

# 酪蛋白双酶水解物对直投式乳酸菌生长及发酵酸乳的影响

王佳佳, 胡志和\*

(天津市食品生物技术重点实验室, 天津商业大学生物技术与食品科学学院, 天津 300134)

**摘 要:** 以直投式乳酸菌为实验菌, 研究富含ACE抑制活性肽的酪蛋白双酶水解物及其超滤物对乳酸菌的生长及发酵酸乳的影响。添加不同质量浓度的水解物和超滤物培养乳酸菌, 检测对乳酸菌生长的影响, 确定对乳酸菌生长无抑制作用的添加量, 并将其应用于酸乳发酵。检测对酸乳的酸度、硬度、黏性、弹性等指标的影响, 结合感官评价, 确定对酸乳的影响。结果表明: 水解物的添加量为4g/100mL, 分子质量在6000u以下的超滤物添加量为0.3g/100mL对乳酸菌的生长有促进作用, 并且对发酵酸乳的感官质量无显著影响。水解物质量浓度 $\geq 5$ g/100mL、超滤物质量浓度 $\geq 0.35$ g/100mL对乳酸菌的生长起到抑制作用。

**关键词:** 酪蛋白; 双酶水解; 抑菌肽; 乳酸菌; 发酵乳

## Effect of Dual-Enzymatic Casein Hydrolysate on DVS Starter Growth and Yogurt Quality

WANG Jia-jia, HU Zhi-he\*

(Tianjin Key Laboratory of Food and Biotechnology, College of Biotechnology and Food Science, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China)

**Abstract:** An enzymatic casein hydrolysate rich in ACE inhibitory peptides was prepared through sequential hydrolysis with pepsin and trypsin and ultrafiltrated to collect peptides less than 6000 u in molecular weight with ACE inhibitory activity. The effects of different concentrations of the casein hydrolysate and the peptides on the growth of DVS (Direct Vat Set) yogurt starter were explored. Their application in yoghurt was explored by investigating their effects on text properties such as acidity, hardness and viscosity and sensory quality. The casein hydrolysate when added at 4 g/100 mL and the peptides when added at 0.3 g/100 mL had a stimulating effect on the growth of lactic acid bacteria but did not have an obvious effect on the sensory quality of yoghurt. Inhibitory effects on the growth of lactic acid bacteria were observed when the hydrolysate was added at concentrations equaling or exceeding 5 g/100 mL or the peptides were added at concentrations equaling or exceeding 0.35 g/100 mL.

**Key words:** casein; dual-enzymatic hydrolysis; antibacterial peptide; lactic acid bacteria; yogurt

中图分类号: TS252.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)21-0258-06

随着对乳及乳制品中生物活性肽的研究, 越来越多的乳源性生物活性肽被发现, 如吗啡样活性肽、抗高血压肽、免疫调节肽、抗菌肽、抗血栓肽、促进金属离子吸收的肽、促细胞生长肽等<sup>[1-3]</sup>。它们在心血管系统、免疫系统、消化系统及神经系统等均有诸多作用<sup>[4-5]</sup>。ACE抑制肽主要来自食品中的蛋白质, 目前已成功提取出的主要有乳类蛋白、植物类蛋白及动物类蛋白中的ACE抑制肽, 人们逐渐发现食物蛋白质水解后形成的小分子多肽具有明显的降血压作用, 它与普通降压药物相比具有无毒副作用, 且对正常的血压无影响等优点。这些多肽可以通过多种方法获得, 如化学降解法、酶解法、微生物发酵法、化学合成法和基因工程法。酶解法条件温和, 对乳及乳制品的

营养价值破坏小, 蛋白质的水解过程易控制, 而且酶可以对蛋白质进行定位水解而产生所需的特定肽类, 酶解法的这些特点使得越来越多的人开始了酶解法制备生物活性多肽的研究。本实验室模拟人体胃肠道系统, 用胃蛋白酶和胰蛋白酶对酪蛋白进行水解得到高ACE抑制率的ACE抑制肽, 其中杨铭等<sup>[6]</sup>通过使用6000u的超滤膜对水解物进行初分离得到IC<sub>50</sub>为250 $\mu$ g/mL的超滤物, 由于未经分离纯化的水解物和超滤物是一个多肽混合体系, 为此要将富含ACE抑制肽的水解物和超滤物应用于降血压发酵乳中还要考虑其他多肽的影响。

根据Lahov等<sup>[7]</sup>的研究报道, 牛奶酪蛋白的酶水解物具有抗菌活性, 其抗菌作用来自 $\alpha_s1$ -酪蛋白中1~23个

收稿日期: 2012-04-25

作者简介: 王佳佳(1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品生物技术。E-mail: jianianhuaajia@163.com

