

# 商业热处理对萨能山羊乳蛋白结构、氧化程度和美拉德反应的影响

颜道民<sup>1</sup>, 朱奕璇<sup>1</sup>, 侯艳梅<sup>2</sup>, 蒲志平<sup>1</sup>, 王燕聪<sup>1</sup>, 张丽娜<sup>1</sup>, 周鹏<sup>\*1</sup>

(1. 江南大学 食品科学与资源挖掘全国重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 海普诺凯营养品有限公司, 湖南 长沙 410011)

**摘要:** 研究了低温长时巴氏杀菌 (low temperature long-time, LTLT)、高温短时巴氏杀菌 (high temperature short-time, HTST)、超高温瞬时杀菌 (ultra-high temperature, UHT)、喷雾干燥 (spray drying, SP) 和保持灭菌 (retort sterilizing, RS) 等 5 种商业热处理对山羊乳蛋白二级结构、氧化程度和美拉德反应产物的影响。结果表明, 不同热处理对山羊乳蛋白的损伤程度为 LTLT、HTST < UHT、SP < RS。与新鲜山羊乳相比, LTLT 和 HTST 处理对山羊乳蛋白粒径、电位和美拉德反应产物的积累变化不显著, 乳清蛋白二级结构和氧化指数出现轻微上升。RS 处理影响最显著, 其中羰基质量摩尔浓度升高 418%、巯基质量摩尔浓度下降 65%, 乳清蛋白变性程度高达 95%。UHT 和 SP 处理对乳蛋白损伤程度接近, 从乳蛋白粒径、电位、氧化指数、内荧光和表面疏水性上看, SP 处理对乳蛋白的影响比 UHT 处理更小; 从美拉德反应产物糠氨酸 (furosine) 和羟甲基糠醛 (5-HMF) 的积累来看, UHT 处理相较 SP 处理对山羊乳蛋白的影响更小。总体来说, 山羊乳蛋白损伤与加热温度和时间相关, 喷雾干燥过程更容易造成美拉德反应产物的积累。

**关键词:** 山羊乳; 商业热处理; 蛋白质氧化; 蛋白质二级结构; 美拉德反应

中图分类号: TS 252.41 文章编号: 1673-1689(2024)06-0086-10 DOI: 10.12441/spyswjs.20230128002

## Effects of Commercial Heat Treatment on the Structure, Oxidation Degree and Maillard Reaction Product Accumulation of Saanen Goat Milk Protein

YAN Daomin<sup>1</sup>, ZHU Yixuan<sup>1</sup>, HOU Yanmei<sup>2</sup>, PU Zhiping<sup>1</sup>,  
WAN Yancong<sup>1</sup>, ZHANG Li'na<sup>1</sup>, ZHOU Peng<sup>\*1</sup>

(1. State Key Laboratory of Food Science and Resources, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Ausnutria Hyproca Nutrition Co., Ltd., Changsha 410011, China)

**Abstract:** The effects of five commercial heat treatments including pasteurization (LTLT at low temperature long-time, HTST at high temperature short-time), UHT (Ultra-high temperature), spray drying (SP), and retort sterilized (RS) on the secondary structure of goat milk protein, the degree of oxidation, and the accumulation of Maillard reaction products were studied. The damage degree of goat milk protein caused by different heat treatments was LTLT, HTST < UHT, SP < RS. Compared with raw milk, the accumulation of particle size, potential and Maillard reaction products of goat milk protein treated with LTLT and HTST did not change significantly, while the secondary structure

收稿日期: 2023-01-28 修回日期: 2023-04-08

基金项目: 国家“十三五”重点研发计划项目(2022YFD2101504)。

\* 通信作者: 周鹏(1975—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事乳制品和水产品加工研究。E-mail: zhoupeng@jiangnan.edu.cn

and oxidation index of whey protein slightly changed and increased. RS treatment had the most significant effect. The carbonyl content in RS milk was 418% higher than that in raw milk, the sulfhydryl content was 65% lower, and the denaturation degree of whey protein was up to 95%. The damage degree of UHT and SP to milk protein was similar. From the perspective of particle size, potential, oxidation index, internal fluorescence and surface hydrophobicity of milk protein, the effect of SP on milk protein was smaller than that of UHT, but according to the accumulation of Furosine and 5-HMF from Maillard reaction products, the effect of UHT on goat milk protein production was smaller than that of SP. In general, goat milk protein damage is related to heating temperature and time, and the spray drying process is more likely to cause the accumulation of Maillard reaction products.

**Keywords:** goat milk, commercial heat treatment, protein oxidation, protein secondary structure, Maillard reaction

山羊乳容易消化吸收,营养全面,具有降血糖等保健功能,山羊乳中的乳蛋白是重要的营养成分<sup>[1]</sup>。随着人们对食品营养的愈加重视,山羊乳基婴幼儿配方乳粉获得了广泛的市场关注。

在乳制品工业中,热处理可以保证微生物安全,是最主要的加工方式。在热处理过程中乳蛋白会发生一系列物理化学变化,其自身三级结构破坏会导致其原有的功能活性降低或消失,同时蛋白质间相互作用会形成聚合体而改变乳制品的稳定性和溶解性<sup>[2]</sup>。

乳体系还存在还原糖组分,包括乳糖和少量低聚糖。在加热过程中,美拉德反应为典型的热反应损害<sup>[3]</sup>。蛋白质或多肽上被糖基化修饰的氨基酸可能被“封闭”,造成营养下降<sup>[4]</sup>。另外,美拉德反应还会生成有害物质,主要是糠氨酸和羟甲基糠醛。这些美拉德反应产物在身体中过多积累可能会诱导诸如动脉粥样硬化、糖尿病和肾脏疾病等<sup>[5]</sup>,因此,监测并降低美拉德反应产物水平对于婴幼儿和儿童消费者健康具有重要意义。

已有报道表明,山羊乳蛋白比牛乳对热处理更加敏感<sup>[6]</sup>,因此牛乳蛋白的相关研究不能直接应用在山羊乳加工中。目前对山羊乳在商业热处理过程中蛋白质结构和美拉德反应程度的研究较少。作者旨在探究不同商业热处理对山羊乳蛋白质结构、氧化程度和美拉德反应的影响,为更好利用山羊乳资源和提高乳制品生产工艺水平提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

