

## 乳蛋白对甜菜红苷热稳定性的影响

芦霞, 胡飞\*

(华南理工大学食品科学与工程学院 广州 510640)

**摘要** 以甜菜红苷(Bt)为对象,采用-荧光光谱、傅里叶变换红外光谱以及圆二色谱技术分析乳清蛋白(WP)和牛血清白蛋白(BSA)与 Bt 作用生成的复合物中乳蛋白组分对 Bt 热稳定性的影响。结果表明:添加 WP 和 BSA 能有效抑制甜菜红苷的热降解作用,其中 WP 对甜菜红苷的保护作用优于 BSA。同时,体系环境的 pH 值变化也明显影响甜菜红苷的热降解,在 pH 5.0 时甜菜红苷复合物的半衰期最长,其中 Bt-WP 复合物的半衰期达 2.99 h。荧光光谱、傅里叶变换红外光谱以及圆二色谱分析表明,复合物中 Bt 组分的作用导致 WP 和 BSA 发生静态荧光猝灭,WP 和 BSA 色氨酸残基和酪氨酸残基所处微环境的疏水性减弱,极性变强。此外,添加 Bt 使两种蛋白质的构象结构发生改变,酰胺 I 带和酰胺 II 带的特征峰位置改变,二级结构中各类构象组成发生不同程度的变化。

**关键词** 甜菜红苷; 复合物; 热稳定性; 光谱分析; 作用机制

**文章编号** 1009-7848(2022)12-0094-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.12.010

甜菜色素(Betalain)是一种含氮水溶性色素,主要存在于藜科、苋科、紫茉莉科以及仙人掌科等多种植物中<sup>[1]</sup>。其中,人们最为熟悉的植物是藜科中的红甜菜及仙人掌科的火龙果皮和果肉。甜菜色素属于吡啶类衍生物,基本发色团是 1,7-二偶氮庚甲碱,其颜色由 1,7-二偶氮庚甲碱共振所产生。甜菜色素主要包含甜菜红素(Betacyanin)和甜菜黄素(Betaxanthin)两大类,其中甜菜红素的主要成分为甜菜红苷(Betanin, Bt, 分子式  $C_{24}H_{26}N_2O_{13}$ )<sup>[2]</sup>。甜菜红苷是从红甜菜根中提取出的成分,被欧盟批准为红色食品着色剂,被广泛用作果酱、冰激凌、蛋糕、酸奶等食品着色<sup>[3-4]</sup>。目前,因甜菜红苷安全无毒<sup>[2]</sup>且具有抗炎<sup>[5-6]</sup>、护肝<sup>[7-9]</sup>、降血压<sup>[10-12]</sup>、降血脂<sup>[13-14]</sup>等特性,而获得研究人员的广泛关注<sup>[15]</sup>。虽然甜菜红苷具有诸多有益特性,但是其易受温度、酸碱度、光、氧气等因素的影响,稳定性较差<sup>[16]</sup>。国内外研究者通过形成络合物<sup>[17]</sup>、微胶囊化<sup>[18]</sup>等尝试改善甜菜红苷的稳定性,然而,形成的络合物易分解,降低了甜菜红苷的长期护色效果。微胶囊化也有明显的局限性,有的壁材对 pH 值有极强的依赖性,且在合成中可能引入对人体有害的物质,这些限制了甜菜红苷的深入开发和应用<sup>[19]</sup>。

通过生物大分子与甜菜红苷相互作用来保护

甜菜红苷是一种良好的思路和技术途径。在食品大分子中脂类溶解性不好,多糖类消化性较差,而蛋白质具有两亲性、消化性好等优点,利用蛋白质与小分子相互作用来实现保护小分子的活性,是目前研究的热点之一<sup>[19]</sup>。目前对蛋白质与花青素结合方面的研究已较为成熟<sup>[20-21]</sup>,而对于蛋白质与甜菜红苷相互作用的研究较少。本文采用乳蛋白中的乳清蛋白(Whey Protein, WP)和牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA)分别与甜菜红苷作用,研究生成的复合物中乳蛋白组分对甜菜红苷热稳定性的影响,并用荧光光谱(MFS)、傅里叶变换红外光谱(FTIR)以及圆二色谱(CD)分析甜菜红苷与乳清蛋白和牛血清白蛋白的作用机制,乳蛋白与甜菜红苷复合物的结构特征及构型。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试剂与仪器

甜菜红苷、牛血清白蛋白,生物技术级,阿拉丁试剂有限公司;乳清蛋白,麦克林试剂有限公司;磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氢氧化钠、盐酸,以上均为 AR 级,国药集团化学试剂有限公司。

Nicolet IS50 - Nicolet Continuum 型傅里叶变换红外光谱仪, Thermo Fisher Scientific 公司; F-7000 分子荧光仪, 日立高新技术公司; Chirascan 型圆二色谱仪, 英国 Applied Photophysics 公司; 雷磁 PXSJ-226 型离子计, 上海仪电科学仪

收稿日期: 2021-12-11

第一作者: 芦霞, 女, 硕士生

通信作者: 胡飞 E-mail: g95216@163.com

器股份有限公司;722N 可见分光光度计,上海仪电科学仪器股份有限公司;FDU-2110 冷冻干燥机,杭州嘉维创新科技有限公司。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 热稳定性分析

1.2.1.1 温度对甜菜红苷稳定性的影响 称取适量的甜菜红苷(Bt)溶于 pH6.3 的 PBS 缓冲液中,得到质量浓度为 2.5 mg/mL 的 Bt 溶液,将 50, 100, 150 mg 乳清蛋白(WP)和牛血清白蛋白(BSA)分别溶于上述 PBS 缓冲液中,得到质量浓度分别为 0.5, 1.0, 1.5 mg/mL 的蛋白质溶液。将配好的 Bt 溶液和蛋白质溶液在常温下按体积比 1:1 混合,涡旋振荡 20 min 使其混合充分,然后,分别在不同温度(35, 45, 55, 65, 75 °C)下水浴加热 3 h,用可见分光光度计测定在最大吸收波长 535 nm<sup>[23]</sup>处处理前、后的吸光度,计算甜菜红苷的保留率。以不加蛋白质的 Bt 溶液为空白对照。重复 3 次试验,取平均值。

