

基于筛选双菌种的大米-牛奶双蛋白酸奶的研制

万红霞¹, 孙海燕², 刘冬²

(1. 广州城市职业学院食品系, 广东广州 510405) (2. 深圳职业技术学院应用技术研究院, 广东深圳 518055)

摘要: 以大米蛋白水解物和全脂乳粉为主要原料, 自筛菌种(谷糠乳杆菌和乳酸乳球菌乳酸亚种)为发酵剂, 感官评定、发酵酸度、黏度为评价指标, 对大米-牛奶双蛋白酸奶的培养基、发酵工艺条件和食品添加剂进行初步研究。结果表明, 发酵培养基: 大米蛋白水解物(水解度 7.5%)添加量在 40%以下(乳粉蛋白 60%以上)发酵的酸奶感官评分均在 70 分以上。最佳发酵工艺条件: 菌种配比 2:1(谷糠乳杆菌: 乳酸乳球菌乳酸亚种), 大米蛋白与乳粉蛋白百分比 30:70, 接种量 3%, 培养温度 42℃。最佳食品添加剂: 蔗糖最佳添加量为 4%~6%, 增稠剂最佳组合为 0.15%果胶+0.60%明胶或 0.40%明胶+0.60% HPDSP。在最佳培养基、食品添加剂和工艺条件下发酵 10 h 可制备的大米-牛奶双蛋白酸奶具有凝乳状态稳定、色泽均匀、口感细腻、米香风味良好等特点。

关键词: 大米-牛奶双蛋白酸奶; 乳酸菌菌种; 大米蛋白水解物

文章编号: 1673-9078(2019)010-225-234

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.10.031

Preparation of Rice-milk Dual Protein Yogurt Based on Screening Two *Lactobacillus* Strains

WAN Hong-xia¹, SUN Hai-yan², LIU Dong²

(1. Food Department, Guangzhou City Polytechnic, Guangzhou 510405, China)

(2. Applied Technology Research Institute, Shenzhen Polytechnic, Shenzhen 518055, China)

Abstract: The fermentation medium and process conditions of rice-milk dual protein yogurt were optimized by using rice protein and whole milk powder as the main raw materials, self-screening bacterium (*Lactobacillus farraginis* and *Lactococcus lactis subsp. Lactis*) as fermentation strains. Sensory evaluation, fermentation acidity and viscosity were used as the evaluation standard. The results showed that the fermentation medium was that rice protein hydrolysate (7.5% degree of hydrolysis) was added below 40% (protein powder by more than 60%). The best fermentation conditions as follows: the breeding ratio of *Lactobacillus farraginis* and *Lactococcus lactis subsp. Lactis* of 2:1, the percentage of rice protein and milk protein of 30:70, the inoculation amount of 3%, and the culture temperature of 42℃. The best food additives were that the optimal adding amount of sucrose is 4%~6%, and the optimal adding combination of thickener is 0.15% pectin +0.60% gelatin or 0.40% gelatin +0.60% HPDSP. The stable curd, uniform color, delicate taste, and distinct rice flavorrice-milk dual protein yogurt could be obtained under the optimum medium, food additives and process conditions.

Key words: rice-milk dual protein yogurt; lactobacillus species; rice protein hydrolysate

酸奶因其独特的风味、爽滑的质构、较高的营养价值和良好的保健功能而一直深受国内外消费者的青睐。目前市场上的酸奶以新鲜牛奶或奶粉为原料发酵生产而成, 但由于在牛奶发酵制成酸奶过程中乳糖只有 20%~30%被分解, 对于乳糖较严重不耐受消费者仍然会引起腹泻等不良反应, 且牛奶原料价格较高导致酸奶产品价格较贵, 一直影响我国居民尤其是中低收入居民的消费。

收稿日期: 2019-06-12

基金项目: 深圳市科技计划项目(JCYJ20170818115059178); 深圳市科技创新计划项目(CXZZ20130517145458596); 广州社区教育项目(2019SQJY032)

作者简介: 万红霞(1984-), 女, 助理研究员, 研究方向: 食品生物技术

通讯作者: 刘冬(1968-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物技术

多年来许多研究者尝试用植物蛋白完全或部分替代奶粉, 开发植物蛋白酸奶或活性乳酸菌饮料。其中研究最多的是用大豆蛋白为原料完全替代或部分替代牛奶制造大豆酸奶^[1-4], 但由于脱腥技术和酸涩的口感未能彻底解决, 至今仍难以产业化。大米蛋白是一种公认的营养价值高而过敏性低的优质食用蛋白^[5-8], 其氨基酸组成平衡合理, 接近WHO/FAO推荐模式。具有抗高血压、降胆固醇、抗糖尿病、抗癌变等多种重要保健功能^[9-12], 大米蛋白的功能特性可与酪蛋白相提并论, 特别适合作为开发婴幼儿食品和特殊人群营养食品的基料^[13,14]。因此, 大米蛋白无论是从营养角度还是价格成本, 都可作为新型蛋白原添加于酸奶制品中。

课题组前期筛选出两株乳酸菌谷糠乳杆菌 (*Lactobacillus farraginis*, 简称LF) 和乳酸乳球菌乳酸亚种 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, 简称LL.L), 本文以大米蛋白水解物和全脂乳粉为主要原料, 对探讨了用大米蛋白水解物部分替代全脂乳粉基于筛选菌株发酵生产大米-牛奶双蛋白酸奶的可行性, 并优化大米-牛奶双蛋白酸奶的培养基配方和发酵工艺条件。既很好利用了大米蛋白的营养价值和保健作用, 满足了消费者对益生菌类食品的多样化需求, 又能降低了产品价格, 产品具有广阔的市场前景。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

谷糠乳杆菌 (*Lactobacillus farraginis*) 筛选自新疆伊宁市奶疙瘩; 乳酸乳球菌乳酸亚种 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) 筛选自法国奶酪; 全脂乳粉 (蛋白含量 24.26%, 乳糖含量 39.10%) 产地为新西兰; 大米蛋白 (蛋白质含量 76.35%) 由深圳市银波米业有限公司提供; 碱性蛋白酶 Alcalase 2.4 L 购自丹麦诺维信有限公司; 蔗糖 (食品级)、增稠剂, 果料等由绿雪生物工程 (深圳) 有限公司提供; 其它试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

5417R离心机, 德国Eppendorf公司; DYY-7B行电泳仪, 北京六一仪器厂; EUROSTAR digital型搅拌机, 德国IKA公司; 877型Titrimo plus自动电位滴定仪, 瑞士Metrohm中国有限公司; GJJ型动态超高压均质泵, 上海诺尼轻工机械有限公司; BSC-1300 II A2系列生物安全柜, 苏净安泰空气技术有限公司; SS-325型高压蒸汽灭菌锅, 上海申安医疗器械; NDJ-1型旋转粘度计, 上海精密科学仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 菌种的筛选

分别从奶疙瘩 (产地新疆伊宁市) 和奶酪 (产地法国) 进行乳酸菌菌种筛选, 筛选流程如下:

