

乳清蛋白木瓜蛋白酶酶解物对酸奶发酵及贮藏特性影响*

曲杜娟,赵强忠,赵谋明

(华南理工大学轻工与食品学院,广东 广州,510640)

摘 要 采用3个水解度(6.63%、8.21%和9.21%)的乳清蛋白木瓜蛋白酶酶解液取代等量蛋白的奶粉用于酸奶发酵,探讨酶解液对酸奶发酵及贮藏特性的影响。结果表明,乳清蛋白木瓜蛋白酶酶解物能明显促进酸奶发酵,在一定水解度范围内,水解度越大,其促发酵能力越强;与对照相比,酶解物能增加酸奶在贮藏期的表现黏度,且在一定水解度范围内,水解度越大,其表现黏度越大;9.21%水解度的酶解液抑制了酸奶的后酸化,而水解度6.63%和8.21%的酶解液则对酸奶的后酸化有促进作用。

关键词 酸奶,乳清浓缩蛋白,酶解,发酵,贮藏特性

近年来,国内外许多学者研究了外加组分对酸奶发酵的影响^[1-6]。国内的研究主要集中在大豆蛋白和酪蛋白水解物对酸奶发酵的影响上。而国外的研究则集中在乳蛋白水解物对酸奶中益生菌的生长及酸奶品质特性的影响。

因此,目前国内外关于乳清蛋白酶解物对酸奶发酵的影响作用及其机理的相关研究报道很少。而乳清蛋白是乳品工业生产干酪的副产物,来源广泛,具有很高的营养价值^[7],是乳蛋白的重要组成部分,而且含有多种生物活性肽序列,其酶解物作为具有生物活性和营养功能的添加剂已被广泛应用于食品中^[8]。

本文初步研究了不同水解度(degree of hydrolysis, *DH*)的乳清浓缩蛋白(WPC)的木瓜蛋白酶酶解物对酸奶发酵及贮藏特性的影响,以期为进一步深入研究乳蛋白水解物对酸奶发酵的影响及作用机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

浓缩乳清蛋白:新西兰乳品有限公司;全脂奶粉:新西兰乳品有限公司;木瓜蛋白酶(酶活力 70×10^4 U/g):广州酶制剂厂;酸奶稳定剂:广州合诚化学有限公司;乳酸菌:YC-380,丹麦汉森公司提供;其他试剂:均为分析纯。

1.2 主要仪器、设备

第一作者:硕士研究生(赵谋明教授为通讯作者)。

*广东省科技计划项目(项目编号 2008A010900001; 2008A010900017)

收稿日期:2009-01-19,改回日期:2009-03-17

JJ500 型精密电子天平:美国双杰兄弟有限公司;电热恒温水浴锅:北京市医疗设备厂;KDN-2C 型蛋白质测定仪:上海纤检仪器有限公司;Amersham 蛋白质分析纯化系统:Amersham 公司;GHX-9270B 隔水式培养箱:上海福玛实验仪器有限公司;PHS-25 型酸度计:上海雷磁仪器厂;MJ-176NR 搅拌机:松下电器产业株式会社;NDJ-1 型旋转粘度计:上海跃华医疗器械厂;APV-1000 均质机:丹麦 APV 公司;冰箱和冷藏柜:华凌公司。

1.3 实验方法

1.3.1 乳清蛋白酶解物的制备

6% 浓缩乳清蛋白溶液 $\rightarrow 55^\circ\text{C}$ 预热 10 min \rightarrow 加入适量蛋白酶($[E]/[S]$ 1.5%) \rightarrow 恒定温度水解,每隔一段时间取样 \rightarrow 沸水浴 10 min 灭酶 \rightarrow 酶解液 \rightarrow 离心 20 min(4°C , 4 800 r/min) \rightarrow 上清液 \rightarrow 测 *DH* 和总氮。

选出不同水解度的 3 种酶解液用于酸奶发酵。

1.3.2 酸奶的制备

酸奶配方(1 000 g):全脂奶粉 100 g,蔗糖 80 g,稳定剂 5.0 g。

配方说明:在酸奶中按蛋白质总质量的 2.50% 计算。添加乳清蛋白水解液时,替换等量蛋白质的全脂奶粉。

工艺流程:

乳粉 + 稳定剂 + 糖 + 水解液 $\rightarrow 50 \sim 55^\circ\text{C}$ 水化 30 min $\rightarrow 20$ MPa 均质 $\rightarrow 90^\circ\text{C}/5$ min 杀菌 \rightarrow 冷却至 42°C \rightarrow 接种 $\rightarrow 42^\circ\text{C}$ 发酵至 pH 4.40 \rightarrow 冷却至 18°C $\rightarrow 4^\circ\text{C}$ 冷藏

