

不同溶剂中玉米醇溶蛋白的聚集状态和结构性质

赖婵娟¹, 吴磊燕¹, 胡林芳¹, 涂瑾¹, 董武辉²

(1. 江西农业大学食品科学与工程学院, 江西南昌 330000) (2. 广东佳焙食品股份有限公司, 广东东莞 523000)

摘要: 本文采用紫外光谱 (UV)、傅里叶红外光谱 (FT-IR)、荧光光谱和扫描电镜 (SEM) 等技术研究不同溶解环境下 (甲醇、乙醇、异丙醇、乙酸和丙酮) zein 蛋白的溶解、聚集和结构性质, 用静态接触角研究 zein 蛋白膜的表面疏水性。结果显示 Zein 在 100% 乙酸和 80% 乙醇和异丙醇溶液中呈现出良好的溶解状态和较高的透光率; 其次, 在 70% 乙酸溶液中粒径最大, 为 5230.16 nm; 在 80% 乙醇溶液中的粒径最小, 为 25.52 nm。异丙醇使 zein 表现出强荧光吸收。80% 乙酸和乙醇溶解的 zein 蛋白与容器接触一侧的接触角为 88.90° 和 86.60°, 表现出中性润湿性, 适合稳定油水界面; 从 80% 甲醇溶液中形成的蛋白膜的空气侧接触角最大, 为 72.10°。综上分析表明, 溶剂浓度差异影响蛋白质与水的相互作用力导致蛋白聚集程度不同。此外, 溶剂极性和电负性差异通过影响分子间疏水相互作用和氢键以及二硫键的形成, 进而影响蛋白粒径、表面疏水性和空间构象。

关键词: 玉米醇溶蛋白; 溶解; 聚集; 有机溶剂; 结构性质

文章编号: 1673-9078(2021)06-115-123

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.6.0258

Aggregation State and Structural Properties of Zein in Different Solvents

LAI Chan-juan¹, WU Lei-yan¹, HU Lin-fang¹, TU Jin¹, DONG Wu-hui²

(1.College of Food Science and Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330000, China)

(2.Guangdong Jiabei Food Stock Corporation, Dongguan 523000, China)

Abstract: The dissolution, aggregation, and structural properties of zein in different solvents (methanol, ethanol, isopropanol, acetic acid, and acetone) were studied using ultraviolet spectroscopy, Fourier-transform infrared spectroscopy, fluorescence spectroscopy, and scanning electron microscopy. The surface hydrophobicity of the zein protein film was determined by static contact angle measurements. Zein showed good dissolution in 100% acetic acid, 80% ethanol, and isopropanol solutions, and the resulting solutions exhibited high light transmittance. A maximum particle size of 5230.16 nm and a minimum particle size of 25.52 nm were obtained when zein was dissolved in 70% acetic acid and 80% ethanol solutions, respectively. Zein dissolved in isopropanol showed high fluorescence absorption. Zein dissolved in 80% acetic acid and ethanol solutions showed contact angles of 88.90° and 86.60°, respectively, with the containers, suggesting neutral wettability and suitability of the solutions for stabilizing oil-water interfaces. The air-side contact angle of the zein film formed in 80% methanol solution was the largest (72.10°). These results revealed that the solvent concentrations affected the water-protein interactions, thereby resulting in different aggregation degrees of the proteins. In addition, differences in the solvent polarity and electronegativity also affected the particle size, surface hydrophobicity, and spatial conformation of the protein by changing the hydrophobic interactions between the molecules and formation of hydrogen and disulfide bonds.

Key words: zein; dissolution; aggregation; organic solvent; structural properties

引文格式:

赖婵娟, 吴磊燕, 胡林芳, 等. 不同溶剂中玉米醇溶蛋白的聚集状态和结构性质[J]. 现代食品科技, 2021, 37(6): 115-123

LAI Chan-juan, WU Lei-yan, HU Lin-fang, et al. Aggregation state and structural properties of zein in different solvents [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(6): 115-123

玉米醇溶蛋白 (zein) 是玉米中的贮藏蛋白, 非极性氨基酸含量高^[1]。zein 不溶于水, 可溶于醇的水溶液、强酸 (pH≤4)、强碱 (pH≥11、高浓度的尿素或阴离子表面活性剂溶液中^[2], 温度高于溶剂的沸点

收稿日期: 2021-03-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31660481; 32060583)

作者简介: 赖婵娟 (1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 蛋白质溶液

通讯作者: 吴磊燕 (1973-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 蛋白界面

时, 玉米醇溶蛋白能溶于高浓度的乙醇甚至无水乙醇溶液^[3]。这说明溶剂环境的物理和化学性质影响蛋白质的溶解性, 同时, 也会影响其折叠和动力学变化^[4], 促进蛋白质动态重排和必要的结构, 使构象转变, 进行纤维聚集或无定形聚集^[5], 最终在溶液中形成微球、纳米颗粒。这种蛋白质的聚集方式也是影响 Pickering 乳液稳定的关键因素。同样, zein 在溶液中也经历聚集这个复杂过程, 大部分情况是先自组装成 β -sheet 为主的

二级结构, 随着依靠各种化学键进行盘曲、折叠、螺旋, 最终形成螺旋结构纤维聚集体^[6]。当环境改变, pH 处于中性或靠近蛋白质等电点, 或在高离子强度条件下, 蛋白质分子表面的电荷被中和或被屏蔽, 疏水相互作用占主导地位, 蛋白就趋于形成无定形聚集^[7]。这种溶剂或蛋白环境改变, 对蛋白质的构象、状态、聚集形貌有重要的影响最后决定了宏观的蛋白颗粒或膜的性质, 如纳米颗粒的通透性和蛋白膜的机械性质^[8]。

目前, 国内外对 zein 的研究集中在蛋白改性、生物膜、微胶囊壁材、纳米粒子和 Pickering 乳液等方面的制备和应用^[9-12]。通过改性去改变 zein 的溶解特性, 为开发其应用潜力和应用领域^[13]。特别地, zein 因其独特的自组装特性广泛应用于生物活性物质的传递系统及 Pickering 乳液等体系, 而其在溶液中的状态和性质影响这些体系的性能。

从上可知, 研究蛋白在溶液中的性质至关重要, 而溶液中溶剂决定了蛋白所处的环境和状态, 对蛋白折叠和展开构象有重要影响。本文选用甲醇、乙醇、异丙醇、甲酸和丙酮五种不同极性的有机溶剂水溶液作为玉米醇溶蛋白的溶解环境, 研究这些有机溶剂对玉米醇溶蛋白溶解、聚集特性和结构等性能的影响, 以期对 zein 的后续研究及应用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 原料及设备