样品前处理-稀释涂布分离-划线培养纯化-革兰氏染色镜检-过氧化氢酶实验-CO₂产气实验-糖发酵实验 (API 试剂盒鉴定)-16S rDNA PCR 扩增-数据库比对-全脂乳培养基凝固实验 (添加 20% 大米蛋白) 筛选

16S rDNA PCR 扩增实验基因组 DNA 提取: 在酒精灯火焰旁取培养基上的菌株于研钵, 液氮研磨。将研磨好的菌至 1.5 mL 离心管中, 加入 0.6 mL TE (pH

8.0), 用枪头吸打均匀, 使菌体充分悬浮。加入 250 μ L 10% SDS, 混匀。加入 3 μ L 蛋白酶 K (20 ng/ μ L), 混匀, 37 $^{\circ}$ C 水浴 1 h。加入 150 μ L 5 mol/L NaCl, 混匀。加入 150 μ L 2% CTAB, 混匀, 65 $^{\circ}$ C 水浴 20 min。12000 r/min 离心 20 min。吸取上清至 1.5 mL 离心管, 加入等体积异丙醇, 混匀, 放置 30 min, 12000 r/min, 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min。吸掉上清, 在吸水纸上空干液体, 加 750 μ L 70% 乙醇, 轻弹管壁, 使沉淀悬浮并反复颠倒几次, 12000 r/min, 4 $^{\circ}$ C 离心 2 min。每管加入 30 μ L 纯化水溶解沉淀 (水中加 Rnase, 终浓度 10 ng/ μ L), 用手轻弹管壁, 4 $^{\circ}$ C 溶解过夜。进行 DNA 电泳检测, PCR 扩增 (35 个循环), 16S 引物序列为 27f: AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 和 1492R: TACGGYTACCTTGTTACGACTT, 电泳 PCR 产物鉴定, 上机测序, 输出峰图。

1.3.2 培养基的优化

1.3.2.1 菌种活化

分别取适量谷糠乳杆菌 (LF) 或乳酸乳球菌乳酸亚种 (LL.L) 接种于灭菌后冷却至 40 $^{\circ}$ C~45 $^{\circ}$ C 的全脂乳培养基中 (蛋白含量为 3%), 于 40 $^{\circ}$ C 恒温培养至全脂乳呈凝固状态, 连续活化 3 代后的菌种可用于发酵。

1.3.2.2 大米蛋白水解度对大米-牛奶双蛋白酸奶发酵的影响

将水解度分别为 0% (即大米蛋白)、2.50%、5%、7.50%、10%、12.50%、15% 的大米蛋白水解物干粉与乳粉按蛋白百分比 20:80 制成大米蛋白水解物乳粉培养基 (蛋白总含量保持为 3%, 以下简称基础培养基), 补加乳糖至培养基中乳糖终浓度与全脂乳相同, 30 MPa 循环均质 3 次, 105 $^{\circ}$ C 灭菌 20 min。将已活化的 LF 菌种或 LL.L 菌种按 5% 接种量分别接种至不同水解度的大米蛋白水解物乳粉培养基中 40 $^{\circ}$ C 发酵 10 h, 发酵结束后将产品置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱 12 h 进行后熟发酵得发酵终产品, 对产品进行测定酸度和感官评分。

1.3.2.3 大米蛋白水解物添加比例对大米-牛奶双蛋白酸奶发酵的影响

将 7.5% 的大米蛋白水解物干粉与乳粉按蛋白百分比 0:100、5:95、10:90、15:85、20:80、25:75、30:70、35:65、40:60 制成基础培养基, 其它操作同 1.3.4.1。

1.3.3 发酵工艺条件的优化

在前期单因素试验的基础上, 确定 LF 菌和 LL.L 菌配比 (X_1)、大米蛋白与乳粉蛋白百分比 (X_2)、接种量 (X_3) 和培养温度 (X_4) 是影响大米-牛奶双蛋白酸奶感官的主要因素, 采用的 $U_9(9^4)$ 均匀试验因素水平表 (表 1), 发酵 10 h 并后熟, 进行感官评分。

表 1 $U_9(9^4)$ 均匀试验因素水平表

Table 1 Uniform experimental factor and level table

水平	X_1	X_2	$X_3/\%$	$X_4/^\circ\text{C}$
1	6:2(1)	22.5:77.5(2)	3.5(4)	43(7)
2	6:3(2)	27.5:72.5(4)	5.5(8)	41(5)
3	6:4(3)	32.5:67.5(6)	3.0(3)	39(3)
4	6:5(4)	37.5:62.5(8)	5.0(7)	37(1)
5	6:6(5)	20:80(1)	2.5(2)	44(8)
6	5:6(6)	25:75(3)	4.5(6)	42(6)
7	4:6(7)	30:70(5)	2.0(1)	40(4)
8	3:6(8)	35:65(7)	4.0(5)	38(2)
9	2:6(9)	40:60(9)	6.0(9)	45(9)

1.3.4 食品添加剂的优化

1.3.4.1 蔗糖的优化 (凝固型和搅拌型大米-牛奶双蛋白酸奶)

将 7.5% 水解度的大米蛋白水解物干粉与乳粉按蛋白百分比 30:70 制成基础培养基 (下同), 在培养基中分别添加 0%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8% 的蔗糖, 将已活化的 LF 菌种和 LLL 菌种按配比 2:1 和接种量 3% (下同) 分别接种至不同蔗糖添加量的基础培养基中, 42 °C 发酵 10 h 并后熟, 进行酸度测定和感官评分。

1.3.4.2 增稠剂的优化 (搅拌型大米-牛奶双蛋白酸奶)

表 2 二次正交旋转组合设计因子水平编码表

Table 2 Quadratic orthogonal rotation combination design factor and level coding table

水平/z	果胶/%	明胶/%	HPDSP/%
+1.4142	0.22	0.64	0.64
+1	0.20	0.60	0.60
0	0.15	0.50	0.50
-1	0.10	0.40	0.40
-1.4142	0.08	0.36	0.36
Δ_j	0.05	0.10	0.10

单因素试验: 在基础培养基中加入 5% 的蔗糖, 分别选用一种增稠剂按不同百分比 (0%、0.05%、0.10%、0.15%、0.20%、0.30%、0.40%、0.50%) 加入培养基中, 将 LF 菌和 LLL 菌接种至培养基中, 发酵 10 h 并后熟, 进行黏度测定和感官评定。双因素试验: 明胶、果胶、HPDSP 的添加量 (水平) 见表 2, 三种增稠剂按二次正交旋转组合设计 (见表 3) 两两进行复配, 发酵后熟, 进行黏度测定和感官评定。

