

高产蛋白酶发酵乳杆菌 RA3 降低牛奶 β -乳球蛋白抗原性的发酵条件优化

吴爱娟, 孙 洁, 黄 苓, 曾志丹, 曾小群*, 潘道东, 吴 振

(宁波大学 浙江省动物蛋白食品精深加工技术重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要: β -乳球蛋白是引起牛奶过敏最常见的物质. 为降低其过敏原性, 本实验将从新疆酸奶中筛选出一株高产蛋白酶的发酵乳杆菌 RA3 用于制作酸奶. 通过试验研究接种量、发酵时间、温度及后熟时间对降低牛奶中 β -乳球蛋白抗原性及感官品质的影响. 结果表明: 接种量 7%, 发酵时间 18 h, 发酵温度 39 °C 时, 在不影响酸奶风味的同时最大程度地降低 β -乳球蛋白抗原性, 达 75.2%. 在此条件下发酵的酸奶和市售酸奶相比, 总蛋白水解率较低, 且过敏蛋白水解率较高, 活菌数是其 8 倍, 高达 4.56×10^9 cfu·mL⁻¹. 这株乳酸菌在酸奶发酵业具有很好的应用前景.

关键词: 乳酸菌; 蛋白酶; β -乳球蛋白; 抗原性; 发酵条件

中图分类号: Q939.11+7

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2018) 02-0013-05

牛奶中含多种导致人体发生过敏反应的蛋白质, 如酪蛋白、 α -乳白蛋白(α -LA)、 β -乳球蛋白(β -LG)^[1-3]. 婴幼儿由于免疫力较弱, 常因牛奶导致发生过敏^[4], 其中 80% 的情况是由于 β -LG 引起的过敏反应^[5-6]. β -LG 因为结构稳定, 分泌到消化道中的胃蛋白酶不能将其分解而导致过敏^[7-8]. 牛奶过敏已经引起了社会各界的广泛关注, 如何解决这一问题也成为当前食品行业重要的研究方向^[9]. 目前, 主要是通过物理、化学和生物等方法来破坏蛋白质的抗原表位, 从而降低牛奶蛋白过敏性^[10-11], 最常用的方法为热处理、酶水解、糖基化法^[12]. 但这些处理会致使一些营养成分变性及制品口感变差, 影响牛奶的品质. 经不同温度的热处理可能会生成更多的抗原表位, 使过敏性增强. 酶种类繁多, 不同条件下酶解的作用方式和程度也有差异, 导致分解的产物和抗原性也不同, 同时还会产生苦味肽, 影响口感和风味. 而发酵则是对产品品质影响较小, 降敏效果较好的方法之一^[13].

乳酸菌作为一种肠道内益生菌, 广泛应用于食品发酵方面. 发酵乳制品除了减少肠道致病菌外, 还可降低过敏蛋白抗原性, 减少过敏症状的发

生, 降低患病风险^[14]. 陈帅等^[15]研究表明: 使用干酪乳酸菌 WPC09 发酵的酸奶, 其 β -LG 含量降低了 70% 左右. 李艾梨等^[16]通过体外小鼠实验表明: 乳酸菌能有效缓解 β -LG 引起的过敏症状.

本实验室以高产蛋白酶的发酵乳杆菌 RA3 为发酵菌种, 研究不同条件和因素对酸奶中的 β -LG 过敏性降低率的影响, 并结合感官评定确定用于制作低敏酸奶的最优方案.

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

原料: 光明纯牛奶、白砂糖均为市售; 发酵乳杆菌 RA3(*Lactobacillus fermentum* RA3)筛选自新疆酸奶, 分离的 40 株乳酸菌中产蛋白酶的活力最高, 为 38.87 U·mL⁻¹, 保存于宁波大学海洋学院实验室^[17].

试剂: MRS 琼脂培养基、MRS 肉汤培养基(均购于杭州微生物试剂有限公司); 1×PBS 缓冲液; β -乳球蛋白 ELISA 试剂盒(购于宁波市镇海航景生物科技有限公司); BCA 试剂盒(购于北京全式金生物技术有限公司).

收稿日期: 2017-07-16.

宁波大学学报(理工版) 网址: <http://journalg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 国家自然科学基金(41641052, 41406165).

