

热处理羊乳酪蛋白结构与抗原性的变化规律

薛海燕¹, 樊娇娇¹, 贺宝元², 操歌¹, 李晶莹¹, 宋宏新¹

(1. 陕西科技大学食品与生物工程学院, 陕西西安 710021)

(2. 陕西科技大学轻工科学与工程学院, 陕西西安 710021)

摘要: 热加工处理羊乳 α -酪蛋白 (α -casein, α -CN) 和 β -酪蛋白 (β -casein, β -CN), 通过圆二色谱、荧光光谱等方法探索不同热加工条件下羊乳的蛋白结构变化与抗原性的关系。结果表明: 随着对蛋白热处理温度的升高, 会破坏羊 α -CN 和 β -CN 的天然结构, 使得分子内部发生交联或聚集, 导致分子量发生改变, 分子内游离羰基含量升高, 在 134 °C 时, 羰基含量分别增长了 134.72%、110.98%; 自由巯基含量则不断下降; 疏水性探针检测最大荧光吸收强度分别增加了 50.38% 和 9.61%, 升温引起疏水基团或二硫键等被暴露出来, 导致蛋白疏水性随着温度的升高而增大。圆二色谱显示, 二级结构中卷曲程度或弹性结构发生复杂的转化, 使蛋白质空间结构发生改变, α -螺旋呈现增加趋势, β -转角和无规则卷曲则在减少。两种蛋白的抗原性随着温度的升高而降低, 经模拟胃肠消化, 134 °C 处理后抗原性分别减少了 80.63% 和 84.12%。故热处理可降低羊乳酪蛋白的抗原性, 且抗原性变化与蛋白的游离羰基含量变化呈反比, 还与二级结构中的无规则卷曲及 β -转角含量呈正相关关系。

关键词: 酪蛋白; 热处理; 二级结构; 抗原性

文章编号: 1673-9078(2021)02-94-102

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.2.0751

The Correlation between Structural and Antigenicity Changes of Goat Casein by Heat Treatment

XUE Hai-yan¹, FAN Jiao-jiao¹, HE Bao-yuan², CAO Ge¹, LI Jing-ying¹, SONG Hong-xin¹

(1. College of Food and Biological Engineering, Shaanxi University of Science and Technology, Xi'an 710021, China)

(2. College of Bioresources Chemical and Materials Engineering, Shaanxi University of Science and Technology, Xi'an 710021, China)

Abstract: The heat treatment of α -casein (α -CN) and β -casein (β -CN) in goat milk was explored by circular dichroism, fluorescence spectroscopy and other methods to analyze the effects of their structure and antigenicity. The results showed that with the increase of the heat treatment temperature of the casein, the natural structure of α -CN and β -CN was destroyed, caused molecular cross-linking or aggregation, and changed the molecular weight. The content of free carbonyl in the molecule increased. At 134 °C, the carbonyl content increased by 134.72% and 110.98%, respectively. The free sulfhydryl content decreased continuously. The maximum fluorescence absorption intensity of the hydrophobic probes increased by 50.38%, and 9.61%, respectively. The temperature rise caused hydrophobic groups or disulfide bonds to be exposed, resulting in increasing hydrophobicity of the proteins. Circular dichroism results showed that the degree of curl or elastic structure in the secondary structure undergoes complex transformation, which changes the spatial structure of the protein. α -spirals were increased, β -turns and irregular curls were decreased. The antigenicity of casein decreased with increased temperature. After simulated gastrointestinal digestion, the antigenicity was reduced by 80.63% and 84.12%, respectively, at 134 °C. Therefore, heat treatment can reduce the antigenicity of goat milk casein. And the change of antigenicity are inversely proportional to the change of free carbonyl content of protein. In addition, it is also

引文格式:

薛海燕, 樊娇娇, 贺宝元, 等. 热处理羊乳酪蛋白结构与抗原性的变化规律[J]. 现代食品科技, 2020, 37(2): 94-102

XUE Hai-yan, FAN Jiao-jiao, HE Bao-yuan, et al. The correlation between structural and antigenicity changes of goat casein by heat treatment [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 37(2): 94-102

收稿日期: 2020-08-13

基金项目: 陕西省重点研发计划项目(2020ZDLNY02-09); 陕西省教育厅服务地方专项项目(19JC05); 西安市科技计划农业科技创新工程项目(201903035YF023NS023, 20NYF0016)

作者简介: 薛海燕(1979-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品加工与质量控制技术

positively correlated with the content of irregular curls and β -turns in the secondary structure.

Key words: casein; heat treatment; secondary structure; antigenicity

乳制品含有丰富的蛋白质、脂肪、维生素、矿物质等的营养成分，是人类摄取营养的重要来源之一。酪蛋白是乳中含量最高的蛋白质，约占乳总蛋白质的80%，它在乳中主要以胶束形式存在，是一种高度磷酸化钙结合蛋白^[1]，酪蛋白主要有 α_{s1} -CN， α_{s2} -CN， β -CN 和 κ -CN 四种类型。对于过敏人群来说，酪蛋白则是引起人体过敏反应的主要过敏原之一，如表 1 中，羊乳酪蛋白中 β -CN 含量最大， κ -CN 也较牛乳含量高，而 α_{s1} -CN 含量低于牛乳。有研究显示了对低 α_{s1} -CN 含量的山羊乳有较小免疫反应性^[2]，故 α_s -CN 对研究羊乳抗原性等方面性质极其重要。而羊乳与牛乳酪蛋白结构不同，受加工影响的结构和抗原性变化亦不同。

表 1 山羊乳、牛乳和人乳中酪蛋白含量差异^[3]

Table 1 Difference of casein content in goat milk, bovine milk

and human milk

蛋白质	山羊乳	牛乳	人乳
蛋白质/%	3.5	3.3	1.2
总酪蛋白/(g/100 mL)	2.11	2.70	0.40
α_{s1} -酪蛋白(占总酪蛋白的百分比)/%	5.6	38.0	-
α_{s2} -酪蛋白(占总酪蛋白的百分比)/%	19.2	12.0	-
β -酪蛋白(占总酪蛋白的百分比)/%	54.8	36.0	60~70.0
κ -酪蛋白(占总酪蛋白的百分比)/%	20.4	14.0	7.0

