DOI:10.12441/spyswjs.20221003001 [文章编号] 1673-1689(2024)07-0126-07

乳蛋白浓缩物的酶法脱磷酸化及模拟婴幼儿体外消化性研究

陶秀梅[1] 王园园[2] 刘大松[2*] 周 鹏[2]

(1.江南大学分析测试中心,江苏 无锡,214122;2.江南大学食品科学与资源挖掘全国重点实验室,江苏 无锡,214122)

摘要:牛乳酪蛋白是婴幼儿配方乳粉的主要蛋白质组分之一,由于其磷酸化水平高于人乳酪蛋白,限制了其在婴幼儿食品中的应用。为了使牛乳酪蛋白在分子水平上更接近人乳酪蛋白,作者以乳蛋白浓缩物(MPC)为研究对象,采用马铃薯酸性磷酸酶(PAP)对MPC进行脱磷酸化修饰处理,制得了一系列具有不同脱磷酸化程度的MPC。同时利用尿素-聚丙烯酰胺凝胶电泳(Urea-PAGE)、微波消解-紫外可见吸收光谱和超高效液相串联质谱(UPLC-MS)鉴定了MPC的脱磷酸化程度,考察了脱磷酸化程度对MPC在模拟婴幼儿胃液和肠液中消化性的影响。研究结果表明,经PAP脱磷酸化修饰后,MPC中酪蛋白磷酸基团脱除率的可控范围为0~85.8%,酪蛋白脱磷酸化程度越高,其在胃液中形成的絮凝结构越疏松,且在模拟婴幼儿胃液和肠液中的消化性越好。

关键词:乳蛋白浓缩物;马铃薯酸性磷酸酶;脱磷酸化;婴幼儿食品;消化性

Study on Enzymatic Dephosphorylation of Milk Protein Concentrate and Its Digestibility *in vitro* Infant

TAO Xiumei[1] *WANG Yuanyuan*[2] *LIU Dasong*[2*] *ZHOU Peng*[2]

(1.Analysis and Testing Center, Jiangnan University,Wuxi 214122, China; 2.State Key Laboratory of Food Science and Resources, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Bovine casein is one of the main protein components of infant formula milk powder. Its phosphorylation level is higher than that of human casein, which limits its direct application in infant foods. In order to make bovine casein closer to human casein at the molecular level, the author considered milk protein concentrate (MPC) as the research object. A series of MPCs with different dephosphorylation degrees were prepared by using potato acid phosphatase (PAP) as the dephosphorylation modification treatment. Urea-PAGE, microwave digestion-UV/visible absorption spectrometry and ultra high-performance liquid tandem mass spectrometry (UPLC-MS) were applied to investigate the changes in dephosphorylation degree. Moreover, the digestibility of dephosphorylated MPC was also investigated using an *in vitro* digestion model. The results showed that a series of MPC with dephosphorylation rate of 0~85.8% was obtained after the modification of MPC by PAP dephosphorylation. With the increase in dephosphorylation degree, the looser clots were observed, and the gastrointestinal digestibility of MPC increased under *in vitro* conditions.

Keywords: milk protein concentrate; potato acid phosphatase; dephosphorylation; infant food; digestibility

---

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(31901613);江南大学食品科学与资源挖掘全国重点实验室自由创新探索项目(SKLF-ZZA-202004);江南大学基本科研计划青年基金项目(JUSRP121077)。

通信作者:刘大松(1986—),男,博士,副研究员,硕士研究生导师,主要从事蛋白质结构和功能性质研究。E-mail:liudasong@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2022-10-03 **改回日期:**2022-10-19

乳蛋白浓缩物（MPC）作为一种高蛋白质、低乳糖的新型乳粉配料，具有较高的营养价值和功能特性，在配方乳粉等婴幼儿食品的研制中有重要的应用前景[1-3]。然而，牛乳与人乳在蛋白质组成和蛋白质分子结构方面存在较大差异。在蛋白质组成方面，牛乳中酪蛋白与乳清蛋白的质量比为8∶2，而人乳中质量比则为4∶6。就蛋白质种类而言，牛乳酪蛋白以α_{S1}和β为主，而人乳酪蛋白以β为主，且不含α_{S2}。虽然牛乳酪蛋白分子与人乳酪蛋白分子在氨基酸组成和序列上比较接近，但人乳酪蛋白分子翻译后的磷酸化修饰水平较低且呈现多分布模式，牛乳酪蛋白则是完全磷酸化的。这些组成和结构上的差异使得牛乳蛋白结合的钙更多，导致其在胃消化过程中更容易发生聚集，从而延缓胃排空，并影响蛋白质的消化吸收[4]，进而影响婴幼儿的生长发育，因此限制了牛乳蛋白在婴幼儿食品中的应用。目前，在牛乳蛋白的婴幼儿食品的研制过程中，主要是通过改变牛乳中酪蛋白与乳清蛋白的质量比使牛乳蛋白的组成更接近人乳蛋白，而较少考虑牛乳蛋白与人乳蛋白在分子结构上的差异。然而，牛乳酪蛋白较高的磷酸化水平也会使其结合更多的钙离子，并且在胃液中更容易发生聚集，导致其消化吸收性与人乳蛋白有着较大差距。因此，通过脱磷酸化改变牛乳酪蛋白分子的磷酸化水平及其分布模式，使其在分子结构和消化吸收性能方面更接近人乳酪蛋白，可为配方乳粉等婴幼儿食品的研发和生产提供更加优质的乳蛋白配料。

