

## 荧光光谱法结合分子对接研究多酚和苋菜红与 $\beta$ -乳球蛋白结合的竞争作用

范金波<sup>1</sup>, 麻 奥<sup>1</sup>, 周素珍<sup>1</sup>, 王长霞<sup>2</sup>, 吕长鑫<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>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

<sup>2</sup>锦州益多乐乳业有限公司 辽宁锦州 121018)

**摘要** 功能性乳制品中富含包括多酚类物质等对人体有益的生物活性成分,然而,为改善食品外观,添加合成偶氮类色素苋菜红(Ama),在一定程度上增加了食品的健康风险。通过荧光光谱法结合分子对接研究 5 种多酚类物质和 Ama 与 $\beta$ -乳球蛋白( $\beta$ -Lg)结合的竞争作用。结果表明:姜黄素(Cur)、白藜芦醇(Res)、槲皮素(Que)、咖啡酸- $\beta$ -苯乙醇酯(CAPE)、绿原酸(CGA)和 Ama 均可与 $\beta$ -Lg 形成复合物,几种配体与 $\beta$ -Lg 的结合常数均在 $10^5\sim 10^7$  L/mol 数量级,结合能力较强。其中,Ama 和 CGA 通过氢键和范德华力与 $\beta$ -Lg 结合,Cur、Res、Que、CAPE 则通过疏水相互作用结合 $\beta$ -Lg。酸性条件下 Ama 和 5 种多酚与 $\beta$ -Lg 结合于不同位点,均无明显竞争结合作用。中性条件下 Ama 与 Cur 竞争结合于 $\beta$ -Lg 的结合位点;而多酚先与 $\beta$ -Lg 结合时,Res 影响 Ama 与 $\beta$ -Lg 位点的结合,即配体添加顺序影响竞争作用。此时,Cur 与 Ama 均结合位于 $\beta$ -Lg 疏水空腔入口处的位点,共同竞争 Asn90,且竞争作用较 Res 更强。通过对小分子间与乳蛋白结合的竞争作用的科学探讨,为利用加工手段控制某些食品添加剂在人体吸收方面的应用提供理论基础。

**关键词**  $\beta$ -乳球蛋白; 苋菜红; 多酚; 荧光光谱法; 分子对接

**文章编号** 1009-7848(2023)02-0014-13 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.02.002

功能性乳制品作为一种有利于养成健康饮食习惯的商品,在预防慢性病方面受到日益关注。其不仅含有植物多酚、维生素等保持人体健康的附加成分,还富含乳蛋白、钙、活性肽等关键营养物。

$\beta$ -乳球蛋白( $\beta$ -Lactoglobulin,  $\beta$ -Lg)约占总乳蛋白的 7%~12%,与 $\alpha$ -乳白蛋白( $\alpha$ -Lactalbumin,  $\alpha$ -La)同属于乳清蛋白<sup>[1-2]</sup>。作为乳酪生产过程中回收的副产品,可广泛获得,且相对廉价<sup>[3]</sup>。 $\beta$ -Lg 的“花萼”空腔可以运载甘油三酯、维甲酸和视黄醇等疏水小分子<sup>[4-5]</sup>。 $\beta$ -Lg 外表面的疏水口袋、Trp19-Arg124 附近 $\beta$ -桶孔径和二聚体的单体-单体界面也被认为是结合亲水性和两亲性配体的潜在位点<sup>[6-7]</sup>。

二酮类多酚姜黄素(Curcumin, Cur)、芪类多酚白藜芦醇(Resveratrol, Res)、黄酮类多酚槲皮素(Quercetin, Que)、酯类多酚咖啡酸- $\beta$ -苯乙醇酯(Caffeic acid phenylethyl ester, CAPE)和苯丙

烷类多酚绿原酸(Chlorogenic acid, CGA)在内的多酚类化合物具有抗炎抗氧化、降压降脂以及阻止癌症细胞起始、生长和转移等众多药理作用,然而,氧、光、热不稳定的特点导致多酚在体内半衰期短,并且较差的水溶性使其生物利用度受限,因此常将其装入两亲性共聚物胶束的疏水核心来发挥有益功效<sup>[8-17]</sup>。

苋菜红(Amaranth, Ama)是一种合成偶氮类染料,广泛应用于红色或棕色食品中,包括软饮料、蛋糕混合物、冰淇淋、谷类食品、葡萄酒、沙拉酱和咖啡<sup>[18]</sup>。然而,Ama 与人体内的某些药物(如阿司匹林、苯甲酸)接触时,可引起敏感人群的过敏和哮喘反应<sup>[19]</sup>。此外,有充分的证据表明,食用合成偶氮染料,其含有的偶氮(N=N)官能团和芳香环结构可被还原裂解成芳香胺,具有致癌毒性<sup>[20]</sup>。

功能性乳制品广受青睐,而在多酚类有益物质被人体吸收的同时,为其外观色泽加分的着色剂也在一定程度上危害健康。借助控制载体蛋白-有害色素复合物的解离来抑制其人体吸收,成为蛋白小分子互作研究需攻克的重点。通过荧光光

收稿日期: 2022-02-08

基金项目: 辽宁省教育厅项目(LJ2020004)

第一作者: 范金波,男,博士,副教授

E-mail: jinbo\_fan@hotmail.com

谱法结合分子对接研究多酚和 Ama 与  $\beta$ -Lg 的竞争结合, 不仅可改善配体的溶解性和稳定性, 达到控制释放的作用, 还可以延申到发挥多酚类物质生物活性的同时, 降低有害添加剂对人体健康的影响研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

$\beta$ -Lg(纯度  $\geq 95\%$ ), 合肥博美生物科技有限公司; Ama、Cur、Res、Que、CAPE、CGA(纯度  $\geq 98\%$ ), 上海生工生物工程股份有限公司; 磷酸氢二钠、磷酸二氢钠(分析纯级), 天津市北辰方正试剂厂; 无水乙醇(分析纯级), 天津市天力化学试剂有限公司; 试验用水皆为超纯水。

### 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; XH-2000-I 旋涡混合器, 天津市泰斯特仪器有限公司; ML104 电子天平、FE20K 实验室 pH 计, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; Milli-Q HX7000 型超纯水机, 德国默克密理博有限公司。

### 1.3 方法

1.3.1 苋菜红、多酚与  $\beta$ -乳球蛋白的分子对接 以分子对接模拟预测多酚、Ama 与  $\beta$ -Lg 结合的相应位点。 $\beta$ -Lg 的 3D 结构采用 RCSB PDB 蛋白质数据库中的 5I05 并去除水分子; Ama(CID: 13506)、Cur(CID: 969516)、Res(CID: 445154)、Que(CID: 5280343)、CAPE(CID: 5281787)、CGA(CID: 1794427) 的 3D 结构来自 PubChem 数据库。Autodock Vina v4.0 软件用于分子对接模拟。设置对接区域( $x=91, y=58, z=89$ )以覆盖整个  $\beta$ -Lg 单体的结合位点,  $\beta$ -Lg 刚性对接, 配体柔性对接, 其它参数均默认。选择对接分数中的最低能量构象, 利用 Pymol 结合 Discovery Studio 2017 v2.0 做图, Adobe Photoshop CS6 与 PowerPoint 2013 软件美化图像<sup>[21]</sup>。

1.3.2 溶液配制 参考但倩誉<sup>[22]</sup>的方法并稍作修改, 以二水合磷酸二氢钠、十二水合磷酸氢二钠配制成 10 mmol/L 的 PBS 磷酸缓冲溶液(pH 7.4), 4  $^{\circ}\text{C}$  冷藏条件下有效期一个月。并以此缓冲液配制 200  $\mu\text{mol/L}$  的  $\beta$ -Lg 溶液, 以及 1 mmol/L 的 Ama、Cur、Res、Que、CAPE、CGA 溶液(除 Ama 外均用

