

# 酶解契达干酪风味形成机理与影响因素

刘 丰,陈历俊\*,隋 欣,卢 阳

(北京三元食品股份有限公司技术中心,北京 100085)

**摘 要:**酶解干酪(EMC)相比自然干酪具有更加营养、经济、有效等特点。本文对酶解契达干酪风味产生的机理进行了阐述,并分析了苦味形成的原因;同时综述了生产工艺、商业酶以及微生物对酶解契达干酪风味等影响因素。

**关键词:**酶解干酪,苦味,酶

## The formation mechanism and influence factors of flavor for enzyme-modified Cheddar cheese

LIU Feng, CHEN Li-jun\*, SUI Xin, LU Yang

(Beijing Sanyuan Foods Co. Ltd., Beijing 100085, China)

**Abstract:** Compared to natural cheese, enzyme-modified cheese (EMC) is more nutritious, economic and effective. In this paper, the mechanism of EMC flavor formation and the reason of the bitterness in cheese were analyzed, also, the effects of process technique, commercial enzyme and microbiology on the flavors of EMC were reviewed.

**Key words:** enzyme modified cheese; bitterness; enzyme

中图分类号: TS252.53

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)13-0406-04

酶解干酪(Enzyme-Modified Cheese, EMC)是以干酪凝块为基质,添加酶的混合物(蛋白酶、肽酶、脂酶可能还有细菌发酵剂),依据酶活性的大小在一段必要的时间里发生作用,然后重新热处理破坏微生物和酶的反应,得到的一种粉末状或膏状干酪产物<sup>[1]</sup>。EMC的风味强度是天然干酪的10~30倍,添加很少的量(0.1%~2%)就可获得干酪风味。在食品中添加EMC替代天然干酪可降低产品成本的40%~80%;添加0.1%的EMC仅仅增加不超过0.07%的脂肪,这符合目前人们追求低脂健康食品的要求<sup>[2]</sup>。但EMC和天然成熟干酪相比,也存在风味物质不平衡的缺陷<sup>[3]</sup>。因此生产优质风味的EMC正成为食品研究者关注的热点,本文就EMC的风味产生机理以及生产条件对风味的影响两个方面进行了深入的阐述。

## 1 EMC风味概述

### 1.1 风味产生机理

EMC的风味主要通过三种初级生化反应产生,包括蛋白质降解、糖酵解和脂肪分解,生成了包括酸类、醛类、酯类、酮类、硫化物、内酯、酚类、醇类、醚类、炔类、氨基酸、吡喃、呋喃等杂环化合物。干酪中的风味是一种多组分的风味体系,研究发现契达干酪中的挥发性风味物质已超过100种,其中最重要的风味组分有乙酸、丁酸、己酸、辛酸、硫化氢、谷氨酸、甲

硫醇及羰基化合物等。

1.1.1 蛋白质降解 干酪的风味是一种多组分风味体系,其中氨基酸的含量和种类对干酪的风味影响最大,因此蛋白水解是多数干酪成熟过程中三个反应中最重要最复杂的生化反应。干酪中由蛋白质降解产生的风味化合物包括肽类、氨基酸以及氨基酸在转氨酶、脱羧酶等作用下进一步代谢生成的酮酸、醇、醚、酚、胺、吡啶,这些物质整体上有有助于风味的形成<sup>[4]</sup>。蛋白水解至少在四个方面对干酪成熟有贡献:直接通过产生氨基酸和肽,间接通过氨基酸代谢;通过在成熟过程中释放有滋味的化合物;通过NH<sub>3</sub>改变pH;通过裂解蛋白网状结构改变干酪的质构。蛋白质降解形成风味物质的主要途径可以分为两步:第一步是蛋白质降解。包括蛋白质水解生成多肽和多肽在肽酶作用下水解形成氨基酸的过程;第二步是游离氨基酸在脱羧或转氨酶作用下降解为风味物质,其中第二步是风味形成的关键。首先,凝乳酶对酪蛋白进行初次降解,然后在发酵剂蛋白酶作用下二次降解生成小肽、氨基酸和一些风味物质。已知含有疏水性氨基酸的肽类尝起来有苦味,因此蛋白质被不同程度地降解产生多种风味物质的同时还会形成一些不良风味。干酪中的苦味肽的产生是由凝乳酶和发酵剂降解酪蛋白形成的,因为发酵剂形成的肽酶活性不强,不能将凝乳酶产生的苦味肽分解为非苦味肽和氨基酸。苦味物质经过进一步降解形成风味物质前体氨基酸,氨基酸在经转氨作用形成 $\alpha$ -酮酸,脱羧转化为乙醛,接着被脱氢形成乙醇或羧酸。这类成分对提高乳制品的整体风味具有重要作用。图1列出了干酪成熟过程中蛋白质降解的过程<sup>[5]</sup>。