乳品加工中，通过一定的加工处理可使蛋白质改性，引起乳品蛋白质的分子结构及理化性质发生改变，有可能会改变乳品的过敏性^[4]。主要的处理方法有物理法（热处理^[5]、高压处理、辐照处理等）、化学法（糖基化作用等）、酶法和生物法等。许倩^[6]等利用动态高压微射流结合加热处理浓缩乳蛋白可降低其中酪蛋白的抗原性，增加 α -乳白蛋白的抗原性，但对 β -乳球蛋白效果不明显；张微等^[7]研究蛋白酶水解作用对牛乳酪蛋白抗原性的影响，结果表明胰蛋白酶能够有效降低牛乳酪蛋白的抗原性。Li^[8]等研究发现，经超声处理后的虾肉蛋白，纯化虾原肌球蛋白的 IgE 结合能力降低了 80%。麻小娟^[9]对卵白蛋白采用糖基化处理来探索其抗原性及过敏性，发现随着糖基化的进行，卵白蛋白的抗原性逐渐升高，过敏性逐渐降低。

而热处理是乳品加工中常用的物理改性方法。在巴氏灭菌奶、UHT 牛奶、乳奶、炼乳等乳制品的加工过程中都有涉及加热。热处理能够使蛋白分子结构发生变化，使得其抗原表位被破坏、掩埋、暴露等，最终影响蛋白的抗原性。Bu^[10,11]等通过不同温度加热处理乳清分离蛋白，结果发现当加热温度在 90 °C 以下

时， α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的抗原性增加，当温度高于 90 °C 时，两种蛋白的抗原性均显著下降。张银^[12]等采用热处理与动态超高压加工两种方式结合处理卵白蛋白，结果表明卵白蛋白抗原性随着加热温度的升高而降低，随着压力的升高先降低后回升，并且表明了热处理对卵白蛋白抗原性的影响比超高压大。

关于热处理改变蛋白性质，目前大多是关于蛋白结构变化的研究，在牛乳方面较多关于乳清蛋白中 α -La 与 β -Lg 的研究，但关于对羊乳酪蛋白结构及抗原性等研究尚少。因此，在现有的研究基础上，采用羊乳酪蛋白中的 α -CN 与 β -CN 作为研究对象，对其进行不同温度处理，测定其蛋白的结构变化与抗原性变化，并分析不同温度下蛋白的结构变化与抗原性之间的关系，为羊乳的过敏性研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

羊乳：陕西金牛乳业有限公司提供；Tris-base；邻甲苯甲醛（DNPH）；乙酸乙酯；盐酸胍；乙二胺四乙酸（EDTA）；5,5'-二硫代双（2-硝基苯甲酸）（DTNB）；1-苯氨基萘-8-磺酸（ANS）；胰蛋白酶；胃蛋白酶。

1.2 仪器与设备

超高温高压灭菌，上海申安医疗器械厂；电泳仪，北京百晶生物技术有限公司；PHS-3C 型 pH 计，赛多利斯科学仪器有限公司；高速冷冻离心机，安徽中科中佳科学仪器有限公司；凝胶成像分析系统，南京驰顺科技有限公司；冷冻干燥机，青岛永和和创新电子科技有限公司；全波长扫描式多功能读数仪，赛默飞世尔科技有限公司；圆二色光谱仪，英国应用光物理公司。

1.3 方法

1.3.1 羊乳酪蛋白的分离制备

将新鲜羊乳离心脱脂，盐酸沉淀（pH=4.1）羊乳酪蛋白。用 0.05 mol/L 的 NaOH 作为溶剂，配置 30 mg/mL 羊乳酪蛋白溶液，在 30 °C 下调 pH 至 12.0，加 CaCl_2 溶液至体系中的 Ca^{2+} 浓度为 0.09 mol/L，调 pH 至中性，4000 r/min 离心 15 min，收集沉淀①。将沉淀①于 3 mol/L 的尿素溶液中完全溶解后，调 pH 为

4.1, 离心, 收集沉淀②, 反复水洗沉淀, 透析并冻干得 α -CN; 将沉淀①溶于水, 待完全溶解后调 pH 4.1, 在 4 °C 下冷却 3 h, 离心, 提取上清液, 在 30 °C 下调 pH 为 4.1, 再离心, 收集沉淀③, 水洗 3 次, 透析并冻干得 β -CN。将制得酪蛋白的分离组分在冷冻干燥机中, 进行真空冻干, 冻干粉末 -20 °C 保存备用。

1.3.2 羊乳酪蛋白的热处理

将羊 α -CN、羊 β -CN 用 0.01 mol/L pH 7.4 的磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 配成 1 mg/mL 的溶液, 依据常见的处理方式温度设定如下: 63 °C (低温保持巴氏杀菌) 30 min、80 °C (高温巴氏杀菌) 15 s、100 °C (煮沸杀菌) 300 s、134 °C (超高温高压灭菌) 4 s, 不进行热处理作为对照组。加热处理后的样品, 取出后瞬间低温冷却放置。

1.3.3 SDS-PAGE 检测分子量^[13]

将热处理后的酪蛋白进行 SDS-PAGE (聚丙烯酰胺凝胶电泳) 分析热处理对蛋白质分子量的影响。

1.3.4 酪蛋白的侧链基团修饰变化

1.3.4.1 游离羰基含量的测定^[14]

采用 DNPH 比色法测定热处理后的羊 α -CN、羊 β -CN 样品溶液中游离羰基含量。以不加蛋白样品为空白, 在 370 nm 波长处测量上清液的吸光值, 用 Bradford 法测上清液中的蛋白质含量^[15]。按朗伯比尔定律计算羰基含量。

$$A = \xi bc$$

式中: A 表示所测样品的净吸光值; ξ 为 DNPH 的摩尔消光系数, 值为 22000 L/(mol·cm); b 为比色皿的厚度; c 为游离羰基的浓度, 用 nmol/g 蛋白质表示。

