

乳清蛋白多孔态结构表征及其加工特性的改善

佟岳¹, 张甜甜¹, 李晶晶¹, 高增丽², 母智深^{2*}, 刘培玲^{1*}

¹ 内蒙古工业大学食品科学与工程系 呼和浩特 010051

² 内蒙古蒙牛乳业(集团)有限公司 呼和浩特 011500

摘要 以乳清蛋白为原料,采用高静压技术处理,研究不同压强对乳清蛋白结构和性质的影响。结果表明:处理后的乳清蛋白从原有的空心球状结构改变为蜂窝状多孔有序结构。在 300 MPa 时 Zeta 电位的绝对值(-211.57 mV)和平均粒径(34.87 μm)均为最小。无规卷曲向 β -转角转化, β -转角含量由 24.63%增至 39.97%,无规卷曲含量由 30.67%显著降至 15.60%。游离巯基含量下降,二硫键含量从 1.69 $\mu\text{mol/g}$ 升至 3.82 $\mu\text{mol/g}$ 。荧光光谱结果显示:乳清蛋白在 400 MPa 时具有最佳的疏水性。经高静压处理的乳清蛋白的起泡性、乳化性、持水/油性及抗氧化性等加工特性有明显改善。乳清蛋白的起泡能力和乳化能力均在 400 MPa 时达到最佳值,起泡性最高达 40.67%,乳化性最高达 108.4 m^2/g ,持水/油率分别提高 83.50%/144.52%,自由基清除能力从 7.64%提高到 14.15%。本研究为高静压技术在乳清蛋白产品开发方面的应用和性质提供参考。

关键词 乳清蛋白;高静压;结构;性质

文章编号 1009-7848(2024)10-0124-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.10.012

乳清蛋白是牛乳中提取出的一种蛋白质,含量仅次于酪蛋白,占牛奶中蛋白质总量的 20%^[1]。乳清蛋白包括 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白、牛血清白蛋白、免疫球蛋白,还存在少量乳铁蛋白和生物活性成分^[2-3],浓缩了牛奶中丰富的营养成分,是营养最完全的蛋白质^[3-5]。此外,乳清蛋白也具有诸多生物学作用和功能特性,如抗氧化、降血压、降血脂、乳化性、发泡性、持水性等,使其成为各种强化型食品的理想蛋白质来源^[1,3-4]。乳清蛋白在食品领域应用虽广泛,但仍存在营养流失大,功能特性低的问题。需对其加工改性以满足人们对于乳清蛋白营养流失最小化和更高功能特性的迫切需求。

目前,乳清蛋白有多种改性方法,主要分为物理、化学和生物法三大类。其中,物理改性方法因加工过程绿色环保,无毒副作用,方便快捷且加工速度快的优点,而成为当前蛋白质研究的热点。高静压技术(High hydrostatic pressure, HHP)是物理改性中非热处理技术之一。高压过程主要遵循

帕斯卡原理(Pascal's principle)和勒夏特列原理(Le Chatelier's principle),即静水压力的传递效果不会随食品的外观、质地发生增减,反应的平衡体系会向着减弱此作用的方向进行。通过设置不同的静水压力(100~600 MPa 之间)^[6-7],以水作为压力传递介质,影响放在高压釜内的样品。HHP 处理下,原料表面和内部的疏水基团、亲水基团、氨基酸残基等发生暴露、包埋或重排,分子结构改变,导致多种性质变化,从而达到对原料的改性、灭菌和提高货架期的效果^[8]。HHP 技术在优化食品功能特性,保留食品营养方面有很大优势^[9],由此广受科研人员的关注。如:张勇等^[10]使用高静压技术改性牛奶,发现游离态钙含量增多,最大限度地保留了牛乳的营养价值。Bouaouina 等^[11]通过动态高压手段发现乳清蛋白发泡性和泡沫稳定性大幅提高。Lee 等^[12]发现高压均质处理可以暴露乳清分离蛋白的疏水基团,促进分子的相互作用,从而使乳液的稳定性显著提高。姜雪等^[13]发现 300 MPa 压力下保压 5 min,可以有效杀灭治病细菌,并保留牛奶中的 VC 等营养成分。然而,HHP 对蛋白质领域的研究大多集中在植物及肉类蛋白、水产和牛奶杀菌中^[14],对单一乳清蛋白体系的研究很少。

本文以乳清蛋白为原料,分析不同压强对乳

收稿日期: 2023-10-10

基金项目: 内蒙古自治区基本科研项目(JY20230106);国家留学基金委资助项目(CSC:202308150167)

第一作者: 佟岳,女,硕士

通信作者: 刘培玲 E-mail: lpl1023@126.com

母智深 E-mail: muzhishen@mengniu.cn

清蛋白结构和性质的影响,旨在为乳清蛋白在食品加工中的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

乳清蛋白(WPC 80),上海钰邦达食品配料有限公司;溴化钾、尿素,天津市风船化学试剂科技有限公司;三羟甲基氨基甲烷、2-硝基苯甲酸(DTNB)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH),上海麦克林生化科技有限公司;甘氨酸、无水乙醇,北京酷来搏技术有限公司;乙二胺四乙酸(EDTA),天津永晟精细化工有限公司;盐酸、氢氧化钠,天津化工厂;葵花籽油(食品级),内蒙古自治区巴彦淖尔市鲁花;十二烷基硫酸钠,天津市风船化学试剂科技有限公司;蒸馏水,自制。试验中所有化学试剂均为分析纯级。

