豆浆保温处理对大豆酸奶品质的影响

刘爱洁，李理
（华南理工大学轻工与食品学院，广东广州 510640）

摘要：以保温不同时间的豆乳为主要原料，经瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus, LH-B02*)、保加利亚乳杆菌(*Lactobacillus bulgaricus AS1.1482, L.B 1482*)和嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus IFFI 6038, S.T 6038*)组合发酵制备大豆酸奶，应用SDS-PAGE和氨基氮来表征豆浆中蛋白质的降解情况，分析了酸奶产品的pH、可滴定酸度、持水力、流变学性质以及感官风味评价。结果表明，豆浆经过55 ℃的保温处理后，氨基氮显著提高，其中保温6 h的豆浆氨基态氮含量增加了14.04%。经过保温处理后的豆浆在制备成大豆酸奶后，酸度显著提高，粘弹性增加，剪切稀化特性变弱，感官评价表明，保温4 h和6 h后制备的大豆酸奶在外观、质构以及风味等方面都有明显提高，凝乳细腻柔和，总体可接受性与对照相比差异显著。

关键词：大豆种子内源酶；豆浆保温处理；大豆酸奶
文章篇号：1673-9078(2013)1-68-72

Effect of Soymilk Heat-processing on the Quality of Soy Yogurt

LIU Ai-jie, LI Li
(College of Light Industrial and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)

Abstract: Soymilk was incubated at 55 ℃ for 0, 2, 4, 6 hours in a water bath and then fermented with the *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* combined culture. The hydrolysis of protein in soymilk was determined by SDS-PAGE and amino-nitrigen method, the quality of the soy yogurt was characterized by pH, titratable acidity, water holding capacity, rhelolgy property, and sensery evaluation. The results indicated that the protein was hydrolyzed as the amino nitrigen content in soymilk increasing significantly along with the incubation time, the amino nitrogen content reaching 14.04% after 6 h incubation. The quality of the soy yogurt was also improved significantly through this soymilk heat-processing treatment. Tthe titratable acidity, viscidity and elasticity increased, and the characteristics of shear thinning got weak. Sensory evaluation showed that the texture of the product became exquisite and soft, and the overall acceptance significantly enhanced.

Key words: soybean endogenous enzyme; soymilk heat-processing; soy yogurt

大豆酸奶是以豆浆为主要原料经乳酸菌发酵制备的一种新型的类酸奶产品[1,2]，大豆酸奶在实现动植物蛋白互补的优势同时可以降低产品的脂肪、胆固醇含量[3]，更具有价格低廉以及改善肠道菌群、降低血清胆固醇、提高身体免疫力、缓和乳糖不耐症、降低卵巢癌和心血管疾病风险等保健功效[4,5]，因此具有极高的开发应用价值，但是大豆酸奶产品也存在豆腥味、青草味等不良风味以及产酸不足、口感不够细腻爽滑、质构粗硬等问题。对大豆蛋白或豆浆进行适当的酶解，可以有效缩短发酵时间、提高乳酸菌产酸的能力[6,11]。本课题组前期研究表明以萌发大豆为原料制备的大豆酸奶在风味、理化、质构、流变、营养特性方面等有明显的改善，其感官特性更接近牛奶酸奶[1,7]，这主要是大豆种子萌发过程中产生的多种内源酶的酶解作用，其中的蛋白酶会催化大豆蛋白部分降解并释放出游离氨基酸，大豆蛋白的这种降解作用有利于乳酸菌的发酵作用，并能改善大豆蛋白凝乳的质构。但是大豆的萌发是一个复杂而缓慢的过程，不利于工业化生产和控制。考虑到浸泡结束后，大豆种子即显示出较高的酸性及中性蛋白酶活性[7]，本研究对豆浆进行保温处理，拟利用大豆内已经产生的内源性蛋白酶，使蛋白质轻度酶解，达到萌发的相似效果，在此基础上制备出风味和品质良好的大豆酸奶产品，现将研究结果报道如下。

收稿日期：2012-08-21
基金项目：广东省科技攻关项目（2011B020310004）
作者简介：刘爱洁（1987-），女，硕士研究生，研究方向为粮食、油脂及植物蛋白工程
通讯作者：李理(1965-)，女，博士，教授，研究方向为蛋白质化学

