

## 超声处理对叶黄素与牛血清白蛋白结合行为的影响

范金波<sup>1</sup>, 张炎<sup>1</sup>, 康柱<sup>1</sup>, 张瀛心<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** 为探究超声处理对叶黄素(LUT)与牛血清白蛋白(BSA)结合行为的影响,采用荧光光谱、紫外-可见吸收光谱法分析不同超声频率(0 Hz/40 kHz/53 kHz)下 LUT 与 BSA 的相互作用,通过位点竞争试验和分子对接技术来确定结合位点。结果表明:不同超声频率下 LUT 对 BSA 造成荧光猝灭,当超声频率 53 kHz 时猝灭率最高(50.6%),同时超声处理使 BSA 结构的疏水性增强,与紫外-可见吸收光谱测定结果一致。同步荧光表明,超声处理使 BSA 骨架变得疏松,且在超声频率 53 kHz 时色氨酸荧光强度变化显著。分子对接结果显示:LUT 与 BSA 结合位点位于亚结构域 III A 和 III B 之间,已得到位点竞争试验的验证。此外,热力学研究和分子对接结果表明:LUT 主要通过氢键和疏水相互作用与 BSA 自发结合。当超声频率 53 kHz 时,对 LUT 与 BSA 的结合行为影响显著。结论:通过改变超声频率,可调控食品中蛋白与小分子相互作用。

**关键词** 叶黄素; 荧光光谱; 结合位点; 超声处理; 牛血清白蛋白

**文章编号** 1009-7848(2023)05-0001-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.05.001

叶黄素(Lutein, LUT)是一种天然类胡萝卜素,在深绿色叶类蔬菜中含量居高<sup>[1-2]</sup>。它在神经系统发育,预防黄斑变性、心血管疾病等方面发挥作用<sup>[3-4]</sup>。然而,由于叶黄素分子中含有不饱和键,当其暴露于氧化剂、光和热时,会迅速恶化<sup>[5]</sup>。构建有效的递送载体是增加水不溶性活性分子应用的常用手段。

牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA)具有营养价值高,可生物降解,成本低,易获得等优点<sup>[6-7]</sup>。此外,BSA 结构上有许多官能团,如醇醌、胺和羧基,可与多种化合物结合<sup>[8]</sup>,常被作为包封生物活性化合物的有效载体。BSA 是一种双链多结构域蛋白,具有 3 个结构域 I (A, B), II (A, B) 和 III (A, B),与 HSA 非常相似<sup>[9]</sup>。Paiva 等<sup>[10]</sup>通过多光谱法研究 LUT 与 BSA 相互作用,发现 LUT 和 BSA 以 1:1 的化学计量比结合形成复合物。

超声波可有效改变食品加工方式,加快蛋白质与小分子的结合<sup>[11]</sup>。近几年,超声处理广泛用于膳食纤维、多糖、蛋白类食品,以提高加工性能,改善食品的品质因数<sup>[12-14]</sup>。Wang 等<sup>[15]</sup>研究表明,超声

预处理会使大豆球蛋白色氨酸(Tryptophan, Trp)侧链移动到蛋白质分子的外部。蛋白质三级结构的变化导致其微环境的极性增加。Jiang 等<sup>[16]</sup>从超声波处理后荧光强度的波动来研究黑豆蛋白质的三级结构,其内部的疏水相互作用被破坏,并暴露在分子表面。

由于人体不能自发产生 LUT,需要更有效的 LUT 来预防上述疾病,因此,LUT 被考虑用于功能性强化食品。LUT 与 BSA 形成复合物已有报道<sup>[10]</sup>,而超声处理对 LUT 与 BSA 结合的影响鲜有报道。通过荧光光谱法、紫外-可见吸收光谱法和位点竞争试验,研究不同频率的超声处理对 LUT 与 BSA 结合行为的影响,具有重要意义。为 LUT 的深度开发和利用提供有效的途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

牛血清白蛋白(98%)、LUT(80%),上海萌芽生物科技有限公司;布洛芬(ibuprofen, IBUP 98%)、华法林(warfarin, WARF 98%),生工生物(上海)股份有限公司;无水乙醇、磷酸氢二钠、柠檬酸(分析纯级),天津市北辰方正试剂厂。

### 1.2 仪器与设备

F-7000 荧光分光光度计,日本日立高新技术

收稿日期: 2022-05-12

基金项目: 教育部创新项目(21YH009CX5)

第一作者: 范金波,男,博士,副教授

E-mail: jinbo\_fan@hotmail.com

公司;PHS-25 pH计,上海仪电科学仪器股份有限公司;UV-2700紫外-可见分光光度计,日本岛津公司;SK6210 HP超声波清洗器,上海科导超声仪器有限公司;KQ-500 DE数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司。

### 1.3 试验方法

1.3.1 LUT与BSA相互作用的荧光光谱 荧光发射光谱的测定参考Yu等<sup>[17]</sup>的方法并稍作改动。取7支规格为5 mL的离心管,依次加入Tris-HCl缓冲溶液(pH 7.4)2 970,2 920,2 870,2 820,2 770,2 720,2 670  $\mu\text{L}$ ,再分别加入 $1.2 \times 10^{-4}$  mol/L BSA储备液30  $\mu\text{L}$ ,最后加入一定体积 $7.2 \times 10^{-4}$  mol/L LUT,溶液总量为3 mL,摇匀,使其反应充分。以298 K和310 K,超声频率0 Hz为对照组,超声频率(40 kHz/53 kHz)为试验组,避光反应30 min。对6组处理样品,设置激发波长280 nm,发射波长范围290~500 nm,激发光栅2.5 nm、发射狭缝5.0 nm。分别测定6组样品在发射波长290~500 nm范围的光谱并记录数据。

