

# 乌饭树树叶色素与大米蛋白相互作用的研究

徐塬, 王立, 钱海峰, 张晖, 齐希光  
(江南大学食品学院, 江苏无锡 214122)

**摘要:** 本文以乌饭树树叶(VBTL)色素和大米蛋白为研究对象,研究了乌饭树树叶染色过程中色素和大米蛋白间的相互作用,分析了染色前后 VBTL 色素抗氧化能力和游离多酚含量的变化,并对染色前后大米蛋白的表面疏水性和二级结构变化进行了分析研究。实验结果表明:染色过程能够显著降低乌饭树树叶色素溶液的抗氧化能力和多酚含量,分别降低了 67.19%和 68.11%;同时,染色也能够显著降低大米蛋白的亮度和表面疏水性,且两者的下降程度呈现高度的相关性。研究发现染色过程中,大米蛋白的二级结构发生变化,其中  $\beta$ -转角含量基本不变, $\alpha$ -螺旋与  $\beta$ -折叠含量下降,无规卷曲含量上升。另外,将大米蛋白分类提取后染色的实验结果表明:色素与清蛋白之间更易形成氢键,与谷蛋白和球蛋白之间更易形成疏水键。从以上结果分析可以推测色素与大米蛋白之间以疏水作用和氢键为主要结合手段。

**关键词:** 乌饭树; 色素; 大米蛋白; 相互作用; 二级结构

文章编号: 1673-9078(2015)12-121-127

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.12.018

## Interactions between *Vaccinium bracteatum* Thunb. Leaf Pigment and Rice Protein

XU Yuan, WANG Li, QIAN Hai-feng, ZHANG Hui, QI Xi-guang

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** Combined proteomic and biochemical strategies were used to study the interaction between *Vaccinium bracteatum* Thunb. Leaf (VBTL) pigment and rice protein. Changes in antioxidant activity and free polyphenol content of VBTL pigment were measured before and/or after the dyeing process. Changes in surface hydrophobicity and secondary structure of the protein were also analyzed. The results indicated that the antioxidant activity and free polyphenol content of VBTL pigment decreased by 67.19% and 68.11%, respectively, after dyeing the rice protein. Meanwhile, the brightness and surface hydrophobicity of rice protein decreased significantly. In addition, the dyeing process changed secondary structure of rice protein. Briefly, there were significant reductions in the content of  $\alpha$ -helix and  $\beta$ -sheet structures, but an obvious increase in random coil. Furthermore, the results indicated that albumin interacted more readily with VBTL pigment than did globulin or glutelin. All the data indicated that the VBTL pigment interacted with rice protein mainly via hydrophobic bonds and hydrogen bonds.

**Key words:** *Vaccinium bracteatum* Thunb.; pigment; rice protein; interaction; secondary structure

乌饭树 (*Vaccinium Bracteatum* Thumb, VBT) 为杜鹃花科越橘属植物,全世界范围内约有 450 多种,主要分布集中在中国、美国、越南和泰国等地<sup>[1]</sup>。越橘属植物中的蓝莓、蔓越莓、越橘等已有较为广泛的研究<sup>[2-4]</sup>,研究表明:越橘属植物中存在大量原花青素、多酚类物质,这些成分有着促进细胞凋亡<sup>[5]</sup>、防癌抗癌<sup>[6]</sup>、抗衰老<sup>[7]</sup>和调节血糖血脂<sup>[8]</sup>等功效。

长久以来,乌饭树树叶(VBTL)作为一种传统的中药材使用,其功效在《本草纲目》等药典中均有

收稿日期: 2014-12-17

基金项目: 教育部留学回国人员科研启动基金项目,江苏省自然科学基金(BK2010146),无锡市科技发展项目(CLE01N1312)

作者简介: 徐塬(1989-),男,硕士研究生,从事功能性天然产物研究

通讯作者: 王立(1978-),男,教授,从事功能因子及健康食品研究

记载。另外,在江苏、浙江、福建等地有利用其叶中的汁液浸渍大米制作乌米饭食用的习俗。近年来,已有一些关于乌饭树树叶色素相关报道,主要包括提取物的理化性质<sup>[9]</sup>、提取分离<sup>[10]</sup>和生理功能<sup>[11]</sup>等方面,研究表明,多酚类物质是色素的主要成分,并且色素对头发、生鸡蛋和米饭有较好的染色效果<sup>[12-13]</sup>,但是染色机理仍然不清楚,这也限制了 VBTL 色素的进一步使用。

目前,国外已有一些研究多酚类物质与蛋白结合的报道,但很少涉及到两者结合前后性质的差异研究,所以反应机理仍不清楚。本文以 VBTL 色素和大米蛋白为研究对象,研究 VBTL 染色过程中色素和大米之间的结合情况,分析了染色前后 VBTL 色素抗氧化能力和游离多酚含量的变化,并对染色前后大米蛋白的