采用高冬菊等<sup>[23]</sup>的方法计算色素保留率,公式如下:

$$\text{色素保留率}(\%) = A/A_0 \times 100 \quad (1)$$

式中:A——甜菜红苷处理后的吸光度;  
A<sub>0</sub>——甜菜红苷处理前的吸光度。

### 1.2.1.2 不同 pH 值条件下甜菜红苷的降解规律

用 0.1 mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 和 0.1 mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 溶液配制母液,氢氧化钠和盐酸调节 pH 值,最终配成 pH 值分别为 1.0, 3.0, 5.0, 7.0, 9.0 的缓冲液。称取适量甜菜红苷、WP 和 BSA 分别溶于上述缓冲液中,以获得质量分数分别为 2.0 mg/mL 的 Bt 溶液和 1.0 mg/mL 的蛋白质溶液。将配好的 Bt 溶液和蛋白质溶液在常温下按体积比 1:1 混合,涡旋振荡 20 min,使其混合充分,然后,在 65 °C 下避光加热 5 h,每隔 1 h 测定各组甜菜红苷含量变化。以不加蛋白质的 Bt 溶液为空白对照。每组试验重复 3 次,取平均值。

### 1.2.2 光谱测试

1.2.2.1 样品制备 用 pH 6.3 的 PBS 缓冲液溶解甜菜红苷,涡旋振荡 10 min,使甜菜红苷最终质量浓度分别为 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mg/mL。用上述 PBS 缓冲液溶解适量的 WP 和 BSA,以得到最终质量浓度分别为 1 mg/mL 的 WP 溶液和 0.5 mg/

mL 的 BSA 溶液。

将配好的 Bt 溶液和蛋白质溶液在常温下按体积比 1:1 混合,涡旋振荡 20 min 使其混合充分,最终样品中 WP 的质量浓度为 0.5 mg/mL, BSA 的质量浓度为 0.25 mg/mL, Bt 的质量浓度分别为 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mg/mL。在温度 4 °C 下避光保存,备用。同时,取部分样品于冷冻干燥机内,设置预冻温度 -20 °C,冷阱温度低于 -40 °C,冻干 48 h,得到 Bt-pro 固体样品。

1.2.2.2 荧光光谱测试 取 1.2.2.1 节样品 3 mL 于 1 cm 石英比色池中,荧光扫描条件为激发波长 280 nm,发射波长 300~540 nm,激发和发射的狭缝宽度均为 2.5 nm,扫描速度 240 nm/s,电压 700 V。同时,以波长差分别为  $\Delta\lambda=15$  nm 和  $\Delta\lambda=60$  nm 测定样品的同步荧光光谱。采用 Origin 9.0 软件分析。

1.2.2.3 傅里叶变换红外光谱测试 取 1.2.2.1 节经冷冻干燥的 1 mg 样品与 100 mg KBr 混合,用研钵研细后制得透明样品薄片,以空白 KBr 来调整基线水平并对差异化光谱进行归一化处理,以空气为参比,测定波段为 4 000~500 cm<sup>-1</sup>,扫描 32 次,采用 Omnic 软件分析数据。

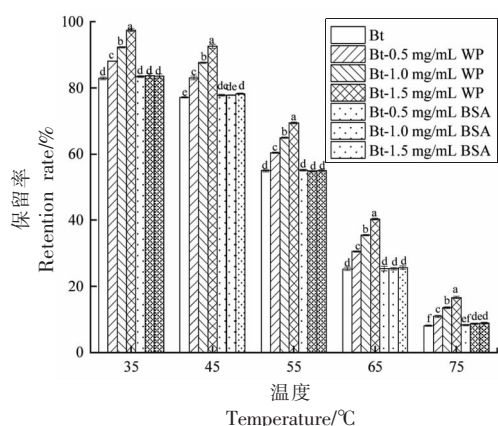
1.2.2.4 圆二色谱测试 取 1.2.2.1 节 1 mL 样品,稀释一定倍数使蛋白质量浓度至 0.1 mg/mL,吸取 300  $\mu$ L 于 1 mm 样品池中,设置扫描波长范围 190~260 nm,扫描速度 60 nm/min,光谱分辨率 0.2 nm,响应时间 0.25 s,光谱带宽 1.0 nm,重复扫描 3 次。采用 Pro-Data Viewer 和 CDNN 软件分析蛋白质二级结构的组成及含量。

1.2.3 统计学分析 采用 SPSS 26.0 统计软件进行统计学分析,对热稳定性数据采用单因素方差法分析,显著水平为  $P<0.05$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 热稳定性

2.1.1 温度对甜菜红苷稳定性的影响 甜菜红苷的稳定性可用保留率的变化来表示,保留率越高,甜菜红苷的稳定性越好。由图 1 可知,随着水浴加热温度的升高,所有样品组的甜菜红苷含量呈下降趋势,此时甜菜红苷因受热而发生脱羧反应,生成脱羧甜菜红苷<sup>[24]</sup>。此外,添加 WP 组的保留率明



注:图中不同小写字母表示甜菜红苷保留率差异显著( $P<0.05$ )。

图1 不同温度下不同浓度乳蛋白对甜菜红苷保留率的影响

Fig.1 Effects of different concentrations of milk protein on the retention of Bt at different temperatures

显高于对照组,而添加BSA组的效果不明显,表明WP能更有效抑制甜菜红苷的降解,保护其稳定性。随着WP浓度的增加,其抑制效果变好。在75 °C加热3 h条件下,当添加WP的质量浓度为1.5 mg/mL时,甜菜红苷保留率约为对照组保留率的2倍。

### 2.1.2 不同pH值条件下甜菜红苷的降解规律

研究<sup>[25]</sup>表明,甜菜红苷的降解规律遵循一级动力学,可用其模拟不同pH值条件下甜菜红苷的降解。动力学公式如下:

$$\ln(C_t/C_0)=-kt \quad (2)$$

$$t_{1/2}=\ln 0.5/k \quad (3)$$

式中: $C_0$ ——甜菜红苷的初始质量浓度(mg/mL); $t$ ——加热时间(h); $C_t$ —— $t$ 时刻甜菜红苷的质量浓度(mg/mL); $k$ ——速率常数; $t_{1/2}$ ——半衰期(h)。

