

# 不同热处理对水牛乳酪蛋白结构和加工性质的影响

杨攀, 李玲, 黄丽, 但霞, 黄子珍, 曾庆坤\*  
(广西壮族自治区水牛研究所, 广西南宁 530001)

**摘要:** 以未经热处理的水牛乳酪蛋白为对照, 探究常见的4种热杀菌处理条件对水牛乳酪蛋白结构的影响, 结果表明, 加热产生大分子聚合物, 大分子聚合物主要由二硫键联接形成; 80 °C时, 水牛乳酪蛋白的起泡性和起泡稳定性最高, 起泡性为137.33%, 起泡稳定性为32.33%; 超高温灭菌(135 °C)条件下, 水牛乳酪蛋白的平均粒径显著增加, 粒径为516.2 nm; 超高温灭菌乳的酪蛋白胶束被破坏, 表面结构发生变化; 热处理造成酪蛋白的二级结构发生变化, 135 °C条件下,  $\alpha$ -螺旋结构和 $\beta$ -折叠含量显著下降, 最小分别为13.76%和35.84%; 酪蛋白的三级结构和表面疏水性发生改变, 其中巴氏杀菌乳(80 °C), 荧光强度最高为582.44, 超高温灭菌乳表面疏水性最大为258.96。基于上述结果, 说明巴氏杀菌条件对酪蛋白的影响比较小, 超高温条件容易造成蛋白聚集, 从而影响产品的稳定性, 80 °C是较佳的热杀菌处理条件。从而为提升生产过程中水牛乳制品的稳定性提供理论基础。

**关键词:** 热处理; 水牛乳; 酪蛋白; 结构

文章编号: 1673-9078(2024)12-170-177

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.12.1192

## Effect of Different Heat Treatments on the Structure and Processing Properties of Buffalo Milk Casein

YANG Pan, LI Ling, HUANG Li, DAN Xia, HUANG Zizhen, ZENG Qingkun\*  
(Guangxi Buffalo Research Institute, Nanning 530001, China)

**Abstract:** The non-heat-treated buffalo milk casein was used as a control to investigate the effects of four common heat treatments on the structure of buffalo milk casein. The results showed that macromolecular polymers were produced by heating and were mainly formed by proteins linked by disulfide bonds. After the heat treatment of 80 °C, buffalo milk casein had the highest foaming capacity (FC) and foaming stability (FS) at 137.33% and 32.33%, respectively. After ultra-high temperature sterilization (135 °C), the buffalo milk casein enlarged significantly to 516.2 nm, with destroyed casein micelles and an altered surface structure. Heat treatments modified the secondary structure of casein; notably, at 135 °C, the  $\alpha$ -helix and  $\beta$ -sheet contents decreased significantly, with minimum values of 13.76% and 35.84%, respectively. Heat treatments also altered the tertiary structure and surface hydrophobicity of casein; the pasteurized milk (80 °C) had the highest fluorescence intensity at 582.44, and the ultrahigh-temperature sterilized milk had the highest surface hydrophobicity at 258.96. These results indicated that pasteurization has a relatively small effect on casein, while the ultra-high temperature condition tends

引文格式:

杨攀,李玲,黄丽,等.不同热处理对水牛乳酪蛋白结构和加工性质的影响[J].现代食品科技,2024,40(12):170-177.

YANG Pan, LI Ling, HUANG Li, et al. Effect of different heat treatments on the structure and processing properties of buffalo milk casein [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(12): 170-177.

收稿日期: 2023-10-08

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFD1600102); 广西科技基地和人才专项(桂科AD21220004); 国家现代农业产业技术体系广西创新团队(nycytxgxcxt-2021-21-02); 南宁市创新创业领军人才“邕江计划”(2021018)

作者简介: 杨攀(1987-), 女, 硕士, 高级畜牧师, 研究方向: 乳品科学技术与加工, E-mail: 414401032@qq.com

通讯作者: 曾庆坤(1968-), 男, 硕士, 研究员, 研究方向: 乳品科学技术与加工, E-mail: zqk456@163.com

to cause protein aggregation, affecting product stability. Therefore, 80 °C is an optimal temperature for the heat treatment of buffalo milk. The findings of this study provide a theoretical basis for improving the stability of buffalo dairy products in the production process.

**Key words:** heat treatment; buffalo milk; casein; structure

水牛乳蛋白含量丰富, 平均含量约为 4.5%, 远高于多种动物乳, 分别是奶牛乳和山羊乳 1.3 倍、牦牛乳 1.4 倍、骆驼乳 1.6 倍、马乳 2.4 倍、驴乳 2.9 倍、人乳 4.4 倍。与牛乳类似, 水牛奶中酪蛋白同样含 4 种类型,  $\alpha$ -s1-酪蛋白、 $\beta$ -酪蛋白和  $\kappa$ -酪蛋白在水牛奶中的浓度高于牛乳中, 水牛奶中 99% 的酪蛋白以胶束形式存在, 而在牛乳中则是 90%~95% 的酪蛋白以胶束形式存在。在透射电镜下观察酪蛋白胶束, 水牛乳胶束(直径 70~200 nm)比牛乳胶束(直径 50~180 nm)大, 此外, 与牛乳酪蛋白胶束相比, 水牛奶酪蛋白胶束的水合作用较弱, 含有更多的胶体钙和胶体无机磷酸盐<sup>[1]</sup>。酪蛋白胶束结构和大小影响人体肠胃消化吸收, 并与干酪加工过程中的凝乳强度、干酪的硬度等性质密切相关, 水牛乳中  $\kappa$ -酪蛋白含量比较高, 有助于凝乳, 更利于干酪的生产, 意大利著名的马苏里拉干酪就是用水牛乳制作的。有研究表明, 水牛乳酪蛋白粒径分布在 43.8~955 nm, 水牛乳酪蛋白颗粒分布均匀, 而牛乳和山羊乳酪蛋白则有聚集行为, 三种酪蛋白均呈球形或椭球形, 水牛乳、牛乳、羊乳三种乳源酪蛋白在分离图谱和组分含量上存在显著差异<sup>[2]</sup>。酪蛋白胶束的结构受离子强度和 pH 等影响, Wu 等<sup>[3]</sup>研究结果表明氯化钠浓度对  $\beta$ -酪蛋白的二级结构影响显著, 其中随着氯化钠浓度的增加  $\alpha$ -螺旋结构增加,  $\beta$ -折叠含量降低, pH 和氯化钠浓度影响水牛乳  $\beta$ -酪蛋白的三级结构。

