

doi:10.12301/spxb202200231

文章编号:2095-6002(2023)01-0099-07

引用格式:庞志花,孙梦雅,李博睿,等.乳清分离蛋白-壳聚糖复合颗粒的构建及其微观结构表征[J].食品科学技术学报,2023,41(1):99-105.



PANG Zhihua, SUN Mengya, LI Borui, et al. Construction and microstructural characterization of whey protein isolate-chitosan composite particles[J]. Journal of Food Science and Technology, 2022,41(1):99-105.

乳清分离蛋白-壳聚糖复合颗粒的构建及其微观结构表征

庞志花, 孙梦雅, 李博睿, 刘萍, 李梦飞, 陈存社, 刘新旗*

(北京工商大学食品与健康学院, 北京 100048)

摘要:为研究蛋白-多糖复合颗粒的形成条件,特别是工艺条件对构建其核壳结构的影响,以乳清分离蛋白(WPI)和自然界唯一带正电荷的多糖——壳聚糖(CS)为原料,构建蛋白为核,多糖为壳的结构化复合颗粒,针对颗粒的形成条件及影响因素进行研究,并对所形成颗粒的粒径、电位及微观结构进行表征。pH值和盐离子浓度是二者发生复合作用的重要条件。实验结果表明,当盐离子浓度为0、pH值达到5.47时,体系浊度最大,达98.34%,二者的复合程度最高。在该条件下制备复合颗粒,研究混合方式、处理温度和剪切处理对复合颗粒的组成及粒径的影响,结果表明:热-混方式(先对蛋白进行热处理再与壳聚糖混合)与混-热方式(先将蛋白和壳聚糖混合再进行热处理)形成复合微粒的组成没有明显差异,但热-混形成颗粒的粒径更小且电位绝对值更大,说明颗粒稳定性更高;75、85、95℃热处理条件下,复合颗粒中蛋白质和多糖的组成基本一致,但温度越高颗粒粒径越大,电位绝对值越小;剪切处理可有效降低颗粒粒径。复合颗粒的共聚焦扫描图像结果显示:75℃热处理的复合颗粒表现出明显的蛋白、多糖荧光共定位现象。研究表明,75℃热处理、热-混方式、辅助高速剪切可以制备具有完整“核壳”结构、粒径为744.5 nm的复合微粒。

关键词:乳清分离蛋白;壳聚糖;复合颗粒;粒径;ζ电位;微观结构

中图分类号:TS201.3

文献标志码:A

微粒化蛋白是通过施加某些外力因素(如剪切、加热)使得蛋白质不再按照原有方式聚集而是形成微粒,该微粒的空间结构相对有序且具有纳微尺度。微粒化蛋白可以作为脂肪替代物或乳液稳定剂在食品结构中起重要作用,目前已经有商业化的、以乳清蛋白为原料生产的微粒化蛋白用于低脂食品的开发。多糖是另一类重要的生物大分子,可通过静电吸引力的弱相互作用与蛋白质形成高度结构化的复杂大分子凝聚物,这种复合

凝聚物往往显示出比单独的蛋白质和多糖更突出的功能,比如水合作用、界面特性、稳定性等。利用多糖对蛋白微粒进行表面包裹,形成以蛋白为核、多糖为壳的复合结构,已经被证明可以有效提高蛋白微粒的稳定性、润滑性及输送载体特性^[1-6]。乳清蛋白是干酪加工的副产物,具有很好的乳化性和界面特性,广泛应用于食品工业^[7-8]。壳聚糖是自然界中唯一存在的天然阳离子多糖,具有良好的蛋白质亲和性,在食品领域应用前景

收稿日期:2022-03-04

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31901817)。

第一作者:庞志花,女,副教授,博士,主要从事食品胶体和口腔加工方面的研究。

*通信作者:刘新旗,男,教授,博士,主要从事植物蛋白加工与营养方面的研究。

广阔^[9-11]。二者可以在中性或弱酸性条件下发生静电复合,是制备蛋白-多糖复合微粒的理想原料。

蛋白质-多糖的复合程度及复合物结构特征取决于环境条件及加工方式。由于复合凝聚是蛋白质与带电多糖之间通过静电驱动的相互作用行为,因此复合颗粒的形成及其结构强烈依赖于 pH 值和盐离子浓度。已有研究表明,壳聚糖在特定的盐离子浓度和 pH 值条件下可以促进或者阻碍 β -乳球蛋白的热聚集^[12]。热处理温度直接影响蛋白质的聚集程度,从而影响复合颗粒的大小与结构。此外,在 β -乳球蛋白与果胶的复合颗粒的研究中发现,混合方式即蛋白热处理前混合或者热处理后进行混合,也被证明会影响复合颗粒的特性^[13]。针对蛋白质与壳聚糖的复合物研究,多集中于二者自组装形成复合膜以及复合物的乳化、包埋性能等方面^[14-17],对于乳清蛋白-壳聚糖复合颗粒的形成条件,特别是工艺条件对构建其核壳结构的影响,缺乏针对性研究。

