

酪蛋白-卡拉胶体系的流变特性及其相互作用研究

刘安军, 胡颖娜, 刘彩红, 滕安国, 杨事维

(天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

摘要: 本文研究了不同卡拉胶的添加量对酪蛋白-卡拉胶体系粒径以及流变学性质的影响, 对维持体系的流变学特性与凝胶特性的分子间作用力进行了探究, 揭示了酪蛋白与卡拉胶混合凝胶机理。结果表明: 卡拉胶浓度的升高会导致体系粒径增大, 浓度为 0.5% 时, 粒径达到 1096.8 nm, 约为酪蛋白溶液分子粒径的 5 倍, 表明卡拉胶与酪蛋白发生吸附作用; 流变学测试表明体系呈现假塑性流体的特征, 随着卡拉胶添加量的增加, 流动指数 n 由 0.9251 下降到 0.7270, 稠度系数 K 由 0.3796 上升到 3.4403; 添加 NaCl 与尿素后, 体系的凝胶强度有不同程度的下降, 当二者浓度为 1.0 mol/L 时, 体系凝胶强度的损失率分别为 100% 与 32.4%, 分子间作用力以静电作用为主; 红外光谱显示反应前后酪蛋白的二级结构发生改变, 进一步证明卡拉胶与酪蛋白分子之间发生交联反应。

关键词: 卡拉胶; 酪蛋白; 流变性

文章编号: 1673-9078(2014)11-23-27

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.11.005

Study on the Rheology and Interactions of Casein-Carrageenan System

LIU An-jun, HU Ying-na, LIU Cai-hong, TENG An-guo, YANG Shi-wei

(College of Food Science and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: In this study, the effects of different amounts of carrageenan on the particle size and rheological properties of the casein-carrageenan system were studied. Furthermore, the intermolecular forces that contribute to the rheological and gel properties of the system were explored to reveal the gelation mechanism of the casein and carrageenan mixture. The results showed that increased concentrations of carrageenan resulted in an increased particle size of the system. When the concentration was 0.5%, the molecular size became 1096.8 nm, almost five times the molecular diameter of casein. This indicates that absorption occurred between carrageenan and casein. Rheological tests showed that the system exhibited pseudo-plastic fluid characteristics. With increasing amounts of carrageenan, the flow index, n , decreased from 0.9251 to 0.7270, and the consistency coefficient, K , increased from 0.3796 to 3.4403. Upon addition of NaCl and urea, the gelation strength of the system decreased to various extents. When the concentrations of the two components were 1.0 mol/L, the loss ratios of the system gelation strength were 100% and 32.4%, respectively. The intermolecular interactions were mainly composed of electrostatic interactions. Infrared spectroscopy analysis showed that the secondary structure of casein changed after the reaction, which further proved that a cross-linking reaction took place between carrageenan and casein.

Key words: carrageenan; casein; rheology

蛋白质和多糖是天然的高分子聚合物, 是食品体系中最重要的一类生物大分子物质, 蛋白质具有乳化且稳定的能力, 多糖具有增稠持水能力, 两者之间常常通过聚合和凝胶作用影响食品的结构与功能^[1-2]。酪蛋白作为牛乳中的主要成分, 具有较高的营养价值与功能特性, 在溶液中酪蛋白以多个单体聚集而成的胶束形式存在, 酪蛋白胶束在加热、浓缩等加工过程中的变化很大程度上决定了产品的稳定性^[3]。为了提高

收稿日期: 2014-05-13

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (2013AA102204); 国家自然科学基金项目 (31271975); 天津市科技型中小企业专项资金 (周转资金) 项目 (11kqzznc280)

作者简介: 刘安军, (1963-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事水产品、畜产 (副产) 品高附加值的开发利用及功能性食品研究等