化学法和酶法是目前最常用的蛋白质脱磷酸化修饰方法。化学法涉及的脱磷酸化修饰反应条件较为剧烈，易生成赖丙氨酸副产物，可能引发肾细胞巨大症，并且导致蛋白质天然结构发生改变，进而影响其物理、化学和营养特性[5]；相比之下，酶法具有条件温和可控、专一性好、最大程度保留蛋白质特定结构和功能等优势，因此其更适合MPC脱磷酸化修饰。文献报道了小牛肠碱性磷酸酶对酪蛋白酸钠（SC）的脱磷酸化修饰[6]，不同磷酸酶对底物的特异性表现不同，MPC中的酪蛋白主要是以高度聚合的胶束结构的形式存在，而SC中的酪蛋白主要是以游离单体或低聚体的形式存在，酪蛋白聚集状态的差异会影响脱磷酸化酶与蛋白质的相互作用，进而影响脱磷酸化的效率，因此MPC和SC脱磷酸化修饰的适用条件也有所不同。相比小牛肠碱性磷酸酶，PAP成本低且易于获取，工业化应用的潜力更大。

目前，国内外关于蛋白脱磷酸化修饰的研究主要集中在磷酸酶的筛选及脱磷酸化产物的功能性质方面，而对于MPC脱磷酸化程度的鉴定及脱磷酸化产物的消化性等方面的研究较少。作者选用PAP制备不同脱磷酸化程度的MPC，利用尿素-聚丙烯酰胺凝胶电泳、微波消解-紫外可见吸收光谱、UPLC-MS等方法鉴定了MPC的脱磷酸化程度，并研究了脱磷酸化MPC在模拟婴幼儿胃液和肠液中的消化过程，以期为MPC在婴幼儿食品研发过程中的应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

乳蛋白浓缩物（蛋白质质量分数为86.2%）：新西兰恒天然集团；马铃薯酸性磷酸酶（6 U/mg）、胃蛋白酶（3 200 U/mg）、异硫氰酸荧光素（FITC）：美国Sigma公司。

1.2 试验仪器

Platform ZMD 4000型液质联用仪：美国Waters公司；Protean II xi Cell型电泳仪、GelDox XR型凝胶成像仪：美国Bio-rad公司；MARS型微波消解仪：美国CEM公司；LSM-780型激光共聚焦显微镜：德国Zeiss公司；Optima L-80 XP型超速离心机：美国Beckman Coulter公司；BenchTop Pro型冷冻干燥机：美国VirTis公司；RC透析膜（截留相对分子质量14 000）：上海绿岛科技发展有限公司。

1.3 不同脱磷酸化程度MPC的制备

PAP脱磷酸化修饰MPC的方法参考Bingham等[7]和Hiller等[8]的研究。使用pH 6.8的Tris-HCl缓冲液溶解PAP，得到0.48 U/mL的酶溶液，然后将该酶溶液与5 mg/mL的MPC等体积混合，将混合液置于37 ℃水浴中分别保持0、2、4、6、8、10、20、30 min和1、2、3、5 h，之后于80 ℃保温10 min使酶失活，之后将水解液在4 ℃超纯水中透析36 h后冷冻干燥。

1.4 脱磷酸化MPC模拟婴幼儿胃液和肠液消化的方法

脱磷酸化MPC消化性的研究采用Dupont

等[9]报道的婴幼儿体外静态消化模型。配制模拟胃液：称取 0.05 g 氯化钠，依次加入 175 μL 盐酸、17.5 mL 超纯水、胃蛋白酶，调节 pH 至 3.0 并定容至 25 mL。接着将模拟胃液与 5 mg/mL 的脱磷酸化 MPC 等体积混合，使每毫克蛋白质添加的胃蛋白酶酶活达到 22.75 U。将混合样品在 37 ℃水浴消化 60 min，每隔 10 min 取样一次，最后通过调节 pH 至 7.0 终止反应。

