

乳清生物发酵及其制品的研究

尤玉如¹,何光华²,刘士旺¹

(1. 浙江科技学院 生物与化学工程学院,杭州 310023;2. 杭州燕牌乳业有限公司,杭州 310008)

摘要: 选用1~2:1比例的保加利亚乳酸杆菌和链球菌菌种,对乳清进行发酵,研究生产具有生物活性的乳清饮品。研究表明,乳清发酵的优化工艺条件为发酵温度42℃、接种量3%、发酵终点75℃,稳定剂PGA和CMC混合协同增效的最佳比例为1:3,发酵产品的感官指标、理化指标和微生物检测指标符合标准。

关键词: 乳清;生物发酵;生物活性

中图分类号: TS275.4

文献标识码: A

文章编号: 1671-8798(2006)03-0192-05

Study on Biological Fermentation of Whey and its Product

YOU Yu-ru¹, HE Guang-hua², LIU Shi-wang¹

(1. School of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310023, China; 2. Hangzhou Yanpai Dairy Co., Ltd, Hangzhou 310008, China)

Abstract: Biological fermentation of whey for its product, which was biological drinks inoculated biomasses of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus* (1~2:1), was studied in this paper. The optimum of whey fermentation was that: 42℃ fermentation temperature, 3% inoculated biomasses, 75℃ fermentation terminal, and Mixed stabilization with PGA and CMC (1:3) for co-operation increasing. The product character conform to standard of quality, including sense organ standard, physical chemistry standard and microorganism inspection standard.

Key words: whey; fermentation; bioactivity

乳清是工业生产干酪、干酪素等的副产品,一般每生产1 kg干酪可得9 kg乳清,每生产1 kg干酪素可得27 kg乳清^[1],仅1999年就有1.54亿t的乳清排出,由此带来了大量的乳清副产品。然而近几年来,各国主要是将乳清加工成乳清粉或乳清蛋白浓缩粉等,因而世界上尚有40%~50%的乳清尚未被再次利用^[1]。这样既造成了大量的环境污染,

又浪费了宝贵的营养资源。研究发现乳清营养极为丰富,就相当于除去酪蛋白的脱脂乳,其营养物质占原料奶55%,干物质约占6%~8%,粗蛋白占1%,粗脂肪占0.3%~0.4%,总糖占3%~5%,还有多种矿物质和水溶性维生素等^[2]。乳清蛋白功能性成分含量也十分丰富,包括β-乳球蛋白、α-乳白蛋白、牛乳血清白蛋白、免疫球蛋白、乳铁蛋白、乳过氧化

收稿日期:2006-06-03

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(Y305208);杭州市科技发展计划资助项目(20051332B21)

作者简介:尤玉如(1957—),男,江苏金坛人,教授,主要从事食品科学与工程研究。

酶、生长因子和许多生物活性因子及酶等。研究证明这些物质均具有一定的生物活性,其中增强免疫力、促进双歧杆菌生长、降低癌症发病率等功效已被证实^[3]。乳清蛋白中还富含半胱氨酸和蛋氨酸,它具有抗肌体氧化作用,并且具有在细胞分裂时能稳定DNA的功能。

随着东西方交流的加强和乳业的发展,我国干酪生产和消费增长迅速。1996年我国干酪消费345 t,2000年1 968 t,2003年4 614 t,2004年国内干酪产品的消费量在1万t左右^[5]。干酪产量的不断增加,乳清的开发利用也日显迫切,特别是工业化生产。目前国内乳清的研究和规模化生产仅局限于提取乳糖和作为婴儿食品的主要原料;以乳清为主要原料的产品研究还不多,投放市场就更少,大多处于研发阶段。本研究就是以乳清为主要原料;在保留乳清原有各种营养和生物活性成分的基础上,利用生物工程技术研究具有新型生物活性功能的发酵型乳清饮品。

