

# 温度和微射流处理对乳清分离蛋白颗粒性质的影响

陈业宝

(华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

**摘要:** 本文旨在研究微射流处理对不同温度下乳清分离蛋白(WPI)颗粒性质的影响。以微射流处理与温度为变量,对WPI的SDS-PAGE电泳、示差扫描量热特性、平均粒径、 $\zeta$ 电位、表面疏水性( $H_o$ )与乳化活性指数(EAI)进行了表征与测定。结果表明:在所有的温度下,经微射流处理的WPI的平均粒径及 $H_o$ 均小于未经微射流处理的WPI,但 $\zeta$ 电位高于未经微射流处理的WPI。无论是否经过微射流处理,在60℃以下时,WPI的 $H_o$ 基本上不受温度影响,在60℃以上时,其 $H_o$ 随温度的升高而增大,在80℃下达到最大,如微射流处理前后WPI在80℃下的 $H_o$ 分别为3786和3082。此外,在60℃以下时,WPI的EAI基本上不受温度影响,在60℃以上时,其EAI随温度的升高而增大,在80℃下达到最大,如微射流处理前后WPI在80℃下的EAI分别为130.5 m<sup>2</sup>/g和120 m<sup>2</sup>/g。微射流处理前后WPI平均粒径及EAI的变化可能与WPI颗粒间 $\zeta$ 电位和 $H_o$ 的共同作用有关。

**关键词:** 乳清分离蛋白; 颗粒性质; 温度; 微射流

文章编号: 1673-9078(2017)9-115-121

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.9.017

## Effects of Temperature and Microfluidization Treatments on the Particle Properties of Whey Protein Isolate(WPI)

CHEN Ye-bao

(College of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** The aim of this paper was to study the effect of microfluidization treatment on the particle properties of whey protein isolate (WPI) at different temperatures. With the microfluidization treatment and temperature as variables, the WPI was analyzed here by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and differential scanning calorimetry, and the average particle size, zeta-potential, surface hydrophobicity ( $H_o$ ) and emulsifying activity index (EAI) of the WPI were characterized and measured. The results showed that both the average particle size and  $H_o$  of the WPI treated with microfluidization were smaller than those of the WPI without microfluidization treatment at all temperatures, whereas the zeta-potential of the WPI treated with microfluidization was higher than that of the control WPI. Regardless of whether the WPI was treated with microfluidization,  $H_o$  of the WPI was basically unaffected by the temperature when it was below 60℃, increased with the increasing temperature when it was above 60℃, and reached a maximum at 80℃. For example, the  $H_o$  values of WPI treated without or with microfluidization at 80℃ were 3786 and 3082, respectively. Besides, the EAI of the WPI was basically unaffected by the temperatures when the temperature was below 60℃, increased with increasing temperature when the temperature was above 60℃, and reached a maximum at 80℃. For example, EAI values of the WPI treated without or with microfluidization at 80℃ were 130.5 and 120 m<sup>2</sup>/g, respectively. The changes in the average particle size and EAI without and with microfluidization treatment may be associated with the synergistic effect of the zeta-potential and  $H_o$  of the WPI.

**Key words:** whey protein isolate; particle properties; temperature; microfluidization

乳清分离蛋白(WPI)享有“蛋白质之王”的美誉,由于其高营养价值而被广泛应用于各种食品配料中<sup>[1]</sup>。此外,乳清分离蛋白具有优良的功能特性(乳化性、凝胶性和起泡性)<sup>[2-4]</sup>,也可作为乳化剂、胶凝剂、

收稿日期: 2017-03-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31471695)

作者简介: 陈业宝(1993-),男,硕士研究生,研究方向:植物蛋白工程

起泡剂应用到食品中,改善食品的质构特性<sup>[5]</sup>。乳清蛋白中主要含有 $\beta$ -乳球蛋白和 $\alpha$ -乳白蛋白,其等电点接近5.0。纯化的乳清分离蛋白大约含有80%的 $\beta$ -乳球蛋白和15%的 $\alpha$ -乳白蛋白。 $\beta$ -乳球蛋白为球状蛋白质,其含有162个氨基酸残基,相对分子质量为18,400 g/mol,二级结构主要为 $\beta$ -折叠,其形成的二聚物的等电点为5.2。 $\beta$ -乳球蛋白含有两个二硫键和一个自由巯

基, 与其不可逆的热团聚及凝胶特性有关。 $\alpha$ -乳白蛋白也呈球形, 相对分子质量为 14,200 g/mol, 呈现  $\alpha$ -螺旋的二级结构, 等电点在 4.2~4.5 之间, 含有 4 个二硫键。此外, 由于没有自由巯基的存在,  $\alpha$ -乳白蛋白的热聚集过程特别缓慢<sup>[6]</sup>。在 60 °C 下加热 WPI 30 min, 其中的  $\beta$ -乳球蛋白会发生部分变性, 而在 95 °C 下加热  $\beta$ -乳球蛋白 30 min, 蛋白会完全变性, 导致蛋白分子的展开, 疏水基团的暴露<sup>[7,8]</sup>。在相同的时间下, 不同的加热温度会导致蛋白变性程度的不同<sup>[9]</sup>, 并导致蛋白表面活性的不同<sup>[10]</sup>。近些年, 有研究者对乳清蛋白的聚集特性及其影响因素(蛋白浓度、pH 和离子强度等)对分子功能的影响进行了广泛的研究<sup>[4]</sup>。通过控制变性和聚集的过程可以制备出不同结构的蛋白聚集物<sup>[11,12]</sup>, 从而改变蛋白的功能特性, 促进其在增稠剂和脂肪替代品生产中的应用<sup>[13]</sup>。