1.3.4.2 自由巯基的测定

参照 Ellman's DTNB 法^[16]。分别取得热处理前后的 1.0 mL 的羊 α -CN、羊 β -CN 样品溶液与 4.0 mL Tris-Gly 缓冲溶液 (0.086 M Tris、0.09 M Gly、5 mM EDTA、pH 8.0) 混匀, 再加入 50 μ L 4 mg/mL 的 Ellman's 试剂 (4.0 mg DTNB 溶于 1.0 mL 的 Tris-Gly 缓冲液), 37 °C 反应 15 min, 在 412 nm 处测其吸光值。

$$\text{自由巯基含量 } (\mu\text{mol/g}) = \frac{73.5 \times A \times D}{C}$$

式中: A 为吸光度; D 为稀释倍数; C 为样品浓度 (mg/mL)。

1.3.5 蛋白质二级结构的测定

利用圆二色光谱仪对热处理前后的羊 α -CN、羊 β -CN 样品用 PBS 配置成 0.02 mg/mL 溶液进行色谱检测。测定条件: 扫描范围是 210~280 nm, 其中石英样品池的光程是 0.01 cm, 扫描速度是 100 nm/min, 扫描带宽为 0.5 nm, 步长为 1 nm。通过系统自带的分析

软件对结果进行分析。

1.3.6 表面疏水性的测定

采用 ANS 荧光探针法对热处理前后的羊 α -CN、羊 β -CN 的疏水性进行测定^[17]。测定条件为: 激发波长为 370 nm, 扫描发射波长范围为 400~600 nm, 电压为 400 V, 狭缝宽度均为 10 nm。本实验用荧光强度来表示疏水性的大小。

1.3.7 测定消化后酪蛋白抗原性

模拟婴儿胃肠消化, 将热处理后的羊 α -CN、羊 β -CN 调节 pH 至 3, 在 37 °C 下加入 0.3% (质量体积比) 的胃蛋白酶, 恒温搅拌反应 2 h, 即开始进行模拟胃液消化。反应停止后立即调节溶液 pH 至 7, 加入胰蛋白酶使其浓度为 10 mg/mL, 恒温搅拌反应 4 h, 即进行模拟肠液消化。最后用 100 °C 沸水浴灭酶 5 min 停止反应, 然后放置冰水冷却, 将样品分装后 -20 °C 条件下保存待测^[18]。

1.3.8 抗原性评估^[19]

采用间接竞争 ELISA 方法测定被处理的 α -CN 和 β -CN 的残余抗原性。在间接竞争 ELISA 体系中待测抗原与包被抗原竞争结合抗体血清, 因此被测抗原的抗原性大小与吸光值成反比。羊 α -CN、羊 β -CN 稀释包被浓度为 12.5 μ g/mL, 取 100 μ L 包被在 96 酶标孔板中 4 °C 过夜; 隔天洗板后加入待测抗原与羊抗兔 IgG 预混液进行竞争反应, 其中对照组不加待测抗原; 1 h 后洗板并加入 1:4000 稀释的羊抗兔 IgG-HRP 标记物进行检测并显色, 终止显色后检测吸光值 OD, 将梯度浓度对应的 OD 值转化为 B/B₀ 值作为纵坐标 (B₀ 为无抗原竞争时的 OD 值, B 为各相应浓度抗原抑制时的 OD 值), 相应浓度的对数是横坐标 lg[α -CN] (或 lg[β -CN]), 绘制标准曲线, 并进行线性回归拟合, 由此计算得待测抗原的浓度, 来反映相应抗原性的变化。

1.3.9 数据处理

采用 Origin 9.0 软件作图, 并用 SPSS 19 软件进行统计学分析。

2 结果与讨论

2.1 分子量分析

如图 1 为羊乳分离制备的酪蛋白组分电泳图谱, 经凝胶成像灰度值分析估算出所分离得到的羊 α -CN 和 β -CN 的纯度都在 80% 以上, 市售标准蛋白纯度为 70% 以上, 表明所分离的蛋白较纯, 可用于后续研究。

酪蛋白经过热处理、高压脉冲电场、辐射以及超声波手段的处理后, 其分子量可能会发生改变。图 2 为羊乳的 α -CN 和 β -CN 经过不同温度处理后对酪蛋白

分子量的影响。观察各组条带颜色可知：羊乳的 α -CN 和 β -CN 在 63 °C 时灰度无明显变化，在温度升高达到 80 °C 之后有灰度变浅的现象。电泳图谱中蛋白条带的灰度深浅可以代表进入电泳凝胶内的蛋白含量变化。因为羊乳的酪蛋白热稳定性差，使得酪蛋白发生脱磷酸化反应引起蛋白分子交联形成大分子物质，而无法进入分离胶形成条带^[20]，导致电泳图所示的条带灰度变浅。这与李林强等^[21]对于热处理牛羊乳酪蛋白的 SDS 电泳结果相似，蛋白经一定程度的热处理均发生交联聚合，且羊乳较牛乳更易发生聚合。

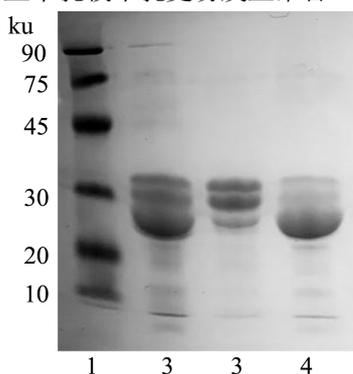


图1 羊奶酪蛋白成分的 SDS-PAGE

Fig.1 SDS-PAGE of the components of casein in goat milk

注：1, Marker; 2, 羊酪蛋白; 3, 羊 α -CN; 4, 羊 β -CN。

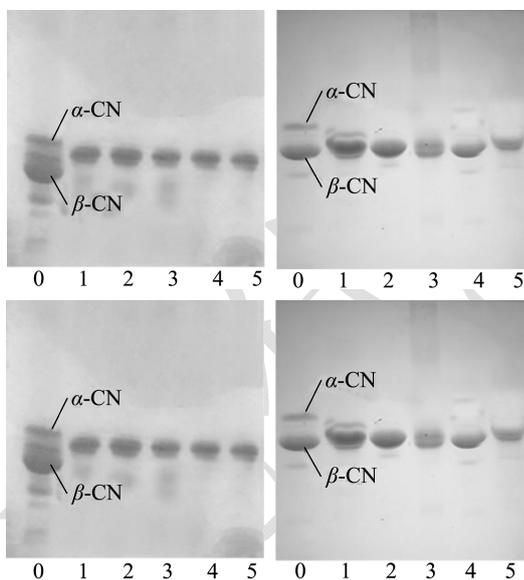


图2 温度对羊乳中 α -CN 和 β -CN 分子量的影响

Fig.2. Effect of temperature on the molecular weight of α -CN and β -CN in goat milk

