

不同热处理方式对牛奶中 IgG 和乳铁蛋白的影响

程金波¹, 王加启¹, 李珊珊¹, 甄云鹏², 刘光磊¹, 卜登攀¹, 刘开朗¹

(1. 中国农业科学院 北京畜牧兽医研究所 动物营养学国家重点实验室 北京 100193;

2. 农业部奶及奶制品质量监督检验测试中心(北京) 北京 100193)

摘要: 功能乳制品的加工失活是目前乳制品工业中的重要难题。本试验旨在研究不同热处理方式对于乳中活性物质免疫球蛋白(IgG)和乳铁蛋白(Lf)的影响。本研究参照目前乳品工业中常用的热处理方式,共选用12种温度和时间组合。结果表明,乳品加工过程中的均质化处理提高了乳中IgG以及Lf的活性;不同的温度与时间的热处理方式组合可以显著的影响乳中IgG和Lf的活性;综合考虑乳中IgG和Lf活性变化,本研究表明70~75℃,15s的加工工艺适合于这两种功能性蛋白的大规模工业化生产。

关键词: 热处理; 牛奶; IgG; 乳铁蛋白

中图分类号: TS252 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2010)增刊-0170-05

The Effect of Different Heat Treatments on IgG and Lactoferrin in the Milk

CHENG Jin-bo¹, WANG Jia-qi¹, LI Shan-shan¹, ZHEN Yun-peng²,

LIU Guang-lei¹, BU Deng-pan¹, LIU Kai-lang¹

(1. State Key Laboratory of Animal Nutrition, Institute of Animal Science, Chinese Academy of

Agriculture Sciences, Beijing 100193, China; 2. Ministry of Agricultural Milk and Dairy

Inspection and Supervision Center(Beijing), Beijing 100193, China)

Abstract: The technology for functional milk products is a major difficult issue in the milk products industry. The objective in this study is to study the effects of different heat treatments on the IgG and lactoferrin in the milk, which are major functional proteins in the milk. According the common heat methods in the milk products industry, we totally choose 12 heat treatments(the interaction of temperature and time). The results in this experiment indicated that the homogenization in the milk products processing could improve the activity of IgG and lactoferrin in the milk. The heat treatments(the interaction of temperature and time) could significantly affect the activity of IgG and lactoferrin in the milk. Taking the consideration of IgG and lactoferrin together, the heat treatment(70℃ to 75℃, 15 s) could be used in the large-scale production of them in the milk products industry.

Key words: Heat treatment; Milk; IgG; Lactoferrin

免疫球蛋白(Immunoglobulin, Ig)和乳铁蛋白(Lactoferrin, Lf)是牛奶中最重要的免疫活性蛋白。牛奶中的免疫球蛋白主要有IgG、IgM、IgA,其中IgG为主要的免疫球蛋白。牛奶IgG能够有效的抑制细菌的繁殖,抑制细菌定植,抑制细菌分泌毒素,阻止毒素与人体细胞受体的结合,中和毒素,有效的抗病毒等^[1]。泌乳期牛乳中IgG的含量为0.030~0.614 mg/mL,平均为0.322 mg/mL^[2]。Lf是一种

铁结合性糖蛋白,由嗜中性粒细胞颗粒(Polymorphonuclear leukocytes, PMNL)和乳腺上皮细胞合成和分泌,广泛存在于乳汁和其他分泌物中,比如眼泪、唾液以及黏膜表面^[3-5]。Lf在机体防御方面起到重要作用,这是由于它具有抑菌、杀菌以及干扰微生物与宿主细胞之间的结合等作用^[6]。以往的许多研究已经表明,Lf在体内和体外具有重要的免疫作用^[6-7]。常乳中Lf含量约0.004~0.271 mg/mL,

收稿日期: 2010-06-11

基金项目: 国际科技合作项目(2009DFB30530); 动物营养学国家重点实验室自主研究课题(2004DA125184(青)0801)