虽然在过去几十年, 有大量研究者对 WPI 变性和聚集的过程进行了相关研究, 但结合微射流技术研究在不同温度下的 WPI 性质还鲜有报道。本文以 WPI 为研究对象, 主要通过表征和测定 WPI 的 SDS-PAGE 电泳、示差扫描量热特性、平均粒径、 $\zeta$  电位、表面疏水性 ( $H_o$ ) 和乳化活性指数 (EAI), 研究了微射流处理前后的 WPI 在不同温度(室温、50、60、70 和 80 °C)下的颗粒性质。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

未经加热灭菌的生牛乳: 广东燕塘乳业股份有限公司赠送; 福临门一级大豆油: 购于广州当地超市; 盐酸和氢氧化钠等化学试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

PHS-3C 酸度计(上海雷磁仪器厂); T 25 高速剪切机(德国 IKA 公司); M110EH 高压微射流纳米均质机(美国 Microfluidics 公司); 示差扫描量热分析仪 DSC(美国 TA Instruments 公司); Malvern Zetasizer Nano ZS 粒度仪(英国 Malvern 公司); 荧光分光光谱仪(日本 HITACHI 公司)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 WPI 的制备

乳清分离蛋白的制备参考 Alomirah、Chen 和 Zhang 等<sup>[14-16]</sup>的方法并加以改进, 具体制备方法如下: 取未经加热灭菌的生牛乳恢复至室温后, 在 8000 r/min 的转速下离心 10 min, 弃去上层乳脂肪(此时

pH=6.73), 用 4 mol/L HCl 调节 pH 至 4.6, 然后在 8000 r/min 下离心 20 min, 弃去沉淀。取上清液, 用 1 mol/L NaOH 调节 pH 至 7.0, 装袋后用去离子水透析 48 h, 期间每隔 12 h 换一次水, 透析结束后冷冻干燥 24 h 即得乳清分离蛋白粉末(用凯氏定氮法测得蛋白含量约为 92.5%)。

#### 1.3.2 WPI 的 SDS-PAGE 分析

根据 Laemmli 的方法进行 WPI 样品的 SDS-PAGE 分析<sup>[17]</sup>, 分离胶浓度为 12.0%, 浓缩胶浓度为 5.0%。称取 2.0 mg 样品加入 500  $\mu$ L 样品缓冲液, 涡旋混匀后煮沸 5 min, 在 10000 r/min 下离心 10 min, 取 10  $\mu$ L 上层清液加到样品槽中。预处理的标准蛋白质(Mark)直接上样, 分子量范围为 14.4~97.4 ku。SDS-PAGE 于恒定电流下进行电泳, 样品在浓缩胶内电流恒定为 10 mA, 进入分离胶内电流调节为 20 mA, 待溴酚蓝移至分离胶底部 3~5 mm 处切断电源。取出胶片采用考马斯亮蓝法染色 1 h, 然后用甲醇乙酸脱色液脱色 24 h, 期间更换两次脱色液。其中电泳缓冲液为 3.0 g Tris、14.4 g Gly 和 1.0 g SDS, 加去离子水定容至 1000 mL; 样品缓冲液为 0.6 mL 1 mol/L Tris-HCl (pH=6.8)、5.0 mL 50%甘油、1.0 mL 1%溴酚蓝、0.9 mL 去离子水、2.0 mL 10% SDS 和 0.25 mL 2-ME; 染色液为 1.0 g 考马斯亮蓝 R-250、450 mL 甲醇、100 mL 冰醋酸和 450 mL 去离子水; 脱色液为 100 mL 甲醇、100 mL 冰醋酸和 800 mL 去离子水。

#### 1.3.3 WPI 的 DSC 分析

参考 Shen<sup>[18]</sup>的方法, 由 TA Q200-DSC 对冻干的乳清分离蛋白(WPI)粉末进行热分析, 取 2.0 mg 蛋白样品置于一个 TA Q20 液体铝坩埚, 加入 10  $\mu$ L 浓度为 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH=7.0), 然后盖上配套的铝盖压盘密封后在室温下静置平衡 12 h, 样品放置在 DSC 炉腔外侧电极, 内侧放置一个无样品的密封铝坩埚作对照, 然后以 5 °C/min 的升温速率从 20 °C 加热至 110 °C, 氮气流速为 25 mL/min。每个蛋白样品至少做两次平行重复试验, 测得的 DSC 数据包括结晶或融化过程的起止温度、顶点温度和热焓变 ( $\Delta H$ ), 所有数据通过 TA Universal Analysis 2000 软件进行分析。