热处理是乳品加工过程中非常重要的环节, 常见的热处理方式 65 °C 30 min、72~75 °C 15 s、80~85 °C 15 s、130~140 °C 3~5 s。热处理过程在杀灭有害微生物, 保障乳制品安全的同时, 乳的营养品质和结构也会发生明显的影响<sup>[4]</sup>。热处理会对乳中乳清蛋白、酪蛋白胶束、乳蛋白之间的相互作用产生不同的影响。脂肪上浮, 蛋白质沉淀, 絮凝或分层等胶体分散体系不稳定现象常是乳制品中常见的问题, 而酪蛋白占乳蛋白的 80% 以上, 解决这些问题的核心就是控制酪蛋白的稳定性, 因此对酪蛋白胶束的研究尤其重要。瓦云超等<sup>[5]</sup>从总溶解固体(TDS)、表观粘度、以及沉淀蛋白含量这几个指标

研究了不同热处理条件对水牛乳稳定性的影响, 结果表明 65 °C 30 min, 75 °C 15 s 对水牛乳稳定性影响较小。

国内外研究热处理对牛乳、羊乳酪蛋白的影响有很多文献报道, 李子超等<sup>[6]</sup>研究了巴氏杀菌与超高温灭菌牛乳酪蛋白结构差异性的研究, 结果表明, UHT 牛乳酪蛋白  $\alpha$ -螺旋结构降低, 无规则结构增加, 色氨酸所处的环境中疏水性增强, 酪蛋白表面不光滑, 几乎不能成胶束。张安琪等<sup>[7]</sup>研究了超巴氏杀菌对牛乳酪蛋白微观结构及凝聚性质的影响, 结果表明, 超巴氏杀菌能够破坏酪蛋白胶束结构, 产生大规模的交联和凝聚, 酪蛋白粒径明显增加。薛海燕等<sup>[8]</sup>研究热处理羊乳酪蛋白结构与与抗原性的变化规律, 结果显示, 蛋白热处理温度的升高, 会导致羊乳的  $\alpha$ -CN 和  $\beta$ -CN 的天然结构破坏, 分子内部发生交联或凝聚, 蛋白疏水性随着温度的升高而增大,  $\alpha$ -螺旋结构增加, 无规则卷曲下降, 最大荧光强度增加。Anema 对热诱导的酪蛋白和酪蛋白胶束的变化, 包括与变性的乳清蛋白的相互作用进行了总结, 主要包括氨基酸官能团的变化, 巯基-二硫键的反应, 酪蛋白胶束在加热时的解离, 变性乳清蛋白与酪蛋白胶束的相互作用等<sup>[4]</sup>。但热处理对水牛乳蛋白结构的研究比较少, 本文将通过测定不同热处理方式对水牛乳酪蛋白结构和加工性质的影响, 为改善生产过程中水牛乳出现的稳定性问题提供一定的理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

生水牛乳, 广西水牛研究所种蓄场; 十二烷基硫酸钠(SDS)、TRIS、8-苯胺-1-萘磺酸(ANS)、溴化钾、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、电泳粉、牛血清白蛋白、 $\beta$ -巯基乙醇、考马斯亮蓝、无水乙醇、冰乙酸, 所有试剂均为分析纯。

DK-600S 三用恒温水槽, 上海精宏实验设备有限公司; PT-20T 管式超高温杀菌机, 上海沃迪自动化装备股份有限公司; D-37520 高速冷冻离心机,

美国 Thermo Fisher 公司; LP Vonex Mixer 涡旋混合器, 美国 Thermo Scientific 公司; UV-8000 紫外可见分光光度计, 上海元析仪器有限公司; ZEN3600 纳米粒度仪, 英国 Malven 仪器有限公司; LS55 荧光分光光度计, 美国 PerkinElmer 公司; Nicolet iS10 傅里叶变换近红外光谱仪, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; F16502 扫描电镜, 荷兰 PHENOM 公司。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 热处理

生水牛乳从牛场取回来后, 立马分装 5 份, 1 份用于冰箱冷藏, 其余 4 份按照不同的杀菌条件进行热处理, 5 种方式处理: (1) 冷藏 4~6 °C; (2) 65 °C, 30 min (低温长时杀菌); (3) 80 °C, 15 s (高温短时杀菌); (4) 95 °C, 5 min (酸乳热处理); (5) 135 °C, 4 s (超高温瞬时灭菌), 超高温瞬时灭菌采用 UHT 超高温杀菌机灭菌, 其余热处理方法采用水浴锅的方法。将不同处理方式的乳样脱脂, 分离酪蛋白和乳清蛋白(冻干)。

### 1.2.2 酪蛋白的提取

4 °C, 5 000×g 离心 15 min, 除去乳脂, 用三层脱脂棉纱布过滤, 去除多余的乳脂, 得到脱脂乳。然后用 10% 乙酸(体积分数)调节水牛乳 pH 值至 4.6 左右, 参照张安琪<sup>[7]</sup>等方法提取酪蛋白, 下层沉淀为酪蛋白, 用超纯水冲洗至中性, 冻干, -20 °C 保存备用。

