

黄油乳清组分分析与乳化特性评价

张雁斌¹ 吴珊² 李芷茜¹ 罗洁¹

(1. 湖南农业大学食品科学技术学院, 长沙 410128; 2. 西安银桥乳业(集团)有限公司研发中心, 西安 710075)

摘要: 黄油乳清(BS)是生产无水黄油时产生的副产物。由于富含乳脂肪球膜等组分,黄油乳清被认为是富集球膜组分的良好原料。然而,目前的研究集中于黄油乳清的基础组分构成,对脂肪球膜源组分的构成及应用特性的研究尚未明确,限制了黄油乳清的应用。通过离心搅打等方式从牛乳黄油中分离出黄油乳清,以原料乳和酪乳为对照,分析了黄油乳清的基本组分和脂肪球膜源组分构成。结果表明,与原料乳、酪乳相比,黄油乳清的蛋白质、脂肪质量分数显著增加,总钙含量显著降低,乳糖质量分数、含水率、pH值等无显著性差异($P>0.05$);黄油乳清中含脂肪球膜磷脂56种,包括磷脂酰胆碱(Phosphatidylcholine,PC)20种、磷脂酰乙醇胺(Phosphatidylethanolamine,PE)10种、磷脂酰丝氨酸(Phosphatidylserine,PS)7种、磷脂酰肌醇(Phosphatidylinositol,PI)6种、鞘磷脂(Sphingomyelin,SM)13种,其中鞘磷脂含量约为酪乳的3倍,质量浓度达到0.352 mg/mL;黄油乳清含脂肪球膜蛋白4种,其中丰度最大的为高碘酸希夫糖蛋白6/7,球膜蛋白占总蛋白的23.32%,是酪乳的1.1倍;对脱脂乳、酪乳和不同浓度黄油乳清乳化特性进行比较,研究结果显示,黄油乳清乳化性显著优于同浓度酪乳($P<0.05$);在添加量3%时,黄油乳清乳化活性指数和乳化稳定性指数达到最大,分别为2.682 m²/g和91.1%。综上,黄油乳清中含丰富的脂肪球膜源组分,同浓度下,黄油乳清乳化特性优于酪乳,具有较高的应用潜力。

关键词: 黄油乳清; 乳脂肪球膜; 磷脂; 脂肪球膜蛋白; 功能特性

中图分类号: TS252.53 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2023)11-0412-09 OSID: 

Composition Analysis and Emulsification Property Evaluation of Butter Serum

ZHANG Yanbin¹ WU Shan² LI Zhixi¹ LUO Jie¹

(1. College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Hunan 410128, China
2. Research and Development Center, Xi'an Yinqiao Dairy (Group) Co., Ltd., Xi'an 710075, China)

Abstract: Butter serum (BS) is a byproduct of anhydrous butter production and a natural milk byproduct. There are two main sources: one was the water phase obtained by melting and centrifugation, and the other was using 75% dilute cream to convert the phase to obtain butter serums. There were few studies on the components and their functional characteristics of butter serums at home and abroad, which limited the reuse value of butter serums. The component composition and application characteristics of butter serums were analyzed in this experiment. By centrifugation and other methods the cow butter serums was successfully isolated, and the basic and fat bulb membrane source components of butter serums were analyzed by using raw milk and buttermilk as controls. The results showed that the protein and fat contents of butter serums were increased significantly, and the total calcium content was decreased significantly, without lactose, moisture and pH value ($P>0.05$). Using liquid phase mass spectrometer, butter serums contained 56 kinds of fat globular membrane phospholipids, of which sphingomyelin content reached 0.352 mg/mL; the fat globular membrane protein of butter serums accounted for 23.32% of the total protein. The effects of butter serum and buttermilk on emulsion emulsification were compared. The results showed that the emulsification of butter serum was significantly better than that of buttermilk ($P<0.05$). The emulsifying activity and stability of butter serum reached the maximum at 3% concentration, which were 2.682 m²/g and 91.1%, respectively. In conclusion, butter serum contained abundant fat globule membrane source components, and the emulsification

收稿日期: 2023-04-28 修回日期: 2023-05-20
基金项目: 湖南省自然科学基金优秀青年项目(2022JJ20026)和湖湘青年英才科技创新类项目(2023RC3151)
作者简介: 张雁斌(1997—),男,博士生,主要从事食品加工与安全研究,E-mail: 1092991174@qq.com
通信作者: 罗洁(1987—),女,副教授,博士,主要从事乳品科学研究,E-mail: luojie@hunau.edu.cn

property of butter serum was better than that of buttermilk at the same concentration, which had higher application potential.

Key words: butter serum; milk fat globular membrane; phospholipid; fat globular membrane protein; functional properties

0 引言

在黄油和无水黄油生产过程中,会产生一部分水相,分别被称为酪乳(Butter milk)和黄油乳清(Butter serum,BS)。黄油乳清的来源主要有两条途径:一是将黄油熔化并离心所获得的水相;二是将75%的稀奶油均质化,使其相态发生转化而得到无水黄油和黄油乳清。黄油乳清组分与酪乳的组分类似^[1],除水外,主要由蛋白质、脂质、灰分和乳糖等组成^[2]。长期以来,黄油乳清和酪乳一直被认为是乳脂行业的低价值副产物。然而近年来,黄油乳清和酪乳因富含功能性乳脂肪球膜(Milk fat globule membrane,MFGM)片段和乳磷脂而备受关注。

MFGM 是指包裹于牛乳中脂肪球表面的 3 层膜结构^[3],其中富含极性脂质,如磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰丝氨酸(PS)、磷脂酰肌醇(PI)、鞘磷脂(SM)等^[4],以及大量膜蛋白。此外,在 MFGM 的 3 层膜中还镶嵌了大量以糖蛋白为主的膜蛋白,如嗜乳脂蛋白、黄嘌呤氧化还原酶、黏液素 1、脂肪分化相关蛋白、分化簇 36 等^[5]。极性脂质和膜蛋白一方面能够有效防止水油聚集,能良好地链接水相和油相^[6],对乳脂肪球具有重要的稳定作用;另一方面又因极性脂质带有负电荷,可以通过静电和胶体间的相互作用降低油-水界面的张力^[7],从而保证脂肪球在分散体系的稳定性。因此,脂肪球膜中的极性脂质和膜蛋白也被认为是良好的乳化剂^[5]。同时,MFGM 鞘磷脂、神经节苷脂和脂肪球膜蛋白等组分还被发现具有促进婴儿大脑认知发育^[8]、增强免疫^[9]等功能。在生产黄油和无水黄油的搅拌过程中,MFGM 片段大量转移至黄油乳清和酪乳中,因此,富含 MFGM 的黄油乳清和酪乳具有较大的应用价值。

