

# 绿原酸改性黑芸豆蛋白抗氧化活性与乳化性能研究

李杨<sup>1,2</sup> 闫世长<sup>1</sup> 齐宝坤<sup>1,2</sup> 张爽<sup>1</sup> 谢凤英<sup>1</sup>

(1. 东北农业大学食品学院, 哈尔滨 150030; 2. 国家大豆工程技术研究中心, 哈尔滨 150086)

**摘要:** 为解析黑芸豆分离蛋白(Black kidney bean protein isolate, BKPI)-绿原酸(Chlorogenic acid, CA)复合体系中CA对BKPI功能性质的影响,研究了不同CA添加量(0.05、0.15、0.25 g/(100 mL))与BKPI相互作用后对BKPI结构及抗氧化特性和乳化特性的影响。采用动态光散射、荧光光谱和红外光谱等技术,研究流体动力学半径、内部结构特性及蛋白空间结构的变化。结果表明,随着CA添加量增加,复合物中多酚结合量与浊度增加,游离氨基含量减少,其溶液液滴粒径分布更加均匀。CA与BKPI的相互作用可以改变BKPI的空间结构,二级结构中 $\alpha$ -螺旋与无规则卷曲的相对含量降低, $\beta$ -转角的相对含量增加。随着CA添加量的提高,复合物乳化性及抗氧化性显著提高( $P < 0.05$ ),当CA添加量为0.25 g/(100 mL)时,复合物的乳化性和抗氧化性最优。这表明在乳液食品体系中,CA-BKPI复合物可被用作有效的抗氧化剂和潜在的乳化剂。

**关键词:** 黑芸豆蛋白; 绿原酸; 共价复合; 抗氧化性; 乳化性质

中图分类号: TS214.9 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2020)05-0356-07

OSID:



## Emulsifying Properties and Antioxidant Activities of Black Kidney Bean Protein Modified by Chlorogenic Acid

LI Yang<sup>1,2</sup> YAN Shizhang<sup>1</sup> QI Baokun<sup>1,2</sup> ZHANG Shuang<sup>1</sup> XIE Fengying<sup>1</sup>

(1. College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

2. National Research Center of Soybean Engineering and Technology, Harbin 150086, China)

**Abstract:** In order to investigate the effects of covalent interaction of black kidney bean protein isolate (BKPI) and different concentrations of chlorogenic acid (CA) on the function of the protein, the effects of the covalent interaction of BKPI and different concentrations of CA on protein structure were studied. The relationship between structural change and the functional properties of the complexes was analyzed through dynamic light scattering, fluorescence spectroscopy and Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy. The results showed that the turbidity and the bonding content of CA in the complexes were increased, and its content of free amino group was decreased with the increase of CA concentration, the covalent interaction made the distribution of droplets in the solution more uniform. The secondary structure of BKPI was changed and the contents of  $\alpha$ -helix and unordered decreased, while the contents of  $\beta$ -sheet were increased, and resulting in its conformational change. The decrease in fluorescence intensity with the increase of CA concentration, indicating the unfolding of the protein structure. The addition of CA improved the antioxidant activities and emulsification properties of BKPI. When the concentration of CA was 0.25 g/(100 mL), the antioxidant activities (168.95  $\mu\text{mol/g}$ ) and emulsifying properties of BKPI were the best. These results suggested that CA-BKPI complexes could be used as efficient antioxidants and potential emulsifiers in emulsion-food systems.

**Key words:** black kidney bean protein; chlorogenic acid; covalent complexes; antioxidant activities; emulsifying properties

收稿日期: 2019-08-21 修回日期: 2019-09-19

基金项目: 黑龙江省杰出青年基金项目(JC2018009)

作者简介: 李杨(1981—),男,教授,主要从事粮食、油脂及植物蛋白工程研究,E-mail: liyangneau@163.com

通信作者: 谢凤英(1975—),女,讲师,主要从事粮食、油脂及植物蛋白工程研究,E-mail: spxfy@163.com

## 0 引言

黑芸豆不仅富含蛋白质、多糖、维生素等多种营养成分,还含有皂苷、尿毒酶等独特成分,具有提高人体自身免疫能力、激活淋巴T细胞、抑制肿瘤细胞的恶化、促进脱氧核苷酸的合成等功能<sup>[1]</sup>。黑芸豆分离蛋白(Black kidney bean protein isolate, BKPI)是一种全价蛋白,含有8种人体必需氨基酸与丰富的铁、钙、碳水化合物及多种微量元素等营养物质,具有很高的药用价值,是一种新兴植物蛋白资源<sup>[2]</sup>。然而,碱溶酸沉提取方式固有的缺陷致使BKPI虽有较好的热稳定性与凝胶特性,但乳化特性较差<sup>[3]</sup>,限制了其在食品工业中的应用。

研究表明,植物资源中获得的酚类化合物可以作为金属离子螯合剂、氢供体、单线态氧猝灭剂或还原剂<sup>[4]</sup>。在这些酚类化合物中,绿原酸(Chlorogenic acid, CA)是最常见的水溶性多酚,通常可作为调味剂添加到食品中<sup>[5]</sup>。这些酚类化合物易被氧气、臭氧或多酚氧化酶氧化成醌,醌可以形成二聚体,或直接通过共价(C—N或C—S)或氢键与蛋白质氨基的侧链反应<sup>[6]</sup>。文献<sup>[7]</sup>研究表明,酚类化合物可通过共价交联显著提高明胶的乳化活性指数和抗氧化活性。因此,酚类化合物可以充当蛋白质的交联剂,与蛋白质相互作用形成稳定的复合物,这些复合物对变性剂的破坏作用具有一定抗性<sup>[8]</sup>。

