

谷氨酰胺转胺酶与大豆多糖复配在酸性乳饮料中的应用

蒲金平¹, 李博², 高红亮¹, 金明飞¹, 崔玉红³, 常忠义¹

(1. 华东师范大学 生命科学学院, 上海 200241; 2. 上海工会管理职业学院, 上海 201415; 3. 平顶山金晶生物科技有限公司, 河南 平顶山 467215)

摘要:研究了谷氨酰胺转胺酶与可溶性大豆多糖复配对酸性乳饮料稳定性的影响。首先通过单因素试验探讨了谷氨酰胺转胺酶的添加方式、最佳添加量和最适体系 pH。然后通过正交试验确定了在酸性乳饮料中谷氨酰胺转胺酶和可溶性大豆多糖最佳复配方案:可溶性大豆多糖添加量为 0.25%、谷氨酰胺转胺酶加量为 $4 \text{ U} \cdot \text{g}_{\text{蛋白}}^{-1}$, 谷氨酰胺转胺酶的添加方式为与可溶性大豆多糖混合加入、酸性乳饮料体系 pH 为 3.4。谷氨酰胺转胺酶与可溶性大豆多糖复配后赋予饮料更好的口感和稳定性。

关键词:谷氨酰胺转胺酶;可溶性大豆多糖;酸性乳饮料;稳定性

中图分类号:TS275.4 文献标识码:A DOI:10.11861/j.issn.1000-9841.2014.05.0738

Application of Transglutaminase Mixed with Soybean Polysaccharides on the Stabilization of Acidified Milk Beverage

PU Jin-ping¹, LI Bo², GAO Hong-liang¹, JIN Ming-fei¹, CUI Yu-hong³, CHANG Zhong-yi¹

(1. School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200241, China; 2. Shanghai Vocational Management College of Trade Union, Shanghai 201415, China; 3. Pingdingshan Jinjing Biotechnology Co. Ltd, Pingdingshan 467215, China)

Abstract: The effect of transglutaminase (TGase) mixed with soybean soluble polysaccharides (SSPS) on the stabilization of acidified milk beverage was studied. The way of adding TGase, the amount of TGase and the pH acidified milk beverage were evaluated by single factor experiments. A suitable formula for TGase mixed with SSPS was evaluated by orthogonal experiment. The result showed that a suitable formula for acidic milk beverage with good flavor and stability was 0.25% SSPS and $4 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ TGase adding in a mixed mode, the suitable pH of beverage was 3.4.

Key words: Transglutaminase; Soybean soluble polysaccharides; Acidic milk beverage; Stabilization

可溶性大豆多糖 (soybean soluble polysaccharide, SSPS) 是以豆粕为原料, 通过酸碱提取和酶解等方法得到的大豆纤维素中的可溶性部分。其分子结构是以鼠李糖半乳糖醛酸和高聚半乳糖酸为主链、半乳糖和阿拉伯糖为侧链形成的近似球状体结构^[1]。可溶性大豆多糖是一种酸性多糖, 其水溶液的粘度较低, 受温度、盐类影响较小^[2-3]。在乳制品中, 可溶性大豆多糖主要依靠多糖侧链形成的空间位阻作用使蛋白质稳定, 是一种低粘度的酸乳饮料稳定剂^[4-5]。与乳制品中其他常用的以增加粘度来提高稳定性的稳定剂相比, 以可溶性大豆多糖为稳定剂的酸乳饮料口感清爽、风味自然、粘度较低^[6-7]。但单独使用可溶性大豆多糖为稳定剂时, 体系中有沉淀产生, 饮料的稳定性欠佳。开发一种既能提高乳饮料的稳定性, 又不增加体系的粘度的稳定剂就显得尤为重要。

谷氨酰胺转胺酶 (transglutaminase, TGase) 是一种能交联蛋白质分子的酶^[8]。该酶能催化肽键中

谷氨酰胺残基的 γ -羧酰胺基与酰基受体之间进行酰基转移, 当肽链中的赖氨酸残基的 ϵ -氨基为氨基受体时, 以蛋白质分子内和分子间形成 ϵ -(γ -谷氨酸) 赖氨酸异肽键使蛋白质发生交联^[9-10]; 当无伯胺存在时, 水充当酰基受体, 谷氨酰胺残基发生水解, 进行脱酰胺。经谷氨酰胺转胺酶改性后的乳蛋白乳化性、热稳定性有明显的提高, 其质量和贮存性能均有所改善。

