



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104284858 B

(45) 授权公告日 2016. 05. 25

(21) 申请号 201380023823. X

(22) 申请日 2013. 03. 13

(30) 优先权数据

61/619, 996 2012. 04. 04 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 11. 06

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/030661 2013. 03. 13

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/151694 EN 2013. 10. 10

(73) 专利权人 百事可乐公司

地址 美国纽约

(72) 发明人 S·贝尔 P·吉文

K·坎加纳庞库尔 J·韦斯

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专
利商标事务所 11038

代理人 李瑛

(51) Int. Cl.

B82B 3/00(2006. 01)

B01J 19/00(2006. 01)

(56) 对比文件

US 2009075354 A1, 2009. 03. 19,

WO 2011123760 A3, 2012. 04. 19,

CN 1762504 A, 2006. 04. 26,

US 2011311671 A1, 2011. 12. 22,

宋唐英, 姚琛, 李新松. 生物高分子静电纺丝
研究进展. 《化学通报》. 2007, (第1期), 第21-28

页.

Hongliang Jiang, Dufei Fang,
Benjamin S. Hsiao 等. Optimization
and Characterization of Dextran
Membranes Prepared by Electrospinning.
《Biomacromolecules》. 2004, 第5卷第326-333
页.

Xin Wang, Haitao Niu, Tong Lin
等. Needleless Electrospinning of Nanofibers
with a conical wire coil. 《Polymer
Engineering and Science》. 2009, 第49卷(第
8期), 第1582-1586页.

Hongliang Jiang, Dufei Fang,
Benjamin S. Hsiao 等. Optimization
and Characterization of Dextran
Membranes Prepared by Electrospinning.
《Biomacromolecules》. 2004, 第5卷第326-333
页.

Laura Jimenez-Castano, Mar Villamiel,
Pedro J. Martin-Alvarez 等. Effect of
the dry-heating conditions on the
glycosylation of b-lactoglobulin with
dextran through the Maillard reaction. 《Food
Hydrocolloids》. 2005, 第19卷(第5期), 第
831-837页.

审查员 韩雪明乐

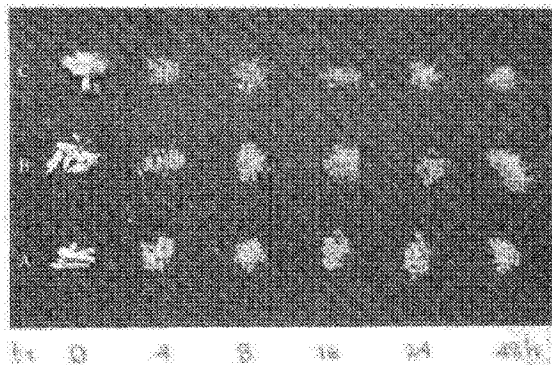
权利要求书1页 说明书20页 附图33页

(54) 发明名称

通过电纺形成缀合蛋白

(57) 摘要

通过制备包含多糖和蛋白质的水溶液、向该
溶液施加高电压、在收集板上收集纤维而制备多
糖-蛋白质纤维的方法。



1. 经由电纺制备缀合的多糖-乳清蛋白纤维的方法,包括以下步骤:
制备包含多糖和乳清蛋白的水溶液,其中所述多糖以0.1g/mL到5.0g/mL的浓度存在,
向所述溶液施加15到25kV的电压,
在收集板上收集纤维;和
将所述纤维于至少45%的相对湿度温育2-24小时,从而形成缀合膜。
2. 权利要求1的方法,其中所述电纺是无针的。
3. 权利要求1的方法,其中所述多糖具有醛基或通过异构形成醛基。
4. 权利要求1的方法,其中所述多糖是葡聚糖。
5. 权利要求4的方法,其中所述葡聚糖分子量在10kDa和500kDa之间。
6. 权利要求1的方法,其中所述蛋白质是乳清蛋白分离物(WPI)。
7. 权利要求1的方法,其中所述水溶液包含混合比(w/w)从50:1到1:50的多糖和蛋白质。
8. 权利要求1的方法,其中所述水溶液包含混合比(w/w)从3:1到1:10的多糖和蛋白质。
9. 权利要求1的方法,其中所述水溶液包含葡聚糖和乳清蛋白分离物。
10. 权利要求1的方法,其中相对湿度在65%和75%之间。
11. 权利要求1的方法,其中温度在10-70°C的范围内。
12. 权利要求1的方法,其中所述纤维直径为100nm到500nm。
13. 权利要求12的方法,其中所述纤维直径为150nm到250nm。
14. 通过电纺制备缀合的多糖-蛋白质薄膜的方法,包括以下步骤:
制备包含100kDa葡聚糖和乳清蛋白分离物的水溶液,其中所述葡聚糖和乳清蛋白分离物以在3:1和10:1之间的混合比(w/w)存在,
向所述溶液施加15到25kV的电压从而产生纤维,
在收集板上收集所述纤维,和
将所述纤维于至少45%的相对湿度温育达4和24小时之间的时间,从而形成缀合膜。
15. 权利要求14的方法,其中相对湿度在65%和75%之间。
16. 权利要求14的方法,其中温育在4和8小时之间。
17. 权利要求14的方法,其中温度在10-70°C的范围内。
18. 权利要求14的方法,其中所述电纺是无针的。

通过电纺形成缀合蛋白

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求2012年4月4日提交的美国临时申请系列号61/619,996的优先权,其全部内容特此通过参考引入。

[0003] 背景

[0004] 缀合蛋白,包括蛋白质-多糖缀合物,在许多加工食品的结构和稳定性中起到显著作用。在加工食品工业中特别重要的一个反应是美拉德反应。美拉德反应是涉及氨基与还原基团缩合的非酶促化学相互作用。该反应导致形成中间产物,其可随后聚合以形成褐色的称为蛋白黑素的含氮化合物。

[0005] 美拉德反应有三个主要阶段。在第一阶段,糖胺形成,然后经历重排成为糖胺化合物。在第二阶段,失去胺基并形成羰基中间体。所述羰基中间体经历脱水或裂变以形成高度反应性的羰基化合物。在最终阶段,所述反应性羰基化合物与食品的其他成分反应以形成蛋白黑素。

[0006] 美拉德反应的产物与正面属性如芳香、味道和颜色相关。但是,该反应也可导致降低的营养价值、缩短的保存期以及形成导致变味的不良化合物。

[0007] 因此控制美拉德反应在开发具有改善的营养价值的食品中非常关键。先前产生蛋白质缀合物的方式出于多种原因并不有效。例如,使用冻干过程联合加热的干温育法缓慢且不能提供足够的产量。因而,需要更有效的方式来控制缀合蛋白的产生。

[0008] 概述

[0009] 本文所述的特征总体涉及使用电纺(electrospinning)来产生缀合蛋白的方法。本文所述特征的一些方面涉及制备葡聚糖缀合乳清蛋白的方法。

[0010] 附图简述

[0011] 本文公开内容通过举例方式加以例示而不限于附图,在附图中类似的参考数字表示相似的要素,其中:

[0012] 图1例示一例电纺装置,在其上可实施本文公开内容的多种特征。

[0013] 图2例示使用0.5g/mL溶剂的葡聚糖(70kDa)的纤维上的珠粒。

[0014] 图3例示从0.7g/mL溶剂的葡聚糖(70kDa)溶液制备的纤维。

[0015] 图4例示从0.8g/mL溶剂的葡聚糖(70kDa)溶液制备的光滑纤维。

[0016] 图5例示从1.0g/mL的葡聚糖(40kDa)水溶液制备的净葡聚糖电纺纤维的LM图像。

[0017] 图6例示从0.6g/mL的葡聚糖(100kDa)水溶液制备的净葡聚糖电纺纤维的LM图像。

[0018] 图7例示用不同葡聚糖以最小可电纺浓度制备的葡聚糖-乳清蛋白分离物混合物的粘度。

[0019] 图8A-F。图8A-8C例示从多种葡聚糖大小制备的葡聚糖-乳清蛋白分离物电纺纤维的扫描电镜(SEM)图像:8A:40kDa,8B:70kDa,和8C:100kDa。图8A、8B和8C中的纤维的纤维直径分别显示于图8D、8E和8F。

[0020] 图9例示不同浓度的葡聚糖水溶液的应力-应变流变曲线。

[0021] 图10例示混合比对葡聚糖和乳清蛋白混合物的流动特性的影响作用。对于每种混

合物,总固体含量为0.6g/mL。

[0022] 图11A-H。图11A-D例示从不同浓度(11A:0.3g/mL溶剂,11B:0.45g/mL溶剂,11C:0.6g/mL溶剂,和11D:0.7g/mL溶剂)的葡聚糖溶液制备的电纺纤维的SEM图像。电纺条件保持恒定于:电压=20kV,电纺距离=18cm,和溶液流速=12 μ L/min。图11A-D中的纤维的纤维直径分别显示于图11E-H。

[0023] 图12A-J。图12A-E例示从具有不同混合比(以重量计)的葡聚糖(100kDa)与乳清蛋白分离物(12A:1:0,12B:0.8:0.2,12C:0.75:0.25;12D:0.67:0.33,和12E:0.5:0.5)的混合物制备的电纺纤维的SEM图像。所有混合物的浓度为0.6g/mL溶剂,且电纺条件保持恒定于:电压=20kV,电纺距离=18cm,和溶液流速=12 μ L/min。图12A-E 中的纤维的纤维直径分别显示于图12F-J。

[0024] 图13A显示不同混合物比的葡聚糖粉末与乳清蛋白分离物粉末之间的混合物的IR光谱。图13B显示乳清蛋白分离物含量与于1518和1004 cm^{-1} 的波数的峰吸光度之间的比值之间的关系。

[0025] 图14显示于60 $^{\circ}$ C和74%RH退火不同时间的电纺膜的外观。

[0026] 图15显示以下的IR光谱:a)粉末形式的WPI-葡聚糖;b)初纺(as-spun)WPI-葡聚糖电纺膜;c)-f)分别于60 $^{\circ}$ C和74%RH退火2、6、20和48小时后的WPI-葡聚糖电纺膜。

[0027] 图16例示退火时间对WPI-葡聚糖缀合物在2-巯基乙醇存在下的SDS-PAGE谱的影响作用。泳道1:WPI溶液;泳道2-8:分别于60 $^{\circ}$ C74%RH退火0、2、4、6、8、16、24和48小时的电纺WPI-葡聚糖(40kDa)膜。

[0028] 图17A和17B例示WPI-葡聚糖缀合物在2-巯基乙醇存在下的SDS-PAGE谱。图17A是蛋白质染色。图17B是糖蛋白染色。图17A和B的泳道均为,泳道1:WPI溶液;泳道2-5:分别于0、8、16和24小时加热的电纺WPI-葡聚糖(40kDa)膜;泳道6-9:分别于0、8、16和24小时加热的电纺WPI-葡聚糖(100kDa)膜。

[0029] 图18A和18B例示WPI-葡聚糖(70kDa)缀合物的SDS-PAGE谱:图18A是蛋白质染色。图18B是糖蛋白染色。所有电纺膜中葡聚糖与WPI之间的重量比为3:1。泳道1:蛋白梯;泳道2-5:分别于0、8、16和24小时于60 $^{\circ}$ C,74%RH退火的电纺膜。

[0030] 图19例示用于SDS PAGE凝胶的TGX预制凝胶的标准曲线。等式中显示的变量MW和d分别为以kDa计的分子量和以%计的移动距离($R^2=99.86\%$)。中心的线和两条外侧的线分别显示预测值和95%置信带。

[0031] 图20A和20B例示不同湿度和退火时间下形成的WPI-葡聚糖(100kDa)缀合物的SDS-PAGE谱。所有电纺膜中葡聚糖与WPI之间的重量比为3:1。图20A是蛋白质染色。图20B是糖蛋白染色。泳道1:初纺膜;泳道2-10:于60 $^{\circ}$ C但不同相对湿度退火的电纺膜:泳道2-4=0%RH;泳道5-7=44%RH;泳道8-10=74%RH。退火时间为8小时:泳道2、5和8;16小时:泳道3、6和9;16小时;和24小时泳道4、7和10。泳道0为标准蛋白梯。

[0032] 图21A和21B例示在恒定湿度条件下的WPI-葡聚糖(100kDa)缀合物的SDS-PAGE谱。分别以葡聚糖与WPI之间不同混合比制备电纺膜:泳道1-4=1:2;泳道5-8:1:1;泳道9-12:2:1。图21A是蛋白质染色。图21B是糖蛋白染色。所有电纺膜于60 $^{\circ}$ C和74%RH退火。退火时间为:泳道1、5和9:初纺膜;泳道2、6和10:8小时;泳道3、7和11:16小时;泳道4、8和12:24小时。泳道0是标准蛋白梯。所用染料是对N-糖苷(其不存在于蛋白质或麦芽糊精中)特异性的。

[0033] 图22A显示从WPI和葡聚糖40kDa混合物制备、以不同退火时间于60°C和74%RH退火的电纺样品的UV吸收光谱。图22B显示电纺样品于282nm的吸光度峰与退火时间(WPI和葡聚糖40kDa样品)之间的关系。

[0034] 图23A显示从WPI和葡聚糖70kDa混合物制备、以不同退火时间于60°C和74%RH退火的电纺样品的UV吸收光谱。图23B显示电纺样品于282nm的吸光度峰与退火时间(WPI和葡聚糖70kDa样品)之间的关系。

[0035] 图24A和24B显示溶液浓度对从WPI和葡聚糖100kDa混合物制备的电纺样品的UV吸光度的影响作用。图24A是5mg/mL,而图24B是3mg/mL。

[0036] 图25A和25B显示从混合比为1:1(图25A)和2:1(图25B)的WPI与葡聚糖100kDa混合物制备的电纺样品于282nm的吸光度峰。

[0037] 图26显示从摩尔比为2:1的葡聚糖100kDa与WPI混合物制备的电纺样品的UV吸收光谱。

[0038] 图27显示以不同混合比:A)1:2;B)1:1;和C)2:1(葡聚糖与WPI之间的混合比)从WPI和葡聚糖100kDa制备的电纺样品。

[0039] 图28A-C例示于1:2(A),1:1(B)和2:2(C)的混合比用比色计测量的电纺膜的亮度(实心圆圈)和黄度(空心圆圈)。

[0040] 图29A和B例示电纺膜WPI-葡聚糖100kDa的NIR光谱。

[0041] 详细描述

[0042] 在本文公开内容的一方面,提供了使用电纺法产生缀合蛋白的方法。在一些方面,缀合物是蛋白质-碳水化合物缀合物(即蛋白质与一种或多种碳水化合物共价连接)。在一些方面,缀合物是蛋白质-多糖缀合物(即蛋白质与一种或多种多糖共价连接)。在特定方面,所述多糖是葡聚糖且所述蛋白质是乳清蛋白分离物(WPI)。

[0043] 乳清蛋白和糖基化作用

[0044] 乳清蛋白由于其优异功能(例如泡沫和乳液稳定作用)及其高营养含量(例如高含量的必需氨基酸)是用于众多食品的关键成分[1]。

[0045] 乳清蛋白在食品加工期间由于固有遭遇到的环境条件如高温、压力和/或存在多种酸而容易变性。因此提高乳清蛋白稳定性已成为食品生产商的主要兴趣所在以改进其在食品应用中的用途。已证实乳清蛋白与葡聚糖之间通过形成希夫碱中间产物的糖基化作用是改善所述蛋白质的热稳定性[1]和乳化特性[3,4]的有效方法。

[0046] 蛋白质-多糖缀合物的形成提高乳液的冻融稳定性,甚至在于-18°C22小时和+40°C2小时的三次冻融循环之后[5]。

[0047] 蛋白质与多糖的非化学糖基化可通过将蛋白质粉末与含有还原糖的粉末的混合物于大约60°C和至少~44%的相对湿度干热长达4天来进行[6]。在干热法中,并非直接将热应用于其最初粉末形式的WPI和葡聚糖,而是先制备液体形式的WPI和葡聚糖溶液,然后冻干以获得固体形式的混合物,其更适于随后的糖基化反应。

[0048] 将WPI糖基化的一种替代方法是将葡聚糖和乳清蛋白分离物溶液于60°C和pH~6.5加热约48小时,即所谓的湿热法。参见例如美国公开申请20090311407。湿热法具有比干热法实质上更短的反应时间,且高级的美拉德反应产物(其生成深色色素)不如在干热法中容易形成。这两种方法由于所涉及的费用以及两种方法均产率低(<5%)而均未能广泛使

用。

[0049] 电纺

[0050] 电纺是一种形式的电沉积,且是通过使用高压电场(例如15-25kV)可从合成和/或天然聚合物产生纤维的通用技术。电纺可以有针或者无针。典型的电纺设置由配备有喷丝头的溶液容器、用于收集沉积的纤维的收集板和在喷丝头与收集板之间生成电场的高压单元组成。参见图1。溶液容器可以是配备有导电针的注射器,所述导电针既可用作喷丝头还可用作电极。

[0051] 聚合物溶液的流速可使用注射器泵来控制。一旦聚合物溶液经由电极而带电,在喷丝头尖端聚合物溶液小滴的形状将转化为泰勒锥体(Taylor cone)形状。如果电压高到足以克服表面张力,则细聚合物射流将从泰勒锥体尖端射出。喷射出的聚合物射流由于射流尺寸小而迅速干燥,而干燥的固体纤维可从收集板收集。电纺纤维的平均直径通常为数百纳米左右。

[0052] 聚合物链缠结是将目标溶液成功电纺成纤维所需的。聚合物链缠结防止聚合物射流由于电纺期间的电拉伸力而破裂。如果聚合物浓度太低,溶液中缺乏聚合物链重叠。当浓度增加到临界浓度 c^* ,链缠结启动。链缠结的程度 $(n_e)_{soln}$ 取决于聚合物浓度和分子量两者,且可通过等式2.1确定[12]:

$$[0053] \quad (n_e)_{soln} = \frac{cM_w}{M_e}$$

[0054] 其中 c 是溶液中的聚合物浓度, M_w 是溶液中的聚合物的分子量,而 M_e 是聚合物缠结分子量或缠结连接之间的平均分子量。

[0055] 等式2.1确立了聚合物分子量越高,则维持恒定缠结数目也即维持溶液可电纺性所需的聚合物浓度越低。

[0056] 蛋白质和碳水化合物/多糖

[0057] 乳清蛋白是食品中的关键成分。乳清蛋白提供良好的泡沫和乳液稳定性,还具有高含量的必需氨基酸。乳清蛋白的制备是现有技术已知的。通常,将乳脂(milk cream)离心以除去奶油或脂肪,然后沉淀酪蛋白,以使得乳清蛋白可通过额外的离心、过滤和/或离子交换步骤来分离。典型的乳清蛋白分离物(WPI)可含有 β -乳球蛋白($\sim 55\%$)、 α -乳白蛋白($\sim 25\%$)、免疫球蛋白($\sim 15\%$)、牛血清白蛋白($\sim 4\%$)和乳铁蛋白($\sim 2\%$)。

[0058] 尽管WPI是优选的糖基化靶标,可选择多种蛋白质进行电纺。在一些方面,仅使用一种类型的蛋白质。在其它方面,蛋白质可以是一种或多种蛋白质的混合物。

[0059] 可使用任何可进行电纺和缀合(与糖类反应)的可溶性动物或植物蛋白质。适宜的蛋白质包括植物基蛋白质,动物基蛋白质和微生物基蛋白质。例如,适宜的植物基蛋白质可包括大豆(浓缩物/分离物)、豌豆(浓缩物/分离物)、小麦(麸胚、麸质)、扁豆、豆类(bbeans)、玉米(玉米蛋白)、燕麦、大麦、苋、稻、荞麦、麦米(Farro)、亚麻、藜麦、黑麦、高粱、埃塞俄比亚画眉草(Teff)、向日葵和坚果(花生、杏仁、美洲山核桃)。适宜的动物基蛋白质可包括奶制品(乳清和酪蛋白)、鱼蛋白、动物蛋白(牛肉、猪肉、小牛肉、禽类...)和卵蛋白。适宜的微生物基蛋白质可包括藻类、真菌和细菌。

[0060] 具有还原官能团的碳水化合物可用于本过程。具体而言,适宜的碳水化合物或具有醛基,或具有在溶液中通过异构而形成醛的能力。适宜的碳水化合物包括琼脂、琼脂糖、

藻酸盐、藻酸、多糖酸(alguronc acid)、 α 葡聚糖、支链淀粉、直链淀粉、阿拉伯半乳聚糖、阿拉伯糖基木聚糖、 β 葡聚糖、Biocell胶原、愈创葡萄糖、capsulan、角叉菜胶、纤维糊精、动物纤维素、纤维素、几丁质、Chitin nanofibril、壳聚糖、金藻昆布多糖、凝胶多糖、环糊精、DEAE-琼脂糖、右旋糖酐、糊精、胞外多糖、 α -环糊精、难消化麦芽糊精(Fibersol)、聚蔗糖、果聚糖、岩藻多糖、半乳葡甘露聚糖、半乳甘露聚糖、吉兰糖胶、葡聚糖、葡甘露聚糖、糖萼、糖原、水解瓜尔胶、瓜尔豆胶、阿拉伯树胶、半纤维素、同聚多糖、羟丙甲纤维素、艾考糊精、菊粉、inulose、开菲尔多糖(kefiran)、魔芋、海带多糖、香菇多糖、果聚糖、地衣多糖、槐树豆胶、MatrixDB、葡聚糖(混合连接)、lucan、改性淀粉、胶浆剂、天然树胶、氧化纤维素、裸藻淀粉、果胶酸、果胶、五聚淀粉(pentastarch)、pleuran、聚葡萄糖、polyglycol alginate、多糖、多糖肽、金属卟啉(porphyrin)、支链淀粉(pulluran)、裂裉菌素、琼脂糖凝胶、左旋糖(sinistrin)、西佐糖(sizofiran)、大豆纤维、舒更葡糖(sugammadex)、不可水解的葡萄糖聚合物、韦兰胶、黄原胶、木聚糖、木葡聚糖、丝兰(yucca)或丝兰/皂树(quillaia)提取物和酵母聚糖。

[0061] 一个特定类别的适宜碳水化合物是多糖。

[0062] 糖类如多糖是糖类的聚合物。寡糖是2-200个糖的聚合物。多糖是比寡糖更长的聚合物。适宜的多糖可以是201-2500个糖的聚合物。

[0063] 适宜的多糖包括葡聚糖。葡聚糖意指复杂的分支多糖,其包含多个葡萄糖分子,连接成不同长度的链(例如从10到150kDa)。直链由葡萄糖分子之间 $\alpha 1 \rightarrow 6$ 糖苷键组成。支链可含有 $\alpha 1 \rightarrow 4$ 键, $\alpha 1 \rightarrow 2$ 键和/或 $\alpha 1 \rightarrow 3$ 键。

