

咖啡酸与乳蛋白结合的光谱特性及结合物抗氧化活性变化

余丹丹¹, 张昊^{1,2*}, 丁庆波³, 郭慧媛^{1*}, 吴建平⁴, 张录达¹, 任发政¹

1. 中国农业大学农业部功能乳品重点实验室, 北京 100083
2. 畜产品北京市高等学校工程研究中心, 北京 100083
3. 中粮集团有限公司, 北京 100020
4. University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada

摘要 利用紫外光谱和荧光光谱技术评价了咖啡酸与乳蛋白(α -酪蛋白、 β -酪蛋白、 κ -酪蛋白、 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白)两者结合的结合常数、结合作用力、结合距离以及能量转移效率, 通过二苯代苦味酰基(DPPH)自由基清除率和铁离子还原能力(FRAP)对两者结合导致的抗氧化活性变化进行了测定。结果表明咖啡酸会使乳蛋白发生内源性荧光猝灭。吉布斯自由能变 $\Delta G < 0$, 表明反应是自发进行的。其中咖啡酸与 α -酪蛋白之间以静电引力结合($\Delta H < 0$, $\Delta S > 0$), 与 β -酪蛋白、 α -乳白蛋白的结合作用力为氢键($\Delta H < 0$, $\Delta S < 0$), 与 κ -酪蛋白、 β -乳球蛋白是以疏水作用力结合($\Delta H > 0$, $\Delta S > 0$)。两者结合距离 $r_0 < 7$ nm, 符合非辐射能量转移条件, 证明咖啡酸对乳蛋白的荧光猝灭是由于生成不发光的配合物而引起的静态猝灭。此外, 两者结合导致咖啡酸的抗氧化能力受到不同程度的抑制。

关键词 咖啡酸; 乳蛋白; 结合; 荧光及紫外光谱; 抗氧化

中图分类号: O657.3 **文献标识码**: A **DOI**: 10.3964/j.issn.1000-0593(2012)04-1061-07

引言

咖啡酸是多酚类物质中一种重要的酚酸, 广泛存在于水果及蔬菜中, 具有较强的抗氧化和抗病毒活性。牛乳中蛋白质主要由 α -酪蛋白、 β -酪蛋白、 κ -酪蛋白构成的酪蛋白及 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白构成的乳清蛋白组成。目前, 在我国饮料市场中果汁乳饮料以独特的营养美味占据着重要的地位, 但果汁中常见的咖啡酸和乳蛋白可能会发生相互作用。已有研究表明蓝莓汁和牛奶同时被人体摄入时会降低蓝莓汁的抗氧化活性^[1]。Arts等研究得出黄酮类物质与血浆蛋白作用后, 黄酮的抗氧化活性降低^[2], 且Haishadrai等也发现牛血清白蛋白与绿原酸因共价结合导致牛血清白蛋白结构的改变^[3]。我们基于以上研究推断乳蛋白与咖啡酸可能存在相互作用, 改变蛋白构象, 并会影响咖啡酸的抗氧化活性。

乳蛋白的荧光来源是芳香族氨基酸上的芳香环^[4], 蛋白荧光强度的变化可以反应其构象的改变, 因此可以利用光谱技术研究多酚类小分子与蛋白间的交互作用^[5]。本实验采用荧光光谱法和紫外吸收光谱研究乳蛋白与咖啡酸相互作用的

光谱特征, 计算乳蛋白与咖啡酸的结合常数、结合位点数和结合距离, 由热力学参数分析乳蛋白与咖啡酸之间的结合作用力, 并以DPPH及FRAP法作为抗氧化指标评价乳蛋白对咖啡酸抗氧化活性的影响。

1 实验部分

1.1 仪器和材料

UV-2102型紫外-可见分光光度计(上海尤尼柯仪器有限公司), RF-5301 PC型荧光分光光度计(日本岛津公司), DELTA 320型pH计(美国梅特勒-托利多公司), CARY Eclipse型荧光分光光度计(美国瓦里安公司)。

α -酪蛋白、 β -酪蛋白、 κ -酪蛋白、 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白、咖啡酸、2,4,6-三(2-吡啶基)三嗪(TPTZ)以及二苯代苦味酰基(DPPH)试剂均购自美国Sigma公司, 其他所用试剂均为分析纯, 实验所用水为灭菌双蒸水, 经检测无荧光杂质。

1.2 咖啡酸与乳蛋白结合的荧光及紫外光谱研究

以Tris-HCl缓冲溶液(pH 7.4, 含 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl

收稿日期: 2011-07-13, 修订日期: 2011-10-10

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划项目(2011BAD09B03), 北京市重大科技计划项目(D10110504600000)资助

