

# 雅致放射毛霉在干酪中的应用\*

汪建明, 郭林海, 孙 团, 张媛媛

(食品营养与安全省部共建教育部重点实验室, 天津科技大学 食品工程与生物技术学院, 天津, 300457)

**摘 要** 雅致放射毛霉(*Actinomucor elegans*)是酿造腐乳的优良菌株, 鉴于其优良发酵特性和蛋白酶解效力, 将其引入到传统表面霉菌成熟干酪的发酵成熟过程中, 研究该菌种对于干酪成熟期间理化特性等各项指标的影响。理化特性研究表明, 雅致放射毛霉表面成熟干酪在成熟期间水分含量由 59%(W/W)下降到 50%; 外部和内部的 pH 都呈上升的趋势, 最后达到 pH7.0 左右; 乳酸含量由 1.2%(W/W)下降到 0.4%; pH4.6 SN(可溶性氮)和 12%TCA(三氯乙酸)SN 在成熟的 30 d 内分别由 10.1%(W/W)和 2.5%增长到了 45.2%和 27.1%; 电泳结果表明, 酪蛋白发生强烈水解; 毛霉干酪游离脂肪酸含量在成熟末期达到 6.54%(W/W); TPA 硬度由 450 g 下降到 150 g。毛霉干酪成品的主要成分指标为: 水分 50%, 蛋白质 20%(W/W), 脂肪 20.6%(W/W), 盐含量 2.1%(W/W), 符合 NY478-2002 软质干酪农业部标准, 与 Camembert 青霉干酪的理化指标相似。

**关键词** 雅致放射毛霉, 毛霉干酪, 理化性质

干酪以其水分含量为标准分为硬质、半硬质、软质和再制干酪 4 种。在软质干酪中, 表面霉菌成熟干酪(surface mould-ripened cheese)具有重要的地位<sup>[1,2]</sup>。近年来, 越来越多的消费者开始青睐于表面霉菌成熟干酪, 因为其质地柔软易于直接食用和涂抹, 同时调查也显示, 消费者的口味倾向于更温和的风味, 生产者在对于干酪的风味改进方面包括对工艺和菌种的改进。

目前使用的霉菌菌种主要有卡地干酪青霉(*P. camemberti*)、姿地青霉(*P. roqueforti*)和白地霉(*Geotrichum candidum*)<sup>[3~6]</sup>, 而对其它表面发酵剂的研究较少。由于传统霉菌干酪的风味比较强烈, 短期内很难被中国消费者接受, 所以选用有自主知识产权的新型霉菌发酵剂, 研制符合中国人口味的霉菌干酪迫在眉睫。

腐乳是我国传统酿造食品, 其风味已被大多数国人所接受, 但由于其盐含量较高, 产品结构单一, 长久以来人均消费量较低。雅致放射毛霉(*Actinomucor elegans*)是我国传统腐乳酿造中常用的优良菌种之一, 该霉菌可分泌多种酶系, 对腐乳后期发酵过程中风味物质的形成起重要作用<sup>[7,8]</sup>。本研究将该霉菌应用于干酪生产, 对该类特殊的霉菌干酪——毛霉干酪在成熟过程中理化性质的变化进行探讨, 并与传统

青霉成熟干酪理化指标进行对比, 以期得到风味温和, 营养价值高, 适于中国人消费的干酪新品种。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

原料乳: 新鲜牛乳, 天津中芬乳业有限公司。

供试菌种: R-704 乳酸菌发酵剂, CHRHANSEN 生产; 雅致放射毛霉(*Actinomucor elegans*), 天津科技大学微生物实验室保藏菌种。

凝乳酶: Stamix 1150, CHRHANSEN 生产, 酶活力为 35 000RU/g。

### 1.2 主要试剂与仪器

pH4.6 醋酸盐缓冲溶液; 12% TCA 溶液; SDS 凝胶电泳浓缩胶、分离胶, 电泳缓冲溶液,  $\beta$ -巯基乙醇, 电泳固定、染色液等。

JA2003 电子天平; 微量凯氏定氮仪; 数显 pH 计; DYY-III 型稳压稳流定时电泳仪; TA-XT Plus 质构仪等。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 干酪的制作方法