收稿日期:2011-08-23 \* 通讯联系人

作者简介:刘丰(1983-),男,硕士,研究方向:乳品科学。

基金项目:“十一五”科技支撑计划(2009BAD9B06);北京市科技计划(D1011050460000)。

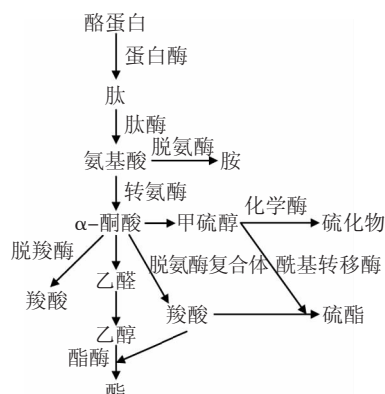


图1 蛋白代谢途径

Fig.1 Metabolic pathways of protein

**1.1.2 脂肪代谢** 传统生产的自然硬质干酪(如契达干酪),蛋白质水解是主要的风味产生途径,然而,对于生产EMC则具有很大的区别,主要是因为乳化的蛋白脂肪底物界面增加了酶解反应。脂肪酶看起来在EMC中比在天然干酪中影响风味的作用更大,脂肪酶作用能力大小直接和EMC底物乳化的状态有关。脂肪代谢是指甘油三酯,甘油二酯和甘油一酯在脂酶作用下代谢产生游离脂肪酸和风味前体物质的过程<sup>[7]</sup>。首先,脂肪经脂肪酶分解产生脂肪酸和甘油,脂肪酸进一步代谢形成游离脂肪酸、醇、内酯、酸、醇。尤其是短链脂肪酸(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)具有强烈的特征性风味,是契达干酪的主要风味物质。同时,短链脂肪酸还可以和甲硫醇生成甲硫酯,能够赋予干酪特有的芳香气味。游离脂肪酸对一些干酪品种中风味形成至关重要。如青纹干酪,其不仅是直接的风味化合物,而且还是第二大主要风味物质甲基酮的前体。其次,脂肪酸尤其是不饱和脂肪酸氧化后会产生多种具有强烈风味的不饱和醛,易造成臭败风味的缺陷,但由于干酪中氧化还原作用较低,通常脂肪酸氧化现象不明显。脂肪分解产生的脂肪酸是影响干酪风味最显著的因素。特别是一些挥发性脂肪酸如丙酸、乙酸、辛酸和癸酸等是干酪的风味物质。不同干酪品种中脂肪水解对干酪风味的贡献也不同。对于风味强烈的干酪如蓝纹干酪,20%的脂肪被分解代谢成中链和长链脂肪酸,C<sub>8</sub>和C<sub>14</sub>脂肪链被氧化生成甲基酮然后进一步生成二级醇,形成其重要风味化合物。研究发现罗马诺和波萝伏洛类型的EMC风味强度与脂肪水解生成的低分子量游离脂肪酸成正比。但对于契达和瑞士类型的EMC,虽然游离脂肪酸相对比率相似,但口

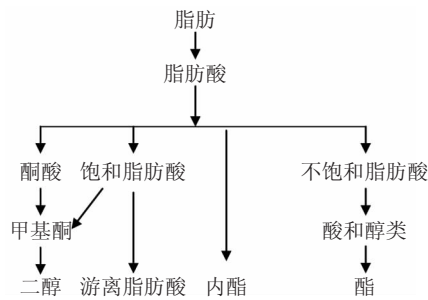


图2 脂肪代谢途径

Fig.2 Metabolic pathways of fat

味却是契达和瑞士类型。这说明游离脂肪酸的比率对于罗马诺和波萝伏洛类型EMC是关键,而对于契达和瑞士类型EMC则不是。图2列出了干酪成熟过程中脂肪降解的过程<sup>[9]</sup>。

