

微波加热对牛乳清蛋白氧化的影响

肖 瀛,方雨婷,胡业芹,谢 凡,周小理,周一鸣,徐 迪
(上海应用技术学院,香料香精技术与工程学院,上海 201418)

摘 要:本研究旨在探究普通加热和微波加热对牛乳清分离蛋白(WPI)氧化影响的差别。分别比较普通方式加热15、30、60和90min以及微波加热60、120、240和360s后WPI的羰基含量、巯基含量、二聚酪氨酸水平、表面疏水性、荧光光谱和SDS-PAGE电泳的变化。结果表明,与普通加热相比,较长时间(>120s)的微波加热会使WPI的羰基含量、二聚酪氨酸含量明显的增加,巯基含量明显下降,表面疏水性与荧光光谱结果显示长时间微波加热可能对WPI结构有明显修饰作用并改变其空间构象,SDS-PAGE结果显示长时间微波加热有明显的交联现象产生。

关键词:乳清分离蛋白,蛋白质氧化,微波加热

Effect of microwave heat on the oxidation of whey protein

XIAO Ying, FANG Yu-ting, HU Ye-qing, XIE Fan, ZHOU Xiao-li, ZHOU Yi-ming, XU Di

(School of Perfume and Aroma Technology, Shanghai Institute of Technology, Shanghai 201418, China)

Abstract: The aim is to investigate the different effects of the normal heating and microwave heating on the oxidation of whey protein. In this study, the whey protein(WPI) was normally heated for 15, 30, 60 and 90min, or heated by microwave for 60, 120, 240 and 360s. The heated samples were measured to compare the changes in fluorescence spectrum, carbonyl content, sulfhydryl content, bityrosine level, surface hydrophobicity and SDS-PAGE. The results showed that comparing with the normal heating, the long-term microwave heating obviously improved the carbonyl content and bityrosine level of WPI and decreases sulfhydryl content. The results from surface hydrophobicity and fluorescence spectrum indicated that microwave heating had an obvious influence on the space structure of WPI. The SDS-PAGE suggested that the microwave heating had obvious production of crosslinking of WPI.

Key words: whey protein isolation(WPI); protein oxidation; microwave heating

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2014)08-0105-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2014.08.014

加热是食品加工过程中导致蛋白氧化的主要因素之一。近年来研究表明普通方式加热可导致大豆蛋白、肉蛋白和乳蛋白等氧化,引起必需氨基酸减少、羰基含量增加、疏水性增加、促进蛋白交联形成二聚体等结构改变,从而改变蛋白质理化特性和营养价值^[1-4]。

微波加热是家庭烹饪和食品工业广泛使用的加热方式,目前研究认为微波加热对食物中蛋白质的含量影响不明显^[5],很少有研究关注微波对蛋白结构的修饰作用。而微波非热效应可加速有机反应速率,一些报道已显示微波对酶蛋白质有改性作用,如微波加热可改变 α -淀粉酶的空间结构^[6],蛋白酶和脂肪酶经微波加热后荧光和紫外光谱发生改变^[7]。

乳清蛋白是一种营养丰富的重要食品组分,它被广泛的使用以提高食品的品质和营养价值。本研究

以牛乳清分离蛋白为研究对象,通过羰基含量、巯基含量、二聚酪氨酸含量、表面疏水性与荧光光谱分析,比较普通方式加热和微波加热对牛乳清蛋白氧化影响的差别。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

分离乳清蛋白(WPI) 纯度>92%,上海锐麟生物科技有限公司;2,4-二硝基苯肼(DNPH)、5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)、8-苯胺-1-萘磺酸(ANS) 分析纯,阿拉丁试剂(上海)有限公司;牛血清蛋白 杭州百思生物科技有限公司;SDS-PAGE凝胶配制试剂盒 碧云天生物技术有限公司。

微波炉 广东格兰仕集团有限公司;UV-2102PC紫外可见分光光度计 上海垒固仪器有限公司;RF-5301 PC岛津荧光分光光度计 日本岛津科技有限公司;DYY-2C型电泳仪 北京市六一仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 WPI样品处理 分别称取约20g WPI四份置于直径9cm平皿,放置于恒温箱(温度设置100℃)中

