

卵白蛋白与绿原酸分子互作对蛋白结构及乳液稳定性的影响

温鹤迪^{1,2}, 宁珍珍^{1,2}, 李金铭^{1,2}, 关玉^{1,2}, 贺家华^{1,2}, 赵颂宁^{1,2}, 刘静波^{1,2}, 张婷^{1,2*}

¹ 吉林省营养与功能食品重点实验室 长春 130062

² 吉林大学食品科学与工程学院 长春 130062

摘要 多酚和蛋白质是构成复杂食品体系的重要物质,利用多酚和蛋白质之间的分子互作,改变蛋白结构并提升乳液稳定性,已成为当前食品加工领域的研究热点。通过荧光光谱法、同步荧光光谱法、圆二色谱法、红外光谱法研究卵白蛋白(OVA)与绿原酸(CA)的相互作用,并利用 OVA-CA 复合物制备高稳定性乳液。结果表明:CA 对 OVA 的内源荧光猝灭机理为静态猝灭,结合位点数为 1,结合位点更接近于 OVA 分子中色氨酸残基的位置。二者结合的主要作用力是氢键和疏水相互作用。CA 的加入会改变 OVA 的蛋白质二级结构,其中,随着 CA 浓度的增加, α -螺旋含量逐渐增加, β -折叠含量逐渐减小。通过比较不同浓度 CA 下 OVA-CA 乳液的粒径,选择 OVA:CA=1:0.1(摩尔比)为最适比例,制备粒径为(755.13±140.29) nm 的乳液。与 OVA 乳液相比,OVA-CA 乳液在常温下保持 7 d,乳液状态稳定,同时 pH 值和盐离子(0~0.125 mol/L)稳定性显著提高。研究结果将为改善蛋清蛋白功能特性,拓展其在食品加工中的应用领域提供参考。

关键词 卵白蛋白; 绿原酸; 乳液; 稳定性; 分子互作

文章编号 1009-7848(2022)10-0066-11 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2022.10.008

卵白蛋白(OVA)是蛋清蛋白中含量最高的蛋白质,占总蛋白含量的 54%~63%,其分子质量为 45 ku,由 385 个氨基酸残基构成,等电点在 4.5~4.8 之间^[1]。OVA 是蛋清蛋白中唯一含有自由巯基的蛋白,具有优良的结构和生物活性以及易得性,能够有效调节多相体系的质地和结构^[2]。同时,OVA 含有合适比例的疏水基团和亲水基团,可以快速吸附在油滴表面,从而形成良好的乳液^[3]。与化学合成的乳化剂相比,蛋白质乳液更加安全、健康。稳定的蛋白质乳液体系可广泛用于食品、化妆品和医药领域。然而,当体系的温度、pH 值和离子强度等环境条件发生变化时,由于维持乳液稳定性的主要作用力被破坏,乳液会出现聚集、沉淀、析出、破乳等现象,使得产品稳定性下降^[4-7]。Li 等^[8]发现加热和环境 pH 值会显著破坏 OVA 乳液的稳定性,在 60 °C 加热条件下,乳液会出现破乳现象,同时在到达等电点时会出现较大粒径,乳液发生聚集。Ozturk 等^[9]发现环境 pH 值和盐离子浓度显

著影响乳清蛋白乳化体系的稳定性,在 pH 值接近等电点时会发生明显分层,在盐离子浓度大于 200 mmol/L 时,乳液也会出现稀薄的油脂分层。李宛蓉等^[10]研究发现,乳清分离蛋白-稻米油 Pickering 乳液热稳定性差,在盐离子环境下,粒径显著增大,稳定性降低。蛋白质乳液稳定性的降低,会严重影响其在食品工业中的应用。如何有效提升蛋白质乳液的稳定性,是当前研究的热点问题。

研究表明,在乳液体系中添加多酚类化合物,可促使多酚-蛋白复合物的形成,从而提高蛋白质乳液的稳定性。多酚是植物体内的次级代谢产物,是具有不同数量羟基芳香环化合物的统称,广泛存在于水果、蔬菜、茶、豆科类以及中草药等植物内^[11]。多酚与蛋白质分子间发生氢键、疏水相互作用, π 键、离子键和共价键等多种相互作用^[12]。多酚种类及结构导致的蛋白结合能力和结合方式的变化,极大地影响蛋白质-多酚复合物的乳化稳定性等加工功能特性^[13]。顾璐萍^[3]利用儿茶素修饰蛋清蛋白并制备儿茶素-蛋清蛋白接枝物乳液,发现该乳液体系具有良好的耐热性,50~90 °C 处理时乳液粒径变化较小,液滴分散性良好;物理稳定性更高,不易聚集;盐离子稳定性也有较好地提升,在 100 mmol/L 浓度下才开始出现粒径急剧增加的现象。Chen 等^[14]制备 OVA-单宁酸(TA)复合物,发现

收稿日期: 2021-10-11

基金项目: 吉林省科技发展计划技术攻关项目(20210402048GH);中央高校基本业务费(JLUXKJC2021QZ11)

作者简介: 温鹤迪(1996—),女,博士生

通信作者: 张婷 E-mail: tingzhang@jlu.edu.cn

虽然 OVA-TA 复合物的乳化性有所降低,但是其乳化稳定性显著增强,利用该复合物制备的纳米乳液,在 OVA 等电点附近的稳定性明显提高。刘雷等^[15]将表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)添加至 α -乳白蛋白为乳化剂的乳液中,结果发现加入适宜比例的 EGCG 可以显著提高乳液稳定性。鞠梦楠等^[16]制备大豆分离蛋白与花青素的共价复合物,以此制备 Pickering 乳液,乳液脂滴状态得到明显改善,稳定性提高。

绿原酸(CA)是肉桂酸和奎宁酸缩合酯化形成的酚酸类化合物,广泛存在于咖啡和杜仲等植物中^[17]。研究表明,CA 可与蛋白质相互作用,改善蛋白质的乳化特性,从而提高蛋白质乳液的乳化稳定性。陈卫军等^[18]利用 CA 制备乳清分离蛋白-CA 复合物,发现该复合物的热稳定性、抗氧化活性、乳化性和乳化稳定性均显著提高。李杨等^[19]研究了不同 CA 浓度对黑芸豆蛋白乳化性的影响,随着 CA 浓度的增加,复合物的粒径分布变得更加均匀,乳化性显著提高。Liu 等^[20]发现利用乳清蛋白-CA 复合物制得的乳液具有良好的乳化性,同时乳液的冻融稳定性、盐离子稳定性、热稳定性和贮藏稳定性均得到改善。