**1.1.3 糖酵解** 糖的分解代谢主要是在乳酸菌的作用下将乳糖生成乳酸。乳酸对酸凝固的干酪风味产生主要作用。乳糖发酵时,风味物质形成的主要途径是先是在乳酸菌(LAB)的作用下生成L-乳酸,然后在非发酵剂作用下转变成D-乳酸,也可能被氧化成醋酸和其他代谢产物,中间体丙酮酸盐在酶的作用下转化为不同的风味物质,如二乙酸、3-羟基-丁酮、乙酸或乙醛,其中部分化合物对干酪的风味起到促进作用<sup>[4]</sup>。糖酵解过程与干酪成熟过程中的其它一些生化反应相比,干酪中乳糖和乳酸的代谢在大部分的干酪中属于基本代谢类型,并且乳糖转化为乳酸对干酪的直接风味并没有影响。但是产生的乳酸,一方面具有抑菌作用,另一方面还可降低干酪中的氧化还原电位和pH,这一条件可以确保酶促反应的缓慢进行,保证酶解反应生成良好的风味化合物。同时,低的氧化还原电位也确保含硫化合物以还原形式存在,而硫化物是干酪风味形成必不可少的。图3列出了干酪成熟过程中糖类降解的过程<sup>[9]</sup>。

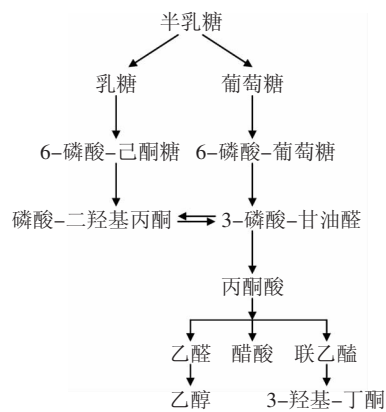


图3 乳糖代谢途径

Fig.3 Metabolic pathways of lactose

## 1.2 EMC的苦味

生产契达风味的EMC比其他类型的困难,因为它的关键风味物质还缺乏相关研究,不像其他干酪,如蓝纹干酪的主要风味物质是甲基酮。生产契达EMC的商业蛋白酶,最重要的作用就是加速蛋白质水解,但由于产生疏水性肽的速率大于降解速率,容易导致苦味的积累。

Ney提出一个公式,用以计算平均疏水性 $Q = \sum f_i/n$ ,其中,  $f_i$  为支链疏水性,  $n$  为残留基团的个数。这个公式可以衡量干酪的苦味,在0.1~10ku范围内的肽中,  $Q$  值小于5442.84J时,不会产生明显苦味。在0.1~6ku范围内,  $Q$  值超过5861.52J时会产生苦味<sup>[8]</sup>。

表现很强苦味的肽链至少有六个氨基酸, N-末端的碱性氨基酸和C-端的疏水性氨基酸明显能加强苦味。研究表明,疏水性亮氨酸残基能引起苦味,它的数量多少决定了苦味的大小。当碱性氨基酸(精氨酸、赖氨酸、组氨酸)在N-端时或者疏水性氨基酸(色

氨酸、异亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸)在C-端时的肽段是具有苦味的。除去苦味需要加入正确平衡的肽链内切酶和肽链端解酶。内切酶切割敏感的多肽链,而肽链端解酶通过在C-端或者N-端切割一个或者两个氨基酸来降低苦味<sup>[9]</sup>。