1 材料与方法

1.1 试验材料与设备

保加利亚乳杆菌、嗜热链球菌:浙江科技学院生物与化学工程学院生物工程研究所提供;脱盐乳清粉:杭州燕牌乳业有限公司提供(澳大利亚产);34%浓缩乳清粉:杭州燕牌乳业有限公司提供(美国产);黄原胶、CMC、PGA、变性淀粉、果汁、柠檬酸、苹果酸等:购于市场。

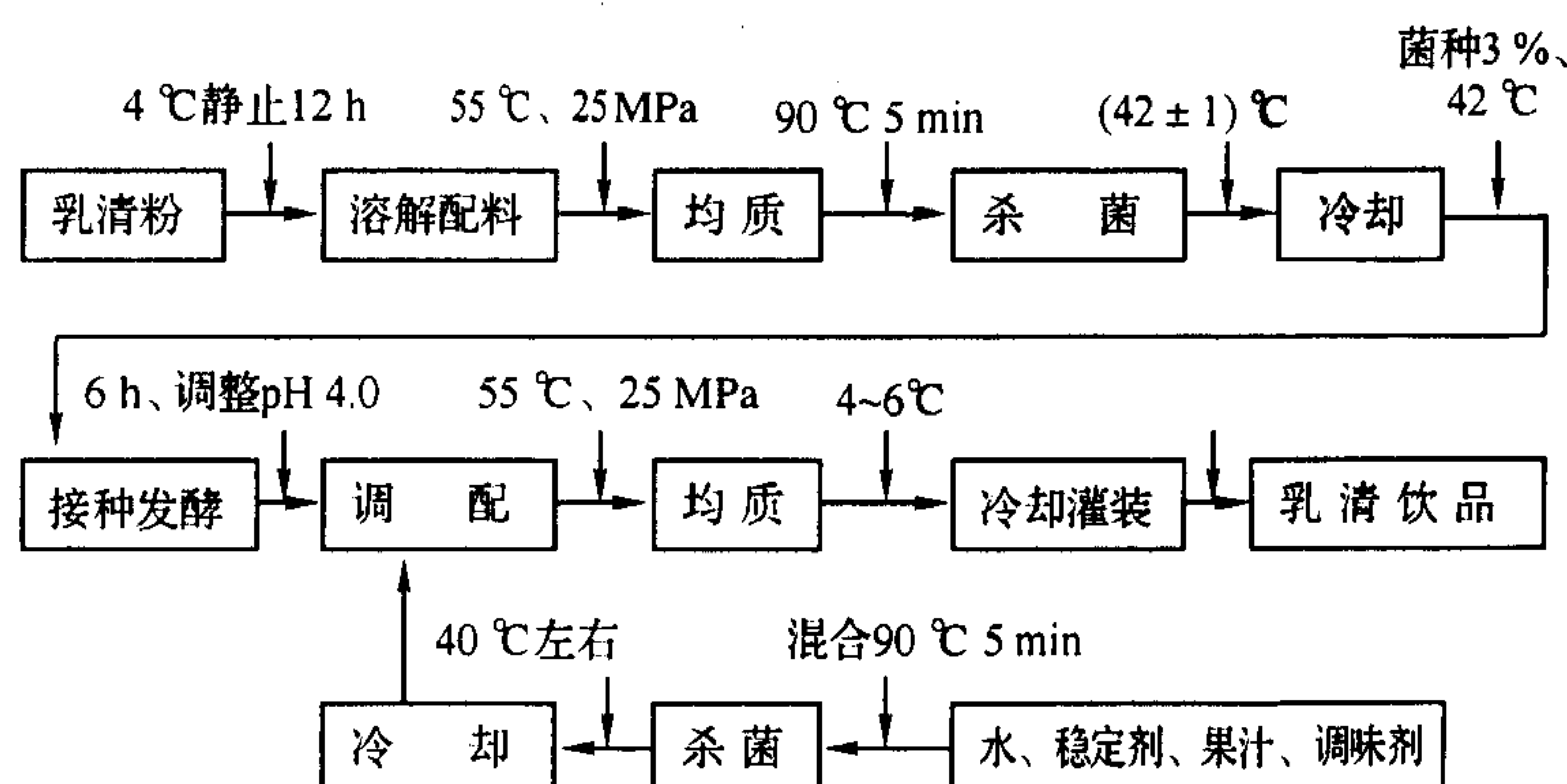
主要试验设备:均质机、超净工作台、生化培养箱、恒温水浴锅、LD4-2高速离心机、pHS-2A酸度计及各种分析仪器等。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种扩培 菌种扩大培养流程如下:



