

复合酶在 pH 值自然变化下水解干酪工艺条件的研究

王蓓, 许时婴

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

摘 要 采用 Flavourzyme 和 Neutrase 双酶组合水解切达干酪制备乳滋味增强物质, 利用单因素优化了双酶组合的作用条件。实验结果表明, 在总酶添加量为 8% 的条件下, 复合酶水解的最佳工艺条件为: F 酶与 N 酶比例为 5:3, 水解温度 45℃, pH 值 8.0, 底物浓度 4%, 水解 12 h。在此工艺条件下水解产物的三氯乙酸-氮(TCA-N)增加百分数为 68.3%, 并且其滋味评分与添加有相同浓度的市售干酪香精最为接近, 乳滋味浓郁, 无苦味、异味。

关键词 切达干酪, 复合蛋白酶水解, 乳滋味增强物质

近年来干酪以其独特的风味和较高的营养价值越来越为国内消费场所接受, 干酪粉或干酪风味香精由于其奶味足、风味独特、保质期长、使用方便等优点被广泛用于各种烘焙制品、膨化休闲食品的增香调味, 但目前国内使用的干酪香精全部依赖于进口, 尚没有厂家进行相关或相近的研究与生产。

目前国内对乳蛋白水解的研究方向主要集中在各种乳蛋白活性肽的制备方面, 对于乳蛋白水解产物对味觉的贡献还鲜见报道。国外较早前已有利用外源性的蛋白酶对干酪制品进行水解从而加速干酪中增味组分成熟的报道^[1]。同时, 利用乳蛋白水解产物中的增味物质配制而成的各种天然牛奶或干酪香精大大提高了天然香精的品质, 因而成为当前国内外香精香料行业的重要研究课题之一^[2,3]。本研究从水解度和滋味评定 2 个指标对 2 种蛋白酶水解干酪得到乳增味物质的工艺条件进行了优化, 为国内干酪香精的研究与生产提供了一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要原料

切达干酪: 购自当地超市, 产地美国; 复合蛋白酶: Neutrase, 食品级, 诺维信中国投资有限公司提供; 复合风味蛋白酶: Flavourzyme, 食品级, 诺维信中国投资有限公司提供; 天然干酪香精: 美国 butter buds; 纯鲜牛奶: 上海光明乳品有限公司。

1.1.2 主要仪器

微量凯氏定氮仪, 精密酸度计, 722 型分光光度计, 电子恒速搅拌器, 恒温水浴锅, 离心机, 电子天平等。

1.2 方法

1.2.1 酶解产物制备

称取一定量的干酪在特定的初始 pH、温度及固定的搅拌转速下进行酶解反应, 允许酶解反应过程中 pH 值自然变化, 反应一段时间后于 85℃ 灭酶活 15 min 后终止反应, 待反应物冷却后吸取适量水解产物, 用 12% 的三氯乙酸(TCA)处理后离心, 取上清液测定其水解度。

1.2.2 水解度的测定

采用 Fox 等人检测干酪成熟指标的 12% TCA-N 的测定方法并加以改进^[4]。

准确移取搅拌均匀的酶解液 2.5 mL, 加入 25 mL 质量分数为 12% 的 TCA 溶液, 再用 20 mL 的缓冲液充分冲洗, 悬浮液在 4 000 r/min 的离心机中离心 20 min, 取上清液进行微量凯氏定氮, 最终水解度表示为: 水解过程中新生成肽的含氮质量占水解物中总氮质量的百分比, 公式如下:

$$\text{TCA-N}/\% = \frac{12\text{hTCA-N} - 0\text{hTCA-N}}{\text{总 N}}$$

1.2.3 感官评定分析

将最终水解产物离心浓缩后冻干, 取适量冻干粉加入由 12% 脱脂奶粉与 2% 的蔗糖配制的复原乳中作为待评定样品, 取商家推荐量的市售天然干酪香精加入上述由 12% 脱脂奶粉与 2% 的蔗糖配制而成的复原乳中作为标准品 1, 同时取市售光明纯鲜牛奶作为标准品 2, 请 13 名感官评价员进行评价比较, 根据样品与标准品的接近程度进行评分: 非常接近为 6

第一作者: 博士研究生(许时婴教授为通讯作者)。

收稿日期: 2008-10-13

分;比较接近为5分;有点接近为4分;接近程度较小为3分;很不接近为2分;截然不同为1分,最后将所有结果取平均值进行分析。此外在评判过程中为了避免气味对评判结果的干扰,每名评价员在对样品进行品评时都需使用鼻夹。

