

水牛乳 *as1* 酪蛋白多态性对类蒙特利杰克半硬质干酪品质的影响

李玲¹, 唐艳¹, 黄丽¹, 农皓如¹, 曾庆坤^{1*}, 任大喜^{2*}, 杨攀¹, 冯玲¹

(1. 中国农业科学院, 广西水牛研究所, 南宁 530002; 2. 浙江大学动物科学学院奶业科学研究所, 杭州 310058)

摘要: **目的** 分析水牛乳 *as1* 酪蛋白(*as1*-casein)多态性对类蒙特利杰克干酪品质的影响。**方法** 采用反相高效液相色谱法分析不同水牛乳样品 *as1*-casein 的多态性, 依据 *as1*-casein 多态性制成半硬质类蒙特利杰克干酪, 比较其在组成、质构和色差等方面的差异。**结果** 水牛乳 *as1*-casein 存在 AB 和 BB 两种表型。以混合样品为对照制成类蒙特利杰克干酪后, 在干酪成份上, BB 型干酪中乳脂肪含量显著低于 AB 型; 在质构方面, BB 型干酪的硬度和弹性分别为 41.21 N 和 6.31 mm, 显著高于 AB 型(29.45 N, 5.56 mm)和混合组(38.21 N, 5.25 mm), 此外 BB 型具有更高的胶粘性 and 咀嚼性; 在色泽方面, BB 型干酪的 *B* 值显著低于 AB 组, 表明黄色程度低于 AB 型。**结论** 水牛乳 *as1*-casein 存在多态性, 且 *as1*-casein 的多态性会影响类蒙特利杰克干酪的品质。

关键词: *as1*-酪蛋白; 多态性; 水牛乳; 类蒙特利杰克干酪

Effect of buffalo *as1*-casein polymorphism on the quality of semi-hard Monterey Jack-type cheese

LI Ling¹, TANG Yan¹, HUANG Li¹, NONG Hao-Ru¹, ZENG Qing-Kun^{1*}, REN Da-Xi^{2*}, YANG Pan¹, FENG Ling¹

(1. Water Buffalo Institute, Chinese Academy of Agricultural Science, Nanning 530002, China; 2. Institute of dairy science, College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou, 310058, China)

ABSTRACT: Objective To analyze the effect of *as1*-casein genotype of water buffalo on the quality of semi-hard Monterey Jack-type cheese. **Methods** The genotype of *as1*-casein was analyzed by phase reversal-high performance liquid chromatography (RP-HPLC), Monterey Jack-type cheese was made according to the *as1*-casein genotypes, and the differences in composition, texture and color of cheese were compared. **Results** Two types of *as1*-casein (AB and BB) were found in water buffalo milk. After making Monterey Jack-type cheese used mixed sample as control group, fat content of BB type was lower than that of AB type. Hardness and springiness of BB type cheese were 41.21 N and 6.31 mm, which were significantly higher than those of AB type (29.45 N, 5.56 mm) and control group (38.21 N, 5.25 mm), moreover, the gumminess and chewiness of BB type cheese were also higher. For

基金项目: 国家自然科学基金项目(31260384, 31501504)、中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(2016FZA6016)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (31260384, 31501504) and Fundamental Research Funds for the Central Universities (2016FZA6016)

*通讯作者: 曾庆坤, 硕士, 研究员, 主要研究方向为水牛乳制品加工. E-mail: zqk456@163.com

任大喜, 博士, 副教授, 博导, 主要研究方向为营养与乳制品加工. E-mail: dxren@zju.edu.cn

*Corresponding author: ZENG Qing-Kun, Master, Researcher, Water Buffalo Institute, Chinese Academy of Agricultural Science, Nanning 530001, China. E-mail: zqk456@163.com

REN Da-Xi, Ph.D, Associate Professor, Doctoral Advisor, Institute of dairy science, College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou, 310058, China. Email: dxren@zju.edu.cn

the colour and lustre, *B* value of BB type cheese was lower than that of AB type, which meant more yellow colour was found in AB type cheese. **Conclusion** *as1*-casein polymorphism is found in Chinese water buffalo, and the quality of semi-hard Monterey Jack-type cheese could be effected by *as1*-casein polymorphism.