第一作者: 吴爱娟(1994-), 女, 安徽宿松人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 食品微生物. E-mail: 714183885@qq.com

*通信作者: 曾小群(1982-), 女, 四川仁寿人, 博士/副教授, 主要研究方向: 发酵食品加工. E-mail: zxqun3447@126.com

1.2 仪器和设备

DKS-26 电热恒温水浴锅(宁波江南仪器厂); LDZX-50KBS 立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂); H2500R-2 湘仪离心机(长沙市湘仪离心机仪器有限公司); HWS 智能型恒温恒湿培养箱(宁波江南仪器厂); TEANC 酶标仪(INFINITE 200 PRO).

1.3 实验方法

1.3.1 不同因素对 β -LG 降低率的影响

在无菌超净工作台, 将保藏在 -80°C 冰箱中的发酵乳杆菌 RA3 置于室温解冻. 经斜面划线和 MRS 肉汤中培养, 活化 3 代. 在光明纯牛奶中按 $6\% \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的比例加入白砂糖溶解, 于 $85\sim 90^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中保持 $15\sim 30 \text{ min}$. 分别接种 $1\%, 3\%, 5\%, 7\%, 9\%$ 的活化菌液于灭菌冷却后的牛奶中, 37°C 发酵培养 16 h , 置于 4°C 冰箱 12 h 后熟, 确定合适的接种量; 将适量的菌液接至灭菌冷却的牛奶中, 37°C 分别发酵 $12, 14, 16, 18, 20 \text{ h}$, 置于 4°C 冰箱 12 h , 确定合适的发酵时间; 接种合适量的菌液分别在 $35, 37, 39, 41, 43^{\circ}\text{C}$ 下及上述确定的合适时间发酵培养, 确定合适的发酵温度; 菌种在上述确定的条件下培养, 放置于 4°C 冰箱, 后熟时间分别达 $8, 12, 16, 20, 24 \text{ h}$, 确定最适后熟时间.

1.3.2 正交试验优化发酵条件

分别选取合适因素和水平进行正交试验, 优化发酵条件.

1.3.3 验证实验

在优化条件下发酵的酸奶, 通过测定总蛋白含量、 β -LG 抗原性及活菌数, 并与市售的酸奶进行比较, 验证优化发酵条件的可行性.

1.3.4 β -LG 抗原性的测定

按照 ELISA 试剂盒说明书, 配制样品、标准品及酶标工作液, 向孔板中加入不同浓度梯度的标准溶液及样品 $50 \mu\text{L}$, 样品稀释液 $40 \mu\text{L}$ 以及检测抗体-HRP $100 \mu\text{L}$, 37°C 温育 60 min , 洗板后加入底物 A、B 各 $50 \mu\text{L}$ 避光孵育 15 min , 最后加入终止液 $50 \mu\text{L}$, 在 450 nm 处测各孔板的 OD 值. 制作标准曲线, 得到样品中 β -LG 抗原性.

1.3.5 蛋白质含量测定

按 BCA 试剂盒说明书, 用 PBS 缓冲液稀释 BSA 标准液和样品液至 $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 将 A、B 液按 $50:1$ 混匀制成工作液. 按一定浓度梯度向孔板中加

入标准液, 向稀释的样品孔板中加入工作液 $200 \mu\text{L}$ 后, 37°C 恒温放置 90 min , 562 nm 处测定各孔的 OD 值. 制作标准曲线得到各样品中所含蛋白量.

1.3.6 感官评定

由 8 人组成的评定小组根据感官评定标准(表 1)对每组发酵酸奶进行打分, 统计每人对产品每项指标的分数, 求出平均值.

表 1 酸奶的感官评定标准^[18-19]

项目	8~10	5~7	1~4
组织状态、色泽	凝乳均匀粘稠、乳白色	凝乳较均匀粘稠、乳白色	凝乳不均匀、黄白色
气味	酸奶香气浓郁	有酸奶香气风味较淡	酸奶香气淡薄
口感	酸甜适宜细腻爽口	酸甜较适宜	酸甜不适口

2 结果与分析

2.1 β -LG 抗原性标准曲线

β -LG 抗原性和 450 nm 处的吸光度关系如图 1 所示. 结果表明抗原性与吸光值呈正相关.

