

复合酶酶解黄油制备天然奶油香精

Preparation of natural cream flavor from natural butter by mixed enzyme hydrolysis

周美玉 傅亮

ZHOU Mei-yu FU Liang

(暨南大学食品科学与工程系, 广东 广州 510632)

(Department of Food Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632, China)

摘要:采用由两种脂肪酶组成的复合酶体系酶解黄油制备天然奶油香精,结合酸价及感官评定,筛选出脂肪酶组合为 Palatase 20000L、Lipase MER。经优化后确定复合酶酶解黄油的最佳工艺条件为:Palatase 20000L 添加量 0.18% (m/m), Lipase MER 添加量 0.09% (m/m), 酶解温度 40 °C, 时间 9 h, pH 7.0。通过 GC—MS 分析,风味成分主要由短链脂肪酸、少量酮、内酯、酯等 11 种成分构成。经烘焙应用评定,产品奶香厚重,口感饱满,未夹带苦涩味等不良后味,且留香持久。

关键词:黄油;奶油;脂肪酶;酶解;天然香精

Abstract: Prepared natural cream flavor by mixed enzyme with two kinds of lipase. Through the determination of acid value and sensory evaluation, the palatase 20000L and lipase MER were selected for enzymolysis reaction. The optimum conditions for enzymatic hydrolysis of butter were palatase 20000L 0.18%, lipase MER 0.09%, hydrolysis time 9 h, temperature 40 °C and pH 7.0. By GC—MS analysis, the main flavor components consist of 11 kinds of substances include short chain fatty acids, small amount of ketones, lactones and esters. Through baking applications and sensory evaluation, finished bakery products had a thick milk and long lasting flavor, without any bad smell.

Keywords: butter; cream; lipase; enzymatic hydrolysis; natural flavor

奶油香精在食品工业中应用非常广泛,普遍用于饼干、饮料、糖果等产品的增香。长期以来,奶油香精多以单体调配为主^[1],由于酶解产物成分复杂,酶法水解相比于调配法制备的奶油香精,奶油香气更自然、柔和、丰满,赋予加香产品的风味与天然奶香更吻合^[2],是奶油香精制备的主要发展

方向。

因酶本身的局限性,目前还没有一种单一的脂肪酶可以制备高品质奶油香精。通过包含多种脂肪酶的复合酶系同时作用于底物可以弥补单一酶系的不足^[3]。脂肪酶^[4]即三酰甘油酯基水解酶,可将乳脂肪水解成多种饱和及不饱和的脂肪酸、酮酸和羧酸等风味物质。而不同来源的脂肪酶因其水解特性不同,生成的产物差异性极大,导致最后水解乳脂后所释放出来的风味物质特异性很大^[5]。田怀香等^[6]选用 Palatase 20000L 为水解用酶,以稀奶油为原料,得到的酶解产物为香型较纯正的奶味香气。汪薇等^[7]利用添加 Lipase AY 水解奶油及辅底物乳清粉,得到具有奶酪特征风味的天然奶油香精。张建强等^[8]筛选不同的商业脂肪酶和蛋白酶用于牛乳干酪的加工,得到香气良好的切达干酪型风味。总体而言,目前研究主要集中在单一酶的筛选及其工艺条件的优化,利用复合脂肪酶酶解黄油,对不同脂肪酶组合酶解效果的差异及复合酶酶解参数控制的研究尚未见诸于报道。基于以上研究背景,试验前期通过多种商品脂肪酶的筛选,选用增香效果较好的 Palatase 20000L、Lipase MER 及 Lipase AY 为试验用酶,探讨该 3 种脂肪酶两两组合与单一酶酶解效果的差异,拟筛选出较好的酶系组合,并对该工艺条件进行优化,期望生产出高品质奶油香精,为工业化生产提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

黄油:新西兰恒天然有限公司;

Palatase 20000L(酶活 2.0×10^4 LU/g):分析纯,诺维信中国生物技术有限公司;