近年来,研究者对蛋白与多酚的复合进行了相关研究。如,文献<sup>[9]</sup>研究了绿原酸和凝乳蛋白的互作机制,发现绿原酸可以提高蛋白的抗氧化性;文献<sup>[5]</sup>研究发现,低浓度的绿原酸通过介导蛋白质的结构修饰能够提高氧化诱导的肌原纤维蛋白凝胶特性。文献<sup>[10]</sup>研究发现,碱性条件下绿原酸与乳铁蛋白复合,蛋白的二级结构发生改变,乳化性增强。可见,绿原酸对蛋白结构的修饰可以改善蛋白质的功能特性。这些研究多数聚焦于动物蛋白,对于菜豆蛋白在碱性条件下与多酚作用的研究尚未见报道。

本文选用不同质量浓度CA,在碱性条件下与BKPI互作以形成CA-BKPI复合物,通过接枝量与反应基团的变化验证蛋白与多酚的结合程度,对改性后复合物的结构变化进行研究,揭示结构对乳化性质与抗氧化特性的影响,以期高乳化性和高抗氧化性CA-BKPI的开发提供技术支持与理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

黑芸豆市售;绿原酸(纯度99%以上),上海源

叶生物科技有限公司;福林酚试剂,1,1-二苯基-2-吡咯基肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH),美国Sigma-Aldrich公司;L-亮氨酸、邻苯二甲醛(OPA)、盐酸、氢氧化钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、甲醇(均为分析纯),北京新光化工试剂厂;其它试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

AL204型分析天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;PHS-3C型实验室pH计,中国上海雷磁公司;F-4500型荧光分光光度计,日本Hitachi公司;TU-1800型紫外-可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;JJ-1型增力电动搅拌器,江苏金城国胜仪器厂;Allegra64R型台式高速冷冻离心机,美国贝克曼公司;IRTracer-100型傅里叶变换红外光谱,日本岛津公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 黑芸豆分离蛋白的制备

根据文献<sup>[11]</sup>的方法,将黑芸豆去皮磨粉,过60目筛,用正己烷脱脂,将脱脂豆粉分散于去离子水中,液料比10 mL/g,用2 mol/L NaOH溶液调节pH值至9.0,搅拌1 h,9 000 r/min离心30 min,取其上清液,然后用2 mol/L HCl溶液调节pH值至4.5,得到蛋白沉淀物,将蛋白沉淀物水洗3次,6 500 r/min离心30 min得到沉淀物,将沉淀物溶解后,用2 mol/L NaOH溶液调节pH值至中性,冻干,即得黑芸豆分离蛋白,使用凯氏定氮测定蛋白含量,蛋白质量分数为(90.62 ± 0.59)%。

#### 1.3.2 蛋白-多酚共价复合物的制备

参照文献<sup>[12]</sup>制备共价复合物的方法,稍作修改。将1 g BKPI粉末溶解于50 mL去离子水中,调节pH值至9.0,在4℃下搅拌24 h,以确保完全水合,然后分别将0.05、0.15、0.25 g CA溶解于50 mL去离子水中并搅拌,将溶液pH值调节到9.0,避光,与空气接触,将蛋白溶液与多酚溶液1:1等体积混合,将两种混合溶液室温(20℃)下连续搅拌反应24 h,并维持pH值为9.0,加入0.02%叠氮化钠以防止微生物的生长,然后用3 000 W的透析袋在4℃下用去离子水透析48 h以除去未结合的绿原酸,将透析袋中的剩余混合液冻干,得到蛋白-多酚共价复合物,置于干燥器中备用,分别标记为0.05CA-BKPI、0.15CA-BKPI、0.25CA-BKPI。

#### 1.3.3 多酚接枝量测定

采用福林酚法测定样品中绿原酸的含量<sup>[13]</sup>。首先,取1 mL样品溶液(1 mg/mL)于试管内,加入5 mL福林酚试剂(体积分数10%),旋涡混匀,静置5 min后,加入4 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液(0.075 g/mL),旋

涡混匀,置于 25℃ 水浴锅中振荡 2 h 后,在 765 nm 波长条件下测定吸光度,并对照绿原酸标准曲线计算样品中绿原酸的含量。

### 1.3.4 荧光光谱测定

根据文献[14]的方法,稍作修改。对 BKPI、CA-BKPI 进行三维荧光光谱测定,使用 F-4500 型光度计,在连续扫描模式下,发射光谱范围为 200~500 nm,激发波长设定为 200~350 nm,并进行总共 16 次扫描,进行光谱分析。

### 1.3.5 傅里叶变换红外光谱

用 IRTracer-100 型傅里叶变换分光光度计在室温下记录 BKPI 与 CA-BKPI 的红外光谱。将样品与 KBr 混合,然后压片。在 500~4 000  $\text{cm}^{-1}$  的范围内记录光谱,分辨率为 4  $\text{cm}^{-1}$ 。采用 Peakfit 4.0 软件,高斯曲线拟合方法拟合  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠、 $\beta$ -转角和无规则卷曲的特征峰<sup>[15]</sup>,分析其含量。

