

# 酪蛋白-汉麻籽蛋白复合物制备工艺优化及其消化性和致敏性研究

王丹凤<sup>1</sup>, 薛舒苑<sup>2</sup>, 周学府<sup>1</sup>, 钟宇<sup>1</sup>, 郑远荣<sup>3</sup>, 邓云<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>上海交通大学农业与生物学院 上海 201100

<sup>2</sup>内蒙古农业大学 呼和浩特 010018

<sup>3</sup>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** 以谷氨酰胺转氨酶(TG 酶)酶活、处理时间和酪蛋白/汉麻籽蛋白质量比为自变量,采用响应面法(RSM)优化酪蛋白-汉麻籽蛋白复合物的制备工艺,测定最优工艺下复合物的体外消化率、致敏性、微观结构。结果表明,复合物制备最优工艺条件为: TG 酶酶活 31.90 U/g,交联时间 2.06 h,酪蛋白/汉麻籽蛋白质量比 10.51:1.49。在最优工艺条件下,酪蛋白-汉麻籽蛋白复合物的抗消化酶酶解能力增强,致敏性在消化前或轻度水解时比未交联蛋白低。此外, TG 酶交联改变了蛋白的微观形貌,证实两种蛋白间存在相互作用。

**关键词** 酪蛋白; 汉麻籽蛋白; 消化性; 致敏性

**文章编号** 1009-7848(2023)07-0267-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.07.028

酪蛋白(Casein)占牛奶蛋白的 80%左右,是牛奶中最主要的蛋白质,由  $\alpha_{s1}$ -、 $\alpha_{s2}$ -、 $\beta$ -和  $\kappa$ -casein 组成,分子质量在 19~24 ku 之间,具有独特的结构和功能特性。酪蛋白是牛奶的主要过敏原,其中  $\alpha_{s1}$ -casein 致敏性最强,牛奶过敏人群中约有 65%对  $\alpha_{s1}$ -casein 过敏<sup>[1]</sup>。对  $\alpha_{s1}$ -casein 的致敏性及降低其致敏性研究至今仍是热点<sup>[2-5]</sup>。

汉麻籽蛋白(Hemp protein isolate, HPI)由 70%左右的麻仁球蛋白和 30%左右的白蛋白组成,是一种新兴的植物蛋白源。研究显示,白蛋白比麻仁球蛋白的二级结构更有序<sup>[6]</sup>。HPI 包含所有必需氨基酸(EAA)<sup>[7]</sup>,必需氨基酸指数(>80)显著高于其它植物蛋白,如板栗蛋白(76~79)、藜麦种子蛋白(79)<sup>[8]</sup>。此外, HPI 几乎没有致敏性且抗营养因子含量极低,有助于其在食品工业中的广泛应用<sup>[9]</sup>。

食品配方中植物蛋白替代动物蛋白已成为重要趋势<sup>[10]</sup>。HPI 因独特的营养特性和低致敏性而被认为是酪蛋白优良的替代品<sup>[11]</sup>。然而, HPI 较差的

溶解性和加工特性使其简单地替换酪蛋白会对食品品质产生不利影响。如何降低 HPI 对其替代后的动植物蛋白复合体系的影响鲜有报道。谷氨酰胺转氨酶(TG 酶)能诱导蛋白质分子间或分子内的共价交联,进而修饰蛋白特性<sup>[12]</sup>。通过 TG 酶强化酪蛋白与 HPI 间的相互作用,以实现 HPI 对酪蛋白的部分替代,具有降低 HPI 对食品体系不利影响的潜力。本团队前期研究已证实 Casein-HPI 复合物具有更强的乳化性、凝胶性,而交联降低了复合物的抗氧化性。本文采用响应面法优化 Casein-HPI 复合物的制备工艺,目的是制备具有最优乳化活性、凝胶持水率和抗氧化性保留率的复合蛋白。考察最优工艺下制备的复合物的体外消化率、致敏性、微观结构,旨在为实现 HPI 替代或部分替代酪蛋白提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与试剂

汉麻籽,巴马十琅生态农业有限公司。

酪蛋白(C3400-500 g),上海 Sigma 公司。胃蛋白酶、胰蛋白酶,国药集团化学试剂有限公司;谷氨酰胺转氨酶,江苏一鸣生物股份有限公司。

### 1.2 主要仪器与设备

D-1903 扫描电子显微镜,德国 WITec 公司;UV-1800 紫外分光光度计,岛津国际贸易(上海)

收稿日期: 2022-07-14

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);上海市科学技术委员会工程中心建设项目(16DZ2281400)

第一作者: 王丹凤,女,硕士,实验师

通信作者: 邓云 E-mail: y\_deng@sjtu.edu.cn

有限公司;PT 10-35GT 均质机, 瑞士 Kinematica 公司;Z326K 低温离心机, 德国哈默股份公司;Triad 冷冻干燥机, 美国 Labconoco 公司。

### 1.3 试验方法

1.3.1 HPI 提取 参照 Alavi 等<sup>[13]</sup>的方法, 粉碎后的汉麻籽粉中添加正己烷(0.33 g/mL)搅拌 2 h 脱脂, 该过程重复 3 次。将脱脂后的汉麻籽粉置于通风橱中, 室温(20 ℃)下风干 24 h, 后将汉麻籽粉分散在去离子水中(0.1 g/mL), 用 6 mol/L NaOH 调节 pH 值至 11, 并在 25 ℃下连续搅拌 2 h。将混合物在 6 000×g 下离心 10 min, 取上清液, 用 6 mol/L HCl 调节 pH 值至 4.5, 并在 4 ℃下过夜以沉淀蛋白质。沉淀通过 6 000×g 离心 10 min 分离, 然后分散于蒸馏水中并调节 pH 值至 7.0, 最后将混合物冻干, 并在 4 ℃下储存备用。

1.3.2 Casein-HPI 复合物的制备 Casein-HPI 的制备参考 Yang 等<sup>[14]</sup>的方法。将酪蛋白溶液(6%)和 HPI 溶液(6%)以一定比例混合, 加入 TG 酶并充分搅拌后, 在 40 ℃条件下水浴交联一段时间。交联结束后在 80 ℃下水浴 10 min, 使 TG 酶失活以终止反应。蛋白溶液经真空冷冻干燥, 并于 4 ℃保存备用。

