

## 高密度二氧化碳对酪蛋白结构及物理特性的影响

周学府, 郑远荣, 钟宇, 王丹凤, 邓云\*

(上海交通大学农业与生物学院 上海 201100)

乳业生物技术国家重点实验室 上海乳业生物工程技术研究中心 光明乳业股份有限公司乳业研究院 上海 200436)

**摘要** 以酪蛋白为对象,研究高密度二氧化碳(dense phase carbon dioxide,DPCD)处理压强、时间、温度对酪蛋白品质的影响规律。采用圆二色谱和表面疏水性表征酪蛋白二、三级结构变化;通过溶解度、粒径、乳化性及表观黏度反映 DPCD 对酪蛋白界面特性、流动行为等物理特性的影响。结果表明:当处理温度与时间恒定时,增大 DPCD 处理压强,导致酪蛋白二级结构中更多  $\alpha$ -螺旋和无规则卷曲转化为  $\beta$ -折叠,提高其表面疏水性并降低酪蛋白溶解度和表观黏度,同时使其粒径先减小后增大,乳化性先降低后轻微升高;处理时间对酪蛋白的影响规律与压强相似,而对其表观黏度影响不显著。当处理压强与时间恒定时,提高 DPCD 处理温度,可引起酪蛋白二级结构相反的变化,使其表面疏水性先升高后下降,同时引起其溶解度、乳化性降低和粒径急剧增大。结论:DPCD 处理压强、时间、温度变化均可影响酪蛋白结构和物理特性,其中温度影响最为显著。选择低温处理条件可有效保护乳制品在 DPCD 处理后的品质。

**关键词** 高密度二氧化碳;酪蛋白;结构;物理特性

**文章编号** 1009-7848(2022)03-0120-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.03.015

酪蛋白(Casein)是牛乳中关键蛋白质之一,主要由  $\alpha_{s1}$ -酪蛋白、 $\alpha_{s2}$ -酪蛋白、 $\beta$ -酪蛋白和  $\kappa$ -酪蛋白组成。在牛乳中大多数酪蛋白呈胶束球形颗粒,约 10%~20%以溶解或非胶束的形式存在<sup>[1]</sup>。作为一种全蛋白,酪蛋白具有较高的营养价值,并具有良好的功能特性,因而被广泛应用于食品工业<sup>[2]</sup>。

高密度二氧化碳(DPCD)是一种新型的非热加工技术,它通过在温度低于 60 °C,压强低于 50 MPa 的条件下,利用 CO<sub>2</sub> 的分子效应实现杀菌和钝酶的目的,最大限度地保持食品感官和营养品质,延长其保质期<sup>[3]</sup>。DPCD 与传统热处理相比,具有能耗低,对食品品质影响较小等优势,被公认为食品工业具有发展前景的冷杀菌技术<sup>[4]</sup>。

据报道,DPCD 能够在杀灭微生物的同时,影响食品中蛋白质的结构及物理特性<sup>[4-5]</sup>,从而引起食品品质变化。研究表明<sup>[3,6]</sup>,DPCD 能使虾肌球蛋白二级结构中  $\alpha$ -螺旋转化为  $\beta$ -折叠,并破坏肌球蛋白三级结构,与此同时也改变其溶解度、浊度、

黏度等物理特性。目前关于 DPCD 对乳制品特征蛋白结构、功能和品质的影响鲜有研究报道。本试验研究 DPCD 处理前、后酪蛋白结构和物理特性的变化,探究其随压强、时间、温度改变的规律,为乳制品的加工提供参考。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料与仪器

1.1.1 试验材料 酪蛋白酸钠(Casein Sodium,酪蛋白含量  $\geq 90\%$ ),Adamas 公司;Bradford 蛋白浓度测定试剂盒,上海皓嘉科技发展有限公司。

1.1.2 主要仪器 间歇式高密度二氧化碳装置(HKY-1),海安石油科研仪器有限公司;圆二色谱仪(J-815 spectrometer),日本分光公司;多功能酶标仪(M1000),瑞士帝肯公司;纳米粒度分析仪(Zetasizer Nano S),英国 Malvern 公司;流变仪(Haake RS 6000),赛默飞世尔科技(中国)有限公司;均质机(PT 10-35 GT),瑞士 Kinematica 公司。

#### 1.2 试验方法

1.2.1 酪蛋白酸钠溶液制备 称取 0.5 g 酪蛋白酸钠溶解于 50 mL 去离子水,室温下于磁力搅拌器上搅拌 20 min,配制成质量浓度为 10 mg/mL 的酪蛋白酸钠溶液。

收稿日期:2021-03-28

基金项目:上海市闵行区科学技术委员会产学研合作计划项目(2019MHC059)

作者简介:周学府(1997—),男,硕士生

通信作者:邓云 E-mail: y\_deng@sjtu.edu.cn

1.2.2 间歇式 DPCD 处理 首先打开循环水泵和冷箱,使处理釜温度升至设定值并使冷箱温度降至 4℃左右。将 50 mL 蛋白溶液平均分装于 3 个离心管,并放置于 DPCD 处理釜中。密封后打开真空泵抽取处理釜中多余气体,打开 CO<sub>2</sub> 总阀、进气阀以及加压泵,待处理釜中压强升至设定值后关闭阀门和加压泵(升压过程约持续 7 min),样品在恒定温度和压强下保持一段时间。处理结束后打开放气阀缓慢泄压(泄压过程约持续 3 min)。本研究针对压强、温度、时间 3 种因素进行单因素重复试验,设计方案如下:

1) 固定温度 35℃,时间 25 min,设置压力梯度为 5,10,15,20,25,30 MPa;

2) 固定温度 35℃,压强 15 MPa,设置时间梯度为 5,15,25,35,45 min;