配制模拟肠液：首先将 175 mg 磷酸二氢钾溶于超纯水中，加入胰蛋白酶，调节 pH 至 6.5 并定容至 25 mL。将经过模拟胃液消化 60 min 后的消化液与模拟肠液等体积混合，使胰蛋白酶酶活达到 3.45 U/mg。然后将该混合样品在 37 ℃水浴中消化 60 min，分别在 0、5、10、20、40、60 min 取样，并立即在 95 ℃加热 10 min 终止反应。

1.5 分析方法

1.5.1 脱磷酸化 MPC 的电泳分析 采用 Urea-PAGE 法分析 MPC 的脱磷酸化程度。用 2 mL Tris-HCl 缓冲液（pH 6.8）溶解 5 mg 冻干样品，将溶解后的样品与上样缓冲液以体积比 1∶1 混合，其中样品缓冲液含 62.5 mol/L Tris-HCl（pH 7.6）、8 mol/L 尿素和体积分数 5% 的 β-巯基乙醇。浓缩胶的质量浓度为 4 g/dL，分离胶的质量浓度为 10 g/dL，样品上样量为 30 μL。

1.5.2 脱磷酸化 MPC 中磷质量分数的测定 脱磷酸化 MPC 中磷质量分数的测定采用 IDF 推荐的方法[10]。将 50 mg 样品置于消解管中，加入 3.5 mL 硝酸进行微波消解，消解液中为总磷质量分数。另外称取 125 mg 样品溶于水中，与体积分数 30% 的三氯乙酸等体积混合，10 000 g 离心 1 h，所得上清液中为无机磷质量分数。

1.5.3 脱磷酸化 MPC 中磷酸基团个数的鉴定 将脱磷酸化样品溶于 pH 8.0 的氨水溶液中，10 000 g 离心 5 min，采用 0.45 μm 的滤膜过滤上清液，收集滤液，通过 UPLC-MS 鉴定脱磷酸化 MPC 中磷酸基团的个数。色谱条件：选用 XBrige BEH C_4（2.1 mm×100 mm×1.7 μm）色谱柱，流动相 A 为体积分数 0.1% 甲酸，流动相 B 为体积分数 100% 乙腈；梯度洗脱的条件是在 40 min 内，流动相 B 的体积分数从 10% 升至 90%。质谱条件：离子化模式设定为 ESI^+，锥孔电压设定为 40 V，碰撞能量设定为 6 eV，质荷比设定为 500~3 000，扫描时间设定为 1 s，扫描时间间隔设定为 0.02 s。数据分析采用 MassLynx V 4.1 和 MassEnt 1。

1.5.4 脱磷酸化 MPC 在模拟婴幼儿胃液中的絮凝结构 取 0.4 mL 经过 FITC 标记的脱磷化 MPC 溶液置于玻璃培养皿中。随后，使用激光共聚焦显微镜（CLSM）在 498~532 nm 发射波长和 488 nm 激发波长下观察脱磷化 MPC 在模拟婴幼儿胃液中的絮凝结构。

1.5.5 脱磷酸化 MPC 消化液的电泳分析 脱磷酸化 MPC 在模拟婴幼儿胃液和肠液中的消化过程采用 SDS-PAGE 进行分析。将消化液与样品缓冲液等体积混合，其中样品缓冲液含 62.5 mmol/L Tris-HCl（pH 6.8）、2 g/dL SDS、体积分数 5% β-巯基乙醇和体积分数 25% 甘油。采用 4 g/dL 浓缩胶和 15 g/dL 分离胶进行电泳分析，胃液和肠液消化液对应的样品上样量分别为 10 μL 和 20 μL。

