



# 脂肪酶酶解黄油制备天然乳味增香物的研究

刘志东<sup>1,2</sup>, 郭本恒<sup>2</sup>, 王荫榆<sup>2,\*</sup>, 刘振民<sup>2</sup>, 李云飞<sup>3</sup>

(1.上海交通大学, 生命科学技术学院, 上海 200240;

2.光明乳业技术中心, 乳业生物技术国家重点实验室, 上海 200436;

3.上海交通大学, 农业与生物学院, 上海 200240)

**摘要:**进行了脂肪酶酶解黄油制备乳味增香物的研究。选取了5种脂肪酶对黄油进行酶解。以酸值和感官评分为指标, 筛选出对乳脂肪酶解效果最好, 感官评分最高的脂肪酶A6为实验用酶。在单因素实验的基础上, 采用正交实验优化脂肪酶酶解黄油制备乳味增香物的最佳工艺条件为: 底物浓度为50%、E/S为1.0%、温度为45℃、酶解时间为3.5h。在此优化条件下, 进行了脂肪酶酶解黄油制备乳味增香物的验证实验, 所得乳味增香物的增香效果较好。

**关键词:**脂肪酶, 黄油, 酶解, 乳味增香物

## Study on hydrolysis of milkfat by lipase for natural flavouring agent

LIU Zhi-dong<sup>1,2</sup>, GUO Ben-heng<sup>2</sup>, WANG Yin-yu<sup>2,\*</sup>, LIU Zhen-min<sup>2</sup>, LI Yun-fei<sup>3</sup>

(1.School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China;

2.State Key Laboratory of Dairy Biotechnology, Technical Center, Bright Dairy Co.Ltd., Shanghai 200436, China;

3.School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

**Abstract:** The production of milk flavor agent by the hydrolysis of butter was studied in the paper. Butter was hydrolyzed by five lipases originated from microorganisms. Lipase B was chosen as having the best milk flavor of the hydrolysates of butter. On the basis of the single factor experiments, the optimum parameters by orthogonal design were determined as follows: the concentration of the substrate 50%, E/S 1.0%, temperature 45℃, time 3.5h, the best milk flavor can be produced. The verification test results indicated that the optimum conditions were adequate for hydrolysis conditions of the butter.

**Key words:** lipase; butter; hydrolysis; milk flavor agent

中图分类号: TS202.3

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2010)09-0208-04

乳味香精是食品工业中应用最广泛的香精之一。目前乳味香精的制备大致有以下几种: 利用单体香原料进行人工调配的香精; 利用相关微生物, 酶水解奶油等生物技术手段处理, 再经修饰调配而成的天然乳味香精; 采用天然萃取物调配的花色香精<sup>[1-2]</sup>。酶法制备天然乳味香精是通过选择合适的脂肪酶和乳脂肪, 通过酶解作用使乳脂肪中的脂肪酸(饱和与不饱和的)甘油三酯、酮酸和羧酸的甘油三酯酶解成饱和及不饱和脂肪酸、酮酸和羧酸释放出来<sup>[3]</sup>。酶法获得的天然乳味香精香气自然、柔和, 赋予加香产品天然的乳香味, 对加香产品内在质量

有明显的改善和提高作用。目前, 利用生物工程技术来制备奶类香精已经有了初步的发展。武彦文等利用脂肪酶水解奶油、奶酪和牛奶, 并对其酶解条件进行了初步探讨<sup>[2]</sup>。陈影等利用解脂假丝酵母脂肪酶对奶油进行水解, 得到了乙酸、丁酸和己酸含量较高的奶油制品<sup>[4]</sup>。R.G.Agnold 和 K.M.Shahani 等<sup>[5]</sup>以稀奶油、奶油和无水奶油为原料, 通过控制脂肪酶对乳脂肪的水解程度获得具有乳香味的主要成分以达到酶解增香的目的。Victor M 等<sup>[6]</sup>用脂肪酶对乳脂肪进行水解就可以得到具有浓郁奶香的产品或香精。目前国内在应用脂肪酶来改善乳脂肪的风味研究方面还比较分散。本文研究了5种脂肪酶对黄油的酶解情况, 筛选出对黄油具有较强特异性的脂肪酶并进一步对该酶水解黄油的工艺条件进行了深入探索, 利用感官评定和脂解率对酶解产物的风味进行评价。

收稿日期: 2009-10-20 \* 通讯联系人

作者简介: 刘志东(1976-), 男, 博士, 研究方向: 食品工程与生物技术。

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划(2006BAD04A14, 2006BAD04A06), “863”国家计划项目(2007AA10Z353)。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

