

# 江米酒脂肪酶对米酒奶脂肪水解风味的影响

薛璐, 伍慧方, 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:** 利用传统江米酒制备凝乳剂来制作米酒奶, 其中江米酒脂肪酶活力为 1.0~1.5 LU/mL。通过酸度值(ADV)分析发现, 脂肪酸的积累主要发生在凝乳期间。采用气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)检测各游离脂肪酸的含量, 棕榈酸、油酸、豆蔻酸和硬脂酸占有较高的比例。

**关键词:** 米酒奶; 江米酒脂肪酶; 脂肪水解

## Effect of Lipase Contained in Glutinous Rice Wine on Lipolysis in Traditional Chinese-style Cheese

XUE Lu, WU Hui-fang, HU Zhi-he

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

**Abstract:** Milk coagulant prepared from glutinous rice wine was used to produce Mijiunai, also called traditional Chinese-style cheese. The lipolytic activity of glutinous rice wine used was between 1.0 LU/mL and 1.5 LU/mL. The accumulation of fatty acids happened mainly during milk-clotting period. The free fatty acid composition of Mijiunai was analyzed by GC-MS. Palmitic, oleic, myristic and stearic acids were found at higher concentrations.

**Key words:** Mijiunai; glutinous rice wine; lipase; lipolysis

中图分类号: TS201.25

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)19-0071-03

米酒奶, 也称中式传统奶酪、宫廷奶酪、扣碗酪, 是我国特有的传统乳制品。它是由鲜牛奶和江米酒按一定比例混合, 通过米酒中的酸性蛋白酶使牛奶凝固而成的。其外观类似凝固型酸奶, 具有牛奶和米酒的香味。目前米酒奶主要依靠手工制作, 虽有少数关于米酒奶制作工艺与凝乳机理方面的研究<sup>[1-2]</sup>, 但是对于其风味方面的研究未见报道。

米酒奶的风味不但来自于凝乳酶水解乳蛋白产生的风味物质, 同时也受到江米酒中脂肪酶的影响。在前期实验中<sup>[3]</sup>, 对凝乳剂(江米酒)中提取的脂肪酶的酶学特性进行了研究, 发现米酒奶的凝乳和贮藏条件正适合于脂肪酶充分水解乳脂肪产生风味物质。本研究在此基础上, 通过检测米酒奶中游离脂肪酸的含量以及种类, 确定江米酒脂肪酶对米酒奶风味的影响程度。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

江米、安琪甜酒曲、UHT 乳、橄榄油 市售; 氨基固相萃取小柱 美国 Agilent 公司; 正壬酸(色谱

纯)、三羟甲基氨基甲烷 美国 Sigma 公司; 25g/100mL 四甲基氢氧化铵-甲醇溶液 比利时 Acros Organics 公司; 邻苯二甲酸氢钾(工作基准试剂); 其他均为国产分析纯试剂。

### 1.2 仪器与设备

SW-CJ-1F 超净工作台 上海博迅实业有限公司; SORVALL RC3BP 低速冷冻离心机 美国 Thermo Fisher 公司; CLIN-250 生化培养箱 天津市华北实验仪器有限公司; KDC-160HR 高速冷冻离心机 科大创新股份有限公司中佳分公司; TRACE DSQ 气相色谱-质谱联用仪 美国 Finnigan 公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 凝乳剂(江米酒)和米酒奶的制作

新鲜江米洗净浸泡 24h 以上, 常压蒸 20min, 摊凉冷却, 加入体积分数 0.5% 酒曲搅拌均匀, 于 30℃保温发酵 48h 后, 加水继续发酵 5d<sup>[4]</sup>, 将发酵液于 4℃、4000r/min 离心 20min, 上清液即为米酒奶的凝乳剂。

将江米酒与牛奶按体积比 1:9 混合均匀后, 在烤箱中 80℃烤制 40min<sup>[5]</sup>, 取出晾凉后于 4℃冰箱中后熟 12h, 即为米酒奶。

