

蒋莹, 沈荷玉, 周可强, 等. 复合酶解法制备山楂绞股蓝清多肽复合饮料的工艺优化 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(7): 171–179. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020060019

JIANG Ying, SHEN Heyu, ZHOU Keqiang, et al. Optimization of the Technology for Preparing Hawthorn *Gynostemma pentaphyllum* Whey Polypeptide Compound Beverage by Compound Enzymes[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(7): 171–179. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020060019

· 工艺技术 ·

复合酶解法制备山楂绞股蓝清多肽复合饮料的工艺优化

蒋 莹, 沈荷玉, 周可强, 李 诚*, 姜荣杰, 唐婉婷, 李辰凤
(四川农业大学食品学院, 四川雅安 625014)

摘要: 以鲜牛乳为原料制备乳清, 通过单因素实验、正交试验、响应面试验, 结合测试多肽的胆固醇胶束溶解度抑制率, 优化复合酶解乳清蛋白的工艺和多肽复合饮料的配方。结果表明, 采用中性蛋白酶和胰蛋白酶复合酶分段酶解乳清蛋白制取乳清蛋白肽的最佳工艺条件是酶添加总量 6%、酶比例 3:1, 酶解总时间 4 h, 分段酶解时间比 1:1。响应面法优化得到该饮料的最佳配方参数为山楂含量 2.8%、枸杞含量 1.56%、绞股蓝含量 0.24%、柠檬酸含量 0.05%、蜂蜜含量 5.11%, 经过调配、均质、杀菌等环节, 得到 pH 为 4.30、感官性能与稳定性较佳、具有原料风味、酸甜度适中、橙红色色泽均匀且不分层的山楂绞股蓝清多肽复合饮料。

关键词: 乳清, 复合酶, 饮料, 山楂, 绞股蓝

中图分类号: TS252.9

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2021)07-0171-09

DOI: [10.13386/j.issn1002-0306.2020060019](https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020060019)

Optimization of the Technology for Preparing Hawthorn *Gynostemma pentaphyllum* Whey Polypeptide Compound Beverage by Compound Enzymes

JIANG Ying, SHEN Heyu, ZHOU Keqiang, LI Cheng*, JIANG Rongjie, TANG Wanting, LI Chenfeng

(College of Food Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: Fresh milk was used as raw material to prepare whey. Through the single factor test, orthogonal test, response surface method, combined with the inhibition rate of the cholesterol micelle solubility of the test polypeptide, the process of enzymatic hydrolysis of whey protein by the complex enzyme and the formula of the peptide compound beverage were optimized. The results showed that the optimal process conditions for the preparation of whey protein peptides by using a neutral protease and trypsin complex enzyme to hydrolyze whey protein in stages were: total enzyme addition was 6%, enzyme ratio was 3:1, total hydrolysis time was 4 h, and the ratio of split digestion time was 1:1. The best formula parameters of this beverage obtained by response surface method were as follows: Hawthorn 2.8%, wolfberry 1.56%, gynostemma 0.24%, citric acid 0.05%, honey 5.11%. After blending, homogenization, sterilization and other steps, the pH of hawthorn *Gynostemma pentaphyllum* whey polypeptide compound beverage was 4.30, which had good sensory performance and stability, raw material flavor, moderate sourness and sweetness, uniform orange-red color with no layering.

Key words: whey; complex protease; beverage; hawthorn; *Gynostemma pentaphyllum*

乳清作为生产奶酪和干酪素过程中的一种液体副产物, 年产量十分高, 世界乳清年产量超过

180000000 吨, 但我国对乳清的开发和利用才刚刚起步。因此, 如何合理开发利用乳清资源已成为亟待解

收稿日期: 2020-06-03

基金项目: 四川省重点研发项目 (2018NZ0033)。

作者简介: 蒋莹 (1997-), 女, 本科, 研究方向: 乳品加工, E-mail: yinghaehae@outlook.com。

* 通信作者: 李诚 (1964-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 畜产品加工及食品质量安全控制, E-mail: lichenglcp@163.com。

决的问题^[1-2]。近年来,西方国家关于乳清再生产方面的研究报道较多,主要是将乳清加工成乳清浓缩物、乳清粉、乳清膏等,可食用也可作饲料用,乳清再生产已成为一个蓬勃发展的行业^[3-5]。乳清的组成成分中含有多种营养物质,如乳糖、乳铁蛋白、脂肪、维生素和矿物质、生长因子等^[6-7]。乳清中约含有0.6%乳清蛋白,是高质量的蛋白,但这部分乳清蛋白还没有被大量地开发利用^[8-11]。因此,如何使这些乳清蛋白得到充分利用,让乳清增值,成为国内乳制品行业中的重大挑战^[12]。

乳清蛋白被相应酶水解后,得到生物活性肽,其中某些活性肽能够明显降低机体血液中的胆固醇含量^[13-14]。有调查表明,未来中国成人血脂异常患病率和青少年高胆固醇血症患病率将持续升高^[15-16],而现有的人工合成降胆固醇药物不仅价格昂贵,还会带来副作用,所以天然的降胆固醇活性因子具有巨大的开发潜力^[17]。乳清是酿酒和制造饮料的理想原料,故开发研制乳清饮料是乳清利用的一个重要方向,利用乳清生产饮料,既可以充分利用乳清资源,又具有比其他利用方式(比如乳清粉、浓缩物等)工艺简单、操作方便、产量大、经济收益高等特点^[18]。但利用乳清直接调配饮料时,热处理往往导致乳清蛋白的变性沉淀,影响产品的感官特性,如果弃去沉淀,会损失许多的营养成分,使营养价值大大降低^[19]。酶水解是改善乳清蛋白质溶解性的有效方法,且乳清蛋白水解后,降解为多肽,促进机体的消化吸收,增强蛋白质分子的表面活性,生产出的饮料产品营养健康、口感独特^[20]。

山楂制成饮料,健脾开胃,且山楂中的熊果酸及金丝桃苷也具有降低胆固醇的作用^[21-22]。绞股蓝号称“南方人参”,其有效成分能够明显降低血液中胆固醇含量和改善肝脏脂肪病变^[23-24]。因此该研究选择乳清、山楂、绞股蓝等为原料制成山楂绞股蓝乳清多肽复合饮料,对中性蛋白酶和胰蛋白酶复合酶解工艺和饮料配方进行优化,提高乳清等原料的利用率,以期为乳清的开发和探究提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

鲜牛乳 四川农业大学农场生产;山楂、绞股蓝、枸杞、蜂蜜 均为市售;柠檬酸 食品级,河南万邦实业有限公司;中性蛋白酶(50 U/mg)、胰蛋白酶(250 U/mg)