目前,关于酪乳组分及功能特性解析研究较多,酪乳产品在食品工业中也得到了一定应用。然而国内外关于黄油乳清的研究主要针对其基本组分构成,对于黄油乳清脂肪球膜源组分构成以及乳化特性的研究尚未明确。因此,本文以牛乳为原料分离黄油乳清,以酪乳和原料乳为对照,分析黄油乳清中基本组分及 MFGM 源特征组分的构成,并比较不同浓度黄油乳清样品的乳化特性,以期为黄油乳清副产物的利用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

生牛乳(脂肪质量分数 3.85%~3.90%,蛋白质质量分数 3.05%~3.20%),湖南省长沙市畜牧研究所;磷酸氢二钾、碳酸钾、氯化钾、硫酸钾、氢氧化钾、柠檬酸钾、柠檬酸钠、氯化钙、六水氯化镁、盐酸、乙醇、乙醚、石油醚、甲醇、二氯甲烷、三氯甲烷、异丙醇、十二烷基硫酸钠(均为分析纯),甲醇、三氯甲烷、异丙醇、乙腈、醋酸铵(均为色谱纯),国药集团化学试剂有限公司;磷脂酰胆碱标品、磷脂酰乙醇胺标品、磷脂酰丝氨酸标品、磷脂酰肌醇标品、鞘磷脂标品(均为色谱纯),美国 Sigma-Aldrich 贸易有限公司。

1.2 仪器与设备

TP-3000E 型分析天平,湘仪天平仪器设备有限公司;DKB-501A 型恒温水浴锅,上海森信实验仪器有限公司;Qtrap 6500 型高效液相色谱-三重四极杆复合线性离子阱质谱,AB SCIEX 公司;VL-220R 型台式高速冷冻离心机,湖南迈克实验仪器有限公司;Read Max 1900 型酶标仪,上海闪谱生物科技有限公司;BTP-8ZLEOX 型真空冷冻干燥机,美国 SP Scientific 公司;165-8001 型电泳槽,美国伯乐公司;164-5050 型电泳仪,美国伯乐公司;KS260 型脱色摇床,德国 IKA 公司;DG-260 型多功能厨师机,北美电器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 黄油乳清与酪乳的分离

取新鲜生牛乳,在 63℃ 条件下巴氏杀菌 30 min,后在冰水浴下快速冷却至 10℃,在 10℃ 条件下以 4 000 g 离心 20 min,收集上层稀奶油。将脂肪质量分数 30%~40% 的稀奶油投入多功能厨师机中,在 10℃ 条件下,以高速模式进行搅打,直到释放出黄油粒(固体颗粒)和酪乳,收集下层液体(即为酪乳,BM)。将黄油在 65℃ 条件下熔化,并在 4 000 g 下离心 5 min,收集下层液体(即为黄油乳清,BS)。将其置于真空冷冻干燥机中于 -60℃ 静置 12 h 干燥,直至粉末,置于 -20℃ 下保存。

1.3.2 黄油乳清中乳成分含量测定

1.3.2.1 黄油乳清总脂质

参照 GB 5009.6—2016^[10],并稍加修改。称取

10 g 试样,加 10 mL 盐酸,混匀。待溶液冷却后加入 10 mL 乙醇,转入分液漏斗中,充分摇匀。加入 25 mL 乙醚,振摇 0.5 ~ 1 min,再加入 25 mL 石油醚,静置 30 min。待上层液澄清时,放出醚层,至已恒量的烧杯中。上层液进行二次提取,分别加入 5 mL 的乙醇、15 mL 乙醚和 15 mL 石油醚,重复上述步骤。最后,用石油醚和乙醚体积比为 1:1 的混合溶剂冲洗分液漏斗内壁。合并将提取液水浴,使醚层挥发至剩 5 ~ 6 mL 后转移至 (102 ± 2)℃ 的干燥箱中加热 1 h,在干燥皿中冷却至室温 (20℃) 后称量,至前后两次质量相差不超过 1 mg,记录烧杯加脂肪质量。

脂肪质量分数计算公式为

$$E = \frac{W_2 - W_1}{W} \times 100\%$$

(1)

式中 W_2 ——烧杯加脂肪质量,g
 W_1 ——烧杯质量,g
 W ——样品质量,g

1.3.2.2 黄油乳清总蛋白

制备 BCA(二辛可宁酸)工作液:试剂 A 和试剂 B 以体积比 50:1 配制,充分混匀。

标准溶液浓度配置:取 2 mg/mL 牛血清白蛋白 600 μL,按梯度稀释的方法,用二次蒸馏水分别稀释原标准品,配制成质量浓度分别为 2 000、1 500、1 000、750、500、250、125、25 μg/mL 的系列标准工作溶液,将工作溶液加入酶标板中。

标准曲线制作:取 9 支试管,依次加入 0、25、125、250、500、750、1 000、1 500、2 000 μg/mL 的标准蛋白溶液 0.1 mL,分别与 2 mL 的 BCA 工作液均匀混合,振摇 5 min 后于 37℃ 孵育 30 min,以未加标准蛋白的第 1 管为空白对照管,在 45 min 以内于 562 nm 波长处读取各管的吸光度。以蛋白质量浓度为横坐标、吸光度为纵坐标绘制标准工作曲线。

取 10 μL 稀释过的黄油乳清溶液加入酶标板中,于 37℃ 孵育 30 min,在 45 min 以内于 562 nm 波长处读取吸光度。

根据被测样品的吸光度,在标准曲线上查到与之对应的质量浓度,即为所测样品蛋白质质量浓度 (μg/mL)。每个样品吸光度重复测量 3 次,取平均值。

1.3.2.3 黄油乳清总钙离子

将原料粉末溶于超纯水中,在离心力 100 000 g 条件下离心 40 min,收集上清液。参考 GB 5009.268—2016^[11] 中电感耦合等离子体发射光谱法进行测定。

胶束中矿质元素的质量浓度计算公式为

$$X = \frac{(\rho - \rho_0) Vf}{m}$$

(2)

式中 ρ ——试样溶液中被测元素质量浓度,mg/L
 ρ_0 ——试样空白液中被测元素质量浓度,mg/L
 V ——试样消化液定容体积,mL
 f ——试样稀释倍数
 m ——试样称取质量或移取体积,g 或 mL

1.3.2.4 黄油乳清中总乳糖

称取 10 g 样品(精确到 0.001 g)经除去蛋白质后,以亚甲蓝作指示剂,在加热条件下滴定标定过的碱性酒石酸铜溶液(已用乳糖标准溶液标定),根据样品液消耗体积计算还原糖含量。参照 GB 5009.7—2016^[12] 中直接滴定法测定。

试样中乳糖含量(质量比)计算公式为

$$x = 100m' / (10/250 \times 1\,000mF)$$

(3)

