

不同除菌处理对脱脂驼乳与稀奶油中活性蛋白质的影响

刘羿飞¹, 彭小雨², 潘丽娜², 李威², 高宇²,
张敏², 刘大松^{*1}, 周鹏¹, 汪家琦²

(1. 江南大学 食品科学与资源挖掘国家重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 澳优乳业(中国)有限公司, 湖南 长沙 410200)

摘要: 将鲜驼乳离心分为脱脂乳和稀奶油, 采用微滤、紫外辐射、巴氏杀菌对脱脂乳进行灭菌, 采用高温处理对稀奶油进行杀菌, 比较非热处理和热处理对微生物去除、活性蛋白质保留及蛋白质和脂肪氧化的影响。与巴氏杀菌相比, 微滤、紫外辐射使脱脂乳中细菌总数降低更多, 且能完全或部分去除芽孢; 1.4 μm 微滤和紫外辐射能保留更多的乳铁蛋白和免疫球蛋白 G; 巴氏杀菌后乳过氧化物酶活力降至杀菌前的 1/6, 而 1.4 μm 微滤和紫外辐射样品中乳过氧化物酶活力保留 95% 以上; 多胺氧化酶活力易受紫外辐射影响; 1.4 μm 微滤使胰岛素完全保留; 微滤对天然乳清蛋白的保留率高于巴氏杀菌; 与热处理相比, 非热处理脱脂乳中蛋白质未发生显著的糖基化反应。与 0.8 μm 微滤相比, 1.4 μm 微滤的膜通量更高, 且蛋白质的透过率更高, 乳清蛋白和酪蛋白透过率分别为 95.5% 和 74.1%。在对稀奶油的高温杀菌中, 125 $^{\circ}\text{C}$ 保持 5 s 能完全杀灭细菌和芽孢, 导致蛋白质和脂肪氧化程度较低。将全脂驼乳先分为脱脂乳和稀奶油, 各部分灭菌后再混合的处理方法可确保整体有效除菌, 同时提高了活性组分的整体保留率。

关键词: 驼乳; 活性蛋白; 微滤; 巴氏杀菌

中图分类号: TS 252.41 文章编号: 1673-1689(2024)05-0072-09 DOI: 10.12441/spyswjs.20230129003

Effects of Different Sterilization Treatments on Bioactive Proteins in Camel Skim Milk and Cream

LIU Yifei¹, PENG Xiaoyu², PAN Li'na², LI Wei², GAO Yu²,
ZHANG Min², LIU Dasong^{*1}, ZHOU Peng¹, WANG Jiaqi²

(1. State Key Laboratory of Food Science and Resources, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Ausnutria Dairy (China) Co., Ltd., Changsha 410200, China)

Abstract: The fresh camel milk was divided into skim milk and cream. Skim milk was treated by microfiltration, ultraviolet-c radiation and pasteurization, and cream was treated by high temperature treatment. The effects of non-thermal and thermal treatments on removal of microorganism, retention of active protein, and oxidation of protein and lipid were studied. Compared with pasteurization, the

收稿日期: 2023-01-29 修回日期: 2023-03-09

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31901613); 湖南省科协科技人才托举工程(2022TJ-XH-047); 江南大学食品科学与资源挖掘国家重点实验室自由创新探索资助项目(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性质研究。E-mail: liudasong68@163.com

results showed that microfiltration and ultraviolet-c irradiation could reduce the total bacterial count and the spores could be completely or partially removed. 1.4 μm microfiltration and ultraviolet-c irradiation retained more lactoferrin and immunoglobulin G. The lactoperoxidase activity decreased to 1/6 after pasteurization. However, the lactoperoxidase activity was more than 95% after 1.4 μm microfiltration or ultraviolet-c irradiation. Polyamine oxidase was susceptible to ultraviolet-c irradiation. Insulin was completely retained after 1.4 μm microfiltration. The retention of native whey protein by microfiltration was higher than that by pasteurization. Compared with thermal treatment, there was no significant glycosylation in non-thermal treated skim milk. Compared with 0.8 μm microfiltration, the membrane flux and permeability of protein was higher than 1.4 μm microfiltration, and the permeability of whey protein and caseins was 95.5% and 74.1%, respectively. In the high temperature sterilization of mixed cream, the bacteria and spores could be killed at 125 $^{\circ}\text{C}$ for 5 s, and the degree of oxidation of protein and lipid was low. Firstly, the whole camel milk was divided into skim milk and cream, each part was sterilized and then mixed. This method could ensure the overall sterilizing efficiency and improve the overall retention of active components.

Keywords: camel milk, bioactive protein, microfiltration, pasteurization

驼乳是生活在干旱和半干旱地区人们的重要营养来源,富含免疫球蛋白 G、胰岛素、乳铁蛋白等功能性蛋白质,可以调节葡萄糖稳态、增强免疫功能,还具有减少过敏反应和肠道性炎症、保护肝肾等功效^[1],具有较高的营养价值。

驼乳通常被加工成驼乳粉,以达到延长保质期的目的,但加工过程涉及的巴氏杀菌、蒸发浓缩、喷雾干燥等关键热处理步骤会导致驼乳中功能性蛋白质的变性,使得驼乳粉中的活性蛋白质含量、活性酶活等降低较多,导致营养价值的降低^[2]。非热除菌处理(如紫外辐射、微滤)的操作温度通常在 50 $^{\circ}\text{C}$ 以内,对蛋白质结构的破坏较小,能够更好地保留功能性蛋白质以及营养和风味^[3-4]。紫外辐射可诱导嘧啶二聚体的形成,阻断 DNA 转录和翻译,起到杀菌的作用。微滤可通过物理截留作用将微生物、体细胞等粒径较大的物质截留,同时使酪蛋白胶束、乳清蛋白等粒径较小的物质透过^[5]。驼乳中酪蛋白胶束直径约为 260~380 nm,大于牛羊乳酪蛋白胶束,使得驼乳微滤效果与牛羊乳不同^[6]。乳中脂肪易导致堵膜,需要将全脂乳分成脱脂乳和稀奶油,脱脂乳经微滤分为透过液和截留液,截留液中含大量微生物和芽孢,通常将其与稀奶油混合并进行高温杀菌处理,之后再与透过液混合^[7]。目前研究主要集中于生鲜牛羊脱脂乳的微滤和紫外辐射处理的影响,主要研究微生物和体细胞的去除,较少研究活