乳制品的热稳定性以及延长产品的货架期, 需要添加亲水胶体作为稳定剂, 而卡拉胶是从红藻中萃取的天然植物胶体, 具有优良的热可逆凝胶化、抗蛋白凝结、亲水无毒等独特性能, 作为一种典型的阴离子多糖卡拉胶可以与牛乳酪蛋白发生络合反应, 防止牛奶发生凝聚沉淀^[4], 在食品、化工和包装等方面应用广泛。目前, 对于蛋白质-多糖之间的复合作用以及相行为的研究较多, 而从流变学性质出发, 进一步分析蛋白质二级结构的变化来探究反应机理的研究较少。本文以酪蛋白-卡拉胶 (Casein-Carrageenan) 体系作为研究对象, 测定了其流变性能及凝胶特性并探究了二者之间分子作用力的主要形式, 通过傅里叶红外光谱分析酪蛋白反应前后结构的变化, 揭示酪蛋白与卡拉胶混合凝胶机理, 为卡拉胶在乳制品中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

酪蛋白 (AR), 购于西亚试剂公司; 卡拉胶, 由天津科技大学生物资源与功能食品研究室提供; NaCl、尿素、HCl、氨水、叠氮化钠, 均为分析纯。

1.2 仪器

Mastersizer 2000 粒度分布仪; BROOKFIELD 流变仪; TA-XT plus 质构仪; Vector22 傅立叶变换红外光谱仪; METTLER-TOLEDO 酸度计; DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器等。

1.3 试验方法

1.3.1 Cas-Carr 体系的制备

称取一定量的酪蛋白溶于去离子水中, 加入少量氨水使溶液趋于弱碱性, 复溶酪蛋白, 在磁力搅拌器上搅拌溶解, 配置成 4wt% 的酪蛋白溶液。称取卡拉胶加入酪蛋白溶液中, 搅拌均匀, 75 °C 水浴加热 20 min^[5], 制成卡拉胶浓度 0.1%~0.5%, 酪蛋白浓度 4% 的 Cas-Carr 体系, 加入 0.4 g/L 的叠氮化钠防止微生物的生长。

1.3.2 Cas-Carr 体系粒径的测定

将制备好的 Cas-Carr 体系与蒸馏水按照 1:10 的比例稀释^[6], 水作分散剂, 利用超声波震荡使样品分散均匀, 用粒度分布仪测定粒径的大小, 平行测量三次并记录数值, 得到平均值即为粒径值。

1.3.3 Cas-Carr 体系流变性的测定

将制备好的 Cas-Carr 体系样品放入旋转流变仪的样品杯中, 75 °C 条件下进行测试, 剪切速率由 0.1 s⁻¹ 上升到 150 s⁻¹ 记录体系流动曲线, 数据运用 Power law 模型数学^[7]进行拟和分析。

1.3.4 凝胶强度的测定

将制备好的 Cas-Carr 体系于 4 °C 条件下冷冻凝胶, 放置 16 小时后, 将凝胶体切成长宽为 2×2×2 (cm) 的小块, 用质构仪测定其凝胶强度的大小。测定条件: 探头 P0.25s, 测前速度 1.0 mm/s, 测定速度 1.1 mm/s, 测后速度 10 mm/s, 测定高度 15 mm, 触发力 5.0 g。

1.3.5 红外光谱分析

分别称取干燥的酪蛋白粉末、经冷冻干燥的 Cas-Carr 体系破碎粉末与定量的 KBr 混合均匀, 进行压片后, 用傅立叶变换红外光谱仪进行图谱分析^[8], 扫描范围为 4000~400 cm⁻¹。从波谱图分析蛋白质基团

结构的变化, 推测样品内部发生的反应。

1.3.6 数据分析

采用 Excel 2003 和 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析与处理, 红外光谱图利用 OMNIC 图形处理软件进行图谱分析。

