

DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.026889

引用格式:张超越,张雪颖,胡锦涛,等.人乳脂肪球在低温储存下的结构变化及其对人乳风味的影响[J].食品与发酵工业,2021,47(17):111-118. ZHANG Chaoyue, ZHANG Xueying, HU Jinhua, et al. Structural changes of human milk fat globules during low temperature storage and its effect on flavor of human milk[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(17): 111-118.

人乳脂肪球在低温储存下的结构变化及其对人乳风味的影响

张超越^{1,2,3}, 张雪颖⁴, 胡锦涛^{1,2,3*}, 周鹏^{1,2,3}

1(食品科学与技术国家重点实验室(江南大学),江苏无锡,214122) 2(江南大学食品学院,江苏无锡,214122)

3(江南大学食品安全与营养协同创新中心,江苏无锡,214122) 4(松下电器研究开发(苏州)有限公司,江苏苏州,215123)

摘要 人乳脂肪球(human milk fat globule, HMFG)膜结构的完整性对于乳脂的消化和吸收有积极的影响,该文主要探究不同储存条件下 HMFG 微观结构的变化及其对人乳风味的影响。将新鲜人乳混匀后进行分装,分别于-18℃冻藏和4℃冷藏,检测人乳中的菌落总数、脂肪及非酯化游离脂肪酸(non-esterified free fatty acid, NEFA)含量、pH值、HMFG粒径及其微观结构、风味等指标随储存时间(2、4和7d)的变化,新鲜人乳指标于采样当日完成检测。结果表明,人乳的菌落总数在4℃冷藏7d时显著增加,超过人乳库制定的标准(1×10^5 CFU/mL),其余储存条件下无显著变化。-18℃冻藏7d,人乳的脂肪含量、NEFA含量和pH值无显著变化;4℃冷藏人乳的脂肪含量在7d时显著降低,在2d时NEFA含量显著增加,而pH值显著降低。-18℃冻藏人乳,在4d时HMFG膜即出现破损,7d时HMFG堆积融合,粒径增加,粒径分布范围增大;而4℃冷藏人乳的HMFG在4d之内无显著变化,7d时粒径分布变宽。GC-MS和电子舌分析人乳的风味(气味和滋味)显示,-18℃冻藏人乳的风味物质含量变化较小,4℃冷藏人乳的酸类物质含量显著升高;电子舌味觉信号的主成分分析(principal component analysis, PCA)表明,相较于4℃冷藏,-18℃冻藏人乳的滋味与新鲜样品较为相似。研究表明,-18℃短期冻藏后人乳风味与新鲜样品更为相似;4℃冷藏则更有利于保持HMFG膜微观结构。

关键词 人乳;人乳脂肪球;微观结构;风味;气相色谱-质谱联用;电子舌

人乳是一切婴幼儿配方食品的黄金标准,人乳中丰富的营养成分还会随着婴儿的需求有特异性的转变,具有动物奶或婴幼儿配方奶粉无可比拟的优势^[1-2],因而研究人乳成分及其影响因素对未来开发高品质的婴幼儿配方食品具有重要意义。现代女性需要面对来自工作、家庭、学业等多方面的压力,因此越来越多的妈妈选择将人乳泵出经低温储存后再喂哺婴儿。储存位置一般选择家用冰箱的4℃冷藏区和-18℃冻藏区。现有的研究主要基于人乳微生物、宏量营养素^[3]及免疫活性物质^[4]等方面的数据给出人乳保存建议^[5],但是关于低温保存下人乳风味的研究还比较有限。实际生活中,妈妈们的喂哺实践经验表明婴儿对冻藏后人乳风味的接受程度存在个体差异^[6],这表明低温储存条件的差异性不仅会对人乳的微生物、宏量营养素及免疫活性物质产生影响,还会使人乳的风味发生变化,进而可能影响婴儿对人乳的接受程度。

人乳风味是由不同类别的物质组成,包括醛类、

醇类、酯类、脂肪酸氧化产物、酮类、内酯类和烃类等^[7]。婴儿可以通过接触人乳中的味道来学习未知味道,从而促进婴儿接受新的口味^[8],并影响其今后对食物的选择^[9-10]。BUETTNER^[11]研究组通过感官及二维高分辨气相色谱-质谱/嗅觉法定量研究了4和-19℃下人乳香气的变化,-19℃冻藏人乳随着储存时间的延长,其特征香气和选定标记物会产生剧烈的变化,而4℃冷藏人乳则没有产生同样程度的变化。另外,在-19℃冻藏人乳中因脂质氧化而产生的不良气味急剧增加,而这一现象在4℃冷藏下没有观察到。这可能是由于冻藏导致乳脂结晶,破坏人乳脂肪球(human milk fat globule, HMFG)膜,导致乳脂分解^[12-13],从而产生典型的酸败气味。因此推测HMFG膜结构的完整性可能影响人乳的风味。HMFG的相关研究还表明HMFG的粒径、HMFG膜的微观结构等会影响脂解程度,对婴儿的脂质消化与吸收产生显著影响^[14-15]。因此研究不同储存条件下HMFG的微观结构变化及其对人乳风味的影响就显

第一作者:硕士研究生(胡锦涛副教授为通讯作者,E-mail:hujinhua@jiangnan.edu.cn)

基金项目:十三五国家重点研发项目“基于我国母乳组分的特需乳制品创制及共性关键技术研究项目”(2017YFD0400603)

收稿日期:2021-01-27,改回日期:2021-02-26

得尤为重要。

本研究以新鲜人乳为原料,在4、-18℃下分别储存2、4和7d,主要研究低温储存对HMFG微观结构的影响,并在此基础上考察HMFG膜结构的完整性对人乳挥发性风味化合物和味觉信号的影响,以期低温储存人乳和未来高品质婴幼儿配方奶粉的研究提供指导。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

人乳,无锡爱尔贝月子会所;NaCl、三氯甲烷、NaOH、丙酮、无水乙醚、石油醚(沸程30~60℃)及无水乙醇,国药集团化学试剂有限公司;十二烷基硫酸钠,生工生物工程(上海)股份有限公司;2-甲基-3-庚酮,梯希爱(上海)化成工业发展有限公司;3M Petrifilm™菌落总数测试片,美国Petrifilm公司;非酯化游离脂肪酸(non-esterified free fatty acid, NEFA)试剂盒,南京建成生物工程研究所。实验所用试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