[0064] 适于缀合构象的糖类(糖的类型)包括还原单糖如葡萄糖、果糖、甘油醛和半乳糖。许多二糖象乳糖和麦芽糖也有还原形式,因为两个单元之一可具有带醛基的开链形式。在葡萄糖聚合物如淀粉和淀粉衍生物象葡萄糖糖浆、麦芽糖糊精和糊精中,大分子始于还原糖—一个游离醛。更为水解的淀粉含有更多还原糖。这些淀粉衍生物中存在的还原糖的百分比称为葡糖当量(DE)。

[0065] 在一些实施方案中,所述碳水化合物如葡聚糖具有在大约10kDa到大约500kDa之间的分子量范围。在其它实施方案中,所述葡聚糖具有在大约40kDa到大约100kDa之间或者在大约70kDa到大约100kDa之间的分子量范围。

[0066] 如本文所用的“大约”意指数值的 $\pm 10\%$ 。

[0067] 任何适宜的电纺方法和设备都可使用,只要提供以下:高电压电源,聚合物溶液贮库,电极(一个接地),和接收板。适宜的电纺设备包括但不限于无针和近场。

[0068] 电纺提供优于先前缀合蛋白质方法的实质优势。本发明的电纺方法有助于以短得多的退火时间和更大产率进行糖基化。

[0069] 例如,在电纺WPI-葡聚糖纤维中,两种聚合物的物理状态使得出于三种原因实现了更高的分子与分子更大接触数目。首先,聚合物更均匀分布,因为电纺由于拉伸和弯曲动作而导致分子排列。其次,由于溶剂迅速蒸发而防止了相分离。最后,纤维的小直径导致密实填充的由WPI和葡聚糖分子组成的纤维。

[0070] 由此,不受理论所限,认为电纺过程引起分子良好排列且由于聚合物链缠结而保持完整,从而导致特别好的产率和降低的成本。

[0071] 可改变多种参数在电纺期间优化纤维形成。影响纤维形成的参数包括葡聚糖浓

度、混合物粘度、混合物中的蛋白质与多糖比、允许退火的时间。

[0072] 以下说明集中于本发明的一个方面,即葡聚糖-乳清蛋白。应理解该过程可延伸至任何适宜的蛋白质和碳水化合物。

[0073] i. 葡聚糖浓度和纤维形成

[0074] 葡聚糖负责葡聚糖-乳清蛋白混合物的可电纺性,同时充当缀合物形成的还原糖试剂。

[0075] 从10-440kDa的宽范围葡聚糖分子量被用于与蛋白质形成缀合物。较低分子量通常给出更高水平的缀合物。对于电纺,当使用低分子量聚合物时需要高浓度。不幸的是,高浓度导致高粘性的溶液,其不能进行电纺。

[0076] 葡聚糖形成纤维的能力与葡聚糖浓度和大小有关。浓度低至0.45g/mL的所有葡聚糖溶液($M_w = 100\text{kDa}$)都表现出剪切稀化流动特性。对于100kDa葡聚糖,光滑和连续的纤维需要0.1g/mL或更高或者0.6g/mL或更高的浓度。因此,在一些方面对于100kDa葡聚糖,进行电纺的混合物含有至少0.6g/mL、至少0.8g/mL或至少1.0g/mL葡聚糖。葡聚糖上限可由混合物粘度决定且取决于聚合物类型,如5g/mL。

[0077] 蛋白质和多糖可合并于缓冲液中进行电纺。例如,进行电纺的混合物可在磷酸盐缓冲液中制备。缓冲液的pH在6.0和7.0之间;通常缓冲液pH为 6.50 ± 0.07 。

[0078] ii. 粘度

[0079] 粘度是进行有效电纺的重要参数。当粘度过高时,电纺效率受到负面影响。例如,对从40kDa葡聚糖制备的溶液的粘度为大约1.8Pa·s(泊)。这一粘度水平出于几种原因是不利的。首先,溶液制备困难,因为溶液变得“黏”。其次,在溶液制备期间,由于混合物中高含量的蛋白质(0.25g/mL溶剂),形成一厚层泡沫。溶剂可以是聚合物可在其中溶解的任何适宜溶剂。理想的是,溶剂应迅速蒸发,且不应可燃。适宜的溶剂是水。因此需要长弛豫时间(relaxation time)来从混合物除去泡沫层。此外,在电纺期间堵塞迅速发生,导致最低的生产率。

[0080] 粘度可通过任何适宜的方法使用任何适宜的粘度计和流变仪(例如但不限于Brookfield粘度计)来测量。通常粘度应沿着期望的流变曲线,且不限于任何单一数值。

[0081] 相比之下,从100kDa葡聚糖-测试的最大葡聚糖-制备的溶液具有最低的粘度。较低的粘度简化溶液制备,减少泡沫层形成,降低堵塞频率。

[0082] 适宜的粘度可通过使用超过40kDa的葡聚糖大小来获得。例如,这类混合物可含有50kDa到大约100kDa之间的葡聚糖。在一些方面,50kDa到大约100kDa之间葡聚糖大小的混合物可用于获得期望的粘度水平。在特定方面,所述葡聚糖具有大约100kDa的分子量。

[0083] iii. 纤维大小和形成

[0084] 据信多糖与蛋白质的缀合在减少或消除珠粒形成时得到增强。珠粒被认为是缺陷因此是不期望的。优选具有极少或没有珠粒的纤维。在本文公开内容的一些方面,如通过扫描电镜所确定的,纤维不含有珠粒。

[0085] 纤维直径可影响缀合。较小的纤维直径导致密实填充的由WPI和葡聚糖分子组成的纤维。缀合受到WPI和葡聚糖分子密实填充的促进。在一些方面,纤维直径在一些方面为大约100nm到大约500nm。在其它方面,纤维直径为大约100nm到大约300nm。在再其它方面,纤维直径在大约150nm到大约250nm之间。纤维直径可如实施例1所述测量。

[0086] iv. 蛋白质与葡聚糖的混合比

[0087] 纤维的蛋白质含量也影响纤维形成和缀合。当混合物的蛋白质含量增加时,纤维直径减小。参见例如实施例7。当蛋白质含量升高到33%wt或更高时,珠粒形成。因此,为减少或消除纤维上成珠,混合溶液中的蛋白质含量可为至多大约25%wt。为了获得这些百分比,用于电纺的水溶液中多糖与蛋白质的混合比(重量/重量)可如表1中所示。

[0088] 表1. 葡聚糖、蛋白质和珠形成的对应

[0089]

混合比 (葡聚糖: WPI; w/w)	% WT 蛋白质	珠粒
1: 0	—	无
4: 1	20%	无
3: 1	25%	无
2: 1	33%	+
1: 1	50%	++

[0090] 有关膜中蛋白质含量的额外细节在表9中给出。

[0091] 当葡聚糖:WPI之比增加时,通过凝胶电泳测量的糖蛋白形成增强。例如,

[0092] 因此,为了实现良好的纤维形成和缀合,多糖与蛋白质的混合比为高于2:1。在一些方面,所述比率为大约3:1,大约4:1,大约5:1,大约5:1,大约5:1,大约5:1,大约5:1,大约5:1,大约5:1,大约5:1。相应地,在特定方面,比率范围可为大约3:1到大约10:1。在其它方面,比率可为大约3:1到大约4:1。

[0093] iv. 退火条件

[0094] 电纺使得分子靠近在一起。然后退火提供在分子之间温度诱导的反应。如本文所用的退火是由在蛋白质和多糖之间形成共价键的缀合过程。退火可通过使用延长的温育期来增强。例如,退火时间可具有下限2小时、4小时、6小时、8小时、10小时、12小时、14小时、16小时、18小时或24小时。退火时间可具有上限为4小时、6小时、8小时、10小时、12小时、14小时、16小时、18小时、24小时或28小时。通常退火时间为2小时到4小时之间。当使用较长的退火时间时膜的颜色变得稍微更深,尤其是当将膜退火超过24小时。

[0095] v. 葡聚糖大小对缀合的影响作用

[0096] 当使用100kDa的葡聚糖制备电纺膜时,糖基化作用较慢。但是,WPI和葡聚糖100kDa之间形成的糖蛋白的大小大于~280kDa,而从WPI和40以及70kDa葡聚糖形成的分别大于~70和~200kDa。

[0097] vi. 湿度对糖基化的影响作用

[0098] 所述方法可在特定湿度水平进行以增强糖基化。较高的湿度可增强糖基化,如在糖蛋白染色凝胶中观察到的更强烈的糖蛋白条带所确定的。当样品在低湿度下退火时,糖蛋白染色凝胶中糖基化条带的强度小得多。与0%RH(图20A和B;泳道2-4)和44%RH(图20A和B;泳道5-7)相比,增强的糖基化于74%RH获得(图20A和B;泳道8-10)。因此,在一些方面,

相对湿度为至少44%。在其它方面,相对湿度为45%到75%或者65%到75%之间;在再其它方面,相对湿度为70%到80%。

[0099] 温度通常为大约室温;但是,预期在10℃到70℃之间的任何适宜温度。

[0100] 评估缀合

[0101] WPI-葡聚糖缀合物的出现可通过任何适宜的手段来监测。例如,凝胶电泳可以是优选的方式来验证退火电纺膜中糖蛋白的存在。FTIR未清楚显示初纺膜与退火膜IR光谱之间的区别,因而可能用途较小。

[0102] 参考文献

[0103] **Jiménez-Castaño, L.**, M. Villamiel 和 **R. López-Fandiño**, Glycosylation of individual whey proteins by Maillard reaction using dextran of different molecular mass. Food Hydrocolloids, 2007. 21(3): p. 433-443.

[0104] Livney, Y. D., Milk proteins as vehicles for bioactives. Current Opinion in Colloid and Interface Science, 2010. 15(1-2): p. 73-83.

[0105] Zhu, D. A. N., S. Damodaran 和 J. A. Lucey, Physicochemical and emulsifying properties of whey protein isolate(WPI)-dextran conjugates produced in aqueous solution. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. 58(5): p. 2988-2994.

[0106] Kato, A., K. Minaki 和 K. Kobayashi, Improvement of emulsifying properties of egg white proteins by the attachment of polysaccharide through maillard reaction in a dry state. Journal of Agricultural and Food Chemistry®, 1993. 41(4): p. 540-543.

[0107] Xu, D. 等人, The effect of whey protein isolate-dextran conjugates on the freeze-thaw stability of oil-in-water emulsion. Journal of Dispersion Science and Technology, 2011. 32(1): p. 77-83.

[0108] **Jiménez-Castaño, L.** 等人, Effect of the dry-heating conditions on the glycosylation of β -lactoglobulin with dextran through the Maillard reaction. Food Hydrocolloids, 2005. 19(5): p. 831-837.

[0109] Zhu, D., S. Damodaran 和 J. A. Lucey, Formation of whey protein isolate(WPI)-dextran conjugates in aqueous solutions. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008. 56(16): p. 7113-7118.

[0110] Akhtar, M. 和 E. Dickinson, Emulsifying properties of whey protein-dextran conjugates at low pH and different salt concentrations. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2003. 31(1-4): p. 125-132.

[0111] Lillard, J. S., D. A. Clare 和 C. R. Daubert, Glycosylation and expanded utility of a modified whey protein ingredient via carbohydrate conjugation at low pH. Journal of Dairy Science, 2009. 92(1): p. 35-48.

[0112] Nie, H. 等人, Effect of poly(ethylene oxide) with different molecular weights on the electrospinnability of sodium alginate. Polymer, 2009. 50(20):

p.4926-4934.

[0113] Jiang,H.等人,Optimization and characterization of dextran membranes prepared by electrospinning.Biomacromolecules,2004.5(2):p.326-333.

[0114] Shenoy,S.L.等人,Role of chain entanglements on fiber formation during electrospinning of polymer solutions:Good solvent,non-specific polymer-polymer interaction limit.Polymer,2005.46(10):p.3372-3384.

[0115] Ritcharoen,W.等人,Electrospun dextran fibrous membranes.Cellulose, 2008.15(3):p.435-444.

[0116] Deitzel,J.M.等人,The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles.Polymer,2001.42(1):p.261-272.

[0117] Kanjanapongkul,K.,S.Wongsasulak和T.Yoovidhya,Investigation and prevention of clogging during electrospinning of zein solution.Journal of Applied Polymer Science,2010.118(3):p.1821-1829.

[0118] Keypour,H.,S.Salehzadeh和R.V.Parish,Synthesis of two potentially heptadentate(N4O3)Schiff-base ligands derived from condensation of tris(3-aminopropyl)-amine and salicylaldehyde or 4-hydroxysalicylaldehyde.Nickel(II) and copper(II)complexes of the former ligand.Molecules,2002.7(2):p.140-144.

[0119] Amsden,J.J.等人,Different structural changes occur in blue-and green-proteorhodopsins during the primary photoreaction.Biochemistry,2008.47(44): p.11490-11498.

[0120] Etzel,M.R.和T.Bund,Monoliths for the purification of whey protein-dextran conjugates.Journal of Chromatography A,2011.1218(17):p.2445-2450.

[0121] Patel,H.A.等人,Methods to determine denaturation and aggregation of proteins in low-,medium-and high-heat skim milk powders.Dairy Science and Technology,2007.87(4-5):p.251-268.

[0122] Ait Kaddour,A.等人,Physico-chemical description of bread dough mixing using two-dimensional near-infrared correlation spectroscopy and moving-window two-dimensional correlation spectroscopy.Journal of Cereal Science, 2008.48(1):p.10-19.

[0123] Pan,B.等人,Study on interaction between gold nanorod and bovine serum albumin.Colloids and Surfaces A:Physicochemical and Engineering Aspects, 2007.295(1-3):p.217-222.

[0124] Izutsu,K.I.等人,Near-infrared analysis of protein secondary structure in aqueous solutions and freeze-dried solids.Journal of Pharmaceutical Sciences,2006.95(4):p.781-789.

[0125] Segtnan,V.H.和T.Isaksson,Temperature,sample and time dependent structural characteristics of gelatine gels studied by near infrared spectroscopy.Food Hydrocolloids,2004.18(1):p.1-11.

[0126] 以上引用的专利、公开申请和杂志文章的公开内容特此通过参考引入。

- [0127] 尽管有权利要求书,本发明还通过以下条款方式来定义:
- [0128] 1.经由电纺制备碳水化合物-蛋白质纤维或颗粒的方法,包括以下步骤:
- [0129] 制备包含碳水化合物和蛋白质的水溶液,
- [0130] 向所述溶液施加15到25kV的电压,
- [0131] 在收集板上收集纤维。
- [0132] 2.条款1的方法,其中所述电纺是无针的。
- [0133] 3.条款1或条款2的方法,其中所述碳水化合物具有醛基或通过异构形成醛基。
- [0134] 4.条款1或条款2的方法,其中所述碳水化合物是葡聚糖。
- [0135] 5.权利要求4的方法,其中所述葡聚糖分子量在大约10kDa和大约500kDa之间。
- [0136] 6.权利要求4的方法,其中所述葡聚糖以0.1g/mL到大约5.0g/mL的浓度存在。
- [0137] 7.之前条款中任一项的方法,其中所述蛋白质选自微生物、动物、奶制品和植物性的。
- [0138] 8.之前条款中任一项的方法,其中所述蛋白质是乳清蛋白分离物(WPI)。
- [0139] 9.之前条款中任一项的方法,其中所述水溶液包含摩尔比(w/w)从50:1到1:50的碳水化合物和蛋白质。
- [0140] 10.之前条款中任一项的方法,其中所述水溶液包含摩尔比(w/w)从3:1到1:10的碳水化合物和蛋白质。
- [0141] 11.之前条款中任一项的方法,其中所述水溶液包含葡聚糖和WPI。
- [0142] 12.之前条款中任一项的方法,还包括将所述纤维于至少45%的相对湿度温育至多24小时从而形成缀合膜的步骤。
- [0143] 13.条款12的方法,其中相对湿度在65%和75%之间。
- [0144] 14.条款12的方法,其中温度在10-70°C的范围内。
- [0145] 15.之前条款中任一项的方法,其中所述纤维直径为大约100nm到大约500nm。
- [0146] 16.权利要求15的方法,其中所述纤维直径为大约150nm到大约250nm。
- [0147] 17.通过电纺制备多糖-蛋白质纤维的方法,包括以下步骤:
- [0148] 制备包含100kDa葡聚糖和乳清蛋白分离物的水溶液,其中所述葡聚糖和乳清蛋白分离物以在3:1和10:1之间的摩尔比(w/w)存在,
- [0149] 向所述溶液施加15到25kV的电压从而产生纤维,
- [0150] 在收集板上收集所述纤维,和
- [0151] 将所述纤维于至少45%的相对湿度温育达4和24小时之间的时间,从而形成缀合膜。
- [0152] 18.权利要求17的方法,其中相对湿度在65%和75%之间。
- [0153] 19.条款17或条款18的方法,其中温育在4和8小时之间。
- [0154] 20.条款16-18中任一项的方法,其中温度在10-70°C的范围内。
- [0155] 21.条款16-18中任一项的方法,其中所述电纺是无针的。
- [0156] 实施例1
- [0157] 材料和方法
- [0158] a. 葡聚糖
- [0159] 由明串珠菌属产生的平均分子量为大约40、70和100kDa的葡聚糖购自Sigma-

Aldrich(Steinheim,德国)。**BIPRO®**乳清蛋白分离物从Davisco Food International, Inc.供应。所有材料不经进一步纯化而使用。

[0160] 将多种不同混合比(1:0、0.8:0.2、0.75:0.25、0.67:0.33和0.5:0.5,以重量计)的葡聚糖粉末和/或乳清蛋白分离物溶解于30mM磷酸盐缓冲溶液中。将溶液于磁力搅拌器上于室温($\sim 22^{\circ}\text{C}$)搅拌过夜以确保混合物完全溶解。分别使用流变仪(Physica, MCS 300, Ashland, VA),微处理器电导仪(WTW, LF537, Weiheim, 德国),密度计(Anton Paar, DMA 35N, Graz, 奥地利)和pH计(WTW, Inolab, Weiheim, 德国)测量溶液粘度、电导率、密度和pH。所有溶液的最终pH为 6.50 ± 0.07 , 先前报道其为乳清蛋白分离物-葡聚糖缀合物形成的适宜pH [7]。

[0161] b. 电纺

[0162] 电纺设置如图1所示。将目标溶液装载到配备有不锈钢针头(内径0.9mm)的10mL玻璃注射器中。然后将该注射器装载到置于注射器泵(Harvard Apparatus 11P, Holliston, MA)上的注射器中。将针尖连接到高压D.C.电源(Gamma High Voltage, ES30P-5W, Ormond Beach, FL)。将接地电极连接到不锈钢收集板。针尖与收集板之间的距离维持在18cm。溶液流速保持恒定于 $12\mu\text{L}/\text{min}$ 。将溶液于大约+20kV带电。收集的电纺膜在作进一步研究前于 -28°C 冷冻。

[0163] 通常电纺期间的电压是15到20kV且不高于25kV。如果电压过高,将会产生电弧作用(火花)。增加安培数直至实现纤维形成。

[0164] c. 形态分析

[0165] 使用带有聚焦离子束的ZEISS ORIGA交叉束场发射扫描电镜(Oberkochen, 德国)研究电纺纤维的形态。将膜真空干燥并进行金溅射镀膜大约4分钟。电纺纤维的平均直径通过使用Image J(National Institutes of Health, Bethesda, MD)进行图像分析来确定。

[0166] d. 通过FTIR进行膜表征

[0167] 通过使用配备有通用衰减全反射附件的傅里叶变换红外光谱仪(ATR-FTIR)(Perkin Elmer, Spectrum100, Beaconsfield, UK)来研究电纺膜。在 $4000\text{--}650\text{cm}^{-1}$ 波长范围内收集红外光谱, 4cm^{-1} 分辨率和10次扫描,透射模式。

[0168] e. SDS-PAGE凝胶

[0169] TGX预制凝胶(Tris-HCl凝胶, 4-20%线性梯度, 15个孔)和蛋白质染色-脱色溶液(Bio-Safe考马斯染色和考马斯脱色)购自Bio-Rad Laboratories。标准蛋白梯(PageRuler™ Plus预染蛋白梯26619, 10-250kDa)和糖蛋白染色试剂盒(**Pierce®**糖蛋白染色试剂盒)购自Thermo Scientific, Pierce Biotechnology(德国)。在用前将标准蛋白梯保存在 -28°C 。碳酸钾(K_2CO_3)和氯化钠(NaCl)购自Sigma-Aldrich(Steinheim, 德国)。

[0170] f. 热处理

[0171] 将大约5-10mg电纺膜置于控制湿度的腔室中。该腔室在热空气炉(Memmert, Model400, Schwabach, 德国)中预平衡以使控制体积达到 60°C 的平衡温度。控制体积内的相对湿度为大约0%RH(使用硅胶)、44%RH(使用饱和 K_2CO_3 溶液)或74%RH(使用饱和 NaCl 溶液)。

[0172] 退火提供蛋白质与糖的缀合,后接美拉德反应。

[0173] g. 通过SDS-PAGE研究对WPI-葡聚糖缀合物相互作用的分析

[0174] 样品缓冲液通过将表2中所列的所有化学化合物溶于去离子蒸馏水至100mL终体积来制备并在用前冷冻于-20℃。

[0175] 表2样品缓冲液的组成(200mL)

[0176]

材料	量
Tris(羟甲基)-氨基甲烷	9.085g
盐酸(浓)	1.250g
SDS	6.2g
甘油20%	40mL
2-巯基乙醇	6mL
溴酚蓝	0.4g

[0177] [0177] 电极缓冲液通过将表3中所列的化合物溶于去离子蒸馏水至5000mL终体积来制备。所述缓冲液在用前贮存于4℃。

[0178] 表3电极缓冲液的组成(1000mL)

材料	量
Tris(羟甲基)- 氨基甲烷	3 g
SDS 10%	10 mL
甘氨酸	14.4 g

[0180] 使用从先前由Zhu等人(2008)所述方法修改的方法制备样品进行凝胶电泳。首先,将经热处理的电纺膜以80μg(蛋白质含量)/15μL的浓度溶于去离子蒸馏水。将水溶液于16000g于22℃离心15分钟。收集上清并进一步用样品缓冲液稀释至40μg/15μL的最终蛋白浓度。然后将稀释溶液于95℃水浴中加热至少5分钟以裂解二硫键和解离蛋白质(还原条件)。然后将溶液保持冷却。