1.3.2 同步荧光光谱的测定 激发波长与发射波长的间隔分别设为 $\Delta\lambda=15$  nm和 $\Delta\lambda=60$  nm,激发、发射狭缝分别定为2.5 nm和5.0 nm。在298 K和310 K测定6组处理样品在250~350 nm的同步光谱并记录数据。

1.3.3 LUT与BSA相互作用的紫外-可见吸收光谱 参照方法1.3.1节,在298 K和310 K测定6组样品在波长200~600 nm范围的紫外吸收光谱并记录数据。

1.3.4 IBUP、WARF位点竞争试验 参照1.3.1节方法,在加入LUT储备溶液前,先加入25  $\mu\text{L}$   $7.2 \times 10^{-4}$  mol/L IBUP/WARF,充分摇匀,避光静置30 min,后续操作同1.3.1节。

1.3.5 分子模拟 为进一步研究LUT与BSA的相互作用,利用AutoDock 4.0软件进行分子对接分析。LUT配体(CID:5281243)和BSA蛋白(ID:4OR0)的晶体结构分别从PubChem和蛋白数据库RCSB PDB下载<sup>[10]</sup>。在分子对接前,首先去除氢原子、水分子及b链,之后进行网格尺寸设置为 $86 \text{ \AA} \times 56 \text{ \AA} \times 64 \text{ \AA}$ ,以覆盖网格中心在 $X=8.66, Y=21.11, Z=103.6$ 的所有BSA活性位点氨基酸残基,BSA

刚性对接,LUT柔性对接,其它对接参数都保留为默认参数,选择最低对接构象进行研究。

1.3.6 数据处理 本试验重复3次,结果表示为 $\bar{x} \pm s$ 。用Excel处理数据,用Origin 2018软件绘制谱图,用SPSS软件进行数据显著性差异分析( $P < 0.05$ 为显著)。

## 2 结果与分析

### 2.1 超声频率对LUT与BSA荧光猝灭的影响

BSA固有的荧光主要来源于其酪氨酸(Tyrosine, Tyr)、苯丙氨酸(Phenylalanine, Phe)和Trp芳香族氨基酸残基<sup>[18]</sup>。荧光猝灭是指荧光物质分子与溶剂分子之间发生猝灭的现象,药物配体可以降低荧光团的强度,BSA荧光基团周围微环境的极性变化会导致光谱红移或蓝移<sup>[19]</sup>。在298 K,超声频率0 Hz/40 kHz/53 kHz时,BSA最大发射波长随LUT浓度的增加发生蓝移(2,3 nm和2 nm),表明BSA附近微环境发生变化,疏水性增强。在温度310 K,超声频率为0 Hz/40 kHz/53 kHz时,随着LUT浓度的增加,BSA荧光强度的最大峰位置在0 Hz时发生蓝移(4 nm),在40 kHz和53 kHz处理条件下红移(1 nm和2 nm),表明其内部疏水相互作用可能被破坏,疏水性降低。由图1可知,不同温度时,随着超声频率的升高猝灭率逐渐增加,在310 K,53 kHz时猝灭率最高(50.6%),说明超声处理时BSA三级结构存在显著差异,影响BSA与LUT的结合。

