

# 红曲霉在类 Camembert 干酪生产中的应用研究

孙颜君<sup>1</sup>, 孙颜杰<sup>2</sup>

(1. 乳业生物技术国家重点实验室, 光明乳业股份有限公司, 上海乳业生物工程技术研究中心, 上海 200436;  
2. 新乡医学院三全学院, 河南新乡 453000)

**摘要:**从红曲类食品中分离出一株高产色素, 不产桔霉素的红曲霉菌种 R-15, 以红曲霉 R-15 替代白霉用于类 Camembert 干酪生产。以传统 Camembert 干酪为对照, 研究红曲霉 R-15 对类 Camembert 干酪成熟过程中(28 d)水分含量、pH、蛋白水解程度和挥发性风味物质的影响。结果表明, 成熟过程中, 对照和红曲霉干酪表皮和中心的水分含量不断降低, 并在接近 28 d 时趋于稳定; 两种干酪 pH 在干酪成熟过程中先降低后升高, 且干酪表皮 pH 以及变化范围都显著大于中心部位( $p < 0.05$ ); 成熟后期, 对照样品的表皮和中心处 pH4.6 酸可溶性氮含量分别显著高于红曲霉干酪( $p < 0.05$ ), 且成熟 14~21 d 期间, 两种干酪的 12% 三氯乙酸可溶性氮含量增加速率最快。红曲霉干酪成熟过程中产生主要挥发性物质共 35 种, 包括酮类、醛类、酸类、醇类和酯类等, 各类物质的种类和含量都有别于对照样品。

**关键词:**红曲霉, 类 Camembert 干酪, 蛋白水解, 挥发性风味物质

## Application of *Monascus* in the production of camembert imitation

SUN Yan-jun<sup>1</sup>, SUN Yan-jie<sup>2</sup>

(1. State Key Laboratory of Dairy Biotechnology, Bright Dairy and Food Co., Ltd.,  
Shanghai Engineering Research Center of Dairy Biotechnology, Shanghai 200436, China;  
2. San Quan College of XinXiang Medical University, Xinxiang 453000, China)

**Abstract:** *Monascus* R-15 with high yield of red pigment and low content of citrinin was selected from monascus products. The objective of this study was to evaluate the effect of R-15 on the proteolysis and volatile of camembert imitation during the ripening period(28 days). The moisture content of all the cheeses decreased and came to a stable value at the end of ripening time. pH increased at the beginning of the ripening period and then decreased. Moreover, pH of the rind part was significantly higher than the core of the cheeses ( $p < 0.05$ ); As the ripening period was prolonged, camembert presented the higher value of pH4.6 ASN than *monascus* cheese; During the ripening period of 14~21 days, TCA-SN increased rapidly; About 35 kinds of volatile substances (including ketones, aldehydes, acids, alcohols and esters ect.) were produced by the monascus cheese and were quite different from the camembert.

**Key words:** *Monascus*; camembert imitation; proteolysis; volatile

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2016)13-0167-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2016.13.025

Camembert 干酪是世界上最著名的干酪之一, 为一种软质的表面霉菌成熟干酪, 起源于法国诺曼底。Camembert 生产工艺包括原料乳杀菌、接种发酵、凝乳、切割、入模、排除乳清、盐浸、接种霉菌发酵剂和成熟等工序<sup>[1]</sup>。卡门培尔干酪青霉(*Penicillium*)和白青霉(*Penicillium candidum*)是 Camembert 干酪中特

有的霉菌, 用于促进干酪成熟, 有助于干酪形成柔软的质地和特有的风味<sup>[2]</sup>。由于饮食和消费习惯差异, 亚洲消费者对于天然干酪, 尤其是天然霉菌干酪的接受程度较低, 市场容量较小。

关于 Camembert 干酪, 国内外已有大量的研究, 主要集中于成熟过程中干酪的理化和风味变化。关

收稿日期: 2015-12-08

作者简介: 孙颜君(1988-), 女, 硕士, 研究方向: 乳品科学与加工, E-mail: 15921569362@163.com。

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划课题(2013BAD18B02)。

[16] 孙家凯, 吴晓娇, 史建明, 等. pH 对大肠杆菌发酵产亮氨酸的影响[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(3): 56-60.

[17] 何瑞. 一株好氧性纳西杆菌(*Naxibacter* sp.SD-09)的产纤维素酶特性研究[D]. 长春: 东北师范大学, 2012.

