

不同酪蛋白水解物对低脂发酵乳发酵参数的影响*

赵强忠¹, 赵谋明¹, 冯立科², 崔春¹

1(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州, 510640) 2(广东国营燕塘牛奶公司, 广东广州, 510640)

摘要 研究了4种蛋白酶(中性蛋白酶 Neutrase、木瓜蛋白酶 PA2、碱性蛋白酶 Alcalase 2.4L 和胰蛋白酶 PTN6.0S)的酪蛋白水解物对低脂发酵乳的发酵参数(滴定酸度、pH 值下降速度、终点酸度和产酸速度)的影响。结果表明, 酪蛋白水解物具有明显促进低脂发酵酸奶发酵、缩短发酵时间的作用, 中性蛋白酶的促进发酵效果最好, 木瓜蛋白酶次之, 碱性蛋白酶和胰酶的效果相差不大; 各添加样在整个发酵过程中发酵速度都高于空白样, 甚至高于双倍接种量的空白样。综合考虑, 采用木瓜蛋白酶对酪蛋白进行水解后产物最适添加到低脂发酵乳。

关键词 蛋白酶, 酶解, 酪蛋白, 低脂发酵乳, 发酵参数

有关添加蛋白水解物对发酵乳中的益生菌在发酵过程影响的研究近几年均有相关报道, 如 Yazici 和 Dave 等^[1,2] 分别通过添加蛋白基质脂肪替代物和乳清蛋白浓缩物表明, 对益生菌在发酵过程中的大量增殖有明显的促进作用, 认为蛋白水解物对益生菌在发酵过程中加速繁殖可能是基于寡肽区别于氨基酸吸收机制的特定吸收机制——易吸收性。张蓉真等^[3] 报道了大豆水解蛋白对乳酸菌增殖的促进作用, 赵新淮等^[4] 研究了大豆蛋白水解物的乳酸发酵促进作用, 吕嘉彬^[5] 指出, 添加肽或氨基酸等微量营养物质可以提高乳制品中益生菌的活菌数。但关于酪蛋白水解物对低脂发酵乳方面的研究尚未见报道。

文中重点研究了不同蛋白酶水解酪蛋白后添加到低脂发酵乳中, 比较其对发酵过程的影响, 并对其促进发酵作用进行机理探讨。为解决低脂发酵乳目前存在的发酵速度慢等问题提供理论和方法的指导。

1 材料与仪器设备

1.1 主要原料与试剂

酪氨酸钠: 德国 NGL; 胰蛋白酶 PTN6.0S, 碱性蛋白酶 Alcalase 2.4 L, 中性蛋白酶 Neutrase: 诺维信公司; 木瓜蛋白酶 PA2: 广州酶制剂厂; 全脂奶粉: 新西兰乳品有限公司; 白砂糖: 一级品, 东莞糖厂; 发酵乳稳定剂: 广州合诚实业有限公司; 丹麦汉森 Yo-Flex 菌种: YC-370; 其他试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器设备

第一作者: 博士, 讲师。

* 国家自然科学基金(20676044); 广州市攻关项目(2005Z3-E0501);

广州市科技计划项目(2005v41c0391)

收稿日期: 2006-11-21, 改回日期: 2007-02-12

电热恒温水浴锅, 北京市医疗设备厂; GHX-9270B 隔水式培养箱, 上海福玛实验设备有限公司; pH-S-25 型酸度计, 上海雷磁仪器厂; JJ500 型精密电子天平, 美国双杰兄弟有限公司; JB200-D 型强力电动搅拌器, 上海标本模型厂; QYQ-1000-UL 取液器, 北京青云航空仪表有限公司; 冰箱和冷藏柜, 华凌公司; APV-1000 匀浆仪, 丹麦 APV 公司; KDN-2C 型蛋白质测定仪, 上海纤检仪器有限公司。

2 实验方法

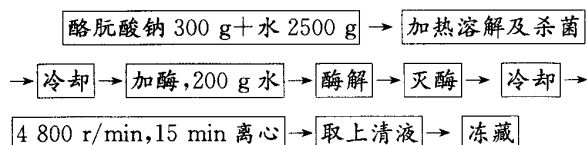
2.1 酪蛋白水解物的制备

2.1.1 酶解条件(表1)