LRH-250CA低温培养箱,上海一恒科学仪器有限公司;W621CG冰箱,日本Panasonic公司;SCI-ONSQ-456-GC气质联用仪,美国布鲁克公司;SA402B味觉分析系统,日本INSENT公司;Seven Compact S220酸度计,瑞士METTLER公司;S3500激光粒度分析仪,美国Microtrac公司;TCS SP8共聚焦激光扫描显微镜(confocal laser scanning microscopy, CLSM),德国Leica公司;BHC-1300 II A/B2生物洁净安全柜,浙江苏净净化设备有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 人乳采集及分装

采集对象为无锡爱尔贝月子会所的15位哺乳期为1~6月龄的志愿者妈妈。收集7:00~8:00通过泵奶器泵出的人乳,2h内带回实验室;将所有的人乳混合在一起,按照每个指标所需要的人乳量进行分装,并立即放入特定的温度下进行储存。检测新鲜人乳样品的菌落总数为 $(2.92 \pm 0.22) \times 10^4$ CFU/mL,蛋白含量为 (11.65 ± 0.59) mg/mL,脂肪含量为 (3.77 ± 0.10) g/dL,乳糖含量为 (7.98 ± 0.12) g/dL。

1.3.2 人乳菌落总数检测

移取1mL经40℃复温的人乳置于装有9mL 0.85%的NaCl溶液的玻璃试管中(即稀释10倍),

记为 10^{-1} ,重复上述操作将人乳样品进行梯度稀释,分别稀释至 10^2 、 10^3 及 10^4 倍,分别记为 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} ;吸取1mL稀释液垂直滴加在菌落测试片中央位置,用专业压板轻轻按压使得样液均匀分散形成圆形培养面积,拿起压板,待菌落测试上的样液凝固后,将菌落测试片置于32℃培养箱内培养 (48 ± 3) h。以上所有操作均在超净台内完成,实验中所用到的试剂及枪头等均经立式自动压力蒸汽灭菌器灭菌。菌落总数计算如公式(1)所示^[16-17]:

$$N = \frac{\Sigma C}{(n_1 + 0.1n_2)d} \quad (1)$$

式中: N ,样品总菌落数; ΣC ,平板(含适宜范围菌落数的平板)菌落数之和; n_1 ,第一稀释度(低稀释倍数)平板个数; n_2 ,第二稀释度(高稀释倍数)平板个数; d ,稀释因子(第一稀释度)。

1.3.3 人乳中脂肪含量、NEFA含量及pH值的测定

参考Rose-Gottlieb法测定脂肪含量^[18];南京建成试剂盒检测样品NEFA含量;酸度计检测人乳样品pH值。

1.3.4 HMFG粒径及CLSM观察

1.3.4.1 HMFG粒径检测

采用激光粒度分析仪进行HMFG粒径检测。其中,粒度的测定选择湿法检测,设置样品为非球形、折射率1.46进行测定。吸取0.5mL样品于2mL离心管中,为裂解乳中的酪蛋白胶束,避免HMFG的聚集,依次加入0.5mL 35mmol/L的EDTA/NaOH(pH 7.0)和0.5mL 1%的SDS溶液,混匀后移取适量样品于粒度仪样品池中,使得红色条带恰好落于绿色区域内符合加样量的要求后开始检测^[19]。

1.3.4.2 HMFG-CLSM观察

吸取200μL人乳样品于1mL离心管中,加入2μL质量浓度为1mg/mL的尼罗红染料对其中的甘油三酯染色标记。混合均匀后,将其置于室温下避光反应20min,移取8μL样品于载玻片上,加盖玻片后固封4周,然后倒置在CLSM载物台上,采用Ar⁺激光器在488nm下激发尼罗红探针,于×40倍物镜下观察乳样的微观结构^[19]。

1.3.5 人乳风味检测

采用GC-MS检测分析人乳挥发性风味物质。取5mL人乳置于20mL顶空进样瓶中,然后加入10μL质量浓度为10mg/L的内标物溶液(2-甲基-3-庚酮);将固相微萃取针插入顶空瓶中的人乳上方进行顶空吸附(60℃恒温水浴吸附30min);吸附结束后

立即将萃取针插入 GC-MS 的进样口内,解吸 8 min^[20-21]。采用日本 INSENT 公司的 SA402B 电子舌检测人乳滋味变化。

1.4 数据处理

采用 SPSS 20 软件对实验数据进行显著性分析,不同字母代表组间存在显著差异 ($P < 0.05$);用 Origin 2018 软件绘图分析。

2 结果与分析

2.1 人乳菌落总数在储存过程中的变化

根据人乳库运行方针的总结,意大利人乳库协会、法国相关法例及 2010 NICE 指南等指出,菌落总数大于 1×10^5 CFU/mL 被认为是质量较差的人乳,高于此标准的人乳会被人乳库所拒绝^[22]。本研究中新采集的新鲜人乳的菌落总数经测定为 $(2.92 \pm 0.22) \times 10^4$ CFU/mL,判定初始样品符合人乳库标准。样品在 -18°C 储存 7 d 以内及在 4°C 储存 4 d 以内时,与新鲜人乳相比,样品的菌落总数均无显著性差异;但在 4°C 储存 7 d 时,样品的菌落总数显著增加为 $(25.03 \pm 2.53) \times 10^4$ CFU/mL ($P < 0.05$),已超过人乳库制定的标准。因此,如果是符合人乳库标准的人乳建议在 4°C 下储存时最好不要超过 4 d。

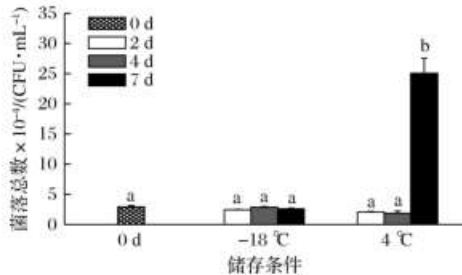


图1 不同储存条件下人乳菌落总数的变化

Fig. 1 Changes of total colony number of human milk under different storage conditions