黄油 光明乳业股份有限公司提供; 脂肪酶 G50、脂肪酶 A6、脂肪酶 R、脂肪酶 AY30G 和脂肪酶 M10 阿玛诺天野酶制剂商贸有限公司馈赠; 其它试剂 均为分析纯。

HZQ-F160 恒温振荡培养箱 中国江苏太仓实验设备厂; 恒温水浴锅 德国 GFL; 乳化机 马来西亚 IKAT25; Avanti J-30I 高速离心机 美国 Beckman Coulter; LABOPOTA 4000 旋转蒸发器 德国 Heidolph; 酸度计 美国 Orion。

### 1.2 实验方法

1.2.1 乳脂肪的酶解反应 在锥形瓶中, 加入去离子水与黄油的混合物, 乳化, 热处理(85℃, 5min); 降温至所用脂肪酶的最适温度, 加入脂肪酶, 混合均匀; 然后将锥形瓶置于恒温振荡培养箱中, 在适当条件下进行酶解反应。反应终止后灭酶(85℃, 30min), 静置分层, 取上层酶解物用于进一步分析。

1.2.1.1 单因素实验 在参考相关文献[7-9]及所用脂肪酶产品说明的基础上进行单因素实验, 测定脂肪酶黄油酶解物的酸价并进行感官评价。分别考察底物浓度、反应温度、E/S 比和反应时间对脂解率的影响, 反应结束后于 85℃ 水浴 30min 灭酶, 静置分层。

表1 单因素实验参数表

因素	水平				
温度(℃)	35	40	45	50	55
E/S(%)	0.5	1	2	3	4
底物浓度(%)	30	40	50	60	70
反应时间(h)	1	2	3	4	5

1.2.1.2 正交实验 在单因素实验基础上, 以酸价和感官评分为评价指标, 对底物浓度、反应温度、E/S 比和反应时间进行正交实验以确定黄油酶解的最佳条件。

表2 正交实验因素水平表

水平	因素			
	A 温度(℃)	B E/S (%)	C 底物浓度 (%)	D 反应时间 (h)
1	40	0.5	45	3.5
2	45	1	50	4
3	50	1.5	55	4.5

### 1.2.2 评价指标

1.2.2.1 酸值的测定 通过对乳脂肪酸价的测定来衡量乳脂肪水解的程度。酸值(Acid Value)是指中和 1g 乳脂肪中游离脂肪酸所需的氢氧化钾的量(mg)(GB/T5530-2005)。

$$AV(\text{mgKOH/g}) = \frac{56.1 \times C \times V}{m}$$

式中: C-所用 KOH 标准溶液的浓度(mol/L); V-所用 KOH 标准溶液的体积(mL); m-样品的质量(g); 56.1-氢氧化钾的摩尔质量(g/mol)。

1.2.2.2 感官评价 参照 GB/T 14454.2-2008 进行。按表 3 分别对黄油酶解物的香气纯度及强度进行评分, 评分结果为二者的和。

表3 香气评分标准

香气纯度	分数	香气强度	分数
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	38.0~31.9
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

## 2 结果与讨论

乳脂肪(稀奶油、奶油或无水奶油)是乳品风味的重要来源, 乳脂肪在乳制品风味形成过程中所起的作用是所有其他脂肪所无法替代的。由于乳脂肪是迄今为止已知的组成和结构最复杂的脂质, 乳脂的风味很难用化学合成的物质模拟。不同方法制得的香精风味与组分差别较大。其中酶解制备的奶油香精香气自然、柔和, 留香持久, 对加香产品内在质量有明显的改善和提高, 赋予加香产品天然奶香口味。因而, 越来越为人们所关注<sup>[10]</sup>。

脂肪酶能够将黄油水解为中、短链脂肪酸, 而十六碳以上的脂肪酸具有皂臭味, 应尽量减少其生成。这些脂肪酸经过进一步分解或重排, 生成丙酮、丙位和丁位内酯、甲基酮等风味物质, 使产品具有一种独特而强烈的奶香味<sup>[11-12]</sup>。此外, 由于脂肪酸参与到类似微生物反应的过程中, 增加了一些新风味物质的形成, 如 β-酮酸、甲基酮类、风味脂类和乳脂类等进一步提高了风味。

乳香成分通常包括醇类、醛类、酸类、酮类、酯类、内酯、硫化物等, 其香气来源一是鲜奶中的天然香气成分, 二是乳品加工中形成的香气成分, 主要包括双乙酰(2,3-丁二酮)、乙偶姻、丁位癸内酯和丁位十二内酯等<sup>[13]</sup>。