性组分的保留。对脱脂乳微滤截留液与稀奶油混合后的高温杀菌处理的研究较少,也很少研究活性组分的保留及蛋白质和脂肪的氧化损伤。

作者以鲜驼乳为原料,经碟式离心分为脱脂乳和稀奶油,对脱脂乳进行巴氏杀菌、微滤和紫外辐射处理,并对脱脂乳微滤截留液与稀奶油混合物进行高温处理。采用液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)、酶联免疫吸附(ELISA)等检测手段,比较不同处理方法对微生物和体细胞去除,乳铁蛋白(lactoferrin, LF)、免疫球蛋白 G(immunoglobulin G, IgG)、乳过氧化物酶(lactoperoxidase, LPO)、多胺氧化酶(polyamine oxidase, PAO)、胰岛素(insulin, INS)等活性组分的保留,以及对蛋白质和脂肪氧化的影响,旨在为高活性驼乳制品的加工提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

双峰驼乳:产自内蒙古阿拉善左旗地区;质谱级胰蛋白酶:美国 Promega 公司;细菌总数和大肠菌群测试片:3M 中国有限公司;同位素肽 DVAFVKDVTVL*DNTDGKNTQWAK:夏鑫(上海)生物科技有限公司;驼乳 IgG ELISA 试剂盒(IGG-16):美国 Life Diagnostics 公司;胰岛素 ELISA 试剂盒(DE2935):德国 Demeditec 公司。

1.2 实验仪器

NRS DR10A 碟片式乳脂分离机:宜兴海德分离机械有限公司;HP-20T 管式杀菌机:上海浩朋机电科技有限公司;GCM-03 陶瓷膜分离系统:国初科技(厦门)有限公司;1.4 μm 和 0.8 μm 孔径陶瓷膜:法国 Tami 公司;GHO36T5L/4 紫外灯:贺利氏(中国)有限公司;Foss F6 体细胞分析仪:丹麦 Fossomatic 公司;QTRAP 5500 三重四级杆液质联用仪:美国 AB Sciex 公司;SpectraMax M5 荧光酶标仪:美国 Molecular Devices 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 脱脂驼乳与稀奶油的除菌处理 生驼乳预热至 45 $^{\circ}\text{C}$ 后通过碟片式离心机脱脂,得到脱脂乳(脂肪质量分数 0.1%)和稀奶油(脂肪质量分数 40%),处理流程见图 1。

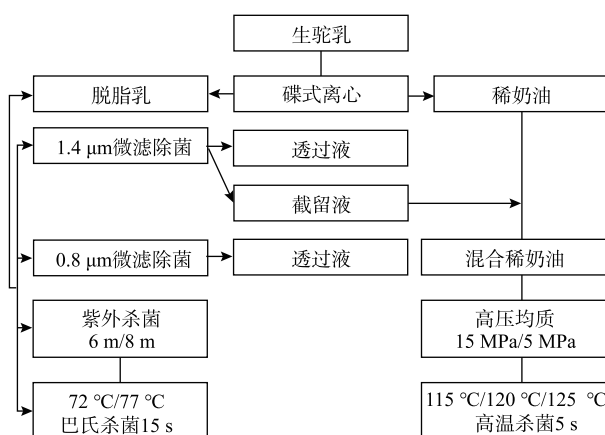


图 1 生驼乳分离及除菌处理实验流程图

Fig. 1 Flow-chart for the fractionation of fresh camel milk followed by microbial removal treatment

脱脂乳微滤除菌:分别用 1.4 μm 和 0.8 μm 孔径的陶瓷膜对脱脂驼乳进行除菌,膜面积为 0.16 m^2 ,操作温度为 45 $^{\circ}\text{C}$,跨膜压力差为 75 kPa,记录透过液体积和处理时间。

脱脂乳紫外杀菌:参照文献[8]的方法,采用绕流式紫外辐射装置,脱脂乳从全氟烷氧基管的一端进入辐射区,设置辐射区的管长分别为 6、8 m,管内径 1.5 mm,流量 100 mL/min 。

脱脂乳巴氏杀菌:设置杀菌时间为 15 s,杀菌温度分别为 72、77 $^{\circ}\text{C}$,冷却温度为 27 $^{\circ}\text{C}$,之后进行无菌灌装。

稀奶油高温杀菌:收集脱脂乳微滤截留液,与稀奶油混合后进行均质(15 MPa/5 MPa),之后进行

高温杀菌处理。设置预热温度为 60 $^{\circ}\text{C}$,杀菌时间为 5 s,杀菌温度分别为 115、120、125 $^{\circ}\text{C}$,冷却温度为 27 $^{\circ}\text{C}$,之后进行无菌灌装。

1.3.2 微生物和体细胞的测定 细菌总数、大肠菌群数、芽孢数的测定参照美国分析化学家协会(AOAC)官方方法 990.12,乳样品于 80 $^{\circ}\text{C}$ 保持 10 min 后测定芽孢数,体细胞数采用体细胞分析仪测定。

