

自筛菌株 PM-1 脂肪酶的提取及 对脱脂乳风味改进的研究

苗君莅, 张锋华, 肖杨, 任璐, 蔡涛, 王辉

(乳业生物技术国家重点实验室, 光明乳业研究院, 上海 200436)

摘要: 本文将筛选到的、对乳脂肪有高度专一性的脂肪酶高产菌株PM-1发酵, 上清液经硫酸铵沉淀、透析脱盐、蒸发浓缩后获得的粗酶提取液是原上清液酶活的4.5倍。将粗酶液发酵稀奶油产物用于90%脱脂乳中, 感官评定效果良好, 并通过测定增香90%脱脂乳中的游离脂肪酸和挥发性风味物质可知, 增香后的90%脱脂乳中中链及部分长链脂肪酸增加, 对奶香有突出贡献的特征性风味物质显著增长。从而肯定了该菌株所产脂肪酶的应用潜质。

关键词: 脂肪酶; 提取; 风味; 应用

文章编号: 1673-9078(2012)12-1751-1754

Purification of Lipase and its Application in Improvement of Skimmed Milk Flavor

MIAO Jun-li, ZHANG Feng-hua, XIAO Yang, REN Lu, CAI Tao, WANG Hui

(State Key Laboratory of Dairy Biotechnology, Technology Center Bright Dairy & Food Co., Ltd, Shanghai 200436, China)

Abstract: Lipase-producing strain PM-1 was fermented. The lipase activity of the extracted solution from supernatant through ammonium sulphate precipitation, desalting and evaporation concentration was found to be 4.5 times of the untreated supernatant. The hydrolyzed cream by this lipase could improve milk flavor. Analysis of composition of free fat acid and volatile milk fat aroma showed that moderate-length chain and some long chain free fat acid in skimmed milk increased and the characteristic flavor substance increased significantly.

Key words: lipase; purification; flavor; application

脂肪酶即三酰甘油酰基水解酶, 它催化底物油脂水解, 生成脂肪酸、甘油和甘油单酯或二酯^[1]。脂肪酶被广泛应用于食品加工及风味改革中。在实际应用中, 提高酶的纯度在催化反应中存在重要的意义, 既可以快速有效地进行催化反应, 又可以对反应的可预测性起到增强作用, 能够对酶的理化性质和反应动力学性质更加准确的做出分析。

乳脂肪中的脂肪酸甘油三酯等被酶解成饱和及不饱和脂肪酸、酮酸等风味物质和风味物质前体, 可作为天然来源风味物质, 应用于焙烤食品、乳制品、糖果等食品中^[2,3], 以达到增加产品奶油香气、标准化不同生产批次产品感官特性等效果。

作者从天然干酪中筛选到了对乳脂肪有高度专一性的脂肪酶高产菌株 PM-1, 本文将该菌株所产脂肪酶进行初步的分离纯化, 而后验证了酶解稀奶油产物用于改善脱脂乳风味的效果。从而确定了该菌株及其

收稿日期: 2012-07-19

作者简介: 苗君莅 (1979-), 女, 工程师, 研究方向: 乳品加工

脂肪酶的应用效果和价值, 为脂肪酶的进一步提纯奠定基础, 为脂肪酶的工业化生产提供了可能。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

自筛菌株 PM-1。

1.1.2 培养基^[3-4]

液体产酶培养基 (g/L): 蛋白胨 5.0, 酵母浸膏 1.5, 氯化钠 5.0, 可溶性淀粉 1.0, 磷酸氢二钾 2.5, 乳化稀奶油 25.0。

1.1.3 试剂和仪器

蛋白胨、酵母膏、可溶性淀粉、磷酸氢二钾、聚乙烯醇、硫酸铵: 均为分析纯, 购自上海国药化学试剂有限公司。稀奶油: 食品级, 光明乳业乳品二厂。

数显恒温搅拌循环水箱 HH-60, 常州国华电器有限公司; 恒温培养振荡器 ZHWY-200, 上海智城分析仪器制造有限公司; 恒温恒湿培养箱 KBF115, 德国

宾得公司。

1.2 方法

1.2.1 脂肪酶活力测定^[5]

