DOI:10.12441/spyswjs.20240520002 [文章编号] 1673-1689(2025)03-0093-09

不同蔗糖浓度下β-乳球蛋白与花青素结合的分子动力学模拟

张喜才[1,2] 胡 霄[1] 黄业传[1*] 李 蓉[1] 阮 军[3] 李硕芳[3]

(1. 荆楚理工学院食品与生物学院,湖北 荆门 448000;2. 荆楚理工学院特色食品功能挖掘与综合利用团队,湖北 荆门 448000;3. 湖北钟祥聚瑞食品有限公司,湖北 荆门 431900)

摘要:【目的】探究含乳植物饮料中蔗糖的添加对乳蛋白结构与性质、蛋白质与植物中小分子物质结合的影响。**【方法】**以β-乳球蛋白和花青素为研究对象,采用分子动力学模拟不同蔗糖浓度(0、0.25、0.50、0.75、1.00 mol/L)下两者的结合规律与蛋白质结构变化。**【结果】**花青素主要结合在β-乳球蛋白的疏水腔。以最优结合构象为起始结构,用GROMACS软件进行150 ns的分子动力学模拟,结果表明,蔗糖环境中β-乳球蛋白的结构更加稳定,氨基酸残基波动也更小;蛋白质的α螺旋数量增加,使蛋白质之间的氢键数量显著增加,同时伴随β折叠数量的减少。与对照组相比,β-乳球蛋白与花青素之间的结合自由能在0.25、0.50 mol/L蔗糖溶液中的变化较小,但在0.75 mol/L蔗糖溶液中显著增加,在1.00 mol/L蔗糖溶液中显著降低,该结合自由能的差异主要是由范德华力和氢键的变化引起的。**【结论】**蔗糖浓度的变化会造成花青素在β-乳球蛋白表面的结合位置和结合机理产生差异。

关键词:β-乳球蛋白;蔗糖;花青素;分子动力学

Molecular Dynamics Simulation of the Binding Between β-Lactoglobulin and Anthocyanins Under Different Sucrose Concentrations

ZHANG Xicai[1,2] *HU Xiao*[1] *HUANG Yechuan*[1*] *LI Rong*[1] *RUAN Jun*[3] *LI Shuofang*[3]

(1. College of Food and Biology, Jingchu University of Technology, Jingmen 448000, China; 2. Functional Exploration and Comprehensive Utilization Team for Specialty Foods, Jingchu University of Technology, Jingmen 448000, China; 3. Hubei Zhongxiang Jurui Food Co., Ltd., Jingmen 431900, China)

Abstract: [**Objective**] This study aims to investigate the effects of adding sucrose to plant-based beverages containing milk on the structure and properties of milk proteins, as well as the binding of proteins to small molecules in plants. [**Method**] Molecular dynamics simulation was conducted for the binding patterns between β-lactoglobulin and anthocyanins and the protein structure changes under different sucrose concentrations (0, 0.25, 0.50, 0.75, and 1.00 mol/L). [**Result**] Anthocyanins mainly bound to the hydrophobic cavity of β-lactoglobulin. With the optimal binding conformation as the starting structure, GROMACS was used for the molecular dynamics simulation at 150 ns. The results showed that the structure of β-lactoglobulin in the sucrose solution was more stable, with milder fluctuations of amino acid residues. The increase in the number of α helixes significantly increased the hydrogen bonds between proteins, which was accompanied by the decrease in the number of β folds. The binding free energy between β-lactoglobulin and anthocyanins did not change much in 0.25 and 0.50 mol/L sucrose environments, but significantly increased in the 0.75 mol/L sucrose solution and significantly

基金项目:湖北省科技计划项目(2022BEC031)。

通信作者:黄业传(1975—),男,博士,教授,硕士研究生导师,主要从事现代食品加工研究。E-mail: huangyc@jcut.edu.cn

收稿日期:2024-05-20 **修回日期:**2024-06-24

decreased in the 1.00 mol/L sucrose solution compared with the control group. The differences in binding free energy were mainly caused by changes in van der Waals forces and hydrogen bonding. [**Conclusion**] The changes in sucrose concentration would cause the differences of the binding position and binding mechanisms of anthocyanins on the *β*-lactoglobulin surface.

Keywords: *β*-lactoglobulin; sucrose; anthocyanins; molecular dynamics

牛乳营养丰富、老少皆宜，不仅能直接饮用，也经常作为配料添加到其他食物中，如含乳饮料、糕点等。含乳饮料中经常会加入一些植物原料，如茶叶、果汁和一些植物提取物。植物原料中含有一些小分子功能成分，而黄酮、多酚，蛋白质可能会与这些小分子物质结合，影响蛋白质和小分子物质的功能性质，如蛋白质的结构、持水性、溶解性等以及小分子物质的抗氧化性等，从而影响产品品质。较多学者对小分子物质与蛋白质的结合位置和机理进行了研究[1-4]，结果表明两者的结合主要是非共价结合，在一定条件下也能共价结合[5-6]。

含乳植物饮料中还会加入蔗糖等甜味剂，蔗糖的加入不可避免会影响到蛋白质的特性以及蛋白质与小分子物质的结合。研究表明，糖类对蛋白质的结构与性质会产生影响[7-10]，不同食物中蔗糖浓度差别较大，不同浓度的蔗糖对蛋白质与小分子物质结合的影响也可能存在较大差异，因此不同浓度蔗糖对蛋白质与小分子物质结合的影响需进一步研究。

