

## 脂肪酶水解乳脂制备天然奶味香基的研究\*

于铁妹<sup>1</sup>,徐 迅<sup>1</sup>,王永华,杨 博<sup>2</sup>,张水华<sup>1</sup>

1(华南理工大学轻工与食品学院,广东广州,510640) 2(华南理工大学生物科学与工程学院,广东广州,510640)

**摘 要** 选取了5种微生物来源的脂肪酶对乳脂进行酶解。结合香气评定,筛选出了对乳脂中短链脂肪酸特异性最强、水解物香气评分最高的 lipase MER 为实验用酶。研究了 lipase MER 水解乳脂的工艺条件,得出其水解乳脂适宜温度为 40℃、pH 值为 6.5,底物浓度为 50%。经焙烤评定 lipase MER 水解乳脂制得的水解物奶香柔和、自然,可作为调配天然奶味香精的香基。

**关键词** 脂肪酶,奶味香精,乳脂,水解

奶味香精是食品工业中应用最广泛的香精之一。利用相关微生物、酶水解奶油等生物技术手段再经修饰调配制成的天然奶味香精具有香气自然、柔和的特点,随着人们对奶味香精的香气及安全性提出了更高的要求,天然奶味香精系列产品的开发具有广阔的市场前景<sup>[1]</sup>。利用微生物发酵手段制备奶味香精具有成本高、操作复杂等缺点,目前酶法是生产天然奶味香精的常用方法。日本早在上世纪八九十年代对酶法增香技术进行了相关的研究,并有多项专利。如 Tojo Hiroaki<sup>[2]</sup>以 *Penicillium chrysogenum* 来源的脂肪酶水解牛乳制备奶油香精,Kihara Hiroshi<sup>[3]</sup>利用脂肪酶及脂氧合酶相结合酶解脂肪制备奶油香精、Nakamura Tamotsu<sup>[4]</sup>利用酵母及特定来源的脂肪酶共同作用乳脂增强奶香等,其主要技术要点集中在脂肪酶及原料的选择上。我国对天然奶味香精的研究较晚,近年来亦有长足发展,主要集中在酶解条件对奶香质量影响方面的研究,较少对不同来源的脂肪酶进行筛选<sup>[1,7,8]</sup>。

奶味香气主要是由低级脂肪酸、羰基化合物以及极微量的挥发性成分组成。中短链脂肪酸对奶味香气直接贡献较大,是构成奶香的直接因素<sup>[5]</sup>。不同来源的脂肪酶水解甘油三酯所表现出的脂肪酸特异性极大<sup>[6]</sup>。目前酶法用脂肪酶按其来源分为动物脂肪酶和微生物脂肪酶。由于动物脂肪酶的来源有限,工业应用受到一定的限制,现研究较多的为微生物脂肪酶。

本文对5种微生物来源的脂肪酶水解乳脂的特性进行了研究,筛选出对中短链脂肪酸有较强特异性的脂肪酶,并进一步对该酶水解乳脂的工艺条件进

行探索,利用香气评定及焙烤评价相结合的方法对酶解产物进行评价。本文的研究对天然奶味香精工业化生产及新产品的开发具有指导意义。

## 1 材料与方法

## 1.1 材料与试剂

无水奶油,双城雀巢有限公司提供;天然奶油香精,市购;酥油(未加香精),南海油脂工业有限公司提供;脂肪酶 lipase MER (*Candida rugosa*), lipase AY 30 (*Rhizopus oryzae*), lipase AYS (*Candida rugosa*), lipase F-API5 (*Rhizopus oryzae*), lipase A (*Aspergillus niger*),日本天野公司馈赠;C<sub>4</sub>~C<sub>24</sub> 37种脂肪酸甲酯标准品混合物,Sigma公司;烘焙用原料均为市购;其他化学试剂均为分析纯试剂。

## 1.2 仪器

全温振荡仪 HZQ-Q(哈尔滨市东联电子技术开发公司);台式离心机 TDL-40B(上海安亭科学仪器厂);FJ-200 高速分散均质机(上海标本模型厂);烤箱(飞利浦公司);气相色谱(惠普 5890 II 型)。

