姜　梅,云　琳,蔡方圆. 响应曲面法优化特色双菌双蛋白发酵乳的配方[J]. 江苏农业科学,2018,46(20):204 – 211.
doi:10.15889/j.issn.1002 – 1302.2018.20.052

响应曲面法优化特色双菌双蛋白发酵乳的配方

姜　梅[1,2], 云　琳[1,3], 蔡方圆[1]
(1. 南京农业大学食品科技学院,江苏南京 210095; 2. 南京农业大学淮安研究院,江苏淮安 223005;
3. 江南大学食品学院,江苏无锡 214000)

摘要:采用响应曲面法优化特色双菌双蛋白发酵乳的配方,研究麦苗粉添加量、抹茶粉添加量、明胶添加量、蔗糖添加量以及水豆比对双菌双蛋白发酵乳品质的影响。在单因素试验的基础上,采用响应曲面法进行发酵乳工艺优化,结果表明,在发酵温度为 38 ℃,发酵时间为 4.5 h,植物乳杆菌 B1 – 6、瑞士乳杆菌 MB2 – 1 发酵剂接种量为 5% 的条件下,获得最佳配方,为麦苗粉添加量 10.8%、抹茶粉添加量 4%、蔗糖添加量 7%、水豆比 11.4 ∶ 1。

关键词:双蛋白;发酵乳;响应曲面法;特色配方优化
中图分类号: TS252.54　　**文献标志码**: A　　**文章编号**:1002 – 1302(2018)20 – 0204 – 07

发酵乳因其独特的风味、顺滑的口感以及较高的营养价值而备受消费者青睐,它多以牛乳为原料、经乳酸菌发酵而成。但牛乳中的饱和脂肪酸含量相对较高,对于有高血脂和超重肥胖倾向者不利。而大豆中蛋白质含量丰富,氨基酸组成较全面,且其来源广泛,价格低廉,因此在发酵乳中添加豆乳,不仅可以降低发酵乳脂肪含量,促进人体对钙和维生素 D 的吸收,同时可以体现大豆蛋白低饱和脂肪、无胆固醇的健康特性[1],更为重要的是大豆蛋白含有人体所需的 8 种必需氨基酸[2],可与牛乳中的氨基酸起到互补作用,提高其营养价值[3],同时实现动物蛋白和植物蛋白资源的开发利用。

大豆酸乳虽然在国外已形成产业化,但其颗粒感和豆腥味使其接受度低,并且色泽较深,严重影响产品的销量[4],因此改善产品品质是开发大豆酸乳的关键。有研究发现,麦苗粉含有丰富的营养成分[5-6],其矿物质含量丰富,碱性度高达 66.4[7],有益于人体健康;同时添加麦苗粉可掩盖豆腥味并赋予发酵乳明亮的绿色。抹茶是一种天然超细微绿茶粉末,含有氨基酸、蛋白质等营养成分,具有较高的营养和食用价值,且与茶叶相比,抹茶更易于消化吸收[8],并可赋予发酵乳清新的绿色。因此,本研究以牛乳和豆乳为双蛋白发酵乳的原料,同时添加麦苗粉和抹茶粉,采用植物乳杆菌 B1 – 6 和瑞士乳杆菌 MB2 – 1 混合双菌进行发酵,获得麦苗粉抹茶粉双菌双蛋白发酵乳,并对其进行配方优化[9]。

1　材料与方法

1.1　材料、菌株与试剂

大豆材料为黑农 48,麦苗粉购自江苏味丹食品有限公司,抹茶粉购自亳州宝丰生物科技有限公司,卫岗全脂巴氏杀菌乳购自南京卫岗乳业有限公司,明胶购自河南鸿鑫食化有限公司,蔗糖购自南京创雅食品有限公司。

植物乳杆菌 B1 – 6(*Lactobacillus plantarum* B1 – 6,下文用 B1 – 6 表示)、瑞士乳杆菌 MB2 – 1(*Lactobacillus helveticuss* MB2 – 1,下文用 MB2 – 1 表示)均由南京农业大学食品微生物实验室保存。

MRS(Man – Rogosa – Sharpe's)培养基:葡萄糖 20 g/L,蛋白胨 10 g/L,牛肉膏 10 g/L,酵母膏 5 g/L,无水乙酸钠 5 g/L,柠檬酸铵 2 g/L,磷酸氢二钾 2.62 g/L,硫酸镁 0.58 g/L,硫酸锰 0.198 g/L,吐温 – 80 1 mL/L,琼脂 1.5% ~2.0%,培养基所用试剂及 NaOH、$NaCl_2$、乙醇等均为分析纯。

1.2　仪器与设备

SW – CJ – IFD 洁净工作台(苏净集团 · 苏州安泰空气技术有限公司);HH – 6 数显恒温水浴锅(常州国华电器有限公司);DJ300 型电子天平(常熟衡器工业公司);LRH – 150 型生化培养箱(上海一恒科学仪器有限公司);SPT – P – A 系列智能生化培养箱(合肥华德利科学器材有限公司);IS128 实验室 pH 计(上海仪迈仪器科技有限公司);九阳电磁灶(IH 智能烹饪灶,杭州九阳生活电器有限公司);BCD – 430W 海尔冰箱(青岛海尔股份有限公司);数显黏度计 NDJ – 8S(上海精天电子仪器有限公司);色差仪 CR – 13[科尼卡美能达光学仪器(上海)有限公司]。

1.3　试验方法

1.3.1　菌种的活化　将保存于甘油管中的 1 mL B1 – 6 接种于 30 mL 稀豆乳中,活化 24 h,然后按 4%(体积比)的接种量再次接种于稀豆乳中活化 16 h 备用。将保存于甘油管中的 1 mL MB2 – 1 接种于 30 mL 牛乳中,活化 24 h,然后按 4%(体积比)的接种量再次接种于牛乳中活化 16 h 备用。

1.3.2　发酵乳的制备

1.3.2.1　工艺流程与操作要点　发酵乳制备的工艺流程如图 1 所示,操作要点为(1)大豆浸泡:选取饱满、没有虫蛀、无霉变的优质大豆,用清水冲洗后按照大豆与水的比例为 1 ∶ 3(质量比)浸泡过夜。(2)磨浆:将浸泡好的大豆与麦苗粉和抹茶粉一同加入打浆机中,按照一定的水豆比(质量比)加入 40 ℃左右的温水,进行榨浆。(3)煮沸:将生豆乳和牛乳混合

收稿日期:2017 – 10 – 25
基金项目:江苏省淮安市政策引导类计划(产学研协同创新)项目(编号:HAC2015020)。
作者简介:姜　梅(1968—),女,山东蓬莱人,博士,副教授,主要研究方向为食品微生物与食品加工。E – mail:meijiang9@njau.edu.cn。

