

单位代码 10467

分类号

申请号 21201408110

密 级

河南科技学院

硕 士 学 位 论 文

动态超高压均质处理对酪蛋白酶解特性的影响

学 科 专 业 : 农产品加工及贮藏工程

研 究 方 向 : 肉品加工及品质控制工程

申请人姓名 : 马亚萍

导 师 姓 名 : 马汉军 教授

导 师 团 队 : 刘本国 副教授, 余小领 教授,

康壮丽 副教授, 潘润淑 高级实验师,

二〇一七 年六月

**Effect of Dynamic Ultra-High Pressure
Homogenization on Enzymatic Hydrolysis
Characteristics of Casein**

A Dissertation Submitted
in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Agronomy

Candidate: Ma Yaping

Supervisor: Prof. Ma Hanjun

Henan Institute of Science and Technology

June, 2017

独创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下独立进行研究所取得的成果。除文中特别加以标注和致谢的地方外，文中不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的科研成果，也不包括为河南科技学院或其他教育机构的学位或证书所使用过的材料，对本文的研究作出重要贡献的个人和集体，均已在文中做了明确的说明，并表示了谢意。本声明的法律责任由本人承担。

论文作者签名：马亚萍

日期：2017年6月15日

导师签名：马汉军

日期：2017年6月15日

学位论文使用授权声明

本人完全了解河南科技学院有关保留、使用学位论文的规定，即学生必须按学校要求提交学位论文的印刷本和电子版本，学校有权保留提交论文的印刷本和电子本，允许论文被查阅和借阅。本人授权河南科技学院可以将本学位论文的全部或部分编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或者其他复制手段保存论文和汇编本学位论文。本人离校后发表、使用学位论文或与该学位论文直接相关的学术论文或成果时，第一署名单位仍然为河南科技学院。

注：保密论文在解密后应遵守此规定。

论文作者签名：马亚萍

日期：2017年6月15日

导师签名：马汉军

日期：2017年6月15日

摘要

超高压处理是一种新兴的物理处理手段,被广泛应用在乳制品及肉类、饮料、果汁等方面的加工及保藏中。动态超高压均质能够杀灭食品中的微生物,可以增加食品稳定性,达到均质、乳化、改善食品外观的效果,同时当动态超高压均质作用于大分子时,还可以改变大分子的结构及功能性,进而增加大分子的应用价值。我国拥有丰富的酪蛋白资源,酪蛋白是一种全价蛋白质,具有较高的营养价值,但人体食用酪蛋白之后难消化、易过敏,同时酪蛋白的功能性较差,致使酪蛋白在食品领域的发展比较缓慢。研究表明,动态超高压均质能够破坏蛋白的结构,改善蛋白的功能特性及酶解特性,但是采用动态超高压均质处理来对酪蛋白酶解进行改善的报道较少。本课题拟以酪蛋白为研究对象,首先采用动态超高压均质对酪蛋白进行处理,对酪蛋白的胶束结构进行破坏,系统的研究动态超高压均质处理对酪蛋白构象及功能性的影响;并分析动态超高压均质处理对酪蛋白水解程度、酪蛋白水解产物氨基酸组成及产物抗氧化活性的影响,探讨酪蛋白结构与酪蛋白酶解特性的内在联系。以期为完善和发展食品动态超高压加工理论,为生物活性肽、呈味肽等新产品的制备提供理论依据。本论文研究的主要内容及结果如下:

1. 动态超高压均质处理对酪蛋白功能性和构象的影响

采用动态超高压均质机对酪蛋白溶液进行处理,研究均质压力水平对酪蛋白结构(巯基二硫键、表面疏水性、二级结构含量)和功能性质(平均粒径、溶解性、起泡性、乳化性、Zeta 电位、乳液平均粒径)的影响。研究表明,动态超高压均质处理能破坏酪蛋白的结构,从而导致酪蛋白平均粒径、巯基二硫键、表面疏水性、二级结构发生相应的变化,同时酪蛋白的功能性质溶解性、起泡性、乳化性都在一定的压力范围内有很大的改善。通过研究可知经 150 Mpa 处理后的酪蛋白的溶解性、起泡性、乳化性等功能性都有所改善,因而此处选 150 Mpa 作为后续试验的参考指标。

2. 酪蛋白水解条件的优化

采用木瓜蛋白酶对经 150 Mpa 处理过的酪蛋白溶液进行酶解,以酪蛋白的水解度为测定指标,选定木瓜蛋白酶的添加量、酶解温度及酶解时间 3 个因素进行

单因素试验；在单因素试验结果的基础上，采用响应面法对酶解工艺条件进行交互优化，最终选出最佳酶解条件：木瓜蛋白酶添加量 5mg/mL、酶解温度 45 ℃、酶解时间 3 h，此条件下的水解度为 55%。

3. 动态超高压均质处理对酪蛋白酶解特性的影响

将经过 150 Mpa 动态高压均质处理过的酪蛋白，采用 2 中得到的最佳酶解条件进行酶解，同时用未经动态超高压均质处理的酪蛋白作为对照。对酶解产物的水解度、固形物含量、氨基酸及游离氨基酸组成、DPPH 清除率。结果表明：动态超高压均质处理可以很大程度的提高酪蛋白的水解度、固形物含量、DPPH 清除率，通过分析酶解产物氨基酸及游离氨基酸组成还发现，动态超高压均质处理不仅可以提高总体氨基酸含量，几乎每种人体所必需的氨基酸的含量都较对照组有所提高。从结果我们可以知道动态超高压均质处理不仅仅只是可以改变酪蛋白的结构和改善酪蛋白的功能性，还可以影响酪蛋白的酶解特性，这说明酪蛋白的酶解特性与它自身的结构特性有关。

关键词：高压均质，酪蛋白，结构，功能性，酶解特性，抗氧化活性

ABSTRACT

Dynamic high pressure homogenization as a novel physical treatment method, is widely used in the processing and preservation of dairy products, meat, beverages, fruit juice and so on. Ultra-high pressure homogenization (UHPH) can kill food-borne microorganisms and increase stability of food to achieve effects of homogenization, emulsification and improvement of food appearance. At the same time UHPH can also change the structure and function of large molecules to increase the application value when acts on large molecules. Our country has rich resources of casein, which is a kind of complete proteins and has high nutritional value, but is difficult to be digested by body after eating. Moreover, as the functionality of the casein is poor, the development of casein is relatively slow in the food field. It is shown that the dynamic high pressure homogenization can destroy the structure of the protein and improve the functionality of the protein and the enzymatic characteristics. However, the application of dynamic high pressure homogenization in improvement of the solution of casein is less. This topic takes casein as the research object and firstly uses dynamic ultrahigh pressure carries on the processing of epicuticular casein to destruct micelle structure of the casein, to research systematically dynamic ultrahigh pressure effect on conformation and function of the casein and analysis effects of dynamic ultrahigh pressure homogeneous treatment on hydrolysis degree of casein, the kinds of hydrolysate amino acids and antioxidant activity of the production, to discuss inner link of internal structure zymohydrolysis characteristic of casein. The obtained results will be helpful to provide important bases for developing the dynamic ultrahigh pressure processing technology of food and to provide a theoretical basis for the preparation of bioactive peptides, flavor peptides and other new products. The main contents and results of this study as follows:

1. Effect of dynamic high pressure homogenization on the structure and functionality of casein

The solution of casein was treated with dynamic UHPH in this study to research the effects of different stress level on structure casein (Sulphydryl Group and Disulfide Bonds, surface hydrophobicity and secondary structure content) and functional properties (average particle size, solubility, foaming, emulsification, Zeta potential, the emulsion particle size). The results showed that the homogenization dynamic ultrahigh pressure can damage the structure of the casein,

leading to the average particle size, Sulfhydryl Group and Disulfide Bonds and surface hydrophobicity and secondary structure corresponding changes. Moreover, functional properties of casein protein(solubility, foaming, emulsification) were improved in much degree. Through the study known, solubility, foaming and emulsification function of casein were also improved when 150Mpa treatment, 150 Mpa as reference index of the subsequent experiment.

2. Optimization of casein hydrolysis conditions

Casein solution after 150 Mpa treatment was enzymed by papain , the degree of hydrolysis as measurement index, enzyme dosage, temperature and time of enzymatic hydrolysis as effect factors of single factor experiment; on basis of the results, the optimization method of enzymatic hydrolysis conditions for the optimization of response surface interaction to determine the optimal conditions for enzymatic hydrolysis, enzyme dosage of 5mg/mL, temperature of 45°C, the reaction time of 3 h. The degree of hydrolysis was 55%.

3. Effect of dynamic high pressure homogenization on the hydrolysis of casein

The casein after 150Mpa treatment was enzymated by using the optimal enzymatic hydrolysis conditions of experiment 2 , without dynamic ultrahigh pressure homogeneous processing casein as controls. The hydrolysis degree, solid content, amino acid and free amino acid composition, molecular weight distribution, DPPH scavenging rate and cell antioxidant activity were determined. The results showed that the dynamic high-pressure treatment can greatly improve the degree of hydrolysis, solids content, casein and the DPPH removal rate and cell antioxidant composition. Moreover, it was also shown that through the analysis of hydrolysis products of amino acids and free amino acids, microfluidization treatment can not only improve the content of total amino acid content, but also every kind of essential amino acids are the control group improved. From the results we can know that the function of dynamic high-pressure treatment not only can change the structure and improve the casein, casein, but also affect the enzymatic characteristics, indicating that the enzyme structure characteristics of casein was related with its structure characteristics.

KEY WORDS: high pressure homogenization, casein, structure, functionality, enzymatic hydrolysis, antioxidant activity

目 录

摘 要.....	I
ABSTRACT.....	I
目 录.....	III
第一章 文献综述.....	1
1.1 酪蛋白结构特性及其酶解特性.....	1
1.1.1 酪蛋白的营养性及功能性.....	1
1.1.2 酪蛋白的分子结构.....	1
1.1.3 酪蛋白功能活性肽研究进展.....	3
1.1.4 酪蛋白的酶解特性.....	5
1.2 动态超高压均质处理技术研究进展.....	6
1.2.1 动态超高压均质技术简介.....	6
1.2.2 动态超高压均质的作用机制.....	7
1.2.3 动态超高压均质技术的应用.....	8
1.3 本文研究的选题意义和主要内容.....	10
1.3.1 选题意义.....	10
1.3.2 研究内容.....	11
第二章 动态超高压均质处理对酪蛋白功能性质和构象的影响.....	13
2.1 引言.....	13
2.2 试验材料与仪器.....	13
2.2.1 试验材料.....	13
2.2.2 主要仪器设备.....	14
2.3 试验方法.....	14
2.3.1 制备酪蛋白溶液.....	14
2.3.2 酪蛋白营养成分的测定.....	14
2.3.3 动态超高压均质处理后酪蛋白温度的测定.....	14
2.3.4 酪蛋白颗粒尺寸大小的测定.....	14
2.3.5 酪蛋白溶解性的测定.....	15

2.3.6 酪蛋白起泡性的测定.....	15
2.3.7 酪蛋白乳化能力的测定.....	15
2.3.8 酪蛋白乳液 Zeta 电位和平均粒径的测定	16
2.3.9 巯基二硫键含量的测定.....	16
2.3.10 表面疏水性测定.....	17
2.3.11 二级结构.....	17
2.3.12 数据统计分析.....	17
2.4 结果与讨论.....	17
2.4.1 酪蛋白成分表.....	17
2.4.2 压力水平对酪蛋白温度的影响.....	18
2.4.3 压力水平对酪蛋白平均粒度的影响.....	18
2.4.4 压力水平对酪蛋白溶解性的影响.....	20
2.4.5 动态超高压均质对酪蛋白起泡性和起泡稳定性的影响.....	21
2.4.6 动态超高压均质对酪蛋白乳化性的影响.....	22
2.4.7 压力水平对乳液 zeta-电位的影响.....	23
2.4.8 动态超高压均质对酪蛋白乳液粒径的影响.....	23
2.4.9 动态超高压均质对酪蛋白巯基二硫键含量的影响.....	24
2.4.10 动态超高压均质对酪蛋白疏水性的影响.....	25
2.4.11 动态超高压均质对酪蛋白二级结构含量的影响.....	25
2.5 本章小结.....	26
第三章 响应面法优化木瓜蛋白酶酶解酪蛋白工艺条件研究.....	29
3.1 引言.....	29
3.2 试验材料与仪器.....	29
3.2.1 试验材料.....	29
3.2.2 仪器与设备.....	30
3.3 试验方法.....	30
3.3.1 酪蛋白溶液的制备.....	30
3.3.2 酪蛋白水解工艺流程.....	30
3.3.3 单因素试验.....	30
3.3.4 响应曲面试验设计.....	30

3.3.5 水解度的测定.....	31
3.3.6 数据处理.....	31
3.4 结果与分析.....	32
3.4.1 木瓜蛋白酶添加量对酪蛋白酶解效率的影响.....	32
3.4.2 酶解温度对酪蛋白酶解效率的影响.....	33
3.4.3 酶解时间对酪蛋白酶解效率的影响.....	33
3.4.4 响应面的试验结果.....	34
3.4.5 验证试验.....	36
3.5 结论.....	36
第四章 动态超高压均质处理对酪蛋白酶解特性的影响.....	37
4.1 引言.....	37
4.2 试验材料与仪器.....	38
4.2.1 材料与试剂.....	38
4.2.2 仪器与设备.....	38
4.3 试验方法.....	38
4.3.1 酪蛋白溶液的制备.....	38
4.3.2 木瓜蛋白酶酶解酪蛋白.....	38
4.3.3 酪蛋白酶解液氨基酸组成和游离氨基酸组成的测定.....	38
4.3.4 水解度的测定.....	39
4.3.5 酪蛋白酶解固形物得率的测定.....	40
4.3.6 DPPH 清除率的测定	40
4.3.7 数据处理.....	40
4.4 结果与分析.....	40
4.4.1 样品前处理对酪蛋白酶解液中氨基酸的影响.....	40
4.4.2 样品前处理对酪蛋白酶解液游离氨基酸的影响.....	43
4.4.3 样品前处理对酪蛋白水解度的影响.....	46
4.4.4 两种前处理对酪蛋白固形物得率的影响.....	47
4.4.5 两种前处理对酪蛋白 DPPH 清除率的影响	48
4.5 结论.....	48
全文结论.....	49

创新说明.....	51
参考文献.....	53
致 谢.....	67
攻读硕士学位期间的研究成果.....	69

第一章 文献综述

1.1 酪蛋白结构特性及其酶解特性

1.1.1 酪蛋白的营养性及功能性

酪蛋白(casein, CN)是牛奶中的重要蛋白质,它是牛乳在 20℃、pH 4.6 的条件下沉淀下来的蛋白质^[1],是一种无味、无臭的呈酸性的含磷蛋白质^[2-3],是牛奶中含量最为丰富、营养价值最高的蛋白质^[4],酪蛋白也因此常被作为婴幼儿的代乳品。

蛋白质的功能性是指在食品加工、贮藏及消费的过程当中,可以影响蛋白质行为表现的性质^[2]。酪蛋白是亲油亲水性分子,有较好的分子柔韧性,还具有起泡性、乳化性、持水性、凝胶性等功能性质^[5-6]。因此,酪蛋白常常作为一种重要的功能性辅料在食品加工中应用,这不仅可以有效改善食品的品质,还可以增加食品的营养性。

1.1.2 酪蛋白的分子结构

酪蛋白的分子量约为 20~25 ku^[7],其包含了 8 种有人体所必需的氨基酸,约占牛奶中蛋白质总量的 80 %^[8]。研究表明,酪蛋白是由 α s-酪蛋白, β -酪蛋白, γ -酪蛋白, κ -酪蛋白四种单体组成的含磷蛋白^[9-10],且这四种单体蛋白在具有构造和性质上的相似性^[9]。四种酪蛋白单体都是链状的亲油亲水性蛋白质,其分子大多都是由磷酸丝氨酸残基和脯氨酸组成的,磷酸丝氨酸能够影响酪蛋白结合钙离子的能力,同时磷酸丝氨酸对酪蛋白的理化性质及功能性质也具有重大的意义^[11]。早在九十年代中期,就有研究报告表明,酪蛋白溶液中酪蛋白分子并不是以单体的形态存在的,它是由多个酪蛋白单体聚集而成的胶束的形态存在的^[12]。Little 和 Holt 等人通过对酪蛋白胶束结构进行研究发现,酪蛋白是由酪蛋白分子和磷酸钙一起构成的球状胶粒^[13]。而酪蛋白单体之间除由于磷酸钙提供的静电相互作用或电荷,对于维持酪蛋白粒子的稳定性起到一定的作用以外^[14],它们之间还有其他可以维持酪蛋白胶束结构稳定的作用力,其中包括疏水相互作用、二硫键、氢键等作用力,其中疏水相互作用在其中起到的作用作为重要^[15]。

(1) α s-酪蛋白

α s-酪蛋白是牛乳中的重要酪蛋白构型，大约占酪蛋白总含量的 38%，它由 α s1-酪蛋白与 α s2-酪蛋白两种形体(α s1-酪蛋白与 α s2-酪蛋白含量比约为 4:1)组成。其中 α s1-酪蛋白的分子质量为 23.5 ku，含 199 个氨基酸，有 A、B、C、D、E 5 个遗传变体种类， α s1-酪蛋白分子上有 8 个磷酸根的结合位点，主要在肽链的第 43 和 79 个肽键处，结合位点处经过酶解可以生成含磷肽，含磷肽能够与钙、铁、铜等金属离子结合转换为可溶性盐，从而有利于人体对于金属离子的吸收和利用^[16-17]。 α s2-酪蛋白是分子质量为 25.2 ku，含 207 个氨基酸的蛋白，酪蛋白的磷酸化程度是四种酪蛋白单体里最高的一个^[18]，同时其也是所带电荷最多的一个。在 α s2-酪蛋白分子内有两个高度磷酸化的区域，分别为肽链的第 8~10 和第 125~150 位，这两个区域都含有成簇存在的磷酸丝氨酸(SerP — SerP — SerP — Glu-Glu)，这些磷酸化的氨基酸结构能够增强 α s2-酪蛋白与钙离子结合的能力^[11]。

(2) β -酪蛋白

β -酪蛋白在酪蛋白分子中所占的比重也是比较高的一个，大约占到酪蛋白总含量的 35%^[18]。 β -酪蛋白的相对分子质量约为 24 ku，大约共由 209 个氨基酸构成； β -酪蛋白分子中有 5 个磷酸丝氨酸结合位点，其主要为肽链的第 14-21 位。 β -酪蛋白的疏水性在所有酪蛋白中是最强的^[19]，其在 N 末端和 C 末端都有明显的疏水区域^[20-21]，且在 β -酪蛋白分子中疏水性区域约占其总链长度的 3/4。 β -酪蛋白在碱性条件下或当温度低于 8℃ 的情况下能够以单体的形态存在于溶液中，但在溶液接近于中性和温度较高的情况下， β -酪蛋白会以丝状聚集体的形态存在； β -酪蛋白容易受到钙离子的影响而发生凝聚沉淀下来^[22]。 β -酪蛋白分子内还含有酪蛋白磷酸肽、ACE 抑制肽等多种具有生物活性的多肽的片段^[16]。

