

# 大豆分离蛋白-黄原胶-茶多酚复合物的制备及其乳液性质表征

王艳红, 田少君, 张争全, 郑奥泽

(河南工业大学粮油食品学院, 郑州 450001)

**摘要:**以大豆分离蛋白(SPI)、黄原胶(XG)、茶多酚(TP)为原料,改变原料的添加顺序制备三元复合物 SPI-XG-TP 和 SPI-TP-XG,研究了不同复合物的结构与乳化特性的差异。结果表明:蛋白质与多糖、多酚复合之后其结构发生一定程度的改变,且复合物的乳化特性都得到了改善,两种三元复合物中 SPI-XG-TP 稳定的乳液粒径更小,电位绝对值更大,乳化活性更高,但乳化稳定性略低于 SPI-TP-XG 稳定的乳液。大分子间能够相互交联形成三元复合物并改变蛋白质的结构,不同原料添加顺序的复合物的结合过程不同。

**关键词:**大豆分离蛋白;黄原胶;茶多酚;三元复合物;乳化特性

中图分类号:TS201.2;TS277 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2021)04-0038-05

## Preparation of SPI-XG-TP complex and characterization of its emulsion properties

WANG Yanhong, TIAN Shaojun, ZHANG Zhengquan, ZHENG Aoze

(College of Food Science and Technology, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China)

**Abstract:** The ternary complexes SPI-XG-TP and SPI-TP-XG were prepared from soybean protein isolate (SPI), xanthan gum (XG) and tea polyphenols (TP) by changing the order of addition of raw materials, and the differences in the structure and emulsifying properties of the complexes were investigated. The results showed that the structure of the proteins complexed with polysaccharides and polyphenols were changed to a certain extent, and the emulsifying properties of the complexes were improved. Between the two ternary complexes, the SPI-XG-TP-stabilized emulsion had smaller particle size, larger absolute value of potential and higher emulsifying activity, but the emulsion stability was slightly lower than that of the SPI-TP-XG-stabilized emulsion. The macromolecules could cross-link with each other to form ternary complexes and change the structure of proteins, and the binding process of the complexes was different for different adding order of raw materials.

**Key words:** soybean protein isolate; xanthan gum; tea polyphenols; ternary complex; emulsifying property

大豆蛋白是一种优质的植物蛋白,含有 8 种人体所必需的氨基酸,且氨基酸组成比例合理,人体对其消化率高<sup>[1]</sup>。大豆蛋白在食品工业中常用于稳定乳液,但由于其对 pH、离子强度和温度等环境压力非常敏感,稳定性易受影响,使其在加工中受到限

制。研究发现蛋白质与多糖能够通过大分子之间的相互作用共价结合形成二元复合物,且拥有更好的溶解性、乳化性、乳化稳定性、热稳定性等功能特性<sup>[2]</sup>,目前主要通过美拉德反应制备蛋白-多糖复合物,但这种方法在制备过程中会产生丙烯酰胺、杂环胺和高级糖基化终产物等有害物质,且蛋白质与多糖之间的反应程度较低。有研究表明,膳食多酚能够抑制美拉德反应中有毒、有害物质的产生,还能够加速蛋白质与多糖间的美拉德初期反应从而提高

收稿日期:2020-08-14;修回日期:2021-01-18

作者简介:王艳红(1995),女,硕士研究生,研究方向为植物蛋白资源开发与利用(E-mail)1020290952@qq.com。

通信作者:田少君,教授(E-mail)shaojun\_tian@haut.edu.cn。

复合物的接枝度<sup>[3]</sup>,同时多酚、蛋白质、多糖之间会发生复杂的相互作用,进而导致体系内部微观结构形态的变化,影响体系的物理化学性质,多酚还能够抑制蛋白质与多糖聚集,改善蛋白质的表面疏水性及水溶性,并起到一定的抗氧化作用,同时与蛋白质复合后由多酚引起的收敛性及酸涩味也有所降低<sup>[4]</sup>。研究蛋白质、多酚和多糖之间的共价相互作用,能够为研发新型多功能食品材料提供理论依据,促进三元复合物在食品加工领域的应用。

