刘美铃, 石林凡, 任中阳, 等. β-伴大豆球蛋白、大豆球蛋白与甘油的相互作用及其对成膜性能的影响 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(4): 134−142. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025030276
LIU Meiling, SHI Linfan, REN Zhongyang, et al. Mechanism of Interaction and Film-forming Properties of Glycerol, Soybean β-Conglycinin, and Glycinin[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(4): 134−142. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025030276

· 研究与探讨 ·

β-伴大豆球蛋白、大豆球蛋白与甘油的相互作用及其对成膜性能的影响

刘美铃, 石林凡, 任中阳, 翁武银*
（集美大学海洋食品与生物工程学院, 福建厦门 361021）

摘　要: 为阐明 β-伴大豆球蛋白（β-conglycinin，7S）、大豆球蛋白（glycinin，11S）与甘油间的相互作用及其对成膜特性的影响，本研究通过分子动力学模拟系统分析甘油、7S 和 11S 球蛋白的分子相互作用变化，结合实验表征考察其对蛋白膜理化性质的影响。结果显示，随着甘油含量的增加，7S 与 11S 球蛋白间的回旋半径和溶剂可及表面积逐渐增加，而氢键数量、静电作用、范德华力、非极性溶剂化能和结合自由能绝对值逐渐下降。当甘油含量增加至 40%，甘油与 7S-11S 复合物之间的氢键、范德华力等相互作用达到峰值，但甘油分子开始出现聚集现象。制备的 7S-11S 蛋白膜的甘油含量从 10% 增加至 50%，其断裂伸长率（elongation at break，EAB）从 13.72% 上升至 208.01%，而抗拉伸强度（tensile strength，TS）从 30.62 MPa 降低至 2.51 MPa。膜的 TS 和 EAB 与 7S 球蛋白、11S 球蛋白和甘油间结合自由能绝对值的相关系数大于 0.8。添加甘油使膜在傅里叶红外光谱上代表游离羟基的 1040 cm^{-1} 处峰强度增加。7S-11S 膜的蛋白质间氢键和疏水作用占比伴随甘油含量的增加而降低，参与疏水作用的高分子组分逐渐减少。膜上、下表面的水接触角伴随甘油含量的增加分别从 115.82°和 112.33°降低至 94.00°和 84.33°。综上，甘油通过调控 7S 和 11S 球蛋白分子间作用力，导致参与疏水作用的高分子组分逐渐转为参与离子键和氢键的形成，从而影响膜的机械性能和表面特性。

关键词: 分子动力学模拟, 大豆球蛋白, 甘油, 相互作用, 成膜性能
中图分类号: TS206.4　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)04−0134−09
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025030276
本文网刊:

Mechanism of Interaction and Film-forming Properties of Glycerol, Soybean β-Conglycinin, and Glycinin

LIU Meiling, SHI Linfan, REN Zhongyang, WENG Wuyin*
（College of Ocean Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China）

Abstract: This study aimed to elucidate the interactions among β-conglycinin (7S), glycinin (11S) and glycerol, as well as their effects on film-forming properties. Molecular dynamics simulations with experimental characterization were systematically combined to analyze changes in molecular interactions and their impact on the physicochemical properties of protein films. The results showed that as the glycerol content increased, the radius of gyration and solvent-accessible surface area between the 7S and 11S globulins gradually increased, while the number of hydrogen bonds, electrostatic interactions, van der Waals forces, non-polar solvation energies, and absolute value of binding free energies progressively decreased. At a glycerol concentration of 40%, interactions such as hydrogen bonding and van der Waals forces between glycerol and the 7S-11S complex reached a maximum, and glycerol began to exhibit aggregation. As glycerol content increased from 10% to 50% in the 7S-11S protein films, the elongation at break (EAB) increased from 13.72% to 208.01%, while tensile strength (TS) decreased from 30.62 MPa to 2.51 MPa. A strong correlation was observed between TS, EAB,

收稿日期: 2025−03−20
基金项目: 国家自然科学基金（32272266）。
作者简介: 刘美铃（1996−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 生物化学与分子生物学, E-mail: 1278266335@qq.com。
*** 通信作者:** 翁武银（1974−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品加工与综合利用, E-mail: wwymail@jmu.edu.cn。

and the absolute value of the binding free energies, with a correlation coefficient exceeding 0.8. Glycerol addition enhanced the film peak intensity at 1040 cm^{-1} in the Fourier-transform infrared spectrum. The proportion of hydrogen bonds and hydrophobic interactions between proteins in the 7S-11S films decreased with increasing glycerol content. Additionally, the high molecular weight components involved in hydrophobic interactions gradually decreased. The water contact angles on both film surfaces decreased from 115.82° and 112.33° to 94.00° and 84.33°, respectively, as the glycerol content increased. These findings suggest that glycerol modulates the intermolecular forces between 7S and 11S globulins, shifting the hydrophobic interactions among high-molecular-weight components toward ionic and hydrogen bonds, thereby affecting the mechanical properties and surface characteristics of the films.

Key words: molecular dynamics simulation; soybean globulin; glycerol; interaction; film-forming properties

利用大豆分离蛋白（soybean protein isolate, SPI）等天然高分子材料制备的生物基可食膜在食品包装领域具有广阔的应用前景[1]。SPI 不仅具有良好的成膜性能，还具备食品营养和功能特性，这使其成为可食膜制备和研发的热门材料[2]。SPI 侧链间的强电荷和极性相互作用使 SPI 可食膜具有较高的刚度和抗拉伸强度，但这种特性会导致薄膜脆性增加，限制了其在实际应用中的范围[3]。为了改善 SPI 可食膜的延展性和柔韧性，添加增塑剂成为一种有效的方法。增塑剂可以与蛋白质聚合物形成新的氢键，从而削弱聚合物链间的相互作用，使得聚合物链的流动性增强和分子自由体积增大，从而提高 SPI 膜的柔韧性和可加工性[4−5]。Kang 等[6] 研究甘油对 SPI 成膜性能影响时，发现甘油分子通过干扰蛋白质网络相互作用对 SPI 薄膜产生塑化作用。研究表明，甘油作为增塑剂在 SPI 成膜过程中起着至关重要的作用。它们通过与 SPI 分子形成氢键、降低分子间的相互作用力以及改变分子的三维空间结构等方式，可以提高 SPI 可食膜的柔韧性和可加工性。因此，有必要深入探究甘油对 SPI 的主要组分 β-伴大豆球蛋白（β-conglycinin, 7S）和大豆球蛋白（glycinin, 11S）相互作用及其成膜的影响，为研发具有良好机械性能的 SPI 基膜提供理论参考。

