

TG 酶和漆酶 对双歧杆菌益生菌酸奶品质的影响

李思宁,唐善虎*,毛濛兰,胡 洋

(西南民族大学生命科学与技术学院,四川成都 610041)

摘要:为了比较谷氨酰胺转氨酶(TG 酶)和漆酶的添加对双歧杆菌益生菌酸奶感官、蛋白质交联及组织质构变化的影响,测定和分析了两种酶交联益生菌酸奶的游离氨基变化率、感官、质构、表观黏度、蛋白条带及微观结构,并添加阿魏酸改善漆酶酸奶的品质。结果表明:当 TG 酶用量增加时,TG 酶交联酸奶的游离氨基变化率、感官得分和硬度显著增大($p < 0.05$),胶黏性、粘聚性及表观黏度先增大后减小($p < 0.05$),内聚性变化不显著($p > 0.05$),TG 酶最佳用量为 1.8 U/g;随着漆酶用量的增加,漆酶酸奶游离氨基变化率、感官得分、硬度、内聚性、胶黏性、粘聚性及表观黏度均先增大后减小($p < 0.05$),漆酶最佳用量为 0.3 U/g;添加 4.5 mmol/L 的阿魏酸明显改善了漆酶交联酸奶的感官、质构及表观黏度;所有待测酸奶中均缺少 β -lg 条带,TG 酶交联酸奶的 κ -CN 和 β -CN 条带消失,聚集成新的蛋白质,而漆酶交联酸奶和阿魏酸+漆酶酸奶与对照及 TG 酶酸奶相比,分子量在 14 kDa 的蛋白条带明显变宽;经两种酶交联的酸奶,三维网络结构变得致密,TG 酶交联酸奶的胶粒分布更均匀,网络结构更致密,且在漆酶交联酸奶中添加了阿魏酸后,相较于漆酶交联酸奶,蛋白胶束聚集的更紧密,从而得出,不同类型酶对牛奶乳蛋白质交联的催化作用不同,但均可改善酸奶的感官及食用品质。

关键词: TG 酶,漆酶,酶交联,益生菌酸奶,品质

Effect of TGase and laccase on the quality of probiotics yogurt

LI Si-ning, TANG Shan-hu*, MAO Meng-lan, HU Yang

(College of Life Science and Technology, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China)

Abstract: In order to contrast the effect of adding TGase or laccase on the sensory quality, protein cross-linking and texture change of bifidobacteria-yoghurt. The rate of change of free amino groups, sensory scores, texture characteristics, apparent viscosity, protein bands and microstructure of the enzymatic cross-linking probiotic yogurt were measured and analyzed, and adding ferulic acid to improve the quality of lactase yogurt. The results showed that the rate of change of free amino groups, the sensory scores and hardness value of yoghurt treated with TGase were significantly increased ($p < 0.05$). Gumminess, cohesiveness and apparent viscosity were increased and then decreased ($p < 0.05$), and no significant difference ($p > 0.05$) for adhesiveness was found with increasing addition of TGase. The optimal addition of TGase was 1.8 U/g. With elevating addition of laccase, increasing and then decreasing trends for the rate of change of free amino groups, sensory scores, hardness, adhesiveness, gumminess, cohesiveness and apparent viscosity were observed ($p < 0.05$). The optimal addition of laccase was 0.3 U/g. The sensory and qualitative properties for laccase cross-linked yogurt were significantly improved ($p < 0.05$) by adding 4.5 mmol/L ferulic acid. There was a shortage of β -lg in all yogurt. Protein bands of κ -CN and β -CN of yoghurt treated with TGase disappeared, and new proteins formed, while compared with the control and yogurt treated with TGase, protein bands of yogurt treated with laccase or with ferulic acid and laccase were significantly widened about 14 kDa of molecular weight. The three-dimensional network structure of yogurt by enzyme crosslinking became denser than control. Yogurt treated with TGase had more uniform distribution of particles and more compact network structure than laccase cross-linking yogurt. And the addition of ferulic acid was able to make protein micelles of laccase cross-linking yogurt more tightly packed together. Therefore, different types of enzymes had different catalysis on milk protein cross-linking, but all improved the sensory and edible quality of yogurt.

Key words: TGase; laccase; enzyme cross-linking; probiotics yogurt; quality

中图分类号: TS252.54

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2018)08-0119-08

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2018.08.022

收稿日期: 2017-09-08

作者简介: 李思宁(1988-),女,硕士,实验师,研究方向:食品加工与贮藏技术,E-mail:616906108@qq.com。

* 通讯作者: 唐善虎(1964-),男,博士,教授,研究方向:动物性食品加工及检测,E-mail:stang01@126.com。

基金项目:“十二五”科技支撑计划项目(2015BAD29B02);四川省成果转化示范项目(2017CC0024)。

引文格式:李思宁,唐善虎,毛濛兰,等.TG 酶和漆酶对双歧杆菌益生菌酸奶品质的影响[J].食品工业科技,2018,39(8):119-125,135.

酸奶是以鲜牛奶为主要原料,经乳酸菌发酵而形成的一种风味独特、营养丰富的功能性乳制品^[1]。在实际的生产、运输、储藏过程中,凝固型酸奶普遍存在因凝胶脆弱导致组织状态破坏及乳清析出等问题,严重影响了酸奶的品质^[2],这些缺陷可以通过添加稳定增稠剂或者蛋白质交联改性来解决。

目前,牛奶蛋白的交联改性研究主要集中于谷氨酰胺转氨酶(TG 酶)的应用。TG 酶是一种催化蛋白质中赖氨酸上的 ϵ -氨基和谷氨酸上 γ -羟酰胺基之间的结合反应,通过转谷氨酰胺作用形成共价化合物的聚合酶^[3]。Schorsch 等^[4-5]研究表明,在发酵阶段,牛奶中的酪蛋白胶束会受 TG 酶的影响而减少分散。苏海龙^[6]研究了 TG 酶在凝固型酸奶中的应用,发现加入 TG 酶可以使凝固型酸奶的乳清析出率降低,持水力提高,表观黏度增加,感官品质提高。吕佳平等^[7]进行了 TG 酶提高酸奶品质的工艺研究,并优化了酶的应用工艺及技术参数,结果表明酶的处理方式为反应后不灭酶,酶的适宜添加量为 0.15 g/L。综上所述,TG 酶可改善酸奶品质。

