

UHT乳贮存期间蛋白变化的研究

郭奇慧, 白雪, 胡新宇*, 刘卫星

(内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司研发中心, 内蒙古呼和浩特 011500)

摘要:在 UHT 乳贮存期间,对其纤维蛋白酶活力、蛋白沉淀量、下层蛋白粒径、游离氨基氮含量进行测定。结果表明,随着贮存时间的延长,纤维蛋白酶活力、蛋白沉淀量、下层蛋白粒径、游离氨基氮含量变化极显著($P < 0.01$);贮存时间与纤维蛋白酶活力、蛋白沉淀量、下层蛋白粒径、游离氨基氮含量间均呈极显著正相关($P < 0.01$)。

关键词:UHT 乳,蛋白变化

Study on protein changes of UHT milk during storage

GUO Qi-hui, BAI Xue, HU Xin-yu, LIU Wei-xing

(Inner Mongolia MENGNIU Dairy (Group) Co., Ltd., R&D, Huhhot 011500, China)

Abstract:During storage, the plasmin activity, protein precipitation, protein size, free amino nitrogen in the UHT milk were analyzed. The results showed that the plasmin activity, protein precipitation, protein size, free amino nitrogen increased during storage ($P < 0.01$); higher correlation coefficient ($P < 0.01$) was found during the plasmin activity, protein precipitation, protein size and free amino nitrogen.

Key words:UHT milk; protein changes

中图分类号:TS252.42

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2008)012-0143-03

UHT(Ultra High Temperature)是超高温灭菌技术的简称,它最早是在 19 世纪末提出的,应用于乳品工业是在 20 世纪 40 年代末,于 60 年代与无菌灌装技术结合用于生产 UHT 乳^[1]。欧共体关于 UHT 产品的定义是:物料在连续流动的状态下,经 135℃ 以上不少于 1s 的超高温瞬时灭菌(以完全破坏其中可以生长的微生物和芽孢),然后在无菌状态下包装于不透汽容器中,以最大限度的减少产品在物理、化学及感官上的变化,这样生产出来的产品称为 UHT 产品^[1]。牛乳中的纤维蛋白酶(plasmin, PL)主要来源于血液,在乳中对酪蛋白起水解作用,它可以将乳中的 β -CN、 α -CN 水解为 γ -CN 和一些短的肽链,它的最适 pH 为 7.4~7.5,最适温度为 37℃^[2]。该酶在乳中大部分以无活性的酶原(plasminogen, PG)形式存在,在乳贮存或处理过程中,PG 在激活剂的作用下可以转变为有活性的 PL。研究表明,PL 和 PG 都有较高的耐热性,巴氏杀菌和 UHT 杀菌都不能使它们完全失活^[3,4]。Manji 等人的研究表明,间接加热杀菌的 UHT 乳在杀菌后并无残留的 PL 活性,但是经直接加热杀菌的 UHT 乳在杀菌后有 19% 的 PL 活性残留,同时在直接加热杀菌的 UHT 乳贮存期间乳中的蛋白水解明显^[3]。Kelly 等人的研究结果证明,在经过间接加热处理(138℃, 2.4s)的 UHT 乳中仍发现有少量残留的 PL 活性^[4]。由于 PL 的高耐热性,

使得它在乳制品的贮存过程中会继续发挥水解作用,对乳制品贮存过程中的品质造成影响。有一些学者认为,在 UHT 乳贮存期间存在的老化胶凝现象是由乳中残留的 PL 活性造成的^[5]。另外,UHT 乳贮存期间 PL 水解乳中蛋白释放出产生苦味的游离氨基氮,会对乳的风味造成不良影响。UHT 乳在贮存期间会在容器底部发现蛋白沉淀。乳本身作为一个缓冲体系,蛋白质是在各种离子组成的平衡体系中处于稳定状态的,但是当条件改变时可能会影响乳中固有的盐类平衡体系,导致乳蛋白聚集,粒径增大,最终形成沉淀。乳中钙离子对乳的稳定性影响最大,因为乳中的钙离子形成钙桥,从而将乳蛋白连接成稳定的长链,但是当钙离子被沉淀时就失去了其枢纽作用,使乳蛋白胶粒变得很不稳定,最终会沉淀下来。本实验的目的是通过开展 UHT 乳与蛋白变化对应关系的调查,寻求其中的规律,并据此及时反应出 UHT 乳的质量情况,可为乳制品的生产加工提供及时准确的指导信息,及时采取控制措施,避免经济损失。