新鲜山羊乳(RAW):杭州云泉约牧场,牧场收

集后在4℃冷链运输条件下运抵实验室;乙醇、乙酸乙酯、三氯乙酸(TCA)、盐酸胍、磷酸钾等常用试剂:中国医药集团有限公司;液相用三氟乙酸(TFA)、2,4-二硝基苯肼(DNPH)、1-苯胺基萘-8-磺酸盐(ANS):美国Sigma公司;BCA蛋白质定量分析测试盒:美国Thermo公司。

### 1.2 仪器与设备

PT-20C-R型管板式换热器:日本Powerpoint Internationa公司;LDZX-30KBS型灭菌锅:上海申安医疗器械有限公司;YC-2000型喷雾干燥机:上海雅程仪器有限公司;Mini-PROTEIN Tetra电泳仪、Chemidoc XRS+系统:美国Bio-rad公司;纳米粒度电位仪:英国Malvern公司;F-2700 FL型荧光分光光度计:日本Hitachi公司;FITR光谱仪:美国Thermo公司。

### 1.3 样品处理

低温长时巴氏杀菌(LTLT)乳:取适量新鲜山羊乳在65℃水浴锅中加热,当中心温度达到65℃时开始计时,保持30min;高温短时巴氏杀菌(HTST)乳:取适量新鲜山羊乳,使用PT-20C-R型管板式换热器加热,设置加热温度75℃,时间15s;超高温灭菌(UHT)乳:取适量新鲜山羊乳,使用管板式换热器加热,设置加热温度135℃,时间5s;喷雾干燥(SP)乳:取适量HTST乳,经95℃灭酶5s后使用R501型旋转蒸发器浓缩至原体积的30%,再使用YC-2000型喷雾干燥机在进口温度180℃,出口温度80℃喷雾干燥;保持灭菌(RS)乳:使用LDZX-30KBS型灭菌锅于121℃加热25min。样品全部贮藏在-80℃下。样品冻干粉:将不同热处理乳在-80℃、4~15 Pa下冷冻干燥48h后收集,并储藏在-80℃。

#### 1.4 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

参考 Schagger 等的方法, 使用 12 g/dL 的分离胶和 4 g/dL 的浓缩胶<sup>[7]</sup>。用 PBS 缓冲液稀释不同热处理组的山羊乳, 调整蛋白质质量浓度为 2 mg/mL。用 BCA 试剂盒确定蛋白质质量浓度。使用 2×样品缓冲液与不同组 2 mg/mL 溶液等体积混合, 其中还原组加入体积分数 5% 的 β-巯基乙醇, 混合后沸水浴 3 min 再冷却至室温。摇匀后取 10 μL, 加载每个样品。初始电压为 60 V。当样品条移动到浓缩凝胶和分离凝胶的交界处时, 调整电压为 120 V。电泳完成后, 将电泳胶移入考马斯亮蓝染色液中, 在室温下摇晃 6 h。倒入染色液, 摇动脱色, 直到胶纸的背景无色透明, 用 ChemiDoc XRS+ 系统进行拍照。每个样品重复 2 次。

#### 1.5 胶束粒径和 Zeta 电位

基于动态光散射原理, 采用纳米粒度仪对乳中酪蛋白胶束的粒径大小进行测定。不同热处理的样品在 10 °C、3 000 g 下离心 15 min, 去除上层脂肪, 下层蛋白质溶液用超纯水稀释 40 倍, 稀释液在 173° 散射角进行粒度测定, 测试模式为蛋白质, 溶液模式为水, 测试次数为 5 次, 每个样品重复测定 3 次, 取平均值。

采用纳米粒度电位仪测定酪蛋白胶束的 Zeta 电位值。不同热处理脱脂山羊乳样品用超纯水稀释 10 倍, 进行电位检测。测试次数为 5 次, 每个样品重复测定 3 次, 取平均值。

#### 1.6 羰基与巯基的检测

**1.6.1 羰基的检测** 参考 Levine 等的方法并略加修改<sup>[8]</sup>。将不同热处理山羊乳在 10 °C、3 000 g 离心 15 min, 移去上层奶油获得脱脂山羊乳。用 BCA 试剂盒确定其蛋白质质量浓度。取 0.5 mL 脱脂乳于棕色离心管中, 与 0.5 mL 的 10 mmol/L DNPH 溶液混合。室温孵育 1 h, 每隔 15 min 充分振荡一次, 再加入 0.5 mL 的 20 g/dL TCA 溶液, 11 000 g 离心 3 min, 弃去上清液。加入 1 mL 洗涤液, 使 V(乙醇):V(乙酸乙酯)=1:1, 充分振荡后于 11 000 g 离心 3 min, 弃去上清液, 重复 3 次。用 1.5 mL 的 6 mol/L 盐酸胍溶解沉淀, 11 000 g 离心 3 min, 取上清液, 在 370 nm 处测吸光度。羰基质量摩尔浓度按式(1)计算:

$$m_1 = \frac{0.04545 \times (A_1 - A_0) \times D}{\rho} \quad (1)$$

式中:  $m_1$  为羰基质量摩尔浓度, μmol/g;  $A_1$  为样品吸光度;  $A_0$  为样品空白吸光度;  $\rho$  为样品质量浓度, g/L; 0.045 45 为转换系数, μmol/L;  $D$  为稀释倍数。

**1.6.2 巯基的检测** 参考 Beveridge 等的方法<sup>[9]</sup>并稍加改动。配制含有 86 mmol/L Tris、92 mmol/L 甘氨酸、4 mmol/L EDTA、8 mol/L 尿素的 urea-Tris-Gly 溶液。取 0.5 mL 脱脂山羊乳样品加入 2.5 mL urea-Tris-Gly 溶液, 室温孵育 40 min, 再加入 20 μL 含有 4 mg/mL DTNB 的 Tris-Gly 溶液。每组空白加入 20 μL 的 Tris-Gly 溶液, 静置 1 h, 11 000 g 离心 30 min, 取上清液, 在 412 nm 处测吸光度。每个样品重复 3 次。巯基质量摩尔浓度按式(2)计算:

$$m_2 = \frac{0.007553 \times (A_2 - A_0) \times D}{\rho} \quad (2)$$

式中:  $m_2$  为巯基质量摩尔浓度, μmol/g;  $A_2$  为样品在 412 nm 处的吸光度;  $A_0$  为样品空白在 412 nm 处的吸光度;  $\rho$  为样品质量浓度, g/L;  $D$  为稀释倍数; 0.007 553 为转换系数, μmol/L。

