

热处理牛乳中乳蛋白变化的比较蛋白质组学的研究

臧长江^{1,2}, 王加启^{2*}, 杨永新², 卜登攀², 杨晋辉², 袁廷杰^{1,2}, 周凌云²,
孙鹏², 李发弟^{1*}

(1. 甘肃农业大学动物科技学院, 兰州 730070; 2. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所,
动物营养学国家重点实验室, 北京 100193)

摘要: 试验旨在研究不同热处理方式对牛乳中蛋白组分及含量的影响。生鲜乳经 75 °C/15 s、125 °C/4 s、135 °C/4 s 和 145 °C/4 s 热处理后, 用双向凝胶电泳分离和质谱鉴定的方法分析了生鲜乳以及不同热处理后的乳蛋白的变化。结果发现, 与生鲜乳蛋白图谱相比, 牛乳经 75 °C/15 s 巴氏杀菌的乳蛋白点的染色密度无明显变化, 经 135 °C/4 s 和 145 °C/4 s 热处理后有 4 个蛋白点的染色密度明显下降, 这些蛋白点质谱鉴定为 α -乳白蛋白、 β -酪蛋白变体、 κ -酪蛋白和免疫球蛋白 γ , ELISA 方法检测乳中 IgG 含量的变化验证了双向电泳结合质谱的结果。这些研究结果表明, 巴氏杀菌对牛乳中的蛋白组分及含量无明显影响, 高温灭菌(135 °C/4 s 和 145 °C/4 s)可造成乳中蛋白含量的降低。

关键词: 热处理; 乳蛋白; 巴氏杀菌; 高温灭菌

中图分类号: S823; S815.4

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)11-1754-06

Comparative Proteomics Analysis of Changes of the Milk Protein during Thermal Treatment

ZANG Chang-jiang^{1,2}, WANG Jia-qi^{2*}, YANG Yong-xin², BU Deng-pan², YANG Jin-hui²,
YUAN Ting-jie^{1,2}, ZHOU Ling-yun², SUN Peng², LI Fa-di^{1*}

(1. College of Animal Science & Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; 2. State Key Laboratory of Animal Nutrition, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: To investigate the changes of milk protein after treated with 75 °C/15 s, 125 °C/4 s, 135 °C/4 s and 145 °C/4 s, two-dimensional gel electrophoresis was used to separate proteins samples and mass spectrometry was used to identify differential protein spots. These results showed that four protein spots were down-regulated after treatment with 135 °C/4 s and 145 °C/4 s compared with raw milk and milk treated with 75 °C/15 s in which protein profiles had no difference. These protein spots were identified as α -lactoalbumin, beta-casein variant, κ -casein and Ig γ chain. Content of IgG from raw milk and thermal treated milk was detected using ELISA method and in consistent with data of two-dimensional gel electrophoresis coupled with mass spectrometry. These finding indicated that milk protein contents were not affected by treatment with 75 °C/15 s and affected by treatment with 135 °C/4 s and 145 °C/4 s.

Key words: heated; milk protein; pasteurization; high temperature sterilization

收稿日期: 2012-02-23

基金项目: 动物营养学国家重点实验室自主研究课题(2004DA125184G1103)