目前，关于蛋白质与小分子物质结合的研究方法主要有2种，一是利用光谱技术和原子力显微镜等方法，但该方法只能探究蛋白质的静态结构，生物体中的大部分蛋白质都在不断变化，为从分子水平更好地了解和认识蛋白质的动态变化，很多研究者都采用第二种研究方法——分子动力学模拟技术[11]，如芹菜素、柑橘黄酮、姜黄素等与牛乳蛋白质之间的结合机理均有报道[12-14]。这些模拟大部分在水溶液中进行，在其他溶液中的模拟很少。目前仅有食盐[15-16]和多元醇[17]体系的相关研究，而蔗糖或其他糖溶液中的分子动力学模拟鲜有报道。

牛乳蛋白质主要由酪蛋白和乳清蛋白组成，其中乳清蛋白含有多种生物活性物质，*β*-乳球蛋白是乳清中含量最为丰富的蛋白质，具有良好的营养与功能特性，对疏水及两性配体均有较强的亲和力[18]，因而广泛应用于食品工业中。花青素常存在于植物原料中，因此作者采用分子对接和分子动力学模拟技术探究不同蔗糖浓度下*β*-乳球蛋白与花青素的结合规律，为含乳功能饮料的开发提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 蔗糖的分子结构绘制

用 ChemDraw Professional 17.1 和 Chem3D 17.1 软件绘制蔗糖的分子结构，并用软件自带的模板进行能量优化；用 amber 软件的 antechamber 工具生成蔗糖的 mol2 文件，使用 amber 的 tleap.in 脚本生成蔗糖的拓扑文件和坐标文件，并利用 acpype. py 脚本，将拓扑和坐标文件转换成 Gromacs 软件格式的 top 文件和 gro 文件。

1.2 *β*-乳球蛋白与花青素的分子对接

从 RCSB 网站下载*β*-乳球蛋白的初始结构，编号为 3npo，用 PyMOL 软件除去结晶水。用 ChemDraw Professional 17.1 和 Chem3D 17.1 准备花青素的分子结构，并用其自带的力场进行结构优化和能量最小化。参照孔庆新等[19-20]的方法，用 AutoDock Tools（1.5.6 版本）软件分别对*β*-乳球蛋白和花青素进行预处理和分子对接，对接后搜索前 20 个最优的构象。

1.3 不同蔗糖浓度下*β*-乳球蛋白与花青素结合的分子动力学模拟

以 1.2 小节中获得的最优构象作为初始结构进行分子动力学模拟，首先从复合物剥离出小分子物质并在 ATB 网站生成其 top 文件。用 Gromacs 软件进行分子动力学模拟[21]，将小分子物质的 top 文件合并到蛋白质中。模拟时选择 AMBER99SB-ILDN protein 力场和 TIP3P 水分子模型，将*β*-乳球蛋白放入立方体水盒子中，并根据相应的蔗糖浓度添加蔗糖分子到盒子中，如 1.00 mol/L 添加 242 个蔗糖分子。分子动力学模拟的其他条件参照孔庆新等[20]的报道，共进行 150 ns 的模拟。

模拟结束并去除周期性边界条件后，使用

gmx自带命令分析不同蔗糖浓度下花青素与β-乳球蛋白的均方根误差（RMSD）、蛋白质残基波动（RMSF）、蛋白质二级结构、蛋白质间氢键、回旋半径（R_g）。RMSD、R_g分析150 ns的数据，其他指标分析100~150 ns时的数据。使用Origin 8.0软件作图。

1.4　β-乳球蛋白与花青素的结合自由能计算

提取各模拟体系100~150 ns的轨迹（xtc文件），借助g_mmpbsa工具，利用MM-PBSA法计算花青素与β-乳球蛋白之间的结合自由能[22-23]。

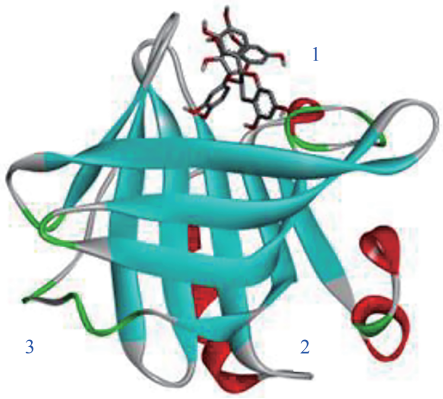
1.5　β-乳球蛋白与花青素结合的二维平面与表面结构图

提取5个模拟复合物100~150 ns的平均结构，使用LigPlot+（V 2.2）分析β-乳球蛋白与花青素之间的疏水相互作用与氢键作用；并用PyMOL软件绘制β-乳球蛋白与花青素结合的表面结构图[24]

2　结果与讨论

2.1　β-乳球蛋白与花青素的结合位点

如图1所示，花青素主要结合在β-乳球蛋白上部的疏水腔处，分子对接选取的前20个优势构象全部在该位置，只是结合姿势有所差异。有学者研究茶多酚与β-乳球蛋白的结合规律时发现，主要结合位点有3个，除了1号位置所在的疏水腔外，还有位于β-乳球蛋白表面的2号和3号位置[20]。但倩誉[25]发现，在体系为中性时，小分子物质主要结合在疏水腔，这与本研究得到的结论一致，本次模拟也是在中性条件下进行的。Al-Shabib等[26]发现芦丁可同时结合在疏水腔与蛋白质表面，但疏水腔的结合力更强。Gholami等[4]发现小分子物质只结合于乳球蛋白表面而非疏水腔。分子对接中能量最高的结合姿势见图1，后续的分子动力学模拟将以此为初始结构。