收稿日期:2013-08-05

作者简介:肖瀛(1981-),男,博士,副教授,研究方向:分子与应用营养学。

基金项目:上海市教委优青基金(yyy11068)。

加热15、30、60、90min后分别取出,另取四份样品于微波炉(功率设置为700W)中加热为60、120、240、360s后分别取出。各组样品取出后,立即使用热红外测温仪(泰克曼TM950D)测定样品,连续测定3次温度取平均值。

1.2.2 羰基含量的测定^[8] 用0.02mol/L pH6.0的PBS配制质量浓度为5.0mg/mL的WPI溶液,准确吸取0.45mL上述样液于2mL塑料离心管,加入1mL的DNPH(浓度为10mmol/L),20℃水浴2h后,加入0.45mL质量分数为40%的三氯乙酸,剧烈振摇后静置20min,10000r/min冷冻离心5min,弃去上清液,用1.5mL乙醇:乙酸乙酯(1:1, v/v)洗涤沉淀3次,加入1.5mL盐酸胍溶液(6mol/L),37℃水浴20min,每隔5min剧烈振摇一次,在367nm处测吸光值。蛋白质浓度通过双缩脲法测定。按式(1)计算羰基含量。

$$\text{羰基含量 (nmol/mg} \cdot \text{Pr)} = \frac{A_{367} \times 10^9}{\text{Mr} \times c} \quad \text{式(1)}$$

式中: A_{367} : 367nm处光程为1cm测得的吸光度; Mr: 摩尔消光系数为22000M⁻¹cm⁻¹; c: 蛋白质浓度(mg/mL)。

1.2.3 巯基含量的测定^[9] 用0.02mol/L pH6.0的PBS配制质量浓度为20mg/mL的WPI溶液,准确吸取1mL蛋白溶液与含有0.05mL的0.01mol/L DTNB的4mL磷酸盐缓冲液(0.1mol/L, pH8.0)混合,剧烈振荡后,25℃水浴20min,并每隔5min振荡一次。用在412nm测定其吸光度。巯基含量按公式2计算。

$$\text{巯基含量 (nmol/mg} \cdot \text{Pr)} = \frac{A_{412} \times 10^9}{\text{Mr} \times c} \quad \text{式(2)}$$

式中: A_{412} : 412nm处光程为1cm测得的吸光度; Mr: 摩尔消光系数为136000M⁻¹cm⁻¹; c: 蛋白质浓度(mg/mL)。

1.2.4 二聚酪氨酸含量的测定^[9] 用pH为6.0浓度为0.02mol/L的PBS(含有浓度为0.6mol/L的KCl)配制质量浓度为0.3g/100mL WPI溶液。测定荧光强度,测量条件:激发波长(EX):325nm,发射波长(EM):420nm,狭缝宽度:10nm,荧光强度:低。最终的二聚酪氨酸(Dtyr)含量以测定荧光强度与蛋白浓度的比值表示,即相对荧光值,单位为arbitrary units(AU)。

1.2.5 表面疏水性的测定^[9] 称取0.1g蛋白样品溶于100mL 0.02mol/L pH6.0的PBS中,取上清液。用PBS稀释至蛋白浓度在0.005~0.50mg/mL之间。取不同浓度的稀释样品4mL,加入40μL ANS溶液,测定荧光强度,测量条件:EX:390nm、EM:470nm、狭缝宽:10nm,荧光强度:低,以荧光强度对蛋白质浓度作图,曲线初始阶段的斜率即为蛋白质分子的表面疏水性指数。

1.2.6 内源性荧光光谱测量条件^[10] EX:280nm,发射光谱扫描范围:300~500nm,记录范围:0~250,荧光强度:低,扫描速度:中速。

1.2.7 激发光谱和发射光谱^[10] 激发光谱测量条件:EM固定在440nm,扫描范围:220~400nm;发射光谱测量条件:EX固定在350nm,扫描范围:400~600nm。荧光强度均设置为:高,扫描速度:中速。

1.2.8 SDS-PAGE凝胶电泳的测定 分离胶浓度12%,浓缩胶浓度5%,开始电泳时电压为80V,待样品进入分离胶后改为100V;取出胶片经考马斯亮蓝染色30min,用甲醇-冰醋酸脱色液脱至透明。电泳胶片置于天能凝胶成像仪摄像。

2 结果与讨论

2.1 加热对WPI温度的变化

表1 普通加热与微波加热对WPI温度的影响
Table 1 Effect of normal heat and microwave heat on temperature of WPI

