

# 抗坏血酸/过氧化氢介导乳清分离蛋白 与 EGCG 接枝聚合动力学

熊厚盛, 陈立莹, 解新安, 李雁, 李璐\*  
(华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)

**摘要:** 以抗坏血酸 (Ascorbic Acid, Asc) 和过氧化氢 (Hydrogen Peroxide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 为引发剂, 研究乳清分离蛋白 (Whey Isolate Protein, WPI) 与表没食子儿茶素没食子酸酯 (()-Epigallocatechin Gallate, EGCG) 接枝聚合动力学。系统研究活化时间、引发剂浓度、单体浓度和温度对接枝量的影响, 通过测定反应级数和表观活化能, 建立接枝反应动力学方程。结果表明, 在 Asc/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 体系中, 由抗坏血酸自由基 (Asc<sup>-•</sup>) 介导 WPI 与 EGCG 接枝反应。当反应条件为 Asc 浓度 0.014 mol/L, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度 0.10 mol/L, 溶液 pH 值 6, 温度 308.15 K 以及活化时间 120 min 时, 接枝量为 42.08 mg/g。基于上述结果, 我们可以得到在 Asc 浓度 0.01~0.022 mol/L, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度 0.09~0.12 mol/L, EGCG 浓度 0.001 2~0.004 2 mol/L, 温度 298.15~308.15 K 变化范围内, 建立了 WPI 接枝 EGCG 的聚合速率方程, 聚合反应的表观活化能  $E=12.96$  kJ/mol。研究结果为蛋白质的结构设计和可控制备提供理论指导, 拓宽蛋白质在食品工业中的应用。

**关键词:** 抗坏血酸; 过氧化氢; 乳清分离蛋白; 表没食子儿茶素没食子酸酯; 聚合动力学

文章编号: 1673-9078(2023)06-53-60

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.6.0821

## Kinetics of Ascorbic Acid/Hydrogen Peroxide-mediated Graft Polymerization of Whey Protein Isolate with EGCG

XIONG Housheng, CHEN Liying, XIE Xin'an, LI Yan, LI Lu\*

(College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** Graft polymerization of (()-epigallocatechin gallate (EGCG) onto whey protein isolate (WPI) was investigated using ascorbic acid (Asc) and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) as a redox system. The effects of different reaction parameters on the graft yield; activation time, initiator concentration, monomer concentration, and temperature were determined, and the kinetic equation for the graft polymerization reaction was established from the reaction level and apparent activation energy. The results demonstrated that, in an Asc/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system, acid free radicals (Asc<sup>-•</sup>) mediate the graft polymerization of WPI and EGCG, with the graft yield reaching 42.08 mg/g under an ascorbic acid concentration of 0.014 mol/L, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration of 0.10 mol/L, pH value 6, temperature of 35 °C, and activation time of 120 min. Based on the above results, a calculation equation describing the WPI-EGCG polymerization rate was obtained for reactions under an Asc concentration range of 0.01~0.022 mol/L, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration range of 0.09~0.12 mol/L, EGCG concentration of 0.001 2~0.004 2 mol/L, and temperature of 298.15~308.15 K. An activation energy of 12.96 kJ/mol was obtained for polymerization. The results provide theoretical guidance for the structural design and controllable preparation of proteins, thus broadening the application of proteins in the food industry.

**Key words:** ascorbic acid; hydrogen peroxide; whey protein isolate; (()-epigallocatechin gallate; polymerization kinetics

引文格式:

熊厚盛,陈立莹,解新安,等.抗坏血酸/过氧化氢介导乳清分离蛋白与 EGCG 接枝聚合动力学[J].现代食品科技,2023,39(6):53-60.

XIONG Housheng, CHEN Liying, XIE Xin'an, et al. Kinetics of ascorbic acid/hydrogen peroxide-mediated graft polymerization of whey protein isolate with EGCG [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(6): 53-60.

收稿日期: 2022-06-28

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31501471)

作者简介: 熊厚盛 (1997-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 纳米乳液研究,

E-mail: 1726656649@qq.com

通讯作者: 李璐 (1978-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品功能载体运

体系构建与应用, E-mail: lulu\_lee@scau.edu.cn

乳清分离蛋白 (Whey Isolate Protein, WPI) 是牛奶在 pH 值为 4.6 下沉淀出酪蛋白后得到的蛋白混合物, 主要组分有  $\alpha$ -乳白蛋白、 $\beta$ -乳球蛋白、免疫球蛋白以及牛血清白蛋白<sup>[1]</sup>。WPI 不仅具有良好的溶解性, 乳化性等功能特性, 还可以作为天然的递送系统保护易被人体消化降解的活性物质<sup>[2]</sup>。多酚可以与蛋白质

共价结合,赋予蛋白强抗氧化性,从而拓宽蛋白质在食品中的应用。目前,已经有碱法、酶法和自由基诱导法三种接枝方法合成蛋白质-多酚复合物。和传统的酶法及碱法接枝相比,自由基接枝可在常温下引发,具有安全快速、避免多酚降解的优点,但接枝效率较低<sup>[3]</sup>。表没食子儿茶素没食子酸酯((-)-Epigallocatechin Gallate, EGCG)是从绿茶中提取的一种多酚类物质,具有很强的抗氧化活性<sup>[4]</sup>。相比于其他多酚物质,EGCG与WPI结合后表现出更好的乳化性、抗氧化性和热稳定性<sup>[5-7]</sup>。