1~3号位置分别代表结合位点。

图1　β-乳球蛋白与花青素的分子对接结果

Fig. 1　Molecular docking results between β-lactoglobulin and anthocyanin

2.2　β-乳球蛋白与花青素在不同蔗糖浓度下结合的分子动力学分析

2.2.1　不同蔗糖浓度对β-乳球蛋白与花青素RMSD的影响

RMSD是评价不同模拟时间点蛋白质构象与初始结构的平均偏差，其值越大表明体系越不稳定。不同浓度的蔗糖体系中，β-乳球蛋白和花青素的RMSD见图2~3。总体看来，RMSD在模拟过程中保持平衡且变化不大，尤其是100 ns后，除了对照组，其他基本保持恒定。比较100 ns后RMSD的平均值，对照组为0.197 nm，当溶液中存在蔗糖时，RMSD均有一定程度的降低，说明蔗糖的存在对β-乳球蛋白的结构有一定的稳定作用。随蔗糖浓度的增加，4个样品的RMSD分别为0.176、0.176、0.163、0.173 nm，其中蔗糖浓度为0.75 mol/L时，β-乳球蛋白结构最为稳定。Walayat等[8]通过分子动力学模拟发现，魔芋低聚糖对鲢鱼蛋白质有保护作用，主要是因为魔芋低聚糖和蛋白质的部分氨基酸形成了氢键，氢键的形成可能导致蛋白质RMSD的增加，与本研究得到的结果有差异，可能是因为该研究对象是低聚糖而本研究是双糖，且研究的蛋白质也不同。

相对β-乳球蛋白而言，花青素的RMSD波动更为剧烈，特别是当蔗糖浓度为0.50 mol/L和1.00 mol/L时。作者前期研究也发现，不同pH的茶多酚与β-乳球蛋白结合时，小分子物质的波动略大于蛋白质。然而，Gholami等[4]研究柚皮苷和β-乳球蛋白的结合时，发现小分子物质波动更小；Al-Shabib等[26]研究芦丁与β-乳球蛋白的结合时，发现两者波动相当。如图3所示，随蔗糖浓度的提高，花青素的RMSD分别为0.235、0.300、0.427、0.293、0.617 nm，说明蔗糖对β-乳球蛋白RMSD的影响和花青素不一样，花青素是在蔗糖存在时波动更大，导致这种差异的具体原因有待进一步探究。

2.2.2　不同蔗糖浓度对β-乳球蛋白R_g的影响

R_g主要反映蛋白质结构的致密性，能表征蛋白质分子结构的膨胀和收缩程度，其值越小说明结构

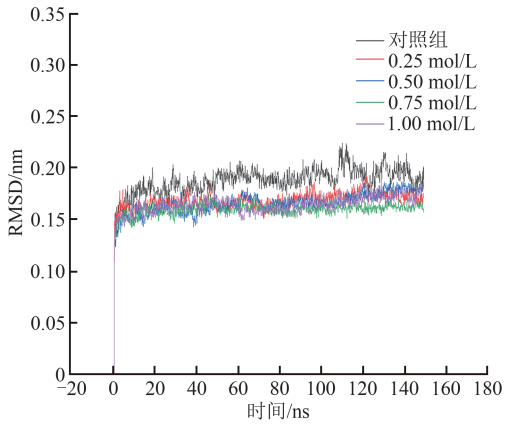


图 2　不同蔗糖浓度对 β-乳球蛋白 RMSD 的影响

Fig. 2　Effects of different sucrose concentrations on the RMSD of β-lactoglobulin

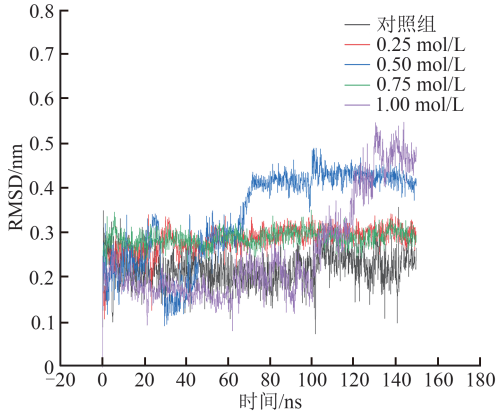


图 3　不同蔗糖浓度对花青素 RMSD 的影响

Fig. 3　Effects of different sucrose concentrations on the RMSD of anthocyanins

越致密，反之越疏松[27]。如图 4 所示，R_g 在不同蔗糖浓度下变化较小。分析 100 ns 后的数据发现，没有添加蔗糖时，β-乳球蛋白 R_g 最小，为 1.496 nm；而在不同浓度的蔗糖溶液中，β-乳球蛋白 R_g 有不同程度的增加，当蔗糖浓度为 0.50 mol/L 时，β-乳球蛋白 R_g 最大，为 1.510 nm，说明蔗糖的添加会使 β-乳球蛋白的结构变得略为疏松。Walayat 等[8]通过分子动力学模拟发现，魔芋低聚糖的加入对鲢鱼蛋白质 R_g 的影响也较小。

2.2.3　不同蔗糖浓度对 β-乳球蛋白 RMSF 的影响

RMSF 主要体现蛋白质中氨基酸残基的波动情况，RMSF 越大说明残基柔性越大，平均柔性越大的蛋白质结构越不稳定。如图 5 所示，不同蔗糖浓度对 β-乳球蛋白 RMSF 的影响较小，这与作者前期研究不同压力或 pH 条件下 β-乳球蛋白 RMSF 时数据基本一致[19-20]。就 β-乳球蛋白 RMSF 的平均值