### 1.2.3 酪蛋白样液的制备

将提取的酪蛋白用 0.02 mol/L pH 值 7.4 的 PBS 缓冲液进行溶解稀释, 配置蛋白浓度为 5 mg/mL 的储备液。

### 1.2.4 SDS-PAGE 电泳

不同热处理的乳清蛋白与酪蛋白进行还原性与非还原性 SDS-PAGE 凝胶电泳。采用 4% 浓缩胶, 12% 分离胶, 酪蛋白上样量为 5 μL, 乳清蛋白上样量 5 μL。电泳初始电压为 50 V, 待样品进入分离胶三分之一时, 调整电压至 80 V, 时间约 2.5 h。

### 1.2.5 扫描电镜测定

参考冯景丽等<sup>[9]</sup>的方法测定, 将微量的冷冻干燥后的样品置于样品台, 经离子溅射仪真空干燥、金粉喷镀, 其中电镜加速电压调节为 5 kV, 观测摄图在 ×10 000 倍数下。

### 1.2.6 粒径测定

使用纳米激光粒度仪测量样品粒径, 根据祁腾

达等<sup>[10]</sup>的方法改进。酪蛋白质量浓度为 1 mg/mL, 参数如下: 颗粒折射率 1.450, 分散剂折射率 1.330, 平衡时间 60 s。

### 1.2.7 傅里叶变换红外光谱测定

参照李晶<sup>[11]</sup>的方法测定, 取冷冻干燥的酪蛋白与干燥的溴化钾以 1:100 (m/m) 混合, 研磨均匀, 取适量与粉末压片机中, 压制成透明的薄片, 置于傅里叶红外光谱仪测定, 测定 4 000~400 cm<sup>-1</sup> 范围内的红外光谱, 分辨率为 4 cm<sup>-1</sup>, 其中扫描次数 64 次。利用 Peakfit 4.12 软件, 对酰胺 I 带 (1 600~1 700 cm<sup>-1</sup>) 进行基线校正, 采用 Gausse 函数进行二阶导数分峰拟合, 根据其积分面积计算各二级结构的相对百分比。

### 1.2.8 表面疏水性测定

采用 ANS 荧光探针法测定酪蛋白的表面疏水性, 4 mL, 0.2 mg/mL 酪蛋白溶液中加入 20 μL ANS, 涡旋震荡充分混合。避光反应 2 min, 采用荧光分光光度计测定。测定条件参考薛海燕等<sup>[8]</sup>稍微修改, 激发波长为 390 nm, 扫描范围 400~600 nm, 狭缝宽度为 10 nm, 用荧光强度最高点峰值来表示疏水性的大小。

### 1.2.9 酪蛋白的三级结构

将蛋白质质量浓度稀释至 0.2 mg/mL, 采用荧光分光光度计测定, 激发波长为 280 nm, 扫描范围为 200~500 nm, 狭缝宽度为 10 nm<sup>[12]</sup>。

### 1.2.10 起泡性和起泡稳定性测定

将酪蛋白质量浓度稀释至 1 mg/mL, 准确量取 10 mL 样品置于 50 mL 离心管中, 参考韩蕊璐<sup>[12]</sup>的方法测定, 室温下高速剪切, 转速设置为 10 000 r/min, 时间 2 min, 分别记录均质后第 0 分钟和第 10 分钟的泡沫和溶液的总容积。起泡性 (FC) 和泡沫稳定性 (FS) 可以根据下列公式得出:

$$B_1 = \frac{V_0 - V_C}{V_C} \times 100\% \quad (1)$$

$$B_2 = \frac{V_{10} - V_C}{V_C} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

$B_1$ ——起泡性 (FC), %;

$B_2$ ——起泡稳定性 (FS), %;

$V_C$ ——均质前的体积, mL

$V_0$ ——均质后 0 min 的体积, mL;

$V_{10}$ ——均质后 10 min 的体积, mL。

### 1.2.11 数据分析

所有数据均采用 IBM SPSS 22.0 进行统计分析, 不同组数据采用单因素方差分析, 并使用 Graph Pad Prism 9.5 软件进行绘图。显著性水平为  $P < 0.05$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 SDS-PAGE电泳结果

从图 1 中可知, 非还原条件下, 随着温度的增加, 样品加样孔出现明显的聚集物, 且出现大分子蛋白聚合物, 还原条件下,  $\kappa$ -酪蛋白条带更明显, 且在 95 和 135 °C 条件下, 乳清蛋白条带 ( $\alpha$ -La 和  $\beta$ -Lg) 更明显, 推断受热程度不断增加, 乳中的聚合物分子也不断增大, 作为强还原剂  $\beta$ -巯基乙醇能够断开半胱氨酸残基之间的二硫键, 加入  $\beta$ -巯基乙醇还原二硫键后, 加样孔的聚集物完全消失, 由此推断聚合物为经加热产生的大分子聚合物, 即蛋白变性聚合物, 主要由二硫键连接形成。变性的乳清蛋白可通过巯基-二硫键交换作用与  $\kappa$ -酪蛋白形成聚合物<sup>[11]</sup>, Wang 等<sup>[13]</sup>研究也显示在 75 和 85 °C 加热时, 牦牛乳蛋白的聚集行为几乎是因为蛋白之间形成的二硫键, 超过 95 °C 时, 除了二硫键之外也可能发生了其他的相互作用。孙佳悦<sup>[14]</sup>研究结果显示非还原条件下, 热处理乳蛋白加样孔及胶层处出现蛋白聚集物, 还原条件下, 条带消失, 说明蛋白聚集物消失。