(3) κ -酪蛋白

κ -酪蛋白在牛乳中的含量约为 13%^[18]，由 169 个氨基酸组成，相对分子量为 19 ku。 κ -酪蛋白与其他三种酪蛋白单体在结构上有较大的差异，它仅有一个磷酸化丝氨酸，且 κ -酪蛋白也是唯一的含糖酪蛋白单体。 κ -酪蛋白对钙不敏感，而对凝乳酶较敏感^[23]，所以当有钙离子存在时，它能够与对钙离子敏感的 α -酪蛋白以及 β -酪蛋白形成热力学上稳定的粒子^[24-25]。

(4) γ -酪蛋白

γ -酪蛋白是乳汁分泌后乳汁中内源性蛋白酶对 β -酪蛋白进行局部降解的过程中产生的^[26]，所以， γ -酪蛋白是 β -酪蛋白的一种水解产物，它在酪蛋白中的含量不多。

1.1.3 酪蛋白功能活性肽研究进展

生物活性肽是指能够对身体的机能和情况产生积极影响的特殊的蛋白片段^[27]。研究发现，在原始酪蛋白中隐藏着百余种生物活性肽^[28]，但他们的功能性在蛋白质中是无法发挥出来的，但当蛋白质被酶水解，酰胺键发生断裂，产生特定的氨基酸序列，其生物活性就能够被释放出来^[29]，发挥作用。由于生物活性肽和其蛋白质母体相比，有更好的生理功效，因此近年来生物活性肽是酪蛋白研究的一个热点。这些活性肽的功能包括清除自由基、抑菌、免疫调节、抗癌等^[30]。

(1) 抗氧化活性肽

抗氧化活性物质是指当以低浓度存在时就能够有效的抑制自由基氧化反应的物质，其抗氧化的作用机理有两种，一种是直接作用于自由基，另一种是间接消耗掉易生成自由基的物质。Jun 等^[31]、Chen 等^[32]、张英等^[33]的研究表明，某些氨基酸，如:Glu, Met, Tyr, His, Lys, Pro, Cys 等具有清除羟自由基的作用。研究人员对酪蛋白中氨基酸的序列进行检测分析，发现酪蛋白分子内有一些氨基酸序列中具有抗氧化活性小肽的片段。胡文琴^[34]等通过研究得到，酪蛋白有一定的羟自由基清除能力，但酪蛋白的酶解物的羟自由基清除能力要比酪蛋白的高的多，这有可能是因为酪蛋白的高级结构阻碍了其清除自由基的能力。同时胡文琴^[34]通过试验发现酪蛋白的酶解产物还具有抗脂质过氧化的作用。Laakso 和 Lilius 通过研究发现酪蛋白既具有清除自由基的能力，又可以改变酶的作用模式使自由基不能形成^[35]。王政^[36]在酪蛋白酶促水解及其酶解物性质研究中采用木瓜蛋白酶和胃蛋白酶分别去酶解酪蛋白，所得酶解产物的 DPPH 清除率都不高，只单纯的研究酪蛋白的外在酶解条件，并不能彻底解决酪蛋白酶解效率低、酶解不彻底、酶解产物目标难以控制等问题，所以要想提高酪蛋白酶解产物的抗氧化性还需要进一步的探索和研究。

(2) 抗高血压肽

血管紧张素 I 型转化酶(ACE)是一种含锌的二肽羧基肽酶，其可以参与到高血压多肽、血管紧张肽 II 以及降解低血压、血管舒缓激肽^[37]的合成。ACE 有两

个活性作用位点，分别为 N-区和 C-区，这两个活性区域除了对不同底物的亲和力有差别外，其他的功能大致没有什么不同。ACE 抑制肽与 ACE 的亲合度相较于血管紧张素 I 或舒张激肽来说是比较强的，且 ACE 抑制肽也不易从 ACE 结合区分离出来，这能够阻止 ACE 催化血管紧张素 I 水解生成血管紧张素 II，以及催化舒缓激肽水解转换为失活片段这两种生化反应进程，从而起到降低血压的作用^[38-39]。

研究表明 α_{s1} -酪蛋白、 β -酪蛋白及 κ -酪蛋白序列中酪蛋白中存在着具有 ACE 抑制活性的肽链，如：Maruyama 和 Suzuki^[40]曾对酪蛋白的胰蛋白酶酶解产物进行分析，对应 α_{s1} -CN(f 23-24)、 α_{s1} -CN(f 23-27)、 α_{s1} -CN(f 194-199)以及 β -CN(f 177-183)、 β -CN(f 193 -202)都具有 ACE 抑制活性。Xue-Ying Mao 等^[41]研究发现 κ -CN(f 156-160)、 β -CN(f 136-140)片段中也具有 ACE 抑制活性。M. Miguel 等^[42]通过研究发现，酪蛋白经胃蛋白酶酶解后，对其酶解产物进行分析得知其具有 ACE 抑制活性，且当 ACE 存在于分子量低于 3000 Da 的短肽中时其 ACE 抑制活性相对来说比较强。Zhanmei Jiang 等^[43]利用中性蛋白酶处理酪蛋白，发现其酶解产物也具有 ACE 抑制活性。

(3) 酪蛋白磷酸肽(CPP)

酪蛋白磷酸肽(Casein Phosphopeptides, 简称 CPP), CPP 是一种富含特殊的簇磷酸丝氨酸结构的生物活性肽^[45], 1950 年由 Mellander 首次从酪蛋白的胰蛋白酶水解物中分离得到^[45]。研究表明, 酪蛋白在体外或体内经消化后可以得到 CPP, 对酪蛋白的氨基酸序列进行分析得到, 在 α_{s1} -酪蛋白的 f 43-58、f 45-55、f 59-79、f 66-74 和 f 106-119, α_{s2} -酪蛋白的 f 2-21、f 46-70、f 55-75、f 126-136 和 f 138-149, β -酪蛋白的 f 1-25、f 1-28、f 2-28 等中都被发现 CPP 序列^[46]。

CPP 中的 3 个磷酸残基结合钙、铁、锌和硒等二价矿物质离子, 且在 3 个磷酸残基之后连接了 2 个谷氨酸残基^[47], 能够帮助运输矿物质, 避免产生磷酸盐沉淀, 提高肠内的可溶性矿物质的浓度, 进而促进机体对矿物质的吸收及利用, 相对来说 CPP 对钙、铁粒子的吸收及利用的促进更强, 因而 CPP 有“矿物质载体”的誉称^[48]。因而在食品加工中 CPPs 常作为营养强化剂添加到食品中, 用来增强人体对矿物的消化和利用^[49]。Mayne 和 Cochrane^[50]等研究发现 CPPs 具有抗龋齿的作用。Hartmann 等^[51]研究发现, CPPs 能够促使人体内的淋巴细胞产生更多的 IgA, 进而提高机体的免疫力。李如兰等^[52]还研究发现 CPPs 可提高精子的质量

以及促进动物体外受精的作用。

(4) 免疫活性肽

新生儿通过母乳喂养可以获取营养,同时也可以从中获取抵抗细菌和病毒感染的能力,其中酪蛋白是新生儿从母乳中获得的免疫物质之一^[36]。有学者研究发现,乳中蛋白质经降解后可有免疫活性肽生成,而这种免疫活性肽在婴儿体内的免疫调节中发挥着重要的作用^[53]。

1981年 Jolles 首先发现母乳在经胰蛋白酶水解后其水解产物具有免疫活性。Kayser 和 Meisel 研究发现来自酪蛋白的免疫活性肽对人外周血淋巴细胞的增殖有促进或抑制两类作用,如当酪蛋白的剂量和浓度不同时其对淋巴细胞具有或刺激或抑制的作用^[54]。郑华等^[55]通过研究得知,酪蛋白酶解物对淋巴细胞的增殖是负向调节的作用。

(5) 其他生物活性肽

酪蛋白中除了含有上述几种生物活性功能的生物活性肽外,其还含有抗菌性活性肽、抗凝血活性肽、调节内分泌作用活性肽等。这些生物活性肽在生物生命活动中起着及其重要的作用,近年来,国内外学者对生物活性肽进行了大量的理论研究及应用研究,大量的功能性食品及多肽药物进入市场,并收获了很好的经济效益。基因工程、蛋白质工程的应用对于生物活性肽的研究和运用具有极大的推进作用,不仅仅加速了我们对生物活性肽的理论和应用研究,还拓宽了其应用范围。我国对于生物活性肽的研究起步较晚,目前我国对于生物活性肽的研究重点主要在天然多肽分离和纯化,而对于生物肽库、化学组合肽库的构建、筛选及应用的研究目前还处于初级阶段。

1.1.4 酪蛋白的酶解特性

蛋白质在经蛋白酶水解后能够得到比游离氨基酸的混合物具有更小的渗透压的小分子肽,因此蛋白质水解物可以添加到膳食中作为氮源,这不仅可以提高氮源的有效吸收还可以起到降低渗透压的作用,且对于吸收能力较弱和消化道水解功能受损的人群来说也是非常有益的。

蛋白质经酶解后其内部疏水集团暴露、离子性集团数量增加、分子量降低,这些酶解后发生的变化可以引起蛋白的功能性质及构象发生变化^[56]。蛋白质的

酶解特性与蛋白质自身的结构特点有很大的关联,如蛋白质的三、四级结构都对蛋白的水解特性有很大的影响。Maryam Salami 等人比较研究采用胰酶酶水解骆驼奶与牛奶时发现,与乳清蛋白不同,酪蛋白具有结构柔韧开放的特性,因而酪蛋白相对于乳清蛋白来说更易于酶解,且其酶解程度取决于蛋白结构酶结合位点的数量及其位点与酶结合的难易程度^[57-58],这说明蛋白质的酶解特性与酪蛋白自身的结构特性有很大的关系。

蛋白酶解产物相较于蛋白本身,无论是营养特性、功能特性还是加工特性都有良好的提升,这也将大大的扩大蛋白的应用领域。然而蛋白酶解会因为酶解温度、酶解时间、pH、底物、酶种类和用量的不同而有很大的不同,且酶解过程也是复杂多变的、酶解产物更是难以很好的掌控。因而如今蛋白酶解仍然存在着酶解效率低、酶解不彻底、目标成分难以获得及酶解产物中含有苦味肽等一系列问题,这些技术难题都制约着我国蛋白深加工的进程。

目前,我国在蛋白质酶解理论研究与其生产应用方面相对来说还是比较落后的,理论研究主要还集中于对酶促水解工艺的研究,其中有蛋白酶的选择及复配、酶解温度、酶解时间、pH、底物浓度和蛋白酶的添加量等;只对蛋白酶解的外部因素进行研究,并不能够解决我们目前面临的蛋白酶解过程中的问题,蛋白酶解特性与蛋白自身的结构特性有很大的联系,我们就必须对蛋白质结构特性与酶解特性的联系进行深入的探究。研究表明,一些处理手段能够破坏蛋白质的结构,使蛋白颗粒破碎,作用键断裂,提高其溶解性、使更多的蛋白酶结合位点从内部暴露出来,加速蛋白的水解,还能够提高蛋白质的水解度^[59]。常见的样品前处理方法有热处理,微波处理,动态超高压均质处理,超声波处理等。

1.2 动态超高压均质处理技术研究进展

1.2.1 动态超高压均质技术简介

超高压处理是近年来兴起的一种物理处理手段,在食品加工行业中其被广泛应用于乳制品、饮料、果汁及肉类等方面的加工中。相较于热处理,超高压处理可以最大程度的保留食品原有的成分、风味和特性,既能达到杀菌的目的又不会带来热处理产生的蒸煮味^[60-61]。目前超高压在食品加工中被广泛应用的主要有静态超高压和动态超高压均质两种处理技术。静态超高压是利用 400 MPa 以上的

高静水压作用于密封于柔性容器内的食品,来实现低温灭菌、抑酶或改进食品功能特性的目的,由于静态超高压容器体积较小,且静态超高压的造价昂贵,因此静态超高压处理技术目前仅用于对食品的科学研究^[62]。动态超高压处理方式是利用液样在均质机的腔体内受到的剪切力、高速流体撞击作用、涡旋作用、空穴爆炸力等综合作用,从而使液样的结构受到破坏,使乳浊液中的颗粒变得更小,达到更稳定的状态^[63]。

传统的均质机压力一般在 20-50 MPa 之间,随着科技的发展,我们制造设备的能力也在逐渐提升,制造出了最高压力可以达到 400 MPa 的均质机^[64-66],可以使物料颗粒减小到 100nm 以内。一般将 100 MPa 以上的均质技术称为高压均质技术,而当处理压力达到 200 MPa 以上时就称为超高压均质技术^[67-68]。而 Velazquez-Estrada^[69]等、吴奕兵^[70]、Lacroix^[71]等则将 100 MPa 以上的均质技术称为超高压均质技术。

虽然动态超高压均质处理的作用产生仍基于高压,但它在形式上已经远远不止静高压杀菌中单纯的挤压作用。相对于静高压而言动态超高压均质仅采用其下限压力时即可获得相同的效果,即在最大程度的保留食品原有营养、风味、色泽、成分等自然特性的基础上,达到杀菌额效果,同时还大大降低了能耗^[72]。动态超高压均质除杀菌的作用外,还可以增加食品稳定性,达到均质、乳化、改善食品外观的效果,赋予食品以新的感官特征,这对于新型食品的开发具有很大的意义。相较于静高压的应用局限性,动态超高压均质机不仅成本低,其在生产上具有更强的操作性,可以应用在液态食品的连续加工中^[73-74],这对于液态食品的加工具有重大的意义。

1.2.2 动态超高压均质的作用机制

液体在通过动态超高压均质机时,液体将会受到以下几种作用力。

(1) 剪切力

液样在动态超高压均质机里会在两个地方受到剪切力的作用,一处是液样在通过窄小的阀门时所受到的剪切,另一处是液样在撞击到碰撞环时所受到的剪切力。Hetheington^[75]等人通过研究表明,发生在均质机内的细胞破碎的主要机理可能是剪切力。Ram 和 Kadim^[76]研究了毛细管剪切对聚合物破碎率的影响,研究表明,破碎率与剪切力正相关。后续研究采用动态超高压均质机处理多聚糖分子,

结果显示剪切力是使多聚糖分子实现破碎的主要作用力,这说明动态超高压均质破碎的作用中包含了剪切力。R. Lander^[77]等人通过研究得到随着处理压力的增加多聚糖分子的破碎程度就越大。这表明,均质时的压力越高,样品在均质机内受到的剪切力就越大。

(2) 高速流体撞击作用

两股不同方向上的高速流体在均质机的撞击管区发生碰撞,流体因失去其原有的方向及速度,因而产生了强大的撞击能量。因为流体中的固体颗粒发生的相互剧烈的碰撞,和期间产生的巨大压力降,流体中的固体颗粒被破碎,使固体颗粒的结构被破坏。

(3) 涡旋作用

液样在撞击区内发生撞击后,会有涡旋形成。在涡旋中,流体中大小不一的颗粒将会进行不同方向和强度的运动,当流体颗粒尺寸较漩涡的尺寸小时,液体颗粒会随着漩涡发生移动,颗粒高速运动发生剪切作用,使得微粒进一步被破碎。而当流体颗粒尺寸较漩涡的尺寸大时,漩涡则完全携带着运动,液体颗粒表面因为各个位置所受到的压力不一样从而而引起颗粒发生振动,使得液体颗粒发生破碎。

(4) 气穴作用

流体经相撞后受到瞬间压力降的作用,当压力低于液体的蒸气压时就会出现气穴现象。气穴作用的时间及强度分别不断延长和增强,此时气蚀会产生巨大的威力,使得微粒颗粒发生进一步的破碎。

1.2.3 动态超高压均质技术的应用

目前动态超高压均质技术在食品加工中主要有三个方面的应用,一是对流体进行超微化、乳化处理,用来提高流体的乳化稳定性;二是对破坏物料的分子结构等,从而改变物料的结构特性,以改善物料的营养功能特性及生产特性;三是作为一种反应场所,使得物料在其中混合均匀,实现某些物理、化学反应^[78-79]。

(1) 超微化、乳化

曹建平^[80]在研究中,采用超高压均质对澳豆豆乳进行处理,发现澳豆豆乳的颗粒粒径随着均质压力的升高而减小,同样澳豆豆乳的沉淀率随着均质压力的升高而逐渐下降,也就是说随着均质压力的升高乳浊体系的稳定性相应的上升。

Chevalier-Lucia^[81]等人在采用超高压均质处理加工亚微乳剂的研究中,发现原料乳在经动态超高压均质后颗粒尺寸减小。Cortes-Munoz^[82]等人用动态超高压均质对 O / W 型乳液进行处理,发现乳液液滴尺寸减少且乳液具有良好的稳定性。Roach^[83]等通过研究发现,动态超高压均质处理能够破坏酪蛋白及酪蛋白胶束的结构,从而使其粒径及粒度分布范围减小。

(2) 在杀灭微生物方面的应用

动态超高压均质处理相较于热杀菌,具有在杀灭细菌的同时可以最大程度的保留食品营养、风味物和色泽的优势。Velazquez-Estrada^[84]等人通过研究得知,动态超高压均质相较于传统的巴氏灭菌有更好的灭菌效果,且对橙汁营养的破坏更小。吴奕兵^[70]通过研究得知,动态超高压均质处理可以杀死胡萝卜汁中的大肠杆菌、酿酒酵母

(3) 动态超高压均质对食品成分和品质的影响

动态超高压均质是一种新兴的物理处理手段,液体样品在均质机的腔体内受到的高剪切力、高速流体撞击作用、涡旋作用、空穴爆炸力等一系列作用力,从而使液体的结构受到破坏,使乳浊液中的颗粒可达到纳米级的粒径,也使样品具有了尺寸效应、表面和体积效应,物料也因此被赋予了特殊的物理及化学性质。超高压均质能够改变多种食品中的风味物质的结构特性,使得食品原有风味及特性被改变,给食品带来了新的食用特点,如果将动态超高压均质处理与无菌包装配合应用于食品加工中,会使得更多的新型食品被生产出来。这种技术在崇尚天然、营养性健康的今天,将会具有很大的研究和发展意义,同时对食品加工行业具有很大意义。

动态超高压均质处理能够减少脂肪颗粒絮凝的产生,使脂肪颗粒更加均匀的分散^[85],从而减小乳状液中颗粒的大小,减少乳液出现沉淀和上浮的现象^[86-87]。从而增强产品的稳定性^[88]、改善产品的口感、延长产品的货架期^[87,89]。通过感官试验可知,将经过动态超高压均质处理过的橙汁、苹果汁芒果汁等的滋味与鲜榨果汁相比,品尝评分并无差距。