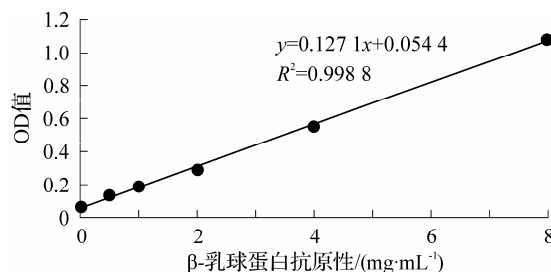


图 1 β -LG 抗原性标准曲线

2.2 单因素试验结果与分析

2.2.1 接种量的影响

图 2 所示为接种量对 β -LG 抗原性的影响.

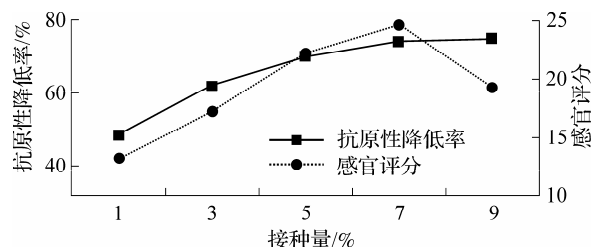


图 2 接种量对降低 β -LG 抗原性及品质影响

随着接种量的增加, β -LG 抗原性降低率呈上升趋势. 接种量为 9% 时, β -LG 的抗原性降低率达到最高. 但接种量过高 ($>7\%$), 降低率增长缓慢,

同时出现凝乳不均匀, 酸奶口感不佳. 随着接种量增加, 其对 β -LG 抗原性降低的影响也逐渐减弱. 提高接种量并没有更为显著的效果, 反而会降低酸奶品质, 因此接种量选用 5%~7% 为宜.

2.2.2 发酵时间的影响

由图 3 可见: 随着发酵时间延长, β -LG 抗原性逐渐降低. 当发酵时间少于 16 h, 抗原性降低趋势显著. 由于乳酸菌生长繁殖快速, 产酶活力不断增强, 发酵时间太短会造成产酸不足, 凝乳效果不佳; 时间太长(>18 h)则会凝乳不均匀, 口感不理想, 延长发酵时间对降低 β -LG 抗原性的效果逐渐减弱, 酸奶品质变差. 因此发酵时间以 16~18 h 为宜.

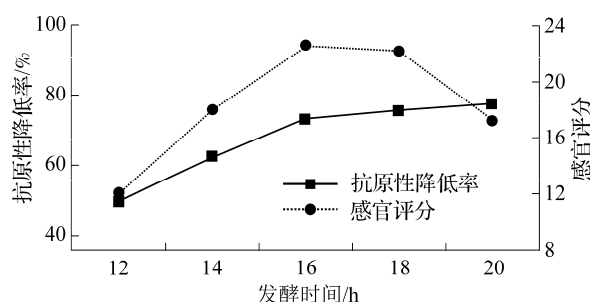


图3 发酵时间对降低 β -LG 抗原性及品质影响

2.2.3 发酵温度的影响

从图 4 中可看出: 发酵温度低于 39 °C 时, β -LG 抗原性降低率随温度的升高而增大, 当大于 39 °C 时, 随着温度的升高, 抗原性降低率逐渐下降, 酸奶品质也逐渐降低. 发酵温度过高(>41 °C), β -LG 抗原性有所升高, 可能由于乳酸菌生长被抑制活性降低, 以及一些隐性表位暴露. 所以温度选择 37~41 °C 最为适宜.

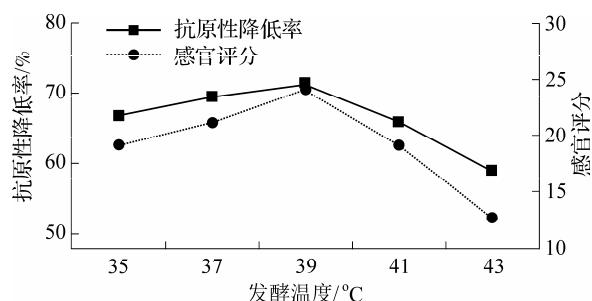


图4 发酵温度对降低 β -LG 抗原性及品质影响

2.2.4 后熟时间的影响

由图 5 可见: 在 8~24 h 范围内, 后熟时间的延长对 β -LG 抗原性降低不显著, 且酸奶品质无明显差别. 可能由于温度低, pH 等不利因素使得菌株生

长缓慢, 产生的蛋白酶活力下降. 从而确定后熟时间为 12 h.