作者简介: 程金波(1982-),男,山东临沂人,硕士,主要从事反刍动物营养和牛奶质量改良研究。

通讯作者: 王加启(1967-),男,安徽人,研究员,博士生导师,主要从事反刍动物营养和牛奶质量改良研究。

平均为 0.101 mg/mL^[8]。

SARS、禽流感等重大传染病提醒人类,提高免疫能力才能有健康的生命,因此牛奶免疫球蛋白的功能引起普遍的关注^[9]。如何使牛奶中主要活性物质最终较大程度地保留在乳制品中,并最终被人们吸收和利用是目前研究的难点之一。有研究报道表明,乳制品的加工工艺会对乳中 IgG 和 Lf 的活性产生不利影响,但此方面的研究并不全面,尤其是对于 Lf 的研究,不能很好地为功能乳制品的加工生产提供足够的理论支持。因此,本研究主要目的在于探索乳制品制作过程中,不同热处理对于乳中主要活性物质(IgG 和 Lf) 活性的影响,为功能乳制品的最终开发上市提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验设计以及样品的采集

本试验参照目前乳品工业中常用的热处理方法(表 1)^[10],共选用 70℃ /15 s、75℃ /15 s、80℃ /15 s、

85℃ /15 s、90℃ /15 s、95℃ /15 s、120℃ /4 s、125℃ /4 s、130℃ /4 s、135℃ /4 s、137℃ /4 s、139℃ /4 s 共 12 种温度与时间处理组合。本试验中,液态乳的加工工艺流程为:生鲜牛乳收集→预热→均质→杀菌,所有技术规范按照中国奶业标准中“无公害食品 牛奶加工技术规范(标准号: NY/T 5050-2001)”^[11],试验中样品采集情况见表 2。

表 1 乳品工业中常用的热处理方法
Tab.1 The common methods of heat treatment in milk product industry

工艺名称 Methods	温度 /℃ Temperature	时间 /s Time
初次杀菌	63 ~ 65	15
低温长时间巴氏杀菌	62.8 ~ 65.6	1800
高温短时巴氏杀菌(牛乳)	72 ~ 75	15 ~ 20
高温短时巴氏杀菌(稀奶油)	> 80	1 ~ 5
超巴氏杀菌	125 ~ 138	2 ~ 4
超高温杀菌(连续式)	135 ~ 140	4 ~ 7
保持杀菌	115 ~ 121	1200 ~ 1800

表 2 试验中样品来源

Tab.2 The samples in this experiment

样品名称 Samples	处理工艺 Treatment	样品数量 Amount	样品来源 Source
生鲜牛乳	—	10	中国农业科学院北京畜牧兽医研究所试验牛场
预热后牛乳	预热(55℃)	10	研究室完成
均质后牛乳	20 Mpa	10	研究室完成:采用 APV-4000 均质机
杀菌温度和时间组合方式	70℃ /15 s	10	研究室完成:采用 Armfield 加工设备 (Armfield ,FT74 ,UHT/HTST processing system)
	75℃ /15 s	10	
	80℃ /15 s	10	
	85℃ /15 s	10	
	90℃ /15 s	10	
	95℃ /15 s	10	
	120℃ /4 s	10	
	125℃ /4 s	10	
	130℃ /4 s	10	
	135℃ /4 s	10	
	137℃ /4 s	10	
	139℃ /4 s	10	

1.2 乳样的处理

每一种试验处理采集样品 n = 10,每个取 2 mL,4℃ 下 10 000 × g 离心 15 min (Legend Mach 1.6/R, Sorvall, 德国)去除乳脂,脱脂乳样品于 -80℃ 保存,用于 ELISA 检测。

1.3 主要设备

乳品加工设备(Armfield ,FT74 ,UHT/HTST processing system,英国)、均质机(APV-4000,丹麦)、高速低温冷冻离心机(Sorvall, legend. mach 1.6R, 德国)、酶标仪(Tecan ,Infinite F200,瑞士)以及其他辅助仪器设备。