Guerzoni^[90]等人通过试验表明,采用经动态超高压处理后的原料制成的干酪成品相较于没有经动态超高压均质处理的具有较好的滑腻感和延展性,且滋味、质地、颜色、后味等方面都更加受食用者的喜爱。

(4) 在改性大分子方面的应用

在改变蛋白质结构方面, Lee 发现动态超高压均质处理可以破坏蛋白的二级结构, 通过研究得知动态超高压均质可以增加 β -折叠结构的含量, 并使得蛋白中 α -螺旋的结构向别得二级结构转换^[91]。Bouaouina^[92]报道了动态高压处理能够暴露包含在乳清分离蛋白中大蛋白聚合体内的疏水性集团, 但对乳清蛋白的溶解性几乎没有影响。Cruz^[93-94]等研究了动态超高压均质处理对豆奶物化性质和微观结构的影响, 并与采用动态超高压均质处理后的豆奶和传统热处理豆奶为原料制备的酸豆乳的酸化特性和质构进行对比。Roach^[83]等研究发现动态超高压均质处理可以使酪蛋白及酪蛋白胶束得粒径减小, 改变其粒度分布范围。万婕^[95]等通过研究证明, 膳食纤维经动态超高压均质处理可以增加其可溶性纤维的含量, 且在经动态超高压均质处理后膳食纤维的粒度也较未处理前变小, 同时膳食纤维的水解速度也有所提高。汪菁琴^[96]通过对大豆分离蛋白进行超高压均质处理, 发现动态超高压均质能够改善大豆分离蛋白某些功能性质, 如可以提高大豆分离蛋白的乳化性、起泡性、溶解性及凝胶性等。

在酶方面的应用, 动态超高压均质对酶的作用主要有增强酶活性和钝化酶两种形式, Vannini^[97]在对动态超高压均质的杀菌作用的研究中发现, 动态超高压均质能够加强 Lysozym 的杀菌作用, 同时增加了 Lysozyme 的杀菌谱, 这可能是由于超高压均质改变了 Lysozyme 的结构引起的。Percda^[98]等人通过研究在冷藏条件下, 牛奶中自身含有的纤维蛋白溶酶的残留活性和其与动态超高压均质处理后牛奶蛋白质水解的关系, 发现纤维蛋白溶酶的钝化作用是随着均质压力的升高而逐渐加强的。

1.3 本文研究的选题意义和主要内容

1.3.1 选题意义

如今牛奶已成为我们日常饮食中重要食物, 而牛奶中除了水含量最多的就是酪蛋白了^[5], 酪蛋白是一种具有高营养价值的全价蛋白质, 也是人体日常从食物中获取蛋白最重要的来源之一, 但酪蛋白在人体内比较难以消化, 且还易引起人体过敏。酪蛋白是由四种单体构成的两亲性物质, 不易溶于水和有机溶剂, 这些因素致使酪蛋白在食品领域的发展较缓慢。目前, 我们常采用酶水解的方法对酪蛋白进行改性。酪蛋白经蛋白酶降解后可以释放出易于被人体吸收的小分子的营

营养物质和一些生物活性肽，同时酶解产物的功能性也较未酶解前更好，这些都大大的改善酪蛋白的食用价值和加工价值。然而我国目前对于食物蛋白酶解的研究还有待发展，酶解效率低、酶解不彻底、目标成分难以获得及酶解产物中含有苦味肽等一系列问题还尚未解决，这些技术难题都严重的制约着我国蛋白深加工的发展进程。

因而对于酪蛋白改性研究不能仅仅只停留在对酶解工艺的研究上，应该加强蛋白质酶解改性机理方面的研究。研究表明，在蛋白质酶解前对底物蛋白进行预处理不仅能够使得底物蛋白质的功能特性得到改善，还能够对蛋白的酶解特性有所改善，因此对底物蛋白进行酶解前处理是用来提高对蛋白利用率的有效手段。本课题以酪蛋白为研究对象，采用动态超高压均质处理，研究均质压力水平对酪蛋白的功能性质、构象、酶解特性及酶解产物抗氧化活性的影响，以期为生物活性肽、呈味肽等新产品的制备提供理论依据。

1.3.2 研究内容

(1) 对酪蛋白进行动态超高压均质技术处理，研究不同压力水平处理对酪蛋白功能性质（溶解性、起泡性、乳化性、Zeta 电位、乳液平均粒径）和结构（平均粒径、巯基二硫键、表面疏水性、二级结构含量）的影响，从中选出能够改善酪蛋白酶解作用的压力，将该压力水平应用于后续试验。

(2) 采用（1）中得到的压力水平对酪蛋白溶液进行动态超高压均质处理，将经处理过的酪蛋白溶液进行酶解，以酪蛋白的水解度为检测指标，控制酪蛋白的酶解条件：木瓜蛋白酶添加量、酶解温度、酶解时间来对木瓜蛋白酶酶解酪蛋白的工艺条件进行优化，得出最佳的酶解工艺条件。

(3) 在酶解前进行动态超高压均质处理，研究动态超高压均质处理对酪蛋白酶解特性的影响，测定经动态超高压均质处理过的酪蛋白酶解液的水解度、固形物得率、DPPH 清除率、细胞抗氧化、氨基酸及游离氨基酸组成，探究动态超高压均质处理对酪蛋白酶解特性的影响。



第二章 动态超高压均质处理对酪蛋白功能性质和构象的影响

2.1 引言

酪蛋白约占牛奶中总蛋白的 80%^[8], 是牛乳在 20 °C、pH 4.6 条件下沉淀下来的蛋白质^[99]。酪蛋白不仅是一种营养价值极高的全价蛋白质, 同时在酪蛋白分子内部还含有百余种活性多肽的肽段^[100], 目前许多科研人员已经从酪蛋白的酶解产物中分离出了具有降血压、降血糖、降血脂、清除自由基、抗癌及增强机体免疫等生物活性功能的生物活性多肽^[101-102], 也在酪蛋白分子中找到了这些生物活性肽所对应的氨基酸序列。但酪蛋白不溶于水和有机溶剂, 使得它的生物活性功能难以充分发挥, 因此如何提高酪蛋白的利用率成为研究热点。Wang^[103]运用热处理的方法来改善耗牛乳中酪蛋白的性质; Huang^[104]等研究了超声波对酪蛋白凝胶性的影响; Rahimi^[105]等采用蛋白酶 K 酶解骆驼奶中的酪蛋白来得到抑制和清除自由基的生物活性肽; 近年来越来越多的学者采用动态超高压均质技术来改善一些蛋白质的结构及功能性质, 动态超高压均质处理是一种新型的特殊物理改性手段^[106], 它利用物料在高压均质机的反应腔中受到的剪切力、高速撞击、剧烈震荡、压力瞬间释放等作用力, 使得大分子如蛋白质、淀粉等的结构发生变化, 从而导致其功能性质发生一定的改变^[107-109], 已用于改善花生蛋白^[100]、大豆蛋白^[111]、乳清蛋白^[112]等的结构特性和功能特性。然而对于动态超高压均质处理对酪蛋白功能性质及结构性质的报道还比较鲜见。本文将采用动态超高压均质对酪蛋白进行处理, 研究其功能性质的变化, 以期改善酪蛋白的功能性质并拓宽酪蛋白的应用领域。

2.2 试验材料与仪器

2.2.1 试验材料

酪蛋白 Solarbio, 北京索莱宝科技有限公司; 甘氨酸: 阿拉丁; Tris: 阿拉丁; DTNB: 阿拉丁; ANS: 阿拉丁; β -巯基乙醇: Synthese 公司; 三氯乙酸:

天津科密欧；无水乙醇：天津科密欧。

2.2.2 主要仪器设备

79-1 磁力加热搅拌器：江苏正基仪器有限公司；FPG12800 均质机：英国 SFP 公司；IKAT25 基本型高速分散机：德国 IKA；Zetasizer Nano ZS90：英国马尔文仪器有限公司；Chirascan 圆二色谱仪：Applied Photophysics Ltd；无菌均质机：宁波新芝生物科技股份有限公司；UNIC 7200：美国尤尼柯；离心机：德国 SIGMA；Kjeltec TM8400 全自动凯氏定氮仪：美国 FOSS 公司。

2.3 试验方法

2.3.1 制备酪蛋白溶液

用 pH6.25 的磷酸缓冲溶液配制浓度为 10 mg/mL 的酪蛋白溶液，用无菌均质器中档拍打 12min 使酪蛋白分散于 pH6.25 的磷酸缓冲溶液中。

2.3.2 酪蛋白营养成分的测定

采用国标的方法，对酪蛋白中的营养成分进行测定。参照 GB 5009.5-2010 中凯氏定氮法对蛋白的纯度进行测定，参照 GB 5009.3-2010 中直接干燥法对酪蛋白中的水分含量进行测定，参照 GB/T 14772-2008 和 GB 5009.4-2010 的方法分别对酪蛋白中的脂肪和灰分进行测定。

2.3.3 动态超高压均质处理后酪蛋白温度的测定

参照 2.3.1 中的方法配制 10 mg/mL 的酪蛋白溶液，进行 0.1、25、50、100、150、200、250 MPa 的动态超高压均质处理，将动态超高压均质处理后的酪蛋白溶液用红外温度仪进行温度的测定。

2.3.4 酪蛋白颗粒尺寸大小的测定

参照 2.3.1 中的方法配制 10 mg/mL 的酪蛋白溶液，进行 0.1、25、50、100、150、200、250 MPa 的动态超高压均质处理，采用激光纳米粒度测定仪对经过动态超高压均质处理过的酪蛋白溶液的粒度进行测定^[113]。

2.3.5 酪蛋白溶解性的测定

参照 2.3.1 中的方法配制 10 mg/mL 的酪蛋白溶液, 进行 0.1、25、50、100、150、200、250MPa 的动态超高压均质处理, 处理后的酪蛋白运用凯氏定氮的方法对酪蛋白的总蛋白含量进行测定。对经动态超高压均质处理过的酪蛋白在 10000 r/min 的离心机内, 离心 20 min, 使不溶于水的蛋白沉淀下来, 吸取上清液并测定其中蛋白质的含量, 计算酪蛋白的溶解性^[114-115], 公式如下:

$$\text{溶解性 (\%)} = \frac{\text{上清液蛋白含量}}{\text{总蛋白含量}} \times 100 \quad (2-1)$$

2.3.6 酪蛋白起泡性的测定

参照 2.3.1 中的方法配制 10 mg/mL 的酪蛋白溶液, 进行 0.1、25、50、100、150、200、250MPa 的动态超高压均质处理, 参考 Yin^[116]的方法, 将 100 mL 经动态超高压处理过的酪蛋白溶液, 采用 11000r/min 分散 2min, 记录总体积 V_0 , 静置 30 min 后, 记录总体积 V_1 。

$$\text{起泡性 (\%)} = \frac{(V_0 - 100)}{100} \times 100 \quad (2-2)$$

$$\text{起泡稳定性} = \frac{(V_1 - 100)}{(V_0 - 100)} \times 100 \quad (2-3)$$

2.3.7 酪蛋白乳化能力的测定

参照 2.3.1 中的方法配制 10 mg/mL 的酪蛋白溶液, 进行 0.1、25、50、100、150、200、250MPa 的动态超高压均质处理, 将 12mL 经动态超高压均质处理过的蛋白溶液与 4mL 植物油进行混合, 并用高速分散机加速其乳化, 乳化完成后吸取 50 μ L 的乳液与 5mL 0.1g/100 mL SDS 溶液进行混合, 混合均匀后在 500 nm 下测其吸光度 A_0 , 静置 30 min 后, 再次按照上面的方法对乳液的吸光度 A_1 进行测定^[117]。

$$EA(m^2/g) = 2T \frac{A_0}{c \times \varphi \times (1 - \theta) \times 10^5} \quad (2-4)$$

$$ES(\%) = \frac{A_0}{A_0 - A_1} \times 30 \quad (2-5)$$

式中: $T = 2.303$; c 为乳状液形成前蛋白浓度, g/mL; φ 是光程 (0.01), θ 为乳状液中油的体积分数(0.25)。

2.3.8 酪蛋白乳液 Zeta 电位和平均粒径的测定

采用 Nano-ZS 90 马尔文粒径分析仪对酪蛋白乳液的 Zeta 电位、中位径进行测定^[118]。仪器参数分别为散射角为 173 °、折光指数 1.33、测定温度 25°C, 保温 3 min。

2.3.9 巯基二硫键含量的测定

游离巯基含量 (SH_F) 的测定: 取 1 mL 经动态超高压均质处理后的酪蛋白溶液置于烧杯中, 向其中加入 5 mL 的 Tris-Gly-8MUrea 溶液 (0.086 mol/L Tris, 0.09 mol/L Gly, 0.004 mol/L EDTA, 8 mol/L 尿素), 和 0.04 mL 4 mg/mL 的 DTNB (5,5'-二硫双-2-硝基苯甲酸) 溶液, 混合均匀后在 25°C 的条件下反应 30 min, 在 412 nm 下吸光度值(A₄₁₂), 同时以蒸馏水代替酪蛋白进行空白值的测定^[119]。

总巯基 (SH_T) 含量的测定: 将 1 mL 的酪蛋白溶液与 5.0 mL 的 Tris-Gly-10 MUrea (0.086 mol/L Tris, 0.09 mol/L Gly, 0.004 mol/L EDTA, 10 mol/L 尿素) 溶液及 0.1mL 的 β-巯基乙醇于 25°C 下反应 1 h, 再加入 10 mL 12% 的 TCA (三氯乙酸) 溶液, 继续恒温反应 1 h, 之后 4000 rpm 离心 15 min, 沉淀再用 12% 的 TCA 溶液洗涤并离心, 重复三次后在离心的残渣中加 15 mL Tris-Gly-8MUrea 溶解, 再加 0.15 mL DTNB 溶液, 混合均匀后在 25°C 下反应 30 min, 在 412 nm 下测定其吸光度值(A₄₁₂), 同时以蒸馏水代替酪蛋白溶液作为对照组进行测定。

巯基及二硫键的计算公式如下:

$$\text{游离巯基 (SH}_F\text{)} \text{ 总巯基 (SH}_T\text{)} = \frac{73.53A_{412}}{C} \text{ (}\mu\text{mol/g 蛋白质)} \quad (2-6)$$

$$\text{二硫键 (-S-S-)} = \frac{SH_T - SH_F}{2} \text{ (}\mu\text{mol/g 蛋白质)} \quad (2-7)$$

其中 $73.53 = 10^6 / (1.36 \times 10^4)$, 1.36×10^4 是 Ellman's 试剂的摩尔消光系数; C 为酪蛋白的浓度 10 mg/mL。

2.3.10 表面疏水性测定

参考 ANS(1-苯胺基-8-萘磺酸)荧光探针法^[120]对样品的表面疏水性进行测定,用 pH6.25 的磷酸缓冲液配制不同浓度的蛋白质溶液(0.005%、0.01%、0.02%、0.05%、0.1%和 0.2%)和 8.0 mmol/L 的 1-苯胺基-8-萘磺酸(1-anilino-8-naphthalene-sulfonate, ANS)溶液。将 6mL 的酪蛋白溶液与 30 μ L ANS 溶液混合均匀,迅速测定混合液的荧光强度(FI')及未加 ANS 溶液的样品荧光强度(FI₀)。检测出样品的激发波长为 338nm,发射波长为 496 nm。FI'与 FI₀的差值记为 FI,以酪蛋白的浓度为横坐标,FI 为纵坐标作图,曲线的斜率即为酪蛋白质分子的表面疏水性指数 H₀。

2.3.11 二级结构

将经动态超高压均质处理过的酪蛋白溶液用 pH 6.25 的磷酸缓冲液稀释一定的倍数,进行圆二色谱扫描,扫描波长范围:190~250 nm;扫描速率:100 nm/min;光程:1 mm;扫描次数:3 次^[121]。

2.3.12 数据统计分析

所有试验数据均进行 5 组平行试验及 3 组重复试验,试验数据应用 SPSS 17.0 和 Origin 8.0 进行统计分析和作图。

2.4 结果与讨论

2.4.1 酪蛋白成分表

按照 2.3.2 中所描述的试验方法对酪蛋白中营养成分进行测定,测得结果如表 1 所示。

表 2-1 酪蛋白中各营养成分及其含/%

Table 2-1 Nutritional composition and content of the casein /%

成分	蛋白质	脂肪	水分	灰分
含量 (%)	79.15 $\pm$ 3.1	5.22 $\pm$ 0.25	10.44 $\pm$ 0.15	5.74 $\pm$ 0.064

由表 1 可知,蛋白质含量达到 79.15%,水分、脂肪和灰分的含量共占约 21%。

蛋白质占干物质含量的 87.83%，说明此蛋白以下试验对酪蛋白的要求。

2.4.2 压力水平对酪蛋白温度的影响

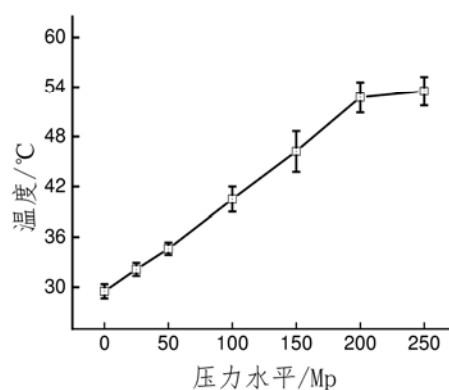


图 2-1 压力水平对酪蛋白温度的影响

Fig.2-1 The influence of pressure level on temperature of casein

动态超高压均质机在处理液体样品的过程中会有样品和均质机发热的情况，均质机的发热情况是由均质的原理所带来的，由于样品在均质机的高压泵内经过均质阀的过程有大量的热产生，因此均质机和样品的温度升高，当然这个升高的温度和均质的压力水平是有一定关系的，图 2-1 为不同压力处理过后酪蛋白的温度变化图，由图可知随着压力的升高酪蛋白溶液的温度几乎呈线性升高的趋势，但 200 MPa 和 250 MPa 是差异不显著的 ($p>0.05$)，这说明压力升高可能会导致物料温度更高，但它可能不会超过某一个温度，因此可能更高的压力将不会有更大的温度变化。