## 2 生产加工对EMC风味的影响

### 2.1 生产工艺对EMC风味的影响

EMC的生产过程就是用生化方法模拟天然干酪自然成熟时产生的风味物质。与天然干酪的生产相比,EMC的生产重视风味和香味而不考虑质地。

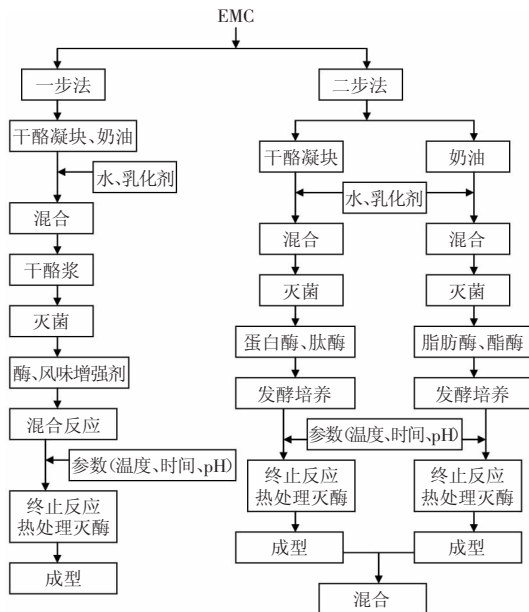


图4 EMC生产工艺

Fig.4 EMC process

生产EMC可以使用不同的制作过程,这主要取决于EMC的类型以及所需产品外观。另外,商业契达EMC期望得到契达干酪的风味,因此要控制蛋白水解,脂肪水解和组分的参数或者加入风味增强剂,有机酸和填充剂来产生契达EMC产品。EMC基本的风味物一般有很强的肉汤味、蛋白分解产生的鲜味和脂肪分解产生的汗臭味,但这些风味在加入最终产品后会被稀释而减弱。EMC风味的强弱和颜色的深浅可以通过正确选择干酪底物、酶和加工参数进行控制。随着现代生物工艺的出现,甚至可以设计酶作用于特定的底物产生预定的色泽。通常,为了得到理想的风味,大多数的EMC都是由同类型的未成熟干酪制得,同时可以添加风味增强剂,例如,谷氨酸钠、酵母提取物和双乙酰,也可以添加一些特殊的干酪风味化合物。

EMC的生产方法通常是蛋白和脂肪同时发生水解或者是不同的风味成分分开水解,然后混合。最初反应底物(干酪浆)的质量对于风味的产生及最终风味的形成影响非常大。EMC加工制作过程通常使用加热灭活的方法来终止反应进行,加热的强度需注意,强度太大,容易造成风味缺陷,从而破坏最终产品的风味。有几种不同的工艺过程来生产EMC,图4列出了EMC的不同生产方法<sup>[10]</sup>。一步法是指在单一

的底物中添加蛋白酶和脂肪酶,同时进行水解一定时间后获得最终产品。两步法指单一的底物首先在蛋白酶作用下水解一段时间,然后在脂肪酶作用下继续水解获得最终产品。事实上两步水解法较一步法更容易控制脂肪酶水解时产生的风味,而且有效防止了因pH降低而抑制蛋白酶水解活性的不良影响。Freund描述了用同一种新鲜凝块生产不同类型EMC的方法。将干酪凝块和酶混合后,在30℃或者更高的温度下反应24h。然后对产物进行热处理终止酶活,产品做成浆状或者粉末状,还可以通过添加其他天然成分产生一系列具有强烈风味的EMC<sup>[11]</sup>。Kilcawley等叙述了一种两阶段生产EMC的新方法,使用不同的蛋白酶与脂肪酶、肽酶生产EMC,并和商业契达EMC相对照。结果显示,所得到的EMC与商业的契达EMC风味和感官特性都很相似,并且都同样接近于天然的契达干酪<sup>[12]</sup>。李飞等在实验中研究了使用复合风味蛋白酶与脂肪酶制作EMC的工艺。通过测定EMC的蛋白和脂肪降解程度,确定了工艺的最佳参数(酶添加量、水解温度、水解时间),从而得到了风味适宜的产品<sup>[13]</sup>。M Mohebbi等通过实验不同工艺参数下的EMC生产过程,建立了工艺参数和产品粘度的模型系统。可以将这种模型系统应用在生产过程中,通过测定特定产品的粘度来确定该产品潜在的工艺参数<sup>[14]</sup>。