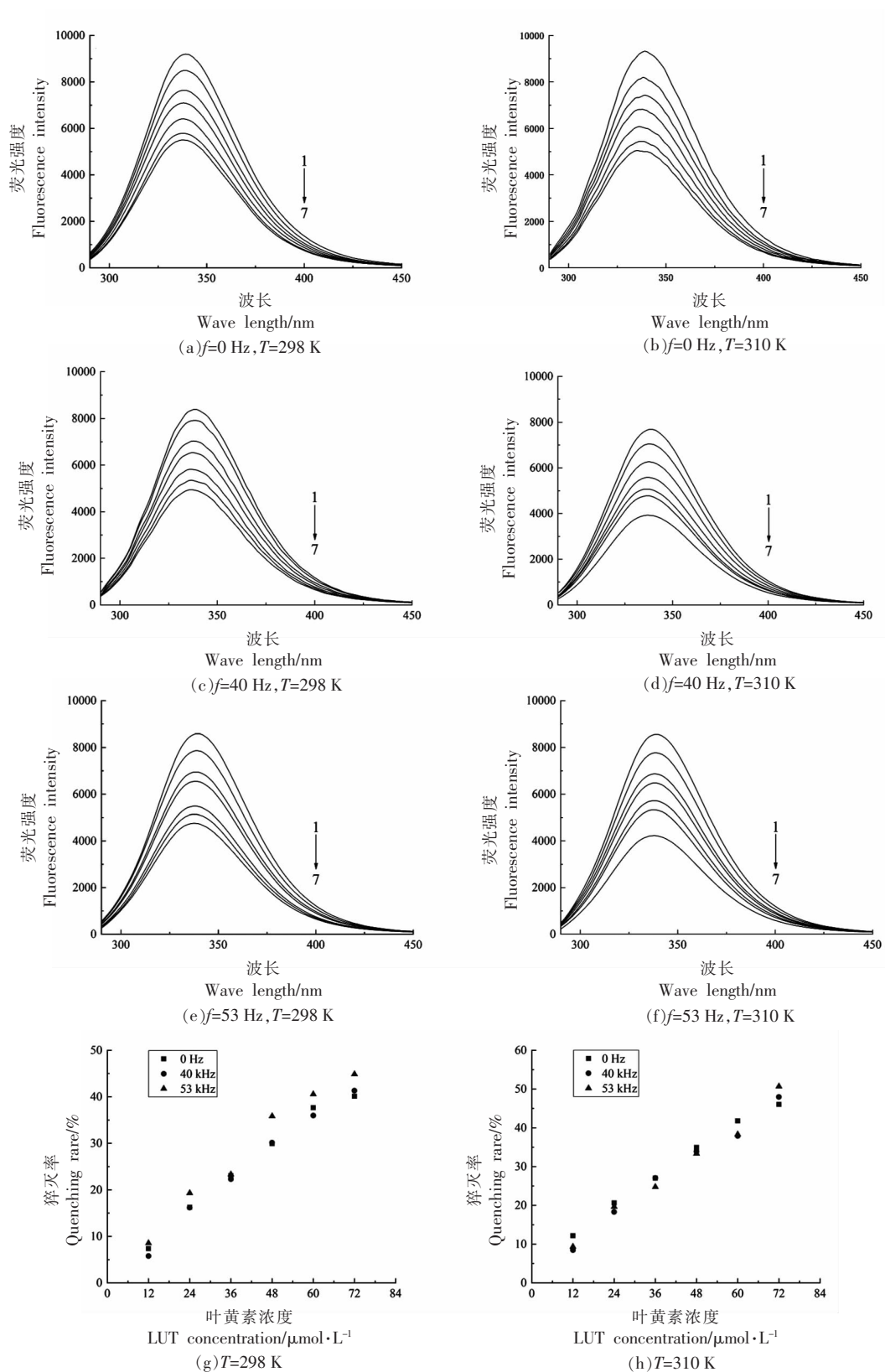
### 2.2 荧光猝灭机理与热力学分析

2.2.1 荧光猝灭机理 分析BSA在不同温度、超声频率下随LUT浓度增加的荧光猝灭光谱。LUT可以猝灭BSA的固有荧光。采用Stern-Volmer方程(1)Hill方程(2)进行分析评价<sup>[20]</sup>。

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

$$\lg(F_0/F - 1) = \lg K_a + n \lg [Q] \quad (2)$$

式中, $F_0, F$ ——分别是BSA在LUT存在和不存在时的荧光强度; $K_q$ ——静态猝灭速率常数; $\tau_0$ ——蛋白质的平均寿命,约 $10^{-8}$  s; $[Q]$ ——LUT浓度, mol/L; $K_{sv}$ ——分子猝灭常数; $K_a$ ——LUT-BSA结合常数; $n$ ——结合位点的数量。



注: BSA 浓度  $1.2 \mu\text{mol/L}$ , 叶黄素浓度 (1→7) 依次为  $0, 12, 24, 36, 48, 60, 72 \mu\text{mol/L}$ 。

图 1 不同超声频率下 LUT 与 BSA 结合的荧光发射光谱

Fig.1 Fluorescence emission spectra of LUT binding to BSA at different ultrasonic frequencies

表1 LUT与BSA相互作用的猝灭常数、结合常数和结合位点

Table 1 Quenching constants, binding constants and binding sites of BSA interacting with LUT

$f/\text{kHz}$	$T/\text{K}$	$K_{\text{sw}}/\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$	$K_{\text{q}}/\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$	$R^{\text{a}}$	$K_{\text{a}}/\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$	$R^{\text{b}}$	$n$
0	298	$9.26\times 10^3$	$9.26\times 10^{11}$	0.9994	$7.05\times 10^4$	0.9964	1.207
	310	$11.6\times 10^3$	$1.16\times 10^{12}$	0.9997	$1.44\times 10^4$	0.9917	1.024
40	298	$9.22\times 10^3$	$9.22\times 10^{11}$	0.9993	$7.95\times 10^4$	0.9911	1.340
	310	$1.12\times 10^4$	$1.12\times 10^{12}$	0.9980	$8.89\times 10^4$	0.9929	1.235
53	298	$1.10\times 10^4$	$1.10\times 10^{12}$	0.9989	$2.61\times 10^5$	0.9830	1.214
	310	$1.18\times 10^4$	$1.18\times 10^{12}$	0.9993	$1.11\times 10^5$	0.9741	1.119

注:  $R^{\text{a}}$  为方程(1)拟合  $K_{\text{sw}}$  相关系数,  $R^{\text{b}}$  为方程(2)拟合  $K_{\text{a}}$  相关系数。

由表1数据可知, 超声频率 0 Hz/40 kHz/53 kHz 时, LUT 活性分子猝灭常数 ( $K_{\text{q}}$ ) 高于猝灭常数  $2.0\times 10^{10} \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{s})$ , 表明 LUT 通过静态猝灭机制诱导 BSA 发生荧光猝灭<sup>[21]</sup>。在不同超声频率条件下二者的结合位点数近似等于 1, 判断 LUT 与 BSA 形成物质的量比为 1:1 的复合物。同时, LUT-BSA 复合物的结合常数均大于  $10^4$  数量级, 证实二者间有强的结合行为, 且在超声频率 53 kHz 时结合常数最大, 与荧光发射光谱分析结果一致。

### 2.2.2 热力学性质 对 BSA 与 LUT 结合的热力

学进行分析, 确定 LUT 在 BSA 上的结合位点, 了解 LUT-BSA 结合的主要驱动力, 有助于优化 BSA 运输 LUT 的热力学条件。由热力学方程(3)和(4)分别计算相关参数<sup>[22]</sup>。通过不同超声频率处理比较热力学常数值的变化, 判断结合力类型。

$$\ln(K_2/K_1) = \Delta H(1/T_1 - 1/T_2)/R \quad (3)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K_{\text{a}} \quad (4)$$