本研究利用乳清蛋白和壳聚糖的静电复合作用,构建蛋白质-多糖复合微粒。研究 pH 值和盐离子浓度对复合作用的影响,进而以构建核壳结构的复合颗粒为目标,研究热处理温度、二者混合方式、机械剪切对颗粒特性及其微观结构的作用,希望为构建完整的结构化乳清蛋白-壳聚糖复合微粒提供数据支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

乳清分离蛋白(WPI)(蛋白质量分数为 91%),购于山东汇益生物科技有限公司;壳聚糖(CS),购于上海源叶生物科技有限公司;氯化钠、盐酸、氢氧化钠等试剂均为分析纯,购于国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

FE20 型 pH 计,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;Cary-60 型紫外可见分光光度计,安捷伦科技(中国)有限公司;ZS90 型 Zeta 电位仪,马尔文帕纳科(上海)公司;GHJ-6 型水浴磁力搅拌器,苏州市国飞实验仪器有限公司;FSH-2 型高速匀浆器,江苏省常州市金坛区荣华仪器制造有限公司;X-30R 型离心机,美国贝克曼库尔特有限公司;FOSS-8400 型全自动凯氏定氮仪,丹麦福斯分析仪器有限公司;AlRsi 型激光共聚焦显微镜,日本

Nikon 有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 WPI-CS 复合体系的制备

WPI-CS 复合体系的制备方法在课题组前期研究的基础上加以修改^[18]。准确称取适量的 WPI 粉末溶于去离子水,配制成质量分数为 0.9% 的 WPI 储备液,在 25 °C 下用电子搅拌器以 500 r/min 搅拌 30 min,置于 4 °C 冰箱水化过夜。准确称取适量 CS 粉末溶于去离子水,配制成质量分数为 0.1% 的储备液,用 1 mol/L HCl 将储备液 pH 值调至 2.50,在 25 °C 用电子搅拌器以 500 r/min 搅拌 30 min。

混合相应的储备溶液,制备蛋白质与多糖质量比为 9:1 的混合溶液,控制混合后总聚合物质量分数为 0.5%。向混合液中添加 NaCl 调节盐离子浓度分别为 0、20、50、100、200 mmol/L,分析盐离子浓度对混合溶液浊度的影响。

1.3.2 WPI-CS 复合体系浊度的测定

采用紫外可见分光光度计对浊度进行测定,使用 1 cm 石英比色皿,测定波长为 600 nm。滴定开始前,首先用 1 mol/L HCl 将 WPI-CS 混合溶液(总生物聚合物质量分数为 0.1%)pH 值调节至 2.00 ± 0.20 ,用 NaOH 溶液对混合体系由酸性向中性滴定至 pH 值为 7.00 ± 0.20 。每当体系 pH 值变化 0.10 ~ 0.20 时,取样测定其浊度,同时记下对应的 pH 值。为保证整个体系混合均匀,滴定过程在磁力搅拌器上进行。样品浊度的计算公式见式(1)。

$$\text{浊度} = (100 - T) \times 100\% \quad (1)$$

式(1)中, T 为透光度。

1.3.3 WPI-CS 复合颗粒的制备及组成测定

为了探究混合方式对制备 WPI-CS 颗粒特性的影响,选用先混合 2 种物质再加热和先加热 WPI 再与 CS 混合的 2 种方法制备颗粒。

方法 1: 调节 1.3.1 中制备的混合溶液的 pH 值,分别在 75、85、95 °C 热处理 30 min,然后用冰水将溶液迅速冷却至室温,混合液在 4 °C 下以 9 000 r/min 离心 30 min,收集沉淀物,所得颗粒称为 WPI-CS(混-热)。