普通加热时间 (min)	温度 (℃)	微波加热时间 (s)	温度 (℃)
0	20.3	0	20.3
15	61.2	60	55.9
30	75.1	120	63.1
60	84.7	240	87.6
90	94.6	360	95.4

本研究普通方式加热的WPI置于恒温箱(热传递与热辐射)进行15~90min加热,由表1可知,普通方式加热后,WPI温度由20.3℃升高至61.2~94.6℃。而微波加热的WPI则在较短加热时间内(60~360s)温度即可升高至55.9~95.4℃。微波加热的原理不同于热传递与热辐射,微波使食品中的偶极分子(如水、蛋白质等)极性取向改变,其旋转次数达数十亿次秒,分子与分子之间急剧的摩擦、碰撞、振动、挤压等的作用产生热能,使物料内各部分在同一瞬间获得热量而升温^[5]。

2.2 加热对WPI结构的影响

本研究通过比较不同加热方式对WPI的羰基含量、巯基含量、二聚酪氨酸含量与表面疏水性的差别,分析微波加热对WPI氧化的影响,结果见表2。

2.2.1 羰基与巯基含量的变化 羰基增多是蛋白质氧化重要的标志产物,而巯基氧化可转变为二硫键^[8-9]。随着加热的增加,WPI的羰基含量呈增加趋势,而巯基含量呈现下降趋势。短时间微波较普通加热方式,在相近温度样品对应的羰基与巯基含量的差别不明显,而长时间(>120s)微波加热对羰基与巯基影响较大,表明微波加热对WPI有更强的氧化作用。

2.2.2 二聚酪氨酸含量的变化 酪氨酸聚合产物二聚酪氨酸(Dtyr)是蛋白经过自由基氧化修饰后一个有效的标志产物^[11-9],普通加热过程中Dtyr含量呈现增加趋势,加热60min内,Dtyr含量明显上升。微波加热过程中Dtyr含量总体呈现更为明显的增加趋势,但短时间微波加热对Dtyr产生的影响较弱。

2.2.3 表面疏水性的变化 疏水性可表征蛋白质的构象变化。本研究结果表明热处理对蛋白质的疏水性有较明显的影响。普通加热15~30min内,WPI表面疏水性值随时间增加明显上升,然后缓慢下降。微波加热后WPI表面疏水性变化趋势基本与普通加热方式相似,其变化程度更大,微波加热时间120s内,其值

呈上升趋势,之后呈下降趋势。疏水性的提高主要可能是因为热变性导致埋藏在内部的疏水性残基暴露到分子外部。随着加热时间的延长,其疏水性又开始缓慢下降,这很可能是氧化导致极性基团(如羰基等)增多与形成不可溶的蛋白聚集体导致的。

李竹青^[11]与吴伶燕等^[12]研究也发现加热乳蛋白可导致羰基、Dtyr和表面疏水性显著增多,巯基含量减少。另外研究报道蛋白质在热变性过程中暴露出的基团还可以通过二硫键和各种次级键结合发生聚集^[12]。但之前的研究均未涉及微波加热的方式,本研究表明微波加热较普通加热方式对乳清蛋白的结构影响更为明显。这可能与微波电磁波可引起分子的振动或转动对化学键的断裂做出贡献以及微波对极性分子的热效应明显有关^[13]。

表2 普通加热与微波加热对WPI结构的影响
Table 2 Effect of normal heat and microwave heat on WPI structure

加热时间	羰基含量 (nmol/mg.Pr)	巯基含量 (nmol/mg.Pr)	Dtyr (AU)	表面疏水性
未加热	102.4	637.3	21.8	344
普通加热(min)				
15	107.7	501.1	24.9	358
30	113.7	465.0	27.0	420
60	114.5	430.2	29.3	380
90	120.2	431.2	30.8	375
微波加热(s)				
60	106.1	565.7	22.7	375
120	115.4	456.4	22.2	454
240	135.5	412.5	29.3	401
360	145.3	383.9	39.5	360

2.3 加热氧化WPI的内源性荧光光谱

已有研究报道热处理(普通加热方式)对蛋白质构象有明显的影响,可增加蛋白无序结构^[12,14]。本研究为了进一步探究微波加热对乳清蛋白的空间结构影响,进行了荧光光谱分析。