注：0号泳道代表酪蛋白，1~5号泳道依次代表未处理，63 °C、80 °C、100 °C 和 134 °C。

2.2 酪蛋白的侧链修饰的变化

2.2.1 游离羰基含量

蛋白质的很多侧链氨基酸官能团都容易氧化形成

羰基类衍生物，如肽键的断裂、氨基酸侧链的氧化等，因此游离羰基含量可以被用来判断蛋白质的氧化程度^[22-24]。图2为不同温度的处理下，羊乳 α -CN 和 β -CN 中游离羰基含量的变化。可以观察到，在温度达到 63 °C 时，羊乳 α -CN 和 β -CN 的游离羰基含量显著增长，且随着温度的升高不断增多，当温度到达 134 °C 时，羊乳的 α -CN 和 β -CN 中游离羰基含量与未处理时相比分别增加了 134.72% 和 110.98%，均有极显著增长。这是由于蛋白中的 α -CN 和 β -CN 为无规则卷曲蛋白，蛋白中的色氨酸、蛋氨酸、组氨酸等受高温影响最易被氧化形成羰基^[25]。羊乳热稳定性低，易在高温条件下被氧化，且温度越高，氧化程度越剧烈。

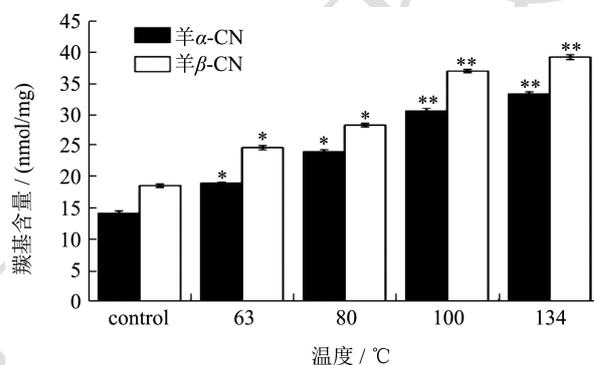


图2 温度对羊乳的 α -CN 和 β -CN 中游离羰基含量的影响

Fig.2 Effect of temperature on free carbonyl content of α -CN and β -CN in goat milk

注：*表示数据与对照组比有显著性差异 ($p < 0.05$)，**表示数据与对照组比有极显著性差异 ($p < 0.01$)。图3、6同。

2.2.2 自由巯基含量

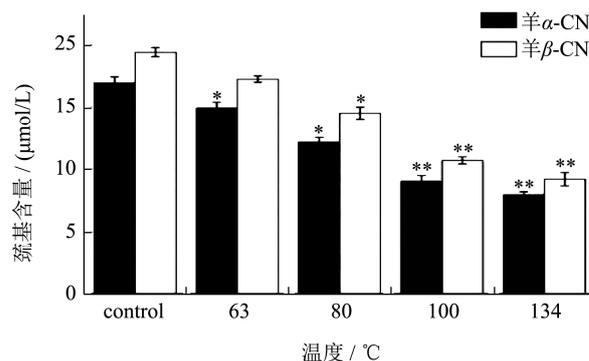


图3 温度对羊乳的 α -CN 和 β -CN 中自由巯基含量的影响

Fig.3 Effect of temperature on free sulfhydryl content of α -CN and β -CN in goat milk

巯基基团时蛋白质中的重要功能性基团之一，它可以相互交联后形成二硫键，用来稳定蛋白质的高级结构^[26,27]。图3是不同温度的处理下，羊乳的 α -CN 和 β -CN 中自由巯基含量的变化。由图可知，羊乳的 α -CN 中自由巯基含量低于 β -CN 中自由巯基的含量，通过计算得出，当温度加热至 63 °C 时，羊乳 α -CN

中的自由巯基含量有显著下降,在温度达到 100 °C 时便有极显著降低,随后下降趋于平缓,当温度为 134 °C 时,其自由巯基含量减少了 53.03%。然而,羊乳 β -CN 中的自由巯基含量不及 α -CN 对温度敏感,当温度达到 80 °C 时,自由巯基的含量才开始有了显著降低,当温度到达 134 °C 时,自由巯基含量减少了 52.65%,与未处理时相比,有了极显著差异。

2.3 酪蛋白二级结构的变化

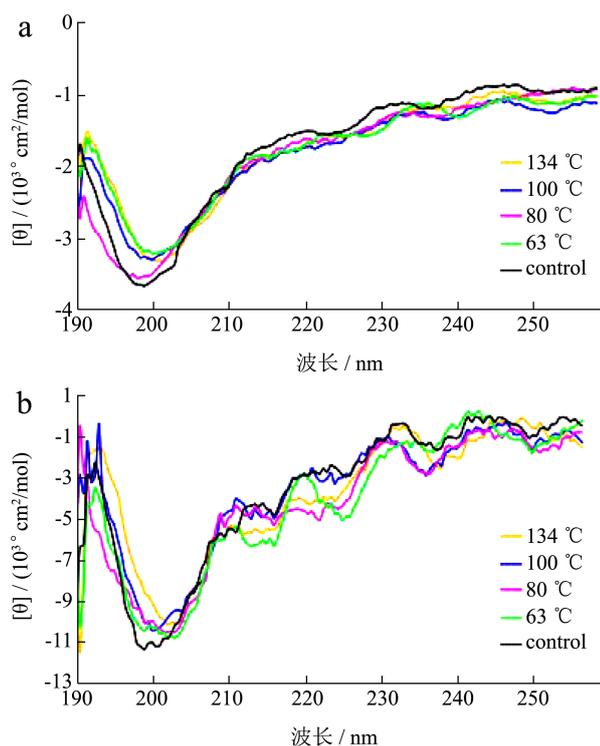


图 4 不同温度条件下羊乳 α -CN (a) 和 β -CN (b) 的圆二色谱图

Fig.4 CD chromatogram of α -CN (a) and β -CN (b) from goat under the different thermal processing conditions