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

大豆：当季新鲜成熟东北大豆；脱脂乳粉（蛋白含量约32.7%）：新西兰Fonterra有限公司；其他试剂均

为国产分析纯。

保加利亚乳杆菌(*Lactobacillus bulgaricus AS1.1482* 简写为 *L.B 1482*)、嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus IFFI 6038*简写为*S.T 6038*)：购于广东省微生物研究所菌种保藏中心；瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus LH-B02*简写为*LH-B02*)：Hansen样品。

JJ500型电子天平：浙江余姚铭称重校验设备有限公司；HSG-IB-2型电热恒温水浴锅：常州奥华仪器有限公司；YXQ-SG46-280S型手提式高压灭菌锅：合肥华泰医疗设备有限公司；ECP3000三恒电泳仪：北京六一仪器厂；双板夹芯式垂直槽（DYCZ30型）：广州市从源仪器有限公司；Hakke流变仪：德国；Seven Easy pH计(S20)：瑞士；PXY-190S-A型生化培养箱：广东韶关科力仪器有限公司；HR 1727PHILIPS搅拌机：珠海飞利浦家用电器有限公司；SZX超净工作台：吴江净化设备总厂。

1.2 试验方法

1.2.1 大豆酸奶制备工艺流程

大豆→挑选→消毒杀菌→浸泡→去皮→打浆→保温→过滤→豆乳→加糖、牛乳→灭菌→42 ℃发酵4 h→4 ℃冷藏24 h

1.2.2 保温豆乳及发酵底物的制备

选择籽粒饱满均一、无虫蛀霉变的完整大豆籽粒，冲洗去杂后于25 ℃浸泡14 h，之后用75%的乙醇浸泡1 min，无菌水清洗6次后去皮，60 ℃无菌水磨浆（豆水比为1:10，干重）。将豆浆盛于无菌锥形瓶中，55 ℃水浴分别加热0 h、2 h、4 h、6 h。豆浆保温后180目筛过滤制得豆乳。

配置12%脱脂乳粉复原牛乳，豆乳和牛乳按7:3比例混合，添加8%的白砂糖（*m/V*），100 ℃灭菌15 min。

1.2.3 接种

配置12%的牛乳，经115 ℃灭菌10 min后，在复原牛乳中按5%接种量（*V/V*）分别接入瑞士乳杆菌*LH-B02*、保加利亚乳杆菌*L.B 1482*和嗜热链球菌*S.T 6038*，37 ℃静止培养8~12 h。发酵剂活化数次后，参照刘占祥[8]等人的方法测定菌种活力，活力达到0.7时即可接种。

在发酵底物中分别添加2%的瑞士干酪乳杆菌，1.5%的保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌，混匀分装后42 ℃静止发酵4 h取出，4 ℃后熟24 h。

1.2.4 保温豆浆及大豆酸奶各项指标测定

1.2.4.1 保温豆浆的氨基态氮含量变化测定

用甲醛滴定法（ZBX66014-87），取5 mL保温豆乳样品，加入60 mL蒸馏水，调节pH到8.20，加入20 mL已中和到pH 7.00的甲醛，然后用0.1000 mol/L标准NaOH滴定到pH 9.20，记下体积V_1。用蒸馏水代替样品，操作方法相同，测得空白体积V_0。

$$\text{氨基氮含量（\%）}=\frac{(V_1-V_0)\times N\times 0.014}{m}\times 100\%$$

式中，V_1为样品耗用氢氧化钠标准溶液毫升数；V_0为空白耗用氢氧化钠标准溶液毫升数；N为氢氧化钠标准溶液摩尔浓度；m为样品质量。

1.2.4.2 分析保温过程中蛋白质亚基组分含量的变化

参照Laemmli的电泳方法，以不同保温时间的豆浆为待测样品，于沸水中加热5 min后，10000 r/min离心10 min。上样量为10 μL，分离胶、浓缩胶浓度分别为14%和4%，浓缩胶电流为40 mA，分离胶电流为80 mA。电泳完毕后凝胶以考马斯亮蓝R250染色40 min，过夜脱色至透明后拍照。

