胰蛋白酶限制性修饰乳清浓缩蛋白纤维聚合物表面性质的研究

高育哲[1]，张一凡[1]，徐红华[2]，董世荣[2]
（1.沈阳师范大学粮食学院，辽宁沈阳 110034）（2.东北农业大学食品学院，黑龙江哈尔滨 150030）

摘要：为了研究胰蛋白酶限制性修饰对乳清浓缩蛋白（WPC）热致聚合物的微观形态及表面性质的影响，本文制备了胰蛋白酶在不同水解度（DH 为 0.2%、0.6%和 1%）限制性修饰后的 WPC 在 pH 2.0、90 ℃下热致聚合物，利用透射电镜分析了聚合物的微观形态特征，测定了不同聚合物的表面性质。结果表明，纤维聚合物较常规 pH 条件下形成的无定形聚合物具有较差的乳化活性和乳化稳定性以及较优的起泡和泡沫稳定性。胰蛋白酶修饰促进 WPC 纤维聚合物的形成，乳化活性较天然 WPC 形成纤维稍有提高；起泡性和泡沫稳定性显著提高，在 DH 为 0.6%时起泡提高幅度最大，较天然 WPC 纤维提高了 11.76%；在 DH 为 1%时，泡沫稳定性较天然 WPC 纤维提高了 12.59%。WPC 经胰蛋白酶修饰后所形成更优的纤维结构以及表面疏水性的提高有利于其界面性质的提高。

关键词：乳清浓缩蛋白；胰蛋白酶；限制性修饰；纤维聚合物；乳化性；起泡性
文章篇号：1673-9078(2017)1-93-99 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.1.015

Surface Properties of Whey Protein Concentrate Fibrils Selectively Modified by Trypsin

GAO Yu-zhe[1], ZHANG Yi-fan[1], XU Hong-hua[2], DONG Shi-rong[2]
(1.College of Grain Science and Technology, Shenyang Normal University, Shenyang 110034, China)
(2.College of Food, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: To gain insight into the effect of proteolysis on the fibril formation and surface properties of whey protein concentrate (WPC), it was selectively modified using trypsin at low degrees of hydrolysis (DH) (0.2%, 0.6%, and 1%) before adjusting the pH to 2.0 and heating at 90 ℃. The microscopic morphology of the aggregates was analyzed using transmission electron microscopy (TEM), and surface properties of the aggregates were also evaluated. The results showed that the fibrils exhibited lower emulsifying activity index (EAI) and emulsifying stability index (ESA), but higher foaming and foam stability than amorphous polymers under similar pH conditions. Trypsin modification was found to promote WPC fibril formation. The EAI was slightly increased compared to native WPC, while foaming and foam stability were significantly increased. The greatest increase in foaming (11.76%) was observed at a DH of 0.6%. At a DH of 1%, the foam stability was increased by 12.59%. Thus, trypsin modification of WPC improved fibril structure and increased surface hydrophobicity of the formed fibril, thus improving the interface properties.

Key words: whey protein concentrate; trypsin; protease hydrolysis; fibril aggregation; emulsifying properties; foaming properties

乳清蛋白多数为球蛋白，具有较强的亲水性，分散程度高，因其优良的营养及功能特性使其作为食品添加剂、乳化稳定剂、增稠剂和起泡剂等在食品加工业中得以广泛的应用[1,2]。一些研究发现乳清蛋白在低 pH 值（<2.5）、低离子强度条件下高温长时间加热能够形成纤维状聚合物。研究显示蛋白质的纤维状聚合物是由多肽热聚合形成直径几纳米、长度几微米及无分枝的杆状纤维聚合物（fibril）[3]，也有报道称其为淀粉样纤维。通常认为蛋白质发生变性和结构的展开是纤维形成过程中的关键步骤，蛋白质或多肽间的非共价作用是形成和稳定纤维聚合物的主要作用力。另外，纤维的形成通常伴随着显著的二级结构中 α-螺旋向 β-折叠的变化。Rullier 报道 β-乳球蛋白在中性 pH 值、较高离子强度条件下热致聚合物具有较差的起泡性和泡沫稳定性[4]，Dissanayake 报道了乳清蛋白在酸

收稿日期：2015-11-17
基金项目：国家自然科学基金资助项目（31471682）；沈阳师范大学科学技术校内项目（L201505）；沈阳师范大学博士科研启动项目（BS201514）
作者简介：高育哲（1982-），女，博士，讲师，研究方向：食品化学、食品蛋白质
通讯作者：张一凡（1966-），男，讲师，研究方向：食品微生物及食品营养学

性(pH 3.0)条件下形成聚合物的乳化性和乳化稳定性显著高于中性 pH 条件下形成的聚合物[5]。与其在常规 pH 值（pH 6.5）条件下形成的无定形聚合物不同，这种独特的聚合结构可以进一步改善乳清蛋白的功能性质，能够更好的拓展其应用领域。