后进行加热,煮沸 5 min。(4)蔗糖添加:双蛋白混合乳在煮沸灭菌的过程中加入适量蔗糖。(5)明胶添加:明胶先用冷水浸泡 20 min,然后放入 75 ℃左右的恒温水浴锅中加热溶解,待混合乳冷却至 40 ℃左右加入其中。(6)发酵:将 10^8 CFU/mL 的 B1 -6 发酵稀豆乳与 10^8 CFU/mL 的 MB2 -1 牛乳按 1∶1(体积比)比例在 40 ℃左右接入不同配方的双蛋白混合乳中,在 38 ℃条件下发酵。(7)后熟:将发酵好的双菌双蛋白发酵乳放入 4 ℃冰箱后熟。

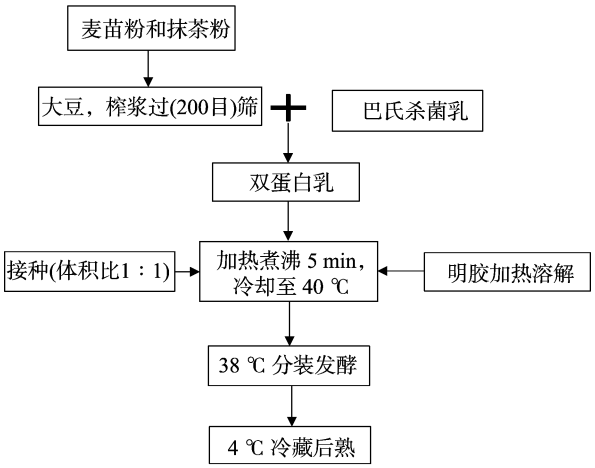


图1　发酵乳制备的工艺流程

1.3.3　测定指标与方法

1.3.3.1　感官评定　邀请 10 位接受过专业感官分析培训的评定员对双菌双蛋白发酵乳的口感、色泽、组织状态和风味进行打分,采用百分制,取平均分作为感官评定结果,评定标准见表 1。

表 1　感官评定

指标	评分标准	分值(分)
口感(30 分)	光滑,清新爽口,甜度适中	21 ~ 30
	散口,味淡,酸涩	10 ~ 20
	入口有颗粒感,过甜或苦涩	< 10
颜色(20 分)	绿色,无染色,色泽均匀	16 ~ 20
	颜色过浅或过深,色泽不均	10 ~ 15
色泽(30 分)	色泽不均匀	< 10
光泽(10 分)	有光泽	8 ~ 10
	略有光泽	5 ~ 7
	无光泽	< 5
组织状态(20 分)	组织均匀细腻,黏稠	16 ~ 20
	组织均匀,不够细腻,较黏稠	10 ~ 15
	组织不均匀,不黏稠	< 10
风味(20 分)	香气浓郁,持续时间长,入口清香	16 ~ 20
	香气较淡,持续时间短	10 ~ 15
	无香气,或有其他异味	< 10

1.3.3.2　黏度测定　取适量样品置于 100 mL 烧杯中,用 3 号转子以 3 r/min 的转速测定黏度,记录数据。

1.3.3.3　pH 值测定　用 pH 计直接测定样品 pH 值,记录数据。

1.3.3.4　滴定酸度测定　准确称取 5 g 经后熟的发酵乳,用匀浆器捣碎匀浆后加入 40 mL 蒸馏水,混合均匀后置于 100 mL 锥形瓶中,加入酚酞指示液,用 0.1 mol/L 的标准氢氧化钠溶液滴定至微红色且 30 s 内不褪色即为滴定终点。滴定过程中所用氢氧化钠标准溶液的体积乘以 20 即为滴定酸度。

1.3.3.5　色值测定　用 CR -13 色差仪对样品色值进行测定。

1.3.3.6　乳酸菌数的测定　乳酸菌数的测定参照 GB/T 4789.35—2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验》,取 5 g 双菌双蛋白发酵乳样品,用灭菌的匀浆器磨碎匀浆,将匀浆后的发酵乳倒入灭过菌的锥形瓶中,并用 45 mL 灭菌生理盐水冲洗匀浆器并将冲洗液一并倒入锥形瓶中,摇匀后取 1 mL 混合液,用灭菌生理盐水梯度稀释,选取合适的稀释度,采用 MRS 培养基,倾注平板法菌落计数,37 ℃倒置培养 36 ~ 48 h,检验乳酸菌的活菌数。

1.3.4　单因素试验设计

1.3.4.1　麦苗粉添加量的优化　选取水豆质量比为 9∶1,乳杆菌 B1 -6 + MB2 -1 接种量为 5%,B1 -6∶MB2 -1 = 1∶1(体积比),发酵温度为 38 ℃,豆乳∶牛乳 = 4∶6(体积比),考察麦苗粉添加量(6%、8%、9%、10%、11%、12%、14%)对双菌双蛋白发酵乳品质的影响。

1.3.4.2　抹茶粉添加量的优化　选取水豆比为 9∶1(质量比),乳杆菌 B1 -6 + MB2 -1 接种量为 5%,B1 -6∶MB2 -1 = 1∶1(体积比),发酵温度为 38 ℃,豆乳∶牛乳 = 4∶6(体积比),麦苗粉添加量为 10%,考察抹茶粉添加量(1%、2%、3%、4%、5%)对双菌双蛋白发酵乳品质的影响。

1.3.4.3　明胶添加量的优化　选取水豆比为 9∶1(质量比),乳杆菌 B1 -6 + MB2 -1 接种量为 5%,B1 -6∶MB2 -1 = 1∶1(体积比),发酵温度为 38 ℃,豆乳∶牛乳 = 4∶6(体积比),麦苗粉添加量为 10%,抹茶粉添加量为 4%,考察明胶添加量(0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、1.0%、2.0%)对双菌双蛋白发酵乳品质的影响。

1.3.4.4　蔗糖添加量的优化　选取水豆比为 9∶1(质量比),乳杆菌 B1 -6 + MB2 -1 接种量为 5%,B1 -6∶MB2 -1 = 1∶1(体积比),发酵温度为 38 ℃,豆乳∶牛乳 = 4∶6(体积比),麦苗粉添加量为 10%,抹茶粉添加量为 4%,考察蔗糖添加量(1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%)对双菌双蛋白发酵乳品质的影响。