\*通信作者: 胡志和(1962—), 男, 教授, 硕士, 研究方向为专用功能食品。E-mail: hzhihe@tjcu.edu.cn

氨基酸残基序列的肽段。而ACE抑制肽的制备也可通过酶解法来得到,目前已用在降压肽生产过程中的蛋白质水解酶有碱性蛋白酶、中性蛋白酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、Alcalase、胶原蛋白酶、嗜热菌蛋白酶、胰糜蛋白酶等。Lahov等<sup>[7]</sup>对牛乳酪蛋白加热并经过凝乳酶水解后产生了具有抗菌活性的聚合阳离子低分子肽团,正如Liepke<sup>[8]</sup>、胡志和<sup>[9]</sup>、夏庆<sup>[10]</sup>等采用胰蛋白酶水解酪蛋白,得到具有抑菌作用的多肽,王桂春等<sup>[11]</sup>利用胃蛋白酶、胰蛋白酶和凝乳酶分步水解酪蛋白制备了具有高ACE抑制活性的多肽。洪伟等<sup>[12]</sup>采用胰蛋白酶水解酪蛋白得到的水解产物ACE抑制率可达到83.2%。由此可知,经酶水解的酪蛋白水解物是存在着多种多肽的体系。故利用这些乳源性的生物活性多肽制造健康食品或功能性食品时需要注意多肽活性之间的影响。

本实验利用具有高ACE抑制活性的酪蛋白双酶(胃蛋白酶、胰蛋白酶)水解物为原料,以乳酸菌的增殖为指标,确定适合其生长的添加量范围,以期生产具有抗血压升高作用的发酵乳提供理论支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

酪蛋白 天津海河乳业有限公司;胰蛋白酶(10000U/g)、胃蛋白酶(10000U/g) 美国Sigma公司;直投式发酵剂 Chr Hansen公司;酵母膏 北京奥博星生物技术有限责任公司;蛋白胨 天津市福晨化学试剂厂;牛肉膏 天津市英博生化试剂有限公司;葡萄糖、无水乙酸钠、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $K_2HPO_4$  天津市化学试剂批发公司;柠檬酸氢二铵 天津石英钟厂霸州市化工分厂;吐温-80 天津市德恩化学试剂有限公司;琼脂 日本Oxoid公司。

### 1.2 仪器与设备

UV-2100紫外-可见分光光度计 日本Unico公司;FA1104N电子天平 上海精密科学仪器有限公司;EMS-8A加热磁力搅拌器 天津市欧诺仪器仪表有限公司;PB-10普及型pH计 德国Sartorius公司;Scientz-50N冷冻干燥机 宁波新芝生物科技股份有限公司;CT3 Texture Analyzer(p58) 美国Brookfield公司;Bioscreen全自动生长曲线分析仪 上海谓哉商贸发展有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 酪蛋白的双酶水解物

根据张艳等<sup>[13]</sup>所确定的胃蛋白酶和胰蛋白酶水解酪蛋白的条件,对酪蛋白进行水解。

设定胃蛋白酶水解条件为37℃、pH3.0、酶与底物比1:100、底物质量浓度7g/100mL,胰蛋白酶水解条件为

48℃、pH7.7、酶与底物比1:500,依次对酪蛋白进行水解3h,水解过程中分别滴加1mol/L HCl和NaOH维持pH值。水解结束后加热煮沸10min灭酶,然后冷却至室温,调节pH7.0。4000r/min离心15min,取上清液进行冷冻干燥得到酪蛋白双酶水解物的粉末,采用最常用的HHL方法<sup>[14-15]</sup>体外检测ACE抑制率,由此得出其半数抑制质量浓度(IC<sub>50</sub>)为560μg/mL。

#### 1.3.2 超滤

利用截留分子质量6000u的中空纤维膜组件对双酶水解液进行循环超滤分离<sup>[16-18]</sup>,在室温下,控制压力0.05~0.10MPa,得到分子质量小于6000u的溶液,并将其进行冷冻干燥成粉末,通过体外检测ACE抑制率测定此超滤物的半数抑制质量浓度(IC<sub>50</sub>)为250μg/mL。

#### 1.3.3 MRS液体培养基的配制

参照国标GB 4789.35—2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验》方法配制。

#### 1.3.4 乳酸菌标准曲线制作

##### 1.3.4.1 制备菌悬液

无菌条件下,称取直投式乳酸菌菌种0.01g溶于0.9%无菌生理盐水20mL振荡5~10min,使菌体分布均匀,调整菌体浓度为 $10^7$ 个/mL。

##### 1.3.4.2 活化菌种

无菌条件下用移液管移取菌悬液,按10%添加量于灭菌的MRS液体培养基中,37℃厌氧培养24h。

##### 1.3.4.3 绘制OD<sub>600nm</sub>-菌落数对数标准曲线

无菌条件下用移液管移取活化一次的菌悬液按10%添加量于灭菌的MRS液体培养基中,37℃厌氧培养24h。

稀释:用无菌移液枪吸取1mL菌液,注入含有9mL无菌生理盐水的试管内,振荡摇匀,制成1:10的稀释样液。另取1mL无菌枪头按照上述的操作顺序,作10倍递增稀释液,制成1:100的稀释液,以此类推。选择5~6个适宜稀释度。