### 2.2 商业酶对EMC风味的影响

在EMC的制作过程中,商业酶的性质和用量直接影响到产品的最终风味。Cliffe等在中性蛋白酶水解产生的苦味干酪浆中添加从乳酸乳球菌乳酸亚种(*L.lactis subsp*)分离得到的商业内切酶,结果发现,经过21.5h发酵后,苦味完全消失并且留下了契达干酪风味<sup>[15]</sup>。Wilkinson等同样在苦味干酪浆中添加三种肽酶KpNA-H, PepX和PepP,结果发现,在这三种肽酶的联合作用下苦味降低了40%<sup>[16]</sup>。Kieran Kilcawley等分别使用从枯草杆菌、米曲霉和黑曲霉提取的蛋白酶和肽酶水解干酪浆,然后在得到的四种EMC产品中添加从娄底青霉菌、毛霉菌、皱褶念珠菌和胰腺组织分离得到的商业脂肪酶,结果显示,四种产品的蛋白水解和脂肪水解程度不同,并表现出不一样的EMC风味<sup>[17]</sup>。Seble Sereke等使用中性蛋白酶分别和干酪乳杆菌胞内提取酶、去苦味酶、风味酶、脂肪酶混合制成EMC样品。对制得的几种EMC样品进行感官分析和RP-HPLC分析,结果显示加入去苦味酶和干酪乳杆菌提取酶的EMC样品苦味减少,而用风味酶制得的EMC具有苦味,脂肪酶生产的EMC具有酸败味<sup>[18]</sup>。Seung Yong Park等在EMC研究中使用了干酪乳杆菌粗提的胞内酶,结果显示,在干酪乳杆菌的内切氨基肽酶和脯氨酸氨基肽酶的作用下,有效降解了EMC中的苦味肽<sup>[19]</sup>。M B Habibi-Najafi等对消除β-酪蛋白水解后的苦味肽进行了研究。结果显示,从干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei ssp*)中粗提的脯氨酸二肽酶能够有效降解EMC中的苦味肽<sup>[20]</sup>。

### 2.3 微生物对EMC风味的影响

商业酶生产制得的EMC风味发展不一致,且很难模仿出天然干酪的风味,因此具有一定的局限性。发

酵剂在天然干酪成熟过程中被用来降解乳糖生成乳酸并产生风味物质。在EMC生产中使用乳酸菌来加速干酪浆成熟,这与添加商业酶以产生风味物质的原理相似。

Farkye介绍了一种使用乳酸菌加速干酪浆成熟的方法。结果显示,添加乳酸菌加速了干酪浆的成熟,促进了蛋白质的水解能力<sup>[21]</sup>。Bassem Bahy EL-DIN等在干酪浆研究中添加了经冷冻修饰的肠球菌(*enterococci*),结果显示,肠球菌具有很高的蛋白和脂肪水解活性,添加到干酪浆中后,明显增加了干酪浆的成熟指标,和对照样品相比,水溶性氮含量和游离氨基酸水平更高<sup>[22]</sup>。Lee研究使用了有活力的和热激修饰的瑞士乳杆菌用来改善契达EMC的风味。结果显示,EMC的二级蛋白水解程度增强,添加热休克瑞士乳杆菌还增加了挥发性短链脂肪酸等风味物质<sup>[23]</sup>。

### 3 结束语

随着国人对干酪营养价值、风味的认同度不断提高,干酪作为配料,越来越广泛地应用于食品加工中。EMC则因其独特的风味与加工特性,且相比天然干酪具有添加量少、产品质量改善作用更显著的特点,作为天然增味物被广泛应用于焙烤食品、重制干酪等食品中,而我国目前主要依赖进口。相信通过乳品科技工作者对EMC风味的深入研究,通过改善工艺条件、添加弱化处理的微生物细胞等一系列手段,定能生产出风味良好的EMC产品,推动我国乳制品的多样化发展。