1.3.4.5　水豆比的优化　选取乳杆菌 B1 -6 + MB2 -1 接种量为 5%,B1 -6∶MB2 -1 = 1∶1(体积比),发酵温度为 38 ℃,豆乳∶牛乳 = 4∶6(体积比),B1 -6∶MB2 -1 = 1∶1(体积比),麦苗粉添加量为 10%,抹茶粉添加量为 4%,蔗糖添加量 7%,考察水豆比[9∶1、10∶1、11∶1、12∶1(质量比)]对双菌双蛋白发酵乳品质的影响。

1.3.5　响应曲面试验设计　根据单因素试验结果,选择麦苗粉添加量(A)、抹茶粉添加量(B)、蔗糖添加量(C)、水豆比(D)作为自变量,以感官评分(Y)为响应值,进行响应曲面优化试验。响应曲面试验设计因素与水平[10]如表 2 所示。

表 2　响应面试验设计因素与水平

水平编码	A(%)	B(%)	C(%)	D
-1	9	3.5	6	10∶1
0	10	4.0	7	11∶1
1	11	4.5	8	12∶1

1.3.6　数据处理方法　试验数据均为 3 次重复试验所得的平均值,采用 SPSS 17.0 软件进行显著性和相关性分析,采用 Origin 8.0 软件作图,用 Design Expert 8.0 软件进行响应面设计和分析。

2　结果与分析

2.1　单因素试验

2.1.1　麦苗粉对特色双菌双蛋白发酵乳品质的影响　在双菌双蛋白乳固形物为 18.1% 的基础上，添加 6% ~14% 的麦苗粉，由图 2 可知，在 6% ~10% 区间内，随着麦苗粉添加量的增加，感官评分逐渐升高，这可能是由于随着麦苗粉的增加，麦苗粉的清香味道掩盖了原有发酵乳中因大豆发酵而带来的豆腥味[11-12]，给人带来愉悦的口感。但当添加量超过 10% 时，感官评分却开始下降，其原因可能是麦苗粉浓度过高给发酵乳带来“青草味”，这与麦苗粉中含有的过氧化物酶（peroxidase，简称 POD）有直接关系[13]，以致感官评分有所降低。

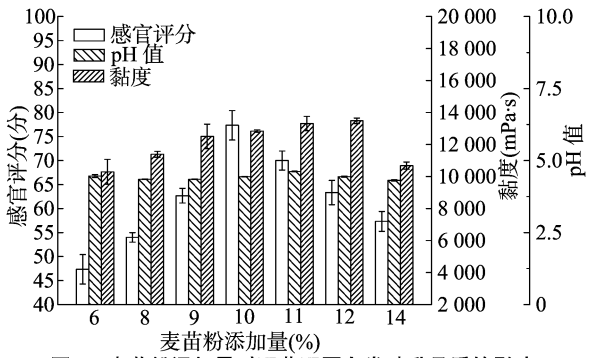


图2　麦苗粉添加量对双菌双蛋白发酵乳品质的影响

黏度[14-15]是反映发酵乳品质优劣的一个指标，它可以反映发酵乳的组织状态，且感官品质也与黏度有较大的相关性，双菌双蛋白经乳酸菌发酵获得了含有酪蛋白（主要牛奶蛋白）和大豆蛋白的复合凝胶[16]，因此，优良品质发酵乳具有一定的强度，以半固体形式存在，组织状态良好，质地均匀[17]。从图 2 可以看出，发酵乳的黏度随着麦苗粉添加量的增加先增大后减小，当添加量为 12% 时，黏度达到最大值，随后有所下降；添加量在 9% ~12% 范围时，黏度变化较小。结合感官评分，虽然麦苗粉添加量为 11%、12% 时，发酵乳的黏度较大，但此时麦苗粉的青草味突出。

酸牛乳的发酵终点为 pH 值 =4.5 左右，过低或者过高都会对发酵乳产生不良影响，过低会使发酵乳产生不良风味，增加酸涩味；过高会增加凝乳时间，不利于凝乳。从图 2 可以看出，随着麦苗粉添加量的增加，发酵乳的 pH 值先下降再升高又降低，在添加量为 11% 时达到最大值，添加量为 9% 和 10% 较合适。

Lab 颜色模型是由明度（L）和有关色彩的 a、b 3 个要素组成的。a 和 b 的值域均为 -128 ~127，a 表示从绿色（-）到红色（+）的范围，b 是从蓝色（-）到黄色（+）的范围；E 为色差综合指标。由表 2 可知，发酵乳的亮度整体随着麦苗粉添加量的增加而减弱；当添加量为 9% 和 10% 时，发酵乳的绿色最明显。以感官评分作为主要判断依据，结合其他各项指标综合评述，确定麦苗粉的最佳添加量为 10% 左右。

表 2　麦苗粉添加量对发酵乳色值的影响

麦苗粉添加量(%)	L	a(-)	b(+)	E
6	78.40 ±0.17e	2.43 ±0.12a	16.60 ±0.10a	80.18 ±0.19c
8	78.50 ±0.20e	3.50 ±0.10b	17.27 ±0.21b	80.45 ±0.15d
9	77.40 ±0.10b	3.83 ±0.06cd	18.40 ±0.10c	79.65 ±0.12a
10	77.77 ±0.15cd	3.67 ±0.06bc	18.20 ±0.26c	79.95 ±0.09b
11	77.97 ±0.06d	3.60 ±0.10b	19.00 ±0.20d	80.33 ±0.10cd
12	77.60 ±0.10bc	3.57 ±0.23b	20.07 ±0.12e	80.23 ±0.07cd
14	76.57 ±0.21a	3.97 ±0.12d	21.63 ±0.38f	79.67 ±0.11a

注：同列数据后的不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。$E=\sqrt{L^2+a^2+b^2}$。表 3 至表 6 同。

2.1.2　抹茶粉对特色双菌双蛋白发酵乳品质的影响　由图 3 可以发现，随着抹茶粉添加量的增加，感官评分值先增加后降低，当添加量为 4% 时达到最大值。其原因可能是添加量较低时，不足以清新爽口，随着添加量的增加，抹茶的清香味渐渐增强，加上发酵乳的奶香味，给人带来愉悦的口感，但当抹茶粉添加量超过 4% 时，感官评分却有所下降，其原因可能是抹茶粉含有茶多酚、咖啡碱[18-19]等物质，茶多酚具有抑菌作用，当添加量较高时，会影响乳酸菌的代谢繁殖，导致产品出现无发酵香等问题，而咖啡碱具有苦味，所以添加量较高时，会有苦涩味。

添加抹茶粉后的双菌双蛋白发酵乳黏度的变化趋势与添加麦苗粉的趋势大致相同，即先增加后下降，当添加量为 3% ~4% 时，黏度较大，添加量为 5% 时黏度下降。其原因可能是抹茶粉颗粒较大，当添加量较高时，会改变发酵乳的凝胶结构，出现硬度减小、组织状态不均匀的现象。