1.2.4.3 pH、酸度及持水力的测定

用Mettler Seven Easy pH计(S20)测定样品的pH值。以涅尔度°T为酸度测定指标，按GB/T5009.46-2010《乳与乳制品卫生标准的分析方法》测定。

取30 g接种后的大豆酸奶，在离心管（32 mm×115 mm）中42 ℃发酵4 h，4 ℃冷藏24 h后将样品在20 ℃条件下480 ×g离心10 min，去除乳清后称重。

持水力(%)=(1-W_2/W_1)×100%

式中，W_1、W_2分别为离心前、离心后样品的质量。

1.2.4.4 大豆酸奶流变特性的测定

将大豆酸奶顺时针、逆时针各搅拌10次之后，用哈克流变仪进行测定，选用探头为35 mm直径的平板，温度控制在25.0±0.5 ℃，分析模式为：频率扫描，应变为0.5%，频率从0.1~10 Hz；剪切扫描，速率从0逐渐增加至500/s，然后再从500/s减小至0，每个步骤时间为180 s。每个测定重复两次。

1.2.4.5 感官评价

感光评价与描述以9分制进行打分，1分为最差，9分为最好，按照外观、风味、质构及整体可接受性四项，邀请8名品评员进行打分，并分别对大豆酸奶的色泽、组织特性、口感和滋味等进行描述分析。

1.2.5 数据处理与分析

实验数据采用SPSS 16.0统计分析软件进行处理，进行一维方差分析。平均值和标准偏差由两个以上样品的测量结果经计算得到。

2 结果与讨论

2.1 豆浆保温处理对蛋白降解作用的影响

2.1.1 豆浆保温处理对蛋白质亚基的影响

大豆球蛋白（11S）和β-伴球蛋白（7S）是大豆种子中主要的储存蛋白，两者占总蛋白含量的70%左右。图1显示豆浆在保温4 h后，大豆蛋白的11S酸性亚基条

带（A1、A2、A3、A4）有变宽的趋势，30 kDa和50 kDa处的条带痕迹也逐渐加深，其余蛋白亚基组成并没有发生显著性变化。本课题组的前期研究表明大豆在浸泡12 h以后就显示出较高的中性和酸性蛋白酶活性，其中中性蛋白酶活力为29.20 μg/(d·mg)，酸性蛋白酶活力为8.57 μg/(d·mg)[7]，但此处经过保温处理，蛋白质的降解并没有预期的明显，有可能是酶解时间不够，因此进一步检测了保温豆浆的氨基氮含量。

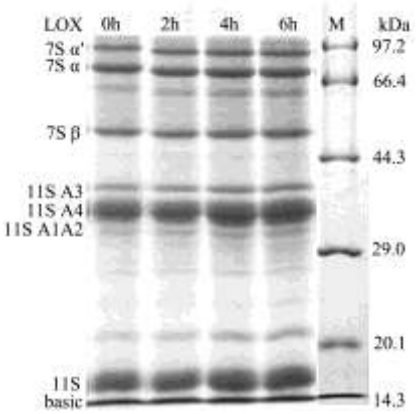


图1 豆浆保温过程中蛋白亚基组成变化图谱

Fig.1 The degradation of soybean protein in the progress of heating

注：泳道从左到右依次为豆浆55 ℃保温0 h、2 h、4 h、6 h，M为蛋白分子量标准品。

2.1.2 豆浆保温处理对氨基态氮含量的影响

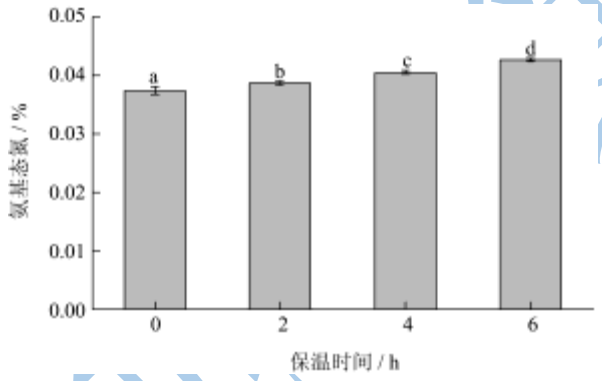


图2 保温过程中大豆蛋白氨基态氮含量变化

Fig.2 The amino nitrogen content changes of soybean protein in the progress of heating