1.3.3 活性蛋白质量浓度的测定 LF 质量浓度的测定参照文献[9]。样品用醋酸调至 pH 4.6,8 000 g 离心 30 min。取 100 μL 上清液,加入 100 μL 内标肽 DVA FV K D V T V L * D N T D G K N T E Q W A K,加入 50 mmol/L 碳酸氢铵溶液 180 μL 和 500 mmol/L 的三(2-巯基乙基)磷盐溶液 15 μL ,于 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min,加入 500 mmol/L 碘乙酰胺溶液 45 μL ,室温下避光 30 min,加入 100 mmol/L 的氯化钙溶液 10 μL 和 0.8 g/L 的胰蛋白酶液 10 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,加入 10 μL 甲酸,经 0.22 μm 有机滤膜过滤后进行质谱检测。内源肽 D V T V L D N T D G K 的检测离子对为:588.7 $\rightarrow$ 762.5,588.7 $\rightarrow$ 649.2;内标肽 D V T V L * D N T D G K 的检测离子对为:592.3 $\rightarrow$ 769.4,592.3 $\rightarrow$ 649.1。IgG 质量浓度的测定参照 IGG-16 ELISA 试剂盒说明书,样品加水稀释(体积比为 1:19 999)。

1.3.4 抗菌酶活性的测定 LPO 酶活的测定参照文献[10],样品加水稀释(体积比为 1:24);PAO 酶活的测定参照文献[11]的荧光法,样品加水稀释(体积比为 1:9)。激发/发射波长设定为 544 nm/590 nm,以 0~8 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 过氧化氢建立标准曲线,根据荧光强度随时间的变化计算酶活力。

1.3.5 胰岛素效价的测定 INS 效价的测定参照 DE2935 ELISA 试剂盒说明书,样品不稀释。

1.3.6 天然乳清蛋白质量浓度的测定 驼乳样品用盐酸调至 pH 4.6,10 000 g 离心 30 min,收集上清液,参照文献[12]的反相液相色谱法,采用 C_4 色谱柱进行测定。采用 Empower 软件对各个色谱峰的面积进行积分,处理样品上清液和未处理样品上清液的洗脱曲线中乳清蛋白峰面积的比值即为乳清蛋白保留率。

1.3.7 总酪蛋白和总乳清蛋白透过率的测定 采用 1.3.6 中的方法对驼乳样品进行测定,微滤处理样品和未处理样品的洗脱曲线中酪蛋白峰面积的比值即为酪蛋白的透过率,乳清蛋白峰面积的比值即为乳清蛋白的透过率。

1.3.8 蛋白质游离氨基和羰基质量摩尔浓度的测定 蛋白质游离氨基质量摩尔浓度的测定参考文献[13]中的邻苯二甲醛法。蛋白质羰基质量摩尔浓度的测定参考文献[14]中的2,4-二硝基苯肼法。

1.3.9 游离脂肪酸含量和过氧化值的测定 游离脂肪酸的测定参考文献[15]的方法。脂质提取参考文献[16]的方法。过氧化值的测定参照 AOAC 官方方法 965.33。

1.4 数据分析

采用 SPSS 23 软件进行统计分析,采用 Duncan 检验, $P<0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 脱脂驼乳的除菌处理

2.1.1 不同除菌处理对微生物和体细胞去除的影响 表 1 显示了不同除菌方式及不同除菌强度处理前后脱脂驼乳的细菌总数、大肠菌群、芽孢数和体细胞数。未经处理的脱脂驼乳的细菌总数最高,达到 1.32×10^5 CFU/mL。根据国标 GB 19301—2010 和 GB 19645—2010,控制巴氏杀菌过程中细菌总数降低幅度达到 97.5%以上,并且完全杀灭大肠菌群。非热处理的强度应达到在消灭大肠菌群的同时减少微生物损伤,以确保微生物安全。杀菌强度过大会导致功能性蛋白质的变性失活,特别是低丰度的蛋白质,因此需要选择尽可能低的杀菌强度以保留活性成分。

所有杀菌方式均能使细菌总数降低 1.31×10^5 CFU/mL 以上。72 ℃处理 15 s 使细菌总数减少了 1.31×10^5 CFU/mL,1.4 μm 和 0.8 μm 微滤均显著降低了脱脂驼乳的细菌数量。和除菌前相比,微滤除菌后细菌总数降低 $1.31\times 10^5\sim 1.32\times 10^5$ CFU/mL,并且大肠菌群和芽孢被完全截留。当孔径从 1.4 μm 减小到 0.8 μm 时细菌数量进一步减少,为 650 CFU/mL。微滤除菌的原理是利用细菌与蛋白质的尺寸不同实现分离,驼乳中常见的细菌如大肠杆菌(直径 1.0~2.0 μm)、溶血性链球菌(直径 0.6~1.0 μm)、金黄色葡萄球菌(直径 0.5~1.5 μm)、体细胞(直径 6~15 μm)被膜孔物理截留,而乳清蛋白(直径小于 10 nm)和酪蛋白(直径 260~380 nm)能够顺利透过膜^[17]。微滤样品的体细胞被完全截留,富集在截留液中。这些结果与徐姝等研究脱脂羊乳微滤的结果基本一致^[18]。对于紫外杀菌,当使用 6 m 管长时,细菌总数减少了 1.3×10^5 CFU/mL;当管长增加到 8 m 时,细菌总数进一步减少了 1 435 CFU/mL。紫外样品中均没有检测到大肠菌群。与巴氏杀菌样品相比,紫外处理能降低芽孢数量但不能完全杀灭芽孢。

综上可知,1.4 μm 微滤、0.8 μm 微滤、紫外杀菌 6 m、巴氏杀菌 72 ℃可以将细菌数量减少 97.5%以上且杀灭大肠菌群,因此这些条件用于后续筛选实验。

表 1 不同除菌处理脱脂驼乳中的细菌总数、大肠菌群数、芽孢数和体细胞数

Table 1 Bacteria, coliform, spore and somatic cell counts in camel skim milk after different microbial removal treatments

