doi:10.6041/j.issn.1000-1298.2020.10.045

酪蛋白对乳清浓缩蛋白自组装形成纳米纤维的影响

徐红华　王　欣　鞠婷婷　马彩虹　关　琛
(东北农业大学食品学院, 哈尔滨 150030)

摘要: 某些蛋白质在非常规条件下可以自组装形成纳米纤维聚合物,这种聚合结构对蛋白质单体及其常规聚合形态赋予了高级功能性质,但这种自组装过程容易受其他蛋白的干扰,破坏其组装聚合方式。研究了乳液中 2 种主要蛋白成分的相互作用和酪蛋白(CN)对乳清浓缩蛋白(WPC)自组装形成纤维状聚合物的影响,分析了 WPC 在自组装的不同时期受 CN 的干扰程度。结果表明,在纤维形成不同阶段混入 CN,决定了形成聚合物的结构形态,CN 加入的时间越早,对纤维形成的抑制作用越明显,提高混入 CN 浓度,能够使形成纤维聚合物的 CN 混入时间点延后。其中表面疏水作用和二硫键的形成共同促进了 CN 与 WPC 的聚合,弱化了 WPC 的自身作用,继而抑制 WPC 的纤维自组装,在纤维形成初期混入 CN,这种抑制作用尤为明显。CN 的混入使聚合速率常数 k 增大,WPC 与 CN 聚合能力增强,而 WPC 间的聚合作用减弱,干扰和破坏了 WPC 纤维聚合物的形成。研究表明,牛乳中酪蛋白的影响导致牛乳蛋白无法形成纳米纤维聚合物,除去牛乳中的酪蛋白,使分离出的乳清蛋白在自组装聚合的中后期混入酪蛋白,则不影响纳米纤维聚合结构的形成。

关键词: 纳米纤维; 酪蛋白; 乳清浓缩蛋白; 自组装; 聚合作用
中图分类号: TS252.1　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 1000-1298(2020)10-0395-08　　**OSID**:

Effect of Casein on Whey Protein Concentrate Self-assembling to Form Nano-fibril Polymers

XU Honghua　WANG Xin　JU Tingting　MA Caihong　GUAN Chen
(*College of Food Science*, *Northeast Agricultural University*, *Harbin* 150030, *China*)

Abstract: Proteins can self-assemble to form nano-fiber polymers under unconventional conditions. This kind of polymer structure given protein monomers and their conventional polymerization formed with high-level functional properties, but this self-assembly process was easily interfered by other proteins and destroyed the assembly and polymerization mode. The interaction of two main protein components in milk was explored, and the effect of casein (CN) on the self-assembly of whey protein concentrate (WPC) to form fibril polymers was studied, and the degree of interference of WPC by CN at different stages of self-assembly was analyzed. The results showed that incorporation of CN at different stages of fibril formation determined the structure and shape of the hybrid copolymer. The earlier CN was added, the more obvious the inhibitory effect on the fibril formation was. With the increase of CN concentration, the mixing time point of CN for the formation of fibril polymer was delated. Among them, the surface hydrophobic interaction and the formation of disulfide bonds promoted the polymerization of CN and WPC, which weakened the interaction between WPC itself, and then inhibited the self-assembly of WPC fibrils. This inhibition was particularly obvious when CN was mixed in the initial stage of fibril formation. The polymerization rate constant k and the polymerization ability of WPC and CN were increased and the polymerization between WPC was weakened. The formation of WPC fibril polymer was destroyed by the interference of CN. The results indicated that cow's milk protein cannot form nano-fibril polymers due to the effect of CN in cow's milk, but the casein in cow's milk was removed, and mixed in the middle and late stages of WPC self-assembly polymerization did not affect the formation of nano-fibril polymer structure.

Key words: nano-fibrils; casein; whey protein concentrate; self-assembling; polymerization

收稿日期: 2020-01-16　修回日期: 2020-02-25
基金项目: 国家自然科学基金项目(31471682)
作者简介: 徐红华(1969—),女,教授,博士生导师,主要从事食品科学研究,E-mail: xhh3161@126.com

0 引言

在非常规条件下,蛋白质分子通过疏水相互作用而形成的线状聚合物被称作纳米纤维[1-3],这种聚合结构对蛋白质单体及其常规聚合形态赋予了高级功能性质,不但具有更好的粘度、持水性、乳化性和起泡性等常规功能性质[4],还具有酸可逆性、导电性[5],可作为超分子材料用于生物传感器。研究发现,乳清蛋白在 pH 值 2.0 和低离子强度下高温加热,可形成纳米纤维[6],且形成的纤维具有共同的结构特征,即有支链或无支链的丝状结构,直径为 5~15 nm,长度为几微米[7-8]。文献[9]研究发现,被胰蛋白酶修饰过的乳清浓缩蛋白(WPC)在加热过程中聚合得更多,且纤维形成速率高于未修饰的 WPC。酪蛋白(CN)是牛乳中的主要蛋白质(约占蛋白质总量 80%),常以酪蛋白胶束形式存在[10]。不同于其他蛋白质,CN 带有相对较高的电荷,具有较高的疏水性和松散的卷曲结构,且所有的 CN 均无游离巯基,但 CN 中的成分 αs_2-CN 和 κ-CN 分子均有半胱氨酸残基,分子间可以形成分子间二硫键而发生交联[11-12]。目前,关于乳蛋白纤维的研究主要集中在乳清蛋白聚合条件及形成机理方面,缺乏复杂蛋白组分干扰的研究。CN 作为主要乳蛋白基料成分,对乳清蛋白纤维结构的形成至关重要。本文以 WPC、CN 为原料,在非常规条件下和 WPC 纤维形成的不同时期混入酪蛋白,观察酪蛋白介入对纤维形成的影响,探究形成的 WPC-CN 纤维与非纤维聚合物的主要作用力和聚合动力学过程,以期为拓展乳蛋白纳米纤维聚合物在食品工业中的应用以及不同乳蛋白基料的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