漆酶(Laccase)是一种多酚氧化酶,含 4 个 Cu^{2+} ,聚合蛋白质或肽类物质,也可在酚酸存在的条件下使乳清蛋白发生交联聚合^[8]。Mokoonlall^[9]研究了漆酶对酸奶和奶酪蛋白质的氧化作用,发现漆酶可加快酸奶凝乳,使酸奶的孔隙增多,而黏度和保质期不受影响。Wang^[10]认为漆酶剂量是影响其在牛奶中氧化作用的重要因素,低剂量条件下漆酶可使蛋白发生有效交联,转化为更高分子量的蛋白质聚合物,蛋白质流变学特性增强,但高剂量漆酶会使蛋白质发生降解,破坏牛奶品质。关于漆酶交联对乳蛋白游离氨基酸变化率、酸奶感官、质构、乳蛋白质变化及微观结构品质变化的影响尚未见报道。

阿魏酸(Ferulic Acid, FA)是植物界普遍存在的一种酚酸,主要使用麦麸、玉米麸皮等作为原材料来提取^[11-12]。阿魏酸在食品中的应用非常广泛,日本已批准其作为抗氧化剂用于食品防腐保鲜。阿魏酸也可作为食品交联剂,结合蛋白质^[13-14]。在制备可食性蛋白膜时,阿魏酸能增加膜的机械强度,并降低膜对水蒸气和氧气的透性^[15]。阿魏酸也可通过减少蛋白质中游离氨基含量,避免蛋白质中游离氨基引起交联而增加乳品在加热过程中的热稳定性^[16]。然而,阿魏酸与漆酶结合用于酸奶蛋白质交联对酸奶的品质影响也未见报道。

本文通过在双歧杆菌益生菌酸奶制备过程中添加 TG 酶和漆酶,对比两种酶在酸奶中蛋白质交联的作用及对益生菌酸奶质构及组织结构变化的影响,并通过添加阿魏酸改善漆酶酸奶的品质,旨在为解决凝固型酸奶的品质缺陷提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

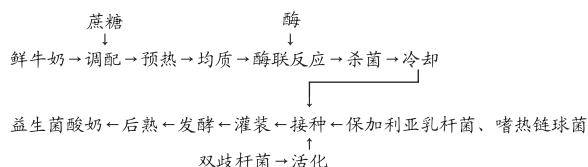
鲜牛奶(蛋白质含量 2.84 g/100 g) 四川新华

西乳业有限公司;蔗糖 太古糖业;混合发酵剂(保加利亚乳杆菌、嗜热链球菌) 北京川秀科技有限公司;双歧杆菌 中国工业微生物菌种保藏管理中心;谷氨酰胺转氨酶(活力 ≥ 100 U/g) 湖北远成药业有限公司;漆酶(活力 ≥ 100 U/g) 德国 Ruibio 公司;阿魏酸、戊二醛(电泳专用) 上海 Aladdin 公司;电泳用蛋白 Marker 天根生化科技有限公司;缓冲液(5×) 上海碧云天生物技术有限公司;L-亮氨酸、邻苯二甲醛(OPA)、甲醇、三氯乙酸(TCA)、四硼酸钠、 β -巯基乙醇、冰乙酸、无水乙醇、溴酚蓝、叔丁醇 均为分析纯,成都市科龙化工试剂厂;考马斯亮蓝 R-250、丙烯酰胺(Acr)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、十二烷基硫酸钠(SDS)、N,N,N',N'-四甲基乙二胺(TEMED)、甘氨酸、过硫酸铵(APS) 均为电泳级,美国 Sigma 公司。

TA.XT.plus 质构仪 英国 Stable Micro Systems 公司;NS1001L 型高压均质机 意大利 Niro Soavi 公司;BROOKFIELD DV-III Ultra 流变仪 美国 Brookfield 公司;JSM-7500F 场发射扫描电子显微镜(SEM) 日本电子株式会社;DHP-9052 电热恒温培养箱 上海齐欣科学仪器有限公司;HH-6 数显恒温水浴锅 国华电器有限公司;UV-2102 PCS 型紫外分光光度计 龙尼克仪器有限公司;Mini 电泳槽 美国 Bio-Rad 公司;DYY-12 型电泳仪 北京市六一仪器厂;Versa Doc 1000 凝胶成像系统 美国 Bio-Rad 公司;ALPHA 1-4 LSC 型冻干机 德国 Christ 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 益生菌酸奶制备流程及操作要点 益生菌酸奶制备工艺流程:



双歧杆菌活化:取 100 mL 鲜牛奶,加入 1% 的双歧杆菌,37℃ 恒温培养至凝乳。取 10 g 凝乳,另加 100 mL 鲜牛奶,搅拌均匀,37℃ 恒温培养,凝固后放入 4℃ 冰箱保存,备用。

在新鲜牛奶中加入 6% 蔗糖,搅拌均匀。将调配好的奶预热到 60℃,采用 20 MPa 压力均质 2 次。按照实验设计加入不同的酶,交联温度 50℃,交联时间 1 h,加热至 90℃ 保持 15 min 进行灭酶和杀菌,并快速冷却至 45℃ 左右;接种 1% 保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌混合发酵剂及 5% 活化后的双歧杆菌,在 42℃ 培养箱中发酵培养至发酵终点(30°倾角倾斜发酵而料液无流动)后,取出放在 4℃ 后熟 36 h。

1.2.2 实验设计

1.2.2.1 TG 酶对益生菌酸奶品质的影响 TG 酶使用量选择 0、0.6、1.2、1.8、2.4、3.0 U/g。通过游离氨基酸变化率、感官、质构、表观黏度对后熟后的酸奶进行

分析,确定TG酶的最佳添加量。

1.2.2.2 漆酶对益生菌酸奶品质的影响 漆酶使用量选择0、0.15、0.3、0.6、0.9、1.2 U/g。通过游离氨基变化率、感官、质构、表观黏度对后熟后的酸奶进行分析,确定漆酶的最佳添加量。

1.2.2.3 阿魏酸对漆酶交联益生菌酸奶品质的影响 在牛奶中加入1.8 U/g漆酶的同时,分别加入0、1.5、3、4.5、6、7.5 mmol/L的阿魏酸。通过游离氨基变化率、感官、质构、表观黏度对后熟后的酸奶进行分析,确定阿魏酸的最佳添加量。

根据以上3个实验确定的TG酶、漆酶、阿魏酸+漆酶的最佳使用量,制备不同酶交联益生菌酸奶,然后对TG酶交联酸奶、漆酶交联酸奶及阿魏酸+漆酶交联酸奶和对照组(不添加酶及阿魏酸)酸奶进行电泳分析和电镜扫描,评价酸奶的蛋白交联情况及组织质构。

