

# 动态高压微射流协同糖基化对 $\beta$ -乳球蛋白乳化和结构的影响

钟俊桢, 涂越, 刘伟, 刘成梅\*

(南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047)

**摘要:** 采用动态高压微射流 (dynamic high pressure microfluidization, DHPM) 协同糖基化处理 $\beta$ -乳球蛋白, 研究改性 $\beta$ -乳球蛋白乳化性、乳化稳定性和结构的变化。研究发现DHPM协同糖基化处理过程中 $\beta$ -乳球蛋白结构变化与其乳化性能可能存在关联; DHPM协同糖基化处理能显著提高 $\beta$ -乳球蛋白的乳化性和乳化稳定性。0、40、120 MPa糖基化处理 $\beta$ -乳球蛋白的乳化活性指数 (emulsifying activity index, EAI) 分别为136.3、168.1、177.9 m<sup>2</sup>/g。0 MPa协同糖基化处理后 $\beta$ -乳球蛋白的乳化稳定指数 (emulsifying stability index, ESI) 为52.3 min; 随着压强逐渐增加至40 MPa和120 MPa, 协同糖基化处理后ESI值分别升高为56.4 min和59.0 min。通过表征分析 $\beta$ -乳球蛋白结构变化发现: 不同压力DHPM协同糖基化处理后,  $\beta$ -乳球蛋白分子质量升高; 巯基含量升高; 表面疏水性降低; 二级结构变化以及氨基酸三维空间构象暴露程度发生变化。这些变化说明 $\beta$ -乳球蛋白与低聚半乳糖发生共价交联时改变了蛋白质结构, 造成 $\beta$ -乳球蛋白表面亲水基团的增加, 从而导致其乳化性能显著提高。

**关键词:**  $\beta$ -乳球蛋白; 动态高压微射流; 糖基化; 乳化性; 结构

## Effect of Glycosylation Treatment Coupled with Dynamic High Pressure Microfluidization on Emulsifying Properties and Structure of $\beta$ -Lactoglobulin

ZHONG Jun-zhen, TU Yue, LIU Wei, LIU Cheng-mei\*

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

**Abstract:** The effect of glycosylation treatment coupled with dynamic high-pressure microfluidization (DHPM) on emulsifying properties and structure change of  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -Lg) was investigated. The results showed that glycosylation treatment coupled with DHPM obviously improved the emulsifying capacity and emulsion stability of  $\beta$ -Lg. The emulsifying activity index (EAI) of  $\beta$ -Lg subjected to glycosylation treatment in the presence of high pressure at 0, 40 and 120 MPa were 136.3, 168.1 m<sup>2</sup>/g and 177.9 m<sup>2</sup>/g, respectively. The emulsifying stability index (ESI) of  $\beta$ -Lg subjected to glycosylation treatment was 52.3 min. With increasing the pressure up to 40 MPa and 120 MPa, the ESI of  $\beta$ -Lg treated by glycosylation were increased to 56.4 min and 59.0 min, respectively, indicating the structural change of  $\beta$ -Lg due to the combinatorial treatment of DHPM and glycosylation. This structural change was characterized as increased molecular weight, sulphhydryl (—SH) content, reduced surface hydrophobicity ( $H_o$ ), changed secondary structure, and unmasked amino acids in the tertiary structure after the combinatorial treatment of DHPM and glycosylation. These results revealed that the conjugation with galacto-oligosaccharides (GOS) changed the structure of  $\beta$ -Lg, which contributed to the increase of surface hydrophilic groups of  $\beta$ -Lg and resulted in the improvement of emulsifying properties.