已有大量文献报道使用抗坏血酸(Ascorbic Acid, Asc)和过氧化氢(Hydrogen Peroxide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)作为引发剂将多酚与蛋白进行自由基接枝聚合<sup>[8-10]</sup>。根据自由基接枝机理,首先是Asc和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>引发产生自由基,其次自由基攻击蛋白使之活化,最后活化蛋白再与多酚结合形成接枝物<sup>[11]</sup>。然而,目前研究人员对Asc/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>引发的自由基种类说法不一,Wu等<sup>[12]</sup>报道了Asc/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>协同超声降解壳聚糖的作用机制。超声波的存在促进Asc/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>分解产生羟基自由基(OH),大量的OH破坏了壳聚糖的β-1,4糖苷键,使壳聚糖迅速降解为短寡聚体。Daniel等<sup>[13]</sup>研究了Asc/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>介导的菊粉-球蛋白接枝的机制。结果显示,OH和抗坏血酸自由基(Asc·)从菊粉的甲基中提取一个氢原子,得到菊粉大自由基,没食子酸分子通过共价键的方式接枝到这些位置,形成聚合物。这些结果表明,对于Asc/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>体系产生的自由基种类还需进一步明确。

在自由基接枝过程中涉及自由基聚合动力学,这是一种研究反应速率与单体浓度、引发剂浓度和温度之间定量关系的方法,通过分析动力学特征及建立聚合速率方程,进而深入探索聚合过程,揭示接枝机制,目前已在乙烯乙酸、甲基丙烯酸等物质的接枝聚合反应研究中得到广泛应用<sup>[14,15]</sup>。但对于WPI接枝多酚的改性研究,还主要集中在针对接枝物结构分析以及应用性能的提高上<sup>[3,16-18]</sup>,有关WPI接枝EGCG等多酚聚合反应的动力学研究仍鲜见报道。

本文通过电子顺磁共振波谱仪(Electron Paramagnetic Resonance, EPR)明确Asc和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>产生的自由基,以EGCG为单体,通过接枝共聚反应制备了WPI-EGCG接枝聚合物,系统研究活化时间、引发剂浓度、EGCG单体浓度、反应温度以及pH等因素对接枝量的影响,以优化接枝条件;进而考察接枝速率随引发剂浓度、EGCG单体浓度、反应温度的变化规律,据此建立接枝反应动力学方程,为WPI接枝EGCG反应过程及机理研究提供理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 试剂和仪器

乳清分离蛋白、5,5-二甲基-1-吡咯啉-N-氧化物(DMPO)广州市齐湘生物技术有限公司;抗坏血酸、过氧化氢、乙二胺四乙酸(EDTA)、氢氧化钠、无水碳酸钠广州化学试剂厂;表没食子儿茶素没食子酸酯上海源叶生物科技有限责任公司。

BK-FD18BS 真空冷冻干燥机济南欧莱博科学仪器有限公司;UV-2500 紫外可见分光光度计德国斯派克分析仪器公司;Bruker EMXplus-10/12 电子顺磁共振波谱仪德国布鲁克公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 Asc/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>体系中自由基鉴定

通过EPR对Asc/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>引发体系中产生的自由基进行定性分析。在49 mL水溶液中加入0.25 g Asc和0.01 mol/L的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液,混匀后取1 mL加入10 μL 100 mmol/L DMPO溶液,对其产生的自由基进行检测。EPR的检测条件如下:微波频率9.44 GHz;扫场宽度100 G;调频100 kHz;调幅1.00 G。微波功率12 mW,磁场3 460~3 560,调制幅度2 500 G,扫描时间64 s,积累3。EPR谱图中最强信号的整体高度可看作自由基信号的相对强度<sup>[19]</sup>。自由基的类型是由特征峰和g值来确定的,g值的计算公式如下:

$$g = \frac{h\nu}{\mu_B \cdot B} \quad (1)$$

式中:

$h$ ——普朗克常数,  $6.626 \times 10^{-34}$  J s;

$\nu$ ——频率, Hz;

$\mu_B$ ——玻尔磁子,  $9.274 \times 10^{-28}$  J/G;

$B$ ——中心磁场, Gauss。

#### 1.2.2 WPI与EGCG接枝物的制备

根据Spizzirri等<sup>[20]</sup>的方法制备WPI-EGCG接枝物。称取0.5 g WPI溶解于49 mL的去离子水中,充分溶解后加入1 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液和Asc,通入30 min氮气以达到除氧的目的,置于恒温水浴锅中振荡一定的时间,使蛋白质活化。之后向蛋白质溶液加入0.05 g EGCG,继续在水浴锅中振荡。反应完后的样品溶液在去离子水中透析72 h,每隔6 h换水一次,然后将透析液在-20 °C下预冻5 h后,再进行真空冷冻干燥(-50 °C)48 h,最后将冻干的样品置于干燥器中备用。

#### 1.2.3 接枝反应条件的优化

以接枝量为评价指标,采用单因素轮换法依次考

察 Asc 浓度 (0.010、0.014、0.028、0.042 mol/L)、 $H_2O_2$  浓度 (0.05、0.010、0.015、0.020 mol/L)、pH 值 (2、4、6、8)、活化时间 (0、60、120、180 h)、反应温度 (298.15、303.15、308.15、313.15 K) 对 EGCG 接枝量的影响。

#### 1.2.4 福林酚法测定 EGCG 与 WPI 接枝量

WPI-EGCG 复合物的总酚含量用福林酚试剂法测定。将 1 mL 样品溶液 (1 mg/mL) 与 2.5 mL 福林酚试剂 (0.2 mol/L) 在室温下混合 5 min, 然后加入 2 mL 碳酸钠溶液 (7.5%, *m/V*), 旋涡搅拌后避光反应 2 h。用紫外可见分光光度计测量 760 nm 处的吸光度。使用 EGCG 标准曲线如图 1 计算样品的 EGCG 含量, 结果表示为接枝量, 单位为 mg EGCG/g 样品。

