

超声波处理对绿原酸与牛血清白蛋白结合作用的影响

范金波, 麻奥, 闵爽, 邢莉, 吕长鑫, 励建荣*

(渤海大学食品科学与工程学院 辽宁省食品安全重点实验室)

生鲜农产品贮藏加工及安全控制技术国家地方联合工程研究中心 辽宁锦州 121013)

摘要 采用荧光光谱法和紫外-可见吸收光谱法研究超声处理(40 kHz/30 min 和 50 kHz/30 min)对绿原酸(CGA)与牛血清白蛋白(BSA)作用的影响。通过荧光发射光谱来分析 CGA 对 BSA 的荧光猝灭作用;通过同步荧光光谱分析结合 CGA 后 BSA 酪氨酸(Tyr)残基与色氨酸(Trp)残基微环境的变化来确定 CGA 对 BSA 构象的影响;运用 Stern-Volmer 方程、Acharya 方程等数学方程计算其猝灭常数、结合常数,以及结合位点数;通过焓变与熵变分析分子间作用力。利用华法林(WARF)、布洛芬(IBU)两种蛋白标记物来判断结合位点;利用紫外光谱测定 BSA 构象变化对比不同超声频率的影响。结果表明:在超声频率 53 kHz 时,CGA 对 BSA 的荧光猝灭效果最为显著,超声处理使 CGA-BSA 复合物的构象发生一定改变,并对 CGA 与 BSA 的结合有增强作用,而不会改变反应的作用力类型。研究结果为超声处理对蛋白质与配体结合的影响研究提供参考。

关键词 牛血清白蛋白;绿原酸;超声波处理;荧光猝灭;紫外-可见吸收光谱法

文章编号 1009-7848(2022)03-0129-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.03.016

绿原酸(Chlorogenic acid,CGA)是由咖啡酸(Caffeic acid)与奎尼酸(Quinic acid)反应生成的缩酚酸,是植物体在有氧呼吸过程中产生的一种苯丙素类化合物。CGA 属于酚酸类物质,是一种有效的抗氧化剂,它在天然植物中广泛存在,其中杜仲、金银花、咖啡中含量相对较高^[1]。CGA 还具有抗病毒、保肝利胆、降血压和降血脂等生物活性^[2-3]。除了多种生物活性外,有研究表明它在食品保鲜方面也有效,如桃贮藏^[4]和生鸡冷藏^[5]。目前,CGA 作为天然活性成分,成为食品领域研究的热点。

小分子活性成分与血清白蛋白的结合,不仅影响血清白蛋白的活性,还对其本身活性有一定影响。牛血清白蛋白(Bovine serum albumin,BSA)具有良好的物理特性及稳定性,且与人血清白蛋白(Human serum albumin, HSA)具有 76% 的结构同源性,近年来许多研究将其作为 HSA 的模型蛋白^[6]。BSA 作为重要转运蛋白,能与外源性和内源性小分子物质特异性结合。BSA 由 3 个同源结构域(I,II,III)组成,每个结构域都由亚结构域 A 和 B 组成^[7]。每个位点都包含疏水性空腔,使 BSA

能够容纳和运输各种分子^[8]。其中,亚结构域 IIA 和 IIIA 是配体结合的两个主要位点^[9]。此外,BSA 因具有成本低、现成可用的优点而被广泛研究。Yao 等^[10]通过多光谱和对接模拟得出 CGA 可能通过与 Cd²⁺形成氢键来减少 Cd²⁺与 BSA 的相互作用的结论。

食品中所含蛋白质不仅能够提供人体所需多种营养元素,而且决定食品色泽、气味、口感、状态等感官品质。目前各种加工处理技术对蛋白质功能性质的影响是国内外研究的热点领域。近年来,超声波处理具有穿透力强、方向性好、能量大,且低成本、无害、环保等特点而作为一种新型的冷处理改性技术快速发展。有研究发现提高超声频率对食品中蛋白质的疏水性有影响^[11]。也有研究表明软超声处理可以导致红酒中酚类物质增加^[12]。然而,对于超声波处理对食品中蛋白质与多酚的结合作用的影响尚缺乏研究。本研究旨在通过多光谱法分析超声波处理对 CGA 与 BSA 结合作用的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

BSA(99%),北京百灵威科技有限公司;CGA(98%)、布洛芬(Ibuprofen,IBU 98%)、华法林

收稿日期:2021-03-02

基金项目:国家自然科学基金面上项目(31972107)

作者简介:范金波(1977—),男,博士,副教授

通信作者:励建荣 E-mail:lijr6491@163.com

(Warfarin, WARF 98%), 生工生物工程(上海)有限公司; 无水乙醇、磷酸氢二钠、柠檬酸等为分析纯试剂。试验用水为去离子水。

1.2 仪器与设备

F-7000 荧光分光光度计, 日本日立高新技术公司; FE20K 实验室 pH 计、ML104 电子天平, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; UV-2700 紫外-可见光分光光度计, 日本 SHIMADZU 公司; Milli-Q Reference 型超纯水机, 德国默克密理博有限公司。

1.3 方法

1.3.1 溶液的配制 BSA 用水配制成浓度为 1.2×10^{-6} mol/L 的储备液, CGA 先用无水乙醇溶解再加水配制成 3.6×10^{-5} mol/L 的储备液(醇量不可超过储备液的 20%), 6.0×10^{-6} mol/L 的 WARF 和 IBU 储备液同样以水为溶剂, 0.2 mol/L 的磷酸缓冲液(pH 4.0); 由磷酸氢二钠与柠檬酸溶液在 pH 计上调节得到。上述溶液均置于 4 °C 冰箱保存。

1.3.2 CGA 与 BSA 结合的荧光光谱 准确移取 2 970, 2 945, 2 920, 2 895, 2 870, 2 845, 2 820, 2 795 μ L PBS 缓冲溶液到 1~8 编号的离心管中, 再分别加入 30 μ L 1.2×10^{-6} mol/L 的 BSA 标准溶液, 然后在每个离心管中加入 3.6×10^{-5} mol/L CGA 标准溶液至 3 mL, 振荡混匀备用。上述样品配制 6 组, 均分为两份, 分别置于 25 °C 和 37 °C 下反应 30 min。接着再从每份中取两组样品, 分别经超声频率 40 kHz 和 53 kHz 处理 30 min, 剩余样品继续在原温度下反应 30 min。每次测样前先取 300 μ L 样品润洗标准石英比色皿 3 次, 接着取 2 mL 样品于比色皿中进行扫描(下同)。设定激发波长 280 nm, 激发光栅为 2.5 nm, 发射光栅为 5 nm, 测定 290~450 nm 的荧光光谱并记录。