依据公式(2)、(3)拟合得出不同pH值条件下甜菜红苷及其蛋白复合物的降解动力学参数,见表1。不同pH条件下甜菜红苷及其蛋白复合物的热稳定性不同。随着pH值的增大,甜菜红苷及其蛋白复合物的降解 $k$ 呈先下降后上升的趋势,表明对甜菜红苷的破坏程度先减弱后增大,在pH 5.0时各组样品的稳定性最佳,甜菜红苷的半衰期最长,其中Bt-WP复合物的半衰期达2.99 h。这是由于甜菜红苷在酸性溶液中加热或碱性条件下甜

表1 不同pH值甜菜红苷及其蛋白复合物在65 °C条件下的降解动力学参数

Table 1 Kinetic parameters for degradation of Bt and Bt-pro under different pH values at 65 °C

pH 值	样品	$k/h^{-1}$	$R^2$	半衰期 $t_{1/2}/h$
1.0	Bt	0.8496 <sup>c</sup>	0.9555	0.82 <sup>c</sup>
	Bt-WP	0.5419 <sup>b</sup>	0.9282	1.28 <sup>b</sup>
	Bt-BSA	0.6816 <sup>d</sup>	0.9281	1.02 <sup>d</sup>
3.0	Bt	0.5010 <sup>i</sup>	0.9739	1.38 <sup>i</sup>
	Bt-WP	0.3733 <sup>l</sup>	0.9580	1.86 <sup>l</sup>
	Bt-BSA	0.4708 <sup>j</sup>	0.9737	1.47 <sup>j</sup>
5.0	Bt	0.3584 <sup>n</sup>	0.9968	1.93 <sup>n</sup>
	Bt-WP	0.2314 <sup>o</sup>	0.9877	2.99 <sup>o</sup>
	Bt-BSA	0.3632 <sup>m</sup>	0.9920	1.91 <sup>m</sup>
7.0	Bt	0.6175 <sup>e</sup>	0.9882	1.12 <sup>e</sup>
	Bt-WP	0.4355 <sup>k</sup>	0.9782	1.59 <sup>k</sup>
	Bt-BSA	0.5458 <sup>s</sup>	0.9878	1.27 <sup>s</sup>
9.0	Bt	0.9908 <sup>a</sup>	0.9453	0.70 <sup>a</sup>
	Bt-WP	0.5978 <sup>f</sup>	0.9203	1.16 <sup>f</sup>
	Bt-BSA	0.8815 <sup>b</sup>	0.9391	0.79 <sup>b</sup>

注:同一列显著性差异由不同小写字母表示( $P<0.05$ )。

菜红苷会被水解为环多巴-5-葡萄糖苷和甜菜醛氨酸,而在加热数小时后,甜菜醛氨酸的醛基和环多巴-5-葡萄糖的氨基间发生亲核反应,生成相应的Schiff碱,又有部分甜菜红苷重新生成<sup>[24]</sup>。甜菜红苷的重生在pH 5.0附近最多,这与各组甜菜红苷在pH=5.0左右时降解速率 $k$ 最小相一致。此外,甜菜红苷和蛋白质形成复合物后,甜菜红苷降解得到有效抑制,WP对甜菜红苷的保护作用优于BSA,这与2.1.2节结果一致。

## 2.2 光谱分析甜菜红苷与蛋白质互作

2.2.1 红外光谱分析结果 通过FTIR光谱评价添加蛋白质后Bt-pro复合物间的相互作用和蛋白质二级结构变化<sup>[26]</sup>。冷冻干燥后的Bt、蛋白质及Bt-WP、Bt-BSA的FTIR光谱如图2所示。添加蛋白质前Bt在酰胺II带( $<1548\text{ cm}^{-1}$ )未出现峰值,而加入WP和BSA后分别在 $1545.18\text{ cm}^{-1}$ 和 $1545.73\text{ cm}^{-1}$ 处出现新峰,推断形成Bt-pro复合物。该复合物中WP酰胺I带( $1600\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$ )的峰值位置从 $1650.23\text{ cm}^{-1}$ 移至 $1650.16\text{ cm}^{-1}$ ,酰胺II带的峰值位置从 $1543.96\text{ cm}^{-1}$ 移至 $1545.18\text{ cm}^{-1}$ ,表明Bt与WP发生作用导致C=O、N-H、C-

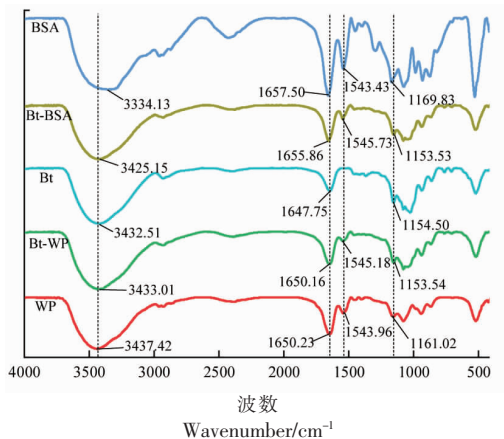


图 2 Bt 与 WP、BSA 相互作用的 FTIR 光谱

Fig.2 The FTIR spectra of WP and BSA in absence and presence of Bt

N 变化。Bt 组分的结合使 BSA 二级结构发生类似变化，其酰胺 I 带的峰值位置从 1 657.50 cm<sup>-1</sup> 变到 1 655.86 cm<sup>-1</sup>，酰胺 II 带 1 543.43 cm<sup>-1</sup> 变到 1 545.73 cm<sup>-1</sup>，酰胺 A 带 (3 300~3 400 cm<sup>-1</sup>) 范围的特征峰从 3 334.13 cm<sup>-1</sup> 变到 3 425.15 cm<sup>-1</sup>，说明 Bt 与 BSA 间相互作用导致 BSA 中 C=O 伸缩振动，N-H 弯曲振动，C-N 伸缩振动发生改变。