1.4 乳中 IgG 和 Lf 含量的检测

分别采用牛 IgG 和 Lf 检测试剂盒(Bethyl Laboratories ,Inc. ,Montgomery ,TX,美国),通过夹心 ELISA 方法检测乳中 IgG 和 Lf 的含量。每种试验处理选择 4 个样品进行检测,样品进行 1:2 000 稀释,并设两个平行样,同时每块板子上设两条标准曲线,具体参照 Liu 等以及 Cheng 等^[2,8]。

1.5 数据处理

以 Excel 初步整理数据,以 SAS 9.0 进行统计分析,多重比较采用 Duncan 法分析,以 P < 0.05 为差异显著水平。

2 结果与分析

2.1 不同热处理方式对乳中 IgG 的影响

由图 1 可以看出,生鲜牛乳中 IgG 的含量为 (0.347 ± 0.051) mg/mL, 55°C 预热以后其含量降为 (0.252 ± 0.023) mg/mL, 达到差异显著水平 ($P < 0.05$)。均质化处理使其含量有所上升, 达到 (0.386 ± 0.098) mg/mL, 显著高于预热后乳中 IgG

的水平 ($P < 0.05$)。把杀菌时间定为 15 s, 将均质后的牛乳进行 $70, 75, 80, 85, 90, 95^{\circ}\text{C}$ 下加热, 乳中 IgG 含量发生显著变化, 其中在 $75^{\circ}\text{C}/15\text{ s}$ 下时其含量为最高 (0.315 ± 0.036) mg/mL, $95^{\circ}\text{C}/15\text{ s}$ 下时其含量最低 (0.030 ± 0.001) mg/mL。 $120 \sim 139^{\circ}\text{C}$ 4 s 加工条件下, 乳中 IgG 含量为 (0.008 ± 0.0003) mg/mL, 仅为生鲜牛乳中的 2.40%。