于 Camembert 干酪成熟用霉菌也有一定的研究,刘南<sup>[3]</sup>等从中国传统食品——腐乳和臭豆腐中筛选出了六株霉菌,并确定了适合制作 Camembert 干酪的一株毛霉和帚状地霉,这两株霉菌混合成熟的干酪质地柔软,且比国外采用 *Penicillium* 和 *Penicillium candidum* 生产的干酪风味更柔和,更能被中国人接受。

红曲霉在中国已有上千年的应用历史,主要用于红曲米(粉)、红曲酒和醋等传统食品,红曲类产品因其天然红色的色泽、特有的风味广受中国消费者欢迎。近年来,红曲霉发酵产生的次级代谢产物由于具有降低胆固醇、降血压等功效而备受关注,主要次级代谢产物有莫纳克林 K、 $\gamma$  氨基丁酸等<sup>[4]</sup>。因此可考虑将红曲霉替代其他霉菌用于 Camembert 干酪的生产,制作出一款适合亚洲消费者口味和具有中国特色的天然干酪产品。这不仅丰富了天然干酪的品类,且对于中国天然干酪的开发具有重要意义。目前尚未有任何关于红曲霉应用于天然干酪的研究。本实验从中国传统红曲产品中筛选出一株高色素无桔霉素毒素的菌株,研究其在干酪成熟过程中对 Camembert 干酪理化和风味的影响,为红曲霉在天然干酪中的应用研发提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

新鲜牛乳 光明乳业华东中心工厂;红曲米粉 福建咕咕鲜食品有限公司;红曲米 浙江农家采集;酵母粉葡萄糖氯霉素琼脂(YGC)培养基和马铃薯葡萄糖培养基(PDB) 青岛瑞水生物科技有限公司;Camembert 专用乳酸发酵剂(MA14),Camembert 专用霉菌发酵剂(PC12 和 GEO17)和凝乳酶 Marzyme 150 丹尼斯克(中国)有限公司。

干酪槽,干酪切割刀和干酪模具 APV 中国有限公司;恒温恒湿培养箱 上海一恒科技有限公司;pH 计 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;Foss2300 全自动凯氏分析定氮仪 瑞典福斯分析仪器有限公司;奥林巴斯光学显微镜 IX71 日本奥林巴斯株式会社;水分测定仪 奥豪斯仪器(上海)有限公司;5975GC/MS 气质联用仪 美国安捷伦科技有限公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 桔霉素含量测定 参考标准 GB/T 5009.222 《红曲类产品中桔青霉素的测定》<sup>[5]</sup>。

1.2.2 色价的测定 参考标准 GB 4926-2008 《食品添加剂红曲米(粉)中色价的测定方法》<sup>[6]</sup>。

1.2.3 红曲霉的培养和形态学鉴定 从不同地域采集的红曲产品中分离红曲霉 15 株,在 YGC 培养基上进行连续多次划线分离,挑选早期菌落为白色,后期为红色或者紫色的单菌落,编号分别为 R1-R15,挑取单菌落于 YGC 平面培养基中培养 3 d(30 ℃),观察菌体生长状态,并在显微镜下观察菌株形态。同时进行 YGC 斜面培养红曲霉菌株,30 ℃ 培养 10 d,培养结束后在斜面上加入少量灭菌生理盐水,并用玻璃珠进行震荡以洗脱孢子,取孢子悬浮液稀释一

定梯度后,吸取少量加入 PDB 培养基中,在 30 ℃,180 r/min 下培养 10 d 后取发酵液测定桔霉素和色素。

1.2.4 菌株的鉴定 采用聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction,PCR)方法进行回收产物纯化后测序。根据杨成龙<sup>[7]</sup>已经报道的红曲霉特异性引物 ITS 基因扩增:ITS 序列采用通用引物 ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) 和 ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) 进行扩增。PCR 扩增 28S rDNA 转录间隔区目的片段。ITS-PCR 扩增程序为:96 ℃ 预变性 1 min;96 ℃ 变性 30 s,50 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 90 s,共 35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min;4 ℃ 保存。PCR 产物回收后测定,PCR 产物测序委托生工生物工程(上海)有限公司完成。

### 1.2.5 表面霉菌成熟干酪的制作

1.2.5.1 霉菌孢子悬浮液的制备 *Penicillium* 和 R15 都于 PDA 斜面培养基 30 ℃ 培养 7 d,直至孢子生成。用无菌水冲洗斜面,经八层无菌纱布过滤,并利用血球计数板将孢子浓度调为  $10^6$ /mL。

1.2.5.2 干酪制作工艺 传统 Camembert 干酪制作参考 Boutrou 和 Linton<sup>[8]</sup>的方法,工艺流程如下:

新鲜牛奶→巴氏杀菌(72 ℃,15 s)→冷却至 32 ℃→接种发酵剂→待 pH 下降 0.2 后添加凝乳酶,凝乳 30~40 min→切割排乳清→成型(15 ℃,相对湿度 90%~95% 过夜)→盐渍→接种霉菌(孢子数为  $10^6$ /mL)→成熟 28 d(15 ℃,相对湿度 90%~95%)。

如上工艺得到的 Camembert 干酪作为对照样品。红曲霉干酪制作参考如上工艺并略加调整,其接种霉菌孢子数为  $10^6$ /mL 的 R15 发酵液,并于 25 ℃,相对湿度 90%~95% 条件下成熟 28 d。