[0181] h.凝胶电泳

[0182] SDS-PAGE在Mini-PROTEAN Tetra Cell上根据Laemmli(1970)进行。还原SDS-PAGE分析在TGX预制凝胶(Tris-HCl凝胶,4-20%线性梯度,15个孔,Bio-Rad Laboratories)上进行。将10μL/孔的样品溶液上样到每个孔中。电泳于200V恒定电压于室温运行大约40分钟。同时跑两份凝胶。电泳后,一份凝胶作蛋白质染色,另一份作糖蛋白染色,以检测WPI-葡聚糖缀合物的存在。

[0183] 对于蛋白质染色,分别用Bio-Safe考马斯染色和考马斯脱色(Bio-Rad, Laboratories)将凝胶对蛋白质染色和脱色。染色过程根据生产商指示说明进行。简而言之,将凝胶用过量去离子蒸馏水清洗并转移到染色容器中,其中加入Bio-Safe考马斯染色以完全覆盖凝胶至少1小时。然后将凝胶在考马斯脱色中于室温脱色过夜。

[0184] 对于糖蛋白染色,使用Pierce®糖蛋白染色试剂盒(Thermo Scientific, Pierce Biotechnology)。将凝胶在100mL50%甲醇中固定30分钟,通过用100mL3%乙酸轻轻振荡10分钟两次来清洗。然后将凝胶浸没在氧化溶液中15分钟,在100mL3%乙酸中洗5

分钟(3次),用糖蛋白染色试剂染色15分钟并转移到还原溶液5分钟,轻轻振荡。最后,将凝胶用过量3%乙酸清洗,然后用去离子蒸馏水清洗。

[0185] i.使用紫外可见光谱研究退火期间的显色

[0186] 将退火的电纺膜溶于去离子蒸馏水至5mg/mL的浓度。使用涡动搅拌器将溶液剧烈振荡大约2分钟并保持静止大约20分钟,然后再次使用涡动搅拌器振荡以确保完全溶解。所有溶液在制备后立即使用。

[0187] j.紫外光谱

[0188] 紫外测量在具有60mm内球的UV-VIS-NIR分光光度计(PerkinElmer, Lambda750S, 德国)上进行。将1mL样品溶液上样到半微量比色皿(Brand, **PLASTIBRAND®**, 德国)中。将样品用于250到350nm的波长扫描,在大约280nm观察到缀合物的存在。

[0189] k.初纺和退火电纺膜的NIR光谱

[0190] 使用具有60mm内球的UV-VIS-NIR分光光度计(PerkinElmer, Lambda750S, 德国)研究热处理之前和之后超细纤维垫的近红外光谱。以反射模式在250–2500cm⁻¹的波长范围收集光谱,分辨率4cm⁻¹。

[0191] 实施例2

[0192] 从葡聚糖制备电纺纤维

[0193] 对平均分子量为大约40、70和100kDa的葡聚糖进行电纺,并如实施例1所述研究所得纤维的形态。

[0194] i.70kDa葡聚糖

[0195] 取决于浓度,葡聚糖(70kDa)给出多种形态。在0.5g/mL(~33%w/w),主要产生珠粒,以及一些短纤维(图2)。将浓度增加到0.7g/mL(~41%w/w)导致较少的珠粒和连续的纤维(图3)。进一步增加葡聚糖浓度至0.8g/mL(~44%w/w)产生光滑的纤维(图4)。

[0196] ii.40kDa葡聚糖

[0197] 对于40kDa葡聚糖,最小可电纺浓度增加至1g/mL溶剂(~50%w/w)。纤维形态光滑且连续(图5)。电纺条件保持恒定在:电压=20kV,电纺距离=18cm和溶液流速=12μL/min。

[0198] iii.100kDa葡聚糖

[0199] 对于100kDa葡聚糖,最小葡聚糖浓度减少至0.6g/mL(~38%w/w)以在相同电纺条件下产生光滑的纤维(图6)。

[0200] 基于这些数据,葡聚糖溶液的最小电纺浓度如表4中计算。

[0201] 表4. 葡聚糖溶液的最小电纺浓度

	葡聚糖分子量 (kDa)	最小电纺浓度 (g/ml 溶剂)
[0202]	40	1.0
	70	0.8
	100	0.6

[0203] 实施例3

[0204] WPI-葡聚糖混合物的粘度分析

[0205] 一般而言,聚合物只在适当粘度范围(1-20泊)内可电纺[14]。如果粘度过高,电纺期间可发生堵塞[15]。粘度取决于聚合物浓度和聚合物分子量。制备葡聚糖-乳清蛋白分离物的混合物并检查混合物的粘度。混合物的浓度取决于葡聚糖分子量。总浓度与表4中显示的葡聚糖溶液的最小可电纺浓度相同。

[0206] 葡聚糖和乳清蛋白分离物之间的混合比保持恒定在3:1(以重量计)。混合物配方如表5总结。

[0207] 表5. 葡聚糖和乳清蛋白分离物混合物配方

No.	葡聚糖分子量 (kDa)	总固体含量(g/mL 溶剂)	
		葡聚糖	乳清蛋白分离物
[0208] 1	40	0.75	0.25
2	70	0.60	0.20
3	100	0.45	0.15

[0209] 图7显示这些混合物的粘度。1号混合物的粘度为大约1.8泊(Pa.s)且分别大约2-5倍高于2和3号混合物的粘度。

[0210] 从40kDa葡聚糖制备的溶液的高粘度引起两个问题。首先,该溶液难于制备和操纵,因为溶液不仅粘而且还非常黏。在混合物溶解期间形成一厚层泡沫(~60%总高度),可能是由于溶液中非常高含量的乳清蛋白。过夜搅拌后,必需将溶液留置在真空腔室内以从蛋白质-空气界面除去空气。其次,由于溶液的高粘度,电纺期间堵塞迅速发生。

[0211] 结果在从最低分子量葡聚糖制备的混合物的情况下生产率最低。相应地,从100kDa葡聚糖制备的混合物更便于制备和电纺,其具有最低的粘度(大约0.4Pa.s)。

[0212] 实施例4

[0213] 电纺纤维的形态分析

[0214] 如表1中所述制备葡聚糖-乳清蛋白分离物电纺纤维,以3:1的混合比(葡聚糖-乳清蛋白分离物)将乳清蛋白分离物加入葡聚糖溶液。图8显示葡聚糖-乳清蛋白分离物电纺纤维的选择SEM图像。对于所有样品,纤维光滑且没有观察到珠粒。参见图8A-C。这些数据显显示,每种溶液的聚合物浓度选择适当,且以3:1(葡聚糖-乳清蛋白分离物)将乳清蛋白分离物引入葡聚糖溶液并未负面影响混合物的可电纺性。

[0215] 对应于图8A-C的纤维直径的范围显示于图8A-F。从40、70、100kDa葡聚糖制备的葡聚糖-乳清蛋白分离物纤维的直径分别为 410 ± 180 , 247 ± 82 , 173 ± 72 nm。纤维直径的区别可能是由于溶液粘度的不同。

[0216] 由于大的最小可电纺浓度,从40kDa葡聚糖制备的混合物的粘度最高。观察到从40kDa葡聚糖制备的混合物表现出迅速堵塞和非常大的平均纤维直径。这可能是由于高粘度。相比之下,100kDa葡聚糖/乳清蛋白分离物混合物的混合物更易于制备和操作,具有较低的堵塞频率并产生更小的纤维直径。

[0217] 因而,40kDa到100kDa之间的葡聚糖可用于形成纤维,优选大约100kDa的葡聚糖。

[0218] 实施例5

[0219] 含有葡聚糖和WPI的混合物的特性

[0220] 将多种不同混合比(1:0、0.8:0.2、0.75:0.25、0.67:0.33和0.5:0.5,以重量计)的葡聚糖粉末和/或乳清蛋白分离物溶解于30mM磷酸盐缓冲溶液中。将溶液于磁力搅拌器上于室温($\sim 22^{\circ}\text{C}$)搅拌过夜以确保混合物完全溶解。分别使用流变仪(Physica, MCS 300, Ashland, VA),微处理器电导仪(WTW, LF537, Weiheim, 德国),密度计(Anton Paar, DMA 35N, Graz, 奥地利)和pH计(WTW, Inolab, Weiheim, 德国)测量溶液粘度、电导率、密度和pH。所有溶液的最终pH为 6.50 ± 0.07 。

[0221] 研究葡聚糖浓度以及葡聚糖与乳清蛋白分离物之间的混合比对溶液特性和纤维形态的影响作用。

[0222] 图9显示葡聚糖水溶液的流动特性。浓度为0.7、0.6、0.45和0.3g/mL溶剂的溶液的粘度分别为大约1.4、0.7、0.3和0.1Pa.s。表6显示所有溶液的稠度系数和流动特性指数。前三种溶液(0.7、0.6和0.45g/mL溶剂)表现出剪切稀化行为,如流动特性指数 $n < 1$ 所证实。在0.3g/mL溶剂的浓度,溶液的流动特性变得越来越像牛顿流体,其表明聚合物链缠结显著减少。

[0223] 表6稠度系数和流动特性指数

[0224]

No.	浓度(g/ml溶剂)	k	n
1	0.70	2.398 ± 0.314	0.92 ± 0.02
2	0.60	0.844 ± 0.039	0.97 ± 0.01
3	0.45	0.305 ± 0.087	0.98 ± 0.03
4	0.30	0.075 ± 0.002	1.01 ± 0.01

[0225] k和n值为重复测量的平均值 $\pm$ 标准偏差。

[0226] 当将WPI加入葡聚糖溶液时,混合物粘度显著降低。图10显示WPI含量对葡聚糖-乳清蛋白分离物混合物的粘度的影响,与纯葡聚糖溶液相比较。较高的WPI含量与较低的混合物粘度相关联。这可能是因为乳清蛋白分离物的球状结构降低混合物中葡聚糖的链缠结程度;并导致混合物粘度降低。混合物的流动特性指数随蛋白质含量增加而降低(表7)。在0.5:0.5的混合比,混合物似乎具有牛顿流动特性,类似于具有0.3g/mL溶剂的最低浓度的葡聚糖溶液。

[0227] 表7葡聚糖溶液和葡聚糖(100kDa)-乳清蛋白分离物混合物的稠度系数(k)和流动特性指数(n)

[0228]

No.	总固体 (g/mL 溶剂)	混合比 (葡聚糖: WPI)	k	n
1	0.60	1: 0	0.84 ± 0.04	0.97 ± 0.01
2	0.60	0.80: 0.20	0.65 ± 0.06	0.97 ± 0.01
3	0.60	0.75: 0.25	0.52 ± 0.06	0.98 ± 0.02
4	0.60	0.67: 0.33	0.41 ± 0.03	0.99 ± 0.01
5	0.60	0.50: 0.50	0.24 ± 0.02	1.02 ± 0.01

[0229] k 和 n 值为重复测量的平均值+/-标准偏差。

[0230] 与粘度相比,混合物的电导率随更高蛋白质含量而增加(表8)。WPI具有净负电荷,因为混合物pH为大约6.5而乳清蛋白的等电点(pI)为~5.2。乳清蛋白分离物的极性结构因而增加混合物中离子的总迁移率,导致更高的电导率。

[0231] 表8乳清蛋白分离物含量对混合物电导率的影响

No.	混合比		电导率* (mS/cm)
	100 kDa 葡聚糖	WPI	
1	1	0	0.64 ± 0.06
2	0.80	0.20	0.92 ± 0.00
3	0.75	0.25	1.09 ± 0.03
4	0.67	0.33	1.26 ± 0.02
5	0.50	0.50	1.51 ± 0.03

[0233] *所报道的值为重复测量的平均值+/-标准偏差。

[0234] 实施例6

[0235] 从葡聚糖和葡聚糖/WPI混合物电纺的纤维的形态

[0236] 仅葡聚糖的纤维

[0237] 使用100kDa葡聚糖以不同浓度制备纤维。图11显示100kDa葡聚糖浓度对葡聚糖纤维形态的影响。在最低浓度(0.3g/mL溶剂),主要形成平均直径800nm的珠粒和极少短纤维(图11A)。这表明如牛顿流动特性所显示的聚合物链缠结不足,如表8中所概括的溶液的剪切应力-应变行为或流动特性指数所表明的。将聚合物浓度增加到0.45g/mL溶剂显著减少珠形成(图11B)。形态变得更为纤维样,平均直径大约90nm。偶尔观察到短纤维,表明聚合物链缠结仍然太低而不能产生连续纤维。当葡聚糖浓度为0.6g/mL溶剂时形成了光滑和连续的纤维(图11C)。发现平均纤维直径为大约180nm。进一步增加葡聚糖浓度至0.7g/mL溶剂导致平均纤维直径大幅增加至大约300nm。(参见图11E-H)。这些数据确立了,对于100kDa葡聚糖,0.6g/mL溶剂的浓度是最佳的。

[0238] 葡聚糖-WPI纤维

[0239] 以不同混合比(参见表8)将乳清蛋白分离物混合到0.6g/mL葡聚糖溶液中。图12显示乳清蛋白分离物含量对电纺纤维形态的影响。当葡聚糖与乳清蛋白含量之间的混合比从1:0变为0.8:0.2时,平均纤维直径从192nm(图12A和F)稍减小到186nm(图12B和G)。通过将混合比变为0.75:0.25而进一步增加乳清蛋白含量将平均纤维直径减小至大约161nm(图12C和H)。

[0240] 减小的纤维直径是由于当乳清蛋白分离物含量更高时电导率增加和混合物粘度减小,其有利于电纺期间聚合物射流拉伸,导致更细的纤维。

[0241] 但是,当乳清蛋白含量等于或高于33%时,观察到纤维上的珠粒(参见图12D和12I,以及图12E和12J),表明混合物的粘度过低。相应地,小于33%的乳清蛋白含量是最佳的。

[0242] 实施例7

[0243] 通过傅里叶变换红外光谱仪(FTIR)分析纤维蛋白质含量

[0244] 如实施例1所述进行FTIR。收集具有不同量的葡聚糖(粉末)和乳清蛋白分离物(粉末)的混合物的IR光谱(图13A)。在大约 1520cm^{-1} 的酰胺键II区域的峰吸光度随蛋白质含量显著增加,并被用作样品中蛋白质含量的指示。从每份光谱计算于大约 1520cm^{-1} 和 1000cm^{-1} 的波数的峰吸光度之间的比值并将数据在图13B中再作图。有趣的是,发现蛋白质含量(ω)与两个峰吸光度之间的比值(p_r)之间的线性关系($R^2=94.00\%$): $p_r=7834.0=\omega$ 。(等式2.2)。

[0245] 所述关系保持线性直至蛋白质浓度为30%wt。当乳清蛋白含量达到50%时,观察到非线性关系。但是,由于本研究中所用的蛋白质含量的靶值为大约25%wt,等式2.2对于定量分析仍然有效。

[0246] 表9显示从不同混合比的葡聚糖-乳清蛋白分离物混合物制备的电纺膜中蛋白质含量的值。计算值与混合比没有太多区别,表明多糖和蛋白质被同时电纺。这表明蛋白质和多糖以对随后的缀合物反应形成而言期望的浓度同时存在于电纺纤维中。

[0247] 表9从不同混合比的葡聚糖-乳清蛋白分离物制备的电纺膜中乳清蛋白分离物含量的分析

No.	混合比		乳清蛋白分离物 * (%wt)
	100 kDa 葡聚糖	WPI	
[0248] 1	1	0	0.20 ± 0.01
2	0.80	0.20	0.22 ± 0.01
3	0.75	0.25	0.32 ± 0.03

[0249] *所报道的值是重复测量的平均值±标准偏差。

[0250] 实施例8

[0251] WPI-葡聚糖缀合物形成的分析

[0252] 尽管WPI蛋白质与葡聚糖纤维缔合,我们需要证实发生缀合;即形成共价键。相应地,我们研究了WPI与葡聚糖之间形成缀合物的条件,包括葡聚糖分子量、退火期间的湿度和WPI与葡聚糖之间的混合比对WPI-葡聚糖缀合物形成的影响。

[0253] 采用凝胶电泳来验证退火电纺膜中糖蛋白的存在,并用UV-VIS-NIR分光光度计来检查退火期间的显色并获得电纺膜的NIR光谱。

[0254] 实施例9

[0255] 热处理膜的外观

[0256] 图14显示初纺和退火电纺膜的外观。初纺膜的颜色是白色的,具有较低密度,而退火样品密度增加且稍微更黄(图14)。在退火后没有检测到味道,表明没有形成短分子量美拉德反应产物。膜的颜色随着增加退火时间而变得更黄。

[0257] 实施例10

[0258] 缀合物形成的分析

[0259] 通过测量IR光谱来检测糖基化蛋白质的最初手段没有成功。我们预期由于N=C拉伸(美拉德反应期间希夫碱产物形成)WPI-葡聚糖IR光谱在大约 $1630-1640\text{cm}^{-1}$ 吸光度的显著改变[16,17]。但是,从WPI-葡聚糖粉末混合物和于 60°C 和74%RH退火的电纺膜获得的IR光谱没有那么不同。参见图15。这可能是因为该技术不够灵敏来检测与未反应葡聚糖和WPI存在相比退火电纺膜中WPI-葡聚糖缀合物的存在。

[0260] 因此,如实施例1所述用凝胶电泳来评价缀合,其在检测样品中的糖蛋白形成方面更有效。

[0261] 我们选择40kDa葡聚糖,因为据报道更小分子量的葡聚糖可比更高分子量葡聚糖更好地促进WPI-葡聚糖缀合物形成[1],使我们在使用目标葡聚糖(100kDa)前验证该方法。图16显示于 60°C 退火至多48小时的WPI-葡聚糖-40kDa缀合物的SDS-PAGE图谱。出乎意料的是,似乎在退火少至2小时(泳道3)的样品中形成了WPI-葡聚糖40kDa缀合物。

[0262] 在对葡聚糖-40kDa和WPI的纤维证实了糖基化之后,从WPI和葡聚糖-100kDa的混合物电纺膜。将膜退火,样品溶液的制备使用如WPI-葡聚糖-40kDa样品相同的条件。然后将制备的样品进行凝胶电泳试验。在相同凝胶中,还上样从先前退火的WPI-葡聚糖-40kDa电纺膜制备的样品,以将其与从退火的WPI-葡聚糖-100kDa制备的溶液相比。WPI-葡聚糖缀合物的SDS-PAGE图谱如图17所示。图17A和17B分别显示蛋白质染色和糖蛋白染色凝胶的图像。两份凝胶同时跑。

[0263] 对从葡聚糖-40kDa制备的样品,结果与图16中显示的类似。在膜退火8小时后WPI条带显著减少(泳道3)。随着更长的退火时间(泳道4和5:分别为16和24小时),具有更大分子质量化合物的条带变得更强。这表明蛋白质与葡聚糖的糖基化随着更长的退火时间而增加(图17B)。

[0264] 从葡聚糖-100kDa制备的电纺膜(泳道6-9)的SDS-PAGE图谱表明与从葡聚糖-40kDa制备的那些(泳道2-5)类似的行为,但在凝胶上强度较低且位置更高。我们怀疑葡聚糖-100kDa的较大大小降低了分子移动性或减少了分子之间接触点的数目(这两个因素均促进反应)。因此所述反应显然比用较小的葡聚糖-40kDa的效率低。尽管如此,根据图17B,显然形成了缀合物且其大小比WPI-葡聚糖-40kDa缀合物要大得多。

[0265] 图18A和B显示WPI-葡聚糖(70kDa)缀合物的SDS-PAGE谱。如前,糖蛋白条带随着更长的退火时间而变得更强。条带强度小于从葡聚糖-40kDa制备的但高于从葡聚糖-100kDa制备的。将标准蛋白梯也上样到相同凝胶中,以通过将移动距离对已知蛋白质分子量作图而为微型凝胶制备分子量标准曲线(图3.6)。从葡聚糖40kDa、70kDa和100kDa制备的电纺膜

中发现的糖蛋白由此可估计为分别>70kDa、>200kDa和>280kDa。

[0266] 图20A和B显示湿度对糖基化的影响。当样品在低湿度(0%RH和44%RH)下退火时,糖蛋白染色凝胶中糖基化条带强度低得多。在74%RH获得增强的糖基化(参见泳道8-10)。

[0267] 电纺膜中的聚合物分子充分缠结由此限制分子的移动性。增加湿度可增加链柔性,导致更多的反应并因此增加WPI-葡聚糖缀合物形成。

[0268] 本试验中所用的乳清蛋白分离物中的两个主要成分 β -乳球蛋白和 α -乳白蛋白分别具有大约18和14kDa的分子量。这与在大约14、18、30和36kDa发现的四个条带一致,其可归因于WPI中两个主要成分的单体和二体(图18A)。在大约60kDa的条带归于牛血清白蛋白(BSA)[7,19]。

[0269] 所有蛋白质染色凝胶中这些主要条带的存在意味着,即使在退火24小时后,电纺膜中保留有未反应的WPI。这提示,通过在前体溶液中增加葡聚糖或减少WPI,可调节葡聚糖与WPI之间的混合比。由此以不同混合比从WPI和葡聚糖100kDa制备电纺膜。图21显示这些电纺膜的SDS-PAGE图谱。糖蛋白染色凝胶证实所有退火电纺膜中糖蛋白条带的存在(泳道2-4,6-8,10-12),但在初纺膜中没有(泳道1、5和9)。糖蛋白条带的强度为以下方式:泳道10-12>泳道6-8>泳道2-4。但是,小分子条带(β -乳球蛋白、 α -乳白蛋白和BSA)的强度没有那么大的区别。因此可能葡聚糖-100kDa与WPI之间的最佳混合比可高于本可行性研究中所用的2:1。

[0270] 实施例11

[0271] 退火期间的显色

[0272] 为了追踪退火电纺膜的显色与时间的函数,使用UV-VIS-NIR分光光度计测量吸收光谱。图22A和22B显示在不同时间退火从葡聚糖-40kDa制备的电纺膜的紫外吸收光谱。光谱显示仅仅在大约280nm的一个清晰吸光度峰,这是用于检测样品中蛋白质残余的相同波长[20,21]。结果显示吸光度峰随退火时间而增加。

[0273] WPI浓度在每个溶液样品中保持恒定;因此,吸光度的增加可能是由于与天然WPI分子相比糖蛋白大小更大。这表明更长的退火时间促进更多糖蛋白形成。吸光度峰与退火时间之间的图看起来类似于s形曲线。在退火开始时,葡聚糖和WPI分子可能需要弛豫期来使它们自己重排,因而糖蛋白形成仅稍有增加(0-4小时)。在该最初的弛豫期后,从4小时到24小时糖基化可以更快速率进行。在24小时到48小时之间,糖基化速率变慢,可能由于反应位点减少。类似的趋势也在从葡聚糖70kDa制备的电纺膜中观察到(图23A和23B)。