1.3.3 CGA 与 BSA 结合的同步荧光光谱 样品配制及处理同 1.3.2 节。设定发射波长 215 nm, 200~350 nm 为激发波长扫描范围, 测定每组样品的同步荧光光谱并记录; 发射波长 260 nm, 200~350 nm 为激发波长扫描范围, 测定每组样品的同步荧光光谱并记录。

1.3.4 CGA 与 BSA 结合位点研究 准确移取 2 945, 2 920, 2 895, 2 870, 2 845, 2 820, 2 795, 2 770 μ L PBS 缓冲溶液和 30 μ L 1.2×10^{-6} mol/L 的 BSA

标准溶液到 1~8 编号的离心管中, 再分别加入 25 μ L 7.2×10^{-4} mol/L WARF 储备液, 充分振荡混匀并反应 15 min 后, 均加入 3.6×10^{-5} mol/L CGA 标准溶液至 3 mL, 混均后置于 25 °C 反应 30 min。上述样品配制两组, 其中一组在超声频率 40 kHz 下反应 30 min, 另一组继续在原温度下反应 30 min。设定激发波长 280 nm, 激发光栅为 2.5 nm, 发射光栅为 5 nm, 测定 290~450 nm 的荧光光谱并记录。数据处理时以未加入 WARF 的样品的荧光光谱数据为对照绘制猝灭率随 CGA 浓度变化的图像。将标记物换为 IBU 后重复上述步骤。

1.3.5 CGA 与 BSA 结合的紫外-可见吸收光谱样品配制同 1.3.2 节 上述样品配制 3 组, 一组置于 25 °C 反应 30 min, 另外两组分别在超声频率为 40, 53 kHz 下处理 30 min。设定狭缝宽度 5 nm, 狭缝间隔 0.5 nm, 测定 250~500 nm 的紫外光谱并进行记录。

1.3.6 统计分析 每个试验重复 3 次, 结果表示为 $\bar{x} \pm s$ 。采用 Origin V9.0 做图。采用 SAS 8.0 软件(SAS Institute Inc., NC, 美国)的一般线性模型(GLM)进行方差分析。邓肯氏多重检验用来确定数据间的差异, 显著水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 超声处理对 CGA 与 BSA 荧光发射光谱的影响

荧光光谱法广泛用于研究蛋白质荧光团对猝灭剂的可及性。BSA 含有的氨基酸残基可以吸收电磁辐射而受到激发, 当激发光源停止时, 残基因吸收能量产生荧光。其中 Trp 荧光的量子产率和发射最大波长对环境的极性和其生物大分子的结构变化非常敏感^[3]。荧光猝灭是指分子间相互作用(如能量转移、激发态反应、碰撞猝灭和基态络合物形成)导致荧光团荧光的减少^[4]。

由图 1 可知, 温度及超声频率不同, CGA 对 BSA 的猝灭效果也不同。CGA 在 340 nm 左右诱导 BSA 发射信号的浓度依赖性降低^[5]。不同条件下的荧光图谱峰形均无明显变化, 随 CGA 浓度的升高, BSA 的荧光强度降低, 峰形均出现红移, 说明 CGA 的加入使荧光物质的极性增强, CGA-BSA 复合物影响了 BSA 的三级结构^[6]。25 °C、40 kHz

时,峰值较未超声组有轻微降低;但 53 kHz 时,峰值显著下降 ($P<0.05$)。37 °C、40 kHz 时,CGA 与 BSA 作用后的荧光强度有所下降,但 53 kHz 时变