70%乙醇溶液预溶), 现配现用(如需暂存置于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱)。

### 1.3.3 苋菜红、多酚对于 $\beta$ -乳球蛋白的荧光猝灭

1.3.3.1 苋菜红和多酚与  $\beta$ -乳球蛋白相互作用的荧光测定 参考张婕<sup>[23]</sup>的方法并稍作修改, 将  $\beta$ -Lg 溶液以及一定量的 Ama、多酚溶液与离心管中的 PBS 缓冲溶液混合, 在旋涡混合器上充分震荡。每管溶液总体积为 3 mL,  $\beta$ -Lg 浓度均为 20  $\mu\text{mol/L}$ , Ama、多酚浓度分别为 0, 2, 6, 10, 14, 20, 30, 40  $\mu\text{mol/L}$ , 即配体蛋白比为 0, 0.1:1, 0.3:1, 0.5:1, 0.7:1, 1.0:1, 1.5:1, 2:1。上述样品每种配制两组, 分别于 25, 37  $^{\circ}\text{C}$  反应 30 min 后取出。

荧光扫描按如下条件进行: 每次取 300  $\mu\text{L}$  配制好的样品润洗标准石英比色皿 3 次, 取 2 mL 样品于比色皿中利用荧光分光光度计进行荧光扫描。固定激发波长为 295 nm, 发射波长 300 nm~500 nm, 激发、发射的狭缝宽度均为 2.5 nm, 扫描速度为 700 nm/min。

1.3.3.2 荧光内滤效应的消除 荧光内滤效应指由于荧光体的高浓度或存在其它吸光物, 荧光体和吸光物吸收激发、发射光而减弱荧光的现象<sup>[24]</sup>。因此, 有必要从荧光数据中消除这种影响。使用式(1)可消除荧光内滤效应, 其中  $F_c$  和  $F_m$  分别为校正荧光和测量荧光,  $A_1$  和  $A_2$  分别是 Ama 或多酚在激发和发射波长下的吸光度<sup>[24]</sup>。

$$F_c = F_m e^{(A_1 + A_2)/2} \quad (1)$$

1.3.3.3 猝灭常数计算 利用 Stern-Volmer(2) 方程对所得荧光数据进行计算, 以求得猝灭速率常数  $K_q$  和 Stern-Volmer 猝灭常数  $K_{sv}$ <sup>[25]</sup>。

$$F_0/F = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad (2)$$

式中,  $F_0$ ——猝灭剂加入前荧光体的荧光强度峰值;  $F$ ——猝灭剂加入后荧光体的荧光强度峰值;  $[Q]$ ——猝灭剂浓度, mol/L;  $\tau_0$ ——未加猝灭剂时荧光体的平均寿命,  $10^{-8}$  s;  $K_{sv}$ ——Stern-Volmer 猝灭常数;  $K_q$ ——生物分子猝灭速率常数。

1.3.3.4 结合常数与结合位点数计算 假设蛋白质上存在  $n$  个独立结合位点, 采用 Hill 方程(3)计算结合常数  $K_a$  和结合位点数  $n$ <sup>[25]</sup>。

$$\lg[(F_0 - F)/F] = \lg K_a + n \lg [Q] \quad (3)$$

式中,  $K_a$ ——表观结合常数;  $n$  为结合位点数。

1.3.3.5 热力学常数计算 分子间作用力包括氢

键、范德华力、静电引力、疏水作用力等<sup>[26]</sup>。由 Van's Hoff 方程(4)和热力学方程(5)可计算出焓变  $\Delta H$ 、吉布斯自由能  $\Delta G$  和熵变  $\Delta S$ <sup>[27]</sup>。

$$\ln(K_2/K_1) = \Delta H(1/T_1 - 1/T_2)/R \quad (4)$$

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

式中,  $R$ ——摩尔气体常数,  $8.314 \text{ J}/(\text{mol} \cdot \text{K})$ ;  $T$ ——试验温度,  $\text{K}$ ;  $K_1$ —— $T_1$  温度下对应的表观结合常数;  $K_2$ —— $T_2$  温度下对应的表观结合常数;  $\Delta G$ ——吉布斯自由能,  $\text{kJ}/\text{mol}$ ;  $\Delta H$ ——焓变,  $\text{kJ}/\text{mol}$ ;  $\Delta S$ ——熵变,  $\text{J}/(\text{mol} \cdot \text{K})$ 。

1.3.4 苋菜红和多酚与  $\beta$ -乳球蛋白的竞争结合试验 试验样品分为两组, 分别为  $\text{pH} 7.4$  组和  $\text{pH} 3.0$  组, 其中  $\text{pH} 3.0$  组所用 PBS 缓冲溶液用  $0.5 \text{ mol/L}$  盐酸调节  $\text{pH}$  值(下同), 后续操作一致<sup>[22]</sup>。

首先在离心管中加入 PBS 缓冲溶液, 每个离心管中溶液总体积为  $3 \text{ mL}$ , 再加入  $\beta$ -Lg 溶液并轻轻摇匀,  $\beta$ -Lg 浓度均为  $20 \mu\text{mol/L}$ , 最后依次加入 Ama 和多酚(多酚和 Ama), 前者浓度均为  $14 \mu\text{mol/L}$ , 后者浓度分别为  $0, 2, 6, 10, 14, 20, 30, 40 \mu\text{mol/L}$ , 每次加入配体后在旋涡混合器上充分混合后反应  $30 \text{ min}$ 。

荧光扫描条件同 1.3.3.1 节。

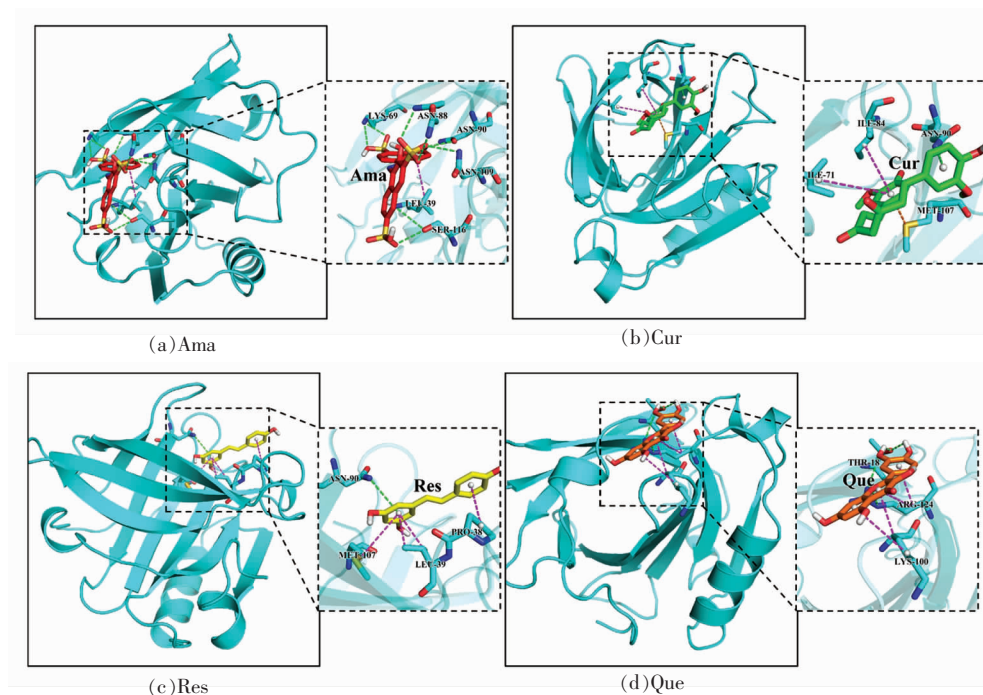
1.3.5 数据分析 试验均重复 3 次, 日立 FL So-

lution 2.1 软件用于数据采集, 结果表示为平均值  $\pm$  标准差, 利用 IBM SPSS Statistics 25.0 软件进行显著性差异分析, 差异水平  $P < 0.05$  为显著, 采用 Origin 9.0 软件绘制图形。