在280nm激发的蛋白样品荧光发射光谱主要是由色氨酸和酪氨酸残基所发射的,即内源性荧光光谱。由于其分子中从酪氨酸残基到色氨酸残基之间发生了能量转移,从而导致了酪氨酸残基的荧光熄灭和色氨酸残基的荧光增加,其荧光峰是色氨酸残基的荧光峰,其最大吸收波长($\lambda_{\max}$)在325~350nm之间^[15-16]。由图1可见,微波加热较普通加热方式,其内源性荧光光谱变化程度更大。所有蛋白样品 $\lambda_{\max}$ (333~335nm)基本没有变化。短时间的微波加热与普通方式加热在此处荧光强度的增加,说明此时色氨酸残基被氧化的程度较低,且有色氨酸残基折叠暴露。而随加热时间增加,微波加热360s的WPI的荧光强度明显降低,表明此时色氨酸残基被氧化的程度较高,位于蛋白质分子表面的色氨酸残基减少。

2.4 加热氧化WPI的激发光谱与发射光谱

图2分别为普通加热和微波加热WPI的激发光

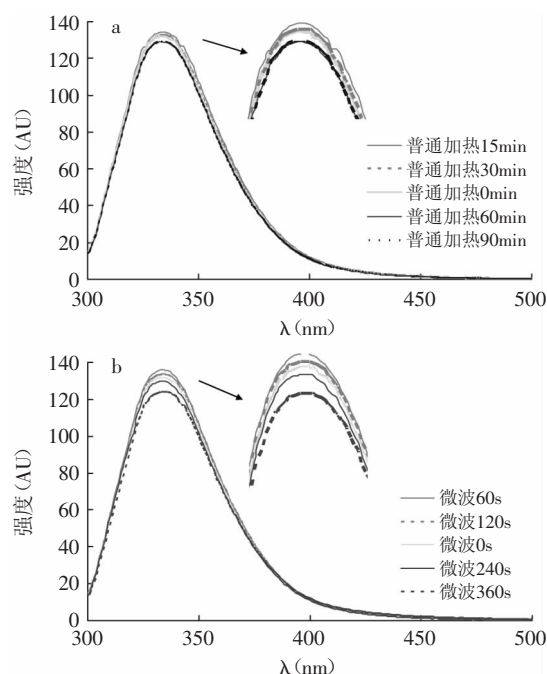


图1 普通加热(a)与微波加热(b)的WPI内源性荧光光谱
Fig.1 Intrinsic fluorescence spectrum of the heated WPI by normal way (a) and microwave (b)

注:图例按曲线由上至下顺序标注;图2、图3同。

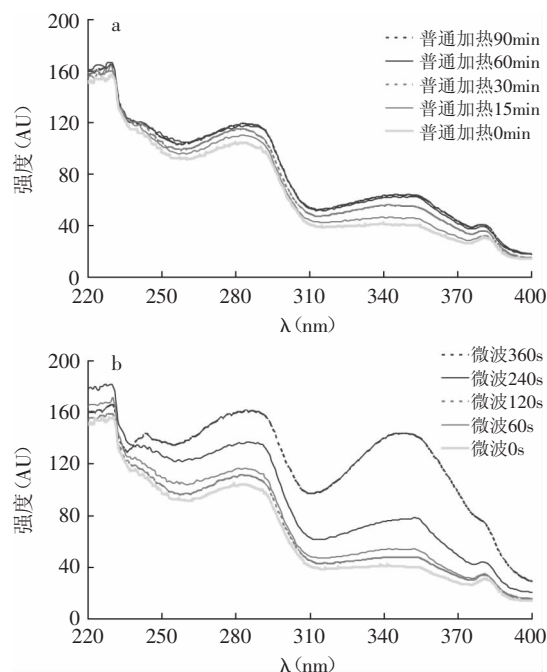


图2 普通加热(a)与微波加热(b)的WPI激发光谱
Fig.2 Excitation spectrum of the heated WPI in by normal way (a) and microwave (b)

谱,发射波长为440nm。激发光谱均有两个峰,分别位于280nm和350nm附近;其中280nm附近的峰强度最大。相比之下,微波加热后(360s)的WPI样品的荧光光谱发生了明显的变化,表现为激发光谱350nm附近的峰强度明显增强,显示加热导致其的发色基团更为裸露^[10],即蛋白分子裸露程度变大。

