

# 非发酵剂乳酸菌 A-3 和 D-3 对半硬质山羊奶干酪成熟的影响

孟昭旭<sup>1</sup>, 辛亮<sup>1</sup>, 易华西<sup>2</sup>, 章检明<sup>1</sup>, 林凯<sup>1</sup>, 张兰威<sup>1,2\*</sup>

(1. 哈尔滨工业大学化工与化学学院, 哈尔滨 150090; 2. 中国海洋大学食品科学与工程学院, 青岛 266003)

**摘要:** **目的** 获得加速半硬质山羊奶干酪成熟的非发酵剂乳酸菌菌株(non-starter lactic acid bacteria, NSLAB)。**方法** 以前期分离自地中海地区山羊奶干酪中的2株优良NSLAB菌株为研究对象,测定其对干酪成熟过程中组成成分、微生物菌群、蛋白质水解和质构的影响。**结果** 添加NSLAB菌株对干酪组成成分没有显著影响,NSLAB菌株没有影响乳球菌生长,在干酪成熟期间pH 4.6-SN和12% TCA-SN逐渐增加,且添加NSLAB的干酪在成熟30 d后显著增加了pH 4.6-SN和12% TCA-SN含量,5% PTASN/TN的增加主要是由于乳酸菌中肽酶作用的结果,SDS-PAGE电泳结果说明添加NSLAB菌株的干酪中小分子多肽含量明显比对照干酪多,RP-HPLC分析得出干酪水溶性中肽的数量随着成熟时间增加。添加NSLAB菌株A-3没有改变干酪的硬度,使干酪的弹性增加。**结论** 添加菌株A-3作为NSLAB的干酪样品中微生物自溶率高,蛋白水解程度强,质构性能良好,具有加速干酪成熟的潜力,是山羊奶干酪工业化生产的优良NSLAB。

**关键词:** 非发酵剂乳酸菌; 干酪促熟; 干酪微生物; 蛋白水解; 干酪质构

## Effects of non-starter lactic acid bacteria A-3 and D-3 on the ripening of semi-hard goat cheese

MENG Zhao-Xu<sup>1</sup>, XIN Liang<sup>1</sup>, YI Hua-Xi<sup>2</sup>, ZHANG Jian-Ming<sup>1</sup>, LIN Kai<sup>1</sup>, ZHANG Lan-Wei<sup>1,2\*</sup>

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150001, China; 2. College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

**ABSTRACT: Objective** To obtain a non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) that accelerates the ripening of semi-hard goat cheese. **Methods** Two excellent NSLAB strains from goat cheese in the Mediterranean region were isolated from the previous study, and their effects on the components, microbial flora, protein hydrolysis and texture of the cheese during ripening were determined. **Results** The addition of NSLAB strain had no significant effect on the cheese composition. The NSLAB strain did not affect the growth of *Lactococcus*, and the pH 4.6-SN and 12% TCA-SN gradually increased during cheese ripening. The addition of NSLAB cheese had significantly increased the pH 4.6-SN and 12% TCA-SN content after 30 days of ripening. The increase of 5% PTASN/TN was mainly due to the action of peptidase in lactic acid bacteria. The results of SDS-PAGE electrophoresis showed that the content of

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (31571850, 31771988)、哈尔滨杰出人才项目(2014RFXXJ026)、黑龙江飞鹤乳业干酪加工改良项目(FH-YF20170620)

**Fund:** Supported by the Natural Science Foundation of China (31571850, 31771988), Harbin Excellent Subject Leader Project, China (2014RFXXJ026), and Processed Cheese Development Program of Heilongjiang Feihe Dairy Co. Ltd. (FH-YF20170620)

\***通讯作者:** 张兰威, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为乳品生物技术。E-mail: zhanglw@hit.edu.cn

\***Corresponding author:** ZHANG Lan-Wei, Professor, Department of Food Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150000, China. E-mail: zhanglw@hit.edu.cn

small molecule polypeptide in cheese added with NSLAB strain was significantly higher than that of the control cheese. RP-HPLC analysis showed that the amount of peptide in the water soluble of the cheese increased with the ripening time. The addition of NSLAB strain A-3 did not change the hardness of the cheese and increased the elasticity of the cheese. **Conclusion** Adding strain A-3 as a cheese sample of NSLAB has high microbial autolysis rate, strong proteolysis degree, good texture performance and potential for accelerating cheese ripening. It is an excellent NSLAB for industrial production of goat cheese.

**KEY WORDS:** non-starter lactic acid bacteria; accelerate cheese ripening; cheese microorganisms; proteolysis; cheese texture

## 1 引言

干酪是一种发酵乳制品,具有很高的营养价值,半硬质山羊奶相当于将乳中的蛋白质和脂肪浓缩 10 倍左右<sup>[1,2]</sup>。干酪成熟是制备干酪的最后一个步骤,也是关键步骤。干酪的成熟指在一定的温度、湿度、pH 值、水分含量及盐分含量等条件下,干酪中所含的脂肪、蛋白质及碳水化合物,在微生物和酶的作用下分解并发生某些生化反应,形成干酪的特有色泽、风味、质地和组织状态的过程<sup>[3,4]</sup>。由于羊奶具有酪蛋白胶粒和脂肪球较小的特点,用其加工的干酪组织结构细腻,滋味浓郁<sup>[5]</sup>,并且经过发酵后羊奶膻味大大降低,在许多方面都优于牛奶干酪<sup>[6]</sup>。在欧美等发达国家约有 70% 的羊奶都被用于干酪的制作<sup>[7]</sup>,而且由于消费者对山羊奶干酪特殊风味和营养性、益生性的喜好,导致山羊奶干酪近年研究呈现逐渐增多的趋势<sup>[8-10]</sup>。羊奶干酪已经成为其饮食结构中不可缺少的一种食品<sup>[11,12]</sup>。但由于山羊奶受产量和奶源的限制、山羊奶干酪家庭化手工生产模式<sup>[13,14]</sup>和繁多的种类<sup>[8,14,15]</sup>、加工技术的差别等因素导致山羊奶干酪品质不均一<sup>[14,16]</sup>、易腐败变质<sup>[17,18]</sup>和致病微生物存在<sup>[19-21]</sup>等风险发生。

为了提供给消费者安全、品味一致并且成熟时间相对较短的高感官品质干酪,生产者和研究者开始探索 NSLAB 的使用。NSLAB 在成熟过程中对风味的形成有着很重要的作用,NSLAB 分泌的氨肽酶将干酪中的大分子蛋白质水解成小肽和游离氨基酸,这些氨基酸或是干酪特定风味物质的前体,或直接构成干酪的风味,从而促进干酪成熟<sup>[22,23]</sup>,通过添加 NSLAB 加速干酪成熟已成为当下研究热点<sup>[23-26]</sup>。

本研究 NSLAB 在山羊奶干酪生产中的应用效果,将前期分离筛选获得的优良 NSLAB 菌株 A-3 和 D-3 应用于干酪的加工,考察干酪在成熟过程中微生物、理化指标及质构的变化情况,进一步确定这 2 株菌应用于干酪生产中的潜力,以及 NSLAB 菌株对干酪成熟的影响,以期提高干酪的品质和加快干酪的成熟,为充分利用了我国的山羊奶资源,增加农民的收入,企业和社会带来直接的经济效益提供前期的实践基础。

