低温微滤处理对牛乳组成、胶束结构及凝乳性质的影响

张媛，李珺珂，周鹏，刘小鸣，赵建新，张灏，陈卫
（江南大学食品学院，江苏无锡 214122）

摘要：β-酪蛋白具有低温溶出的特性。本文通过低温微滤处理制备了β-酪蛋白脱除率为 10、20、30%的牛乳，运用 HPLC、场发射扫描电镜、流变仪以及激光共聚焦研究了这些牛乳的蛋白组分、酪蛋白胶束结构及凝乳性质变化。结果表明：脱脂乳与低温微滤处理得到的牛乳样品的脂肪含量，总钙含量及 pH 值无显著性差异，但总蛋白含量有显著性差异，其中 κ-酪蛋白和 α_{s2}-酪蛋白浓度无差异，α_{s1}-酪蛋白浓度有显著差异，但低温处理样品间 α_{s1}-酪蛋白浓度则无差异，β-酪蛋白及乳清蛋白浓度差异极显著，其浓度随处理时间增加显著减小。脱脂乳与牛乳样品均可形成致密的具有空隙的凝胶结构，且其酸凝乳及酶凝乳所表现的流变学变化趋势相似，但随着β-酪蛋白脱除率升高，表征凝乳块硬度的最大 G'逐渐下降，凝胶结构逐渐变疏松，出现的孔隙则更大更多。

关键字：低温微滤；牛乳；酪蛋白胶束；β-酪蛋白；凝乳
文章篇号：1673-9078(2017)7-90-96 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.7.014

Effect of Low Temperature Microfiltration on the Composition, Micellar Structure, and Coagulation Properties of Bovine Milk

ZHANG Yuan, LI Jun-ke, ZHOU Peng, LIU Xiao-ming, ZHAO Jian-xin, ZHANG Hao, CHEN Wei
(Jiangnan University School of Food Science and Technology, Wuxi 214122, China)

Abstract: β-Casein (β-CN) dissociates from milk during low-temperature treatment. Skim milk was subjected to low-temperature microfiltration to obtain milk samples with β-CN removal ratios of 10, 20, or 30%. High-performance liquid chromatography (HPLC), field emission scanning electron microscopy, rheometry, and laser scanning confocal microscopy were used to study the changes in protein composition, CN micellar structure, and coagulation properties of these milk samples. The results showed no significant differences between skim milk and the milk sample treated with low-temperature microfiltration in fat content, total calcium content, and pH value, but significant differences were found in total protein content. Among proteins, no difference was found in κ-CN and α_{s2}-CN concentrations, and significant differences were found for α_{s1}-CN concentrations. However, although no difference was found in α_{s1}-CN concentration among the samples treated by low-temperature microfiltration, highly significant differences were found in the concentrations of β-CN and whey protein, and these were significantly decreased with increasing processing time. Both skim milk and treated milk samples could form a compact and porous gel structure, and the trend in the rheological changes of the coagulations induced by glucono-delta-lactone (GDL) and GDL combined with chymosin were similar. However, with increasing β-CN removal ratio, the maximum G′ characterizing the hardness of curds gradually decreased, the curd structure gradually became loose, and more pores with a larger size appeared.

Key words: low temperature microfiltration, bovine milk, casein micelle, β-casein, coagulation

牛乳含 3.4%左右的乳蛋白，其中 80%为酪蛋白。酪蛋白分为 4 种，分别是 κ-酪蛋白、α_{s1}-酪蛋白、α_{s2}-酪蛋白和 β-酪蛋白。牛乳中四种酪蛋白比例约为 1:4:1:4[1~3]，且并不以单体形式存在，而是 α_{s1}-酪蛋白，α_{s2}-酪蛋白，β-酪蛋白通过分子间作用力聚集，再通过胶体磷酸钙（CCP）将这些聚集体连接起来[4,5]，κ-酪蛋白位于这些连接体的表面[6,7]。各种酪蛋白相互作用，最终形成直径约为 80~400 nm 胶束粒子[7]。研究表明，在这些胶束中，有水通道存在[4]。

β-酪蛋白作为组成胶束中的一种蛋白质，具有低温溶出的特性。有研究表明当牛乳温度降至低于 10 ℃时，β-酪蛋白开始从胶束中游离出来，但当温度恢复

收稿日期：2017-01-13
基金项目：国家自然科学基金项目（31371803）；江苏省产学研联合创新资金（BY2015019-34）
作者简介：张媛（1991-），女，硕士，研究方向：生物技术中心
通讯作者：刘小鸣（1974-），女，博士，教授，研究方向：乳品科学与技术

到室温，游离的 β-酪蛋白又会重新结合到胶束上[8~11]。低温长时处理可使将近 60% β-酪蛋白溶出[11]。

利用 β-酪蛋白的低温溶出的特性，通过离心或膜过滤可将溶出的 β-酪蛋白从酪蛋白胶束中分离出来，选择性地去除牛乳中的组分，实现牛乳组分的调整。Hekken 等[12]和 O'Mahony 等[13]运用微滤系统进行了 β-酪蛋白的分离，并提出脱 β-酪蛋白的牛乳可改善凝乳块的延展性及弹性。而 Holland 等人[14]同样运用微滤手段实现了 20%的 β-酪蛋白的脱除，并研究了脱除后牛乳的酸凝乳和酶凝乳的凝乳性质。但目前相关的研究相对较少，且没有明确说明低温微滤处理对牛乳蛋白组分、胶束结构以及凝乳性质的影响。此外，这些研究局限在单一 β-酪蛋白脱除率对其凝乳性质的影响。

