

酶解对脱脂牛乳蛋白抗原性及感官特性的影响

李敏, 刘爱成, 朱晴, 陈馨萍, 刘微, 梁肖娜, 郑艳, 岳喜庆*
(沈阳农业大学食品学院, 辽宁 沈阳 110866)

摘要: 以脱脂牛乳为原料, 采用间接竞争酶联免疫吸附测定法和三(羟甲基)甲基-甘氨酸-聚丙烯酰胺凝胶电泳等方法研究碱性蛋白酶(Alcalase, AT)、复合蛋白酶(Protamex, PT)和风味蛋白酶(Flavorzyme, FT)处理对脱脂牛乳的抗原性、分子质量分布、滋味和色泽的影响。结果表明: AT对主要致敏乳蛋白的脱敏效果显著优于PT和FT ($P < 0.05$), 当酶底比为500 U/g、酶解时间为20 min时, 其对 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白和酪蛋白的抗原抑制率分别达到64.01%、76.00%和69.10%; AT、PT和FT处理后脱脂牛乳中低分子量肽段明显增加, 且苦味、涩味、苦后味、涩后味随酶解时间延长、酶底比的增加而升高, FT处理脱脂牛乳的滋味优于AT和PT; 酶解脱脂牛乳的亮度值显著降低, 红度值显著升高 ($P < 0.05$), 透光性增加, AT处理脱脂牛乳的色泽更接近于牛乳。

关键词: 脱脂牛乳; 酶解; 抗原性; 滋味; 色泽

Effects of Enzymatic Hydrolysis on Protein Antigenicity and Sensory Properties of Skim Milk

LI Min, LIU Aicheng, ZHU Qing, CHEN Xinping, LIU Wei, LIANG Xiaona, ZHENG Yan, YUE Xiqing*
(College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract: The effects of Alcalase (AT), Protamex (PT) or Flavorzyme (FT) treatment on the antigenicity and molecular mass distribution of proteins, flavor and color of skim milk were investigated by using various techniques such as indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ic-ELISA) and Tricine-sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (Tricine-SDS-PAGE). The results showed that the effect of AT treatment on reducing the antigenicity of the major milk allergens was significantly better than that of PT and FT treatment ($P < 0.05$). The antigenicity of α -lactalbumin (α -LA), β -lactoglobulin (β -LG) and casein (CN) was inhibited by 64.01%, 76.00% and 69.10% by AT treatment for 20 min at an enzyme/substrate ratio of 500 U/g, respectively. The amount of low molecular mass peptides in skim milk increased significantly after treatment with each of the three enzymes. The bitterness, astringency, aftertaste of bitterness (aftertaste-B) and aftertaste of astringency (aftertaste-A) increased with increasing enzymatic treatment time and with increasing enzyme/substrate ratio. The taste of FT-treated milk was better than that of AT- or PT-treated milk. The brightness value of milk decreased significantly, while the redness value increased significantly after enzymatic treatment ($P < 0.05$). The transmittance increased as well. The color of skim milk treated by AT was more similar to that of whole milk.

Keywords: skim milk; enzymatic hydrolysis; antigenicity; taste; color

DOI:10.7506/rykxyjs1671-5187-20220614-037

中图分类号: TS252.1

文献标志码: A

文章编号: 1671-5187(2022)04-0014-08

引文格式:

李敏, 刘爱成, 朱晴, 等. 酶解对脱脂牛乳蛋白抗原性及感官特性的影响[J]. 乳业科学与技术, 2022, 45(4): 14-21.

DOI:10.7506/rykxyjs1671-5187-20220614-037. <http://www.dairyst.net.cn>

LI Min, LIU Aicheng, ZHU Qing, et al. Effects of enzymatic hydrolysis on protein antigenicity and sensory properties of skim milk[J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2022, 45(4): 14-21. DOI:10.7506/rykxyjs1671-5187-20220614-037.

<http://www.dairyst.net.cn>

收稿日期: 2022-06-14

基金项目: “十三五”国家重点研发计划重点专项(2018YFC1604302-03);

辽宁省“兴辽英才计划”科技创新领军人才项目(XLYC1902083)

第一作者简介: 李敏(1997—)(ORCID: 0000-0003-1007-8322), 女, 硕士研究生, 研究方向为动物源食品加工与利用。

E-mail: 1736964047@qq.com

*通信作者简介: 岳喜庆(1966—)(ORCID: 0000-0001-5558-1461), 男, 教授, 博士, 研究方向为动物源食品加工与利用。

E-mail: yxqsyau@126.com

牛乳作为优质蛋白来源^[1-2], 具有含高蛋白、全氨基酸、多矿物质与微量元素的营养特点^[3-5], 是人类首选补充蛋白的食物, 也是婴幼儿较早接触的辅食。然而, 全球约有1.0%~7.5%的人群对牛乳及牛乳制品过敏^[6], 婴幼儿及儿童中更为常见, 其中我国婴幼儿及儿童牛乳过敏发生率约为2.7%^[7], 0~24月龄婴幼儿中牛乳过敏发生率高达4.5%^[8]。因此, 牛乳及牛乳制品被联合国粮农组织及农业组织和世界卫生组织认定为引起人类过敏反应的八大类常见食物之一^[9], 牛乳蛋白中酪蛋白(casein, CN)、 α -乳白蛋白(α -lactalbumin, α -LA)、 β -乳球蛋白(β -lactoglobulin, β -LG)是公认的主要过敏原^[10]。

