

低胆固醇牛奶的研制

苗君莅, 于 鹏, 肖 杨, 任 璐, 蔡 涛, 王 辉

(光明乳业研究院(乳业生物技术国家重点实验室), 上海 200436)

摘 要: 采用 β -环糊精降低牛奶中的胆固醇含量。在反应温度、反应时间、离心转速、 β -环糊精添加量的单因素实验基础上, 采用二次回归正交旋转组合的实验设计, 得到最佳的工艺条件为: 反应温度 60°C , 反应时间 60min , 离心转速 12000r/min , β -环糊精添加量 $2\%(\text{w/w})$ 。在此条件下制得的牛奶胆固醇脱除率最高, 胆固醇含量仅 $0.18\text{mg}/100\text{g}$ 牛奶(低于GB/T 22220-2008的最低检出限), 且 β -环糊精残留量很低。

关键词: 低胆固醇, 牛奶, 研制

Development of on low cholesterol milk

MIAO Jun-li, YU Peng, XIAO Yang, REN Lu, CAI Tao, WANG Hui

(State Key Laboratory of Dairy Biotechnology, Technology Center Bright Dairy & Food Co., Ltd., Shanghai 200436, China)

Abstract: This study was designed to develop β -cyclodextrin(β -CD) and determine the optimum conditions of different factors(mixing temperature, mixing time and centrifugal speed) on cholesterol reduction from milk. By dual quadratic rotary regression orthogonal design experiment, the optimum parameters were mixing temperature 60°C , mixing time 60min , centrifugal speed 12000r/min , and β -CD addition $2\%(\text{w/w})$. Under this condition, cholesterol removal rate was highest, the cholesterol content was $0.18\text{mg}/100\text{g}$ and below the detection limit and β -CD residue was very low.

Key words: low cholesterol; milk; development

中图分类号: TS252.42

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2013)20-0241-05

人体血液中胆固醇含量的增加与冠心病发病率的升高密切相关, 过多胆固醇的堆积会导致多种心血管疾病^[1]。虽然目前市面上有许多降低胆固醇的药物, 但人们希望从饮食做起、通过非药物途径达到降低胆固醇的目的。

人体每天胆固醇的摄入量上限值为 300mg (相当于一个鸡蛋黄的胆固醇含量), 对于高胆固醇患者而言, 每日摄入胆固醇含量不宜超过 200mg 。牛奶(按脂肪含量 $3.2\text{g}/100\text{g}$ 计)中的胆固醇含量约为 $15\text{mg}/100\text{g}$ ^[2], 如果每人每天喝 250g 牛奶, 胆固醇的摄入量已占最高值的近 20% 。而脱脂牛奶虽然随着脂肪的去除, 基本不含有胆固醇, 但存在的风味缺陷, 是众多消费者不愿接受的。因此, 在不损失口味的情况下, 生产一款真正的低胆固醇牛奶, 意义重大。

目前国内外有关降低食品中胆固醇含量的报道, 多为采用超临界萃取法^[3]、(接枝) β -环糊精法^[4-5]、胆固醇氧化酶法^[6]等来降低猪油、蛋黄、乳脂肪等动物性食品中的胆固醇含量, 胆固醇脱除率均在 80% 左右, 且 β -环糊精残留量较高。而对于降低牛乳中的胆固醇却没有报道。本文采用食用级 β -环糊精降低牛奶中的胆固醇, 其成本低廉, 胆固醇去除率高, β -环糊精脱除后残留量极低。因此, 为低胆固醇牛奶

的问世奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

生牛乳(胆固醇含量 $15\sim 18\text{mg}/100\text{g}$) 光明乳业; 食用级 β -环糊精 欣荣贸易; 无水乙醚、石油醚(沸程 $30\sim 60^{\circ}\text{C}$)、硫酸铁二铵、冰醋酸、胆固醇标准品、硫酸铜、次甲基蓝、酒石酸钾钠、亚铁氰化钾 均为分析纯, 国药化学。

ND-2000C NanoDrop型微量分光光度计 美国 Thermo Fisher Scientific公司; C32M020279D型离心机

美国热电Thermo; SY0201型高效液相色谱仪 日本岛津; HH-60型恒温烘箱 常州国华电器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 低胆固醇牛奶的制备 牛奶均质后加入 β -环糊精, 保温搅拌一段时间, 离心去除 β -环糊精^[7], 牛奶升温、均质、杀菌、灌装。