3) 固定压强 15 MPa,时间 25 min,设置温度梯度为 35,34,55,65℃,并以相同温度的单纯热处理作为对照。

1.2.3 圆二色谱分析 酪蛋白二级结构通过圆二色谱仪进行测定<sup>[7]</sup>。将蛋白样品用磷酸盐缓冲液(10 mmol/L,pH 7.4)稀释至 0.1 mg/mL。在 25℃条件下,使用光程长度为 1 mm 的石英比色皿在 190~260 nm 的波长范围内以 100 nm/min 的速率扫描,每次扫描进行 3 次重复。使用相同浓度磷酸盐缓冲液对所有测得的光谱进行基线校正。

1.2.4 表面疏水性( $H_0$ ) 使用 1-苯胺基-8-萘磺酸盐(ANS)测定酪蛋白的表面疏水性<sup>[8]</sup>,将每组蛋白样品用磷酸盐缓冲液(10 mmol/L,pH 7.4)稀释至 5 个不同的质量浓度(0.05~0.2 mg/mL),将 10 μL ANS(8 mmol/L)添加至 4 mL 样品溶液中,静置 3 min。用荧光光谱仪在 390 nm(激发波长)和 470 nm(发射波长)下进行测定。荧光强度随蛋白浓度变化的斜率即为相对表面疏水性,进行 3 次重复。

1.2.5 溶解性 将酪蛋白样品于 25℃、8 000 r/min 离心 15 min,取上清液,通过 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒测定上清液可溶性蛋白含量。溶解度按以下公式计算:

$$\text{溶解度}(\%) = \frac{\text{离心后上清液可溶性蛋白含量}(\text{mg/mL})}{\text{离心前蛋白质浓度}(\text{mg/mL})} \times 100 \quad (1)$$

1.2.6 动态光散射(DLS) 通过动态光散射测定蛋白样品的粒径,方法如下<sup>[9]</sup>:将蛋白样品用去离子水稀释至 1 mg/mL,用纳米激光粒度仪测定酪蛋白的粒径,每组样品测定 3 次取其平均值。

1.2.7 表观黏度 酪蛋白溶液的流变学特性通过流变仪评估<sup>[11]</sup>。通过流变仪测定酪蛋白溶液(10 mg/L)表观黏度与剪切速率的函数关系,试验条件:平板间距:1 mm,温度:25℃,剪切速率范围:0.1~100 s<sup>-1</sup>。

1.2.8 乳化性 将 6 mL 酪蛋白溶液(10 mg/mL)和 2 mL 玉米油混合,使用均质机以 10 000 r/min 转速均质 1 min,从离心管底部吸取 20 μL 新鲜配置的乳液,加入至 5 mL 0.01 g/L SDS 溶液中,混合均匀,在 500 nm 处测量吸光度,记为  $A_0$ 。乳液静置 30 min 后,以相同的方法吸取乳液稀释于 SDS 溶液中,在 500 nm 处测量吸光度,记为  $A_{30}$ ,以 0.01 g/L SDS 溶液作为对照,试验进行 3 次重复。酪蛋白的乳化活性(EAI)和乳化稳定性(ESI)计算公式如下:

$$\text{EAI}(\text{m}^2/\text{g}) = \frac{2 \times T \times A_0 \times N}{C \times \Phi \times 10^4} \quad (2)$$

$$\text{ESI}(\text{min}) = \frac{A_0}{30 \times (A_0 - A_{30})} \quad (3)$$

式中: $T=2.303$ ;  $N$ ——稀释倍数;  $C$ ——乳状液形成前蛋白质水溶液中蛋白质的质量浓度, g/mL;  $\Phi$ ——乳状液中油相的体积分数。

1.2.9 数据处理 试验结果以平均值±标准偏差表示,并使用 SPSS 16.0 软件进行分析。使用单因素方差分析(ANOVA)分析数据,并进行 Duncan 的多范围检验以确定平均值之间的差异。结果在  $P<0.05$  时被认为有显著性差异,具有统计学意义。

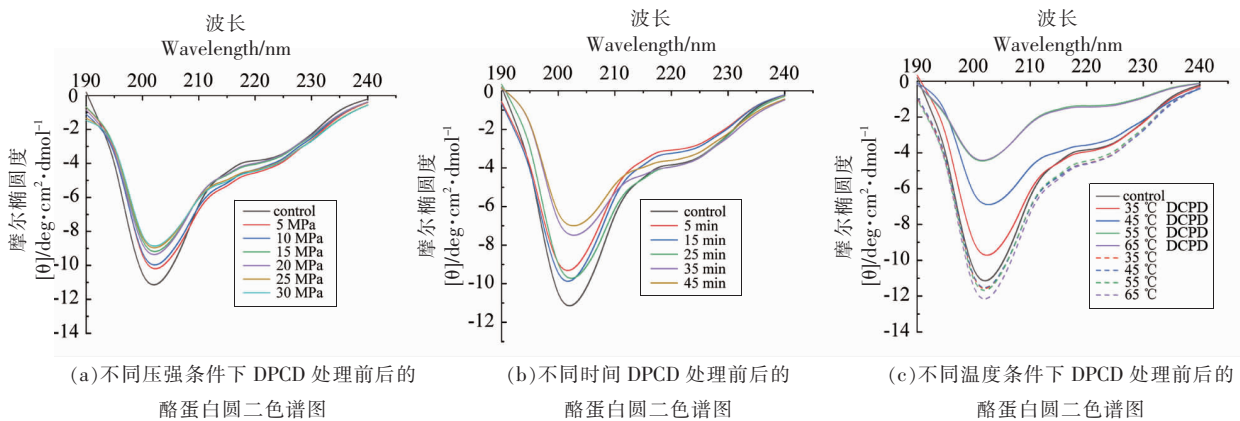
## 2 结果与讨论

### 2.1 二级结构

DPCD 对酪蛋白的二级结构影响如图 1 和表 1 所示。从图 1 看出,酪蛋白 CD 光谱在波长为 200 nm 附近均出现 1 个明显的负峰,表明酪蛋白含有大量的无规则卷曲结构<sup>[12]</sup>,Kong 等<sup>[12]</sup>也发现类似的二级结构特征。经 DPCD 处理后酪蛋白的 CD 光谱信号强度显著降低,意味着处理对酪蛋白二级结构产生显著影响。表 1 显示了 DPCD 处理