上海瑞永生物科技有限公司;水(GB/T6682 规定的三级水)、硫酸铜、硫酸钾、硫酸、氢氧化钠、对硝基苯酚、乙酸钠、无水乙酸钠、乙酸、甲醇、乙酰丙酮、盐酸、水杨酸、硫酸亚铁、过氧化氢、乙醇、乙酸、磷酸、硫酸铁铵、胆固醇标准品、牛磺胆酸钠、磷酸钠、氯化钠、油酸(均为分析纯) 源叶生物有限公司。

DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器 上海力辰邦西仪器科技有限公司、D-37520 型高速冷冻离

心机 美国 Thermo Fisher 公司、Phs-3C⁺酸度计 方舟科技、GA12038 电子天平 上海越平科学仪器有限公司;Varioskan las 荧光酶标仪 美国 Thermo Fisher 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 乳清复合饮料制备工艺流程

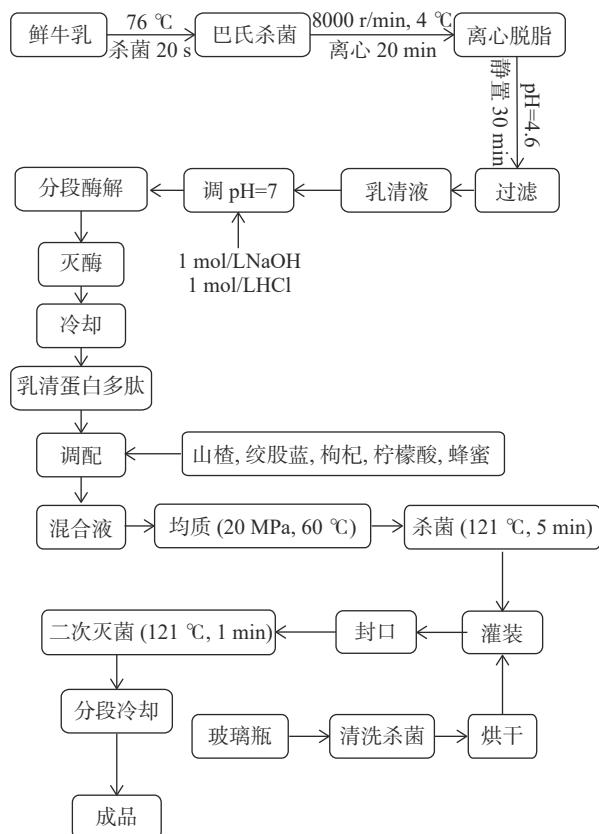


图 1 复合饮料的工艺流程图
Fig.1 The process flow diagram of complex drinks

1.2.2 乳清制备 鲜牛乳 76 °C 杀菌 20 s, 立即冷却, 转入离心管, 8000 r/min, 4 °C, 离心 20 min。将下层清液(脱脂乳)转入烧杯中。使用磁力搅拌器低速搅拌, 用 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 滴定至 pH 为 4.6, 静置 30 min, 用四层纱布过滤备用。

1.2.3 复合酶两步分段水解乳清

1.2.3.1 酶解工艺 乳清→调节温度和 pH→中性蛋白酶酶解→90 °C 水浴灭酶 5 min→调节最适温度和 pH→胰蛋白酶酶解→90 °C 水浴灭酶 5 min→离心→过滤→乳清水解液

操作要点:酶解过程需要保持温度不变、同时用 NaOH(HCl)溶液维持 pH 恒定。

中性蛋白酶和胰蛋白酶进行分步酶解,酶解总时长为 4 h,单一酶酶解完成后沸水浴钝化,冷却。8000 r/min 离心 20 min, 102 定性滤纸过滤,所得滤液即为乳清水解液。

1.2.3.2 优化酶解条件的单因素实验 经过预实验得出,中性蛋白酶最适温度为 50 °C, pH 为 7.0;胰蛋白

酶最适温度 37 °C, pH 为 7.5。在此条件下, 以胆固醇胶束溶解度抑制率为指标, 对乳清进行两步分段水解。固定酶比例 1:1、酶解时间比 2:1, 酶用量为 2%、4%、6%、8%、10%, 研究酶用量对胆固醇胶束溶解度抑制率的影响。固定酶用量 6%、酶解时间比 1:1, 酶比例为 1:2、1:1、2:1、3:1、4:1, 研究酶比例对胆固醇胶束溶解度抑制率的影响。固定酶用量 6%、酶比例 2:1, 分段酶解时间 1:3、1:2、1:1、2:1、3:1, 研究酶解时间对胆固醇胶束溶解度抑制率的影响。

1.2.3.3 优化酶解条件的正交试验 将两步水解过程中的酶用量、酶比例、酶解时间比三个因素分为三个合适的水平进行正交试验, 采用 $L_9(3^4)$ 设计进行正交试验, 以胆固醇胶束溶解度抑制率为指标, 确定乳清蛋白酶解的最优条件。正交试验因素与水平见表 1。

表 1 正交实验因素与水平表

Table 1 Factors and levels table of orthogonal experiment

水平	因素		
	A酶用量(%)	B酶比例	C时间比
1	4	2:1	1:2
2	6	3:1	1:1
3	8	4:1	2:1

1.2.4 山楂绞股蓝乳清多肽复合饮料的调配 以酶解所得的乳清多肽液中胆固醇胶束溶解度抑制率最高的乳清为原料, 将绞股蓝、干山楂、枸杞子挑选清洗、除杂去梗、粉碎过筛(40 目); 采用煎煮法, 以煮沸的乳清水解液作为溶剂, 水浴提取 30 min; 使用 200 目筛子进行过滤; 采用蜂蜜、柠檬酸调配口味, 使酸甜均匀; 使用 100 mL 玻璃瓶灌装。

1.2.4.1 山楂绞股蓝乳清多肽复合饮料调配的单因素实验 以山楂含量 3.0%、绞股蓝含量 0.25%、枸杞含量 1.6%、柠檬酸含量 0.05%、蜂蜜含量 5% 为基础调配条件, 以山楂含量(2.0%、2.5%、3.0%、3.5%、4.0%)、绞股蓝含量(0.15%、0.20%、0.25%、0.30%、0.35%)、枸杞含量(1.2%、1.4%、1.6%、1.8%、1.9%)、柠檬酸含量(0.03%、0.04%、0.05%、0.06%、0.07%)、蜂蜜含量(3%、4%、5%、6%、7%)为变量进行单因素实验, 考察各个因素对山楂绞股蓝乳清多肽复合饮料感官品质的影响。以感官评分来确定饮料不同成分的配方含量范围, 以便后续响应面优化试验。

