

## EGCG 修饰对乳清蛋白乳液冷凝胶特性的影响

曹艳芸, 林金瓯, 韩剑众\*

(浙江工商大学食品与生物工程学院 杭州 310018)

**摘要** 研究不同浓度表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG; 2.7, 13.3, 26.6  $\mu\text{mol}$  多酚/g 蛋白质)对乳清蛋白乳液冷凝胶微观结构及凝胶特性的影响。采用动态光散射和凯氏定氮法测定乳液的粒径、带电性质和界面蛋白吸附量,激光共聚焦显微镜观察乳液微观结构,分析 EGCG 对蛋白乳液微观结构和特性的影响。采用质构仪单轴压缩法测定凝胶强度,通过凝胶在 4 种溶液中溶解度的差异分析支撑凝胶的作用力,采用扫描电镜观察凝胶结构,综合分析 EGCG 对乳液冷凝胶特性的影响。结果表明:加入 EGCG 使蛋白乳液的粒径减小,乳液液滴间静电斥力增大,液滴分布更均匀;使得乳清蛋白乳液冷凝胶中孔隙增多、变小且分布更均匀,凝胶切面更加平滑且致密,凝胶强度增强。总体上,EGCG 浓度越高,影响程度越大。当 EGCG 浓度为 26.6  $\mu\text{mol}$  多酚/g 蛋白质时,乳液的平均粒径最小,约 385 nm;乳液液滴间静电斥力最大,乳液凝胶中疏水作用力、静电作用力最强,凝胶强度增强 92.6%。

**关键词** 乳清蛋白; EGCG; 乳液; 冷凝胶; 凝胶特性

**文章编号** 1009-7848(2022)03-0018-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.03.003

蛋白质的乳化和凝胶特性对于维持食品的感官和质构具有重要的意义。比如:在冰淇淋、舒芙蕾、泡沫饮料这些乳液和泡沫形态的食品中,往往通过添加蛋白质作为表面活性剂,帮助形成和稳定食品体系<sup>[1]</sup>。蛋白质乳液凝胶可作为营养活性物质的传递载体。冷凝胶技术是一种较新的食品凝胶制备技术,在室温下便可以形成凝胶,更适用于构建热敏感性营养成分的载体,其在功能性食品和医药等领域应用也愈加广泛。目前有研究表明利用乳清蛋白冷凝胶对维生素 E、益生菌等生物活性物质进行包埋,其运输传递效果良好<sup>[2]</sup>。使用蛋白凝胶珠对核黄素进行包埋时,其包埋率能达到 80%以上<sup>[3-5]</sup>。

然而,通常蛋白质冷凝胶在成胶时所需要的蛋白质浓度比较高,凝胶强度比较低,并且包裹在内部的脂质容易被氧化<sup>[6]</sup>。许多研究者通过向体系中添加天然植物多酚以提高乳液凝胶的氧化稳定性,并取得良好的效果。Zhou 等<sup>[7]</sup>通过在鱼糜中添加茶多酚来改善鱼糜凝胶强度、持水性和蛋白交联度。Chen 等<sup>[8]</sup>研究发现丁香提取物可以促进肌

原纤维蛋白的交联,从而增强其凝胶的流变性质。同时,植物多酚的添加能够有效提高食品体系的附加营养价值。据报道<sup>[9]</sup>,多酚与蛋白质反应在一定程度上降低食品中的营养价值,降低蛋白质在体内、体外的消化率。多酚化合物对蛋白质功能特性的影响亦不可忽视。

乳清蛋白是加工生产奶酪或者酪蛋白过程中产生的副产物<sup>[10]</sup>,它具有良好的加工特性和生物活性<sup>[11-14]</sup>。乳清蛋白中含量高的 $\beta$ -乳球蛋白在天然状态下很难被胃蛋白酶水解,并且它与多酚发生相互作用后其消化性也会发生变化<sup>[15]</sup>。乳清蛋白是构建乳液凝胶传递系统良好的蛋白质壁材<sup>[16-18]</sup>。

茶多酚是广泛应用于食品加工的天然抗氧化剂之一<sup>[19]</sup>,具有良好的水溶性,其中表没儿茶素没食子酸酯(EGCG)是茶多酚中含量最高、抗氧化活性最强的多酚类单体。Cao 等<sup>[20]</sup>发现,没食子酸和表没食子儿茶素没食子酸酯在一定浓度范围均有利于乳清蛋白在两相界面的吸附,并加强冷凝胶形成过程中蛋白聚集体的交联。

目前关于植物多酚对蛋白质乳液凝胶特性影响的研究很多,根据反应条件、蛋白质以及多酚种类不同等试验条件不同,研究结果有所出入<sup>[21-23]</sup>;对乳液凝胶特性影响的研究不够充分,有待深入探究。本文以乳清分离蛋白(Whey Protein Isolate,

收稿日期: 2021-03-06

基金项目: 浙江省自然科学基金探索项目(LQ20C200003)

作者简介: 曹艳芸(1989—),女,博士,助理研究员

通信作者: 韩剑众 E-mail: hanjz99@zjssu.edu.cn

WPI)为蛋白质模型,探究 EGCG 对乳清蛋白乳液冷凝胶特性的影响规律,为利用植物多酚提高蛋白质乳液凝胶特性,开发新型食品功能因子载体提供科学依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与试剂

