

# 酪蛋白水解物对瑞士乳杆菌生长的影响

胡志和<sup>1</sup>, 区翠颜<sup>1</sup>, 朱利民<sup>2</sup>, 冯永强<sup>2</sup>, 张建军<sup>2</sup>

(1.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;

2.天津海河乳业有限公司, 天津 300402)

**摘 要:** 利用胰蛋白酶水解酪蛋白, 以水解物对瑞士乳杆菌增殖效果为指标, 优化水解条件, 并研究最佳增殖效果。结果表明: 胰蛋白酶水解酪蛋白的最佳水解条件为水解温度 37℃、底物质量分数 5%、酶与底物质量比 1:600、pH8.0, 此条件下制备的水解产物添加量为 1g/100mL 时对瑞士乳杆菌生长增殖效果最好, 而添加量大于 4g/100mL 时, 对瑞士乳杆菌生长呈现抑制作用。

**关键词:** 胰蛋白酶; 酪蛋白水解物; 瑞士乳杆菌; 增殖

## Effect of Casein Hydrolysate on Promoting the Growth of *Lactobacillus helveticus*

HU Zhi-he<sup>1</sup>, OU Cui-yan<sup>1</sup>, ZHU Li-min<sup>2</sup>, FENG Yong-qiang<sup>2</sup>, ZHANG Jian-jun<sup>2</sup>

(1. Tianjin Key Laboratory of Food Biotechnology, College of Biotechnology and Food Science, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China; 2. Tianjin Haihe Dairy Co. Ltd., Tianjin 300402, China)

**Abstract:** Effect of casein hydrolysate on promoting the growth of *Lactobacillus helveticus* was studied and the hydrolysis condition was optimized based on the growth promoting effect. The results showed that optimal hydrolysis conditions of casein by trypsin included temperature at 37 °C, pH value 8.0, substrate concentration 5%, ratio of enzyme to substrate 1:600, and hydrolysis time 180 min. Casein hydrolysate prepared at this optimal condition was added into *L. helveticus* culture solution, and the addition of 1 g/100mL casein hydrolysate exhibited the highest promoting effect on the growth of *L. helveticus*, while addition more than 4 g/100mL had the inhibiting effect.

**Key words:** trypsin; casein hydrolysate; *Lactobacillus helveticus*; growth promoting

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)23-0188-06

牛乳酪蛋白中蕴藏着许多具有生物活性的多肽, 如阿片活性、抑制血管紧张素转化酶活性、免疫调节活性、结合矿物质、抗血栓活性、抑菌活性、促进双歧杆菌活性和抗氧化活性等, 这些多肽可通过体内和体外的酶水解释放出来<sup>[1-6]</sup>。近几年来, 有关添加蛋白水解物对发酵乳中益生菌生长影响的研究均有相关报道, 张蓉真等<sup>[7]</sup>报道了大豆水解蛋白对乳酸菌增殖的促进作用; 赵新淮等<sup>[8]</sup>研究了大豆蛋白水解物的乳酸发酵促进作用; 吕嘉彬等<sup>[9]</sup>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。

本研究利用胰蛋白酶水解酪蛋白制备酪蛋白水解物, 并以水解产物对瑞士乳杆菌增殖情况为指标, 确定水解条件。同时, 在培养基中添加不同量的水解物培养瑞士乳杆菌, 确定适合其生长的添加量。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

酪蛋白(酪蛋白含量≥80%)、乳清粉(蛋白含量≥80%) 天津海河乳业有限公司。

胰蛋白酶(10000U/g) Sigma公司; 瑞士乳杆菌(6024) 天津商业大学微生物实验室; 酵母膏(生化试剂) 北京奥博星生物技术有限责任公司; 蛋白胨(生化试剂) 天津市福晨化学试剂厂; 牛肉膏(生化试剂) 天津市英博生化试剂有限公司; 葡萄糖、无水乙酸钠、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(均为分析纯) 天津市化学试剂批发公司; 柠檬酸氢二铵(分析纯) 天津石英钟厂霸州市化工分厂; 吐温-80(化学纯) 天津市德恩化学试剂有限公司; 琼脂(生化试剂) 日本Oxoid公司; 溴甲酚绿(分析纯) 天津市蓟县长城化学试剂厂。