方法 2: 调节质量分数为 0.9% 的 WPI 溶液的 pH 值,分别在 75、85、95 °C 热处理 30 min,然后用冰水将溶液迅速冷却至室温,再加入质量分数为 0.1% 的 CS 储备液,按照 1.3.1 中的方法制备混合溶液,混合液在 4 °C 下以 9 000 r/min 离心 30 min,收集沉淀物,所得颗粒称为 WPI-CS(热-混)。

分别采用凯氏定氮法和苯酚-硫酸法测定离心后上清液中的蛋白质和多糖含量,沉淀中蛋白质和多糖含量的计算方法见式(2)和式(3)。

$$m_1(\text{沉淀}) = m_1 - m_1(\text{上清液}) \quad ; \quad (2)$$

$$m_2(\text{沉淀}) = m_2 - m_2(\text{上清液}) \quad 。 \quad (3)$$

式(2)中, m_1 为原溶液中总蛋白质质量,g; m_1 (沉淀)为沉淀颗粒中蛋白质的质量,g; m_1 (上清液)为复合离心后上清液中蛋白质质量,g。式(3)中, m_2 为原溶液中多糖质量,g; m_2 (沉淀)为沉淀颗粒中多糖的质量,g; m_2 (上清液)为复合离心后上清液中多糖质量,g。

1.3.4 粒径和ζ电位的测定

将热处理后的混合液用高速匀浆器在剪切速度为 10 000 r/min 下剪切 2 min,再稀释至总生物聚合物质量分数为 0.1%。采用ζ电位仪测定剪切前后颗粒的粒径和ζ电位,溶剂和复合颗粒的折射率分别为 1.33 和 1.50。所有测量均在 25℃下重复 3 次。

1.3.5 颗粒形态观察

使用激光共聚焦电子显微镜观察颗粒中的蛋白质和多糖分布。分别用荧光染料尼罗蓝和 5-氨基荧光素对 WPI 和 CS 进行荧光标记,室温下搅拌 1 h 后,按照 1.3.3 中的方法制备 WPI-CS 复合颗粒。取 400 μL 颗粒分散液,滴于共聚焦小皿,并盖上盖玻片用于荧光观察。尼罗蓝和 5-氨基荧光素的激发波长分别为 633 nm 和 488 nm,使用 60×物镜扫描并收集荧光图像,观察颗粒的构成形态。

1.4 数据处理

实验数据使用 SPSS 统计软件进行处理,采用单因素方差分析,在 95% 置信区间分析结果的显著性。所有实验均重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 pH 值和盐离子浓度对 WPI-CS 复合作用的影响

2.1.1 pH 值对 WPI-CS 复合作用的影响

WPI 的等电点在 pH 值为 4~5,CS 的酸度系数(pK_a) 在 6 附近,对于蛋白质和阳离子多糖复合体系,两者结合形成复合物会改变混合体系的浊度^[19],因此,可利用浊度滴定法研究 WPI 与 CS 的复合程度。图 1 为 WPI 和 WPI-CS 溶液浊度随 pH 值变化的情况。从图 1 可以看出,随着 pH 值的增

加,WPI 溶液浊度呈现先增加后降低的趋势,在 pH 值为 4.45 时溶液达到最大浊度值,为 79.48%,说明 WPI 的等电点在 pH 值为 4.45 附近。随着 pH 值的增加,WPI-CS 溶液浊度呈现先增加后减小再增加最后稳定的趋势,在 pH 值 5.47 时达到最大浊度值,为 98.34%。该结果是因为当 pH 值高于 WPI 等电点时,WPI 带负电荷,可与带正电荷的 CS 发生静电吸引作用,表现为混合溶液浊度的迅速增加。当 pH 值向 CS 的 pK_a 靠近时,CS 质子化程度降低,与 WPI 的静电吸引作用减弱^[20],因此溶液浊度减小。进一步增加复合溶液的 pH 值,CS 溶解度降低,以沉淀形式析出,导致整个体系的浊度增加^[21~22]。

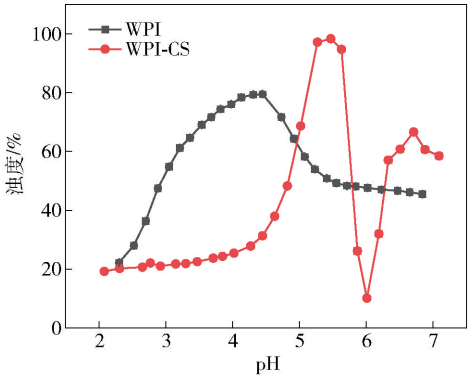


图 1 pH 值对 WPI 和 WPI-CS 溶液浊度的影响
Fig. 1 Effect of pH value on turbidity of WPI and WPI-CS solutions