1.2.2 胆固醇标准曲线的绘制 根据GB/T 5009.128-2003^[8]方法, 绘制胆固醇标准曲线。

1.2.3 牛奶中胆固醇含量的测定 根据GB/T 22220-2008^[9]和GB/T 5009.128-2003^[8]测定牛奶中胆固醇含量。

1.2.4 胆固醇脱除率 计算公式如下:

胆固醇脱除率($\%$) = (牛奶中原胆固醇含量 - 脱除后牛奶中胆固醇含量) / 牛奶中原胆固醇含量 $\times 100$

其中, 脱除后牛奶中胆固醇含量由GB/T 5009.128-2003测定。

收稿日期: 2013-05-09

作者简介: 苗君莅(1979-), 女, 硕士研究生, 工程师, 研究方向: 乳品研究与开发。

1.2.5 β -环糊精残留量测定 参照分光光度计法测定 β -环糊精残留量^[10]。

1.2.6 反应温度对牛奶中胆固醇脱除率的影响 在100g牛奶中加入1% (w/w) 的 β -环糊精, 分别于30、45、60、75℃下保温搅拌15min, 8000r/min离心20min, 测定牛奶的胆固醇脱除率。

1.2.7 搅拌时间对牛奶中胆固醇脱除率的影响 在100g牛奶中加入1% (w/w) 的 β -环糊精, 在60℃下分别搅拌15、30、45、60、75min, 8000r/min离心20min, 测定牛奶的胆固醇脱除率。

1.2.8 离心转速对牛奶中胆固醇脱除率的影响 在100g牛奶中加入1% (w/w) 的 β -环糊精, 在60℃下保温搅拌60min, 分别在4000、6000、8000、10000r/min的条件下离心20min, 测定牛奶的胆固醇脱除率。

1.2.9 β -环糊精添加量对牛奶中胆固醇脱除率的影响 分别加入1%、2%、3%、4% (w/w) 的 β -环糊精至100g牛奶中, 60℃下保温搅拌60min, 10000r/min离心20min, 测定牛奶的胆固醇脱除率。

1.2.10 脱除胆固醇的工艺条件优化 上述单因素的实验的基础上, 按三因素二次回归正交组合设计对脱除胆固醇的工艺条件进行优化, 优化的因素水平表如表1所示, 进而得出最优方案, 用SAS软件对结构进行统计分析。

表1 响应面分析因素水平表

Table 1 Analytical factors and levels for RSA

因素	水平		
	-1	0	1
A 反应温度(℃)	50	60	70
B 搅拌时间(min)	45	60	75
C 离心转速(r/min)	8000	10000	12000

2 结果与讨论

食用级 β -环糊精是葡萄糖基转移酶作用于淀粉的产物, 由7个 α -(1,4)糖苷键链接成环形的结构。 β -环糊精具有一个外环亲水、内环疏水且有一定尺寸的立体手性空腔, 其环状结构和空腔可以包络不同的化合物。包合物的形成受到时间、反应温度、搅拌(或超声振荡)时间、反应物浓度等外在条件的影响^[11]。

2.1 胆固醇标准曲线

根据GB/T 5009.128-2003, 得到的胆固醇标准曲线见图1。

2.2 反应温度对牛奶中胆固醇脱除率的影响

由图2可见, 在45~60℃的反应温度下, 牛奶中胆固醇脱除率随反应温度的上升而增加, 当温度超过60℃时, 脱除率逐渐下降。这也许由于温度过高时, 脂肪的聚集速度迅速增加, 致使 β -环糊精与脂肪的接触几率减少, 从而导致包合脱除率降低。