蛋白的二级结构中,肽键的序列都是一定的,这些顺序决定着肽键能级会发生的跃迁情况,圆二色谱

的谱带因蛋白的二级结构不同而有所差异,因此,根据圆二色谱可以分析蛋白的二级结构差异。如图 4 为不同温度条件下羊乳 α -CN 和 β -CN 的圆二色谱图。由图 4 可以看出,在 190~250 nm 范围内,在 206 nm 处由负转正有一正谱带,这是 β -转角结构^[28];在 212 nm 处和 225 nm 处的两个负峰是 α -螺旋特征峰;在 222 nm 处还有一个负谱带,是 β -折叠特征峰,谱图可发现结构中含有大量无规则卷曲结构^[29]。

表 2 和表 3 是关于羊乳中 α -CN 和 β -CN 的二级结构含量变化。计算发现羊乳 α -CN 与 β -CN 的二级结构含量变化,其中,羊 β -CN 的 α -螺旋结构的初始含量高于 α -CN 的该结构含量,这或许是由于羊乳本身 α -CN 的含量就远低于 β -CN^[30]。且由表格可知,随着温度变化,两种酪蛋白的无规则卷曲结构和 β -转角的含量变化均随着温度的升高而减少,当温度达到 134 °C 时 α -CN 的 β -转角结构含量减少了 85.38%,无规则卷曲减少了 51.71%, β -CN 的两类结构的含量分别减少了 56.14%和 94.38%,这表明了随着温度升高羊乳 α -CN 的结构弹性增加,这或将与它更易被水解有关。 α -螺旋结构的含量变化则与上述两种结构变化相反,随着温度的升高而增加,当温度达到 134 °C 时两种蛋白分别增加了 53.11%和 85.50%。该二级结构变化与章宇斌^[31]对酪蛋白进行不同温度处理后的 CD 测定的部分研究结果相似,加热导致 α -及 β -CN 的螺旋含量逐渐增加。然而,两种酪蛋白的 β -折叠结构的含量却随着温度的升高分别在 26.52%~28.56%和 13.79%~ 21.88%的区间内有着小幅度的无规则的变化,这表明了温度的改变不会对羊乳的该蛋白结构有明显的影 响。吴相佚^[26]等对浓缩乳蛋白 70 进行热处理,其蛋白二级结构中 α -螺旋和 β -转角的含量下降, β -折叠和无规则卷曲含量上升。蛋白的不同可能导致结构的差异,且乳蛋白自身还存在着酪蛋白与清蛋白的交联与聚集,可能导致结果的差异。

表 2 温度对羊 α -CN 二级结构各组分含量的影响

Table 2 Effect of temperature on the content of goat α -CN secondary structure (%)

加热条件/°C	二级结构组成/%			
	α -螺旋	β -转角	β -折叠	无规则卷曲
control	39.33±0.22 ^a	12.11±0.51 ^a	27.33±0.18 ^a	23.01±0.88 ^a
63 °C	40.82±0.32 ^a	10.26±0.22 ^b	28.56±0.03 ^a	20.23±0.17 ^b
80 °C	44.36±0.47 ^c	7.97±0.32 ^c	27.96±0.56 ^a	18.88±0.19 ^c
100 °C	58.78±0.13 ^d	2.32±0.33 ^d	26.52±0.27 ^a	12.98±0.34 ^d
134 °C	60.22±0.09 ^e	1.77±0.26 ^e	27.65±0.09 ^a	11.11±0.28 ^e

注: 每列不同的字母表示数据与对照组比有极显著性差异 ($p < 0.05$), 下表同。

表 3 温度对羊 β -CN 二级结构各组分含量的影响

Table 3 Effect of temperature on the content of goat β -CN secondary structure (%)

加热条件/°C	二级结构组成/%			
	α -螺旋	β -转角	β -折叠	无规则卷曲
control	41.72±0.33 ^a	14.41±1.01 ^a	21.88±0.33 ^a	22.79±0.72 ^a
63 °C	50.68±0.29 ^b	13.22±0.29 ^a	14.42±0.67 ^b	10.22±0.67 ^b
80 °C	58.61±0.32 ^c	12.14±0.87 ^c	16.93±0.45 ^c	8.28±0.09 ^c
100 °C	69.18±0.07 ^d	11.29±0.23 ^d	13.79±0.74 ^d	3.44±0.23 ^d
134 °C	77.39±0.17 ^e	6.32±0.18 ^e	15.82±0.21 ^e	1.28±0.46 ^e

表 4 温度对样品荧光光谱分析时最大荧光强度的影响

Table 4 Effect of temperature on maximum fluorescence intensity in fluorescence spectrum analysis of samples

温度/°C	Control	63 °C	80 °C	100 °C	134 °C
羊 α -CN	6.51±0.25 ^a	7.13±0.06 ^a	8.91±0.10 ^c	9.22±0.03 ^d	9.79±0.42 ^e
羊 β -CN	12.69±0.22 ^a	12.36±0.09 ^a	14.95±0.17 ^c	13.91±0.07 ^d	13.91±0.16 ^e

2.4 酪蛋白疏水性分析

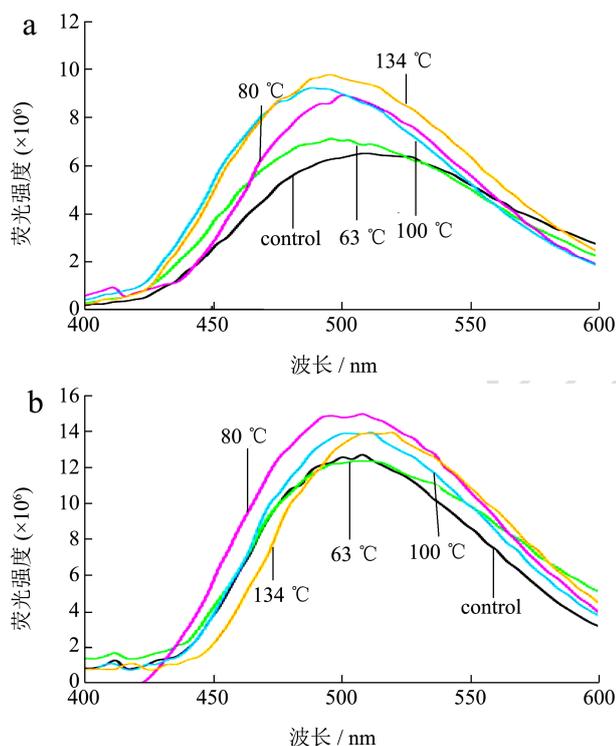


图 5 不同温度条件下羊 α -CN (a) 和 β -CN (b) 的荧光光谱
Fig.5 Fluorescence spectra of α -CN (a) and β -CN (b) from goat at different temperatures