1.1.1 原料

玉米醇溶蛋白粉(纯度≥98%), 北京索莱宝科技有限公司; 8-苯胺-1-萘磺酸(ANS), 上海阿拉丁试剂有限公司; 其他化学试剂(分析纯)均从西陇科学股份有限公司购买。

1.1.2 主要仪器设备

756PC UV 紫外可见分光光度计, 天津瑞普生物技术股份有限公司; ColorQuest XE 色差分析仪, 美国 HunterLab 公司; Nano-ZS 纳米粒度仪, 英国 Malvern Panalytical 公司; F-9700 荧光分光光度计, 日本 Hitachi Corp 公司; FTIR-7600 傅里叶变换红外光谱仪, 澳洲 Lambda 公司; JSM-6490LV 扫描电子显微镜, 日本 JEOL 公司; OSA 100 界面分析仪, 北京东方德菲仪器有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 溶液透光率的测定

当玉米醇溶蛋白溶解时, 可通过测定其溶液的透光率来研究溶液浊度从而研究玉米醇溶蛋白在几种有

机溶剂中的溶解及聚集状态。称取 0.01 g zein, 分别用甲醇、乙醇、异丙醇、乙酸和丙酮这五种不同浓度(70%、80%、90%、100%)的溶剂将 zein 溶解, zein 浓度为 1 mg/mL。利用紫外可见分光光度法在 633 nm 条件下测定溶液的透光率。以不加玉米醇溶蛋白的醇类溶液作空白。

1.2.2 溶液色差测定

称取 0.01g zein, 分别溶于 80%浓度的甲醇、乙醇、异丙醇、乙酸和丙酮这五种不同极性溶剂中, zein 浓度为 1%, 用色差分析仪测定每组样品的 L*、a*、b* 值。仪器用标准白板进行校正。总色差

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}; \text{色度 } C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2};$$

$$\text{色调 } h_{ab}^* = \tan^{-1}(b^* / a^*).$$

1.2.3 粒径测定分析

将 zein 分别充分溶解在不同浓度(70%、80%、90%、100%)的甲醇、乙醇、异丙醇、乙酸和丙酮这五种溶剂中, 将 zein 稀释成 1 mg/mL, 过 0.22 μm 有机微孔滤膜。应用 Malvern 纳米粒度分析仪测定溶液的粒径大小及其分布。平衡时间为 180 s, 水的折射率为 1.33, 样品的折射率为 1.53, 测试温度为 25 °C。

1.2.4 内源性荧光光谱扫描

根据董世荣^[14]的方法, 测定不同处理条件下的玉米醇溶蛋白样品的内源性荧光光谱。内源性荧光光谱用于研究蛋白质溶液体系内部荧光基团的微环境, 进而反映蛋白质的构象变化。激发波长为 280 nm, 发射波长为 250~400 nm, 激发波长和发射波长的狭缝宽度均为 5 nm, 扫描速度为 10 nm/s, 测定的吸光度值为玉米醇溶蛋白的内源性荧光光谱。

1.2.5 ANS 荧光光谱分析测定

参照任晓锋^[6]的方法, 蛋白表面疏水性采用 8-苯胺-1-萘磺酸(ANS)作为荧光探针进行测定。用 0.2 mol/L pH=7.0 的磷酸缓冲液将 ANS 配制成 2 mmol/L 的溶液待用。将分别由不同浓度(70%、80%、90%、100%)、不同溶剂溶解得到的 zein 溶液稀释成蛋白浓度为 1 mg/mL 的待测液样品。同时取上述样液 6 mL, 加入 50 μL ANS 溶液, 充分混匀后避光反应 15 min。设置荧光分光光度计的激发波长为 360 nm, 发射波长为 400~600 nm, 激发波长和发射波长狭缝宽度均为 5 nm, 扫描速度为 10 nm/s, 测定反应后样品的吸光度值, 获得不同处理条件下的玉米醇溶蛋白表面疏水性光谱。

1.2.6 紫外光谱分析测定

将 zein 充分溶解在 80%浓度的几种有机溶剂中, zein 浓度为 1 mg/mL, 紫外光谱扫描波长为 245~445

nm, 扫描速率为 0.1 nm/s。

1.2.7 红外光谱分析测定

傅里叶红外变换光谱用来测定蛋白分子结构信息的变化。经不同处理后的蛋白冷冻干燥制成粉末, 过 100 目的筛。精确称量蛋白粉末与 KBr, 蛋白粉末与 KBr 比例为 1:100, 研磨、制片。红外扫描范围为 4000~400 cm⁻¹, 分辨率为 4 cm⁻¹, 扫描次数为 64。

1.2.8 光学显微镜观察

取 200 μL 0.1 g/mL 的 zein 溶液滴在载玻片上, 盖上盖玻片, 用光学显微镜观察溶液。

1.2.9 SEM 分析测定

采用扫描电子显微镜观察溶解后玉米醇溶蛋白的表面微观结构。取 1 mg/mL 的少量样品溶液涂在双面导电胶上, 自然干燥后进行喷金处理, 喷金厚度约 10 nm。离子溅射时间为 3 min, 真空度为 0.05 Mbar; 最后将样品转移置成像室, 设置电镜在 15 kV 电压下扫描。测试温度为 25 °C。

1.2.10 接触角的测定

将 zein 分别溶解在 80% 的五种溶剂中, zein 浓度为 10%。然后将 zein 倒在聚四氟乙烯板上形成平整的 zein 膜。剪取 2 mm×2 mm 的膜片, 固定在界面仪的载物台上, 分别测定 zein 膜两面(膜液与聚四氟乙烯板的接触面和与空气的接触面)的接触角。

1.3 数据统计分析

试验中所有数据结果均为三次测定的平均值, 采用 IBM SPSS Statistic 软件进行数据统计分析以及显著性差异 ($p < 0.05$) 评价, 并用平均值±标准差表示。用 Origin 9.0 软件作图。