本文针对乳饮料中单独使用可溶性大豆多糖稳定性欠佳的现象, 利用谷氨酰胺转胺酶的独特特性, 将谷氨酰胺转胺酶复配可溶性大豆多糖应用到酸性乳饮料中, 以期得到一种口感清爽、粘度低、稳定性好的酸性乳饮料稳定剂配方, 为酸性乳饮料稳定性的控制提供一定的理论和方法指导。

1 材料与方法

1.1 材料

雀巢脱脂乳粉, 可溶性大豆多糖 (平顶山金晶

收稿日期: 2014-02-18

基金项目: 质检公益性行业科研专项 (201310255)。

第一作者简介: 蒲金平 (1987-), 女, 硕士, 主要从事食品科学与工程研究。E-mail: pujinping123@126.com。

通讯作者: 常忠义 (1968-), 男, 副教授, 主要从事食品科学与工程研究。E-mail: zychang@bio.ecnu.edu.cn。

生物科技有限公司),谷氨酰胺转氨酶(泰兴市东圣食品科技有限公司),白砂糖(食品级),柠檬酸钠(食品级),柠檬酸(食品级)。

1.2 仪器和设备

FE20KPlus 酸度计(梅特勒-托利多),DZKW-S-4 电热恒温水浴锅(北京光明医疗仪器厂),均质机(上海中鹿均质机有限公司),LD5-10 离心机(北京京立离心机有限公司),85-2 磁力搅拌器(江苏金坛市中大仪器厂),PL3002 电子天平(梅特勒-托利多)。

1.3 方法

1.3.1 酸性乳饮料的制备 3%的脱脂乳粉先用部分 50~60℃的水水合 30 min;然后加入可溶性大豆多糖、8%的蔗糖溶于余量的 50~60℃的水中并搅拌 20 min;二者混合均匀后冷却至室温边搅拌边用 10%的柠檬酸或 10%的柠檬酸钠调 pH;将调酸后的乳液升温至 60℃均质(均质压力 20 MPa);90℃灭菌 10 min。

1.3.2 谷氨酰胺转氨酶添加方式的确定 谷氨酰胺转氨酶的酶活性的大小受温度、反应时间影响较大^[11]。为了确定谷氨酰胺转氨酶的最佳添加方式,采用可溶性大豆多糖添加量为 0.2% 酸乳体系 pH 为 3.8,谷氨酰胺转氨酶的添加方式分别按照:(1)在奶粉水合时加入,水合温度 50℃;(2)和可溶性大豆多糖一起加入;(3)奶液和糖水混合时加入。对照组不添加谷氨酰胺转氨酶。通过直接测定体系沉淀率来确定最佳添加方式。

1.3.3 谷氨酰胺转氨酶最佳添加量的确定 谷氨酰胺转氨酶在不同体系中用量差别较大,试验中可溶性大豆多糖添加量 0.2%,酸乳体系 pH 为 3.8,谷氨酰胺转氨酶添加梯度按照:0 1 2 3 4 5 6 7 8 U·g_{蛋白}⁻¹。通过测定体系离心沉淀率来确定谷氨酰胺转氨酶的最佳添加量。

1.3.4 离心沉淀率测定 沉淀率的测定分为直接测定及冷藏 4 h 后测定^[12]。直接测定:10 mL 酸性乳饮料 3 000 r·min⁻¹(离心力 1 860 g)离心 10 min,去上清液,于 45°斜面上倒置 15 min 后擦去管口的水珠后称重。每个样品 3 次平行。离心沉淀率取 3 次平行的平均值。冷藏 4 h 后测定沉淀率方法相同。

沉淀率(%)

$$= \frac{\text{离心后去上清液管的质量} - \text{空管的质量}}{\text{样品和空管的质量} - \text{空管的质量}} \times 100$$

