

小麦醇溶蛋白与茶皂苷的相互作用 及其对甘油基泡沫性质的影响

刘雨阳, 杨晓泉

(华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要: 本研究通过调控大分子-小分子相互作用构建界面主导的食品泡沫体系, 首次利用食品级甘油作为绿色共溶剂溶解疏水性小麦醇溶蛋白和两亲性小分子茶皂苷, 进一步研究和评估了蛋白-茶皂苷复合体系的相互作用及其泡沫形成和稳定能力。内源荧光光谱分析荧光猝灭参数为 $1.345 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$, 其远远小于最大动态猝灭常数 ($2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$), 说明由茶皂苷介导的动态猝灭可促使蛋白与茶皂苷通过非特异性疏水相互作用形成复合体系。通过界面动态吸附结果可知, 与单纯的小麦醇溶蛋白或茶皂苷相比, 蛋白-茶皂苷复合体系在适宜的茶皂苷浓度 (0.5%~0.75%) 下可通过两者在气-甘油界面的相互作用增强界面活性及覆盖面积。激光共聚焦图片显示在上述茶皂苷浓度下小麦醇溶蛋白富集在气泡表面, 可形成尺度更小的泡沫, 最终提高小麦醇溶蛋白-茶皂苷复合体系的起泡能力和泡沫稳定性。

关键词: 小麦醇溶蛋白; 茶皂苷; 相互作用; 泡沫

文章编号: 1673-9078(2019)04-56-60

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.4.009

Interaction between Wheat Gliadin and Tea Saponin and Its Effect on the Properties of Glycerol-based Foam

LIU Yu-yang, YANG Xiao-quan

(School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: In this study, we prepared an interface-dominated food foam system *via* regulating the interactions between macromolecules and small molecules. For the first time, food-grade glycerol was used as a green co-solvent to dissolve the hydrophobic gliadin and amphiphilic small-molecule tea saponins (TS). The interaction between gliadin and tea saponin as well as its foam-forming ability and stability were further evaluated. Intrinsic fluorescence spectroscopy measurements revealed that the fluorescence quenching parameter was $1.345 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$, which was much smaller than the maximum dynamic quenching constant ($2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$). These findings indicated that TS-mediated dynamic quenching enabled the formation of a complex system *via* the non-specific hydrophobic interactions prior to the formation of foam. The results of dynamic adsorption at the interface showed that at a suitable TS concentration (0.5%~0.75%), the gliadin-TS interaction could increase the interfacial activity and coverage area, compared with gliadin or tea saponin. Confocal laser scanning microscopy showed that at the above-mentioned TS concentrations, gliadin was accumulated on the foam surface, leading to a foam containing small-sized air bubbles, and eventually a gliadin-TS system with foam-forming ability and stability.

Key words: gliadin; tea saponin; interaction; foam

泡沫常见于我们的食品中, 比如啤酒、冰淇淋和奶油等。泡沫在贮藏过程中通常会发生粗化、排水及聚结行为, 从而导致不稳定^[1]。已经有研究表明泡沫等多相食品体系的形成及稳定很大程度上决定于体系中表面活性物质在气-水界面的行为表现^[2]。蛋白

收稿日期: 2018-08-20

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31771923)

作者简介: 刘雨阳 (1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 植物蛋白工程

通讯作者: 杨晓泉 (1965-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 植物蛋白质的开发与利用

质和小分子等表面活性剂常在泡沫、乳液等多相食品胶体体系的形成和稳定过程中有着极关键的作用^[3]。

小麦醇溶蛋白 (Gliadin) 作为小麦蛋白重要的组成部分, 在面团发酵和焙烤过程中, 其对于形成疏松多孔的固态泡沫网络结构具有十分重要的作用, 表明具有良好的界面活性^[4]。但由于 Gliadin 极强的疏水特性, 通常采用反溶剂方法制备水溶性蛋白胶体颗粒用于水相食品体系中, 但复杂的制备过程导致其无法在食品工业中广泛应用^[5]。可食用甘油广泛应用于饮料、果汁、酒及食品配料中, 可改善其风味, 味道, 颜色