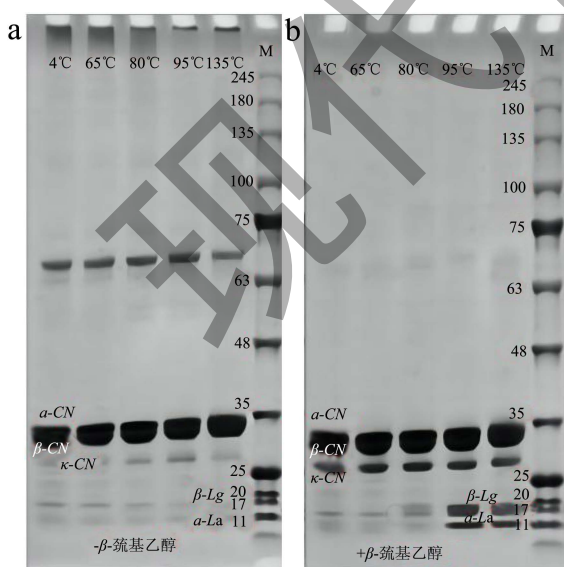


图 1 SDS-PAGE 电泳图

Fig.1 SDS-PAG electropherogram

注: a 图为未添加  $\beta$ -巯基乙醇 (非还原型电泳图), b 图为添加  $\beta$ -巯基乙醇 (还原型电泳图)。

### 2.2 平均粒径

图 2 结果显示, 4 °C 酪蛋白样品的平均粒径为 260.01 nm, 与 4 °C 酪蛋白样品比, 65 °C 样品的平均粒径为 249.45 nm, 略有减小, 这可能是因为低温长时间处理使酪蛋白胶束表面的  $\kappa$ -酪蛋白单体发生解离, 80 °C 样品的平均粒径为 261 nm, 略有增加, 可能是由于温度升高, 酪蛋白自身凝聚程度开始大于解离程度, 所以平均粒径出现增加, 135 °C 的样品平均粒径为 516.2 nm, 显著增加 ( $P < 0.05$ ), 可能是超高温处理时, 造成变性的乳清蛋白粘附在酪蛋白表面, 使粒径增加, 或是因为酪蛋白自身的凝聚作用, 或是因为相互疏水作用, 本身由胶束状态转变为聚集状态, 导致粒径增加<sup>[15]</sup>。而张安琪等<sup>[7]</sup>的研究结果显示, 与生牛乳酪蛋白粒径 (7.27  $\mu\text{m}$ ) 比, 65 °C、30 min 和 72 °C、15 s 两种巴氏杀菌处理方式下, 其酪蛋白的粒径无显著性变化 (分别为 6.19  $\mu\text{m}$  和 8.91  $\mu\text{m}$ ), 而 121 °C、5 s 时, 酪蛋白的平均粒径明显增加 (88.98  $\mu\text{m}$ ), 但因本实验研究对象是水牛乳酪蛋白, 粒径仪型号、以及提取酪蛋白的条件等因素影响, 所以粒径不同。Anema 等<sup>[16]</sup>研究也表明酪蛋白胶束粒径的大小与 pH 值和加热温度有关, 天然的乳清蛋白在等电点是可溶的, 但变性的乳清蛋白不可溶, 当高温使乳清蛋白变性时, 变性的乳清蛋白结合到酪蛋白胶束表面使其粒径增大。周洁瑾等<sup>[17]</sup>也指出, 酪蛋白在加热时较为稳定, 但乳清蛋白容易变性, 对热不稳定, 高温会造成  $\alpha$ -乳清蛋白、 $\beta$ -乳球蛋白与酪蛋白生成稳定的二硫键形成聚合物, 从而影响酪蛋白胶粒的大小。

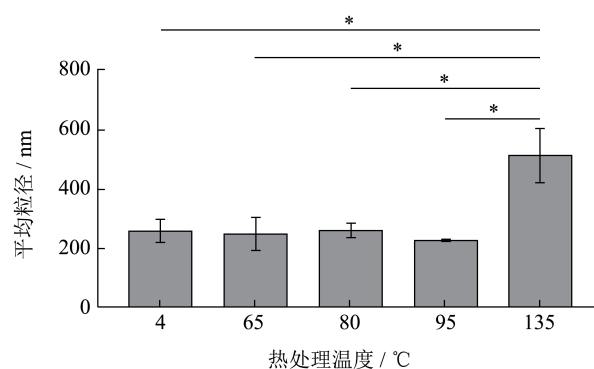


图 2 不同热处理水牛乳酪蛋白平均粒径

Fig.2 Average particle size of buffalo milk casein with different heat treatments

注: 图中 \* 代表显著性差异 ( $P < 0.05$ )。图 5、7 同。

### 2.3 扫描电镜

由图 3 可知, 与 4 °C 对照组比, 不同加热方式

对酪蛋白表面结构均有影响, 65 °C时, 出现更多更小的无规则的结构, 可能是因为长时间低温加热使酪蛋白胶束发生解离, 并且解离程度随着加热时间的延长越来越大, 这也和酪蛋白平均粒径在 65 °C 时变小相对应<sup>[18]</sup>。80 °C时, 表面结构开始出现凝聚, 可能是杀菌温度的升高导致维持酪蛋白胶束的次级键受到破坏, 使酪蛋白表面的结构发生变化, 同时, 温度的升高会使酪蛋白胶束与胶束之间也进一步黏附, 形成更大更均一的状态。135 °C时, 酪蛋白胶束的结构被破坏, 酪蛋白胶束出现断裂, 由胶束状态转变为聚集状态, 可能是因为变性的乳清蛋白与酪蛋白形成聚合物, 同时导致酪蛋白的粒径增大。李子超等<sup>[6]</sup>报道, 粘附在酪蛋白表面的小颗粒会随着温度的升高, 逐渐增多, 造成颗粒直径逐渐增大。本次实验结果也是在 135 °C时, 酪蛋白的平均粒径显著增大。

