

酰化修饰对牦牛乳酪蛋白结构及理化性质的影响

杨敏, 史莹, 梁琪, 文鹏程, 张卫兵

(甘肃农业大学食品科学与工程学院, 甘肃省功能乳品工程实验室, 甘肃兰州 730070)

摘要: 以丁二酸酐、丁二酸、乙酸酐为酰化试剂对牦牛乳酪蛋白进行酰化修饰, 研究了酪蛋白空间结构、缓冲性能、钙镁磷含量、色度的变化。结果显示, 丁二酸酐、乙酸酐、丁二酸酰化程度分别为 90.0%、87.9%、18.5%。酰化修饰后, 牦牛乳酪蛋白二级结构以转角和 β -折叠的含量为主; 丁二酸酐酰化促使酪蛋白形成少量规则的 α -螺旋结构, 含量为 9.4%, 其他样品中未检出。丁二酸酐酰化使其三级结构变化程度最大, 丁二酸最小。酰化修饰后, 牦牛乳酪蛋白最大荧光强度降低, 除了乙酸酐修饰酪蛋白之外, 其他样品最大发射波长红移; 丁二酸修饰酪蛋白三级结构变化较小。酰化修饰后, 酪蛋白缓冲性能增强。经酰化修饰后, 牦牛乳酪蛋白中的钙、镁、磷含量均降低, 但其色泽均变白。研究结果可为牦牛乳酪蛋白的改性及构效关系研究提供参考依据。

关键词: 牦牛乳酪蛋白; 酰化修饰; 缓冲容量; 色度; 空间结构

文章编号: 1673-9078(2014)5-6-11

Influence of Acylation on the Structures and Physico-chemical Properties of Yak Caseins

YANG Min, SHI Ying, LIANG Qi, WEN Peng-cheng, ZHANG Wei-bing

(College of Food Science and Engineering, Functional dairy product engineering lab of Gansu, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: The influence of different acylation reagents (succinic anhydride, succinic acid and acetic anhydride) on the spatial conformation and physico-chemical properties of yak caseins were investigated. The secondary and tertiary structure, buffer capacity and calcium, magnesium, phosphorus content of original and modified yak caseins were also studied. The results showed that the acylation degree with succinic anhydride, acetic anhydride and succinic acid was 90.0%, 87.9% and 18.5%, respectively. After acylation with different reagents, the secondary structures of yak casein were mainly turn and β -sheet; a few α -helix structures formed after succinylated modification, with the content of 9.4%. Succinic anhydride had the largest influence on tertiary structure of casein, followed by acetic anhydride and succinic acid. The maximum fluorescence intensity of intrinsic and ANS fluorescence spectrum were reduced with modification and the maximum emission wavelength were shifted red except acetic anhydride modified casein. The modification improved the buffer capacity, reduced the content of calcium, magnesium, phosphorus. The color of modified caseins was whiter than original casein. The results could provide references for the chemical modification of yak caseins.

Key words: yak casein; acylation; buffer capacity; color; spatial conformation

蛋白质的功能特性取决于其结构。为了提高蛋白质的功能特性, 扩大工业应用范围, 常对其结构进行修饰。蛋白质结构修饰方法有物理修饰、化学修饰和酶法修饰。其中, 化学修饰以其修饰效率高、修饰程度易于控制而受到广大学者的关注。酰化修饰是化学修饰中最常用的一种修饰手段, 其原理为酸酐或羧酸与蛋白质赖氨酸残基上的 ϵ -氨基发生酰化反应, 将酰化试剂以酰胺键连接于蛋白质肽链上, 从而改变蛋白质的电荷、构象, 使其理化性质和功能特性得以改变

收稿日期: 2013-12-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30960260)