## 2 结果与分析

### 2.1 配体与 $\beta$ -乳球蛋白的分子对接

在分子对接模拟结果中, 绿色键代表氢键, 粉色键代表疏水相互作用。由图 1a 可知, Ama 结合于  $\beta$ -Lg 的疏水空腔的“入口”处, 主要通过氢键与 Lys69、Asn88、Asn90、Asn109 和 Ser116 结合。Cur(图 1b)与 Ama 的结合位点接近, 同样结合于  $\beta$ -Lg“桶口”处, 被 Ile71、Ile84、Asn90、Met07 4 个氨基酸残基包围, 主要通过疏水相互作用与 Ile71、Ile84 结合。Res(图 1c)的结合位点也在“ $\beta$ -桶口”附近, 并通过疏水相互作用与 Leu39、Pro38、Met107 3 个氨基酸残基结合。Que(图 1d)和 CAPE(图 1e)均通过疏水相互作用结合于  $\beta$ -Lg 的“桶底”, 且由于氨基酸残基偏向一侧, 可以判断此时二者结合于疏水空腔的外部。图 1f 显示了 CGA 的结合位点位于  $\beta$ -Lg 的外表面, 作用力主要是氢键。6 种配体与  $\beta$ -Lg 结合的吉布斯自由能分别为  $-40.32$  (Ama),  $-31.54$  (Cur),  $-32.15$  (Res),





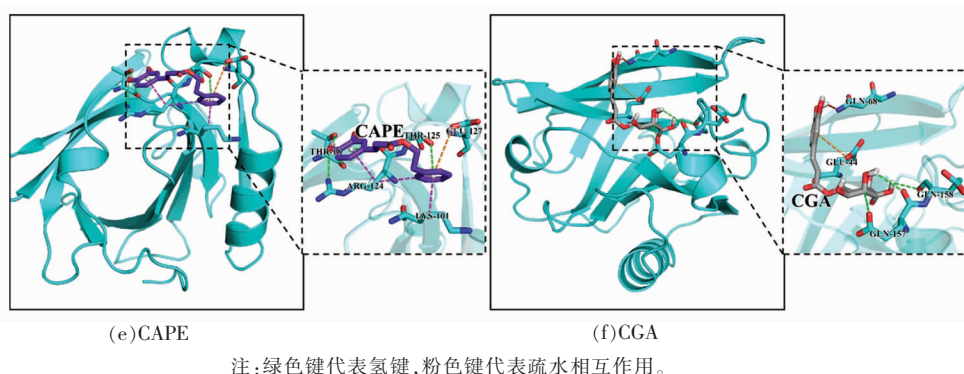


图 1 Ama 和 5 种多酚与  $\beta$ -Lg 的预测结合位点、氨基酸残基及作用力

Fig.1 Predicted binding sites, the binding sites amino acids and interaction forces of Ama with five polyphenols on  $\beta$ -Lg

-35.63 (Que), -37.44 (CAPE), -36.96 kJ/mol (CGA)。

分子对接的结果表明 Cur 和 Res 与  $\beta$ -Lg 结合的位点与 Ama 的结合位点接近 (Cur、Res、Ama 均与 Asn90 结合, Res、Ama 皆与 Leu39 结合), 若 Cur 或 Res 与 Ama 同时与  $\beta$ -Lg 相互作用时可能会产生竞争作用彼此影响与  $\beta$ -Lg 的结合, 而 Que、CAPE 和 CGA 因结合位置远离 Ama 的结合位点, 将不会对 Ama 结合于  $\beta$ -Lg 之上造成影响。

## 2.2 苋菜红、多酚对 $\beta$ -乳球蛋白荧光光谱的影响

分子对接结果从 5 种多酚类物质中筛选出了与 Ama 竞争结合位点的 Cur 与 Res, 为验证分子对接的结果并进一步选择与 Ama 竞争结合能力强的多酚, 进行  $\beta$ -Lg 与 Ama、多酚相互作用的荧光光谱检测。

蛋白质的内源荧光与 Trp、Tyr、Phe 残基的存在密不可分。与配体的结合会诱导蛋白质的荧光猝灭, 通过对荧光光谱的分析, 可以得到蛋白质与配体结合的有关信息, 以及与配体相互作用过程中氨基酸残基微环境的变化情况。 $\beta$ -Lg 含有两个 Trp 残基 Trp19 和 Trp61 以及 4 个 Tyr 残基 Tyr20、Tyr42、Tyr99 和 Tyr102<sup>[28]</sup>。激发波长为 295 nm 时, 荧光光谱主要由 Trp 贡献<sup>[29]</sup>。

由图 2 可知, 当激发波长为 295 nm 时,  $\beta$ -Lg 的最大荧光强度峰位置在 334 nm 附近, 且  $\beta$ -Lg 的固有荧光强度值随着配体浓度的增加有规律的降低, 而峰形无明显变化, 即几种配体均对  $\beta$ -Lg

的荧光产生了猝灭作用。其中 Res (图 2c)、CAPE (图 2e)、CGA (图 2f) 对  $\beta$ -Lg 的荧光猝灭能力相对其它几种配体明显更强。同时由图可以看出, 随着 Res (图 2c) 和 CGA (图 2f) 浓度增加,  $\beta$ -Lg 最大荧光峰发生明显红移 (334 nm  $\rightarrow$  356 nm 和 333 nm  $\rightarrow$  354 nm), CAPE (图 2e) 的加入也导致最大荧光峰位置的轻微红移 (334 nm  $\rightarrow$  346 nm), 此现象表明这几种配体存在时,  $\beta$ -Lg 芳香族氨基酸残基的微环境发生了变化, 在分子层面表现为亲水性增加, 疏水性降低, 与 Kanakis 等<sup>[30]</sup>、张婕<sup>[23]</sup>和郝明皓<sup>[31]</sup>的研究结果一致。Cur (图 2b) 与 Que (图 2d) 的添加, 造成了蛋白最大荧光峰位置一定程度上的蓝移 (335 nm  $\rightarrow$  331 nm 和 335 nm  $\rightarrow$  332 nm), 此时芳香族氨基酸残基的微环境变得更加疏水, 试验结果与 Kanakis 等<sup>[30]</sup>和李晓蕾等<sup>[11]</sup>一致。图 2a 还体现了一个独特的现象, 即在 420 nm 附近, 出现了一个随 Ama 浓度增加荧光强度升高的峰, 即 Ama 与  $\beta$ -Lg 的复合物产生了内源荧光。

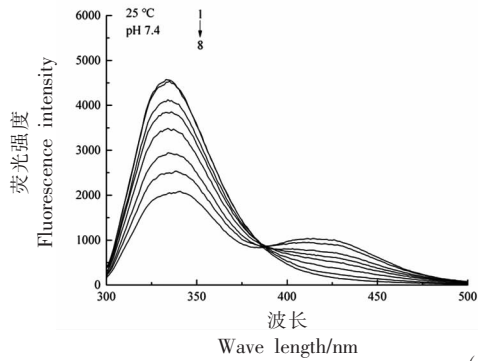
对比每种配体的左、右两图可以看出温度升高虽导致  $\beta$ -Lg 的内源荧光强度减弱, 但不会对配体猝灭  $\beta$ -Lg 内氨基酸残基荧光的能力造成明显影响, 这可能与温度升高程度较低有关。

