

表面毛霉成熟干酪制备工艺优化

张 娜^{1,2}, 郭庆启³, 赵新淮^{1,*}

(1. 东北农业大学乳品科学教育部重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150030;

2. 哈尔滨商业大学食品工程学院, 黑龙江哈尔滨 150076;

3. 东北林业大学林学院, 黑龙江哈尔滨 150040)

摘 要: 利用从毛豆腐中分离得到的一株毛霉属菌株, 制备得到表面毛霉成熟干酪, 并在干酪生产过程中采用乳酸预酸化的方式避免了常规乳酸菌发酵剂对毛霉干酪成熟的影响。单因素实验确定牛乳预酸化 pH 为 5.7, 氯化钙添加量 0.02%, 凝乳酶的添加量为 0.0035%, 凝固温度 33℃, 毛霉孢子悬浮液浓度为 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ cfu · mL⁻¹。

关键词: 毛霉, 干酪, 工艺, 优化

Optimization of preparation process of surface *Mucor*-ripened cheese

ZHANG Na^{1,2}, GUO Qing-qi³, ZHAO Xin-huai^{1,*}

(1. Key Laboratory of Dairy Science of Ministry of Education, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

2. College of Food Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China;

3. College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract: Surface *Mucor*-ripened cheese was produced from a strain of *Mucor spp.* which was separated from local mao-tofu product. By means of pre-acidification with lactic acid to avoid the effects of lactobacillus to *Mucor*-ripened cheese during producing, single factor test confirmed that the pH of pre-acidification was 5.7, CaCl₂ and chymosin were added at a level of 0.02% and 0.0035% respectively. Coagulate temperature was at 33℃, and the concentration of spore suspension of *Mucor* was $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ cfu · mL⁻¹.

Key words: *Mucor*; cheese; process; optimization

中图分类号: TS252.53

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2010)01-0210-04

干酪成熟是一个复杂的物理化学和生物化学变化过程, 但由于生产方法、成熟条件、原料乳种类等因素的影响, 结果差异较大^[1-2], 因此干酪生产工艺对于干酪的成熟来说是至关重要的。绝大部分干酪在加工中添加乳酸菌等发酵剂来调整牛乳的酸度, 促进凝乳的形成并对干酪成熟产生积极的作用, 而本研究的目的是考察经分离纯化后得到的毛霉在干酪成熟中的作用效果, 为了避免乳酸菌等发酵剂对毛霉作用效果产生干扰, 在干酪的制备过程中没有添加初级发酵剂, 而是采用预酸化的方式调整牛乳的酸度, 模拟乳酸菌作用下的牛乳体系, 并使整个牛乳环境达到凝乳酶作用的适合范围, 并采用单因素实验确定毛霉干酪制备工艺参数。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

收稿日期: 2009-10-16 * 通讯联系人

作者简介: 张娜(1979-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 食品检测。

基金项目: 国家高新技术研究与发展规划(863 计划)(2006AA10Z324); 国家“十一五”重大技术研究与发展规划(2006DAD04A09)。

菌株 从自然发酵的毛豆腐中得到一株霉菌, 初步鉴定为毛霉属(*Mucor Micheli ex Fries*) 菌株; 牛乳 购于东北农业大学早市; 凝乳酶 Maxiren-180 1:10000, 荷兰代夫特 DSM 公司(食品级); 乳酸、氯化钙 哈尔滨市昌泰食品添加剂销售公司(食品级); 其它药品 均为分析纯。

质构仪 TA.XT PLUS 型 美国 Stable Micro System 公司; 干酪模具 齐齐哈尔市第二机床厂。

1.2 实验方法

1.2.1 毛霉干酪的制备工艺及参数优化

1.2.1.1 毛霉干酪制备工艺流程 新鲜牛乳用滤布进行过滤后, 63℃ 杀菌 30min; 原料乳冷却至 35℃, 用乳酸将 pH 调节至 6.5, 分别加入 0.016% (w/w) 氯化钙和 0.014% (w/w) 硝酸钾, 缓慢加入 2mL 用超纯水进行溶解的凝乳酶, 添加量为 0.0034%, 并快速搅拌均匀, 32℃ 保温 30min 使牛乳凝固。将凝块切割成 1.0cm × 1.0cm × 1.0cm 的正方体, 将凝乳温度升高至 35℃, 每隔 15min 排出 1/3 乳清, 共排 3 次。将排乳清后的凝乳转移至直径 15cm, 高 30cm 的圆形模具中, 0.3MPa 下压榨 2h, 每隔 30min 将干酪翻转, 继续压榨。压榨后的凝乳切割成 3cm × 1.5cm × 1.5cm 的