### 1.2 仪器与设备

HWS24 电热恒温水浴锅 上海一恒科学仪器有限公

收稿日期: 2010-09-13

作者简介: 胡志和(1962—), 男, 教授, 硕士, 主要从事专用功能食品研究与开发。E-mail: hzhihe@tjcu.edu.cn

司; RW20.n 搅拌器 德国 IKA 公司; Scientz-50N 冷冻干燥机 宁波新芝生物科技股份有限公司; Q2-901 漩涡振荡器 海门市其林贝尔仪器制造公司; L535-1 台式低速离心机 湘仪离心机仪器有限公司; HVE-50 高压灭菌器 Hirayama 公司; DPX-9082B-1 电热恒温培养箱 上海福玛实验设备有限公司; UV-2100 紫外-可见分光光度计 日本 Unico 公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 瑞士乳杆菌菌液浓度与 OD 值工作关系曲线制作<sup>[10]</sup>

##### 1.3.1.1 培养基的制备

1) 乳清液的制备: 120g 乳清粉溶解于 1000mL 水中, 112℃ 灭菌 20min, 过滤取清液即为乳清液。2) MRS 为基础的改良培养基<sup>[11]</sup>(1 号培养基): 酵母膏 5g、蛋白胨 10g、牛肉浸膏 10g、葡萄糖 20g、无水乙酸钠 5g、柠檬酸氢二铵 2g、吐温-80 1mL、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.58g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2g、乳清液 100mL, 调 pH6.4, 121℃ 灭菌 20min。3) 计数培养基: A 液: 120g 乳清粉溶解于 1000mL 水中, 112℃ 灭菌 20min, 过滤取清液; B 液: 0.5% 葡萄糖, 1% 酵母膏, 调 pH7.4, 加 3.6% 琼脂和 0.16% 的溴甲酚绿。将 A、B 液按体积比 1:1 混合, 115℃ 灭菌 20min 即为计数培养基。4) 琼脂培养基: 1.2% 的琼脂溶液。

##### 1.3.1.2 瑞士乳杆菌菌液浓度与 OD 值工作关系曲线的制作

按体积分数 3% 的接种量, 向装有 10mL 灭菌 MRS 的改良培养基中接入 0.3mL 菌液, 迅速摇匀后, 放入 37℃ 恒温培养箱中培养 24h。

对培养 24h 后的菌液进行系列稀释, 稀释液为 MRS 为基础的改良培养基, 在 600nm 波长处测定每个稀释度的 OD 值, 并采用平板计数法检测各稀释度的菌落数。具体方法为: 取 5 个稀释度样品, 再分别稀释至 10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup>, 取菌液 0.1mL 于计数培养基内进行涂布, 涂布均匀后加上一层琼脂培养基, 30℃ 培养 4d, 进行菌落计数。

#### 1.3.2 单因素条件下胰蛋白酶水解酪蛋白的产物对瑞士乳杆菌生长的影响

##### 1.3.2.1 酪蛋白水解物的制备

###### (1) 胰蛋白酶水解酪蛋白单因素条件

温度的单因素试验: pH8.0、底物质量分数 4%、酶与底物质量比 1:200, 温度分别取 35、40、45、50、55℃ 进行水解。酶与底物质量的单因素试验: pH8.0、温度 45℃、底物质量分数比 4%, 酶与底物质量比分别为 1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600 进行水解。底

物质量分数的单因素试验: pH8.0、温度 45℃, 酶与底物质量比 1:200, 底物质量分数分别为 2%、4%、6%、8%、10% 进行水解。

##### (2) 酪蛋白水解物的制备<sup>[12]</sup>

根据上述各单因素的试验条件, 称取一定量的酪蛋白, 边搅拌边缓慢加入至 500mL 去离子水中溶解, 放入恒温水浴中, 并保持适当温度, 用 1mol/L NaOH 溶液调 pH 值至 8.0, 加入胰蛋白酶液, 开始计时, 检测 pH 值变化并使用 1mol/L NaOH 溶液维持体系 pH8.0, 记录 NaOH 溶液的添加体积, 水解至平衡, 用 HCl 溶液调至 pH7.0, 沸水浴灭酶 15min; 4000r/min 离心 20min, 上清液冷冻干燥得酪蛋白水解产物。考察各单因素变化对水解度的影响。