1.4 测定方法

1.4.1 蛋白质含量测定^[9]

半微量凯氏定氮法。

1.4.2 水解度(DH)测定

甲醛滴定法^[10]。

1.4.3 酶解液中肽分子量的测定

分子量测定采用 Amersham 蛋白质分析纯化系统。色谱条件: Superdex-peptide-10/300-GL 玻璃柱, 洗脱液为 0.25 mol/L NaCl 磷酸盐缓冲液(pH 7.2), 流速 0.5 mL/min, 检测波长 214 nm。标准肽样品与洗脱体积拟合方程为 $\lg M = -0.0578 V + 4.6289$ ($r^2 = 0.99$), 式中 $\lg M$ 为标准肽相对分子量的常用对数, V 为洗脱体积。标准肽样品为 Globin III, Globin II, Globin I, Globin I + III, Globin I + II, Globin, 其分子量分别为 2 512 u, 6 214 u, 8 519 u, 10 700 u, 14 404 u, 16 949 u。

1.4.4 酸奶 pH 的测定

用 PHS-25 型酸度计测定。

1.4.5 酸奶滴定酸度的测定

GB5409-1985。

1.4.6 酸奶表观黏度的测定

酸奶发酵至 pH 4.40 时结束发酵, 搅拌并冷却至 18 ℃ 后分装于酸奶杯并于 4 ℃ 冷藏, 然后分别在贮藏的第 1 天、6 天、11 天和 16 天取出, 检测黏度和滴定酸度。

DJ-1 旋转黏度计, 在 10 ℃ 下用 3# 转子测定 12 r/min 时的黏度, 单位 Pa·s。

1.4.7 产酸速度($^{\circ}\text{T/h}$)

$$\text{平均产酸速度} = \frac{\text{终点滴定酸度}}{\text{发酵时间}}$$

发酵酸奶 pH 达到 4.40 时确定为发酵终点, 从接种到此时的时间间隔记为发酵时间。

2 结果与讨论

2.1 酶解液中肽的分子量分布

表 1 不同水解度的酶解液中肽的分子量分布

酶解液编号	DH/%	基于分子量的肽的分布/%				
		>10 000u	5 000-10 000 u	3 000-5 000 u	3 000-1 000 u	<1 000u
木 1	6.63	19.82	64.89	13.18	1.97	0.00
木 2	8.21	11.17	65.84	20.82	2.17	0.00
木 3	9.21	6.25	63.21	24.71	5.33	0.51

由表 1 可以看出, 不同水解度的酶解液中肽的分子量分布有明显的差异; 3 种酶解液的主要组分都为分子量在 5 000-10 000 u 的肽段, 该部分肽段在 3 种酶解液中所占的比例, 都在 60% 以上, 且含量接近; 但是, 随水解度的增大, 分子量 >10 000 u 的组分明显较少, 而 <5 000 u 的肽段呈现相反的变化趋势, 其在酶解液中所占的比例由 15.15% 递增至 30.04%。

2.2 不同水解度的乳清蛋白木瓜蛋白酶对酸奶发酵的影响

将酶解液以质量分数为 4% 的添加量加入奶液中, 替代含等量蛋白质的奶粉。发酵过程中每隔 1 h 取样测定奶液 pH 值, 并测定相应的滴定酸度。发酵过程的 pH 下降曲线和滴定酸度变化曲线如图 1 和图 2 所示。

由图 1 和图 2 看出, 添加乳清蛋白的木瓜蛋白酶水解物可明显促进酸奶的发酵; 在一定水解度范围内, 水解度越高, 促发酵作用越明显, 这与刘瑶^[3]等用大豆分离蛋白的酶解液及刘宏峰^[4]等用酪蛋白酶解液添加于酸奶的研究结果相同; 添加乳清蛋白酶解