2.2 不同储存条件下人乳脂肪含量、NEFA 含量及 pH 值变化

人乳中脂肪是婴儿能量的主要来源 (40% ~ 55%),且提供了婴儿生长发育所必需的脂肪酸^[23]。不同的储存条件下脂肪含量的变化如图 2 所示,随着储存时间的延长,人乳脂肪含量有降低的趋势;在 4°C 储存 7 d 的样品脂肪含量显著降低 ($P < 0.05$)。图 3 和图 4 表明, -18°C 冻藏人乳的 NEFA 含量随着储存时间延长出现升高的趋势,但与新鲜样品相比,无显著性差异,相应的 pH 值也无显著变化; 4°C 冷藏人乳的 NEFA 含量在储存 2 d 时,与新鲜样品相

比显著增加 ($P < 0.05$),相应的 pH 值显著降低 ($P < 0.05$),此结果与 SLUTZAH 等^[24]的研究结果一致。其原因可能是人乳在储存过程中甘油三酯在脂肪酶的作用下发生水解,导致 NEFA 含量增加,pH 值也随之降低^[25]。

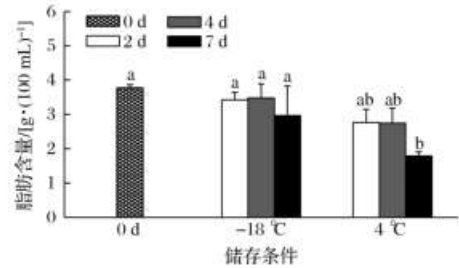


图2 不同储存条件下人乳脂肪含量的变化

Fig. 2 Changes of human milk fat content under different storage conditions

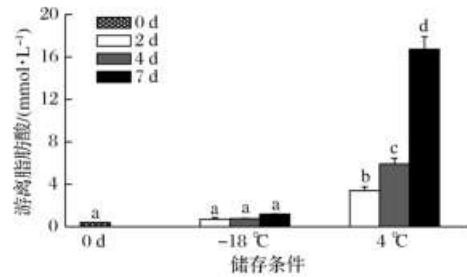


图3 不同储存条件下人乳 NEFA 含量的变化

Fig. 3 Changes of NEFA content in human milk under different storage conditions

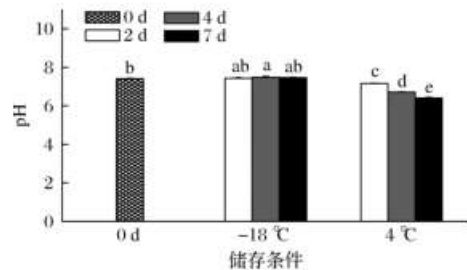


图4 不同储存条件下人乳 pH 值变化

Fig. 4 Changes of pH value of human milk under different storage conditions

2.3 不同储存条件下人乳脂肪球物理特性分析

2.3.1 HMFG 粒径分析

通过激光粒度分析仪测定不同储存条件下的 HMFG 粒径及其分布,结果如表 1 及图 5 所示。从图 5 可观察到,新鲜及 4°C 冷藏后 HMFG 粒径随储存时间发生了小幅的变化,但粒径分布始终保持在较窄的范围内;表 1 显示新鲜的 HMFG 体积平均粒径 $d_{4,3}$ 为 $(4.58 \pm 0.02) \mu\text{m}$, 4°C 冷藏 2 和 4 d 后分别为 $(4.64$

± 0.07) 和 (4.59 ± 0.11) μm , 和新鲜样品无显著性差异。由图 5 可知, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏 7 d 时粒径向右移动, 根据表 1 可知, 此时粒径为 (4.99 ± 0.11) μm , 已和新鲜样品出现显著性差异。

图 5 中 -18 $^{\circ}\text{C}$ 冻藏人乳粒径分布则随储存时间延长逐渐变宽, 新鲜样品中体积分数占比最多 (14.67%) 的 HMFG 粒径约 4.62 μm , -18 $^{\circ}\text{C}$ 冻藏 2 d 后体积分数占比最多的 HMFG 粒径为 5.5 μm 。表 1 显示, -18 $^{\circ}\text{C}$ 冻藏 2 d 时 HMFG 体积平均粒径 $d_{4,3}$ 为 (4.81 ± 0.03) μm , 已经和新鲜样品产生差异; 到第 7 天时已经显著增加, 为 (5.87 ± 0.14) μm 。表 1 中体积分布 $\leq 50\%$ 的颗粒粒径 $d_{0,5}$ 及体积分布 $\leq 95\%$ 的颗粒粒径 $d_{0,95}$ 都显示了与 $d_{4,3}$ 相同的粒径变化规律。另外从表 1 中的粒径分布范围中还可以更详细的了解到 -18 $^{\circ}\text{C}$ 冻藏 2、4 和 7 d 后,

HMFG 的最大粒径从新鲜样品的 18.5 μm 变为 22、26.16 和 44 μm ; 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏 2、4 和 7 d 后 HMFG 最大粒径则都在 22 μm 左右; 说明 -18 $^{\circ}\text{C}$ 冻藏样品的 HMFG 粒径分布在不断变宽, 而 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏则可保持较窄的粒径分布, 这些与图 5 的观察是一致的。

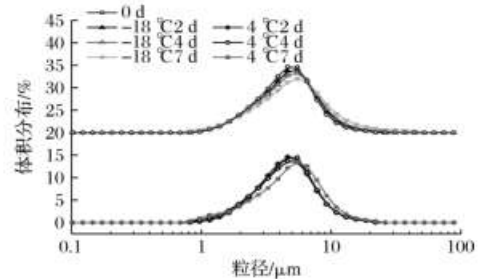


图 5 不同储存条件下的人乳脂肪球粒径分布
Fig. 5 Particle size distribution of HMFG under different storage conditions

