

新橙皮苷对乳清蛋白抗氧化活性的影响

马松博, 许艳, 刘露, 冯娇娇, 赵利, 白春清*

(江西科技师范大学生命科学学院 南昌 330013)

摘要 尝试利用新橙皮苷(NH)与乳清蛋白(WP)的非共价相互作用制备新橙皮苷-乳清蛋白非共价复合物(NH-WP),以改善乳清蛋白的抗氧化活性。采用荧光光谱法、同步荧光光谱法结合热力学分析以及分子对接模拟研究二者的相互作用力类型及机制。以游离 NH 为对照,采用多种抗氧化活性评价方法探讨 NH 与 WP 相互作用前、后 WP 的抗氧化活性。结果表明:加入 NH 后,WP 中所含有的芳香族氨基酸的固有荧光能够被猝灭,且猝灭方式为静态猝灭,并引起其芳香族氨基酸微环境的变化。两者相互作用过程中吉布斯自由能变(ΔG) <0 、熵变(ΔS) >0 、焓变(ΔH) >0 ,说明两者的相互作用是自发进行的吸热反应,且疏水作用为主要作用力;二者相互作用只有一个结合位点,并按照物质的量比 1:1 的比例结合形成新的复合物。复合物的抗氧化活性虽低于同浓度的游离 NH,但高于 WP,且 WP 的抗氧化活性与 NH 的加入量呈剂量依赖性关系。本研究可丰富 WP 与多酚相互作用研究的理论基础,为蛋白质功能性质的改善以及 NH、WP 在食品及医药品领域的应用提供参考。

关键词 新橙皮苷; 乳清蛋白; 抗氧化性; 相互作用; 分子对接

文章编号 1009-7848(2024)08-0122-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.08.012

新橙皮苷(NH)是柑橘类果实中一种重要的二氢黄酮类多酚物质(结构式见图 1),具有多种药理特性,包括抗雌激素、抗增殖作用、抗氧化、抗过敏以及神经保护活性^[1]。近年来,NH 物质的设计、开发及药理研究成为生物医药领域的研究热点,日益引起有关科研人员的重视。

乳清蛋白(WP)是牛乳中酪蛋白经沉淀后存在于乳清中的蛋白质。作为牛奶中含量丰富、功能特性优良的完全蛋白质,WP 的营养价值和功能特性受其结构和生物学功能的影响,常被用作乳化剂用于制备 O/W 型载体(如微胶囊、乳液)进行配体和微量元素的转运。WP 在提高免疫力^[2]、抗癌^[3]、缓解疲劳^[4]、抗氧化^[5]等方面还有多种应用。然而,WP 仍存在抗氧化保护作用有限等问题,使其应用受到一定的限制。

大量研究表明,植物多酚可通过非共价相互作用与蛋白质结合,用于蛋白质功能作用的改善。有研究表明,茶多酚能提高蛋清蛋白的起泡性和牛血清蛋白的乳化性^[6],儿茶素没食子酸酯能改善乳清蛋白的起泡性和乳化性^[7]。目前,虽有大量有关多酚与蛋白质相互作用的研究,但橙皮苷类物质(橙皮苷、柚皮苷、新橙皮苷等)作为多酚类物质中一大类活性成分,其与蛋白质间的相互作用及其对蛋白质功能活性的影响相关报道较少。课题组前期研究表明,橙皮苷与乳清蛋白存在非共价相互作用,且二者的结合可改善乳清蛋白的抗氧化活性^[8]。此外,刘蓉^[9]发现新橙皮苷与牛血清白蛋白存在相互作用。Jiang 等^[10]发现橙皮苷/橙皮素可提高麦谷蛋白的热稳定性及乳化活性。以上研究表明橙皮苷类物质与蛋白质间存在一定的相互作用,并有可能改善蛋白质的功能活性。然而,新橙皮与乳清蛋白是否存在相互作用,新橙皮苷的引入对乳清蛋白抗氧化活性不理想的问题是否有改善作用尚未知。据此,本研究在前期研究基础上,借助现代分析技术(荧光光谱、同步荧光光谱等)结合热力学分析以及分子对接模拟探究 NH 与 WP 的作用机制,采用 2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸 (ABTS) 法、二苯基苦基苯肼 (DPPH) 法、铁离子还原能力测定 (FRAP) 法等常

收稿日期: 2023-08-11

基金项目: 江西省自然科学基金面上项目 (20232BAB205083);江西省现代农业产业技术体系建设专项(赣财文指[2018]13号);国家级大学生创新创业计划项目(202211318009);江西省省级研究生创新专项资金资助项目(YC2023-S920)

第一作者: 马松博,男,硕士生

通信作者: 白春清 E-mail: chungqingbai01@hotmail.com

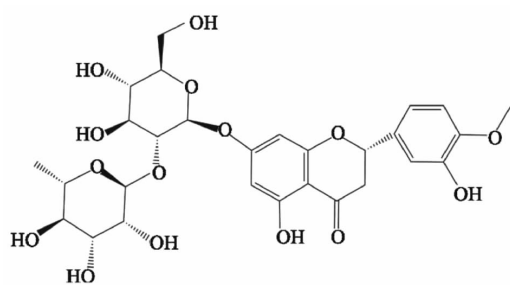


图1 新橙皮苷的结构式

Fig.1 Structural formula of neohesperidin

用抗氧化活性评价方法测定 WP-NH 复合物的抗氧化能力,并与游离的 NH、纯 WP 进行对照,评价二者相互作用对 WP 抗氧化活性的影响,为 WP 等蛋白质的功能活性改善提供研究新思路,为拓展 WP、NH 在食品和保健品中的进一步应用提供参考。

1 试验材料

1.1 试剂材料

新橙皮苷(97%)、ABTS、Trolox、TPTZ,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;乳清蛋白,上海源叶生物科技有限公司;磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、无水乙醇、氢氧化钠、三氯化铁、醋酸钠、冰乙酸,西陇科学股份有限公司;DPPH,上海麦克林生化科技股份有限公司。

1.2 仪器与设备

F-2700 荧光分光光度计,日本日立公司;U-T6A 紫外-可见分光光度计,屹谱仪器制造有限公司;pHS-3C 酸度计,上海仪电科学仪器股份有限公司;电子天平,舜宇集团有限公司;85-2 恒温磁力搅拌器,常州国华电器有限公司;HH-恒温水浴锅,金坛市中大仪器厂;-85℃超低温冰箱,美国 New Brunswick 公司;真空冷冻干燥机,宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.3 方法