1.3.5 大米蛋白水解物的制备

将大米蛋白粉加入蒸馏水制成大米蛋白悬浊液, 调 pH 值至 8.5, 65 °C, 400 r/min 搅拌充分溶胀 1 h, 加

入酶底比 (W/W) 为 1% 的碱性蛋白酶水解大米蛋白至所需水解度 (水解度的计算参考文献^[15]), 90 °C 灭酶 20 min 终止水解, 冷却至常温, 调 pH 值至 6.5 ± 0.2 , 将大米蛋白水解液浓缩冷冻干燥制成大米蛋白水解物干粉。

表 3 二次正交旋转组合设计表 (二因子)

Table 3 Quadratic orthogonal rotation combination design table (two factor)

试验号	Z_1	Z_2
1	1	1
2	1	-1
3	-1	1
4	-1	-1
5	-1.4142	0
6	+1.4142	0
7	0	-1.4142
8	0	+1.4142
9	0	0
10	0	0
11	0	0
12	0	0
13	0	0
14	0	0
15	0	0
16	0	0

1.3.6 酸度和黏度的测定

大米-牛奶双蛋白酸奶在 4 °C 冰箱进行 12 h 后熟发酵后, 酸度的测定采用食品安全国家标准 GB 5009.239-2016 进行, 黏度测定利用 NDJ-1 型旋转黏度计, 先用搅拌机搅拌均匀后 (搅拌转速为 350 r/min, 30~40 s), 对大米-牛奶双蛋白酸奶的黏度进行测定。

1.3.7 感官评定

发酵终产品由 12 位感官鉴别员分别评分, 取平均值。大米-牛奶双蛋白酸奶的感官评分表及其评分标准参考食品安全国家标准 GB 19302-2010, 并稍作修改 (见表 4)。感官得分达到 70 分以上即判断此大米-牛奶双蛋白酸奶合格。

1.3.8 统计分析

每次实验均做 3 次平行, 数据结果以平均值 \pm SD 表示, 用 Systat Sigmaplot v12.0 软件进行作图。实验数据的差异显著性用 SPSS 20.0 统计软件中 one-way ANOVA 法检验, $p < 0.05$ 视为有显著差异。均匀试验和二次正交旋转组合试验用 DPS 7.05 软件进行试验设计及数据分析。

表4 大米-牛奶双蛋白酸奶感官评分指标及标准

Table 4 Sensory evaluation index and standards of rice protein yogurt

感官特性	评分标准	得分
色泽	色泽均匀一致, 有光泽, 呈乳白色	16~20
	色泽较深, 均匀一致	11~15
	色泽较暗, 不均匀	0~10
组织状态	组织细腻, 质地均匀, 无乳清析出, 凝乳状态稳定	31~35
	组织较细腻, 有少量乳清析出, 凝乳状态较好	26~30
	组织粗糙, 有较多乳清析出, 凝乳状态欠佳	0~25
滋味和气 ^a	酸味/酸甜味适中, 口感柔滑细腻, 酸奶风味浓郁	41~45
	酸味/酸甜味偏重或轻, 口感较细腻, 酸奶风味良好	31~40
	酸味/酸甜味过重或轻, 口感粗糙, 酸奶风味欠佳	0~29

注: ^a未添加蔗糖的大米-牛奶双蛋白酸奶采用酸味标准, 添加蔗糖的大米-牛奶双蛋白酸奶采用酸甜味标准。

2 结果与分析

2.1 菌种的确定

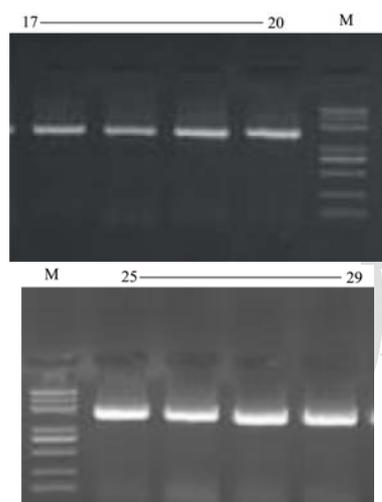


图1 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳检测结果

Fig.1 Detection results of agarose gel electrophoresis for PCR amplified products

根据 BLAST 进行微生物 DNA 序列比对结果显示, 从伊宁奶疙瘩样品中分离出的 4 株菌种 (图 1 编号 17~20) 分别与植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*, LP)、粪便肠球菌 (*Enterococcus faecium*, EF)、耐肠球菌 (*Enterococcus durans*, ED)、谷糠乳杆菌 (*Lactobacillus farraginis*, LF) 亲源关系最近。从法国奶酪样品分离出的 4 株菌种 (图 1 编号 25~29) 分别与野生原核生物 (*uncultured prokaryote*, UP)、乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*, LL)、假肠膜明串珠菌 (*Leuconostoc pseudomesenteroides*, LPM)、乳酸乳球菌乳酸亚种 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, LLL) 亲源关系最近。

将分离出的 8 株菌种经过凝固性实验 (培养基中

大米蛋白与乳粉蛋白百分比为 20:80) 进行筛选, 测定发酵 10 h 并后熟的酸度 (见图 2), 从菌种的发酵能力及菌株安全性考虑, 最终选择发酵大米-牛奶双蛋白酸奶的菌株分别为谷糠乳杆菌 (LF 菌) 和乳酸乳球菌乳酸亚种 (LLL 菌)。

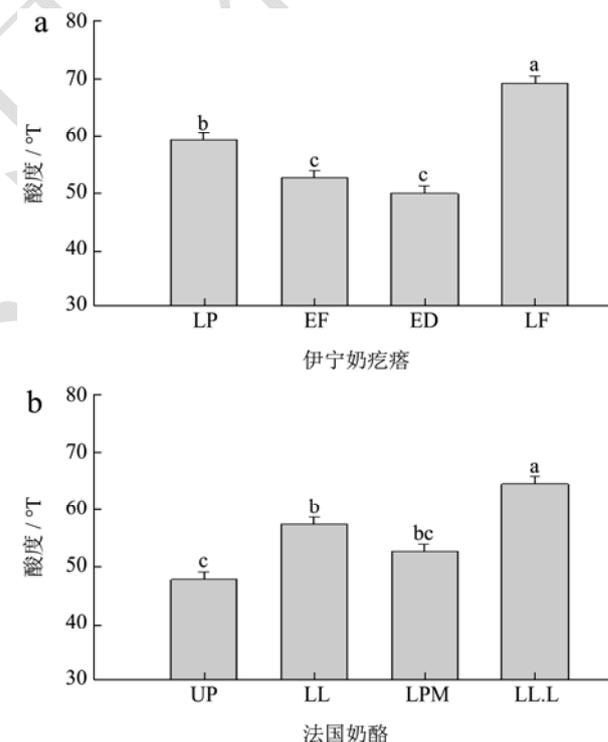


图2 蔗糖不同添加量对大米-牛奶双蛋白酸奶酸度和感官的影响

Fig.2 Effects of sucrose supplementation on the acidity and sensory of rice protein yogurt

