新疆双峰驼乳杀菌条件的选择及其热稳定性

杨 洁，豆智华，李 冠*
(新疆大学生命科学与技术学院，新疆 乌鲁木齐 830046)

摘 要：研究加热温度和时间与驼乳相对密度、滴定酸度、pH值、黏度、酒精稳定性、乳糖含量和总蛋白质含量的关系，用残活率对数值(1g(N/N_0))评价杀菌效果，采用SDS-PAGE检测每个热处理水平驼乳蛋白质的变性程度。结果表明：在75℃热处理时间分别为5、10、15min时，菌落总数减少了60.2%、61.9%、81.9%。热处理对驼乳理化指标无显著影响($P>0.05$)，对酒精稳定性影响显著($P<0.05$)。在60～75℃条件下，热处理时间对蛋白质含量的影响不显著($P>0.05$)；在65～100℃时，热处理温度对乳糖含量的影响显著($P<0.05$)。蛋白质的热稳定性：乳酸脱氢酶＞α-乳白蛋白＞白蛋白＞乳铁蛋白。60℃热处理对驼乳中蛋白质的影响不显著($P>0.05$)。65～100℃热处理对驼乳中蛋白质的影响显著($P<0.05$)。结论：在75℃热处理5～15min，可以杀灭81.9%的微生物，蛋白质的变性程度较低。

关键词：新疆双峰驼乳；杀菌条件；热稳定性；理化性质

Selection of Sterilization Conditions for Xinjiang Bactrian Camel Milk and Its Thermal Stability

YANG Jie，DOU Zhi-hua，LI Guan*
(College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Ürümqi 830046, China)

Abstract：The relative density, titratable acidity, pH, viscosity, alcohol stability, lactose content and total protein content of mixed milk samples from 10 bactrian camels in Ürümqi suburb, Xinjiang autonomous region were determined as a function of sterilization temperature and time. The sterilization efficiency was evaluated based on decimal logarithm of survival fraction (lg (N/N_0)). Protein denaturation in milk samples at each thermal treatment was assayed by SDS-PAGE. The results showed that after 5, 10 min and 15 min at 75 ℃, the total number of colonies was reduced by 60.2%, 61.9% and 81.9%, respectively, without a significant effect on physiochemical parameters ($P > 0.05$); however, the alcohol stability was significantly influenced ($P < 0.05$). Heating time at 60—75 ℃ did not significantly protein content ($P > 0.05$). Heating temperatures of 65—100 ℃ exhibited a significant effect on lactose content ($P < 0.05$). The thermal stability of various protein components followed the order: lactate dehydrogenase > α-lactalbumin > albumin > lactoferrin. No significant effect on milk proteins was observed after heat treatment at 60 ℃ ($P > 0.05$). The effect of heat treatment at 65—100 ℃ on milk proteins was significant ($P < 0.05$). From these results, it can be concluded that heat treatment at 75 ℃ for 5—15 min can kill 81.9% of the microbes in bactrian camel milk, resulting in lower degree of protein denaturation

Key words：bactrian camel milk；sterilization conditions；heat stability；physical and chemical properties
中图分类号：TS252.7 文献标志码：A 文章编号：1002-6630(2013)21-0036-06
doi:10.7506/spkx1002-6630-201321008

驼乳的成分与牛乳近似[1]，此外驼乳还有它自己独特的性质。Farahn[1]报道过驼乳的VC含量是牛乳中的4～6倍。Jirimutu等[2]报道的阿拉善双峰驼常乳中VC的平均含量为29.6mg/L。对于居住在沙漠地区缺乏蔬菜和水果的人们来说驼乳成为非常宝贵的维生素源。驼乳长链脂肪酸比例较高，达96%，而牛乳中仅为85.3%[3]。驼乳营养丰富，易为人体消化吸收，在俄罗斯、哈萨克斯坦，医生将驼乳当成一种处方推荐给身体虚弱的病人；在印度，驼乳被用来治疗水肿、黄疸、脾脏疾病、肺结核、哮喘、贫血和痔疮；在非洲，常建议艾滋病人饮用骆驼奶，以增强身体的抵抗力[4-5]；另外驼乳在控制高血压、改善动脉硬化和骨质疏松方面也具有积极的疗效。驼乳中富含牛奶中缺少的乳铁传递蛋白和溶菌酶[6]，这两种具有杀菌作用的物质可强化人体的免疫系统，因此科学家认为驼乳有助于辅助治疗癌症或艾滋病等免疫缺陷疾病。研究表明驼乳的健康效应有益于人体的身心健康例如抗