**Key words:**  $\beta$ -lactoglobulin; dynamic high pressure microfluidization; glycosylation; emulsifying properties; structure

中图分类号: TS252

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2014)01-0007-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201401002

$\beta$ -乳球蛋白是牛奶中一种分子质量为18 kD的球形乳清蛋白, 由于具有高含量的氨基酸和多种功能性质而

被广泛应用于食品工业中<sup>[1]</sup>。食品加工中主要是依赖于通过蛋白质改性使蛋白质的利用价值达到最高以满足食

收稿日期: 2013-04-07

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目 (21366021); 食品科学与技术国家重点实验室目标导向项目 (SKLF-MB-201004); 教育部高等学校博士学科点专项科研基金项目 (20103601110002)

作者简介: 钟俊桢 (1984—), 女, 助理研究员, 博士, 研究方向为食品科学与工程。E-mail: zhongjunzhen@163.com

\*通信作者: 刘成梅 (1963—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食物资源利用与开发。E-mail: liuchengmei@aliyun.com

品加工过程的复杂要求<sup>[2]</sup>。近年来,国际上采用许多处理方法,主要包括物理和化学方法来改性 $\beta$ -乳球蛋白期望提高其功能性: Kumar等<sup>[3]</sup>发现大分子质量的聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)比小分子质量PEG对蛋白质功能性影响更大; Corzo-Martinez等<sup>[4]</sup>研究发现半乳糖修饰能显著提高牛乳中 $\beta$ -乳球蛋白的起泡性能。本课题组前期采用动态高压微射流(dynamic high pressure microfluidization, DHPM)方法改性乳清蛋白的研究发现DHPM能有效提高其溶解性和起泡性,但乳化性有所降低<sup>[5]</sup>; 研究低聚木糖修饰 $\beta$ -乳球蛋白的功能性变化发现低聚木糖能显著提高其乳化性和溶解性,但对起泡性能没有显著影响<sup>[6]</sup>。然而,目前关于动态高压微射流协同糖基化复配方法改性 $\beta$ -乳球蛋白的研究少见报道。

$\beta$ -乳球蛋白是以二聚体结构存在的含有2个二硫键的蛋白质,由9条反平行的 $\beta$ -折叠和一条 $\alpha$ -螺旋组成<sup>[7]</sup>。 $\beta$ -乳球蛋白特殊的空间结构赋予了它特殊的生理功能性质。本课题前期研究发现乳清蛋白和 $\beta$ -乳球蛋白的功能性质与其结构变化密切相关: 动态高压微射流胁迫乳清蛋白发生去聚集以及再聚集现象,导致其功能性发生相应的变化<sup>[5]</sup>; 当 $\beta$ -乳球蛋白与低聚果糖发生共价修饰反应后, $\beta$ -乳球蛋白二、三级结构变化导致其溶解性和乳化性增加<sup>[8]</sup>。因此,本实验是在前期研究的基础上,采用动态高压微射流协同糖基化处理手段对 $\beta$ -乳球蛋白进行改性处理,研究物理化学协同作用对 $\beta$ -乳球蛋白乳化性和结构的影响,阐明 $\beta$ -乳球蛋白乳化性和结构变化的关系,为加工改性 $\beta$ -乳球蛋白在乳制品中的应用提供一定理论依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与试剂

$\beta$ -乳球蛋白、低聚半乳糖 美国Sigma公司; 其他所需试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

M-7125 Microfluidics微射流均质机 美国Microfluidics公司; MOS-450圆二色谱仪 法国Bio-Logic SAS公司; F-4500型荧光分光光度计 日本日立公司; T6型紫外分光光度计 北京普析通用公司; QY-300型电动分散机 德国IKA公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 DHPM处理 $\beta$ -乳球蛋白

将 $\beta$ -乳球蛋白溶于蒸馏水中配成1 mg/mL的溶液,采用动态高压微射流DHPM均质机分别在0、40、120 MPa条件下处理 $\beta$ -乳球蛋白。收集样品并保存于4℃条件下用于样品分析。

#### 1.3.2 糖基化处理 $\beta$ -乳球蛋白

根据Hattori<sup>[9]</sup>和Li Zheng<sup>[10]</sup>的方法稍作修改,将

DHPM处理前后的 $\beta$ -乳球蛋白与低聚半乳糖按质量比为1:4混匀,混合物在50℃、相对湿度为79%的条件下反应24 h,冰浴10 min后终止反应,超滤,4℃存储备用。