本研究以 OVA 与 CA 为研究对象,通过非共价结合方式制备 OVA-CA 复合物,利用多种光谱学方法分析 OVA 和 CA 之间的相互作用,明确二者间分子互作对 OVA 蛋白结构的影响。以 OVA-CA 复合物为原料制备 W/O 乳液,并考察该体系的 pH 稳定性和盐离子稳定性,进一步明确 OVA 和 CA 分子互作对其乳液稳定性的影响,为 OVA 乳液的开发应用提供参考,为 OVA 在食品加工中的应用拓展提供新思路。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

卵白蛋白(Ovalbumin, OVA, 98%),美国 Sigma 公司;绿原酸(Chlorogenic acid, CA, $\geq 98\%$),上海源叶生物技术有限公司;大豆油(金龙鱼),长春市欧亚超市(西安大路店)。其余试剂均为分析纯级。

1.2 仪器与设备

FJ300-SH 高速分散机,上海标本模型厂;纳

米激光粒度仪,美国贝克曼库尔特有限公司;HYQ-3110 涡旋混合器,赛伯乐(上海)仪器有限公司;F-7100 荧光光谱仪,日本日立公司;MOS-500 圆二色光谱仪,法国 Biologic 公司;IRPrestige-21 傅立叶变换红外光谱仪,日本岛津公司。

1.3 方法

1.3.1 OVA-CA 复合物的制备 使用磷酸盐缓冲溶液(PBS)(0.02 mol/L, pH 7.0)溶解 OVA,放置在 4 °C 冰箱过夜储藏以确保完全水合,得到 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 OVA 储备液。使用磷酸盐缓冲溶液(0.02 mol/L, pH 7.0)溶解 CA,分别配制得到 10, 100, 1 000, 2 000, 3 000 $\mu\text{mol/L}$ 的 CA 溶液,使用时现配现用,避光保存。将 OVA 与不同浓度的 CA 以体积比 1:1 混合,充分混匀后在室温下(25 °C)反应 1 h,即得到 OVA-CA 复合物溶液,此时蛋白质终浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 。

1.3.2 荧光光谱 利用 PBS 缓冲液将 OVA-CA 复合物溶液稀释至蛋白质终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$,采用荧光分光光度计测定。参数设定:激发波长分别为 280 nm 和 295 nm,激发和发射狭缝宽度为 5 nm,电压为 400 kV,收集速率为 1 200 nm/min。扫描范围为 290~450 nm 和 300~450 nm。测定 OVA 溶液、CA 溶液和 OVA-CA 复合溶液的荧光强度。溶液中 OVA 作为荧光物质分子和猝灭剂 CA 分子发生相互碰撞引起的荧光猝灭过程由 Stern-Volmer 方程描述^[21]:

$$F_0/F = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_s [Q] \quad (1)$$

式中, F_0 和 F ——不存在猝灭剂和存在猝灭剂时, OVA 溶液的荧光强度; $[Q]$ ——猝灭剂浓度, mol/L; K_q ——双分子猝灭速率常数, L/(mol·s); τ_0 ——不存在猝灭剂时荧光分子的寿命,通常为 1×10^{-8} s。

当荧光物质分子为生物大分子时,其最大扩散碰撞猝灭常数为 2×10^{10} L/(mol·s),因此,将上述公式计算得到的 K_q 与之比较,若 $K_q > 2 \times 10^{10}$ L/(mol·s),则属于静态猝灭,若 $K_q < 2 \times 10^{10}$ L/(mol·s) 则属于动态猝灭。

对于静态猝灭,可通过下式计算得到结合常数 K_a 和结合位点数 n :

$$\lg[(F_0 - F)/F] = \lg K_a + n \lg [Q] \quad (2)$$

式中, F_0 和 F ——不存在猝灭剂和存在猝灭

剂时, OVA 溶液的荧光强度; K_a ——表观结合常数, L/mol; n ——结合位点数; $[Q]$ ——猝灭剂浓度, mol/L。

1.3.3 同步荧光光谱 利用同步荧光光谱测定 OVA-CA 复合物的色氨酸与酪氨酸残基的荧光光谱。利用 PBS 缓冲液将 OVA-CA 复合物溶液稀释至蛋白质终浓度为 10 μ mol/L, 分别扫描 $\Delta\lambda = 15$ nm 和 $\Delta\lambda = 60$ nm。

1.3.4 圆二色谱 利用 PBS 缓冲液将 OVA-CA 复合物溶液稀释至蛋白质终浓度为 10 μ mol/L。在室温下, 磷酸盐缓冲体系 (0.02 mol/L, pH 7.0) 中, 分别扫描 190~250 nm 范围内 OVA 溶液和 OVA-CA 复合物溶液的圆二色谱, 通过在线 DICHROWEB 网站 (<http://dichroweb.cryst.bbk.au.uk/html/home.shtml>) 计算样品中 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规则卷曲的比例。

1.3.5 红外光谱法 称取 2 mg 冻干的 OVA-CA 复合物固体样品, 再加入一定量的溴化钾, 研磨成均匀粉末, 压制成薄片, 再用红外光谱仪做全波段扫描 (400~4 000 cm^{-1}), 扫描次数 32 次^[22]。

1.3.6 表面疏水性测定 参考 Liu 等^[23]的方法测定 OVA-CA 复合物的表面疏水性。将样品溶液用 PBS 溶液分别稀释到 OVA 终浓度为 5, 10, 15, 20, 25 μ mol/L。取上述稀释液 1 mL 分别加入 5 μ L 的 ANS 溶液, 混匀后避光反应 15 min, 测定样品的荧光强度。参数设定: 激发波长 390 nm, 发射波长 470 nm, 激发和发射狭缝宽度 5 nm, 电压 700 kV, 收集速率 2 400 nm/min, 扫描范围 400~650 nm。以蛋白质浓度为自变量, 荧光强度为因变量, 拟合得到一次函数, 拟合线斜率为表面疏水性的数值 H_0 。