1.3.1 WP-NH 的制备 称取一定量的 WP,并将其溶解于 10 mmol/L pH 6.8 的 PBS 缓冲溶液中,制得质量浓度为 0.5 mg/mL WP 母液,试验前将其稀释至 0.1 mg/mL 的质量浓度待用。NH 用热水溶解后,并用去离子水稀释,配制成浓度为 1×10^{-3} mol/L 的母液,放到 4℃冰箱冷藏保存待用。分别

吸取 0.1 mg/mL WP 溶液于 3 mL 于离心管中,随后依次增加储备液的量,样品溶液中 NH 得最终浓度为 0~2.67 $\mu\text{mol/L}$,充分振荡混合后在室温下放置 2 h,制成 NH-WP。

1.3.2 荧光光谱测定 按照 2.1 节的方法制备不同 NH 浓度的 NH-WP 复合物,并将其分别置于 298,304,310 K 下水浴,30 min 后测定其荧光发射光谱。测定条件:设置激发波长为 280 nm,发射波长为 300~500 nm,狭缝宽度为 5 nm^[11]。

1.3.3 新橙皮苷与乳清蛋白的荧光猝灭机理研究 为进一步判断 NH 对 WP 荧光猝灭的猝灭类型,采用 Stern-Volmer 方程进行计算并分析:

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

式中: F_0 和 F 分别为不存在和存在 NH 时 WP 的荧光强度; K_q 为猝灭速率常数, $\text{L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$; $[Q]$ 为 NH 的浓度, mol/L ; τ_0 为不含猝灭剂的荧光团荧光寿命,约为 10^{-8} s; K_{sv} 为静态猝灭常数, L/mol ^[12]。

1.3.4 WP 与 NH 相互作用类型和热力学参数分析 基于 Stern-Volmer 方程分析的基础上,NH-WP 之间的结合常数和结合位点数使用双对数回归方程计算来进行计算。计算公式如下。

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

式中: n 为结合位点; K_a 为结合常数; F_0 和 F 分别为不存在和存在橙皮苷时乳清蛋白的荧光强度; $[Q]$ 为新橙皮苷的浓度, mol/L 。

298,304,310 K 下的热力学参数,焓变(ΔH)、熵变(ΔS)和吉布斯自由能变(ΔG)由范特霍夫方程计算得到。

$$\ln K_a = -\Delta H/RT + \Delta S/R \quad (3)$$

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

式中: R 为气体常数, $8.314 \text{ J}/(\text{mol} \cdot \text{K})$; T 为绝对温度,298,304,310 K^[12]。

1.3.5 同步荧光光谱法 NH 与 WP 结合的同步荧光光谱参照 2.2 节的方法,固定发射波长为 260 nm 和 215 nm 并扫描 200~350 nm 波长范围的光谱来分别表示 $\Delta\lambda=60$ nm 和 $\Delta\lambda$ 为 15 nm 所具有的同步荧光光谱^[8],所有样品在测定前均在 298 K 反应 10 min。

1.3.6 分子对接模拟 NH(ID:442439)的模型结构来自 PubChems 数据库。 β -乳球蛋白(β -LG)是 WP 的主要蛋白质,本试验将 β -乳球蛋白作为分

子对接的模型,从 RCSB 数据库下载进行分子对接模拟。在导入 AutoDock Vina 程序之前,使用 PyMOL 工具删除了 β -LG 3D 结构中的原始水分子和配体。此外,在进行模拟之前,氢原子和电荷被添加到蛋白质分子结构中。NH 和 β -LG 分别作为配体和受体。然后使用 AutoDock Vina 程序模拟 NH 和 β -LG 之间的相互作用。对接以 NH 的中心为网格中心(β -LG: -13, 15, -10),对接盒的尺寸为(54Å×55Å×51Å)。保存对接结果的前 10 个姿态,显示最低交互能量的姿态被视为优化结果。使用 Discovery Studio 程序可视化了 NH 和 β -LG 之间的相互作用。

1.3.7 抗氧化活性的测定

1.3.7.1 ABTS 法 按照蒋变玲等^[13]的方法进行测定,具体:取 1.5 mL 的 NH 溶液、WP-NH 复合物分别与 0.5 mL 的 ABTS⁺工作液振荡混合,室温避光反应 6 min 后,在波长 734 nm 处测定吸光度(A_1)。同时,设置空白组,以 PBS 缓冲液代替样品,进行相同反应后测定其吸光度(A_0)。所有样品平行测定 6 次,各样品的 ABTS 自由基清除率通过公式(5)计算。

$$\text{ABTS 自由基清除率}(\%) = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100 \quad (5)$$

1.3.7.2 DPPH 法 按照张田^[14]的方法进行测定,具体:取 2 mL NH 样品溶液、WP-NH 复合溶液分别与 1 mL DPPH 工作液振荡混合,在室温、避光条件下反应 30 min,于波长 517 nm 处测定溶液吸光度($A_{\text{试验}}$)。同时,设置空白组、对照组,其中空白组用乙醇代替样品与 DPPH 工作液反应后进行测定(A_2),对照组用无水乙醇代替 DPPH 与样品反应后进行测定($A_{\text{对照}}$)。所有样品平行测定 6 次,各样品的 DPPH 自由基清除率通过公式(6)计算得出。

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = (A_2 - A_{\text{试验}} - A_{\text{对照}}) / A_2 \times 100 \quad (6)$$

1.3.7.3 FRAP 法 按照郭扬凯^[15]的方法进行测定,具体:取 1 mL NH 样品溶液、WP-NH 复合溶液分别与 4.5 mL 的 TPTZ 工作液振荡混合,37 °C 下避光处反应 10 min 后,于波长 593 nm 处测定样品的吸光度($A_{\text{测}}$)。同时,设置空白组($A_{\text{空白}}$)、对照组(A_3),按照同法分别进行反应。空白组以去离子水代替样品与 TPTZ 溶液反应,对照组以 4.5

mL 去离子水代替 TPTZ 溶液与样品进行反应。所有样品平行测定 6 次,各样品的铁离子还原力通过公式(7)计算。

$$\text{铁离子还原力}(\%) = (A_{\text{测}} - A_3 - A_{\text{空白}}) \times 100 \quad (7)$$