作者简介: 杨敏 (1981-), 女, 博士, 副教授, 研究方向为乳品科学与技术

[1-2]。蛋白质酰化修饰常用试剂为乙酸酐、丁二酸酐和丁二酸[3-4]。

牦牛是中国古老而原始的牛种之一, 是青藏高原特有的优势畜种, 牦牛乳是牦牛最大宗的产品。酪蛋白 (Casein, CN) 为乳中主要蛋白质, 其中包括 α_{s1} -、 α_{s2} -、 β -、 κ -酪蛋白四种主要单体[5]。酪蛋白单体分子间以疏水性相互作用、盐键等作用力结合成胶束状态存在于乳中。牦牛乳为青藏高原特色乳资源, 酪蛋白含量为 40.2 g/L, 高于荷斯坦牛乳[6]。众多研究证实, 牦牛乳酪蛋白在胶束粒径、磷含量、各酪蛋白单体含量等方面存在差异[7-8]。已有研究表明, 牦牛乳酪蛋白主要单体氨基酸序列与其他乳酪蛋白具有差异[9-10]。本研究

团队已研究了丁二酰化修饰对牦牛乳酪蛋白胶束结构及疏水性的影响,然而,关于不同酰化试剂对牦牛乳酪蛋白的修饰作用研究未见报道。

本研究在前期研究的基础上,进一步研究丁二酸、乙酸酐、丁二酸酐对牦牛乳酪蛋白胶束的修饰作用,对比分析不同酰化试剂对酪蛋白胶束疏水性、缓冲性能、主要矿物质含量、色度的影响,探讨不同酰化试剂对酪蛋白胶束的修饰作用,为改善牦牛乳酪蛋白的功能特性提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

牦牛乳酪蛋白(干酪素)由甘肃华羚生物科技有限公司提供,其中酪蛋白含量为94.20%,水分含量为3.12%,灰分含量为1.63%,脂肪含量为1.05%。

试剂:丁二酸(琥珀酸)、丁二酸酐(琥珀酸酐)、乙酸酐,天津市凯信化学工业有限公司;氢氧化钠,天津市化学试剂三厂;盐酸,天津市化学试剂三厂;8-苯胺-1-萘磺酸(ANS),阿拉丁化学试剂有限公司。

仪器:精密电子天平,上海良平仪器仪表有限公司;集热式磁力加热搅拌器,DF-II,金坛市顺化仪器有限公司;pH计,PHS-3C-01,上海三信仪表厂;荧光分光光度计,RF-5301PC,日本Shimadzu公司;全自动电位滴定仪,794 Basic Titrino,瑞士万通公司;低速离心机,TDD5M,长沙平凡仪器仪表有限公司;冷冻干燥真空机,GLZ-0.4,北京速原中天科技有限公司;真空傅里叶红外光谱仪,VERTEX 70V,德国布鲁克仪器有限公司;精密色差仪,HP-200,河南兄弟仪器设备有限公司。

1.2 方法

1.2.1 牦牛乳酰化酪蛋白的制备

准确称取1.0000 g牦牛乳酪蛋白,加入100 mL去离子水中,在40℃磁力搅拌直至酪蛋白完全溶解。将溶液pH调至8~9,在40℃磁力搅拌下加入0.6 g丁二酸酐并不断加入1.0 mol/L NaOH溶液使反应液pH稳定在8~9,反应50 min。用1.0 mol/L HCl溶液将酰化后酪蛋白溶液pH调至产生大量沉淀,于3500 r/min离心15 min,弃去上清液,将沉淀置于钢制托盘进行冷冻干燥,得到白色粉末状丁二酸酐酰化酪蛋白制品,备用。以不加酰化试剂的样品作为对照,处理方法同上。

丁二酸、乙酸酐酰化酪蛋白制备方法同上,乙酸酐用量为0.56 mL,丁二酸用量为1.5 g。

1.2.2 牦牛乳酪蛋白二级结构测定

牦牛乳酪蛋白红外光谱图采用傅里叶变换红外光谱法测定。参照杨敏(2013)的方法^[11],采用红外光谱图分析软件 PeakFit 4.12 对酪蛋白的酰胺 I 带1600~1700 cm⁻¹进行处理,获得二级结构含量。

