

巴氏杀菌与超高温灭菌牛乳酪蛋白结构差异性的研究

李子超, 徐明芳, 向明霞, 成希飞

(暨南大学 生命科学技术学院, 广东广州 510632)

摘要:采用圆二色谱(CD)、荧光分光光度计、扫描电子显微镜(SEM)、纳米粒度仪对巴氏杀菌与超高温灭菌(UHT)牛乳酪蛋白的二级结构、内源荧光发射光谱、胶束形态结构、粒径分布情况进行研究。结果表明,相对于巴氏杀菌牛乳酪蛋白(α -螺旋 47.4%、 β -折叠 19.7%、 β -转角 13.4%、无规卷曲 19.4%),UHT牛乳酪蛋白的无规则结构增多(α -螺旋 22.1%、 β -折叠 23.1%、 β -转角 22.4%、无规卷曲 33.4%);UHT牛乳酪蛋白色氨酸在酪蛋白中所处的环境疏水性增强;巴氏杀菌牛乳酪蛋白颗粒呈圆球状,表面光滑,能够连接成较短的胶束结构,而UHT牛乳酪蛋白表面不光滑,几乎不能形成胶束;巴氏杀菌牛乳酪蛋白平均粒径为 295.1 nm,UHT 酪蛋白平均颗粒明显变小,平均粒径为 221.7 nm。可见,巴氏杀菌乳与超高温灭菌乳之间存在明显的结构差异。

关键词:巴氏杀菌;超高温灭菌;酪蛋白;结构

中图分类号:TS252.1

文献标志码:A

文章编号:1001-411X(2013)02-0192-05

Research on the Structural Differences of the Casein from Milk by Pasteurization and Ultrahigh Temperature Sterilization

LI Zichao, XU Mingfang, XIANG Mingxia, CHENG Xifei

(College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: Secondary structure, intrinsic fluorescence emission spectra, micelle morphology and particle size distribution of bovine casein were researched respectively by circular dichroism, fluorescence spectrophotometer, scanning electron microscope and nano-particle size analyzer. Results showed that bovine casein by ultrahigh temperature sterilization (UHT) had more random structures (α -helix 22.1%, β -sheet 23.1%, β -turn 22.4%, random 33.4%), compared with casein by pasteurization (α -helix 47.4%, β -sheet 19.7%, β -turn 13.4%, random 19.4%). Tryptophan of casein by UHT had more hydrophobic. Casein particles by pasteurization were spherical with smooth surface, and able to connect to short micelles. But casein particle by UHT did not have smooth surface, and could not connect to micelles. Compared with pasteurization, casein particles by UHT was smaller, with the diameter being 221.7 nm. This research suggested the structure of casein by pasteurization and ultrahigh temperature sterilization had obvious differences.

Key words: pasteurization; ultrahigh temperature sterilization; casein; structure

收稿日期:2012-02-21 网络出版时间:2013-01-22

网络出版地址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20130122.1710.007.html>

作者简介:李子超(1985—),男,硕士研究生;通信作者:徐明芳(1962—),女,教授,博士, E-mail: txmfxf2006@126.com

基金项目:广东省科技计划项目(2009B011300003)

