

# 基于荧光及紫外光谱法对红松种鳞多酚与乳清蛋白相互作用的研究

岳鑫, 包怡红

(东北林业大学林学院, 黑龙江哈尔滨 150040)

**摘要:** 利用紫外-可见吸收光谱法和荧光光谱法, 研究了红松种鳞多酚与乳清蛋白之间的相互作用及其作用方式。紫外-可见吸收光谱表明: 红松种鳞多酚与乳清蛋白发生了相互作用并生成新的复合物, 改变了蛋白质芳香族残基在空间结构中所处的微环境, 诱导乳清蛋白的构象发生改变。荧光光谱表明: 红松种鳞多酚对乳清蛋白有较强的荧光猝灭作用且猝灭类型为生成复合物的静态猝灭作用。通过计算得出在不同温度下其二者相互作用的表现结合常数( $K_A$ )分别为:  $1.111 \times 10^4$  L/mol (25 °C),  $2.201 \times 10^4$  L/mol (30 °C),  $6.206 \times 10^4$  L/mol (35 °C), 对应的结合位点数( $n$ )分别为: 0.885、0.937、1.043。由热力学参数分析确定红松种鳞多酚与乳清蛋白间的相互作用反应是吸热过程, 反应的主要作用力是疏水作用力。

**关键词:** 红松种鳞多酚; 乳清蛋白; 相互作用; 紫外-可见吸收光谱; 荧光光谱

文章编号: 1673-9078(2019)07-114-120

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.7.016

## Interaction between the Polyphenols from *Pinus koraiensis* Seeds Scales and Whey Protein Studied by Fluorescence and Ultraviolet Spectroscopy

YUE Xin, BAO Yi-hong

(School of Forestry Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

**Abstract:** The interaction between the polyphenols from *Pinus koraiensis* seed scales and whey protein and associated modes of action were studied by ultraviolet-visible absorption spectroscopy and fluorescence spectroscopy. The analysis by ultraviolet-visible absorption spectroscopy revealed that the polyphenols from *Pinus koraiensis* seed scales interacted with whey protein and yielded new complexes, which also changed the microenvironment surrounding the spatial structures of the aromatic residues of proteins, and induced the conformational change of whey protein. The fluorescence spectroscopy analysis showed that the polyphenols had a strong fluorescence quenching effect on the whey protein, and the quenching type belonged to the static quenching of the formed complexes. The apparent binding constants ( $K_A$ ) of their interactions at different temperatures were calculated as:  $1.111 \times 10^4$  L/mol (25 °C),  $2.201 \times 10^4$  L/mol (30 °C),  $6.206 \times 10^4$  L/mol (35 °C), and the corresponding number of the binding sites ( $n$ ) were 0.885, 0.937 and 1.043, respectively. The analysis of thermodynamic parameters revealed that the interaction between the polyphenols from *Pinus koraiensis* seed scales and whey protein was an endothermic process, and the main interactive force was hydrophobic interaction.

**Key words:** polyphenols from *Pinus koraiensis* seed scales; whey protein; Interaction; ultraviolet-visible absorption spectroscopy; fluorescence spectroscopy

红松 (*Pinus koraiensis*), 亦称果松、海松, 常绿乔木, 广泛分布于我国的东北地区<sup>[1]</sup>。红松树皮、松塔鳞片、松子壳都含有大量的多酚类化合物, 一种天然抗氧化剂<sup>[2]</sup>, 由于其特殊的分子结构, 红松多酚还具有抗氧化<sup>[3-5]</sup>、抗肿瘤<sup>[6,7]</sup>、抗辐射<sup>[2,8]</sup>、增强免疫<sup>[9,10]</sup>

收稿日期: 2019-01-31

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2017YFC1601901)

作者简介: 岳鑫 (1992-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 功能食品

通讯作者: 包怡红 (1970-), 女, 教授, 博士后, 研究方向: 林下资源精深加工及功能性食品

的作用。松科植物多酚类物质在食品加工领域中的应用主要用以澄清饮料和酒类, 或作为食品保鲜剂和抗氧化剂, 并改善食品风味色泽<sup>[2]</sup>。

乳清蛋白是指牛乳在 pH 4.6 下沉淀酪蛋白后分离出的蛋白质总称, 是一种具有较高生物效价的优质天然蛋白, 约占牛乳蛋白质的 20%<sup>[11]</sup>。乳清蛋白中含有过氧化物酶、溶菌酶生长因子和大量氨基酸, 令其具有很高的营养价值<sup>[12]</sup>。同时, 受到如氨基酸组成等内在因素和加工条件等外在因素的影响, 使乳清蛋白具有包括发泡性<sup>[13]</sup>、乳化性<sup>[14]</sup>和持水性<sup>[15]</sup>在内的多种加