##### (3) pH-Stat 法计算酪蛋白水解度<sup>[13]</sup>

$$\text{水解度 DH/\%} = V \times c \times 1/\alpha \times 1/m_p \times 1/h \times 100$$

式中: V 为水解过程中消耗的 NaOH 溶液体积/mL; c 为 NaOH 的浓度/(mol/L); m<sub>p</sub> 为蛋白质总质量/g; α 为 α-氨基酸的解离度, 对于酪蛋白, 1/α=2.26; h 为每克蛋白质中肽键的毫摩尔数/(mmol), 对于酪蛋白取 8.2。

##### 1.3.2.2 各单因素条件下制备的水解产物对瑞士乳杆菌生长的影响

###### (1) 酪蛋白水解物的适宜添加量确定

选在 pH8.0、温度 45℃、底物质量分数 4%、酶与底物质量比为 1:200 的水解条件下得出的酪蛋白水解物为实验用材料, 按水解物添加质量浓度为 0、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4g/100mL 的添加量, 分别加入到 1 号改良培养基中, 接菌量为 3%, 37℃ 恒温培养 24h 后, 对菌液分别做 5 倍稀释后测 OD<sub>600nm</sub>, 空白为 1 号培养基; 根据工作关系曲线计算出瑞士乳杆菌菌浓度。

###### (2) 各单因素条件下制备水解产物对瑞士乳杆菌的影响

按上述所确定的添加量, 将方法 1.3.2.1 节中各条件下制备的水解产物加入 1 号培养基, 然后接入瑞士乳杆菌, 接种量为 3%, 37℃ 恒温培养 24h, 5 倍稀释后测 OD<sub>600nm</sub>, 空白为 1 号培养基, 根据工作关系曲线计算出瑞士乳杆菌菌浓度。根据各单因素条件下制备的水解产物对乳酸菌生长的影响程度, 确定各单因素水解条件的范围。

##### 1.3.3 胰蛋白酶水解酪蛋白条件的优化

###### 1.3.3.1 水解条件的优化

根据水解产物对瑞士乳杆菌生长的影响, 优化胰蛋白酶的水解条件, 选取三因素三水平进行正交试验, 因素及水平见表 1。

表1 胰蛋白酶水解酪蛋白的正交试验条件

Table 1 Orthogonal experiment condition of casein hydrolysate by trypsin

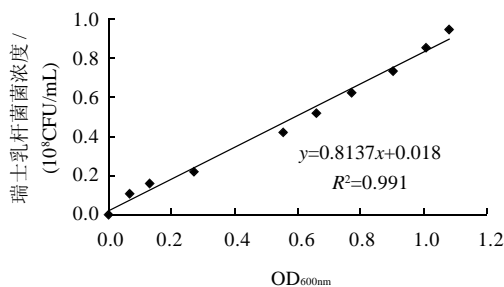
水平	A 底物质量分数/%	B 酶与底物质量比	C 温度/℃
1	5	1:200	37
2	6	1:400	40
3	7	1:600	43

### 1.3.3.2 优化条件下制备的水解产物对瑞士乳杆菌生长的影响

根据方法 1.3.3.1 节优化的水解条件, 制备水解产物, 并以 0、1、2、3、4、6、8、10 g/100 mL 的质量浓度制备培养基, 观察水解物在不同添加量时对瑞士乳杆菌生长的影响。

## 2 结果与分析

### 2.1 瑞士乳杆菌菌浓度与 OD<sub>600nm</sub> 值关系曲线

图1 瑞士乳杆菌菌浓度与 OD<sub>600nm</sub> 值关系曲线Fig.1 Relation between concentration of *Lactobacillus helveticus* and OD<sub>600nm</sub>

由图 1 可知, 瑞士乳杆菌菌浓度增大, 光密度增加, 并呈线性关系, 通过线性回归分析可得回归方程:  $y = 0.8137x + 0.018 (R^2 = 0.991)$ 。