2.4.3 压力水平对酪蛋白平均粒度的影响

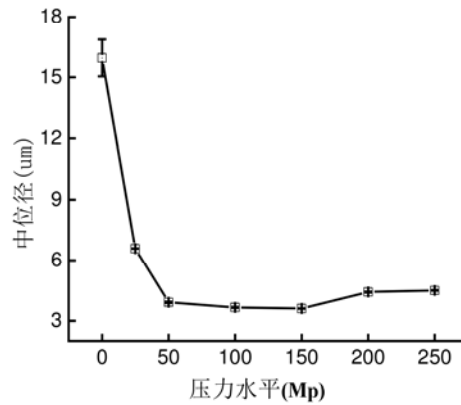


图 2-2 压力水平对酪蛋白平均粒度的影响

Fig.2-2 The influence of pressure level on average particle size of casein

不同动态超高压下酪蛋白中位径大小如图 2-2 所示。从图中我们能够看出伴随着压力水平的提高酪蛋白的中位径大小呈现出先减小后增大的趋势，且 50 Mpa-150 Mpa 处理后酪蛋白中位径彼此不显著 ($p>0.05$)。此结果与黎鹏在采用动态超高压均质技术对花生球蛋白的研究结果基本相符，在较低压力范围内，粒度随着压力水平的提高而快速变小；但在较高压力的范围内，随着压力水平的提高粒度的大小有上升的趋势^[112]。经动态超高压处理后的酪蛋白中位径减小是因为酪蛋白在均质机的反应腔内受到剪切、高速撞击、剧烈震荡、压力瞬间释放等动力作用，使酪蛋白颗粒被粉碎、聚集体被破坏，因而减小了酪蛋白的中位径。随着压力的升高酪蛋白颗粒被进一步粉碎，酪蛋白聚合物被破坏，结构被打开，此时会产生很多新的表面随，但新形成的这些较小的聚合物由于热力学上的不稳定部分重新聚集在一起^[122]，由上图可知 50 Mpa-150 Mpa 处理后酪蛋白中位径彼此不显著，这说明压力在 50 Mpa-150 Mpa 之间时颗粒破碎和颗粒重组达到一个动态平衡。综上所述经 50 Mpa-150 Mpa 处理的酪蛋白都可以达到中位径较小的酪蛋白。

2.4.4 压力水平对酪蛋白溶解性的影响

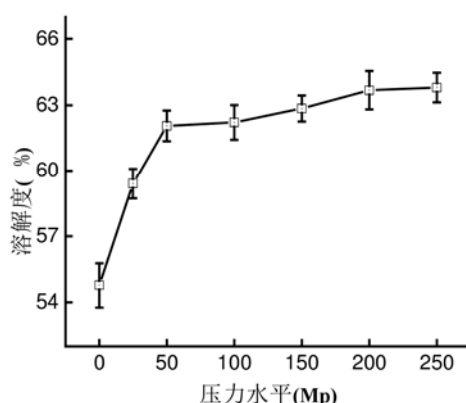


图 2-3 压力水平对酪蛋白溶解度的影响

Fig.2-3 The influence of pressure level on solubility of casein

蛋白质的溶解性通常指的是蛋白质的水溶性，溶解性是蛋白质的功能性质中最为重要的一个，它同时也是其他功能性质的基础。如果蛋白质的溶解性较高，那么蛋白质的乳化性、发泡性、凝胶性等功能性质也必然是不错的，因此溶解性好的蛋白质也就更易于食品的加工利用^[123]。动态超高压均质对酪蛋白溶解性的影响如图 2-3 所示，由图可知随着压力水平的升高酪蛋白的溶解度呈现出先升高后不变的趋势。这可能是因为，酪蛋白在反应腔内受到的剪切力、高速流体撞击作用、涡旋作用、空穴爆炸力等作用力，破坏酪蛋白的结构使得酪蛋白粒度变小，增大了其与水的接触面，导致其溶解度增大^[121,124]；同时，在动态超高压均质处理过程中，由于样品在均质机的高压泵内经过均质阀时产生了大量的热，这个热量使得样品在高温高压下展开蛋白质分子，亲水性氨基酸残基暴露，从而使得酪蛋白的溶解度得到提高^[124]。

2.4.5 动态超高压均质对酪蛋白起泡性和起泡稳定性的影响

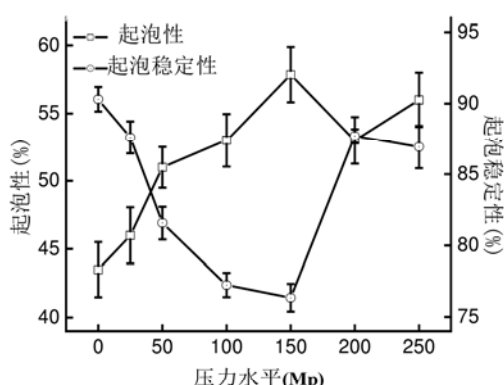


图 2-4 压力水平对酪蛋白起泡性和起泡稳定性的影响

Fig.2-4 The influence of pressure level on foaming capacity and foam stability of casein

动态超高压均质处理对酪蛋白起泡性和起泡稳定性的影响如图 2-4 所示。由图可知酪蛋白的起泡性随着压力水平的升高呈现出先升高后降低的趋势，而酪蛋白起泡稳定性则随着压力水平的升高先降低后升高。酪蛋白分子是由亲水性氨基酸和疏水性氨基酸共同构段成的，其表面活性比较强，在搅拌的过程中易形成泡沫。蛋白质分子的溶解性、分子柔性、疏水性、带电基团等这些内在因素都能够影响酪蛋白的起泡性，而包括蛋白质浓度、起泡方法等在内的外界因素对酪蛋白的起泡性也有一定的影响。对蛋白质的起泡稳定性起决定性作用的主要是蛋白质的流变学性质，如吸附膜中蛋白质的水合、蛋白质的浓度、膜的厚度、适当的蛋白质分子相互作用^[114,125]。由 2.4.3 中我们可以知道动态超高压均质处理提高了酪蛋白的溶解度，因此酪蛋白分子更容易在气-水界面得到扩展和吸附，在气-水界面形成一层坚硬的膜，进而提高酪蛋白的起泡性^[126]，同时动态超高压均质技术可以使蛋白质部分结构展开增加其泡沫的产生^[124]。但随着压力水平的进一步提高，动态超高压均质技术破坏了酪蛋白分子的疏水亲水基团和带电极性基团之间的平衡，使得酪蛋白表面疏水性增强，而蛋白质膜在气水界面的平衡被破坏，不易形成泡沫^[127]。

2.4.6 动态超高压均质对酪蛋白乳化性的影响

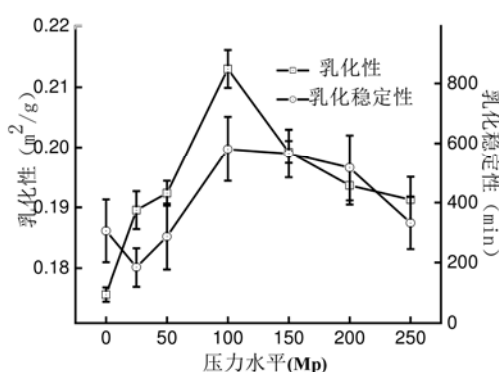


图 2-5 压力水平对酪蛋白乳化性和乳化稳定性的影响

Fig.2-5 The influence of pressure level on emulsifying capacity and emulsion stability of casein

不同动态超高压下酪蛋白乳化性和乳化稳定性的变化如图 2-5 所示。由图可知随着压力水平的提高酪蛋白乳化性呈现出先增大后减小的趋势，在 100 Mpa 时酪蛋白的乳化性最大，而乳化稳定性先增大后减小的趋势。动态超高压均质处理能够提高酪蛋白的乳化性可能是因为高压均质破坏了酪蛋白分子的结构，暴露出了酪蛋白分子内部的疏水性基团和亲水基团，使得酪蛋白分子的亲水性和亲油性有所增强^[128]，且蛋白质的乳化特性与蛋白质的溶解度、表面疏水性、分子链段柔性 and 表面电荷分布相关^[129]，动态超高压均质处理提高了酪蛋白的溶解度和表面疏水性，从而增加了乳化性。而随着压力的进一步提高展开的蛋白质分子会通过氢键和二硫键等作用力重新形成聚合体，分子链段柔性降低，使蛋白与油滴不易结合，且随着压力的升高均质机也会造成样品的温度进一步升高，机械作用与热效应的双重影响，使得蛋白发生一定程度的变性，导致酪蛋白乳化性下降。

2.4.7 压力水平对乳液 zeta-电位的影响

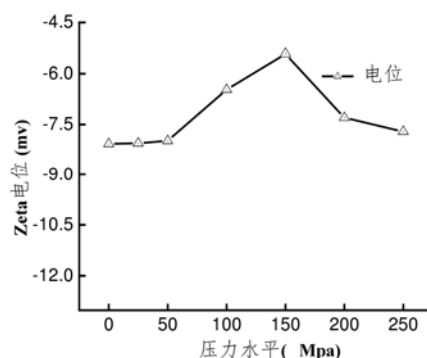


图 2-6 压力水平对酪蛋白乳液 zeta-电位的影响

Fig.2-6 The influence of pressure level on the zeta- potential of casein emulsion

压力水平对酪蛋白 Zeta 电位的影响如图 2-6 所示，由图可知随着压力水平的提高除了在 200 Mp 时骤然下降外，在其他压力水平下酪蛋白的 Zeta 电位是有少许增加的。Zeta 电位值通常被认为与胶体溶液的稳定性有关，通常 Zeta 电位高的溶液会因为溶液中的粒子间不容易发生聚集而可以保持稳定，而在 Zeta 电位低的溶液中粒子之间的吸引力会大于斥力，导致粒子聚集到一起，悬浮液失去稳定性。因为动态超高压均质处理可以使得酪蛋白溶液中的酪蛋白粒径减小，曝露出更多相斥的电性，因此 Zeta 电位有所升高，但在 200 Mp 时由于高压处理引起的温度升高，导致酪蛋白颗粒重新聚集在一起，因此 Zeta 电位值降低。

2.4.8 动态超高压均质对酪蛋白乳液粒径的影响

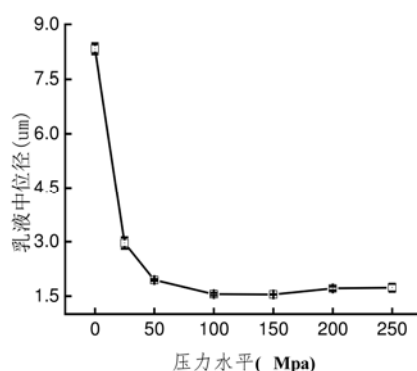


图 2-7 压力水平对酪蛋白乳液平均粒度的影响

Fig.2-7 The influence of pressure level on average particle size of casein emulsion

图 2-7 为不同压力水平对酪蛋白乳液粒径的影响, 由图可知随着压力水平的升高乳液中位径平均粒径依次降低且逐渐趋于平衡, 这说明在一定压力范围内提高均质压力水平可以有效的提高均质效率, CHENG Q 等^[130]研究也表明 β -乳球蛋白的粒径有随着均质压力水平的升高而逐渐减小且最后趋于平衡的趋势。这是因为动态超高压处理可以使乳液的粒径减小, 但在乳液中位径达到一定程度时, 乳液的分散和聚集达到了相对的平衡, 因此 50 MPa 以后乳液中位径趋于稳定。

2.4.9 动态超高压均质对酪蛋白巯基二硫键含量的影响

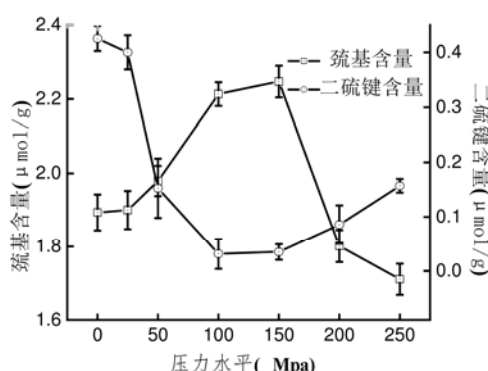


图 2-8 压力水平对酪蛋白巯基二硫键含量的影响

Fig.2-8 The influence of pressure level on the content of sulfhydryl (SH) and disulfide bond(S-S)average of casein

巯基和二硫键是蛋白质的重要功能基团, 属于维持蛋白质三维结构的弱次级键, 其含量的变化能够反映出蛋白质的变性程度, 且在蛋白质功能特性的发挥上巯基和二硫键也担当着重要的角色^[121]。Kaj iyama(1995)等^[131]和 Zhang(2003)等^[132]报道, 高压处理后大豆蛋白中巯基含量增大表明蛋白构象的改变。由上图可知随着压力水平的提高蛋白质的巯基含量先升高后减少、二硫键含量呈现先减少后升高的趋势。在动态超高压的作用下, 蛋白质分子的结构展开而变得疏松, 部分蛋白质结构内部的二硫键会因为结构的展开而暴露到分子的表面; 一些暴露到分子表面的巯基基团会在空气中转化成二硫键, 同时一些蛋白颗粒由于热力学上的不稳定, 导致巯基基团重折叠包埋于分子内部^[119]。由图可知在 0.1~150 MPa 时二硫键的断裂作用占优势, 因此巯基含量逐步升高, 二硫键含量相应减少; 在 150~250 MPa 时巯基的氧化和包埋占优势, 因此巯基含量减少, 二硫键含量升高。

2.4.10 动态超高压均质对酪蛋白疏水性的影响

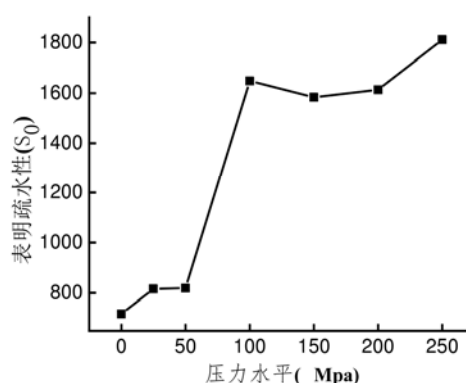


图 2-9 压力水平对酪蛋白表面疏水性的影响

Fig.2-9 The influence of pressure level on the hydrophobicity of casein

疏水相互作用是影响蛋白质三级结构的主要作用力,它对蛋白质的功能性质如溶解性、乳化性和起泡性等都有显著的影响。不同压力水平对酪蛋白表面疏水性的影响如图 2-9 所示,由图可知,100 MPa 的处理会导致酪蛋白的表面疏水性出现显著上升。在天然状态下,蛋白质中的非极性的氨基酸侧链残基大多分布在内部的疏水性区域,构成稳定的疏水性内核,而极性氨基酸侧链残基则大多分布于蛋白质分子的表面,以保证在亲水环境中表面水分子相互作用的稳定^[133-134]。动态超高压均质处理会使蛋白高级结构受到外部因素影响而发生变化,蛋白质分子发生去折叠,疏水性侧链就会重新分布,有更多的残基暴露于蛋白表面,从而使更多的非极性基团暴露,使得蛋白质的表面疏水性增大^[135-136]。

2.4.11 动态超高压均质对酪蛋白二级结构含量的影响

表 2-2 动态超高压均质对酪蛋白二级结构含量的影响

Table 2-2 Effect of dynamic high pressure homogenization on the content of casein in the two stage

样品	α -螺旋	β -折叠	β -转角	无规则卷曲
0 Mp	11.5% $\pm$ 3.9 $\times 10^{-3}$ a	26.8% $\pm$ 4.5 $\times 10^{-3}$ d	27.25% $\pm$ 4.9 $\times 10^{-3}$ a	37.78% $\pm$ 0.5 $\times 10^{-3}$ c
25 Mp	10.1% $\pm$ 0.7 $\times 10^{-3}$ b	26.8% $\pm$ 3.5 $\times 10^{-3}$ d	27.78% $\pm$ 4.6 $\times 10^{-3}$ a	39.32% $\pm$ 0.5 $\times 10^{-3}$ a
50 Mp	9.9% $\pm$ 0.1 $\times 10^{-3}$ bc	28.28% $\pm$ 4 $\times 10^{-3}$ c	27.52% $\pm$ 4.4 $\times 10^{-3}$ a	37.92% $\pm$ 4.6 $\times 10^{-3}$ c
100 Mp	9.84% $\pm$ 1.1 $\times 10^{-3}$ c	28.86% $\pm$ 4.3 $\times 10^{-3}$ b	27.42% $\pm$ 4.9 $\times 10^{-3}$ a	38.12% $\pm$ 4.6 $\times 10^{-3}$ bc
150 Mp	9.66% $\pm$ 2 $\times 10^{-3}$ c	29.08% $\pm$ 4.4 $\times 10^{-3}$ b	27.12% $\pm$ 4 $\times 10^{-3}$ ab	38.52% $\pm$ 4.4 $\times 10^{-3}$ b
200 Mp	9.32% $\pm$ 0.5 $\times 10^{-3}$ d	30.72% $\pm$ 4 $\times 10^{-3}$ a	26.78% $\pm$ 4.6 $\times 10^{-3}$ b	37.98% $\pm$ 4.4 $\times 10^{-3}$ c
250 Mp	9.1% $\pm$ 1.5 $\times 10^{-3}$ d	30.5% $\pm$ 3 $\times 10^{-3}$ a	25.42% $\pm$ 5 $\times 10^{-3}$ c	38.12% $\pm$ 0.5 $\times 10^{-3}$ bc

a-d 不同字母表示纵列存在显著差异 (P < 0.05)

a-d Different parameter superscripts in the same column indicate significant differences (P < 0.05).

