

大豆蛋白乳酸菌饮料工艺研究

王才华¹, 毕会敏², 周雪松¹, 曾建新¹

(1. 广州合诚实业有限公司, 广东广州 510530) (2. 广东农工商职业技术学院, 广东广州 510630)

摘要: 研究了大豆蛋白乳酸菌饮料的工艺条件, 通过优化磨浆工艺和酶解工艺, 改善大豆蛋白乳酸菌饮料风味, 并提高储藏期乳酸活菌数, 从而提升大豆蛋白乳酸菌饮料的品质。结果表明, 将大豆在 0.03% 柠檬酸溶液中煮沸 5 min, 然后于 37 °C 浸泡 4 h, 磨浆过滤得到豆浆; 豆浆进一步采用 0.5% 木瓜蛋白酶于 55 °C 酶解 4 h, 然后于 90 °C 保持 10 min 灭酶; 酶解后的豆浆接种乳酸菌, 发酵 5 h 制备发酵基料。以此发酵基料制备活性乳酸菌饮料风味较好, 没有明显的豆腥味或其他不良风味, 含有丰富的大豆肽, 于 4 °C 储藏 30 d 后的乳酸菌活菌数大于 10⁸ cfu/mL。

关键词: 大豆蛋白; 乳酸菌饮料; 活菌数; 风味

文章编号: 1673-9078(2013)5-1085-1088

Processing Technology for a Soybean-protein Beverage Fermented by *Lactobacillus*

WANG Cai-hua¹, BI Hui-min², ZHOU Xue-song¹, ZENG Jian-xin¹

(1. Guangzhou Honsea Industry CO. LTD, Guangzhou 510530, China)

(2. Guangdong AIB Polytechnic College, Guangzhou 510630, China)

Abstract: Processing conditions for a soybean-protein drink with *Lactobacillus* were studied. Grinding parameters of soybean and enzymatic hydrolysis of soybean were optimized in order to improve flavor and number of active *Lactobacillus* during storage. Soybean was boiled in 0.05% citric acid solutions for 5 minutes, and then soaked in water at 37 °C for 4 hours. The soaked soybean was ground to soy milk and filtered. Filtrate of soy milk was hydrolyzed by 0.5% papain at 55 °C for 4 hours. Hydrolyzed milk was heated to 90 °C for 10 minutes to inactivate papain, and then fermented by *Lactobacillus*. *Lactobacillus* drink containing soybean peptide based on the fermented soy milk tasted good and showed non-significant beany flavor. The number of active *Lactobacillus* in the beverage was above 10⁸ cfu/mL after a 30-day storage.

Key words: soybean protein; *Lactobacillus* drink; viable bacteria counts; flavor

大豆蛋白是一种优质的蛋白资源, 我国非转基因大豆蛋白资源十分丰富, 据统计, 2001~2007 年我国的大豆年产量一直维持在 1500~1700 万 t^[1]。如何高效充分利用大豆蛋白已成为国内外食品工业的重要课题, 以乳酸菌发酵大豆蛋白开发营养保健食品是大豆深加工利用的热门方向之一^[2]。

大多数乳酸菌无毒、无害, 属于食品级安全的微生物, 并且对人体具有较好的益生效果, 在近十几年里, 乳酸菌也被称为“益生菌”^[3]。活性乳酸菌能维持生态平衡和肠道机能, 改善肠道微环境, 促进营养成分的分解、吸收和利用, 降低血清胆固醇水平,

收稿日期: 2013-03-06

基金项目: 广东省教育部产学研结合项目 (2011B090400205), 广州市科技计划项目 (2011J2200030)