1.4 数据处理及统计分析

所有试验重复进行 3 次,结果用平均数±标准差表示,利用 Origin 2021 和 Excel 绘图。

2 结果与分析

2.1 NH 与 WP 相互作用的荧光光谱分析

由于蛋白质中含有一些芳香族氨基酸具有一些特殊的化学结构(如具有芳香族苯环以及共轭结构),而这些结构在一定的激发波长下能够发射荧光,因此蛋白质一般都具有固有的内源性荧光^[15]。图 2 显示,WP 在所固定的 280 nm 激发波长下,在 335.5 nm 的发射波长处具有最大发射峰,因不同芳香族氨基酸具有不同的生色团,其出现荧光峰的位置也不同,例如苯丙氨酸(Phe)在 282 nm 附近出现荧光峰,而酪氨酸(Tyr)和色氨酸(Trp)分别在 303 nm 和 348 nm 附近出现荧光峰^[16]。并且在蛋白质分子中,由于 Phe 残基所具有的荧光信号微乎其微且容易被猝灭,因此蛋白质中所具有的内源性荧光主要由 Tyr 和 Trp 提供^[17]。故该荧光峰较为接近色氨酸(Trp)的发射峰,故本试验中 WP 所具有的荧光峰主要是 Trp,所观察的荧光峰的变化也主要是 Trp 残基微环境的变化。同时,预试验中发现 NH 在该处的荧光发射信号非常弱,对 WP 的荧光信号基本不产生干扰,因此不需考虑荧光内滤效应的干扰。

图 2 显示了不同浓度 NH 与 WP 相互作用的荧光光谱。由图可知,不同温度(298, 304, 310 K)下,NH 的加入主要致使 WP 的荧光光谱产生两方面变化:荧光猝灭和荧光峰位移。加入 NH 后,WP 分子中所具有的荧光发射峰的形状基本未变,而最大发射波长处所具有的荧光强度发生了降低,且呈浓度依赖性。这表明 NH 与 WP 之间存在着相互作用,使得蛋白质的构象发生了变化,同时,NH 的加入诱使 WP 在 335.5 nm 处发生了轻微红移(1 nm)。研究表明,蛋白质分子中芳香族氨基酸所具有的发色基团本身以及周围的微环境发生变化,就会使蛋白质分子所具有的最大发射波长发

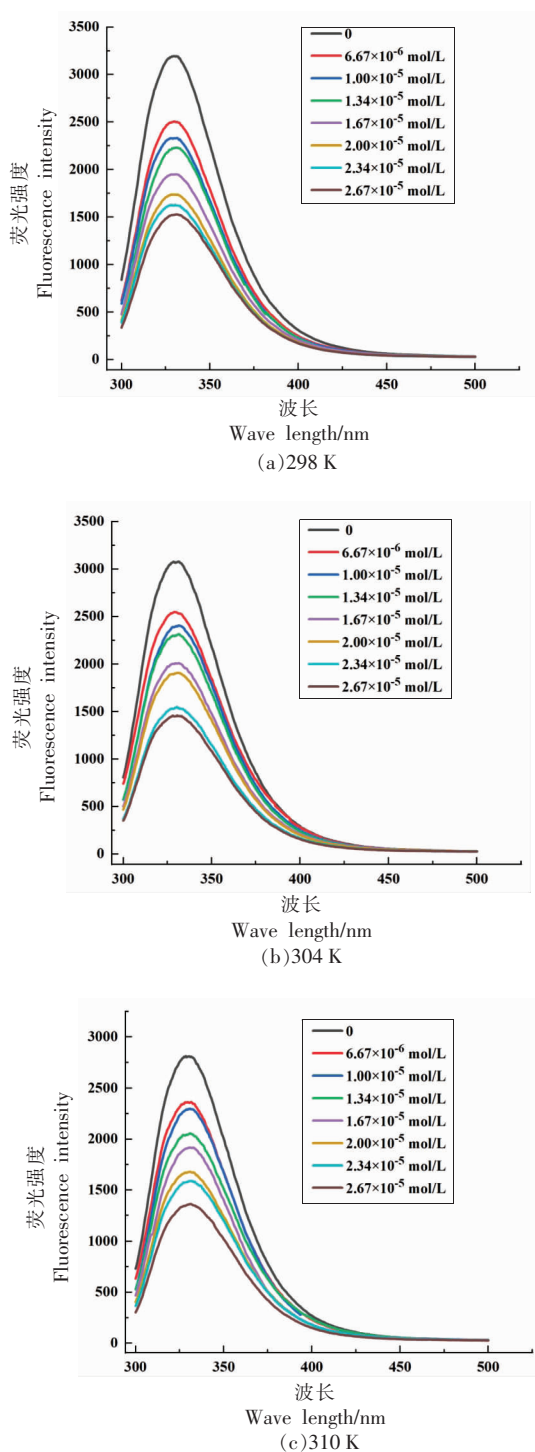


图 2 NH 与 WP 相互作用的荧光光谱
Fig.2 Fluorescence spectra of interaction
between NH and WP

生一定程度的移动^[18]。新橙皮苷加入后,WP 的荧光峰发生了 1 nm 的位移,表明 WP 分子中色氨酸残基的疏水性发生降低,而其极性和亲水性增强,

导致了色氨酸残基周围的微环境发生了变化,从而致使最大发射波长发生了变化^[8]。以上的结果表明,加入 NH 后形成了一种 NH-WP 复合物,而这种复合物不发射荧光,使得 WP 本身所具有的内源性荧光降低,改变了 WP 的构象以及使得 Trp 残基周围的微环境发生了改变。该结果与已有研究结果^[19-20]较为一致。Dai 等^[19]的研究发现原花青素二聚体与大米谷蛋白结合后改变了大米谷蛋白中氨基酸残基的微环境,形成了非荧光的大米谷蛋白-原花青素二聚体复合物使原有大米谷蛋白的内源荧光发生猝灭;Shu 等^[20]的研究发现芥酸加入能够与牛血清蛋白相互结合使牛血清蛋白中的构象发生改变,从而使牛血清蛋白中的内源荧光发生猝灭,荧光强度降低。

2.2 荧光猝灭机制研究

荧光猝灭机制主要有静态猝灭和动态猝灭 2 种^[21]。动态猝灭的 K_{sv} 随温度的增加而增大,是由小分子和蛋白之间发生相互碰撞而引起的,而静态猝灭的 K_{sv} 随温度的增加而降低,是由小分子与蛋白之间形成不发射荧光的复合体引起的^[22]。此外,动态猝灭的最大扩散猝灭常数为 $2.0 \times 10^{10} \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$ 。若 NH 对 WP 的荧光猝灭常数数值大于 $2.0 \times 10^{10} \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$,说明 NH 对 WP 的荧光猝灭类型是静态猝灭,反之,则是动态猝灭^[21]。

根据 Stern-Volmer 方程处理数据,作 $(F_0-F)/F$ 关于猝灭剂(NH)浓度 $[Q]$ 的图线得到图 3a,进而得到斜率 K_{sv} 和不同温度下的 K_q ,结果见表 1。

