

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20250610002

引用格式: 杨惠仪, 刘秋美, 张雨萌, 等. 超声预处理对驴乳酪蛋白酶解物抗氧化性及结构的影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(15): 16–27.

YANG HY, LIU QM, ZHANG YM, *et al.* Effects of ultrasonic pretreatment on antioxidant activity and structure of donkey milk casein hydrolysate [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(15): 16–27. (in Chinese with English abstract).

超声预处理对驴乳酪蛋白酶解物抗氧化性及结构的影响

杨惠仪¹, 刘秋美¹, 张雨萌¹, 谢远方¹, 岳喜庆¹, 李墨翰^{1,2,3*}

(1. 沈阳农业大学食品学院, 沈阳 110866; 2. 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; 3. 上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200240)

摘要: 目的 探究超声协同酶解对驴乳酪蛋白抗氧化性及结构的影响, 优化复合处理工艺参数, 解析超声预处理对酶解过程的促进机制。**方法** 以驴乳酪蛋白为原料, 单因素试验优化超声参数(200 W、20 min、6 s/6 s 间歇比), 筛选中性蛋白酶与胰蛋白酶(质量比 2:1)复配, 结合响应面法优化酶解条件(酶添加量 4.86%、55.28 °C、pH 7.76)。通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)、红外光谱法等分析蛋白分子质量、二级结构及官能团变化, 测定 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)自由基清除率等抗氧化指标。**结果** 超声协同酶解使抗氧化能力达 69.77%, Fe³⁺还原能力提升 65.3%, 显著优于单一处理。结构显示 α -螺旋减少至 26.70%, 无规卷曲增至 28.35%, 芳香族氨基酸暴露, 巯基氧化为二硫键, 分子质量降低。响应面模型预测值与实测值吻合度高 ($R^2=0.9937$)。**结论** 超声预处理通过破坏蛋白胶束结构, 协同酶解释放抗氧化短肽, 显著提升抗氧化性, 研究结果为高附加值驴乳抗氧化产品的生产提供可参考的工艺参数, 有助于推动驴乳产业的发展, 提高驴乳的经济价值。

关键词: 超声; 酶解; 酪蛋白; 抗氧化性; 结构

Effects of ultrasonic pretreatment on antioxidant activity and structure of donkey milk casein hydrolysate

YANG Hui-Yi¹, LIU Qiu-Mei¹, ZHANG Yu-Meng¹, XIE Yuan-Fang¹, YUE Xi-Qing¹, LI Mo-Han^{1,2,3*}

(1. College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China; 2. State Key Laboratory of Dairy Biotechnology, Shanghai Engineering Research Center of Dairy Biotechnology, Dairy Research Institute, Bright Dairy & Food Co., Ltd., Shanghai 200436, China; 3. School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

ABSTRACT: Objective To explore the effects of ultrasonic synergistic enzymatic hydrolysis on the antioxidant

收稿日期: 2025-06-10

基金项目: 辽宁省自然科学基金联合基金项目(2023-BSBA-281)

第一作者: 杨惠仪(2004—), 女, 主要研究方向为动物源食品加工与利用。E-mail: YangHuiYi805@163.com

*通信作者: 李墨翰(1994—), 男, 副教授, 主要研究方向为动物源食品加工与利用。E-mail: fslimohan@126.com

activity and structure of donkey milk casein, optimize the process parameters of composite treatment, and analyze the promotion mechanism of ultrasonic pretreatment on the enzymatic hydrolysis process. **Methods** Using donkey milk casein as raw material, the ultrasonic parameters (200 W, 20 min, 6 s/6 s intermittency ratio) were optimized by single factor experiment, the neutral protease and trypsin (the mass ratio was 2:1) were screened, and the enzymatic hydrolysis conditions were optimized by response surface method (enzyme addition amount 4.86%, 55.28 °C, pH 7.76). The changes of protein molecular weight, secondary structure and functional groups were analyzed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and infrared spectroscopy. The antioxidant indexes such as 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) scavenging rate were determined. **Results** Ultrasonic synergistic enzymatic hydrolysis resulted in antioxidant ability of 69.77% and a 65.3% increase in Fe^{3+} reducing capacity, which was significantly better than that of the single treatment. The structure showed that the α -helix decreased to 26.70%, the random coil increased to 28.35%, the aromatic amino acids were exposed, the sulfhydryl groups were oxidized to disulfide bonds, and the molecular weight was reduced. The predicted value of the response surface model was in good agreement with the measured value ($R^2=0.9937$). **Conclusion** The results of ultrasonic pretreatment significantly improves the antioxidant activity by destroying the structure of protein micelles and releasing antioxidant short peptides in synergy with enzymes, which provides a reference process parameter for the production of high value-added donkey milk antioxidant products, which is helpful to promote the development of donkey milk industry and improve the economic value of donkey milk.

KEY WORDS: ultrasonic; hydrolysis; casein; antioxidant activity; structure

0 引言

驴乳富含酪蛋白^[1-2], 其氨基酸组成均衡且具有抗氧化^[3]、抗菌^[4]等生物活性, 在功能食品与营养领域具有广阔应用前景^[5-7]。当下, 氧化损伤相关健康问题频发, 食品中抗氧化成分需求迫切, 而酪蛋白作为驴乳关键成分, 提升其抗氧化性对开发功能性食品、增强产品健康价值意义重大, 可更好发挥抗氧化、延缓氧化劣变等作用, 满足消费者对健康食品的需求^[8-10]。目前, 单一物理或酶解技术对酪蛋白抗氧化性的提升效果有限^[11-12], 现有研究表明超声辅助酶解可用于对过敏原进行过敏性降低处理^[13], 超声预处理与酶解的协同作用因能突破天然蛋白结构限制^[14]、增强活性肽释放潜力, 成为改善蛋白功能特性的研究热点。国内外研究表明, 超声空化效应可破坏酪蛋白胶束的疏水相互作用^[15-18], 暴露内部活性位点, 而酶解能定向切割肽链生成抗氧化肽段^[19]。然而, 现有研究对超声与酶解协同处理驴乳酪蛋白的抗氧化机制研究较少。

本研究以驴乳酪蛋白为对象, 旨在通过超声预处理结合酶解技术, 探究其对抗氧化活性的提升效果及作用机制。首先通过单因素试验优化超声参数, 解析超声对蛋白二级结构(傅里叶红外光谱)、三级结构(紫外/荧光光谱)的影响; 进而筛选复合酶配比并优化酶解工艺(响应面法), 明确超声与酶解协同作用下蛋白分子降解规律[十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)]; 研究结果将为驴乳功能性产品开发提供理论依据, 同时为蛋白复合

改性技术在食品工业中的应用拓展新思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

驴乳酪蛋白粉(实验室自制)。

木瓜蛋白酶(酶活力 32767 U/g)、碱性蛋白酶(酶活力 105466 U/g)、胰蛋白酶(酶活力 1250000 U/g)、胃蛋白酶(酶活力 348204 U/g)、中性蛋白酶(酶活力 88070 U/g)(诺维信生物有限公司); 四硼酸钠(分析纯, 无锡市展望化工试剂有限公司); SDS、邻苯二甲醛、氢氧化钠、苯氨基-萘磺酸铵盐、乙二胺四乙酸二钠、尿素、8-苯氨基-萘磺酸铵盐(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); *L*-丝氨酸、硫代巴比妥酸、考马斯亮蓝 R250(分析纯, 北京索莱宝有限公司); 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)(分析纯, 美国 Sigma 公司); 铁氰化钾(分析纯, 天津博迪化工股份有限公司); 无水硫酸铜(CuSO_4)(分析纯, 天津市华盛化学试剂有限公司); 氯化铁(分析纯, 无锡市展望化工试剂有限公司); 菲洛嗪(分析纯, 合肥博美生物科技有限责任公司); 邻苯二酚紫(分析纯, 天津市鲁鑫化工科技有限公司); 三氯乙酸、 β -巯基乙醇(分析纯, 天津市巴斯夫化工有限公司); 三(羟甲基)氨基甲烷(Tris)、三(羟甲基)甲基甘氨酸(Tricine)(分析纯, 上海麦克林生化科技有限公司); 5,5-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(分析纯, 合肥千盛生物科技有限公司); 甲醇、冰乙酸(分析纯, 成都市科隆化学有限公司)。

1.2 仪器与设备

Sonics VCX750 超声波细胞破碎仪(美国 Sonics 公司); 雷磁 PHS-25 pH 计(上海仪电科学仪器股份有限公司); UV2700 紫外可见分光光度计(日本岛津公司); Eon 酶标仪、PowerPac Basic 电泳仪(美国 BioTek 仪器有限公司); SQP 天平(精度 0.01 mg, 赛多利斯科学仪器有限公司); Hitachi F-4600 荧光光谱仪(日本日立公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 蛋白酶选择及配比确定

将冻干的酪蛋白粉用 0.01 mol/L, pH 7.4 的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)配成质量浓度为 10 mg/mL 母液, 取 25 mL 于高筒烧杯中, 放入超声细胞破碎仪中, 探头浸入液面下 1 cm, 进行超声波处理, 超声处理条件设置为: 超声功率 200 W, 超声处理 20 min, 超声间歇比 6 s/6 s。