1.3.7 乳液的制备 使用 PBS 溶液分别配制 1.1 mmol/L 的 OVA (Acros organics) 溶液和 0.11, 1.1, 11, 22, 33 mmol/L 的 CA 溶液。将 OVA 与 CA 以体积比 1:1 混合, 充分混匀后在室温下 (25 $^{\circ}\text{C}$) 避光反应过夜。选择大豆油作为油相, 油/水比为 10% (体积分数), 使用高速均质机在 12 000 r/min 下均质 1 min, 得到不同浓度 CA 浓度的乳液。

1.3.8 粒径、电位的测定 用 Zetasizer 纳米粒度仪测定乳液的平均粒径和电位。使用 PBS 缓冲液将 OVA 乳液及 OVA-CA 乳液稀释 20 倍, 稀释

液在仪器内进行 120 s 的平衡, 然后在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下收集至少 8 次连续读数。参数设定为颗粒吸收率 0.001, 颗粒折射率 1.470, 分散剂折射率 1.330^[24]。

1.3.9 物理稳定性 储藏稳定性: 将新鲜制备的乳液放置在常温环境下 (25 $^{\circ}\text{C}$), 在固定时间进行拍照并观察乳液状态。

盐离子稳定性: 分别取 OVA 乳液 OVA-CA 乳液 3 mL, 分别向其中添加 0.05, 0.1, 0.5 mol/L NaCl 溶液 1 mL。混匀后在室温下静置 6 h, 分别测定不同 NaCl 浓度下的粒径及其 PDI 值。

pH 稳定性: 分别取 OVA 乳液和 OVA-CA 乳液, 使用 1 mol/L NaOH/HCl 调节乳液 pH 值至 2, 4, 6, 7, 8。摇匀后在室温下静置 6 h, 分别测定不同 pH 值条件下的粒径及其 PDI 值^[25]。

1.4 数据统计分析

试验数据采用 3 次平行试验结果的平均值, 试验数据用平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s, n=3$) 表示。用 SPSS 18.0 软件对数据进行显著性分析, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 荧光光谱分析

在 280 nm 和 295 nm 的激发波长下, 蛋白质分子中的色氨酸和酪氨酸残基会产生荧光。在蛋白质溶液中加入多酚, 多酚作为猝灭剂会导致荧光强度降低, 因而可以通过荧光强度的变化考察蛋白质与多酚之间的相互作用。OVA 与 CA 的荧光猝灭图见图 1a 和图 1b。加入 CA 后, OVA 的荧光强度随 CA 浓度的增加而逐渐降低。且 CA 的加入引起了最大发射峰出现了轻微的红移现象 (从 332 nm 至 335 nm), 这说明色氨酸和酪氨酸残基的微环境发生了轻微改变, 色氨酸和酪氨酸残基逐渐从内源疏水区转移至亲水性区域, 这可能是由 OVA 和 CA 之间的疏水相互作用引起的^[8]。

小分子与蛋白质相互作用过程中会出现蛋白质荧光猝灭现象, 猝灭类型包括动态猝灭和静态猝灭。由图 1c 可以看出, CA 和 OVA 相互作用的 Stern-Volmer 曲线为非典型的直线关系, $R^2 = 0.796/0.779$, 表明二者的相互作用并非由分子扩散和碰撞导致的动态猝灭主导^[26-27]。此外, 由表 1 可以看出猝灭速率常数 K_q 值为 4.28×10^{10} L/(mol·

s) / $24.84 \pm 0.27 \times 10^{10}$ L/(mol·s), 大于最大动态猝灭速率 2.0×10^{10} L/(mol·s)。因此, 可以看出 CA 和 OVA 在结合过程中形成了复合物, 从而引起静态荧光猝灭^[28]。由 280 nm 下结合位点数 $n=1.04$ 可知(表 1), CA 和 OVA 的结合比例为 1:1。同时, 2 个

氨基酸残基的结合位点数之间可能存在一定差异, 表明 CA 的结合位点可能更接近 OVA 分子中的色氨酸残基, 这也与 OVA 分子中色氨酸主要分布在 OVA 外层, 而酪氨酸主要存在于 OVA 内部有关。

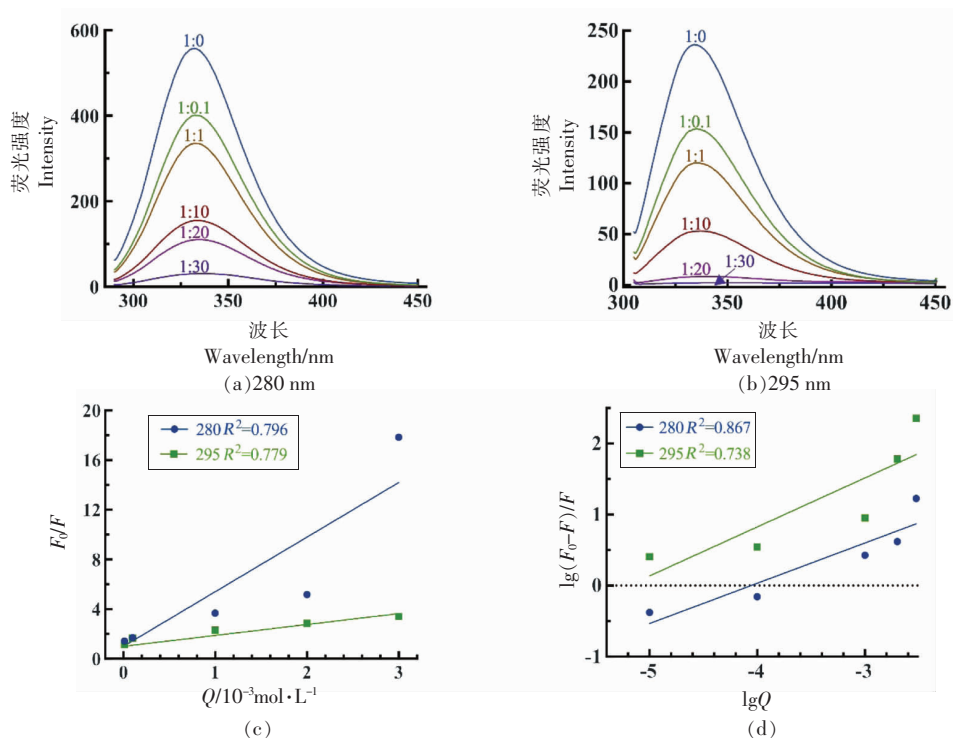


图 1 CA 对 OVA 内源荧光的猝灭作用

Fig.1 Quenching effect of CA on OVA's intrinsic fluorescence

表 1 CA 与 OVA 相互作用的相关常数

Table 1 Correlation constants for the interaction between CA and OVA

激发波长/nm	$K_{ss}/\times 10^3$ L·mol ⁻¹	$K_q/\times 10^{11}$ L·mol ⁻¹ ·s ⁻¹	$K_d/10^3$ L·mol ⁻¹	n
280	4.28 ± 0.03	4.28 ± 0.03	4.27 ± 0.24	1.04 ± 0.02
295	24.84 ± 0.27	24.84 ± 0.27	3.72 ± 0.12	0.69 ± 0.003