因此本研究旨在通过低温微滤手段得到不同 β-酪蛋白脱除率的牛乳，研究这些牛乳的组分、酪蛋白胶束的结构，以及凝乳性质的变化，从而为牛乳的深加工利用提供更多的可能。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

1.1.1 主要材料

脱脂牛乳（光明优倍低脂牛乳），无锡欧尚超市；10 ku 超滤膜，南京汉隆实验器材有限公司；50 μm 微滤膜，上海科琅膜科技有限公司；凝乳酶：MARZYME 150，丹尼斯克(上海)食品配料公司。

1.1.2 试剂

叠氮化钠、双三羟基甲氨基丙烷、异硫氰酸荧光素（FITC）、二硫苏糖醇、三氟乙酸：Sigma-alarich；柠檬酸三钠二水、尿素和葡萄糖酸内酯（GDL）：生工生物工程(上海)股份有限公司；戊二醛、无水硫酸铜、硫酸钾、硫酸和乙腈：国药集团化学试剂北京有限公司。

1.2 主要仪器设备

超滤设备，密理博中国有限公司；MF-1 陶瓷膜微滤系统，无锡赫普轻工设备技术有限公司；LX-0250 低温制冷循环器，无锡冠亚恒温制冷技术有限公司；Q Exactive 高相液相色谱仪，赛默飞世尔科技(中国)有限公司；分析天平，梅特勒-托利多仪器有限公司；电子天平，梅特勒-托利多仪器；pH 计，梅特勒-托利多（上海）有限公司；全自动凯氏定氮仪，济南海能仪器股份有限公司；Spectr AA 220 原子吸收光谱分析仪，美国 Varian 公司；S-4800 II 场发射扫描电镜，日本 Hitachi 公司；CO_2 临界点干燥机，德国 Leica 公司；DHR-3 旋转流变仪，美国沃特世公司；LSM-780 激光共聚焦显微镜，德国 Zeiss 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 牛乳样品制备

从欧尚超市购买脱脂乳，加入 0.02%叠氮化钠，分成两部分。一部分用分子截留量为 10 ku 的超滤膜制备牛乳超滤液，另一部分用孔径为 50 μm 的微滤膜进行微滤。微滤设备与温控系统相连，保持整个微滤过程牛乳体系处于 4 ℃左右。10 L 牛乳进行微滤时，接透过液 7 L，再往微滤体系里补充等体积的超滤液，平衡一定时间，得到牛乳样品 W_1；将 W_1 样品再进行微滤，接 7 L 透过液，补充 7 L 超滤液，平衡，连续操作两次，得到 W_2；同样地连续操作 4 次，得到 W_3，具体如表 1 所示。

表 1 微滤实验设计

Table 1 Experimental design of microfiltration

样品编号	牛乳体积/L	透过液体积/L	添加超滤液体积/L	洗虑次数/次
W_1	10	7	7	0
W_2	10	7	7	2
W_3	10	7	7	4

1.3.2 基本成分测定

总蛋白、脂肪以及钙含量测定分别参照 GB 5009.5-2010，GB 54133-2010 以及 GB 541321-2010。

1.3.3 牛乳蛋白组分测定

牛乳蛋白组分测定采用反相-高效液相色谱法（RP-HPLC），参照 Xu 等人[15]的方法并作适当修改。色谱条件：Xbridge C18 色谱柱（BEH 300 Å，250×4.6 mm，3.5 μm）；柱温 30 ℃，检测波长 220 nm；采用双泵系统 A 和 B，流速为 0.8 mL/min，进样量 20 μL。流动相 A 为乙腈:水:三氟乙酸（900:100:0.7），流动相 B 为乙腈:水:三氟乙酸（100:900:1.0）。采用梯度洗脱：0~35 min，26%~40% B；35~51 min，44% B；51~53 min，70% B；保持 5 min；58~60 min，26% B，保持 5 min。样品处理则完全参照 Yuting Xu 等方法。

1.3.4 酪蛋白胶束的场发射扫描电镜（FESEM）

牛乳样品的酪蛋白胶束的场发射扫描电镜参照 Dalgleish 等人[16]的方法并做适当调整。取 1.5 mL 牛乳样品在 10000 g，4 ℃条件离心 3 min，进行样品富集，弃掉上清液，用 2.5%戊二醛溶液进行固定沉淀样品，置于 4 ℃下过夜。将固定好的样品用 0.1 M pH 7.2 的磷酸盐缓冲液进行清洗 3 次，每次 12 min。然后用乙醇进行梯度脱水（50%~70%~80%~90%~95%~100%，各梯度 5 min）。脱水好的样品进行 CO_2 临界点干燥，粘样，镀膜，最后在电镜下进行观察，电压为 15 kV。