## 1.3 实验方法

## 1.3.1 脂肪酶水解乳脂反应

无水奶油与磷酸缓冲液按一定比例加入具塞锥形瓶中,经高速均质后,加入 200 U/g 乳脂脂肪酶,混合均匀后,置于振荡仪中,于 180 r/min、一定温度下反应。每隔 2 h 取样进行检测。

## 1.3.2 水解率的测定

按 GB/T5530-1985,GB/T5534-1995 方法测定酸价(AV)和皂化值(SV),并计算水解率。

$$\text{水解率}/\% = \frac{AV}{SV} \times 100$$

## 1.3.3 气相色谱分析脂肪酸组成

第一作者:硕士研究生(王永华、杨博为通讯作者)。

\* 广东省科技厅粤港关键领域重点突破项目(2006A25004001)

收稿日期:2008-01-07,改回日期:2008-02-22

气相色谱检测脂肪酶水解乳脂产物及无水奶油脂肪酸组成。无水奶油经甲酯化处理<sup>[9]</sup>。脂肪酶水解乳脂产物经离心(3 000 r/min)后取上层油样(约5滴)于样品管内,加入1 mL 正己烷,混匀。加入少量无水硫酸钠,进行气相色谱分析。

色谱分析条件:色谱柱为 OV351(60 m × 0.25 mm i. d × 0.20 μm),柱前压 20 psi,载气流量 3 mL/min,柱前压 20 psi,分流比 1:30,进样量为 1 μL。进样口温度 250℃,检测器温度 300℃。程序升温:60℃ 保持 3 min,11℃/min 升温至 170℃ 保持 5min,然后以 1℃/min 升温到 190℃ 保持 5 min,再以 5℃/min 升温到 220℃ 保持 30 min。

1.3.4 奶味香基的评定

1.3.4.1 香气评定

参照 GB/T 14454.2—1993 进行。按表 1 分别对水解物的香气纯度及强度进行评分,评分结果为 2 者分值之和。

表 1 香气评分标准

香气纯度	分值	香气强度	分值
纯正	39.1~40	浓烈刺鼻	39.1~40
较纯正	36.0~39.0	强烈刺鼻	36.0~39.0
可以	32.0~35.9	较刺鼻	32.0~35.9
尚可	28.0~31.9	比原料风味强	28.0~31.9
及格	24.0~27.9	比原料风味微强	24.0~27.9
不及格	24.0 以下	原料风味	24.0 以下

1.3.4.2 焙烤评价

在不锈钢容器中加入 45 g 酥油及 20 g 蔗糖,用打蛋器搅打至膏状。加入半个已打匀的鸡蛋及 70 g 低筋面粉继续搅打约 20 min。用裱花袋将其裱成相似的形状,置于刷有一层色拉油的烤盘中,下火 150℃,烤约 15 min 后冷却。品尝,描述香气特征。

2 结果与讨论

2.1 无水奶油脂肪酸组成

乳脂肪中的脂肪酸组成与其它天然来源的油脂不同,其显著特点是短碳链、中碳链脂肪酸含量较高,且含有不饱和脂肪酸、少量的酮酸和羧酸。中短链脂肪酸是奶香的主要致香成分之一,酮酸、羧酸及不饱和脂肪酸进一步发生微反应生成甲基酮、内酯等重要奶香成分。正是乳脂中脂肪酸的这一独特组成使得乳脂成为制备奶味香精的常用原料。

不同来源的乳脂肪中脂肪酸的组成存在较大的差异,本研究测定了原料无水奶油中的脂肪酸组成,结果如表 2 所示。从表 2 可知,原料无水奶油中脂肪

酸包括碳原子数为 C<sub>4</sub>、C<sub>6</sub>、C<sub>8</sub>、C<sub>10</sub>、C<sub>12</sub>、C<sub>14</sub>、C<sub>16</sub>、C<sub>18</sub> 的脂肪酸,其中含量较多的为豆蔻酸、软脂酸、硬脂酸和油酸。短链脂肪酸(小于等于 C<sub>6</sub>)百分含量为 2.208%,中短链脂肪酸(小于 12)含量为 8.182%,长链脂肪酸含量为(从 16 开始)80.795%。