通过预试验固定酶解条件: 底物浓度 4%、酶添加量 4%、时间 3 h, 将超声处理后的溶液, 按预试验固定酶解条件, 在各蛋白酶最适 pH 和温度条件下酶解 3 h(表 1), 反应进程中用 0.1 mol/L NaOH 标准溶液稳定酶解液 pH, 根据水解度(degree of hydrolysis, DH)、DPPH 自由基清除率的大小, 筛选出酶解效果最好的 2 种酶。将效果最优的两种酶以 1:1、1:2、1:3、2:1、3:1 的质量比进行复配, 以 DH、DPPH 自由基清除率的大小为指标筛选最佳的酶配比。

表 1 蛋白酶种类及最适条件
Table 1 Types and optimal conditions of protease

蛋白酶种类	最适 pH	最适温度/°C
碱性蛋白酶	8.0~9.0	50~60
中性蛋白酶	6.5~7.5	45~55
胃蛋白酶	1.5~2.5	35~45
胰蛋白酶	7.5~8.5	45~55
木瓜蛋白酶	6.0~7.0	55~65

1.3.2 超声辅助酶解法单因素试验

以 DH 和抗氧化性为指标, 各单因素的基础条件为温度 45 °C、时间 3 h、pH 6.5、酶添加量 4%、底物浓度 4%。各单因素的水平为温度 45、50、55、60、65 °C; 时间 1、2、3、4、5 h; pH 6.5、7.0、7.5、8.0、8.5; 酶添加量 1%、2%、3%、4%、5%; 底物浓度 2%、3%、4%、5%、6%。根据加入 NaOH 的量, 计算 DH。水解结束后时间组煮沸 10 min; 温度、底物浓度组煮沸 15 min; pH、酶添加量组煮沸即可, 终止酶解, 测定抗氧化率。

1.3.3 酪蛋白 DH 测定

准备待测的酪蛋白水解溶液, 在水解反应开始前, 使用 0.1 mol/L NaOH 溶液将样品的初始 pH 调整至目标 pH, 使用 pH 计实时测定, 确保在设定的 pH 范围内。当 pH 下降时, 通过滴定管滴加 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液, 至 pH 恢

复至设定的数值。DH 可通过公式(1)计算:

$$DH/\% = \frac{V \times C \times f}{\text{样品质量}} \times 100\% \quad (1)$$

式中: V 为 NaOH 的体积, L; C 为 NaOH 的浓度, mol/L; f 为氨基酸中氮的摩尔化当量, 通常为 14 分子量。

1.3.4 酪蛋白抗氧化性测定

(1) DPPH 自由基清除能力分析

参考文献[20]方法稍作修改。将驴乳酪蛋白溶液配制为 4 mg/mL, 移取 2.5 mL 至反应试管中, 定量加入等体积 0.2 mmol/L DPPH 溶液。混合体系于避光环境孵育 30 min 后, 设定离心力 5000 r/min 进行 10 min 离心。取上清液在 517 nm 波长下测定吸光值。超纯水替代样品的空白对照组, 乙醇为对照组。按公式(2)计算 DPPH 自由基清除率:

$$\text{DPPH 自由基清除率}/\% = \left(1 - \frac{A_s - A_b}{A_c}\right) \times 100\% \quad (2)$$

式中: A_s 、 A_b 和 A_c 分别为样品组、空白组和对照组的吸光度。

(2) Fe^{3+} 还原能力分析

参考文献[21]方法稍作修改。将待测样品经超纯水稀释至目标质量浓度(2.0 mg/mL), 准确移取 0.5 mL 并与等体积浓度为 1% 铁氰化钾溶液及 0.02 mol/L 缓冲液混合。反应后置于 55 °C 恒温孵育 20 min 后立即冰浴降温, 加入 0.5 mL 浓度为 10% 的三氯乙酸溶液进行混合。取混匀后液体 1 mL 与显色剂体系(1 mL 超纯水+0.2 mL 0.1% FeCl_3 溶液)经涡旋振荡混匀, 静置显色 10 min 后, 于 700 nm 处测定吸光值。用超纯水替代样品作为空白对照组。按公式(3)计算 Fe^{3+} 还原能力:

$$\text{Fe}^{3+} \text{还原能力} = A_n - A_m \quad (3)$$

式中: A_n 和 A_m 分别为样品组、对照组的吸光度。

(3) 金属离子螯合能力分析

Fe^{2+} 螯合能力, 参考文献[22]试验方法, 将 1 mL 驴乳酪蛋白样品, 3.7 mL 去离子水, 0.1 mL FeCl_2 溶液和 0.2 mL 菲啰啉溶液分别加入到试管中, 混合均匀, 混合溶液在常温静置 20 min, 取上清液于 562 nm 处测定吸光度, 用去离子水作为对照组并进行调零。按公式(4)计算 Fe^{2+} 螯合能力:

$$\text{Fe}^{2+} \text{螯合能力}/\% = \left(1 - \frac{A_1}{A_0}\right) \times 100\% \quad (4)$$

式中: A_0 为空白对照的吸光度; A_1 为样品溶液的吸光度。

Cu^{2+} 螯合能力测定, 参考文献[22]试验方法, 采用邻苯二酚紫测定, 将 1 mL 浓度为 2 mmol/L 的 CuSO_4 溶液、1 mL 浓度为 10% 的吡啶与 20 μL 浓度为 0.1% 的邻苯二酚紫进行混合, 混合均匀后加入 1 mL 样品溶液, 继续混合均匀, 室温下静置 5 min。取上清液在波长 632 nm 处测定吸光度, 以 1 mL 的去离子水作为对照组。按公式(5)计算 Cu^{2+} 螯合能力:

$$\text{Cu}^{2+} \text{螯合能力}/\% = \left(1 - \frac{A_2}{A_3}\right) \times 100\% \quad (5)$$

式中: A_2 为空白对照的吸光度; A_3 为样品溶液的吸光度。

1.3.5 响应面优化设计

(1) Plackett-Burman 试验

Plackett-Burman 试验次数为 12 次, 利用 Design-expert 13 进行试验的组合设计, 对 A-温度、B-时间、C-pH、D-酶添加量和 E-底物浓度 5 个因素进行考察(表 2), 以 DPPH 自由基清除率为响应值, 测定各因素组合对抗氧化性的影响。

表 2 Plackett-Burman 设计因子水平及编码值
Table 2 Design factor levels and coding values of Plackett-Burman

编码水平	A-温度 /°C	B-时间 /h	C-pH	D-酶添加量 /%	E-底物浓度 /%
低(-1)	50	2	7	3.5	3
高(+1)	60	4	8	4.5	5

(2) 最陡爬坡试验

最陡爬坡试验是通过在参数空间中进行局部线性回归, 识别响应函数在特定条件下的变化率。试验过程主要是围绕当前设计点对各影响因素进行微小变化, 观察响应变量的变化, 选择温度、pH、酶添加量 3 个最显著因素进行最陡爬坡试验。

(3) 响应面试验

Box-Behnken 设计是一种常用的响应面设计方法^[23]。在 Plackett-Burman 试验和最陡爬坡试验的基础上, 以温度、pH、酶添加量为变量, 以驴乳酪蛋白水解产物的 DPPH 自由基清除率为响应值 Y_1 , 进行 3 因素 3 水平的试验, 试验水平的选取及编码如表 3 所示。

表 3 Box-Behnken 试验中变量及其水平
Table 3 Variables and their levels in the Box-Behnken experiment

因素	编码水平		
	-1	0	1
A-温度/°C	55.0	55.5	56.0
C-pH	7.5	7.9	8.3
D-酶添加量/%	4.0	4.5	5.0

1.3.6 超声处理结合酶解驴乳酪蛋白的样品制备

将冻干处理的驴乳酪蛋白粉用 0.01 mol/L, pH 7.4 的 PBS 配成质量浓度为 10mg/mL 的溶液, 在 25 °C 条件下磁力搅拌 2 h, 取 25 mL 于烧杯中, 放入超声波细胞破碎仪中(探头直径为 6 mm, 超声探头浸入液面下 1 cm)进行超声波处理, 超声处理条件设置为: 超声功率 200 W, 超声间歇比 6 s/6 s, 超声处理 20 min。45 °C 水浴加热 3 h, 未超声和超声处理后的驴乳酪蛋白分别加入酶与底物的质量比为 4% 的复合酶, 调节 pH 至 6.5, 45 °C 水浴加热 3 h。

1.3.7 SDS-PAGE 电泳

基于文献[24]方法略作调整, 40 μ L 样品中加入 10 μ L 非还原上样缓冲液混合, 在 100 °C 温度下加热 5 min, 冷却后进

行 50 s 离心, 取上清液进行上样, 每孔上样 20 μ L, Marker 每孔上样 8 μ L。电压 120 V, 当样品条带跑至玻璃板边缘大约 0.5 cm 时停止电泳。固定时间 20 min, 染色 3 h 后, 用甲醇-冰乙酸脱色液进行脱色, 直至出现清晰的蛋白条带。

1.3.8 傅里叶红外光谱分析

基于文献[25]方法略作调整。将 2 mg 样品与 KBr 粉末均匀混合后精细研磨, 经液压成型工艺制备透明薄片。采用傅里叶变换红外光谱仪在恒温条件(25 °C)下进行全波长扫描, 参数设定为: 波数范围 4000~400 cm^{-1} , 光谱分辨率 4 cm^{-1} , 扫描 64 次。试验设置纯 KBr 薄片作为空白对照组, 获取的原始光谱数据通过 OMNIC 进行多峰拟合处理。通过 Peak Fit v4.12 软件进行处理并计算蛋白二级结构的相对含量。