1.2.2 试验工艺 试验工艺流程如下:



1.2.3 感官测定 根据色泽、滋味和气味、组织状态在产品感官中的重要程度,确定相应的分值比例,总分为100分^[6]。感官测定细则见表1。

表1 感官测定细则

色泽	滋味和气味	组织状态
均匀淡乳黄 8~10	清香宜人 35~40	均匀细腻、不分层 40~50
乳黄偏重 6~8	香味较淡、过酸或过甜 20~35	细腻略分层 30~40
色重偏红 6以下	香味淡有涩味、杂味 20以下	组织粗糙分层有沉淀 30以下

1.2.4 乳酸菌数测定 采用酸化MRS培养基和M17培养基,分别测定保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌的菌数^[7]。按GB/T 16347标准^[8]测定乳酸菌菌

落总数。

2 结果与分析

2.1 乳清蛋白成分分析及与其他动植物蛋白原料营养价值的比较

乳清蛋白成分分析及与其他动植物蛋白原料营养价值的比较见表2和表3。

表2 乳清蛋白主要成分及理化特性

蛋白成分	含量/%	等电点(pH)	分子量/D
β -乳球蛋白	48	5.2	18 400~36 800
α -乳白蛋白	19	5.1	14 200
免疫球蛋白	8	5.5~6.8	160 000
牛乳血清白蛋白	5	4.8	69 000
蛋白酶-蛋白胨	20	5.1~6.0	4 000~80 000

表 3 乳清蛋白与其他动植物蛋白原料营养价值的比较

品种	生物价 BV	有效率 PER	净利用率 NPU
乳清蛋白	104	3.6	92
牛奶	91	3.1	82
酪蛋白	77	2.9	76
大豆	74	2.1	61
鸡蛋白	100	3.8	94

注:1)生物价(BV):被生物体利用保留的氮量与吸收的氮量之比。其比例越高,生物价越好。

$$BV = \frac{\text{食物 } N - (\text{粪 } N - \text{代谢 } N) - (\text{尿 } N - \text{内生 } N)}{[\text{食物 } N - (\text{粪 } N - \text{内生 } N)]}$$

2)有效率(PER):实验动物体重增重与摄食的蛋白重量之比。

$$PER = \frac{\text{体重增重}}{\text{蛋白质摄入量}}$$

3)净利用率(NPU):生理价值中没有包括在消化过程中未被吸入而丢失的这部分氮,包括这一部分氮在内的蛋白质营养质量指标叫蛋白净效系数。

$$NPU = \frac{\text{食物 } N - (\text{粪 } N - \text{代谢 } N) - (\text{尿 } N - \text{内生 } N)}{\text{食物 } N}$$

从表 2 和表 3 中可以看出,乳清蛋白组成中人体需要的白蛋白和球蛋白含量高达 80%,生物价和有效率(效价比、PER)也高于其他食物,与鸡蛋白相近,分别高达 104 和 3.6。一般认为,当某蛋白质 PER 值超过 2.5 时,则被认为是高营养优质蛋白质。乳清蛋白的必需氨基酸组成完全符合或超出 FAO/WHO 要求。乳清中糖类几乎都是乳糖,乳糖不仅可为机体提供能量,还有多种营养与保健功能。另外,乳清矿物质处于良好的平衡状态,其中钾和钠比例为 2:1,具有完全的营养功效。