原料乳→巴氏杀菌→冷却→添加乳酸菌发酵剂→调整酸度→添加凝乳酶→凝乳形成→切割→搅拌→入模→翻转→擦盐→喷洒霉菌孢子液→成熟→成品

#### 1.3.2 水分测定方法

采用烘干法进行测定<sup>[9]</sup>。

#### 1.3.3 乳酸含量的测定<sup>[10]</sup>

第一作者: 博士, 副教授

\* 天津市科技发展计划项目(NO06YEGZSH02300); “十一五”国家科技支撑计划与课题(No. 2006BAD04A06)

收稿日期: 2008-08-20, 改回日期: 2008-0-0

取 10 g 干酪加 95 mL 脱 CO<sub>2</sub> 的 60℃ 蒸馏水中, 混合 30 s 后过滤, 取 25 mL 滤液, 加入酚酞指示剂, 用 0.1 mol/L 的标准 NaOH 溶液滴定, 每个处理重复 3 次。

### 1.3.4 pH 的测定<sup>[11]</sup>

从干酪样品的边缘处取宽度约 10 mm 的圆环为外部待测样品, 以中心为圆点取直径约 40 mm 的圆为内部待测样品, 各取 10 g 与 10 mL 脱除 CO<sub>2</sub> 的蒸馏水在研钵中混合, 测定 pH, 每个处理重复 3 次<sup>[11]</sup>。

### 1.3.5 pH 4.6 可溶性氮含量测定

准确称取 0.75 g 干酪, 加入 25 mL pH 4.6 的醋酸盐缓冲溶液, 将干酪充分磨碎, 再用 25 mL 的缓冲液充分冲洗, 悬浮液 4 000 r/min 离心 20 min, 取上清液定量移入凯氏消化瓶, 进行微量凯氏定氮, 每个处理重复 3 次, 结果以可溶性氮占干酪总氮量的质量分数(%)表示<sup>[12]</sup>。

### 1.3.6 12% TCA 可溶性氮含量测定

准确称取 1.5 g 干酪, 加入 25 mL 12% 的 TCA 溶液, 将干酪充分磨碎, 再用 20 mL 的 TCA 溶液充分冲洗, 悬浮液在 4 000 r/min 离心 20 min, 取上清液定量移入凯氏消化瓶, 进行微量凯氏定氮, 每个处理重复 3 次, 结果以可溶性氮占干酪总氮量的质量分数(%)表示<sup>[12]</sup>。

### 1.3.7 SDS(聚丙烯酰胺)凝胶电泳的测定

采用 5% 的浓缩胶和 15% 的分离胶<sup>[13]</sup>。

### 1.3.8 游离氨基酸(FAA)含量的测定

采用甲醛滴定法测定<sup>[14]</sup>。

### 1.3.9 游离脂肪酸(FFA)含量的测定

采用 GB/T5530—1998 法测定<sup>[15]</sup>。

### 1.3.10 干酪质构的测定

用质构仪 TA-XT Plus 测定干酪的 TPA 硬度<sup>[16]</sup>。

## 1.4 实验设计

将对照干酪与雅致放射毛霉干酪进行对比, 研究该霉菌在干酪成熟过程中所起的作用。分别在 0 d、5 d、10 d、15 d、20 d、25 d、30 d 取样, 进行指标测定。对照干酪与 1.3.1 节中干酪加工方法相同, 在盐渍后不喷洒霉菌孢子悬浮液, 直接放入成熟室进行成熟。