#### 1.3.3 Casein-HPI 复合物制备条件的响应面设计

1) 因素及水平 通过单因素实验, 根据 Box-Behnken 设计原理, 采用三因素三水平的响应面分析法, 研究其对 Casein-HPI 复合物乳化活性、抗氧化性保留率和凝胶持水率的影响。因素及水平见表 1。

2) 响应面试验方案 试验方案由 Design-Expert 8.0 软件随机生成, 如表 2 所示。

3) 最优工艺选择 在 Design-Expert 软件中选择乳化活性、抗氧化性保留率和凝胶持水率均最高的值(各指标的权重为 1:1:1), 由软件进行最优工艺选择, 使用 RSM 法预测最优工艺和处理效果, 从而得到 Casein-HPI 复合物最优的制备工艺。

4) 最优工艺验证 按照最优工艺制备 Casein-HPI 复合物, 测定其乳化活性、抗氧化性保留率和凝胶持水率, 并与软件计算出的理论值对比, 验证试验结果与实际检测结果的一致性与可靠性。

表 1 响应面的因素及水平

因素	水平		
	-1	0	1
TG 酶酶活/ $U \cdot g^{-1}$	10	30	50
时间/h	1	2	3
Casein/HPI(质量比)	11:1	10:2	9:3

表 2 响应面试验方案设计

组别	TG 酶酶活/ $U \cdot g^{-1}$	时间/h	Casein/HPI(质量比)
1	30	1	9:3
2	50	2	11:1
3	10	3	10:2
4	30	1	11:1
5	50	3	10:2
6	30	2	10:2
7	50	2	9:3
8	30	2	10:2
9	30	3	11:1
10	30	2	10:2
11	10	2	11:1
12	30	2	10:2
13	30	2	10:2
14	50	1	10:2
15	10	2	9:3
16	30	3	9:3
17	10	1	10:2

1.3.4 乳化活性测定 蛋白质的乳化活性指数(EAI)测定参照 Jiang 等<sup>[15]</sup>的方法并稍作修改。将 6 mL 质量浓度为 2.5 mg/mL 蛋白质样品与 3 mL 大豆油混合以制备水包油乳液, 并使用均质器以 10 000 r/min 均质 1 min。然后吸取 30  $\mu$ L 乳液加入至 3 mL SDS(1 g/L)溶液中, 于波长 500 nm 处测量吸光度。根据式(1)计算 EAI:

$$EAI(m^2/g) = \frac{2 \times T \times A_0 \times D}{C \times \Phi \times 10^4} \quad (1)$$

式中, T——log 与 ln 的换算常数,  $\ln 10 \approx 2.303$ ;  $A_0$ ——稀释的乳液吸光度; D——稀释倍数(100); C——蛋白溶液质量浓度(2.5 mg/mL);  $\Phi$ ——油相体积分数(1/3)。

1.3.5 凝胶持水率测定 将葡萄糖酸内酯(GDL)粉末以 0.2 g/g 蛋白质的比例添加到 Casein-HPI

溶液(60 mg/mL)中,40 ℃孵育 3 h,将凝胶样品转移到 4 ℃下稳定 24 h。凝胶持水率测定参照 Tang 等<sup>[16]</sup>的方法并稍作修改。凝胶样品以 2 000×g 离心 15 min。根据式(2)通过凝胶中的水损失计算持水率(WHC):

$$\text{WHC}(\%) = \frac{M_1 - M_2}{M_1} \times 100 \quad (2)$$

式中, $M_1$ ——离心前的凝胶质量(g); $M_2$ ——离心后去除水分的凝胶质量(g)。

1.3.6 抗氧化保留率测定 复合物抗氧化性通过 ABTS 法测定,具体参照 Jiang 等<sup>[17]</sup>的方法,其保留率为交联后与交联前复合物抗氧化能力的比值。将 7.4 mmol/L ABTS 溶液加到 2.6 mmol/L 过硫酸钾中,使用前室温下暗处静置至少 12 h。然后将 ABTS 溶液用 5 mmol/L pH 7.0 的磷酸钠缓冲盐水溶液稀释,直至在波长 734 nm 下的吸光度达到 0.7±0.02。测定时,将 1 mL 蛋白样品加到 2 mL 稀释的 ABTS 溶液中。室温下反应 6 min 后,用酶标仪在波长 734 nm 处测定样品的吸光值  $A_s$ 。以蒸馏水为空白对照测定的吸光值为  $A_c$ 。抗氧化性保留率计算公式如下:

$$\text{抗氧化性保留率}(\%) = \frac{1 - (A_s/A_c)}{1 - (A_{s0}/A_c)} \times 100 \quad (3)$$

式中, $A_{s0}$ ——未经 TG 酶交联的蛋白样品吸光值; $A_s$ ——经 TG 酶交联的蛋白样品吸光值; $A_c$ ——空白对照的吸光值。

1.3.7 体外消化率测定 参照 He 等<sup>[18]</sup>的方法,通过体外消化过程中的氮释放分析,评估蛋白样品的体外消化率。为模仿人体内消化环境,整个过程在 37 ℃水浴中进行。首先配制质量浓度为 10 g/L 的蛋白悬浮液,并用 2 mol/L 盐酸调节 pH 值至 2.0。随后向悬浮液中加入胃蛋白酶(20 mg/g pro),振荡孵育 1 h。用 1 mol/L NaOH 调节悬浮液 pH 值至 7.5,以终止胃消化阶段,后加入胰蛋白酶(20 mg/g pro),振荡孵育 2 h。在体外消化 1,2,3 h 时,分别收集样品溶液,并用同体积的 15%的三氯乙酸洗涤,随后在 8 000×g 下离心 15 min,收集上清液。通过凯氏定氮测定上清液的氮含量,根据公式(4)计算样品的体外消化率:

$$\text{消化率}(\%) = \frac{N_0}{N_{\text{总}}} \times 100 \quad (4)$$

式中, $N_0$ ——上清液 N 含量(mg); $N_{\text{总}}$ ——样品总氮含量(mg)。

1.3.8 致敏性测定 参照 Hu 等<sup>[19]</sup>的方法,用 ELISA 测定蛋白样品消化前、后的致敏性。将样品稀释适当倍数,将 100 μL 稀释液加入到包被有特异性抗体的微孔板中,室温下(20~25 ℃)孵育 10 min,倒出孔中液体,倒置微孔板并在吸水纸上拍打 3 次,加入 250 μL 洗涤缓冲液洗涤,重复洗涤 3 次。加入酶标记的抗体,小心混匀,室温下孵育 10 min,倒出孔中的液体,并重复上述洗涤动作,后加入 100 μL 底物,室温下暗处孵育 10 min,使底物与酶连接物结合。最后加入 100 μL 反应终止液并充分混合,于波长 450 nm 处测量吸光值。根据标准曲线,计算样品的抗原性。