1.3.5 流变实验

1.3.5.1 GDL 诱导凝乳的流变学实验

GDL 诱导凝乳的流变学实验参照 Choi 等人[17]的方法，并做适当调整。牛乳样品在 65 ℃下加热 30 min，然后在 15 min 内冷却至 32 ℃，加入 3%（*m/m*）GDL，立即搅拌 15 s，然后将 15 mL 样品转移至旋转流变仪进行流变实验。流变条件：模具由直径分别为 30.18 mm 杯子和 32.02 mm 套筒组成双壁桶，测试温度为 32 ℃，频率 1 Hz，应变 0.05%，gap 值 2000 μm，在 120 min 内进行测定。

1.3.5.2 GDL 和凝乳酶诱导的流变学实验

牛乳样品加热冷却后，加入 1%（*m/m*）GDL 以及 0.08%（*V/V*）被 ddH_2O 1:40 稀释的凝乳酶，搅拌均匀后立即转移至流变仪进行测定，流变条件同上。

1.3.6 凝乳块的激光共聚焦（CLSM）

凝乳块的微观结构观察参照 Zhihua Pang 等人[18]的方法并做适当调整。取 10 g 巴杀的牛乳样品置于烧杯中，加入 0.001%（*m/V*）异硫氰酸荧光素（fluorescein isothiocyanate，FITC）以及 3% GDL 或 1% GDL 及凝乳酶，混合均匀。然后移取 200 μL 样品滴在玻底培养皿上，封上 AB 胶后盖上盖玻片放置水分挥发。培养皿用锡箔纸避光包好置于 32 ℃烘箱中 1 h 后在激发光波长为 448 nm，20 倍物镜下进行观察。

1.3.7 数据处理及分析

采用 Origin 8.5 对实验数据进行绘图，SPSS statistics 16.0 对实验结果进行单因素方差分析，其中 $p<0.05$ 表示差异显著，$p>0.05$ 表示差异不显著。

2 结果与讨论

2.1 基本成分

低温微滤处理后牛乳的基本成分如表 2 所示。如表中数据所示，未经处理的脱脂乳蛋白含量与低温微滤处理样品间有显著性差异，脱脂乳中蛋白含量为 3.47%，经低温微滤处理后，乳蛋白含量降至 3.35%，且随洗虑次数增加蛋白含量继续下降，当洗虑次数达到 4 时，蛋白含量为 3.04%。但低温微滤处理对牛乳中的脂肪含量、钙含量及 pH 值无显著影响。

表 2 牛乳经低温微滤处理后蛋白含量、钙含量及 pH 值

Table 2 Protein, calcium content, and pH value of de-*β*-CN milk

样品	乳蛋白含量/%	脂肪含量/%	钙含量/($\times10^{-2}$mg/g)	pH
SM	3.47±0.21^{b}	0.51±0.01^{a}	109.10±0.61^{b}	6.67±0.02^{ab}
W1	3.35±0.19^{ab}	0.55±0.03^{a}	103.39±2.32^{a}	6.64±0.01^{a}
W2	3.22±0.08^{a}	0.60±0.01^{a}	105.55±0.14^{ab}	6.65±0.02^{a}
W3	3.04±0.06^{a}	0.57±0.03^{a}	100.84±0.64^{a}	6.62±0.01^{b}

注：表中数据为平均值±标准偏差，不同字母表示同一列之间存在显著性差异（$p<0.05$）。

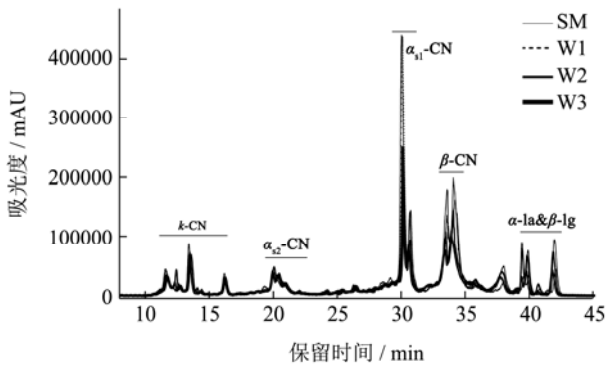


图 1 低温微滤处理牛乳的高效液相色谱分析图

Fig.1 RP-HPLC chromatograms of SM and de-*β*-CN milk samples

2.2 蛋白组成

牛乳经脱 *β*-酪蛋白处理后其 RP-HPLC 结果如图 1 所示。从图 1 可知，牛乳中的蛋白依次被分离为 *κ*-酪蛋白、α_{s2}-酪蛋白、α_{s1}-酪蛋白、*β*-酪蛋白以及乳清蛋白（*α*-la 及 *β*-lg），各蛋白成分的浓度与峰面积呈正比。其中，各牛乳样品的 *κ*-酪蛋白和 α_{s2}-酪蛋白峰高变化较小，α_{s1}-酪蛋白有轻微变化，乳清蛋白峰高从脱脂乳到 W3 样品有逐渐减小的趋势，*β*-酪蛋白变化最明显，其峰高及峰面积显著下降。