取样:分别在做10倍递增稀释的同时,即用吸取该稀释度的移液枪吸取0.2mL稀释样液于无菌平皿内,用涂布棒涂布均匀。每个稀释度作2个平皿。另外,测出与稀释度相对应的菌液的吸光值。在37℃恒温箱内培养24h后取出,计算平皿内的菌落数。测出的菌光密度值,以此作为横坐标(X),将计算出的菌落数取对数作为纵坐标(Y),得到乳酸菌标准曲线,乳酸菌菌落数与其对应的吸光值(OD<sub>600nm</sub>)呈线性关系,得回归方程: $Y=5.704X+0.068(R^2=0.999)$ 。

#### 1.3.5 乳酸菌生长曲线测定

在无菌条件下,取17支试管,分别加入9.5mL MRS液体培养基,再加入乳酸菌液0.5mL,置于恒温培养箱中,37℃培养。分别在0、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32h,选用600nm波

长处测定菌液的光密度值,以未接种的MRS液体培养基作为空白对照。根据菌落数对数标准曲线,将光密度值换算成菌落数对数值。再分别以时间作为横坐标,菌落数对数值作为纵坐标,绘制乳酸菌生长曲线。

### 1.3.6 酪蛋白双酶水解物对乳酸菌生长的影响

在无菌条件下,取9支经灭菌的试管,加入8.0mL灭菌的MRS液体培养基,1.0mL经活化的菌液,1.0mL灭菌的蒸馏水,再分别加入双酶水解物充分振荡混匀,配成的质量浓度为0、0.5、1、2、3、4、5、7、9g/100mL。另取9支经灭菌的试管分别加入9.0mL灭菌的MRS液体培养基,1.0mL灭菌的蒸馏水,再分别加入相应量的双酶水解物充分振荡混匀作为空白,每一质量浓度的水解物溶液平行做2次。在无菌操作台上,把Bioscreen C(细菌生长曲线测定仪)的蜂窝板从真空袋中取出,分别将各质量浓度的溶液取400 $\mu$ L加入蜂窝板的孔里,每个试管的溶液重复取3次,将蜂窝板放入提前预热0.5h的Bioscreen C仪器中,设定温度37 $^{\circ}$ C,波长为600nm,时间32h,时间间隔2h,开始测定。

### 1.3.7 超滤物对乳酸菌的影响

在无菌条件下,取11支经灭菌的试管,移入8.0mL灭菌的MRS液体培养基,1.0mL经活化的菌液,1.0mL灭菌的蒸馏水,再分别加入超滤物充分振荡混匀,配成的质量浓度为0、0.05、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4、0.45、0.5g/100mL。另取11支经灭菌的试管分别加入9.0mL灭菌的MRS液体培养基,1.0mL灭菌的蒸馏水,再分别加入对应量的超滤物充分振荡混匀作为空白。同1.3.6节操作,将各质量浓度的溶液加入蜂窝板里并放入预热的Bioscreen C仪器中测定。

### 1.3.8 酪蛋白双酶水解物和超滤物的添加对发酵乳的影响

#### 1.3.8.1 发酵乳的工艺流程

乳粉 $\rightarrow$ 复原(质量浓度12g/100mL) $\rightarrow$ 加入蔗糖 $\rightarrow$ 均质 $\rightarrow$ 加入酪蛋白双酶水解物(对乳酸菌生长不抑制的最大添加量) $\rightarrow$ 搅拌均匀 $\rightarrow$ 杀菌 $\rightarrow$ 冷却 $\rightarrow$ 接种 $\rightarrow$ 保温发酵 $\rightarrow$ 冷藏后酵 $\rightarrow$ 成品

#### 1.3.8.2 酸奶发酵工艺条件的优化

选取对降血压发酵乳发酵工艺有显著影响的4个因素,即蔗糖用量、接种量、发酵温度、发酵时间,作对比试验。在单因素试验的基础上设计 $L_9(3^4)$ 正交试验,以优化低温短时间发酵酸奶的工艺参数。通过测定酸度、感官评分,测定酸奶的第一循环硬度、黏力、黏性和弹性长度等指标评价酸奶品质。对测定值进行分析,确定各因素水平的最佳组合,得出发酵酸奶的生产工艺参数。