1.3.9 微观结构观察 将蛋白样品喷金处理,随后用扫描电子显微镜在 5 kV 电压条件下观察其微观结构。

#### 1.4 数据处理

采用 SPSS 26.0 进行统计分析,使用 Duncan 多范围检验( $P < 0.05$ )进行单向方差分析。结果以“平均值±标准差( $\bar{x} \pm s$ )”表示,使用 OriginPro 2018 进行绘图。

## 2 结果与分析

根据单因素实验结果,选择酶活(10,30,50 U/g)、交联时间(1,2,3 h)、Casein/HPI 的质量比(11:1,10:2,9:3)进行响应面试验。

### 2.1 响应面优化 Casein-HPI 复合物制备

2.1.1 Box-Behnken 试验结果 根据上述试验方案,在不同酶活、交联时间及 Casein/HPI 质量比条件下制备 Casein-HPI 复合物,并测定其乳化活性、凝胶持水率及抗氧化性保留率。结果如表 3 所示。

2.1.2 自变量对 Casein-HPI 复合物乳化活性的影响 用 Design-Expert 软件对回归模型进行方差分析(ANOVA),结果表明了各个变量的重要性以及变量之间的相互作用,如表 4 所示。模型的  $F=58.31$ , $P=0.0001 < 0.05$ ,差异显著,表明方程可能由于噪音干扰导致 0.01%的概率与实际结果有差异。函数模型  $R^2=0.964$ ,说明模型预测值和试验值拟合度高,预测 Casein-HPI 乳化活性最大值是可

信的。回归方程的方差分析结果显示,一次项  $X_1$ ,  $X_2, X_3$ , 交互项  $X_1X_2$  和二次项  $X_1^2$  对乳化活性的影响显著。回归分析得到的回归方程为:

$$Y_1=1.26X_1+0.4406X_2-0.3577X_3-0.4186X_1X_2-1.04X_1^2+8.41$$

表3 响应面试验结果

Table 3 Results of the response surface experiment

序号	乳化活性/ $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$	凝胶持水率/%	抗氧化性保留率/%
1	5.12 ± 0.16	74.42 ± 0.87	84.23 ± 2.25
2	8.56 ± 0.01	77.02 ± 1.47	78.31 ± 1.32
3	6.69 ± 0.06	76.27 ± 1.42	83.92 ± 1.17
4	8.46 ± 0.03	77.87 ± 1.80	73.28 ± 1.13
5	6.57 ± 0.08	75.60 ± 2.24	85.31 ± 1.28
6	8.93 ± 0.01	80.39 ± 0.92	76.51 ± 2.16
7	6.06 ± 0.15	73.80 ± 2.84	89.66 ± 0.84
8	8.58 ± 0.04	74.32 ± 0.84	81.59 ± 0.61
9	8.18 ± 0.04	78.07 ± 1.84	78.53 ± 2.44
10	9.47 ± 0.03	79.13 ± 1.21	77.29 ± 0.13
11	7.44 ± 0.05	75.76 ± 1.47	82.51 ± 1.40
12	8.20 ± 0.04	73.79 ± 2.39	80.33 ± 0.67
13	8.62 ± 0.09	78.65 ± 1.28	81.35 ± 1.42
14	8.62 ± 0.22	79.06 ± 1.96	82.93 ± 0.45
15	8.67 ± 0.23	78.07 ± 2.84	81.28 ± 4.44
16	8.24 ± 0.13	78.41 ± 3.07	82.54 ± 0.87
17	8.20 ± 0.06	78.04 ± 1.97	81.68 ± 1.66

表4 乳化活性的响应面模型拟合结果

Table 4 Model fitting for EAI

来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	20.56	5	4.11	58.31	< 0.0001**
$X_1$	12.74	1	12.74	180.68	< 0.0001**
$X_2$	1.55	1	1.55	22.03	0.0007**
$X_3$	1.02	1	1.02	14.52	0.0029**
$X_1X_2$	0.7010	1	0.7010	9.94	0.0092**
$X_2X_3$	-	-	-	-	-
$X_1X_3$	-	-	-	-	-
$X_1^2$	4.54	1	4.54	64.37	< 0.0001**
$X_2^2$	-	-	-	-	-
$X_3^2$	-	-	-	-	-
剩余	0.7757	11	0.0705	-	-
失拟项	0.5599	7	0.800	1.48	0.3695
误差	0.2158	4	0.0540	-	-
总和	21.34	16	-	-	-

注:\*. 表示差异显著,  $0.01 < P < 0.05$ ; \*\*. 表示差异极显著,  $P < 0.01$ ; -. 表示该组对响应值无显著影响,  $P > 0.05$ 。

如图1所示,随TG酶酶活增大,Casein-HPI复合物乳化活性先增大后减小,TG酶交联暴露出Casein-HPI的疏水性基团,并在低酶活条件下达到亲水性和疏水性平衡。蛋白乳化活性在酶活较低条件下呈增大趋势,然而随酶活继续增大,过

度交联导致其亲水和疏水相互作用被打破,而使其乳化活性降低<sup>[20]</sup>。然而此趋势在交联时间缩短时发生改变,尤其在1h时,随TG酶酶活增大乳化活性呈持续增大的趋势,说明短时间交联条件下,达到亲水性和疏水性平衡需要更大的TG酶

酶活。另外,随交联时间的延长,Casein-HPI 复合物乳化活性呈增大趋势,而该趋势随着酶活增大变得不显著。尤其当 TG 酶酶活为 50 U/g 时,Casein-HPI 复合物的乳化活性随处理时间延长基本

无显著变化。可能是因为在高酶活条件下,交联反应达到饱和所需的时间更短。此外,由图 1 可知,增大 HPI 在复合物中的配比会降低 Casein-HPI 的乳化活性。