式中 x ——试样中乳糖含量,g/(100g)
 m' ——碱性酒石酸铜溶液相当于乳糖的质量,mg

1.3.3 黄油乳清中极性脂质

1.3.3.1 脂质提取

脂质提取参考文献[13-14]并做微调,具体如下:取黄油乳清粉末溶于超纯水中,取黄油乳清溶液 0.2 mL,经离心富集乳脂质球后向其中加入 4.0 mL 的二氯甲烷甲醇混合溶剂(二氯甲烷与甲醇体积比 2:1),旋转混合,在 4 000 g 离心 10 min。静置分层后将有机相转移至螺口玻璃管中。之后再向水相中加入 4.0 mL 的二氯甲烷甲醇混合溶剂,重复上述操作 2 次,合并有机相并将其转移至旋转蒸发心形瓶。40℃、100 r/min 条件下蒸发除去有机溶剂,余下的组分复溶于 1.0 mL 的色谱级氯仿甲醇混合溶剂(氯仿与甲醇体积比 2:1)中,经 0.45 μm 滤膜过滤后置于 1.0 mL 进样瓶中氮气保护存放(-20℃),等待进样分析。

1.3.3.2 色谱条件

利用高效液相色谱-三重四极杆复合线性离子阱质谱,测定黄油乳清中的极性脂质,色谱柱:Cemini NX-C18(2 × 500 mm,Phenomenex)。流动相包括 A 相、B 相,其中 A 相为水(含有 0.1 mmol/L 甲酸、10 mmol/L 乙酸铵),B 相为乙腈。流动相流速为 0.3 mL/min,柱温为 40℃,进样量 5 μL。洗脱程序见表 1。

1.3.3.3 质谱条件

质谱仪为高效液相色谱-三重四极杆复合线性离子阱质谱(Qtrap 6500,AB SCIEX)ESI 电喷雾离子源,正离子扫描,多反应监测(MRM 模式),气

表 1 极性脂质分析的梯度洗脱表

Tab.1 Gradient elution for polar lipids analysis

时间/min	A 相体积分数/%	B 相体积分数/%
0	90	10
2	90	10
7	0	100
10	0	100
11	90	10
15	90	10

帘气压强 206.843 kPa, 离子化电压 5 500 V, 温度 500℃, 喷雾气压强 344.735 kPa, 辅助加热器压强 344.735 kPa。数据采集采用 Analyst 1.6.3 数据处理系统, 通过 MultiQuant 软件进行数据分析。

1.3.4 黄油乳清中脂肪球膜蛋白构成分析

利用 SDS - PAGE (聚丙烯酰胺凝胶电泳) 对黄油乳清膜蛋白进行分离和鉴定, 经凝胶成像获得膜蛋白的凝胶电泳图像, 进一步利用 Image J 软件结合 SDS 凝胶电泳图, 对黄油乳清中的蛋白质进行半定量分析。分离胶质量分数为 4%, 浓缩胶质量分数为 12%, 上样量为 10 μL。电泳操作电压为浓缩胶 80 V, 分离胶 120 V, 所有样品重复 3 次。

1.3.5 黄油乳清乳化特性评价

参照文献[15]的方法分析由黄油乳清制备乳液的乳化活性及乳化稳定性。称取一定量的脱脂乳, 配成 2 mg/mL 的溶液, 向脱脂乳溶液中分别添加不同质量分数(1%、3%、5%) 黄油乳清和酪乳, 混匀新溶液, 取上述溶液 6.00 mL 与 2.00 mL 大豆油混合于 50 mL 离心管中, 于 8 000 g 条件下均质乳化 1 min; 分别在 0 min、静置 10 min 和 30 min 时从距离离心管底部 0.5 cm 处取 50 μL 乳液, 并与 5 mL 质量浓度为 1 g/L 的十二烷基硫酸钠溶液混匀, 以质量浓度为 1 g/L SDS 溶液做参比, 记录 500 nm 处

的吸光度。
乳化活性指数 (EAI, m²/g) 及乳化稳定性指数 (ESI, %) 的计算公式为

$$E_{AI} = \frac{2 \times 2.303 A_0 D}{1\,000 C \varphi (1 - \theta)}$$

(4)

$$E_{SI} = \frac{A_i}{A_0} \times 100\%$$

(5)

式中 C —— 乳化前溶液质量浓度, g/L
D —— 稀释倍数, 取 100
φ —— 比色皿厚度, 取 0.01 mm
θ —— 乳液中油相体积分数, 取 25 %
A₀ —— 乳化后 0 min 吸光度
A_i —— 静置时间 i (min) 吸光度

1.3.6 数据分析

实验数据采用 SPSS Statistics 25 和 Origin 2018 统计软件进行统计分析, 采用平均值 ± 标准差表示 (n = 3)。采用 One-way analysis of variance (ANOVA) 和 Tukey's test 统计均值和显著性分析。

2 结果与分析

2.1 黄油乳清中基本组分

以原料乳、酪乳为对照, 对黄油乳清的基本组分进行分析, 结果见表 2。和原料乳相比, 乳源副产物黄油乳清和酪乳的蛋白质、脂肪、总钙含量存在显著性差异 (P < 0.05), 而在 pH 值、乳糖含量、含水率指标上无显著性差异 (P > 0.05)。与原料乳相比, 乳源副产物样品总钙含量显著下降, 可能是由于乳源副产物中酪蛋白含量下降, 从而导致结合钙含量显著下降。与酪乳相比, 黄油乳清的蛋白质、脂肪含量基本相近但略有增加, 可能是分离工艺造成黄油乳清的蛋白质、脂肪回收率较高。实验结果与前人报道的黄油乳清成分趋势一致^[16-17]。

表 2 黄油乳清、酪乳以及乳基本组分分析

Tab.2 Results of macroscopic components of butter serum, butter milk and milk

项目	蛋白质质量分数/ %	脂肪质量分数/ %	pH 值	总钙质量比/ (mg·kg ⁻¹)	乳糖质量分数/ %	含水率/%
原料乳	(3.03 ± 0.03) ^c	(3.86 ± 0.01) ^c	(6.59 ± 0.01) ^a	(1 105 ± 15) ^a	(5.276 ± 0.011) ^a	(87.93 ± 0.66) ^a
酪乳	(3.16 ± 0.02) ^b	(3.90 ± 0.01) ^b	(6.45 ± 0.01) ^a	(780 ± 21) ^b	(5.134 ± 0.012) ^a	(88.26 ± 0.80) ^a
黄油乳清	(3.26 ± 0.02) ^a	(4.10 ± 0.01) ^a	(6.41 ± 0.01) ^a	(636 ± 24) ^c	(5.161 ± 0.049) ^a	(87.71 ± 0.50) ^a