1.2.3 测定指标

1.2.3.1 游离氨基变化率 参考Church^[17]的方法测定游离氨基变化率。主要包括亮氨酸标准曲线的建立和蛋白质中游离氨基含量的测定两个步骤,具体为:a.将亮氨酸配制成浓度为0、180、270、360、450、540、630、720 μg/mL的标准溶液,准确移取300 μL标准溶液与6 mL的邻苯二甲醛试剂混合后摇匀,2 min后在340 nm下测定吸光度。以亮氨酸浓度为横坐标,反应后的吸光度值为纵坐标绘制标准曲线;b.采用邻苯二甲醛法测定蛋白质中游离氨基含量,并计算游离氨基变化率。将40 mg的邻苯二甲醛溶于1 mL甲醇中,分别加入100 mmol/L的四硼酸钠25 mL、10%十二烷基磺酸钠2.5 mL、β-巯基乙醇100 μL,加水定容至50 mL,配制邻苯二甲醛试剂。取10 mL待测的酸奶样品在4000 r/min离心20 min。取后熟后的酸奶样品2.5 mL,分别加入5 mL质量分数为12%的三氯乙酸、0.5 mL蒸馏水,在2000 r/min离心15 min。取清液300 μL,加入6 mL邻苯二甲醛试剂,室温下反应2 min,340 nm下测定其吸光度值。根据亮氨酸标准曲线计算出酸奶中游离氨基的浓度;游离氨基变化率使用下面公式计算。

游离氨基变化率(%) = $\frac{M_1 - M_2}{M_1} \times 100$

式中,M₁:交联前蛋白质中游离氨基的含量,μg/mL;M₂:交联后蛋白质中游离氨基含量,μg/mL。

1.2.3.2 感官评价 酸奶后熟完成后,随机编号,邀请经过培训的10位食品专业人员,男女各一半,从产品的色泽、组织状态、滋味以及气味这四个方面进

行感官评定,逐项记分。评分标准^[18]见表1。

表1 酸奶感官评定标准

Table 1 Score card for fermented milk sample		
项目	特征	评分(分)
色泽	乳白色,分布均匀,无杂色	15~11
	颜色分布不均,整体偏黄色	10~6
	颜色不协调,有明显色差	5~0
	无乳清析出,粘稠度适宜	30~21
组织状态	少量乳清析出,有小颗粒,粘稠度较适宜	20~11
	乳清析出较多,有颗粒,偏稠/稀	10~0
滋味	酸甜适宜,口感细腻	40~31
	偏酸/甜,口感细腻	30~21
	偏酸/甜,口感略粗糙	20~11
	过酸/甜,口感粗糙	10~0
气味	奶香味浓	15~11
	有奶香味	10~6
	奶香味淡	5~0

1.2.3.3 质构 质构测定参考李春红^[19]的方法:A/BE活塞探头,探头压盘直径:35 mm。其测定参数为:探头运行测前速率:1.0 mm/s;测试速率:1.0 mm/s;测后速率:10.0 mm/s;穿透测试距离:30 mm;触发器类型(感应力):Auto-10.0 g。

1.2.3.4 表观黏度 用RVDV-III Ultra型旋转黏度计测定酸奶的黏度值,转子为RV5,设定转速2.5 r/min,扭矩10%~100%,测定时间30 s。

1.2.3.5 SDS-PAGE 参考Laemmli^[20]的方法并略作修改。将待测酸奶稀释至蛋白质浓度为5 mg/mL,取50 μL溶液于1.0 mL离心管中与样品上样缓冲液按1:1混合均匀,沸水浴中煮5~10 min,12000 r/min离心10 min,除去不溶性颗粒,上清液用于电泳分析。用微型进样器上样,每孔进样量为10 μL;样品在80 V电压进行浓缩,待溴酚蓝前沿进入分离胶后加压至120 V,待溴酚蓝距离下缘0.5~1.0 cm时结束电泳。然后对电泳胶进行染色和脱色,用考马斯亮蓝R-250染色液对胶染色0.5~1 h,更换成脱色液,3 h后更换一次脱色液,脱色24 h,直至条带清晰、背景色完全褪去为止;最后用蒸馏水清洗和用7%冰乙酸保存。SDS-PAGE分离胶和浓缩胶成分见表2。

1.2.3.6 微观结构 参考马力^[21]的方法测定。用药匙挑取酸奶中心的凝块若干,放在2.5%的戊二醛溶液中,于4℃固定10 h。用0.9%的生理盐水清洗样

表2 SDS-PAGE分离胶和浓缩胶成分

Table 2 Composition of separating and stacking gel of SDS-PAGE

浓缩胶(5 mL)	用量(mL)	分离胶(12%, 10 mL)	用量(mL)
蒸馏水	2.77	蒸馏水	3.2
30%丙烯酰胺溶液	0.83	30%丙烯酰胺溶液	4
0.5 M Tris-HCl(pH6.8)	1.26	1.5 M Tris-HCl(pH8.8)	2.6
10%十二烷基磺酸钠溶液	0.05	10% SDS溶液	0.1
10%过硫酸铵溶液	0.05	10%过硫酸铵溶液	0.1
N,N,N',N'-四甲基乙二胺	0.005	TEMED	0.004

品3次,每次10 min,然后用液氮迅速处理样品后,用锤子轻轻锤击,使之自然断裂。采用30%、50%、70%、90%和100%乙醇分别对样品脱水10 min,再用叔丁醇置换乙醇10 min;将置换后的样品在-80℃预冷,24 h后迅速转移到冻干机中进行冷冻干燥10 h(温度-55℃,压力<0.1 MPa)。采用离子溅射仪镀铂金膜,观察微观结构并记录。

1.3 数据处理

所有实验均设置3次重复,结果采用 $\bar{x} \pm SD$ 表示。用SPSS 21.0进行统计分析,用单因素方差分析(Duncan),检测各处理平均数间的差异显著性, $p < 0.05$ 为差异显著水平。

2 结果与分析

2.1 游离氨基变化率

以游离氨浓度为横坐标,以340 nm处的吸光值为纵坐标做标准曲线,吸光值Y与游离氨浓度X的线性方程: $Y = 0.0018X + 0.0171$, $R^2 = 0.9972$,线性关系良好,可以用于样品中游离氨基(亮氨酸)的测定。通过游离氨基变化率公式计算,得到TG酶、漆酶交联酸奶游离氨基变化率见表3,阿魏酸+漆酶交联酸奶游离氨基变化率见图1。

由表3可知,经TG酶交联后,酸奶的游离氨基变化率呈显著上升的趋势($p < 0.05$),当TG酶用量为1.8 U/g时,酸奶的游离氨基变化率达到67.42%,之后再增加TG酶用量,游离氨基变化率无显著变化($p > 0.05$);经漆酶交联后,酸奶的游离氨基变化率呈先上升后下降的趋势,当漆酶用量为0.3 U/g时,酸奶中的游离氨基最高,且显著高于其他用量所得游离氨基变化率($p < 0.05$)。