#### 1.3.3 SDS-PAGE测定 $\beta$ -乳球蛋白的分子质量

参考Laemmli<sup>[11]</sup>和Li Xin<sup>[12]</sup>的方法,采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)测定 $\beta$ -乳球蛋白的分子质量。15%分离胶,5%积层胶。样品与pH 6.8, 0.5 mol/L Tris-盐酸(含2 mg SDS、2  $\mu$ L甘油、2  $\mu$ L  $\beta$ -巯基乙醇和0.04 mg溴苯酚蓝)按照1:1的比例混合后,100℃加热5~10 min,离心1 min后电泳。电泳结束后用0.25%考马斯亮蓝R-250在25%甲醇、10%乙酸中染色1~2 h,之后用5%甲醇和7.5%乙酸脱色。预染标准分子质量分别为14.3、20.1、29.0、44.3、66.0、97.0 kD。

#### 1.3.4 乳化性能测定

根据Pearce<sup>[13]</sup>和Wang Xiansheng<sup>[14]</sup>等方法稍作修改对 $\beta$ -乳球蛋白乳化活性指数(emulsifying activity index, EAI)和乳化稳定性指数(emulsifying stability index, ESI)进行测定。将5 mL溶于50 mmol/L、pH 7.0磷酸缓冲液的蛋白质溶液(1 mg/mL)与1 mL的玉米油进行乳化反应,从上层乳液中取50  $\mu$ L溶液用0.1% SDS溶液稀释(1:100),将稀释后溶液于高速分散机下混匀5s。采用分光光度计在500 nm波长处测定乳液的吸光度。用公式(1)、(2)计算EAI和ESI。

$$EAI / (\text{m}^2/\text{g}) = \frac{2 \times 2.303 \times A_0 \times DF}{\rho \times \theta \times (1 - \theta) \times 10000} \quad (1)$$

$$ESI / \text{min} = \frac{A_0}{A_0 - A_{10\text{min}}} \times 10 \quad (2)$$

式中: DF为稀释倍数( $\times 100$ );  $\rho$ 为蛋白质初始质量浓度/(g/mL);  $\theta$ 为光程(0.01 m);  $\theta$ 为用于形成乳液的油的系数(取0.25);  $A_0$ 和 $A_{10\text{min}}$ 分别为0和10 min条件下测定的乳液的吸光度。

#### 1.3.5 游离巯基(-SH)含量测定

采用Ellman试剂分析游离巯基含量。处理前后的 $\beta$ -乳球蛋白溶液溶于0.1 mol/L、pH 8.0的磷酸钠缓冲液中,质量浓度为1 mg/mL。配好的溶液至于25℃条件下恒温1 h。之后取50  $\mu$ L样品与25  $\mu$ L 0.01 mol/L的5,5'-二硫代双-2-硝基苯甲酸混匀。将混匀后的样品稀释至10 mL。采用紫外分光光度计在25℃、412 nm波长处测定吸光度( $A_{412\text{nm}}$ )。 $\beta$ -乳球蛋白的游离巯基含量的 $A_{412\text{nm}}$ 与2-硝基-5-硫代苯甲酸摩尔消光系数13 600 L/(mol $\cdot$ cm)的比值来计算。游离巯基含量结果表示为 $\mu\text{mol/g pro}^{[15-16]}$ 。

#### 1.3.6 表面疏水性( $H_0$ )测定

蛋白质的表面疏水性是根据Haskard等<sup>[17]</sup>的方法采用1-苯氨基萘-8-磺酸(ANS)分析测定。配制一定质量浓度

梯度的蛋白质溶液分别与等量的ANS混合。取等量ANS-蛋白质混合物用荧光分光光度计在常温下测定相对荧光强度。以蛋白质质量浓度为横坐标、荧光强度为纵坐标模拟曲线,该曲线的斜率即为蛋白质的表面疏水性指数 $H_0$ 。

### 1.3.7 圆二色谱(circular dichroism, CD)分析

根据Chen等<sup>[18]</sup>的方法对处理前后的 $\beta$ -乳球蛋白样品的CD进行分析。将 $\beta$ -乳球蛋白样品采用10 mmol/L、pH 7.0的磷酸钠缓冲液配制成0.1 mg/mL样品,用于远紫外CD分析。采用圆二色谱仪在22 °C条件下恒温测定。采用光路长为0.1 cm的圆形石英比色皿进行远紫外CD分析,扫描范围为185~250 nm。远紫外CD的扫描步进分辨率为1 nm;以100 nm/min扫描速率,谱带宽度为1.0 nm。采用Contin/LL二级结构软件预测不同二级结构含量。