乳品中的蛋白主要包括酪蛋白和乳清蛋白 2 大类,酪蛋白含有人体必需的 8 种氨基酸,能够与磷和钙结合,不溶于水,主要包括 α_{S1} -酪蛋白、 α_{S2} -酪蛋白、 β -酪蛋白、 κ -酪蛋白 4 种蛋白^[1-2],通常以聚集体的形式存在,约占乳品总蛋白含量的 80%,是乳品中重要的蛋白组分.酪蛋白作为乳源蛋白的主要成分,具有促进机体对磷、钙离子吸收^[3],调节人体免疫等功能^[4].近些年来,伴随大众饮食健康意识的提高和层出不穷的乳品安全问题,乳品蛋白成为大众和许多科研工作者所关注的热点.科研工作者的研究对酪蛋白的功能和应用方面的研究较多,如酪蛋白活性肽^[5]、酪蛋白乳化特性^[6]等.对酪蛋白结构的研究虽有报道,但多集中于单一酪蛋白组分的结构、金属离子等其他物质与单一酪蛋白组分相互作用对结构的影响等方面.如酪蛋白单体氨基酸序列的研究^[7],槲皮素与 β -酪蛋白相互作用对二级结构的影响^[8],茶多酚与 α -酪蛋白、 β -酪蛋白相互作用对结构的影响等^[9].但实际情况是,在高尔基体中,单体的酪蛋白通过与磷和钙的结合,屏蔽酪蛋白本身所具有的电荷并使之聚集成为更大颗粒状态^[10-12],酪蛋白中磷酸化的丝氨酸残基能够结合磷酸钙,在酪蛋白聚集体内部形成不同大小的聚集区^[13-14].由于人们生活中饮用的乳制品中的酪蛋白是以各个组分都存在的聚集形态存在的,所以相比于对单一酪蛋白组分的研究,对全酪蛋白的研究更具有实际应用价值和意义.目前液态乳的杀菌方式主要有巴氏杀菌和超高温短时灭菌(UHT),考虑到灭菌方式可能对蛋白质结构的影响,为此采用圆二色谱(CD)、荧光分光光度计、扫描电子显微镜(SEM)及纳米粒度分析仪对不同灭菌方式加工的牛乳酪蛋白的结构差异进行研究,旨在探讨不同加工方式对乳品中酪蛋白结构的影响,为乳品加工方式的研究、加工方式对乳品结构的影响、加工方式不同导致的乳品在人体内的消化吸收性质的差异等后续研究奠定必要的理论基础.

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

巴氏杀菌牛乳、超高温灭菌牛乳(广州风行),PBS 缓冲液,戊二醛、乙醇、醋酸异戊脂均为国产分析纯,pH 计(PH-3C,上海雷磁),扫描电子显微镜(PHILIPS XL-30 ESEM,荷兰 PHILIPS),荧光分光光度计(F-4500,日本 HITACHI),圆二色谱仪(CHIRASCAN,英国

Applied photophysics),台式离心机(TDL-5-A,上海安亭),纳米粒度分析仪(Zetasizer Nano ZS,英国).

1.2 试验方法

1.2.1 酪蛋白的制备 取 100 mL 乳品在 4 °C 条件下 4 000 r/min 离心 30 min,脱脂.弃上层脂肪,取下层蛋白溶液,调等电点至 pH4.6,离心 10 min 沉淀酪蛋白,之后分别用蒸馏水、冷丙酮各清洗 3 次,每次在 4 °C 条件下离心 10 min,弃上层溶液,得酪蛋白沉淀.放于自然条件下干燥后,保存于 -20 °C 冰箱中备用.

1.2.2 圆二色谱测定的样品制备及条件 准确称量 0.5 g 酪蛋白,溶于 100 mL pH8.0 PBS 缓冲液,配制成质量浓度为 5 g/L 的溶液,稀释至 0.1 g/L 作为待测样品.扫描范围 190 ~ 250 nm,步长 1 nm,带宽 0.5 nm,扫描速度 0.5 s/nm,石英样品池光径 0.1 mm.

1.2.3 内源荧光发射光谱测定的样品制备及条件 将酪蛋白用 pH8.0 的 PBS 缓冲液配制成质量浓度 2 mg/mL 的样品溶液,恒温静置 2 h,在激发波长(λ_{ex})295 nm、荧光发射和狭缝宽度 5.0 nm 条件下,测定样品在 300 ~ 500 nm 范围内的荧光发射光谱.

1.2.4 扫描电子显微镜观察的样品制备 将酪蛋白用 pH8.0 的 PBS 缓冲液配制成质量浓度 80 μ g/mL 的样品溶液,取 5 μ L 酪蛋白样品,滴在洁净的盖玻片上,于自然条件下干燥;然后,在盖玻片样品上滴加 50 μ L 戊二醛,4 °C 条件下固定 3 h;用浓度为 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液清洗 3 次,每次 5 min;分别用体积分数为 50%、70%、90% 和 100% 的乙醇进行脱水,每次 5 min;用醋酸异戊酯对乙醇进行置换,每次 5 min,共 3 次;CO₂ 临界点干燥后可进行电镜下观察.