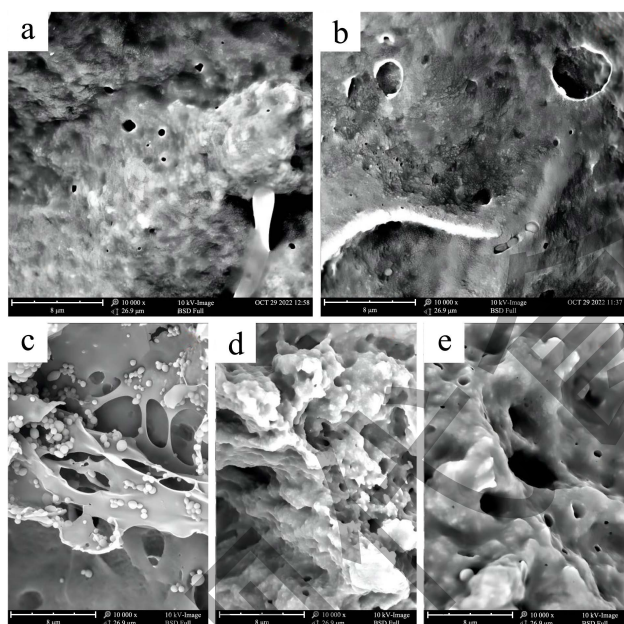


图3 不同热处理水牛乳酪蛋白扫描电镜图

Fig.3 Scanning electron microscopy of buffalo milk casein with different heat treatments

注: a~e 依次为 4、65、80、95、135 °C。

综上, 酪蛋白的表面结构会随着热处理时间和热处理温度的增加而被破坏越多, 热处理对酪蛋白表面结构的影响的因素需要进一步分析。

#### 2.4 傅里叶红外光谱分析-二级结构

采用傅里叶红外光谱分析水牛乳酪蛋白的二级结构, 由图4可知, 在 65 °C时, 红外光谱谱图与对照

相似无差别, 80 °C开始, 红外光谱图出现变化, 在酰胺 I 带 (1 700~1 600  $\text{cm}^{-1}$ ) 酰胺 II 带 (1 500~1 300  $\text{cm}^{-1}$ ) 均有变化, 五组酪蛋白样品的红外图谱整体趋势基本相似, 说明对于蛋白质中特有的酰胺类结构而言, 蛋白的主体官能团组成相似。热处理时间和温度不同, 局部的峰面积、峰强度、以及峰的组成有不同程度的差异, 说明热处理条件对酪蛋白官能团结构的影响大小不一, 135 °C 的红外谱图则出现更多的吸收峰。孙静丽<sup>[19]</sup> 研究结果显示, 在 2 935~2 925、2 870~2 855、1 760~1 730 和 1 327  $\text{cm}^{-1}$  附近出现的吸收峰只有超高温乳酪蛋白中存在, 说明不同热处理对酪蛋白官能团结构影响不同。

为进一步分析蛋白质二级结构 (包括  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠、无规卷曲、 $\beta$ -转角) 的变化信息, 使用 Peak Fit V4.12 对水牛乳酪蛋白 1 600~1 700  $\text{cm}^{-1}$  波长范围内的红外光谱进行高斯拟合, 计算各样品蛋白质二级结构的组分占比。由表1可知, 与未加热的水牛乳酪蛋白相比, 热处理条件下, 95、135 °C 时,  $\alpha$ -螺旋结构显著下降, 分别下降至 14.56% 和 13.76%,  $\beta$ -折叠显著下降, 分别下降至 36.90% 和 35.84%,  $\beta$ -转角 (%) 显著增加, 增加至 36.68% 和 39.78%, 超高温灭菌乳中  $\alpha$ -螺旋结构含量最少, 可能是高温破坏了水牛乳酪蛋白的二级结构, 使得  $\alpha$ -螺旋中的氢键断裂, 发生解螺旋, 且  $\beta$ -折叠含量显著降低,  $\beta$ -转角含量显著升高, 可能是超高温热处理导致酪蛋白胶束内部疏水基团暴露, 表面疏水作用力增强, 热处理形成聚合物, 使得  $\beta$ -折叠结构转变为  $\beta$ -转角。热处理后, 水牛乳中酪蛋白规则结构的含量由 53.75% 下降至 49.59%, 不规则结构的含量由 46.25% 增加至 50.41%。而本次实验结果显示 80 °C 条件下,  $\alpha$ -螺旋结构含量不降反而升高, 与后面的三级结构和起泡性的结果相对应。且无规则卷曲没有显著升高, 与文献报道中的牛乳蛋白会随着热处理强度增加无规则卷曲显著升高相左, 但无规则结构中  $\beta$ -转角是显著增加的, 二级结构由规则结构转变为无规则结构的趋势是与文献报道一致的, 但本次实验结果表现的是更多的是转变为  $\beta$ -转角, 而不是向无规则卷曲转变。许多文献报道, 随着温度的升高大部分蛋白质的  $\alpha$ -螺旋结构含量减少, 而  $\beta$ -折叠含量有所降低,  $\beta$ -转角和无规则卷曲含量升高, 这也说明了热处理改变了酪蛋白的二级结构<sup>[20]</sup>。

表 1 不同热杀菌条件下酪蛋白二级结构含量变化 (%)

Table 1 Changes in secondary structure content of casein under different thermal sterilization conditions