## 2 结果与讨论

### 2.1 干酪成熟过程中水分含量的变化

分别取不同成熟期的对照干酪和毛霉干酪样品,

测定其水分含量变化, 结果如图 1 所示。

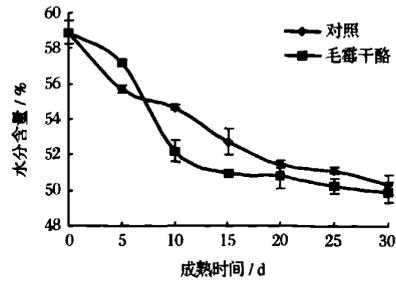


图 1 干酪成熟过程中水分含量的变化

由图 1 可以看出, 毛霉干酪成熟至第 5 天, 水分含量较对照组要高, 这主要由于霉菌在干酪表面结壳, 阻止了水分的蒸发。但随着成熟时间的增加, 霉菌的蛋白酶与脂肪酶的活性大大增加, 分解出的羧基和氨基组分与水分结合, 使得此后干酪样品的水分含量低于对照组, 维持在 50% 左右。

### 2.2 干酪成熟过程中 pH 值的变化

分别取不同成熟期的对照干酪和毛霉干酪样品, 测定其 pH 变化, 结果如图 2 所示。

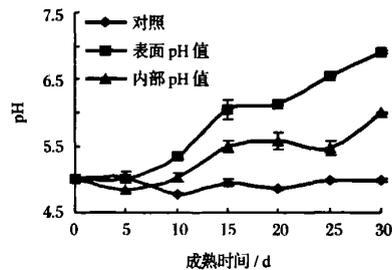


图 2 干酪成熟过程中 pH 的变化

由图 2 可以看出, 直到成熟结束, 对照干酪表面的 pH 仍保持在 5.0 左右, 而毛霉干酪在成熟过程中外部和内部的 pH 都呈逐渐上升的趋势。一方面由于霉菌将乳酸进一步降解为 H<sub>2</sub>O 和 CO<sub>2</sub>; 另一方面, 由于霉菌产酶的作用, 蛋白质降解产生 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 的反应占优势, 使得干酪表面 pH 上升, 同时 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 渗透至干酪内部, 使得内部的 pH 也逐渐上升。

### 2.3 乳酸含量的变化

分别取不同成熟期的对照干酪和毛霉干酪样品, 测定其乳酸含量的变化, 结果如图 3 所示。

由于牛乳中存在蛋白质、柠檬酸盐和磷酸盐的缓冲系统, 而干酪的加工生产是一个去除水分、乳糖和一些牛乳中物质的过程, 通过去除水分, 形成一种牛乳脂肪和蛋白质的浓缩物。在干酪的成熟和贮藏过程中, 由于干酪主要成分的水解, 会发生一系列复杂

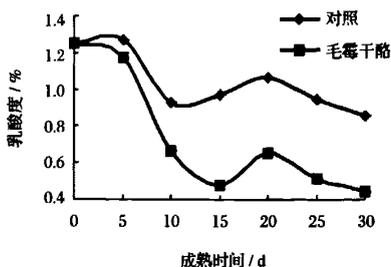


图3 干酪成熟过程中乳酸度的变化

的生化反应,产生一些中等大小的肽段和小分子氨基酸,这样形成一个较大的缓冲体系。在贮藏过程中,其乳酸含量的变化并不是与pH的变化相一致。由图3可以看出,2组干酪的乳酸度都呈下降趋势,毛霉干酪变化更明显,在成熟末期乳酸降到0.429%,可能是由于霉菌对乳酸等其他酸类的降解能力较强造成的。

#### 2.4 可溶性氮(SN)含量的变化

一般认为,pH 4.6时SN表示蛋白水解的广度,可直观地反映酪蛋白降解情况。而12%TCA SN表示蛋白水解的深度,可反映降解酪蛋白产生的短肽,本实验对毛霉干酪成熟过程中pH 4.6 SN和12%TCA SN进行测定,以说明毛霉干酪成熟过程中蛋白水解的程度,结果见图4和图5。