前后酪蛋白的4种二级结构含量,能看出酪蛋白二级结构绝大多数呈无规则卷曲,这与CD光谱特征峰分析结果一致。DPCD能够显著降低酪蛋白二级结构中 $\alpha$ -螺旋含量( $P<0.05$ ),尤其在高压(30 MPa)和长时间(45 min)处理条件下其影响更为显著,其 $\alpha$ -螺旋含量从8.15%分别降低至5.65%和5.95%。 $\alpha$ -螺旋含量减少,表明维持酪蛋白结构稳定的氢键部分断裂,使得蛋白质处于伸展状态。但在温度较高处理条件下(55 °C、65 °C),

酪蛋白 $\alpha$ -螺旋含量分别上升至10.1%和8.6%,可能是因为高温和DPCD的协同作用增强了酪蛋白分子相互作用,改变蛋白质氢键取向从而生成更多氢键。另外,35 °C下DPCD使酪蛋白中的 $\beta$ -折叠含量显著增大( $P<0.05$ ),无规则卷曲含量降低,说明其二级结构中 $\alpha$ -螺旋和无规则卷曲存在向 $\beta$ -折叠转化的趋势。DPCD导致蛋白质二级结构发生此类转变在其它蛋白质中也有所报道,例如虾肌球蛋白<sup>[6]</sup>和肌红蛋白<sup>[13]</sup>。



注:Control:对照(未经DPCD处理的酪蛋白)。

图1 DPCD处理前后酪蛋白圆二色谱图

Fig.1 CD spectra of casein before and after DPCD treatment

表1 DPCD对酪蛋白二级结构各组分含量影响

Table 1 The effect of DPCD treatment on second structure fractions of casein

处理条件			$\alpha$ -螺旋	$\beta$ -折叠	$\beta$ -转角	无规则卷曲
压强/MPa	时间/min	温度/°C				
对照	25	35	8.15 ± 0.07 <sup>d</sup>	27.50 ± 0.14 <sup>a</sup>	5.55 ± 0.35 <sup>e</sup>	58.50 ± 0.14 <sup>c</sup>
5			7.00 ± 0.42 <sup>bc</sup>	31.00 ± 0.84 <sup>b</sup>	5.35 ± 0.07 <sup>c</sup>	56.65 ± 0.35 <sup>ab</sup>
10			6.55 ± 0.78 <sup>b</sup>	31.20 ± 1.27 <sup>c</sup>	5.45 ± 0.07 <sup>c</sup>	56.70 ± 0.42 <sup>ab</sup>
15			7.00 ± 0.14 <sup>bc</sup>	31.26 ± 0.21 <sup>c</sup>	4.70 ± 0.14 <sup>b</sup>	57.00 ± 0.28 <sup>b</sup>
20			7.45 ± 0.07 <sup>bc</sup>	30.00 ± 0.56 <sup>c</sup>	5.20 ± 0.42 <sup>bc</sup>	57.30 ± 0.14 <sup>b</sup>
25			7.65 ± 0.07 <sup>c</sup>	27.80 ± 0.42 <sup>a</sup>	6.45 ± 0.21 <sup>d</sup>	58.10 ± 0.28 <sup>c</sup>
30			5.65 ± 0.35 <sup>a</sup>	36.25 ± 0.63 <sup>d</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	56.10 ± 0.27 <sup>a</sup>
15	对照	35	8.15 ± 0.07 <sup>c</sup>	27.50 ± 0.14 <sup>a</sup>	5.55 ± 0.35 <sup>b</sup>	58.50 ± 0.14 <sup>c</sup>
	5		7.35 ± 0.07 <sup>bc</sup>	29.05 ± 0.35 <sup>ab</sup>	4.50 ± 0.14 <sup>b</sup>	59.10 ± 0.14 <sup>c</sup>
	15		6.85 ± 0.05 <sup>b</sup>	28.65 ± 0.77 <sup>ab</sup>	5.70 ± 0.85 <sup>b</sup>	58.80 ± 0.00 <sup>c</sup>
	25		7.35 ± 0.05 <sup>bc</sup>	31.05 ± 0.49 <sup>b</sup>	4.70 ± 0.14 <sup>b</sup>	56.85 ± 0.35 <sup>b</sup>
	35		6.55 ± 0.35 <sup>ab</sup>	37.45 ± 2.33 <sup>c</sup>	0.65 ± 0.91 <sup>a</sup>	55.35 ± 0.92 <sup>ab</sup>
	45		5.95 ± 0.70 <sup>a</sup>	39.55 ± 1.91 <sup>c</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	54.50 ± 1.13 <sup>a</sup>

(续表 1)