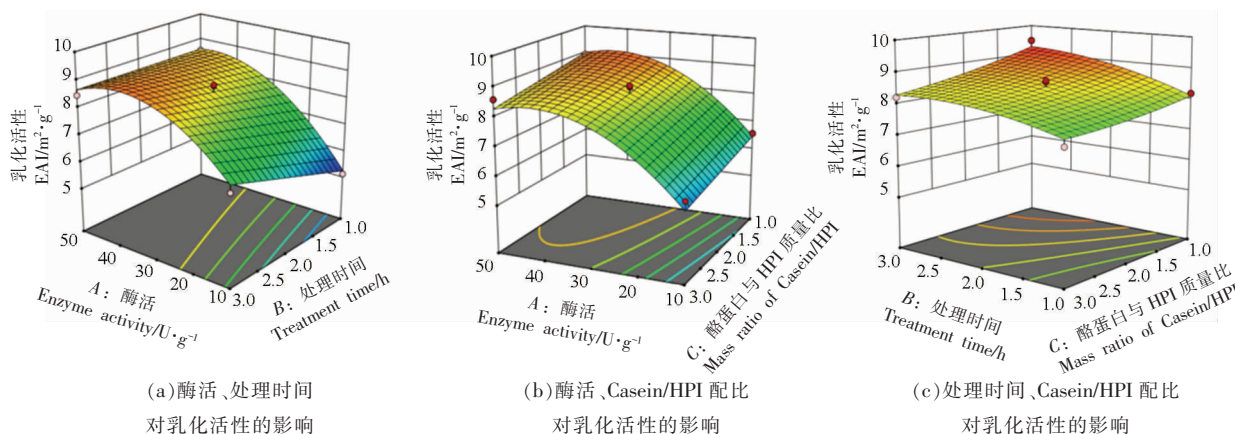


图 1 不同自变量对 Casein-HPI 复合物乳化活性影响的响应面等高线图

Fig.1 The response surface and contour for the effect of emulsifying activity index (EAI) of casein-HPI complex between different independent variables

2.1.3 自变量对 Casein-HPI 复合物抗氧化性保留率的影响 如表 5 所示,模型的  $F=76.13, P=0.0001<0.05$ ,差异显著,表明方程可能由于噪音干扰导致 0.01%的概率与实际结果有差异。函数模型  $R^2=0.9786$ ,说明模型的预测值和试验值拟合度高,预测 Casein-HPI 复合物抗氧化性保留率最大

值可信。由回归方程的方差分析结果可以看出,一次项  $X_1, X_2, X_3$ ,交互项  $X_1X_2$  和二次项  $X_1^2, X_2^2$  对抗氧化性保留率的影响显著。回归分析得到的回归方程为:

$$Y_2 = -0.0418X_1 - 0.0109X_2 + 0.0206X_3 - 0.0118X_1X_2 + 0.0082X_1^2 - 0.0287X_2^2 + 0.8217$$

表 5 抗氧化性保留率的响应面模型拟合结果

Table 5 Model fitting for antioxidant retention rate

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	0.023	6	0.0037	76.13	< 0.0001**
$X_1$	0.0140	1	0.0140	285.79	< 0.0001**
$X_2$	0.0010	1	0.0010	19.54	0.0013**
$X_3$	0.0034	1	0.0034	69.29	< 0.0001**
$X_1X_2$	0.0006	1	0.0006	11.38	0.0071**
$X_1X_3$	-	-	-	-	-
$X_2X_3$	-	-	-	-	-
$X_1^2$	0.0003	1	0.0003	5.81	0.0367*
$X_2^2$	0.0033	1	0.0033	66.92	< 0.0001**
$X_3^2$	-	-	-	-	-
剩余	0.0005	10	0.0000	-	-
失拟项	0.0003	6	0.0000	0.8167	0.6081
误差	0.0002	4	0.0001	-	-
总和	0.0228	16	-	-	-

注:\*. 表示差异显著,  $0.01 < P < 0.05$ ; \*\*. 表示差异极显著,  $P < 0.01$ ; -. 表示该组对响应值无显著影响,  $P > 0.05$ 。

如图2所示,随酶活增大,Casein-HPI复合物的抗氧化性保留率呈下降趋势,表明交联处理对Casein-HPI复合物的抗氧化性有抑制作用。根据预试验结果,酶活增大使得Casein-HPI交联度增大,蛋白质的共价交联导致更多自由基清除活性位点被掩埋。然而,增大HPI在复合蛋白中的配比

能有效提高Casein-HPI的抗氧化性保留率,如图2b所示。结合预试验结果,添加HPI导致复合蛋白交联度降低,复合物聚集程度降低,有效抑制了抗氧化基团的掩埋,从而使得蛋白质抗氧化性保留率提高。

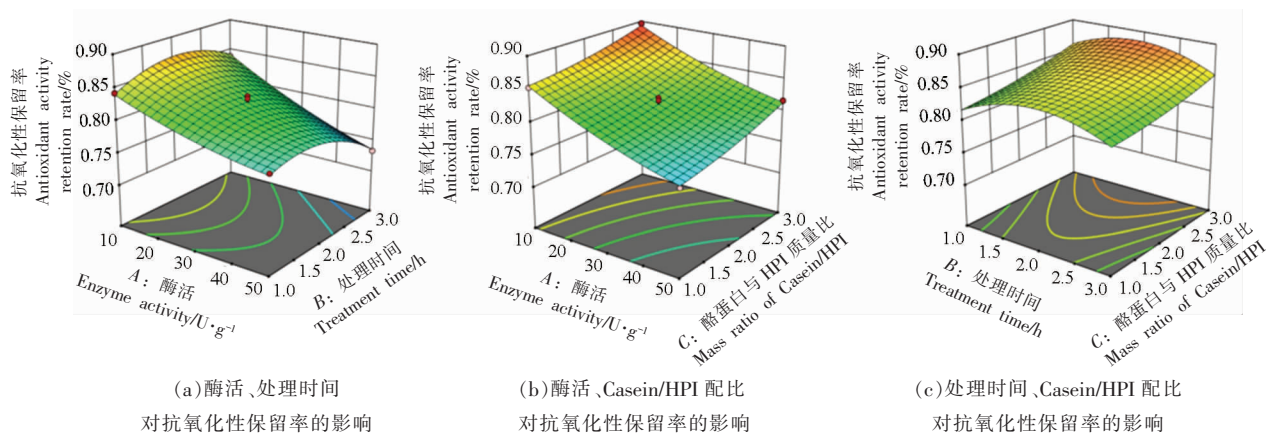


图2 不同自变量对Casein-HPI复合物抗氧化性保留率影响的响应面等高线图

Fig.2 The response surface and contour for the effect of antioxidant retention rate of casein-HPI complex between different independent variables