作者简介: 余丹丹, 女, 1990年生, 中国农业大学食品科学与营养工程学院本科生 e-mail: 814042164@qq.com

*通讯联系人 e-mail: zhanghaocau@foxmail.com; guohuiyuan99@gmail.com

维持溶液的离子强度)为溶剂配制 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的乳蛋白溶液备用, 咖啡酸用双蒸水配成 $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的标准溶液备用。于 5 mL 离心管中分别加入 2 mL 乳蛋白标准溶液, 再加入一定量咖啡酸溶液, 使最终制得溶液中咖啡酸的浓度分别为 0.25×10^{-5} , 0.5×10^{-5} , 1×10^{-5} , 2×10^{-5} , 3×10^{-5} , 4×10^{-5} , 5×10^{-5} , $6 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 将上述反应体系置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中 2 h^[6, 7]。分别在 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 及 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下, 激发波长 281 nm, 狭缝宽度 5 nm, 在 300~450 nm 范围内测定反应液的荧光发射光谱, 每组重复 3 次, 每次取样 200 μL , 以只含咖啡酸的溶液作为空白对照。紫外光谱方面, 以 pH 7.4 Tris-HCl 缓冲溶液为溶剂配制 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的咖啡酸溶液, 室温下扫描 300~450 nm 范围内的 UV 吸收光谱^[8]。

1.3 抗氧化活性测定

1.3.1 DPPH 法

DPPH· 在有机溶剂乙醇中是一种稳定的自由基, 其孤对电子在 517 nm 附近有强吸收(显深紫色)。当有自由基清除剂存在时, 孤对电子被配对, 吸收消失或减弱, 通过测定吸收减弱的程度, 可评价自由基清除剂的活性。称取 0.039 4 g DPPH 以无水乙醇定容至 1 000 mL 作为 DPPH 工作液。以超纯水配制的 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 咖啡酸溶液及乳蛋白与咖啡酸质量比 20 : 1 的混合组溶液作为待测物, 取 2 mL DPPH 工作液加入待测物 100 μL , 避光静置 30 min, 517 nm 处测定吸光度, 以加入 100 μL 超纯水作为空白对照, 每个样品测定三次^[9], 样品的 DPPH 自由基清除率计算公式如下

