

## · 论 著 ·

## 柚皮挥发性有机化合物与牛乳铁蛋白相互作用分子机制及指纹图谱

耿照明<sup>1</sup>, 周清滕<sup>1</sup>, 郭明<sup>1</sup>, 胡智燕<sup>1</sup>, 朱杰丽<sup>2</sup>

(1. 浙江农林大学化学与材料工程学院, 浙江 杭州 311300; 2. 浙江省林业科学研究院, 浙江 杭州 310023)

**摘要:**目的 探究柚皮挥发性有机化合物(PVOC)与牛乳铁蛋白(BLF)相互作用分子机制及指纹图谱。方法 利用顶空固相微萃取气相色谱-质谱(HS-SPME/GC-MS)技术分别获得琯溪蜜柚、南非葡萄柚和以色列青柚(S1~S9)PVOC物质组与BLF间相互作用指纹图谱并筛选活性PVOC物质组。通过分子对接技术建立PVOC物质组与BLF间结合的分子模型,结合荧光发射、同步荧光、圆二色性光谱及三维荧光光谱技术和动力学模拟交叉验证PVOC物质组与BLF相互作用的分子机制。结果 通过HS-SPME/GC-MS技术共鉴定出S1~S9中21种共有成分,并鉴定出D-柠檬烯(Dt)、乙酸芳樟酯(La)和圆柚酮(Nt)为活性特征成分。PVOC物质组与BLF的分子对接模型表明,Dt上的双键及环己烯与BLF上的Trp560和Ala558联合产生交叉疏水作用,同时周围还存在Thr636, Thr527和Arg531等氨基酸残基通过范德华力与之结合。La分子被包裹在BLF由Trp560, Thr636, Ser519, Thr527, Leu639, Gly525, Tyr524, Gly528, Glu521, Lys522, Arg531及Ala558形成的疏水口袋中;Nt分子被包裹在由Asp509, Glu521, Asp508, Trp560, Ser519, Lys520, Gly528, Thr527, Lys637, Glu635, Thr636, Ala558, Arg531, Glu353及Lys522形成的疏水口袋中。光谱结果表明,PVOC物质组能够引起BLF内源荧光猝灭,Dt和La在BLF中存在独立结合位点与BLF形成复合物,是静态猝灭机制,Nt在BLF中则有多个结合位点且存在协同关系;Dt,La,Nt和柚皮PVOC物质组与BLF间的作用为非辐射能量转移,BLF二级结构改变, $\alpha$ -螺旋松动和 $\beta$ -折叠结构增多。计算结果表明,BLF与PVOC物质组中含量最少的Nt亲和性最强,但结合力不强,对La的亲和性最弱,对含量最多的Dt亲和性较弱,但结合力最强,结合率54.66%。结论 BLF与柚皮PVOC物质组的选择结合强度取决于PVOC分子的结构与含量,BLF更倾向选择结合含有羰基氧结构的醛酮类PVOC分子。PVOC物质组导入后引起BLF二级结构的松动、伸展,构象改变是范德华力、疏水力和氢键共同作用的结果。

**关键词:**柚皮挥发性有机化合物;牛乳铁蛋白;顶空固相微萃取气相色谱-质谱联用;多光谱;分子建模

中图分类号:R285

文献标志码:A

文章编号:1000-3002-(2022)10-0754-14

DOI:10.3867/j.issn.1000-3002.2022.10.005

柚皮挥发性有机化合物(pomelo volatile organic compounds, PVOC)因具有独特的香味及存在大量具有抗菌消炎的烯萜和醛酮类化合物,在医药食品、化学化工等方面具有潜在应用价值<sup>[1]</sup>。而挥发性活性物质的药理活性需要与载体蛋白结合转运至相应作用靶点方能发挥作用<sup>[2]</sup>。蛋白质可与PVOC分子发生可逆或不可逆结合,二者的相互作

用高度依赖于PVOC分子的性质、蛋白质的天然结构、蛋白质与PVOC分子结合时的结构变化以及温度和pH等参数。探究两者的作用本质和规律是一个系统且复杂的工作。在处理挥发性物质样品进行分析时,确保其完整性非常重要。顶空固相微萃取(headspace-solid phase microextraction, HS-SPME)是一种无溶剂的样品处理技术,具有成本低、所需样品少、灵敏度高、重现性好和操作简单快捷的特点,能较准确地反映样品的挥发物组成<sup>[3]</sup>,可与气相色谱-质谱技术联用(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS),实现挥发性样品成分的快速分析<sup>[4-5]</sup>。光谱学可用于评估生理条件下蛋白质配体相互作用。借助多光谱方法,如荧光猝灭、三

基金项目:浙江省基础公益研究计划项目(LGN20B070001)

作者简介:耿照明,硕士研究生,主要从事植源性活性组分药理作用机制研究,E-mail:gengzhaoming0408@163.com

通讯作者:郭明,教授,主要从事药理毒理机制研究,E-mail:guoming@zafu.edu.cn

维荧光、圆二色性光谱和紫外吸收,可研究蛋白质分子相互作用和结构变化的主要作用力。分子建模可以预测蛋白质和配体之间的最佳结合构象<sup>[6-7]</sup>。

牛乳铁蛋白(bovine lactoferrin, BLF)是一种源自转铁蛋白的铁结合糖蛋白,主要从牛乳中提取。BLF 具有抗氧化、抗癌、抗炎防止微生物感染、维持铁在正常范围内的平衡和调节铁在肠道的吸收等一系列功能特性<sup>[8]</sup>,因此被广泛应用于营养补充剂和婴儿配方食品中。而 BLF 若在胃内消化程度过高,将失去一些生物活性功能,如失去输运铁和对抗自由基的功能,可能引起食物过敏,降低在肠道发挥生理功能的可能性<sup>[9-10]</sup>。为保证 BLF 作为一种有效的铁转运蛋白,必须在到达特定受体之前保持其稳定性。因此,寻找一种蛋白质-活性物复合物保护机制来保持蛋白质稳定性尤为重要。

本研究对 PVOC 物质组与 BLF 的吸附结合进行探索,选取低丰度蛋白 BLF(图 1)作为 PVOC 物质组小分子的蛋白受体,采用 HS-SPME/GC-MS 技术分离、鉴定 PVOC,采用光谱和分子建模技术从微观角度探究 PVOC 与载体蛋白之间的相互作用机制,结合组学阐释 PVOC 物质组与载体蛋白作用的分子机制。

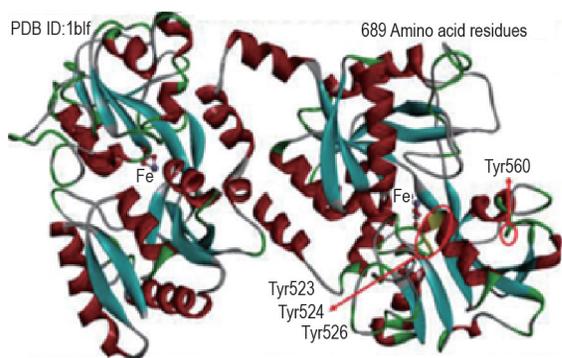


Fig. 1 Three-dimensional structure of bovine lactoferrin (BLF) (low abundance)

## 1 材料与方法

### 1.1 药材、主要试剂、仪器和软件

一、二和三级琯溪蜜柚及南非葡萄柚和以色列青柚(3个品种各级挑选1个样品,依次编号为S1~S9)均产自福建省漳州市平和果园,所选柚子长势相近,无病虫害,果实直径约10 cm,采后4℃保存备用。*D*-柠檬烯[(+)-dipentene, Dt, 纯度≥95%],上海萨恩化学技术有限公司;乙酸芳樟酯(linalylacetate, La, 纯度≥95%),上海梯希爱化成工业发展有限公司;圆柚酮(nootkatone, Nt, 纯度≥

98%)和 BLF(80 ku, 纯度≥95%),上海源叶生物科技有限公司;醋酸钠( $\text{CH}_3\text{COONa}$ , NaAc, 纯度≥98%),国药集团化学试剂有限公司;冰醋酸( $\text{CH}_3\text{COOH}$ , HAc, 纯度≥98%),上海凌峰化学试剂有限公司。7890A/5975C 气相色谱-质谱联用仪和 DB-17MS 色谱柱(30 m×250 μm×0.25 μm),美国 Agilent 公司;AL204 电子天平,上海梅特勒托利多国际贸易有限公司;SPME 手柄和固相微萃取头(50 μm/30 μm DVB/CAR/PDMS),美国 Supelco 公司;F-4500 型荧光分光光度计,日本 HITACHI 公司;UV-2600 型紫外光谱仪,日本 SHIMADZU 公司;ZD-2 型酸度计,上海精密科学仪器有限公司;J-810CD 光谱仪,日本 Jasco 公司。ChemDraw 2019 软件,美国 CambridgeSoft 公司;Discovery Studio 2.5 软件,美国 Biovia 公司;AutoDock4.2.6 软件,美国 Scripps Research 公司;Origin 2021 软件,美国 OriginLab 公司。

### 1.2 顶空固相微萃取气质联用技术构建 PVOC 指纹图谱及其与牛乳铁蛋白吸附结合指纹图谱

配制  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  HAc-NaAc 缓冲液(pH=7.4),然后使用该缓冲液配制 BLF  $5 \times 10^3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  溶液。PVOC  $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  单分子及混合液标准品均使用无水乙醇配制。通过5次连续进样考察仪器的精密度、稳定性及重复性。将采集的柚子样品取果皮并切成小块(2 mm×2 mm),分别称取0.5 g置于顶空瓶中,25℃于固相微萃取仪上平衡萃取,萃取结束后,采用 GC-MS 技术获得 PVOC 指纹图谱。样品在 GC 进样口热解吸 2 min。色谱条件:氮气作为载气,扫描速度  $3.2 \text{ amu} \cdot \text{min}^{-1}$ ,初始温度为 50℃,保持 1 min,然后以  $10^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$  程序升温至 260℃,保持 2 min;前进样口、传输线、离子源和四极杆温度分别为 260℃,260℃,230℃和 150℃。质谱条件:电子轰击源(electron Impact, EI)电离能量为 -70 eV,质量扫描范围为质荷比( $m/z$ ) 50~500,溶剂延迟时间为 4.5 min。总运行时间 24 min。