#### 1.3.8.3 酸奶品质评价方法

1)感官指标检测方法<sup>[19-20]</sup>:选择并培训5名感官评定人员,按表1的标准评分,取平均值。其中组织状态、气

味、滋味、口感等4项每项满分为2.5分,总分为10分。

表1 发酵乳的感官评定标准

Table 1 Criteria for sensory evaluation of yogurt

感官指标	评分标准
组织状态	凝块具有适当的硬度,均匀而细腻,富有弹性,组织均匀一致,表面无变色、龟裂、气泡等现象,不得有乳清析出,轻轻倾斜容器凝乳不流动
气味	具有酸奶固有的气味,不得有其他异味,香气浓郁
滋味	具有酸奶固有的滋味,酸甜适中,不得有腐败味、苦味、酵母味等异味
口感	具有细腻清爽、回味悠长的口感

2)酸度( $^{\circ}$ T)的测定<sup>[21]</sup>:氢氧化钠滴定法测定。

3)凝固型酸奶质构指标测定方法:第一循环硬度、黏力、黏性、弹性长度等质构指标用CT3型质构仪测定,选用型号为TA4/1000的圆柱型挤压检测探头。测试参数设定为下压力为4.5g,测试速率1mm/s,测试距离30mm,每个样品重复两次。

## 2 结果与分析

### 2.1 乳酸菌的生长曲线

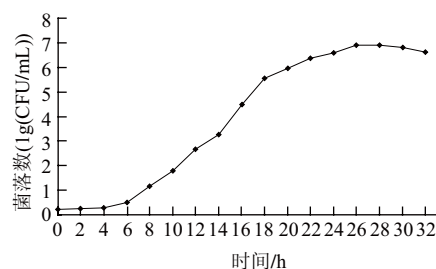


图1 乳酸菌生长曲线

Fig.1 Growth curve of lactic acid bacteria

由图1可知,在乳酸菌接种后的0~6h,曲线平坦稳定,此时乳酸菌繁殖少,处于细菌生长的调整期;在7~18h,活菌数的增加变得较快,此期生长曲线上活菌数直线上升。细菌以稳定的几何级数极快增长,此时乳酸菌处于其生长的对数期;18~26h,菌体的生长由对数期进入了稳定期,在26h时达到了最大活菌数,为 $8.2 \times 10^6$  CFU/mL。可知,在上述实验条件下,乳酸菌具有较强的生长活力、生长迟滞期短,最佳生长期为7~18h,稳定期的活菌数达到 $8.27 \times 10^6$  CFU/mL以上。

### 2.2 酪蛋白双酶水解物对乳酸菌生长的影响

由图2可知,与无添加酪蛋白双酶水解物的相比,在培养的前6h,加入不同质量浓度的酪蛋白水解物对菌体的光密度值影响不大,呈现比较平稳的趋势,各条曲线几乎重合一起,比较各质量浓度下的光密度值与未添加水解物(质量浓度0g/100mL,对照组)0.147相比,添加质量浓度0.5~7g/100mL在6h的光密度值都高于对照,而



质量浓度为9g/100mL的光密度值为0.14略低于对照,这说明在生长延滞期内,菌体细胞的生理状态刚刚恢复,尽管加入了酪蛋白双酶水解物对乳酸菌的生长有一定的影响,但影响甚微,生长加速并不明显。从6h起,曲线走势开始发生显著变化,未添加酪蛋白水解物的光密度值为1.313,随着添加量增加到4.0g/100mL时其光密度值增至1.407,可以看出在对数增长期内添加量为3g/100mL时,水解物对乳酸菌的生长的影响最显著,在26h时可达1.407,与未添加水解物的相比质量浓度为0.5、1、2、3、4g/100mL时添加物对乳酸菌的生长都有促进作用,而当添加量达到5g/100mL及其以上时,在对数生长期和稳定期时,光密度值则低于未添加的,反而对乳酸菌的生长起到了抑制效果,由此可知酪蛋白水解物的添加质量浓度 $\leq 4\text{g}/100\text{mL}$ 时,可不影响乳酸菌的生长。在制作发酵乳时,添加量可确定为4g/100mL之内。