图 5 是由 ANS 荧光探针检测法得到的两种酪蛋白不同温度条件下的荧光光谱图。应用荧光探针法来研究蛋白质的构象，在一定范围内，最大荧光强度与蛋白表面的疏水性呈线性关系^[32]。

观察谱图可以看出，未经过热处理时，羊乳的 α -CN 疏水性均小于 β -CN 的疏水性，这说明羊乳 α -CN 的疏水性结合位点低于 β -CN。结合表 4 可以看出，随着温度升高，羊乳 α -CN 的最大荧光强度随之增强，

到 134 °C 时增加了约 50.38%，这是由于温度的升高导致二硫键介导的聚合反应隐藏了部分含有荧光色基团的氨基酸，导致荧光强度增强，同时，蛋白二级构象发生改变，一些集中在 α -螺旋、 β -折叠等转角处的亲水区域因结构的变化而减少，从而使得蛋白分子内的疏水基团暴露，也可导致荧光强度增强。上述现象可以证明随着温度的升高，酪蛋白结构表面疏水基团会增加，而疏水性的增强或将导致蛋白的解离程度有所增大。又因羊乳酪蛋白的热稳定性弱，且 β -CN 在羊乳酪蛋白中占有很大比例，所以羊乳 β -CN 的胶束与 ANS 结合的亲和力与紧密度相对不稳定，使得最大荧光强度与其他蛋白相比在温度的升高过程中有着摆动性的无规则变化。

2.5 抗原性的变化

通过模拟婴儿的胃肠水解消化，并采用间接竞争 ELISA 法检测热处理对牛羊乳 α -CN 和 β -CN 的抗原浓度变化，来反应其抗原性的变化。图 6 表示消化前后的抗原性变化。观察发现：在未经过热处理时，羊乳中的 β -CN 含量高于 α -CN，因此图示羊乳 α -CN 的抗原性低于 β -CN 的抗原性^[33]。在未经过胃肠模拟消化时，羊乳中 α -CN 和 β -CN 的抗原性均随着温度的升高而持续性降低，当加热温度为 80 °C 时，抗原性有显著性变化，当温度为 134 °C 时抗原性有了极显著的降低， α -CN 和 β -CN 的抗原性分别降低了 61.80% 和 69.02%。羊乳的 α -CN 在模拟胃肠消化之后，其抗原性与相同温度下未消化时的抗原性相比约下降了 50% 左右，且仅当温度达到 63 °C 时抗原性就有显著降低，而羊乳 β -CN 的抗原性却直至温度达到 80 °C 时才有显著性减少。当温度在 134 °C 时，两种蛋白的抗原性浓度相似，仅剩 7.86~8.54 μ g/mL，与未经温度处理的

消化前后相比,都有着极显著的降低。这就与前人所得出的羊乳酪蛋白较牛乳在体内来说更易被人体消化吸收的结论相呼应。结合羊乳的 α -CN和 β -CN的侧链修饰变化、二级结构和疏水性的变化可推断,随着温度升高,羊乳酪蛋白抗原性的减少,除了与其氧化程度(游离羰基含量的增多)、疏水性增加有关,或与二级结构中的 β -转角含量和无规则卷曲含量的减少有关,它们随着温度的升高几近消失,这种现象或导致部分抗原结合位点的消失而减少了免疫反应的进行。

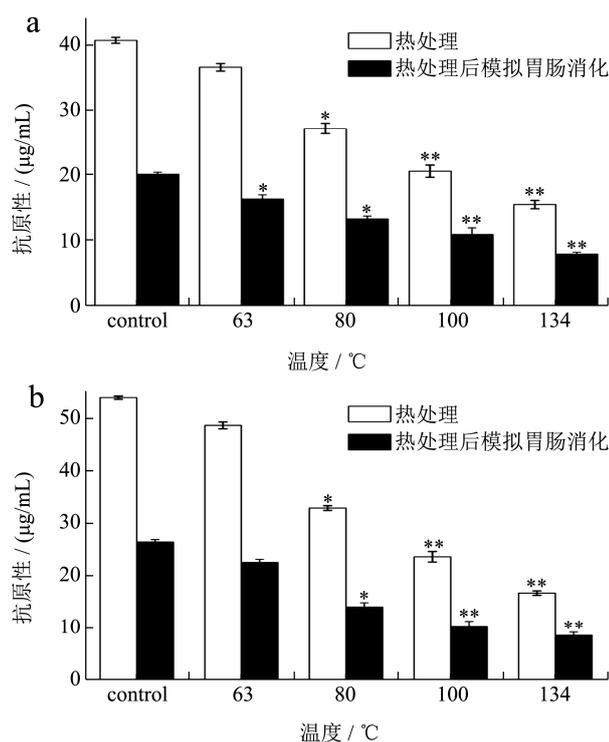


图6 不同温度对羊 α -CN和 β -CN抗原性的影响

Fig.6. Effects of different temperatures on the antigenicity of goat α -CN (a) and β -CN (b)

3 结论

热处理羊乳酪蛋白会发生蛋白的交联,导致部分沉降或聚集成大分子物质。同时,样品蛋白被高温所氧化,导致游离羰基含量升高、自由巯基含量减少。且随着温度的不断升高,羊乳的 α -CN和 β -CN的二级结构中, α -螺旋呈现增加趋势, β -转角和无规则卷曲则减少至几近消失。此外,羊乳 α -CN的荧光强度均随着温度升高而增强,而羊乳 β -CN的胶束与ANS结合的亲和力与紧密度相对不稳定,故羊乳 β -CN的荧光强度呈现无规则变化。温度的升高会引起蛋白的卷曲程度及弹性结构发生改变,导致分子内的疏水基团,二硫键等暴露,蛋白结构发生聚合或交联,部分分子表面的抗原表位被掩埋或被氧化分解,最终导致了被测蛋白抗原性均有所降低。故温度的升高,能够使羊