Lipase MER(酶活 7.5×10^3 LU/g)、Lipase AY(酶活 3.0×10^4 U/g):分析纯,阿码诺天野酶制剂有限公司;

NaH_2PO_4 (纯度 99%)、 Na_2HPO_4 (纯度 98%):食品级,江苏科伦多食品配料有限公司;

氢氧化钾、乙醇、石油醚:分析纯,天津市富宇精细化工

基金项目:广州市重大科技计划项目(编号:2010U1-E00781)

作者简介:周美玉(1991—),女,暨南大学在读硕士研究生。

E-mail:770875795@qq.com

通讯作者:傅亮

收稿日期:2015-10-15

有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

数显恒温水浴锅:HH-4型,金坛富华仪器有限公司;
水浴恒温振荡器:SHA-BA型,金坛市宏华仪器厂;
低速离心机:KDC-12型,安徽中科中佳科学仪器有限公司;
pH计:PHS-3C型,上海精密科学仪器有限公司;
电子天平:HR-120型,上海精密科学仪器有限公司;
SPME萃取头:CAR/PDMS 75 μm型,美国 supelco 公司;
气相色谱质谱联用仪:TRACE型,美国菲尼根质谱公司。

1.2 方法

1.2.1 酶解工艺过程 取一定的黄油及0.2 mol/L磷酸盐缓冲液置于250 mL锥形瓶中(其中黄油:缓冲液为70:30),85℃水浴锅中保温15 min,冷却至所用酶的最适温度,添加酶(加酶量为酶与底物的百分比)于锥形瓶中并在水浴恒温振荡器中进行酶解,搅拌速度170 r/min,每隔2 h取适量的反应物测定酸价,进行感官评定。酶解完毕后,85℃灭酶30 min,4 500 r/min离心20 min,取上层油相进行GC-MS分析。

1.2.2 不同脂肪酶组合的初步筛选 按照1.2.1的方法,选用3种不同微生物来源的脂肪酶 Palatase 20000L、Lipase MER、Lipase AY,两两组合,以1:1的比例添加至底物中,总添加量为0.20%,在水浴恒温振荡器中(40℃,170 r/min)酶解8 h后,测定酸价及进行感官评定筛选出较好的脂肪酶组合。

1.2.3 复合酶酶解黄油单因素试验

(1) Palatase 20000L对产品酸价和感官评分的影响:按1.2.1的方法,Palatase 20000L添加量分别为0.04%,0.08%,0.12%,0.16%,0.20%,0.24%,Lipase MER添加量为0.10%,调节pH为7.0,于40℃下酶解8 h,测定酸价并进行感官评分。

(2) Lipase MER对产品酸价和感官评分的影响:按1.2.1的方法,Palatase 20000L添加量为0.16%,Lipase MER添加量分别为0.05%,0.07%,0.09%,0.11%,0.13%,0.15%,调节pH为7.0,于40℃下酶解8 h,测定酸价并进行感官评分。

(3) pH值对产品酸价和感官评分的影响:按1.2.1的方法,Palatase 20000L添加量为0.16%,Lipase MER添加量为0.11%,分别调节pH为6.0,6.5,7.0,7.5,8.0,8.5,于40℃下酶解8 h,测定酸价并进行感官评分。

(4) 酶解温度对产品酸价和感官评分的影响:按1.2.1的方法,Palatase 20000L添加量为0.16%,Lipase MER添加量为0.11%,调节pH为7.0,分别于30,35,40,45,50,55℃下酶解8 h,测定酸价并进行感官评分。

(5) 酶解时间对产品酸价和感官评分的影响:按1.2.1的方法,Palatase 20000L添加量为0.16%,Lipase MER添加量为0.11%,调节pH为7.0,于40℃下进行酶解,分别在

2,4,6,8,10,12 h时测定酸价并进行感官评分。

1.2.4 评价指标

(1) 酸价(AV)测定:按GB/T 5530—2005执行。

$$AV = \frac{56.1 \times V \times c}{m} \quad (1)$$

式中:

V——所用氢氧化钾标准溶液的体积,mL;

c——所用氢氧化钾标准溶液的准确浓度,mol/L;

m——试样的质量,g;

56.1——氢氧化钾的摩尔质量,g/mol。

(2) 感官评价:由10位人员组成感官评价小组,按表1分别对黄油酶解物香气强度和纯度进行评分,评分结果为两者分值之和。

表1 感官评分标准

Table 1 The standard of sensory evaluation

香气强度	评分/分	香气纯度	评分/分
强	50.1~60.0	纯正,协调,无异味	35.1~40.0
较强	40.1~50.0	较纯正,协调,无异味	30.1~35.0
较弱	30.1~40.0	尚可,协调性一般	25.1~30.0
比原料风味稍强	20.1~30.0	及格,协调性差,夹杂异味	20.1~25.0
与原料风味一致	20.0以下	不及格,协调性差,明显异味	20.0以下

1.2.5 SPME-GC-MS分析酶解物风味成分

(1) 固相微萃取工艺过程(SPME):取酶解物10 mL放入25 mL样品瓶中,并加入磁旋子于瓶中加快水浴平衡速度,加盖密封,将待吸附样品在60℃水浴中平衡30 min,然后将已老化好的75 μm的CAR/PDMS萃取头插入样品瓶中进行萃取,吸附时间30 min。

(2) 色谱条件:毛细管色谱柱:30 m×0.25 mm×0.25 μm;载气He,流速1.0 mL/min;固相微萃取洗脱时间10 min,起始柱温60℃,2 min,2℃/min上升至180℃,再以10℃/min上升至220℃,保温40 min;分流比10:1;进样口温度250℃,检测器温度280℃。

(3) 质谱条件:电离方式EI,离子源温度200℃;电子能量70 eV;灯丝发射电流200 μA;接口温度250℃;扫描质量范围为32~402 m/z。

1.2.6 蛋糕烘焙应用评价 在不锈钢容器中加入120 g鸡蛋与60 g糖粉,用打蛋器混合打发15~20 min,然后依次加入50 g低筋粉、5 g泡打粉、25 g淀粉,低筋粉与淀粉预先过筛,最后放入40 g黄油、0.6 g食盐继续搅打20 min,用蛋糕袋分装后置于烤盘中,面火160℃,底火210℃,烤15 min。

添加香料效果评价方法:按上述工艺,添加0.50%酶解产物,以未加酶解产物为空白,通过品尝、闻香评定蛋糕的口感及香气。

2 结果与分析

2.1 脂肪酶组合的筛选

由图1可知,3种单一酶中Palatase 20000L酶解效率最

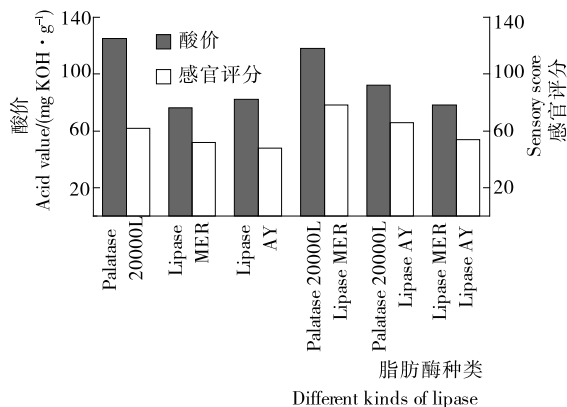


图 1 脂肪酶种类对感官评分及酸价的影响

Figure 1 Effect of different kinds of lipase on sensory score and acid value

快,其产物酸价最高,香气强度大但不够均衡。3种组合酶中 Palatase 20000L 与 Lipase MER 组合酶解黄油得到的产物其感官评分及酸价均最高,且与单一 Palatase 20000L 得到的产物相比,其香气更加饱满,具有典型的奶油风味,而 Palatase 20000L 与 Lipase AY 组合得到的酶解产物奶油香味平淡,不丰满;Lipase MER 与 Lipase AY 组合对应的酶解产物香气很弱。因此,选用 Palatase 20000L 与 Lipase MER 组合作为试验用酶进行进一步研究。