注: 柱状图上无共同字母表示差异显著 ($p < 0.05$)。

2.2 培养基的优化

2.2.1 大米蛋白水解度对大米-牛奶双蛋白酸奶发酵的影响

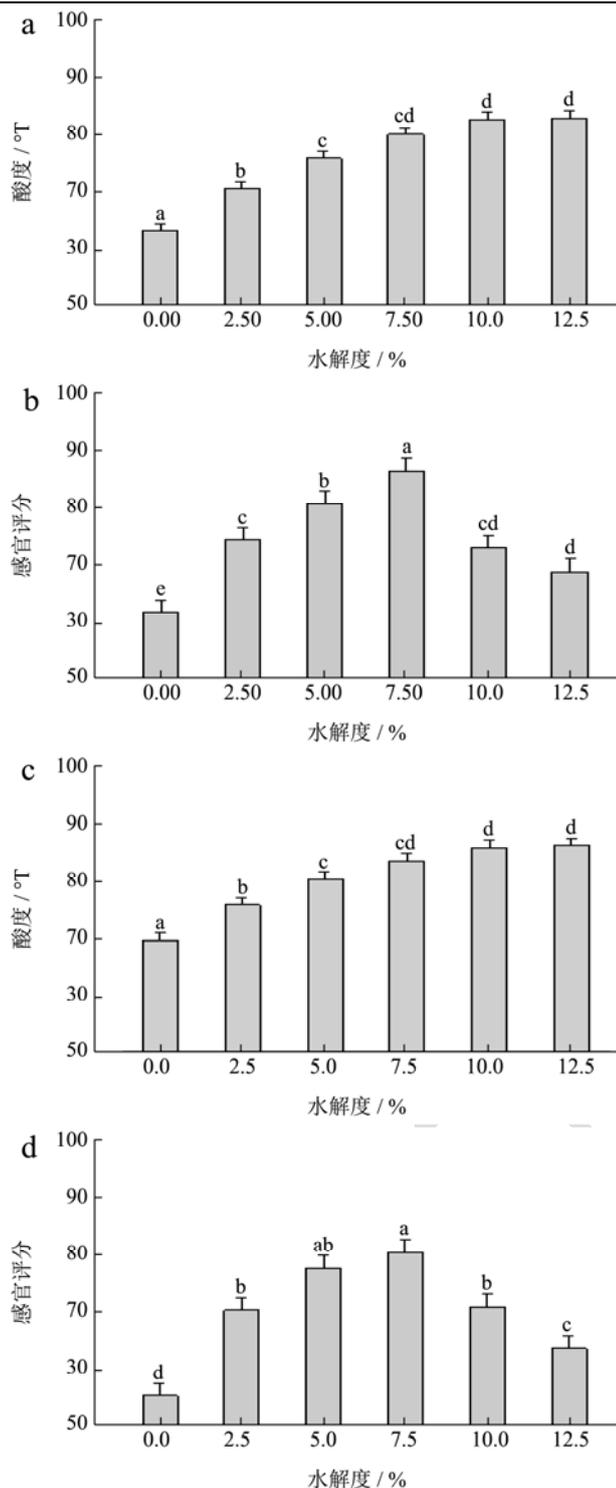


图3 不同水解度大米蛋白水解物对大米-牛奶双蛋白酸奶酸度和感官的影响

Fig.3 Effects of hydrolysis degree of rice protein on the acidity and sensory of rice protein yogurt

注：图a和b为LF菌发酵；图c和d为LL.L菌发酵；柱状图上无共同字母表示差异显著($p < 0.05$)。

不同水解度的大米蛋白水解物(20%添加比例)乳粉培养基经过LF菌或LL.L菌发酵10h并后熟,大米-牛奶双蛋白酸奶的酸度及感官评分如图3所示。由

图3a和3c可见,大米-牛奶双蛋白酸奶的酸度随着水解度的增大而显著升高,水解度至7.5%以后,酸度增加不再显著($p > 0.05$)。赵强忠等^[16]人研究也得到了相似的结果,经LF菌或LL.L菌发酵后0%水解度的大米-牛奶双蛋白酸奶的酸度最低,分别为 69.57 ± 1.18 °T和 63.23 ± 1.12 °T,水解度12.5%的酸度分别为 86.23 ± 1.26 °T和 82.93 ± 1.27 °T。结果表明,大米蛋白经水解后产生的大量氨基酸和多肽类物质更容易被乳酸菌利用,因而有利于大米-牛奶双蛋白酸奶的发酵。

由图3b和3d可见,用不同水解度的大米蛋白水解物乳粉培养基发酵制备的大米-牛奶双蛋白酸奶产品感官得分先随大米蛋白水解度的增加而升高随后又降低。经LF菌或LL.L菌发酵的大米-牛奶双蛋白酸奶在水解度为7.5%时的感官得分,最高为 85.35 ± 3.22 和 80.25 ± 2.37 ,其感官表现为色泽均匀,组织细腻,凝乳状态稳定,无乳清析出,酸味适中,口感细腻,无不良风味;当水解度超过7.5%后,产品苦味越来越重,12.5%水解度的产品感官得分分别为 68.15 ± 2.05 和 64.40 ± 2.14 。水解度增加口感劣变的主要原因是大米蛋白水解到一定程度产生了苦味肽,虽然经过乳酸菌发酵后苦味有一定降低,但仍有隐约苦味。因此,水解度以控制在7.5%以内为宜。

天然蛋白质的疏水性基团大部分都隐藏在内部,因而不会呈现苦味,然而随着蛋白质水解度的增加,这些疏水性基团和肽类末端氨基酸残基就会暴露出来而产生苦味,且水解度越高苦味会越浓重^[17,18]。有研究表明风味蛋白酶等外切酶可抑制苦味和涩味^[19,20],本研究也尝试了用风味水解酶对大米蛋白水解物进行脱苦实验,但实验表明基本没有脱苦效果。因此,若要抑制或降低大米蛋白水解物的苦味,需要将水解度控制在一定的范围,王威等^[21]人研究表明大米浓缩蛋白在水解度 $\geq 8\%$ 之后蛋白水解产物的开始出现苦味,控制水解度在6%以内可以防止苦味的出现。

2.2.2 大米蛋白水解物添加对大米-牛奶双蛋白酸奶发酵的影响

不同添加比例的大米蛋白水解物(水解度7.5%)乳粉培养基发酵产酸和感官变化情况如图4所示。由图4a和4c可见,基于LF菌或LL.L菌发酵的大米-牛奶双蛋白酸奶的酸度随大米蛋白水解物添加比例的增高而逐渐降低,张鸿儒等^[22]人研究大豆分离蛋白的不同添加比例对双蛋白酸奶pH影响的结果相一致,发酵10h后大米-牛奶双蛋白酸奶的凝乳状态均良好,当大米蛋白水解物添加比例达到40%时,大米-牛奶双蛋白酸奶的酸度分别为 73.29 ± 1.40 °T(LF菌)和 71.43 ± 1.23 °T(LL.L菌)。