酪蛋白	$\alpha$ -螺旋	$\beta$ -折叠	$\beta$ -转角	无规则卷曲
4 °C	15.213 ± 0.057 <sup>b</sup>	38.542 ± 1.107 <sup>a</sup>	34.858 ± 1.103 <sup>c</sup>	11.387 ± 0.198 <sup>b</sup>
65 °C, 30 min	15.565 ± 0.427 <sup>b</sup>	36.062 ± 0.849 <sup>b</sup>	37.496 ± 1.451 <sup>b</sup>	10.876 ± 0.178 <sup>c</sup>
80 °C, 15 s	16.475 ± 0.024 <sup>a</sup>	32.900 ± 0.276 <sup>b</sup>	39.769 ± 0.351 <sup>a</sup>	10.855 ± 0.100 <sup>c</sup>
95 °C, 5 min	14.562 ± 0.147 <sup>c</sup>	36.898 ± 0.612 <sup>b</sup>	36.679 ± 0.488 <sup>b</sup>	11.861 ± 0.083 <sup>a</sup>
135 °C, 4 s	13.756 ± 0.128 <sup>d</sup>	35.835 ± 0.256 <sup>c</sup>	39.780 ± 0.237 <sup>a</sup>	10.749 ± 0.305 <sup>c</sup>

注: 同列右上角不同的小写字母表示具有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

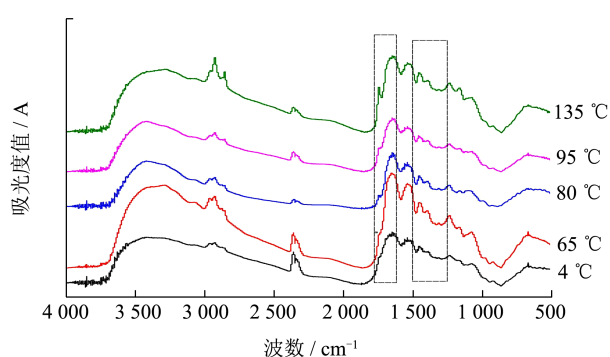


图 4 不同热处理水牛乳酪蛋白傅里叶红外光谱图

Fig.4 Fourier infrared spectra of buffalo casein with different heat treatments

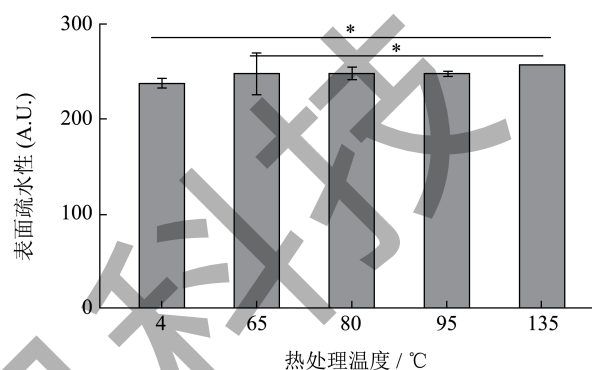


图 5 不同热处理水牛乳酪蛋白表面疏水性

Fig.5 Surface hydrophobicity of buffalo milk casein with different heat treatments

## 2.5 表面疏水性

由图 5 可知随着热处理强度的增加,酪蛋白的表面疏水性增强。65 °C 时,表面疏水性和 4 °C 无显著性差异,随着热处理温度的升高,表面疏水性增加越大,135 °C 的热处理表面疏水性 (258.96) 显著高于 4 °C (237.68) 和 65 °C (240.98),这可能是高温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,亲水区域因结构的变化而减少,100 °C 以上热处理会导致酪蛋白胶束内部疏水基团暴露,表面疏水性增强,由图 5 结果可知酪蛋白表面疏水性随热处理强度升高而升高。Skelte 等<sup>[21]</sup>的研究结果为当热处理温度超过 70 °C 时,乳清蛋白中的  $\beta$ -乳球蛋白会与  $\kappa$ -酪蛋白形成二硫键从而发生聚合反应,聚合物会附在胶束表面,此聚合反应除了因二硫键形成外,还与分子间的疏水相互作用有关。另外可能的原因是一定程度的热处理会使蛋白质的多肽链展开,从而暴露出活性基团,使蛋白质的表面疏水性上升。这与前面的实验结果粒径显著增加,酪蛋白二级结构发生变化, $\beta$ -折叠含量显著降低, $\beta$ -转角含量显著升高,疏水基团暴露,表面疏水作用力增强相符合。

## 2.6 荧光扫描测定

光谱能有效反应蛋白质三级结构构象变化。最大发射波长 ( $\lambda_{max}$ ) 是反映色氨酸残基所处微环境的重要指标,可体现蛋白质构象的变化和结构的伸展情况<sup>[22]</sup>。其不同热杀菌条件下酪蛋白最大荧光强度值见表 2。

表 2 不同热杀菌条件下酪蛋白三级结构荧光强度变化  
Table 2 Changes of fluorescence intensity of casein tertiary structure under different thermal sterilization conditions

杀菌温度/°C	最大荧光强度
4	565.01 ± 15.05
65	571.02 ± 13.33
80	582.44 ± 17.38 <sup>a</sup>
95	578.10 ± 6.81
135	546.42 ± 19.62 <sup>b</sup>