2 结果与讨论

2.1 溶剂对 zein 溶液透光率和色差的影响

图 1 是溶剂和浓度对 zein 溶液的透光率影响, 收

表 1 不同溶剂对 zein 溶液色差的影响

Table 1 Effect of different solvents on chromatic aberration of zein solution

组别	色差参数					
	L*	a*	b*	C*	h*	ΔE*
空白	56.94±0.07 ^a	-0.51±0.01 ^a	-0.67±0.04 ^e	0.82±0.04 ^c	0.78±0.14 ^a	51.81±0.08 ^e
甲醇	49.26±0.85 ^e	-2.14±0.06 ^e	27.41±0.81 ^c	27.98±0.81 ^c	-0.07±0.07 ^{bc}	57.77±1.17 ^c
乙酸	46.07±0.48 ^f	-1.32±0.15 ^b	23.68±0.50 ^d	23.71±0.52 ^d	-0.05±0.30 ^b	57.00±0.71 ^d
乙醇	52.56±0.26 ^c	-3.12±0.03 ^e	31.12±0.32 ^b	31.27±0.32 ^b	-0.10±0.08 ^c	61.17±0.42 ^b
异丙醇	53.20±0.79 ^b	-3.60±0.11 ^f	31.94±0.97 ^a	32.14±0.98 ^a	-0.11±0.11 ^c	62.16±1.26 ^a
丙酮	51.73±0.30 ^d	-2.55±0.06 ^d	32.08±0.30 ^a	32.18±0.31 ^a	-0.08±0.19 ^{bc}	61.15±0.43 ^b

注: 同列不同小写字母代表均值间差异显著 ($p < 0.05$)。下表同。

集瓶中液体对应为 80% 溶剂溶解的 zein 溶液。结果表明, 不同有机溶剂中的 zein 溶液透光率的存在差异。随着甲醇的浓度增大, zein 溶液的透光率也增大。在乙酸溶液中, zein 溶液的透光率随浓度增加无明显变化; 而在乙醇、异丙醇和丙酮溶液中, 在高浓度溶剂中 (90% 以上), 蛋白质透光率降低。根据光学原理, 若溶液的混浊程度越小, 表现出的光学效应强度就会相应增大, 所测得的透光率值就大, 即溶液溶解效果较好^[15]。溶解度除受到溶质自身性质、溶剂极性及两者相互作用的影响外, 还与溶液体系所处的环境有关, 如浓度、温度、pH 值和离子等^[16]。从图 1 中看出, zein 更易溶于 100% 的乙酸、80%~90% 的乙醇。而在 100% 的乙醇、异丙醇和丙酮中 zein 蛋白溶液透光率显著下降, 最低降至 60.70%, 此时, 溶液呈悬浊液状态且出现聚集甚至成团现象。溶剂浓度和极性差异使 zein 复杂的多肽链展开程度不一, 所以呈现的溶解状态也不同。在高浓度的有机溶剂中, zein 疏水基团充分暴露, 在疏水相互作用下主导 zein 分子自组装, 形成更大的颗粒, 透光率下降^[17]。Chen Ye 等在热处理对玉米醇溶蛋白颗粒在醇水溶液中的分散和聚集研究中也证实了这一结果^[16]。

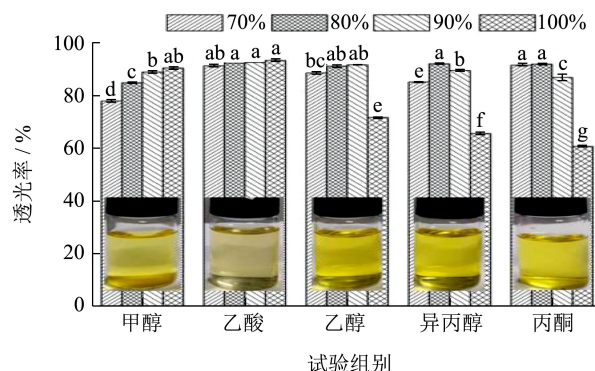


图 1 溶剂和浓度对 zein 溶液透光率的影响

Fig.1 Effect of different solvents on light transmittance of zein solution

注: 英文字母上标不同代表均值之间存在显著性差异 ($p < 0.05$)。

表 2 不同溶剂对 zein 溶液粒径大小的影响

Table 2 Effect of different solvents on particle size of zein solution

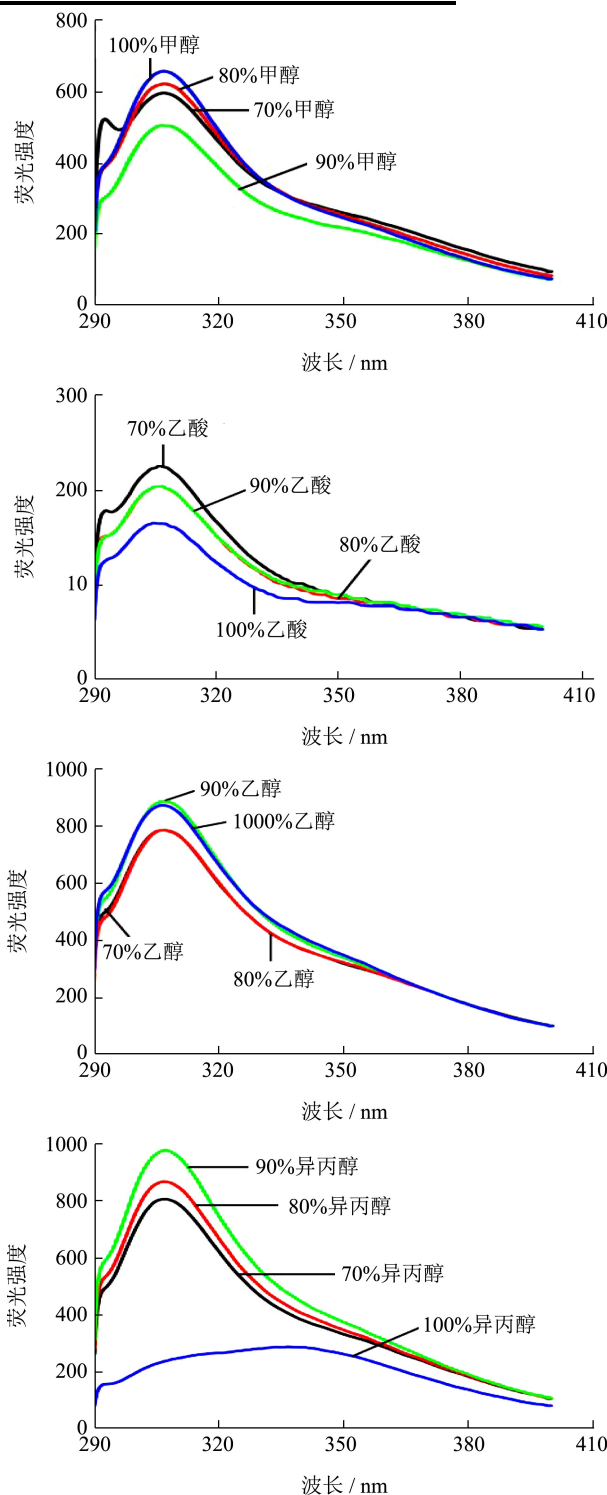
溶剂浓度	平均粒径/nm				
	甲醇	乙酸	乙醇	异丙醇	丙酮
70%	1726.17±22.13 ^a	5230.16±32.44 ^a	33.76±0.44 ^b	70.18±5.89 ^c	1560.26±17.37 ^a
80%	197.42±6.04 ^b	1233.13±23.25 ^b	25.52±1.66 ^d	47.02±3.21 ^d	31.43±0.115 ^d
90%	52.37±4.41 ^c	1102.73±17.26 ^c	29.26±1.93 ^c	433.56±12.05 ^b	107.91±8.29 ^c
100%	31.31±1.36 ^d	801.55±14.01 ^d	264.17±11.73 ^a	510.98±8.92 ^a	149.47±7.57 ^b