牛乳过敏严重危害人体健康, 会对人体的皮肤、消化道、呼吸道等产生多种损伤, 出现皮肤红斑、瘙痒、腹泻、呕吐、呼吸不畅等症状, 严重者甚至会引起休克等不良反应^[11-12]。牛乳脱敏的原理是通过蛋白改性技术改变大分子蛋白的空间构象, 破坏其构象表位或线性表位, 使过敏表位被掩盖或隐藏^[13], 或者使其水解为不会引起过敏的小分子肽段或氨基酸, 从而降低牛乳致敏性^[14]。目前, 降低牛乳致敏性的方法有物理法、化学法及生物法等^[15]。Yang Fan等^[16]发现, 辐照处理可以降低牛乳蛋白与免疫球蛋白E (immunoglobulin, IgE) 的结合能力, 但加大辐照剂量使得牛乳的感官与营养品质变差, 且辐照处理产物的安全性有待进一步研究。Dąbrowska等^[17]发现, 用源自解脂耶氏酵母的丝氨酸蛋白酶可以降低浓缩乳清蛋白、 α_s -CN与IgE和IgG抗体的结合能力, 浓缩乳清蛋白水解1 h会降低蛋白的抗原性, 而较长时间(5 h)可能会导致新的IgE反应性表位的暴露, 从而提高抗原性。张光艳等^[18]研究发现, 生物法中利用酶水解可以显著降低食物致敏性, 且酶解过程条件温和、效率高、工艺简单、可操作性强, 被广泛应用于食物致敏性研究中。目前利用蛋白酶降低牛乳抗原性的研究主要集中在对乳清蛋白及酪蛋白的研究中, 对全牛乳体系的研究比较少。

本研究以脱脂牛乳为研究对象, 探究碱性蛋白酶(Alcalase, AT)、复合蛋白酶(Protamex, PT)和风味蛋白酶(Flavorzyme, FT)处理对牛乳主要致敏蛋白的降解规律、抗原性、分子质量分布及感官特性的影响, 确定最佳酶解工艺及参数, 为低致敏性牛乳及制品的研发提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

食品级AT(酶活力105 466 U/g)、PT(酶活力144 542 U/g)、FT(酶活力20 786 U/g) 诺维信(中国)

生物技术有限公司; 超高温灭菌脱脂牛乳 辽宁越秀辉山控股股份有限公司。

1.2 仪器与设备

ICC B S025恒温水浴锅、V 2 S025涡旋振荡器 IKA(广州)仪器设备有限公司(IKA中国); CR21N离心机 日本Hitachi公司; Eon酶标仪 美国BioTek仪器有限公司; PowerPac Basic电泳仪 美国Bio-Rad公司; SA402电子舌 日本Insent公司; NS810 3nh分光测色仪 沈阳市三恩时科技有限公司; 十万分之一天平 美国Sartorius公司; AI600UV超灵敏多功能成像仪 美国GE公司。

1.3 方法

1.3.1 酶解脱脂牛乳的制备

酶底比(enzyme to substrate ratio, E/S)设置为100、200、300、400、500 U/g, 酶解时间设置为20、40、60、80、100 min, 酶解温度设置为(50±5) °C。首先将蛋白酶用超纯水稀释成0.1 g/mL的蛋白酶溶液, 脱脂牛乳与蛋白酶溶液预热20 min, 将蛋白酶溶液按照相应E/S加入脱脂牛乳中进行酶解, 酶解后(90±5) °C、10~15 min灭酶, 并用冰水冷却至室温, 5 000 r/min离心10 min, 取上清液-80 °C冷冻备用。

1.3.2 酶解脱脂牛乳抗原性测定

用间接酶联免疫吸附测定法测定过敏原(酶解后牛乳蛋白)与特异性抗体(IgG)的结合能力, 反映过敏原的免疫反应性。具体操作步骤如下:

- 1) 包被: 采用96孔酶标板, 每孔加入100 μ L包被酶解牛乳(1.0 μ g/mL), 4 °C冰箱平放过夜;
- 2) 洗涤: 第2天由冰箱取出, 恢复至室温, 倾去包被液, 每孔加入280 μ L PBST洗涤3次, 每次5 min, 吸水纸拍干;
- 3) 封阻: 每孔加入250 μ L 1 g/100 mL明胶作为封阻液, 37 °C保温1 h, 培养箱取出恢复至室温, 洗涤同步步骤2);
- 4) 加待测血清: 每孔加入100 μ L以PBS倍比稀释(1:500)的兔血清, 膜覆盖37 °C保温1 h后280 μ L PBST洗涤3次, 每次5 min, 扣干;
- 5) 加酶标二抗: 每孔加入100 μ L辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG, 膜覆盖37 °C保温1 h后280 μ L PBST洗涤3次, 每次5 min, 扣干;
- 6) 显色: 每孔加入显色液100 μ L, 置于37 °C恒温培养箱避光反应15 min;
- 7) 终止反应: 每孔加入50 μ L 2 mol/L H₂SO₄终止反应;
- 8) 吸光度测定: 酶标仪测定490 nm波长处吸光度。抗原抑制率按下式计算。

$$\text{抗原抑制率}/\% = \frac{A - A_0}{A} \times 100$$

式中: A 为未处理牛乳的吸光度; A_0 为处理牛乳的吸光度。

1.3.3 酶解脱脂牛乳蛋白分子质量分布测定

采用三(羟甲基)甲基甘氨酸-十二烷基硫酸钠-聚

丙烯酰胺凝胶电泳 (Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, Tricine-SDS-PAGE) 对酶解脱脂牛乳的分子质量分布进行测定。固定电泳玻璃板, 按照从下至上的顺序依次制备16.5%致密胶 (高度约4.8 cm)、10%夹层胶 (高度约1 cm)、4%浓缩胶 (高度约1.5 cm); 将制备的酶解脱脂牛乳稀释后与上样缓冲液按照1:1等体积混合; 非预染Marker与样品同时预煮, 温度95~100 °C, 时间3~5 min; 冷却后依次加入孔中, 样品每孔上样20 μL, Marker每孔上样5 μL; 设置电泳参数, 在浓缩胶与夹层胶阶段设置电压为80 V, 进入致密胶后设置电压为120 V; 电泳结束后, 将凝胶从玻璃板上剥离, 进行固定与染色; 固定液固定10 min, 考马斯亮蓝G250染色液染色40 min; 用甲醇-冰乙酸脱色液进行脱色; 最后待脱色完全后, 将其置于扫描仪中成像。