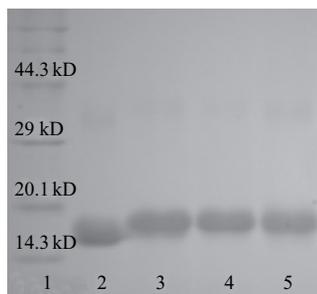
### 1.3.8 内源荧光强度测定

采用F-4500型日立荧光分光光度仪分析不同条件下处理前后 $\beta$ -乳球蛋白的内源荧光性。将 $\beta$ -乳球蛋白溶于10 mmol/L、pH 7.0的磷酸缓冲液中配制成蛋白质质量浓度为1 mg/mL的溶液。选用10 mm口径的方形石英进行装样测定。激发波长为280 nm,发射波长为300~450 nm,采用5 nm宽带,分别采用2.5 nm和5.0 nm的激发和发射狭缝,扫面速率为240 nm/min<sup>[19]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 DHPM协同糖基化处理前后的 $\beta$ -乳球蛋白分子质量的变化

根据相关报道<sup>[20]</sup>,当蛋白质与糖发生反应时,蛋白质中的氨基酸残基会与糖分子末端发生交联并形成共价键。这种共价交联反应会促使 $\beta$ -乳球蛋白糖基化共价体的分子质量的增加。如图1所示,与未处理的 $\beta$ -乳球蛋白相比,DHPM协同糖基化处理后 $\beta$ -乳球蛋白糖基化共价体的条带明显上移,说明反应过程中 $\beta$ -乳球蛋白与糖分子形成共价键发生了共价交联反应。



1. Marker; 2.  $\beta$ -乳球蛋白; 3~5分别为0、40、120 MPa糖基化 $\beta$ -乳球蛋白。

图1 DHPM协同糖基化处理前后 $\beta$ -乳球蛋白分子质量变化

Fig.1 Effect of DHPM and glycosylation on the molecular weight of  $\beta$ -lactoglobulin

### 2.2 DHPM协同糖基化处理对 $\beta$ -乳球蛋白乳化性的影响

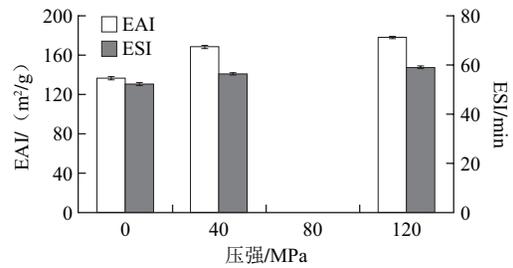


图2 DHPM协同糖基化处理对 $\beta$ -乳球蛋白乳化性的影响

Fig.2 Effect of DHPM and glycosylation on the EAI and ESI of  $\beta$ -lactoglobulin

由图2可知,随着压力的不断增大, $\beta$ -乳球蛋白的乳化活性指数EAI逐渐增加。0 MPa糖基化处理后 $\beta$ -乳球蛋白的EAI为136.3 m<sup>2</sup>/g;40 MPa和120 MPa协同糖基化处理后 $\beta$ -乳球蛋白的EAI分别增加至168.1 m<sup>2</sup>/g和177.9 m<sup>2</sup>/g。结果表明动态高压不同压强协同糖基化处理都能显著提高 $\beta$ -乳球蛋白的乳化稳定性。0、40、120 MPa压力协同糖基化处理后, $\beta$ -乳球蛋白ESI值分别为52.3、56.4、59.0 min。Fachin等<sup>[21]</sup>认为蛋白质的乳化性能与其处理过程中构象变化密切相关。此外,本实验前期研究也发现加工手段胁迫蛋白质构象变化从而影响其功能性质<sup>[5]</sup>。为此,接下来的研究工作主要是分析表征和动态高压协同糖基化处理过程 $\beta$ -乳球蛋白结构变化。