注: 同列数据不同字母表示差异显著 (P < 0.05)。

2.2 黄油乳清中脂肪球膜上极性脂质组分

2.2.1 黄油乳清中脂肪球膜磷脂种类

在黄油乳清分离过程中, MFGM 组分得到显著富集。为明确黄油乳清和酪乳在 MFGM 磷脂组分上差异, 采用 HPLC - MS 对二者磷脂组成进行分

析。如表 3 所示, 黄油乳清中含磷脂 56 种, 主要包括磷脂酰胆碱 (PC) (包括溶血性磷脂酰胆碱 (LPC) 在内) 20 种、磷脂酰乙醇胺 (PE) 10 种、磷脂酰丝氨酸 (PS) 7 种、磷脂酰肌醇 (PI) 6 种、鞘磷脂 (SM) 13 种。本研究所检测的磷脂种类与文献[18]报道的

表 3 黄油乳清与酪乳的磷脂组分构成

Tab.3 Membrane phospholipid components of butter serum and butter milk

磷脂分子简式	质荷比	保留时间/min	加和离子	黄油乳清	酪乳
PE(16:0/18:2)	716.5	8.58	[M+N] ⁺	检出	检出
PE(16:0/18:1)	718.5	11.82	[M+N] ⁺	检出	检出
PE(16:0/20:4)	740.5	11.83	[M+N] ⁺	检出	检出
PE(18:0/18:2)	744.5	10.02	[M+N] ⁺	检出	检出
PE(18:0/18:1)	746.5	7.80	[M+N] ⁺	检出	检出
PE(16:0/22:6)	764.5	10.37	[M+N] ⁺	检出	检出
PE(18:0/20:4)	768.5	11.75	[M+N] ⁺	检出	检出
PE(18:0/22:6)	792.5	4.56	[M+N] ⁺	检出	检出
LPE(18:0)	482.3	6.99	[M+N] ⁺	检出	检出
LPE(16:0)	454.2	6.45	[M+N] ⁺	检出	检出
PC(16:0/16:1)	732.5	10.31	[M+N] ⁺	检出	检出
PC(16:0/16:0)	734.5	4.49	[M+N] ⁺	检出	检出
PC(16:0/18:2)	758.5	4.51	[M+N] ⁺	检出	检出
PC(16:0/18:1)	760.5	4.24	[M+N] ⁺	检出	检出
PC(16:0/20:5)	780.5	4.41	[M+N] ⁺	检出	检出
PC(16:0/20:4)	782.5	4.21	[M+N] ⁺	检出	检出
PC(16:0/20:3)	784.5	4.39	[M+N] ⁺	检出	检出
PC(18:0/18:2)	786.6	4.55	[M+N] ⁺	检出	检出
PC(18:0/18:1)	788.6	10.27	[M+N] ⁺	检出	检出
PC(16:0/22:6)	806.5	6.68	[M+N] ⁺	检出	检出
PC(18:1/20:4)	808.5	4.64	[M+N] ⁺	检出	检出
PC(18:0/20:4)	810.6	4.48	[M+N] ⁺	检出	检出
PC(18:0/20:3)	812.6	4.43	[M+N] ⁺	检出	检出
PC(18:1/22:6)	832.5	4.74	[M+N] ⁺	检出	检出
PC(18:0/22:6)	834.6	1.01	[M+N] ⁺	检出	检出
PC(18:0/22:5)	836.6	7.10	[M+N] ⁺	检出	检出
LPC(16:0)	496.3	6.48	[M+N] ⁺	检出	检出
LPC(18:2)	520.3	6.28	[M+N] ⁺	检出	检出
LPC(18:1)	522.3	6.64	[M+N] ⁺	检出	检出
LPC(18:0)	524.3	7.01	[M+N] ⁺	检出	检出
SM(16:0/16:0)	677.5	7.88	[M+N] ⁺	检出	检出
SM(18:1/20:0)	759.6	7.20	[M+N] ⁺	检出	检出
SM(18:1/15:0)	689.5	7.74	[M+N] ⁺	检出	检出
SM(18:1/16:0)	703.5	8.32	[M+N] ⁺	检出	检出
SM(18:0/16:0)	705.5	8.87	[M+N] ⁺	检出	检出
SM(18:0/20:0)	761.6	8.92	[M+N] ⁺	检出	检出
SM(18:1/21:0)	773.6	8.30	[M+N] ⁺	检出	检出
SM(18:0/21:0)	775.6	9.50	[M+N] ⁺	检出	检出
SM(18:1/22:0)	787.6	8.88	[M+N] ⁺	检出	检出
SM(18:0/22:0)	789.6	10.14	[M+N] ⁺	检出	检出
SM(18:1/23:1)	799.6	9.40	[M+N] ⁺	检出	检出
SM(18:0/23:0)	801.6	9.55	[M+N] ⁺	检出	检出
SM(18:1/24:1)	813.6	9.98	[M+N] ⁺	检出	未检出
PI(16:0/18:2)	852.5	6.36	[M+N] ⁺	检出	检出
PI(16:0/20:3)	878.5	6.08	[M+N] ⁺	检出	检出
PI(18:0/18:2)	880.5	6.08	[M+N] ⁺	检出	检出
PI(18:0/18:1)	882.6	4.54	[M+N] ⁺	检出	检出
PI(18:0/20:4)	904.5	4.41	[M+N] ⁺	检出	检出
PI(18:0/20:3)	906.6	8.13	[M+N] ⁺	检出	检出
PS(16:0/18:2)	760.5	8.60	[M+N] ⁺	检出	检出
PS(16:0/18:1)	762.5	8.26	[M+N] ⁺	检出	检出
PS(18:1/18:2)	786.5	7.43	[M+N] ⁺	检出	检出
PS(18:0/18:2)	788.5	11.90	[M+N] ⁺	检出	检出
PS(18:0/18:1)	790.5	11.87	[M+N] ⁺	检出	检出
PS(18:1/20:4)	810.5	11.88	[M+N] ⁺	检出	检出
PS(18:0/20:4)	812.5	11.87	[M+N] ⁺	检出	检出

58 种接近。酪乳含磷脂 55 种,较黄油乳清少 1 种,为鞘磷脂 SM(18:1/24:1)。鞘磷脂是脂肪球膜的主要组成部分,具有重要的生理功能^[5]。因此,与酪乳相比,黄油乳清在磷脂构成上更为丰富。

2.2.2 黄油乳清中脂肪球膜磷脂含量

黄油乳清和酪乳的膜磷脂各组分构成及质量浓度如表 4 所示。文献[17]报道原料乳中磷脂质量分数大致为 0.3% 左右,由表 4 可看出,黄油乳清和酪乳的 MFGM 总磷脂含量均得到富集,是原料乳磷脂的 2~3 倍,但彼此差距不大。酪乳、黄油乳清各磷脂组分含量不同,黄油乳清的 PE、SM 含量显著高于酪乳($P<0.05$),但 PI、PS 含量显著低于酪乳($P<0.05$),这与文献[19-21]报道的各组分磷脂含量的趋势一致。