1.2.3 牦牛乳酪蛋白疏水性测定

牦牛乳酪蛋白内源荧光及 ANS 荧光参照杨敏(2013)的方法^[11],采用荧光分光光度计测定,激发波长及发射波长狭缝均为3.0 nm。

1.2.4 牦牛乳酪蛋白缓冲容量测定

酪蛋白缓冲容量测定参照 Raouche(2009)的方法并进行修改^[12]。分别准确称取2.000 g各种酪蛋白样品于250 mL小烧杯中,加入适量蒸馏水,不断调节pH至7.0左右,40℃磁力搅拌直至酪蛋白制品溶解。将酪蛋白溶液定容至200 mL,待用。

分别准确量取25.00 mL酪蛋白溶液于小烧杯中,采用794 Basic Titrino全自动电位滴定仪用准确标定的盐酸溶液分别进行滴定。最小滴定量为5.0 μL,滴定速度0.2 mL/min,温度为20℃。将各种酪蛋白溶液依次从pH 10.0滴定至pH 2.5停止滴定。缓冲容量按照下式计算:

$$\beta = \frac{dB}{dpH} = \frac{da}{V(CN) \times dpH} = \frac{\Delta V(HCl) \times c(HCl)}{V(CN) \times (\Delta pH)}$$

注:β为缓冲容量;V(CN)为酪蛋白溶液总体积,本试验中为25.00 mL;ΔpH为pH的变化量;ΔV(HCl)为pH变化量为ΔpH时所消耗的HCl的体积,mL;c(HCl)为盐酸溶液的浓度,mol/L。

1.2.5 牦牛乳酪蛋白钙、镁、磷离子含量测定

酪蛋白制品中磷含量参照GB 5413.22-2010方法,采用钼蓝比色分光光度法测定,钙、镁离子含量参照GB 5413.21-2010方法,采用原子吸收分光光度法测定。

1.2.6 牦牛乳酪蛋白色度测定

酪蛋白制品色度参照 Raouche(2008)的方法测定^[13],其中L*表示亮度,L*=0表示黑色,L*=100表示白色,a*表示绿(-)、红(+)轴,b*表示蓝(-)、黄(+)轴。采用W表示酪蛋白样品的白色度,计算公式如下^[12,14]:

$$W = 100 - [(11 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}]^{1/2}$$

1.2.7 牦牛乳酰化程度测定

酪蛋白酰化程度采用邻苯二甲醛法测定^[15-16]。

1.2.8 统计学方法

各组数据均为3次试验的平均值,以平均值±标准差表示;数据采用SPSS 18.0进行统计分析;采用Origin 8.0作图。

2 结果与分析

2.1 牦牛乳酪蛋白酰化程度分析

采用邻苯二甲醛法测得牦牛乳酪蛋白的丁二酸酐酰化程度为 90.0%，乙酸酐酰化程度为 87.9%、丁二酸酐酰化程度为 18.5%，由此可见，不同酰化试剂对牦牛乳酪蛋白的酰化程度具有差异。丁二酸酐、乙酸酐与氨基反应活性较高，酰化程度高。丁二酸酐带有负电荷，与氨基反应后在蛋白质侧链上引入了负电基团，使得蛋白质内部侧链间及蛋白质分子之间静电斥力增大，加之丁二酸体积较乙酸大，酰化后酪蛋白结构变得更加松散，从而使内部包埋的氨基裸露，酰化程度最高。丁二酸反应活性较低，即使在用量较高的条件下酰化程度仍然较低。

2.2 牦牛乳酪蛋白二级结构分析

牦牛乳酪蛋白二级结构含量见图 1。

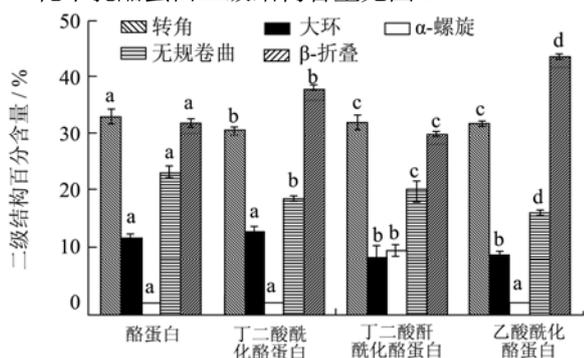


图 1 牦牛乳酪蛋白二级结构含量

Fig.1 The content of secondary structure in modified yak casein from FT-IR spectra