## 2 材料与方法

### 2.1 实验材料

#### 2.1.1 菌株

本实验选取的 NSLAB 菌株参照前期筛选具有优良发酵性能的 NSLAB 菌株工作<sup>[1]</sup>。菌株 A-3(*Lactobacillus paracasei*)分离自西班牙 Iborens 干酪样品;菌株 D-3(*Lactobacillus paracasei*)分离自希腊 Batzos 干酪样品,丹尼斯克半硬质干酪发酵剂 TA50(乳酸乳球菌乳脂亚种, *Lactococcus lactis* subsp. 乳酸乳球菌乳脂亚种 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*)。

#### 2.1.2 试剂

十二烷基硫酸钠(分析纯,美国 Sigma-Aldrich 公司);三羟甲基氨基甲烷(分析纯,美国 Ameresco 公司);小牛皱胃酶(食品级,丹尼斯克(中国)有限公司);乙腈(HPLC 级,美国 TEMIA 公司);考马斯亮蓝 G250(分析纯,美国 Sigma-Aldrich 公司);荧光染料 SYTO9 和 PI(分析纯,美国 Sigma-Aldrich 公司);标准蛋白 3.3~20 kDa(分析纯,大连宝生物公司);氯化钙(食品级,浙江巨化新联化工有限公司);溴化乙淀(分析纯,美国 Sigma-Aldrich 公司);TEMED(分析纯,美国 Sigma-Aldrich 公司);鲜山羊奶购自双城真农牧业。

#### 2.1.3 菌株培养基

培养基配制主要参考《乳酸菌:生物学基础及应用》。M17 固体培养基:用于乳球酸菌的培养;MRS 液体培养基:用于乳杆菌的增殖培养;MRS 固体培养基:用于乳杆菌的培养及计数。

### 2.2 仪器设备

AG PB-10 pH 计(北京赛多利斯仪器系统有限公司);自制干酪槽;自制干酪压榨机;TA-XT2i 质构分析仪(英国 Stable Micro Systems 公司);LEZCA DMZ3000B 荧光显微镜(德国 LEICA 公司);DHP-9272 电热恒温培养箱(上海一恒科技有限公司);LDZX-40AI 高压灭菌锅(上海申安医疗器械厂);Universal Hood II 凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司);Anguil 1100 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);KDN-05A 凯氏定氮仪(上海贝特仪电设备厂)。

### 2.3 干酪加工流程

按照 Zeng<sup>[27]</sup>制作半硬质山羊奶干酪的方法,利用同一奶源不同组别发酵剂组合进行半硬质山羊奶干酪的制作,重复样品 2 个。干酪制作工艺流程:鲜羊奶→过滤→巴氏杀菌 63 °C, 30 min→冷却至 32~33 °C→添加发酵剂→保温→添加 CaCl<sub>2</sub>→添加凝乳酶→32~33 °C静置凝乳 60 min→切成 1 cm×1 cm×1 cm 凝块→升温 35 °C→搅拌 25 min→排除一般的乳清→加入等体积的食盐溶液(50 °C)→搅拌 5 min→排出乳清和食盐的混合液→装模压榨 2 h(1.5 kg/cm<sup>2</sup>)→真空包装,在 13 °C下成熟。其中,CK 组仅添加发酵剂 1.5%; A-3 组:添加发酵剂 1.3%+菌株 A-3, 0.2%; D-3 组:添加发酵剂 1.3%+菌株 D-3, 0.2%。

### 2.4 干酪组成成分分析

干酪样品中蛋白质含量参照 Simeonni 等<sup>[28]</sup>方法。干酪样品中脂肪含量的测定参照 Madejsk 等<sup>[29]</sup>方法。干酪样品中 NaCl 含量的测定参照 Okuno 等<sup>[30]</sup>方法。干酪样品中水分含量的测定参照 Alexandraki<sup>[31]</sup>方法。干酪 pH 的测定方法参照 Kenny 等<sup>[32]</sup>方法。

### 2.5 干酪中微生物分析

在干酪成熟 1、7、15、30、45 和 60 d 时,分别取样进行微生物分析。参照 Bunthof 等<sup>[33]</sup>研究中的平板计数法分析干酪中微生物菌数变化。采用 L13152 LIVE/DEAD Bac Light Bacterial Viability Kits 试剂盒分析干酪成熟过程中的微生物自溶。参照 Gomez 等<sup>[34]</sup>的方法,将配制好的荧光染液滴加干酪样品表面,31 °C培养后,放置于荧光显微镜下蓝光激发并观察,呈现亮绿色荧光则为活菌,呈现红色荧光则为死菌。

### 2.6 干酪中蛋白质水解

在干酪成熟 1、7、15、30、45 和 60 d 时,分别取样进行蛋白质降解程度分析。pH 4.6-SN 的测定参照 Lourdes 等<sup>[35]</sup>的方法,以占干酪总氮量百分数(%)表示。12%TCA-SN/ TN 测定参照 Lourdes 等<sup>[35]</sup>的方法,以占干酪总氮量的百分数(%)表示。5%PTA-SN/TN 测定参照 Barłowska 等<sup>[36]</sup>的方法,以占干酪总氮量的百分数(%)表示。干酪样品参照 Jin 等<sup>[37]</sup>的方法进行前处理,然后利用 Tricine-SDS- PAGE 电泳考察不同组别干酪样品成熟期间

降解形成的小肽。

将干酪与水以 1:4(w:w)比例混合,制备干酪水溶性提取液,研磨后于 4 °C条件下 12000 g 离心 20 min,获得悬浮液,除去脂肪层,用滤纸将水相过滤,再用 0.45 μm 滤膜过滤,处理后的样品参照 Delgado 等<sup>[38]</sup>的方法进行肽含量的测定。

### 2.7 干酪质构的测定

取成熟 1、15、30、45 和 60 d 的干酪样品于室温放置 30 min,然后参照 Campagnollo 等<sup>[39]</sup>方法进行质地剖面分析(texture profile analysis, TPA),测定干酪样品的硬度、弹性和凝聚性,分析干酪的质地特性。

### 2.8 数据处理与统计分析

采用 SPSS16.0 对实验数据进行处理,多重比较采用 Duncan 法,  $P < 0.05$  时,表示组间差异显著;  $P > 0.05$  时,表示组间差异不显著。数据采用 Origin 8.0 软件作图。

## 3 结果与分析

### 3.1 干酪组成成分分析

3组干酪样品的水分含量、蛋白质含量、脂肪含量、盐含量及 pH 值均在典型的半硬质干酪指标范围内<sup>[40-43]</sup>。干酪成熟 1 d 时检测其水分、蛋白质、脂肪、盐和 pH 值,与 CK 组相比,干酪组间的脂肪、蛋白质和水分无显著性差异 ( $P > 0.05$ ),实验组干酪的 pH 值低于 CK 组 ( $P < 0.05$ )。