作者简介: 王才华 (1980-), 工程师, 主要研究方向为功能性蛋白及多肽产品开发应用

通讯作者: 周雪松

期饮用能增强机体免疫能力, 赋予乳酸菌发酵食品良好的保健功能^[3~4]。由于大豆蛋白本身的理化特性, 发酵后产品往往具有较重的豆(腥)味、口感粗糙, 与传统发酵牛乳有十分明显的差距, 因此虽然大豆酸乳虽然成本较低, 但市场很少见这类产品; 另一方面, 大豆乳酸菌制品储藏一段时间后, 活性乳酸菌数量偏低, 导致其功能大打折扣。

乳酸菌活菌数达到足够的数量, 才具有人们所期望的功能特性。国家卫生标准 GB16321-2003《乳酸菌饮料卫生标准》对乳酸菌指标数值的规定是: 出厂时不少于 1×10⁶ cfu/mL, 销售过程有活菌检出即可。对乳酸菌数在保质期内活菌的检出没有作出确切的含量要求。目前许多研究发现, 进入货架上的产品中益生菌的数量, 会由于自身的生长特性及周围环境因素的影响, 呈下降趋势。要获得所期望的保健效果, 必须保持食品中乳酸菌的活菌数量, 以确保乳酸菌通过消化道后仍大量存活, 进入肠道后发挥益生作用^[5]。

本文通过优化磨浆工艺,降低豆腥味,并通过酶解豆浆,将大豆蛋白降解成大豆肽,进一步改善豆浆的豆腥味、异味。然后利用乳酸菌发酵,改善由于酶解带来的苦味。以此发酵基料制备的乳酸菌饮料风味好,乳酸菌在储藏期内活菌数高。同时,发酵基料含有丰富的大豆肽,具有抗氧化、提高免疫力、抗疲劳、降血压、恢复体力等功能特性^[6]。

1 材料与方法

1.1 材料

优质大豆、白砂糖,市售;碱性蛋白酶 Alcalase 2.4 L (6.0×10⁴ U/mL)、中性蛋白酶 Neutrase (3.5×10⁴ U/mL)、胰蛋白酶 PTN6.0S (5.5×10⁴ U/mL),诺维信公司;木瓜蛋白酶 (5.0×10⁴ U/mL),广州酶制剂厂;柠檬酸,帝斯曼公司;碳酸氢钠、氢氧化钠,天津启轮化学科技有限公司;双氧水,武汉江城化工有限责任公司;乳化稳定剂 HS-900,广州合诚实业有限公司;YC-380 乳酸菌种,丹麦汉森公司。

1.2 主要仪器

JJ500 型精密电子天平,美国双杰兄弟有限公司;高效液相色谱仪,美国 Waters 公司;SZX 超净工作台,上海浦东跃新科学仪器厂;YX-280 高压灭菌锅,江阴滨江医疗设备厂;凯氏定氮仪,上海纤检仪器有限公司;均质机,丹麦 APV 公司;SC-15B 型超级恒温水浴箱,宁波海曙赛福试验仪器厂;pHS-25 型酸度计,上海雷磁仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 发酵基料的制备方法

大豆→浸泡→磨浆→分离→酶解→灭酶→添加乳糖→接种→发酵(43℃、5h)→冷却→破乳→4℃冷藏备用

1.3.2 乳酸菌饮料的制备方法

稳定剂、蔗糖等→加入 90℃ 的水、水化 15 min→冷却(室温)→紫外杀菌(15 min)→加 20% 发酵基料→剪切→调酸→均质→无菌罐装→4℃冷藏

1.3.3 蛋白提取率的测定

蛋白提取率(%) = 豆浆蛋白质量/大豆蛋白质量 × 100%

1.3.4 感官评定方法

选 20 名训练有素的食物感官鉴定员,对豆浆、酶解豆浆、发酵豆浆的风味进行评定,满分为 5 分,结果取平均值。

1.3.5 分子量测定

用 6 mol/L 盐酸将酶解豆浆 pH 调节至 4.50,用 10000 r/min 离心分离,取清液。分子量测定采用 Amersham 蛋白质分析纯化系统。色谱条件:

Superdex-peptide-10/300-GL 玻璃柱,洗脱液为 0.25 mol/L NaCl 磷酸盐缓冲液(pH=7.2),流速 0.5 mL/min,检测波长 214 nm。

表 1 感官评定标准

Table 1 Standard of sensory evaluation

评分标准	分值
有严重的豆腥味、苦味	0~1
有较重的豆腥味、苦味,风味不协调	2
有豆腥味、苦味,风味一般,可接受	3
略有豆腥味、苦味,风味协调	4
无豆腥味、苦味等杂味,风味协调	5

1.3.6 乳酸菌活菌数的测定血球平板计数法^[7]

样品活菌数/mL = 菌数平均数 × 400 × 10⁶ × 稀释倍数

2 结果与讨论

2.1 磨浆工艺

豆腥味是影响豆奶产品不被消费者接受的主要原因,因此,豆制品的生产首先要考虑如何消除豆腥味。由于磨浆时大豆细胞壁的破坏,大豆中的脂肪氧化酶迅速与脂类底物发生氧化反应,生成正己醇、正己醛、正乙基乙烯酮等,产生明显的豆腥味^[8]。豆浆出现豆腥味,后期往往难以消除,因此磨浆工艺中要充分减少豆腥味产生。

在总结先前资料和实验研究的基础上,分别采用 NaHCO₃ 浸泡、H₂O₂ 浸泡、柠檬酸浸泡、热烫等磨浆工艺,研究磨浆对产物风味、蛋白质提取率的影响。具体方案如下:

准确称取 200 g 大豆,放入 600 g 自来水中,按照表 2 条件浸泡。浸泡结束后用自来水漂洗干净,然后加入到 2000 g 去离子水中磨浆,过胶体磨 3 次。依次用 50 目、100 目和 200 目的纱布过滤,4℃冷藏备用。

表 2 大豆磨浆工艺参数

Table 2 Grinding parameters of soybean

编号	浸泡溶液	浸泡温度/℃	浸泡时间/h	磨浆温度/℃
0#	自来水	37	4	常温
1#	0.05% NaHCO ₃	37	4	100
2#	0.2% 过氧化氢	37	4	100
3#	0.03% 柠檬酸	60	4	100
4#	0.03% 柠檬酸	100/37	4	100

注:4#柠檬酸将 pH 调节至 3.0,煮沸保持 5 min,转移至 37℃ 环境浸泡 4h。

2.1.1 工艺对风味的影响

由表 3 可以看出磨浆工艺对豆浆风味影响十分显著。0#未经任何处理,具有十分浓郁的豆腥味,采用柠檬酸浸泡工艺都能够有效降低豆腥味,而采用

NaHCO₃ 和 H₂O₂ 浸泡豆浆的豆腥味一般。这说明采用 NaHCO₃ 和 H₂O₂ 浸泡对大豆中的脂肪氧化酶活性影响有限。大豆由于脂肪氧合酶的活力较高,要经过充分的热烫处理(95 °C, 10 min)可能才能达到灭酶的目的^[9]。虽然 2#和 3#采用沸水磨浆,但由设备条件限制,磨浆时间较短只有 2~3 min,很难完全钝化脂肪氧化酶的活性。长时间热烫或高温浸泡处理会导致豆浆产生蒸煮味。

表 3 磨浆工艺对豆浆风味的影响

Table 3 Effects of grinding parameters on the flavor of soybean milk

编号	风味评价	评分
0#	豆腥味显著	1.1±0.1
1#	有豆腥味, 风味一般	3.5±0.3
2#	有豆腥味, 风味一般	3.0±0.2
3#	蒸煮味比较重	3.0±0.2
4#	豆味清淡, 风味较好	4.5±0.1