注：图中标有不同字母的同种二级结构含量差异显著 ($P < 0.05$) 33.1%、32.0%。

由图 1 可以看出，不同酰化试剂对牦牛乳酪蛋白二级结构具有一定影响，而修饰前后的酪蛋白空间结构均以转角和 β -折叠为主。牦牛乳酪蛋白空间结构中转角含量为 33.1%， β -折叠为 32.0%。酰化后，转角含量均减少，且变化显著，其中酸酐酰化后转角含量差异不显著。牦牛乳酪蛋白大环结构含量为 11.7%，酸酐酰化后含量减少显著，而丁二酸酐酰化对其无显著影响。 α -螺旋结构仅在丁二酸酐酰化酪蛋白中检出，含量为 9.4%。无规卷曲结构在牦牛乳酪蛋白中含量为 23.2%，酰化后各个样品中含量均比酰化前少，且差异显著。不同酰化试剂对 β -折叠结构含量的影响较为显著，丁二酸酐酰化使其含量降低，其他试剂使其增加。有文献指出，酪蛋白本身规则结构含量较少，酰

化修饰对其空间结构影响较大^[17-18]。不同酰化试剂修饰时，破坏了氨基与其他基团之间的氢键，致使酪蛋白空间结构发生变化。丁二酸酐酰化修饰使酪蛋白上的游离氨基转化为丁二酰胺基，带上了负电荷，氨基酸侧链之间的静电斥力增大，促使 α -螺旋结构形成。综上所述，酰化修饰改变了牦牛乳酪蛋白的二级结构。

2.3 牦牛乳酪蛋白疏水性分析

蛋白质疏水性反应了色氨酸残基所处的环境，当色氨酸残基微环境变化时，蛋白质的三级结构改变。酰化前后牦牛乳酪蛋白的内源荧光和 ANS 荧光图谱见图 2 和 3。

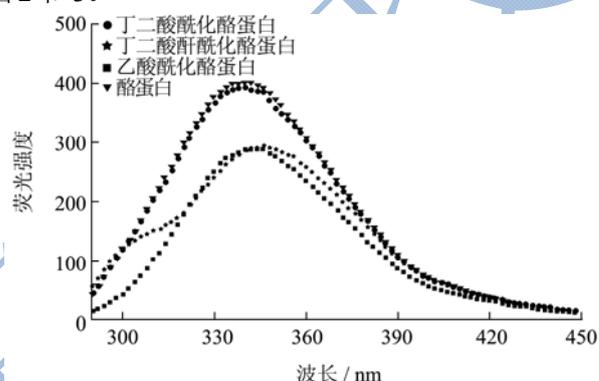


图 2 牦牛乳酪蛋白内源荧光发射光谱

Fig.2 Fluorescence emission spectra of yak casein

由图 2 可以看出，酰化修饰使得酪蛋白最大荧光强度降低。由于丁二酸酐酰化程度较低，最大荧光强度降低幅度较小，酸酐酰化程度较大，最大荧光强度降低幅度较大。可见，酸酐酰化使得酪蛋白三级结构变化较大。

最大发射波长是衡量酪蛋白色氨酸残基所处微环境疏水性强弱的有效手段^[19-20]。牦牛乳酪蛋白最大发射波长为 339 nm，与丁二酸酐酰化酪蛋白相同；丁二酸酐酰化酪蛋白最大发射波长为 346 nm，乙酸酐为 343 nm。由于丁二酸与氨基酰化反应活性小，酰化程度低，酪蛋白色氨酸残基所处微环境几乎不发生变化，酪蛋白三级结构改变甚微。酸酐酰化后，酪蛋白最大发射波长发生红移，显著改变了酪蛋白色氨酸残基的微环境，使酪蛋白的疏水性降低，三级结构改变。由于酸酐酰化活性高，酰化程度大，随着酰化反应的进行，乙酰基和丁二酰基被引入至酪蛋白赖氨酸残基上，使得酪蛋白结构伸展，内部包埋的色氨酸残基裸露于水中，其所处微环境疏水性降低，三级结构显著变化。然而，丁二酰基体积庞大，并且带有羧基，亲水性较强，因此丁二酸酐酰化酪蛋白最大发射波长红移程度较乙酸酐大。