[0274] 相比之下,以1:2混合比从葡聚糖100kDa-WPI制备的电纺膜表现出不寻常的紫外吸光度波动(图24A)。凝胶电泳试验结果证实,糖蛋白随时间增加,无论葡聚糖大小;因此,波动可能是由于测量本身。由于所有溶液以与从葡聚糖40kDa-和葡聚糖70kDa-电纺膜制备的溶液相同的浓度制备,我们怀疑较大大小的葡聚糖分子和/或糖蛋白可能干扰吸光度。

[0275] 因此以较低浓度制备溶液,从5-3mg/mL。似乎减少了分子大小对吸光度的干扰作用。图24B显示与图22B和23B类似的趋势。然而,当葡聚糖-100kDa与WPI之间的混合比增加到1:1时,干扰作用又恢复了(图25A)。且增加混合比至2:1导致更大干扰(图25B)。在每次测量中都观察到高水平噪音(图26)。这些结果与凝胶电泳结果或甚至简单目测(图27)形成对比,后者显示形成有色产物。

[0276] 实施例12

[0277] 比色计分析

[0278] 制备含有WPI-葡聚糖纤维的退火电纺膜并如上所述退火。用比色计来评价从葡聚糖100kDa产生的退火电纺膜的显色。如预期的,随退火时间样品的亮度减小而黄度增加(图28A-C)。颜色越浅(例如黄色或褐色越浅)越好。理想情况下膜是无色的。希夫反应后应停止反应以避免颜色。

[0279] 实施例13

[0280] NIR光谱分析

[0281] 收集从WPI和葡聚糖100kDa制备并在不同时间退火的电纺膜的NIR光谱(图29A和B)。我们在2000到2300nm的范围内没有检测到新的吸光度峰,其归于蛋白质分子的二级结构[20,22]。这可能表明于60℃退火期间蛋白质的二级结构没有显著变化。这一结果与初纺和退火电纺膜的FTIR光谱一致(图15)。观察到一个峰位于大约1400nm,其可归于由于在高湿度环境中退火期间存在水而发生O-H拉伸和蛋白质分子的N-H拉伸的第一泛频峰(first overtone)[20,23]。总体而言,退火电纺膜的反射向更低迁移。这是因为退火的电纺膜随着较长的退火时间而变得亮度稍稍更低;导致吸收光能力更高。与初纺膜相比,退火电纺膜的所有光谱显示出在大约280nm较低的反射值(或更高的吸光度)。一般而言,膜越深,膜越有问题且难以实现FTIR分析。

[0282] 作为另一个实例,上述示例性实施例的各个特征可单独或与其它实例的元素联合或亚联合使用。例如,任何上述系统和方法或其部分可与上述的其它方法和系统或其部分组合。例如,本领域普通技术人员将认识到,示例性附图中例示的步骤可以与所述不同的次序进行,且一个或多个例示的步骤根据公开内容的一些方面可以是任选的。还将领会并且理解,可以做出修改而不偏离本公开内容的真实精神和范围。因此说明书应被认为是例示性的而非限制本公开内容。

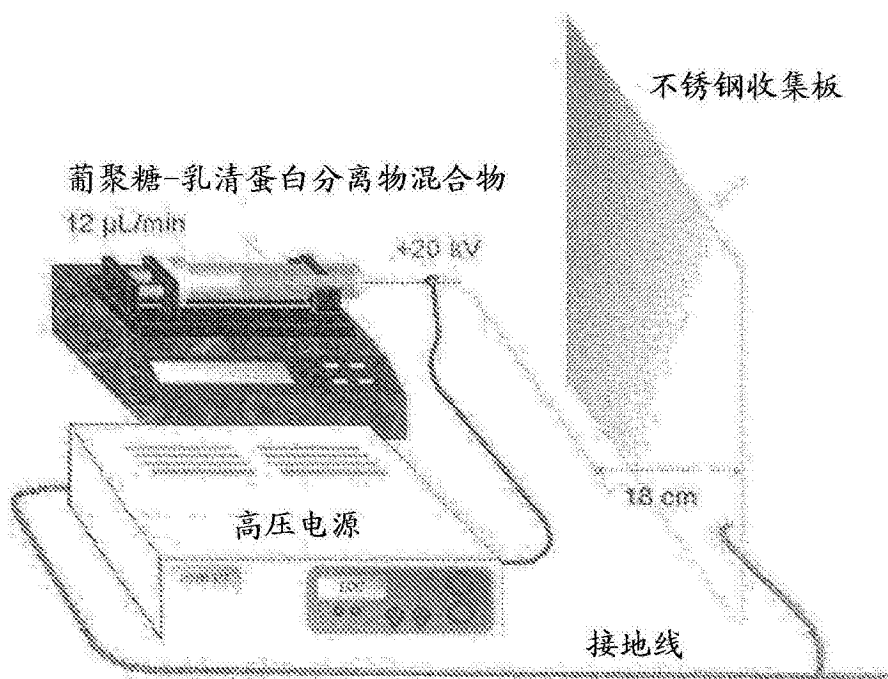


图1电纺装置

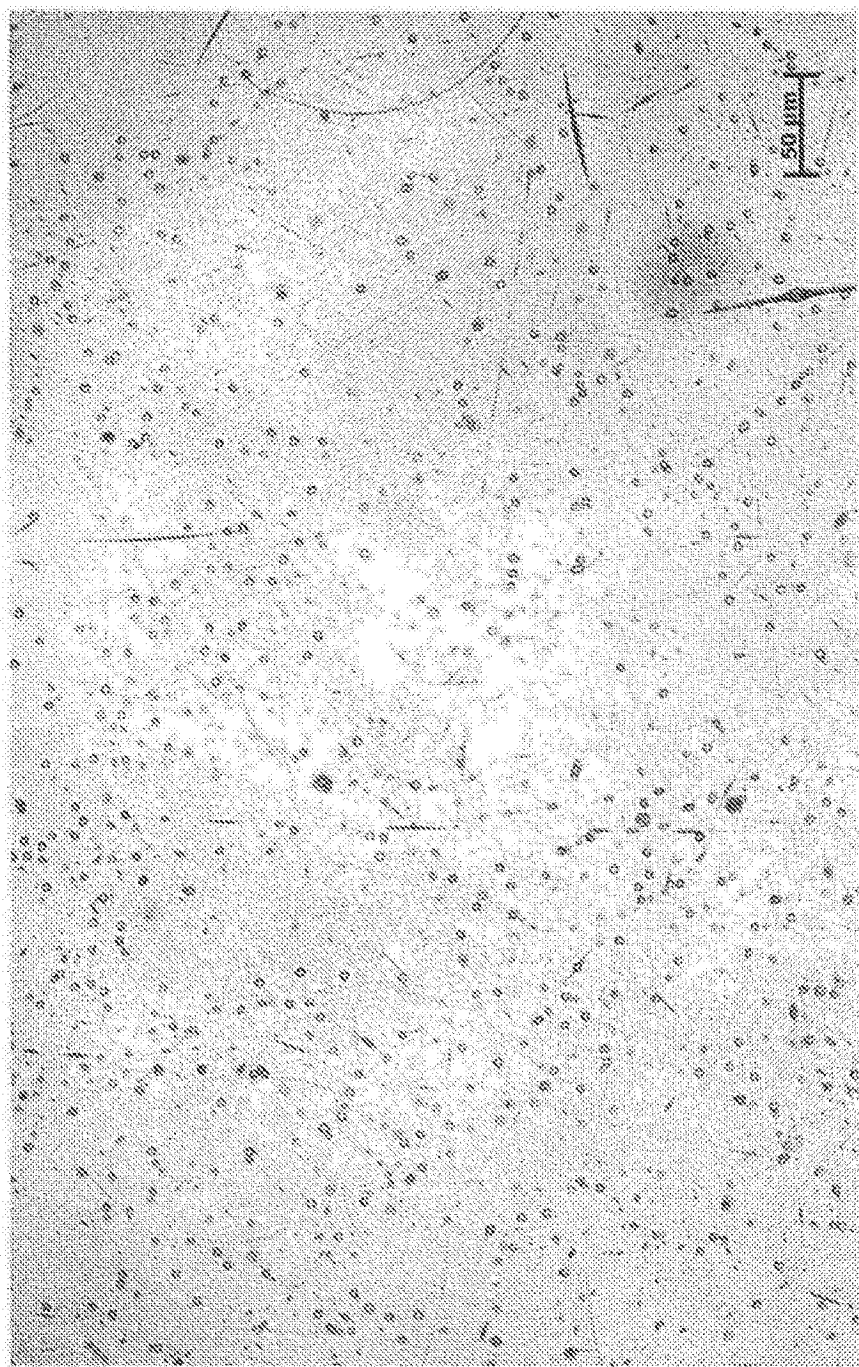


图2(图2.2)0.5g/mL葡聚糖(70kDa)纤维上的珠粒



图3(图2.3)从0.7g/mL溶剂的葡聚糖(70kDa)溶液制备的纤维

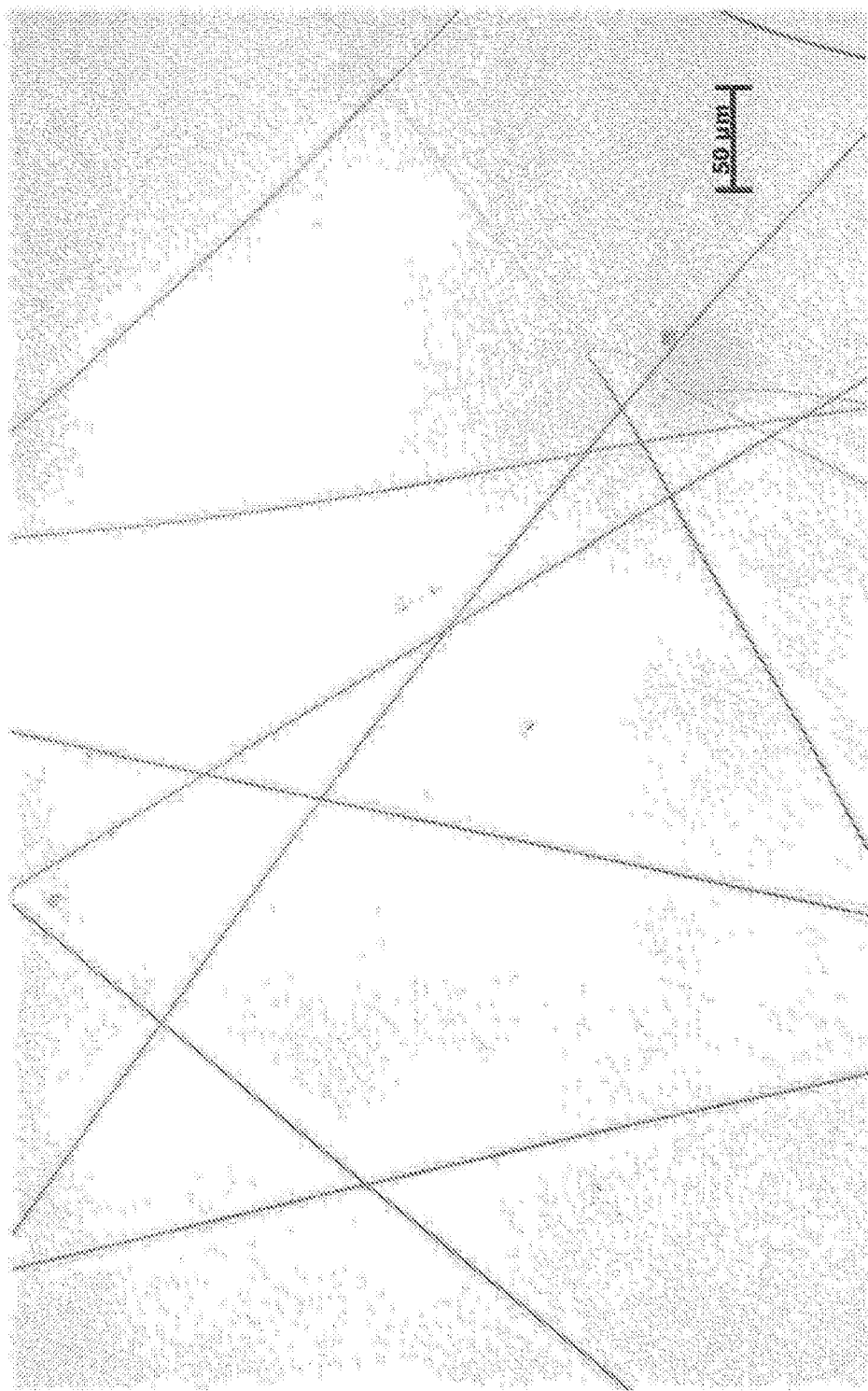


图4(图2.4)从0.8g/mL溶剂的葡聚糖(70kDa)溶液制备的光滑纤维

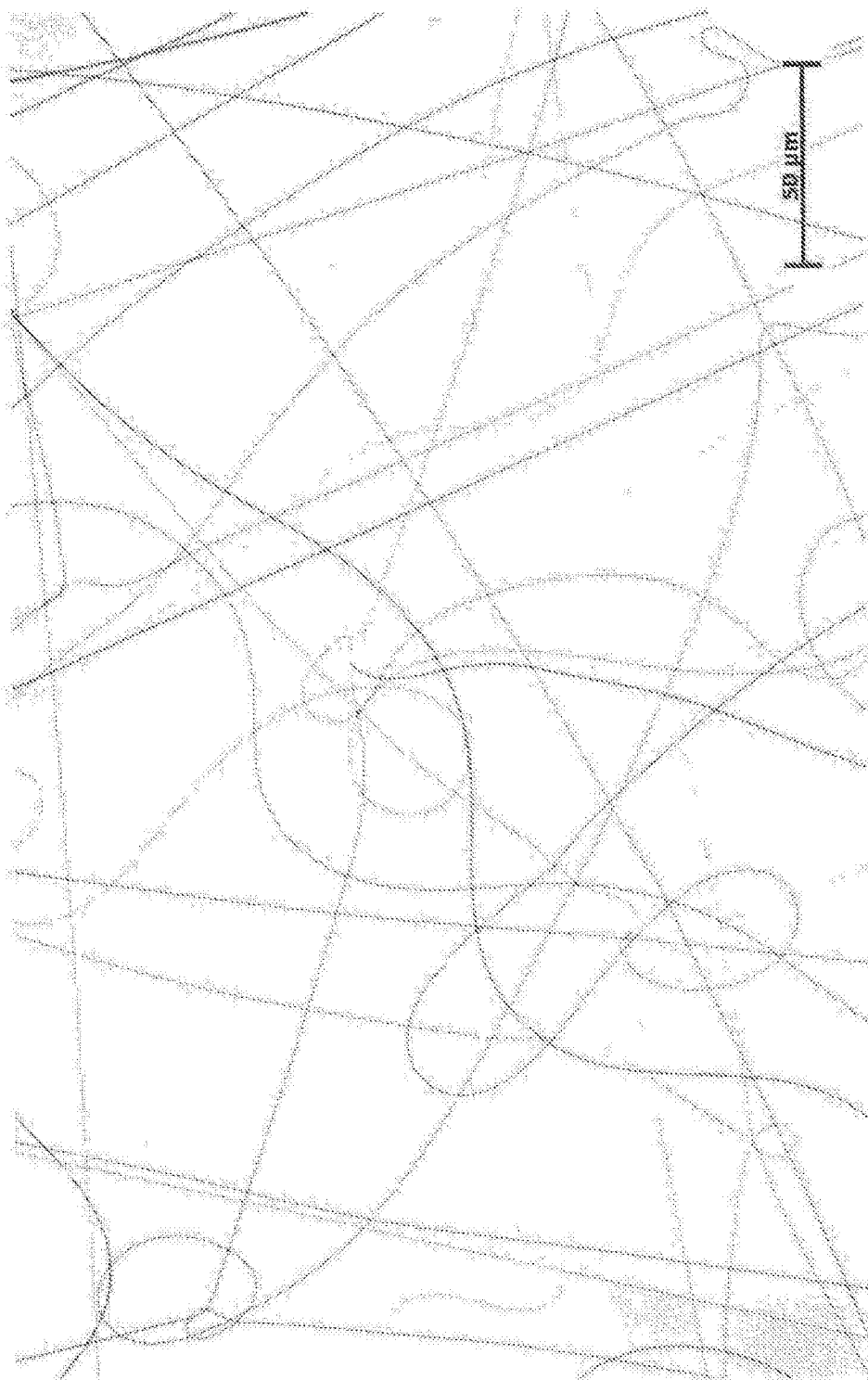


图5图2.5从1.0g/mL的葡聚糖(40kDa)水溶液制备的净葡聚糖电纺纤维的LM图像



图6图2.6从0.6g/mL的葡聚糖(100kDa)水溶液制备的净葡聚糖电纺纤维的LM图像

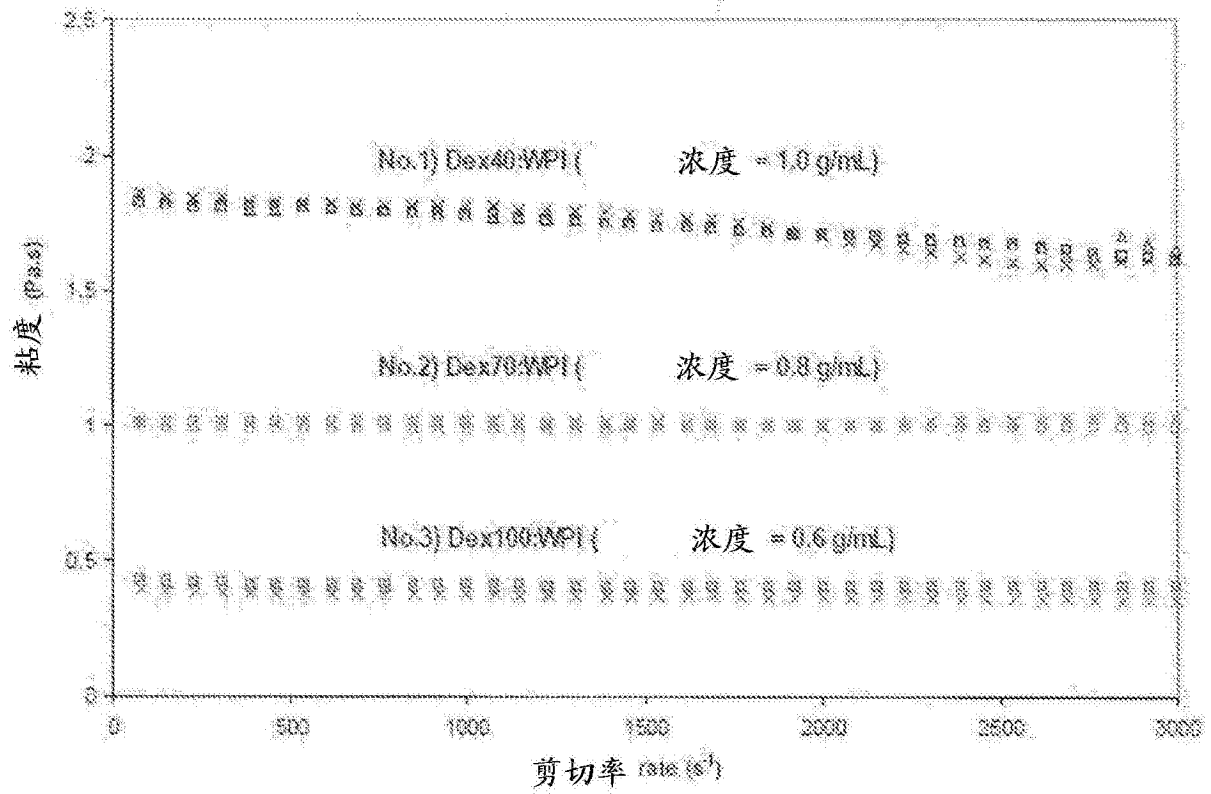
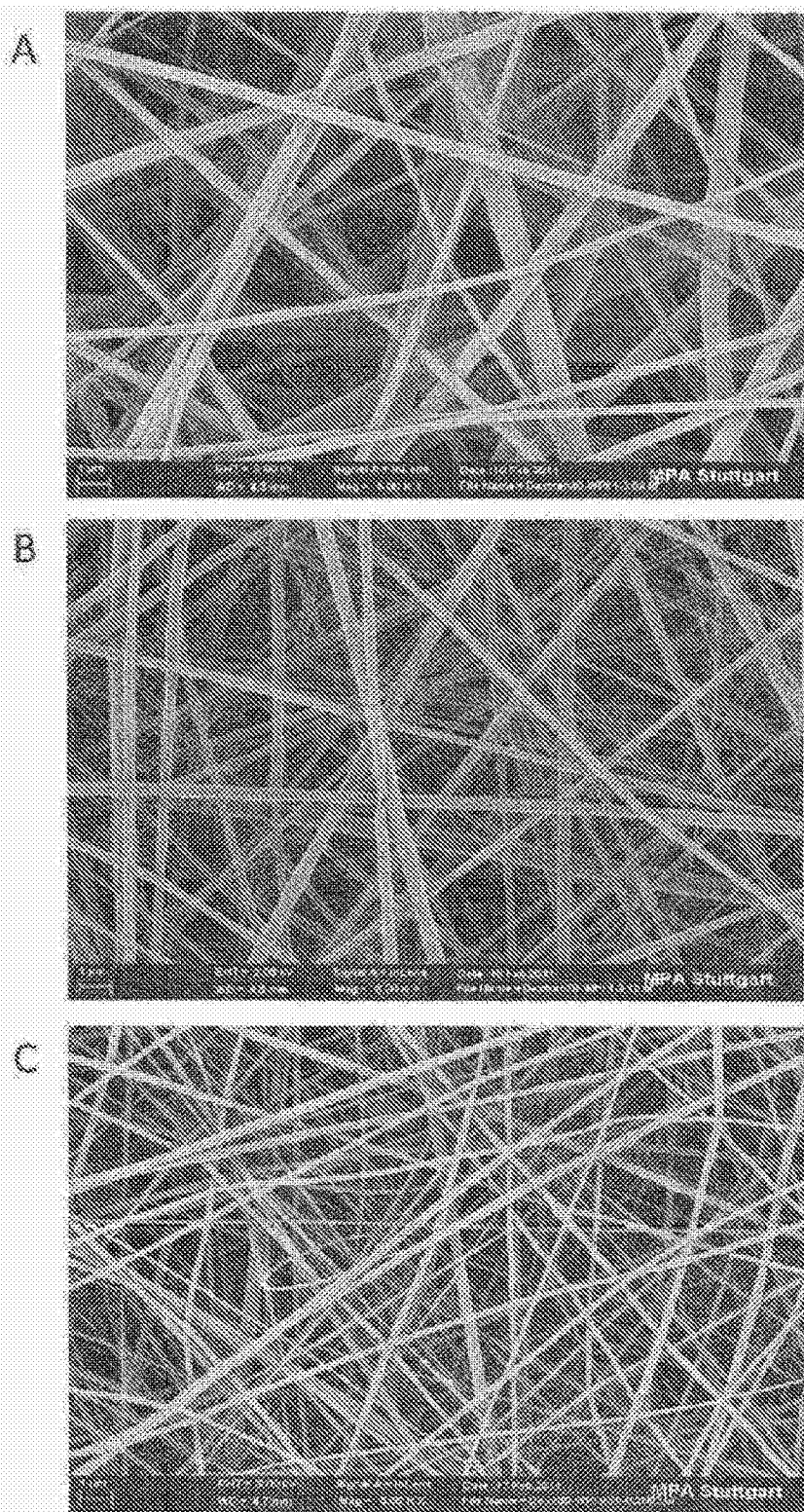
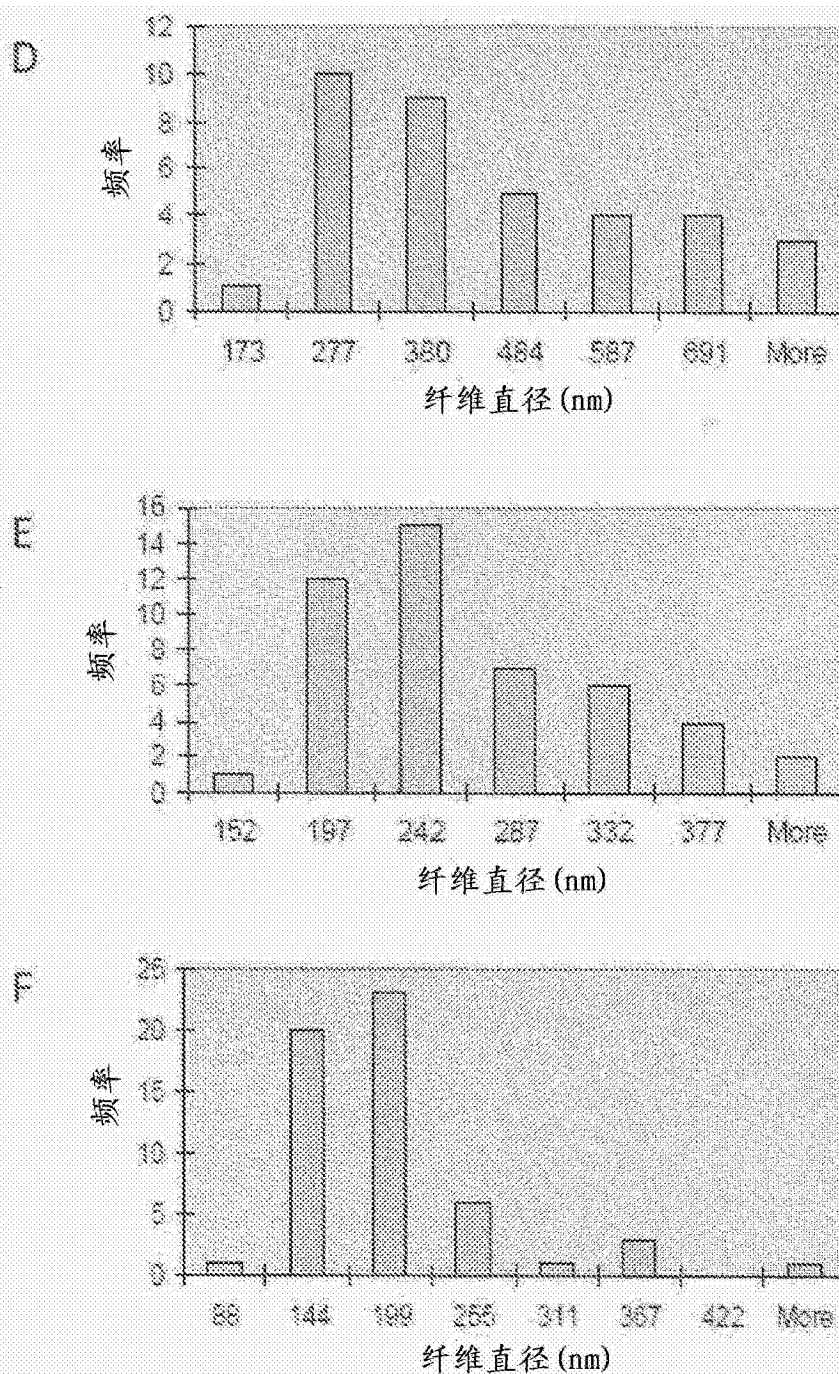