发酵乳的 pH 值整体随着抹茶粉添加量的增加而升高，当添加量为 2% 时，pH 值达到最大值，不利于凝乳，添加量为 3% ~5% 时，pH 值无明显变化。

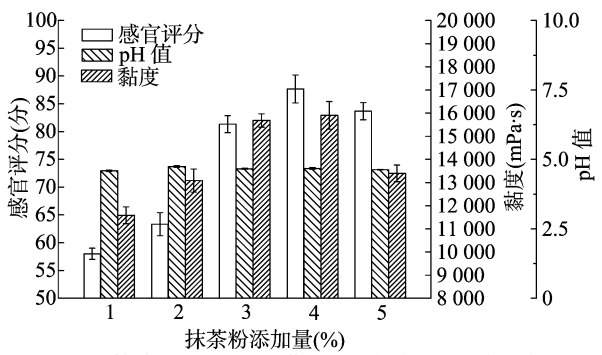


图3　抹茶粉添加量对双菌双蛋白发酵乳品质的影响

由表 3 可知，发酵乳的亮度整体随着抹茶粉添加量的增加而减弱，在添加量为 4% 时，a 值最大，表明色泽最绿，符合感官评定要求，因此，抹茶粉添加量在 4% 左右最佳。

2.1.3　明胶对特色双菌双蛋白发酵乳品质的影响　明胶是一种来源于动物的胶体，作为食品增稠剂时一般添加于肉制品、蛋糕、冰淇淋、啤酒、果汁等中。明胶在加热时熔化，冷却时凝固。明胶价格低且溶解性好，虽然具有类似脂肪的口感，

表 3　抹茶粉添加量对发酵乳色值的影响

抹茶粉添加量(%)	L	$a(-)$	$b(+)$	E
1	74.23 ±0.06d	4.60 ±0.10c	21.77 ±0.25a	77.41 ±0.10c
2	70.37 ±2.22b	2.57 ±0.67b	21.97 ±0.15a	75.09 ±0.07b
3	71.07 ±0.25c	3.90 ±0.10c	23.57 ±0.25b	75.01 ±0.32b
4	68.30 ±0.35a	5.53 ±0.12d	27.13 ±0.47c	73.67 ±0.24a
5	68.33 ±0.25a	5.13 ±0.06cd	27.67 ±0.15d	73.93 ±0.19a

但其却是几乎不含有脂肪、糖类、无机质的纯蛋白食品,对增强酸奶产品的香浓口感具有明显作用[20-21]。从图 4 可以看出,明胶添加量为 0.3% 时,感官评分最高,结合黏度来看,此时发酵乳的黏度适中,可以有效地减慢麦苗粉和抹茶粉颗粒的下沉;添加量在 0.3% ~0.5% 范围内时,黏度无明显变化;而当添加量低于 0.3% 时,出现乳清析出的现象;当添加量高于 0.5% 时,发酵乳黏度虽有所增加,但出现明胶特有的骨胶原味道,口感不佳,进而降低口感评分。当明胶添加量为 0.3% 时,pH 值最低,可以有效缩短凝乳时间;同时,为了减少生产成本,明胶添加量适宜控制在 0.3% 左右。

由表 4 可以看出,明胶添加量在 0.3% 时 a 值较高,绿色较明显,符合感官评定要求。

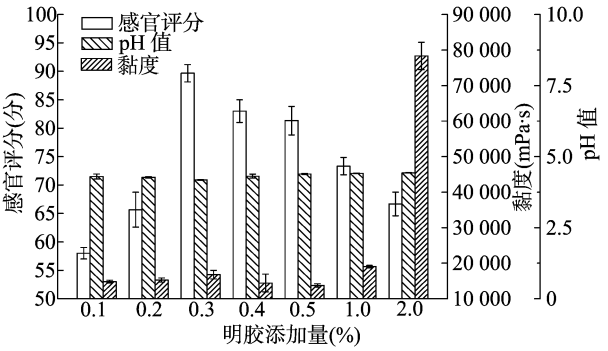


图4　明胶添加量对双菌双蛋白发酵乳品质的影响

表 4　明胶添加量对发酵乳色值的影响

明胶添加量(%)	L	$a(-)$	$b(+)$	E
0.1	65.63 ±0.15a	5.43 ±0.12c	27.53 ±0.21c	71.38 ±0.06a
0.2	67.07 ±0.49b	5.73 ±0.12d	28.53 ±0.38d	73.11 ±0.61b
0.3	66.77 ±0.06b	5.90 ±0.17de	28.50 ±0.10d	72.83 ±0.03b
0.4	67.07 ±0.06b	6.17 ±0.06e	28.93 ±0.06e	73.30 ±0.07b
0.5	67.20 ±0.26bc	5.03 ±0.06b	28.37 ±0.06d	73.11 ±0.27b
1.0	67.83 ±0.81c	4.30 ±0.10a	25.40 ±0.00b	72.56 ±0.75b
2.0	66.50 ±0.36b	4.37 ±0.32a	25.03 ±0.12a	71.19 ±0.31a

2.1.4　蔗糖对特色双菌双蛋白发酵乳品质的影响　蔗糖添加量的多少会直接影响发酵乳的适口性。加糖是为了使发酵乳具有酸中有甜、甜中带酸的口感。加糖量过少,发酵乳酸味过重,固形物含量少,组织结构粗糙,发酵效果差:加糖量过多,发酵乳口味过甜,掩盖了发酵乳独特的乳香味,影响酸甜比[22]。由图 5 可知,pH 值整体随着蔗糖添加量的增加先升高后下降,当加糖量 <6% 时,发酵乳风味较差,凝乳时间较长,当加糖量为 6% ~8% 时,发酵乳凝固较好,风味纯正,酸甜可口,绿色均匀有光泽。由表 5 可知,发酵乳的亮度整体随着添加量的增加而降低,当蔗糖添加量为 7% 时,a 值显著高于其他添加量处理,色泽感官最佳。综合而言,蔗糖的添加量应控制在 7% 左右。