式中,  $K_1$ 、 $K_2$ —— $T_1$ (298 K)、 $T_2$ (310 K) 时的结合常数;  $R$ ——热力学常数值,  $8.314 \text{ J}/(\text{mol}\cdot\text{K})$ ;  $\Delta H$ ——焓变,  $\text{kJ}/\text{mol}$ ;  $\Delta S$ ——熵变,  $\text{J}/(\text{mol}\cdot\text{K})$ ;  $\Delta G$ ——吉布斯自由能,  $\text{kJ}/\text{mol}$ 。

表2 LUT与BSA相互作用的热力学常数

Table 2 Thermodynamic constants of BSA interacting with LUT

$f/\text{kHz}$	$T/\text{K}$	$\Delta G/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta H/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta S/\text{J}/\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$
0	298	-27.659	-101.70	-248.46
	310	-24.677		
40	298	-30.902	-54.94	-80.65
	310	-29.934		
53	298	-28.232	-7.11	70.87
	310	-29.082		

LUT 与 BSA 之间的结合力类型可根据以下 3 种形式判断, 当  $\Delta H$  为负值,  $T\Delta S$  为正值时, 静电相互作用占主导地位; 当  $\Delta H$  和  $T\Delta S$  均为正值时, 疏水作用驱动结合过程; 当  $\Delta H$  和  $T\Delta S$  均为负值时, 氢键和范德华力是分子间主要作用力<sup>[23]</sup>。由表 2 可知,  $\Delta G$  和  $\Delta H$  均为负值, 说明 LUT-BSA 复合物的形成是自发形成的放热反应;  $\Delta G$  为负值, 随着温度的升高略有降低, 这表明在一定温度范围, BSA-LUT 复合物比游离 BSA 和 LUT 分子更稳定, 温度越高, 配合物越稳定。当超声频率为 0 Hz/

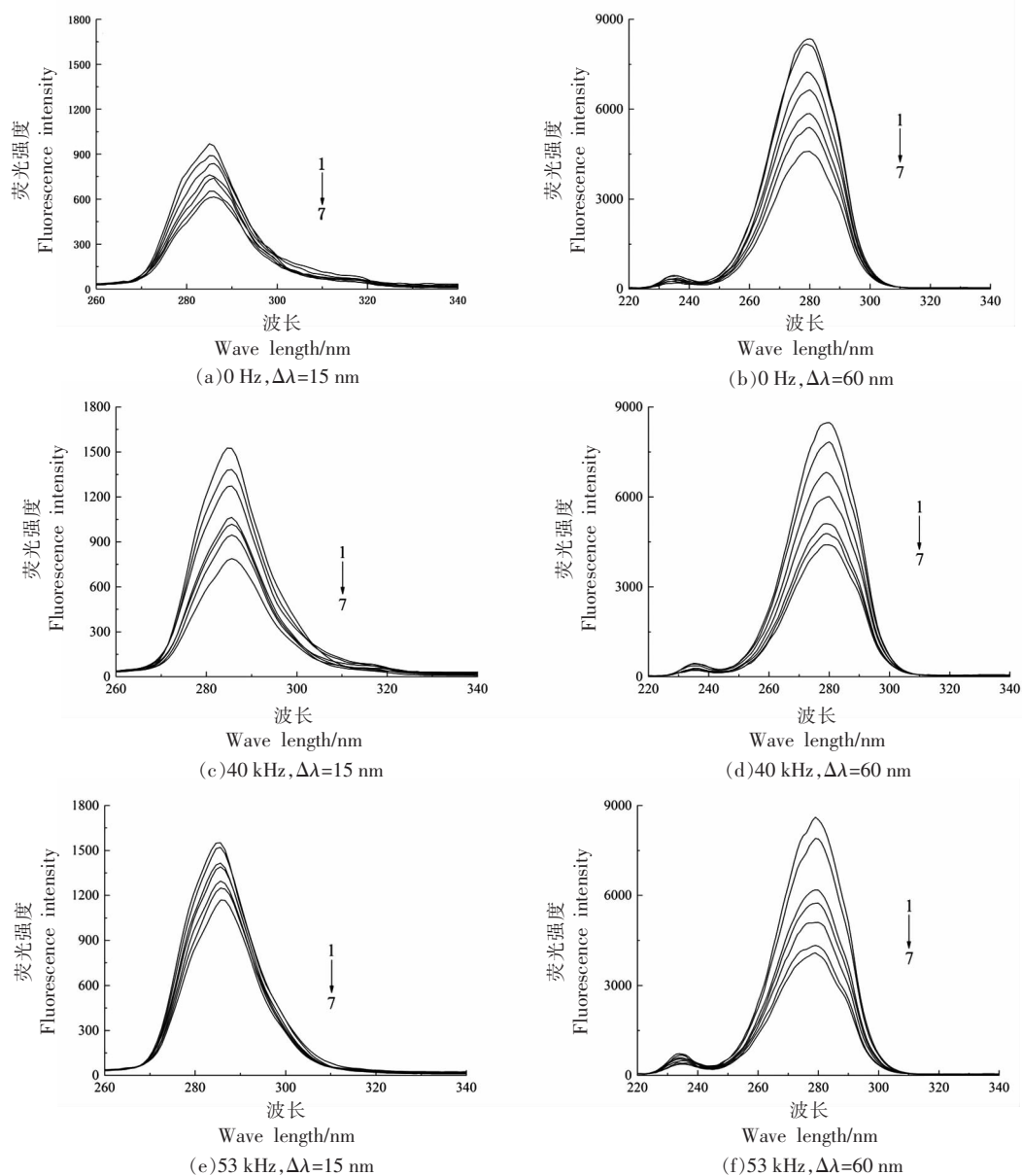
40 kHz 时,  $T\Delta S < 0$ , 二者结合主要依赖于氢键和范德华力; 当超声频率 53 kHz 时,  $T\Delta S > 0$ , 主要作用力是静电引力, 推测超声频率过高改变了二者结合的作用力类型。