图7图2.7用不同葡糖以最小可电纺浓度制备的葡聚糖-乳清蛋白分离物混合物的粘度



从多种葡聚糖大小:
A) 40kDa; B) 70kDa; c) 100kDa制备的葡聚糖-
乳清蛋白分离物电纺纤维的SEM图像

图S.图8A-C(图2.8A-C)



图A-C中从多种葡聚糖大小
: D) 40kDa; E) 70kDa; F) 100kDa制备的葡聚糖-
乳清蛋白分离物电纺纤维的SEM图像的纤维直径

图8D-F(图2.8D-F)

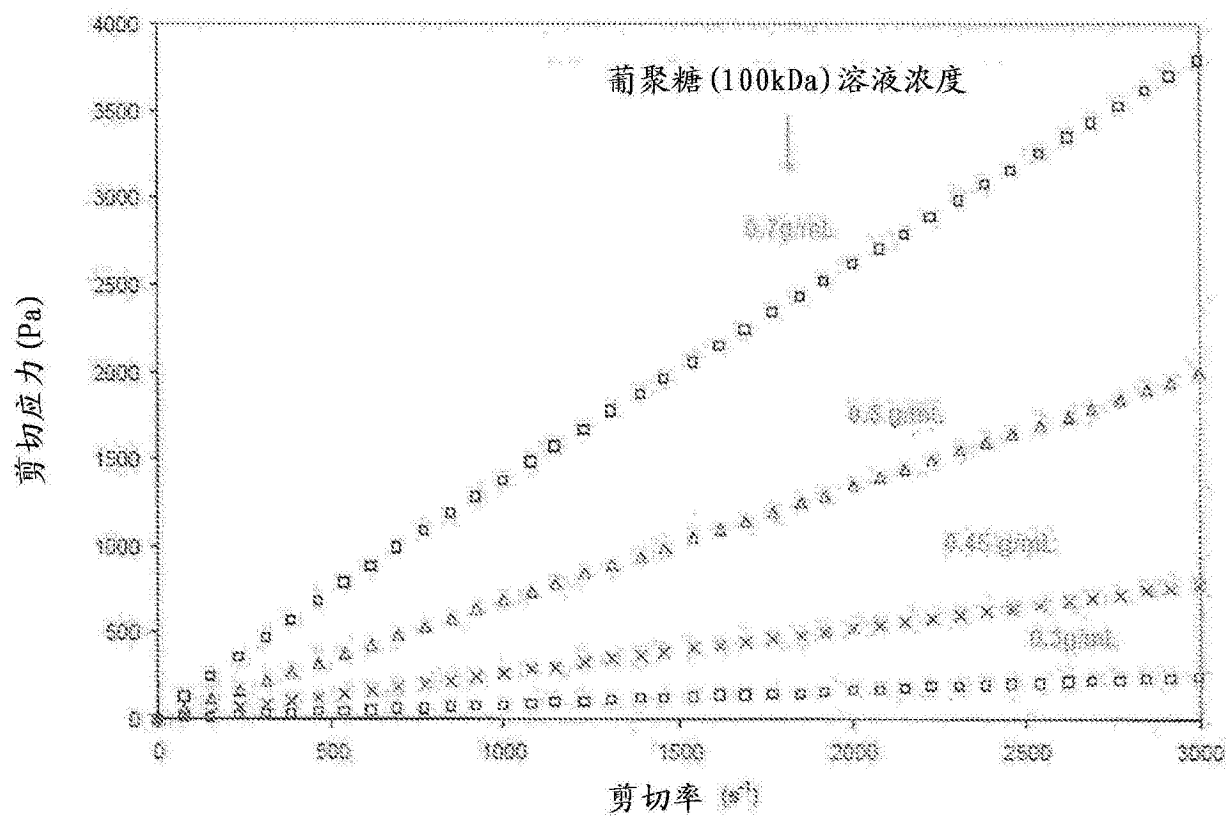


图9(图2.9)不同浓度的葡聚糖水溶液的应力-应变流动曲线

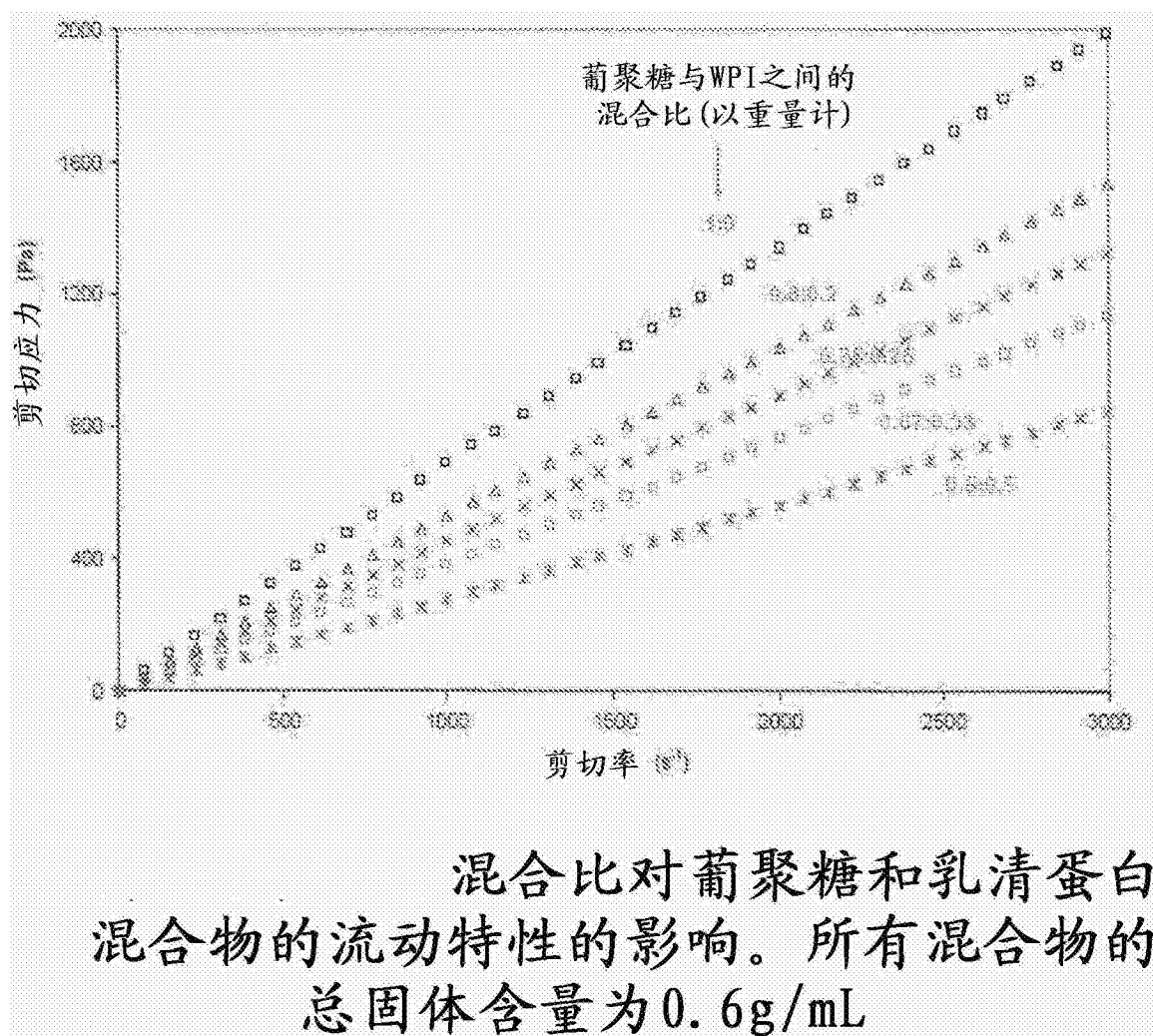


图10(图2.10)

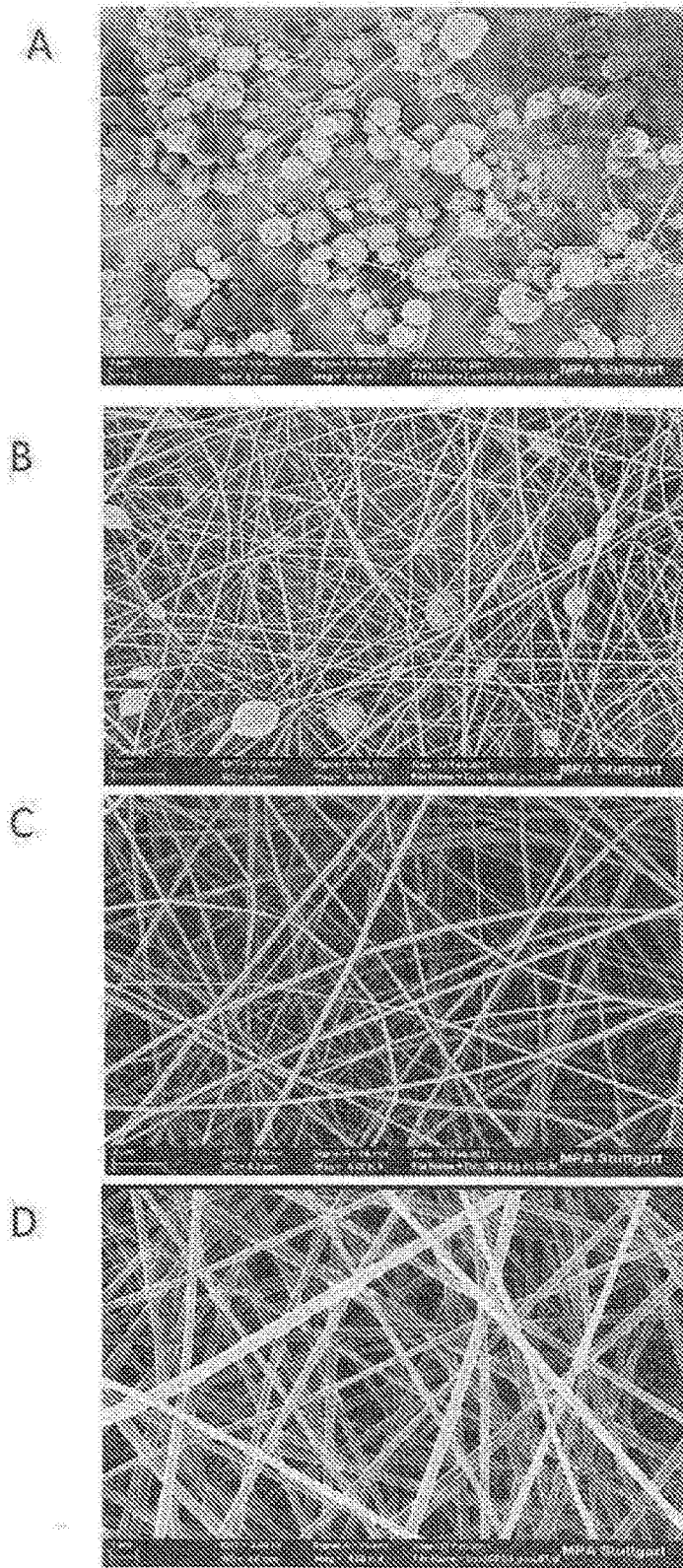


图11A-D

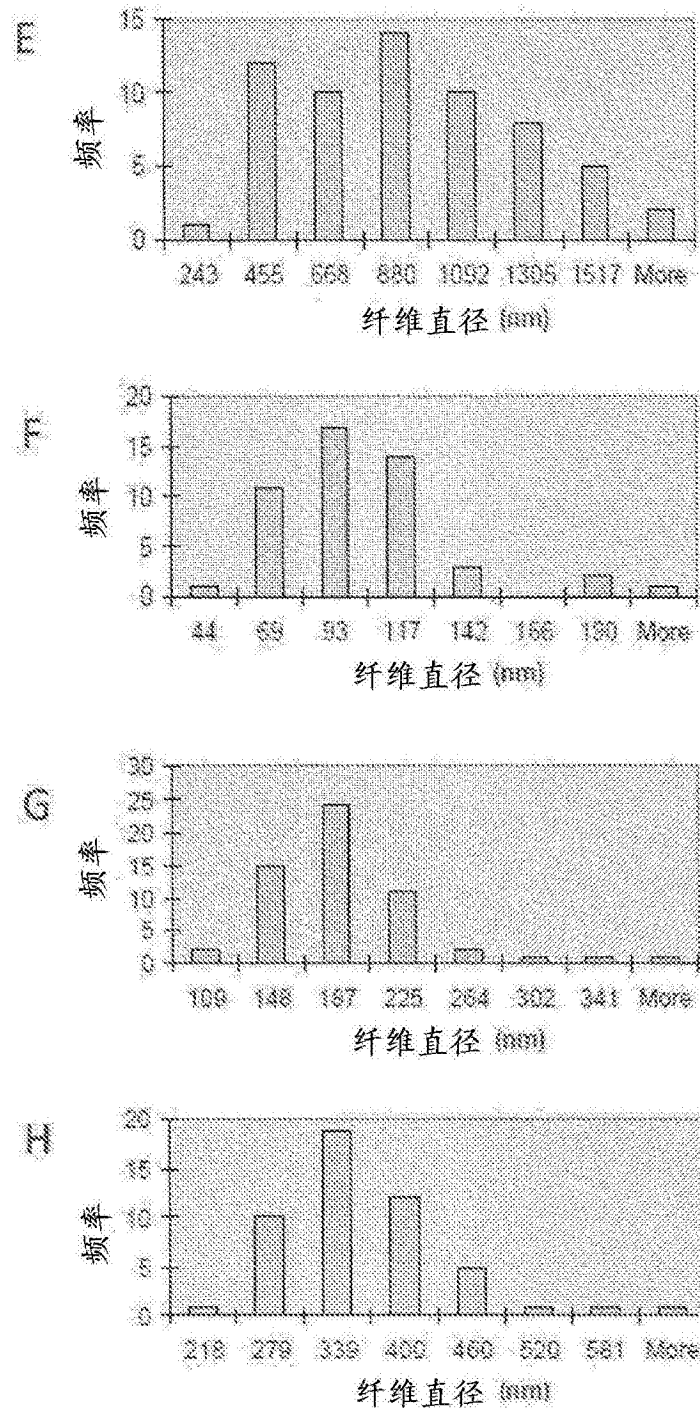


图11A-H(2.11E-H)

