

CaCl₂ 作用下核诱导形成乳清蛋白纤维聚合物特性研究

徐红华 郭芮池 谢明明 马彩虹 陈颖 刘玉琪

(东北农业大学食品学院, 哈尔滨 150030)

摘要: 在低 pH 值、低离子强度、长时间高温加热条件下乳清蛋白可以自组装形成纳米纤维聚合物。纤维的形成主要有自发和核诱导 2 种方式,对改善乳清蛋白的功能性质具有重要作用。通过界面性质与纤维结构的关系探究 CaCl₂ 对核形成、核诱导以及成熟纤维的影响。结果表明:核诱导方式比自发方式对 CaCl₂ 的耐受性更强,CaCl₂ 浓度为 50 mmol/L 时,均相核诱导、二次核诱导乳清蛋白形成的纤维聚合物较自发方式样品乳化稳定性指数分别降低了 30.92%、34.09%,泡沫稳定性指数分别降低了 68.18%、78.59%。加入 20~50 mmol/L CaCl₂ 能提高蛋白质的聚合速率,同时降低反应的活化能,但这种快速聚合破坏了纤维有序组装的过程,核诱导方式由于加快了纤维聚合物的形成速度,与自发方式相比,核诱导对 CaCl₂ 的耐受程度更高。

关键词: 乳清蛋白; 纤维; 聚合; 起泡性; 乳化性; 核诱导

中图分类号: TS252.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2021)09-0361-08 OSID: 

Properties of CaCl₂ on Nucleation-induced Whey Protein Fiber Polymer

XU Honghua GUO Ruichi XIE Mingming MA Caihong CHEN Ying LIU Yuqi

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

Abstract: Whey protein concentrate (WPC) is capable of self-assembling into amyloid fibril aggregates under certain denature conditions, such as high temperature with low pH and low ionic strength. There are two pathways for WPC to form amyloid fibril aggregates with spontaneous pathway and nucleation-induction pathway, which play an important role in improving the functional properties of WPC. The effect of CaCl₂ on nucleation formation, nucleation-induction and mature fibrils was investigated through the relationships between interface properties and fibrils structure. The results showed that the nucleation-induction method was more resistant to CaCl₂ than the spontaneous mode. When the CaCl₂ concentration was 50 mmol/L, the emulsification stability of the fibrous polymer formed by homogeneous nucleation-induction and two nucleation-induced whey protein was decreased by 30.92% and 34.09%, respectively, and the foam stability was decreased by 68.18% and 78.59%, respectively. The addition of 20~50 mmol/L CaCl₂ can increase the polymerization rate of protein and reduce the activation energy of the reaction. However, the rapid polymerization destroyed the orderly assembly process of fiber. Compared with the spontaneous mode, the nucleation-induction mode was more tolerant to CaCl₂ because it accelerated the formation of fiber polymer.

Key words: whey protein concentrate; fiber; aggregation; foaming properties; emulsifying properties; nucleation-induction

0 引言

乳清作为生产奶酪的副产品长久以来被人们充分利用^[1-2]。乳清蛋白在改善食品的性质、提高食品质量等方面具有重要作用^[3-4]。乳清蛋白在低 pH 值、低离子强度、长时间高温加热条件下能够形

成纳米纤维聚合物^[5-6]。这种纤维聚合物是一种长的、半柔性的淀粉状纤维,具有常规聚合物不具备的优良特性,在起泡性、乳化性等方面性质良好^[7-8]。乳清蛋白纤维聚合物可以通过自发和核诱导 2 种方式自组装形成,但是,蛋白质纤维聚合物的形成受离子强度的影响很大,一般盐的加入会改变其组装路

径进而导致形成能力丧失^[9-10],这也是其应用受到限制的主要原因。核的形成主要来自乳清蛋白组装初期形成的具有晶体结构的低聚物(均相核)和最终的成熟纤维(二次核)^[11-12]。针对乳清蛋白纤维聚合物只能在低离子条件下形成的缺陷^[13-14],本文研究乳清蛋白组装聚合物界面性质,通过改变CaCl₂浓度分析核诱导方式下形成的纤维聚合物能够耐受的离子强度,通过分析功能性质改变所产生的纤维组装结构变化,探究CaCl₂对核形成(第1阶段)、核诱导(第2阶段)、纤维聚合物(第3阶段)界面性质(乳化性、起泡性)的变化,同时研究CaCl₂对乳清蛋白聚合量动力学、纤维生成量的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料

乳清浓缩蛋白 WPC-80,美国 HILMAR 公司;CaCl₂,纯度 99.99%,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;硫黄素 T, Sigma 公司;其他化学试剂均为分析纯。

1.2 样品制备

1.2.1 均相核与二次核制备

乳清浓缩蛋白(WPC):参照文献[15-16],取5.00 g 乳清浓缩蛋白粉(WPC-80)溶于去离子水中,使用6 mol/L 和1 mol/L HCl 调 pH 值至2.0并用pH 值2.0的水(事先用6 mol/L HCl 调节pH 值)定容至100 mL,16 000 g 离心20 min(4℃),取中层清液,凯氏定氮测定蛋白质含量,用pH 值2.0的去离子水稀释至质量分数3.0%,4℃冰箱保存。