2.2 同步荧光光谱分析

同步荧光光谱可以用于判断 OVA-CA 复合物的色氨酸和酪氨酸残基周围微观环境的变化, 其中 $\Delta\lambda = 15$ nm 表示酪氨酸残基的特性, $\Delta\lambda = 60$ nm 表示色氨酸残基的特性。由图 2 可知, 随着 CA 浓度的增加, OVA 的 2 种荧光均产生猝灭现象。CA 的引入不会改变峰形, 而最大发射峰的位置会有一定的偏移, 说明 CA 使得色氨酸和酪氨酸残基所处的微环境发生了改变。此外, 对比 2 种氨基酸残基的荧光猝灭程度, 可以发现, 色氨酸的荧光

猝灭程度更强, 因此猜测色氨酸残基的位置更接近 CA 的结合位点, 其结果与荧光光谱结果一致。

2.3 表面疏水性分析

如图 3 所示, 当 OVA 与 CA 的摩尔比为 1:0.1 时, 疏水性显著增加 ($P < 0.05$)。这可能是低浓度多酚条件下, CA 的引入改变了 OVA 的空间结构, 使得内部的疏水基团暴露出来, 导致表面疏水性 H_0 增加。而当 OVA 与 CA 的摩尔比从 1:1 逐渐增加到 1:30 时, 蛋白质表面疏水性随着 CA 浓度的增加而降低, Chang 等^[29]和 Wei 等^[30]也有类似

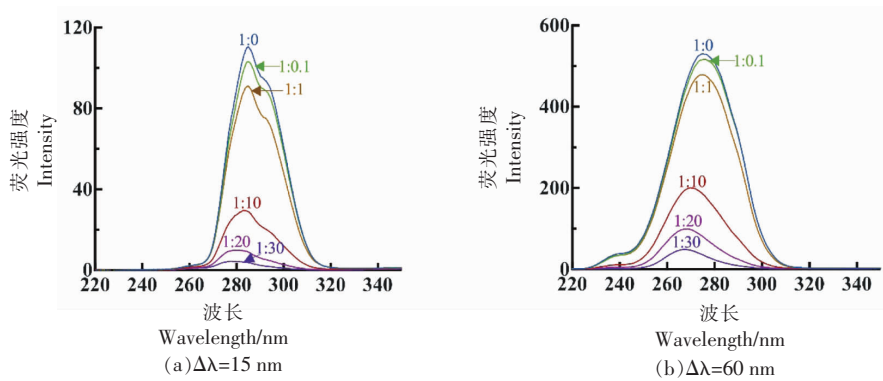
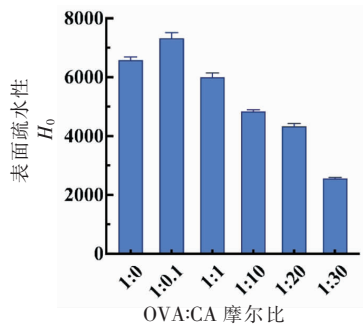


图2 不同 CA 浓度的 OVA-CA 复合物的同步荧光光谱

Fig.2 Synchronous fluorescence spectra of OVA-CA complexes with different CA concentrations



Molar ratio of ovalbumin and chlorogenic acid

图3 不同 CA 浓度的 OVA-CA 复合物的表面疏水性

Fig.3 Surface hydrophobicity of OVA-CA complexes with different CA concentrations

的发现,随着多酚浓度增加,OVA-阿魏酸复合物和牛奶蛋白-茶多酚复合物的表面疏水性也逐渐降低。CA 的加入改变了 OVA 的三级结构,使得 OVA 的聚集形态发生了变化。CA 很可能通过疏水相互作用与 OVA 的疏水区域结合,因此 ANS

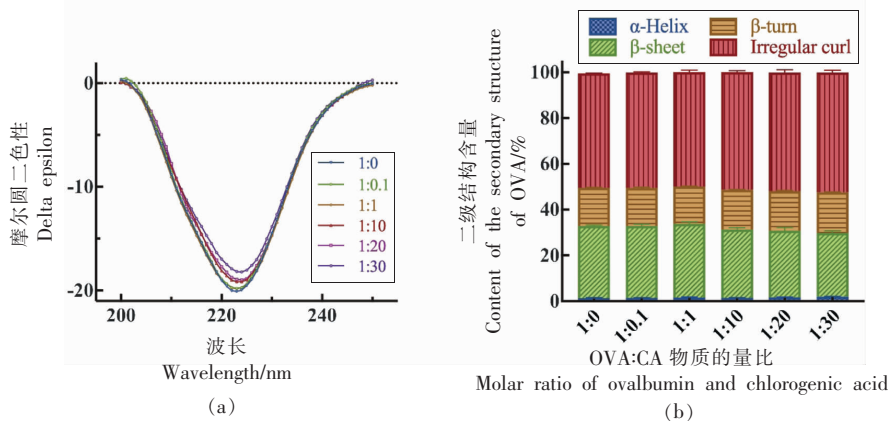


图4 不同 CA 浓度的 OVA-CA 复合物的圆二色谱图

Fig.4 Circular Di chromatograms of OVA-CA complexes with different CA concentrations