2.2 复合酶酶解黄油单因素试验结果

2.2.1 Palatase 20000L 添加量对酶解产物酸价及感官评分的影响 由图 2 可知,随着酶量的增加,酶解产物酸价和感官评分也相应增加,增长速度由大变小,当加酶量超过 0.16% 时,酸价和感官评分上升的幅度减小,最后趋于平缓,说明增加酶量已经无法提高酶解效果。因此 Palatase 20000L 添加量为 0.16%。

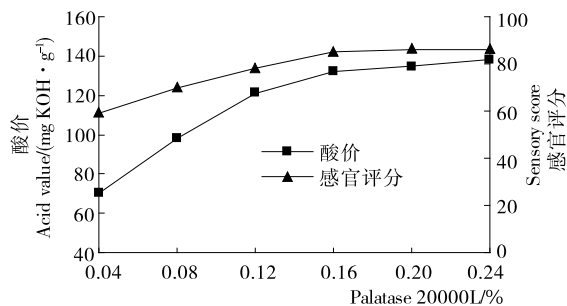


图 2 Palatase 20000L 添加量对感官评分和酸价的影响

Figure 2 Effect of amount of Palatase 20000L on sensory score and acid value

2.2.2 Lipase MER 添加量对酶解产物酸价及感官评分的影响 由图 3 可知,随着酶量的增加,酸价和感官评分也相应增加,当酶量超过 0.11% 时,酸价持续上升,但酶解产物香型开始不纯正,有不良异味而导致感官评分下降,因此 Lipase MER 添加量为 0.11%。

2.2.3 pH 值对酶解产物酸价及感官评分的影响 由图 4 可知,pH 值为 7.0 时,酶解产物酸价及感官评分最高,但 pH 值继续上升,酸价和感官评分反而下降,这可能是因为 pH 过高

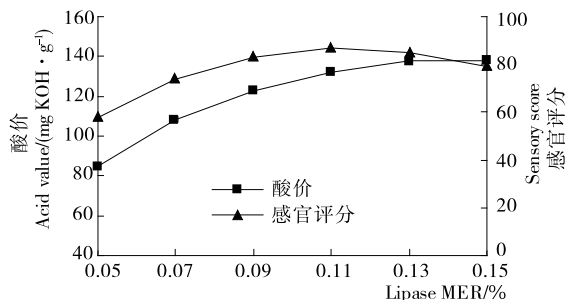


图 3 Lipase MER 添加量对感官评分和酸价的影响

Figure 3 Effect of amount of Lipase MER on sensory score and acid value

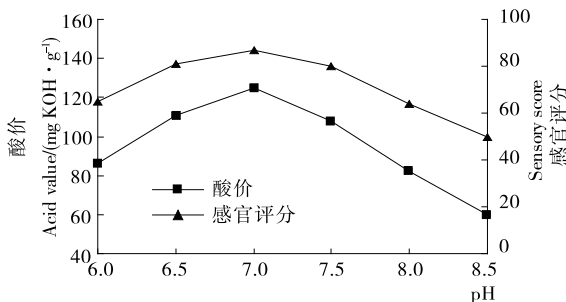


图 4 pH 值对感官评分和酸价的影响

Figure 4 Effect of pH value on sensory score and acid value

导致酶活性减弱。因此该复合酶酶解黄油的较适 pH 值为 7.0。

2.2.4 酶解时间对酶解产物酸价及感官评分的影响 由图 5 可知,随着酶解时间的增加,酸价及感官评分升高,当酶解时间超过 8 h 后,酸价继续上升,开始出现不愉快的刺激性酸臭味,感官评分下降,这可能是酶解程度过高导致产物中不良风味物质的生成。因此较适酶解时间为 8 h。