将图 1 中的各个峰积分后可详细知道各蛋白成分的变化情况，结果见表 3。脱脂乳中的 *κ*-酪蛋白及 α_{s2}-酪蛋白浓度分别为 3.33 mg/mL 和 3.39 mg/mL，低温

微滤处理样品中这两种酪蛋白含量与脱脂乳含量无显著性差异，分别在 3.27~3.31 mg/mL 和 3.26~3.29 mg/mL。α_{s1}-酪蛋白经低温微滤处理后则有少许溶出，从脱脂乳的 10.70 mg/mL 减少到 10.10 mg/mL 左右，但低温处理样品之间则没有显著性差异。所有牛乳样品（脱脂乳及低温处理样品）间，β-酪蛋白浓度具有极显著差异。脱脂乳中 β-酪蛋白含量为 10.29 mg/mL，经不同时间的低温微滤处理后，得到不同浓度的 β-酪蛋白，分别为 9.04、7.99、6.79 mg/mL。通过计算脱掉的 β-酪蛋白含量占总 β-酪蛋白含量的比例知，不同样品分别对应 β-酪蛋白脱除率 9.22%、18.03%以及 28.15%。进一步计算牛乳样品中四种酪蛋白含量的比例，可看出 κ-酪蛋白和 α_{s2}-酪蛋白在四种酪蛋白中比例无变化，低温处理样品的 α_{s1}-酪蛋白比脱脂乳稍有减小，但低温处理样品间无变化，β-酪蛋白所占比例逐渐减小。除了 β-酪蛋白含量发生显著变化外，所有牛乳样品间乳清蛋白变化也极显著，从脱脂乳的 5.08 mg/mL 降至 3.15 mg/mL。

表 3 低温微滤处理后牛乳蛋白组分变化

Table 3 Changes in the protein composition of SM and de-β-CN milk samples

样品	κ-CN 浓度 /(mg/mL)	α_{s2}-CN 浓度 /(mg/mL)	α_{s1}-CN 浓度 /(mg/mL)	β-CN/(mg/mL)	de-β-CN/%	κ:α_{s2}:α_{s1}:β	乳清蛋白 /(mg/mL)
SM	3.33±0.14^{a}	3.39±0.09^{a}	10.70±0.11^{b}	10.29±0.05^{d}	-	1.0:1.0:3.2:3.1	5.08±0.01^{d}
W1	3.31±0.01^{a}	3.26±0.02^{a}	10.10±0.03^{a}	9.04±0.01^{c}	9.22±0.05^{a}	1.0:1.0:3.1:2.7	3.15±0.02^{a}
W2	3.28±0.02^{a}	3.27±0.03^{a}	10.24±0.05^{a}	7.99±0.04^{b}	18.03±0.32^{b}	1.0:1.0:3.1:2.4	3.41±0.02^{b}
W3	3.27±0.01^{a}	3.29±0.01^{a}	10.12±0.03^{a}	6.79±0.07^{a}	28.15±0.61^{c}	1.0:1.0:3.1:2.1	3.52±0.04^{c}

注：表中数据为平均值±标准偏差，不同字母表示同一列之间存在显著性差异（p<0.05）。

2.3 低温微滤处理牛乳酪蛋白胶束 FESEM 变化

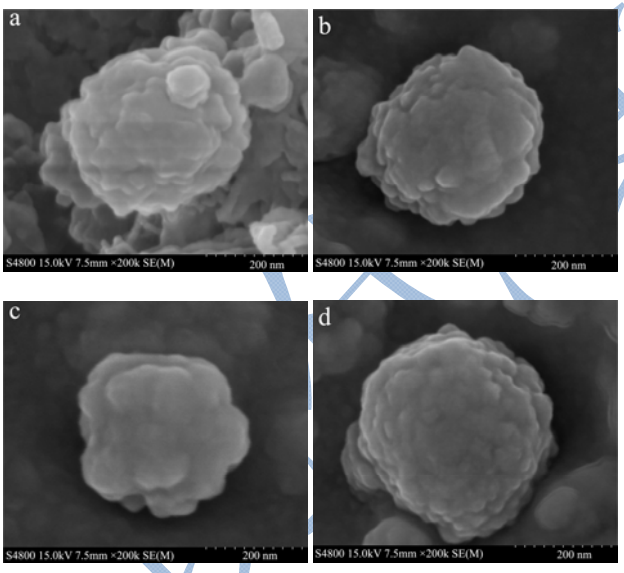


图 2 牛乳经低温微滤处理后的场发射扫描电镜图

Fig.2 FESEM images of SM and de-β-CN milk

注：a，SM；b，W_1；c，W_2；d，W_3。

脱脂乳经低温微滤处理后，酪蛋白胶束的场发射扫描电镜结果见图 2。a 为脱脂乳样品，b、c 和 d 分别对应 β-酪蛋白脱除率为 10%、20%和 30%。酪蛋白胶束在牛乳中以一定大小的球状结构存在，并在其表面有明显的层次感，这是由位于胶束表面的 κ-酪蛋白的“毛发”结构导致[4]。观察各样品的胶束结构发现，脱 β-酪蛋白牛乳的胶束与正常牛乳没有明显的差别，且它们的粒径均在 140~200 nm 之间。由此说明脱低温微滤进行脱 β-酪蛋白处理可以维持牛乳酪蛋白胶束结构。