1.2.6 干酪成熟过程中指标的测定 在 Camembert 干酪成熟过程中,霉菌只在干酪表面生长,因此干酪表面和内部呈现不同的性质。具体参考 IDF NO 261<sup>[9]</sup> 中干酪取样方法(图 1),将一块干酪根据成熟情况分为中心(A 处)和表皮(B 处)两个部位,于 A 和 B 处分别取样进行分析。

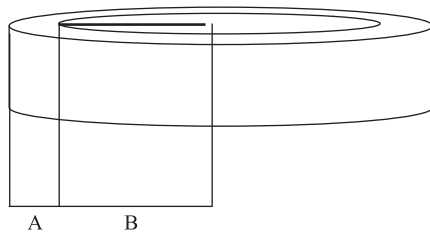


图 1 干酪取样示意图

Fig.1 Schematic of sampling the cheese

本研究中,白霉干酪的中心部位简称 CC,边缘部位 CR;红曲霉干酪的中心部位 RC,边缘部位 RR。

1.2.6.1 pH 测定 干酪的表皮和中心各取 1 g 样品,将样品与 10 mL 蒸馏水混合并用高速剪切机于 12000 r/min 下剪切 1 min,成为干酪浆,测定干酪浆的 pH。

1.2.6.2 水分含量的测定 采用水分测定仪进行测试,干酪表皮和中心分别取样 3 g,置于干燥恒重的

铝箔盘上。测定温度为 180 ℃, 读数稳定后, 记录样品的水分含量, 每个样品测定三次并取平均值作为最终测定结果。

1.2.6.3 pH4.6 酸可溶性氮 (pH4.6 acid-soluble nitrogen, pH4.6 ASN) 的测定方法 参考孙卓等的方法略加改进<sup>[11]</sup>。准确称取 1.5 g 干酪, 加入 50 mL pH 为 4.6 的醋酸盐缓冲液, 采用高速剪切机在 12000 r/min 条件下剪切 1 min, 再用 50 mL 的缓冲液冲洗, 悬浮液在 4000 r/min 的离心机中离心 20 min。取上清液进行凯氏微量定氮, 并以占干酪总氮量的百分数表示。进行三次平行实验, 结果为平均值。

1.2.6.4 12% 三氯乙酸溶液中可溶性氮 (12% Trichloroacetic acid, 12% TCA-SN) 的测定方法 参考孙卓等的方法略加改进<sup>[11]</sup>。准确称取 1.5 g 干酪, 加入 25 mL 12% 的 TCA 溶液, 匀浆。再用 25 mL 的缓冲液充分冲洗, 取上清液进行微量凯氏定氮, 并以占干酪总氮量的百分数表示。进行三次平行实验, 结果为平均值。

1.2.6.5 干酪成熟期间风味物质的测定 样品处理: 分别在干酪成熟期的 1、7、14、21 和 28 d 取样, 进行冷冻干燥后与等量的无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 混合碾碎至样品混合物为粉状, 迅速将样品装入 15 mL 的样品瓶内, 制备后加盖封口。将 SPME 萃取头在气相色谱进样口老化 2 h (温度 250 ℃), 将老化好的萃取头插入样品瓶顶空部分, 在 60 ℃ 条件下超声波萃取 30 min, 按以下条件进行 GC-MS 分析。

色谱条件: 分离柱: OV1701, 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm; 进样口温度: 250 ℃; 载气: He; 载气流速: 0.8 mL/min 程序升温: 33 ℃, 3 min; 以 10 ℃/min 升至 42 ℃; 以 5 ℃/min 升至 140 ℃; 以 18 ℃/min 升至 240 min, 保持 8 min。质谱条件: 离子源温度: 200 ℃; 传输线温度: 250 ℃; 检测气电压: 350 V; 离子化模式: EI<sup>+</sup>; 发射电流 200 μA; 电子能: 70 eV; 数据采集: 全扫描。

数据分析: 采用 Agilent G1701 MSD Productivity Chemstation 工作站进行图谱的定量分析。

### 1.3 数据分析和处理

每组实验重复测定 3 次, 最后结果以均值 + 标准方差 (mean ± SD) 表示。采用 SPSS 18.0 软件对实验结果在  $p < 0.05$  水平上的显著性进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 红曲发酵液中桔霉素和色价测定

红曲米中分离出的 15 株红曲霉菌株发酵过程中产生的桔霉素和色价如表 1。

红曲色素作为添加剂在各类食品中有着广泛的应用。近年来, 红曲色素广泛应用于发酵香肠中, 用来替代亚硝酸盐, 提高了产品的安全性<sup>[12]</sup>。早在 1931 年, 桔霉素已被证实可损害人体健康, 其毒性可与黄曲霉毒素 B1 相提并论<sup>[13]</sup>。由表 1 可知, 相同培养条件下, 不同红曲霉菌株的产色素和桔霉素能力不同。除菌株 R-15 外, 其余菌株都产生桔霉素, R-13 和 R-8 产桔霉素含量较高, 分别为 483 μg/L 和 247 μg/L。R-14 产色素能力最好, R-13 次之, 两