表1 酶解条件

蛋白酶型号	PTN6.0S	Alcalase 2.4L	Neutrase	木瓜蛋白酶 PA2
酶活力/ $u \cdot g^{-1}$	5.5×10^4	$6.9 \times 10^4 u/mL$	2.7×10^4	5.1×10^4
酶解温度/ $^{\circ}C$	55	60	45	60
底物浓度/%	10	10	10	10
pH 值	自然	自然	自然	自然
加酶量/ $u \cdot g^{-1}$	410	500	200	380

2.1.2 酪蛋白水解工艺



2.2 氨态氮测定

酶解过程中取样, 灭酶、离心后, 取上清液, 采用甲醛滴定法进行测定^[7]。

2.3 水解度测定

采用 pH-stat 法结合甲醛滴定法测定^[6,7]

2.4 蛋白质测定

酶解过程中取样, 灭酶、离心后, 取上清液, 采用

凯氏定氮法进行测定^[8]。

2.5 发酵乳制备

全脂奶粉 4.0%, 脱脂奶粉 4.3%, 蔗糖 8.0%, 稳定剂 0.45%。

注: 当加入酪蛋白水解物时, 保持蛋白质总量为 2.5%, 替换等蛋白质质量的脱脂奶粉。

工艺流程: 奶粉+稳定剂+蔗糖 → 50~55℃水化 30 min → 20 MPa 均质 → 90℃/5 min 杀菌 → 冷却至 42℃ → 接种 → 42℃发酵 → 冷却至 18℃ → 4℃冷藏

2.6 滴定酸度测定

洁尼尔度(°T): 用 5 mL 吸管取搅拌均匀的发酵乳 5 mL, 加入含 25 mL 蒸馏水锥形瓶中, 滴入 3~4 滴 1% 酚酞指示剂, 用 0.1 mol/L NaOH 溶液滴定至浅红色, 保持 20 s 不退色。消耗的 NaOH 溶液的体积(mL)乘以 20 即为酸度(°T)^[9]。

2.7 pH 值测定

用 pHS-25 型酸度计测定。每次使用前都用 pH 为 6.86 和 4.00 磷酸缓冲溶液校准。

2.8 产酸速度

产酸速度是发酵过程的重要发酵参数, 其大小是对菌种活力和发酵效果的反映^[9]。

$$\text{平均产酸速度} (^{\circ}\text{T}/\text{h}) = \frac{\text{终点滴定酸度} (^{\circ}\text{T})}{\text{发酵时间} (\text{h})}$$

注: 发酵乳 pH 值达到 4.40 时确定为发酵终点, 从接种到此时的时间记为发酵时间, 立即冷却以控制后发酵。

3 结果与讨论

采用木瓜蛋白酶 PA2、Alcalase 2.4L 碱性蛋白酶、Neutrase 中性蛋白酶和 PTN 6.0S 胰酶 4 种蛋白酶, 在各酶最适条件下对酪蛋白进行水解, 将获得的相当水解度(DH% 为 10~10.5%)的不同酪蛋白水解液添加于低脂发酵乳中, 比较发酵过程中各样品的发酵参数, pH 值下降速度和酸度变化情况。当酪蛋白水解物添加量高于 2.5% 时, 低脂发酵乳产品中有较明显的苦味, 考虑成本和风味, 酪蛋白水解物在本实验中均采用添加量为 1%。各添加样和空白样的菌种接种量为正常量, 并将接种量为正常接种量 2 倍的另一空白样作为对照(对应以下各图中的“双倍菌种”)。