1 材料与方法

1.1 实验材料

纯牛奶 市售 250mL 利乐包装的纯牛奶,置于室温下储存,定期剪包,对纤维蛋白酶活力、蛋白沉淀量、下层蛋白粒径、游离氨基氮含量进行测定。

1.2 测定方法

1.2.1 纤维蛋白酶活力的测定 UHT 乳中 PL 活性的测定参照 Albenzio 等^[6]的方法,略有改动。

1.2.2 蛋白沉淀含量的测定 取乳样 8mL,经离心机(HITACHI CR21G II)离心 15min(4528g/min),弃去上

收稿日期:2008-08-21 * 通讯联系人

作者简介:郭奇慧(1980-),女,硕士,研发员,研究方向:乳品感官及工艺学。

表1 UHT 乳贮存期间的蛋白变化

贮存时间 (d)	0	45	90	135	180	225	270	显著水平 (ANOVA)
蛋白酶活力 (u/mL)	0.41 ± 0.03 ^c	0.61 ± 0.03 ^d	0.91 ± 0.09 ^e	1.31 ± 0.02 ^b	1.51 ± 0.02 ^{ab}	1.87 ± 0.03 ^a	1.99 ± 0.03 ^a	* *
蛋白沉淀 (%)	0.013 ± 0.001 ^c	0.021 ± 0.004 ^d	0.032 ± 0.005 ^e	0.041 ± 0.001 ^b	0.047 ± 0.004 ^{ab}	0.052 ± 0.001 ^a	0.055 ± 0.004 ^a	* *
下层蛋白粒径 (μm)	0.43 ± 0.05 ^c	0.47 ± 0.11 ^{bc}	0.48 ± 0.09 ^{bc}	0.50 ± 0.14 ^b	0.57 ± 0.11 ^a	0.59 ± 0.08 ^a	0.61 ± 0.21 ^a	* *
游离氨基氮 (mmol/L 奶)	0.65 ± 0.04	0.70 ± 0.03	0.78 ± 0.12	0.81 ± 0.12	0.82 ± 0.12	0.84 ± 0.12	0.85 ± 0.12	* *

注: * * 表示在 0.01 水平下差异显著; a、b、c、d、e 表示各组间差异。

表2 UHT 乳贮存时间、蛋白变化之间多元回归系数检验表

	贮存时间	纤维蛋白酶活力	蛋白沉淀量	下层蛋白粒径	游离氨基氮
贮存时间	1.00000	0.95212 * *	0.81321 * *	0.87411 * *	0.77598 * *
纤维蛋白酶活力		1.00000	0.88124 * *	0.95479 * *	0.88529 * *
蛋白沉淀量			1.00000	0.84123 * *	0.93241 * *
下层蛋白粒径				1.00000	0.85774 * *
游离氨基氮					1.00000

注: * * 表示 0.01 水平下相关性显著。

清液,得到蛋白沉淀,于电热鼓风干燥箱中(J.P.Selecta Venticell222)60℃干燥 2h,对蛋白沉淀称重。

1.2.3 下层蛋白粒径测定 小心吸取下层乳样 10~15μL,用激光衍射粒径仪(LS13320 Beckman Coulter USA)测定乳样中的下层蛋白粒径。

1.2.4 游离氨基氮含量测定 游离氨基氮(FAN)的测定采用邻苯二甲醛衍生比色法,参照 Church 等^[7]的方法,在 440nm 下用分光光度计(UV-1700 Shimadzu)测定吸光值,确定游离氨基氮含量。

1.3 统计分析

利用 SAS 软件(V6.12)对数据进行分析^[8]。

2 结果与分析

2.1 UHT 乳贮存期间蛋白变化的差异性研究

根据 UHT 乳储存的时间,把样品分成八组(分组情况见表 1),每组各指标计算平均数,对纤维蛋白酶活力、蛋白沉淀量、下层蛋白粒径、游离氨基氮含量的差异性和相关性进行分析,结果见表 1。

从表 1 分析可知,UHT 乳中纤维蛋白酶活力、蛋白沉淀量、下层蛋白粒径、游离氨基氮含量随贮存时间的延长而增加,经统计学分析后发现,UHT 乳中纤维蛋白酶活力、蛋白沉淀量、下层蛋白粒径、游离氨基氮含量组间有显著差异($P < 0.01$)。