化不大。在 25 °C、53 kHz 时,CGA 对于 BSA 的荧光强度影响最大。

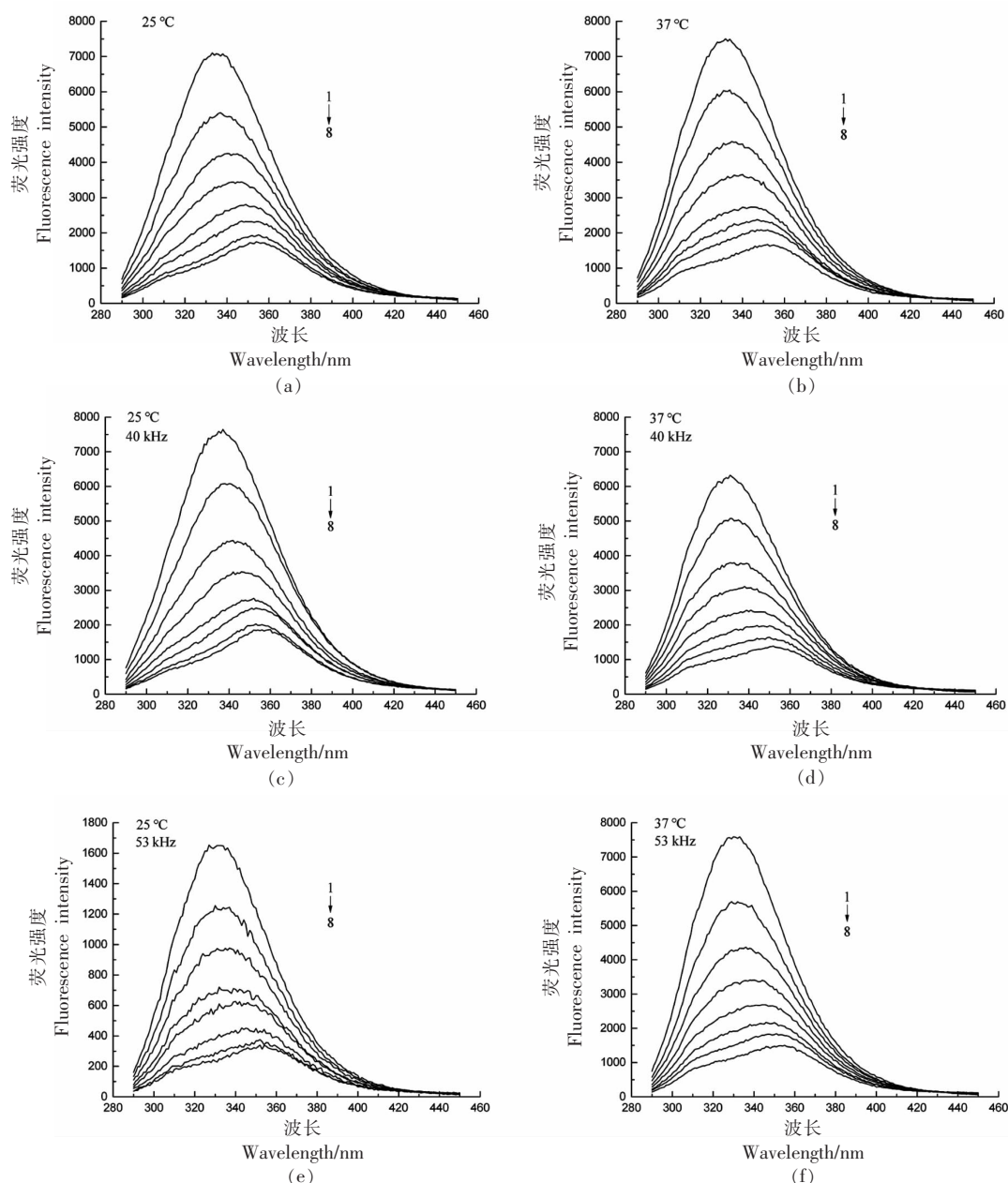


图 1 不同温度下超声频率对 CGA 与 BSA 作用的荧光光谱的影响

Fig.1 Effect of ultrasonic frequency on fluorescence spectra of CGA and BSA at different temperature

2.2 超声处理对 CGA 与 BSA 同步荧光光谱的影响

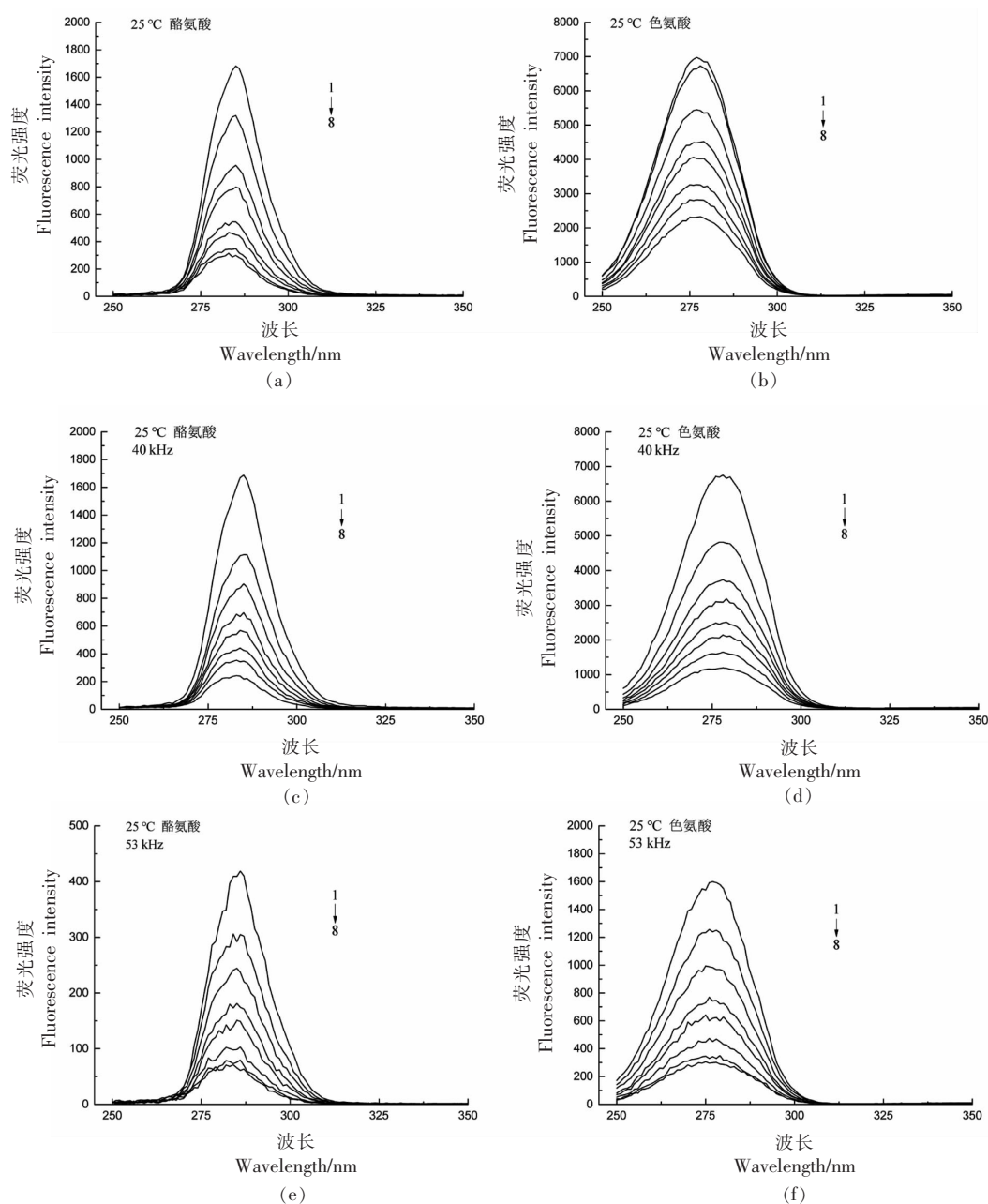
同步荧光光谱通常用来研究蛋白质与配体相互作用的相关构象变化,主要是测定酪氨酸(Tyrosine, Tyr)残基与色氨酸(Tryptophan, Trp)残基的