2.2.5 酶解温度对酶解产物酸价及感官评分的影响 由图 6 可知,随着酶解温度的升高,酸价和感官评分相应增加,当温度超过 40 °C 后,可能是酶活力开始下降导致酸价和感官评分降低。因此较佳酶解温度为 40 °C。

单因素试验结果表明,当 Palatase 20000L 及 Lipase MER 添加量分别为 0.16%,0.11%,pH 值为 7.0,酶解时间

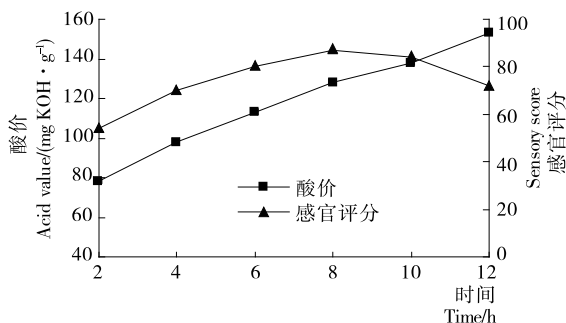


图 5 酶解时间对感官评分和酸价的影响

Figure 5 Effect of enzymolysis time on sensory score and acid value

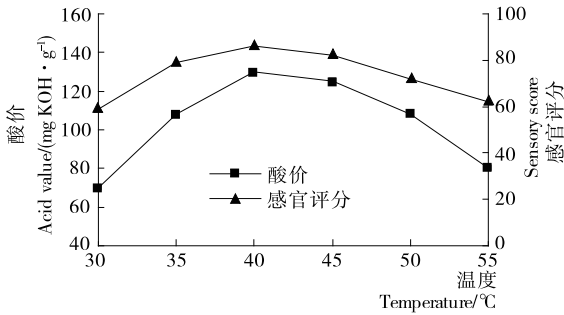


图6 酶解温度对感官评分和酸价的影响

Figure 6 Effect of enzymolysis temperature on sensory score and acid value

为8 h,酶解温度为40 °C时,复合酶酶解黄油得到的酶解产物奶油香气浓郁,香型纯正,愉悦度好。

2.3 正交试验结果与分析

在单因素试验的基础上,以感官评分为评价指标,采用L₁₆(4⁵)正交试验,研究 Palatase 20000L 及 Lipase MER 添加量、pH 值、酶解温度、酶解时间对酶解物感官评分的影响,因素水平见表2,结果与分析见表3。

由表3可知,最佳工艺组合是A₃B₂C₂D₃E₃,即最佳 Palatase 20000L 及 Lipase MER 的添加量分别为0.18%,0.09%,酶解温度40 °C,初始pH值7.0,酶解时间9 h。各因素对试验影响顺序为:pH 值>酶解温度>Palatase 20000L 添加量>Lipase MER 添加量>酶解时间,即pH 值对反应的影响最大,在此优化条件下制备的黄油酶解物奶油香气最好。

2.4 验证实验

根据正交试验优化结果,即 Palatase 20000L 及 Lipase MER 的添加量分别为0.18%,0.09%,酶解温度为40 °C,初始pH值为7.0,酶解时间为9 h,在此条件下进行酶解,实验重复3次得到酶解产物酸价平均值为142 mg KOH/g,感官评分平均值为91分,产物奶油香味浓郁,香型纯正,该配方投入生产后获得市场好评。

2.5 酶解物风味成分分析

通过SPME对样品中的挥发性风味成分进行萃取,经GC-MS分析得到酶解物中风味成分总离子流色谱图(图7),与标准谱库进行比对,在该复合酶酶解黄油样品中检测出11种主要成分(表4):脂肪酸类物质主要是以丁酸、戊酸、辛酸等为主的中、短链脂肪酸,构成了奶香精的主要致香成分,使产品具有浓厚的奶油特征风味^[9];而长链脂肪酸