### 2.1 脂肪酶的筛选

研究发现, C<sub>4</sub>-C<sub>12</sub>的脂肪酸对乳的香气贡献较大, 而 C<sub>16</sub>以上的饱和脂肪酸则会带来皂臭味等不良气味, 从而影响产品的香气质量, 应尽量减少其生成。不同来源的脂肪酶由于酶活性中心结构的差异, 水解相同的甘油三酯所表现出的脂肪酸特异性也就不同, 表现为酶解物的酸价和感官评分也各不相同。因此, 筛选出合适的脂肪酶, 是获得纯正、浓郁奶味香基的前提。实验研究了 5 种不同来源的脂肪酶, 分析了其黄油酶解物的酸值并对其风味进行评定。

由表 4 中可以看出, 5 种脂肪酶酶解物中, 脂肪酶 A6 酶解物的感官评分最高, 其次为脂肪酶 C, 其余 3 种脂肪酶酶解物的感官评分相差不大。这表明脂肪酶 A6 对乳脂肪的酶解能力较强, 而且, 该酶解物各脂肪酸之间的比例协调, 风味纯正浓郁。因此, 选择脂肪酶 A6 作为实验用酶进行后续实验。

表4 脂肪酶对乳脂肪酶解反应的影响

脂肪酶	G50	A6	R	AY30G	M10
AV(mg/g)	8.64	10.26	9.43	11.39	10.63
感官评分	57	70	61	55	58

### 2.2 单因素实验

研究选用脂肪酶 A6 作为实验用酶, 进一步探讨

底物浓度、E/S、反应时间和温度对乳脂肪酶解工艺的影响。

2.2.1 底物浓度的影响 酶解反应受底物浓度的影响较大,底物浓度较低时,酶解速度随底物浓度的增加而增加;但当底物浓度增加到一定程度后,由于高浓度底物对酶解反应有抑制作用,酶解反应速度变缓直至不再增加。由表 5 可知,当底物浓度较低时,随着底物浓度的增加,酸值和感官评分也随之增加;但当底物浓度超过 50% 时,酸值和感官评分的增加变缓,可能是由于底物的抑制作用而导致酶解反应不能充分进行。因此,底物浓度为 50% 时较合适。

表 5 底物浓度对乳脂肪酶解反应的影响

底物浓度 (%)	30	40	50	60	70
AV (mg/g)	9.21	9.59	10.67	9.31	8.62
感官评分	59	65	75	61	47

2.2.2 E/S 的影响 脂肪酶酶解乳脂肪时,脂肪酶的用量对黄油酶解物的风味有较大影响。脂肪酶用量少时,水解不完全,风味物质生成量少,乳制品的风味尚未充分反应形成;脂肪酶用量多时,虽然可以生成大量的风味物质,但会引起其他不良现象的产生,如水解产物变酸,不良风味的形成,同时也会增加生产成本。因此,合适的脂肪酶用量是影响黄油酶解物的重要因素。从表 6 可以看出,随着反应体系中脂肪酶用量的增加,酸价也随之增加;当 E/S 达到 1% 时,奶油风味最为浓郁。但当 E/S 超过 1% 时,酸价继续上升;但感官评分则呈现降低的趋势,风味则由原来清淡的奶香味变成浓郁刺鼻的难闻气味。综合考虑以 E/S 为 1% 为宜。

表 6 E/S 对乳脂肪酶解反应的影响

E/S (%)	0.5	1	2	3	4
AV (mg/g)	8.37	10.36	11.48	12.84	14.35
感官评分	59	77	68	61	51

2.2.3 时间的影响 酶解时间的长短直接影响到乳脂肪水解的程度,进而也会影响酶解产物的风味。理论上,酶解时间越长,乳脂肪的酶解就越彻底。但实际上,由于脂肪酶解的过程比较复杂,过长的反应时间,可能会造成不良风味物质的产生增多,影响酶解物的整体风味。所以,不一定是酶解时间越长越好;而且时间延长,也会增加生产成本。但如果酶解时间过短,酶解反应不充分,风味物质生成量少,乳制品的风味就不会充分形成。所以要达到理想的风味,应严格控制好反应时间。在反应初期,酶解反应的速度较快,酸价和脂解率增加较快;但随着反应时间的延长,底物量不断减少,酶活力下降,反应速度逐渐降低,酸价和脂解率的增加趋于平缓。从表 7 可以看出,酶解反应进行到 4h 后,感官评分趋于下降;随着酶解时间的延长,酶解物的酸价过大,风味则由原来的奶香味变成难以接受的气味。因此,综合考虑选择酶解时间 4h 较适宜。