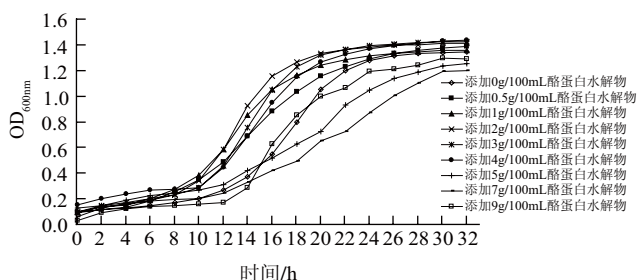


图2 酪蛋白双酶水解物对乳酸菌生长的影响

Fig.2 Effect of the casein hydrolysate on the growth of lactic acid bacteria

### 2.3 超滤物对乳酸菌生长的影响

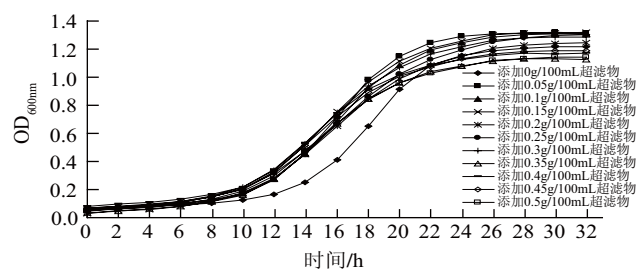


图3 超滤物对乳酸菌生长的影响

Fig.3 Effect of the ACE inhibitory peptides on the growth of lactic acid bacteria

由图3可知,与未添加酪蛋白双酶水解超滤物的相比,在培养的前8h,加入不同质量浓度的超滤物对菌体的光密度值影响不大,呈现比较平稳的趋势,各条曲线几乎重合一起,这说明在生长延滞期内,菌体细胞的生理状态刚刚恢复,尽管加入的超滤物对乳酸菌的生长有一定的影响,但影响甚微,生长加速并不明显。从8h起,曲线走势开始发生显著变化,未添加超滤物的光密度值为0.914,随着添加的质量浓度增加到0.5g/100mL,其光密度值增至1.151,在对数生长期8~20h内,光密度值由0.914增加到1.151,添加超滤物对乳酸菌的生长都有促进作用,从22h开始,超滤物添加的质量浓度为0.35、0.4、

0.45、0.5g/100mL,对乳酸菌的生长的OD值与对照的相比,光密度值有一定抑制,在26h时各菌体样液的菌浓对数值达到最大,超滤物的添加量从0%增加到0.3g/100mL,菌浓光密度值从1.190增加到1.311;超滤物的添加量从0.35g/100mL增加到0.5g/100mL,菌浓光密度值分别为1.114、1.156、1.167、1.119低于对照组。由此可知超滤物的添加质量浓度 $\leq 0.3\text{g}/100\text{mL}$ 时,不影响乳酸菌的生长。在制作发酵乳时,添加的质量浓度可确定为0.3g/100mL之内。

### 2.4 发酵酸奶的单因素试验结果

#### 2.4.1 加糖量对酸奶品质的影响

在复原乳中分别添加6%、8%、10%、12%的白砂糖,接种量0.6%、发酵温度42℃、发酵时间6h,对比发酵后的口感,确定最佳加糖量。

表2 加糖量对发酵乳品质的影响

Table 2 Effect of sucrose concentration on yogurt quality

添加量/%	6	8	10	12
酸奶品质	酸味明显,甜味淡	酸甜适度	口味偏甜	甜味显著,酸味变淡

从表2可以得出,加糖量为8%时,发酵出来的酸奶是一种甜中有酸,酸甜适度的产品,故加糖量为8%时,口味最佳。

#### 2.4.2 接种量对酸奶品质的影响

确定加糖量8%后,分别以0.2%、0.4%、0.6%、0.8%的量进行接种,发酵温度42℃、发酵时间6h,观察发酵后的凝固情况和滋味,确定最佳发酵接种量。

表3 接种量对发酵乳品质的影响

Table 3 Effect of inoculation amount on yogurt quality

接种量/%	酸奶品质
0.2	凝乳状态不好,倾斜容器凝乳流动,有乳清析出,酸味淡
0.4	凝乳状态良好,倾斜容器凝乳略有流动,酸味稍淡
0.6	凝乳状态良好,倾斜容器凝乳不流动,无乳清析出,酸味适度
0.8	凝乳状态良好,有乳清析出,偏酸,有发酵过度味道

从表3可以看出,接种量低于0.6%时,产酸量低且酸奶的凝乳状态差,有乳清析出;接种量高于0.6%时,凝乳状态尚好,有少量乳清析出,但酸奶产酸过度,酸甜比例失调,口味较差;接种量为0.6%时,发酵出来的酸奶凝乳状态良好,倾斜容器凝乳不流动,无乳清析出且酸味适度,故接种量为0.6%时,酸奶的感官品质最好。

#### 2.4.3 发酵时间对酸奶品质的影响

确定加糖量8%、接种量0.6%后,分别在发酵时间4、5、6、7h发酵,发酵温度为42℃,观察发酵后发酵凝固情况和滋、气味,确定最佳发酵时间。

从表4可以看出,酸奶发酵时间过长或过短都会影响酸奶的品质。时间过短时,酸奶的组织状态差,且产酸率

低;发酵时间过长时,凝乳状态较好,有少量乳清析出。同时,发酵时间过长酸奶在冷却前过度酸化,酸甜比例严重失衡。总体来说,当发酵时间在6h时,酸奶的组织状态较好,质地均匀、软硬适度,酸甜合宜,口感润滑。