收稿日期: 2010-06-24

基金项目: 天津市高等学校科技发展基金项目(20070911)

作者简介: 薛璐(1976—), 女, 副教授, 博士, 主要从事食品微生物研究。E-mail: hellenxue76@yahoo.com.cn

### 1.3.2 凝乳剂脂肪酶活力的检测

采用碱性滴定法<sup>[6-7]</sup>,在测定条件下,每分钟释放1  $\mu\text{mol}$  脂肪酸的酶量定义为1个酶活力单位(LU)。

### 1.3.3 酸度值测定<sup>[8]</sup>

采用有机溶剂法。取20g样品→加入饱和氯化钠溶液25mL→加入乙醚正己烷混合萃取溶剂100mL(80:20, V/V)→4滴甲基橙指示剂→振荡1min→加入体积分数2%硫酸溶液至溶液pH2~3(粉红色)→振荡1min→1500r/min离心10min→取上清液→1-萘酚酞指示剂0.5mL→0.02mol/L氢氧化钾-乙醇标准液滴定至溶液蓝绿色

### 1.3.4 固相萃取米酒奶的游离脂肪酸<sup>[9-10]</sup>

取10g米酒奶,加入10mL无水乙醇,1mL 2.5mol/L盐酸充分振荡(加入正壬酸标准品),然后加入15mL乙醚-正庚烷混合有机溶剂(1:1, V/V),用漩涡振荡器振荡数秒。2500r/min离心3min后,上清液转入装有1g无水硫酸钠的具塞三角瓶中,用10mL混合有机溶剂重复萃取两次,合并脂肪萃取液。将萃取液过氨基固相萃取小柱(使用前先用10mL正庚烷清洗),再用10mL氯仿-异丙醇混合洗液(2:1, V/V)将中性脂肪洗出,用5mL含有体积分数2%甲酸的乙醚溶液过柱,获得脂肪酸乙醚溶液。该溶液加入25g/100mL四甲基氢氧化铵-甲醇溶液,振荡3min,静置15min。用3mL乙醚冲洗两次下层的脂肪酸盐,再用2mol/L盐酸-甲醇溶液中和至pH值为中性,得到待测样进行气质检测。

### 1.3.5 游离脂肪酸的气相色谱-质谱(GC-MS)鉴定

#### 1.3.5.1 色谱条件

色谱柱:TR-5MS 石英毛细管柱(30m  $\times$  0.25mm, 0.25  $\mu\text{m}$ );载气为氦气,流速1.0mL/min;进样口温度为275℃;升温程序:40℃保持6min,以10℃/min升至140℃,再以4℃/min升至220℃,保持10min;进样量0.5  $\mu\text{L}$ ;分流比20:1。

#### 1.3.5.2 质谱条件

离子源为EI;电子能量70eV;发射电流为100  $\mu\text{A}$ ;传输线温度250℃;离子源温度250℃;质量扫描范围 $m/z$  35~350,溶剂延迟4min。

## 2 结果与分析

### 2.1 江米酒脂肪酶活力的大小

实验中所用的酒曲是商品化的纯种根霉菌,在发酵期间产生了相当的脂肪酶。利用橄榄油为水解底物,将江米酒作为酶液直接检测其脂肪酶活力,发现与传统液态皱胃酶中的脂肪酶相当,达到了1.0~1.5LU/mL,这为米酒奶在凝乳和贮藏期间游离脂肪酸的积累提供可能。

### 2.2 米酒奶贮藏期间酸度值的变化

米酒奶的脂肪水解程度就是酸度值(acid degree value, ADV),表示游离脂肪酸的总量。取不同贮藏时间的样品测定其酸度值,结果如图1所示,其中,第0天是指凝乳前,第1天是指经过12h后熟的产品。