1.2 仪器与设备

电子天平,上海浦春计量仪器有限公司;S-3400N 扫描电子显微镜,日本厥场制作所;3000HSA 纳米激光粒度分析仪,英国马尔文仪器有限公司;FTIR 红外光谱仪 Nexus 87030400403,美国 Nicolli 公司;G9800A 荧光光谱仪,美国 Agilent 公司;UV-3150 紫外-可见分光光度计,日本岛津公司;UHPF-750MPa 高压设备,包头科发高压科技有限责任公司;鼓风机干燥箱,上海高致精密仪器有限公司;3150S 真空封口机,新鲜世界公司;FW-4A 粉末压片机,天津市拓扑仪器有限公司;HH-2 恒温水浴锅,江南仪器厂;FSH-2A 高速组织捣碎机,方科仪器(常州)有限公司;TDL 高速台式离心机,上海离心机机械研究所。

1.3 方法

1.3.1 高静压处理 用真空封口机密封盛装有质量分数 9%乳清蛋白溶液的耐高压聚乙烯袋。将密封袋放入高压釜中,压强设置为 100,200,300,400,500,600 MPa,控制保压时间 20 min,得到待测样品,冷冻干燥后备用。

1.3.2 扫描电镜观察 扫描电子显微镜(SEM)观察处理前、后乳清蛋白的微观结构。参照文献[15]取 1.0 mg 样品粘在导电胶上,经真空喷金处理后将待测样品转移到 SEM 台面,于 4 500 倍电镜下观察样品的微观结构。

1.3.3 Zeta 电位测定 蛋白质的表面电荷影响蛋白的聚集状态和改性过程中的行为变化^[16]。参照文献[17]测定样品的 Zeta 电位并稍加修改。配制 pH 7.0 的 10 mg/mL 乳清蛋白溶液,溶解后用纳米激光粒度分析仪测定电位。

1.3.4 粒径的测定 参照文献[18]测定样品的粒径并稍加修改。配制 10 mg/mL 的乳清蛋白溶液,搅拌均匀后,滴加到纳米激光粒度分析仪中测定粒径。

1.3.5 红外光谱的测定 参照文献[19]并稍加修改,取 1.0 mg 样品与干燥溴化钾(样品:溴化钾为 1:100)一起研磨均匀,用 5×10^7 Pa 压力压成透明薄片,放入红外光谱仪扫描,扫描 32 次,扫描波段 $500 \sim 3\,500 \text{ cm}^{-1}$ 。使用 Omnic 4.12 软件去卷积分处理,并用 PeakFit v4 软件进行高斯拟合,计算二级结构中各组分含量。

1.3.6 巯基和二硫键的测定 采用 Ellman 法测定,参照文献[20]并稍加修改。游离巯基含量测定:取 0.5 mL 1%乳清蛋白溶液,5 mL Tris-Glycine 缓冲液(1.04 g Tris,0.69 g Glycine,0.12 g EDTA,蒸馏水定容 100 mL)与 20 μL Ellman (0.04 g DTNB, Tris-Glycine 缓冲溶液定容 10 mL)试剂混合,静置 15 min 后于波长 412 nm 紫外分光光度下读取吸光值。总巯基含量测定:取 0.5 mL 乳清蛋白溶液,5 mL 8 mol/L 尿素缓冲液(10.4 g Tris,6.9 g Glycine,1.2 g EDTA,480 g 尿素,蒸馏水定容 1 000 mL, pH 8.0)与 20 μL Ellman 试剂混合,静置 15 min 后于波长 412 nm 紫外分光光度下测定吸光值。巯基及二硫键含量计算公式如(1)和(2)所示。

$$\text{游离巯基}(\mu\text{mol/g}) = \frac{73.53 \times A_{412} \times D}{C} \quad (1)$$

$$\text{总巯基}(\mu\text{mol/g}) = \frac{\text{SH}_T - \text{SH}_F}{2} \quad (2)$$

式中: A_{412} 为吸光度值; C 为蛋白质质量浓度,mg/mL; D 为稀释倍数;73.53 由 $10\% / (1.36 \times 10^4)$ 得出; 1.36×10^4 为摩尔吸光系数。

1.3.7 内源荧光光谱的测定 pH 7.0 10 mmol/L 磷酸缓冲液为分散剂,配制质量浓度为 0.2 mg/mL 的乳清蛋白溶液。设置激发波长 290 nm,扫描范围 300~500 nm,激发狭缝和发射狭缝 5 nm。

1.3.8 起泡性及起泡稳定性的测定 使用高速旋转组织搅打机将 1.0%乳清蛋白溶液于转速 10 000 r/min 搅打 2 min。分别记录搅打前溶液体积,搅打后的泡沫体积和静置 20 min 后的泡沫体积。起泡性及泡沫稳定性的计算公式如(3)和(4)所示:

$$\text{起泡性}(\%) = \frac{V_1 - V_0}{V_0} \times 100 \quad (3)$$

$$\text{起泡稳定性}(\%) = \frac{V_2 - V_0}{V_1 - V_0} \times 100 \quad (4)$$

式中: V_0 为发泡前溶液体积,mL; V_1 为搅打结束时的泡沫体积,mL; V_2 为搅打后静置 20 min 时的剩余泡沫体积,mL。

1.3.9 乳化性及乳化稳定性的测定 取 9 mL 1 mg/mL 蛋白溶液和 3 mL 葵花籽油,用高速旋转组织搅打机在转速 10 000 r/min 下处理 2 min,分别吸取 50 μ L 静置 0 min 和 10 min 的试管底部乳化液,与 5 mL 0.1%十二烷基硫酸钠溶液充分混合后于波长 500 nm 处测定吸光度。乳化性和乳化稳定性的计算公式如(5)和(6)所示:

$$\text{乳化性}(\text{m}^2/\text{g}) = \frac{2 \times 2.303 \times A_0 \times n}{10000 \times C \times \varphi} \quad (5)$$

$$\text{乳化稳定性}(\%) = \frac{A_0}{A_1 - A_{10}} \times 100 \quad (6)$$

式中: C 为乳清蛋白质量浓度,g/mL; φ 为葵花籽油所占体积分数($\varphi=1/4$); A_0 为静置 0 min 时乳状液的吸光值; A_{10} 为静置 10 min 时乳状液的吸光值; n 为稀释倍数 100。