或提高产品的货架寿命。甘油可以降低油-水或气-水界面张力,相比于纯水相体系,可形成功能性质更好的胶体体系^[6]。同时食品级甘油作为一种绿色溶剂已被证实可以溶解疏水性大分子或小分子活性物质^[7]。茶皂苷(TS)是一种酸性植物皂甙,分子结构主要由亲水的糖体与疏水的五环三萜的配基组成。TS作为两亲性小分子吸附到油-水或气-水界面,降低表面张力,是一种天然的小分子非离子型表面活性剂^[8]。

基于两亲性分子结构, Gliadin 和 TS 作为表面活性剂均能吸附到两相界面降低其界面张力。蛋白质-小分子表面活性剂复合体系制备泡沫时,经常会出现协同或拮抗效果,这主要归因于两者不同的界面稳定机制以及在体相及两相界面发生的相互作用^[9]。因此,本文采用甘油作为 Gliadin 和 TS 共溶剂,制备 Gliadin-TS 复合体系及其稳定的泡沫,通过控制 TS 的添加量定向调控蛋白-皂苷相互作用,从而更好地理解 Gliadin-TS 之间的相互作用与泡沫等界面主导食品体系的形成和稳定性之间可能存在的内在关系。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

谷朊粉(蛋白质含量 74.7%), Bob's Red Mill 天然食品公司;茶皂苷(TS,纯度 98%以上),西安一禾生物技术有限公司;食品级甘油(纯度 99%以上),马来西亚宝洁公司;尼罗蓝, Sigma-Aldrich 公司。其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

电热恒温水浴锅,江苏金坛市宏华仪器有限公司;打泡器,日本 HARIO 公司;Langmuir-Blodgett 膜天平,芬兰 KSV 公司;激光共聚焦显微镜,德国 Leica 公司;F7000 荧光分光光度计,日本 Hitachi 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 Gliadin 的制备

以谷朊粉作为原料,首先准确称取 50 g 谷朊粉,在室温环境下,将其缓慢加入搅拌过程中的 500 mL 70% (V/V) 的乙醇水溶液中,用电子搅拌器不断搅拌 2 h 使谷朊粉充分溶解分散。随后将谷朊粉溶液用离心机离心分离提取 Gliadin,在 8000 r/min 转速下离心 20 min,去除沉淀(主要为小麦麦谷蛋白)保留上清溶液(Gliadin),后用透析袋对上清液进行透析处理。第一天用蒸馏水进行透析,第二天换用 0.5% (V/V) 的冰醋酸进行透析,最后一天再次用蒸馏水透析。对透

析完后所得的溶液进行冷冻干燥 24 h,干燥后得到的 Gliadin 放入密封袋,置于干燥柜中备用。

1.3.2 Gliadin-TS 复合体系的制备

首先将 1 g Gliadin 粉末分散到 100 g 甘油溶液,在 80 °C 下搅拌 3 min 充分溶解,冷却至 25 °C 中仍保持稳定透明的溶液状态。在 25 °C 条件下,在 Gliadin 甘油溶液中加入不同浓度的 TS (0、0.1%、0.25%、0.5%、0.75%、1%, m/m) 并充分搅拌 1 h 形成 Gliadin-TS 复合体系。同时在 25 °C 条件下制备 1% TS 甘油溶液作为对照组。