2 结果与讨论

根据酶的实测酶活以及它们各自水解产物的特性,本研究采用水解产物没有苦味的蛋白酶 Flavourzyme 500MG 和用于水解干酪生成较强滋味物质的 Neutrase 两种蛋白酶共同作用水解切达干酪,以达到制备乳滋味增强物质的目的。

Flavourzyme 500MG 是一种用于在中性或微酸性条件下水解蛋白质的真菌蛋白酶/肽酶的复合体,它包含有内切蛋白酶和外切肽酶 2 种活性^[5]。该酶可以用来脱除高水解度产物的苦味,同时也可以用于彻底水解蛋白质,增进和改善水解液的风味。鉴于此酶具有部分外切肽酶活性因而单独使用该酶水解程度较低,本研究采用 Neutrase 与其共同作用,以期获得水解程度较高并且风味良好的水解产物。

乳制品的主要风味物质可以分为 2 大类:挥发性风味化合物和不挥发性风味化合物。前者包括中、短碳链的脂肪酸、甲基酮、内酯以及含硫化合物等;而后者则包含长链脂肪酸、相对分子质量较低的肽类、蛋白质以及其它杂环类化合物^[6]。由于乳制品风味物质中不含氮部分在加酶水解前后都是可溶的,因而其含量在水解前后变化不大,而含氮部分尤其是游离氨基酸和小肽在水解前后的含量变化较大,因而本研究中引入干酪生产过程中用于评价干酪成熟程度的 12% 三氯乙酸-可溶氮 (12% TCA-N) 的改变量这一指标作为评价蛋白酶作用效果的依据^[7]。另外,由于蛋白水解易产生苦味,苦味是由于肽链被水解后,其中的疏水性氨基酸残基暴露与味蕾接触而产生^[8]。如何控制水解的程度使得水解得到的混合肽的滋味最佳同时无明显苦味产生也是用酶解法制备滋味增强肽的重点及难点,因而滋味评价也是必需的评价指标之一^[9]。

影响酶水解蛋白产物的因素有酶的种类、酶浓度与底物浓度的比值、反应的温度及反应的初始 pH 等^[10]。根据实际情况本研究分别讨论了 2 种酶的添加比、底物浓度、反应的温度、反应初始 pH 以及 2 酶共同作用时间对蛋白酶水解效果的影响。

2.1 两酶的添加比对水解效果的影响

在总酶添加量为 8% (质量百分数) 不变的基础上,选定五个不同的 F 酶:N 酶值 (3:1、5:3、1:1、3:5、1:3) 来考察 2 种蛋白酶的添加比对水解效果的影响,结果如图 1 所示。由于 F 酶具有部分外切肽酶活性,而 N 酶仅有内切蛋白酶活性,因此若 F 酶过多则水解强度不够,水解速率较低,而若 N 酶含量过高则虽然水解速率会有所提高但由于水解度不易控制因而会生成大量苦味肽而造成水解液滋味品质的严重下降。从图 1 可以得到随着 F 酶在总酶中比例的不断下降,水解度缓慢上升,且当 F 酶与 N 酶比值达到 1:3 时水解度与前组数据相比显著增大,但此时水解液已有明显苦味。因而综合考虑水解程度与水解液滋味两个指标,最终选择 F 酶与 N 酶比值为 5:3 的条件下进行水解反应,此时水解度较高,且水解产物无苦味。

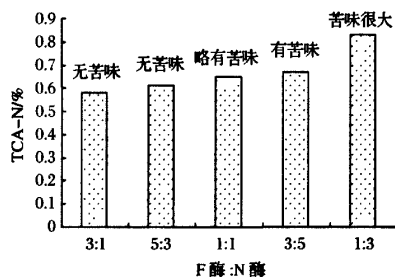


图 1 两酶添加比对水解效果的影响

2.2 底物浓度对水解效果的影响

选定 5 个不同水平的底物浓度 (2%、3%、4%、5%、6% 质量百分比) 来考察不同底物浓度对水解效果的影响,结果如图 2 所示。

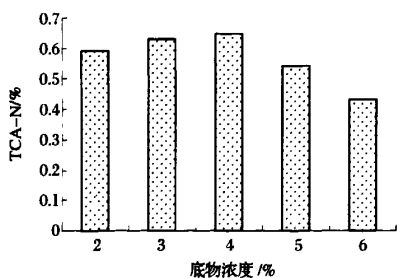


图 2 酶解底物浓度对水解效果的影响

底物浓度对酶解过程的影响主要体现在酶对底物的作用程度上,若底物过量,则酶浓度偏低,会造成酶解反应不完全,不能生成足够的滋味物质;若底物不足量,则酶浓度偏高,水解速度过快不易控制容易生成苦味肽从而影响水解液的滋味。由图 2 可知,蛋白酶在底物浓度为 4% 时水解度最高,水解效果最