色差在一定程度上反映 zein 蛋白分子在溶液中的状态。溶解时,蛋白展开,将与高度螺旋化的 zein 缠绕在一起的色素释放出来,使溶液颜色改变^[18]。从直观上看,zein 蛋白溶解在不同溶剂中都呈现黄色(见图 1 收集瓶中溶液颜色),但深浅不一,表明蛋白的展开程度不同。表 1 是用色差仪测得的 zein 溶液(80%溶剂)色差值,色差值越大,溶液颜色越深。乙酸环境的蛋白溶液颜色最浅,说明 zein 蛋白展开程度最小。

2.2 溶剂对 zein 溶液粒径大小的影响

表 2 是 zein 在不同溶液中的粒径变化情况,从表中可看出,zein 溶液的粒径大小随着有机溶剂不同而变化。相同溶剂浓度下,在乙醇溶液中的粒径较小,而在乙酸中的粒径最大。蛋白在溶液粒径大小跟蛋白质的展开程度和蛋白聚集有关。乙酸溶液中,虽然其展开程度较低,但蛋白在该溶液中易聚集,形成了较大的颗粒,70%乙酸溶液中,zein 粒径达到 5230.16 nm。另外,同溶液中随着溶剂浓度的增加,粒径也发生变化。在甲醇和乙酸溶液,随着溶剂浓度的增加,zein 粒径逐渐减小,而在乙醇、异丙醇和丙酮溶液,zein 粒径先变小,后变大,80%的乙醇溶液中的 zein 粒径最小,为 25.52 nm。粒径差异与溶剂极性也有关系,蛋白质溶液中不仅存在蛋白之间相互作用,也存在蛋白与溶剂之间的相互作用,溶剂浸入蛋白内部,使蛋白逐渐展开,暴露内部疏水基团,改变蛋白分子的亲水/疏水性^[18]。Kim 等^[17]在研究玉米醇溶蛋白在乙醇水溶液中结构变化时提出:蛋白间疏水作用力不同,会直接导致蛋白质肽链断开与二硫键形成速度不一或者是溶剂极性差异导致了玉米醇溶蛋白极化程度不一样,蛋白亚基间通过非共价键形成大小不一的微聚体^[19]。不同浓度的溶液,其亲水/疏水性不同,让蛋白展开的程度和聚集的程度也不同,形成粒子大小有差异。

2.3 溶剂对 zein 表面疏水性的影响



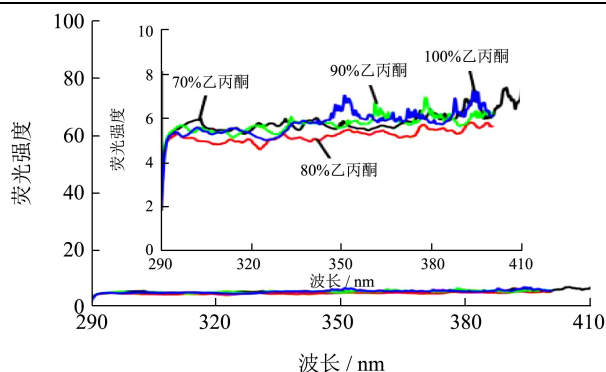


图2 不同溶剂对 zein 内源性荧光光谱的影响

Fig.2 Effects of different solvents on the endogenous fluorescence spectra of zein

维持蛋白质分子构象的化学键主要有氢键、范德华力、二硫键、离子键和疏水相互作用力等，而疏水相互作用力对蛋白质三级结构、四级结构的形成与稳定起很重要的作用。疏水相互作用力大小外在表现之一为蛋白的表面疏水性的强弱^[6]。