MFGM 的最外层双层膜上存在一个横向分布的区域组织,其中是鞘磷脂和胆固醇构成的液相态有序相区域,这个液相态有序相区域在双层膜界面有对称分布、非对称分布两种形式^[22],而甘油磷脂(PC、PE、PS、PI)在其中呈现无序的分布形式。此外,极性脂质存在不均匀分布情况,PC、SM 位于 MFGM 外表面,PE、PI、PS 位于 MFGM 内表面,位于球膜外侧的磷脂分子在分离时受离心力和温度影响更为显著^[22]。因此,SM 选择性地富集于黄油乳清中,可能与其松散结合于 MFGM 外侧有关,也可能是因为 SM 富含长链饱和脂肪酸、具有更高的刚性有关。在乳脂肪球分离中,富含 SM 的刚性结构域可优先从 MFGM 中脱落,且比酪乳的水相相比,存在于有序相的 SM 对黄油的固体甘油三酯相具有更高的亲和力^[23]。

黄油乳清与酪乳膜磷脂各组分相对含量见图 1(*表示组间差异较显著, $P<0.1$; **表示组间差异显著, $P<0.05$; ***表示组间差异极显著, $P<0.01$; 无*表示组间不存在显著差异, $P>0.1$)。从图 1a 可看出,和酪乳相比,黄油乳清中的 PE、SM 的相对含量高于酪乳,而 PS、PI 的相对含量低于酪乳,与表 4 的质量浓度趋势一致。这可能是由于 PS、PI 位于 MFGM 内层^[5,22]。在搅打过程中脂肪球膜部分破碎,因此 MFGM 内层磷脂得以大量保留于酪乳中,再经过离心等步骤,部分破碎的 MFGM 继续破碎,内层膜磷脂无法保留于黄油乳清中;而 SM 的相对含量显著高于酪乳中的相对含量,猜测可能是因为鞘磷脂位于 MFGM 外层^[5,22],在离心过程中最先脱落下来,因此鞘磷脂相对含量显著高于酪乳。

从图 1b 可以看出,黄油乳清和酪乳均含有 10 种 PE,其中黄油乳清中 PE(18:0/18:1)的相对含量

表 4 黄油乳清与酪乳膜磷脂组分质量浓度

Tab.4 Butter serum and butter milk's relative content of membrane phospholipid fractions

	总磷脂占原料乳	各磷脂质量浓度/(mg·mL ⁻¹)				
	质量分数/%	PE	PC	PI	PS	SM
酪乳	0.834 ± 0.018	0.196 ± 0.004	0.291 ± 0.006	0.108 ± 0.002	0.148 ± 0.002	0.089 ± 0.001
黄油乳清	0.981 ± 0.0145	0.306 ± 0.004	0.289 ± 0.004	0.015 ± 0.001	0.013 ± 0.001	0.352 ± 0.005
差异显著性	*	**	—	**	**	**

注：** 表示组间差异极显著, $P < 0.01$ ；* 表示组间差异显著, $P < 0.05$ ；“—”表示组间不存在显著差异。

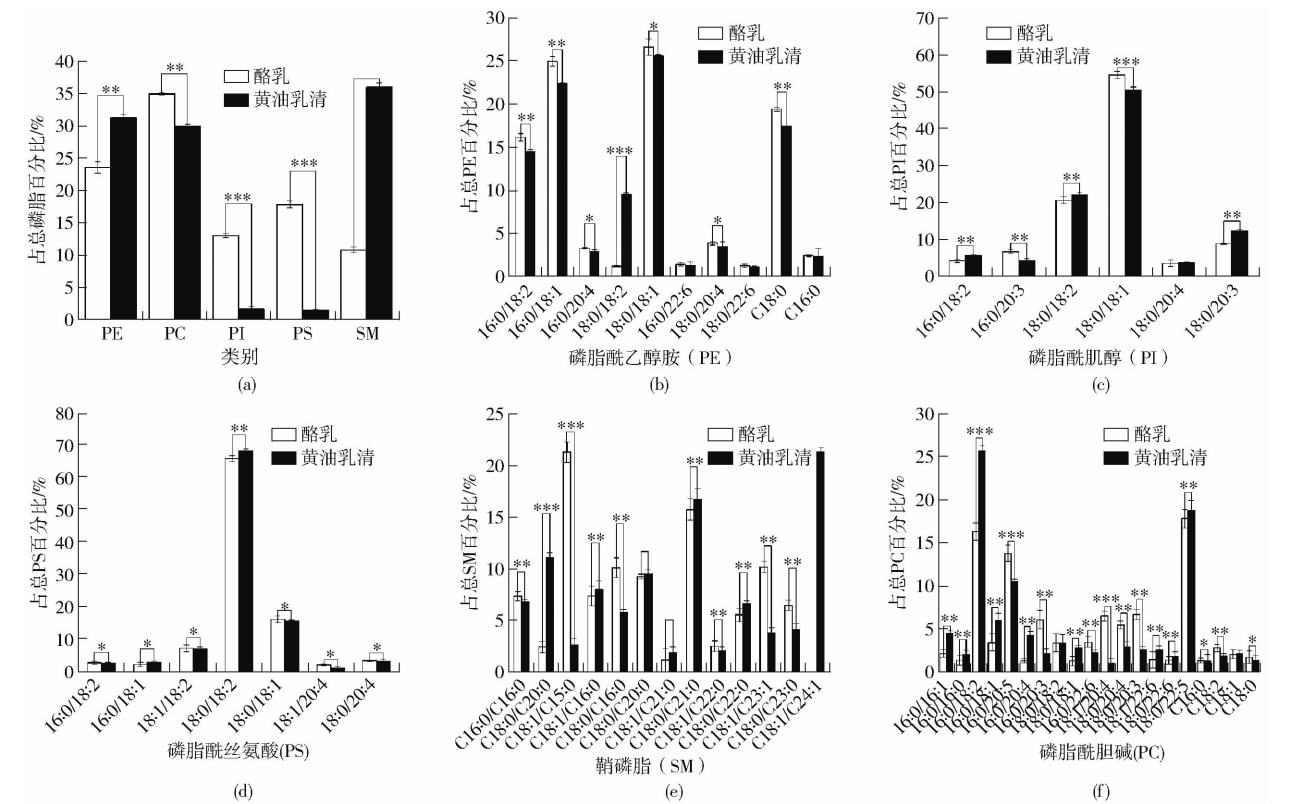


图 1 黄油乳清与酪乳膜磷脂各组分相对含量

Fig. 1 Relative percentages of membrane phospholipids of butter milk and butter serum

极显著高于酪乳 ($P < 0.01$)；此外,黄油乳清与酪乳在 PE (16:0/18:2)、PE (16:0/18:1)、PE (C18:0) 相对含量上差异较为显著 ($P < 0.05$),在 PE (16:0/20:4)、PE (18:0/20:4) 上差异一般显著 ($P < 0.1$),均为黄油乳清中低于酪乳。