注：结果为平均值±标准偏差，n=2，a，b，c，d表示显著性差异（P<0.05）。

氨基氮主要用来表征游离氨基的含量，当蛋白质降解并释放出游离氨基酸时，氨基氮含量升高，氨基氮含量是判定发酵产品如酱油、料酒、酿造醋等发酵程度的特性指标。由图2可知豆浆55 ℃水浴保温过程中，其氨基态氮含量有了显著性增加，这应该是由于浸泡过程中被激发的大豆种子内源性外肽酶作用的结果。本课题组的前期研究表明，在浸泡结束后即可检测出氨肽酶活力和羧肽酶活力，其中氨肽酶对合成底物Ala-pNA的酶活为69.22 μmol/(d·mg)，对底物Leu-pNA的酶活为24 μmol/(d·mg)[7]。此外，早期Kubota Y.等人从萌发的大豆中分离纯化出两种羧肽酶，Asano M.等人从萌发大豆中分离出一种新型的氨肽酶，它们都能够降解多肽链C-或N-末端的氨基酸残基并释放出游离氨基酸[9]。游离氨基酸的增加不仅有利于乳酸菌的增殖产酸，而且对大豆酸奶的风味也会产生影响[9~11]。

综上所述，豆浆在经过保温处理后，虽然7S和11S等主要大豆蛋白亚基没有发生明显的降解作用，但氨基氮随保温时间的增长而显著增加，游离氨基酸的增加将有利于后续的发酵作用和产品品质的改善。

2.2 豆浆保温处理对对酸奶品质的影响

2.2.1 豆浆保温处理对酸奶pH、酸度和持水力的影响

表1 豆浆保温对大豆酸奶的pH、酸度和持水力的影响

Table 1 The effect of soymilk heat-processing on the pH, acidity and water-holding capacity of soy yogurt

保温时间/h	pH	酸度	持水力
0	3.78±0.12a	101.10±0.99a	95.55±0.53a
2	3.75±0.15a	106.20±0.16b	95.38±0.20a
4	3.70±0.10b	107.59±0.68b	93.80±0.80b
6	3.71±0.23b	107.52±1.14b	94.89±0.89ab

注：结果为平均值±标准偏差，n=3，a，b，c表示显著性差异（P<0.05）。

由表1可知豆浆保温对大豆酸奶的pH和酸度都产生了有利的影响，持水力有小幅度下降趋势。豆浆保温过程中大豆各种内源酶的作用产生的小分子蛋白、氨基酸、还原糖和矿物质等有利于缩短发酵剂的适应期，加快乳酸菌的增殖产酸[12]，导致酸度上升。持水力是评价酸奶凝胶网络结构稳定性的重要指标，与酸奶的微观结构密切相关。豆浆保温后，大豆酸奶依然显示出较强的持水力(>90%)。

2.2.2 豆浆保温处理对酸奶流变特性的影响

2.2.2.1 频率扫描

应用线性粘弹性理论，研究大豆酸奶在小变形范围内的粘弹性质及变化规律。不同大豆酸奶样品的频率扫描结果如图3所示。G’是在振动测试中每一个变形周期内的储能模量，它可以表征酸奶网络结构的强度，代表酸奶的弹性；G”是酸奶在变形过程中所损失的能量，代表酸奶的粘性。在0.1至10 Hz的线性粘弹性范围内，大豆酸奶样品的G’和G”显示出较强的频率敏感性，数值均随扫描频率增加而增大，且G’值均高于G”值，表现出类固体的流变特性[13]。随着保温时间的延长，大豆酸奶样品的G’和G”都呈现增大的趋势，表明大豆酸奶的粘弹性增大。豆浆经过保温处理以及轻度酶解，