### 1.3.6 自由氨基含量测定

根据文献[16]的方法测定自由氨基含量。配制邻苯二甲醛(OPA)溶液:准确称取 40 mg OPA 溶解于 1 mL 甲醇中,分别加入 0.01 g/mL 的 SDS(十二烷基硫酸钠)溶液 2.5 mL、0.1 mol/L 的硼砂溶液 25 mL、100  $\mu\text{L}$   $\beta$ -巯基乙醇,最后用蒸馏水定容到 50 mL 容量瓶中。测定时,取 OPA 溶液 4 mL 于试管中,分别加入 200  $\mu\text{L}$  样品液,混匀后于 35℃ 反应 2 min,在 340 nm 处测定其吸光度,以在 OPA 试剂中加入 200  $\mu\text{L}$  水为空白对照,并用 L-亮氨酸制作标准曲线,根据其吸光度分析自由氨基含量。

### 1.3.7 粒径分布的测定

利用 Mastersizer 2000 型激光粒度仪对 BKPI 和 CA-BKPI 共价复合物溶液样品进行粒径分布测定。颗粒折射率 1.45,分散剂折射率 1.33,吸收参数 0.001。实验采用体积平均直径  $D_{4,3}$  表征液滴粒度大小<sup>[17]</sup>。

### 1.3.8 Zeta 电位测定

采用 Zeta 电位仪测定样品的 Zeta 电位,将 BKPI 与 CA-BKPI 共价复合物进行适度稀释,上样体积为 1 mL,测定温度为 25℃,温度平衡时间为 2 min<sup>[17]</sup>。

### 1.3.9 浊度测定

将待测样品适当稀释后(样品质量浓度为 5 mg/mL)倒入石英比色皿中,并利用紫外分光光度计在波长 600 nm 处对样品进行测定,在 25℃ 条件下测量浊度<sup>[18]</sup>。

### 1.3.10 乳化活性与乳化稳定性测定

文献[17]的方法稍作修改。将上述样品溶液用磷酸盐缓冲液稀释(10 mmol/L, pH 值 7.0)至蛋

白质量浓度为 1 mg/mL,将稀释的样品以体积比 3:1 溶解于葵花油中,使用高剪切均质机以 10 000 r/min 均质 1 min 形成乳状液,立即从其乳状液底部提取 50  $\mu\text{L}$  的乳液分散于 0.1% 的 SDS 溶液稀释 100 倍。经旋涡振荡后用分光光度法在波长 500 nm 处测定样品的吸光度  $A_{500\text{nm}}$ ,用相同浓度 SDS 溶液作为空白对照。经 10 min 后再次测量其吸光度。乳化活性指数和乳化稳定性指数计算公式为

$$E_{\text{AI}} = \frac{2 \times 2.303A_0D}{10000\theta LC} \quad (1)$$

$$E_{\text{SI}} = \frac{10A_0}{A_0 - A_{10}} \quad (2)$$

式中  $E_{\text{AI}}$ ——乳化活性指数,  $\text{m}^2/\text{g}$

$E_{\text{SI}}$ ——乳化稳定性指数, min

$D$ ——稀释倍数,取 100

$\theta$ ——油相体积分,取 0.25

$L$ ——比色杯厚度,取 1 cm

$C$ ——蛋白质质量浓度, mg/mL

$A_0$ 、 $A_{10}$ ——在 0、10 min 乳状液的吸光度

### 1.3.11 抗氧化性的测量

根据文献[19]的方法测量 DPPH 自由基清除活性,稍作修改。用乙醇配制 0.15 mmol 的 DPPH 溶液,取 1.5 mL 样品加入到 1.5 mL 的 DPPH 乙醇溶液中,室温避光反应 60 min,随后检测在 517 nm 处的吸光度,用 Trolox 绘制标准曲线,以 Trolox 质量摩尔浓度(单位:  $\mu\text{mol}/\text{g}$ )表明其抗氧化能力。

## 1.4 数据统计

所有实验重复 3 次,实验结果采用平均值  $\pm$  标准差表示。利用 SPSS 20 软件进行 ANOVA 差异显著性分析及相关分析,当  $P < 0.05$  时,差异性显著。利用 Origin 2018 进行制图。

## 2 结果与讨论

### 2.1 多酚接枝量与反应基团分析

为表征 BKPI 与不同浓度 CA 的结合量,通过建立绿原酸标准曲线,用福林酚检测复合物中 CA 的接枝量,结果表明,随着绿原酸含量的增加,与 BKPI 结合的多酚质量摩尔浓度分别为  $(54.6 \pm 3.92)$  nmol/mg、 $(74.85 \pm 2.33)$  nmol/mg、 $(98.76 \pm 2.53)$  nmol/mg。可以得知,绿原酸添加量为 0.25 g/(100 mL) 时,接枝量达到最大。绿原酸分子含有 3 个醇羟基和 2 个酚羟基,在碱性条件下酚羟基可以氧化为醌与氨基酸残基反应,形成强而稳定的共价键(C-N, C-S),进而使 CA 与 BKPI 发生紧密结合<sup>[6,12]</sup>。