2.3 搅拌时间对牛奶中胆固醇脱除率的影响

由图3可见, 胆固醇脱除率随搅拌时间的增加而上升。当搅拌时间达到60min时, 胆固醇脱除率超过95%, 说明充分包合胆固醇需要一定的时间。但当时

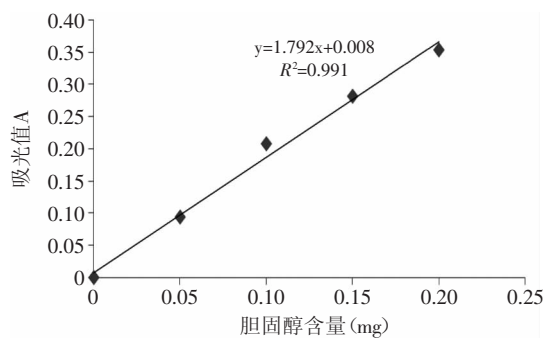


图1 胆固醇标准曲线图

Fig.1 Standard sorption curve of cholesterol

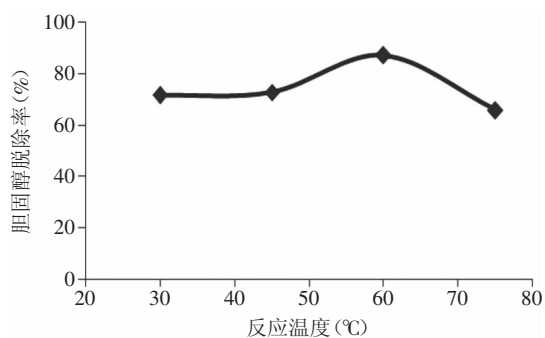


图2 反应温度对胆固醇脱除率的影响

Fig.2 Influence of temperature on the cholesterol removal rate

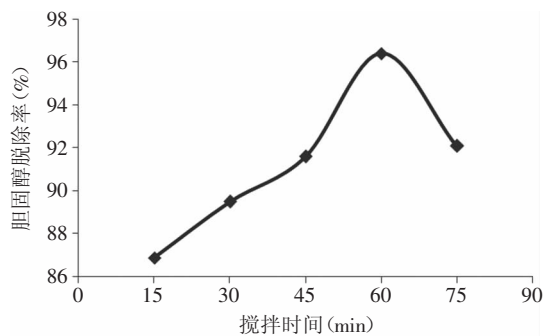


图3 搅拌时间对胆固醇脱除率的影响

Fig.3 Influence of mixing time on the cholesterol removal rate

间无限延长时, 由于搅拌剪切作用, 使得 β -环糊精结构受到一定破坏, 胆固醇再次释放出来, 从而脱除率有所下降。

2.4 离心转速对牛奶中胆固醇脱除率的影响

离心操作使 β -环糊精沉降的同时, 促进了对胆固醇的包合, 因此, 如图4所示, 当离心速率6000~10000r/min时, 胆固醇脱除率逐步升高, 当转速为10000r/min时, 胆固醇脱除率达到97.4%, 之后便趋于平稳。

2.5 β -环糊精添加量对牛奶中胆固醇脱除率的影响

由图5可见, 当 β -环糊精添加量在1%~2%时, 胆固醇脱除率有所增加, 从97.4%上升至99%; 当添加量大于2%时, 脱除率几乎没有变化, 但总体差异不大。因此, 基于 β -环糊精残留量及成本的考虑, β -环糊精添加量2%为宜。

2.6 脱除胆固醇的工艺条件优化

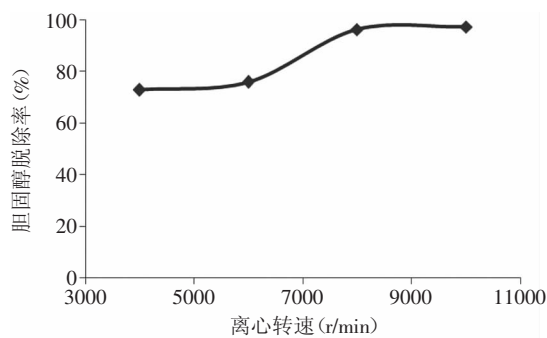


图4 离心转速对胆固醇脱除率的影响

Fig.4 Influence of centrifugation rate on the cholesterol removal rate

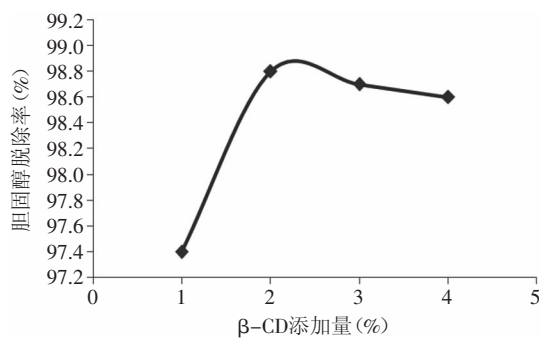


图5 β -环糊精添加量对胆固醇脱除率的影响

Fig.5 Influence of β -CD dosage on the cholesterol removal rate

从上述单因素实验结果可以看出,反应温度、搅拌时间、离心转速对于脱除牛奶中胆固醇具有较大的影响,而 β -环糊精添加量影响不大。按照响应面优化实验设计,优化实验结果如表2所示。

