

益生菌干酪成熟过程中微生态变化的研究进展

王 辑, 杨贞耐*

(北京工商大学食品质量与安全北京实验室, 北京 100048)

摘 要: 随着人们健康意识及对益生菌产品需求的增强, 有关益生菌干酪的研究和加工也不断增多。益生菌干酪在成熟过程中, 由于受到益生菌的作用, 干酪会发生一系列复杂的微生态理化反应, 从而影响到产品的风味、质构、安全性和功能性等特性。本文重点综述了益生菌干酪在成熟过程中微生态变化的研究进展, 包括益生菌在干酪基质中的存活、益生菌干酪在益生菌作用下发生的理化特性变化以及组学方法在益生菌干酪中的应用等, 以期提升干酪加工技术水平、推动益生菌干酪产品的研制以及促进我国干酪产业的发展提供参考。

关键词: 益生菌干酪; 益生菌存活; 微生态变化; 组学方法

Advance of microecological changes of probiotic cheese during ripening

WANG Ji, YANG Zhen-Nai*

(Beijing Laboratory of Food Quality and Safety, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China)

ABSTRACT: With increased awareness of human health and demands for probiotic products, research and processing of probiotic cheese also increased constantly. Probiotic cheese usually generated a series of complex microecological physicochemical reactions during its ripening, which could influence the flavor, texture, safety and functionality characteristics of final product. This paper mainly reviewed the advance of the microecological changes of probiotic cheese during ripening, including the survival of probiotics in cheese matrix, the effect of probiotics on physicochemical changes of probiotic cheese, and the application of omics methods in probiotic cheese, in order to provide references for enhancing the processing technology of cheese products and developing probiotic cheese products, as well as promoting the development of cheese industry in China.

KEY WORDS: probiotic cheese; probiotic survival; microecological changes; omics methods

1 引 言

益生菌干酪是指在原料乳杀菌处理后将益生菌以辅助菌的形式加入或在排乳清后添加益生菌到凝乳块中, 经压榨成型、成熟(对于部分新鲜干酪品种可以不经成熟阶段)而制成的有益于人体健康的各种功能性干酪产品。目前研究应用最多的益生菌是乳杆

菌和双歧杆菌。在干酪成熟阶段(通常 3~24 个月), 益生菌在干酪基质中的存活状况以及其与发酵剂、非发酵剂微生物的相互作用都直接影响到益生菌干酪的品质和功能性。根据相关研究报道, 在干酪加工过程中添加适量益生菌可以有效地抑制干酪中有害微生物的生长代谢, 从而提升干酪的品质及安全性^[1]。

如何在干酪成熟阶段保持较高的益生菌活菌数,

基金项目: 国家自然科学基金项目(31371804)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (31371804)

*通讯作者: 杨贞耐, 教授, 主要研究方向为乳品加工及交叉学科的理论和应用。E-mail: yangzhennai@th.btbu.edu.cn

*Corresponding author: YANG Zhen-Nai, Professor, Beijing Technology and Business University, No.11, Fucheng Road, Haidian District, Beijing 100048, China. E-mail: yangzhennai@th.btbu.edu.cn

同时对干酪感官品质无负面影响, 仍是当前益生菌干酪生产中亟待解决的重要问题。干酪成熟过程中的微生物变化是微生物酶作用导致的一系列生化反应, 包括乳蛋白质水解、脂解和糖酵解等^[2]。益生菌作为辅助菌添加到干酪中, 基于其在干酪成熟过程中产生的蛋白酶、脂酶或乳糖酶等的活性不同, 同时有些益生菌在生长过程中会产生胞外多糖、抑菌物质和各种功能成分等, 因此在干酪成熟阶段, 益生菌对不同种类干酪风味物质的形成、质构性、安全性和功能性等特性的影响是个复杂的过程。本文主要对近年来有关益生菌干酪在成熟过程中的微生态变化研究进展, 包括益生菌在干酪基质中的存活、干酪在益生菌作用下产生的微生态变化以及组学方法在干酪中的应用等方面进行了综述。