好。所以水解时选择底物浓度 4% 为宜。

2.3 反应的温度对水解效果的影响

选定 5 个不同的温度 (40℃、45℃、50℃、55℃、60℃) 来考察不同反应温度对水解效果的影响, 结果如图 3 所示。在较低温度条件下温度对蛋白酶作用效果的影响不是特别显著, 但当温度较高时 (60℃) 酶对温度比较敏感, 水解度显著下降。温度对酶催化反应的影响是多方面的, 包括对酶催化反应的反应速度和对酶的稳定性等影响。不同的酶有其最适的反应温度范围, 温度过高或过低都会对酶促反应产生不利的影响。由图 3 可知风味蛋白酶在 45℃ 时水解率最高, 所以酶解最适温度选择 45℃ 为宜。

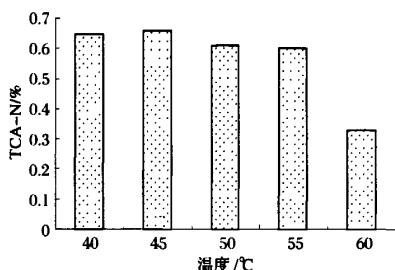


图 3 酶解温度对水解效果的影响

2.4 反应初始 pH 对水解效果的影响

选定 5 个不同水平的初始 pH 值 (pH 5、pH 6、pH 7、pH 8、pH 9) 来考察不同反应初始 pH 对水解效果的影响, 结果如图 4 所示。酶作为一种具有生物催化活性的蛋白质, 其活性高低受 pH 值影响很大。pH 对酶催化反应的影响包括 3 个方面: 影响酶的稳定性、影响酶与底物的结合以及影响酶催化底物转变成产物, 因而 pH 值过高或过低均对酶促反应有不利的影响。由图 4 可知, 相对于其它酶解条件反应初始 pH 对酶解作用影响较大, 蛋白酶在 pH 8 时 TCA-N% 最高, 水解效果最好, 所以水解时选择 pH 8 为宜。

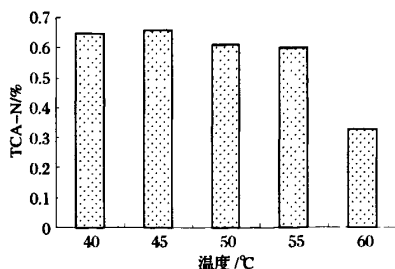


图 4 酶解初始 pH 对水解效果的影响

2.5 共同作用时间对水解效果及对水解产物滋味的影响

影响

酶解作用时间的长短直接到底物蛋白水解的程度, 进而也会影响酶解产物的滋味, 所以需要最终对酶解作用时间进行确定。选定 6 个时间点两两间隔 4 h, 以水解度和滋味评分 2 个指标对水解效果进行评定, 结果如图 5 所示。在初始的 12 h 内 TCA-N% 的增加速率较大, 接下来反应随着水解时间的增长 TCA-N% 仍继续增加, 但 16 h 以后其增加趋势明显减慢, 20 h 后基本无明显增大。而水解产物的滋味与两种标准样品相似度的变化则均为先增加后减小的趋势, 其中样品与添加牛奶香精的复配乳的滋味相似评分在 12 h 处达到最高, 20 h 以后迅速降低; 而样品与纯鲜奶的滋味相似度评分则是在 16 h 处达到最高, 随后迅速降低。同鲜奶样品比较, 添加有酶解香精样品的滋味与添加有天然干酪香精的复配乳标准品更为接近, 由于 12 h 酶解产物与天然干酪香精样品的最为相似, 12 h 与 16 h 的酶解产物与鲜牛奶的滋味相似评分结果相差较小, 并且在此时水解物的 TCA-N% 含量也较高, 因而综合考虑滋味评分与水解度随时间变化的结果选择 12 h 为最终 2 酶共同作用时间。

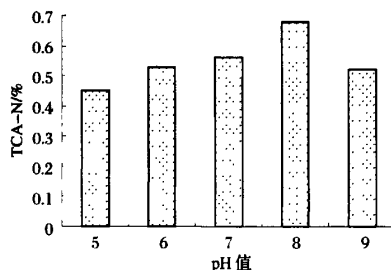


图 5 两酶共同作用时间对水解效果的影响及滋味评定结果

3 结论

在允许自然 pH 变化的条件下, 使用双酶复合法水解干酪得到滋味增强物质的最佳工艺条件为: 总酶添加量为 8%, F 酶与 N 酶的添加比例为 5:3, 水解温度 45℃, pH 值 8.0, 底物浓度 4%, 水解时间 12 h。此时水解产物的 TCA-N 的变化百分数为 68.3%, 滋味评分接近添有天然干酪香精的复原乳样品。