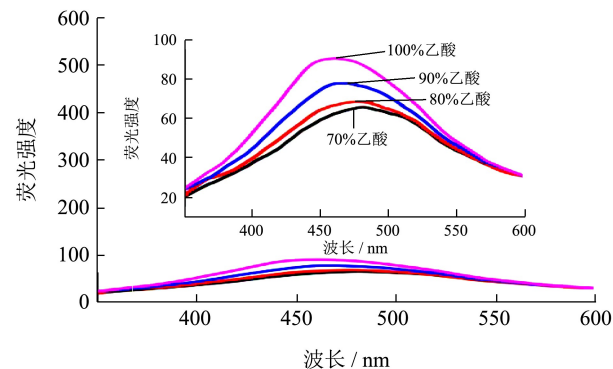
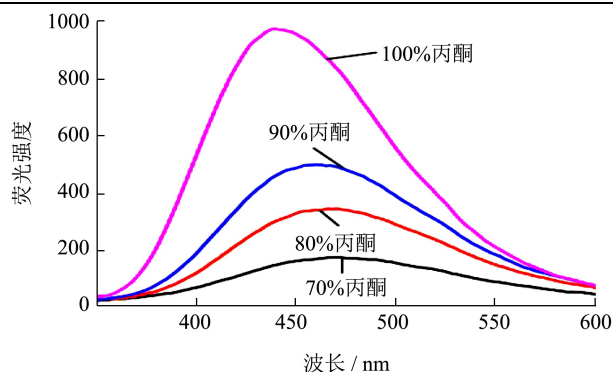
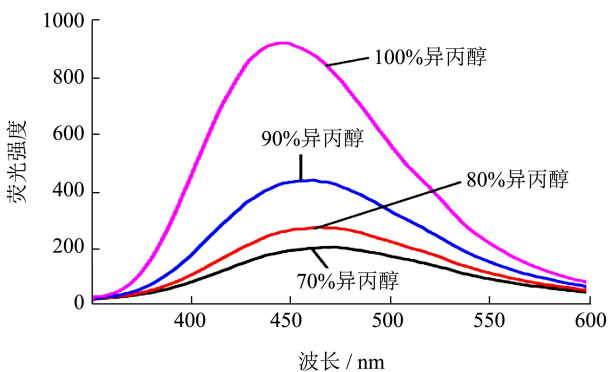
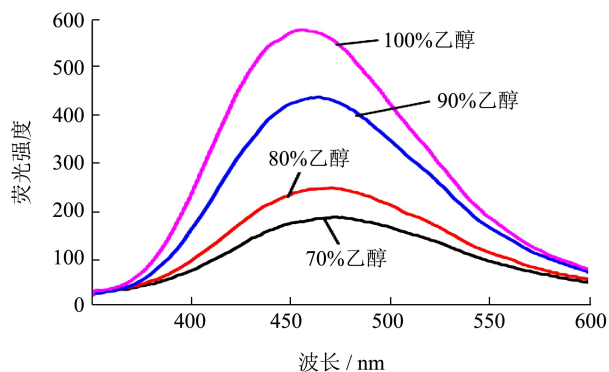
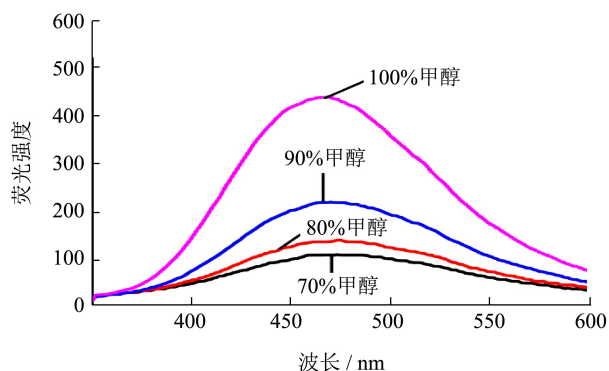


图3 不同溶剂对 zein 表面疏水性的影响

Fig.3 Effect of different solvents on surface hydrophobicity of zein

图2显示 zein 溶液的内源性荧光吸收光谱最大峰位都在 306 nm 附近。蛋白质的吸收光谱主要是指色氨酸和酪氨酸吸收值，该值依赖发色团的微环境极性的变化。自然状态下的蛋白质暴露在溶剂中的残基和包裹的基团的吸附效应差异是很小的^[20]。因此，不同的蛋白质溶液的吸收值变化不大，在图中表现为峰值位置相近。对于同一种溶剂，不同浓度 zein 溶液的内源性荧光强度有显著差异。因为当溶剂含量不同，溶液的极性也发生改变，蛋白质展开程度不同，造成荧光吸收值的差异。zein 溶于丙酮溶液时，zein 蛋白的内源性吸收荧光强度很小，这可能是 zein 在丙酮溶液中生色基团暴露后重新由于疏水作用聚集在一起，使外露疏水基团减少，引起蛋白溶液荧光强度变小^[21]。加入 ANS 后，ANS 与蛋白质中的疏水基团结合表现出荧光强度，ANS 与蛋白质结合的荧光强度与蛋白质的表面疏水性成正比^[22]。图3表明加入荧光探针 ANS 后，溶液的荧光强度随着溶剂的浓度增大而增大，且不同溶剂处理的 zein 溶液 ANS 荧光强度不同，zein 蛋白在乙酸溶液中的荧光吸收最弱，在丙酮溶液中的荧光吸收最强。溶剂使溶液微环境极性发生变化，推测出蛋白质构象发生变化。原因是有机溶剂浓度增大，蛋白分子间疏水相互作用增强，zein 结构变得更加松散，疏水长链暴露，有效地改变了 zein 的表面疏水性，这与 Kelly 等报道中的结果相符^[23]。



2.4 溶剂对 zein 蛋白结构的影响

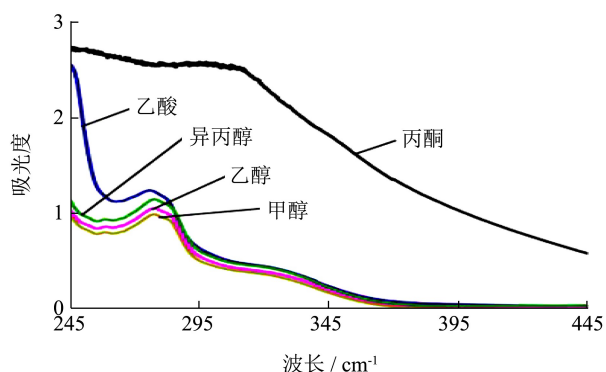


图 4 不同溶剂溶解的 zein 的紫外光谱扫描

Fig.4 UV scanning of zein dissolved in different solvents

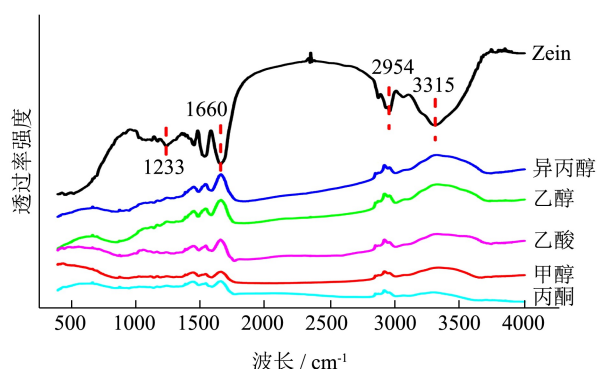


图 5 不同溶剂对 zein 的傅里叶红外光谱分析

Fig.5 Fourier infrared spectroscopy analysis of zein in different solvents

图 4 的紫外光谱扫描结果反应了 zein 不同溶剂中溶解后化学结构的变化。Zein 溶于有机溶剂中，蛋白

间巯基形成二硫键以及氢键的作用使其次级结构被破坏，疏水基团去折叠，zein 有序的紧密结构变松散无序^[20]。图 4 中丙酮溶解的玉米醇溶蛋白在 295 nm 处有一吸收宽峰，而其他四种溶剂溶解的玉米醇溶蛋白在 278 nm 处都有明显的紫外吸收，这主要是紫外吸收峰波长分别为 277 nm 和 285 nm 酪氨酸和色氨酸残基的伸缩振动引起的^[24]。丙酮、乙酸、异丙醇、乙醇和甲醇处理组的峰强度依次下降，原因可能是羰基和羧基比羟基更有利于 zein 生色基团的展开。丙酮溶解的 zein 很有可能还引起了部分苯丙氨酸和半胱氨酸残基向外翻转，暴露于微环境中。紫外光谱分析结果说明 zein 溶解、聚集状态的变化不仅有溶剂极性大小有关，还与溶剂自身化学结构息息相关，溶剂自身化学结构主要影响蛋白质二、三级结构作用位点^[25]。

