

# 植物乳杆菌对干酪促熟的研究

苗君莅 莫蓓红 赵建 刘振民 肖杨 高红艳 张锋华

(光明乳业技术中心,国家乳业科学与技术国家重点实验室,上海 200436)

**摘要:** 将一株筛选到的高产肽酶的植物乳杆菌 SP-3 运用于能够快速成熟的干酪模型中,通过研究蛋白质水解特性,进一步衡量 SP-3 在干酪促熟、改善品质等方面的能力。通过水溶性氮浓度测定及干酪电泳分析,植物乳杆菌 SP-3 对干酪中蛋白质的初级水解无显著影响;12% TCASN 测定及 RP-HPLC 对干酪水溶性提取物的分析表明,SP-3 影响了干酪中小肽的形成;总游离氨基酸浓度测定表明 SP-3 促进了体系中游离氨基酸的产生。

**关键词:** 乳杆菌;干酪;促熟

中图分类号: S432 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2011)增刊-0176-05

## Study on Accelerating Ripening of Cheese Containing *Lactobacillus plantarum*

MIAO Jun-li MO Bei-hong ZHAO Jian LIU Zhen-min XIAO Yang GAO Hong-yan ZHANG Feng-hua  
(State Key Laboratory of Dairy Biotechnology, Technology Center Bright Dairy & Food Co., Ltd, Shanghai 200436, China)

**Abstract:** Proteolysis of cheese model containing *Lactobacillus plantarum* SP-3 was study accordingly strain SP-3 was determined for further study for its better contribution to improve development of cheese sensory quality and accelerate cheese ripening. The value of WSN and the electrophoretic profile for casein degradation in cheese model indicated SP-3 had no influence on casein primary proteolysis. Reverse phase HPLC of water-soluble extracts of the slurries indicated differences in peptide profiles between slurries with nonstarter compared with the control. And the significant difference of 12% TCASN also approve this result. Total free amino acids and individual amino acids concentrations also suggest varied proteolytic capabilities between nonstarter strains in control and other cheeses.

**Key words:** *Lactobacillus plantarum*; Cheese; Accelerate ripening

出于经济方面的考虑,许多研究者致力于干酪促熟的研究。乳杆菌作为附属发酵剂应用于干酪的生产,能够促进干酪的成熟或改善产品品质。而干酪成熟过程中,游离氨基酸的生成速率及生成量,对于干酪的成熟和风味的改善起着主要作用。在前期的试验中,以脱脂乳凝乳酶处理液为介质,以体系中游离氨基酸的产生速率为主要指标,筛选得到一株高产肽酶的植物乳杆菌 SP-3,接下来,将其用于干酪的制作,对它在干酪成熟过程中的蛋白质水解特性进一步研究。

由于干酪的成熟及风味的形成是一个昂贵且费时的过程,许多研究者通过建立模型来达到快速准确评价添加特定菌株对干酪成熟及品质的影响。

Kristofferse 等<sup>[1]</sup>报道了采用新鲜的干酪凝乳浆可以加快成熟。干酪浆体系(Cheese slurry system)中含有较高的水分,并且采用了较高的成熟温度(30~32℃),从而起到了快速成熟的效果。此模型可作为一种快速可靠的工具,用于评价不同添加物对干酪成熟的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料、试剂

干酪生产专用发酵剂(丹尼斯克生产);植物乳杆菌 SP-3(自筛);新鲜无抗牛奶;凝乳酶;氯化镉;茚三酮;三氯乙酸(TCA);磷钨酸(PTA);Tris;SDS;TEMED;巯基乙醇;甘油;溴酚蓝;过硫酸铵等。

收稿日期:2011-03-25

基金项目:干酪生产副产物乳清的综合利用研究(08PJ14318)