处理条件			$\alpha$ -螺旋	$\beta$ -折叠	$\beta$ -转角	无规则卷曲
压强/MPa	时间/min	温度/°C				
15	25	对照	8.15 ± 0.07 <sup>bc</sup>	27.50 ± 0.14 <sup>abc</sup>	5.55 ± 0.35 <sup>d</sup>	58.50 ± 0.14 <sup>c</sup>
		35	7.35 ± 0.07 <sup>b</sup>	31.05 ± 0.49 <sup>c</sup>	4.70 ± 0.14 <sup>cd</sup>	56.85 ± 0.35 <sup>b</sup>
		45	6.05 ± 0.21 <sup>a</sup>	39.35 ± 0.21 <sup>d</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	54.60 ± 0.42 <sup>a</sup>
		55	10.10 ± 0.42 <sup>d</sup>	24.60 ± 0.71 <sup>a</sup>	3.60 ± 0.14 <sup>bc</sup>	61.70 ± 0.42 <sup>e</sup>
		65	8.60 ± 0.87 <sup>bc</sup>	28.80 ± 3.21 <sup>bc</sup>	2.47 ± 1.66 <sup>b</sup>	60.10 ± 1.19 <sup>d</sup>
—	—	35	7.90 ± 0.57 <sup>bc</sup>	28.85 ± 0.92 <sup>b</sup>	4.45 ± 0.21 <sup>cd</sup>	58.80 ± 0.14 <sup>cd</sup>
		45	8.30 ± 0.14 <sup>bc</sup>	28.25 ± 0.21 <sup>bc</sup>	4.45 ± 0.07 <sup>cd</sup>	59.00 ± 0.21 <sup>cd</sup>
		55	8.20 ± 0.00 <sup>bc</sup>	27.60 ± 0.14 <sup>abc</sup>	5.10 ± 0.14 <sup>cd</sup>	59.10 ± 0.00 <sup>cd</sup>
		65	8.45 ± 0.07 <sup>bc</sup>	27.20 ± 0.14 <sup>ab</sup>	5.25 ± 0.35 <sup>cd</sup>	59.10 ± 0.14 <sup>cd</sup>

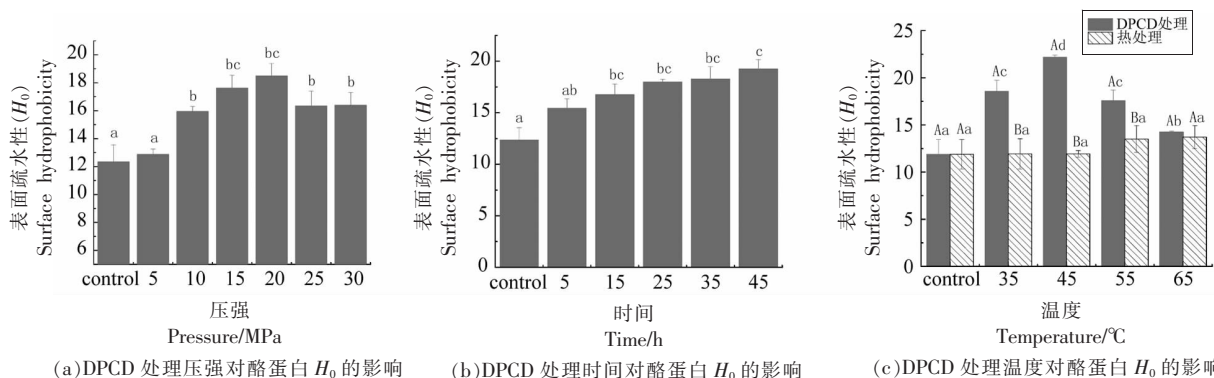
注:不同的小写字母表示压强、时间或温度的影响存在显著差异( $P < 0.05$ );不同的大写字母表示相同温度,经过和未经 DPCD 处理存在显著差异( $P < 0.05$ )。

## 2.2 表面疏水性( $H_0$ )

DPCD 对酪蛋白表面疏水性影响如图 2 所示。随着 DPCD 处理压强增大以及温度升高,酪蛋白表面疏水性先升高后下降,分别在处理压强为 20 MPa,温度为 45 °C 条件下达到最大值(18.49 和 22.16)。而在一定范围内,处理时间越长其表面疏水性越大。

总体而言,DPCD 能够显著增大酪蛋白的表面疏水性( $P < 0.05$ ),暴露出埋藏于分子内部的疏

水性基团,其归因于超临界  $\text{CO}_2$  作为疏水性溶剂,能与蛋白质结构中疏水性基团反应,对蛋白质表面疏水性起修饰作用<sup>[14]</sup>。Ding 等<sup>[14]</sup>和 Sheng 等<sup>[15]</sup>的研究也存在相似结果,其研究表明,经 DPCD 处理后的蛋清和全蛋液的表面疏水性显著上升。而在本研究中,高压(25, 30 MPa)以及高温(55, 65 °C)导致酪蛋白表面疏水性降低是因为高压和高温可导致疏水性基团相互结合而重新掩埋于蛋白质分子内部<sup>[6]</sup>。



注:Control:对照(未经 DPCD 处理),不同的小写字母表示压强、时间、温度的影响存在显著差异( $P < 0.05$ );不同的大写字母表示相同温度,经过和未经 DPCD 处理存在显著差异( $P < 0.05$ )。

图 2 DPCD 对酪蛋白表面疏水性影响

Fig.2 The effect of DPCD on the surface hydrophobicity of casein

## 2.3 物理特性

2.3.1 溶解度 DPCD 对酪蛋白溶解度影响如表 2 所示。与未处理的酪蛋白相比,经 DPCD 处理后酪蛋白溶解度显著降低 ( $P < 0.05$ )。其原因是  $\text{CO}_2$

降低了体系 pH 值及其对酪蛋白碱性氨基酸的修饰作用<sup>[16-17]</sup>。

由表 2 可知,随着处理压强增大以及处理时间延长,酪蛋白溶解度呈降低趋势,其归因于升压



能增大 CO<sub>2</sub> 在水中的密度与溶解度以及长时间处理使 CO<sub>2</sub> 得以充分溶解与扩散,从而增强 CO<sub>2</sub> 分子效应。对于温度影响而言,单纯热处理未能影响酪蛋白溶解度,而高温条件(55,65 °C)下 DPCD 使其溶解度急剧下降,从 93.98%分别降至 38.62%和 42.68%,这与酪蛋白二、三级结构的异常变化相关。溶解度作为酪蛋白重要的物理性质之一,与其它功能性质如乳化性、起泡性存在紧密联系<sup>[18]</sup>。因此考虑到 DPCD 对酪蛋白溶解度影响,在相同杀菌效果前提下,选择较低的 DPCD 处理压强、温度和较短处理时间对乳制品进行杀菌能减少酪蛋白的沉淀。