2 结果与讨论

2.1 Cas-Carr 体系粒径的测定

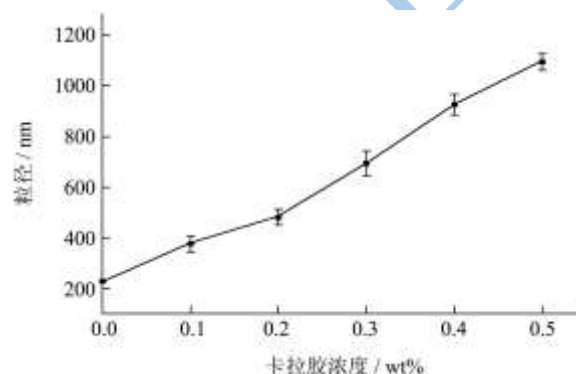


图 1 卡拉胶浓度对 Cas-Carr 体系粒径的影响

Fig.1 The effect of Carr concentration on casein micelle diameter

酪蛋白溶液的分子粒径约为 200 nm, 由图 1 可以看出, 加入卡拉胶后, 体系的粒径逐渐增大, 当卡拉胶浓度为 0.5% 时, 粒径达到 1096.8 nm, 粒径增加了近 5 倍, 表明卡拉胶与酪蛋白发生了吸附作用, 随着卡拉胶浓度的增加, 其与酪蛋白胶束吸附的可能性就越大, 吸附量越高。出现这种现象的原因可能由于卡拉胶形成的空间网状结构将酪蛋白胶束包围, 同时相邻的网络在剩余的卡拉胶的交联作用下相互络合, 而这种吸附交联反应是何种作用力的结果需要进一步的探讨。

2.2 Cas-Carr 体系流变学性质的测定

将制备好的 Cas-Carr 体系进行流变学测试结果如图 2。

由图 2 可以看出, 酪蛋白溶液添加卡拉胶后, 会对其流变学特性产生一定的影响。随着卡拉胶浓度的升高, 体系的表现黏度增大, 可能原因是卡拉胶浓度的增大, 造成体系中单位体积内卡拉胶分子与酪蛋白凝胶颗粒之间的缠结和碰撞几率增大, 流动阻力增大, 因此在相同剪切速率下所对应的表现黏度也越大; 而随着剪切频率的增大, 体系表现黏度逐渐下降, 卡拉胶浓度越高, 这种现象越明显。流动而导致缠绕密度减小, 随着剪切速率的稳态增高, 体系分子间的结构逐渐被破坏, 当达到高剪切速率时, 分子间结构已完

全被破坏,导致表观黏度值降低,这种剪切变稀现象说明 Cas-Carr 体系为典型的假塑性流体。

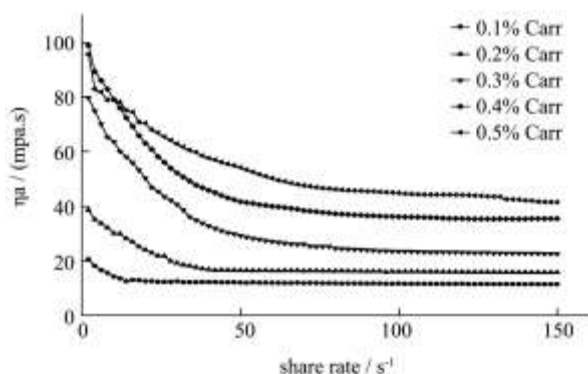


图 2 Cas-Carr 体系表观黏度随剪切速率的变化

Fig.2 The effect of shear rate on the viscosity of the Cas-Carr system

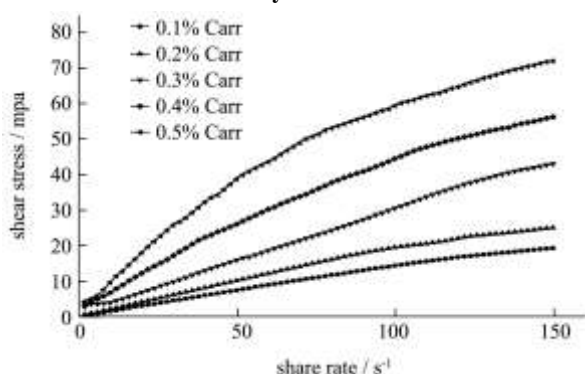


图 3 Cas-Carr 体系剪切应力随剪切速率的变化

Fig.3 The effect of shear rate on the shear stress of the Cas-Carr system

采用 Power-Law 模型拟合图 3 中各条曲线,结果见表 1。可知,流动指数 n 均小于 1,表现出非牛顿流体的特征,并且随着体系中卡拉胶浓度的增大,对应的牛顿幂律方程流动指数从 0.9251 下降到 0.7270,表明体系越来越偏离理想状态下的牛顿流体,其假塑性程度增大,剪切稀化现象明显。与此同时,稠度系数 K 随着卡拉胶浓度的增大由 0.3796 增大到 3.4403 呈现逐渐上升的趋势,表明卡拉胶的加入,增加了体系的粘稠度,降低了其流动性。