根据接枝量, 可计算样品得率:

$$W_E = \frac{M \times W_g}{1000} \quad (2)$$

$$P_e = \frac{W_E}{0.05} \times 100\% \quad (3)$$

式中:

$W_E$ —接枝 EGCG 的重量, g;

$M$ —接枝量, mg EGCG/g 样品;

$W_g$ —接枝后样品质量, g;

$P_e$ —得率, %;

0.05—EGCG 的添加量, g。

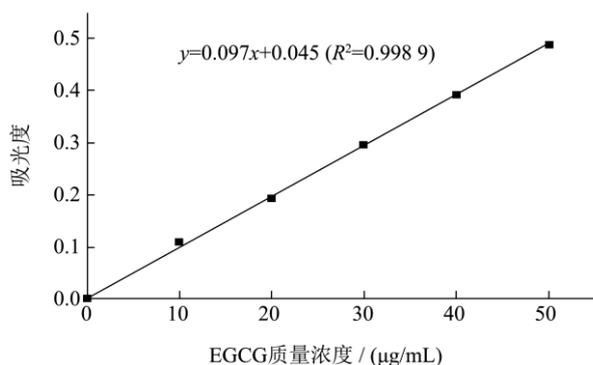


图 1 EGCG 标准曲线

Fig.1 EGCG standard curves

#### 1.2.5 建立聚合动力学方程模型

根据 1.2.2 方法制备 WPI-EGCG 复合物。在一定的反应时间 (10、40、60、120、180、240、300、360、420、480 min) 内终止反应, 经透析干燥后, 称量所得固体粉末质量以计算接枝率。根据接枝率—时间关系曲线的斜率得到聚合初始速率。改变单体浓度 (固定引发剂浓度和温度), 分别做 [EGCG]-t 图, 得到不同单体浓度下的聚合速率  $R$ , 以  $\lg R$  对  $\lg [EGCG]$  作图, 通过线性回归求出直线的斜率即可得到单体的反应级数。用同样的方法固定其它两个参数, 分别得到

氧化剂  $H_2O_2$ 、还原剂 Asc 的反应级数以及表观活化能。

接枝聚合速率  $R$  表示单位时间内接枝反应单体接枝率的变化量, 可由接枝率随时间的变化量求得。接枝率是接枝反应中产物关键的表征数据之一, 其计算公式如下:

$$P_g = \frac{W_E}{W_P} \times 100\% \quad (4)$$

式中:

$W_E$ —接枝 EGCG 的质量, g;

$P_g$ —接枝率, %;

$W_P$ —分别表示接枝前 WPI 的质量, g。

#### 1.2.6 聚合速率方程和表观活化能

自由基接枝分为四步基元反应, 包括链引发、链增长、链转移和链终止。其中链转移只使聚合度降低, 不影响速率, 故暂且不考虑。推导聚合动力学时, 作了链转移反应无影响、自由基等活性、聚合度大和自由基为稳态四个基本假定<sup>[21]</sup>。根据四个假定, 得到总聚合速率普适方程:

$$R = k[I]^n[M]^m \quad (5)$$

根据 Arrhenius 公式, 聚合速率常数与温度的关系可表示为:

$$k = Ae^{-E/RT} \quad (6)$$

由 (5) 式和 (6) 式可得:

$$R = Ae^{-E/RT} [I]^n [M]^m \quad (7)$$

式中:

$R$ —聚合速率;

$k$ —聚合速率常数;

$A$ —指前因子;

$E$ —表观活化能, kJ/mol;

$[I]$ 和 $[M]$ —分别表示引发剂浓度和单体浓度, mol/L;

$n$ 、 $m$ —反应级数。

### 1.3 数据分析

实验均设置 3 组平行, 所得数据采用 SPSS 26 软件以邓肯新极差法 (Duncan's Multiple Range Tests) 进行显著性分析,  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。运用 Origin 2018 软件作图。

## 2 结果和分析

### 2.1 WPI-EGCG 共价复合物接枝机理

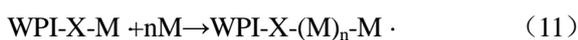
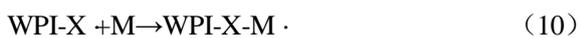
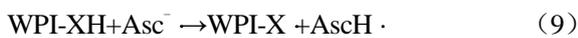
通过 EPR 检测 Asc/ $H_2O_2$  引发体系产生的自由基, 从而探究 WPI-EGCG 共价复合物接枝机理。如图 2

所示, EPR 谱图呈现两重峰, 并经过计算得到旋转磁常数  $g=2.0051$ , 超精细分裂常数  $aH=1.8003$ , 与文献报道的  $Asc^-$  特征值一致, 表明在  $Asc/H_2O_2$  体系中由  $Asc^-$  介导接枝反应<sup>[22,23]</sup>。自由基能攻击蛋白质上巯基和氨基等敏感残基上的氢原子, 从而在氨基酸结构上产生大分子自由基。这些大分子自由基与多酚单体进行反应, 形成结构单元更多的链自由基, 最后自由基生长链的终止可能发生在两个活性链之间的相互反应。Singha 等<sup>[24]</sup>从自由基的角度推测了蚕丝蛋白接枝甲基丙烯酸甲酯的反应过程, 认为自由基从蚕丝蛋白的主链上夺氢生成大分子自由基, 大分子自由基上与甲基丙烯酸甲酯反应形成聚合物。

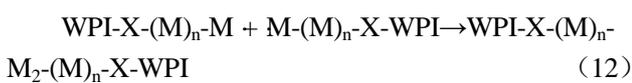
链引发:



链增长:



链终止:



式中:

M—EGCG 单体;

X—SH 和 NH;

WPI-X—乳清分离蛋白自由基。

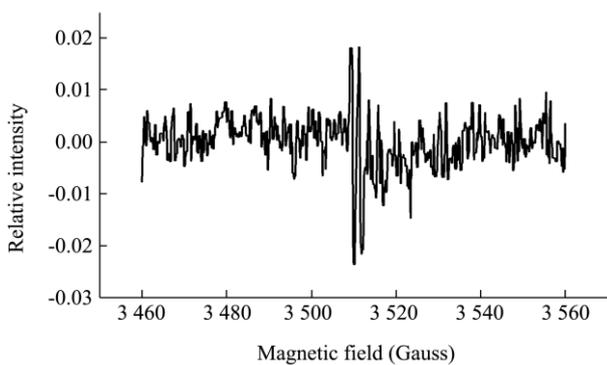


图 2  $Asc/H_2O_2$  体系的 EPR 谱图

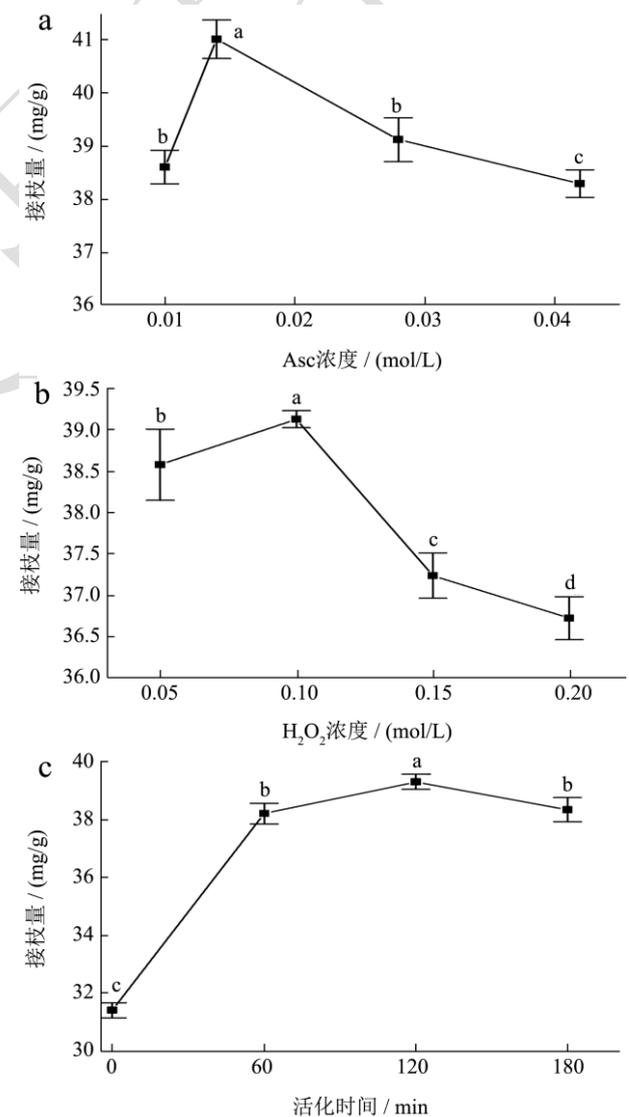
Fig.2 EPR spectrum of  $Asc/H_2O_2$  system

## 2.2 接枝反应条件的优化

通过单因素实验研究 WPI 和 EGCG 接枝反应过程中  $Asc$  和  $H_2O_2$  浓度以及反应温度、pH 和活化时间对接枝量的影响。结果如图 3 所示。

图 3a 和图 3b 表明, 随着  $Asc$  和  $H_2O_2$  浓度的增加, 接枝量呈现先增加后减少的趋势。这可能是由于  $Asc^-$  与 WPI 反应形成蛋白质大分子自由基,  $Asc^-$  产

生量越多, 形成的蛋白质大自由基越多, 获得的接枝量越高。然而, 超出一定范围, 大量自由基通过氧化反应终止增长的接枝链, 从而导致接枝量下降。从图 2c 可以看出随着活化时间的延长, 自由基有足够时间与蛋白质发生作用, 导致接枝量增加。但活化时间超过 120 min 时, 大分子自由基可能发生电荷转移等作用造成活性下降<sup>[25]</sup>, 导致蛋白质上的接枝位点减少, 因此接枝量反而降低。图 3d 和图 3e 表明, 当温度为 308.15 K, 溶液 pH 值为 6 时, WPI-EGCG 接枝量最高。根据以上结果, 当  $Asc$  浓度 0.014 mol/L,  $H_2O_2$  浓度 0.10 mol/L, 溶液 pH 值 6, 温度 308.15 K 以及活化时间 120 min 时, WPI-EGCG 接枝量为 42.08 mg/g, 得率为 43.76%。后续研究基于优化后的反应条件, 考察引发剂浓度、EGCG 浓度和温度对接枝速率影响, 获得相应接枝参数, 从而建立 WPI 接枝 EGCG 聚合反应动力学方程。