2.3.2 粒径 表 2 显示了 DPCD 处理前后的平均粒径,可用于分析酪蛋白的分子链构象、聚集体尺寸及形态。由表 2 可知酪蛋白粒径随 DPCD 处理

压强升高和处理时间延长先减小后增大;温度方面,升高处理温度能够引起酪蛋白粒径突增,尤其在 55 °C 处理温度下,其粒径突变至 1 030.43 nm。

以上结果表明,DPCD 对酪蛋白粒径的影响是处于使其解离和聚集的动态平衡中<sup>[19]</sup>,在高压(30 MPa)、长时间(45 min)以及较高温(45,55,65 °C)的处理条件下,DPCD 对酪蛋白聚集效应大于解离效应而引起其粒径增大,而其它条件下 DPCD 对酪蛋白存在轻微解离效应。蛋白质的解离可能是因为 DPCD 处理过程中,溶液中不仅存在酪蛋白间的相互作用,同时也存在 CO<sub>2</sub> 与蛋白质的相互作用,如疏水相互作用、氢键、静电作用<sup>[20]</sup>等,从而导致蛋白间的相互作用减弱而解离<sup>[19]</sup>。高温(55,65 °C)下 DPCD 诱导酪蛋白粒径的突变与二级结构、表面疏水性变化相符,再次印证

表 2 DPCD 对酪蛋白物理性质的影响

Table 2 The effect of DPCD treatment on physical properties of casein

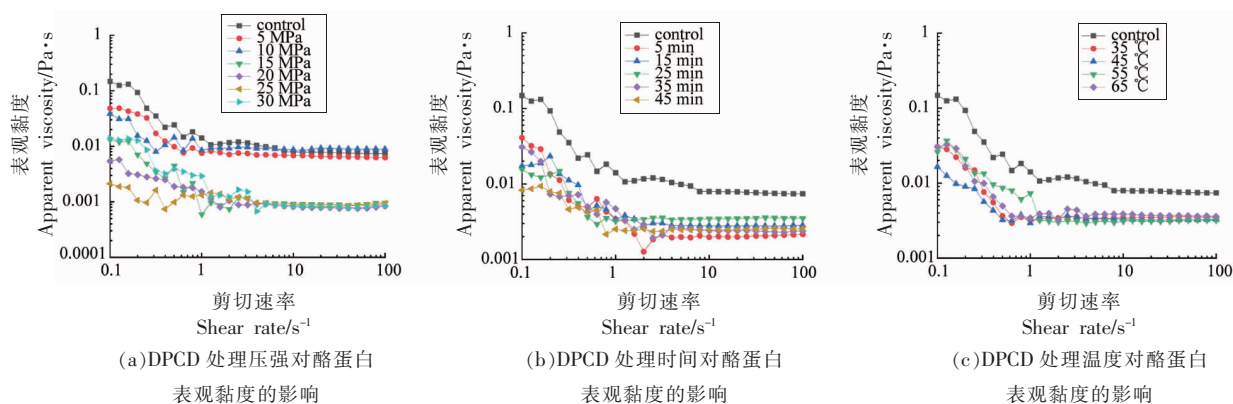
处理条件			溶解度/%	粒径/nm	乳化性	
压强/MPa	时间/min	温度/°C			乳化活性/m <sup>2</sup> ·g <sup>-1</sup>	乳化稳定性×10 <sup>3</sup> /min
对照	25	35	96.30 ± 1.57 <sup>d</sup>	225.06 ± 0.96 <sup>c</sup>	6.38 ± 0.11 <sup>d</sup>	10.27 ± 0.46 <sup>d</sup>
	5		86.01 ± 1.50 <sup>e</sup>	206.93 ± 3.61 <sup>a</sup>	4.41 ± 0.15 <sup>c</sup>	4.28 ± 0.43 <sup>b</sup>
	10		77.17 ± 2.25 <sup>b</sup>	213.26 ± 0.91 <sup>b</sup>	3.95 ± 0.06 <sup>a</sup>	3.62 ± 0.12 <sup>a</sup>
	15		75.72 ± 1.75 <sup>b</sup>	217.70 ± 1.82 <sup>b</sup>	4.11 ± 0.06 <sup>b</sup>	3.56 ± 0.16 <sup>a</sup>
	20		77.17 ± 1.30 <sup>b</sup>	223.50 ± 2.88 <sup>c</sup>	4.42 ± 0.04 <sup>c</sup>	4.46 ± 0.12 <sup>c</sup>
	25		74.27 ± 1.76 <sup>b</sup>	225.57 ± 4.41 <sup>c</sup>	4.47 ± 0.06 <sup>c</sup>	4.90 ± 0.15 <sup>bc</sup>
	30		61.52 ± 2.17 <sup>a</sup>	275.93 ± 2.30 <sup>d</sup>	4.48 ± 0.04 <sup>c</sup>	4.84 ± 0.11 <sup>c</sup>
15	对照	35	98.04 ± 3.39 <sup>e</sup>	225.07 ± 0.96 <sup>bc</sup>	6.38 ± 0.11 <sup>d</sup>	10.27 ± 0.46 <sup>d</sup>
	5		84.85 ± 4.35 <sup>d</sup>	216.80 ± 3.15 <sup>a</sup>	4.50 ± 0.10 <sup>bc</sup>	4.56 ± 0.19 <sup>b</sup>
	15		84.42 ± 3.32 <sup>d</sup>	216.80 ± 1.45 <sup>a</sup>	4.31 ± 0.09 <sup>ab</sup>	4.58 ± 0.21 <sup>b</sup>
	25		79.92 ± 1.32 <sup>bc</sup>	212.2 ± 4.46 <sup>a</sup>	4.07 ± 0.15 <sup>a</sup>	3.50 ± 0.16 <sup>a</sup>
	35		77.31 ± 2.39 <sup>ab</sup>	222.17 ± 1.91 <sup>b</sup>	4.73 ± 0.21 <sup>c</sup>	5.51 ± 0.14 <sup>c</sup>
	45		72.82 ± 4.14 <sup>a</sup>	229.2 ± 2.43 <sup>c</sup>	4.48 ± 0.09 <sup>bc</sup>	4.73 ± 0.18 <sup>b</sup>
15	25	对照	93.98 ± 1.32 <sup>d</sup>	225.07 ± 0.96 <sup>a</sup>	6.38 ± 0.11 <sup>d</sup>	10.27 ± 0.46 <sup>d</sup>
		35°C	74.56 ± 3.04 <sup>e</sup>	222.17 ± 1.91 <sup>a</sup>	4.10 ± 0.06 <sup>b</sup>	3.56 ± .016 <sup>a</sup>
		45°C	62.82 ± 6.08 <sup>bc</sup>	264.43 ± 6.28 <sup>b</sup>	3.84 ± 0.17 <sup>a</sup>	3.30 ± 0.34 <sup>a</sup>
		55°C	38.62 ± 1.96 <sup>ab</sup>	1030.43 ± 52.49 <sup>d</sup>	3.89 ± 0.04 <sup>ab</sup>	3.55 ± 0.13 <sup>a</sup>
		65°C	42.68 ± 0.66 <sup>a</sup>	389.60 ± 7.60 <sup>c</sup>	3.96 ± 0.09 <sup>ab</sup>	3.57 ± 0.23 <sup>a</sup>
—	—	35°C	92.24 ± 0.66 <sup>d</sup>	223.2 ± 2.82 <sup>a</sup>	6.44 ± 0.09 <sup>d</sup>	9.95 ± 0.30 <sup>d</sup>
		45°C	94.56 ± 1.99 <sup>d</sup>	212.23 ± 2.94 <sup>a</sup>	5.96 ± 0.23 <sup>c</sup>	8.78 ± 0.88 <sup>c</sup>
		55°C	93.69 ± 1.30 <sup>d</sup>	206.33 ± 2.90 <sup>a</sup>	5.75 ± 0.15 <sup>c</sup>	7.89 ± 0.49 <sup>b</sup>
		65°C	99.49 ± 1.32 <sup>d</sup>	197.57 ± 5.54 <sup>a</sup>	6.46 ± 0.14 <sup>d</sup>	10.50 ± 0.59 <sup>d</sup>