均相核:参照文献[17-18],上述pH 值2.0、质量分数3.0%的WPC在90℃水浴加热2 h,4℃冰箱保存。

二次核:参照文献[19],上述pH 值2.0、质量分数3.0%的WPC在90℃水浴加热10 h,4℃冰箱保存。

1.2.2 纳米纤维制备

自发:质量分数3.0%的WPC(pH 值2.0)于90℃水浴加热10 h,取样并于4℃冰箱保存。

均相核诱导:将上述均相核与质量分数3.0%的WPC(pH 值2.0)以体积比1:3混合均匀,90℃水浴加热10 h,取样并于4℃冰箱保存。

二次核诱导:将上述二次核与质量分数3.0%的WPC(pH 值2.0)以体积比1:3混合均匀,90℃水浴加热10 h,取样并于4℃冰箱保存。

空白样品的制备:为了消除核自身与WPC原料结构的差异,将1.2.1节形成的WPC、均相核、二次核分别与pH 值2.0的水以体积比1:3混合均匀,

90℃水浴加热10 h,取样并于4℃冰箱保存。后续测定的各项指标均减去空白样的相应值。

1.3 CaCl₂对核形成的影响

为了探究CaCl₂对核形成的影响,在乳清蛋白原料中加入不同离子强度的CaCl₂制备核,并进行核诱导,判断在CaCl₂作用下形成的核是否具有诱导形成正常纤维的能力。

CaCl₂对均相核形成的影响:取pH 值2.0、质量分数3.0%的WPC 28 mL添加2 mL 浓度0.15、0.3、0.75 mol/L的CaCl₂使溶液中CaCl₂浓度分别为0、20、50 mmol/L,蛋白最终质量分数为2.86%,混合均匀后90℃水浴加热2 h,4℃冰箱保存。

CaCl₂对二次核形成的影响:取pH 值2.0、质量分数3.0%的WPC 28 mL添加2 mL 浓度0.15、0.3、0.75 mol/L的CaCl₂,使溶液中CaCl₂浓度分别为0、20、50 mmol/L,蛋白最终质量分数为2.86%,混合均匀后90℃水浴加热10 h,4℃冰箱保存。

之后将上述在CaCl₂作用下形成的均相核、二次核与质量分数3.0%的WPC(pH 值2.0)以体积比1:3混合均匀,90℃水浴加热10 h,取样并于4℃冰箱保存。

空白样品的制备:将上述在CaCl₂作用下形成的均相核、二次核与pH 值2.0去离子水以体积比1:3混合均匀,以保证核浓度相同,90℃水浴加热10 h,取样并于4℃冰箱保存。

1.4 CaCl₂对核诱导能力的影响

为了探究CaCl₂对核诱导的影响,核形成之后加入不同离子强度的CaCl₂,通过核诱导制备纤维,与不加CaCl₂的自发相比判断CaCl₂对核诱导的影响。

CaCl₂对均相核诱导能力的影响:pH 值2.0、质量分数3.0%的WPC均相核与质量分数3.0%WPC以体积比1:3混合均匀,取28 mL上述蛋白样品添加2 mL CaCl₂使溶液中CaCl₂浓度分别为0、20、50 mmol/L,蛋白最终质量分数均为2.86%,90℃水浴加热2 h,取样并于4℃冰箱保存。

CaCl₂对二次核诱导能力的影响:pH 值2.0、质量分数3.0%的WPC均相核、二次核与质量分数3.0%的WPC以体积比1:3混合均匀,取28 mL上述蛋白样品添加2 mL 浓度0.15、0.3、0.75 mol/L的CaCl₂使溶液中CaCl₂浓度分别为0、20、50 mmol/L,蛋白最终质量分数均为2.86%,90℃水浴加热10 h,取样并于4℃冰箱保存。

空白样品的制备:WPC、均相核、二次核分别与去离子水(pH 值2.0)以体积比1:3混合,取28 mL混合样品添加2 mL 浓度0.15、0.3、0.75 mol/L的

CaCl₂ 使溶液中 CaCl₂ 浓度分别为 0、20、50 mmol/L, 90℃ 水浴加热 10 h, 取样并于 4℃ 冰箱保存。

1.5 界面性质

为探究在不同阶段添加 CaCl₂ 对纳米纤维聚合物功能性质的影响, 测定了在 CaCl₂ 作用下形成的核诱导 WPC、在诱导过程中添加 CaCl₂、在纤维成熟后添加 CaCl₂ 的自发、均相核诱导、二次核诱导的起泡性与乳化性, 样品均为热处理 10 h, CaCl₂ 浓度为 0、20、50 mmol/L。

1.5.1 起泡性

参照文献[20-21]并加以改进, 用 pH 值 7.0 的去离子水将蛋白质量分数稀释至 0.15%, 室温(20℃)下均质 1 min(10 000 r/min)后测定泡沫的体积, 并记录静置至泡沫消泡至原体积一半的时间。通过相对溢出量和静止后稳定的泡沫体积比测定样品的起泡能力和泡沫稳定性指数, 具体计算方法为

$$F_c = V_0/V_i \times 100\%$$

$$F_s = t_{1/2}$$

式中 F_c ——起泡能力, %

F_s ——泡沫稳定性指数, min

V_0 ——起泡 0 h 时的泡沫体积

V_i ——起泡前最初液体的体积

$t_{1/2}$ ——消泡至 $V_0/2$ 的时间, min

$$F_{CWPC} = F_c - F_{c0}$$

$$F_{SWPC} = t - t_0$$

式中 F_{CWPC} ——被诱导 WPC 的起泡能力, %

F_{c0} ——对应空白样品的起泡能力, %

F_{SWPC} ——被诱导 WPC 的泡沫稳定性指数, min

t ——样品的泡沫稳定性指数, min

t_0 ——对应空白样品的泡沫稳定性指数, min

1.5.2 乳化性

参照文献[22]的方法并加以改进, 用 pH 值 2.0 的去离子水稀释样品至质量分数 1.0%, 取 30 mL 的样品加入 10 mL 大豆油, 室温下用高速匀浆机 20 000 r/min 下均质 3 min, 立即取底部乳状液 30 μL 加入 5 mL 质量分数 0.1% 的 SDS(十二烷基硫酸钠)溶液中, 在 500 nm 处测定吸光度, 以质量分数 0.1% 的 SDS 为空白调零, 乳化活性指数和乳化稳定性指数计算公式为