## 2.3 配体对 $\beta$ -乳球蛋白的荧光猝灭机理与热力学性质

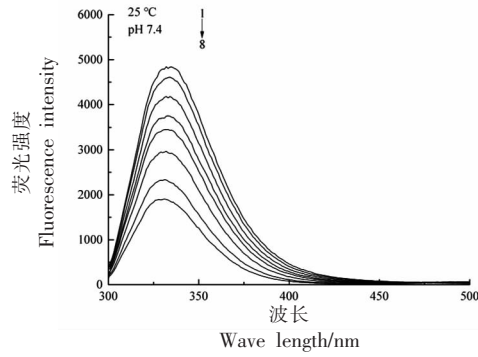
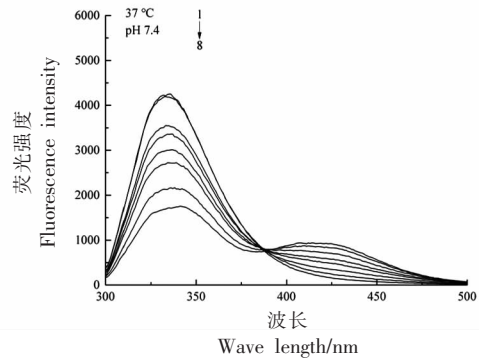
动态和静态猝灭作为配体猝灭蛋白质的两种模式<sup>[32]</sup>, 前者意味着高温导致分子碰撞剧烈和扩散加快, 表现为动态猝灭常数与温度成正比; 而静态猝灭形成的复合物受热分解, 因此静态猝灭常

数会随温度升高而减小<sup>[33]</sup>。Stern-Volmer 方程【式(2)】和 Hill 方程【式(3)】可阐明荧光猝灭机理<sup>[25]</sup>。同时,利用 Van's Hoff 方程【式(4)】和热力学方程【式(5)】可分析反应的热力学性质,判断相互作用

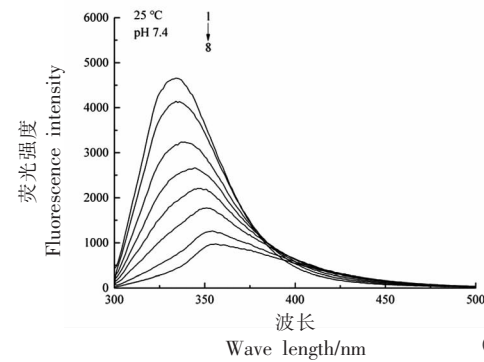
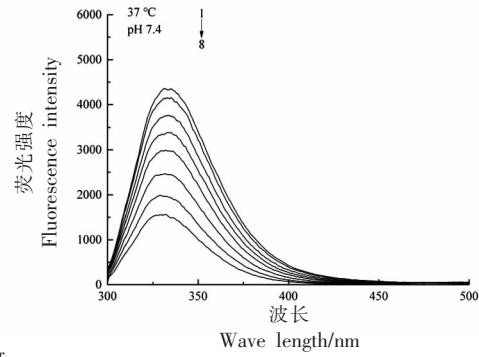
力。对于作用力类型的判断,一般认为,当反应放热, $\Delta S < 0$ 时,结合的主要驱动力是氢键和范德华力;而  $\Delta S > 0$ 时,静电相互作用是主要作用力;当  $\Delta H$  和  $\Delta S$  均大于 0 时,主要是疏水相互作用<sup>[34]</sup>。



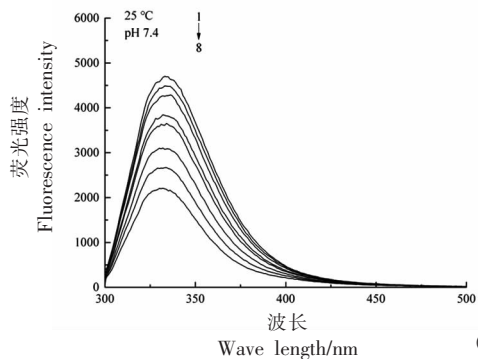
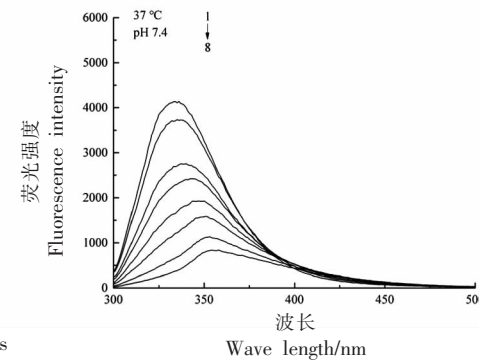
(a)Ama



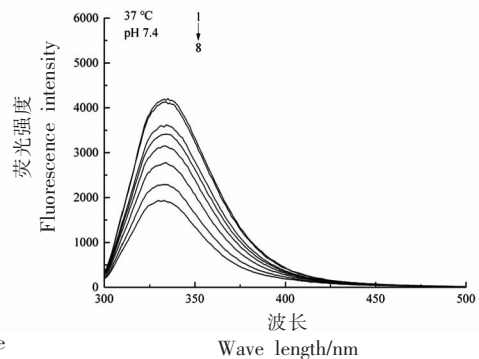
(b)Cur

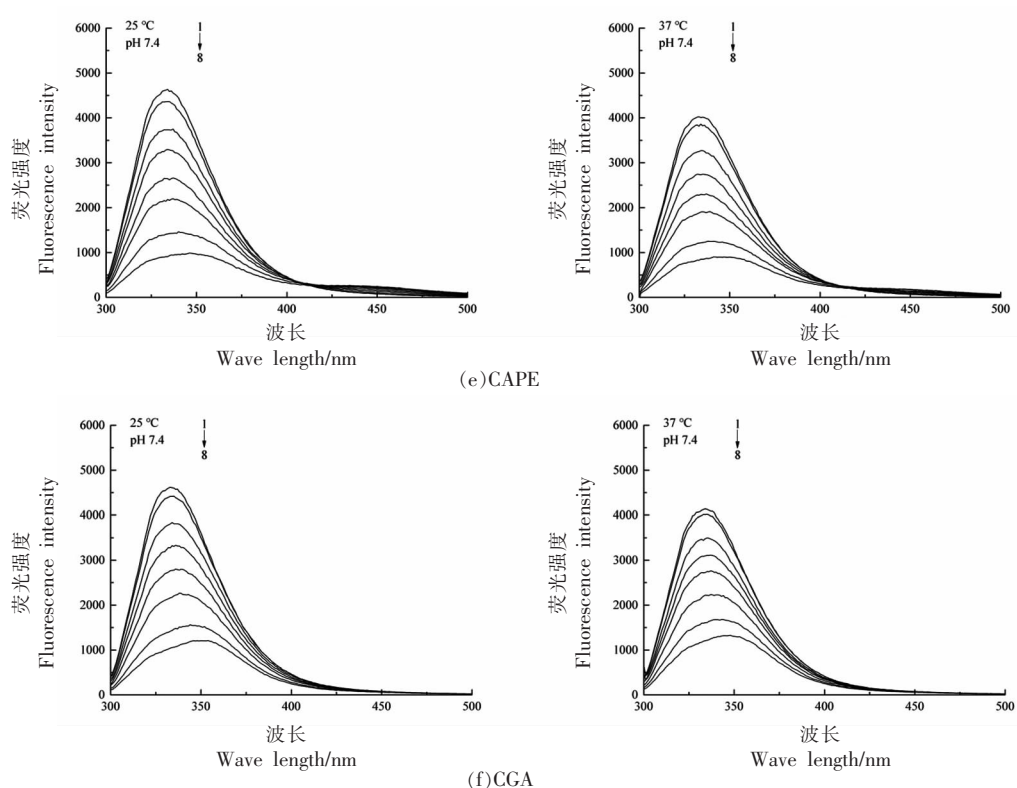


(c)Res



(d)Que





注:1~8 配体浓度依次为 0,2,6,10,14,20,30,40  $\mu\text{mol/L}$ 。

图 2 不同温度下 Ama 和 5 种多酚对  $\beta$ -Lg 的荧光猝灭

Fig.2 Fluorescence quenching of  $\beta$ -Lg by Ama and five kinds of polyphenols at different temperatures