表 2 原料无水奶油中脂肪酸组成及其相对百分含量

编号	脂肪酸名称	碳原子数	分子式	相对百分含量/%
1	丁酸	C <sub>4</sub>	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	1.122
2	己酸	C <sub>6</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	1.086
3	辛酸	C <sub>8</sub>	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	0.858
4	癸酸	C <sub>10</sub>	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	2.228
5	月桂酸	C <sub>12</sub>	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	2.888
6	豆蔻酸	C <sub>14</sub>	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	11.023
7	软脂酸	C <sub>16</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	31.282
8	十六碳烯酸	C <sub>16:1</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	2.033
9	硬脂酸	C <sub>18:0</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	13.396
10	油酸	C <sub>18:1</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	30.688
11	亚油酸	C <sub>18:2</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	3.396

2.2 脂肪酶的筛选

对奶香贡献较大的为 C<sub>4</sub>~C<sub>12</sub> 脂肪酸,C<sub>16</sub> 以上的饱和脂肪酸会带来皂臭味等不良气味从而影响最终香气质量,应尽量减少其生成。不同微生物来源的脂肪酶由于酶活中心结构的差异,水解相同的甘油三酯所表现出的脂肪酸特异性不同。选择出对中短链脂肪酸具有较强水解能力的脂肪酶,是制备纯正、浓郁奶味香基的前提。研究选择了 5 种微生物来源的脂肪酶 lipase MER、lipase AY、lipase A、lipase AYS 和 lipase F-API5 催化乳脂,制备水解率均为 30% 的水解产物,分析其脂肪酸组成及进行香气评定,结果如图 2 和图 3 所示。

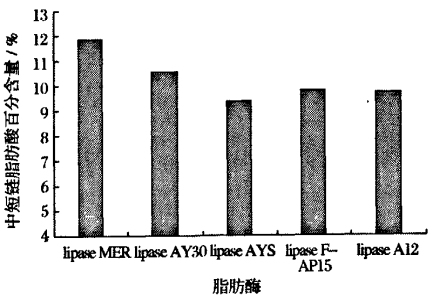


图 1 五种脂肪酶水解产物中短链脂肪酸百分含量

由图 1 可以看出,5 种脂肪酶水解产物中,lipase MER 水解产物中的中短链脂肪酸含量最高,约为 12%。其次为 lipase AY30 约为 11%,其余 3 种酶相差不多,约为 9%。由 2.1 可知,原料无水奶油中的中短链脂肪酸含量为 8.128%,明显低于 lipase MER 水解产物(12%),说明 lipase MER 对乳脂中短链脂

肪酸具有较强的水解能力,其次为 lipase AY30,其余3种酶对短链脂肪酸几乎无特异选择性。结合脂肪酸组成分析,并对酶水解产物进行香气评价(图2),表明 lipase MER 水解产物中短链脂肪酸含量较高,同时各脂肪酸之间的比例协调,奶香纯正浓郁。

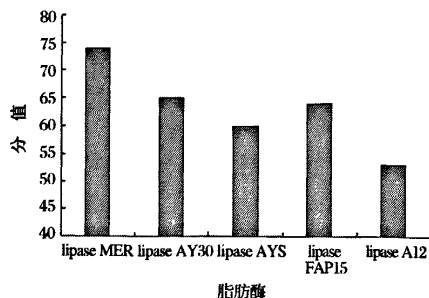


图2 五种脂肪酶水解产物香气评定结果

### 2.3 lipase MER 催化乳脂工艺条件探讨

研究选用 lipase MER 脂肪酶水解乳脂,进一步探讨不同温度、pH 值、底物浓度对乳脂水解率的影响。

#### 2.3.1 温度

考察不同温度对乳脂水解率的影响。选取的温度为 30℃、35℃、40℃、45℃。反应在 pH 值为 6.5 的缓冲液中进行,底物浓度为 50%,分别于 0 h、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h 取样测定水解率,结果如图 3 所示。由图 3 可知,随着温度的升高,乳脂的水解率增加,当温度超过 40℃ 后,乳脂的水解率开始降低。因此,该脂肪酶水解乳脂的最佳温度为 40℃。