#### 1.3.4 WPI 溶液的准备

准确称取一定量冻干的乳清分离蛋白(WPI)溶于去离子水中, 配制成 0.5% ( $m/V$ ) 的 WPI 分散液, 室温下搅拌 2 h, 充分溶解后于 4 °C 冰箱中水化过夜, 使蛋白充分溶解。次日, 将蛋白溶液从冰箱中取出恢复至室温, 在 8000 r/min 下离心 20 min 后, 取上层清液, 将溶液 pH 调至 7.0 后, 分别在室温、50、60、70

和 80 °C 下水浴加热 30 min。取出迅速用冷水冷却至室温。将在不同温度下处理的 WPI 溶液分为两组（一组不经微射流处理，另一组用微射流在 80 MPa 的压力下处理一次）。

### 1.3.5 WPI 粒度和 $\zeta$ 电位的测定

用 5 mmol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH 7.0, 过 0.22  $\mu\text{m}$  的膜) 将蛋白浓度稀释至 0.1% ( $m/V$ )，在室温 25 °C 下，用 Malvern Zetasizer Nano ZS 粒度仪测量样品的粒度及  $\zeta$  电位，每组测量重复三次，取平均值用于数据分析。

### 1.3.6 WPI 表面疏水性的测定

WPI 表面疏水性的测量参照 Haskard 等<sup>[19]</sup>的方法，稍加改动：

(1) 用 10 mmol/L pH 7.0 的磷酸盐缓冲液配制 8.0 mmol/L 荧光探针 ANS<sup>-</sup>，WPI 浓度为 5.0 mg/mL；

(2) 往 4.0 mL 磷酸盐缓冲液中 (加入 20  $\mu\text{L}$  ANS<sup>-</sup>) 分别加入 10、20、30、40、50  $\mu\text{L}$  的 WPI 溶液，漩涡混合均匀 (约 5 s)，以不加 ANS<sup>-</sup> 的作为空白组；

(3) 将激发波长  $\lambda_{\text{ex}}$ 、发射波长  $\lambda_{\text{em}}$  分别设置为 370 nm、470 nm，狭缝宽度为 5 nm，电压为 600 V，测定荧光强度，蛋白的相对荧光强度值为样品的荧光强度值扣除空白值；

(4) 以相对荧光强度值对蛋白浓度 (mg/mL) 作图，其初始段的直线斜率即为 WPI 的表面疏水性指数 ( $H_0$ )。

### 1.3.7 WPI 乳化活性指数 (EAI) 的测定

EAI 的测量采用 Perice 和 Keinslla<sup>[20]</sup>经典的浊度法，略加改动。取 4 mL 不同处理的蛋白溶液与 1 mL 大豆油混合，用 IKA T25 均质机在 25,600 r/min 下均质 2 min。立即吸取 10  $\mu\text{L}$  乳液加入到 10 mL 1% SDS 中，轻轻振荡混匀后，在 500 nm 下测其吸光度值。

乳液的浊度 (T) 用下式计算：

$$T = (2.303 \times A) / L \quad (1)$$

其中，A 为 500 nm 下吸光度值，L 为光程长 (1 cm)。

乳化活性指数 (EAI) 用下式计算：

$$\text{EAI} (\text{m}^2/\text{g}) = (2 \times T \times D) / (\varphi \times C \times 10000) \quad (2)$$

其中，T 为浊度，D 为稀释倍数 (1000)， $\varphi$  为油相比例 (0.2)，C 为连续相蛋白浓度 (0.5%)，10000 为换算系数。

每次测量重复三次，取平均值与标准偏差。

### 1.3.8 数据分析

对所有数据进行方差分析 (ANOVA) 和置信区间为 95% 的显著性分析，显著性分析通过 Tukey 的多范围检验，显著性水平为  $p < 0.05$ 。所有图表中采用相同的字母表示在  $p < 0.05$  水平下差异不显著，不同的字母表示差异显著。

## 2 结果与讨论

### 2.1 WPI 的 SDS-PAGE 分析

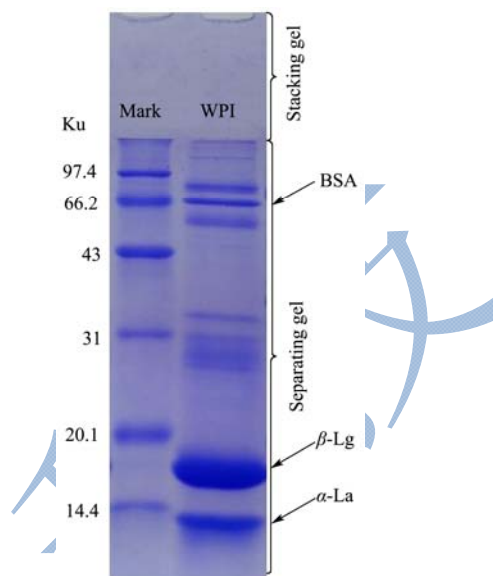


图 1 WPI 的 SDS-PAGE 凝胶电泳

Fig.1 SDS-PAGE profile of the WPI

为了鉴定实验室提取的 WPI 的成分及纯度，以还原型十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 来进行验证。图 1 中 WPI 出现了 BSA、 $\beta$ -Lg 和  $\alpha$ -La 特征条带，其分子量分别约为 66、18 和 14 ku，这与 Mohd Mazlan<sup>[21]</sup>的实验结果一致。结果表明，实验室提取的蛋白为纯度较高的乳清分离蛋白。