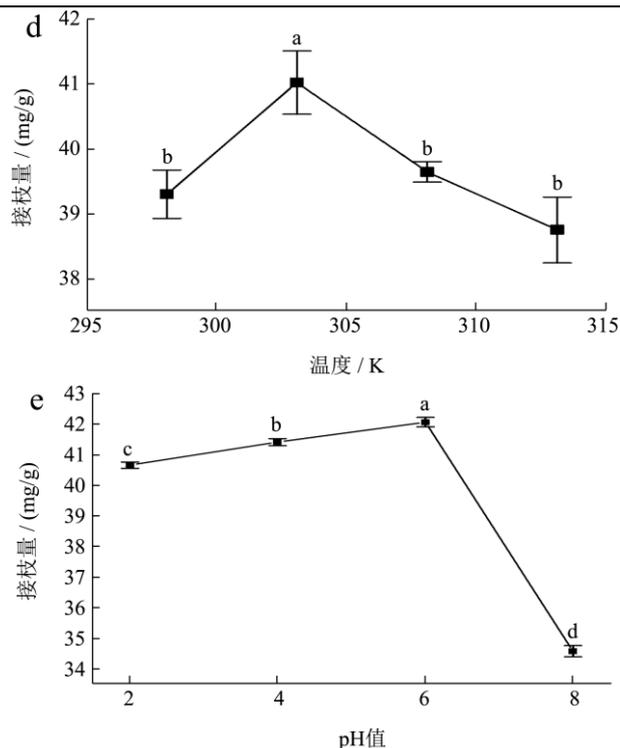


图3 Asc 浓度(a)、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度(b)、活化时间(c)、温度(d)和 pH(e)对 WPI-EGCG 接枝量的影响

Fig.3 Effect of Asc concentration (a), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration (b), activation time (c), temperature (d) and pH (e) on the grafting amount of WPI-EGCG

注: 不同小写字母表示差异性显著 ( $P < 0.05$ )。

### 2.3 引发剂对接枝聚合速率的影响

#### 2.3.1 Asc 浓度对接枝聚合速率的影响

控制反应温度为 308.15 K, 固定 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度为 0.10 mol/L, EGCG 浓度为  $2.2 \times 10^{-3}$  mol/L, 改变 Asc 浓度 ( $1.0 \times 10^{-2}$ ~ $2.2 \times 10^{-2}$  mol/L), 考察其对接枝反应速率的影响。如图 4a 所示, 对于不同的 Asc 浓度, 在反应初期接枝率以较快地速率上升, 之后逐渐减缓。将反应初期接枝率对反应时间求导, 可得反应初期接枝速率 R。以 ln R 与 ln Asc 作图, 斜率即为反应级数。

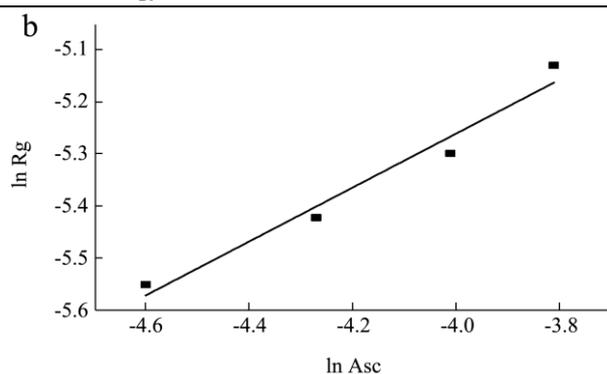
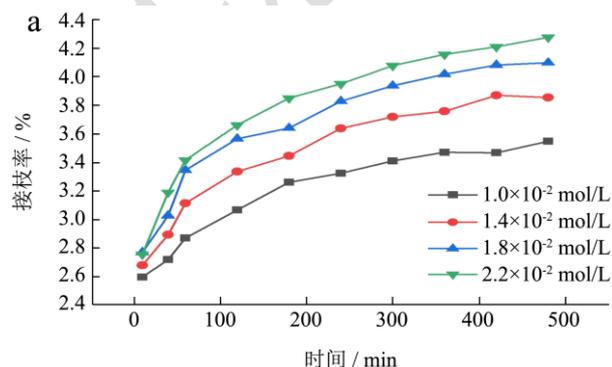


图4 不同 Asc 浓度下接枝率与反应时间的关系 (a); ln Rg 与 ln Asc 的关系曲线 (b)

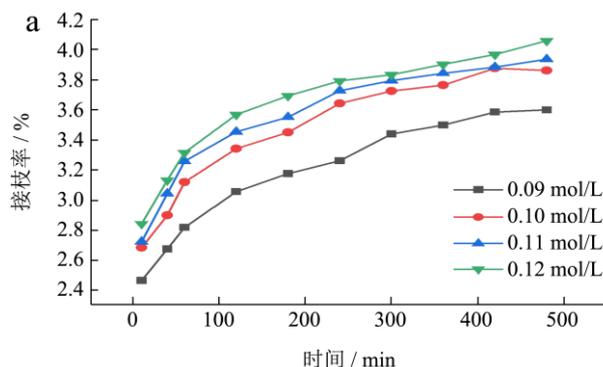
Fig.4 Relationship between grafting rate and reaction time at different Asc concentrations (a); Relationship curve between ln Rg and ln Asc (b)

由图 4b 可知, ln R 与 ln Asc 拟合直线的斜率为 0.51, 因此聚合速率与 Asc 的关系可表示为  $R \propto Asc^{0.51}$ 。R 随着 Asc 浓度的增大而增加, 这是因为在一定条件下, 引发剂浓度增加, 产生自由基数量增多, 快速引发 WPI 形成大分子自由基, 从而导致聚合速率加快。Asc 的反应级数接近自由基双基终止的反应级数 (0.5), 说明链终止方式主要是双基终止<sup>[26]</sup>。

#### 2.3.2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度对接枝聚合速率的影响

控制反应温度为 308.15 K, 固定 Asc 浓度为  $1.4 \times 10^{-2}$  mol/L, EGCG 浓度为  $2.2 \times 10^{-3}$  mol/L, 改变 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度 (0.09~0.12 mol/L), 考察其对接枝反应速率的影响。由图 5a 可知, 在接枝反应初期, 接枝率随着 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度的增加而上升, 在反应后期, 接枝率趋于平缓。以图 5a 各曲线的聚合反应速率与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度的双对数作图, 斜率即为反应级数。