本文以大豆分离蛋白、茶多酚、黄原胶为原料,改变原料的添加顺序制备大豆分离蛋白-茶多酚-黄原胶复合物及大豆分离蛋白-黄原胶-茶多酚复合物,研究原料添加顺序及各组分间的比例对复合物结构的影响,并比较了其乳化特性的差异,为复合物的制备提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

大豆分离蛋白(SPI),益海嘉里食品工业有限公司(湿基蛋白质含量为85%);茶多酚(TP),无锡太阳绿宝科技有限公司;黄原胶(XG),北京索莱宝科技有限公司;大豆油,益海嘉里食品有限公司。叠氮化钠、溴化钾等均为分析纯。

TDL-5-A 高速离心机;HH-6J 数显恒温水浴锅;PHS-3C 型精密 pH 计;FA2004 分析天平;LGJ-25C 冷冻干燥机;FA25 高速剪切乳化机,德国 FLUKO 流体机械制造公司;722S 可见分光光度计;Zetasizer NanoZS90 纳米激光粒度仪,英国 Malvern Instruments Ltd.。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 三元复合物的制备

参考 Rawel 等<sup>[5]</sup>的方法,采用碱法制备大豆分离蛋白-茶多酚复合物。将 6 g 大豆分离蛋白溶解于 100 mL 蒸馏水中搅拌过夜,将 0.6 g 茶多酚溶解于 100 mL 蒸馏水中,然后用 0.1 mol/L NaOH 溶液分别将上述两种溶液的 pH 调节至 9.0,再将大豆分离蛋白溶液与茶多酚溶液按体积比 1:1 混合后连续搅拌 24 h(搅拌前加入 20 mg 质量分数 0.02% 的叠氮化钠),然后透析 48 h 除去多余的多酚,最后冷冻干燥得到大豆分离蛋白-茶多酚(SPI-TP)复合物。

参考 Liu 等<sup>[6]</sup>的方法,制备大豆分离蛋白-茶多酚-黄原胶(SPI-TP-XG)复合物。称取 6 g SPI-TP 复合物与 0.4 g 黄原胶分别溶解于 100 mL 蒸馏水中,等体积混合后用 0.1 mol/L HCl 溶液调节 pH 至 7.0,冷冻干燥后得到的样品放入装有饱和

溴化钾溶液的干燥器中(60℃,相对湿度 79%)反应 24 h,得到 SPI-TP-XG 复合物。

按照上述方法,改变添加顺序在同样的条件下制备大豆分离蛋白-黄原胶-茶多酚(SPI-XG-TP)复合物。

#### 1.2.2 凝胶电泳(SDS-PAGE)分析

将样品溶解于蒸馏水中配制成质量浓度为 3 mg/mL 的待测液,之后与样品缓冲液按照体积比 1:1 混合,在分离胶质量浓度为 10 g/100 mL、浓缩胶质量浓度为 5 g/100 mL、每个泳道上样量为 10  $\mu$ L 的条件下进行 SDS-PAGE 分析。

#### 1.2.3 紫外吸收光谱分析

参照文献[7]的方法略微改进。使用蒸馏水将样品稀释成蛋白质质量浓度为 0.5 mg/mL 的待测液,使用紫外分光光度计在 200~450 nm 范围内进行全波长扫描,并在 294 nm 与 420 nm 处测定样品的吸光度,测定时以蒸馏水作为空白对照。

#### 1.2.4 内源荧光光谱分析

根据文献[8]中的方法,将样品用蒸馏水配制为蛋白质质量浓度为 0.5 mg/mL 的待测液,然后用荧光分光光度计扫描其荧光光谱。扫描参数为:激发波长 280 nm,发射波长 300~400 nm,激发和发射狭缝宽分别为 5 nm 和 3 nm。以蒸馏水作为空白对照,记录样品的荧光强度变化。