#### 1.7 蛋白质表面疏水性的测定

将不同热处理山羊乳在 10 °C 下于 120 000 g 离心 90 min, 取中间层乳清相, 过 1.3 mm 滤膜, 用凯式定氮法确定乳清相中蛋白质质量浓度。

用 F-2700 FL 型荧光分光光度计测定不同热处理山羊乳内源性荧光, 激发和发射单色光镜宽 2.5 mm, 激发波长 295 nm, 发射波长扫描范围 310~450 nm, 每个样品重复 3 次。使用外源性荧光探针 ANS 测定外源性荧光, 将乳清稀释为 0.01、0.05、0.10、0.20、0.50 mg/mL 共 5 个梯度, 2 mL 稀释后样品与 10 μL 的 8 mmol/L ANS 溶液混合后孵育 3 min。调整激发和发射单色光镜宽度为 5 nm。在激发波长 390 nm 条件下, 测量发射波长 473 nm 处的荧光强度。对荧光强度和样品蛋白质质量浓度进行线性拟合, 其初始斜率为该样品中乳清蛋白的疏水性指数( $S_0$ ), 每个样品重复 3 次。

#### 1.8 蛋白质傅里叶红外光谱测定

蛋白质样品的傅里叶光谱用 FITR 光谱仪检测, 波长范围为 4 000~400  $\text{cm}^{-1}$ , 分辨率为 4  $\text{cm}^{-1}$ , 进行 32 次扫描, 每个样品重复 3 次。使用 Omnic 8.2 进行光谱收集、峰鉴定和基本红外光谱图分析。二阶导数计算在酰胺 I 区 (1 700~1 600  $\text{cm}^{-1}$ )。使用 Peakfit 4.2 版本解析并拟合 19~21 个峰, 用高斯函数对所有峰进行拟合, 分别对应 β-折叠 (1 640~



1 600  $\text{cm}^{-1}$ )、无规则卷曲(1 650~1 640  $\text{cm}^{-1}$ )、 $\alpha$ -螺旋(1 660~1 650  $\text{cm}^{-1}$ )、 $\beta$ -转角(1 700~1 660  $\text{cm}^{-1}$ )。将一个样品给定的二级结构单元的成分带面积除以总的成分带面积,得出相应二级结构单元的百分比。

### 1.9 Furosine 的检测

Furosine 的检测参考 Sakkas 等的方法<sup>[10]</sup>并稍加修改。称取 1.000 0 g 的冻干粉样品于 15 mL 螺纹玻璃消化管中,加入 8 mL 的 10.6 mol/L HCl,氮吹 3 min 后于(110±1) °C 水解 24 h,过滤并定容至 15 mL。先后用 18 mL 甲醇和 20 mL 超纯水活化平衡萃取柱,萃取 0.5 mL 稀释水解液,用 3 mol/L HCl 溶液洗脱样品,装在液相小瓶中等待 HPLC 检测。

### 1.10 5-HMF 的检测

5-HMF 的检测参考 Chávez-Servín 等的方法,并略加修改<sup>[11]</sup>。称取 1.000 0 g 的样品冻干粉于 25 mL 螺纹玻璃消化试管中,加入 5 mL 的 2 mol/L 草酸溶液并充分振荡溶解。在沸水浴中加热 25 min,冷却至室温后加 1.5 mL 体积分数 40% 的 TCA,3 000 g 离心 15 min,将上清液转移至 25 mL 容量瓶。再用 10 mL 的体积分数 4% 的 TCA 溶液添加到固体残留物中,彻底将其混合 10 min,然后再次离心。上清液转移至容量瓶中,弃去固相。在容量瓶中加入体积分数 4% 的 TCA 溶液定容至 25 mL,将定容后的上清液通过 0.45  $\mu\text{m}$  尼龙过滤器装于液相小瓶中用于 HPLC 分析。另外配置 0.05~5.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 5-HMF 标准溶液,使用外标法计算样品中 5-HMF 的溶液,用 WATERS HPLC 检测。

### 1.10 超高效液相色谱串联质谱检测蛋白质糖基化

将不同热处理的山羊乳样品在 10 °C 于 120 000 g 离心 90 min,取中间乳清层,过 0.22  $\mu\text{m}$  尼龙过滤器,置于液相小瓶中。

使用 UPLC-ESI-MS 仪器和 TFA 溶液(含体积分数 0.1% 的 TFA 溶液)与 ACN 溶液(含体积分数 0.1% TFA 的乙腈溶液)两种流动相,以 0.3 mL/min 的流量进行梯度洗脱,分离柱为 BEC C<sub>4</sub> 色谱柱(2.1 mm×100 mm)。TFA 溶液的比例在最初的 30 min 从 99% 降到 79%,在接下来的 10 min 从 79% 降到 59%,最后 10 min 内降到 19%。Waters SYNAPT Q-TOF 系统采用正离子模式,锥电压为 30 V,碰撞能量为 6 eV,  $m/z$  扫描范围 20~2 000。

### 1.11 数据分析与处理

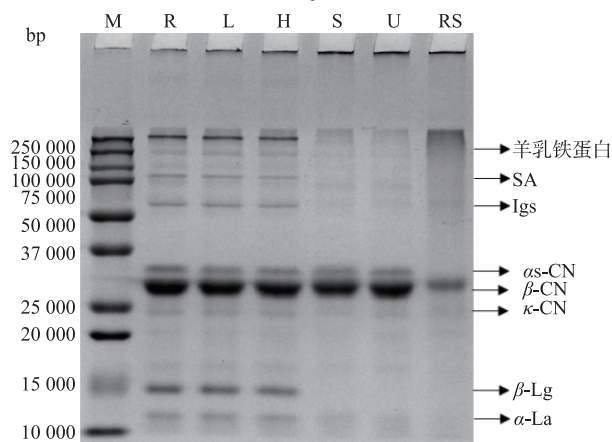
通过与标准品对比保留时间、光谱或质谱进行

定性分析,外标法进行定量分析。每组样品重复 3 次,所用数据均表示为平均值±标准差;使用 SPSS 26 邓肯模型进行显著性差异分析;用 MassLynx 4.1 分析相对分子质量数据,相对分子质量增加 324 为一个乳糖结合(lactosylation),增加 162 为一个果糖结合(fructosylation)<sup>[12]</sup>。用 GraphPad Prism 9 绘图。