2.2 菌种选择(杆菌球菌比例的确定)

发酵乳清芳香味是乳清发酵过程中微生物分解乳糖后,产生挥发性物质的复合物,主要成分是乳酸与少量的副产物(乙醛、联乙酰等风味物质),这些物质的来源主要决定于杆菌与球菌的比例,联乙酰的风味物质主要是链球菌生成。为此在相同的发酵条件下,对保加利亚乳杆菌和链球菌比例与发酵风味(滋味和气味)和时间,进行了试验。

从图 1 中可以看出,杆菌:球菌的比值小于 1.0,发酵时间偏长(约 8.5 h),风味也较差(受杂菌影响);比值大于 2.0,发酵时间虽只有 3.5 h 以下,但口味太酸,发酵的芳香味严重不足;因此,经比较后选择杆菌球菌的比值在 1~2:1 时为佳。

2.3 发酵工艺条件确定

乳清发酵过程受诸多因素的影响,根据初步试验,影响因素较大的主要有发酵温度、接种量和发酵

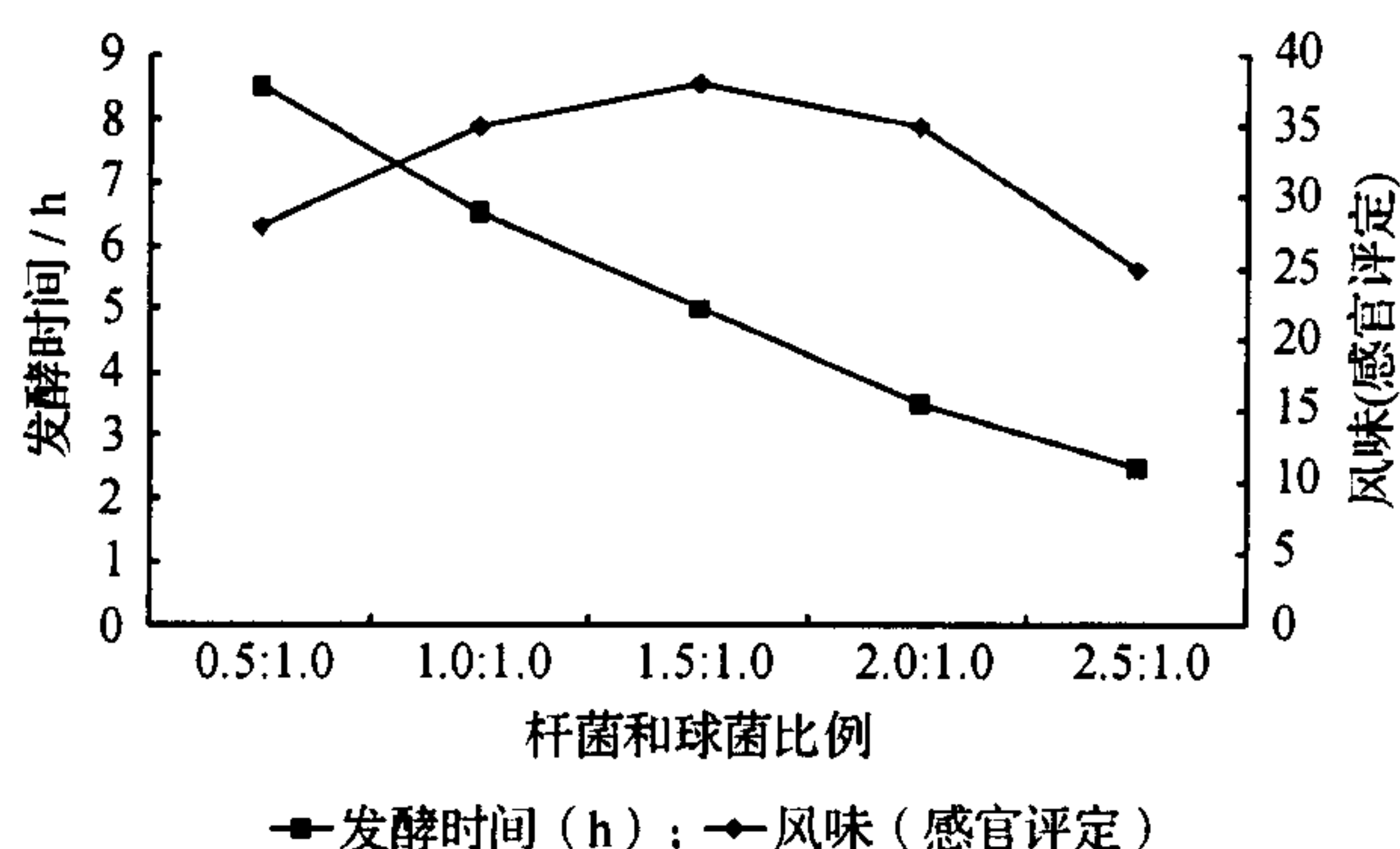


图 1 杆菌和球菌比例对发酵时间和风味的影响

终点等,因此就以这三个因素进行发酵工艺条件优化正交试验(表 4)。并根据中国乳制品工业行业规范 RHB103—2004 酸牛乳感官质量评鉴细则,确定以色泽、滋味和气味、组织状态作为考查指标,进行感官评定,以确定最佳工艺条件。发酵工艺条件优化正交试验方案及评定结果见表 5。

表 4 发酵工艺条件优化正交试验因素水平

发酵温度(A)/°C	接种量(B)/%	发酵终点(C)/°T
40	3	70
42	5	75
44	7	80

表 5 发酵工艺条件优化正交试验及评定结果

试验编号	因素			感官评分			
	A	B	C	色泽	滋味和气味	组织状态	总分
1	1	1	1	8.0	33.0	44.0	85.0