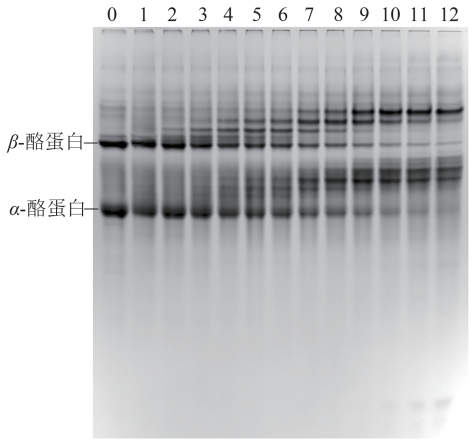
2 结果与分析

2.1 不同脱磷酸化程度的 MPC 的制备及鉴定分析

酪蛋白酶法脱磷酸化的效率与底物状态、酶的种类、反应介质的 pH 等密切相关，前期的相关研究主要是以酪蛋白酸钠或单个的酪蛋白为研究对象[7, 11-12]。MPC 是一种经膜过滤制备的高蛋白配料，其保留了牛乳中天然存在的酪蛋白胶束结构，而酪蛋白酸钠中的蛋白质是以单分子或小分子量聚集体的形式存在的。酪蛋白胶束结构中携载了大量的钙离子，有利于婴幼儿的骨骼发育，因此 MPC 比酪蛋白酸钠更适合作为配方乳粉等婴幼儿食品的原料。酪蛋白的胶束结构会影响磷酸化酶与蛋白质分子中磷酸丝氨酸残基的相互作用，从而影响酪蛋白脱磷酸化的效率[13]。因此，研究影响 MPC 脱磷酸化效率的关键因素尤为重要。经预实验确定脱磷酸化的最适 pH 和酶活添加量后，再于最适条件下通过不同反应时间制备不同脱磷酸化程度的 MPC。

尿素电泳是根据蛋白质质荷比的差异来达到分离效果的[14]。PAP 在脱除酪蛋白分子中丝氨酸残基上磷酸基团的同时，会保留丝氨酸残基的完整结构，因此酪蛋白的等电点会随脱磷酸化程度的增加而逐渐增加，其在尿素电泳碱性分离胶中的迁移速率也会随之降低[15]。因此，可以通过 Urea-PAGE 上蛋白质条带迁移率的改变，来初步分析酪蛋白磷酸化程度的变化。

在PAP的作用下，MPC脱磷酸化程度随反应时间的变化见图1。在0 min时，即未经脱磷酸化处理的MPC有两条明显的单一蛋白质条带，分别为完全磷酸化的β-酪蛋白和α-酪蛋白。随着反应时间的增加，泳道中蛋白质条带的数量也逐渐增多，在脱磷酸化反应的6 min内，条带迁移率随磷酸基团的脱除逐渐降低；在8~10 min内，泳道中蛋白质条带的数量最多，且迁移率低的条带逐渐增强，表明此时酪蛋白的磷酸化水平分布最广；在0.5~5 h，泳道中高迁移率的条带逐渐减弱，而低迁移率的条带进一步增强，表明酪蛋白的磷酸化水平分布逐渐变小。



0—MPC对照；1—0 min；2—2 min；3—4 min；4—6 min；5—8 min；6—10 min；7—20 min；8—0. 5 h；9—1 h；10—2 h；11—3 h；12—5 h。

图1 MPC经PAP脱磷化修饰不同时间后的Urea-PAGE图

Fig. 1 Urea-PAGE electrophoresis of MPC modified by PAP dephosphorization for different time periods

上述结果表明，MPC的脱磷酸化程度随反应时间的延长逐渐增加，其中脱磷酸修饰8 min的MPC的磷酸化水平分布模式与人乳酪蛋白最接近。根据脱磷酸化程度和磷酸化水平分布模式，选择PAP脱磷酸修饰0、8 min和5 h的MPC分别代表未脱磷酸化（PAP-MPC1）、部分脱磷酸化（PAP-MPC5）和高度脱磷酸化（PAP-MPC12）的样品，进一步研究脱磷酸化MPC中磷的质量分数、磷酸基团的个数及脱磷酸化程度对其消化性能的影响。

2.2 脱磷酸化MPC中磷的质量分数

脱磷酸化MPC中磷的分布及其质量分数见表1。可以看出，未脱磷酸化的MPC中总磷质量分数为6.74 μg/mg。前期研究报道，MPC中磷的分布及质量分数受奶源、加工条件等因素的影响，市售MPC的总磷质量分数为6.6~20.9 μg/mg[16]。有机磷对应于MPC中与酪蛋白分子的丝氨酸残基共价结合的部分，经PAP脱磷酸修饰8 min和5 h后，MPC中有机磷的脱除率分别为64.7%和85.8%。

表1 脱磷酸化MPC中磷的分布及质量分数

Table 1 Distribution and mass fracion of phosphorus in dephosphorylated MPC

脱磷酸化MPC	总磷/（μg/mg）	无机磷/（μg/mg）	有机磷/（μg/mg）	有机磷的脱除率/%
PAP-MPC1	6.74±0.06	0.90±0.03	5.84	0
PAP-MPC5	2.88±0.04	0.82±0.04	2.06	64.7
PAP-MPC12	1.56±0.06	0.73±0.02	0.83	85.8