由图 3 可以看出，酰化修饰使得酪蛋白最大 ANS

荧光强度降低。丁二酸酐化酪蛋白最大荧光强度降低幅度较小，丁二酸酐最大，乙酸酐次之。可见，酸酐酰化使得酪蛋白三级结构变化显著。牦牛乳酪蛋白的ANS 荧光发射光谱最大发射波长为 475 nm，与丁二酸酐化酪蛋白相同；丁二酸酐酰化酪蛋白最大发射波长为 489 nm，乙酸酐为 473 nm。牦牛乳酪蛋白经过不同试剂酰化修饰后 ANS 荧光图谱变化趋势与内源荧光相似。

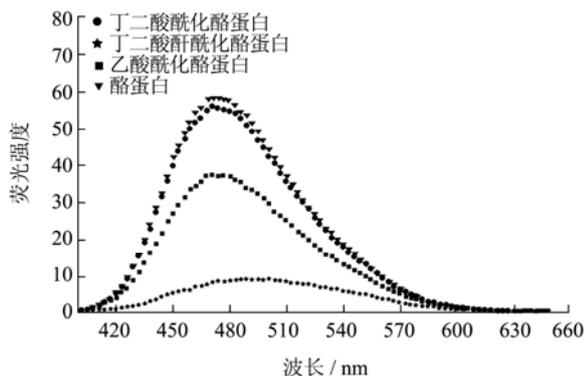


图3 牦牛乳酪蛋白 ANS 荧光发射光谱

Fig.3 Fluorescence emission spectra of ANS in yak casein solution

众多研究指出，蛋白质 ANS 荧光产生于 ANS 阴离子，它与肽链上的阳离子残基（如赖氨酸、精氨酸、组氨酸等）以静电作用力相结合，结合数量越多，荧光值越大^[21-23]。丁二酸与丁二酸酐酰化后，赖氨酸残基形成了丁二酰胺键而带上了负电荷，从而与 ANS 阴离子产生了静电斥力，使其结合数量降低，因此荧光强度降低，并且荧光值随着酰化程度的增大而降低。当乙酸酐作为酰化试剂时，酰化后与带有正电荷的氨基结合的是呈电中性的乙基，从而降低了 ANS 与蛋白质的结合数量，使其荧光强度降低。

综上所述，酰化程度影响了酪蛋白的三级结构，酸酐酰化程度较高，对酪蛋白三级结构影响较大。丁二酰基因其特殊的带电性而使酪蛋白结构变化程度较乙酸酐酰化大。

2.4 牦牛乳酪蛋白缓冲容量分析

不同试剂酰化牦牛乳酪蛋白缓冲容量如图 4 所示。

由图 4 可以看出，牦牛乳酪蛋白在 pH 2~3 范围内均表现出较强的缓冲能力，大多数氨基酸残基上的羧基 pKa 值在该范围内，而且酪蛋白在该范围具有良好的溶解性，从而表现出较强的缓冲能力。另一个缓冲能力较强的 pH 范围为 5~6，该范围为酪蛋白胶束中的无机态和有机态磷酸盐的缓冲范围^[12-13]。在上述两个缓冲范围内，牦牛乳酪蛋白的缓冲容量最小，丁