### 2.2 WPI 的 DSC 分析

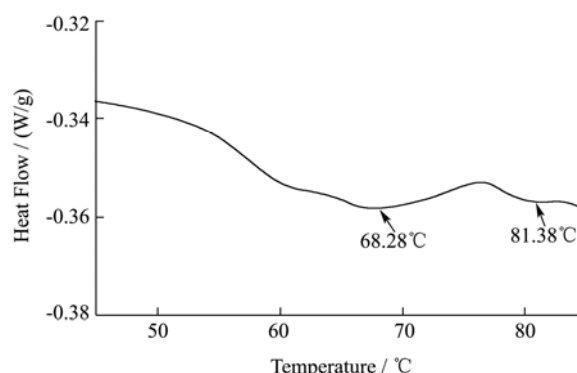


图 2 WPI 的 DSC 热分析

Fig. 2 Representative DSC thermogram of the WPI

为了鉴定实验室提取 WPI 的变性程度，将 WPI 粉末溶于磷酸盐缓冲液进行 DSC 分析来确定。结果表明：WPI 分别在 68.28 和 81.38 °C 处有吸收峰，这与 Toro-Sierra<sup>[22]</sup>报道的  $\beta$ -Lg 和  $\alpha$ -La 的变性温度 (66.4 和 78.4 °C) 基本符合。结果表明，实验室提取的 WPI 为低变性蛋白。