1.2.5 纳米粒度仪测定的样品制备及条件 将酪蛋白用 pH8.0 的 PBS 缓冲液配制成质量浓度 2 mg/mL 的样品溶液,上样前将样品摇匀.纳米粒度仪相关参数:颗粒折射率为 1.45,颗粒吸收率为 0.887 2,分散剂为水,分散剂折射率为 1.33.试验重复 3 次,取平均值.

2 结果与分析

2.1 巴氏杀菌与 UHT 牛乳酪蛋白二级结构差异性

巴氏杀菌牛乳酪蛋白的远紫外 CD 图谱如图 1 所示,并通过 CDPro 软件对数据进行分析处理和二级结构含量的计算.结果显示,巴氏杀菌牛乳酪蛋白二级结构中: α -螺旋 47.4%、 β -折叠 19.7%、 β -转角 13.4%、无规卷曲 19.4%.巴氏杀菌牛乳酪蛋白中 α -螺旋结构含量最大,有序的二级结构含量高,占 80.5%.

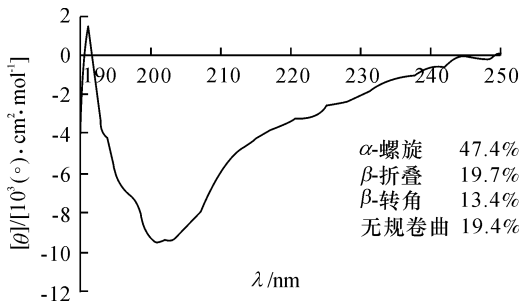


图1 巴氏杀菌牛乳酪蛋白的远紫外圆二色谱图

Fig. 1 Far-UV CD of bovine casein from pasteurized milk

UHT 牛乳酪蛋白的远紫外 CD 图谱如图 2 所示,并通过 CDPPro 软件对数据进行分析处理和二级结构含量的计算.结果表明,UHT 牛乳酪蛋白中: α -螺旋 22.1%、 β -折叠 23.1%、 β -转角 22.4%、无规卷曲 33.4%.相对于巴氏杀菌,在牛乳的 UHT 杀菌过程中,高温导致的酪蛋白结构变化主要表现在如下几点:第一, α -螺旋的含量大幅度降低. α -螺旋是蛋白质二级结构中最稳定的,UHT 灭菌乳中 α -螺旋含量的降低表明蛋白的结构稳定性下降.第二,无规卷曲含量大幅度增高,这种蛋白二级结构无规则、无固定空间结构、非重复,这种结构的含量增高表明在 UHT 灭菌之后,蛋白二级结构的随机性增强.第三,UHT 灭菌乳中有序结构总量仅为 66.6%,明显小于巴氏杀菌乳中的 80.5%,也表明了 UHT 灭菌酪蛋白的结构变得更加无规则.

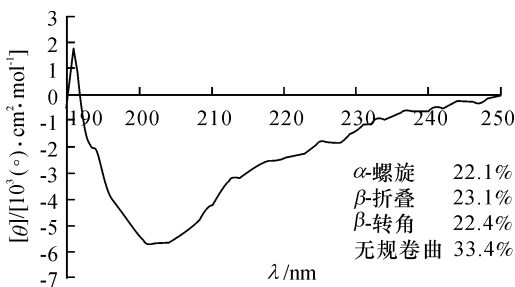


图2 UHT 牛乳酪蛋白的远紫外圆二色谱图

Fig. 2 Far-UV CD of bovine casein from UHT milk

2.2 巴氏杀菌与 UHT 牛乳酪蛋白内源荧光发射光谱差异性

巴氏杀菌与 UHT 牛乳酪蛋白的内源荧光发射光谱如图 3 所示,从图 3 中可以看出,相对于巴氏杀菌酪蛋白,UHT 酪蛋白的内源荧光强度 (I_f) 4 345 明显低于巴氏杀菌酪蛋白内源荧光强度 9 130,且最大发射波长 (λ_{max}) 发生 2 nm 红移,由 340 nm 迁移至 342 nm. λ_{max} 的红移表明酪蛋白颗粒内部的色氨酸 (Trp) 残基所处的微环境疏水性增加.首先,UHT 酪蛋白的 λ_{max} 红移之后仍然处于 335 ~

350 nm 的范围内,即其仍然处于蛋白质结构的疏水区域,在这一点上巴氏杀菌乳与 UHT 酪蛋白是一致的;其次,UHT 酪蛋白的 I_f 强度大幅度降低,这就表明酪蛋白在 UHT 灭菌后,原本处于蛋白质结构表面的 Trp 残基迁移到了蛋白结构内部的疏水环境中^[15].