### 2.2 单因素条件下胰蛋白酶水解酪蛋白的产物对瑞士乳杆菌生长的影响

#### 2.2.1 底物质量分数对酪蛋白水解进程及水解度的影响

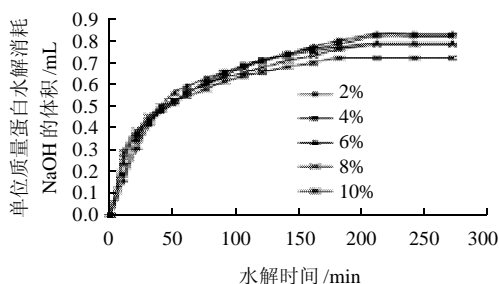


图2 不同底物质量分数的酪蛋白水解进程曲线

Fig.2 Hydrolysis process of casein hydrolyzed by trypsin at different concentrations of substrate

在 pH8.0、温度 45℃、酶与底物质量比 1:200 的条件下, 底物质量分数为 2%、4%、6%、8%、10% 时, 酪蛋白水解进程及水解度见图 2、3。

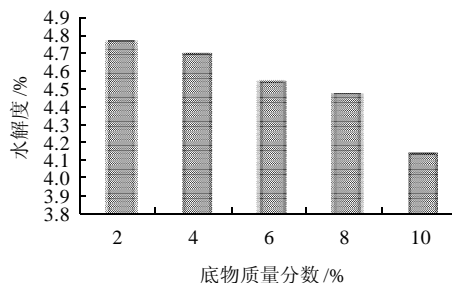


图3 不同底物质量分数酪蛋白的水解度

Fig.3 Degree of casein hydrolysis by trypsin at different concentration of substrate

由图 2 可知, 不同底物质量分数条件下水解, 在 220 min 时到达平衡。由图 3 可知, 随着底物质量分数的增大, 酪蛋白水解度降低。

#### 2.2.2 酶与底物比对酪蛋白水解进程及水解度的影响

在 pH8.0、温度 45℃、底物质量分数 4% 的条件下, 酶与底物质量比分别为 1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600。水解酪蛋白的水解进程及水解度见图 4、5。

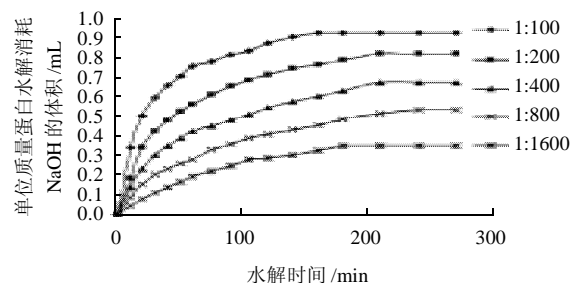


图4 不同酶与底物质量比酪蛋白的水解进程曲线

Fig.4 Hydrolysis process of casein by trypsin at different quality ratios of enzyme to substrate

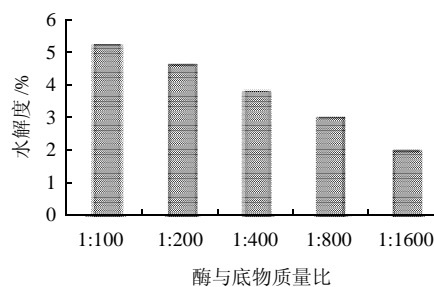


图5 不同酶与底物质量时酪蛋白的水解度

Fig.5 Degree of casein hydrolysis by trypsin at different quality ratio for enzyme to substrate