利用双酶法对干酪进行水解, 在其最佳水解条件下, 所得水解液的风味较佳, 无苦味和异味, 并有较浓郁的奶滋味, 可作为奶味滋味增强物直接添加入

各种乳制品中起到增强乳滋味的作用还可以配合其它香料用于调配各种天然牛奶或干酪香精。

参 考 文 献

- 1 Corsetti A, Gobetti M, Smacchi E, et al. Accelerated Ripening of Pecorino Umbro Cheese[J]. Journal of Dairy Research, 1998, 65: 631~642
- 2 Noronha N, Cronin D A, O'Riordan E D, et al. Flavouring of imitation cheese with enzyme-modified cheeses (EMCs): Sensory impact and measurement of aroma active short chain fatty acids (SCFAs) [J]. Food Chemistry, 2007, 106: 905~913
- 3 汪建明,李秉业,马凤艳. 干酪风味剂的研究与开发[J]. 中国食品添加剂, 2008 (增刊): 171~177
- 4 Fox P F, Folkertsma B. Use of the Cd-ninhydrin reagent

- to assess proteolysis in cheese during ripening [J]. Journal of Dairy Research, 1992, 59: 217~224
- 5 田怀香,王璋,许时婴. 酶法提取金华火腿中的风味前体物质[J]. 食品与机械, 2005, 21: 1~5
 - 6 李和,李佩文,于振华. 食品香料化学[M]. 北京:中国轻工业出版社, 1992. 115~121
 - 7 赵秀玲. 不同凝乳酶对干酪成熟期间蛋白质降解的影响[J]. 黄山学院学报, 2005(7): 93~95
 - 8 周俊清,吕加平,孟雅潇. 自然酸度下乳蛋白酶解动态分析及其物化特性研究[J]. 食品科学, 2008 (1): 196~201
 - 9 梁荣蓉,罗欣,刘希山. 干酪快速成熟的研究进展[J]. 食品工业科技, 2007, (5): 238~291
 - 10 Adler-Nissen J. Determination of the Degree of Hydrolysis of Food Protein Hydrolysates by Trinitrobenzenesulfonic Acid [J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1979, 27: 1256~1262

Study on Bienzyme Method of Hydrolysis Cheddar Cheese on pH Naturally Changed Condition

Wang Bei ,Xu Shiying

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, School of Food Science and Technology,
Jiangnan University, Wuxi 214112, China)

ABSTRACT The enzyme combination of Flavourzyme and Neutrase were employed to hydrolyze Cheddar cheese and get the enhanced milky materials as thoroughly as possible. Operation conditions of enzymatic combinations were optimized by single factor experiment. Under the concentration of enzyme fixed at 8%, the experimental results indicated that the optimum conditions were the ratio of Flavourzyme to Neutrase 5 : 3, reaction temperature 45℃, initial pH 8.0, the concentration of substrate was 4% and then incubating for 12 hours. Under such experimental conditions, the increase of 12% TCA-N percentage was 68.3%, taste grade nearly reached the standard sample added with commercial natural cheese flavor and the final hydrolyzed product has rich milky flavor.

Key words Cheddar cheese, enzymatic hydrolysis, enhanced milky materials

2009年欧洲食品配料展览会

2009年欧洲食品配料展览会将于2009年11月16~19日在德国法兰克福展览中心举办。

欧洲食品配料展(Fi Europe)由欧洲CMP Information公司主办,享有业界最高层次食品配料专业品牌盛会的美誉,是一个真正意义上食品配料行业的国际盛会。在短短的3天展会期间,您在展会发现的商机将超出您的想象,围绕您的是新的合作伙伴,新的业务联系,此展会是把产品销往全球最好的契机。

展品范围:食品添加剂、酸化剂、氨基酸及衍生物、抗氧化剂、烘焙食品、肉类制品、谷物、干酪食品、食用色素、发酵食品、乳制品、禽蛋产品、乳化剂、纤维食品、海产品、香精香料、果蔬产品、胶凝剂、草药及调味品、蛋黄素、家禽产品、乳制品、矿物质、坚果食品、有机食品、配料、防腐剂、蛋白质、调味剂、大豆制品、淀粉及其制品、食用糖及糖浆。

中国组展:北京领汇国际展览有限公司;联系地址:北京市朝阳区农展馆南路13号瑞辰国际中心719室;邮编:100125;联系人:刘阳 13146044077;电话:010-51295359 转 8605;传真:010-51295379 转 8605;邮箱:linghuiuiyang@163.com;msn:expo8605@worldfairs.cn;网站:www.lewayfairs.com。