表 1 与表 2 所示为方法中所述数学方程计算得到的配体与  $\beta$ -Lg 相互作用的一些重要常数。

由表 1 可知配体与  $\beta$ -Lg 结合的生物分子猝灭常数( $K_q$ )均大于最大扩散碰撞猝灭速率常数  $2 \times 10^{10} \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$ , 说明形成了蛋白质-配体复合物,即发生了静态猝灭<sup>[35]</sup>。研究表明当结合常数( $K_a$ )在  $(1 \sim 15) \times 10^4 \text{ L/mol}$  范围内时,配体以可逆的方式与蛋白质结合<sup>[36]</sup>,可以看出除 Que 在 25 °C 结合常数较低外,配体与  $\beta$ -Lg 均有较强的结合能力,且结合能力与荧光发射光谱中对  $\beta$ -Lg 的猝灭能力相对应。几种配体结合位点数接近于 1 说明与  $\beta$ -Lg 均有单个结合位点,结果符合前人的研究结论。

由表 2 可知配体与  $\beta$ -Lg 的结合均为自发进行( $\Delta G < 0$ )。其中 Ama 与 CGA 的  $\Delta H < 0$ ,说明二者与  $\beta$ -Lg 的结合反应放热,也与表 1 中的  $K_a$  随温度升高而减小相对应。反之  $\Delta H > 0$  的蛋白质-配体复合物的  $K_a$  值随温度升高而增大。由  $\Delta H$  与

$\Delta S$  推断蛋白质与配体结合主要驱动力可知,Ama 和 CGA 与  $\beta$ -Lg 作用类型为氢键与范德华力,Cur、Res、Que 和 CAPE 则通过疏水相互作用与  $\beta$ -Lg 结合,与分子对接中所表现的相互作用力基本相符。

#### 2.4 和苋菜红竞争结合 $\beta$ -乳球蛋白的多酚的确定

$\beta$ -Lg 的疏水空腔,也就是被称为“花萼”的  $\beta$ -桶由于特殊构造,对结合位点控制具有 pH 值响应性。“EF 环”类似于开关控制小分子进入疏水空腔内部,当  $\beta$ -Lg 处于中性 pH 值时,“EF 环”打开,小分子可进入疏水空腔并结合,而当外部环境为酸性时,Glu89 质子化使“EF 环”闭合挡住空腔入口,阻止小分子结合到疏水腔内,此时小分子只能结合于  $\beta$ -Lg 的外表面<sup>[37]</sup>。

由荧光猝灭率图 3 所示,可以看出在 pH 值为 7.4 时 Ama 与  $\beta$ -Lg 的结合显著影响了 Cur 的结合,具体体现在猝灭率降低。而在 pH 值为 3 时

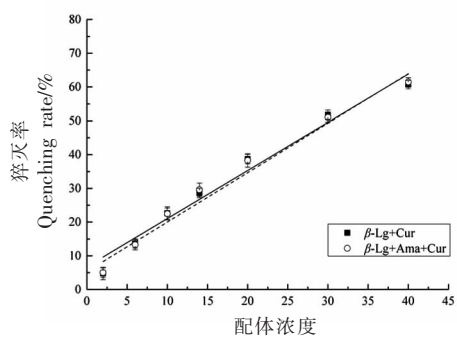
表1 配体与 $\beta$ -Lg相互作用的猝灭、结合常数Table 1 Quenching constants and binding constants of  $\beta$ -Lg interacting with ligands

配体	$T/K$	$K_{sv}/\times 10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$	$K_q/\times 10^{12} \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$	$R^a$	$K_d/\times 10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$	$R^b$	$n$
Ama	298	2.782	2.782	0.9980	1 201.0	0.9724	1.571
	310	3.289	3.289	0.9981	450.7	0.9396	1.461
Cur	298	3.590	3.590	0.9978	15.32	0.9972	1.143
	310	4.095	4.095	0.9966	38.67	0.9970	1.219
Res	298	8.985	8.985	0.9974	36.68	0.9996	1.136
	310	9.147	9.147	0.9956	50.66	0.9933	1.165
Que	298	2.631	2.631	0.9986	6.605	0.9764	1.094
	310	2.789	2.789	0.9991	113.0	0.9652	1.347
CAPE	298	7.757	7.757	0.9765	262.2	0.9912	1.347
	310	7.538	7.538	0.9833	774.8	0.9982	1.447
CGA	298	6.375	6.375	0.9901	342.9	0.9993	1.385
	310	4.849	4.849	0.9947	319.6	0.9958	1.400

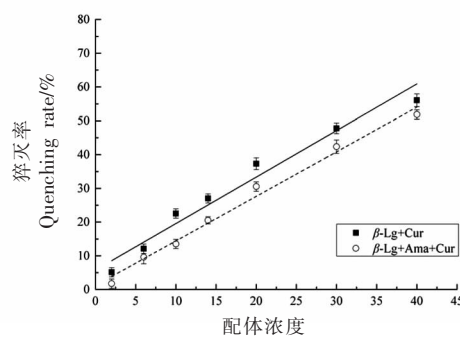
注:  $R^a$  为方程(2)拟合  $K_{sv}$  相关系数,  $R^b$  为方程(3)拟合  $K_b$  相关系数。

表2 配体与 $\beta$ -Lg相互作用的热力学常数Table 2 Thermodynamic constants of  $\beta$ -Lg interacting with ligands

配体	$T/K$	$\Delta G/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta H/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta S/\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$
Ama	298	-40.39	-62.71	-74.92
	310	-39.49		
Cur	298	-29.58	59.25	298.1
	310	-33.16		
Res	298	-31.74	20.66	175.9
	310	-33.85		
Que	298	-27.50	181.8	702.2
	310	-35.92		
CAPE	298	-36.62	69.35	355.6
	310	-40.88		
CGA	298	-37.28	-4.498	-110.0
	310	-38.60		