由图 3 可知,NH 与 WP 相互作用的 Stern-Volmer 曲线呈现出良好的线性关系($r > 0.98$)。由表 1 数据可知,此反应不同温度下的的 K_q 值分别为 3.67×10^{12} , 3.31×10^{12} , $3.04 \times 10^{12} \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$, K_q 值均大于最大扩散猝灭常数 $2.0 \times 10^{10} \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$,且猝灭常数与温度呈反比关系,因此认为,NH 通过静态猝灭的方式降低 WP 的荧光。

按照静态猝灭机理,利用公式(2)计算,处理试验数据,作 $\lg[(F_0-F)/F]$ 关于 $\lg[Q]$ 的图线得图 3b。曲线所代表的结合常数和结合位点数结果见表 1。由表中数据显示,在不同试验温度下的结合位点数均约等于 1,这表明 NH 与 WP 之间只有一个结合位点^[23],且结合常数 K_a 与随温度升高而增大,这说明 NH 与 WP 形成的复合物在较高的温

表1 在不同温度下的猝灭常数(K_{sv} 、 K_q)、结合位点数量(n)、结合常数(K_a)测定系数(R^2)Table 1 Quenching constants (K_{sv} , K_q), number of binding sites (n), binding constants (K_a), coefficient of determination (R^2) at different temperatures

T/K	$K_{sv}/(\times 10^4 \text{ L/mol})$	$K_q/[\times 10^{12} \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{s})]$	n	$K_a/(\times 10^5 \text{ L/mol})$	R^2
298	3.67	3.67	0.979	2.91	0.9843
304	3.31	3.31	0.998	2.99	0.9897
310	3.04	3.04	1.0745	7.54	0.9874

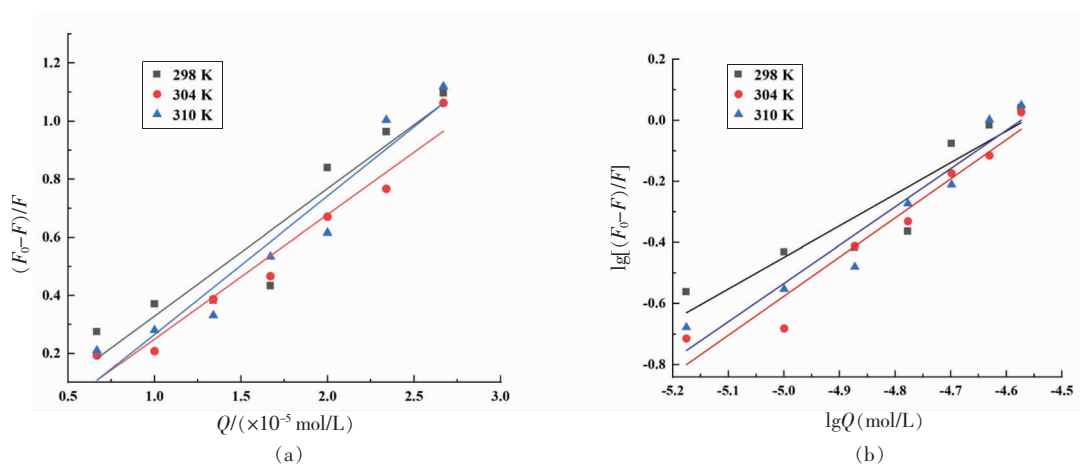


图3 NH与WP相互作用的Stern-Volmer曲线(a)和NH与WP相互作用的双对数曲线(b)

Fig.3 Stern-Volmer curve of the interaction between NH and WP (a) and double logarithmic curve of the interaction between NH and WP (b)

度下具有较好的稳定性。

2.3 热力学分析

蛋白质等生物大分子与小分子之间常通过疏水相互作用、静电相互作用、范德华力、氢键等非共价作用力结合。研究表明,可以根据热力学参数的符号和大小来判断蛋白质分子与小分子间结合力的类型。如果 ΔH 和 ΔS 均为正,说明疏水作用占主导;如果 ΔH 和 ΔS 一正一负且 ΔH 小于0,说明静电相互作用在两者中占主导;反之,说明二者相互作用中静电相互作用和疏水作用占主导;如果 ΔH 和 ΔS 同为负,说明范德华力或氢键在二者相互作用中占主导^[24]。

为确定在不同温度下的NH与WP的相互作用的结合力,利用式(3)和(4)计算热力学参数 ΔG 、 ΔS 和 ΔH ,结果见表2。

由表2可知:试验中的NH与WP相互作用中的 ΔG 为负,其余两者为正,说明WP-NH的结合过程主要与疏水相互作用有关。其中, $\Delta H > 0$,表明NH与WP的结合过程中吸收热量,温度越高

表2 NH与WP相互作用热力学参数

Table 2 Thermodynamic parameters of the interaction between neohesperidin and whey protein

T/K	$\Delta H/(\text{kJ/mol})$	$\Delta S/[\text{J}\cdot/(\text{kmol}\cdot\text{K})]$	$\Delta G/(\text{kJ/mol})$
298	60.91	0.32	-25.47
304			-26.06
310			-28.95

能量越高,越有利于两者的结合,这与 K_a 随着温度的升高而增加的结果一致。除此之外,表2显示不同温度下的吉布斯自由能变(ΔG)都是负值,表明NH与WP之间的反应是自发进行的^[11]。郭扬凯^[8]的研究发现橙皮苷与乳清蛋白相互作用中主要相互作用力为疏水相互作用,同时氢键也参与其中。由于两者分别为橙皮苷及其衍生物与乳清蛋白的相互作用,因此试验结果基本一致。疏水作用也被证实常存在于黄酮类多酚与蛋白质的相互作用中,如牛血清白蛋白^[25]、水稻蛋白^[26]、 β -乳球蛋白^[27]。

2.4 同步荧光光谱分析

图 4a 和图 4b 分别为在 $\Delta\lambda=15\text{ nm}$ 和 $\Delta\lambda=60\text{ nm}$ 条件下测得的 WP 中 Tyr 残基和 Trp 残基的同步荧光光谱。图 4 显示,未加入 NH 时, Tyr 残基在最大波长处的荧光强度显著低于 Trp 残基的荧光强度,由此推断,WP 的内源荧光主要是由色氨酸残基贡献^[28]。加入 NH 时,随着溶液中 NH 质量浓度的增加,这 2 种氨基酸残基的荧光强度都逐渐降低。此外,NH 的加入在一定程度上能引起最大波长的偏移。例如当 $\Delta\lambda=15\text{ nm}$ 时,随着 NH 浓度的增加,峰值从 290 nm 移至 292 nm,发生轻微红移,说明酪氨酸残基周围极性增加^[29];当 $\Delta\lambda=60\text{ nm}$ 时,峰值从 275 nm 降至 270 nm,发生蓝移,说明色氨酸残基周围疏水性增强,极性降低^[30]。