作者简介: 臧长江(1978-), 男, 新疆昌吉人, 博士生, 主要从事反刍动物营养与饲料科学研究, E-mail: zcj780@126.com

* 通讯作者: 王加启, E-mail: wang-jia-qi@263.net; 李发弟, E-mail: lifd@gsau.edu.cn

牛乳含有人体所需的全部氨基酸(AA)、丰富的矿物质(钙、磷、铁、钠、镁、钾等)、维生素(VA、VD、VE、VB、VC等)、乳蛋白和乳脂肪等成分,营养丰富,是理想的天然食品,除提供营养外,还有一些其他的生理功能,包括防御作用(免疫球蛋白和其他抗菌物质等)、助消化(酶或酶抑制剂,结合蛋白和载体蛋白)及提供生长因子(激素)^[1-2]等。在现代乳品工业中,为保证牛乳的食品安全,方便异地配送,延长保质期,达到无毒、无害、无菌、天然食品的要求,对牛乳进行不同的热处理是乳品加工中常用的措施,乳品工业中常用的热处理工艺主要包括巴氏杀菌(62.8~65 ℃ 30 min 或 72~75 ℃ 15~20 s)、超巴氏杀菌(125~138 ℃ 2~4 s)、超高温杀菌(135~150 ℃ 2~4 s)等。一般情况下,热处理的温度与牛乳品质密切相关,处理温度的增加不但影响牛乳的营养成分和风味,导致品质下降,而且还影响牛乳的储存时间^[3-4]。牛乳中蛋白质的含量约为3.4%,主要有2类,其中酪蛋白(α_{s1} -、 α_{s2} -、 β -、 κ -酪蛋白)的含量最多,约占总蛋白量的83%;乳清蛋白中 α -乳白蛋白占13%左右, β -乳球蛋白和少量脂肪球蛋白约占4%左右,其中乳白蛋白中含有营养所必需的各种氨基酸(AA),是一种完全蛋白^[2]。

牛乳中蛋白质含量除了受奶牛品种、饲养的日粮、胎次、泌乳阶段等因素影响外,乳品后期的加工方式也是影响乳中蛋白质含量的主要因素之一。目前,常采用传统的EILSA方法检测热处理对乳中活性蛋白含量的影响,最近有研究采用蛋白质组学方法分析了热处理对乳蛋白化学修饰的影响,发现热处理可造成二硫键连接的多聚体含量增加和乳糖基化修饰位点增加。特别是蛋白质组学是一门相对较新的、发展较快的学科,可以同时检测和鉴定多个差异表达蛋白^[5]。然而,用蛋白组学方法研究热处理对牛乳中乳蛋白变化的研究鲜有报道,为此,本试验将采用二维凝胶电泳结合质谱的方法研究不同热处理温度对牛乳中蛋白表达的影响,为探索热处理影响牛乳中乳蛋白的变化奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 仪器设备

乳品加工设备(Armfield, FT74, UHT/HTST processing system, UK)、均质机(APV-1000, Denmark)、高速低温冷冻离心机(Sorvall, legend. mach 1.6R., Germany); 无菌灌装台(GV900A), PRO-

TEAN IEF Cell 等电聚焦系统(Bio-Rad, USA), PDQuest 分析软件(Bio-Rad, 美国), ultraflex TOF/TOF 质谱仪(Bruker, Germany)和光密度扫描仪 GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad, USA), Milli-Q 超纯水系统。

1.2 主要试剂

17 cm pH4~7 固相化 pH 梯度(IPG)预制胶条、矿物油为 Bio-Rad(USA)公司产品; IPG 缓冲液 pH3~10 为 Amersham Biosciences(Uppsala, Sweden)公司产品; 尿素、3-(3-胆酰胺丙基)-二甲氨基-1-丙磺酸(CHAPS)、二硫苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺、十二烷基硫酸钠(SDS)、甘氨酸和低熔点琼脂糖为 Amresco(Solon, Oh, USA)公司分装; 三氨基甲烷、丙烯酰胺、甲叉双丙稀酰胺、过硫酸胺、乙腈(色谱纯)、考马斯亮蓝 G-250 和甘油为 Sigma(St. Louis, MO, USA)公司分装; 无水乙醇(国产分析纯); 测序级胰蛋白酶为 Promega(Madison, WI, USA)公司产品; 过硫酸铵、磷酸等药品为国产分析纯。