作者简介:苗君莅(1979-),女,河北人,工程师,硕士研究生,主要从事乳品加工的研究。

## 1.2 方法

1.2.1 附属发酵剂 SP-3 活化 将 SP-3 活化并增殖培养,收集菌体。将菌体重新悬浮于 10% 脱脂乳中,作为试验用附属发酵剂。

1.2.2 干酪模型的制作 自制新鲜干酪凝乳 100 g 装入无菌拍打机专用无菌袋中,加入 50 mL 的 5% 的灭菌氯化钠溶液(对照样)或 47 mL 的灭菌氯化钠溶液和 3 mL 的 SP-3 脱脂乳悬浮液(试验样),与拍打机上拍成浆状,封口。对照样与试验样放置于 30℃ 下培养,分别于 0,3,6,9,12 d 取样分析。上述操作均在无菌操作室内进行。

1.2.3 干酪模型成熟过程中的蛋白质水解情况的测定

1.2.3.1 可溶性氮(WSN)的测定 干酪模型与去离子水 1:2 混合,高速匀浆机匀浆后 50℃ 水浴保温 40 min,离心( $9\,000 \times g$ , 30 min, 4℃),去除上层脂肪和下层沉淀,中层清液通过玻璃绒过滤后即得干酪模型的水溶性提取液(WSE)<sup>[2]</sup>。水溶性氮(WSN)的测定采用凯氏定氮法测定。

1.2.3.2 12% 三氯乙酸溶液中可溶性氮(12% TCA-SN)的测定 取 1.2.3.1 中制备的 WSE 16 mL,加 4 mL 48% (W/V) TCA 溶液,离心( $4\,000 \times g$ , 20 min, 4℃),除去上层脂肪和底层的蛋白质,取中层溶液进行凯氏定氮<sup>[3]</sup>。

1.2.3.3 5% 磷钨酸溶液中可溶性氮(5% PTA-SN)的测定 取 1.2.3.1 制备的 WSE 10 mL 加 2.5 mL 20% (W/V) PTA 溶液,离心( $4\,000 \times g$ , 20 min, 4℃),除去上层脂肪和底层的蛋白质,取中层溶液进行凯氏定氮。

1.2.3.4 RP-HPLC 分析干酪模型的水溶性提取液(WSE)中的小分子多肽 制备的干酪模型的水溶性提取液(WSE)经超滤后,滤液(分子量 < 10 000 Da)冻干。取 10 mg WSE 冻干粉溶解于 1 mL 的 0.1% 三氟乙酸(TFA)溶液中,离心( $7\,000 \times g$ , 10 min),上清液经 0.45  $\mu\text{m}$  膜过滤,取 10  $\mu\text{L}$  滤液上样进行 RP-HPLC 分析<sup>[4,5]</sup>。

1.2.3.5 干酪模型的尿素-SDS-PAGE 分析 样品处理:取 0.1 g 样品,加入 3.5 mL 样品溶解液,沸水浴加热 3 min,快速冷却,磁力搅拌 10 h 作用至蛋白质完全溶,离心( $2\,000 \times g$ , 20 min, 4℃),去除上层脂肪<sup>[6]</sup>。

1.2.3.6 干酪模型成熟过程中总游离氨基酸含量的测定 采用茚三酮法测定。WSE 冻干粉重新溶解于去离子水中(1% W/V),pH 值 7.0。取 0.2 mL 的溶液用去离子水稀释至 1.0 mL,然后加入 2.0

mL 的茚三酮溶液,84℃ 下加热 5 min,冷却 10 min 后测定吸光值( $A_{507\text{ nm}}$ ),根据总游离氨基酸标准曲线将  $A_{507\text{ nm}}$  值转化为亮氨酸浓度。

## 2 结果与分析

### 2.1 添加 SP-3 对干酪模型中 WSN 的影响

由图 1 可知,随着成熟时间的延长,干酪模型中水溶性氮(WSN)的浓度不断增加,并且在成熟初期增长速率较快。这是由于在干酪成熟早期,在残留凝乳酶、乳内源胞浆酶和发酵剂胞壁蛋白酶的作用下,酪蛋白被降解成水溶性多肽物质,WSN/TN 作为干酪成熟的指标之一可以直观地反映酪蛋白被降解的情况,说明干酪成熟过程中蛋白水解进程、蛋白酶的活性和凝乳酶的活性。经方差分析,两试验组间 WSN 的浓度无显著性差异( $P > 0.05$ ),说明乳杆菌 SP-3 对酪蛋白的初级水解基本无影响,这可能与其缺乏某些蛋白酶有关。