由图4可知,整个反应体系在210min时达到平衡。由图5可知,酶与底物之比越小,水解程度越低。

### 2.2.3 温度对酪蛋白水解进程及水解度的影响

在pH8.0,底物质量分数4%、酶与底物质量比1:200的条件下,水解温度分别取35、40、45、50、55℃,水解酪蛋白的进程曲线及水解度见图6、7。

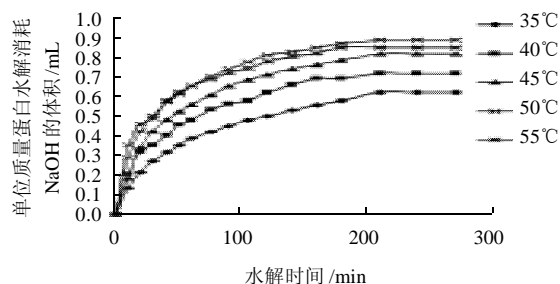


图6 不同温度酪蛋白的水解进程曲线

Fig.6 Hydrolysis process of casein by trypsin at different temperatures

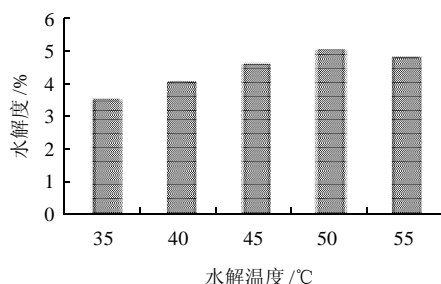


图7 不同温度酪蛋白的水解度

Fig.7 Degree of casein hydrolysis by trypsin at different temperatures

由图6可知,在所选择的温度范围内,不同温度条件下反应,在210min时整个反应体系达到平衡。由图7可知,水解温度在50℃时,水解效果较好。

### 2.2.4 单因素条件下制备酪蛋白水解物添加量对瑞士乳杆菌生长的影响

#### 2.2.4.1 水解物添加量的确定

选在pH8.0、温度45℃、底物质量分数4%、酶与底物质量比为1:200的水解条件下得出的酪蛋白水解物为实验材料,在培养基中添加0~0.4g/10mL的水解物,其对瑞士乳杆菌生长影响结果见图8。

由图8可知,在酪蛋白水解物添加量的范围为0~0.1g/10mL时,随着添加量的增大,对瑞士乳杆菌生长的促进作用逐渐增大;0.1g/10mL时达到最高点;添加

量大于0.1g/10mL时,这种促进作用逐渐减小;添加量为0.4g/10mL时,出现抑制作用。

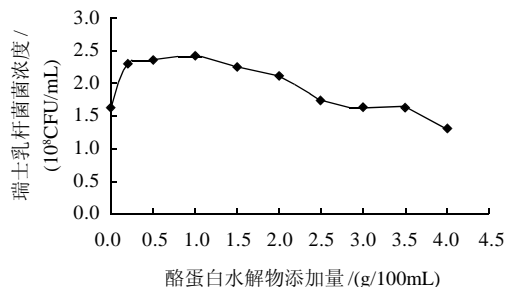


图8 不同酪蛋白水解物添加量对瑞士乳杆菌生长的影响

Fig.8 Effect of addition quality on promoting the growth of *Lactobacillus helveticus*

#### 2.2.4.2 各单因素条件下胰蛋白酶水解酪蛋白产物对瑞士乳杆菌生长的影响

将各单因素条件下所获得的水解产物按照0.1g/10mL的量添加到1号培养基中,接种瑞士乳杆菌进行培养,其影响见图9~11。

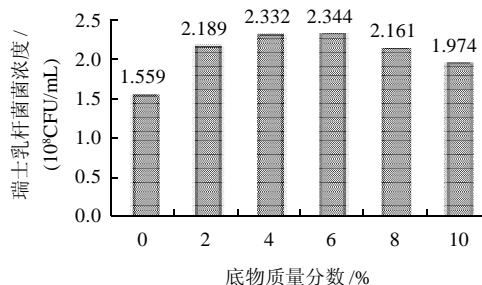


图9 不同底物质量分数酪蛋白水解物对瑞士乳杆菌生长的影响

Fig.9 Effect of casein hydrolysate at different substrate concentrations on growth of *Lactobacillus helveticus*

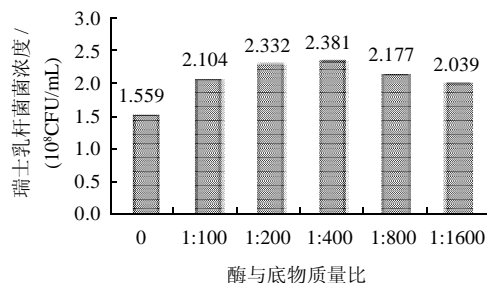


图10 不同酶与底物质量比酪蛋白的水解物对瑞士乳杆菌生长的影响

Fig.10 Effect of casein hydrolysate at different quality ratios of enzyme to substrate on growth of *Lactobacillus helveticus*