1.3.3 内源荧光光谱分析

为探究 TS 的结合对 Gliadin 内源荧光的影响。设定 Gliadin 的浓度为 1 μg/g,改变 TS 浓度为 0 到 30 μg/g,制备不同 TS 浓度的复合体系,并用 F7000 荧光分光光度计检测其吸光值。检测条件是:激发波长 280 nm;发射波长 290 nm 到 500 nm。蛋白内源荧光猝灭的数据分析,依据 Stern-Volmer 等进行:

$$\frac{F_0}{(F_0 - F)} = \frac{1}{(F_a K_a [-Q])} + \frac{1}{f_a}$$

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q]$$

其中: F_0 和 F 分别是不添加 TS 和添加 TS 时样品的荧光强度; $[Q]$ 是 TS 的浓度; K_{sv} 是 Stern-Volmer 猝灭常量; K_q 是双分子猝灭速率常量; τ_0 是在没有猝灭剂情况下的荧光寿命值; F_a 是可及荧光分数; K_a 是荧光探针的有效猝灭常量,该常量也被认为是猝灭剂和猝灭受体之间的结合常量。

1.3.4 界面动态吸附

采用的 LB 膜天平槽面积为 401.76 cm²,配有一对滑障用于压缩,并通过 Willhelmy 铂金吊片(周长为 39.44 mm)检测膜压值。首先,依次用纯水、无水乙醇清洗 Langmuir 槽及配件,自然晾干安装完之后,倒入 250 g 空白甘油溶液到 Langmuir 槽作为亚相,悬挂铂金吊片,并通过压缩滑障检测亚相气-甘油界面的膜压值,当膜压值低于 0.5 mN/m 时,表明亚相表面的灰尘不影响测定结果。然后取分散好的 30 μg 样品溶液用进样器小心分散于界面,铺展的样品平衡 30 min 后,滑障以 8 mm/min 的速度压缩。计算机自动记录表面压(Π)、时间(t)的数据。其中 $\Pi = \gamma_w - \gamma$, γ_w 是纯甘油的界面张力。

1.3.5 起泡性和泡沫稳定性的测定

采用手持式低速剪切气泡仪制备泡沫。将蛋白浓度为 1% 的 Gliadin-TS 复合体系液体置于的烧杯,然后在室温下(25 °C)剪切 1 min 后,通过录像机记录不同时间点的泡沫和析出液体的体积。搅拌完成后的初始泡沫高度用来反映样品的起泡能力,通过观察泡

沫体积的衰减来衡量泡沫的稳定性。

1.3.6 泡沫的微观结构观察

采用激光共聚焦 (CLSM) 观察泡沫的微观结构。用尼罗蓝 (激发波长为 633 nm) 染 Gliadin。将 600 μL 1 mg/mL 的尼罗蓝溶液加入 15 g Gliadin 浓度为 1% 的复合体系, 并充分混合均匀。采用 1.3.5 的方法和步骤制备泡沫, 并迅速将泡沫转移到载玻片上用激光共聚焦观察。

1.4 数据处理分析

使用 SPSS Inc 公司的 SPSS Statistics 21.0 软件对数据进行整理与统计分析, 使用 OriginLab Inc 公司的 Origin 21.0 软件作图。测得值以“平均数 $\pm$ 标准误 (S.E.)”表示, 方差分析采用邓肯氏新复级差检验法 (Duncan's Multiple Ranger Test, DMRT)。

2 结果与讨论

2.1 Gliadin-TS 复合溶液

Gliadin 作为典型的疏水性醇溶蛋白, 通常采用反溶剂方法制备水溶性胶体颗粒用于水相食品体系中, 但是由于过程繁琐, 需要去除乙醇等步骤无法在食品工业中大规模利用。本研究首次发现食品级热甘油可作为溶剂一步法溶解 Gliadin。由图 1 可知, 将溶解后的 Gliadin 甘油溶液冷却到 25 $^{\circ}\text{C}$, 溶液仍可以保持澄清透明状态, Gliadin 在常温状态下稳定存在表明甘油作为良好的溶剂可以在常温环境下生产蛋白基食品产品, 有助于其在食品工业中更为广泛的利用。TS 由于良好的亲水性, 也能很好的溶解在甘油体系中。TS 呈淡黄色, 随着 TS 添加量的提高, 复合体系的颜色也逐渐显黄色, 但仍能保持透明澄清的溶液状态。