2.1.4 自变量对Casein-HPI复合物凝胶持水率的影响 如表6所示,回归模型方差分析(ANOVA)  $F=23.47, P=0.0001 < 0.05$ , 差异显著,表明方程可能由于噪音干扰导致0.01%的概率与实际结果有差异。函数模型  $R^2=0.9591$ , 说明模型的预测值

和试验值拟合度高,预测Casein-HPI凝胶持水率最大值可信。由回归方程的方差分析结果可以看出,一次项  $X_1, X_3$ , 交互项  $X_1X_2, X_2X_3$  和二次项  $X_1^2, X_2^2, X_3^2$  对凝胶持水率的影响显著。回归分析得到的回归方程为:

表6 凝胶持水率的响应面模型拟合结果

Table 6 Model fitting for WHC of gel

来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	0.0065	8	0.0008	23.47	< 0.0001**
$X_1$	0.0011	1	0.0011	32.72	0.0004**
$X_2$	0.0000	1	0.0000	1.15	0.3148
$X_3$	0.0030	1	0.0030	87.22	< 0.0001**
$X_1X_2$	0.0005	1	0.0005	13.26	0.0066*
$X_1X_3$	-	-	-	-	-
$X_2X_3$	0.0002	1	0.0002	6.67	0.0325*
$X_1^2$	0.0008	1	0.0008	22.42	0.0015**
$X_2^2$	0.0002	1	0.0002	5.89	0.0414*
$X_3^2$	0.0005	1	0.0005	13.88	0.0058**
剩余	0.0003	8	0.0000	-	-
失拟项	0.0002	4	0.0001	2.80	0.1717
误差	0.0001	4	0.0000	-	-
总和	0.0068	16	-	-	-

注:\*. 表示差异显著,  $0.01 < P < 0.05$ ; \*\*. 表示差异极显著,  $P < 0.01$ ; -. 表示该组对响应值无显著影响,  $P > 0.05$ 。

$$Y_3 = 0.0119X_1 + 0.0022X_2 - 0.0194X_3 - 0.0107X_1X_3 - 0.0076X_2X_3 - 0.0136X_1^2 - 0.0069X_2^2 - 0.0107X_3^2 + 0.7845$$

如图 3 所示, Casein-HPI 凝胶持水率随 TG 酶酶活的升高和交联时间的延长呈先上升后下降的趋势。TG 酶交联能诱导蛋白凝胶形成致密的蛋白网络结构, 有利于凝胶中保留更多水分。这使得在酶活和交联时间增大的初始阶段 Casein-HPI 复合物凝胶的持水率提升。而继续增大酶活或延

长交联时间, 过度交联导致 Casein-HPI 与水分子的结合位点减少, 凝胶持水率下降<sup>[21]</sup>。如图 3c 所示, 随着复合物中 HPI 配比增大, Casein-HPI 复合物凝胶的持水率显著降低, 是由于 HPI 导致复合蛋白的交联度降低, 形成更为疏松的网络结构, 进而使得持水能力降低。HPI 含量增大导致凝胶持水率下降的趋势在高酶活条件下尤为明显, 证实 HPI 在高酶活条件下对复合物的交联存在更强的抑制能力。

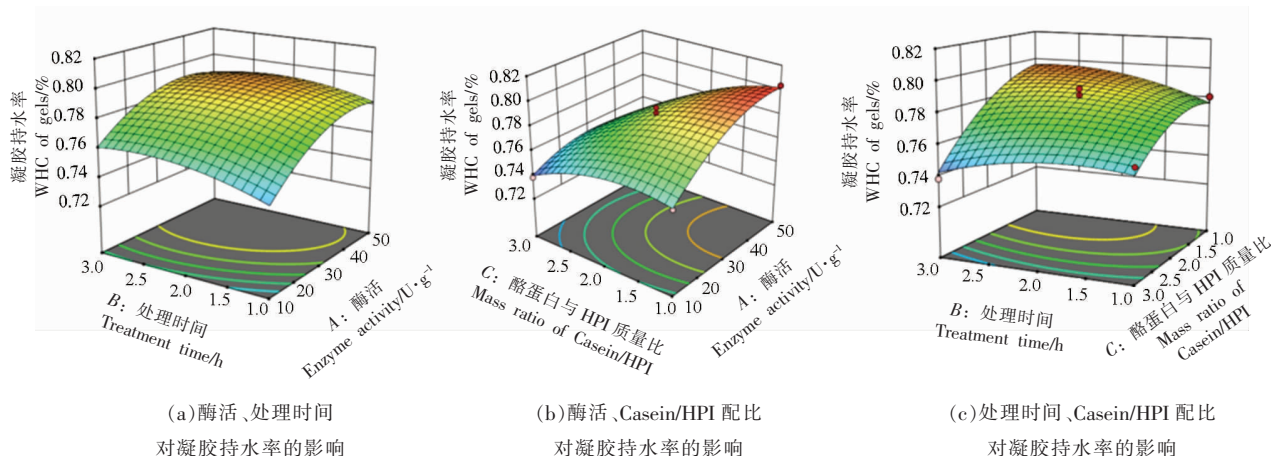


图 3 不同自变量对 Casein-HPI 复合凝胶持水率影响的响应面等高线图

Fig.3 The response surface and contour for the effect of WHC of casein-HPI complex between different independent variables

2.1.5 最优交联工艺验证 将乳化活性、抗氧化性保留率、凝胶持水率的权重设为 1:1:1, 经 RSM 预测, Casein-HPI 最优交联条件为 TG 酶酶活为 31.90, 交联时间为 2.06 h, Casein/HPI 质量比为

10.51:1.49。按最优工艺制备 Casein-HPI 复合物, 对比实际值与预测值, 结果如表 7 所示, 各预测值的相对偏差均小于 5%, 可见响应面法优化得到的最优工艺结果可靠。

表 7 最优工艺条件制备的 Casein-HPI 复合物实际值与预测值对比

Table 7 Comparison of optimal processing Casein-HPI response value and prediction value