### 2.3 DHPM协同糖基化处理对 $\beta$ -乳球蛋白-SH含量和表面疏水性 $H_0$ 的影响

表1 DHPM协同糖基化处理对 $\beta$ -乳球蛋白-SH含量和 $H_0$ 的影响  
Table 1 Effect of DHPM and glycosylation on the SH and  $H_0$  contents of  $\beta$ -lactoglobulin

压力/MPa	-SH含量/( $\mu$ mol/g pro)	$H_0$
0	52.05 $\pm$ 1.93 <sup>b</sup>	8580.3 $\pm$ 31.0 <sup>a</sup>
40	52.79 $\pm$ 0.20 <sup>b</sup>	8152.6 $\pm$ 31.2 <sup>b</sup>
120	55.91 $\pm$ 1.58 <sup>a</sup>	8298.2 $\pm$ 35.0 <sup>c</sup>

注:同列小写字母不同表示有显著性差异( $P < 0.05$ )。表2同。

由表1可知,DHPM协同糖基化处理促使 $\beta$ -乳球蛋白的游离-SH含量增加。120 MPa协同糖基化处理对 $\beta$ -乳球蛋白游离-SH含量变化具有显著影响( $P < 0.05$ )。据报道<sup>[16]</sup>,一个 $\beta$ -乳球蛋白分子仅仅含有一个游离-SH含量,且该游离巯基含量为54.6  $\mu$ mol/g pro。天然状态下, $\beta$ -乳球蛋白是以二聚体形式存在,游离-SH可能包埋在蛋白质的二聚体结构范围内,不能完全暴露出来。0 MPa和40 MPa协同糖基化处理后, $\beta$ -乳球蛋白样品的游离巯基含量分别为52.05  $\mu$ mol/g pro和52.79  $\mu$ mol/g pro,均低于54.6  $\mu$ mol/g pro,说明0 MPa和40 MPa协同糖基化处理后蛋白质仍可能处于聚集体状态,游离-SH没有完全暴露出来。随着DHPM处理压力升高至120 MPa后, $\beta$ -乳球蛋白-SH含量增加至55.91  $\mu$ mol/g pro且高于54.6  $\mu$ mol/g pro,意

味着120 MPa协同糖基化处理过程可能引起 $\beta$ -乳球蛋白二硫键断裂, 导致其蛋白质结构发生变化, 促使-SH含量显著上升。

本课题组前期采用DHPM处理研究 $\beta$ -乳球蛋白-SH含量变化时也发现DHPM处理诱导 $\beta$ -乳球蛋白轻微去折叠, 导致其-SH含量上升, 但数值仍未达到 $54.6 \mu\text{mol/g pro}^{[22]}$ 。这一研究结果与Monahan等<sup>[23]</sup>研究结果类似, 该研究发现蛋白质-SH含量的增加, 说明蛋白质构象发生了变化。

从表1还可以看出, DHPM协同糖基化处理对 $\beta$ -乳球蛋白 $H_0$ 具有显著影响 ( $P < 0.05$ )。0 MPa协同糖基化处理后 $\beta$ -乳球蛋白 $H_0$ 为8 580.3, 随着压力升高至40 MPa和120 MPa后,  $H_0$ 显著降低为8 152.6和8 298.2。研究表明蛋白质的结构变化与其乳化性质关系密切<sup>[24]</sup>。本课题组前期采用DHPM处理乳清蛋白研究其表面疏水性变化时发现DHPM处理后, 乳清蛋白的表面疏水性随着压力的上升先降低后增加, 其原因主要是蛋白质结构发生了变化<sup>[5]</sup>。乳化过程中, 蛋白吸附在油水界面, Hiller等<sup>[25]</sup>报道糖基化修饰能提高牛乳蛋白的乳化性能主要是由于糖基化产物在油水界面中亲水能力提高。在本实验中, DHPM协同糖基化处理胁迫 $\beta$ -乳球蛋白结构发生变化, 促使亲水基团从蛋白质内部暴露在水环境中; 与此同时, 糖分子与蛋白质共价交联也提高蛋白质表面亲水性能, 从而导致其表面疏水性降低以及乳化性能的提高。