1.2.4.2 山楂绞股蓝乳清多肽复合饮料调配的响应面试验设计 综合单因素实验结果, 根据 Design-Expert 8.0.6 软件设计原理, 选取山楂含量、绞股蓝含量、枸杞含量、柠檬酸含量、蜂蜜含量进行 5 因素 3 水平响应面设计。试验分析方案见表 2。

1.2.5 指标测定

1.2.5.1 活性多肽胆固醇胶束溶解度抑制率测定 参

表 2 响应面试验设计因素水平表
Table 2 Factors and levels table of orthogonal experiment

因素	水平		
	-1	0	1
A山楂含量(%)	2.5	3	3.5
B枸杞含量(%)	1.4	1.6	1.8
C绞股蓝含量(%)	0.20	0.25	0.30
D柠檬酸含量(%)	0.04	0.05	0.06
E蜂蜜含量(%)	4	5	6

照蒋琛等^[25]的方法并略做修改, 配制 0.1 mg/mL 胆固醇标准使用液和模拟胆汁胶束溶液, 37 °C 培养 24 h, 10000×g 离心 60 min 后取上清液测定胆固醇含量。上清液中的胆固醇含量即为胆固醇胶束溶解度(mol/L), 以不加活性肽的胶束溶液为空白, 活性肽对胆固醇在模拟胆汁胶束溶液中的溶解度的抑制率计算公式为:

$$\text{抑制率}(\%) =$$

$$\frac{\text{空白溶液的胆固醇溶解度} - \text{样品溶液的胆固醇溶解度}}{\text{空白溶液的胆固醇溶解度}} \times 100$$

1.2.5.2 感官评价 感官评定小组成员通过筛选确定, 由 8 位食品专业相关人员和 2 位非食品专业相关人员组成。感官评价细则见表 3, 分别从滋味、色泽、口感、气味 4 个方面对山楂绞股蓝乳清多肽复合饮料进行评分, 总分 100 分。根据每个小组成员的感官评分结果计算平均值, 结果保留 1 位小数。要求感官评定小组成员在每评价一个样品后需温开水漱口, 并间隔 3 min 再评定下一个样品, 且评价过程中避免讨论。

1.2.6 饮料稳定性试验 通过破坏性试验^[26], 即分别将饮料样品放置在 4、37 °C, 以 4 °C 放置的饮料作为参照标样, 每隔 1 d 观察山楂绞股蓝乳清多肽功能性复合饮料的组织状态、色泽、香味、口感的变化, 并进行 pH 测定及菌落总数的测定, 以测试山楂绞股蓝乳清多肽功能性复合饮料的稳定性。

1.3 数据处理

乳清蛋白酶解最佳工艺条件确定采用 IBM SPSS Statistics 26 软件进行正交分析; 运用 Design-Expert 8.0.6 软件, 通过响应曲面设计分析优化饮料配方。

2 结果与讨论

2.1 蛋白酶解单因素实验分析

2.1.1 蛋白酶用量对胆固醇胶束溶解度抑制率的影响

由图 2 可知, 酶用量小于 6% 时, 胆固醇胶束溶解度抑制率随着酶用量增加而增大, 在酶用量为 6% 时达到最大值, 之后胆固醇胶束溶解度抑制率下降。根据酶促动力学, 反应初期, 底物蛋白和酶的结合位点还没有完全被占据, 酶用量增加, 降胆固醇活性肽量

表 3 感官评价评分指标
Table 3 Sensory evaluation indexes

感官项目	评分标准	评分(分)
滋味(满分30分)	具有原料风味,山楂酸甜口味明显,酸甜度适中	26~30
	具有原料风味,山楂酸甜口味明显,酸甜比不适宜	21~25
	单一原料味道较重,茶味明显,酸甜比不适宜	16~20
	单一原料味道较重,茶味明显有异味	1~15
色泽(满分30分)	色泽均匀,呈橙红色,不分层	26~30
	色泽较均匀,呈较暗的橙红色,不分层	21~25
	色泽较均匀,呈较暗的橙红色,轻微分层	16~20
口感(满分20分)	色泽不均匀,呈暗橘色,分层	1~15
	口感顺滑,无颗粒感	16~20
	口感较顺滑,无颗粒感	11~15
	口感较顺滑,有轻微颗粒感	6~10
气味(满分20分)	口感不顺滑,颗粒感较重	1~5
	具有所有原料气味,山楂气味较明显,气味柔和	16~20
	具有所有原料气味,气味较柔和	11~15
气味(满分20分)	具有单一原料气味,茶味明显,气味较柔和	6~10
	仅具有单一原料气味,且气味刺鼻	1~5

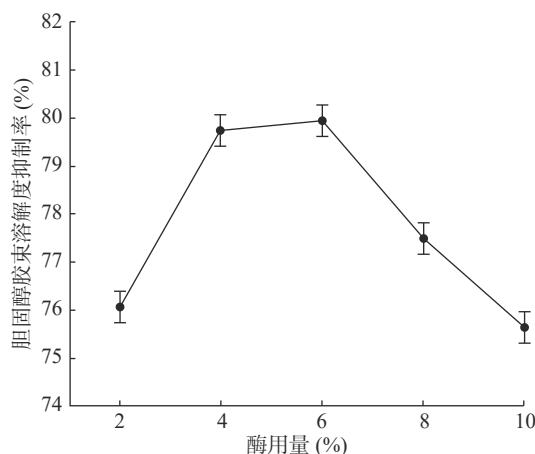


图 2 酶用量对胆固醇胶束溶解度抑制率的影响

Fig.2 Effect of enzyme addition on inhibition rate of cholesterol micelle solubility

增加。但当酶的用量达到一定值时会发生抑制作用,而导致所生成的降胆固醇活性肽量减少,胆固醇胶束溶解度抑制率下降^[27~32]。因此,确定适宜蛋白酶用量为 6%。

2.1.2 蛋白酶比例对胆固醇胶束溶解度抑制率的影响

由图 3 可知,酶比例小于 3:1 时,胆固醇胶束溶解度抑制率随着酶比例的增大而升高,酶比例达到 3:1 时胆固醇胶束溶解度抑制率达到最高,之后趋于下降。每一种酶有专一的酶切位点,专一性不同的两种酶组合起来,酶比例达到 3:1 时达到比较好的组合效果,能更多地切断多肽链,因而提高酶解效果,降胆固醇活性肽量增加,胆固醇胶束溶解度抑制率升高^[33~34]。因此确定适宜酶比例为 3:1。