1.3.5 感官评定 以清爽度、色泽、接受度等作为感官评价的指标,以不记名的方式随机找 10 个人对该酸性乳饮料进行感官评价,采用百分制评方法。

分数越高表明产品感官品质越好。

1.4 数据分析

采用 Excel 进行统计分析,所有数据均采用 3 次重复平均值。

2 结果与分析

2.1 TGase 添加方式对酸性乳饮料稳定性的影响

由图 1 可以看出,与对照相比,谷氨酰胺转氨酶和奶粉一起水合时,不仅没有提高酸乳饮料的稳定性,反而增加沉淀率。谷氨酰胺转氨酶在奶液和糖水混合时加入或和可溶性大豆多糖一起加入都能提高乳饮料的稳定性。这可能是因为当谷氨酰胺转氨酶在奶粉水合时加入时,由于蛋白浓度相对较高,谷氨酰胺转氨酶直接通过转谷氨酰胺作用催化蛋白质形成共价交联,从而导致乳蛋白在热巴氏杀菌处理时凝结沉淀。当谷氨酰胺转氨酶和可溶性大豆多糖一起加入或奶液和糖水混合时加入,乳液蛋白浓度相对比水合时低,水充当一部分的酰基受体,谷氨酰胺残基发生水解,生成谷氨酸和氨,从而改变蛋白质的溶解性和等电点。同时谷氨酰胺转氨酶和可溶性大豆多糖一起加入时有可能一部分谷氨酰胺转氨酶和可溶性大豆多糖本身糖蛋白交联,交联后的可溶性大豆多糖形成较大的空间位阻,从而提高可溶性大豆多糖本身的稳定性,且这种作用效果更明显。

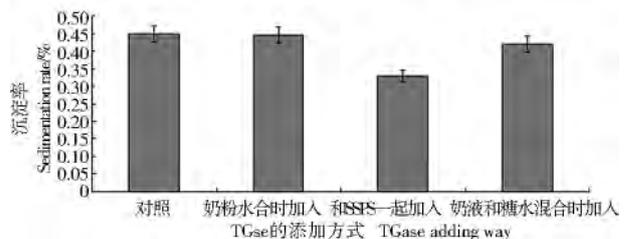


图 1 TG 添加方式对酸性乳饮料稳定性的影响

Fig. 1 Effect of TGase adding way on the stabilization of acidified milk beverage

2.2 TGase 添加量对酸性乳饮料稳定性的影响

如图 2 所示,无论是直接测定还是冷藏 4 h 后测定沉淀率,随着谷氨酰胺转氨酶添加量的增加,酸性乳饮料的沉淀率都是先降低后增加。当添加量为 4~5 U·g_{蛋白}⁻¹时,乳饮料的离心沉淀率较低,稳定性较好。随着谷氨酰胺转氨酶的继续增加,离心沉淀率逐渐增大。这可能是因为少量的谷氨酰胺转氨酶能够防止在热巴氏杀菌处理时饮料乳蛋白的凝结沉淀,增加乳蛋白本身的溶解性。当继续增加谷氨酰胺转氨酶后,谷氨酰胺转氨酶催化酪蛋白之间发生交联反应,蛋白颗粒的增大,导致在热巴

氏杀菌处理过程中的乳蛋白凝结沉淀。

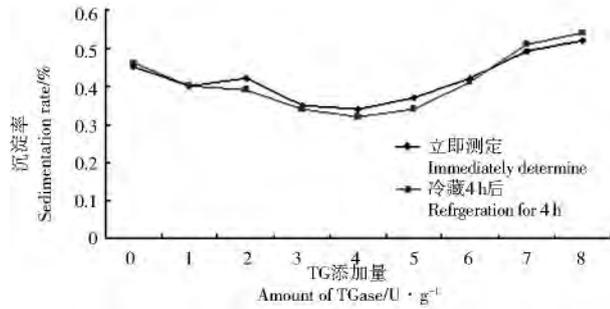


图2 谷氨酰胺转氨酶添加量对酸性乳饮料稳定性的影响

Fig.2 Effect of TGase amount on the stabilization of acidified milk beverage

2.3 谷氨酰胺转氨酶对不同 pH 的酸性乳饮料稳定性的影响

如图3所示,体系 pH 在 3.4~4.4 时,随着 pH 的增加酸乳饮料的直接测定离心沉淀率逐渐增大,酸乳饮料的稳定性逐渐降低。添加谷氨酰胺转氨酶后, pH 在 3.4~4.2 时,沉淀率比不加谷氨酰胺转氨酶组有所降低。这可能是因为,在酸性条件下,谷氨酰胺残基发生水解,进行脱酰胺,改变了蛋白质的等电点和溶解性,进而提高了热巴氏杀菌处理后乳蛋白的溶解性。