KEY WORDS: *as1*-casein; polymorphism; water buffalo milk; Monterey Jack-type cheese

1 引言

乳蛋白多态性是由于核酸基因插入、缺失或突变, 导致肽链中对应氨基酸序列发生改变。酪蛋白(*as1*, *as2*, β 和 κ -酪蛋白)和乳清蛋白(α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白)是牛乳中主要的蛋白, 研究表明, 这些乳蛋白上均存在多态性^[1]。乳蛋白多态性可以从蛋白和基因两个层面进行分析, 蛋白水平的分析包括等电聚焦、液相色谱、毛细管电泳等方法, 基因水平包括聚合酶链反应-限制性片断长度多态性(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)、焦磷酸测序及各种基因测序技术^[2,3]。有研究表明, 乳蛋白基因多态性与产奶动物的泌乳性能、牛乳成分以及乳制品加工特性等密切相关^[4]。本课题组前期对荷斯坦奶牛的研究发现, 乳蛋白多态性与乳蛋白组成和含量显著相关^[5], κ -酪蛋白多态性与蛋白的抗氧化性和起泡性功能特性显著相关^[6]。国内外的研究表明, κ -酪蛋白多态性与牛乳凝乳特性相关, 也会影响马苏里拉等干酪的品质^[7,8]。

中国水牛存栏及产奶量均位居世界前列, 包括摩拉、尼里-拉非、本地沼泽型水牛以及它们的杂交品种。我课题组前期对水牛乳蛋白多态性及其与乳蛋白组成关联进行了研究, 发现 *as1* 酪蛋白(*as1*-casein)主要存在 AB 和 BB 这 2 种基因型, 且乳蛋白多态性与乳蛋白组成存在显著关联^[9,10]。然而, 目前关于水牛乳蛋白多态性与乳蛋白性质、功能及乳制品品质间关联的研究尚不充分, 其对干酪品质的影响仍有待进一步研究确定。

本研究拟通过对水牛乳中 *as1*-casein 多态性的分析, 采用不同类型的牛乳制成类蒙特利杰克干酪(Monterey Jack-type cheese), 并比较其组成和品质确定水牛 *as1*-casein 多态性与干酪品质的关联, 旨在为水牛育种提供依据, 对干酪等制品的加工也具有重要的指导意义。

2 材料与方法

2.1 材料、仪器与试剂

Agilent 1100 液相分析系统(美国安捷伦公司); Kjeltac 8400 凯氏定氮仪(丹麦福斯公司); SMY-2000 色差计(北京盛名杨公司); TMS-PRO 质构仪(美国 FTC 公司); 超纯水仪(德国 Millipore 公司); 离心机(美国 Beckman 公司)。

生水牛乳: 本单位奶水牛种畜场; 凝乳酶、R-704 菌种: 丹麦科汉森公司; 三氟乙酸、乙腈为色谱纯; 其余试剂

为分析纯。

2.2 样品采集及前处理

新鲜水牛奶样取自广西水牛研究所种畜场。样品采集后立即放置在冰块上运送到实验室。样本通过分装、脱脂(在 4 °C, 2000×g 离心力下离心 30 min), -20 °C 保存待用于反相高效液相色谱(phase reversal-high performance liquid chromatography, RP-HPLC)的蛋白表型分析。

2.3 RP-HPLC 分析多态性

蛋白的前处理根据 Bobe 等^[11]进行, 将解冻后水牛乳样和蛋白溶解液混合, 以 10000 r/min 离心除去脂肪和杂质。取底层溶液 300 μ L 于新的离心管中, 采用流动相稀释后过滤到进样瓶中待测。流动相 A: 三氟乙酸水溶液(1:1000, V:V); 流动相 B: 三氟乙酸乙腈溶液(1:1000, V:V)。