分子动力学（molecular dynamics, MD）模拟方法可以从分子或原子水平分析甘油与 7S 和 11S 球蛋白之间的相互作用机制。Eslami-Farsani 等[7] 借助 MD 模拟方法揭示了甘油分子主要通过氢键和范德华力与肌红蛋白形成相互作用。Chen 等[8] 通过 MD 模拟发现添加甘油可以增大 β-乳球蛋白氨基酸残基间的静电作用，从而增强蛋白质结构稳定性。Wu 等[9] 采用 MD 模拟方法揭示了 7S 和 11S 球蛋白与金丝桃苷之间主要由氢键和范德华力驱动分子间自发结合。Zhou 等[10] 将 MD 模拟应用于亚油酸对 7S 球蛋白膜形成机理的研究，结果发现静电作用主导了二者的结合过程，揭示了小分子与蛋白质的相互作用对膜理化性质的调节作用。因此，通过 MD 模拟将有助于揭示甘油对 SPI 链的构象、动力学行为以及相互作用的影响规律。研究表明，与 7S 球蛋白膜相比，11S 球蛋白膜中蛋白质间的疏水作用更强，且巯基含量更高，促进分子间二硫键的形成，从而赋予其更优异的机械性能[10−11]。然而，有关甘油分子、7S 和 11S 球蛋白的三元互作机制及其对 SPI 膜成膜的影响研究未见报道。

本研究旨在揭示甘油、7S 与 11S 球蛋白之间的相互作用及其成膜机制。因此，通过 MD 模拟结合蛋白膜理化性质的分析，深入探讨甘油分子、7S 和 11S 球蛋白间的相互作用及其对 7S-11S 成膜能力的影响，结果不仅有助于理解分子水平的相互作用机制，还可以为实际应用提供有价值的指导。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

大豆　黑龙江仓天然生态农业有限公司；甘油、正己烷、盐酸、氢氧化钠、氯化钙、亚硫酸氢钠、氯化钠、尿素　分析纯，西陇科学股份有限公司；β-巯基乙醇　上海麦克林生化科技有限公司；十二烷基硫酸钠（SDS）、丙烯酰胺、Bradford 试剂盒（Quick Start™ Bradford Protein Assay）　美国 Bio-Rad 公司；标准蛋白（Page Ruler TM Protein Ladder）　美国 Thermo Fisher 公司；考马斯亮蓝 R-250　北京中生瑞泰科技有限公司；所使用其他试剂均为分析纯。

TA-XT Plus 质构仪　英国 Stable Micro Systems 公司；Nicolet IS 50 型傅里叶变换红外（Fourier transform infrared, FTIR）光谱仪　美国赛默飞世尔科技公司；UV-8000A 紫外-可见分光光度计　上海元析仪器有限公司；SDC-100 型接触角测定仪　东莞市晟鼎精密仪器有限公司；UM-113 型搅拌脱泡机　日本 UNIX 公司。

1.2　实验方法

1.2.1　分子动力学模拟方法　7S 球蛋白结晶结构（PDB ID: 1UIK）和 11S 球蛋白晶体结构（PDB ID: 1OD5）来源于 RCSB 网站的蛋白质数据库。甘油（glycerol, GLY）结构（PubChem CID: 753）通过 UCSF Chimera 软件获取并保存为.pdb 格式。通过 GROMACS 程序构建初始体系和运行模拟。首先，将 7S 和 11S 球蛋白置于周期性长方体盒子中心，并设置蛋白质表面与盒子边缘的最小距离为 1 nm（图 1）。接着，将甘油分子添加到盒子内，采用 simple point charge 水模型填充空隙，并添加 Na^+或 Cl^-平衡电荷。共构建 5 个初始体系，甘油分子的添加量分别为蛋白质质量的 10%、20%、30%、40% 和

50%(w:w)。所有模拟均在 AMBER 14SB 力场下运行，模拟过程采用了最速下降法，Leap-frog 算法、Particle Mesh Ewald 方法和 Linear Constraint Solver 算法。模拟时长 100 ns，步长 2 fs，轨迹保存间隔 10 ps。通过 VMD 和 PyMOL 软件获取可视化结构。使用 GROMACS 的分析工具对模拟轨迹进行分析。使用分子力学/泊松-玻尔兹曼表面积法(molecular mechanics Poisson-Boltzmann surface area，MM/PBSA)计算结合自由能[12]。

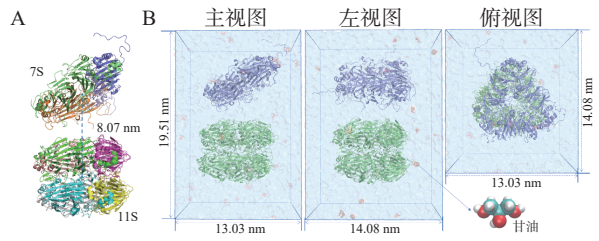


图 1 7S-11S-GLY 体系的初始构型示意图

Fig.1 Initial configuration diagram of the 7S-11S-GLY system

注：A. 7S 与 11S 的初始三维图；B. 7S-11S-GLY 体系三视图。

1.2.2 7S 和 11S 球蛋白提纯 参考文献 [10−11] 报道的方法，提纯大豆 7S 和 11S 球蛋白。大豆经过液氮研磨和真空干燥后，使用正己烷脱脂。得到的脱脂豆粉按 1∶15(w∶v)的比例溶于蒸馏水中。采用 2 mol/L NaOH 将溶液 pH 调至 7.5 并搅拌 2 h，随后在 25 ℃，9000×g 离心 30 min。离心后的上清液(L_1)中加入 10 mmol/L $NaHSO_3$ 粉末，然后用 2 mol/L HCl 将 pH 调至 6.4，置于 4 ℃ 冷藏 16 h。静置后，再在 4 ℃，6500×g 下离心 30 min，得到 11S 沉淀和上清液(L_2)，并向上清液中加入 5 mmol/L $CaCl_2$ 粉末。粉末完全溶解后，在 4 ℃，9000×g 离心 30 min，取上清液(L_3)将 pH 调至 5.5，再次离心 30 min。将新的上清液(L_4)pH 调至 4.8，在 4 ℃，6500×g 下离心 30 min 后，收集 7S 球蛋白沉淀。7S 和 11S 球蛋白的沉淀中分别加入适量蒸馏水，并将 pH 调至 7.0 使沉淀溶解。溶解后在 4 ℃ 下透析 48 h，冻干后保存。采用 SDS-PAGE 电泳测 7S 和 11S 球蛋白的纯度分别约为 87.52% 和 91.23%。

1.2.3 7S-11S 膜制备 参考 Hu 等[13] 报道的方法制备 7S-11S 膜。将 2.4 g 7S 球蛋白和 3.6 g 11S 球蛋白溶于 100 mL 蒸馏水中，再分别加入 0.6、1.2、1.8、2.4 和 3.0 g 甘油。将溶液 pH 调至 7.0 搅拌 30 min 后，于 95 ℃ 水浴加热下搅拌 30 min，获得成膜液。成膜液利用搅拌脱泡机脱除气泡后，均匀地倒在硅胶树脂板上，在 25±0.5 ℃、相对湿度 50%±5% 条件下干燥 24 h，将干燥的膜从板上揭下，并在相同条件下放置 48 h 后进行分析。