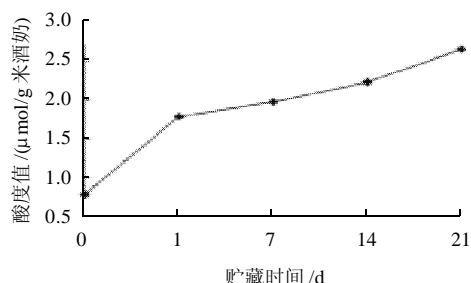


图1 米酒奶在贮藏期间酸度值的变化

Fig.1 Change in acid degree value of Mijiunai during storage

由图1可知,米酒奶在凝乳和贮藏期间ADV持续呈上升趋势,制作过程变化较快,后期贮藏变化较缓慢。米酒奶在凝乳前的ADV为0.79  $\mu\text{mol/g}$  米酒奶,经过40min的凝乳、晾凉以及12h的后熟,产生了大量的游离脂肪酸,增加到了1.79;在贮藏前中期,ADV缓慢增大,从1.79增加到了2.22;在贮藏后期,游离脂肪酸的积累速率有所加快。

在先前对江米酒脂肪酶酶学<sup>[3]</sup>的研究中发现:在米酒奶的制作过程中,凝乳温度在45~50℃范围内,凝乳的中心温度也接近45℃,而这正是江米酒脂肪酶的最适反应温度。在此温度条件下,脂肪酶充分作用于牛奶中的乳脂肪,使脂肪水解生成大量的游离脂肪酸。

由于低温贮藏条件,江米酒脂肪酶的活力受到了抑制,另外,米酒奶是以稳定的酪蛋白凝胶网状结构形式存在的,作为分散相的脂肪球和脂肪酶接触的几率大大降低,因此,ADV在贮藏前中期比较稳定。到贮藏后期,奶酪的凝胶结构发生松散,有部分乳清析出和微生物的活动等,这些可能是ADV的增加又有所加快的原因。

### 2.3 米酒奶中的游离脂肪酸的种类及其变化

游离脂肪酸除了自身可以直接作为奶酪的风味物质,同时也是一些挥发性物质的前体,有酮类、内酯类、醇类、酯类以及醛类等<sup>[11]</sup>。

图2是第14天米酒奶游离脂肪酸的总离子流图。一共分离鉴定出10种脂肪酸,分别是丁酸( $\text{C}_{4:0}$ )、己酸( $\text{C}_{6:0}$ )、辛酸( $\text{C}_{8:0}$ )、癸酸( $\text{C}_{10:0}$ )、月桂酸( $\text{C}_{12:0}$ )、豆蔻酸( $\text{C}_{14:0}$ )、棕榈酸( $\text{C}_{16:0}$ )、硬脂酸( $\text{C}_{18:0}$ )、油酸( $\text{C}_{18:1}$ )和亚油酸( $\text{C}_{18:2}$ )。结合图3可以看出棕榈酸、油酸、豆蔻酸和硬脂酸等脂肪酸占主要部分,占到了80%以上,这和牛乳的脂肪酸组成<sup>[12]</sup>是一致的。

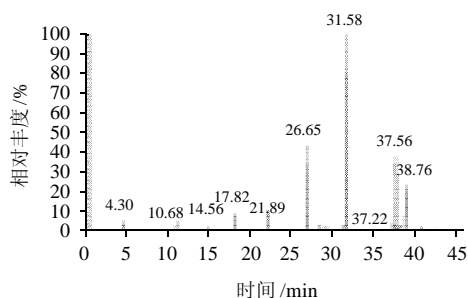


图2 第14天米酒奶游离脂肪酸的总离子流图

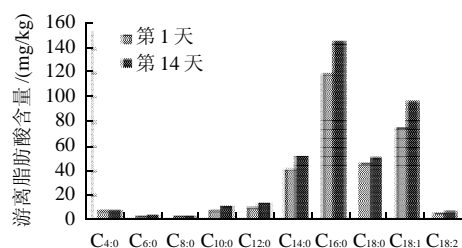
Fig.2 Total ion chromatogram of free fatty acids in Mijiunai on the 14<sup>th</sup> day of storage