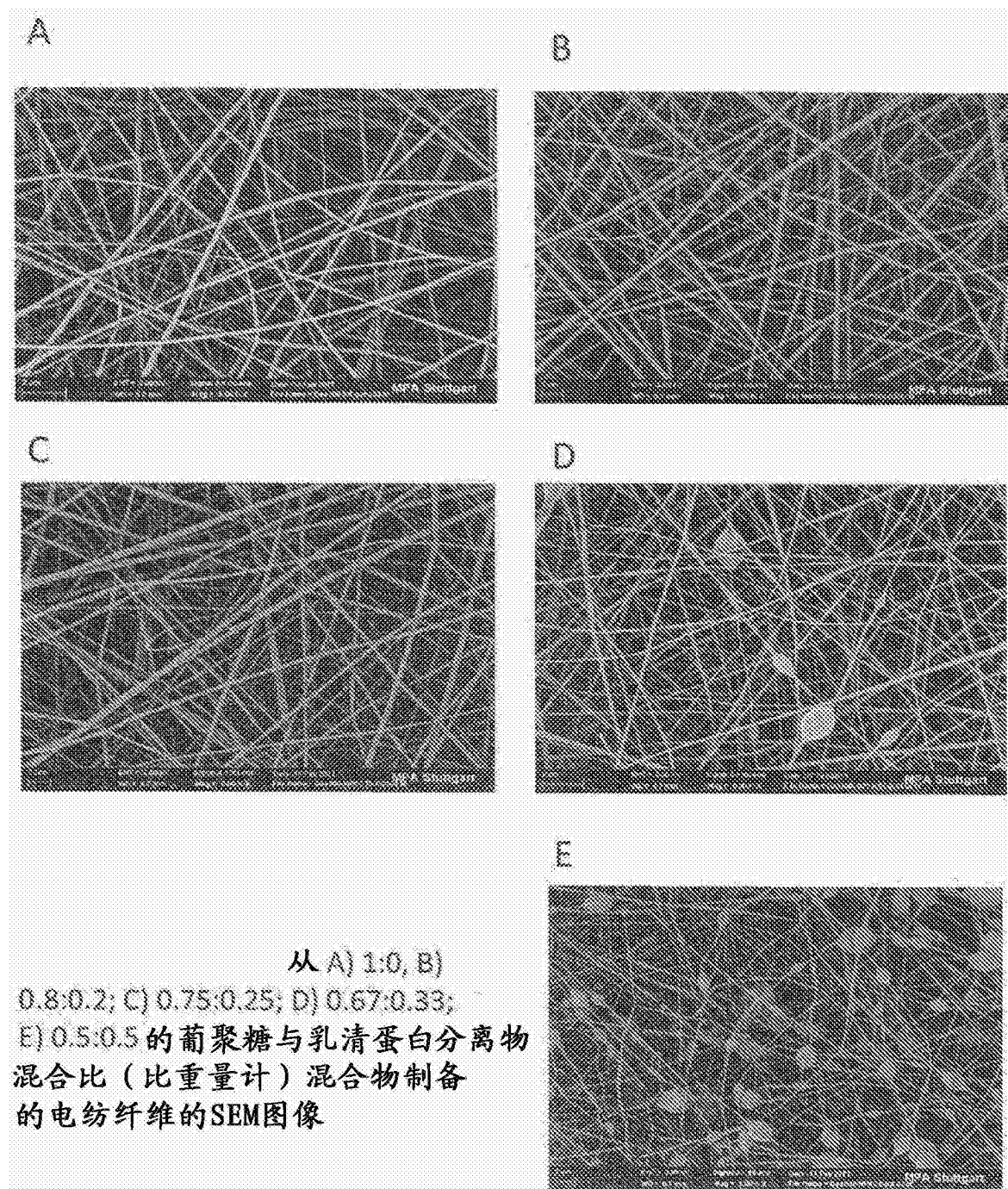


图12A-E 图2.12A-E

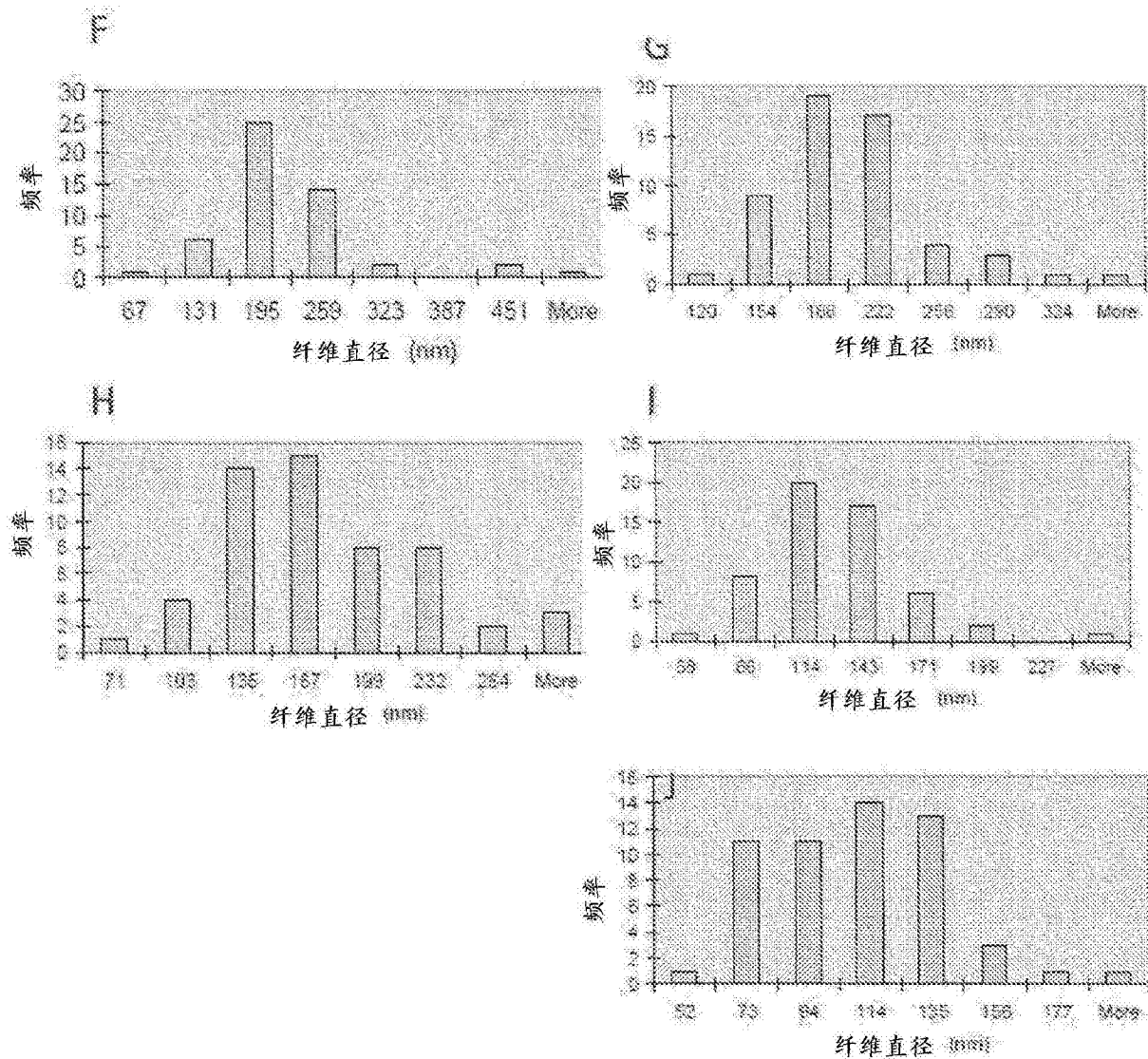


图12F-J(图2.12F-J)

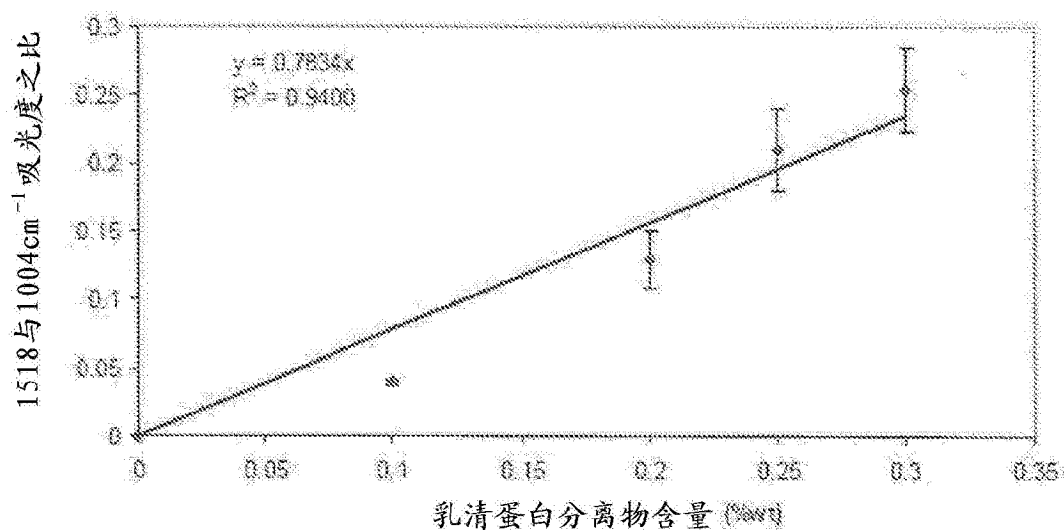
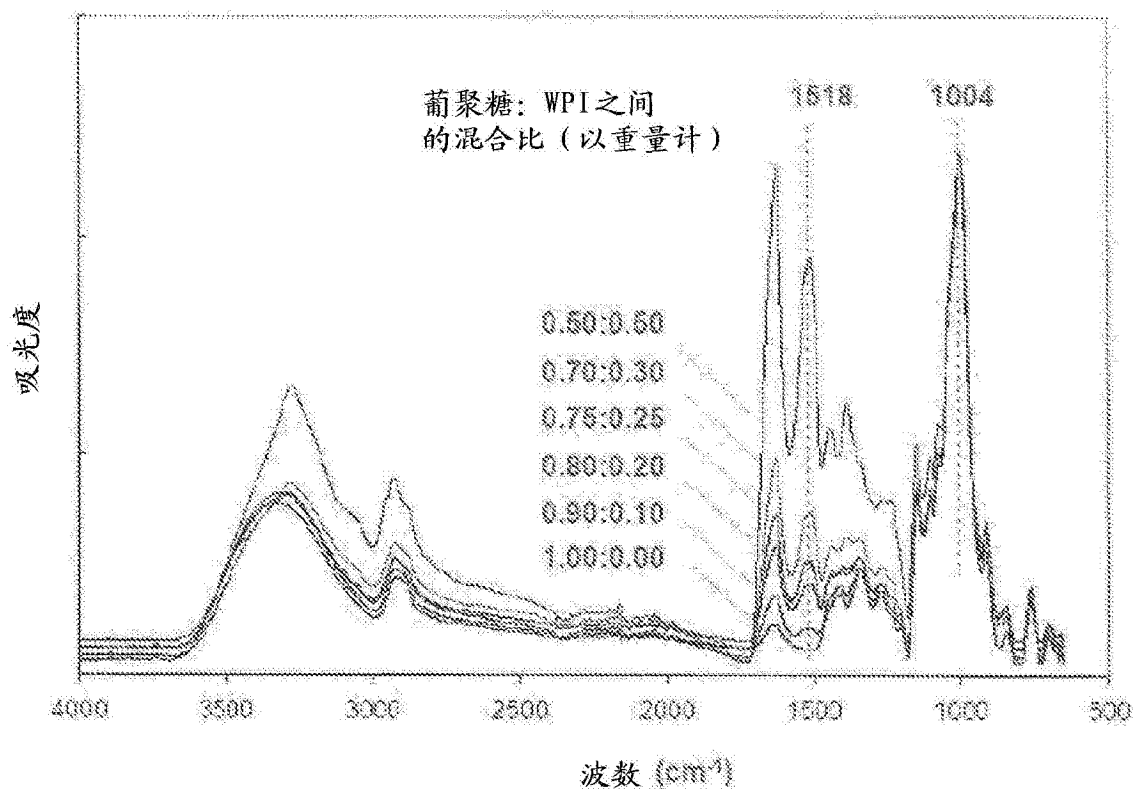


图13A-B(图2.13)

A) 不同混合比的葡聚糖粉末与乳清蛋白分离物粉末之间的混合物的红外光谱

B) 乳清蛋白分离物含量与在 1518cm^{-1} 和 1004cm^{-1} 波数下的峰吸光度之比之间的关系

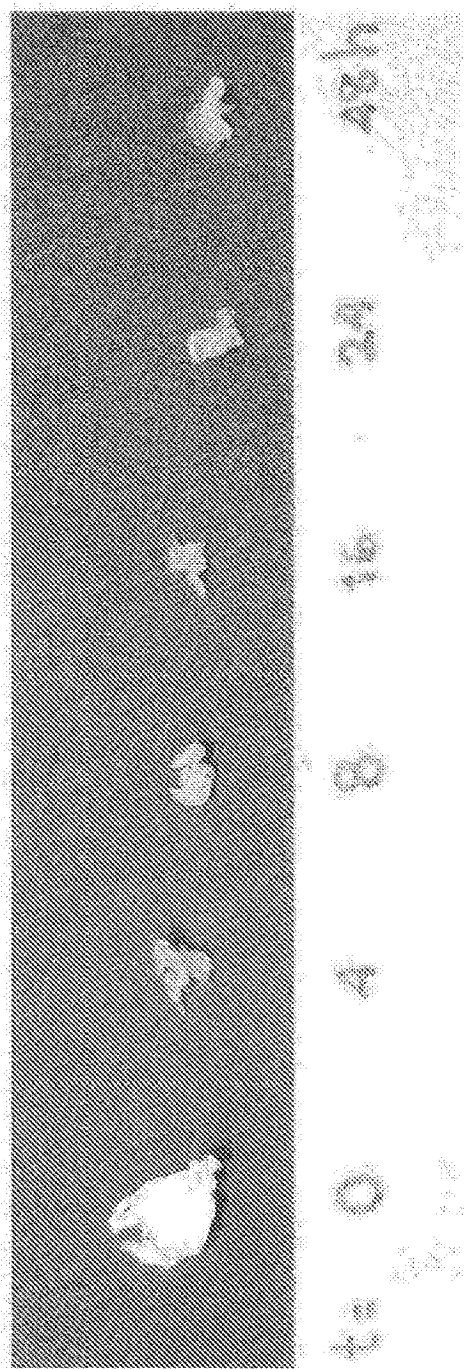


图14(图3.1)于60°C和74%RH退火不同时间的电纺膜的外观

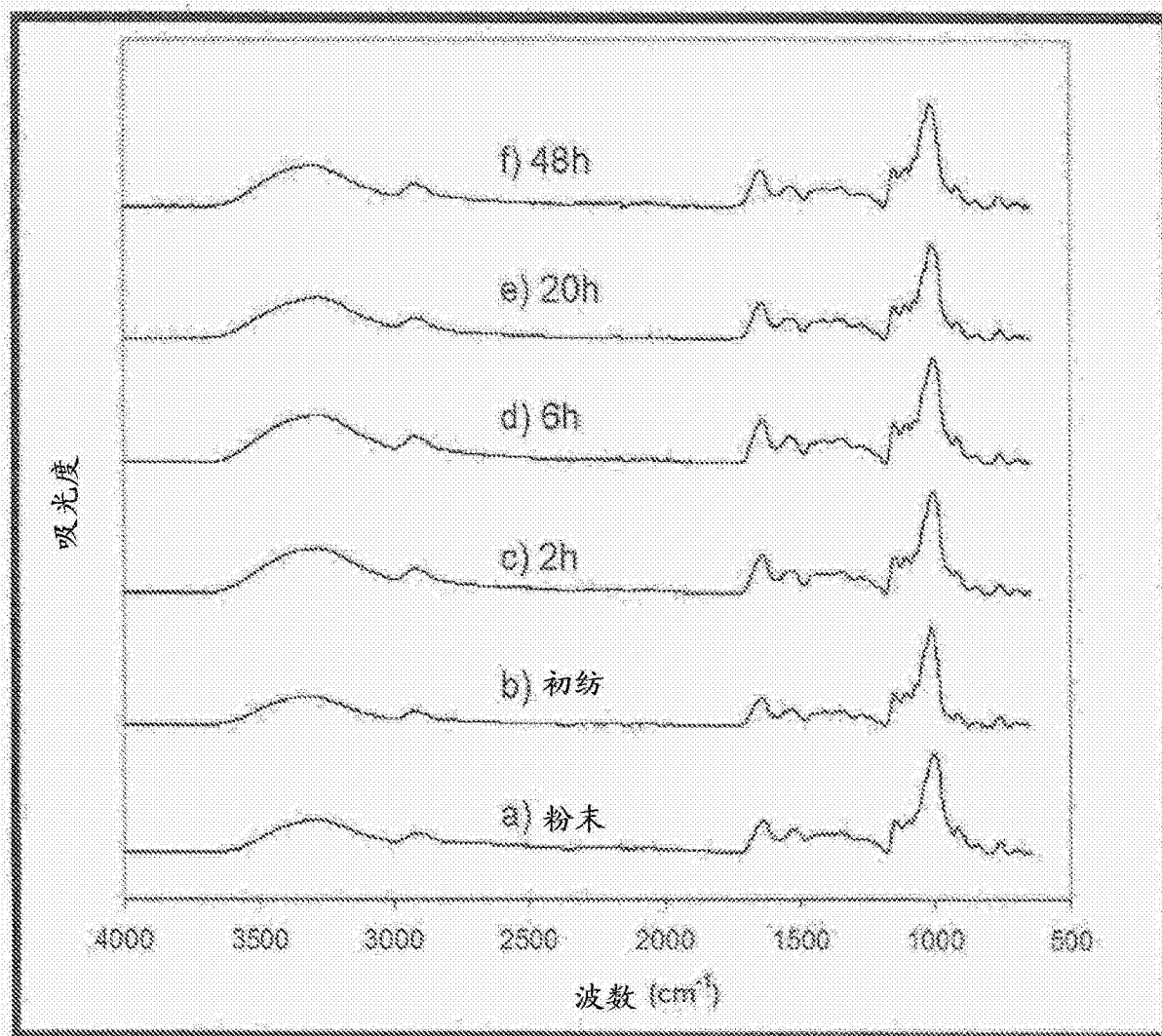


图3.2红外光谱: a) 粉末形式的WPI-葡聚糖; b) 初纺WPI-葡聚糖电纺膜; c)-f) 分别于60℃和74%RH退火2、6、20和48小时后的WPI-葡聚糖电纺膜

图15

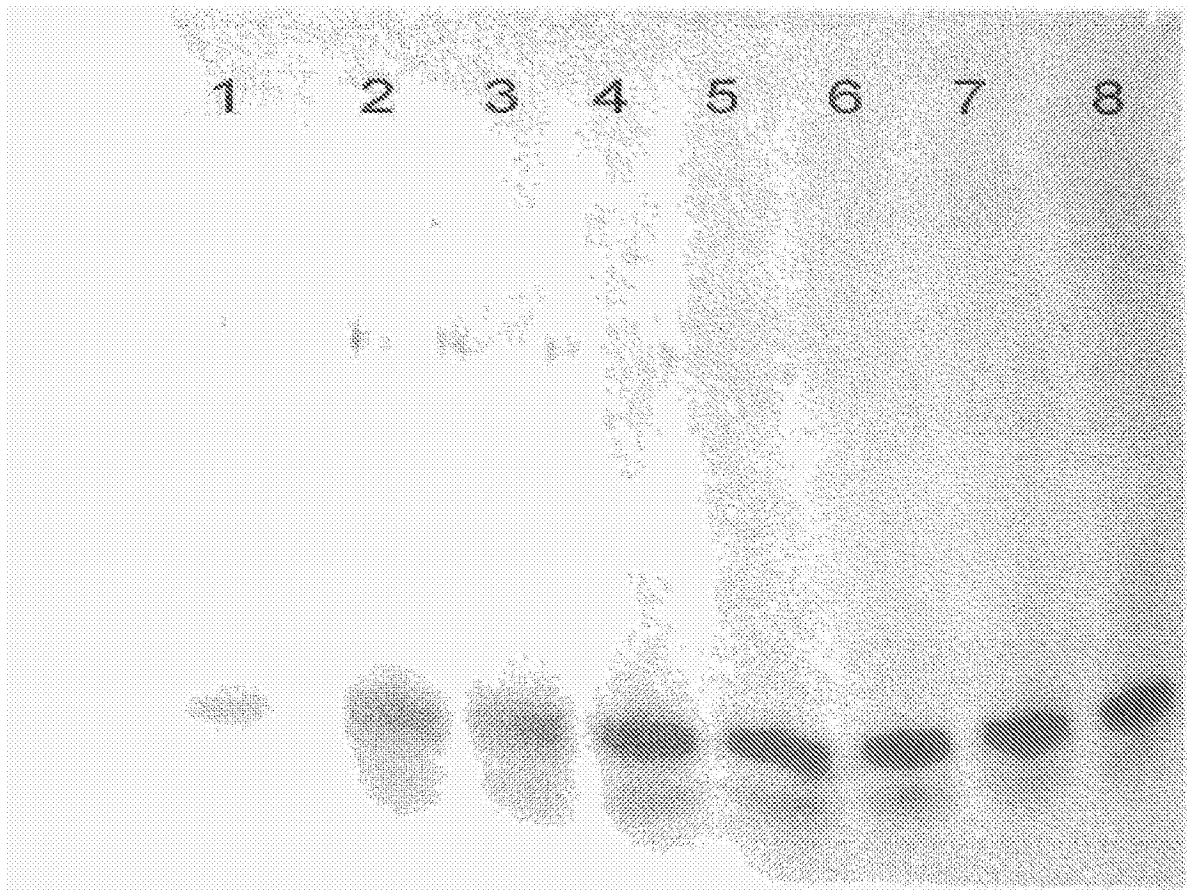


图3. 3退火时间对在2-巯基乙醇存在下WPI-葡聚糖缀合物的SDS-PAGE谱的影响。泳道1: WPI溶液; 泳道2-8: 分别于60℃ 74%RH退火0、2、4、6、8、16、24和48小时的电纺WPI-葡聚糖(40kPa)膜

图16

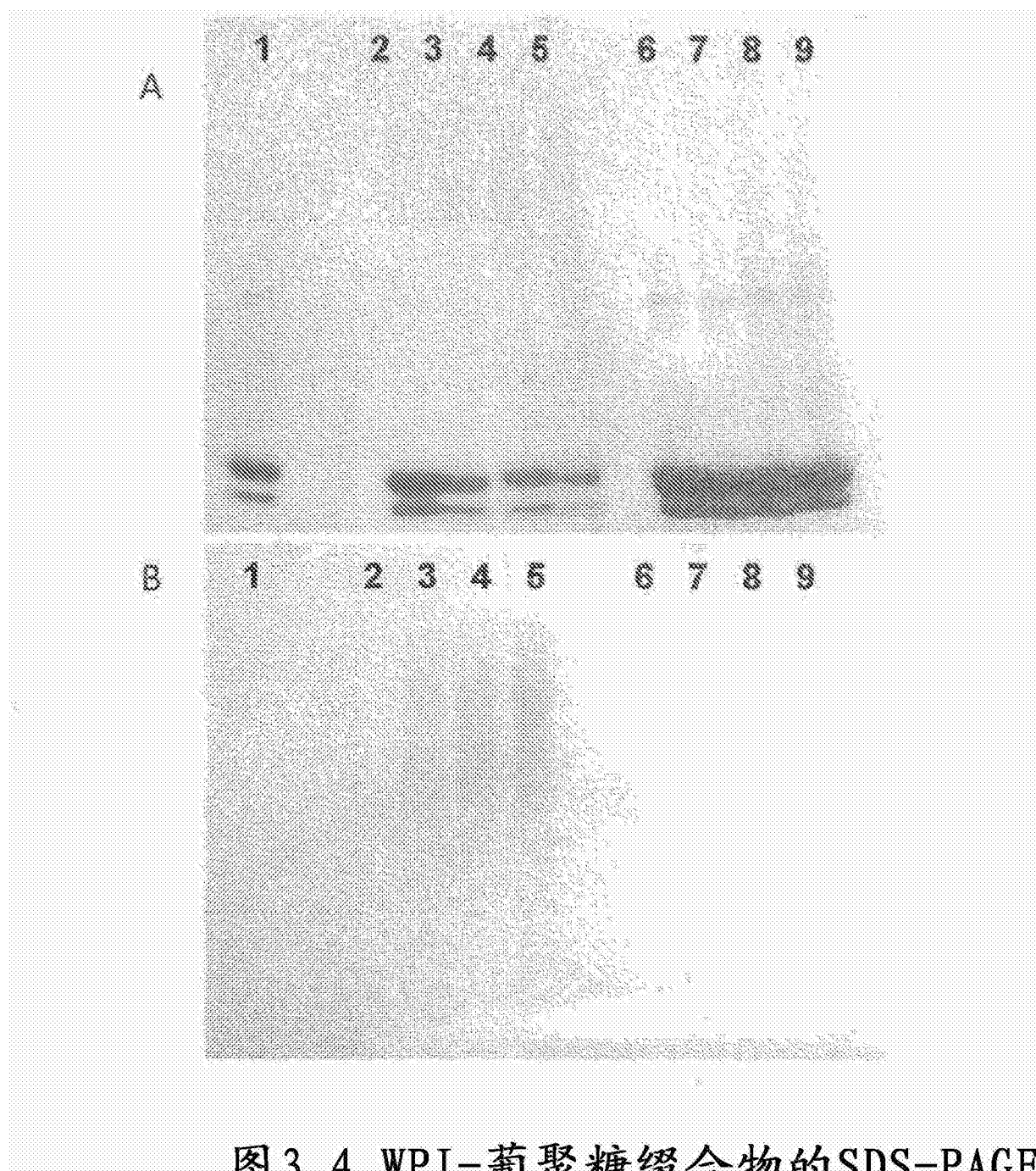
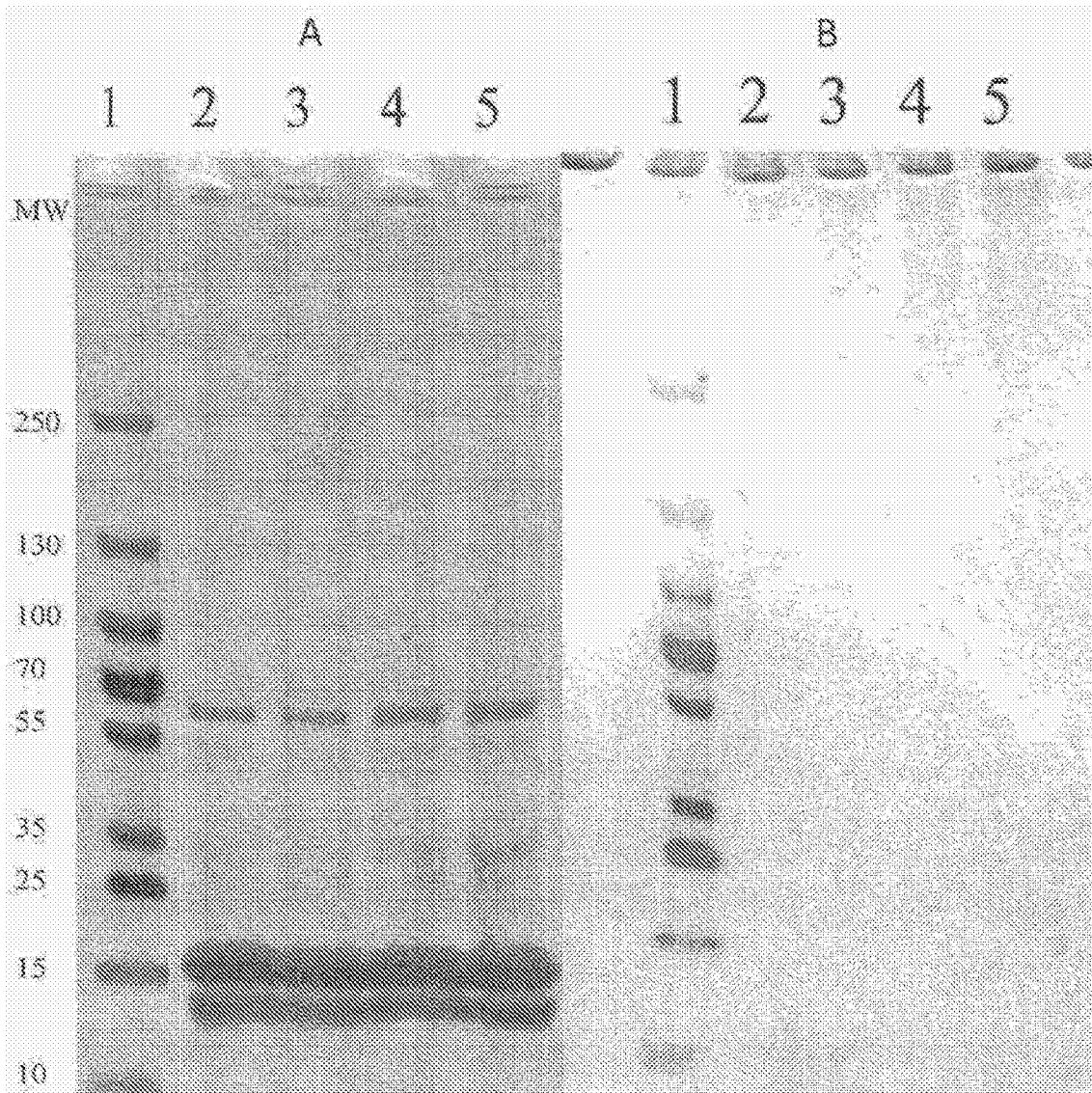