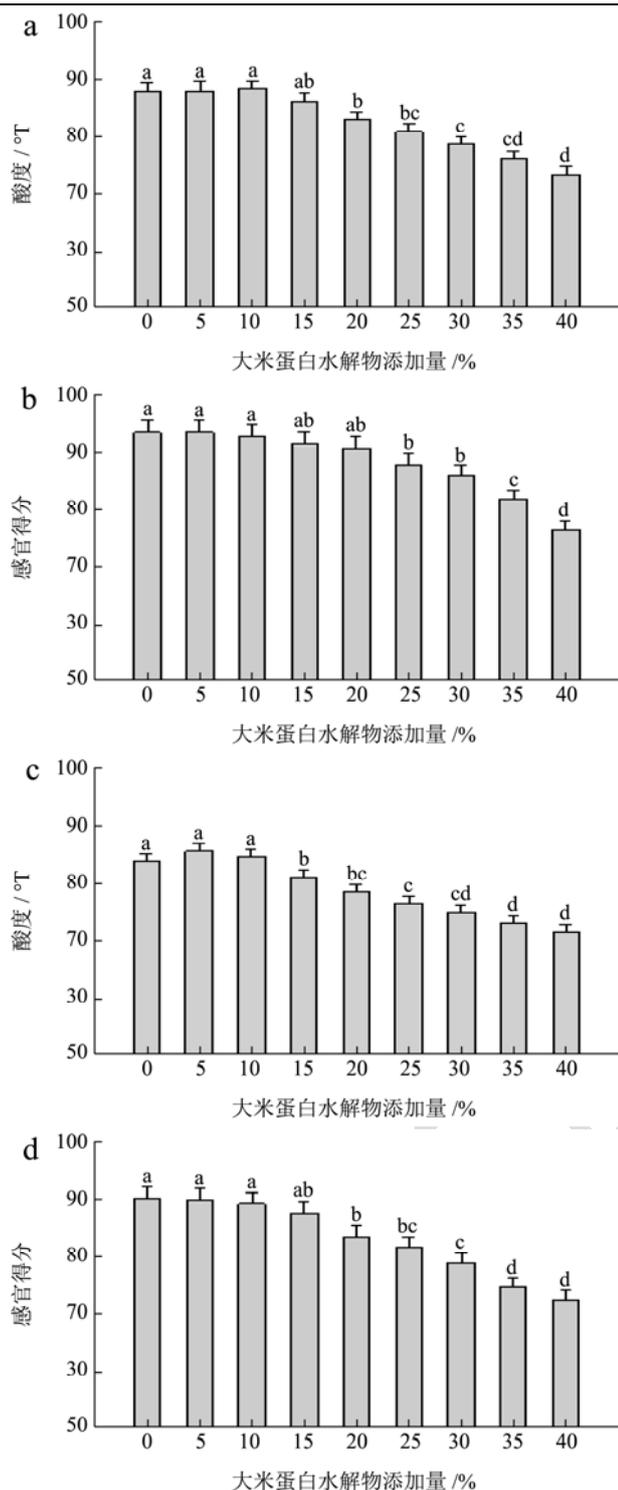


图4 大米蛋白水解物不同添加比例对酸度和感官的影响

Fig.4 Effects of different proportion of rice protein hydrolysates on the acidity and sensory

注：图 a 和 b 为 LF 菌发酵；图 c 和 d 为 LLL 菌发酵；柱图上无共同字母表示差异显著 ($p < 0.05$)。

由图 4b 和 4d 可见，大米-牛奶双蛋白酸奶的感官得分随大米蛋白水解物添加比例的增高而降低，康红艳等人^[23]研究凉薯添加比例对产酸影响在对感官影响影响凉薯因为其淀粉量高对产品起正作用，而大米

蛋白水解物在添加量大于 20% 时在感官影响中起到了副作用，其主要原因是大米蛋白水解到一定程度产生的苦味肽导致成品的口感发生了劣变。当大米蛋白水解物添加比例达到 40% 时，大米-牛奶双蛋白酸奶的感官得分分别为 76.30 ± 2.46 (LF 菌) 和 71.95 ± 1.84 (LLL 菌)，两者的感官得分均大于 70 分，即为合格的大米-牛奶双蛋白酸奶，其感官表现为色泽均匀，凝乳状态稳定性较好，无乳清析出，口感细腻，酸奶风味良好。但如果大米蛋白水解物添加比例进一步增加时，水解物的苦味将影响酸奶的口感和风味。因此，从大米-牛奶双蛋白酸奶的整体口感考虑，最多可添加 40% 大米蛋白水解物，即大米蛋白水解物与全脂乳粉的最高蛋白百分比为 40:60。

2.3 发酵工艺条件的均匀试验回归分析

按照表 1 中的均匀设计方案进行发酵工艺条件优化，发酵 10 h 后得到的大米-牛奶双蛋白酸奶各感官得分 (Y) 见表 5。

用 DPS 软件对均匀试验的感官结果进行二次多项式逐步回归分析，去除 $\alpha = 0.05$ 不显著项，得到的拟合方程如下：

$$Y = -492.5083 + 11.8607X_1 + 27.5777X_4 - 3.6024X_1^2 - 0.3437X_3^2 - 0.3370X_4^2 + 0.0415X_3X_4$$

表 5 均匀试验结果

Table 5 Uniform experimental results					
试验号	X ₁	X ₂	X ₃ / %	X ₄ / °C	Y
1	6:2	22.5:77.5	3.5	43	74±2
2	6:3	27.5:72.5	5.5	41	79±3
3	6:4	32.5:67.5	3.0	39	82±2
4	6:5	37.5:62.5	5.0	37	73±1
5	6:6	20:80	2.5	44	78±2
6	5:6	25:75	4.5	42	77±2
7	4:6	30:70	2.0	40	78±3
8	3:6	35:65	4.0	38	74±2
9	2:6	40:60	6.0	45	67±1

经过计算后最高指标时的各因素组合为：保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌配比为 1.5462，大米蛋白与乳粉蛋白百分比为 29.59:70.41，接种量为 2.978%，培养温度为 42.07 °C，此时大米-牛奶双蛋白酸奶的感官得分最高为 83.15 ± 2.73 。这与康红艳等人^[23]研究的正交试验优化得到的凉薯酸奶的最佳工艺条件有很多相似之处。在 LF 菌和乳 LL 菌配比为 2:1，大米蛋白与乳粉蛋白百分比为 30:70，接种量为 3%，培养温度为 42 °C 的优化条件下，经验证试验得到的大米-牛奶双蛋白酸奶感官得分为 84.65 ± 2.86 ，远超过均匀试验中

各组的感官得分,说明该均匀试验优化后的最优条件发酵的大米-牛奶双蛋白酸奶具有最高的感官得分,优化结果可靠。

2.4 食品添加剂的优化

2.4.1 蔗糖的优化(凝固型和搅拌型大米-牛奶双蛋白酸奶)