2	1	2	2	8.0	32.0	44.0	84.0
3	1	3	3	8.0	31.0	45.0	84.0
4	2	1	2	9.5	37.0	47.5	94.0
5	2	2	3	9.0	31.5	43.5	84.0
6	2	3	1	9.5	33.5	43.0	86.0
7	3	1	3	8.0	32.0	40.0	80.0
8	3	2	1	9.5	33.0	46.5	89.0
9	3	3	2	9.0	35.0	42.0	86.0
K ₁	253.0	259.0	260.0				
K ₂	264.0	257.0	264.0				
K ₃	255.0	256.0	248.0				
H ₁	84.3	86.3	86.7				
H ₂	88.0	85.7	88.0				
H ₃	85.0	85.3	82.7				
R	3.7	1.0	5.3				

表 5 中比较三个因素的 R 值可以看出,发酵终

点酸度 C 因素的极差 R 值为最大,说明该因素水平变动对最终结果的指标影响最大。影响产品最终评价的因素主次顺序为 C、A、B,最佳工艺条件为 A2B1C2,即发酵温度 42 ℃、接种量 3%、发酵终点酸度 75 °T,在此条件下生产的乳清饮品最好。

2.4 稳定剂选择

加工过程中酸和加热的共同作用会引起乳清蛋白的沉淀,考虑到乳清蛋白中含有的多种人体有益生物活性物质,如免疫球蛋白、多肽等,本试验采取了保留乳清蛋白的方法。为使产品稳定,不出现沉淀,故对稳定剂进行了选用试验。

图 2 中对乳清产品持水稳定效果较好者为 PGA 和 CMC。但考虑到成本和产品的风味和口感等因素,我们选择 PGA 与 CMC 复合做本产品的稳定剂,PGA 与 CMC 不同复合比例对产品稳定效果试验结果见表 6。