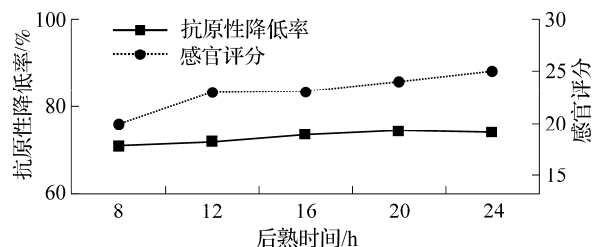


图5 后熟时间对降低 β -LG 抗原性及品质的影响

2.3 正交实验结果

从表 2 各因素的 K1, K2, K3 以及 R(极差)可知, 降低 β -LG 抗原性的影响力大小因素顺序为: 发酵温度>发酵时间>接种量. 最佳发酵条件为接种量 7%, 温度 39 °C, 时间 18 h, β -LG 降低率为 75.2%, 此时不影响酸奶风味的同时可以最大程度地降低牛奶中 β -LG 抗原性.

表2 正交试验数据表

试验号	接种量/%	发酵时间/		β -LG 降低率/%
		h	°C	
1	5	16	37	71.6
2	5	17	39	73.9
3	5	18	41	72.8
4	6	16	39	73.3
5	6	17	41	71.8
6	6	18	37	74.1
7	7	16	41	71.4
8	7	17	37	73.6
9	7	18	39	75.2
K1	218.3	216.3	219.3	
K2	219.2	219.3	222.4	
K3	220.2	222.1	216.0	
R	1.9	5.8	6.4	

2.4 验证实验

蛋白质质量浓度和 562 nm 处的吸光度对应关系如图 6 所示, 蛋白质质量浓度和吸光度值成正比相关. 结合图 6 和表 3 来看, 发酵牛奶中的蛋白质量浓度略高于购买的光明原味酸奶. 而实验发酵酸奶中 β -LG 抗原性却低于原味酸奶. 实验发酵酸奶中活菌数达 4.56×10^9 cfu·mL⁻¹, 是光明原味酸奶的 8 倍以上. 表明在优化条件下, 发酵效果很好, 乳酸菌 RA3 适合应用于发酵酸奶.

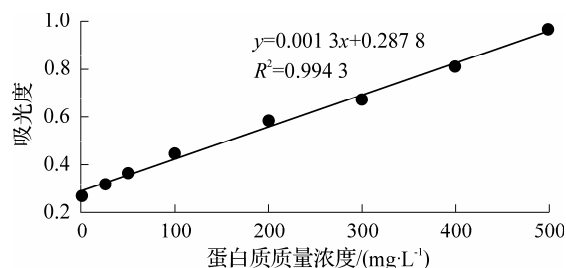


图6 蛋白质质量浓度标准曲线图

表3 验证实验结果分析

乳品	蛋白质量浓度/(g·L ⁻¹)	β-LG 抗原性
实验发酵酸奶	29.1	0.87
购买光明酸奶	27.7	1.27
原料奶	35.9	3.63

3 讨论

目前, β-LG 引起的过敏现象是乳品行业亟待解决的问题, 而通过乳酸菌发酵降低牛乳抗原性是近年来研究的焦点. 乳酸菌抗敏机制主要体现在两方面, 一是乳酸菌能缓解 β-LG 引发的特异性 IgE 介导的 I 型过敏反应, 即调节 Th1/Th2 的免疫失衡^[20-22]; 二是一些专家通过测定发酵过程中游离氨基酸和乳清蛋白的含量, 发现发酵产生的蛋白酶、肽酶能将过敏蛋白降解成肽或氨基酸^[23]. 研究重点大都集中在前者, 对后者研究很少. 这两种机制的具体降敏过程还不清晰, 有待进一步研究.