2.1.3 蛋白酶分段酶解时间比对胆固醇胶束溶解度抑制率的影响

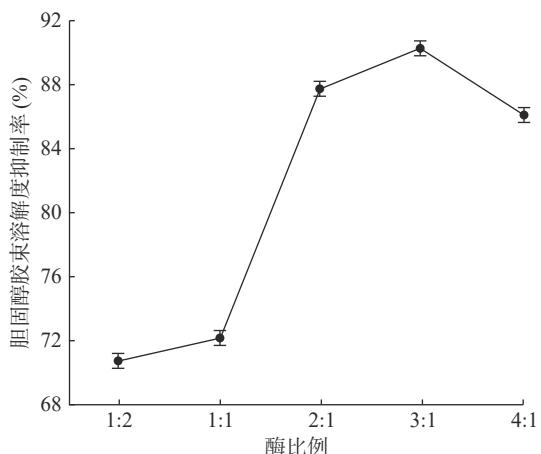


图 3 酶比例对胆固醇胶束溶解度抑制率的影响

Fig.3 Effect of enzyme ratio on inhibition rate of cholesterol micelle solubility

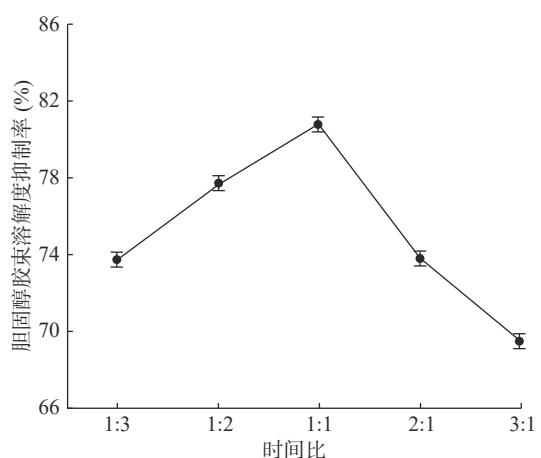


图 4 时间比对胆固醇胶束溶解度抑制率的影响

Fig.4 Effect of time ratio on inhibition rate of cholesterol micelle solubility

随着酶比例的增大呈现先升高后下降的趋势, 在时间比为 1:1 时胆固醇胶束溶解度抑制率达到最高。随着时间比的增大, 抑制率呈现下降趋势。不同酶的最佳反应时间不同, 时间延长或者缩短都会影响酶解效果, 导致抑制率下降。除此之外, 加热时间延长, 酶可能部分失活, 酶的总活力下降, 导致所生成的降胆固醇活性肽量减少, 且中性蛋白酶水解过程中随着内切位点逐渐减少, 外切的活力逐渐显现, 体系中的一些多肽分子被水解为氨基酸, 从而导致胆固醇胶束溶解度抑制率下降^[35-37]。因此确定蛋白酶分段酶解时间比为 1:1。

2.2 乳清蛋白酶解最佳工艺条件确定

2.2.1 正交试验结果及方差分析 由表 4 分析结果可看出, 影响酶解所得乳清多肽的胆固醇胶束溶解度抑制率的因素主次关系为酶比例>时间比>酶用量; 由表 5 方差分析可看出, 酶用量、酶比例和时间比对胆固醇胶束溶解度抑制率具有极显著影响($P<0.01$)。

表 4 正交试验结果
Table 4 Results of orthogonal experiments

试验号	A	B	C	D(空白)	抑制率(%)
1	2	1	2	3	83.21
2	2	2	3	1	87.21
3	3	2	1	3	79.80
4	3	1	3	2	74.32
5	1	1	1	1	73.06
6	1	2	2	2	85.75
7	3	3	2	1	82.19
8	2	3	1	2	78.18
9	1	3	3	3	77.32
k_1	78.71	76.86	77.01	80.82	
k_2	82.87	84.25	83.72	79.42	
k_3	78.77	79.23	79.62	80.11	
R	4.16	7.39	6.70	1.41	

表 5 酶解条件正交试验方差分析结果
Table 5 Variance analysis of orthogonal experiment for enzymolysis conditions

差异来源	III类平方和	自由度	均方	F	显著性
修正模型	572.842a	8	71.605	261.164	0.000**
截距	173302.765	1	173302.765	632081.734	0.000**
A	102.219	2	51.110	186.411	0.000**
B	256.158	2	128.079	467.139	0.000**
C	205.546	2	102.773	374.841	0.000**
D	8.919	2	4.459	16.265	0.000**
误差	4.935	18	0.274		
总计	173880.543	27			
修正后总计	577.778	26			
$R^2=0.991$ (调整后 $R^2=0.988$)					

注: **表示差异极显著($P<0.01$)。

由正交试验可得, 最优酶解工艺水平组合为 $A_2B_2C_2$, 即酶用量 6%、酶比例(中性蛋白酶: 胰蛋白酶)3:1、时间比 1:1。在该条件下所测得的胆固醇胶束溶解度抑制率平均值为 89.87%, 且试验过程中

三次试验所得抑制率皆大于正交试验中所有组合的值, 故试验结果可靠。

2.3 山楂绞股蓝清多肽复合饮料的配方优化

2.3.1 单因素实验结果 由图 5~图 9 可知, 原料含量的改变影响感官评分。由图 5 可以看出, 山楂含量从 2.0% 增加到 3.0% 时, 感官评分随山楂含量的增加而增大, 呈现明显的上升趋势, 且酸甜滋味可口, 但在山楂含量大于 3.0% 时, 感官评分逐渐降低, 这是因为过量的山楂使饮料整体口感偏酸。因此选择山楂含量为 3.0%。由图 6 可以看出, 绞股蓝含量从 0.15% 增加到 0.25% 时, 感官评分随绞股蓝含量的增加而增大, 呈现明显的上升趋势, 但在绞股蓝含量大于 0.25% 时, 感官评分逐渐降低, 这是因为过量的绞股蓝使饮料口感变涩。因此选择绞股蓝含量为 0.25%。由图 7 可以看出, 枸杞含量从 1.2% 增加到 1.6% 时, 感官评分随枸杞含量的增加而增大, 呈现明显的上升趋势, 但在枸杞含量大于 1.6% 时, 感官评分逐渐降低, 这是因为枸杞影响饮料的整齐感官颜色分层, 过量的枸杞会使饮料色彩偏暗红。因此选择枸