#### 1.2.5 乳液的制备

常温下准确称取 0.5 g 三元复合物并溶于 100 mL 蒸馏水中,在 1 500 r/min 条件下搅拌过夜使其充分溶解,冷却至室温后量取 95 mL 于烧杯中,加入 5 mL 大豆油,使用高速剪切乳化机在 10 000 r/min 条件下剪切 2 min,即制得三元复合物乳液。

#### 1.2.6 乳液粒径、蛋白质分散指数和 Zeta 电位分析

取 1 mL 按 1.2.5 方法制备的乳液于离心筒中,用蒸馏水稀释至 50 mL,使用涡旋振荡器振荡 1 min 使其均匀分散后,采用纳米激光粒度仪测定乳液粒径、蛋白质分散指数(PDI)和 Zeta 电位。

#### 1.2.7 乳液乳化活性及乳化稳定性的测定

根据文献[9]的方法,取按 1.2.5 方法制备的新鲜乳液于试管中,从试管底部吸取 50  $\mu$ L 乳液,与 5 mL 质量分数为 0.1% 的 SDS 混合,经涡旋振荡摇匀后,使用可见分光光度计在 500 nm 波长处测定吸光度( $A_0$ ),放置 30 min 后再次测定其吸光度( $A_{30}$ )。乳化活性( $E$ )及乳化稳定性( $S$ )分别按公式(1)、(2)计算。

$$E = \frac{2 \times 2.303 \times A_0 \times D}{\rho \times L \times \varphi \times 10\ 000} \quad (1)$$

$$S = A_0 / (A_0 - A_{30}) \times 30 \quad (2)$$

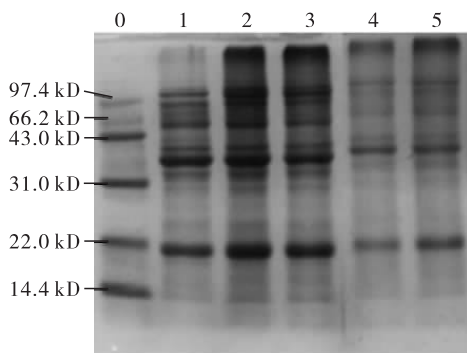
式中: $D$ 为稀释倍数,100; $\rho$ 为稀释前的蛋白质质量浓度,mg/mL; $L$ 为光程,1 cm; $\varphi$ 为形成乳液的油的体积分数。

### 1.2.8 数据分析

所有实验均重复3次,实验结果使用 IBM SPSS Statistics 20 软件进行单因素方差分析(Duncan), $P < 0.05$ 时差异显著。

## 2 结果与讨论

### 2.1 凝胶电泳(SDS-PAGE)图谱(见图1)



注:0. Marker; 1. SPI; 2. SPI-XG; 3. SPI-TP; 4. SPI-XG-TP; 5. SPI-TP-XG。

图1 大豆分离蛋白及其复合物的 SDS-PAGE 图谱

由图1可见:大豆分离蛋白的相对分子质量主要集中在22 kDa和43 kDa左右;与单独的蛋白相比复合物的电泳条带迁移较慢,这说明复合物的相对分子质量变大;两种三元复合物的条带均发生上移,并产生了新的条带,这是因为蛋白质与多糖、多酚通过相互作用发生了交联。凝胶电泳样品缓冲液中的SDS和 $\beta$ -巯基乙醇能够破坏分子间的非共价作用力,但经缓冲溶液处理后复合物间的相互交联并没有消失,这说明蛋白质与多糖、多酚之间存在共价作用。