2.1.2 盐离子浓度对 WPI-CS 复合作用的影响

图 2 为含有不同盐离子浓度的 WPI-CS 溶液的浊度分析结果。由图 2 可知,随 pH 值的增加,各盐离子浓度复合溶液的浊度曲线都呈现相同的变化趋势,即先增加达到最大浊度值,随后降低达

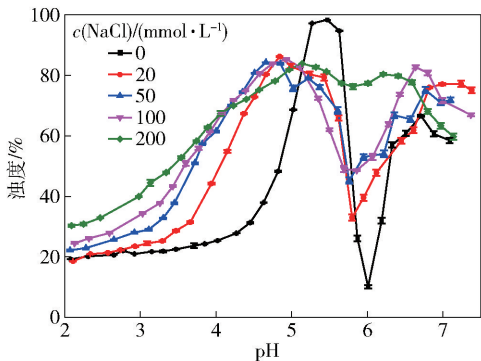


图 2 盐离子浓度对 WPI-CS 溶液浊度的影响
Fig. 2 Effect of salt ionic concentration on turbidity of WPI-CS solutions

到极小值,再增加最后趋于稳定。与不含盐离子 WPI-CS 溶液相比,添加不同盐离子浓度的复合溶液最大浊度值均减小且达到最大浊度值对应的 pH 值也降低。这是因为盐离子的存在使 WPI 的等电点降低,盐离子对表面电荷的屏蔽作用使得 WPI 与 CS 的结合程度降低^[23]。在宏观上表现为未添加盐离子的复合溶液浊度更高。此外,盐离子浓度越高,溶液浊度极小值越大,当盐离子浓度达 200 mmol/L 时,WPI-CS 溶液浊度极小值最大,该

现象是因为高浓度盐离子对表面电荷的屏蔽作用会阻碍 CS 的去质子化,从而阻止复合物解离。本部分研究表明,当盐离子浓度为 0、pH 值为 5.47 时 WPI 与 CS 的静电吸引相互作用最强。

2.2 混合方式和热处理温度对 WPI-CS 颗粒特性的影响

在 2.1 中所得最佳盐离子浓度和 pH 值的基础上,探讨混合方式和热处理温度对 WPI-CS 复合颗粒的颗粒特性的影响,实验结果见表 1。

表 1 WPI 颗粒和 WPI-CS 复合颗粒的组成、粒径和电位

Tab. 1 Composition, particle size and ζ potential of WPI particles and WPI-CS composite particles

样品	$t/^\circ\text{C}$	$w(\text{WPI/CS})$	d/nm	ζ 电位/ mV
WPI	75		639.7 ± 12.2^a	-28.27 ± 0.45^a
	85		717.4 ± 6.0^a	-25.93 ± 0.38^b
	95		$1\,057.7 \pm 24.6^b$	-24.43 ± 0.06^c
WPI-CS(混-热)	75	13.09 ± 0.65^a	$1\,945.7 \pm 71.0^a$	8.98 ± 1.13^b
	85	13.52 ± 1.29^a	$2\,231.0 \pm 44.3^b$	11.97 ± 0.81^c
	95	13.82 ± 0.66^a	$2\,415.7 \pm 67.0^b$	6.35 ± 0.39^a
WPI-CS(热-混)	75	13.10 ± 0.89^a	$1\,348.0 \pm 20.7^a$	20.60 ± 0.70^c
	85	13.09 ± 0.96^a	$1\,618.2 \pm 52.0^b$	9.32 ± 0.05^b
	95	13.39 ± 1.04^a	$1\,951.7 \pm 20.3^c$	6.42 ± 0.25^a