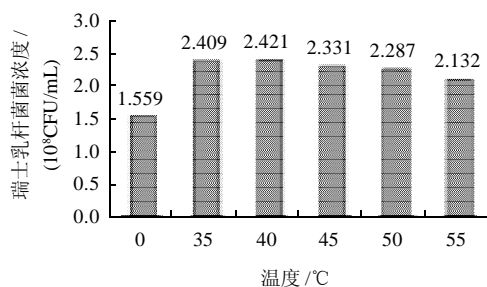


图 11 不同温度酪蛋白的水解度对瑞士乳杆菌生长的影响

Fig.11 Effect of casein hydrolysate at different temperatures on growth of *Lactobacillus helveticus*

由图 9~11 可知, 较适宜的底物质量分数为 4%~6%, 酶与底物质量比 1:200~1:800, 温度为 35~45℃, 在上述条件下获得的水解物对瑞士乳杆菌生长均有较好的促进作用, 并确定了正交试验各因素的水平范围。另外, 与图 3、图 5 和图 7 结果比较可知, 水解度大的水解产物对瑞士乳杆菌生长的促进作用并非最强。

### 2.3 酪蛋白水解条件优化

#### 2.3.1 正交试验各条件下水解产物对瑞士乳杆菌增殖的影响

表 2 正交试验条件下酪蛋白水解产物对瑞士乳杆菌生长的影响

Table 2 Orthogonal experiment on the effect of casein hydrolysate on promoting the growth of *Lactobacillus helveticus*

试验号	A底物质量分数	B酶与底物质量比	C温度	菌浓度/(10 <sup>8</sup> CFU/mL)
1	1(5%)	1(1:200)	1(37℃)	2.109
2	1	2(1:400)	2(40℃)	2.314
3	1	3(1:600)	3(43℃)	2.132
4	2(6%)	1	3	1.992
5	2	2	1	1.975
6	2	3	2	2.114
7	3(7%)	1	2	1.653
8	3	2	3	1.869
9	3	3	1	2.146
均值1	2.184	1.917	2.076	
均值2	2.027	2.053	2.027	
均值3	1.889	2.131	1.998	
极差	0.295	0.241	0.078	
最优水平	A <sub>1</sub>	B <sub>3</sub>	C <sub>1</sub>	

由表 2 可知, 3 种因素(水解条件)对瑞士乳杆菌生长影响的大小依次为  $A > B > C$ , 即底物质量分数 > 酶与底物质量比 > 温度, 最好的实验方案为  $A_1B_3C_1$ , 即水解温度 37℃、底物质量分数 5%、酶与底物质量比 1:600, pH8.0, 此条件下得出的水解产物对瑞士乳杆菌生长增殖效果最好, 菌浓度为  $2.484 \times 10^8$  CFU/mL。

#### 2.3.2 正交试验条件下水解产物的制备

根据正交试验条件制备水解产物, 各条件下水解进程曲线见图 12, 水解度见图 13。

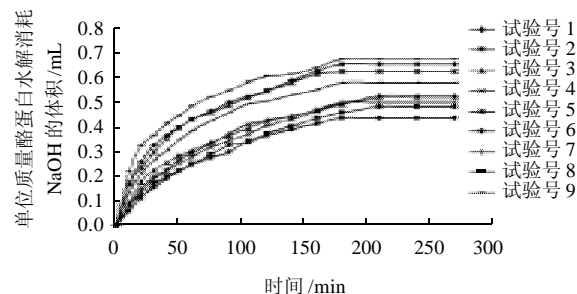


图 12 正交试验条件下胰蛋白酶水解酪蛋白水解进程曲线

Fig.12 Hydrolysis process of casein hydrolysed by trypsin under orthogonal experiment condition

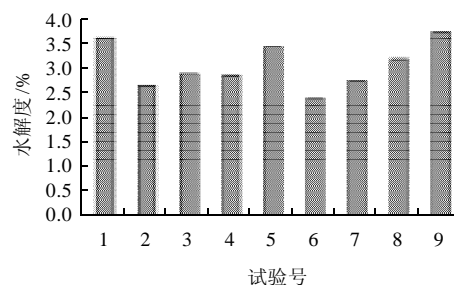


图 13 正交试验条件下胰蛋白酶水解酪蛋白的水解度

Fig.13 Orthogonal experiment condition for the degree of casein hydrolysis by trypsin