将收集的 9 种柚皮 PVOC 分别定量通入盛有 2 mL BLF 蛋白溶液的顶空瓶中,密封。室温低速平衡搅拌 10 min,使 PVOC 与 BLF 充分结合至饱和后进行 HS-SPME 定时平衡萃取,采用 GC-MS 技术获得 PVOC 与 BLF 吸附结合的指纹图谱<sup>[11]</sup>。空白对照组(2 mL HAc-NaAc 缓冲溶液  $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )按上述步骤操作。

在 NIST98.L 标准谱库中对 GC-MS 分析得到的质谱数据进行检索,查寻有关质谱资料,对基峰、 $m/z$  和相对丰度等进行分析,分别对各峰所代表物

质的化学结构和名称进行确认,获得 PVOC 物质组成分信息<sup>[12]</sup>,采用峰面积归一法分析相对含量。采用 Origin 7.5 软件建立 GC-MS 指纹图谱;以 9 个柚皮 PVOC 物质组共有成分相对含量为特征,采用离差平方和法,选用欧式距离为测度,对样品进行聚类分析<sup>[13]</sup>。

### 1.3 PVOC 物质组与 BLF 结合的分子模型的建立

使用 ChemDraw 构建 PVOC 配体结构,并进行 MM2 能量最优化处理,在 Autodock 软件中添加原子类型后保存文件。PDB 蛋白质数据库导出“1BLF”晶体结构作为 BLF 的对接模板。在 Pymol 中打开配体文件对其进行去水和加氢的前期处理。利用 Autodock 4.2.6 软件添加 AD4 原子类型并保存。利用 Autodock 进行分子对接,体系盒子大小设置为 X:70,Y:70,Z:70(X,Y 和 Z 分别表示各方向上格点的数量),格点间隔默认 0.375 Å(1 Å=0.1 nm),格子的中心移至格子整体包覆住 Try523, Try524, Try526 和 Try560,采用拉马克遗传算法(LGA)进行内部构象搜索,通过 AutoDock 软件包的 python 脚本,运行 AutoGrid,进行分子对接,输出保存为 pdb 格式。对接结束后,根据 Autodock 4.2.6 软件内分子间结合能高低进行分子模型评估,首选对接排名较高的对接结果。在这一步中,PyMol 软件用于 pdb 文件的可视化和生成。

### 1.4 紫外光谱、荧光光谱和紫外可见吸收光谱测定 PVOC 物质组与 BLF 相互作用

使用 F-4500 荧光分光光度计分别在 298 和 310 K 检测 BLF 的固有荧光发射,激发波长设置为 282 nm,发射波长设置为 270~450 nm。分别用 PVOC 单分子(Dt, La 和 Nt)标准液及物质组(Dt, La 和 Nt)混合液对 BLF 溶液进行连续滴定至饱和。对于所有样品,滴定结束时乙醇的含量不超过 3%(V/V)。根据式①进行内滤效应校正<sup>[14]</sup>。

$$F_{\text{Corr}} = F_{\text{Obs}} \times 10^{(A_{\text{Exc}} + A_{\text{Emi}})/2} \quad (1)$$

其中  $F_{\text{Obs}}$  和  $F_{\text{Corr}}$  分别为初始荧光强度和内滤波效应校正后的荧光强度。 $A_{\text{Exc}}$  和  $A_{\text{Emi}}$  分别是 PVOC 在最大激发波长处的荧光值和最大发射波长处的荧光值。

分别取 BLF 溶液、PVOC 单分子标准液及物质组混合液各 3 mL 于比色皿中,测定 200~500 nm 紫外可见吸收光谱。收集 BLF 固有荧光发射数据与 PVOC 单分子的紫外吸收数据,根据 Förster 的偶极-偶极非辐射能量转移理论,得到蛋白质与配体间作用结合距离<sup>[15]</sup>。

通过 Stern-Volmer 方程(式②)分析荧光猝灭数据<sup>[16]</sup>,探索 BLF 与 PVOC 物质组结合机制。

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{\text{sv}}L = 1 + K_q\tau_0L \quad (2)$$

式中, $F_0$ ,  $F$ ,  $K_q$ ,  $K_{\text{sv}}$ ,  $\tau_0$  ( $10^{-8}$  s) 和  $L$  分别表示无猝灭剂和有猝灭剂时的荧光强度、猝灭速率常数、Stern-Volmer 猝灭常数、分子平均寿命和猝灭剂浓度。

确认荧光猝灭机制后,用双对数 Stern-Volmer 方程(式③)计算 PVOC 物质组在 BLF 上的结合位点数<sup>[17]</sup>。

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

其中, $K$  为结合常数, $n$  为结合位点数, $L$  为 PVOC 样品浓度。

使用 Hill 方程(式④)消除约束模型中的假设,减少建模条件之间的差异<sup>[18]</sup>。

$$\lg \frac{\theta}{1 - \theta} = n_H \lg K_a + n_H \lg L \left( \theta = \frac{F_0 - F}{F_0 - F_{\text{sat}}} \right) \quad (4)$$

式中, $\theta$  为荧光饱和度, $F_{\text{sat}}$  为蛋白荧光强度最小时的荧光值, $K_a$  为结合常数, $n_H$  为 Hill 系数, $L$  为 PVOC 物质组样品浓度。

### 1.5 理论方程计算 PVOC 物质组与 BLF 结合作用力类型和结合距离

根据 Ross 理论<sup>[19]</sup>,可由体系的焓变( $\Delta H$ )、熵变( $\Delta S$ )和自由能变( $\Delta G$ )来判断生物大分子与小分子之间相互作用力的类型。配体与蛋白受体分子作用的作用力有氢键、静电作用力、范德华力和疏水作用力。体系的  $\Delta H$ ,  $\Delta S$  和  $\Delta G$  可反映蛋白受体与配体之间相互作用力的类型, $\Delta S > 0$  表示作用力为疏水作用力和静电力; $\Delta S < 0$  表示氢键和范德华力; $\Delta H > 0$ ,  $\Delta S > 0$  表示疏水作用力; $\Delta H < 0$ ,  $\Delta S < 0$  表示为氢键和范德华力<sup>[20]</sup>。通过荧光光谱极值测取,并根据 Van't Hoff 方程(式⑤和⑥)<sup>[21-23]</sup>,得到体系的  $\Delta H$  和  $\Delta G$ 。

$$\ln K_1 - \ln K_2 = (\Delta H/R) \cdot (1/T_1 - 1/T_2) \quad (5)$$

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (6)$$

根据 Gibbs-Helmholtz 方程(式⑦),计算获得作用体系的  $\Delta S$ 。

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad (7)$$

按照 Förster 的偶极-偶极非辐射能量转移理论,可求出蛋白质与配体间作用结合距离。结合距离  $r$  由 FRET 方程(式⑧,⑨和⑩)进行计算<sup>[24]</sup>。

$$E = 1 - F/F_0 = R_0^6 / (R_0^6 + r^6) \quad (8)$$

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} K^2 N^{-4} \Phi J \quad (9)$$

$$J = \int_0^\infty F(\lambda) \epsilon(\lambda) \lambda^4 d\lambda / \int_0^\infty F(\lambda) d\lambda \quad (10)$$

式⑧中, $E$  为能量转移效率, $R_0$  为能量转移效率为 50% 时分子间的距离, $r$  为供受体分子间的实际

距离。式⑨中,溶液折射常数  $N=1.336$ ; 供体的荧光量子产率  $\Phi=0.118$ ;  $K^2$  是取向因子,一般将溶液中的供受体当作混乱取向,从而取  $K^2=2/3$  计算  $R_0$ ; 式⑩中,  $J$  是蛋白荧光发射谱与猝灭剂紫外吸收谱的重叠积分,  $\lambda$  为波长,  $F(\lambda)$  为波长  $\lambda$  处的荧光值,  $\epsilon(\lambda)$  为波长  $\lambda$  处的紫外吸收值。

### 1.6 圆二色性光谱法测定 BLF 蛋白二级结构变化

移取 BLF 溶液 3 mL 于比色皿中,以 HAc-NaAc 缓冲液为参比溶液,记录圆二色性(circular dichroism, CD)光谱仪上 BLF 的远紫外-CD 谱,再分别测定添加等摩尔浓度的 3 种 PVOC 单分子及其混合物溶液的 CD 谱。检测波长为 190~260 nm。BLF 的二级结构中占主导作用的  $\alpha$ -螺旋含量变化由式⑪计算得出,将数据转换为摩尔椭圆率  $[\theta]$  ( $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ ),并绘制 CD 谱图。BLF 蛋白的  $\alpha$ -螺旋结构的特征是在 208~210 nm 处出现负带<sup>[25]</sup>,  $\beta$ -折叠结构的特征是在 190~200 nm 处有一个强的正带,在 210 nm 附近有一个负带。结合 CD 谱图及式⑫计算  $\alpha$ -螺旋含量。以  $\alpha$ -螺旋含量反映二级结构变化。

$$MER = \theta_{\text{obs}} / (10 \times n \times l \times C_p) \quad (11)$$

$$\alpha\text{-螺旋}(\%) = [(-MER)_{208} - 4000] / (33000 - 4000) \times 100\% \quad (12)$$