理化性质和二级结构变化进行了分析研究,探索了两者之间结合的特征和方式,以期为乌饭树叶的深度开发提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

乌饭树叶(VBTL),2014年5月采摘于江苏宜兴,经脱脂、烘干、粉碎,过100目筛后备用;大米蛋白,购于江西金农生物科技有限公司;其他常用试剂:分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

岛津UV-1800分光光度计,日本岛津公司;F-7000荧光光谱仪,日本HITACHI;傅立叶变换红外光谱仪,美国赛默飞公司;高精度分光测色仪,美国Hunterlab公司。常用设备未列出。

### 1.2 大米蛋白的分级提取

按Osborne分类法<sup>[14]</sup>对大米蛋白进行分级提取,并稍加改进。具体如下:大米蛋白100g分散在2000mL离子水中,25℃下搅拌60min后3000r/min离心30min取上清液I(清蛋白)。离心沉淀依次用5%NaCl、70%乙醇和0.05MNaOH依照上述工艺参数处理,分别得到上清液II、III和IV。上清液I、II和IV分别在pH4.1、pH4.3和pH4.8条件下等电点沉淀,得到大米清蛋白、球蛋白和谷蛋白。上清液II经过真空浓缩得醇溶蛋白。NaOH提取后离心沉淀中的蛋白表示不溶性蛋白。每个提取过程重复两次。蛋白质含量通过凯氏定氮法测定。

### 1.3 VBTL色素的提取分离

VBTL粉末→水浸提→抽滤得滤液→AB-8大孔树脂纯化→旋转蒸发浓缩→冷冻干燥→VBTL色素

经过测定,色素中多酚含量为61.97%,蛋白和碳水化合物含量分别为1.12%和25.64%。

### 1.4 VBTL色素与大米蛋白的染色工艺

称取VBTL色素0.1g溶解于50mL去离子水中,加入2g大米蛋白后在70℃下分别搅拌一定时间(0、4、8、12、20、40、60min),抽滤并用蒸馏水反复冲洗滤饼直至洗脱液呈无色,滤饼即为反应后的大米蛋白,滤液(反应后的VBTL色素)浓缩后冷冻干燥,4℃保存备用。

### 1.5 颜色的测定

染色后大米蛋白的颜色用高精度分光测色仪测

定,并由 $L^*$ 、 $a^*$ 和 $b^*$ 表示。 $L^*$ 、 $a^*$ 和 $b^*$ 的大小分别代表颜色由黑到白、由绿到红和由蓝到黄。

### 1.6 抗氧化能力的测定

抗氧化能力用ABTS自由基清除能力测定法测定,并与Trolox清除自由基能力相对比,确定其抗氧化活性(TEAC),即1 $\mu$ mol/L待测物质的自由基清除能力相当于Trolox的自由基清除能力的微摩尔数。

### 1.7 游离多酚含量的测定

游离多酚含量由Folin-酚法测定,并用每毫升溶液含有的没食子酸(mg)来表示。

### 1.8 大米蛋白表面疏水性的测定

大米蛋白样品0.075g分散于5mL10mmol/L的PBS缓冲液(pH7.0)中,配制成1.5%(m/V)的蛋白分散液。在4mL10mmol/L的PBS缓冲液(pH7.0)中分别加入0、10、20、30、40、50 $\mu$ L上述配置的蛋白分散液和8mmol/L的ANS溶液,立刻震荡摇匀10s后避光反应1min,测定荧光强度。分析条件:激发波长390nm,检测波长470nm,夹缝宽度5nm。以蛋白分散液浓度对荧光强度作图,初始斜率即可表示表面疏水性( $S_0$ )。

### 1.9 大米蛋白二级结构的测定

按照Nabet A和Pezolet M的方法<sup>[15]</sup>在傅立叶变换红外光谱仪上测定其红外光谱图,并选取酰胺I带(1600~1700 $\text{cm}^{-1}$ )进行大米蛋白二级结构分析,应用PeakFit 4.1.2软件进行Gauss函数多峰拟合红外谱图,分析二级结构的变化情况。

### 1.10 数据分析

所有数据采用 $\bar{x} \pm \text{SEM}$ 表示( $n=3$ ),采用Origin 8.6软件进行数据统计分析和作图,采用SPSS 17.0软件进行数据处理,组间显著性检验用t检验及相关分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 大米蛋白的分级提取

大米蛋白中四种单一组分蛋白(清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白和谷蛋白)的相对含量及提取后的纯度见表1。大米蛋白中有部分的不溶性蛋白,可能是原料中的杂质、未提取干净的蛋白以及一些存储过程中的变性蛋白,这部分蛋白对后续实验没有太大影响,同时,

鉴于醇溶蛋白的相对含量和纯度都显著低于其他三种蛋白,因此,后续实验中选择清蛋白、球蛋白和谷蛋白这三种蛋白来进行实验。

表1 大米蛋白的分级提取分析 (Osborne 分类法)