表 1 红曲霉发酵液中桔霉素和色素含量

Table 1 Production of citrinin and pigments by *Monascus* in liquid-state culture

编号	桔霉素含量 (μg/L)	色价 (U/mL)
R-1	25 + 1	5.31 + 0.12
R-2	13 + 2	4.26 + 0.14
R-3	65 + 5	5.01 + 0.09
R-4	132 + 8	5.30 + 0.19
R-5	41 + 2	1.97 + 0.15
R-6	36 + 3	3.91 + 0.28
R-7	56 + 5	2.73 + 0.17
R-8	247 + 10	5.25 + 0.16
R-9	39 + 3	3.69 + 0.09
R-10	72 + 6	5.00 + 0.29
R-11	6 + 1	1.96 + 0.26
R-12	165 + 11	5.32 + 0.13
R-13	483 + 10	5.69 + 0.09
R-14	16 + 2	5.75 + 0.17
R-15	-	5.55 + 0.14

注: “-”表示含量过低或未检出。

者色价分别为 5.75 U/mL 和 5.69 U/mL。对不同红曲霉产桔霉素和色价含量进行方差分析, 结果表明在 0.05 水平上差异显著 ( $p < 0.05$ )。R-15 用于干酪生产, 在 28 d 成熟周期中, 并未有桔霉素检出, 因此 R-15 认为是安全的, 可用于干酪的成熟。

红曲色素和桔霉素都属于红曲霉发酵后期产生的次级代谢产物, 两者的代谢途径开始都由一个乙酰辅酶 A 的参与下合成戊酮, 随后分开为两条途径, 一条由丁酮在丙二酰辅酶 A 的参与下合成戊酮, 最后产生红曲色素; 另一条途径由丁酮在乙酰辅酶 A 的参与下合成桔霉素中间体, 最后产生桔霉素, 因此红曲色素产生常伴随着桔霉素的产生<sup>[13]</sup>。

本研究中选用 PDB 培养基来研究红曲霉产桔霉素情况, 但仅用一种培养基不足以评价红曲霉产毒素情况。不同的培养条件下, 红曲霉产生红曲色素和桔霉素的能力也有差异。如改变培养基的氮源、加入短链酸<sup>[14]</sup>或改变培养过程的通风量等<sup>[15]</sup>。为确保红曲干酪产品的安全性, 本研究中还主要跟踪了红曲霉在干酪成熟过程中产桔霉素情况, 发现 R-15 在干酪成熟周期中并未有桔霉素产生。

### 2.2 菌株鉴定

2.2.1 菌种形态观察 R-15 于 YGC 培养基 30 ℃ 培养, 第 5 d 起该菌株开始产生色素物质, 菌落中心的颜色由初期的白色慢慢向红色转变, 菌落四周菌丝仍为白色。培养 7 d 后, 菌落直径约为 22 mm (图 2 中 a)。菌落为圆形, 平坦而稀疏, 平板正面观察菌落中间微隆起, 边缘整齐, 有放射状条纹, 质地致密, 表面有绒毛状菌丝; 反面观察菌落渗入周围培养基中。

显微特征: 由图 2 中 (b), 分生孢子由菌丝生出, 生在侧梗或者菌丝顶端; 分生孢子排列呈链状, 通常 2~6 个向基型生长, 单个孢子呈圆形或者梨形; 培养过程中有闭囊壳产生, 呈椭圆形, 单生在类似柄菌丝

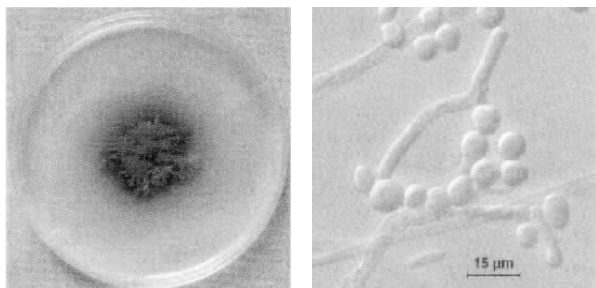


图2 红曲霉菌落(a)和孢子(b)显微观察图

Fig.2 Micro-morphology of *Monascus* colony (a) and spores (b) 上。根据 R-15 在培养基上的形态特征和孢子的显微特征,并与红曲霉属的特征相对比,两者基本吻合,初步判定 R-15 属于红曲霉属的真菌。

2.2.2 菌株生物学鉴定 以 R-15 基因组为模板进行 PCR 扩增,得到长度为 544 bp 的片段,与 Genbank 中其他红曲霉菌株进行比对和同源性分析,并筛选相似菌株的 ITS 序列进行系统发育树的构建(图 3)。结果表明,该菌株与红色红曲霉 (*Monascus ruber*)、紫色红曲霉 (*Monascus purpureus*)、丛毛红曲霉 (*Monascus pilosus*) 都有较高的同源性。综合形态特征和 ITS 序列分析,鉴定 R-15 为紫色红曲霉。