图3分别为普通加热和微波加热WPI的发射光

谱,激发波长为350nm。样品最大发射波长为440nm附近。普通加热15min发射光谱基本不变,加热30min发射光谱在440nm附近的峰强度明显增加,加热大于60min其增加趋势又趋缓。而微波加热的WPI发射光谱有较大变化,在440nm附近峰强度增加,长时间微波加热(360s)发射光谱在440nm附近的峰强度则明显增加,可能生成某些新的荧光物质^[17],此结果与羰基含量和二聚酪氨酸含量变化均一致。

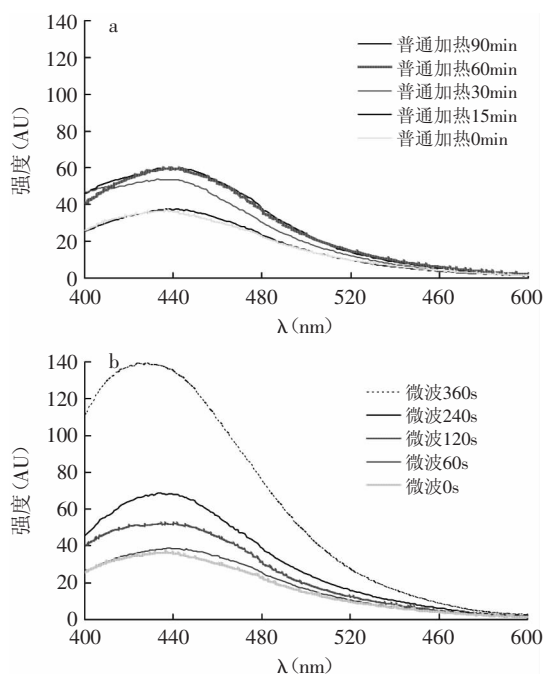


图3 普通加热(a)与微波加热(b)的WPI发射光谱
Fig.3 Optical emission spectrum of the heated WPI by normal way (a) and microwave (b)

2.5 加热氧化WPI的SDS-PAGE电泳

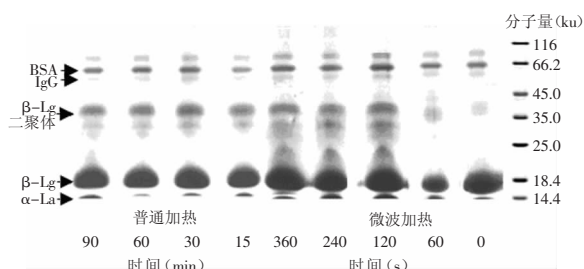


图4 普通加热与微波加热对WPI结构影响的电泳图
Fig.4 Electrophoretogram of the heated WPI by normal way and microwave

由图4可见,未加热WPI的SDS-PAGE结果有4条较清晰带,即 α -乳白蛋白(α -La)、 β -乳球蛋白(β -Lg)、免疫球蛋白(IgG)和牛血清白蛋白(BSA),以及隐约可见的 β -乳球蛋白二聚体(β -Lg二聚体)。普通加热随着时间增加,交联体条带增多。短时间微波加热聚合物形成相对不明显,而随微波加热时间增加(120~360s),蛋白交联聚合现象更为明显增加,一些研究报道蛋白质氧化可发生蛋白质的聚集,导致降

低消化道酶的对其的敏感性^[18-19]。因此,本研究结果显示长时间微波加热可增加WPI中二聚体含量,可能降低人体对其消化利用率^[14]。

3 结论

长时间(>120s)的微波加热WPI与普通方式加热相比,可使其羰基含量、二聚酪氨酸含量明显提高,而巯基含量明显降低。长时间微波加热WPI的表面疏水性与荧光光谱图发生明显的变化,可能与WPI结构修饰作用及空间构象变化有关。SDS-PAGE结果表明长时间微波加热WPI的交联产物(如 β -乳球蛋白二聚体等)明显增多。而短时间(<120s)的微波加热对WPI氧化影响的相对较小。本研究结果显示应该合理地控制微波加热牛乳及其制品的时间,减少氧化作用的产生,防止其营养价值的降低。