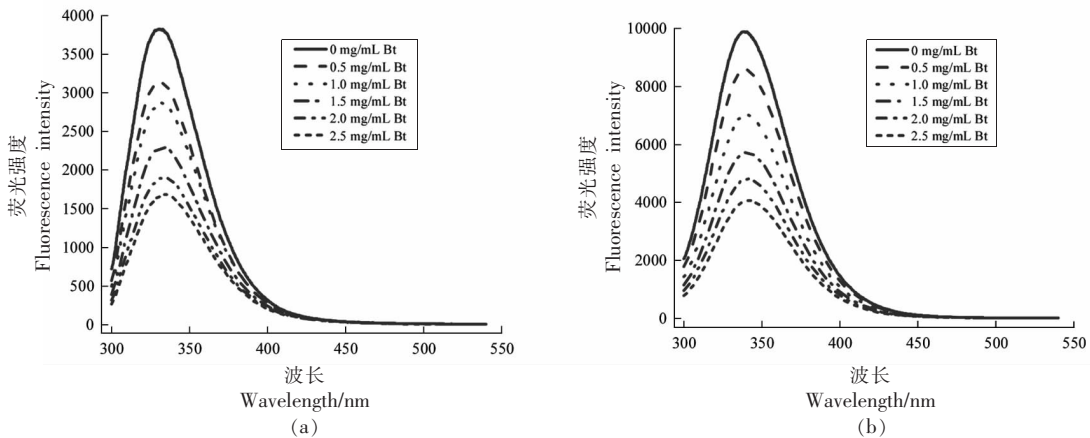


图 3 Bt 对乳清蛋白(a)及牛血清白蛋白(b)的荧光强度的影响

Fig.3 Effect of Bt on the fluorescence intensity of WP(a) and BSA(b)

2.2.2.2 甜菜红苷对蛋白质荧光猝灭方式的影响  
通过 Stern-Volmer 方程可判断 Bt 与蛋白质相互作用的猝灭类型<sup>[29]</sup>：

$$F_0/F = 1 + K_{sv}[Q] = 1 + K_q\tau_0 [Q] \quad (4)$$

式中： $F_0$ ——未添加猝灭剂甜菜红苷时的荧光强度； $F$ ——添加猝灭剂甜菜红苷时的荧光强

## 2.2.2 荧光光谱分析结果

2.2.2.1 甜菜红苷含量对蛋白质荧光猝灭光谱的影响  
蛋白质因含有色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)和苯丙氨酸(Phe)残基而具有内源荧光性<sup>[27]</sup>。在激发波长 280 nm 处，蛋白质的内源荧光主要取决于 Trp 和 Tyr<sup>[28]</sup>。可根据荧光强度值的变化来判断 WP 和 BSA 是否与 Bt 发生相互作用，研究 WP 和 BSA 构象的变化以及发色团附近微环境的改变。

波长 280 nm 处 WP 和 BSA 的荧光发射光谱如图 3 所示。WP 的最大荧光发射波长 ( $\lambda_{max}$ ) 在 329 nm 附近，BSA 的  $\lambda_{max}$  在 338 nm 附近。在 Bt 加入之后，WP 和 BSA 的荧光强度均显著降低，且随 Bt 浓度的增加，WP 的荧光强度从 3 827.96 降至 1 692.20，BSA 的荧光强度从 9 899.83 降至 4 062.81，说明甜菜红苷的加入使 WP 和 BSA 出现内源性荧光猝灭现象，即 WP、BSA 分别和 Bt 发生作用。此外，随着 Bt 浓度的增加，WP 的  $\lambda_{max}$  从 329 nm 红移到 335 nm，BSA 的  $\lambda_{max}$  从 338 nm 红移到 342 nm。红移现象表明 WP 和 BSA 中 Trp 和 Tyr 残基附近的微环境极性发生变化。

度； $K_{sv}$ ——Stern-Volmer 猝灭常数 (L/mol)； $[Q]$ ——甜菜红苷的浓度 (mol/L)； $\tau_0$ ——不存在猝灭剂时荧光分子的平均荧光寿命，一般为  $10^{-8}$  s； $K_q$ ——生物大分子猝灭速率常数 [L/(mol/s)]。

不同温度 (308.15, 318.15, 328.15 K) 下的 Stern-Volmer 特征参数见表 2。两种蛋白质与 Bt

相互作用的 Stern-Volmer 方程呈良好的线性关系,表明存在单一的静态或动态猝灭机制<sup>[30]</sup>。动态猝灭通过碰撞和扩散形成,导致其猝灭常数 K<sub>SV</sub> 随温度的升高而增大;静态猝灭是由于分子间的相互作用形成新的复合物,其猝灭常数 K<sub>SV</sub> 随温度的升高而降低<sup>[31]</sup>。在 WP 和 BSA 与 Bt 相互作用

过程中,随着温度的升高,猝灭常数 K<sub>SV</sub> 值逐渐降低,表明 Bt 通过静态猝灭的形式对两种蛋白质的固有荧光进行有效抑制,WP 和 BSA 与 Bt 形成复合物。BSA 与 Bt 结合后,猝灭速率常数 K<sub>q</sub> 远大于极限扩散速率常数[2×10<sup>10</sup> L/(mol·s)],说明 Bt-BSA 复合物的生成。

表 2 不同温度下 Bt-pro 的猝灭常数

Table 2 Quenching constants of Bt-pro at different temperatures

	T/K	回归方程	R <sup>2</sup>	K <sub>SV</sub> /L·mol <sup>-1</sup>	K <sub>q</sub> /×10 <sup>10</sup> L·mol <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup>
Bt-WP	308.15	F <sub>0</sub> /F=0.16814[Q]+0.98587	0.99939	168.14	1.68
	318.15	F <sub>0</sub> /F=0.15885[Q]+0.97347	0.99797	158.85	1.59
	328.15	F <sub>0</sub> /F=0.15873[Q]+0.95162	0.99284	158.73	1.59
Bt-BSA	308.15	F <sub>0</sub> /F=0.22908[Q]+0.91097	0.99893	229.08	2.29
	318.15	F <sub>0</sub> /F=0.22759[Q]+0.91067	0.99890	227.59	2.28
	328.15	F <sub>0</sub> /F=0.22214[Q]+0.90983	0.99966	222.14	2.22