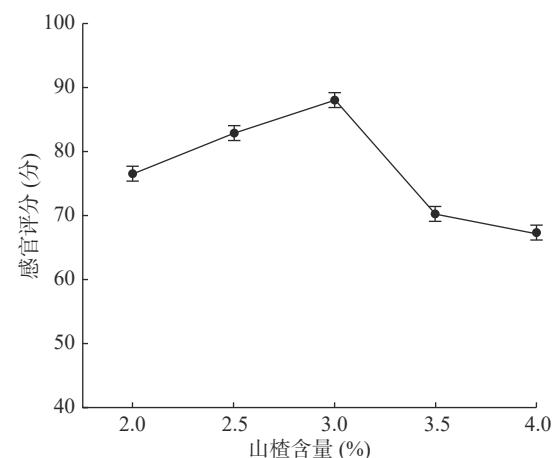


图 5 山楂含量对感官评分的影响
Fig.5 Effect of hawthorn content on sensory score

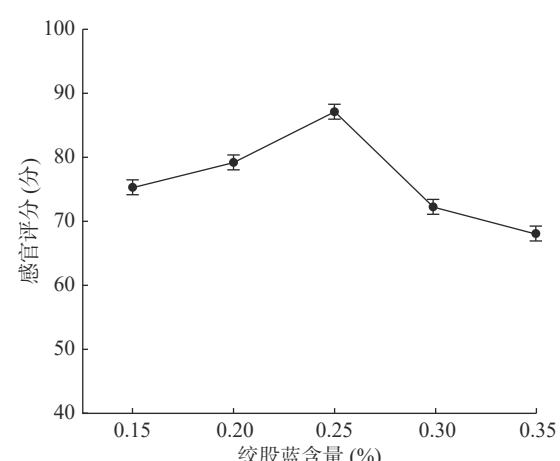


图 6 绞股蓝含量对感官评分的影响
Fig.6 Effect of *Gynostemma pentaphyllum* content on sensory score

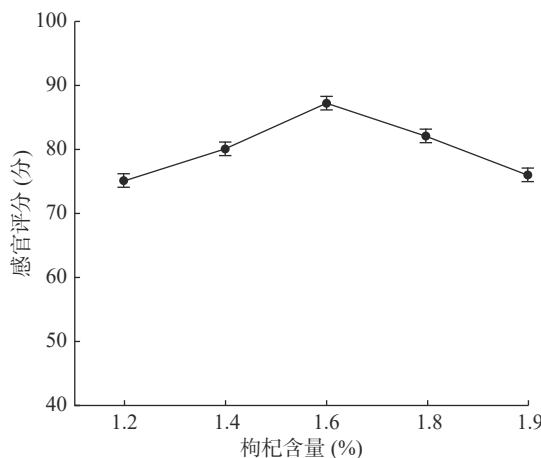


图 7 枸杞含量对感官评分的影响

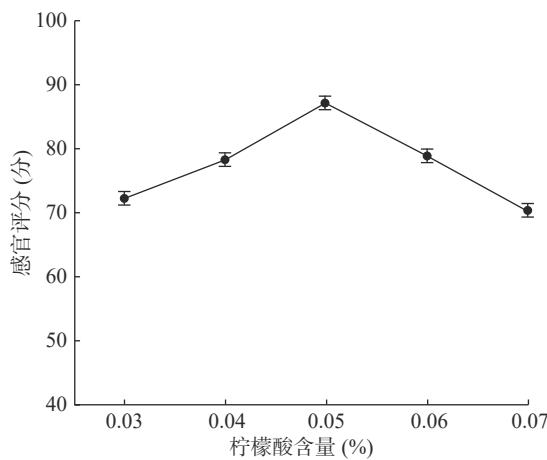
Fig.7 Effect of *Lycium barbarum* content on sensory score

图 8 柠檬酸含量对感官评分的影响

Fig.8 Effect of citric acid content on sensory score

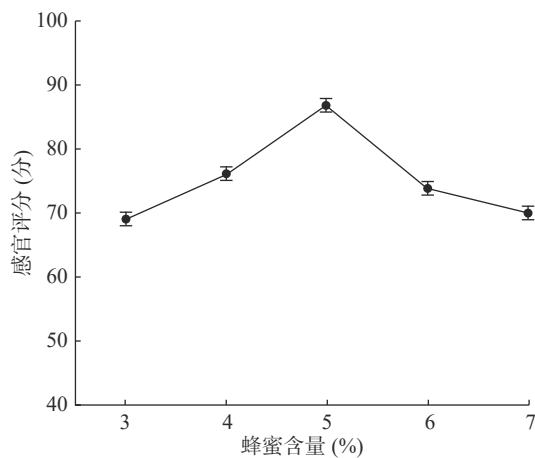


图 9 蜂蜜含量对感官评分的影响

Fig.9 Effect of honey content on sensory score

杞含量为 1.6%。由图 8 可以看出, 柠檬酸含量从 0.03% 增加到 0.05% 时, 感官评分随柠檬酸含量的增加而增大, 呈现明显的上升趋势, 但在柠檬酸含量大于 0.05% 时, 饮料酸甜比偏高, 感官评分逐渐降低。因此选择柠檬酸含量为 0.05%。由图 9 可以看出, 蜂蜜含量从 3.0% 增加到 5.0% 时, 感官评分随蜂

蜜含量的增加而增大, 呈现明显的上升趋势, 但在蜂蜜含量大于 5.0% 时, 饮料酸甜比偏低, 感官评分逐渐降低。因此选择蜂蜜含量为 5.0%。综上, 适宜的原料含量分别为山楂 3%、绞股蓝 0.25%、枸杞 1.6%、柠檬酸 0.05%、蜂蜜 5%。

2.3.2 响应面试验结果 为确定饮料加工最优工艺参数, 采用响应面软件设计 5 因素 3 水平的响应面优化试验, 以感官评分为响应值, 结果见表 6。

2.3.3 响应面分析及方差分析 采用 Design-Expert 8.0.6 软件对表 6 中的试验结果进行多元回归拟合分析, 得出感官评分(Y)对山楂含量(A)、枸杞含量