国外对乳酸菌降低乳清蛋白过敏性的工艺研究相对国内而言更加成熟. Wroblewska 等^[24]用嗜温和嗜热乳酸菌发酵酸奶, 用兔血清间接竞争 ELISA 法测定, 发现 β-LG 抗原性减少了 90%. Bu 等^[25]也发现乳酸菌发酵能显著减少乳清蛋白含量, 经瑞士乳杆菌和嗜热链球菌联合发酵 6 h, 冷藏 0.5 d 后, 抗原性显著下降. 本实验使用筛选的高产蛋白酶发酵乳杆菌 RA3, 酶活达 38.87 U·mL⁻¹, 高于宋园亮等^[26]研究的乳酸菌蛋白酶活力(32.50 U·mL⁻¹), 陈超^[27]研究的乳酸菌蛋白酶活力(28.82 U·mL⁻¹), 用其发酵酸奶后 β-LG 抗原性降低了 75.2%, 与以上国外研究的乳酸菌相比降敏效果也很明显. 但在用乳酸菌发酵生产低敏酸奶时, 抗原性能显著降低的同时, 经常会出现色泽和口感等品质在一定程度上下降的情况, 如色泽暗黄、酸度偏低、酸甜比失调、乳清析出凝乳不均匀等. 而本

实验经优化发酵条件: 接种量 7%, 发酵时间 18 h, 发酵温度 39 °C, 后熟时间 12 h, 酸奶的口感依然很好, 而且活菌数是市售酸奶的 8 倍, 更能促进人体的消化功能.

为了进一步提高酸奶的品质, 用 RA3 发酵时可采用复合菌株共同发酵, 因为菌株不同, 降敏效果也存在差异, 乳酸杆菌对水解过敏蛋白活性高于球菌, 而混合发酵的菌株会相互促进生长^[28-29]. 也可采用发酵法和酶法等结合发酵. 同时还可对发酵前处理时的加热温度和时间进行优化, 研究出降敏效果和口感更佳的工艺条件来提高和改善乳品品质, 为我国发酵乳制品品质的提高建立更加完善的理论和实验基础.

参考文献:

- [1] Fritsche R. Role of technology in dairy allergy[J]. Australian Journal of Dairy Technology, 2003, 58(2):89-91.
- [2] 宋宏新, 潘洁, 薛海燕. 牛乳蛋白抗原性研究现状概述[J]. 中国酿造, 2011, 30(1):17-21.
- [3] 曹晓燕, 潘道东, 彭涛, 等. 水解乳蛋白产生肽及降低蛋白过敏性研究[J]. 中国食品学报, 2012(2):7-14.
- [4] 郭鸽, 霍贵成, 张英华. 牛乳蛋白过敏综述[J]. 食品科技, 2007, 4:262-264; 268.
- [5] 陈简. 适度水解乳清蛋白配方对婴儿过敏性疾病的预防作用[J]. 中外医疗, 2014, 33(23):6-8.
- [6] 胡长利, 陈历俊, 宋小红, 等. 乳源过敏及低致敏乳制品的研究[J]. 中国乳品工业, 2011, 39(3):42-45.
- [7] 姜俊. 具有降 β-乳球蛋白抗原性乳酸菌筛选及其特征研究[D]. 无锡: 江南大学, 2009.
- [8] Sharma S, Kumar P, Betzel C, et al. Structure and function of proteins involved in milk allergies[J]. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 2001, 756(1/2):183-187.
- [9] 布冠好, 郑喆, 郑海, 等. 牛乳过敏原 β-乳球蛋白间接竞争 ELISA 检测方法的建立[J]. 中国农业大学学报, 2008, 13(6):71-76.
- [10] Bertrand-harb C, Ivanova I V, Dalgalarroondo M, et al. Evolution of β-lactoglobulin and α-lactalbumin content during yoghurt fermentation[J]. International Dairy Journal, 2003, 13(1):39-45.
- [11] 李冰, 龙再浩. 牛乳蛋白过敏及其改性研究[J]. 农产品加工(学刊), 2012(6):41-44; 63.
- [12] 张颖, 罗永康, 张岩春. 发酵和酶解结合对乳清蛋白抗原性影响的研究[J]. 乳业科学与技术, 2010, 33(4):151-155.