同列同一样品上标字母不同代表差异显著($P < 0.05$)。

2.2.1 混合方式对 WPI-CS 颗粒特性的影响

由表 1 可以看出,WPI-CS(热-混)颗粒与 WPI-CS(混-热)颗粒中 WPI 与 CS 的组成比例没有显著性差异。WPI-CS(热-混)颗粒的平均粒径小于相同热处理温度下 WPI-CS(混-热)颗粒的粒径,这是因为先加热 WPI 后与 CS 混合制备的 WPI-CS 颗粒的蛋白质内核是在没有多糖存在的情况下形成的,颗粒粒径主要取决于 WPI 在加热过程中的聚集程度;而先混合 WPI 与 CS,再加热混合物制备的 WPI-CS 颗粒粒径还受到 CS 比例的影响,会出现已经形成的 WPI-CS 颗粒与 WPI 聚集体二次结合的现象,从而导致最终形成的复合颗粒的粒径更大,这在之前的报道中也有相关说明^[13]。WPI-CS(热-混)颗粒在 75 $^\circ\text{C}$ 时电位绝对值最大,为 20.60 mV,显著高于 WPI-CS(混-热)颗粒在 85 $^\circ\text{C}$ 时达到的最大电位绝对值 11.97 mV,即 WPI-CS(热-混)颗粒稳定性更好。这是由于 75 $^\circ\text{C}$ 加热 WPI 时,WPI 的解折叠程度低,在疏水相互作用和静电相互作用的驱动下 CS 包裹在 WPI 表面且结构稳定,表现为电位绝对值大^[24];而先混合 WPI 和 CS,再进行加热处理会使得已经形成 WPI-CS 颗粒中的 WPI 构象发生改变,WPI 与 CS 结合作用减弱,体系变得不稳

定。研究表明,混合方式不会对 WPI-CS 颗粒的结合程度产生影响,先加热 WPI 再与 CS 混合的方式可制备粒径更小的复合颗粒,且该复合颗粒的稳定性更好。

2.2.2 热处理温度对 WPI-CS 颗粒特性的影响

热处理温度直接影响蛋白质的聚集程度和颗粒形态。由表 1 可以看出,3 种热处理温度形成的 WPI-CS 颗粒中 WPI 与 CS 的组成比例没有显著性差异,说明热处理温度不会对 WPI-CS 颗粒的结合程度产生影响。随着热处理温度的增加,WPI 和 WPI-CS(热-混)颗粒的粒径逐渐增加,电位绝对值逐渐减小。这是因为温度升高,WPI 的变性程度增加,解折叠程度更高,内部的疏水基团暴露的更多,表面电荷随之减少,WPI 分子间的疏水相互作用得到加强,聚集程度增加^[25],从而形成粒径更大、电位绝对值更小的颗粒。热处理温度对 WPI-CS(混-热)颗粒的影响表现为随温度的增加,颗粒粒径逐渐增加,电位绝对值先增大后减小,这可能是因为适当热处理可促进 WPI 与 CS 的静电络合反应,而温度过高会破坏 WPI-CS 颗粒的稳定结构,表现为电位绝对值下降。本研究表明,75 $^\circ\text{C}$ 热处理 WPI 颗粒再与 CS 混合形成的复合颗粒的稳定性最好,且颗粒粒径较小。

2.3 剪切处理对 WPI-CS 颗粒特性的影响

为了明确剪切处理对颗粒粒径和电位的影响,将 WPI 和 WPI-CS 颗粒进行高速剪切处理,剪切后颗粒的粒径和 ζ 电位的测定结果见表 2。从表 2 可以看出,剪切处理后 WPI 颗粒和 2 种 WPI-CS 颗粒的粒径值均随温度的升高而增大,且 WPI-CS (热-混)颗粒的粒径比 WPI-CS(混-热)颗粒的粒径更小,75 $^{\circ}\text{C}$ 时为 744.5 nm;剪切后 WPI 颗粒和 WPI-CS(热-混)颗粒在 75 $^{\circ}\text{C}$ 获得最大电位绝对值,WPI-CS(混-热)颗粒在 85 $^{\circ}\text{C}$ 获得最大电位绝对值,该现象与未剪切时颗粒的粒径和 ζ 电位变化情况一致。结合表 1 和表 2,对比剪切前后相同制备条件下的颗粒粒径和 ζ 电位能够看出,剪切处理可有效减小颗粒的粒径,对 WPI 颗粒和先加热 WPI 后与 CS 混合制备的 WPI-CS 颗粒的 ζ 电位无明显影响。本研究表明:剪切处理可获得粒径更小的 WPI 和 WPI-CS 颗粒,且不会改变混合方式和热处理温度对颗粒粒径产生的影响;75 $^{\circ}\text{C}$ 或 95 $^{\circ}\text{C}$ 热处理 WPI 再与 CS 混合制备的 WPI-CS 颗粒经剪切处理能形成粒径更小、稳定性更好的复合颗粒。