脱脂乳粉(蛋白质质量分数 34.67%、CN 质量分数 27.92%、乳清蛋白质量分数 6.75%)来自新西兰恒天然公司;乳清浓缩蛋白粉 WPC-80(蛋白质质量分数 76.93%)购自美国 HILMAR 公司;大豆色拉油(九三集团哈尔滨惠康食品有限公司);丙烯酰胺(美国 Amersco 公司);TEMED(美国 Sigma 公司);8-苯氨基-1-奈酚-碘酸(ANS)(美国 Sigma 公司);硫黄素 T(ThT)(美国 Sigma 公司);考马斯亮蓝 R250(美国 Amresco 公司);甲叉双丙烯酰胺(北京 Solarbio 公司);十二烷基硫酸钠(SDS)(美国 Sigma 公司),所用其他试剂均为国产分析纯。

1.2 主要仪器设备

GL-21M 型离心机(上海精密仪器研究所),KDN-102C 型半自动定氮仪(上海纤检仪器有限公司),F-4500 型荧光分光光度计(日本日立公司),JEM-1200EX 型透射电子显微镜(日本日立公司),DELTA320 型 pH 计(梅特勒-托利多仪器有限公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 CN 的制备

参照文献[13]的方法并加以改进。用去离子水溶解脱脂乳粉,搅拌 1.5 h,使其充分水合,7 000 g 离心 15 min,取上清液,调其 pH 值至 4.6(6 mol/L HCl 和 0.1 mol/L HCl),1 000 g 离心 15 min(室温),弃上清液,用去离子水洗沉淀,1 000 g 离心 10 min,弃上清液,再用去离子水溶解沉淀,并调 pH 值至 2.0(6 mol/L HCl 和 0.1 mol/L HCl)或 6.5(2 mol/L NaOH 和 0.1 mol/L NaOH),搅拌 1.5 h,使其充分溶解,7 000 g 离心 15 min,取上清液并测定蛋白质含量,溶液 4℃保存。

1.3.2 纤维与常规 WPC 聚合物的制备

纤维聚合物的制备参照文献[14]的方法并加以改进。用去离子水溶解 WPC-80 粉,2 mol/L 和 0.1 mol/L 盐酸将溶液 pH 值调至 2.0,在 19 000 g、4℃条件下离心 30 min,吸其中层清液,测定清液蛋白质含量,并用去离子水将溶液的蛋白质质量分数稀释为 3.0%,再用盐酸将溶液 pH 值调至 2.0,90℃水浴 10 h,每间隔 1 h 取样并立即冷却,于 4℃保存。

常规 WPC 聚合物的制备是在上述过程中去除调节 pH 值的步骤,其他部分同上。

1.3.3 WPC-CN 聚合物的制备

在 WPC 溶液不同的热处理时间混入 CN,混合均匀,即在纤维(或常规 WPC)聚合物形成的过程中混入 CN,继续 90℃水浴至 10 h,每间隔 1 h 取样并立即冷却,于 4℃保存。

1.3.4 CN 混杂对 WPC 纤维形成的影响因素

(1)CN 混入时间点

在固定 WPC、CN 溶液浓度的条件下,研究 CN 的混入时间点对 WPC 纳米纤维形成的影响。试验条件确定为:pH 值 2.0、90℃条件下热处理蛋白质量分数 3.0% 的 WPC 溶液,在不同热处理时间点(0、0.5、1.5、2、3、4、5、7、9 h)时与蛋白质量分数 3.5% 的 CN 溶液以体积比 2∶1 的比例混合,并继续加热至 10 h,每间隔 1 h 取样后立即冷却,于 4℃保存。

(2)CN 质量分数

选择 4 种质量分数的 CN:1.5%、2.0%、3.5%、6.0%。试验条件确定为:将 pH 值 2.0、蛋白质量分数 3.0% 的 WPC 溶液,在 90℃条件下热处理至不同

时间点(0、0.5、1.5、2、3、4、5、7、9 h)时与 pH 值 2.0、不同蛋白质量分数 CN 以体积比 2∶1的比例混合(以质量分数 3.0% 的 WPC 与 pH 值 2.0 的去离子水以 2∶1的比例混合,即质量分数 2% 的 WPC 为对照),并继续加热至 10 h,每间隔 1 h 取样后立即冷却,于 4℃保存。

1.3.5 硫黄素 T 荧光强度

根据文献[15]的方法并加以改进,取 400 μL 待测样品加入 10 mL 质量浓度 16 mg/L 的 ThT 工作液中,混匀,用荧光分光光度计(激发波长为 460 nm,发射波长为 490 nm,狭缝宽度分别设为 5 nm 和 10 nm)进行测量。

1.3.6 透射电子显微镜

根据文献[16]的方法并加以改进,用透射电子显微镜(Transmission electron microscopy, TEM)(采用 80 kV 电压处理)观察样品微观结构。

