李欣, 陈威风, 许美娟, 等. 基于荧光光谱及二维红外光谱技术研究 ECG 与牛肉肌球蛋白的相互作用机制 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(18): 124−134. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025100079
LI Xin, CHEN Weifeng, XU Meijuan, et al. Interaction Mechanism between ECG and Beef Myosin Based on Fluorescence Spectroscopy and Two-dimensional Infrared Spectroscopy Techniques[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(18): 124−134. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025100079

· 食品组分与品质机制 ·

基于荧光光谱及二维红外光谱技术研究 ECG 与牛肉肌球蛋白的相互作用机制

李　欣[1], 陈威风[1], 许美娟[1], 孙智达[2], 胡　燕[1], 邹　建[1,*]
(1.河南牧业经济学院食品科学学院, 河南郑州 450000;
2.华中农业大学食品科学技术学院, 湖北武汉 430070)

摘　要: 为探究莲房原花青素（lotus seedpod proanthocyanidin，LSPC）抑制牛肉蛋白质氧化的作用机制，运用纳米粒度仪、二维红外相关谱、荧光光谱等技术研究了 LSPC 的重要组分表儿茶素没食子酸酯（Epicatechin gallate，ECG）终浓度为 10~40 μmol/L 时对牛肉肌球蛋白（Myosin）氧化聚集的影响以及两者相互作用类型、主要作用力、作用位点、参与相互作用的基团、猝灭类型等。结果表明：与肌球蛋白相比，ECG 终浓度为 10~30 μmol/L 时，ECG-肌球蛋白复合物 SDS-PAGE 图谱中 250 kDa 处条带变窄，Zeta 电位绝对值增大、浊度降低，能够抑制蛋白氧化交联。这与 ECG 作为供氢体与肌球蛋白之间发生了非共价相互作用有关。荧光光谱及化学分析法结果显示，ECG 与肌球蛋白的结合是以氢键和疏水相互作用为主要作用力、熵驱动的可以自发进行的吸热反应，能够猝灭肌球蛋白荧光。运用二维红外相关谱发现，ECG 的 D 环上的-OH 作为供氢体，优先于酯键、醚键及骨架中的 C=C，与肌球蛋白 α-螺旋中 C=O 及 N-H、C-H 形成氢键、疏水相互作用，从而抑制了肌球蛋白氧化及分子间的交联聚集。该研究为开发 LSPC 作为天然植物抗氧化剂应用于肉及肉制品行业提供了理论依据与实验支撑。

关键词: 莲房原花青素, 肌球蛋白, 荧光光谱, 二维红外光谱, 非共价结合, 抗蛋白质氧化
中图分类号: TS251.5　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)18−0124−11
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025100079
本文网刊:

Interaction Mechanism between ECG and Beef Myosin Based on Fluorescence Spectroscopy and Two-dimensional Infrared Spectroscopy Techniques

LI Xin[1], CHEN Weifeng[1], XU Meijuan[1], SUN Zhida[2], HU Yan[1], ZOU Jian[1,*]
(1.College of Food Science, Henan University of Animal Husbandry and Economy, Zhengzhou 450000, China;
2.College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: To elucidate the mechanism underlying the inhibition of beef protein oxidation by lotus seedpod proanthocyanidin (LSPC), epicatechin gallate (ECG) at a final concentration of 10 to 40 μmol/L, was investigated using a combination of nanoparticle size analysis, two-dimensional infrared correlation spectroscopy (2D-IR COS), and fluorescence spectroscopy. This study focused on how ECG affected the oxidative aggregation of beef myosin as well as the interaction mode, dominant binding forces, action sites, involved functional groups, and fluorescence quenching mechanism between ECG and myosin. The results indicated that, relative to native myosin, ECG treatment at final concentrations of 10~30 μmol/L resulted in a narrowed 250 kDa band in the sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis profiles of the ECG-Myosin complex, an increased absolute value of Zeta potential, and reduced turbidity. These observations

收稿日期: 2025−10−13
基金项目: 河南牧业经济学院博士科研启动资金项目（2024HNUAHEDF037）; 河南省重点研发专项（251111113000）。
作者简介: 李欣（1984−）, 女, 博士, 讲师, 研究方向: 畜产品加工、食品营养与卫生, E-mail: 343887155@qq.com。
*** 通信作者:** 邹建（1981−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品营养赋能、畜禽副产物高值化调控, E-mail: zoujianzz@126.com。

suggested that ECG inhibited oxidative myosin cross-linking with non-covalent interactions between ECG (acting as a hydrogen donor) and myosin. Fluorescence spectroscopy and chemical probing analyses revealed that ECG binding to myosin was an entropy-driven, thermodynamically favorable endothermic process, with hydrogen bonds and hydrophobic interactions serving as the dominant forces. This interaction induced the static fluorescence quenching of myosin. Furthermore, 2D-IR COS demonstrated that the hydroxyl (-OH) groups on the D-ring of ECG, as hydrogen donors, preferentially formed hydrogen bonds and hydrophobic interactions with carbonyl (C=O), amide (N-H), and alkyl (C-H) groups within the α-helical domains of myosin. These interactions inhibited protein oxidation and intermolecular cross-linking aggregation. This study provides a theoretical basis and experimental support for LSPC development as a natural plant-derived antioxidant for meat and meat products industry-related applications.

Key words: lotus seedpod proanthocyanidin; myosin; fluorescence spectroscopy; two-dimensional infrared spectroscopy; non-covalent binding; anti- oxidation protein

牛肉是人类摄入蛋白质的良好来源。肌原纤维蛋白是牛肉中含量最丰富的蛋白质，而肌球蛋白则是肌原纤维蛋白的最主要成分，其功能性质的表达受自身分子量大小及氧化还原状态的影响，直接决定着冷藏期间牛肉的品质[1]。肌球蛋白富含巯基，且在牛肉生产、运输、销售中难免受光照、氧气等外界条件的影响，极易发生蛋白质氧化，从而导致牛肉出现色泽褐变、汁液流失、嫩度下降、营养价值降低等品质劣变问题[2]，削弱消费者的购买欲。

随着人们健康意识的增强，相比人工合成抗氧化剂，使用安全性更高的天然抗氧化剂逐渐成为肉类保鲜的应用趋势[3]。植物多酚具有抗氧化、抗炎、抗菌等特性，近年来受到研究者的关注，并被运用到肉品保鲜中。如桑葚多酚、茶多酚、番石榴叶多酚等能够延缓肉类蛋白质氧化聚集[4−6]，黑莓、桑叶的多酚提取物质可以抑制冷鲜猪肉脂肪氧化，增强牛肉饼的抗氧化稳定性，且具有抗菌性，能够延长肉品货架期[7−9]。葡萄籽原花青素能有效抑制鸡肉蛋白质的降解、降低菌落总数，具有明显的保鲜效果[10]。莲房原花青素是从莲蓬壳中提取的一种以黄烷-3-醇为结构单元通过 C4-C6 键缩合而成的植物多酚，提取率约 2.66%，主要组分为儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素、表儿茶素没食子酸酯及 B-型原花青素二聚体[11]，无不良气味，剂量<5 g/kg 时安全无毒，具有抗氧化、抑菌等多种功效[12−13]。这为 LSPC 作为绿色安全的天然保鲜剂应用于食品加工提供了可能。禹华娟[14] 研究表明，LSPC 应用于火腿中可抑制油脂氧化。最近研究证实，LSPC 能够显著抑制冷藏期间冷鲜牛肉蛋白质氧化，延长牛肉货架期 4~8 d[15]，说明 LSPC 具有作为天然植物保鲜剂应用于肉及肉品保鲜行业的潜在价值。LSPC 可以从废弃的莲蓬壳中提取，节约生产成本，变废为宝，具有可观的经济效益及广阔的应用前景。但目前 LSPC 抗肉类蛋白质氧化机理尚不清楚，这制约了 LSPC 应用于肉及肉制品行业的开发利用。

据报道，植物多酚与蛋白质共存于同一食品体系中多发生非共价相互作用，不仅能改变蛋白的氧化稳定性[16]，还可能改变蛋白质的理化、功能特性，最终改变肉的品质。由于研究相互作用的精细化要求，以及 LSPC 组成成分复杂性，本文通过预实验筛选出抗氧化能力最强、结合能最低的 ECG 作为 LSPC 的代表性组分，通过荧光光谱法及二维红外技术探究 ECG 与冷鲜牛肉肌球蛋白的相互作用类型、作用位点等作用机制，从相互作用的角度揭示 LSPC 抗蛋白质氧化交联的机理，也为 LSPC 作为天然保鲜剂的有效开发及在肉与肉制品行业规模化生产中的应用提供理论基础和实验支撑。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