如图 5b 所示, 聚合速率与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度呈对数线性关系, 其斜率为 0.58, 可表示为  $R \propto H_2O_2^{0.58}$ 。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的反应级数略高于 0.5, 说明在聚合反应过程中除了双基终止, 自由基可能出现向引发剂转移的单基终止<sup>[27]</sup>。由于聚合反应物质间复杂的相互作用, 例如空间位阻效应, 同种电荷间的排斥反应等, 导致单基终止比例增加。



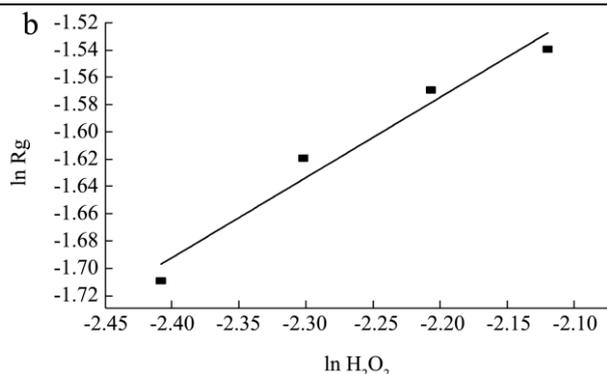


图5 不同 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度下接枝率与反应时间的关系 (a); ln Rg 与 ln H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的关系曲线 (b)

Fig.5 Relationship between grafting rate and reaction time at different H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations (a); Relationship curve between ln Rg and ln H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (b)

由以上分析可知, Asc 的反应级数比 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 小, 说明在聚合反应过程中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度对聚合速率影响较大。Bhanu 等<sup>[28]</sup>研究 Asc/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 引发脱木质素纤维接枝甲基丙烯酸甲酯单体聚合动力学过程中, 得到 Asc 的反应级数为 0.28, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 反应级数为 0.53, 与本研究所得结果相似。

#### 2.4 单体浓度对接枝聚合速率的影响

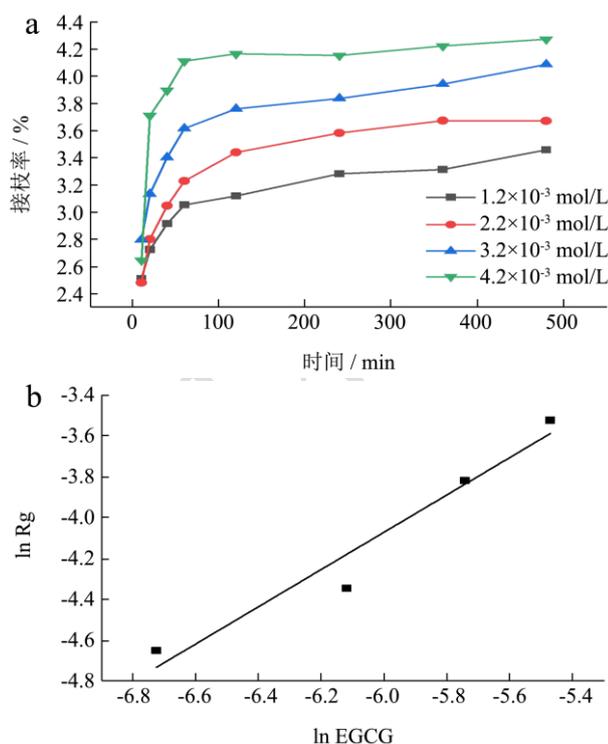


图6 不同 EGCG 浓度下接枝率与反应时间的关系 (a); ln Rg 与 ln EGCG 的关系曲线 (b)

Fig.6 Relationship between grafting rate and reaction time at different EGCG concentrations (a); Relationship curve between ln Rg and ln EGCG (b)

控制反应温度为 308.15 K, 固定 Asc 浓度为 1.4 × 10<sup>-2</sup> mol/L, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度为 0.10 mol/L, 改变 EGCG 浓度 (1.2 × 10<sup>-3</sup> ~ 4.2 × 10<sup>-3</sup> mol/L), 考察其对接枝反应速率的影响。如图 6a 所示, 接枝率随着 EGCG 浓度的增加而增大, 表明单体数目增多导致大分子自由基接枝单体几率增加, 这与在不同氧化还原体系引发不同单体的聚合反应中, 都呈现聚合速率随单体浓度的增加而增加的规律相一致<sup>[29,30]</sup>。对于不同的 EGCG 浓度, 接枝率呈现先快速上升后平稳的趋势, 以反应初期的接枝率与 EGCG 浓度做双对数, 得到图 6b。

图 6b 中拟合直线斜率为 0.92, 即聚合速率与 EGCG 的关系可表示为  $R \propto EGCG^{0.92}$ 。一般来说, 自由基聚合动力学方程中单体反应级数为 1, 本实验的结果低于理论值。可能的原因是在反应过程中, 引发剂引发 WPI 成为大分子自由基, EGCG 仅作为接枝单体与大分子自由基反应, 从而减小自由基链传播。