3#采用柠檬酸浸泡工艺,由于长时间高温浸泡,导致豆浆有蒸煮味,产品风味接受程度较低。4#是在 3#的基础上进一步改进,0.03%柠檬酸浸泡,煮沸保持 5 min,转移至 37 °C环境浸泡 4 h。首先采用高温加热钝化脂肪氧合酶的活性,高温蒸汽还会隔绝氧气与脂肪氧合酶脂肪酶和底物接触,避免长时间高温浸泡产生蒸煮风味。然后在 37 °C环境浸泡 4 h,使得大豆充分溶胀软化,有利于下一步的磨浆工艺。由于 NaHCO₃ 和 H₂O₂ 的高温下易分解,所以 2#和 3#都没有采用高温浸泡工艺。

2.1.2 浆工艺对蛋白提取率的影响

磨浆工艺对豆浆的蛋白提取率也有显著的影响,如图 1 所示。

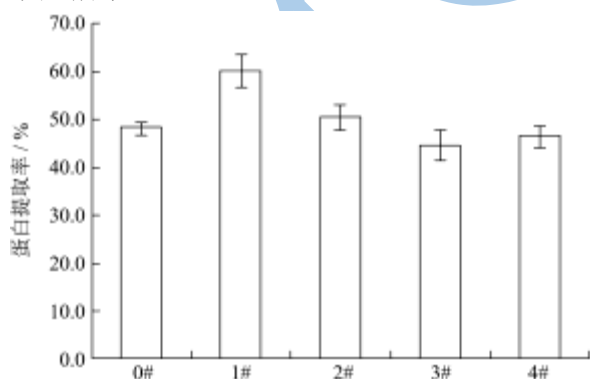


图 1 磨浆工艺对大豆蛋白提取率的影响

Fig.1 Effects of grinding parameters on the extraction rate of soy protein

由图 1 可知, 1#的蛋白提取率最高达到 60.1±3.4%, 3#的蛋白提取率最低。这与大豆蛋白的溶解性有关,大豆蛋白是一类易溶于碱性溶液的蛋白,其等

电点为 4.50。1#采用 NaHCO₃ 溶液形成的弱碱性环境有利于大豆蛋白溶出。采用 1#工艺蛋白提取率高,能够提高产品的出品率,但另一方面,产品风味一般。4#虽然蛋白提取率不高,但风味较好。同时 4#采用 100 °C/5 min 的煮豆工艺,使得大豆蛋白适度变性,有利于下一步的酶解工艺,因此本文选择 4#磨浆工艺。

2.2 酶解工艺

本文选取四种不同蛋白酶(碱性蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶和胰蛋白酶)对豆浆进行酶解,以产品风味、提高乳酸菌存活为指标,筛选出最适合的酶解条件。酶解之前用 10% NaOH 溶液将豆浆 pH 调节至 7.0,酶解过程中不调节 pH 值,酶解方案见表 4。

表 4 酶解条件

Table 4 Enzymatic hydrolysis conditions

编号	蛋白酶	酶用量/%	温度/°C	时间/h
SH0	-	-	55	4
SH1	碱性蛋白酶	0.5%	55	4
SH2	中性蛋白酶	0.5%	45	4
SH3	木瓜蛋白酶	0.5%	55	4
SH4	胰蛋白酶	0.5%	55	4

表 5 酶水解物的分子量分布

Table 5 Molecular weight distribution of hydrolysates

酶解物	分子量分布/%				
	>10kDa	5~10kDa	3~5kDa	1~3kDa	0~1kDa
SH1	2.9±0.3	6.9±0.5	10.7±0.9	47.6±5.2	31.8±2.9
SH2	18.3±2.3	17.1±1.7	17.3±1.2	32.9±5.3	14.4±1.8
SH3	11.8±1.8	9.3±0.8	12.5±1.4	40.6±6.0	25.8±2.4
SH4	5.5±0.6	7.6±0.4	11.0±1.0	44.7±3.9	31.2±3.3