收稿日期：2013-01-21
基金项目：国家自然科学基金项目(31260369)
作者简介：杨洁(1963—)，女，副教授，硕士，主要从事天然产物的研究与开发。E-mail：xindayangjie@sina.com
*通信作者：李冠(1949—)，男，教授，博士，主要从事植物生理生化与分子生物学研究。E-mail：xjliguan@sina.com

菌[7]、抗病毒[8]、以及抗炎症[9]，具有降胆固醇糖[10]、降血糖的作用[11]。

人们除了以鲜驼乳和酸驼奶的形式饮用驼乳外，还可以通过巴氏消毒、煮沸等热处理和灭菌后再饮用或保存。然而，这些处理对驼乳蛋白的营养特性和生物学活性均会产生一定影响。热处理对牛奶中成分的影响已被广泛地研究，但热处理对驼乳影响的研究却很少。

新疆是我国重要的畜牧基地，也是双峰驼的饲养基地之一，现有骆驼约16万峰，主要分布在昌吉州、伊犁州、塔城地区和阿勒泰地区，当地牧民自古以来就有以驼乳为滋补品的习俗[12]。目前，新疆驼乳加工业正处于起步阶段，由于驼乳的理化性质、营养成分的组成及其比例都有别于牛乳，所以驼乳原料乳的加工工艺条件都与牛乳不尽相同。目前采用牛乳巴氏杀菌条件处理原料，但是，由于驼乳与牛乳原料性质不同，产品或因灭菌温度过高蛋白质变性，造成驼乳粉冲调性差；影响了企业的正常生产。因此，确定驼乳的最佳杀菌条件已成为迫在眉睫的问题。本实验通过对新疆双驼峰驼乳的杀菌条件的选择和蛋白质热稳定性的研究，在有效地提高杀菌率的同时，最大限度地保护驼乳中的活性蛋白质，确定最佳的热杀菌条件，以期为驼乳制品的深加工提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

以2010年4月采自乌鲁木齐市郊的10峰新疆双峰驼常乳的混合样为实验材料。

N,*N*,*N*',*N*'-四甲基乙二胺(TEMED)、营养琼脂、甘氨酸、丙烯酰胺、三羟甲基氨基甲烷、*N*,*N*-甲叉丙烯酸胺、甘油、考马斯亮蓝R250、邻苯二甲酸氢钾　北京鼎国昌盛生物技术有限公司；氢氧化钠　北京化工厂；溴酚蓝、甲醇、冰乙酸、乙醇、盐酸　天津市富宇精细化工有限公司；磷酸氢二钠、磷酸二氢钠　天津市圣淼精细化工有限公司；标准分子质量蛋白(14.4k～116.0kD)生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 仪器与设备

精密pH计　上海精密科学仪器有限公司；PROTEMANR® Tetra cell、超级恒温水槽　上海精宏试验设备有限公司。

1.3 方法

1.3.1 样品前处理

无菌操作量取新鲜驼常乳50mL，分别置于24支灭菌的离心管中，立即将分装好的样品离心管放置于恒温水浴锅中，在60、65、70、75、85、100℃分别处理10、20、30、40min，处理完毕后立即放入4℃冰箱。