Table 1 Fractionation of rice proteins by the Osborne method

蛋白组分	相对含量/%	纯度/%
清蛋白	5.79	68.72
球蛋白	4.13	82.94
醇溶蛋白	5.83	15.82
谷蛋白	60.92	95.26
不溶性蛋白	23.33	-

## 2.2 染色对 VBTL 色素抗氧化能力和游离多酚含量的影响

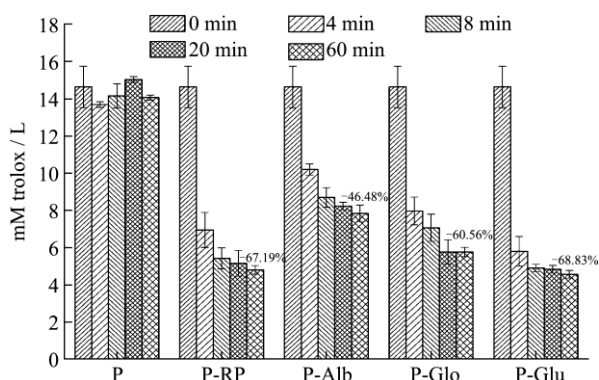


图1 不同反应时间 VBTL 色素和色素-蛋白体系的抗氧化能力  
Fig.1 Antioxidant activity of VBTL pigment and pigment-protein at different interaction time points

注: 数据由“平均值±标准差”表示, n=3; 进行显著性分析得出: P 在 0 和 60min 之间无显著性差异, P-RP、P-Alb、P-Glo 和 P-Gu 在 0 和 60min 之间存在显著性差异。P: 纯大米蛋白体系; P-RP: 色素-大米蛋白体系; P-Alb: 色素-大米清蛋白体系; P-Glo: 色素-大米谷蛋白体系; P-Glu: 色素-大米球蛋白体系。

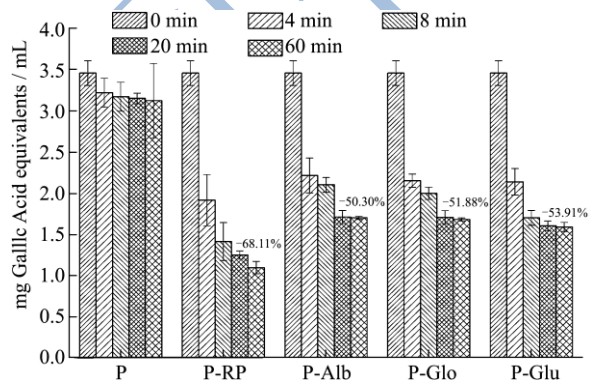


图2 不同反应时间 VBTL 色素和色素-蛋白体系的游离多酚含量  
Fig.2 Free polyphenol content of VBTL pigment and pigment-protein at different interaction time points

注: 数据由“平均值±标准差”表示, n=3; 进行显著性分析

得出: P 在 0 和 60 min 之间无显著性差异, P-RP、P-Alb、P-Glo 和 P-Gu 在 0 和 60 min 之间存在显著性差异。P: 纯大米蛋白体系; P-RP: 色素-大米蛋白体系; P-Alb: 色素-大米清蛋白体系; P-Glo: 色素-大米谷蛋白体系; P-Glu: 色素-大米球蛋白体系。

图 1 和图 2 分别为五种不同的体系在染色过程中抗氧化性和游离多酚含量的变化。由图可以看出,在反应过程中, P 体系的抗氧化能力和游离多酚含量并没有显著性的变化,表明实验中所用的反应条件不会影响体系中的游离多酚含量和本身具备的抗氧化能力。当加入大米蛋白进行染色后,体系 (P-RP) 的抗氧化能力和游离多酚含量随时间的延长呈显著降低的趋势 ( $P < 0.05$ ), 反应 60 min 后, 抗氧化能力和游离多酚的含量分别降低了 67.19% 和 68.11%, 说明在反应过程中, 大量的 VBTL 色素与大米蛋白进行了反应, 可能以某种或者某些作用方式结合在了一起, 导致剩余溶液的抗氧化性显著降低<sup>[16]</sup>。

对于 P-Alb、P-Glo 和 P-Glu 体系, 随反应时间的延长, 抗氧化能力 (图 1) 和游离多酚含量 (图 2) 的变化也呈显著性降低的趋势, 但三种蛋白之间有所差异。清蛋白、球蛋白和谷蛋白的抗氧化能力分别降低了 46.48%、60.56% 和 68.83%, 而游离多酚含量则分别降低 50.30%、51.88% 和 53.91%。下降最显著的是谷蛋白和球蛋白, 原因可能是谷蛋白、球蛋白与清蛋白的结构存在差异, 清蛋白相较于其他两种蛋白-SH、-OH 较多, 清水性较强、疏水性较差, 结构较为简单<sup>[17]</sup>。实验结果表明, 对于 VBTL 色素来说, 可能更容易与溶解度小且疏水性强的蛋白结合<sup>[18]</sup>。