### 2.3 WPI 的粒度分布

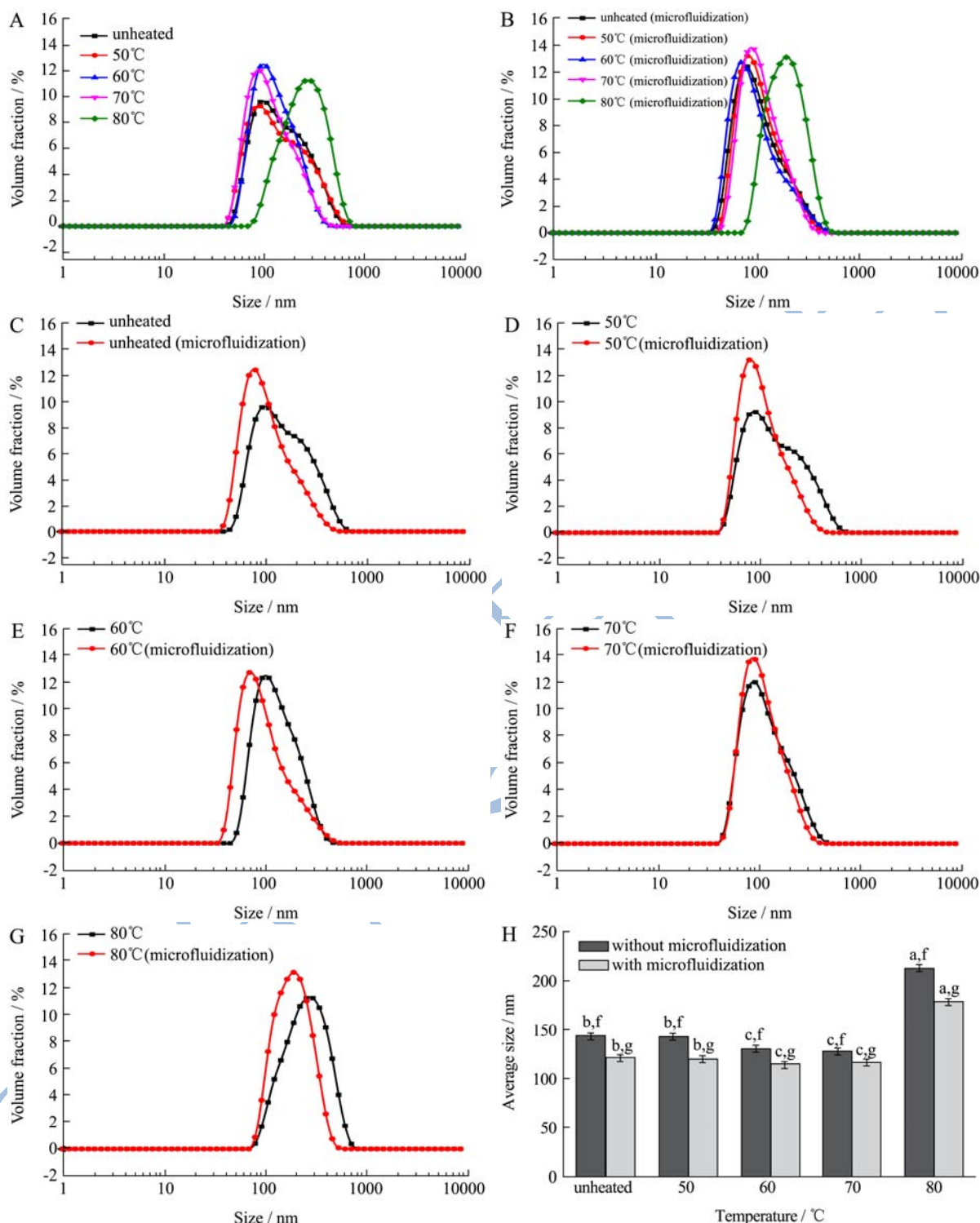


图3 未经微射流处理 WPI 的粒径分布 (A), 经过微射流处理 WPI 的粒径分布 (B), 分别表示微射流处理前后 WPI 在室温、50、60、70、80 °C 下的粒径分布 (C-G), 微射流处理前后 WPI 在不同温度下的平均粒径 (H)

**Fig.3 The particle size distribution of the WPI without microfluidization treatment(A), The particle size distribution of the WPI with microfluidization treatment(B), Represent the particle size distribution of WPI without and with microfluidization treatment at different temperatures (nature, 50, 60, 70, 80 °C), respectively(C-G), The average particle size of the WPI without and with microfluidization at different temperatures(H)**

注: 每组数据重复三次, 取平均值及标准偏差。不同的字母 (a-c) 表示在  $p < 0.05$  水平下, 不同温度下样品之间的差异显著;

不同的字母 (f-g) 表示在  $p < 0.05$  水平下, 微射流处理前后样品的差异显著。

由图 3 可知, 微射流处理前后的 WPI 在不同温度下的粒径均呈现单峰分布 (图 3A, B), 另外, 经过微射流处理的 WPI 在不同温度下的粒径分布峰更高更窄 (图 3C~G), 且平均粒径均小于未经微射流处理的 WPI (图 3H), 说明经过微射流处理的 WPI 粒径更加均匀, 这主要是因为高压 (80 MPa) 的作用下, 原先存在于 WPI 溶液中的部分聚集物发生了解聚作用, 类似的现象在 Liu 研究中也有报道<sup>[23]</sup>。

鉴于 DSC 结果 (图 2), WPI 在制备的过程中发生了一定的变性 (可能由盐酸和氢氧化钠引起的), 可能会形成部分蛋白聚集物。由图 3H 可知, 无论是否经过微射流处理, 在 50、60 和 70 °C 下的 WPI 的平均粒径均较常温下的 WPI 有轻微的减小, 这可能与较高温度下的热力作用使本来存在于 WPI 中的部分聚集物的解聚作用有关。而在 80 °C 下, WPI 的平均粒径明显增大, 这主要是因为 70 °C 下, WPI 基本不会发生变性或变性程度极低, 而在 70 °C 以上时, 蛋白分子结构更容易变性展开, 使得蛋白分子之间的相互作用增强, 导致蛋白的聚集。在 80 °C 时, 微射流处理前后 WPI 的平均粒径分别为 212.1 nm 和 178.6 nm, 主要是因为强烈的热力作用使得大量的蛋白分子聚集, 因此粒径明显增大。类似的现象在文献中也有报道<sup>[7-9]</sup>。另外, 由 DSC 结果 (图 2) 可知, WPI 中  $\beta$ -Lg 和  $\alpha$ -La 的变性温度分别为 68.28 和 81.38 °C, 这也证明了在 70 °C 以下, WPI 在短时间 (本实验热处理时间为 30 min) 的加热下是不容易发生变性的。

#### 2.4 WPI 的 $\zeta$ 电位及表面疏水性

在不同的温度下, 微射流处理 WPI 的  $\zeta$ -电位均大于未经微射流处理 WPI 的  $\zeta$ -电位 (图 4A), 如室温下经微射流处理 WPI 的  $\zeta$ -电位为 -23.9 mV, 而未经微射流处理 WPI 的  $\zeta$ -电位为 -17.5 mV。可能的原因是在高压 (80 MPa) 作用下, 破坏了蛋白分子结构, 导致更多的带负电基团暴露于蛋白分子表面, 从而使得蛋白表面负电荷增加。有文献报道<sup>[24]</sup>, 在低浓度条件下由于蛋白结构变化和聚集, 导致蛋白表面带负电氨基酸内卷, 从而使蛋白表面净电荷减少。本实验是在较低蛋白浓度 ( $C=0.5\%$ ) 下进行的, 对比经过微射流处理的 WPI 在不同温度下的  $\zeta$ -电位, 不难发现, 50、60、70 和 80 °C 下的 WPI 的  $\zeta$ -电位要小于室温下 WPI 的  $\zeta$ -电位, 与文献报道的现象一致, 可能与带负电氨基酸内卷有关。基于此, 对于经过微射流处理的 WPI 在不同温度下  $\zeta$ -电位的差异, 我们可以合理地推测: 在本实验条件下, WPI 表面带负电氨基酸的内卷程度可能与