#### 2.5 温度对接枝聚合速率的影响

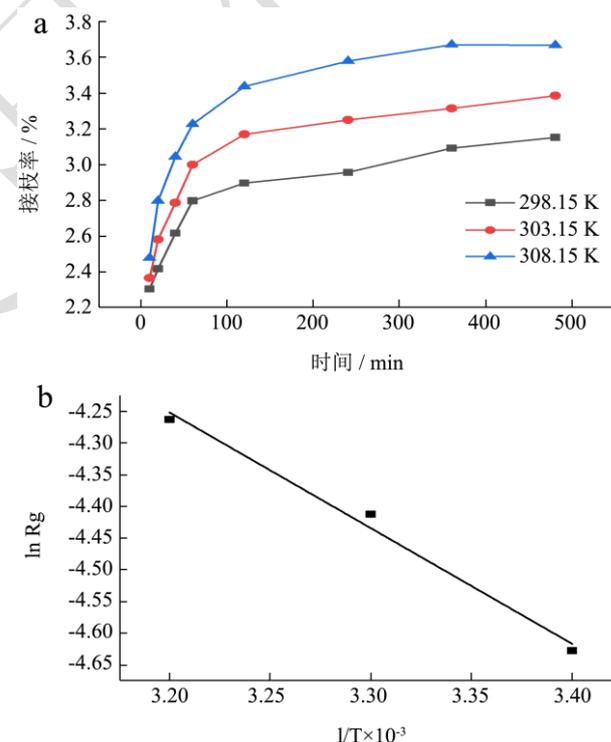


图7 不同温度下接枝率与反应时间的关系 (a); ln Rg 与 1/T 的关系曲线 (b)

Fig.7 Relationship between grafting rate and reaction time at different temperatures (a); Relationship curve between ln Rg and 1/T (b)

固定 Asc 浓度为 1.4 × 10<sup>-2</sup> mol/L, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度为 0.10 mol/L, EGCG 浓度为 2.2 × 10<sup>-3</sup> mol/L, 考察反应温度对接枝反应速率的影响。如图 7a 所示, 当接枝温度在 298.15~308.15 K 变化时, 接枝率随着温度的升高

而增加。这是因为升高温度, 引发剂加速分解, 同时提高单体分子的动能, 导致单体分子向蛋白质活性位点的扩散速率增加, 从而接枝率增加。

以各曲线的聚合反应速率的对数与温度的倒数作图, 得到图 7b。在 298.15~308.15 K 范围内,  $\ln R$  与  $1/T$  呈线性关系, 拟合直线斜率为-1.56。通过 Arrhenius 方程计算得到表观活化能, 通过其反映大分子物质与单体聚合难易程度。活化能越低, 物质间的亲和性越高, 聚合反应则越容易进行。WPI 与 EGCG 接枝聚合的表观活化能为 12.96 kJ/mol, 相比于其他的聚合反应活化能较低<sup>[30,31]</sup>, 说明 WPI 与 EGCG 接枝的亲合性较高。

### 3 结论

乳清是乳品行业的副产品, 由于其含有大量的残留营养物质, 可以将其提纯并转化为增值产品 WPI。EGCG 作为一种强抗氧化剂, 在食物基质中具有较弱的自由基清除能力。通过绿色、简便的自由基接枝技术, 将 EGCG 分子引入到 WPI 分子上, 可显著改善其功能特性。本文以 Asc 和  $H_2O_2$  为引发剂, 通过 EPR 技术证明体系中是 Asc-介导 WPI 与 EGCG 接枝反应。当 Asc 浓度为 0.014 mol/L,  $H_2O_2$  浓度为 0.10 mol/L, 溶液 pH 值为 6, 温度 308.15 K 以及活化时间 120 min 时, WPI 与 EGCG 接枝效果较好 (42.08 mg/g)。通过对 WPI 与 EGCG 接枝聚合动力学研究得出, 在 Asc 浓度  $1.0 \times 10^{-2} \sim 2.2 \times 10^{-2}$  mol/L,  $H_2O_2$  浓度 0.09~0.12 mol/L, EGCG 浓度  $1.2 \times 10^{-3} \sim 4.2 \times 10^{-3}$  mol/L, 温度 298.15~308.15 K 变化范围内, 反应初期 Asc 浓度、 $H_2O_2$  浓度和 EGCG 浓度与接枝聚合速率的关系为  $R=k[Asc]^{0.51}[H_2O_2]^{0.58}[EGCG]^{0.92}$ , 从引发剂的反应级数得知在聚合反应过程中除了双基终止, 自由基还可能出项向引发剂转移的单基终止。通过 Arrhenius 方程计算得到 WPI 与 EGCG 接枝聚合的表观活化能为 12.96 kJ/mol, 相比于其他的聚合反应活化能较低, 说明两者接枝的亲合性较高。研究结果为探索 WPI 接枝 EGCG 聚合反应动力学过程及机理提供实验参数, 同时为蛋白质的结构设计和可控制备提供理论指导, 拓宽蛋白质在食品工业中的应用。

### 参考文献

[1] Santos M J, Teixeira J A, Rodrigues L R. Fractionation of the major whey proteins and isolation of  $\beta$ -lactoglobulin variants by anion exchange chromatography [J]. Separation and Purification Technology, 2012, 90: 133-139.

[2] Tang C. Assembled milk protein nano-architectures as potential nanovehicles for nutraceuticals [J]. Advances in

Colloid and Interface Science, 2021, 292: 102432.

[3] 陈卫军,刘东红,李云成,等.制备方法对乳清分离蛋白-绿原酸共价接枝物结构和功能性质的影响[J].食品科学,2021,42(13):43-50.

[4] Chowdhury A, Sarkar J, Chakraborti T, et al. Protective role of epigallocatechin-3-gallate in health and disease: A perspective [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2016, 78: 50-59.

[5] 郑敏.表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)对乳清分离蛋白的改性作用研究[D].杭州:中国计量学院,2014.