## 2 结果与分析

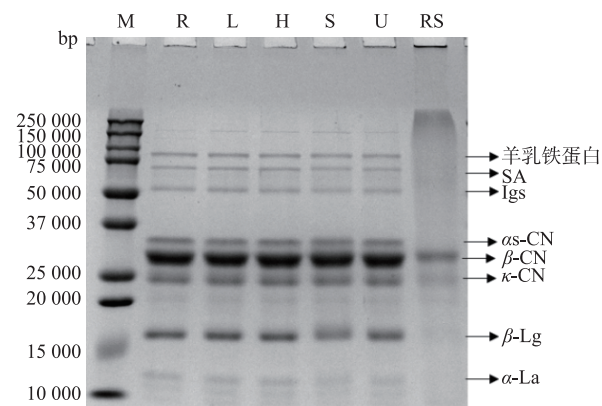
### 2.1 蛋白质电泳变化

图 1 显示了不同热处理山羊乳蛋白在还原和非还原状态下的电泳差异。



M. 相对分子质量为 1 000 000 的标准品; R. 新鲜山羊乳; L. 低温长时巴氏杀菌; H. 高温短时巴氏杀菌; U. 超高温瞬时杀菌; SP. 喷雾干燥; RS. 保持灭菌。

(a) 山羊乳蛋白非还原电泳



M. 相对分子质量为 1 000 000 的标准品; R. 新鲜山羊乳; L. 低温长时巴氏杀菌; H. 高温短时巴氏杀菌; U. 超高温瞬时杀菌; SP. 喷雾干燥; RS. 保持灭菌。

(b) 山羊乳蛋白还原电泳

图 1 山羊乳蛋白电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of goat milk protein

图 1(a)显示在非还原条件下,2 种巴氏杀菌后的山羊乳蛋白与 RAW 组的条带相对一致。UHT 和 SP 中的乳清蛋白条带减弱,尤其是  $\beta$ -乳球蛋白条

带几乎不可见,  $\kappa$ -CN 条带也变浅。与 RS 组相比, RAW 组差异最大, 仅存在缩小的  $\beta$ -CN 条带, 同时在大相对分子质量区域中看到明显的蛋白质拖尾阴影。这种热变性是因为乳蛋白中的半胱氨酸残基上的巯基基团在加热过程中从内部暴露出来, 与其他暴露的巯基基团疏水接触时触发巯基与二硫键交换反应, 形成蛋白质聚集体<sup>[13]</sup>。

从图 1(b)可以看出, 在还原状态下 2 种巴氏杀菌(UHT 和 SP)对山羊乳的蛋白质的影响较小, 主要蛋白质组分条带清晰。在 SP 组泳道中,  $\beta$ -乳球蛋白的条带出现了上移。RS 组中的乳蛋白变化较大, 在 RS 组泳道上方大相对分子质量区域有明显蛋白质聚集。除 RS 组中大部分乳蛋白被完全破坏, 其他组中乳清蛋白和酪蛋白的组成与 RAW 组一致, 因为  $\beta$ -巯基乙醇还原了二硫键, 使聚合消失的蛋白质条带重新显现。

## 2.2 粒径与 Zeta 电位变化

图 2(a)显示了不同热处理对山羊乳蛋白粒径的影响。热处理造成了乳蛋白粒径的增加, 增加最明显的是 UHT 组和 RS 组。图 2(b)显示山羊乳蛋白 Zeta 电位均为负数, 并且山羊乳蛋白 Zeta 电位绝对值在加热后出现降低, 下降程度最为明显的分别是 RS 组、UHT 组和 SP 组。

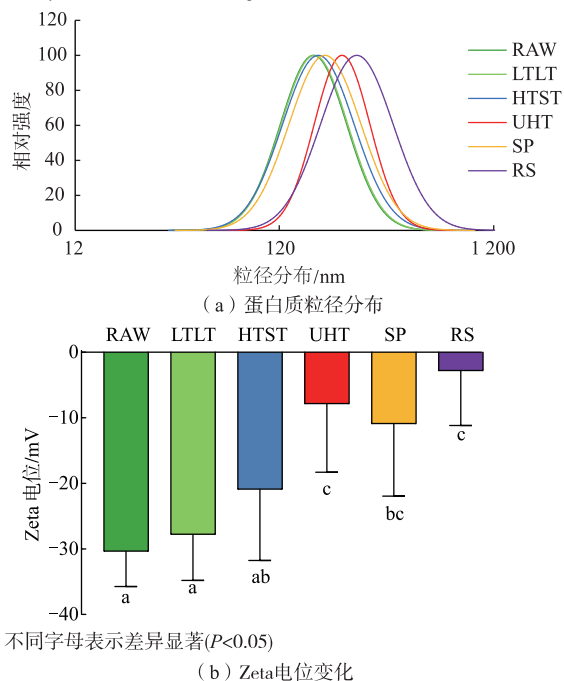


图 2 不同热处理山羊乳蛋白质粒径分布和 Zeta 电位变化  
Fig. 2 Protein particle size distribution and Zeta potential change of goat milk with different heat treatments

Zeta 电位是蛋白质在体系中稳定性的重要表征, 蛋白质电位强度的下降说明蛋白质颗粒间的排斥力下降, 从物理角度解释了蛋白质发生聚集的原因, 这与 Sun 等的报道一致<sup>[14]</sup>。同时蛋白质粒径的增大与电位绝对值的减小也与山羊乳蛋白的相互作用有关。