1.3.7 表面疏水性

参照文献[17]的方法并加以改进,利用 ANS 荧光探针法测定蛋白质的表面疏水性。用 0.01 mol/L 磷酸缓冲液(pH 值 7.0)将样品溶液稀释至蛋白质量分数分别为 0.01%、0.005%、0.002 5% 和 0.001 25%,然后向 6 mL 稀释液中加入 16 μL 浓度 8 mmol/L 的ANS 溶液,混匀,避光 15 min,后用荧光分光光度计(激发波长和发射波长分别设为 390 nm 和 470 nm,狭缝 5 nm)测量,利用荧光强度对稀释液的蛋白质质量浓度作图,将斜率作为蛋白质表面疏水性指数。

1.3.8 游离巯基

参照文献[17]的方法并稍加改进。将 10.4 g Tris(氨基丁三醇)、6.9 g 甘氨酸、1.2 g EDTA(乙二胺四乙酸)、480 g 脲素用水溶解,并定容至 1 000 mL,调节 pH 值至 8.0,得到 Tris－Gly(氨基丁三醇-甘氨酸)缓冲溶液。将待测样品稀释到蛋白质量分数为 2.5%,取 0.25 mL 稀释液加入到 5 mL 的 Tris－Gly 缓冲溶液中,向其加入 20 μL 的 DTNB(二硫代二硝基苯甲酸)试剂,混匀,静止 15 min,并在 412 nm 波长下测定其吸光度,以不加样品的溶液用于空白。巯基质量摩尔浓度计算公式为

$$X = (73.53A_{412}D)/C \tag{1}$$

式中　A_{412}——在 412 nm 的吸光度

C——固形物质量浓度,mg/mL

D——稀释系数

X——巯基质量摩尔浓度,μmol/g

1.3.9 未聚合乳清蛋白含量

将质量分数 3.0% 的 WPC 与 3.5% 的 CN 混合进行热处理,将 15 mL 不同热处理时间(0～10 h)下的样品溶液 pH 值调至 4.6(使用 2 mol/L HCl 和 0.1 mol/L HCl),然后 1 000 g 离心 15 min,取上清液,并定容至 25 mL,利用凯氏定氮方法测定;不同热处理时间下未聚合 WPC 的含量;单位时间内与 CN 聚合的 WPC 占总聚合 WPC 的百分比;时间 t 时混入 CN 热处理 1 h 内形成的不同聚合物的聚合速率常数 k。计算公式分别为

$$Y_1 = C_t/C_0 \tag{2}$$

$$Y_2 = 1 - C_t/C_0 \tag{3}$$

$$M = (C_{t-1} - C_1)/(1 - C_{10}) \times 100\% \tag{4}$$

$$k = (C_t - C_{t+1})/(1 - C_t) \tag{5}$$

式中　Y_1——WPC 未聚合率

Y_2——WPC 聚合率

M——单位时间聚合 WPC 百分比,%

k——聚合速率常数

C_0、C_1、C_{10}——0、1、10 h 时 WPC 质量浓度,mg/mL

C_{t-1}、C_t、C_{t+1}——t － 1 h、t、t + 1 h 时未聚合 WPC 质量浓度,mg/mL

1.4 统计方法

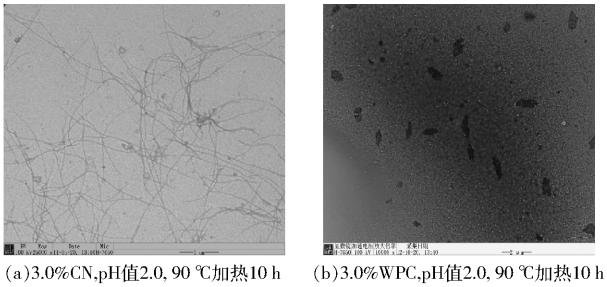
使用 Excel 软件对试验数据进行统计分析,其中每组试验有 3 个重复(n = 3),数据用平均数 ± 标准差表示。

2 结果与分析

2.1 CN 对 WPC 纤维形成的干扰

2.1.1 形貌分析

pH 值 2.0、90℃加热 10 h 的条件下,CN 单独存在不能形成纤维,如图 1a 所示,其形成的是较大的不规则聚合物。而此条件下 WPC 单独存在形成的纤维如图 1b 所示,其形成杆状细长的纤维。



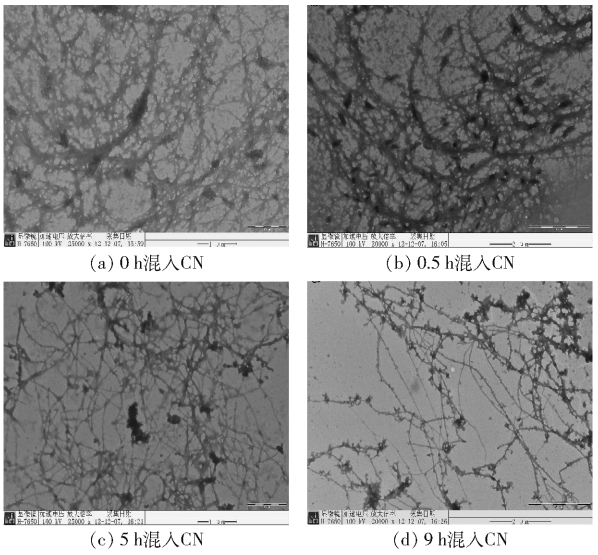
(a)3.0%CN,pH值2.0, 90 ℃加热10 h　(b)3.0%WPC,pH值2.0, 90 ℃加热10 h

图 1　CN 和 WPC 热聚合后的 TEM 结果

Fig. 1　TEM results after thermal polymerization of CN and WPC

WPC 纤维化过程主要有 3 个阶段,成核期、生长期、稳定期对应的时间段可分别划为 0～2 h、2～5 h、5～10 h[18]。CN 混入 WPC 后形成纤维的微观结构如图 2 所示,在 5、9 h 混入 CN 对 WPC 纤维的