- [13] 王席娟. 深度水解蛋白配方乳对早产儿早期胃肠道功能的影响及机制探讨[D]. 武汉: 华中科技大学, 2010.
- [14] 包惠燕, 欧仕益, 傅亮, 等. 乳酸菌发酵对蛋奶胆固醇的影响[J]. 暨南大学学报(自然科学版), 2003, 24(3): 115-117.
- [15] 陈帅, 穆海波, 姜俊, 等. 干酪乳杆菌 WPC09 对 β -乳球蛋白抗原性降低的研究[J]. 乳品科学与技术, 2010, 145(6):251-253.
- [16] 李艾黎, 孟祥晨, 郭翎, 等. 应用体内外实验筛选可降低牛乳 β -乳球蛋白过敏的乳杆菌[J]. 微生物学报, 2012, 52(2):243-249.
- [17] 何捷, 曾小群, 吕鸣春, 等. 新疆酸奶中高产蛋白酶与产脂肪酶乳酸菌的筛选[J]. 食品科学, 2015, 36(17): 130-133.
- [18] 廖芬, 刘用明, 郑凤锦, 等. 不同稳定剂对香蕉凝固型酸奶品质的影响[J]. 南方农业学报, 2015, 46(1):123-127.
- [19] 魏明, 赵博. 南瓜发酵酸奶的工艺研究[J]. 食品工业科技, 2007, 28(10):171-173.
- [20] Adel-Patient K, Cr  minon C, Bernard H, et al. Evaluation of a high IgE-responder mouse model of allergy to bovine b-lactoglobulin BLG: Development of sandwich immunoassays for total and allergen-specific IgE, IgG1 and IgG2a in BLG-sensitized mice[J]. Journal of Immunological Methods, 2000, 235(1/2):21-32.
- [21] 叶笑艳, 钱方, 孙洋, 等. 生物法制备低过敏乳的研究进展[J]. 食品与机械, 2013(2):231-233; 254.
- [22] Cross M L, Stevenson L M, Gill H S. Anti-allergy properties of fermented foods: An important immunoregulatory mechanism of lactic acid bacteria[J]. International Immunopharmacology, 2001, 5(1):891-901.
- [23] 谭梦, 华家才, 冯凤琴. 牛乳过敏原及加工技术对其致敏性的影响[J]. 食品工业科技, 2016, 37(5):384-387; 393.
- [24] Wroblewska B, Karamac M, Amarowicz R, et al. Immunoreactive properties of peptide fractions of cow whey milk proteins after enzymatic hydrolysis[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2004, 39(8):839-850.
- [25] Bu G H, Luo Y K, Zhang Y, et al. Milk processing as a tool to reduce cow's milk allergenicity: A mini-review[J]. Dairy Science & Technology, 2013, 93(3):211-223.
- [26] 宋园亮, 张忠华, 熊骏, 等. 元阳豆豉中高产蛋白酶乳酸菌的筛选及其产酶条件的研究[J]. 中国微生态学杂志, 2011, 23(1):8-12.
- [27] 陈超. 产蛋白酶乳酸菌种的筛选及应用研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2008.
- [28] Tzvetkova I, Dalgalarondo M, Danova S, et al. Hydrolysis of major proteins by lactic acid bacteria from Bulgarian yogurts[J]. Journal of Food Biochemistry, 2007, 31(5):680-702.
- [29] 张颖, 布冠好, 郑喆, 等. 脱脂乳发酵过程中 β -乳球蛋白和 α -乳白蛋白抗原性变化规律[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(6):7-11.

Optimization of fermentation condition for reducing β -lactoglobulin antigenicity of milk by *Lactobacillus fermentum* RA3 with high protease activity

WU Ai-juan, SUN Jie, HUANG Ling, ZENG Zhi-dan, ZENG Xiao-qun*, PAN Dao-dong, WU Zhen

(Key Laboratory of Animal Protein Food Processing Technology of Zhejiang Province,
Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: Bovine β -lactoglobulin (β -LG) is the major allergen in milk. To reduce its antigenicity, *Lactobacillus fermentum* RA3 was isolated from Xinjiang mare's milk with high protease activity and used to produce yogurt in this experiment. The effects of inoculation amount, time, ripening time and temperature on antigenicity reduction and the influence on sensory quality were examined in the current study. Then optimal fermentation condition that produced greatest reduction in the beta-globulin antigenicity (75.2%), with the flavor of yogurt remained, was found to be 7% inoculation, 18 h fermentation time, 39 °C fermentation temperature. Compared with yogurt on the market, fermented yogurt has a significantly lower rate of total protein hydrolysis, higher rate of allergic protein hydrolysis. The number of viable bacteria in the fermented yogurt is 4.56×10^9 cfu·mL⁻¹ which is about 8 times more than yogurt on the market. This lactobacillus has great application potential in the yogurt fermentation industry.

Key words: lactic acid bacteria; protease; β -lactoglobulin; antigenicity; fermentation condition

(责任编辑 韩超)