2.6.1 三因素二次旋转回归分析 经回归拟合后,胆固醇脱除率对响应值的影响可用以下函数表示:

表2 响应面优化实验结果

Table 2 Program and experimental results of RSA

实验号	A	B	C	Y 胆固醇脱除率 (%)
1	-1	1	0	83.5
2	1	0	1	86.7
3	0	1	-1	91.8
4	0	1	1	96.6
5	0	-1	1	98.7
6	-1	0	-1	89.9
7	0	0	0	98.5
8	0	0	0	98.8
9	0	-1	-1	96.5
10	1	1	0	81.0
11	1	0	-1	85.0
12	0	0	0	99.0
13	-1	0	1	90.1
14	0	0	0	98.9
15	0	0	0	99.1
16	1	-1	0	84.0
17	-1	-1	0	83.6

$$Y = 98.86 - 1.30A - 1.24B + 1.11C - 0.73AB + 0.38AC + 0.65BC - 11.91A^2 - 3.93B^2 + 0.97^2$$

其响应面二次模型方差分析表见表3。

表3 响应面方差分析表

Table 3 Results of variance analysis

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	Pr>F	
模型	724.48	9	80.50	56.46	<0.0001	显著
A	13.15	1	13.15	9.48	0.0178	
B	12.25	1	12.25	8.59	0.0220	
C	9.90	1	9.90	6.95	0.0336	
AB	2.10	1	2.10	1.47	0.2640	
AC	0.56	1	0.56	0.39	0.5498	
BC	1.69	1	1.69	1.19	0.3123	
A ²	596.75	1	596.75	418.59	<0.0001	
B ²	65.03	1	65.03	45.62	0.0003	
C ²	3.96	1	3.96	2.78	0.1395	
误差	9.98	7	1.43			
失拟项	9.77	3	3.26	61.43	0.0008	显著
纯误差	0.21	4	0.053			
所有项	734.46	16				

由表3可见,方程具有显著性,可用此方程分析反应温度、搅拌时间、离心转速对于胆固醇脱除率的影响。回归模型的 $R^2=0.9864$,说明模型的拟合度较好,响应值的98.64是由所选变量引起,采用F检验方法对模型的显著性进行分析。F值为56.46, p 值<0.0001,模型相当显著。由表3的分析结果可知,各因素对胆固醇脱除率影响的大小顺序为:A>B>C,说明反应温度对于胆固醇脱除率的影响最为明显,其次为搅拌时间,最后是离心转速,而三因素之间的交互作用影响并不显著。

2.6.2 反应温度、搅拌时间、离心转速单因子及交互作用对胆固醇脱除率的影响 通过方程可以得出反应温度、搅拌时间、离心转速单因子及其交互作用对胆固醇脱除率的影响图(见图6~图8)。

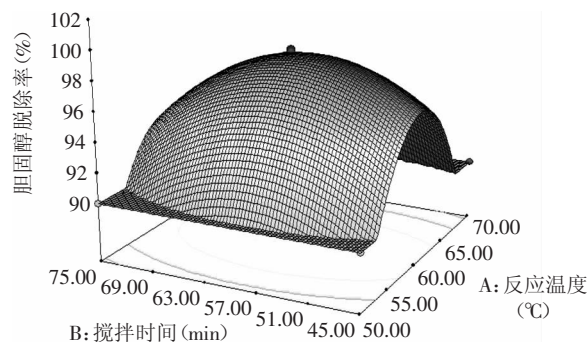


图6 反应温度和搅拌时间的响应面图

Fig.6 Responsive surfaces of temperature and mixing time

当离心转速一定时,胆固醇脱除率与反应温度-搅拌时间呈二次曲线相关的关系。由图6可见,胆固醇脱除率随反应温度的升高而升高,其增加趋势十分明显。60℃时达到最高点,当温度超过60℃时,胆