### 3.2 干酪成熟期间微生物的变化

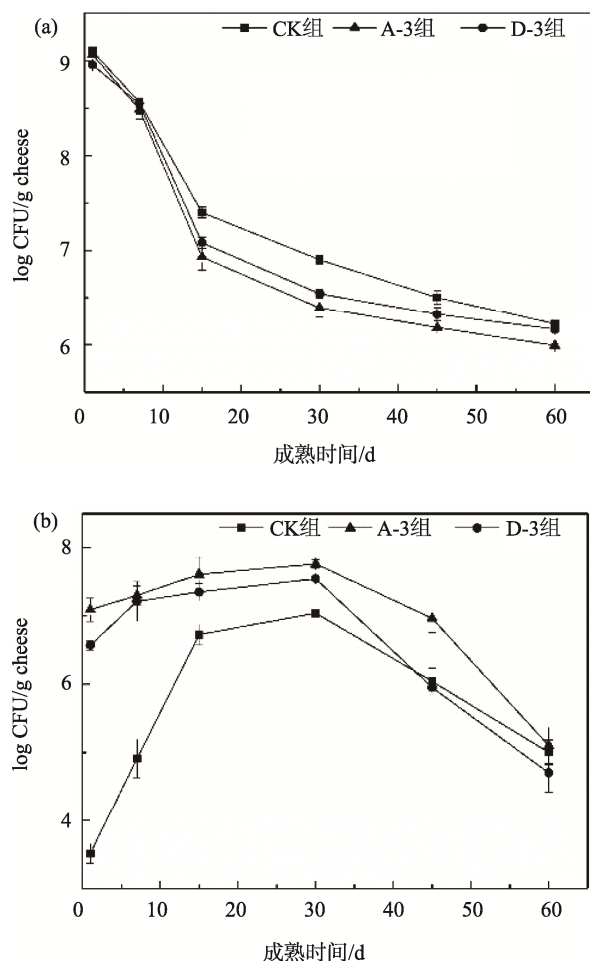
#### 3.2.1 干酪中微生物动态变化分析

根据干酪制作过程中是否产酸,将干酪微生物分为发酵剂和次级菌群。在干酪制作阶段,发酵剂菌株利用乳中的乳糖快速繁殖;但在成熟阶段,由于其不耐受高盐高酸的环境,数量大幅下降。而隶属于次生菌群的 NSLAB,可以很好地适应干酪成熟的环境,持续生长,加快生化反应进程,促进风味物质形成,从而加速干酪成熟。本实验中使用到的发酵剂为丹尼斯克半硬质干酪发酵剂 TA50,包含乳酸乳球菌乳脂亚种 *Lactococcus lactis* subsp. 和乳酸乳球菌乳酸亚种 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*。本实验添加的 NSLAB 菌株 A-3 和 D-3 为 *Lactobacillus paracasei*。

干酪成熟期间乳球菌和乳杆菌的数量变化如图 1 所示。

表 1 成熟 1 d 干酪的成分含量( $n=3$ )  
Table 1 Composition of 1 d old cheese manufactured ( $n=3$ )

组别	水分/%	蛋白质/(%TS)	NaCl/(%TS)	脂肪/(%TS)	pH
CK 组	48.86±0.17	45.67±0.59	2.90±0.11	39.61±0.41	5.23±0.04
A-3 组	48.61±0.50	45.49±0.49	2.92±0.17	39.51±0.81	5.14±0.04
D-3 组	48.60±0.28	45.90±0.45	2.92±0.11	39.72±0.66	5.16±0.04



注: a) 乳球菌; b) 乳杆菌。

图1 干酪成熟过程中微生物数量变化( $n=3$ )

Fig.1 Viable cell counts of bacteria during cheese ripening ( $n=3$ )

成熟 1 d 的 CK 组、D-3 组和 A-3 组干酪中的乳球菌数量分别为  $9.10 \pm 0.00$ 、 $8.96 \pm 0.06$  和  $9.07 \pm 0.05$  log CFU/g, CK 组和实验组乳球菌活菌数之间没有明显差异 ( $P > 0.05$ ); 在干酪成熟 7 d 时乳球菌数降低, CK 组、D-3 组和 A-3 组分别为  $8.56 \pm 0.11$ 、 $8.56 \pm 0.16$  和  $8.49 \pm 0.05$  log CFU/g, CK 组和实验组乳球菌活菌数之间没有明显差异 ( $P > 0.05$ ); 在成熟 15 d 时, 乳球菌数明显下降, CK 组、D-3 组和 A-3 组的数量分别为  $7.40 \pm 0.06$ 、 $7.08 \pm 0.06$  和  $6.93 \pm 0.14$  log CFU/g, CK 组显著高于实验组 ( $P < 0.05$ ), 实验组间没有差别 ( $P > 0.05$ ); 在干酪成熟 30 d 时, CK 组、D-3 组和 A-3 组乳球菌数分别为  $6.90 \pm 0.04$ 、 $6.54 \pm 0.04$  和  $6.39 \pm 0.10$  log CFU/g, CK 组显著高于实验组 ( $P < 0.05$ ), 实验组间没有差别 ( $P > 0.05$ ); 在干酪成熟 45 d 时, CK 组、D-3 组和 A-3 组乳球菌数分别为  $6.50 \pm 0.07$ 、 $6.32 \pm 0.07$  和  $6.18 \pm 0.03$  log CFU/g, A-3 组数量显著低于其他两组 ( $P < 0.05$ ), 实验组和 D-3 组之间没有差别 ( $P > 0.05$ ); 在干酪成熟 60 d 时, CK 组、D-3 组和 A-3 组乳球菌数量分别为  $6.22 \pm 0.03$ 、 $6.16 \pm 0.06$  和

$5.99 \pm 0.01$  log CFU/g, A-3 组数量显著低于其他两组 ( $P < 0.05$ ), 实验组和 D-3 组之间没有差别 ( $P > 0.05$ )。

干酪成熟过程中乳杆菌数量的变化如图 1-b 所示。成熟 1 d 的 CK 组、D-3 组和 A-3 组中乳杆菌数量分别为  $3.51 \pm 0.14$ 、 $6.57 \pm 0.07$  和  $7.09 \pm 0.17$  log CFU/g, 3 组间彼此存在显著差异 ( $P < 0.05$ ), A-3 组数量最高, CK 组最低。CK 组中虽未添加乳杆菌, 但检测出乳杆菌, 其菌体可能是乳自身和加工设备及开放式的生产环境引入<sup>[44]</sup>。在干酪成熟 0~30 d 的过程中, 乳杆菌活菌数呈增加趋势。成熟 30 d 时, 各组干酪样品中乳杆菌数量均达到最高, CK 组、D-3 组和 A-3 组分别为  $7.04 \pm 0.06$ 、 $7.55 \pm 0.07$  和  $7.77 \pm 0.06$  log CFU/g。在干酪成熟 30 d 后, CK 组和实验组乳杆菌数量均呈现下降趋势, 其中 D-3 组干酪中乳杆菌数量下降最为显著 ( $P < 0.05$ )。成熟 60 d 的干酪样品中, CK 组、D-3 组和 A-3 组的乳杆菌数分别为  $5.00 \pm 0.18$ 、 $4.70 \pm 0.28$  和  $5.1 \pm 0.26$  log CFU/g。此时, 3 组之间没有显著性差异 ( $P > 0.05$ )。

结合乳球菌和乳杆菌的数量变化可知, 干酪在成熟 1 d 时, CK 组和实验组中乳球菌活菌数均显著高于乳杆菌活菌数 ( $P < 0.05$ ), 因此优势菌株为乳球菌。在干酪在成熟 60 d 时, CK 组和实验组中乳球菌和乳杆菌活菌数量已无显著差异 ( $P > 0.05$ )。