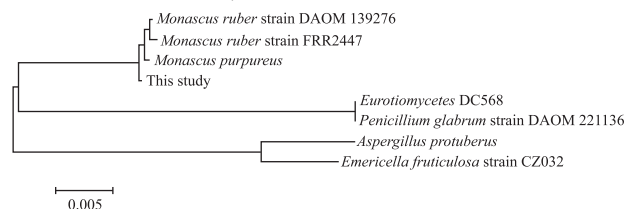


图3 基于 ITS 序列构建的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree based on ITS sequences

### 2.3 干酪成熟过程中指标的测定

2.3.1 水分含量测定结果 成熟 1~20 d 期间,干酪表皮和中心的水分含量不断降低,且在 1~7 d 下降速率最快(图 4)。成熟第 7 d 结束,CR,CC,RR 和 RC 水分含量分别下降至 57.24%, 57.65%, 56.49% 和 56.80%。随后至 21 d,水分含量进一步下降,并在接近 28 d 时趋于稳定,此时 RR 和 RC 的水分含量分别为 52.33% 和 53.65%,均低于白霉干酪。整个成熟期间,两种干酪的表皮水分含量显著低于中心部位 ( $p < 0.05$ )。

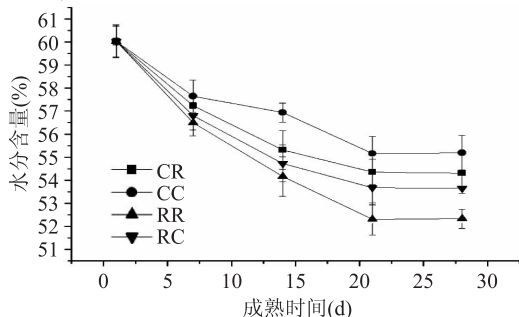


图4 干酪成熟期间水分含量的变化

Fig.4 Change of water content during ripening period

干酪的水分含量不仅影响出品率,且对奶酪成熟过程中质量的控制具有重要意义。在 1~7 d 成熟

期,干酪表面水分迅速蒸发,导致表皮和中心水分含量大量下降,成熟 7 d 后霉菌逐渐覆盖干酪表面,从而降低了表面水分蒸发率,但由于霉菌生长消耗水分,所以水分还会进一步下降。在 7 d 以后成熟期中,白霉干酪表皮和中心水分含量都高于红曲霉干酪,这可能是因为白霉生长情况优于红曲霉,能够更好的覆盖干酪表面,防止水分挥发。成熟 20 d 后,霉菌进入缓慢生长期,且干酪表面开始形成一层薄壳,干酪的表皮和中心水分含量逐渐趋于稳定。

2.3.2 成熟过程干酪 pH 变化 pH 是影响干酪品质的重要因素之一,pH 与干酪成熟期间质构变化密切相关。图 5 为干酪在 28 d 内的 pH 变化情况。成熟 1~7 d 中,干酪表皮和中心的 pH 不断下降,降低至 4.2~4.3 左右开始升高。两种干酪的表皮 pH 变化范围显著大于中心部位,如整个成熟期间,CC 的 pH 变化幅度为 1.69,CR 为 1.29。在成熟终点处,RR 的 pH 显著高于 RC、CC 和 CR ( $p < 0.05$ ),而 RC、CC 和 CR 之间 pH 差异不显著 ( $p > 0.05$ )。

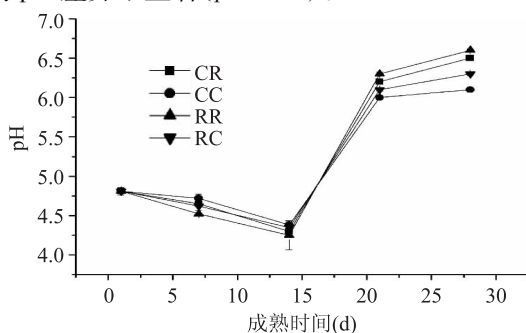


图5 成熟过程中干酪表皮和中心 pH 变化

Fig.5 pH change of cheese rind and core during the ripening period

霉菌干酪成熟过程中,pH 呈现先降低后升高的趋势。霉菌干酪成熟初期,表皮和中心的乳酸菌优先开始生长,不断的消耗干酪中脂肪和乳糖,代谢产生乳酸盐和脂肪酸,造成 pH 降低<sup>[16]</sup>。随着成熟时间的增加,霉菌不断在表面生长并产生蛋白水解酶,促进蛋白水解并产生较多的  $\text{NH}_4^+$ ,造成干酪表皮 pH 增加,干酪表面和内部的 pH 形成梯度差,内部乳酸向表皮扩散,同时  $\text{NH}_4^+$  也会由表皮向中心渗透,内部 pH 逐渐上升。*P.camemberti* 菌丝生长和孢子萌发的过程中会消耗乳酸盐,但乳酸菌生长过程中会产生乳酸盐,因此干酪表面的乳酸盐浓度会受到乳酸和霉菌孢子数的影响<sup>[17]</sup>。Leclercq P<sup>[2]</sup> 研究 Camembert 干酪成熟发现,成熟第 6 d 至终点,干酪表面和中心的 pH 不断上升,乳酸盐浓度降低,生物胺的含量增加。