## 2.3 染色对大米蛋白表面疏水性的影响

图 3 反映了三种不同的蛋白 (清蛋白、球蛋白和谷蛋白) 染色前后表面疏水性随时间的变化情况。对于清蛋白和球蛋白来说, 未染色前, 表面疏水性在 40 min 左右达到峰值, 随后略有下降, 而谷蛋白则在 20 min 左右达到峰值。推测这是因为蛋白在加热时, 蛋白内部的大量疏水性基团暴露出来, 导致了疏水性的增加<sup>[19]</sup>, 而随着加热时间的延长, 蛋白分子几乎伸展完全, 开始变性, 导致蛋白改变了原有的结构并且开始沉淀, 最终导致表面疏水性下降<sup>[20]</sup>。

对于用 VBTL 色素染色后的三个蛋白体系 (P-Alb、P-Glo 和 P-Glu), 表面疏水性的变化趋势与未染色的虽然相似, 但数值要更低 (图 3), 这可以当作衡量色素与蛋白发生作用的指标。清蛋白、球蛋白和谷蛋白染色前后表面疏水性的差别分别为 2004.5、7964.5 和 17172.7 (60 min), 三者之间也有着显著性差异。清蛋白只下降了 20% 左右, 而球蛋白和谷蛋白

则下降了 40%~60%，说明色素更能利用疏水作用与谷蛋白结合。推测是因为一些疏水键暴露在蛋白表面，多酚类物质（VBTL 色素）虽然是可溶性的，但是其中的疏水键也能与蛋白表面的疏水键相互作用，促进了两者之间的结合，最终导致了疏水性的降低<sup>[16]</sup>。从本实验的结果可以推测，VBTL 色素与大米蛋白能以疏水键相结合，这也与很多酚类物质的报道结果类似：Zou 等人<sup>[21]</sup>研究发现多酚类物质能与人的血清蛋白以疏水键结合；而 M Gallo<sup>[18]</sup>也发现可可多酚与牛奶蛋白的相互作用是依靠疏水键和弱共价键；也有研究报道<sup>[16]</sup>，多酚不仅能与蛋白表面的疏水基团作用，也能与内部的一些疏水基团作用。

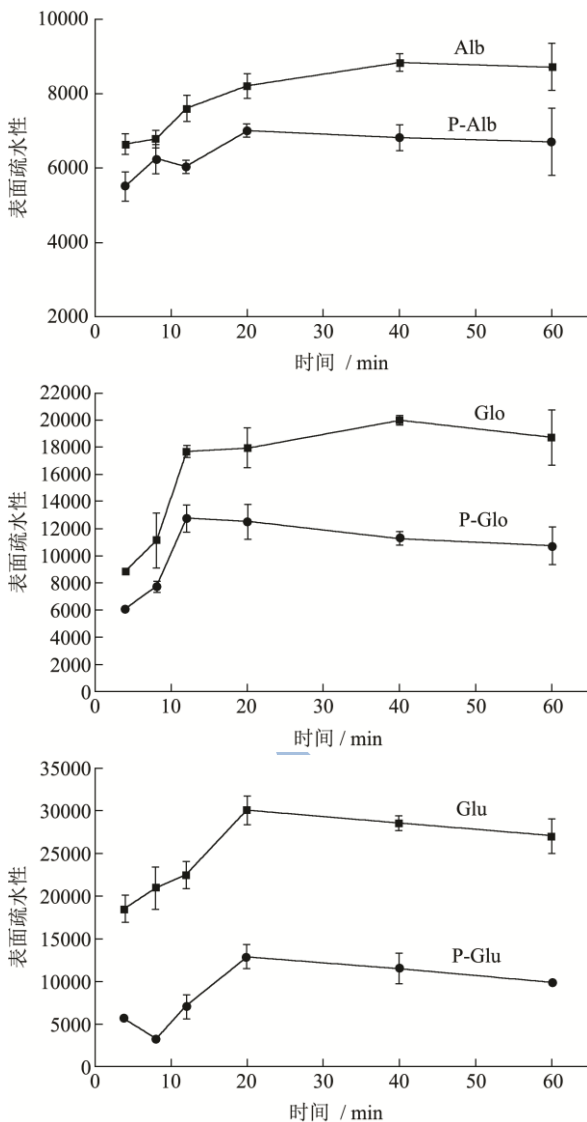


图 3 不同反应时间蛋白和蛋白-色素体系的表面疏水性

Fig.3 Surface hydrophobicity of protein and protein-pigment at different interaction time points