2 益生菌在干酪基质中的存活

与其他乳制品相比, 干酪基质具有更适于益生菌存活的 pH 环境, 其中相对较高的脂肪、固形物含量以及缓冲能力, 都有利于益生菌保持较高的生物活性, 并能够有效地保护益生菌免受胃肠道中不利条件的影响^[3]。在益生菌干酪生产过程中, 既要保证益生菌较高的活菌数, 也要保证添加益生菌不会对干酪的感官品质产生负面影响。Santillo 等^[4]对益生菌嗜酸乳杆菌和双歧杆菌进行微胶囊化处理用于 Pecorino 干酪加工, 发现干酪成熟 1 个月后, 由于微胶囊降解使其中的益生菌释放出来, 导致干酪基质中其活菌数大幅增加。Minervini 等^[5]对德氏保加利亚乳杆菌 SP5 和副干酪乳杆菌 BGP1 进行热处理 (42 °C, 10 min), 然后用于加工 Fior di Latte 干酪, 发现此热处理可以增强益生菌对干酪加工过程的热烫处理 (55 °C, 10 min) 的抵抗力, 提高产品中益生菌活菌数。Alves 等^[6]在稀奶油干酪中添加益生性双歧杆菌 Bb-12、嗜酸乳杆菌 La-5 和益生元菊糖, 在储藏过程中, 发酵剂嗜热链球菌和益生性双歧杆菌 Bb-12 的活力良好, 而嗜酸乳杆菌菌数则大幅度下降。Escobar 等^[7]在益生菌 Panela 干酪的加工过程中加入 3% 蚕豆淀粉, 干酪在 4 °C 条件下储藏 1 个月, 其中的益生菌弯曲双歧杆菌 ATCC 15700 对淀粉具有一定的水解作用, 但其存活能力不受影响, 说明蚕豆淀粉不适合作为益生元用于此种干酪的加工。Fortin 等^[8]研究了切达干酪加工工艺条件对益生性长双歧杆菌 15708 存活能力的影响, 结果表明, 在原料乳中添加益生菌,

与在凝块翻转处理(或称堆酿处理)时添加相比, 前者更有利于保持益生菌在储藏阶段的稳定性; 干酪中的盐分抑制益生菌的存活; 益生菌接种量对其存活率没有影响。然而 Gomes 等^[9]的研究表明, 在干酪加工中过量添加嗜酸乳杆菌, 一定程度上可以增加干酪产品中益生菌的活菌数, 但是过高的活菌数 (>10⁹ CFU/g) 会使干酪基质中有机酸产量增加 (pH 值下降) 从而影响干酪的表现、质构和风味等感官品质。

3 益生菌干酪在成熟过程中的理化特性变化

益生菌干酪在成熟过程中, 由于受到益生菌产生的蛋白酶、脂酶或乳糖酶等不同活性微生物酶以及胞外多糖、抑菌物质和各种功能成分等的作用, 从而影响干酪产品的风味、质构、安全性和功能性等特性, 这也是目前益生菌干酪研究的热点。Minervini 等^[10]通过对益生菌干酪的感官特性评价发现益生菌干酪的各项感官指标分数均高于普通干酪。Milesi 等^[11]研究发现在软质或半硬质干酪中添加益生菌干酪乳杆菌 I90 或植物乳杆菌 I91 可以改善干酪的感官特性, 并且不会对干酪的品质产生负面影响。Özer 等^[12]研究发现在包埋的益生菌干酪中, 其短链及中链脂肪酸明显高于空白干酪。Santillo 等^[13]将凝乳酶与嗜酸乳杆菌或双歧杆菌混合添加到羊乳干酪中, 结果发现, 经过 30 d 成熟期后, 添加含嗜酸乳杆菌的凝乳酶的干酪中共轭亚油酸 (CLA) 的含量最高, 而添加含双歧杆菌的凝乳酶的干酪中游离亚油酸 (FLA) 的含量最高, 说明益生菌与凝乳酶混合添加能影响羊乳干酪成熟过程中的游离脂肪酸 (FFA) 和共轭亚油酸 (CLA) 的含量。

低脂干酪由于其脂肪含量较低, 经常表现出不良的质构、风味以及融化性。利用产胞外多糖乳酸菌制备低脂干酪不仅可以增加干酪得率, 而且还可以提高干酪的质构及融化性。Costa 等^[14]利用产胞外多糖乳酸乳球菌 DPC6532 制备低脂切达干酪, 结果发现, 含有胞外多糖的干酪得率提高了 8.17%, 硬度降低, 水结合能力增强, 形成柔软圆滑的结构, 不易破碎, 同时产胞外多糖菌的加入使低脂干酪的融化性更接近于全脂干酪。Ahmed 等^[15]研究发现胞外多糖干酪具有较低的粘着性, 凝聚力和咀嚼性。Hassana 等^[16]分别用产胞外多糖的菌种和不产胞外多糖的菌种制备了低脂的 kareish 干酪, 结果发现, 胞外多糖以细纤维状态存在于蛋白质网络中, 同时填充着干