2.2.2.3 甜菜红苷与蛋白质的结合常数、结合位点数及热力学参数分析 因 Bt 与 WP、BSA 之间的猝灭机制为静态猝灭,依据公式<sup>[30]</sup>(5)分析两种蛋白质在 3 个温度下与 Bt 复合的结合常数(K<sub>a</sub>)和结合位点数(n):

$$\lg[(F_0-F)/F] = \lg K_a + n \lg [Q] \quad (5)$$

式中:K<sub>a</sub>——Bt 与蛋白质的结合常数;n——Bt 与蛋白质的结合位点数。

lg[(F<sub>0</sub>-F)/F]和 lg[Q]的双对数回归曲线如图 4 所示,根据回归曲线的斜率和截距可知复合物的结合位点数和结合常数,见表 3。

由表 3 可知,随着温度的升高,两种蛋白质与 Bt 的结合常数 K<sub>a</sub> 均逐渐减小,表明温度升高不利

于蛋白质与甜菜红苷的结合。当温度为 308.15 K 时,复合物 Bt-WP 的 K<sub>a</sub> 值高于 Bt-BSA,说明此条件下 WP 对 Bt 的结合亲和力强于 BSA,这与 WP 能有效抑制 Bt 的热降解作用结果一致。此外,两种蛋白质的结合位点数 n 值均在 1 附近,表明 Bt 与 WP 和 BSA 都只有一个结合位点,即 Bt 与 WP 和 BSA 反应后生成物质的量比为 1:1 的复合物。

通过热力学方程可以判断大分子蛋白质与 Bt 小分子间的主要结合作用力,通过 Vant' Hoff 公式(6)、(7)、(8)可计算热力学参数吉布斯自由能变化(ΔG)、焓变(ΔH)和熵变(ΔS)<sup>[32]</sup>。其中,当 ΔH>0 且 ΔS>0 时,为疏水相互作用;当 ΔH<0 且 ΔS>0 时,为范德华力和氢键作用;当 ΔH<0 且

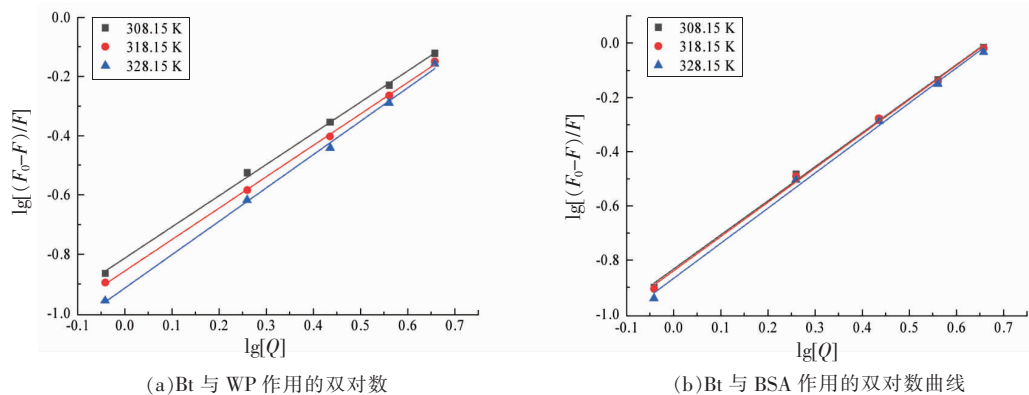


图 4 Bt 与蛋白质相互作用的双对数曲线  
Fig.4 Double logarithmic curve of Bt-pro interaction

$\Delta S > 0$  时,为静电相互作用;当  $\Delta H > 0$  且  $\Delta S < 0$  时,为静电力和疏水相互作用<sup>[31]</sup>。

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

$$\Delta H = d(\Delta G/T) / d(1/T) \quad (7)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (8)$$

式中: $T$ ——绝对温度(K); $K_a$ ——与温度相关的结合常数; $R$ ——气体常数[8.314 J/(mol·K)]。当温度变化不大时,反应的  $\Delta H$  和  $\Delta S$  可看作常数。

由表 3 可知,Bt-WP 和 Bt-BSA 的  $\Delta H$  均小于 0,且  $\Delta S$  均大于 0,说明 Bt 与 WP 及 BSA 的分子间作用力主要表现为静电相互作用。此外,Bt-WP 和 Bt-BSA 的  $\Delta H$  值分别为 -2.4 kJ/mol 和 -2.1 kJ/mol,表明 Bt 与两种蛋白质的结合反应为放热反应; $\Delta G$  均为负值,表明 Bt 与两种蛋白质之间的结合作用均为自发进行的。

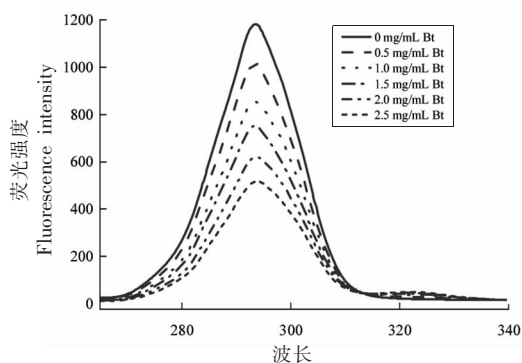
表 3 不同温度下 Bt-pro 的结合常数、结合位点及热力学参数

Table 3 Binding constants, binding sites and thermodynamic parameters of Bt-pro at different temperatures							
	$T/K$	$K_d/L \cdot mol^{-1}$	$n$	$R^2$	$\Delta H/kJ \cdot mol^{-1}$	$\Delta S/J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$	$\Delta G/kJ \cdot mol^{-1}$
Bt-WP	308.15	153.61	1.05	0.99903			-12.90
	318.15	139.00	1.06	0.99944	-2.4	33.42	-13.05
	328.15	121.72	1.13	0.99782			-13.10
Bt-BSA	308.15	146.97	1.26	0.99807			-12.78
	318.15	144.65	1.26	0.99802	-2.1	34.74	-13.16
	328.15	135.73	1.29	0.99673			-13.40