注：PAP-MPC1、PAP-MPC5和PAP-MPC12分别对应PAP脱磷酸化修饰0、8 min和5 h后的MPC。

2.3 脱磷酸化MPC的磷酸基团个数的变化

通过降低牛乳酪蛋白分子的磷酸化程度，并拓展其磷酸化水平的分布范围，可以使其在分子结构上更接近人乳酪蛋白，有利于其在配方乳粉等婴幼儿食品中的应用。

脱磷酸化MPC中β-酪蛋白的去卷积质谱图如图2（a）、2（b）和2（c）所示。可以看出，未脱磷酸化的MPC中β-酪蛋白有2种变体，其相对分子质量分别为23 981.0和23 997.0，且都含5个磷酸基团。PAP脱磷酸化修饰8 min后，β-酪蛋白的两种变体都呈现4种磷酸化水平，对应的相对分子质量分别减少了80、160、240和320，即分别含有4、3、2、1个磷酸基团。PAP脱磷酸化修饰5 h后，β-酪蛋白的2个变体都呈现2种磷酸化水平，分别含1、0个磷酸基团。

脱磷酸化MPC中α-酪蛋白的去卷积质谱图见图2（d）、2（e）和2（f）。未脱磷酸化的MPC中α-酪蛋白有2种变体，其相对分子质量分别为23 611.0和23 631.0，且都含8个磷酸基团。PAP脱磷酸化修饰8 min后，α-酪蛋白呈现4种磷酸化水平，对应的相对分子质量分别减少了240、320、400和480，即分别脱除了3、4、5、6个磷酸基团。PAP脱磷酸化修饰5 h后，α-酪蛋白呈现3种磷酸化水平，对应的相对分子质量分别减少了480、560和640，即分别含2、1、0个磷酸基团。

PAP脱磷酸化修饰8 min后，β-酪蛋白和α-酪蛋白都呈现出多磷酸化分布，这表明PAP对酪蛋白脱磷酸化的顺序和位点不具有选择性，这与Molina等的报道一致[17]。