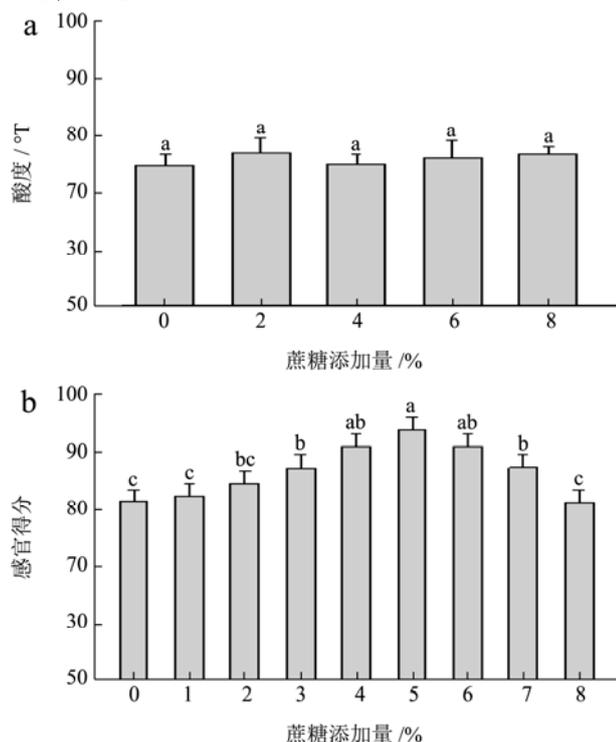


图5 蔗糖不同添加量对大米-牛奶双蛋白酸奶酸度和感官的影响

Fig.5 Effects of sucrose supplementation on the acidity and sensory of rice protein yogurt

注:柱图上无共同字母表示差异显著($p < 0.05$)。

由图 5a 可见,不同蔗糖添加量发酵后大米-牛奶双蛋白酸奶的发酵酸度无显著性差异($p > 0.05$),添加蔗

糖可显著影响大米-牛奶双蛋白酸奶的酸甜度并进而影响产品口感(见图 5b),感官得分最高的大米-牛奶双蛋白酸奶所添加的蔗糖量为最佳蔗糖添加量,蔗糖添加对发酵 10 h 大米-牛奶双蛋白酸奶的感官得分有显著性影响,其最佳蔗糖添加量为 4%~6%,最高感官得分分别为 92.85 ± 3.15 。该大米-牛奶双蛋白酸奶感官表现为色泽均匀一致,质地细腻,凝乳状态稳定,无乳清析出,口感细腻柔滑,酸甜味适中,且具有良好的米香味。康红艳等人^[23]研究发酵凉薯酸奶的实验表明,蔗糖添加量对凉薯酸奶的 pH 值和产酸量几乎没有影响,这与本实验的蔗糖对产酸能力影响相同。甜味剂添加量取决于感官评价,当蔗糖加量在 6% 时酸奶的风味最佳,这与本研究的蔗糖对感官的影响相一致。

2.4.2 增稠剂的优化(搅拌型大米-牛奶双蛋白酸奶)

2.4.2.1 单因素试验结果分析

由表 6 可知,单添加结冷胶、琼脂、HPDSP、明胶或果胶的大米-牛奶双蛋白酸奶黏度显著大于未添加增稠剂的产品,最大黏度分别为: 5567 ± 159 、 1683 ± 63 、 994 ± 37 、 967 ± 32 和 936 ± 30 MPa·s,其中结冷胶和琼脂添加量在 2% 以内时增稠效果不显著,2% 以上时黏度过大,严重影响大米-牛奶双蛋白酸奶的组织状态和口感。果胶在 2% 以内黏度呈上升的趋势,这与李星岩^[24]研究结果相一致,但是大于 2% 黏度则呈下降趋势。添加单个增稠剂大米-牛奶双蛋白酸奶的感官评分结果见表 7,单添加 HPDSP、明胶或果胶的大米-牛奶双蛋白酸奶感官得分显著大于未添加增稠剂的产品,最高感官得分分别为: 90.75 ± 3.56 、 89.55 ± 3.26 和 88.45 ± 3.31 。所以选定将 HPDSP、果胶和明胶两两复配后进行双因素优化。

表 6 单增稠剂添加对大米-牛奶双蛋白酸奶黏度的影响

Table 6 Effect of single thickener addition on viscosity of rice-milk dual protein yogurt

增稠剂	添加 0%	添加 0.05%	添加 0.1%	添加 0.15%	添加 0.2%	添加 0.3%	添加 0.4%	添加 0.5%
明胶	611±20	655±22	697±24	723±26	767±27	859±28	933±30	967±32
果胶	595±19	636±20	807±23	904±27	936±30	814±27	654±24	558±19
HPDSP	605±21	701±29	769±33	804±31	851±34	921±35	972±36	994±37
琼脂	617±17	631±22	647±22	656±21	855±32	902±36	1634±52	1683±63
PGA	608±20	338±11	351±10	377±12	361±12	336±10	364±11	387±12
CMCNa	585±18	556±14	429±12	401±10	233±6	188±4	194±5	212±7
阿拉伯胶	609±22	645±21	638±22	607±20	588±19	569±18	537±18	467±15
卡拉胶	592±19	380±10	406±12	462±14	554±15	499±14	376±11	389±12
瓜尔胶	601±20	226±8	181±7	175±7	159±6	135±4	189±6	166±5

转下页

接上页

黄原胶	593±19	625±22	291±10	229±7	189±6	180±5	169±6	191±7
刺槐豆胶	606±22	568±16	326±12	171±7	164±6	152±5	194±8	229±9
结冷胶	611±20	284±10	339±14	352±17	1200±53	4458±113	4855±135	5567±159

表 7 单增稠剂添加对大米-牛奶双蛋白酸奶感官得分的影响

Table 7 Effect of single thickener addition on sensory score of rice-milk dual protein yogurt

增稠剂	添加0.0%	添加0.05%	添加0.1%	添加0.15%	添加0.2%	添加0.3%	添加0.4%	添加0.5%
明胶	83.25±2.58	81.05±3.16	82.30±2.63	85.65±2.75	86.40±2.82	86.88±3.35	88.15±3.62	89.55±3.26
果胶	82.40±3.63	82.15±3.13	84.90±3.22	88.45±3.31	86.95±3.12	84.75±2.25	82.90±3.53	80.85±2.68
HPDSP	83.50±2.57	85.40±2.71	86.50±3.26	88.50±3.13	88.85±3.34	89.05±3.43	90.10±2.86	90.75±3.56
琼脂	83.45±2.63	84.95±3.22	77.55±2.85	67.40±3.29	62.45±2.70	50.15±1.82	42.80±2.58	37.55±1.79
PGA	82.85±3.15	78.45±2.74	74.85±2.73	71.75±3.55	65.50±3.68	61.58±2.57	57.55±2.69	55.30±2.87
CMCNa	82.35±2.53	82.75±3.41	81.70±3.42	77.55±2.59	65.30±2.49	61.10±2.93	55.60±1.94	51.20±1.69
阿拉伯胶	83.60±3.34	86.40±2.88	85.60±3.44	84.30±3.13	83.45±2.52	82.25±3.39	80.35±2.58	78.55±3.63
卡拉胶	82.45±2.89	80.90±3.41	77.35±2.64	74.35±2.81	70.25±3.32	64.05±2.73	61.20±2.48	57.10±2.67
瓜尔胶	83.20±3.27	64.50±2.86	51.25±2.35	46.75±2.76	41.75±1.71	37.20±2.48	35.00±1.56	34.50±1.57
黄原胶	82.55±2.84	65.80±3.48	63.50±2.74	45.60±1.85	40.85±2.84	36.45±2.68	31.35±1.58	26.35±1.79
刺槐豆胶	83.70±3.35	83.45±3.32	75.40±2.65	63.45±3.03	58.35±2.67	54.60±1.89	52.20±2.74	50.75±2.64
结冷胶	82.85±2.94	77.60±3.62	69.70±2.93	63.80±2.64	58.60±2.49	41.85±2.58	31.65±1.89	24.60±1.76