动态超高压均质对酪蛋白二级结构含量的影响如表 2-2 所示。 α -螺旋是蛋白质中最常见和最稳定的的二级结构类型。由表可知随着处理压力不断升高， α -螺旋结构含量逐渐降低，而 α -螺旋结构的维持依靠的主要是多肽链上羰基和氨基之间的氢^[137]，因此 α -螺旋结构含量的降低，这可能是由于态超高压均质处理影响了氢键的稳定性引起的。 α -螺旋结构同时又是蛋白质中最稳定的二级结构，其含量的变化可以反映蛋白质结构稳定度的变化， α -螺旋含量降低表明蛋白质结构稳定性降低，蛋白质的结构被破坏。 β -折叠和 β -转角的总和随着压力水平的升高逐渐升高，说明蛋白质结构发生伸展和重组，酪蛋白分子的段柔性增强。而无规则卷曲含量随着压力水平的升高变化没有规律。这样的结果说明动态超高压均质处理破坏了酪蛋白的二级结构，而酪蛋白二级结构的变化将导致整个分子结构的构象发生变化，同时也影响维持蛋白质三级、四级结构的静电作用和范德华力等，进而影响影响蛋白质的功能性质^[138]。

2.5 本章小结

综上所述动态超高压均质处理对酪蛋白温度、平均粒度、溶解性、起泡性、乳化性、Zeta 电位、巯基二硫键、表面疏水性及二级结构等都有一定的影响，动

态超高压均质处理可以使酪蛋白颗粒变小，使其在溶剂中更好的分散，提高其溶解度；一定的压力水平还可增强酪蛋白的起泡性和乳化性，由结果可知在 100 Mpa 和 150 Mpa 时酪蛋白具有较好的起泡性和乳化性，且此时酪蛋白乳液的平均粒径较小 Zeta 电位值较高；动态超高压均质处理可以改变酪蛋白的二三级结构，由上述结果可知不同的压力水平下酪蛋白的巯基二硫键、表面疏水性及二级结构含量都在发生着不同的变化；综合评定选取 150 Mpa 对酪蛋白处理进行更深层次的研究。结果表明：动态超高压均质处理可以减小酪蛋白的平均粒径和酪蛋白乳液的平均粒径，提高溶解性、起泡性、乳化性、Zeta 电位；且对酪蛋白的二三级结构也有一定的影响，在 150 MPa 时酪蛋白的平均粒径为 $3.61\mu\text{m}$ ，酪蛋白的溶解性为 62.86%，酪蛋白的起泡性和起泡稳定性为 57.86%和 76.34%，酪蛋白的乳化性和乳化稳定性为 $0.2\text{m}^2/\text{g}$ 和 565.32min，酪蛋白乳液的 Zeta 电位和平均粒径为 -5.42mv 和 $1.55\mu\text{m}$ ，酪蛋白的巯基二硫键含量为 $2.25\mu\text{mol/g}$ 和 $0.03\mu\text{mol/g}$ ，酪蛋白的表面疏水性为 1583.9S₀，酪蛋白的二级结构中 α -螺旋的含量为 9.66%、 β -折叠的含量为 29.08%、 β -转角的含量为 27.12%、无规则卷曲的含量为 38.52%，此时酪蛋白的结构发生改变，其功能性得到发挥，提高了酪蛋白在生产中的应用。



45,000Psi
3,100Bar
-4°C- 80°C

苏州微流纳米生物技术
高压均质机 细胞破碎仪 脂质体挤出器

实验型 1-100mL
中试型 1L-5L
生产型 5L-100L



第三章 响应面法优化木瓜蛋白酶酶解酪蛋白工艺条件研究

3.1 引言

牛奶是目前我们日常从饮食中获取蛋白质的重要来源,而牛奶中 80%的蛋白为酪蛋白^[8]。酪蛋白是一种全价蛋白质^[139],具有较高的营养价值,在食品加工中常常用来作为婴幼儿的代乳品。但酪蛋白会在胃中凝聚在一起产生大的凝块,这会使婴儿产生消化不良和过敏等反应^[140]。我们常采用水解的方法对其进行改善,酪蛋白的水解有高压、加热等物理水解,利用酸、碱等化学水解^[27-28],及酶水解的方法,因为物理水解条件常常会破坏蛋白的结构及性质且条件不易控制,而酸、碱水解会在水解过程中会产生一定的副反应,因此我们常常选用水解产物的氨基酸组成接近于原料蛋白酶对蛋白进行水解。酪蛋白经水解后生成的肽不仅有易于消化吸收的营养功能,还有抗氧化、免疫调节、抗高血压、抗菌等多种生理功能^[29-30,141-143]。如 Irshad 等^[144]采用胰蛋白酶和胃蛋白酶酶解酪蛋白制备抗氧化活性肽。Malinowski 等^[145]运用胰蛋白酶对酪蛋白进行酶解来制备抗炎活性肽。因此,从酪蛋白的酶解产物中提取功能性肽成近年来对于酪蛋白研究的热点之一。本文在本课题组研究的基础上采用经 150Mp 动态超高压均质处理过的 10 mg/mL 的酪蛋白为研究对象,用木瓜蛋白酶对其进行酶解,研究木瓜蛋白酶添加量、酶解温度及酶解时间等酶解条件对酪蛋白酶解效率的影响,在单因素结果的基础上采用响应面优化法对木瓜蛋白酶酶解酪蛋白的酶解工艺条件进行优化,以期为后续研究提供理论依据。

3.2 试验材料与仪器

3.2.1 试验材料

酪蛋白 Solarbio, 北京索莱宝科技有限公司;木瓜蛋白酶:阿拉丁;甲醛:天津科密欧;无水乙醇:天津科密欧。

3.2.2 仪器与设备

FPG12800 均质机：英国 SFP 公司；无菌均质机：宁波新芝生物科技股份有限公司；Kjeltec TM8400 全自动凯氏定氮仪：美国 FOSS 公司。

3.3 试验方法

3.3.1 酪蛋白溶液的制备

将酪蛋白分散于 pH 6.25 的磷酸缓冲溶液中，配制成浓度为 10 mg/mL 的酪蛋白溶液。

3.3.2 酪蛋白水解工艺流程

酪蛋白溶液配制→动态超高压均质处理→添加木瓜蛋白酶→进行酶解→灭酶→冷却至室温→指标测定

3.3.3 单因素试验

以经过动态超高压均质处理的 10 mg/mL 的酪蛋白溶液做为酶解底物，以酪蛋白的水解度为测定指标，研究不同木瓜蛋白酶添加量（1、2、3、4、5、6 mg/mL）、不同酶解温度（35、40、45、50、55、60℃）、不同酶解时间（1、2、3、4、5、6 h）对酶解效率的影响，初步确定适宜的酶解条件。

3.3.4 响应曲面试验设计

在单因素试验结果的基础上，根据 Box—Behnken 的设计原理，以木瓜蛋白酶添加量、酶解温度及酶解时间为影响因子，选取水解度为响应值，进行 3×3 响应面试验，来优化出木瓜蛋白酶酶解酪蛋白的最佳酶解参数。试验因素水平表见表 3-1。

表 3-1 响应面的因素水平表

Table 3-1 Factors and levels of response surface experiment

水平	X ₁ (木瓜蛋白酶添加量 mg/mL)	X ₂ (酶解温度℃)	X ₃ (酶解时间 h)
-1	3	45	3
0	4	50	4
1	5	55	5

3.3.5 水解度的测定

取 1 mL 酪蛋白酶解液加入烧杯中，再向其中加入 60 mL 蒸馏水，用 0.05 M 的 NaOH 溶液将样品滴定至 pH 8.2。向样品中加入 10mL 的甲醛溶液，混合均匀后再用 0.05 M 的 NaOH 溶液将样品滴定至 pH 9.2，同时用蒸馏水代替酪蛋白酶解液做空白对照^[146-147]。记录滴加的标准 NaOH 溶液的体积，计算水解度 (DH)。

$$DH (\%) = \frac{h}{h_{tot}} \quad (3-1)$$

$$h = \frac{C \times (V_1 - V_2)}{S \times W} \quad (3-2)$$

式中：V₁：向样品中加入甲醛溶液后滴定所用 NaOH 溶液的体积 (mL)；

V₂：对照组加入甲醛溶液后滴定所用 NaOH 溶液的体积 (mL)；

C：氢氧化钠标准滴定溶液的浓度 (mol/L)；

S：为底物浓度；

W：为样品中蛋白质含量，采用开始定氮法测定，为 79.15；

H_{tot}：是蛋白中肽键总数 mmol/g，酪蛋白的肽键总数为 8.2×10^{-3} mmol/g。

3.3.6 数据处理

所有试验数据均进行 5 组平行试验及 3 组重复试验，试验数据应用 SPSS 17.0 和 Origin 8.0 进行统计分析和作图。

3.4 结果与分析

3.4.1 木瓜蛋白酶添加量对酪蛋白酶解效率的影响

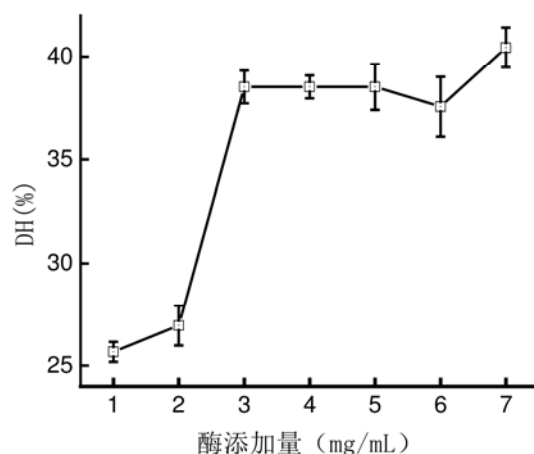


图 3-1 木瓜蛋白酶浓度对水解度的影响

Figure.3-1 Effect of papain concentration on DH

图 3-1 为不同木瓜蛋白酶添加量对酪蛋白水解度大小的影响，由图 3-1 可知酪蛋白的水解度随着木瓜蛋白酶添加量的逐渐增加呈现出先升高后趋于稳定的趋势。木瓜蛋白酶添加量从 1 mg/mL 到 3 mg/mL 时水解度变化显著 ($p < 0.05$)，而从 3 mg/mL 到 6 mg/mL 时酪蛋白水解度变化差异不显著，说明当向酪蛋白溶液中添加的木瓜蛋白酶的量过少时，酪蛋白并没有完全被水解，而当进一步增加木瓜蛋白酶的添加量到一定量的时候酪蛋白被完全水解，在这一酶解条件下酪蛋白的水解程度达到最大，水解度也得到较大的值 38.52%。

3.4.2 酶解温度对酪蛋白酶解效率的影响

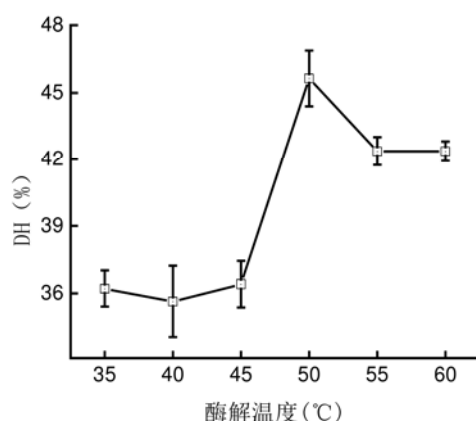


图 3-2 酶解温度对水解度的影响

Figure. 3-2 Effect of hydrolysis temperature concentration on DH

图 3-2 为不同酶解温度对酪蛋白酶水解度的影响，由图可知酪蛋白的水解度随着酶解温度的升高呈现先升高后降低的趋势。当酶解温度在 35℃-50℃时酪蛋白的水解度逐渐升高，且当温度由 45℃升到 50℃时酪蛋白水解度骤然升高并在 50℃时水解度达到最大值 45.65%，而之后酪蛋白的水解度随着温度的升高却开始减小。这说明在未达到最适酶解温度前温度逐渐升高是对酶解有利的，而过高的温度则会因为破坏酪蛋白的结构和性质而导致水解效率降低。

3.4.3 酶解时间对酪蛋白酶解效率的影响

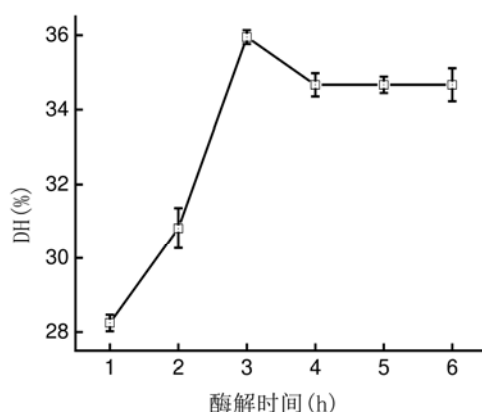


图 3-3 酶解时间对水解度的影响

Figure. 3-3 Effect of hydrolysis time concentration on DH

图 3-3 为不同酶解时间对酪蛋白酶解效率的影响，由图 3-3 可知当酶解时间在 1-3 h 之间时酪蛋白的水解度呈直线上升，并且在 3 h 时达到最大值 35.95%，然后当酶解时间进一步延长时酪蛋白水解度有所下降，但最终趋于不变。

3.4.4 响应面的试验结果

在单因素试验结果的基础上，根据 Box—Behnken 的设计原理，对木瓜蛋白酶水解酪蛋白体系进行了 17 组的响应面分析试验设计，其中有 5 组为中心重点重复试验，结果见表 3-3，利用 Design Expert7.0 软件对表 3-3 的试验数据进行多元化回归拟合，得到木瓜蛋白酶添加量、酶解温度、酶解时间的二次多项回归模型：

$$DH=39.94+1.19X_1+0.7X_2-0.32X_3+0.55X_1X_2-0.4X_1X_3+1.69X_2X_3+5.16X_1^2+6.93X_2^2+2.77X_3^2。$$

表 3-3 响应面分析试验设计及结果

Table 3 Results of response surface analysis experiments

试验号	木瓜蛋白酶添加量 (mg/mL)	酶解温度 (℃)	酶解时间 (h)	试验值 (%)	预测值 (%)
1	-1	-1	0	50.65	50.68
2	1	-1	0	52.31	51.97
3	-1	1	0	50.65	50.99
4	1	1	0	54.5	54.48
5	-1	0	-1	46.22	46.6
6	1	0	-1	49.05	49.79
7	-1	0	1	47.51	46.77
8	1	0	1	48.73	48.35
9	0	-1	-1	51.36	50.96
10	0	1	-1	49.69	48.98
11	0	-1	1	46.22	46.94
12	0	1	1	51.32	51.73
13	0	0	0	39.29	39.94

14	0	0	0	39.87	39.94
15	0	0	0	40.44	39.94
16	0	0	0	40.83	39.94
17	0	0	0	39.29	39.94

表 3-4 二次回归模型方差分析表

Table 4 Quadratic model analysis of variance

变异来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
总模型	410.7	9	45.63	65.84	< 0.0001	**
X ₁	11.42	1	11.42	16.47	0.0048	**
X ₂	3.95	1	3.95	5.7	0.0483	*
X ₃	0.81	1	0.81	1.16	0.3169	
X ₁ X ₂	1.2	1	1.2	1.73	0.2296	
X ₁ X ₃	0.64	1	0.64	0.93	0.3672	
X ₂ X ₃	11.46	1	11.46	16.53	0.0048	**
X ₁ ²	111.97	1	111.97	161.53	< 0.0001	**
X ₂ ²	202.19	1	202.19	291.7	< 0.0001	**
X ₃ ²	32.42	1	32.42	46.78	0.0002	**
残差	4.85	7	0.69			
失拟项	2.95	3	0.98	2.07	0.2465	
纯误项	1.9	4	0.47			
总和	415.55	16				

注意：*-显著性（0.01<p<0.05）；**-极显著性（p<0.01）

由表 3-4 可知，本试验所选用的模型极显著($P<0.01$)，失拟项 $P=0.2465>0.01$ ，失拟项不显著也就是说二次多项模型成立，模型的校正决定 $R^2_{Adj}=0.9733$ ，说明仅有总变异大约 2.67%不能用此模型来解释；决定系数 $R^2=0.9883$ ，这表明该模型拟合程度良好，该模型可以用来分析和预测木瓜蛋白酶对酪蛋白的水解 [148]。

3.4.5 验证试验

根据响应面优化后的各酶解因素的最佳酶解条件进行修订后为:木瓜酶添加量 5mg/mL、酶解温度 45℃、酶解时间为 3 h, 在此条件下进行酶解, 水解度为 54.54%。我们采用此酶解条件进行水解, 得到水解度为 $54.50\% \pm 0.42\%$, 说明建立的回归方程能真实地反映木瓜蛋白酶添加量、酶解温度、酶解时间对木瓜蛋白酶酶解酪蛋白工艺的影响, 对生产具有很好的指导意义。

3.5 结论

采用木瓜蛋白酶对经动态超高压处理过的酪蛋白进行酶解, 在单因素试验结果的基础上采用响应面法对酶解工艺条件进行优化, 得到的最佳的酶解工艺条件为: 木瓜蛋白酶添加量 5mg/mL、酶解温度 45℃、酶解时间 3 h。此时酪蛋白的水解度为, $54.50\% \pm 0.42\%$ 。

苏州微流纳米生物技术 www.willnano.cn

高压均质机 脂质体挤出器 细胞破碎仪 压力: 3,100bar 控温-4℃

纳米材料 纤维素 MLCC 锂电池导电涂层 细胞破碎 白蛋白纳米粒



第四章 动态超高压均质处理对酪蛋白酶解特性的影响

4.1 引言

酪蛋白是目前婴幼儿代乳品的首选原料^[16]，它是一种营养价值极高的全价蛋白^[14]，其组成蛋白质的全部 20 种氨基酸均被检出，且其中八种人体必需氨基酸的含量完全符合 FAO/WHO 模式的要求^[149]。

生物活性肽是指能够对身体的机能和情况产生积极影响的特殊的蛋白片段^[150]。研究表明，在酪蛋白分子中隐藏着百余种无活性或活性很低的生物活性肽^[37]，这些活性肽的功能涵盖免疫调节、清除自由基、抑菌、抗癌等^[100]，但他们的功能性在蛋白质中几乎是发挥不出来的，但当蛋白质被某些特定的酶水解后，一些酰胺键会发生断裂，一些具有生物活性的氨基酸序列会因此产生，部分蛋白内的生物活性被释放出来^[151]。因此酪蛋白酶解自然成为研究酪蛋白功能性的不必要步骤。

影响蛋白水解的因素有很多，除了外部因素如酶解工艺条件温度、pH、固液比、酶用量等^[152-153]，还有有蛋白内部结构等因素的影响。因而对于酪蛋白改性研究如果仅仅只停留在对酶解工艺的研究上，并不能彻底的解决蛋白水解效率低、蛋白水解不彻底和目标产物难以控制等问题，因此应该加强蛋白质酶解改性机理方面的研究。研究表明，由于蛋白质自身结构特性，蛋白中某些特殊组分或肽片段对于蛋白酶的敏感性较低，致使其水解不彻底^[154-155]。而适当的蛋白变性可以改变蛋白质的酶解特性^[156-157]。研究表明，一些处理手段能够破坏蛋白质的结构，使蛋白颗粒破碎，作用键断裂，提高其溶解性、使更多的蛋白酶结合位点从内部暴露出来，加速蛋白的水解，还能够提高蛋白质的水解度^[59]。常见的样品前处理方法有热处理，微波处理，动态超高压均质处理，超声波处理等。而本文在前期研究的基础上选择动态超高压均质处理作为酪蛋白酶解前处理的手段，研究动态超高压均质处理对酪蛋白酶解产物的氨基酸组成、游离氨基酸组成、抗氧化性、细胞抗氧化及固形物得率的影响，以期改善酪蛋白酶解不彻底、及抗氧化活性低等问题提供积极的理论依据。

4.2 试验材料与仪器

4.2.1 材料与试剂

酪蛋白 Solarbio, 北京索莱宝科技有限公司; 甘氨酸: 阿拉丁; 木瓜蛋白酶: 阿拉丁; 17 种氨基酸混合标准液: 美国 Agilent 公司; 双蒸水; 三(羟甲基)氨基甲烷: 阿拉丁; 氢氧化钠: 天津科密欧; 试验中所用化学试剂均为分析纯。