$$K(\%) = (1 - A_i/A_0) \times 100$$

式中, K 为样品对 DPPH 自由基的清除率, A_i 为加入待测物的吸光度, A_0 为加入超纯水的吸光度。

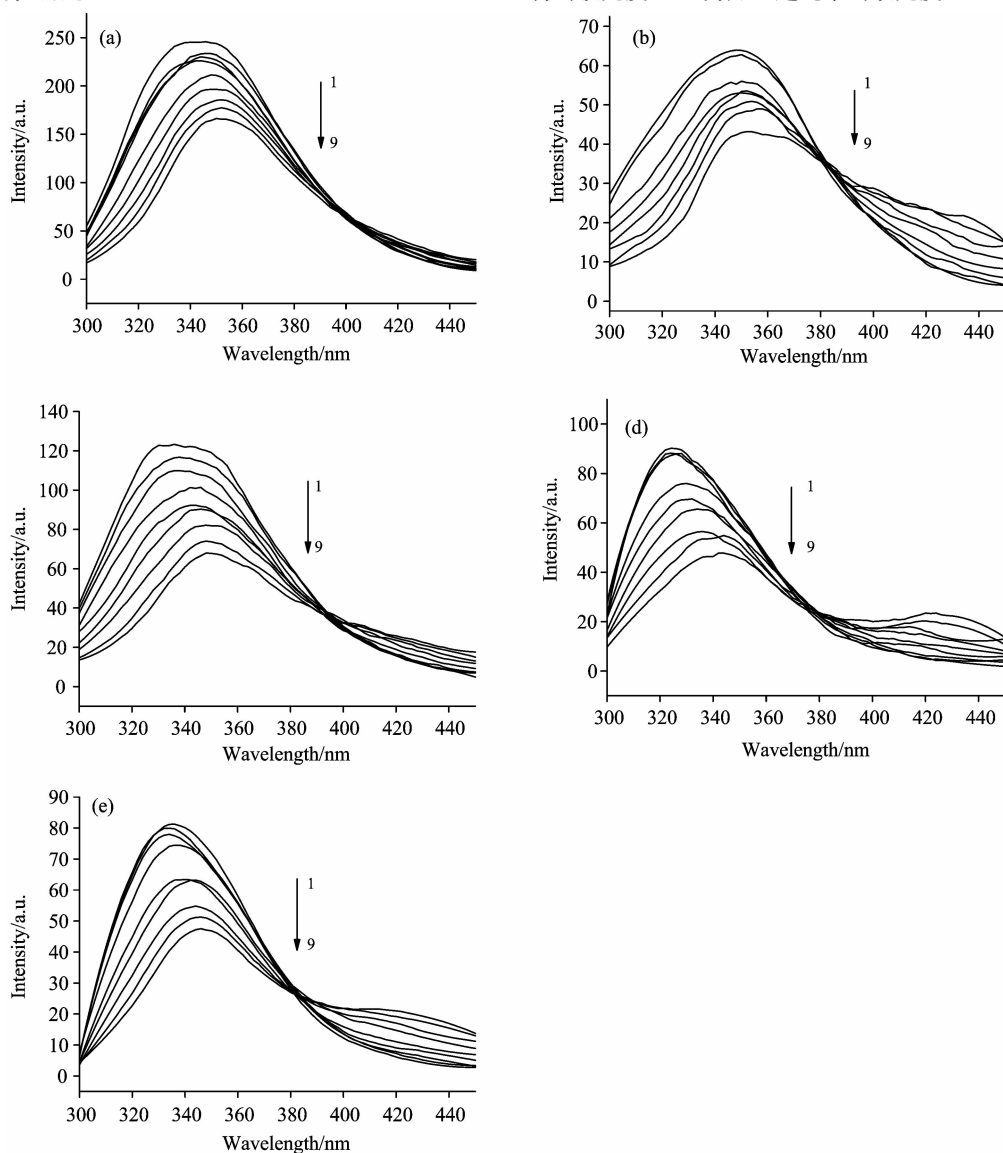


Fig. 1 Fluorescence quenching spectra of milk protein (MP) by caffeic acid (CA) ($25 \text{ }^\circ\text{C}$)

$c_{\text{MP}} = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $c_{\text{CA}} = 0, 0.25 \times 10^{-5}, 0.5 \times 10^{-5}, 1 \times 10^{-5}, 2 \times 10^{-5}, 3 \times 10^{-5}, 4 \times 10^{-5}, 5 \times 10^{-5}, 6 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (from 1 to 9), (a)—(e) stands for the spectra of caffeic acid with α -Casein, β -Casein, κ -Casein, α -Lactalbumin, β -Lactoglobulin, respectively

1.3.2 FRAP法

Fe^{3+} -吡啶三吡啶可被样品中还原物质还原为二价铁形式, 呈现出蓝色, 并于 593 nm 处具有最大吸收, 根据吸光度大小计算样品抗氧化活性的强弱。(1)称取 1.55 g 三水合乙酸钠加入 8 mL 冰醋酸, 以超纯水定容至 500 mL; (2)称取 0.312 4 g TPTZ, 加入 330 μL 浓盐酸, 以超纯水定容至 100 mL; (3)称取 0.162 1 g FeCl_3 , 加入 30 mL 超纯水溶解摇匀。以上三种溶液按体积 10:1:1 比例混合配制成 FRAP 工作液。以超纯水配制的 0.05 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 咖啡酸溶液及乳蛋白与咖啡酸质量比 20:1 的混合组溶液作为待测物, 取 2 mL FRAP 工作液加入待测物 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 中放置 10 min, 于 593 nm 处测定吸光度。每个样品测定三次^[10]。

1.4 数据分析

本实验中, 荧光及紫外光谱谱图使用 Origin 8.0 软件处理作图。抗氧化指标结果表示为平均数士标准差, 测定结果采用 SPSS 17.0 软件中独立样本均值 T 检验比较咖啡酸与咖啡酸-牛奶蛋白结合物的抗氧化活性, $p < 0.01$ 认为具有极显著差异。

2 结果与讨论

2.1 咖啡酸与乳蛋白结合的荧光光谱

乳蛋白中存在色氨酸和酪氨酸残基, 受到特定的光激发后会发射一定强度的荧光^[8]。在乳蛋白浓度一定的条件下, 逐渐增加咖啡酸溶液的浓度, 得到室温下的荧光猝灭光谱图如图 1 所示, 结果表明五种乳蛋白的荧光强度均随咖啡酸溶液浓度的增加而降低, 并且峰值对应的发射波长也有红移现象, 说明色氨酸残基附近的结合腔中疏水性下降, 乳蛋白的二级结构发生了改变^[11]。通过比较几种乳蛋白的猝灭情况可知, 最大浓度的咖啡酸引起 α -酪蛋白、 β -酪蛋白的猝灭率为 39%, κ -酪蛋白 51%, α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白 62%, 猝灭率的不同可能与咖啡酸-乳蛋白的反应程度有关。

2.2 咖啡酸引起乳蛋白荧光猝灭的类型

猝灭过程实际上是与发光过程相互竞争从而缩短发光分子激发态寿命的过程, 猝灭过程可能发生于猝灭剂与荧光物质的激发态分子之间的相互作用, 也可能发生于猝灭剂与荧

光物质的基态分子之间的相互作用, 前一种过程为动态猝灭, 后一种过程为静态猝灭^[8]。荧光分子与猝灭剂之间的猝灭效率服从 Stern-Volmer 方程

$$F_0/F = 1 + K_Q t_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q]$$

式中, F_0 和 F 分别为荧光分子与猝灭剂作用前后的荧光强度, $[Q]$ 为猝灭剂浓度, t_0 为猝灭剂不存在时荧光分子的寿命 (10^{-8} s), K_Q 为双分子猝灭过程的猝灭常数, K_{SV} 为 Stern-Volmer 常数^[12]。