色谱条件: 色谱柱: Zorbax 300SB-C₈ RP(4.6 mm×250 mm, 5 μ m), 检测波长 214 nm, 柱温 45 °C, 进样量 10 μ L, 流速 0.5 mL/min, 梯度洗脱程序参照文献设定^[12]。

2.4 类蒙特利杰克干酪的制作

根据 *as1*-casein 多态性分析结果(AB 和 BB), 采集不同类型的水牛乳样品进行干酪加工, 以混合样为对照。

类蒙特利杰克干酪的加工方法根据国外学者的方法^[13], 并根据下列流程进行制作:

新鲜水牛乳→标准化→63 °C 杀菌 30 min→立刻冷却至 32 °C→添加 R-704 菌种→发酵维持 30 min→添加氯化钙和凝乳酶至凝乳→切割, 维持 10 min→搅拌、程序升温(从 32 °C 到 41 °C, 45 min)→升温结束后维持 30 min→排出大部分乳清→加灭菌的冷水至乳清温度 30 °C→维持温度, 搅拌 5 min→排出全部乳清→加盐、装模、压榨→真空包装→4 °C 贮存

2.5 干酪组成分析

在干酪制备后的第 7 d 取样, 测定干酪的灰分^[14]、脂肪^[15]、蛋白质^[16]、钙和磷、质构以及色差等指标。钙和磷含量送广西分析测试中心测定, 采用电感耦合等离子体发射光谱(inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry, ICP-AES)检测。

2.6 干酪品质分析

干酪质构采用质构仪进行测定。取整块干酪块中间的样品, 切成 2 cm×2 cm×2 cm 的方块进行测试, 测试参数: 下压 2 次, 测试速度的 120 mm/s; 触发力为 0.1 N; 形变量

为30%。每个样品重复测定3次。

干酪色差采用测色色差计测定,每个样品测定4次,统计L、A、B值的差异。

2.7 数据统计

采用SPSS 17.0软件对结果进行统计分析,采用LSD对结果进行方差分析,若 $P < 0.05$ 则认为其在统计学上存在显著差异,不同字母代表差异显著性。

3 结果与分析

3.1 $\alpha s1$ -casein 多态性分析结果

水牛乳 $\alpha s1$ -casein 多态性分析结果见图1。根据前期对150头处于泌乳中期水牛的分析,并根据文献^[4]中的液相色谱结果进行比对,色谱图中21~25 min出现的峰为 $\alpha s1$ -casein,其中前面出现的为B型,后面出现的为A型。发现中国广西的摩拉、尼里-拉菲、摩拉×本地、尼里-拉菲×本地奶水牛中 $\alpha s1$ -casein 存在多态性,一共存在2种基因型,即AB型和BB型。

3.2 干酪组成

采用不同类型 $\alpha s1$ -casein 的牛乳制成类蒙特利杰克干酪,干酪组成分析结果见表1。由表1显示, $\alpha s1$ -casein BB型干酪产率高于AB和混合型,但差异不显著。不同类型

干酪在水分、蛋白、灰分及钙和磷含量等方面无显著差异。但AB型干酪中乳脂肪含量显著高于BB型和对照干酪($P < 0.05$)。不同类型的干酪在7d后的pH值也存在差异,其中BB型的pH值显著低于AB型和混合对照干酪。

3.3 干酪质构

不同 $\alpha s1$ -casein 类型的水牛乳制成类蒙特利杰克干酪质构的分析结果见表2。表2中显示,不同类型干酪在质构上存在显著差异,其中BB型干酪硬度上显著高于AB型,弹性和咀嚼性上显著高于AB型和混合型。胶黏性上BB型最高,其次是混合型,再次是AB型。3种类型在粘附性上差异不显著。上述结果表明, $\alpha s1$ -casein 多态性与类蒙特利杰克干酪的质构间存在显著关联。