工功能特性。这些功能特性使得乳清蛋白及其衍生产物在食品生产加工中具有广泛的应用。

在食品加工及人体消化过程中,多酚能与多种化合物发生相互作用,其中蛋白质是最主要的化合物<sup>[16]</sup>。已有研究表明植物多酚与蛋白质能够发生相互作用,并对蛋白质的理化性质产生影响。如覃思<sup>[17]</sup>通过试验发现,茶多酚能够提高乳清蛋白的乳化能力;Sarker<sup>[18]</sup>等指出儿茶素能使 $\beta$ -乳球蛋白的发泡能力提高,并改善其泡沫稳定性;Harbourne<sup>[19]</sup>等人和Staszewski<sup>[20]</sup>等人的研究都指出多酚的加入使酪蛋白的凝胶强度增强。然而,以上的研究主要集中在多酚对乳类蛋白理化活性的影响,但其二者相互作用的机制研究讨论还较少。

本研究运用紫外-可见光谱和荧光光谱,研究了红松种鳞多酚与乳清蛋白相互作用的光谱特征。通过对荧光光谱数据的处理,深入分析了两者之间的结合机理、表观结合常数、结合位点数和作用力等重要信息,为了解红松种鳞多酚与乳清蛋白的结合方式,以及红松种鳞多酚在乳制品中的应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

红松种鳞多酚,实验室自制:原料预处理粉碎后采用超声辅助提取,经过 AB-8 大孔树脂和聚酰胺进行二次分离纯化,得到红松种鳞多酚纯化物,纯度 67.8%;乳清蛋白,纯度>80%,购自上海源叶生物科技有限公司。

试验中所用其他试剂均为国产分析纯;试验用水为去离子水。

### 1.2 仪器与设备

F-4500 型荧光分光光度计,日本 Hitachi 公司;UV-5500PC 型紫外可见分光光度计,上海元析仪器有限公司;FJ-200 型中草药粉碎机,天津市泰斯特有限责任公司;FA2004 型电子天平,上海天平仪器厂;KQ-300DE 型数控超声波清洗器,昆山超声仪器有限公司;DK-8D 型电热恒温水浴槽,上海一恒科学仪器有限公司;SHB-III G 循环式多用真空泵,郑州长城科工贸有限公司;RE-5205 旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;具砂板层析柱,上海三爱思试剂有限公司;LGJ-10B 型冷冻干燥机,北京四环科学仪器有限公司;PHS-3E 型 pH 计,上海仪电科学仪器股份有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 溶液配制

乳清蛋白用 pH 7.4 的 Tris-HCl 缓冲溶液(含 0.1 mol/L NaCl 以维持离子强度)配制成  $1.0 \times 10^{-4}$  mol/L 储备液置于冰箱 0~4 °C 保存备用;红松种鳞多酚用去离子水配制成  $1.0 \times 10^{-3}$  mol/L 储备液(为计算方便,统一使用多酚标准品没食子酸的分子质量 170.12 作为红松种鳞多酚的近似分子质量进行处理)。红松种鳞多酚溶液现用现配。

#### 1.3.2 紫外-可见吸收光谱测定

以相应试剂为空白参比,测定乳清蛋白添加了不同浓度红松种鳞多酚后的紫外-可见吸收图谱,乳清蛋白的浓度为  $2 \times 10^{-5}$  mol/L,加入不同体积红松种鳞多酚溶液,使红松种鳞多酚浓度依次为 0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0 $\times 10^{-5}$  mol/L。扫描区间:200~500 nm,采样间隔 1 nm,相互作用反应时间:120 min。

#### 1.3.3 荧光光谱分析

##### 1.3.3.1 荧光光谱测定

荧光试验在恒温条件下进行,恒温水浴温度分别为 25 °C、30 °C 和 35 °C。乳清蛋白的浓度固定为  $2 \times 10^{-5}$  mol/L,分别加入不同体积红松种鳞多酚溶液,使红松种鳞多酚浓度依次为 0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0 $\times 10^{-5}$  mol/L,混匀,水浴 2 h 后进行荧光扫描。荧光光谱测定条件:激发波长 280 nm,发射波长:300~500 nm,激发和发射的狭缝宽度均设定为 5 nm。比色皿厚度 10 mm,四面透光。

##### 1.3.3.2 猝灭常数计算

利用 Stern-Volmer 方程对荧光数据进行分析,以求得动态猝灭速率常数和动态猝灭常数:

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

式中: $F_0$ 和 $F$ 分别为荧光猝灭剂加入前后荧光分子的荧光强度, $[Q]$ 为猝灭剂浓度, $K_q$ 为动态猝灭速率常数, $K_{sv}$ 为动态猝灭常数, $\tau_0$ 为猝灭剂不存在时荧光分子的平均寿命,生物大分子的荧光平均寿命为  $10^{-8}$  s。