表 6 响应面试验设计及结果

Table 6 Design and results of response surface experiment

试验号	A	B	C	D	E	Y感官评分(分)
1	3.00	1.40	0.30	0.05	5.00	77
2	2.50	1.60	0.25	0.05	6.00	80
3	3.00	1.60	0.25	0.05	5.00	91
4	3.00	1.60	0.25	0.05	5.00	87
5	3.00	1.60	0.20	0.06	5.00	76
6	3.00	1.80	0.25	0.06	5.00	74
7	2.50	1.60	0.20	0.05	5.00	85
8	3.00	1.60	0.25	0.04	6.00	72
9	3.00	1.60	0.30	0.05	4.00	73
10	2.50	1.80	0.25	0.05	5.00	78
11	3.00	1.60	0.20	0.04	5.00	79
12	3.00	1.60	0.30	0.04	5.00	76
13	3.50	1.40	0.25	0.05	5.00	74
14	3.00	1.40	0.25	0.04	5.00	79
15	3.00	1.80	0.20	0.05	5.00	73
16	3.00	1.60	0.25	0.05	5.00	84
17	3.50	1.60	0.25	0.06	5.00	66
18	3.00	1.40	0.20	0.05	5.00	82
19	3.00	1.60	0.30	0.06	5.00	74
20	3.50	1.60	0.25	0.05	6.00	75
21	3.00	1.80	0.25	0.04	5.00	74
22	3.00	1.80	0.25	0.05	6.00	73
23	3.50	1.60	0.25	0.05	4.00	68
24	3.00	1.60	0.25	0.05	5.00	87
25	2.50	1.60	0.25	0.04	5.00	79
26	3.00	1.60	0.30	0.05	6.00	77
27	3.50	1.80	0.25	0.05	5.00	67
28	2.50	1.40	0.25	0.05	5.00	83
29	3.00	1.60	0.25	0.05	5.00	88
30	3.00	1.60	0.25	0.06	4.00	73
31	3.50	1.60	0.30	0.05	5.00	74
32	3.00	1.60	0.20	0.05	4.00	70
33	3.00	1.80	0.30	0.05	5.00	73
34	3.00	1.60	0.25	0.06	6.00	77
35	3.00	1.60	0.25	0.04	4.00	74
36	3.50	1.60	0.25	0.04	5.00	74
37	3.00	1.40	0.25	0.05	4.00	75
38	3.00	1.80	0.25	0.05	4.00	70
39	2.50	1.60	0.25	0.06	5.00	80
40	3.50	1.60	0.20	0.05	5.00	69
41	2.50	1.60	0.25	0.05	4.00	74
42	2.50	1.60	0.30	0.05	5.00	76
43	3.00	1.40	0.25	0.05	6.00	77
44	3.00	1.60	0.20	0.05	6.00	74
45	3.00	1.40	0.25	0.06	5.00	76
46	3.00	1.60	0.25	0.05	5.00	87

(B)、绞股蓝含量(C)、柠檬酸含量(D)、蜂蜜含量(E)的回归模型, 回归方程为:

$$Y=87.33-4.25A-2.56B-0.50C-0.69D+1.75E-0.50AB+3.50AC-2.25AD+0.25AE+1.25BC+0.75BD+0.25CD+0.000CE+1.50DE-0.600A^2-5.75B^2-5.50C^2-5.92D^2-7.67E^2$$

由表 7 可得 A、B、E、AC、A²、B²、C²、D²、E² 对感官评价的影响极显著($P<0.01$), AD 对感官评价的影响显著($P<0.05$)。其中, 失拟项=0.6874>0.05 即失拟项差异不显著, 表明该回归模型能够较显著拟合山楂、枸杞、蜂蜜含量对感官评分的影响, 该模型能够代替试验真实点对试验结果进行分析。

表 7 响应面试验 ANOVA 分析结果
Table 7 Anova analysis of response surface experiment

差异来源	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
模型	1372.25	20	68.61	16.38	<0.0001	**
A	289.00	1	289.00	69.00	<0.0001	**
B	105.06	1	105.06	25.08	<0.0001	**
C	4.00	1	4.00	0.96	0.3378	
D	7.56	1	7.56	1.81	0.1911	
E	49.00	1	49.00	11.70	0.0022	**
AB	1.00	1	1.00	0.24	0.6294	
AC	49.00	1	49.00	11.70	0.0022	**
AD	20.25	1	20.25	4.83	0.0374	*
AE	0.25	1	0.25	0.060	0.8090	
BC	6.25	1	6.25	1.49	0.2333	
BD	2.25	1	2.25	0.54	0.4704	
BE	0.25	1	0.25	0.060	0.8090	
CD	0.25	1	0.25	0.060	0.8090	
CE	0.000	1	0.000	0.000	1.0000	
DE	9.00	1	9.00	2.15	0.1551	
A ²	314.18	1	314.18	75.01	<0.0001	**
B ²	288.55	1	288.55	68.89	<0.0001	**
C ²	264.00	1	264.00	63.03	<0.0001	**
D ²	305.52	1	305.52	72.94	<0.0001	**
E ²	512.97	1	512.97	122.48	<0.0001	**
残差误差	104.71	25	4.19			
失拟项	79.38	20	3.97	0.78	0.6874	
纯误差	25.33	5	5.07			
总离差	1476.96	45				

注: **表示极显著, $P<0.01$; *表示显著, $P<0.05$; ; $R^2=0.9291$, $R^2_{Adj}=0.8724$ 。

2.3.4 最优配方方案的预测及验证 运用 Design-Expert 8.0.6 软件对试验数据进行优化预测, 即对回归方程取一阶偏导数等于 0, 得到感官评分最高的最佳配方参数: 山楂含量 2.8%、枸杞含量 1.56%、绞股蓝含量 0.24%、柠檬酸含量 0.05%、蜂蜜含量 5.11%, 在此条件下感官评分为 88.6139。在此条件下对模型的预测参数进行 3 次平行验证试验, 得到感官评分为 89.60, 与模型预测值接近, 表明采用响应面分析法优化得到的该饮料的配方是可靠的。

2.4 饮料稳定性试验结果

由表 8 试验结果可知, 以 4 °C 放置的饮料作为参照标样; 山楂绞股蓝乳清多肽复合饮料在 37 °C 环

境下放置 5 d 后, 饮料色泽黄色变深, 开盖有明显异味, 菌落总数急剧增加, pH 下降。再存放 1 d 后腐败更严重, 无法饮用故停止试验。由此推算山楂绞股蓝乳清多肽复合饮料在 4 °C 保质期约为 5 个月, 室温环境下放置下 50 d 后出现色泽仍然正常。

表 8 饮料稳定性试验结果

Table 8 Test results of beverage stability

时间 (d)	4 °C			37 °C		
	感官评价	菌落总数 (CFU/ml)	pH	感官评价	菌落总数 (CFU/ml)	pH
1	正常	0	4.34	正常	1	4.27
2	正常	2	4.30	正常	2	4.26
3	正常	5	4.30	正常	4	4.26
4	正常	5	4.29	有少量沉淀	7	4.25
5	有少量沉淀	9	4.27	颜色变浅	11	4.24
6	颜色变浅、 甜味加重	15	4.23	饮料浑浊	17	4.20
7	饮料浑浊、 颜色黯淡	24	4.19	饮料浑浊、 有异味	27	4.17