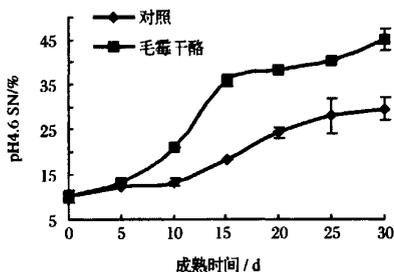


图4 成熟过程中pH 4.6 SN含量的变化

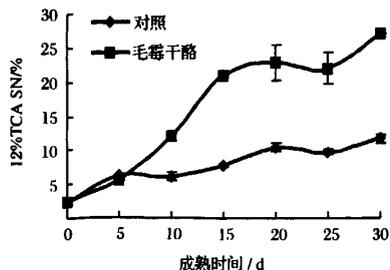


图5 成熟过程中12%TCA SN含量的变化

由图4和图5可以看出,毛霉干酪在成熟过程中酪蛋白发生强烈水解,pH 4.6 SN和12%TCA SN

随着成熟时间的延长呈明显增长趋势,pH 4.6 SN和12%TCA SN在成熟的30 d内分别由10.1%和2.5%增长到了45.2%和27.1%。霉菌干酪在成熟过程中由于乳酸菌和毛霉蛋白酶的持续作用使pH 4.6 SN和12%TCA SN的增长基本呈一平滑上升趋势。

#### 2.5 游离氨基酸(FAA)含量的变化

游离氨基酸(FAA)是干酪中蛋白质水解的主要产物,因此对干酪中FAA含量的测定也能进一步说明干酪蛋白质的水解情况。本实验取毛霉干酪在成熟过程中对其不同成熟期干酪样品的FAA含量进行测定,以进一步说明毛霉干酪成熟过程中蛋白水解的程度,结果见图6。

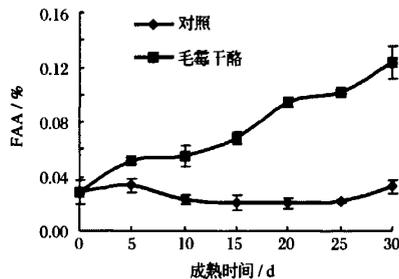


图6 成熟过程中FAA含量的变化

由图6可以看出,对照干酪游离氨基酸含量基本保持不变,而随着毛霉干酪成熟时间的延长,FAA含量呈明显增加趋势,在成熟的30 d内由0.029%增长到0.124%。FAA含量的增加也进一步说明毛霉干酪在成熟过程中酪蛋白发生了强烈水解,这主要是由于随着干酪pH值的升高,乳酸菌和霉菌产生的肽酶活性增强,将大肽进一步分解成小肽和氨基酸。

#### 2.6 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

不同成熟期的对照干酪和毛霉干酪样品SDS凝胶电泳图如图7和图8所示。

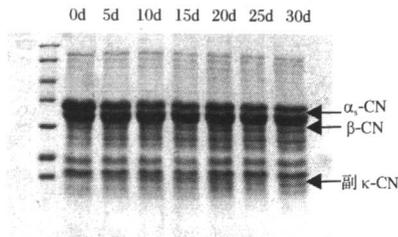


图7 对照干酪SDS凝胶电泳图

由图7和图8可以看出, $\alpha$ -CN和 $\beta$ -CN是凝胶中主要的电泳带,位于凝胶的上方。 $\alpha$ -CN包含 $\alpha_{s1}$ -

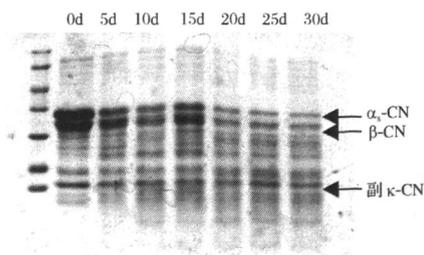


图8 毛霉干酪 SDS 凝胶电泳图

CN 和  $\alpha_2$ -CN, 下半部分泳带主要是副  $\kappa$ -CN, 而在牛乳中主要是  $\kappa$ -CN。 $\alpha_1$ -CN 和  $\beta$ -CN 的水解片段处在  $\beta$ -CN 和副  $\kappa$ -CN 之间以及副  $\kappa$ -CN 以下。从图中还可以看出, 随着成熟时间的延长, 毛霉干酪酪蛋白的水解程度也增加, 主要表现在出现了大量的小分子量物质, 酪蛋白的强烈水解表明了毛霉干酪的蛋白酶、氨肽酶和羧肽酶有很高的活性。在副  $\kappa$ -CN 以下的小分子量的快速迁移肽随时间逐渐增多, 而  $\beta$ -CN 和副  $\kappa$ -CN 之间的大分子量的快速迁移肽增加不明显, 这是由于乳酸菌和毛霉生长代谢所产生的酶系将大分子量的快速迁移肽及时地进一步水解为小分子量的快速迁移肽的结果。