除菌处理	细菌总数/(CFU/mL)	大肠菌群数(CFU/mL)	芽孢数(CFU/mL)	体细胞数(CFU/mL)
Raw	$1.32\times 10^5\pm 0.21\times 10^5$ ^a	1 310±46 ^a	903±117 ^a	$1.17\times 10^5\pm 0.15\times 10^5$ ^a
1.4MF	800±400 ^b	—	—	—
0.8MF	150±132 ^b	—	—	—
UV6	1 600±100 ^b	—	90±17 ^b	$1.03\times 10^5\pm 0.11\times 10^5$ ^a
UV8	165±21 ^b	—	22±6 ^b	$1.09\times 10^5\pm 0.17\times 10^5$ ^a
HTST72	1 100±300 ^b	—	887±67 ^a	$1.16\times 10^5\pm 0.13\times 10^5$ ^a
HTST77	967±306 ^b	—	883±35 ^a	$1.09\times 10^5\pm 0.14\times 10^5$ ^a

注:同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$);Raw 为生鲜脱脂驼乳,MF 为微滤,UV 为紫外辐射,HTST 为高温短时巴氏杀菌;—表示未检出。

2.1.2 不同除菌处理对活性蛋白质保留的影响 不同杀菌处理前后 LF 和 IgG 质量浓度见图 2。由图 2 可知,不同杀菌方式会使活性蛋白质发生不同程度失活。脱脂驼乳中 LF 质量浓度为 101.6 mg/L,巴

氏杀菌后 LF 的保留率为 75.8%。这与 Elagamy 测定的驼乳巴氏杀菌后 LF 保留率相近,其在 65 ℃处理 30 min 和 75 ℃处理 30 min 后保留率分别为 91.7% 和 67.6%^[19]。紫外杀菌对 LF 的保留率最高,达到

99.7%。1.4 μm 和 0.8 μm 微滤后透过液中 LF 保留率分别为 84.8% 和 63.4%, 1.4 μm 微滤的 LF 保留率高于巴氏杀菌。由于不同乳蛋白的分子直径和等电点不同, 在微滤中透过膜的能力也不同。驼乳 LF 分子尺寸较大, 相对分子质量为 75 000~79 000, 并且是碱性蛋白质, 在乳体系中带正电荷, 在微滤中易与带负电的膜结合而被截留^[20]。

脱脂驼乳中 IgG 质量浓度为 292.3 mg/L, 1.4 μm 微滤、0.8 μm 微滤、紫外杀菌、巴氏杀菌后 IgG 保留率分别为 91.8%、80.5%、88.7%、73.5%。巴氏杀菌造成的 IgG 变性最为严重, 相比之下, 1.4 μm 微滤、0.8 μm 微滤、紫外杀菌均能显著提升 IgG 保留率。与巴氏杀菌相比, 微滤处理过程温度保持在 45 $^{\circ}\text{C}$, 较低的温度使 IgG 大部分保持其构象。

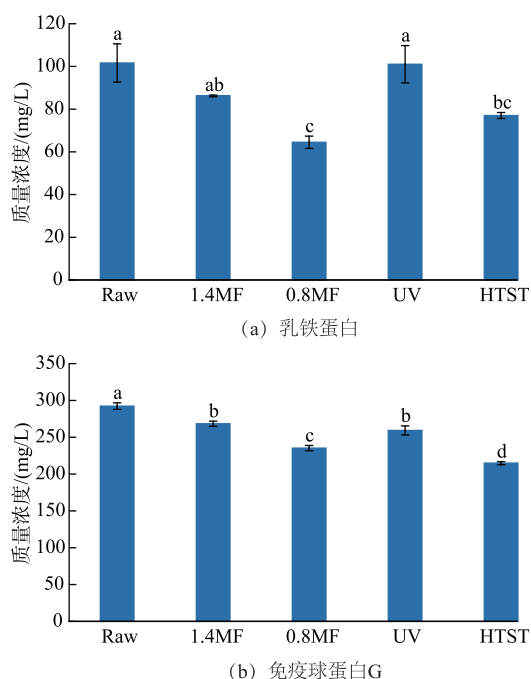


图2 不同除菌处理脱脂驼乳中的 LF、IgG 质量浓度

Fig. 2 Mass concentration of LF and IgG in camel skim milk after different microbial removal treatments

2.1.3 不同除菌处理对抗菌酶酶活的影响 图3为不同除菌处理前后脱脂驼乳 LPO 和 PAO 酶活的变化。脱脂驼乳中 LPO 酶活为 105.1 U/L, 与 Zou 等测定的驼乳 LPO 酶活相近^[10]。72 $^{\circ}\text{C}$ 巴氏杀菌 15 s 后 LPO 酶活降至 18.2 U/L, 说明其活力受热处理影响较大。1.4 μm 微滤和紫外杀菌后 LPO 酶活分别为 100.6、123.0 U/L, 比巴氏杀菌高 5 倍以上。LPO 相对分子质量约为 78 000, 是一种碱性蛋白酶, 和

过氧化氢、硫氰酸根组成 LPO 抗菌系统后, 主要对革兰氏阴性菌有杀菌作用。Benkerroum 等发现巴氏杀菌部分破坏了驼乳中的抗菌系统, 在 80 $^{\circ}\text{C}$ 加热 40 s 或者 76 $^{\circ}\text{C}$ 加热 1 min 后, 驼乳中 LPO 完全失活^[21]。

PAO 表现出不同的趋势, 微滤和巴氏杀菌处理前后没有显著下降, 而紫外杀菌后活力下降 19.3%。PAO 通过氧化精胺生成氢过氧化物, 作为内源氢过氧化物的提供者, 是乳天然抗菌系统的重要组成部分。以上表明, LPO 对热敏感, 而 PAO 具有较好的热稳定性。