表 1 不同储存条件人乳脂肪球粒径比较

单位: μm

Table 1 Particle size comparison of HMFG under different storage conditions

指标	0 d	-18 $^{\circ}\text{C}$ 2 d	-18 $^{\circ}\text{C}$ 4 d	-18 $^{\circ}\text{C}$ 7 d	4 $^{\circ}\text{C}$ 2 d	4 $^{\circ}\text{C}$ 4 d	4 $^{\circ}\text{C}$ 7 d
$d_{4,3}$	4.58 ± 0.02^a	4.81 ± 0.03^b	5.03 ± 0.03^c	5.87 ± 0.14^d	4.64 ± 0.07^a	4.59 ± 0.11^a	4.99 ± 0.07^c
$d_{0,1}$	2.05 ± 0.05^{cd}	2.02 ± 0.01^c	1.99 ± 0.02^{bc}	1.98 ± 0.02^{bc}	2.11 ± 0.09^d	1.91 ± 0.02^{ab}	1.87 ± 0.05^a
$d_{0,5}$	4.19 ± 0.01^a	4.33 ± 0.03^b	4.42 ± 0.03^b	4.72 ± 0.10^d	4.15 ± 0.03^a	4.15 ± 0.08^a	4.55 ± 0.04^c
$d_{0,95}$	8.90 ± 0.10^a	9.74 ± 0.06^{bc}	10.62 ± 0.08^d	14.11 ± 0.57^e	9.29 ± 0.38^{ab}	9.23 ± 0.38^{ab}	10.23 ± 0.28^{cd}
粒径分布范围	0.97 - 18.50	0.97 - 22.00	0.97 - 26.16	0.82 - 44.00	0.97 - 22.00	0.82 - 18.50	0.82 - 22.00

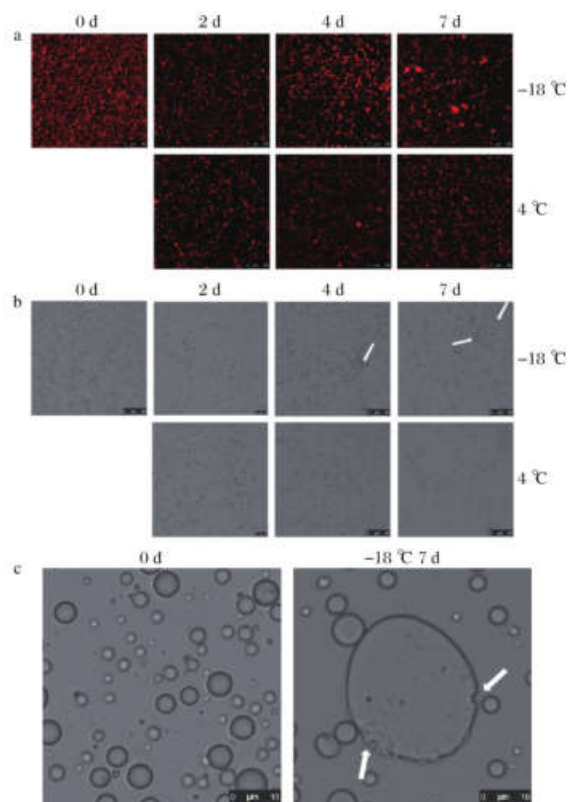
注: $d_{4,3}$ 为体积平均粒径; $d_{0,1}$ 为体积分布中 $\leq 10\%$ 的颗粒粒径; $d_{0,5}$ 为体积分布中 $\leq 50\%$ 的颗粒粒径; $d_{0,95}$ 为体积分布中 $\leq 95\%$ 的颗粒粒径

HMFG 粒径分析显示, 人乳在 -18 $^{\circ}\text{C}$ 冻藏 2 d 后即出现显著增加, 且随着储存时间粒径分布逐渐变宽, 文献指出冻藏产生的冰晶会导致 HMFG 结构破裂^[12], HMFG 融合堆积会导致其粒径逐渐增大, 这与 TAKAHASHI 等^[26] 的研究结果一致。HMFG 具有较大的比表面积、较高的亲水能力, 具有良好的消化能力^[27]; 另外, HMFG 膜表面的活性成分在肠道运输和输送脂溶性营养物质方面也起着重要作用^[28]。如果 HMFG 结构破裂则会影响脂解率^[15], 进而影响婴儿对乳的吸收, 因而维持 HMFG 膜结构的完整性对于维持人乳的营养特性十分重要。本研究中储存温度对 HMFG 结构变化的影响显示, 与新鲜人乳相比, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏 7 d 后才出现显著增加, 这表明, 相较于 -18 $^{\circ}\text{C}$ 冻藏, 4 $^{\circ}\text{C}$ 短期冷藏 (< 4 d) 可能更有利于保持 HMFG 膜结构的完整性。

2.3.2 HMFG 的微观结构观察

甘油三酯以球形液滴的形式存在于人乳中, 具有多分散的尺寸分布^[29]。通过尼罗红荧光标记甘油三

酯, 在 488 nm 波长下激发尼罗红荧光探针, 通过 CLSM 考察不同储存条件下人乳中的甘油三酯 (尼罗红染色图) 和 HMFG (明场图) 微观结构的变化。图 6-a 是 CLSM 观察下的尼罗红染色图片, 图 6-b 为 CLSM 观察下明场图片。由图可知, 新鲜样品和 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏样品中 HMFG 的粒径尺寸较小且大小相对均一; 而 -18 $^{\circ}\text{C}$ 冻藏后 HMFG 粒径增大, 且粒径大小不一。图 6-c 是图 6-b 的局部放大图, 从图 6-c 中可以更加清晰地看到, 新鲜样品的 HMFG 膜结构完整; 而 -18 $^{\circ}\text{C}$ 冻藏 7 d 时人乳 HMFG 膜结构出现明显破裂和堆积融合 (见图中白色箭头所指)。这表明 2.3.1 中激光粒度仪所测得的 -18 $^{\circ}\text{C}$ 冻藏样品的粒径变大和分布变宽是因为 HMFG 结构破裂并发生堆积和融合造成的。人乳在 -18 $^{\circ}\text{C}$ 冻藏时会产生冰晶, 冰晶可能刺破 HMFG 膜^[12], 导致脂肪球相互融合堆积; 这导致了 HMFG 的粒径增大, 且数量同步减少。