注:不同的小写字母表示压强、时间或温度的影响存在显著差异( $P < 0.05$ );不同的大写字母表示相同温度,经过和未经 DPCD 处理存在显著差异( $P < 0.05$ )。

高温和DPCD 存在一定协同作用,共同引起酪蛋白聚集沉淀。蛋白质粒径可影响其吸收率和食品感官品质<sup>[21]</sup>,蛋白较小粒径赋予食品细腻的口感和更高的消化吸收率。因此,DPCD 对乳制品杀菌过程中应避免较高的处理温度以及处理压强。

**2.3.3 表观黏度** DPCD 处理前后的酪蛋白溶液的流动行为如图 3 所示。酪蛋白在剪切速率 ( $0.01\sim 1\text{ s}^{-1}$ ) 范围内表现出较强的假塑性行为,而在 ( $1\sim 100\text{ s}^{-1}$ ) 范围内其表观黏度变化不显著,近似于牛顿流体。虽然 DPCD 对酪蛋白结构具有破坏作用,但仍未改变其剪切稀化的流动行为。由图 3 可知,DPCD 显著降低酪蛋白的表观黏度,其原因一方面来自于较小的粒径导致酪蛋白体系流动性增强<sup>[22]</sup>。另一方面,蛋白质黏度与其溶解度存在一

定关系<sup>[23]</sup>,只有同时具备高溶解度以及强吸水性才能产生高黏度体系。因此受 DPCD 影响,酪蛋白溶解度降低使得酪蛋白与水的体系表观黏度下降,这也能解释高温处理条件下酪蛋白粒径增大但表观黏度降低的现象。范金波等<sup>[24]</sup>与 Sheng 等<sup>[15]</sup>有相似的研究结果,全蛋液和蛋清液经 DPCD 处理后黏度也显著降低。但由图 3 可知,相比于温度与时间因素对酪蛋白表观黏度影响,处理压强对其影响更为显著。当压强大于 10 MPa 时,其表观黏度急剧降低。乳制品的黏度与感官品质之间存在相关关系<sup>[25]</sup>,过高或过低的黏度都不利于乳制品的加工,因此控制处理压强是维持乳制品黏度的有效手段。



注:Control:对照(未经 DPCD 处理的酪蛋白)。

图 3 DPCD 对酪蛋白表观黏度的影响

Fig.3 The effect of DPCD treatment on viscosity profile of casein

**2.3.4 乳化性** DPCD 对酪蛋白乳化活性(EAI) 乳化稳定性(ESI)影响如表 2 所示。乳化活性表征了乳剂形成过程中蛋白质在油水界面快速吸附的能力<sup>[26]</sup>,由表 2 可知,总体上 DPCD 处理降低了酪蛋白的乳化活性,这一现象可通过溶解度和表面疏水性变化解释。蛋白质乳化活性与其溶解度相关,DPCD 处理后酪蛋白较差的溶解性使其吸附于油水界面的分子数量减少,从而限制其乳化活性<sup>[27]</sup>。另外 DPCD 对酪蛋白表面疏水性的修饰作用使其本身亲水性/疏水性平衡被破坏,使酪蛋白在界面处的吸附能力降低,从而降低其乳化活性<sup>[28]</sup>。乳化稳定性方面,DPCD 导致酪蛋白乳化稳