1.2.4 水分含量测定 参照 Zhao 等[14] 的方法测定水分含量。膜在 25±0.5 ℃ 且相对湿度 50%±5% 条件下干燥 24 h 后取出称重，随后在 105 ℃ 的烘箱中干燥 24 h 再次称重。水分含量的计算公式如下：

$$水分含量(\%)=\frac{W_1-W_0}{W_1}\times 100$$

式中，W_1 代表 7S-11S 膜干燥前的重量，g，W_0 代表膜干燥后的重量，g。

1.2.5 机械性能测定 参照江睿钊等[15] 报道的方法，使用TA-XT Plus 质构仪测定膜(20 mm×45 mm)的抗拉伸强度(tensile strength，TS)和断裂伸长率(elongation at break，EAB)。在 5 个随机位置测量每片膜的厚度。设置夹具的初始间距为 30 mm，仪器测试速度为 60 mm/min。TS 和 EAB 计算公式如下：

$$TS(MPa)=\frac{F_m}{A}$$

式中，F_m 为拉断膜所需的最大拉力，N；A 为横截面面积，mm^2。

$$EAB(\%)=\frac{L}{30}\times 100$$

式中，L 为膜断裂时增加的长度，mm；30 是夹具的初始间距，mm。

1.2.6 水接触角测定 参考 Zhao 等[16] 报道的方法，使用光学接触角测量仪，采用座滴法测定膜的上、下表面接触角。将 5 μL 蒸馏水滴加在膜(20 mm×45 mm)表面后等待 5 s 拍照，并通过设备配套软件计算接触角。

1.2.7 傅里叶变换红外光谱测定 参照 Hu 等[17] 的方法，通过 Nicolet iS50 的 ATR-FTIR 扫描膜的 FTIR 光谱。将膜样品置于硅胶中干燥 7 d，干燥后的膜在扫描分辨率 4 cm^{-1} 和波数范围 4000~500 cm^{-1} 扫描 32 次。

1.2.8 化学结合力测定 参考 Weng 等[18] 报道的方法，制备四种蛋白变性溶液，分别是：0.6 mol/L NaCl(S1)，0.6 mol/L NaCl+1.5 mol/L urea(S2)，0.6 mol/L NaCl+8 mol/L urea(S3)，和 0.6 mol/L NaCl+8 mol/L urea+0.5 mol/L β-巯基乙醇(S4)。在液氮中将膜研磨成粉末，并置于硅胶中干燥 7 d。精确称取 50 mg 干燥的膜粉末，加入 1 mL 的 S1 溶液溶解 24 h 使蛋白膜中离子键断裂，然后在 10000×g下离心 30 min。按照相同的方法将离心后的蛋白质沉淀继续溶解到 S2、S3 溶液中，最后溶解到 S4 溶液中，依次使蛋白膜中氢键、疏水作用和二硫键断裂，通过离心(10000×g)收集上清液。通过 Bradford法测定上清液中蛋白质浓度。按照 Bradford试剂盒说明书，将上清液与 Bradford 试剂按 1∶50(v∶v)比例混合并反应 5 min，使用紫外-可见分光光度计测定溶液在波长 595 nm 处的吸光度，并以牛血清蛋白为标准蛋白，计算上清液中的蛋白含量。同时，通过 SDS-PAGE 法测定上清液中蛋白质的亚基分布。

1.2.9 SDS-PAGE 测定 参考 Weng 等[18] 的方法，使用浓度为 5% 的浓缩胶和浓度为 10% 的分离胶，测定 7S/11S 球蛋白以及 7S-11S 膜的 SDS-PAGE。

电泳后的凝胶在含 0.025% 考马斯亮蓝 R-250 的 5% 甲醇和 10% 乙酸试剂中染色 2 h，随后用 30% 甲醇和 10% 乙酸试剂脱色 20 min。蛋白质组分的分子量对照 10~200 kDa 的标准蛋白估算。

1.3　数据处理

数据采用 IBM SPSS 26.0 软件进行 Duncan 检验，对数据进行显著性分析，数据以平均值±标准差表示，显著性水平设为 $P<0.05$。

2　结果与分析

2.1　分子动力学模拟分析

2.1.1　模拟体系结构分析　7S 球蛋白、11S 球蛋白和甘油分子经过 100 ns 模拟后，三维结构变化如图 2 所示。在甘油含量为 10% 的体系中，7S 和 11S 球蛋白相互靠近形成复合物，除了部分甘油分子附着到 7S-11S 复合物表面，大部分甘油分子呈现均匀的分散状态。随着模拟体系中甘油含量的增加，7S-11S 复合物表面附着的甘油数量逐渐增加。当甘油含量达到 40% 及以上时，游离的甘油分子会在 7S-11S 复合物附近形成甘油聚集体，结果如图 2 中黑色框内所示。这可能是由于过量的甘油分子之间发生相互作用形成聚集。Mojumdar 等[19] 和Özeren 等[20] 分别通过蛋白膜热学性能分析和 MD 模拟研究支持这一观点，发现在小麦面筋蛋白中添加过多的甘油会导致甘油分子间发生相互作用。

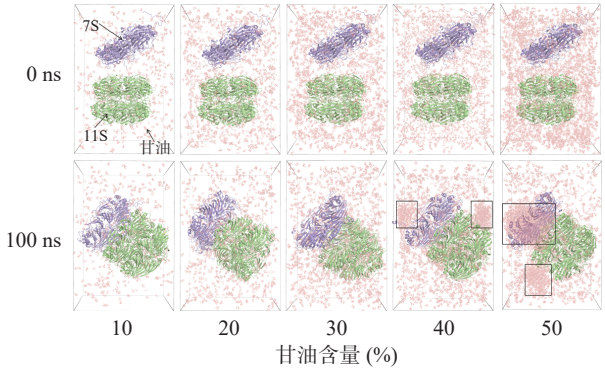


图 2　MD 模拟中 7S-11S-GLY 体系的结构变化

Fig.2　Structural changes of the 7S-11S-GLY system in MD simulations

注: 黑色框内为甘油聚集体。

通过均方根偏差(root-mean-square deviation, RMSD)和回旋半径(radius-of-gyration, Rg)对模拟体系中 7S-11S 的结构稳定性和紧凑性进行分析，结果如图 3 所示。所有体系的 RMSD 在经过 60 ns 模拟后达到相对平衡(图 3A)，表明形成的 7S-11S 复合物结构已经趋于稳定。图 3B 可以看出，各体系 Rg 值均在 10 ns 内降低随后基本不变，进一步说明所有体系的 7S 与 11S 球蛋白在模拟过程中相互靠近并形成相对稳定的复合物。当甘油含量为 10% 时，7S-11S 的 Rg 值降低至 4.6 nm 左右开始趋于稳定。然而，伴随着甘油含量的增加，Rg 值逐渐增大，这可能是增加的甘油分子会阻碍 7S 和 11S 球蛋白间相互作用，从而导致 7S-11S 复合物的结构紧凑性下降。类似的，Chen 等[8] 通过小角度 X 射线散射法研究甘油诱导的 β-乳球蛋白构象变化，也发现蛋白质分子间的 Rg 值随着甘油含量的增加而增大。Aguirre 等[21] 研究甘油对黑小麦蛋白膜理化性质的影响时，发现甘油分子会阻碍蛋白质之间的相互作用。