不同温度下咖啡酸-乳蛋白 Stern-Volmer 方程的表达式如表 1 所示, 当 K_Q 大于最大动态扩散猝灭常数 $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 时认为是静态猝灭, 本实验得到的 K_Q 均是 $10^{12} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 数量级, 从而表明猝灭类型属于静态猝灭, 荧光分子和猝灭剂之间形成不发光的基态配合物^[13, 14]。

Table 1 The Stern-Volmer equation of the combinations at different temperature

结合物	25 $^{\circ}\text{C}$	37 $^{\circ}\text{C}$
咖啡酸- α -酪蛋白	$F_0/F = 1 + 1.0966[Q]$	$F_0/F = 1 + 10.148[Q]$
咖啡酸- β -酪蛋白	$F_0/F = 1 + 10.254[Q]$	$F_0/F = 1 + 10.023[Q]$
咖啡酸- κ -酪蛋白	$F_0/F = 1 + 19.499[Q]$	$F_0/F = 1 + 20.279[Q]$
咖啡酸- α -乳白蛋白	$F_0/F = 1 + 23.164[Q]$	$F_0/F = 1 + 22.649[Q]$
咖啡酸- β -乳球蛋白	$F_0/F = 1 + 21.071[Q]$	$F_0/F = 1 + 21.874[Q]$

2.3 咖啡酸与乳蛋白的结合常数及结合位点数

咖啡酸对乳蛋白的猝灭类型为静态猝灭, 二者的结合符合荧光物质-猝灭剂间的结合表达式

$$\log(F_0 - F)/F = \log K_A + n \log [Q]$$

式中 $[Q]$ 为咖啡酸溶液的浓度, K_A 为结合常数, n 为结合位点数^[8]。图 2 为咖啡酸与乳蛋白结合情况的示意图。在 25 和 37 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下计算, 所得结果如表 2 所示, 其中, 25 $^{\circ}\text{C}$ 下咖啡酸与 α -酪蛋白、 β -酪蛋白、 κ -酪蛋白、 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白的 K_A 分别为 0.109×10^4 , 0.0255×10^4 , 0.362×10^4 , 6.050×10^4 , $0.802 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 结合位点数分别为 0.773, 0.616, 0.835, 1.099, 0.914, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下咖啡酸与 α -酪蛋白、 β -酪蛋白、 κ -酪蛋白、 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白的 K_A 分别为 0.0875×10^4 , 0.0175×10^4 , 0.483×10^4 , $1.120 \times$

Table 2 Thermodynamic parameters of the caffeic acid-milk protein binding procedure

结合物*	$T/^{\circ}\text{C}$	K_A $/(\times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1})$	n	R^2	ΔH $/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	ΔG $/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	ΔS $/(\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1})$
α -酪蛋白	25	0.109	0.773	0.992	-14.10	-17.33	+10.83
	37	0.0875	0.769	0.988	-	-17.46	-
β -酪蛋白	25	0.0255	0.616	0.987	-24.16	-13.73	-0.035
	37	0.0175	0.602	0.946	-	-13.31	-
κ -酪蛋白	25	0.362	0.835	0.995	+12.79	-19.96	+111.76
	37	0.483	0.859	0.984	-	-21.86	-
α -乳白蛋白	25	6.050	1.099	0.996	-73.63	-26.62	-164.62
	37	1.120	0.934	0.996	-	-24.03	-
β -乳球蛋白	25	0.802	0.914	0.981	+16.26	-21.90	+130.59
	37	1.160	0.937	0.979	-	-24.12	-