表3 不同酶交联酸奶游离氨基变化率

Table 3 The rate of change of free amino groups of different enzymes crosslinked yogurt

TG酶添加量 (U/g)	游离氨基 变化率(%)	漆酶添加量 (U/g)	游离氨基 变化率(%)
0	0.00 ± 0.00 ^d	0	0.00 ± 0.00 ^d
0.6	29.34 ± 4.31 ^c	0.15	32.38 ± 1.56 ^b
1.2	54.91 ± 2.40 ^b	0.3	51.18 ± 4.62 ^a
1.8	67.42 ± 2.84 ^a	0.6	36.43 ± 5.92 ^b
2.4	70.78 ± 1.64 ^a	0.9	35.72 ± 0.29 ^b
3.0	70.95 ± 6.11 ^a	1.2	18.17 ± 4.20 ^c

注:同列上标不同小写字母表示差异显著($p < 0.05$),相同小写字母表示差异不显著($p > 0.05$);表4~表8同。

由图1可知,在确定漆酶最佳使用量后,随着阿魏酸添加量的增加,酸奶的游离氨基变化率先增大后减小,当阿魏酸添加量为4.5 mmol/L,显著提高了漆酶交联酸奶的交联程度($p < 0.05$)。

酶与蛋白质相互作用,增强了蛋白质网络的稳定性。无论是哪种交联方式,交联程度越高,形成的酶-蛋白质复合物结构越强,改善了酸奶的性能^[22]。TG酶交联是共价交联,形成的凝胶主要是三维的类固体网络结构,当增加TG酶的量,酶与底物作用交联程度增加,继续增加酶的用量,酶与底物作用达到

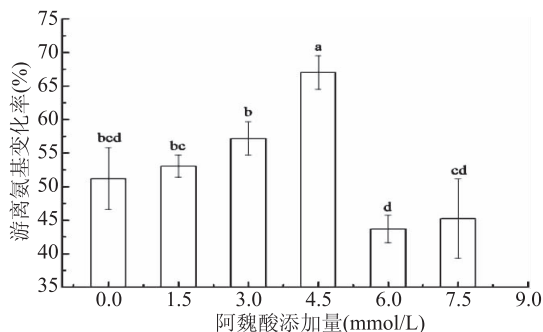


图1 阿魏酸+漆酶交联酸奶游离氨基变化率

Fig.1 The rate of change of free amino groups of yogurt treated with ferulic acid and laccase

注:不同小写字母表示差异显著($p < 0.05$),

相同小写字母表示差异不显著($p > 0.05$);图3~图4同。

饱和,交联反应难以进行^[23]。目前,关于TG酶与牛奶蛋白质的作用机理的研究已有很多报道。漆酶交联是直接氧化交联蛋白质酪氨酸残基上的苯环,形成二硫-铜的结合物。国外学者^[24-25]对漆酶催化乳蛋白进行了研究,发现漆酶能促使乳蛋白发生分子间的交联反应。Wang^[10]报道高剂量的漆酶会使蛋白质发生降解,这可能是导致漆酶交联酸奶随漆酶使用量增加而交联程度显著下降的原因。漆酶与牛奶蛋白质的作用机理较复杂,具体是如何影响牛奶蛋白质的交联情况有待进一步研究。

2.2 感官评价

TG酶、漆酶交联酸奶感官评价见表4,阿魏酸+漆酶交联酸奶感官评价见图2。

过量的TG酶会使酸奶产生苦味,过量的漆酶则造成酸奶凝乳偏软,且酶使用量过多,成本高。由表4可知,经TG酶交联后,随TG酶用量的增加,酸奶的感官得分先增大后减小,添加量为1.2、1.8、2.4和3.0 U/g酸奶的感官评分差异不显著($p > 0.05$);经漆酶交联后,随漆酶用量的增加,酸奶的感官得分先增大后减小,且添加量为0.3 U/g时的感官评分显著高于其他水平($p < 0.05$)。

表4 不同酶交联酸奶感官评价

Table 4 The sensory value of different enzymes crosslinked yogurt

TG酶添加量 (U/g)	感官评分	漆酶添加量 (U/g)	感官评分
0	69.56 ± 2.22 ^c	0	69.56 ± 2.22 ^c
0.6	73.28 ± 4.24 ^{bc}	0.15	73.67 ± 1.00 ^b
1.2	75.06 ± 4.51 ^{abc}	0.3	80.33 ± 1.73 ^a
1.8	75.42 ± 0.25 ^{abc}	0.6	76.89 ± 1.64 ^b
2.4	81.28 ± 5.20 ^a	0.9	76.78 ± 2.52 ^b
3.0	78.61 ± 4.00 ^{ab}	1.2	74.22 ± 1.54 ^b

由图2可知,添加阿魏酸后,能够显著改善酸奶的感官($p < 0.05$),但是过量添加阿魏酸会显著降低漆酶交联酸奶的感官($p < 0.05$),主要表现在阿魏酸添加量为6 mmol/L和7.5 mmol/L时,酸奶的质地变软、凝乳性能变差。当阿魏酸添加量为4.5 mmol/L

时,酸奶的感官品质最好。

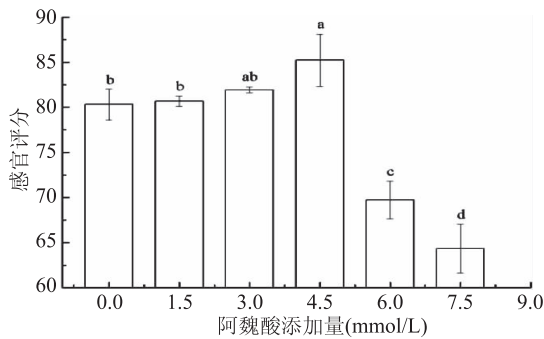


图2 阿魏酸+漆酶交联酸奶感官评价
Fig.2 The sensory value of yoghurt treated with ferulic acid and laccase

2.3 质构特性

TG 酶和漆酶交联酸奶的质构特性见表 5 和表 6,阿魏酸+漆酶交联酸奶质构变化见表 7。

由表 5 可知,随 TG 酶添加量的增加,内聚性增加不显著 ($p > 0.05$);TG 酶添加量 ≤ 1.8 U/g, TG 酶交联酸奶的硬度、胶黏性及粘聚性显著上升 ($p < 0.05$);TG 酶添加量 > 1.8 U/g,酸奶的硬度、胶黏性及粘聚性不同程度降低。