1.3.9 紫外吸收光谱分析

基于文献[22]方法略作调整, 样品使用 PBS 稀释至 1 mg/mL, 取 3 mL 样品打入两面透光的比色皿中, 用 PBS 作为空白对照, 检测前使用两种不同 pH 的 PBS 对仪器进行基线校正, 在温度为 25 °C、波长为 190~450 nm 的条件下对样品进行扫描, 参数设置为: 分辨率 0.5 nm, 扫描步长 1 nm, 速率 50 nm/min, 得到紫外吸收光谱后, 选择波长为 200~450 nm 的蛋白样品紫外吸收光谱进行分析。

1.3.10 内源荧光光谱分析

基于文献[25]方法, 样品使用 PBS 稀释至 0.5 mg/mL。取 3 mL 样品加入比色皿中, 用 PBS 作为空白对照测定参数设置为: 扫描范围 290~450 nm, 激发狭缝 5 nm, 发射狭缝 5 nm, 扫描速度 1200 nm/min, 激发波长 280 nm, 电压 500 V, 测定样液的内源荧光发射光谱, 并分析其内源荧光强度的变化。

1.4 数据处理

通过 Design-Expert 13 软件进行响应面试验设计和分析, 所有试验均平行测定 3 次, 结果用平均值 \pm 标准偏差表示, 使用软件 IBM SPSS Statistix 26 进行显著性分析, $P < 0.05$ 为差异显著, $P > 0.05$ 为差异不显著。采用 Origin 2022 软件作图。

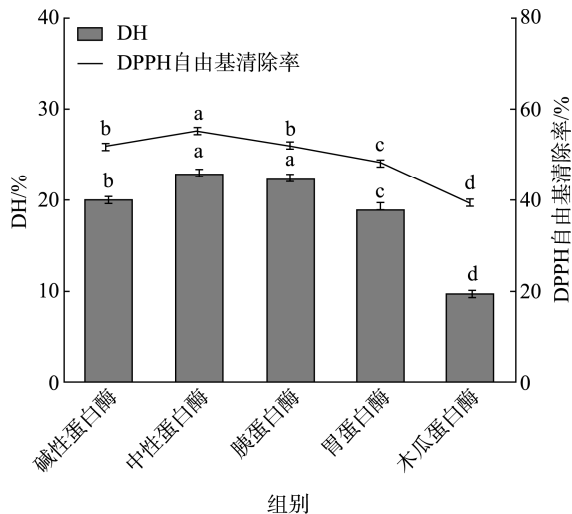
2 结果与分析

2.1 复合酶对抗氧化性的影响

2.1.1 单酶酶解效果的比较

酶解特性研究表明, DH 可作为肽键断裂比例的量化指标^[26-27], 能反映蛋白酶解进程, 而 DPPH 自由基清除率反映样品降低羟自由基、烷自由基和过氧化自由基等的的能力, 被广泛证实为评价物质抗氧化效能的可靠参数^[28]。

如图 1 数据所示, 中性蛋白酶与胰蛋白酶的 DH 分别达 22.83% 和 22.25%, DPPH 自由基清除率则达到 55.33% 与 51.83%。木瓜蛋白酶组在两项指标中均呈现显著劣势(DH<10%, DPPH 自由基清除率<40%)。基于酶解效率与抗氧化功能的测定, 最终选定中性蛋白酶与胰蛋白酶进行后续试验。



注: 不同小写字母表示组间差异显著($P < 0.05$), 图 2~3、9 同。

图 1 单酶酶解的 DH 及抗氧化性

Fig.1 DH and antioxidant activity of single enzyme hydrolysis

2.1.2 复合酶酶解效果的比较

由于酶具有特异性, 当下越来越多的研究都选择使用多种酶复配进行酶解, 不仅可以提高 DH, 在一定程度上还可以提高抗氧化性^[29]。选择中性蛋白酶与胰蛋白酶按比例复配后水解酪蛋白, DH、DPPH 自由基清除率如图 2 所示。从图 2 中可以看出, 中性蛋白酶与胰蛋白酶以 2:1 复配时 DH 可达 27.73%, DPPH 自由基清除率最高达 57.3%, 显著高于其他复配组合($P < 0.05$), 因此, 选择中性蛋白酶与胰蛋白酶配比为 2:1 进行驴乳酪蛋白的酶解。

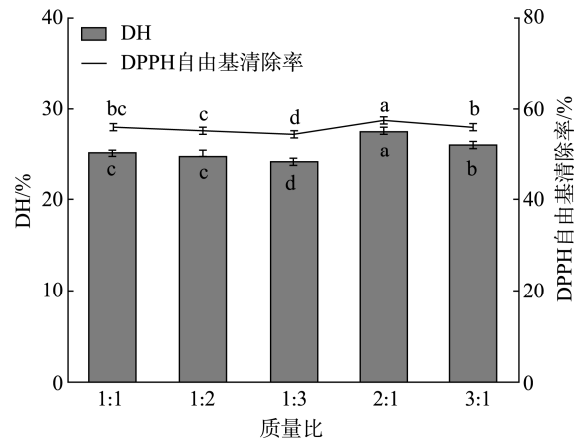


图 2 复合酶酶解的 DH 及抗氧化性

Fig.2 DH and antioxidant activity of composite enzyme hydrolysis

2.2 单因素试验

图 3 为各因素下蛋白酶酶解的 DH 及抗氧化性。

由图 3(a)可以发现, DH 和 DPPH 自由基清除率随温度变化均呈先升后降的趋势并出现一个峰值(55 °C), 适度的热效应也可增加酶的构象柔韧性, 从而提高胰蛋白酶和中性蛋白酶两种酶的活性协同性, 获得最佳的水解率和抗氧化性^[29]。以 DPPH 自由基清除率为主要标准, 55 °C 为最佳酶解温度。

由图 3(b)可知, DH 和 DPPH 自由基清除率随着时间的增长, 呈现先升高后降低的趋势, 在 3 h 时均达到峰值。在反应前 3 h 时, 复配酶之间表现出较强的协同作用, 使酪蛋白快速降解释放出富含抗氧化基团的短肽片段, 并且新

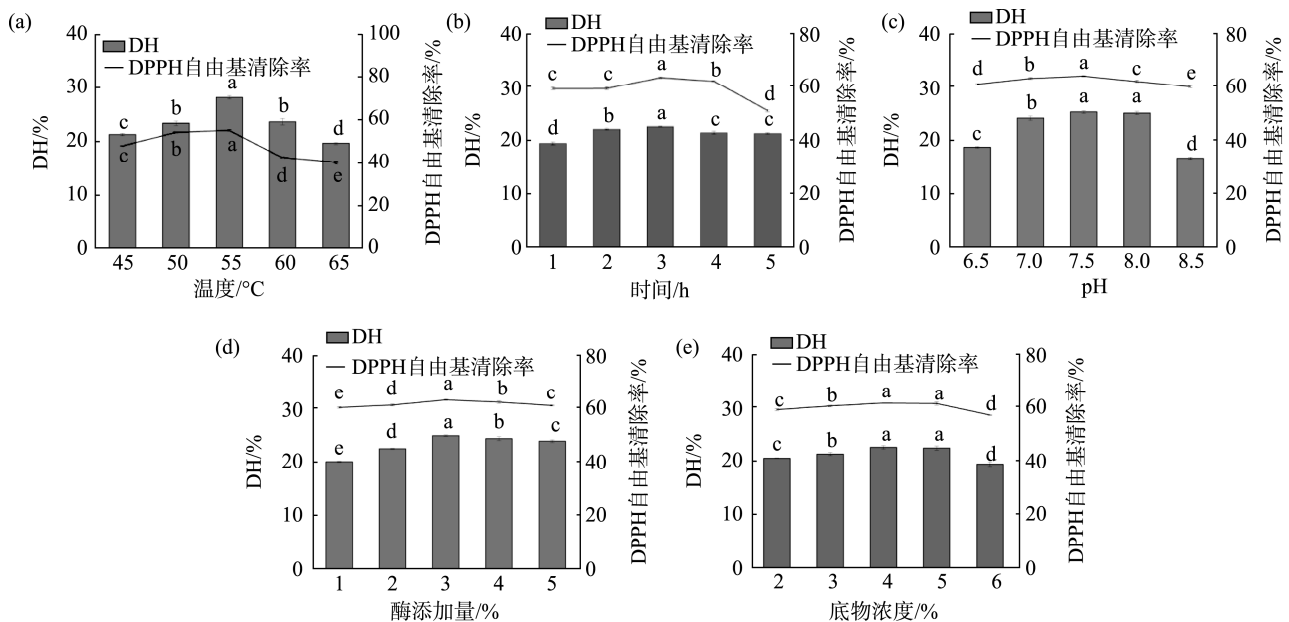


图 3 各因素下蛋白酶酶解的 DH 及抗氧化性

Fig.3 DH and antioxidant activity of protease hydrolysis under various factors

生成的肽段其活性位点未被破坏, 共同推动 DH 与 DPPH 自由基清除率升高。因此, 以 DPPH 自由基清除率为主要判断标准时, 选择 3 h 为酶解驴乳酪蛋白的最佳时间。