### 2.3 同步荧光光谱

同步荧光图谱可提供残基周围微环境的极性与空间是否舒展等信息<sup>[24]</sup>。从图 2 可看出, 试验组样品荧光峰值均高于对照组样品的荧光峰值, 说明超声处理使 BSA 结构变得更加舒展, 更加有利于 LUT 与 BSA 的结合<sup>[25]</sup>。在温度 298 K, 超声频率

0 Hz/40 kHz/53 kHz 时, Tyr 发射波长分别红移 1.5, 0.4 nm 和 0.9 nm。Trp 发射波长分别蓝移 0.6, 0.7 nm 和 1.3 nm。根据 Samari 等<sup>[20]</sup>研究可知, 蓝移表示 Trp 和 Tyr 残基所处微环境极性减弱, 周围空间收缩; 红移则相反。超声处理会使 Tyr 残基红移变小, 即阻碍 Tyr 周边肽链的折叠; 而超声处理

使 Trp 残基蓝移变大, 即促进其周围空间的收缩。在同步荧光光谱图中, 随着超声频率的增强, Trp 的荧光强度呈现明显下降趋势, 在超声功率 53 kHz 时变化最显著 ( $P < 0.05$ )。综上所述, LUT 主要与 BSA 结构中的 Trp 残基相互作用, 超声处理改变了 BSA 的构象。



注: BSA 浓度 1.2 mol/L, 叶黄素浓度 (1→7) 依次为 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72  $\mu\text{mol/L}$ 。

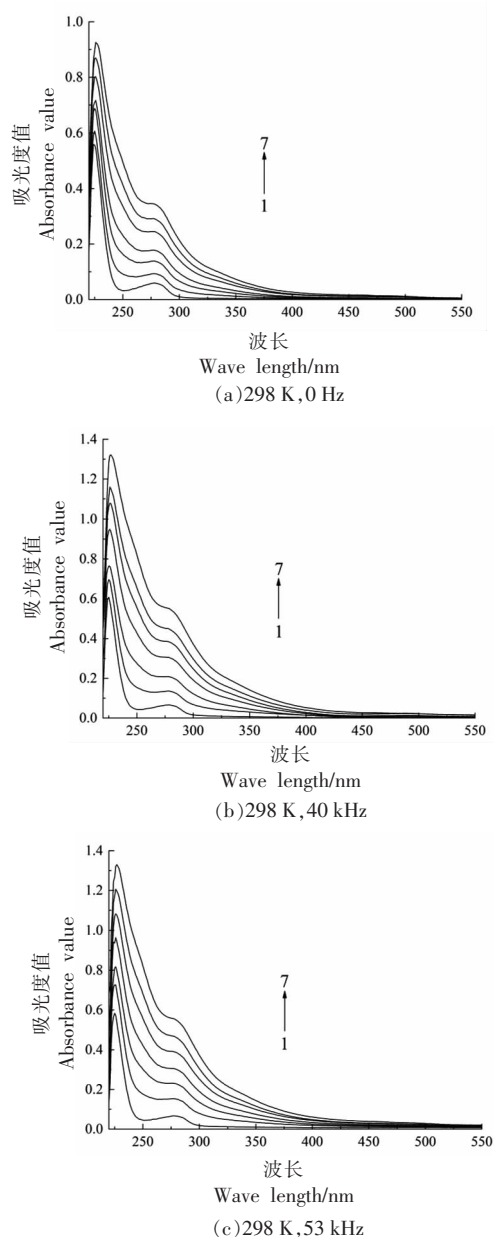
图 2 0 Hz(a, b), 40 kHz(c, d), 53 kHz(e, f) 时 LUT 与 BSA 相互作用的同步荧光光谱 (298 K)

Fig.2 Synchronous fluorescence spectra of LUT binding to BSA at 0 Hz(a, b), 40 kHz(c, d), 53 kHz(e, f) (298 K)

## 2.4 超声频率对 LUT 与 BSA 结合紫外吸收光谱的影响

BSA 的吸收最大值对周围的微环境高度敏

感, 并因蛋白质构象的变化而发生变化<sup>[17]</sup>。在图 3 紫外光谱图中 BSA 有两个典型的吸收峰, 225 nm 处的峰表征蛋白质中的肽键, 279 nm 处的峰反映



注:BSA 浓度  $1.2 \mu\text{mol/L}$  叶黄素浓度(1→7)依次为 0,12,24,36,48,60,72  $\mu\text{mol/L}$ 。

图3 LUT 与 BSA 相互作用的紫外可见光谱  
Fig.3 UV-Vis spectra of LUT binding to BSA

芳香族氨基酸(Trp、Tyr 和 Phe)<sup>[27]</sup>。在温度 298 K, 改变超声频率, 随着 LUT 的加入,BSA 在 225 nm 处的峰值强度下降, 水平方向没有移动; 在 279 nm 处 BSA 的吸收强度降低, 并发生轻微的蓝移, 水分子亲和力下降。超声处理组样品吸光值均明显高于未经超声组样品的吸光值 ( $P<0.05$ ), 即

BSA 中加入 LUT 后有明显的增色效应, 且随 LUT 浓度的增大, 增色效应增强, 表明加入 LUT 影响 BSA 的结构, 改变了 BSA 分子的取代基结构, 表明因 LUT 和 BSA 形成复合物而引起 BSA 吸收光谱的变化, 与荧光光谱的分析结果一致。