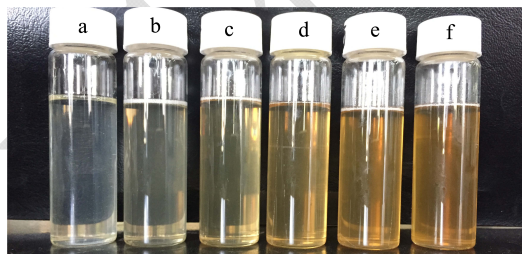


图 1 Gliadin 以及各 TS 浓度下 Gliadin-TS 复合体系的甘油溶液

Fig.1 Gliadin and Gliadin-TS with various TS concentration singlycerol solution

注: a-f 茶皂素浓度分别为 0、0.1%、0.25%、0.5%、0.75%、1%, Gliadin 浓度恒为 1%。

2.2 Gliadin 与 TS 的相互作用

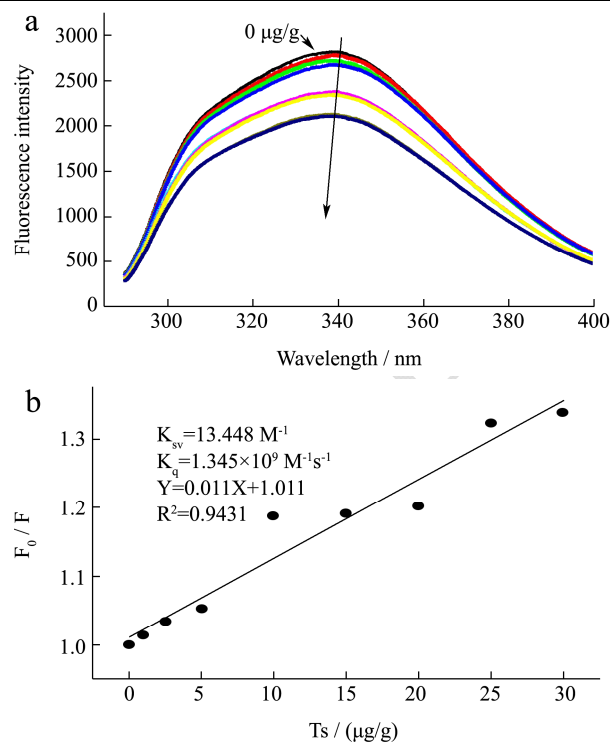


图 2 小麦醇溶蛋白 (1 $\mu\text{g/g}$) 在不同 TS 浓度 (0~30 $\mu\text{g/g}$) 下的荧光强度及 Stern-Volmer 荧光猝灭常量和曲线

Fig.2 Intrinsic fluorescence of gliadin (1 $\mu\text{g/g}$) in the presence of different concentrations of TS (0~30 $\mu\text{g/g}$) and the Stern-Volmer plots of fluorescence quenching of gliadin in the presence of TS