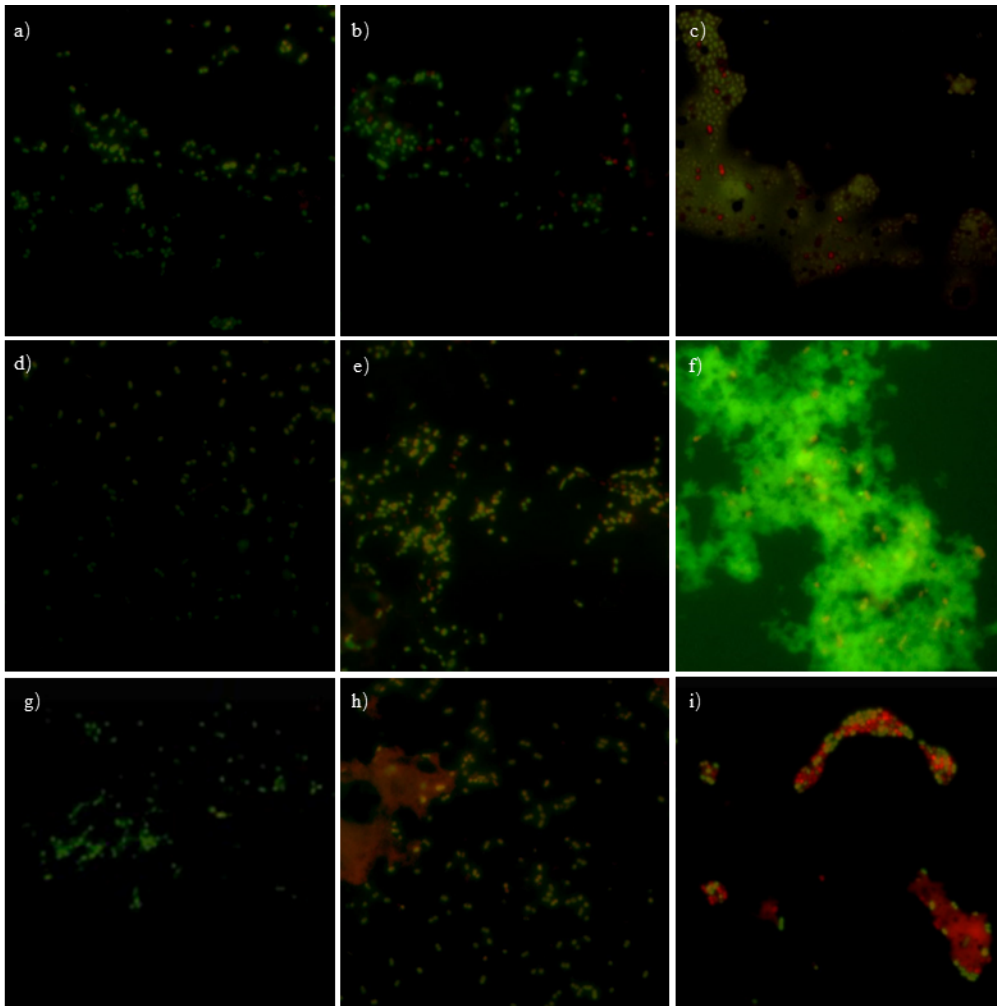
### 3.2.2 干酪中微生物荧光染色分析

为直观观察干酪中微生物的裂解情况, 采用 SYTO9 和 PI 染料结合的荧光染色法对干酪样品进行分析。实验收集成熟 1 d、30 d 和 60 d 的干酪样品, 与 SYTO9 和 PI 混合后培养, 利用荧光显微镜观察分析干酪基质内的微生物, 结果如图 2 所示。

SYTO 9 可以快速穿透细胞壁与 DNA 结合, PI 则对完整细胞壁不能穿透, 可以透过不完整细胞壁与 DNA 有更大亲和力, 在细胞壁不完整细胞中 PI 可以取代 SYTO 9 与 DNA 结合。在 488 nm 激发下, SYTO9 呈绿色荧光, PI 呈红色荧光。由图 2 可知, 成熟 1 d 的各组干酪荧光图像中呈现绿色荧光, 表示活菌构成微生物的主要部分。与一些学者中发现的成熟初期干酪内乳酸菌数量迅速增加的结论一致<sup>[45]</sup>。成熟 30 d 的干酪样品中有少数菌体被 PI 染为红色, 说明菌体开始出现裂解。干酪成熟 60 d 时, 已有大量细胞呈现红色, 说明这部分菌体细胞的细胞壁已不完整成为渗透性细胞, 或菌体细胞已经发生裂解。本实验所采取荧光染色法虽不能对菌体进行精确计数, 但可以直观观察到干酪成熟过程中基质中乳酸菌的菌群变化, 同时结合干酪中微生物的变化, 可以更加清晰直接了解干酪中乳酸菌变化趋势。

### 3.3 NSLAB 对成熟期间蛋白质水解的影响

蛋白质水解的广度和深度以及水解产物是干酪成熟的重要标志。干酪成熟度可用可溶性氮的质量与总氮质量的比值表示。pH 4.6-SN/TN 和 12% TCA SN/TN 是常用的 2 个标准, 前者指小分子量肽类, 后者包括中等分子量和



注: a~c: CK组干酪成熟1、30和60 d; d~f: A-3组干酪成熟1、30和60 d; g~i: D-3组干酪成熟1、30和60 d。

图 2 干酪成熟过程中菌体的自溶(40×)

Fig.2 Lysis of strains during cheese ripening (40×)

大分子量的肽类。5% PTA-SN/TN 用以指示干酪成熟期间游离氨基酸含量。此外, SDS-PAGE 也可以从整体分析蛋白质水解情况。

### 3.3.1 pH 4.6-SN/TN、12% TCA-SN/TN 和 5% PTA-SN/TN 含量变化

在干酪成熟 1、7、15、30、45 和 60 d, 分别采集 CK 组和实验组的样品, 测定其 pH 4.6-SN/TN 和 12% TCA-SN/TN, 结果如图 3 所示。

在干酪成熟初期, pH 4.6 SN/TN 主要由干酪中残留的少量凝乳酶的活力决定, 在干酪成熟后期, 羊奶干酪中残留的少量凝乳酶活性降低直至失活, pH 4.6 SN/TN 主要是由乳酸菌蛋白酶降解产生的。12% TCA SN/TN 主要由加入的凝乳酶和菌内微生物释放的胞内酶共同决定<sup>[2,3]</sup>。由图 3 可知, 成熟 0~30 d 的 CK 组和实验组干酪的 pH 4.6-SN/TN 和 12% TCA-SN/TN 不断升高, 表明干酪成熟初期蛋白质不断被降解。在成熟 30 d 之后, pH 4.6-SN/TN 和 12%