温度有关, 且在 80 °C 时表面带负电氨基酸的内卷程度最大。

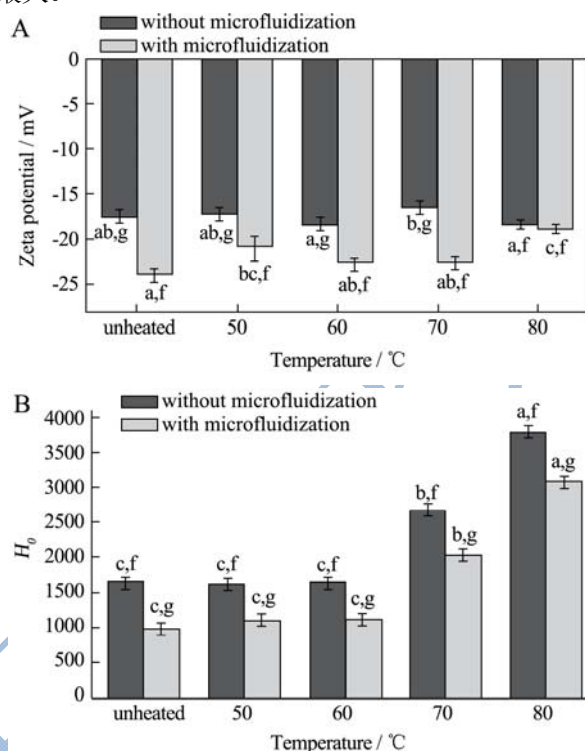


图 4 微射流处理前后 WPI 的  $\zeta$  电位 (A) 和微射流处理前后 WPI 的表面疏水性 (B)

Fig. 4 Zeta-potential of the WPI without or with microfluidization (A) and the surface hydrophobicity ( $H_0$ ) of WPI without or with microfluidization (B)

注: 每组数据重复三次, 取平均值及标准偏差。不同的字母 (a-c) 表示在  $p < 0.05$  水平下, 不同温度下样品之间的差异显著; 不同的字母 (f-g) 表示在  $p < 0.05$  水平下, 微射流处理前后样品的差异显著。

荧光探针 ANS 可以与蛋白分子暴露的疏水基团结合, 在 pH 7.0 下使用 ANS 测定 WPI 的  $H_0$  可以反映蛋白分子的表面疏水性。在一定的温度下, 经过微射流处理 WPI 的表面疏水性 ( $H_0$ ) 均要小于未经过微射流处理 WPI 的  $H_0$  (图 4B), 可能的原因是微射流过程中产生的高压破坏或掩盖了 WPI 表面的疏水基团, 并可能使更多氨基酸的亲水基团暴露于表面, 导致  $H_0$  的降低<sup>[23]</sup>。然而, Shen<sup>[18]</sup>等发现经过微射流处理的大豆分离蛋白 (SPI) 的  $H_0$  要大于未经过微射流处理的 SPI, 与本实验结果不符合的可能原因是: (1) 蛋白原料性质差异; (2) Shen<sup>[18]</sup>等采用的微射流压力是 120 MPa, 而本实验采用的微射流压力是 80 MPa。Liu<sup>[23]</sup>等表明, 经过微射流处理的乳清浓缩蛋白 (WPC) 的表面疏水性与微射流过程中采用的压力是紧密相关的。当压力  $\leq 100$  MPa (如 40 MPa 和 80 MPa)

时, 蛋白的表面疏水性会有所减小, 但当压力 $\geq 100$  MPa 时 (如 120 MPa 和 160 MPa) 时, 蛋白的表面疏水性又会增大, 其中在 120 MPa 下的表面疏水性达到最大。当压力较大时, 蛋白聚集物的解聚会导致内部疏水基团的暴露, 导致蛋白表面疏水性的增加, 但当压力继续增大时, 蛋白颗粒之间又会重新聚集, 导致表面疏水性的减小。

无论是否经过微射流处理, 可以明显地看到, 室温、50 和 60  $^{\circ}\text{C}$  下 WPI 的表面疏水性基本上不受温度影响, 但当温度大于 60  $^{\circ}\text{C}$  时, WPI 的表面疏水性明显增大, 在 80  $^{\circ}\text{C}$  时达到最大, 如微射流处理前后 WPI 的  $H_o$  分别为 3786 和 3082。结合前面 WPI 粒径的数据, 在 80  $^{\circ}\text{C}$  下 WPI 的粒径达到最大, 说明在高温的作用下, 蛋白的疏水基团暴露, 在疏水相互作用下, 蛋白聚集形成更大的聚集体。Shen<sup>[18]</sup> 等也研究了 SPI 在不同温度下的表面疏水性, 并指出 SPI 的表面疏水性与加热温度及是否采用微射流处理紧密相关。

此外, 综合考虑 WPI  $\zeta$ -电位及表面疏水性对 WPI 粒径的影响 (经过微射流处理的 WPI  $\zeta$ -电位变大, 而表面疏水性变小, 粒径变小), 可以合理地认为: 经过微射流处理的 WPI  $\zeta$ -电位的增大以及表面疏水性的减小是粒径减小的重要原因, 因为蛋白之间的静电斥力越强、疏水相互作用越弱, 蛋白越不容易发生聚集。