金龙鱼玉米油,丰益贸易(中国)私人有限公司;乳清蛋白 BiPRO,美国 Davisco 有限公司;表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG),南京春秋生物工程有限公;磷酸二氢钠、十二烷基硫酸钠(SDS)、尼罗红(19123)、Na<sub>2</sub>EDTA、快绿(Fast Green),美国 Sigma 公司;磷酸氢二钠、无水氯化钙(CaCl<sub>2</sub>)、三羟甲基氨基甲烷(Tris),Aladdin 公司; $\beta$ -巯基乙醇,Acme公司。

### 1.2 设备与仪器

T-18-D-S25 高速剪切机,德国 IKA 公司;JY92-IIDN 超声波细胞粉碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司;UV-2600 紫外分光光度计,日本岛津公司;MS3000 激光粒度仪,马尔文仪器有限公司(英国);KND-816 自动凯氏定氮仪,上海纤检仪器有限公司;SP-8 激光共聚焦显微镜,Leica 公司;TA-XT2i 质构仪,STABLE MICRO SYSTEM 公司;SU-8010 扫描电镜,Hitachi 公司。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 乳清蛋白乳液凝胶的制备

1.3.1.1 多酚对蛋白质修饰 乳清蛋白粉末(NWPI)均匀地溶解于去离子水中得到 10%(质量分数)的 NWPI 溶液。在室温下,用磁力搅拌器在转速为 300 r/min 下搅拌 1 h。为了让蛋白质充分水化,将室温下完全溶解的 NWPI 溶液置于 4℃ 冰箱中保存过夜。用 1 mol/L 的 NaOH 或 HCl 调节蛋白溶液 pH 值至 7.0 后将其置于 85℃ 的水浴锅中加热 20 min 得到热变性乳清蛋白(HWPI)溶液。乳清蛋白经热处理后,内部疏水基团暴露,有利于蛋白质胶凝,是制备蛋白质冷凝胶的重要步骤。HWPI 溶液冷却至室温后与多酚溶液进行下一步反应。

EGCG 贮液(10 mmol/L)为新鲜配置并冷藏,使用前稀释至适当浓度。

在中性(pH 7.0)条件下,HWPI 溶液与 EGCG

溶液均匀混合,使溶液中 EGCG 终浓度分别为 0.2,1,2 mmol/L,溶液中蛋白质量浓度为 75 mg/mL(及 2.7,13.3,26.6  $\mu$ mol 多酚/g 蛋白),轻微振荡后在室温反应 2 h。

1.3.1.2 乳液制备 HWPI-EGCG 溶液(乳清蛋白质量浓度为 75 mg/mL)和金龙鱼玉米油按体积比 3:1 加至 50 mL 离心管中,终体积为 20 mL。用装有低起泡性探头的高速剪切分散机在转速 13 600 r/min 下预乳化 2 min 得到粗乳液(乳清蛋白质量浓度为 56.25 mg/mL)。为了防止超声过程中温度过高对乳液造成影响,将装有粗乳液的离心管置于装满碎冰的玻璃杯中,用超声细胞破碎仪进行进一步分散得到 HWPI-GA 乳液。超声条件设定如下:6 号探头;超声开启 5 s,关闭 5 s;超声功率 40%(240 W),超声时间共 10 min。

1.3.1.3 乳液凝胶制备 取一定量的 HWPI-GA/EGCG 乳液于定制的玻璃小管中,用移液枪缓慢地注入凝胶剂 CaCl<sub>2</sub>(终浓度为 7.5 mmol/L),然后顺时针轻搅 30 s,逆时针轻搅 30 s,以免在搅拌均匀的过程中带入气泡从而对凝胶产生影响。最后将玻璃小管小心地放在固定的盒中,置于 4℃ 冰箱中成胶 48 h。每组凝胶制作 3 个平行。

#### 1.3.2 乳液结构和特性表征

1.3.2.1 界面蛋白吸附量测定 利用凯氏定氮法测定原乳液和上清中的蛋白质含量。用 KDN-816 自动定氮仪对新鲜制备的乳液进行凯氏定氮,测定其蛋白含量。界面吸附蛋白含量测定公式如下:

$$\text{界面蛋白含量}(\%) = \frac{(V_{\text{总}} - V_{\text{清}})}{V_{\text{总}}} \times 100 \quad (1)$$

式中: $V_{\text{总}}$ ——滴定新鲜乳液所用盐酸体积,mL; $V_{\text{清}}$ ——滴定乳液离心后的下清溶液所用盐酸体积,mL;下清溶液通过乳液采用 3 次高速离心进行相分离后得到,具体方式如下:于 4℃ 下采用离心力 14 000 g 离心 25 min,用注射器吸取初次离心得到的下清溶液;用相同的方法和相同的离心条件,再离心 2 次得到 3 次离心后的下清液。

1.3.2.2 乳液平均粒径和  $\zeta$  电位测定 用马尔文 3 000 粒度仪测定乳液的粒径和  $\zeta$  电位。参考 Wang 等<sup>[24]</sup>的方法,进行少许改进。在测试前,取 30  $\mu$ L 乳液于 5 mL 离心管中,加入 3 mL 磷酸钠缓冲液(0.1 mol/L,pH 7.0)进行稀释,以免乳液浓