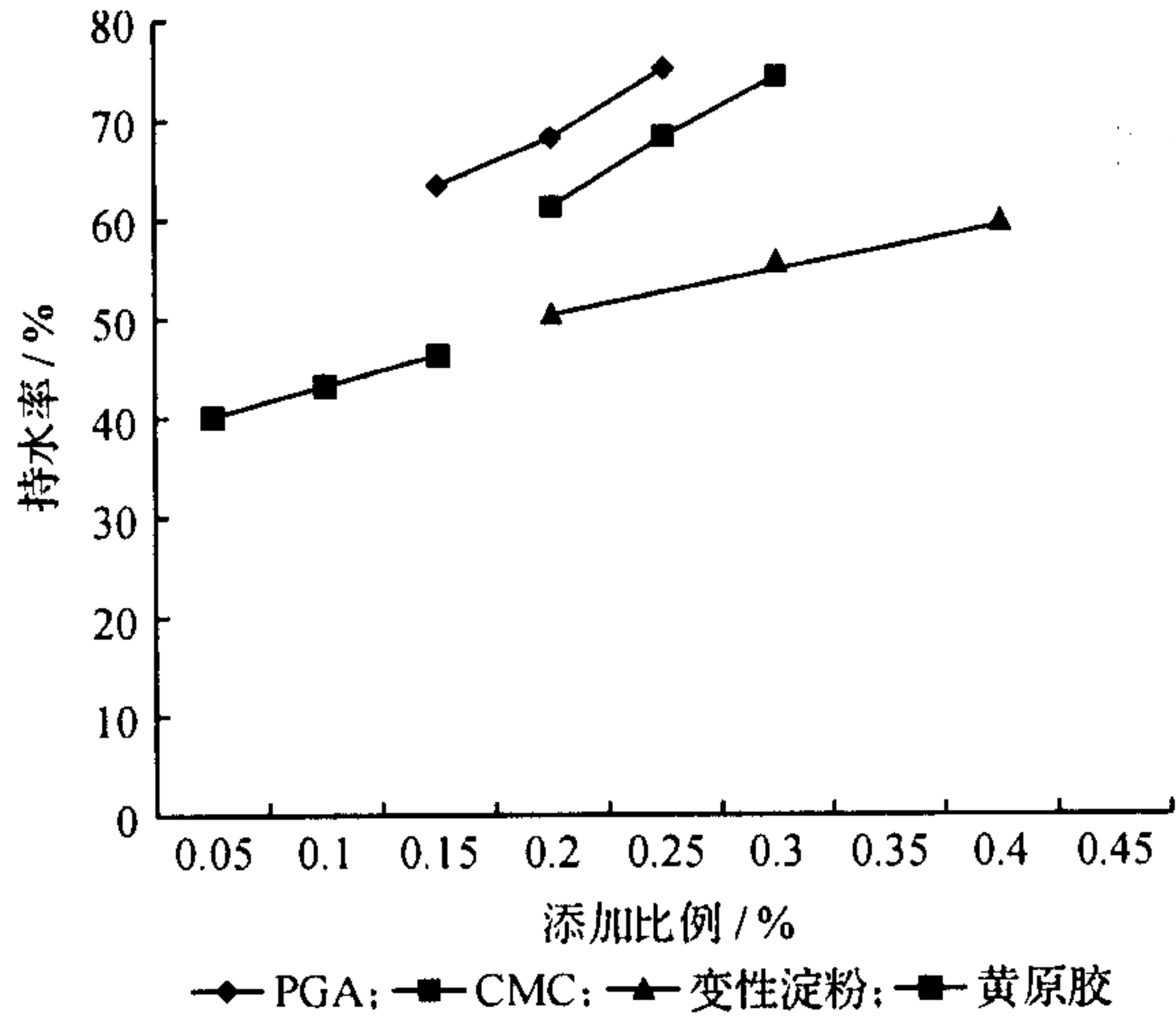


图 2 不同稳定剂对乳清蛋白稳定性的影响

表 6 PGA 与 CMC 复合比例对产品稳定性的影响

PGA : CMC	稳定性	感官评定
1 : 1	+	滑爽有点稀
1 : 1.5	++	细腻滑爽
1 : 2	++	细腻滑爽
1 : 2.5	+++	细腻滑爽
1 : 3	++++	细腻滑爽
1 : 3.5	+++	有点糊口
1 : 4	+++	稍感硬