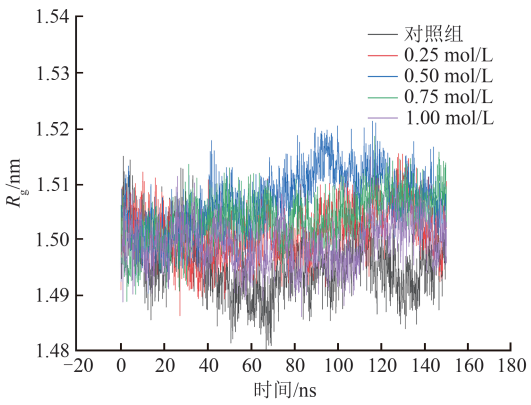


图 4　不同蔗糖浓度对 β-乳球蛋白 R_g 的影响

Fig. 4　Effects of different sucrose concentrations on the R_g of β-lactoglobulin

而言，对照组的波动最大，为 0.105 7 nm，而随蔗糖浓度的增加，RMSF 依次为 0.089 0、0.085 4 、0.084 2、0.088 8 nm，因此蔗糖的添加可以减少蛋白质中氨基酸残基的波动，这与 RMSD 的变化规律一致。波动较大的主要有 5、8、35、51、62、63、77、88、100、112、113、114、115、141 等位置的氨基酸残基，其中与花青素结合的氨基酸主要有 88 位的 Asn 和 114 位的 Glu。

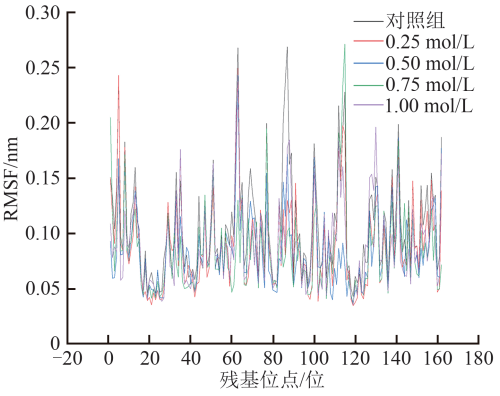


图 5　不同蔗糖浓度对 β-乳球蛋白 RMSF 的影响

Fig. 5　Effects of different sucrose concentrations on the RMSF of β-lactoglobulin

2.2.4　不同蔗糖浓度对 β-乳球蛋白间氢键的影响

氢键是一种稳定蛋白质结构的非共价作用力。如图 6 所示，在不同浓度的蔗糖溶液中，β-乳球蛋白间氢键相比对照组均有不同程度提高。无蔗糖时，100 ns 后蛋白质间平均氢键数量为 121.5 个，而随蔗糖浓度的增加，平均氢键数量分别为 131.1 个、123.5 个、128.3 个、126.3 个。这与食盐对蛋白质间氢键的影响不一致，可能是因为食盐溶液中的钠离子或氯

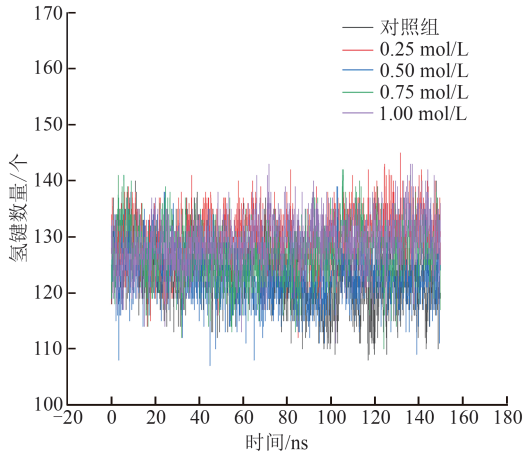


图 6　不同蔗糖浓度对β-乳球蛋白间氢键的影响

Fig. 6　Effects of different sucrose concentrations on the hydrogen bonds between β-lactoglobulin

离子会破坏蛋白质间的氢键[15-16]，而蔗糖分子有利于β-乳球蛋白之间氢键的形成。氢键的变化规律与RMSD一致，蛋白质间存在更多氢键能使蛋白质结构更加稳定。

2.2.5　不同蔗糖浓度对β-乳球蛋白二级结构的影响

如表1所示，蔗糖溶液中β-乳球蛋白的二级结构会发生变化，不同蔗糖浓度下β-乳球蛋白二级结构变化规律不一致。在蔗糖环境中，各蛋白质体系的α螺旋数量会增加，而β折叠数量相应会下降。α螺旋数量在蔗糖浓度为0.25 mol/L时增加幅度最大，β折叠数量则在蔗糖浓度为0.50 mol/L时下降最明显。α螺旋数量的增加可能与蛋白质之间氢键数量的增加有关，蛋白质间氢键对稳定α螺旋有重要作用[28]。Jafari等[7]发现蔗糖浓度为0~0.4 mol/L时可增加α螺旋和无规卷曲的数量，而使β折叠和弯曲的数量减少；杨宝燕等[29]发现壳寡糖与脂肪酶相互作用后β折叠含量增加而无规卷曲含量下降；杭瑜瑜等[10]发现随着聚葡萄糖添加量的增加，鱼糜凝胶中肌原纤维蛋白的α螺旋结构减少，β折叠结构增加。各研究的结果不尽相同可能与试验对象、试验方法的差异有关。

表1　不同蔗糖浓度对β-乳球蛋白二级结构的影响

Table 1　Effects of different sucrose concentrations on the secondary structure of β-lactoglobulin

蔗糖浓度/(mol/L)	无规卷曲数量/个	β折叠数量/个	弯曲数量/个	β转角数量/个	α螺旋数量/个
0	32.59±1.51	65.17±1.63	25.46±2.45	16.37±2.72	20.67±3.25
0.25	32.78±1.50	64.61±1.05	26.41±2.02	16.48±3.27	23.25±2.67
0.50	32.67±2.80	62.37±2.58	26.43±1.50	15.51±2.80	21.94±2.89
0.75	32.48±1.65	63.97±1.79	25.90±1.98	17.17±3.28	22.70±3.49
1.00	33.90±1.57	63.21±1.00	25.76±1.92	15.57±2.87	21.37±2.63