由于多酚在 pH 值为 9.0 和有氧的情况下极易

氧化成醌,与蛋白接触时,可以与蛋白的侧链氨基酸等亲核基团发生反应,形成共价键(C—N,C—S)<sup>[6,12]</sup>。不同质量浓度的 CA—BKPI 共价复合物自由氨基含量测定结果表明,蛋白—多酚共价复合物的自由氨基含量显著低于对照蛋白,BKPI、0.05CA—BKPI、0.15CA—BKPI、0.25CA—BKPI 自由氨基质量摩尔浓度分别为(0.493 ± 0.006) nmol/mg、(0.381 ± 0.005) nmol/mg、(0.317 ± 0.005) nmol/mg、(0.251 ± 0.003) nmol/mg,相比对照 BKPI,自由氨基含量分别减少了 22.72%、35.70%、49.09%,表明随着绿原酸浓度增大,蛋白与绿原酸反应程度增大,共价结合程度增加。文献[20]研究了猪骨蛋白水解物与芦丁的共价结合作用,发现蛋白的自由氨基含量减少,且该方法中使用了 1% SDS,SDS 可以破坏蛋白多酚之间形成的非共价键,因此可知,蛋白—多酚共价复合物中自由氨基残基含量的减少可能是由于与多酚发生共价结合导致的。

## 2.2 荧光光谱分析

图 1 为 BKPI 与 CA—BKPI 三维荧光光谱图,peak a ( $\lambda_{Ex} = \lambda_{Em}$ ) 是瑞利散射峰,peak b ( $2\lambda_{Ex} = \lambda_{Em}$ ) 是二阶散射峰,peak 1 ( $\lambda_{Ex} = 280$  nm,  $\lambda_{Em} = 330$  nm) 主要代表蛋白中酪氨酸残基和色氨酸残基的变化<sup>[21]</sup>,其中  $\lambda_{Ex}$  和  $\lambda_{Em}$  表示激发波长和发射波长。色氨酸荧光强度的改变表征了蛋白的三级结构

的改变,蛋白质疏水基团内部主要包裹着色氨酸,当蛋白与多酚形成复合物以后,色氨酸残基暴露,多酚经碱处理氧化为醌与部分氨基酸残基反应,进而导致荧光强度降低<sup>[17]</sup>。如图 1 所示,随着绿原酸浓度的增加,等高线显示峰的颜色变浅,且根据 peak 1 处荧光强度计算得知,与未加绿原酸的对照蛋白相比,0.05CA—BKPI、0.15CA—BKPI、0.25CA—BKPI 的 peak 1 处荧光强度分别降低了 72.32%、83.46%、92.17%,表示黑芸豆蛋白的荧光强度随着绿原酸的加入逐渐降低,黑芸豆蛋白与绿原酸的结合力逐渐增强。此外,peak 2 ( $\lambda_{Ex} = 230$  nm,  $\lambda_{Em} = 330$  nm) 主要代表多肽链骨架的特征峰<sup>[22]</sup>,由图可知,在绿原酸和蛋白结合之后,峰的面积和强度变弱,0.25CA—BKPI 的荧光强度降低最为明显,这表明随着绿原酸的加入,蛋白多肽链骨架伸展,当蛋白与多酚形成共价复合物时,绿原酸使蛋白的结构发生改变。

## 2.3 红外光谱分析

通过红外光谱 (FTIR) 分析来证明蛋白与多酚之间的共价结合,不同样品的 FTIR 光谱如图 2 所示,BKPI 表现出几个特征峰,3 278.63  $\text{cm}^{-1}$  (酰胺 A 带, N—H 键的拉伸振动和氢键的吸收峰)、1 634.31  $\text{cm}^{-1}$  (酰胺 I 带区, C—O 键之间的伸缩振动) 和 1 519.76  $\text{cm}^{-1}$  (酰胺 II 带区, C—N 键的拉伸