固醇脱除率随之下降。胆固醇脱除率随搅拌时间的增加而升高,搅拌时间到达60min时,胆固醇脱除率最高,搅拌时间越长,脱除率也会受影响而随之下落。此结果与单因素实验相符,说明反应温度和搅拌时间都有最高点,只有适当条件的配合下,才能使脱除率达到最高。

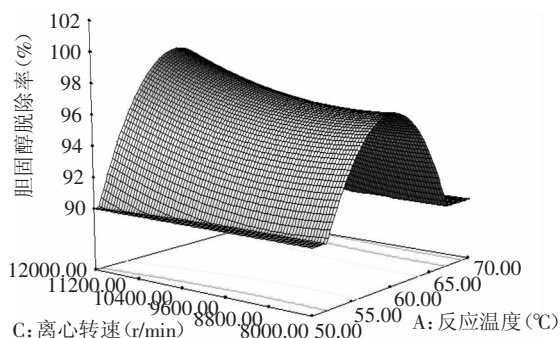


图7 反应温度和离心转速的响应面图

Fig.7 Responsive surfaces of temperature and centrifugation rate

当搅拌时间一定时,胆固醇脱除率与反应温度-离心转速呈二次曲线相关的关系。如图7所示,胆固醇脱除率随反应温度的升高而升高,60℃达到最大值,当温度大于60℃时,胆固醇脱除率开始下降。胆固醇脱除率随离心转速的加大而逐渐升高。离心转速达到10000r/min时,脱除率超过95%。

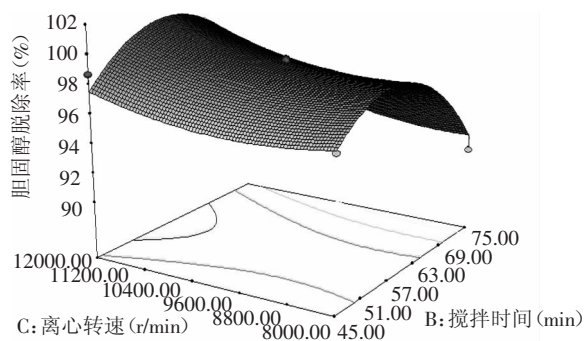


图8 搅拌时间和离心转速的响应面图

Fig.8 Responsive surfaces of mixing time and centrifugation rate

当反应温度一定时,胆固醇脱除率与搅拌时间-离心转速呈二次曲线相关的关系。如图8所示,胆固醇脱除率随离心转速的升高而逐渐升高;胆固醇脱除率随搅拌时间的增加而升高,搅拌时间到达60min时,胆固醇脱除率最高,搅拌时间继续增加,脱除率也会受影响而随之下落。

2.6.3 优化设计结果 通过响应面优化实验,采用SAS系统计算进行联合求解,得到的优化条件为:反应温度59.63℃,反应时间58.94min,离心转速12000r/min,β-环糊精添加量2%。考虑实际操作性,修正条件为:反应温度60℃,反应时间60min,离心转速12000r/min;此条件下制得的牛奶胆固醇脱除率预测值为98.854%,经实验后实测值为99.10%。

2.7 牛奶中胆固醇含量的测定

根据工艺优化结果,制得的低胆固醇牛奶,参照GB/T 22220-2008(最低检出限为2.6mg/100g),对其中的胆固醇含量进行测定。其色谱图和测定结果如下:

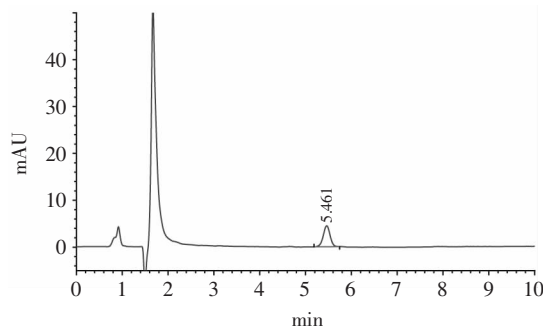


图9 胆固醇标样图谱

Fig.9 Chromatograms of cholesterol standards

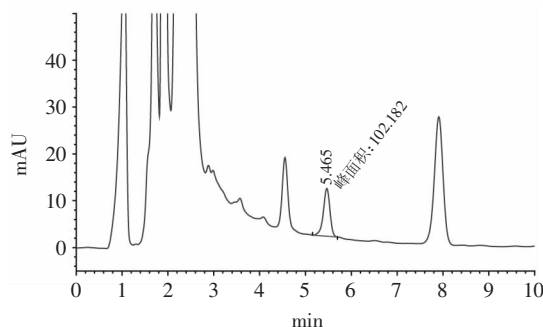


图10 样品峰值图

Fig.10 Chromatograms of sample

以上结果说明,当β-环糊精法与牛奶在60℃下搅拌反应60min后,12000r/min离心脱除β-环糊精,牛奶中的胆固醇含量位于检出限以下。由此可见,通过β-环糊精法降低牛奶中的胆固醇含量效果明显。

2.8 β-环糊精残留量的测定

将2%的β-环糊精加入牛奶中,以上述优化工艺对牛奶中的胆固醇进行脱除,反应完毕后12000r/min离心脱除,测得的β-环糊精残留量为2.2%。此残留量远低于之前报道^[12]中采用β-环糊精脱除食品中胆固醇的β-环糊精残留。

3 结论

本实验将β-环糊精直接加入牛奶中,对胆固醇进行脱除。分别研究了反应温度、反应时间、离心转速、β-环糊精添加量对胆固醇脱除率的影响,并在单因素实验基础上,采用二次回归正交旋转组合的实验设计,得到最佳的工艺条件为:反应温度60℃,反应时间60min,离心转速12000r/min,β-环糊精添加量2%。在此条件下制得的牛奶胆固醇脱除率达到98%以上,且在检测限以下,β-环糊精残留量2.2%。此研究为低胆固醇牛奶的生产奠定了基础。

参考文献

- [1] 廖端芳,唐朝克. 胆固醇逆向转运基础与临床[M]. 北京:科学出版社,2009:22-23.
- [2] 郭本恒. 液态奶[M]. 北京:化学工业出版社,2004.

- [3] 张佳程, 骆承庠, 卢明春, 等. 超临界二氧化碳的萃取压力和时间对蛋黄粉中胆固醇脱除的影响[J]. 食品科学, 1999(6):38-42.
- [4] 张峰, 张晖, 郭晓娜, 等. 接枝 β -环糊精米糠纤维脱除猪油中的胆固醇[J]. 中国油脂, 2008, 33(7):17-20.
- [5] S H Kim, J Ahn, H S Kwak. Crosslinking of β -cyclodextrin on cholesterol removal from milk[J]. Arch Pharm Res, 2004, 27(11):1183-1187.
- [6] 马熟军, 王素英. 胆固醇氧化酶法脱除食品中胆固醇的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2005, 26(3):36-39.
- [7] H S Kwak, S H Kim, J H Kim, et al. Immobilized β -cyclodextrin as a simple and recyclable method for cholesterol removal in milk[J]. Arch Pharm Res, 2004, 27(8):873-877.

- [8] 中华人民共和国卫生部 中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009.128-2003. 食品中胆固醇的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [9] 中华人民共和国卫生部 中国国家标准化管理委员会. GB/T 22220-2008. 食品中胆固醇的测定高效液相色谱法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [10] 刘燕华. 分光光度法测定 β -环状糊精[J]. 日用化学工业, 1990(6):35-37.
- [11] 曹劲松, 赵谋明, 彭志英. 用 β -环状糊精包合法脱除食品胆固醇的工艺探讨[J]. 食品科学, 1996, 17(1):31-36.
- [12] 吕春, 耿倩, 孙健, 等. β -环状糊精法去除稀奶油中胆固醇的研究[J]. 中国乳业工业, 2005, 33(3):25-28.

(上接第229页)

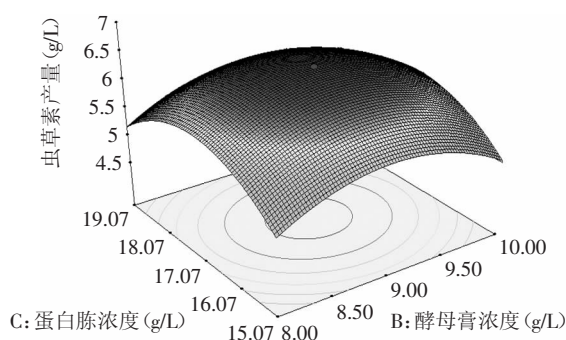


图8 酵母膏浓度与蛋白胨浓度对虫草素产量的响应面图
Fig.8 Response surface graph of cordycepin production by *C. militaris* 14014 as a function of yeast extract and tryptone concentration