3.1 不同酪蛋白水解物对滴定酸度的影响

由图 1 可知, 添加不同酪蛋白水解物对低脂发酵

乳发酵过程中的滴定酸度有明显促进作用。中性蛋白酶的促进产酸效果最好, 木瓜蛋白酶次之, 碱性蛋白酶和胰蛋白酶的效果相差不明显; 且各添加样在整个发酵过程中产酸都高于空白样, 甚至高于双倍接种量的空白样。这说明, 在水解度相差不大的情况下, 采用不同蛋白酶水解获得的酪蛋白水解物对低脂发酵乳发酵具有促进作用, 且具有一定的差异性。这主要原因可能是, 各种不同蛋白酶水解相同底物——酪蛋白时, 由于各种酶的作用位点不同, 致使不同酪蛋白水解物所含的非蛋白态氮组成如氨基酸和肽等存在有明显差异, 而这些非蛋白态氮对乳酸菌来说是比酪蛋白更好的氮源, 因此, 添加酪蛋白水解物具有明显的促进乳酸菌产酸; 又由于各种蛋白酶水解产物中的氨基酸和多肽组成不同, 乳酸菌对其利用情况也不同, 因而, 不同蛋白酶的水解产物对乳酸菌的促进作用也不同。

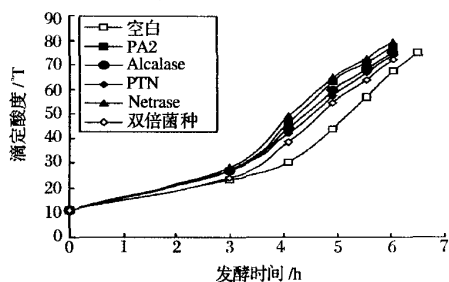


图 1 不同酪蛋白水解液对发酵过程酸度变化的影响

3.2 不同酪蛋白水解物对 pH 值下降速度的影响

pH 值下降速度是发酵乳发酵过程中表征菌种活力的重要指标, 最大 pH 值下降速度可以反映乳酸菌产酸能力的大小。从图 2 可以看出, 不同酪蛋白水解物添加到低脂发酵乳中, 对其 pH 值下降速度和最大 pH 值下降速度都有着显著影响。由图 2 可知, 最大 pH 值下降速度按大小顺序分别对应的蛋白酶为: Neutrase 中性蛋白酶 > 木瓜蛋白酶 > PA2PTN 6.0S 胰酶 ≈ Alcalase 2.4L 碱性蛋白酶 > 双倍菌种; 最大

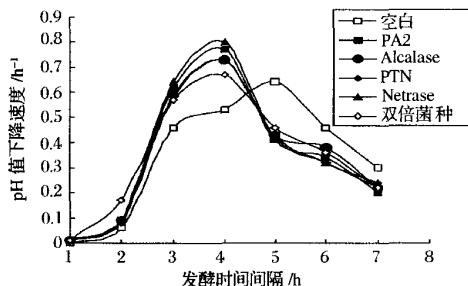


图 2 不同酪蛋白水解液对 pH 值下降速度的影响

pH 值下降速度与各样品滴定酸度增加快慢的顺序相同,最大 pH 值下降速度越大的菌种说明产酸能力越强,体现在发酵过程中酸度升高也越快。

从图 2 还可发现,双倍菌种样与正常接种量的空白样之间的最大 pH 值下降速度的差异不明显,前者为 0.647,后者为 0.64。这种情形说明,增大菌种的接种量虽然提高了菌种的产酸量和缩短了发酵时间,但菌种本身的产酸活力并没有明显改变;在各个乳酸菌单体产酸水平一样时,只是由于乳酸菌数量的增加,使得积累的乳酸量增多。

3.3 不同酪蛋白水解物对终点酸度的影响

测定添加不同酪蛋白水解物的低脂发酵乳发酵终点时的终点滴定酸度,结果如图 3 所示。

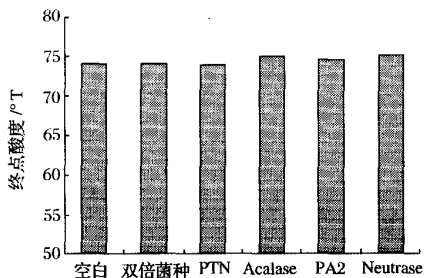


图 3 不同添加样和空白样发酵终点的酸度比较

从图 3 可知,各样品的终点酸度相近,大约在 74° T。这主要原因是本实验是以 pH 值达到 4.40 时作为发酵终点,由于体系中的各主要成分基本相同,如蛋白质、盐类和亲水胶体的组成及含量基本一样,只有添加的水解物组成有差异,可以认为,这种特定体系中由蛋白质、盐类和亲水胶体引起的整体缓冲能力相近,添加的酪蛋白水解物对体系的缓冲能力影响很小,使得终点的滴定酸度基本相同。