1.3.4 酶解脱脂牛乳滋味测定

参照陈增鑫^[19]、宿小杰^[20]等方法, 采用电子舌测定酶解脱脂牛乳的滋味, 测定前先配制标准液、负极与正极溶液。然后取35 mL样品放入测试杯中, 设定运行程序, 进行测定。甜味设定检测次数为5次, 全味设定检测次数为4次, 处理数据时删除第1次测定数据。

1.3.5 酶解脱脂牛乳色泽测定

采用分光测色仪对酶解脱脂牛乳进行色泽测定^[21], 用黑白板校正仪器后, 将3 mL牛乳酶解液倒入平皿中, 启动仪器进行测定, 每个样品重复测定3次。

1.4 数据处理

以上实验均以脱脂牛乳为对照, 数据以平均值±标准差表示, 实验均重复3次, 采用Origin 2021软件作图, 选用IBM SPSS Statistics 26软件进行数据分析。

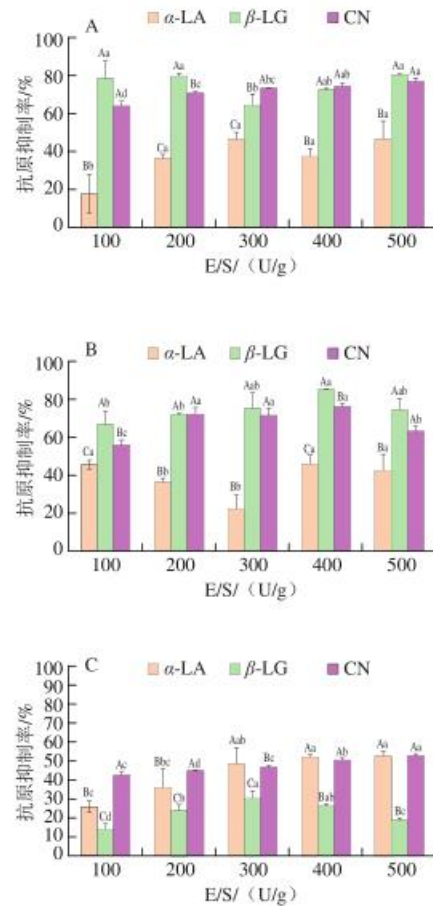
2 结果与分析

2.1 E/S的确定

2.1.1 E/S对脱脂牛乳蛋白抗原性的影响

由图1可知, 与脱脂牛乳相比, AT、PT、FT组中α-LA、β-LG、CN的抗原抑制率均为正值, 即抗原性降低, 不同蛋白酶及E/S对脱脂牛乳蛋白抗原抑制率影响不同。AT组中CN及FT组中α-LA、CN抗原抑制率均与E/S呈正相关; PT组中α-LA在E/S为200~300 U/g时, 抗原抑制率最低且与其他E/S组差异显著 ($P<0.05$), β-LG、CN在E/S为100~500 U/g时, 抗原抑制率呈现先升高后降低的趋势。AT、PT和FT在固定酶解时间为60 min条件下, 抗原抑制率分别在E/S为500、400、500 U/g时达到最高值。AT、PT和FT组在相同E/S下, α-LA在E/S为300~500 U/g时, FT组抗原抑制率高于AT、PT组, β-LG

及CN在E/S为100~500 U/g时, AT、PT组抗原抑制率显著高于FT组 ($P<0.05$)。



大写字母不同, 表示相同E/S下不同蛋白间差异显著 ($P<0.05$); 小写字母不同, 表示同一蛋白在不同E/S下差异显著 ($P<0.05$)。A. AT; B. PT; C. FT, 图2~6同。

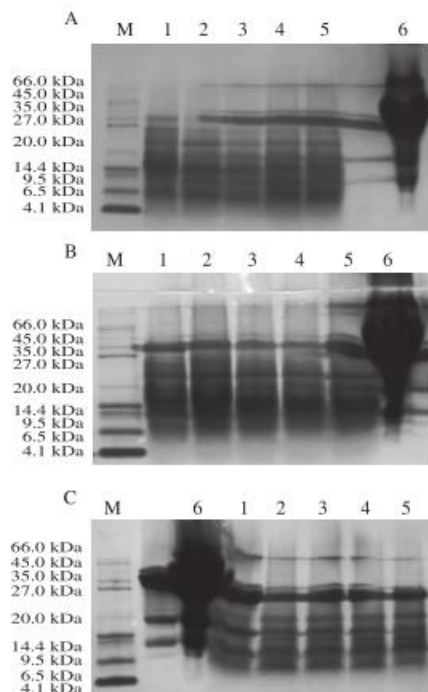
图1 酶解脱脂牛乳蛋白在不同E/S下的抗原抑制率

Fig. 1 Inhibition rates of the antigenicity of skim milk proteins by enzymatic treatment at different E/S ratios

不同蛋白酶对蛋白的酶切位点与水解效率不同。其中, AT是内切酶, 可以特异性切断疏水性氨基酸的C端, 从而更好地断裂肽键; FT属于内外切酶, 且在相同的E/S下水解效率最高, 对牛乳蛋白的水解速率大于AT与PT, 水解后过敏表位暴露或隐藏, 从而影响抗原性^[22-24]。