	乳化活性/ $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$	抗氧化性保留率/%	凝胶持水率/%
预测值	8.72	80.70	79.30
实际值	$8.88 \pm 0.08$	$83.12 \pm 0.90$	$79.96 \pm 1.02$
相对误差/%	1.83	3.00	0.83

## 2.2 体外消化率

蛋白质体外消化率揭示了蛋白质被消化酶水解的能力, 直接影响消化后氨基酸和肽的吸收, 因此可体现出待测物的营养价值及在食品领域是否具有广泛应用的潜力<sup>[22]</sup>。图 4 显示了酪蛋白、HPI、Casein-HPI 混合物(不添加 TG 酶)以及最优工艺

下制备的 Casein-HPI 复合物体外消化过程中的氮释放曲线。4 种蛋白样品显示出相似的氮释放特性, 其消化过程主要集中于胃消化阶段(0~1 h)和肠道消化前半阶段(1~2 h)。而在消化的 2~3 h 内, 所有蛋白样品的氮释放曲线逐渐趋于平稳。He 等<sup>[18]</sup>也报道了相似的结论, 其发现大米谷蛋白的

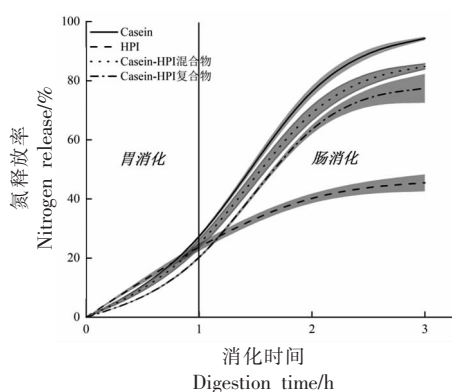


图4 酪蛋白、HPI、Casein-HPI混合物、Casein-HPI复合物的体外消化氮释放曲线

Fig.4 Protein digestion curves of casein, HPI, Casein-HPI mixture, Casein-HPI complex *in vitro*

体外消化过程中肠道消化的后半阶段氮释放变得缓慢。在胃消化阶段中,酪蛋白、HPI及Casein-HPI混合物显示出较相似的消化特性。胃消化阶段结束后,上述3种蛋白的消化率呈酪蛋白>Casein-HPI混合物>HPI的规律。而交联后的Casein-HPI复合物在胃消化1h后消化率显著降低。赖氨酸作为胃蛋白酶酶切位点之一,在TG酶诱导下与谷氨酰胺残基共价交联形成异肽键,从而抑制胃蛋白酶的水解作用<sup>[23]</sup>。Romano等<sup>[24]</sup>研究了TG酶对豆粉蛋白体外消化率的影响,发现TG酶诱导豆粉蛋白形成致密的网络结构而降低了其在胃消化阶段的消化率。

进入肠道消化阶段后,4种蛋白氮释放量持续增加证实了胰蛋白酶的水解作用。在肠道消化阶段,酪蛋白、Casein-HPI混合物以及Casein-HPI复合物的氮释放增加了3~4倍,而HPI显示出最平缓的释放曲线,其氮释放量仅增大1倍左右,最终消化率仅有50%左右,表明HPI含有较少的胰蛋白酶酶切位点。据报道<sup>[22,25]</sup>,HPI的体外消化率可达70%~80%,显著高于本文HPI的消化率。一方面是因为体外消化阶段的时长不同,另一方面可能是因为本文的HPI是由未脱壳的汉麻籽制备,壳中的酚类物质与蛋白形成多酚-蛋白质复合体从而导致消化率降低<sup>[25]</sup>。体外消化中,酪蛋白消化率最高,Casein-HPI混合物介于酪蛋白和HPI之间。与上述胃消化阶段相似,TG酶交联显著降低了Casein-HPI复合物的体外消化率,归因于

TG酶诱导更大分子质量的抗消化共聚物的形成。然而,Casein-HPI复合物消化率的降低有利于增强饱腹感,并且在胃肠道特异性药物递送方面具有应用潜力<sup>[18]</sup>。

### 2.3 致敏性测试

检测了蛋白质消化前、后的抗原含量以表征蛋白质的致敏性。如图5所示,酪蛋白、Casein-HPI混合物在体外消化前致敏性没有明显差异。TG酶交联显著降低了混合物体外消化前的致敏性。这是因为TG酶能催化赖氨酸残基和谷氨酰胺残基生成异肽共价键,最终形成多分支结构的共聚物。当有足够多的交联位点参与交联时,TG酶诱导的多分支结构可能会掩盖潜在的IgE结合位点,进而降低蛋白质的致敏性<sup>[26]</sup>。Li等<sup>[26]</sup>也曾证明TG酶交联具有降低蛋白致敏性的潜力,其发现酪蛋白、乳清蛋白、大豆蛋白通过TG酶交联能有效降低其致敏性。

消化作用显著降低了蛋白的致敏性,归因于消化酶的水解作用破坏了IgE结合位点<sup>[27]</sup>。消化结束后,酪蛋白、Casein-HPI混合物、Casein-HPI复合物显示出相似的致敏性。表明仍有未被消化酶水解的过敏原表位,这也证实了TG酶交联只能降低消化前或轻度水解时的致敏性,其交联作用并未破坏蛋白的IgE结合位点,而是通过聚合作用掩埋其过敏原表位。因此随着消化时间的延长,尤其是后期阶段,Casein-HPI致敏性的降低主要是由于蛋白酶对过敏原表位的破坏作用而与TG