形成影响不大,在 0、0.5 h 混入 CN 破坏了 WPC 纤维的结构,对 WPC 纤维的形成影响较大。CN 混入的时间越晚,纤维结构越清晰,大量的 CN 附着在纤维表面上,因此,在 WPC 纤维形成的不同时期混入 CN 对其结构的影响有很大不同,成核期混入 CN,严重破坏了 WPC 纤维的结构;生长期混入 CN,纤维形态已经初步形成,CN 对其有一定影响,但是纤维结构的总体结构框架没有被破坏;稳定期混入 CN,纤维形态良好,大量 CN 附着在纤维表面上。



(a) 0 h混入CN (b) 0.5 h混入CN

(c) 5 h混入CN (d) 9 h混入CN

图 2 WPC 纤维形成不同时期 CN 混杂共聚的 TEM 结果

Fig. 2 TEM images of aggregate solution by adding casein to WPC at different periods of heat-induced formation of WPC fibrils

2.1.2 酪蛋白混入时间对纤维形成的干扰

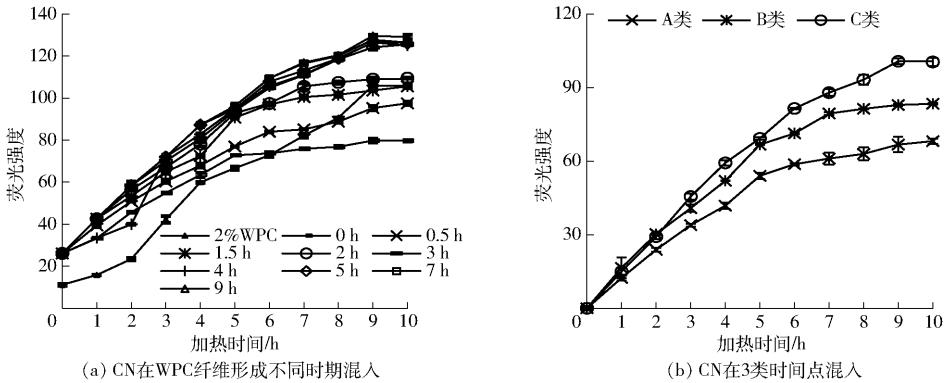
纤维形成过程中,β-折叠数量不断增加,ThT 是一种能与 β-折叠特异性结合的染料,结合后其荧光强度会随折叠数量的增加而上升[19],因此通常用此方法间接反映纤维形成的情况。以单一质量分数 2.0% 的 WPC 为对照,可将 ThT 结果分为 3 类,如图 3a 所示,A 类为 ThT 曲线明显低于质量分数 2.0% 的 WPC,即其对纤维结构形成有明显的抑制作用,B 类为 ThT 的曲线与质量分数 2.0% 的 WPC 相近;C 类为 ThT 结果明显高于质量分数 2.0% 的 WPC,即不抑制 WPC 纤维形成。故将 A、B、C 类混入 CN 的时间点归纳如下:A 类:0、0.5、1.5 h 混入 CN;B 类:2 h 混入 CN;C 类:3、4、5、7、9 h 混入 CN。

如图 3b 所示,三者的差异在加热至 5 h 后愈发明显,在 A 类时间点混入 CN 加热至 10 h 时,荧光强度增加缓慢,B 类的荧光强度增加量是 A 类的 1.22 倍,C 类的荧光强度增加量分别是 A 类、B 类的 1.47、1.20 倍。结果表明,CN 在 WPC 纤维形成的不同时间点混入时,其荧光强度变化规律与 TEM 的纤维形貌结果一致,CN 加入的时间越早,对应纤维形成的抑制作用越明显,在 C 类时间点(3 ~ 9 h)混入 CN 时,不影响 WPC 纤维形成,故认为质量分数 3.0% 的 WPC 与质量分数 3.5% 的 CN 混合时,3 h 为不影响纤维形成的 CN 混入时间点,此时形成的是 WPC - CN 纤维聚合物。

2.1.3 酪蛋白混入质量分数对纤维形成的干扰

由于 pH 值 2.0 下的 CN 粘度很大,可以得到最大的质量分数为 6.0%,故选取 4 个 CN 质量分数分别为 1.5%、2.0%、3.5%、6.0%,形成的不同聚合物的荧光强度均随着加热时间的延长呈增长趋势至稳定,荧光强度的变化情况如图 4 所示。

在 CN 质量分数为 1.5% ~ 3.5% 时,WPC 热处理 2 h 之前混入 CN,皆可破坏 WPC 纤维的形成,3 h 之后混入 CN 不会破坏 WPC 纤维的形成,此时形成的是 WPC - CN 纤维聚合物。而当 CN 质量分数进一步增加到 6.0% 时,WPC 热处理 4 h 之前混入 CN,皆破坏 WPC 纤维的形成,5 h 之后混入 CN 不会破坏 WPC 纤维的形成,故 ThT 结果可划分为:A 类:0、0.5、1.5、3 h 混入 CN;B 类:4 h 混入 CN;C 类:5、7、9 h 混入 CN。故 5 h 是不影响纤维形成的 CN 混入时间点,此时形成的是 WPC - CN 纤维聚合物。在 WPC 热处理 2 h 混入质量分数 6.0% 的 CN 时,高于其他时间点混入 CN 的 ThT 结果。综上,A、B 类破坏纤维形成,C 类不影响纤维形成,且随着 CN