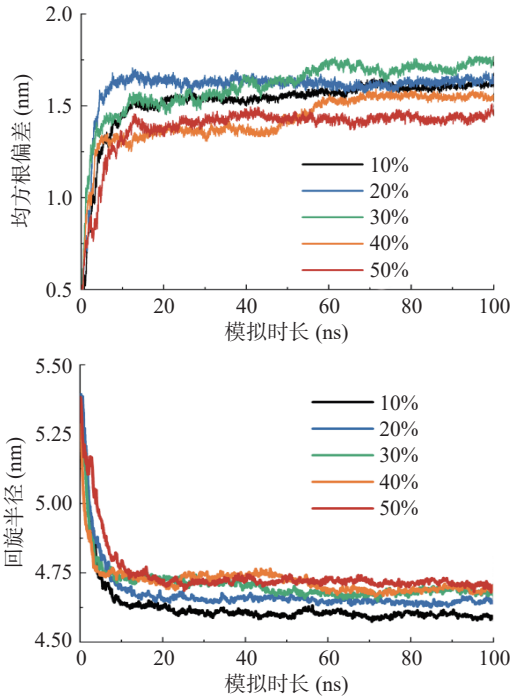


图 3　7S-11S-GLY 模拟体系中 7S-11S 的结构稳定性和紧凑性变化

Fig.3　Changes in the structural stability and compactness of 7S-11S in the 7S-11S-Gly simulation system

注: A. 均方根偏差; B. 回旋半径。

溶剂可及表面积(solvent-accessible surface area, SASA)也可以反映蛋白质结构紧凑性，SASA 值降低代表结构紧凑性增强[22]。在 7S-11S-GLY 模拟体系中，7S-11S 的 SASA 变化趋势如图 4 所示。在甘油含量为 10% 的体系中，随着模拟时间从 0 ns 延长至 100 ns，7S-11S 的 SASA 从 1315.57 nm^2 降低至

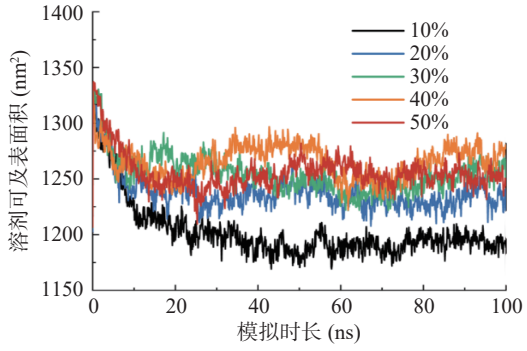


图 4　7S-11S-GLY 模拟体系中 7S-11S 的溶剂可及表面积变化

Fig.4　Changes in the solvent-accessible surface area of 7S-11S in the 7S-11S-GLY simulation system

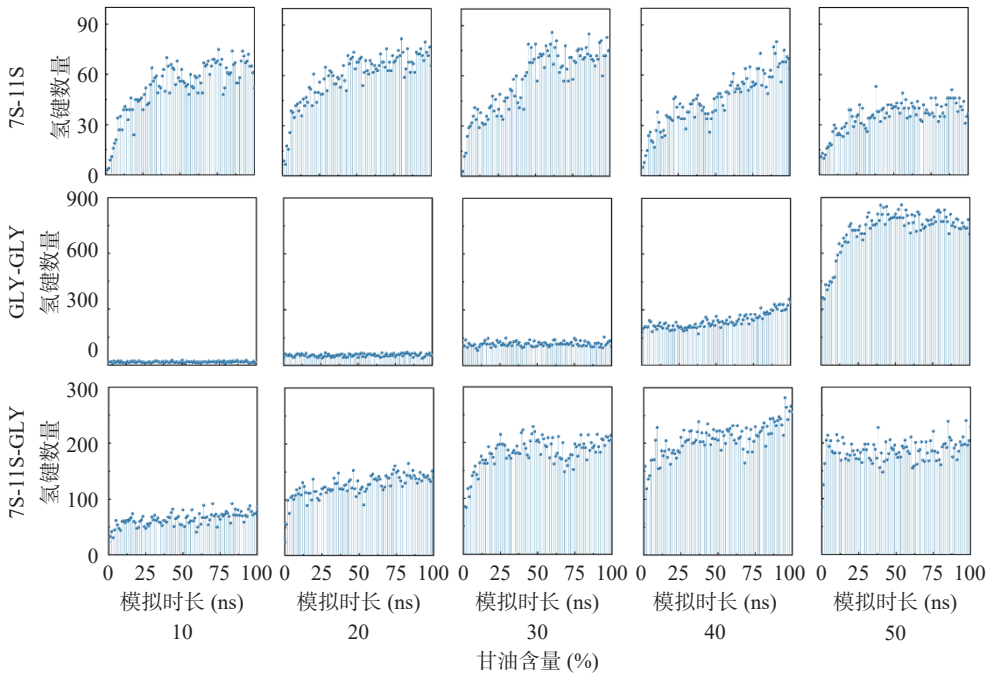


图 5　模拟过程中 7S 球蛋白、11S 球蛋白和甘油分子间氢键数量变化

Fig.5　Changes in the number of hydrogen bonds between 7S, 11S globulin and glycerol during the simulation

1188.29 nm^2。随着甘油含量从 10% 增加至 30%，7S-11S 在 100 ns 时的 SASA 值从 1188.29 nm^2 增大到 1244.66 nm^2。这与图 3B 的 Rg 趋势一致，表明增加甘油含量会导致 7S-11S 复合物结构变松散。然而，当甘油含量超过 30% 时，甘油分子对 SASA 值的影响不明显，这可能归因于过量的甘油分子会在 7S-11S 复合物附近聚集(图 2)。

2.1.2　模拟体系的分子间氢键分析　7S 球蛋白、11S 球蛋白和甘油分子间的氢键数量变化如图 5 所示。当甘油含量不超过 30% 时，甘油对 7S 与 11S 球蛋白间氢键数量无明显影响，而进一步增加甘油含量会导致 7S-11S 氢键数量减少。这表明在低甘油浓度下，甘油分子可能主要作为溶剂或塑化剂存在，对蛋白质间的氢键作用影响较小，而过量的甘油可能会与蛋白质分子产生竞争作用，进而阻碍 7S 与 11S 球蛋白间氢键的形成。值得注意的是，当甘油添加量达到 40% 时，甘油分子间的氢键数量开始急剧增加，表明过量的甘油分子主要通过氢键形成聚集体。而且，甘油聚集体的形成可能会进一步影响蛋白质与甘油分子间的相互作用，以及蛋白质间的结构稳定性。甘油添加量对 7S-11S 复合物与甘油分子间的氢键数量影响结果进一步证实了甘油聚集体的形成会阻碍蛋白质与甘油分子间的氢键形成。有研究报道，分散在膜中的甘油降低了 SPI 分子内或分子间氢键，并通过氢键和范德华力与氨基酸残基发生相互作用[6]。Özeren 等[20] 通过 MD 模拟研究甘油对小麦面筋蛋白间氢键的影响时，发现甘油分子中的羟基不仅与小麦面筋中的 Gln 和 Pro 残基通过氢键发生结合，而且会通过氢键形成甘油-甘油聚集，从而抑制蛋白质间的相互作用。图 5 结果表明，甘油含量会影响 7S-11S 复合物及其与甘油之间的氢键作用，过量甘油的加入会破坏蛋白质间的氢键网络，从而影响蛋白质的结构稳定性。