图3.4 WPI-葡聚糖缀合物的SDS-PAGE谱。(A) 蛋白质染色。(B) 糖蛋白染色。泳道1: WPI-葡聚糖 (40kDa) 膜; 泳道6-9: 分别于0、8、16和24小时的WPI-葡聚糖 (100kDa) 膜

图17A-B



所有电纺膜中葡聚糖与WPI之间的重量比为3:1。泳道1: 蛋白质梯; 泳道2-5: 分别于0、8、16和24小时于60℃RH退火的电纺膜

图18A-B

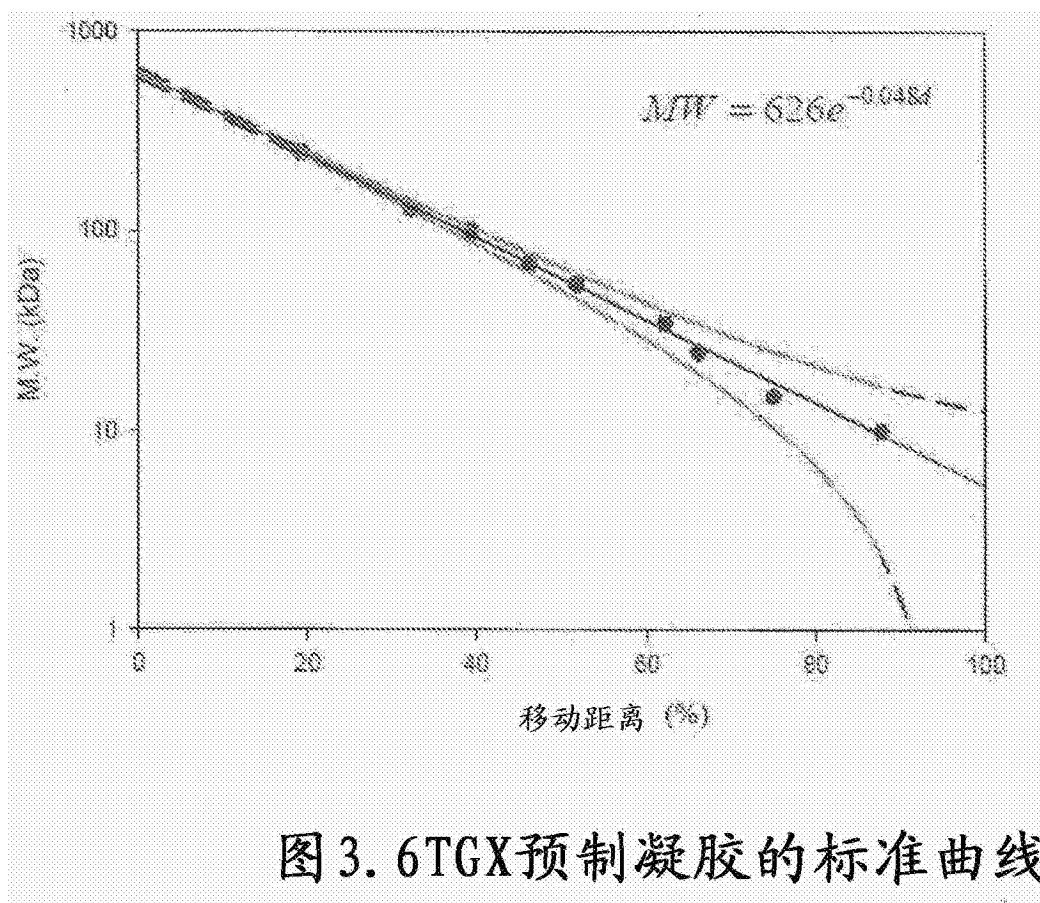
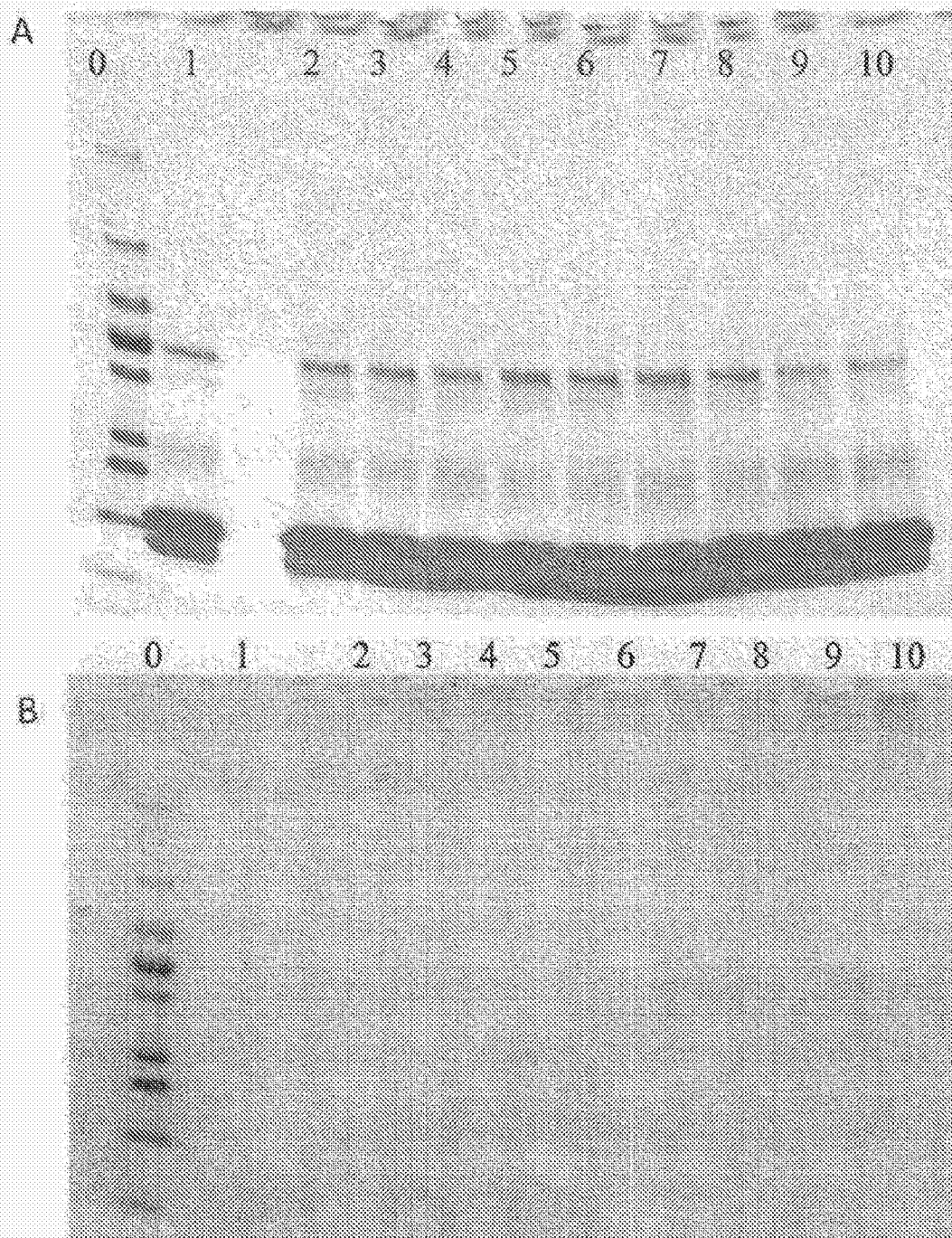


图3. 6TGX预制凝胶的标准曲线

图19



泳道1: 初纺膜; 泳道2-10: 于60℃但不同相对湿度退火的电纺膜:
泳道2-4=0%RH; 泳道5-7=44%RH; 泳道8-10=74%RH。退火时间为
8小时: 泳道2、5和8; 16小时: 泳道3、6和9; 16小时; 和24小时:
泳道4、7和10。泳道0是标准蛋白质梯。