a-尼罗红染料染色图片;b、c-明场显微图片

图6 不同储存条件下HMFG的微观结构

Fig.6 Microstructure of HMFG under different storage conditions

2.4 储存条件对人乳风味的影响

2.4.1 GC-MS 测定人乳挥发性风味

通过固相萃取头对人乳中的挥发性风味物质

进行萃取,而后利用 GC-MS 进行鉴定分析,结果见表 2。随着储存时间的延长,人乳样品中的酸类和醛类物质在不同储存温度下产生的变化具有一定的差异性, -18 °C 冻藏样品中两者皆少量增加;而 4 °C 冷藏人乳中两者则相对增加较多,其中酸类物质显著增加。有研究表明,冻藏过程中冰晶刺破 HMFG 膜会导致脂肪在脂肪酶的作用下发生分解^[12],挥发性的酸类物质含量逐渐增加,酸类物质继续氧化就会产生醛类物质;因此随着冻藏时间的延长,人乳中酸类和醛类物质含量逐渐增多。但是,此类研究的冻藏期一般较长(2~6 个月)^[6],而本实验主要研究 0~7 d 内人乳样品的变化,虽然在储存的第 4 天即观察到 -18 °C 冻藏样品的 HMFG 结构发生破裂,至第 7 天时可以观察到明显的破裂,但由于 0~7 d 仍属于非常短的储存时间,因冻藏导致的 HMFG 膜破裂继而脂肪在脂肪酶作用下发生分解可能需要更长时间的累积其效应才能体现,因此可能不是本研究中导致冷藏人乳风味劣变的主要原因;本研究中 4 °C 冷藏样品 HMFG 膜结构保持相对较完整,其风味劣变更显著,这是因为由微生物脂肪酶促进的脂类分解才是其风味劣变的主要诱因^[30],由于 4 °C 冷藏 7 d 的样品中菌落总数显著增加,微生物越多,其代谢产物中的脂肪酶也越多,因此观察到了显著的风味劣变。从表 2 中也可看到,此时 4 °C 冷藏人乳中酸类和醛类物质增加较多,而 -18 °C 冻藏样品的酸类和醛类物质仅呈现少量增加。

表 2 GC-MS 分析不同储存条件人乳的挥发性风味物质

单位: $\mu\text{g/L}$

Table 2 GC-MS analysis of volatile flavor compounds in human milk under different storage conditions

风味成分	0 d	-18 °C 2 d	-18 °C 4 d	-18 °C 7 d	4 °C 2 d	4 °C 4 d	4 °C 7 d
己酸	-	-	-	-	2.03 ± 0.74	32.40 ± 21.69	97.74 ± 2.26
庚酸	-	-	-	-	-	0.84 ± 0.89	3.18 ± 1.60
辛酸	-	-	-	2.88 ± 0.77	7.56 ± 1.59	245.46 ± 123.85	497.62 ± 23.31
正癸酸	2.12 ± 0.55	3.07 ± 2.17	5.90 ± 5.26	8.69 ± 5.67	31.53 ± 18.63	369.14 ± 168.19	1028.13 ± 253.94
月桂酸	-	-	-	25.36 ± 24.55	-	109.99 ± 37.77	347.90 ± 127.81
乙酸乙酯	119.61 ± 11.58	129.51 ± 2.01	102.23 ± 17.89	59.57 ± 17.41	177.87 ± 21.91	133.03 ± 5.96	120.82 ± 33.64
乙酸丙酯	32.98 ± 13.76	88.53 ± 14.72	253.30 ± 82.25	115.85 ± 47.04	62.22 ± 15.20	69.30 ± 20.77	15.81 ± 0.83
癸酸甲酯	7.59 ± 2.21	1.10 ± 0.43	-	-	-	7.42 ± 3.40	6.76 ± 1.22
月桂酸甲酯	5.27 ± 1.39	2.11 ± 0.29	2.06 ± 0.07	1.00 ± 0.08	-	2.95 ± 1.17	4.12 ± 0.10
巴豆酸正丁酯	-	-	29.54 ± 0.90	17.26 ± 3.34	-	-	-
正己醛	-	10.62 ± 0.00	16.47 ± 0.00	39.05 ± 19.10	62.36 ± 12.47	130.49 ± 28.65	177.39 ± 36.90
正辛醛	-	-	-	-	-	-	3.10 ± 0.74
壬醛	8.97 ± 0.69	3.88 ± 0.51	4.28 ± 0.00	8.76 ± 0.48	9.38 ± 1.81	7.03 ± 1.75	14.48 ± 0.01
3-壬酮	-	2.07 ± 0.03	2.33 ± 0.00	1.10 ± 0.00	-	3.42 ± 0.19	6.43 ± 0.11
3-十一酮	-	-	-	-	-	-	2.17 ± 0.61
2,2,4,6,6-五甲基庚烷	62.89 ± 1.64	123.25 ± 46.61	132.60 ± 13.63	55.59 ± 13.46	144.41 ± 11.06	90.69 ± 9.55	68.03 ± 2.65
2,5,9-三甲基癸烷	23.95 ± 1.25	-	42.55 ± 8.99	18.78 ± 1.79	36.25 ± 10.42	25.90 ± 1.63	-
癸烷	3.51 ± 0.57	-	-	-	-	-	-
十二烷	28.36 ± 0.86	-	-	38.20 ± 10.95	22.32 ± 10.43	20.58 ± 0.56	-
十三烷	9.53 ± 0.79	-	-	8.15 ± 6.11	11.20 ± 0.00	7.04 ± 1.78	-
十四烷	4.93 ± 0.07	-	28.44 ± 9.17	-	27.19 ± 0.00	-	23.02 ± 0.00
十五烷	4.32 ± 0.16	-	-	3.95 ± 4.01	5.51 ± 0.70	-	-
3-甲基十三烷	1.63 ± 0.09	1.08 ± 0.00	1.77 ± 0.11	0.68 ± 0.03	-	2.37 ± 1.24	1.83 ± 0.36