同步荧光光谱常用于监测蛋白与多酚结合前后的微环境变化^[12],而蛋白质构象的变化可以根据在固定波长下蛋白质同步荧光光谱的变化来判断。通常,最大吸收峰位置的变化可反映芳香族氨基酸残基所处极性微环境的变化。设定 $\Delta\lambda$ 为 60 nm 和 15 nm 时所得同步荧光光谱可分别表示 WP 中 Trp 和 Tyr 残基微环境的光谱特征。通常情况下,最大发射波长位置的变化可揭示 Tyr 或 Trp 残基周围极性微环境的变化,最大发射波长的红移表示 Trp 或 Tyr 残基周围的亲水性增加以及肽链的延伸程度增加;而蓝移表示 Trp 或 Tyr 残基周围的极性降低^[18]。以上表明 NH 与 WP 之间存在相互作用,且该作用改变了 WP 氨基酸残基的微环境,并改变了乳清蛋白的构象。

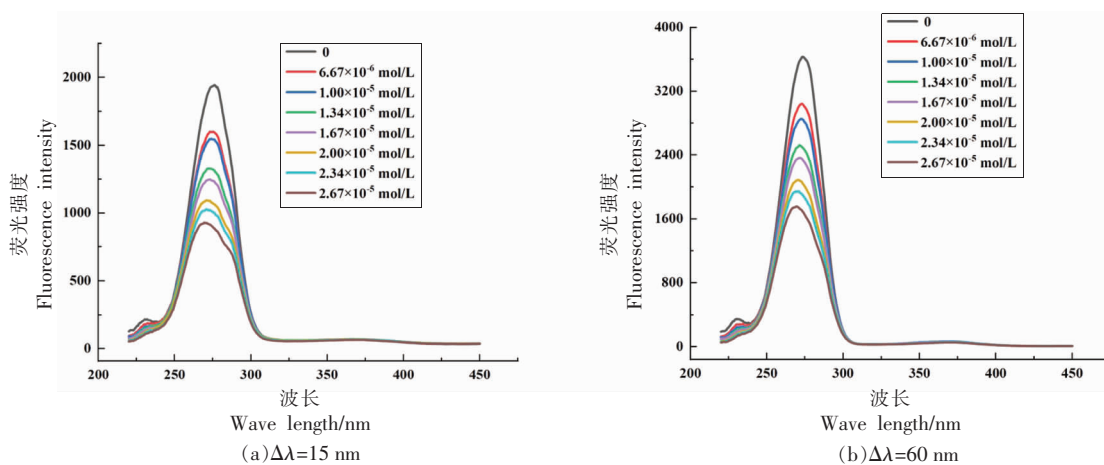


图 4 WP 与 NH 相互作用的同步荧光光谱

Fig.4 Synchronous fluorescence spectra of WP interacting with NH

2.5 分子对接模拟

分子对接模拟是判断受体和配体之间相互作用的有效工具。在本文的模拟中,NH 被选为配体,而 WP 中的 β -LG 被选为受体。 β -LG 与 NH 最可能的分子相互作用构象,被认为是具有最低能量分数的构象,如图 5 所示。3D 分子对接模式(图 5a)和 2D 相互作用图(图 5c)表明 NH 将自身通过疏水作用插入 β -LG 的疏水空腔中。NH 主要被 15 个氨基酸残基包围,包括 Glu114、Pro144、Pro113、Leu117、Ser27、Lys138、Gln5、Ala139、Leu95、Ala142、Cys106、Leu143、Leu93、Glu108、Lys91。NH 通过疏水作用力与 β -LG 中的 Leu143、Ala142、Ala139、Gln5 结合。此外,Glu114 和 NH 的羟基之

间存在 2 个氢键。以范德华力与 β -LG 结合的氨基酸残基有 Pro144、Pro113、Leu117、Ser27、Lys138、Leu95、Cys106、Leu93、Glu108、Lys91。范德华力的作用力虽然相对较弱,但对维持 NH-WP 的稳定起到支撑作用。NH 被氨基酸残基形成的疏水口袋包裹着,主要通过疏水作用力与 WP 形成复合物,使 WP 发生静态猝灭,这与荧光和热力学得出的结论基本一致。

2.6 抗氧化活性研究

生物样品的总抗氧化能力常用 ABTS 自由基清除法测定,它由 Miller 等建立,具有操作简单、快速、高通量等优点^[31-33]。由图 6 可知,未加 NH 时 WP 的 ABTS 自由基清除率为 13.32%,与 NH 非