立方体,于5%冷盐水中盐渍18h后,涂抹2mL毛霉孢子悬浮液,置于 $28 \pm 1^\circ\text{C}$ 环境中恒温培养24h,然后将干酪样品转移至相对湿度85%~90%, $4 \pm 1^\circ\text{C}$ 干酪成熟室内成熟。

1.2.1.2 毛霉干酪制备工艺参数优化 对毛霉干酪制备过程中的预酸化pH、氯化钙添加量、凝乳酶添加量、凝固温度分别进行单因素实验,确定这些因素对干酪凝乳时间、干酪实际产率、凝乳硬度、排出乳清在 $\lambda = 500\text{nm}$ 下的光密度值的影响;对于干酪制备过程中毛霉孢子悬浮液浓度分别进行单因素实验,确定这两个因素对干酪成熟过程中pH4.6-SN占总氮比例的作用效果,综合分析确定毛霉干酪的最佳制备工艺。

1.2.2 考察指标分析方法

1.2.2.1 干酪实际产率测定 采用Konuklar等的方法进行测定^[3]。

1.2.2.2 凝乳时间测定 从加入凝乳酶起计时,直到牛乳凝固时为止,所花费的时间即为凝乳时间,用min表示。

1.2.2.3 乳清OD值测定 将压榨前排出的乳清收集后,测定其在 $\lambda = 500\text{nm}$ 时的光密度值,用 $\text{OD}_{500\text{nm}}$ 表示。

1.2.2.4 凝乳硬度测定 探头型号为p/0.5,凝乳直径为350mm,高度约为300mm,每块凝乳选择3个不同点进行测定,测试前速度 $2.0\text{mm} \cdot \text{s}^{-1}$,测试速度为 $0.5\text{mm} \cdot \text{s}^{-1}$,测试后速度为 $2.0\text{mm} \cdot \text{s}^{-1}$,测试距离5.0mm,通过Texture exponent 32软件自动记录凝乳硬度。

1.2.2.5 pH4.6可溶性氮占总氮比例 总氮测定(TN):采用IDF标准进行测定^[4];pH4.6可溶性氮(pH4.6-SN)的测定:采用Kuchroo等的方法进行测定^[5];pH4.6-SN占TN比例($\text{pH4.6-SN}/\text{TN}$)= $(\text{pH4.6-SN}/\text{TN}) \times 100\%$