续表 2

风味成分	0 d	-18 ℃ 2 d	-18 ℃ 4 d	-18 ℃ 7 d	4 ℃ 2 d	4 ℃ 4 d	4 ℃ 7 d
甲苯	18.69 ± 0.54	27.70 ± 1.84	-	12.06 ± 0.00	38.77 ± 2.46	83.58 ± 4.43	68.79 ± 5.00
1,3-二叔丁基苯	2.66 ± 0.42	3.96 ± 1.30	3.97 ± 0.20	3.16 ± 0.55	5.08 ± 0.45	3.45 ± 0.06	-
邻二甲苯	3.27 ± 4.14	-	4.32 ± 0.00	6.52 ± 0.27	-	0.31 ± 0.00	17.64 ± 0.52
对二甲苯	0.82 ± 0.98	3.86 ± 0.00	3.94 ± 2.23	3.34 ± 0.00	11.40 ± 2.55	1.32 ± 1.73	-
联三甲苯	-	-	6.04 ± 0.00	3.42 ± 0.97	-	1.36 ± 0.00	2.25 ± 0.02
2-乙基甲苯	-	-	6.76 ± 1.24	2.34 ± 0.05	-	-	-
2-乙基己醇	1.23 ± 0.13	1.12 ± 0.00	1.33 ± 0.00	0.79 ± 0.36	2.05 ± 0.63	-	1.85 ± 0.07
异丁醇	-	-	11.05 ± 3.04	8.47 ± 0.83	-	-	-
1-辛烯-3-醇	-	-	-	2.17 ± 0.46	-	2.63 ± 0.45	6.18 ± 1.54
苯乙烯	-	-	-	-	8.03 ± 1.69	-	10.62 ± 1.39
邻癸基羧酸	1.65 ± 0.77	27.07 ± 13.94	14.28 ± 3.19	1.31 ± 0.24	17.85 ± 4.09	22.97 ± 0.00	4.04 ± 0.58
酸类	2.12 ± 0.55 ^a	3.07 ± 2.17 ^a	5.90 ± 5.26 ^a	36.94 ± 30.99 ^a	41.11 ± 20.97 ^a	757.83 ± 350.62 ^b	1 974.57 ± 404.39 ^c
酯类	165.45 ± 28.94 ^a	221.25 ± 13.43 ^a	387.12 ± 101.10 ^b	193.68 ± 67.87 ^a	240.10 ± 37.11 ^a	212.71 ± 31.30 ^a	147.51 ± 33.93 ^a
醛类	8.97 ± 0.69 ^a	14.50 ± 0.51 ^a	18.61 ± 3.03 ^a	47.80 ± 19.57 ^{ab}	71.74 ± 10.66 ^b	137.51 ± 26.89 ^c	194.97 ± 36.16 ^d
酮类	0.00 ± 0.00 ^a	2.07 ± 0.03 ^a	2.33 ± 0.00 ^c	1.10 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	3.42 ± 0.19 ^d	8.59 ± 0.49 ^e
烷烃类	139.13 ± 0.33 ^{ab}	123.80 ± 47.38 ^{ab}	205.37 ± 31.67 ^{cd}	125.35 ± 5.84 ^{ab}	222.31 ± 36.32 ^d	146.58 ± 4.33 ^{bc}	78.54 ± 14.57 ^a
其他类	28.33 ± 6.98 ^a	61.23 ± 15.13 ^{bc}	47.08 ± 5.96 ^{ab}	35.89 ± 10.65 ^{ab}	83.17 ± 6.33 ^{cd}	103.29 ± 19.72 ^{de}	111.37 ± 4.84 ^e
总含量	344.00 ± 21.49 ^a	425.92 ± 51.79 ^a	665.24 ± 128.80 ^a	440.21 ± 1.59 ^a	658.43 ± 77.41 ^a	1 361.34 ± 268.18 ^b	2 515.55 ± 387.70 ^c

通过 PCA 图可看出不同挥发性风味物质种类对
不同人乳样品的分类贡献的关系,图中样品间的距离
远近可以反映出样品间的相似性高低^[20-21]。本研究
选择人乳样品中含量较高、对风味贡献较大的物质种
类(即酸、醛、酮和酯)进行 PCA,描述不同样品之间的
整体风味是否相似,以及不同的挥发性风味物质对
区分样品间整体风味差异的贡献。从图 7 的 PCA 可
知,F1 贡献率为 66.34%,F2 的贡献率为 15.29%,两
者整体贡献率 > 80% (81.63%),包含了样品酸、酯、
醛及酮等风味的绝大多数信息^[31]。

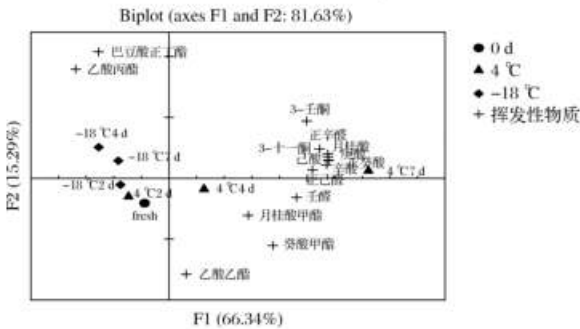


图 7 不同储存条件下人乳主要挥发性物质 PCA 图

Fig. 7 PCA plot of volatile substances in human milk under different storage conditions

由 F1 可知,己酸、正癸酸、庚酸等在显示样品风
味差异性上的作用更为明显,其次是月桂酸、正辛醛
及 3-十一酮等;由 F2 可知,巴豆酸正丁酯、乙酸丙酯
等在显示样品风味差异性上的作用更为明显;4 ℃ 储
存 2 d 及冻藏后的样品与新鲜样品距离更为接近,4
℃ 储存 7 d 的样品与新鲜样品距离较大,说明冷藏 2
d 及短期冻藏后样品的整体风味与新鲜样品的相似

性更高。

2.4.2 电子舌分析不同低温处理人乳的滋味

利用电子舌检测不同储存条件下人乳样品的味
觉信号,并对结果进行 PCA,结果如图 8 所示。其中
F1 贡献率为 64.09%,F2 贡献率为 23.31%,两者整
体贡献率大于 80% (87.40%),包含了样品味觉信号
的绝大多数信息。从 F1 来看,丰富度、苦味回味及涩
味在显示母乳味觉信号差异性上的作用更为明显,其
次是甜味、苦味等;从 F2 来看,鲜味在显示母乳味
觉信号差异性上的作用更为明显,其次是涩味回味。

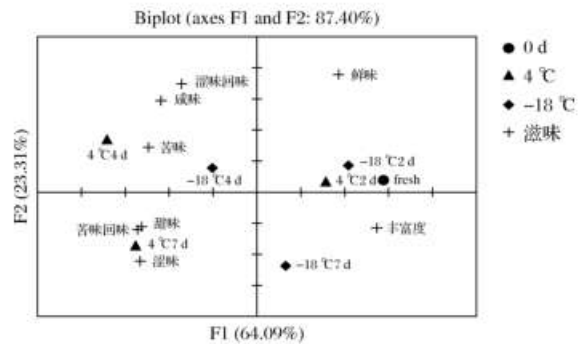


图 8 不同条件储存人乳后滋味的 PCA 图

Fig. 8 PCA plot of post-storage taste of human milk under different storage conditions