## 2.5 LUT 与 BSA 的结合位点

研究发现, IBUP 和 WARF 可以作为 BSA 亚结构域 II A (Sudlow's site I) 和亚结构域 III A (Sudlow's site II) 既定位点的荧光探针<sup>[28]</sup>。通过对猝灭率的比较, 可以判断 LUT 与 BSA 的结合位点是否位于亚结构域 II A 或亚结构域 III A。

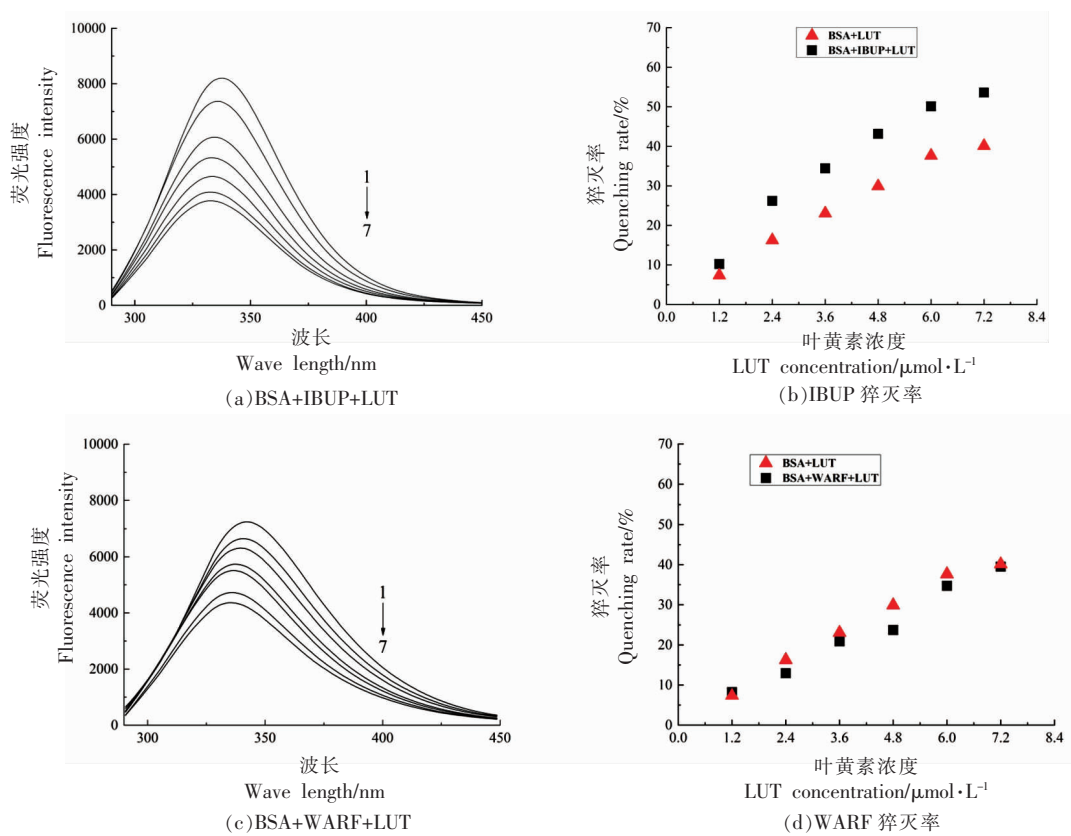
图 4 显示在温度 298 K, 未超声处理条件下, 两种标记物对于 LUT 与 BSA 相互作用荧光光谱的影响。可以看出, 标记物 IBUP 和 WARF 的加入并未降低 LUT-BSA 复合物的猝灭率, 因此不存在标记物位点竞争, 说明 LUT 与 BSA 的结合位点不在亚结构域 II A 和亚结构域 III A。

## 2.6 LUT 与 BSA 的分子对接结果

分子对接技术不仅可以证明氢键的存在, 还可以验证竞争试验结果<sup>[29]</sup>。利用 Autodock vina 对接软件分析 10 种预测。根据吉布斯自由能选取最佳构象,  $\Delta G$  值为  $-35.16 \text{ kJ/mol}$ 。与热力学常数值存在差异, 可能是受缓冲溶液离子和未结合分子(如水)的影响, 这些因素在对接研究中被忽略了<sup>[30]</sup>。由图 5 可知, 当与 BSA 结合时, LUT 被 Leu 490 通过氢键包围, Pro 492、Arg 412、Val 408、Tyr 400、Arg 409、Ala 405 等残基通过疏水相互作用包围, 与结合竞争试验一致。

## 3 结论

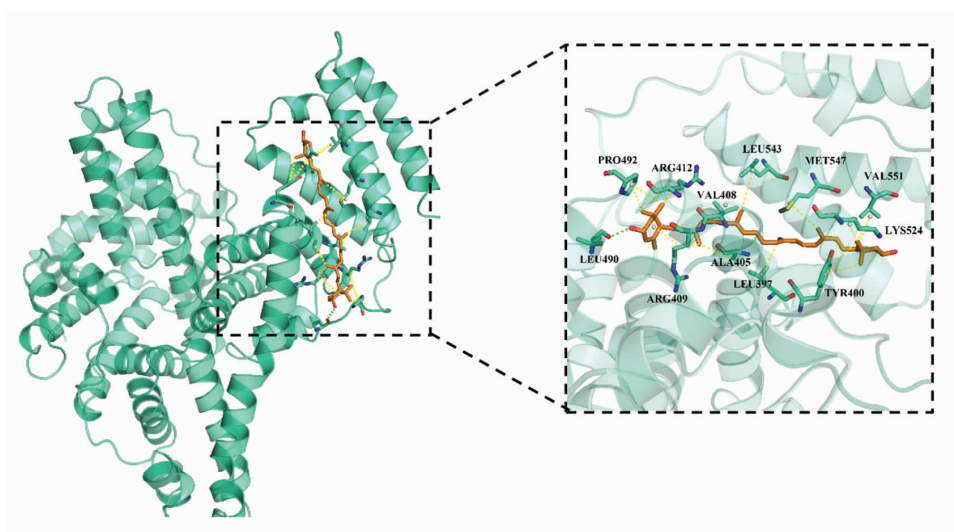
采用荧光光谱法研究超声处理(0 Hz/40 kHz/53 kHz)对 LUT 与 BSA 的荧光猝灭作用; 采用同步荧光和紫外-可见吸收光谱判断 3 种超声条件下 LUT 对 HSA 三级结构的影响; 采用位点竞争试验结合分子对接确定结合位点及相互残基作用力。结果表明, 超声处理使 LUT 对 BSA 的猝灭作用增强, 53 kHz 超声处理猝灭效果最好, 结合常数最大, 二者主要通过氢键和疏水相互作用与 BSA 自发结合, 随着超声频率的增加, 改变了作用力的结合方式。位点 Marker 试验和分子对接试验表明, LUT 与 BSA 结合位点位于亚结构域 III A 和