2.1.2 E/S对脱脂牛乳蛋白分子质量分布的影响

由图2可知, 脱脂牛乳呈现完整的乳蛋白条带, 3种酶水解脱脂牛乳中α-LA、β-LG、CN的蛋白条带颜色均变浅, 低分子质量肽段增多。表明大分子蛋白被水解为小分子的肽段或氨基酸, 过敏表位暴露或隐藏, 从而影响牛乳的致敏性。随着E/S的增加, AT组小分子质量肽段呈现增加趋势, PT、FT组小分子质量蛋白条带变化无明显差异。



M. Marker; 泳道1~5. E/S分别为100、200、300、400、500 U/g; 泳道6. 对照(脱脂牛乳)。

图2 酶解脱脂牛乳电泳图

Fig. 2 Electropherograms of enzymatically treated skim milk

2.1.3 E/S对脱脂牛乳滋味的影响

由图3可知, 3组酶解脱脂牛乳的丰富度明显降低, 鲜味与甜味降低, 酸味、苦味、涩味、苦后味、涩后味随E/S的增加而升高, 酶解脱脂牛乳出现苦涩滋味。在相同E/S下, FT组滋味优于AT及PT组。

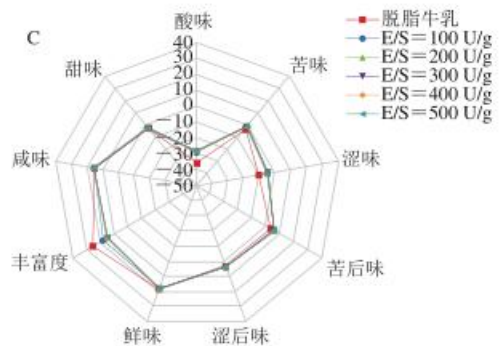
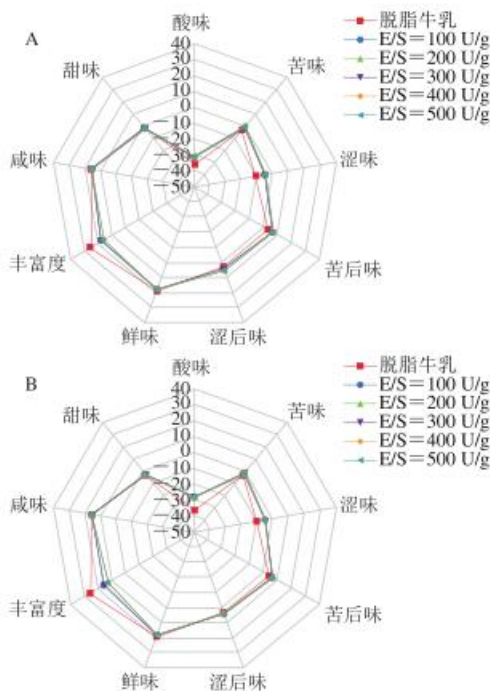


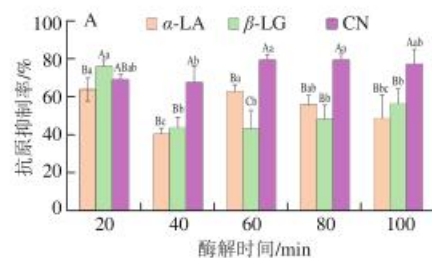
图3 E/S对酶解脱脂牛乳滋味的影响

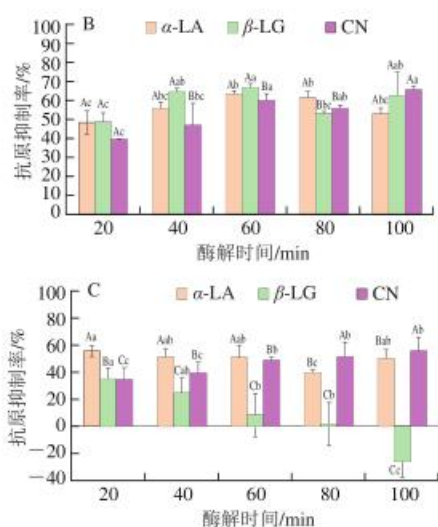
Fig. 3 Effect of E/S ratio on the taste of enzymatically treated skim milk

2.2 酶解时间的确定

2.2.1 酶解时间对脱脂牛乳蛋白抗原性的影响

固定AT、PT、FT组E/S分别为500、400、500 U/g, 探究酶解时间对脱脂牛乳蛋白抗原性的影响。由图4可知, 与脱脂牛乳相比, AT、PT组中 α -LA、 β -LG、CN及FT组中 α -LA、CN抗原抑制率均为正值, 抗原性降低, FT组中 β -LG抗原抑制率在酶解100 min时显著降低 ($P < 0.05$), 抗原性升高。由图4A可知, E/S=500 U/g时, AT组 α -LA及 β -LG分别在酶解时间20、60 min及20 min时抗原抑制率较高且与其他酶解时间差异显著 ($P < 0.05$), CN在酶解时间为20~100 min时, 抗原抑制率均为65%以上, 在60、80 min时抗原抑制率较高。由图4B可知, E/S=400 U/g时, PT组 α -LA、 β -LG、CN在酶解时间为20~60 min时, 抗原抑制率与酶解时间呈正相关, α -LA、 β -LG分别在酶解时间为60、80 min及40、60、100 min时抗原抑制率较高且与其他组差异显著 ($P < 0.05$), CN在酶解时间为60、100 min时抗原抑制率较高且与其他组差异显著 ($P < 0.05$)。由图4C可知, E/S=500 U/g时, FT组 α -LA抗原抑制率在不同酶解时间下各组差异不显著, CN抗原抑制率与酶解时间呈正相关, 但 β -LG抗原抑制率与酶解时间呈负相关, 说明脱脂牛乳蛋白的构象表位与线性表位被破坏的同时产生了新的过敏表位, 反而提高了抗原性^[25-27]。在相同的酶解时间下, AT、PT组 α -LA、 β -LG、CN抗原抑制率高于FT组。