参考文献

- [1] Lund MN, Heinson M, Baron CP, *et al.* Protein oxidation in muscle foods: a review[J]. *Drug Metab Rev Mol Nutr Food Res*, 2011, 55(1): 83-95.
- [2] Keerati-u-rai M, Corredig M. Heat-induced changes in oil-in-water emulsions stabilized with soy protein isolate[J]. *Food Hydrocolloid*, 2009, 23(8): 2141-2148.
- [3] 吴伶燕, 李竹青, 吴秋萍, 等. 氧化酪蛋白对小鼠组织抗氧化能力及血液组成的影响[J]. *世界科技研究与发展*, 2011, 33(3): 489-493.
- [4] Traore S, Aubry L, Gatellier P, *et al.* Effect of heat treatment on protein oxidation in pig meat[J]. *Meat Sci*, 2012, 91(1): 14-21.
- [5] 刘晓庚, 曹崇江, 周逸婧. 微波加工对食品安全性的影响[J]. *食品科学*, 2008, 29(5): 484-488.
- [6] Zhang X, Qin W, Tian X, *et al.* Effect of microwave irradiation on secondary structure of α -amylase by circular dichroism[J]. *J Cent South Univ Technol*, 2011, 18(4): 1029-1032.
- [7] 闵瑞, 方云, 夏咏梅. 低功率微波耦合溶剂相酶促酯化反应与其荧光光谱的变化[J]. *光谱学与光谱分析*, 2009, 29(2): 428-31.
- [8] Levine R L, Garland D, Oliver C N. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins[J]. *Methods Enzymol*, 1990, 186: 464-477.
- [9] 孔保华, 孙妍, 熊幼翎. 抗氧化剂对羟自由基引起的乳清分离蛋白氧化抑制效果的研究[J]. *食品科学*, 2011, 31(5): 5-10.
- [10] 黄友如. 脂质氧化酶催化亚油酸诱导大豆蛋白聚集机理[D]. 无锡: 江南大学, 2006: 34-53.
- [11] 李竹青, 吴伶艳, 乐国伟, 等. 氧化酪蛋白对小鼠血液和消化器官氧化损伤的影响[J]. *营养学报*, 2013, 35(1): 39-43, 47.
- [12] 王伟. 蛋白质氧化对大豆蛋白结构和凝胶性质的影响[D]. 无锡: 江南大学, 2010: 58-67.
- [13] Solyom K, Mato RB, Pérez-Elvira SI, *et al.* The influence of the energy absorbed from microwave pretreatment on biogas production from secondary wastewater sludge[J]. *Bioresource Technol*, 2011, 102(23): 10849-1054.
- [14] Tang X, Wu Q, Le G, *et al.* Effects of heat treatment on

(下转第113页)

同纯度的酚类提取物中酚类化合物组成不同所致。

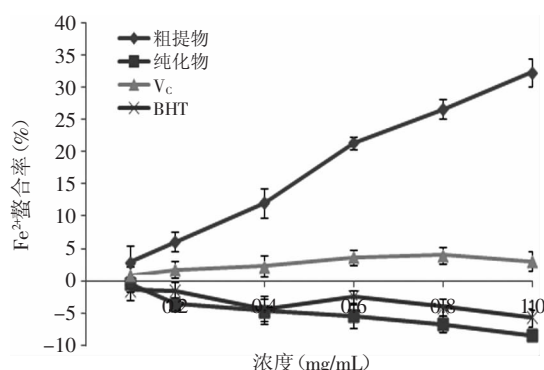


图8 样品、BHT和Vc的亚铁离子螯合能力

Fig.8 Ferrous ion chelating ability of sample, BHT and Vc

3 结论

本文分别采用7种体外抗氧化体系,对黄参茎叶多酚粗提物、纯化物的抗氧化活性进行综合评价。结果表明:黄参茎叶多酚具有较高的清除DPPH自由基的能力、脂质抗氧化能力;较好的清除羟基自由基、亚硝酸盐的能力;一定的还原能力;基本不具有清除超氧阴离子的作用,但具有较弱的亚铁离子螯合能力。综上所述,黄参茎叶多酚提取物显示具有较好的抗氧化性能,部分指标甚至比阳性对照效果还好,可作为天然抗氧化剂进一步开发利用。