### 2.2 紫外吸收光谱(见图2)

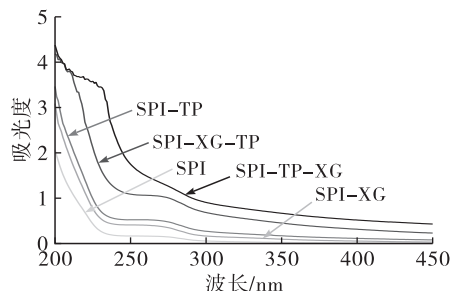


图2 大豆分离蛋白及其复合物的紫外吸收光谱

由图2可见,所有复合物的吸光度明显高于单独的蛋白并且吸收峰也更加明显,三元复合物分别在220、250 nm处出现了新的肩峰,而二元复合物并

未出现新的吸收峰,说明三元复合物中的蛋白质结构发生了一定的改变,这可能是由多酚、多糖与蛋白质之间的相互作用导致的。

样品在294 nm( $A_{294}$ )和420 nm( $A_{420}$ )的紫外吸光度可以分别作为美拉德反应的中间和最终反应进行程度的指标,此外 $A_{294}/A_{420}$ 可作为反应复合物结合程度的指标<sup>[10]</sup>。大豆分离蛋白及其复合物在294 nm和420 nm处的紫外吸光度见表1。

表1 大豆分离蛋白及其复合物在294 nm和420 nm处的紫外吸光度

项目	SPI	SPI-XG	SPI-TP	SPI-XG-TP	SPI-TP-XG
$A_{294}$	0.089	0.230	0.351	0.821	1.050
$A_{420}$	0.010	0.044	0.099	0.278	0.479
$A_{294}/A_{420}$	8.90	5.23	3.55	2.95	2.19

由表1可见:复合物的 $A_{294}$ 和 $A_{420}$ 均高于单独的蛋白,这是由于蛋白质与其他大分子物质发生了美拉德反应,羰基与游离氨基发生缩合反应形成席夫碱,席夫碱是一种类黑素化合物,能显著增加样品的紫外吸光度<sup>[11]</sup>;而随着多酚和多糖的加入,加速了美拉德反应中间产物向最终产物的转变,复合物的 $A_{294}/A_{420}$ 显著下降,复合物的结合度升高,SPI-TP-XG的 $A_{294}$ 、 $A_{420}$ 高于SPI-XG-TP,但 $A_{294}/A_{420}$ 较SPI-XG-TP的低,说明SPI-TP-XG的结合度较高,这是因为多酚在碱性条件下氧化为醌类化合物后能够与游离氨基色氨酸等亲核试剂通过共价反应结合,不同的原料添加顺序制备的复合物的反应进程差别较大。

### 2.3 内源荧光光谱(见图3)

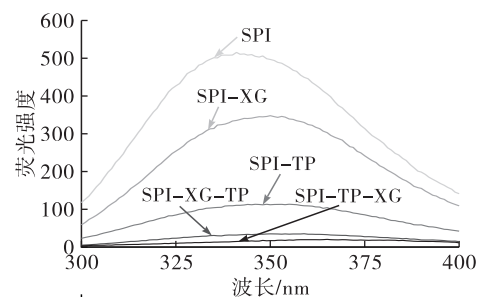


图3 大豆分离蛋白及其复合物的内源荧光光谱

由图3可见,复合物的荧光强度均有所降低,这是因为280 nm的激发波长蛋白质中的色氨酸和酪氨酸能够发生荧光反应,而在碱性条件下多酚能够与蛋白质中的色氨酸、酪氨酸等荧光基团结合产生荧光猝灭效应<sup>[12]</sup>,同时多糖能够在蛋白质表面形成共价吸附层,这些反应都会使体系的荧光强度降低。与SPI-XG-TP相比,SPI-TP-XG的荧光强度更低,这可能是由于多糖先与蛋白质反应,会在蛋白质表面形成一层保护膜,阻碍了多酚与蛋白质的结

合<sup>[13]</sup>。另外,复合物的荧光峰均发生了一定程度的红移,这是由于蛋白质中氨基酸分子的侧链基团逐渐暴露在水溶液中,色氨酸等荧光基团转入到了更加疏水的环境中,所处的环境极性逐渐增加<sup>[14]</sup>,蛋白质的结构产生了一定程度的改变。三元复合物的红移和荧光猝灭效应更加明显,这说明三元复合物能够形成更强的屏蔽效应,且其中蛋白质的三级结构也更加紧密。