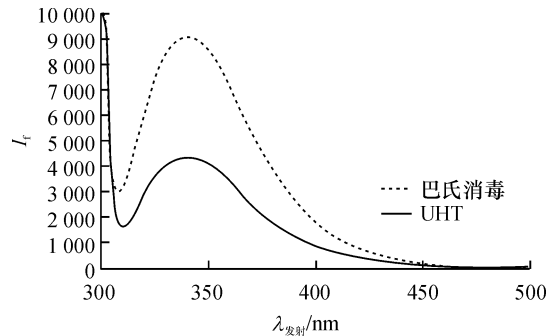


图3 巴氏杀菌和 UHT 牛乳酪蛋白的内源荧光发射光谱图

Fig. 3 Intrinsic fluorescence emission spectra of bovine casein from pasteurized and UHT milk

2.3 巴氏杀菌与 UHT 牛乳酪蛋白聚集形态差异性

巴氏杀菌酪蛋白的胶束结构形态如图 4 所示.从图 4 中可以看到,巴氏杀菌酪蛋白多颗粒结构明显,呈圆球状,表面比较光滑,可以通过数个酪蛋白颗粒的连接,形成较短的胶束.酪蛋白颗粒大小比较均匀,直径主要分布在 200 ~ 700 nm 之间,所形成的胶束结构除少量位置出现数个酪蛋白并行导致的直径变大外,大多数位置与酪蛋白颗粒的直径一致.而且,这些酪蛋白之间交联程度很低,无法形成较为致密的网络状结构.巴氏杀菌酪蛋白颗粒的这种形态结构特征可能与 α_{S1} -酪蛋白、 α_{S2} -酪蛋白、 β -酪蛋白、 κ -酪蛋白在酪蛋白颗粒的表面分布有关,曾有关于酪蛋白颗粒模型报道,疏水性的 α_{S1} -酪蛋白、 α_{S2} -酪蛋白、 β -酪蛋白聚集在酪蛋白颗粒内部形成“核”,亲水性的 κ -酪蛋白覆盖在“核”的外层,形成“套”,即“套核”结构模型^[16].

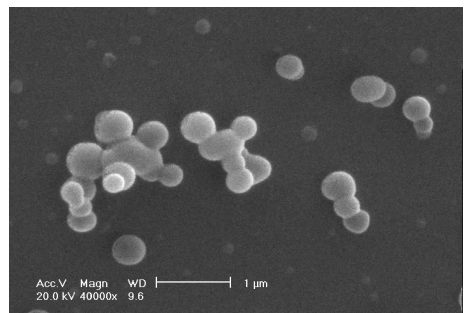


图4 巴氏杀菌牛乳酪蛋白的扫描电子显微镜图

Fig. 4 Scanning electron microscope (SEM) image of bovine casein from pasteurized milk

UHT 乳酪蛋白的形态结构如图 5 所示,从图 5 中可以看到,相对于巴氏杀菌乳酪蛋白的表面光滑的球状结构,UHT 乳酪蛋白的圆球状结构遭到严重破坏,形成大量的直径较小的酪蛋白颗粒,且表面不光滑,同时伴随出现聚集程度很高的无规则聚集体形态,束状结构不明显。

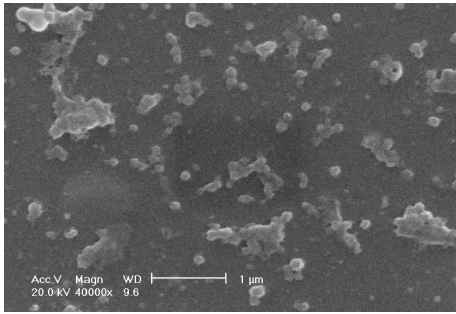


图5 UHT 牛乳酪蛋白的扫描电子显微镜图

Fig. 5 SEM image of casein from UHT milk

2.4 巴氏杀菌与 UHT 牛乳灭菌酪蛋白粒径分布差异性

为进一步研究酪蛋白颗粒的大小分布情况,采用纳米粒度仪对其颗粒直径进行测量.巴氏杀菌乳酪蛋白的纳米粒径分布情况如图 6 所示,从图 6 中可以看到,巴氏杀菌乳酪蛋白直径大小集中分布于 105.7 ~ 1 106.0 nm 之间,颗粒大小分布比较均匀,平均颗粒直径为 295.1 nm。