2.4 低温微滤处理对牛乳的流变学性质影响

凝乳是奶酪或酸奶的关键加工工艺之一。为进一步探讨脱掉部分 β-酪蛋白后对牛乳的凝乳特性的影响，用旋转流变仪在时间-震荡模式下对牛乳凝乳过程的流变学性质进行了分析，结果见图 3，图 4。其中，a 为凝乳块弹性模量（G′）随时间变化，表征凝乳块的硬度；b 为凝乳块的损耗角正切（Tanδ）随凝乳时间变化，表征凝乳块的粘弹性。

2.4.1 酸凝乳流变学性质

酸凝乳指将经过预处理牛乳的 pH 降至酪蛋白的等电点，酪蛋白相互聚集，溶解度下降，最终形成凝胶的过程。脱脂乳和脱 β-酪蛋白牛乳的酸凝乳的流变学性质见图 3，酸凝乳过程根据流变学性质可清晰分为三个过程。首先，在 G′变化曲线上出现滞后时间（图 3a，Ⅰ），然后 G′迅速增加达到最大值（图 3a，Ⅱ），最后趋于稳定（图 3a，Ⅲ）。相应地，在 Tan δ 时间曲线上，其中先迅速下降达到最小值后（图 3b，Ⅰ），缓慢上升出现一个小峰（图 3b，Ⅱ），最终趋于稳定（图 3b，Ⅲ）。该变化趋势与 Sadeghi 等人[19]，Lucey 等人[20]的研究结果一致。

酸凝乳流变性质上的变化可用物理化学理论进行解释。阶段Ⅰ，正常牛乳 pH 值约为 6.7，酪蛋白胶束

表面带负电荷，加入 GDL 后，向牛乳体系中不断释放 H^+，从而中和酪蛋白所带的负电荷，导致胶束表面的 κ-CN 的静电斥力减小[21]，该阶段牛乳体系在宏观上没有发生明显的变化，G′在零点附近。同时，由于牛乳体系逐渐从流体向凝胶体过渡，分子间具有相互吸引的趋势，Tan δ 迅速下降，直到最小值，开始凝胶形成。从图 3a 中，发现牛乳样品之间的滞后时间并不完全一样，依次为脱脂乳>10%>20%>30%，牛乳样品的滞后时间分别为 1566.21 s、1200.77 s、783.18 s 和 548.06 s，由此说明脱掉 β-酪蛋白后会影响加速牛乳体系的酸凝速度。

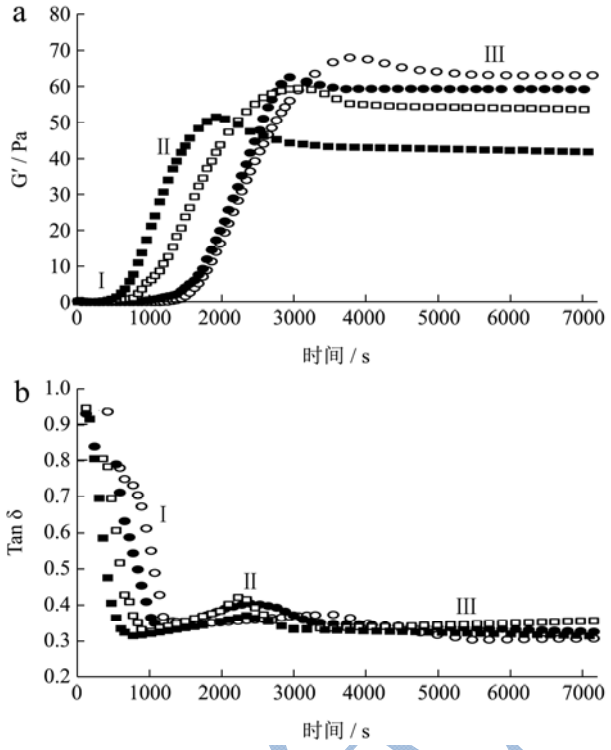


图 3 不同 β-CN 脱除率牛乳酸凝乳流变学性质变化 G′ (a), tan δ (b)

Fig.3 Changes in G′ (a) and Tanδ (b) determined by small oscillatory rheology during GDL-induced coagulation of SM and de-β-CN milk with different β-CN removal ratios

注：SM (○)，10% (●)，20% (□)，30% (■)。

阶段 II，牛乳体系的 pH 值进一步降低，胶束所含的静电荷含量快速减少，位于胶束表面的 κ-酪蛋白完全坍塌，CCP 几乎全部溶解，导致单体酪蛋白从胶束中解离；对应于流变学上的 G′迅速增加达到最大值，Tan δ 缓慢上升形成一个小峰，主要由于 CCP 溶解导致酪蛋白之间钙桥减弱，分子间作用力减弱[22]。从图 3a 可看出随着 β-酪蛋白脱除率增加，最大 G′逐渐下降，依次为 68.0 Pa、62.6 Pa、59.5 Pa 和 51.5 Pa。在保持各样品的总钙含量一致的条件下，G′减小一方面可能是由于总蛋白含量减小，参与凝乳块形成的总量减小，另一方面可能是 β-酪蛋白减少导致各酪蛋白重新聚集时作用力减小导致。