* 结合物指的是咖啡酸与几种乳蛋白的结合物

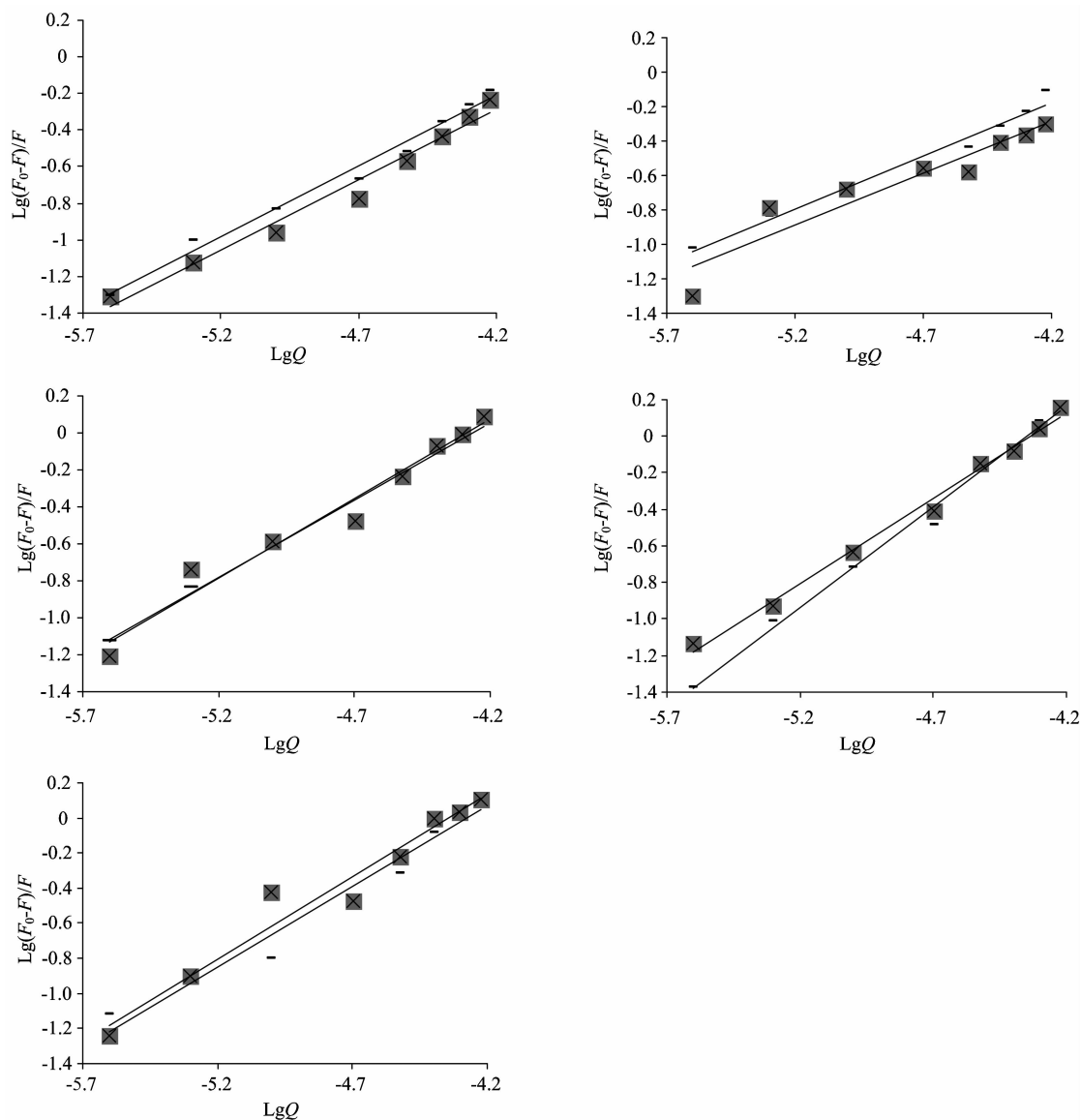


Fig. 2 Lineweaver-Burk curves of caffeic acid and milk protein at different temperature

(a)—(e) stands for the curves of caffeic acid with α -Casein, β -Casein, κ -Casein, α -Lactalbumin, β -Lactoglobulin, respectively ($-25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\times 37\text{ }^{\circ}\text{C}$)

$10 \cdot 1.16 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 结合位点数分别为 0.769, 0.602, 0.859, 0.934, 0.937, 由结合位点数可知咖啡酸与乳清蛋白反应后生成摩尔比近为 1 : 1 的结合物, 而酪蛋白提供的结合位点数较少, 并且与咖啡酸的结合常数也较小, 反映其结合的紧密程度较弱^[8]。

2.4 咖啡酸与乳蛋白的结合作用力类型

咖啡酸与乳蛋白相互作用满足的热力学公式如下

$$\ln K_A = -\Delta H/RT + \Delta S/R$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

$$\Delta G = -RT \ln K$$

通过 25 及 37 $^{\circ}\text{C}$ 下的结合常数计算可得标准吉布斯自由能变 ΔG 、焓变 ΔH 、熵变 ΔS , 所得的结果如表 2 所示。 $\Delta G < 0$ 说明乳蛋白与咖啡酸的反应是自发进行的。根据热力学常数与作用力的关系, 当反应的 $\Delta H > 0$ 、 $\Delta S < 0$ 时, 分子间

作用力来自于静电作用和疏水作用力; 当 $\Delta H < 0$ 、 $\Delta S < 0$ 时, 分子间作用力可能来自于范德华力、氢键或质子化等作用力; 当 $\Delta H > 0$ 、 $\Delta S > 0$ 时, 分子间作用力可能为疏水作用力; 当 $\Delta H < 0$ 、 $\Delta S > 0$ 时, 分子间作用力可能是静电引力^[15,16]。由此可见咖啡酸与 α -酪蛋白之间以静电引力结合 ($\Delta H < 0$, $\Delta S > 0$), 与 β -酪蛋白、 α -乳白蛋白的结合作用力为氢键 ($\Delta H < 0$, $\Delta S < 0$), 与 κ -酪蛋白、 β -乳球蛋白是以疏水作用力结合的 ($\Delta H > 0$, $\Delta S > 0$)。