$$E_{AI} = 2 \times 2.303 / [C(1 - \phi) \times 10^4] A_{500} \times 100$$

$$E_{SI} = \frac{A_t}{A_0} \times 100\%$$

式中 E_{AI} ——乳化活性指数, m²/g

E_{SI} ——乳化稳定性指数, %

C ——蛋白质质量浓度, g/mL

A_{500} ——溶液在 500 nm 下的吸光度

ϕ ——大豆油占乳化液的体积分数, 取 25%

A_t ——乳化液静置 20 min 时的吸光度

A_0 ——乳化液静置 0 min 时的吸光度

$$E_{AIWPC} = E_{AI} - E_{AI0}$$

$$E_{SIWPC} = E_{SI} - E_{SI0}$$

式中 E_{AIWPC} ——被诱导 WPC 的乳化活性指数, m²/g

E_{AI0} ——对应空白样品的乳化活性指数, m²/g

E_{SIWPC} ——被诱导 WPC 的乳化稳定性指数, %

E_{SI0} ——对应空白样品的乳化稳定性指数, %

1.6 Th T 荧光强度

参照文献[23]的方法并加以改进, 取 0.80 g 甲硫磺素 T(Th T)溶于 0.2 mol/L 的 NaCl、0.01 mol/L 的磷酸缓冲液(pH 值 7.0), 并定容至 1 000 mL。用水系 0.22 μm 滤膜过滤, 所得滤液即为 Th T 储备液。测定时使用 Th T 工作液, 即储备液含有 0.2 mol/L 的 NaCl、0.01 mol/L 的磷酸缓冲液(pH 值 7.0)稀释 50 倍。储备液与工作液均存放在冰箱 4℃ 避光棕色瓶内。取 800 μL 样品加入 10 mL 的 Th T 工作液中, 旋涡振荡 1 min 后, 于荧光分光光度计下比色。设定参数为: 激发波长为 460 nm, 发射波长为 490 nm, 狭缝宽度分别为 5 nm 和 10 nm, 测定不同加热时间下样品的荧光强度公式为

$$T_{hTWPC} = T_{hT} - T_{hT0}$$

式中 T_{hTWPC} ——被诱导的 WPC 的 Th T 荧光强度

T_{hT} ——样品的 Th T 荧光强度

T_{hT0} ——对应空白样品的 Th T 荧光强度

被诱导的 WPC 每小时荧光强度变化量为诱导 $t + 1$ h 的荧光强度减去诱导 t 的荧光强度。

1.7 蛋白聚合率

取 20 mL 样液于 50 mL 离心管中, 15 000 g、4℃ 离心 30 min, 取上层清液, 利用凯氏定氮法测定蛋白含量, 计算公式为

$$C' = C_t/C_0 \times 100\%$$

式中 C' ——蛋白聚合率, %

C_0 ——初始样品蛋白质质量浓度, mg/mL

C_t —— t 时未聚合蛋白质质量浓度, mg/mL

核诱导过程中核自身也会发生变化, 本试验中为去除核自身的影响, 研究被诱导的 WPC 蛋白聚合率的变化, 因此需要减去空白样品的蛋白聚合率, 公式为

$$C'_{WPC} = C' - C'_0$$

式中 C'_{WPC} ——被诱导的 WPC 蛋白聚合率

C'_0 ——对应空白样品的蛋白聚合率

1.8 蛋白质聚合速率

利用 1.7 节中的数据结果和非线性回归速率公式计算自发、均相核诱导、二次核诱导在形成纤维过程中加入不同浓度 CaCl_2 的动力学参数公式为

- df/dt = k_n Cⁿ (12)

式中 df/dt——每小时荧光强度变化量, h⁻¹
n 取 1。在一定的加热时间 t 后, 蛋白形成聚合物通过离心沉淀聚合物, 上清液中蛋白质量浓度由 C₀ 下降至 C_t (g/L), 活化能满足公式

ln C_t/C₀ = -kt (13)

E_a = -RT lnk + C (14)

k = k_n C₀ⁿ⁻¹ (15)

式中 k——反应速率常数(蛋白质聚合速率)
E_a——反应的活化能
R——气体常数, 取 8.314 J/(mol·K)
T——热力学温度

1.9 数据统计分析

所有试验均重复 3 次。采用 SPSS 16.0 软件进行方差分析 (ANOVA), 检验差异显著性 (P <

0.05), 结果均用平均值 ± 标准差表示, 使用 Excel 2010 软件制图。

2 结果与讨论

2.1 乳化性

采用核诱导方式制备乳清蛋白纳米纤维, 整个过程分为 3 个阶段: 第 1 阶段核形成时期; 第 2 阶段核诱导时期; 第 3 阶段纤维聚合物已形成时期^[24-25]。 CaCl_2 在不同阶段混入对纤维聚合物的形成可能有不同影响, 通过乳化性能的差异推断可能产生的结构差异。从图 1 (图中不同大写字母表示组间差异显著, 不同小写字母表示组内差异显著, 下同) 可以看出, 未添加 CaCl_2 时核诱导的乳化活性高于自发, 其中二次核诱导高于均相核诱导。添加 CaCl_2 时, 乳清蛋白通过自发方式形成纤维聚合物的乳化活性无明显变化, 对于核诱导方式而言, 核形成时期 (第 1 阶段) 添加 CaCl_2 会降低其乳化活性, 但在核诱导期以及纤维形成之后 (第 2、3 阶段) 则无影响, 且乳化活性优于自发方式。