如图 3(c)所示, DH 和 DPPH 自由基清除率随 pH 升高, 二者先上升后降低, 且在 pH 7.5 处同时达到峰值。pH 6.5~7.5 时, 中性蛋白酶与胰蛋白酶的协同增效作用较突出。因此, 以 DPPH 自由基清除率为主要参考指标, 将 pH 7.5 确定为酶解驴乳酪蛋白的最佳 pH。

图 3(d)表明, 随着酶添加量的升高, DH 表现出先升后降的趋势, 在 3%时达最大值; 而 DPPH 自由基清除率变化幅度不大, 同样在 3%时达最大值。这表明酶量对 DH 和抗氧化性具有非线性影响。以 DPPH 自由基清除率为判断指标, 选择 3%为酶解驴乳酪蛋白的最佳酶添加量。

由图 3(e)可以看出, 随着底物浓度的升高, DH 和 DPPH 自由基清除率均在 4%达最大值。低浓度底物情况下(2%~4%)底物与酶的摩尔比逐渐优化, 得到具有抗氧化活性的短肽片段, 同时保证反应体系的传质效率, 使水解产物的生成速度和自由基清除效果处于最优化状态, 通过评价指标 DPPH 自由基清除率, 确定 4%为酶水解驴乳酪蛋白的最适浓度。

2.3 酶解优化设计及结果分析

2.3.1 Plackett-Burman 试验设计筛选结果

对表 4 Plackett-Burman 试验设计与结果进行方差分析, 使用 Lenth 方法识别 Plackett-Burman 试验中的显著效应^[30], 得到因素标准化效应的半正态概率图(图 4)和帕累托图(图 5)。

在图 4 中, 因素 D、A 和 C 的标准化效应点远离拟合线, 表明它们是显著因素($P < 0.05$), 即酶添加量、温度和时间是影响抗氧化性的主要因素, 而其他因素的标准化效应值较小。

通过图 5 的标准化效应帕累托图, 可以看出因素 D、A 和 C 超过 t 值, 表明它们是显著因子^[31]。

表 4 Plackett-Burman 试验设计与结果

试验号	A/°C	B/h	C	D/%	E/%	DPPH 自由基清除率/%
1	60	4	7	4.5	5	67.16
2	50	4	8	3.5	5	55.63
3	60	2	8	4.5	3	63.21
4	50	4	7	4.5	5	62.51
5	50	2	8	3.5	5	54.06
6	50	2	7	4.5	3	64.96
7	60	2	7	3.5	5	62.50
8	60	4	7	3.5	3	64.10
9	60	4	8	3.5	3	59.34
10	50	4	8	4.5	3	61.31
11	60	2	8	4.5	5	63.73

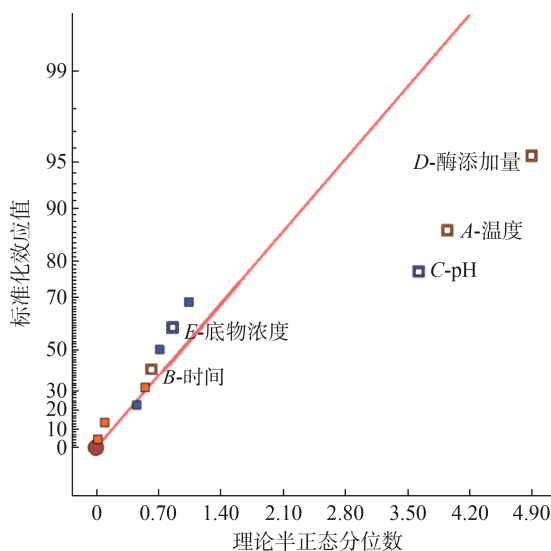


图 4 标准化效应的半正态概率效应图($\alpha=0.05$)

Fig.4 Semi normal probability effects diagram of standardization effects ($\alpha=0.05$)

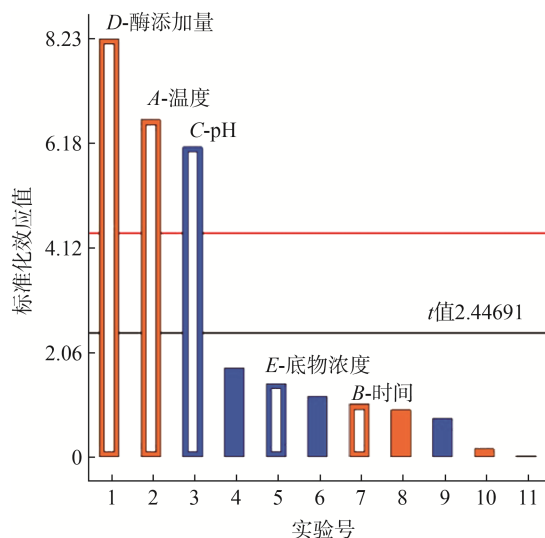


图 5 标准化效应的帕累托图($\alpha=0.05$)

Fig.5 Pareto chart of standardization effects ($\alpha=0.05$)

由 Plackett-Burman 试验的显著性分析见表 5, 该模型的 $P < 0.01$, 表明这一模型极显著, 整个回归区域的拟合性能良好。相关系数 $R^2=0.9621$, 说明此模型能解释 96.21% 的试验数据变异量, 有 3.79% 的变异不能用此模型解释(校正系数 $R^2_{adj}=0.9306$), CV 越小, 试验的可信度和精确度越高, $CV=1.68\%$, 说明 Plackett-Burman 试验的可靠性较高。精密密度 > 4.0 为合理^[32], 此试验精密密度为 17.9891。通过对数数据进行多元回归拟合, 得到回归方程如公式(6)所示:

$$Y=48.062+0.395A+0.312B-3.633C+4.9D-0.432E \quad (6)$$

2.3.2 最陡爬坡试验结果

最陡爬坡试验由回归方程(6)可知, 因素 D 偏回归系数为 4.9, 表明因素 D 对 DPPH 自由基清除率的影响为 7 下正效应, 即随着 D 因素的增加, DPPH 自由基清除率呈上

表 5 Plackett-Burman 试验因素、水平及显著性分析
Table 5 Factors, levels and significance analysis of Plackett-Burman test

来源	自由度	平方和	均方	<i>F</i>	<i>P</i>	显著性
模型	5	161.92	32.38	30.49	0.0003	显著
<i>A</i> /°C	1	46.89	46.89	44.14	0.0006	显著
<i>B</i> /h	1	1.17	1.17	1.10	0.3352	
<i>C</i>	1	39.60	39.60	37.28	0.0009	显著
<i>D</i> %	1	72.03	72.03	67.81	0.0002	显著
<i>E</i> %	1	2.24	2.24	2.11	0.1970	
残差	6	6.37	1.06	30.49	0.0003	
综合	11	168.29	32.38	44.14	0.0006	
$R^2=0.9621$		$R_{\text{Pred}}^2=0.8485$		CV/%=1.68		
$R^2_{\text{adj}}=0.9306$		精密度=17.9891				

注: 变异系数(coefficient of variation, CV)。

升趋势; *C* 因素为负效应, *A* 因素为正效应。因此选取 *D*、*C*、*A* 3 个因素做响应面试验, 响应面试验中 3 个因素的试验次数为 20。最显著的为因素 *D*, 因此选择 *D* 为爬坡单位。 *A*、*C*、*D* 步长计算如公式(7)~(9)所示:

$$A \text{ 步长} = \frac{0.395}{4.9} \times \frac{60-50}{2} = 0.403 \quad (7)$$

$$C \text{ 步长} = \frac{3.633}{4.9} \times \frac{8-7}{2} = 0.37 \quad (8)$$

$$D \text{ 步长} = \frac{4.9}{4.9} \times \frac{4.5-3.5}{2} = 0.5 \quad (9)$$

式中: *A* 根据试验实际取为 0.5 °C; *C* 根据试验实际取为 pH=0.4; 后续试验 *D* 步长取 0.5%。

根据步长计算结果(7)~(9)设计最陡爬坡试验表格, 如表 6 所示。

由表 6 可知, 处理 2 的 DPPH 自由基清除率达到最大值, 因此以处理 2 为响应面试验的中心点。

表 6 最陡爬坡试验设计及其结果

Table 6 Design and results of steepest climbing test

处理	步长	<i>D</i> %	<i>A</i> /°C	<i>C</i>	DPPH 自由基清除率/%
1	0	4.0	55.0	7.5	59.91
2	0+1Δ	4.5	55.5	7.9	65.25
3	0+2Δ	5.0	56.0	8.3	64.53
4	0+3Δ	5.5	56.5	8.7	60.72
5	0+4Δ	6.0	57.0	9.1	55.28
6	0+5Δ	6.5	57.5	9.5	53.74

注: Δ 为一个步长单位。

2.3.3 Box-Behnken 响应面法试验结果

根据最陡爬坡试验, 以处理 2 为中心点实行 Box-Behnken 试验^[23], 选择酶添加量、pH 和温度 3 个因素作为自变量, 根据 Box-Behnken 设计建立 3 因素 3 水平试验, 以 DPPH 自由基清除率为响应值。试验设计及结果见表 7。