2.5 咖啡酸与乳蛋白的结合距离

乳蛋白受激发后能发射内源性荧光, 其荧光发射光谱与咖啡酸的紫外吸收光谱有一定程度的重叠, 依据 Förster 的偶极-偶极非辐射能量转移理论, 可以求出结合位置与供能体乳蛋白分子中荧光基团之间的距离, 能量转移效率与结合距离的关系为

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + r_0^6) = 1 - F/F_0$$

式中, R_0 为能量转移效率 $E=50\%$ 时的临界距离, r 是咖啡酸与乳蛋白间的距离, F 和 F_0 分别为存在和不存在咖啡酸时乳蛋白的荧光强度, 其中 R_0^6 满足如下表达式

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} K^2 N^{-4} \Phi J$$

式中, K^2 为供能体—受能体各项随机分布的取向因子, N 为介质的折射指数, Φ 为供能体的荧光量子产率, J 是供能

体的荧光发射光谱和受能体的吸收光谱之间的光谱重叠积分, 其表示如下

$$J = \int F(\lambda)\epsilon(\lambda)\lambda^4 d\lambda / \int F(\lambda) d\lambda$$

式中, $F(\lambda)$ 是乳蛋白在波长 λ 处的荧光强度, $\epsilon(\lambda)$ 为咖啡酸在波长 λ 处的摩尔消光系数。

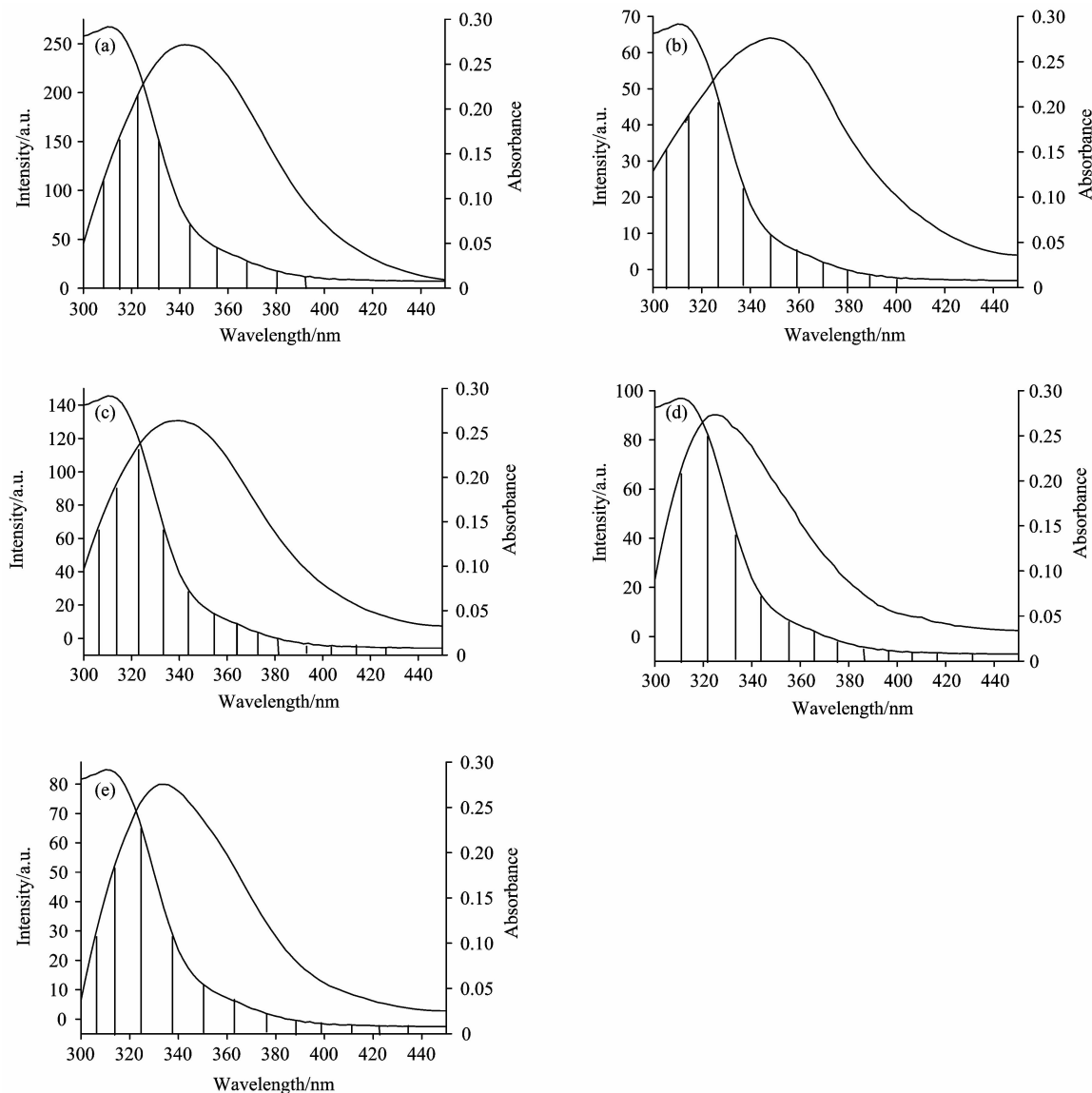


Fig. 3 The UV absorption spectra of CA (1) and the fluorescence emission spectra of MP (2)