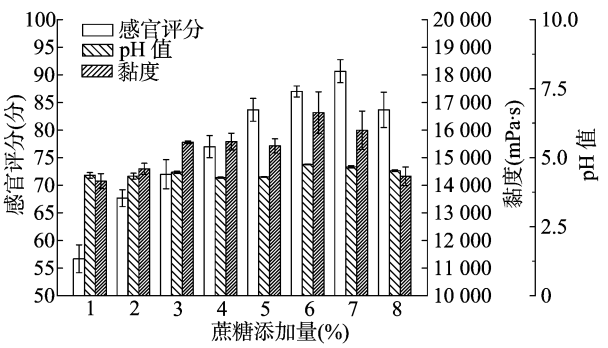


图5　蔗糖添加量对双菌双蛋白发酵乳品质的影响

2.1.5　水豆比对特色双菌双蛋白发酵乳品质的影响　水豆比的大小可直接影响双蛋白乳的可溶性固形物含量及最终产品的组织状态,可溶性固形物含量是影响乳酸菌产酸和双蛋白发酵乳凝胶的重要因素[23]。从图 6 可以看出,当水豆质量比为 11∶1 时,感官评分最高;当水豆质量比低于 11∶1 时,乳酸菌可利用的营养物质丰富,同时 B1 -6 产酸较多,导致发酵乳的酸度较高,口感偏酸,水豆质量比 9∶1 的产品 pH 值为 4.19,且黏度较高,煮浆时容易结焦给生产带来不便,形成的凝胶组织强度大,粗糙不细腻,豆腥味较重;当水豆比较高时,双蛋白发酵乳中固形物含量降低[24],B1 -6 生长受到抑制,产酸能力下降,酸度较低,没有发酵乳特有的香气,并且会使发酵乳绿色减弱。由表 6 可知,随着水豆比的增加,a 值逐渐减小,绿色减弱,综合感官评分,水豆质量比控制在 11∶1 左右较合适。

综上,以感官为主要评价指标,综合黏度、pH 值、色值等指标考察各因素对特色双菌双蛋白发酵乳品质的影响,麦苗粉的适宜添加量为 9% ~11%,抹茶粉适宜添加量为 3.5% ~4.5%,明胶的适宜添加量为 0.3% ~0.5%,蔗糖添加量为 6% ~8%,水豆比应选取 10∶1 ~12∶1。

2.2　响应曲面优化试验

响应面优化法是一种寻找最优试验条件的方法,通过对

表 5　蔗糖添加量对发酵乳色值的影响

蔗糖添加量(%)	L	$a(-)$	$b(-)$	E
1	69.57 ±0.06g	4.63 ±0.06c	26.17 ±0.25a	74.47 ±0.05f
2	69.10 ±0.26f	4.47 ±0.15b	26.10 ±0.35a	74.00 ±0.19e
3	66.33 ±0.06c	4.13 ±0.06a	26.03 ±0.12a	71.38 ±0.09b
4	68.33 ±0.15e	4.80 ±0.00d	26.93 ±0.06b	73.61 ±0.14d
5	67.73 ±0.21d	4.20 ±0.10a	26.40 ±0.20a	72.82 ±0.27c
6	65.10 ±0.17b	5.77 ±0.06e	29.20 ±0.26d	71.58 ±0.27b
7	64.73 ±0.06a	6.00 ±0.00f	29.53 ±0.12d	71.40 ±0.01b
8	64.78 ±0.15a	4.73 ±0.06cd	28.80 ±0.10c	71.04 ±0.10a

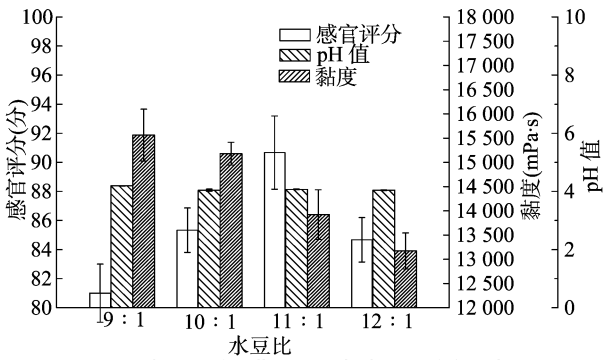


图6　不同水豆比对双菌双蛋白发酵乳品质的影响

表 6　水豆比对发酵乳色值的影响

水豆比	L	$a(-)$	$b(-)$	E
9∶1	66.87 ±0.15a	4.90 ±0.10d	26.63 ±0.21d	72.79 ±1.20a
10∶1	68.00 ±0.26c	4.77 ±0.08c	25.80 ±0.20c	72.89 ±0.28a
11∶1	67.57 ±0.29b	4.63 ±0.06b	24.33 ±0.06a	71.93 ±0.29a
12∶1	67.20 ±0.10ab	4.50 ±0.00a	25.40 ±0.10b	71.98 ±0.13a

过程的回归拟合和响应曲面、等高线的绘制可方便地求出相应于各因素水平的响应值。在单因素的基础上,初步确定双菌双蛋白发酵乳中各种成分的适宜添加量范围,并以此为基础,利用 Box – Behnken Design(BBD)[25] 设计试验方案。将表 7 结果录入软件,应用 BBD 试验设计,分别以麦苗粉添加量(A)、抹茶粉添加量(B)、蔗糖添加量(C)以及水豆比(D)为自变量,以感官分值(Y)为因变量,初步得到以下模型:$Y = 91.80 + 3.00A + 1.83B + 0.25C + 1.42D + 0.75AB + 0.50AC + 2.25AD - 0.25BC - 3.50BD - 9.77A^2 - 5.77B^2 - 2.40C^2 - 3.40D^2$。

由表 8 可以看出,F(模型) = 18.99,$P < 0.000\ 1$,表明模型方程间的差异极显著,说明该模型与实际情况拟合良好。失拟项 $F = 2.62 < F_{0.05}(14.10) = 2.86$,$P = 0.182\ 8 > 0.05$,不显著,说明试验数据与所采用的模型相吻合。此外,4 个因素的平方项对双菌双蛋白酸乳的感官评分有极显著影响($P < 0.01$);除 A、B、D、AD、BD 外,一次项及其他交互项对感官评分无显著影响,因此可在 $\alpha = 0.05$ 显著水平对模型进行进一步的分析,剔除其中的不显著项,得到简化后的回归模型,即

$Y = 91.80 + 3.00A + 1.83B + 1.42D + 2.25AD - 3.50BD - 9.77A^2 - 5.77B^2 - 2.40C^2 - 3.40D^2$。

4 个单因素对特色双菌双蛋白酸乳感官评分的影响程度为 A > B > D > C,即麦苗粉添加量对感官评分影响最大,其次是抹茶粉添加量,然后是水豆比,最后是蔗糖添加量。固定 2 个因素零水平,研究另外 2 个因素间的交互作用,利用 Design – Expert 制作相应曲面图(图 7)。等高线的形状可反映出交互作用的强弱,椭圆形表示 2 因素交互作用显著,而圆形则不显著。