阶段III，解离的单体酪蛋白重新聚集，最终形成具有一定大小和结构的的凝乳块，在流变学性质上表现为 G′以及 Tan δ 保持稳定。

2.4.2 凝乳酶及 GDL 共同引起的牛乳凝乳的流变学性质

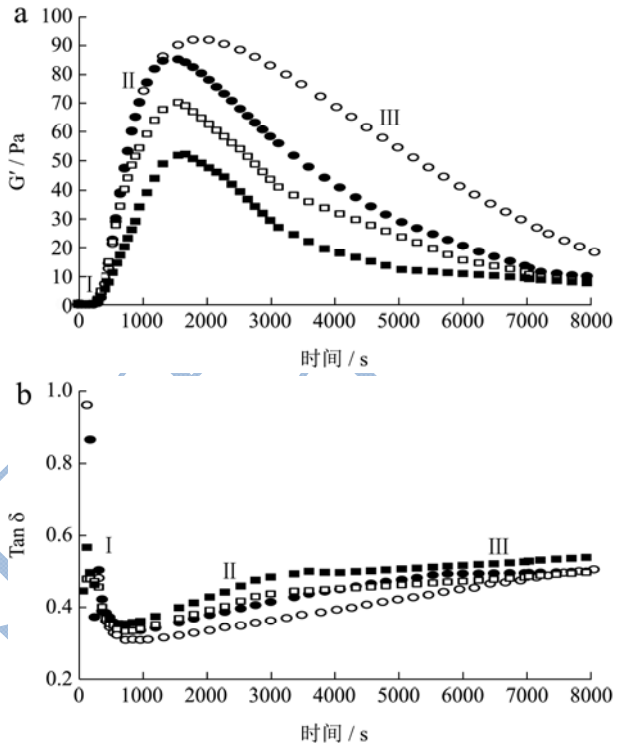


图 4 不同 β-CN 脱除率牛乳酶凝乳流变学性质变化 G′ (a), tan δ (b)

Fig.4 Changes in G′ (a) and Tan δ (b) determined by small oscillatory rheology during GDL and rennet-induced coagulation of SM and de-β-CN milk with different β-CN removal ratios

注：SM (○)，10% (●)，20% (□)，30% (■)。

向各样品中加入 1% GDL 及凝乳酶诱导凝乳的流变学性质见图 4。首先 G′表现出一定的滞后性（图 4a，Ⅰ），然后快速增加，达到最大值（图 4a，Ⅱ），再逐渐减小，达到最小值后，最后保持不变（图 4A，Ⅲ）。相应地，Tan δ 最开始急剧下降（图 4b，Ⅰ），降到 0.3 左右，缓慢上升（图 4b，Ⅱ），最后保持在 0.5 左右不变（图 4b，Ⅲ）。该趋势与 Choi[23]等人，Lucey 等人[24]一致。

在该凝乳体系中首先凝乳酶专一性降解 κ-酪蛋白 Met(105)-Phe(106)肽键，形成 CPM（酪蛋白巨肽）及衍生酪蛋白[17,25]，表现为 G′滞后时间（图 4a，Ⅰ），Tan δ 急剧下降（图 4b，Ⅰ）。同时由于 GDL 释放 H^+ 引起牛乳体系的 pH 降低，导致 CCP 溶解，又会加速

凝乳过程发生，因此其滞后时间与酸凝乳体系比较明显缩短。牛乳样品间滞后时间几乎没有区别，约为 365 s，说明脱除 β-酪蛋白并不影响凝乳酶对 κ-酪蛋白的降解。当 85~90%的 κ-酪蛋白被降解后，κ-酪蛋白无法提供足够的空间阻力及静电斥力来抑制酪蛋白之间的聚集，因此衍生酪蛋白开始相互吸引聚集最终形成凝乳块[25]。在 G′时间曲线上表现为 G′迅速增加，达到最大值（图 4a，Ⅱ）。在此阶段，由于 GDL 的作用导致 CCP 进一步溶解，降低了分子间的钙桥的作用，因此在 Tan δ 变化曲线中表现为缓慢增加出现一个小峰(图 4b，Ⅱ)。同样地，不同 β-酪蛋白脱除率具有不同的最大 G′值，即 SM>10%>20%>30%，最大 G′值依次为 91.7 Pa、84.8 Pa、69.9 Pa 和 52.0 Pa，说明凝乳块内部结构致密性下降。由于在该体系中，凝乳块发生脱水缩合反应，因此导致 G′缓慢下降，达到最小值后缓慢趋于稳定（图 4a，Ⅲ），而在 Tan δ 变化曲线中，则有极缓慢上升的趋势（图 4a，Ⅲ）。