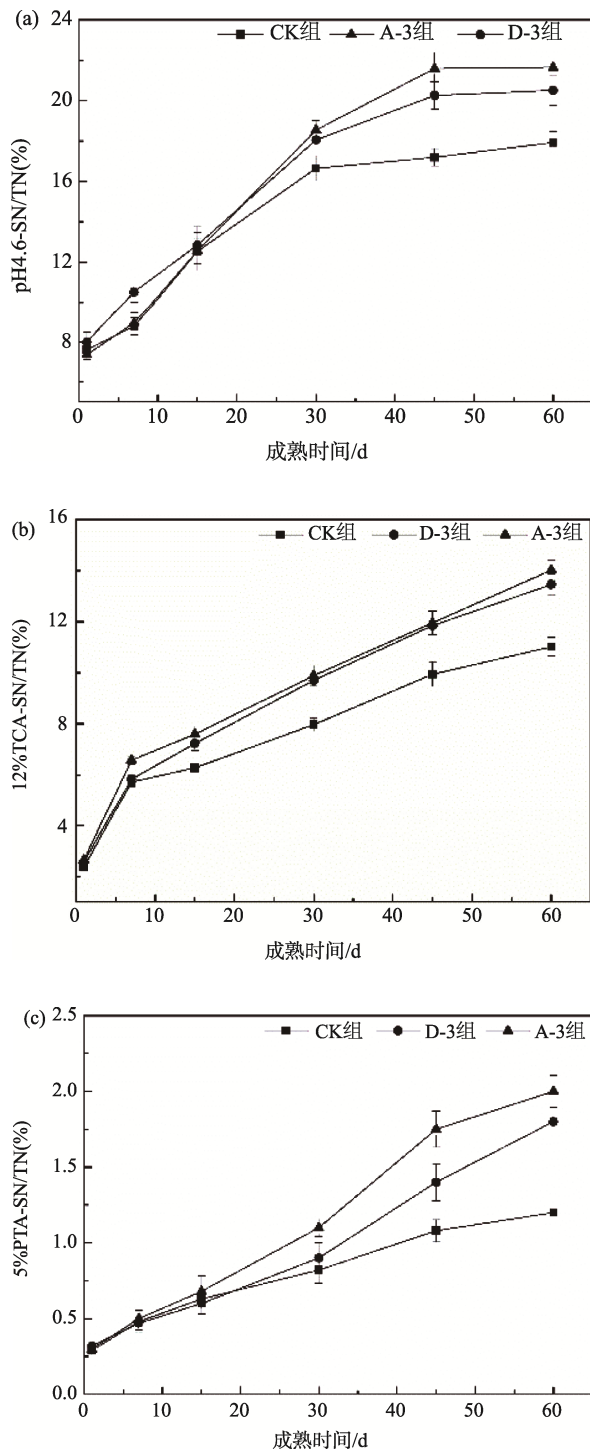
TCA-SN/TN 仍然不断升高, 说明该阶段菌体裂解释放的胞内酶发挥主要作用。其中, 实验组 A-3 和 D-3 的 pH 4.6-SN/TN 和 12% TCA-SN/TN 显著高于 CK 组, 说明非发酵剂菌株的添加促进了干酪成熟期间可溶性氮含量的增加。在干酪成熟前 15 d 时, 蛋白质降解生成的 5% PTA-SN/TN 均呈增加的趋势, 且差异不显著( $P>0.05$ ), 在干酪成熟 30 d 时, 实验组 A-3 5% PTASN/TN 明显高于其他 2 组, 差异显( $P<0.05$ )。在成熟 30 d 以后, 实验组 5% PTA-SN/TN 均高于 CK 组。干酪中小肽和氨基酸的含量与乳酸菌菌种所含肽酶活性有关, 由于乳酸菌失活破裂, 使菌体内大量的肽酶得以释放, 作用于肽类物质生成游离氨基酸<sup>[46]</sup>。

### 3.3.2 成熟期间小分子量多肽含量凝胶分析

在凝乳酶和乳酸菌共同作用下, 干酪的蛋白质被水解为小分子肽和游离氨基酸等物质, 这是干酪成熟中重要的生化反应。凝乳酶不断将蛋白质降解为大分子量多肽。

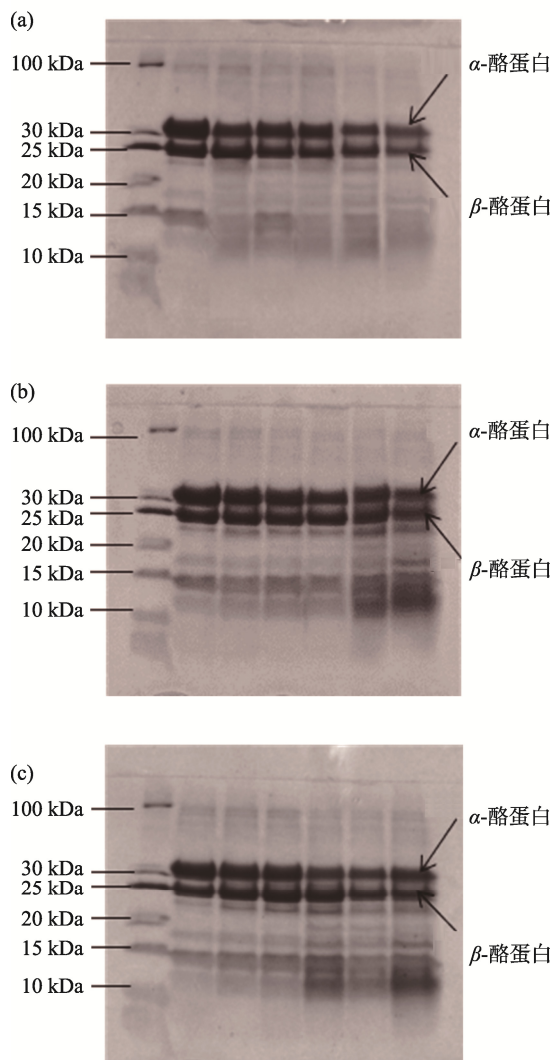


然后, 非发酵剂乳酸菌进一步将大分子多肽降解为小分子多肽, 促进干酪风味和质地的形成。



注: a) pH 4.6-SN/TN; b) 12% TCA-SN/TN; c) 5% PTA-SN/TN。

图3 干酪成熟期间pH 4.6-SN/TN、12% TCA-SN/TN和5%PTA-SN/TN的变化(n=3)  
Fig.3 Changes of pH 4.6-SN/TN, 12% TCA-SN/TN and 5% PTA-SN/TN during cheese ripening (n=3)



注: a) CK组; b) A-3组; c) D-3组。

图4 干酪成熟期间SDS-PAGE凝胶电泳图  
Fig.4 SDS-PAGE gel electrophoresis of cheese during ripening

SDS-PAGE电泳能够显示酪蛋白水解的程度。它可以根据蛋白片段和肽段的分子量大小将其分成不同的条带, 条带颜色的深浅反应出其含量的多少。由图4分析得出, 所有组别随着干酪成熟时间的增加,  $\alpha$ -酪蛋白,  $\beta$ -酪蛋白含量逐渐降解为大分子量和小分子量肽段。在干酪成熟前15 d, 酪蛋白降解程度差别不大。在干酪成熟30 d以后, 与CK组相比, 实验组A-3、D-3干酪中蛋白质基本上得到了较充分的降解, 尤其在成熟45、60 d时, 实验组A-3、D-3条带数要明显多于CK组, 颜色也要比CK组深, 说明含量也高于CK组。综合分析图3和图4可以得出, NSLAB菌株促进蛋白质水解以及肽段的产生, 加快干酪成熟。