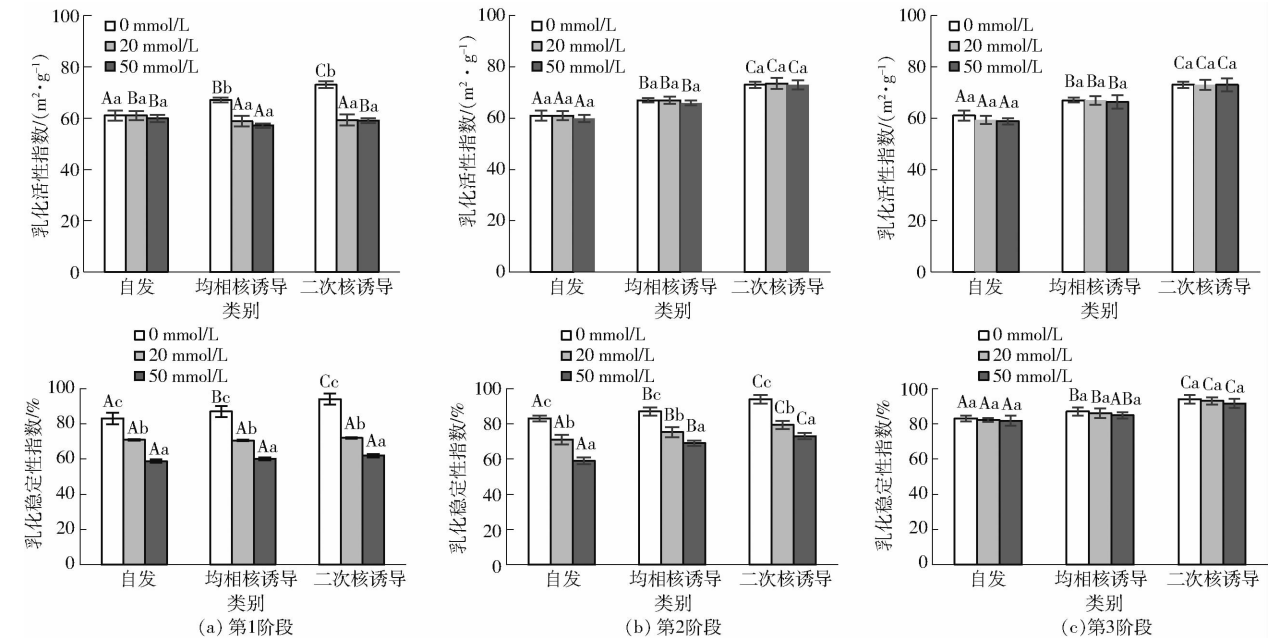


图 1 纤维不同形成阶段添加 CaCl_2 其乳化性的变化

Fig. 1 Emulsifying changes of fiber at three different stages with addition of CaCl_2

对其乳化稳定性而言, 未添加 CaCl_2 时核诱导的乳化稳定性高于自发, 其中二次核诱导高于均相核诱导。在核形成时期 (第 1 阶段) 添加 CaCl_2 , 其乳化稳定性降低程度高于自发方式; 与第 1 阶段不同, 核诱导阶段 (第 2 阶段) 添加 CaCl_2 , 核诱导方式比自发方式表现出更好的乳化稳定性能, 二次核诱导更为突出, CaCl_2 浓度为 50 mmol/L 时, 均相核诱导、二次核诱导乳清蛋白形成的纤维聚

合物较自发方式样品乳化稳定性指数分别降低了 30.92%、34.09%; 对于纤维已经形成的第 3 阶段添加 CaCl_2 的样品乳化稳定性无明显变化。

2.2 起泡性

起泡能力如图 2 所示, 未添加 CaCl_2 时, 核诱导的起泡能力高于自发, 其中二次核诱导高于均相核诱导。在核形成时期 (第 1 阶段) 添加 CaCl_2 时, 自发样品的起泡能力无明显变化, 核诱导样品的起泡