式中,  $\theta_{\text{obs}}$  是仪器测定的 CD 光谱强度;  $MRE$  是椭圆率;  $C_p$  是蛋白物质的量分数;  $l$  是样品池的厚度;  $n$  是氨基酸残基基团的数目。

### 1.7 三维荧光光谱法测定 BLF 蛋白三级结构变化

使用 F-4500 型荧光分光光度计在 298 K 检测记录 BLF 的三维荧光数据,然后再分别测定添加等体积的 3 种 PVOC 单分子及其混合物溶液时 BLF 三维荧光数据。激发波长( $\lambda_{\text{ex}}$ )范围为 220~310 nm,增量为 10 nm;发射波长( $\lambda_{\text{em}}$ )范围为 220~500 nm,增量为 5 nm。将三维荧光数据导出,使用 Origin2021 软件进行可视化分析。以  $\lambda_{\text{max}}$  红移程度或蓝移程度反映蛋白质构象变化的程度。以特征峰  $\lambda_{\text{ex}}=280$  nm 处 Peak1 的变化反映 Tyr 和 Trp 残基的光谱特征;以  $\lambda_{\text{ex}}=230$  nm 处 Peak2 的变化反映多肽骨架结构荧光特征,同时反映蛋白二级结构特征。

### 1.8 分子动力学模拟软件分析 BLF-PVOC 最佳结合模型构象稳定性

选择 PVOC 物质组单分子(Dt, La 和 Nt)分别在 BLF 上的最佳结合模型进行配体与蛋白的分离,将蛋白与配体分别导入到分子动力学模拟软件中,将蛋白置于盒子中心且距离盒子边缘 3 nm,采用 AMBER3 力场,并向盒子中填充 TIP3P 周期性水模型,并添加  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  以中和电荷,保证体系的稳定性。

能量优化首先采用最陡下降法进行 1000 步能量优化,再采用共轭梯度法进行 2000 步能量优化,之后再压力平衡和温度平衡。最后系统温度为 298 K,时间步长设置为 2.5 fs。每隔 100 ps 保存一次能量和坐标信息,体系进行 100 ns 的非限制动力学模拟。非键分子间作用距离截断值设置为 10.0 Å,每 100 ps 保存一次能量和坐标信息。结合能计算采用 MM/PBSA 方法<sup>[26]</sup>。最后对 100 ns 模拟结果进行  $\text{C}\alpha$  原子的均方根偏差(root mean square deviation, RMSD)和氨基酸残基均方根浮动(root mean square fluctuation, RMSF)分析,以此判断对接模型的构象稳定性。

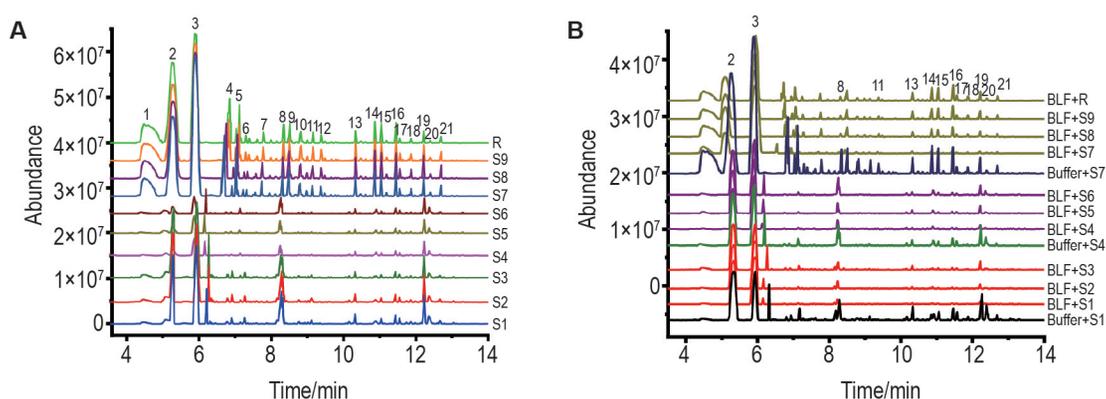
## 2 结果

### 2.1 9 种柚皮挥发物指纹图谱及牛乳铁蛋白吸附结合指纹图谱

方法学考察结果表明,各共有峰的相对保留时间及相对峰面积 RSD 均 < 3%,说明仪器的精密度、稳定性和重复性良好。以出峰最多且峰型较完整的一级以色列青柚挥发物作为样品对照峰,测定 S1~S9 PVOC 物质组的总离子流色谱(total ionic chromatography, TIC)(图 2A),共筛选出 21 种共有成分(表 1);通过峰面积归一化法确定 PVOC 的相对含量,并采用平方和法和欧氏距离进行聚类分析,经聚类分析筛选出 Dt, La 和 Nt 等活性 PVOC 物质组特征成分<sup>[27]</sup>。利用 HS-SPME/GC-MS 测定 BLF 对柚皮 PVOC 物质组平衡吸附的 GC-MS 总离子流图(图 2B),BLF 对柚皮 PVOC 物质组平衡吸附的 GC-MS 数字化指纹图谱见表 2。

由图 2 可知,排除溶剂干扰,9 种柚皮的 PVOC 在与 BLF 溶液平衡吸附后,指纹图谱中峰高均有不同程度降低,表明 BLF 吸附结合柚皮 PVOC 的能力较强。琯溪蜜柚和南非葡萄柚的共有特征峰峰高明显降低,由于出峰位置基本未变,初步判断该成分与 BLF 进行结合。比较图 2A 和 2B 中共有峰峰高并结合表 2 中缓冲液与 BLF 溶液对挥发物吸附数据,可见 BLF 溶液对 9 种柚皮的 PVOC 的吸附量 > 缓冲液对挥发物的吸附量,因此可排除溶剂吸附挥发物的影响。

对 BLF 与 9 种柚皮 PVOC 共有吸附结合程度结果进行聚类分析,以组间分类距离为横坐标,样品编号为纵坐标绘制聚类分析图(图 3)。结果在组间距离为 10 时,存在 3 条直线能够连接所有样品组分,因此 PVOC 与 BLF 的吸附结合程度也被分为



**Fig.2** Total ion chromatography of volatile organic compounds (PVOCs) of 9 pomelo peels before (A) and after adsorption with BLF (B). S1–S3, S4–S6 and S7–S9: the first, second and third grade Guanxi pomelo (S1–S3), South African grapefruit (S4–S6) and Israel green pomelo (S7–S9), respectively; R: contrast fingerprint of volatile compounds in pomelo peels.

**Tab.1** Identification results of peaks of PVOCs in 9 pomelo peels in Fig.2A

Peak number	Retention time/min	Ingredient	CAS No.	Similarity/%
1	4.53	(3 <i>R</i> ,4 <i>E</i> )-3,7-Dimethyl-1,4,6-octatriene	13877-91-3	80
2	5.27	Limonene	5989-27-5	83
3	5.90	4-Methylidene-1-(propan-2-yl)bicyclo[3.1.0]hexane	3387-41-5	83
4	6.86	Beta-myrcene	123-35-3	86
5	7.14	(3 <i>R</i> ,6 <i>S</i> )-6-Isopropenyl-3-methyl-1-cyclohexen-1-ol	5113-87-1	53
6	7.32	1-Methyl-4-(1-methylethyl)-1,4-cyclohexadiene	99-85-4	78
7	7.80	1-Methyl-4-(1-methylethylidene)-cyclohexene	586-62-9	90
8	8.35	3,7-Dimethyl-1,6-octadiene-3-acetate	115-95-7	59
9	8.51	3-Carene	13466-78-9	47
10	8.83	3,7,7-Trimethylbicyclo[4.1.0]-2-heptene	84304-13-2	80
11	9.15	4-(1-Methylethenyl)-1-cyclohexene-1-methanol	536-59-4	72
12	9.38	3,7-Dimethyl-1,6-octadien-3-ol (linalool)	78-70-6	83
13	10.34	( <i>Z</i> )-3,7-Dimethyl-2,6-octadien-1-ol (nerol)	106-25-2	43
14	10.89	Camphene	79-92-5	47
15	11.05	2,2-Dimethyl-3-methylene dicyclic [2.2.1] heptane	5794-03-6	64
16	11.47	Dihydrocelery acetate	57287-13-5	86
17	11.57	(+/-)-Lavandulol acetate	50373-59-6	72
18	11.89	(4 <i>S</i> ,4 <i>aR</i> ,6 <i>S</i> )-6-Isopropenyl-4,4a-dimethyl-4,4a,5,6,7,8-hexahydro-3 <i>H</i> -naphthalen-2-one	4674-50-4	83
19	12.21	2,5-Dimethyl-3-methylene-1,5-heptadiene	74663-83-5	50
20	12.40	2-Methyl-5-(1-methylethenyl)cyclohexanol	20549-47-7	47
21	12.70	2,6-Dimethyl-1,8-naphthylidene	26488-98-2	80

3类,即一、二和三级以色列青柚(S7~S9)PVOC是第一类;一、二和三级南非葡萄柚(S4~S6)PVOC为第二类;一、二和三级琯溪蜜柚(S1~S3)PVOC则是第三类。根据表2分别计算3类PVOC与BLF的吸附结合程度总和,发现琯溪蜜柚PVOC与BLF的吸附结合程度最强是27.492,其次是以色列青柚(21.856)和南非葡萄柚(17.280)。