尽管一些文献中报道了水解作用是纤维形成的必要条件，但这种水解作用主要指的是蛋白质在酸性条件下长时间加热而产生的酸水解，蛋白酶水解是蛋白质改性研究中常用的方法和手段，不同种蛋白酶可以特异性的断裂不同肽键从而使蛋白质分子被水解成多肽。在一定环境条件下控制水解度在较低的范围内可以修饰天然蛋白质的分子结构，Otte 报道利用枯草杆菌中性蛋白酶水解乳白蛋白制备纤维聚合物[6]，我们前期研究报道不同蛋白酶修饰 WPC 对纤维形成的影响及其影响机理，但国内外对于酶水解对蛋白质纤维聚合物功能性质的影响少有报道。因此，本文主要研究天然 WPC 经胰蛋白酶适度结构修饰(DH<1%)后在 pH 2.0、90 ℃条件下形成的聚合物的微观结构形态及其表面性质，探讨不同微观结构形态聚合物的表面性质以及胰蛋白酶修饰对 WPC 纤维聚合物的形态及其表面性质的影响。

1 材料与方法

1.1 原料

乳清浓缩蛋白 WPC-80（其中蛋白质的含量为 76.93 wt%，脂肪含量为 1.4%、乳糖含量为 5.6%及灰分含量为 4.62%），美国 HILMAR 公司；胰蛋白酶，Sigma 公司；ANS 8-苯氨基-1-萘磺酸，Sigma 公司；十二烷基磺酸钠，Sigma 公司；大豆色拉油（食品级），哈尔滨九三大豆油；盐酸，天津市华耀化学公司；氢氧化钠，天津市力天化学公司。

1.2 主要仪器设备

DK-98-ⅡA 恒温磁力水浴锅，天津市泰斯特仪器有限公司；pHS-3C 型精密 PH 计，梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司；GL-21M 型冷冻离心机，上海精密仪器研究所；F-4500 荧光分光光度计，日本日立公司；BME100L 高剪切混合乳化机，启东市长江机电有限公司；DS-1 高速组织捣碎机，上海精科实业有限公司；UV-240IPC 紫外分光光度计，日本岛津公司；JEM-1200EX 透射电子显微镜，日本日立公司。

1.3 试验方法

1.3.1 乳清浓缩蛋白纤维聚合物的制备

参考 Suzanne 等人的方法[7]并加以改进，将 7.9 g 乳清浓缩蛋白（WPC-80）溶于 100 mL 去离子水中，用 6 M HCl 将溶液的 pH 调至 2.0、19000 g、4 ℃离心 30 min，取中间清液（弃去上层少量泡沫和下层少量沉淀），利用凯氏定氮法测定蛋白含量，用去离子水稀释至蛋白浓度 3wt%，再用 1 M HCl 溶液的 pH 值调至 2.0、90 ℃水浴加热 10 h 每隔 1 h 取样立即冷却，4 ℃冰箱保存。同时在 pH 6.5，其他步骤同上的条件下制备乳清浓缩蛋白的常规聚合物作为对照样品。

1.3.2 胰蛋白酶修饰乳清浓缩蛋白纤维聚合物的制备流程

7.9 g WPC 定容 100 mL→添加胰蛋白酶 30 ℃水解，控制水解度→调节水解液 pH 2.0，19000 g，4 ℃离心 30 min→取中间层清液配成 3%蛋白浓度溶液并调 pH 2.0→90 ℃加热 10 h→样品取出后迅速冷却，4 ℃冰箱放置

1.3.3 酶修饰乳清浓缩蛋白水解度测定

参照 Adler-Nissen 的方法并加以改进。7.9 *m/V* %的 WPC 蛋白溶液中添加一定量胰蛋白酶，在 pH 6.5、30 ℃条件下水解，用 pH-State 法控制蛋白水解液的水解度[8]。水解度 DH %按下式计算：

$$DH = \frac{V_{NaOH} \times N_{NaOH}}{\alpha \times MP \times h_{tot}} \times 100\%$$

其中 V 是消耗 NaOH 的体积；α 是 α-氨基酸的解离度；MP 是蛋白质量(g)；h_{tot} 是溶质所含的肽键数(meqv/g protein)；N 是 NaOH 的浓度，本试验中是 0.1 mol/L，本试验中 α 为 0.44，h_{tot} 是 7.8[7]。

1.3.4 透射电镜试验

不同热处理时间得到的蛋白质样品，用超纯水稀释到一定的蛋白质浓度（0.02 wt%），取一滴稀释液滴于透射电镜专用铜网吸附 20 min，多余的部分用滤纸吸除，室温下干燥 15 min，在 80 kV 电压，放大倍数 20000 倍条件下用透射电镜进行分析样品微观形貌[9]。