由于霉菌主要在干酪表面生长,因此干酪表面的 pH 变化较中心部位有更大的变化。表面霉菌成熟干酪中,pH 的变化会影响干酪的质构和持水性,大量关于 Camembert 干酪研究已经表明,pH 升高有利于霉菌干酪形成较为柔软的质地。较高的 pH 条件下,磷酸钙很快超出其溶解阈而在干酪表面析出,形成磷酸钙浓度梯度,中心的可溶性磷酸钙开始不断向表皮扩散并析出,从而在干酪表面形成一层较

硬的外壳。而干酪内部由于  $Ca^{2+}$  浓度降低, 质地变得柔软顺滑。一些中性蛋白酶和脂肪酶的活性与 pH 密切相关, 因此 pH 的改变也会影响这些酶水解蛋白和脂肪的能力, 从而影响干酪的风味。由图 5 可知, 白霉干酪的中心和表皮 pH 都显著高于红曲霉干酪, 这也可能是造成两种干酪风味存在差异性的原因之一。

**2.3.3 成熟过程中干酪 pH4.6 ASN 值变化** 干酪成熟前, 白霉和红曲霉干酪的 pH4.6 ASN 值差异不显著 ( $p > 0.05$ )。但是随着成熟进行, CR 显著高于 RR ( $p < 0.05$ ), 且成熟前 7 d 中, CR 和 RR 的 pH4.6 ASN 增加速率较快, 随后趋于平缓。由图 5 可知, RR 的 pH4.6 ASN 在整个成熟周期中都高于 RC; 在成熟前期, CR 比 CC 有较高的 pH4.6 ASN 值, 但在成熟终点时两者的 pH4.6 ASN 逐渐接近。

表面霉菌干酪中蛋白水解会受到不同种类的蛋白水解酶影响, 包括发酵剂中微生物产生酶、凝乳酶、牛乳中纤溶酶, 最重要的为成熟过程中霉菌产生的内源和外源性蛋白酶。酪蛋白被蛋白酶水解后产生的肽可溶于 pH4.6 醋酸缓冲溶液, 其他形式的氮溶解量非常少, 因此可用 pH4.6 ASN 反映干酪成熟过程中酪蛋白水解情况<sup>[18]</sup>。CR 和 RR 在前 15 d 成熟周期中 pH4.6 ASN 速率先增加后降低, 表明此期间, 主要是酪蛋白水解为长链肽。由于白霉和红曲霉只在干酪表面生长, 因此干酪内部的酪蛋白水解速率处于缓慢增加状态, CC 和 RC 直至成熟 28 d 后 pH4.6 ASN 速率才开始下降, 且低于表面酪蛋白水解值。由图 5 可知, 白霉表面和中心的 pH4.6 ASN 分别高于红曲霉干酪, 这表明白霉比红曲霉有更强的酪蛋白水解能力。

**2.3.4 成熟过程中干酪 12% TCA-SN 值变化** TCA-SN 可反映干酪中酪蛋白水解产生的短肽和氨基酸氮的多少。白霉和红曲霉干酪的表皮 TCA-SN 值在 1~7 d 成熟期内迅速增加, 中心部位 TCA-SN 变化较小; 在 14~21 d 中, 两种干酪的表皮和中心 TCA-SN 增长速率达到最大值。由图 6 可知, 在前 7 d 成熟期中, 两种干酪的表皮和中心 TCA-SN 程度相近, 随后白霉干酪 TCA-SN 值增加速率迅速升高, 这表明白霉干酪中产生的肽酶和氨基酸酶的活力较红曲霉强。成熟 14 d 后, CR 的 TCA-SN 值大于 RR; 在 21~28 d 成熟期中, RR 和 RC 的 TCA-SN 值差异逐渐减小。

两种干酪的表皮和中心在成熟 7~14 d 周期中 TCA-SN 有较快的增加速率, 表明此阶段酪蛋白水解产生的长链肽发生了近一步的水解, 产生了短肽和氨基酸等。刘楠<sup>[3]</sup>采用毛霉和帚状地霉制作干酪, 发现在 0~20 d 期间 TCA-SN 增加较为平稳, 20~30 d 期间增加速率最大, 且在 25~30 d 期间增加速率大于 pH4.6-SN, 说明在成熟后期主要产生了短肽和小肽。酪蛋白降解产生的长链肽中, 有部分疏水肽会产生苦味, 从而对于干酪风味产生不良影响, 因此应避免这些长链肽在干酪中过高的积累, 加速长链肽分解为相应的短肽和氨基酸的过程, 以提高和改善干酪的风味<sup>[19]</sup>。