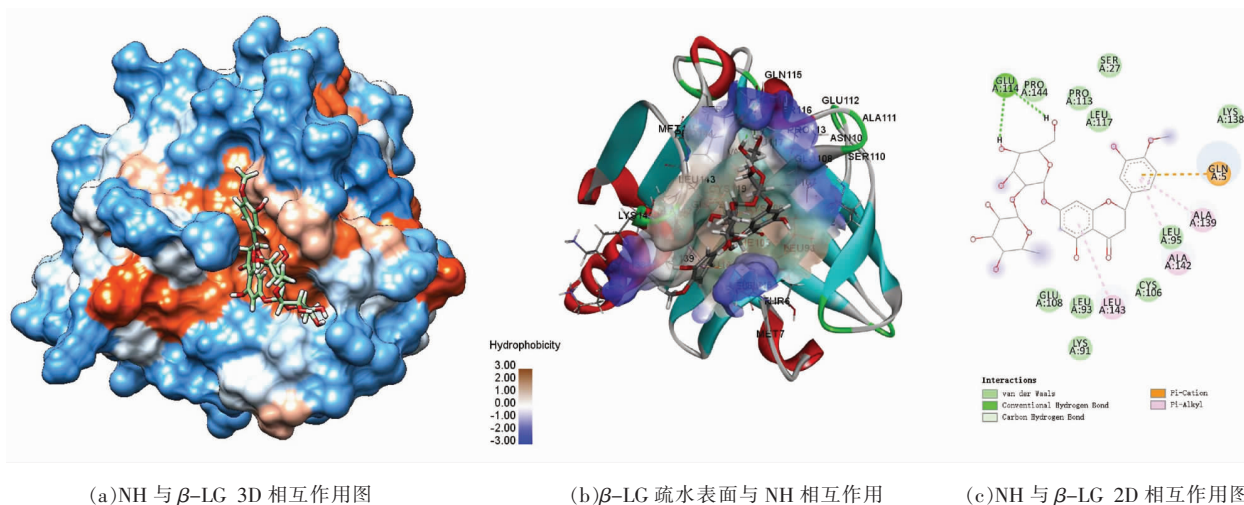


图5 NH与WP相互作用分子对接图

Fig.5 Molecular docking diagram of NH-WP interaction

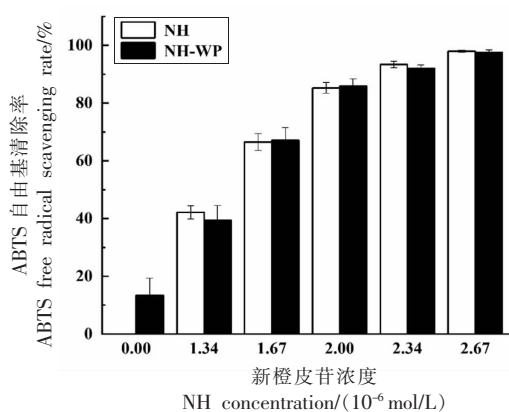


图6 ABTS法测定WP-NH的抗氧化活性

Fig.6 Determination of antioxidant activity of WP-NH by ABTS

共价结合之后,复合物的ABTS自由基清除率增加,说明加入NH可以改善WP的抗氧化能力。且随着NH浓度的增加,NH-WP复合物的抗氧化活性呈整体上升趋势,可能是多酚与蛋白质相互结合后,NH分子中的酚羟基具有更强的自由度而表现出较强的抗氧化活性^[34]。

DPPH自由基清除法相比其它抗氧化检测方法来说,更为快速、简单^[35],故其常被用来测定物质的总抗氧化能力。波长523 nm约为DPPH的吸收带最大值,其分子的离域性使之出现紫色。DPPH与氢供体相互作用时,可生成还原形式的DPPH分子,同时紫色消失。

由图7a所示,其中DPPH法测定的未加NH样品的对照WP组,其自由基清除率为12.26%,加入NH后的复合物组的抗氧化活性明显升高,且与NH浓度呈剂量依赖性关系。在相同NH浓度下,复合物的自由基清除能力小于游离NH的测定值,这可能是由于WP与NH的结合,降低了NH的游离程度,导致NH分子中的部分酚羟基自由度降低,致使其抗氧化活性低于游离NH^[36]。吕丹丹等^[37]的研究显示游离态的核桃多酚对DPPH的自由基清除率高于其它结合方式的自由基清除率。多酚与蛋白质间相互作用是疏水作用为主要驱动力的结合,并由二者间的氢键维持稳定。结合效果与多酚的疏水性密切相关,并取决于多酚的结构特点,如:酚羟基的数量、位置,糖苷位置、空间结构。郭杨凯^[38]的研究也表明加入橙皮苷后WP的抗氧化性得到显著提高,结合后复合物的自由基清除能力比游离橙皮苷的自由基清除能力低,可能是结合导致橙皮苷的游离程度降低,与本试验的结果一致。

FRAP法依赖于铁离子-TPTZ复合物被抗氧化剂还原的能力^[38],其还原能力的高低可通过测定样品在波长593 nm处的吸光度大小判断,这种方法操作简单,重现性好,也是常用的抗氧化活性检测方法。由图7b可知,未加多酚的WP组,其铁离子还原力为0.29%。相较于对照WP组,用FRAP方法测定的NH-WP复合物依然表现出较

强的抗氧化性。同时结果显示,复合物的抗氧化性显著提高,且随着 NH 浓度的增大而增大,而又低于相同浓度下游离 NH 的测定值。试验结果表明

NH 与 WP 的结合会明显降低复合物的抗氧化能力,该结果与 DPPH 法的试验结果一致。

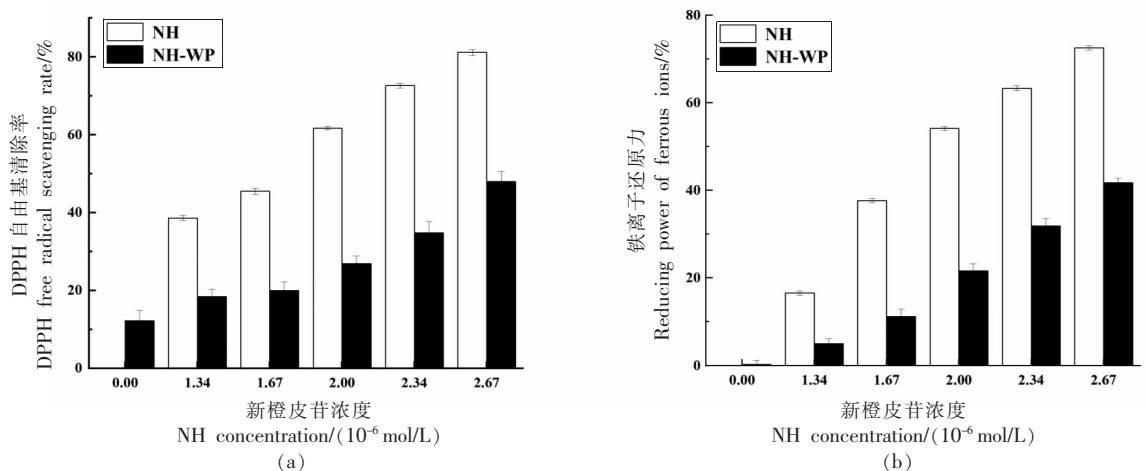


图 7 DPPH 法(a)、FRAP 法(b)测定 WP-NH 的抗氧化活性

Fig.7 The antioxidant activity of WP-NH was determined by DPPH (a) and FRAP (b)

3 结论

本研究利用 WP 和 NH 制备了非共价复合物,综合采用荧光光谱、同步荧光光谱,结合热力学分析以及分子对接模拟较为全面地研究了 NH 与 WP 的相互作用及作用机制,结果表明 NH 与 WP 之间可以按照物质的量比 1:1 的形式相互作用并通过静态猝灭的方式降低 WP 的内源荧光, NH-WP 之间主要是通过疏水作用进行结合,并且 NH 与 WP 之间的反应是自发进行的, NH 可引起 WP 中芳香族氨基酸微环境的变化。对 NH-WP 的抗氧化性的研究显示 NH 可以显著提高 WP 的抗氧化性,其抗氧化性随着 NH 浓度的增加而增加,呈现剂量依赖作用。WP-NH 复合物的抗氧化性虽然比添加同浓度的游离多酚抗氧化性低,但是其复合物始终表现出比原始蛋白质更强的抗氧化活性。NH 的引入对 WP 其它活性的影响作用(乳化性、热稳定性、起泡性等)以及 NH-WP 在食品领域(乳液、脂肪粒等)的进一步有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 马雪琴, 李辰, 袁林华, 等. 枳实总黄酮提取物中柚皮苷和新橙皮苷的大鼠药代动力学[J]. 中国医科
- [2] BRIX S, BOVETTO L, FRITSCHÉ R, et al. Immunostimulatory potential of β -lactoglobulin preparations[J]. The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2003, 112(6): 1216-1222.
- [3] 周衍香, 刘中洋. 乳清蛋白在慢性消耗性疾病营养支持中的应用[J]. 中国食物与营养, 2019, 25(9): 83-86.
- [4] 马彬. 食物中乳清蛋白对高强度运动能力的促进作用分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(24): 8424-8431.
- [5] 杨若愚. 乳清蛋白与运动营养[J]. 中国科技信息, 2008(23): 272, 274.