##### 1.3.3.3 结合位点计算

假设蛋白质上存在  $n$  个等同的独立结合位点,可以采用以下方程来计算结合常数和结合位点:

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

式中: $F_0$ 和 $F$ 分别为荧光猝灭剂加入前后荧光分子的荧光强度, $K_A$ 为表观结合常数, $n$ 为结合位点, $[Q]$ 为猝灭剂浓度。

##### 1.3.3.4 热力学参数计算

各热力学参数值通过以下公式进行计算:

$$\Delta G = -RT \ln K_A \quad (3)$$

$$\ln \frac{K_2}{K_1} = -\frac{\Delta H}{R} \left( \frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1} \right) \quad (4)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (5)$$

式中: R 为摩尔气体常数, 8.314 J/(mol·K), T 为试验温度,  $K_A$  为对应温度下表观结合常数。

### 1.3.4 数据分析

本文运用 Origin 2018、Microsoft Excel 2007 等软件处理试验数据, 获得红松种鳞多酚与乳清蛋白相互作用的紫外-可见吸收光谱、荧光光谱, 并由谱图变化来分析两者相互作用机制。

## 2 结果与分析

### 2.1 红松种鳞多酚与乳清蛋白相互作用的紫外-可见吸收光谱分析

由于组成蛋白质的部分氨基酸残基具有紫外吸收性质, 故紫外-可见吸收光谱法是研究小分子与蛋白质相互作用的常用方法<sup>[21]</sup>。通常, 氨基酸残基的构象是由蛋白质分子的微环境决定, 微环境改变导致构象改变, 生色基团的紫外吸收光谱随之发生改变<sup>[22]</sup>。当蛋白质与小分子发生作用后会吸收峰的位移、吸光度的变化。根据蛋白与小分子结合前后吸收光谱的差异可以判断两者是否发生了相互作用和蛋白质分子在配体的作用下其结构和构象的动态变化过程<sup>[23]</sup>等。在本试验中, 测定了红松种鳞多酚添加前后乳清蛋白的紫外-可见吸收光谱。红松种鳞多酚对乳清蛋白紫外-可见吸收光谱的影响如图 1 所示。

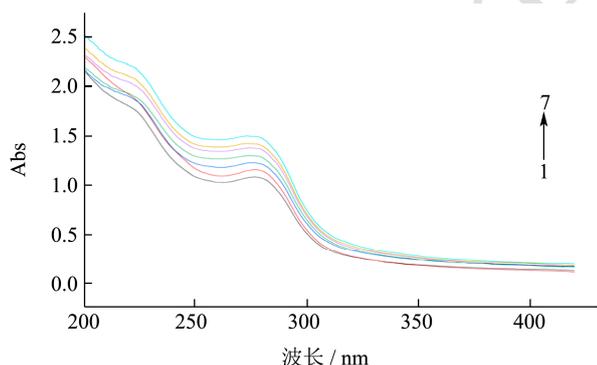


图 1 红松种鳞多酚与乳清蛋白相互作用的紫外-可见光谱  
Fig.1 UV-Vis absorption spectrum of interaction between polyphenols from *Pinus koraiensis* seeds and whey protein

注: (1~7) 乳清蛋白:  $2 \times 10^{-5}$  mol/L; 红松种鳞多酚: 0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0 ( $\times 10^{-5}$  mol/L)。

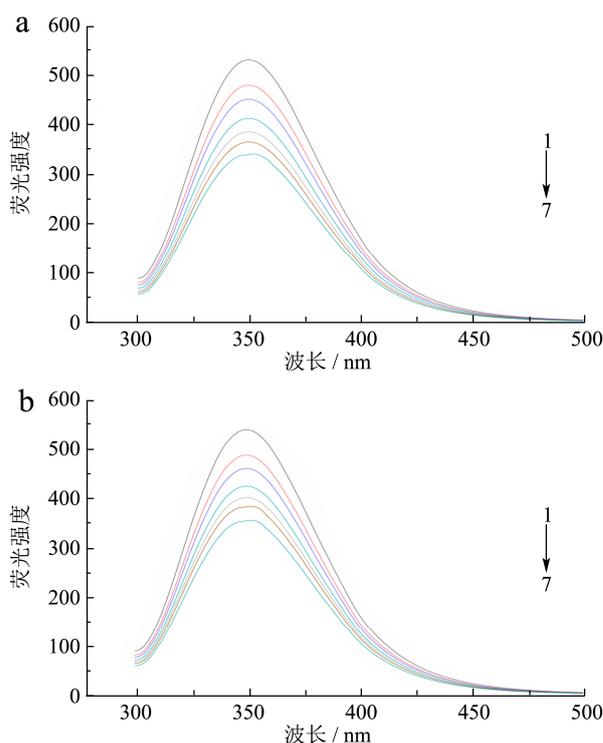
由图 1 可以看出, 加入红松种鳞多酚后, 乳清蛋白的吸收峰强度增大。乳清蛋白吸收峰值随着多酚浓度的增加而增大, 当多酚浓度为  $12.0 \times 10^{-5}$  mol/L 时, 乳清蛋白的吸收峰值最大, 且最大吸收峰波长发生 3 nm 的蓝移。这说明红松种鳞多酚对乳清蛋白的结构