1.3.5 乳化性和乳化稳定性测定

蛋白质溶液的乳化性能的测量采用 Pearce 等人的方法，并加以改进[10]。取 3 mL 的大豆油加入到 1 mL，1 mg/mL 的蛋白样品稀释溶液中，混合液在 20000 r/mim 下均质 2 min，乳状液放置 10 min，在放置 0 min 和 10 min 时小心的从玻璃容器底部取 100 μL 乳化液加入到 5 mL、0.1 wt%的 SDS 溶液中，混匀，利用紫外-可见分光光度计于波长为 500 nm 下测量其吸光值，用 0.1 wt%的 SDS 为空白调零。乳化活性（EAI）和乳化稳定（ESI）计算公式如下[11]：

$$EAI\ (m^2/g) = \{(2\times 2.303)/[C\times(1-\varphi)\times 10^4]\}\times A_{500}\times \text{dilution}$$

$$ESI(\%) = 100\times(A_{10}/A_0)$$

式中：A_{500} 为溶液在波长 500 nm 下的吸光值；C 为蛋白

质浓度（g/mL）；φ 为大豆油占乳化液的体积分数（φ=1/4）；A_{10} 为静止 10 min 时乳状液的吸光值；A_0 为静止 0 min 时乳状液的吸光值。

1.3.6 起泡性和泡沫稳定性测定

蛋白质溶液的起泡性能的测量采用 Motoi 等人的方法，并加以改进[12]。然后取 200 mL 浓度为 1 mg/mL 的样品溶液，用高速组织捣碎机在 10000 r/min 下搅打 1 min，小心地将泡沫转移至量筒中，测量最初的泡沫体积和静止 10 min 时的泡沫体积。以初如时刻泡沫的高度（mL）作为样品的起泡性指标，泡沫稳定性计算方法如下[13]：

$$泡沫稳定性=\frac{V_{10}}{V_0}\times 100\%$$

式中：V_0 为起泡 0 min 时的泡沫体积；V_{10} 为起泡 10 min 后的泡沫体积。

另外，小心地移取适量搅打后的泡沫于载玻片上，于光学显微镜下（放大倍数为 100 倍）观察泡沫形态，并在放置不同时间时（0、2、5 和 10 min）拍摄泡沫的结构形态。

1.3.7 表面疏水性测定

参照相关 ANS（8-苯氨基-1-奈磺酸）荧光探针法测定乳蛋白表面疏水性，并加以改进[14]。用 0.01 mol/L 的磷酸缓冲液 pH 7.0 将热处理不同时间得到的蛋白溶液稀释成蛋白浓度分别为 0.15、0.075、0.038、和 0.019 wt%的 4 个浓度样品。取稀释后的蛋白溶液 6 mL，加入 8 mmol/L ANS 溶液 20 μL，混匀，在室温下避光 15 min，然后在激发波长为 390 nm，发射波长为 470 nm 以及狭缝 5 nm 的条件下荧光分光光度计下比色，测定荧光强度，以荧光强度值为纵坐标，蛋白质溶液浓度为横坐标作图，初始斜率为样品表面疏水性值。

1.4 数据分析

试验数据采用 SPSS 16.0 统计分析软件中 One-way ANOVO 方法进行方差分析，对 F 检验达显著性水平（p<0.05）的因子进行 LSD 法多重比较。数据均以平均值±标准差表示（n=3）。

2 结果与讨论

2.1 胰蛋白酶修饰乳清蛋白聚合物形貌分析

试验利用透射电镜（TEM）观察和分析天然 WPC 在 pH 6.5 和 pH 2.0 以及胰蛋白酶修饰的 WPC 在 pH 2.0、90 ℃条件下加热前后（0 h 和 10 h）得到的聚合物的微观形态特征，试验结果如图 1 所示。