乳 α -CN和 β -CN的抗原性减弱,且与蛋白的游离羰基含量呈负相关关系,其二级结构中 β -转角和无规则卷曲与抗原性变化呈一定正相关,而 α -CN的抗原性与疏水性呈反比关系。此外,羊乳 α -CN和 β -CN经过不同条件的热处理后再经胃肠消化,抗原性再度明显降低。但仅依据单体蛋白研究还不能十分准确的探究其具体规律性改变,在实际加工过程中,蛋白的分子间也存在交联与聚合现象,这还需进一步探究其中的潜在规律。

参考文献

- [1] Yosuke Komatsu, Yasuaki Wada, Hirohisa Izumi, et al. Casein materials show different digestion patterns using an *in vitro* gastrointestinal model and different release of glucagon-like peptide-1 by enteroendocrine GLU Tag cells [J]. Food Chemistry, 2019, 277: 423-431
- [2] Ballabio C, Chessa S, Rignanese D, et al. Goat milk allergenicity as a function of α_{s1} -casein genetic polymorphism [J]. Journal of Dairy science, 2011, 94(2): 998-1004
- [3] Park Y W, Haenlein, G F W. Handbook of Milk of Non-bovine Mammals [M]. Chemical Industry Press, 2010
- [4] 杨晋辉,李松励,郑楠,等.热处理对牛乳成分的影响以及热敏感指标的变化研究进展[J].食品科学,2017,38(7): 302-308
YANG Jin-hui, LI Song-li, ZHENG Nan, et al. Effect of heat treatment on milk components and changes in heat-sensitive components: a review [J]. Food Science, 2017, 38(7): 302-308
- [5] 赵焯,李向莹,秦于思,等.热处理对 α -乳白蛋白变性及其与其他乳蛋白相互作用影响的研究进展[J].食品科学, 2019, 40(21):260-265
ZHAO Xuan, LI Xiang-ying, QIN Yu-si, et al. Recent advances in understanding the effect of heat treatment on α -lactalbumin denaturation and its interaction with other milk proteins [J]. Food Science, 2019, 40(21): 260-265
- [6] 许倩,李大鹏,黄和平,等.动态高压微射流对乳蛋白抗原性的影响[J].中国农业大学学报,2015,20(5):222-227
XU Qian, LI Da-peng, HUANG He-ping, et al. Effects of dynamic high-pressure microfluidization on antigenicity of milk protein concentrate [J]. Journal of China Agricultural University, 2015, 20(5): 222-227
- [7] 张微,张索坤,王希彪.蛋白酶水解降低牛乳酪蛋白抗原性的研究[J].黑龙江畜牧兽医,2014,15:112-115
ZHANG Wei, ZHANG Suo-kun, WANG Xi-biao. Study on reducing the antigenicity of bovine casein by protease

- hydrolysis [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2014, 15: 112-115
- [8] Li Z X, Lin H, Cao L M, et al. Effect of high intensity ultrasound on the allergenicity of shrimp [J]. Journal of Zhejiang University Science, 2006, 7(4): 251-256
- [9] 麻小娟.糖基化对卵白蛋白的构象及其抗原性和过敏原性的影响[D].南昌:南昌大学,2011
MA Xiao-juan. Effects of glycosylation on conformation antigenicity and allergenicity of egg ovalbumin [D]. Nanchang: Nanchang University, 2011
- [10] Bu G, Lu J, Zheng Z, et al. Influence of Maillard reaction conditions on the antigenicity of bovine α -lactalbumin using response surface methodology [J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2010, 89(14): 2428-2434
- [11] Bu G, Luo Y, Lu J, et al. Reduced antigenicity of β -lactoglobulin by conjugation with glucose through controlled Maillard reaction conditions [J]. Food and Agricultural Immunology, 2010, 21(2): 143-156
- [12] 张银,佟平,麻小娟,等.热加工及超高压处理对卵白蛋白抗原性的影响[J].食品科学,2010,31(19):250-253
ZHANG Yin, TONG Ping, MA Xiao-juan, et al. Respective and combined effects of heat and high-pressure treatments on the antigenicity of egg white ovalbumin [J]. Food Science, 2010, 31(19): 250-253
- [13] 宋宏新,张歌,李红心,等.牛羊乳酪蛋白制备及电泳分析比较[J].中国酿造,2012,31(10):65-67
SONG Hong-xin, ZHANG Ge, LI Hong-xin, et al. Preparation and electrophoretic analysis of casein in cow and goat milk [J]. China Brewing, 2012, 31(10): 65-67
- [14] Lenz A G, Costabel U, Shaltiel S, et al. Determination of carbonyl groups in oxidatively modified proteins by reduction with tritiated sodium borohydride [J]. Analytical Biochemistry, 1989, 177(2): 419
- [15] 段丽菊,刘英帅,朱燕,等.DNPH 比色法:一种简单的蛋白质羰基含量测定方法[J].毒理学杂志,2005,19(4):320-322
DUAN Li-ju, LIU Ying-shuai, ZHU Yan, et al. DNPH colorimetric method: a simple method for determination of carbonyl content of proteins [J]. Journal of Toxicology, 2005, 19(4): 320-322
- [16] Ellman G L. Tissue sulfhydryl groups [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1959, 82(1): 70-77
- [17] Takagi S A E A. Determination of hydrostatic region in soybean globulin [J]. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 1979, 26: 133-138
- [18] Dupont D, Mandalari G, Molle D, et al. Comparative resistance of food proteins to adult and infant in vitro digestion models [J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2010, 54(6): 767-780
- [19] 布冠好,郑喆,郑海,等.牛乳过敏原 β -乳球蛋白间接竞争 ELISA 检测方法的建立[J].中国农业大学学报,2008, 13(6):71-76
BU Guan-hao, ZHENG Zhe, ZHENG Hai, et al. A method for detecting β -lactoglobulin in cow milk allergens by indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay [J]. Journal of China Agricultural University, 2008, 13(6): 71-76
- [20] 宋宏新,张小苗,薛海燕.牛羊乳蛋白组分比较研究[J].中国酿造,2012,31(2):21-23
SONG Hong-xin, ZHANG Xiao-miao, XUE Hai-yan. The comparative studies of proteins of bovine and goat milk [J]. China Brewing, 2012, 31(2): 21-23
- [21] 李林强,朱莉莉,万威,等.牛羊乳热处理蛋白质变性程度比较及机理分析[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2016,44(11):149-154
LI Lin-qiang, ZHU Li-li, WAN Wei, et al. Comparison and mechanism analysis of protein thermal denaturation degree of cow milk and goat milk [J]. Journal of Northwest University of A & F University (Nat. Sci.Ed.), 2016, 44(11): 149-154
- [22] Dominguez A V, Nicolai T. Heat induced gelation of micellar casein with and without whey proteins in the presence of polyphosphate [J]. International Dairy Journal, 2020, 104: 104640
- [23] Mario Estévez. Protein carbonyls in meat system: a review [J]. Meat Science, 2011, 89(3): 259-279
- [24] 孙静丽.不同热处理对乳蛋白理化性状影响[D].西安:陕西师范大学,2018
SUN Jing-li. Effects of different heat treatment on physicochemical properties of milk protein [D]. Xian: Shaanxi Normal University, 2018
- [25] Dalsgaard T K, Otzen D, Nielsen J H, et al. Changes in structures of milk proteins upon photo-oxidation [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2007, 55(26): 10968
- [26] 吴相佚,刘泽朋,毛学英.热处理对乳蛋白结构和消化特性的影响[J].乳业科学与技术,2019,42(3):8-13
WU Xiang-yi, LIU Ze-peng, MAO Xue-ying. Effect of heat treatment on the structure and digestibility of milk protein [J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2019, 42(3): 8-13
- [27] L W, J N. The influence of oxidation on proteolysis in raw milk [J]. Journal of Dairy Research, 2004, 71(2): 196-200
- [28] 李萌,王娟,魏子凯,等.圆二色光谱、红外光谱法解析羊乳和牛乳 β -酪蛋白结构及性质差异[J].光谱学与光谱分