为了深入探究 7S 球蛋白、11S 球蛋白与甘油间的氢键相互作用，选取甘油-蛋白质间氢键最多的甘油含量 40% 模拟体系对分子间氢键进行可视化(图 6)。结果显示，甘油的羟基之间通过氢键连接，可以形成甘油-甘油聚集体。7S 与 11S 球蛋白之间通过 Arg 和 Asp 等氨基酸残基形成氢键。甘油的羟基与 7S 球蛋白的 Asn、Arg、Gln、Lys 和 Ser 等氨基酸残基，或与 11S 球蛋白的 Asn、Gly 和 Tyr 等氨基酸残基形成氢键连接。Zheng 等[23] 通过 MD 模拟发现花青素 cyanidin-3-O-glucoside 的羟基也可以与 7S 和 11S 球蛋白的 Asn、Ser 和 Gln 等氨基酸残基形成氢键相互作用。甘油的羟基可以与 β-乳球蛋白的 Trp 和 Gly 等氨基酸残基形成氢键[7]。结果表明，甘油、7S 与 11S 球蛋白之间的相互作用主要通

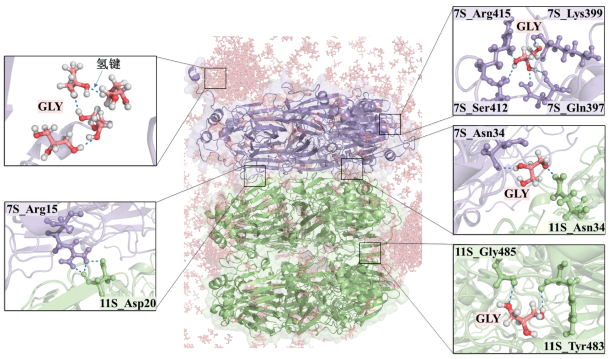


图 6　7S 球蛋白、11S 球蛋白、甘油分子之间的氢键连接图

Fig.6　Hydrogen bond connections between 7S, 11S globulin and glycerol molecules

表 1　MD 模拟中 7S 球蛋白、11S 球蛋白与甘油分子间的结合自由能

Table 1　Binding free energies between 7S, 11S globulin and glycerol in MD simulations

体系	甘油含量(%)	结合自由能(kcal/mol)				
		ΔE_{vdW}	ΔE_{ele}	ΔE_{PB}	ΔE_{SA}	ΔE_{Total}
7S-11S	10	−289.39±5.89^{a}	−4520.46±137.89^{a}	4659.52±133.70^{d}	−44.99±1.72^{a}	−195.32±11.72^{a}
	20	−256.70±11.22^{b}	−4005.49±119.20^{b}	4114.66±120.74^{c}	−41.79±1.82^{b}	−189.33±10.19^{b}
	30	−283.05±7.41^{a}	−3590.39±103.10^{c}	3754.96±106.88^{b}	−44.43±1.20^{a}	−162.91±18.23^{c}
	40	−207.14±11.51^{c}	−3601.86±87.75^{c}	3701.50±90.65^{b}	−32.83±1.41^{c}	−140.33±6.35^{d}
	50	−207.06±7.91^{c}	−3153.86±185.15^{d}	3283.02±173.48^{a}	−29.80±1.60^{d}	−107.69±21.21^{e}
7S-11S-GLY	10	−1322.03±34.16^{e}	−489.01±47.61^{e}	1198.81±58.43^{a}	−228.74±6.03^{e}	−840.96±24.39^{e}
	20	−1875.30±64.32^{d}	−774.01±38.27^{d}	1778.85±36.60^{b}	−321.32±9.05^{d}	−1191.78±50.93^{d}
	30	−3046.17±71.73^{c}	−1362.03±57.43^{c}	3027.18±77.23^{c}	−522.53±12.11^{c}	−1903.55±60.91^{c}
	40	−4262.27±70.99^{a}	−1910.90±78.91^{a}	4209.95±101.66^{e}	−713.58±11.21^{a}	−2676.80±60.00^{a}
	50	−3554.23±64.70^{b}	−1768.58±79.49^{b}	3752.47±93.06^{d}	−597.26±12.08^{b}	−2167.59±59.13^{b}

注：7S-11S表示7S与11S球蛋白之间的结合自由能；7S-11S-GLY表示7S-11S复合物与甘油之间的结合自由能；同列小写字母不同表示差异显著(P<0.05)。

过氢键来实现，这种相互作用在维持复合物的结构稳定性和改善其物理化学性质方面将起到重要作用。

2.1.3　模拟体系结合自由能分析　7S 球蛋白、11S 球蛋白、甘油分子间的结合自由能如表 1 所示。结合自由能中负值表明分子间能够自发结合，负值的绝对值越大越有利于结合[24]。在模拟体系中，范德华力(ΔE_{vdW})、静电相互作用(ΔE_{ele})和非极性溶剂化能(ΔE_{SA})均为负值，而极性溶剂化能(ΔE_{PB})均为正值，表明ΔE_{vdW}、ΔE_{ele}、ΔE_{SA} 共同促进了 7S 球蛋白、11S 球蛋白、甘油分子间结合，而ΔE_{PB} 不利于分子间结合。任意分子间的总结合自由能(ΔE_{Total})均为负值，表明 7S 球蛋白、11S 球蛋白和甘油分子在模拟体系中可以自发结合。伴随着甘油含量的增加，7S-11S 的ΔE_{Total} 绝对值逐渐降低，表明甘油分子会抑制 7S 与 11S 球蛋白分子间结合。与之相反，7S-11S-GLY 的ΔE_{Total} 绝对值却随着甘油含量上升至 40% 而逐渐增加，表明甘油分子会与 7S/11S 球蛋白结合在一起，结果导致图 3 中 7S-11S 复合物结构紧凑性下降。然而，当甘油含量进一步增大至 50% 时，7S-11S-GLY 的ΔE_{Total} 绝对值却出现下降。这可能是由于甘油含量较高时，部分甘油分子倾向于形成甘油聚集体，而不是与蛋白质发生相互作用[20]。相比于静电作用和非极性溶剂化能，7S-11S-GLY 的结合自由能中范德华力的负值绝对值更大，表明范德华力在 7S/11S 球蛋白与甘油的结合中起重要作用。这一发现与 Kang 等[6] 的分子对接结果相呼应，他们观察到甘油分子主要通过范德华力与 7S 球蛋白的 His204 和 11S 球蛋白的 Gln67 等残基形成相互作用。表 1 的结果表明，甘油分子能够降低 7S 与 11S 球蛋白之间的结合力，增加甘油含量会导致更多甘油分子通过范德华力等与 7S-11S 复合物结合，但过量甘油不利于蛋白质与甘油分子发生相互作用。

2.2　蛋白膜理化性质的实验表征

2.2.1　蛋白膜水分含量分析　甘油添加量对 7S-11S 膜水分含量的影响如表 2 所示。当甘油含量从 10% 上升至 20% 时，7S-11S 膜中水分含量变化不显著。伴随着甘油含量进一步上升至 50%，7S-11S 膜中的水分含量逐渐显著增加(P<0.05)。Chen 等[25] 报道了类似的现象，增加甘油导致大豆蛋白膜中水分含量增加。这是因为甘油中羟基可以与水分子和生物材料形成氢键使生物基可食膜水分含量增加[26]。

表 2　甘油对 7S-11S 膜水分含量和机械性能的影响

Table 2　Effects of glycerol on moisture content and mechanical properties of 7S-11S films