表 1 幂率关系式的参数

浓度/%	K	n	R ²
0.1	0.3796	0.9251	0.9987
0.2	0.5569	0.9000	0.9962
0.3	1.3562	0.7863	0.9658
0.4	2.3997	0.7400	0.9921
0.5	3.4403	0.7270	0.9877

2.3 Cas-Carr 体系结合作用力的研究

酪蛋白与卡拉胶形成凝胶可能是范德华力、氢键、疏水作用、静电作用等多种作用协同的结果。二者均属于高分子物质,所以分子间范德华力较小,可以忽略不计。图 4 是添加不同浓度的 NaCl 和尿素与其所形成的凝胶强度之间的关系,考察凝胶强度的变化,分析其作用力的强弱。

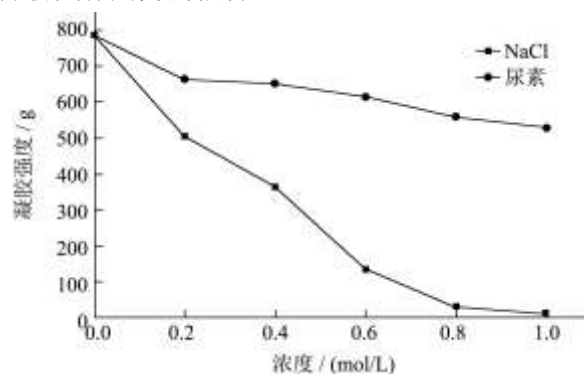


图 4 不同浓度的 NaCl 和尿素对 Cas-Carr 体系凝胶强度的影响

Fig.4 The effects of NaCl and urea concentrations on gelation strength of the Cas-Carr system

高浓度的 NaCl 能屏蔽电荷效应,降低静电相互作用。尿素能影响水分子结构,阻碍氢键形成。由图 4 看出,随着 NaCl 与尿素浓度的升高,体系的凝胶强度呈现下降的趋势,但是 NaCl 浓度上升所导致的凝胶强度下降幅度比尿素浓度上升所导致的凝胶强度下降幅度大得多,凝胶强度损失率见表 2。

表 2 Cas-Carr 体系凝胶强度的损失率

Table 2 Gel strength loss rate of Cas-Carr system

添加浓度 / (mol/L)	凝胶强度损失率/%	
	NaCl	尿素
0.2	35.53	15.55
0.4	53.38	16.89
0.6	82.70	21.75
0.8	96.06	28.64
1.0	100.00	32.39

由表 2 看出,当 NaCl 浓度为 1.0 mol/L 时,基本上不形成凝胶,体系的凝胶强度完全丧失,而添加尿素体系凝胶强度损失率仅为 32.4%。凝胶强度反应了卡拉胶与酪蛋白之间分子作用力的大小,作用力越大,凝胶强度越高,反之,凝胶强度越低。添加 NaCl 主要是削弱了静电作用力,也可能影响蛋白质的溶解度,而添加尿素会干扰氢键和疏水作用,由损失率可以推测, Cas-Carr 体系相互作用力主要以静电作用为主,氢键和疏水作用次之。