注：数据由“平均值±标准差”表示，n=3；进行显著性分析得出：Alb、Glo、Glu、P-Alb、P-Glo 和 P-Glu 在 0 和 60min

之间存在显著性差异。Alb: 大米清蛋白体系；Glo: 大米谷蛋白体系；Glu: 大米球蛋白体系；P-Alb: 色素-大米清蛋白体系；P-Glo: 色素-大米谷蛋白体系；P-Glu: 色素-大米球蛋白体系。

## 2.4 染色对大米蛋白颜色的影响

表 2 为三种不同的蛋白（清蛋白、球蛋白和谷蛋白）染色前后色差（ $L^*$ 、 $a^*$ 和  $b^*$ ）的变化。由表 2 可看出，染色后，大米蛋白的  $L^*$  显著降低， $b^*$  有所降低，而  $a^*$  基本保持不变。P-Alb、P-Glo 和 P-Glu 体系的  $L^*$  值分别下降到了 40.72、38.23 和 35.22，同时，总游离多酚含量不断降低，说明这三种蛋白都与乌饭树叶色素进行了结合。

表 3 为染色前后大米蛋白的色差与表面疏水性之间的相关性分析。从中可以看出， $\Delta a^*$  与  $\Delta S_0$  之间的相关系数在 -0.434~0.269 之间，呈弱相关，所以两者之间没有必然的联系。而  $\Delta b^*$  与  $\Delta S_0$  之间的相关系数在 0.752~0.960，呈现一定的相关性， $\Delta L^*$  与  $\Delta S_0$  之间的皮尔森相关系数在 0.814~0.931，呈现高度的相关性。因为在染色过程中，溶液中 VBTL 色素不停的被消耗，部分吸附到蛋白表面，可能依然保有 VBTL 色素原有的黄色，同时蛋白的表面疏水性下降，所以两者有着一定的相关性。 $\Delta L^*$  与  $\Delta S_0$  有着高度的相关性，说明在染色过程中，大米蛋白变黑，同时表面疏水性下降，疏水基团消耗的越多，反应过后蛋白的颜色就越黑（ $\Delta L^*$  更低）。对比三种蛋白，我们发现清蛋白的相关系数（0.814）明显比其他两种蛋白低（0.896 和 0.931），这说明相较于清蛋白，球蛋白和谷蛋白的颜色变化与表面疏水性更为密切。

## 2.5 染色对大米蛋白二级结构的影响

表 4 为三种不同蛋白（清蛋白、球蛋白和谷蛋白）染色前后二级结构的变化。从中可以看出，随着染色时间的增加，三种蛋白的  $\alpha$ -螺旋的含量均显著降低（清蛋白、球蛋白和谷蛋白分别降低了 7.93%、4.85% 和 4.76%），但与未加色素的体系相比，P-Alb、P-Glo 和 P-Glu 体系的  $\alpha$ -螺旋含量下降的更为快速（清蛋白、球蛋白和谷蛋白分别降低了 5.92%、6.20% 和 6.86%），最终的  $\alpha$ -螺旋含量更低， $\beta$ -折叠也有着相似的趋势。对于  $\beta$ -转角，两种体系的含量无显著性差异。对于无规卷曲，纯蛋白体系的含量显著增加（清蛋白、球蛋白和谷蛋白分别增加了 9.84%、3.85% 和 4.04%），但是染色后的蛋白中无规卷曲含量的增加相对来说则更为明显（清蛋白、球蛋白和谷蛋白分别增加了 8.78%、3.67% 和 11.43%）。

表2 不同反应时间蛋白和色素-蛋白体系的颜色变化情况

Table 2 Color of protein and protein-pigment at different interaction time points