甘油含量(%)	水分含量(%)	TS(MPa)	EAB(%)
10	8.80±0.93^{a}	30.62±3.25^{d}	13.72±10.04^{a}
20	9.45±0.53^{a}	14.35±3.08^{c}	52.30±28.13^{b}
30	14.38±0.90^{b}	5.99±1.09^{b}	112.56±31.64^{c}
40	20.62±0.58^{c}	3.13±0.42^{a}	183.29±27.41^{d}
50	23.94±0.30^{d}	2.51±0.28^{a}	208.01±48.15^{d}

注：同列小写字母不同表示差异显著(P<0.05)。

2.2.2　蛋白膜机械性能分析　7S-11S 膜的 TS 和 EAB 如表 2 所示。TS 值随着甘油含量从 10% 增加至 40% 而出现显著降低，这是由于甘油分子阻碍 7S 与 11S 球蛋白间的相互作用(表 1)。Tarique 等[27] 研究甘油对竹芋淀粉膜机械性能的影响时，发现甘油分子会减少淀粉链之间的氢键从而降低淀粉膜的 TS。Lü等[28] 的研究表明，甘油分子通过氢键与丝蛋白发生结合会破坏蛋白质分子间相互作用，结果导致丝蛋白膜的 TS 下降。然而，当甘油含量超过 40% 时，甘油对膜的 TS 影响不显著，这可能与过量的甘油自身容易形成聚集体有关(图 2)。添加甘油对 EAB 的影响与对 TS 的影响的趋势相反(表 2)。研究表明，甘油分子与蛋白质分子间的相互作用对膜的 TS 会产生负面影响，而甘油分子间的相互作用不影响膜 TS。这将有助于更好地理解甘油添加对 7S-11S 膜机械性能的调控。

SPI 膜的机械性能与蛋白质之间的相互作用有关，同时也与蛋白质和甘油之间的相互作用有关[29]。添加甘油会使 7S 与 11S 球蛋白之间的分子相互作用减弱(表 1)，导致可食膜中蛋白质相互作用网络被破坏，从而引起 TS 的下降。而且，甘油分子与 7S/11S

球蛋白之间的相互作用增强会降低蛋白质网状结构紧凑性(表 1),结果导致 EAB 增加。通过相关性分析(图 7),发现 7S-11S 膜的 TS 与 MD 模拟中 7S-11S 的ΔE_{Total}绝对值的相关系数为 0.84,且膜的 EAB 与 7S-11S-GLY 的ΔE_{Total}绝对值的相关系数为 0.87。

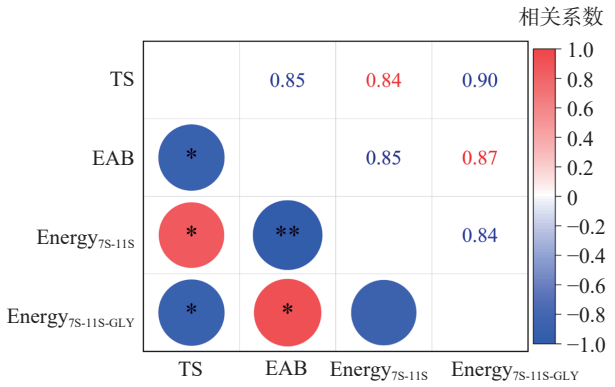


图 7　7S-11S 膜机械性能与 MD 模拟结合自由能的相关性

Fig.7　Correlation between mechanical properties of 7S-11S films and binding free energy of MD simulations

注:图中 $Energy_{7S-11S}$ 和 $Energy_{7S-11S-GLY}$ 分别代表 7S-11S 和 7S-11S-GLY 的ΔE_{Total}绝对值;*代表 $P<0.05$, **代表 $P<0.01$。

2.2.3　蛋白膜表面疏水性分析　表 3 显示了 7S-11S 膜上表面和下表面水接触角的结果。蛋白膜表面水接触角越小,表明膜表面亲水性越高。膜上表面的水接触角伴随着甘油含量的增加而逐渐减小,表明增加甘油含量可以显著提高($P<0.05$)7S-11S 膜的表面亲水性。成膜溶液在 95 ℃ 加热会使蛋白质变性暴露出疏水基团,在干燥过程中暴露的疏水基团更容易移动到与空气接触的上表面[13,30]。类似的现象也出现在 7S-11S 膜中,虽然甘油对膜的下表面水接触角影响趋势与上表面一致,但数值上始终小于上表面。

表 3　甘油对 7S-11S 膜表面水接触角的影响

Table 3　Effects of glycerol on the water contact angle of the 7S-11S film surfaces

甘油含量(%)	上表面水接触角(°)	下表面水接触角(°)
10	115.82±0.79^{d}	112.33±0.59^{d}
20	111.52±2.98^{c}	110.24±5.60^{cd}
30	106.96±0.88^{b}	103.34±4.52^{c}
40	97.95±2.30^{a}	94.49±1.93^{b}
50	94.00±2.17^{a}	84.33±2.06^{a}

注:同列小写字母不同表明差异显著($P<0.05$)。

2.2.4　傅里叶变换红外光谱分析　有研究报道,蛋白膜 FTIR 光谱中位于 3600~3000 cm^{-1} 的特征峰代表参与氢键相互作用的 N-H 和 O-H 基团[31]。在 2930 cm^{-1} 处出现的酰胺 B 带是由于 C-N 拉伸和-NH_2 拉伸[13],在 1624、1532 和 1235 cm^{-1} 左右出现的酰胺Ⅰ带、酰胺Ⅱ带和酰胺Ⅲ带特征峰分别对应 C=O 拉伸、N-H 弯曲和 C-N 拉伸[16]。位于 1040 cm^{-1} 左右的峰不仅与甘油中 C-O 振动有关[32],也与甘油分子中的 O-H 基团有关[33]。7S-11S 膜的 FTIR 光谱图中位于 3270 cm^{-1} 左右的酰胺 A 带特征峰强度伴随着甘油含量增加而增强(图 8),表明参与氢键作用的 O-H 增加。这与 MD 模拟结果(图 5 和图 6)相互印证,表明甘油分子羟基不仅会与 7S 或 11S 球蛋白中氨基酸残基形成氢键,而且过量的甘油分子间还会形成氢键作用,结果导致蛋白膜中氢键作用增强。7S-11S 膜中 1040 cm^{-1} 附近的特征峰伴随着甘油含量的增加而逐渐变宽且强度增加(图 8),表明甘油分子的 C-O 键及其游离羟基数量增加。