荧光探针的结合位点逐渐减少,从而降低了表面疏水值。这也表明疏水相互作用是 OVA-CA 复合物的主要作用力之一。

2.4 圆二色谱分析

圆二色谱是分析多酚与蛋白质相互作用,以及表征蛋白质二级结构变化的一个重要分析手段。由图 4a 可以看出,加入不同浓度 CA 后,OVA 在 210~230 nm 波长处的吸收峰强度发生改变,且呈现浓度依赖性,说明 CA 与 OVA 发生了相互作用,并对 OVA 的二级结构产生了影响。加入 CA 后, α -螺旋的含量从 $1.3\% \pm 0.29\%$ 提高至 $1.93\% \pm 0.21\%$, β -折叠的含量从 $31.65\% \pm 0.35\%$ 降低至 $27.93\% \pm 0.84\%$ 。当 OVA:CA 小于 1:1 时,CA 的引入对 α -螺旋和 β -折叠的含量影响较小。而随着 CA 逐渐增加 ($>1:10$),OVA 的二级结构出现显著变化 ($P < 0.05$)。CA 主要影响 OVA 结构中的 α -螺旋和 β -折叠。 α -螺旋的变化主要是由于蛋白质

分子内氢键导致的, α -螺旋含量越高, 蛋白质分子内氢键作用越强, 分子结构越紧密。此时, OVA 蛋白中的疏水性位点被更多地包裹起来, 从而表现出较低的表面疏水性, 这与表面疏水性的结果(图 3) 一致。而 β -折叠的变化主要与分子间氢键有关, β -折叠含量降低表示蛋白质分子间氢键作用减弱, 蛋白质分子间的聚集程度有所降低^[31-32]。这也进一步表明, CA 与 OVA 之间产生氢键相互作用, 并改变 OVA 的二级结构。

2.5 红外光谱分析

红外光谱可以进一步分析 OVA 构象的变化。酰胺 I 带(1 600~1 700 cm^{-1})和酰胺 II 带(1 500~1 600 cm^{-1})常被广泛用于定性和定量评估蛋白质的二级结构。如图 5 所示, 不同浓度的 CA 与 OVA 形成的复合物的红外光谱图显示出比较明显的差异。首先, 3 300 cm^{-1} 位置出现偏移, 这表明 OVA 与 CA 之间同时存在氢键相互作用^[33]。另外, 酰胺 I 带和酰胺 II 带的峰值均出现红移现象, 这说明 OVA 与 CA 发生了疏水相互作用, 并且 OVA 的

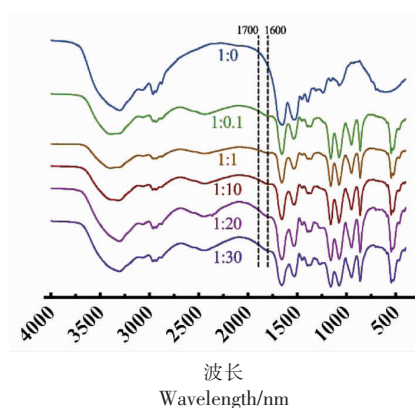


图 5 不同 CA 浓度的 OVA-CA 复合物的红外光谱图

Fig.5 Infrared spectra of OVA-CA complexes with different CA concentrations

二级结构发生改变^[34]。进一步对 OVA 以及 OVA-CA 复合物的蛋白质二级结构进行定量分析, 结果如表 2 所示。CA 的引入主要改变了 β -折叠的含量, β -折叠的比例从 0.50 逐渐减小至 0.36, 猜测这可能与 OVA 和 CA 反应产生的氢键作用有关。

表 2 不同 CA 浓度的 OVA-CA 复合物的酰胺 I 带红外光谱拟合结果

Table 2 Fitting results of amide I band infrared spectra of OVA-CA complexes with different CA concentrations

二级结构	1:0	1:0.1	1:1	1:10	1:20	1:30
α -螺旋	0.11	0.21	0.20	0.16	0.11	0.08
β -折叠	0.50	0.42	0.45	0.37	0.39	0.36
β -转角	0.24	0.13	0.10	0.28	0.27	0.27
无规则卷曲	0.15	0.24	0.25	0.19	0.22	0.29

2.6 乳液粒径电位的变化

如图 6 所示, 乳液的粒径与 CA 浓度成正相关关系, 随着多酚浓度的增加, 粒径逐渐增大。当 OVA:CA=1:0.1 时, 乳液粒径最小, 且显著小于 OVA 乳液粒径; 当 OVA:CA=1:30 时, 乳液粒径最大, 且超过 OVA 乳液粒径的大小。当 OVA:CA=1:0.1 时, OVA-CA 复合物的表面疏水性增加, 乳化能力随即提高。此时 OVA-CA 复合物的界面性质提高, 为乳液的油水界面提供了更强的相互作用, 从而起到抑制乳液聚集的作用, 最终导致乳液粒径减小^[16]。随着 CA 浓度的增加, OVA 的结构更加紧密, 卵白蛋白的球形结构在乳液的油水界面难

以展开, 因此乳化能力逐渐降低^[35]。此外, 随着 CA 浓度的增加, 过多的羟基可能会导致更大聚集体的形成^[36], 乳液粒径逐渐增加。同样, CA 的加入使得 PDI 值出现了与粒径相同的变化趋势, 当 OVA:CA=1:0.1 时, 乳液粒径最小且 PDI 值最小, 此时的乳液具有更强的稳定性以及更好的分散性。

乳液体系均为负电, 表明液滴之间存在静电排斥作用, 而随着 CA 浓度的增加, 电位出现了逐渐减小的趋势。因此, 低浓度的 CA 制备的 OVA-CA 复合物乳液更加稳定。故本研究选择 OVA:CA 为 1:0.1 的比例, 用于后续乳液的表征及稳定性的研究。