2.2 UHT 乳储存期间蛋白变化的相关性研究

对贮存时间、纤维蛋白酶活力、蛋白沉淀量、下层蛋白粒径、游离氨基氮含量的相关性进行分析,结果见表 2。

从表 2 分析可知,UHT 乳贮存时间与纤维蛋白酶活力、蛋白沉淀量、下层蛋白粒径、游离氨基氮含量呈极显著正相关($P < 0.01$);纤维蛋白酶活力与蛋白沉淀量、下层蛋白粒径、游离氨基氮含量呈极显著正相关($P < 0.01$);蛋白沉淀量与下层蛋白粒径、游离氨基氮含量呈极显著正相关($P < 0.01$);下层蛋白粒径与游离氨基氮含量呈极显著正相关($P < 0.01$)。

有报道称,在经过 UHT 处理之后,乳中 PL 活性

仍有残留,并且由于 PG 及其激活剂的存在,在 UHT 乳贮存期间乳中 PL 活性会逐渐增加^[9]。从实验结果可以看出,随着贮存时间的延长,UHT 乳中 PL 的活性明显增大,并且分解了蛋白质,产生了大量游离氨基氮,这与前人的研究结果是一致的。

从实验结果可以看出,UHT 乳在贮存期间,乳蛋白发生了聚集,导致乳中蛋白粒径的增大,最终发生了沉淀现象。这可能是由于随着贮存时间的延长,乳中固有的盐类平衡体系逐渐被破坏,导致乳蛋白聚集,粒径增大,最终形成沉淀。

3 结论

3.1 UHT 乳中纤维蛋白酶活力、蛋白沉淀量、下层蛋白粒径、游离氨基氮含量随贮存时间的延长而增加,经统计学分析后发现,UHT 乳中纤维蛋白酶活力、蛋白沉淀量、下层蛋白粒径、游离氨基氮含量有显著差异($P < 0.01$)。

3.2 贮存时间与纤维蛋白酶活力、蛋白沉淀量、下层蛋白粒径、游离氨基氮含量呈极显著正相关($P < 0.01$);脂酶活力与上层脂肪含量、上层脂肪粒径、FFA 呈极显著正相关($P < 0.01$);上层脂肪含量与上层脂肪粒径、FFA 呈极显著正相关($P < 0.01$);上层脂肪粒径与 FFA 呈极显著正相关($P < 0.01$)。

参考文献:

- [1]武建新. 乳制品生产技术[M]. 北京:中国轻工业出版社,2000. 78~79.
- [2] Korycka - Dahl M, Ribadeau Dumas B, Chene N, et al. Plasmin activity in milk[J]. J Dairy Sci, 1983, 66: 704~711.
- [3] Manji B, Kakuda Y, Arnott D R. Effect of storage temperature on age gelation of ultra high temperature milk processed by direct and indirect heating systems [J]. J Dairy Sci, 1986, 69: 2994~3001.
- [4] Kelly A L, Foley J. Proteolysis and storage stability of UHT

(下转第 147 页)

也越高。但 $[E]/[S]$ 过大时,不仅生产成本过高,同时也可能导致酶自身水解,使酶活力降低。所以选择 $[E]/[S]$ 为6000U/g较为合适。

2.2.4 最佳酶解时间的确定 松仁蛋白溶液, pH8.5, 加入 Alcalase2.4L 碱性蛋白酶 6000U/g, 在50℃下分别反应10、20、30、40、50、60、70、80、90min, 终止反应, 测定其水解度。结果如图5, 前30min 水解度增长明显, 第40min 起水解度增加缓慢, 到第50min 后趋于平缓, 说明酶活力已经下降或酶已经被底物饱和, 所以选择酶解时间为50min 便可以保证水解完全。

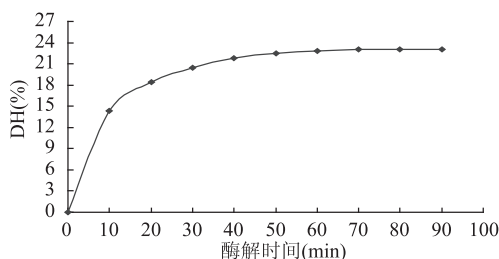


图5 酶解时间对水解度的影响

2.3 响应面实验

2.3.1 实验设计与结果 各实验点根据设计, 采用不同的 pH、温度、酶与底物比进行15次实验。实验以随机次序进行, 重复三次, 实验获得的水解度的平均值用 Minitab 程序进行分析, 并得到响应面分析图和方差分析表。

将实验数据用 Minitab 程序进行回归拟合, 可得到响应值 DH(%) 和各因子(X_1, X_2, X_3)之间的二次多元方程:

$$DH = 38.512 - 3.4236X_1 + 0.4197X_2 + 6.6514X_3 - 2.3926X_1^2 - 7.2724X_2^2 - 4.8631X_3^2 - 3.811X_1X_2 - 0.3967X_1X_3 + 0.267X_2X_3$$