表儿茶素没食子酸酯（ECG，纯度大于 98%）　成都普瑞法生物有限公司；冷鲜牛肉牛背最长肌　河南焦作某公司，即西门塔尔杂交牛宰杀后冷却排酸，通过 4 ℃ 冷链运输车快速运至实验室，立即用于实验；β-巯基乙醇、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼、2,2-氨基-双（3-乙基苯并噻唑-6-磺酸）二铵盐、三（羟甲基）氨基甲烷、2,4,6-三吡啶基三嗪、三磷酸腺苷（Adenosine triphosphate，ATP）　均为色谱纯，上海麦克林科技有限公司。

Zetasizer Nano ZS 纳米粒度分析仪　英国 Malvern 有限公司；UV1750 紫外-可见分光光度计　岛津（上海）实验器材有限公司；F-4600 荧光光谱仪　丹麦福斯集团公司；470 FT-IR 傅里叶变换红外光谱仪　美国 Thermo Eletron Corporation。

1.2　实验方法

1.2.1　冷鲜牛肉肌球蛋白的提取　参考 Zhang 等[17] 的方法，取冷鲜牛肉背最长肌，绞成肉糜。称取 50 g 肉糜加入 10 倍体积的试剂 A（0.1 mol/L KCl，20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液，用 HCl 调节 pH 至 7.5），4 ℃ 10000 r/min，均质 1 min。在 4 ℃ 下静置 15 min，离心。取沉淀，加入 5 倍体积的试剂 B（0.45 mol/L KCl，5 mmol/L β-巯基乙醇，0.2 mol/L 乙酸镁，1 mmol/L EGTA，20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液，用马来酸调节 pH 至 6.8），再加入 ATP 使其最终浓度为 10 mmol/L，静置 90 min，离心。取上清液，加入 5 倍体积的 1 mmol/L $KHCO_3$ 缓慢稀释，静置 20 min，离心。取沉淀，加入 2.5 倍体积的试剂 C（0.5 mol/L

KCl, 5 mmol/L β-巯基乙醇, 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液, pH7.5), 静置 10 min, 然后缓慢加入 7 倍体积的 1 mmol/L $KHCO_3$, 同时加入 $MgCl_2$ 使其终浓度为 10 mmol/L。4 ℃ 静置 12 h, 离心, 沉淀即为肌球蛋白。用 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH7.5, 含 0.5 mol/L NaCl)溶解肌球蛋白, 测定蛋白浓度后, 4 ℃ 保存备用, 48 h 内用完。

1.2.2 ECG-肌球蛋白复合物样液的制备 配制 20、40、60、80 μmol/L 的 ECG 水溶液, 各取适量分别与等体积的 1 mg/mL 肌球蛋白溶液混匀, 用蒸馏水代替 ECG 水溶液作为空白对照组, 使各组实验样品中肌球蛋白的浓度为 0.5 mg/mL, ECG 终浓度分别为 0、10、20、30、40 μmol/L。4 ℃ 下静置 12 h, 得到不同浓度的 ECG 与肌球蛋白复合物(ECG-肌球蛋白复合物), 即为样液, 用于指标测定。

1.2.3 Zeta 电位与粒度测定 参考 Zhang 等[17] 的方法, 取 1 mL 0.2 mg/mL 的 ECG-肌球蛋白复合物样液, 采用 Zetasizer Nano ZS 纳米粒度分析仪, 测定样品的粒度和 Zeta 电位。

1.2.4 浊度测定 取适量 ECG-肌球蛋白复合物样液, 运用紫外-可见分光光度计在 600 nm 处测量吸光度, 即为样品浊度[18]。

1.2.5 SDS-PAGE 分析 使用超快 SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒进行凝胶板的制备, 分离胶浓度为 12%, 浓缩胶浓度为 4%。选择 13 孔梳, 取离心后上清液上样, 每孔上样量 20 μL, 蛋白 Marker 上样量 7 μL。电泳仪初始电压设定为 80 V, 当样品到达浓缩胶与分离胶的分界线时, 将电压调为 120 V。当样品达到距离玻璃板底端边缘 1 cm 处, 关闭电泳仪。将凝胶板取出转移至染色盒中, 加入 0.1% 的考马斯亮蓝 R250 染色液在摇床上染色 3 h 后, 加入脱色液震荡脱色, 直至凝胶底色脱尽, 蛋白条带清晰后, 拍摄电泳图。

1.2.6 荧光光谱法分析 按照 Huang 等[19] 的方法测定样品的荧光猝灭光谱。取 5 份 1 mL 1 mg/mL 的肌球蛋白溶液, 分别加入 1 mL 不同浓度的 ECG 梯度混匀后(ECG 终浓度范围: 0~40 μmol/L), 在 277、298、310 K 下反应 2 h 后, 使用荧光光谱仪测定样品的荧光猝灭光谱, 测试条件为: 激发波长 280 nm, 狭缝宽度为 5 nm, 收集 300~450 nm 范围内的发射光谱。运用 Stern-Volmer 方程式(1)来确定荧光猝灭机制。最后通过双对数方程式(2)计算出 ECG 与肌球蛋白的结合常数和结合位点数。

$$\frac{F_0}{F} = 1+Kq\tau_0[Q]=1+Ksv[Q] \quad 式(1)$$

$$\lg\left[\frac{F_0-F}{F}\right] = \lg K_a + n\lg[Q] \quad 式(2)$$

式中: F_0 为未加入猝灭剂时的荧光强度; F 为加入猝灭剂后的荧光强度; Kq 为双分子猝灭过程速率常数(L/mol·s); Ksv 为 Stern-Volmer 动态猝灭常数(L/mol); [Q] 为猝灭剂 ECG 的浓度(mol/L); τ_0 为猝灭剂不存在条件下生物大分子的平均荧光寿命(约为 10^{-8} s); K_a 为结合常数(L/mol); n 为结合位点数。

根据不同温度下的荧光数据, 运用 Van't Hoff 方程式(3)和热力学方程式(4)计算出热力学参数, 判断作用力类型。

$$\ln K_a = \frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad 式(3)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad 式(4)$$

式中, K_a 为结合常数; T 为绝对温度(K); R 为气体常数 8.314 $J\cdot mol^{-1}\cdot K^{-1}$; ΔH 表示焓变(kJ/mol); ΔS 表示熵变(J/mol·K); ΔG 表示吉布斯自由能(kJ/mol)。

1.2.7 化学作用力分析 参考 Zhang 等[17] 的方法, 按照样品制备方法同比例调大浓度, 使样品肌球蛋白最终浓度为 10 mg/mL。取 1 mL ECG-肌球蛋白复合物样液分别与 5 mL 0.05 mol/L NaCl(溶液 A)、0.6 mol/L NaCl(溶液 B)、0.6 mol/L NaCl(溶液 C, 含 1.5 mol/L 尿素), 0.6 mol/L NaCl(溶液 D, 含 8 mol/L 尿素), 0.6 mol/L NaCl(溶液 E, 分别含有 8 mol/L 尿素和 0.05 mol/L β-巯基乙醇)混匀, 7000 r/min, 均质 30 s, 离心(4 ℃, 10000 r/min, 5 min), 用考马斯亮蓝法测定上清液中的蛋白浓度。各种化学力的计算方法如下:

离子键(静电相互作用) = 溶液B的蛋白含量–溶液A的蛋白含量 式(5)

氢键 = 溶液C中蛋白含量 – 溶液B中蛋白含量 式(6)

疏水相互作用 = 溶液D中蛋白含量–溶液C中蛋白含量 式(7)

二硫键 = 溶液E的蛋白含量 – 溶液D的蛋白含量 式(8)

1.2.8 二维红外相关光谱测定 参考 Li 等[20] 的方法将 1mg/mL 肌球蛋白溶液分别与不同浓度(20~120 μmol/L)的 ECG 溶液按体积比 1∶1 混合后, 4 ℃ 下静置 12 h 后, 冷冻干燥并研磨成粉末, 取 30 mg 样品粉末与 1.5 g 干燥的 KBr 粉末(1∶50)研磨成混合粉末。准确称量 200 mg 混合粉末, 压制成片进行 FT-IR 测定, 得到一系列 ECG-肌球蛋白复合物的 FT-IR 光谱, 并通过 2Dshige 软件(version 1.3)进行数据处理与分析, 得到二维红外相关谱。

1.3 数据处理

采用 SPSS Statistics 20.0 进行 ANOVA 单因素方差分析和邓肯多重比较法进行差异显著性分析。

P<0.05 表示结果具有显著性差异。运用 Origin9.0 软件（Origin Lab Inc. USA）作图，所有实验均重复 3 次，结果用平均值±标准差表示。