## 2.3 氧化指数变化

图 3(a)显示了不同热处理方式对山羊乳羰基质量摩尔浓度的影响, 随着加工强度的增加, 羰基质量摩尔浓度升高。本实验中未经加热处理的新鲜山羊乳样品 RAW 组含有羰基 2.3 mmol/g, 两种巴氏杀菌乳的羰基质量摩尔浓度增加最少, 其次是 UHT 组, 略高于 SP 组。RS 组羰基质量摩尔浓度最高, 达到 11.7 mmol/g, 比 RAW 组升高 418%。图 3(b)显示了不同热处理方式对山羊乳巯基质量摩尔浓度的影响。新鲜山羊乳 RAW 组含有巯基 5.8 mmol/g, 随着加热程度增加, 巯基质量摩尔浓度下降。两种巴氏杀菌乳巯基下降较少, HTST 组中巯基下降程度高于 LTLT 组, UHT 组下降程度高于 SP 组。RS 组中巯基质量摩尔浓度下降最多, 为 2.0 mmol/g。通过巯基质量摩尔浓度的变化可以明显看出, 经过热处理后总巯基质量摩尔浓度显著下降, 这与电泳和电位测定的山羊乳蛋白热损伤情况一致。

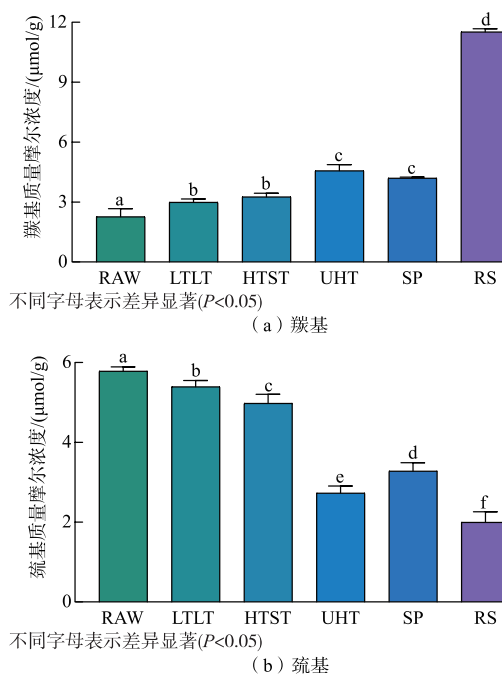


图 3 不同热处理山羊乳中羰基和巯基质量摩尔浓度  
Fig. 3 Carbonyl and sulfhydryl content in different heat-treated goat milk

### 2.4 乳清蛋白表面疏水性变化

不同热处理山羊乳蛋白荧光强度变化见表1。在激发波长295 nm下,RAW组中乳清乳蛋白固有荧光的最大发射波长位于332 nm处,两种巴氏杀菌对最大发射波长的影响不明显,但UHT、SP和RS组中乳蛋白固有荧光的最大发射波长出现显著红移。新鲜山羊乳和巴氏杀菌乳的最大发射波长在332 nm左右,远离游离态色氨酸348 nm的最大发射波长频率,说明乳蛋白色氨酸残基埋藏于蛋白质的疏水区域<sup>[15]</sup>。经过SP和UHT处理,山羊乳清蛋白内源性荧光最大吸收波长红移6~8 nm,同时荧光强度显著上升。RS组最大发射波长为436.17 nm,接近游离态色氨酸348 nm最大发射波长,说明乳清蛋白被严重破坏,蛋白质色氨酸残基更多处于游离态。在相同蛋白质质量浓度下,经过热处理的山羊乳清蛋白比RAW组固有荧光辐射强度显著上升,同时经过ANS探针标记的外源性荧光强度 $S_0$ 比RAW组显著上升,说明山羊乳清蛋白表面疏水性在热处理后显著上升。

### 2.5 乳清蛋白傅里叶光谱分析

采用FTIR光谱法分析了6种不同热处理山羊乳中乳清蛋白的表观二级结构,见表2。新鲜山羊乳RAW组中乳清蛋白的二级结构以 $\beta$ -折叠为主,占45.25%, $\alpha$ -螺旋占16.96%, $\beta$ -转角占22.65%,无规则卷曲占15.14%。新鲜山羊乳 $\beta$ -折叠比例随着热处理程度的增加而降低。无规则卷曲区域比例在加热程度较强的UHT、SP和RS中上升。另外在RS组中 $\alpha$ -螺旋的比例比其他组显著降低。两种巴氏杀菌乳和新鲜山羊乳的无规则卷曲较少,说明巴氏杀菌条件对山羊乳清蛋白变性的影响较小。UHT、SP和RS组中乳清蛋白的无规则卷曲比例显著上升,且 $\beta$ -折叠比例下降,说明这几种热处理对乳清蛋白变性影响较大,与前人的研究一致<sup>[16-17]</sup>。

UHT组色氨酸残基最大吸收波长红移程度和内荧光强度大于SP组,但是SP组的疏水性指数 $S_0$ 大于UHT组。这可能是SP中乳清蛋白 $\beta$ -折叠损失程度更大,从而暴露了更多的疏水性结构与ANS结合。

表1 不同热处理山羊乳蛋白荧光强度变化

Table 1 Changes of fluorescent light intensity of goat milk protein under different heat treatments

热处理	内源性荧光		外源性荧光强度 $S_0$
	最大发射波长/nm	发射荧光强度/ $\times 10^2$	
RAW	332.667 $\pm$ 0.236 <sup>a</sup>	25.493 $\pm$ 0.856 <sup>a</sup>	22.715 $\pm$ 0.123 <sup>a</sup>
LTLT	332.767 $\pm$ 0.256 <sup>a</sup>	29.400 $\pm$ 0.033 <sup>b</sup>	24.112 $\pm$ 0.039 <sup>b</sup>
HTST	332.833 $\pm$ 0.850 <sup>a</sup>	36.650 $\pm$ 0.085 <sup>c</sup>	24.838 $\pm$ 0.371 <sup>b</sup>
UHT	340.667 $\pm$ 0.624 <sup>c</sup>	80.307 $\pm$ 0.653 <sup>e</sup>	51.344 $\pm$ 0.326 <sup>c</sup>
SP	338.167 $\pm$ 1.434 <sup>b</sup>	72.293 $\pm$ 0.411 <sup>d</sup>	55.511 $\pm$ 0.189 <sup>d</sup>
RS	346.167 $\pm$ 1.027 <sup>d</sup>	136.437 $\pm$ 0.163 <sup>f</sup>	79.694 $\pm$ 0.204 <sup>f</sup>