2.2.4 温度的影响 温度对酶解反应的影响是多方面的,包括对酶解反应的速度和酶的稳定性等的影响。酶解反应在酶的最适温度时,反应速度快,酶解反应的最适温度受酶的最适温度、底物性质、反应时

间等因素的影响。反应温度低于酶的最适温度时,酶活力低,同时也会影响底物的粘度进而影响传质速度,酶解反应的速度慢;反应温度高于酶的最适温度时,则由于酶的变性而减弱甚至丧失其催化活性,酶解反应速度降低或停止。从表 8 中可以看出,在 45~50℃ 范围内,温度的升高能够加快反应的进行,酸价随之增加;酶解物的风味也随之增强;45℃ 时,酶解物的香气浓郁;随着温度的继续上升,酸价继续上升;但脂肪酶开始变性失活;在 55℃ 时,酶解物的风味则由奶香味变成难以接受的刺鼻味。因此,该酶酶解乳脂肪的最适温度范围为 40~45℃。此外,实验结果也表明,酶解物的酸价与感官评价的变化趋势并不完全一致,水解温度在 55℃ 以上会导致酶解物的酸价过高,产物中产生刺鼻的难闻气味,影响感官评价结果。

表 7 时间对乳脂肪酶解反应的影响

时间 (h)	1	2	3	4	5
AV (mg/g)	6.64	7.45	9.38	10.86	11.75
感官评分	61	67	71	77	58

表 8 温度对乳脂肪酶解反应的影响

温度 (°C)	35	40	45	50	55
AV (mg/g)	8.35	9.58	10.69	11.48	12.95
感官评分	61	68	76	55	51

## 2.3 正交实验

表 9 正交实验结果

实验号	A	B	C	D	感官评分
1	1	1	1	1	64
2	1	2	2	2	76
3	1	3	3	3	61
4	2	1	2	3	72
5	2	2	3	1	78
6	2	3	1	2	74
7	3	1	3	2	65
8	3	2	1	3	72
9	3	3	2	1	76
k <sub>1</sub>	67.000	67.000	70.000	72.667	
k <sub>2</sub>	74.667	75.333	74.667	71.667	
k <sub>3</sub>	71.000	70.333	68.000	68.333	
R	7.667	8.333	6.667	4.334	

比较实验中 A、B、C、D 4 个因素极差的大小,可得出 B 因素,即 E/S 为最重要的因素,其次为 A 因素,即温度。4 个因素的主次关系是: B > A > C > D。按照各因素的最好水平选取 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>D<sub>1</sub>,即温度为 45℃,E/S 为 1%,底物浓度为 50%,时间为 3.5h。在此优化工艺条件下,乳脂肪的酶解反应较充分,酶解物的增香效果较明显。

## 3 结论

5 种不同来源脂肪酶酶解乳脂肪获得的酶解物以脂肪酶 A6 感官评分较好。在单因素实验基础上,通过正交实验确定脂肪酶 A6 酶解乳脂肪制备乳味增香物的较佳条件为:温度为 45℃、E/S 为 1%、底物浓度为 50%、水解 3.5h。在此优化工艺条件下,乳脂肪的酶解反应较充分,脂肪酶 A6 的黄油酶解物风味

(下转第 215 页)

燕麦内酯豆腐所添加的物料配比为:燕麦粉:大豆分离蛋白粉:水 = 9g:10g:300g。

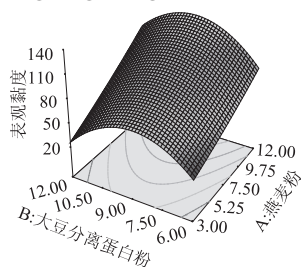


图2 燕麦粉添加量和大豆分离蛋白粉添加量对产品表观黏度影响

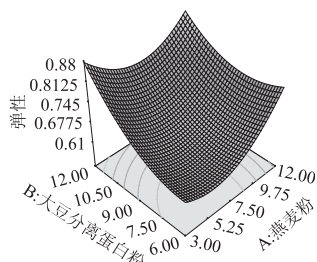


图3 燕麦粉添加量和大豆分离蛋白粉添加量对产品弹性影响

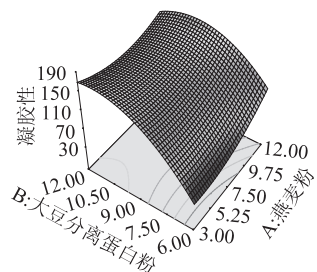


图4 燕麦粉添加量和大豆分离蛋白粉添加量对产品凝胶性影响

### 3 结论

3.1 燕麦内酯豆腐的硬度、弹性和凝胶性受大豆分离蛋白粉添加量的影响较显著,均随其含量的增加而增强。

3.2 按照燕麦粉:大豆分离蛋白粉:水 = 9:10:300 的

(上接第 210 页)