蛋白	时间/min	A	B	C	D	E	F
清蛋白	0	90.48±1.32 <sup>NS</sup>	-	-1.91±0.13 <sup>NS</sup>	-	3.47±0.01 <sup>NS</sup>	-
	4	91.29±0.35	87.62±0.87 <sup>c</sup>	-1.98±0.06	-2.32±0.19 <sup>NS</sup>	3.55±0.37	13.8±0.73 <sup>c</sup>
	8	92.16±0.42	86.49±2.93 <sup>c</sup>	-1.95±0.01	-2.63±0.01	3.46±0.21	13.4±1.45 <sup>c</sup>
	20	88.84±0.85	61.85±2.31 <sup>b</sup>	-1.90±0.03	-2.71±0.13	3.41±0.01	8.17±0.04 <sup>b</sup>
	60	90.23±0.30	40.72±0.76 <sup>a</sup>	-2.01±0.03	-2.37±0.21	3.57±0.14	3.32±0.01 <sup>a</sup>
球蛋白	0	82.15±0.29 <sup>NS</sup>	-	-0.26±1.63 <sup>NS</sup>	-	2.40±1.64 <sup>NS</sup>	-
	4	82.54±0.11	78.80±0.75 <sup>d</sup>	1.54±0.40	0.04±1.95 <sup>a</sup>	3.56±0.98	10.14±0.45 <sup>c</sup>
	8	82.50±0.72	75.21±1.51 <sup>c</sup>	-0.97±0.01	-0.16±1.48 <sup>a</sup>	3.39±0.09	9.86±0.55 <sup>c</sup>
	20	83.25±0.01	62.31±0.08 <sup>b</sup>	0.91±0.01	1.10±0.01 <sup>b</sup>	2.51±1.48	4.36±0.17 <sup>b</sup>
	60	82.15±0.01	35.21±1.48 <sup>a</sup>	-0.78±0.21	-0.48±0.10 <sup>a</sup>	2.46±0.39	3.05±0.74 <sup>a</sup>
谷蛋白	0	83.69±0.65 <sup>NS</sup>	-	1.15±3.40 <sup>NS</sup>	-	0.72±0.36 <sup>NS</sup>	-
	4	82.26±1.37	75.42±1.19 <sup>d</sup>	0.44±1.88	2.64±1.72 <sup>b</sup>	1.17±0.08	13.16±0.43 <sup>d</sup>
	8	84.42±2.88	67.86±0.84 <sup>c</sup>	1.61±2.60	-1.72±1.06 <sup>a</sup>	1.59±0.86	10.87±0.55 <sup>c</sup>
	20	80.80±0.66	64.17±0.54 <sup>b</sup>	-0.84±0.01	1.49±2.51 <sup>b</sup>	1.04±0.09	8.21±0.06 <sup>b</sup>
	60	82.14±1.01	38.25±2.76 <sup>a</sup>	3.76±0.72	1.87±0.02 <sup>b</sup>	1.05±0.13	3.94±0.26 <sup>a</sup>

注: 表中每个数据都由平均值±标准差表示, n=3; A: 蛋白体系的 L\*; B: 色素-蛋白体系的 L\*; C: 蛋白体系的 a\*; D: 色素-蛋白体系的 a\*; E: 蛋白体系的 b\*; F: 色素-蛋白体系的 b\*。

表3 不同蛋白的色差与表面疏水性之间的相关性

Table 3 Correlations between color aberration and surface hydrophobicity of different proteins

相关性	P 体系与 P-Alb 体系的表面疏水性(ΔS <sub>0</sub> )差异	P 体系与 P-Glo 体系的表面疏水性(ΔS <sub>0</sub> )差异	P 体系与 P-Glu 体系的表面疏水性(ΔS <sub>0</sub> )差异
ΔL*	0.814**	0.896**	0.931**
Δa*	-0.235*	-0.434*	0.269*
Δb*	0.802**	0.752*	0.960**

注: 两个变量的相关性由皮尔森相关系数来表示。皮尔森相关系数反应了两个变量的线性相关程度。1 或-1 代表变量之间有着完全或不完全的线性关系; 当 0.7<|r|<0.99 或 0.4<|r|<0.69 或 0.1<|r|<0.39 时, 代表着高度或适度或低度相关。

表4 不同反应时间清蛋白、球蛋白和谷蛋白的二级结构

Table 4 Secondary structures of protein and pigment-protein complex at different interaction time points

蛋白	时间/min	α-螺旋		β-折叠		β-转角		无规卷曲	
		P	P-RP	P	P-RP	P	P-RP	P	P-RP
清蛋白	0	25.25	-	25.02	-	29.63	-	18.07	-
	4	23.85	23.06	29.74	27.24	28.95	23.56	17.46	26.14
	8	23.42	17.52	27.72	26.75	25.93	29.35	22.93	26.37
	20	21.92	20.51	30.71	30.12	25.10	26.83	22.26	22.54
	60	17.32	19.33	27.84	25.48	26.93	25.33	27.91	26.85
球蛋白	0	19.04	-	21.59	-	48.41	-	17.04	-
	4	18.72	16.72	23.85	22.84	42.94	43.82	14.48	16.48
	8	20.34	20.12	22.18	21.12	43.80	43.82	13.70	14.08
	20	16.62	16.40	23.85	23.36	44.92	40.18	15.61	20.06
	60	14.19	12.84	23.92	20.63	44.98	45.82	20.89	20.71
谷蛋白	0	18.68	-	21.82	-	42.18	-	17.30	-

转下页

接上页

	4	18.15	18.50	25.82	24.05	38.67	40.34	17.36	17.05
谷蛋白	8	18.19	18.51	25.28	24.13	39.35	40.50	17.17	16.86
	20	15.62	15.74	28.41	23.71	36.78	35.97	19.19	24.59
	60	13.92	11.82	30.01	25.84	35.50	33.62	21.34	28.72