1.3 方法

1.3.1 牛乳样品的采集 牛乳样品从中国农业科学院北京畜牧兽医研究所昌平试验基地牧场采集。奶牛采用全混合日粮方式饲养, 每天饲养 2 次(07:00 和 16:00), 自由饮水, 挤奶 2 次。于 4 ℃ 奶罐中采集 20 头奶牛的全天混合乳样 50 kg, 带回实验室牛奶加工间, 生鲜乳用 4 种热处理(75 ℃/15 s、125 ℃/4 s、135 ℃/4 s 和 145 ℃/4 s)方式进行 3 次独立试验处理, 采集 4 种热处理方式下的牛奶样品。

1.3.2 牛乳的热处理方式 试验参考目前乳品工业中常用的热处理方法(表 1)^[3], 选用 75 ℃/15 s、125 ℃/4 s、135 ℃/4 s、145 ℃/4 s 共 4 种温度与时间的处理组合。本试验中, 液态乳的加工工艺流程为: 生鲜乳的采集→预热→均质→杀菌, 所有技术规范按照中国奶业标准“无公害食品牛乳加工技术规范(标准号: NY/T 5050-2001)”^[6]进行。均质机压力为 20 Mpa。每种温度与时间处理组合的乳品样品在无菌灌装台中采集 5 个, 每个样品取 2 mL, 并 10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 收集乳蛋白, 用于后续蛋白样品的制备。

1.3.3 蛋白样品制备 室温溶解乳蛋白, 加入蛋白裂解液(8 mol·L⁻¹ 尿素、4% CHAPS、65 mmol·L⁻¹ 二硫苏糖醇及 0.5% IPG 缓冲液)周期性涡旋 10 min, 并 10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 收集上清液即为二维凝胶电泳乳蛋白样品, 采用考马斯亮蓝法测

定蛋白浓度。

表 1 乳品工业中常用的热处理方法

Table 1 The common methods of heat treatment in milk product industry

工艺名称 Method	温度/℃ Temperature	时间/s Time
初次杀菌 Primary sterilization	63~65	15
高温短时巴氏杀菌(牛乳) High temperature and short time pasteurization(milk)	72~75	15~20
高温短时巴氏杀菌(稀奶油) High temperature and short time pasteurization(cream)	> 80	1~5
超巴氏杀菌 Super pasteurization	125~138	2~4
超高温杀菌(连续式) Superhigh temperature sterilization	135~140	4~7
保持杀菌 Keep sterilization	115~121	1 200~1 800

资料来源于郭本恒的研究^[3]

The data is from Guo^[3]

1.4 双向电泳分离蛋白

1.4.1 上样 根据已测的蛋白浓度,取 300 μg 乳蛋白样品的上样量(17 cm 胶条),与终体积 350 μL 的水化上样缓冲液(8 mol \cdot L⁻¹ 尿素、4% CHAPS、65 mmol \cdot L⁻¹ 二硫苏糖醇及 0.5% IPG 缓冲液和痕量溴酚蓝)混合,周期性涡旋 5 min。混合均匀后将乳蛋白样品均匀加入聚焦盘的聚焦槽内。胶条室温放置 10 min 左右,撕开胶条的保护膜,分清正负极,轻轻地将 17 cm pH4~7 IPG 胶条胶面朝下置于聚焦盘或水化盘中样品溶液上,确保胶条与电极紧密接触。胶条上方加一层矿物油防止样品蒸发。滴加矿物油后置于等电聚焦电泳仪中进行第一向等电聚焦。

1.4.2 水化 先被动水化 2 h,使小分子蛋白进入胶条,然后主动水化 12 h。

1.4.3 聚焦 聚焦的程序为:250 V 快速 1 h,1 000 V 线性 1 h、9 000 V 线性 5 h 及 9 000 V 聚焦 80 000 Vh,所有程序都在 20 $^{\circ}\text{C}$ 下运行。

1.4.4 平衡 聚焦结束后,将胶条依次置入含 2.0% 二硫苏糖醇和 2.5% 碘乙酰胺的平衡缓冲液

(6 mol \cdot L⁻¹ 尿素、2% SDS、0.375 mol \cdot L⁻¹ Tris-HCl pH8.8 及 20% 甘油)中,分别缓慢振荡 12 min。