## 2.5 WPI 的乳化活性指数 (EAI)

乳化活性指数 (EAI) 表示为每克蛋白能够稳定的表面积 ( $\text{m}^2/\text{g}$ ), 同时也表示蛋白吸附到油水界面的能力<sup>[20]</sup>。

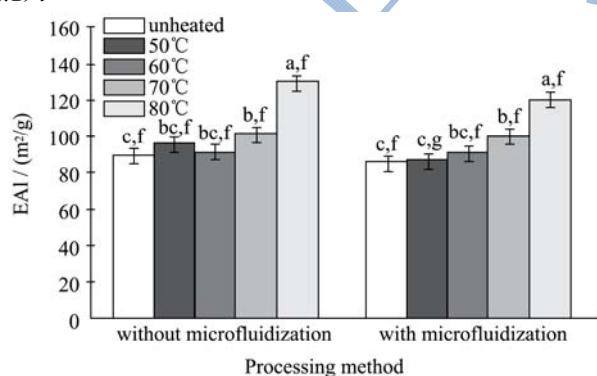


图5 微射流处理前后 WPI 的乳化活性指数

Fig. 5 The emulsifying activity index of the WPI without or with microfluidization

注: 每组数据重复三次, 取平均值及标准偏差。不同的字母 (a-c) 表示在  $p < 0.05$  水平下, 不同温度下样品之间的差异显著; 不同的字母 (f-g) 表示在  $p < 0.05$  水平下, 微射流处理前后样品的差异显著。

由图 5 可知, 室温、50 和 60  $^{\circ}\text{C}$  下 WPI 的 EAI 差别不大, 70  $^{\circ}\text{C}$  下 WPI 的 EAI 略有增加, 80  $^{\circ}\text{C}$  下 WPI 的 EAI 明显增大, 如未经微射流处理 WPI 在 80  $^{\circ}\text{C}$  下的 EAI 为  $130.5 \text{ m}^2/\text{g}$ , 远远大于在室温下 WPI 的 EAI ( $89.6 \text{ m}^2/\text{g}$ )。另外, 在不同温度下, 经微射流处理 WPI 的 EAI 均略小于未经微射流处理 WPI 的 EAI, 这与图 4B 中表面疏水性的规律一致, 说明 WPI 的 EAI 与  $H_o$  是呈正相关的。基于此, 80  $^{\circ}\text{C}$  下 EAI 的明显增大主要是因为 WPI 疏水基团明显暴露, 表面疏水性增强。此外, 结合  $\zeta$ -电位及表面疏水性数据, 如 80  $^{\circ}\text{C}$  下  $\zeta$ -电位较小 (静电斥力小) 而  $H_o$  最大, 可知: 微射流处理前后 EAI 的变化可能与 WPI 颗粒间的  $\zeta$ -电位及表面疏水性的共同作用有关,  $\zeta$ -电位的增大不利于蛋白吸附到油水界面, 导致 EAI 减小, 但表面疏水性的增大却有利于蛋白吸附到油水界面, 导致 EAI 增大。

## 3 结论

3.1 在所有温度下, 经过微射流处理的 WPI 的平均粒径均小于不经过微射流处理的 WPI, 这与微射流产生的高压对聚集物的解聚作用有关。

3.2 无论是否经过微射流处理, 在 60  $^{\circ}\text{C}$  以下时, WPI 的  $H_o$  基本上不受温度影响, 在 60  $^{\circ}\text{C}$  以上时, 其  $H_o$  随温度的升高而增大, 在 80  $^{\circ}\text{C}$  下达到最大。在所有温度下, 经过微射流处理的 WPI 的表面疏水性均小于不经过微射流处理的 WPI, 这可能与微射流产生的高压破坏或掩盖了蛋白表面的疏水基团, 并可能使更多的亲水基团暴露于蛋白表面有关。

3.3 经过微射流处理的 WPI 的  $\zeta$ -电位高于未经微射流处理的 WPI, 这可能是因为微射流产生的高压破坏了蛋白分子结构, 导致更多的带负电基团暴露于蛋白表面, 从而使得蛋白表面负电荷增加。

3.4 无论是否经过微射流处理, 在 60  $^{\circ}\text{C}$  以下时, WPI 的 EAI 基本上不受温度影响, 在 60  $^{\circ}\text{C}$  以上时, 其 EAI 随温度的升高而增大, 在 80  $^{\circ}\text{C}$  下达到最大。微射流处理前后 EAI 的变化可能与 WPI 颗粒间  $\zeta$ -电位及  $H_o$  的共同作用有关, 因为  $\zeta$ -电位的增大不利于蛋白吸附到油水界面, 导致 EAI 减小, 但表面疏水性的增大却有利于蛋白吸附到油水界面, 导致 EAI 增大。

## 参考文献

- [1] Sindayikengera Séverin, Xia Wenshui. Milk biologically active components as nutraceuticals: review [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2005, 45(7-8): 645-656