定性显著降低 ( $P<0.05$ ),可归因于由 DPCD 引起的酪蛋白表观黏度的下降导致分子分散于油水界面的稳定性降低,不能有效阻止乳化液滴絮凝而使其乳化稳定性下降。但随着压强升高和处理时间延长,其乳化性存在轻微上升趋势,这可能与酪蛋白溶液浊度变化有关。由此可见,DPCD 对酪蛋白乳化活性和乳化稳定性存在不利影响,一定程度上影响了酪蛋白的加工特性。

### 3 结论

DPCD 通过影响酪蛋白二、三级结构来改变其物理特性,从而影响乳制品品质。35 °C 条件下

DPCD 将酪蛋白二级结构中  $\alpha$ -螺旋和无规则卷曲结构转化为  $\beta$ -折叠,并增大其表面疏水性。但高温与 DPCD 的协同作用可引起酪蛋白二、三级结构相反的变化。基于其对酪蛋白结构影响,35℃条件下 DPCD 可降低酪蛋白溶解度并且能对蛋白质分子起轻微解离作用,但高温处理条件下酪蛋白溶解度降低趋势更明显且更容易发生聚集而发生粒径的突变。而 DPCD 对酪蛋白流动行为和界面特性影响表现在其引起酪蛋白表观黏度和乳化性的降低。总而言之,高温可增强酪蛋白对 DPCD 的敏感性而使其品质更容易被破坏,因此用 DPCD 对乳制品进行杀菌时低温(35℃)处理能有效维持酪蛋白的物理特性。然而,在实际生产过程中,还需和 DPCD 的杀菌效果以及能耗相结合,实现在充分杀菌的同时,最低限度地影响乳制品品质。

### 参 考 文 献

- [1] HAN T L, WANG M Y, WANG Y, et al. Effects of high-pressure homogenization and ultrasonic treatment on the structure and characteristics of casein[J]. LWT, 2020, 130: 109560.
- [2] 苏银杰,王金水,高芸芳.酪蛋白酶解特性的研究[J].食品科技,2013,38(1):62-65.  
SU Y J, WANG J S, GAO Y F. Enzymatic characterization of the casein[J]. Food Science and Technology, 2013, 38(1): 62-65.
- [3] YAN W J, XIE Y Y, WANG X X, LI X M, et al. The effect of dense phase carbon dioxide on the conformation of hemoglobin[J]. Food Research International, 2018, 106: 885-891.
- [4] 周学府,郑远荣,刘振民,等.高密度二氧化碳对食品中蛋白质结构及其加工特性影响研究进展[J].乳业科学与技术,2020,43(1):39-44.  
ZHOU X F, ZHENG Y R, LIU Z M, et al. A review of recent research on the effect of dense phase carbon dioxide on protein structure and processing characteristics in foods[J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2020, 43(1): 39-44.
- [5] 陈亚励.高密度 CO<sub>2</sub>对凡纳滨对虾肌球蛋白物理特性的影响[D].湛江:广东海洋大学,2015.  
CHEN Y L. Effect of dense phase carbon dioxide on physical properties of *Litopenaeus vannamei* myosin[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2015.
- [6] 屈小娟.高密度 CO<sub>2</sub>对凡纳滨对虾肌肉品质和蛋白质特性的影响[D].湛江:广东海洋大学,2013.  
QU X J. Effects of dense phase carbon dioxide on muscle qualities and protein characteristics of *Litopenaeus vannamei*[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2013.
- [7] GUO M H, LIU S C, ISMAIL M, et al. Changes in the myosin secondary structure and shrimp surimi gel strength induced by dense phase carbon dioxide[J]. Food Chemistry, 2017, 227: 219-226.
- [8] ZHANG Q J, YANG L, HU S T, et al. Consequences of ball-milling treatment on the physicochemical, rheological and emulsifying properties of egg phosvitin[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 95: 418-425.
- [9] 朱玉英,王存芳,王建民.羊乳酪蛋白的乳化性质和热稳定性研究[J].食品工业,2017,38(7):84-88.  
ZHU Y Y, WANG C F, WANG J M. Study on emulsifying properties and thermal stability of casein extracted from foat milk[J]. The Food Industry, 2017, 38(7): 84-88.
- [10] 石燕,葛辉,涂宗财,等.超声波对酪蛋白结构与功能性质的影响[J].食品与发酵工业,2014,40(2):16-21.  
SHI Y, GE H, TU Z C, et al. Effects of ultrasound treatment on structure and functional properties of casein[J]. Food and Fermentation Industries, 2014, 40(2): 16-21.
- [11] JIANG Y L, ZHOU X F, ZHENG Y R, et al. Impact of ultrasonication/shear emulsifying/microwave-assisted enzymatic extraction on rheological, structural, and functional properties of *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz. seed protein isolates[J]. Food Hydrocolloids, 2021, 112: 106355.
- [12] KONG F H, KANG S M, AN Y J, et al. The effect of non-covalent interactions of xylitol with whey protein and casein on structure and functionality of protein[J]. International Dairy Journal, 2020, 111: 104841.
- [13] YAN W J, XU B C, JIA F, et al. The Effect of high-pressure carbon dioxide on the Skeletal Muscle Myoglobin[J]. Food and Bioprocess Technology, 2016, 9(10): 1-8.
- [14] DING L X, ZHAO Q N, ZHOU X, et al. Changes