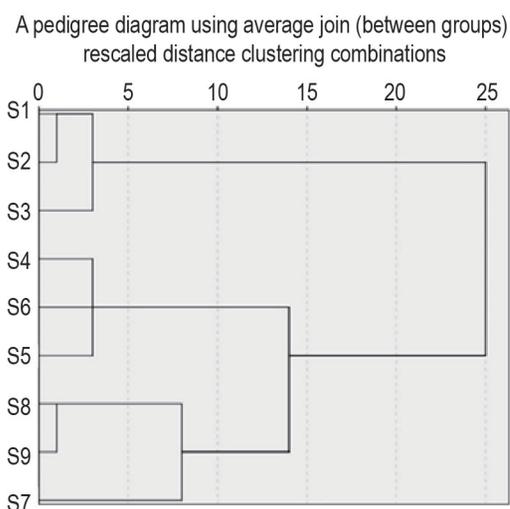
## 2.2 PVOC物质组与BLF结合的分子模型

由建立的PVOC物质组与BLF结合的分子模型(图4)可知,3种PVOC单分子Dt,La和Nt均与BLF上的活性位点Trp560存在氢键及不同类型的疏水作用力(图4B~D)。疏水性配体Nt的羰基氧以4.54 Å的距离与BLF上的Thr636产生氢键作用,并被BLF中的Trp560, Asp508, Asp509, Glu521,

**Tab.2 Digital fingerprint of adsorption and binding degree of common aroma between BLF and PVOCs of 9 pomelo peels**

System	Amount of compound corresponding to each peak adsorbed by buffer or BLF solution												
	Peak 2	Peak 3	Peak 8	Peak 11	Peak 13	Peak 14	Peak 15	Peak 16	Peak 17	Peak 18	Peak 19	Peak 20	Peak 21
Buffer+S1	0.035	0.080	0.165	0.130	0.148	0.038	0.192	0.048	0.291	0.142	0.128	0.169	0.190
BLF+S1	0.142	0.123	0.771	0.886	0.576	0.800	0.890	0.931	0.960	0.840	0.847	0.930	0.960
BLF+S2	0.131	0.134	0.671	0.936	0.510	0.683	0.854	0.915	0.907	0.827	0.840	0.900	0.902
BLF+S3	0.105	0.141	0.420	0.967	0.473	0.577	0.809	0.872	0.892	0.896	0.798	0.826	0.850
Buffer+S4	0.046	0.091	0.191	0.175	0.074	0.072	0.103	0.187	0.099	0.180	0.138	0.107	0.113
BLF+S4	0.157	0.227	0.316	0.775	0.427	0.456	0.485	0.523	0.549	0.786	0.494	0.491	0.423
BLF+S5	0.113	0.225	0.193	0.879	0.418	0.385	0.252	0.487	0.362	0.559	0.491	0.371	0.437
BLF+S6	0.096	0.188	0.493	0.789	0.520	0.324	0.526	0.471	0.514	0.489	0.615	0.454	0.520
Buffer+S7	0.040	0.166	0.026	0.142	0.114	0.166	0.101	0.150	0.170	0.181	0.057	0.064	0.046
BLF+S7	0.599	0.416	0.921	0.683	0.928	0.765	0.585	0.647	0.457	0.529	0.500	0.468	0.569
BLF+S8	0.551	0.433	0.910	0.918	0.478	0.418	0.397	0.267	0.390	0.490	0.509	0.480	0.593
BLF+S9	0.585	0.454	0.837	0.904	0.502	0.455	0.462	0.371	0.287	0.579	0.492	0.443	0.584

The data in Tab.2 were peak area ratios of corresponding peaks in Fig.2A and Fig.2B.



**Fig.3 Systematic cluster analysis tree of degree of common aroma adsorption and binding between BLF and PVOCs of 9 pomelo peels**

Lys522, Glu353, Arg531, Ala558, Thr636, Glu635, Lys637, Thr527, Gly528, Lys520 形成的疏水封闭球型包裹。

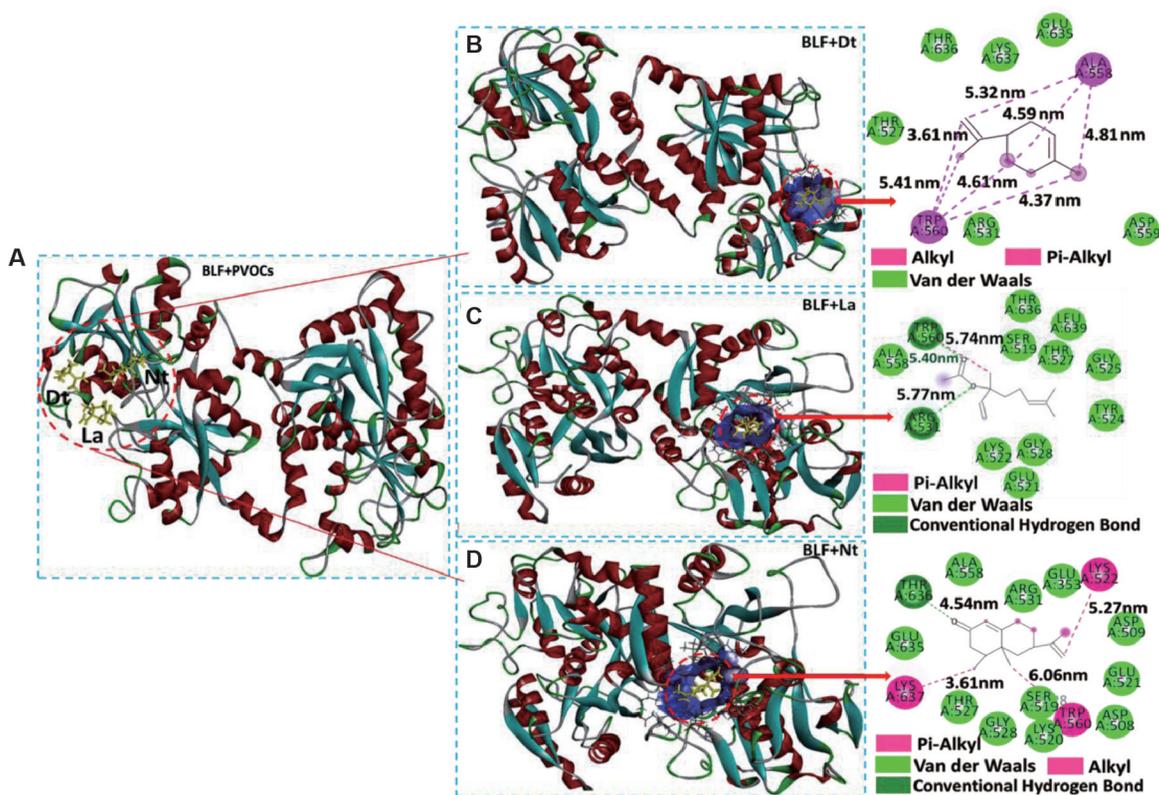
La 的 2 个酯基氧分别以 5.77 Å 和 5.74 Å 的距离与 BLF 上的 Trp560 和 Arg531 产生氢键作用, 整个 La 分子被包裹在 BLF 中由 Trp560, Thr636, Ser519, Thr527, Leu639, Gly525, Tyr524, Gly528, Glu521, Lys522, Arg531 及 Ala558 形成的疏水口袋中。Dt 结构中不存在氧原子, 与 BLF 无氢键作用, 但其上的双键及环己烯基与 BLF 上的 Trp560