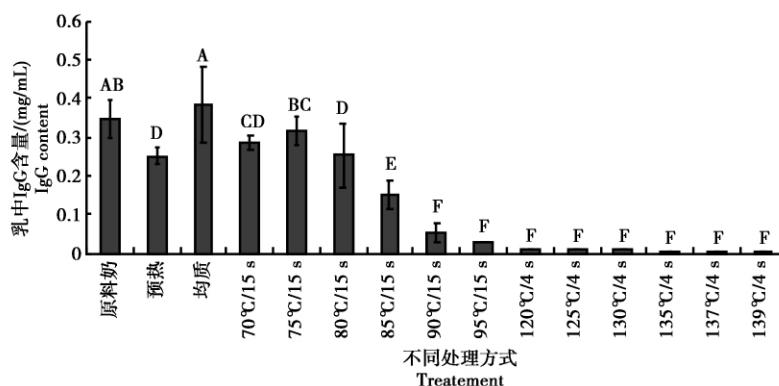


图 1 不同热处理方式对乳中 IgG 的影响

Fig. 1 The effect of different heat treatment on the IgG in the milk

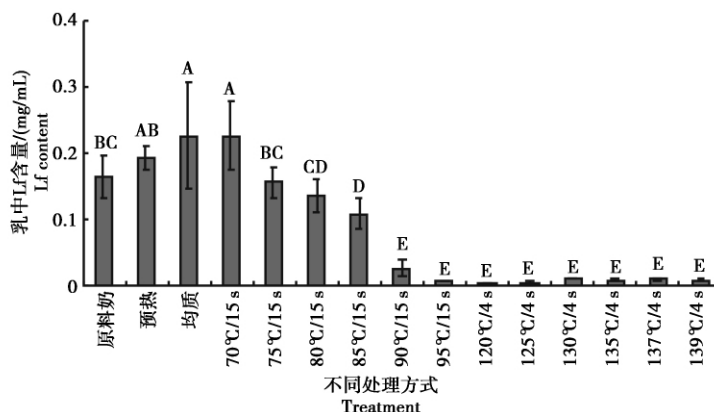


图 2 不同热处理方式对乳中 Lf 的影响

Fig. 2 The effect of different heat treatment on the lactoferrin in the milk

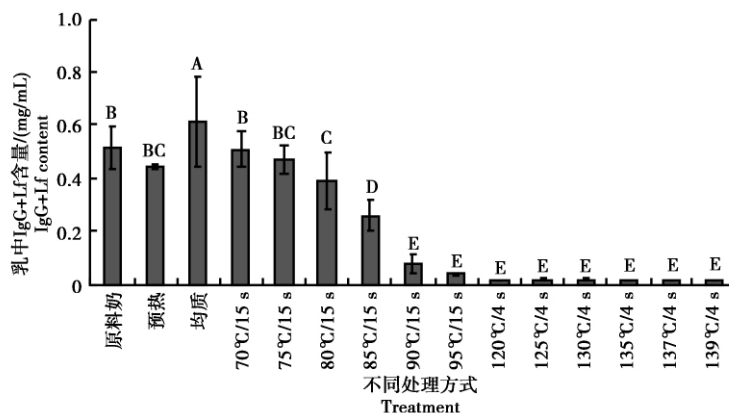


图 3 不同热处理方式对乳中 IgG 和 Lf 之和的影响

Fig. 3 The effect of different heat treatment on the IgG and lactoferrin in the milk

2.2 不同热处理方式对乳中 Lf 的影响

由图 2 可以看出,生鲜牛乳中 Lf 的含量为 (0.165 ± 0.031) mg/mL, 55°C 预热以后其含量有所

上升,均质化处理使其含量达到最高 (0.226 ± 0.054) mg/mL,显著高于生鲜牛乳中的水平 ($P < 0.05$)。15 s 条件下,不同加工温度同样对其含量影

响较大,其浓度随着温度的升高呈下降的趋势。120 ~ 139℃ 4 s 加工条件下,乳中 Lf 含量为 (0.008 ± 0.001) mg/mL,仅为生鲜牛乳中的 4.62%。

2.3 不同热处理方式对乳中主要活性物质(IgG + Lf)的影响

由图 3 可以看出,乳中活性物质 IgG 与 Lf 含量之和在均质后为最高,显著高于其余各处理组($P < 0.05$)。70 ~ 95℃,15 s 条件下,随着温度的上升,其两者之和呈下降的规律,其中在 70℃ 和 75℃ 时,它们的变性率分别为 0.29% 和 8.12%;120 ~ 139℃ 4 s 条件下,其两者含量之和较低,活性基本完全丧失。

3 讨论

3.1 温度和时间处理组合的选择标准

目前,乳品工业中热处理方法较多,不同的方法各有其优缺点,而且不同的乳品企业采用的方法并不完全相同。在众多杀菌方法中,高温短时间杀菌法(HTST)和超高温瞬间杀菌法(UHT)具有许多优点,得到较为普遍的应用。HTST 杀菌与低温长时间杀菌比较,有许多优点:占地面积小,节省空间,因利用热交换连续短时间杀菌,所以效率高。节省热源,加热时间短,牛乳的营养成分破坏小,无蒸煮臭,自动连续流动,操作方便、卫生,不必经常拆卸。另外,设备可直接用酸、碱液进行自动就地清洗。超高温瞬间杀菌法(UHT)杀菌效率极高,可以达到灭菌的效果,一般在冷藏下可保存 20 d。如果与无菌包装结合起来可以生产灭菌乳,保持商业无菌状态,无需冷藏,常温下可长期保存(3 ~ 6 个月)或更长。为了研究热处理对于乳中 IgG 以及 Lf 活性的影响,本试验参照了以上两种方法中的温度和时间参数,共选用了 12 种温度和时间处理组合,对不同热处理方式下乳中 IgG 以及 Lf 的活性进行了系统的研究。