- 析,2020,40(3):770-776
- LI Meng, WANG Juan, WEI Zi-kai, et al. Analyzing structure and properties of goat milk β -casein and bovine milk β -casein by circular dichroism and fourier transformation infrared spectroscopy [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2020, 40(3): 770-776
- [29] 邓楚君,许琳霜,李波,等.天然和热变性乳铁蛋白与姜黄素复合物的结构表征及结合机理研究[J].食品工业科技,2019,40(16):32-38,44
- DENG Chu-jun, XU Lin-shuang, LI Bo, et al. Structural characteristics and binding mechanism of native and thermally modified lactoferrin-curcumin complexes [J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(16): 32-38, 44
- [30] 冯景丽,贾峰,王金水,等.超声波处理对酪蛋白结构特性的影响[J].中国乳品工业,2015,43(6):20-23
- FENG Jing-li, JIA Feng, WANG Jin-shui, et al. Effect of ultrasonic on the structural properties of casein [J]. China Dairy Industry, 2015, 43(6): 20-23
- [31] 章宇斌.酪蛋白多级结构及聚集行为的多尺度研究[D].天津:天津大学,2007
- ZHANG Yu-bin. Multi-scale characterization on multilevel structural nature and aggregation behavior of casein [D]. Tianjin: Tianjin University, 2007
- [32] 陈蓁蓁,张宁,张文申,等.蛋白质分子荧光探针研究及其应用新进展[J].分析化学,2006,34(9):1341-1347
- CHEN Zhen-zhen, ZHANG Ning, ZHANG Wen-shen, et al. Progresses and applications of protein fluorescent probes [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2006, 34(9): 1341-1347
- [33] Azdad O, Mejrhit N, El Kabbaoui M, et al. Effect of heating and enzymatic hydrolysis on casein cow milk sensitivity in Moroccan population [J]. Food & Agricultural Immunology, 2017: 1-11

(上接第 113 页)

- [27] Cai X, Zhang R, Guo Y, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of gardenia fruit oil with bioactive components and their identification and quantification by HPLC-DAD/ESI-MS(2) [J]. Food & Function, 2015, 6(7): 2194-2204
- [28] Marangoni F, Agostoni C, Borghi C, et al. Dietary linoleic acid and human health: focus on cardiovascular and cardiometabolic effects [J]. Atherosclerosis, 2019, 292: 90-98
- [29] Saini R K, Keum Y S. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: dietary sources, metabolism, and significance - a review [J]. Life sciences, 2018, 203: 255-267
- [30] Sugeedha J, Reddy K S, Venkata M S, et al. Substitution of linoleic acid with α -linolenic acid or long chain n-3 polyunsaturated fatty acid prevents western diet induced nonalcoholic steatohepatitis [J]. Entific Reports, 2018, 8(1): 10953
- [31] Kanlayavattanakul M, Lourith N. Volatile profile and sensory property of *Gardenia jasminoides* aroma extracts [J]. Journal of Cosmetic Science, 2015, 66(6): 371
- [32] Debnath T, Park P J, Nath N C D, et al. Antioxidant activity of *Gardenia jasminoides* Ellis fruit extracts [J]. Food Chemistry, 2011, 128(3): 697-703
- [33] Biglari F, Alkarkhi A F M, Easa A M. Antioxidant activity and phenolic content of various date palm (*Phoenix dactylifera*) fruits from Iran [J]. Food Chemistry, 2008, 107(4): 1636-1641
- [34] Ni Y, Li L, Zhang W, et al. Discovery and LC-MS characterization of new crocins in gardeniae fructus and their neuroprotective potential [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2017, 65(14): 2936-2946
- [35] Imsanguan P, Roaysubtawee A, Borirak R, et al. Extraction of α -tocopherol and γ -oryzanol from rice bran [J]. LWT - Food Science and Technology, 2008, 41(8): 1417-1424
- [36] Thompson M D, Cooney R V. The potential physiological role of γ -tocopherol in human health: a qualitative review [J]. Nutrition and Cancer, 2020, 72(5): 808-825
- [37] Paweł Górnaś, Magdalena Rudzińska, Anna Grygier, et al. Sustainable valorization of oak acorns as a potential source of oil rich in bioactive compounds [J]. Process Safety & Environmental Protection, 2019, 128: 244-250