注: a: 小麦醇溶蛋白的荧光强度; b: Stern-Volmer 荧光猝灭常量和曲线。

图 2a 展示的是内源荧光光谱分析可用于反应蛋白质分子内部荧光基团的微环境, 进而间接反映蛋白质的结构变化。浓度为 1 $\mu\text{g/g}$ 的 Gliadin 在不同 TS 浓度 (0~30 $\mu\text{g/g}$) 作用下的荧光发射光谱。单独的 Gliadin 在波长 280 nm 的激发下展示出荧光发射峰约在 335 nm 处。当 TS 添加量为 1~5 $\mu\text{g/g}$ 时, Gliadin 的荧光强度没有发生明显变化, 随后随着 TS 添加量的增加 Gliadin 的发射波峰值分别出现了锐减, 说明了 TS 与 Gliadin 发生了结合, 屏蔽了部分的色氨酸, 使得蛋白内源性荧光出现衰减。此外, 随着 TS 的添加, Gliadin 出现波峰的位置几乎没有发生偏移, 说明了 Gliadin 中色氨酸的介质环境没有改变, 推测 TS 分子可能通过疏水相互作用结合到 Gliadin 中部分或全部的色氨酸残基上。Gliadin 荧光猝灭实验的结果证明 TS 分子能够结合到 Gliadin 中, 导致荧光猝灭现象。图 2b 计算了一系列荧光猝灭的参数值, 由于回归方程斜率 k_q ($1.345 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) 远远小于最大动态猝灭常量 ($2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), 说明了由 TS 介导的荧光猝灭属于动态猝灭, 这之前相关文献报道的大豆球蛋白-甜菊

糖苷相互作用类似,均属于典型的蛋白-皂苷相互作用体系^[10,11]。

2.3 界面动力学行为

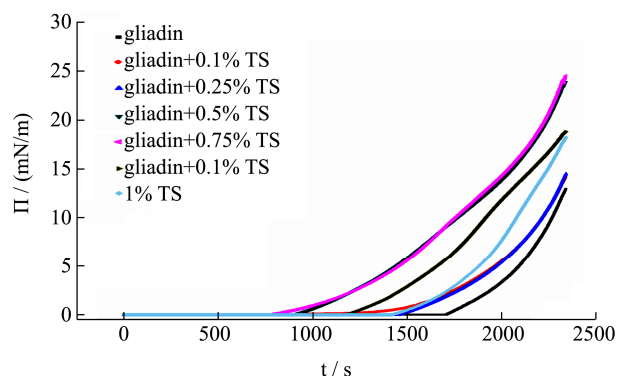


图3 Gliadin、TS 和 Gliadin-TS 复合体系在气-甘油界面的面压-时间曲线

Fig.3 Surface pressure-compression time of the air-glycerol surfaces stabilized by pure gliadin, TS, and mixtures of gliadin with various amounts of TS (0.1%~1%)

注: Gliadin 浓度恒为 0.1%。

表面压在 Langmuir 膜压缩过程变化趋势一般可分为三种状态:初始的气态膜状态时,分子气-水界面上处于分散状态,分子之间相互作用较小,表面压非常低(<0.5 mN/m)基本保持不变;当变为液态膜状态时,随压缩过程分子平均面积开始变小,分子在界面处接触产生相互作用,表面压开始上升;最后当固态膜状态时,随着进一步的压缩,分子平均面积达到最小导致更强的相互作用,表面压急剧增高,分子在界面处形成固体晶格,呈现紧密堆积结构^[12]。从 Π -t 等温线(图3)可知,与单独 Gliadin 相比,复合体系具有相对较高的表面压力。尤其在 TS 浓度在 0.5%~0.75%,复合体系的表面压力均高于同单独 Gliadin 和 TS 的值,表明 Gliadin-TS 体系在界面上形成了混合吸附层(Mixed layer)。此外,当 TS 浓度增加到 1%时,表面压力又开始下降,复合体系的表面张力值与单独 1% TS 的值几乎保持一致,这表明此时的界面层完全由 TS 主导。这可能是由于相对于已经形成的蛋白质界面层,添加表面活性剂 TS 也会导致界面上的蛋白质被逐步取代,当 TS 的浓度高于一定值时,原本的复合界面层将会完全被小分子表面活性剂覆盖^[13]。具体对于本研究来说,添加的 TS 会逐渐吸附到 Gliadin 在界面网络上所留有的空隙处,随着 TS 添加量的提高,表面活性剂区域不断形成,这容易导致界面蛋白网络被破裂成小的碎片,最终形成界面替代现象, Gliadin 完全被 TS 挤压到体相,该过程的主要驱动力即为蛋白质-表面活性剂间的非特异性疏水相互