酪基质的空隙结构,蛋白质和胞外多糖的这种相互作用可能是影响干酪质构的主要原因。

近年来,我国学者对益生菌干酪的研究也取得了一定的进展。Wang等^[17]研究发现在切达干酪中添加不同比例的干酪乳杆菌 Zhang,可增加干酪中乳杆菌活菌数,提升干酪中ACE(血管紧张素转移酶)抑制活性和 γ -氨基丁酸含量。Zhang等^[18]将藏灵菇来源植物乳杆菌 K25 应用于切达干酪中。结果发现,植物乳杆菌 K25 在整个成熟期内保持了良好的存活能力,且对干酪的成分没有显著影响;另外,动物实验表明益生菌干酪可以显著降低高脂模型小鼠血清中总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇和甘油三酯的水平。许女等^[19]的研究表明添加了植物乳杆菌 MA2 的益生菌干酪的可溶性氮及不饱和脂肪酸的含量显著高于普通干酪,且具有良好的风味和质地,更加符合国人的口味习惯,具有良好的生产开发前景。

4 组学方法在益生菌干酪中的应用研究

随着现代分子生物学技术的发展,利用宏基因组学、蛋白质组学和生物信息学等先进方法和技术研究益生菌干酪在成熟过程中的微生态变化及对干酪品质和功能性的影响是目前干酪研究的新方向。干酪中存在大量的微生物菌群,这些微生物在干酪成熟的不同时期会发生不同的变化,且绝大多数微生物是严格厌氧或兼性厌氧菌,体外培养困难,加上大量微生物不可继代培养,传统培养技术很难对干酪中微生物进行全面深入的研究。应用 16Sr DNA 和变性梯度凝胶电泳(DGGE)等宏基因组学技术的手段,可以绕过传统培养的障碍直接从基因组信息入手,是一条探知干酪成熟过程中微生物菌群多样性及变化规律,寻找新的功能基因及其代谢产物的新途径。

利用蛋白质组学技术中的双向凝胶电泳和质谱技术,不仅可以定性和定量地分析益生菌在干酪成熟过程中释放到干酪基质中的蛋白质,也可以研究益生菌受到外界胁迫因子影响,其蛋白质表达模式的动态变化。Henri-Dubernet等^[20]运用培养与非培养方法结合,分析了法国诺曼底地区自制奶酪中乳酸菌的多样性,并对非培养方法的技术进行了探讨,由于非培养的分子生物学方法在运用过程中具有局限性,如PCR-DGGE方法就只能使用DNA片段的最适长度为200~900 bp,超出此范围的片段难以检测,只能对微生物群落中数量大于1%的优势种群进行分析,

因此, Henri-Dubernet 等的实验也证实了传统培养与非传统培养方法相结合将会更全面,更准确地反映样品中微生物的菌群多样性。Flórez等^[21]结合传统培养方法和PCR-DGGE方法研究了Cabrales干酪在成熟过程中菌群的多样性和动力学。结果发现,PCR-DGGE方法可以分离出传统培养方法无法分离出来的菌株。Hoorde等^[22]从Gouda干酪中提取DNA,并通过PCR-DGGE方法分析2株副干酪乳杆菌在干酪成熟过程中的菌群变化及对其他微生物的影响。结果显示,2株副干酪乳杆菌在干酪成熟过程中生长良好,且对干酪中其他微生物菌群的变化有显著影响。Jardin等^[23]利用SDS-PAGE技术从瑞士干酪中分离出30种蛋白质,并确定了这些蛋白主要来源于瑞士乳杆菌、嗜热链球菌和牛乳清蛋白。Voigt等^[24]将经过高压处理的原料乳用于制作干酪,SDS-PAGE法分析结果表明,高压处理对干酪成熟过程中蛋白质组成变化没有产生显著影响。

5 结 语

迄今为止,尽管人们已尝试性地将不同种类的益生菌添加到干酪中制成益生菌干酪,但是,对于益生菌干酪成熟过程中存在于干酪基质中的活性或非活性益生菌所起的作用以及由此导致的干酪微生态变化,包括干酪熟化相关的理化和微生物变化机制等仍然了解不多,致使目前益生菌干酪产品品质不稳定,对益生菌干酪中适宜的活菌数和功能性的界定不明确。