由图 12、13 可知, 各条件下制备水解产物的时间为 210min, 样品 1、5、9 的水解度较大。但由表 2 可知, 样品 1、5、9 虽然水解度较大, 但其对瑞士乳杆菌生长的促进作用并非最强。

#### 2.3.3 优化条件下制备的酪蛋白水解物对瑞士乳杆菌生长的影响

根据优化水解条件制备酪蛋白水解物, 添加量梯度为 0、1、2、4、6、8、10g/100mL 制作培养基, 观察其对瑞士乳杆菌生长的影响, 结果见图 14。

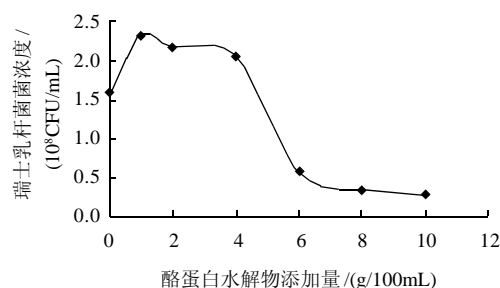


图 14 不同质量浓度酪蛋白水解物对瑞士乳杆菌生长的影响

Fig.14 Effect of different concentrations of casein hydrolysate on promoting the growth of *Lactobacillus helveticus*

由图 14 可知, 1g/100mL 的酪蛋白水解物为最适添加量; 当添加质量浓度范围在 2~4g/100mL 时, 促进作用逐渐减缓, 当添加质量浓度超过 4g/100mL 时, 开始呈现抑制瑞士乳杆菌生长的趋势。

### 3 结 论

通过上述研究可知, 胰蛋白酶水解酪蛋白的水解产物添加量 $\leq$ 1g/100mL, 对瑞士乳杆菌具有一定的增殖作用; 添加量 $>$ 1g/100mL 时, 对其增殖促进作用减弱; 当添加量 $>$ 4g/100mL 时, 酪蛋白水解物则呈现抑制其生长的作用。另外, 水解度大的水解产物对瑞士乳杆菌的生长促进作用并非最强。

### 参考文献:

- [1] SILVA S V, MALCATA F X. Caseins as source of bioactive peptides[J]. International Dairy Journal, 2005, 15(1): 1-15.
- [2] HATAI, UEDA J, OTANI H. Immunostimulatory action of a commercially available casein phosphopeptide preparation, CPPIII, in cell cultures[J]. Milchwissenschaft, 1999, 54(1): 3-7.
- [3] JOLLÈS P, PARKER F, FLOCH F, et al. Immunostimulating substances from humancasein[J]. Journal of Immunopharmacology, 1981, 3: 363-369.
- [4] KAYSER H, MEISEL H. Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk proteins[J]. FEBS Letters, 1996, 383(12): 18-20.
- [5] LEBLANC J G, MATAR C, VALDEZ J C, et al. Immunomodulating effects of peptidic fractions issued from milk fermented with *Lactobacillus helveticus*[J]. Journal of Dairy Science, 2002, 85(11): 2733-2742.
- [6] ALEJANDRA M L, MATAR C, CATHERINE T, et al. Effects of milk fermented by *Lactobacillus helveticus* R389 on immune cells associated to mammary glands in normal and a breast cancer model[J]. Immunobiology, 2005, 9: 349-358.
- [7] 张蓉真, 李珑. 大豆水解蛋白对乳酸菌增殖的促进作用[J]. 粮油学报, 1997, 12(6): 40-43.
- [8] 赵新淮, 关瑞. 大豆蛋白水解物对乳酸发酵的促进作用[J]. 东北农业大学学报, 1998, 9(1): 102-104.
- [9] 吕嘉彬, 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.
- [10] 朱艳静, 李宇. 测定菌体浓度的简便方法[J]. 工业微生物, 2006, 36(4): 47-49.
- [11] 吴玲, 何颖. 瑞士乳杆菌增菌培养基的筛选[J]. 常州工程职业技术学院学报, 2007(4): 129-131.
- [12] 徐海军, 尹富贵, 曾军英, 等. 正交设计和均匀设计优化酪蛋白酶水解参数的比较[J]. 食品科学, 2008, 29(12): 87-90.
- [13] 宁正祥. 食品成分分析手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998: 119-124.