(a) Cur, pH 3.0



(b) Cur, pH 7.4

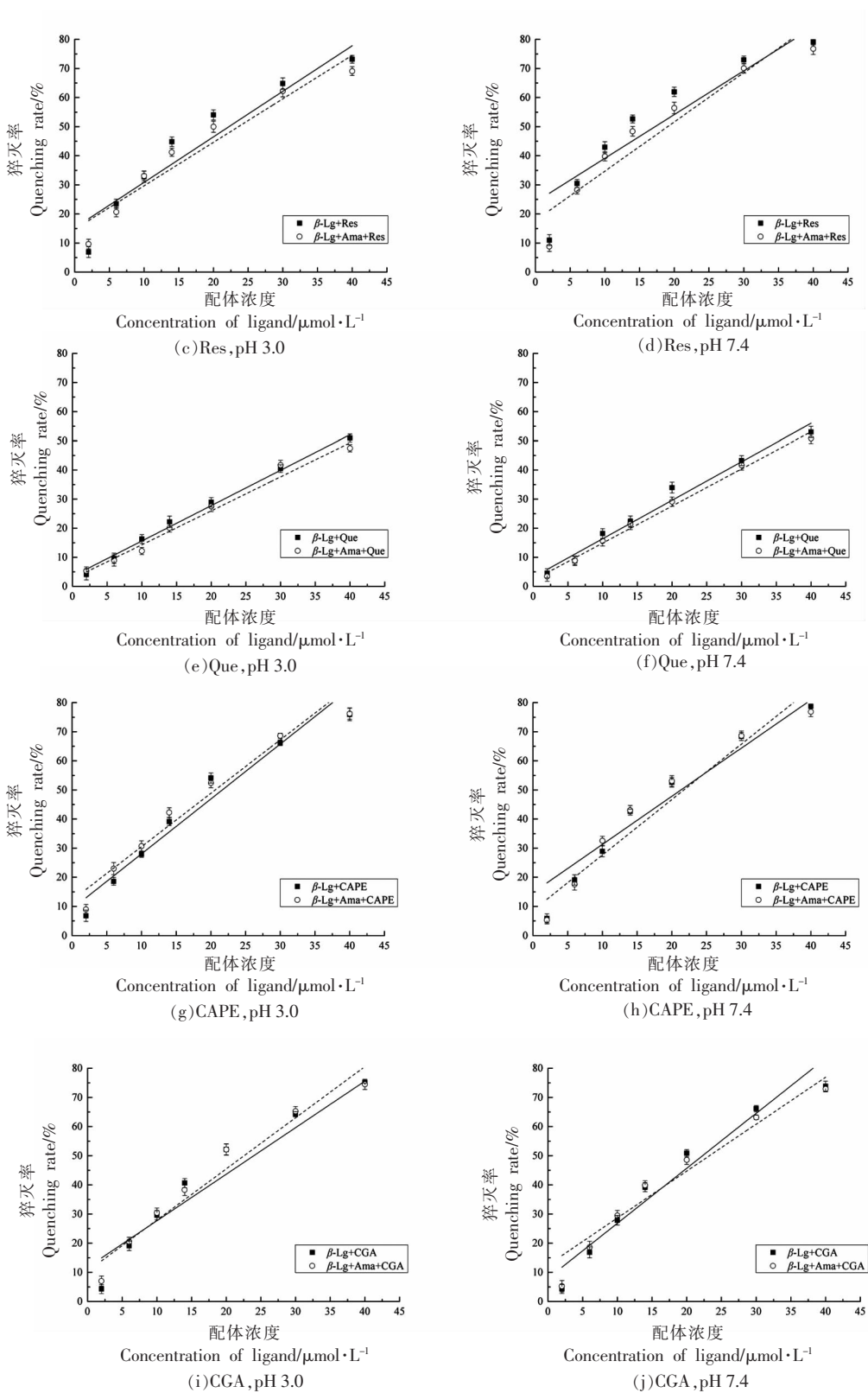


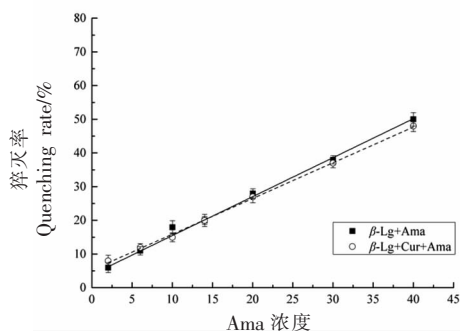
图 3 不同 pH 值下 Ama 对  $\beta$ -Lg-配体复合物的荧光猝灭率影响

Fig.3 Effect of Aminoacids on fluorescence quenching rate of  $\beta$ -Lg-ligand complex at different pH value

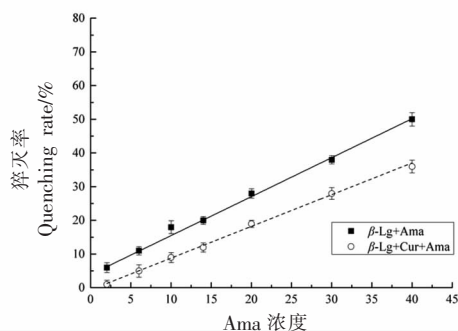


Ama 与  $\beta$ -Lg 的结合未对 Cur 造成影响。同时其它多酚类物质与 Ama 无竞争结合  $\beta$ -Lg 的体现或竞争作用较弱。说明在中性条件下, Cur 与 Ama 均结

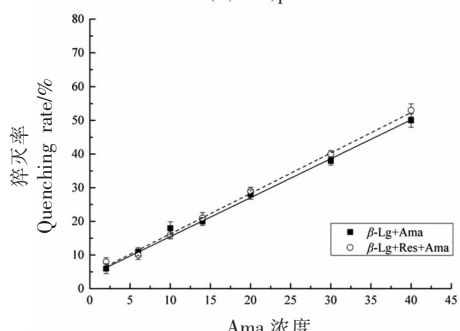
合到  $\beta$ -Lg 的相近位点,而在酸性条件下,“EF 环”关闭,此时 Cur 和 Ama 结合于  $\beta$ -Lg 外表面的不同位点,二者与  $\beta$ -Lg 的结合互不影响。