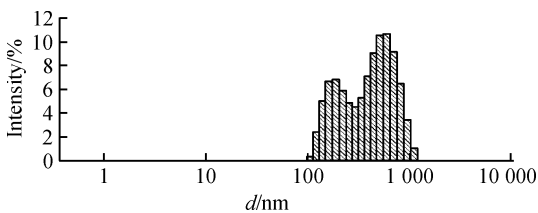


图6 巴氏杀菌牛乳酪蛋白的纳米粒径分布图

Fig. 6 Nano-particle size distribution of bovine casein from pasteurized milk

相对于巴氏杀菌乳酪蛋白,UHT 乳酪蛋白粒径分布呈现明显的差异性,如图 7 所示,UHT 乳酪蛋白颗粒粒径可以分为 2 个范围:粒径在 105.7 ~ 164.2 nm 的较小颗粒和 255.0 ~ 458.7 nm 的较大颗粒,其含量分别占 58.8% 和 41.1%,颗粒大小不均匀,平均颗粒直径为 221.7 nm,明显小于巴氏杀菌乳酪蛋白.在直径小于 200 nm 的较小酪蛋白颗粒的含量上,可以发现 UHT 乳酪蛋白中的含量为 58.8%,明显高于巴氏杀菌乳酪蛋白中的 21.5%.这种较小酪蛋白颗粒含量的差异从图 4 与图 5 的比较中也可以明显看出,证明研究结果的可靠.较小酪蛋白颗粒含量的增加、较大酪蛋白颗粒的减少就说明酪蛋白在 UHT 灭

菌之后, α_{s1} -酪蛋白、 α_{s2} -酪蛋白、 β -酪蛋白及 κ -酪蛋白在重新聚集成胶粒的过程中,聚集程度减弱.而驱动酪蛋白聚集的主要驱动力就是 α_{s1} -酪蛋白、 α_{s2} -酪蛋白、 β -酪蛋白的疏水作用,酪蛋白胶粒是依靠 α_{s1} -酪蛋白、 α_{s2} -酪蛋白、 β -酪蛋白的疏水作用才能够形成疏水的“核”。