和 Ala558 联合产生交叉疏水作用, 同时周围还存在 Thr636, Thr527 和 Arg531 等范德华力辅助结合作用。

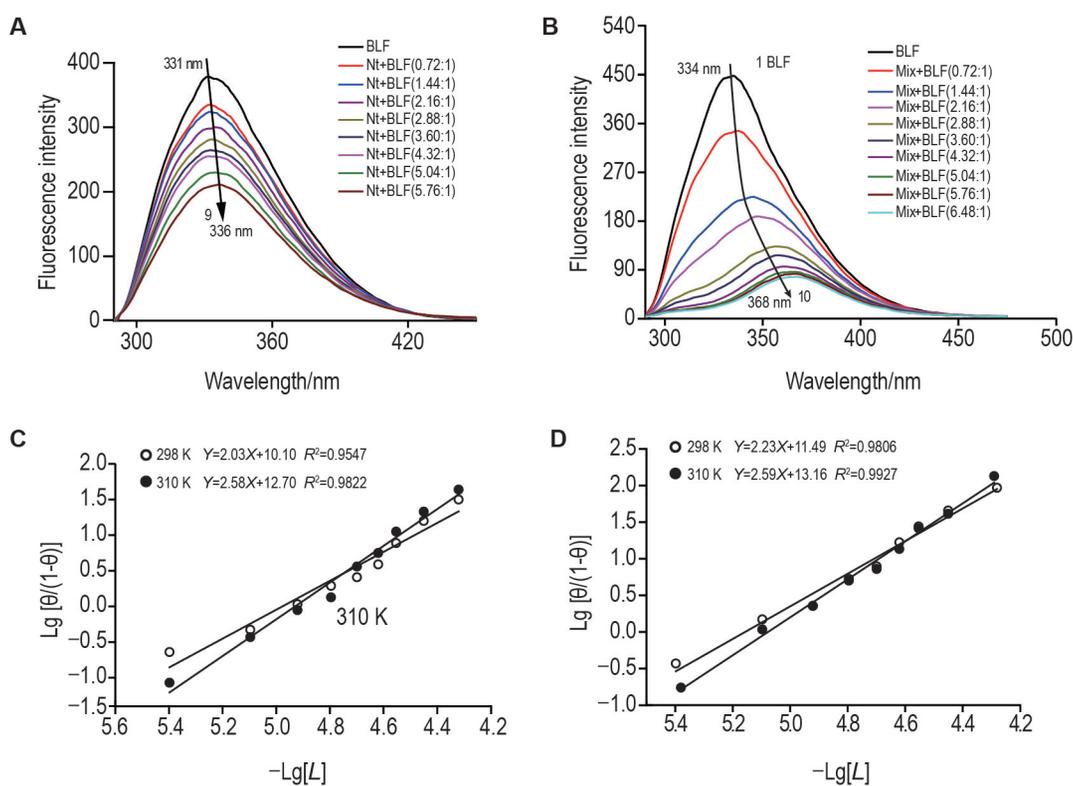
### 2.3 PVOC 物质组与 BLF 的相互作用

由荧光谱(图 5)可见, Nt 和 PVOC 物质组混合液均能强烈猝灭 BLF 的内源荧光, 由于 Dt 和 La 对 BLF 内源荧光的猝灭效果相较于 Nt 不明显, 因此未展示结果。对比图 5A 和 5B 可看出, 在相同的浓度比条件下, PVOC 物质组对 BLF 内源荧光的猝灭程度强于 Nt。在进行的 10 次滴定过程中, BLF 的内源荧光强度共降低了 372, 同时引起 BLF 荧光发射谱红移 34 nm。表明 PVOC 物质组与 BLF 结合后, BLF 的 Tyr 残基所处的微环境疏水性降低, 极性增加。从而推断 PVOC 物质组与 BLF 发生了较强的结合作用。对比图 5A 和 5B 可以看出, Nt 与 BLF 的相互作用则无 PVOC 物质组强烈, 前者引起 BLF 荧光猝灭的程度是后者的 1/2 倍, 且未引起 BLF 荧光发射峰红移或蓝移现象。表明 Nt 与 BLF 间的相互作用对 BLF 结合位点氨基酸残基的微环境影响较小。

从图 5C 和 5D 可以看出, 温度升高时, Nt 和 PVOC 物质组与 BLF 的结合位点数  $n$  值(方程斜率值)增高, 分别从 2.03, 2.23 升高到 2.58 与 2.59。表明 PVOC 分子与蛋白相互作用时温度增大(蛋白活性范围内), PVOC 分子热运动剧增, 触碰蛋白的活性位点机会增多。



**Fig.4 Optimal conformation of BLF combined with PVOCs.** A: distribution of PVOCs on BLF; B, C and D: molecular docking model of PVOCs monomolecular Dt, La and Nt binding with BLF, respectively.



**Fig.5 Fluorescence spectra and Hill equation fitting curve of BLF combined with Nt and PVOCs mix.** A and B: the fluorescence spectra of BLF combined with Nt and PVOCs at 298 K; C and D: fitting curves of Hill equation for BLF+Nt system and BLF+PVOCs system at 298 and 310 K. Curves 1→10 correspond to different concentrations of PVOCs ( $0-8.64 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 7.4). The variation of fluorescence spectra at 310 K is similar to that at 298 K, not given in the figure.

由图 5C 和 5D 中 Nt 和 PVOC 物质组与 BLF 作用后  $R^2$  高线性趋势可排除同时发生静态和动态猝灭现象的可能性<sup>[28-29]</sup>。此外, PVOC 物质组与 BLF 作用后  $K_q$  均高于  $2 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , 证实二者的结合是静态猝灭机制。Hill 方程对荧光猝灭数据的拟合结果见表 3。Dt, La, Nt 和 PVOC 物质组与 BLF 结合的  $n_H$  值分别为 1.64, 1.38, 2.03 和 2.23, Dt 和 La 与 BLF 结合的结合位点数更接近 1, 而物质组和 Nt 与 BLF 结合的结合位点数大于 2。表明 Dt 和 La 在 BLF 中存在独立结合位点, 而物质组和 Nt 在 BLF 中则有多个结合位点且依然存在协同关系。此外, Dt, La, Nt 和 PVOC 物质组与 BLF 作用后  $R^2$  均具有较高的线性相关度, 同时  $K_q$  值均高于  $2 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , 进一步表明 Dt, La, Nt 和 PVOC 物质组与 BLF 形成复合物是静态猝灭机制。

#### 2.4 PVOC 物质组与 BLF 结合的作用力类型和结合距离

由 Van't Hoff 方程及 Gibbs-Helmholtz 方程计算所得各体系焓变  $\Delta H$ 、自由能变  $\Delta G$  和熵变  $\Delta S$  结果见表 4。PVOC 物质组与 BLF 的自由能变  $\Delta G$  均为负值, 以焓为驱动力自发结合, 且随温度升高, 该自发趋势增大。此外, Dt+BLF, Nt+BLF 和 PVOCs mix+BLF 体系中  $\Delta H < 0$ ,  $\Delta S < 0$ , 表明范德华力和氢键是其主要分子间相互作用力。而 La+BLF 体系中  $\Delta S > 0$ ,  $\Delta H < 0$ , 表明疏水作用力和范德华力是其主

要分子间相互作用力。与图 4 分子对接显示的 PVOC 物质组与 BLF 结合的主要作用力类型一致。

分子间作用的能量转移机制分为辐射和非辐射 2 种, 前者会导致生物大分子荧光峰形发生畸变, 而后者不会导致生物大分子的荧光发射峰峰形发生畸变。PVOC 与 BLF 相互作用的荧光光谱中, BLF 的荧光发射峰形状未发生畸变(图 5), 可判断 Dt, La 和 Nt 及 PVOC 物质组与 BLF 间的作用荧光光谱为非辐射能量转移。根据 Förster 的偶极-偶极非辐射能量转移理论, 得到 Dt, La 和 Nt 及 PVOC 物质组与 BLF 的结合距离  $r$ (图 6) 分别为 3.99, 4.76, 1.27 和 1.64 nm。以上 4 个体系通过计算得出  $0.5 R_0 < r < 1.5 R_0$ , 即 PVOC 与 BLF 间的作用距离均  $< 7 \text{ nm}$ , 说明 PVOC 与 BLF 间的作用为短程分子间作用, 进一步验证了 PVOC 与 BLF 间发生了分子间作用, 同时也说明 Dt, La 和 Nt 与 BLF 的能量转移主要是通过非辐射荧光共振能量转移进行的。

#### 2.5 PVOC 对 BLF 蛋白二级结构的影响

将得出的 CD 光谱数据通过 Origin2021 软件进行可视化分析, 如图 7 所示。

Dt 和 La 分别与 BLF 结合后, BLF  $\alpha$ -螺旋结构的负带特征峰增强,  $\beta$ -折叠结构的正带特征峰增强(图 7A 和 7B),  $\alpha$ -螺旋结构和  $\beta$ -折叠结构所占比例均有所增大(图 7E)。Nt 与 BLF 结合后, BLF 的  $\alpha$ -螺旋负带特征峰削弱, 而对  $\beta$ -折叠结构在 190~

**Tab.3 Binding characteristics of BLF with Dt, La, Nt and PVOCs mix at 298 K by fitting fluorescence quenching data with Stern-Volmer and double logarithmic model and Hill model**

System	Stern-Volmer and double logarithmic model				Binding parameters of Hill model		
	$K_{sv}/\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	$K_q/\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	$R^2$	$n$	$n_H$	$K_{a2}/\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$	$R^2$
BLF+Dt	$3.09 \times 10^4$	$3.09 \times 10^{12}$	0.9582	0.81	1.64	$1.04 \times 10^5$	0.9667
BLF+La	$5.67 \times 10^4$	$5.67 \times 10^{12}$	0.9763	1.41	1.38	$5.83 \times 10^4$	0.9054
BLF+Nt	$9.64 \times 10^3$	$9.64 \times 10^{11}$	0.9836	0.87	2.03	$9.45 \times 10^4$	0.9547
PVOCs mix+BLF	$3.56 \times 10^3$	$3.56 \times 10^{12}$	0.9829	1.38	2.23	$1.42 \times 10^4$	0.9806

$K_{sv}$ : the Stern-Volmer quenching constant;  $K_q$ : the bimolecular quenching rate constant;  $R^2$ : the correlation coefficient;  $n$ : the number of binding sites;  $n_H$ : the Hill coefficient;  $K_{a2}$ : Hill binding constant obtained by fluorescence spectroscopy.

**Tab.4 Spontaneous tendency and main binding force types of Dt, La, Nt and PVOCs mix with BLF**

System	$\Delta H/\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	$\Delta S/\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$	Main force type	$\Delta G/\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$		Docking score/ $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	$r/\text{nm}$
				298 K	310 K		
Dt+BLF	-3.35	-84.81	Hydrogen bonds and van der Waals forces	-28.62	-29.64	-3.35	3.99
La+BLF	-30.68	11.71	Hydrophobic force and van der Waals force	-27.19	-27.05	-5.14	4.76
Nt+BLF	-7.79	-69.09	Hydrogen bonds and van der Waals forces	-28.38	-29.21	-4.18	1.27
PVOCs mix+BLF	-10.52	-63.33	Hydrogen bonds and van der Waals forces	-29.39	-30.15	-5.31	1.64

$r$ : the binding distance.