(a) CN在WPC纤维形成不同时期混入 (b) CN在3类时间点混入

图 3 CN 混入时间对纤维形成的干扰

Fig. 3 Interference of mixing time of CN on fibril formation

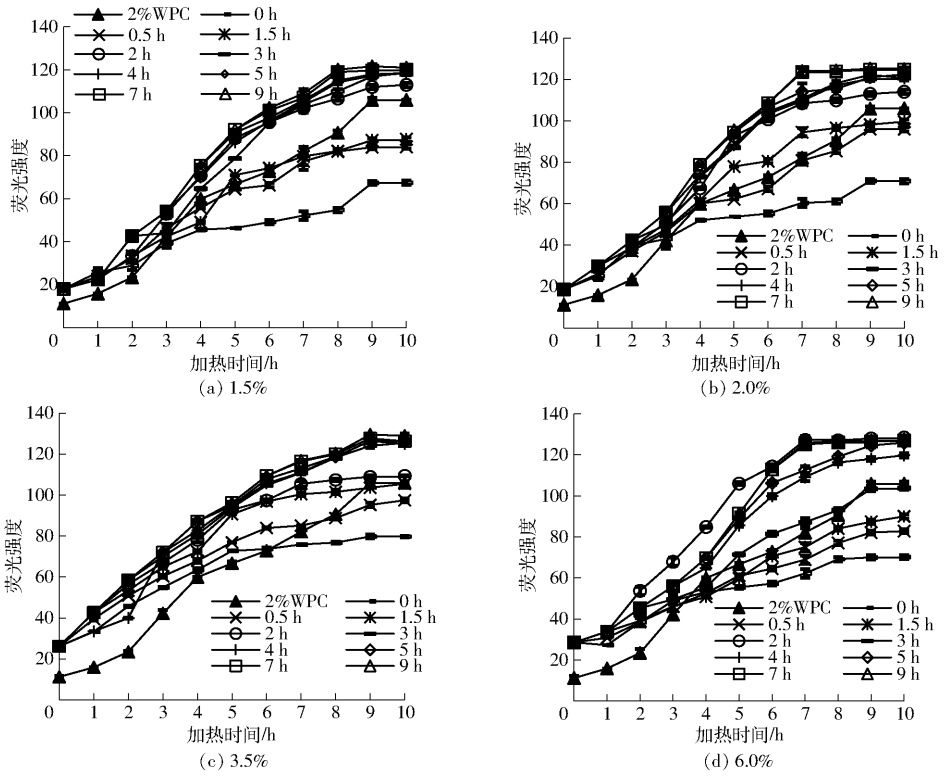


图 4　混入 CN 质量分数对纤维形成的干扰

Fig. 4　Interference of CN concentration on fibril formation

质量分数增大,形成 WPC－CN 纤维聚合物的 CN 混入时间点延后。

2.2　WPC－CN 聚合物形成的主要作用力

在热处理过程中,乳清蛋白与酪蛋白会发生变性,乳清蛋白自身或者与酪蛋白之间都会发生聚合,继而导致聚合过程中作用力的变化,而聚合过程的主要作用力是表面疏水作用和游离巯基浓度变化导致的[20],故试验继续探究了不同条件下 WPC－CN 聚合物的表面疏水性、游离巯基之间的差异。试验选择中间浓度 CN(质量分数 3.5%)参与反应,根据 3.5% CN 的 3 类 CN 混入时间点分别为:A 类(0、0.5 h)、B 类(2 h)、C 类(3、5、9 h)。

2.2.1　表面疏水性

如图 5 所示,pH 值 2.0 的表面疏水性高于 pH 值 6.5。这可能是由于在 pH 值 2.0 条件下,蛋白质所带电荷量较大,分子间斥力较大,疏水氨基酸暴露程度较大所致[21]。而在 pH 值 2.0 的环境下,混入 CN 形成聚合物的表面疏水性明显低于质量分数 2.0% 的 WPC 的表面疏水性,表明 CN 的介入整体上降低了聚合物的表面疏水性。表面疏水性从大到小依次为:质量分数 2.0% 的 WPC、B 类、C 类、A 类,WPC 纤维表面疏水性的出峰时间是热处理 5 h,该点对应的表面疏水性指数提高率为 195.61%。而 CN 的混入改变了聚合物表面疏水性的出峰时间,使出峰时间点前移。WPC－CN 纤维聚合物(即 C 类)出峰时间对应的表面疏水性指数提高率约为 0 h 混入的 1.46 倍,约是 WPC 纤维的 44.77%,WPC－CN 非纤维聚合物的表面疏水性指数是 WPC

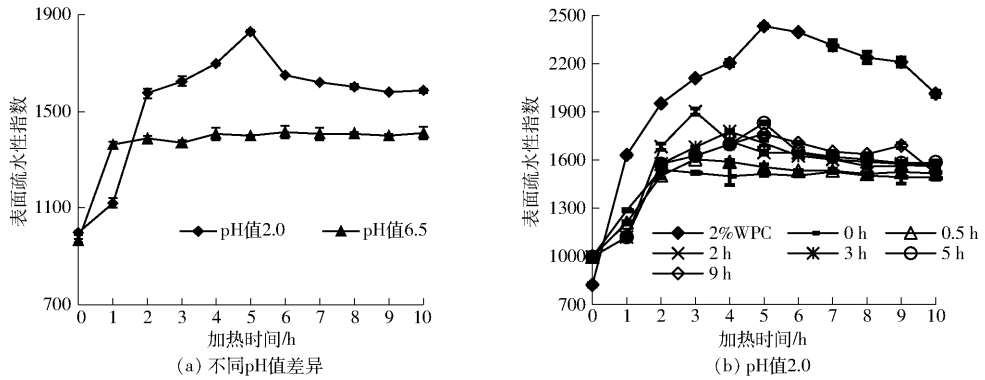


图 5　不同 pH 值下 WPC 与 CN 混合共聚的表面疏水性变化曲线

Fig. 5　Changes in surface hydrophobicity of aggregate solution by adding casein to WPC at different periods of heat-induced WPC