4.2.2 仪器与设备

FPG12800 均质机: 英国 SFP 公司; 7890A 型气相色谱: 美国 Agilent 公司; 无菌均质机: 宁波新芝生物科技股份有限公司; 离心机: Alpha 1-2 LD plus 真空冷冻干燥机: 德国 SIGMA 公司。

4.3 试验方法

4.3.1 酪蛋白溶液的制备

用 pH6.25 的磷酸缓冲溶液配制浓度为 10 mg/mL 的酪蛋白溶液, 用无菌均质器中档拍打 3min 使酪蛋白分散于 pH6.25 的磷酸缓冲溶液中。

4.3.2 木瓜蛋白酶酶解酪蛋白

将 4.3.1 中制得的酪蛋白溶液经 150MPa 动态超高压处理后(未经动态超高压处理的酪蛋白为对照)在酶解温度 45℃、酶解时间 3h、木瓜蛋白酶添加量为 5mg/ml 的酶解条件下进行酶解, 将酪蛋白酶解液进行灭酶和离心处理后进行冷冻干燥处理, 将制得的酪蛋白酶解液粉末收集进行指标测定。

4.3.3 酪蛋白酶解液氨基酸组成和游离氨基酸组成的测定

(1) 样品制备

将 4.3.2 中得到的固体水解样品配制成 1g/100mL 的水溶液吸取 100μL 于 HPLC 样品瓶中上机测定。

(2) 游离氨基酸的提取

将 4.3.2 中得到的固体水解样品配制成 1g/100mL 的水溶液置于离心管中。

将离心管放入离心机内,14 000r/min 离心 15min。取上清液 100μL 于 HPLC 中,上机测定。

(3) 标准溶液配制

将 17 种标准氨基酸进行混合,形成混合标样液,待测。

(4) 色谱条件

色谱柱:Zorbax Eclipse AAA C18 柱,75 mm×4.6 mm,3.5 μm。流动相 A:40mmol/LNaH₂PO₄·H₂O,pH 7.8(称取 NaH₂PO₄·H₂O 5.52g,溶于 1 000mL 水中,用 10mol/LNaOH 调 pH 至 7.8);流动相 B:乙腈/甲醇/水= 45/45/10(v/v/v);流速:2mL/min;流动相梯度洗脱程序:0.0 ~1.0 min (B :0 %),1.0 ~ 9.8 min (B :0 % ~57 %),9.8 ~ 10.0 min(B :57 % ~ 100 %),10.0 ~12.0 min(B :100 %),12.0 ~ 12.5 min(B :100 %~ 0 %),12.5 ~ 14.0 min (B :0 %)。柱温:40 ℃。检测波长:0 ~ 8.5 min,紫外波长 338.10 nm(谱带宽 10 nm),参考波长 390.26 nm(谱带宽 20 nm);8.5 ~ 14.0 min,紫外波长 262 nm(谱带宽 16 nm),参考波长 324 nm(谱带宽 8 nm)。衍生步骤(由进样器自动完成):分别吸取硼酸缓冲液和氨基酸混合标准液(样品水解液)各 2.5 μL 和 0.5 μL,充分混合→吸取 OPA 试剂 0.5 μL,充分混合→吸取 FMOC 试剂 0.5 μL,充分混合→吸取水 32 μL,充分混合→进样 18 μL。

4.3.4 水解度的测定

取 1 mL 酪蛋白酶解液加入烧杯中,再向其中加入 60 mL 蒸馏水,用 0.05 M 的 NaOH 溶液将样品滴定至 pH 8.2。向样品中加入 10mL 的甲醛溶液,混合均匀后再用 0.05 M 的 NaOH 溶液将样品滴定至 pH 9.2,同时用蒸馏水代替酪蛋白酶解液做空白对照^[146-147]。记录滴加的标准 NaOH 溶液的体积,计算水解度(DH)。

$$DH (\%) = \frac{h}{h_{tot}} \quad (4-1)$$

$$h = \frac{C \times (V_1 - V_2)}{S \times W} \quad (4-2)$$

式中: V₁: 向样品中加入甲醛溶液后滴定所用 NaOH 溶液的体积 (mL);

V₂: 对照组加入甲醛溶液后滴定所用 NaOH 溶液的体积 (mL);

C: 氢氧化钠标准滴定溶液的浓度 (mol/L);

S: 为底物浓度;

W: 为样品中蛋白质含量,采用开始定氮法测定,为 79.15;

H_{tot} ：是蛋白中肽键总数 mmol/g，酪蛋白的肽键总数为 $8.2 \times 10^{-3} \text{ mmol/g}$ 。

4.3.5 酪蛋白酶解固形物得率的测定

将经过前处理(即动态超高压均质处理)和未经前处理的酪蛋白分别酶解后，进行灭酶、离心、过滤后进行冷冻干燥处理，取得酶解液干粉，并计算酪蛋白酶解得率^[158]。

$$\text{固形物得率 (\%)} = \frac{\text{冷冻干燥后质量}}{\text{冷冻干燥前质量}} \times 100\% \quad (4-3)$$

4.3.6 DPPH 清除率的测定

用 1.3.2 中制取的酶解液干粉分别配制 10mg/ml 的酶解液，取 2mL 酶解液，加入 2mL DPPH ($2 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$) 溶液，混合均匀后在黑暗处反应 30min，用无水乙醇为对照组，检测样品在 517 nm 处吸光值的大小 $A_{\text{样品}}$ 。同时，将 2.0 mL 的样品与 2.0 mL 的乙醇混合液均匀，在 517 nm 下测定其吸光值 $A_{\text{空白}}$ ，再将 2.0 mL 的 DPPH 溶液和 2.0 mL 的无水乙醇混合均匀后，测定其在 517 nm 处吸光值的大小 $A_{\text{对照}}$ ^[159]。

$$\text{DPPH 自由基清除率 (\%)} = \left[\frac{1 - (A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}})}{A_{\text{对照}}} \right] \times 100\% \quad (4-4)$$

4.3.7 数据处理

所有试验数据均重复三次，应用 SPSS 17.0、Origin 8.0 和 Design Expert 7.0 对试验数据进行统计分析和作图。

4.4 结果与分析

4.4.1 样品前处理对酪蛋白酶解液中氨基酸的影响

表 4-1 未经前处理酪蛋白酶解产物中的氨基酸

Table 4-1 without pretreatment casein enzymolysis products of amino acids

序号	保留 时间/min	峰名称	峰面积 mAU*s	含量/峰面积	含量 g/100g
1	2.87	天冬氨酸	348.500	0.340	2.653
2	3.24	谷氨酸	899.620	0.418	8.422
3	6.66	丝氨酸	261.437	0.268	1.570
4	7.50	组氨酸	17.528	0.700	0.275
5	8.41	甘氨酸	460.965	0.185	1.910
6	8.84	苏氨酸	107.690	0.307	0.742
7	10.10	精氨酸	167.508	0.443	1.665
8	11.14	丙氨酸	331.046	0.217	1.608
9	13.57	酪氨酸	185.669	0.484	2.016
10	16.66	胱氨酸	17.752	0.366	0.146
11	17.79	缬氨酸	367.223	0.293	2.411
12	18.13	甲硫氨酸	106.128	0.366	0.871
13	20.84	苯丙氨酸	182.088	0.421	1.720
14	21.33	异亮氨酸	270.577	0.328	1.990
15	22.62	亮氨酸	527.628	0.319	3.777
16	23.40	赖氨酸	649.562	0.208	3.024
17	30.17	脯氨酸	1648.213	0.246	9.077
合计			6549.133	5.908	43.879

表 4-2 经前处理酪蛋白酶解产物氨基酸组成

Table 4-2 premenstrual processing casein enzymolysis products of amino acids

序号	保留 时间/min	峰名称	峰面积 mAU*s	含量/峰面积	含量 g/100g
1	2.87	天冬氨酸	355.638	0.340	2.894
2	3.24	谷氨酸	904.053	0.418	9.047
3	6.65	丝氨酸	265.332	0.268	1.703
4	7.49	组氨酸	18.377	0.700	0.308
5	8.41	甘氨酸	455.827	0.185	2.020
6	8.84	苏氨酸	108.867	0.307	0.802
7	10.10	精氨酸	166.345	0.443	1.768
8	11.14	丙氨酸	331.175	0.217	1.720
9	13.57	酪氨酸	192.324	0.484	2.233
10	16.66	胱氨酸	19.773	0.366	0.173
11	17.79	缬氨酸	372.968	0.293	2.618
12	18.13	甲硫氨酸	105.047	0.366	0.921
13	20.84	苯丙氨酸	184.156	0.421	1.860
14	21.33	异亮氨酸	273.452	0.328	2.150
15	22.62	亮氨酸	525.563	0.319	4.022
16	23.40	赖氨酸	666.005	0.208	3.315
17	30.17	脯氨酸	1415.391	0.246	8.333
合计			6360.294	5.908	45.887

由表 4-1 和表 4-2 我们可以看出两种样品中都含有异亮氨酸、亮氨酸、苏氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、缬氨酸、谷氨酸、酪氨酸等 17 种氨基酸，从表 4-1 我们可以看出含量最高的为脯氨酸 9.077%，谷氨酸 8.422%，亮氨酸 3.777%，赖氨酸 3.024%，天冬氨酸 2.653%，而表 2 中含量最高的为谷氨酸 9.047%，脯氨酸 8.333%，亮氨酸 4.022%，赖氨酸 3.315%，天冬氨酸 2.894%。谷氨酸有健脑的作用，同时对食物还具有提鲜的作用^[161]。脯氨酸可以修复牙釉质，使得牙齿更加

坚固并更富有弹性，亮氨酸能诊断治疗幼儿特发性高血糖症，还可用于调节中枢神经、大脑、肌肉及蛋白质代谢^[162]。赖氨酸能够促进人体对钙离子的吸收，还能够使钙离子在体内累积^[163]。天冬氨酸具有可以增强肝脏的功能，预防和治疗心脏病、肝脏病和高血压症等重要作用^[164]。老蛋白酶解液含有六种必需氨基酸（蛋氨酸和色氨酸未检测），表 4-1 中含量最多的必需氨基酸为亮氨酸 3.777%，赖氨酸 3.024%，缬氨酸 2.411%，而表 4-2 中含量最多的必需氨基酸为亮氨酸 4.022%，赖氨酸 3.315%，缬氨酸 2.618%。缬氨酸与异亮氨酸和亮氨酸协同作用能够促进身体正常发育。由两表我们可知经过超高压处理的酪蛋白经酶解后酶解液中每种氨基酸含量都比未经处理的酪蛋白中的要高，根据氨基酸含量排序除了谷氨酸和脯氨酸的排序外都相同。这说明经动态超高压处理后酪蛋白被酶解的更彻底，得到的小分子氨基酸的含量也就更高。

4.4.2 样品前处理对酪蛋白酶解液游离氨基酸的影响

表 4-3 未经前处理酪蛋白酶解产物游离氨基酸组成结果

Table 4-3 without pretreatment casein enzymolysis products free amino acid composition

序号	保留 时间/min	峰名称	峰面积 mAU*s	含量/峰面积	含量 g/100g
1	2.87	天冬氨酸	22.427	0.340	0.019
2	3.27	谷氨酸	103.922	0.418	0.111
3	6.68	丝氨酸	17.805	0.268	0.012
4	7.50	组氨酸	5.019	0.700	0.009
5	8.41	甘氨酸	454.451	0.185	0.215
6	8.84	苏氨酸	25.471	0.307	0.020
7	10.10	精氨酸	163.716	0.443	0.186
8	11.16	丙氨酸	101.585	0.217	0.056
9	13.59	酪氨酸	68.687	0.484	0.085
10	16.62	胱氨酸	5.456	0.366	0.005
11	17.82	缬氨酸	54.283	0.293	0.041
12	18.13	甲硫氨酸	102.878	0.366	0.096
13	20.84	苯丙氨酸	69.490	0.421	0.075
14	21.31	异亮氨酸	46.677	0.328	0.039
15	22.62	亮氨酸	361.027	0.319	0.295
16	23.41	赖氨酸	391.573	0.208	0.208
17	30.22	脯氨酸	54.255	0.246	0.034
合计			2048.721	5.908	1.505

表 4-4 经前处理酪蛋白酶解产物游离氨基酸组成结果

Table 4-4 premenstrual processing casein enzymolysis products free amino acid composition

序号	保留 时间/min	峰名称	峰面积 mAU*s	含量/峰面积	含量 g/100g
1	2.87	天冬氨酸	26.665	0.340	0.022
2	3.27	谷氨酸	118.090	0.418	0.119
3	6.67	丝氨酸	20.525	0.268	0.013
4	7.49	组氨酸	5.526	0.700	0.009
5	8.40	甘氨酸	509.814	0.185	0.227
6	8.83	苏氨酸	29.779	0.307	0.022
7	10.09	精氨酸	184.064	0.443	0.196
8	11.15	丙氨酸	115.950	0.217	0.060
9	13.58	酪氨酸	83.595	0.484	0.098
10	16.63	胱氨酸	10.840	0.366	0.010
11	17.82	缬氨酸	51.962	0.293	0.037
12	18.13	甲硫氨酸	111.568	0.366	0.098
13	20.84	苯丙氨酸	78.974	0.421	0.080
14	21.31	异亮氨酸	48.881	0.328	0.039
15	22.62	亮氨酸	420.933	0.319	0.324
16	23.41	赖氨酸	438.566	0.208	0.219
17	30.22	脯氨酸	70.268	0.246	0.042
合计			2326	5.908	1.614

由表 4-3 和表 4-4 我们可以看出两种样品中都含有异亮氨酸、亮氨酸、苏氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、缬氨酸、谷氨酸、酪氨酸等 17 种氨基酸，和 6 中必须氨基酸（蛋氨酸和色氨酸未检测），比较表 4-3 和表 4-4 我们可以知道经动态超高压处理后酪蛋白酶解液中游离氨基酸总含量是增加的，而游离氨基酸是一类可直接被人体吸收的氨基酸，且其吸收速率快，利用率高。表 4-3 中除了缬氨酸含量比表 4-4 种高外其他氨基酸含量都低于或等于表 4-4 中氨基酸含量。由此结

果可知动态超高压处理使得酪蛋白酶解液中可被吸收利用的氨基酸含量增加。

4.4.3 样品前处理对酪蛋白水解度的影响

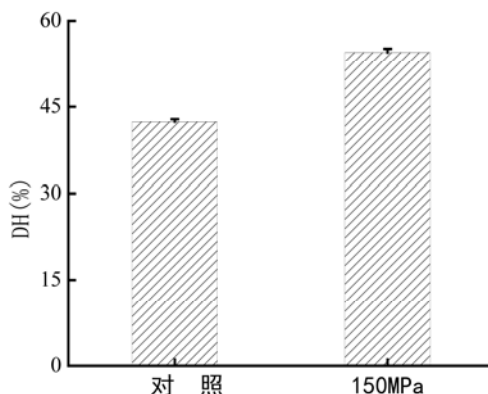


图 4-1 样品前处理对水解度的影响

Figure.4-1 Effect of sample pretreatment on DH

上图为酶解条件相同而前处理条件不同时对酪蛋白酶水解程度影响的研究结果，在此处我们采用的前处理为将酪蛋白溶液经 150MPa 动态超高压处理，由图我们可以看出经过动态超高压处理过的酪蛋白的水解度明显高于未经处理的酪蛋白，这是因为酪蛋白在动态超高压均质机的反应腔中受到剪切力、高速撞击、压力瞬间释放等作用而达到高度的破碎，使得酪蛋白的粒度减小、溶液度提高、可溶性多肽含量提高，酪蛋白的结构发生变化，从而也暴露出了更多的木瓜蛋白酶结合位点，从而使酪蛋白的水解程度提高。酪蛋白难溶于水和有机溶剂的性质，使得酪蛋白很多功能性难以发挥，而我们看到动态超高压均质处理可以有效的提高酪蛋白的水解度，因此我们以经过动态超高压均质处理过的酪蛋白作为底物去研究酪蛋白的酶解特性。

4.4.4 两种前处理对酪蛋白固形物得率的影响

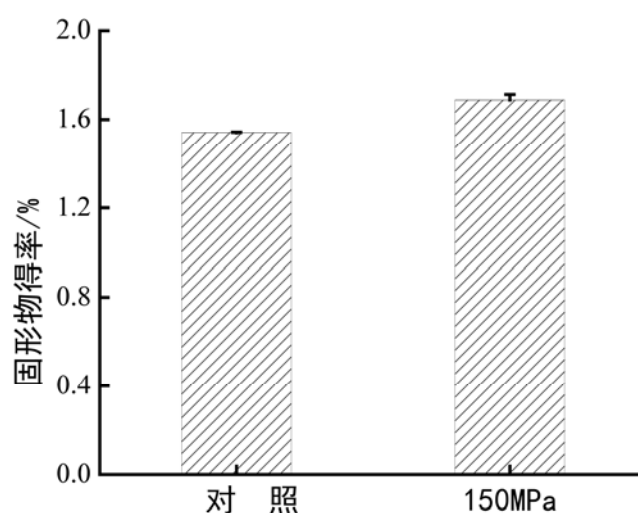


图 4-2 样品前处理对固形物得率的影响

Figure.4-2 Effect of sample pretreatment on yield of soybean

酶解产物的固形物得率是反应蛋白酶解程度的一个指标，图 4-2 为不同前处理对酪蛋白酶解产物固形物得率影响的研究结果，由图我们可以看出经动态超高压均质处理的酪蛋白酶解产物的固形物的率高于未处理的酪蛋白酶解产物固形物得率，根据 2.3 的研究结果我们可以知道动态超高压处理可以提高酪蛋白的水解度，许女等^[165]研究发现水解液中小分子片段的量会随着水解度的增加而变大，因此经过前处理的酪蛋白酶解产物中可溶性固形物的含量也较未处理的高些，加上在动态超高压的作用下酪蛋白的颗粒也相对减小，溶解度升高，都使得酪蛋白酶解产物的固形物得率提高。

4.4.5 两种前处理对酪蛋白 DPPH 清除率的影响

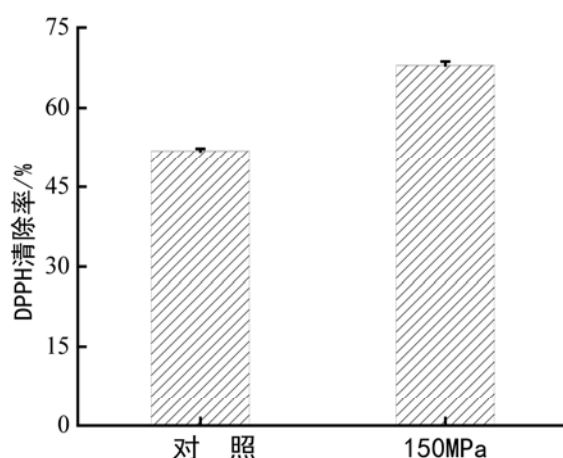


图 4-3 样品前处理对 DPPH 清除率的影响

Figure.4-3 Effect of sample pretreatment on DPPH radical scavenging activities

DPPH 自由基是一种稳定的自由基，其乙醇溶液在 517 nm 处有强吸收。在向其中加入自由基清除剂后，DPPH 孤对电子被配对从而使其溶液的颜色变浅，且溶液颜色变化的程度与配对电子数成剂量关系，因此我们可以通过 517 nm 处吸光度值的大小来判断自由基的清除情况^[166]。图 4-3 为不同样品前处理下酪蛋白酶解产物的 DPPH 清除率的结果，由上图我们可以看出经过动态超高压均质处理的酪蛋白酶解产物的 DPPH 清除率显著高于未经动态超高压均质处理的酪蛋白酶解产物的 DPPH 清除率，这说明经动态超高压均质处理使酪蛋白结构发生变化，因此使得酪蛋白酶解产物的 DPPH 清除率提高，这对于酪蛋白酶解产物抗氧化性的研究是一个积极的结果。