1.3.2 细菌菌落总数的测定

采用平板记数法测定菌落总数的变化，以评价热处理的杀菌效果。

1.3.3 杀菌效果的测定

杀菌效果采用残活率对数值(1g(N/N_0))表示，按下式计算。杀菌效果分析采用一级反应动力学公式分析。

$$\lg(N/N_0)=\frac{Kt}{2.303} \tag{1}$$

$$D=\frac{2.303}{K} \tag{2}$$

式中：N_0为热处理前的原始微生物数量/(CFU/mL)；N为热处理后的微生物数量/(CFU/mL)；K为在一定的压强和温度条件下反应速率常数/min；t为处理时间/min；D为指数递减时间，即在设定的压强和温度条件下微生物数量降低90%所需的时间/min。

1.3.4 相对密度的测定

参照GB 5413.33—2010《生乳相对密度的测定》[13]方法。

1.3.5 滴定酸度的测定

参照GB 5413.34—2010《乳和乳制品酸度的测定》[14]方法。

1.3.6 pH值的测定

参照GB6920—1986《pH值的测定方法》[15]方法。

1.3.7 黏度的测定

参照GB/T 22235—2008《液体黏度的测定》[16]方法。

1.3.8 蛋白质含量的测定

采用考马斯亮蓝法[17]测定。

1.3.9 乳糖含量测定

采用3,5-二硝基水杨酸比色法[18]。

1.3.10 驼乳酒精稳定性的测定

取驼乳lmL加入到试管中，然后加入lmL不同体积分数的酒精，立刻混合均匀，在室温下观察是否出现絮状沉淀，把絮状沉淀出现时的最低酒精体积分数作为驼乳的酒精稳定性值[19]。

1.3.11 凝胶电泳

热处理后的样品和未处理的样品在12000×*g*离心30min后脱脂，吸取乳清。用5%的乙酸调至pH4.6，在40℃水浴锅中保温40min后，12000×*g*离心30min后，吸取乳清，除去酪蛋白。然后用pH6.9的磷酸盐缓冲液按体积比1:10比例稀释后，加入样品缓冲液。上样之前，将样品于沸水浴中加热5～10min。5.0%浓缩胶，10.0%分离胶。凝胶经过固定、考马斯亮蓝染色、脱色后，在凝胶成像系统中照相，并利用相应的图像分析软件确定各条带蛋白质的分子质量与含量。

1.4 统计分析

按完全随机设计，实验结果为不同处理分别取3个样，测定3次数据的“$\bar{x}\pm s$”，用Excel软件作图。

2 结果与分析

2.1 热处理对驼乳杀菌效果的影响

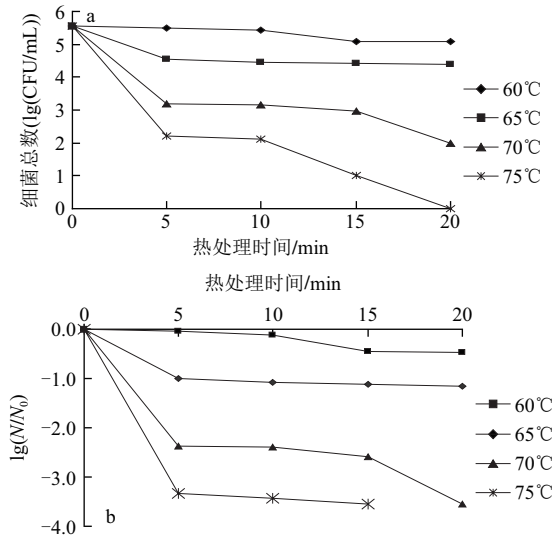


图1 热处理对驼乳细菌总数(a)和杀菌效果(b)的影响

Fig.1 Effect of heat treatment on total bacterial count (a) and sterilization efficiency (b)