由表 6 可知,随漆酶使用量的增加,漆酶交联酸奶的硬度、胶黏性、粘聚性和内聚性均先增大后减

小,且漆酶使用量为 0.3 U/g 时,硬度、胶黏性和内聚性显著高于其他水平;粘聚性略高于其他水平。综上所述,TG 酶和漆酶均能提高酸奶的硬度、胶黏性和粘聚性。

由表 7 看出,添加阿魏酸后,随阿魏酸添加量的增加,漆酶交联酸奶的硬度、胶黏性、内聚性及粘聚性均先上升后下降,综合各指标结果,选择阿魏酸添加量为 4.5 mmol/L。

2.4 酶交联酸奶表观黏度

TG 酶、漆酶交联酸奶表观黏度见表 8,阿魏酸+漆酶交联酸奶表观黏度见图 3。

由表 8 可知,经 TG 酶和漆酶交联后,酸奶的表观黏度均先增大后减小。在酶的催化下,酸奶的表观黏度增大是由于酶使蛋白质交联成很大的聚合物,使蛋白质的分子量增加,从而增加酸奶的黏度^[22];但过度交联又使蛋白质的空间结构过于紧密,抑制其均匀发展,从而降低了黏度^[26]。

由图 3 看出,在确定漆酶最佳使用量后,随着阿魏酸添加量的增加,酸奶的表观黏度呈先上升后下降的趋势,当阿魏酸添加量为 4.5 mmol/L,酸奶表观黏度最大。阿魏酸的存在使得乳蛋白质交联程度增加,大分子蛋白质增多,黏度增大^[27]。

综合上述游离氨基变化率、感官、质构及表观黏度等指标,选择酶交联酸奶的 TG 酶和漆酶最佳用量

表 5 TG 酶交联酸奶质构

Table 5 Hardness, gumminess, adhesiveness and cohesiveness of TGase cross-linking yogurt

TG 酶使用量 (U/g)	硬度 (g)	胶黏性 (g)	内聚性 (g·s)	粘聚性 (mJ)
0	338.854 ± 34.495 ^d	7197.601 ± 81.886 ^c	134.905 ± 2.846 ^a	287.247 ± 4.764 ^c
0.6	393.099 ± 2.827 ^c	8110.414 ± 668.665 ^c	137.365 ± 20.223 ^a	297.880 ± 4.356 ^c
1.2	458.085 ± 34.564 ^b	10415.534 ± 769.937 ^b	143.522 ± 9.626 ^a	311.573 ± 10.439 ^{bc}
1.8	517.097 ± 47.779 ^a	12921.155 ± 728.210 ^a	152.388 ± 10.102 ^a	348.813 ± 33.109 ^a
2.4	492.344 ± 21.652 ^{ab}	11148.934 ± 617.699 ^b	156.548 ± 6.273 ^a	338.177 ± 23.189 ^{ab}
3.0	502.272 ± 5.609 ^{ab}	11344.866 ± 1145.465 ^b	157.556 ± 21.271 ^a	287.077 ± 2.078 ^c

表 6 漆酶交联酸奶质构

Table 6 Hardness, gumminess, adhesiveness and cohesiveness of laccase cross-linking yogurt

漆酶使用量 (U/g)	硬度 (g)	胶黏性 (g)	内聚性 (g·s)	粘聚性 (mJ)
0	338.854 ± 34.495 ^{bc}	7197.601 ± 81.886 ^b	134.905 ± 2.846 ^c	287.247 ± 4.764 ^a
0.15	374.112 ± 20.522 ^b	7215.739 ± 274.211 ^b	139.111 ± 1.100 ^{bc}	289.525 ± 0.517 ^a
0.3	440.565 ± 50.651 ^a	8260.173 ± 912.468 ^a	154.265 ± 5.386 ^a	305.689 ± 8.879 ^a
0.6	294.519 ± 11.917 ^{cd}	6820.953 ± 249.473 ^{bc}	145.613 ± 7.353 ^b	287.666 ± 25.161 ^a
0.9	267.251 ± 15.517 ^d	6177.592 ± 305.424 ^c	133.535 ± 6.810 ^c	281.852 ± 18.250 ^a
1.2	215.481 ± 10.629 ^e	4916.460 ± 350.651 ^d	107.362 ± 1.308 ^d	218.720 ± 13.298 ^b

表 7 阿魏酸+漆酶交联酸奶质构

Table 7 Hardness, gumminess, adhesiveness and cohesiveness of ferulic acid and laccase cross-linking yogurt

阿魏酸添加量 (mmol/L)	硬度 (g)	胶黏性 (g)	内聚性 (g·s)	粘聚性 (mJ)
0	440.565 ± 50.651 ^a	8260.173 ± 912.468 ^c	154.265 ± 5.386 ^a	305.689 ± 8.879 ^{bc}
1.5	446.769 ± 13.259 ^a	8545.536 ± 461.334 ^{bc}	153.443 ± 1.378 ^{ab}	325.466 ± 4.167 ^{ab}
3.0	496.152 ± 7.052 ^a	9566/740 ± 590.372 ^b	155.104 ± 1.720 ^a	336.878 ± 8.161 ^{ab}
4.5	485.518 ± 8.171 ^a	11232.959 ± 767.000 ^a	156.521 ± 0.189 ^a	366.273 ± 55.093 ^a
6.0	350.155 ± 52.864 ^b	7716.170 ± 174.050 ^{cd}	148.748 ± 1.100 ^{bc}	253.453 ± 12.957 ^c
7.5	322.114 ± 48.531 ^b	7170.823 ± 200.028 ^d	147.044 ± 3.142 ^c	253.970 ± 39.013 ^c

表8 不同酶交联酸奶表观黏度

Table 8 The apparent viscosity of different enzymes crosslinked yogurt

TG 酶添加量 (U/g)	表观黏度 (cP)	漆酶添加量 (U/g)	表观黏度 (cP)
0	65520 ± 1211 ^c	0	65520 ± 1211 ^{bc}
0.6	68467 ± 1276 ^c	0.15	68653 ± 1535 ^{ab}
1.2	71657 ± 585 ^b	0.3	72600 ± 7550 ^a
1.8	77587 ± 1560 ^a	0.6	64300 ± 1420 ^{bc}
2.4	77260 ± 2442 ^a	0.9	61427 ± 5786 ^c
3.0	72253 ± 1858 ^b	1.2	46840 ± 3355 ^d