$c_{MP} = c_{CA} = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, (a)—(e) stands for the spectra of caffeic

acid with α -Casein, β -Casein, κ -Casein, α -Lactalbumin, β -Lactoglobulin, respectively

乳蛋白的荧光光谱与咖啡酸的紫外吸收光谱的重叠图谱如图 3 所示, 用矩形分割法对图中光谱重叠部分的面积求和, 可计算得重叠积分 J 。在上述实验条件下, 取向因子供体-受体各项随机分布的平均值 $K^2 = 2/3$, 折射指数取水和有机物的平均值 $N = 1.4$, 乳蛋白荧光量子产率 $\Phi = 0.15$, 代入式中可求出 R_0^6 , 再通过咖啡酸与五种乳蛋白摩尔比为 1 : 1 时结合物的荧光强度得到能量转移效率 E , 最终可计算

出咖啡酸与乳蛋白中色氨酸残基的结合距离, 所得结果如表 3 所示, 咖啡酸与 α -酪蛋白、 β -酪蛋白、 κ -酪蛋白、 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白的结合距离分别为 2.91, 2.68, 2.72, 2.87 和 2.91 nm, 由于 $r_0 < 7$ nm, 符合非辐射能量转移条件, 再次证明咖啡酸对乳蛋白的荧光猝灭是由于生成不发光的配合物而引起的静态猝灭。

Table 3 The binding distance between caffeic acid and milk protein

结合物	$J/$ ($\text{cm}^3 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$)	$R_0/$ cm^3	E	$r_0/$ nm
咖啡酸- α -酪蛋白	3.47E-15	7.94E-41	0.115	2.91
咖啡酸- β -酪蛋白	3.43E-15	7.85E-41	0.174	2.68
咖啡酸- κ -酪蛋白	3.71E-15	8.49E-41	0.174	2.72
咖啡酸- α -乳白蛋白	4.63E-15	1.06E-40	0.160	2.87
咖啡酸- β -乳球蛋白	3.97E-15	9.09E-41	0.130	2.91

2.6 乳蛋白对咖啡酸抗氧化活性的影响

咖啡酸与乳蛋白结合前后抗氧化活性变化如图 4 所示, 两种抗氧化指标均表明乳蛋白会降低咖啡酸的抗氧化活性。通过显著性分析可知, DPPH 法测定的结果中, 除了 β -酪蛋白、 α -乳白蛋白外, 其他三种蛋白引起咖啡酸抗氧化活性的降低具有极显著性 ($p < 0.01$); 以 FRAP 为抗氧化指标时, 除了 α -酪蛋白外, 其他几种乳蛋白与咖啡酸结合后抗氧化活性的降低均有极显著差异 ($p < 0.01$)。这与前面叙述的牛奶降低蓝莓汁抗氧化活性的结果一致。

3 结论

本文利用荧光光谱及紫外吸收光谱, 研究了咖啡酸与乳蛋白的结合情况, 发现两者的结合为静态猝灭过程。咖啡酸与 α -酪蛋白之间以静电引力结合, 与 β -酪蛋白、 α -乳白蛋白的结合作用力为氢键, 而与 κ -酪蛋白、 β -乳球蛋白是以疏水作用力结合的, 并且两者的结合距离 $r_0 < 7$ nm。通过比较咖啡酸与不同乳蛋白的结合常数可知, 咖啡酸与乳清蛋白的结

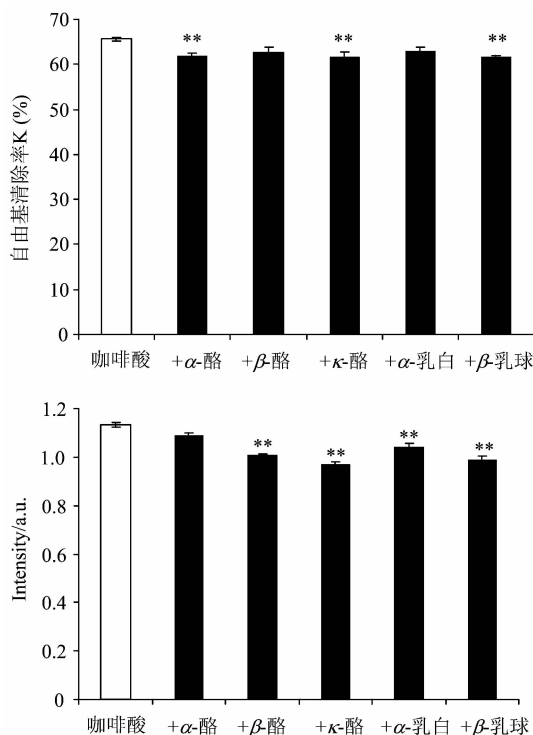


Fig. 4 The effect of milk protein on the antioxidant capacity of caffeic acid

(a): Stands for DPPH; (b): Stands for FRAP;