由图1a可知，样品经热处理，细菌菌落总数随热处理温度和时间的不同而发生变化。热处理时间越长、温度越高，菌落总数越少。60℃热处理时，菌落总数无明显下降趋势。65℃热处理时，菌落总数在0～5min内有明显的下降趋势；70℃热处理时，在0～5、15～20min内有明显下降趋势。在75℃热处理时，0～5、10～20min内有显著下降趋势。在75℃热处理时间分别为5、10、15min时，菌落总数减少60.2%、61.9%、81.9%。由图1b可知，热处理对驼乳中微生物的杀菌分为两个阶段：热处理温度在60℃和65℃时，菌落总数没有显著降低效果($P>0.05$)；而热处理温度在70℃和75℃时，驼乳中菌落总数显著下降($P<0.05$)。随着热处理时间的延长和热处理温度的升高，对驼乳中细菌的杀菌效果显著增强。

2.2 热处理对驼乳理化性质的影响

由图2可知，热处理对驼乳其相对密度、黏度、折射率、pH值以及滴定酸度都没有显著影响($P>0.05$)，但对驼乳的酒精稳定性有显著影响($P<0.05$)。驼乳的酸度是由于微生物的作用而增高的，热处理不会对驼乳的酸度有明显的影响。pH值的大小是由溶液中的氢离子的浓度决定的，由于驼乳是一个具有缓冲的体系，热处理不会对其产生显著的影响。随着温度的升高和热处理时间的延长，驼乳的酒精稳定性有逐渐降低的趋势。温度越高，乳的酒精稳性越低。热处理时间越长，酒精稳定性随着时间的延长显著降低($P<0.05$)。温度对乳样胶体的亲水性有影响，这可能是升高温度使驼乳胶体的亲水能力发生变化，从而导致其稳定性的降低[20]。