- in protein structure and physicochemical properties of egg white by super critical carbon dioxide treatment[J]. *Journal of Food Engineering*, 2020, 284: 110076.
- [15] SHENG L, ZU L L, MA M H. Study of high pressure carbon dioxide on the physicochemical, interfacial and rheological properties of liquid whole egg[J]. *Food Chemistry*, 2021, 337: 127989.
- [16] 刘书成, 陈亚励, 郭明慧, 等. 高密度 CO<sub>2</sub> 处理过程中虾肌球蛋白溶液浊度和溶解度的变化[J]. *食品科学*, 2017, 38(19): 42-48.
- LIU S C, CHEN Y L, GUO M H, et al. Change in turbidity and solubility of myosin solution from *Litopenaeus vannamei* treated by dense phase carbon dioxide[J]. *Food Science*, 2017, 38(19): 42-48.
- [17] 陈亚励, 屈小娟, 郭明慧, 等. 高密度 CO<sub>2</sub> 在肉制品和水产品加工中的应用[J]. *现代食品科技*, 2014, 30(9): 304-311.
- CHEN Y L, QU X J, GUO M H, et al. Application of dense phase carbon dioxide in the processing of meat and aquatic products[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 30(9): 304-311.
- [18] 郭超凡, 张振娜, 刘艳, 等. 射频加热对大豆分离蛋白功能性质的影响[J]. *中国食品学报*, 2019, 19(3): 48-54.
- GUO C F, ZHANG Z N, LIU Y, et al. Effects of radio frequency heating treatment on functional properties of soy protein isolate[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2019, 19(3): 48-54.
- [19] 刘书成, 董安迪, 罗帅, 等. 高密度 CO<sub>2</sub> 对虾肌球蛋白微观形貌的影响[J]. *肉类研究*, 2018, 32(2): 15-21.
- LIU S C, DONG A D, LUO S, et al. Effect of dense phase carbon dioxide on micromorphology of myosin from *Litopenaeus vannamei* muscle[J]. *Meat Research*, 2018, 32(2): 15-21.
- [20] LIU S C, LIU Y, LUO S, et al. Molecular dynamics simulation of the interaction between dense phase carbon dioxide and the myosin heavy chain[J]. *Journal of CO<sub>2</sub> Utilization*, 2017, 21: 270-279.
- [21] 崔亚丽, 李莹莹, 栾广忠, 等. 豆浆粒径与豆浆品质的关系研究[J]. *大豆科学*, 2012, 31(1): 103-107.
- CUI Y L, LI Y Y, LUAN G Z, et al. Relationship between particle size and quality of soymilk[J]. *Soybean Science*, 2012, 31(1): 103-107.
- [22] 傅玉颖, 武肖, 潘伟春, 等. 高浓度下热诱导大豆蛋白聚集体流变特性研究[J]. *农业机械学报*, 2014, 45(7): 196.
- FU Y Y, WU X, PAN W C, et al. Heat-induced soybean protein aggregates and rheological properties of their concentrated suspensions[J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2014, 45(7): 196.
- [23] 黄友如, 华欲飞, 裘爱泳. 大豆分离蛋白功能性质及其影响因素[J]. *粮食与油脂*, 2003(5): 12-15.
- HUANG Y R, HUA Y F, QIU A Y. Functional properties of soy protein isolate and affecting factors [J]. *Journal of Cereals & Oils*, 2003(5): 12-15.
- [24] 范金波, 王瑞环, 周素珍, 等. 不同杀菌方法对蛋清物化性质的影响[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(11): 143-146.
- FAN J B, WANG R H, ZHOU S Z, et al. The effect of different sterilization methods on the physical and chemical properties of egg white liquid[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2014, 35(11): 143-146.
- [25] SHOEMAKER C F, NANTZ J, BONNANS S, et al. Rheological characterization of dairy products[J]. *Food Technol*, 1992, 46(1): 98-104.
- [26] SHEVKANI K, SINGH N, RANA J C, et al. Relationship between physicochemical and functional properties of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) protein isolates[J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2014, 49(2): 541-550.
- [27] 李向阳, 李盼盼, 董海洲, 等. 银杏蛋白功能特性研究[J]. *中国食品学报*, 2013, 13(2): 60-66.
- LI X Y, LI P P, DONG H Z, et al. Study on the functional characteristics of ginkgo biloba protein[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2013, 13(2): 60-66.
- [28] JIANG H, XING Z, WANG Y, et al. Preparation of allicin-whey protein isolate conjugates: Allicin extraction by water, conjugates' ultrasound-assisted binding and its stability, solubility and emulsibility analysis [J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2020, 63: 104981.



## The Effect of DPCD on the Structure and Physical Properties of Casein

Zhou Xuefu, Zheng Yuanrong, Zhong Yu, Wang Danfeng, Deng Yun\*

(School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 201100)

State Key Laboratory of Dairy Biotechnology, Shanghai Engineering Research Center of Dairy Biotechnology,

Dairy Research Institute, Bright Dairy & Food Co., Ltd., Shanghai 200436)

**Abstract** Dense phase carbon dioxide (DPCD) is a promising non-thermal sterilization technology. In order to explore the effect of DPCD on the quality of casein in dairy products. We took casein as the research object and studied the effect of DPCD treatment pressure, time and temperature on the structure and physical properties of casein. The secondary and tertiary structure changes of casein are characterized by circular dichroism and surface hydrophobicity. And the effect of DPCD on the physical properties of casein such as interface properties and flow behavior are reflected by solubility, particle size, emulsibility and viscosity. The results show that when the treatment temperature and time are constant, increasing the DPCD treatment pressure will cause more  $\alpha$ -helices and random coils to be converted into  $\beta$ -sheets in the secondary structure of casein, improve its surface hydrophobicity, and reduce its solubility and apparent viscosity, at the same time make its particle size and emulsibility first decrease and then increase. The effect of treatment time on casein is similar to pressure, but its effect on apparent viscosity is not significant; When the treatment pressure and time are constant, increasing the DPCD treatment temperature may cause the opposite change in the secondary structure of casein, and make its surface hydrophobicity increase first and then decrease, at the same time cause the reduction of its solubility, emulsibility and increase its particle size sharply. In summary, the pressure, time, and temperature of DPCD treatment affect the structure and physical properties of casein, among which temperature has the most significant effect. Therefore, the low temperature treatment conditions can effectively protect the quality of dairy products after DPCD treatment.

**Keywords** dense phase carbon dioxide; casein; structure; physical properties