荧光强度^[17]。当激发和发射波长的差值 $\Delta\lambda$ 设置为 15 nm 和 60 nm 时,同步荧光可分别提供 Tyr 和 Trp 残基的特征信息^[18]。

由图 2、图 3 可知,随 CGA 浓度的升高,Trp 与 Tyr 的荧光强度均降低,峰形基本无变化,但峰

值均发生蓝移,表明BSA的Trp与Tyr残基附近的微环境疏水性增强。CGA可能通过与Trp和Tyr结合来诱导BSA的构象变化,即CGA与BSA的结合位置可能在Trp和Tyr残基附近。25℃、40 kHz时,Tyr与Trp峰值无明显变化($P>0.05$),而

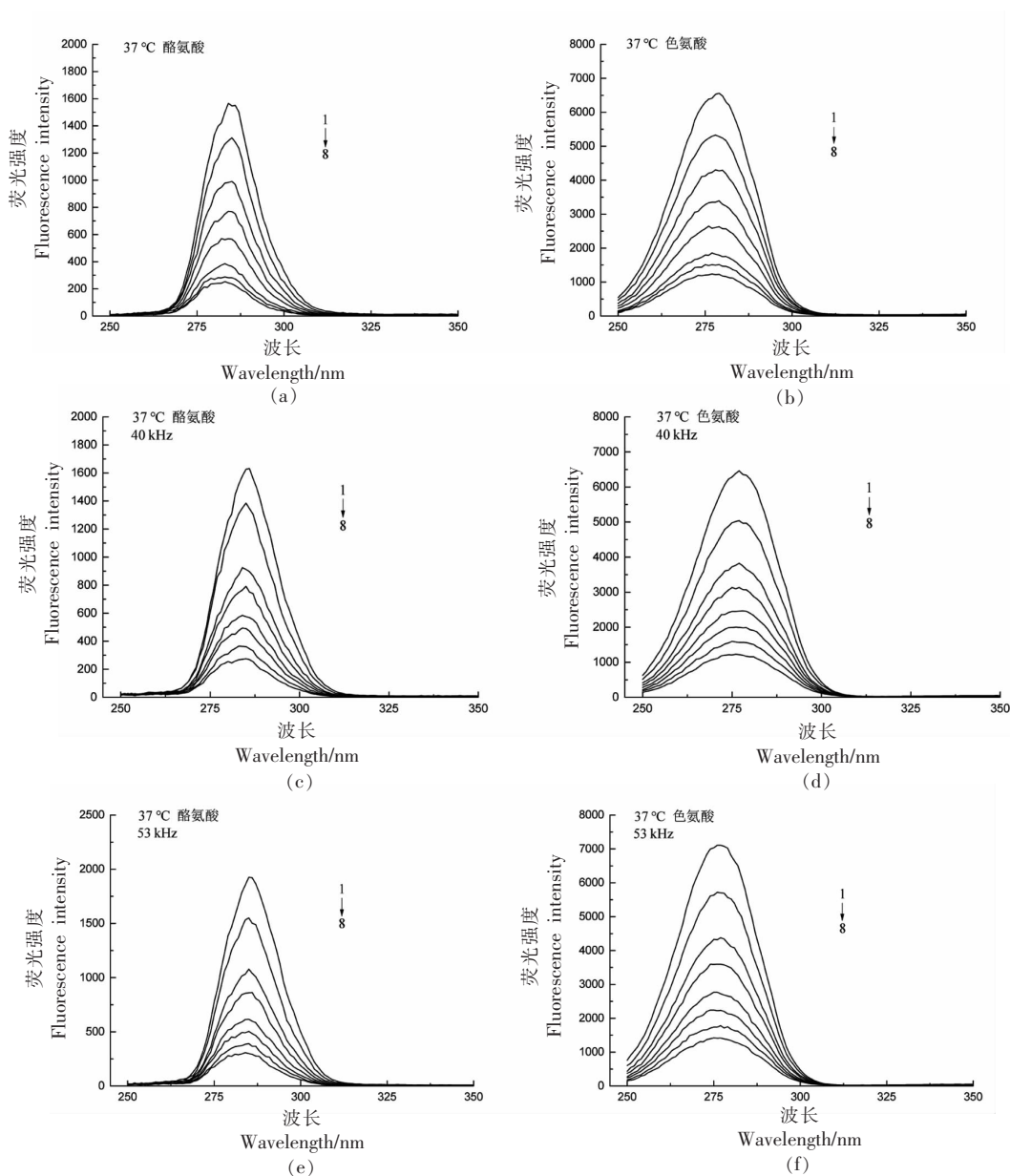
53 kHz时,Tyr与Trp峰值均显著降低($P<0.05$);37℃、40 kHz时,峰值无明显变化($P>0.05$),而53 kHz时,Tyr与Trp峰值均升高,说明猝灭效果有所下降。在25℃、53 kHz时,CGA对BSA的同步荧光强度影响最大。



注:BSA浓度为 1.2×10^{-6} mol/L;CGA浓度1→8依次为(0,0.6,1.2,1.8,2.4,3.0,3.6,4.2) $\times 10^{-6}$ mol/L。

图2 25℃时超声频率对CGA与BSA作用的同步荧光光谱的影响

Fig.2 Effect of ultrasonic frequency on synchronous fluorescence spectra of CGA and BSA at 25℃



注:BSA 浓度为 1.2×10^{-6} mol/L;CGA 浓度 1→8 依次为 $(0, 0.6, 1.2, 1.8, 2.4, 3.0, 3.6, 4.2) \times 10^{-6}$ mol/L。

图 3 37 °C 时超声频率对 CGA 与 BSA 作用的同步荧光光谱的影响

Fig.3 Effect of ultrasonic frequency on synchronous fluorescence spectra of CGA and BSA at 37 °C