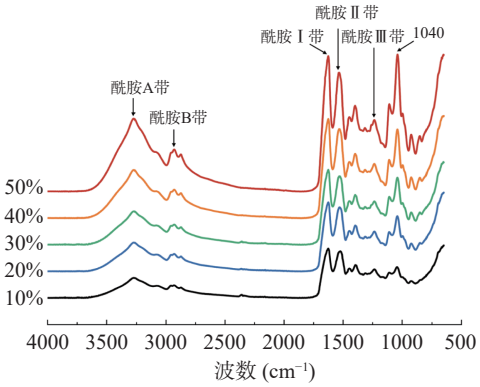


图 8　7S-11S 膜的 FTIR 光谱图

Fig.8　FTIR spectra of the 7S-11S films

2.2.5　蛋白膜化学结合力分析　7S-11S 膜在四种蛋白变性溶液中的溶解率如图 9A 所示。蛋白膜在 S1、S2、S3 和 S4 溶液中的蛋白溶解率分别表征膜中蛋白质之间的离子键、氢键、疏水作用和二硫键。当 7S-11S 膜的甘油含量从 10% 增加至 30%,S2 和 S3 中溶解的蛋白质比例分别从 19.25% 和 71.94% 降低至 14.28% 和 65.38%,S4 中溶解的蛋白质比例从 3.42% 增加至 14.75%,表明添加甘油使蛋白质间氢键和疏水作用逐渐减弱,而共价二硫键比例相对增加。这可能是由于蛋白质之间的氢键等非共价作用比共价二硫键更容易受到甘油分子的阻碍。Niu 等[34] 研究甘油对肌原纤维蛋白凝胶分子间相互作用的影响时,发现甘油的添加也会导致蛋白凝胶中氢键和疏水作用比例减少,而二硫键比例增加。然而,伴随着甘油含量进一步增大至 40%,二硫键的比例下降至 12.42%,表明过量甘油会抑制二硫键的形成。这一发现与 Kang 等[6] 的研究结果相印证,他们观察到甘油分子可以与 11S 中二硫键附近氨基酸残基通过氢键和范德华力发生相互作用,从而干扰或破坏蛋白质亚基之间的二硫键,导致蛋白质内聚性降低、延展性增强。

利用 SDS-PAGE 对蛋白变性剂中溶解的组分进行分析,探究甘油添加量对 7S-11S 膜中化学结合力的影响(图 9B)。结果发现,甘油含量为 10% 时,在 S1 和 S2 中观察到 α、α'亚基以及 60~70 kDa 和< 30 kDa 的组分,在 S3 中观察到 α、α'、β 亚基以及

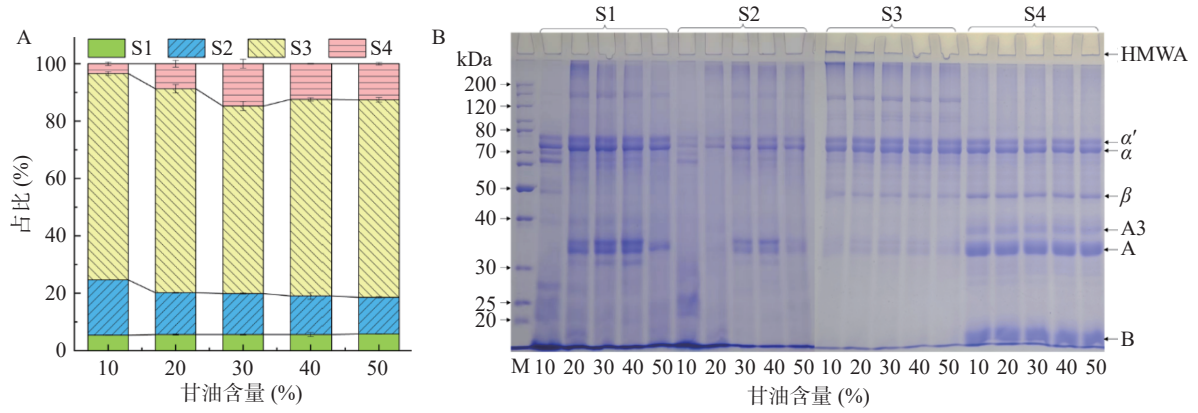


图 9　7S-11S 膜中化学结合力

Fig.9　Chemical binding forces in 7S-11S films

注：A. 7S-11S 膜在不同变性溶液中的溶解率；B. 参与不同化学作用的蛋白质组分 SDS-PAGE 图谱，其中 M 为标准蛋白；HMWA 为高分子量聚集体。

HMWA 和 150 kDa 组分。伴随甘油含量的增加，S3 中 HMWA 的条带强度减弱，而 S1 和 S2 中新增了≥150 kDa 的组分，表明高分子量组分参与的疏水作用在甘油的影响下，可能逐渐转变为离子键和氢键。这主要是甘油分子结构中的醚键（-C_2H_5O-）等疏水基团可能与蛋白质疏水基团发生相互作用[35]，进而减弱蛋白质间的疏水相互作用。图 9B 的结果分析表明，添加甘油会影响参与离子键、氢键和疏水作用形成的蛋白质组分，但不影响参与二硫键形成的蛋白质组分。当 7S-11S 膜中甘油含量不低于 20% 时，α、α′亚基会参与离子键、氢键、疏水相互作用和二硫键的形成，维持蛋白膜的网络结构。尤其，在甘油含量为 30%~40% 的 7S-11S 膜中，11S 球蛋白的 A 亚基可以参与离子键、氢键和二硫键的形成。因此，甘油添加量确实会影响参与蛋白膜网络的化学结合力的组成及比例。Xia 等[36] 研究表明，增加甘油增塑剂会抑制蛋白质的展开和聚集，进而阻碍大麦蛋白膜中二硫键的形成。MD 模拟研究结果也证实了甘油分子会阻碍蛋白质聚集，且过量甘油会进一步抑制蛋白质间的相互作用。这些研究结果表明，甘油主要通过改变甘油与蛋白质间的相互作用及甘油对蛋白膜网络结构化学结合力的作用来影响蛋白膜的理化性能，因此在实际应用中可以根据具体需求选择合适的甘油添加量对大豆分离蛋白膜的性能进行优化。

3　结论

本研究揭示了 7S 球蛋白、11S 球蛋白和甘油在成膜中的相互作用机制。研究发现，甘油分子主要通过氢键和范德华力与蛋白质结合，从而抑制 7S 与 11S 球蛋白之间的氢键、静电等相互作用，导致 7S-11S 复合物结构紧凑性降低。过量的甘油自身还会通过氢键形成聚集体，进而影响蛋白质分子间相互作用。形成的 7S-11S 膜会受到甘油的影响导致断裂伸长率增大，而抗拉伸强度降低，这是因为甘油与蛋白质间的相互作用以及甘油形成的聚集体阻碍了蛋白质间的相互作用。而且，甘油会使 7S-11S 膜中高分子组分间疏水作用转变为氢键和离子键，并增强膜的表面亲水性。因此，添加甘油可以改变 7S-11S 膜中蛋白质间相互作用，从而降低膜的抗拉伸强度和表面疏水性。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

[1] KHANDEPARKAR A S, PAUL R, SRIDHAR A, et al. Eco-friendly innovations in food packaging: A sustainable revolution[J]. Sustainable Chemistry and Pharmacy, 2024, 39: 101579.

[2] MIKUS M, GALUS S, CIURZYŃSKA A, et al. Development and characterization of novel composite films based on soy protein isolate and oilseed flours[J]. Molecules, 2021, 26(12): 3738.

[3] KOKOSZKA S, DEBEAUFORT F, HAMBLETON A, et al. Protein and glycerol contents affect physico-chemical properties of soy protein isolate-based edible films[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2010, 11(3): 503−510.

[4] SUN Y, LIU Z, ZHANG L, et al. Effects of plasticizer type and concentration on rheological, physico-mechanical and structural properties of chitosan/zein film[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 143: 334−340.