产生了影响, 两者发生了相互作用生成了新的产物。相互作用导致了乳清蛋白的结构骨架变得松散, 肽链伸展, 使得蛋白分子内部疏水区域的酪氨酸残基和色氨酸疏水基团裸露, 所处微环境的疏水性减小, 使乳清蛋白构象改变。吸光度的增强表明这种构象的变化有利于蛋白质分子中色氨酸残基和酪氨酸残基中芳香环的  $\pi-\pi^*$  跃迁。

### 2.2 红松种鳞多酚与乳清蛋白相互作用的荧光光谱分析

#### 2.2.1 红松种鳞多酚对乳清蛋白内源性荧光光谱的影响

乳清蛋白分子中存在色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸残基, 这些残基含有的苯环结构或共轭双键使其在一定的波长下能够发射荧光, 故乳清蛋白具有内源性荧光<sup>[24]</sup>。色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸残基因为生色基团不同而分别在 348 nm、303 nm、282 nm 波长处出现荧光峰。由于蛋白质分子中苯丙氨酸残基的荧光极弱且易被猝灭, 荧光的产生主要是酪氨酸和色氨酸<sup>[25]</sup>。在 280 nm 激发波长下, 乳清蛋白的最大发射波长为 350.6 nm, 且在 303 nm 波长处未见荧光峰出现, 故本试验主要观察的是色氨酸荧光信息的变化。同时, 红松种鳞多酚本身的荧光发射信号非常弱, 对乳清蛋白的荧光信号基本不产生干扰, 因此不需考虑荧光内滤效应的干扰。



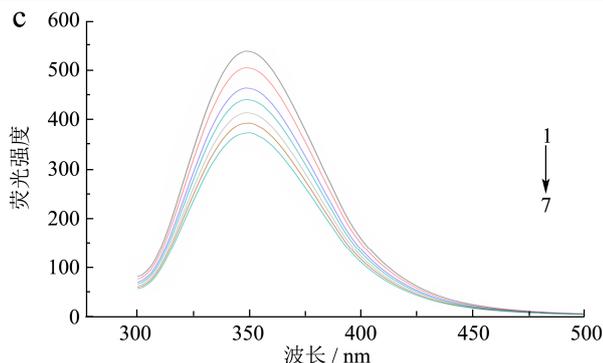


图2 红松种鳞多酚与乳清蛋白相互作用的荧光光谱

**Fig.2 Fluorescence spectra of interaction between polyphenols from *Pinus koraiensis* seeds and whey protein at different temperature**

注: a: 298 K, b: 303 K, c: 308 K; 1~7 乳清蛋白:  $2 \times 10^{-5}$  mol/L, 红松种鳞多酚:  $0 \times 10^{-5}$ 、 $2.0 \times 10^{-5}$ 、 $4.0 \times 10^{-5}$ 、 $6.0 \times 10^{-5}$ 、 $8.0 \times 10^{-5}$ 、 $10.0 \times 10^{-5}$ 、 $12.0 \times 10^{-5}$  mol/L。

红松种鳞多酚在结合过程中对乳清蛋白内源荧光光谱的影响如图2所示。在298 K、303 K及308 K试验温度下,保持乳清蛋白浓度固定不变,随着红松种鳞多酚添加量的增加,乳清蛋白的荧光光谱产生两方面变化:荧光猝灭和荧光峰位移。加入多酚后,蛋白质分子荧光发射峰的峰形基本未发生变化,而其在350.6 nm波长处的荧光发射强度逐渐下降。这说明红松种鳞多酚与乳清蛋白之间发生了相互作用。同时,红松种鳞多酚的加入使得乳清蛋白的最大荧光发射波长产生2 nm红移。研究表明,蛋白质分子最大荧光发射波长的变化,在一定程度上能够反映蛋白质分子中荧光发色基团本身及其周围环境的变化<sup>[26]</sup>。红松种鳞多酚的加入使得乳清蛋白荧光峰产生位移,说明色氨酸残基的亲水性增强,其肽链的伸展程度也有所增加,导致最大发射波长的变化<sup>[27]</sup>。以上结果表明,红松种

表1 不同温度下红松种鳞多酚与乳清蛋白相互作用的 Stern-Volmer 猝灭常数

**Table 1 Stern-Volmer constants of interaction polyphenols from *Pinus koraiensis* seeds and whey protein at different temperatures**