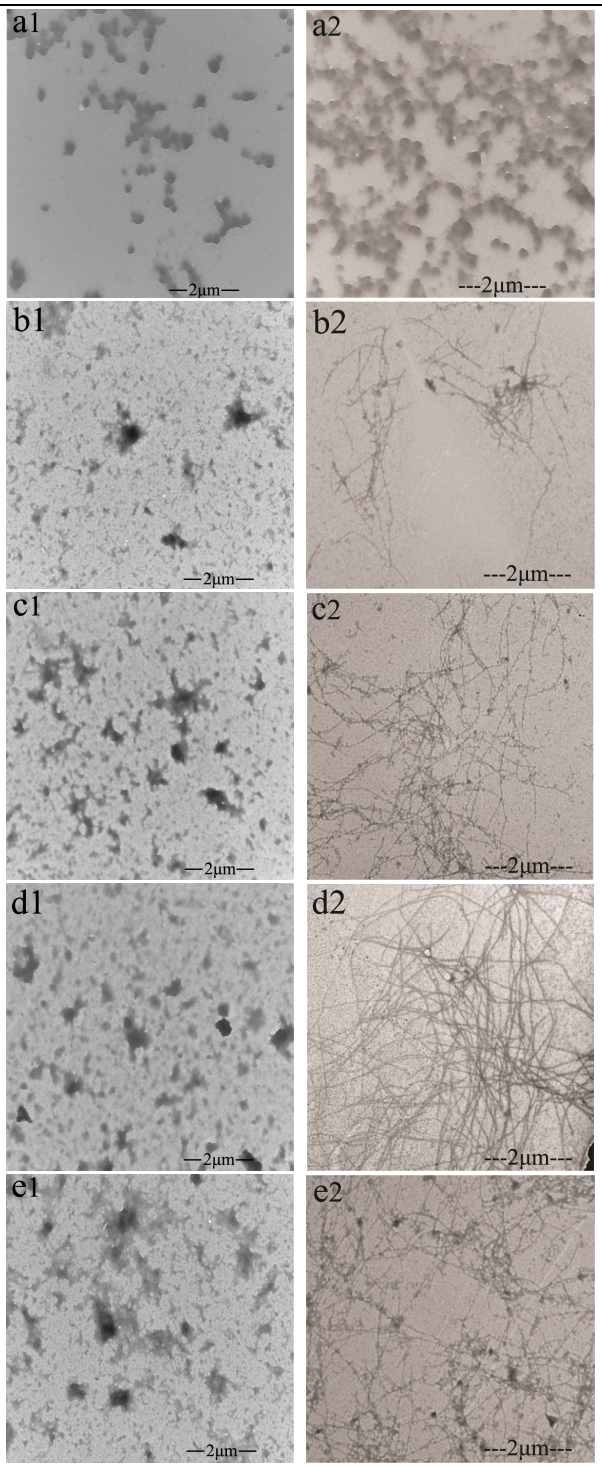


图 1 天然 WPC 和胰蛋白酶修饰 WPC 微观结构形态图

Fig.1 Transmission electron micrographs of native and trypsin-modified WPC

注：a1，天然 WPC 在 pH 6.5 加热 0 h；a2，天然 WPC 在 pH 6.5 加热 10 h；b1，天然 WPC 在 pH 2.0 加热 0 h；b2，天然 WPC 在 pH 2.0 加热 10 h；c1，胰蛋白酶修饰 WPC 在 DH 0.2% 加热 0 h；c2，胰蛋白酶修饰 WPC 在 DH 0.2%加热 10 h；d1，胰蛋白酶修饰 WPC 在 DH 0.6%加热 0 h；d2，胰蛋白酶修饰 WPC 在 DH 0.6%加热 10 h；e1，胰蛋白酶修饰 WPC 在 DH 1%

加热 0 h；e2，胰蛋白酶修饰 WPC 在 DH 1%加热 10 h。

由图 1 可见，天然 WPC 在 pH 6.5、90 ℃条件下热致聚合形成无定形的聚合物，在 pH 2.0、90 ℃条件下热致聚合形成纤维状的聚合物。胰蛋白酶在水解度 0.2%~1%范围内适度修饰 WPC，酶修饰后的 WPC 在 pH 2.0、90 ℃条件下加热形成较天然 WPC 更细长，数量更多的纤维形态的聚合物。胰蛋白酶修饰促进 WPC 纤维聚合物的形成可能的原因是 WPC 经胰蛋白酶的适度修饰，蛋白质分子展开，结构发生适度变化，这种结构的改变可能有利于纤维聚合物的形成。而 WPC 在不同条件下热致聚合后形成聚合物形态不同，以及胰蛋白酶修饰后 WPC 结构的改变都有可能使其界面性质发生显著的变化。

2.2 胰蛋白酶修饰乳清蛋白聚合物的乳化性质

WPC 在不同条件下形成不同微观形态的聚合物是因为在聚合物形成过程中 WPC 的结构发生了不同的变化，而这些结构的改变很可能表现出不同的表面性质。因此，试验测定和比较了不同微观形貌 WPC 聚合物的乳化活性和乳化稳定性。

2.2.1 胰蛋白酶修饰乳清蛋白聚合物的乳化活性

试验测定了天然 WPC 在 pH 6.5 和 pH 2.0、90 ℃条件下加热 0 h 和加热 10 h 的乳化活性，以及胰蛋白酶修饰的 WPC 在 pH 2.0、90 ℃条件下加热 0 h 和加热 10 h 的乳化活性，并分析和比较它们乳化活性的差异，试验结果如图 2 所示。

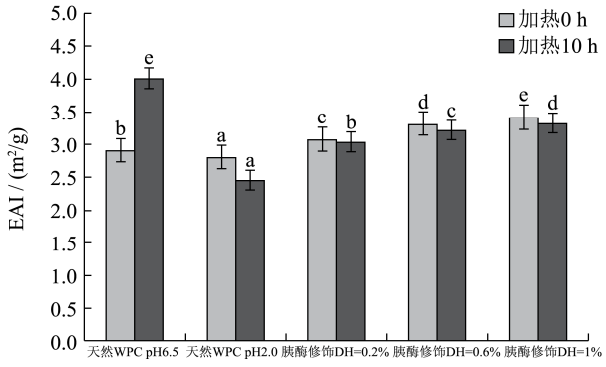


图 2 天然 WPC 和胰蛋白酶修饰 WPC 聚合物的乳化活性

Fig.2 EAI of native WPC and modified WPC aggregates at different heating times (0 h and 10 h)