A、B两个锥形瓶，A为空白对照，B为样品瓶。分别在两个瓶中加入5 mL磷酸缓冲液和4 mL稀奶油乳化液，28 °C水浴保温5 min，在B瓶中加入1 mL酶液。反应10 min，取出后立即在两瓶中都加入95%的乙醇15 mL，在A瓶中加入1 mL酶液。滴加3滴酚酞，用0.05 mol/L NaOH滴定。

$$\text{酶活力(U/mL)} = (V - V_0) / t \times 50$$

式中：V-滴定样液所消耗的NaOH体积(mL)；V₀-滴定空白样液所消耗的NaOH体积(mL)；T-反应时间(min)；N-样品的稀释倍数。

1.2.2 粗酶液的提取^[6]

1.2.2.1 发酵液的收集

将菌株 PM-1 种子液以 2% 接种量接入液体产酶培养基中，摇床 180 r/min、28 °C，培养 72 h。

1.2.2.2 盐析范围的确定

发酵液 12000 r/min 离心 10 min 后，取上清液加入 20% 饱和度的硫酸铵，搅拌 2 h，静置过夜，12000 r/min 离心 10 min，将沉淀的蛋白重新溶解于 pH 7.5 的磷酸缓冲液中，测液体酶活。上清液以相同的方法加入 40% 饱和度的硫酸铵，以此类推再分别测定 60%、80%、100% 饱和度硫酸铵沉淀蛋白的酶活，以此确定最适的硫酸铵沉淀饱和度。

1.2.2.3 粗酶液纯化提取

用最适饱和度的硫酸铵沉淀发酵上清液中蛋白，离心后将蛋白沉淀重新溶于 pH 7.5 的磷酸盐缓冲液中，置于透析袋透析脱盐，再将透析液于 50 °C 旋转蒸发，得到浓缩粗酶液。

1.2.3 酶解稀奶油的应用

将粗酶液以 5% 的接入量加至灭菌稀奶油中，摇床培养，180 r/min，28 °C，24 h 后，95 °C 水浴保温 10 min 灭酶。将酶解产物分别以 0.5% 添加量，加入至 90% 脱脂乳中，加热→搅拌→均质→杀菌→冷却，品尝风味改变方向和改变程度。

1.2.4 酸值的测定

通过对乳脂肪酸价的测定来衡量乳脂肪水解程度。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/T 5530-2005)。

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

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)。

1.2.5 感官评价

参照GB/T 14454.2-2008对加入酶解产物的牛奶进行感官评定。

香气评定结果用分数表示(满分为40分)，选用纯正(39.1分~40.0分)、较纯正(36.0分~39.0分)、可以(32.0分~35.9分)、尚可(28.0分~31.9分)、及格(24.0分~27.9分)和不及格(24.0分以下)表述。

1.2.6 固相微萃取(SPME)

萃取条件：萃取温度70 °C；萃取时间30 min；平衡时间30 min；解析时间3 min。

1.2.7 GC-MS条件^[7-9]

1.2.7.1 色谱条件

进样口温度：250 °C；色谱柱型号：HP-INnowax, 60 m×0.25 mm×0.25 μm；进样条件：60 °C，保持2 min，2 °C每分钟到180 °C，5 °C每分钟到230 °C，保持20 min；进样方式：不分流进样；载气：He，流速：1 mL/min。

进样量1 μL。

1.2.7.2 质谱条件

离子源：230 °C，四级杆温度：150 °C。

1.2.8 统计分析与数据处理

化合物经计算机检索同时与NIST library (107k Compounds)和Wiley Library (320k Compound Version 6.0)相匹配，仅选取匹配度和纯度大于800(最大值1000)的鉴定结果，并采用相对百分含量按峰面积归一化法计算。

2 结果与讨论

2.1 脂肪酶粗品的盐析范围

对发酵上清液进行硫酸铵分级沉淀，结果见图1。当硫酸铵饱和度在40%以下时，沉淀的酶活力很小；当硫酸铵饱和度为60%时，沉淀的酶活最高；而当硫酸铵饱和度为60%以上时，沉淀酶活明显降低。因此，确定硫酸铵饱和度范围为60%。