1.3.10 持水/持油性的测定 取 0.5 g 样品于离心管中,分别加入 5 mL 蒸馏水/葵花籽油,经高速组织捣碎机混合均匀后置转速 4 000 r/min 的离心机中,离心 30 min 后倒去上清液,称离心管的质量。持水性和持油性的计算公式如(7)和(8)所示:

$$\text{持水性}(\%) = \frac{M_2 - M_1}{M_0} \times 100 \quad (7)$$

$$\text{持油性}(\%) = \frac{G_2 - G_1}{G_0} \times 100 \quad (8)$$

式中: M_0 、 G_0 为样品质量,g; M_1 、 G_1 为离心管质量,g; M_2 、 G_2 为离心后沉淀与离心管总质量,g。

1.3.11 抗氧化性的测定 配制 20 mg/mL 乳清蛋白溶液。称取 0.0025 g DPPH,溶解在无水乙醇中并定容至 100 mL 棕色容量瓶中,配成 DPPH·乙醇溶液。取 2 mL 蛋白溶液与 2 mL DPPH·乙醇溶

液混合。取 2 mL 无水乙醇和 2 mL DPPH·乙醇溶液混合。取 2 mL 蛋白溶液和 2 mL 无水乙醇混合。混合均匀的溶液在室温反应 30 min 后于波长 517 nm 处测定吸光值。DPPH 自由基清除率计算公式如(9)所示:

$$\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3}\right) \times 100 \quad (9)$$

式中: A_1 为乳清蛋白溶液与 DPPH 溶液反应的吸光值; A_2 为无水乙醇与 DPPH 溶液反应的吸光值; A_3 为乳清蛋白溶液、无水乙醇混合溶液与 DPPH 溶液反应的吸光值。

1.4 数据处理

所有数据为 3 次平行测定的平均值。采用 SPSS 26.0 软件进行数据的统计分析,试验数据用“平均值 \pm 标准差”表示。所有图形用 Origin 2021 制图软件制作。

2 结果与分析

2.1 乳清蛋白的表观结构

图 1A~1G 为 HHP 处理后乳清蛋白放大 4 500 倍的 SEM 图。未处理的乳清蛋白为直径较大的空心球状体(图 1a)。经 100 MPa 处理后,乳清蛋白的封闭球状结构破裂,变为不规则的块状,整体结构松散,表面出现类似孔洞的结构(图 1b)。随着压强增大,孔洞不断加深,出现类似蜂窝状的结构,分布变得均匀,块状结构的破碎程度加剧,被压力冲击成小块状(图 1c~1e)。继续加压,孔洞变得越来越细小,各部分粘连在一起,形成大块状聚合物(图 1f~1g)。说明高静压使乳清蛋白形成新的结构,从而促成乳清蛋白性质的改变。由此从不同角度验证高静压技术可以改变乳清蛋白的结构,改善其性质。

2.2 表面电荷分析

Zeta 电位说明分散介质中相邻乳清蛋白的排斥程度,电位绝对值越大,体系越稳定;电位绝对值越小,静电排斥作用越小,体系越不稳定并趋向于聚集。图 2 所示,乳清蛋白的等电点(pH 5.3)高于蛋白溶液的等电点(pH 7.0),样品的电位值显负值。加压后,电位绝对值随压强的增大先减小后增大且均小于对照组,在压强 300 MPa 时达到最小值-211.57 mV。电位绝对值减小是因为 HHP 处

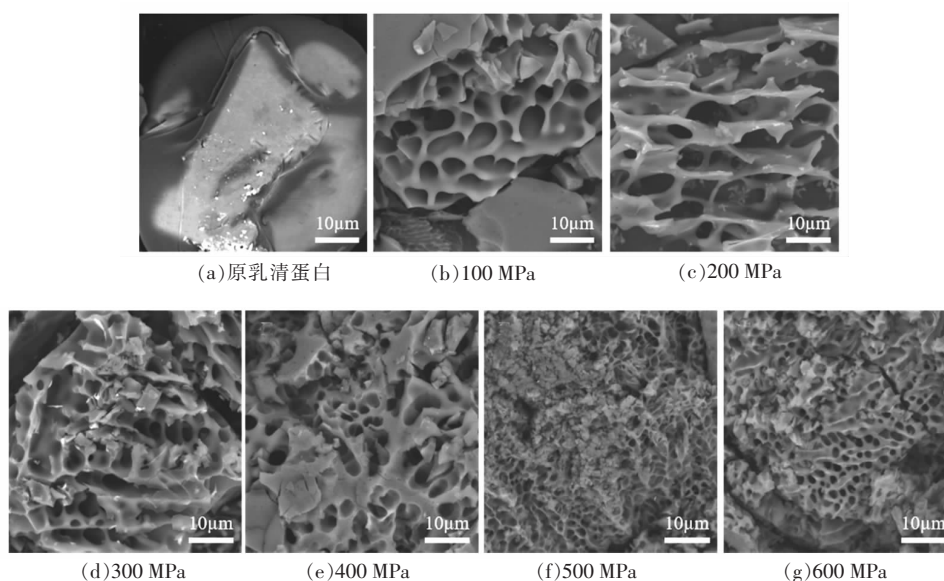


图 1 HHP 处理后乳清蛋白电镜图像(放大倍数 4 500×)