表 7 Box-Behnken 试验设计及其结果

Table 7 Design and results of Box-Behnken experimental

试验号	<i>D</i> %	<i>A</i> /°C	<i>C</i>	DPPH 自由基清除率/%
1	4.0	55.0	7.9	65.61
2	5.0	55.0	7.9	65.77
3	4.0	56.0	7.9	65.44
4	5.0	56.0	7.9	66.12
5	4.0	55.5	7.5	65.56
6	5.0	55.5	7.5	65.89
7	4.0	55.5	8.3	65.83
8	5.0	55.5	8.3	65.98
9	4.5	55.0	7.5	65.87
10	4.5	56.0	7.5	66.07
11	4.5	55.0	8.3	66.21
12	4.5	56.0	8.3	66.08
13	4.5	55.5	7.9	66.71
14	4.5	55.5	7.9	66.79
15	4.5	55.5	7.9	66.75
16	4.5	55.5	7.9	66.78
17	4.5	55.5	7.9	66.76

通过对数据进行二次多元回归拟合, 得到二次多项式方程如公式(10)所示:

$$Y = 66.76 + 0.1650D + 0.0313A + 0.0887C + 0.1300DA - 0.0450DC - 0.0825AC - 0.6328D^2 - 0.3903A^2 - 0.3102C^2 \quad (10)$$

模型的显著性小于 0.01, 失拟项大于 0.05, 表明该模型极显著, 说明模型与实际数据拟合较好, 相关系数 $R^2=0.9937$, 校正系数 $R^2_{\text{adj}}=0.9856$ 说明预测值与实测值之间具有高度相关性, 该模型可以解释 98.56% 的变化, 可用于分析和预测酶解处理后蛋白的抗氧化性的变化情况。从表 8 中可以看出, 因素 *D* 和 *C*、交互项 *DA*、*AC* 对抗氧化性有显著性影响, *DC* 没有显著性影响; 二次项 D^2 、 A^2 、 C^2 对抗氧化性有显著性影响。由 *F* 可以看出, 各因素影响程度顺序为: $D > C > A$ 。

表 8 Box-Behnken 试验设计二次模型方差分析

Table 8 Analysis of variance of Box-Behnken experimental design quadratic model

来源	平方和	自由度	均方	<i>F</i>	<i>P</i>	显著性
模型	3.4100	9	0.3784	122.60	<0.0001	显著
<i>D</i>	0.2178	1	0.2178	70.57	<0.0001	显著
<i>A</i>	0.0078	1	0.0078	2.53	0.1556	
<i>C</i>	0.0630	1	0.0630	20.42	0.0027	显著
<i>DA</i>	0.0676	1	0.0676	21.90	0.0023	显著
<i>DC</i>	0.0081	1	0.0081	2.62	0.1493	
<i>AC</i>	0.0272	1	0.0272	8.82	0.0208	显著
D^2	1.6900	1	1.6900	546.19	<0.0001	显著
A^2	0.6412	1	0.6412	207.76	<0.0001	显著
C^2	0.4053	1	0.4053	131.31	<0.0001	显著
残差	0.0216	7	0.0031			
失拟	0.0177	3	0.0059	6.09	0.0567	不显著
$R^2=0.9937$		$R_{\text{Pred}}^2=0.9155$		CV/%=0.0840		
$R^2_{\text{adj}}=0.9856$		精密度=30.1989				

利用回归模型预测不同酶解条件下的抗氧化性。为更加直观地反映模型预测效果, 分别绘制模型预测值与试验

值相关图, 如图 6 所示。可以看出, 各个样本点都近乎分布在 45°对角线上, 说明该模型对于预测各个酶解条件下的抗氧化性与试验结果具有较高的拟合度, 二者较为接近。

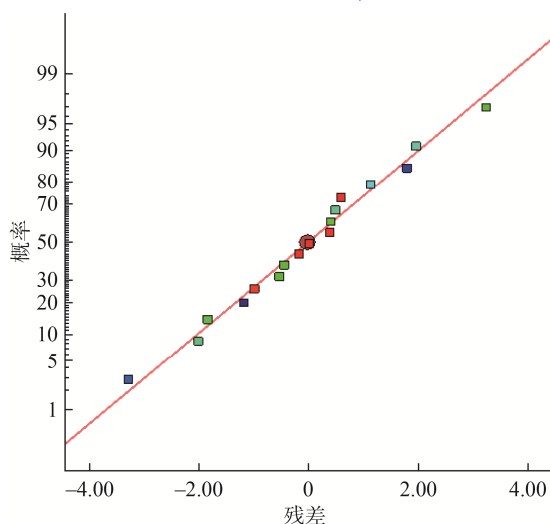


图 6 模型预测值与试验值相关性
Fig.6 Correlation between model predicted values and experimental values

理想的模型通常要求大部分样本预测误差在模型的 ± 2 标准差(standard deviation, SD)范围以内, 由图 7 可以看出, 该模型中的样本点都在模型的 $\pm 2SD$ 的范围内, 并未发现离群点, 说明该模型预测能力较强, 可以用来分析蛋白酶解后的抗氧化能力^[33]。

依据回归方程, 利用 Design-expert 绘出响应面分析图, 结果见图 8。通过响应面 3D 图可以明显看到所做试验的范围包括最大值所在区域。利用 Design-expert 对模型进行分析预测, 得到酶添加量为 4.86%, 温度为 55.28 °C, pH 为 7.76, 此时的响应值最大值为 66.79%。

2.4 不同处理对驴乳酪蛋白抗氧化性的影响

图 9 为不同处理对驴乳酪蛋白抗氧化性的影响。

如图 9(a)所示, 采用单一处理方式, 超声与酶解均能

提升 Fe^{3+} 的还原能力, 但酶解效果更显著, 可能酶解过程中 DH 较高, 水解物中的小肽比例增加, 从而氢离子可用性增强, 增加与铁离子的反应表面积, 促进还原反应的进行。通过超声协同酶解的处理方式, 显著提升 Fe^{3+} 的还原能力至 65.3%。

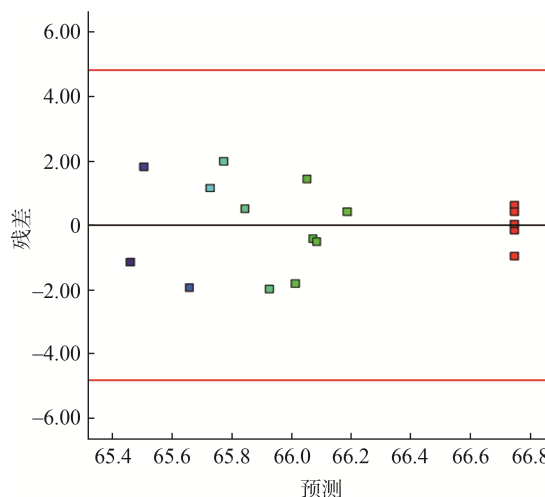


图 7 残差对模型预测散布图
Fig.7 Scatter plot of residuals to predict the model

如图 9(b)所示, 驴乳酪蛋白经超声与酶解联合处理后 DPPH 自由基清除能力的显著提升, 且酶解效果优于超声处理。与未超声处理组相比, 超声预处理结合酶解后 DPPH 自由基清除能力有显著性升高($P < 0.05$), 可能是因为超声预处理使蛋白致密结构舒展开来, 促使酶能更好的切割肽链, 所以超声后的反应体系的 DPPH 自由基的清除能力增强^[34]。

如图 9(c)所示, 以超声、酶解、超声结合酶解处理驴乳酪蛋白后, 其金属离子螯合能力均得到提高。超声处理是以物理方法来改变蛋白质的空间构象, 从而暴露出更多的活性位点, 进而能够更容易与金属离子螯合; 酶解处理则是通过酶的催化降解, 又进一步降解出更多小肽段, 这些小肽段的金属离子结合能力比蛋白好^[35-36]。