1.4.5 SDS-PAGE 电泳 制备 12% 的分离胶,把平衡后的胶条用电泳液浸湿,然后用镊子放到分离胶的上方,用低熔点琼脂糖固定,封后进行第二向电泳分离,注意胶条和分离胶之间不能有气泡。循环水浴温度为 12 $^{\circ}\text{C}$,起始电压 50 V 电泳 0.5 h,等溴酚蓝跑出胶条形成一条线,然后调电压至 200 V,电泳约 5 h 时停止电泳,切角标记。

1.5 胶的染色、脱色

电泳结束后,胶用考马斯亮蓝 G-250 染色液染色 16 h 以上^[7],然后脱色,直至底色脱掉。

1.6 图像分析

凝胶用 40% 甲醇和 10% 乙酸的固定液固定 3 h,考马斯亮蓝 G-250 溶液染色,用蒸馏水漂洗至无明显背景色时,用 GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad, USA) 扫描采集图像。用 PDQuest 图像软件检测、匹配分析表达变化的蛋白点。

1.7 蛋白酶解和质谱检测

以蛋白点染色密度 1.5 倍变化选择凝胶中的差异蛋白点,手工切割后移至 1.5 mL 离心管中。MillQ 水漂洗多次,用 50% 乙氰和 50% (50 mmol \cdot L⁻¹) 碳酸氢铵溶液脱色过夜,乙氰干燥至凝胶颗粒变白;然后,干燥凝胶颗粒加 10 μL (20 ng \cdot μL^{-1}) 胰蛋白酶,37 $^{\circ}\text{C}$ 酶解过夜,加入 1% TFA 终止反应。最后,样品用 ultraflex TOF/TOF 质谱仪 (Bruker, Germany) 分析。氮气激光为 337 nm,反射模式分析肽指纹图谱,质谱数据用 MASCOT 软件搜索 NCBI 非冗余 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 数据库,搜索参数设置为允许漏切 1 个酶切位点,一级质谱的质量误差小于 100 ppm,串联质谱的质量误差小于 50 ppm,固定修饰为半胱氨酸的脲甲基化,可变修饰为甲硫氨酸的氧化。

1.8 ELISA 测定

用免疫球蛋白 G (IgG) ELISA 试剂盒 (Bethyl Laboratories, Inc. USA) 检测生乳和 3 次独立热处理的牛乳中 IgG 含量。首先用试剂盒中亲和纯化的绵羊抗牛 IgG 抗体包被酶标板,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜后用 PBST 封闭液 (含 0.2% 的鸡血清) 封闭,之后加入被检样品孵育,然后用辣根过氧化物酶标记的二抗孵育,最后经 DAB 显色后酶标仪读数,最低检测限为 6.25 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。依据 ELISA 试剂盒说明书进行操作,记录数据,并用 SPSS 16.0 和 Excel