作用,这与图2所述的 Gliadin-TS 通过疏水相互作用是相一致的。

2.4 起泡性和泡沫稳定性



图4 泡沫在放置 0 d、5 d、10 d 的照片

Fig.4 Images of foams taken immediately, 5 days, and 10 days after whipping

注: a: 0 d; b: 5 d; c: 10 d。由左到右依次为: TS (1%), gliadin (1%), gliadin-TS 复合体系(TS 浓度为 0.1%、0.25%、0.5%、0.75%、1%, gliadin 为 1%)。

由图4可知,相比于 Gliadin 或 TS,复合体系的起泡性略有提高,且随着 TS 浓度的提高,起泡性越来越好,这可能归功于增加表面活性物质在界面上的吸附。但在放置 5 d 后,单独 TS 稳定的泡沫已完全消失,而 Gliadin 和复合体系相对较为稳定,这是由于小分子表面活性剂稳定的泡沫体系大多是不稳定的,较易发生聚合。但放置时间延长至 10 d, Gliadin 也已完全消失,当 TS 的浓度为 0.5%~0.75%时,复合体系稳定的泡沫仍能维持相对高的泡沫高度,这归功于其具有最高的界面压,形成坚固的混合界面吸附层。但是,进一步增加表面活性剂的浓度(1%)反而降低泡沫稳定性,这与图3的表面压力的研究结果是一致的。为了进一步评估复合体系的泡沫稳定性,我们测定了泡沫形成之后的初始起泡高度和泡沫稳定性。如图4B所示,在 0 min 时,初始起泡高度差异不大,随 TS 的添加量增加而略有增加,当 TS 添加量为 1%时复合体系可达最大起泡高度 33.65 mL;但随着放置时间的

增加可以明显看出添加适量 TS 能显著改善泡沫的稳定性,复合体系稳定的泡沫的消失速率要明显小于单独 TS 或 Gliadin 稳定的泡沫。当 TS 浓度为 0.75% 时,复合体系稳定的泡沫的消失速率最低,在放置到 12960 min 后,起泡高度仍可以保持到 10.5 mL,而 TS 或 Gliadin 稳定的泡沫高度则接近于 0 mL。总之,虽然 TS 或 Gliadin 初始起泡高度和复合体系相似,但其稳定性远远小于复合体系。植物蛋白基水相泡沫体系通常只能维持 1~2 d 的稳定性,而对于本研究而言,甘油体系中的蛋白基泡沫稳定性远远高于先前文献中所报道的水相食品泡沫体系,通常这可能是由于甘油可以降低油-水或气-水界面张力,相比于纯水相体系,可形成功能性质更好的胶体体系。复合体系形成的界面可能有效地阻止气泡粗化、聚合等失稳现象的发生,这主要是由于高表面活性的蛋白质-表面活性剂复合体系 (Gliadin-TS) 的形成。