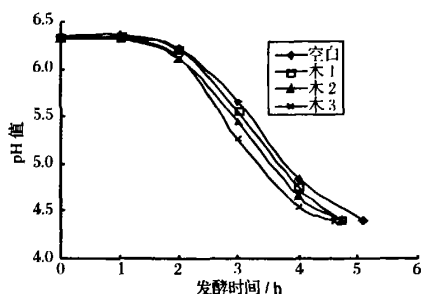


图 1 不同 DH 的酶解液对酸奶发酵过程 pH 的影响

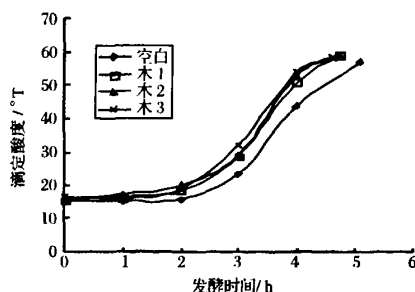


图 2 不同 DH 的酶解液对酸奶发酵过程滴定酸度的影响

液并没有改变菌种的迟滞时间, 在前 2 h 内添加样和

空白样的 pH 下降曲线相当;但从 2 h 开始,添加样的 pH 下降速度开始明显大于空白样,其中以水解度最大的木 3 酶解液最为明显;从最终的发酵时间来看,这 3 种酶解液之间的差异并不明显,尤其是水解度较低的木 1 和木 2,几乎同时到达发酵终点(pH 4.40),而且这两者的滴定酸度变化曲线也几乎重合;木 1、木 2 及木 3 可分别缩短发酵时间 6.3 %、6.9 % 及 8.9 %;在发酵终点(pH4.40),空白与 3 个添加样的滴定酸度基本相等。pH 值表示溶液的有效酸度(指被测溶液中 H^+ 的浓度,所反映的是已解离的那部分酸的浓度),受食品中缓冲物质的影响;而总酸度(滴定酸度)是食品中所有酸性成分的总量,它包括未解离的酸的浓度和已解离的酸的浓度。张旭晖等^[11]报道,某些乳清浓缩蛋白(如 WPC80)会影响酸奶的酸奶的缓冲能力。本实验中,在发酵终点(pH4.40),空白与 3 个添加样的滴定酸度基本相等,表明,添加乳清浓缩蛋白水解物没有明显改变酸奶的缓冲能力。

酶解液能明显促进酸奶发酵,主要原因是牛奶本身只含有很少量的非蛋白态氮,而嗜热链球菌的生长需要保加利亚乳杆菌水解酪蛋白所产生的肽和氨基酸,因此牛奶并非嗜热链球菌生长的理想氮源。外加的乳清蛋白酶解物含有的肽和氨基酸可以为球菌的生长提供非蛋白氮源而加快其产酸速度从而缩短发酵时间。而不同水解度的酶解液显示出的促发酵能力的差异,可能与酶解液中分子量 $<5\ 000\ u$ 的肽段的含量不同有关。木 1、木 2、木 3(促发酵能力依次增大)3 种酶解液中, $<5\ 000\ u$ 的肽段在总的酶解液中所占比例逐渐增大且 3 者差异明显(表 1),其中促发酵能力最强的木 3 酶解液中该部分肽段所占比例为 30.04 %,比木 2、木 1 分别高 23.47 % 和 49.57 %。因而,据此可以推断,乳清蛋白木瓜蛋白酶酶解物中,对促进酸奶发酵较有利的为 $<5\ 000\ u$ 的肽段。关于不同分子量的肽段对乳酸菌生长增殖的影响作用还有待进一步研究阐明。

2.2.1 乳清蛋白酶解液对酸奶贮藏期间表观黏度的影响

从图 3 可以看出,添加了乳清蛋白酶解液的酸奶明显增加了贮藏期的黏度,且在一定水解度范围内,酶解液 DH 越高,酸奶黏度越大;添加样和空白样在贮藏的前 5 d 黏度均缓慢上升,之后两者的黏度都开始下降,与添加样相比,空白样黏度下降速度更快。其可能原因是,初期乳清蛋白水解物增强了酸奶菌株的产胞外多糖能力,因而使酸奶的黏度增大;在发酵

结束后,虽然经过搅拌的剪切作用,破坏了原先的凝胶态网络组织结构,但这种网络组织结构在贮藏后得到部分恢复,因此在贮藏的前几天,其表观黏度有所上升;而后期,因为网络结构骨架的蛋白质分子在酸性环境下发生部分降解,同时增稠剂也在酸性条件下产生部分降解,从而使表观黏度降低。