表 7　Box – Behnken Design 试验设计及结果

试验号	A(%)	B(%)	C(%)	D	Y
1	10	4	7	11	93
2	9	4	8	11	77
3	9	4	6	11	78
4	9	3.5	7	11	73
5	9	4	7	12	75
6	10	4	7	11	92
7	10	3.5	6	11	80
8	11	4.5	7	11	79
9	10	4	8	12	87
10	10	3.5	7	12	85
11	11	4	6	11	82
12	10	4	7	11	90
13	10	4	6	12	87
14	10	4	8	10	83
15	10	3.5	7	10	76
16	9	4.5	7	11	71
17	10	4.5	7	10	88
18	11	3.5	7	11	78
19	10	3.5	8	11	82
20	11	4	8	11	83
21	10	4.5	8	11	88
22	10	4.5	6	11	87
23	10	4	6	10	83
24	11	4	7	10	79
25	10	4	7	11	93
26	10	4	7	11	91
27	9	4	7	10	77
28	10	4.5	7	12	83
29	11	4	7	12	86

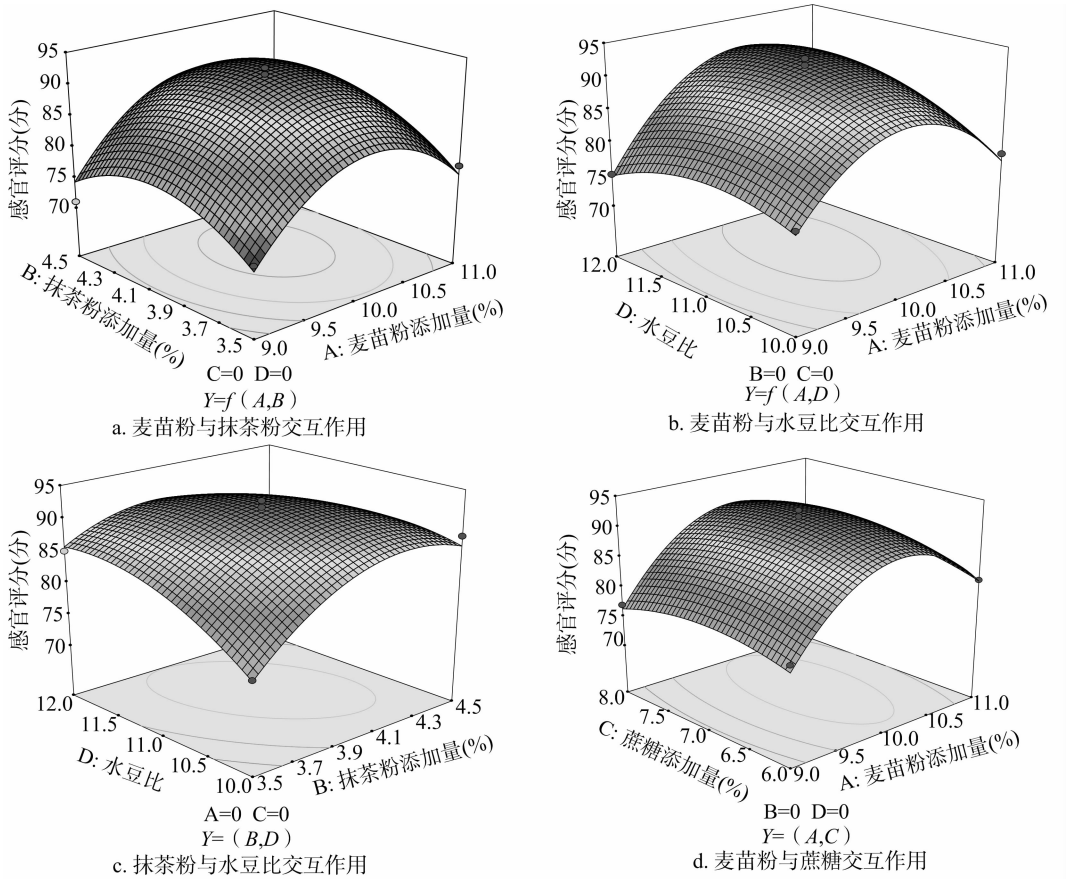
由图 7 可知,随着各交互因子编码值的升高,双菌双蛋白酸乳感官分值呈上升趋势,但当编码值达到一定的组合后,感官分值呈下降趋势。由图 7 – a 可知,保持蔗糖添加量、水豆比以及抹茶粉添加量不变,感官评分随麦苗粉添加量的增加先升高后降低,主要是由于随着麦苗粉含量的增加,双菌双蛋白发酵乳口感变得清新爽口,但当添加量过高时,麦苗粉青草味过重,影响口感。同样,当蔗糖添加量、水豆比以及麦苗粉添加量不变时,感官评分也会随着抹茶粉添加量的增加呈现先升高后降低的趋势。从图 7 – b 可以看出,确定抹茶粉添加

表 8　方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
模型	975.58	14	69.68	18.99	<0.000 1	**
A	108	1	108	29.43	<0.000 1	**
B	40.33	1	40.33	10.99	0.005 1	**
C	0.75	1	0.75	0.2	0.658 2	
D	24.08	1	24.08	6.56	0.022 6	*
AB	2.25	1	2.25	0.61	0.446 7	
AC	1	1	1	0.27	0.609 8	
AD	20.25	1	20.25	5.52	0.034 0	*
BC	0.25	1	0.25	0.068	0.797 9	
BD	49	1	49	13.35	0.002 6	**
CD	0	1	0	0	1	
A^2	619.79	1	619.79	168.87	<0.000 1	**
B^2	216.33	1	216.33	58.94	<0.000 1	**
C^2	37.36	1	37.36	10.18	0.006 5	**
D^2	74.98	1	74.98	20.43	0.000 5	**
残差	51.38	14	3.67			
失拟项	44.58	10	4.46	2.62	0.182 8	
纯误差	6.8	4	1.70			
总误差	1 026.97	28				
	R^2 =0.950 0	R^2_{adj} =0.899 9				