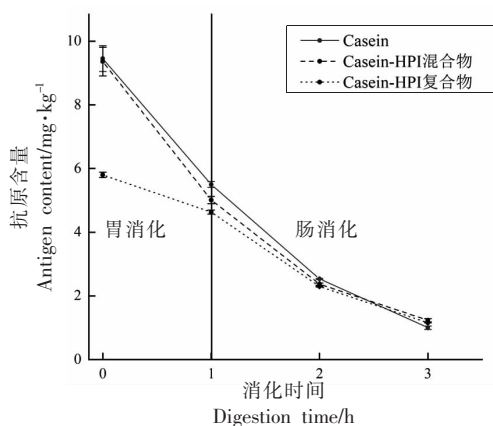


图5 酪蛋白、HPI、Casein-HPI混合物、Casein-HPI复合物致敏性

Fig.5 Allergenicity of casein, HPI, Casein-HPI mixture, Casein-HPI complex

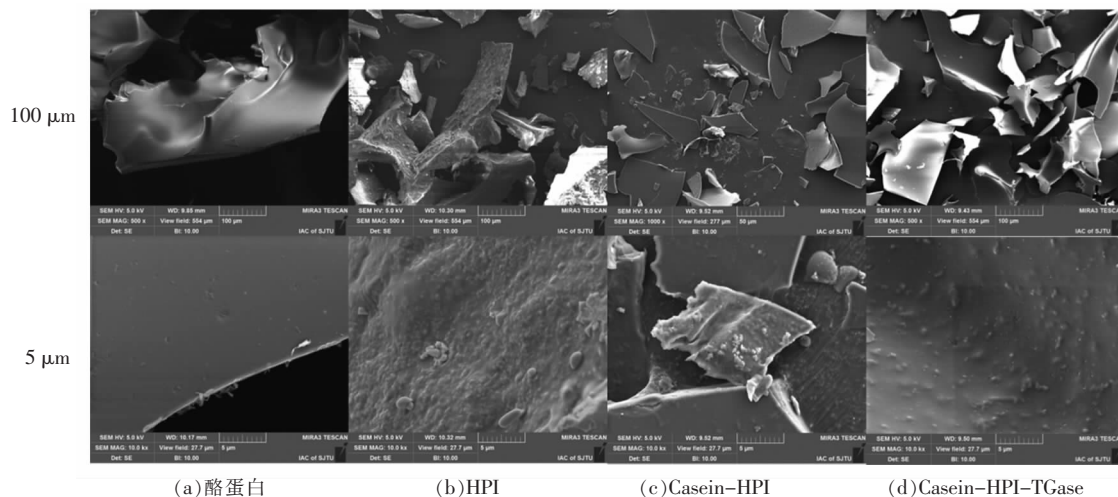


酶无关。

## 2.4 微观结构

通过扫描电子显微镜观察进一步表征蛋白质交联前、后的微观结构。如图 6 所示,酪蛋白呈现表面光滑的片状微观结构。而 HPI 的表面相对粗糙,可能是碱溶酸沉法提取 HPI 过程中蛋白质有轻微变性。交联后的 Casein-HPI 显示出不同于其

它 3 种蛋白的微观结构,表面出现明显的颗粒状突起。证明 TG 酶交联显著改变了复合蛋白的微观形貌,主要是因为 TG 酶对复合蛋白的结构修饰。Yang 等<sup>[14]</sup>也发现卵黄高磷蛋白与面筋蛋白通过 TG 酶交联后,其微观结构从蜂窝状空腔结构逐渐向致密、光滑的结构转化。



(a)酪蛋白 (b)HPI (c)Casein-HPI (d)Casein-HPI-TGase

图 6 酪蛋白、HPI、Casein-HPI 混合物、Casein-HPI 复合物微观形貌

Fig.6 Morphology of casein, HPI, Casein-HPI mixture, Casein-HPI complex

## 3 结论

1) 以乳化活性、凝胶持水率和抗氧化性保留率作为响应指标, TG 酶酶活、处理时间和酪蛋白/HPI 质量比为自变量, 采用响应面法优化了 Casein-HPI 制备条件。3 个响应值模型拟合方程的  $R^2$  值均超过 0.9,  $P$  值均小于 0.05, 失拟项均不显著, 证实了模型的有效性。通过响应面法拟合后得出的最优工艺条件为: TG 酶酶活 31.90 U/g, 交联时间 2.06 h, 酪蛋白/HPI 质量比 10.51:1.49。

2) 在最优工艺下制备的 Casein-HPI 复合物与未交联蛋白相比具有更强的抗酶解能力。酪蛋白通过 TG 酶与 HPI 交联在消化前或轻度水解阶段致敏性显著降低, 而在消化末期复合物致敏性和未交联蛋白没有显著区别。同时, 交联改变了混合蛋白的微观形貌, 源于 TG 酶对蛋白质结构的修饰。

3) 本文通过 TG 酶强化酪蛋白和 HPI 的相互作用以实现 HPI 部分替代酪蛋白的同时, 能有效缓解 HPI 对复合蛋白的不利影响, 进而促进

HPI 在食品工业中的广泛应用。

## 参 考 文 献

- [1] 汝成业. 酶法降低牛乳  $\alpha$ s1-酪蛋白致敏性[D]. 无锡: 江南大学, 2015.  
RU C Y. Enzymatic hydrolysis of milk  $\alpha$ s1-casein for allergenicity reduction[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2015.
- [2] 丛艳君, 刘家琦, 于晓凤, 等. 基于 BALB/C 小鼠模型评价牛乳  $\alpha$ s1-酪蛋白的致敏特性[J]. 中国食品学报, 2020, 20(3): 21-30.  
CONG Y J, LIU J Q, YU X F, et al. Allergic mechanism of  $\alpha$ s1-casein in cow milk based on BALB/C mice model[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(3): 21-30.
- [3] 丛艳君, 吕晓哲, 李晔, 等. 牛乳  $\alpha$ S1-酪蛋白与大豆蛋白交叉过敏原的识别鉴定[J]. 食品科学, 2019, 40(18): 70-75.