注:同列不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

表2 不同热处理时山羊乳蛋白质二级结构的比例

Table 2 Secondary structure content of goat milk protein with different heat treatments

热处理	$\beta$ -折叠比例/%	无规则卷曲比例/%	$\alpha$ -螺旋比例/%	$\beta$ -转角比例/%
RAW	45.25 $\pm$ 1.03 <sup>a</sup>	15.14 $\pm$ 0.87 <sup>a</sup>	16.96 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	22.65 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>
LTLT	43.00 $\pm$ 0.29 <sup>b</sup>	15.45 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>	17.48 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	24.07 $\pm$ 0.19 <sup>ab</sup>
HTST	41.96 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	15.21 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	16.54 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	26.29 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>
UHT	40.38 $\pm$ 0.49 <sup>c</sup>	17.22 $\pm$ 0.71 <sup>b</sup>	17.35 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	25.04 $\pm$ 1.02 <sup>bc</sup>
SP	39.49 $\pm$ 0.99 <sup>c</sup>	17.00 $\pm$ 0.47 <sup>b</sup>	17.58 $\pm$ 0.45 <sup>a</sup>	25.93 $\pm$ 0.21 <sup>c</sup>
RS	40.21 $\pm$ 0.51 <sup>c</sup>	22.18 $\pm$ 0.56 <sup>c</sup>	14.36 $\pm$ 1.53 <sup>b</sup>	23.25 $\pm$ 1.48 <sup>a</sup>

注:同列不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

### 2.6 美拉德产物变化

山羊乳中还原糖与蛋白质发生美拉德反应生成有健康风险的早期产物——乳果糖基赖氨酸,其

经酸水解为糠氨酸<sup>[18-19]</sup>,是评价山羊乳制品热损伤的重要指标<sup>[20]</sup>。美拉德反应产物可能对糖尿病、动脉粥样硬化和认知障碍等疾病有影响<sup>[21]</sup>,对于主要消

费人群为婴幼儿和青少年的山羊乳制品,应当尽量限制其含量。

图 4(a)显示了不同热处理时山羊乳中糠氨酸的质量浓度。RAW 组中含有 11.319  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的糠氨酸, LTLT 处理对糠氨酸质量浓度的影响不显著;其他液态乳中随着加热强度的提高,糠氨酸质量浓度显著升高,且 SP 显著高于其他组。

热处理会加速生成美拉德反应早期产物乳果糖基赖氨酸,糠氨酸水平与热加工强度成正相关<sup>[22]</sup>。SP 组比 HTST 组多了灭酶过程(95  $^{\circ}\text{C}$ 、5 s)以及喷雾干燥过程(干燥塔入口温度 180  $^{\circ}\text{C}$ , 出口温度 80  $^{\circ}\text{C}$ ),在液态乳阶段 SP 组经历的热处理强度小于 UHT 组,但是糠氨酸积累水平却大于 UHT 组甚至 RS 组。这种差异的产生与水分质量分数有关,喷雾干燥过程中水分质量分数不断降低,更容易发生糖基化反应<sup>[23]</sup>。

图 4(b)显示了不同热处理对山羊乳中 5-HMF 的影响。RAW 组中 5-HMF 质量浓度为 0.97  $\mu\text{g}/\text{dL}$ , 巴氏杀菌对山羊乳中 5-HMF 的质量浓度影响不明显,但 UHT 组、SP 组和 RS 组中 5-HMF 的质量浓度比 RAW 组分别增长 4.5 倍、7 倍和 25 倍。山羊乳中原有的 5-HMF 质量浓度极低,经过巴氏杀菌后并没有明显增加,可能原因是较低的温度难以提高 Amadori 产物的烯醇化以及乳糖的异构化与降解速率,这个温度可能需要大于 100  $^{\circ}\text{C}$ <sup>[24-25]</sup>,因此在强度更高的热处理条件下,5-HMF 的积累明显提高。