由图 1c 可以看出,黄油乳清和酪乳均含有 6 种 PI,其中 PI (18:0/18:1) 在两种乳源副产物中相对含量差异极为显著 ($P < 0.01$),黄油乳清中的相对含量低于酪乳;黄油乳清与酪乳 PI (16:0/18:2)、PI (18:0/18:2)、PI (18:0/20:3)、PI (16:0/20:3) 这 4 种 PI 差异较为显著 ($P < 0.05$),其中黄油乳清中 PI (16:0/18:2)、PI (18:0/18:2)、PI (18:0/20:3) 显著高于酪乳,而 PI (16:0/20:3) 的相对含量低于酪乳。

从图 1d 可以看出,黄油乳清和酪乳均含有 7 种 PS,其中 PS (18:0/18:2) 在两种乳源副产物中的相对含量均超过了 60%,显著高于酪乳 ($P < 0.05$);黄油乳清

与酪乳在其余 6 种 PS 相对含量上都有一定差异 ($P < 0.1$)。

从图 1e 可以看出,黄油乳清含有 13 种 SM,而酪乳仅含有 12 种 SM,其中 SM (C18:1/24:1) 为黄油乳清中特有,且 SM (C18:1/24:1) 占黄油乳清中 SM 的大部分。在共同含有的 12 种 SM 中,黄油乳清中 SM (C18:1/20:0) 的相对含量黄油乳清极显著高于酪乳 ($P < 0.01$),SM (C18:1/21:0) 的相对含量显著高于酪乳 ($P < 0.05$),而 SM (C16:0/16:0)、SM (C18:0/16:0)、SM (C18:1/23:0)、SM (C18:0/23:0) 的相对含量显著低于酪乳 ($P < 0.05$),SM (C18:1/15:0) 的相对含量极显著低于酪乳 ($P < 0.01$)。

从图 1f 可以看出,黄油乳清和酪乳均含有 20 种 PC,其中黄油乳清中大多数 PC 相对含量都是高于酪乳,尤其是黄油乳清中 PC (16:0/18:2) 的相对含量几乎是酪乳中相对含量的 2 倍。

PE(18:0/18:1)、PI(16:0/18:2)、PI(18:0/18:2)、SM(18:1/24:1)这4种脂肪球膜磷脂与文献[15]中报道的结果有相同的趋势,但是PI(16:0/20:3)、SM(C18:1/20:1)、PC(16:0/18:2)这3种MFGM磷脂与文献[18]中报道的结果不完全一致,文献中报道称PI(16:0/20:3)、SM(C18:1/20:1)这两种磷脂含量较高,而PC(16:0/18:2)磷脂含量较低。原因可能是乳源、分离工艺、检测方法等不同,导致磷脂构成的差异。脂肪球膜富含膜磷脂及特异性膜蛋白,对乳脂肪球具有重要的稳定作用^[6],是良好的天然乳化剂。此外,多项证据表明,补充脂肪球膜或来自脂肪球膜的生物活性组分(唾液酸、神经节苷脂、膜磷脂)对大脑和视觉功能的最佳发育至关重要。因此黄油乳清和酪乳中膜磷脂构成的差异,可能会导致黄油乳清和酪乳在乳化性和健康功能上的不同表现。

2.3 黄油乳清中 MFGM 蛋白组分分析

黄油乳清及相同蛋白浓度的脱脂乳、酪乳的S凝胶电泳图如图2(图中第1泳道为Marker;第2泳道为黄油乳清;第3泳道为酪乳;第4泳道为脱脂乳)所示。由图2可看出,脱脂乳的凝胶电泳图主要由乳清中的蛋白构成,包括酪蛋白、β-乳球蛋白和α-乳白蛋白等;而黄油乳清和酪乳的酪蛋白与乳清蛋白浓度显著降低,MFGM蛋白浓度显著增加。

具体而言,黄油乳清和酪乳在脂肪球膜上的蛋白质构成中都显示出了黄嘌呤氧化酶(XO, 145 ku)、嗜乳脂蛋白(BTN, 67 ku)、亲脂素(Adipophlin, 48 ku)、高碘酸希夫糖蛋白(PAS6/7, 40 ku),这些蛋白均为存在于脂肪球膜上的糖蛋白,与前人报道^[17,24]基本一致,但图上未识别出分化抗原簇36(CD36, 66 ku)蛋白,原因可能是CD36蛋白较为紧密地结合在脂肪球膜上^[6],且与BTN的分子

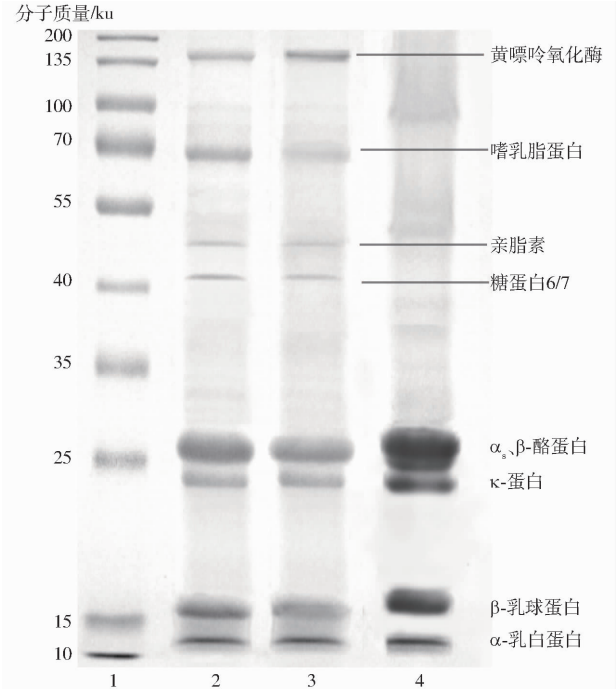


图2 黄油乳清和酪乳的 SDS 凝胶电泳图

Fig.2 SDS-PAGE patterns of butter serum and butter milk

量极为接近,因此在图上未能反映。
进一步利用 Image J 软件结合 SDS 凝胶电泳图,对黄油乳清中的蛋白质进行半定量分析。如表5所示,和酪乳相比,黄油乳清总乳清蛋白和总酪蛋白质量分数为76.70%,低于酪乳的79.05%;总MFGM蛋白质量分数为23.32%,显著高于酪乳的20.95%,这表明与酪乳相比,脂肪球膜蛋白在黄油乳清中进一步得到了富集。这可能是因为,在分离过程中,MFGM蛋白组分通过离心,一部分破碎后富集于酪乳中,而随着分离过程的进行,剩余未破碎的MFGM片段的蛋白组分在无水黄油制备时全部破碎,从而更多地富集在黄油乳清中。