[6] Von Staszewski M, Pizones Ruiz-Henestrosa V M, Pilosof A M R. Green tea polyphenols- $\beta$ -lactoglobulin nanocomplexes: Interfacial behavior, emulsification and oxidation stability of fish oil [J]. Food Hydrocolloids, 2014, 35: 505-511.

[7] Liu X, Song Q, Li X, et al. Effects of different dietary polyphenols on conformational changes and functional properties of protein-polyphenol covalent complexes [J]. Food Chemistry, 2021, 361: 130071.

[8] Feng J, Cai H, Wang H, et al. Improved oxidative stability of fish oil emulsion by grafted ovalbumin-catechin conjugates [J]. Food Chemistry, 2018, 241: 60-69.

[9] 顾璐萍.儿茶素-蛋清蛋白抗氧化性载体材料的制备、表征及其应用[D].无锡:江南大学,2018.

[10] Sun J, Jing H, Mu Y, et al. Fabrication of antioxidant emulsifiers from natural ingredients: Conjugation of egg white proteins with catechin and chlorogenic acid [J]. Food Hydrocolloids, 2020, 108: 106019.

[11] Liu J, Yong H, Yao X, et al. Recent advances in phenolic-protein conjugates: synthesis, characterization, biological activities and potential applications [J]. RSC Advances, 2019, 9(61): 33584-35825.

[12] Wu T, Wu C, Xiang Y, et al. Kinetics and mechanism of degradation of chitosan by combining sonolysis with  $H_2O_2$ /ascorbic acid [J]. RSC Advances, 2016, 6(8): 76281-76287.

[13] Arizmendi-Cotero D, Gómez-Espinosa R M, Dublán García O, et al. Electron paramagnetic resonance study of hydrogen peroxide/ascorbic acid ratio as initiator redox pair in the inulin-gallic acid molecular grafting reaction [J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 136: 350-357.

[14] 李昭,马宏伟,支朝晖,等.红薯渣接枝乙酸乙烯酯复合材料的制备及反应动力学研究[J].化工新型材料,2016,44(12): 53-55.

[15] 武芹.聚丙烯固相接枝改性及其接枝聚合动力学的研究[D].大庆:东北石油大学,2012.

- [16] Pessato T B, de Moraes F P R, de Carvalho N C, et al. Protein structure modification and allergenic properties of whey proteins upon interaction with tea and coffee phenolic compounds [J]. *Journal of Functional Foods*, 2018, 51: 121-129.
- [17] Xu H, Zhang T, Lu Y, et al. Effect of chlorogenic acid covalent conjugation on the allergenicity, digestibility and functional properties of whey protein [J]. *Food Chemistry*, 2019, 298: 125024.
- [18] 濮慧敏. 自由基介导的壳聚糖-咖啡酸接枝共聚物的合成机理及抗氧化活性研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2018.
- [19] Spizzirri U G, Iemma F, Puoci F, et al. Synthesis of antioxidant polymers by grafting of gallic acid and catechin on gelatin [J]. *Biomacromolecules*, 2009, 10(7): 1923-1930.
- [20] 潘祖仁. 高分子化学(第五版)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2011.
- [21] Liu J, Pu H, Chen C, et al. Reaction mechanisms and structural and physicochemical properties of caffeic acid grafted chitosan synthesized in ascorbic acid and hydroxyl peroxide redox system [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 66(1): 279-289.
- [22] Arizmendi-Cotero D, Gómez-Espinosa R M, Dublín García O, et al. Electron paramagnetic resonance study of hydrogen peroxide/ascorbic acid ratio as initiator redox pair in the inulin-gallic acid molecular grafting reaction [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 136: 350-357.
- [23] Singha A S, Guleria A, Rana R K. Ascorbic acid/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-initiated graft copolymerization of methyl methacrylate onto abelmoschus esculentus fiber: A kinetic approach [J]. *International Journal of Polymer Analysis & Characterization*, 2013, 18(1): 1-14.
- [24] HammaAdama M A, Osemeahon S A, Barminas J T. Graft copolymerization of acrylamide onto bombax costatum calyx by initiator ceric ammonium nitrate: Study of effective grafting parameters for optimization [J]. *Journal of Applied Chemistry*, 2014, 5(7): 11-17.
- [25] Schulz D N, Kaladas J J, Maurer J J, et al. Copolymers of acrylamide and surfactant macromonomers: synthesis and solution properties [J]. *Polymer*, 1987, 28(12): 2110-2115.
- [26] 黄行健, 章肇, 莉刘, 等. 魔芋葡甘聚糖\_丙烯腈接枝共聚反应动力学研究[J]. *食品工业科技*, 2013, 34(7): 137-139.
- [27] Priya B, Singha A S, Pathania D. Synthesis and kinetics of ascorbic acid initiated graft copolymerized delignified cellulosic fiber [J]. *Polymer Engineering & Science*, 2015, 55(2): 474-484.
- [28] Sorour M, El-Sayed M, Moneem N A E, et al. Free radical grafting kinetics of acrylamide onto a blend of starch/chitosan/alginate [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 98(1): 460-464.
- [29] 曹绪龙, 刘坤, 祝仰文, 等. 对甲氧基苯辛基二甲基烯丙基氯化铵与丙烯酰胺共聚动力学研究[J]. *高分子通报*, 2016, 7: 70-77.
- [30] Mirzaei A A, Kaykhahi M. Kinetics and mechanism of potassium persulphate/L-serine initiated polymerization of methylmethacrylate [J]. *Journal of Polymer Research*, 2004, 11(3): 231-238.
- [31] Mokhtar S M, Gomaa F A, Abd-Elaziz S M, et al. Synthesis, characterizations and polymerization of a novel fluoro-acrylamide monomer [J]. *American Journal of Polymer Science*, 2017, 1(7): 1-7.