2　结果与分析

2.1　ECG 对牛肉肌球蛋白 Zeta 电位与粒径的影响

冷藏条件下 ECG 对肌球蛋白 Zeta 电位和粒径的影响见图 1。图 1A 显示，各组样品 Zeta 电位均小于 0，说明样品表面氨基酸均带负电荷。空白对照组肌球蛋白 Zeta 电位为−4.7 mV，随着 ECG 浓度增大，Zeta 电位绝对值逐渐升高。当 ECG 终浓度为 30 μmol/L 时，ECG-肌球蛋白复合物 Zeta 电位绝对值最大（6.97 mV）。值得注意的是，ECG 终浓度增至 40 μmol/L 时，Zeta 电位绝对值反而降至 6.28 mV，但差异不显著，这归因于过高的 ECG 浓度对肌球蛋白表面的负电荷产生了屏蔽作用，肌球蛋白分子间的静电斥力减弱，出现聚集的倾向[21]。

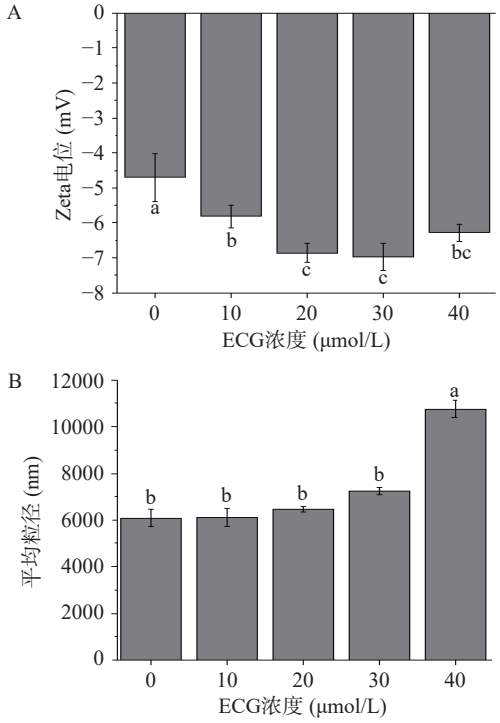


图 1　ECG 对肌球蛋白 Zeta 电位（A）和粒径（B）的影响

Fig.1　Effects of ECG on Zeta potential (A) and Average particle size (B)

注：不同字母代表经不同处理的样品之间存在显著性差异（P<0.05）；图 2、图 8 同。

蛋白粒径是蛋白质聚集的直观反映。图 1B 中，空白对照肌球蛋白平均粒径为 6084.33 nm，ECG 终浓度为 10、20、30 μmol/L 的 ECG-肌球蛋白复合物粒径略有升高，但无显著性差异。然而经 40 μmol/L ECG 处理的肌球蛋白，粒径陡增至 10765.33 nm，显著高于空白对照组（P<0.05）。以上结果表明，10~30 μmol/L ECG 在抑制肌球蛋白自氧化的同时未引起蛋白分子间交联聚集，有效维持了 ECG-肌球蛋白复合物溶液体系的稳定性。但当浓度≥40 μmol/L 时，ECG-肌球蛋白复合物粒径略陡增。这可能是因为中低浓度的 ECG（10~30 μmol/L）可能作为供氢体抑制了蛋白质氧化，且能诱导蛋白结构适当展开，抑制了肌球蛋白氧化交联。过量的 ECG（40≥μmol/L）则促使了肌球蛋白表面疏水性升高，而疏水作用是蛋白质交联聚集的主要作用力，这种聚集在一定程度上影响了蛋白质分子的粒径分布。此外，过量 ECG 对肌球蛋白表面负电荷的屏蔽作用降低了蛋白稳定性，也会增大其粒径[22−23]。前人研究也发现氧化多酚会诱导肉类蛋白质的聚集，如周扬等[24] 报道，加入高浓度迷迭香也会促进猪肉肌球蛋白的聚集，促使蛋白粒径增加。曹云刚[25] 也报道了高浓度绿原酸会引起猪肉肌原纤维蛋白交联聚集。

2.2　ECG 对牛肉肌球蛋白浊度的影响

浊度可以指示大分子和聚电解质的非共价络合，以及聚集和非聚集的胶体，常被用于研究多酚与蛋白质之间发生共价或非共价相互作用的复杂行为[26]。图 2 显示，空白对照组肌球蛋白浊度为 0.183，随着 ECG 浓度升高，ECG-肌球蛋白复合物的浊度先降低后升高。ECG 浓度为 30 μmol/L 的 ECG-肌球蛋白复合物浊度显著降低至 0.158（P<0.05），因为 2.1 中低浓度的 ECG（10~30 μmol/L）增高 Zeta 电位，且抑制了肌球蛋白发生氧化交联，维持了 ECG-肌球蛋白复合物溶液体系的稳定性，与空白对照组相比浊度降低。而 ECG 终浓度增加至 40 μmol/L 时，ECG-肌球蛋白复合物的浊度则增至 0.185。这是因为此时 Zeta 电位绝对值降低，粒径增大，ECG-肌球蛋白复合物溶液体系不稳定，浊度增大。该结果与此前相关报道结果一致[27]。

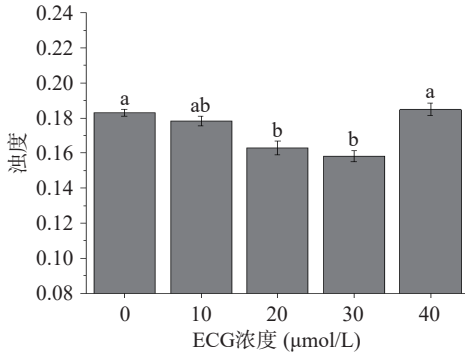


图 2　ECG 对肌球蛋白浊度的影响

Fig.2　Effect of ECG on turbidity of myosin

2.3　SDS-PAGE

肌球蛋白易发生自氧化，导致分子内和分子间二硫键及其他共价键交联，因此，采用 SDS-PAGE 分析 ECG 加入对于肌球蛋白氧化交联的影响，并初步分析两者之间的相互作用。由图 3 可知，4 ℃ 冷藏放置 12 h 后，空白对照组（a 道）在 250 kDa 处条带变宽，证实了肌球蛋白发生了自氧化与交联。ECG 终浓度为 10~30 μmol/L 的 ECG-肌球蛋白复合物，250 kDa 处条带较窄，表明中低浓度下 ECG 能够抑制肌球蛋白自氧化与交联聚集。但 ECG 终浓度为 40 μmol/L 时（e 道），与 d 道相比，该处条带略有变

宽，说明过量的 ECG 会促使蛋白质分子交联聚集，这印证了 2.1、2.2 中 ECG 终浓度为 10~30 μmol/L 时能够抑制蛋白质交联聚集，降低粒径与浊度，而高浓度 ECG(40 μmol/L)促使肌球蛋白粒径增大、浊度增大的原因。各组样品均未发现新的条带，说明 ECG 与肌球蛋白之间发生了非共价相互作用。

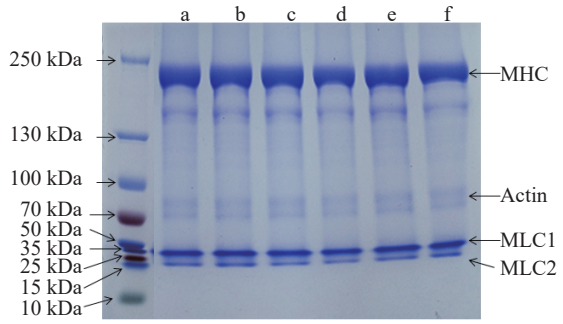


图 3　不同处理组样品的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.3　SDS-PAGE electrophoresis of samples in different treatment groups

注：a~e 表示 ECG 浓度分别为 0、10、20、30、40 μmol/L(4 ℃静置 12 h)；f：刚提取出的肌球蛋白。

2.4　荧光光谱分析

2.4.1　猝灭荧光光谱分析　当激发波长设置为 280 nm 时，肌球蛋白在 331 nm 处出现特征荧光吸收峰，这是肌球蛋白固有的荧光(见图 4)，主要来源于其结构中的色氨酸和酪氨酸[20]。在 277、298、310 K 三个不同温度下，随着 ECG 浓度的增加，肌球蛋白在 331 nm 处的特征吸收峰强度均逐渐降低，表明 ECG 能够猝灭肌球蛋白固有荧光。