200 nm 处的正带特征峰正性增强(图 7C),说明 Nt 的介入使 BLF 的  $\alpha$ -螺旋结构减少, $\beta$ -折叠结构增加(图 7E)。而 PVOC 物质组与 BLF 结合则使得  $\alpha$ -螺旋负带特征峰负性和在 190~200 nm 处的正带特征峰正性增加,说明其与 BLF 结合后导致 BLF 的  $\alpha$ -螺旋松动和  $\beta$ -折叠结构增多。

### 2.6 三维荧光光谱法分析 PVOC 对 BLF 蛋白三级结构的影响

BLF 与 Nt 和 PVOC 物质组间作用前后的三维

荧光光谱见图 8。与二维荧光结果一致,Nt 与 PVOC 物质组均能有效猝灭 BLF 内源荧光;同样,由于 Dt 和 La 对 BLF 内源荧光的猝灭效果相较于 Nt 不明显,因此结果未展示。BLF+Nt、BLF+PVOC 物质组相互作用体系三维荧光光谱中 2 个主要检测峰 Peak1 和 Peak2 的变化结果见表 5。表 5 中可以看出 BLF 由于 Nt 和物质组的介入,使得  $\lambda_{EX}=230$  nm 处 Peak2 有较明显的红移,且荧光强度降低也较为显著,这说明,Nt 和物质组对 BLF 的二级结构影

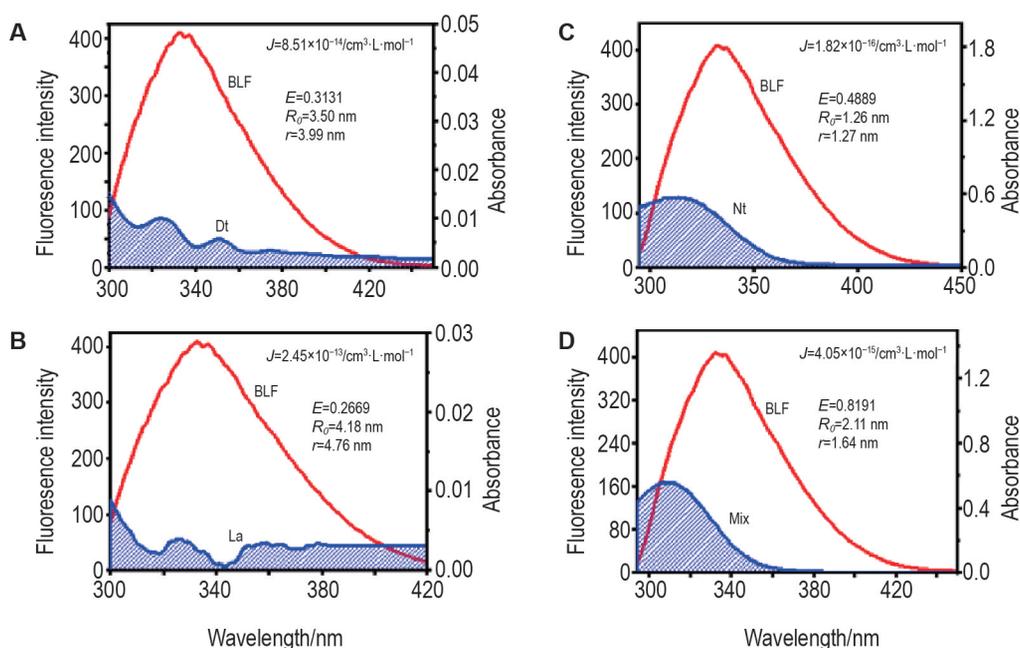


Fig.6 Fluorescence-UV overlapping spectra of Dt(A), La(B), Nt(C) and PVOCs(D) combined with BLF.

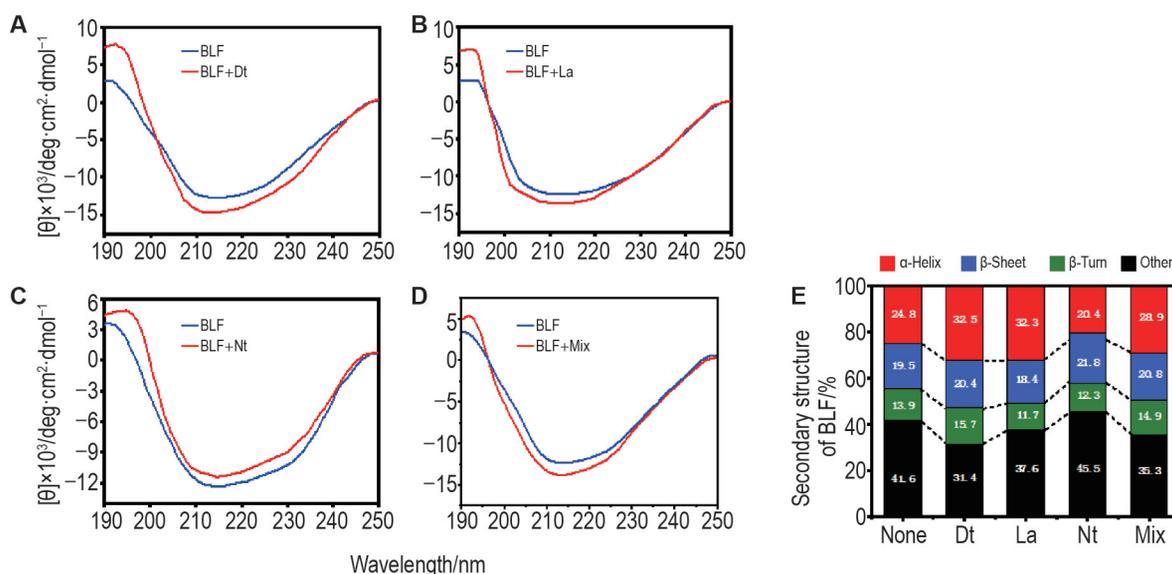


Fig.7 Circular dichroism of BLF combined with PVOCs. A-D: the change of circular dichromatography before and after BLF was combined with Dt, La, Nt and PVOCs mix; E: the change of the proportion of  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -sheet,  $\beta$ -turn and other secondary structure in BLF.

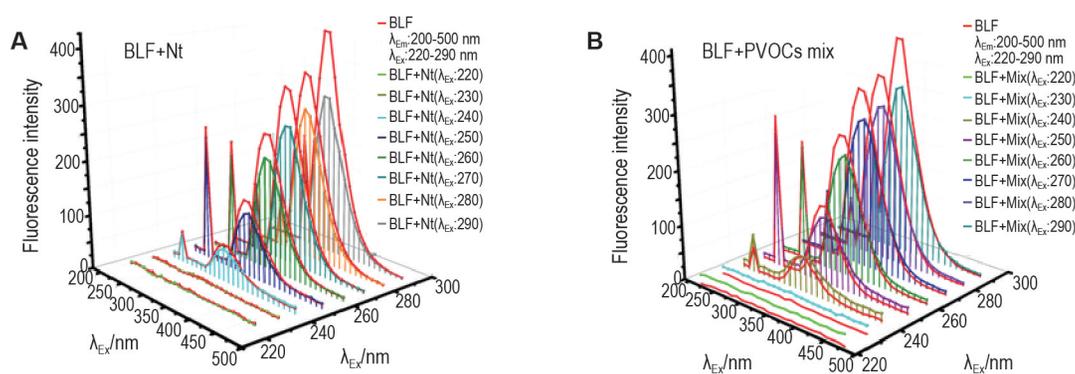


Fig.8 3D contour spectra of BLF combined with Nt (A) and PVOCs mix (B)

Tab.5 Three-dimensional fluorescence spectra of BLF before and after combination with Nt and PVOCs mix

Sample	Peak1	DI/nm	Intensity	Peak2	DI/nm	Intensity
BLF	280/335	55	412.5	230/251	21	9.96
Nt+BLF	280/341	61	318.4	230/278	48	5.13
BLF	280/335	55	411.8	230/251	21	22.67
PVOCs mix+BLF	280/337	57	298.4	230/398	168	5.13

PVOCs mix represent the mixed pharmacodynamic activity of PVOCs group; Peak1 means the peak at  $\lambda_{\text{ex}}=280$  nm; Peak2 means the peak at  $\lambda_{\text{ex}}=230$  nm;  $DI=\lambda_{\text{em}} - \lambda_{\text{ex}}$ .

响较大,导致 BLF 中大量的  $\alpha$ -螺旋松动及部分  $\beta$ -折叠结构增加,这与圆二色性光谱所得结果高度一致。

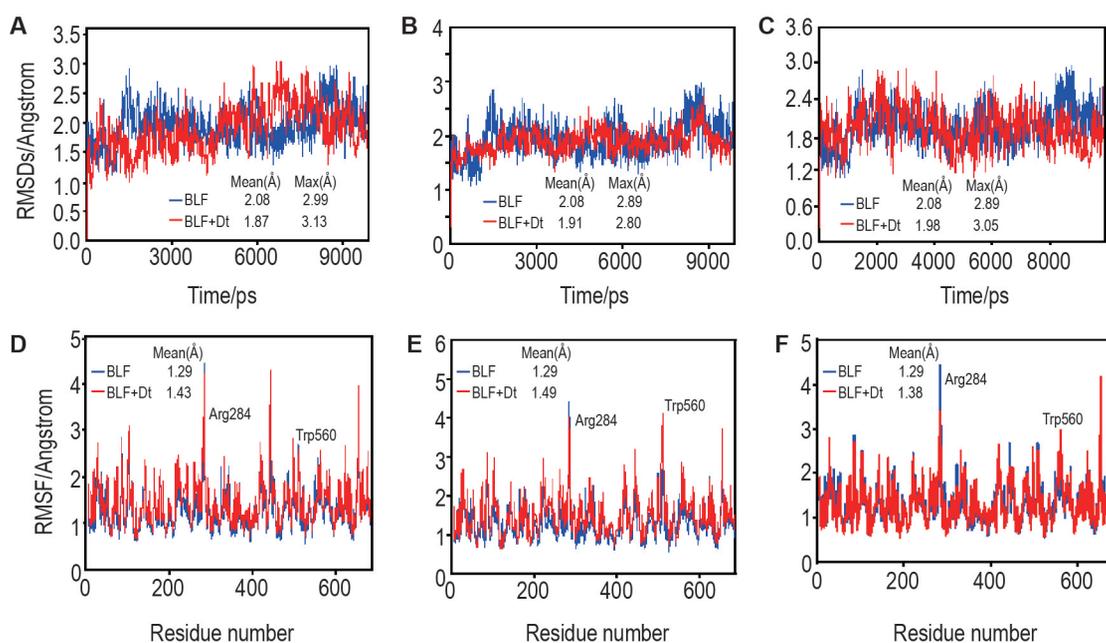
如等高线图(图 8)所示, Nt 和 PVOC 物质组与 BLF 结合后 Peak1 的荧光强度下降,且伴随轻微的红移,说明 Nt 和 PVOC 物质组与 BLF 发生了结合,并分别结合在 BLF 的荧光基团当中。同时也说明相互作用引起蛋白荧光基团残基微环境的改变,对其三级结构产生了影响。结合图 4 分子对接结果, Nt 结合在 BLF 上的 Trp560 残基上,结合距离为 3.60 Å。而 Trp560 是 BLF 上的荧光基团残基。表明光谱实验与分子模拟的结果一致。