2.4 WPI-CS 复合颗粒的微观结构分析

根据 2.1、2.2、2.3 中的实验结果,制备在 75、95 $^{\circ}\text{C}$ 热处理条件下剪切处理的 WPI-CS(热-混)颗粒。图 3 为 WPI 和 WPI-CS 颗粒在 60 $\times$ 物镜下观察到的荧光图像,其中绿色荧光为 CS,红色荧光为 WPI。从图 3(a) 可以看到,75 $^{\circ}\text{C}$ 热处理后的 WPI 以小颗粒状均匀地分布在体系中。从图 3(b) 可以看出,几乎整个视野内呈现黄色荧光。这是因为 75 $^{\circ}\text{C}$

表 2 剪切后 WPI 颗粒和 WPI-CS 复合颗粒的粒径与电位
Tab. 2 Particle size and ζ potential of WPI particles and WPI-CS composite particles after shearing

样品	t/ $^{\circ}\text{C}$	d/nm	ζ 电位/mV
WPI	75	509.4 $\pm$ 46.8 ^a	-25.70 $\pm$ 0.40 ^a
	85	657.3 $\pm$ 16.6 ^b	-23.63 $\pm$ 0.86 ^b
	95	724.8 $\pm$ 43.5 ^b	-23.00 $\pm$ 0.30 ^b
WPI-CS(混-热)	75	1 194.7 $\pm$ 88.6 ^a	2.66 $\pm$ 0.42 ^a
	85	1 248.0 $\pm$ 58.1 ^a	8.04 $\pm$ 0.33 ^c
	95	1 966.7 $\pm$ 137.9 ^b	4.78 $\pm$ 0.40 ^b
WPI-CS(热-混)	75	744.5 $\pm$ 37.8 ^a	19.10 $\pm$ 0.88 ^b
	85	1 061.7 $\pm$ 25.8 ^c	6.75 $\pm$ 0.21 ^a
	95	931.9 $\pm$ 16.1 ^b	5.89 $\pm$ 0.23 ^a

同一样品区域角标含有相同字母的每列数据之间差异不显著 ($P>0.05$)。

热处理后 WPI 解折叠,内部疏水基团展开,在疏水相互作用下发生聚集。CS 在静电相互作用和疏水相互作用下包裹在聚集的 WPI 表面,发生共定位现象,表现为黄色荧光,形成以 WPI 为核、CS 为壳的复合颗粒。观察图 3(c) 可以发现,视野内呈现红色、绿色、黄色 3 种荧光,说明只有部分 WPI 与 CS 发生共定位现象,这是因为 95 $^{\circ}\text{C}$ 热处理后 WPI 解折叠程度过高,疏水相互作用增强,聚集程度更高,CS 难以完全覆盖 WPI 表面,最终形成“核壳”结构残缺的复合颗粒。本研究表明,75 $^{\circ}\text{C}$ 热处理条件下 WPI 能够更好地与 CS 结合,形成的复合颗粒结构更加完整。

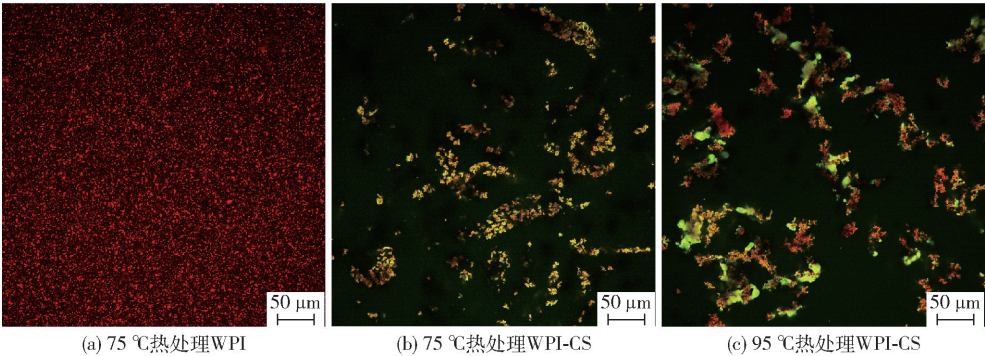


图 3 WPI 颗粒和 WPI-CS 复合颗粒的微观结构

Fig. 3 Microstructure of WPI particles and WPI-CS composite particles

3 结 论

乳清蛋白和壳聚糖是构建具有核壳结构复合微

粒的理想原料。当盐离子浓度为 0、pH 值为 5.47 时,二者复合程度最高。热处理温度越高,颗粒粒径越大。采用先加热 WPI 再与 CS 复合,所制备的颗粒粒径更小且电位绝对值更大。剪切处理可有效降