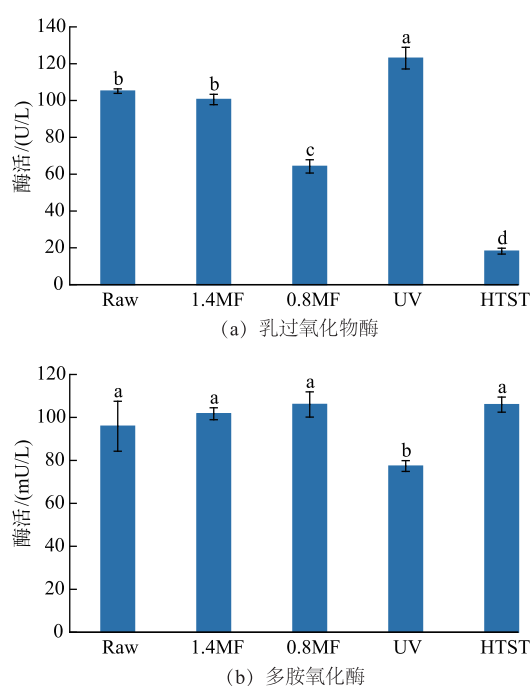


图3 不同除菌处理脱脂驼乳中的 LPO、PAO 酶活力

Fig. 3 Activities of LPO and PAO in camel skim milk after different microbial removal treatments

2.1.4 不同除菌处理对活性肽保留的影响 不同除菌处理脱脂驼乳中 INS 效价见图 4。驼乳 INS 效价在 1.4 μm 微滤或巴氏杀菌后没有显著改变, 而 0.8 μm 微滤和紫外杀菌导致 INS 效价损失 14.2% 和 12.7%。INS 的损失率低于 LF 和 IgG, 这可能与多肽结构相关。INS 是由 51 个氨基酸残基组成的蛋白酶, 在乳中形成二聚体, 进一步结合成六聚体, 增加了其稳定性^[22]。

上述结果表明, 与生脱脂乳相比, 巴氏杀菌显著降低了 LF、IgG 的质量浓度, 而经过 1.4 μm 微滤或紫外杀菌处理的脱脂乳中上述活性蛋白质的保

留明显高于巴氏杀菌脱脂驼乳,对驼乳 LPO 体系无不良影响。5 种活性蛋白质中 LPO 热稳定性最低, LF 和 IgG 次之,INS 热稳定性最好,损失较低。

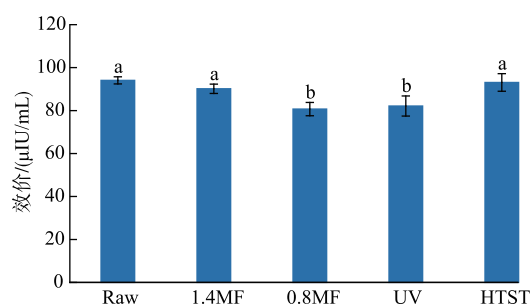


图 4 不同除菌处理脱脂驼乳中的 INS 效价

Fig. 4 Titer of INS in camel skim milk after different microbial removal treatments

2.1.5 不同除菌处理对天然乳清蛋白保留的影响

图 5 为不同除菌处理对天然乳清蛋白保留的影响。天然乳清蛋白保留率能反映 α -乳白蛋白、血清白蛋白等主要乳清蛋白在 pH 4.6 时的稳定性。巴氏杀菌后天然乳清蛋白保留率为 91.3%,与 0.8 μm 微滤的保留率相近(91.8%),结合 Sakandar 等报道驼乳乳清蛋白在 80 $^{\circ}\text{C}$ 加热 30 min 的变性率为 32%~35%^[23],而牛乳乳清蛋白为 70%~75%,说明驼乳乳清蛋白的热稳定性较好。1.4 μm 微滤样品显示较高的保留率(96.2%),微滤过程中乳蛋白的吸附和沉积形成浓差极化层,使膜孔径减小、部分孔堵塞、膜表面疏水性更强,会导致对部分乳清蛋白的排斥^[24]。紫外杀菌样品中可溶性乳清蛋白保留率最低(85.5%),说明紫外辐射对主要乳清蛋白的空间结构产生较大影响。

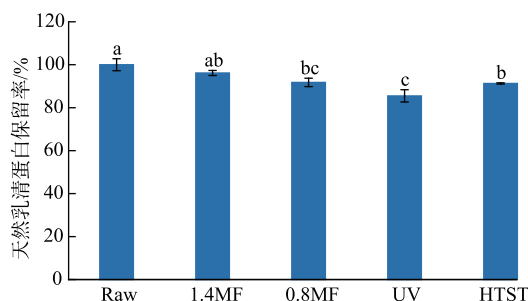


图 5 不同除菌处理脱脂驼乳中的天然乳清蛋白保留率

Fig. 5 Retention of native serum protein in camel skim milk after different microbial removal treatments

2.1.6 不同除菌处理对蛋白质糖基化的影响 图 6 为不同除菌处理后蛋白质游离氨基质量摩尔浓度。

蛋白质游离氨基是蛋白质与还原性物质如还原糖发生糖基化反应的重要反应位点。微滤和紫外处理对蛋白质游离氨基没有显著影响,而巴氏杀菌会使蛋白质游离氨基质量摩尔浓度发生显著下降,表明热处理增加了糖基化反应程度。紫外杀菌后蛋白质游离氨基质量摩尔浓度轻微下降,具有紫外吸收生色团的芳香族氨基酸同时也是光氧化过程的主要靶标,可能会通过生成自由基影响蛋白质稳定性和糖基化反应程度^[25]。