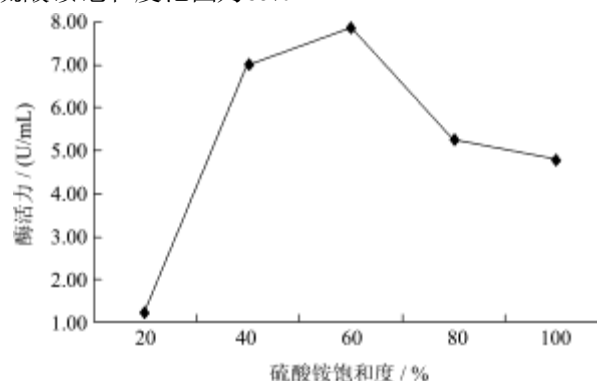


图1 硫酸铵分级沉淀

Fig.1 Ammonium sulfate fractional precipitation

2.2 粗酶液的酶活

硫酸铵沉淀的活性蛋白，经过溶解、透析脱盐、蒸发浓缩后，滴定法测得的酶活力为8.77 U/mL，是发酵上清液酶活力（1.95 U/mL）的4.5倍。

2.3 酶解稀奶油的应用效果

2.3.1 感官评价

将酸值13.00 mg/g的酶解产物以0.5% (V/V)添加量加入至90%脱脂乳中，制得的增香牛奶感官评价分数均为39.0分以上。因此判断，此脂肪酶酶解稀奶油产物能够改进脱脂乳风味，达到了良好的增香效果。

2.3.2 游离脂肪酸的变化

乳脂肪酸中的中短链(≤C14)及部分长链(>C14)脂肪酸是乳类食品重要的香气来源。

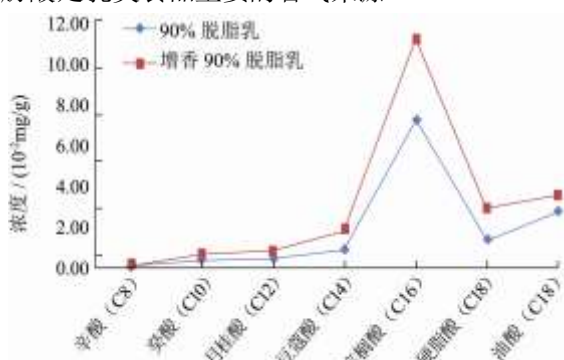


图2 90%脱脂乳增香前后游离脂肪酸 (FFA) 含量比较

Fig.2 Comparison of FFA in skimmed milk and developed flavor skimmed milk

由图2可知，所提脂肪酶酶解稀奶油产物加入脱脂乳中，使脱脂乳中的总游离脂肪酸有了明显增长，其中，C14-C18的中长链脂肪酸增长更是显著，而这些偶数碳的中长链脂肪酸正是乳中的重要成香物质。由此可见，该脂肪酶作用于稀奶油，可分解出大量与乳香相关的中长链脂肪酸等成分，以此可用于相关产品的风味改进。

2.3.3 挥发性风味物质变化^[10]

乳脂肪中的脂肪酸甘油三酯在脂肪酶的作用下水解成各种饱和及不饱和脂肪酸，酮酸进一步反应可以生成酮类物质，羧酸生成内酯类物质，都对乳香的贡献很大。同时，C4~C12脂肪酸和烯酸类物质及其反应产物又是影响乳香的主要物质。

通过对90%脱脂乳及添加酶解产物（增香）的90%脱脂乳的风味物质测定，对奶香贡献较大的特征性风味物质增长了一倍以上，其中，除作为乳香重要组成成分的中、短链及部分长链游离脂肪酸增长外，具有奶油甜味的酮类、对奶香有特别贡献的酯类^[11]、以及醛类都有显著增长。因此，从挥发性风味物质的角度证明了该脂肪酶酶解产物的加入，改进了90%脱脂乳的风味。