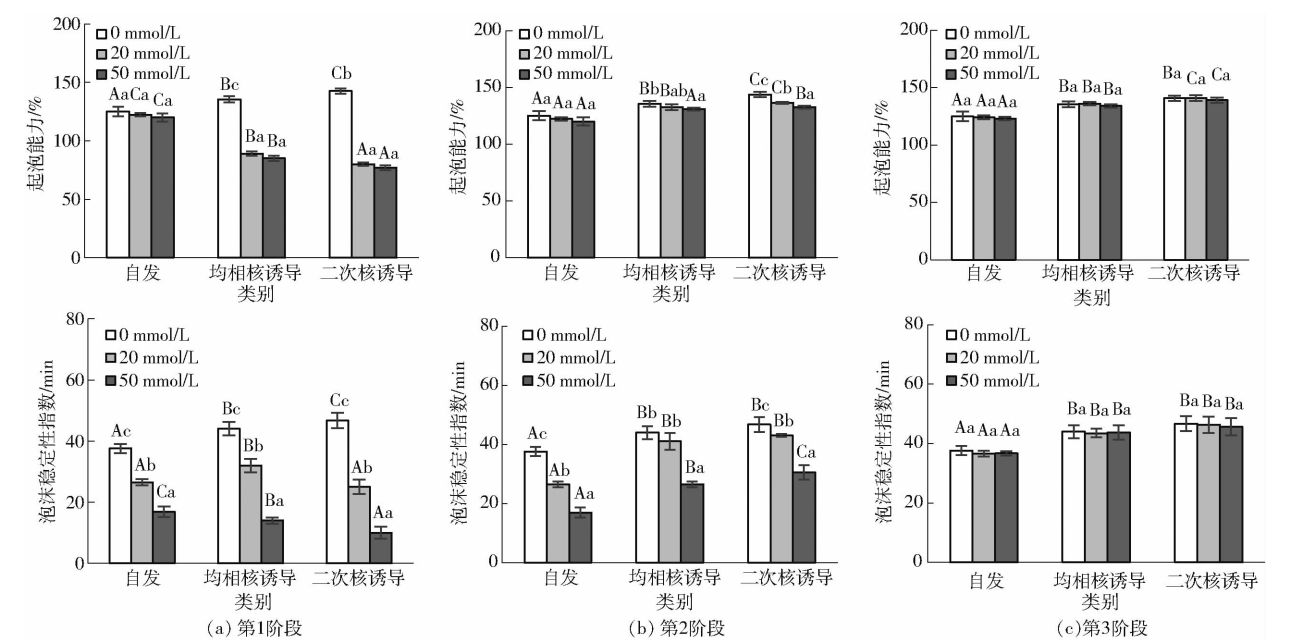


图2 纤维不同形成阶段添加 CaCl₂ 起泡性变化

Fig. 2 Foaming changes of fiber at three different stages with addition of CaCl₂

能力明显低于自发样品;其中二次核诱导样品较均相核诱导样品的起泡能力相比略低,且起泡能力随 CaCl₂ 浓度变化较小。第 2、3 阶段添加 CaCl₂ 样品的起泡能力分别与对照样相比无明显变化。

泡沫稳定性如图 2 所示,第 1 阶段添加 CaCl₂ 时破坏了纤维核的形成,使其不能正常形成纤维聚合结构,表现出对 CaCl₂ 的耐受性差,导致样品的泡沫稳定性均低于自发方式样品,且随 CaCl₂ 浓度的增加而降低;第 2 阶段添加 CaCl₂ 时,纤维核已经形成,诱导乳清蛋白形成纤维聚合物的过程中对 CaCl₂ 耐受性强于自发样品,导致样品的泡沫稳定性比自发样品高,且随 CaCl₂ 浓度的增加而增加,在添加 50 mmol/L CaCl₂ 时,均相核诱导、二次核诱导泡沫稳定性指数分别降低了 68.18%、78.59%。第 3 阶段添加 CaCl₂ 时纤维已经形成, CaCl₂ 对纤维无影响,导致样品的泡沫稳定性变化不大。

2.3 Th T 荧光分析

2.3.1 核形成

通过测定样品的 Th T 荧光强度,判断在 CaCl₂ 作用下形成的核是否具有诱导形成正常纤维的能力 [26-27]。硫黄素 (Th T) 是一种荧光染料,可特异性与纤维 β-折叠结构相结合,可侧面反映纤维的数量 [28-29]。由图 3 可知, CaCl₂ 对核的形成有影响, CaCl₂ 对均相核与二次核的形成影响有所不同,2 种核丧失诱导能力的程度不同。

在低 CaCl₂ 浓度下,自发的荧光强度大于核诱导,且均相核大于二次核;证明在该条件下核的形成

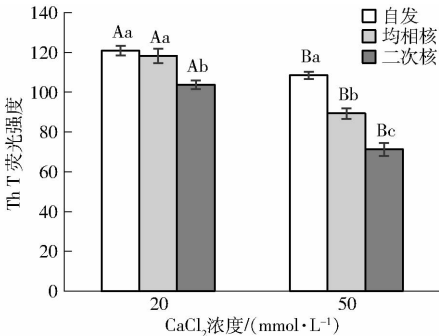


图3 不同浓度 CaCl₂ 对核诱导形成能力的影响

Fig. 3 Effects of different concentrations of CaCl₂ on nucleation-induction capacity

受到破坏,丧失诱导能力。在高 CaCl₂ 浓度下,自发的荧光强度大于核诱导,且均相核大于二次核; CaCl₂ 浓度越高破坏能力越强。

2.3.2 核诱导过程纤维量

如图 4 所示,未加 CaCl₂ 时,自发的荧光强度低于 2 种核诱导,且二次核诱导高于均相核诱导,2 种

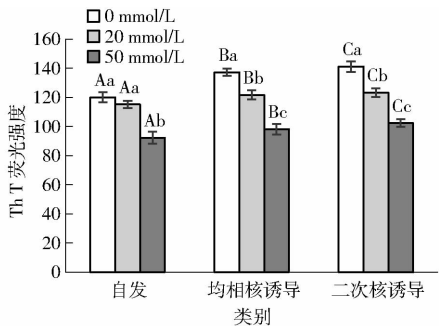


图4 CaCl₂ 对不同纤维形成方式乳清蛋白纤维量的影响

Fig. 4 Effects of CaCl₂ on whey protein fiber content in different fiber formation modes