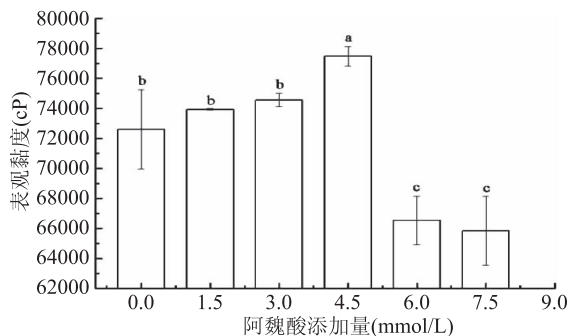


图3 阿魏酸 + 漆酶交联酸奶表观黏度

Fig.3 The apparent viscosity of

yoghurt treated with ferulic acid and laccase

分别为 1.8 U/g 和 0.3 U/g,漆酶交联酸奶中,阿魏酸的最佳添加量为 4.5 mmol/L。

2.5 酶交联酸奶 SDS-PAGE

TG 酶、漆酶交联益生菌酸奶 SDS-PAGE 图谱见图 4。乳中的蛋白质主要由酪蛋白、乳清蛋白、乳脂肪球膜蛋白等组成,含量为 2.8%~3.7%。酪蛋白包括 α -酪蛋白(α -CN)、 β -酪蛋白(β -CN)、 κ -酪蛋白(κ -CN)和 γ -酪蛋白(γ -CN),其中 γ -CN 是乳中蛋白酶分解 β -CN 产生的,实际上乳中酪蛋白只有前 3 种类型;酪蛋白分子量在 20~40 kDa,主要集中在 31 kDa 范围。乳清蛋白包括 α -乳白蛋白(α -la)、 β -乳球蛋白(β -lg)、血清白蛋白及乳铁蛋白等,各组分理论分子量分别为 14、18、66 和 76 kDa^[28]。由图 4 可以看出,所有酸奶样品的 β -lg 条带都消失了,这一现象可能是由于双歧杆菌对蛋白质降解导致的,具体原因有待进一步研究。与对照(泳道 3)及漆酶酸奶(泳道 5 和 6)相比,经 TG 酶交联后,酸奶(泳道 4)不存在 κ -CN 和 β -CN 条带,而是集成了新的蛋白质,分子量在 55~68 kDa,与常忠义^[29]研究结论一致,同时也论证了酪蛋白是 TG 酶的良好底物^[30];与只添加阿魏酸(泳道 1)相比,经漆酶交联后,漆酶酸奶(泳道 5)及阿魏酸 + 漆酶酸奶(泳道 6)的蛋白质条带基本没有发生变化。但与对照(泳道 3)和 TG 酶酸奶(泳道 4)相比,漆酶酸奶(泳道 5)及阿魏酸 + 漆酶酸奶(泳道 6)分子量在 14 kDa 的蛋白条带明显变宽,表明在漆酶、阿魏酸作用下,牛乳中一些比 α -la 更小分子量的蛋白质聚集成了新的蛋白质,新蛋白质的分子量在 14 kDa 附近,这也进一步说明漆酶、阿魏酸作用的是小分子乳蛋白。

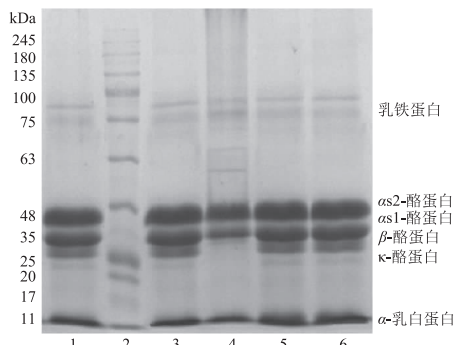


图4 不同酶交联益生菌酸奶 SDS-PAGE 图谱

Fig.4 SDS-PAGE pattern of

different enzymes crosslinked yogurt

注:1:阿魏酸;2:蛋白 marker;3:对照;4:TG 酶(1.8 U/g);

5:漆酶(0.3 U/g);6:阿魏酸 + 漆酶(4.5 mmol/L)。

2.6 酶交联酸奶微观结构

对不同酶交联益生菌酸奶的微观结构进行观察,样品对应的扫描电镜图片见图 5,所有样品的放大倍数均为 8000 倍。

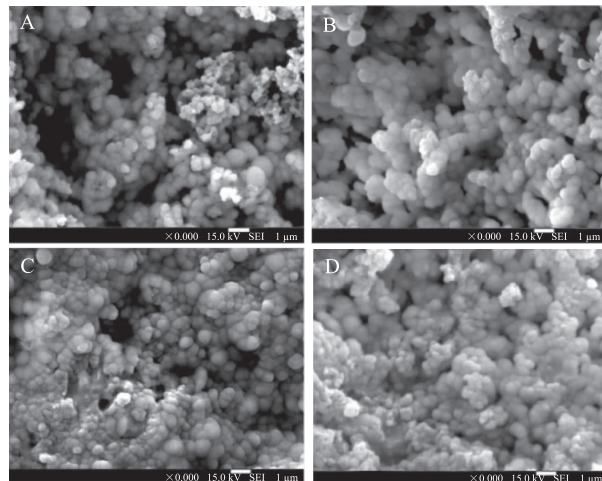


图5 不同酶交联益生菌酸奶扫描电镜图(8000 ×)

Fig.5 SEM photographs of different

enzymes crosslinked yogurt(8000 ×)

注:A:对照;B:TG 酶酸奶(1.8 U/g);

C:漆酶酸奶(0.3 U/g);D:阿魏酸 + 漆酶酸奶(4.5 mmol/L)。

由图 5 可知,所有酸奶的内部都形成了三维立体网络结构,所有的网络结构都是由球形酪蛋白胶束堆砌而成,而由球形酪蛋白胶束形成的三维网络结构比较脆弱,是造成酸奶硬度较低的一个原因^[31-32]。有文献报道,在酸性乳体系中,体系中粒子间的静电斥力越强烈,越有利于链状结构的形成,因为粒子间斥力越强烈,体系内部粒子分散得越均匀,粒子越容易有规律地排列在一起而形成链状结构;而链状分支越多,则越有利于胶粒间的交联作用,这对于形成稳定强有力的网络结构是很有利的^[33-34]。

在对照酸奶样品(A)中,胶粒间空隙较多且较大,空隙的大小分布在 0~7 μm,形成的网络结构较疏松;经 TG 酶、漆酶交联的酸奶,三维网络结构变得致密,胶粒间的空隙变小,结构也变得平滑。相对于漆酶交联酸奶(C),TG 酶交联酸奶(B)的胶粒更大、