注：a~e 相同字母表示差异不显著（p<0.05），不同字母表示差异显著（p<0.05）。

由图 2 可见，加热前适度的胰蛋白酶水解利于 WPC 乳化活性的提高，水解度越大，乳化活性提高的幅度越大，在 DH 1%时，乳化活性较天然 WPC 提高了 24.55%。这是因为胰蛋白酶修饰会使乳清蛋白表面张力降低从而提高蛋白质的乳化活性。加热后由于不同微观结构特征聚合物的形成（图 1），乳化活性的差异很大。其中常规 pH（pH 6.5）条件下形成的无定形聚合物的乳化活性显著高于 pH 2.0 条件下热致聚合形成的纤维状聚合物，这可能是因为低 pH 条件下蛋白质分子间的斥力增加，热致聚合后导致其溶解度的降低致使其乳化活性低于中性条件下热致聚合形成的无定形聚合物[15]。但与非酶修饰的纤维状聚合物相比，胰蛋白酶修饰的纤维聚合物的乳化性明显提高，且随着水解度的增加乳化活性提高的幅度增大，在水解度为 1%时，乳化活性提高最大，较天然 WPC 形成纤维聚合物提高了 35.96%。产生此结果的原因可能是胰蛋白酶在较低的水解度条件下修饰后 WPC 分子结构发生了变化，蛋白质的表面疏水性和分子柔性改变，表面张力降低，这种结构上的变化有可以适度地改善其乳化活性。

2.2.2 胰蛋白酶修饰乳清蛋白聚合物的乳化稳定性

试验测定了天然 WPC 在 pH 6.5 和 pH 2.0、90 ℃条件下加热 0 h 和加热 10 h 的乳化稳定性，以及胰蛋白酶修饰的 WPC 在 pH 2.0、90 ℃条件下加热 0 h 和加热 10 h 的乳化稳定性的变化，并分析和比较它们乳化稳定性的差异，试验结果如图 3 所示。

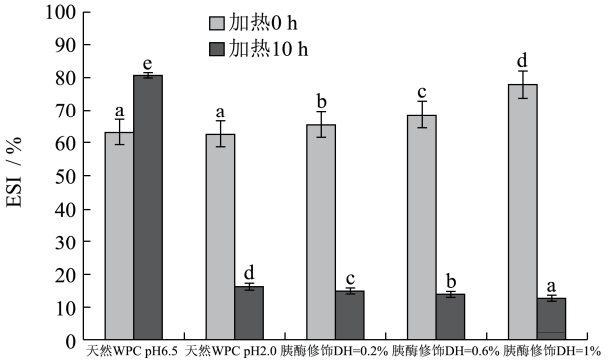


图 3 天然 WPC 和胰蛋白酶修饰 WPC 聚合物的乳化稳定性

Fig.3 ESI of native WPC and modified WPC aggregates at different heating times (0 h and 10 h)

注：a~e 相同字母表示差异不显著（p<0.05），不同字母表示差异显著（p<0.05）。

由图 3 可以看出，加热前天然 WPC 在不同 pH 条件下（pH 6.5 和 pH 2.0）乳化稳定性没有显著性差异，WPC 经胰蛋白酶修饰后乳化稳定性有所提高，且随水解度增加提高的幅度增大，在 DH 为 1%时，乳化稳定性较天然 WPC 提高了 24.81%。加热 10 h 后，具有纤维形态的聚合物的乳化稳定性较无定形聚合物显著

降低，且经胰蛋白酶修饰后乳化稳定性降低幅度更大。产生此结果的原因，一方面由于酸性条件下加热会发生酸水解，水解后蛋白质相对分子质量变小，与完整蛋白质相比，肽在界面上吸附的蛋白膜的黏度较弱致使膜的乳化稳定性降低；另一方面，蛋白质的乳化稳定性取决于其在脂肪球表面的相对吸附情况，WPC 在 pH 6.5 较 pH 2.0 吸附的多，而且 WPC 经胰蛋白酶修饰后使 WPC 具有更好的疏水性和分子柔性，使乳化稳定性有所提高。但是，WPC 在酸性条件下加热，分子间斥力增加，溶解度降低，通常会降低吸附于界面上的蛋白质膜的黏度，加上热处理导致蛋白质的聚集和不溶，因而会降低纤维聚合物乳浊液的稳定性。