3.4 不同酪蛋白水解物对产酸速度的影响

产酸速度表明,在整个发酵过程中菌种产酸能力的大小,在相同接种量的条件下,是菌种活力的另一重要指标。不同酪蛋白水解物对低脂发酵乳发酵过程产酸速度的影响如图 4 所示。

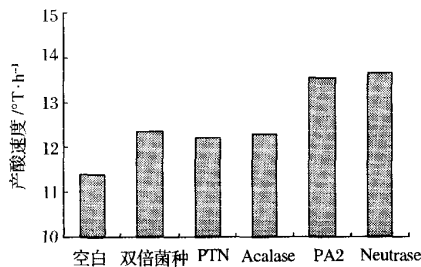


图 4 不同酪蛋白水解液对发酵过程产酸速度的影响

由图 4 可知,添加木瓜蛋白酶 PA2 和 Neutrase 中性蛋白酶水解产物时,乳酸菌的产酸能力相差不明显,但明显高于添加其他 2 种蛋白酶的水解产物样品。在正常接种量下,添加酪蛋白水解物的样品的产酸能力均明显高于空白样,而添加双倍菌种样与添加 Alcalase2.4L 碱性蛋白酶和 PTN6.0S 胰酶水解产物的产酸能力相当。

综合图 4 和图 2 的结果可知,提高接种量能够增大产酸速度,但并不能增大菌种产酸的活力。比较产酸速度,只有相同的接种量下才能够正确表征菌种活力的大小。

3.5 不同酪蛋白水解物对发酵时间的影响

从图 5 可知,添加酪蛋白水解物可明显缩短低脂发酵乳发酵时间,且不同蛋白酶的水解产物对发酵的促进作用具有明显的差异,添加木瓜蛋白酶 PA2 和 Neutrase 中性蛋白酶,水解物的样品发酵所需时间最短,约为 5.5 h,比空白样缩短了约 1 h。Alcalase2.4 L 碱性蛋白酶和 PTN6.0S 胰酶水解产物添加样与双倍菌种样的发酵时间大约都在 6.1 h。从成本考虑,木瓜蛋白酶 PA2 水解物是最佳的低脂发酵乳发酵促进剂。

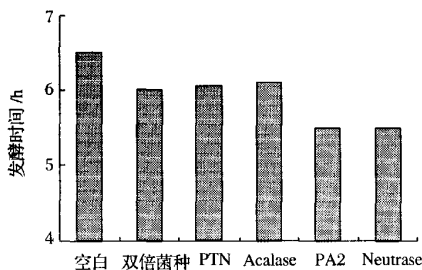


图 5 不同酪蛋白水解液对发酵时间的影响

4 结 论

通过研究添加了蛋白酶的酪蛋白水解物对低脂发酵乳发酵过程参数的影响,得到如下结论:

(1) 添加不同酪蛋白水解物对低脂发酵乳发酵过程中滴定酸度有明显的促进作用。中性蛋白酶的促进产酸效果最好,木瓜蛋白酶次之,碱性蛋白酶和胰蛋白酶的效果相差不明显且较差;各添加样在整个发酵过程中产酸都高于空白样,甚至高于双倍接种量的空白样。

(2) 不同蛋白酶的水解产物添加到低脂发酵乳中对其 pH 值下降速度和最大 pH 值下降速度都有着显著影响。最大 pH 值下降速度按大小顺序分别对应的水解酶为:中性蛋白酶>木瓜蛋白酶≈胰酶>

碱性蛋白酶>双倍菌种>空白样。

(3) 添加不同蛋白酶水解产物的低脂发酵乳发酵终点时的滴定酸度基本相近,添加木瓜蛋白酶和中性蛋白酶的这两种水解产物时,乳酸菌的产酸能力相差明显,且明显高于添加其他2种蛋白酶的水解产物样品。