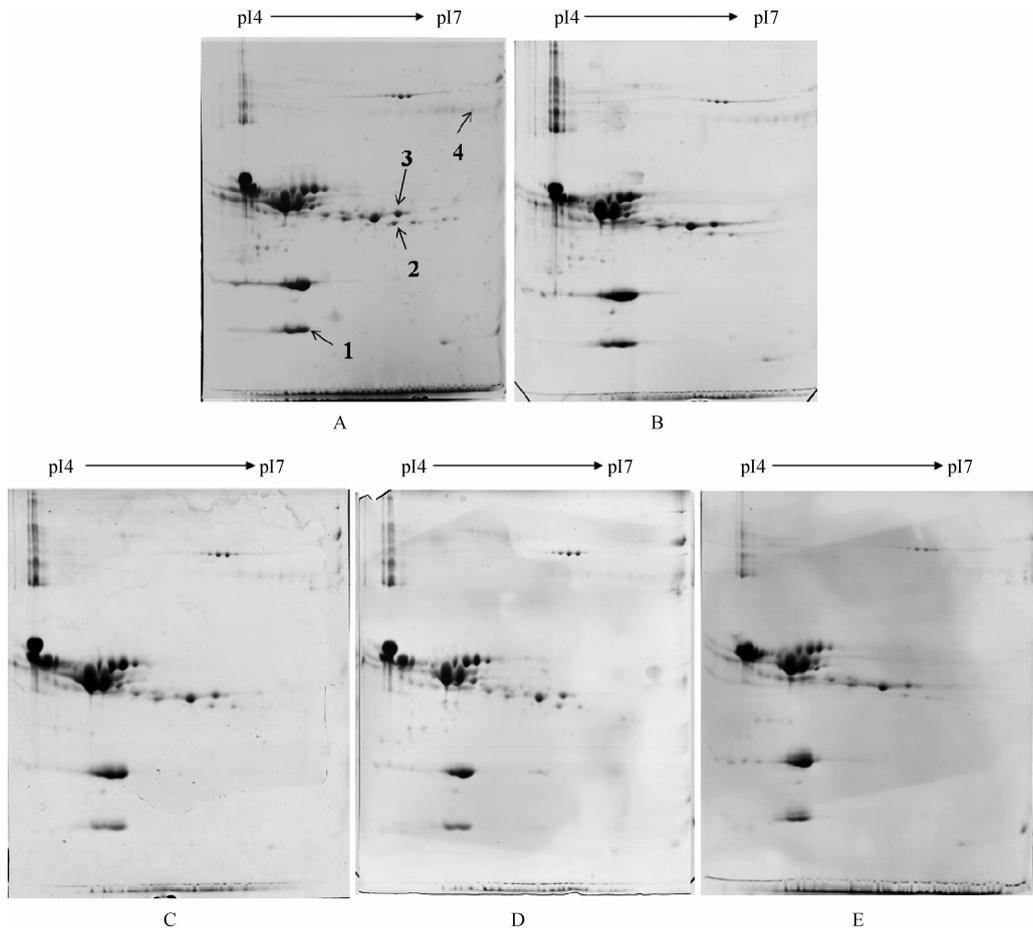
2007 软件统计分析。

2 结果

2.1 热加工影响乳蛋白变化分析

用双向凝胶电泳分离生乳和 3 次独立热处理后的乳蛋白,并重复 2 次。这些凝胶图谱用 PDQuest 图像软件分析,以蛋白点染色密度 1.5 倍变化选择凝胶中的差异蛋白点。检测结果表明,生鲜乳蛋白凝胶图谱和牛乳经 75 °C/15 s 巴氏杀菌的乳蛋白凝胶图谱中蛋白点染色密度无变化,牛乳经 125 °C/4

s、135 °C/4 s 和 145 °C/4 s 热处理的乳蛋白点的染色密度呈现变化,特别是生鲜乳凝胶图谱中存在 4 个蛋白点的染色密度明显高于 135 °C/4 s 和 145 °C/4 s 热处理的蛋白点,其在凝胶中的位置如图 1 所示。这些表达变化的蛋白点经 MALDI-TOF/TOF 质谱仪分析后,用检索软件 Mascot 搜索 NCBI 蛋白质数据库,发现 4 个蛋白点对应于 4 种蛋白质— α -乳白蛋白、 β -酪蛋白变异体、 κ -酪蛋白和免疫球蛋白 γ 链,这些鉴定蛋白点如表 2 所示。