2.3 荧光猝灭机理

本文中荧光猝灭机理由 Stern-Volmer 方程 (1) 和 Acharya 方程 (2) 来进行描述^[19]。

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

$$\lg\left(\frac{F_0}{F} - 1\right) = \lg K_a + n \lg [Q] \quad (2)$$

式中: F_0 ——未加入 CGA 时 BSA 的荧光峰值; F ——加入 CGA 后 BSA 的荧光峰值; $[Q]$ ——

CGA 的浓度, mol/L; τ_0 ——荧光分子平均寿命, s, BSA 的 τ_0 约为 10^{-8} s; K_q ——生物分子的猝灭速率常数, L/(mol·s); K_{sv} ——Stern-Volmer 猝灭常数, L/mol; K_a ——Acharya 结合常数, L/mol。

由表 1 可知, CGA 与 BSA 作用的猝灭速率常数 K_q 大于 10^{12} L/(mol·s), 远大于最大动态猝灭的 K_q 值, 说明 CGA 与 BSA 形成了复合物且为静态猝灭^[20-21], 许多以往的研究也证明了如茶多酚等多酚类物质与血清白蛋白发生静态猝灭作用^[22],

因此结果可靠;温度一定时,随超声频率的升高,CGA 对于 BSA 的猝灭常数 K_{sv} 增大;25 °C 时,经超声处理后的结合常数 K_a 明显升高($P<0.05$),说明超声处理促进 CGA 与 BSA 的结合。37 °C、40 kHz

时,结合常数 K_a 相较未超声处理有所增大,但 53 kHz 时却又降低,说明超声处理超过一定频率,反而会对 CGA 与 BSA 的结合产生抑制作用。

表 1 CGA 与 BSA 相互作用的荧光猝灭常数

Table 1 Fluorescence quenching constants of BSA by CGA

f/kHz	T/K	$K_{sv}/\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$	$K_q/\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$	R^2	$K_a/\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$	R^2	n
-	298	6.98×10^4	6.98×10^{12}	0.9971	4.88×10^5	0.9979	1.1891
	310	7.44×10^4	7.44×10^{12}	0.9935	3.03×10^6	0.9971	1.3584
40	298	7.25×10^4	7.25×10^{12}	0.9977	1.29×10^6	0.9933	1.2767
	310	7.63×10^4	7.63×10^{12}	0.9919	3.24×10^6	0.9984	1.3637
53	298	8.69×10^4	8.69×10^{12}	0.9915	2.29×10^6	0.9917	1.3180
	310	8.65×10^4	8.65×10^{12}	0.9922	1.60×10^6	0.9972	1.2844

2.4 热力学性质

蛋白质与小分子间的主要作用力类型为:范德华力、氢键、静电相互作用以及疏水相互作用等^[23]。根据 Van's Hoff 方程(3)和热力学方程(4)分别计算反应的焓变 ΔH 、吉布斯自由能 ΔG 和熵变 ΔS ,并比较在频率 40,53 kHz 处理后数值的变化情况。

$$\ln\left(\frac{K_2}{K_1}\right) = \frac{\Delta H\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)}{R} \quad (3)$$

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

式中: K_1 、 K_2 为 T_1 、 T_2 时的结合常数; ΔG ——吉布斯自由能, kJ/mol; ΔH ——焓变, kJ/mol; ΔS ——熵变, J/(mol·K)。当 ΔS 和 ΔH 均大于 0

时,分子间作用力为疏水相互作用;当 $\Delta H \approx 0$, $\Delta S > 0$ 时,为静电相互作用;当 ΔS 和 ΔH 均小于 0 时则为氢键和范德华力^[24-25]。

由表 2 可知,25 °C 时,反应的 $\Delta H < 0$, $\Delta G < 0$, $\Delta S < 0$,说明 CGA 与 BSA 的作用过程是一个熵减少,分子结合后自由能升高的自发放热反应,结合前人的研究推断此时分子间作用力为氢键。随超声频率的升高, ΔH 、 ΔG 和 ΔS 均减小,由此可知随超声频率的升高,其自发反应越发强烈,放出的热能也更高。37 °C 时,反应的 $\Delta H > 0$, $\Delta G < 0$, $\Delta S > 0$,说明该过程是一个熵增加的自发吸热反应,同时自由能降低,作用力为疏水相互作用。超声频率变化,反应所吸收的热量也随之改变。

表 2 CGA 与 BSA 相互作用的热力学常数

Table 2 Thermodynamic constants of the interactions between CGA and BSA

f/kHz	T/K	$\Delta G/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta H/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta S/\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$
-	298	-32.45	116.9	501.1
	310	-38.46		501.1
40	298	-34.86	58.94	314.8
	310	-38.64		314.8
53	298	-36.28	-22.95	-44.74
	310	-36.82		-44.74

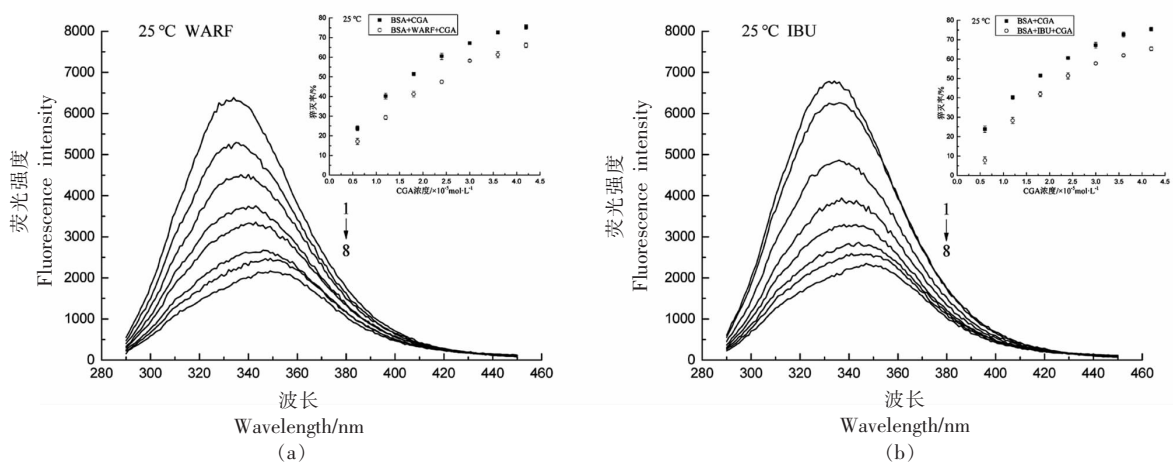
2.5 结合位点的研究

WARF 和 IBU 能与 BSA 的子域 II A(Sudlow's site I)和子域 III A(Sudlow's site II)特异结合^[26]。通过比较猝灭率推断 CGA 与 BSA 的结合位点。