核诱导可增加纤维量。2 种核在 20 mmol/L 的 CaCl_2 浓度下,核诱导样品的荧光强度高于自发样品,均相核、二次核仍具有诱导能力,且二次核诱导高于均相核诱导。在 50 mmol/L 的 CaCl_2 浓度下时,自发、均相核诱导、二次核样品较对照组样品的荧光强度均减少,分别减少了 23.14%、28.43%、26.91%,说明在诱导过程中 CaCl_2 降低核诱导能力,破坏纤维结构,但荧光强度上依旧保持着核诱导高于自发、二次核高于均相核的规律。

为探究核诱导在添加不同浓度 CaCl_2 后核诱导能力的差异,用添加 CaCl_2 的二次核样品的 Th T 荧光强度与不加 CaCl_2 的样品作差,ThT 荧光强度下降 27.55%。添加 CaCl_2 的样品 Th T 荧光强度减小,均相核诱导与二次核诱导在低 CaCl_2 浓度下其 Th T 荧光强度依旧高于自发,说明依然具有诱导能力;高 CaCl_2 浓度下其 Th T 荧光强度下降,诱导能力丧失。此结果表明核诱导过程中加入盐离子会破坏纤维结构的形成。

综上,纤维核通过自发方式形成时对 CaCl_2 的耐受能力差,这也说明盐离子对乳清蛋白自组装形成纤维聚合物的破坏主要是影响核的形成;相反,一旦纤维核已经形成,相比自发方式,核诱导方式更能够在一定的盐离子条件下诱导乳清蛋白形成纤维聚合物。

2.4 蛋白质聚合能力

2.4.1 蛋白质聚合率

如图 5 所示,延长加热时间,不同样品的未聚合量均呈现下降趋势,3 种样品随 CaCl_2 浓度增加,未聚合量逐渐降低,表明延长热处理时间和提高 CaCl_2 浓度会促进蛋白质之间聚合形成大分子聚合物。纤维形成过程主要分为 3 个阶段,滞后期(0~2 h)、指数增长期(2~5 h)、成熟期(5~10 h)。与自发手段不同,核诱导的聚合量在滞后期增长较快,而自发在指数增长期同样增长迅速。在滞后期 CaCl_2 对聚合速率的影响尤为明显,加入 CaCl_2 会显著提高样品的聚合速率,且随 CaCl_2 浓度升高提高幅度越大。

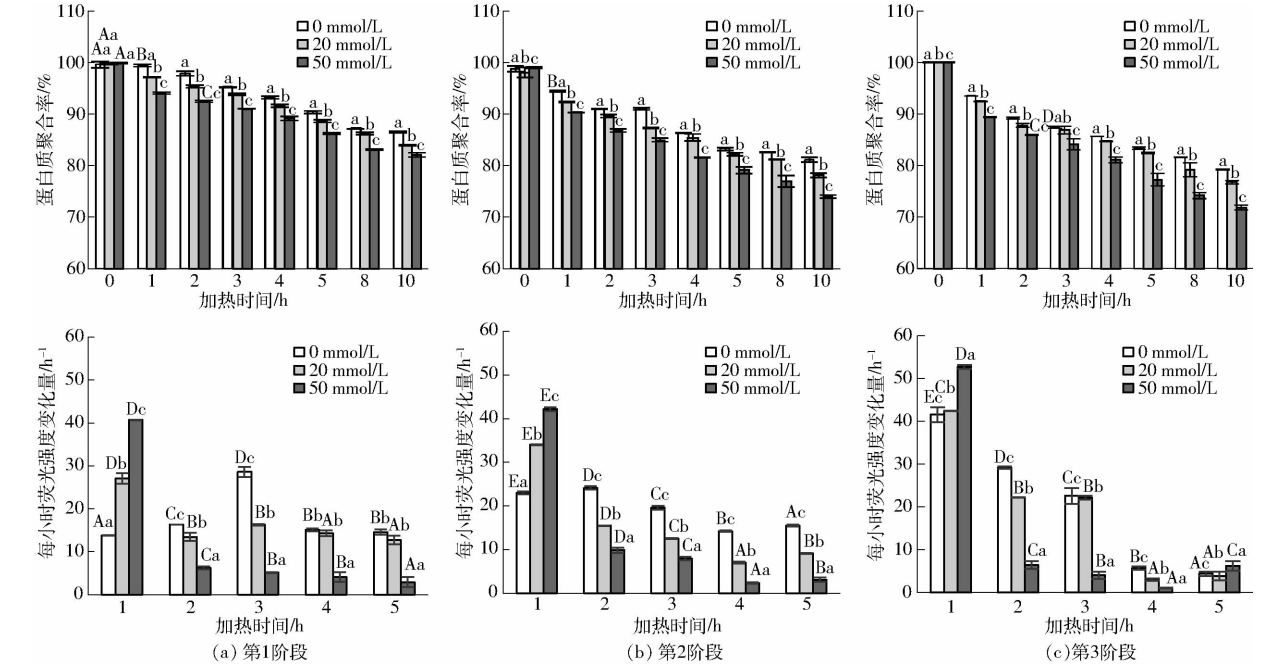


图 5 纤维不同形成阶段添加 CaCl_2 其蛋白质聚合率的变化

Fig. 5 Change of protein polymerization amount when adding CaCl_2 at different stages of fiber formation