表4 发酵时间对发酵乳品质的影响  
Table 4 Effect of fermentation time on yogurt quality

发酵时间/h	酸奶品质
4	凝乳状态不好,倾斜容器凝乳流动,有乳清析出,无乳香味,风味差
5	凝乳状态良好,倾斜容器凝乳不流动,乳香味淡,具有酸奶固有滋味
6	凝乳状态良好,倾斜容器凝乳不流动,乳香浓郁,具有酸奶固有滋味
7	凝乳状态良好,倾斜容器凝乳不流动,有乳清析出,乳香浓郁,滋味偏酸

#### 2.4.4 发酵温度对酸奶品质的影响

表5 发酵温度对发酵乳品质的影响  
Table 5 Effect of fermentation temperature on yogurt quality

发酵温度/℃	酸奶品质
38	凝块硬度低,倾斜容器凝乳流动,乳香不明显
40	凝块具有适当的硬度,倾斜容器凝乳不流动,乳香不明显
42	凝块具有适当的硬度,倾斜容器凝乳不流动,乳香浓郁
44	凝块具有适当的硬度,倾斜容器凝乳不流动,有乳清析出,风味浓郁

确定加糖量8%、接种量0.6%、发酵时间6h后,分别在温度38、40、42、44℃发酵,观察发酵后发酵凝固情况和气味,确定最佳发酵温度。

从表5可以看出,菌种对温度很敏感,温度过高或过低

都会对其产生不利影响。发酵温度过低,微生物的生长变得缓慢,发酵变得缓慢,对酸奶的发酵质地产生影响;发酵温度过高,酸奶产酸过多,会使酸奶酸味过重,故当发酵温度为42℃时,酸奶无论从质地还是风味口感上都是最佳的。

#### 2.5 发酵酸奶的正交试验结果

根据上述单因素试验的结果,按照表6的方案进行正交试验,产品发酵结束后,于4℃冷藏12h,以表1中酸奶的感官评价、酸度和质构3个指标进行鉴定,综合打分,确定酸奶的最佳制作条件。

从表6可以看出,感官评分最高的是第2组为9.2,其次是第3组为9.1;酸度值最高的是第3组达到87℃T,其次是第5组达到84℃T,然后第2组为83℃T;质构指标中第一循环硬度、黏力、黏性的最大值都是第3组分别是50.0、14.5、2.47g,其次是第2组分别是48.5、13.5、1.94g,弹性长度最大的是第2组为7.97mm,其次是第3组为7.77mm。对酸奶感官评分的因素影响顺序为:发酵温度>加糖量>接种量>发酵时间,感官评分最高的为9.2,由K值可知,当发酵温度42℃、加糖量7%、接种量0.7%、发酵时间6.5h时产品的感官最佳。由此可知,发酵酸奶生产的工艺条件为:加糖量7%、接种量0.7%、发酵时间6.5h、发酵温度42℃。

#### 2.6 添加水解物对发酵乳影响

利用2.2节所确定的最优工艺条件,制备出添加超滤物质量浓度为0.3g/100mL的发酵乳、4g/100mL的酪蛋白双酶水解物的发酵乳和无任何添加的普通发酵乳,分别对其进行感官评定、酸度的测定和质构仪的指标测定并进行对比。

从表7可以看出,3种发酵乳无论从感官评分还是质构指标都很接近,加入两种添加物后发酵乳的酸度高于无添加的发酵乳,表明这两种物质的添加对乳酸菌

表6 发酵酸奶正交试验测定结果  
Table 6 Orthogonal array design arrangement and corresponding results for optimization of yoghurt production

试验号	因素				感官评分	酸度/℃T	第一循环硬度/g	黏力/g	黏性/mJ	弹性长度/mm
	A加糖量/%	B接种量/%	C发酵时间/h	D发酵温度/℃						
1	1(7)	1(0.5)	1(5.5)	1(41)	7.2	69	41.0	12.5	1.57	6.76
2	1	2(0.6)	2(6)	2(42)	9.2	83	48.5	13.5	1.94	8.08
3	1	3(0.7)	3(6.5)	3(43)	9.1	87	50.0	14.5	2.47	7.97
4	2(8)	1	2	3	8.1	75	41.0	12.5	1.82	7.77
5	2	2	3	1	7.4	84	41.0	12.0	1.50	7.47
6	2	3	1	2	8.6	80	37.0	10.5	1.42	6.35
7	3(9)	1	3	2	8.4	79	38.5	12.0	1.61	6.37
8	3	2	1	3	7.8	73	44.5	11.0	1.23	6.17
9	3	3	2	1	7.5	81	38.0	11.0	1.21	6.17
感官 评分	K <sub>1</sub>	25.5	23.7	23.6	22.1					
	K <sub>2</sub>	24.1	24.4	24.8	26.2					
	K <sub>3</sub>	23.7	25.2	24.9	25.0					
	R	0.6	0.5	0.433	1.366					