3.2 不同热处理方式对乳中 IgG 的影响

关于热处理对于 IgG 的影响,目前已经有所报道。Mainer 等^[12]报道牛乳中的 IgG 能够很好地抵抗乳品工业中常用的巴氏杀菌,低温长时间巴氏杀菌(LTLT,63℃、30 min)几乎不影响 IgG 的活性,HTST(72℃、15 s)的热处理 IgG 的变性率仅为 1%。张和平等^[13]研究了免疫乳中 IgG 的变性率,发现 HTST 杀菌(75℃、15 s)条件下,乳中 IgG 的变性率为 0.52%,UHT(120℃、0.4 s)条件下,乳中 IgG 的变性率为 100%。本试验中,在 75℃、15 s 条件下,乳中 IgG 变性率最小,约为 9.3%,120 ~ 139℃ 4 s 条件下,乳中 IgG 活性基本损失,变性率约为 97.6%,此研究结果基本与以上报道相一致。

3.3 不同热处理方式对乳中 Lf 的影响

目前,关于不同加热方式对于乳中 Lf 的影响研究相对较少。本研究发现,经 20 MPa 均质后,乳中 Lf 的活性为最高,显著高于生鲜牛乳($P < 0.05$);同时在 70 ~ 95℃,15 s 条件下,其含量随着温度的升高呈下降的趋势。Luciana 等^[14]研究表明,100 MPa 的高压均质可以提高 Lf 的抗李斯特菌活性。然而,70℃ 加热处理 30 s 并没有增加 Lf 抗李斯特菌的活性。这可能是由于高压均质改变了细菌周围的环境,同时增强了 Lf 分子的抗菌活性。Lf 的抗菌活性主要受水的活性、pH 值、介质组成以及阳离子浓度等影响,由于 Lf 本身带正电荷,它可以与其他蛋白质进行相互作用^[15,16]。另外有报道显示,高压均质可以作用于蛋白质和酶的功能区域与活性区域^[17,18],并且可以改变溶液中氮的比例、钙离子浓度、磷离子浓度以及溶液的 pH 值^[19]。Dupont 等^[20]利用夹心 ELISA 方法检测发现巴氏杀菌乳中 Lf 含量并没有太大变化。在 120 ~ 139℃ 4 s 加热条件下,Lf 的活性基本完全丧失,变性率为 95.38%,由此说明 Lf 不适合 UHT 的加工工艺。

3.4 不同热处理方式对乳中主要活性物质(IgG + Lf)的影响

由于 IgG 和 Lf 是乳中主要的生物活性物质,因此有必要综合考虑两者的热稳定性,找到一种能同时适合这两种功能蛋白的乳品加工工艺。高压均质可以显著提高乳中 IgG 和 Lf 的含量之和($P < 0.05$),70 ~ 95℃,15 s 条件下,其两者含量随着温度的升高呈下降的趋势,120 ~ 139℃ 4 s 条件下,两者的含量较低,都已基本完全变性。因此,综合考虑 IgG 和 Lf 的活性变化,70 ~ 75℃,15 s 的加工工艺适合于这两种功能性蛋白的大规模工业化生产。

4 结论

乳品加工过程中的均质化处理提高了乳中 IgG 活性、Lf 活性以及 IgG 与 Lf 之和的水平;不同的温度与时间的热处理方式组合可以显著影响乳中 IgG 和 Lf 的活性;综合考虑乳中 IgG 和 Lf 活性变化,本研究表明 70 ~ 75℃,15 s 的加工工艺适合于这两种功能性蛋白的大规模工业化生产。

参考文献:

- [1] Marnila P, Korhonen H. Immunoglobulins [M]// Roginski H, Fuquay W J, Fox F P. Encyclopedia of Dairy Sciences. Academic Press, London, UK, 2002: 1950 - 1956.
- [2] Liu G L, Wang J Q, Bu D P, et al. Factors affecting the transfer of immunoglobulin G1 into the milk of Holstein