注：“*”“**”分别表示在 0.05、0.01 水平上显著。

量、麦苗粉添加量以及蔗糖添加量不变时，感官评分会随着水豆比的升高先增加后减少，其原因可能是水豆比较低时，固形物含量过高，乳酸菌产酸较多，风味较酸，而水豆比过高时，固形物含量降低，乳酸菌产酸减少，影响感官。从图 7－d 可以看出，当麦苗粉添加量、抹茶粉添加量以及水豆比不变时，感官评分会随着蔗糖添加量的增加先升高后降低，这是因为一



a. 麦苗粉与抹茶粉交互作用　　b. 麦苗粉与水豆比交互作用

c. 抹茶粉与水豆比交互作用　　d. 麦苗粉与蔗糖交互作用

图中水豆比10.00=10∶1、10.50=10.5∶1、11.00=11∶1、12.00=12∶1

图7　响应曲面分析

定量的蔗糖会促进乳酸菌的生长繁殖,产生的风味物质会掩盖豆腥味,但蔗糖含量过高,会使双菌双蛋白发酵乳过甜,发酵过度产酸,影响感官风味。

由图 7 可以看出,抹茶粉添加量和水豆比的交互作用最显著,麦苗粉和蔗糖的交互作用次之,再次为麦苗粉和水豆比的交互作用,麦苗粉和抹茶粉的交互作用最弱。这与表 8 中方差分析的结果基本一致;结合单因素试验结果可以看出,4 个单因素对双菌双蛋白酸乳感官评分的影响不是简单的线性关系,这也符合实际情况。因此,只有当 2 个因素均在 0 ~ 0.5 水平时,感官分值达到最高,说明此时产品的感官品质最佳。因此,在以巴氏杀菌乳、麦苗粉和抹茶粉为原料,经乳酸菌发酵生产双菌双蛋白酸乳时,以上 4 个因素在影响双菌双蛋白酸奶品质上的优先次序为麦苗粉添加量 > 抹茶粉添加量 > 水豆比 > 蔗糖添加量。

2.3　特色双菌双蛋白发酵乳最佳工艺条件的响应曲面优化及验证模型

用 Design Expert 设置响应值的变化范围及预期目标值,软件运行预测,以感官评分为指标,给出最优组合,特色双菌双蛋白发酵乳的最佳生产工艺参数为麦苗粉添加量 10.75%、抹茶粉添加量 4.04%、蔗糖添加量 7.13%、水豆比 11.41∶1 预测感官评分为 89.4 分,为便于实际生产,将参数修正为麦苗粉添加量 10.8%,抹茶粉添加量 4%,蔗糖添加量 7%,水豆比 11.4∶1;在该条件下进行 3 次验证,所得感官评价的平均分为 91 分,与预测结果无明显区别,证明结果合理可靠,说明试验的优化条件可行。

2.4　特色双菌双蛋白发酵乳的营养特性和理化指标

该产品评价指标除感官外,还有理化指标、微生物指标、工艺过程可在线控制 pH 值、滴定酸度和黏度等参数。对试验所得的最佳组合进行 3 次重复试验,所制得的双菌双蛋白发酵乳口感细腻、色泽均一、组织状态均匀、麦苗香气清新、风味独特(图 8)。其感官评分为 91 分,黏度值为 11 602 mPa/s,色值为 33.2,pH 值为 4.12,乳酸菌数≥10^8 CFU/mL,蛋白质含量≥3.1 g/100 g,脂肪含量≥2.9 g/100 g,非脂乳固体≥8.9 g/100 g,酸度为 85.9 °T。



图8　特色双菌双蛋白发酵乳

3　结论

本研究以感官为主要评价指标,综合考察黏度、pH 值、色值等指标对品质的影响。麦苗粉的适宜添加量为 9% ~ 11%,抹茶粉适宜添加量为 3.5% ~ 4.5%,蔗糖适宜添加量为 6% ~ 8%,明胶适宜添加量为 0.3% ~ 0.5%,水豆比选取 10∶1 ~ 12∶1。用响应曲面法进行发酵乳工艺优化,在发酵温度为 38 ℃,发酵时间为 4.5 h,植物乳杆菌 B1 - 6、瑞士乳杆菌 MB2 - 1 混合发酵剂接种量为 5% 的条件下,获得的特色双菌双蛋白发酵乳最佳配方为麦苗粉添加量 10.8%、抹茶粉添加量 4.0%、蔗糖添加量 7.0%、水豆比 11.4∶1,感官评分为 91 分。

双蛋白发酵乳无论从蛋白质含量还是质量上来讲,都远高于牛奶或者豆奶,是具有高蛋白的优质饮品,而且我国盛产大豆,根据我国的国情,“双蛋白”开发战略将是大豆产业持续发展的一个方向[26]。本研究所开发的产品不仅是受大众青睐的、营养丰富的功能性保健发酵乳,更重要的是为麦苗粉、抹茶粉的开发利用提供了新的途径。

参考文献:

[1] Hou J J, Yang X Q, Fu S R, et al. Preparation of double - network tofu with mechanical and sensory toughness[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2016, 51(4): 962 - 969.

[2] 毛叶宁,俞佳薇,曹铮铮,等. 含双蛋白风味发酵乳的开发研究[J]. 现代农业科技,2017(2):251 - 252.

[3] 陈　鸽. 大豆蛋白对牛奶及乳饮料品质的影响[D]. 无锡:江南大学,2009.

[4] 刘晓恒. 大豆蛋白替代牛乳蛋白对酸奶性质影响[D]. 无锡:江南大学,2013.

[5] Arimoto T, Ichinose T, Yoshikawa T, et al. Effect of the natural antioxidant 2″ - *O* - glycosylisovitexin on superoxide and hydroxyl radical generation[J]. Food and Chemical Toxicology, 2000, 38(9): 849 - 852.

[6] Kitta K, Hagiwara Y, Shibamoto T. Antioxidative activity of an isoflavonoid, 2″ - *O* - glycosylisovitexin isolated from green barley leaves[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1992, 40(10): 1843 - 1845.

[7] 鲜　瑶,张　雷,宋　戈,等. 大麦苗粉营养保健功能的研究及进展[J]. 中国食物与营养,2016,22(11):73 - 76.

[8] 李　翔,许　彦. 抹茶制品开发研究进展[J]. 饮料工业,2013,16(6):13 - 15.

[9] Selvamuthukumaran M, Khanum F. Optimization of seabuckthorn fruit yogurt formulation using response surface methodology[J]. Journal of Food Science and Technology, 2015, 52(2): 831 - 839.

[10] Viereck N, Nørgaard L, Bro R, et al. Chemometric analysis of NMR data[M]//Modern magnetic resonance. Dordrecht: Springer, 2008: 1833 - 1843.

[11] 阿罗拉 S K. 豆类的化学和生物化学[M]. 北京:科学出版社,1987.

[12] 戴家焜. 豆腥味的产生、防止和去除[J]. 食品科学,1983,4(7):12 - 18.

[13] 张　辉,陈召亮,乔勇进. 麦绿素保健功能及加工工艺研究进展[J]. 农产品加工(学刊),2013(10):51 - 54,57.

[14] Biliaderis C G, Khan M M, Blank G. Rheological and sensory properties of yogurt from skim milk and ultrafiltered retentates[J]. Internantional Diary Journal, 1992, 2(5): 311 - 323.

[15] Bohin L, Hegg P O, Ljusberg - Wahren H. Viscoelastic properties of coagulating milk[J]. Journal Diary Science, 1984, 67(4): 729 - 734.