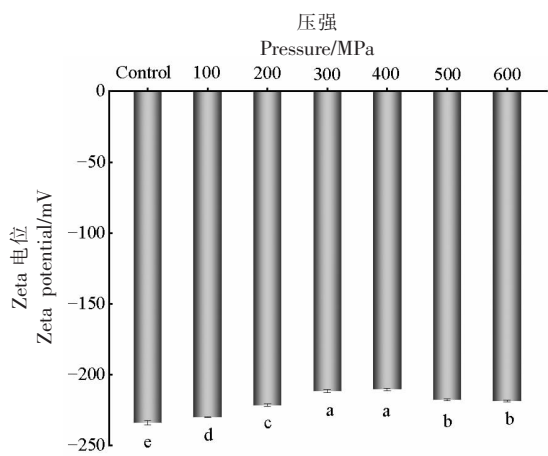
Fig.1 Electron microscope images of whey protein after HHP (Magnification 4 500×)

理破坏了乳清蛋白原有的空心球状紧密结构和分子内次级键(离子键、氢键和疏水键等),从而使疏水基团和极性基团暴露,有利于蛋白质分子重排聚集,并将带电基团掩埋于分子内。随着压强的继续增大,电位绝对值逐渐增大,但仍保持聚集趋势,可能是分子重排过程中将疏水基团包埋所致。

2.3 粒径分析

图 3 所示,与对照组相比,压强范围 100~300 MPa 的粒径逐渐降低,300 MPa 时粒径最小,分布

在 23~47 μm 范围。这是因为 HHP 处理后,乳清蛋白内部空腔压缩所致。400~600 MPa 范围的粒径随压强的增加而增大。这是因为 HHP 破坏了分子间维持平衡的作用力,暴露的疏水基团导致分子结构打乱,发生重排。随着乳清蛋白分子的不断伸展并到达一定限度,聚集作用随之发生,最后形成颗粒较大的聚集体。蛋白颗粒大小是由打散破碎和聚集增大两个对立的竞争结果决定的。超过 300 MPa 后蛋白较之前趋向于聚集,重聚占优势,



注:不同小写字母代表具有显著性差异($P < 0.05$)。

图 2 HHP 处理后乳清蛋白的电位变化

Fig.2 The potential change of whey protein after HHP treatment

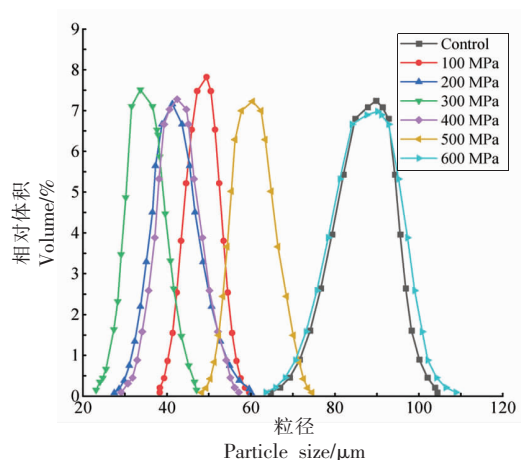


图 3 HHP 处理后蛋白的粒径变化

Fig.3 The particle size change of whey protein after HHP treatment

与 Zeta 电位结果一致。相关研究也发现 HHP 处理条件为 200~400 MPa, 有助于触发乳清分离蛋白的部分展开^[21], 而高于 400 MPa 的压力水平促进了分子聚集体的形成^[22]。

2.4 二级结构

红外光谱在分子层面上揭示了蛋白质展开和结构重排^[19]。由图 4 看出, 3 500~3 000 cm^{-1} 出现由 O-H 拉伸振动产生的强而宽的吸收峰^[23]。未处理的乳清蛋白的 O-H 伸缩振动的特征吸收峰为 3 289.00 cm^{-1} 。在压强为 100 MPa 时, 特征峰位于 3 286.59 cm^{-1} 处, 随着压强的增大, 特征峰继续偏移, 当压强达到 300 MPa 时, 偏移最大值为 3 283.02 cm^{-1} 。O-H 伸缩振动的特征吸收峰发生红移, 这是高压导致极性基团暴露, 形成氢键。

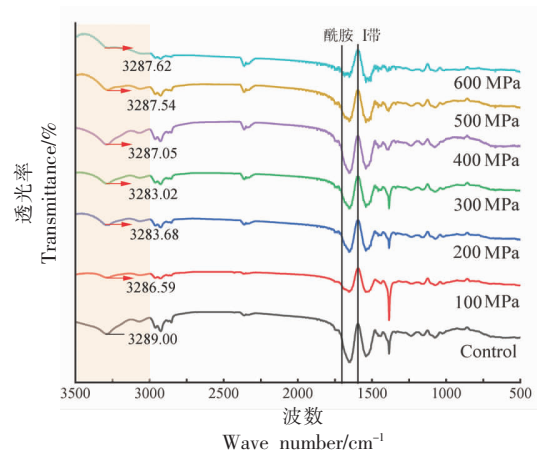


图 4 HHP 处理前、后乳清蛋白红外光谱图
Fig.4 Infrared spectra of whey protein before and after HHP treatment

表 1 HHP 处理前、后乳清蛋白二级结构分析

Table 1 Analysis of the secondary structure of whey protein before and after HHP treatment

压强/MPa	α -螺旋/%	β -折叠/%	β -转角/%	无规则卷曲/%
Control	36.00 \pm 0.26 ^e	8.27 \pm 0.12 ^a	24.63 \pm 0.15 ^f	30.67 \pm 0.34 ^a
100	40.33 \pm 0.25 ^b	7.56 \pm 0.09 ^b	24.43 \pm 0.12 ^f	25.66 \pm 0.07 ^b
200	41.63 \pm 0.21 ^a	7.03 \pm 0.13 ^c	29.87 \pm 0.25 ^e	21.53 \pm 0.15 ^c
300	39.60 \pm 0.20 ^c	6.37 \pm 0.10 ^d	33.36 \pm 0.14 ^d	20.57 \pm 0.09 ^d
400	38.23 \pm 0.15 ^d	7.83 \pm 0.15 ^b	35.77 \pm 0.21 ^c	18.33 \pm 0.08 ^e
500	36.70 \pm 0.21 ^f	8.20 \pm 0.06 ^a	38.60 \pm 0.36 ^b	16.63 \pm 0.13 ^f
600	36.36 \pm 0.16 ^f	8.27 \pm 0.13 ^a	39.97 \pm 0.08 ^a	15.60 \pm 0.12 ^e