分布更加均匀,网络结构更加致密。在漆酶交联酸奶中添加了阿魏酸后,酸奶(D)的蛋白胶束更加均匀,空隙的数量也减少。有研究表明,酸奶的微观结构在很大程度上反映了其持水力、质构以及流变学性质等^[35]。酸奶的扫描电镜图进一步论证了TG酶和漆酶对酸奶的交联程度、质构及表观黏度都有改善作用。

3 结论

通过对比TG酶、漆酶与牛奶蛋白交联对双歧杆菌益生菌酸奶游离氨基变化率、感官、质构特性及表观黏度的影响,得到: TG酶和漆酶均能够明显提高酸奶的游离氨基含量,改善酸奶的感官、质构等特性。当TG酶、漆酶用量分别为1.8和0.3 U/g时,这两种酶制备的益生菌酸奶的游离氨基含量、感官、质构及表观黏度最好。添加阿魏酸明显提高了漆酶交联酸奶的交联程度,阿魏酸的最适添加量为4.5 mmol/L。

在确定了TG酶、漆酶、阿魏酸的最适用量后,通过对酸奶进行电泳分析和电镜扫描,得到: 所有双歧杆菌酸奶样品均缺少 β -lg条带;与对照及漆酶酸奶相比, TG酶交联酸奶 κ -CN和 β -CN条带消失,聚集成了新的蛋白质;相较于对照及TG酶酸奶,漆酶交联酸奶及阿魏酸+漆酶酸奶分子量在14 kDa的蛋白条带明显变宽。经TG酶和漆酶交联的酸奶,三维网络结构变得致密,胶粒间的空隙变小,结构也变得平滑,但TG酶交联酸奶的胶粒分布更加均匀,网络结构更加致密;阿魏酸能够提高漆酶交联酸奶的蛋白胶束聚集程度。

参考文献

[1] 王微,赵新淮.发酵温度及超声波处理对凝固型酸奶质地等的影响[J].中国乳品工业,2008,36(12):21-25.
[2] 蔡蕊,宋春花,李汴生,等.蛋白质强化对搅拌型酸奶品质特性的影响[J].食品科学,2011,32(5):132-136.
[3] Gah D J, Koppelman S J. Transglutaminase catalyzed reactions: Impact on food applications [J]. Journal of Food Science, 2002, 67(8): 2798-2806.
[4] Schorsch C, Carrie H, Norton I T. Cross-linking casein micelles by a microbial transglutaminase: Influence of crosslinks in acid-induced gelation[J]. International Dairy Journal, 2000, 10(8): 529-539.
[5] Vasbinder A J, Rollema H S, Bot A, et al. Gelation mechanism of milk as influenced by temperature and pH; studied by the use of transglutaminase cross-linked casein micelles [J]. Journal of Dairy Science, 2003, 86(5): 1556-1563.
[6] 苏海龙.转谷氨酰胺酶在凝固型酸奶中的应用研究[D].保定:河北农业大学,2003:1-53.
[7] 吕佳平,刘心伟,夏志春,等.转谷氨酰胺酶提高酸奶品质的工艺研究[J].中国乳品工业,2008,36(2):4-7,12.
[8] 单丽君,郑晓东.漆酶在食品工业的应用进展[J].食品科学,2004,25(S1):188-192.
[9] Mokoonlall A, Pfannstiel J, Struch M, et al. Structure modification of stirred fermented milk gel due to laccase-catalysed protein crosslinking in a post-processing step [J].

Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2016, 33: 563-570.

[10] Wang Y. Determination of catechol by a novel laccase biosensor based on zinc-oxide sol-gel [J]. Analytical Letters, 2015, 48(12): 1842-1853.
[11] Sancho A I, Bartolomé B, Gómez-Cordovés C, et al. Release of ferulic acid from cereal residues by barley enzymatic extracts [J]. Journal of Cereal Science, 2001, 34(2): 173-179.
[12] Bartolomé B, Faulds C B, Williamson G, et al. Enzymic release of ferulic acid from barley spent grain [J]. Journal of Cereal Science, 1997, 25(3): 285-288.
[13] 欧仕益,康宇杰,李爱军,等.阿魏酸对可食性大豆蛋白膜理化特性的影响[J].中国粮油学报,2003,18(3):47-50.
[14] Jiang Z H, Zeng S K, Zhang C H, et al. Effect of Transglutaminase and 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid on the properties of film from tilapia skin gelatin [J]. Advanced Materials Research, 2013, 781-784: 623-627.
[15] 贾超,王利强,卢立新,等.阿魏酸对马铃薯淀粉基复合膜性能的影响[J].食品工业科技,2013(7):82-86.
[16] 高维,孔伟龙,刘刚.阿魏酸对蛋白基美拉德反应产物的影响[J].保鲜与加工,2016,16(2):44-47.
[17] Church F C, Swaisgood H E, Porter D H, et al. Spectrophotometric assay using o-phthalaldehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins 1 [J]. Journal of Dairy Science, 1983, 66(6): 1219-1227.
[18] 牟英杰,林海君,杨丽杰,等.谷氨酰胺转氨酶对搅拌型酸奶品质的影响[J].食品工业科技,2013,34(24):155-158, 172.
[19] 李春红,张明晶,潘家荣.物性测试仪在粘稠类食品品质评价上的应用研究[J].现代科学仪器,2006(6):111-113.
[20] Laemmli U K. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227(5259): 680-685.
[21] 马力,张国栋,谢林.酸凝乳超微结构的电镜观察[J].食品科学,2004,25(1):63-66.
[22] 马微,杨会琴,王海波,等.谷氨酰胺转氨酶作用的酸奶超微结构电镜观察[J].食品科学,2006,27(2):104-107.
[23] 付颖.微生物谷氨酰胺转移酶对酸奶品质的影响[D].上海:华东师范大学,2005:23.
[24] Selinheimo E, Lampila P, Mattinen M L, et al. Formation of protein-oligosaccharide conjugates by laccase and tyrosinase [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(9): 3118-3128.
[25] Steffensen C L, Andersen M L, Degn P E, et al. Cross-linking proteins by laccase-catalyzed oxidation: importance relative to other modifications [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(24): 12002-12010.
[26] 杨洋,刘奕伟,周方,等. TG酶与稳定剂复配改善搅拌型酸奶生产特性的研究[J].中国乳品工业,2013,41(4):26-31.
[27] 温研.牛乳的过氧化物酶处理对凝固型酸奶和干酪品质的影响[D].哈尔滨:东北农业大学,2011.
[28] 张歌.牛乳和羊乳蛋白质差异比较及检测方法的研究

(下转第135页)