2.3 胰蛋白酶修饰乳清蛋白聚合物的起泡性质

WPC 所形成的纤维状聚合物并没有表现出较无定形聚合物优良的乳化性和乳化稳定性。试验测定和比较了不同微观形貌以及经胰蛋白酶修饰后 WPC 起泡性和泡沫稳定性。

2.3.1 胰蛋白酶修饰乳清蛋白聚合物的起泡性

试验测定了天然 WPC 在 pH 6.5 和 pH 2.0、90 ℃条件下加热 0 h 和加热 10 h 的起泡性，以及胰蛋白酶修饰的 WPC 在 pH 2.0、90 ℃条件下加热 0 h 和加热 10 h 的起泡性的变化，并分析和比较它们起泡性的差异，试验结果如图 4 所示。

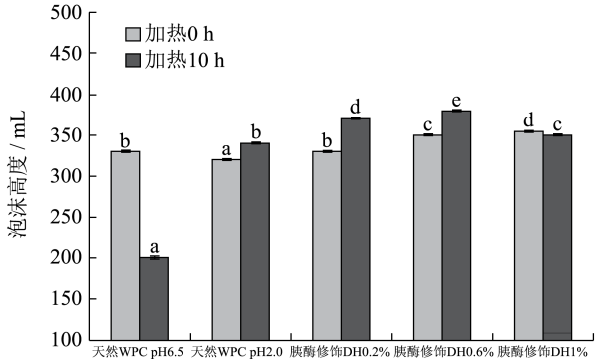


图 4 天然 WPC 和胰蛋白酶修饰 WPC 聚合物的起泡性

Fig.4 Foaming properties of native WPC and modified WPC aggregates at different heating times (0 h and 10 h)

注：a~e 相同字母表示差异不显著（p<0.05），不同字母表示差异显著（p<0.05）。

由图 4 可以看出，加热前，胰蛋白酶饰的 WPC 较天然 WPC 的起泡性稍有增加，且随水解度增大，起泡性提高幅度增大，在 DH 为 1%时，较天然 WPC 起泡性提高了 10.94%。加热后，WPC 形成不同结构的聚合物，具有纤维结构的聚合物较无定形聚合物的起泡性显著提高，天然 WPC 纤维聚合物较天然 WPC 形成的无定形聚合物起泡性提高了 70%。经胰蛋白酶水解后 WPC 得到的纤维聚合物起泡性得到进一步提高，尤其在 DH 为 0.6%时，起泡性提高幅度最大，较天然 WPC 形成无定形聚合物提高了 95%，较天然 WPC 形成的纤维状聚合物提高了 11.76%。这说明 WPC 在酸性条件下加热形成纤维状聚合物，分子间斥力增强，这种线性的分子排布和蛋白质构象的变化有利于 WPC 快速在气-液界面吸附，快速降低表面张力从而具有较无定形聚合物更优的起泡性，另外已有研究也表明蛋白质的水解修饰处理可以改善蛋白质的发泡性，且随水解度的提高起泡性提高，这可能是因为 WPC 纤维聚合物是在酸性条件下经热处理发生了水解，再加之胰蛋白酶修饰 WPC 后可能暴露更多的疏水基团使其起泡性进一步提高。WPC 的纤维结构形态和较多疏水基团的暴露有助于提高 WPC 起泡性。

2.3.2 胰蛋白酶修饰乳清蛋白聚合物的泡沫稳定性

试验测定了天然 WPC 在 pH 6.5 和 pH 2.0、90 ℃条件下加热 0 h 和加热 10 h 的泡沫稳定性，以及胰蛋白酶修饰的 WPC 在 pH 2.0、90 ℃条件下加热 0 h 和加热 10 h 的泡沫稳定性的变化，并分析和比较它们泡沫稳定性的差异，试验结果如图 5 所示。

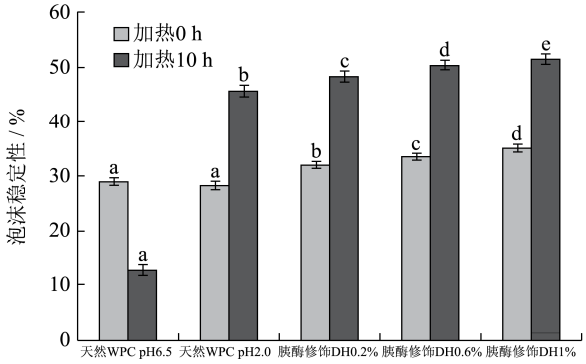


图 5 天然 WPC 和胰蛋白酶修饰 WPC 聚合物的泡沫稳定性

Fig.5 Foaming properties of native WPC and modified WPC aggregates at different heating times (0 h and 10 h)

注：a~e 相同字母表示差异不显著（p<0.05），不同字母表示差异显著（p<0.05）。

由图 5 可以看出加热前，胰蛋白酶饰的 WPC 较天然 WPC 的泡沫稳定性稍有增加，且随水解度增大，泡沫稳定性提高幅度增大，在 DH 为 1%时，较天然 WPC 泡沫稳定性提高了 24.39%。加热后，WPC 形成不同微观形貌的聚合物，具有纤维结构的聚合物较无定形聚合物的泡沫稳定性显著提高，天然 WPC 纤维聚合物较天然 WPC 形成的无定形聚合物泡沫稳定性提高了 3.65 倍。经胰蛋白酶水解后 WPC 随着水解度