3.4 干酪色差

采用不同类型的 $\alpha s1$ -casein 制成类蒙特利杰克干酪,干酪色差分析结果见表3。表3中L表示亮暗,+表示偏亮,-表示偏暗;A表示红绿,+表示偏红,-表示偏绿;B表示黄蓝,+表示偏黄,-表示偏蓝。统计结果发现,3种类型干酪在L亮度上差异不显著,但BB型干酪A值上显著低于AB型和对照组,表明BB型干酪颜色偏绿。而B值上,BB型显著低于混合乳和AB型,表明BB型干酪色泽中更偏蓝,而AB型更偏向黄色。

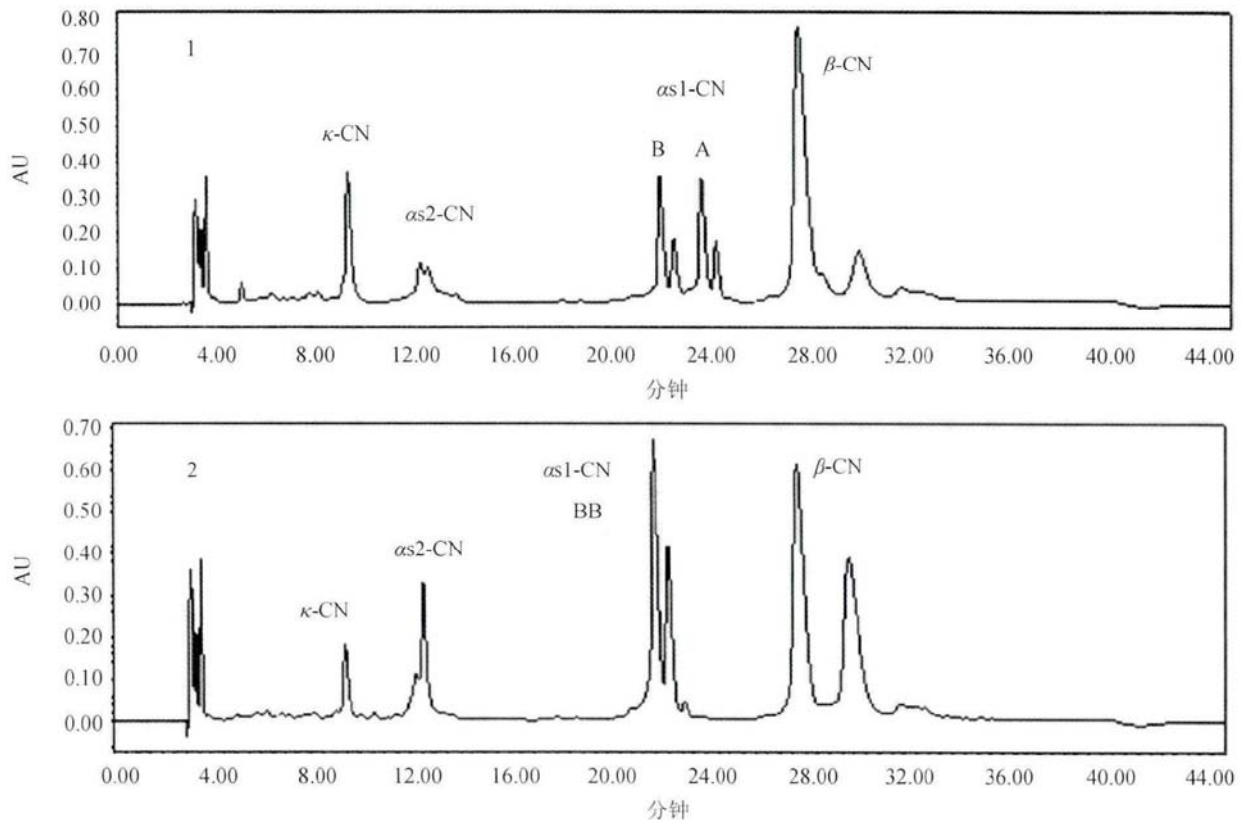


图1 不同水牛 $\alpha s1$ -casein 的多态性色谱图(1.AB型;2.BB型)

Fig. 1 Chromatograms of $\alpha s1$ -casein genotype in buffalo milk (1. AB type; 2. BB type).