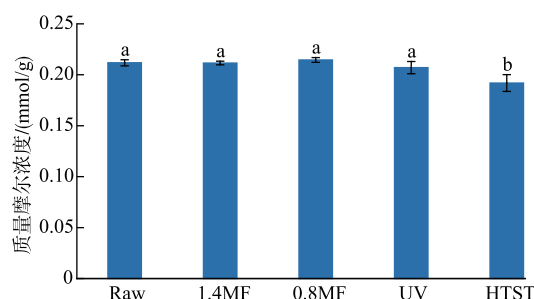


图 6 不同除菌处理脱脂驼乳中的蛋白质游离氨基质量摩尔浓度

Fig. 6 Molality of protein free amino group in camel skim milk after different microbial removal treatments

2.1.7 不同膜孔径 MF 处理对膜通量及蛋白质透过率的影响

图 7 为不同膜孔径微滤时的膜通量和微滤透过液中乳清蛋白和酪蛋白的透过率。脱脂驼乳 1.4 μm 微滤的平均通量约为 150 $\text{L}/(\text{h}\cdot\text{m}^2)$ 。与 1.4 μm 微滤相比,0.8 μm 微滤的平均通量低约 80%,说明脱脂驼乳的通量受孔径影响,孔径越小通量越小。随着微滤的进行,1.4 μm 膜通量先上升后下降,0.8 μm 膜通量持续降低,说明在此操作条件下,0.8 μm 膜不能进行长时间生产。两种膜微滤对乳清蛋白透过率大于 90%,1.4 μm 和 0.8 μm 透过液中酪蛋白透过率分别为 74%和 52%,表明乳清蛋白和酪蛋白以不同的速率透过微滤膜。微滤过程中酪蛋白胶束与膜表面结合,同时脂肪球、菌体在膜表面上的堆积也会改变膜的孔径和疏水性,从而改变膜对蛋白质的选择性^[26]。

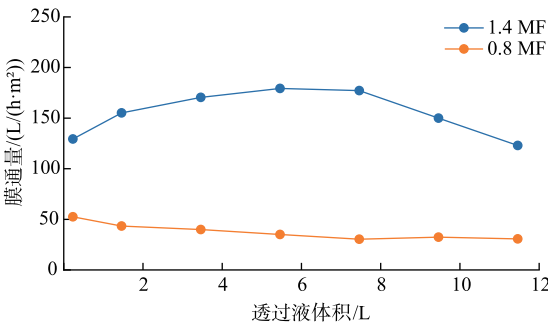
2.2 驼乳稀奶油的杀菌处理

2.2.1 杀菌温度对微生物去除的影响 表 2 是稀奶油和微滤截留液混合并经过不同高温杀菌处理前后的微生物数量。与未经杀菌的脱脂驼乳不同,和微滤截留液混合后的稀奶油的细菌总数达到了 3.1×10^6 CFU/mL。115~120 $^{\circ}\text{C}$ 高温杀菌显著降低了

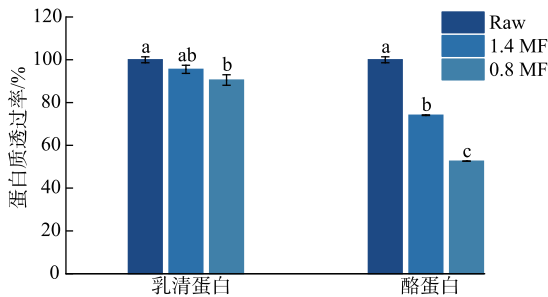
稀奶油的细菌总数,125℃能够完全杀灭细菌。芽孢是芽孢杆菌的内生孢子,芽孢杆菌是潜在的致病菌,它可以在巴氏杀菌中存活,在储藏期内导致乳蛋白水解和脂解,并分泌肠毒素,限制液态奶的货架期^[26]。当高温杀菌温度达到125℃时可以有效杀灭微滤截留液和稀奶油混合物中的芽孢,对牛羊乳稀奶油或稀奶油与微滤截留液的混合物进行杀菌,前期研究常用的温度为110~145℃,时间为1~5 s。杀菌强度越大,能耗越大,且组分损伤越严重^[27-28]。由表2可知,对脱脂驼乳微滤截留液与稀奶油的混合物125℃杀菌5 s,可以有效杀灭芽孢,在相对较低的热处理强度下保证微生物安全。

2.2.2 杀菌温度对活性蛋白、抗菌酶酶活、活性肽保留的影响 高温杀菌处理后稀奶油中IgG质量浓度和INS效价、LPO、PAO酶活均显著下降,且随温度增加呈现出一定的下降趋势,见表3。其中INS和PAO在125℃高温杀菌后损失率为18.4%和32.7%;IgG经过高温杀菌后损失了85%~90%的活性;LPO在高温杀菌后已完全失活。作者采用全脂驼乳先分成稀奶油和脱脂乳、各部分杀菌后混合的处理方法,活性蛋白质主要在脱脂乳中,稀奶油中活性蛋白质比例相对较少,该处理方法能在确保整体有效除菌的同时,提高活性组分的整体保留率。

2.2.3 杀菌温度对蛋白质和脂肪氧化的影响 驼乳稀奶油的羰基质量摩尔浓度、游离脂肪酸含量和过氧化值见表4。高热杀菌样品的羰基质量摩尔浓度和杀菌前相比略有增加,蛋白质羰基质量摩尔浓度反映蛋白质损伤程度,羰基化程度越高,蛋白质功能的不可逆损伤越严重。稀奶油的游离脂肪酸在高热杀菌前后无显著变化,表明脂肪未发生显著水解^[29]。过氧化值反映样品中脂肪的初级氧化程度,其在高温杀菌后略有增加。在3种杀菌温度下,羰基



(a) 膜通量随透过液体积增加的变化



(b) 乳清蛋白、酪蛋白的透过率

图7 1.4 μm和0.8 μm微滤处理脱脂驼乳的膜通量和蛋白质透过率

Fig. 7 Membrane flux and transmission of proteins during MF (1.4 μm and 0.8 μm pore diameters) treatments of camel skim milk