注: 同列右上角不同的小写字母表示具有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

由图 6 可知,随着热处理条件强度的增加,酪蛋白的色氨酸强度先增加后降低,4 °C 酪蛋白最大荧光强度对应峰位于 348~349 nm,荧光强度为

565.01, 在 80 °C 时色氨酸强度最大, 最大荧光强度位于 349~351 nm, 色氨酸强度 582.44, 135 °C 时的色氨酸强度最小, 349.5 nm 处, 色氨酸强度为 546.42, 经过热处理后, 与对照相比酪蛋白最大荧光强度的对应峰位发生红移, 稍向高波数峰位移动, 可能是热处理导致酪蛋白内部的色氨酸暴露, 导致酪蛋白峰位数值红移, 而 135 °C 的高强度的热处理时, 荧光强度显著降低, 高强度的热处理使酪蛋白的三级结构发生变化, 它会影响色氨酸残基的暴露。这说明温度过高会使维持蛋白质构象的疏水相互作用被破坏, 从而引起蛋白质三级结构变化<sup>[23]</sup>。李子超等<sup>[6]</sup>研究结果显示, UHT 牛乳酪蛋白荧光强度 (4345) 显著低于巴氏杀菌乳 (9130), 且最大发射波长发生 2 nm 的红移 (340 nm 和 342 nm), 而本次实验结果, 135 °C 的荧光强度 (546.42) 显著低于巴氏杀菌的荧光强度 (582.44)。

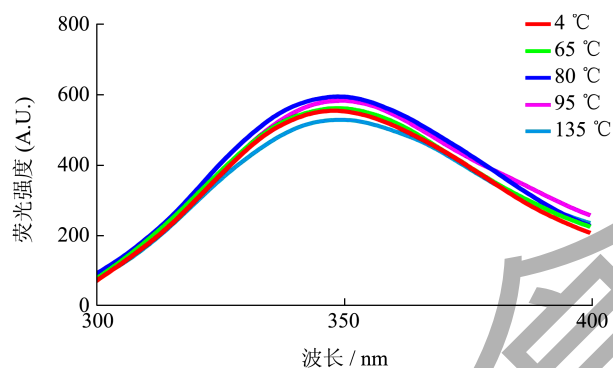


图 6 水牛乳酪蛋白内源荧光光谱

Fig.6 Endogenous fluorescence spectroscopy of buffalo casein proteins

## 2.7 起泡性和起泡稳定性

起泡性 (Foaming Capacity, FC) 和泡沫稳定性 (Foaming Stability, FS) 均用于评价蛋白质的起泡特性。起泡性是蛋白质所产生泡沫的量, 通过测定泡沫初始体积或密度来衡量。可用泡沫完全塌陷所需的时间来衡量形成泡沫的稳定性<sup>[24]</sup>。

泡沫的形成受到三个因素的影响: 空气/水界面上分子的运动、渗透和重组, 这些过程取决于表面活性剂的大小、结构弹性和疏水性<sup>[25]</sup>。pH 值、离子强度等环境因素影响泡沫的稳定性。

由图 7 可知, 不同温度条件下, 随着温度的升高酪蛋白的起泡性先升高后降低, 4 °C 起泡性为 100.83%, 65 °C 时起泡性为 116.67%, 起泡性有所增加, 增加不显著, 80 °C 时, 起泡性最大

为 137.33%, 但 95 和 135 °C 时, 起泡性又下降至 120% 和 120.83%。与对对比, 65 °C 时, 起泡稳定性无显著变化, 80 °C 条件下和 135 °C 条件下起泡稳定性显著增加, 稳定性最高为 32.33%。这可能是由于通过热处理后蛋白质肽链的拉伸和蛋白质结构内部的疏水基团的暴露来解释, 疏水相互作用的增强有利于泡沫的形成。而前面研究结果显示, 80 °C 时酪蛋白的二级结构中  $\alpha$ -螺旋增加, 三级结构中色氨酸荧光强度最大相对应。王乃慧<sup>[26]</sup>研究热处理对驼乳理化性质的结果显示, 起泡性随着热处理时间的延长呈现先增大后减小的趋势, 当 125 °C 处理时, 起泡性达到最大值 (56.25%), 而 135 °C 时, 又降低到最低值 (17.28%), 整个驼乳蛋白起泡性的变化趋势亦是随着温度的升高, 起泡性先升高后降低。陈珂玥等<sup>[27]</sup>研究结果显示适当的热处理使得蛋白质分子解聚, 疏水性增强, 从而提高蛋白的起泡性, 但若热处理温度过高, 造成蛋白质聚集沉淀, 溶解度降低, 从而使起泡性和起泡稳定性下降。而本次实验结果为 80 °C 时, 起泡性和起泡稳定性最大, 起泡性最大为 137.33%, 稳定性最高为 32.33%。

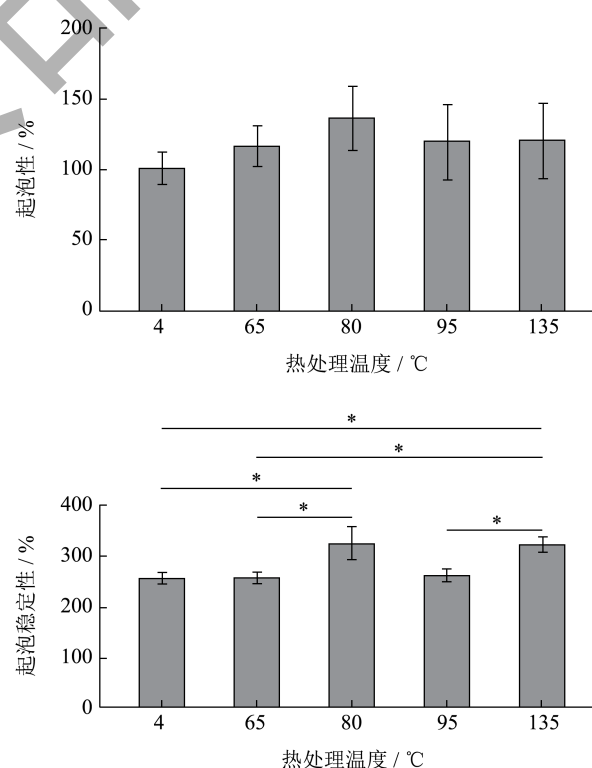


图 7 不同热处理水牛乳酪蛋白起泡性和起泡稳定性

Fig.7 Foaming properties and foaming stability of buffalo casein with different heat treatments