表 1 不同 $\alpha S1$ -casein 表型干酪的组成($n=3$)
Table 1 Compositions of cheese with different $\alpha S1$ -casein genotypes ($n=3$)

指标(%)	$\alpha S1$ -casein 表型			P 值
	AB	BB	混合乳	
干酪校正产率	15.57±0.59	17.10±0.82	16.49±0.05	0.216
水分	42.04±0.29	42.40±2.66	42.98±2.33	0.856
蛋白(干物质)	38.58±0.22	39.25±2.07	39.44±0.23	0.676
脂肪(干物质)	51.60±1.32 ^a	47.43±2.38 ^b	46.54±0.67 ^b	0.018
灰分(干物质)	5.16±0.06	5.27±0.08	5.27±0.08	0.179
钙(干物质)	1.35±0.08	1.48±0.09	1.42±0.09	0.230
磷(干物质)	0.83±0.06	0.91±0.06	0.80±0.05	0.114
pH 值	5.28±0.04 ^c	5.14±0.01 ^a	5.20±0.01 ^b	0.001

注: 表中不同字母(a, b, c)代表组间存在显著差异($P<0.05$).

表 2 不同 $\alpha S1$ -casein 表型干酪的质构($n=3$)
Table 2 Textures of cheese with different $\alpha S1$ -casein genotypes ($n=3$)

指标	$\alpha S1$ -CN 表型			P 值
	AB	BB	混合乳	
硬度(N)	29.45±4.17 ^a	41.21±2.48 ^b	38.21±2.41 ^b	0.009
弹性(mm)	5.56±0.20 ^a	6.31±0.21 ^b	5.25±0.09 ^a	0.001
咀嚼性(mJ)	109.22±15.50 ^a	171.46±15.32 ^b	121.15±5.39 ^a	0.002
胶黏性(N)	19.61±2.13 ^a	27.15±1.54 ^c	23.09±1.37 ^b	0.005
粘附性(mJ)	0.58±0.36	0.72±0.07	0.55±0.30	0.137
内聚性(Ratio)	0.67±0.02 ^b	0.66±0.01 ^b	0.60±0.01 ^a	0.001

注: 表中不同字母(a, b, c)代表组间存在显著差异($P<0.05$).

表 3 不同 $\alpha S1$ -casein 表型干酪的质构($n=3$)
Table 3 Textures of cheese with different $\alpha S1$ -casein genotypes ($n=3$)

指标	$\alpha S1$ -CN 表型			P 值
	AB	BB	混合乳	
L 值	85.24±0.47	85.53±1.24	84.42±1.43	0.497
A 值	-1.41±0.18 ^a	-3.34±0.88 ^b	-1.84±0.50 ^a	0.016
B 值	14.09±0.32 ^c	10.07±0.01 ^a	11.44±0.02 ^b	0.000

注: 表中不同字母(a, b, c)代表组间存在显著差异($P<0.05$).

4 讨 论

水牛乳营养丰富, 总干物质达到 18%~21%, 比荷斯

坦牛乳高 50%, 1 kg 水牛乳相当于 1.45~1.8 kg 的标准乳; 其蛋白质含量在 4%~6%之间, 显著高于荷斯坦牛乳的蛋白质含量(2.9%~3.5%), 脂肪含量可以达到 8%。因此, 水牛

乳具有很高的加工价值和开发潜力,尤其适合制作高端干酪,比如 Mozzarella 等干酪。蒙特利杰克干酪是一种流行于美国的半硬质干酪,具有较硬的结构、圆润的质地和柔和的风味。蒙特利杰克干酪采用改良的切达干酪加工工艺,具有更高的水分含量(高达 44%,切达干酪水分一般低于 39%)^[13]。蒙特利杰克干酪一般采用荷斯坦牛乳和山羊乳加工,尚未见有关水牛乳制作的研究报道。