大豆蛋白经过酶解后分子量分布如表 5 所示。在蛋白酶的催化作用下,大豆蛋白被切割成更小的片段。在本文选取的四种蛋白酶中,碱性蛋白酶的酶解效率最高,胰蛋白酶位居其次,木瓜蛋白酶和中性蛋白酶的效率相对较低。Kunji 等人^[10]研究发现,乳酸菌对小分子肽的吸收优于自由氨基酸,小分子肽能够促进微生物生长繁殖,并提高它们的在储藏期的存活性。另一方面,研究表明大豆肽具有抗氧化、提高免疫力、抗疲劳、降血压、恢复体力等功能性^[6]。因此,酶解工艺是富含大豆肽乳酸菌饮料的关键工艺步骤。

2.2.1 酶解工艺对风味的影响

酶解工艺对风味的影响十分显著,SH0 大豆经过磨浆工艺处理后,仍然有淡淡的豆味,其他通过酶解工艺处理后样品,不再有明显的豆味。这说明酶解能够改善豆味,Saha^[11]认为酶解使得大豆蛋白质降解成小肽或氨基酸,不良气味成分与蛋白质发生分离,从

而改善豆浆的风味。

经过酶解工艺处理,虽然豆味有明显的改善,但酶解液的苦味十分突出。其中碱性蛋白酶的酶解液苦味最为突出,其次分别是胰蛋白酶和中性蛋白酶,木瓜蛋白酶的酶解液苦味相对较淡。Nishiwaki^[12]等人研究认为,多肽中的苦味是由于其中包含水解所释放出的疏水性氨基酸残基,特别是长链的芳香族氨基酸残基所致。一般天然蛋白质的疏水性基团都隐藏在内部,因而不会呈现苦味。然而当蛋白质水解为小分子肽时,就会露出这些疏水性基团,它们接触味蕾而呈现出苦味。

表6 酶解工艺对风味的影响

Table 6 Effects of enzymatic hydrolysis condition on the flavor

编号	酶解液风味评价	评分	成品风味评价	评分
SH0	淡淡的豆味	4.2±0.2	淡淡的豆味,有蒸煮味	3.0±0.1
SH1	明显的苦味	2.0±0.1	有苦味	3.1±0.2
SH2	较明显的苦味	2.4±0.3	略有苦味	3.5±0.2
SH3	较淡的苦味	2.9±0.3	无明显苦味和异味	4.1±0.1
SH4	明显的苦味	2.2±0.2	略有苦味	3.3±0.2

由表6还可以看出,虽然豆浆酶解液有苦味,但经过乳酸菌发酵后,其风味有较大的改善,主要表现为苦味降低,适口性更好。其中采用木瓜蛋白酶的酶解处理的成品风味最好,被接受程度最高,无明显的苦味和异味,通过添加白砂糖、香精或果汁等方法可有效地掩盖不良风味。何慧等人^[13]的研究表明,乳酸菌存在一定的肽酶体系,它们能将苦味肽进一步水解,使得苦味下降甚至完全脱除。采用乳酸菌发酵能够改善苦味,但不能完全消除苦味,碱性蛋白酶的酶解液发酵之前,苦味较重,发酵之后仍有较明显苦味。

2.2.2 酶解工艺对储藏期间乳酸菌活菌数的影响

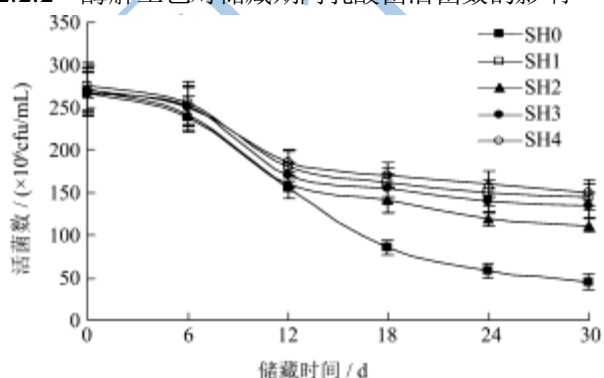


图2 酶解工艺对储藏期间乳酸菌活菌数的影响

Fig.2 Effect of enzymatic hydrolysis conditions on number of active *Lactobacillus* during storage