表2 高温杀菌驼乳稀奶油中的细菌总数和芽孢数
Table 2 Bacteria and spore counts in camel milk cream after high temperature sterilization

杀菌处理	细菌总数/(CFU/mL)	芽孢数/(CFU/mL)
Raw	$3.10 \times 10^6 \pm 0.17 \times 10^6$ ^a	$2.83 \times 10^3 \pm 0.71 \times 10^3$ ^a
HT115	53 ± 5 ^b	23 ± 6 ^b
HT120	10 ± 3 ^b	7 ± 3 ^b
HT125	—	—

注:同列不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$);Raw为生鲜混合稀奶油,HT为高温杀菌,—为未检出。

表3 高温杀菌驼乳稀奶油中的IgG质量浓度和INS效价、LPO、PAO酶活力

Table 3 Mass concentration of IgG, the titer of INS and activities of LPO and PAO in camel milk cream after high temperature sterilization

杀菌处理	IgG质量浓度/(mg/L)	INS效价/(μIU/mL)	LPO酶活/(U/L)	PAO酶活/(mU/L)
Raw	230.76 ± 18.40 ^a	86.63 ± 5.83 ^a	130.11 ± 1.26 ^a	94.83 ± 4.33 ^a
HT115	34.03 ± 0.36 ^b	75.87 ± 0.95 ^b	0.27 ± 0.15 ^b	71.70 ± 4.60 ^b
HT120	25.43 ± 0.56 ^b	76.00 ± 3.64 ^b	0.33 ± 0.08 ^b	66.23 ± 10.06 ^b
HT125	17.81 ± 1.58 ^b	70.65 ± 1.87 ^b	0.18 ± 0.21 ^b	63.80 ± 8.51 ^b

注:同列不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$);Raw为生鲜混合稀奶油,HT为高温杀菌。

表 4 高温杀菌驼乳稀奶油中的羰基质量摩尔浓度、游离脂肪酸含量和过氧化值

Table 4 Molality of protein carbonyl, free fatty acid content and peroxide value in camel milk cream after high temperature sterilization

杀菌处理	羰基质量摩尔浓度/ ($\mu\text{mol/g}$)	游离脂肪酸含量/ ($\mu\text{eq/g}$)	过氧化值/ ($\mu\text{eq/kg}$)
Raw	6.51 $\pm$ 0.55 ^b	7.81 $\pm$ 1.76 ^a	0.13 $\pm$ 0.04 ^b
HT115	8.98 $\pm$ 0.54 ^a	8.27 $\pm$ 1.67 ^a	0.22 $\pm$ 0.05 ^a
HT120	9.43 $\pm$ 0.32 ^a	6.96 $\pm$ 0.93 ^a	0.22 $\pm$ 0.02 ^a
HT125	9.62 $\pm$ 0.49 ^a	6.73 $\pm$ 0.06 ^a	0.23 $\pm$ 0.05 ^a

注:同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$);Raw 为生鲜混合稀奶油,HT 为高温杀菌。

质量摩尔浓度和过氧化值随着温度提高呈一定的增加趋势。高温杀菌后过氧化值低于乳脂过氧化值

的异味阈值(0.3 $\mu\text{eq/kg}$)^[30]。上述结果说明采用的杀菌强度对驼乳蛋白和脂肪氧化的不良影响较小。

3 结语

不同除菌处理对脱脂驼乳与稀奶油活性蛋白及理化性质有不同的影响。驼乳中 LPO 热稳定性低于 LF 和 IgG,INS 和 PAO 热稳定性较好。1.4 μm 微滤对微生物去除、活性蛋白质保留优于巴氏杀菌。与 0.8 μm 微滤相比,1.4 μm 微滤具有更高的膜通量和蛋白质透过率。对脱脂乳微滤截留液与稀奶油的混合物 125 $^{\circ}\text{C}$ 处理 5 s,能够完全杀灭细菌和芽孢,且蛋白质和脂肪氧化程度较低。可将脱脂乳微滤截留液与稀奶油的混合物回添至微滤透过液,在确保整体有效除菌的同时,提高活性组分的整体保留。上述结果可为微生物安全、活性成分高保留的驼乳制品的开发提供参考。

参考文献:

- [1] DUBEY U, LAL M, MITTAL A, et al. Therapeutic potential of camel milk[J]. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 2016, 28(3): 164.
- [2] LI R R, YUE H T, SHI Z, et al. Protein profile of whole camel milk resulting from commercial thermal treatment[J]. *LWT- Food Science and Technology*, 2020, 134: 110256.
- [3] MASOTTI F, CATTANEO S, STUKNYTE M, et al. Current insights into non-thermal preservation technologies alternative to conventional high-temperature short-time pasteurization of drinking milk[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2023, 63(22): 5643-5660.
- [4] 陈梅仙, 胡晓宇, 卢蓉蓉, 等. 高压脉冲电场对乳铁蛋白抑菌性能的影响[J]. *食品与生物技术学报*, 2007, 26(3): 1-5.
CHEN M X, HU X Y, LU R R, et al. Effects of pulsed electric fields on antibacterial activity of lactoferrin[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2007, 26(3): 1-5. (in Chinese)
- [5] CAPLAN Z, BARBANO D M. Shelf life of pasteurized microfiltered milk containing 2% fat[J]. *Journal of Dairy Science*, 2013, 96(12): 8035-8046.
- [6] ROY D, YE A Q, MOUGHAN P J, et al. Composition, structure, and digestive dynamics of milk from different species-a review [J]. *Frontiers in Nutrition*, 2020, 7: 577759.
- [7] LORENZEN P C, CLAWIN-RÄDECKER I, EINHOFF K, et al. A survey of the quality of extended shelf life (ESL) milk in relation to HTST and UHT milk[J]. *International Journal of Dairy Technology*, 2011, 64(2): 166-178.
- [8] LI Z B, LIU D S, XU S, et al. Effects of pasteurization, microfiltration, and ultraviolet-c treatments on microorganisms and bioactive proteins in bovine skim milk[J]. *Food Bioscience*, 2021, 43: 101339.
- [9] LI X, LI Z M, XU E M, et al. Determination of lactoferrin in camel milk by ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry using an isotope-labeled winged peptide as internal standard[J]. *Molecules*, 2019, 24(22): 4199.
- [10] ZOU Z Z, BAULAND J, HEWAVITHARANA A K, et al. A sensitive, high-throughput fluorescent method for the determination of lactoperoxidase activities in milk and comparison in human, bovine, goat and camel milk [J]. *Food Chemistry*, 2021, 339: 128090.
- [11] ZOU Z Z, BOUCHEREAU-DE PURY C, HEWAVITHARANA A K, et al. A sensitive and high-throughput fluorescent method for determination of oxidase activities in human, bovine, goat and camel milk[J]. *Food Chemistry*, 2021, 336: 127689.