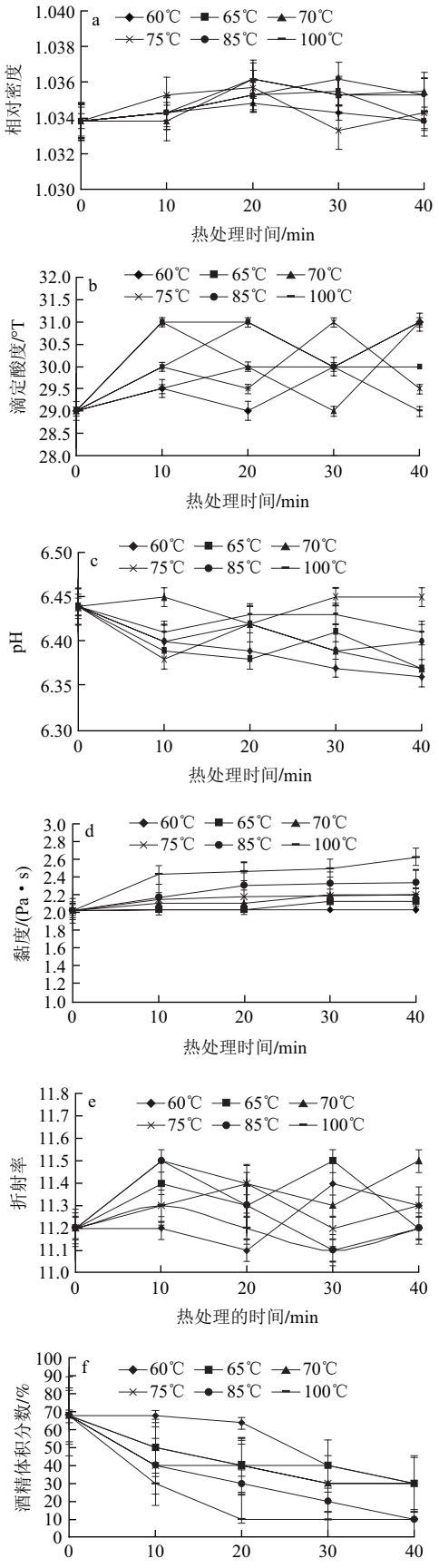


图2 热处理对驼乳理化性质的影响

Fig.2 Effect of heat treatment on physio-chemical properties of camel milk

2.3 热处理对总蛋白质含量和乳糖含量的影响

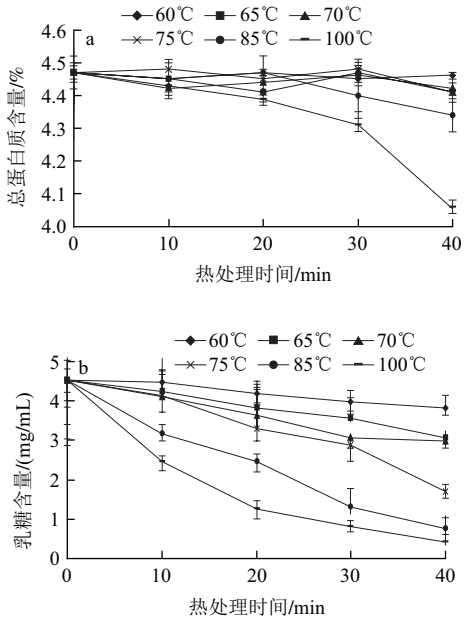


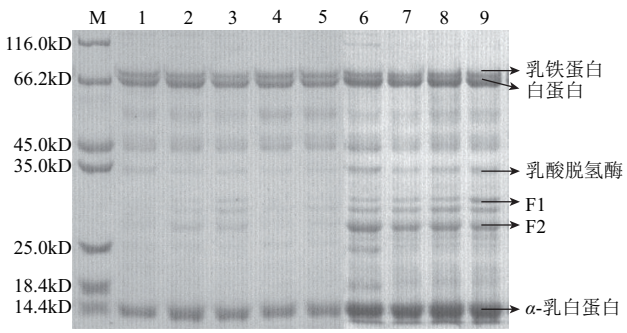
图3 热处理对驼乳总蛋白(a)和乳糖含量(b)的影响

Fig.3 Effect of heat treatment on total protein (a) and reducing sugar contents (b) of camel milk

由图3可知，一般热处理使驼乳的蛋白质变性沉淀，但它们都还在其中，所以热处理不会对驼乳中的总蛋白产生显著影响($P>0.05$)。在60～75℃条件下，热处理时间对蛋白质含量的影响不显著($P>0.05$)；但当热处理温度上升至85℃随着热处理时间的延长，蛋白质含量显著下降($P<0.05$)。总蛋白质含量的下降是由于考马斯亮蓝法只能测定可溶性的蛋白含量，热处理后驼乳中的蛋白质变性后发生沉淀，所以随着热处理温度的升高，驼乳的中可溶性的蛋白质含量越低。乳糖具有还原性，有变旋现象，在热水中的溶解度比在冷水中的大，但热处理温度过高，会对驼乳中的乳糖产生破坏，随着热处理温度的升高和热处理时间的延长，对乳糖含量的影响越来越明显。热处理温度为60℃时，热处理温度对乳糖含量的影响不显著($P>0.05$)；当热处理温度在65～100℃时，热处理温度对乳糖含量的影响显著($P<0.05$)。在同样温度处理下，热处理时间对乳糖含量的影响显著($P<0.05$)。

2.4 热处理对乳清中蛋白质的影响

由图4可知，当驼乳在60℃分别热处理10、20、30、40min时，在乳清的电泳图中没有明显的变化。65℃处理10、20、30、40min时，对驼乳的白蛋白和乳酸脱氢酶(35kD)以及α-乳白蛋白没有明显变化。但在这个热处理水平上，出现了F1(32kD)和F2(26.9kD)两个蛋白质条带，这两个条带随时间的增加而越来越深。由图5可知，60℃热处理对驼乳中蛋白质的影响不显著($P>0.05$)。65℃热处理对驼乳中蛋白质的影响显著($P<0.05$)。在65℃处理时，白蛋白的含量有呈线性下降的趋势，乳铁蛋白有下降的趋势，F1和F2蛋白质有呈线性增加的趋势。