2.4.2　猝灭机理分析　蛋白质荧光猝灭通常分为动态和静态猝灭[28]。为确定 ECG 对肌球蛋白荧光猝灭作用类型，运用经典的 Stern-Volmer 方程对图 4 中荧光猝灭数据进行分析。277、298、310 K 条件下 ECG 对肌球蛋白荧光猝灭的 Stern-Volmer 方程拟合见图 5，具体猝灭常数见表 1。

由以上结果可知，ECG 与肌球蛋白之间的 Stern-Volmer 方程中 F_0/F 和 ECG 浓度 [Q] 之间具有线性相关性(见图 5 及表 1)。3 个不同温度下的猝灭速率常数 Kq 最小为 1.094×10^{12}，明显大于最大动态猝灭常数 2.0×10^{10} L/(mol·s)，且随着温度升高，猝灭常数 Ksv 降低，说明 ECG 对肌球蛋白的荧光猝灭属于静态猝灭。

2.4.3　结合常数和结合位点数　通过式(2)静态猝灭公式计算得到静态猝灭中荧光猝灭剂与荧光物质之间 $\lg[(F_0-F)/F]$ 与 $\lg[Q]$ 的方程及相关常数见图 6 及表 2。

由表 2 可知，结合常数 Ka 随着温度的升高而增大，表明 ECG 与肌球蛋白的结合可能为吸热反应，这将在下面的ΔH 中进一步验证。

2.4.4　ECG 与肌球蛋白之间相互作用力类型分析　根据上文相关数据，按照 1.2.6 中式(3)、式(4)，计算

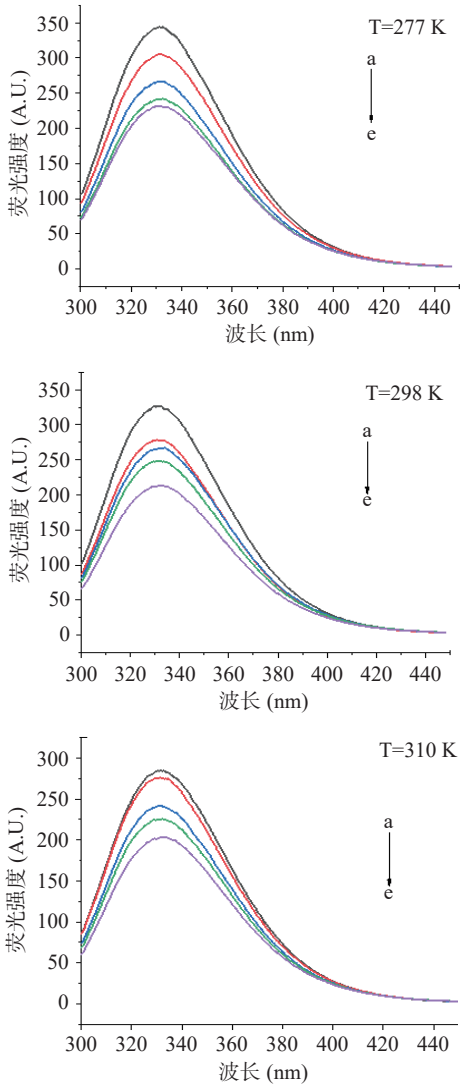


图 4　不同浓度的 ECG 在 277、298 和 310 K 对肌球蛋白的荧光猝灭光谱

Fig.4　Different ECG concentrations at 277, 298 and 310 K for fluorescence quenching spectra of myosin

注：a~e 表示 ECG 浓度依次为 0、10、20、30、40 μmol/L。

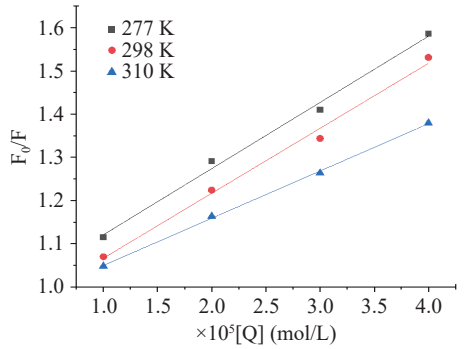


图 5　277、298、310 K 温度下 ECG 对肌球蛋白荧光猝灭的 Stern-Volmer 方程拟合图

Fig.5　Plots of Stern-Volmer equation of myosin fluorescence quenching by ECG at 277, 298 and 310 K

得到 ECG 与肌球蛋白结合的热力学参数(见表 3)。由结果可知，ΔH>0，ΔS>0，表明 ECG 和肌球蛋白主要通过疏水相互作用发生非共价结合；ΔS>0 表明两者结合的过程是熵驱动的过程；ΔH>0 表明两者结合

表 1　277、298、310 K 温度下 ECG 对肌球蛋白荧光猝灭的 Stern-Volmer 方程及猝灭常数 Ksv

Table 1　Stern-Volmer equation and quenching constant Ksv for myosin fluorescence quenching by ECG 277, 298 and 310 K

温度(K)	线性回归方程	Kq(L/(mol·s))	Ksv(L/mol)	相关系数r
277	$F_0/F=0.1532\times10^5[Q]+0.9676$	1.532×10^{12}	1.532×10^4	0.9944
298	$F_0/F=0.1504\times10^5[Q]+0.9162$	1.504×10^{12}	1.504×10^4	0.9982
310	$F_0/F=0.1094\times10^5[Q]+0.9403$	1.094×10^{12}	1.094×10^4	0.9991

表 2　277、298、310 K 温度下 ECG 对肌球蛋白荧光猝灭曲线方程及相关常数

Table 2　Fluorescence quenching curve equation and related constants of myosin by ECG at 277, 298 and 310 K

温度(K)	线性回归方程	K_a(L/mol)	n	相关系数r
277	$\lg[(F_0-F)/F]=0.9491\lg[Q]+2.7420$	8.483×10^5	0.95	0.9972
298	$\lg[(F_0-F)/F]=1.4444\lg[Q]+6.0821$	1.208×10^6	1.44	0.9922
310	$\lg[(F_0-F)/F]=1.4755\lg[Q]+6.0877$	1.223×10^6	1.48	0.9932

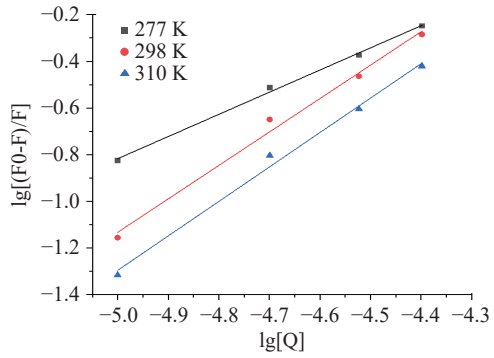


图 6　277、298、310 K 温度下 ECG 对肌球蛋白的荧光猝灭对数曲线

Fig.6　Logarithm curves of fluorescence quenching of myosin by ECG at 277, 298 and 310 K

表 3　ECG 与肌球蛋白结合的热力学参数

Table 3　Thermodynamic parameters of ECG –Myosin interactions

温度(K)	ΔH(kJ/mol)	ΔS(J/mol·K)	ΔG(k/mol)
277			−20.83
298	107.27	462.47	−34.73
310			−36.09

反应为吸热反应；ΔG<0 说明两者的非共价结合是自发过程。目前研究也有类似报道，如槲皮素与牛血清蛋白之间的非共价结合也以疏水相互作用为主[29]。

2.4.5　同步荧光光谱分析　色氨酸残基和酪氨酸残基的同步荧光光谱如图 7 所示，对比可知，色氨酸残基的荧光强度强于酪氨酸，表明前者对肌球蛋白自身的荧光贡献大于后者。图 7A 表明，当Δλ 为 15 nm 时，ECG 浓度越大，酪氨酸残基的荧光强度越弱，并且最大吸收波长出现了轻微的红移，说明酪氨酸所处环境中疏水性减弱[19]，这是因为 ECG 的加入引入羟基等亲水性基团，可能形成更多氢键，增强了酪氨酸残基所处的微环境极性，降低了疏水性，这将在二维红外研究中得到验证。由图 7 可知，当Δλ 为 60 nm 时，ECG 浓度越大，色氨酸的荧光强度越低，但最大吸收峰峰值并未发生位移变化。以上结果表明，ECG 与肌球蛋白之间的非共价相互作用会导致酪氨酸和色氨酸发生荧光猝灭，对酪氨酸残基的荧光猝灭高于对色氨酸残基的荧光猝灭作用，这可能与 ECG 与二者的相互作用差异有关。