大豆蛋白分子舒展，内部疏水基团暴露[14]，而蛋白疏水性的增大会使蛋白之间疏水结合作用加强，使酸奶蛋白凝胶的结构更加紧密、稳定，其粘弹性也会增大。

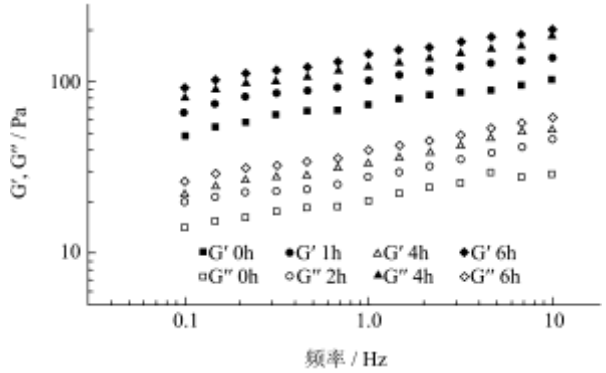


图3 大豆酸奶的频率扫描曲线

Fig.3 The frequency scanning curve of soy yogurt

2.2.2.2 剪切扫描

本实验采用Herschel-Bulkley模型对大豆酸奶的的剪切扫描曲线进行了分析。该模型可由公式$\tau=\tau_0+\kappa\gamma^n$来表示，其中τ为剪切应力，$\tau_0$为屈服应力，γ为剪切速率，κ和n分别为稠度系数和流动行为指数。

如表2所示，所有样品的R^2均高于0.99，表明Herschel-Bulkley模型适合用于大豆酸奶剪切扫描曲线的分析。保温过程中大豆酸奶的屈服应力τ_0有减小的趋势但不显著。实验中所有样品的n值均小于1，表明大豆酸奶为假塑性流体[15]。随着保温时间延长，大豆酸奶样品的稠度系数(κ)显著增大，流动行为指数(n)显著减小，这表明保温之后样品的剪切稀化特性变弱。在剪切速率为20 s^{-1}和100 s^{-1}时，表观粘度显著性增大的结果也证明了这一趋势。轻度酶解的蛋白分子结构舒展，使大豆蛋白的交联作用变强，当酸奶凝胶受到剪切力作用时，舒展的肽链相互勾挂，因此显示出较高的粘度和较弱的剪切稀化特性。而在长时间的保温过程中可能会使豆浆中的淀粉糊化，这也会增加产品的粘度，使产品剪切稀化特性变弱。

表2 豆浆保温对大豆酸奶流变学参数的影响

Table 2 The effect of soymilk heat-processing on the rheology parameters of soy yogurt

保温时间/h	Herschel-Bulkley				表观粘度/mPa·s	
	τ_0(Pa)	κ(Pa.s^n)	n	R^2	20 s^{-1}	100 s^{-1}
0	5.76±0.06a	0.15±0.04a	0.83±0.06a	0.99	0.87±0.13a	0.24±0.06a
2	5.54±0.15a	0.13±0.02b	0.85±0.01b	1.00	1.02±0.12a	0.26±0.01b
4	5.42±0.35a	0.35±0.04c	0.70±0.02c	0.99	1.25±0.08b	0.27±0.03c
6	5.44±0.34a	0.67±0.02d	0.60±0.01d	0.99	1.53±0.58c	0.26±0.02d

注：1.结果为平均值±标准偏差，n=2，a，b，c表示显著性差异（P<0.05）；0 h，2 h，4 h，6 h表示发酵前的豆浆55 ℃水浴保温时间；2.τ0=屈服应力，κ=稠度系数，n=流动行为指数，R=相关系数，20 s^{-1}、100 s^{-1}表示在20 s^{-1}、100 s^{-1}的剪切速率下的表观粘度。

2.2.3 豆浆保温处理对酸奶感官品质的影响

表3 大豆酸奶的感官评价

Table 3 The sensory evaluation of soy yogurt

保温时间/h	外观	质构	风味	总体可接受性
0	6.00±0.53a	5.19±0.65a	5.62±0.52a	5.87±0.64a
2	6.37±0.74ab	5.75±0.38a	6.00±0.93a	6.00±0.76a
4	6.75±0.46bc	6.94±0.42b	7.25±0.89b	7.12±0.83b
6	7.25±0.71c	7.25±0.71b	7.25±1.03b	7.37±1.19b