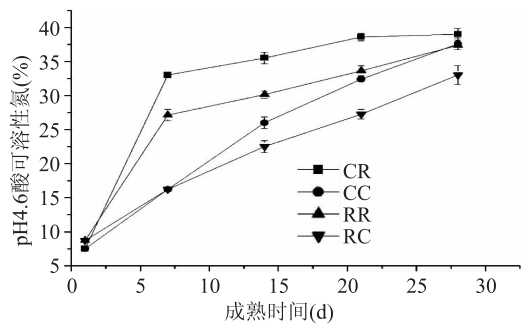


图 6 成熟过程中干酪 pH4.6 可溶性氮含量变化

Fig.6 pH4.6 acid-soluble nitrogen change of cheese during the ripening period

综上, penicillium 比 monascus 有更强的蛋白水解能力, 因此白霉干酪比红曲霉干酪有较高的 TCA-SN 值。霉菌产生的蛋白水解酶只在产生部位发生催化作用, 而不会进行迁移, 因此霉菌干酪中心部位的酪蛋白水解程度和水解速率通常较低, 但肽酶等产生的小肽和氨基酸类却可以由干酪的表面向中心迁移, 从而提高中心的 TCA-SN 值, 这是红曲霉干酪成熟终点中心和表面 TCA-SN 逐渐接近的原因。

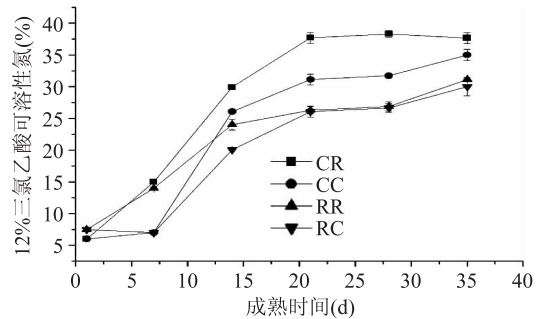


图 7 成熟过程中干酪 12% 三氯乙酸可溶性氮含量变化

Fig.7 12% trichloroacetic acid nitrogen change of cheese during the ripening period

**2.3.5 成熟过程中干酪中挥发性风味物质测定结果** 红曲霉干酪在成熟过程中产生的主要挥发性风味物质共 35 种, 其中有酮类 5 种、醛类 3 种、酸类 12 种、醇类 3 种、酯类 4 种、内酯类 3 种, 硫化物、杂环和烷烃类各一种。

关于白霉干酪成熟过程中风味的研究, 已有大量文献报道。表 2 为 1~4 周成熟期中, 红曲霉干酪各类挥发性风味物质成分所占比例。酸类物质在 4 周内占挥发性物质比例分别为 79.62%, 97.84%, 93.24% 和 90.99%, 在成熟 2 周时达到最大值。在 4 周成熟过程中, 酮类物质含量先降低后增加, 主要为 2-辛酮。红曲霉干酪成熟初期, 酯类物质占挥发性风味物质比例为 16.338%, 成熟 4 周后降低至 1.565%。内酯类在整个成熟期内占比约为 0.5%~2.08%, 主要包括  $\gamma$ -十一内酯,  $\delta$ -癸内酯和  $\delta$ -戊内酯三种, 这些内酯类在 Camembert 成熟期间对其风味有主要贡献, 主要为水果香味, 如桃子和杏的香味。在干酪成熟初期产生醛类物质, 主要为苯乙醛、戊醛和十六醛三种, 其中苯乙醛具有苦杏仁香味。红曲霉干酪中硫化物产生量较小, 仅在成熟后期检出, 约

表2 红曲霉干酪成熟过程中挥发性风味物质含量

Table 2 Production of volatiles in *Monascus* cheese during the ripening period

占比(%)	成熟时间(d)			
	7	14	21	28
酮	2.29 + 0.16	0.775 + 0.07	1.855 + 0.11	3.865 + 0.21
醇	0.16 + 0.01	0.045 + 0.00	0.075 + 0.01	0.245 + 0.00
酸	79.62 + 4.17	97.845 + 2.35	93.245 + 4.67	90.995 + 7.54
醛	0.39 + 0.04	0.205 + 0.01	0.395 + 0.05	0.965 + 0.09
酯	16.39 + 2.46	0.555 + 0.05	3.265 + 0.16	1.565 + 0.12
内酯	1.15 + 0.05	0.525 + 0.02	1.075 + 0.13	2.085 + 0.19
杂环	-	-	-	0.145 + 0.02
硫化物	-	-	-	0.175 + 0.03
烷烃	-	0.075 + 0.00	0.135 + 0.02	-