** : Stands for $p < 0.01$

合能力较酪蛋白强, 并且二者的结合导致了咖啡酸抗氧化活性的显著降低。

References

- [1] Mauro S, Maria F T, Debora V, Monia P, et al. Free Radical Biology and Medicine, 2009, 46(6): 769.
- [2] Rawel H M, Rohn S, Kruse H P, et al. Food Chemistry, 2002, 78(4): 443.
- [3] Arts M J T J, Haenen G R M M, Voss H P, et al. Food and Chemical Toxicology, 2009, 39: 787.
- [4] Hegde A H, Sandhya B, Seatharamappa J. Molecular Biology Reports, 2010, 1-9, Article in Press.
- [5] Pastukhov A V, Levchenko L A, Sadkov A P. Journal of Molecular Structure, 2007, 842(3): 60.
- [6] Mahesha H G, Singh S A, Srinivasan N, et al. FEBS Journal, 2006, 273(3): 451.
- [7] Rohn S, Rawel H M, Kroll J. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2004, 52(15): 4725.
- [8] CHEN Guo-zhen, HUANG Xian-zhi, ZHENG Zhu-zi, et al (陈国珍, 黄贤智, 郑朱梓, 等). Fluorescence Analysis Method (荧光分析法). Beijing: Science Press (北京: 科学出版社), 1990.
- [9] Sharma V, Kumar H V, Rao L J M. Food Research International, 2008, 41(2): 124.
- [10] Almajano M P, Delgado M E, Gordon M H. Food Chemistry, 2006, 101(1): 126.
- [11] Liu Y, Xie M X, Jiang M, et al. Spectrochimica Acta Part A, 2005, 61(9): 2245.
- [12] Zhang H M, Tang B P, Wang Y Q. Molecular Biology Reports, 2010, 37(7): 3127.
- [13] Ding L, Zhou P J, Li S Q, et al. Journal of Fluorescence, 2011, 21(1): 17.
- [14] Singh T S, Mitra S. Spectrochimica Acta Part A, 2010, 78: 942.
- [15] Seeder N, Agarwal P. Journal of Luminescence, 2010, 130(10): 1841.
- [16] Pinto M C, Duque A L, Macias P. Journal of Molecular Structure, 2010, 980(3): 143.

Spectral Properties of Interaction between Caffeic Acid and Milk Protein and The Change in Antioxidant Capacity

YU Dan-dan¹, ZHANG Hao^{1,2*}, DING Qing-bo³, GUO Hui-yuan^{1*}, WU Jian-ping⁴, ZHANG Lu-da¹, REN Fa-zheng¹

1. China Agricultural University, Key Laboratory of Functional Dairy, Ministry of Education, Beijing 100083, China

2. Beijing Higher Institution Engineering Research Center of Animal Product, Beijing 100083, China

3. COFCO Limited, Beijing 100020, China

4. University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada

Abstract The interaction between caffeic acid and milk protein (α -casein, β -casein, κ -casein, α -lactalbumin, β -lactoglobulin) were studied in this work. The binding constant K_A , binding force, binding distance r_0 and transfer efficiency E were evaluated by UV-absorption and fluorescence spectroscopy. The antioxidant capacity of the combination was determined using both 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay. The results showed that the interaction between milk protein and caffeic acid resulted in the endogenous fluorescence quenching of milk protein, which belongs to a static quenching mechanism. The negative sign of free energy meant that the interaction process was spontaneous. The strength between caffeic acid and α -casein was electrostatic attraction ($\Delta H < 0$, $\Delta S > 0$), and that between β -casein and α -Lactalbumin was hydrogen bonding ($\Delta H < 0$, $\Delta S < 0$). In addition, the strength of caffeic acid interacting with κ -casein and β -lactoglobulin was hydrophobic interaction ($\Delta H > 0$, $\Delta S > 0$). The binding distance ($r^0 < 7$ nm) proved that caffeic acid lead to a static quenching mechanism of milk protein. The antioxidant capacity of caffeic acid was inhibited by milk protein to different degrees.

Keywords Caffeic acid; Milk protein; Binding; Fluorescence and UV spectrum; Antioxidant

(Received Jul. 13, 2011; accepted Oct. 10, 2011)

* Corresponding author