M.标准分子质量蛋白；1.新鲜驼乳乳清；2～5. 60℃热处理10、20、30、40min的驼乳乳清；6～9. 65℃热处理10、20、30、40min的驼乳乳清。

图4 60℃和65℃热处理后驼乳蛋白质电泳图谱

Fig.4 SDS-PAGE of camel milk samples heated at 60 ℃ or 65 ℃

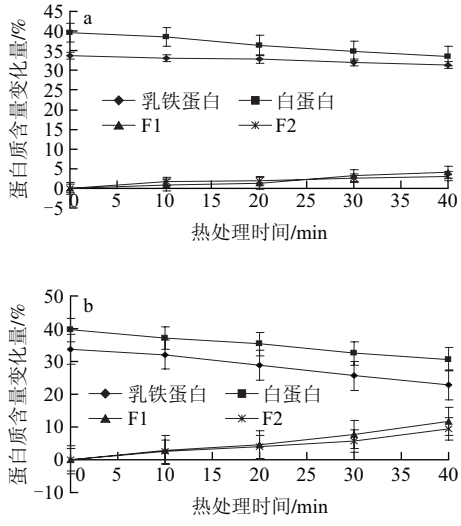
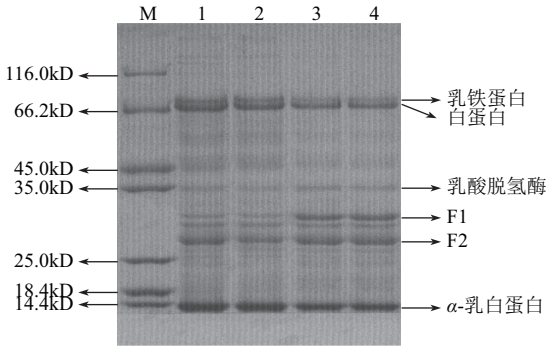


图5 60℃(a)和65℃(b)热处理对驼乳蛋白质含量变化的影响

Fig5 Effect of heat treatment at 60 ℃ (a) or 65 ℃ (b) on the content of various protein components in camel milk

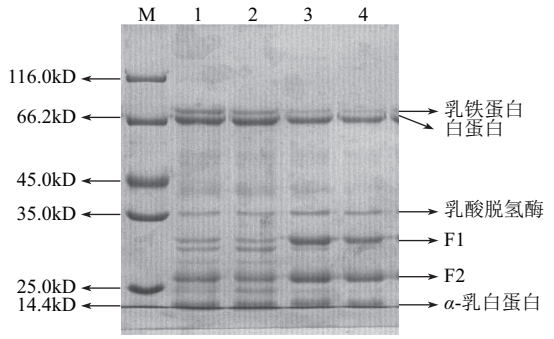
由图6、7可知，热处理温度上升到70℃和75℃时，乳铁蛋白和白蛋白的条带逐渐变淡，F1和F2蛋白质条带随时间的增加而越来越深，乳酸脱氢酶和α-乳白蛋白没有明显变化。由图8可知，70℃和75℃热处理对驼乳中蛋白质的影响较显著，乳铁蛋白和白蛋白的含量呈线性下降的趋势($P<0.05$)，F1和F2蛋白质含量显著增加($P<0.05$)。在75℃热处理5～15min，蛋白质的变性程度相对较低，鲜驼乳与热处理10min的驼乳相比，乳铁蛋白质含量减少30.26%，白蛋白含量减少17.24%，F1蛋白质含量增加31倍，F2蛋白质含量增加67倍。