从表 6 中又可看出,PGA 和 CMC 混合协同增效的最佳比例为 1 : 3。

2.5 质量指标

2.5.1 感官指标 淡乳黄色;组织状态为乳浊液,均匀一致,不分层,无肉眼可见杂质;滋味和气味具有浓郁的发酵乳清风味,清新爽口。

2.5.2 理化指标 蛋白质≥1.8%,脂肪≤0.2%,总固形物≥12%,酸度≥70 °T。

2.5.3 微生物指标 乳酸菌≥1×10⁶ cfu/mL,大肠菌群≤3 MPN/100mL,无致病菌。

2.6 稳定性试验

根据以上的工艺条件和质量指标进行了乳清产品的试验生产,先对成品进行了检测,然后放在 0~6 ℃的冷藏箱作保温稳定性试验,保质期 20 d 后再取出测定相同的指标,以验证产品的稳定性(见表 7)。

从稳定性检测数据可以看出,乳酸菌数虽有下降,但保质期内仍符合质量指标要求,不过保藏温度的控制十分重要;蛋白质和酸度值变化不大,大肠菌也完全符合要求;感官也很正常,呈细腻和均匀一致状态,无分层和沉淀现象出现。说明所选工艺条件和稳定剂符合产品的设计要求。

表 7 乳清饮品稳定性

日期	成品检测结果					20 d 后检测结果				
	乳酸菌数/ (cfu · mL ⁻¹)	蛋白质/ %	酸度/ °T	大肠菌/ (MPN · 100mL ⁻¹)	感官	乳酸菌数/ (cfu · mL ⁻¹)	蛋白质/ %	酸度/ °T	大肠菌/ (MPN · 100mL ⁻¹)	感官
04-01-14	2.5×10 ⁸	1.91	72	<3	正常	3.6×10 ⁶	1.89	78	<3	正常无分层沉淀
04-01-17	1.2×10 ⁸	1.87	78	<3	正常	3.2×10 ⁶	1.86	84	<3	正常无分层沉淀
04-02-05	5.3×10 ⁸	1.88	79	<3	正常	2.3×10 ⁶	1.91	85	<3	正常无分层沉淀
04-03-10	4.5×10 ⁸	1.92	74	<3	正常	5.1×10 ⁶	1.88	85	<3	正常无分层沉淀

3 讨 论

3.1 杆菌与球菌的比例是保证发酵乳清质量的关键因素之一

发酵乳清芳香味是乳清发酵过程中微生物分解

乳糖后,产生挥发性物质的复合物,不同菌种以及不同菌种的混合比例,对发酵产品质量十分重要。要维持杆菌与球菌比例为 1~2 : 1,须根据球菌与杆菌的发育比例调节培养温度、培养时间及接种量,笔者获得的理想条件是:发酵温度 42 ℃,发酵时间

7~8 h,接种量为3%。本研究确定的杆菌与球菌的比例,以及接种量,试验结果表明,产品符合优质生产要求。

3.2 乳清生物发酵条件控制对我国乳清发酵生产生物活性物具有重要意义

乳清生物发酵工艺条件优化正交试验表明,发酵终点酸度对产品质量影响最大,为稳定乳清蛋白,避免出现分层和沉淀现象,本研究选择试验了四种稳定剂,确定了PGA和CMC混合协同增效的最佳比例,稳定剂PGA和CMC混合协同增效在1:3条件下,进行产品质量检测,各项指标完全符合食品安全要求,并经保质期和稳定性试验,证实乳酸活菌数和产品稳定性完全符合设计要求。试验相关工艺条件参数,为乳清生物活性物的发酵生产提供重要的技术指标,为乳清的深度开发利用和研究提供指导。