度过高而产生多重散射效应。取 1.5 mL 稀释后的样品加入样品池, 关闭仪器盖子后开始对样品的粒径和  $\zeta$  电位进行分析测定。测定的参数如下: 设定磷酸钠缓冲液折射率为 1.34, 乳液折射率 1.450, 测试温度为 22.5 °C, 激光衍射角为 173° 广角, 扫描前平衡时间为 60 s, 扫描时间为 10 s, 每两次扫描间隔时间为 10 s, 每个样品扫描 3 次。

### 1.3.2.3 激光共聚焦显微镜分析乳液微观结构

采用激光扫描共聚焦显微镜 (Confocal laser scanning microscope, CLSM) 来表征 HWPI-EGCG 乳液。用 50  $\mu$ L 快绿 (1 mg/mL 溶解于去离子水) 对乳液中蛋白质进行染色, 用 50  $\mu$ L 尼罗红 (1 mg/mL 溶解于丙酮) 对乳液中脂肪染色。染色在避光条件下进行。取 20  $\mu$ L 染色后的样品滴于载玻片上, 盖上盖玻片静置 10 min 后用激光共聚焦显微镜成像系统进行拍照。扫描条件设置如下: 20 或 40 倍物镜, 用 633 nm 处的 CY5 通道来激发快绿染色的蛋白质, 用 488 nm 处的 FITC 通道来激发尼罗红染色的脂肪。

### 1.3.3 乳液凝胶特性分析

1.3.3.1 凝胶强度测定 用 TA-XT Plus 质构仪测定凝胶强度。质构仪的参数设置如下: 探头型号选择 P/0.5, 触发力为 2 g, 下压速度为 0.8 mm/s, 下压距离为 1 cm, 测试前速度 2 mm/s, 测试后速度 5 mm/s。将凝胶发生破裂时所测量到的感应力作为凝胶强度。

1.3.3.2 凝胶持水性测定 将 HWPI-EGCG 乳液凝胶置于 4 °C 冰箱中放置 24 h 后测定凝胶的持水性。具体方法如下: 称取一整块完整的凝胶置于 10 mL 离心管中, 质量控制在 1 g 左右, 准确记录凝胶质量为  $M_a$ 。在 4 °C, 8 000 g 离心力条件下离心 30 min 后, 小心地从离心管中取出凝胶置于吸水纸上, 并用吸水纸小心地擦干其表面残留水分, 以免弄碎或黏留在吸水纸上, 然后称重并准确记录其质量为  $M_b$ 。凝胶的持水性用离心后的凝胶质量占原凝胶质量的百分比来表示, 公式如下:

$$\text{持水性} = \frac{M_b}{M_a} \times 100\% \quad (2)$$

1.3.3.3 凝胶作用力分析 凝胶中的相互作用力分析参考 Tang 等<sup>[25]</sup>的方法, 略微加以修改。将 HWPI-EGCG 乳液凝胶分别溶解在 4 种溶液中,

通过比较凝胶在 4 种溶液中溶解度的不同来反映其作用力类型。4 种溶液分别为: A 液: 蒸馏水; B 液: pH 值为 8.0 的缓冲液, 其中含有 0.086 mol/L Tris, 0.09 mol/L 甘氨酸和 4 mmol/L  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ; C 液: B 液 + 2.0 g/100 mL 十二烷基硫酸钠 (SDS); D 液: C 液 + 1 g/100 mL  $\beta$ -巯基乙醇 ( $\beta$ -ME)。用小刀将乳液凝胶切成 0.5 cm  $\times$  0.5 cm  $\times$  0.5 cm 的凝胶小块。在玻璃瓶中称取 1 g 凝胶小块, 然后加入 15 mL 对应的 A、B、C、D 溶液, 在 4 °C 条件下用磁力搅拌器慢速搅拌 1 h。然后将溶液转移至离心管, 以 300 g, 4 °C 条件下离心 20 min。离心后溶液形成两层: 上层为凝胶层, 下层为乳液层。用针筒吸取下层乳液, 并用去离子水将下层乳液稀释至一定浓度, 然后在波长 500 nm 处用紫外分光光度计测定溶液的吸光度。浊度 ( $T$ ) 计算如下:

$$T = (2.303 \times A) / L \quad (3)$$

式中:  $A$ ——在 500 nm 处的吸光度 ( $\times$  稀释倍数);  $L$ ——光程长度, cm。

1.3.3.4 扫描电子显微镜观察凝胶微观结构 用 Hitachi SU-8010 型扫描电镜来观察 HWPI-EGCG 乳液凝胶。在扫描之前, 需要对凝胶样品进行预处理: 1) 双固定: 首先将样品先后在 2.5% 的戊二醛溶液和 1% 的锇酸溶液中固定, 最后用 pH 7.0 的磷酸缓冲液漂洗样品; 2) 脱水: 用梯度浓度 (包括 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% 和 100%) 的乙醇溶液对双固定后的样品进行脱水处理; 3) 干燥: 将脱水后的凝胶在 Hitachi HCP-2 型临界点干燥仪中进行干燥。