2.5 脱 β-酪蛋白牛乳的凝乳块的微观结构

2.5.1 GDL 诱导的凝乳块的 CLSM

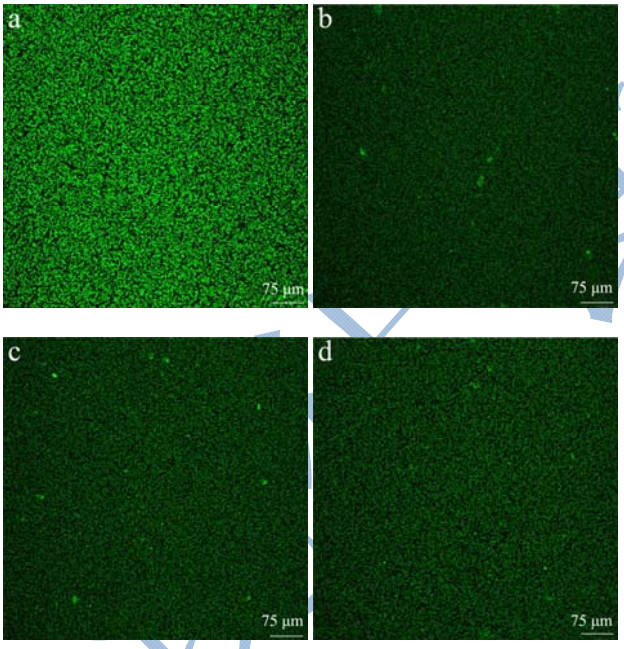


图 5 不同 β-CN 脱除率牛乳的酸凝胶 CLSM 图

Fig.5 CLSM micrographs of GDL-induced coagulation of SM and de-β-CN milk with different β-CN removal ratios

注：a，SM，b，10%，c，20%，d，30%。

GDL 诱导的凝乳块的 CLSM 结果见图 5a、b、c 和 d 分别对应 SM、β-酪蛋白脱除率为 10%、20%以及 30%。图中绿色部分为被 FITC 染色的乳蛋白，黑色部分即孔隙为水相。从图可看出，各样品均可形成具有微小空隙的较为致密的网络结构，而 a~d 并没有明显区别，说明虽然 β-酪蛋白脱除会导致凝胶的 G′减小，但酪蛋白颗粒在空间上的重排并没有发现显著的变化。而图中亮度不同是由于拍照及制样的厚薄导致。

2.5.2 GDL 及凝乳酶共同诱导的凝乳块的 CLSM

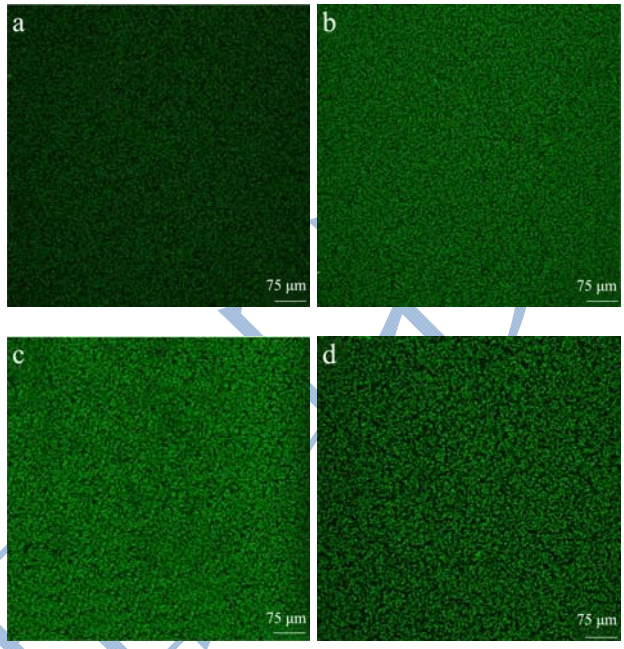


图 6 不同 β-CN 脱除率牛乳酶凝乳形成凝乳块的 CLSM 结果

Fig.6 CLSM micrographs of GDL and rennet-induced coagulation of SM and de-β-CN milk with different β-CN removal ratios

注：a，SM，b，10%，c，20%，d，30%。

1%GDL 及凝乳酶诱导的凝乳块的 CLSM 结果见图 6a、b、c 和 d 分别对应样品 SM，β-酪蛋白脱除率为 10%、20%以及 30%。与酸诱导凝乳块类似，各样品均形成具有微小空隙的较为致密的网络结构，但在该体系中，可发现图 6d 明显比其余样品疏松，空隙更多、更大，说明 30%的 β-酪蛋白脱除率导致衍生酪蛋白聚集程度减小，从侧面反映 β-酪蛋白在酶凝乳体系中具有重要的作用。有研究报道参与凝胶形成的 4 种酪蛋白中均存在“polar tracts”结构[26]，该结构的存在更容易使得蛋白与水作用而形成的凝胶[27]。其中 β-酪蛋白所形成的“polar tracts”氨基酸序列更多更长[23]，因此认为 β-酪蛋白可能更加容易形成凝胶。

3 结论

通过对牛乳进行不同时间的低温微滤处理可得到不同 β-酪蛋白脱除率的牛乳。脱除 β-酪蛋白对牛乳的蛋白含量具有显著影响外，并不影响胶束结构的维持，且其功能特性凝乳的变化规律与普通脱脂乳没有显著差异，但表征凝乳块硬度的最大 G′随 β-酪蛋白脱除率