A 为生鲜乳蛋白凝胶图谱,B 为牛乳 75 °C 加热 15 s 乳蛋白凝胶图谱,C 为牛乳 125 °C 加热 4 s 乳蛋白凝胶图谱,D 为牛乳 135 °C 加热 4 s 乳蛋白凝胶图谱,E 为牛乳 145 °C 加热 4 s 乳蛋白凝胶图谱,蛋白点 1~4 表示质谱鉴定的蛋白点
A shows the protein map of raw milk, B shows the protein profile of thermal treated milk at 75 °C/15 s, C shows the protein profile of thermal treated milk at 125 °C/4 s, D shows the protein profile of thermal treated milk at 135 °C/4 s, E shows the protein profile of thermal treated milk at 145 °C/4 s, protein spots 1 to 4 were identified by mass spectrometry

图 1 热加工牛乳蛋白 2-DE 图谱

Fig. 1 2-DE maps of milk protein during thermal treatment

2.2 ELISA 检测结果分析

生鲜乳和生鲜乳经 75 °C/15 s、125 °C/4 s、135 °C/4 s 和 145 °C/4 s 热处理后,用 ELISA 方法检测

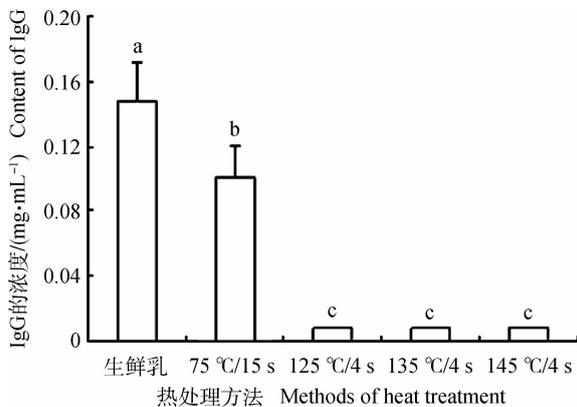
乳中 IgG 含量,检测结果如图 2 所示,由此可见,生鲜乳和 75 °C/15 s 热处理的乳中 IgG 含量显著高于 125 °C/4 s、135 °C/4 s 和 145 °C/4 s 热处理牛乳,

此结果与双向电泳结合质谱结果一致。

表 2 凝胶中表达变化蛋白点的质谱鉴定

Table 2 Identification of changes of protein spots in gels by mass spectrometer

蛋白点 Spot	蛋白名称 Protein name	登录号 Accession No.	分子量/ku Molecular weight	等电点 Isoelectric point	得分 Score
1	α -乳白蛋白 α -lactoalbumin	gi:68	14.603	4.8	210
2	β -酪蛋白变异体 beta-casein A2 variant	gi:248147	5.512	9.52	60
3	κ -酪蛋白 κ -casein	gi:27881412	21.269	6.29	169
4	免疫球蛋白 γ 链 Ig gamma-2 chain C region	gi:89611	36.590	8.04	128



上标不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

^{a, b}. Values with different letter superscripts are significantly different at $P < 0.05$ level

图 2 生鲜乳及热处理后乳中 IgG 含量的 ELISA 检测结果

Fig. 2 The results of ELISA detection of IgG level in raw milk and heated milk

3 讨论

蛋白质组学是应用各种技术手段分析蛋白质种类、数量、局部存在的时间与空间上的变化,其目的是从整体的角度分析细胞内动态变化的蛋白质组成、表达水平与修饰状态,了解蛋白质之间的相互作用与联系,揭示蛋白质功能与细胞生命活动规律的科学^[8-9]。Larsen 等^[10]以生鲜奶和巴氏杀菌 (72 °C, 15 s) 脱脂乳为原料制备甜乳清和酶凝酪蛋白,采用蛋白质组学方法研究了上述组分的蛋白质组表达谱。采用改进的传统二维凝胶电泳 (2-DGE) 方法,在非还原条件下分析蛋白质;该方法可以呈现出由于杀菌过程中形成的以二硫键连接的蛋白复合物。将分离获得的蛋白质采用考马斯亮蓝进行染色,比