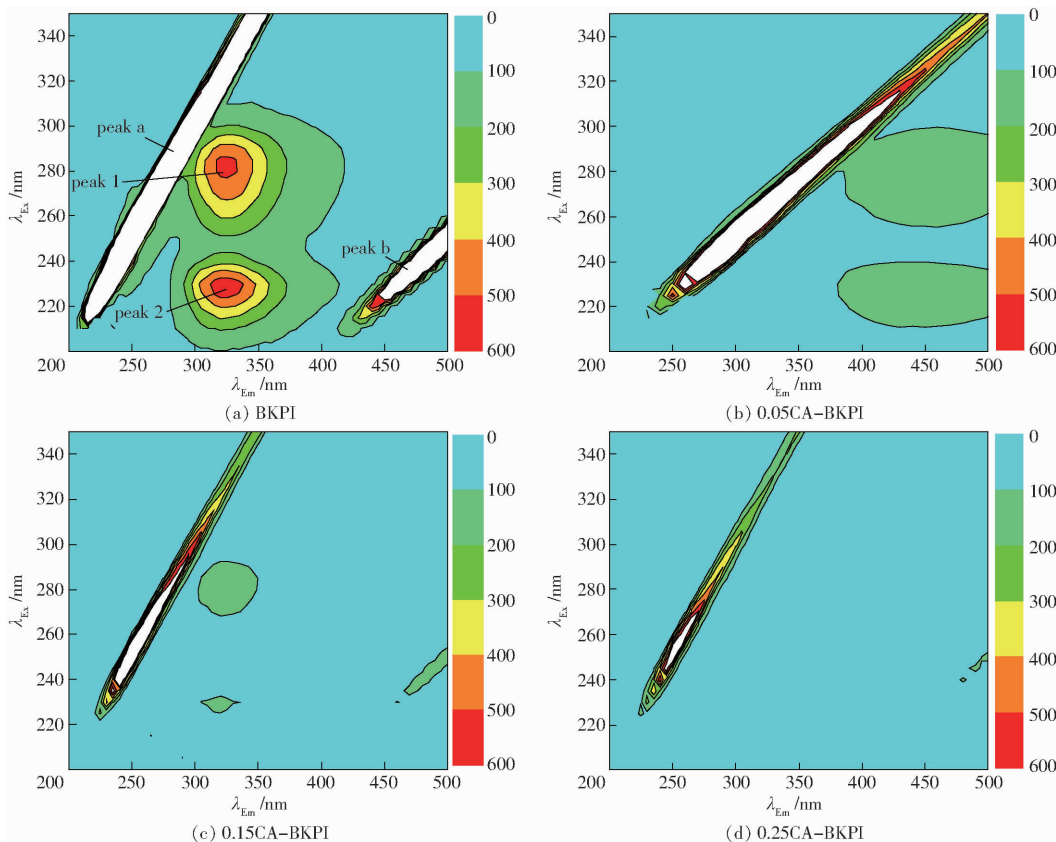


图 1 不同质量浓度 CA—BKPI 结合物三维荧光光谱图

Fig. 1 Three-dimensional fluorescence spectral analysis of CA—BKPI complexes with different concentrations

振动、N—H 键的弯曲振动)<sup>[23]</sup>。与对照 BKPI 相比,0.05CA—BKPI、0.15CA—BKPI、0.25CA—BKPI 酰胺 I 带的吸收峰均发生了蓝移,分别从  $1\,634.31\text{ cm}^{-1}$  移至  $1\,635.10$ 、 $1\,639.00$ 、 $1\,639.01\text{ cm}^{-1}$ , 其中,样品 0.25CA—BKPI 的酰胺 I 带变化最为明显,这表明了多酚与蛋白的复合消耗了蛋白的氨基酸残基,这与蛋白氨基酸残基变化的结果一致。

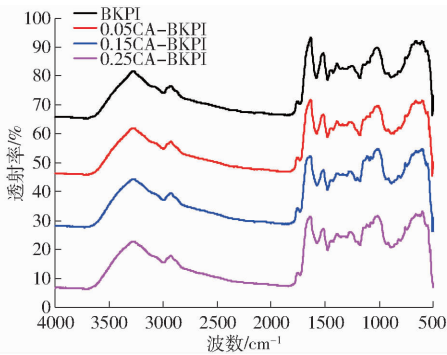


图2 BKPI 与 CA—BKPI 复合物的傅里叶变换红外光谱  
Fig.2 FTIR spectrum of BKPI and CA—BKPI complexes

BKPI 及 CA—BKPI 共价复合物样品的不同二

表1 不同质量浓度 CA—BKPI 复合物二级结构相对含量

Tab.1 Secondary structure of CA—BKPI complexes with different concentrations

样品	$\alpha$ -螺旋	$\beta$ -转角	$\beta$ -折叠	无规则卷曲
BKPI	(17.74 ± 0.23) <sup>a</sup>	(28.51 ± 1.05) <sup>b</sup>	(32.79 ± 0.14) <sup>a</sup>	(20.95 ± 0.26) <sup>a</sup>
0.05CA—BKPI	(15.50 ± 0.33) <sup>b</sup>	(36.55 ± 1.22) <sup>a</sup>	(31.24 ± 0.61) <sup>b</sup>	(16.23 ± 0.15) <sup>b</sup>
0.15CA—BKPI	(14.37 ± 0.12) <sup>c</sup>	(38.22 ± 1.34) <sup>a</sup>	(31.84 ± 0.85) <sup>ab</sup>	(15.55 ± 0.16) <sup>c</sup>
0.25CA—BKPI	(14.07 ± 0.18) <sup>c</sup>	(37.79 ± 1.11) <sup>a</sup>	(31.45 ± 0.34) <sup>b</sup>	(15.67 ± 0.13) <sup>c</sup>

注:同列不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

## 2.4 粒径电位分析

图3为BKPI和CA—BKPI共价复合物的粒径分布,粒径分布可以体现出体系的稳定性,由图可知,共价复合物的粒径主要呈单峰分布,表明所形成的体系较稳定。随着绿原酸浓度的增加,共价复合物的平均粒径减小,BKPI、0.05CA—BKPI、0.15CA—BKPI、0.25CA—BKPI的平均粒径分别为 $(203.4 \pm 10.32)\text{ nm}$ 、 $(180.8 \pm 15.92)\text{ nm}$ 、 $(155.9 \pm 4.7)\text{ nm}$ 、 $(134.9 \pm 2.65)\text{ nm}$ 。文献[26]研究表明,蛋白与多