### 2.2 添加 SP-3 对干酪模型中 12% TCASN 的影响

三氯乙酸(TCA)是一种蛋白质沉淀剂,常用来分离成熟干酪中的氮组分。大量研究表明,TCASN 主要是残留的凝乳酶和干酪中微生物细胞中肽酶的共同作用下形成的。12% TCASN 作为干酪成熟的指标之一反映了蛋白质降解的深度,可用来考察干酪中肽酶的酶活。如图 2 随着成熟时间的延长,由于发酵剂细胞发生自溶释放出胞内肽酶,在肽酶及残留的凝乳酶的共同作用下,大的肽被进一步降解

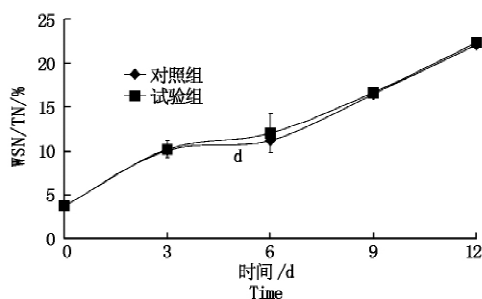


图 1 干酪模型成熟过程中 WSN/TN%

Fig. 1 WSN/TN% in cheese model during cheese ripening

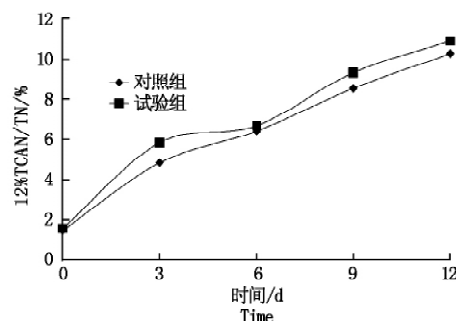
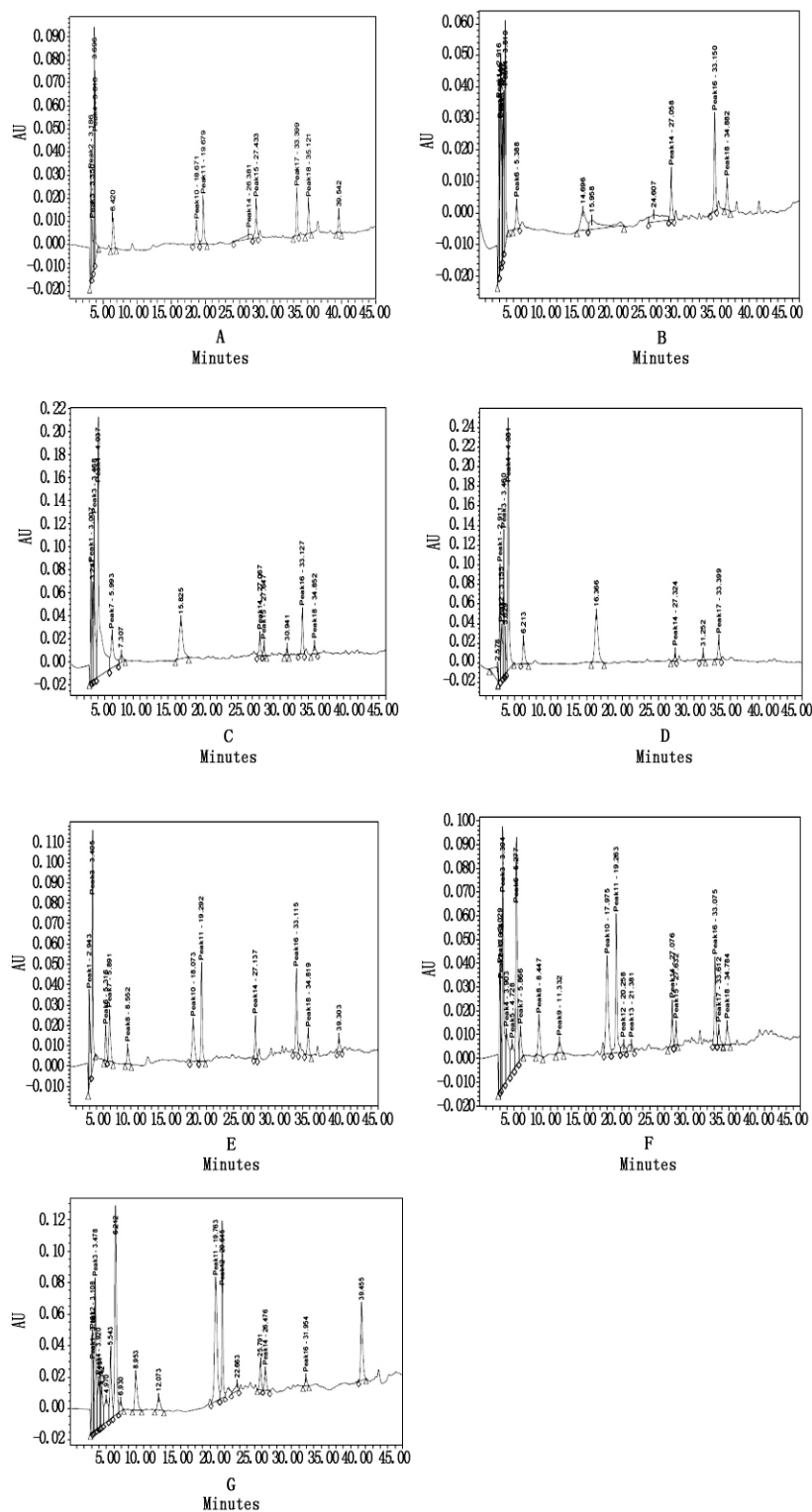