根据图 5 中傅里叶红外光谱结果发现，天然 zein 在 1233 nm、1660 nm、2954 nm 和 3315 nm 处有明显的红外吸收峰，分别归因于 C-N 键、酰胺键、CH₂ 键和 N-H 键的伸缩振动^[6]。Zein 溶解在有机溶剂，这些特征红外吸收峰显著降低甚至消失，这可能是溶剂通过氢键和疏水相互作用改变 zein 多肽链之间的空间构象，从而使蛋白质红外吸收强度降低或消失^[26]。此外，处理组在 1760~2750 nm 范围内有一宽峰，这对应-SH 的伸缩振动。说明蛋白质溶解在有机溶剂中，由于溶剂极性和电负性差异，蛋白基团吸附电子能力下降，引起键的断裂，从而溶液中-SH 增加。

2.5 zein 蛋白在溶液中表观形貌的研究

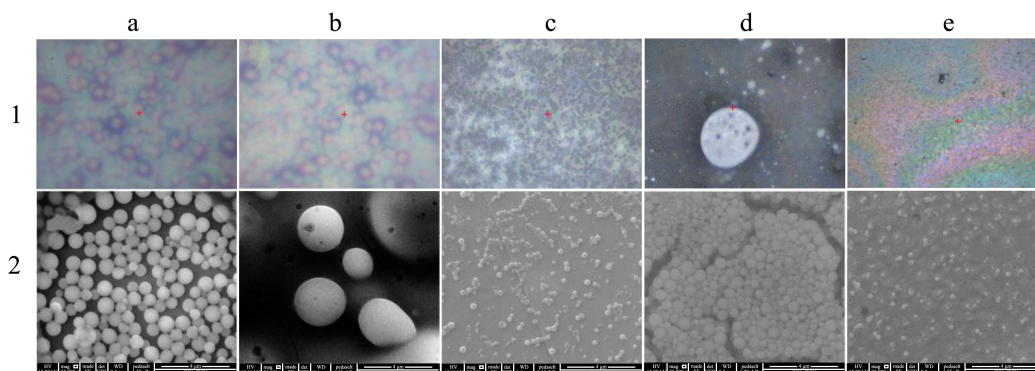


图 6 zein 在不同溶液的形貌

Fig.6 Morphologies of zein in different solutions

注：1 为光学显微镜下观察 0.1 g/mL zein 溶液 (50×)；2 为 1 mg/mL zein 溶液的 SEM 扫描结果 (25000×)；a、b、c、d、e 分别表示由甲醇、乙酸、乙醇、异丙醇和丙酮溶解的 zein 溶液。

从图 6-1 中可看出，在 50 倍光学显微镜下，zein 蛋白在几种溶液中以球形颗粒状态存在，且颗粒大小和形状略有差异。颗粒之间由“有机膜”链接，这说明蛋白在溶液中发生聚集。进一步用扫描电镜 (SEM) 观察 (图 6-2)，溶剂诱导 zein 蛋白在溶液中聚集和自

组装。zein 蛋白在甲醇溶液中颗粒均匀分散，在异丙醇溶液中是密集分布状态，在乙酸溶液中，颗粒大小和间距最大，分散程度高，而在乙醇和丙酮溶液中颗粒很小。这现象与表 2 粒径大小的结果一致。这表明不同有机溶剂溶解分散 zein 的能力不同，这主要是

因为不同溶剂极性不同，且它们的主要作用官能团分别是羟基、羧基和羰基，所带电负性不同，从而影响 zein 蛋白疏水长链的折叠与展开。

2.6 溶剂对 zein 界面性质的影响

水在不同 zein 膜上的接触角信息一定程度上也可以反映出溶剂对 zein 膜的表面疏水性，这可以作为研究 zein 膜的界面性质^[27]。10% zein 蛋白 (W/V) 溶解在不同溶剂中，随着溶剂的蒸发，zein 蛋白形成更大的聚集，通过化学键及分子间的相互作用形成薄膜。从图 7 可看出，从不同溶液中形成的蛋白膜的水接触角具有显著差异，表示形成的膜表面亲水性性质差异较大。zein 蛋白溶解在不同溶剂中，结构展开程度有差异，当溶剂蒸发时，蛋白分子之间聚集，溶剂分子蒸发速率也不同，形成的蛋白膜除表面形貌上的差异，还有膜表面的亲水性性质的差异。溶剂极性差异导致蛋白极化程度和与水的相互作用不同，促使蛋白无定型聚集的过程趋于多元化。介质不同，蛋白分子内部二硫键、氢键和疏水相互作用之间的平衡水平不同，宏观表现为静态接触角和表面疏水性的差异^[18]。80%乙酸和乙醇溶解的 zein 蛋白与容器接触一侧的接触角为 88.90°和 86.60°，表现出中性润湿性，适合稳定油水界面^[28]。另一方面，蛋白膜的性质还跟溶液体系外的环境有关，如成膜时的温度、湿度^[29]。特别有趣的是，

跟膜接触面也相关。从图 7 中可以看出，跟容器接触侧的 zein 膜表面比跟空气侧接触的表面具有更大的水接触角。原因可能是容器侧比空气侧的疏水性更强，因而吸引蛋白疏水基团在该侧聚集，使该膜表面疏水性增加。再者，容器侧表面平整，水分从空气侧蒸发，形成容器侧表面光滑，空气侧表面粗糙的 zein 蛋白膜。当水滴在空气侧膜表面时，由于水分子的流动性，首先将凹凸不平的表面填平，因此，从滴形上看，其显得更扁平，计算出的接触角更小。图 8 可直观地看出空气侧和容器侧的 zein 蛋白膜表面的滴形。从甲醇溶液中形成的膜的空气侧接触角最大，为 72.10°。