1.3.4 数据分析 试验均设置 3 组平行对照, 且重复 3 次。试验数据采用 Statistix9.0 进行方差分析, 用 LSD 程序检验是否存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )。结果表示为平均值  $\pm$  标准偏差。

## 2 结果与讨论

### 2.1 EGCG 对乳液性质的影响

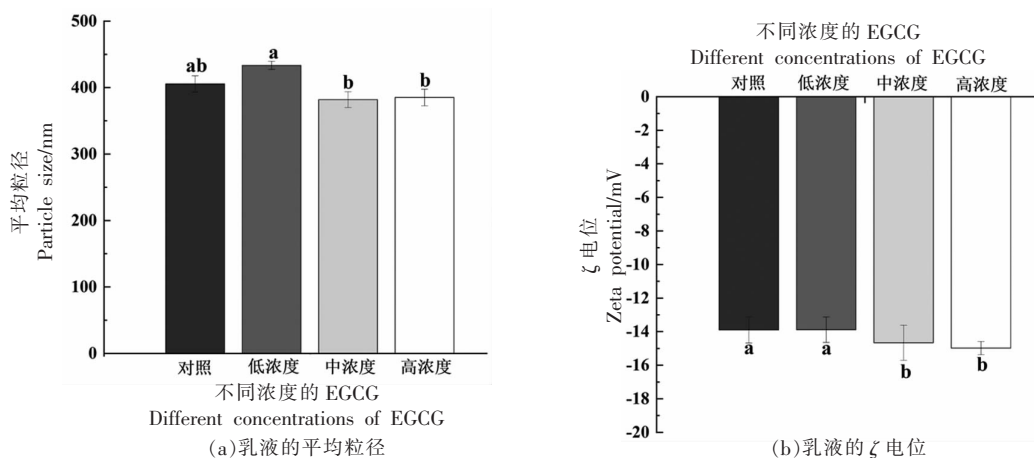
2.1.1 乳液平均粒径和  $\zeta$  电位 图 1a 为不同浓度 EGCG 修饰对蛋白质乳液粒径的影响, 由图中可以得到, 与对照组相比, 低浓度的 EGCG 加入使乳状液粒径略微增大, 而中、高浓度的 EGCG 使乳状液粒径变小。平均粒径小的乳液中, 多酚和蛋白质可以更有效地吸附在油水界面上, 使乳液体系

更稳定。

图 1b 为不同浓度 EGCG 修饰对蛋白质乳液 Zeta 电位的影响, 由图中可以得出, 与对照组相比, EGCG 的加入使蛋白质乳液的 Zeta 电位绝对值变大, 且随着 EGCG 浓度的增加, 乳液 Zeta 电位的绝对值逐渐增加。乳液的 Zeta 电位可以反映乳液中吸附在油-水界面的蛋白质分子之间的排

斥力<sup>[26]</sup>。乳液的 Zeta 电位绝对值越大, 乳液液滴间的斥力越大, 从而阻止了乳液液滴的聚集, 防止出现蛋白质絮凝。

所以综合乳液粒径和 Zeta 电位的结果来看, 中、高浓度 EGCG 对蛋白质修饰使其形成的乳液更加稳定。



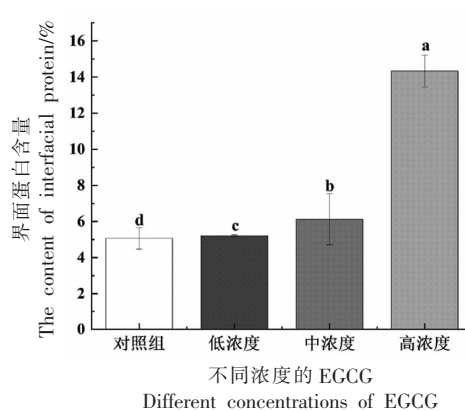
注: 低浓度: 2.7  $\mu\text{mol}$  多酚/g 蛋白质; 中浓度: 13.3  $\mu\text{mol}$  多酚/g 蛋白质; 高浓度: 26.6  $\mu\text{mol}$  多酚/g 蛋白质; 对照组中不含多酚; 不同字母 a、b 表示样品之间存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

图 1 与不同浓度 EGCG 反应后, 蛋白质乳液的粒径和 Zeta 电位

Fig.1 Particle size distribution and zeta potential of emulsion treated by different concentrations of EGCG

2.1.2 蛋白质界面吸附量 图 2 为不同浓度 EGCG 修饰对蛋白质乳液中界面蛋白吸附的影响。从图中可以看出, 与对照组相比, EGCG 的加入增加了蛋白质乳液中界面蛋白吸附量, 且随着 EGCG 浓度的增加, 乳液的界面蛋白吸附量增大。其中, 在高浓度条件下, EGCG 的加入使乳液的界面蛋白吸附量增加了 9%, 增加最显著。这是由于 EGCG 的化学结构中的多个疏水性苯环和亲水性羟基基团有利于界面吸附膜的表面性质, 所以 EGCG 与 HWPI 反应后增加了蛋白质的界面吸附量。