表5 黄油乳清和酪乳蛋白质半定量结果

Tab.5 Semi-quantitative protein for butter serum and butter milk

蛋白种类	占黄油乳清 质量分数/%	占酪乳 质量分数%	占脱脂乳 质量分数/%	黄油乳清半定量/ (g·(100g) ⁻¹)	酪乳半定量/ (g·(100g) ⁻¹)	脱脂乳半定量/ (g·(100g) ⁻¹)
黄嘌呤氧化酶	4.65 ± 0.02	5.89 ± 0.02		0.14 ± 0.01	0.17 ± 0.01	
嗜乳脂蛋白	5.61 ± 0.01	4.36 ± 0.02		0.16 ± 0.02	0.13 ± 0.02	
亲脂素	4.72 ± 0.02	2.60 ± 0.02		0.14 ± 0.03	0.07 ± 0.01	
高碘酸希夫糖蛋白 6/7	8.34 ± 0.03	8.10 ± 0.01		0.25 ± 0.01	0.24 ± 0.01	
总膜蛋白	23.32 ± 0.05	20.95 ± 0.06		0.70 ± 0.09	0.63 ± 0.03	
α _s 、β-酪蛋白	(30.30 ± 0.02) ^b	(30.88 ± 0.02) ^b	(45.32 ± 0.02) ^a	(0.91 ± 0.02) ^B	(0.93 ± 0.02) ^B	(1.37 ± 0.06) ^A
κ-酪蛋白	(9.30 ± 0.03) ^c	(12.83 ± 0.03) ^b	(14.73 ± 0.02) ^a	(0.28 ± 0.01) ^C	(0.38 ± 0.02) ^B	(0.44 ± 0.05) ^A
总酪蛋白	(39.60 ± 0.03) ^c	(43.71 ± 0.01) ^b	(60.05 ± 0.01) ^a	(1.19 ± 0.01) ^C	(1.31 ± 0.02) ^B	(1.81 ± 0.04) ^A
β-乳球蛋白	(23.56 ± 0.02) ^b	(22.84 ± 0.01) ^b	(26.84 ± 0.02) ^a	(0.71 ± 0.01) ^B	(0.69 ± 0.01) ^B	(0.81 ± 0.04) ^A
α-乳白蛋白	13.54 ± 0.01	12.50 ± 0.01	13.11 ± 0.02	0.41 ± 0.01	0.37 ± 0.01	0.39 ± 0.05
总乳清蛋白	(37.10 ± 0.08) ^b	(35.34 ± 0.08) ^c	(39.95 ± 0.05) ^a	1.12 ± 0.04	1.06 ± 0.05	1.20 ± 0.08

注:同行数据不同字母表示组间差异显著(P<0.05)。

MFGM 蛋白具有乳化作用^[25-26],文献[27]认为,大量的 MFGM 特异性蛋白如 XDH/XO 等是酪乳乳化性能良好的原因^[25,28],使用膜蛋白质作为乳化剂的乳液比用磷脂作为乳化剂的乳液更加稳定^[27]。因此,黄油乳清中较高的脂肪球膜蛋白含量预示着较高的乳化性。

2.4 添加黄油乳清对乳液乳化特性的影响

膜磷脂、膜蛋白含量的不同对乳液乳化性会有不同的影响,因此设置不同浓度,并以脱脂乳制备的乳液为基准进行实验。由图 3(图中不同字母表示组间差异显著($P < 0.05$))可以看出,添加黄油乳清和酪乳都使脱脂乳的乳化活性和乳化稳定性显著提高。和酪乳乳液相比,同添加量下黄油乳清乳液的乳化活性和乳化稳定性显著增加。这可能是由于黄油乳清中与酪乳中 MFGM 组分差异导致。黄油乳清在膜蛋白总量上显著高于酪乳,且在膜磷脂总量上也高于酪乳。因此可能会导致两者在乳化特性上的差异。球膜磷脂一方面能够有效防止水油聚集,能良好地链接水相和油相,对乳脂肪球具有重要的稳定作用;另一方面又因带有负电荷,可以通过静电和胶体间的相互作用,可以降低油-水界面的张力,从而保证脂肪球在分散体系的稳定性。与球膜磷脂类似,脂肪球膜蛋白同样具有乳化作用,可通过在液滴周围形成粘弹

性吸附层,起到保护涂层的作用,并通过空间稳定来延缓液滴的合并^[7]。因此脂肪球膜蛋白与脂肪球膜磷脂协同使用可显著增强用脂肪球膜制备的乳液的稳定性。因此 MFGM 组分中磷脂和蛋白种类、含量的不同,使得同浓度下黄油乳清和酪乳乳化活性和乳化稳定性存在差异。

如图 3 所示,随着黄油乳清在乳液中的浓度增大,乳化活性呈现先增大后减小的趋势,而随着酪乳在溶液中的浓度增大,乳化活性也随之增大,当酪乳添加量达 5% 时,乳化活性指数达到最大,达到 $1.950 \text{ m}^2/\text{g}$ 。这可能是由于随着黄油乳清浓度的增加,MFGM 磷脂、蛋白聚集在溶液中,蛋白质分子彼此相互连接在一起形成胶束,有助于增强乳化性,但当溶液达到胶束的临界浓度时,溶液的乳化活性和乳化稳定性不再升高,甚至出现下降趋势^[29]。当黄油乳清添加量为 3% 时,达到最大活性指数 $2.682 \text{ m}^2/\text{g}$ 。对于乳化稳定性来说,随着酪乳、黄油乳清浓度的增大,乳液的乳化稳定性也随之增大,在 5% 时,二者乳化稳定性指数均达到最大,酪乳溶液为 89.9%,略低于黄油乳清溶液的 91.9%。

3 结束语

分析了黄油乳清的基本组分和脂肪球膜源组分构成,并评价了黄油乳清的乳化特性。结果表明,黄油乳清的基本组分与酪乳接近,但在 MFGM 源组分构成上更为丰富。黄油乳清中脂肪球膜磷脂种类较酪乳多 1 种,为 SM(18:1/24:1),且其中鞘磷脂、磷脂酰乙醇胺的比例显著高于酪乳。此外,黄油乳清中的 MFGM 蛋白种类与酪乳一致,但占比较高,质量分数达到 23.32%。将黄油乳清与酪乳添加至脱脂乳中制备乳液,显著提高了脱脂乳的乳化性,其中添加 3% 黄油乳清时乳液的乳化活性、乳化稳定性达到最大,显著高于酪乳乳液,黄油乳清与酪乳乳化特性的差异可能与球膜组分构成有关。研究明确了黄油乳清中的功能活性组分构成及乳化特性,为拓展乳源副产物黄油乳清的应用途径提供了理论依据。

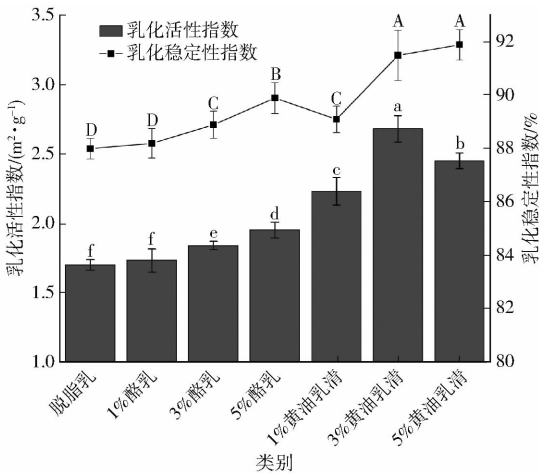


图 3 黄油乳清和酪乳的添加对乳液乳化性的影响
Fig.3 Effect of butter serum and butter milk on emulsification of emulsion

参 考 文 献

[1] LILI Z, RAN F, FAZHENG R, et al. Addition of buttermilk improves the flavor and volatile compound profiles of low-fat yogurt [J]. LWT, 2018, 98:9-17.