2.4 红外光谱分析结果

红外光谱 (FT-IR) 是探讨分子结构的有力手段,

振动谱带的强度、宽度和峰的位置都对分子水平的高聚物构象及分子环境的改变很灵敏。将酪蛋白和 Cas-Carr 体系进行 FTIR 分析, 图谱如下。

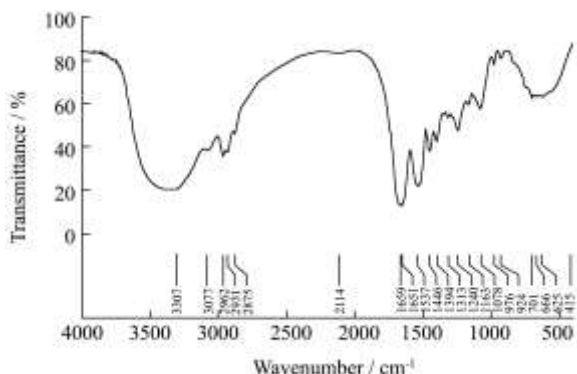


图 5 酪蛋白红外光谱

Fig.5 FTIR infrared spectrogram of casein

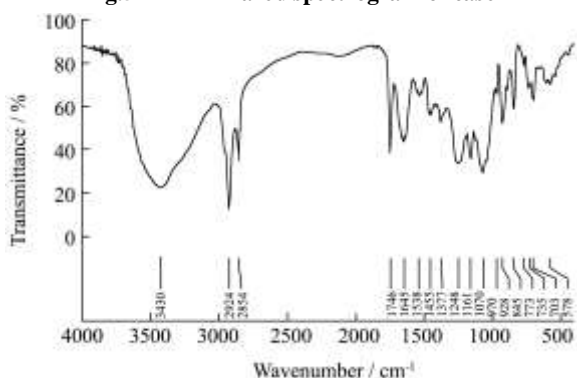


图 6 Cas-Carr 体系波谱图

Fig.6 FTIR spectrum of the Cas-Carr system

由图 5、图 6 看出, 反应前后, 酪蛋白的特征吸收峰没有明显的变化, 这说明反应前后酪蛋白分子的空间结构没有发生展开等一些其它改性方法所导致的分子结构的变化, 仅仅是在蛋白分子中共价结合了多糖链来改善其功能性质。酪蛋白中 3307 cm^{-1} 处的吸收峰属于 N-H 键的伸缩振动吸收, 在 Cas-Carr 体系中其向高波数移动至 3430 cm^{-1} 处, 这是由于共价交联反应 N-H 键变成 =N-H, 键长缩短, 伸缩振动引起波数增大^[9]。Cas-Carr 体系在 2924 cm^{-1} 与 1746 cm^{-1} 处出现两处新峰, 2924 cm^{-1} 处的吸收峰为 C-H 键的伸缩振动吸收, 1746 cm^{-1} 处的吸收峰是酰胺 I 带中 C=O 的伸缩振动吸收, 表明酪蛋白与卡拉胶之间存在明显的交互作用, 3430 cm^{-1} 处的羟基伸缩振动峰增强并且向低波数方向移动, 频率降低, 这可能是因为卡拉胶残基上有半酯式硫酸盐基团而成为一种阴离子型分子电解质有关, 使得氢键作用增强, 分子间相互作用力增大, 表现为共混体系的凝胶化能力不断提高, 凝胶强度不断增大。

利用 OMNIC 软件分析图 5、图 6 中属于酰胺 I 带特征峰的 $1600\sim 1700\text{ cm}^{-1}$ 波段 (用吸光度值表示),

先校正基线, 然后进行去卷积, 再利用二阶导数法拟合, 拟合完成后可根据各特征峰面积与总面积的比值计算出各二级结构的比率, 结果如表 3 所示。

表 3 蛋白质二级结构

Table 3 The protein secondary structure

类型	β -折叠	无规则卷曲	α -螺旋	β -转角
酪蛋白	20.40%	12.64%	16.16%	50.79%
Cas-Carr 体系	23.20%	10.96%	18.25%	41.59%

α -螺旋和 β -折叠结构是蛋白质二级结构中的有序结构, 结构的有序性与蛋白质的某些功能性质存在协同性^[10]。由表 3 可以看出酪蛋白反应前后的二级结构中, α -螺旋由 16.16% 增加到 18.25%, β -折叠由 20.40% 增加到 23.20%, 由于 α -螺旋和 β -折叠结构中存在较多的氢键, 所以导致酪蛋白规则二级结构具有一定的刚性, 增强了 Cas-Carr 体系的凝胶特性。无规则卷曲由 12.64% 减少到 10.96%, β -转角由 50.79% 减少到 41.59% 变化最大, 说明大量无规则结构转化为规则结构。卡拉胶是线型的聚合物, 分子残基中存在交链扭结, 在与酪蛋白加热形成凝胶的过程中, 卡拉胶与酪蛋白胶束由于静电作用产生吸附, 卡拉胶分子可在酪蛋白胶束中引入 3,6-脱水氧桥结构, 有助于消除扭结, 使分子链伸直, 形成双螺旋结构。而由于酪蛋白具有四种单体结构, 结构复杂, 具体变化机理及确切情况至今没有相关报道。