2.4.2 蛋白质聚合速率

自发、均相核诱导、二次核诱导添加 CaCl_2 后热处理形成纤维聚合物的聚合动力学参数存在一定差异(见表 1)。未添加 CaCl_2 时,均相核与二次核诱导的聚合速率高于自发,分别是自发的 1.44 与 1.61 倍,二次核诱导的聚合速率最大,核诱导的活化能低于自发,说明核诱导更容易达到活化状态,更易聚合形成纤维。添加 CaCl_2 可明显提高自发和核诱导 2 种纤维聚合方式的聚合速率,降低活化能,改

变幅度随离子浓度的增加而增大。在 CaCl_2 浓度为 50 mmol/L 时,自发、均相核诱导、二次核诱导其聚合速率较其对照样(未加 CaCl_2 样品)分别提高了 41.98%、45.75%、44.49%。通过聚合量动力学参数可知, CaCl_2 的加入可促进聚合反应,加快聚合速率,降低活化能。文献[30-31]研究同样也指出向蛋白中添加纤维核就是引入了有序的区域,这导致了酸水解形成的肽段可以直接吸附到均相核上,从而导致滞后期缩短,加快了纤维形成速率。由于核

表 1 自发、均相核诱导、二次核诱导添加 CaCl_2 后热处理聚合动力学参数

Tab.1 Polymerization kinetic parameters for spontaneous, homogeneous nucleation-induction and secondary nucleation-induction addition of CaCl_2 after heat treatment

类别	CaCl_2 浓度/(mmol·L ⁻¹)	蛋白质聚合速率 $k/(\text{g}^{1-n} \cdot \text{L}^{n-1} \cdot \text{s}^{-1})$	活化能 $E_a/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$
自发	0	$(4.74 \times 10^{-6} \pm 5.37 \times 10^{-8})^{\text{Aa}}$	$(17.08 \pm 0.05)^{\text{Aa}}$
	20	$(5.32 \times 10^{-6} \pm 5.42 \times 10^{-8})^{\text{Ab}}$	$(16.95 \pm 0.01)^{\text{Ab}}$
	50	$(6.73 \times 10^{-6} \pm 7.73 \times 10^{-8})^{\text{Ac}}$	$(16.80 \pm 0.04)^{\text{Ac}}$
均相核诱导	0	$(6.82 \times 10^{-6} \pm 5.84 \times 10^{-8})^{\text{Ba}}$	$(16.77 \pm 0.03)^{\text{Ba}}$
	20	$(7.48 \times 10^{-6} \pm 6.21 \times 10^{-8})^{\text{Bb}}$	$(16.70 \pm 0.05)^{\text{Bb}}$
	50	$(9.94 \times 10^{-6} \pm 5.44 \times 10^{-8})^{\text{Bc}}$	$(16.50 \pm 0.02)^{\text{Bc}}$
二次核诱导	0	$(7.62 \times 10^{-6} \pm 5.76 \times 10^{-8})^{\text{Ca}}$	$(16.67 \pm 0.03)^{\text{Ca}}$
	20	$(8.74 \times 10^{-6} \pm 6.01 \times 10^{-8})^{\text{Cb}}$	$(16.58 \pm 0.04)^{\text{Cb}}$
	50	$(1.10 \times 10^{-5} \pm 6.84 \times 10^{-8})^{\text{Cc}}$	$(16.40 \pm 0.05)^{\text{Cc}}$

注:同列数据不同大写字母表示组间差异显著,不同小写字母表示组内差异显著。

诱导形成纤维的聚合速率高于自发方式,加入 CaCl_2 产生的这种聚合动力学的变化可能对核诱导聚合形成纤维的影响更小。

3 结论

- (1)核形成过程中(第 1 阶段)加入 CaCl_2 能破坏核的形成,使核的诱导能力丧失,因此乳化活性、乳化稳定性、起泡能力和泡沫稳定性降低, CaCl_2 浓度增加,对核形成的破坏作用加剧。
- (2)核诱导过程中(第 2 阶段)加入 CaCl_2 纤维形成量虽然下降,但与自发方式相比,核诱导方式对

CaCl_2 的耐受能力相对更强,纤维形成量更多,界面性质更优。

- (3)纤维形成后(第 3 阶段)加入 CaCl_2 对纤维结构无破坏作用,对其界面性质也无显著影响。
- (4)加入 CaCl_2 对核的形成以及核诱导过程的破坏作用,可能主要来自 CaCl_2 能够提高蛋白质的聚合速率,降低反应的活化能,这种快速聚合破坏了乳清蛋白形成纤维的有序组装过程。但是,由于核诱导自身组装聚合的速率高于自发方式, CaCl_2 产生的这种聚合动力学的变化可能对核诱导聚合形成纤维的影响更小。

参 考 文 献

[1] 徐红华,王欣,鞠婷婷,等.酪蛋白对乳清浓缩蛋白自组装形成纳米纤维的影响[J/OL].农业机械学报,2020,51(10):395-402. XU Honghua, WANG Xin, JU Tingting, et al. Effects of casein on whey protein concentrate self-assembling to form nano-fibril polymers[J/OL]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2020, 51(10):395-402. http://www.jcsam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?file.no=20201045&flag=1. DOI:10.6041/j.issn.1000-1298.2020.10.045. (in Chinese)

[2] ZY J U, KILARA A. Textural properties of cold-set gels induced from heat-denatured whey protein isolates[J]. Journal of Food Science, 1998, 63(2): 288-292.

[3] KEPPLER J K, SCHWARZ K. Increasing the emulsifying capacity of whey proteins at acidic pH values through covalent modification with allyl isothiocyanate[J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2017, 522: 514-524.

[4] ODUSE K, CAMPBELL L, LONCHAMP J, et al. Electrostatic complexes of whey protein and pectin as foaming and emulsifying agents[J]. International Journal of Food Properties, 2018, 20(3): 3027-3041.