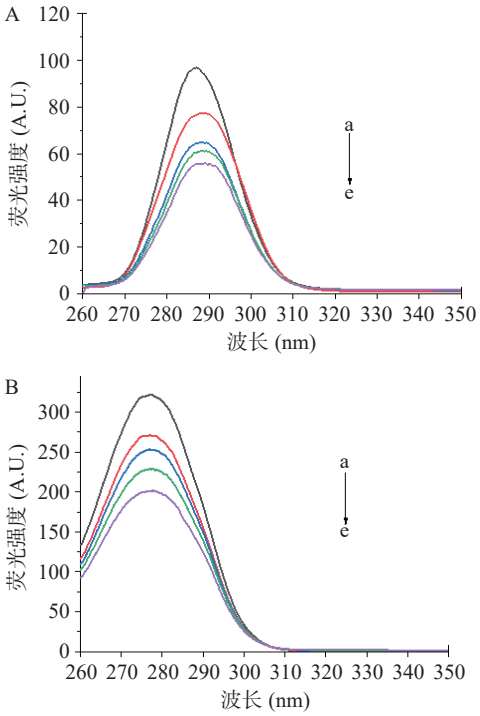


图 7　ECG 与牛肉肌球蛋白的同步荧光光谱

Fig.7　Synchronous fluorescence spectra of ECG and beef myosin

注：A. 酪氨酸同步荧光光谱，Δλ=15 nm；B. 色氨酸同步荧光光谱Δλ=60 nm；a~e 表示 ECG 浓度依次为 0、10、20、30、40 μmol/L。

2.5　化学作用力分析

多酚与蛋白质之间的相互作用比较复杂，用一种方法很难分析全面，通常需要多种分析方法综合验证。因此，采用化学作用力法进一步研究 ECG 与肌球蛋白之间的相互作用。各组样品化学作用力的变化见图 8，由图 8 可知，随着 ECG 浓度的增大，疏水相互作用、氢键逐渐增强，离子键逐渐减弱，二硫键无显著变化。当 ECG 浓度增大到 200 μmol/L 时，疏水相互作用、氢键分别比未添加 ECG 的肌球

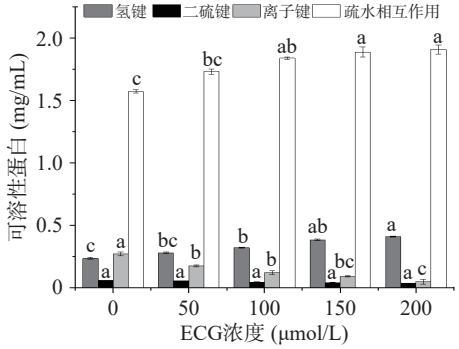


图 8　ECG 与牛肉肌球蛋白的分子间化学作用力分析

Fig.8　Analysis of intermolecular chemical forces between ECG and myosin

蛋白显著升高了 20.36%(P<0.05)、73.91%(P<0.05),离子键显著下降了 81.92%(P<0.05),二硫键无显著性变化。

以上变化表明,ECG 的加入极大增强了疏水相互作用和氢键作用,弱化了离子键作用。也就是说,ECG 与肌球蛋白之间的非共价相互作用驱动力是疏水相互作用和氢键。这与目前相关报道结果一致,即冷藏条件下疏水-疏水相互作用是参与蛋白质-多酚偶联物形成的主要作用力[30−31]。这与多酚和蛋白质中氨基酸的结构密切相关。ECG 具有联苯二酚、联苯三酚结构,可作为供氢体,与蛋白质中的 C=O 以及肽链氨基酸的羟基和氨基形成氢键[32];其非极性芳香环的疏水取代基可以和肌球蛋白头部聚集的酪氨酸等大量疏水性氨基酸形成疏水相互作用。这些结构特点为两者之间发生非共价结合提供了条件。

2.6　二维红外相关光谱分析

由于采用了干涉的信号检测手段,对一维红外中的部分重叠峰作了进一步处理,二维红外相关光谱包含各频率光的相位信息,使其能够被观察到,从而增加了图谱的分辨率[33]。图 9、图 11 中的空白区和阴影区分别表示官能团间相互作用正相关及负相关的强度,通常阴影区代表负峰,表示相消干涉产生的信号;空白区代表正峰,表示相长干涉产生的信号。

3600~3200 cm^{-1} 高波数区同步相关谱图和异步相关谱图如图 9 所示。同步相关谱图中(图 9A),3375、3426、3475、3517、3537 cm^{-1} 处观察到位于对角线上的 5 个自动峰。根据官能团特征及 Wang 等[11] 报道,3537、3469、3375 cm^{-1} 的吸收峰归属于 ECG 苯环上不同位置(见图 10 中 B 环的 3、4 号位或者 D 环的 3、4、5 号位)的-O-H 伸缩振动吸收。因此,图 9A 中(3300, 3537),(3375, 3537),(3469, 3537)处的正交叉峰是 ECG 分子内苯环上不同位置羟基的振动具有相同取向的结果。

图 11A 显示,1800~1000 cm^{-1} 同步相关谱中,对角线上有 1044、1323、1363、1650 cm^{-1} 8 个自动峰(依次对应图 11A 中 1~8 号峰),各自动峰的归属分析见表 4。在非对角度线区域还出现了交叉峰,说明 ECG 与肌球蛋白之间既有分子内相互作用,也有

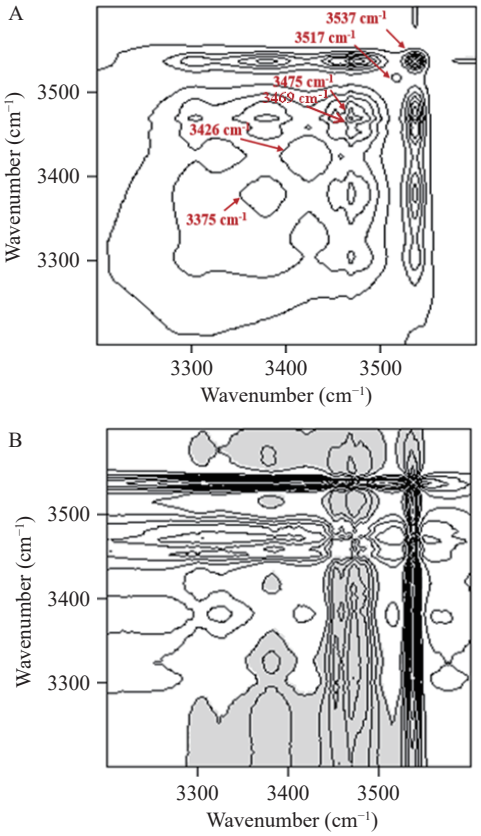


图 9　ECG-肌球蛋白复合物的二维红外光谱

Fig.9　2D FTIR spectra of the ECG-Myosin compound

注:A 为同步相关谱(3600~3200 cm^{-1});B 为异步相关谱(3600~3200 cm^{-1});空白部分为正峰,阴影部分为负峰。

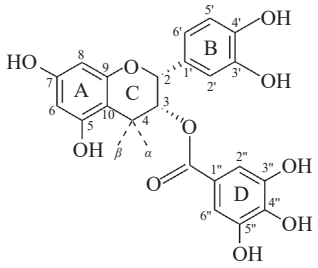


图 10　ECG 的化学结构图

Fig.10　Chemical structure of ECG

分子间相互作用,其中(1455, 1323)、(1455, 1240)、(1455, 1147)、(1455, 1085)、(1455, 1045)均大于 0,表明 1455 cm^{-1} 归属于 ECG 骨架上的-CH_2 振动。

在以上峰归属的基础上继续分析图 11B 异步相关谱发现,(1147, 1650)、(1044, 1650)、(1323, 1550)、(1213, 1550)、(1147, 1550)、(1085, 1550)均为负峰,说明微扰过程中,肌球蛋白的 C=O 伸缩振动、N-H 摇摆振动和 N-H 面内变形振动与 ECG 骨架上的-O-H 以及醚键、酯键上的-C-O 发生了相互作用。(1654, 1240)、(1550, 1240)处均出现较弱的负峰,说明 1240 cm^{-1} 处是肌球蛋白酰胺Ⅲ带与 ECG 酯键上的-C-O-伸缩振动吸收耦合的结果。异步峰中有交叉峰,说明两者之间存在相互作用。(1240, 1363)、(1240, 1618)、(1240, 1680)虽为正峰,但在异步谱