的增大，得到的纤维聚合物泡沫性提高的幅度更大，在 DH 为 1%时，泡沫稳定性较天然 WPC 形成无定形聚合物提高了 4.11 倍，较天然 WPC 形成的纤维状聚合物提高了 12.59%。结果说明 WPC 形成的纤维状聚合物泡沫稳定性明显优于无定形聚合物，且经胰蛋白酶修饰后 WPC 所形成更优的纤维形态聚合物更有利于其泡沫稳定性的发挥。WPC 经胰蛋白酶修饰后加热处理在界面吸附了更多的蛋白质分子且纤维溶液的黏度较无定形聚合物增加，有助于稳定所形成的泡沫。胰蛋白酶修饰后 WPC 形成纤维聚合物所表现出来的较天然 WPC 聚合物更优的表面性质是因为胰蛋白酶的适度水解作用使 WPC 分子内的一些基团暴露出来，这些基团的暴露有利于提高蛋白质聚合物的表面性质。

2.4 胰蛋白酶修饰乳清蛋白聚合物的表面疏水性

为了进一步分析 WPC 不同微观形貌聚合物界面性质所产生的差异，试验测定了天然 WPC 和胰蛋白酶修饰 WPC 在不同 pH 条件下热致聚合形成聚合物的表面疏水性，试验结果如表 1 所示。

表 1 天然 WPC 和胰蛋白酶修饰 WPC 的表面疏水性值(S_0)

Table 1 Surface hydrophobicities (S_0) of native WPC and trypsin-modified WPC at different DH (DH = 0.2%, 0.6%, and 1%) at different heating times (0 h and 10 h)

	天然 WPC	天然 WPC	胰蛋白酶修饰 WPC，DH=0.2%	胰蛋白酶修饰 WPC，DH=0.6%	胰蛋白酶修饰 WPC，DH=1%
	pH 6.5	pH 2.0	pH 2.0	pH 2.0	pH 2.0
加热 0 h	478.52±4.41^{a}	495.63±7.70^{b}	508.07±5.33^{c}	897.00±17.42^{d}	948.33±8.72^{e}
加热 10 h	661.24±2.23^{a}	900.00±29.08^{b}	1,358.33±19.07^{c}	1,498.33±15.43^{d}	1,539.37±27.65^{e}

注：数值表示为均值±标准偏差，a~e 相同字母表示差异不显著（p<0.05），不同字母表示差异显著（p<0.05）。

由表 1 可见，加热前胰蛋白酶修饰 WPC 较天然 WPC 表面疏水性显著提高，且随水解度增加，提高幅度增大，在 DH 为 1%时，表面疏水性较天然 WPC 提高了 91.34%，这与起泡性结果呈正相关（图 4~图 5）。产生这一结果的原因可能是因为胰蛋白酶主要作用 WPC 的疏水氨基酸精氨酸和赖氨酸[16]，由于胰蛋白酶的水解作用，使 WPC 内部的疏水基团暴露，表面疏水性增加，这可能是有利于表面性质的提高的原因之一。加热后，天然 WPC 与加热前相比，表面疏水性增加，其中具有纤维结构的 WPC 较无定形聚合物增加的幅度大，原因可能是纤维聚合物的形成主要是疏水作用等非共价键起作用，而颗粒状聚合物的形成主要是二硫键等共价键作用。此外，胰蛋白酶修饰 WPC 纤维聚合物较天然 WPC 纤维聚合物的表面疏水性进一步增加，水解度越大，增加的增多，在 DH 为 1%时，表面疏水性较无定形聚合物增加了 71.04%，较天然 WPC 纤维聚合物增加了 132.80%。这是由于 WPC 经酶解后疏水基团暴露和纤维结构共同决定的，这也能够解释胰蛋白酶修饰有利于提高 WPC 聚合物的表面性质。

3 结论

本试验研究结果显示：（1）天然 WPC 在 pH 6.5 热致聚合形成无定形聚合物，在 pH 2.0 热致聚合形成纤维状聚合物，胰蛋白酶在 DH 为 0.2%~1%范围内修饰 WPC 促进其纤维聚合物的形成。（2）WPC 形成的纤维聚合物的乳化活性和乳化稳定性较无定形聚合物差，胰蛋白酶修饰后 WPC 纤维聚合物的乳化活性较天然 WPC 纤维聚合物稍有提高，在 DH 为 1%时提高了 35.96%。（3）WPC 形成的纤维聚合物的起泡性和泡沫稳定性明显优于无定形聚合物，且 WPC 经胰蛋白酶修饰有利于其纤维聚合物的起泡性和泡沫稳定性进一步提高，在 DH 为 0.6%时起泡性提高幅度最大，较天然 WPC 形成无定形聚合物提高了 95%，较天然 WPC 形成的纤维状聚合物提高了 11.76%；在 DH 为 1%时，泡沫稳定性较天然 WPC 形成颗粒状聚合物提高了 4.11 倍，较天然 WPC 形成的纤维状聚合物提高了 12.59%。（4）具有纤维结构的 WPC 尤其是胰蛋白酶修饰后 WPC 纤维聚合物的表面疏水性显著高于无定形聚合物，在 DH 为 1%时，胰蛋白酶修饰 WPC 纤维聚合物的表面疏水性较无定形聚合物增加了 71.04%，较天然 WPC 纤维聚合物增加了 132.80%。