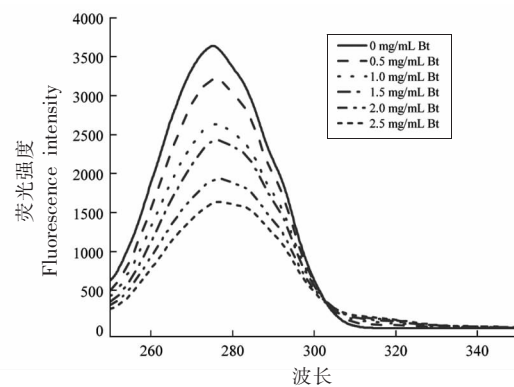
2.2.3 甜菜红苷与蛋白质相互作用的同步荧光光谱 Bt 与蛋白质相互作用的同步荧光光谱如图 5 所示。当  $\Delta\lambda=15$  nm 时的同步荧光光谱图为 Tyr 残基周围的微环境变化, $\Delta\lambda=60$  nm 时所得谱图为 Trp 残基周围微环境的变化<sup>[33]</sup>。如图 5a、5c 所示,当  $\Delta\lambda=15$  nm 时,固定蛋白质浓度,逐渐增加 Bt 的浓度,两种蛋白质 Tyr 残基的荧光强度均逐渐降低,WP 和 BSA 的  $\lambda_{max}$  均发生红移(WP:从 292.78 nm 变到 294.02 nm;BSA:从 286.21 nm 变到 287.01 nm),表明 Tyr 残基的疏水性减弱,极性变强,Tyr 残基随 Bt 的加入逐渐暴露出来。如图 5b、5d 所示,当  $\Delta\lambda=60$  nm 时,两种蛋白质 Trp 残基的荧光

强度随 Bt 的加入逐渐降低,WP 和 BSA 的  $\lambda_{max}$  同样也发生红移(WP:从 274.69 nm 变到 277.04 nm;BSA:从 279.66 nm 变到 283.20 nm),说明随着 Bt 的加入,Trp 残基的疏水性减弱,极性逐渐增强。Tyr 残基和 Trp 残基周围微环境的变化表明两种蛋白质的构象因与 Bt 结合形成复合物而改变。

2.2.4 甜菜红苷与蛋白质相互作用的圆二光谱 蛋白质具有圆二色性,不同的构象表现出不同的光谱性质,通过圆二色谱可以定量分析形成 Bt-pro 复合物前、后 WP 和 BSA 二级结构组成类型的变化,进一步验证 Bt 与 WP 和 BSA 的相互作用。由图 6 和表 4 可知,WP 在 92 nm 附近有一正



(a)WP 的曲线



(b)WP 的曲线

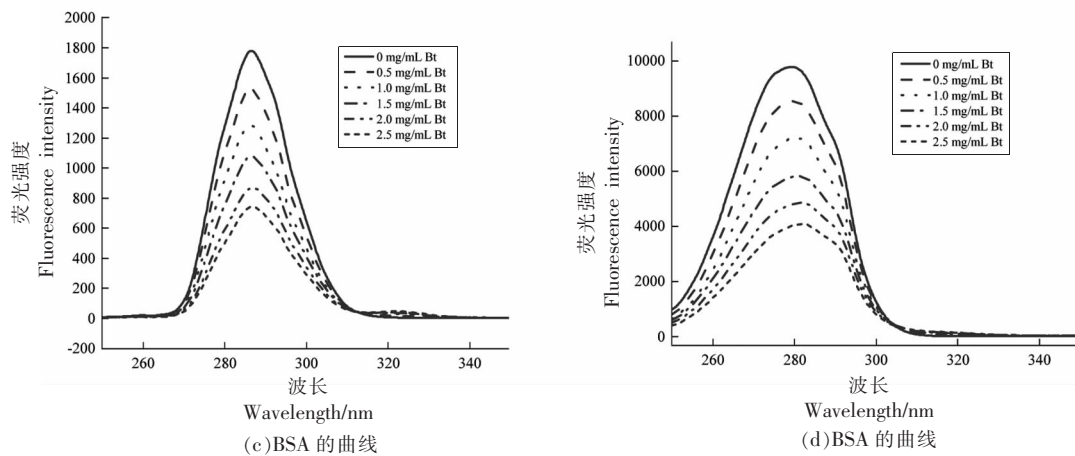


图5  $\Delta\lambda=15\text{ nm}$ (a,c)和 $\Delta\lambda=60\text{ nm}$ (b,d)时 Bt 与蛋白质相互作用的同步荧光光谱图

Fig.5 Synchronous fluorescence spectra of the interaction between Bt-pro at 15 nm (a, c) and 60 nm (b, d)

峰,在 210 nm 处有一负峰,为典型的蛋白质  $\alpha$ -螺旋结构的特征峰。形成 Bt-WP 复合物之后,特征峰的强度显著降低,WP 二级结构发生改变, $\alpha$ -螺旋含量减少,从 19.57%降至 16.17%; $\beta$ -折叠含量增加,从 31.52%增至 33.63%; $\beta$ -转角含量减少,从 16.80%降至 15.93%;无规则卷曲含量增加,从 32.12%增至 34.28%。BSA 在远紫外区表现出两个明显的负峰(208 nm 和 223 nm),添加 Bt 后其特征峰强度降低,二级结构发生明显变化, $\alpha$ -螺旋含量减少,从 80.53%降至 75.05%; $\beta$ -折叠含量增加,从 2.32%增至 3.25%; $\beta$ -转角含量增加,从 10.09%增至 10.85%;无规则卷曲含量增加,从

表 4 WP 和 BSA 及其 Bt 复合物的二级结构含量  
Table 4 Secondary structure analysis of WP and BSA in absence and presence of Bt