表2 正交试验因素水平表

Table 2 Orthogonal factor level table

水平	A Palatase 20000L/%	B Lipase MER /%	C 酶解温度/°C	D pH 值	E 酶解时间/h
1	0.14	0.07	35	6.0	7
2	0.16	0.09	40	6.5	8
3	0.18	0.11	45	7.0	9
4	0.20	0.13	50	7.5	10

表3 正交试验结果

Table 3 The results of orthogonal experiment

试验号	A	B	C	D	E	感官评分
1	1	1	1	1	1	64
2	1	2	2	2	2	86
3	1	3	3	3	3	80
4	1	4	4	4	4	58
5	2	1	2	3	4	88
6	2	2	1	4	3	68
7	2	3	4	1	2	62
8	2	4	3	2	1	83
9	3	1	3	4	2	66
10	3	2	4	3	1	81
11	3	3	1	2	4	84
12	3	4	2	1	3	83
13	4	1	4	2	3	77
14	4	2	3	1	4	72
15	4	3	2	4	1	78
16	4	4	1	3	2	85
<hr/>						
k ₁	72.00	73.75	75.25	70.25	76.50	
k ₂	75.25	76.75	83.75	82.50	74.75	
k ₃	78.50	76.00	75.25	83.50	77.00	
k ₄	78.00	75.50	71.50	67.50	75.50	
R	6.50	3.00	12.15	16.00	2.25	

如月桂酸对产物香气的贡献程度虽然有限,但其能在一定程度上改善奶油香精的滋味,使口感更加圆润;酯类、酮类及内酯类物质阈值较低,但都具有令人愉悦的水果及奶油清香^[10],使产品香气更加丰满,柔和。

2.6 蛋糕烘焙应用评价

黄油酶解后生成的呈香味物质及前体,有可能在高温条件下挥发或发生化学反应而导致风味改变。应用试验表明添加0.50%酶解产物制作的蛋糕相比于空白对照组,最终产品奶油香味浓郁,滋味饱满,留香持久,未夹带苦涩味等不良后味。说明该酶解物适用于高温焙烤的饼干、蛋糕等的加香,也可作为调配天然奶油香精的香基。

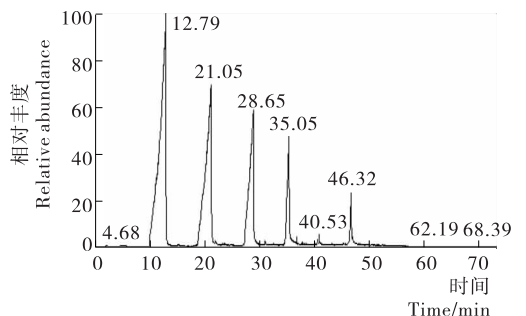


图7 黄油酶解物中风味成分总离子流色谱图

Figure 7 The chromatogram of flavor substances of butter hydrolyzate

表 4 黄油酶解物中的主要风味物质

Table 4 The main flavor substances of butter hydrolyzate

化合物	含量/%	化合物	含量/%
乙酸	0.08	2-甲基戊醛	0.07
丁酸	43.02	丁位癸内酯	0.08
戊酸	25.92	2-羟基丙酸戊酯	0.12
辛酸	15.75	癸酸辛酯	0.32
2-庚酮	0.12	月桂酸	2.45
癸酸	7.15	未知成分	4.91

3 结论

本研究通过不同脂肪酶组合的筛选,得到了酶解效果较好的脂肪酶组合 Palatase 20000L、Lipase MER 为试验用酶,结合优化试验,确定复合酶酶解黄油的最佳工艺条件为: Palatase 20000L 添加量 0.18% (m/m), Lipase MER 添加量 0.09% (m/m), 酶解温度 40 °C, 时间 9 h, pH 7.0。经 GC-MS 分析,风味成分主要由短中链脂肪酸、少量的酮、内酯、酯等 11 种成分构成。添加 0.50% 的酶解产物于蛋糕中进行烘焙应用评定,产品具有典型纯正的奶油香气,风味浓郁、口感饱满、不存在苦涩味等不良后味、且留香持久。