Temperature/K	$K_{sv}/(\times 10^4 \text{ L/mol})$	$K_q/[\times 10^{12} \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{s})]$	$R^2$
298	4.536	4.536	0.9972
303	4.030	4.030	0.9938
308	3.706	3.706	0.9975

结果表明,不同温度下红松种鳞多酚与乳清蛋白相互作用的 Stern-Volmer 曲线均呈现出良好的线性关系。通过比较得知,此反应的  $K_q$  值均大于各类猝灭剂对生物大分子的最大扩散猝灭常数  $2.0 \times 10^{10} \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{s})$ ,这表明它们之间的猝灭过程是由于乳清蛋白在基态时与红松种鳞多酚之间反应结合形成新的基态复合物所引起的静态猝灭。且由表1可知,随着温度的升高,猝灭常数  $K_{sv}$  值减小。而如果猝灭类型为

鳞多酚与乳清蛋白之间发生相互作用,生成不发射荧光的基态配合物,使得乳清蛋白的内源荧光发生猝灭,改变了色氨酸残基的微环境及蛋白质的构象。

### 2.2.2 红松种鳞多酚与乳清蛋白相互作用的荧光猝灭机理

小分子物质与蛋白结合的荧光猝灭机理主要分为动态猝灭和静态猝灭两种<sup>[28]</sup>。动态猝灭,是指荧光发射物质的激发态分子与荧光猝灭剂之间发生相互作用的过程。静态猝灭,是指荧光发射物质分子与荧光猝灭剂在基态时发生配合反应生成不发射荧光的基态配合物的过程。这两种猝灭机理可以根据荧光猝灭常数随温度的变化来区分:动态猝灭表现为随着温度的升高,荧光猝灭常数增大,静态猝灭相反<sup>[29]</sup>。因此,可根据不同试验温度下红松种鳞多酚与乳清蛋白相互作用的猝灭常数判断多酚对蛋白的猝灭机制。

根据 Stern-Volmer 方程,以  $[Q]$  为自变量,  $F_0/F$  为因变量进行线性拟合得图3。进而计算得到红松种鳞多酚与乳清蛋白相互作用的  $K_{sv}$  和  $K_q$ , 结果见表1。

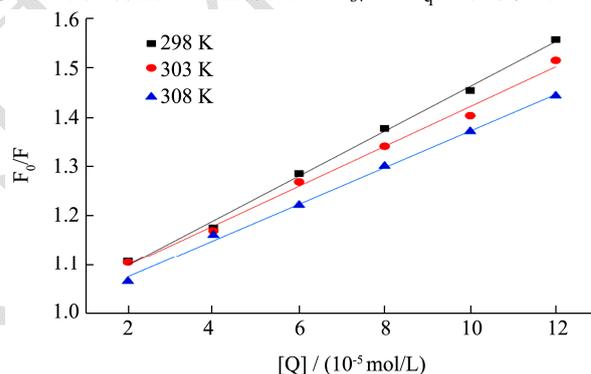


图3 红松种鳞多酚与乳清蛋白相互作用的 Stern-Volmer 曲线

**Fig.3 Stern-Volmer plots of interaction between polyphenols from *Pinus koraiensis* seeds and whey protein at different temperatures**

动态猝灭,随着温度的升高,体系的扩散系数也增大,会导致猝灭常数的增大。从而进一步说明红松种鳞多酚对乳清蛋白的猝灭是形成了稳定复合物的静态猝灭而不是通过相互碰撞的动态猝灭,即温度升高会引起复合物的稳定性降低。

此外,紫外可见吸收光谱分析也可以辅助判断猝灭类型:动态猝灭是由小分子与蛋白质动态碰撞引起的,蛋白质的吸收光谱不会发生改变;静态猝灭是由

形成复合物引起的，蛋白质的吸收光谱将发生变化<sup>[30]</sup>。与红松种麟多酚发生作用后，乳清蛋白的紫外吸收峰发生位移，也进一步证明了红松种麟多酚对乳清蛋白的荧光猝灭过程为静态猝灭。

### 2.2.3 红松种麟多酚与乳清蛋白相互作用的结合常数及结合位点数

根据公式 (2)，以  $\lg[Q]$  为自变量， $\lg[(F_0-F)/F]$  为因变量进行线性拟合得图 4。根据直线的截距和斜率求得各个温度下相应的  $K_A$  和  $n$  的值，结果见表 2。