注:BSA 浓度 1.2 μmol/L,IBUP/WARF 浓度 6.0 μmol/L,a 图和 c 图 1→7 依次为 LUT 浓度 0,12,24,36,48,60,72 μmol/L。

图 4 位点竞争试验的荧光光谱图及猝灭率(298 K)

Fig.4 Fluorescence spectrogram and quenching rate of site competition experiment (298 K)



注:绿色键代表氢键,黄色键代表疏水相互作用。

图 5 LUT 和 BSA 的预测结合位点、氨基酸残基及作用力

Fig.5 Predicted binding site, the binding sites amino acids and interaction forces of LUT and BSA

III B 之间。本试验结果表明:增大超声频率可促进 LUT 与 BSA 的结合,为后续超声频率调控食品中

蛋白与小分子相互作用提供了新思路。

## 参 考 文 献

- [1] XU Y, MA X Y, GONG W, et al. Nanoparticles based on carboxymethylcellulose-modified rice protein for efficient delivery of lutein[J]. *Food & Function*, 2020, 11(3): 2380-2394.
- [2] DERRIEN M, AGHABARARNEJAD M, GOSSELIN A, et al. Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of lutein and chlorophyll from spinach by-products using response surface methodology[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2018, 93: 79-87.
- [3] MANTOVANI R A, HAMON P, ROUSSEAU F, et al. Unraveling the molecular mechanisms underlying interactions between caseins and lutein[J]. *Food Research International*, 2020, 138: 109781.
- [4] STEINER B M, MCCLEMENTS D J, DAVIDOV-PARDO G. Encapsulation systems for lutein: A review[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2018, 82: 71-81.
- [5] MA M J, YUAN Y K, YANG S, et al. Fabrication and characterization of zein/tea saponin composite nanoparticles as delivery vehicles of lutein[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2020, 125(4): 109270.
- [6] MARYAM S, JAFAR E, FARZANEH F, et al. Surface plasmon resonance and molecular docking studies of bovine serum albumin interaction with neomycin: Kinetic and thermodynamic analysis [J]. *Bioimpacts*, 2017, 7(2): 91-97.
- [7] QI X, XU D X, ZHU J J, et al. Studying the interaction mechanism between bovine serum albumin and lutein dipalmitate: Multi-spectroscopic and molecular docking techniques[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 113: 106513.
- [8] GHOSH S, DE Y J. Binding of fatty acid amide amphiphiles to bovine serum albumin: Role of amide hydrogen bonding[J]. *Journal of Physical Chemistry B*, 2015, 119(25): 7804-7815.
- [9] SOBHY R, KHALIFA I, LIANG H, et al. Phytosterols disaggregate bovine serum albumin under the glycation conditions through interacting with its glycation sites and altering its secondary structure elements[J]. *Bioorganic Chemistry*, 2020, 101(26): 104047.
- [10] PAIVA P H C, COELHO Y L, SILVA L H M, et al. Influence of protein conformation and selected Hofmeister salts on bovine serum albumin/lutein complex formation[J]. *Food Chemistry*, 2020, 305: 125463.
- [11] 荆卉, 孙俊, 牟瑶瑶, 等. 超声波物化效应及其对蛋白质改性的应用研究进展[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(6): 321-330.
- JING H, SUN J, MU Y Y, et al. Research advance in physicochemical effect of ultrasonic and its application in protein modification[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2021, 21(6): 321-330.
- [12] 潘艳芳, 陈晓彤, 杨维巧, 等. 超声处理控制鲜切甘薯褐变的生理机制[J]. *包装工程*, 2019, 40(9): 1-5.
- PAN Y F, CHEN X T, YANG W Q, et al. Physiological mechanism for browning inhibition in fresh-cut sweet potato by ultrasound[J]. *Packaging Engineering*, 2019, 40(9): 1-5.
- [13] 朱颖, 吴隆坤, 贾有青, 等. 超声处理对黑豆蛋白与可溶性多糖复合物功能性质及结构的影响[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(5): 181-186.
- ZHU Y, WU L K, JIA Y Q, et al. The effects of ultrasonic treatment on the physical properties and structure of black soybean protein and soluble polysaccharide complexes[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2020, 20(5): 181-186.
- [14] 夏蓉, 姬青华, 周存山, 等. 超声预处理和湿度控制对香蕉干燥特性的影响[J]. *包装工程*, 2019, 40(1): 40-48.
- XIA R, JI Q H, ZHOU C S, et al. Effects of ultrasonic pretreatment and humidity control on banana drying characteristics [J]. *Packaging Engineering*, 2019, 40(1): 40-48.
- [15] WANG Y T, WANG Z J, HANDA C L, et al. Effects of ultrasound pre-treatment on the structure of  $\beta$ -conglycinin and glycinin and the antioxidant activity of their hydrolysates[J]. *Food Chemistry*, 2017, 218: 165-172.
- [16] JIANG L Z, WANG J, LI Y, et al. Effects of ultrasound on the structure and physical properties of black bean protein isolates[J]. *Food Research International*, 2014, 62: 595-601.
- [17] YU X, CAI X G, LUO L Y, et al. Influence of