#### 2.4 乳液粒径与 PDI

大豆分离蛋白及其复合物稳定的乳液的粒径与 PDI,结果见图 4。

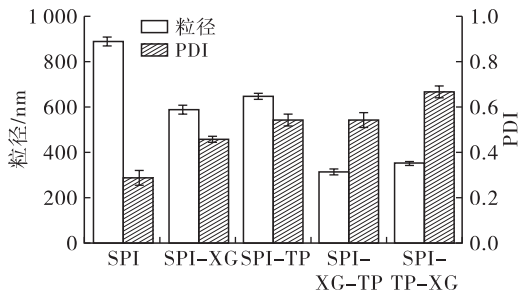


图 4 大豆分离蛋白及其复合物稳定的乳液的粒径与 PDI

由图 4 可见,三元复合物稳定的乳液粒径最小,而由大豆分离蛋白稳定的乳液粒径最大,这是因为复合物制备乳液时能够形成较大的界面厚度,在液滴周围形成保护层,加大了液滴间的空间位阻,抑制了液滴之间发生聚集、沉淀<sup>[15]</sup>,使乳液粒径减小。随着多糖和多酚的加入,乳液的 PDI 值增大,这说明乳液粒度分布的均匀性变差。两种三元复合物中 SPI-XG-TP 稳定的乳液的粒径与 PDI 均小于 SPI-TP-XG 稳定的乳液,这说明 SPI-XG-TP 复合物拥有更好的乳化性。

对不同质量浓度的多酚制备的 SPI-XG-TP 稳定的乳液粒径与 PDI 进行了分析,结果见图 5。

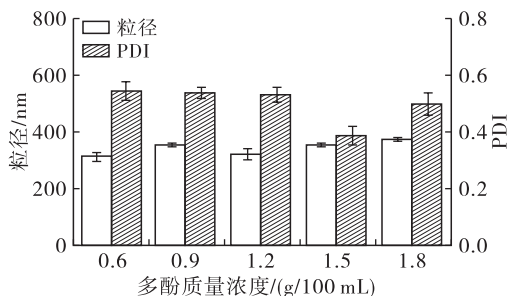


图 5 多酚质量浓度对 SPI-XG-TP 稳定的乳液的粒径与 PDI 的影响

由图 5 可见,随着多酚质量浓度的增加,SPI-XG-TP 稳定的乳液的粒径与 PDI 值都呈现出先减小后增加的趋势,这可能是因为多酚与蛋白质结合之后能够使体系中的疏水基团排列得更加紧密,提

高了界面膜的机械强度,抑制了液滴的聚集,乳液粒径减小,随着多酚质量浓度的继续增加,多余的多酚通过弱的亲和力结合在蛋白质分子表面,形成亚稳态的网状结构,打破了体系的原有稳定性,液滴间发生聚集,使乳液粒径增大,粒度分布不均<sup>[16]</sup>。