抑菌浓度为 0.5 mg/mL。

3 结论

本文采用 BBD 实验模型对陈皮黄酮的提取工艺进行了优化,得到其最佳提取条件为:当提取剂乙醇体积浓度 60%、微波功率 619 W、微波时间为 3 min、温度 62 ℃、料液比 1:21 g/mL 时,陈皮黄酮得率最高 1.3468% ± 0.0142%,与预测值的偏差仅为 0.0107%,说明模型与实际契合度高。

抑菌活性实验表明:纯化后的陈皮黄酮对三种被测菌株均有不同程度的抑菌效果,其中,对大肠杆菌的抑菌效果最佳,对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌效果均优于对照茶多酚,可应用于食品防腐剂、水果保鲜等领域。

参考文献

- [1] Carlos Mesejo, Roberto Yuste, Carmina Reig, et al. Gibberellin reactivates and maintains ovary-wall cell division causing fruit set in parthenocarpic *Citrus* species [J]. *Plant Science*, 2016, 247: 13–24.
- [2] F Pratiwi, J K Tinata, A W Prakasa, et al. Citric acid compounds of tangerines peel extract (*Citrus reticulata*) as potential materials teeth whitening [J]. *Journal of Physics: Conference Series*, 2017, 824(1): 1–5.
- [3] Dong Ping, Qiu Peiju, Zhu Yi, et al. Simultaneous determination of four 5-hydroxy polymethoxy flavones by reversed-phase high performance liquid chromatography with electrochemical detection [J]. *Journal of Chromatography A*, 2010, 1217(5): 642–647.
- [4] Curtis Green O, Andrew Wheatley O, McGrowdet D A, et al. Citrus peel polymethoxylated flavones extract modulates liver and heart function parameters in diet induced hypercholesterolemic rats [J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 51(1): 306–309.
- [5] Mirhosseini H, Rashid N F A, Amid B T, et al. Effect of partial replacement of corn flour with durian seed flour and pumpkin flour on cooking yield, texture properties, and sensory attributes of gluten free pasta [J]. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technology*, 2015, 63(1): 184–190.
- [6] 田红梅. 高速逆流色谱在天然产物中的应用及柑橘功能因子保健新产品的开发 [D]. 杭州: 浙江工业大学, 2011.
- [7] 陈艾萌, 潘洁, 胡博, 等. 川牛膝多糖抗氧化活性测定和微波提取工艺优化 [J]. *食品工业科技*, 2017, 39(1): 80–84.

(上接第 125 页)

- [D]. 西安: 陕西科技大学, 2013: 37–38.
- [29] 常忠义. 谷氨酰胺转氨酶和丙酸杆菌代谢物对酸奶品质影响的研究 [D]. 上海: 华东师范大学, 2004: 48.
- [30] Bönisch M P, Tolkach A, Kulozik U. Inactivation of an indigenous transglutaminase inhibitor in milk serum by means of UHT-treatment and membrane separation techniques [J]. *International Dairy Journal*, 2006, 16(6): 669–678.
- [31] 汪丽. 聚谷氨酸对凝固型酸奶的稳定作用机理研究 [D]. 上海: 上海应用技术学院, 2016: 33.
- [32] 胡陵. 酸变性酪蛋白与高酯果胶作用机理的研究 [D]. 杭

- [8] 陈少华, 张秀玲, 王晓君, 等. 响应面优化双酶法提取川陈皮素工艺 [J]. *食品工业科技*, 2016, 37(24): 259–264.
- [9] Carlos ALedesma – Escobar, Feliciano Priego – Capote, María Dolores Luque de Castro. Comparative study of the effect of auxiliary energies on the extraction of citrus fruit components [J]. *Talanta*, 2015, 144(1): 522–528.
- [10] 黄智, 肖南. 超声与微波辅助提取陈皮中橙皮苷及其抗氧化性研究 [J]. *食品工业科技*, 2017, 38(8): 250–255.
- [11] 逢显娟, 李杰, 段冷昕, 等. 陈皮中橙皮苷的溶剂热法提取工艺及检测方法的研究 [J]. *食品工业科技*, 2016, 37(18): 267–271.
- [12] 李侠, 邹基豪, 王大为. 响应面实验优化超声波-酶法提取绿豆皮黄酮类化合物工艺 [J]. *食品科学*, 2017, 38(8): 206–212.
- [13] 朱孔岳, 冯琦, 盘赛昆, 等. 响应面分析法优化超临界 CO₂ 萃取陈皮精油工艺的研究 [J]. *安徽农业科学*, 2016, 44(13): 56–58.
- [14] Behnaz Abdous, S Maryam Sajjadi, Leila Ma' mani. β-Cyclodextrin modified mesoporous silica nanoparticles as a nano-carrier: Response surface methodology to investigate and optimize loading and release processes for curcumin delivery [J]. *Journal of Applied Biomedicine*, 2017, 15(3): 210–218.
- [15] M S Aezhisai Vallavi, N Mohan Das Gandhi, C Velmurugan. Assessment of cutting force and surface roughness in LM6/SiC p using response surface methodology [J]. *Journal of Applied Research and Technology*, 2017, 15(3): 283–296.
- [16] 姜昭, 曹博, 陈玉坤, 等. 菌株 *Arthrobacter* sp. DNS10 降解酶固定化条件的响应面优化 [J]. 2016, 10(9): 5281–5288.
- [17] 崔蕊静, 刘秀凤, 常学东, 等. 安梨皮渣中总黄酮微波辅助提取工艺优化 [J]. *中国酿造*, 2014, 33(12): 85–88.
- [18] 刘景玲, 张治海, 李鑫, 等. 大孔树脂法分离纯化大血藤中原花青素 [J]. *食品工业科技*, 2017, 38(1): 112–116.
- [19] 董爱君, 刘华臣, 刘冰, 等. 肉桂酸薄荷酯的合成及抑菌活性研究 [J]. *食品科技*, 2017, 42(5): 253–256.
- [20] Biesaga Magdalena. Influence of extraction methods on stability of flavonoids [J]. *Journal of Chromatography A*, 2011, 1218(18): 2505–2512.
- [21] 宋思园, 苏平, 王丽娟, 等. 响应面实验优化超声提取黄秋葵花果胶多糖工艺及其体外抗氧化活性 [J]. *食品科学*, 2017, 38(2): 283–289.

州: 浙江工商大学, 2013.

- [33] Şanlı T, Sezgin E, Deveci O, et al. Effect of using transglutaminase on physical, chemical and sensory properties of set-type yoghurt [J]. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25(6): 1477–1481.
- [34] Clark A H, Kavanagh G M, Ross – Murphy S B. Globular protein gelation-theory and experiment [J]. *Food Hydrocolloids*, 2001, 15(4–6): 383–400.
- [35] 于茜. 酶促作用对大豆酸奶品质的影响研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2015: 38.