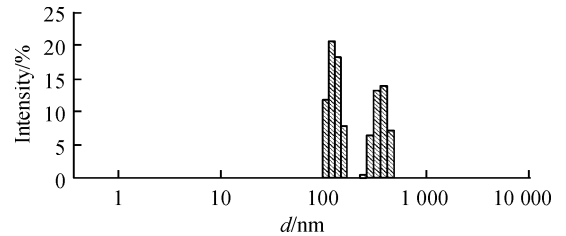


图7 UHT 牛乳酪蛋白的纳米粒径分布图

Fig. 7 Nano-particle size distribution of bovine casein from UHT milk

3 结论

鉴于目前对牛乳蛋白质结构方面的研究,多集中于牛乳酪蛋白中单一组分结构探索及其与金属离子等其他小分子物质相互作用对结构的影响^[7-9],本文主要探讨加工工艺的不同对牛乳酪蛋白结构的影响.由于乳品的杀菌工艺在温度、时间等方面的差异,巴氏杀菌与 UHT 牛乳酪蛋白在结构方面存在明显的差异.首先,蛋白质二级结构方面的差异表明 UHT 牛乳酪蛋白的稳定性下降,空间结构的无规则性增强,进而空间结构的随机性增强.由于酶具有专一性,在蛋白质的消化过程中,酶与蛋白质的结合需要识别固定的氨基酸序列和空间结构,这种随机性很强的空间结构,明显不利于酶与酪蛋白的结合,进而影响酪蛋白的消化.其次,内源荧光光谱的差异表明在 UHT 灭菌之后,原本处于蛋白质结构表面的 Trp 残基迁移到了蛋白结构内部的疏水环境中.这种结构的变化对酪蛋白性质的影响有待进一步研究.第三,酪蛋白形态方面的差异表明,UHT 灭菌之后, κ -酪蛋白组成的“套”层结构遭到破坏,进而导致酪蛋白颗粒的圆球状结构、胶束结构被破坏.该形态出现的原因,可能是 UHT 乳酪蛋白在杀菌过程中酪蛋白形成胶束过程中的盐键和氢键作用遭到破坏,导致 κ -酪蛋白组成的“套”层结构遭到破坏,进而导致酪蛋白颗粒的圆球状结构、胶束结构被破坏^[15].第四,UHT 牛乳酪蛋白相对于巴氏杀菌牛乳酪蛋白的平均颗粒直径更小,表明 α_{s1} -酪蛋白、 α_{s2} -酪蛋白、 β -酪蛋白的结构被破坏,导致其在酪蛋白聚集成胶粒过程中的疏水作用减弱.酪蛋白结构的这些变化

对其在人体内消化、吸收性质的影响,有待进一步研究.

参考文献:

- [1] FARRELL H M, JIMENEZ F. Nomenclature of the proteins of cow's milk-sixth revision [J]. *J Dairy Sci*, 2004, 87(6): 1641-1674.
- [2] MOITZI C, PORTNAYA I, GLATTER O, et al. Effect of temperature on self-assembly of bovine β -casein above and below isoelectric pH: Structural analysis by cryogenic-transmission electron microscopy and small-angle X-ray scattering [J]. *Langmuir*, 2008, 24(7): 3020-3029.
- [3] KITTS D D, YUAN Y V. Caseinophosphopeptides and calcium bioavailability [J]. *Trends Food Sci Technol*, 1992, 3(2): 31-35.
- [4] MCCANN K B, SHIELL B J, MICHALSKI W P, et al. Isolation and characterisation of a novel antibacterial peptide from bovine α_{s1} -casein [J]. *Int Dairy J*, 2006, 16(4): 316-323.
- [5] 胡志和, 阎喜霜, 庞广昌. 富含生理活性功能成分的蛋白质——牛初乳蛋白 [J]. *食品科学*, 2002, 23(3): 155-157.
- [6] 郭本恒. 乳品化学 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2001: 131-157.
- [7] SMITHER G W, BRAFORD R S. New dairy products: Fresh opportunities for the dairy industry [J]. *CSIRO Food Research Quarterly*, 1991, 51(1): 92-98.
- [8] 吕鉴泉, 王雪梅, 吕桂英, 等. 圆二色谱法研究酸度、槲皮素、锌离子对 β -酪蛋白二级结构的影响 [J]. *化学学报*, 2010, 68(14): 1449-1453.
- [9] IMED H, PHILIPPE B, SABER H, et al. Interaction of α - and β -casein with tea polyphenols [J]. *Food Chem*, 2011, 126(2): 630-639.
- [10] HUPPERTZ T, FOX P F, DE KRUIF K G, et al. High pressure-induced changes in bovine milk proteins: A review [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1764: 593-598.
- [11] FARRELL H M, Jr Jr, MALIN E L, BROWN E M, et al. Casein micelle structure: What can be learned from milk synthesis and structural biology? [J]. *Curr Opin Coll Interface Sci*, 2006, 11(2/3): 135-147.
- [12] HORNE D S. Casein micelle structure: Models and muddles [J]. *Curr Opin Coll Interface Sci*, 2006, 11(2/3): 148-153.
- [13] HOLT C. An equilibrium thermodynamic model of the sequestration of calcium phosphate by casein micelles and its application to the calculation of the partition of salts in milk [J]. *Eur Biophys J*, 2004, 33(5): 421-434.
- [14] HOLT C, TIMMINS P A, ERRINGTON N, et al. A core-shell model of calcium phosphate nanoclusters stabilized by β -casein phosphopeptides, derived from sedimentation equilibrium and small-angle X-ray and neutrons scattering measurements [J]. *Eur J Biochem*, 1998, 252(1): 73-78.
- [15] 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.
- [16] 郭本恒. 乳粉 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 215-218.

【责任编辑 李晓卉】