	$\alpha$ -螺旋/%	$\beta$ -折叠/%	$\beta$ -转角/%	无规则卷曲/%
WP	19.57	31.52	16.80	32.12
Bt-WP	16.17	33.63	15.93	34.28
BSA	80.53	2.32	10.09	7.06
Bt-BSA	75.05	3.25	10.85	10.85

7.06%增至 10.85%,说明 Bt-pro 复合物的形成对 WP、BSA 的二级结构有很大影响。

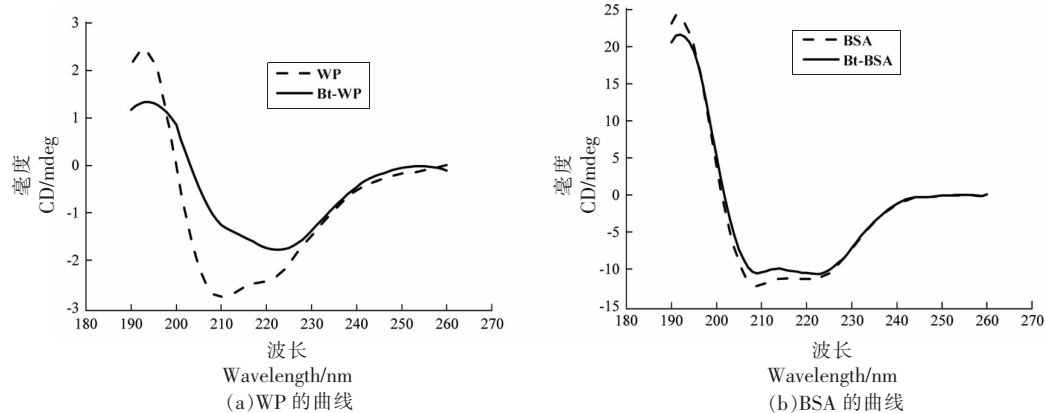


图 6 Bt 与 WP、BSA 相互作用的圆二色谱图

Fig.6 The CD spectra of WP and BSA in absence and presence of Bt

### 3 结论

利用光谱技术研究甜菜红苷与 WP 和 BSA 之

间的作用机制,并探究甜菜红苷及其 Bt-pro 复合物的热稳定性。结果表明:添加 WP 和 BSA 能有效

抑制甜菜红苷的热降解,其中 WP 对甜菜红苷的保护作用优于 BSA。同时,pH 值的变化对甜菜红苷的热降解也有影响,在 pH 5.0 时各组样品中甜菜红苷的半衰期最长。此外,复合物中 Bt 组分导致 WP 及 BSA 发生荧光猝灭,猝灭类型均为静态猝灭,Bt 与两种蛋白质均按照 1:1 物质的量比形成复合物,其结合过程为自发的放热反应,Bt 与蛋白质分子间作用力主要表现为静电相互作用。形成 Bt-pro 复合物后,WP 和 BSA 两种蛋白质中 Trp 和 Tyr 残基附近的疏水性减弱,极性增强,残基周围微环境发生改变。同时,Bt-pro 复合物的形成导致两种蛋白质在酰胺 I 带和酰胺 II 带的特征峰位置发生改变,其中 WP 的  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -转角含量减少, $\beta$ -折叠和无规则卷曲含量增加;BSA 的  $\alpha$ -螺旋含量减少, $\beta$ -折叠  $\beta$ -转角及无规则卷曲含量增加。

### 参 考 文 献

- [1] SAWICKI T, TOPOLSKA J, ROMASZKO E, et al. Profile and content of betalains in plasma and urine of volunteers after long-term exposure to fermented red beet juice[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(16): 4155-4163.
- [2] 高彦祥, 刘璇. 甜菜红色素研究进展[J]. *中国食品添加剂*, 2006, 4(1): 65-70.  
GAO Y X, LIU X. Research progress on betalain[J]. *China Food Additives*, 2006, 4(1): 65-70
- [3] AMJADI S, GHORBANI M, HAMISHEHKAR H, et al. Improvement in the stability of betanin by liposomal nanocarriers: its application in gummy candy as a food model[J]. *Food Chemistry*, 2018, 256(5): 156-162.
- [4] DELGADO V F, JIMÉNEZ A R, PAREDES L O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains -characteristics, biosynthesis, processing, and stability[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2000, 40(3): 173-289.
- [5] REDDY M K, ALEXANDER-LINDO R L, NAIR M G. Relative inhibition of lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes, and human tumor cell proliferation by natural food colors[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53(23): 9268-9273.
- [6] ALLEGRA M, FURTMÜLLER P G, JANTSCHKO W, et al. Mechanism of interaction of betanin and indicaxanthin with human myeloperoxidase and hypochlorous acid[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 332(3): 837-844.
- [7] KRAJKA-KUŹNIAK V, PALUSZCZAK J, SZAEFER H, et al. Betanin, a beetroot component, induces nuclear factor erythroid-2-related factor 2-mediated expression of detoxifying/antioxidant enzymes in human liver cell lines[J]. *British Journal of Nutrition*, 2013, 110(12): 2138-2149.
- [8] KRAJKA-KUŹNIAK V, SZAEFER H, IGNATOWICZ E, et al. Beetroot juice protects against N-nitrosodiethylamine-induced liver injury in rats[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2012, 50(6): 2027-2033.
- [9] FU Y, SHI J, XIE S Y, et al. Red beetroot betalains: perspectives on extraction, processing, and potential health benefits[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(42): 11595-11611.
- [10] NINFALI P, ANGELINO D. Nutritional and functional potential of beta vulgaris cicla and rubra[J]. *Fitoterapia*, 2013, 89(5): 188-199.
- [11] JAJJA A, SUTYARJOKO A, LARA J, et al. Beetroot supplementation lowers daily systolic blood pressure in older, overweight subjects[J]. *Nutrition Research*, 2014, 34(10): 868-875.
- [12] KAPIL V, KHAMBATA R S, ROBERTSON A, et al. Dietary nitrate provides sustained blood pressure lowering in hypertensive patients: a randomized, phase 2, double-blind, placebo-controlled study[J]. *Hypertension*, 2015, 65(2): 320-327.
- [13] ALLEGRA M, TESORIERE L, LIVREA M A. Betanin inhibits the myeloperoxidase/nitrite-induced oxidation of human low-density lipoproteins[J]. *Free Radical Research*, 2007, 41(3): 335-341.
- [14] WROBLEWSKA M, JUSKIEWICZ J, WICZKOWSKI W. Physiological properties of beetroot crisps applied in standard and dyslipidaemic diets of rats[J]. *Lipids in Health and Disease*, 2011, 10(1): 178.
- [15] KUMAR S S, MANOJ P, GIRIDHAR P. Nutrition facts and functional attributes of foliage of Basella spp.[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2015, 64(1): 468-474.
- [16] 李达, 刘兆庆, 姜媛媛, 等. 不同环境对甜菜红色