纤维的38.64%。结果表明,CN 混入得越早,其表面疏水性变化越低,即疏水相互作用越小,可能越抑制纤维的形成。

2.2.2 游离巯基

如图6所示,在 WPC 热处理过程中,混入 CN 所形成的聚合物,随着热处理时间的延长,游离巯基含量呈下降趋势,这可能是由于蛋白质在热处理过程中,蛋白质结构打开,游离巯基暴露并向二硫键转变所致[22-23]。不同 pH 值间游离巯基的差异如下:pH 值6.5 条件下,游离巯基在 1 ~2 h 迅速降低,之后变化平缓,加热至10 h 其游离巯基质量摩尔浓度约降低了76.33%,而 pH 值2.0 条件下的相应值约降低了13.0%,前者降低幅度远高于后者,是后者的5.87 倍;说明 pH 值6.5 乳蛋白热聚合的主要作用力为二硫键。相反,在 pH 值2.0 条件下,二硫键在乳蛋白热聚合中起到的作用较弱,对质量分数2.0% 的 WPC 纤维而言,游离巯基质量摩尔浓度仅降低了8.40%,而不同时间点混入 CN,游离巯基质量摩尔浓度变化量差异不大,约降低了13.76%,结果表明 CN 的加入提高了游离巯基质量摩尔浓度的变化量,其是 WPC 纤维的1.64 倍。由图可知,不同时间点混入 CN 的游离巯基质量摩尔浓度变化速率不同,从大到小依次为:A 类(0、0.5 h)、B 类(2 h)、C 类(3、5、9 h),A 类和 B 类在热处理0 ~5 h 时,游离巯基含量下降明显。

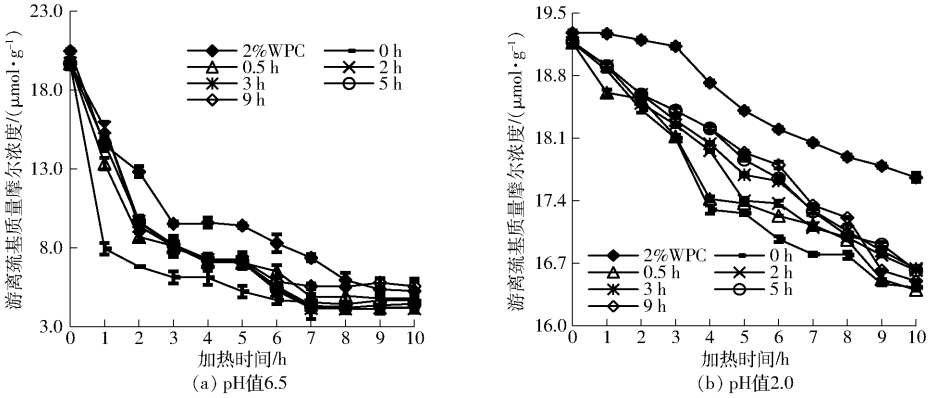


图6 质量分数3.0% 的 WPC 与3.5% 的 CN 混合共聚的游离巯基含量变化曲线

Fig. 6 Change of free sulfhydryl group by mixed copolymerization of 3.0% WPC and 3.5% CN

综上所述,pH 值2.0 下,WPC 与 CN 聚合的主要作用力为表面疏水性(见表1),CN 早期的混入,可以促进二硫键的形成,降低表面疏水性的提高。两种作用力的共同作用促进了 CN 与 WPC 的聚合,弱化了 WPC 自身间的作用,继而抑制 WPC 的纤维自组装,这种抑制作用在纤维形成初期混入CN尤为明显,而在纤维形成的中后期混入 CN,这种抑制减弱,可能是聚合发生在 CN 与初具纤维形态的 WPC 聚集体之间的缘故。

表1 不同 pH 值下聚合物主要作用力的差异

Tab. 1 Differences among major force of aggregate solution with two pH values

pH 值	类别	表面疏水性指数提高率/%	游离巯基质量摩尔浓度变化率/%
6.5	WPC - CN	42.43	76.33
6.5	WPC - CN 非纤维聚合(0 h 混入 CN)	54.49	14.29
2.0	WPC - CN 纤维聚合(5 h 混入 CN)	83.62	13.35
2.0	WPC 纤维	195.61	8.40

2.3 聚合动力学

为了定量比较 WPC 纤维形成不同时期混入 CN 的聚合量,试验研究了聚合动力学过程。

2.3.1 聚合量

如图7所示,质量分数2.0% 的 WPC 未聚合率高于 WPC 与 CN 混合的。在 pH 值6.5 时,热处理1 h 内,WPC 与 CN 聚合基本完成,并且不同时间点混入 CN,WPC 与 CN 聚合量差异不大;pH 值2.0