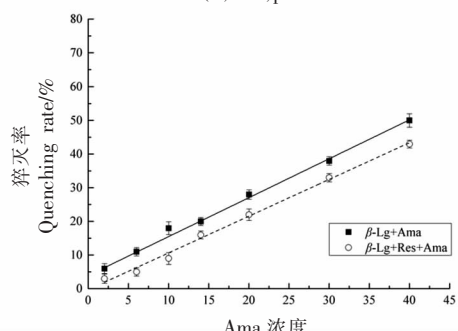
(a) Cur, pH 3.0



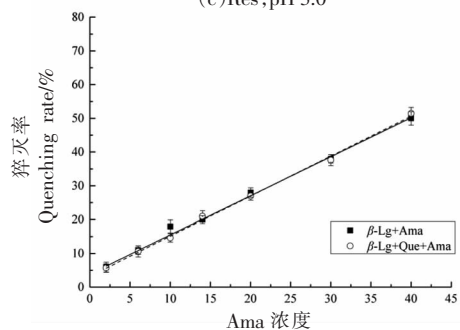
(b) Cur, pH 7.4



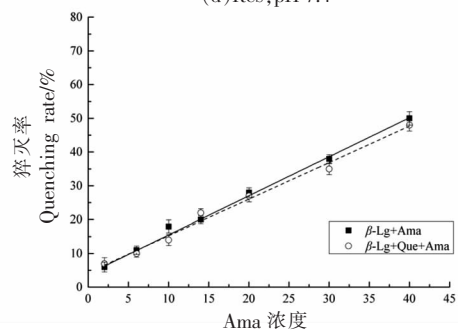
(c) Res, pH 3.0



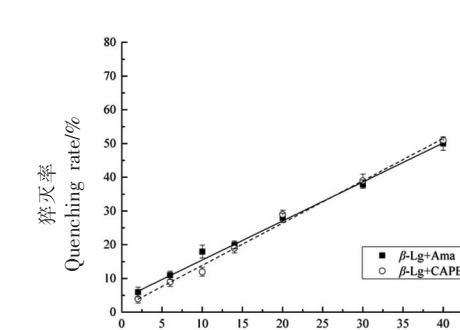
(d) Res, pH 7.4



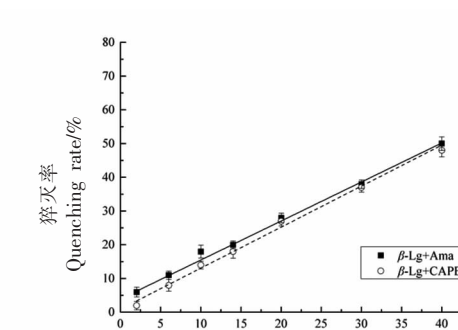
(e) Que, pH 3.0



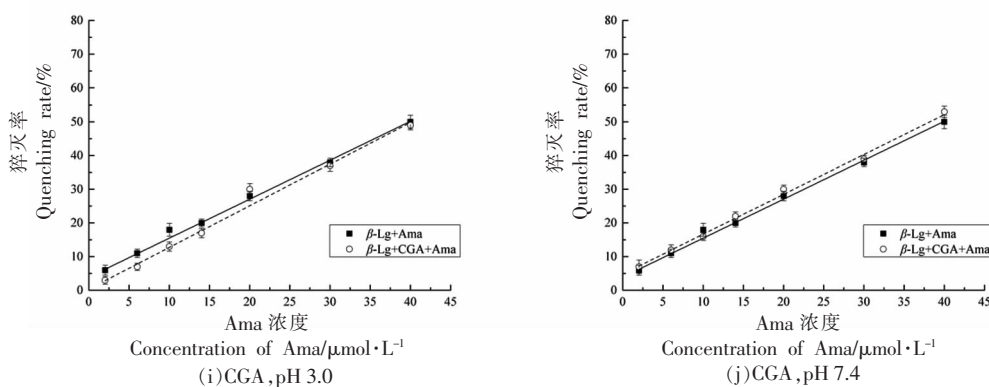
(f) Que, pH 7.4



(g) CAPE, pH 3.0



(h) CAPE, pH 7.4

图 4 不同 pH 值下配体对  $\beta$ -Lg-Ama 复合物的荧光猝灭率Fig.4 Effect of ligands on fluorescence quenching rate of  $\beta$ -Lg-Ama complex at different pH value

由荧光猝灭率图 4 可知中性条件下 Cur、Res 与  $\beta$ -Lg 的结合均影响了 Ama 的结合, 两种配体出现竞争关系, 此时 Ama 与 Cur、Res 竞争结合相近位点, 猝灭率降低, 对应了分子对接的结论, 此时 Cur、Res 先于 Ama 与  $\beta$ -Lg 结合, 而由于 Ama 对此位点的结合能力较强因此与前者产生竞争作用。从图中可以看出 Cur 与 Ama 的竞争作用略强于 Res。酸性环境中 5 种多酚与  $\beta$ -Lg 的结合不会对 Ama 造成影响。二配体竞争试验的结果表明配体添加顺序的改变也可以影响配体与蛋白质的结合。

### 3 结论

以分子对接模拟了 5 种多酚和 Ama 与  $\beta$ -Lg 的结合位点氨基酸和作用力类型, 并采用荧光光谱法验证多酚和 Ama 与  $\beta$ -Lg 结合的荧光猝灭、结合位点数和相互作用力, 最后通过竞争结合试验结合分子对接确定了与 Ama 竞争  $\beta$ -Lg 位点的多酚。结果表明, 多酚类活性成分 Cur、Res、Que、CAPE 和 CGA 与人工合成偶氮类染料 Ama 均可对  $\beta$ -Lg 产生静态猝灭从而形成蛋白质-配体复合物。Ama、Cur 和 Res 的结合位点在  $\beta$ -Lg 空腔入口附近, Que、CAPE、CGA 的结合于  $\beta$ -Lg 空腔外表面。其中 Ama 和 CGA 与  $\beta$ -Lg 作用力类型为氢键和范德华力, Cur、Res、Que 和 CAPE 则通过疏水相互作用与  $\beta$ -Lg 结合, 结果与分子对接模拟的配体与  $\beta$ -Lg 结合的主要作用力类型一致。酸性条件下 Cur、Res、Que、CAPE、CGA 与 Ama 均无明显竞争结合作用, 推测此时 Ama 和 5 种多酚与  $\beta$ -Lg

结合于不同位点。在先加 Ama 再添加多酚时, 中性条件下 Ama 与 Cur 竞争结合于  $\beta$ -Lg 的结合位点; 而在多酚先与  $\beta$ -Lg 结合的情况下, Cur 和 Res 在中性环境中均会影响 Ama 与  $\beta$ -Lg 位点的结合。综上所述表明 5 种多酚中 Cur 和 Res 存在与 Ama 的位点竞争作用, 且竞争作用受配体与  $\beta$ -Lg 的结合顺序影响, 对为控制功能性乳制品中小分子物质的人体吸收提供启发具有重要意义。

### 参 考 文 献

- [1] ALI M, KEPPLER J K, COENYE T, et al. Covalent whey protein-rosmarinic acid interactions: A comparison of alkaline and enzymatic modifications on physicochemical, antioxidative, and antibacterial properties[J]. Journal of Food Science, 2018, 83(7/9): 2092-2100.
- [2] SOLEIMANIFAR M, JAFARI S M, ASSADPOUR E. Encapsulation of olive leaf phenolics within electro-sprayed whey protein nanoparticles; production and characterization[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 101(4): 105572.
- [3] KATOUZIAN I, JAFARI S M. Nanotubes of  $\alpha$ -lactalbumin for encapsulation of food ingredients[J]. Biopolymer Nanostructures for Food Encapsulation Purposes, 2019, 1(1): 101-124.
- [4] RONALD C H. Bone health, calcium, vitamin D metabolism, and gastro-intestinal diseases[J]. Journal of Clinical Densitometry, 2020, 23(2): 153-154.
- [5] DIMUTHU B, JAYANI C, TODOR V. Thermal denaturation of bovine  $\beta$ -lactoglobulin in different pro-

- tein mixtures in relation to antigenicity[J]. International Dairy Journal, 2019, 91(4): 89-97.
- [6] SAWYER L, BROWNLOW S, POLIKARPOV I, et al. beta-Lactoglobulin: Structural studies, biological clues[J]. International Dairy Journal, 1998, 8(2): 65-72.
- [7] PADILLA P, IZQUIERDO M, MARGARITA M T, et al. Polymorphisms of  $\alpha$ -lactalbumin,  $\beta$ -lactoglobulin and prolactin genes are highly associated with milk composition traits in Spanish Merino sheep[J]. Livestock Science, 2018, 217(11): 26-29.
- [8] LIU J W, JIANG L, ZHANG Y Y, et al. Binding behaviors and structural characteristics of ternary complexes of  $\beta$ -lactoglobulin, curcumin, and fatty acids[J]. RSC Advances, 2017, 7(73): 45960-45967.
- [9] STIRPE A, PANTUSA M, RIZZUTI B, et al. Resveratrol induces thermal stabilization of human serum albumin and modulates the early aggregation stage[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 92(11): 1049-1056.
- [10] 高浩祥, 梁恒宇, 曾维才, 等. 植物多酚常见的定性定量分析方法[J]. 包装工程, 2021, 42(7): 1-11.
- GAO H X, LIANG H Y, ZENG W C, et al. Common methods of qualitative and quantitative analysis for plant polyphenols[J]. Packaging Engineering, 2021, 42(7): 1-11.
- [11] 李晓雷, 郑丽丽, 艾斌凌, 等. 槲皮素与 $\beta$ -乳球蛋白 B 的结合机制及其溶解性能[J]. 食品科学, 2019, 40(16): 8-16.
- LI X L, ZHENG L L, AI B L, et al. Binding between quercetin and  $\beta$ -lactoglobulin B: Mechanism and improved solubility of quercetin[J]. Food Science, 2019, 40(16): 8-16.
- [12] BRUNA R S, SALLES D, ANDRÉA M. Caffeic acid phenethyl ester promotes wound healing of mice pressure ulcers affecting NF- $\kappa$ B and NOS2 and NRF2 expression[J]. Life Sciences, 2018, 207(8): 158-165.
- [13] BALKHI H, HAQ E, GUL T, et al. Anti-glioma effects of caffeic acid phenethyl ester and dasatinib combination therapy in an *in vivo* rat glioma model[J]. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents), 2018, 18(12): 1729-1735.
- [14] 吴文能, 曹森, 雷霖卿, 等. 植物提取物对猕猴桃软腐病致病菌的抑制活性[J]. 包装工程, 2020, 41(1): 37-43.
- WU W N, CAO S, LEI J Q, et al. Inhibition activity of the plant extract against the kiwifruit soft rot[J]. Packaging Engineering, 2020, 41(1): 37-43.
- [15] KALINOVA R, YORDANOV Y, TZANKOV B, et al. Cinnamyl modified polymer micelles as efficient carriers of caffeic acid phenethyl ester[J]. Reactive and Functional Polymers, 2020, 157(3): 104763.
- [16] KIM J, BEAK S, KANG P L, et al. Chlorogenic acid in viscum album callus is a potential anti-cancer agent against C6 glioma cells[J]. Pharmacognosy Magazine, 2020, 16(71): 531-537.
- [17] MEI X Y, ZHOU L Y, ZHANG T Y, et al. Chlorogenic acid attenuates diabetic retinopathy by reducing VEGF expression and inhibiting VEGF-mediated retinal neovascularization[J]. Vascular Pharmacology, 2018, 101(2): 29-37.
- [18] CUVACA I, CURRIE R, ROOZEBOOM K, et al. Increased absorption and translocation contribute to improved efficacy of dicamba to control early growth stage Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*)-Corrigendum[J]. Weed Science, 2020, 68(6): 681.
- [19] LEO L, LOONG C, HO X L, et al. Occurrence of azo food dyes and their effects on cellular inflammatory responses[J]. Nutrition, 2018, 46(2): 36-40.
- [20] DIAS N C, ALVES T, AZEVEDO D A, et al. Metabolization of by-products formed by ozonation of the azo dye reactive red 239 in moving-bed biofilm reactors in series[J]. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 2020, 37(1): 495-504.
- [21] TROTT O, OLSON A J. Software news and update AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading[J]. Journal of Computational Chemistry, 2010, 31(2): 455-461.
- [22] 但倩誉.  $\beta$ -乳球蛋白与川陈皮素相互作用机制研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2019.
- DAN Q Y. Research of interaction mechanism between beta-lactoglobulin and nobiletin[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2019.
- [23] 张捷. 乳蛋白和三种活性成分间相互作用及对活性成分的保护作用[D]. 无锡: 江南大学, 2014.
- ZHANG J. Protective effect of dairy protein to bioactive molecules via their complexes[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2014.