3 结论

本文以 Cas-Carr 体系为研究对象, 通过其粒径的变化趋势确定卡拉胶与酪蛋白发生了不同程度的吸附结合; 流变学测试表明体系为假塑性流体, 呈明显的非线性变化规律, 符合幂定律; 体系所呈现的流变学特性与凝胶特性是由于酪蛋白与卡拉胶分子间产生了相互作用力, 这种作用力以静电作用为主; 红外光谱通过酪蛋白反应前后二级结构的变化进一步证明了酪蛋白与卡拉胶分子间发生了交联反应, 揭示了卡拉胶与酪蛋白的反应机理。

参考文献

[1] 许朵霞, 许洪高, 毛立科, 等. 蛋白质多糖共价复合物的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(11): 186-190
 XU Duo-xia, XU Hong-gao, MAO Li-ke, et al. Research advances in the conjugation of protein and polysaccharide through covalent interaction [J]. Food Research and Development, 2008, 29(11): 186-190
 [2] 齐军茹, 杨晓泉, 彭志英. 蛋白-多糖共价复合作用研究进展[J]. 食品工业科技, 2003, 24(11): 85-87

- QI Jun-ru, Yang Xiao-quan, PENG Zhi-Ying. Research advances of protein and polysaccharide [J]. Science and Technology of Food Industry, 2003, 24(11): 85-87
- [3] 韩清波, 刘晶. 酪蛋白胶束结构及其对牛乳稳定性的影响[J]. 中国乳品工业, 2007, 35(2): 43-46
- HAN Qing-bo, LIU Jing. Casein micelle structure and its effects on the stability of milk [J]. China Dairy Industry, 2007, 35(2): 43-46
- [4] 孟凡玲, 罗亮, 宁辉, 等. κ -卡拉胶研究进展[J]. 高分子通报, 2003, 5: 51-58
- MENG Fan-ling, LUO Liang, NI Hui, et al. Research advances of κ -carrageenans [J]. Polymer Bulletin, 2003, 5: 51-58
- [5] V Langendorff, G Cuvelier, C Michon, et al. Effects of carrageenan type on the behaviour of carrageenan [J]. Food Hydrocolloids, 2000, 14: 273-280
- [6] 胡陵. 酸变性酪蛋白与高酯果胶作用机理的研究[D]. 浙江工商大学, 2013
- HU Ling. Research on the mechanism of stabilisation of acid casein gels by high methoxyl pectinin yogurt drinks [D]. Zhejiang Gongshang University, 2013
- [7] M M Farouk, D A Frost, G Krsinic, et al. Phase behaviour rheology and microstructure of mixture of meat proteins and kappa and iota carrageenans [J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25: 1627-1636
- [8] 何东保, 彭学东, 詹东风. 卡拉胶与魔芋葡甘聚糖协同相互作用及其凝胶化的研究[J]. 高分子材料科学与工程, 2001, 17(2): 29-31
- HE Dong-bao, PENG Xue-dong, ZHAN Dong-feng. The research of gelation and collaborative interaction between carrageenan and konjac mannan [J]. Polymer Materials Science and Engineering, 2001, 17(2): 29-31
- [9] 张付利, 敬永升, 宋丽. 曲克芦丁对牛血清白蛋白溶液二级结构影响的研究[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(1): 75-78
- ZHANG Fu-li, JING Yong-sheng, SONG Li. Studies on effect of trolox on the secondary structure of BSA [J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2011, 31(1): 75-78
- [10] 涂宗财, 王辉, 刘光宪, 等. 动态超高压微射流对卵清蛋白微观结构的影响[J]. 光谱学与光谱分析, 2010, 30(2): 495-498
- TU Zong-cai, WANG Hui, LIU Guang-xian, et al. Effect of dynamic high pressure microfluidization treatment on the microstructure of ovalbumin [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2010, 30(2): 495-498