大学学报, 2013, 44(2): 161-166.

MA X Q, LI C, YUAN L H, et al. Pharmacokinetics of naringin and neohesperidin in the total flavanones of Zhishi extract in rats[J]. Journal of China Pharmaceutical University, 2013, 44(2): 161-166

ZHOU Y X, LIU Z Y. The application of whey protein in nutritional support for chronic wasting diseases[J]. Food and Nutrition in China, 2019, 25(9): 83-86.

MA B. Analysis of the promoting effect of whey protein in food on high strength exercise ability[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2019, 10(24): 8424-8431.

YANG R Y. Whey protein and sports nutrition[J]. China Science Information, 2008(23): 272, 274.

- YANG R Y. Whey protein and sports nutrition[J]. China Science and Technology Information, 2008 (23): 272, 274.
- [6] 覃思. 茶多酚对蛋白质起泡性能和乳化性能的影响及典在蛋糕中的应用[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2006.
- QIN S. Effect of tea polyphenols on foaming and emulsifying properties of egg nuts and its application in cake[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2006.
- [7] 郑敏. 表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)对乳清分离蛋白的改性作用研究[D]. 杭州: 中国计量学院, 2014.
- ZHENG M. Modification the structure and functional properties of whey protein isolate with (-)-epigallocatechin-3-gallate(EGCG)[D]. Hangzhou: China Jiliang University, 2014.
- [8] 郭扬凯. 基于乳清蛋白-橙皮苷复合物纳米乳液的构建及其稳定性研究[D]. 南昌: 江西科技师范大学, 2021.
- GUO Y K. Study on the construction and stability of nanoemulsion based on whey protein-hesperidin complex[D]. Nanchang: Jiangxi Science and Technology Normal University, 2021.
- [9] 刘蓉. 新橙皮苷与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 饮食科学, 2017(8): 43-44, 47.
- LIU R. Interaction between neohesperidin and bovine serum albumin[J]. Diet Science, 2017(8): 43-44, 47.
- [10] JIANG H H, HU X, PAN J H, et al. Effects of interaction between hesperetin/hesperidin and glutenin on the structure and functional properties of glutenin [J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 155: 112983.
- [11] 岳鑫. 红松种鳞多酚稳定性及其与乳清蛋白相互作用的研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2019.
- YUE X. Study on stability of polyphenols from *Pinus koraiensis* seed scales and its interaction with whey protein [D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2019.
- [12] 刘雪梅, 王华敏, 赵利, 等. 橙皮苷、柚皮苷与酪蛋白相互作用机制比较分析[J]. 食品科学, 2023, 44 (4): 162-170.
- LIU X M, WANG H M, ZHAO L, et al. Comparative study on interaction mechanism between hesperidin, naringin and casein [J]. Food Science, 2023, 44(4): 162-170.
- [13] 蒋变玲, 王志花, 张东京, 等. 四种柑橘果皮主要活性物质测定和抗氧化能力对比研究[J]. 阜阳师范大学学报(自然科学版), 2021, 38(1): 51-56.
- JIANG B L, WANG Z H, ZHANG D J, et al. Determination of main bioactive compounds and comparison of antioxidant capacity of four cultivars of citrus peels[J]. Journal of Fuyang Normal University(Natural Science), 2021, 38(1): 51-56.
- [14] 张田. 大豆蛋白与绿茶多酚相互作用对方便食品品质及抗氧化性的影响[J]. 粮食与油脂, 2021, 34(2): 67-70.
- ZHANG T. Effect of interaction between soybean protein and green tea polyphenols on quality and antioxidant activity of instant noodles[J]. Cereals & Oils, 2021, 34(2): 67-70.
- [15] 岳鑫, 包怡红. 基于荧光及紫外光谱法对红松种鳞多酚与乳清蛋白相互作用的研究[J]. 现代食品科技, 2019, 35(7): 114-120.
- YUE X, BAO Y H. Interaction between the polyphenols from *Pinus koraiensis* seeds scale and whey protein studied by fluorescence and ultraviolet spectroscopy[J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 35(7): 114-120.
- [16] 刘勤勤, 朱科学, 郭晓娜, 等. 茶多酚与大豆分离蛋白的相互作用[J]. 食品科学, 2015, 36(17): 43-47.
- LIU Q Q, ZHU K X, GUO X N, et al. Spectroscopic analysis of interaction between tea polyphenol and soy protein isolate[J]. Food Science, 2015, 36 (17): 43-47.
- [17] 王安萍. 几种天然药物黄酮类活性成分与蛋白质相互作用的研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2007.
- WANG A P. Study on the interaction between some flavonoids active components in natural products and proteins[D]. Nanchang: Nanchang University, 2007.
- [18] 刘璐. 糖皮质激素与牛血清白蛋白相互作用机制的研究: 代谢物、联用药物的影响[D]. 锦州: 渤海大学, 2021.
- LIU L. Study on the mechanism of action between glucocorticoids and bovine serum albumin: Effects of metabolites and combination drugs[D]. Jinzhou: Bohai University, 2021.
- [19] DAI T, CHEN J, MCCLEMENTS D J, et al. Protein-polyphenol interactions enhance the antioxidant capacity of phenolics: Analysis of rice glutelin-pro-