M.标准分子质量蛋白；1～4.热处理10、20、30、40min。

图 6 70℃热处理后驼乳乳蛋白质电泳图谱

Fig.6 SDS-PAGE of camel milk samples heated at 70 ℃



M.标准分子质量蛋白；1～4.热处理10、20、30、40min。

图 7 75℃热处理后驼乳乳蛋白质电泳图谱

Fig.7 SDS-PAGE of camel milk samples heated at 75 ℃

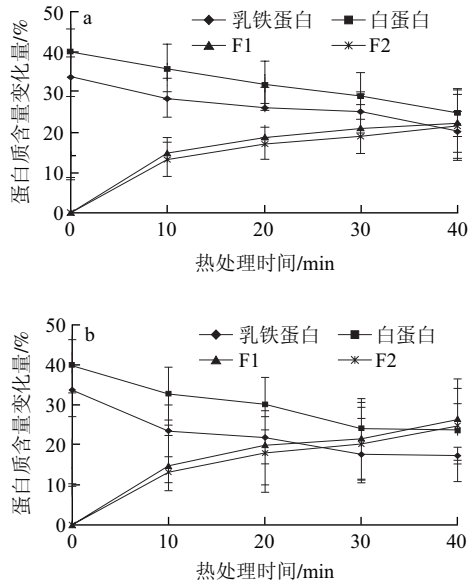
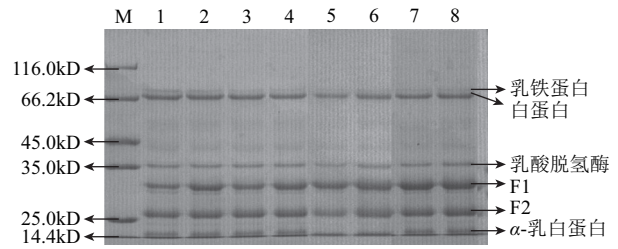


图 8 70℃(a)和75℃(b)热处理对驼乳乳蛋白质含量变化的影响

Fig.8 Effect of heat treatment at 70 ℃ (a) or 75 ℃ (b) on the content of various protein components in camel milk

由图9可知，当热处理温度上升到85℃和100℃时，乳铁蛋白、白蛋白和α-乳白蛋白的条带都开始变淡，尤其是乳铁蛋白条带，F1和F2条带随时间的增加和温度的升高越来越深。乳酸脱氢酶的条带没有明显变化，说明这个蛋白的热稳定性很高。白蛋白和乳铁蛋白的条带变淡，说明这两个蛋白质的热稳定性较低。F1和F2的条带越来越深，它们有可能热稳定性较差蛋白变性后产生的一些片段。由图10可知，85℃和100℃热处理对驼乳中蛋白质的影响显著，乳铁蛋白和白蛋白的含量呈线性下降的趋势($P<0.05$)，F1和F2蛋白质显著增加($P<0.05$)。



M.标准分子质量蛋白；1～4. 85℃热处理10、20、30、40min的驼乳乳清；5～8. 100℃热处理10、20、30、40min的驼乳乳清。

图 9 85℃和100℃热处理后驼乳蛋白质电泳图谱

Fig.9 SDS-PAGE of camel milk samples heated at 85 ℃ or 100 ℃

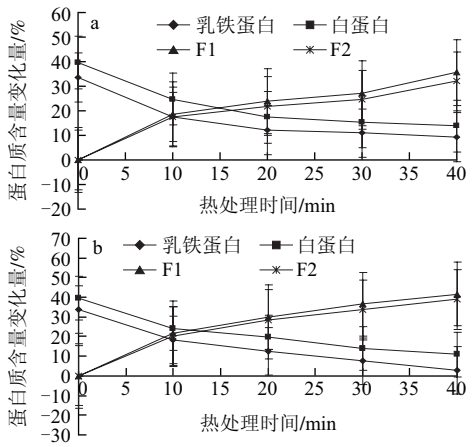


图 10 85℃(a)和100℃(b)热处理对驼乳乳蛋白质含量变化的影响

Fig.10 Effect of heat treatment at 85 ℃ (a) or 100 ℃ (b) on the content of various protein components in camel milk

3 结 论

在75℃热处理5～15min，可以杀灭81.9%的微生物，蛋白质的变性程度相对较低。鲜驼乳与热处理10min的驼乳相比，乳铁蛋白质含量减少30.26%，白蛋白含量减少17.24%，F1蛋白质含量增加31倍，F2蛋白质含量增加67倍。在这个热处理水平上，既能杀灭大部分有害微生物，延长驼乳的货架期，又能最大限度的保护驼乳中原有的营养成分。

参考文献：

[1] FARAH Z. Camel milk: properties and products[M]. SKAT, Switzerland, 1996.