较了源于鲜奶和巴氏杀菌脱脂乳的不同蛋白质组分在 2-DGE 上的相对量。甜乳清和酶凝酪蛋白组分对杀菌的反应不同,产生了大量的差异蛋白斑点。在酶凝酪蛋白组分中,较高分子量复合物的含量增加。经过质谱检测,这些复合物中含有 α_{S1} -酪蛋白。巴氏杀菌的乳清中 α_{S1} -酪蛋白的某些片段含量增加,这些片段可能是由于凝乳酶切割的结果;而且在这种乳清中 PP3 (Proteose peptone component 3) 和乳多肽的含量降低。这表明杀菌后,PP3 与脂肪球膜的结合增加了。Pinto 等^[11]用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱鉴定少量不同强度热处理牛乳中酪蛋白磷酸肽 (Casein phosphopeptides, CPP), 结果表明,不同的热处理方式对乳中 CPP 的影响较大,因此,热处理牛乳中乳糖基化酪蛋白磷酸肽可作为乳热处理强度特殊的检测指标之一。Chevalier 等^[12-13]运用蛋白质组学方法定量了鲜牛奶和热加工牛乳中蛋白的二硫键聚合物,结果发现,90 °C 30 min 处理后牛奶中白蛋白、 β -乳球蛋白和 κ -酪蛋白分别降低了 85%、75% 和 75%,同时,二硫键连接的多聚体含量增加。Arena 等^[14]运用蛋白质组学方法研究了不同热处理条件下牛奶蛋白的乳糖化修饰,在 35 个蛋白鉴定了 157 非冗余修饰位点。Cavaletto 等^[15]采用蛋白质组学方法分析了乳脂肪球膜蛋白在热处理条件下的变化。

加热处理不仅影响牛乳的加工性能,同时对乳及乳制品的物理化学等性质也产生影响,加热产生的这些变化可能导致蛋白质的凝固、pH 下降、磷酸钙沉淀、乳清蛋白的变性及其与酪蛋白的反应、美拉德褐变、酪蛋白变性等,热处理中所发生的化学变化有利也有弊,而高温条件下的化学变化则大多数是不利的。研究结果表明,乳清蛋白的热稳定性总体

而言低于酪蛋白,相对来说,免疫球蛋白最低。加热 30 min 时,免疫球蛋白的变性温度为 70 ℃,血清白蛋白的变性温度为 74 ℃,而 β -乳球蛋白和 α -乳白蛋白的变性温度相对较高,分别为 90 和 96 ℃;由此可见,免疫球蛋白相对于其它乳清蛋白更易变性^[16-17]。程金波等^[18]研究乳品工业中常用的 12 种温度和时间组合的热处理方式对牛乳中活性物质免疫球蛋白(IgG)和乳铁蛋白(Lf)的影响。结果表明,把杀菌时间定为 15 s,将均质后的牛乳进行 70、75、80、85、90、95 ℃ 条件下加热,乳中 IgG 含量发生显著变化,其中在 75 ℃ 条件下,其含量最高为 $(0.315 \pm 0.036) \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,95 ℃ 时其含量最低为 $(0.030 \pm 0.001) \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。120~139 ℃,4 s 加工条件下,牛乳中 IgG 含量为 $(0.008 \pm 0.0003) \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,仅为生鲜牛乳中的 2.40%。在 15 s 加热时间下,不同加工温度同样对 Lf 含量影响较大,其浓度随温度的升高呈下降的趋势;120~139 ℃,4 s 加工条件下,乳中 Lf 含量为 $(0.008 \pm 0.001) \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,仅为生鲜牛乳中的 4.62%。Dupont 等^[19]利用 ELISA 方法测定巴氏杀菌乳中乳铁蛋白的含量,结果发现其含量没有太大变化。