何建川等人<sup>[22]</sup>也研究发现,在加热的过程中, $\alpha$ -螺旋和 $\beta$ -折叠的含量都有所降低,无规卷曲含量增加,推测是因为加热使蛋白伸展、变性,造成某些二级结构内部化学键的破坏,从而破坏他们的结构,迫使他们向无规卷曲变化。对于 P-Alb、P-Glo 和 P-Glu 体系来说,蛋白的二级结构变化更为明显,说明色素的主要成分-酚类物质欲蛋白发生了较多的结合,具体原因是:多酚类物质会影响某些蛋白的二级结构,导致 $\alpha$ -螺旋和 $\beta$ -折叠的降低和无规卷曲的升高<sup>[22]</sup>;蛋白二级结构( $\alpha$ -螺旋和 $\beta$ -折叠)内部存在大量的氢键,色素也含有大量的极性基团,这些多酚类物质中的极性基团会与 $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠中的极性基团形成氢键<sup>[23]</sup>,阻碍了 $\alpha$ -螺旋和 $\beta$ -折叠内部氢键的形成和强度,甚至导致自身氢键的破坏,迫使他们向无规卷曲转变<sup>[24]</sup>。其中清蛋白的 $\alpha$ -螺旋和 $\beta$ -折叠的降低和无规卷曲的增加最为显著,更证实了这一结论。M Gallo 等人<sup>[18]</sup>在研究可可多酚与蛋白的相互作用时,也发现存在着氢键作用。因此,从实验结果可以推测,氢键也是 VBTL 色素与大米蛋白结合的另一种形式。

成一定的影响,如色素的抗氧化能力显著降低,而大米蛋白的表面疏水性降低,颜色变黑;同时,大米蛋白的 $\alpha$ -螺旋和 $\beta$ -折叠含量降低,无规卷曲含量增加。实验结果说明染色过程中色素与大米蛋白之间以疏水作用和氢键为主要结合手段。

### 参考文献

- [1] 谢远程.乌饭树(*Vaccinium Bracteatum* Thunb.)生态学特性及其无性繁殖技术研究[D].南京林业大学,2005  
XIE Yuan-cheng. Ecological characteristics and asexual propagation techniques of *Vaccinium Bracteatum* Thunb. [D]. Nanjing Forestry University, 2005
- [2] Rodriguez-Mateos A, Cifuentes-Gomez T, George T W, et al. Impact of cooking, proving, and baking on the (poly) phenol content of wild blueberry [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 62(18): 3979-3986
- [3] McKay D L, Chen C Y O, Zampariello C A, et al. Flavonoids and phenolic acids from cranberry juice are bioavailable and bioactive in healthy older adults [J]. Food Chemistry, 2015, 168(1): 233-240
- [4] Viljanen K, Heiniö R L, Juvonen R, et al. Relation of Sensory Perception with Chemical Composition of Bioprocessed Lingonberry [J]. Food Chemistry, 2014, 157: 148-156
- [5] Mahbub A A, Le Maitre C L, Haywood-Small S L, et al. Differential effects of polyphenols on proliferation and apoptosis in human myeloid and lymphoid leukemia cell lines [J]. Anticancer Agents in Medical Chemistry, 2013, 13(10): 1601-1613
- [6] Ramassamy C. Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets [J]. European Journal of Pharmacology, 2006, 545(1): 51-64
- [7] Rendeiro C, Vauzour D, Kean R J, et al. Blueberry supplementation induces spatial memory improvements and region-specific regulation of hippocampal bdnf mma expression in young rats [J]. Psychopharmacology, 2012, 223(3): 319-330
- [8] Prior R L, Wilkes S E, Rogers T R, et al. Purified blueberry anthocyanins and blueberry juice alter development of obesity in mice fed an obesogenic high-fat diet [J]. Journal of