- CONG Y J, LÜ X Z, LI Y, et al. Identification and characterization of cross-reactive allergens between cow milk  $\alpha$ S1-casein and soybean proteins[J]. Food Science, 2019, 40(18): 70-75.
- [4] 任大喜, 王德国, 郭鸽, 等. 胰蛋白酶水解降低乳蛋白过敏的研究[J]. 中国食品学报, 2009, 9(5): 49-54.
- REN D X, WANG D G, GUO L, et al. The study of trypsin hydrolysis to reduce milk protein allergy [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2009, 9(5): 49-54.
- [5] 付莉, 岳喜庆, 宋建新. 复合酶降低牛乳蛋白致敏性的研究[J]. 中国乳品工业, 2013, 41(5): 22-25.
- FU L, YUE X Q, SONG J X. Research on reducing milk protein allergenicity by mixed enzyme [J]. China Dairy Industry, 2013, 41(5): 22-25.
- [6] ALUKO R. Hemp seed (*Cannabis sativa* L.) proteins: Composition, structure, enzymatic modification, and functional or bioactive properties [M]. Canada, North York: Sustainable protein sources. Elsevier, 2017: 121-132.
- [7] HADNA ĐEV M, DAPČEVIĆ-HADNA ĐEV T, LAZARIDOU A, et al. Hempseed meal protein isolates prepared by different isolation techniques. Part I. physicochemical properties[J]. Food Hydrocolloids, 2018, 79: 526-533.
- [8] SHEN P, GAO Z, XU M, et al. Physicochemical and structural properties of proteins extracted from dehulled industrial hempseeds: Role of defatting process and precipitation pH[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 108: 106065.
- [9] DECUYPER I, VAN GASSE A, COP N, et al. Cannabis sativa allergy: Looking through the fog[J]. Allergy, 2017, 72(2): 201-206.
- [10] ALVES A C, TAVARES G M. Mixing animal and plant proteins: Is this a way to improve protein techno-functionalities?[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 97: 105171.
- [11] WANG Q, JIANG J, XIONG Y L. High pressure homogenization combined with pH shift treatment: A process to produce physically and oxidatively stable hemp milk [J]. Food Research International, 2018, 106: 487-494.
- [12] GASPAR A L C, DE GÓES-FAVONI S P. Action of microbial transglutaminase (MTGase) in the modification of food proteins: A review[J]. Food Chemistry, 2015, 171: 315-322.
- [13] ALAVI F, EMAM-DJOMEH Z, CHEN L. Acid-induced gelation of thermal co-aggregates from egg white and hempseed protein: Impact of microbial transglutaminase on mechanical and microstructural properties of gels[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 107: 105960.
- [14] YANG L, JIA J, ZHOU X, et al. Phosvitin-wheat gluten complex catalyzed by transglutaminase in the presence of  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ : Formation, cross-link behavior and emulsifying properties[J]. Food Chemistry, 2021, 346: 128903.
- [15] JIANG Y, ZHOU X, ZHENG Y, 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.
- [16] TANG C H, YANG M, LIU F, et al. Stirring greatly improves transglutaminase-induced gelation of soy protein-stabilized emulsions[J]. LWT-Food Science and Technology, 2013, 51(1): 120-128.
- [17] JIANG Y, YIN H, ZHOU X, et al. Antimicrobial, antioxidant and physical properties of chitosan film containing *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz. peel extract/montmorillonite and its application [J]. Food Chemistry, 2021, 361: 130111.
- [18] HE C, HU Y, WOO M W, et al. Effect of microbial transglutaminase on the structural and rheological characteristics and *in vitro* digestion of rice glutelin-casein blends[J]. Food Research International, 2021, 139: 109832.
- [19] HU G, ZHENG Y, LIU Z, et al. Effects of high hydrostatic pressure, ultraviolet light-C, and far-infrared treatments on the digestibility, antioxidant and antihypertensive activity of  $\alpha$ -casein[J]. Food Chemistry, 2017, 221: 1860-1866.
- [20] LIU C, DAMODARAN S, HEINONEN M. Effects of microbial transglutaminase treatment on physicochemical properties and emulsifying functionality of faba bean protein isolate[J]. LWT, 2019, 99: 396-403.
- [21] ZHANG M, YANG Y, ACEVEDO N C. Effects of pre-heating soybean protein isolate and transglutaminase treatments on the properties of egg-soybean protein isolate composite gels [J]. Food Chemistry,

- 2020, 318: 126421.
- [22] LIN Y, PANGLOLI P, DIA V P. Physicochemical, functional and bioactive properties of hempseed (*Cannabis sativa* L.) meal, a co-product of hempseed oil and protein production, as affected by drying process [J]. Food Chemistry, 2021, 350: 129188.
- [23] GLUSAC J, ISASCHAR-OVDAT S, FISHMAN A. Transglutaminase modifies the physical stability and digestibility of chickpea protein-stabilized oil-in-water emulsions[J]. Food Chemistry, 2020, 315: 126301.
- [24] ROMANO A, GIOSAFATTO C V L, DI PIERRO P, et al. Impact of transglutaminase treatment on properties and *in vitro* digestibility of white bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flour[J]. Food Research International, 2016, 88: 239-246.
- [25] 伍圣文, 贾成刚, 崔春. 脱壳处理对火麻蛋白提取, 功能特性和消化性的影响[J]. 食品科学技术学报, 2021, 39(4): 87-94.
- WU S W, JIA C G, CUI C. Effects of hulling treatment on extraction, functional properties and digestibility of hemp protein[J]. Journal of Food Science and Technology, 2021, 39(4): 87-94.
- [26] LI Y, DAMODARAN S. *In vitro* digestibility and IgE reactivity of enzymatically cross-linked heterologous protein polymers [J]. Food Chemistry, 2017, 221: 1151-1157.
- [27] 张微, 张索坤, 王希彪. 蛋白酶水解降低牛乳酪蛋白抗原性的研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2014(8): 112-115.
- ZHANG W, ZHANG S K, WANG X B. Research on reducing antigenicity of casein by protease hydrolysis[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2014(8): 112-115.

### Optimization of Casein-Hempseed Protein Complex Preparation Technology and Its Digestibility, Allergenicity

Wang Danfeng<sup>1</sup>, Xue Shuyuan<sup>2</sup>, Zhou Xuefu<sup>1</sup>, Zhong Yu<sup>1</sup>, Zheng Yuanrong<sup>3</sup>, Deng Yun<sup>1\*</sup>  
(<sup>1</sup>School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 201100

<sup>2</sup>Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018

<sup>3</sup>State Key Laboratory of Dairy Biotechnology, Shanghai Engineering Research Center of Dairy Biotechnology, Dairy Research Institute, Bright Dairy & Food Co., Ltd., Shanghai 200436)

**Abstract** The preparation conditions including transaminase (TGase) activity, treatment time and casein/ hemp protein isolate (HPI) ratios were optimized through response surface methodology (RSM). The *in vitro* digestibility, allergenicity and microstructure of the optimal complex were determined. The optimal cross-linking conditions were as follows: TGase activity was 31.90 U/g, treatment time was 2.06 h, and casein/HPI ratio was 10.51:1.49. In this case, casein-HPI complex showed enhanced resistance to digestive enzymes and lower allergenicity before digestion or mild hydrolysis. In addition, TGase cross-linking changed the microscopic morphology of the protein, confirming the interaction between casein and HPI.

**Keywords** casein; hempseed protein; digestibility; allergenicity