[5] BOLDER S G, VASBINDER A J, SAGIS L M C, et al. Heat induced whey protein isolate fibrils: conversion, hydrolysis, and disulphide bond formation[J]. International Dairy Journal, 2007, 17(7): 846-853.

[6] SUTARIYA S G, HUPPERTZ T, PATEL H A. Influence of milk pre-heating conditions on casein-whey protein interactions and skim milk concentrate viscosity[J]. International Dairy Journal, 2017, 69: 19-22.

[7] DILEK S, VENEMA P, VRIES R D, et al. Relation between gelation conditions and the physical properties of whey protein particles[J]. Langmuir, 2012, 28(16): 6551-6560.

[8] GUZEY D, MCCLEMENTS D J. Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry[J]. Advances in Colloid & Interface Science, 2006, 128-130: 227-248.

[9] MANTOVANI R A, FURTADO G D F, NETTO F M, et al. Assessing the potential of whey protein fibril as emulsifier[J]. Journal of Food Engineering, 2018, 223: 99-108.

[10] OBOROCEANU D, WANG L, MAGNER E, et al. Fibrillization of whey proteins improves foaming capacity and foam stability at low protein concentrations[J]. Journal of Food Engineering, 2014, 121(1): 102-111.

- [11] HONGSPRABHAS P, BARBUT S. Structure-forming processes in Ca^{2+} induced whey protein isolate gelation[J]. International Dairy Journal, 1997, 7(12): 827 – 834.
- [12] KATSUTA K. Effects of salts and saccharides on the rheological properties and pulsed NMR of rice starch during gelatinization and retrogradation processes[M] // WILLIAMS P A, PHILLIPS G O. Gums and stabilisers for the food industry 9. Elsevier, 1998.
- [13] HONGSPRABHAS P, BARBUT S, MARANGONI A G. The structure of cold-set whey protein isolate gels prepared with Ca^{2+} [J]. LWT—Food Science and Technology, 1999, 32(4): 196 – 202.
- [14] HONGSPRABHAS P, BARBUT S. Effect of gelation temperature on Ca^{2+} -induced gelation of whey protein isolate [J]. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie, 1997, 30(1): 45 – 49.
- [15] 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.
- [16] MOHAMMOL/LADIAN M, MADADLOU A. Cold-set hydrogels made of whey protein nanofibrils with different divalent cations [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 89: 499 – 506.
- [17] MANTOVANI R A, FATTORI J, MICHELON M, et al. Formation and pH-stability of whey protein fibrils in the presence of lecithin[J]. Food Hydrocolloids, 2016, 60: 288 – 298.
- [18] NICOLAI T, DURAND D. Controlled food protein aggregation for new functionality[J]. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2013, 18(4): 249 – 256.
- [19] MANTOVANI R A, PINHEIRO A C, VICENTE A A, et al. In vitro digestion of oil-in-water emulsions stabilized by whey protein nanofibrils[J]. Food Research International, 2017, 99(1): 790 – 798.
- [20] PENG D, JIN W, TANG C, et al. Foaming and surface properties of gliadin nanoparticles: influence of pH and heating temperature[J]. Food Hydrocolloids, 2018, 77: 107 – 116.
- [21] KAUR M, HEALY J, VASUDEVAMURTHY M, et al. Stability and cytotoxicity of crystallin amyloid nanofibrils [J]. Nanoscale, 2014, 6(21): 13169 – 13178.
- [22] AGYARE K K, ADDO K, XIONG Y L. Emulsifying and foaming properties of transglutaminase-treated wheat gluten hydrolysate as influenced by pH, temperature and salt[J]. Food Hydrocolloids, 2009, 23(1): 72 – 81.
- [23] AKKERMANS C, VENEMA P, AJ V D G, et al. Peptides are building blocks of heat-induced fibrillar protein aggregates of beta-lactoglobulin formed at pH 2[J]. Biomacromolecules, 2008, 9(5): 1474 – 1479.
- [24] NICOLAI T, BRITTEN M, SCHMITT C. β -Lactoglobulin and WPI aggregates: formation, structure and applications[J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(8): 1945 – 1962.
- [25] MUDGAL P, DAUBERT C R, FOEGEDING E A. Kinetic study of β -lactoglobulin thermal aggregation at low pH[J]. Journal of Food Engineering, 2011, 106(2): 159 – 165.
- [26] DURAND D, GIMEL J C, NICOLAI T. Aggregation, gelation and phase separation of heat denatured globular proteins[J]. Physica A Statistical Mechanics & Its Applications, 2002, 304(1): 253 – 265.
- [27] ADAMCIK J, MEZZENGA R. Proteins fibrils from a polymer physics perspective[J]. Macromolecules, 2012, 45(3): 1137 – 1150.
- [28] LOVEDAY S M, ANEMA S G, SINGH H. β -Lactoglobulin nanofibrils: the long and the short of it[J]. International Dairy Journal, 2016, 67: 35 – 45.
- [29] KHURANA R, IONESCU-ZANETTI C, POPE M, et al. A general model for amyloid fibril assembly based on morphological studies using atomic force microscopy[J]. Biophysical Journal, 2003, 85(2): 1135 – 1144.
- [30] VANEYCK J, SEGERS-NOLTEN I, BROERSEN K, et al. Cross-seeding of alpha-synuclein aggregation by amyloid fibrils of food proteins[J]. Journal of Biological Chemistry, 2021, 296: 100358.
- [31] 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.