表7 3种发酵乳指标的测定结果  
Table 7 Comparison of sensory quality, acidity and texture properties of yoghurt with the addition of the casein hydrolysate, the peptides and none

组别	感官评分	酸度/℃T	第一循环硬度/g	黏力/g	黏性/mJ	弹性长度/mm
无添加水解物的发酵乳	9.4	79	50.8	13.2	2.27	7.97
添加0.3g/100mL超滤物发酵乳	9.2	85	54.4	12.6	2.51	8.05
添加4g/100mL水解物发酵乳	9.1	89	52.3	13.5	2.40	7.68

的生长有一定的促进作用,这表明在发酵乳中添加4g/100mL的酪蛋白双酶水解物与0.3g/100mL的超滤物对发酵乳的品质影响很小,故在制备降血压发酵乳中可以加入酪蛋白双酶水解物的添加量为4g/100mL及其以下,超滤物的添加量为0.3g/100mL及其以下。

### 3 讨论

生物活性肽的分子结构复杂程度不一,可以是小分子的二肽或是环状大分子的多肽。一般而言,生物活性肽的分子质量小于6000u<sup>[4]</sup>,本实验室通过超滤和Sephadex G-15对富含ACE抑制肽的酪蛋白双酶水解物进行分离纯化,分离纯化的3个组分经Q-TOF LC/MS测得其分子质量范围400~800u。目前已经有600多种抗菌肽被分离、鉴定。它们是一类具有分子质量小(12~100个氨基酸残基)、多聚阳离子型、两亲结构的肽类。

1995年Lahov等<sup>[7]</sup>从 $\alpha_{s1}$ -酪蛋白的凝乳酶水解产物中分离并证明是 $\alpha_{s1}$ -酪蛋白N末端1~23个氨基酸残基片段,通过体外实验显示出该片段对指示菌金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、八叠球菌和化脓链球菌均具有较强的抑制作用,测得分子质量为2770D。1999年Recio等<sup>[22]</sup>用猪胃蛋白酶从牛 $\alpha_{s2}$ -酪蛋白中分离到一种位于 $\alpha_{s2}$ -酪蛋白165~203的氨基酸序列的抗菌肽,通过阳离子交换层析和HPLC纯化得到了具有抗菌活性的肽,并将其命名为Casocidin,体外实验证明Casocidin能抑制大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的生长。李彦峰等<sup>[23]</sup>在2003年用胰蛋白酶酶解酪蛋白得到的一种富含酪氨酸的抗菌肽(Tyr-rich polypeptide, 简写Trpi),它对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌效果很好,测得分子质量为6200D,同时具有免疫活性。胡婷<sup>[24]</sup>在2008年用胃蛋白酶酶解酪蛋白得到对蜡样芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌效果很明显的抗菌肽,测得其分子质量为3386D。侯恩娟<sup>[25]</sup>在2010年用胰蛋白酶酶解酪蛋白,并通过用分子质量10000u的超滤膜超滤水解液得到对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌均有较强的抑菌性,具有较广的抗菌谱的抗菌肽,测得其分子质量为3162D。

酪蛋白双酶水解物对乳酸菌生长没有抑制作用的最大添加质量浓度为4g/100mL,而超滤物对乳酸菌生长没有抑制作用的最大添加质量浓度为0.3g/100mL。可知超滤对水解物中的抑菌肽进行了富集,这与文献[4]中报道的抗菌肽是一类小分子质量的物质,其分子质量低于6000u左右是相符合的。

### 4 结论

利用具有高ACE抑制活性的酪蛋白双酶(胃蛋白酶、胰蛋白酶)水解物,和水解物用截留分子质量6000u的膜超滤得到超滤物为原料,通过其对乳酸菌的增殖为指标,以确定适合其生长的添加量范围得到,水解物的添加质量浓度为4g/100mL,超滤物的添加质量浓度为0.3g/100mL对乳

酸菌的生长有促进作用,水解物质量浓度 $\geq 5\text{g}/100\text{mL}$ ,超滤物质量浓度 $\geq 0.35\text{g}/100\text{mL}$ 对乳酸菌的生长起到抑制作用,并在制备含有4g/100mL的酪蛋白双酶水解物和0.3g/100mL超滤物的发酵乳,与无任何添加的普通发酵乳相比,这两种物质的添加对发酵乳的品质和发酵影响很小,故可以添加 $\leq 4\text{g}/100\text{mL}$ 的酪蛋白双酶水解物和 $\leq 0.3\text{g}/100\text{mL}$ 的超滤物制备功能性降血压发酵乳。