2.3　β-乳球蛋白与花青素的结合自由能变化

如表2所示，β-乳球蛋白与花青素的结合自由能主要是范德华力，其次为静电相互作用，非极性溶剂化能也贡献了少部分能量，而极性溶剂化能对两者的结合起到阻碍作用。从总结合自由能来看，0.25、0.50 mol/L的蔗糖对β-乳球蛋白与花青素的结合自由能影响较小，相较于对照组略有增加；当蔗糖浓度为0.75 mol/L时，结合自由能明显增加，其主要是由范德华力的增加引起的，另外非极性溶剂化能也有所增加，其主要反映疏水相互作用增强；当蔗糖浓度为1.00 mol/L时，β-乳球蛋白与花青素的总结合自由能明显低于对照组，特别是范德华力大幅度降低，虽静电相互作用有所增加，但静电相互作用被极性溶剂化能所屏蔽[30]。

一些研究者报道了小分子物质与蛋白质之间的结合自由能：孔庆新等[19-20]研究了不同压力和pH条件下茶多酚与β-乳球蛋白之间的结合自由能，得到的结合自由能小于本研究结果，说明在蔗糖溶液中小分子物质与蛋白质的结合更为紧密，蔗糖对两者的结合起到了积极作用，具体的机制有待进一步研究；Al-Shabib等[26]研究了芦丁和β-乳球蛋白的结合，其结合自由能大于本研究结果，这可能与计算方法的差异有关，Al-Shabib等使用的是MMGBSA计算方法，而本研究中使用的是MMPBSA；Zhan等[30]研究β-乳球蛋白与辣椒素结合时发现，两者主要以范德华力进行结合。

当蔗糖浓度为0.75 mol/L时，β-乳球蛋白与花青素的总结合自由能最大；当蔗糖浓度为1.00 mol/L时，β-乳球蛋白与花青素的总结合自由能最小。因此，为进一步探究不同氨基酸残基对总结合自由能

表 2 不同蔗糖浓度对 β-乳球蛋白与花青素结合自由能的影响

Table 2 Effects of different sucrose concentrations on the binding free energy between β-lactoglobulin and anthocyanins

蔗糖浓度/(mol/L)	范德华力/(kJ/mol)	静电相互作用力/(kJ/mol)	极性溶剂化能/(kJ/mol)	非极性溶剂化能/(kJ/mol)	总结合自由能/(kJ/mol)
0	−227.021±16.941	−36.303±11.031	100.930±14.488	−17.915±1.237	−180.309±14.850
0.25	−222.411±10.642	−40.351±11.916	97.170±14.450	−17.906±0.878	−183.498±11.775
0.50	−227.779±8.516	−35.086±5.452	90.815±7.301	−16.210±0.718	−188.280±10.005
0.75	−256.206±10.059	−32.658±7.905	95.390±9.615	−19.305±10.781	−212.719±10.677
1.00	−200.000±12.008	−43.009±10.956	105.653±10.439	−17.240±0.813	−154.596±12.762

的贡献，在蔗糖浓度分别为 0.75、1.00 mol/L 时，对 β-乳球蛋白与花青素结合有明显贡献（<−1.0 kJ/mol）或阻碍（>1.0 kJ/mol）作用的氨基酸及其能量贡献进行分析。如图 7 所示，当蔗糖浓度为 0.75 mol/L 时，有 22 个氨基酸残基对 β-乳球蛋白与花青素的结合有明显贡献作用，特别是 31、38、39 和 87 位氨基酸，而阻碍作用较大的只有 60 位的 Lys；当蔗糖浓度为 1.00 mol/L 时，有明显贡献作用的氨基酸只有 13 个，且大部分氨基酸的贡献作用降低，如蔗糖浓度为 0.75 mol/L 时贡献作用较大的有 31、38、39 和 87 位氨基酸；对两者结合起明显阻碍作用的氨基酸增加为 2 种，其中 85 位氨基酸从起正面作用到起负面作用。上述综合作用导致蔗糖浓度为 1.00 mol/L 时 β-乳球蛋白与花青素的结合自由能远低于蔗糖浓度为 0.75 mol/L 时。

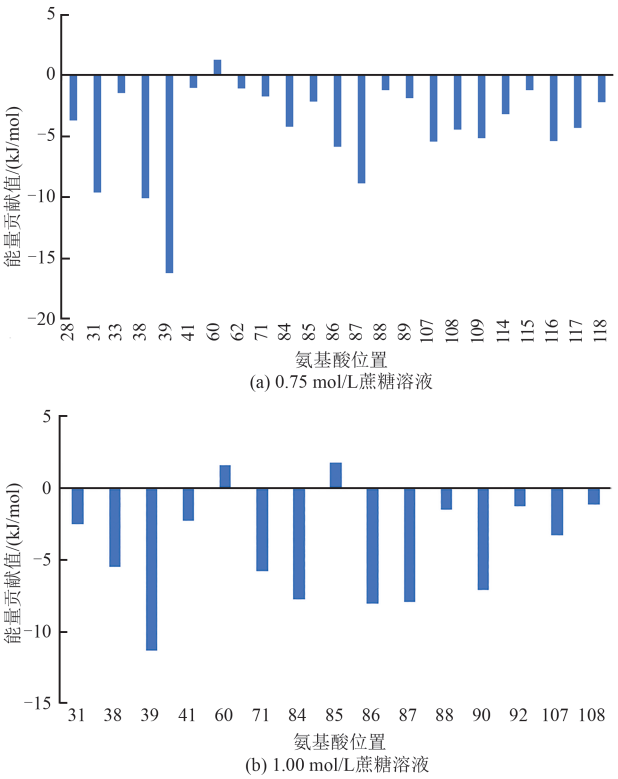


图 7 β-乳球蛋白与花青素结合中主要氨基酸的能量贡献

Fig. 7 Energy contributions of key amino acids in the binding of β-lactoglobulin to anthocyanins