参考文献

- [1] Yu H H, Liu X G, Xing R E, et al. *In vitro* determination of antioxidant activity of proteins from jellyfish *Rhopilema esculentum*[J]. Food Chemistry, 2006, 95(1): 123-130.
- [2] Terashima M, Nakatani I, Harima A, et al. New method to evaluate water-soluble antioxidant activity based on protein structural change[J]. Journal of Agriculture Food Chemistry, 2007, 55: 165-169.
- [3] 中国科学院西北高原生物研究所. 青海经济植物志[M]. 西宁: 青海人民出版社, 1987: 417-418.
- [4] Gao C Y, Lu Y H, Tian C R, et al. Main nutrients, phenolics, antioxidant activity, DNA damage protective effect and microstructure of *Sphallerocarpus gracilis* root at different harvest time[J]. Food Chemistry, 2011, 127: 615-622.
- [5] Gao C Y, Tian C R, Lu Y H, et al. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Sphallerocarpus gracilis* seeds

against selected food-related bacteria[J]. Food Control, 2011, 22 (3-4): 508-516.

[6] Shi R M, Pe D, Liu J X, et al. Chemical constituents from *Sphallerocarpus gracilis*[J]. Biochem Syst Ecol, 2012, 127: 1-3.

[7] 郝果, 田呈瑞, 高春燕, 等. 不同采收期黄参功效成分及甲醇提取物抗氧化性研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(5): 131-133.

[8] Brandwiliams W, Cuvelier M E, Berset C. Use of a free-radical method to evaluate antioxidant activity[J]. Food Science and Technology - Lebensmittel - Wissenschaft & Technology, 1995, 28(1): 25-30.

[9] Siddhuraju P, Becker K. Studies on antioxidant activities of mucuna seed (*Mucuna pruriens* var *utilis*) extract and various non-protein amino/imino acids through *in vitro* models[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2003, 83(14): 1517-1524.

[10] Vaquero M J R, Serravallo L R T, de Nadra M C M, et al. Antioxidant capacity and antibacterial activity of phenolic compounds from argentinean herbs infusions[J]. Food Control, 2010, 21(5): 779-785.

[11] Li Y H, Jiang B, Zhang T, et al. Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate[J]. Food Chemistry, 2008, 106(2): 444-450.

[12] Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase[J]. European Journal of Biochemistry, 1974, 47(3): 469-474.

[13] 薛长晖, 王佩维, 姚晨之. 苦荞粉提取液对 NO₂-清除作用的体外实验研究[J]. 粮油加工与食品机械, 2002(10): 48-49.

[14] Gülçin I, Berashvili D, Gepdiremen A. Antiradical and antioxidant activity of total anthocyanins from *Perilla pankenensis* decne[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2005, 101: 287-293.

[15] Siddhuraju P, Becker K. Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves [J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2003, 51 (8): 2144-2155.

[16] 张清安, 范学辉, 张志琪, 等. 沙苑子酚类提取物的抗氧化能力研究[J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(5): 955-958.

[17] 李均, 陈炳华, 苏安玲. 中华补血草根提取物抗氧化活性的初步研究[J]. 福建师范大学学报: 自然科学版, 2008, 24(3): 83-87.

(上接第108页)

structural modification and *in vivo* antioxidant capacity of soy protein[J]. Nutrition, 2012, 28(11-12): 1180-5.

[15] Kalapathy U, Hettiarachchy NS, Rhee KC. Effect of drying methods on molecular properties and functionalities of disulfide bond-cleaved soy proteins[J]. J Am Oil Chem Soc, 1997, 74(3): 195-199.

[16] 陶慰孙, 李惟, 姜涌明. 蛋白质分子基础[M]. 第二版. 北京: 高等教育出版社, 1995: 260-263.

[17] Liang JH. Fluorescence due to interactions of oxidizing

soybean oil and soy proteins[J]. Food Chem, 1999, 66(1): 103-108.

[18] Sante' -Lhoutellier V, Engel E, Aubry L, et al. Effect of animal (lamb) diet and meat storage on myofibrillar protein oxidation and *in vitro* digestibility[J]. Meat Sci, 2008, 79(4): 777-783.

[19] Chang CH, Zhao XH. *In vitro* digestibility and rheological properties of caseinates treated by an oxidative system containing horseradish peroxidase, glucose oxidase and glucose[J]. Int Dairy J, 2012, 27(1-2): 47-52.