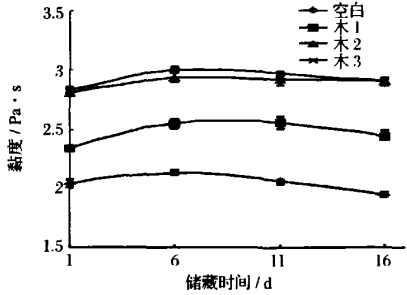


图 3 不同 DH 酶解液对酸奶贮藏期黏度的影响

2.2.2 乳清蛋白水解液对酸奶贮藏过程中滴定酸度的影响

由图 4 可以看出,在 1-16 d 的贮藏期内,各样品的滴定酸度都缓慢上升,但均未超过 $100^{\circ}T$,即都在 GB2746-1985 规定的 $70-110^{\circ}T$ 范围内;3 个添加样比较,水解度越低,贮藏期间滴定酸度越高;与空白样相比,添加水解度较低的木 1 及木 2 酶解液的样品,在贮藏期间的滴定酸度高于空白,显示出促进后酸化的效果,而添加水解度较高的木 3 酶解液的样品,则显示出抑制后酸化的效果。酸奶的后酸化是指酸奶在正常发酵结束后,在工厂贮存、产品运输、销售、食用前这一过程中,菌体仍在生长,分解残存的乳糖产生乳酸,使酸奶的 pH 值继续下降的现象。酸奶在贮藏期间发生的后酸化,主要是其中的保加利亚乳杆菌作用的结果^[12]。酶解液所显示的对后酸化的不同影响作用,可能与其对酸奶发酵剂中的两种菌:保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌的生长和稳定有不同的影响有关,其具体机制有待进一步研究阐明。

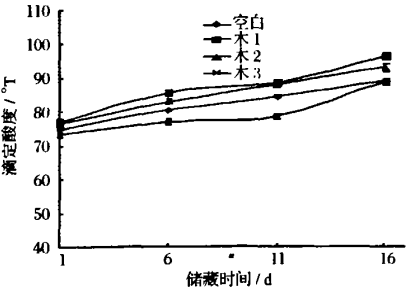


图 4 不同 DH 酶解液对酸奶贮藏期间滴定酸度的影响

3 结论

(1)添加乳清蛋白的木瓜蛋白酶酶解物可以明显促进酸奶的发酵,且在一定水解度范围内,水解度越大,其促进效果越明显;酶解液中 $<5\ 000\ \text{u}$ 的肽段可能更有利于乳酸菌的生长增殖。不同分子量的肽段对乳酸菌在酸奶中的增殖的影响及其对发酵的调控还有待进一步研究阐明。

(2)与空白相比,添加乳清蛋白的木瓜蛋白酶酶解物,可以明显增加酸奶在贮藏期的表观黏度,且贮藏期的表观黏度随添加的酶解物的水解度的增大而增大。

(3)添加水解物较高的木3酶解液,可抑制酸奶在贮藏过程中的后酸化,而水解度较低的木1和木2则加速了酸奶的后酸化。

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] 刘瑶,潘思秩,王可兴. Flavourzyme 酶解大豆分离蛋白对酸奶发酵酸度及流变特性的影响研究[J].食品科学,2006,27(3):48-52.
- [4] 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(7):78-52.

- [5] Oliveira M N, Sodini I, Remeuf F, et al. Effect of milk supplementation and culture composition on acidification, textural properties and microbiological stability of fermented milks containing probiotic bacteria [J]. International Dairy Journal, 2001, 11:935-942.
- [6] Lucas A, Sodinia I, Monnet C, et al. Probiotic cell counts and acidification in fermented milks supplemented with milk protein hydrolysates [J]. International Dairy Journal, 2004, 14: 47-53.
- [7] 张丹凤.乳清蛋白的特性及其在乳制品生产中的应用[J].中国乳品添加剂,2007(7):27-28.
- [8] Liu Lijun, Zhu Chuanhe, Zhao Zheng. Analyzing molecular weight distribution of whey protein hydrolysates [J]. Food and Bioproducts Processing, 2008, 86: 1-6.
- [9] 北京大学生物系生物化学教研室.生物化学实验指导[M].北京:高等教育出版社,1988:87-93.
- [10] 大连轻工学院.华南理工大学等.食品分析[M].北京:中国轻工业出版社,1995:234-235.
- [11] 张旭晖,龙芳羽,孙健,等.乳清蛋白的功能特性及其在酸奶中的应用[J].中国奶牛,2006(6):46-48.
- [12] 郭清泉,张兰威,夏秀芳.酸奶制品发生后酸化主要发酵剂菌确定及性质研究[J].食品与发酵工业,2001,28(4):42-46.

Effect of Whey Protein Hydrolysate by Papain on Fermentation and Storage Characteristics of Yogurt

Qu Dujuan, Zhao Qiangzhong, Zhao Mouming

(College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

ABSTRACT Acidity change and storage characteristic of yogurt mixed with whey protein hydrolysate (WPH) of different hydrolytic degree (DH, 6.63%, 8.21% and 9.21%) by Papain were studied. The results showed that, WPH accelerated the acidification of yogurt during fermentation, and within certain range of DH, the higher the DH, the shorter the fermentation time. Compared to the control, WPH increased the apparent viscosity of yogurt. Moreover, within certain range of DH, the higher the DH, the higher the apparent viscosity of yogurt. WPH with DH of 9.21% inhibited the post-acidification of yogurt, while WPH with DH of 6.63% and 8.21% accelerated the post-acidification of yogurt.

Key words yogurt, whey protein hydrolysate, enzymatic hydrolysis, fermentation, storage characteristic