1.2.3 数据统计分析 实验结果采用SPSS 15.0软件进行处理,利用LSD方法进行方差分析。

2 结果与讨论

2.1 预酸化pH对凝乳性能的影响

加入乳酸调整牛乳的pH分别为5.1、5.4、5.7、6.0,用不调整pH的牛乳作对照,分别以各项评价指标为纵坐标,结果如图1所示。

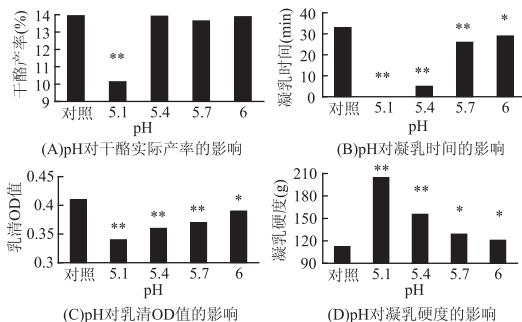


图1 预酸化pH对凝乳性能的影响

*表示变化显著 $P < 0.05$; **表示变化极显著 $P < 0.01$;图2~图4同。

从图1A~图1D可以看出,随着pH的降低,排出

乳清OD值呈现减少趋势,同时干酪产率降低,凝乳时间缩短,凝乳硬度增大。当pH调整为5.7时,凝乳时间同对照相比极显著降低($P < 0.01$),凝乳硬度明显高于对照($P < 0.05$)。导致这一现象的原因可能有两方面:当牛乳中的pH逐渐调整为5.7时,凝乳酶的活力增加,单位时间内凝乳酶作用于 κ -酪蛋白的速度增大;同时,降低蛋白质表面电荷而使之互相接近变得容易,形成的网络结构紧密,凝块硬度显著增加。当调整pH小于5.4时,牛乳开始凝固,凝乳收缩相当严重,形成的凝块空洞较大,质地粗糙、疏松,缺乏弹性,不易切割,凝乳强度最大,高达204.71g,不适宜于干酪工艺。有报道称,pH从6.1降为5.1的过程中,干酪凝胶发生脱水收缩的比例增加,引起酪蛋白磷酸钙的分解,降低酪蛋白胶束表面的净电荷,胶束之间的静电斥力下降,不溶性的钙、磷转变成可溶性而游离出来,伴随乳清的排放而损失^[6]。当pH为5.2~5.8之间时,有足够的钙离子和氢离子取代钠离子,促使干酪组织状态良好^[7-8]。综合考虑,决定将鲜乳体系中pH调整到5.7。

2.2 氯化钙添加量对凝乳性能的影响

将 CaCl_2 添加量分别为0.01%、0.02%、0.03%、0.04% (w/w),用不加 CaCl_2 的牛乳作对照,分别以各项评价指标为纵坐标,评价结果如图2所示。

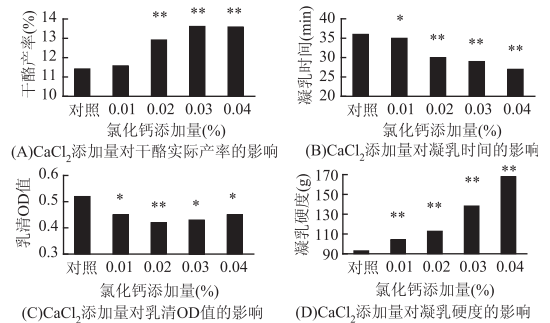


图2 氯化钙添加量对凝乳性能影响

随着氯化钙添加量增加,干酪实际产率和凝乳硬度显著增加($P < 0.01$),而凝乳时间显著降低($P < 0.01$)。由于 Ca^{2+} 浓度增大,破坏酪蛋白分子表面的水膜和双电层,而减少酪蛋白分子相互之间的斥力,有助于凝乳过程中酪蛋白相互凝聚,使酶的作用变得容易;另外, Ca^{2+} 直接作为酪蛋白网络结构形成的底物参与反应。当 Ca^{2+} 添加量在0~0.02%之间时,乳清的OD值随 Ca^{2+} 浓度增加而降低,干酪产率增大,说明在干酪中适当添加的钙离子同酪蛋白相结合,中和结合在酪蛋白粒子上的基团或者形成胶体磷酸钙。当 Ca^{2+} 添加量达到0.02%时,排出乳清的吸光值达到最小,凝乳效果最好, Ca^{2+} 浓度大于0.02%后,乳清的OD值反而轻微上升,干酪质地粗糙,这是由于酪蛋白与过量的 Ca^{2+} 结合,从而破坏原本连接在一起的 α_s -酪蛋白和 κ -酪蛋白之间的化学键, α_s -酪蛋白发生沉淀,而且由于 Ca^{2+} 浓度过大,凝乳速度加快,乳中的水分和脂肪不能及时被酪蛋白形成的网络结构包裹,造成凝乳较粗糙,干酪实际产率稍有减少。当 CaCl_2 的添加量在0.04%时,凝乳时间最短,凝乳强度变化最大。综合考虑,选择 CaCl_2