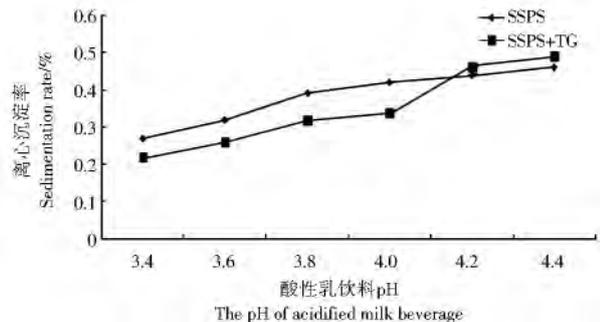


图3 谷氨酰胺转氨酶对不同 pH 的酸性乳饮料稳定性的影响

Fig.3 Effect of the TGase on the stabilization of acidified milk beverage under different pH

2.4 酸性乳饮料加工工艺优化

在上述单因素试验的基础上,采用 $L_9(3^3)$ 正交试验,以沉淀率为标准,确定可溶性大豆多糖的添

加量(A)、酸性乳饮料 pH(B)、谷氨酰胺转氨酶的添加量(C)3个因素的最佳工艺参数。

由表1可以看出,3种因素对酸性乳饮料沉淀率的影响大小顺序为:A>B>C,即可溶性大豆多糖添加量的影响最大,其次为酸性乳饮料 pH,谷氨酰胺转氨酶对体系的影响相对较小。最优组合为 $A_3B_1C_1$,即可溶性大豆多糖添加量为 0.25%、酸性乳饮料 pH 为 3.4、谷氨酰胺转氨酶加量为 $4 \text{ U} \cdot \text{g}_{\text{蛋白}}^{-1}$ 。多次验证试验表明,在此条件下,酸性乳饮料的离心沉淀率为 0.28%。

表1 正交试验结果与分析

Table 1 Results and analysis of orthogonal test

试验号 Test No.	A/%	B	C/ $\text{U} \cdot \text{g}_{\text{蛋白}}^{-1}$	沉淀率 Sedimentation ration /%
1	1(0.200)	1(3.40)	1(4.0)	0.38
2	1	2(3.70)	2(4.5)	0.44
3	1	3(4.00)	3(5.0)	0.56
4	2(0.225)	1	2	0.36
5	2	2	3	0.42
6	2	3	1	0.40
7	3(0.250)	1	3	0.34
8	3	2	1	0.33
9	3	3	2	0.38
K_1	1.38	1.08	1.11	
K_2	1.18	1.19	1.18	
K_3	1.05	1.34	1.32	
K_1	0.46	0.36	0.37	
K_2	0.39	0.40	0.39	
K_3	0.34	0.45	0.44	
R	0.12	0.09	0.07	

2.5 感官评定

添加谷氨酰胺转氨酶后,乳饮料的色泽略有提高,众所周知,乳白色的减退主要是由于在低于蛋白等电点的酸性 pH 范围内进行热巴氏灭菌处理时蛋白的增溶造成的,添加谷氨酰胺转氨酶后能够防止乳蛋白的增溶来抑制含乳蛋白酸化饮料乳白色的减退,并抑制乳蛋白的凝结沉淀,便可得到具有乳白色外观的含乳蛋白酸化饮料,且并不影响饮料本身的清爽口感,消费者总体接受度提高。总评定结果显示:添加谷氨酰胺转氨酶后的酸性乳饮料比不添加组有明显的感官提高。

表2 酸性乳饮料感官评定

Table 2 Test evaluation of the acidified milk beverage by consumers

序号 Test order	可溶性大豆多糖 SSPS/%	谷氨酰胺转氨酶 TGase/ $\text{U} \cdot \text{g}_{\text{蛋白}}^{-1}$	感官评价 Sensory evaluation			总分 Total score
			色泽 Color	清爽度 Refresh	接受度 Accepted	
1	0.25	-	96	95	92	94.3
2	0.25	4	98	95	94	95.7