2.3.2 响应面结果分析 由结果可知, $p < 0.01$ 模型是极显著的, $p < 0.05$ 是显著的, 回归模型的相关系数平方 $R^2 = 0.9640$, 可以用此模型对实验数据进行分析 and 预测。数据分析结果显示, 酶与底物比对水解度具有极显著影响, pH 对水解度有显著影响, 而温度的影响不显著。三个因素中, pH 和温度之间存在显著的交互作用, 其它各因素之间交互作用不显著。使用 Matlab 对回归方程进行分析, 得出最佳酶解工艺条件为 pH8.0、水解温度 53.1℃、酶与底物比 8836U/g 蛋白, 在此条件下的理论水解度为 42.7706%。

因为回归模型的线性关系 $R^2 = 0.9640$, 说明上述回归方程描述各因子与响应值之间的关系时, 其因变量与全体自变量之间线性关系是显著的, 即这种实验方法是可靠的。所以可以用回归模型对实验结果进行分析和预测。根据预测值确定松仁蛋白的最佳酶解条件是 pH8.0、水解温度 53℃、酶与底物比 8800U/g 蛋白, 在此条件下的理论水解度为 42.77%。在最佳酶解条件下进行了两组平行实验, 平均水解度为 43.15%。

3 结论

3.1 研究了国产中性、碱性蛋白酶、风味蛋白酶和 Alcalase2.4L 碱性蛋白酶对松仁蛋白的水解作用, 得出水解红松松仁蛋白的最佳蛋白酶是 Alcalase2.4L 碱性蛋白酶。

3.2 采用响应面回归分析法对酶解松仁蛋白工艺进行了研究, 得到碱性蛋白酶 Alcalase2.4L 酶解松仁蛋白的最佳酶解条件: pH 为 8.0、水解温度 53℃、酶与底物比 8800U/g 蛋白、酶解时间 50min, 在最佳酶解条件下水解度 DH 为 43.15%。

参考文献:

- [1] 冯彦博, 白凤翎. 松仁的营养价值及其深加工[J]. 食品研究与开发, 2003, 24(4): 86~87.
- [2] Hee - Guk Byun. Purification and characterization of angiotensin converting [J]. Process Biochemistry, 2001, 36(6): 1155~1162.
- [3] Seronei Chelulei Cheison, Zhang Wang. Multivariate strategy in screening of enzymes to be used for whey protein hydrolysis in an enzymatic membrane reactor [J]. International Dairy Journal, 2007(17): 393~396.
- [4] 谭斌, 曾凡坤. 花生肽的酶法生产工艺研究[J]. 食品与机械, 2000(3): 14~15.
- [5] 杜明, 朱蓓薇. 水解松仁蛋白用酶的最佳工艺条件[J]. 大连轻工业学院学报, 2003, 22(2): 121~123.
- [6] 丁小燕, 张雯, 等. 复合风味蛋白酶水解鸡骨泥工艺条件的研究[J]. 中国食品学报, 2006, 6(1): 88~90.
- [7] Gontard N, Guilbert S, Cuq J L. Edible wheat gluten films: Influence of the main process variables on film properties using response surface methodology [J]. Food Sci, 1992, 57: 190~196.
- [8] 胡筱波, 徐明刚, 等. 响应面优化油菜花粉谷蛋白酶解条件[J]. 食品科学, 2007, 28(7): 117~120.

(上接第144页)

milk as influenced by milk plasmin activity, plasmin/ β -lactoglobulin complexation, plasminogen activation and somatic cell count [J]. Int Dairy Journal, 1997(7): 411~420.

[5] Kohlmann K L, Nielsen S S, Ladisch M R. Effects of a low concentration of added plasmin on ultra - high temperature processed milk [J]. J Dairy Sci, 1991, 74: 151~156.

[6] Anthony J E, Nivedita D, Boka A, Hilton C D. Heat - induced and other chemical changes in commercial UHT milks [J]. J Dairy Res, 2005, 72: 442~446.

[7] Andersson R E, Danielsson G, Hedlund C B, Svensson S G. Effect of heat-resistant microbial lipase on flavor of ultra-high - temperature sterilized milk [J]. J Dairy Sci, 1981, 64: 375~379.

[8] 裴喜春, 薛河儒. SAS 及应用 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1998. 32~57.

[9] Green M J, Green L E, Schukken V H, et al. Somatic cell count distributions during lactation predict clinical mastitis [J]. J Dairy Sci, 2004, 87: 1256~1264.