低颗粒粒径。本研究表明,75 ℃热处理、热-混方式可以制备具有完整“核壳”结构、粒径为744.5 nm的复合微粒。研究结果旨在为蛋白质-多糖生物聚合物颗粒的制备及将其作为包封材料或脂肪替代物的开发提供重要数据。本研究探索了WPI-CS复合颗粒的形成条件及结构特性,后续可进一步研究颗粒体系的流变性、乳化性能、润滑性等,明确WPI-CS复合颗粒的应用特性。

参考文献:

- [1] RIBEIRO E F, MORELL P, NICOLETTI V R, et al. Protein-and polysaccharide-based particles used for Pickering emulsion stabilisation [J]. Food Hydrocolloids, 2021, 119:1–13.
- [2] BEN K, MELVIN H, MARKUS S, et al. Review on fat replacement using protein-based microparticulated powders of microgels: a textural perspective[J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 106:457–468.
- [3] LIU K, TIAN Y, STIEGER M, et al. Evidence for ball-bearing mechanism of microparticulated whey protein as fat replacer in liquid and semi-solid multi-component model foods[J]. Food Hydrocolloids, 2016, 52:403–414.
- [4] YASHINI M, SUNIL C K, SAHANA S, et al. Protein-based fat replacers: a review of recent advances [J]. Food Reviews International, 2019, 37(2):1–27.
- [5] LIU R, WANG L, LIU Y, et al. Fabricating soy protein hydrolysate/xanthan gum as fat replacer in ice cream by combined enzymatic and heat-shearing treatment [J]. Food Hydrocolloids, 2018, 81:39–47.
- [6] LIU K, STIEGER M, VAN DER LINDEN E, et al. Effect of microparticulated whey protein on sensory properties of liquid and semi-solid model foods[J]. Food Hydrocolloids, 2016, 60:186–198.
- [7] 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.
CHEN W J, LIU D H, LI Y C, et al. Effect of preparation methods on the structural and functional properties of whey protein isolate-chlorogenic acid conjugates [J]. Food Science, 2021, 42(13):43–50.
- [8] DE CASTRO R J S, DOMINGUES M A F, OHARA A, et al. Whey protein as a key component in food systems: physicochemical properties, production technologies and applications[J]. Food Structure, 2017, 14:17–29.
- [9] PILLAI C K S, PAUL W, SHARMA C P. Chitin and chitosan polymers: chemistry, solubility and fiber formation[J]. Progress in Polymer Science, 2009, 34(7):641–678.
- [10] MA J L, ZHONG L X, PENG X W, et al. Functional chitosan-based materials for biological applications[J]. Current Medicinal Chemistry, 2020, 27 (28):4660–4672.
- [11] BAKSHI P S, SELVAKUMAR D, KADIRVELU K, et al. Chitosan as an environment friendly biomaterial: a review on recent modifications and applications [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 97:404–416.
- [12] MOUNSEY J S, O'KENNEDY B T, FENELON M, et al. The effect of heating on β -lactoglobulin: chitosan mixtures as influenced by pH and ionic strength[J]. Food Hydrocolloids, 2008, 22:65–73.
- [13] JONES O G, DECKER E A, MCCLEMENTS D J. Comparison of protein-polysaccharide nanoparticle fabrication methods: impact of biopolymer complexation before or after particle formation[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2010, 344(1):21–29.
- [14] FARSANIPOUR A, KHODANAZARY A, HOSSEINI S M. Effect of chitosan-whey protein isolated coatings incorporated with tarragon *Artemisia dracunculoides* essential oil on the quality of *Scomberoides commersonianus* fillets at refrigerated condition[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 155:766–771.
- [15] BHIMRAO M A, REKHA S. Extension of postharvest shelf life of strawberries (*Fragaria ananassa*) using a coating of chitosan-whey protein isolate conjugate [J]. Food Chemistry, 2020, 329:1–11.
- [16] LI S Q, SUN J L, YAN J, et al. Development of antibacterial nanoemulsions incorporating thyme oil: layer-by-layer self-assembly of whey protein isolate and chitosan hydrochloride [J]. Food Chemistry, 2021, 339:1–10.
- [17] LÜ P F, WANG D, LIANG R, et al. Lycopene-loaded bilayer emulsions stabilized by whey protein isolate and chitosan [J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 151:1–9.
- [18] LI B R, GU W J, IMANE B, et al. Lubrication behaviors of core-shell structured particles formed by whey proteins and xanthan gum [J]. Food Hydrocolloids, 2022, 127:1–10.
- [19] LI Z, WANG Y, PEI Y, et al. Effect of substitution degree on carboxymethylcellulose interaction with lysozyme [J]. Food Hydrocolloids, 2017, 62:222–229.
- [20] GONZALEZ D A, CARRILLO H, BARRERA C E, et al. Characterization of a novel complex coacervate based on whey protein isolate-tamarind seed mucilage [J]. Food Hydrocolloids, 2017, 72:115–126.