3 讨 论

可溶性大豆多糖是一种酸性多糖,结构类似果胶^[13]。在乳制品中主要依靠侧链形成的空间位阻作用使蛋白质稳定,是一种低粘度的酸性乳饮料稳定剂^[4]。但可溶性大豆多糖自身粘度较低,在清爽型酸性乳饮料中单独添加会有少量的沉淀产生,而通过添加粘度大的稳定剂如果胶、黄原胶、羧甲基纤维素钠又会增加体系的粘度,对酸性乳饮料的口感影响较大。因此找到一种既能提高乳饮料的稳定性,降低沉淀率,又对乳饮料本身的粘度影响较小的稳定剂就显得尤为迫切。

谷氨酰胺转氨酶本身并不是一种乳饮料稳定剂,但是谷氨酰胺转氨酶借助于催化蛋白质分子间形成 ϵ -(γ -谷氨酰)赖氨酸共价键,产生共价交联,生成网络状超大蛋白质分子,从而提高蛋白质的水溶性、乳化性和热稳定性,进而改善食品蛋白质的质构、外观和风味。并且当谷氨酰胺转氨酶酰基受体为水时,谷氨酰胺残基发生水解,进行脱酰胺,生成谷氨酸和氨,该反应可以改变蛋白质的等电点和溶解度,产物谷氨酸可以增强食品的风味。但是谷氨酰胺转氨酶和可溶性大豆多糖的糖蛋白是否发生化学反应进而影响产品的特性还有待研究。

适量的谷氨酰胺转氨酶能显著提高以可溶性大豆多糖为稳定剂的酸性乳饮料的稳定性,并且能够提高乳饮料的外观,对乳饮料本身的粘度没有影响。

参考文献

- [1] Nakamura A, Furuta H, Maeda H, et al. Analysis of the molecular construction of xylogalacturonan isolated from soluble soybean polysaccharides [J]. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 2002, 66(5):1155-1158.
- [2] Maeda H, Phillips G O, Williams P A. Soluble soybean polysaccharide [J]. *Handbook of hydrocolloids* 2000:309-320.
- [3] Furuta H, Maeda H. Rheological properties of water-soluble soy-

bean polysaccharides extracted under weak acidic condition [J]. *Food Hydrocolloids*, 1999, 13(3):267-274.

- [4] Nakamura A, Yoshida R, Maeda H, et al. The stabilizing behaviour of soybean soluble polysaccharide and pectin in acidified milk beverages [J]. *International Dairy Journal* 2006, 16(4):361-369.
- [5] 李庄. 大豆水溶性多糖的提取与应用研究 [D]. 上海:华东师范大学, 2005:20-30. (Li Z. Extraction of water-soluble soybean polysaccharides and its applications [D]. Shanghai: East China Normal University 2005:20-30.)
- [6] 张晓华, 任晨刚, 郭顺堂. 可溶性大豆多糖的提取工艺及其应用研究 [J]. *大豆科学* 2006, 25(1):28-31. (Zhang X H, Ren C G, Guo S T. The extraction and utilization of soluble soybean polysaccharide [J]. *Soybean Science* 2006, 25(1):28-31.)
- [7] 袁海燕, 常忠义, 高红亮, 等. 大豆多糖与常见稳定剂复配在酸乳饮料中的应用 [J]. *大豆科学* 2008, 27(2):347-350. (Yuan H Y, Chang Z Y, Gao H L, et al. Application of soybean soluble polysaccharide mixed with other stabilizer in the acidified milk beverage [J]. *Soybean Science* 2008, 27(2):347-350.)
- [8] Folk J E. Structural requirements of specific substrates for guinea pig liver transglutaminase [J]. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 1965, 240:2951-2960.
- [9] 陶红军, 邵虎, 黄亚东, 等. 谷氨酰胺转氨酶的研究进展 [J]. *中国酿造* 2010(6):9-12. (Tao H J, Shao H, Huang Y D, et al. Research advance of transglutaminase [J]. *China Brewing* 2010(6):9-12.)
- [10] 蔡慧农, 李亚玲, 陈发河. 谷氨酰胺转氨酶对酪蛋白的改性效应 [J]. *食品科学* 2004, 25(2):107-111. (Cai H J, Li Y L, Chen F H. Modification study on goat milk casein by transglutaminase [J]. *Food Science* 2004, 25(2):107-111.)
- [11] 王齐, 宋小平, 王雅洁, 等. 微生物发酵生产谷氨酰胺转氨酶的研究进展 [J]. *齐齐哈尔医学院学报* 2013, 34(5):732-733. (Wang Q, Song X P, Wang Y J, et al. Latest advance of research on transglutaminases made by microbial fermentation [J]. *Journal of Qiqihar University of Medicine* 2013, 34(5):732-733.)
- [12] 熊素英. 花生奶生产过程中稳定性的研究 [J]. *塔里木农垦大学学报* 1999, 11(1):21-23. (Xiong S Y. Research of control on stability in processing of peanut milk [J]. *Journal of Talim University of Agricultural Reclamation*, 1999, 11(1):21-23.)
- [13] 曾令平, 常忠义, 高红亮. 水溶性大豆多糖和果胶作为酸性乳饮料稳定剂的研究 [J]. *中国乳品工业* 2008, 36(11):25-28. (Zeng L P, Chang Z Y, Gao H L. Studies of water soluble soybean polysaccharides and pectin on the stabilization of acidified milk beverage [J]. *China Dairy Industry* 2008, 36(11):25-28.)