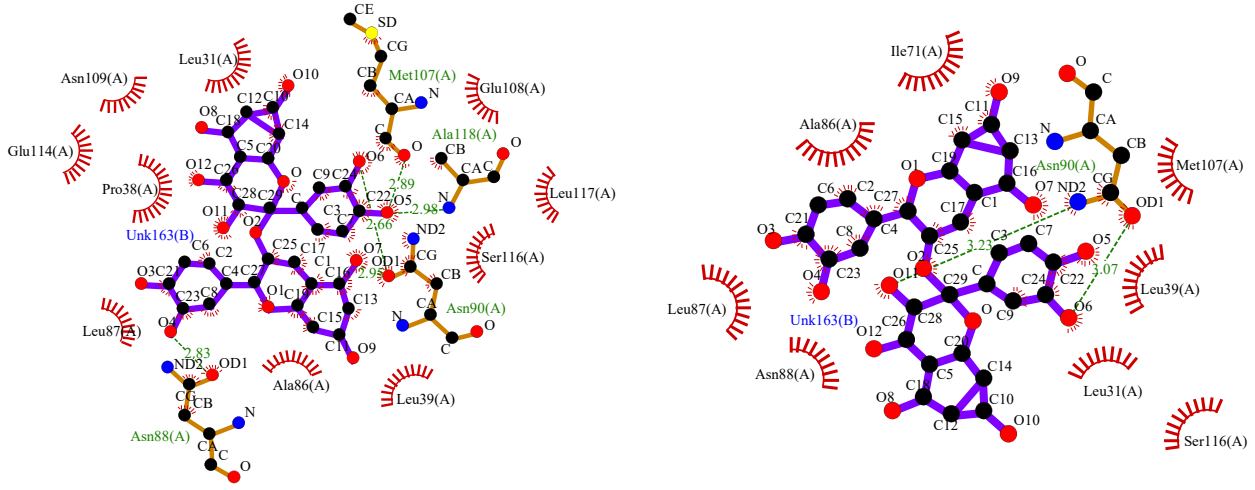
2.4 β-乳球蛋白与花青素结合机制分析

为进一步探究蔗糖浓度对结合机制的影响，以自由结合能最高和最低的 2 个模拟体系为例进行分析。0.75、1.00 mol/L 蔗糖溶液中，β-乳球蛋白与花青素结合位点处的二维平面图见图 8，在蔗糖浓度为 0.75 mol/L 时，Unk 与蛋白质之间形成了 4 个氢键，分别与 107 位 Met、118 位 Ala、88 位 Asn 和 90 位 Asn 之间形成了 1 个氢键；蔗糖浓度为 1.00 mol/L 时，只与 90 位 Asn 形成 2 个氢键，因此在 2 种不同的蔗糖浓度下，β-乳球蛋白与花青素之间无论是氢键的数量还是氢键形成的位置都发生了明显变化。另外，从疏水环境看来，蔗糖浓度分别为 0.75、1.00 mol/L 时，周围分别有 10 个和 8 个氨基酸，只有 5 个氨基酸相同，说明 2 个体系的疏水环境差异也较大。

Cheng 等[31]发现矢车菊素-3-O-葡萄糖苷主要吸附在 β-乳球蛋白的疏水腔，主要靠氢键和疏水相互作用进行结合。贾晶晶[32]发现 EGCG 与 β-乳球蛋白主要以疏水相互作用进行结合，同时也以范德华力和氢键进行结合。本研究中，β-乳球蛋白与花青素的结合同时存在氢键、疏水相互作用、静电相互作用和范德华力，但静电相互作用被极性溶剂化能所掩蔽导致作用不明显。蔗糖浓度为 1.00 mol/L 时，β-乳球蛋白与花青素的结合自由能显著低于蔗糖浓度为 0.75 mol/L 时，主要是由于范德华力、氢键同时减弱引起的，而疏水相互作用总体上差异不大。作者前期研究发现，不同 pH 下 EGCG 与 β-乳球蛋白之间的结合自由能不同，这主要是由范德华力、氢键和疏水相互作用的差异引起的[20]，而不同压力条件下则主要与范德华力和氢键相关[19]。

为探究蔗糖浓度对 β-乳球蛋白表面结构及与花青素结合的影响，用 PyMOL 软件绘制了

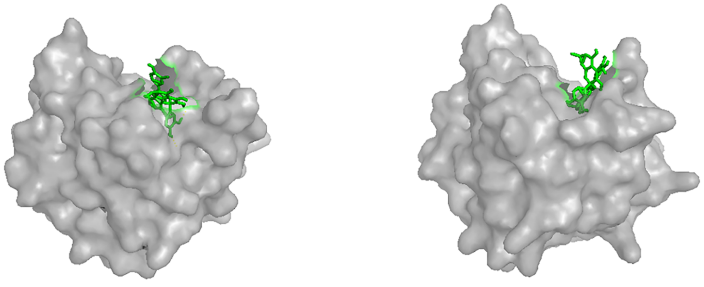
β-乳球蛋白表面结构图，蔗糖浓度分别为0.75、1.00 mol/L时，100~150 ns模拟过程中β-乳球蛋白的表面结构及花青素在结合位点处的情况见图9。与蔗糖浓度为0.75 mol/L时相比，蔗糖浓度为1.00 mol/L时的β-乳球蛋白表面结构发生了较大变化。蔗糖浓度为0.75 mol/L时，花青素的结合更靠近β-乳球蛋白内部，而蔗糖浓度为1.00 mol/L时，花青素与β-乳球蛋白的结合较为松散。结合图8分析可知，蔗糖浓度为0.75 mol/L时，β-乳球蛋白与花青素之间形成的氢键数量更多，且2个蔗糖浓度下疏水环境和结合自由能的差异也较大，因此，2个蔗糖浓度下β-乳球蛋白与花青素之间的结合位置和结合机理都发生了较大变化。