## 2.7 游离脂肪酸(FFA)的变化

由图 9 可以看出, 随着成熟时间的延长, 毛霉干酪总的游离脂肪酸含量呈不断上升趋势, 在成熟末期达到 6.54%, 与对照组游离脂肪酸含量相比, 脂肪酸含量增长并不特别明显, 说明雅致放射毛霉虽然可以产生一些脂肪酶, 但其活力并不是很高, 所以脂肪降解程度不高, 减少一些刺激性风味物质的产生, 因此该毛霉干酪风味比较温和。

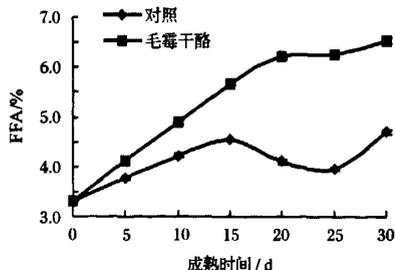


图9 成熟过程中 FFA 含量的变化

## 2.8 TPA 硬度的变化

硬度反映的是干酪凝胶体系的强度, 对不同成熟期的对照干酪和毛霉干酪样品的 TPA 硬度进行测试, 结果如图 10 所示。

由图 10 可知, 硬度的下降表明了毛霉干酪随着

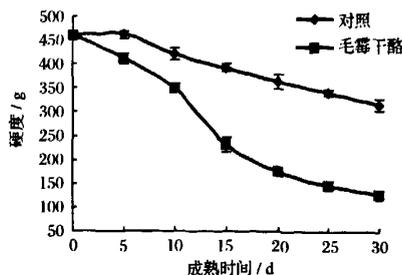


图10 成熟过程中 TPA 硬度的变化

成熟时间的延长, 干酪体系变得更加松散。主要是由于毛霉干酪在成熟过程中蛋白质和脂肪发生了大量的水解, 产生了大量水溶性物质, 酪蛋白原来的网络结构被破坏, 干酪的体系变得松散, 成熟过程中 pH 的升高也会使干酪体系变得松散, 从而使得干酪的硬度随之下降, 形成柔软均匀的组织结构。

## 2.9 成品指标比较

### 2.9.1 理化指标比较结果

测定毛霉干酪成品指标, 与 Camembert 干酪及 NY478-2002 软质干酪标准进行对比, 结果如表 1 所示。

表1 成品与 Camembert 干酪及标准指标比较

	水分/%	蛋白/%	脂肪/%	盐含量/%
雅致放射毛霉干酪	50	20	20.6	2.1
Camembert 干酪	50~55	18~20	20~25	1~3
NY478-2002 软质干酪标准	≤56	-	≥17.6	≤2.5

### 2.9.2 感官指标比较结果

(1) 雅致放射毛霉干酪: 干酪表面及内部均为淡黄色, 有奶油风味, 质地细腻、均匀。

(2) Camembert 干酪: 干酪表面白色, 内部黄色, 味道浓郁, 有蘑菇风味, 质地细腻、均匀。

(3) NY478-2002 软质干酪农业部标准: 干酪表面及内部呈均匀一致的乳白色或乳黄色, 具有成熟干酪特有的滋味和气味, 质地均匀细腻、柔软。

## 3 结论

(1) 雅致放射毛霉可以在干酪表面正常生长, 且对干酪成熟过程中各项指标变化均有显著影响: 乳酸度和 pH 的变化对毛霉产脂肪酶和蛋白酶的活性有重要影响, 雅致放射毛霉对干酪蛋白和脂肪不同程度的降解是毛霉干酪产生特征风味物质和质地的主要原因。由于毛霉干酪在成熟过程中蛋白质和脂肪发生了大量的水解, 产生了大量水溶性物质, 酪蛋白原来的网络结构被破坏, 干酪的体系变得松散, 成熟过