二酸酐化酪蛋白其次，再次为乙酸酐酰化酪蛋白，丁二酸酐酰化酪蛋白缓冲容量最大。

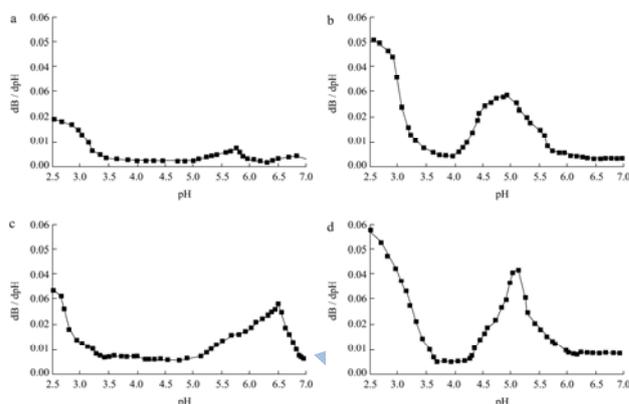


图4 牦牛乳酪蛋白及酰化酪蛋白缓冲容量图

Fig.4 Buffer capacity of original and acylated yak caseins

注：a: 酪蛋白；b: 乙酸酐酰化酪蛋白；c: 丁二酸酐化酪蛋白；d: 丁二酸酐酰化酪蛋白。

酪蛋白的缓冲能力与羧基、氨基以及胶束中含有的盐类有关。酰化修饰会降低胶束中盐类的含量，但是在溶解性差异较大的情况下，溶解性是决定缓冲能力的主要因素。酰化修饰会增加酪蛋白的溶解性，丁二酸酐酰化修饰作用较乙酰化强，而且溶解性与酰化程度有关^[18]。酰化后牦牛乳酪蛋白溶解性增强，缓冲能力增强，但乙酸酐酰化酪蛋白缓冲能力较丁二酸酐酰化酪蛋白弱。丁二酰化增加了酪蛋白羧基含量，使其在 pH 2~3 范围内缓冲容量显著增加。丁二酸酐化能力较弱，酰化后酪蛋白缓冲容量增加程度较小。由此可见，酰化修饰可促进酪蛋白溶解，致使其缓冲能力增强。

2.5 牦牛乳酪蛋白钙、镁、磷离子含量分析

不同试剂酰化修饰后牦牛乳酪蛋白中钙、镁、磷含量见表 1。

表 1 牦牛乳酪蛋白及酰化酪蛋白钙、镁、磷含量

Table 1 The content of calcium, magnesium, phosphorus in original and modified yak caseins

样品	磷含量 / (mg/g)	钙含量 / (mg/g)	镁含量 / (mg/g)
牦牛乳酪蛋白	7.26±0.16 ^a	10.57±0.28 ^a	1.08±0.05 ^a
乙酸酐酰化酪蛋白	6.59±0.19 ^b	6.34±0.06 ^b	0.74±0.02 ^b
丁二酸酐化酪蛋白	7.10±0.06 ^c	7.41±0.19 ^c	0.87±0.02 ^c
丁二酸酐酰化酪蛋白	6.50±0.87 ^d	6.71±0.15 ^d	0.61±0.01 ^d

注：标有不同字母的同种数据差异显著 (P<0.05)。

由表 1 可以看出，牦牛乳酪蛋白经过酰化修饰后，钙、镁、磷含量均降低。酰化反应使酪蛋白胶束发生一定程度的解离，胶束态磷酸钙和磷酸镁游离于溶剂

中,因此胶束中这些物质含量降低。随着酰化程度的增加,酪蛋白胶束解离程度增加,矿物质含量降低。丁二酸酐酰化程度高于乙酸酐,其体积较乙酸酐大,且带有负电荷,酰化后酪蛋白结构伸展程度较高,磷酸盐解离程度较大,使得酰化酪蛋白中钙、镁、磷含量较低。