[5] BOŽIČ M, MAJERIČ M, DENAC M, et al. Mechanical and barrier properties of soy protein isolate films plasticized with a mixture of glycerol and dendritic polyglycerol[J]. Journal of Applied Polymer Science, 2015, 132: 41837.

[6] KANG S, BAI Q, QIN Y, et al. Film-forming modifications and mechanistic studies of soybean protein isolate by glycerol plasticization and thermal denaturation: A molecular interaction perspective[J]. Food Research International, 2024, 196: 115042.

[7] ESLAMI-FARSANI R, SHAREGHI B, FARHADIAN S, et al. Insight into the binding of glycerol with myoglobin: Spectroscopic and MD simulation approach[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 159: 433−443.

[8] CHEN X, ZHANG H, HEMAR Y, et al. Glycerol induced stability enhancement and conformational changes of β-lactoglobulin [J]. Food Chemistry, 2020, 308: 125596.

[9] 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.
[10] ZHOU R, ZHAO Y, REN Z, et al. Physicochemical properties of soybean β-conglycinin-based films affected by linoleic acid[J]. Food Chemistry: X, 2023, 17: 100609.
[11] 周荣雪, 赵源, 石林凡, 等. 亚油酸含量对大豆 11S 球蛋白膜理化性质的影响[J]. 食品科学, 2024, 45(2): 1−8. [ZHOU R X, ZHAO Y, SHI L F, et al. Physicochemical properties of soybean 11S globulin-based films affected by linoleic acid concentration[J]. Food Science, 2024, 45(2): 1−8.]
[12] HOMEYER N, GOHLKE H. Free energy calculations by the molecular mechanics Poisson−Boltzmann surface area method[J]. Molecular Informatics, 2012, 31(2): 114−122.
[13] HU Y, SHI L, REN Z, et al. Characterization of emulsion films prepared from soy protein isolate at different preheating temperatures[J]. Journal of Food Engineering, 2021, 309: 110697.
[14] ZHAO Y, REN Z, SHI L, et al. Effect of potassium salt type on physicochemical properties of carrageenan films and rehydrated hydrogels[J]. Food Hydrocolloids, 2025, 158: 110595.
[15] 江睿钊, 赵源, 石林凡, 等. 发酵谷朊粉对大豆分离蛋白膜理化性质的影响[J]. 食品工业科技, 2025, 46(11): 1−7. [JIANG R Z, ZHAO Y, SHI L F, et al. Effect of fermented wheat gluten on the physicochemical properties of soy protein isolate films[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(11): 1−7.]
[16] ZHAO Y, REN Z, SHI L, et al. Effect of W/O pre-emulsion prepared with different emulsifiers on the physicochemical properties of soy protein isolate-based emulsion films[J]. Food Hydrocolloids, 2023, 139: 108440.
[17] HU Y, YANG S, ZHANG Y, et al. Effects of microfluidization cycles on physicochemical properties of soy protein isolate-soy oil emulsion films[J]. Food Hydrocolloids, 2022, 130: 107684.
[18] WENG W, ZHENG W. Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) surimi acid-induced gel extract characteristics: A comparison with heat-induced gel[J]. International Journal of Food Properties, 2015, 18(4): 821−832.
[19] MOJUMDAR S C, MORESOLI C, SIMON L C, et al. Edible wheat gluten (WG) protein films[J]. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 2011, 104(3): 929−936.
[20] ÖZEREN H D, WEI X, NILSSON F, et al. Role of hydrogen bonding in wheat gluten protein systems plasticized with glycerol and water[J]. Polymer, 2021, 232: 124149.
[21] AGUIRRE A, BORNEO R, LEÓN A E. Properties of triticale protein films and their relation to plasticizing–antiplasticizing effects of glycerol and sorbitol[J]. Industrial Crops and Products, 2013, 50: 297−303.
[22] LIU S, LIU Y, LUO S, et al. Molecular dynamics simulation of the interaction between dense-phase carbon dioxide and the myosin heavy chain[J]. Journal of CO_2 Utilization, 2017, 21: 270−279.
[23] ZHENG J, ZHENG X, ZHAO L, et al. Effects and interaction mechanism of soybean 7S and 11S globulins on anthocyanin stability and antioxidant activity during *in vitro* simulated digestion[J]. Current Research in Food Science, 2021, 4: 543−550.
[24] LIANG F, SHI Y, SHI J, et al. Exploring the binding mechanism of pumpkin seed protein and apigenin: Spectroscopic analysis, molecular docking and molecular dynamics simulation[J]. Food Hydrocolloids, 2023, 137: 108318.
[25] CHEN P, ZHANG L, CAO F. Effects of moisture on glass transition and microstructure of glycerol-plasticized soy protein[J]. Macromolecular bioscience, 2005, 5(9): 872−880.
[26] HAZRATI K Z, SAPUAN S M, ZUHRI M Y M, et al. Effect of plasticizers on physical, thermal, and tensile properties of thermoplastic films based on *Dioscorea hispida* starch[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 185: 219−228.
[27] TARIQUE J, SAPUAN S M, KHALINA A. Effect of glycerol plasticizer loading on the physical, mechanical, thermal, and barrier properties of arrowroot (*Maranta arundinacea*) starch biopolymers[J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 13900.
[28] LÜ H, SUN Z, LIU Y, et al. Processing-structure-properties relationships of glycerol-plasticized silk films[J]. Molecules, 2022, 27(4): 1339.
[29] ZHANG H, WANG L, LI H, et al. Changes in properties of soy protein isolate edible films stored at different temperatures: Studies on water and glycerol migration[J]. Foods, 2021, 10(8): 1797.
[30] SHIKU Y, HAMAGUCHI P Y, WENG W, et al. Film-forming mechanism of biodegradable films prepared from fish myofibrillar proteins[J]. Journal of The Japanese Society for Food Science and Technology-nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi, 2005, 52: 325−329.
[31] DE JESUS G L, BALDASSO C, MARCÍLIO N R, et al. Demineralized whey–gelatin composite films: Effects of composition on film formation, mechanical, and physical properties[J]. Journal of Applied Polymer Science, 2020, 137(42): 49282.
[32] SHAN G, XU Z, JIANG L, et al. Fabrication and characterization of glycerin-plasticized soy protein amyloid fibril scaffolds by unidirectional freeze casting method[J]. Food Hydrocolloids, 2024, 147: 109400.
[33] ZHANG Y, SIMPSON B K, DUMONT M. Effect of beeswax and carnauba wax addition on properties of gelatin films: A comparative study[J]. Food Bioscience, 2018, 26: 88−95.
[34] NIU F, YU J, FAN J, et al. The role of glycerol on the thermal gelation of myofibrillar protein from giant squid (*Dosidicus gigas*) mince[J]. Food Chemistry, 2022, 371: 131149.
[35] KNOWLES D B, SHKEL I A, PHAN N M, et al. Chemical interactions of polyethylene glycols (PEGs) and glycerol with protein functional groups: Applications to effects of PEG and glycerol on protein processes[J]. Biochemistry, 2015, 54(22): 3528−3542.
[36] XIA Y, WANG Y, CHEN L. Molecular structure, physicochemical characterization, and *in vitro* degradation of barley protein films[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(24): 13221−13229.