本研究采用 RP-HPLC 分析我国水牛乳的 *as1*-casein 多态性,发现存在 AB 和 BB 两种类型。这与 Lina 等^[17]分析地中海水牛的 *as1*-casein 多态性结果类似,即存在两种基因型 A 和 B,其中 Leu¹⁷⁸(A)置换成 Ser¹⁷⁸(B)。Ferranti 等^[18]采用薄层等电聚焦技术研究发现水牛 *as1*-casein 还存在一种其他的突变, Ser¹¹⁵(C)变成 Leu¹¹⁵(W)。关于水牛 *as1*-casein 多态性与乳成分和凝乳性能的关联也有研究者进行了一些工作, Bonfatti 等^[4]研究发现 *as1*-casein 不同类型,其产奶量、乳脂、乳蛋白含量以及凝乳时间、硬度和 pH 值存在差异。

关于乳蛋白多态性与干酪品质关联已经有许多国内外的学者进行过研究报道,多数研究表明 κ -casein 与干酪品质和加工关联显著,因为 κ -casein 位于酪蛋白胶束表面,水解程度会影响酪蛋白凝胶的形成^[7]。此外,有国外多数研究表明 κ -casein、 β -casein 和 α s-casein 多态性中 BB 型的牛乳加工性能和制成的干酪品质最佳。本研究发现, *as1*-casein BB 型水牛乳制成的干酪,其弹性和硬度显著高于 AB 型,与前人研究结果一致。乳蛋白多态性对干酪品质的作用包括:(1)影响乳蛋白含量及组成,比如 BB 型中酪蛋白含量高以及 κ -casein 含量较高,制成的干酪品质最佳。(2)酪蛋白多态性会影响干酪中蛋白网络结构,蛋白多态性导致了氨基酸序列的改变,这可能会影响凝乳酶的水解及钙桥的形成,进而影响干酪的质构。而干酪中的蛋白网络结构还会影响干酪中的水分及脂肪含量,这些含量的变化也会影响干酪的质构。表 3 显示 AB 干酪的颜色更偏黄色,这可能与 AB 中的脂肪含量更高有关,牛乳中呈现黄色的叶黄素和胡萝卜素主要存在乳脂肪中。

综上所述,本研究采用 RP-HPLC 分析了我国水牛的 *as1*-casein 多态性,并建立了 *as1*-casein 多态性与干酪品质的关系。研究结果表明不同水牛 *as1*-casein 表型(AB 和 BB)与水牛类蒙特利杰克干酪的组成、质构和色泽等方面存在显著关联,其中以 BB 型干酪品质最优。

参考文献

- [1] Caroli AM, Chessa S, Erhardt GJ. Invited review: milk protein polymorphisms in cattle: effect on animal breeding and human nutrition [J]. *J Dairy Sci*, 2009, 92(11): 2549-2559.
- [2] Gustavsson F, Buitenhuis AJ, Johansson M, *et al*. Effects of breed and casein genetic variants on protein profile in milk from Swedish Red, Danish Holstein, and Danish Jersey cows [J]. *J Dairy Sci*, 2014, 97:

3866-3877.