2.6 牦牛乳酪蛋白色度分析

牦牛乳酪蛋白采用不同酰化试剂酰化后色度变化如表 2 所示

表 2 牦牛乳酪蛋白及酰化酪蛋白色度

Table 2 Color of original and acylated yak caseins

样品	L*	a*	b*	W
牦牛乳酪蛋白	89.21±0.11 ^a	3.53±0.26 ^c	15.91±0.12 ^a	80.46±0.19 ^a
丁二酸酐酰化酪蛋白	88.37±0.30 ^b	3.08±0.05 ^{ab}	12.50±0.21 ^b	82.65±0.19 ^b
丁二酸酐酰化酪蛋白	90.73±0.27 ^c	2.84±0.17 ^a	10.52±0.48 ^c	85.69±0.49 ^c
乙酸酐酰化酪蛋白	87.64±0.29 ^d	3.38±0.28 ^{bc}	13.25±0.23 ^d	81.57±0.19 ^d

注: 标有不同字母的同种数据差异显著 (P<0.05)。

由表 2 可以看出,牦牛乳酪蛋白色泽为白色,略显黄色和红色,这是由于酪蛋白在加工过程中发生轻度美拉德反应以及乳脂肪残留^[24-25]。经过丁二酸酐酰化处理后,酪蛋白白色度增加,黄色和红色度降低,显著改善了酪蛋白的色泽。丁二酸酐酰化对酪蛋白的白色度也有增加作用。乙酸酐酰化后,虽然酪蛋白红色度增加,黄色度降低,白度略有降低,但总体上白色度有所增加。酰化反应可能导致部分美拉德反应产物分解或转化为其他物质,或者致使部分有色物质在酸沉淀过程中残留于溶剂中,从而使酪蛋白色泽变白。

3 结论

采用不同酰化试剂,对牦牛乳酪蛋白进行了酰化修饰,研究了修饰前后酪蛋白空间结构及部分理化性质变化。采用傅里叶变换红外光谱分析修饰前后酪蛋白胶束的二级结构发现,不同酰化试剂对酪蛋白二级结构影响程度不同,但其结构都以转角和 β -折叠为主;丁二酸酐酰化促使酪蛋白形成少量规则的 α -螺旋结构。较高级别的酰化修饰改变了酪蛋白的三级结构,不同酰化试剂改变程度不同。酰化修饰后,由于溶解性增加,酪蛋白缓冲能力增强。酰化修饰可导致酪蛋白胶束发生解离,钙、镁、磷含量降低。丁二酸和丁二酸酐酰化能够改善酪蛋白色泽,使其白色度增加。

综上所述,酰化修饰改变了酪蛋白结构及理化性质,不同酰化试剂影响程度不同。由于酸酐对酪蛋白的酰化程度较高,影响较为显著。

参考文献

- [1] Veen M, Norde W, Stuart M C. Effects of succinylation on the structure and thermostability of lysozyme [J]. *Agricultural Food Chemistry*, 2005, 53 (14): 5702-5707
- [2] Lawal O S, Adebawale K O. Effect of acetylation and succinylation on solubility profile, water absorption capacity, oil absorption capacity and emulsifying properties of mucuna bean (*Mucuna pruriens*) protein concentrate [J]. *Nahrung/Food*, 2004, 48(2): 129-36
- [3] Achouri A, Zhang W. Effect of succinylation on the physicochemical properties of soy protein hydrolysate [J]. *Food Research International*, 2001, 34(6): 507-514
- [4] Mirmoghtadaie L, Kadivar M, Shahedi M. Effects of succinylation and deamidation on functional properties of oat protein isolate [J]. *Food Chemistry*, 2009, 114(1): 127-131
- [5] de Kruijff 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] Li Haimei, Ma Ying, Dong Aijun, et al. Protein composition of yak milk [J]. *Dairy Science and Technology*, 2009, 90(1): 111-117
- [7] Wang Pengjie, Liu Hongna, Wen Pengcheng, et al. The composition, size and hydration of yak casein micelles [J]. *International Dairy Journal*, 2013, 31(2): 107-110
- [8] Li C P, Akasaki E, Zhao Y, et al. Micellar calcium phosphate-cross-linkage in yak casein micelles [J]. *Milchwissenschaft*, 2006, 61(3): 288-292
- [9] Bai W L, Yin R H. Molecular characterization and phylogenetic analysis of a yak (*Bos grunniens*) κ -casein cDNA from lactating mammary gland [J]. *Molecular Biology Reports*, 2011, 38(4): 2711-2718
- [10] Cui Yanhua, Liu Binyue Y, Qu Xiaojun, et al. Detection of β -casein variants in yak (*Bos grunniens*) by PCR-SSCP [J]. *European Food Research and Technology*, 2012, 234: 551-556
- [11] 杨敏,梁琪,毕阳,等.琥珀酰化修饰改善牦牛乳酪蛋白胶束结构及疏水性[J].*农业工程学报*,2013,29(10):287-292
YANG Min, LIANG Qi, BI Yang, et al. Influence of succinylation on the structure and hydrophobicity of yak casein micelles [J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE)*, 2013,