注: 同列不同字母代表差异显著 ($P < 0.05$)。

通过处理红外光谱中酰胺 I 带 (1 600~1 700 cm^{-1}) 计算出蛋白质二级结构的相对含量见表 1。HHP 处理后 α -螺旋含量均高于对照组, 且随压强的增加呈先增加后下降的趋势, 当压强增至 300 MPa 时开始解螺旋。 β -折叠含量随压强的增加先减少后增大, 在 300 MPa 时达到最小值 6.37%。值得注意的是, 对照组与处理组 (压强 600 MPa) β -折叠含量没有发生变化, 这是因为随着重聚作用占据主体发生的重新折叠。 α -螺旋和 β -折叠在 HHP 作用下相互转化。 β -转角含量从 24.63% 持续增至 39.97%, 无规卷曲含量由 30.67% 显著降至 15.60%。此结果说明 HHP 处理使乳清蛋白结构变得有序, 无规卷曲转化为 β -转角。

2.5 巯基与二硫键含量分析

HHP 处理对乳清蛋白 S-H 和 S-S 含量的影

响见表 2。随着压强的增大, 二硫键含量增加, 游离巯基含量只在 100 MPa 时有所增加。其原因是一定的压强使乳清蛋白发生去折叠, 埋藏在蛋白质分子中的半胱氨酸残基暴露出来。继续加压, 游离巯基含量降低, 这是由于分子间或分子内不断发生 S-H/S-S 的交换反应, 形成新二硫键, 导致游离巯基减少^[24]。本身存在于蛋白分子表面的巯基在氧化重折叠过程中, 随着重排被包埋在分子内部, 也会造成游离巯基含量下降。

2.6 荧光光谱分析

HHP 对乳清蛋白荧光光谱的影响如图 5 所示。压强对乳清蛋白的荧光强度影响显著。压强范围 100~400 MPa, 荧光强度增加, 压强增至 500~600 MPa 时, 荧光强度下降。其原因可能是天然乳清蛋白可以产生荧光的芳香族氨基酸大都位于分

表 2 HHP 处理后乳清蛋白巯基和二硫键含量的变化
Table 2 The changes of sulfhydryl and disulfide bond content in whey protein treated by HHP

压强/MPa	S-H 含量/ ($\mu\text{mol/g}$)	S-S 含量/ ($\mu\text{mol/g}$)
Control	17.13 ± 0.01^b	1.69 ± 0.03^e
100	17.87 ± 0.01^a	1.76 ± 0.02^f
200	16.92 ± 0.01^c	2.29 ± 0.01^e
300	15.81 ± 0.01^d	2.76 ± 0.01^d
400	15.49 ± 0.01^e	3.19 ± 0.04^c
500	15.07 ± 0.01^f	3.63 ± 0.02^b
600	14.23 ± 0.01^g	3.82 ± 0.01^a

注:同列不同字母代表差异显著($P < 0.05$)。

子内部。HHP 处理后,内部芳香族氨基酸暴露出来,荧光强度增强。压强继续增大,聚合反应使暴露出来的氨基酸包埋进去,并由于分子的展开,导致色氨酸和酪氨酸等暴露于外部的极性环境中,而极性溶剂使发色基团荧光猝灭,导致荧光强度降低。

2.7 起泡性及起泡稳定性

由图 6 可知,压强在 100~400 MPa 条件下,乳清蛋白的起泡能力随压强的增加呈显著上升趋势,起泡性最高达 40.67%。这是因为 HHP 处理增大了乳清蛋白分子的灵活性,增加了蛋白分子间的接触频率。由于乳清蛋白分子在 HHP 作用下被压缩或破碎成小颗粒,在搅打过程中更易与空气和水分混合,界面张力降低,提高了蛋白的柔性,促进泡沫形成。400 MPa 后继续增大压强,起泡性降低,是由于粒径增大后蛋白溶解度减小,聚集作用使蛋白分子不能有效舒展,聚集在界面上,导致界面膜流动性变差,弹性降低,难以修复局部膜的薄化,因此降低了起泡能力。

对于起泡稳定性而言,HHP 处理后乳状液的稳定性随压强的增加而增加。其原因:一是由于超高压处理会打破乳清蛋白分子间的静电平衡;二是随着压力的不断施加,蛋白疏水性先增大后减小,分子表面的疏水基团使蛋白在空气-水的界面保持稳定,从而使蛋白质的起泡稳定性随着压强持续增加。

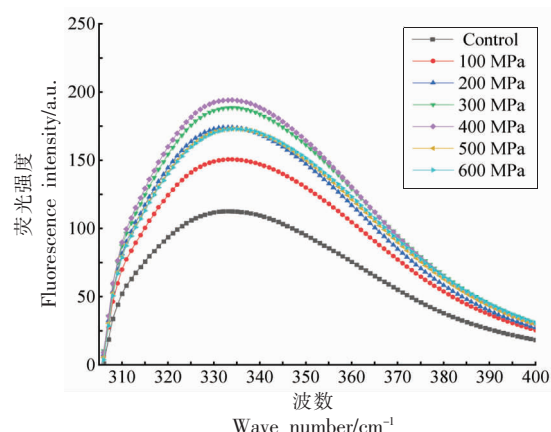
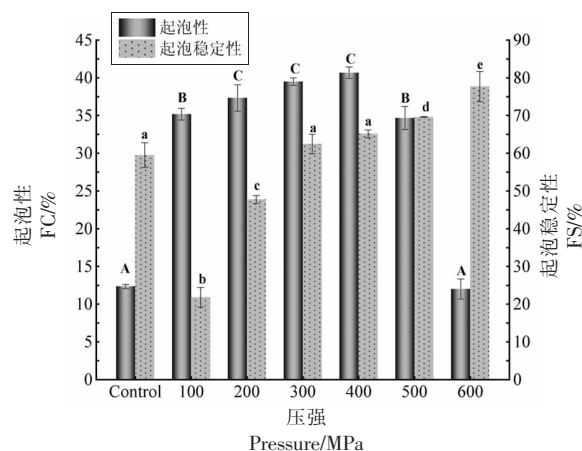