- tea polyphenol and bovine serum albumin on tea cream formation by multiple spectroscopy methods and molecular docking[J]. *Food Chemistry*, 2020, 333: 127432.
- [18] MALEKI S, DEHGHAN G, SADEGHI L, et al. Surface plasmon resonance, fluorescence, and molecular docking studies of bovine serum albumin interactions with natural coumarin diversin[J]. *Spectrochimica Acta Part A Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2020, 230: 118063.
- [19] CHENG L Y, XIA W, ZHANG X, et al. *In vitro* binding comparison of cephalosporins to human serum albumin by spectroscopy and molecular docking approaches: A novel structural pursuing[J]. *Journal of Molecular Liquids*, 2017, 248: 168–176.
- [20] CHAI W M, YANG O C, HUANG Q, et al. Anti-tyrosinase and antioxidant properties of mung bean seed proanthocyanidins: Novel insights into the inhibitory mechanism[J]. *Food Chemistry*, 2018, 260 (15): 27–36.
- [21] ABOU-ZIED O K, AL-SHIHI O I K. Characterization of subdomain IIA binding site of human serum albumin in its native, unfolded, and refolded states using small molecular probes[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(32): 10793–10801.
- [22] 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.
- [23] ROUFEGARINEJAD L, JAHANBANJ -ESFAHLAN A, SAJED-AMIN S, et al. Molecular interactions of thymol with bovine serum albumin: Spectroscopic and molecular docking studies[J]. *Journal of Molecular Recognition*, 2018, 31(21): e2704.
- [24] BOBONE S, WEERT M, STELLA L. A reassessment of synchronous fluorescence in the separation of Trp and Tyr contributions in protein emission and in the determination of conformational changes [J]. *Journal of Molecular Structure*, 2014, 1077: 68–76.
- [25] ZHANG Q A, FU X Z, MARTINJ F G. Effect of ultrasound on the interaction between epicatechin gallate and bovine serum albumin in a model wine [J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2017, 37: 405–413.
- [26] SAMARI F, HEMMETEENEJAD B, SHAMSIPUR M, et al. Affinity of two novel five-coordinated anticancer Pt (II) complexes to human and bovine serum albumins: A spectroscopic approach[J]. *Inorganic Chemistry*, 2012, 51(6): 3454–3464.
- [27] ZHAO X, LIU R, CHI Z, et al. New insights into the behavior of bovine serum albumin adsorbed onto carbon nanotubes: Comprehensive spectroscopic studies[J]. *Journal of Physical Chemistry B*, 2010, 114 (16): 5625–5631.
- [28] ISHTIKHAR M, KHAN S, BADR G, et al. Interaction of the 5-fluorouracil analog 5-fluoro-2'-deoxyuridine with 'N' and 'B' isoforms of human serum albumin: A spectroscopic and calorimetric study[J]. *Molecular Biosystems*, 2014, 10(11): 2954–2964.
- [29] ALI M S, MUTHUKUMARAN J, AL-LOHEDAN H A. Molecular interactions of ceftazidime with bovine serum albumin: Spectroscopic, molecular docking, and DFT analyses[J]. *Journal of Molecular Liquids*, 2020, 313: 113490.
- [30] YEKTA R, DEHGHAN G, RASHTBARI S, et al. Activation of catalase by pioglitazone: Multiple spectroscopic methods combined with molecular docking studies[J]. *Journal of Molecular Recognition*, 2017, 30(12): 2648–2671.

## Effect of Ultrasonic Treatment on the Binding Behavior of Lutein and Bovine Serum Albumin

Fan Jinbo<sup>1</sup>, Zhang Yan<sup>1</sup>, Kang Zhu<sup>1</sup>, Zhang Yingxin<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** It is of great significance to explore the effect of ultrasonic treatment on the binding behavior of lutein (LUT)

and bovine serum albumin (BSA) for the development of active molecular carrier. The interaction between LUT and BSA at different ultrasonic frequencies (0 Hz/40 kHz/53 kHz) was analyzed by fluorescence spectroscopy and UV-visible absorption spectroscopy. The binding sites were determined by binding site competition experiment and molecular docking technology. The results showed that LUT could quench the fluorescence of BSA at different ultrasonic frequencies, and the quenching rate was the highest (50.6%) at 53 kHz. Meanwhile, ultrasonic treatment could enhance the hydrophobicity of BSA structure, which was consistent with UV-vis absorption spectrum. Synchronous fluorescence showed that ultrasonic treatment made the BSA skeleton loose and the fluorescence intensity of tryptophan changed significantly at 53 kHz. Molecular docking showed that the binding site of LUT and BSA was located between subdomain III A and III B, which was verified by site competition experiments. In addition, thermodynamic studies and molecular docking showed that LUT spontaneously binds to BSA mainly through hydrogen bonding and hydrophobic interaction. In conclusion, ultrasonic treatment has a significant impact on the binding behavior of LUT and BSA at 53 kHz, which provides a new idea to regulate the interaction between protein and small molecules in food by changing the ultrasonic frequency.

**Keywords** lutein; fluorescence spectrum; binding site; ultrasonic treatment; bovine serum albumin