表 8 二次正交旋转组合试验的感官评定结果

Table 8 The sensory evaluation results of quadratic orthogonal rotation combination test

试验号	Z ₁	Z ₂	果胶和明胶	果胶和HPDSP	明胶和HPDSP
1	1	1	90.60±3.13	87.85±2.87	85.65±1.97
2	1	-1	87.50±2.57	85.40±1.67	85.45±3.28
3	-1	1	88.15±3.64	86.60±2.98	93.25±2.78
4	-1	-1	85.20±2.96	84.70±3.49	89.50±2.48
5	-1.4142	0	86.75±2.48	84.45±1.88	91.55±2.76
6	1.4142	0	87.60±3.42	85.65±2.98	85.35±1.86
7	0	-1.4142	88.35±2.68	86.85±1.79	88.70±3.47
8	0	1.4142	92.40±2.64	88.55±2.49	86.55±2.65
9	0	0	90.85±3.14	86.20±3.07	89.80±3.17
10	0	0	90.55±2.58	87.60±2.58	89.35±2.75
11	0	0	90.65±3.29	87.30±3.65	88.60±2.73
12	0	0	89.80±2.65	86.15±2.36	89.45±3.31
13	0	0	90.40±2.85	87.65±2.96	88.30±2.72
14	0	0	89.65±3.10	86.45±2.64	89.60±2.96
15	0	0	90.40±2.77	87.75±3.53	89.35±3.36
16	0	0	89.70±3.43	86.50±2.87	88.15±2.89

2.4.2.2 二次正交旋转组合试验结果分析

根据表 3 中的二次正交旋转组合设计方案进行试验,在相应浓度的增稠剂复配添加得到的大米-牛奶双蛋白酸奶各感官得分见表 8。

用 DPS 软件对二次正交旋转组合试验的感官评定结果进行二次多项式逐步回归分析,剔除 $\alpha=0.05$ 水平不显著项后,得到简化后的回归方程如下:

$$Y=91.0588+0.2524Z_1+1.1715Z_2-1.2442Z_1^2+0.0558Z_2^2-0.025Z_1Z_2 \text{ (果胶和明胶)}$$

$$Y=88.8225+0.3201Z_1+0.4741Z_2-1.5406Z_1^2+0.2969Z_2^2+0.065Z_1Z_2 \text{ (果胶和 HPDSP)}$$

$$Y=87.1163-2.2936 Z_1-0.3794Z_2+0.8763Z_1^2+0.1738Z_2^2-1.003 Z_1Z_2 \text{ (明胶和 HPDSP)}$$

根据编码公式: $Z_i = \frac{X_i - X_{i0}}{\Delta J_i}$

由果胶 $Z_1=20X_1-3$, 明胶 $Z_2=10X_2-5$,
 $Y=74.2663+156.852 X_1+6.885 X_2-497.68X_1^2+5.58X_2^2-5X_1X_2$;

由果胶 $Z_1=20X_1-3$, HPDSP $Z_2=10X_2-5$,
 $Y=80.0238+184.774X_1-26.899X_2-616.24X_1^2+29.69X_2^2+13 X_1X_2$;

由明胶 $Z_1=10X_1-5$, HPDSP $Z_2=10 X_2-5$,
 $Y=120.1188-10.266X_1+8.916X_2+87.63X_1^2+17.38X_2^2-20.6 X_1X_2$ 。

以大米-牛奶双蛋白酸奶感官得分为指标, 根据回归方程计算得到果胶和明胶复配添加时最佳组合为 0.154% 和 0.605%, 此时大米-牛奶双蛋白酸奶感官得分最高为 92.40 ± 2.64 。果胶和 HPDSP 复配添加时最佳组合为 0.161% 和 0.553%, 此时大米-牛奶双蛋白酸奶感官得分最高为 88.55 ± 2.49 。明胶和 HPDSP 复配添加时最佳组合为 0.392% 和 0.614%, 此时大米-牛奶双蛋白酸奶感官得分最高为 93.25 ± 3.78 。在果胶和明胶添加量分别为 0.15% 和 0.60%, 果胶和 HPDSP 添加量分别为 0.15% 和 0.55%, 明胶和 HPDSP 添加量分别为 0.40% 和 0.60% 的条件下, 经验证试验得到的大米-牛奶双蛋白酸奶感官得分分别为: 93.45 ± 3.32 , 88.70 ± 2.74 和 94.85 ± 3.59 。因此, 0.15% 果胶+0.60% 明胶或 0.40% 明胶+0.60% HPDSP 进行复配添加是较为理想的组合条件。

3 结论

3.1 从伊宁奶疙瘩和法国奶酪中筛选出适合大米-牛奶双蛋白酸奶的菌种为谷糠乳杆菌 (LF 菌) 和乳酸乳球菌乳酸亚种 (LL.L 菌)。用大米蛋白水解物部分替代乳粉制备基于 LF 菌或 LL 菌发酵的大米-牛奶双蛋白酸奶, 发酵酸度随着大米蛋白水解度的增加而增大, 但酸奶苦味也随之加重, 当水解度达到 7.5% 时, 产品感官最佳; 随着水解物添加比例的增加, 发酵酸度先增大其后逐渐减小, 酸奶产品的口感则逐渐变差。用 7.5% 水解度的大米蛋白水解物添加比例控制在 40% (以蛋白百分比计) 以内时, 可制备出感官评分在 70 分以上的大米-牛奶双蛋白酸奶。

3.2 通过均匀试验得出大米-牛奶双蛋白酸奶发酵最佳工艺条件为 LF 菌和 LL 菌配比 2:1, 7.5% 水解度的大米蛋白水解物与乳粉的蛋白百分比 30:70, 接种量 3%, 培养温度 42 °C。凝固型大米-牛奶双蛋白酸奶的蔗糖最佳添加量为 4%~6%, 通过二次正交旋转组合试验得出搅拌型大米-牛奶双蛋白酸奶的增稠剂添加最