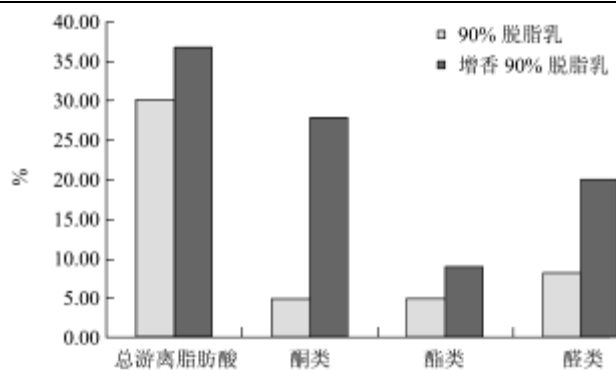


图3 90%脱脂乳增香前后主要特征性风味物质的比较

Fig.3 Comparison of characteristic flavor components in skimmed milk and developed flavor skimmed milk

表1 90%脱脂乳增香前后部分特征性风味物质的比较

Table 1 Comparison of some flavor components in skimmed milk and developed flavor skimmed milk

检出的风味物	风味物质含量/%		
	90%脱脂乳	增香 90%脱脂乳	
酮类	2-戊酮	0.31	7.26
	2-庚酮	2.69	4.97
	2-壬酮	0.93	5.13
	2-十一酮	0.24	5.17
	酮类总量	4.86	28.01
酸类	乙酸	1.67	1.20
	丁酸	10.21	11.26
	辛酸	0.14	0.14
	癸酸	11.35	11.77
	十二酸	3.01	4.76
	酸类总量	30.05	36.80
酯类	乙酸异戊酯	3.01	6.54
	丁位己内酯	0.21	0.93
	辛酸乙酯	0	0.583
酯类总量	4.92	9.03	
醛类	己醛	3.835	1.093
	辛醛	0.64	2.60
	壬醛	1.88	4.97
	癸醛	0.79	6.85
	醛类总量	8.08	19.92

3 结论

将对乳脂肪有高度专一性的脂肪酶高产菌株PM-1发酵，上清液经硫酸铵沉淀、透析脱盐、蒸发浓缩后获得的粗酶提取液酶活8.77 U/mL，是发酵上清液的4.5倍。将粗酶液发酵稀奶油产物用于90%脱脂乳中，对其风味改善进行感官评定，效果良好。通过对增香前后90%脱脂乳中的游离脂肪酸和挥发性风味物质进行比

较,作为乳香重要成分的中链及部分长链脂肪酸显著增加,特征性风味物质总量增长一倍以上,具有奶油味、奶味的醛类、酮类及酯类显著增加,因而,从原理上解释了90%脱脂乳风味得到改善的原因,证明了该脂肪酶可用于增强乳品相关风味的应用前景。从而,为该菌株及所产脂肪酶的进一步提纯与应用奠定了基础。

参考文献

- [1] Haki GD, Rakshit SK. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review [J]. *Bioresource Technology*, 2003, 89(1): 17-34
- [2] 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
- [3] 曾璐,林亲录,王伟.脂肪酶产生菌产酶条件的研究[J].*现代食品科技*.2007,23(7):15-21
- [4] Vijay G, Debabrata D. Lipase fermentation: progress and prospects [J]. *Indian Journal of Biotechnology*, 2005, 4: 437-445
- [5] L Chen, T Coolbear, R M Daniel. Characteristics of proteinases and lipases produced by seven *Bacillus sp.* isolated from milk powder production lines [J]. *International Dairy Journal*, 2004, 14: 495-504
- [6] 尚喜雨,柯涛,王玲玲,等.产脂肪酶酵母的筛选及菌种鉴定[J].*安徽农业科学*,2010,38(20):10512-10513
- [7] 郭冉冉.高产脂肪酶菌株的筛选及酶学性质的研究[D].重庆:西南大学,2010
- [8] 刘志东,王荫榆,郭本恒,等.酶解方式对黄油酶解物风味物质的影响[J].*食品工业科技*,2010,10:68-71
- [9] 侯园园.酶处理对天然乳脂组成和风味的影响研究[D].无锡:江南大学,2008
- [10] 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,2001
- [11] Roberts D D, Pollien P. Relative influence of milk components on flavor compound volatility [J]. *Symp. Ser.*, 2000, 763: 321-332
- [12] 鲁玉侠.胰脂肪酶固定化及其水解天然黄油制备奶香底料的研究[J].*现代食品科技*,2011,27(6):655-657