### 3.3.3 成熟期间干酪水溶性提取液(WSE)中小分子多肽的RP-HPLC分析

由图 5 可知, CK 组和实验组干酪样品的色谱图中有

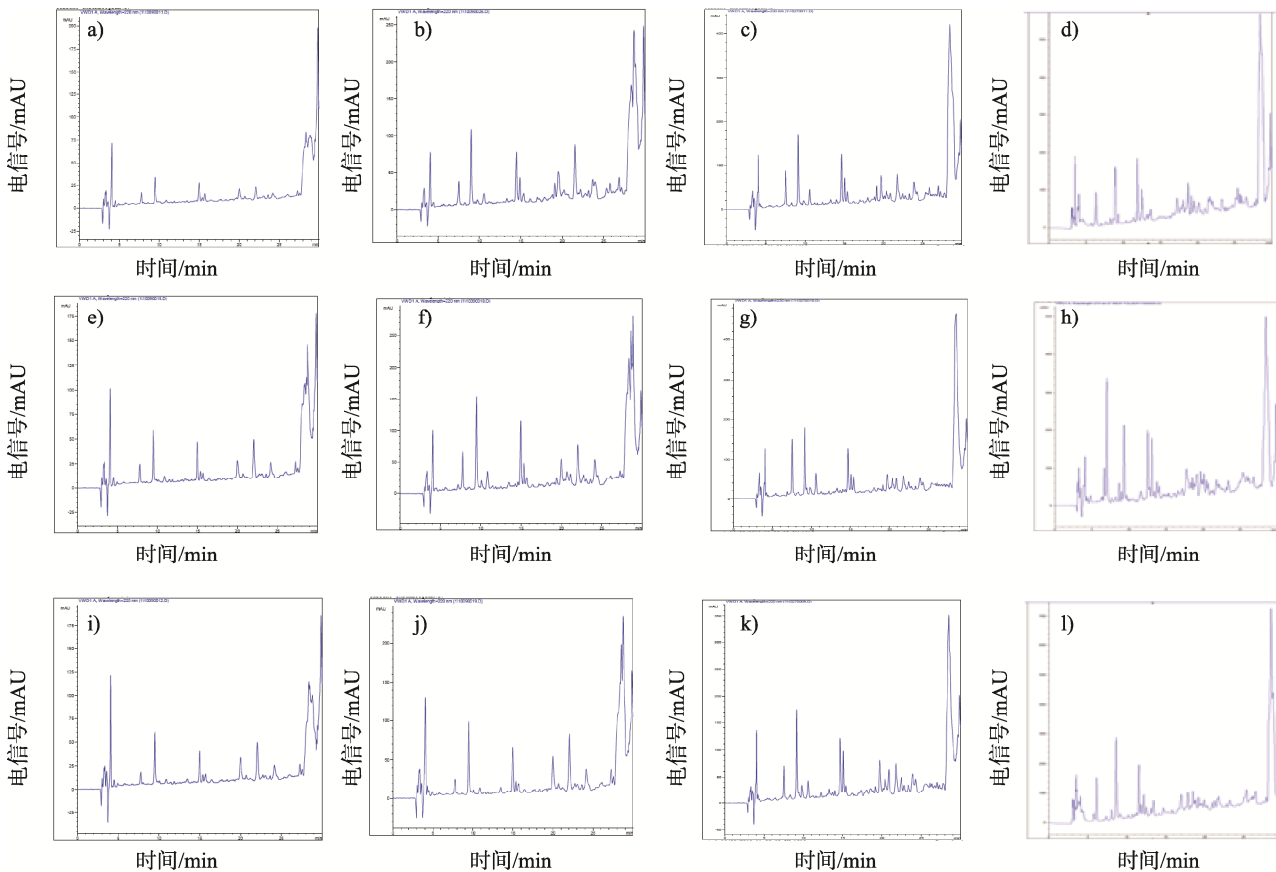
大量峰出现,说明干酪中水溶性提取液中含有多种蛋白质水解产物。图谱中峰的数量及面积见表 2。

由表 2 可知,随着干酪成熟时间的延长,峰数量逐渐增多,且峰面积逐渐增加,说明蛋白质降解生成的肽的种类和数量逐渐增加。CK、A-3 和 D-3 组成熟 45 d 的干酪样品峰面积分别是成熟 1 d 样品的 7.13、6.08 和 5.21 倍。将相同成熟期的干酪图谱进行比对发现,实验组的色谱峰数量和峰面积显著高于 CK 组,其中,添加菌株 A-3 的干酪成熟 45 d 肽含量最高,其次是添加菌株 D-3 的干酪,此阶段实验组蛋白质水解生成的肽的种类和数量均比 CK 组多,

说明非发酵剂乳酸菌的添加改变了干酪中肽酶的水平,增加了总肽酶的活性,促进了蛋白的水解。

### 3.4 NSLAB 对干酪成熟期间质构的影响

在干酪成熟过程中发酵剂、非发酵剂和微生物来源的蛋白酶不断降解酪蛋白,导致酪蛋白骨架的变化,进而发生硬度、弹性和凝聚性等质构特性的变化,这些性质与干酪成熟程度密切相关。为检测不同 NSLAB 菌株对干酪质构产生的影响,采用 TPA 方法对干酪进行分析,结果如表 3 所示。



注: a~d: CK组干酪成熟1、15、30和45 d; e~h: A-3组干酪成熟1、15、30和45 d; i~l: D-3组干酪成熟1、15、30和45 d。

图5 干酪的水溶性提取液中肽的RP-HPLC在214 nm检测谱图

Fig.5 The RP-HPLC chromatograms of the water-soluble N fraction during ripening at 214 nm

表 2 干酪水溶性提取液的 RP-HPLC 谱图中峰的数量和面积

Table 2 The number and area of peaks in the RP-HPLC spectrum of the water-soluble extract of cheese

成熟时间/d	CK 组		A-3 组		D-3 组	
	峰数量	峰面积	峰数量	峰面积	峰数量	峰面积
1	27	1632.78±150.21 <sup>aA</sup>	33	3204.35±57.87 <sup>bA</sup>	32	3223.69±74.37 <sup>bA</sup>
15	39	5529.40±179.11 <sup>aB</sup>	43	6632.70±49.83 <sup>bB</sup>	44	9065.86±107.47 <sup>bB</sup>
30	45	9853.52±165.28 <sup>aC</sup>	56	11302.17±108.49 <sup>bC</sup>	55	10954.90±212.30 <sup>bC</sup>
45	58	11650.00±82.46 <sup>aD</sup>	79	19500.13±53.31 <sup>cD</sup>	69	16801.09±100.04 <sup>bD</sup>

注: 大写字母表示列间差异显著( $P < 0.05$ ), 小写字母表示行间差异显著( $P < 0.05$ )。

由表 3 可知, 干酪成熟期间对照、A-3 和 D-3 组干酪硬度呈现先升高后下的趋势, CK 组干酪在 30 d 时硬度开始下降, 样品组 45 d 时硬度开始下降, 3 组样品的 45 和 60 d 时干酪的硬度均较 30 d 显著下降, 且 CK 组和 2 个样品组之间硬度差异显著( $P<0.05$ )。这可能是由于 NSLAB 的添加导致蛋白质水解程度增加, 产生大量水溶性物质, 酪蛋白原来的网状结构被破坏, 干酪体系变得松散, 导致硬度随之下降<sup>[47]</sup>。弹性的变化为先升高后下降, 所有组别在 15 d 时弹性达到最高, 之后出现下降趋势, 其中 A-3 组弹性下降不显著。A-3 组在所有检测时间点均表现出最高弹

性, 其次为 D-3 组, CK 组弹性最低。这可能是由于添加的 NSLAB 的胞内酶使干酪原有的大的网络结构被破坏, 分解产生更小的物质, 这些物质间形成更多的连接键, 搭建更多小的网络结构, 有利于干酪保持一定的弹性。对照、A-3 和 D-3 组干酪凝聚性在成熟过程中呈下降趋势, 在干酪成熟 15 d 时凝聚性下降显著, 之后下降不显著。D-3 组在成熟 30、45 和 60 d 时均表现出低于其他两组低的凝聚性, 但不显著。这说明 NSLAB 的添加虽然对干酪的结构有一定改变, 但是干酪内部分子间的作用力并受到显著影响, 干酪仍能够保持较好的完整性。

表 3 干酪在成熟期间硬度、弹性和凝聚性的变化( $n=3$ )  
Table 3 Change of hardness, springiness and cohesiveness during ripening of cheese ( $n=3$ )