### 参考文献

- [1] 郭本恒. 干酪:现代乳品加工技术丛书[M]. 北京:化学工业出版社,2003:263.
- [2] BUHLER TJ. Natural dairy concentrates going beyond flavor[J]. Food Tech Europe,1995(3):56-58.
- [3] Cliffe AJ, Law BA. Peptide composition of enzyme-treated Cheddar cheese slurries, determined by revers-phase high performance liquid chromatography[J]. Food Chemistry,1990,36:73-80.
- [4] Melchiorson CR, Jokumsen KV, Villadsen J, et al. The level of pyruvate formate-lyase controls the shift from homolactic to mixed-acid product formation in *Lactococcus lactis* [J]. Appl Microbiology Biotechnology,2002,58:338-344.
- [5] Marilley L, Casey MG. Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains [J]. International Journal of Food Microbiology,2004,90:139-159.
- [6] 褚中秋,吕加平,任星环. 干酪的成熟及其风味物质[J]. 中国乳品工业,2006,34(12):42-45.
- [7] McSweeney PLH, Sousa MJ. Biochemical pathways for the production of flavor compounds in cheese during ripening: a review[J]. Dairy Science and Technology,2000,80:293-324.
- [8] Ishibashi N, Ono I, Kato K, et al. Role of the hydrophobic amino acid residue in the bitterness of peptides[J]. Agricultural & Biological Chemistry,1988,52:91.
- [9] Alder-Nissen J. Proteases[M]. Enzymes in Food Processing. London:T. Nagodawitha and G. Reed(Eds.),1993:159-203.
- [10] Wilkinson MG, Kilcawley K N. Enzyme modified cheese flavour ingredients[R]. Moorepark End of Project Report,1999: DPRC No.10.
- [11] Freund PR. Cheese flavours ripen into maturity [J]. International Food Ingredients,1995(5):35-37.
- [12] Kilcawley KN, Wilkinson M G, Fox P F. A novel two-stage process for the production of enzyme-modified cheese[J]. Food Research International,2006,39:619-627.
- [13] 李飞,刘宁. 复合风味蛋白酶与脂肪酶制作酶改性干酪[J]. 食品工业科技,2008,29(9):218-221.
- [14] M Mohebbi, J Barouei, MR Akbarzadeh-T, et al. Modeling and optimization of viscosity in enzyme-modified cheese by fuzzy logic and genetic algorithm[J]. Computers and Electronics in Agriculture,2008,62(2):260-265.
- [15] Cleffe AJ, Law BA. Peptide composition of enzyme-treated Cheddar cheese slurries, determined by revers-phase high performance liquid chromatography[J]. Food Chemistry,1990,36:73-80.
- [16] Wilkinson MG. Acceleration of cheese ripening[M]. In cheese: chemistry, physics and microbiology. Chapman & Hall, London: Fox P F,1993:523-556.
- [17] Kilcawley KN, Wilkinson MG, Fox PF. Determination of key enzyme activities in commercial peptidase and lipase preparations from microbial and animal sources[J]. Enzyme and Microbial Technology,2002,31:310-320.
- [18] Seble Sereke Berhan Haileselassie. Production of enzyme-modified cheese and bioactive peptides by lactobacillus and commercial enzymes[D]. Montreal, Quebec, Canada: Department of Food Science and Agricultural Chemistry Macdonald Campus of McGill University,1999:53-60.
- [19] Seung Yong Park, Bernard F Gibbs, Byong H Lee. Effects of crude enzyme of *Lactobacillus casei* LLG on water-soluble peptides of enzyme-modified cheese[J]. Food Research International,1995,28:43-49.
- [20] MB Habibi-najafi, BH Lee. Debittering of tryptic digests from  $\beta$ -casein and enzyme modified cheese by X-prolyl dipeptidylpeptidase from *Lactobacillus Casei ssp. Casei*. Llg[J]. Iranian Journal of Science & Technology,2007,31:263-270.
- [21] Farkye Nana Y, Madkor Sabry A, Atkins Harrieff G. Proteolytic abilities of some lactic acid bacteria in a model cheese system[J]. International Dairy Journal,1995(7):715-725.
- [22] Bassem Bahy EL-DIN, Morsi EL-SODA, Nihal EZZAT. Proteolytic, lipolytic and autolytic activities of *enterococci* strains isolated from Egyptian dairy products[J]. Dairy Science and Technology,2002,82:289-304.
- [23] BH Lee, KN Kilcawley, JA Hannon, et al. The use of viable and heat-shocked *Lactobacillus Helveticus* DPC 4571 in enzyme-modified cheese production[J]. Food Biotechnology,2007,21:129-143.