## 2.7 BLF-PVOC 最佳结合模型的构象稳定性

为了探索 PVOC 物质组与不同蛋白受体相互作用规律,分别对 BLF 受体蛋白单体体系和由分子对接筛选出的 Dt+BLF, La+BLF, Nt+BLF 最佳结合模型体系进行 100 ns 的分子动力学模拟,在各个体系中均以初始蛋白构象为参照,在模拟时间内对系统 C $\alpha$  原子的 RMSD 进行计算。BLF 蛋白质单体体系的主链 RMSD 平均值为 0.208 Å, >0.2 Å, 各二元复合物体系 Dt+BLF, La+BLF, Nt+BLF 的蛋白质主链 RMSD 平均值分别为 0.187 Å, 0.191 Å 和 0.198 Å

(图 9A~C), 所有结果均 <0.2 Å, 表明所有的动态模拟轨迹平衡性是合理的,而且当 PVOC 物质组单分子进入 BLF 蛋白质活性位点后,使得二元复合物体系的稳定性增强。

Dt+BLF, La+BLF 和 Nt+BLF 最佳结合模型的稳定性通过分子动力学模拟估算后,对各个体系分子动力学平衡后氨基酸残基波动情况进行分析(图 9A~C)。结果表明, BLF 在被 Dt, La 和 Nt 分子进攻结合前,整个氨基酸残基 RMSF 波动值波动较大,当 Nt 配体分子进入 BLF 蛋白活性位点之后, RMSF 波动值的波动幅度减弱,说明 BLF 氨基酸残基能够与 Nt 或溶剂产生某种程度的结合作用。结合对接可视化结果, Nt 与 BLF Thr636 残基以 4.54 Å 的距离产生氢键作用(图 4D)可能导致了 BLF 构象的改变。如图 9D 所示, Dt 进入 BLF 蛋白活性位点后, BLF 整个氨基酸残基 RMSF 波动值波动幅度减小,且 BLF Trp560 残基 RMSF 波动值明显减小,说明 Dt 的介入使得 BLF 蛋白氨基酸残基刚性增大。结合图 4B 对接可视化结果, Dt 的双键及环己烯基于 BLF Trp560 和 Ala558 残基联合产生交叉疏水作用可能导致了 BLF 构象的变化,这与 CD 光谱得出的结论较为一致。



**Fig.9 Mean values of RMSD and RMSF for C $\alpha$  atoms of various systems.** A–C: the mean root mean square deviation (RMSD) values for the C $\alpha$  atoms of systems of BLF and Dt+BLF, BLF and La+BLF, and BLF and Nt+BLF. C–E: the mean root mean square fluctuation (RMSF) values for the C $\alpha$  atoms of systems of BLF and Dt+BLF, BLF and La+BLF, and BLF and Nt+BLF.

### 3 讨论

本研究利用 HS-SPME/GC-MS、多光谱验证、理论计算及分子建模研究柚皮 PVOC 物质组与 BLF 的相互作用,发现 BLF 对柚皮 PVOC 物质组有较强的亲和力,结合常数为  $1.42 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。BLF 对烯类 PVOC 的亲合力及结合力均较强,对酮类及酯类的均较弱。但若将烯类、酯类及酮类同时与 BLF 进行结合作用,BLF 对柚皮 PVOC 物质组的亲合力及结合力的总和增大,说明柚皮 PVOC 物质组对 BLF 的结合作用可能存在强抵消和弱助长的协同作用关系。在 BLF 作为载体时,与 BLF 亲合力较低但活性高的 PVOC 单分子能与亲合力较高的 PVOC 单分子混合作用于 BLF 载体蛋白,这可能为提高柚皮 PVOC 物质组单分子的生物利用度提供可行途径。

BLF 与柚皮 PVOC 物质组结合后,BLF 的 Tyr 残基所处的微环境疏水性降低,极性增加,PVOC 分子热运动剧增,触碰蛋白的活性位点机会增多。Dt 和 La 在 BLF 中存在独立结合位点与 BLF 形成复合物是静态猝灭机制,而物质组和 Nt 在 BLF 中则有多个结合位点且依然存在协同关系。Dt, La, Nt 和柚皮 PVOC 物质组与 BLF 间的作用荧光谱为非辐射能量转移。二级结构上 PVOC 物质组与 BLF 结合使得  $\alpha$ -螺旋负带特征峰负性和在 190~200 nm 处

的正带特征峰正性增加, $\alpha$ -螺旋松动和  $\beta$ -折叠结构增多。考虑到 BLF 由于小分子的嵌入结合,可能导致的蛋白三维结构疏松不利于保持蛋白的结构稳定性,本研究对蛋白结合柚皮 PVOC 物质组前后进行了分子动力学模拟,从模拟的 RMSD 结果可以得出,BLF 与柚皮 PVOC 物质组的结合对蛋白的分子结构不会有较大影响,反而在于物质组结合后蛋白的构象更趋于稳定;但是通过 RMSF 结果发现,由于物质组的结合,BLF 分子运动的自由度受到了限制。这也可能对维持蛋白的结构稳定性有一定的促进作用。另外,光谱及分子模拟共同评估了柚皮 PVOC 物质组与 BLF 的结合作用的结合距离、结合作用力、结合位置、结合前后蛋白的二和三级结构变化及束缚 PVOC 气体分子的关键氨基酸残基。组学角度下综合阐述柚皮 PVOC 物质组与载体蛋白的选择结合的分子机制,可为深入研究活性化合物的药理学及毒理学提供有益参考。

### 参考文献:

- [1] 范刚, 乔宇, 姚晓琳, 等. 柑橘加工制品中香气物质的研究进展 [J]. 中国农业科学 (*Scientia Agricultura Sinica*), 2009, 42: 4324-4332.
- [2] Gu S, Dai W, Chong Y, et al. The binding of key fishy off-flavor compounds to silver carp proteins: a thermodynamic analysis [J]. *RSC Adv*, 2020, 10(19):