图 5 HHP 处理的乳清蛋白的荧光光谱

Fig.5 Fluorescence spectra of whey protein under HHP treatment

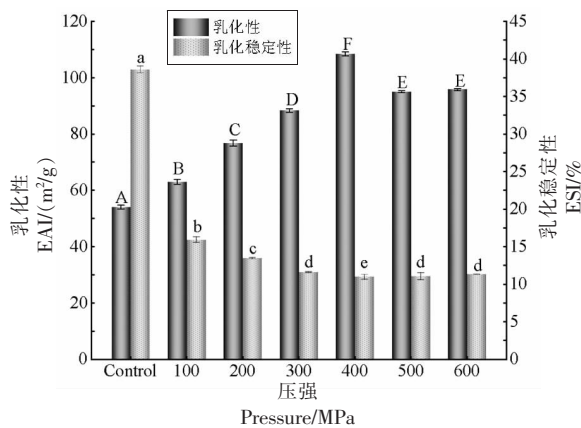


注:不同大写字母代表起泡性具有显著性差异($P < 0.05$);不同小写字母代表起泡稳定性具有显著性差异($P < 0.05$)。

图 6 HHP 对乳清蛋白起泡性及起泡稳定性的影响
Fig.6 The effect of HHP on the foaming property and foaming stability of whey protein

2.8 乳化性及乳化稳定性

乳化性是指蛋白质快速吸附于水/油界面的能力。图 7 结果显示,0~400 MPa 压强下,乳清蛋白的乳化能力持续上升,在 400 MPa 时达到最大值 $108.4 \text{ m}^2/\text{g}$ 。在此范围内蛋白分子暴露出更多的极性基团和离子基团与水发生作用,改善了亲水性,同时也暴露出疏水基团,改善亲油性,当两者达到平衡时,乳清蛋白更快、更好地溶于油-水界面中,使乳化性得到提高。有研究表明,乳化性与疏水性呈线性关系,蛋白的疏水性越强,界面张力



注:不同大写字母代表乳化性具有显著性差异($P<0.05$);不同小写字母代表乳化稳定性具有显著性差异($P<0.05$)。

图7 HHP对乳清蛋白乳化性及乳化稳定性的影响

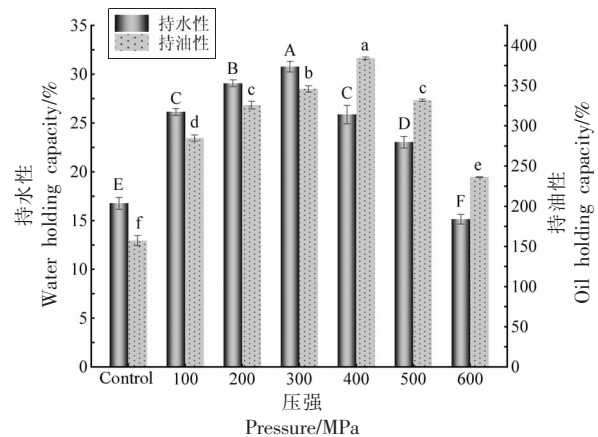
Fig.7 The effect of HHP on the emulsification and emulsification stability of whey protein

越小,乳化性越大。当蛋白质进一步聚集时,打破了亲水、亲油平衡,使其溶解度和持油性下降,吸附在界面上的蛋白浓度下降,导致乳化性降低。

乳化稳定性是指水油混合物在界面维持稳定的能力。HHP处理使蛋白的乳化稳定性显著降低,这是由于乳清蛋白颗粒聚集造成蛋白分子流动性降低。另外,乳清蛋白分子间的静电平衡和亲油、亲水的平衡被打破,导致稳定性下降。

2.9 持水/油性

HHP对乳清蛋白持水/油性的影响如图8所示。乳清蛋白的持水性和持油性均随压强的增大呈先增大后减小的趋势。持水性在300 MPa时达到最大值30.77%。其原因是压强使蛋白质分子变得松散,允许更多的水进入蛋白质分子内部,同时提供了更多的水结合位点,在分子内部形成水化层,保留水分的能力更强。400~600 MPa压强条件下乳清蛋白的持水性下降,是因为聚集体颗粒增大,不溶性蛋白增多且结构致密,减小了颗粒比表面积和孔隙率导致持水性下降。持油性在压强400 MPa时达到最大值384.20%,相比对照组提高144.51%。由于HHP处理打破了分子中非共价键的平衡,使原来埋藏在分子内部的疏水基团暴露出来,在400 MPa时的蛋白荧光强度最大,疏水性最强。同时,乳清蛋白分子开始伸展,结构变得疏松多孔,与脂质接触的面积增大,从而导致乳清