图20A-B

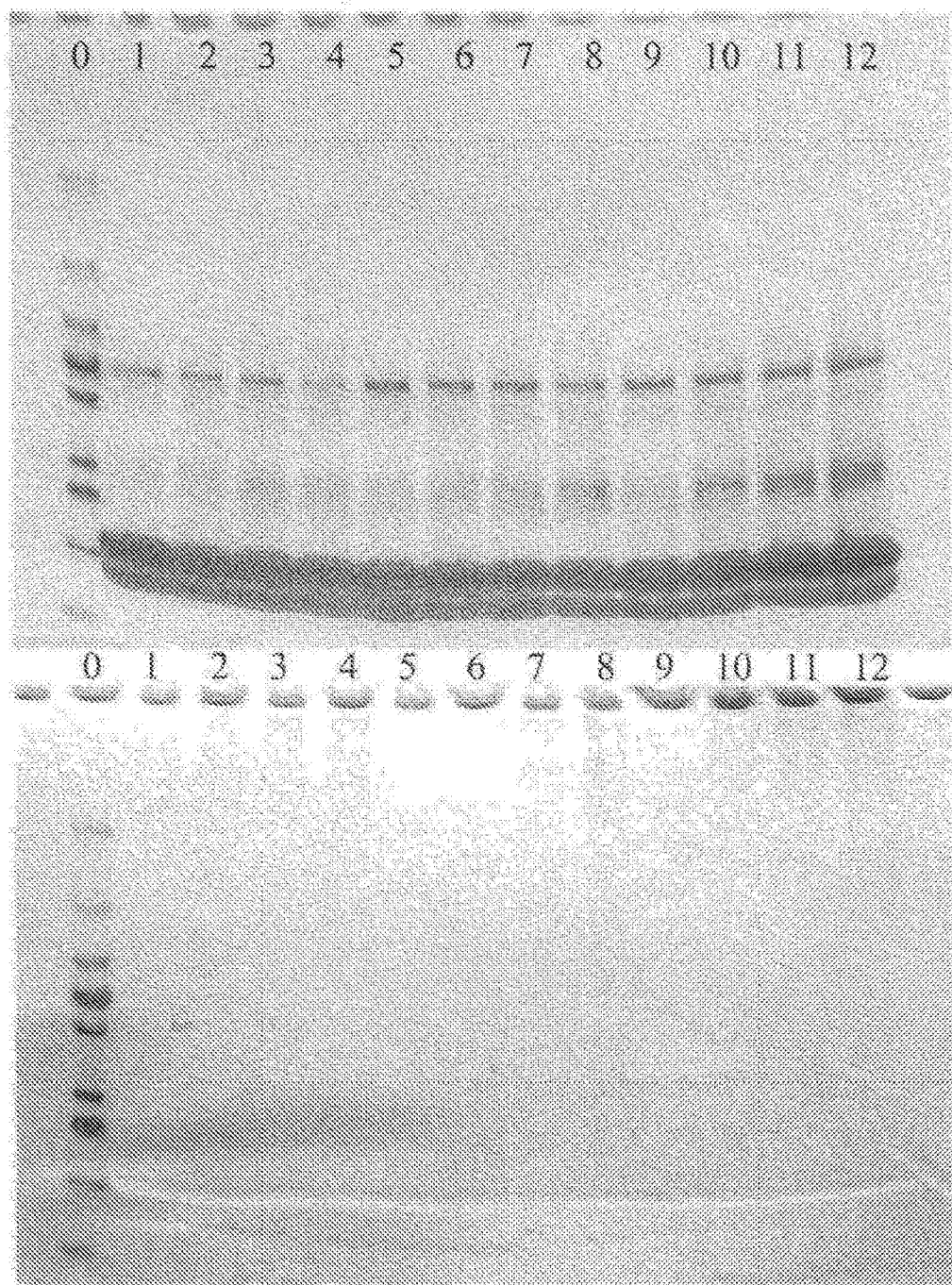


图21A和B

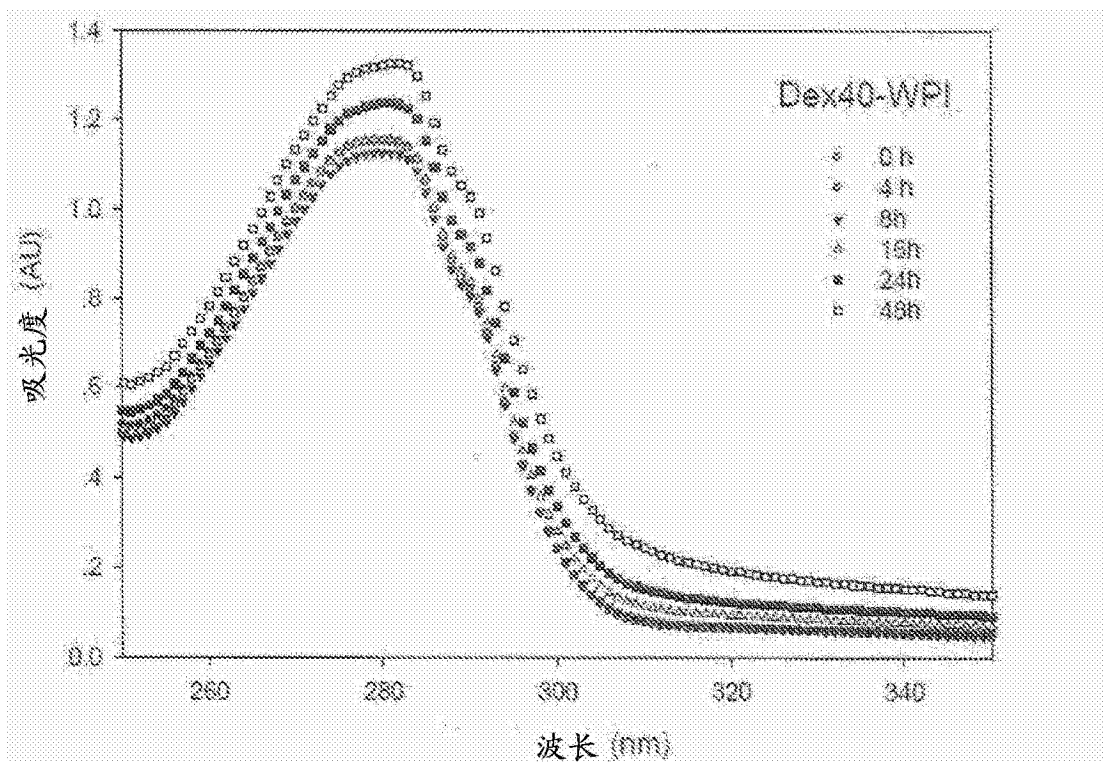


图3. 9从WPI和葡聚糖40kDa混合物制备、以不同退火时间于60℃和74%RH退火的电纺样品的紫外吸收光谱

图22A

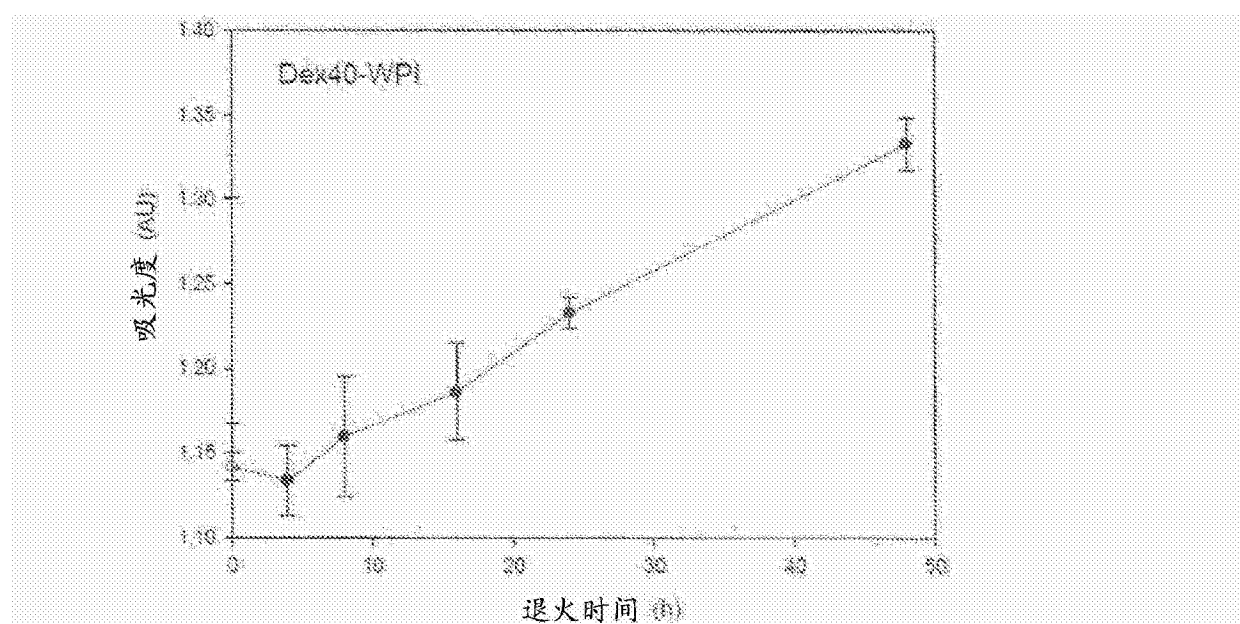


图3.10从WPI和葡聚糖40kDa混合物制备的电纺样品于282nm的吸光度峰与退火时间之间的关系

图22B

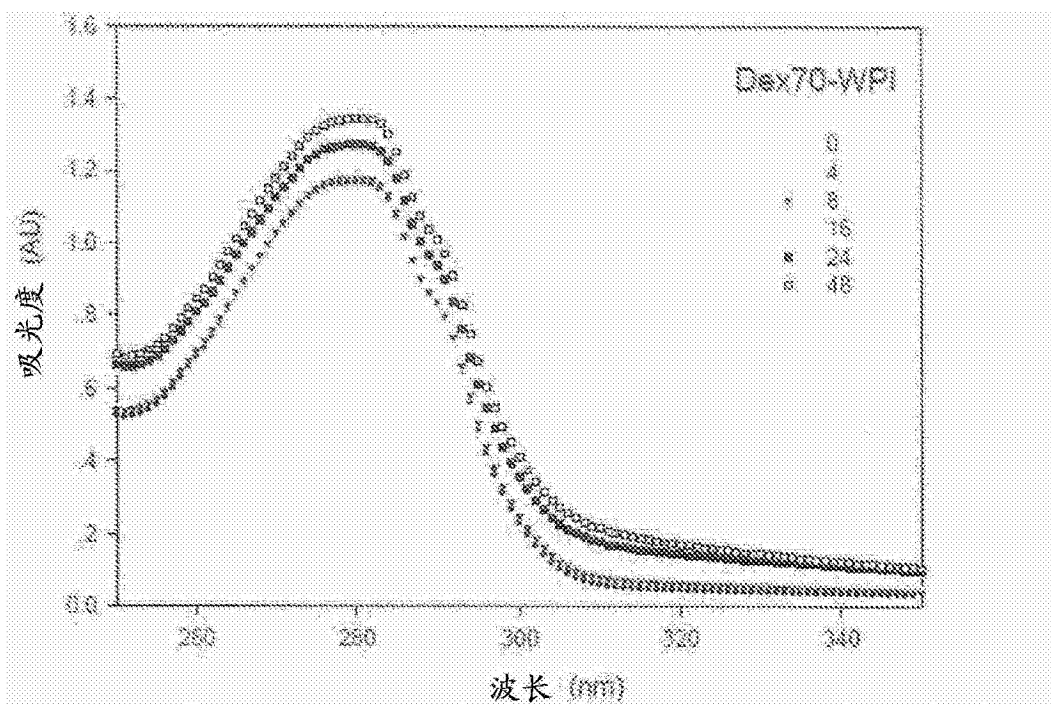


图3.11从WPI和葡聚糖70kDa混合物制备、以不同退火时间于60℃和74%RH退火的电纺样品的紫外吸收光谱

图23A

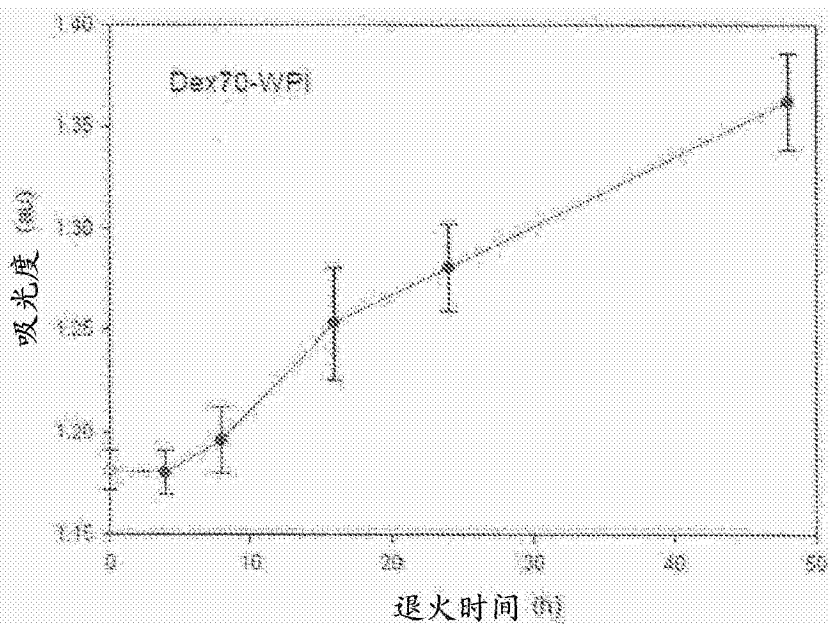


图3.12 从WPI和葡聚糖70kDa混合物制备的电纺样品于282nm的吸光度峰与退火时间之间的关系

图23B

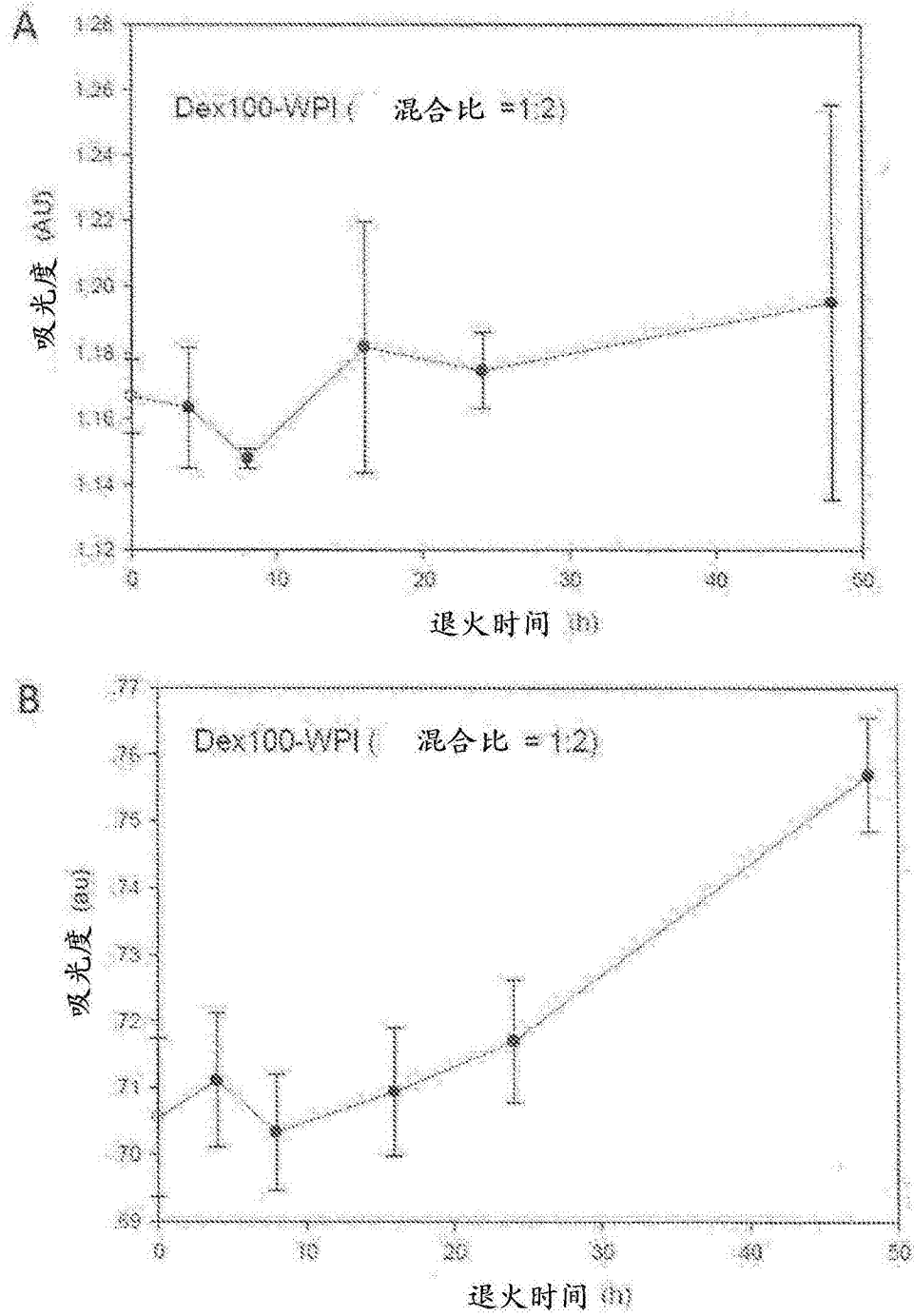


图24 图3.13溶液浓度对从WPI和葡聚糖100kDa混合物制备的电纺样品的紫外吸光度的影响。图24A是5mg/mL而图24B是3mg/mL。

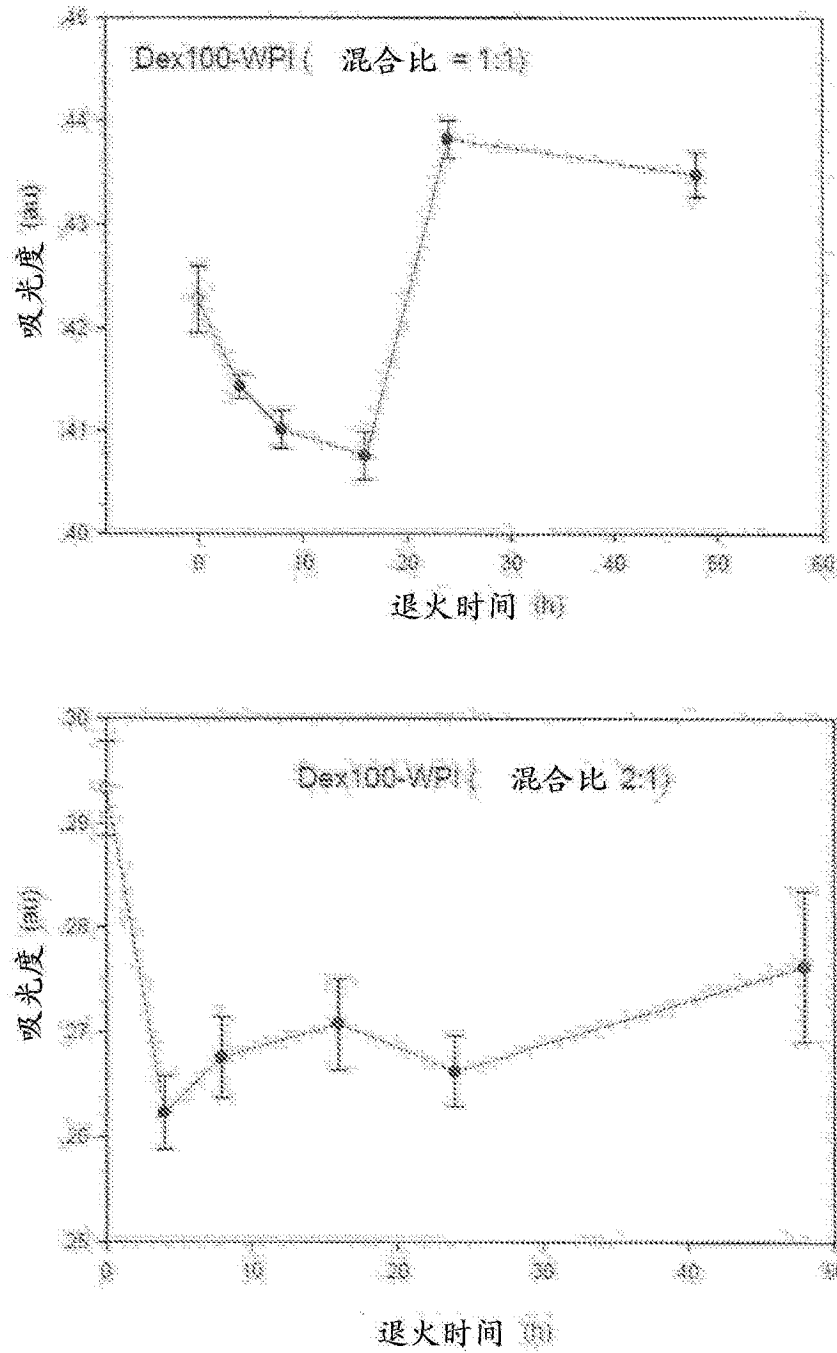


图25A和B 图3.15从1:1(图25A)和2:1(图25B)混合比的WPI和葡聚糖100kDa混合物制备的电纺样品于282nm的吸光度峰

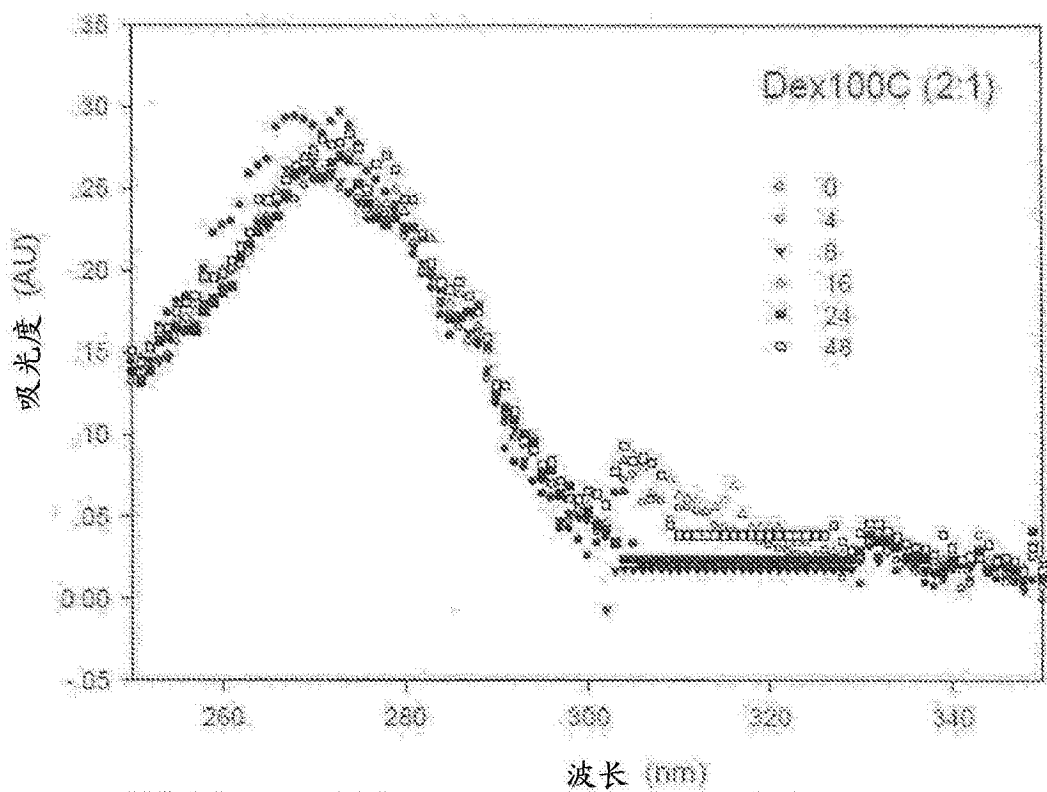


图26 图3.16从2:1混合比的葡聚糖100kDa和WPI混合物制备的电纺样品的紫外吸收光谱

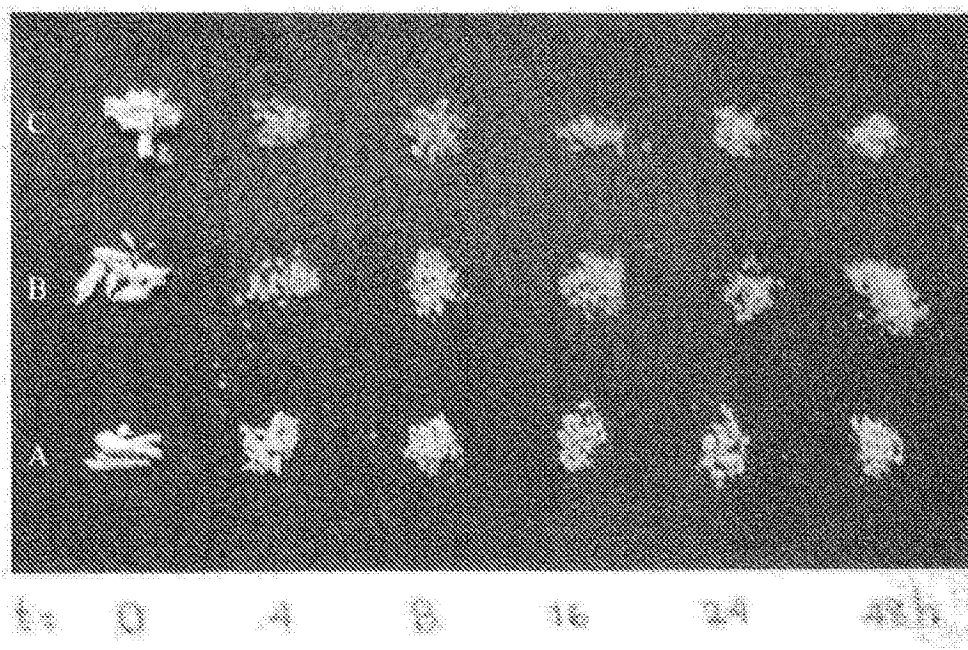


图27 图3.17从不同混合比:A)1:2;B)1:1;和c)2:1(葡聚糖与WPI之间的混合比)的WPI和葡聚糖100kDa制备的电纺膜的外观

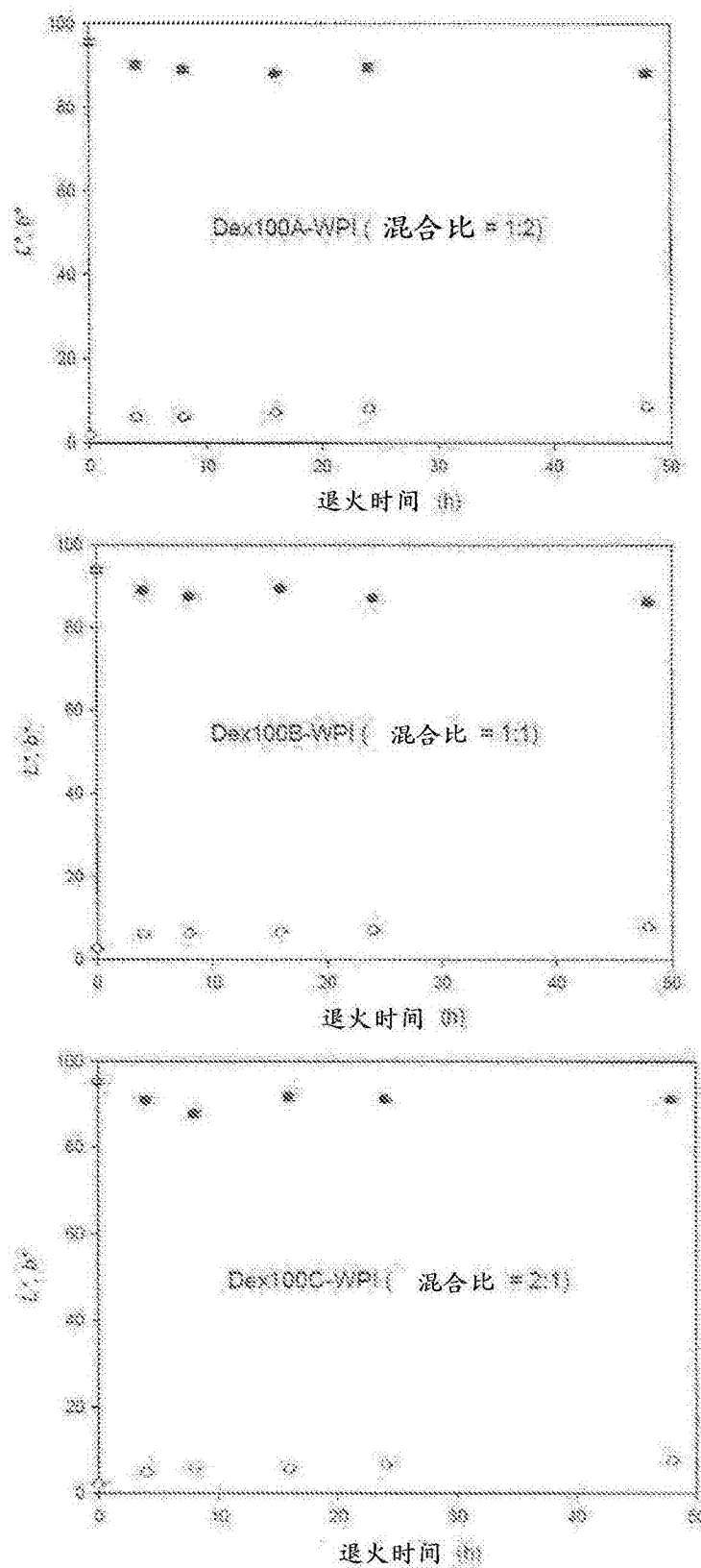


图28A-C 图3.18使用比色计测量的电纺膜的亮度(实心圆圈)和黄度(空心圆圈)

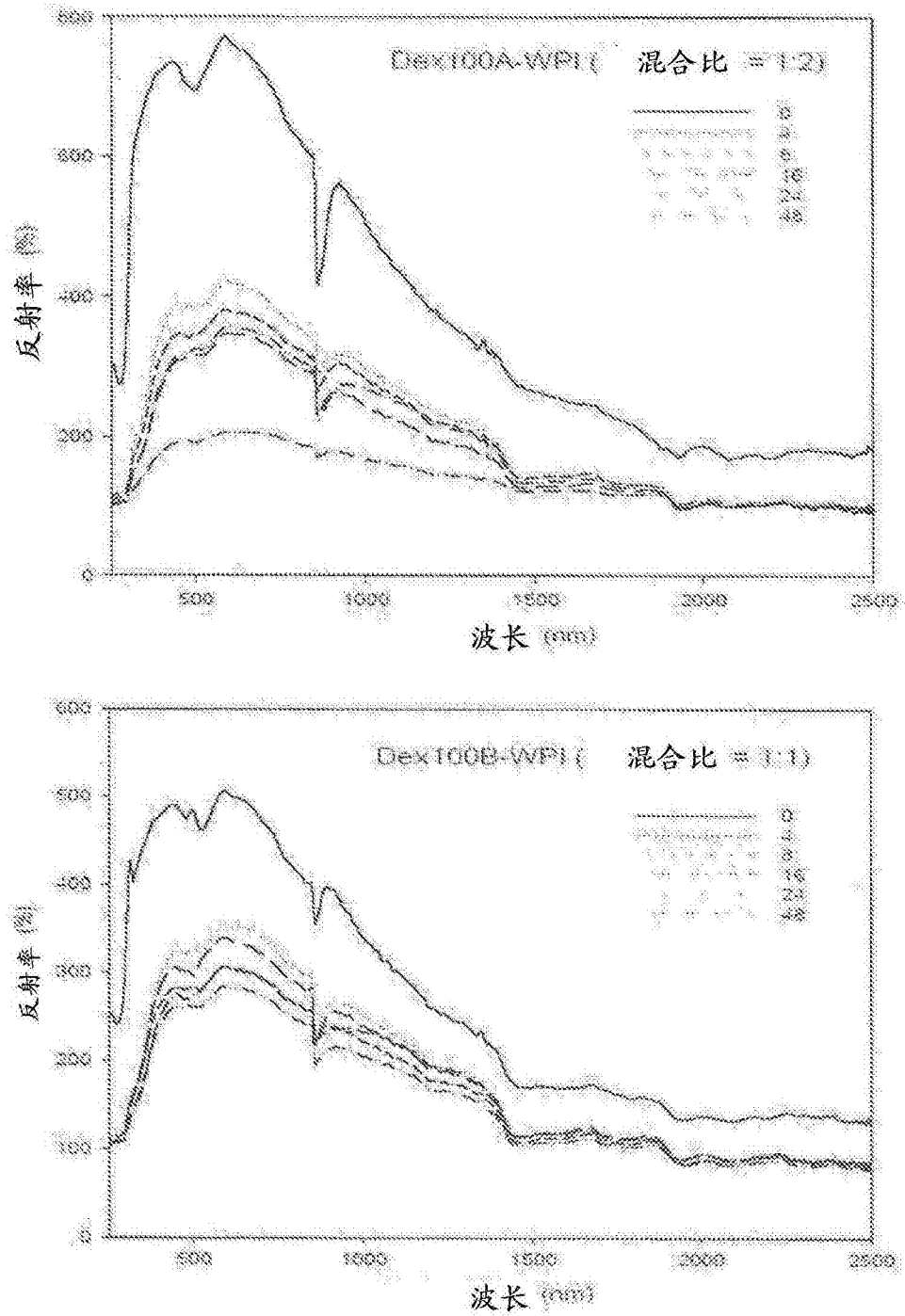


图29A-B 图3.19电纺膜(WPI-葡聚糖100kDa)的近红外光谱