- cyanidin dimer interactions [J]. *Food & Function*, 2019, 10(2): 765–774.
- [20] SHU Y, XUE W W, XU X Y, et al. Interaction of erucic acid with bovine serum albumin using a multi-spectroscopic method and molecular docking technique[J]. *Food Chemistry*, 2015, 173: 31–37.
- [21] 徐洁琼. 乳蛋白与茶多酚的相互作用及茶多酚生物可及性的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2017.
- XU J Q. Study on the milk protein-tea polyphenol interactions and tea polyphenol bioaccessibility [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2017.
- [22] 邹淑君, 张蕾, 郭迎喜, 等. 橙皮素及橙皮苷与牛血清白蛋白作用的比较[J]. *中医药信息*, 2014, 31(2): 8–12.
- ZOU S J, ZHANG L, GUO Y X, et al. Comparative study on the interaction of hesperetin and hesperidin with bovine serum albumin[J]. *Information on Traditional Chinese Medicine*, 2014, 31(2): 8–12.
- [23] TANG L, LI S, BI H, et al. Interaction of cyanidin-3-O-glucoside with three proteins [J]. *Food Chemistry*, 2016, 196: 550–559.
- [24] 张蕊, 吴超仪, 刘宇, 等. 分子对接和荧光光谱法研究麦角甾醇与牛血清蛋白的相互作用[J]. *食品科学*, 2015, 36(23): 38–42.
- ZHANG R, WU C Y, LIU Y, et al. Studies on the interaction of ergosterol with bovine serum albumin (BSA) by fluorescence spectroscopy and molecular docking[J]. *Food Science*, 2015, 36(23): 38–42.
- [25] SOBH Y R, ZHAN F, MEKAWI E, et al. The noncovalent conjugations of bovine serum albumin with three structurally different phytosterols exerted antiglycation effects: A study with AGEs-inhibition, multispectral, and docking investigations [J]. *Bioorganic Chemistry*, 2020, 94: 103478.
- [26] DAI T T, LI R Y, LIU C M, et al. Effect of rice glutelin-resveratrol interactions on the formation and stability of emulsions; A multiphotonic spectroscopy and molecular docking study[J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 97: 105234–105234.
- [27] HE Z Y, XU M Z, ZENG M M, et al. Interactions of milk α - and β -casein with malvidin-3-O-glucoside and their effects on the stability of grape skin anthocyanin extracts[J]. *Food Chemistry*, 2016, 199: 314–322.
- [28] 王舒雅, 赵靖响, 代亚磊, 等. 鱼皮明胶和多酚组
- 装行为与相互作用[J]. *食品科学*, 2021, 42(14): 1–8.
- WANG S Y, ZHAO J Y, DAI Y L, et al. Assembly behavior and interaction between fish skin gelatin and polyphenols[J]. *Food Science*, 2021, 42(14): 1–8.
- [29] 郝明皓. 三种多酚与 β -酪蛋白及 β -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 β -casein and β -lactoglobulin[D]. Jinan: Shandong Normal University, 2019.
- [30] 毕红娜. 盐酸四环素与三种牛乳蛋白及 β -半乳糖苷酶相互作用机制的研究[D]. 济南: 山东师范大学, 2017.
- BI H N. Study on the interaction mechanism of tetracycline hydrochloride with three kind of milk protein and β -galactosidase[D]. Jinan: Shandong Normal University, 2017.
- [31] KANG W Y, WANG J M. *In vitro* antioxidant properties and *in vivo* lowering blood lipid of Forsythia suspense leaves [J]. *Medicinal Chemistry Research*, 2010, 19(7): 617–628.
- [32] 张逸波, 郑文杰, 黄峙, 等. 硒杂环化合物 SPO 清除 DPPH 和 ABTS 自由基的光谱学研究[J]. *光谱学与光谱分析*, 2010, 30(7): 1866–1871.
- ZHANG Y B, ZHENG W J, HUANG Z, et al. Spectroscopic investigation of the antioxidant activity of a novel synthetic selenadiazole derivative SPO against DPPH and ABTS free radicals[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2010, 30(7): 1866–1871.
- [33] ALONSO A M, DOMINGUEZ C, GUILLEN D A, et al. Determination of anti-oxidant power of red and white wines by a new electrochemical method and its correlation with polyphenolic content[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50: 3112–3115.
- [34] 陈春玉, 李毅, 黄超明, 等. 新橙皮苷的制备工艺及应用进展[J]. *天然气化工(C1化学与化工)*, 2014, 39(3): 81–87.
- CHEN C Y, LI Y, HUANG C M, et al. Advances in preparation and application of neohesperidin [J]. *Natural Gas Chemical Industry*, 2014, 39(3): 81–87.
- [35] 陈志飞. 蛋清抗氧化肽对 HEK293 细胞氧化应激损伤的抑制作用及机制研究[D]. 长春: 吉林大学, 2015.
- CHEN Z F. The anti-oxidative effects and mecha-

- nism of antioxidant peptides from egg white against oxidative stress injury in human embryonic kidney 293 cells[D]. Changchun: Jilin University, 2015.
- [36] DAI T T, LI T, LI R Y, et al. Utilization of plant-based protein-polyphenol complexes to form and stabilize emulsions: Pea proteins and grape seed proanthocyanidins [J]. *Food Chemistry*, 2020, 327: 127219.
- [37] 吕丹丹, 毛晓英. 核桃多酚与蛋白质的作用方式及其抗氧化活性[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(13): 23-28.
- LÜ D D, MAO X Y. Interaction between walnut polyphenols and protein and its antioxidant activity [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(13): 23-28.
- [38] 眭银花. 儿茶素与血浆蛋白质的相互作用及复合物抗氧化作用的研究[D]. 南昌: 江西师范大学, 2020.
- SUI Y H. The interaction between catechin and plasma proteins and the antioxidant effect of complex[D]. Nanchang: Jiangxi Normal University, 2020.

Effect of Neohesperidin on the Antioxidant Activity of Whey Protein

Ma Songbo, Xu Yan, Liu Lu, Feng Jiaojiao, Zhao Li, Bai Chunqing*

(College of Life Sciences, Jiangxi Science and Technology Normal University, Nanchang 330013)

Abstract In this work, neohesperidin (NH) and whey protein (WP) complex (NH-WP) was prepared to explore the possibility of enhancing the antioxidant activity of whey protein (WP). The non-covalent interaction mechanism of NH with WP was studied in terms of fluorescence spectroscopy, synchronous fluorescence spectroscopy, thermodynamic analysis and molecular docking simulation. The antioxidant activity of NH-WP was also analyzed by a series of common used methods. The results showed that the endogenous fluorescence of WP could be statically quenched by NH, which changed the microenvironment of aromatic amino acids in WP. Non-covalent interactions between NH and WP lead to the formation of NH-WP complexes, characterized by a negative ΔG , positive ΔS , and positive ΔH , suggesting an endothermic and spontaneous process primarily driven by hydrophobic forces. There was only one binding site between them and the complex was formed by combining them at a ratio of 1:1. In addition, the antioxidant activity of NH-WP complex was lower than that of free NH at the same concentration, but higher than that of the pure protein, what's more, the antioxidant activity of WP exhibited dose-dependent effect with the increase of NH addition, suggesting that the introducing of NH could effectively improve the antioxidant activity of WP. This research could enrich the theoretical basis of the interaction between WP and polyphenols, and provide good reference basis for improving functional properties of proteins as well as widening the application of NH and WP in the field of food and medicine.

Keywords neohesperidin; whey protein; antioxidant activity; interaction; molecular docking