图 2 干酪模型中 12% TCAN/TN%

Fig. 2 12% TCAN/TN% in cheese model

为小肽及游离氨基酸,两试验组的干酪模型中 12% TCASN 浓度不断增加。添加 SP-3 制备的干酪模型在成熟过程中 12% TCASN 浓度明显高于对照组( $P < 0.05$ ),

这说明菌株 SP-3 在成熟过程中也发生自溶释放出胞内肽酶,加速和增强了体系中小肽和游离氨基酸的产生,可能对干酪的促熟起到一定作用。



A、B、C、D. 成熟 0、3、9 d 的对照组样品; E、F、G. 成熟 0、3、9 d 的试验组样品。  
A、B、C、D. Control cheese ripened 0、3、9 d; E、F、G. experimented cheese ripened 0、3、9 d.

图 4 干酪模型 WSE(分子量 10 000) 的 RP-HPLC 谱图

Fig. 4 RP-HPLC chromatogram of WSE in cheese model( molecular weight 10 000)

### 2.3 添加 SP-3 对干酪模型中 5% PTASN 的影响

磷钨酸(PTA)是一种极有分辨力的蛋白质沉淀剂,除氨基二羧酸外,所有的游离氨基酸都可在 PTA 中溶解,而分子量大于 600 Da 的肽则被沉淀出来<sup>[7,8]</sup>。因此,PTASN 常作为干酪成熟期间游离氨基酸含量多少的指数。游离氨基酸主要是微生物(发酵剂和非发酵剂菌群)产生的酶对酪蛋白和酪蛋白肽降解形成的。本试验中,由于控制了外界微生物的污染,5% PTASN 的差异可以认为是 SP-3 产生的酶造成的。

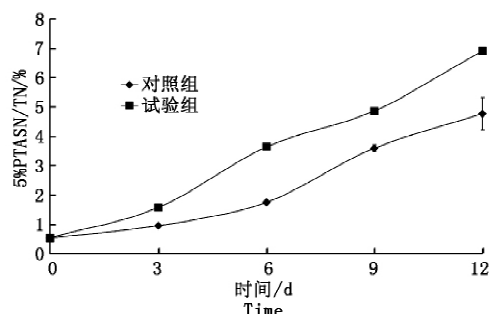


图3 干酪模型成熟过程中 5% PTASN/TN%

Fig.3 5% PTASN/TN% in cheese model during cheese ripening

由图3和方差分析可以看出,干酪模型中5% PTASN 的浓度随着成熟时间的延长呈显著性增加,添加 SP-3 的干酪模型中 5% PTASN 的浓度明显比对照组高,说明 SP-3 能够促进体系中游离氨基酸的释放。游离氨基酸对契达干酪的风味有直接贡献作用,也是许多风味化合物形成的底物。