### 参考文献:

- [1] BRANTL V, TESCHEMACHER H, HENSCHEN A, et al. Novel opioid peptides derived from casein (beta-casomorphins). I. Isolation from bovine casein peptone[J]. Hoppe Seylers Z Physiol Chem, 1979, 360(9): 1211-1216.
- [2] LOTTSPREICH F, HENSCHEN A, BRANTL V, et al. Novel opioid peptides derived from casein (beta-casomorphins). III. Synthetic peptides corresponding to components from bovine casein peptone[J]. Hoppe Seylers Z Physiol Chem, 1980, 361(12): 1835-1839.
- [3] MEISEL H, SCHLIMME E. Milk proteins: precursors of bioactive peptides[J]. Trends Food Science Technology, 1990, 1: 41-43.
- [4] XU Ruojun. Bioactive peptides in milk and their biological and health implications[J]. Food Rev Int, 1998, 14(1): 1-9.
- [5] 姜毓君, 李庆春, 闫宏博, 等. 乳蛋白生物活性肽的药理作用及应用前景[J]. 中国乳品工业, 2004, 32(5): 30-33.
- [6] 杨铭, 胡志和. 酪蛋白双酶水解物ACE抑制肽的分离纯化[J]. 食品科学, 2012, 33(9): 50-53.
- [7] LAHOV E, REGELSON W. Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: caseicin, isracidin peptides[J]. Food and Chemical Toxicology, 1996, 34(1): 131-145.
- [8] LIEPKE C, ZUCHT H D, FORSSMANN W G, et al. Purification of novel peptide antibiotics from human milk[J]. Journal of Chromatography B, 2001, 752(2): 369-377.
- [9] 胡志和, 区翠颜, 朱利民, 等. 酪蛋白水解物对瑞士乳杆菌生长的影响[J]. 食品科学, 2010, 31(23): 188-193.
- [10] 夏庆, 薛正莲. 胰蛋白酶水解酪蛋白所得产物抗菌活性的研究[J]. 安徽工程科技学院学报, 2007, 22(1): 23-26.
- [11] 王桂春, 吕兵. 分步酶解酪蛋白制备小分子ACE抑制肽[J]. 食品科学, 2011, 32(21): 152-155.
- [12] 洪伟, 薛正莲, 陈玲. 酪蛋白制备ACE抑制肽的酶解工艺优化[J]. 食品与发酵科技, 2010(2): 37-40.
- [13] 张艳, 胡志和, 闫星, 等. 胃蛋白酶水解酪蛋白制备ACE抑制肽的条件[J]. 食品科学, 2010, 31(14): 42-46.
- [14] 申晓文, 牟光庆. 酪蛋白源ACE抑制肽的评价方法和研究进展[J]. 食品工业科技, 2010, 31(9): 375-381.
- [15] CUSHMAN D W, CHEUNG H S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung[J]. Biochemical Pharmacology, 1971, 20: 1637-1648.
- [16] MIGUEL M, CONTETAS M M, RECIO I, et al. ACE-inhibitory and antihypertensive properties of a bovine casein hydrolysate[J]. Food Chemistry, 2009, 112(1): 211-214.
- [17] 赵骏, 宫霞, 郭本恒. 乳酪蛋白源ACE抑制肽的分离纯化[J]. 中国乳品工业, 2006, 34(6): 8-11.
- [18] 姜瞻梅, 田波, 霍贵成. 超滤法分离酪蛋白酶解物中的ACE抑制肽[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(10): 59-61.
- [19] 廖敏. 低温长时间发酵酸奶加工关键技术与品质研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2005.
- [20] 王微. 凝固型原味酸奶质地及微观结构的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2007.
- [21] 谢继忠, 肖宏彬. 酸奶中乳酸菌数及酸度的检测与评价[J]. 中国乳品工业, 2002, 30(1): 23-25.
- [22] RECIO I, VISSER S. Identification of two distinct antibacterial domains within the sequence of bovine alpha(S2)-casein[J]. Biochim Biophys Acta, 1999, 1428(2/3): 314-326.
- [23] 李彦峰, 庞广昌, 阎亚丽. 酪蛋白来源新型抗菌肽中抗菌活性的初步研究[J]. 食品科学, 2003, 24(12): 34-36.
- [24] 胡婷. 酪蛋白抗菌肽制备技术的研究[D]. 成都: 西华大学, 2008.
- [25] 侯恩娟. 酪蛋白抗菌肽的制备与研究[D]. 成都: 西华大学, 2010.