(4) 添加酪蛋白水解物可明显缩短低脂发酵乳发酵时间,且不同蛋白酶的水解产物对发酵的促进作用具有明显的差异,添加木瓜蛋白酶和中性蛋白酶水解物的样品发酵所需时间最短,碱性蛋白酶和胰酶水解产物添加样与双倍菌种样的发酵时间相当。

参 考 文 献

- 1 Yazici, Akgun A. Effect of some protein based fat replacers on physical, chemical, textural, and sensory properties of strained yoghurt[J]. Journal of Food Engineering, 2004, 62: 245~254
- 2 Rajiv I, Dave, Nagendra P. Effectiveness of Ascorbic Acid as an Oxygen Scavenger in Improving Viability of Probiotic Bacteria in Yoghurt Made with Commercial Starter Cultures[J]. Int Dairy Journal, 1997, 7: 435~443
- 3 张蓉真,李珑. 大豆水解蛋白对乳酸菌增殖的促进作用[J]. 中国粮油学报, 1997, 12(6): 40~43
- 4 赵新淮,关瑞. 大豆蛋白水解物的乳酸发酵促进作用[J]. 东北农业大学学报, 1998, 9(1): 102~104
- 5 吕嘉桢,成妮妮. 提高乳品中益生菌存活力的方法[J]. 中国乳品工业, 2001, 29(6): 31~34
- 6 宁正祥主编. 食品成分分析手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998. 119~124
- 7 Adler-Nissen J. Enzymatic Hydrolysis of Food Proteins [M]. Applied Science Publishers, 1986b: 122~126
- 8 无锡轻工业学院,天津轻工业学院合编. 食品分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1983. 211~219
- 9 赵谋明,刘宏锋,林伟锋,等. 酪蛋白水解物对酸奶发酵的促进作用及其对酸奶质构的影响[J]. 食品工业科技, 2005, 26(7): 78~81

Effect of Different Casein-hydrolysates on Fermentation Parameter of Low-fat Yoghurt

Zhao Qiangzhong¹, Zhao Mouming¹, Feng Like², Cui Chun¹

1(South China University of Technology Department of Light Industry and Food Guangzhou 510640, China)

2(Guangdong Yantang Dairy Company, Guangzhou 510640, China)

Abstract Effects of casein-hydrolysates (CH) by different enzymes (Neutrase, Papain PA2, Alcalase 2.4L and trypsinase PTN6.0S) on fermentation parameters (titration acidities, speed of pH decrease, final acidities and acidification speed) of low-fat yoghurt were studied. The study showed that CH can obviously shorten the fermentation time and enhance the acidification speed. The effect was related to the kinds of the enzymes. The order of the four kinds of enzymes, in terms of impact of fermentation time and acidification speed was Neutrase, Papain, Alcalase and trypsinase. The fermentation rate of CH addition was better than not only control sample but also the double fermentation adjuncts. Considering the fermentation rate and cost, however the Papain was more favorable enzyme.

Key words protease, enzymatic hydrolysis, low-fat yogurt, casein, fermentation parameter

《浓香型白酒》等3项国家标准延期实施

国家标准委发出关于延期实施 GB/T10781.1—2006《浓香型白酒》等3项国家标准的通知。通知说,经研究决定,GB/T10781.1—2006《浓香型白酒》、GB/T10781.2—2006《清香型白酒》、GB/T10781.3—2006《米香型白酒》等3项国家标准延期至2008年1月1日起实施。

国家酝酿制定茶饮料标准

茶饮料标准正在制定中,标准正式出台后,茶味过淡或茶多酚含量不够都将不能称茶饮料,只能叫“茶味饮料”。

茶饮料已成为饮用水之外消费者购买最多的饮料,大大超过碳酸饮料及含乳饮料。新的茶饮料国家标准将对茶饮料的分类、技术要求进行详细规定。如对添加果汁的茶饮料,原果汁含量未达到5%时,可归属于果味茶饮料,对茶多酚含量达不到要求的产品,划为“茶味饮料”。