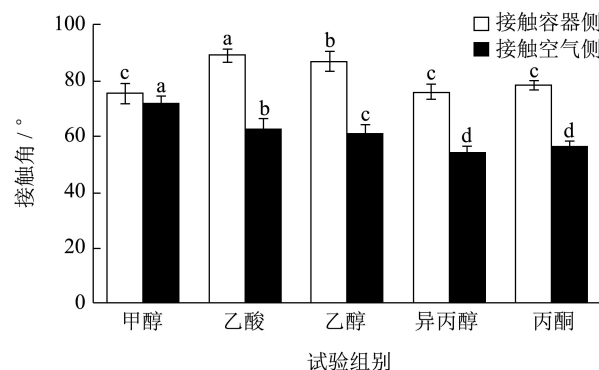


图 7 不同溶剂对 zein 膜接触角的影响

Fig.7 Effect of different solvents on the contact Angle of zein film

注：不同小写字母代表差异显著 ($p < 0.05$)。

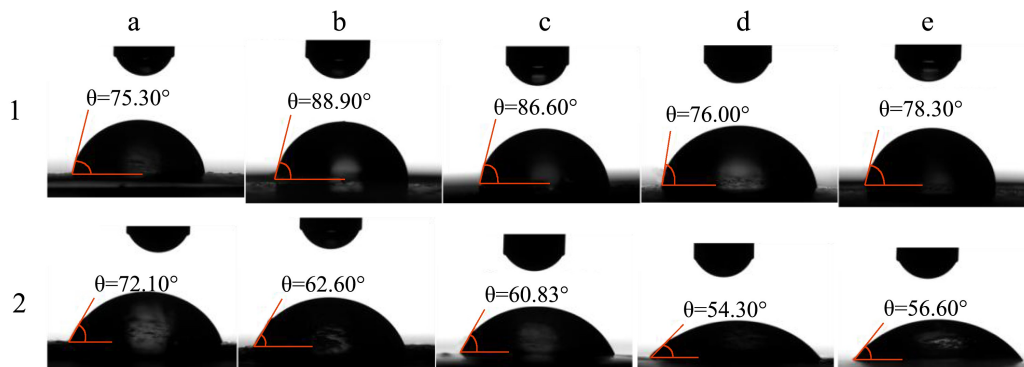


图 8 不同 zein 膜的接触角图；

Fig.8 Contact Angle diagram of different zein films

注：a、b、c、d、e 分别表示甲醇、乙酸、乙醇、异丙醇和丙酮处理，1、2 分别为 zein 膜与聚四氟乙烯板的接触侧和与空气的接触侧。

3 结论

玉米醇溶蛋白溶解在甲醇、乙醇、异丙醇、乙酸和丙酮有机溶液中，由于溶剂效应，蛋白质在溶液中折叠和展开程度存在差异，主要体现为蛋白在不同溶剂中的溶解、聚集状态和结构性质的不同。高浓度有机溶剂 (>90%) 中，蛋白质的水合作用减弱，zein 分子趋于聚集，形成较大颗粒；另一方面，蛋白疏水相

相互作用增强，表面疏水性也增强。就溶剂而言，zein 在异丙醇和丙酮溶液的表面疏水性较强，结构松散；而在甲醇和乙酸溶液中表面疏水性较弱，结构紧密。SEM 结果表明溶剂诱导 zein 蛋白在溶液中聚集和自组装成球形颗粒，但颗粒大小和分布不一。Zein 蛋白膜表面疏水性不仅跟其在溶液中的展开程度和聚集状态有关，也与成膜时的接触面有关，容器侧形成的膜表面的接触角比空气侧膜表面接触角大，疏水性更强。

本文的研究为玉米醇溶蛋白颗粒的形成提供理论依据,对今后玉米醇溶蛋白在生物膜、纳米体系和生物活性物质递送系统方面的进一步研究和应用具有重要的意义。

参考文献

- [1] V Cabra, R Arreguin, R Vazquez-Duhalt, et al. Effect of temperature and pH on the secondary structure and processes of oligomerization of 19 kDa alpha-zein [J]. *Biochemical Et Biophysical Acta, Proteins and Proteomics*, 2006, 1764(6): 1110-1118
- [2] XU Wei-jie, Narendar Reddy, Yany Yi-qi. An acidic method of zein extraction from DDGS [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(15): 6279-6284
- [3] N Matsushima, G Danno, H Takezawa, et al. Three-dimensional structure of maize α -zein proteins studied by small-angle X-ray scattering [J]. *Biochemical Et Biophysical Acta, Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1997, 1339(1): 14-22
- [4] Katarzyna Tych, Lorna Dougan. A Single-Molecule Approach to Explore the Role of the Solvent Environment in Protein Folding [M]. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA, 2013: 315-334
- [5] B N Arieh. Molecular Theory of Water and Aqueous Solutions: Part II: The Role of Water in Protein Folding, Self-Assembly and Molecular Recognition [M]. World Scientific Publishing Company, 2011: 163-196
- [6] 任晓锋.扫频超声预处理对玉米醇溶蛋白特性及其酶法制备Ace抑制肽的影响[D].镇江:江苏大学,2014
REN Xiao-feng. Effects of sweeping frequency ultrasound on properties of zein and preparation of ACE-inhibitory peptides on enzymatic from zein [D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2014
- [7] A M Morris, M A Watzky, R G Finke. Protein aggregation kinetics, mechanism, and curve-fitting: a review of the literature [J]. *Biochemical Et Biophysical Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 2009, 1794(3): 375-397
- [8] ZHENG Peng, CAO Yi, BU Tian-jia, et al. Single molecule force spectroscopy reveals that electrostatic interactions affect the mechanical stability of proteins [J]. *Biophysical Journal*, 2011, 100(6): 1534-1541
- [9] 洪宇.改善玉米醇溶蛋白水溶性的研究[D].长春:吉林农业大学,2013
HONG Yu. Improvement of zein solubility in water [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2013
- [10] RAN Meng, WU Zheng-zong, XIE Qiu-tao, et al. Preparation and characterization of zein/carboxymethyl dextrin nanoparticles to encapsulate curcumin: physicochemical stability, antioxidant activity and controlled release properties [J]. *Food Chemistry*, 2021, 340(15): 127893
- [11] Christopher J Cheng, Owen G Jones. Stabilizing zein nanoparticle dispersions with I-carrageenan [J]. *Food Hydrocolloids*, 2017, 69: 28-35
- [12] HU Kun, David Julian McClements. Fabrication of surfactant-stabilized zein nanoparticles: a pH modulated antisolvent precipitation method [J]. *Food Research International*, 2014, 64: 329-335
- [13] Y Wang, G W Padua. Formation of zein microphases in ethanol-water [J]. *Langmuir*, 2010, 26(15): 12897-12901
- [14] 董世荣,蒋梦琪,孙宇.热诱导对玉米醇溶蛋白胶体颗粒特性的影响[J].*中国调味品*,2020,45(11):46-50
DONG Shi-rong, JIANG Meng-qi, SUN Yu. Effects of heat induction on the properties of zein colloidal particles [J]. *China Condiment*, 2020 45(11): 46-50
- [15] Abdr Lorina Bisharat, Gblc Perinelli, Gfp Hatim S Alkhatib. Aggregation of zein in aqueous ethanol dispersions: effect on cast film properties [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 106: 360-368
- [16] CHEN Ye, YE Ran, LIU Jun. Understanding of dispersion and aggregation of suspensions of zein nanoparticles in aqueous alcohol solutions after thermal treatment [J]. *Industrial Crops and Products*, 2013, 50: 764-770
- [17] S Kim, J Xu. Aggregate formation of zein and its structural inversion in aqueous ethanol [J]. *Journal of Cereal Science*, 2008, 47(1): 1-5
- [18] SHUNG Dong, WANG Jian-ming, CHENG Li-min, et al. Behavior of zein in aqueous ethanol under atmospheric pressure cold plasma treatment [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(34): 7352-7360
- [19] M Pascoli, R de Lima, LF Fraceto. Zein nanoparticles and strategies to improve colloidal stability: a mini-review [J]. *Frontiers in Chemistry*, 2018, 6(6): 1-5
- [20] V I Dodero, P V Messina. Analyzing the Solution State of Protein Structure, Interactions, and Ligands by Spectroscopic Methods [M]. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA, 2013: 73-98
- [21] V Cabra, E Vázquez-Contreras, A Moreno, et al. The effect of sulfhydryl groups and disulphide linkage in the thermal aggregation of Z19 α -zein [J]. *Biochemical Et Biophysical Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 2008, 1784(7-8):