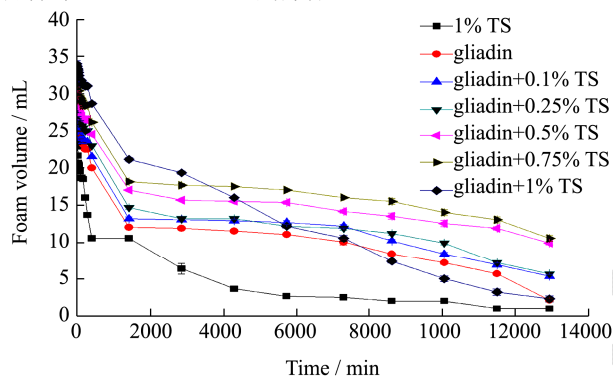


图5 泡沫体积随时间的变化

Fig.5 Foam volume versus time obtained from the solutions

2.5 泡沫的微观结构

作为蛋白基稳定的气-甘油界面食品泡沫体系,所以有必要观察蛋白在气泡膜的吸附积累情况。泡沫在制备后迅速采用 CLSM 方法观察,尼罗蓝为蛋白的染色剂,结果如图 6 所示,其中图中用红色表示蛋白。在所有样品中都发现气泡的界面处积累有蛋白。单独 Gliadin 形成的气泡具有较大的起始尺寸,且为多面体形状,说明单独 Gliadin 的起泡能力是非常低的,对于含有 TS 浓度为 0.1%~0.25% 的复合体系稳定的泡沫来说,只有少量的 Gliadin 可以在气泡界面上观察到,导致形成大的气泡尺度。当 TS 浓度增大到 0.5%~0.75% 时,有更多的蛋白可以在气泡界面上观察到,其形成的气泡的尺寸更小且周围液体膜更厚。当 TS 浓度进一步增加到 1%,气泡的尺度又开始变大,在界面处的红色颜色变浅,液体膜变薄。这一微观结构现象也与之前的结论是相一致的。

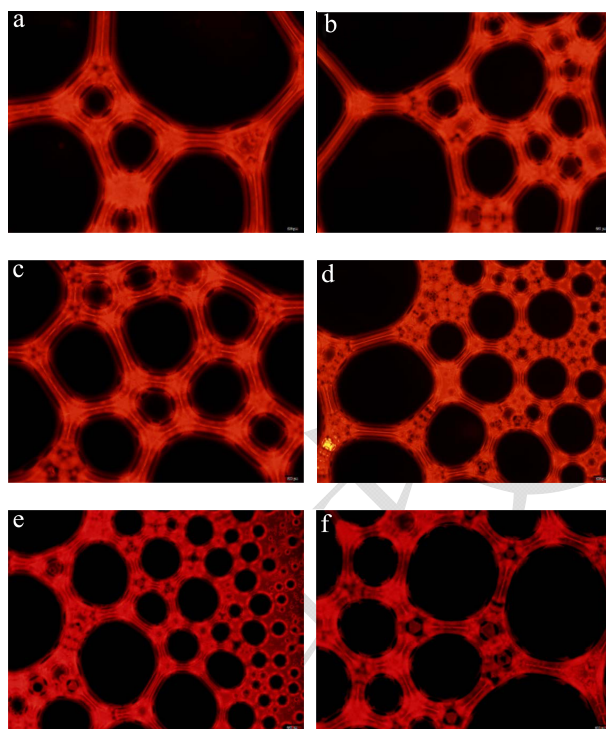


图6 Gliadin 及 Gliadin-TS 复合体系稳定的泡沫的 CLSM 图

Fig.6 CLSM images of the foams stabilized by gliadin or gliadin-TS

注: a: Gliadin; b~f: Gliadin-TS (TS, 0.1%、0.25%、0.5%、0.75%、1%)。

3 结论

本研究利用食品级绿色溶剂甘油一步法溶解 Gliadin 和 TS。泡沫形成前,在体相甘油溶液中蛋白与皂苷通过疏水相互作用驱动其在界面产生界面协同作用,在 TS 添加量为 0.5%~0.75%,可增强 Gliadin-TS 复合体系的表面压力,制备出起泡性和泡沫稳定性都十分出色的蛋白基食品泡沫体系。这表明该体系具备作为天然起泡剂配料应用于食品工业的能力。

参考文献

- [1] Maldonado-Valderrama J, Patino J M R. Interfacial rheology of protein-surfactant mixtures [J]. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2010, 15(4): 271-282
- [2] Dickinson E. Structuring of colloidal particles at interfaces and the relationship to food emulsion and foam stability [J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2015, 449: 38-45
- [3] Pugnali L A, Dickinson E, Ettelaie R, et al. Competitive adsorption of proteins and low-molecular-weight surfactants: computer simulation and microscopic imaging [J]. Advances in Colloid and Interface Science, 2004, 107(1): 27-49

(下转第 181 页)