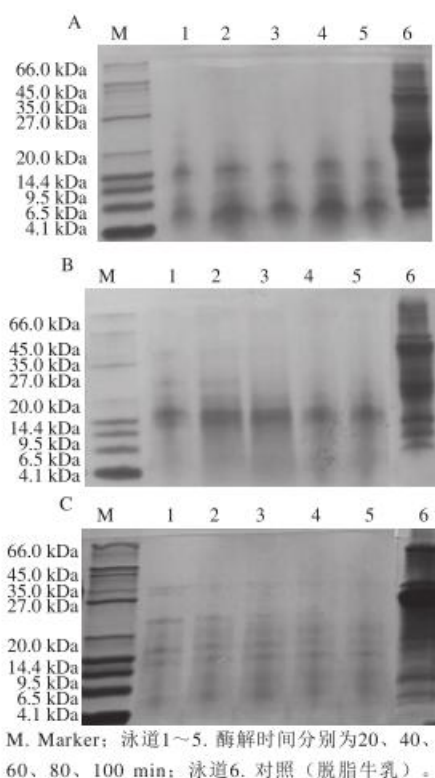


大写字母不同, 表示相同酶解时间、不同蛋白间差异显著 ($P < 0.05$); 小写字母不同, 表示同一蛋白、不同酶解时间差异显著 ($P < 0.05$)。

图4 酶解脱脂牛乳蛋白在不同酶解时间下的抗原抑制率

Fig. 4 Inhibition rate of the antigenicity of skim milk proteins by enzymatic treatment for different periods of time

2.2.2 酶解时间对脱脂牛乳蛋白分子质量分布的影响



M: Marker; 泳道1~5. 酶解时间分别为20、40、60、80、100 min; 泳道6. 对照(脱脂牛乳)。

图5 酶解脱脂牛乳电泳图

Fig. 5 Electropherograms of skim milk enzymatically treated for different periods of time

由图5可知, 3组酶解脱脂牛乳中大分子蛋白均发生了不同程度的降解, 分子质量主要分布在20 kDa以下。

3种蛋白酶在不同的酶解时间下, 对脱脂牛乳蛋白的酶解效果差异不显著, 但FT组的脱脂牛乳在相同酶解时间下, 蛋白条带颜色较AT、PT组浅, 这表明FT对脱脂牛乳的水解效果优于AT和PT, 这可能与不同蛋白酶对蛋白的作用位点与水解强度差异有关。

2.2.3 酶解时间对脱脂牛乳滋味的影响

由图6可知, 与牛乳相比, 随酶解时间延长, 3组酶解脱脂牛乳的滋味中丰富度、甜味和鲜味下降, 酸味、苦味、涩味、苦后味和涩后味升高。相同水解时间下FT组的苦涩味较低, 鲜味高于AT与PT组, AT组苦涩味较高。以上结果主要是疏水性氨基酸暴露所致^[28-29]。

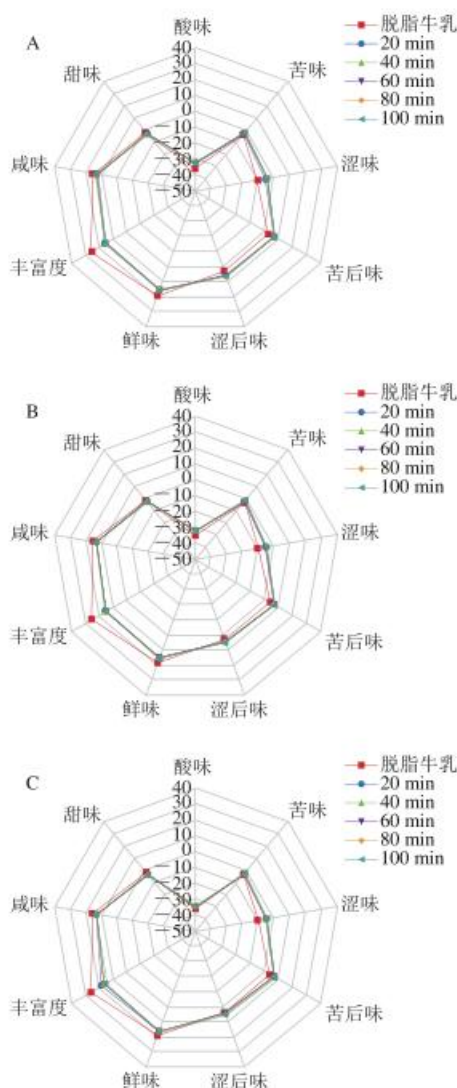


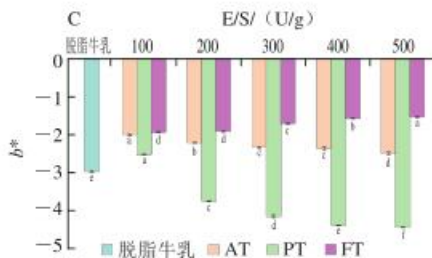
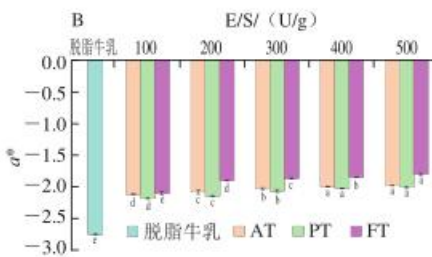
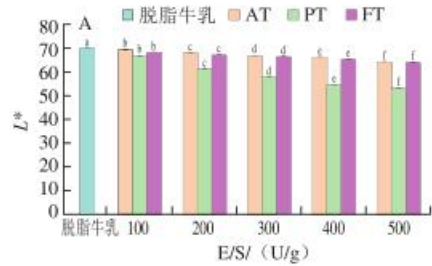
图6 酶解时间对脱脂牛乳滋味的影响