2.1.3 乳液微观结构的观察 图 3 为乳液的 CLSM 微观结构图。从图中可以看出, 与对照组相比, EGCG 的添加使 HWPI 乳液油滴分布更均匀, 且随着 EGCG 浓度的升高, 乳液液滴粒径变小, 该趋势与乳液平均粒径结果相一致。Sabouri 等<sup>[27]</sup>研究发现, 与未加入 EGCG 的乳液相比, 加入了 EGCG 的乳液的界面弹性模量显著提高, 更有利



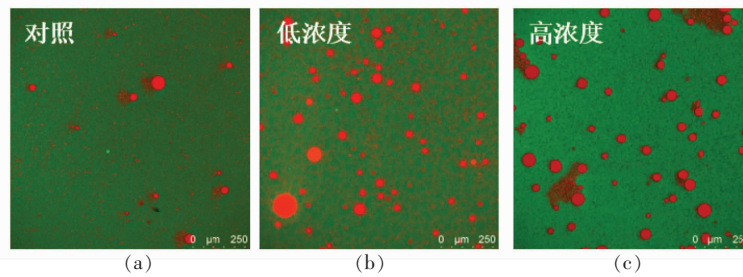
注: 低浓度: 2.7  $\mu\text{mol}$  多酚/g 蛋白质; 中浓度: 13.3  $\mu\text{mol}$  多酚/g 蛋白质; 高浓度: 26.6  $\mu\text{mol}$  多酚/g 蛋白质; 对照组中不含多酚; 不同字母 a、b、c 表示样品之间存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

图 2 与不同浓度 EGCG 反应后乳液中界面蛋白的含量  
Fig.2 The content of interfacial protein in emulsion treated by different concentrations of EGCG

于乳液界面的稳定性。多酚改变了 HWPI 的微观结构, 使其形成的乳液液滴平均粒径减小, 液滴表

面带电量增大,体系趋于稳定。另外,在高浓度条件下,EGCG的加入使乳液中的蛋白质基质呈现

一种聚集状态。



注:低浓度:2.7  $\mu\text{mol}$  多酚/g 蛋白质;高浓度:26.6  $\mu\text{mol}$  多酚/g 蛋白质;对照组中不含多酚;图中红色为尼罗红染色的脂质,绿色为快绿染色的蛋白质。

图3 与不同浓度EGCG反应后HWPI乳液的CLSM图

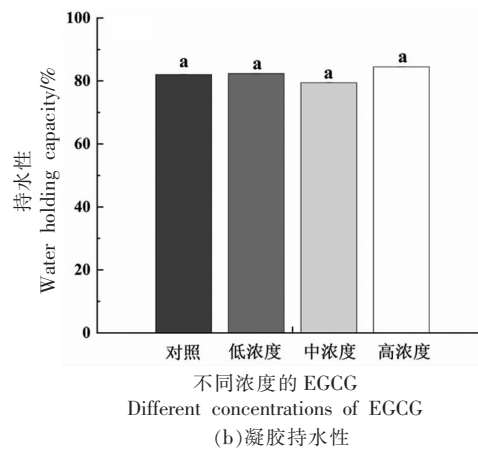
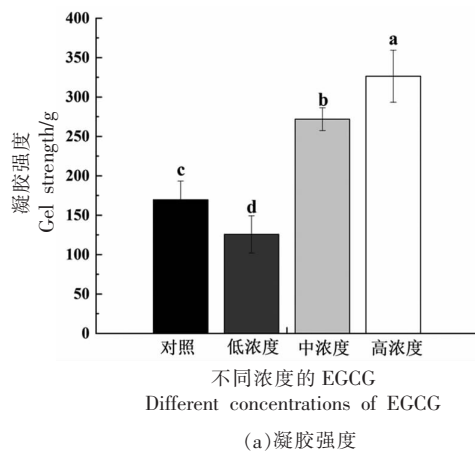
Fig.3 CLSM images of HWPI emulsion treated by different concentrations of EGCG

## 2.2 EGCG对乳清蛋白乳液冷凝胶特性的影响

2.2.1 凝胶强度和凝胶持水性 由图4a可以看出,与对照组凝胶相比,低浓度EGCG的添加使乳液凝胶的凝胶强度减弱,中、高浓度EGCG增强了乳液凝胶的凝胶强度。Jongberg等<sup>[28]</sup>发现,低浓度的绿茶提取物增加了肉乳液凝胶在蒸煮过程中的损失并且降低了其凝胶强度,该结论与低浓度

EGCG组凝胶强度趋势一致。Feng等<sup>[29]</sup>研究发现,高浓度的EGCG能够增强肌原纤维蛋白凝胶的凝胶强度,说明高浓度的EGCG有利于蛋白质的胶凝。

从图4b中可以看出,EGCG的加入对HWPI形成的乳液凝胶持水性影响较小,各组之间不存在显著性差异。



注:低浓度:2.7  $\mu\text{mol}$  多酚/g 蛋白质;中浓度:13.3  $\mu\text{mol}$  多酚/g 蛋白质;高浓度:26.6  $\mu\text{mol}$  多酚/g 蛋白质;对照组中不含多酚;不同字母 a、b、c 表示样品之间存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