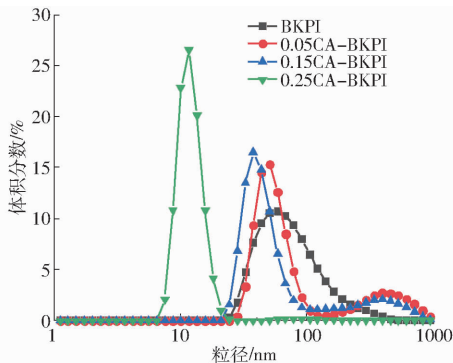


图3 BKPI 与 CA—BKPI 的粒径分布

Fig.3 Particle size distribution of BKPI and CA—BKPI conjugates

级结构相对含量如表1所示,BKPI含有17.74%的 $\alpha$ -螺旋、28.51%的 $\beta$ -转角、32.79%的 $\beta$ -折叠、20.95%的无规则卷曲,不同浓度的多酚反应体系中蛋白的二级结构均发生显著变化,随着多酚的添加, $\alpha$ -螺旋与无规则卷曲相对含量显著降低, $\beta$ -转角相对含量显著增加,样品0.25CA—BKPI二级结构改变最为显著,相比对照BKPI, $\alpha$ -螺旋与无规则卷曲相对含量分别降低到14.07%、15.67%, $\beta$ -转角相对含量增加到37.79%。样品0.25CA—BKPI的荧光强度变化也最为显著,这与荧光的结果相同,表明多酚与蛋白共价结合可以使蛋白解折叠,使得部分蛋白结构展开<sup>[24]</sup>。文献[13]研究了南瓜蛋白和焦性没食子酸的共价结合,蛋白的二级结构 $\alpha$ -螺旋与无规则卷曲相对含量显著降低。 $\alpha$ -螺旋形成和稳定性受蛋白侧链的分子量和电荷状态的影响,另外极性基团或带电基团与氨基酸侧链的连接对 $\beta$ -转角结构的形成具有促进作用,因此,从这一方面也证明了CA—BKPI复合物是共价结合的<sup>[25]</sup>。

酚共价复合后可改变蛋白质性质,复合物的粒径更为均一,蛋白与多酚内部连接更加紧密,本研究与其结果一致。

蛋白与复合物的电位结果显示,未加入绿原酸的蛋白电位为低负电性,电位为 $(-19.5 \pm 1.01)\text{ mV}$ 。随着绿原酸浓度的增加,共价复合物呈现出带有较高的负电性,这表明绿原酸中和了蛋白的正电荷,使蛋白共价结合后呈现出较高的负电性,电位分别为 $(30.7 \pm 3.52)\text{ mV}$ 、 $(32.3 \pm 3.19)\text{ mV}$ 、 $(38.7 \pm 1.74)\text{ mV}$ 。当绿原酸添加量为 $0.25\text{ g}/(100\text{ mL})$ 时,共价复合物带有最强的负电荷,其粒子之间的相互斥力也最强,粒径最小,与粒径分布结果一致。文献[17]研究了大豆蛋白与花青素的共价复合,结果表明,共价复合后蛋白的负电性显著增强,粒径分布均一。

## 2.5 浊度分析

浊度通常用于研究蛋白质或水解产物与酚类化合物之间通过共价或非共价相互作用的复杂行为,浊度的增加是蛋白与多酚交联的重要表现形式<sup>[8]</sup>。从不同浓度的CA改性BKPI溶液的浊度变化结果可知,在600 nm处测定的BKPI、0.05CA—BKPI、



0.15CA - BKPI、0.25CA - BKPI 的浊度分别为 0.07、0.411、0.895、1.138。可以得知,与对照组(BKPI)相比,随着 CA 浓度的增加,浊度显著增强,表明蛋白和多酚发生交联作用<sup>[27]</sup>。文献[8]报道,浊度的增加是由于酚类化合物的加入和蛋白发生交联引起的。文献[28]也表明,CA 可作为一种蛋白质交联剂,介导蛋白进行共价复合,特别是在较高水平的 CA 时。多酚与多肽的巯基或氨基侧链通过共价 C-S 或 C-N 键形成二聚体或共价缀合物,猪血浆蛋白和 CA 之间通过共价相互作用诱导微聚集,从而导致浊度增加。

## 2.6 乳化活性与乳化稳定性分析

乳化活性指数(EAI)与乳化稳定性指数(ESI)分别反映 CA - BKPI 复合物形成油-水界面的能力和形成小液滴的抗应变能力。复合物的乳化性受多种因素的影响,如多酚的结合量、蛋白的柔性等<sup>[29]</sup>。BKPI 与 CA - BKPI 的乳化特性如图 4(图中不同大、小写字母分别表示乳化稳定性指数、乳化活性指数差异显著)所示,随着 CA 浓度的增加,共价复合物的 EAI、ESI 显著增强,由于 CA 与 BKPI 共价结合,蛋白的二级、三级结构发生改变,疏水氨基酸处的环境发生改变,多肽链伸展,使蛋白的亲水亲油性增强,从而降低了油相与水相之间界面张力,形成更稳定的界面膜,增大复合物的乳化性<sup>[6]</sup>。当绿原酸添加量为 0.25 g/(100 mL)时,复合物的 ESI、EAI 与单纯蛋白相比分别增加了 29.06%、72.88%,这与粒径电位的研究结果一致,0.25CA - BKPI 具有较强的负电荷和较小的粒径,从而具有更强的乳化活性与乳化稳定性。然而,其乳化活性较 0.15CA - BKPI 时变化差异不显著,这可能是绿原酸添加量为 0.25 g/(100 mL)时,蛋白接枝较多的亲水性多酚变

得更加亲水,进而改变了油水平衡,降低了其乳化活性。结果与文献[6]研究的一致,蛋白与多酚共价复合可以改变蛋白的结构和表面电荷,从而提高复合物的乳化特性。文献[28]还表明,当绿原酸的浓度在一定范围内持续增加时,猪血浆蛋白疏水性降低,猪血浆蛋白的乳化活性变化不明显,乳化稳定性持续增加。