### 2.4 RP-HPLC 分析干酪模型的水溶性提取液(WSE)中的小分子多肽

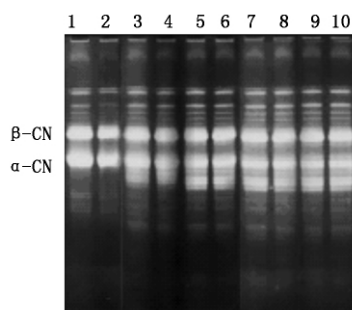
由图4可知,两组干酪模型在成熟过程中水溶性小肽的组成有着较大的差异,添加 SP-3 的干酪模型 RP-HPLC 图谱中的峰个数及总峰面积与对照组相比有明显的增多,这说明 SP-3 的加入改变体系中的肽酶水平,增强了总肽酶酶活,这与 2.2 试验中结论(SP-3 提高了干酪模型中 12% TCASN 的含量)基本一致。

### 2.5 电泳分析

由图5可以看出,同一成熟时刻取样的两组干酪模型的电泳图无明显差异,这一结果与 Lynch 等<sup>[9]</sup>分析添加附属发酵剂的契达干酪的结果一致。研究表明,电泳能够检测到的蛋白质水解情况主要是由凝乳酶及乳内源蛋白酶引起的。

运用 Quantity one 分析软件定量分析电泳图,得到两组干酪模型中  $\alpha$ s1-酪蛋白和  $\beta$ -酪蛋白的降解程度,从图6、7可知,两组干酪模型中  $\alpha$ s1-酪蛋白和  $\beta$ -酪蛋白的降解速率及程度基本一致,其中  $\beta$ -酪蛋

白的降解比  $\alpha$ s1-酪蛋白彻底,说明 SP-3 对蛋白质的一级水解基本不产生影响,这与 2.1 中对干酪模型中 WSN 的分析结果一致。



条带 1 3 5 7 9 分别为成熟 0 3 6 9 12 d 对照组干酪模型;条带 2 4 6 8 10 分别为成熟 0 3 6 9 12 d 试验组干酪模型。  
1 3 5 7 9. Control cheese ripened 0 3 6 9 12 d; 2 4 6 8 10: Experimented cheese ripened 0 3 6 9 12 d.