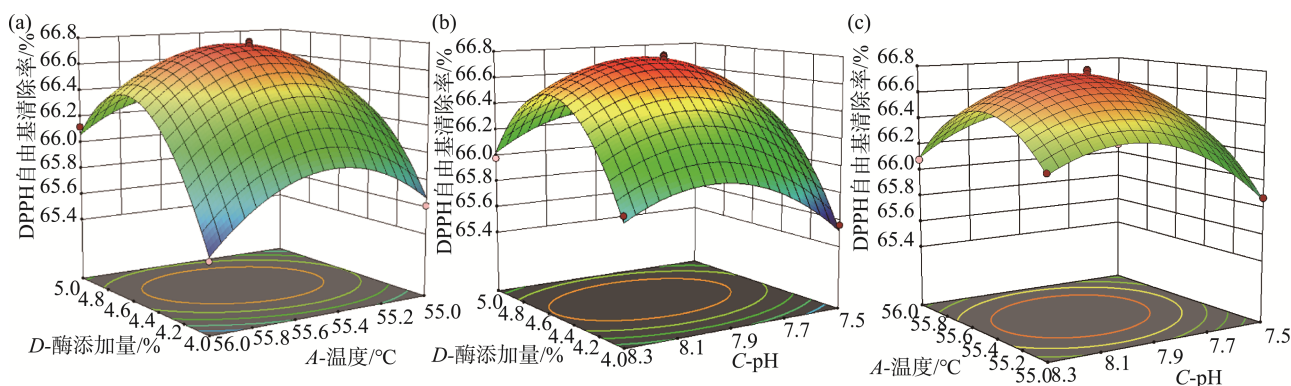
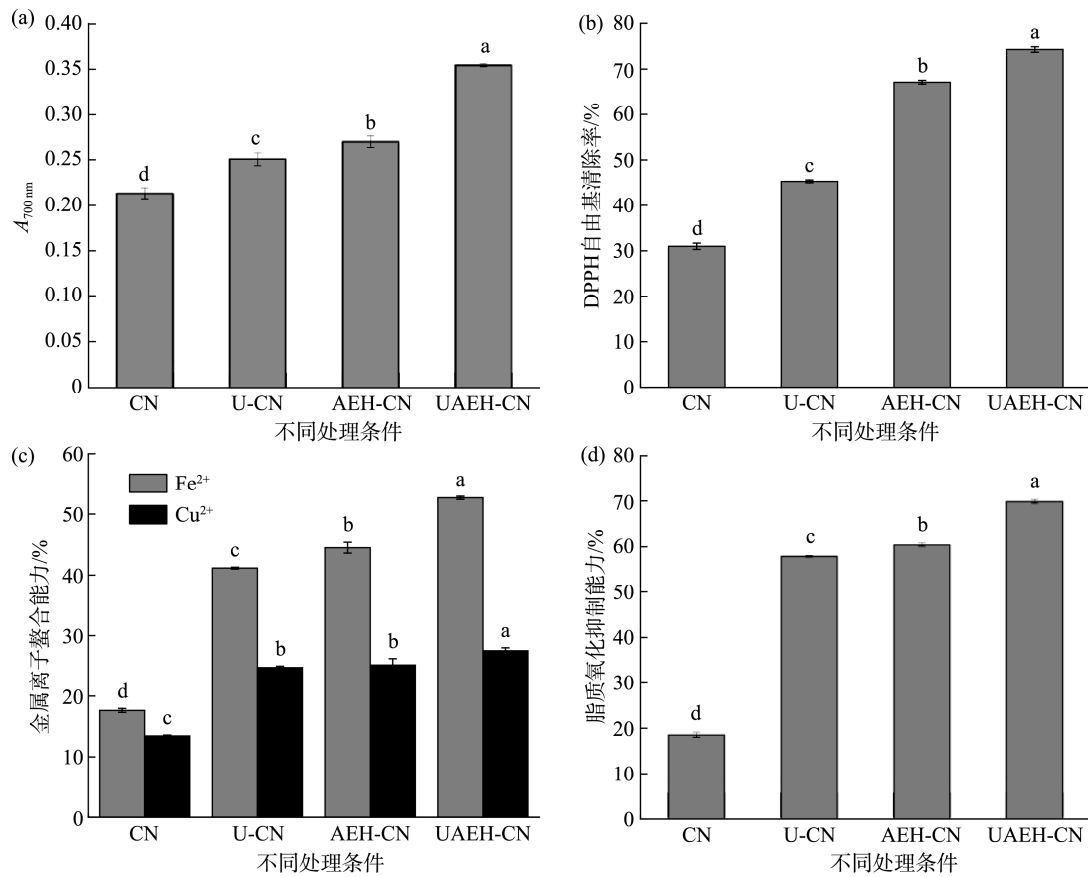


图 8 各因素交互作用对抗氧化性的影响
Fig.8 Effects of the interaction of various factors on antioxidant activity



注: CN. 未处理组; U-CN. 超声处理组; AEH-CN. 酶解组; UAEH-CN. 超声结合酶解组, 下同。

图 9 不同处理条件下驴乳酪蛋白抗氧化性

Fig.9 Antioxidant activity of donkey milk casein under different treatment conditions

如图 9(d)所示, 未经处理的驴乳酪蛋白脂质抗氧化能力为 18.4%, 而经过超声处理后, 抗氧化能力显著提升至 57.8%, 可能是超声引起的蛋白质结构重组和活性位点的暴露, 进而增强了其与自由基的结合能力; 酶解处理后抗氧化能力达到 60.3%, 超声结合酶解处理后的抗氧化能力进一步提高至 69.77%, 可能是超声波引起液体中的微小气泡产生爆炸效应, 这种空化现象可以有效地破坏细胞壁和生物膜, 提高脂质纤维的暴露, 增加酶与脂质的接触面, 促进酶的水解反应, 提高脂质抗氧化能力^[37-38]。

2.5 不同处理对酪蛋白分子量分布的影响

如图 10 所示, 超声处理条带与未经处理的酪蛋白相比, 条带变浅, 可能是超声的机械作用, 引起蛋白质的断裂或者降解, 导致其空间构象发生改变, 降低了蛋白质的聚合程度和稳定性, 在凝胶电泳中蛋白条带的强度降低, 颜色变浅^[39]。经过酶解处理后, 酪蛋白的条带出现上移的现象, 可能是由于分子被酶切割为较小的肽段和氨基酸, 导致在电泳过程中, 胶体中的小肽移动速度加快, 会相对较高的位置出现, 因此会向上移动, 电泳图谱表现为条带上移。经过超声结合酶解处理后, 电泳条带出现变深的现象, 可能是超

声后的酪蛋白经过酶解处理, 生成比原始蛋白更有效的聚合物或肽段, 聚合物在电泳中表现为更深的条带^[40]。

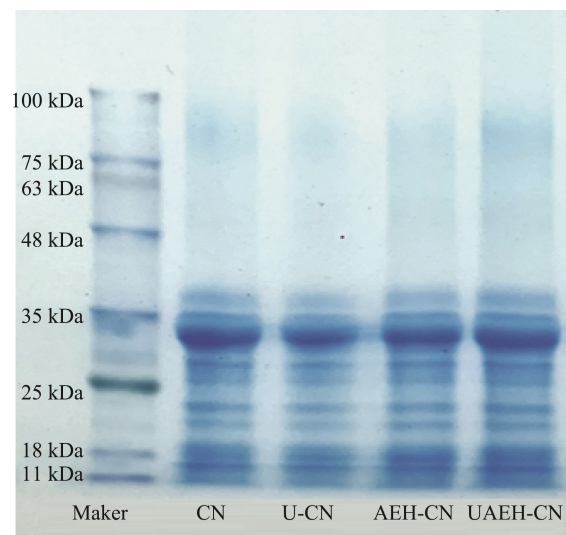


图 10 不同处理对酪蛋白分子量分布的影响

Fig.10 Effects of different treatments on the molecular weight distribution of casein

2.6 不同处理对驴乳酪蛋白二级结构的影响

不同处理对驴乳酪蛋白傅里叶红外光谱如图 11 所示。与未超声处理组对比, 其他处理组在 3600~3000 cm⁻¹ 的光谱范围内, 出现谱带变宽的现象, 可能是超声处理通过空化效应破坏酪蛋白胶束的疏水聚集结构, 导致分子间氢键相互作用断裂或重组, 而酶解作用进一步切割肽链, 暴露更多极性基-NH₂, 促使游离羟基和氨基与水分子形成动态氢键网络, 导致 O-H 的伸缩振动和 N-H 的弯曲振动, 引起光谱图的变化, 表现为吸收峰展宽^[41]。

表 9 结构分析数据显示, 超声结合酶解处理能显著改变驴乳酪蛋白二级结构组成: 相较于对照组, α -螺旋相对含量下降(26.70%), 无规卷曲增加(28.53%), β -折叠相对含量提升, β -转角相对含量下降。 α -螺旋的减少可归因于超声空化效应产生的剪切力场及瞬态高温, 导致螺旋区氢键断裂并重排为 β -折叠。也可能是由于超声产生的机械作用使蛋白结构松散, 削弱了维系蛋白结构稳定的氢键作用力, 增加了底物与酶的结合位点, 使有序的蛋白结构在水解后向无序形式转变^[42]。

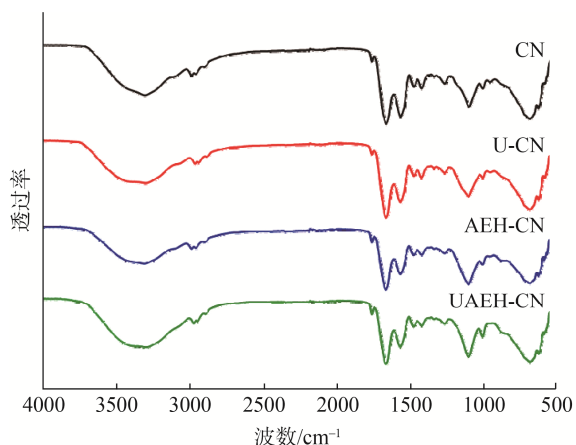


图 11 不同处理驴乳酪蛋白傅里叶红外光谱图
Fig.11 Fourier transform infrared spectra of donkey milk casein under different treatments

表 9 不同处理驴乳酪蛋白二级结构含量
Table 9 Secondary structure content of donkey milk casein under different treatments

处理方法	α -螺旋相对含量/%	β -折叠相对含量/%	β -转角相对含量/%	无规卷曲相对含量/%
CN	28.93±0.33 ^a	26.91±0.21 ^b	17.55±0.37 ^a	26.49±0.64 ^a
U-CN	28.79±0.43 ^a	26.60±0.37 ^b	16.49±0.64 ^{ab}	27.91±1.16 ^a
AEH-CN	28.78±0.33 ^a	27.17±0.22 ^b	16.86±0.38 ^{ab}	28.12±0.51 ^a
UAEH-CN	26.70±0.47 ^b	28.53±0.54 ^a	16.32±0.36 ^b	28.35±0.71 ^a