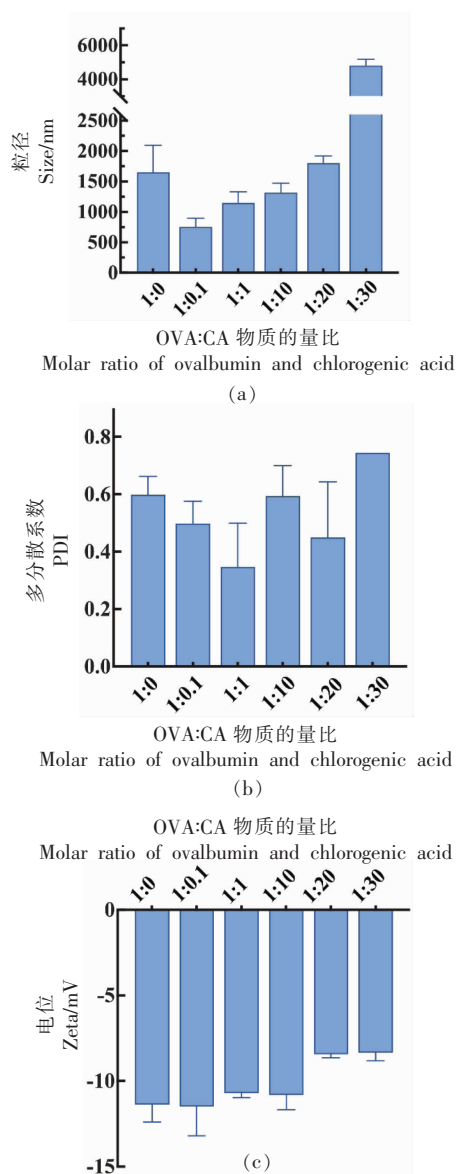


图6 不同CA浓度下乳液粒径、PDI值、电位的变化
Fig.6 Changes of emulsion particle size, PDI value, and potential under different CA concentrations

2.7 乳液稳定性分析

储藏稳定性的提高对扩展乳液的应用有着重要影响。如图7a所示,分别记录OVA乳液和OVA-CA乳液在0,3,5,7d的状态。OVA乳液在3d出现了显著的改变,乳液出现结块分层的现象,此时乳液状态不稳定。这可能是由于卵白蛋白单独作为乳化剂无法起到长时间稳定油脂的作用。OVA乳液的液滴在储藏过程中会发生聚集,从而导致乳液状态不稳定。而OVA-CA乳液在室温条

件下始终保持乳液状态稳定,在储藏7d内没有发生显著变化。此外,储藏期内,OVA乳液的颜色有变黄的趋势,这可能与蛋白质及油脂氧化有关。CA是一种具有抗氧化活性的多酚,CA的引入极有可能增强OVA-CA复合物抗氧化活性,从而抑制乳液中的蛋白质和油脂的氧化,因此颜色没有明显变化。综上所述,OVA-VA乳液具有比OVA乳液更好的储藏稳定性。

盐离子和pH值是影响乳液稳定性的关键因素,同时也是生产加工过程中不可避免的加工手段。盐离子和pH稳定性将决定乳液的使用领域和应用范围。通过考察不同盐离子浓度和不同pH环境下的乳液粒径和PDI值的变化,来评价乳液的稳定性。不同pH值处理会改变蛋白质表面的电荷数,从而影响静电相互作用和氢键的稳定性,进而影响乳液的稳定性。如图7b所示,在pH=2~8范围内,OVA-CA复合物乳液的粒径和PDI值均小于OVA乳液,OVA-CA复合物乳液表现出更强的pH稳定性。在pH4时,OVA乳液和OVA-CA乳液的粒径增大,此时可能由于接近OVA的等电点所致,而OVA-CA的粒径仍然小于OVA乳液,稳定性更高。在pH7时,OVA乳液的粒径和PDI值最大,说明此时OVA出现了聚集现象,而OVA-CA乳液的粒径变化较小,这可能是由于OVA-CA的静电相互作用抑制了OVA的聚集。如图7c可知,CA的加入显著提高了乳液的盐离子稳定性。在OVA乳液中,随着盐离子浓度的增加,OVA乳液的粒径先增加后减少。盐离子的加入产生的静电屏蔽效应影响了液滴之间的静电相互作用^[37],在不同盐离子浓度下,乳液的粒径变化十分明显,表现出不稳定的趋势。而在OVA-CA复合物乳液中,盐离子浓度对乳液粒径的影响并不明显,表明OVA-CA复合物可以有效地提高乳液的盐离子稳定性。

3 结论

利用OVA-CA复合物制备得到具有良好物理稳定性的乳液体系。通过荧光光谱法、同步荧光光谱法、圆二色谱法、红外光谱法明确了OVA与CA之间的相互作用。与OVA乳液相比,OVA-CA乳液具有更好的pH稳定性和盐离子稳定性。该研

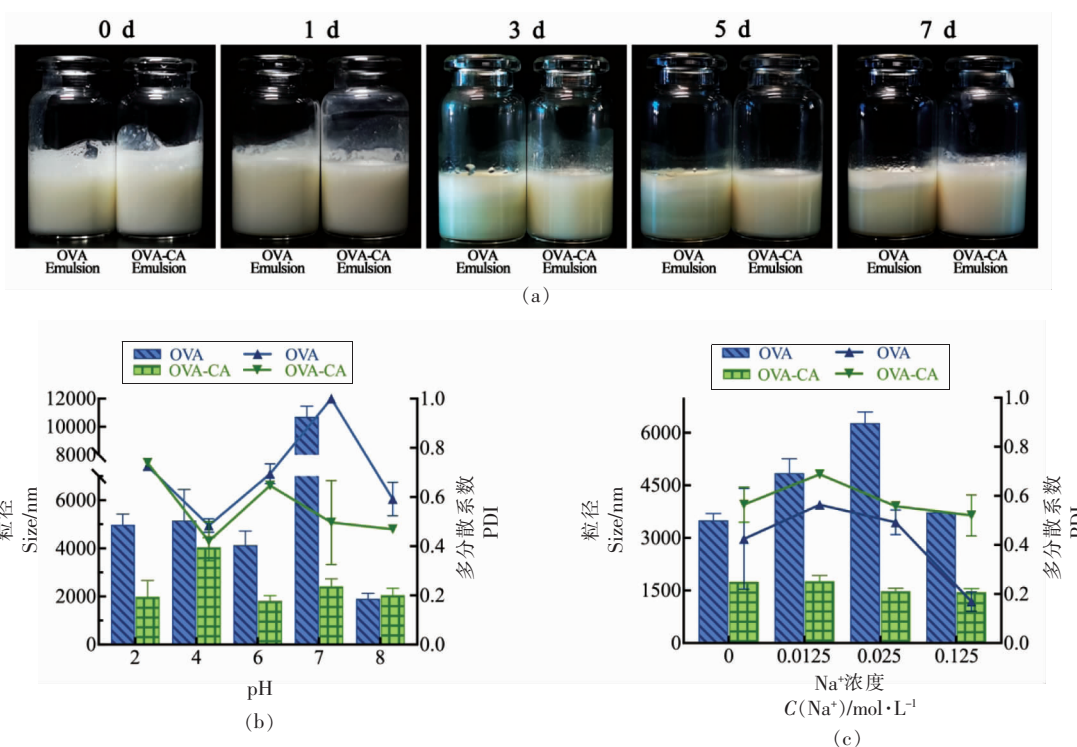


图7 OVA乳液和OVA-CA的物理稳定性:常温条件下乳液储藏7 d的样品图(a)、pH值对乳液粒径的影响(b)、不同盐离子浓度对乳液粒径的影响(c)