自然,协调,柔和,具有黄油的特征性风味。

#### 参考文献

[1]李玉发.奶香型香味料的种类及合成方法[J].安徽化工,2002(5):17-19.  
 [2]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,2003,298(12):39-42.  
 [3]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.  
 [4]陈影.乳脂肪水解及其产物的微胶囊化[D].天津:天津科技大学硕士学位论文,2004.  
 [5]R G Agnold, K M Shahani. Application of lipolytic enzyme to flavor development in dairy products [J]. J Dairy Sci, 1976(8): 589-601.  
 [6]Victor M. Lipase catalyzed modification of milk fat [J]. Biotechnology Advances, 1998, 16: 198-206.

比例添加燕麦粉和大豆分离蛋白粉,使用直接加热煮沸 5min 的方式进行煮浆,按 3g/kg 的比例向熟燕麦-豆浆中添加 D 葡萄糖酸-δ-内酯,采用 80℃ 加热 20min 的热凝固方式,进行燕麦内酯豆腐的加工,可以使制得的产品表观黏度较小,硬度、弹性、凝胶性和持水能力较强。

#### 参考文献

[1]张怀珠,彭涛,魏巧玲,等.花色内酯豆腐的研制[J].食品工业科技,2009,30(7):249-251.  
 [2]中国食品信息网 [http://www.chinafoods.cn/supply/Supply\\_Sub.aspx?cpID=511375](http://www.chinafoods.cn/supply/Supply_Sub.aspx?cpID=511375).  
 [3] Food and Drug Administration, Food labeling; health claims; soluble fiber from whole oats and risk of coronary heart disease [S]. Fed Regist, 1997, 62: 15343-15344.  
 [4] Food and Drug Administration, Food labeling; health claims; oats and coronary heart disease [S]. Fed Regist, 1997, 62: 3584-3601.  
 [5] Inglett GE, Carriere CJ, Maneepun S, et al. Nutritional value and functional properties of a hydrocolloidal soybean and oat blend for use in Asian foods [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2002, 83: 86-92.  
 [6]韩丽英.大豆蛋白凝胶特性对豆腐品质影响研究[D].东北农业大学,2008.  
 [7]路国权,赵文静.甘薯多酚最佳提取工艺及多酚含量的基因型差异研究[J].中国粮油学报,2009,24(3):49-52.  
 [8]Stat-Ease, Inc. Design Expert User's Guide [M]. USA: The State-Ease Inc, 2000.  
 [9]Chen MJ, Chen KN, Lin CW. Optimization on response surface models for the optimal manufacturing conditions of dairy tofu [J]. Journal of Food Engineering, 2002, 68: 471-480.  
 [10]胡小军,冯兴才,李清平,等.葡萄糖酸内酯豆腐的研究[J].食品与健康,1995(2):44-45.  
 [11]Gu X, Campbell LJ, Euston SR. Influence of sugars on the characteristics of glucono-δ-lactone-induced soy protein isolate gels [J]. Food Hydrocolloids, 2009, 23: 314-326.

[7] Mafalda A R, Betina M C. Flavour Development via Lipolysis of Milkfats: Changes in Free Fatty Acid Pool [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2007, 42(8): 961-968.  
 [8] Anderson M. Milk Lipase and Off-Flavour Development [J]. Journal of the Society of Dairy Technology, 1983, 36(1): 3-7.  
 [9]刘晓艳,成坚.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.  
 [10]Kerry E Kaylegian, Richard W Hartel, et al. Lindsay, Applications of Modified Milk Fat in Food Products, 1993, 76: 1782-1796.  
 [11]X Fu, X Zhu. Oil and Fat Hydrolysis with Lipase from Aspergillus sp. [J]. JAOCS, 1995, 72: 527-530.  
 [12]鲁玉侠,蔡妙颜,王兆梅,等.脂肪酶的固定化及其水解天然黄油研究[J].食品研究与开发,2007,28(2):60-63.  
 [13]胡文效,姜兴涛.乳类食品香成分及其成因 [J]. 山东食品发酵, 2001(4): 36-38.