注：结果为平均值±标准偏差，n=8，a，b，c表示显著性差异（P<0.05）。

豆浆保温对大豆酸奶感官特性的影响作用如表3所示。未经保温处理的大豆酸奶质地稍硬、质脆，入口有颗粒感不够柔和，且有豆腥味。与之相比，经过2 h保温后，酸奶的颗粒感消失，酸度增加且豆腥味基本消失。保温超过4 h后，大豆酸奶的组织更加细腻，质地变得柔软，并且黏度增加，保温6 h时感官评分由5.87分提高到7.37分，总体可接受性显著提高。研究表明，大豆酸奶的豆腥味源于脂肪氧化酶催化作用产生的一些短链的酮类、醇类及醛类等挥发性风味物质，其中最重要的是己醛，本研究中55 ℃长时间的保温可能使这些豆腥味成分挥发或者发生了其它的生物转化如产生豆香味掩盖部分豆腥味，但相关机理需要进一步研究。

3 结论

3.1 豆浆在55 ℃保温4 h后，在大豆种子内源蛋白酶的作用下，大豆蛋白亚基开始发生变化，氨基氮含量显著提高。

3.2 豆浆经过55 ℃保温处理4 h后，经过乳酸菌发酵制备的大豆酸奶其pH和酸度显著改善，粘弹性增加，剪切稀化特性变弱，感官品评表明颗粒感和豆腥味基本消失，组织变得细腻柔和，黏度增加，其总体可接受性显著提高。

参考文献

[1] Yang M, L Li. Physicochemical, Textural and Sensory Characteristics of Probiotic Soy Yogurt Prepared from Germinated Soybean [J]. Food Technology and Biotechnology, 2010, 48(4): 490

[2] 毛军,李理,杨晓泉.新型大豆酸乳的研制[J].食品与发酵工业,2007,32(10):150-155

[3] 周雪松.不同蛋白源发酵酸奶研究[J].现代食品科技,2010, 26(5): 502-504

[4] Parvez S, et al. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health [J]. Journal of applied microbiology, 2006, 100(6): 1171-1185

[5] Wagar L, et al. Immunomodulatory properties of fermented soy and dairy milks prepared with lactic acid bacteria [J]. Journal of Food Science, 2009, 74(8): 423-430

[6] 严颖,夏明,朱娜,等.胃蛋白酶预处理对大豆酸奶发酵过程的影响[J].现代食品科技, 2011,27(12):1440-1442

[7] Yang M, J Fu, L Li. Rheological Characteristics and Microstructure of Probiotic Soy Yogurt Prepared from Germinated Soybeans [J]. Food Technology and Biotechnology, 2012, 50(1): 73-80

[8] 刘占祥,王琪.酸牛奶的加工技术[J].宁夏农林科技,2000,5: 62-63

[9] Asano M, et al. Purification and characterization of an N-terminal acidic amino acid-specific aminopeptidase from soybean cotyledons (Glycine max) [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2010. 74(1): 113-118

[10] Klein N, et al. Conversion of amino acids into aroma compounds by cell‐free extracts of Lactobacillus helveticus [J]. Journal of applied microbiology, 2001. 91(3): 404-411

[11] 余保宁,毛军,李理.3 种酶解方法对大豆酸奶品质的影响[J].食品与发酵工业,2007,33(5):137-142

[12] 王莘,王艳梅,董浩.豆类萌发期矿物质元素和糖类含量变化的研究[J].扬州大学学报:农业与生命科学版,2003,24(2): 72-74

[13] Donkor ON, et al. Rheological properties and sensory characteristics of set-type soy yogurt [J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2007, 55(24): 9868-9876

[14] Murphy KP, PL Privalov, SJ Gill. Common features of protein unfolding and dissolution of hydrophobic compounds [J]. Science, 1990, 247(4942): 559-562

[15] Lucey J, H Singh. Formation and physical properties of acid milk gels: a review [J]. Food Research International, 1997. 30(7): 529-542

现代食品科技