乳清制品作为我国生产配方乳粉的主要原料,目前大多依赖进口。2001年全国进口量已增长到119 781 t,价值8 806万美元,2004年138 000 t,价值上亿美元,说明每年都在增加。随着配方乳粉市场的增长对乳清制品的需求仍会增长,因此,尽快开发此类产品十分必要,特别是乳清生物活性物的开发,市场前景广阔。

3.3 乳清发酵生物活性物将成为乳清蛋白利用新的热点

人们已从乳清蛋白的酶水解产物中,发现了具有免疫调节、降血压、抗血栓,以及矿物质结合、抗氧化、抗菌和抗病毒等作用的活性肽,因其源于天然食物蛋白以及生理功能的多样性而备受关注^[9-11]。乳清的生物发酵,特别是菌种比例、发酵条件、稳定剂等,为开发利用乳清蛋白发酵活性物提供了前期技术指导。

乳清蛋白水解的乳清多肽及其生物学活性功能的研究目前引起了广泛重视^[12,13]。有关活性多肽的研究,大多处于初级的应用性阶段。对乳清活性多肽功能的结构基础研究更少有报道。为进一步阐明乳清多肽的生物学功能,目前我们对乳清多肽生物水解获得均一乳清多肽的条件以及活性多肽的组成比例进行了相关研究,将从分子水平上阐明活性

多肽的结构特征和生物学特性,相关研究工作正在进行之中。

参考文献:

- [1] 赵海智,韩建春,董和亮. 乳清多肽发酵饮料的研究[J]. 食品研究与开发, 2004, 25(1): 47-49.
- [2] 包怡红. 乳清多肽乳酸菌饮料的研制[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(3): 89-91.
- [3] Lagrange V. 功能性乳制品和新型保健食品配料的乳清产品及其新组分[J]. 中国乳品工业, 1999, 27(4): 32-37.
- [4] 宋昆冈. 中国乳制品十年回顾与展望 [C]//中国乳制品工业协会年会刊, 2005.
- [5] 余疾风. 现代食品感官分析技术[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1991.
- [6] 王淑军, 韦友兵. 酸乳制品中乳酸菌分离筛选方法研究[J]. 淮海工学院学报: 自然科学版, 1997, 6(3): 58-62.
- [7] GB/T 16347—1996, 乳酸菌饮料中乳酸菌的微生物学检验[S].
- [8] 蒲丽丽, 刘宁. 乳中生物活性肽的研究进展[J]. 中国乳业, 2005(1): 51-53.
- [9] KIM H J, DECKER E A, MCCLEMENTS D J. Influence of free protein on flocculation stability of beta-lactoglobulin stabilized oil-in-water emulsions at neutral pH and ambient temperature [J]. Langmuir, 2004, 20(24): 10394-10398.
- [10] WALSH D J, BERNARD H, MURRAY B A, et al. In vitro generation and stability of the lactokinins β -lactoglobulin fragment(142-148)[J]. Dairy Sci, 2004, 87: 3845-3857.
- [11] GROLEAU P E, MORIN P, GAUTHIER S F, et al. Effect of physicochemical conditions on peptide-peptide interactions in a tryptic hydrolysate of beta-lactoglobulin and identification of aggregating peptides [J]. J Agric Food Chem, 2003, 51(15): 4370-4375.
- [12] KOBAYASHI T, IKEGUCHI M, SUGAI S. Construction and characterization of beta-lactoglobulin chimeras [J]. Proteins, 2002, 49(3): 297-301.
- [13] KONTOPIDIS G, HOLT C, SAWYER L. β -lactoglobulin: Binding properties, structure, and function [J]. J Dairy Sci, 2004, 87(4): 785-796.