- cows [J]. The Veterinary Journal 2009 ,182(1) : 79 – 85
- [3] Baggiolini M ,De Duve C ,Masson P L *et al.* Association of lactoferrin with specific granules in rabbit heterophil leukocytes [J]. The Journal of Experimental Medicine , 1970 ,131: 559 – 570.
- [4] Masson P L ,Heremans J F ,Prignot J J *et al.* Immunohistochemical localization and bacteriostatic properties of an iron-binding protein from bronchial mucus [J]. Thorax , 1966 21(6) : 538 – 544.
- [5] Rerter B ,Oram J D. Bacterial inhibitors in milk and other biological fluids [J]. Nature(Lond.) ,1967 ,216: 328 – 330.
- [6] Valenti P ,Antonini G. Lactoferrin: an important host defence against microbial and viral attack [J]. Cellular and Molecular Life Sciences 2005 62: 2576 – 2587.
- [7] Baveye S ,Elass E ,Mazurier J ,Spik G *et al.* Lactoferrin: a multifunctional glycoprotein involved in the modulation of the inflammatory process [J]. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine ,1999 37: 281 – 286.
- [8] Cheng J B ,Wang J Q ,Bu D P *et al.* Factors affecting the lactoferrin concentration in bovine milk [J]. Journal of Dairy Science 2008 91(3) 970 – 977.
- [9] 王加启. 21 世纪国际奶业发展新动向 [J]. 中国畜牧兽医 2007 34(4) : 5 – 6.
- [10] 郭本恒. 现代乳品加工技术丛书: 液态奶 [M]. 北京: 化学工业出版社 2003: 144.
- [11] 王金华 张宗城. NY/T 5050 – 2001 无公害食品 牛奶加工技术规范 [S]. 北京: 中国农业出版社 2001.
- [12] Mainer G ,Sanchez L ,Ena I M. Kinetic and thermodynamic parameters for heat denaturation of bovine milk IgG ,IgA and IgM [J]. Journal of Food Science ,1997 , 62: 1034 – 1038
- [13] 张和平 ,郭 军 ,李立民 ,等. 免疫乳中 IgG 热变性动力学研究 [J]. 中国乳品工业 2001 29(4) : 4 – 8
- [14] Luciana L ,Francesca P ,Melania V. Effects of high pressure homogenization on the activity of lysozyme and lactoferrin against *Listeria monocytogenes* [J]. Food Control 2007 18(5) : 558 – 565
- [15] Hekman A. Association of lactoferrin with other proteins , as demonstrated by changes in electrophoretic mobility [J]. Biochimica et Biophysica Acta ,1971 ,251: 380 – 387.
- [16] Lampreave F ,Pineiro A ,Brock J H *et al.* Interaction of bovine lactoferrin with other proteins of milk whey [J]. International Journal of Biological Macromolecules , 1990 ,12: 2 – 5.
- [17] Kheadr E E ,Vachon J F ,Paquin P *et al.* Effect of dynamic high pressure on microbiological ,rheological and microstructural quality of Cheddar cheese [J]. International Dairy Journal 2002 ,12: 435 – 446.
- [18] Vannini L ,Lanciotti R ,Baldi D *et al.* Interactions between high pressure homogenization and antimicrobial activity of lysozyme and lactoperoxidase [J]. International Journal of Food Microbiology 2004 94 ,123 – 135.
- [19] Guerzoni M E ,Vannini L ,Chaves-Lopez C *et al.* Effect of high pressure homogenization on microbial and chemico-physical characteristics of goat cheeses [J]. Journal of Dairy Science ,1999 82: 851 – 862.
- [20] Dupont D ,Arnould C ,Rolet-Repecaud O. Determination of bovine lactoferrin concentrations in cheese with specific monoclonal antibodies [J]. International Dairy Journal 2006 16: 1081 – 1087