- 素稳定性的影响[J]. 农产品加工 (学刊), 2006, 4(12): 55-57.
- LI D, LIU Z Q, JIANG Y Y, et al. In different environment to betacyanin stable influence[J]. Academic Periodical of Farm Products Processing, 2006, 4(12): 55-57.
- [17] KHAN M I, GIRIDHAR P. Enhanced chemical stability, chromatic properties and regeneration of betalains in *Rivina humilis* L. berry juice[J]. LWT - Food Science and Technology, 2014, 58(2): 649-657.
- [18] AZEREDO H M C, SANTOS A N, SOUZA A C R, et al. Betacyanin stability during processing and storage of a microencapsulated red beetroot extract[J]. American Journal of Food Technology, 2007, 2(4): 307-312.
- [19] 冉旭龙. 大豆蛋白和酪蛋白非共价结合蓝莓花色苷稳定性作用机理[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2020.
- RAN X L. Non-covalent binding of soybean protein and casein to blueberry anthocyanin stability mechanism[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2020.
- [20] GONG S, YANG C, ZHANG J, et al. Study on the interaction mechanism of purple potato anthocyanins with casein and whey protein[J]. Food Hydrocolloids, 2021, 111(5): 106223.
- [21] CHEN Z, WANG C, GAO X, et al. Interaction characterization of preheated soy protein isolate with cyanidin-3-O-glucoside and their effects on the stability of black soybean seed coat anthocyanins extracts[J]. Food Chemistry, 2019, 271(5): 266-273.
- [22] 王春丽. 红甜菜甜菜红素的稳定性及降血脂作用研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2011.
- WANG C L. Study on the stability and hypolipidemic effect of betacyanin from red beet[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2011.
- [23] 高东菊, 张凤娥, 闫颖. 天竺葵红色素的稳定性研究[J]. 湖南农业科学, 2014, 4(8): 64-68.
- GAO D J, ZHANG F E, YAN Y. Stability of red pigment in geranium [J]. Hunan Agricultural Sciences, 2014, 4(8): 64-68.
- [24] 王丽. 甜菜红素母体结构的改进及其初步合成[D]. 乌鲁木齐: 新疆大学, 2007.
- WANG L. The Modification and Initially Synthesis of Betanidin Enatic Structure[D]. Urumqi: Xinjiang University, 2007.
- [25] GUNESER O. Pigment and color stability of beetroot betalains in cow milk during thermal treatment [J]. Food Chem, 2016, 196(5): 220-227.
- [26] HE W, MU H, LIU Z, et al. Effect of preheat treatment of milk proteins on their interactions with cyanidin-3-O-glucoside[J]. Food Research International, 2018, 107(5): 394-405.
- [27] RUI G, NUNO M, ISABELLE P, et al. Mechanisms of tannin-induced trypsin inhibition: a molecular approach[J]. Langmuir: the ACS Journal of Surfaces and Colloids, 2011, 27(21): 13122-13129.
- [28] SAHU A, KASOJU N, BORA U. Fluorescence study of the curcumin-casein micelle complexation and its application as a drug nanocarrier to cancer cells[J]. Biomacromolecules, 2008, 9(10): 2905-2912.
- [29] WEI J, XU D, YANG J, et al. Analysis of the interaction mechanism of anthocyanins (aronia melanocarpa elliot) with  $\beta$ -casein[J]. Food Hydrocolloids, 2018, 84(5): 276-281.
- [30] 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,  $\beta$ -lactoglobulin[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 105(Pt 1): 965-972.
- [31] ROSS P D, SUBRAMANIAN S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability[J]. Biochemistry, 1981, 20(11): 3096-3102.
- [32] TANG J, LUAN F, CHEN X. Binding analysis of glycyrrhetic acid to human serum albumin: Fluorescence spectroscopy, FTIR, and molecular modeling[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2006, 14(9): 3210-3217.
- [33] BI S, PANG B, WANG T, et al. Investigation on the interactions of clenbuterol to bovine serum albumin and lysozyme by molecular fluorescence technique[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2014, 120(5): 456-461.

## Effect of Milk Proteins on the Thermal Stability of Betanin

Lu Xia, Hu Fei\*

(School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640)

**Abstract** The effects of whey protein (WP) and bovine serum albumin (BSA) on the thermal stability of betanin (Bt) at different temperatures were investigated. Fluorescence spectroscopy, circular dichroism, and Fourier transform infrared spectroscopy were used to study the interaction between WP/BSA and Bt. The results showed that WP and BSA inhibited the degradation of Bt content and the protection provided with WP was better than with BSA. Additionally, the change of pH also affected the thermal degradation of Bt. The half-life ( $t_{1/2}$ ) of the compound was the longest at pH 5.0, and the  $t_{1/2}$  of Bt-WP was up to 2.99 h. The fluorescence analysis showed that Bt led to a static quenching of WP/BSA. Further, the interaction was a spontaneous process with electrostatic interactions being the main force. Synchronous fluorescence spectra presented alterations in microenvironment of Trp and Tyr residues of WP/BSA, respectively, upon interaction with Bt. Circular dichroism and Fourier transform infrared spectroscopy analysis indicated that characteristic peak positions of amide I, II band and the secondary structures of WP/BSA was changed upon conjugation with Bt.

**Keywords** betanin; complex; thermal stability; spectral analysis; mechanism