## 2.7 乳清蛋白糖基化程度

图 5 为 UPLC-MS 鉴定的  $\alpha$ -乳白蛋白质谱图。

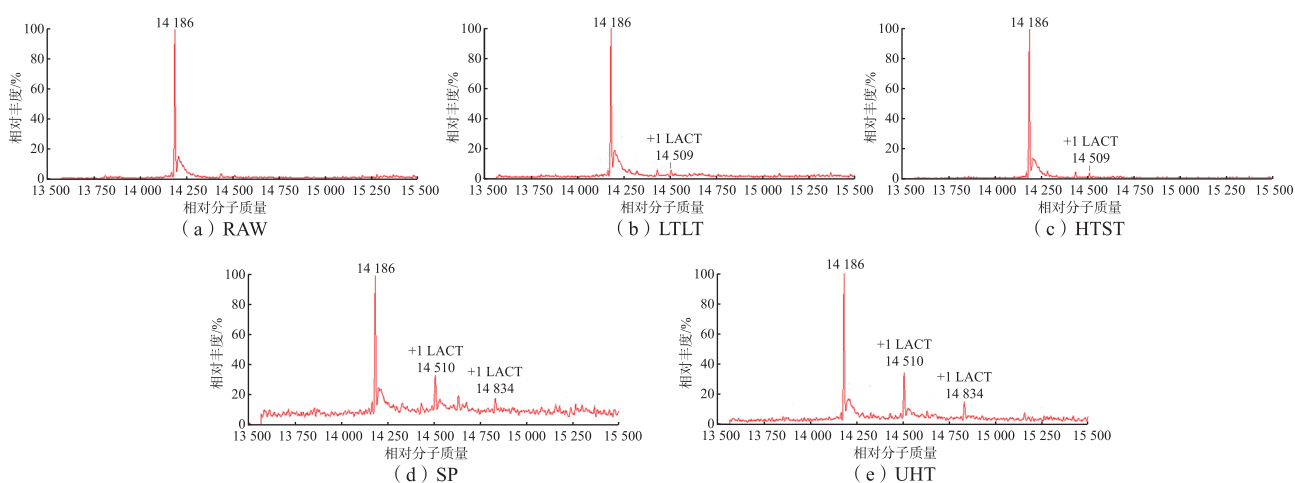


图 5  $\alpha$ -乳白蛋白质谱图

Fig. 5 Mass spectra of  $\alpha$ -lactalbumin

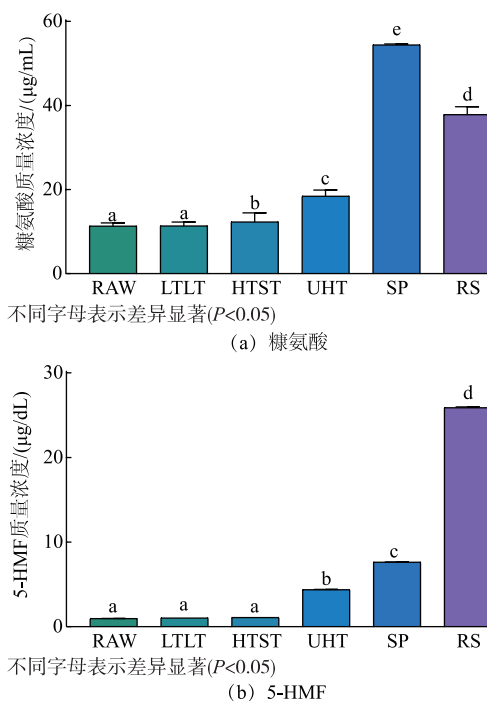
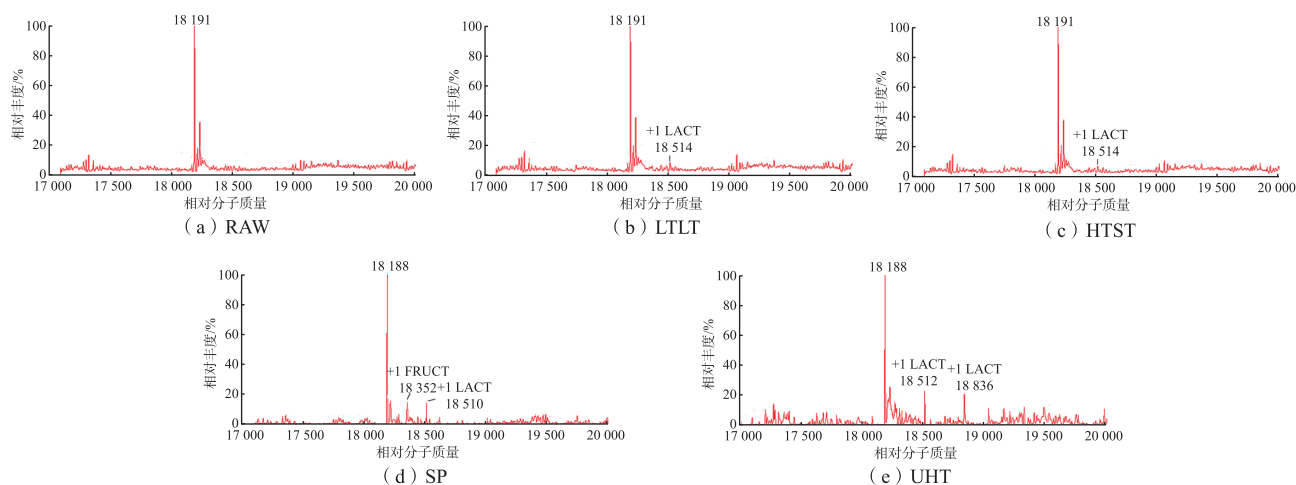


图 4 不同热处理乳中糠氨酸和 5-HMF 的质量浓度

Fig. 4 Furosine and 5-HMF content in different heat-treated goat milk

可以看出,与 RAW 组相比,经过热处理的山羊乳  $\alpha$ -乳白蛋白都出现了不同程度的乳糖化峰。图 6 为  $\beta$ -乳球蛋白的质谱图,经过 LTLT 和 HTST 处理,在  $\beta$ -乳球蛋白质谱图中出现了低强度的乳糖化峰。UHT 组中  $\beta$ -乳球蛋白出现 2 个乳糖化峰,与  $\alpha$ -乳白蛋白糖基化情况相同。SP 组不仅出现一个乳糖化峰,还出现一个乳果糖糖基化峰,糖基化情况与  $\alpha$ -乳白蛋白不同。



图 6  $\beta$ -乳球蛋白质谱图Fig. 6 Mass spectra of  $\beta$ -lactoglobulin

Liu 等研究了相似热处理条件下牛乳清蛋白<sup>[26]</sup>,在巴氏杀菌中 $\beta$ -Lg 和 $\alpha$ -La 没有出现乳糖化。但在本研究中,相同巴氏杀菌条件下山羊乳 $\beta$ -Lg 和 $\alpha$ -La 发生了乳糖化,说明羊乳乳清蛋白在加热过程中更容易发生糖基化反应,这与前人研究结果一致<sup>[27]</sup>。电泳结果和内源性荧光最大发射波长红移结果显示,乳清蛋白在 RS 处理中完全变性,说明 RS 组中乳清蛋白分子结构与质量完全改变,因此无法在 UPLC-MS 中找到原有的乳清蛋白组分,所以没有对应的乳清蛋白糖基化质谱图像。

### 3 结语

研究了 5 种常用商业热处理对山羊乳蛋白结构和美拉德反应的影响,结果表明乳清蛋白比酪蛋

白更容易受热处理的影响。巴氏杀菌处理对乳清蛋白的损害整体低于 UHT、SP 和 RS 处理。RS 处理是对山羊乳蛋白影响最大的热处理过程,会造成乳清蛋白的完全变性和美拉德反应产物的大量积累。从粒径、电位、巯基氧化、内源荧光强度和乳清蛋白二级结构来看,对于 UHT 和 SP 这两种最常见的长期保存乳制品的热处理方法,SP 处理对山羊乳影响更小。但从美拉德反应产物积累和蛋白质疏水性指数看,UHT 处理对山羊乳蛋白的影响更小。作者认为使用新技术对 SP 加工流程的优化,比如低压喷雾干燥技术可以更好控制热处理过程对山羊乳蛋白的影响,减少潜在风险物质的产生,保证货架期品质。