表1 毛霉孢子悬浮液浓度对干酪中 pH4.6-SN 占总氮比例(%)的影响

成熟时间 (d)	孢子悬浮液浓度($\text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$)				
	1×10^3	1×10^4	1×10^5	1×10^6	1×10^7
1	$4.56 \pm 0.74^{\text{A}}$	$4.56 \pm 0.74^{\text{A}}$	$4.56 \pm 0.74^{\text{A}}$	$4.56 \pm 0.74^{\text{A}}$	$4.56 \pm 0.74^{\text{A}}$
7	$7.17 \pm 0.78^{\text{Ba}}$	$8.20 \pm 0.70^{\text{Ba}}$	$9.53 \pm 0.59^{\text{Bab}}$	$11.90 \pm 0.05^{\text{Bb}}$	$14.95 \pm 0.92^{\text{Bc}}$
14	$9.15 \pm 0.36^{\text{BCa}}$	$9.42 \pm 0.12^{\text{BCa}}$	$12.74 \pm 0.90^{\text{Cb}}$	$15.93 \pm 0.17^{\text{Cc}}$	$19.67 \pm 0.72^{\text{Cd}}$
21	$12.64 \pm 0.52^{\text{CDa}}$	$13.01 \pm 0.38^{\text{CDb}}$	$15.23 \pm 0.48^{\text{Dc}}$	$19.97 \pm 0.27^{\text{Dd}}$	$23.28 \pm 0.24^{\text{De}}$
28	$14.85 \pm 0.73^{\text{DEa}}$	$15.15 \pm 0.22^{\text{DEb}}$	$18.42 \pm 0.35^{\text{DEc}}$	$23.69 \pm 0.12^{\text{Ed}}$	$27.38 \pm 0.53^{\text{Ee}}$
35	$15.81 \pm 0.75^{\text{Ea}}$	$16.37 \pm 0.25^{\text{Eb}}$	$20.83 \pm 0.04^{\text{Ec}}$	$26.06 \pm 0.59^{\text{Fd}}$	$31.59 \pm 0.61^{\text{Fe}}$

注:A~F表示为组内差异显著($P < 0.05$);a~e表示为组间差异显著($P < 0.05$)。

的添加浓度为0.02%。

2.3 凝乳酶添加量对凝乳性能的影响

改变凝乳酶添加量分别为0.0025%、0.0035%、0.0045%、0.0055% (w/w),用凝乳酶添加量0.0025%的操作条件作对照,分别以各项评价指标为纵坐标,结果如图3所示。

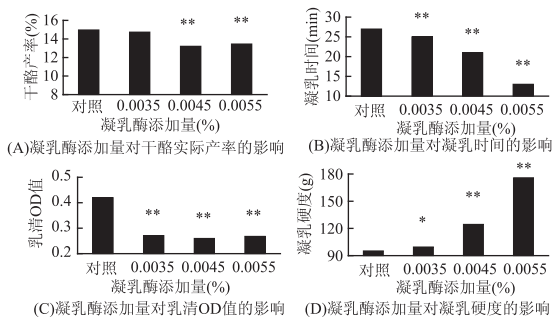


图3 凝乳酶添加量对凝乳性能的影响

凝乳酶添加量增加,凝乳硬度极显著增加,同时凝乳时间缩短,乳清 OD 值减小,干酪实际产率降低。凝乳酶添加量为0.0035%时,干酪实际产率同对照相比,变化不显著($P > 0.05$),所形成的凝乳硬度显著增加($P < 0.05$),而乳清 OD 值和凝乳时间却极显著降低($P < 0.01$)。凝乳酶添加量的增加能够迅速水解 κ -酪蛋白,促进Phe105-Met106键断裂,溶液中电荷增高,酪蛋白胶束表面电势降低,从而加快凝乳过程,使酪蛋白形成的三维网络结构更紧密,所形成的凝乳硬度增加^[9]。凝乳酶添加量继续增加时,凝乳时间大大缩短,但是干酪实际产率出现降低,这是由于凝乳过程中,过量的凝乳酶使凝固过程时间缩短,酪蛋白之间结合紧密,切割后大量乳清排出,干酪中水分含量减少,干酪的实际产率降低。因此,一方面为了保证凝乳的快速形成,另外为了确保干酪质地适中,并降低生产成本,选择凝乳酶的添加量为0.0035%。

2.4 凝固温度对凝乳性能的影响

改变凝乳酶凝固温度分别为28、33、38、43℃,用凝固温度为28℃的操作条件作对照,分别以各项评价指标为纵坐标,结果如图4所示。

凝固温度由28℃升高到38℃,凝乳时间由27min降低至23.5min,凝乳硬度由117.6g升高到159.3g。尽管提高凝乳温度可以提高蛋白聚集速度,加快凝固过程,但当凝固温度由38℃增加到43℃时,凝乳时间缓慢降低,凝乳硬度却持续升高,干酪产率稍有增长,乳清 OD 值显著下降,这可能是由于凝乳酶的酶学性质导致的,不同种类的凝乳酶,其合作用温度不同,大部分凝乳酶适合在40℃以下更