由图 4 内插图可知,标记物的加入导致猝灭率降低,因此判断在未超声处理时 CGA 与 BSA 相互作用的结合位点在子域 II A 和子域 III A 之间。由图 5 内插图可知,40 kHz 时,加入标记物后,

猝灭率在低 CGA 浓度下无明显变化, 而随 CGA 浓度升高猝灭率又明显降低, 说明超声可改变

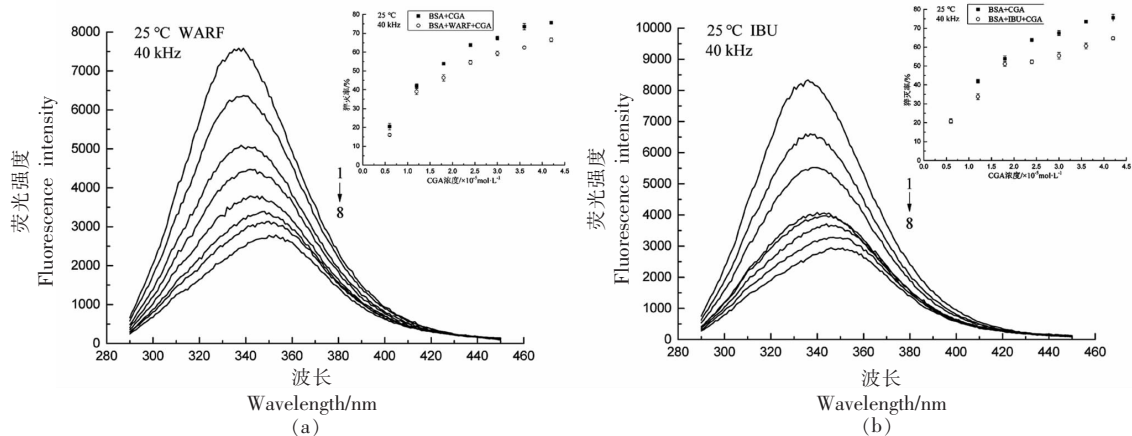
CGA 在低浓度下的结合位点, 而对高浓度 CGA 与 BSA 的结合位点无影响。



注: WARF 浓度 6.0×10^{-6} mol/L; IBU 浓度 6.0×10^{-6} mol/L; BSA 浓度 1.2×10^{-6} mol/L; CGA 浓度 1→8 依次为 (0, 0.6, 1.2, 1.8, 2.4, 3.0, 3.6, 4.2) $\times 10^{-6}$ mol/L。

图 4 WARF 与 IBU 对于 CGA 与 BSA 作用的荧光光谱的影响

Fig.4 Effects of WARF and IBU on fluorescence spectra of CGA and BSA



注: WARF 浓度 6.0×10^{-6} mol/L; IBU 浓度 6.0×10^{-6} mol/L; BSA 浓度 1.2×10^{-6} mol/L; CGA 浓度 1→8 依次为 (0, 0.6, 1.2, 1.8, 2.4, 3.0, 3.6, 4.2) $\times 10^{-6}$ mol/L。

图 5 40 kHz 超声下 WARF 与 IBU 对于 CGA 与 BSA 作用的荧光光谱的影响

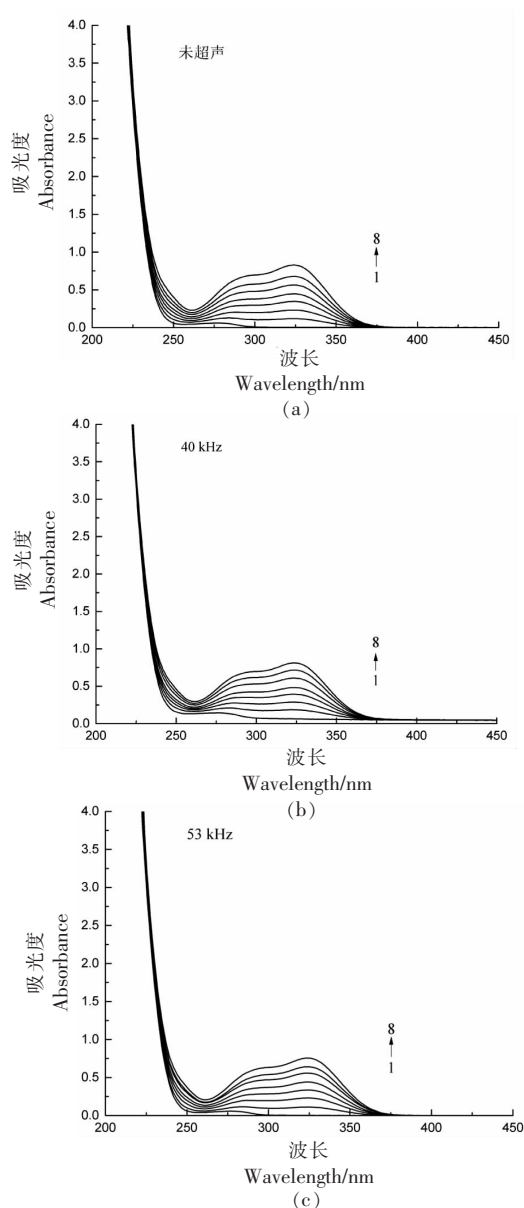
Fig.5 Effects of WARF and IBU on fluorescence spectra of CGA and BSA under 40 kHz ultrasonic treatment

2.6 超声处理对 CGA 与 BSA 紫外光谱的影响

紫外-可见吸收光谱法广泛用于探索蛋白质的结构变化和蛋白质配体复合物的形成, 是通过分析蛋白质 Trp 和 Tyr 残基周围的变化来研究蛋白质与配体相互作用的有效工具^[26]。CGA 与 BSA 的反应产物对于紫外光的吸收具有专一性, 即一定结构的分子只可以吸收一定的能量, 这样就可以通过紫外光谱来研究其产物的结构特点及