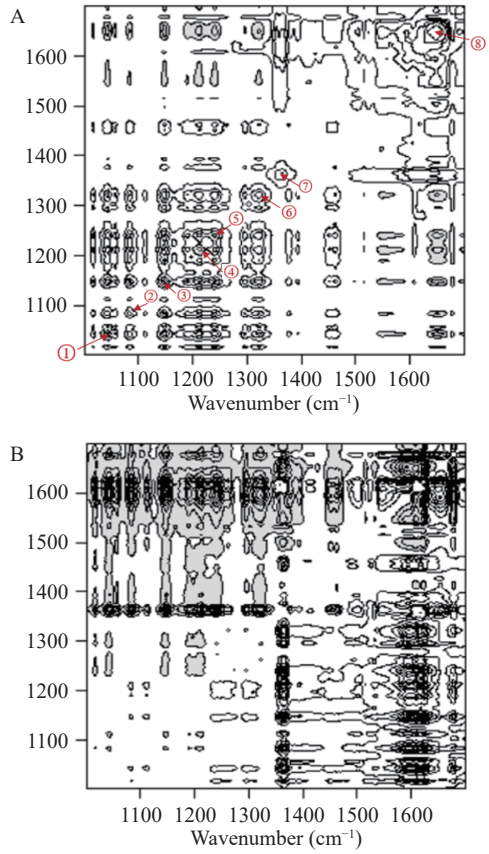


图 11　ECG-肌球蛋白复合物的二维红外相关光谱

Fig.11　2D FT-IR correlation spectroscopy of the ECG-Myosin compound

注：A. 同步相关谱（1800~1000 cm^{-1}）；B. 异步相关谱（1800~1000 cm^{-1}）；空白部分为正峰，阴影部分为负峰。

中显示均有交叉负峰，说明此处 ECG、肌球蛋白均存在分子间相互作用，同时也存在分子内相互作用。1240 cm^{-1} 归属于酰胺Ⅲ带的吸收，1618 cm^{-1}、1680 cm^{-1} 分别归属于 ECG 的-C=C-骨架伸缩振动以及苯环上的 C=O 的振动。

综合二维红外同步、异步相关图谱分析结果，证实了 ECG 和肌球蛋白之间存在复杂的非共价相互作用，且表明 ECG 的一些官能团参与了两者之间的相互作用（详见表 5、表 6），具体为：肌球蛋白酰胺Ⅲ带 C-N 与 ECG 的 C=C 骨架、苯环上的 C=O 进行结合；肌球蛋白酰胺Ⅱ带中 N-H、C-H 与 ECG 中 D 环上的-O-H-以及酯键上的-C-O-进行结合；肌球蛋白酰胺Ⅰ带的 α-螺旋中 C=O 与ECG 中 D 环上-O-H 的变形振动以及醚键上的-C-O-伸缩振动进行结合。据 Sun 等[31] 报道，植物多酚苯环上的酚羟基被认为是极好的供氢基团，它可以与蛋白质的 C=O 基团、羟基（-OH）和氨基（$-NH_2$）形成氢键。上述结果中，肌球蛋白酰胺Ⅱ带、酰胺Ⅰ带中基团的结合促使 ECG 与肌球蛋白之间形成氢键；疏水相互作用主要是由多酚的芳香环和肌球蛋白中酪氨酸等疏水性氨基酸残基等引起[30]。而蛋白质酰胺Ⅲ带吸收峰主要来源于氨基酸残基中 C-N 伸缩振动和 N-H 面内弯曲振动[34]。酰胺Ⅲ带、酰胺Ⅱ带中 N-H、C-H 与 D 环上的-O-H-以及酯键上的-C-O-结合，促进了 ECG 与肌球蛋白之间疏水相互作用的形成。这有力揭示了 2.5 中 ECG 与肌球蛋白之间非共价结合主要

表 4　ECG 与肌球蛋白的二维红外相关光谱（1800~1000 cm^{-1}）部分自动峰归属（cm^{-1}）

Table 4　Partial automatic peak assignment of 2D FT-IR correlation spectroscopy (1800~1000 cm^{-1}) of ECG and myosin (cm^{-1})

序号	峰位分析	峰归属
1号（1044, 1044）	（1044, 1044）>0、（1044, 1240）>0、（1044, 1213）>0、（1044, 1650）<0、（1044, 1550）<0	ECG分子内相互作用形成的峰，归属于ECGC/D环上的醚键上-C-O-的伸缩振动
2号（1085, 1085）	（1085, 1085）>0、（1085, 1213）>0、（1085, 1550）<0	ECG分子内相互作用形成的峰，归属于ECG C/D环上的醚键上-C-O-的伸缩振动
3号（1147, 1147）	（1147, 1147）>0、（1147, 1240）>0、（1147, 1650）<0、（1147, 1550）<0	ECG分子内相互作用形成的峰，归属于ECG C/D环上的醚键上-C-O-的伸缩振动
4号（1213, 1213）	（1213, 1213）>0、（1213, 1044）>0、（1213, 1085）>0、（1213, 1240）>0、（1213, 1650）<0	ECG分子内相互作用形成的峰，归属于ECG酯键上的-C-O-伸缩振动
5号（1240, 1240）	（1240, 1240）>0、（1240, 1044）>0、（1240, 1085）>0、（1240、1147）>0	ECG分子内相互作用、肌球蛋白分子内相互作用或两者之间的相互作用，归属于ECG D环酯键上的-C-O-的伸缩振动或肌球蛋白酰胺Ⅲ带-C-N-的伸缩振动或两种官能团间的相互作用
6号（1323, 1323）	（1323, 1323）>0、（1323, 1650）<0、（1323, 1550）<0	ECG分子内相互作用形成的峰，归属于ECG的-O-H变形振动
7号（1363, 1363）	（1363, 1363）>0、（1363, 1240）>0、（1363, 1147）>0	ECG分子内相互作用形成的峰，归属于ECG的-O-H变形振动
8号（1650, 1650）	（1650, 1650）>0、（1650, 1213）<0、（1650, 1044）<0	肌球蛋白分子内相互作用，归属于肌球蛋白酰胺Ⅰ带α-螺旋-C=O-的特征吸收峰

表 5　参与相互作用的 ECG 官能团及与之结合的肌球蛋白官能团（cm^{-1}）

Table 5　ECG functional groups involved in the interaction and myosin functional groups bound to them (cm^{-1})

参与反应的肌球蛋白基团	与之结合的ECG基团
酰胺Ⅰ带α-螺旋的C=O（1658, 1650）	C/D环上的醚键上-C-O-（1044、1085、1147）
酰胺Ⅱ带N-H、C-H（1550）	D环上的-O-H-（1323）D环酯键上的-C-O-（1213）C/D环上的醚键上-C-O-（1085、1147）
酰胺Ⅲ带C-N（1240）	-C=C-骨架（1618）苯环上的C=O骨架（1680）

表 6 ECG 与肌球蛋白相互作用位点的精细分析表(cm^{-1})

Table 6 Detailed analysis of ECG and myosin interaction sites (cm^{-1})

官能团名称	ECG	肌球蛋白
D环上-C=O伸缩振动	1680	
-C=C-骨架伸缩振动	1618	
-O-H-变形振动	1323	
C环上-CH_2变形振动	1455	
C/D环上的醚键上-C-O-	1085、1147	
D环酯键上的-C-O-	1213、1240	
酰胺Ⅰ带中-C=O-		1658、1650
酰胺Ⅱ带-N-H-		1550
酰胺Ⅲ带-C-N-		1238

以氢键和疏水相互作用为主要驱动力的根本原因。

根据表 5、表 6 中精细的吸收峰归属以及 Noda 规则[35], 分析 ECG 或肌球蛋白中参与相互作用的主要官能团反应顺序。同步相关谱中峰 $\Phi(v_1, v_2)$与异步相关谱中峰 $\Psi(v_1, v_2)$同为正或者同为负, 说明 v_1 代表的官能团优先于 v_2 代表的官能团优先发生反应, 标记为 v_1 先于 v_2。若同一峰位在同步相关谱和异步相关谱中一正一负, 则说明 v_2 优先于 v_1 发生反应, 标记为 v_1 后于 v_2[36−37]。

首先对 ECG、肌球蛋白分子内相互作用的官能团反应顺序进行分析, 详见表 7、表 8。其次再对 ECG 和肌球蛋白相互作用的官能团进行比较分析, 进一步探究 ECG 和肌球蛋白在受到外界微扰动时官能团参与结合的活泼程度, 详见表 9。

对 ECG、肌球蛋白中参与分子间相互作用以及 ECG 分子内相互作用的官能团进行总结, 分析主要基团参与两者相互作用的反应顺序, 见表 10、表 11。

表 7 ECG 分子内相互作用主要基团反应顺序总结

Table 7 Summary of main group reaction sequence of ECG intramolecular interaction

物质	范围(cm^{-1})	顺序
ECG	3600~3250	-OH(3303, 3380 cm^{-1}先于3537 cm^{-1}先于3375, 3475 cm^{-1})
	1200~1700	-CH_2变形振动(1455 cm^{-1})/D环上的-O-H-(1323 cm^{-1})先于C/D环上的醚键上-C-O-(1085 cm^{-1})先于D环上酯键-C-O-(1213 cm^{-1})/C/D环上的醚键上-C-O-(1147, 1047 cm^{-1})