[2] LAMBERT S, LECONTE N, BLOT M, et al. The lipid content and microstructure of industrial whole buttermilk and butter serum affect the efficiency of skimming[J]. Food Research International, 2016, 83: 121-130.

[3] 康巧娟, 华家才, 李琳瑶. 乳脂肪球膜(MFGM)的研究进展及其在婴幼儿配方奶粉中应用[J]. 现代食品, 2021(18): 31-37.

[4] CALVO M V, MARTÍN-HERNÁNDEZ M C, GARCÍA-SERRANO A, et al. Comprehensive characterization of neutral and polar lipids of buttermilk from different sources and its milk fat globule membrane isolates [J]. Journal of Food Composition and

Analysis, 2020, 86: 103386.

- [5] 李晓东, 潘悦, 刘璐, 等. 乳脂肪球膜的特性, 开发及在模拟母乳脂肪球结构中的应用[J]. 食品科学, 2021, 42(21): 372–379.
- LI Xiaodong, PAN Yue, LIU Lu, et al. Characteristics and development of milk fat globule membrane and its applications in simulating human milk fat globule structure[J]. Food Science, 2021, 42(21): 372–379. (in Chinese)
- [6] DE SILVA R C, COLLERAN H L, IBRAHIM S A. Milk fat globule membrane in infant nutrition: a dairy industry perspective[J]. Journal of Dairy Research, 2021, 88(1): 105–116.
- [7] SHIMIZU M, YAMAUCHI K, KANNO C. Effect of proteolytic digestion of milk fat globule membrane proteins on stability of the globules[J]. Milchwissenschaft, 1980, 35(1): 9–12.
- [8] TIMBY N, ADAMSSON M, DOMELLÖF E, et al. Neuro development and growth until 6.5 years of infants who consumed a low-energy, low-protein formula supplemented with bovine milk fat globule membranes: a randomized controlled trial[J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 2021, 113(3): 586–592.
- [9] AMBROZEJ D, DUMYCZ K, DZIECHCIARZ P, et al. Milk fat globule membrane supplementation in children: systematic review with Meta-analysis[J]. Nutrients, 2021, 13(3): 714.
- [10] GB 5009.6—2016 食品安全国家标准 食品中脂肪的测定[S]. 2016.
- [11] GB 5009.268—2016 食品安全国家标准 食品中多元素的测定[S]. 2016.
- [12] GB 5009.7—2016 食品安全国家标准 食品中还原糖的测定[S]. 2016.
- [13] FOLCH J, LEES M, SLOANE STANLEY G H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues[J]. J. Biol. Chem., 1957, 226(1): 497–509.
- [14] 何扬波, 龙明秀, 刘宁. UPLC–Triple–TOF–MS/MS 法分析中国东北地区人乳磷脂的组成[J]. 现代食品科技, 2017, 33(7): 270–279.
- [15] PEARCE K N, KINSELLA J E. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique[J]. J. Agric. Food Chem., 1978, 26(3): 716–723.
- [16] SRINIVASAN M, LUCEY J A. Effects of added plasmin on the formation and rheological properties of rennet-induced skim milk gels[J]. Journal of Dairy Science, 2002, 85(5): 1070–1078.
- [17] ROMBAUT R, DEJONCKHEERE V, DEWETTINCK K. Microfiltration of butter serum upon casein micelle destabilization[J]. Journal of Dairy Science, 2006, 89(6): 1915–1925.
- [18] CASTRO-GÓMEZ P, MONTERO O, FONTECHA J. In-depth lipidomic analysis of molecular species of triacylglycerides, diacylglycerides, glycerophospholipids, and sphingolipids of buttermilk by GC–MS/FID, HPLC–ELSD, and UPLC–QToF–MS[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18(3): 605.
- [19] BRITTEN M, LAMOTHE S, ROBITAILLE G. Effect of cream treatment on phospholipids and protein recovery in butter-making process[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2008, 43(4): 651–657.
- [20] SODINI I, MORIN P, OLABI A, et al. Compositional and functional properties of buttermilk: a comparison between sweet, sour, and whey buttermilk[J]. Journal of Dairy Science, 2006, 89(2): 525–536.
- [21] MORIN P, POULIOT Y, JIMÉNEZ-FLORES R. A comparative study of the fractionation of regular buttermilk and whey buttermilk by microfiltration[J]. Journal of Food Engineering, 2006, 77(3): 521–528.
- [22] LOPEZ C, MAILLARD M B, BRIARD-BION V, et al. Lipolysis during ripening of emmental cheese considering organization of fat and preferential localization of bacteria[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2006, 54(16): 5855.
- [23] LOPEZ C, BLOT M, BRIARD-BION V, et al. Butter serums and buttermilks as sources of bioactive lipids from the milk fat globule membrane: differences in their lipid composition and potentialities of cow diet to increase n–3 PUFA[J]. Food Research International, 2017, 100: 864–872.
- [24] HOLZMÜLLER W, KULOZIK U. Quantification of MFGM proteins in buttermilk and butter serum by means of a stain free SDS–PAGE method[J]. Journal of Food Composition & Analysis, 2016, 49: 102–109.
- [25] 罗洁. 乳脂肪球的聚集特性与机制研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2015.
- [26] PHAN T T Q, LE T T, VAN DE WALLE D, et al. Combined effects of milk fat globule membrane polar lipids and protein concentrate on the stability of oil-in-water emulsions[J]. International Dairy Journal, 2016, 52: 42–49.
- [27] PHAN T, MOENS K, LE T T, et al. Potential of milk fat globule membrane enriched materials to improve the whipping properties of recombined cream[J]. International Dairy Journal, 2014, 39(1): 16–23.
- [28] VANDERGHEM C, BODSON P, DANTHINE S, et al. Milk fat globule membrane and buttermilks: from composition to valorization[J]. Biotechnologie Agronomie Societe Et Environnement, 2010, 14(3): 485–500.
- [29] 胡坤, 方少瑛, 王秀霞, 等. 蛋白质凝胶机理的研究进展[J]. 食品工业科技, 2006, 27(6): 202–205.