2.5 提高山楂绞股蓝乳清多肽复合饮料稳定性的操作要点

a. pH 对蛋白质饮料的稳定性有十分显著的影响。饮料的 pH 愈接近蛋白质的等电点, 蛋白质愈容易絮凝析出。因此, 在配料时必须用柠檬酸将饮料的 pH 调整为<4.5 或>6.8, 否则将不可避免地产生絮凝沉淀现象, 而本饮料的 pH 为 4.3。

b. 分散质粒度较大, 对饮料稳定性的影响至关重要。若粒度较大, 便容易在其重力作用下沉淀析出。因此, 蛋白质饮料一般采取均质机对蛋白饮料粒子进行细微化处理, 以提高饮料的稳定性, 而本饮料在 20 MPa 和 60 °C 条件下进行均质。

c. 杀菌条件不严格, 无论哪个生产环节没有做好严格的杀菌工作, 都可能导致饮料的劣变: 如 pH 下降, 分层沉淀, 腐败变质等。本饮料在 121 °C 条件下进行两次灭菌操作, 时长分别为 5 和 1 min。

d. 饮料保存过程中需低温冷藏(0~4 °C), 否则会分层沉淀。

3 结论

两步水解酶解乳清蛋白制取乳清蛋白肽的最佳工艺是采用中性蛋白酶和胰蛋白酶, 酶添加总量 6%, 酶比例 3:1, 酶解总时间 4 h, 分段酶解时间比 1:1, 在此条件下胆固醇抑制率为 89.87%。且正交试验分析得到影响酶解所得乳清多肽的胆固醇胶束溶解度抑制率的因素主次关系为酶比例>时间比>酶用量。以酶解所得的乳清多肽液中胆固醇胶束溶解度抑制率最高的乳清为原料, 制备山楂绞股蓝乳清多肽复合饮料, 经过响应面分析数据优化配方, 得到该饮料感官评分最高(89.60)的最佳配方参数为: 山楂含量 2.8%、枸杞含量 1.56%、绞股蓝含量 0.24%、柠檬酸含量 0.05%、蜂蜜含量 5.11%。

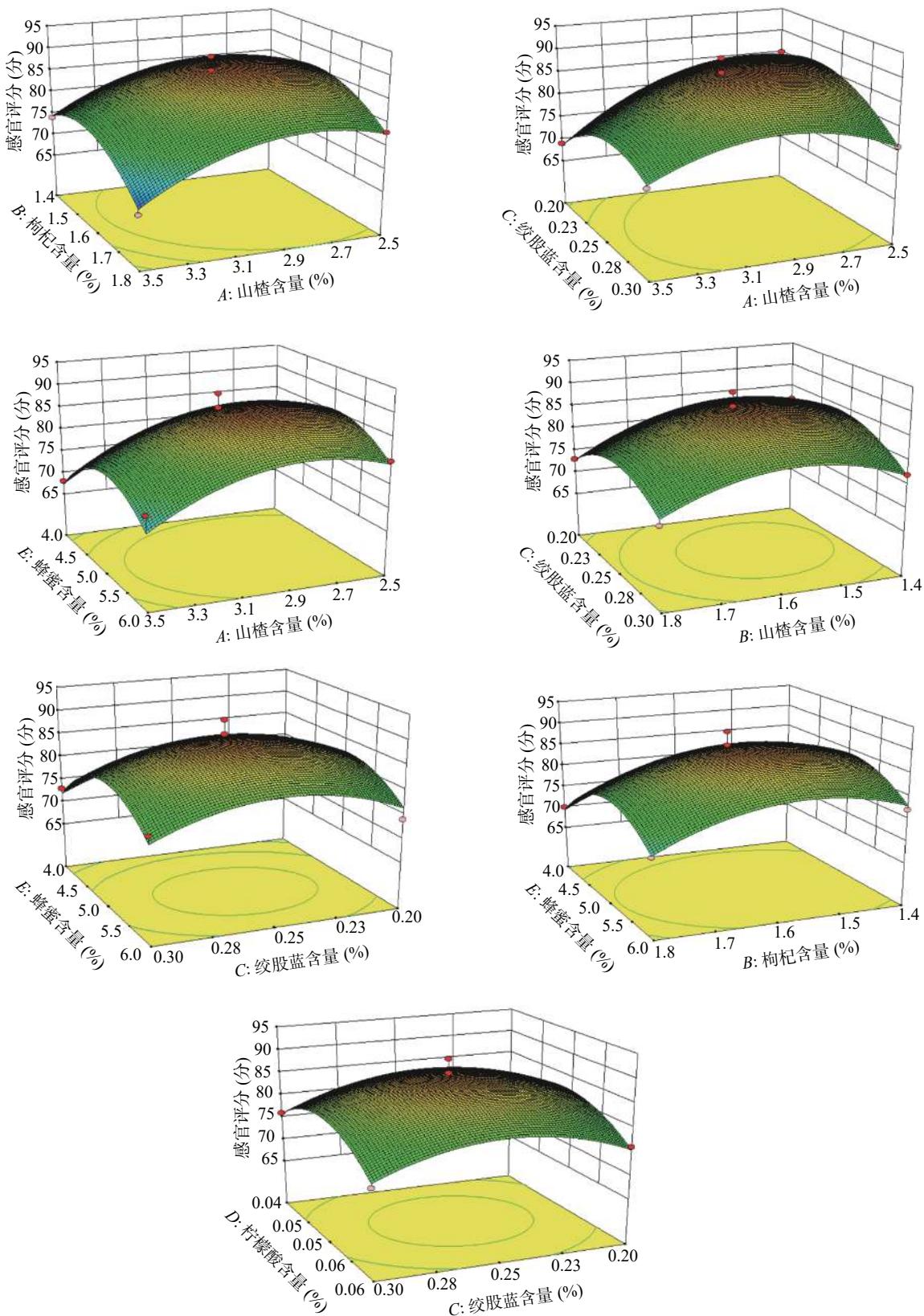


图 10 两因素交互作用响应面图

Fig.10 Response surface diagram interaction between two factors

参考文献

- [1] Baldasso C, Barros T C, Tessaro I C. Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration[J]. Desalination, 2011, 278(1/2/3): 381–386.
- [2] 郑伟丽, 屈小玄, 孙金威, 等. 希腊酸奶工艺及乳清利用研究进展[J]. 食品与发酵科技, 2018, 54(5): 75–79.