- [12] LIU D S, ZHANG J, YANG T Y, et al. Effects of skim milk pre-acidification and retentate pH-restoration on spray-drying performance, physico-chemical and functional properties of milk protein concentrates[J]. **Food Chemistry**, 2019, 272: 539-548.
- [13] NIELSEN P M, PETERSEN D, DAMBMANN C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis [J]. **Journal of Food Science**, 2001, 66(5): 642-646.
- [14] LEVINE R L, GARLAND D, OLIVER C N, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins [J]. **Methods in Enzymology**, 1990, 186: 464-478.
- [15] DEETH H C, FITZ-GERALD C H, WOOD A F. A convenient method for determining the extent of lipolysis in milk [J]. **Australian Journal of Dairy Technology**, 1975, 30(3): 109-111.
- [16] CESA S, CASADEI M A, CERRETO F, et al. Influence of fat extraction methods on the peroxide value in infant formulas [J]. **Food Research International**, 2012, 48(2): 584-591.
- [17] ZHAO J N, FAN H, KWOK L Y, et al. Analyses of physicochemical properties, bacterial microbiota, and lactic acid bacteria of fresh camel milk collected in Inner Mongolia [J]. **Journal of Dairy Science**, 2020, 103(1): 106-116.
- [18] 徐姝, 刘大松, 李志宾, 等. 巴氏杀菌、微滤及紫外处理对羊乳中菌落数与活性蛋白的影响 [J]. **食品与发酵工业**, 2021, 47(15): 150-156.
- XU S, LIU D S, LI Z B, et al. Effect of pasteurization, microfiltration and ultraviolet-C treatments on microorganism counts and bioactive proteins in goat milk [J]. **Food and Fermentation Industries**, 2021, 47(15): 150-156. (in Chinese)
- [19] ELAGAMY E I. Effect of heat treatment on camel milk proteins with respect to antimicrobial factors: a comparison with cows' and buffalo milk proteins [J]. **Food Chemistry**, 2000, 68(2): 227-232.
- [20] MUURONEN K, PARTANEN R, HEIDEBRECHT H J, et al. Effects of conventional processing methods on whey proteins in production of native whey powder [J]. **International Dairy Journal**, 2021, 116: 104959.
- [21] BENKERROUM N, MEKKAOU M, BENNANI N, et al. Antimicrobial activity of camel's milk against pathogenic strains of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* [J]. **International Journal of Dairy Technology**, 2004, 57(1): 39-43.
- [22] MALIK A, AL-SENAIDY A, SKRZYPCZAK-JANKUN E, et al. A study of the anti-diabetic agents of camel milk [J]. **International Journal of Molecular Medicine**, 2012, 30(3): 585-592.
- [23] SAKANDAR H A, AHMAD S, PERVEEN D R, et al. Camel milk and its allied health claims: a review [J]. **Progress in Nutrition**, 2018, 20(1): 15-29.
- [24] TOMASULA P M, MUKHOPADHYAY S, DATTA N, et al. Pilot-scale crossflow-microfiltration and pasteurization to remove spores of *Bacillus anthracis* (Sterne) from milk [J]. **Journal of Dairy Science**, 2011, 94(9): 4277-4291.
- [25] HELLWIG M. The chemistry of protein oxidation in food [J]. **Angewandte Chemie**, 2019, 58(47): 16742-16763.
- [26] GRIEP E R, CHENG Y F, MORARU C I. Efficient removal of spores from skim milk using cold microfiltration: spore size and surface property considerations [J]. **Journal of Dairy Science**, 2018, 101(11): 9703-9713.
- [27] SCHMIDT V S, KAUFMANN V, KULOZIK U, et al. Microbial biodiversity, quality and shelf life of microfiltered and pasteurized extended shelf life (ESL) milk from Germany, Austria and Switzerland [J]. **International Journal of Food Microbiology**, 2012, 154(1/2): 1-9.
- [28] HOFFMANN W, KIESNER C, CLAWIN-RÄDECKER I, et al. Processing of extended shelf life milk using microfiltration [J]. **International Journal of Dairy Technology**, 2006, 59(4): 229-235.
- [29] MTIBAA I, ZOUARI A, PURCARO G, et al. Crystallization mechanisms in camel milk cream during physical ripening: effect of temperature and ripening duration [J]. **Food and Bioproducts Processing**, 2021, 127: 435-442.
- [30] TRUONG T, PALMER M, BANSAL N, et al. Effect of dissolved carbon dioxide on the sonocrystallisation and physical properties of anhydrous milk fat [J]. **International Dairy Journal**, 2019, 93: 45-56.

(责任编辑:李春丽)