#### 2.4 DHPM协同糖基化处理前后 $\beta$ -乳球蛋白二级结构分析

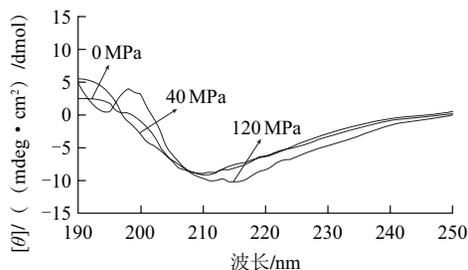


图3 DHPM协同糖基化处理后 $\beta$ -乳球蛋白CD谱图分析

Fig.3 CD spectral analysis of  $\beta$ -Lg treated by DHPM and glycosylation

DHPM协同糖基化处理前后 $\beta$ -乳球蛋白CD谱图如图3所示, 二级结构组成与比例如表2所示。众所周知,  $\beta$ -乳球蛋白是以 $\beta$ -折叠为主的蛋白质, 由9条反平行的 $\beta$ -折叠和分子C端上的一个主要的 $\alpha$ -螺旋构成<sup>[26]</sup>。CD谱图显示蛋白质在195 nm和210 nm左右分别有个正峰和负峰, 说明蛋白质是以 $\beta$ -折叠为主。这与表中数据相符,  $\beta$ -乳球蛋白的 $\beta$ -折叠含量最高。DHPM协同糖基化处理后 $\beta$ -乳球蛋白糖基化体的光谱发生红移现象, 说明蛋白质二级结构发生显著变化。从表2可以发现, 处理后的 $\beta$ -乳球蛋白 $\beta$ -折叠含量没有显著变化, 但 $\alpha$ -螺旋含量却显著降低。0、40、120 MPa协同糖基化处理后 $\alpha$ -螺旋含量分别为20.2%、13.1%和7.9%。说明DHPM协同糖基化处理

过程 $\beta$ -乳球蛋白 $\alpha$ -螺旋附近的二级结构发生显著变化。当 $\beta$ -乳球蛋白二级结构发生变化时, 可能促使亲水氨基酸暴露, 从而造成蛋白质乳化性能的提高。

表2 DHPM协同糖基化处理对 $\beta$ -乳球蛋白二级结构含量的影响  
Table 2 Effect of DHPM and glycosylation on the proportions of  $\beta$ -lactoglobulin secondary structure

压力/MPa	$\alpha$ -螺旋/%	$\beta$ -折叠/%	转角/%	无规卷曲/%
0	20.2 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	38.3 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	24.0 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	17.5 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>
40	13.1 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	39.2 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	22.6 $\pm$ 0.4 <sup>ad</sup>	25.1 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>
120	7.9 $\pm$ 0.4 <sup>c</sup>	38.8 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	21.4 $\pm$ 0.5 <sup>d</sup>	31.8 $\pm$ 0.4 <sup>c</sup>

#### 2.5 DHPM协同糖基化处理 $\beta$ -乳球蛋白三级结构分析

$\beta$ -乳球蛋白的内源荧光主要来源于色氨酸 (Trp), 它对周围环境非常敏感。DHPM协同糖基化处理 $\beta$ -乳球蛋白的荧光光谱如图4所示。0、40、120 MPa协同糖基化处理后 $\beta$ -乳球蛋白的荧光强度分别为1 684、1 555和1 831。此外, 不同条件处理下 $\beta$ -乳球蛋白的荧光图谱发生轻微的红移现象, 40 MPa协同糖基化处理后由0 MPa处理的350 nm红移至352 nm。根据Hattori等<sup>[9]</sup>的报道, 蛋白质的红移现象说明 $\beta$ -乳球蛋白结构发生变化。 $\beta$ -乳球蛋白单体主要包括两个色氨酸 (Trp19和Trp61)。根据相关报道及前期研究发现,  $\beta$ -乳球蛋白的糖基化位点可能主要发生在Lys60位置<sup>[8-9]</sup>。当40 MPa DHPM协同糖基化处理时,  $\beta$ -乳球蛋白在Lys60位置与低聚半乳糖发生糖基化反应, 可能导致Trp61被掩盖从而引起荧光淬灭。随着处理压力升高至120 MPa, 协同糖基化处理后,  $\beta$ -乳球蛋白发生去折叠现象, 促使Trp19被暴露出来, 导致蛋白质荧光强度升高。 $\beta$ -乳球蛋白结构发生变化时亲水氨基酸的暴露以及亲水糖分子的共价交联促使 $\beta$ -乳球蛋白乳化性能的提高。