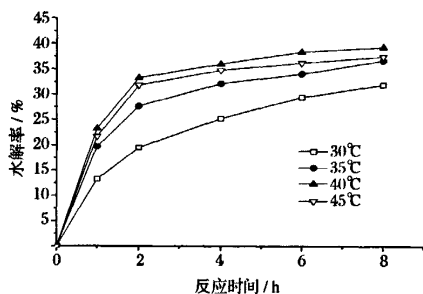


图3 温度对水解率的影响

#### 2.3.2 pH 值

选择 pH 值分别为 5.5、6、6.5、7、7.5、8。反应在 40℃ 下进行,底物浓度为 50%,分别于 0 h、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h 取样测定水解率,结果如图 4 所示。由图 4 可知,在相同条件下,pH 值为 6.5 时,水解率最高,表明该脂肪酶水解乳脂的最适 pH 值为 6.5。

#### 2.3.3 底物浓度

考察不同的底物浓度对乳脂水解率的影响。选

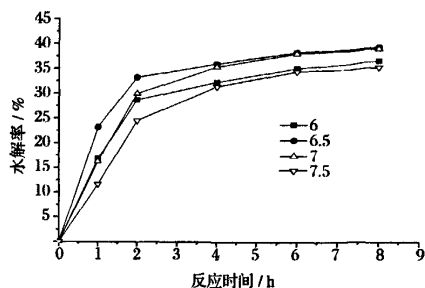


图4 pH 值对水解率的影响

取的底物浓度分别为 40%、50%、60%、70%、80%。在无水奶油用量不变的前提下,利用 pH 值为 6.5 的缓冲液配制不同的底物浓度,40℃ 下反应,分别于 0 h、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h 取样测定水解率,结果如图 5 所示。由图 5 可知,底物浓度较低时,随底物浓度的增加水解率增加。当底物浓度为 50%,反应 8 h 后,水解率为 39.5%。底物浓度再增加时,水解率开始下降。因此,该脂肪酶水解乳脂最适底物浓度为 50%。

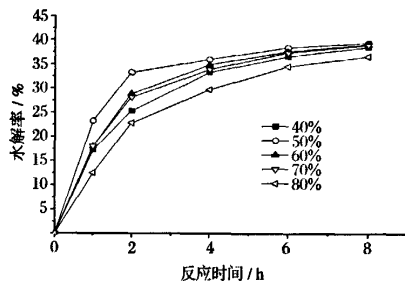


图5 底物浓度对水解率的影响

### 2.4 焙烤评价

乳脂中含有羧酸甘油三酯约 1% 左右、酮酸甘油三酯约 1%<sup>[7]</sup>,乳脂经脂肪酶水解后除生成饱和与不饱和脂肪酸外还生成少量酮酸和羧酸。酮酸、羧酸等为奶香化合物的前体物,羧酸经加热脱水环化生成不同碳数的丙、丁位内酯。酮酸进一步脱 CO<sub>2</sub>,生成甲基酮类化合物。内酯类、甲基酮类物质含量虽少但对奶香的贡献极大。故对水解物进行高温焙烤才能更准确的对其品质进行评价。在酥油中加入水解率为 30% 的 lipase MER 水解产物 1%,以未加水解产物为对照,按 1.3.4.2 进行焙烤实验。加入 lipase MER 水解产物后得到的产品香味柔和自然,具有奶油的特征香味,头香稍刺激,后味较好。

### 3 结论

由实验可知,5 种微生物来源脂肪酶水解乳脂制

备奶味香基以 lipase MER 对乳脂中短链脂肪酸特异性较强,香气评定较佳。lipase MER 水解乳脂的适宜温度为 40℃、pH 值为 6.5、底物浓度为 50%。经焙烤评定, lipase 水解乳脂制得的水解物香气柔和自然,具有奶油的特征香味,可作为调配天然奶味香精的香基。