- [24] AL-HASHIMI B, OMER K M, RAHMAN H S. Inner filter effect (IFE) as a simple and selective sensing platform for detection of tetracycline using milk-based nitrogen-doped carbon nanodots as fluorescence probe [J]. *Arabian Journal of Chemistry*, 2020, 13(4): 5151–5159.
- [25] CHAI W M, OU-YANG C, HUANG Q, et al. Antityrosinase and antioxidant properties of mung bean seed proanthocyanidins: Novel insights into the inhibitory mechanism[J]. *Food Chemistry*, 2018, 260(15): 27–36
- [26] JIANG J, ZHANG Z P, ZHAO J, et al. The effect of non-covalent interaction of chlorogenic acid with whey protein and casein on physicochemical and radical-scavenging activity of *in vitro* protein digests [J]. *Food Chemistry*, 2018, 268(1): 334–341.
- [27] WANG R, HU X, PAN J H, et al. Interaction between quinoline yellow and human serum albumin: Spectroscopic, chemometric and molecular docking studies[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2019, 99(1): 73–82.
- [28] YIN J Y, HUO J S, MA X X, et al. Study on the simultaneously quantitative detection for  $\beta$ -lactoglobulin and lactoferrin of cow milk by using protein chip technique [J]. *Biomedical and Environmental Sciences*, 2017, 30(12): 875–886.
- [29] KHANJI A N, MICHAUX F, DOMINIQUE S, et al. The study of curcumin interaction with micellar casein and lactic acid bacteria cell envelope [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2018, 91(5): 293–302.
- [30] KANAKIS C D, TARANTILIS P A, POLISSIOU M G, et al. Probing the binding sites of resveratrol, genistein, and curcumin with milk  $\beta$ -lactoglobulin[J]. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2012, 31(12): 1455–1466.
- [31] 郝明皓. 三种多酚与 $\beta$ -酪蛋白及 $\beta$ -乳球蛋白相互作用研究[D]. 济南: 山东师范大学, 2019.
- HAO M H. Interaction of three polyphenols with  $\beta$ -casein and  $\beta$ -lactoglobulin[D]. Jinan: Shandong Normal University, 2019.
- [32] CASELLA L, MONZANI E, NICOLIS S. Potential applications of peroxidases in the fine chemical industries[J]. *Biocatalysis Based on Heme Peroxidases*, 2010, 7(1): 111–153.
- [33] FRAJLI L K, HAYES D M, WERNER T C, et al. Static and dynamic fluorescence quenching experiments for the physical chemistry laboratory[J]. *Journal of Chemical Education*, 1992, 69(5): 424.
- [34] ROSS P D, SUBRAMANIAN S. Thermodynamics of protein association reactions: Forces contributing to stability[J]. *Biochemistry*, 1981, 20(11): 3096–3102.
- [35] SEKOWSKI S, BITIUCKI M, IONOV M, et al. Influence of valoneoyl groups on the interactions between *Euphorbia tannins* and human serum albumin [J]. *Journal of Luminescence*, 2018, 194(2): 170–178.
- [36] SURYAWANSHI V D, WALEKAR L S, GORE A H, et al. Spectroscopic analysis on the binding interaction of biologically active pyrimidine derivative with bovine serum albumin[J]. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2016, 6(1): 56–63.
- [37] GOKKAYA E O, YESILOU S, OZGOCMEN M, et al. Protective effects of resveratrol and avocado oil against paracetamol-induced hepatotoxicity in rats[J]. *Drug and Chemical Toxicology*, 2021, 4(2): 1–9.

### The Competitive Binding Interactions between Polyphenols and Amaranth with $\beta$ -Lactoglobulin by Fluorescence Spectroscopy and Molecular Docking Methods

Fan Jinbo<sup>1</sup>, Ma Ao<sup>1</sup>, Zhou Suzhen<sup>1</sup>, Wang Changxia<sup>2</sup>, Lü Changxin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>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

<sup>2</sup>Jinzhou Yiduole Dairy Co. Ltd., Jinzhou 121018, Liaoning)

**Abstract** Functional dairy products are rich in bioactive ingredients like polyphenols which are beneficial to human



body, but at the same time, in order to improve the appearance of food, the addition of synthetic azo pigment amaranth (Ama) increases the health risk of food to some extent. In this study, fluorescence spectroscopy combined with molecular docking was used to study the binding competitive effect of five polyphenols and Ama with  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -Lg). The results showed that curcumin (Cur), resveratrol (Res), quercetin (Que), caffeic acid phenylethyl ester (CAPE), chlorogenic acid (CGA) and Ama could form complexes with  $\beta$ -Lg. The binding constants of several ligands with  $\beta$ -Lg were in the order of  $10^5\sim 10^7$  L/mol, which indicated that the binding ability was very strong. Among them, Ama and CGA bind  $\beta$ -Lg by hydrogen bond and van der Waals force, while Cur, Res, Que and CAPE bind  $\beta$ -Lg by hydrophobic interaction. Under acidic conditions, Ama and five polyphenols could bind to  $\beta$ -Lg at different sites, and no obvious competitive binding effect was observed. Under neutral condition, Ama and Cur competed for binding site of  $\beta$ -Lg. When polyphenols were first bound to  $\beta$ -Lg, Res affected the binding of Ama to  $\beta$ -Lg, that was, the order of ligand addition affected the competitive effect. At the same time, both Cur and Ama bind to the site at the entrance of  $\beta$ -Lg hydrophobic cavity, and both of them bind with Asn90, and the competitive effect was stronger than Res. In this paper, the competition between small molecules and milk protein was studied, which provided a theoretical basis for the practical application of controlling the absorption of some food additives by means of processing.

**Keywords**  $\beta$ -lactoglobulin; amaranth; polyphenols; fluorescence spectrometry; molecular docking