- 11292-11299.
- [3] De Oliveira CP, Rodriguez-Lafuente A, Soares NDFF, *et al.* Multiple headspace-solid-phase micro-extraction as a powerful tool for the quantitative determination of volatile radiolysis products in a multilayer food packaging material sterilized with  $\gamma$ -radiation [J]. *J Chromatogr A*, 2012, 1244: 61-68.
- [4] Zhang J, Chen Z, Wang Z, *et al.* Interactions of fish proteins and volatile flavor compounds: mechanisms, affecting factors and analytical methods [J]. *Mini-Rev Org Chem*, 2021, 18(2): 258-268.
- [5] Ni H, Hayes H, Stead D, *et al.* Interaction of whey protein with polyphenols from salal fruits (*Gaultheria shallon*) and the effects on protein structure and hydrolysis pattern by flavourzyme<sup>®</sup> [J]. *Int J Food Sci Technol*, 2020, 55(3): 1281-1288.
- [6] Anantharamkrishnan V, Reineccius GA. Influence of pH, temperature, and water activity on covalent adduct formation between selected flavor compounds and model protein  $\beta$ -lactoglobulin [J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(47): 13833-13843.
- [7] Zhan F, Ding S, Xie W, *et al.* Towards understanding the interaction of  $\beta$ -lactoglobulin with capsaicin: multi-spectroscopic, thermodynamic, molecular docking and molecular dynamics simulation approaches [J/OL]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 105: 105767 (2020-02-14) [2022-02-03]. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105767>.
- [8] Wang R, Wang J, Liu H, *et al.* Sensitive immunoassays based on specific monoclonal IgG for determination of bovine lactoferrin in cow milk samples [J/OL]. *Food Chem*, 2021, 338: 127820 (2021-08-13) [2022-02-03]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127820>.
- [9] Liu H, Boggs I, Weeks M, *et al.* Kinetic modelling of the heat stability of bovine lactoferrin in raw whole milk [J/OL]. *J Food Eng*, 2020, 280: 109977 (2020-02-14) [2022-02-03]. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.109977>.
- [10] 申静. 乳铁蛋白联合幽门螺杆菌标准三联疗法对儿童 *H.pylori* 感染根除率的影响 [J/OL]. 中西医结合心血管病电子杂志 (*Cardiovascular Disease Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine*), 2019, 7(2): 175-177 [2022-02-03]. [https://wenku.baidu.com/view/893c741ca4c30c22590102020740be1e650ecc6c?fr=xueshu\\_top&\\_wks\\_=1668520295710](https://wenku.baidu.com/view/893c741ca4c30c22590102020740be1e650ecc6c?fr=xueshu_top&_wks_=1668520295710). DOI: CNKI:SUN:ZXJH.0.2019-02-137.
- [11] Feyzi S, Varidi M, Housaindokht MR, *et al.* Binding of safranal to whey proteins in aqueous solution: combination of headspace solid-phase microextraction / gas chromatography with multi spectroscopic techniques and docking studies [J]. *Food Chem*, 2019, 287: 313-323.
- [12] 邱晓红, 张丹丹, 韦航, 等. 基于 PTR-TOF-MS 与 GC-MS 技术的武夷水仙和武夷肉桂香气特征分析 [J]. 天然产物研究与开发 (*Nature product research and development*), 2018, 30(7): 1195-1201.
- [13] 李俭, 钟八莲, 姚锋先, 等. 顶空气相色谱-质谱法分析 3 种柚子果皮精油成分 [J]. 食品研究与开发 (*Food Research and Development*), 2020, 41(24): 173-180.
- [14] Mohseni-Shahri FS, Housaindokht MR, Bozorgmehr MR, *et al.* Studies of interaction between propranolol and human serum albumin in the presence of DMMP by molecular spectroscopy and molecular dynamics simulation [J]. *Biomacromolecul J*, 2015, 1(2): 154-166.
- [15] 郭明, 王晓萌, 詹敏忠, 等. 光谱法结合分子模拟法分析毛蕊花糖苷与血清白蛋白的分子作用机制 [J]. 中草药 (*Chinese Traditional and Herbal Drugs*), 2015, 46(4): 541-548.
- [16] Zheng Y, Guo M, Zhou Q, *et al.* Effect of lignin degradation product sinapyl alcohol on laccase catalysis during lignin degradation [J/OL]. *Ind Crops Prod*, 2019, 139: 111544 (2019-07-11) [2022-02-03]. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111544>.
- [17] Wani TA, Bakheit AH, Zargar S, *et al.* Spectrophotometric and molecular modelling studies on *in vitro* interaction of tyrosine kinase inhibitor linifanib with bovine serum albumin [J/OL]. *PLoS One*, 2017, 12(4): 176015 (2017-04-18) [2022-02-03]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176015>.
- [18] 方博文, 齐睿婷, 张英, 等. 常山胡柚果实不同部位有效成分含量及其抗氧化活性比较 [J]. 食品科学 (*Food Science*), 2015, 36(10): 158-163.
- [19] Ross PD, Subramanian S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability [J]. *Biochemistry*, 1981, 20(11): 3096-3102.
- [20] 方健, 吴晓宁, 蒋剑平, 等. 常山胡柚皮黄酮类成分指纹图谱与其抗氧化活性的谱效关系研究 [J]. 中国现代应用药学 (*Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy*), 2018, 35(10): 1489-1493.
- [21] Zhou F, Zhao M, Su G, *et al.* Binding of aroma compounds with myofibrillar proteins modified by a hydroxyl-radical-induced oxidative system [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(39): 9544-9552.
- [22] Wei J, Jin F, Wu Q, *et al.* Molecular interaction study of flavonoid derivative 3d with human serum albumin using multispectroscopic and molecular modeling approach [J]. *Talanta*, 2014, 126: 116-121.
- [23] Raza M, Jiang Y, Wei Y, *et al.* Insights from spectro-

- scopic and in-silico techniques for the exploitation of biomolecular interactions between human serum albumin and paromomycin [J]. *Colloid Surface B*, 2017, 157: 242-253.
- [24] 王桂花, 吕宝乾, 金启安, 等. 几种植物气味挥发物与性信息素组合对棉铃虫触角电位反应的影响 [J]. 热带作物学报 (*Chinese Journal of Tropical Crops*), 2013, 34 (9): 1781-1785.
- [25] Tomczyńska-Mleko M, Kamysz E, Sikorska E, *et al*. Changes of secondary structure and surface tension of whey protein isolate dispersions upon pH and temperature [J]. *J Food Sci*, 2014, 32(1): 82-89.
- [26] 梁臣艳, 冯旭, 甄汉深, 等. 广西柚子皮红外指纹图谱的研究 [J]. 安徽农业科学 (*Journal of Anhui Agricultural Sciences*), 2012, 40(24): 12464-12465.
- [27] 周清滕, 郭明, 胡智燕, 等. 药效活性 BVOCs 物质组与  $\beta$ -牛乳球蛋白选择性结合的分子机制 [J]. 中国生物化学与分子生物学报 (*Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*), 2021, 37(9): 1205-1219.
- [28] 陈岗, 周瑶, 詹永, 等. 不同树龄梁平柚果皮精油挥发性成分的差异分析 [J]. 食品工业科技 (*Science and Technology of Food Industry*), 2020, 41(1): 17-24.
- [29] Temthawee W, Panya A, Cadwallader KR, *et al*. Flavor binding property of coconut protein affected by protein-glutaminase: vanillin-coconut protein model [J/OL]. *LWT Food Sci Technol*, 2020, 130: 109676 (2020-05-30) [2022-02-03]. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109676>.
- [30] 张凤莲, 杨哲萱, 杨文静, 等. 欧盟当归属欧白芷制剂中呋喃香豆素风险评估报告的介绍及思考 [J]. 药物评价研究 (*Drug Evaluation Research*), 2021, 44(8): 1644-1652.

## Molecular mechanism and fingerprint of interactions of whole matter group of volatile organic compounds in pomelo peels binding with bovine lactoferrin

GENG Zhao-ming<sup>1</sup>, ZHOU Qing-teng<sup>1</sup>, GUO Ming<sup>1</sup>, HU Zhi-yan<sup>2</sup>, ZHU Jie-li<sup>2</sup>

(1. College of Chemistry and Materials Engineering, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Hangzhou 311300, China; 2. Zhejiang Academy of Forestry, Hangzhou 310023, China)

**Abstract: OBJECTIVE** To explore the molecular mechanism and interaction fingerprint between volatile organic compounds in pomelo peels (PVOCs) and bovine lactoferrin (BLF). **METHODS** Head-space solid phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry (HS-SPME/GC-MS) was used to obtain the interaction fingerprint of PVOCs from Guanxi honey pomelo, South African grapefruit and Israel green pomelo (3 samples for each kind, S1-S9) with BLF, and the active PVOCs substances were screened. A molecular model of PVOCs binding with BLF was established by molecular docking technology, and the molecular mechanism of the interactions between PVOCs and BLF was cross-verified by combining fluorescence emission, synchronous fluorescence, three-dimensional fluorescence, circular dichroism spectroscopy and kinetic simulation. **RESULTS** Twenty-one common components of PVOCs in S1-S9 were identified by HS-SPME/GC-MS, and *D*-limonene (Dt), linalool acetate (La) and naringone (Nt) were confirmed as the characteristic components. The molecular docking model of PVOCs interacting with BLF showed that the double bond and cyclohexene on Dt combined with Trp560 and Ala558 on BLF to produce cross-hydrophobic interaction. At the same time, amino acids Thr636, Thr527, Arg531 and other amino acids were bound to them by van der Waals forces. La molecule was encapsulated in hydrophobic pockets formed by Trp560, Thr636, Ser519, Thr527, Leu639, Gly525, Tyr524, Gly528, Glu521, Lys522, Arg531 and Ala558. The Nt molecule was wrapped in the hydrophobic pockets composed of Asp509, Glu521, Asp508, Trp560, Ser519, Lys520, Gly528, Thr527, Lys637, Glu635, Thr636, Ala558, Arg531, Glu353 and Lys522. The spectral results showed that PVOCs could cause endogenous fluorescence quenching of BLF. Dt and La had independent binding sites of BLF to form a complex, which was a static quenching mechanism. Nt had multiple binding

sites in BLF and there was a synergistic relationship. The interactions between Dt, La, Nt, PVOCs and BLF were non-radiation energy transfer, and the secondary structure change of BLF. **CONCLUSION** The binding strength of BLF and pomelo peel PVOCs group depends on the structure and content of PVOC molecules, and BLF is more inclined to select aldehyde and ketone PVOC molecules containing carbonyl oxygen structure. The introduction of the pharmacodynamically active PVOCs group causes the loosening and stretching of the BLF secondary structure, and the conformational change is the result of the combined action of van der Waals force, hydrophobic force and hydrogen bonding.

**Key words:** pomelo volatile organic compounds; bovine lactoferrin; headspace solid phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry (HS-SPME/GC-MS); multispectral; molecular modeling

**Foundation item:** Zhejiang Public Welfare Technology Application Research Project (LGN20B070001)

**Corresponding author:** GUO Ming, E-mail: guoming@zafu.edu.cn

(收稿日期: 2021-02-03 接受日期: 2022-03-10)

(本文编辑: 魏霞)

## 《中国药理学与毒理学杂志》编辑部投稿温馨提示

结合本刊的稿约及平时常见的问题,编辑部温馨提示:

1. 在线(<http://cjpt.magtechjournal.com>)投稿成功后,请尽快在线上传“版权专有使用授权书”,编辑部收到全部材料后方开始稿件的处理工作。

2. “版权专有使用授权书”可在本刊网站的“投稿指南”下载;签名作者的顺序一定要与稿件署名顺序一致;不方便签字者,可由第一作者或通讯作者代签;加盖单位公章。

3. 本刊中英文稿件兼收,优秀英文稿件优先刊出。

4. 为方便修改,文稿要采用Word文档格式;提供中英文的文题、摘要、作者单位、关键词及基金项目名称。摘要的结果部分不能只进行结论性描述,要给出重要的数据。为便于国际交流,中文稿件的英文摘要可以比中文摘要更详细。

5. 为便于文中插图的编辑处理及排版,由数据利用软件绘出的柱图或线图,要以原图的形式插入(双击能够进入作图软件),不要以图片形式插入,同时用表格形式给出作图数据( $\bar{x}\pm s$ )。图表一律用英文,同时图表要自明。

6. 为缩短稿件的处理时间,请一定尽快修改稿件,及时发回编辑部。