Fig. 6 Effect of enzymatic treatment time on the taste of skim milk

2.3 酶解脱脂牛乳色泽分析

色泽是影响食物感官评价的重要因素, 同时色泽也会对消费者购买力产生影响。由图7~8可知, 3组酶解脱

脂牛乳的 L^* 、 a^* 和 b^* 均发生显著性变化 ($P < 0.05$)， L^* 降低， a^* 升高，除PT组外 b^* 也升高。且E/S越高，酶解时间越长，酶解脱脂牛乳颜色越浅，透光性增加。



小写字母不同，表示差异显著 ($P < 0.05$)。图8、9、11同。

图7 E/S对脱脂牛乳色泽的影响

Fig. 7 Effect of E/S ratio on skim milk color

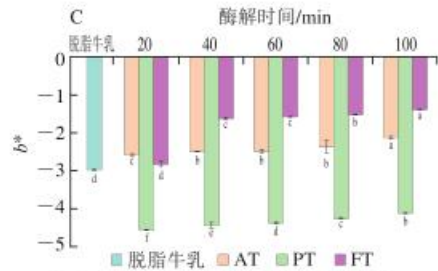
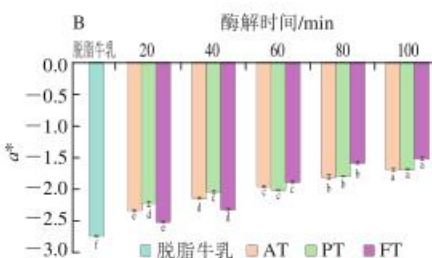
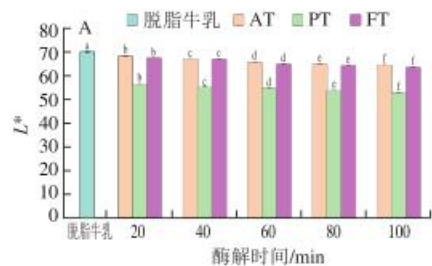


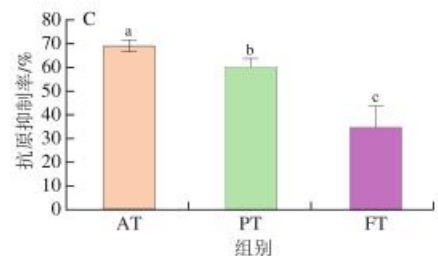
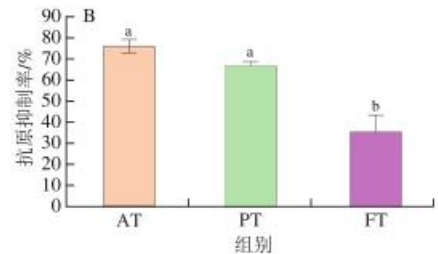
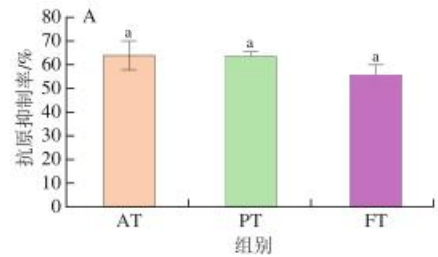
图8 酶解时间对脱脂牛乳色泽的影响

Fig. 8 Effect of enzymatic treatment time on skim milk color

2.4 最优蛋白酶的确定

2.4.1 抗原抑制率分析

由以上实验结果综合分析，AT在E/S=500 U/g、酶解时间20 min，PT在E/S=400 U/g、酶解时间60 min，FT在E/S=500 U/g、酶解时间20 min时，可以有效减少牛乳中主要过敏蛋白。综合对比AT、PT、FT组在最佳酶解条件下的脱脂牛乳抗原性、滋味和色泽，确定降解脱脂牛乳主要过敏蛋白的最优蛋白酶。



A. α -LA; B. β -LG; C. CN.

图9 AT、PT、FT在最佳水解条件下的抗原抑制率

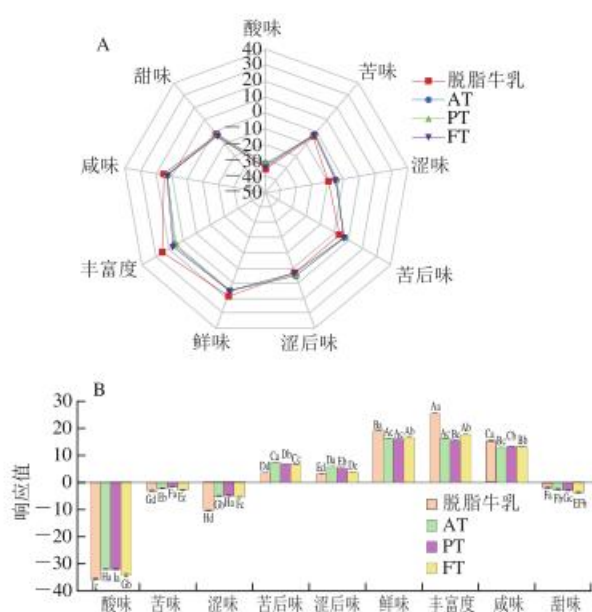
Fig. 9 Inhibition rates of the antigenicity of milk proteins by AT, PT or FT treatment under optimal conditions