表 8 ECG 分子内相互作用主要基团反应顺序

Table 8 Reaction sequence of major groups in ECG intramolecular interactions

编号	同步相关谱(cm^{-1})	异步相关谱(cm^{-1})	归属	变化顺序(cm^{-1})
1	Φ(3475, 3380)>0	Ψ(3475, 3380)<0	(ECG, ECG)	3475后于3380
2	Φ(3303, 3475)>0	Ψ(3303, 3475)>0	(ECG, ECG)	3303先于3475
3	Φ(3475, 3537)>0	Ψ(3475, 3537)<0	(ECG, ECG)	3475后于3537
4	Φ(3375, 3537)>0	Ψ(3375, 3537)<0	(ECG, ECG)	3375后于3537
5	Φ(3303, 3537)>0	Ψ(3303, 3537)>0	(ECG, ECG)	3303先于3537
6	Φ(1455, 1147)>0	Ψ(1455, 1147)>0	(ECG, ECG)	1455先于1147
7	Φ(1363, 1147)>0	Ψ(1363, 1147)>0	(ECG, ECG)	1363先于1147
8	Φ(1213, 1085)>0	Ψ(1213, 1085)<0	(ECG, ECG)	1213后于1085
9	Φ(1147, 1085)>0	Ψ(1147, 1085)<0	(ECG, ECG)	1147后于1085
10	Φ(1047,1085)>0	Ψ(1047,1085)<0	(ECG, ECG)	1047后于1085
11	Φ(1240,1044)>0	Ψ(1240,1044)>0	(ECG, ECG)	1240先于1044
12	Φ(1240,1147)>0	Ψ(1240,1147)>0	(ECG, ECG)	1240先于1147
13	Φ(1240,1213)>0	Ψ(1240,1213)>0	(ECG, ECG)	1240先于1213

表 9 ECG 和肌球蛋白中参与分子间相互作用主要基团的反应顺序表

Table 9 Reaction sequence of major groups involved in intermolecular interactions in ECG and myosin

编号	同步相关谱(cm^{-1})	异步相关谱(cm^{-1})	归属	变化顺序(cm^{-1})
1	Φ(1147, 1650)<0	Ψ(1147, 1650)<0	(ECG, Myosin)	1147先于1650
2	Φ(1044, 1650)<0	Ψ(1044, 1650)<0	(ECG, Myosin)	1044先于1650
3	Φ(1323, 1550)<0	Ψ(1323, 1550)<0	(ECG, Myosin)	1323先于1550
4	Φ(1323, 1650)<0	Ψ(1323, 1650)<0	(ECG, Myosin)	1323先于1650
5	Φ(1213, 1550)<0	Ψ(1213, 1550)<0	(ECG, Myosin)	1213先于1550
6	Φ(1147, 1550)<0	Ψ(1147, 1550)<0	(ECG, Myosin)	1147先于1550
7	Φ(1085, 1550)<0	Ψ(1085, 1550)<0	(ECG, Myosin)	1085先于1550
8	Φ(1618, 1240)>0	Ψ(1618, 1240)>0	(ECG, Myosin)	1618先于1240
9	Φ(1680, 1240)>0	Ψ(1680, 1240)>0	(ECG, Myosin)	1680先于1240
10	Φ(1240, 1650)<0	Ψ(1240, 1650)<0	(ECG, Myosin)	1240先于1650
11	Φ(1240, 1554)<0	Ψ(1240, 1554)<0	(ECG, Myosin)	1240先于1554

表 10　ECG 和肌球蛋白中参与分子间相互作用主要基团的反应顺序比较表

Table 10　Comparison of the reaction sequence of major groups involved in intermolecular interactions in ECG and myosin

肌球蛋白	顺序	ECG
酰胺Ⅰ带α-螺旋的C=O（1658, 1650）	后于	D环上的-O-H-（1323 cm^{-1}）先于D环上酯键-C-O-（1240~1213 cm^{-1}）先于C/D环上的醚键上-C-O-（1044 cm^{-1}、1147 cm^{-1}）
酰胺Ⅱ带N-H、C-H（1550 cm^{-1}, 1554 cm^{-1}）	后于	D环上的-O-H-（1323 cm^{-1}）先于D环上酯键-C-O-（1213 cm^{-1}、1240 cm^{-1}）先于C/D环上的醚键上-C-O-（1044 cm^{-1}、1085 cm^{-1}、1147 cm^{-1}）
酰胺Ⅲ带C-N伸缩振动和N-H（1240 cm^{-1}）	后于	-C=C-骨架（1618 cm^{-1}）先于苯环上的C=O（1680 cm^{-1}）

表 11　ECG 和肌球蛋白中参与分子内相互作用主要基团的反应顺序总结表

Table 11　Summary of the reaction order of major groups involved in intramolecular interactions in ECG and myosin

物质	反应顺序
ECG	第一反应序列：D环上的-O-H-（1323 cm^{-1}）先于D环上酯键-C-O-（1213~1240 cm^{-1}）先于C/D环上的醚键上-C-O-（1044、1085、1147 cm^{-1}） 第二反应序列：-C=C-骨架（1618 cm^{-1}）先于苯环上的C=O（1680 cm^{-1}）
肌球蛋白	酰胺Ⅲ带（1240 cm^{-1}）先于酰胺Ⅱ带（1550 cm^{-1}, 1554 cm^{-1}）先于酰胺Ⅰ带（1650 cm^{-1}）

综上所述，根据二维红外得到参与相互作用基团类别、结合情况及先后顺序表明，小分子 ECG 优先于肌球蛋白参与两者结合。在 ECG 内部，D 环上的-OH 先于酯键，优于醚键-C-O-，先于骨架中 C=C 键参与两者反应；在肌球蛋白中，酰胺Ⅲ带中 C-N 先于酰胺Ⅰ带中 C=O、酰胺Ⅱ带中 N-H、C-H 参与两者反应。

3　结论

本文运用纳米粒度仪、紫外分光光度计、荧光光谱、二维红外光谱等测定了 LSPC 的重要组分 ECG 终浓度为 10~40 μmol/L 时对牛肉肌球蛋白 Zeta 电位、粒径及浊氧化及氧化交联的影响，重点运用荧光光谱、化学分析法、二维红外研究了 ECG 与肌球蛋白的相互作用类型、结合位点及参与相互作用基团，以揭示 LSPC 抑制肉类蛋白质氧化的机理。研究发现，中低浓度的 ECG（10~30 μmol/L）使 ECG-肌球蛋白复合物 SDS-PAGE 图谱中 250 kDa 处条带变窄，增大 Zeta 电位绝对值、降低浊度，能够抑制肌球蛋白自氧化与交联聚集，维持复合物溶液稳定性；高浓度 ECG（40 μmol/L）则促使肌球蛋白交联聚集，Zeta 电位绝对值降低，浊度增大，溶液体系稳定性降低，这与 ECG 作为供氢体与肌球蛋白之间发生了非共价相互作用有关，提示将 ECG、LSPC 等植物多酚作为抗氧化剂应用于肉品保鲜时应选择适宜的浓度与用量。运用二维红外相关谱、荧光光谱等技术进一步研究发现，ECG 与肌球蛋白之间发生了以氢键和疏水相互作用为主要作用力的非共价结合，是熵驱动的可以自发进行的吸热反应，能够猝灭肌球蛋白荧光。结合过程中 ECG 的 D 环上的-OH 作为供氢体，优先于酯键、醚键及骨架中的 C=C，与肌球蛋白 α-螺旋中 C=O 及 N-H、C-H 形成氢键、疏水相互作用，从而降低了 ECG-肌球蛋白复合物 Zeta 电位、粒径和浊度，发挥了抗蛋白质氧化聚集的作用，维持了溶液的稳定性。本研究为 LSPC 的开发及作为天然抗氧化剂在改善肉及肉制品品质中的应用提供了理论依据和应用指导。

© 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] BAI G, PAN Y, ZHANG Y, et al. Research advances of molecular docking and molecular dynamic simulation in recognizing interaction between muscle proteins and exogenous additives[J]. Food Chemistry, 2023, 429: 11.

[2] MICHAEL H. The chemistry of protein oxidation in Food[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2019, 58: 16742−16763.

[3] LIANG Z, VERONICA V, HUANG J, et al. Combined effects of plant food processing by-products and high oxygen modified atmosphere packaging on the storage stability of beef patties[J]. Food Control, 2022, 33(2): 46.