4.5 结论

酪蛋白在被木瓜蛋白酶酶解前经动态超高压均质处理，可以提高酪蛋白的水解度、固形物含量、DPPH 清除率，通过分析酶解产物氨基酸及游离氨基酸组成还发现，动态超高压均质处理不仅可以提高总体氨基酸含量，几乎每种必需氨基酸的含量都较对照组有所提高。从结果我们可以知道动态超高压均质处理不仅仅只是可以改变酪蛋白的结构和改善酪蛋白的功能性，还可以影响酪蛋白的酶解特性，这说明酪蛋白的酶解特性与它自身的结构特性有关。

全文结论

(1) 动态超高压均质处理可以破坏酪蛋白的结构，从而致使酪蛋白结构和功能性发生变化。酪蛋白在经 150 Mpa 处理后，酪蛋白的中位径从 15.9 μm 降到 3.6 μm ，溶解度从 54.7%上升至 62.8%，起泡性从 43.5%上升至 57.8%，同时酪蛋白的乳化性等功能性也都有所改善。

(2) 采用木瓜蛋白酶对经 150 Mpa 处理过的酪蛋白进行酶解，以酪蛋白的水解度为测定指标，经单因素及响应面试验优化得到的木瓜蛋白酶水解酪蛋白的较佳水解条件为：木瓜蛋白酶添加量 5mg/mL、酶解温度 45 $^{\circ}\text{C}$ 、酶解时间 3 h，水解度为 54.50% $\pm$ 0.42%，经回归分析、模型评价，发现响应面法能较好的用于酪蛋白酶解工艺条件的优化。

(3) 经 150 MPa 动态超高压均质处理过的酪蛋白经酶解后，水解度从 42.3% 提高到 54.2%，固形物得率从 1.5%提高到 1.69%，DPPH 清除率从 51.8%提高到 68%，且酪蛋白酶解产物中的氨基酸及游离氨基酸含量都有所提升。



CE
45,000Psi
3,100Bar
-4 $^{\circ}\text{C}$ -80 $^{\circ}\text{C}$

苏州微流纳米生物技术
高压均质机 细胞破碎仪 脂质体挤出器

实验型 1-100mL
中试型 1L-5L
生产型 5L-100L



创新说明

1. 采用动态超高压均质技术处理酪蛋白，研究动态超高压均质对酪蛋白功能性及构象的影响，在此基础上进行研究，并发现高压均质可以提高酪蛋白的酶解效率。

参考文献

- [1] 田琳. 酪蛋白来源血管紧张素转化酶抑制肽的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2009.
- [2] 杨楠. 热处理对牦牛乳酪蛋白性质影响的研究[D]. 甘肃农业大学, 2013.
- [3] Horne D S. Casein structure, self-assembly and gelation[J]. Current opinion in colloid & interface science, 2002, 7 (5): 456-461.
- [4] Horne D S. Casein structure, self-assembly and gelation[J]. Current opinion in colloid & interface science, 2002, 7(5): 456-461.
- [5] 张建忠, 酃一心. 酪蛋白和酪蛋白制品的开发[J]. 中国乳品工业, 1998, 26: 31-32.
- [6] 周俊清. 酪蛋白及其苦味肽功能特性的研究[D]. 北京: 北京农业科学院, 2008.
- [7] Ivan Bonizzi, Joanna Natalia Buffoni, Maria Feligini. Quantification of bovine casein fractions by direct chromatographic analysis of milk. Approaching the application to a real production context [J]. Journal of Chromatography A, 2009(1216): 165-168.
- [8] Marinova K G, Basheva E S, Nenova B, et al. Physico-chemical factors controlling the foamability and foam stability of milk proteins: Sodium caseinate and whey protein concentrates[J]. Food Hydrocolloids, 2009, 23(7): 1864-1876.
- [9] Narambuena C F, Ausar F S, Bianco I D, et al. Aggregation of casein micelles by interactions with chitosans: a study by Monte Carlo simulations[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2005, 53(2): 459-463.
- [10] Gamier, C., Michon, C., Durand, S., Cuvelier, G, Doublier, J. L., Launay, B. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2003, 31: 177-184.
- [11] 潘晓赞. 基于酪蛋白纳米粒子制备及其应用的研究[D]. 复旦大学, 2008.
- [12] 杨楠, 梁琪, 甘伯中, 等. 热处理对牛乳酪蛋白胶束结构影响的研究进展[J]. 中国乳品工业, 2012, 40(1): 46-49.
- [13] Little E M, Holt C. An equilibrium thermodynamic model of the sequestration of calcium phosphate by casein phosphopeptides[J]. European Biophysics Journal, 2004, 33(5): 435-447.
- [14] 刘燕. 酪蛋白胶束结构与功能特性的研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2007.
- [15] Xiaoyun Pan, Minfang Mu. Micellization of Casein -graft -Dextran Copolymer Prepared through Maillard Reaction [J]. Wiley Periodicals, 2006, 81: 29-38.

- [16] 苏银杰. 酪蛋白酶解特性的研究[D]. 郑州, 河南工业大学, 2013.
- [17] 李晓晖. 牛乳中酪蛋白的结构特性及其应用[J]. 食品工业, 2002(1): 29-30.
- [18] Saunders B R, Vincent B. Microgel particles as model colloids: theory, properties and applications[J]. *Advances in colloid and interface science*, 1999, 80(1): 1-25.
- [19] Rasmussen L K, Hojrup P, Petersen T E. Disulfide arrangement in bovine caseins: Localization of intrachain disulphide bridges in monomers of κ - and α_{s2} -casein from bovine milk[J]. *Journal of Dairy Research*, 1994, 61(4): 485-493.
- [20] P F Fox, Paul McSweeney. In *Advanced Dairy Chemistry Proteins*, 3rd ed[J]. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003, 111-140.
- [21] O'mahony J A, Fox P F. Milk proteins: Introduction and historical aspects[M]//*Advanced dairy chemistry*. Springer US, 2013: 43-85.
- [22] 任娇艳, 赵谋明. 乳状液中 α_{s1} -酪蛋白与 β -酪蛋白的结构特点与吸附行为[J]. *食品科学*, 2003, 24(6): 154-155.
- [23] Kiser P F, Wilson G, Needham D. A synthetic mimic of the secretory granule for drug delivery[J]. *Nature*, 1998, 394(6692): 459-462.
- [24] 王恒樑, 等译. 蛋白质生物化学与生物技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006, 298-299.
- [25] 范金波, 王鹏杰, 周素珍, 等. 酪蛋白胶束结构和理化性质的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(3): 396-400.
- [26] 郭本恒. 乳品化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 132-133.
- [27] PIHLANTO A. Antioxidative peptides derived from milk protein[J]. *International Dairy Journal*, 2006, 16(11): 1306-1312.
- [28] 施用晖, 黎观红, 张杰, 等. 乳酪蛋白源免疫调节肽[J]. *中国食品添加剂*, 2004, 6(11): 54-58.
- [29] EXP SITO I L, RECIO I. Antibacterial activity of peptides and folding variants from milk proteins[J]. *International Dairy Journal*, 2006, 16(11): 1294-1305.
- [30] L PEZ-FANDI O R, OTTE J, van CAMP J. Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity[J]. *International Dairy Journal*, 2006, 16(11): 1277-1293.
- [31] Jung M Y, Kim S K, Kim S Y. Riboflavin-sensitized photooxidation of ascorbic acid: kinetics and amino acid effects[J]. *Food Chemistry*, 1995, 53(4): 397-403.
- [32] Chen H M, Muramoto K, Yamauchi F, et al. Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein[J]. *Journal of agricultural*

and food chemistry, 1996, 44(9): 2619-2623.

[33] 张英, 董绍华. 氨基酸清除活性氧自由基作用的研究[J]. 科技通报, 1997, 13(5): 312-315.

[34] 胡文琴, 王恬, 霍永久, 等. 酪蛋白酶解物体外抗氧化作用的研究[J]. 食品科学, 2004, 25(4): 158-162.

[35] Laakso S, Lilius E M. Milk casein: inhibitor of lipoxigenase-catalyzed lipid peroxidation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1982, 30(5): 913-916.

[36] 王政. 酪蛋白酶促水解及其酶解物性质研究[D]. 河南农业大学, 2005.

[37] 高芸芳. 超声波处理对酪蛋白酶解特性的影响[D]. 河南工业大学, 2013.

[38] Nakamura Y, Masuda O, Takano T. Decrease of tissue angiotensin I-converting enzyme activity upon feeding sour milk in spontaneously hypertensive rats[J]. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 1996, 60(3): 488-489.

[39] Pihlanto-Leppala A, Rokka T, Korhonen H. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins[J]. International Dairy Journal, 1998, 8(4): 325-331.

[40] Silva S V, Malcata F X. Caseins as source of bioactive peptides[J]. International dairy journal, 2005, 15(1): 1-15.

[41] Xue-Ying Mao, Jin-Ren Ni, Wei-Ling Sun. Value-added utilization of yak milk casein for the production of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides[J]. Food Chemistry, 2007(103): 1282-1287.

[42] Miguel M, Contreras M M, Recio I, et al. ACE-inhibitory and antihypertensive properties of a bovine casein hydrolysate[J]. Food Chemistry, 2009, 112(1): 211-214.

[43] Jiang Z, Tian B, Brodkorb A, et al. Production, analysis and in vivo evaluation of novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from bovine casein[J]. Food chemistry, 2010, 123(3): 779-786.

[44] 王玉莹, 陈锡威, 冯凤琴, 等. 酪蛋白磷酸肽的研究进展[J]. 食品工业, 2014, 35(5): 204-208.

[45] 梁肖娜, 张居明, 杨梅, 等. 两种酪蛋白磷酸肽阻止钙沉淀形成的比较研究[J]. 现代食品工业科技, 2017, 3(33): 1-7.

[46] Kitts, D.. Bioactive peptides in food: Identification and potential uses[J]. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 1994, 72(4): 423-434.

- [47] 蔺丹华, 王金水, 苏银杰, 高芸芳. 酪蛋白酶解改性研究进展[J]. 农产品加工(学刊), 2013, 3(311): 52-55.
- [48] Tulipano G, Bulgari O, Chessa S, et al. Direct effects of casein phosphopeptides on growth and differentiation of in vitro cultured osteoblastic cells (MC3T3-E1)[J]. Regulatory peptides, 2010, 160(1): 168-174.
- [49] Meisel H, FitzGerald R J. Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects[J]. Current pharmaceutical design, 2003, 9(16): 1289-1296.
- [50] Mayne R J, Cochrane N J, Cai F, et al. In-vitro study of the effect of casein phosphopeptide amorphous calcium fluoride phosphate on iatrogenic damage to enamel during orthodontic adhesive removal[J]. American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, 2011, 139(6): 543-551.
- [51] Hartmann R, Meisel H. Cytochemical assessment of phosphopeptides deprivation from casein as potential ingredients for functional food[J]. Nahang Food, 2002, 46: 427-431.
- [52] 李如兰, 王立克, 章文, 等. 酪蛋白磷酸肽对肉仔鸡生产性能的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2012, 21: 61-62
- [53] Fiat A M, Migliore-Samour D, Jollès P, et al. Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities[J]. Journal of Dairy Science, 1993, 76(1): 301-310.
- [54] Kayser H, Meisel H. Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk proteins[J]. FEBS letters, 1996, 383(1-2): 18-20.
- [55] 郑华, 傅伟龙. 酪蛋白水解物对小鼠生长及免疫功能的影响[J]. 华南农业大学学报, 2000 21(3): 71-74.
- [56] Guanli Zhao, Yan Liu, Mourning Zhao. Enzymatic hydrolysis and their effects on conformational and functional properties of peanut protein isolate[J]. Food Chemistry, 2011(127): 1438-1443.
- [57] 高芸芳, 王金水, 苏银杰. 酪蛋白结构及其酶解特性研究进展[J]. 农产品加工(学刊), 2013, 3(310): 1-4.
- [58] Marym Salami, Reza Yousefi, et al. Kinetic characterization of hydrolysis of camel and bovine milk proteins by pancreatic enzymes[J]. International Dairy Journal, 2008(18): 1097-1102.
- [59] Chen L, Chen J, Ren J, et al. Modifications of soy protein isolates using combined extrusion pre-treatment and controlled enzymatic hydrolysis for improved emulsifying properties[J]. Food

Hydrocolloids, 2011, 25(5): 887-897.

[60] 励建荣, 俞坚. 超高压对酶活的影响[J]. 食品科技, 2006, 31(9): 18-20.

[61] 尹曼. 动态高压微射流技术对脂肪酶活性与构象的影响[D]. 南昌大学, 2011.

[62] 阎乃珺. 动态高压微射流对小麦面筋蛋白性质和结构的影响[D]. 广州: 华南理工大学, 2013.

[63] 杨诗斌, 徐凯, 张志森. 高剪切及高压均质机理研究及其在食品工业中的应用[J]. 粮油加工与食品机械, 2002 (4): 33-35.

[64] 周林燕, 关云静, 毕金峰, 等. 超高压均质技术在鲜榨果蔬汁加工中应用的研究进展[J]. 高压物理学报, 2016, 30(1): 78-88.

[65] Velazquez-Estrada R M, Hernández-Herrero M M, Lopez-Pedemonte T J, et al. Inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* serovar Senftenberg 775W inoculated into fruit juice by means of ultra high pressure homogenisation[J]. Food Control, 2011, 22(2): 313-317.

[66] Dumay E, Chevalier-Lucia D, Picart-Palmade L, et al. Technological aspects and potential applications of (ultra) high-pressure homogenisation[J]. Trends in Food Science & Technology, 2013, 31(1): 13-26.

[67] McKay A M, Linton M, Stirling J, et al. A comparative study of changes in the microbiota of apple juice treated by high hydrostatic pressure (HHP) or high pressure homogenisation (HPH)[J]. Food microbiology, 2011, 28(8): 1426-1431.

[68] Suarez-Jacobo A, Saldo J, Rüfer C E, et al. Aseptically packaged UHPH-treated apple juice: Safety and quality parameters during storage[J]. Journal of Food Engineering, 2012, 109(2): 291-300.

[69] Velázquez-Estrada R M, Hernández-Herrero M M, Guamis-López B, et al. Impact of ultra high pressure homogenization on pectin methylesterase activity and microbial characteristics of orange juice: A comparative study against conventional heat pasteurization[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2012, 13: 100-106.

[70] 吴奕兵. 超高压均质对胡萝卜汁理化性质及酶和微生物的影响[D]. 南京农业大学, 2009.

[71] Lacroix N, Fliss I, Makhoul J. Inactivation of pectin methylesterase and stabilization of opalescence in orange juice by dynamic high pressure[J]. Food Research International, 2005, 38(5): 569-576.

- [72] 姜梅. 超高压均质和热处理对豆乳, 豆腐和豆腐皮特性的影响[D]. 南京农业大学, 2013.
- [73] Calligaris S, Foschia M, Bartolomeoli I, et al. Study on the applicability of high-pressure homogenization for the production of banana juices[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2012, 45(1): 117-121.
- [74] Suarez-Jacobo A, Gervilla R, Guamis B, et al. Effect of UHPH on indigenous microbiota of apple juice: a preliminary study of microbial shelf-life[J]. *International journal of food microbiology*, 2010, 136(3): 261-267.
- [75] Hetherington P J, Follows M, Dunnill P, et al. RELEASE OF PROTEIN FROM BAKERS YEAST (*SACCHAROMYCES-CEREVISIAE*) BY DISRUPTION IN AN INDUSTRIAL HOMOGENISER[J]. *Transactions of the Institution of chemical Engineers and the chemical Engineer*, 1971, 49(2): 142-148.
- [76] Ram A, Kadim A. Shear degradation of polymer solutions[J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 1970, 14(8): 2145-2156.
- [77] Lander R, Manger W, Scouloudis M, et al. Gaulin homogenization: a mechanistic study[J]. *Biotechnology progress*, 2000, 16(1): 80-85.
- [78] Laneuville S I, Paquin P, Turgeon S L. Effect of preparation conditions on the characteristics of whey protein—xanthan gum complexes[J]. *Food Hydrocolloids*, 2000, 14(4): 305-314.
- [79] 刘伟. 动态高压微射流技术对酶的活性与构象变化的影响[D]. 南昌大学, 2009.
- [80] 曹建平. 超高压均质对澳豆豆乳理化性质及与溶菌酶协同作用对微生物的影响[D]. 南京农业大学, 2008.
- [81] Chevalier-Lucia D, Cortés-Muñoz M, Picart-Palmade L, et al. Submicron emulsions processed by ultra-high pressure homogenization[J]. *High Pressure Research*, 2009, 29(4): 732-738.
- [82] Cortes-Munoz M, Chevalier-Lucia D, Dumay E. Characteristics of submicron emulsions prepared by ultra-high pressure homogenisation: Effect of chilled or frozen storage[J]. *Food hydrocolloids*, 2009, 23(3): 640-654.
- [83] Roach A, Harte F. Disruption and sedimentation of casein micelles and casein micelle isolates under high-pressure homogenization[J]. *Innovative food science & emerging technologies*, 2008, 9(1): 1-8.
- [84] Velazquez-Estrada R M, Hernandez-Herrero M M, Guamis-Lopez B, et al. Impact of ultra

high pressure homogenization on pectin methylesterase activity and microbial characteristics of orange juice: A comparative study against conventional heat pasteurization[J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2012, 13: 100-106.

[85] Flourey J, Desrumaux A, Lardieres J. Effect of high-pressure homogenization on droplet size distributions and rheological properties of model oil-in-water emulsions[J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2000, 1(2): 127-134.

[86] Keenan T W, Moon T W, Dylewski D P. Lipid globules retain globule membrane material after homogenization[J]. *Journal of Dairy Science*, 1983, 66(2): 196-203.

[87] Flourey J, Desrumaux A, Axelos M A V, et al. Degradation of methylcellulose during ultra-high pressure homogenisation[J]. *Food Hydrocolloids*, 2002, 16(1): 47-53.