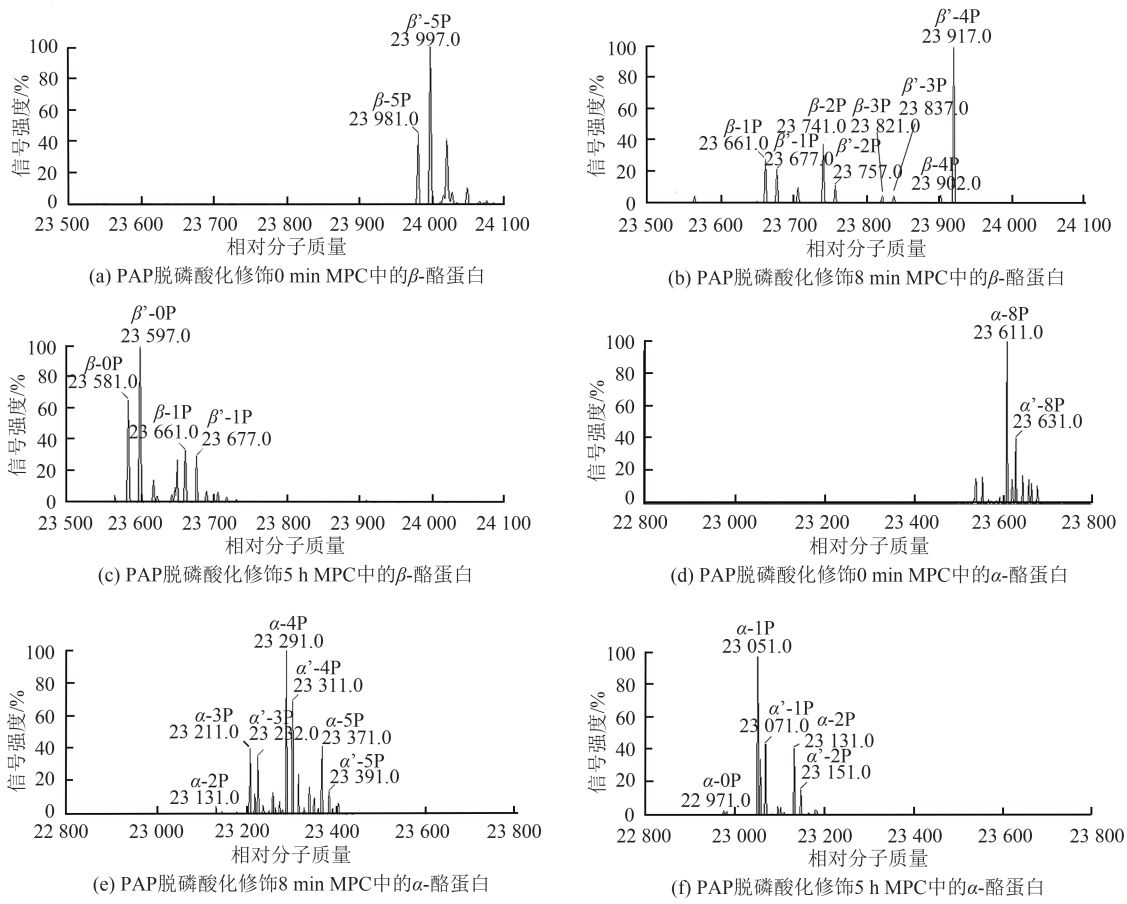


图 2　脱磷酸化 MPC 中 β-酪蛋白和 α-酪蛋白的去卷积质谱图

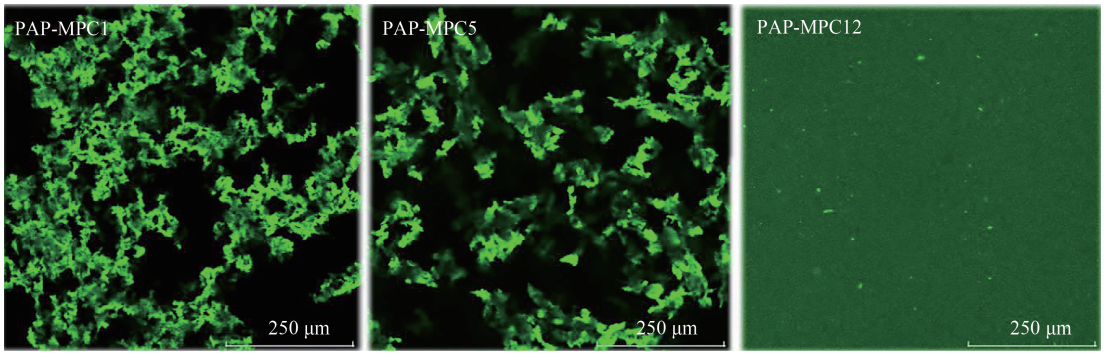
Fig. 2　Deconvolution mass spectra of β-casein and α-casein in dephosphorylated MPC

2.4　脱磷酸化 MPC 在模拟婴幼儿胃液和肠液中的消化性

蛋白质在胃液和肠液中的消化情况是评价其营养与功能性的重要依据[18-19]。MPC 应用的一个重要领域是配方乳粉等婴幼儿食品，因此采用婴幼儿体外静态消化模型来探究脱磷酸程度对 MPC 消化性的影响[20]。

2.4.1　脱磷酸化 MPC 在模拟婴幼儿胃液中的絮凝结构

胃液中的絮凝结构会影响消化酶与蛋白质底物的接近，致密的絮凝结构导致消化酶难以与蛋白质底物接近，从而影响蛋白质的消化性[21]。因此，通过激光共聚焦考察不同脱磷酸化程度的 MPC 形成絮凝结构的差异。如图 3 所示，在模拟婴幼儿胃液中，未脱磷酸化的 MPC 形成了致密的网



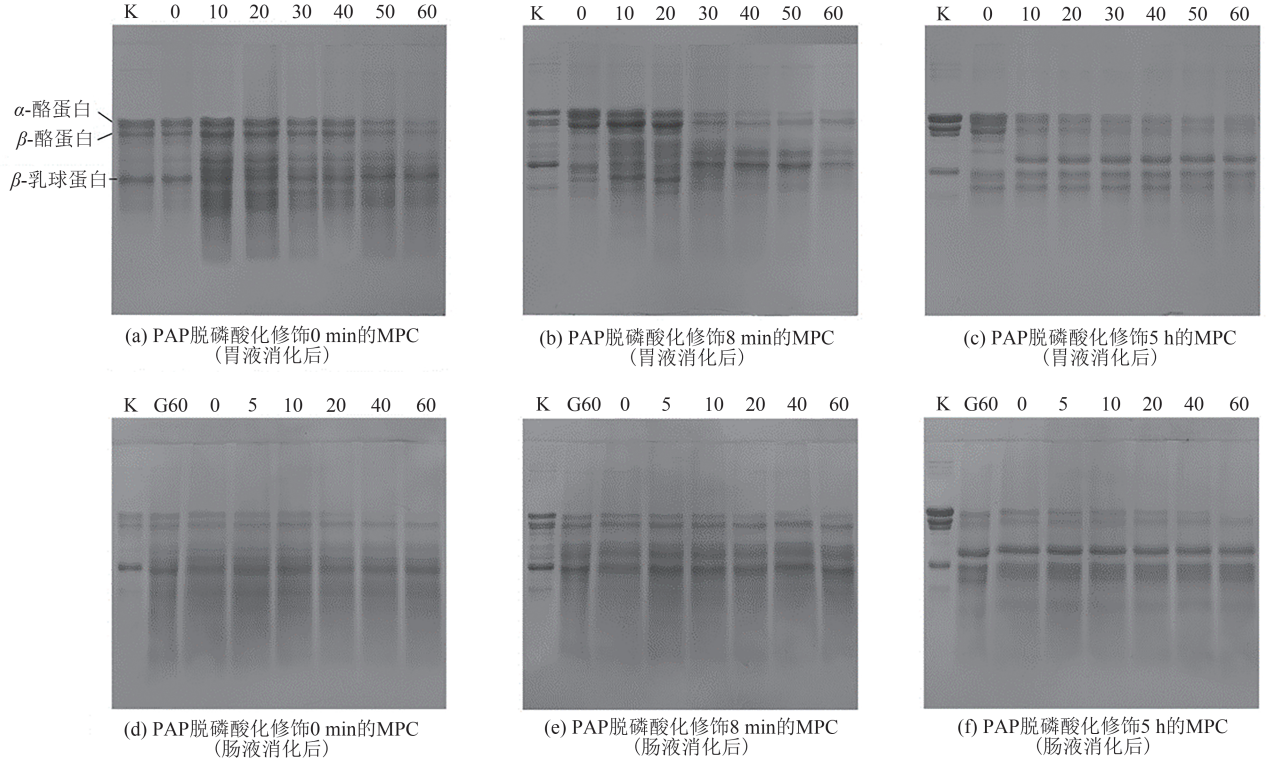
(a) 脱磷酸化修饰0 min的MPC　(b) 脱磷酸化修饰8 min的MPC　(c) 脱磷酸化修饰5 h的MPC