#### 2.5 乳液电位

大豆分离蛋白及其复合物稳定的乳液的 Zeta 电位以及由不同质量浓度的多酚制备的 SPI-XG-TP 稳定的乳液的 Zeta 电位测定结果分别见图 6、图 7。

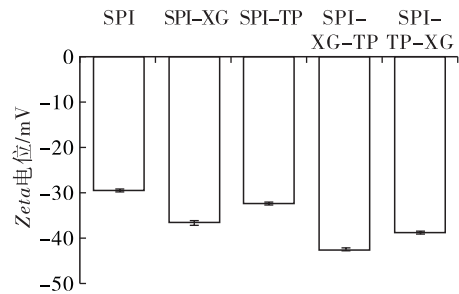


图 6 大豆分离蛋白及其复合物稳定的乳液的 Zeta 电位

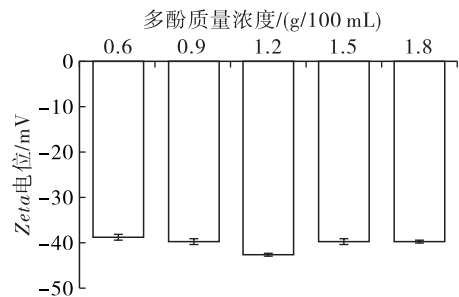


图 7 多酚质量浓度对 SPI-XG-TP 稳定的乳液的 Zeta 电位的影响

由图 6 可见:所有乳液的 Zeta 电位都为负值,这是因为大豆分离蛋白的等电点在 4.5 左右,乳液的 pH 高于蛋白质的等电点使蛋白质吸附  $\text{OH}^-$ ,所以乳液 Zeta 电位为负值;复合物稳定的乳液的 Zeta 电位绝对值均高于大豆分离蛋白稳定的乳液,这可能是因为多糖、多酚分子通过交联作用镶嵌到蛋白质分子内部或简单地吸附在蛋白质表面,使蛋白质二级、三级结构发生变化,从而改变了蛋白质的电荷分布情况<sup>[17]</sup>。由图 7 可见,随着多酚质量浓度的增加,复合物的 Zeta 电位绝对值呈现先上升后下降的趋势,这是由于一定浓度的茶多酚与大豆分离蛋白结合能够使大豆分离蛋白表面酚羟基的含量增加,从而增加了乳液的 Zeta 电位绝对值<sup>[18]</sup>,但过高的多酚浓度会使多余的多酚与蛋白质结合形成不溶性的络合物,产生电子屏蔽效应,降低了乳液的 Zeta 电位绝对值<sup>[19]</sup>。

## 2.6 乳液乳化活性及乳化稳定性(见图8)

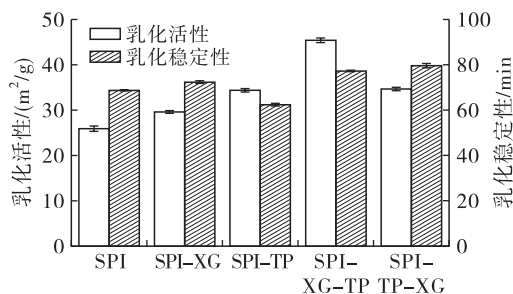


图8 大豆分离蛋白及其复合物稳定的乳液的乳化活性和乳化稳定性

由图8可见,黄原胶、茶多酚的添加能够显著改善大豆分离蛋白的乳化活性。这是因为蛋白质经大分子物质修饰后能够增加表面疏水性,从而呈现出较好的乳化活性<sup>[20]</sup>。三元复合物的乳化稳定性也得到了-定的改善,这与Zeta电位的结果一致,而不同原料添加顺序制备的三元复合物的乳化活性则出现了显著的差异( $P < 0.05$ )。

## 3 结论

本文通过对比发现由大豆分离蛋白(SPI)、黄原胶(XG)、茶多酚(TP)所制备的三元复合物的凝胶电泳图谱出现了新的条带,紫外吸光度升高且吸收光谱在220、250 nm处出现了新的肩峰,同时复合物中蛋白质发生了强烈的荧光猝灭效应,这说明蛋白质、多糖、多酚之间能够通过相互作用发生交联,使蛋白质结构发生改变。改变茶多酚和黄原胶的添加顺序,所制备的大豆分离蛋白三元复合物的反应进程不同,对蛋白质的结构产生了较大的影响。与单独的大豆分离蛋白相比,复合物显示出更好的乳化特性,两种三元复合物中SPI-XG-TP稳定的乳液拥有更小的粒径、更高的电位绝对值和更好的乳化活性,但乳化稳定性略低于SPI-TP-XG稳定的乳液。

## 参考文献:

[1] 王珏,程涛,宋恒祥.大豆分离蛋白的生产工艺[J].中国乳品工业,2002,30(5):110-112.

[2] XU X, LUO L, LIU C, et al. Utilization of anionic polysaccharides to improve the stability of rice glutelin emulsions: impact of polysaccharide type, pH, salt, and temperature[J]. Food Hydrocolloid, 2017, 64:112-122.