[2] JIRIMUTU R, ZHANG Heping, ZHAO Dianbo. Changes in chemical composition of Alax Bactrian camel milk during lactation[J]. Dairy Sci, 2005, 88: 3402-3410.

[3] HASSAN A, HAGYASSA E, SORYAI K A, et al. Physicochemical properties camel milk during lactation period in Egypt[J]. Egypt Jan Journal of Food Science, 1987, 15: 1-14.

[4] YAGIAL R, ZAGORSKI O, van CREFELD C, et a1. Science and camel's milk production[C]//Expansion Scientifique Francais, 1994, 12: 75-89.

[5] ALEMAYEHU G. Breeding program and evaluation of semen characteristics of camels in the central rift valley of Ethiopi[D]. Ethiopia: Alemaya University, 2001.

[6] KONUSPAYEVA, FAYE B, LOISEAU G, et a1. Lactoferrin and immunoglobulin contents in camel's milk from Kazakhstan[J]. J Dairy Sci, 2007, 90: 38-46.

[7] LIU C, GELIUS E, LIU G, et al. Mammalian peptidoglycan recognition protein binds peptidoglycan with high affinity, is expressed in neutrophils and inhibits bacterial growth[J]. Journal of Biological Chemistry, 2000, 275: 24490-24499.

[8] REDWAN E R M, TABLL A. Camel lactoferrin markedly inhibits hepatitis C virus genotype 4 infection of human peripheral blood leukocytes[J]. Journal of Immunoassay and Immunochemistry, 2007, 28: 267-277.

[9] HAMERS-CASTERMAN C, ATAHOUCH T, MUYLDERMANS S, et al. Naturally-occurring antibodies devoid of light chains[J]. Nature, 1993, 363: 446-448.

[10] ELAYANE A A, SULIEMAN A E, SALEH F A. The hypercholesterolemia effect of gariss and gariss containing *Bifidobacteria* in rats fed on a cholesterol-enriched diet[J]. Asian Journal of Biochemistry, 2008, 3: 43-47.

[11] AGRAWAL R P, SWAMI S C, BENIWAL R, et al. Effect of camel milk on glycemic control, lipid profile and diabetes quality of life in type-1 diabetes: a randomised prospective controlled cross over study[J]. Indian Journal of Animal Science, 2003, 73: 1105-1110.

[12] 陆东林, 张静, 何晓瑞. 驼乳的化学成分和加工利用[J]. 中国乳业, 2008(7): 36-38.

[13] GB 5413.33—2010 食品安全国家标准 生乳相对密度的测定[S].

[14] GB 5413.34—2010 食品安全国家标准 乳和乳制品酸度的测[S].

[15] GB 6920—1986 pH值的测定方法[S].

[16] GB/T 22235—2008 液体黏度的测定[S].

[17] 孙士青, 王少杰. 考马斯亮蓝法快速测定乳品中蛋白质含量[J]. 山东科学, 2011, 24(6): 53-55.

[18] 吴逊, 浦朝文, 封雷. 3,5－二硝基水杨酸快速测定食品还原糖[J]. 预防医学杂志, 2002, 18(1): 92-93.

[19] 赵电波, 吉日木图, 刘红霞, 等. 内蒙古阿拉善盟双峰驼驼乳理化性质研究[J]. 乳业科学与技术, 2005(3): 112-117.

[20] KIM B Y, 范淳. 温度和pH值对酪蛋白凝聚的影响[J]. 中国乳品工业, 1994, 22(3): 140-143.