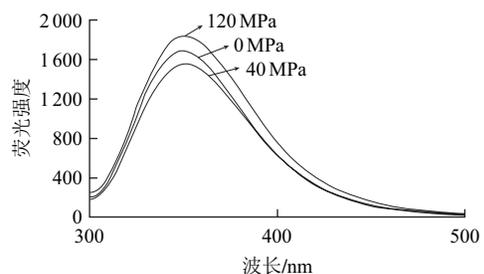


图4 DHPM协同糖基化处理对 $\beta$ -乳球蛋白荧光强度的影响

Fig.4 Effect of DHPM and glycosylation on the fluorescence intensity of  $\beta$ -lactoglobulin

### 3 结论

采用DHPM协同糖基化改性 $\beta$ -乳球蛋白, 研究处理过程对 $\beta$ -乳球蛋白乳化性的影响。结果表明DHPM协同糖基化处理显著提高 $\beta$ -乳球蛋白的乳化性和乳化稳定性。0 MPa糖基化处理后 $\beta$ -乳球蛋白的EAI和ESI值分别为

136.3 m<sup>2</sup>/g和52.3 min; 40 MPa和120 MPa协同糖基化处理后 $\beta$ -乳球蛋白的EAI值分别增加至168.1 m<sup>2</sup>/g和177.9 m<sup>2</sup>/g, ESI值分别升高为56.4 min和59.0 min。利用分子质量、—SH含量、表面疏水性和二、三级结构变化表征 $\beta$ -乳球蛋白结构变化。研究发现DHPM协同糖基化处理过程 $\beta$ -乳球蛋白结构变化可能促使其乳化性能提高。不同压力DHPM协同糖基化处理后,  $\beta$ -乳球蛋白与低聚半乳糖发生共价交联反应,  $\beta$ -乳球蛋白结构的变化(—SH含量升高、表面疏水性降低以及二、三级结构变化)可能造成 $\beta$ -乳球蛋白表面亲水基团的增加, 从而导致其乳化性能的提高。