图3 米酒奶贮藏期间游离脂肪酸的变化

Fig.3 Changes in free amino acids in Mijiunai after 13 days of storage

米酒奶在贮藏期间,中链脂肪酸( $C_{10:0} \sim C_{12:0}$ )和长链脂肪酸( $C_{14:0} \sim C_{18:2}$ )相对于短链( $C_{4:0} \sim C_{8:0}$ )而言变化较快,这和江米酒脂肪酶有密切关系。虽然根霉脂肪酶对乳脂肪的水解具有1,3位置专一性<sup>[13]</sup>;但是同时还对链长也有选择性,其会优先水解1,3位上有中长链脂肪酸的乳脂肪<sup>[14]</sup>。另外,短链脂肪酸的含量也有部分增加,这可能与UHT乳中残存的嗜冷菌脂肪酶有关。

虽然短链脂肪酸占整个游离脂肪酸总量的比例较小,但是阈值很小,每一种都赋予米酒奶特有的风味,例如,丁酸有腐臭味,己酸有刺激的辛辣味,辛酸有蜡味、体臭味,十二酸可以表现出桂花油味等。长链脂肪酸阈值相对较大,因此对米酒奶风味的贡献主要体现在口感上,随着贮藏时间的延长,奶酪的酸味加重。

### 3 结论

本实验中使用的凝乳剂(江米酒)的脂肪酶活力为1.0~1.5LU/mL。通过酸度值的测定,米酒奶在凝乳和后熟期间,游离脂肪酸总量从 $0.79 \mu\text{mol/g}$ 增加到了 $1.79 \mu\text{mol/g}$ 。利用GC-MS一共分离出10种游离脂肪酸,其中棕榈酸、油酸、豆蔻酸和硬脂酸占了大部分。

### 参考文献:

- [1] 刘振民, 骆承庠. 江米酒乳凝固机理研究[J]. 食品科学, 2000, 21(7): 13-15.
- [2] 张学伟, 杨丽荣, 刘增杰. 甜凝奶酪试制初报[J]. 中国奶牛, 1995(6): 44-46.
- [3] 薛璐, 胡志和, 洪振威. 江米酒脂肪酶酶学特性的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(9): 393-395.
- [4] 薛璐, 张会, 陈历俊. 米酒奶凝乳剂-江米酒发酵特性的研究[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(6): 114-116.
- [5] 滕国新. 酒曲中根霉凝乳酶性质及对扣碗酪凝乳质地影响的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2005.
- [6] 何耀强, 王炳武, 谭天伟. 假丝酵母99-125脂肪酶的发酵工艺研究[J]. 生物工程学报, 2004, 20(6): 918-921.
- [7] 舒正玉. 黑曲霉脂肪酶的酶学性质、基因克隆与表达及结构预测[D]. 武汉: 华中科技大学, 2007.
- [8] EVERS J M. Determination of free fatty acids in milk using the BDI method-some practical and theoretical aspects[J]. International Dairy Journal, 2003, 13(2/3): 111-121.
- [9] SERRA M, TRUJILLO A J, PEREDA J, et al. Quantification of lipolysis and lipid oxidation during cold storage of yogurts produced from milk treated by ultra-high pressure homogenization[J]. Journal of Food Engineering, 2008, 89(1): 99-104.
- [10] CHAVARRI F, VIRTO M, MARTIN C, et al. Determination of free fatty acids in cheese: comparison of two analytical methods[J]. Journal of Dairy Research, 1997, 64: 445-452.
- [11] McSWEENEY P L H, SOUSA M J. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review[J]. Lait, 2000, 80(3): 293-324.
- [12] COLLINS A Y F, McSWEENEY P L H, WILKINSON M G. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: A review of current knowledge[J]. International Dairy Journal, 2003, 13(11): 841-866.
- [13] 颜兴和, 王栋, 徐岩. 根霉脂肪酶的研究进展[J]. 工业微生物, 2005, 35(3): 45-49.
- [14] 王乐乐. 华根霉(*Rhizopus chinensis*)脂肪酶的基因克隆、表达、纯化和酶学性质研究[D]. 无锡: 江南大学, 2008.