根据图 8 中各样品与新鲜样品之间的距离,4 ℃
冷藏人乳 2 d 和 -18 ℃ 冻藏 2 d 人乳都能显示出
与新鲜人乳非常相似的滋味丰富度,这一结论与 GC-
MS 风味的 PCA 相似。但是,随着储存时间的延长,4
℃ 冷藏人乳整体滋味的劣化稍甚于 -18 ℃ 冻藏人
乳,表现出更多的苦味、咸味和涩味,与新鲜样品滋味

的相似度也更低。

3 结果与讨论

根据研究结果,新鲜人乳在4℃下冷藏7d时菌落总数显著性增加,超过人乳库推荐标准^[22],不建议食用;在-18℃冻藏7d内无显著性变化。随着储存时间的延长,人乳脂肪含量在4℃冷藏及-18℃冻藏条件下均有降低趋势,但仅在4℃储存7d时显著降低($P < 0.05$)。与新鲜样品相比,4℃冷藏人乳的NEFA含量在储存2d时显著增加($P < 0.05$),相应的pH值显著降低($P < 0.05$);随着储存时间延长,-18℃冻藏人乳的NEFA含量出现升高的趋势,但与新鲜样品相比,无显著性差异,相应的pH值也无显著变化。由此推测,温度越低越能抑制微生物的增殖,抑制脂肪酶的活性从而延缓脂肪分解。

与新鲜人乳相比,4℃冷藏人乳7d时其 $d_{4,3}$ 值出现显著性增加,粒径分布范围基本无变化,HMFG膜无明显破裂,但此时菌落总数已超标;而-18℃冻藏人乳的 $d_{4,3}$ 值在储存2d时显著增加,粒径分布范围变宽,且HMFG膜结构在储存4d时可观察到破裂,7d时破裂更为明显,这可能是由冻藏后冰晶的形成刺破了HMFG膜,引起HMFG的融合堆积造成的。随着储存时间的延长,4℃冷藏人乳的挥发性风味物质含量逐渐增加,其中以酸类物质最为显著,这可能是由于微生物代谢产生的脂肪酶促进了脂类的分解反应,造成脂肪酸败引起的;而-18℃冻藏后人乳的各类风味物质变化较大的也是酸类物质,这可能是由于冻藏后冰晶的产生刺破了HMFG膜,导致HMFG膜吸附的脂肪酶与膜内的甘油三酯相互作用,导致脂肪分解,但由于储藏时间较短,HMFG膜破损的程度较低,另外较低的储藏温度也在一定程度延缓了脂肪分解反应,因此-18℃冻藏后人乳中的风味物质含量及种类并未发生显著变化。PCA也表明,-18℃短期冻藏后人乳的整体风味(气味和滋味)与新鲜人乳更为相似,但本研究表明冻藏后HMFG粒径增大,HMFG膜结构破裂,可能会影响婴儿对人乳脂质的消化吸收。因而,未来人乳低温储存的研究方向可关注既能延缓脂质分解又能避免冰晶产生导致HMFG破裂从而影响人乳营养特性的温度带。

参 考 文 献

[1] NANCY E. Donor human milk for preterm infants [J]. *Journal of Perinatology Official Journal of the California Perinatal Association*, 2001, 21(4):249-54.

[2] 彭秀明,潘岩,叶清,等.人乳与牛乳天然小分子蛋白肽的差异对比及功能分析[J].*食品与发酵工业*,2016,42(3):36-41.
PENG X M, PAN Y, YE Q, et al. Comparison and functional analysis of natural small protein peptides in human milk and cow milk [J]. *Food and Fermentation Industry*, 2016, 42(3):36-41.

[3] AHRABI A F, HANDA D, CODIPILLY C N, et al. Effects of extended freezer storage on the integrity of human milk [J]. *The Journal of Pediatrics*, 2016, 177:140-143.

[4] RAMÍREZ-SANTANA C, PÉREZ-CANO F J, AUDÍ C, et al. Effects of cooling and freezing storage on the stability of bioactive factors in human colostrum [J]. *Journal of Dairy Science*, 2012, 95(5):2319-2325.

[5] 翟英辰. 低温保存对人乳营养成分和免疫物质的影响 [D]. 上海:上海交通大学,2015.
ZHAI Y C. Effect of cold storage on the nutrient and immune substance of human milk [D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2015.

[6] SPITZER J, BUETTNER A. Monitoring aroma changes during human milk storage at -19℃ by quantification experiments [J]. *Food Research International*, 2013, 51(1):250-256.

[7] HAUSNER H, PHILIPSEN M, SKOV T H, et al. Characterization of the volatile composition and variations between infant formulas and mother's milk [J]. *Chem sensory Perception*, 2009, 2(2):79-93.

[8] HAUSNER H, NICKLAUS S, ISSANCHOU S, et al. Breastfeeding facilitates acceptance of a novel dietary flavour compound [J]. *Clinical Nutrition*, 2010, 29(1):141-148.

[9] MENNELLA J A, BEAUCHAMP G K. Early flavor experiences: Research update [J]. *Nutrition Reviews*, 1998, 56(7):205-211.

[10] BEAUCHAMP G K, MENNELLA J A. Early flavor learning and its impact on later feeding behavior [J]. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 2009, 48:S25-S30.

[11] SPITZER J, KLOS K, BUETTNER A. Monitoring aroma changes during human milk storage at +4℃ by sensory and quantification experiments [J]. *Clinical Nutrition*, 2013, 32(6):1036-1042.

[12] GARCÍA-LARA N R, ESCUDER-VIECO D, GARCÍA-ALGAR O, et al. Effect of freezing time on macronutrients and energy content of breastmilk [J]. *Breastfeeding Medicine*, 2012, 7(4):295-301.

[13] HUNG H T, HSU Y Y, SU P F, et al. Variations in the rancid-flavor compounds of human breastmilk under general frozen-storage conditions [J]. *BMC Pediatrics*, 2018, 18(1):94.

[14] 蒋文笛. 人乳脂肪球的微观结构随泌乳过程的变化规律及其对脂类消化的影响 [D]. 无锡:江南大学,2019.
JIANG W D. Changes of microstructure of human milk fat globules with lactation progress and its effects on lipid digestion [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2019.

[15] 梁丽. 乳脂肪球的体外消化特性及其影响因素研究 [D]. 无锡:江南大学,2019.
LIANG L. Study on milk fat globules digestion characteristics *in vitro* and its influence factors [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2019.