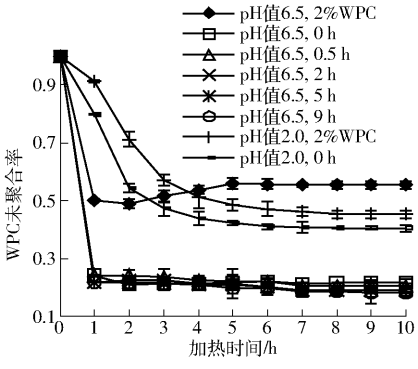


图7 WPC 未聚合率曲线

Fig. 7 WPC unpolymerization rate curves

下，在 WPC 纤维形成过程中，WPC 在热处理 1 ~ 5 h 聚合逐渐增加，5 h 以后聚合量很少；而在 WPC 纤维形成过程中混入 CN 时，WPC 与 CN 在 1 ~ 5 h 内缓慢发生聚合。

2.3.2　WPC 纤维形成不同时期 CN 混杂聚合的动力学差异

计算不同时间点混入 CN 后，单位时间内参与聚合的 WPC 占总聚合 WPC 的百分比见表 2，WPC 与 CN 的聚合主要发生在混入 CN 后的 1 ~ 2 h 里，并且 CN 加入得越早，与 CN 聚合的 WPC 越多。这种聚合量的变化不同于单一 WPC 形成纤维的聚合，在纤维形成过程中，WPC 的聚合主要发生在前 1 ~ 5 h，随后的聚合量非常低。

混入 CN 热处理 1 h 后，形成了不同聚合物的聚合速率常数 k，WPC 与 CN 在 pH 值 6.5 热处理的聚合速率常数是 pH 值 2.0 的 3.83 倍，而 pH 值 2.0 时不同时间混入 CN 间的聚合速率常数从大到小依次为：2 h、0 h、5 h、WPC + WPC、2.0% WPC、9 h，即 WPC - CN 纤维聚合物的聚合速率低于非纤维聚合物。0 h 混入 CN 聚合速率常数是 5、9 h 混入的 2.33、25.13 倍，而 2 h 混入 CN 聚合速率常数是 0 h 混入的 1.76 倍，表明在与 WPC 热聚合物过程中，CN 混入越晚，WPC 与 CN 聚合的速率越慢，这里 2 h 较为特殊，这可能与其表面疏水性有关[24-25]。

表 2　单位时间内参与聚合的 WPC 占总聚合 WPC 的百分比

Tab. 2　Percentage of aggregated WPC per hour of aggregate WPC　%

pH 值	混入 CN 时间/h	加热时间/h									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2.0	0	33.803	43.057	11.767	5.681	2.648	1.981	0.756	0.256	0.052	0.001
2.0	2	-	-	21.170	10.434	3.617	2.983	1.304	0.570	0.013	0.003
2.0	5	-	-	-	-	-	7.560	2.219	1.870	0.015	0.015
2.0	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.770
6.5	0	94.230	4.206	0.894	0.537	0.013	0.051	0	0.070	0	0
2.0% WPC		15.947	36.640	25.861	10.344	5.172	2.586	1.724	1.724	0.002	0
WPC + WPC		18.244	37.059	27.773	11.116	2.307	1.223	1.232	1.040	0.007	0

注：WPC + WPC 表示质量分数 3.0% 的 WPC 与 3.5% 的 WPC 混合；0 h 表示质量分数 3.0% 的 WPC 在热处理 0 h 与质量分数 3.5% 的 CN 混合，“ - ”表示混入 CN 时间为已加热过的时间，没有数据。

综上，CN 在 WPC 纤维的成核期混入时，由透射电镜可知愈加破坏纤维的微观形态；由荧光强度可知愈加降低 β-折叠结构的形成；由作用力可知愈加促进二硫键形成，愈加降低表面疏水性；而由聚合量可知，WPC 与 CN 聚合速率快，CN 竞争性地与 WPC 结合，弱化了 WPC 的纤维化进程，致使破坏混杂纤维的形成。CN 在纤维的生长期和稳定期混入时，WPC 已经初具纤维形态，此时发生的是 CN 与 WPC 纤维的聚合，CN 大多聚合在纤维的表面，不影响混杂纤维的形成。

3　结论

(1)在纤维形成不同阶段混入 CN，决定了形成聚合物的结构形态。在 WPC 纤维形成的成核期混入 CN，严重破坏了 WPC 的纤维结构；在生长期混入 CN，对纤维结构有一定影响，但纤维结构的总体结构框架没有破坏；在稳定期混入 CN，纤维形态良好，没有破坏 WPC 的纤维结构。

(2)WPC - CN 聚合物的作用力主要为疏水相互作用，二者间二硫键的过多形成会破坏混杂共聚纤维结构的形成。

(3)混入酪蛋白越晚(5 h 以后混入)，聚合速率常数 k 越小，多数乳清蛋白已在前期初步形成纤维，酪蛋白只与少量的乳清蛋白发生聚合，而这种聚合也主要发生在纤维结构表面；反之，混入酪蛋白越早，聚合速率常数 k 越大，乳清蛋白与酪蛋白的聚合量越多，破坏了纤维的构架，减弱了 WPC 间的聚合，形成更多的 WPC - CN 纤维聚合物。

参　考　文　献

[1] MICHAELS T C, DEAR A J, KIRKEGAARD J B, et al. Fluctuations in the kinetics of linear protein self-assembly[J]. Physical Review Letters, 2016, 116(25): 258103.

[2] HE J S, GAO Q, MU T H, et al. Molecular chaperone-like properties of sodium caseinate to suppress the pressure-induced aggregation of β-lactoglobulin[J]. High Pressure Research, 2019, 39(2): 1-8.

[3] AROSIO P, KNOWLES T P J, LINSE S. On the lag phase in amyloid fibril formation[J]. Physical Chemistry Chemical Physics, 2015, 17(12): 7606-7618.