### 3 结论

本文以新鲜水牛乳为原料,探究了4种热处理温度对水牛乳酪蛋白胶束结构的影响,通过本次实验结果可知,热处理对水牛乳酪蛋白的影响主要有:凝胶电泳图可知,随着热处理温度的增加,乳中聚合物分子不断变大,且大分子聚合物主要是由二硫键连接形成;热处理改变了酪蛋白的起泡性和起泡稳定性,随着热处理温度的升高,先增加后降低,80℃时起泡性和泡沫稳定性( $P<0.05$ )最大;超高温灭菌乳中出现凝聚状态,造成平均粒径最大,二级结构发生改变,规则结构的含量由53.75%下降至49.59%,不规则结构的含量由46.25%增加至50.41%。三级结构显示荧光强度最低,表面疏水性最大。说明超高温杀菌条件对酪蛋白结构的影响最大,这也是高温杀菌加工容易造成产品的稳定性下降的一个主要因素。在加工过程中,杀菌条件的控制尤其重要,低温杀菌条件可以提高酪蛋白的起泡性和起泡稳定性,超高温杀菌具有更好的杀菌效果,能够延长保质期,但对蛋白结构的影响最大。

### 参考文献

- [1] CAROLYN T, MEJARES, THOM H, et al. Thermal processing of buffalo milk-A review [J]. *International Dairy Journal*, 2022, 129: 105311.
- [2] 王丽娜.南方水牛奶酪蛋白与其他乳源酪蛋白差异性的研究[D].广州:暨南大学,2011.
- [3] WU K Y, YANG T X, LI Q Y. The effects of pH and NaCl concentration on the structure of  $\beta$ -casein from buffalo milk [J]. *Food Science Nutrition*, 2021, 9(5): 2436-2445.
- [4] SKELTE G ANEMA. Heat-induced changes in caseins and casein micelles, including interactions with denatured whey proteins [J]. *International Dairy Journal*, 2021, 122: 105136.
- [5] 瓦云超,赵海晴,李仁芳,等.热处理对水牛乳稳定特性的影响[J].*乳业科学与技术*,2016,39(3):25-28.
- [6] 李子超,徐明芳,向明霞,等.巴氏杀菌与超高温灭菌牛乳酪蛋白结构差异性的研究[J].*华南农业大学学报*,2013, 34(2):192-196.
- [7] 张安琪,王玉莹,李瑞,等.超巴氏杀菌对牛乳酪蛋白微观结构及凝聚性质的影响[J].*食品科学*,2020,41(3):106-110.
- [8] 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*,2021,37(2):94-102.
- [9] 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.
- [10] 祁腾达,马艳秋,迟玉杰,等.热杀菌期间胰蛋白酶改性对蛋清液耐热性和结构特性的影响[J].*食品科学*,2023, 44(24):26-33.
- [11] 李晶.pH-热诱导羊乳的热稳定性及乳蛋白的结构和功能特性研究[D].济南:齐鲁工业大学,2018.
- [12] 韩蕊璐.高压均质和超声处理对酪蛋白和乳清蛋白结构及功能特性的研究[D].济南:山东师范大学,2020.
- [13] WANG T T, GUO Z W, LIU Z P, et al. The aggregation behavior and interactions of yak milk protein under thermal treatment [J]. *Journal of Dairy Science*, 2016, 99(3): 6137-7143.
- [14] 孙佳悦.乳清蛋白和酪蛋白热凝聚反应机理研究[D].大连:大连工业大学,2017.
- [15] 王辉,孙琦,刘鹭,等.热处理对牛乳中盐类组分及酪蛋白胶体特性的影响[J].*食品科学*,2012,33(23):75-78.
- [16] ANEMA S G, LI Y. Effect of pH on the association of denatured whey proteins with casein micelles in heated reconstituted skim milk [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2003, 51(6): 1640-1646.
- [17] 周洁瑾,张列兵,梁建芬.加热及贮藏对牛乳脂肪及蛋白聚集影响的研究[J].*食品科技*,2010,35(5):72-76.
- [18] JAMBRAK A R, MASON T J, LELAS V, et al. Effect of ultrasound treatment on solubility and foaming properties of whey protein suspensions [J]. *Journal of Food Engineering*, 2008, 86(2): 281-287.
- [19] 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.
- [20] 王丹琳.热处理对驼乳蛋白结构和理化性质的影响研究[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2023.
- [21] SKELTE G A, LI Y. Further studies on the heat-induced pH-dependent dissociation of casein from the micelles in reconstituted skim milk [J]. *Lebensmittel-Wissenschaftund-Technologie*, 2000, 33: 335-343.
- [22] 郭洪伟.超高压、pH值对芽孢皮层裂解酶的活力及二、三级结构影响的研究[D].银川:宁夏大学,2019.
- [23] 王喜波,张安琪,王玉莹,等.巴氏杀菌和超巴氏杀菌对牛乳清蛋白结构及热稳定性的影响[J].*农业工程学报*, 2019,35(6):307-313.
- [24] LONCHAMP J, CLEGG P S, EUSTON S R. Foaming, emulsifying and rheological properties of extracts from a co-product of the Quorn fermentation process [J]. *European Food Research and Technology*, 2019, 245(9): 1825-1839.
- [25] WILDE P J, CLAPK D C. The competitive displacement of  $\beta$ -lactoglobulin by tween 20 from oil-water and air-water interfaces [J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1993, 155(1): 48-54.
- [26] 王乃慧.热处理对驼乳理化性质及体外消化特征的影响[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2021.
- [27] 陈珂玥,任健.热处理对葵花分离蛋白功能性质的影响[J].*食品工业*,2015,36(7):183-185.