由图9可知，对3种蛋白酶在最优条件下酶解处理脱脂牛乳的 α -LA、 β -LG、CN抗原抑制率分析发现，3组 α -LA的抗原抑制率无显著差异，CN抗原抑制率存在显著

差异 ($P < 0.05$)，FT组 β -LG抗原抑制率显著低于AT、PT组 ($P < 0.05$)。综合比较发现，AT处理可以有效降低脱脂牛乳主要过敏蛋白的抗原性，对 α -LA、 β -LG和CN的抗原抑制率分别为64.01%、76.00%和69.10%。

2.4.2 滋味分析

由图10可知，与脱脂牛乳相比，3组酶解脱脂牛乳的滋味存在显著差异 ($P < 0.05$)。AT、PT组中苦味、涩味、苦后味和涩后味的响应值显著高于FT组 ($P < 0.05$)，鲜味和丰富度的响应值显著低于FT组 ($P < 0.05$)，滋味与脱脂牛乳存在差异，苦涩味较重。FT组酶解脱脂牛乳的滋味优于AT及PT组。



A. 雷达图; B. 检测器响应值。小写字母不同，表示同一滋味不同组间差异显著 ($P < 0.05$)；大写字母不同，表示同组间不同滋味差异显著 ($P < 0.05$)。

图10 最佳水解条件下AT、PT、FT组酶解脱脂牛乳的滋味

Fig. 10 Taste evaluation of skim milk treated by AT, PT or FT under optimal conditions

2.4.3 色泽分析

由图11可知，在AT、PT、FT最佳水解条件下，酶解脱脂牛乳的 L^* 、 a^* 和 b^* 发生显著变化 ($P < 0.05$)，PT组脱脂牛乳色泽变化最大，综合比较，AT组酶解脱脂牛乳色泽更接近于脱脂牛乳。

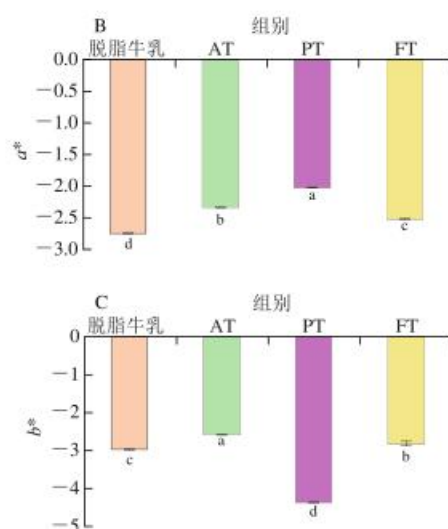
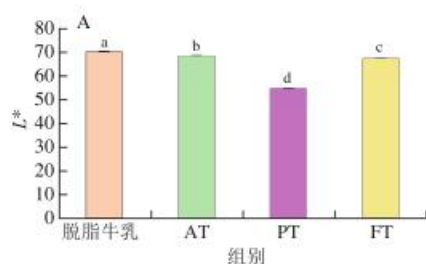


图11 最佳水解条件下AT、PT、FT组酶解脱脂牛乳的色泽

Fig. 11 Color parameters of skim milk treated by AT, PT or FT under optimal conditions

3 结论

以脱脂牛乳为原料，探究AT、PT和FT处理对脱脂牛乳抗原性及感官特性的影响规律，结果表明：AT与PT处理可以有效降低脱脂牛乳中 α -LA、 β -LG、CN的抗原性，AT组在E/S为500 U/g、酶解时间为20 min，PT组在E/S为400 U/g、酶解时间为60 min时， α -LA、 β -LG、CN的抗原抑制率均达到60%以上，酶解脱脂牛乳的丰富度、甜味、鲜味下降，苦味、涩味、苦后味、涩后味上升，苦涩味随E/S的增加及酶解时间的延长而增大；随E/S的增加及酶解时间的延长，3组酶解脱脂牛乳的 L^* 显著降低， a^* 显著升高，除PT组外 b^* 升高。综合比较发现，AT处理效果显著优于PT和FT，该研究为低致敏性牛乳及制品的研发提供了参考。

参考文献:

- [1] 张养东, 刘月娟, 王宗伟, 等. 牛奶: 人类最接近完美的食物[J]. 中国乳业, 2017(6): 18-20. DOI:10.16172/j.cnki.114768.2017.06.003.
- [2] 丁蕊艳, 郭长英, 范丽霞, 等. 牛乳及三种特色生鲜乳的蛋白质营养价值评价[J]. 山东农业科学, 2018, 50(2): 124-127. DOI:10.14083/j.issn.1001-4942.2018.02.025.
- [3] 李文斐, 张磊, 宋宇轩, 等. 绵羊、山羊和牛乳的营养成分比较分析[J]. 食品工业科技, 2020, 41(24): 286-291. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2020110282.
- [4] 龚婷, 王宜敬. 牛乳的营养价值及功能特性研究进展[J]. 甘肃畜牧兽医, 2019, 49(12): 12-15. DOI:10.15979/j.cnki.cn62-1064/s.2019.12.003.
- [5] 闫虹, 李洪亮, 钱文涛, 等. 直接UHT灭菌对牛乳营养成分、感官和风味的影响[J]. 食品工业, 2020, 41(5): 329-332.
- [6] KOMEI I, MASAK F, ROBERT M, et al. The usefulness of casein-specific IgE and IgG4 antibodies in cow's milk allergic children[J].