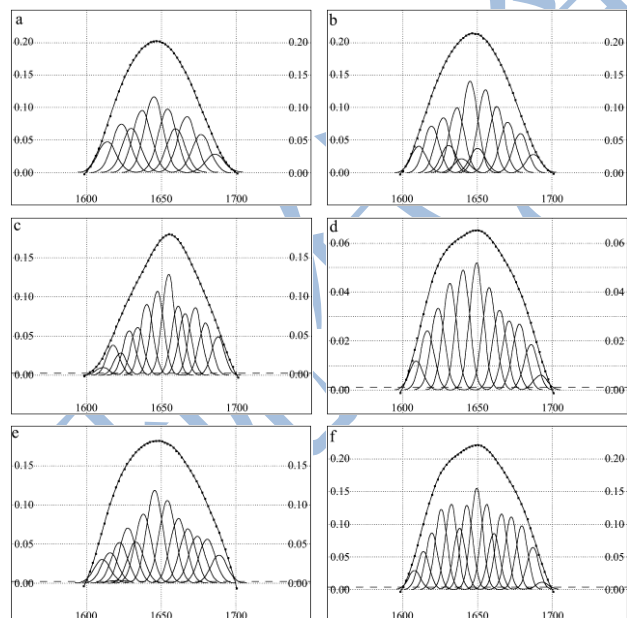


图4 60min 时蛋白和蛋白-色素体系的红外去卷积图

Fig.4 Deconvolution of protein and protein-pigment at 60 min

注: a:Alb、b: P- Alb、c:Glo、d: P- Glo、e:Glu、f:P- Glu。

### 3 结论

染色会对乌饭树树叶色素和大米蛋白的性质造

- Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(7): 3970-3976
- [9] Chen Y Y, Zhang D J. Adsorption kinetics, isotherm and thermodynamics studies of flavones from vaccinium bracteatum thunb. leaves on NKA-2 Resin [J]. Chemical Engineering Journal, 2014, 254: 579-585
- [10] 王立,姚惠源.大孔吸附树脂纯化乌饭树叶黑色素的研究[J].天然产物研究与开发, 2006,18(1): 20-24  
WANG Li, YAO Hui-yuan. Purification of black pigment from vaccinium bracteatum thunb. leaves by resin [J]. Natural Product Research and Development, 2006, 18(1): 20-24
- [11] WANG L, ZHANG Y, Xu M, et al. Anti-diabetic activity of vaccinium bracteatum thunb. leaves' polysaccharide in STZ-induced diabetic mice [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 610: 317-321
- [12] 姜萍,程从秋,胡志杰.乌饭树叶色素提取工艺及色素特性的研究[J].中国野生植物资源,1999,18(3): 47-49  
JIANG Ping, CHENG Cong-qiu, HU Zhi-jie. Research on extraction process of vaccinium bracteatum thunb. leaves pigment and its characteristics [J]. Chinese Wild Plant Resources, 1999, 18(3): 47-49
- [13] 胡志杰,姜萍,张义生.乌饭树叶色素提取工艺及色素性质再研究[J].中国野生植物资源,2001,1:47-49  
HU Zhi-jie, JIANG Ping, ZHANG Yi-sheng. Re-research on extraction process of vaccinium bracteatum thunb. leaves pigment and its characteristics [J]. Chinese Wild Plant Resource, 2001, 1: 47-49
- [14] Agboola S, Ng D, Mills D. Characterisation and functional properties of Australian rice protein isolates [J]. Journal of Cereal Science, 2005, 41(3): 283-290
- [15] Nabet A, Pezolet M. Two-Dimensional FT-IR Spectroscopy: A Powerful method to study the secondary structure of proteins using H-D Exchange [J]. Applied Spectroscopy, 1997,51: 466-469
- [16] Stojadinovic M, Radosavljevic J, Ognjenovic J, et al. Binding affinity between dietary polyphenols and  $\beta$ -lactoglobulin Negatively Correlates with the Protein Susceptibility to Digestion and Total Antioxidant Activity of Complexes Formed [J]. Food Chemistry, 2013, 136: 1263-1271
- [17] 李亦蔚.大米蛋白提取与分离纯化技术的研究[D].长沙理工大学, 2005  
LI Yi-wei. Studies on the extraction and purification of rice protein [D]. Changsha University of Science and Technology, 2005
- [18] Gallo M, Vinci G, Graziani G et al. The interaction of Cocoa Polyphenols with Milk Proteins Studied by Proteomic Techniques [J]. Food Research International, 2013, 54: 406-415
- [19] Wani A A, Kaur D, Ahmed I, et al. Extraction Optimization of Watermelon Seed Protein Using Response Surface Methodology [J]. LWT-Food Science and Technology, 2008, 41: 1514-1520
- [20] 陈建新,徐岩.蛋白溶解性分析法研究大米焙炒过程中蛋白质热变性行为[J].食品工业科技,2014,35(6):132-135  
Chen Jian-xin, XU Yan. Analysis of the thermal denaturation of rice protein during roasting by protein solubility study [J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(6): 132-135
- [21] Zou D, Xie A. Influence of polyphenol-plasma protein interaction on the antioxidant properties of polyphenols [J]. Current Drug Metabolism, 2013, 14(4): 451-455
- [22] 何建川,邵阳,张波.蛋白质和变性蛋白质二级结构的 FTIR 分析进展[J].食品研究与应用,2012,24(8):1176-1180  
HE Jian-chuan, SHAO Yang, ZHANG Bo. Progress in study of protein secondary structure and denatured protein by FT-IR [J]. Chemical Researcher and Application, 2012, 24(8): 1176-1180
- [23] Hudson S A, Ecroyd H, Dehle F C, et al. (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) Maintains  $\kappa$ -casein in its pre-fibrillar state without redirecting its aggregation pathway [J]. Journal of Molecular Biology, 2009, 392: 689-700
- [24] Baxter N J, Williamson M P, Lilley T H, et al. Stacking interactions between caffeine and methyl gallate [J]. Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions, 1996, 92: 231-234