[3] BASTA G, TURCO S D. Can dietary polyphenols prevent the formation of toxic compounds from Maillard reaction? [J]. Curr Drug Metab, 2016, 17(6):598-607.

[4] LIU F, MA C, MCCLEMENTS D J, et al. Development of polyphenol-protein-polysaccharide ternary complexes as emulsifiers for nutraceutical emulsions: impact on formation, stability, and bioaccessibility of  $\beta$ -carotene emulsions[J]. Food Hydrocolloid, 2016, 61:578-588.

[5] RAWEL H M, CZAJKA D, ROHN S, et al. Interactions of

different phenolic acids and flavonoids with soy proteins [J]. Int J Biol Macromol, 2002, 30(3/4):137-150.

[6] LIU F G, SUN C, WANG D, et al. Glycosylation improves the functional characteristics of chlorogenic acid-lactoferrin conjugates[J]. RSC Adv, 2015(95):78215-78228.

[7] ARMENTA-LÓPEZ R, GUERRERO I L, HUERTA S. Astaxanthin extraction from shrimp waste by lactic fermentation and enzymatic hydrolysis of the carotenoprotein complex[J]. J Food Sci, 2006, 67(3):1002-1006.

[8] 姚文俊,周磊,付珊琳,等.添加顺序对 $\beta$ -乳球蛋白与EGCG及葡萄糖三元复合物结构和功能的影响[J].食品科学,2019,40(14):41-47.

[9] JIN W G, PEI J J, DU Y N, et al. Characterization and functional properties of gelatin extracted from Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*) skin[J]. J Aquat Prod Technol, 2019, 28(8):861-876.

[10] AJANDOUZ E H, TCHIAKPE L S, DALLE ORE F, et al. Effects of pH on caramelization and Maillard reaction kinetics in fructose-lysine model systems [J]. J Food Sci, 2001, 66(7):926-931.

[11] LEDL F, SCHLEICHER R N H E. New aspects of the Maillard reaction in foods and in the human body[J]. Ang Chem Int Ed, 2010, 29(6):565-594.

[12] VIGO M S, MALBC L S, GOMEZ R G, et al. Spectrophotometric assay using *o*-phthaldialdehyde for determination of reactive lysine in dairy products [J]. Food Chem, 1992, 44(5):363-365.

[13] STOKKUM I H M V, LAPTENOK S P. Quantitative fluorescence spectral analysis of protein denaturation[J]. Meth Mol Biol, 2014, 1076(17):43-51.

[14] PAIN R H. Determining the fluorescence spectrum of a protein[J/OL]. Curr Protoc Protein Sci, 2004[2020-08-14]. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0707538>.

[15] EVANS M, RATCLIFFE I, WILLIAMS P A. Emulsion stabilisation using polysaccharide-protein complexes[J]. Curr Opin Colloid In, 2013, 18(4):272-282.

[16] YANG W, XU C, LIU F, et al. Fabrication mechanism and structural characteristics of the ternary aggregates by lactoferrin, pectin, and (-)-epigallocatechin gallate using multispectroscopic methods [J]. J Agric Food Chem, 2015, 63(20):5046-5054.

[17] 杨伟,李波,徐响,等.蛋白质-多酚-多糖三元复合物的结构和功能特性研究进展[J].食品工业科技,2017,38(17):329-334.

[18] STASZEWSKI M, IAGUS R J, PILOSOF A M R. Influence of green tea polyphenols on the colloidal stability and gelation of WPC[J]. Food Hydrocolloid, 2011, 25(5):1077-1084.

[19] BROWN P J, WRIGHT W B J. An investigation of the interactions between milk proteins and tea polyphenols [J]. J Chromatogr, 1963, 11(4):504-514.

[20] 张曼,王岸娜,吴立根,等.蛋白质、多糖和多酚间相互作用及研究方法[J].粮食与油脂,2015,28(4):42-46.