- Clinical and Molecular Allergy, 2012, 10(1): 1. DOI:10.1186/1476-7961-10-1.
- [7] YANG Min, TAN Meizhen, WU Jiuling, et al. Prevalence, characteristics, and outcome of cow's milk protein allergy in Chinese infants: a population-based survey[J]. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition, 2019, 43(2): 803-808. DOI:10.1002/jpen.1472.
- [8] 聂晶, 冉域辰, 张亚果, 等. 成都市0~24月龄儿童食物过敏流行病学调查[J]. 中国妇幼健康研究, 2017, 28(增刊2): 364-365.
- [9] 何圣发, 陈红兵, 龙彩云, 等. 牛乳过敏原 β -乳球蛋白检测方法的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(7): 1763-1769. DOI:10.3969/j.issn.2095-0381.2019.07.004.
- [10] 熊子奕, 马鑫, 陈红兵, 等. 牛乳主要过敏原酪蛋白的特性和分离纯化研究进展[J]. 食品工业科技, 2021, 42(20): 391-399. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2020080184.
- [11] 李宏. 牛奶严重过敏反应[J]. 中华临床免疫和变态反应杂志, 2021, 15(4): 471. DOI:10.3969/j.issn.1673-8705.2021.04.019.
- [12] VALENTINA P, MAURIZIO M, I VERONICA C, et al. How to actively treat food allergy[J]. Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology, 2018, 18(3): 248-257. DOI:10.1097/ACI.0000000000000450.
- [13] 王佳蕊, 李朝旭, 李书国. 牛乳中主要过敏原致敏机理及其脱敏技术的研究进展[J]. 中国乳品工业, 2019, 47(6): 28-32. DOI:10.3969/j.issn.1001-2230.2019.06.007.
- [14] 陈境, 张晓宁, 霍麒文, 等. 婴幼儿牛乳蛋白过敏机制及解决方法研究进展[J]. 中国食品学报, 2020, 20(7): 289-298. DOI:10.16429/j.1009-7848.2020.07.035.
- [15] 黄美佳. 钙离子对牛乳 α -乳白蛋白结构与致敏性的影响[D]. 南昌: 南昌大学, 2018: 2-6.
- [16] YANG Fan, ZOU Li, WU Yong, et al. Structure and allergenicity assessments of bovine β -lactoglobulin treated by sonication-assisted irradiation[J]. Journal of Dairy Science, 2020, 103(5): 4109-4120. DOI:10.3168/jds.2019-17070.
- [17] DĄBROWSKA A, BAJZERT J, BABIŃ K, et al. Reduced IgE and IgG antigenic response to milk proteins hydrolysates obtained with the use of non-commercial serine protease from *Yarrowia lipolytica*[J]. Food Chemistry, 2020, 302(C): 125350. DOI:10.1016/j.foodchem.2019.125350.
- [18] 张光艳, 何宏, 周晓红, 等. 不同来源牛乳酪蛋白过敏原性评价及酶解消减作用研究[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(1): 124-130. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.027505.
- [19] 陈增鑫, 刘咏霖, 潘芸芸, 等. 不同脱腥方法对海参肠卵酶解液脱腥效果的比较[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(5): 187-194. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.029212.
- [20] 宿小杰, 王珊珊, 崔青曼, 等. 不同蛋白酶对红鳍笛鲷鱼排酶解液风味影响[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(21): 29-35. DOI:10.12161/j.issn.1005-6521.2021.21.005.
- [21] 程娇, 孙敬, 梁肖娜, 等. 蛋白酶处理对脱脂乳感官品质及游离氨基酸的影响[J]. 食品科学, 2021, 42(16): 14-22. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20200714-190.
- [22] 熊鼎. 低致敏乳清蛋白产品的研究与中试设计[D]. 南昌: 南昌大学, 2015: 24-26.
- [23] CARINA V, TREVOR B, ROSAN M, et al. Better recognition, diagnosis and management of non-IgE-mediated cow's milk allergy in infancy: iMAP-an international interpretation of the MAP (Milk Allergy in Primary Care) guideline[J]. Clinical and Translational Allergy, 2017, 7(1): 26. DOI:10.1186/s13601-017-0162-y.
- [24] EDDINE E M K, SÉBASTIEN C, ROBERTA L, et al. Combined microwave processing and enzymatic proteolysis of bovine whey proteins: the impact on bovine β -lactoglobulin allergenicity[J]. Journal of Food Science and Technology, 2019, 56(1): 177-186. DOI:10.1007/s13197-018-3471-9.
- [25] 姜竹茂, 刘晓, 张书文, 等. 热处理对生鲜乳及复原乳蛋白质体外消化特性的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(8): 33-38. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201808006.
- [26] RAHAMAN T, VASILJEVIC T, RAMCHANDRAN L. Conformational changes of β -lactoglobulin induced by shear, heat, and pH: effects on antigenicity[J]. Journal of Dairy Science, 2015, 98(7): 4255-4265. DOI:10.3168/jds.2014-9010.
- [27] ALI A, POTIER I L, HUANG N, et al. Effect of high pressure homogenization on the structure and the interfacial and emulsifying properties of β -lactoglobulin[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2018, 537(1/2): 111-121. DOI:10.1016/j.ijpharm.2017.12.019.
- [28] LU Ping, ZHANG Chenhai, LIFSHITZ L M, et al. Extraoral bitter taste receptors in health and disease[J]. The Journal of General Physiology, 2017, 149(2): 181-197. DOI:10.1085/jgp.201611637.
- [29] 赵普瑛, 曾小英, 覃瑞, 等. 脱苦风味蛋白酶的研究进展[J]. 中国食物与营养, 2021, 27(10): 29-34. DOI:10.19870/j.cnki.11-3716/ts.20210913.001.