程中 pH 的升高也会使干酪体系变得松散,从而使得干酪成熟过程中 TPA 硬度呈下降趋势。

(2) 成品干酪指标与传统 Camembert 干酪相近,且风味更加柔和,符合国家 NY478-2002 软质干酪农业部标准。

#### 参 考 文 献

- 1 骆承庠. 乳与乳制品工艺学(第二版)[M]. 北京:中国农业出版社, 1999. 242~256
- 2 Barry A L. Technology of cheese making[M]. Sheffield Academic Press, 1999. 122~123
- 3 郭本恒. 干酪[M]. 北京:化学工业出版社, 2004. 134
- 4 Bruna B S. Penicillium roqueforti production and its utilization in gorgonzola cheese making[J]. Marschallilalian and Specialty Cheese Seminars, 1979, 15: 1~6
- 5 Gaborit P, Menard A, Morgan F. Impact of ripening strains on the typical flavour of goat cheese[J]. International Dairy Journal, 2001, 11: 315~325
- 6 Kawai T, Ueda C, Nakazawa Y. Studies on Camembert Cheese Manufacture Using Yeast Flora[J]. Milk Science, 1998, 47(2): 91~99
- 7 鲁绯, 刘萍, 孙君社, 等. 雅致放射毛霉蛋白酶[J]. 食品与生物技术学报, 2005, 24(2): 18~21
- 8 鲁绯. 腐乳发酵机理、品质改进和模式识别研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2005
- 9 刘福岭, 戴行钧. 食品物理与化学分析方法[M]. 北京: 北京科技出版社, 1987: 35~37
- 10 Lembo P, Spedicato E L. Prodotti cassari del mezzogiorno [M]. Rome: Consiglio Nazionale delle Ricerche, 1992. 97~99
- 11 Sousa M J, Ardo Y, Mc sweeney P L H. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening[J]. International Dairy Journal, 2001, (11): 327~345
- 12 Yun J J, Kiely L J, Barband D M. Mozzarella cheese: Impact of Cooking temperature on chemical composition, proteolysis and functional properties[J]. J Dairy Sci, 1993, 76(12): 3 664~3 673
- 13 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 1999. 167~170
- 14 赵永芳. 生物化学原理及其技术应用[M]. 武汉: 武汉大学出版社, 1995. 58~60
- 15 GB/T5530-1998, 动植物油脂酸价和酸度测定[S]
- 16 Kindstedt P S. Effect of salt concentration and freezing on Mozzarella cheese Texture[J]. J Dairy Sci, 1883, 66: 204~213

## Study on Plastic Curd Cheese Fermentation By *Lactobacillus casei* Subsp. *Casei*

Wang Jianming, Guo Linhai, Sun Jian, Zhang Yuanyuan

(Food Engineering and Biotechnology College, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

**ABSTRACT** *Actinomucor elegans* is one of the primary strains utilized in the fermentation of preserved soft cheese. In this paper, the effects of *Actinomucor elegans* on mold cheese ripening were studied. The effect of mucor on cheese physical and chemical changes during ripening showed that: the water content decreased from 59% to 50%; the pH of both surface and inner increased to pH 7.0 and lactic acid from 1.2% to 0.4%; pH 4.6 SN and 12% TCA SN contents increased from 10.1% and 2.5% to 45.2% and 27.1%, respectively. Total free fatty acid content reached 6.54%; TPA hardness decreased from 450g to 150g during ripening. The product's main component indexes were as follows: moisture content 50%, protein 20%, fat 20.6% and salt content 2.1%. The indexes meet the NY478-2002 Ministry of Agriculture standard for soft cheese and are close to the characteristics of traditional Camembert cheese.

**Key words** *Actinomucor elegans*, mucor cheese, physical and chemical character