- 1028-1036
- [22] 董世荣.改性玉米醇溶蛋白结构形态与功能关系的研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2017
DONG Shi-rong. Relationships between structural morphology and functional properties of modified zein [D]. Harbin: Dongbei Agricultural University, 2017
- [23] S M Kelly, T J Jess, N C Price. How to study proteins by circular dichroism [J]. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 2005, 1751(2): 119-139
- [24] Scyj F. Effects of dynamic high-pressure microfluidization treatment and the presence of quercetagenin on the physical, structural, thermal, and morphological characteristics of zein nanoparticles [J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2016, 9(2): 320-330
- [25] Mimr Mohammad Khavani, Housaindokht. The effects of amino acid sequence and solvent polarity on the self-assembling of cyclic peptide nanotubes and molecular channel formation inside the lipid bilayer [J]. *Journal of Molecular Liquids*, 2020,314(15): 113660
- [26] D R Livesay, D H Huynh, S Dallakyan, et al. Hydrogen bond networks determine emergent mechanical and thermodynamic properties across a protein family [J]. *Chemistry Central Journal*, 2008, 2(1): 1-20
- [27] 刘君.玉米醇溶蛋白在醇水中的凝聚行为和性质研究[D].天津:天津科技大学,2013
LIU Jun. Study on aggregation behavior and property of zein dissolved in alcohol aqueous solution [D]. Tianjin: Tianjin University of Technology, 2013
- [28] YANG Jiang, CHEN Zhang, YANG Jing-he, et al. Effects of pectin polydispersity on zein/pectin composite nanoparticles (ZAPs) as high internal-phase Pickering emulsion stabilizers [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2019, 219: 77-86
- [29] Morgan J Malm, Ganesan Narsimhan, Jozef L Kokini. Effect of contact surface, plasticized and crosslinked zein films are cast on, on the distribution of dispersive and polar surface energy using the Van Oss method of deconvolution [J]. *Journal of Food Engineering*, 2019, 263: 262-271

(上接第 27 页)

- [24] Chaula D, Laswai H, Chove B, et al. Effect of clove (*Syzygium aromaticum*) and seaweed (*Kappaphycus alvarezii*) water extracts pretreatment on lipid oxidation in sun-dried sardines (*Rastrineobola argentea*) from Lake Victoria, Tanzania [J]. *Food Science & Nutrition*, 2019, 7(4): 1406-1416
- [25] Yu X G, Gao X A, Jia Z W, et al. Patchouli oil ameliorates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in rats *via* protecting intestinal barrier and regulating water transport [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2015, 250: 112519
- [26] Gao Y D, Yue W L, Gui Z H, et al. Effect of dietary fiber on intestinal barrier function of 5-fu stressed rats [J]. *Research in Experimental Medicine*, 1999, 199(2): 111-119
- [27] Bai Y J, Huang F, Zhan R F, et al. Longan pulp polysaccharides relieve intestinal injury *in vivo* and *in vitro* by promoting tight junction expression [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 229: 115475
- [28] Zhang L, Jin Y Y, Peng J, et al. Qingjie Fuzheng granule attenuates 5-fluorouracil-induced intestinal mucosal damage [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019, 118: 109223
- [29] Maya R, Mukesh D. κ -Carrageenan from marine red algae, *Kappaphycus alvarezii* - A functional food to prevent colon carcinogenesis [J]. *Journal of Functional Foods*, 2015, 15: 354-364
- [30] Chang V S, Okechukwu P N, Teo S S. The properties of red seaweed (*Kappaphycus alvarezii*) and its effect on mammary carcinogenesis [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2017, 87: 296-301
- [31] Suganya A M, Sanjivkumar M, Chandran M N, et al. Pharmacological importance of sulphated polysaccharide carrageenan from red seaweed *Kappaphycus alvarezii* in comparison with commercial carrageenan [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2016, 84: 1300-1312
- [32] Tomaino A, Cimino F, Zimbalatti V, et al. Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils [J]. *Food Chemistry*, 2005, 89(4): 549-554
- [33] Klein B P, Kurilich A C. Processing effects of dietary antioxidants from plant food [J]. *Hortscience*, 2000, 35(4): 580-584