[4] HUANG X, SUN L, LIU L, et al. Study on the mechanism of mulberry polyphenols inhibiting oxidation of beef myofibrillar protein[J]. Food Chemistry, 2022, 372: 131241.

[5] HU Y, GAO Y, SOLANGI I, et al. Effects of tea polyphenols on the conformational, functional, and morphological characteristics of beef myofibrillar proteins[J]. LWT-Food science and technology, 2022, 154: 1−9.

[6] NUERJIANG M, LI Y, YUE X, et al. Analysis of inhibition of guava (*Psidium guajava* L.) leaf polyphenol on the protein oxidative aggregation of frozen chicken meatballs based on structural changes[J]. Food Research International, 2023, 164: 1−14.

[7] BABAOGLU A S, UNAL K, DILEK N M, et al. Antioxidant and antimicrobial effects of blackberry, black chokeberry, blueberry, and red currant pomace extracts on beef patties subject to refrigerated storage[J]. Meat Science, 2022, 187: 1−7.

[8] CUI H, DONG Y, LU T, et al. Effect of ethanolic extract from *Morus alba* L. leaves on the quality and sensory aspects of chilled pork under retail conditions[J]. Meat Science, 2021, 172: 1−8.

[9] LIAO G, KANG J, ZHANG S L. Covalent and non-covalent interaction of myofibrillar protein and cyanidin-3-O-glucoside: Focus on structure, binding sites and in vitro digestion properties[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2024, 104(2): 905−915.

[10] 董晓敏. 葡萄籽原花青素的提取、抑菌活性及其对鸡肉保鲜研究[D]. 济南：齐鲁工业大学, 2015. [DONG X M. Extraction, Anti-bacterial mechanism and Fresh-keeping effect of procyanidins

from Grape seeds[D]. Jinan: Qilu University of Technology, 2015.]
[11] WANG J, ZHANG W, TANG C, et al. Synergistic effect of B-type oligomeric procyanidins from lotus seedpod in combination with water-soluble Poria cocos polysaccharides against E. coli and mechanism[J]. Journal of Functional Foods, 2018, 48: 134−143.
[12] CHEN Y, ZHANG R, XIE B, et al. Lotus seedpod proanthocyanidin-whey protein complexes: Impact on physical and chemical stability of β-carotene-nanoemulsions[J]. Food Research International, 2020, 127: 1−15.
[13] 凌智群. 莲房原花青素及其生物、药理活性研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2001. [LING Z Q. Study on procyanidins and its biological, pharmacological activities form the seedpod of nelumbo nucifera gaertn [D]. Wuhan: Huazhong University, 2001.]
[14] 禹华娟. 莲原花青素的酶辅助提取技术及其在油脂中的抗氧化活性研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2010. [YU H J. Study on enzyme assistant extraction of procyanidins from seedpod of lotus and its antioxidation in oils[D]. Wuhan: Huazhong University, 2010.]
[15] LI X, WANG J, GAO X, et al. Inhibitory effects of lotus seedpod procyanidins against lipid and protein oxidation and spoilage organisms in chilled-storage beef[J]. LWT-Food science and technology, 2022, 160: 1−9.
[16] LIU X, SONG Q, LI X, et al. Effects of different dietary polyphenols on conformational changes and functional properties of proteinpolyphenol covalent complexes[J]. Food Chemistry, 2021, 361: 1−7.
[17] ZHANG L, WANG P, YANG Z, et al. Molecular dynamics simulation exploration of the interaction between curcumin and myosin combined with the results of spectroscopy techniques[J]. Food Hydrocolloid, 2020, 101: 1−20.
[18] SMIRNOFF N, CUMBES Q J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes[J]. Phytochemistry, 1989, 28: 1057−1060.
[19] HUANG Y, DU H, KAMAL G M, et al. Studies on the binding interactions of Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*) myosin with chlorogenic acid and rosmarinic acid[J]. Food and Bioprocess Technology, 2020, 13: 1421−1434.
[20] LI W, SUN B, WU P. Study on hydrogen bonds of carboxymethyl cellulose sodium film with two-dimensional correlation infrared spectroscopy[J]. Carbohydrate Polymers, 2009, 78: 454−461.
[21] 陈雪珂. 肌球蛋白凝胶化过程中与迷迭香酸的互作机制及其对蛋白理化特性的影响[D]. 重庆: 西南大学, 2019. [CHEN X K. Interaction mechanism of myosin with rosmarinic acid during gelation and its effect on protein physicochemical properties[D]. Chongqing: Southwest University, 2019.]
[22] ZHANG X Y, ZHENG X, SHANG Z, et al. Improving the biological activity and emulsification ability of soybean meal hydrolysate via non-covalent interactions with polyphenols[J]. LWT-Food Science and Technology, 2023, 182: 1−8.
[23] ROHN S, RAWEL H M, KROLL J. Antioxidant activity of protein–bound quercetin[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(15): 4725−4729.
[24] 周扬, 陈雪珂, 戴宏杰, 等. 溶液体系中迷迭香酸与肌球蛋白的相互作用及其对蛋白理化特性的影响[J]. 食品科学, 2020, 41(12): 14−21. [ZHOU Y, CHEN X K, DAI H J, et al. Interaction of rosmarinic acid with myosin in aqueous buffer solution and its effect on protein physicochemical properties[J]. Food Science, 2020, 41(12): 14−21.]
[25] 曹云刚. 植物多酚对肉蛋白氧化稳定性和功能性质的影响机理及应用[D]. 无锡: 江南大学, 2016. [CAO Y G. Effect of plant-derived polyphenols on oxidative stability and functional properties of meat proteins: mechanism and application[D]. Wuxi: Jingnan University, 2016.]
[26] CHEN Y, JIANG S, CHEN Q, et al. Antioxidant activities and emulsifying properties of porcine plasma protein hydrolysates modified by oxidized tannic acid and oxidized chlorogenic acid[J]. Process Biochemistry, 2019, 79: 105−113.
[27] WOOJEONG K, WANG Y, CORDELIA S. Emerging technologies to improve plant protein functionality with protein-polyphenol interactions[J]. Trends in Food Science & Technology, 2024, 147: 1−13.
[28] JIA N, WANG L, SHAO J, et al. Changes in the structural and gel properties of pork myofibrillar protein induced by catechin modification[J]. Meat Science, 2017, 127: 45−50.
[29] 刘建垒, 邢效娟, 周瑞, 等. 牛血清白蛋白与槲皮素及花青素相互作用方式及其纳米颗粒特征的比较[J]. 食品科学, 2017, 38(5): 7−13. [LIU J L. XING X J, ZHOU R, et al. Interaction modes and nanoparticle characteristics of bovine serum albumin with quercetin and anthocyanin[J]. Food Science, 2017, 38(5): 7−13.]
[30] QUAN T H, BENJAKUL T, SAEL A, et al. Protein–polyphenol conjugates: Antioxidant property, functionalities and their applications[J]. Trends in Food Science & Technology, 2019, 91: 507−517.
[31] SUN X, SARTESHNIZI R A, UDENIGWE C C. Recent advances in protein–polyphenol interactions focusing on structural properties related to antioxidant activities[J]. Current Opinion in Food Science, 2022, 45: 1−8.
[32] BUITIMEA-CANTUA N E, GUTIERREZ-URIBE J A, SERNA-SALDIVAR S O. Phenolic–protein interactions: Effects on food properties and health benefits[J]. Journal of Medicinal Food, 2018, 21: 1−11.
[33] GANIM Z, CHUNG S H, SMITH A W, et al. Amide I two-dimensional infared spectroscopy of proteins[J]. Accounts of Chemical Research, 2008, 41(3): 432−441.
[34] 彭林, 马良, 戴宏杰, 等. 多酚与肌原纤维蛋白相互作用机制及其对蛋白特性的影响研究进展[J]. 食品科学, 2020, 41(11): 239−246. [PENG L, MA L, DAI H J, et al. Recent progress in understanding the interaction mechanism between polyphenols and myofibrillar protein and its effects on protein properties[J]. Food Science, 2020, 41(11): 239−246.]
[35] NODA I. Determination of two-dimensional correlation spectra using the hilbert transform[J]. Applied Spectroscopy, 1990, 54(7): 994−999.
[36] XIA J, WANG D, LIANG P, et al. Vibrational (FT-IR, Raman) analysis of tea catechins based on both theoretical calculations and experiments[J]. Biophysical Chemistry, 2020, 256: 1−27.
[37] YANG J, MA S, TAO S, et al. Improvement of lactose digestion by highland barley (*Hordeum vulgare* var. coeleste L.) β-glucan: Activation of lactase under simulated gastric/small intestinal digestive conditions[J]. Carbohydrate Polymers, 2025, 347: 1−15.