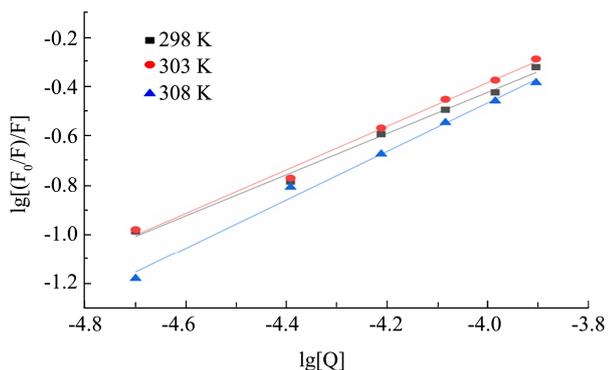


图 4 红松种麟多酚与乳清蛋白相互作用的双对数曲线

Fig.4 Double-log plots of interaction between polyphenols from *Pinus koraiensis* seeds and whey protein at different temperatures

表 2 红松种麟多酚-乳清蛋白复合物的结合位点数、表观结合常数及线性相关系数

Table 2 Apparent binding constants, binding sites numbers and correlation coefficients of polyphenols from *Pinus koraiensis* seeds and whey protein

Temperature/K	$K_A/(\times 10^4 \text{ L/mol})$	$n$	$R^2$
298	1.111	0.885	0.9924
303	2.201	0.937	0.9931
308	6.206	1.043	0.9938

所得数据显示，在不同试验温度下，红松种麟多酚与乳清蛋白之间都存在较强的结合力，均形成了结合位点接近于 1 的复合物，且随着温度的变化不明显。这表示两者之间有 1 个结合位点，即每个蛋白分子能够结合 1 个多酚分子。随着温度的升高，结合常数增大，这说明红松种麟多酚与乳清蛋白的相互作用应为吸热反应。

### 2.2.4 红松种麟多酚与乳清蛋白相互作用的热力学参数及作用力类型

蛋白质分子与配体间的相互作用力可以根据热力学参数焓变  $\Delta H$ 、熵变  $\Delta S$  和吉布斯自由能变  $\Delta G$  进行判断： $\Delta H > 0$ 、 $\Delta S > 0$ ，主要表现为疏水作用； $\Delta H > 0$ 、 $\Delta S < 0$ ，主要表现为静电相互作用和疏水作用； $\Delta H < 0$ 、 $\Delta S < 0$ ，主要表现为范德华力或氢键； $\Delta H < 0$ 、 $\Delta S > 0$ ，

主要表现为静电作用<sup>[31]</sup>。

为了确定红松种麟多酚与乳清蛋白相互作用中起主导作用的作用力类型，对相关的热力学参数进行计算。当温度变化不明显时， $\Delta H$  可认为是常数。根据公式 (3) ~ (5) 计算热力学参数，结果见表 3，柱状图如图 5。

表 3 红松种麟多酚与乳清蛋白相互作用的热力学参数

Table 3 Thermodynamic parameters of interaction between polyphenols from *Pinus koraiensis* seeds and whey protein

Temperature/K	$\Delta H/(\text{kJ/mol})$	$\Delta G/(\text{kJ/mol})$	$\Delta S/[\text{J}/(\text{mol} \cdot \text{K})]$
298		-23.08	82.43
303	1.49	-25.19	88.04
308		-28.26	96.57

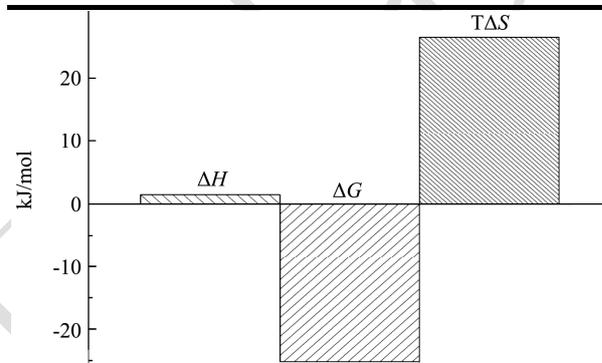


图 5 红松种麟多酚与乳清蛋白相互作用的热力学参数柱状图

Fig.5 The bar diagram of thermodynamic parameters for interaction between polyphenols from *Pinus koraiensis* seeds and whey protein at different temperatures

由表 3 和图 5 可知，红松种麟多酚与乳清蛋白相互作用的  $\Delta H > 0$ 、 $\Delta S > 0$ 、 $\Delta G < 0$ ，表明这两者的结合是一个熵增、自由能降低的过程。不同反应温度下的吉布斯自由能变  $\Delta G$  的数值均为负，表明红松种麟多酚与乳清蛋白的结合是一个自发过程。且  $\Delta H$  和  $\Delta S$  的数值为正，即相互作用的主导作用是疏水作用力。其中， $\Delta H > 0$ ，说明红松种麟多酚与乳清蛋白的结合过程吸热，这也解释了表观结合常数  $K_A$  随着温度的升高而增大的现象。