注:不同大写字母代表持水性具有显著性差异($P<0.05$);不同小写字母代表持油性具有显著性差异($P<0.05$)。

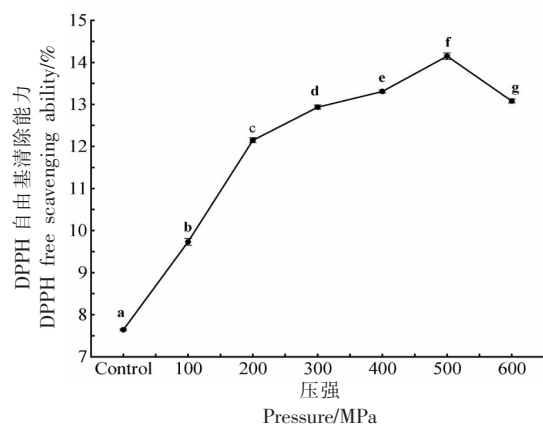
图8 HHP对乳清蛋白持水/油性的影响

Fig.8 The effect of HHP on the water/oil holding capacity of whey protein

蛋白的持油性逐渐增大。500~600 MPa时,乳清蛋白持油性下降。综上所述,较大的压强使已形成的三维网状结构遭到破坏,疏水性降低,导致蛋白持油性降低。

2.10 抗氧化性

高静压处理乳清蛋白对其抗氧化性的影响如图9所示。与对照组相比,HHP处理的蛋白具有更高的DPPH自由基清除活性。HHP处理使内部的活性基团暴露于溶剂中,增强了自由基清除能力,导致抗氧化活性提高。500 MPa时自由基清除



注:不同小写字母代表具有显著性差异($P<0.05$)。

图9 HHP对乳清蛋白抗氧化性的影响

Fig.9 The effect of HHP on the anti-oxidation of whey protein

能力达到最大值 14.15%。继续加压, 自由基清除能力下降, 这是由于 HHP 使蛋白质发生不可溶性聚集, 使暴露出来的活性基团重新被包裹。Paul 等^[25]的研究也表明, 高静压处理(压强 400 MPa, 保压 20 min)干酪后, 其抗氧化性显著提高。高静压技术也可作为一种有效提高蛋白抗氧化性的预处理技术^[26]。

3 结论

HHP 处理会诱导乳清蛋白形成多孔态结构, 改善其加工性能。HHP 处理破坏了乳清蛋白原有的空心球状结构, 颗粒微观形貌中致密的蜂窝状孔隙增多, 影响分子聚集, 粒径减小。当压强为 300 MPa 时, 处理的效果最明显。粒径减小有助于提高溶解度, 增大与外界的接触面积。蛋白质二级结构由无规卷曲转化为 β -转角, 结构变得松散有序。游离巯基的减少与二硫键含量的增多, 使乳清蛋白的三维网状结构更加稳定。荧光光谱显示蛋白在 400 MPa 时荧光强度最大, 即疏水性最好。暴露的亲水、疏水基团和活性基团对蛋白的持油性、持水性、乳化性、抗氧化性的改善有积极影响。本研究提出高静压处理的乳清蛋白形成多孔结构, 进而使其加工特性发生改变, 为乳清蛋白的应用拓展提供了新思路。

参 考 文 献

- [1] 陈静廷. 乳清蛋白及其加工利用的研究进展[J]. 中国奶牛, 2013(13): 35-39.
CHEN J T. Research advances on the process and application of whey protein[J]. China Dairy Cattle, 2013(13): 35-39.
- [2] 刘培玲, 张晴晴, 高增丽, 等. 乳清蛋白改性研究进展[J]. 食品科学, 2021, 42(23): 333-348.
LIU P L, ZHANG Q Q, GAO Z L, et al. Advances in modification of whey proteins[J]. Food Science, 2021, 42(23): 333-348.
- [3] 王妍, 陈雨春, 王畅, 等. 乳清蛋白的功能特性及其在乳制品生产中的应用[J]. 食品安全导刊, 2021(18): 40-42.
WANG Y, CHEN C Y, WANG C, et al. Functional properties of whey protein and its application in dairy production[J]. China Food Safety Magazine, 2021(18): 40-42.
- [4] 陈泽珊. 乳清蛋白的功能特性分析及在乳制品中的应用研究[J]. 食品安全导刊, 2021(30): 186-187.
CHEN Z S. Analysis of the functional characteristics of whey protein and its application in dairy products [J]. China Food Safety Magazine, 2021(30): 186-187.
- [5] SMITHERS G W, BALLARD F J, COPELAND A D, et al. New opportunities from the isolation and utilization of whey proteins[J]. Journal of Dairy Science, 1996, 79(8): 1454-1459.
- [6] 张晓, 王永涛, 李仁杰, 等. 我国食品超高压技术的研究进展[J]. 中国食品学报, 2015, 15(5): 157-165.
ZHANG X, WANG Y T, LI R J, et al. Advances of high hydrostatic pressure for food processing in China[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2015, 15(5): 157-165.
- [7] HE X H, LIU H Z, LIU L, et al. Effects of high pressure on the physicochemical and functional properties of peanut protein isolates[J]. Food Hydrocolloids, 2014, 36(5): 123-129.
- [8] 陈复生. 食品超高压加工技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 1-22.
CHEN F S. Food ultra-high pressure processing technology[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 1-22.
- [9] 王国栋. 超高压处理对食品品质的影响[D]. 大连: 大连理工大学, 2013.
WANG G D. Effects of ultra-high pressure treatment on food quality [D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2013.
- [10] 张勇, 段旭昌, 白燕红, 等. 超高压杀菌处理对牛乳感官和理化特性的影响[J]. 中国乳品工业, 2007, 35(6): 13-16.
ZHANG Y, DUN X C, BAI Y H, et al. Effect on the sense and phy-chemical characteristics of sterilization milk by ultra-high pressure[J]. China Dairy Industry, 2007, 35(6): 13-16.
- [11] BOUAOUINA H, DESRUMAUX A, LOISEL C, et al. Functional properties of whey proteins as affected by dynamic high-pressure treatment[J]. International Dairy Journal, 2006, 16(4): 275-284.
- [12] LEE S H, LEFEVRE T, SUBIRADE M, et al. Effects of ultra-high pressure homogenization on the properties and structure of interfacial protein layer in whey protein-stabilized emulsion[J]. Food Chemistry, 2021(18): 40-42.