从传统乳制品和健康人群肠道中分离筛选出具有优良益生特性的菌株,以辅助菌的形式添加到干酪生产中,然后利用宏基因组学方法对成熟阶段干酪基质中有关微生物的特异性基因和功能基因进行了PCR扩增测序和生物信息学分析,研究益生菌干酪成熟过程中益生菌、干酪主发酵剂和非发酵剂微生物种群的变化及其相互作用,同时利用蛋白质组学方法分析鉴定干酪基质中的蛋白质、肽类以及存在的各种酶,利用气质联用仪、质构仪、流变仪、扫描电镜测定干酪成熟过程中风味、质构及微观结构的变化,对明确益生菌干酪成熟过程中的微生态变化及其品质形成机制具有重要意义。

随着人们健康意识以及对益生菌产品需求的增强,利用不同种类益生菌制备的各种益生菌干酪也不断增加。通过大量研究明确了干酪成熟过程中,基

于益生菌作用下的干酪基质微生物菌群、生物酶活性及酶促反应、干酪微观结构及质构特性等微生态变化机制, 及益生菌与干酪品质指标的相关性, 为有效地控制益生菌干酪的品质、建立益生菌干酪技术标准提供了科学依据。同时也为提升干酪的加工技术, 推动益生菌干酪产品的研制, 促进我国干酪产业的发展提供了理论参考。

参考文献

- [1] Banks JM, Williams AG. The role of the nonstarter lactic acid bacteria in Cheddar cheese ripening [J]. *Int J Dairy Technol*, 2004, 57(2-3): 145-152.
- [2] Lavasani ARS, Ehsani MR, Mirdamadi S, *et al.* Changes in physicochemical and organoleptic properties of traditional Iranian cheese Lighvan during ripening [J]. *Int J Dairy Technol*, 2012, 65(1): 64-70.
- [3] Ouwehand AC, Ibrahim F, Forssten SD. Cheese as a carrier for probiotics: in vitro and human studies [J]. *Aus J Dairy Technol*, 2010, 65(3): 165-169.
- [4] Santillo A, Albenzio M, Bevilacqua A, *et al.* Encapsulation of probiotic bacteria in lamb rennet paste: Effects on the quality of Pecorino cheese [J]. *J Dairy Sci*, 2012, 95(7): 3489-3500.
- [5] Scheller M, O'Sullivan DJ. Comparative analysis of an intestinal strain of *Bifidobacterium longum* and a strain of *Bifidobacterium animalis* subspecies *lactis* in Cheddar cheese [J]. *J Dairy Sci*, 2011, 94(3): 1122-1131.
- [6] Alves LL, Richards NSPS, Mattanna P, *et al.* Cream cheese as a symbiotic food carrier using *Bifidobacterium animalis* Bb-12 and *Lactobacillus acidophilus* La-5 and inulin [J]. *Int J Dairy Technol*, 2012, 66(1): 63-69.
- [7] Escobar MC, Van Tassell ML, Martinez-Bustos F, *et al.* Characterization of a Panela cheese with added probiotics and fava bean starch [J]. *J Dairy Sci*, 2012, 95(6): 2779-2787.
- [8] Fortin MH, Champagne CP, St-Gelais D, *et al.* Effect of time of inoculation, starter addition, oxygen level and salting on the viability of probiotic cultures during Cheddar cheese production [J]. *Int Dairy J*, 2011, 21(2): 75-82.
- [9] Gomes AA, Braga SP, Cruz AG, *et al.* Effect of the inoculation level of *Lactobacillus acidophilus* in probiotic cheese on the physicochemical features and sensory performance compared with commercial cheeses [J]. *J Dairy Sci*, 2011, 94(10): 4777-4786.
- [10] Minervini F, Siragusa S, Faccia M, *et al.* Manufacture of Fior di Latte cheese by incorporation of probiotic lactobacilli [J]. *J Dairy Sci*, 2012, 95(2): 508-520.
- [11] Milesi MM, Vinderola G, Sabbag N, *et al.* Influence on cheese proteolysis and sensory characteristics of non-starter lactobacilli strains with probiotic potential [J]. *Food Res Int*, 2009, 42(8): 1186-1196.
- [12] Özer B, Kirmaci HA, Senel E, *et al.* Improving the viability of *Bifidobacterium bifidum* BB-12 and *Lactobacillus acidophilus* LA-5 in white-brined cheese by microencapsulation [J]. *Int Dairy J*, 2009, 19(1): 22-29.
- [13] Santillo A, Albenzio M, Quinto M, *et al.* Probiotic in lamb rennet paste enhances rennet lipolytic activity, and conjugated linoleic acid and linoleic acid content in Pecorino cheese [J]. *J Dairy Sci*, 2009, 92(4): 1330-1337.
- [14] Casta NE, Hannon JA, Guinee TP, *et al.* Effect of exopolysaccharide produced by isogenic strains of *Lactococcus lactis* on half-fat Cheddar cheese [J]. *J Dairy Sci*, 2010, 93(8): 3469-3486.
- [15] Ahmed NH, El Soda M, Hassan AN, *et al.* Improving the textural properties of an acid-coagulated (Karish) cheese using exopolysaccharide producing cultures [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2005, 38(8): 843-847.
- [16] Hassana AN, Franka JF, Elsoda M. Observation of bacterial exopolysaccharide in dairy products using cryo-scanning electron microscopy [J]. *Int Dairy J*, 2003, 13(9): 755-762.
- [17] Wang H, Dong C, Chen Y, *et al.* A new probiotic Cheddar cheese with high ACE-Inhibitory activity and γ -aminobutyric acid content produced with koumiss-derived *Lactobacillus casei* Zhang [J]. *Food Technol Biotechnol*, 2010, 48(1): 62-70.
- [18] Zhang L, Zhang X, Liu C, *et al.* Manufacture of Cheddar cheese using probiotic *Lactobacillus plantarum* K25 and its cholesterol-lowering effects in a mice model [J]. *World J Microb Biot*, 2013, 29(3): 127-135.
- [19] 许女, 王艳萍, 刁傲登, 等. 益生菌干酪的工艺研究[J]. *食品研究与开发*, 2011, 32(8): 42-47.
Xu N, Wang YP, Xi OD, *et al.* Study on probiotic cheese [J]. *Food Res Dev*, 2011, 32(8): 42-47. 2011, 32(8): 42-47.
- [20] Henri-Dubernet S, Desmasures N, Guéguen M. Culture-dependent and culture-independent methods for molecular analysis of the diversity of lactobacilli in "Camembert de Normandie" cheese [J]. *Le Lait*, 2004, 84(1-2): 179-189.
- [21] Flórez AB, Mayo B. Microbial diversity and succession during the manufacture and ripening of traditional, Spanish, blue-veined Cabrales cheese, as determined by PCR-DGGE [J]. *Int J Food Microbiol*, 2006, 110(2): 165-171.
- [22] Hoorde KV, Leuven IV, Dirinck P, *et al.* Selection, application