图 3　脱磷酸化 MPC 在模拟婴幼儿胃液中的激光共聚焦图

Fig. 3　CLSM of dephosphorylated MPC in simulated infant gastric fluid

状絮凝结构；有机磷脱除率为64.7%的MPC，其形成的疏松絮凝结构与人乳在胃液中形成的絮凝结构类似；有机磷脱除率为85.8%的MPC则均匀分散在模拟胃液中，无絮凝结构产生。这主要是由于随着磷酸基团的脱除，脱磷酸化修饰后的MPC中酪蛋白的等电点逐渐升高，导致其在模拟胃液中所带的净正电荷增加，蛋白质分子间的静电斥力也增加，从而在胃液环境中形成较为疏松的絮凝结构，有利于消化酶与蛋白质分子接近并产生水解。

2.4.2　脱磷酸化MPC经模拟婴幼儿胃液和肠液消化后的SDS-PAGE图　脱磷酸化MPC在经过模拟婴幼儿胃液和肠液连续消化后，其SDS-PAGE电泳图见图4。未脱磷酸化的MPC在胃液和肠液的连续消化过程中，随着消化时间的延长，α-酪蛋白和β-酪蛋白的条带逐渐减弱，其下方的蛋白质条带呈现模糊分布模式，这表明α-酪蛋白和β-酪蛋白被降解成了低相对分子质量的多肽；有机磷脱除率为64.7%和85.8%的MPC在模拟婴幼儿胃液和肠液中也被逐渐降解，但和未脱磷酸化的MPC相比，其被降解成低相对分子质量多肽的速率更高，尤其是有机磷脱除率为85.8%的MPC经胃液消化10 min后，其所对应的蛋白质条带强度显著降低。此外，相比α-酪蛋白和β-酪蛋白，β-乳球蛋白对胃肠液的消化耐受性更强。上述结果表明，MPC在婴幼儿胃液和肠液中的消化性随脱磷酸化程度的增加而提高。根据文献报道，酪蛋白的脱磷酸化以及脱磷酸化带来的蛋白质降解程度的提高，都使酪蛋白尤其是α-酪蛋白的致敏性降低[22]。



泳道上方的数字代表消化时间（min）；K为未经消化的对照组。

图4　脱磷酸化MPC经模拟婴幼儿胃液和肠液连续消化后的SDS-PAGE图

Fig. 4　SDS-PAGE of dephosphorylated MPC after simulated continuous digestion of infant gastric juice and gastrointestinal juice

3　结论

作者以MPC为研究对象，通过PAP脱磷酸化修饰成功制备了不同脱磷酸化程度的MPC，并对其进行了鉴定，同时探讨了脱磷酸化程度对MPC在模拟婴幼儿胃液和肠液中消化性的影响。研究结果表明：在pH 6.8、PAP添加量为0.24 U/mL的条件下，经PAP脱磷酸化修饰0~300 min后，MPC中磷酸基团的脱除率可达0~85.8%；随脱磷酸化程度的增加，β-酪蛋白和α-酪蛋白所含磷酸基团的数量逐渐减少，且磷酸化水平均呈现多分布模式，其中部分脱磷化MPC的磷酸化水平分布模式与人乳更接近；脱磷酸化程度越高，MPC在婴幼儿胃

液中的分散性越好，同时在婴幼儿胃液和肠液中的消化性也越好。该研究为脱磷酸化MPC在配方乳粉等婴幼儿食品中的应用提供了参考，具有潜在的实际应用价值。

参考文献

[1] MULVIHILL D，FOX P. Production，functional properties and utilization of milk protein products[J]. Agricultural and Food Sciences，1992.