图5 干酪模型尿素-SDS-PAGE 电泳图

Fig.5 SDS-PAGE electrophoregrams of cheese model

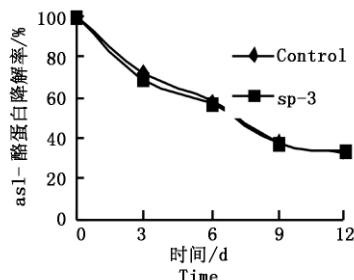


图6 干酪模型中  $\alpha$ s1-酪蛋白降解情况

Fig.6  $\alpha$ s1-casein hydrolyzed in cheese model

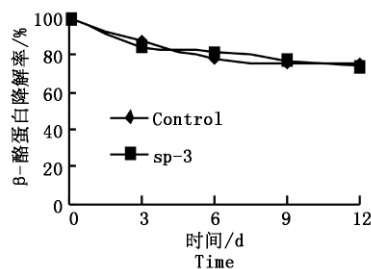


图7 干酪模型中  $\beta$ -酪蛋白降解情况

Fig.7  $\beta$ -casein hydrolyzed in cheese model

### 2.6 干酪模型成熟过程中总游离氨基酸含量的测定

镉-茚三酮试剂与干酪 WSE 中的游离氨基酸有专一性反映,因此  $A_{507\text{nm}}$  值与干酪中总游离氨基酸的浓度具有直接相关性。由于干酪中主要的游离氨基酸为甘氨酸和亮氨酸,本试验以亮氨酸的浓度代表体系中总游离氨基酸的浓度。干酪中游离氨基酸的产生主要是其中微生物胞内肽酶的作用<sup>[10,11]</sup>。由图8可以看出,SP-3 的添加增加了干酪模型内游离氨基酸的释放,在成熟早期,两组差异不太明显,随着不断成熟,差异越来越明显( $P < 0.001$ )。这可能是由于菌体细胞自溶后胞内肽酶才能释放,需要一定的时间。

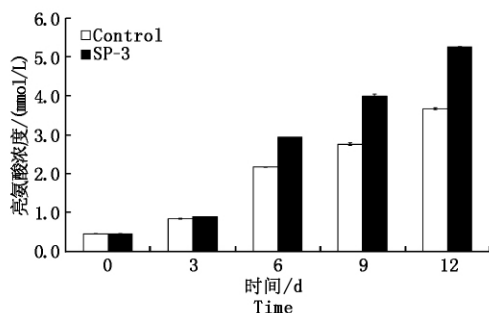


图 8 干酪模型中亮氨酸浓度 (mmol/L)

Fig. 8 Concentration of total free amino acids

### 3 结论

高产肽酶菌株 SP-3 作为附属发酵剂运用于干酪浆模型中,加速了蛋白质的水解进程,增强了体系中小肽和游离氨基酸的产生,而小肽和游离氨基酸对干酪的风味有直接贡献,也是许多风味化合物形成的底物,对于干酪的成熟和风味的改善起着主要作用。因此 SP-3 具备作为附属发酵剂,促进成熟、改善品质的潜力。接下来,可以对其风味物质及其在干酪实际生产、成熟过程中的表现进行测评,确定实际运用价值。

#### 参考文献:

- [1] Kristoffersen T, E M Mikolajcik I A, Gould. Cheddar cheese flavor. IV. Directed and accelerated ripening process. [J]. Dairy Sci. ,1967 50: 292 – 297.
- [2] Kuchroo C N, Fox P F. Soluble nitrogen in cheddar cheese : comparison of extraction procedures [J]. Milchwissenschaft ,1982 37( 6) : 331 – 335.
- [3] Sousa M J, Ardo Y, McSweeney P L H, Advances in the study of proteolysis during cheese ripening [J]. Int Dairy J 2001 ,11: 327 – 345.
- [4] Volutaki A J, Kaminarides S E. Detection of bovine milk in ovine halloumi cheese by HPLC analysis of cheese caseins hydrolysed by plasmin [J]. Milchwissenschaft , 2001 56( 4) : 207 – 210.
- [5] Amantea G F, Furtula V N, Choi ,etc. Assessment of accelerated cheese ripening by reverse-phase HPLC [J]. Adv Exp Med Biol ,1995 367: 131 – 122.
- [6] 郑小平. 尿素-SDS-PAGE 显示干酪成熟过程中酪蛋白降解生成的小分子肽 [J]. 乳业科学与技术 ,2002 2 ( 99) : 7 – 8.
- [7] Scott R. Cheesemaking practice [J]. Aspen Publishers Inc ,1998: 54 – 59.
- [8] 郭本恒. 干酪 [M]. 北京: 中国轻工业出版社 ,2004: 67 – 73.
- [9] C M Lynch ,D D Muir ,J M Banks *et al.* Influence of adjunct cultures of *Lactobacillus paracasei* ssp. Paracasei or *Lactobacillus plantarum* on cheddar cheese ripening [J]. J Dairy Sci ,1999 82: 1618 – 1628.
- [10] Hickey M W, Hillier A J, Jago G R. Peptidase activities in lactobacilli ,Aust J Dairy Tech ,1983 9: 118 – 123.
- [11] Weimer B, Dias B, Ummadi M *et al.* Influence of NaCl and pH on intracellular enzymes that influence Cheddar cheese ripening [J]. Int Dairy J ,1997 77: 383 – 398.