图4 与不同浓度EGCG反应后HWPI形成的乳液凝胶的凝胶强度和持水性

Fig.4 Gel strength and water holding capacity of emulsion gel formed by HWPI treated by different concentrations of EGCG

2.2.2 凝胶中相互作用力分析 由图5a可以看出,对照组凝胶中几乎不含静电作用力,EGCG的加入明显增加了HWPI形成的乳液凝胶中的静电作用力,且随着多酚浓度的升高,凝胶中静电作用

力逐渐增强。由于EGCG的结构中具有多个羟基,EGCG与HWPI反应后体系中的带电基团增多,从而使其形成的凝胶中静电作用力增强。该结果与Zeta电位的趋势一致。

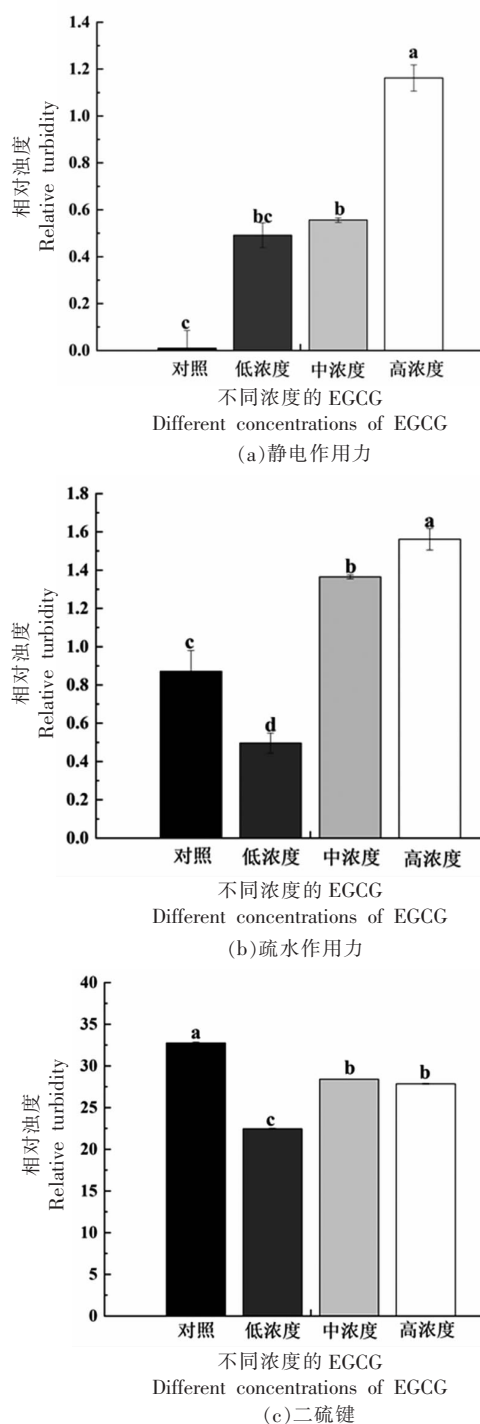
由图 5b 可知,与对照组相比,低浓度 EGCG 的加入减弱了凝胶中的疏水作用力,而中、高浓度 EGCG 明显增强了凝胶中的疏水作用力,其中高浓度 EGCG 组凝胶中的疏水作用力最大。由乳液微观的 CLSM 结果可知,高浓度 EGCG 组乳液中蛋白质基质聚集现象最明显,从而使其形成的凝胶中疏水作用力最大。凝胶中疏水作用力是决定凝胶性质的重要作用力,其结果与凝胶强度的趋势一致。

从图 5c 中可以看出,与对照组相比,EGCG 的加入使 HWPI 乳液凝胶中二硫键的作用减弱。蛋白质中的自由氨基侧链组(赖氨酸)、巯基组(半胱氨酸),羰基化合物和其它氨基酸残基(色氨酸、脯氨酸、蛋氨酸、组氨酸、酪氨酸等)都会因为蛋白质与多酚相互结合而减少<sup>[30]</sup>,而巯基的损失不利于蛋白质胶凝过程中形成二硫键。但是在中、高浓度条件下,EGCG 对乳液凝胶中二硫键的影响较小。这可能是由于中、高浓度的 EGCG 增强了凝胶体系内的疏水作用力,从而使蛋白质分子之间相互作用增强,增加了巯基与二硫键之间的转化。另外,由 Ali 等<sup>[31]</sup>的结果推测,中、高浓度的 EGCG 可能诱导 HWPI 的构象发生改变,使得多酚与蛋白质巯基之间接触几率增加。

**2.2.3 扫描电镜对凝胶微观结构的观察** 图 6 为乳液的三维网络结构 SEM 图像。从图中可以看出对照组乳液凝胶的微观结构表面较粗糙,表面孔隙大小不一,孔隙分布不均匀。与对照组相比,高浓度 EGCG 组乳液凝胶的微观结构表面孔隙数量明显增多,且孔隙减小,分布更加均一,凝胶表面变得平整。Line 等<sup>[32]</sup>发现凝胶的持水性与其结构中的孔隙大小有关,具有较大孔隙的凝胶对水的结合性较小,凝胶持水性较低。从图中可以看出多酚组凝胶的孔隙大小与对照组差别不大,该结果与凝胶持水性的结果一致。