## 3 结论

本文采用紫外-可见吸收光谱和荧光光谱法研究了红松种麟多酚与乳清蛋白的相互作用机制。研究结果表明，两者之间存在相互作用，红松种麟多酚对乳清蛋白内源荧光的猝灭机制为形成新复合物的静态猝灭。且结合位点数为 1，即两者按照 1:1 的比例结合形成新的静态复合物。通过对猝灭过程热力学参数及作用力类型的计算和分析可知，红松种麟多酚与乳清蛋白的结合为自发进行，两者在结合过程中疏水作用

力是主要驱动力。紫外-可见吸收光谱的分析表明红松种鳞多酚与乳清蛋白的相互作用能改变蛋白质芳香族氨基酸残基在空间结构中所处的微环境,引起乳清蛋白的构象变化。且吸收峰出现蓝移的现象进一步证明了红松种鳞多酚对乳清蛋白的荧光猝灭过程为静态猝灭。研究结果对进一步研究红松种鳞多酚与乳清蛋白相互作用所形成复合物的性质和红松种鳞多酚作为食品添加剂提供理论基础。

## 参考文献

- [1] 伊娟娟.红松球果多酚类化合物分离鉴定及抗肿瘤作用机制研究[D].哈尔滨:哈尔滨工业大学,2017  
YI Juan-juan. Separation and identification of *Pinus koraiensis* pinecone polyphenol and its antitumor mechanism [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2017
- [2] 王吉昌.红松多酚分离鉴定及对辐射诱导氧化伤害的防护作用[D].哈尔滨:哈尔滨工业大学,2011  
WANG Ji-chang. Study on separation identification and protective effect of oxidative damage induced by radiation of polyphenols in *Pinus koraiensis* [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2011
- [3] WANG Lu, LI Xiao-yu, WANG Hong-chao. Physicochemical properties, bioaccessibility and antioxidant activity of the polyphenols from pine cones of *Pinus koraiensis* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 126: 385-391
- [4] 李波,包怡红,高峰,等.SephadexLH-20 纯化红松球鳞片多酚及其体外抗氧化研究[J].食品工业科技,2014,35(7):57-61  
LI Bo, BAO Yi-hong, GAO Feng, et al. Purification of polyphenols from korean pine cone lamella by sephadexlh-20 and their antioxidative activities *in vitro* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(7): 57-61
- [5] 符群,徐明慧,王振宇.红松种鳞多酚超声波辅助提取优化工艺及其抗氧化性研究[J].北京林业大学学报,2015,37(11):128-135  
FU Qun, XU Ming-hui, WANG Zhen-yu. Optimization of ultrasonic assisted process of extracting polyphenols from seed scales of korean pine and their antioxidation [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2015, 37(11): 128-135
- [6] YI Juan-juan, WANG Zhen-yu, BAI Hai-na, et al. Optimization of purification, identification and evaluation of the *in vitro* antitumor activity of polyphenols from *Pinus koraiensis* pinecones [J]. Molecules, 2015, 20: 10450-10467
- [7] 苏晓雨.红松种壳组成及多酚提取分离与抗氧化抗肿瘤功能研究[D].哈尔滨:哈尔滨工业大学,2010  
SU Xiao-yu. Research on the composition and polyphenols isolation of *Pinus koraiensis* seed shell and its antioxidant and antitumor characteristics [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2010
- [8] SHAO Su-juan, YI Juan-juan, Joe M Regenstein, et al. Protective effects on 60Co- $\gamma$  radiation damage of pine cone polyphenols from *Pinus koraiensis*-loaded chitosan microspheres *in vivo* [J]. Molecules, 2018, 23: 1392-1406
- [9] YI Juan-juan, QU Hang, WU Yun-zhou, et al. Study on antitumor, antioxidant and immunoregulatory activities of the purified polyphenols from pinecone *Pinus koraiensis* on tumor-bearing S180 mice *in vivo* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 94: 735-744
- [10] 王硕,徐红艳,王凯,等.红松树皮多酚对衰老小鼠抗氧化能力的影响[J].食品工业科技,2014,35(20):142-146  
WANG Shuo, XU Hong-yan, WANG Kai, et al. Effect of *Pinus koraiensis* bark polyphenols on antioxidant abilities in aging mice [J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(20): 142-146
- [11] 赵爱迪.微波加热对牛乳清蛋白结构及功能的影响[D].沈阳:沈阳农业大学,2017  
ZHAO Ai-di. Effect of microwave treatment on the structure and function properties of whey protein [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2017
- [12] 马爽.高强度超声对乳清蛋白的结构及功能特性影响研究[D].长春:吉林大学,2018  
MA Shuang. Effects of ultrasound treatment on structure and functional properties of whey protein [D]. Changchun: Jilin University, 2017
- [13] Greta Krešić, Lelas V, Herceg Z, et al. Effects of high pressure on function of whey protein concentrate and whey protein isolate [J]. Inra Edp Sciences, 2006, 86: 303-315
- [14] Kovacova R, Synytsya A, Stetina J. Characterisation of whey proteins-pectin interaction in relation to emulsifying properties of whey proteins [J]. Czech Journal of Food Sciences, 2009, 27: 4-8
- [15] Amid B T, Mirhosseini H, Poorazarang H, et al. Implications of partial conjugation of whey protein isolate to durian seed gum through maillard reactions: Foaming properties, water holding capacity and interfacial activity [J]. Molecules, 2013, 18: 15110-15125
- [16] 刘夫国,马翠翠,王迪,等.蛋白质与多酚相互作用研究进展[J].食品发酵工业,2016,42(2):282-288  
LIU Fu-guo, MA Cui-cui, WANG Di, et al. Research