- [21] KOO C K W, CHUNG C, PICARD R, et al. Modulation of physical properties of microfluidized whey protein fibrils with chitosan[J]. Food Research International, 2018, 113:149 – 155.
- [22] AHMED K F, ASCHI A, NICOLAI T. Formation and characterization of chitosan-protein particles with fractal whey protein aggregates[J]. Colloids & Surfaces B: Biointerfaces, 2018, 169:257 – 264.
- [23] UNTERHASLBERGER G, SCHMITT C, SANCHEZ C, et al. Heat denaturation and aggregation of β -lactoglobulin enriched WPI in the presence of arginine HCl, NaCl and guanidinium HCl at pH 4.0 and 7.0[J]. Food Hydrocolloids, 2006, 20(7):1006 – 1019.
- [24] KHUNAWATTANAKUL W, PUTTIPIPAKHACHORN S, RADES T, et al. Chitosan-magnesium aluminum silicate composite dispersions: characterization of rheology, flocculate size and zeta potential[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2008, 351(1 – 2): 227 – 235.
- [25] OCHENDUSZKO A, BUCKIN V. Real-time monitoring of heat-induced aggregation of β -lactoglobulin in aqueous solutions using high-resolution ultrasonic spectroscopy[J]. International Journal of Thermophysics, 2010, 31(1):113 – 130.

Construction and Microstructural Characterization of Whey Protein Isolate-Chitosan Composite Particles

PANG Zhihua, SUN Mengya, LI Borui, LIU Ping, LI Mengfei, CHEN Cunshe, LIU Xinqi*
(School of Food and Health, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China)

Abstract: To study the formation conditions of protein and polysaccharide composite particles, especially the effect of processing conditions on the construction of their core-shell structure, whey protein isolate (WPI) and chitosan (CS), the only naturally positively charged polysaccharide, were used to form composite particles with protein as core and polysaccharide as shell. The conditions of particle formation and the influencing factors were investigated, and the particle size, potential and microstructure of the formed particles were characterized. The pH value and salt ionic strength were important factors for composite reactions of the two substance. The results showed that when the salt ionic strength was 0 and the pH value reached 5.47, the turbidity of the system reached maximum, which was 98.34% and complexation of the two substance reached the highest degree. Therefore, composite particles prepared at these conditions were used to study the effect of mixing mode, treatment temperature and shear treatment on the composition and particle size of composite particles. The results showed that there was no significant difference in the composition of the composite particles formed by heat-mixing (heat treatment of protein followed by mixing with chitosan) and heat-mixing (mixing of protein and chitosan followed by heat treatment), but the particle size of the particles formed by heat-mixing was smaller and the absolute value of ξ potential was larger, indicating that the particles were more stable. There was no significant difference in the proportion of protein and polysaccharide in the composite particles under heat treatment conditions of 75, 85, 95 °C, but the higher temperature, the larger particle size and the smaller absolute value of the potential. The particle size could be effectively reduced by shear treatment. The confocal laser scanning microscopy showed that the composite particles formed at 75 °C exhibited a clear co-localization of protein and polysaccharide fluorescence. The results showed that complete core-shell structured composite particles with particle size approximately 744.5 nm could be prepared by heat treatment at 75 °C, heat-mixing, and assisted with high-speed shearing.

Keywords: whey protein isolate; chitosan; composite particles; size; ξ potential; microstructure

(责任编辑:叶红波)