(上接第 737 页)

参考文献

- [1] 谢棒祥, 张敏红. 生物类黄酮生理功能及其应用研究进展 [J]. *动物营养学报* 2003, 15(2):11-15. (Xie B X, Zhang M H. Recent advances on the function and application of flavonoids [J]. *Acta Zoon Utrimenta Sinica* 2003, 15(2):11-15.)
- [2] 幸宏伟. 玫瑰花醇提取物对油脂的抗氧化作用 [J]. *重庆工商大学学报(自然科学版)* 2006, 23(2):150-153. (Xing H W. Antioxidant effect of flavonoids extracts of rose on lard [J]. *Journal of Chongqing Technology Business University (Nature Science Edition)* 2006, 23(2):150-153.)
- [3] 蔡碧琼, 蔡珠玉, 张福娣, 等. 稻壳中黄酮提取物的抗氧化性质研究 [J]. *江西农业大学学报* 2010, 32(4):813-818. (Cai B Q, Cai Z Y, Zhang F D, et al. Study on antioxidant activities of flavonoided extracts from rice hull [J]. *Acta Agriculurae Universitatis Jiangxiensis* 2010, 32(4):813-818.)
- [4] 钱正清. 最新中药大辞典 [M]. 北京:中国中医药出版社, 2005:2365. (Qian Z Q. The latest Chinese medicine dictionary [M]. Beijing: Chinese Press of Traditional Chinese Medicine, 2005:2365.)

- [5] 徐美奕, 韩雅莉, 陈志红. 紫荆花总黄酮提取工艺的优化研究 [J]. *时珍国医国药* 2007, 18(11):2712-2713. (Xu M Y, Han Y L, Chen Z H. Optimization study on extraction of total flavonoids from *Cercis chinensis* Bge [J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medical Research* 2007, 30(10):1252-1255.)
- [6] 徐美奕, 韩雅莉, 东野广智, 等. 紫荆花总黄酮的分离纯化与光谱分析 [J]. *中药材* 2007, 30(10):1252-1255. (Xu M Y, Han Y L, Dong Y G Z, et al. Separation, purification and spectrum analysis of total flavonoids from *Cercis chinensis* [J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials* 2007, 30(10):1252-1255.)
- [7] 李君玲. 紫荆皮总黄酮超声提取工艺优化 [J]. *江苏农业科学*, 2012, 40(7):266-267. (Li J L. Optimization of ultrasonic extraction of total flavonoids from *Cercis chinensis* skin [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences* 2012, 40(7):266-267.)
- [8] 黄锁义, 林丹英, 尤婷婷. 韭菜总黄酮的提取及对羟自由基的清除作用研究 [J]. *时珍国医国药* 2007, 18(11):2786-2787. (Huang S Y, Lin D Y, You T T. Extraction of total flavanone from Chinese chives and its scavenging effect on hydroxyl radical [J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medical Research* 2007, 18(11):2786-2787.)