佳组合为: 0.15% 果胶+0.60% 明胶或添加 0.40% 明胶+0.6% HPDS。在最佳培养基和工艺条件下发酵 10 h 可制备的大米-牛奶双蛋白酸奶具有凝乳状态稳定、色泽均匀、口感细腻、米香风味良好等特点。

参考文献

- [1] 董攀茗, 吕静, 于薇薇, 等. 凝固型大豆酸奶的加工工艺研究 [J]. 中国酿造, 2012, 31(10): 177-179
DONG Pan-ming, LYU Jing, YU Wei-wei, et al. The production process of set soybean yogurt [J]. China Brewing, 2012, 31(10): 177-179
- [2] 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
YU Qian. Studies on the effect of enzymatic catalysis on soy yogurt quality [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2015
- [3] 王新惠, 白婷, 张崑, 等. 发酵型紫薯大豆酸奶的研制 [J]. 食品研究与开发, 2015, 36(19): 71-74
WANG Xin-hui, BAI Ting, ZHANG Yin, et al. Fermentation technology for purple sweet potato juice soybean yoghurt [J]. Food Research and Development, 2015, 36(19): 71-74
- [4] 王红燕, 张锐生, 金选东, 等. 凝固型大豆酸奶发酵剂的筛选及工艺优化 [J]. 中国奶牛, 2015, 22: 35-39
WANG Hong-yan, ZHANG Rui-sheng, JIN Xuan-dong, et al. Screening starters and optimizing technology of the production of soybean yogurt [J]. China Dairy Cattle, 2015, 22: 35-39
- [5] Shih F F, Daigle K W. Preparation and characterization of rice protein isolates [J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2000, 77(8): 885-889
- [6] Tang S, Hettiarachchy N S, Horax R, et al. Physicochemical properties and functionality of rice bran protein hydrolyzate prepared from heat-stabilized defatted rice bran with the aid of enzymes [J]. Journal of Food Science, 2003, 68(1): 152-157
- [7] Tatsuya M, Shuhachi K. Mass production method for rice protein isolate and nutritional evaluation [J]. Journal of Food Science, 1993, 58(6): 1393-1396
- [8] 潘菁, 汪何雅, 钱和. 大米过敏蛋白的研究进展 [J]. 食品科技, 2012, 37(5): 126-128
PAN Jing, WANG He-ya, QIAN He. Advances of rice allergen proteins [J]. Food Science and Technology, 2012, 37(5): 126-128
- [9] Morita T, Oh-Hashi A, Kasaoka S, et al. Rice protein isolates produced by the two different methods lower serum

- cholesterol concentration in rats compared with casein[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1996, 71(4): 415-424
- [10] Zhang Hui-Juan, Yokoyama W H, Zhang Hui. Concentration-dependent displacement of cholesterol in micelles by hydrophobic rice bran protein hydrolysates [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2011, 92(7): 1395-401
- [11] 王章存,催胜文,袁道强,等.高压处理大米蛋白酶解过程中糖-蛋白结合特性的变化[J].食品工业科技,2013,34(15): 100-103
WANG Zhang-cun, CUI Sheng-wen, YUAN Dao-qiang, et al. Characteristics of saccharide-protein linkage in the enzymatic hydrolysis of rice protein pretreated with high hydrostatic pressure [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(15): 100-103
- [12] 钱莹,段钢.不同大米蛋白降低胆固醇及抗疲劳作用的功能性研究[J].食品工业科技,2013,34(5):341-346
QIAN Ying, DUAN Gang. Functional study of different rice protein concentrate effect on cholesterol level and anti-fatigue [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(5): 341-346
- [13] Chandi G K, Sogi D S. Functional properties of rice bran protein concentrates [J]. Journal of Food Engineering, 2007, 79(2): 592-597
- [14] Clemente A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition[J]. Trends in food science and technology, 2000, 11(7): 254-262
- [15] 吕乐.酶膜耦联制备米糠小分子肽工艺研究[D].乌鲁木齐:新疆农业大学,2014,39-40
LYU Le. Preparation of rice bran small peptide by using enzyme membrane coupling technology [D]. Urumqi, Xinjiang Agricultural University, 2014, 39-40
- [16] 赵强忠,黄丽华,陈碧芬,等.大豆分离蛋白酶解产物对自制酸奶品质的影响[J].华南理工大学学报(自然科学版),2019, 47(3):85-91
ZHAO Qiang-zhong, HUANG Li-hua, CHEN Bi-fen, et al. Influences of soybean protein isolate hydrolysate on the quality of laboratory prepared yoghurt [J]. Journal of South China University of Technology (Natural Science Edition), 2019, 47(3): 85-91
- [17] Fitzgerald R J, Cuinn G O. Enzymatic debittering of food protein hydrolysates [J]. Biotechnology Advances, 2006, 24(2): 234-237
- [18] 肖莲荣,任国谱.大米蛋白改性研究进展[J].食品与发酵工业,2012,38(2):151-156
XIAO Lian-rong, REN Guo-pu. Research progress on rice protein modification [J]. Food and Fermentation Industry, 2012, 38(2): 151-156
- [19] 周雪松.蛋白质酶解物苦味形成机理及控制研究[J].粮食与油脂,2004,8:20-24
ZHOU Xue-song. Study on the mechanism and control of bitterness of protein enzymes [J]. Food and Grease, 2004, 8: 20-24
- [20] 马铁铮,王强,周素梅.蛋白短肽苦味成因与脱苦技术研究进展[J].中国粮油学报,2008,23(6):220-226
MA Tie-zheng, WANG Qiang, ZHOU Su-mei. Advances in research on bitter cause and absorption techniques of protein short peptides [J]. Chinese Journal of Grain and Oil, 2008, 23(6): 220-226
- [21] 王威,曾里,曾凡骏.大米浓缩蛋白限制性水解及其性质研究[J].食品研究与开发,2008,29(9):14-17
WANG Wei, ZENG Li, ZENG Fan-jun. Restrictive hydrolysis of rice concentrate protein and its properties [J]. Food Research and Development, 2008, 29(9): 14-17
- [22] 张鸿儒,韩迪,谢晋,等.大豆牛奶双蛋白益生菌酸奶配方的确定及其营养分析[J].食品工业科技,2018,39(21):91-95
ZHANG Hong-ru, HAN Di, XIE Jin, et al. Formulation and nutritional analysis of soy-milk dual protein probiotic yogurt [J]. Food Industry Technology, 2018, 39(21): 91-95
- [23] 康红艳,王妙妹,刘凤臣.发酵凉薯酸奶工艺研究[J].中国农学通报,2018,34(28):160-164
KANG Hong-yan, WANG Miao-shu, LIU Feng-chen. Fermentation process of pachyrhizus yogurt [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2018, 34(28): 160-164
- [24] 李星岩,杨畅,高飞,等.食品添加剂对饮用型高蛋白酸奶质构的改善[J].食品工业,2019,40(5): 24-28
LI Xing-yan, YANG Chang, GAO Fei, et al. Texture improvement of high protein drinking yogurt by food additives [J]. Food Industry, 2019, 40(5): 24-28