- [3] Hallen E, Allmer T, Naslund J, *et al*. Effect of genetic polymorphism of milk proteins on rheology of chymosin-induced milk gels [J]. *Int Dairy J*, 2007, 17(7): 791-799.
- [4] Bonfatti V, Giantin M, Gervaso M, *et al*. Effect of CSN1S1-CSN3 (α s₁- κ -casein) composite genotype on milk production traits and milk coagulation properties in Mediterranean water buffalo [J]. *J Dairy Sci*, 2012, 95(6): 3435-3443.
- [5] 马美蓉, 王翀, 任大喜. 荷斯坦奶牛乳蛋白基因多态性与泌乳性能的关联分析[J]. *中国畜牧杂志*, 2012, 48(9): 13-16.
Ma MR, Wang C, Ren DX. Associations between milk protein polymorphism and milk production traits in Holstein cows [J]. *Chin J Anim Sci*, 2012, 48(9): 13-16.
- [6] 任大喜, 陈有亮, 缪淑颖, 等. κ -酪蛋白基因多态性与牛乳加工性能的关联[J]. *中国食品学报*, 2012, 06:66-70.
Ren DX, Chen YL, Miao SY, *et al*. Associations of κ -casein genetic polymorphism with milk processing characteristics [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2012, 06: 66-70.
- [7] Ren D, Chen B, Chen Y, *et al*. The effects of κ -casein polymorphism on the texture and functional properties of mozzarella cheese [J]. *Int Dairy J*, 2013, 31: 65-69.
- [8] Jensen HB, Poulsen NA, Andersen KK, *et al*. Distinct composition of bovine milk from Jersey and Holstein-Friesian cows with good, poor, or non-coagulation properties as reflected in protein genetic variants and isoforms [J]. *J Dairy Sci*, 2012, 95: 6905-6917.
- [9] 任大喜, 陈有亮, 刘建新, 等. 焦磷酸测序法分析中国荷斯坦牛、娟姗牛及水牛的乳蛋白基因多态性 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2014, 5(10): 3149-3156.
Ren DX, Chen YL, Liu JX, *et al*. Genetic polymorphisms of milk protein in Chinese Holstein cattle, Jersey cattle and water buffalo analyzed by pyrosequencing [J]. *J Food Saf Qual*, 2014, (10): 3149-3156.
- [10] 刘亚楠, 任大喜, 刘建新, 等. 中国水牛乳蛋白基因多态性与乳蛋白组成的关联研究[J]. *中国畜牧杂志*, 2016, 05: 8-12.
Liu Y, Ren DX, Liu JX, *et al*. The relationship between the genetic polymorphism and protein composition in Chinese water buffalo [J]. *Chin J Anim sci*, 2016, 05: 8-12.
- [11] Bobe G, Beitz DC, Freeman AE, *et al*. Separation and quantification of bovine milk proteins by reversed phase high-performance liquid chromatography [J]. *J Agric Food Chem*, 1998, 46(2): 458-463.
- [12] Bonfatti V, Grigoletto L, Cecchinato A, *et al*. Validation of a new reversed-phase high-performance liquid chromatography method for separation and quantification of bovine milk protein genetic variants [J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1195(1/2): 101-106.
- [13] Van Hekken D, Tunick M, Park Y. Rheological and proteolytic properties of monterey jack goat's milk cheese during aging [J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52(17): 5372-5377.
- [14] IDF. Determination of dry matter in cheese and processed cheese. Standard FIL-IDF 4 [Z]. Brussels, Belgium: International Dairy Federation, 1958.
- [15] Kleyn DH, Lynch JM, Barbano DM, *et al*. Determination of fat in raw and processed milks by the Gerber method: collaborative study [J]. *J AOAC*

Int, 2001, 84, 1499–1508.

- [16] IDF. ISO 8968-3:2004 (IDF20-3:2004) Milk: Determination of nitrogen content, part 3: Block digestion method (semi-micro rapid routine method) [S].
- [17] Lina C, Maria Q, Fabiana P, *et al.* Occurrence of genetic polymorphism at the $\alpha_s I$ -casein locus in Mediterranean water buffalo milk [J]. Int Dairy J, 2009, 19: 181–189.
- [18] Ferranti P, Scaloni A, Caira S, *et al.* The primary structure of water buffalo $\alpha_s I$ -casein: identification of phosphorylation sites and characterization of a novel β -casein variant [J]. J Protein Chem, 1998, 17: 835–844.

(责任编辑: 姚菲)

作者简介



曾庆坤, 硕士, 研究员, 主要研究方向为水牛乳制品加工。

E-mail: zqk456@163.com



任大喜, 博士, 副教授, 博士生导师, 主要研究方向为营养与乳制品加工。

E-mail: dxren@zju.edu.cn