用 SH4 发酵好的基料按照 1.3.2 所述方法制备乳

酸菌饮料。由图2可以看出,从整个30d的储存过程中,乳酸菌活菌数呈下降的趋势。其中采用酶解工艺的乳酸菌活菌数要高于空白样。在储藏前6d,各样品乳酸菌活菌数差别不大;在储藏6d后,乳酸菌活菌数急剧下降,大量的乳酸菌死亡;在储藏12d后,对照样的乳酸菌活菌数仍然快速下降,而采用酶解工艺的乳酸菌活菌数变化平稳。SH1、SH3和SH4三者乳酸菌活菌数差别不大,SH2的乳酸菌活菌数相对较低。储藏30d后,SH0的活菌数为 $(45\pm 10)\times 10^6$ cfu/mL,SH1的活菌数为 $(149\pm 15)\times 10^6$ cfu/mL,后者是前者的3倍,这一结果说明酶解工艺产生的大豆肽对乳酸菌具有较好的活菌保护作用,对于维持乳酸菌饮料中含有一定数量的活性乳酸菌具有重要作用。

综合考虑酶解工艺对产品风味、乳酸菌存活性的影响,SH4酶解方案是风味最好,其在30d储藏期的乳酸菌活菌数大于 10^8 cfu/mL,满足活菌乳酸菌饮料对产品功能性的要求。

3 结论

本文对大豆蛋白乳酸菌饮料的工艺条件进行了研究,得出如下结论:大豆磨浆工艺采用0.05%柠檬酸溶液煮沸5min,然后在37℃浸泡4h,于100℃沸水磨浆;豆浆酶解工艺,采用0.5%木瓜蛋白酶在55℃酶解4h,在90℃保持10min灭酶,然后接种发酵。制备乳酸菌饮料风味较好,无明显豆味以及其他杂味,于4℃储藏30d后的乳酸菌活菌数大于 10^8 cfu/mL。

参考文献

- [1] 龙开胜,陈利根,顾忠盈,等.我国大豆产业发展的现状、危机与对策[J].乡镇经济,2009,3:27-31
- [2] 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
- [3] Lima K G C, Kruger M F, Behrens J, et al. Evaluation of culture media for enumeration of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium animalis* in the presence of *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* [J]. LWT Food Science and Technology. 2009, 42: 491-495
- [4] Gilland S E, Speck M L. Deconjugation of bile acids by intestinal lactobacillus [J]. Applied Environmental Microbiology, 1977,33: 15-18
- [5] 郭本恒.酸奶[M].北京:化学工业出版社,2003
- [6] 王丽华,黄明发.大豆源生物活性肽研究进展[J].粮食与油脂,2008,1:42-45
- [7] 大连轻工等合编.食品分析[M].中国轻工出版社,1994

- [8] 钱海峰,周惠明.大豆制品腥味控制研究进展[J].粮食与油脂,2003,8:18-21
- [9] Kin-Chor K, Keshavan N. Review: effect of thermal processing on soymilk [J]. International J. Food Sci Tech., 1995, 30: 263- 295
- [10] Kunji E R S, Mierau I, Hagting A, et al. The proteolytic systems of lactic acid bacteria [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1996, 70: 187-221
- [11] Saha B C, Hayashi K. Debittering of protein hydrolyzates [J]. Biotechnology Advances, 2001, 19 (5): 355-370
- [12] Nishiwaki T, Yoshimizu S, Furuta M, et al. Debittering of enzymatic hydrolysates using an aminopeptidase from the edible basidiomycete *Grifola frondosa* [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2002, 93(1): 60-63
- [13] 何慧,王进,裴凡,等.蛋白水解物与苦味的构效关系及脱苦研究[J].食品科学,2006,27(10):571-574

现代食品科技