质地参数	样品	成熟时间/d				
		1	15	30	45	60
硬度/g	CK 组	2865.41±286.41 <sup>cA</sup>	2956.98±220.70 <sup>cA</sup>	2826.45±21.82 <sup>cA</sup>	2165.81±60.91 <sup>bB</sup>	1665.81±68.01 <sup>aB</sup>
	A-3 组	2479.02±393.50 <sup>cA</sup>	2565.40±214.58 <sup>cA</sup>	3033.62±302.77 <sup>cA</sup>	1741.21±65.39 <sup>bA</sup>	133.74±53.41 <sup>aA</sup>
	D-3 组	2310.34±154.02 <sup>bA</sup>	2632.94±186.70 <sup>bA</sup>	2922.11±69.95 <sup>bA</sup>	1929.65±72.95 <sup>aA</sup>	1329.66±59.52 <sup>aA</sup>
弹性/mm	CK 组	1.58±0.035 <sup>bA</sup>	2.76±0.016 <sup>dB</sup>	2.00±0.141 <sup>cA</sup>	1.48±0.014 <sup>bA</sup>	1.01±0.014 <sup>aA</sup>
	A-3 组	1.65±0.099 <sup>abA</sup>	2.58±0.136 <sup>dAB</sup>	2.27±0.163 <sup>cA</sup>	1.90±0.001 <sup>bC</sup>	1.52±0.013 <sup>aA</sup>
	D-3 组	1.43±0.058 <sup>bA</sup>	2.43±0.021 <sup>dA</sup>	1.98±0.068 <sup>cA</sup>	1.52±0.010 <sup>bB</sup>	1.00±0.011 <sup>aB</sup>
凝聚性	CK 组	0.28±0.033 <sup>bA</sup>	0.15±0.021 <sup>aA</sup>	0.14±0.006 <sup>aA</sup>	0.14±0.025 <sup>aA</sup>	0.14±0.025 <sup>aA</sup>
	A-3 组	0.26±0.044 <sup>bA</sup>	0.13±0.010 <sup>abA</sup>	0.14±0.088 <sup>abA</sup>	0.11±0.035 <sup>aA</sup>	0.11±0.035 <sup>aA</sup>
	D-3 组	0.27±0.031 <sup>cA</sup>	0.16±0.035 <sup>bA</sup>	0.09±0.011 <sup>aA</sup>	0.078±0.004 <sup>aA</sup>	0.078±0.004 <sup>aA</sup>

注: 小写字母表示列间差异显著( $P<0.05$ ), 大写字母表示行间差异显著( $P<0.05$ )。

## 4 结论

研究了不同 NSLAB 菌株对干酪成熟过程中组分、微生物菌群、蛋白质水解和质构的影响。结果表明, 添加 NSLAB 菌株对干酪微生物自溶率, 蛋白水解, 质构性能均具有重要影响, 可促进干酪成熟和改善干酪质地, 具有应用的潜力。

## 参考文献

- [1] Meng ZX, Zhang LW, Xin L, *et al.* Technological characterization of *Lactobacillus* in semi-hard artisanal goat cheeses from different Mediterranean areas for potential use as nonstarter lactic acid bacteria [J]. *J Dairy Sci*, 2018, 101(4): 2887.
- [2] Soda ME, Awad S. Cheese accelerated cheese ripening [J]. *Encyclop Dairy Sci*, 2011, 795–798.
- [3] Liang R. Recent developments in accelerated cheese ripening [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2007.
- [4] Ribeiro AC, Ribeiro SDA, Kawas JR. Specialty products made from goat milk [J]. *Small Ruminant Res*, 2010, 89(2): 225–33.
- [5] Serhan M, Linder M, Hosri C, *et al.* Changes in proteolysis and volatile

fraction during ripening of Darfiyeh, a Lebanese artisanal raw goat's milk cheese [J]. *Small Ruminant Res*, 2010, 90(1): 75–82.

- [6] Haenlein GFW. Goat milk in human nutrition [J]. *Small Ruminant Res*, 2004, 51(2): 155–63.
- [7] Biss K. Sheep and goat cheese [J]. *Int J Dairy Technol*, 2010, 44(4): 104–106.
- [8] Chen SX, Zhao SJ, Shi BX, *et al.* Study on effects of somatic cell count on properties of semi-hard goat cheese [J]. *Food Sci*, 2008. [http://en.cnki.com.cn/Article\\_en/CJFDTotal-SPKX200802006.htm](http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTotal-SPKX200802006.htm)
- [9] Fernandes, Barreira JCM, Barros L, *et al.* Chemical and physicochemical changes in Serrana goat cheese submitted to extra-long ripening periods [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2017, 87. DOI: 10.1016/j.lwt.2017.08.071
- [10] Queiroga, Santos BM, Gomes AMP, *et al.* Nutritional, textural and sensory properties of Coalho cheese made of goats', cows' milk and their mixture [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2013, 50(2): 538–44.
- [11] Mart NS, Franco I, Carballo J. Spanish goat and sheep milk cheeses [J]. *Small Ruminant Res*, 2011, 101(1–3): 41–54.
- [12] Calatrava J, Sayadi S. Quality strategies and local farm produce in Mediterranean mountainous areas: the case of handmade goat's cheese in the southeastern Spanish Betic Massif [C]. *Mediterranean Livestock Production: Uncertainties & Opportunities Seminar of the Scientific*