(a) 0.75 mol/L蔗糖溶液　　(b) 1.00 mol/L蔗糖溶液

图8　β-乳球蛋白与花青素结合的二维平面图

Fig. 8　Two-dimensional planar diagram of the binding between β-lactoglobulin and anthocyanins



(a) 0.75 mol/L蔗糖溶液　　(b) 1.00 mol/L蔗糖溶液

图9　β-乳球蛋白与花青素结合的表面结构图

Fig. 9　Surface structure of the binding between β-lactoglobulin and anthocyanins

3　结论

花青素主要结合在β-乳球蛋白的疏水腔位置。在β-乳球蛋白与花青素的混合溶液中加入0~1.00 mol/L的蔗糖，会使β-乳球蛋白的结构更稳定，残基波动更小，β-乳球蛋白的α螺旋数量增加，蛋白质间氢键数量明显增加。花青素在蔗糖溶液中的波动大于β-乳球蛋白，其与β-乳球蛋白主要靠范德华力、疏水相互作用、氢键和静电相互作用进行结合。花青素与β-乳球蛋白的结合自由能在蔗糖浓度≤0.50 mol/L时变化较小，但在蔗糖浓度为0.75 mol/L时明显增加，而在蔗糖浓度为1.00 mol/L时显著降低，增加和降低主要是由范德华力和氢键引起。因此，含乳植物饮料中蔗糖等甜味剂的添加不仅影响产品的口感，也影响其中β-乳球蛋白与花青素的结合，进而影响产品的质量及其功能性。在该研究中，添加0.75 mol/L蔗糖有利于花青素的稳定，但在实际应用中，目前大都

用一些功能性甜味剂替代部分蔗糖，这些功能性甜味剂的添加对花青素稳定性的影响有待进一步研究。

参考文献

[1] 刘婵．体外消化环境下多酚与蛋白、酶间的竞争相互作用及其对多酚和蛋白功能特性的影响研究[D]．无锡：江南大学，2017．

[2] LI T，HU P，DAI T T，et al．Comparing the binding interaction between β-lactoglobulin and flavonoids with different structure by multi-spectroscopy analysis and molecular docking [J]．Spectrochimica Acta Part A：Molecular and Biomolecular Spectroscopy，2018，201：197-206．

[3] ZHANG G W，WANG L，PAN J H．Probing the binding of the flavonoid diosmetin to human serum albumin by multispectroscopic techniques[J]．Journal of Agricultural and Food Chemistry，2012，60(10)：2721-2729．

[4] GHOLAMI S，BORDBAR A K．Exploring binding properties of naringenin with bovine β-lactoglobulin：a fluorescence，molecular docking and molecular dynamics simulation study[J]．Biophysical Chemistry，2014，187：33-42．

[5] SUI X N，SUN H B，QI B K，et al．Functional and conformational changes to soy proteins accompanying anthocyanins：focus on covalent and non-covalent interactions[J]．Food Chemistry，2018，245：871-878．

[6] JAKOBEK L．Interactions of polyphenols with carbohydrates，lipids and proteins[J]．Food Chemistry，2015，175：556-567．

[7] JAFARI A，SHAREGHI B，HOSSEINI-KOUPAEI M，et al．Characterization of osmolyte-enzyme interactions using different spectroscopy and molecular dynamic techniques：binding of sucrose to proteinase K [J]．International Journal of Biological Macromolecules，2020，151：1250-1258．

[8] WALAYAT N，YI M H，WANG X P，et al．Cryoprotective role of konjac oligosaccharide on silver carp proteins during frozen storage through molecular dynamic simulation[J]．LWT-Food Science and Technology，2023，188：115329．

[9] 丛海花，逯晓燕，周倩，等．褐藻寡糖结合低磁场冷冻对鲢肌原纤维蛋白结构和性质的影响[J]．南方水产科学，2023，19(3)：110-118．
CONG H H，LU X Y，ZHOU Q，et al．Effect of alginate oligosaccharides combined with low magnetic field freezing on structure and properties of myofibrillar protein of silver carp[J]．South China Fisheries Science，2023，19(3)：110-118．(in Chinese)

[10] 杭瑜瑜，于淑池，商文慧，等．聚葡萄糖对罗非鱼鱼糜凝胶特性及蛋白结构的影响[J]．食品科技，2023，48(4)：147-152．
HANG Y Y，YU S C，SHANG W H，et al．Effect of polydextrose on gel properties and protein structure of *Tilapia surimi*[J]．Food Science and Technology，2023，48(4)：147-152．(in Chinese)

[11] 王翠萍，晁琛，王书军．基于分子动力学模拟研究淀粉与脂质和蛋白质的相互作用：现状分析与未来趋势[J]．食品与生物技术学报，2022，41(7)：44-56．
WANG C P，CHAO C，WANG S J．Investigating the interactions between starch，lipids and proteins based on molecular dynamic simulation：current situation and future trends[J]．Journal of Food Science and Biotechnology，2022，41(7)：44-56．(in Chinese)