- 2009, 113(1): 191-195.
- [13] 姜雪, 于鹏, 肖杨, 等. 超高压处理对生鲜牛乳品质的影响[J]. 食品科技, 2015, 40(4): 99-102.
JIANG X, YU P, XIAO Y, et al. Effects of ultra-pressure treatment on the quality of milk[J]. Food Science and Technology, 2015, 40(4): 99-102.
- [14] 刘树攀. 超高压技术在食品加工中的应用[J]. 食品安全导刊, 2022(14): 163-165.
LIU S P. Application of ultra-high pressure technology in food processing[J]. China Food Safety Magazine, 2022(14): 163-165.
- [15] 郑喜群, 马艳秋, 刘晓兰, 等. 挤压膨化对玉米醇溶蛋白结构特性的影响[J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 2014, 42(3): 131-136.
ZHENG X Q, MA Y Q, LIU X L, et al. Effects of extrusion on structural characteristics of zein[J]. Journal of South China University of Technology (Natural Science Edition), 2014, 42(3): 131-136.
- [16] 赵飞. 物理预处理对大豆分离蛋白结构和理化性质的影响机制[D]. 泰安: 山东农业大学, 2019.
ZHAO F. Effects of physical pretreatment on structure and physicochemical properties of soybean protein isolate[D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2019.
- [17] 张浩嘉, 朱秀清, 孙莹. 挤出参数控制对大豆蛋白微观构象的影响[J]. 食品科学, 2023, 44(15): 103-112.
ZHANG H J, ZHU X Q, SUN Y. Effect of extrusion parameters on soybean protein conformation[J]. Food Science, 2023, 44(15): 103-112.
- [18] CHEN W, YU H, SHI R, et al. Comparison of carrying mechanism between three fat-soluble vitamins and alpha-lactalbumin: Effects on structure and physicochemical properties of alpha-lactalbumin[J]. Food Hydrocolloids, 2021, 116(7): 106662.
- [19] ZHANG Y Y, HE Z J, XU M J, et al. Physicochemical properties and protein structure of extruded corn gluten meal: Implication of temperature[J]. Food Chemistry, 2022, 399: 133985.
- [20] 张楠, 杨晨, 张伟伟, 等. 不同氧化/冷冻条件对乳清蛋白结构的影响[J]. 天津科技大学学报, 2022, 37(4): 1-8.
ZHANG N, YANG C, ZHANG W W, et al. Effect of different oxidation/freezing conditions on the structure of whey protein[J]. Journal of Tianjin University of Science & Technology, 2022, 37(4): 1-8.
- [21] CARULLO B. Changes of structural and technological properties of high hydrostatic pressure (HHP) treated whey protein isolate over refrigerated storage[J]. LWT-Food Science & Technology, 2021, 137(1): 110436.
- [22] MARIA S D, FERRARI G, MARESCA P. Effects of high hydrostatic pressure on the conformational structure and the functional properties of bovine serum albumin[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2016, 33(2): 67-75.
- [23] ZHANG B R, KANG X M, CHENG Y H, et al. Impact of high moisture contents on the structure and functional properties of pea protein isolate during extrusion[J]. Food hydrocolloids, 2022, 127(7): 107508.
- [24] 张意锋, 邓云, 赵艳云. 双循环高静压对鱿鱼原肌球蛋白二、三级结构的影响[J]. 中国食品学报, 2018, 18(5): 45-50.
ZHANG Y F, DENG Y, ZHAO Y Y. Effect of two-cycle high hydrostatic pressure on the secondary and tertiary structures of squid tropomyosin Td p1[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2018, 18(5): 45-50.
- [25] PAUL M, BREWSTER J D, VAN HEKKEN D L, et al. Measuring the antioxidative activities of Queso Fresco after post-packaging high-pressure processing[J]. Advances in Bioscience and Biotechnology, 2012, 2012(4): 297-303.
- [26] KLEBER N, MAIER S, HINRICHS J. Antigenic response of bovine β -lactoglobulin influenced by ultra-high pressure treatment and temperature[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2007, 8(1): 39-45.

The Characterization of Whey Protein Porous Structure and Its Properties Improvements

Tong Yue¹, Zhang Tiantian¹, Li Jingjing¹, Gao Zengli², Mu Zhishen^{2*}, Liu Peiling^{1*}

¹*Department of Food Science and Engineering, Inner Mongolia University of Technology, Hohhot 010051*

²*Inner Mongolia Mengniu Emulsion (Group) Co., Ltd., Hohhot 011500*

Abstract Using whey protein as raw material and treated with high hydrostatic pressure technology, the effect of different pressures on the structure and properties of whey protein was studied. The results showed that the treated whey protein changed from the original hollow spherical structure to a honeycomb porous ordered structure. At 300 MPa, the average particle size (34.87 μm) and the absolute value of zeta potential (-211.57 mV) are minimal. The random was converted into β -turn, the β -turn content increased from 24.63% to 39.97%, and the random content decreased significantly from 30.67% to 15.60%. The free sulfhydryl content decreased, and the disulfide bond content increased from 1.69 $\mu\text{mol/g}$ to 3.82 $\mu\text{mol/g}$. Fluorescence spectroscopy showed that whey protein had the best hydrophobicity at 400 MPa. Moreover, the processing characteristics of whey protein after high hydrostatic pressure treatment such as foaming, emulsification, water/oil holding capacity and oxidation resistance have been significantly improved. The foaming ability and emulsifying ability of whey protein reached the best value at 400 MPa, the foaming ability reached up to 40.67%, the emulsifying reached up to 108.4 m^2/g , the water/oil holding capacity increased by 83.50%/144.52%, and the free radical scavenging capacity increased from 7.64% to 14.15%. This study provides a reference for the development and property of whey protein products with high hydrostatic pressure technology.

Keywords whey protein; high hydrostatic press; structure; properties