注: 同列不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

2.7 不同处理对驴乳酪蛋白紫外吸收光谱的影响

如图 12 所示, 通过紫外吸收光谱分析不同处理方式对驴乳酪蛋白结构的影响。超声组、酶解组及超声结合酶

解处理组的吸光度与未处理组相比均有所增强。其中, 超声结合酶解处理组的吸光度最高, 可能是超声预处理使包裹于蛋白内部的芳香族氨基酸残基暴露, 且促进酶解产物的发色基团释放, 通过破坏酪蛋白胶束的致密结构, 蛋白结构更加疏松, 暴露出更多酶切位点, 促使酶解反应更彻底^[22]。酶解处理组的吸光度低于超声处理组, 可能因蛋白酶特异性切割导致部分发色基团随小分子肽段流失。

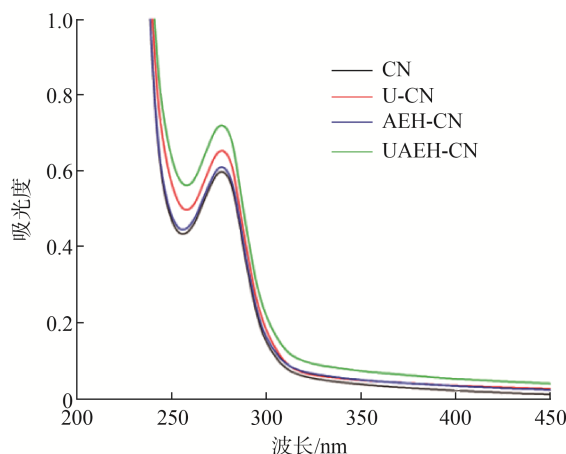


图 12 不同处理酪蛋白紫外光谱图
Fig.12 Ultraviolet spectra of casein under different treatments

2.8 不同处理对驴乳酪蛋白内源荧光光谱的影响

如图 13 所示, 经过超声处理后酪蛋白的内源荧光强度明显高于未处理的酪蛋白, 而经过酶解处理和超声结合酶解的处理下, 荧光强度低于未处理组。在超声作用下, 二硫键诱导聚合反应形成聚合物, 导致具有荧光特性的氨基酸被隐藏起来, 从而荧光强度增强^[43]。酶解处理后的蛋白荧光光谱最大吸收峰从 342 nm 蓝移到 340 nm, 荧光强度降低, 可能是酪蛋白在酶解条件下结构容易展开, 残留在疏水区域的色氨酸暴露于溶剂中, 从而导致荧光强度下

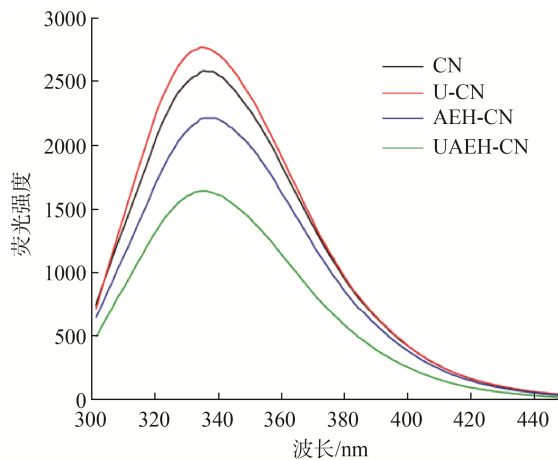


图 13 不同处理酪蛋白内源荧光图
Fig.13 Intrinsic fluorescence spectra of casein under different treatments

降。在超声结合酶解处理后,蛋白质分子之间结构稳定性下降,改变它们的微环境,进一步导致荧光猝灭现象。

3 结 论

本研究通过超声预处理结合酶解技术对驴乳酪蛋白进行改性,系统探究了不同处理方式对蛋白抗氧化性及结构的影响。结果表明,超声处理(200 W, 20 min, 6 s/6 s 间歇比)可通过破坏蛋白胶束结构、暴露疏水基团,使 DPPH 自由基清除率提升至 57.3%;中性蛋白酶与胰蛋白酶(2:1)复配酶解可将 DH 和 DPPH 清除率提高至 27.73%和 57.3%。超声结合酶解协同处理进一步使抗氧化能力达 69.77%, Fe^{3+} 还原能力提升 65.3%,显著优于单一处理,归因于超声破除空间位阻促进酶解效率,释放更多小分子抗氧化肽。结构分析显示,协同处理导致 α -螺旋减少、无规卷曲增加(28.35%),紫外吸光度增强表明芳香族氨基酸暴露,内源荧光强度降低及巯基氧化反映微环境改变。响应面优化确定最优酶解条件为酶添加量 4.86%、55.28 °C、pH 7.76,此时抗氧化性达峰值。本研究证实超声-酶解协同可通过结构重构提升酪蛋白抗氧化性,可为驴乳功能性产品开发提供理论依据。

参考文献

- [1] COSENZA G, MAURIELLO R, GARRO G, *et al.* Casein composition and differential translational efficiency of casein transcripts in donkey's milk [J]. *Journal of Dairy Research*, 2019, 86(2): 201–207.
- [2] MOHAN L, HAIKUN Y, JIALI C, *et al.* Novel insights into whey protein differences between donkey and bovine milk [J]. *Food Chemistry*, 2021, 365: 130397.
- [3] SIMOS Y, METSIOS A, VERGINADIS I, *et al.* Antioxidant and anti-platelet properties of milk from goat, donkey and cow: An *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* study [J]. *International Dairy Journal*, 2011, 21(11): 901–906.
- [4] ŠARIĆ LJUBIŠA, PREMOVIĆ TAMARA, ŠARIĆ BOJANA, *et al.* Microbiological quality of raw donkey milk from serbia and its antibacterial properties at pre-cooling temperature [J]. *Animals*, 2023, 13(3): 327.
- [5] 李墨翰, 张秀敏, 宋婉莹, 等. 驴初乳与常乳脂球膜蛋白质组的对比分析(英文)[J]. *食品科学*, 2022, 43(8): 104–112.
LI MH, ZHANG XM, SONG WY, *et al.* Comparative proteomic analysis of milk fat globule membrane proteins between donkey colostrum and mature milk [J]. *Food Science*, 2022, 43(8): 104–112.
- [6] VINCENZETTI S, SANTINI G, POLZONETTI V, *et al.* Vitamins in human and donkey milk: Functional and nutritional role [J]. *Nutrients*, 2021, 13(5): 1509.
- [7] 李墨翰, 刘爱成, 赵闪闪, 等. 驴乳营养成分研究进展[J]. *乳业科学与技术*, 2022, 45(6): 42–49.
LI MH, LIU AIC, ZHAO SS, *et al.* Progress in research on the nutritional components of donkey milk [J]. *Journal of Dairy Science and Technology*, 2022, 45(6): 42–49.
- [8] 吴登宇, 韦体, 马忠仁, 等. 牦牛乳酪蛋白抗氧化肽对 HEK293 细胞氧化应激损伤的保护作用[J]. *食品科学*, 2023, 44(23): 142–150.
WU DY, WEI T, MA ZR, *et al.* Protective effect of antioxidant peptides derived from yak milk casein on oxidative stress injury in HEK293 cells [J]. *Food Science*, 2023, 44(23): 142–150.
- [9] 李委红. 酪蛋白糖肽酶解物的制备及抗氧化活性研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2019.
LI WH. Studies on the preparation and antioxidant activity of casein glycomacropeptide hydrolysates [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2019.
- [10] 成雪. 酪蛋白糖肽抑制巨噬细胞炎症反应的分子机制研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2015.
CHENG X. Molecular mechanisms underlying the anti-inflammatory effects of casein glycopeptide in macrophages [D]. Beijing: China Agricultural University, 2015.
- [11] SHU GW, WANG Z, CHEN L, *et al.* Enzymolysis technology optimization for production of antioxidant peptides from goat milk casein [J]. *Acta Universitatis Cibiniensis. Series E: Food Technology*, 2017, 21(1): 51–60.
- [12] LI Y, LIU J, ZHANG T, *et al.* Enzymolysis technology optimization for production of antioxidant peptides from chickpea protein [J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2008, 24(1): 268–273.
- [13] 孙佳益. 南美白对虾主要过敏原原肌球蛋白的过敏原性消减方法探讨 [C]. 上海: 上海海洋大学第十四届研究生学位论文报告会论文集, 2012.
SUN JY. Reduction of allergenicity of *Penaeus vannamei* major allergen tropomyosin [C]. Shanghai: Proceedings of the 14th Graduate Thesis Report of Shanghai Ocean University, 2012.
- [14] YU GH, HE PJ, SHAO LM, *et al.* Extracellular proteins, polysaccharides and enzymes impact on sludge aerobic digestion after ultrasonic pretreatment [J]. *Water Research*, 2008, 42(8-9): 1925–1934.
- [15] GHASEMI S, ABBASI S. Formation of natural casein micelle nanocapsule by means of pH changes and ultrasound [J]. *Food Hydrocolloids*, 2014, 42: 42–47.
- [16] VARGAS SA, RUIZ-LOPEZ II, AMADOR-ESPEJO GRE, *et al.* Use of high-intensity ultrasound and micellar casein concentrate addition for improving whey Ricotta cheese production [J]. *International Journal of Dairy Technology*, 2024, 77(2): 518–531.
- [17] 张雨萌. 农产品加工利用. 超声改性酪蛋白胶束及其与多糖互作的酶诱导凝胶特性研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2022.
ZHANG YM. Study on the rennet-induced gel properties of caseinmicellar modified by ultrasound and interacted with polysaccharides [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences Thesis, 2022.
- [18] 梁振华, 张静, 张千喜, 等. 超声预处理改性羊乳酪蛋白对酶解物 ACE 抑制活性的影响[J]. *中国乳品工业*, 2025, 53(1): 37–43.
LIANG ZH, ZHANG J, ZHANG QX, *et al.* Effect of ultrasonic pretreatment-modified goat milk casein on the ACE inhibitory activity of enzymatic digest [J]. *China Dairy Industry*, 2025, 53(1): 37–43.
- [19] 钟焯钰, 刘宇佳, 朱杰, 等. 超声辅助酶解法提取火龙果皮结合酚及其抗氧化和酶抑制活性研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(13): 25–32.
ZHONG XY, LIU YJ, ZHU J, *et al.* Study on ultrasonic assisted enzymatic hydrolysis for extraction of bound phenol of pitahaya peel and its antioxidant and enzyme inhibitory activities [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2023, 14(13): 25–32.
- [20] 熊治渝, 孙兰静, 张倩倩, 等. 虾肉蛋白在乳酸菌发酵过程中的降解及其体外抗氧化活性的动态变化[J]. *食品科学*, 2024, 45(22): 65–72.
XIONG ZY, SUN LJ, ZHANG QQ, *et al.* Degradation of shrimp proteins during fermentation with lactic acid bacteria and dynamic changes in their *in vitro* antioxidant activity [J]. *Food Science*, 2024, 45(22): 65–72.
- [21] 张涵, 黄意情, 王海东, 等. 五味子蛋白酶解前后抗氧化活性和功能特性[J]. *食品研究与开发*, 2024, 45(15): 42–52.
ZHANG H, HUANG YQ, WANG HD, *et al.* Antioxidant activity of *Schisandra chinensis* protein before and after enzymolysis and functional