[2] 孙颜君. 乳蛋白浓缩物加工特性及其应用研究进展[J]. 食品工业，2014，35(7)：210-215.
SUN Y J. The functionality and application of milk protein concentrate[J]. The Food Industry，2014，35(7)：210-215.(in Chinese)

[3] 夏文水，Sindayikengera Séverin. 食品中乳蛋白的重要作用[J]. 食品与生物技术学报，2005，24(6)：100-105.
XIA W S，SÉVERIN S. Significance of milk proteins in food[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2005，24(6)：100-105.(in Chinese)

[4] NGUYEN T T P，BHANDARI B，CICHERO J，et al. A comprehensive review on *in vitro* digestion of infant formula[J]. Food Research International，2015，76(3)：373-386.

[5] MANSON W，CAROLAN T. Formation of lysinoalanine from individual bovine caseins[J]. Journal of Dairy Research，1980，47(2)：193-198.

[6] 胡锦华，王园园，刘大松，等. 酶法脱磷酸化修饰酪蛋白酸钠及其体外模拟消化[J]. 食品与发酵工业，2016，42(7)：35-39.
HU J H，WANG Y Y，LIU D S，et al. Enzymatical dephosphorylation of sodium caseinate and the effect on digestibility[J]. Food and Fermentation Industries，2016，42(7)：35-39.(in Chinese)

[7] BINGHAM E W，FARRELL H M. Removal of phosphate groups from casein with potato acid phosphatase[J]. Biochimica et Biophysica Acta，1976，429(2)：448-460.

[8] HILLER B，LORENZEN P C. Effect of phosphatase/transglutaminase treatment on molar mass distribution and techno-functional properties of sodium caseinate[J]. LWT - Food Science and Technology，2009，42(1)：87-92.

[9] DUPONT D，MANDALARI G，MOLLÉ D，et al. Food processing increases casein resistance to simulated infant digestion[J]. Molecular Nutrition & Food Research，2010，54(11)：1677-1689.

[10] Czech Republic，Cesky NormalizacniInstitut. Milk-determination of total phosphorus content-method using molecular absorption spectrometry：CSN ISO 9874[S]. Brussels，Belgium：International Dairy Federation，2008：12.

[11] LI-CHAN E，NAKAI S. Enzymic dephosphorylation of bovine casein to improve acid clotting properties and digestibility for infant formula[J]. The Journal of Dairy Research，1989，56(3)：381-390.

[12] LORIENT D，LINDEN G. Dephosphorylation of bovine casein by milk alkaline phosphatase[J]. The Journal of Dairy Research，1976，43(1)：19-26.

[13] THOMAR P，BENYAHIA L，DURAND D，et al. The influence of adding monovalent salt on the rheology of concentrated sodium caseinate suspensions and the solubility of calcium caseinate[J]. International Dairy Journal，2014，37(1)：48-54.

[14] 夏其昌，曾嵘. 蛋白质化学与蛋白质组学[M]. 北京：科学出版社，2004：80-91.

[15] KRUZEL M，MORAWIECKA B. Acid phosphatase of potato tubers (*Solanum tuberosum* L). Purification，properties，sugar and amino acid composition[J]. Acta Biochimica Polonica，1982，29(3/4)：321-330.

[16] CATTANEO S，MASOTTI F，PELLEGRINO L. Chemical modifications of casein occurring during industrial manufacturing of milk protein powders[J]. European Food Research and Technology，2012，235(2)：315-323.

[17] MOLINA A C，ALLI I，KONISHI Y，et al. Effect of dephosphorylation on bovine casein[J]. Food Chemistry，2007，101(3)：1263-1271.

[18] AZUMA N，KAMINOGAWA S，YAMAUCHI K. Reconstitution of human casein micelle and its properties[J]. Agricultural and Biological Chemistry，1985，49(9)：2655-2660.

[19] MILLS E N C，JENKINS J A，ALCOCER M J，et al. Structural，biological，and evolutionary relationships of plant food allergens sensitizing via the gastrointestinal tract[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition，2004，44(5)：379-407.

[20] BERNARD H，MEISEL H，CREMINON C，et al. Post-translational phosphorylation affects the IgE binding capacity of caseins[J]. FEBS Letters，2000，467(2/3)：239-244.

[21] CAVELL B. Gastric emptying in preterm infants[J]. Acta Paediatrica Scandinavica，1979，68(5)：725-730.

[22] TEZCUCANO MOLINO A C. Effects of enzymatic dephosphorylation on properties of bovine casein[D]. Montreal：McGill University，2006.

（责任编辑：刘冬梅）