注：“-”表示含量过低或未检出。

占所有挥发性风味物质比重的 0.165%。酸类物质主要为肉豆蔻酸和棕榈酸,由于长链脂肪酸(> C12)的阈值较高,因此两者对于干酪的主题风味并没有主要影响。

对比文献中白霉干酪挥发性风味分析结果<sup>[20]</sup>,主要是酮类、酯类和硫化物种类不同于红曲霉干酪。白霉成熟干酪如 Camembert 和布里干酪成熟一周后产生甲基酮。此外, *Penicillium* 可通过  $\beta$ -氧化长链脂肪酸,产生 2-壬酮和 2-庚酮,2-庚酮会产生类似于蓝纹干酪的风味,2-壬酮具有水果香气,且白霉干酪成熟过程中产生的 3-甲基-2-戊酮可赋予产品天然发酵的醇香;白霉干酪成熟过程中产生很多酯类物质,表征为水果和植物芳香,其中乙酸苯乙酯和丙酸苯乙酯对风味贡献较大。硫化物呈现大蒜的辛香味道,在 Camembert 干酪中,棒状杆菌被认为是产生硫化物的主要来源。硫化物含量的差异是红曲霉干酪风味较 Camembert 干酪风味柔和的主要原因。

### 3 结论

3.1 红曲霉干酪成熟过程中并未检测到桔霉素含量,因此 R-15 可用于干酪的生产。

3.2 红曲霉和 Camembert 干酪成熟过程中,由于蒸发作用,水分含量不断降低;白霉干酪蛋白水解速率较快,且蛋白水解率较高,这导致在成熟周期中两种干酪呈现出不同的 pH、pH4.6 ASN 和 TCA-SN 值。与白霉干酪相比,红曲霉干酪成熟过程中,产生的挥发性风味物质中主要酮类、酯类和硫化物种类不同于白霉干酪,其中硫化物产量低于白霉干酪。

#### 参考文献

- [1] 蒋爱民,杨小姣.卡门培尔(Camembert)干酪加工工艺研究[J].食品工业,2005,(1):21-23.
- [2] Leclercq P, Thiverval G. Camembert, Brie, and Related varieties[J]. Encyclopedia of Dairy Sciences(Second Edition), 2011,773-782
- [3] 刘南.毛霉和帚状地霉在类 Camembert 干酪中的应用[C].无锡:江南大学,2004:31-32.
- [4] 丘振宇,王亚琴,许喜林.红曲霉中 MonacolinK 的应用研究[J].中国酿造,2007,5:4-6
- [5] GB/T 5009.222,红曲类产品中桔青霉素的测定[S].2008.

[6] GB 4926,食品添加剂红曲米(粉)中色价的测定方法[S].2008.

[7] 杨成龙,陈章斌,吴小平,等.基因组 ITS 序列分析鉴定红曲霉菌株[J].核农学报,2015,29(2):252-259.

[8] Boutrou R, Molle D, Leonil J. Action of the lactococcal proteinase during Camembert-type curd making[J]. International dairy journal,2001(11):347-354.

[9] IDF No.261, Chemical methods for evaluation of proteolysis in cheese maturation[S],1991.

[10] QB/T 2847,轻工标准:功能性红曲米(粉)[S],2007.

[11] 孙卓.切达干酪促进成熟方法及其质量控制技术研究[C].北京:青岛农业大学,2011:25-26.

[12] 贾娟,张军.红曲霉菌的应用研究[J],农产品加工:学刊,2005,1:25-28.

[13] Hassan H, Blancphili P, Grousac E, et al. Kinetic analysis of red Pigment and citrinin Production[J]. Enzyme and Microbial Technology,2000,27:619-625.

[14] 李燕萍,许杨,徐尔尼,等.红曲菌的抑菌活性物质与桔青霉素[J],卫生研究,1998,27:75-78.

[15] Hassan H, Groussac E., Gerard J, et al. Improvement of red pigment/citrinin production ratio as a function of environmental conditions by *Monascus ruber* [J], Biotechnology and Bioengineering,1999,64(4):497-501.

[16] Delgado F J, González C J, Cava R, et al. Changes in the volatile profile of a raw goat milk cheese treated by hydrostatic pressure at different stages of ripening[J]. International Dairy Journal,2011,21:135-141.

[17] Patrick F. Fundamentals of cheese Science[M], USA: Aspen publishers, 1999:1154-1158.

[18] Sousa M J, Ardo Y, McSweeney P L H. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening [J]. International Dairy Journal,2001,11:327-345.

[19] Hamilton J S, Hill R D, Leeuwen V. A bitter peptide from cheddar cheese[J]. Agriculture biology chemistry,1974,38(2):375-379.

[20] Sousa M J, Surface mold - ripened cheese variety, Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition) [M]. London: Elsevier Science Ltd.,2014:1122-1130.