[12] ZHU J X，LI K J，WU H，et al．Multi-spectroscopic，conformational，and computational atomic-level insights into the interaction of β-lactoglobulin with apigenin at different pH levels[J]．Food Hydrocolloids，2020，105：105810．

[13] SAHIHI M，GHAYEB Y．An investigation of molecular dynamics simulation and molecular docking：Interaction of *Citrus flavonoids* and bovine β-lactoglobulin in focus[J]．Computers in Biology and Medicine，2014，51：44-50．

[14] MOHAMMADI F，SAHIHI M，BORDBAR A K．Multispectroscopic and molecular modeling studies on the interaction of two curcuminoids with β-lactoglobulin[J]．Spectrochimica Acta Part A：Molecular and Biomolecular Spectroscopy，2015，140：274-282．

[15] 陈星．利用分子动力学方法研究金属离子对鸡胱抑素蛋白结构的影响[D]．沈阳：辽宁大学，2011．

[16] 关婧，李辉，邹志远，等．氯化钠促进溶菌酶聚集机制的分子动力学研究[J]．东北师大学报(自然科学版)，2011，43(3)：117-121．
GUAN J，LI H，ZOU Z Y，et al．Mechanism study of sodium chloride on lysozyme aggregation investigated by molecular dynamics simulation[J]．Journal of Northeast Normal University (Natural Science Edition)，2011，43(3)：117-121．(in Chinese)

[17] ALI F，MANZOOR U，KHAN F I，et al．Effect of polyol osmolytes on the structure-function integrity and aggregation propensity of catalase：a comprehensive study based on spectroscopic and molecular dynamic simulation measurements [J]．International Journal of Biological Macromolecules，2022，209：198-210．

[18] KANAKIS C D，HASNI I，BOURASSA P，et al．Milk β-lactoglobulin complexes with tea polyphenols [J]．Food Chemistry，2011，127(3)：1046-1055．

[19] 孔庆新，罗丽梅，黄业传，等．分子动力学探究高压对β-乳球蛋白与多酚结合的影响[J]．食品与发酵工业，2022，48(3)：107-114．
KONG Q X，LUO L M，HUANG Y C，et al．The effect of high pressure on the combination of β-lactoglobulin and polyphenols using molecular dynamic model[J]．Food and Fermentation Industries，2022，48(3)：107-114．(in Chinese)

[20] 孔庆新，黄业传，徐伟平，等．β-乳球蛋白与EGCG结合规律的分子动力学探究[J]．食品与生物技术学报，2022，41(1)：51-59．
KONG Q X，HUANG Y C，XU W P，et al．Interaction between β-lactoglobulin and polyphenols investigated by molecular dynamics simulation[J]．Journal of Food Science and Biotechnology，2022，41(1)：51-59．(in Chinese)

[21] ABRAHAM M J，MURTOLA T，SCHULZ R，et al．GROMACS：high performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers[J]．SoftwareX，2015，1：19-25．

[22] KUMARI R，KUMAR R，et al．g_mmpbsa：a GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations[J]．Journal of Chemical Information and Modeling，2014，54(7)：1951-1962．

[23] ISLAM M A，PILLAY T S．β-secretase inhibitors for Alzheimer's disease：identification using pharmacoinformatics[J]．Journal of Biomolecular Structure and Dynamics，2019，37(2)：503-522．

[24] HUANG Y C，ZHANG X C，SUO H Y．Interaction between β-lactoglobulin and EGCG under high-pressure by molecular dynamics simulation[J]．PLoS One，2021，16(12)：e0255866．

[25] 但倩誉．β-乳球蛋白与川陈皮素相互作用机制研究[D]．武汉：华中农业大学，2019．

[26] AL-SHABIB N A，KHAN J M，MALIK A，et al．Molecular insight into binding behavior of polyphenol (rutin) with beta lactoglobulin：spectroscopic，molecular docking and MD simulation studies[J]．Journal of Molecular Liquids，2018，269：511-520．

[27] 李军，符禹婷，俞健，等．两条鲢鱼小清蛋白源抗冻肽的活性及作用机制比较[J]．食品与机械，2024，40(4)：7-12，58．
LI J，FU Y T，YU J，et al．Comparison of the activities and cryoprotective mechanism of two antifreeze peptides derived from silver carp parvalbumin[J]．Food & Machinery，2024，40(4)：7-12，58．(in Chinese)

[28] MOZHAEV V V，LANGE R，KUDRYASHOVA E V，et al．Application of high hydrostatic pressure for increasing activity and stability of enzymes[J]．Biotechnology and Bioengineering，1996，52(2)：320-331．

[29] 杨宝燕，郑敦锦，何康平，等．分子动力学模拟研究壳寡糖与脂肪酶相互作用机制[J]．现代食品科技，2021，37(6)：72-81．
YANG B Y，ZHENG D J，HE K P，et al．A molecular dynamics simulation study on the mechanism underlying the interaction between chitooligosaccharides and lipase[J]．Modern Food Science and Technology，2021，37(6)：72-81．(in Chinese)

[30] ZHAN F C，DING S，XIE W Y，et al．Towards understanding the interaction of β-lactoglobulin with capsaicin：multi-spectroscopic，thermodynamic，molecular docking and molecular dynamics simulation approaches[J]．Food Hydrocolloids，2020，105：105767．

[31] CHENG J，LIU J H，PRASANNA G，et al．Spectrofluorimetric and molecular docking studies on the interaction of cyanidin-3-O-glucoside with whey protein，β-lactoglobulin[J]．International Journal of Biological Macromolecules，2017，105：965-972．

[32] 贾晶晶．多酚类物质与牛乳β-乳球蛋白及β-半乳糖苷酶相互作用的研究[D]．济南：山东师范大学，2018．

（责任编辑：闫林红）