- professional Network on Mediterranean Livestock Farming, 2008.
- [13] Moraes GM, Santos KM, Barcelos CD, *et al.* Potentially probiotic goat cheese produced with autochthonous adjunct culture of *Lactobacillus mucosae*: Microbiological, physicochemical and sensory attributes [J]. LWT, 2018, 94. DOI: 10.1016/j.lwt.2018.04.028
- [14] Colombo E, Franzetti L, Frusca M, *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Italian goat cheese [J]. J Food Prot, 2010, 73(4): 657–62.
- [15] Martins IBA, Deliza R, Santos KM, *et al.* Viability of probiotics in goat cheese during storage and under simulated gastrointestinal conditions [J]. Food Bioprocess Technol, 2018, 11(4): 853–63.
- [16] Garcia EF, DeE OME, Queiroga RC, *et al.* Development and quality of a Brazilian semi-hard goat cheese (coalho) with added probiotic lactic acid bacteria [J]. Int J Food Sci Nutr, 2012, 63(8): 947–956.
- [17] Ram EDJ, Daz P, Herman E, *et al.* Sensory profiles of artisan goat cheeses as influenced by the cultural context and the type of panel [J]. Int J Food Sci Technology, 2017. DOI: 10.1111/ijfs.13452
- [18] Jamali H, Radmehr B, Thong KL. Prevalence, characterisation, and antimicrobial resistance of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* isolates from raw milk in farm bulk tanks [J]. Food Control, 2013, 34(1): 121–5.
- [19] Oliveira ME, Garcia EF, Gomes AMP, *et al.* Addition of probiotic bacteria in a semi-hard goat cheese (coalho): Survival to simulated gastrointestinal conditions and inhibitory effect against pathogenic bacteria [J]. Food Res Int, 2014, 64: 241–247.
- [20] Dearajo VG, Arruda DO, Dantas FN, *et al.* Predicting and modelling the growth of potentially pathogenic bacteria in Coalho cheese [J]. J Food Prot, 2017, 80(7): 1172–1181.
- [21] Bezerra TKA, Arcanjo NM, Arajo AR, *et al.* Volatile profile in goat coalho cheese supplemented with probiotic lactic acid bacteria [J]. LWT-Food Sci Technol, 2016, 80(7): 1172–1181.
- [22] Gobetti M, Angelis MD, Cagno RD, *et al.* Pros and cons for using non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) as secondary/adjunct starters for cheese ripening [J]. Trends Food Sci Technol, 2015, 45(2): 167–78.
- [23] Yuvasen A, Macit E, Dertli E. Microbial species playing roles for the production of traditional Kasar cheese during pre-maturation period [J]. LWT, 2018, 91: 241–247.
- [24] Blaya J, Barzideh Z, Lapointe G. Interaction of starter cultures and nonstarter lactic acid bacteria in the cheese environment [J]. J Dairy Sci, 2017, 101(4): DOI: 10.3168/jds.2017-13345
- [25] Oh NS, Joung JY, LEE JY, *et al.* Characterization of the microbial diversity and chemical composition of gouda cheese made by potential probiotic strains as an adjunct starter culture [J]. J Agric Food Chem, 2016, 64(39): DOI: 10.1021/acs.jafc.6b02689
- [26] Ščavničar A, Rogelj I, Kočar D, *et al.* Determination of biogenic amines in cheese by ion chromatography with tandem mass spectrometry detection [J]. JAOAC Int, 2018, 101(5): 1542–1547.
- [27] Zeng SS, Soryal K, Fekadu B, *et al.* Predictive formulae for goat cheese yield based on milk composition [J]. Small Ruminant Res, 2007, 69(1–3): 180–6.
- [28] Simeonni MC, Sergi M, Pepe A, *et al.* Determination of free fatty acids in cheese by means of matrix solid-phase dispersion followed by ultra-high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry analysis [J]. Food Anal Methods, 2018, 11(10): 2961–2968.
- [29] Madejska A, Michalski M, Pawulgruba M, *et al.* Histamine content in rennet ripening cheeses during storage at different temperatures and times [J]. J Vet Res, 2018, 62(1): 65–69.
- [30] Okuno NT, Freire IR, Segundo RT, *et al.* Polymerase chain reaction assay for detection of *Stenotrophomonas maltophilia* in cheese samples based on the *smcT* gene [J]. Curr Microbiol, 2018, 75(12): DOI: 10.1007/s00284-018-1559-0
- [31] Alexandraki V, Moatsou G. Para- $\kappa$ -casein during the ripening and storage of low-pH, high-moisture Feta cheese [J]. J Dairy Res, 2018, 85(2): 226–231.
- [32] Kenny O, Fitzgerald RJ, O’ Cuinn G, *et al.* Autolysis of selected *Lactobacillus helveticus* adjunct strains during Cheddar cheese ripening [J]. Int Dairy J, 2006, 16(7): 797–804.
- [33] Bunthof CJ, Schalkwijk SV, Meijer W, *et al.* Fluorescent method for monitoring cheese starter permeabilization and lysis [J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(9): 4264.
- [34] Gomez MJ, Garde S, Gaya P, *et al.* Relationship between level of hydrophobic peptides and bitterness in cheese made from pasteurized and raw milk [J]. J Dairy Res, 1997, 64(2): 289–297.
- [35] Lourdes ED, Lima CD, Fernandes DM, *et al.* Optimized fermentation of goat cheese whey with *Lactococcus lactis* for production of anti-listerial bacteriocin-like substances [J]. LWT-Food Sci Technol, 2017, 84: 710–716.
- [36] Barłowska J, Pastuszka R, Rysiak A, *et al.* Physicochemical and sensory properties of goat cheeses and their fatty acid profile in relation to the geographic region of production [J]. Int J Dairy Technol, 2018, 71(3): DOI: 10.1111/1471-0307.12506
- [37] Jin YK, Park YW. SDS-PAGE of proteins in goat milk cheeses ripened under different conditions [J]. J Food Sci, 2010, 61(3): 490–495.
- [38] Delgado FJ, Gonz J, Cava R, *et al.* Changes in microbiology, proteolysis, texture and sensory characteristics of raw goat milk cheeses treated by high-pressure at different stages of maturation [J]. LWT-Food Sci Technol, 2012, 48(2): 268–275.
- [39] Campagnollo FB, Gonzales U, Cadavez VAP, *et al.* Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in traditional Minas cheeses: the cases of artisanal semi-hard and fresh soft cheeses [J]. Food Control, 2018, 92. DOI: 10.1016/j.foodcont.2018.05.019
- [40] Darnay L, Krlik F, Oros G, *et al.* Monitoring the effect of transglutaminase in semi-hard cheese during ripening by hyperspectral imaging [J]. J Food Eng, 2017, 196(Complete): 123–129.
- [41] Campagnollo FB, Margalho LP, Kamimura BA, *et al.* Selection of indigenous lactic acid bacteria presenting anti-listerial activity, and their role in reducing the maturation period and assuring the safety of traditional Brazilian cheeses [J]. Food Microbiol, 2018, 73: 288–297.
- [42] Fuka MM, Wallisch S, Engel M, *et al.* Dynamics of bacterial communities during the ripening process of different Croatian cheese types derived from raw ewe's milk cheeses [J]. PLoS One, 2013, 8(11): e80734.
- [43] Piconi A, Garde S, Ávila M, *et al.* Microbiota dynamics and lactic acid bacteria biodiversity in raw goat milk cheeses [J]. Int Dairy J, 2016, 58: 14–22.

[44] Pangallo D, Sakova N, Korenova J, *et al.* Microbial diversity and dynamics during the production of May bryndza cheese [J]. *Int J Food Microbiol*, 2014, 170: 38–43.

[45] Callon C, Retureau E, Didiene R, *et al.* Microbial biodiversity in cheese consortia and comparative *Listeria* growth on surfaces of uncooked pressed cheeses [J]. *Int J Food Microbiol*, 2014, 174: 98–109.

[46] Fox PF. Proteolysis during cheese manufacture and ripening 1 [J]. *J Dairy Sci*, 1989, 72(6): 1379–400.

[47] Fox PF, Mcsweeney PLH. Rennets: their role in milk coagulation and cheese ripening [M]. US: Springer, 1997.

(责任编辑: 武英华)

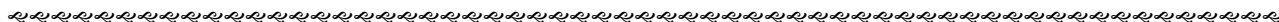
### 作者简介



孟昭旭, 博士研究生, 主要研究方向为乳品生物技术。  
E-mail: 623840756@qq.com



张兰威, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为乳品生物技术。  
E-mail: zhanglw@hit.edu.cn



## “农副产品综合利用”专题征稿函

在农业生产过程中,除了可被食用的部分,还产生了大量的不可食用的产物,这些产物如果不能被合理利用,将会产生大量的废弃物,造成资源的浪费,同时增加垃圾处理的负担。如果能够将农副产品进行有效利用,将会带来巨大的经济效益和环境效益。

鉴于此,本刊特别策划了“农副产品综合利用”专题。专题将围绕**果蔬副产物(皮、渣、籽、壳、叶、茎、根、花等)、粮油副产物(麸皮、胚芽、米糠、饼粕、玉米芯、皮壳、皂脚等)、畜、禽、水产副产物(毛、皮、骨、内脏、腺体、血液等)以及有一定商业价值的小宗农产品(芳香植物、南瓜等)**等各类农副产物资源的综合利用技术展开。或您认为本领域有意义的问题综述及研究论文均可,专题计划在 2019 年 7 月出版。

本刊主编国家风险评估中心**吴永宁**研究员和本专题主编四川大学**何强**教授特邀请有关食品领域研究人员为本专题撰写稿件,综述、研究论文和研究简报均可。请在 2019 年 6 月 01 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。

投稿方式(注明专题): **农副产品综合利用**

网站: [www.chinafoodj.com](http://www.chinafoodj.com)

E-mail: [jfoodsq@126.com](mailto:jfoodsq@126.com)

《食品安全质量检测学报》编辑部