[16] 国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局. GB 4789.2—2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定 [S]. 北京:中国标准出版社,2010.
State Food and Drug Administration, National Health and Family Planning Commission. GB 4789.2—2016 National food safety standard Food microbiological examination; Aerobic plate count [S]. Beijing: China Standards Press, 2010.

[17] 中华人民共和国卫生部. GB 4789.18—2010 食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳与乳制品检验 [S]. 北京:中国标准出版社,2010.
Ministry of Health of the People's Republic of China. GB 4789.18—2010 National food safety standard Food microbiological examination; Milk and milk products [S]. Beijing: China Standards Press, 2010.

- [18] ZHANG L N, WU Y Y, MA Y P, et al. Macronutrients, total aerobic bacteria counts and serum proteome of human milk during refrigerated storage[J]. *Food Bioscience*, 2020, 35. DOI:10.1016/j.fbio.2020.100562.
- [19] 杨洁. 人乳脂肪球的磷脂组成、结构及低温储存性能研究[D]. 无锡: 江南大学, 2018.
YANG J. Composition of phospholipid, structure and low-temperature storage property of human milk fat globules[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2018.
- [20] 刘芳, 杨康卓, 张建敏, 等. 基于电子鼻和气质联用技术的浓香型白酒分类[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(2): 73-78.
LIU F, YANG K Z, ZHANG J M, et al. Classification of strong-flavor Baijiu using electronic nose and GC-MS technologies[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(2): 73-78.
- [21] 简东振, 周志磊, 巩敏, 等. 镇江香醋陈酿过程中温度和氧气对挥发性风味物质的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(7): 75-82.
JIAN D Z, ZHOU Z L, GONG M, et al. Study on the effect of temperature and oxygen on volatile flavor compounds of Zhenjiang aromatic vinegar during aging[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(7): 75-82.
- [22] ARSLANOGLU S, BERTINO E, TONETTO P, et al. Guidelines for the establishment and operation of a donor human milk bank[J]. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 2010, 23: 1-20.
- [23] 吴珂剑. 中国三地区母乳脂肪、脂肪酸、杭州地区母乳雌激素类物质研究及与膳食相关性分析[D]. 杭州: 浙江大学, 2014.
WU K J. Dietary intake, breast milk fat content and fatty acid composition of lactating women in three regions in China, and breast milk estrogen content in Hangzhou[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2014.
- [24] SLUTZAH M, CODIPILLY C N, POTAK D, et al. Refrigerator storage of expressed human milk in the neonatal intensive care unit[J]. *The Journal of Pediatrics*, 2010, 156(1): 26-28.
- [25] BERTINO E, GIRIBALDI M, BARO C, et al. Effect of prolonged refrigeration on the lipid profile, lipase activity, and oxidative status of human milk[J]. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 2013, 56(4): 390-396.
- [26] TAKAHASHI K, MIZUNO K, ITABASHI K. The freeze-thaw process and long intervals after fortification denature human milk fat globules[J]. *American Journal of Perinatology*, 2012, 29(4): 283-288.
- [27] MICHALSKI M C, GASSI J Y, FAMELART M H, et al. The size of native milk fat globules affects physico-chemical and sensory properties of Camembert cheese[J]. *Le Lait*, 2003, 83(2): 131-143.
- [28] LIU H X, ADACHI I, HORIKOSHI I, et al. Mechanism of promotion of lymphatic drug absorption by milk fat globule membrane[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 1995, 118(1): 55-64.
- [29] ZOU X Q, GUO Z, HUANG J H, et al. Human milk fat globules from different stages of lactation: A lipid composition analysis and microstructure characterization[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(29): 7158-7167.
- [30] 罗金斯基, 富卡, 福克斯, 等. 乳品科学百科全书[M]. 北京: 科学出版社, 2009.
ROGINSKI H, FUQUAY J, FOX P, et al. Encyclopedia of dairy science[M]. Beijing: Science Press, 2009.
- [31] 宋慧敏. 热处理对牛乳风味及保藏品质的影响[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2015.
SONG H M. The influence of heat treatment on the flavor and preservation quality of milk[D]. Haerbin: Northeast Agricultural University, 2015.

Structural changes of human milk fat globules during low temperature storage and its effect on flavor of human milk

ZHANG Chaoyue^{1,2,3}, ZHANG Xueying⁴, HU Jinhua^{1,2,3*}, ZHOU Peng^{1,2,3}

1(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

2(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

3(Synergetic Innovation Center of Food Safety and Nutrition, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

4(Panasonic Research and Development center (Suzhou) Co. Ltd., Suzhou 215123, China)

ABSTRACT The structural integrity of the human milk fat globule (HMFG) membrane could positively affect the digestion and absorption of milk fat. This work was to investigate the microstructure changes of HMFG and its effect on the human milk flavor under different storage conditions. Fresh human milk was mixed and repacked under -18 and 4 °C, respectively. The total bacterial count, the content of non-esterified free fatty acid (NEFA), pH value, particle size and microstructure of HMFG, and flavoring components in human milk were determined during storage (2, 4 and 7 d). Fresh human milk was detected on the day of sample collection. The total bacterial colony count of human milk significantly increased after 7 d cold storage at 4 °C, which exceeded the standard (1×10^5 CFU/mL) set by the human milk bank. However, it was no significant changes under the remaining storage conditions. The fat content, NEFA content and pH value of human milk at -18 °C frozen storage for 7 d showed insignificant changes. Moreover, under 4 °C cold storage, the fat content of human milk significantly decreased after 7 d, while the NEFA content significantly increased and the pH value significantly decreased after 2 d. The membrane of HMFG was punctured and leaked under -18 °C for 4 d, and subsequently, their accumulation and fusion caused the particle size distribution of HMFG to increase after storage of 7 d. But no significant changes were observed for those stored at 4 °C within 4 d and wider distribution was only observed after 7 d. The flavors (odor and taste) of human milk were analyzed by GC-MS and electronic tongue respectively. The results showed that limited changes were observed for the flavor substances content in frozen human milk stored at -18 °C, while that of samples stored at 4 °C increased significantly. The principal component analysis of electronic tongue taste signals showed that, compared with samples stored at 4 °C, the taste of human milk stored at -18 °C was more similar to that of fresh human milk. The results showed that the short storage of human milk at -18 °C made the flavor more similar to that of the fresh samples. The microstructure of the HMFG membrane could be well maintained under 4 °C cold storage.

Key words human milk; human milk fat globule; microstructure; flavor; GC-MS; electronic tongue