单一的脂肪酶酶解黄油时由于酶的专一性导致酶解方向较为单一,产物构成及分布较窄,呈香较为单调、刺激及虚浮。本研究采用两种脂肪酶协同作用于底物可使脂肪酸甘油酯酶解后形成的产物组分更加丰富,呈香更为自然合理。说明采用复合脂肪酶酶解是制备高品质天然香料的有效手段,也证实了选用脂肪酶的种类及参数的控制尤为重要。寻求更多更好的酶制剂,进一步提高酶解产物的呈香质量,是下一步深入研究的重点,研究开发新型的酶制剂也是该行业技术攻关的关键。本研究采用两种脂肪酶组合酶解黄油产生呈香物质,为生产香气浓郁、风味均衡的天然奶油香精提

供了参考依据,该试验结果已投入生产应用。试验中发现,采用进口的酶制剂成本占原料的比例仍然较大,如何在有效进行酶解产生风味的同时提高酶制剂的利用率以及如何测定并保护酶活等环节还需进一步深入探讨。

参考文献

- [1] 艾娜丝,王静,张晓梅,等. 奶香型香味料的制备及分析技术研究进展[J]. 食品工业科技, 2014, 35(21): 380-384.
- [2] Balção V M, Malcata F X. Lipase catalyzed modification of milk-fat[J]. Biotechnology Advances, 1998, 16(2): 309-341.
- [3] 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, 31(10): 68-71.
- [4] Regado M A, Cristóvão B M, Moutinho C G, et al. 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.
- [5] Hernandez I, de Renobales M, Virto M, et al. Assessment of industrial lipases for flavour development in commercial Idiazabal (ewe's raw milk) cheese[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2005, 36(7): 870-879.
- [6] 田怀香,李风华,马霞. 天然奶味香精的酶解工艺优化[J]. 食品与机械, 2013, 29(3): 120-124.
- [7] 汪薇,赵文红,白卫东,等. 酶促奶油水解制备天然奶味香精[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(1): 94-97.
- [8] 张建强,李浩,王英,等. 切达干酪促熟复合酶制剂的筛选[J]. 食品与机械, 2013, 29(5): 45-50.
- [9] Pinho O, Ferreira I M P L V O, Ferreira M A. Solid-phase microextraction in combination with GC/MS for quantification of the major volatile free fatty acids in ewe cheese[J]. Analytical Chemistry, 2002, 74(20): 5 199-5 204.
- [10] Nogueira M C L, Lubachevsky G, Rankin S A. A study of the volatile composition of Minas cheese [J]. LWT-Food Science and Technology, 2005, 38(5): 555-563.

信息窗

北京大学发现调控植物分枝形成基因

植物分枝的多少,是植物在形态上适应环境的一种非常重要的方式,还可以影响粮食产量。那么植物的分枝是如何形成的呢?分枝形成的过程又是如何调控的呢?北京大学秦跟基课题组发现了一个重要的调控植物分枝的基因。相关成果日前发布于《植物细胞》。

一些名为“腋芽分生组织调控因子”(RAX)的 MYB 类转录因子对干细胞形成起非常重要的作用。科学家通过正向遗传学方法鉴定了一个促进植物分枝增多的基因,命名为“过多分枝”(EXB1)。在突变体中 EXB1 基因的表达量升高,植物就长出很多分枝,而且有些叶腋处长出更多个初

级分枝和更高级分枝,甚至在子叶的叶腋处也能长出分枝。这说明 EXB1 基因可促进腋芽干细胞的形成,甚至在正常情况下不能形成腋芽干细胞的部位也能形成腋芽干细胞。

研究发现,EXB1 基因编码是一个植物中特有的转录因子。EXB1 通过调控 RAX 基因的表达来促进分枝,而且体内和体外实验证明 EXB1 可直接结合到 RAX 基因的启动子区,从而调控 RAX 基因的表达。同时,植物激素生长素也在 EXB1 促进植物分枝形成的过程中起重要作用。

(来源:www.foodmate.net)