- characteristics [J]. *Food Research and Development*, 2024, 45(15): 42–52.
- [22] 夏琪娜. 超声预处理结合美拉德对酪蛋白及其酶解物抗氧化性影响[D]. 哈尔滨: 东北农林大学, 2019.
- XIA QN. Effects of ultrasonic pretreatment combined with Maillard reaction on antioxidant activity of casein and its enzymatic hydrolysates [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2019.
- [23] FERREIRA SC, BRUNS R, FERREIRA HS, *et al.* Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2007, 597(2): 179–186.
- [24] PATRICK W, HANS S, ANGELIKA P. Determination of the bovine food allergen casein in white wines by quantitative indirect ELISA, SDS-PAGE, western blot and immunostaining [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(18): 8399–8405.
- [25] 刘爱成, 杨惠仪, 王奕雯, 等. 超声处理对乳清蛋白致敏性及结构的影响[J]. *中国乳品工业*, 2024, 52(6): 17–22.
- LIU AIC, YANG HY, WANG YW, *et al.* Effect of ultrasonic treatment on sensitization and structure of whey protein [J]. *China Dairy Industry*, 2024, 52(6): 17–22.
- [26] MAHMOUD MI, MALONE WT, CORDLE CT. Enzymatic hydrolysis of casein: Effect of degree of hydrolysis on antigenicity and physical properties [J]. *Journal of Food Science*, 1992, 57(5): 1223–1229.
- [27] SMITH RM, HANSEN DE. The pH-rate profile for the hydrolysis of a peptide bond [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1998, 120(35): 8910–8913.
- [28] 董晓斌, 付丽丽, 朴娜善, 等. 发酵乳清蛋白制取抗氧化肽的研究[J]. *食品科学*, 2011, 32(S1): 172–175.
- DONG XB, FU LL, PIAO SS, *et al.* Study on the anti-oxidative capability of the fermentation product of the whey protein by probiotics [J]. *Food Science*, 2011, 32(S1): 172–175.
- [29] 马宇骥, 李键, 王洪志, 等. 复合酶解牛乳酪蛋白工艺优化及抗氧化性的研究[J]. *食品科技*, 2018, 43(2): 109–114.
- MA YJ, LI J, WANG HZ, *et al.* Optimization on enzyme process and antioxidant activity of yak's milkcasein polypeptide [J]. *Food Science and Technology*, 2018, 43(2): 109–114.
- [30] 张辉, 张娜娜, 马丽, 等. 响应面法优化大麦苗叶绿素提取工艺[J]. *食品科学*, 2014, 35(2): 75–80.
- ZHANG H, ZHANG NN, MA L, *et al.* Optimization of extraction process for chlorophyll from young barley grasses based on response surface methodology [J]. *Food Science*, 2014, 35(2): 75–80.
- [31] 田洪源, 李瑞芳. 响应面法在生物过程优化中的应用[J]. *食品工程*, 2010(2): 8–11, 53.
- TIAN YY, LI RF. Application of response surface methodology in the optimization of bioprocesses [J]. *Food Engineering*, 2010(2): 8–11, 53.
- [32] 褚冲, 姚尚杰, 黄钧, 等. 中心组合设计优化野葛糖化工艺[J]. *中国酿造*, 2016, 35(9): 145–149.
- CHU C, YAO SJ, HUANG J, *et al.* Optimization of saccharification conditions of *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi with central composite design [J]. *China Brewing*, 2016, 35(9): 145–149.
- [33] 彭传友, 廖立敏. 中心组合设计优化超声波提取枇杷叶多糖研究[J]. *中国食品添加剂*, 2021, 32(12): 9–15.
- PENG CY, LIAO LM. Study on optimization of ultrasonic extraction of polysaccharides from loquat leaf by center combination design [J]. *China Food Additives*, 2021, 32(12): 9–15.
- [34] YU L, SUN J, LIU S, *et al.* Ultrasonic-assisted enzymolysis to improve the antioxidant activities of peanut (*Arachin conarachin L.*) antioxidant hydrolysate [J]. *International Journal of Mechanical Sciences*, 2012, 13(7): 9051–9068.
- [35] ELAHE A, SHIMA K, SEYED HBM. Structure-based modification of α -amylase by conventional and emerging technologies: Comparative study on the secondary structure, activity, thermal stability and amylolysis efficiency [J]. *Food Chemistry*, 2023, 437(P1): 137903.
- [36] CAI C, LIU Y, XU Y, *et al.* Mineral-element-chelating activity of food-derived peptides: Influencing factors and enhancement strategies [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2025, 65(16): 3241–3255.
- [37] 李墨翰, 宋婉莹, 张秀敏, 等. 乳极性脂质组成及其功能性研究进展[J]. *乳业科学与技术*, 2022, 45(2): 24–29.
- LI MH, SONG WY, ZHANG XM, *et al.* Progress in understanding the composition and function of milk polar lipids [J]. *Journal of Dairy Science and Technology*, 2022, 45(2): 24–29.
- [38] 李墨翰, 宋婉莹, 于海坤, 等. 乳脂分离与检测分析技术研究进展[J]. *沈阳农业大学学报*, 2021, 52(2): 246–256.
- LI MH, SONG WY, ZHANG HK, *et al.* Research progress in separation and analytical methods of milk lipids [J]. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2021, 52(2): 246–256.
- [39] WANLU M, RU H, LI F, *et al.* Study on processing stability and fermentation characteristics of donkey milk [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2020, 124: 109151.
- [40] 李墨翰, 张秀敏, 王亦宁, 等. 牛初乳与牛常乳脂肪球膜中丰度差异蛋白的表征与分析[J]. *食品科学*, 2022, 43(12): 163–170.
- LI MH, ZHANG XM, WANG YN, *et al.* Characterization and analysis of differentially abundant proteins in milk fat globule membranes between bovine colostrum and mature milk [J]. *Food Science*, 2022, 43(12): 163–170.
- [41] CHANDRAPALA J, MARTIN GJO, ZISU B, *et al.* The effect of ultrasound on casein micelle integrity [J]. *Journal of Dairy Science*, 2012, 95(12): 6882–6890.
- [42] 胡锦瑞, 曹荣安, 陈洪生, 等. 超声辅助酶解对绿豆蛋白水解物结构和抗氧化活性的影响[J/OL]. *中国食品学报*, 1–14. [2024-12-30]. DOI: 10.16429/j.1009-7848.2025.01.023
- HU JR, CAO RAN, CHEN HS, *et al.* Effect of ultrasound-assisted enzymatic digestion on the structure and antioxidant activity of mung bean protein hydrolysate [J/OL]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 1–14. [2024-12-30]. DOI: 10.16429/j.1009-7848.2025.01.023
- [43] 杜童申, 刘悦, 马骏骅, 等. 超声预处理对亚麻籽胶-大豆分离蛋白复合凝胶凝胶特性及结构的影响[J]. *食品工业科技*, 2024, 45(13): 83–90.
- DU TS, LIU Y, MA JH, *et al.* Effect of ultrasonic pretreatment on the gel properties and structure of flaxseed gum-soybean protein isolate composite gels [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2024, 45(13): 83–90.

(责任编辑: 安香玉 于梦娇)