[88] Desrumaux A, Marcand J. Formation of sunflower oil emulsions stabilized by whey proteins with high-pressure homogenization (up to 350 MPa): effect of pressure on emulsion characteristics[J]. *International journal of food science & technology*, 2002, 37(3): 263-269.

[89] Diels A M J, Callewaert L, Wuytack E Y, et al. Inactivation of *Escherichia coli* by high-pressure homogenisation is influenced by fluid viscosity but not by water activity and product composition[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 101(3): 281-291.

[90] Guerzoni M E, Vannini L, Lopez C C, et al. Effect of high pressure homogenization on microbial and chemico-physical characteristics of goat cheeses[J]. *Journal of Dairy Science*, 1999, 82(5): 851-862.

[91] Lee S H, Lefèvre T, Subirade M, et al. Effects of ultra-high pressure homogenization on the properties and structure of interfacial protein layer in whey protein-stabilized emulsion[J]. *Food Chemistry*, 2009, 113(1): 191-195.

[92] Bouaouina H, Desrumaux A, Loisel C, et al. Functional properties of whey proteins as affected by dynamic high-pressure treatment[J]. *International Dairy Journal*, 2006, 16(4): 275-284.

[93] Cruz N, Capellas M, Hernández M, et al. Ultra high pressure homogenization of soymilk: Microbiological, physicochemical and microstructural characteristics[J]. *Food Research International*, 2007, 40(6): 725-732.

[94] Cruz N S, Capellas M, Jaramillo D P, et al. Soymilk treated by ultra high-pressure homogenization: Acid coagulation properties and characteristics of a soy-yogurt product[J]. *Food Hydrocolloids*, 2009, 23(2): 490-496.

- [95] 万婕, 刘成梅, 蓝海军, 等. 动态瞬时高压作用对膳食纤维酶解速度的影响[J]. 高压物理学报, 2008, 22(4): 439-444.
- [96] 汪菁琴. 动态超高压均质对大豆分离蛋白改性的研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2007.
- [97] Vannini L, Lanciotti R, Baldi D, et al. Interactions between high pressure homogenization and antimicrobial activity of lysozyme and lactoperoxidase[J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 94(2): 123-135.
- [98] Pereda J, Ferragut V, Buffa M, et al. Proteolysis of ultra-high pressure homogenised treated milk during refrigerated storage[J]. Food Chemistry, 2008, 111(3): 696-702.
- [99] Thorn D C, Ecroyd H, Carver J A. The two-faced nature of milk casein proteins: amyloid fibril formation and chaperone-like activity. Australian Journal of Dairy Technology, 2009, 64(1): 34-34.
- [100] Dauphas S, Amestoy M, Llamas G, Anton M, Riaublanc A. Modification of the interactions between β -casein stabilised oil droplets with calcium addition and temperature changing[J]. Food hydrocolloids, 2008, 22(2): 231-238.
- [101] Korhonen H J. Bioactive milk proteins and peptides: from science to functional applications[J]. Australian Journal of Dairy Technology, 2009, 64(1): 16-16.
- [102] Post A E, Ebert M, Hinrichs J. [beta]-casein as a bioactive precursor-processing for purification[J]. Australian Journal of Dairy Technology, 2009, 64(1): 84-84.
- [103] Wang T T, Guo Z W, Liu Z P, Feng Q Y, Wang X L, Tian Q, et al . The aggregation behavior and interactions of yak milk protein under thermal treatment. Journal of dairy science, 2016; 18-18.
- [104] Huang Z, Cao Y, Xu D, Wang C, Zhang D. Effect of ultrasound on the diffusion properties of casein entrapped in alginate-chitosan gel[J]. Ultrasonics sonochemistry, 2015, 26: 149-156.
- [105] Rahimi M, Ghaffari SM, Salami M, Mousavy S J, Niasari-Naslaji A, Jahanbani R, et al . ACE-inhibitory and radical scavenging activities of bioactive peptides obtained from camel milk casein hydrolysis with proteinase K[J]. Dairy Science & Technology, 2016, 1-1.
- [106] Chandrapala J, Martin G J, Kentish S E, Ashokkumar M. Dissolution and reconstitution of casein micelle containing dairy powders by high shear using ultrasonic and physical methods[J]. Ultrasonics sonochemistry, 2014, 21(5): 1658-1665.
- [107] Patrignani F, Lanciotti R. Applications of high and ultra high pressure homogenization for

food safety[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7-7.

[108] Zamora A, Guamis B. Opportunities for ultra-high-pressure homogenisation (UHPH) for the food industry[J]. *Food Engineering Reviews*, 2015, 7(2): 130-142.

[109] Sorensen H, Mortensen K, Sorland GH, Larsen F H, Paulsson M, Ipsen R. Dynamic ultra-high pressure homogenisation of milk casein concentrates: Influence of casein content[J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2014, 26: 143-152.

[110] Zhang X, Haque Z Z. Generation and Stabilization of Whey-Based Monodisperse Nanoemulsions Using Ultra-High-Pressure Homogenization and Small Amphipathic Co-emulsifier Combinations[J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2015, 63(45): 10070-10070.

[111] Ferragut V, Cruz N S, Trujillo A, Guamis B, Capellas M. Physical characteristics during storage of soy yogurt made from ultra-high pressure homogenized soymilk[J]. *Journal of Food Engineering*, 2009, 92(1): 63-69.

[112] Sorensen H, Mortensen K, Sorland G H, Larsen F H, Paulsson M, Ipsen R. Dynamic ultra-high pressure homogenisation of whey protein-depleted milk concentrate[J]. *International Dairy Journal*, 2015, 46: 12-21.

[113] Liu X, Yu M. Effects of Paraffin Emulsion on the Structure and Properties of Soy Protein Films[J]. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 2016, 37(9): 1252-1258.

[114] Le T T, Bhandari B, Holland J W, Deeth H C. Maillard reaction and protein cross-linking in relation to the solubility of milk powders[J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2011, 59(23): 12473-12479.

[115] Shuqin Y, Dongjian H, Jifeng N. Predicting wheat kernels' protein content by near infrared hyperspectral imaging[J]. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 2016, 9(2): 163-163.

[116] Yin S W, Tang C H, Cao J S, Hu E K, Wen Q B, Yang X Q. Effects of limited enzymatic hydrolysis with trypsin on the functional properties of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolate[J]. *Food chemistry*, 2008, 106(3): 1004-1013.

[117] Lili L, Huan W, Guangyue R, Xu D, Dan L, Guangjun Y. Effects of freeze-drying and spray drying processes on functional properties of phosphorylation of egg white protein[J]. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 2015, 8(4), 116-123.

[118] Shen L, Tang C H. Microfluidization as a potential technique to modify surface properties of

soy protein isolate [J]. Food Research International, 2012, 48(1): 108-118.

[119] Ellman G L. Tissue sulfhydryl groups. Archives of biochemistry and biophysics, 1959, 82(1): 70-77.

[120] Zhao Q, Selomulya C, Xiong H, Chen X D, Ruan X, Wang S, et al. Comparison of functional and structural properties of native and industrial process-modified proteins from long-grain indica rice[J]. Journal of cereal science, 2012, 56(3): 568-575.

[121] 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.

[122] Jafari, S.M., He, Y,&Bhandari, B. Production of sub-micron emulsions by ultrasound and microfluidization techniques[J]. Journal of Food Engineering, 2007, 82, 478-488.

[123] Chandi G K, Sogi D S. Functional properties of rice bran protein concentrates[J]. Journal of Food Engineering, 2007, 79(2): 592-597.

[124] Shanmugam A, Chandrapala J, Ashokkumar M. The effect of ultrasound on the physical and functional properties of skim milk[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2012; 16: 251-258.

[125] Dombrowski, J., Dechau, J., & Kulozik, U. Multiscale approach to characterize bulk, surface and foaming behavior of casein micelles as a function of alkalisation[J]. Food Hydrocolloids, 2016, 57, 92-102.

[126] Bolontrade A J, Scilingo A A, Anon M C. Amaranth proteins foaming properties: Film rheology and foam stability-Part 2[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2016, 141: 643-650.

[127] Sharma P, Oey I, Everett D W. Thermal properties of milk fat, xanthine oxidase, caseins and whey proteins in pulsed electric field-treated bovine whole milk[J]. Food chemistry, 2016, 207: 34-42.

[128] PUPPO M C, SPERONI F, CHAPLEAU N, et al. Effect of high pressure treatment on emulsifying properties of soybean proteins [J]. Food Hydrocolloids, 2005, 19(2): 289-296.

[129] 尹寿伟, 唐传核, 温其标, 等. 微射流处理对芸豆分离蛋白构象和功能特性的影响[J]. 华南理工大学学报, 2009, 37(10): 112-116.

[130] CHENG Q, MCCLEMENTS D J. Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: Factors affecting particle size[J].

Food Hydrocolloid, 2011, 25: 1001-1008.

[131] Giles J. Channel hoppers land chemistry Nobel[J]. nature, 2003, 425(6959): 51-651.

[132] Sanderson, Katharine. Nobel prize blurs boundaries[J]. nature, 2006, 443(7112): 615-615.

[133] S. Riebroy, S. Benjakul, W. Visessanguan, U. Erikson, T. Rustad. Acid-Induced Gelation of Natural Actomyosin from Atlantic Cod (*Gadus Morhua*) and Burbot (*Lota Lota*)[J]. Food Hydrocolloids, 2009, 23 (1): 26-39.

[134] S. Riebroy, S. Benjakul, W. Visessanguan, U. Erikson, T. Rustad. Comparative Study on Acid-Induced Gelation of Myosin from Atlantic Cod (*Gardus Morhua*) and Burbot (*Lota Lota*)[J]. Food Chemistry, 2008, 109 (1): 42-53.

[135] N. Chapleau, C. Mangavel, J.-P. Compont, M. de Lamballerie-Anton. Effect of High-Pressure Processing on Myofibrillar Protein Structure[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2004, 84 (1): 66-74.

[136] N.J. Chapleau, M.I. de Lamballerie-Anton. Changes in Myofibrillar Proteins Interactions and Rheological Properties Induced by High-Pressure Processing[J]. European Food Research and Technology, 2003, 216 (6): 470-476.

[137] SANO T, Ohno T, OTSUKA - FUCHINO H, et al. Carp natural actomyosin: thermal denaturation mechanism[J]. Journal of Food Science, 1994, 59(5): 1002-1008.

[138] 黎鹏. 动态超高压微射流技术对花生球蛋白功能性质的影响及其机理研究[D]. 南昌: 南昌大学. 2008.

[139] 任晓芬, 潘道东, 曾小群, 等. 胞壁蛋白酶 (CEP) 酶解对酪蛋白结构及功能特性的影响[J]. 现代食品科技, 2013, 29(11): 2643-2585.

[140] 李桂琴, 刘晶, 韩清波. 蛋白酶水解牛乳蛋白的研究[J]. 乳品工业, 2003(6): 11-13.

[141] 张根生, 丁碗莹, 王月, 等. 响应面法优化双酶酶解酪蛋白工艺[J]. 食品科学, 2013, 34(21): 237-241.

[142] Hustinx J C A, Singh T K, Fox P F. Heat-induced hydrolysis of sodium caseinate[J]. International dairy journal, 1997, 7(4): 207-212.

[143] Fairise J F, Cayot P, Lorient D. Characterisation of the protein composition of casein micelles after heating[J]. International Dairy Journal, 1999, 9(3): 249-254.

[144] 高婷, 沈滢, 卢蓉蓉. 酪蛋白抗氧化肽制备工艺及酶解产物特性研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(6): 192-198.

- [145] 洪伟, 薛正莲, 陈玲. 酪蛋白制备 ACE 抑制肽的酶解工艺优化[J]. 食品与发酵科技, 2010, 46(2): 37-40.
- [146] 马亚萍, 白腾辉, 康壮丽, 等. 响应面法优化鸡骨蛋白酶解工艺条件[J]. 食品工业科技, 2015, 31(19): 219-223.
- [147] 袁斌, 吕桂善, 刘小玲. 蛋白质水解度的简易测定方法[J]. 广西农业生物科学, 2002, 21(2): 113-115.
- [148] 刘立新. 猪骨蛋白水提工艺的优化[J]. 食品与机械, 2013, 29(5): 220-222.
- [149] 白腾辉. 高压处理促进胃蛋白酶酶解酪蛋白机制研究[D]. 河南科技学院, 2015.
- [150] Kitts D D, Weiler K. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery[J]. Current pharmaceutical design, 2003, 9(16): 1309-1323.
- [151] Korhonen H, Pihlanto A. Bioactive peptides: production and functionality[J]. International dairy journal, 2006, 16(9): 945-960.
- [152] 赵征, 王晓丽. 水解酪蛋白铁的制备及其稳定性的研究[J]. 中国乳品工业, 1999 (6): 9-13.
- [153] 许瑞, 徐红华. 胰蛋白酶水解乳蛋白对凝固型酸奶质地的影响[J]. 中国乳业, 2006 (3): 43-44.
- [154] Wang J, Zhao M, Yang X, et al. Improvement on functional properties of wheat gluten by enzymatic hydrolysis and ultrafiltration[J]. Journal of Cereal Science, 2006, 44(1): 93-100.
- [155] Peñas E, Préstamo G, Baeza M L, et al. Effects of combined high pressure and enzymatic treatments on the hydrolysis and immunoreactivity of dairy whey proteins[J]. International Dairy Journal, 2006, 16(8): 831-839.
- [156] Wang J, Wei Z, Li L, et al. Characteristics of enzymatic hydrolysis of thermal-treated wheat gluten[J]. Journal of Cereal Science, 2009, 50(2): 205-209.
- [157] Anema S G, Lee S K, Klostermeyer H. Effect of pH at heat treatment on the hydrolysis of κ -casein and the gelation of skim milk by chymosin[J]. LWT-Food Science and Technology, 2007, 40(1): 99-106.
- [158] 穆利霞, 廖森泰, 詹宝瑟, 等. 超声处理对碱法制备蚕蛹蛋白条件的优化[J]. 热带作物学报, 2014, 35(5): 1005-1011.
- [159] Sun T, Ho C T. Antioxidant activities of buckwheat extracts[J]. Food chemistry, 2005, 90(4):

743-749.

[160] Joseph G S, Jayaprakasha G K, Selvi A T, et al. Antiaflatoxigenic and antioxidant activities of *Garcinia* extracts[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 101(2): 153-160.

[161] 李安林, 熊双丽. 豇豆籽蛋白的氨基酸含量与营养价值评价[J]. *食品研究与开发*, 2008, 29(6): 147-150.

[162] 王建华. 药用氨基酸[J]. *国外药学 (合成药/生化药/制剂分册)*[J], 1982.

[163] 郭刚军, 邹建云, 徐荣, 等. 澳洲坚果粕营养成分测定与氨基酸组成评价[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(9): 421-423.

[164] 杨鲜, 祝慧凤, 王涛, 等. 重庆巫山等多地党参氨基酸及营养价值比较与分析[J]. *食品科学*, 2014, 35(15): 251-257.

[165] 许女, 西艳双, 杨莉榕. 乳清蛋白酶解物的抗氧化活性研究[J]. *食品研究与开发*, 2012, 33(7): 29-32.

[166] Shimada K, Fujikawa K, Yahara K, et al. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion[J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 1992, 40(6): 945-948.

致 谢

本论文是在导师马汉军教授的精心指导下完成的。马汉军教授在本论文的选题、试验方案设计、试验方法和问题分析以及论文的撰写等各方面都给予了我不可或缺的提点和帮助，导师渊博的学识、深彻的产业化思想以及对我国食品科学教育和研究事业的责任感给学生留下深刻的印象。老师们以其严谨求实的治学态度和高度的敬业精神在我的试验和生活中产生巨大的影响。论文完成之际，谨向导师表示崇高的敬意和衷心的感谢！

非常感谢食品学院农产品加工及贮藏工程方向全体老师所给予的帮助和支持，特别感谢刘本国老师和康壮丽老师在论文试验方案和试验过程中出现的问题分析上给予的悉心指导，感谢潘润淑老师在科研上的资助及生活中给予的谆谆教诲。

非常感谢陪伴我三年研究生岁月的师兄师姐和同学们在试验中给予我的无私的支持和帮助，感谢白腾辉师兄和项丰娟师姐在学习和生活中给予我的指导，感谢沈青山同学和耿升同学及王嘉楠师弟和李想师妹在试验中给我的帮助，三年的研究生生活我收获很多，非常感谢大家。

最后，感谢家人对我的支持和帮助，是他们默默无私的奉献铸就我今朝之论文，衷心感谢他们多年来一直给予的关心、理解和帮助、支持。

作者：马亚萍

2017年4月 河南科技学院

攻读硕士学位期间的研究成果

- [1] 马亚萍, 康壮丽, 王嘉楠, 等. 卡拉胶结合超高压处理对鸡胸肉糜品质的影响[J]. 食品工业科技, 2016, 6: 054.
- [2] 马亚萍, 白腾辉, 康壮丽, 等. 响应面法优化鸡骨蛋白酶解工艺条件[J]. 食品工业科技, 2015, 19: 040.
- [3] Ma Yaping, Liu Benguo, Geng Sheng, Wang Jianan, Wang Chunyan, Ma Hanjun*.Effect of Dynamic Ultra-High Pressure Homogenization on the Structure and Functional Properties of Casein[J].International Journal of Agricultural and biological.(on review)
- [4] Ma Yaping, Liu Benguo, Geng Sheng, Wang Jianan, Wang Chunyan, Ma Hanjun*.The effect of high -pressure treatment on the enzymatic properties of pepsin[J].Journal of Food science and Technology .(on review)
- [5] 白腾辉, 马亚萍, 康壮丽, 等. 响应面法优化鸡胸肉肌原纤维蛋白酶法水解工艺条件[J]. 食品工业科技, 2016, 1: 036.
- [6] 王嘉楠, 康壮丽, 马亚萍, 等. 魔芋胶结合高静压处理对鸡胸肉糜品质的影响[J].
- [7] 白腾辉, 潘润淑, 马亚萍, 等. 鸡骨渣高压蒸煮提取鸡骨素的工艺优化[J]. 食品与机械, 2014 (6): 199-203
- [8] 白腾辉, 潘润淑, 马亚萍, 等. 超高压处理对鸡肉品质影响的研究进展[J]. 农产品加工: 创新版 (中), 2014 (8): 57-60.
- [9] 白腾辉, 潘润淑, 马亚萍, 等. 响应面法优化酪蛋白酶法水解条件[J]. 食品工业科技, 2014, 35(23): 203-206.
- [10] 白腾辉, 马汉军, 潘润淑, 刘本国, 马亚萍, & 郝振宇. (2014). 高压处理对酪蛋白酶解产物抗氧化活性的影响. 高压物理学报, 29(6), 467-474.