下降而逐渐减小。此外，在 GDL 和凝乳酶诱导形成的凝乳块在 β-酪蛋白脱除率达到 30%时，其微观结构较为疏松。

参考文献

[1] Swaisgood H, Fox P. Advanced dairy chemistry-1 protein chemistry of the caseins [M]. New York: Springer, 1992

[2] Swaisgood H. Advanced dairy chemistry-1 protein chemistry of the caseins [M]. New York: Springer, 2003

[3] Farrell H, Jimenez-Flores R, Bleck G, et al. Nomenclature of the proteins of cows' milk-sixth revision [J]. Journal of Dairy Science, 2004, 87(6): 1641-1674

[4] Dalgleish D G. On the structural models of bovine casein micelles-review and possible improvements [J]. Soft Matter, 2011, 7(6): 2265-2272

[5] De Kruif C G, Huppertz T, Urban V S, et al. Casein micelles and their internal structure [J]. Advances in Colloid and Interface Science, 2012, 171-172(1): 36-52

[6] Tuinier R, De Kruif C G. Stability of casein micelles in milk [J]. The Journal of Chemical Physics, 2002, 117(3): 1290-1295

[7] De Kruif C G, Zhulina E B. *K*-casein as a polyelectrolyte brush on the surface of casein micelles [J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 1996, 117(1): 151-159

[8] O'connell J E, Grinberg V Y, De Kruif C G. Association behavior of β-casein [J]. Journal of Colloid & Interface Science, 2003, 258(1): 33-39

[9] Creamer L K, Berry G P, Mills O E. Study of the dissociation of beta casein from the bovine casein micelle at low temperature [J]. New Zealand Journal of Dairy Science & Technology, 1977, 12: 58-66

[10] Mcmahon D J, Oommen B S. Supramolecular structure of the casein micelle [J]. Journal of Dairy Science, 2008, 91(5): 1709-1721

[11] Yazdi S Y, Corredig M, Dalgleish D G. Studying the structure of β-casein-depleted bovine casein micelles using electron microscopy and fluorescent polyphenols [J]. Food Hydrocolloids, 2014, 42: 171-177

[12] Hekken D L V, Holsinger V H. Use of cold microfiltration to produce unique β-casein enriched milk gels [J]. Dairy Science & Technology, 2000, 80(1): 69-76

[13] O'mahony J A, Smith K E, Lucey J A. Purification of beta casein from milk: U.S., 8889208B2 [P] 2014-11-18. http://www.warf.org/documents/ipstatus/P05143US.PDF

[14] Holland B, Corredig M, Alexander M. Gelation of casein micelles in β-casein reduced milk prepared using membrane filtration [J]. Food Research International, 2011, 44(3): 667-671

[15] Xu Y, Liu D, Yang H, et al. Effect of calcium sequestration by ion-exchange treatment on the dissociation of casein micelles in model milk protein concentrates [J]. Food Hydrocolloids, 2016, 60: 59-66

[16] Dalgleish D G, Spagnuolo P A, Goff H D. A possible structure of the casein micelle based on high-resolution field-emission scanning electron microscopy [J]. International Dairy Journal, 2004, 14(12): 1025-1031

[17] Choi J, Horne D, Lucey J. Effect of insoluble calcium concentration on rennet coagulation properties of milk [J]. Journal of Dairy Science, 2007, 90(6): 2612-2623

[18] Pang Z, Deeth H, Sharma R, et al. Effect of addition of gelatin on the rheological and microstructural properties of acid milk protein gels [J]. Food Hydrocolloids, 2015, 43: 340-351

[19] Sadeghi M, Madadlou A, Khosrowshahi A, et al. Acid-induced gelation behavior of casein/whey protein solutions assessed by oscillatory rheology [J]. Journal of Food Science And Technology, 2014, 51(9): 2113-9

[20] Lucey J, Van Vliet T, Grolle K, et al. Properties of acid casein gels made by acidification with glucono-δ-lactone. 1. rheological properties [J]. International Dairy Journal, 1997, 7(6): 381-388

[21] Dalgleish D G, Corredig M. The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing [J]. Annual Review of Food Science and Technology, 2012, 3: 449-467

[22] Lucey J, Tamehana M, Singh H, et al. A comparison of the formation, rheological properties and microstructure of acid skim milk gels made with a bacterial culture or glucono-δ-lactone [J]. Food Research International, 1998, 31(2): 147-155

[23] Choi J, Horne D, Lucey J. Effect of insoluble calcium concentration on rennet coagulation properties of milk [J]. Journal of Dairy Science, 2007, 90(6): 2612-23

[24] Lucey J. Formation and physical properties of milk protein gels [J]. Journal of Dairy Science, 2002, 85(2): 281-94

[25] Zoon P, Vliet, P Walstra. Rheological properties of rennet-induced skim milk gels [J]. Netherlands Milk & Dairy Journal, 1988, 42(3): 295-312

[26] Holt C. Casein and casein micelle structures, functions and diversity in 20 species [J]. International Dairy Journal, 2016,

60: 2-13

[27] Williamson M P. The structure and function of proline-rich regions in proteins [J]. Biochemical Journal, 1994, 297(2): 249-260

现代食品科技