其特性。

由图 6 可知, 25 °C 时, 紫外光谱峰形无变化, 随 CGA 浓度的升高, 吸光度值增大。在静态猝灭中, 猝灭剂和蛋白质之间形成复合物。而在动态猝灭中, 猝灭剂与蛋白质发生碰撞扩散。动态猝灭只影响荧光分子的激发态, 而不影响荧光物质的紫外吸收光谱的变化^[27]。结果再次证实了 CGA 与 BSA 的相互作用是通过静态猝灭机制实现的。未



注:BSA 浓度为 1.2×10^{-6} mol/L;CGA 浓度 1→8 依次为(0,0.6, 1.2, 1.8, 2.4, 3.6, 4.2) $\times 10^{-6}$ mol/L。

图 6 25 °C 时超声频率对 CGA 与 BSA 作用的紫外-可见吸收光谱的影响

Fig.6 Effect of ultrasonic frequency on UV-vis absorption spectra of CGA and BSA at 25 °C

超声的吸光度峰值比超声后的大,紫外吸收光谱发生 15 nm 的蓝移,说明超声处理后 CGA 与 BSA 反应的产物发生部分解离,生成了新的物质;同时超声处理导致 BSA 的结构骨架变得舒展,二级构象发生改变,微环境疏水性减小。同时,也有研究表明超声处理同样会迫使 β -乳球蛋白的二、三级

结构发生改变^[28]。

3 结论

CGA 可与 BSA 发生结合作用且自发进行,猝灭类型为静态猝灭。CGA 与 BSA 作用的结合位点在亚结构域 II A 和亚结构域 III A 之间,且 CGA 在浓度低时与 BSA 的结合位点受超声处理影响。25 °C 时,CGA 与 BSA 的反应是一个熵减少的自发放热反应,作用力为氢键和范德华力;37 °C 时是一个熵增加的自发吸热反应,作用力为疏水相互作用,因此温度可能改变 CGA 与 BSA 结合的作用力。超声处理可使 CGA-BSA 复合物的构象发生一定改变,并且对 CGA 与 BSA 的结合起增强作用。超声处理不会影响 CGA 与 BSA 结合的作用力类型,只影响反应的强度,但可能对 CGA 在 BSA 上的结合位点造成一定影响。经超声处理后,CGA-BSA 复合物发生部分分解,BSA 的二级构象发生变化,使 BSA 的氨基酸残基的微环境发生改变,即极性增强,疏水性变小。研究结果表明 CGA 与 BSA 的相互作用受超声处理的影响,且不同超声频率影响不同。在生产加工中选择合适的处理条件及处理方式可以达到一定的目的。本研究结果将为超声处理对蛋白质与配体结合的影响提供有益的参考。

参 考 文 献

- [1] KARAR M G E, MATEI M F, JAISWAL R, et al. Neuraminidase inhibition of Dietary chlorogenic acids and derivatives -potential antivirals from dietary sources[J]. Food & Function, 2016, 7(4): 2052-2059.
- [2] 赵惠茹, 路荣荣, 靖会, 等. 金银花中绿原酸超声提取工艺的优化[J]. 化工科技, 2018, 26(6): 22-26.
ZHAO H R, LU R R, JING H, et al. Optimization of extraction technology of chlorogenic acid from Lonicera japonica by ultrasonic method[J]. Science & Technology in Chemical Industry, 2018, 26(6): 22-26.
- [3] 王晓梅, 奚宇, 范新光, 等. 绿原酸的生物利用率和抗氧化活性研究进展[J]. 中国食品学报, 2019, 19(1): 271-279.

- WANG X M, XI Y, FAN X G, et al. Research progress on bioavailability and antioxidant activity of chlorogenic acid[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(1): 271–279.
- [4] JIAO W, SHU C, LI X X, et al. Preparation of a chitosan–chlorogenic acid conjugate and its application as edible coating in postharvest preservation of peach fruit[J]. Postharvest Biology and Technology, 2019, 154(4): 129–136.
- [5] SUN Z L, ZHANG X X, WU H H, et al. Antibacterial activity and action mode of chlorogenic acid against Salmonella Enteritidis, a foodborne pathogen in chilled fresh chicken[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2020, 36(2): 24.
- [6] PAWAR S K, NAIK R S, SEETHARAMAPPA J. Exploring the binding of two potent anticancer drugs bosutinib and imatinib mesylate with bovine serum albumin: spectroscopic and molecular dynamic simulation studies[J]. Analytical & Bioanalytical Chemistry, 2017, 409(27): 6325–6335.
- [7] TOMASZ J, RODRIGUEAS L R, ZANETA C. Study of metal–lipopeptide complexes and their self-assembly behavior, micelle formation, interaction with bovine serum albumin and biological properties[J]. Journal of Molecular Liquids, 2018, 268: 743–753.
- [8] OSBORN B L, OLSEN H S, NARDELLI B, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of a human serum albumin–interferon- α fusion protein in cynomolgus monkeys[J]. Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics, 2002, 303(2): 540–548.
- [9] RABBANI G, AHN S N. Structure, enzymatic activities, glycation and therapeutic potential of human serum albumin: A natural cargo[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 123: 979–990.
- [10] YAO C Y, DING Y X, LI P F, et al. Effects of chlorogenic acid on the binding process of cadmium with bovine serum albumin: A multi-spectroscopic and docking study[J]. Journal of Molecular Structure, 2019, 1204(15): 127531.
- [11] O’SULLIVAN J, MURRAY B, FLYNN C, et al. The effect of ultrasound treatment on the structural, physical and emulsifying properties of animal and vegetable proteins[J]. Food Hydrocolloids, 2016, 53: 141–154.
- [12] MASUZAWA N, OHDAIRA E, IDE M. Effects of ultrasonic irradiation on phenolic compounds in wine[J]. Japanese Journal of Applied Physics, 2000, 39(5): 2978–2979.
- [13] STOJADINOVIC M, RADOSAVLJEVIC J, OGNJENOVIC J, et al. Binding affinity between dietary polyphenols and β -lactoglobulin negatively correlates with the protein susceptibility to digestion and total antioxidant activity of complexes formed[J]. Food Chemistry, 2013, 136(3/4): 1263–1271.
- [14] ZHANG Y Z, ZHOU B, ZHANG X P, et al. Interaction of malachite green with bovine serum albumin: Determination of the binding mechanism and binding site by spectroscopic methods[J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 163(2/3): 1345–1352.
- [15] VIOLETTA M, TIMEA B, GABRIELLA B, et al. Interactions of casticin, ipriflavone, and resveratrol with serum albumin and their inhibitory effects on CYP2C9 and CYP3A4 enzymes[J]. Biomedecine & Pharmacotherapie, 2018, 107: 777–784.
- [16] WU W H, KONG X Z, ZHANG C M, et al. Improving the stability of wheat gliadin nanoparticle–effect of gum arabic addition[J]. Food Hydrocolloids, 2018, 80(7): 78–87.
- [17] 黄朝波, 徐晗, 杨明冠, 等. 光谱法和分子对接研究红斑红曲胺与牛血清白蛋白相互作用[J]. 光谱学与光谱分析, 2019, 39(10): 3102–3108.
- HUANG C B, XU H, YANG M G, et al. The interaction between rubropunctamine and bovine serum albumin using spectrometry and molecular docking[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2019, 39(10): 3102–3108.
- [18] SAHA S, CHOWDHURY J. Binding interaction of juglone with lysozyme: Spectroscopic studies aided by in silico calculations[J]. Journal of Photochemistry & Photobiology B Biology, 2019, 193: 89–99.
- [19] TANG B, HUANG Y M, MA X L, et al. Multi-spectroscopic and docking studies on the binding of chlorogenic acid isomers to human serum albumin: Effects of esteryl position on affinity[J]. Food Chemistry, 2016, 212: 434–442.
- [20] KOHLMANN T, NAUMANN R, KERZIG C, et al. Combined static and dynamic quenching in micellar systems–closed–form integrated rate laws verified