#### 参考文献:

- [1] MORO A, BAEZ G D, BUSTI P A, et al. Effects of heat-treated beta-lactoglobulin and its aggregates on foaming properties[J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(5): 1009-1015.
- [2] LI C P, ENOMOTO H, OHKI S, et al. Improvement of functional properties of whey protein isolate through glycation and phosphorylation by dry heating[J]. Journal of Dairy Science, 2005, 88(12): 4137-4145.
- [3] KUMAR V, SHARMA V K, KALONIA D S. Effect of polyols on polyethylene glycol (PEG)-induced precipitation of proteins: impact on solubility, stability and conformation[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2009, 366(1/2): 38-43.
- [4] CORZO-MARTINEZ M C, CARRERA SANCHEZ F, JAVIER MORENO J M, et al. Interfacial and foaming properties of bovine beta-lactoglobulin: galactose Maillard conjugates[J]. Food Hydrocolloid, 2012, 27(2): 438-447.
- [5] LIU Chengmei, ZHONG Junzhen, LIU Wei, et al. The relationship between functional properties and aggregation changes of whey protein induced by high pressure microfluidization[J]. Journal of Food Science, 2011, 76(4): 341-347.
- [6] 涂越, 刘伟, 钟俊桢, 等. 低聚木糖修饰对牛乳 $\beta$ -乳球蛋白功能性质的影响[J]. 中国乳品工业, 2012, 40(12): 12-15.
- [7] JIANG Z M, BRODKORB A. Structure and antioxidant activity of Maillard reaction products from alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin with ribose in an aqueous model system[J]. Food Chemistry, 2012, 133(3): 960-968.
- [8] ZHONG Junzhen, XU Yujia, LIU Wei, et al. Antigenicity and functional properties of  $\beta$ -lactoglobulin conjugated with fructooligosaccharides in relation with conformational changes[J]. Journal of Dairy Science, 2013, 96(5): 2012-2019.
- [9] HATTORI M, MIYAKAWA S, OHAMA Y, et al. Reduced immunogenicity of beta-lactoglobulin by conjugation with acidic oligosaccharides[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(14): 4546-4553.
- [10] LI Zheng, LUO Yongkang, FENG Ligeng. Effects of Maillard reaction conditions on the antigenicity of alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin in whey protein conjugated with maltose[J]. European Food Research Technology, 2011, 233(3): 387-394.
- [11] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4[J]. Nature, 1970, 227: 680-685.
- [12] LI Xin, LUO Zenglin, CHEN Hongbing, et al. Isolation and antigenicity evaluation of beta-lactoglobulin from buffalo milk[J]. African Journal of Biotechnology, 2008, 7(13): 2258-2264.
- [13] PEARCE K N, KINSELLA J E. Emulsifying properties of proteins evaluation of a turbidimetric technique[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1978, 26(3): 716-723.
- [14] WANG Xiansheng, TANG Chuanhe, LI Biansheng, et al. Effects of high-pressure treatment on some physicochemical and functional properties of soy protein isolates[J]. Food Hydrocolloids, 2008, 22(4): 560-567.
- [15] ELLMAN G L. Tissue sulfhydryl groups[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1959, 82(1): 70-77.
- [16] SAVA N, van der PLANCKEN I, CLAEYS W, et al. The kinetics of heat-induced structural changes of beta-lactoglobulin[J]. Journal of Dairy Science, 2005, 88(5): 1646-1653.
- [17] HASKARD C A, LI-CHAN E C Y. Hydrophobicity of bovine serum albumin and ovalbumin determined using uncharged (PRODAN) and anionic (ANS-) fluorescent probes[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46(7): 2671-2677.
- [18] CHEN W L, HWANG M T, LIAU C Y, et al. Beta-lactoglobulin is a thermal marker in processed milk as studied by electrophoresis and circular dichroic spectra[J]. Journal of Dairy Science, 2005, 88(5): 1618-1630.
- [19] de la HOZ L, NETTO F M. Structural modifications of beta-lactoglobulin subjected to gamma radiation[J]. International Dairy Journal, 2008, 18(12): 1126-1132.
- [20] KATO A, MINAKI K, KOBAYASHI K. Improvement of emulsifying properties of egg-white proteins by the attachment of polysaccharide through maillard reaction in a dry state[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1993, 41(4): 540-543.
- [21] FACHIN L, VIOTTO W H. Effect of pH and heat treatment of cheese whey on solubility and emulsifying properties of whey protein concentrate produced by ultrafiltration[J]. International Dairy Journal, 2005, 15(4): 325-332.
- [22] ZHONG Junzhen, LIU Wei, LIU Chengmei, et al. Aggregation and conformational changes of bovine  $\beta$ -lactoglobulin subjected to dynamic high pressure microfluidization in relation with antigenicity[J]. Journal of Dairy Science, 2012, 95(8): 4237-4245.
- [23] MONAHAN F J, GERMAN J B, KINSELLA J E. Effect of pH and temperature on protein unfolding and thiol-disulfide interchange reactions during heat-induced gelation of whey proteins[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995, 43(1): 46-52.
- [24] CHAPLEAU N, de LAMBALLERIE-ANTON M. Improvement of emulsifying properties of lupin proteins by high pressure induced aggregation[J]. Food Hydrocolloid, 2003, 17(3): 273-280.
- [25] HILLER B, LORENZEN P C. Functional properties of milk proteins as affected by Maillard reaction induced oligomerisation[J]. Food Research International, 2010, 43(4): 1155-1166.
- [26] SHIBAYAMA N. Circular dichroism study on the early folding events of beta-lactoglobulin entrapped in wet silica gels[J]. FEBS Letters, 2008, 582(17): 2668-2672.