[16] Grygorczyk A, Duizer L, Lesschaeve I, et al. Gelation of recombined soymilk and cow's milk gels: effect of homogenization order and mode of gelation on microstructure and texture of the final matrix[J]. Food Hydrocolloids, 2014, 35: 69 - 77.

曹学彬,王建波,邢荣莲,等. 北极海参不同酶解多肽的抗氧化活性与高效液相色谱分析[J]. 江苏农业科学,2018,46(20):211 – 214.
doi:10.15889/j.issn.1002 – 1302.2018.20.053

北极海参不同酶解多肽的抗氧化活性与高效液相色谱分析

曹学彬[1], 王建波[2], 邢荣莲[2], 姜爱莉[2]
(1. 山东东方海洋科技股份有限公司/国家海藻与海参工程技术研究中心,山东烟台 264000;
2. 烟台大学生命科学学院,山东烟台 264005)

摘要:利用 5 种蛋白酶酶解北极海参蛋白得到 5 种多肽,通过化学方法检测 5 种多肽的体外抗氧化活性,结果表明,5 种酶解多肽的体外抗氧化能力均随多肽浓度的增加而提高,对羟自由基(·OH)清除能力大小顺序为木瓜蛋白酶酶解多肽 PAP > 胰蛋白酶酶解多肽 TP≈酸性蛋白酶酶解多肽 AP > 中性蛋白酶酶解多肽 NP > 胃蛋白酶酶解多肽 PP,对超氧阴离子(O_2^-·)清除能力大小顺序为胰蛋白酶酶解多肽 TP > 酸性蛋白酶酶解多肽 AP > 中性蛋白酶酶解多肽 NP > 木瓜蛋白酶酶解多肽 PAP > 胃蛋白酶酶解多肽 PP,还原能力强弱顺序为酸性蛋白酶酶解多肽 AP > 中性蛋白酶酶解多肽 NP > 胰蛋白酶酶解多肽 TP > 胃蛋白酶酶解多肽 PP > 木瓜蛋白酶酶解多肽 PAP。利用高效液相色谱分析酶解多肽的分子量分布,PP、PAP 分别集中在 8 ~ 20、20 ~ 14 ku,NP 和 TP 小于 7 ku 的含量较高,AP 一部分在 20 ~ 7 ku,另一部分在 7 ~ 3 ku。

关键词:北极海参;多肽;抗氧化;羟自由基;超氧阴离子;酶解;高效液相色谱;分子量
中图分类号:TS254.1　　**文献标志码**:A　　**文章编号**:1002 – 1302(2018)20 – 0211 – 04

小分子量的多肽容易被人体吸收,具有对人体有益的各种生理功能[1-2]。抗氧化性多肽是生物活性肽的一种,通过减少氧自由基、羟自由基(·OH)从而达到抗衰老的功能[3-5],使用安全性高。海参(*Acaudina molpadioidea*)是典型的高蛋白、低脂肪、极低胆固醇、富含矿物质和维生素的优质食品,体壁富含蛋白质、皂苷、多糖等营养成分,具有多种保健功能及药用价值,是制备生物活性多肽的理想原料[6-7]。

海参多肽具有良好的溶解性和稳定性特点,易消化吸收,而且具有降血压、预防心脑血管疾病、抗疲劳、提高免疫力、抗肿瘤、抗氧化、延缓衰老等生物活性[8-9]。来自海参的生物活性肽有两大类,一类是存在于生物体中的天然多肽,如海参上皮组织中具有抗肿瘤和抗炎活性的五肽,由亮氨酸、脯氨酸、丝氨酸、精氨酸等氨基酸构成,其中个别氨基酸为 D – 型[10];另一类是海参生物蛋白质酶解产生的活性肽,如 Zhao 等连续酶解海参制备得到的 ACE 抑制多肽[11]。

不同种类的海参由于生活环境和摄食不同,其营养价值和生理功效也有所差异[12]。苏永昌等研究了地瓜参多肽抗氧化活性[13];赵芹等系统分析了不同分子量的刺参(*Apostichopus japonicus*)、菲律宾刺参(*Pearsonothuria graeffei*)、美国肉参(*Isostichopus badionotus*)和冰岛刺参(*Cucumaria frondosa*)等海参多肽抗氧化活性[14];陈卉卉等对东海海参胶原多肽的制备及自由基清除功能进行了研究[15]。

酶解水产品蛋白质进行深加工是经常采用的一种加工方法,也是获取抗氧化多肽的重要途径[3-4]。曾庆祝等研究表明,枯草杆菌蛋白酶和木瓜蛋白酶酶解扇贝边所得酶解物具有较好的·OH 清除效果,其清除率分别为 84.37%、

收稿日期:2017 – 05 – 17
基金项目:国家自然科学基金面上项目(编号:31070368、31572622)。
作者简介:曹学斌(1978—),男,山东潍坊人,硕士,高级工程师,主要从事海参养殖及深加工研究。Tel:(0631)6792268;E – mail:caoxvebin1978@163.com。
通信作者:姜爱莉,博士,教授,主要从事海洋生物化工研究。Tel:(0535)6881942;E – mail:jal9035@163.com。

[17]蔡　超. 酸奶在贮存期间参数的变化和对货架寿命预测模型的研究[D]. 武汉:华中农业大学,2012:18.
[18]段琼辉,李　永,葛竹兴,等. 大麦苗粉营养成分分析及评价[J]. 现代中药研究与实践,2014(3):55 – 57.
[19]商业部茶叶畜产局,商业部杭州茶叶加工研究所. 茶叶品质理化分析[M]. 上海:上海科学技术出版社,1989.
[20]王卫平,冯建军. 食品品质改良剂:亲水胶体的性质及应用(之一)[J]. 食品与发酵工业,1995(1):77 – 79.
[21]彭劲娣. 亲水胶体的应用[J]. 食品研究与开发,2000,21(6):15 – 16.
[22]李　祎,林智毳,包怡红. 凝固型紫薯酸奶工艺研究[J]. 安徽农业科学,2014,42(18):5937 – 5941,5949.
[23]邢广良. 乳酸菌混合发酵制备功能性双蛋白酸乳酪的研究[D]. 南京:南京农业大学,2015:45 – 46.
[24]王军辉,查学强,姜绍通. 发酵豆奶制作工艺优化的探讨[J]. 合肥工业大学学报(自然科学版),2008,31(7):1029 – 1033.
[25]Ambati P, Ayyanna C. Optimizing medium constituents and fermentation conditions for citric acid production from palmyra jaggery using response surface method[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology,2001,17(4):331 – 335.
[26]吴祖兴,杨　倩. 新型双蛋白奶产品的研究[J]. 食品科技,2008(10):25 – 28.