4 结 论

经 75 ℃/15 s 巴氏杀菌,牛乳中蛋白质含量及组成无明显变化,高温灭菌(135 ℃/4 s 和 145 ℃/4 s)可造成乳中 α -乳白蛋白、 β -酪蛋白变体、 κ -酪蛋白和免疫球蛋白含量的降低,因此,鲜牛奶经巴氏杀菌能够最大程度的保留乳中蛋白组分和含量。

参考文献:

- [1] 罗金斯基 H,富卡 J W,福克斯 P F. 乳品科学百科全书[M]. 第 3 卷. 赵新淮,刘 宁主译,李庆章主审. 北京:科学出版社,2009:2310.
- [2] 肖陆飞. 牛奶与营养化学[J]. 安徽卫生职业技术学院学报,2004,3(3):91-93.
- [3] 郭本恒. 现代乳品加工技术丛书:液态奶[M]. 北京:化学工业出版社,2003:144.
- [4] SMIT G. 现代乳品加工与质量控制[M]. 任发政,韩北忠,罗永康,等主译. 北京:中国农业大学出版社,2006.
- [5] DEBORAH P. Two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry for biomarker discovery[J]. *Proteom Clin Appl*, 2009, 3(2):155-172.
- [6] 王金华,张宗城. NY/T 5050-2001,无公害食品牛奶加工技术规范[S]. 北京:中国农业出版社,2001.
- [7] CANDIANO G, BRUSCHI M, MUSANTE L, et al. Blue silver: a very sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteome analysis[J]. *Electrophoresis*, 2004, 25(9): 1327-1333.
- [8] ANDERSON N L, ANDERSON N G. Proteome and proteomic: new technologies, new concepts, and new words [J]. *Electrophoresis*, 1998, 19 (11): 1853-1861.
- [9] PETRICOIN E F, ZOON K C, KOHN E C, et al. Clinical proteomics: translating bedside promise into bedside reality[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2002, 1(9): 683-695.
- [10] LARSEN LOTTE B, WEDHOLM-PALLAS A, LINDMARK-MÅSSON H, et al. Different proteomic profiles of sweet whey and rennet casein obtained after preparation from raw versus heat-treated skimmed milk[J]. *Dairy Sci Technol*, 2010, 90:641-656.
- [11] PINTO G, CUOLLO M, NICOLAI M A, et al. Lactosylated casein phosphopeptides as specific indicators of heated milks[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2012, 402: 1961-1972.
- [12] CHEVALIER F, KELLY A L. Proteomic quantification of disulfide-linked polymers in raw and heated bovine milk[J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(12): 7437-7444.
- [13] CHEVALIER F, HIRTZ C, SOMMERER N, et al. Use of reducing/nonreducing two-dimensional electrophoresis for the study of disulfide-mediated interactions between proteins in raw and heated bovine milk[J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(13): 5948-5955.
- [14] ARENA S, RENZONE G, NOVI G, et al. Redox proteomics of fat globules unveils broad protein lactosylation and compositional changes in milk samples subjected to various technological procedures[J]. *J Proteomics*, 2011, 74(11):2453-2475.
- [15] CAVALETTO M, GIUFFRIDA M G, CONTI A. Milk fat globule membrane components—a proteomic approach [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2008, 606:129-141.
- [16] 张春刚,王加启,刘光磊,等. 乳品加工技术对乳中免疫球蛋白的影响[J]. 中国畜牧兽医,2007, 34(9): 64-66.
- [17] 周洁瑾,张列兵,梁建芬. 热处理对牛乳蛋白质品质的影响[J]. 食品科技,2010, 35(6):74-77.
- [18] 程金波,王加启,李珊珊,等. 不同热处理方式对牛奶中 IgG 和乳铁蛋白的影响[J]. 华北农学报,2010, 25(增刊): 170-174.
- [19] DUPONT D, ARNOULD C, RPLET-REPECAUD O. Determination of bovine lactoferrin concentrations in cheese with specific monoclonal antibodies[J]. *Int Dairy J*, 2006, 16: 1081-1087.