### 3 结论

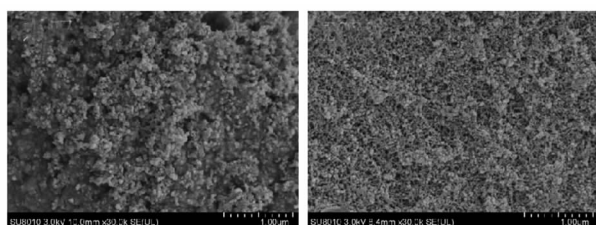
本文围绕 EGCG 与蛋白质相互作用对乳清蛋白乳液冷凝胶特性的影响规律展开研究工作。研究结果显示,EGCG 的添加使蛋白质乳液的粒径变小,乳液体系中液滴分布更均匀,这与乳液液滴间静电斥力增大有关;添加 EGCG 可以使得乳清



注:低浓度:2.7  $\mu\text{mol}$  多酚/g 蛋白质;中浓度:13.3  $\mu\text{mol}$  多酚/g 蛋白质;高浓度:26.6  $\mu\text{mol}$  多酚/g 蛋白质;对照组中不含多酚;不同字母 a、b、c、d 表示样品之间存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

图 5 与不同浓度 EGCG 反应后 HWPI 形成的乳液凝胶中的作用力

Fig.5 The force in the emulsion gel formed by HWPI treated by different concentrations of EGCG



(a)对照

(b)EGCG

注:高浓度;26.6  $\mu\text{mol}$  多酚/g 蛋白质;对照组中不含多酚。

图6 与高浓度 EGCG 反应后 HWPI 形成的乳液凝胶 SEM 微观图像

Fig.6 SEM microscopic images of emulsion gel treated by high concentration of EGCG

蛋白乳液冷凝胶的微观结构更为致密和均匀,支撑凝胶的疏水作用力、静电作用力均增强,从而显著增强了凝胶特性。总的来看,EGCG 浓度越高,影响程度越大。由此表明,高浓度的 EGCG 有助于使蛋白质乳液更加趋于稳定,乳液冷凝胶的凝胶特性得到提升。

### 参 考 文 献

- [1] MCCLEMENTS C M B J. Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey[J]. Trends in Food Science & Technology, 1998, 9(4): 143-151.
- [2] CHEN L, REMONDETTO G E, SUBIRADE M. Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems[J]. Trends in Food Ence & Technology, 2006, 17(5): 272-283.
- [3] LIVNEY Y D. Milk proteins as vehicles for bioactives[J]. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2010, 15(1/2): 73-83.
- [4] LIANG L, LINE V L S, REMONDETTO G E, et al. *In vitro* release of  $\alpha$ -tocopherol from emulsion-loaded  $\beta$ -lactoglobulin gels [J]. International Dairy Journal, 2010, 20(3): 176-181.
- [5] BEAULIEU L, SAVOIE L, PAQUIN P, et al. Elaboration and characterization of whey protein beads by an emulsification/cold gelation process: application for the protection of retinol[J]. Biomacromolecules, 2002, 3(2): 239.
- [6] MCCLEMENTS D J, DECKER E A, PARK Y, et al. Structural design principles for delivery of bioactive components in nutraceuticals and functional foods[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2009, 49(6): 577-606.
- [7] ZHOU X, CHEN T, LIN H, et al. Physicochemical properties and microstructure of surimi treated with egg white modified by tea polyphenols[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 90(5): 82-89.
- [8] CHEN H, DIAO J, LI Y, et al. The effectiveness of clove extracts in the inhibition of hydroxyl radical oxidation-induced structural and rheological changes in porcine myofibrillar protein [J]. Meat Science, 2016, 111: 60-66.
- [9] OZDAL T, CAPANOGLU E, ALTAY F. A review on protein-phenolic interactions and associated changes[J]. Food Research International, 2013, 51(2): 954-970.
- [10] 任雁, 赵丹, 张焯, 等. 乳清蛋白的功能成分及其主要应用[J]. 中国食品添加剂, 2007, 1: 142-146.
- [11] 韩雪, 孙冰. 乳清蛋白的功能特性及应用[J]. 中国乳品工业, 2003, 31(3): 28-30.
- [12] HAN X, SUN B. The functions and main applications of whey protein[J]. China Dairy Industry, 2003, 31(3): 28-30.
- [13] FOEGEDING E A, DAVIS J P, DOUCET D, et al. Advances in modifying and understanding whey protein functionality [J]. Trends in Food Science & Technology, 2002, 13(5): 151-159.
- [14] SMILOWITZ J T, DILLARD C J, GERMAN J B. Milk beyond essential nutrients : the metabolic food [J]. Australian Journal of Dairy Technology, 2005, 60(2): 77-83.
- [15] EVANS E W. Uses of milk proteins in formulated foods[J]. Developments in Food Proteins, 1982, 131-169.
- [16] CAO Y, XIONG Y L. Interaction of whey proteins with phenolic derivatives under neutral and acidic pH conditions[J]. Journal of Food Science, 2017, 82(1/2/3): 409-419.
- [17] ELOFSSON C, DEJMEK P, PAULSSON M, et al. Characterization of a cold-gelling whey protein concentrate[J]. International Dairy Journal, 1997, 7(8/9): 601-608.
- [18] FARJAMI T, MADADLOU A. An overview on