2.7 验证实验

为检验响应面法回归方程预测是否可靠, 采用上述最佳条件进行发酵培养。发酵培养基组成和培养条件为: 葡萄糖60g/L, KH_2PO_4 0.7g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.7g/L, 酵母膏9.00g/L, 蛋白胨17.10g/L, 初始pH6.3, 温度27.1℃。所得虫草素产量为6.50g/L, 与方程预测值相比, 相对误差在1%以内。这表明响应面法拟合的回归方程可以用于预测实际的虫草素产量。

3 结论

本文分别研究了接种与发酵培养基组成、发酵条件对蛹虫草发酵产虫草素的影响, 并采用响应面实验设计方法对发酵培养基进行了优化, 通过Plackett-Burman设计从影响蛹虫草产虫草素培养基中筛选出了温度、酵母膏和蛋白胨三个重要因素, CCD实验设计实现了条件的优化。最终得到蛹虫草静置发酵产虫草素的最佳培养基组成和培养条件为: 葡萄糖60g/L, KH_2PO_4 0.7g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.7g/L, 酵母膏9.00g/L, 蛋白胨17.10g/L, 初始pH6.30, 温度27.1℃。在优化条件下, 虫草素产量达到6.50g/L, 比优化前提高了近2倍。与国内最优水平相比(2.05g/L^[11]), 也提高了2倍多; 虽较国外最优水平(8.57g/L^[12])还有一段距离。但是, 本研究达到虫草素最高产量仅需21d, 而国外达到最优水平需要发酵30d, 因此本研究虫草素的生产效率还是具有一定优势的。

参考文献

- [1] Ng TB, Wang HX. Pharmacological actions of *Cordyceps*, a prized folk medicine[J]. J Pharm Pharmacol, 2005, 57(12):1509-1519.
- [2] Paterson RRM. *Cordyceps* -A traditional Chinese medicine and another fungal therapeutic biofactory? [J]. Phytochemistry, 2008, 69(7):1469-1495.
- [3] 汤佳鹏, 柳依婷, 赵强, 董伟. 虫草菌素生物合成的研究进展[J]. 轻工科技, 2012(6):16-18.
- [4] 莫红丽. 吡啶橙诱导提高蛹虫草虫草素含量的研究[J]. 广东蚕业, 2011, 45(2):23-26.
- [5] Das SK, Masuda M, Hatashita M, Sakurai A, et al. Optimization of culture medium for cordycepin production using *Cordyceps militaris* mutant obtained by ion beam irradiation[J]. Process Biochem, 2010, 45(1):129-132.
- [6] Xie CY, Liu GX, Gu ZX, et al. Effects of culture conditions on mycelium biomass and intracellular cordycepin production of *Cordyceps militaris* in natural medium[J]. Ann Microbiol, 2009, 59(2):293-299.
- [7] Mao XB, Eksriwong T, Chauvatcharin S, Zhong JJ. Optimization of carbon source and carbon/nitrogen ratio for cordycepin production by submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris* [J]. Process Biochem, 2005, 40(5):1667-1672.
- [8] 陈自宏, 虞泓, 曾文波, 等. 拟黑虫草菌cnig-56固体发酵生产虫草素工艺[J]. 食用菌学报, 2010, 17(1):80-82.
- [9] 汤佳鹏, 柳依婷, 赵强, 等. 蛹虫草发酵产虫草素的培养条件研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(21):181-183, 187.
- [10] Haider MA, Pakshirajan K. Screening and optimization of media constituents for enhancing lipolytic activity by a soil microorganism using statistically designed experiments[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2007, 141(2-3):377-390.
- [11] 刘艳芳, 唐庆九, 顾俊杰, 等. 北冬虫草草深层发酵高产虫草素工艺的优化[J]. 上海农业学报, 2010, 26(3):26-30.
- [12] Das SK, Masuda M, Sakurai A, Sakakibara M. Effects of additives on cordycepin production using a *Cordyceps militaris* mutant induced by ion beam irradiation[J]. Afr J Biotechnol, 2009, 8(13):3041-3047.