### 参考文献:

- [1] CLARK S, MORA GARCÍA M B. A 100-Year Review: advances in goat milk research[J]. *Journal of Dairy Science*, 2017, 100(12): 10026-10044.
- [2] LI S Q, YE A Q, SINGH H. Impacts of heat-induced changes on milk protein digestibility: a review[J]. *International Dairy Journal*, 2021, 123: 105160.
- [3] VAN BOEKEL M A J S. Effect of heating on Maillard reactions in milk[J]. *Food Chemistry*, 1998, 62(4): 403-414.
- [4] ZENKER H E, VAN LIESHOUT G A A, VAN GOOL M P, et al. Lysine blockage of milk proteins in infant formula impairs overall protein digestibility and peptide release[J]. *Food & Function*, 2020, 11(1): 358-369.
- [5] POULSEN M W, HEDEGAARD R V, ANDERSEN J M, et al. Advanced glycation endproducts in food and their effects on health[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2013, 60: 10-37.
- [6] 李林强, 王亮, 田苏辉, 等. 牛羊乳蛋白质粒度对其热处理沉淀率的影响[J]. *食品与生物技术学报*, 2017, 36(9): 1002-1007.  
LI L Q, WANG L, TIAN S H, et al. Influence of protein particles size on milk sedimentation rate from cow and goat after heat treatment[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2017, 36(9): 1002-1007. (in Chinese)
- [7] SCHÄGGER H, VON JAGOW G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of



- proteins in the range from 1 to 100 kDa[J]. **Analytical Biochemistry**, 1987, 166(2):368-379.
- [ 8 ] LEVINE R L, GARLAND D, OLIVER C N, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins[J]. **Methods in Enzymology**, 1990, 186:464-478.
- [ 9 ] BEVERIDGE T, TOMA S J, NAKAI S. Determination of sh- and ss-groups in some food proteins using ellman's reagent[J]. **Journal of Food Science**, 1974, 39(1):49-51.
- [10] SAKKAS L, MOUTAFI A, MOSCHOPOULOU E, et al. Assessment of heat treatment of various types of milk[J]. **Food Chemistry**, 2014, 159:293-301.
- [11] CHÁVEZ-SERVÍN J L, CASTELLOTE A I, LÓPEZ-SABATER M C. Evolution of potential and free furfural compounds in milk-based infant formula during storage[J]. **Food Research International**, 2006, 39(5):536-543.
- [12] SICILIANO R, REGA B, AMORESANO A, et al. Modern mass spectrometric methodologies in monitoring milk quality[J]. **Analytical Chemistry**, 2000, 72(2):408-415.
- [13] PATEL H A, SINGH H, ANEMA S G, et al. Effects of heat and high hydrostatic pressure treatments on disulfide bonding interchanges among the proteins in skim milk[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2006, 54(9):3409-3420.
- [14] SUN Y X, WANG C N, SUN X M, et al. Protein digestion properties of Xinong Saanen goat colostrum and mature milk using *in vitro* digestion model[J]. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2019, 99(13):5819-5825.
- [15] CHENG J J, MA Y, LI X S, et al. Effects of milk protein-polysaccharide interactions on the stability of cream mix model systems[J]. **Food Hydrocolloids**, 2015, 45:327-336.
- [16] CHEN D, LI X Y, ZHAO X, et al. Proteomics and microstructure profiling of goat milk protein after homogenization[J]. **Journal of Dairy Science**, 2019, 102(5):3839-3850.
- [17] CURLEY D M, KUMOSINSKI T F, UNRUH J J, et al. Changes in the secondary structure of bovine casein by Fourier transform infrared spectroscopy: effects of calcium and temperature[J]. **Journal of Dairy Science**, 1998, 81(12):3154-3162.
- [18] ERBERSDOBLER H F, SOMOZA V. Forty years of furosine - forty years of using Maillard reaction products as indicators of the nutritional quality of foods[J]. **Molecular Nutrition & Food Research**, 2007, 51(4):423-430.
- [19] LI M, ZENG M M, HE Z Y, et al. Increased accumulation of protein-bound N( $\epsilon$ )-(carboxymethyl)lysine in tissues of healthy rats after chronic oral N( $\epsilon$ )-(carboxymethyl)lysine[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2015, 63(5):1658-1663.
- [20] PELLEGRINO L, NONI I, RESMINI P. Coupling of lactulose and furosine indices for quality evaluation of sterilized milk[J]. **International Dairy Journal**, 1995, 5(7):647-659.
- [21] 吴若彤, 王兴伟, 夏书芹, 等. 外源氨基酸对牡蛎肽美拉德反应产物风味特性的调控作用[J]. **食品与生物技术学报**, 2023, 42(3):30-37.
- WU R T, WANG X W, XIA S Q, et al. Flavor characteristics of oyster peptide Maillard reaction products regulated by exogenous amino acids[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2023, 42(3):30-37. (in Chinese)
- [22] 贾晓迪. 全脂液态乳及乳粉中美拉德反应有害产物生成影响因素研究[D]. 无锡: 江南大学, 2019.
- [23] EICHNER K, KAREL M. Influence of water content and water activity on the sugar-amino browning reaction in model systems under various conditions[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 1972, 20(2):218-223.
- [24] THOMSEN M K, LAURIDSEN L, SKIBSTED L H, et al. Temperature effect on lactose crystallization, Maillard reactions, and lipid oxidation in whole milk powder[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2005, 53(18):7082-7090.
- [25] BRANDS C M, VAN BOEKEL M A. Reactions of monosaccharides during heating of sugar-casein systems: building of a reaction network model[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2001, 49(10):4667-4675.
- [26] LIU Y W, ZHANG W J, ZHANG L N, et al. Characterizing the changes of bovine milk serum proteins after simulated industrial processing[J]. **LWT-Food Science and Technology**, 2020, 133:110101.
- [27] WANG C F, ZHU Y Y, WANG J M. Comparative study on the heat stability of goat milk and cow milk[J]. **Indian Journal of Animal Research**, 2016, 50(4):610-613.

(责任编辑:李春丽)