## 2.7 抗氧化性分析

DPPH 广泛用于评估蛋白质的抗氧化活性。BKPI 的 DPPH 自由基清除活性被测定,对照组(BKPI)的 DPPH 自由基清除活性为 82.57  $\mu\text{mol/g}$ 。随着 CA 添加量的增加,BKPI 的 DPPH 自由基清除活性显著增加,分别为 95.79、142.43、168.95  $\mu\text{mol/g}$  ( $P < 0.05$ )。DPPH 自由基清除活性的增强表明,酚类化合物的羟基在供给氢和电子中起关键作用,导致自由基链反应的终止,从而改善食品质量和安全性<sup>[30]</sup>。因此,结果表明,用 CA 改性 BKPI 可以通过引入羟基提供电子来改善 DPPH 自由基清除活性,从而导致较低程度的氧化。文献[28]发现猪血浆蛋白中添加绿原酸可以提高蛋白的抗氧化性,与本文的结论相一致。

## 3 结论

(1)随着 CA 添加量的增加,复合物的多酚接枝量与浊度增加,游离氨基含量减少,表明共价键(C-N、C-S)的形成,复合物的电位增强,粒径分布变得均匀,溶液的稳定性增强。

(2)FTIR 和荧光光谱法分析表明,CA - BKPI 共价复合物中酪氨酸与色氨酸所处的极性微环境发生改变,发色基团逐渐被猝灭,多肽链伸展从而改变了蛋白质的构象。CA 会导致 BKPI 的  $\alpha$ -螺旋与无规则卷曲结构相对含量降低, $\beta$ -转角结构相对含量增加。 $\beta$ -转角的松散结构使蛋白柔性增加,结构更易发生改变和伸展,进而影响 BKPI 的界面性质,说明 CA 的复合对 BKPI 的界面性质及蛋白的二级结构与构象具有不可忽视的影响。

(3)乳化特性和抗氧化特性分析结果表明,随着 CA 浓度的增加,复合物的乳化性增强。所有样品中,CA 添加量为 0.25 g/(100 mL)时,复合物乳化稳定性最佳,乳液最稳定。同时,DPPH 法表明,CA 与 BKPI 发生共价作用,复合物的抗氧化性随 CA 添加量的增加而增强。由此可见,CA 的添加可以增强蛋白的抗氧化性。

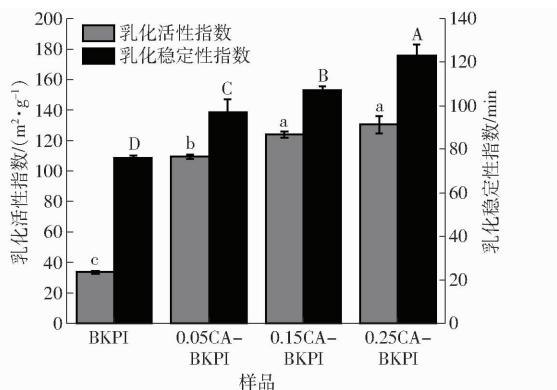


图 4 BKPI 与 CA - BKPI 复合物的乳化活性指数和乳化稳定性指数

Fig. 4 EAI and ESI of BKPI and CA - BKPI conjugates

## 参 考 文 献

- [1] 马文鹏,任海伟. 芸豆蛋白的提取及其营养价值评价[J]. 食品科技, 2013(1): 75 - 79.  
 MA Wenpeng, REN Haiwei. Nutritional value evaluation and extraction of protein isolate from kidney bean[J]. Food Science and Technology, 2013(1): 75 - 79. (in Chinese)