- [2] Destribats M, Rouvet M, Gehin-Delval C, et al. Emulsions stabilised by whey protein microgel particles: towards food-grade Pickering emulsions [J]. *Soft Matter*, 2014, 10(36): 6941
- [3] Egan T, Jacquier J C, Rosenberg Y, et al. Cold-set whey protein microgels for the stable immobilization of lipids [J]. *Food Hydrocolloids*, 2013, 31(31): 317-324
- [4] Nicolai T, Britten M, Schmitt C.  $\beta$ -Lactoglobulin and WPI aggregates: formation, structure and applications [J]. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25(8): 1945-1962
- [5] Lizarraga M S, Dde P V, González R, et al. Rheological behaviour of whey protein concentrate and  $\lambda$ -carrageenan aqueous mixtures [J]. *Food Hydrocolloids*, 2006, 20(5): 740-748
- [6] Schmitt C, Bovay C, Vuillomenet A M, et al. Influence of protein and mineral composition on the formation of whey protein heat-induced microgels [J]. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25(4): 558-567
- [7] Mantovani R A, Ângelo Luiz Fazani Cavallieri, Cunha R L. Gelation of oil-in-water emulsions stabilized by whey protein [J]. *Journal of Food Engineering*, 2015, 175(2): 108-116
- [8] Havea P, Singh H, Creamer L K. Characterization of heat-induced aggregates of beta-lactoglobulin, alpha-lactalbumin and bovine serum albumin in a whey protein concentrate environment [J]. *Journal of Dairy Research*, 2001, 68(3): 483-97
- [9] Millqvistfureby A, Elofsson U, Bergenstahl B. Surface composition of spray-dried milk protein-stabilised emulsions in relation to pre-heat treatment of proteins [J]. *Colloids & Surfaces B Biointerfaces*, 2001, 21(1-3): 47-58
- [10] Ruffin E, Schmit T, Lafitte G et al. The impact of whey protein preheating on the properties of emulsion gel bead [J]. *Food Chemistry*, 2014, 151(4): 324-332
- [11] Zhang Z, Arrighi V, Campbell L, et al. Properties of partially denatured whey protein products: formation and characterisation of structure [J]. *Food Hydrocolloids*, 2015, 52: 95-105
- [12] Zhang Z, Arrighi V, Campbell L, et al. Properties of partially denatured whey protein products 2: Solution flow properties [J]. *Food Hydrocolloids*, 2016, 56: 218-226
- [13] J J Resch, C R Daubert. Rheological and physicochemical properties of derivatized whey protein concentrate powders [J]. *International Journal of Food Properties*, 2002, 5(2): 419-434
- [14] Alomirah H F, Alli I. Separation and characterization of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin from whey and whey protein preparations [J]. *International Dairy Journal*, 2004, 14(5): 411-419
- [15] 陈静廷, 卜登攀, 马露, 等. 不同等电点沉淀法和超速离心法提取牛奶乳清蛋白的双向电泳分析[J]. *食品科学*, 2014, 35(20): 180-184
- CHEN Jing-ting, BU Deng-pan, MA Lu, et al. 2-DE analysis of whey protein extracted by different isoelectric precipitations and ultracentrifugation methods from cow milk [J]. *Food Science*, 2014, 35(20): 180-184
- [16] 张睿, 袁敏伟, 史炳照. 从新鲜牛奶中提取  $\beta$ -乳球蛋白[J]. *中国医药工业杂志*, 1999, 2: 51-53
- ZHANG Rui, YUAN Min-wei, SHI Bing-zhao. Purification of human plasm inogen by affinity chromatography [J]. *Chinese Journal of Pharmaceuticals*, 1999, 2: 51-53
- [17] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. *Nature*, 1970, 227(5259): 680-685
- [18] Shen L, Tang C H. Microfluidization as a potential technique to modify surface properties of soy protein isolate [J]. *Food Research International*, 2012, 48(1): 108-118
- [19] Haskard C A, Ecy L C. Hydrophobicity of bovine serum albumin and ovalbumin determined using uncharged (PRODAN) and anionic (ANS-) fluorescent probes [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 1998, 46(7): 2671-2677
- [20] Pearce K N, Kinsella J E. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 1978, 26(3): 716-723
- [21] Mohd Mazlan M. Isolation of  $\beta$ -Lactoglobulin and  $\alpha$ -Lactalbumin from whey [J]. 2010
- [22] Toro-Sierra J, Tolkach A, Kulozik U. Fractionation of  $\alpha$ -Lactalbumin and  $\beta$ -Lactoglobulin from whey protein isolate using selective thermal aggregation, an optimized membrane separation procedure and resolubilization techniques at pilot plant scale [J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2013, 6(4): 1032-1043
- [23] Liu C M, Zhong J Z, Liu W, et al. Relationship between functional properties and aggregation changes of whey protein induced by high pressure microfluidization [J]. *Journal of Food Science*, 2011, 76(4): E341-E347
- [24] Wang J M, Yang X Q, Yin S W, et al. Structural rearrangement of ethanol-denatured soy proteins by high hydrostatic pressure treatment [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2011, 59(13): 7324