C,说明由于加入单宁酸后,单宁酸的多羟基基团能够通过氢键等分子间的相互作用填充到酪蛋白中,使酪蛋白酸钠分子链之间的范德华力增大,链段移动受阻,形成更大的立体网状结构,结晶度升高,玻璃化转变温度升高。

比较酪蛋白和单宁酸-酪蛋白酸钠复合物的红外,荧光图谱及热重行为可知:酪蛋白酸钠分子中有极性基团,如胍基、酰胺、肽基、氨基和羧基可参与氢键的形成,而单宁酸分子中的众多的羰基和酚羟基也可参与氢键的形成,因此二者结合时通过分子间氢键等弱的作用力相互作用,在酪蛋白酸钠分子之间形成多点交连从而构成网络结构。单宁酸与酪蛋白酸钠作用的模型示意图如图 10 所示。

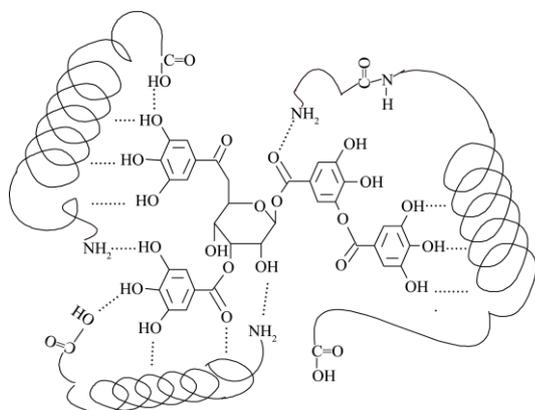


图 10 单宁酸与酪蛋白酸钠相互作用模型示意图

Fig.10 Interactions between tannin acid and sodium caseinate

3 结论

单宁酸与酪蛋白酸钠结合后单宁酸的多羟基结构与酪蛋白酸钠极性基团间形成氢键,这种弱的相互作用导致酪蛋白酸钠二级结构发生显著变化使得 β -折叠和 β -转角相应地减少, α 螺旋、无规则卷曲结构增多。单宁酸能使酪蛋白酸钠发生荧光静态猝灭;导致酪蛋白酸钠分子链之间的弱作用力增大,链段移动受阻,形成更大的立体网状结构,结晶度升高,玻璃化转变温度升高,稳定性增加。

参考文献

- [1] Bartosz A, Oili K, Veikko K, et al. Can we measure condensed tannins from tannine-protein complexes?-A case study with acide-butanol assay in boreal forest soil organic layer [J]. *European Journal of Soil Biology*, 2014,64: 40-45
- [2] Schmidt M A, Halvorson J J, Gonzalez J M, et al. Kinetics and binding capacity of six soils for structurally defined hydrolyzable and condensed tannins and related phenols [J]. *Soils Sediments*, 2012, 12: 366-375
- [3] Quideau S, Deffeux D, Douat-Casassus C, et al. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis [J]. *Angew. Chem. Int. Ed*, 2011, 50: 586-621
- [4] Hasni I, Bourassa P, Hamdani S, et al. Interaction of milk α - and β -caseins with tea polyphenols [J]. *Food Chemistry*, 2011, 126: 630-639
- [5] Kristo E, Zbiliaderis C G, Zampraka A. Water vapour barrier and tensile properties of composite caseinate-pullulan films: Biopolymer composition effects and impact of beeswax lamination [J]. *Food Chemistry*, 2007, 101(2): 753-764
- [6] Moser S, Chegeni M, Jones O G, et al. The effect of milk proteins on the bioaccessibility of green tea flavan-3-ols [J]. *Food Research International*, 2014, 66, 297-305
- [7] 王秀奇,秦淑媛,高天慧.基础生物化学实验[M].北京:高等教育出版社,1999
WANG Xiu-qi, QIN Shu-yuan, GAO Tian-hui. *Biochemistry Experiment* [M]. Beijing: Higher Education Press, 1999
- [8] 李栋玉,晏翠琼,胡粉娥,等.蛋白质二级结构的二维红外相关光谱模拟研究[J].*光散射学报*,2013,25(4):417-422
LI Dong-yu, Yan Cui-qiong, Hu Fen-e, et al. Studied on simulation spectra of protein secondary structures by two-dimensional infrared correlation spectroscopy [J]. *the Journal of Light Scattering*, 2013, 25(4): 417-422
- [9] Ramos L, Reinas I, Silva S I, et al. Effect of whey protein purity and glycerol content upon physical properties of edible films manufactured therefrom [J]. *Food Hydrocolloids*, 2013, 30: 110-122
- [10] Anal á V G, Evelina G F, Mar á C A, et al. Changes in secondary structure of gluten proteins due to emulsifiers [J]. *Journal of Molecular Structure*, 2013, 1033: 51-58
- [11] Zhang G, Que Q, Pan J, et al. Study of the interaction between icariin and human serum albumin by fluorescence spectroscopy [J]. *Journal of Molecular Structure*. 2008, 881: 132-138
- [12] Zhang G W, Zhao N, Hu X, et al. Spectrochimica acta part a: molecular and biomolecular spectroscopy [J]. *Spectrochimica Acta Part A*, 2010, 76: 410-417
- [13] 靳利娥,王晓娟,申非凡,等.六元环蛋氨酸螯合硒的合成、表征及光谱分析[J].*光谱学与光谱分析*,2013,33(4):1061-1065
JIN Li-e, WANG Xiao-juan, SHEN Fan-fan, et al. Synthesis and spectral characteristics of selenium-chelated methionine with hexagon [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2013, 33(4): 1061-1065
- [14] Wu Y M, Zhao Z L, Li H B, et al. Low temperature pyrolysis characteristics of major components of biomass [J]. *Journal of Fuel Chemistry and Technology*, 2009, 37(4): 427-432

现代食品科技