- [2] 冯玉超,王长远,李玉琼,等. 芸豆蛋白与糖基化芸豆蛋白结构与功能特性研究[J]. 中国食品学报,2019,19(7):99-107.  
FENG Yuchao, WANG Changyuan, LI Yuqiong, et al. Studies on the structure and functional characteristics of the kidney bean protein and the modified kidney bean protein[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(7): 99-107. (in Chinese)
- [3] 尹寿伟,唐传核,温其标,等. 微射流处理对芸豆分离蛋白构象和功能特性的影响[J]. 华南理工大学学报(自然科学版),2009,37(10):112-116.  
YI Shouwei, TANG Chuanhe, WEN Qibiao, et al. Effect of micro-fluidization treatment on conformational and functional properties of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolates[J]. Journal of South China University of Technology (Natural Science Edition), 2009, 37(10): 112-116. (in Chinese)
- [4] MOURE A, DOMÍNGUEZ H, PARAJÓ J C. Antioxidant properties of ultrafiltration-recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates[J]. Process Biochemistry, 2006, 41(2): 447-456.
- [5] CAO Y, XIONG Y L. Chlorogenic acid-mediated gel formation of oxidatively stressed myofibrillar protein[J]. Food Chemistry, 2015, 180: 235-243.
- [6] JIA Z, ZHENG M, TAO F, et al. Effect of covalent modification by (-)-epigallocatechin-3-gallate on physicochemical and functional properties of whey protein isolate[J]. LWT—Food Science and Technology, 2016, 66: 305-310.
- [7] AEWSIRI T, BENJAKUL S, VISESSANGUAN W. Emulsifying property and antioxidative activity of cuttle fish skin gelatin modified with oxidized linoleic acid and oxidized tannic acid[J]. Food Bioprocess Technology, 2013, 6(4): 870-881.
- [8] AMJADKHANSAHEB B, SOOTAWAT B. Effect of oxidised tannic acid on the gel properties of mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) mince and surimi prepared by different washing processes[J]. Food Hydrocolloids, 2009, 23(7): 1693-1701.
- [9] LOI M, QUINTIERI L, FANELLI F, et al. Application of a recombinant laccase-chlorogenic acid system in protein crosslink and antioxidant properties of the curd [J]. Food Research International, 2018, 106: 763-770.
- [10] LIU F, WANG D, SUN C, et al. Utilization of interfacial engineering to improve physicochemical stability of beta-carotene emulsions: multilayer coatings formed using protein and protein-polyphenol conjugates[J]. Food Chemistry, 2016, 205: 129-139.
- [11] MEINLSCHMIDT P, SCHWEIGGERT-WEISZ U, BRODE V, et al. Enzyme assisted degradation of potential soy protein allergens with special emphasis on the technofunctionality and the avoidance of a bitter taste formation [J]. LWT—Food Science and Technology, 2016, 68: 707-716.
- [12] RAWEL D, HARSHADRAI M, ROHN S, et al. Structural changes induced in bovine serum albumin by covalent attachment of chlorogenic acid[J]. Food Chemistry, 2002, 78(4): 443-455.
- [13] YANG C, WANG B, WANG J, et al. Effect of pyrogallol (1,2,3-benzenetriol) polyphenol-protein covalent conjugation reaction degree on structure and antioxidant properties of pumpkin (*Cucurbita sp.*) seed protein isolate[J]. LWT—Food Science and Technology, 2019, 109: 443-449.
- [14] ZHANG Y Z, ZHOU B, LIU Y X, et al. Fluorescence study on the interaction of bovine serum albumin with p-aminazobenzene[J]. Journal of Fluorescence, 2008, 18(1): 109-118.
- [15] WEI Y, LIU F, XU C, et al. Molecular interaction between (-)-epigallocatechin-3-gallate and bovine lactoferrin using multi-spectroscopic method and isothermal titration calorimetry[J]. Food Research International, 2014, 64: 141-149.
- [16] VIGOLSM M S, GOMEZ R G, LLOSA R A. Spectrophotometric assay using o-phthalaldehyde for determination of reactive lysine in dairy products[J]. Food Chemistry, 1992, 44(5): 363-365.
- [17] SUI X, SUN H, QI B, et al. Functional and conformational changes to soy proteins accompanying anthocyanins: focus on covalent and non-covalent interactions[J]. Food Chemistry, 2018, 245: 871-878.
- [18] WANG Y H, WAN Z L, YANG X Q, et al. Colloidal complexation of zein hydrolysate with tannic acid: constructing peptides-based nanoemulsions for alga oil delivery[J]. Food Hydrocolloids, 2016, 54: 40-48.
- [19] BINSAN W, BENJAKUL S, VISESSANGUAN W, et al. Antioxidative activity of mungoong, an extract paste, from the cephalothorax of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. Food Chemistry, 2008, 106(1): 185-193.
- [20] LIU H, HAN G, ZHANG H, et al. Improving the physical and oxidative stability of emulsions based on the interfacial electrostatic effects between porcine bone protein hydrolysates and porcine bone protein hydrolysate-rutin conjugates[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 94: 418-427.
- [21] LI Y, LIU B, JIANG L, et al. Interaction of soybean protein isolate and phosphatidylcholine in nanoemulsions: a fluorescence analysis[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 87: 814-829.
- [22] DING F, LIU W, LI N, et al. Complex of nicosulfuron with human serum albumin: a biophysical study [J]. Journal of Molecular Structure, 2010, 975(1-3): 256-264.
- [23] LIU F, SUN C, YANG W, et al. Structural characterization and functional evaluation of lactoferrin-polyphenol conjugates formed by free-radical graft copolymerization[J]. RSC Advances, 2015, 5(20): 15641-15651.
- [24] HASNI I, BOURASSA P, HAMDANI S, et al. Interaction of milk  $\alpha$ - and  $\beta$ -caseins with tea polyphenols [J]. Food Chemistry, 2011, 126: 630-639.
- [25] SHAO Q, WEI H, GAO Y Q, et al. Effects of turn stability and side-chain hydrophobicity on the folding of  $\beta$ -structures [J]. Journal of Molecular Biology, 2010, 402(3): 595-609.
- [26] YUKSEL Z, AVCI E, ERDEM Y K. Characterization of binding interactions between green tea flavanoids and milk proteins [J]. Food Chemistry, 2010, 121(2): 450-456.
- [27] 刘蕾,陈历水,马莺,等. EGCG对 $\beta$ -胡萝卜素乳液物理稳定性的影响[J/OL]. 农业机械学报, 2019, 50(2): 340-349.  
LIU Lei, CHEN Lishui, MA Ying, et al. Effect of EGCG on physical stability of  $\beta$ -carotene encapsulated in oil-in-water emulsions [J/OL]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2019, 50(2): 340-349. [http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view\\_abstract.aspx?file\\_no=20190239&flag=1](http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?file_no=20190239&flag=1). DOI:10.6041/j.issn.1000-1298.2019.02.039. (in Chinese)
- [28] CHEN Y, JIANG S, CHEN Q, et al. Antioxidant activities and emulsifying properties of porcine plasma protein hydrolysates modified by oxidized tannic acid and oxidized chlorogenic acid[J]. Process Biochemistry, 2019, 79: 105-113.
- [29] KITTIPHATTANABAWON P, BENJAKUL S, VISESSANGUAN W, et al. Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*) [J]. Food Chemistry, 2005, 89(3): 363-372.
- [30] LIU Q, KONG B, XIONG Y L, et al. Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis[J]. Food Chemistry, 2010, 118(2): 403-410.