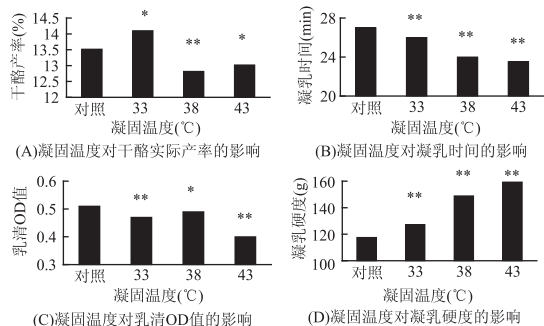


图4 凝固温度对凝乳性能的影响

好地发挥作用,凝固温度过高时,部分凝乳酶会被钝化。凝固温度33℃时,干酪产率相对最大,此时的乳清 OD 值较小,表明乳清中流失的蛋白质的量较少,本研究选择采用33℃环境下进行原料乳的凝固。

2.5 毛霉孢子悬浮液浓度对酪蛋白水解的影响

取5块新鲜干酪,盐渍后分别在其表面涂抹2mL浓度分别为 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、 $1 \times 10^7 \text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的毛霉孢子悬浮液,置于 $28 \pm 1^\circ\text{C}$ 培养24h后,转入干酪成熟室中进行成熟,干酪表面pH4.6-SN/TN结果见表1。

由表1可知,当毛霉孢子悬浮液浓度由 $1 \times 10^3 \text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 增大到 $1 \times 10^7 \text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$,随着成熟时间的延长,干酪中pH4.6-SN部分占总氮的比例显著增高($P < 0.05$)。成熟7~35d内,随着毛霉孢子悬浮液浓度的提高,组间差异同样显著($P < 0.05$)。毛霉孢子悬浮液浓度过低,会延缓酪蛋白的水解速度,而当毛霉孢子悬浮液浓度为 $1 \times 10^6 \text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,在35d的成熟过程中,干酪中pH4.6-SN占总氮的比例高达 $26.06\% \pm 0.59\%$,虽然我们的研究希望酪蛋白进行快速的水解,但是,当毛霉孢子悬浮液添加量过多时,经水解后干酪表面产生水样,说明干酪表面发生快速而过度的水解,同时产生浓烈的不期望的氨味,给干酪的质地和气味带来不利影响,缩短干酪的保质期。当毛霉的孢子悬浮液浓度为 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5 \text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,酪蛋白水解速度稳定而适当,没有不良气味产生。

3 结论

表面毛霉涂抹干酪制备单因素实验优化确定牛乳预酸化pH为5.7,氯化钙添加量0.02%,凝乳酶的添加量为0.0035%,凝固温度33℃,毛霉孢子悬浮液浓度为 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5 \text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

(下转第216页)

因素作用显著,随着磨浆温度和浸泡时间的增加,有利于可溶性蛋白质得率的提高;固液比和碳酸氢钠浓度与可溶性蛋白质得率均呈开中向下的抛物线关系,表明两因素均存在一个合理范围,即对可溶性蛋白质得率影响都呈先上升后下降的趋势。这些情况与前面的单因素实验结果吻合。

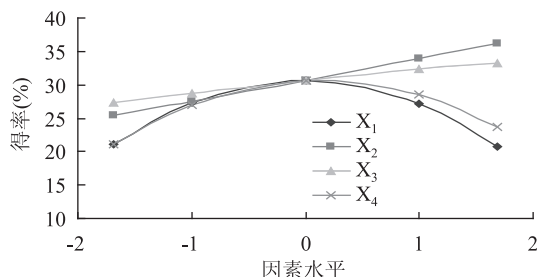


图6 实验因子的主效应分析

2.3.9 磨浆工艺的最佳参数组合 通过计算机模拟寻优得出可溶性蛋白质得率的优化组合为:固液比在0水平(1:8),磨浆温度在1.682水平(70℃),浸泡时间在1.682水平(3h),碳酸氢钠量在0水平(0.6%)。在此条件下可溶性蛋白质得率为39.01%。在此最佳磨浆工艺条件下,通过实际实验得出最佳得率为36.84%,与预测值仅差0.94%,说明此最佳模型是可靠的。

3 结论

3.1 核桃渣磨浆工艺条件的优化回归数学模型为: $Y = 30.59497 + 3.20393X_2 + 1.79671X_3 - 3.40536X_1^2 - 2.87313X_4^2$ 。此模型在本实验范围内能较准确预测核桃渣蛋白液中可溶性蛋白质的得率。