Fig.7 The physical stability of OVA emulsion and OVA-CA emulsion: Sample pictures of emulsion stored for 7-day at room temperature (a), effect of pH value on emulsion particle size (b), different salt ion concentration on emulsion particle (c)

究结果有望为以OVA为代表的蛋清蛋白加工功能性提升提供一定数据支持,为蛋清蛋白在食品乳液体系中的应用提供一定参考,为OVA在食品加工中的应用领域拓展提供新思路。

参 考 文 献

- [1] DAI Z L, WU Z L, JIA S C, et al. Analysis of amino acid composition in proteins of animal tissues and foods as pre-column o-phthalaldehyde derivatives by HPLC with fluorescence detection[J]. Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2014, 964(SI): 116-127.
- [2] GU L P, SU Y J, ZHANG M Q, et al. Protection of β -carotene from chemical degradation in emulsion-based delivery systems using antioxidant interfacial complexes: Catechin-egg white protein conjugates[J]. Food Research International, 2017, 96: 84-93.
- [3] 顾璐萍. 儿茶素-蛋清蛋白抗氧化性载体材料的制备、表征及其应用[D]. 无锡: 江南大学, 2018. GU L P. Preparation, characteristics and application of antioxidant delivery system: Catechin-egg white protein conjugates [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2018.
- [4] HUNTINGTON J A, STEIN P E. Structure and properties of ovalbumin[J]. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 2001, 756(1/2): 189-198.
- [5] LAM R S H, NICKERSON M T. Food proteins: A review on their emulsifying properties using a structure-function approach [J]. Food Chemistry, 2013, 141(2): 975-984.
- [6] MCCLEMENTS D J. Protein-stabilized emulsions[J]. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2004, 9(5): 305-313.
- [7] KARACA A C, LOW N H, NICKERSON M T. Potential use of plant proteins in the microencapsulation of lipophilic materials in foods[J]. Trends in

- Food Science & Technology, 2015, 42(1): 5-12.
- [8] LI Z S, KUANG H R, YANG J C, et al. Improving emulsion stability based on ovalbumin-carboxymethyl cellulose complexes with thermal treatment near ovalbumin isoelectric point [J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 64-70.
- [9] OZTURK B, ARGIN S, OZILGEN M, et al. Formation and stabilization of nanoemulsion-based vitamin E delivery systems using natural biopolymers: Whey protein isolate and gum arabic[J]. Food Chemistry, 2015, 188: 256-263.
- [10] 李宛蓉, 刘佩, 余静怡, 等. 乳清分离蛋白与单宁酸相互作用提高稻米油 Pickering 乳液的稳定性[J]. 食品科学, 2020, 41(18): 1-7.
- LI W R, LIU P, YU J Y, et al. The interaction of whey protein isolate with tannic acid improves the stability of rice bran oil Pickering emulsion[J]. Food Science, 2020, 41(18): 1-7.
- [11] HOSSEN M S, ALI M Y, JAHURUL M H A, et al. Beneficial roles of honey polyphenols against some human degenerative diseases: A review [J]. Pharmacological Reports, 2017, 69(6): 1194-1205.
- [12] KROLL N J, RAWEL H M, ROHN S. Reactions of plant phenolics with food proteins and enzymes under special consideration of covalent bonds[J]. Food Science and Technology Research, 2003, 9(3): 205-218.
- [13] 刘爽, 袁芳, 高彦祥. 蛋白质或乳液与茶和咖啡中的多酚相互作用的研究概述[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(12): 130-135.
- LIU S, YUAN F, GAO Y X. The research progress of interaction between protein or emulsion and polyphenols from tea or coffee[J]. Food and Fermentation Industry, 2014, 40(12): 130-135.
- [14] CHEN Y, HU J, YI X Z, et al. Interactions and emulsifying properties of ovalbumin with tannic acid [J]. LWT-Food Science and Technology, 2018, 95: 282-288.
- [15] 刘蕾, 陈历水, 马莺, 等. EGCG 对 β -胡萝卜素乳液物理稳定性的影响[J]. 农业机械学报, 2019, 50(2): 340-349.
- LIU L, CHEN L S, MA Y, et al. Effect of EGCG on physical stability of β -carotene encapsulated in oil-in-water emulsions [J]. Journal of Agricultural Machinery, 2019, 50(2): 340-349.
- [16] 鞠梦楠, 祝钢, 陈红宇, 等. 大豆球蛋白-花青素 Pickering 乳液性质[J]. 食品科学, 2020, 41(2): 1-7.
- JU M N, ZHU G, CHEN H Y, et al. Physicochemical characterization of Pickering emulsions stabilized by anthocyanin and soybean protein isolate composite nanoparticles[J]. Food Science, 2020, 41(2): 1-7.
- [17] 陈百莹. 基于 Nrf2 通路研究番茄红素、叶黄素、绿原酸和飞燕草素的抗氧化相互作用[D]. 南昌: 南昌大学, 2020.
- CHEN B Y. Mechanism of antioxidant interactions of lycopene, lutein, chlorogenic acid and delonidin by Nrf2 pathway[D]. Nanchang: Nanchang University, 2020.
- [18] 陈卫军, 刘东红, 李云成, 等. 制备方法对乳清分离蛋白-绿原酸共价接枝物结构和功能性质的影响[J]. 食品科学, 2021, 42(13): 43-50.
- CHEN W J, LIU D H, LI Y C, et al. Effect of formation methods on the structural and functional properties of whey protein isolate-chlorogenic acid conjugates[J]. Food Science, 2021, 42(13): 43-50.
- [19] 李杨, 闫世长, 齐宝坤, 等. 绿原酸改性黑芸豆蛋白抗氧化活性与乳化性能研究[J]. 农业机械学报, 2020, 51(5): 356-362.
- LI Y, YAN S C, QI B K, et al. Emulsifying properties and antioxidant activities of black kidney bean protein modified by chlorogenic acid[J]. Journal of Agricultural Machinery, 2020, 51(5): 356-362.
- [20] LIU F G, WANG D, SUN C X, et al. Utilization of interfacial engineering to improve physicochemical stability of β -carotene emulsions: Multilayer coatings formed using protein and protein-polyphenol conjugates[J]. Food Chemistry, 2016, 205: 129-139.
- [21] 吴云雪, 李娟, 高晴, 等. EGCG 与乳清蛋白相互作用的光谱分析[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(1): 7-13.
- WU Y X, LI J, GAO Q, et al. Spectral analysis of the interaction between EGCG and whey protein isolate[J]. Food Research and development, 2020, 41(1): 7-13.
- [22] 魏晨. 木糖糖基化改性对卵白蛋白功能特性的影响[D]. 吉林: 吉林大学, 2019.
- WEI C. Effect of xylose glycosylation modification on the functional properties of ovalbumin[D]. Jilin: Jilin University, 2019.
- [23] LIU F G, WANG D, MA C C, et al. Conjugation