## 参 考 文 献

- 1 武彦文,欧阳杰,张津凤,等. 酶法水解奶油制备奶味香精的研究[J]. 中国调味品, 2003, (12): 39~42
- 2 Tojo Hiroaki, Funakoshi Hosokawa. Production of sustained release dairy product flavor [P]. JP, 05091851A. 1993-04-16
- 3 Kihara Hiroshi . Production of butter flavor [P]. JP, 55061780A. 1980-05-09
- 4 Nakamura Tamotsu, Ogawa Naonobu, Tamura Katsuhiko, et al. Production of dairy flavor[P]. JP, 62096039. 1987-05-02
- 5 宋焕禄. 食用香味料的生化生物制备[M]. 北京: 中国物资出版社, 2002. 6
- 6 宋欣. 微生物酶转化技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004
- 7 张之涤. 酶法奶类香精的研制及其应用[J]. 中国食品添加剂, 1999, (4): 51~53
- 8 刘晓艳. 非水体系脂肪酶催化生成奶味香精的研究[J]. 食品工业科技, 2007, 28(4): 191~193
- 9 李行方. 气相色谱法测定牛肉中 C9, t11-共轭亚油酸的含量[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(2): 83~85

## Production the Base of Milk Flavor by Lipase Hydrolysis

Yu Tiemei<sup>1</sup>, Xu Xun<sup>1</sup>, Wang Yonghua<sup>1</sup>, Yang Bo<sup>2</sup>, Zhang Shuihua<sup>1</sup>

1(College of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology Guangzhou 510640, China)

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

**ABSTRACT** Milk fat was hydrolyzed by five lipases originated from microorganisms. Lipase MER was chosen as having the strongest ability of hydrolyzing middle and short chain fatty acids of milk fat. The optimum conditions of lipase MER hydrolysis were determined as follows: the hydrolysis temperature is 40℃, the pH is 6.5, and the substrate concentration is 50%. The quality of this product was evaluated by baking. It showed a natural milky flavor, and could be used as flavoring base.

**Key words** lipase, milk flavor, milk fat, hydrolysis

行业  
动态

## 光明乳业集团率先实践现代奶业标准化

由中国奶业协会主办、上海市奶业行业协会和光明乳业共同协办的“第三届中国奶牛发展大会”于 2008 年 4 月 16 日在上海开幕,大会主题是“奶牛饲养标准化与现代奶业”。光明乳业总裁郭本恒表示,推进我国现代奶业建设需要各界共同努力,希望业内同行都能更多地参与到标准化奶牛场建设中去,使我国奶源整体质量不断得到提升。健康发展的奶业应该是让奶农、乳品厂商和消费者三方面都得益。

2007 年 9 月底,国务院出台的《关于促进奶业持续健康发展的意见》指出,我国奶业发展出现较大波动的深层原因主要是奶牛良种覆盖率和单产水平低、养殖方式较为落后,质量保障体系不健全等。奶业是农业现代化的重要标志,只有解决上述问题,才能确保我国奶业持续健康发展。第三届中国奶牛发展大会的主题正由此而定。

当前我国乳品加工方面的 HACCP 已经日趋完善,但在牧场和奶源管理的 HACCP 方面国内还几乎是空白。光明乳业早在 2006 年就借鉴其经验,在业内率先将 HACCP 理念渗入到奶源管理之中,从预防生奶的化学性污染、物理性污染和微生物污染着手,对奶牛投入品、饲料、兽药、水、清洗剂、消毒剂的使用均做了详细规定,从源头到挤奶,然后到储存和运输,实行全过程、全方位的控制,从而真正保证了原料奶的安全优质。

从 2006~2008 年,光明乳业在上海地区的 25 个公司自有大型牧场和华东近 100 个合同制规模牧场全部通过无公害农产品产地认定。奶牛场无公害农产品产地认定主要通过对奶牛投入品和接触品的控制,使之符合无公害要求,并且对饮用水和环境保护方面进行规范,使畜牧业和谐发展。

光明乳业金山牧场是 2008 年上海市标准化体系试点企业中唯一的一家奶牛场试点企业,目前正在建立中的标准化体系,是以技术标准为核心,连同管理标准、工作标准、安全技术标准、职业健康标准、环保技术标准、信息技术标准等,共同构成了企业的标准化管理系统。