- progress on the interaction between proteins and polyphenols [J]. Food and Fermentation Industry, 2016, 42(2): 282-288
- [17] 覃思. 茶多酚对蛋白质起泡性能和乳化性能的影响及其在蛋糕中的应用[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2006
- QIN Si. Effect of tea polyphenols on the foaming property and emulsification of proteins and the qualities of cake [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2006
- [18] Sarker D K, Wilde P J, Clark D C. Control of surfactant-induced destabilization of foams through polyphenol mediated protein-protein interactions [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995, 43: 295-300
- [19] Harbourne N, Jacquier J C, O'Riordan D. Effects of addition of phenolic compounds on the acid gelation of milk [J]. International Dairy Journal, 2010, 21(3): 185-191
- [20] Von Staszewski M, Jara F L, Ruiz ALTG, et al. Nanocomplex formation between beta-lactoglobulin or caseinomacropptide and green tea polyphenols: Impact on protein gelation and polyphenols antiproliferative activity [J]. Journal of Functional Foods, 2012, 4(4): 800-809
- [21] 肖建波. 多酚类化合物与血清蛋白相互作用的结构-结构力关系、理论模型和应用研究[D]. 长沙: 中南大学, 2009
- XIAO Jian-bo. Structure-affinity relationship, theory model and application of interaction between polyphenols and serum albumin [D]. Changsha: Central South University, 2009
- [22] 王琳. 若干植物活性成分与蛋白质的相互作用研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2012
- WANG Lin. Study on interaction of some plant active components with protein [D]. Nanchang: Nanchang University, 2012
- [23] 薛斐. 香草醛与蛋白质相互作用研究[D]. 上海: 上海师范大学, 2016
- XUE Fei. Study on the interaction between vanillin and protein [D]. Shanghai: Shanghai Normal University, 2016
- [24] 王安萍. 几种天然药物黄酮类活性成分与蛋白质相互作用的研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2007
- WANG An-ping. Study on the interaction between some flavonoids active components in natural products and proteins [D]. Nanchang: Nanchang University, 2007
- [25] Biswas A, Swarnkarn R K, Hussain B, et al. Fluorescence quenching studies of *o*-butyrolactone binding protein (CprB) from *Streptomyces coelicolor* A3(2) interactions [J]. The Journal of Physical Chemistry B, 2014, 118(34): 10035-10042
- [26] 尚永辉, 李华, 孙家娟, 等. 光谱法研究芹菜素与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 光谱实验室, 2009, 26(6): 1413-1417
- SHANG Yong-hui, LI Hua, SUN Jia-juan, et al. Spectroscopic study on the interaction between apigenin and bovine serum albumin [J]. Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory, 2009, 26(6): 1413-1417
- [27] 吴克刚, 周华丽, 柴向华, 等. 光谱法研究芳樟醇与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 现代食品科技, 2015, 31(12): 141-148
- WU Ke-gang, ZHOU Hua-li, CHAI Xiang-hua, et al. Multi-spectroscopic studies of the interaction of linalool with bovine serum albumin [J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(2): 141-148
- [28] ZHANG Guo-wen, MA Ya-di, WANG Lin, et al. Multispectroscopic studies on the interaction of maltol, a food additive, with bovine serum albumin [J]. Food Chemistry, 2012, 133: 264-270
- [29] 张蕊, 吴超仪, 刘宇, 等. 分子对接和荧光光谱法研究麦角甾醇与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 食品科学, 2015, 36(23): 38-42
- ZHANG Rui, WU Chao-yi, LIU Yu, et al. Studies on the interaction of ergosterol with bovine serum albumin (BSA) by fluorescence spectroscopy and molecular docking [J]. Food Science, 2015, 36(23): 38-42
- [30] 李振. 蛋白质与药物小分子及类似物相互作用的光谱学研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2015
- LI Zhen. Spectroscopic investigation of the interaction of proteins with drugs and analogs [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2015
- [31] Ross P D, Subramanian S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability [J]. Biochemistry, 1981, 20(11): 3096-3102