- preparation of emulsion-filled gels and emulsion particulate gels[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2019, 86: 85–94.
- [18] YE A, TAYLOR S. Characterization of cold-set gels produced from heated emulsions stabilized by whey protein[J]. *International Dairy Journal*, 2009, 19(12): 721–727.
- [19] GRAF B A, MILBURY P E, BLUMBERG J B. Flavonols, flavones, flavanones, and human health: epidemiological evidence [J]. *Journal of Medicinal Food*, 2005, 8(3): 281–290.
- [20] CAO Y, XIONG Y L, CAO Y, et al. Interfacial properties of whey protein foams as influenced by preheating and phenolic binding at neutral pH[J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 82(9): 379–387.
- [21] GUO S T, TOMOTADA. The role of composition and content of protein particles in soymilk on tofu curdling by glucono- $\delta$ -lactone or calcium sulfate[J]. *Journal of Food Science*, 2006, 70(4): 258–262.
- [22] SARKER D K, WILDE P J, CLARK D C. Control of surfactant-induced destabilization of foams through polyphenol-mediated protein-protein interactions[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 1995, 43(2): 295–300.
- [23] YUMENG Z, YUANQI L, LIN C, et al. Inhibition of Epigallocatechin-3-gallate/protein interaction by methyl- $\beta$ -cyclodextrin in myofibrillar protein emulsion gels under oxidative stress [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2018, 66(30): 8094–8103.
- [24] WANG L, GAO Y, LI J, et al. Effect of resveratrol or ascorbic acid on the stability of alpha-tocopherol in O/W emulsions stabilized by whey protein isolate: Simultaneous encapsulation of the vitamin and the protective antioxidant [J]. *Food Chemistry*, 2016, 196: 466–474.
- [25] TANG C H, WU H, CHEN Z, et al. Formation and properties of glycinin-rich and  $\beta$ -conglycinin-rich soy protein isolate gels induced by microbial transglutaminase[J]. *Food Research International*, 2006, 39(1): 87–97.
- [26] DICKINSON E. Food emulsions and foams: Stabilization by particles[J]. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2010, 15(1/2): 40–49.
- [27] SABOURI, JIAHUI, CORREDIG. Tea polyphenols association to caseinate-stabilized oil-water interfaces [J]. *Food Hydrocolloids*, 2015, 51: 95–100.
- [28] JONGBERG S, TERKELSEN L D S, MIKLOS R, et al. Green tea extract impairs meat emulsion properties by disturbing protein disulfide cross-linking[J]. *Meat Science*, 2015, 100(2): 2–9.
- [29] FENG X, CHEN L, LEI N, et al. Emulsifying properties of oxidatively stressed myofibrillar protein emulsion gels prepared with (-)-epigallocatechin-3-gallate and NaCl[J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2017, 65(13): 2816–2826.
- [30] RAWEL H M, ROHN S, KRUSE H P. Structural changes induced in bovine serum albumin by covalent attachment of chlorogenic acid[J]. *Food Chemistry*, 2002, 78(4): 443–455.
- [31] ALI M, HOMANN T, KHALIL M, et al. Milk whey protein modification by coffee-specific phenolics: effect on structural and functional properties[J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2013, 61(28): 6911–6920.
- [32] LINE V L S, REMONDETTO G E, SUBIRADE M. Cold gelation of  $\beta$ -lactoglobulin oil-in-water emulsions[J]. *Food Hydrocolloids*, 2005, 19(2): 269–278.

### Effects of EGCG Binding on the Gel Properties of Whey Protein Cold-set Emulsion Gel

Cao Yanyun, Lin Jinou, Han Jianzhong\*

(College of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018)

**Abstract** This study aimed to investigate the gel properties of whey protein cold-set emulsion gel as influenced by interaction of different concentrations (2.7, 13.3, 26.6  $\mu\text{mol}$  phenolic/g protein) of epigallocatechin gallate (EGCG) with the protein. The particle size, zeta potential and interfacial protein adsorption were measured by dynamic light scattering and automatic Kjeldahl nitrogen determination, respectively. The microstructure of the emulsion was observed by laser scanning confocal microscope. The gel strength was measured by the texture analyzer, and the force in the gel was evaluated by



the difference of the solubility of the emulsion gel in four solutions. Scanning electron microscope was used to analyze the microstructure of the emulsion gel. The results showed that with the treatment of EGCG, the protein emulsion exhibited smaller average particle size, increased electrostatic repulsion between the emulsion droplets, and more uniform distribution of the particle size. Moreover, with the interaction of EGCG and protein, the microstructure of the corresponding cold-set emulsion gel was more uniform, smoother and closely connected, as well as the gel strength was enhanced. With EGCG at high concentration, the average particle size of emulsion was the smallest (~385 nm); the electrostatic repulsion between emulsion droplets was the largest; the hydrophobic force and electrostatic force in the emulsion gel were the strongest, and a 92.6% increase in gel strength when compared with the control.

**Keywords** whey protein; EGCG; emulsion; cold-set gel; gel properties