- 29(10): 287-292
- [12] Raouche S, Dobenesque M, Bot A, et al. Casein micelles as a vehicle for iron fortification of foods [J]. *European Food Research and Technology*, 2009, 229(6): 929-935
- [13] Raouche S, Marie D, Arjen B, et al. Stability of casein micelles subjected to CO₂ reversible acidification: impact of carbonation temperature and chilled storage time [J]. *International Dairy Journal*, 2008, 18(3): 221-227
- [14] Wu N, Wang L, Yang X, et al. Comparison of flavor volatiles and some functional properties of different soy protein products [J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2011, 88(10): 1621-1631
- [15] Dinnella C, Gargaro M T, Rossano R, et al. Spectrophotometric assay using o-phthalaldehyde for the determination of transglutaminase activity on casein [J]. *Food Chemistry*, 2002, 78(3): 363-368
- [16] Gebhardt R, Doster W, Friedrich J, et al. Size distribution of pressure-decomposed casein micelles studied by dynamic light scattering and AFM [J]. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters*, 2006, 35(6): 503-509
- [17] Hussain R, Gaiani C, Aberkane L, et al. Multiscale characterization of casein micelles under nacl range conditions [J]. *Food Biophysics*, 2011, 6(4): 503-511
- [18] Lakkis J, Villota R. Effect of acylation on substructural properties of proteins: a study using fluorescence and circular dichroism [J]. *Agricultural Food Chemistry*, 1992, 40(4), 553-560
- [19] Liu Yan, Guo Rong. pH-dependent structures and properties of casein micelles [J]. *Biophysical Chemistry*, 2008, 136(2): 67-73
- [20] Yazdi S R, Corredig M. Heating of milk alters the binding of curcumin to casein micelles: a fluorescence spectroscopy study [J]. *Food Chemistry*, 2012, 132(3): 1143-1149
- [21] Uversky V N, Gillespie J R, Millett I S, et al. Natively unfolded human prothymosin α adopts partially folded collapsed conformation at acidic pH [J]. *Biochemistry*, 1999, 38(45): 15009-15016
- [22] Manderson G A, Creamer L K, Hardman M J. Effect of heat treatment on the circular dichroism spectra of bovine β -lactoglobulin A, B, and C [J]. *Agricultural Food Chemistry*, 1999, 47(11): 4557-4567
- [23] 徐红华,申德超.不同挤压参数对大豆粕蛋白质结构的影响 [J]. *农业工程学报*, 2007, 23(7): 267-271
XU Hong-hua, SHEN De-chao. Effects of extrusion parameters on the structure of soybean meal proteins [J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE)*, 2007, 23(7): 267-271
- [24] 甘伯中,常海军,余群力,等.牦牛曲拉干酪素脱色工艺优化 [J]. *农业工程学报*, 2006, 22(10): 203-207
GAN Bo-zhong, CHANG Hai-jun, YU Qun-li, et al. Optimization of the technology for the decoloration of yak milk casein "Qula" [J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE)*, 2006, 22(10): 203-207
- [25] 余群力,甘伯中,敏文祥,等.牦牛"曲拉"精制干酪素工艺研究 [J]. *农业工程学报*, 2005, 21(7): 140-144
YU Qun-li, GAN Bo-zhong, MIN Wen-xiang, et al. Processing technology for purifying casein made from Yak "Qula" [J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE)*, 2005, 21(7): 140-144