- of polyphenols prevents lactoferrin from thermal aggregation at neutral pH[J]. *Food Hydrocolloids*, 2016, 58: 49–59.
- [24] XU J H, HAO M H, SUN Q F, et al. Comparative studies of interaction of β -lactoglobulin with three polyphenols[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 136: 804–812.
- [25] WEN H D, LIU J B, YU Y D, et al. γ -Cyclodextrin-BSA for nano-encapsulation of hydrophobic substance[J]. *Food Bioscience*, 2021 41: 101009.
- [26] CHENG Z J, LIU R, JIANG X H, et al. The interaction between cepharanthine and two serum albumins: Multiple spectroscopic and chemometric investigations[J]. *Luminescence*, 2014, 29(5): 504–515.
- [27] WU X L, WU H, LIU M X, et al. Analysis of binding interaction between (-)-epigallocatechin (EGC) and β -lactoglobulin by multi-spectroscopic method[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2011, 82(1): 164–168.
- [28] HE Z Y, CHEN J, MOSER S E, et al. Interaction of β -casein with (-)-epigallocatechin-3-gallate asayed by fluorescence quenching: Effect of thermal processing temperature[J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2016, 51(2): 342–348.
- [29] CHANG K F, LIU J B, JIANG W, et al. Ferulic acid-ovalbumin protein nanoparticles: Structure and foaming behavior [J]. *Food Research International*, 2020, 136: 109311–109311.
- [30] WEI Z H, YANG W, FAN R, et al. Evaluation of structural and functional properties of protein-EGCG complexes and their ability of stabilizing a model β -carotene emulsion[J]. *Food Hydrocolloids*, 2015, 45: 337–350.
- [31] 杨玉玲, 游远, 彭晓蓓, 等. 加热对鸡胸肉肌原纤维蛋白结构与凝胶特性的影响[J]. *中国农业科学*, 2014(10): 2013–2020.
- [32] 万红兵, 李海鹏, 雷元华, 等. 烹饪熟度对牛肉肌原纤维蛋白结构特性和氧化特性的影响[J]. *食品科学*, 2021, 42(13): 17–25.
- [33] WAN H B, LI H P, LEI Y H, et al. Effect of degree of doneness on structural properties and oxidation properties of beef myofibrillar protein[J]. *Food Science*, 2021, 42(13): 17–25.
- [34] YANG D Y, GAO S, YANG H S. Effects of sucrose addition on the rheology and structure of iota-carrageenan[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 99: 105317.
- [35] CHEN S, HAN Y H, HUANG J Y, et al. Fabrication and characterization of layer-by-layer composite nanoparticles based on zein and hyaluronic acid for codelivery of curcumin and quercetagenin[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2019, 11(18): 16922–16933.
- [36] TANG C H. Emulsifying properties of soy proteins: A critical review with emphasis on the role of conformational flexibility[J]. *Taylor & Francis*, 2017, 57(12): 2636–2679.
- [37] YANG W, XU C Q, LIU F G, et al. Native and thermally modified protein-polyphenol coassemblies: Lactoferrin-based nanoparticles and submicrometer particles as protective vehicles for (-)-epigallocatechin-3-gallate[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(44): 10816–18027.
- [38] LIU G, YUAN D, WANG Q, et al. Maillard reaction-functionalized egg white ovalbumin stabilizes oil nanoemulsions[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(16): 4251–4258.

Effect of Molecular Interaction between Ovalbumin and Chlorogenic Acid on Protein Structure and Emulsion Stability

Wen Hedi^{1,2}, Ning Zhenzhen^{1,2}, Li Jinming^{1,2}, Guan Yu^{1,2}, He Jiahua^{1,2},
Zhao Songning^{1,2}, Liu Jingbo^{1,2}, Zhang Ting^{1,2*}

¹Jilin Provincial Key Laboratory of Nutrition and Functional Food, Changchun 130062

²College of Food Science and Engineering, Jilin University, Changchun 130062)

Abstract Polyphenols and proteins are important material sources that constitute a complex food system. Molecular interactions between polyphenols and proteins would change the structure of proteins and improve emulsion stability. It has become a research hotspot in the current food processing field. In this experiment, the interaction between ovalbumin (OVA) and chlorogenic acid (CA) was studied by fluorescence spectroscopy, synchronous fluorescence spectroscopy, circular dichroism, and infrared spectroscopy. The OVA-CA complex was used to prepare high stable emulsion. The experimental results showed that OVA and CA were 1:1 binding. The binding site is closer to the position of the tryptophan residue in the OVA molecule. The quenching mechanism of CA to OVA's endogenous fluorescence was static quenching, and the main force of the combination was hydrophobic interaction. The addition of CA would change the protein secondary structure of OVA. Among of them, the content of α -helix increased, and the content of β -sheet gradually decreased with the increase of CA concentration. The ratio of CA and OVA was optimized according to the particle size of the emulsion. The results showed that the particle size was the smallest when the ratio of CA and OVA was 1:0.1. The particle size was (755.13 ± 140.29) nm. Compared with OVA emulsion, OVA-CA emulsion remains stable for 7-day at room temperature, while the pH value and salt ion (0-0.125 mol/L) stability of OVA-CA emulsion were significantly improved. This research will provide a theoretical basis for improving the functional properties of egg white protein and expand the application of egg white protein in food processing.

Keywords ovalbumin; chlorogenic acid; emulsion; stability; molecular interaction