3.2 通过单因素水平实验,确定了磨浆工艺中各单因素的适宜范围:固液比为1:8;磨浆温度为60℃;浸泡时间为2.5h;碳酸氢钠浓度为0.6%。

3.3 在单因素实验的基础上,运用回归设计的理论与方法,通过DPS进行数据处理,确定最佳的磨浆工

艺:固液比1:8,磨浆温度在70℃,浸泡时间在3h,碳酸氢钠浓度在0.6%。在此条件下可溶性蛋白质得率为39.01%。在此最佳磨浆工艺条件下,通过实际实验得出最佳得率为36.84%,与预测值仅差0.94%,说明此最佳模型是可靠的。考虑到成本和工作效率,得出最佳磨浆工艺为:固液比1:8,磨浆温度在60℃,浸泡时间在2.5h,碳酸氢钠浓度在0.6%。在此条件下,可溶性蛋白质得率为37.02%。

参考文献

- [1] Sztetko KWC, Sathe SK. Walnut (*Juglans regia*). Proximate composition, protein solubility, protein amino acid composition, and protein in vitro digestibility[J]. J Sci Food, 2000, 80: 1393-1401.
- [2] FAO. Production Yearbook[M]. Rome Food and Agriculture organization of the United Nation, 1998.
- [3] 钟梅雁, 李忠梅, 袁列江, 等. 核桃生产加工利用研究的现代与前景[J]. 食品与机械, 2002(4): 4-6.
- [4] 王增. 最佳健康食品[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2005: 80-82.
- [5] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 184-185.
- [6] 郭春峰, 李婧研, 张守文, 等. 二次回归通用旋转组合设计在饮料研究与开发中的应用[J]. 实验报告与理论研究, 2006(9): 38-42.
- [7] 唐启义, 冯光明. 实用统计分析及其计算机处理平台[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997: 77-91.
- [8] 张晓娜, 周素梅, 王世平, 等. 二次回归正交旋转组合设计对麦麸中阿拉伯木聚糖酶解工艺的优化[J]. 食品科学, 2008(1): 141-145.
- [9] 张红, 姚舜, 李国军, 等. 核桃仁脱皮和蛋白提取研究[J]. 粮食与油脂, 2003(12): 22-23.
- [10] 姜莉, 徐怀德, 何玉君, 等. 核桃渣中蛋白质的提取工艺及其功能性研究[J]. 食品科技, 2007(4): 237-239.

- Belgium; International Dairy Federation IDF Standard 20B, 1993.
- [5] Kuchroo C N, Fox P F. Soluble nitrogen in Cheddar cheese: Comparison of extraction procedures[J]. Milchwissenschaft, 1982, 37: 331-335.
- [6] Karahadian C, Lindsay R C. Integrated roles of lactate, ammonia, and calcium in texture development of mould surface ripened cheese[J]. Journal of Dairy Science, 1987, 70(5): 909-918.
- [7] Watkinson P, Coker C, Crawford R, et al. Effect of cheese pH and ripening time on Model cheese textural properties and proteolysis[J]. International Dairy Journal, 2001, 11(4-7): 455-464.
- [8] Pastorino A J, Hansen C L, McMahon D J. Effect of pH on the chemical composition and structure-function relationships of Cheddar cheese[J]. Journal of Dairy Science, 2003, 86(9): 2751-2760.
- [9] Fox P F, Timothy P G, Timothy M C, et al. Undamentals of cheese science an aspen publication aspen publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland, 2000.

参考文献

- [1] Prieto B, Franco I, Prieto J G, et al. Compositional and physico-chemical modifications during the manufacture and ripening of león raw cow's milk cheese[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2002, 15(6): 725-735.
- [2] Linton M, Mackle A B, Upadhyay V K, et al. Margaret F. Patterson the fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture of Camembert-type cheese: A comparison between raw milk and milk treated with high hydrostatic pressure Innovative[J]. Food Science and Emerging Technologies, 2008, 9(4): 423-428.
- [3] Konuklar G, Inglett G E, Carriere C J, et al. Use of a β -glucan hydrocolloidal suspension in the manufacture of low-fat Cheddar cheese: Manufacture, composition, yield and microstructure[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2004, 39(1): 109-119.
- [4] IDF. Milk. Determination of the nitrogen (Kjeldahl method) and calculation of the crude protein content[S]. Brussels,

(上接第212页)