[4] DANIELA O, WANG L. Fibrillization of whey proteins improves foaming capacity and foam stability at low protein

concentrations[J]. Journal of Food Engineering, 2014, 121: 102 - 111.
[5] XU H H, WANG J, DONG S R, et al. Acid-responsive properties of fibrils from heat-induced whey protein concentrate[J]. Journal of Dairy Science, 2016, 99(8): 6052 - 6060.
[6] SUZANNE G B, ASTRID J V, LEONARD M C S. Heat-induced whey protein isolate fibrils: conversion, hydrolysis, and disulphide bond formation[J]. International Dairy Journal, 2007, 17(7): 846 - 853.
[7] TOYAMA B H, WEISSMAN J S. Amyloid structure: conformational diversity and consequences[J]. Annual Review of Biochemistry, 2011, 80(1): 557 - 585.
[8] NELSON R, EISENBERG D. Recent atomic models of amyliid fibril structure[J]. Current Opinion in Structural Biology, 2006, 16(2): 260 - 265.
[9] GAO Y Z, XU H H, JU T T, et al. The effect of limited proteolysis by different proteases on the formation of whey protein fibrils[J]. Journal of Dairy Science, 2013, 96(12): 7383 - 7392.
[10] LIU Y, GUO R. pH-dependent structures and properties of casein micelles[J]. Biophysical Chemistry, 2008, 136(2 - 3): 67 - 73.
[11] SOHEILA G, SOLEIMAN A. Formation of natural casein micelle nanocapsule by means of pH changes and ultrasound[J]. Food Hydrocolloids, 2014,42: 42 - 47.
[12] ANEMA S G, LOWE E K, LEE S K. Effect of pH at heating on the acid-induced aggregation of casein micelles in reconstituted skim milk[J]. LWT—Food Science and Technology, 2004, 37(7): 779 - 787.
[13] FANNY G, MERVILLE N T, NICOLAI T, et al. Heat-induced aggregation of whey proteins in the presence of κ-casein or sodium caseinate[J]. Food Hydrocolloids, 2009, 23(4): 1103 - 1110.
[14] GHOSH P, VAIDYA A, KUMAR A, et al. Determination of critical nucleation number for a single nucleation amyloid-β aggregation model[J]. Mathematical Biosciences, 2016, 273: 70 - 79.
[15] MARK R H, KREBS G L, DEVLIN A M. Amyloid fibril-like structure underlies the aggregate structure across the pH range for β-lactoglobulin[J]. Biophysical Journal, 2009, 96(12): 5013 - 5019.
[16] WANG J, ZHAO M, YANG X, et al. Improvement on functional poperties of wheat gluten by enzymatic hydrolysis and ultrafiltration[J]. Journal of Cereal Science, 2006, 44(1): 93 - 100.
[17] MINGJIE H, SANHUI L, PENG X, et al. Selection and analyses of variants of adesigned protein suggest importance of hydrophobicity of partially buried sidechains for protein stability at high temperatures[J]. Protein Science, 2019, 28(8): 1437 - 1447.
[18] TAN J Y, XU H H, XIE M M, et al. Comparative experiments of fibril formation from whey protein concentrate with homogeneous and secondary nuclei[J]. Food Research International, 2018, 111: 556 - 564.
[19] BODE D C, STANYON H F, HIRANI T, et al. Serum albumin's protective inhibition of amyloid-β fibre formation is suppressed by cholesterol, fatty acids and warfarin[J]. Journal of Molecular Biology, 2018, 430(7): 919 - 934.
[20] ALEXIS L,TRISTAN B F, JOSEPH R. A topology-based investigation of protein interaction sites using hydrophobic cluster analysis[J]. Biochimie, 2019, 167: 68 - 80.
[21] JAYARAMAN J, GANESH S. Diameter of the vial plays a crucial role in the amyloid fibril formation: role of interface area between hydrophilic-hydrophobic surfaces[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 101: 290 - 298.
[22] GULZAR M, CROGUENNEC T, JARDIN J, et al. Copper modulates the heat-induced sulfhydryl/disulfide interchange reactions of beta-lactoglobulin[J]. Food Chemistry, 2009, 116(4): 884 - 891.
[23] 赵新淮, 李君文. 过氧化物酶催化酪蛋白的交联反应优化与乳化性改善[J]. 农业机械学报, 2009, 40(11): 144 - 149.
ZHAO Xinhuai, LI Junwen. Linking of casein by peroxidase and modification in emulsifying properties[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2009, 40(11): 144 - 149. (in Chinese)
[24] 徐红华, 谢明明, 丁瑞, 等. $CaCl_2$ 对纤维核诱导乳清浓缩蛋白聚合能力的影响[J/OL]. 农业机械学报, 2018, 49(10): 375 - 380.
XU Honghua, XIE Mingming, DING Rui, et al. Effect of $CaCl_2$ on aggregates of whey protein concentrate with adding fibril nuclei[J/OL]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2018, 49(10): 375 - 380. http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx? flag=1&file_no=20181043&journal_id=jcsam. DOI:10.6041/j.issn.1000-1298.2018.10.043. (in Chinese)
[25] 徐红华, 丁瑞, 郭珊珊, 等. 低 pH 值条件下不同大豆蛋白组分聚合性能研究[J/OL]. 农业机械学报, 2019,50(12): 380 - 386.
XU Honghua, DING Rui, GUO Shanshan, et al. Comparative experiments of polymerization properties for different soybean protein components at low pH value[J/OL]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2019,50(12): 380 - 386. http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx? flag=1&file_no=20191244&journal_id=jcsam. DOI:10.6041/j.issn.1000-1298.2019.12.044. (in Chinese)