[3] 陈笛, 王存芳. 乳清蛋白及与其它乳成分的热聚合作用机制研究进展[J]. 中国食品学报, 2020, 20(3): 298–306.

- [4] 李晓东, 蒋琛, 宋惠敏. 乳清蛋白水解制备功能性多肽的研究概况[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(5): 1405–1412.

- [5] 翟丽丽. 乳清及乳清饮料的研究现状及其展望 [J]. 农产品加工(学刊), 2014(15): 63-64, 68.
- [6] 孙敏, 李诚, 刘爱平, 等. 乳清蛋白抗氧化肽的制备及体外抗氧化活性研究 [J]. 中国油脂, 2019, 44(8): 22-27.
- [7] Morikawa K, Kondo I, Kanamaru Y, et al. A novel regulatory pathway for cholesterol degradation via lactostatin [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, 352(3): 697-702.
- [8] 周艳. 生物法制备稀奶油-乳清复合风味乳基的研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2018.
- [9] Pescuma M, Hébert E M, Mozzi F, et al. Functional fermented whey-based beverage using lactic acid bacteria [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, 141(1/2): 73-81.
- [10] Magalhães K T, Dragone G, de Melo Pereira G V, et al. Comparative study of the biochemical changes and volatile compound formations during the production of novel whey-based kefir beverages and traditional milk kefir [J]. *Food Chemistry*, 2011, 126(1): 249-253.
- [11] Corrochano A R, Ferrareto A, Arranz E, et al. Bovine whey peptides transit the intestinal barrier to reduce oxidative stress in muscle cells [J]. *Food Chemistry*, 2019, 288: 306-314.
- [12] Kareb O, Aider M. Whey and its derivatives for probiotics, prebiotics, synbiotics, and functional foods: A critical review [J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2019, 11(2): 348-369.
- [13] 徐庆. 中链脂肪酸对小鼠胆固醇代谢的调节及其机制研究 [D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2013.
- [14] 高学飞. 乳清蛋白降胆固醇活性肽的制备及其生物学功能的研究 [J]. *中国乳业*, 2005(5): 41-42.
- [15] 张宇, 李晓东, 刘璐, 等. 乳清蛋白降胆固醇肽的制备及活性研究 [J]. 食品科技, 2019, 44(3): 14-20.
- [16] 诸骏仁, 高润霖, 赵水平, 等. 中国成人血脂异常防治指南(2016年修订版) [J]. *中国循环杂志*, 2016, 31(10): 937-953.
- [17] 丁文清, 董虹宇, 米杰. 中国儿童青少年血脂异常流行现状 Meta 分析 [J]. *中华流行病学杂志*, 2015, 36(1): 71-77.
- [18] 顾浩峰, 张富新, 张怡, 等. 乳制品中生物活性肽的研究进展 [J]. 食品工业科技, 2013, 34(2): 370-375, 381.
- [19] 刘妍妍, 张学玲, 王宪青, 等. 乳清多肽果汁饮料的研究 [J]. 农产品加工(学刊), 2008(2): 9-11.
- [20] 马平. 人参乳清蛋白多肽饮料的稳定性及活性研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2016.
- [21] 佚名. 山楂燕麦降胆固醇 [J]. 保健与生活, 2016(7): 41.
- [22] 潘琳, 蔡永梅, 王利新. 山楂精降脂片对高血脂症家兔的降脂作用 [J]. 宁夏医学杂志, 2018, 40(12): 1170-1171.
- [23] 黄晓飞. 绞股蓝复方降糖、降脂作用的实验研究 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2014.
- [24] 鲁艳柳, 杜艺政, 秦琳, 等. 基于胆汁酸代谢网络分析绞股蓝总皂苷降脂作用的机制 [J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(7): 1143-1148.
- [25] 蒋琛, 李晓东, 马丽媛, 等. 酶解乳清蛋白制备降胆固醇活性肽的工艺研究 [J]. *中国酿造*, 2016, 35(3): 70-73.
- [26] 陈丽花, 朱楚楚, 唐飞. 桑叶生理活性成分的提取及其饮料的制备 [J]. 食品工业, 2017, 38(7): 111-116.
- [27] 苏伟, 文飞, 母应春, 等. 鸭胱酶解工艺优化及降胆固醇活性研究 [J]. 食品科技, 2016, 41(3): 144-149.
- [28] 冯小敏, 杨锡洪, 解万翠, 等. 响应面分析法优化复合酶解南美白对虾虾头的工艺条件 [J]. *食品科学*, 2009, 30(22): 66-70.
- [29] 包小兰, 刘晓静, 郑睿, 等. 亚麻籽降胆固醇活性肽的酶解工艺优化及分级制备 [J]. *中国油脂*, 2020, 45(6): 30-35.
- [30] 庄建鹏, 李晓东, 杜玲玲, 等. 微胶囊化乳清蛋白水解物的降胆固醇活性、苦味和稳定性研究 [J]. *中国食品学报*, 2017, 17(1): 31-38.
- [31] 庄建鹏. 乳清浓缩蛋白水解物的降胆固醇活性及微胶囊化的研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2015.
- [32] 苏建辉, 马朝阳, 杨鹿, 等. 槲皮素、EGCG 对胆固醇酯酶活性和胆固醇胶束抑制作用研究 [J]. 食品工业科技, 2015, 36(11): 346-349.
- [33] 李若昀, 张国治, 黄纪念, 等. 双酶水解芝麻 11S 蛋白制备抗氧化肽的工艺研究 [J]. *河南工业大学学报(自然科学版)*, 2018, 39(4): 44-52, 58.
- [34] 孔美兰, 金榕, 王佳虹. 双酶法水解寻氏肌蛤蛋白制备抗氧化肽的研究 [J]. *教育教学论坛*, 2019(29): 106-108.
- [35] 严志鹏, 张皓雅, 涂红艳, 等. 铜藻多糖酶解工艺优化及肠道环境调节功能研究 [J]. *核农学报*, 2018, 32(6): 1153-1161.
- [36] 陈启航, 朱秀花, 俞珺, 等. 金枪鱼蒸煮液酶解工艺优化及风味海鲜调味汁的制备 [J]. 食品工业科技, 2018, 39(9): 124-130.
- [37] 陈雪, 王雪, 张丽萍. 制备麦胚降胆固醇肽的水解条件优化 [J]. *黑龙江八一农垦大学学报*, 2012, 24(6): 46-52.