and monitoring of *Lactobacillus paracasei* strains as adjunct cultures in the production of Gouda-type cheeses [J]. *Int J Food Microbiol*, 2010, 144(2): 226–235.

[23] Jardin J, Mollé D, Piot M, *et al.* Quantitative proteomic analysis of bacterial enzymes released in cheese during ripening [J]. *Int J Food Microbiol*, 2012, 155(1–2): 19–28.

[24] Voigt DD, Chevalier F, Donaghy JA, *et al.* Effect of high-pressure treatment of milk for cheese manufacture on proteolysis, lipolysis, texture and functionality of Cheddar cheese during ripening [J]. *Innov Food Sci Emerg*, 2012, 13(2): 23–30.

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介



王辑, 博士, 主要研究方向为乳品加工。

E-mail: wangji198644@163.com



杨贞耐, 博士, 教授, 主要研究方向为乳品加工及交叉学科的理论和应用研究。

E-mail: yangzhennai@th.btbu.edu.cn

“样品前处理研究”专题征稿

样品前处理在仪器分析过程中是一个既耗时又极易引进误差的步骤, 样品前处理的好坏直接影响最终的分析结果。因此, 为了提高仪器分析的测试效率, 改善和优化样品前处理的方法和技术是个重要的问题。

鉴于此, 《食品安全质量检测学报》特别策划了“样品前处理方法研究”专题, 由中山大学化学与化学工程学院李攻科教授担任专题主编, 围绕常用的食品前处理技术、前处理新方法、在线样品前处理技术、食品基质的影响等多方面展开讨论, 计划在 2014 年 5 月出版。

本刊编辑部及陈教授欢迎各位专家为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述、实验报告、研究论文均可, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。请在 2014 年 5 月 10 日前通过网站或 Email 投稿。我们将快速处理并优先发表。

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com

Email: tougao@chinafoodj.com

《食品安全质量检测学报》编辑部