- with a versatile probe[J]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2017, 19(13): 8735–8741.
- [21] 赵刚, 顾佳丽, 励建荣. 胭脂红与牛血清白蛋白相互作用的光谱学研究[J]. *中国食品学报*, 2017, 17(5): 270–275.
- ZHAO G, GU J L, LI J R. Spectroscopic analysis on the interaction of ponceau 4R and bovine serum albumin[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2017, 17(5): 270–275.
- [22] BOSE A. Interaction of tea polyphenols with serum albumins: A fluorescence spectroscopic analysis [J]. *Journal of Luminescence*, 2016, 169: 220–226.
- [23] RAHAYU P P, ANDRIANI R D, MALIGAN J M. Molecular docking studies and physicochemical properties on the interaction of xanthone with whey protein (β -lactoglobulin and α -lactalbumin)[J]. *IOP Conference Series Earth and Environmental Science*, 2020, 443(1): 012011.
- [24] 王晨, 谢岩黎, 范亭亭. 花青素与小麦蛋白相互作用及对蛋白质结构的影响[J]. *食品科学*, 2019, 40(20): 60–66.
- WANG C, XIE Y L, FAN T T. Interactions of Cyanidin-3-O-Glucoside with gliadin and glutenin and their effects on protein structure[J]. *Food Science*, 2019, 40(20): 60–66.
- [25] ZHANG H M, WU P R, WANG Y Q, et al. Affinity of miriplatin to human serum albumin and its effect on protein structure and stability[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 92: 593–599.
- [26] BENVIDI A, REZAEINASAB M, GHARAGHANI S, et al. Experimental and theoretical investigation of interaction between bovine serum albumin and the mixture of caffeic acid and salicylic acid as the antioxidants[J]. *Electrochimica Acta*, 2017, 255: 428–441.
- [27] TANG L, LI S, BI H N, et al. Interaction of cyanidin-3-O-glucoside with three proteins[J]. *Food Chemistry*, 2016, 196: 550–559.
- [28] 李雪, 涂宗财, 齐午城, 等. 超声波处理对 β -乳球蛋白结构和抗原性的影响[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(18): 106–110.
- LI X, TU Z C, QI W C, et al. Effect of ultrasound treatment on structure and antigenicity of β -lactoglobulin[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2016, 37(18): 106–110.

Effect of Ultrasonic Treatment on the Binding of Chlorogenic Acid to Bovine Serum Albumine

Fan Jinbo, Ma Ao, Min Shuang, Xing Li, Lü Changxin, Li Jianrong*

(College of Food Science and Technology, Bohai University; Food Safety Key Lab of Liaoning Province; National & Local Joint Engineering Research Center of Storage, Processing and Safety Control Technology for Fresh Agricultural and Aquatic Products, Jinzhou 121013, Liaoning)

Abstract The paper uses fluorescence spectroscopy and ultraviolet-visible absorption spectroscopy to study the effect of ultrasonic treatment (40 kHz / 30 min, 50 kHz / 30 min) on the binding of chlorogenic acid (CGA) and bovine serum albumin (BSA). Analyze the fluorescence quenching effect of CGA on BSA by fluorescence emission spectroscopy; analyze the microenvironmental changes of BSA tyrosine (Tyr) and tryptophan (Trp) residues after CGA binding by synchronous fluorescence spectroscopy to determine the effect of CGA on the conformation of BSA; use mathematical equations such as Stern-Volmer equation and Acharya equation to calculate its quenching constant, binding constant, and number of binding sites; then use warfarin (WARF) and ibuprofen (ibuprofen, IBU) two protein markers to determine the binding site; and use ultraviolet spectroscopy to measure the changes in BSA conformation to compare the effects of different ultrasonic frequencies. The results showed that CGA had the most significant fluorescence quenching effect on BSA at the ultrasonic frequency of 53 kHz, and the conformation of CGA-BSA complex could be changed by ultrasonic treatment to some extent, and the combination of CGA and BSA could be enhanced to some extent, but the reaction force type would not be changed. The results of this study will provide a useful reference for the effect of sonication on the binding of protein and ligand.

Keywords bovine serum albumin (BSA); chlorogenic acid (CGA); ultrasonic treatment; fluorescence quenching method; UV-vis absorption spectroscopy (UV-vis)