参与文献

[1] Alting A C, de Jongh H H J, Visschers R W, et al. Physical and chemical interactions in cold gelation of food proteins [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(16): 4682-4689

[2] Portugal C A M, Crespo J G, Lima J C. Monitoring the structural alterations induced in β-lactoglobulin during

ultrafiltration: learning from chemical and thermal denaturation phenomena [J]. Journal of Membrane Science, 2007, 300: 211-223

[3] 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: 1135-1144

[4] Rullier Bénédicte, Novales Bruno, Axelos A V Monique. Effect of protein aggregates on foaming properties of *β*-lactoglobulin [J]. Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects, 2008, 330(2-3): 96-102

[5] Dissanayake m, Liyanaarachchi S, Vasiljevic T. Functional properties of whey proteins microparticulated at low pH [J]. Journal of Dairy Science, 2012, 95(4): 1667-1680

[6] Otte Jeanette, Ipsen Richard, Bauer Rogert, et al. Formation of amyloid-like fibrils upon limited proteolysis of bovine a-lactalbumin [J]. International Dairy Journal, 2005 15(3): 219-229

[7] Suzame G, Bolder Astrid J. Heat-induced whey protein isolate fibrils: conversion, hydrolysis, and disulphide bond formation [J]. International Dairy Journal, 2007, 17(7): 846-853

[8] Adler-Nissen J. A Review of food protein hydrolysis specific areas: enzymic hydrolysis of food proteins [M]. New York: Elsevier Applied Science Publications, 1986

[9] Mark R H, Krebs Glyn L, Devlin. Amyloid fibril-like structure underlies the aggregate structure across the pH range for *β*-lactoglobulin [J]. Biophysical Journal, 2009, 96(12): 5013-5019

[10] Pearce K N, Kinsella J E. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1978, 26(3): 716-723

[11] 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

[12] Motoi H, Fukudome S, Urabe I. Continuous production of wheat gluten peptide with foaming properties using immobilized enzymes [J]. European Food Research and Technology, 2004, 219(5): 522-528

[13] Hammersh J M, Qvist K B. Research note: importance of hen age and egg storage time for egg albumen foaming [J]. Lebensmittel-Wissenschaft and-Technologie, 2001, 34(2): 118-120

[14] Hayakawa S, Nakai S. Relationships of hydrophobicity and net charge to the solubility of milk and soy proteins [J]. Journal of Food Science, 1985, 50(2): 486-491

[15] MADL Fuente, H Singh, Y Hemar. Recent advances in the characterisation of heat-induced aggregates and intermediates of whey proteins [J]. Trends Food Sci. Technol., 2002, 13(8): 262-274

[16] Kishimura H, Tokuda Y, Yabe M, et al. Trypsins from the pyloric ceca of jacopever (*Sebastes schlegelii*) and elkhorn sculpin (*Alcichthys alcicornis*): isolation and characterization [J]. Food Chemistry, 2007, 100(4): 1490-1495

（上接第 124 页）

[18] Mohapatra B, Kuriakose S, Mohapatra S. Rapid green synthesis of silver nanoparticles and nanorods using *Piper nigrum* extract [J]. Journal of Alloys and Compounds, 2015, 637(3): 119-26

[19] Singh D, Rathod V, Ninganagouda S, et al. Biosynthesis of silver nanoparticle by endophytic fungi *Pencillium* sp. isolated from *Curcuma longa* (turmeric) and its antibacterial activity against pathogenic gram negative bacteria [J]. Journal of Pharmacy Research, 2013, 7(5): 448-53

[20] Saravanakumar A, Ganesh M, Jayaprakash J, et al. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Cassia tora* leaf extract and its antioxidant and antibacterial activities [J]. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 2015, 28: 277-81

[21] Nayak D, Ashe S, Rauta P R, et al. Bark extract mediated green synthesis of silver nanoparticles: Evaluation of antimicrobial activity and antiproliferative response against osteosarcoma [J]. Materials Science and Engineering: C, 2016, 58(30): 44-52

[22] Kim D Y, Suk Sung J, Kim M, et al. Rapid production of silver nanoparticles at large-scale using gallic acid and their antibacterial assessment [J]. Materials Letters, 2015, 155: 62-64