

响应面法优化双蛋白干酪加工工艺

万俊¹, 蒋爱民², 曲直², 谭淑君², 尹凯丹¹

(1. 广东农工商职业技术学院热作系, 广东广州 510507) (2. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 根据 Box-Behnken 中心组合实验设计原理, 采用 4 因素 3 水平响应曲面分析法, 以凝乳效果为响应值建立二次多项回归模型, 并验证模型的有效性。实验结果表明: 双蛋白干酪最佳制作工艺为豆乳添加量为 20% (V/V), 氯化钙添加量 0.04%, 凝乳酶添加量为 0.02%, 凝乳温度为 32 °C。在此条件下, 理论凝乳效果得分为 87.67, 验证值为 88.00。

关键词: 响应面; 双蛋白干酪; 凝乳效果

文章编号: 1673-9078(2012)8-1013-1017

Optimization of Processing Technology of Double

Protein Cheese by Response Surface Method

WAN Jun¹, JIANG Ai-min², QU Zhi², TAN Shu-jun², YIN Kai-dan¹

(1. Department of Tropical Crop, Guangdong AIB Polytechnic College, Guangzhou 510570, PR China)

(2. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, PR China)

Abstract: According to Box-Behnken center combination experimental design principle, second multiple regression models were established using curd effect as response, and the effectiveness of the model was verified. The results showed that the best processing conditions for double protein cheese production were as follows: 20% (V/V) soybean milk, 0.04% calcium chloride, 0.02% curd enzyme and curd temperature 32 °C, under which the highest yield of curd effect reached with estimated value and verified value being of 87.67 and 88.00, respectively.

Key words: response surface; double protein cheese; curd effect

干酪以乳为原料, 经凝乳分离乳清而制得, 营养价值极高^[1~2]。有“东方干酪”之称的中国腐乳利用我国丰富大豆资源, 经磨浆制得豆乳, 凝结成型后利用毛霉发酵成熟而制得, 因风味独特, 质地柔软细腻, 味道鲜美深受我国人民喜爱^[3]。利用黄豆乳替代部分牛乳加工而成的双蛋白干酪, 可降低干酪的加工成本, 丰富干酪品种, 改善传统软质干酪风味, 均衡干酪营养, 缓解我国乳源不足, 对开拓我国干酪市场有一定的现实意义^[4]。

本文在系统研究典型霉菌成熟软质 Camembert 干酪工艺、成熟机理等基础上, 以牛乳和豆乳为原料, 结合传统 Camembert 干酪加工工艺, 以凝乳效果、乳清 OD 值、凝乳时间、产品得率等为观测指标, 在单因素实验的基础上利用 SAS 统计软件, 采取响应面法, 建立数学模型对双蛋白干酪的工艺条件进行优化。

收稿日期: 2012-05-18

基金项目: 农业部引进国际先进农业科学技术“948”项目(2010-232)

作者简介: 万俊(1984-), 男, 硕士, 助教, 食品加工与贮藏方向

通讯作者: 蒋爱民(1957-), 男, 博士, 教授, 研究方向为畜产食品加工及质量控制

1 材料与方法

1.1 材料

牛乳, 购于华南农业大学实验农场; 黄豆, 购于华南农业大学农贸市场; 凝乳酶, PD 204931-4.1 CN Marzyme 150 MG 丹尼斯克(DANISCO)中国有限公司, 2080-2305 IMCU/g; 干酪发酵剂, PD 207205-6.0 CN CHOOZIT™ STAM 7 LYO 50 DCU 丹尼斯克(DANISCO)中国有限公司。

1.2 仪器与设备

FT20A 干酪槽, 英国 ARMFIELD 公司; PHS-3C 型精密 PH 计, 上海雷磁仪器厂; PL203 型电子天平, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; SW-CJ-2FD 超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; SPX-80BS-II 生化培养箱, 上海新苗医疗器械有限公司; UV-1800 紫外分光光度计, 岛津有限公司; 全温振荡器, 上海福马实验设备有限公司; HH-4 数显恒温水浴锅, 常州澳华仪器有限公司; 豆浆机 DJ14B-D09, 九阳股份有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 黄豆乳制备

黄豆→浸泡(豆水比 $m:V=1:3$, 0.1% NaHCO_3 溶液室温下浸泡 12 h) →清洗→磨浆(豆水比 $m:V=1:7$) →过滤(200 目) →杀菌(煮沸 20 min) →冷却备用

1.3.2 Camembert 干酪加工工艺

新鲜牛乳→标准化→杀菌(75 °C, 15 s) →冷却(32 °C) →牛乳、豆乳混合→加乳酸菌发酵剂(3%) →发酵(32 °C) →加氯化钙→加凝乳酶→凝乳→切割→搅拌升温(40 °C) →排乳清→压榨(0.25~0.30MPa, 30 min) →盐渍(2%) →加后熟菌种(1%) →后熟(12~14 °C, RH95%)^[5]。

1.3.3 凝乳效果评价

采用加权系数法, 以凝乳感官、乳清 OD 值、凝乳时间、产品得率为指标, 进行综合评定。综合评定总分为 100 分, 其中凝乳感官、乳清 OD 值、凝乳时间、产品得率各为 30、30、20 和 20 分, 具体评定标准见表 1。

表 1 干酪凝乳效果评分体系

Table 1 Scoring standards for sensory quality evaluation of cheese curd

项目	指标	得分
凝乳效果 (满分 30 分)	凝乳松散, 易碎, 无弹性, 刀迹模糊, 入模时凝乳块易外流, 不成型	00~09
	凝乳较细腻, 但结构松散, 刀迹较模糊, 入模时有部分碎乳块外流, 压榨结束后仍有部分水分析出	10~19
	凝乳细腻, 洁白, 有弹性, 光滑, 刀迹清晰, 无碎末, 入模时凝乳块不外流, 压榨结束后无明显水分析出	20~30
	凝乳变硬, 无弹性, 刀迹生硬, 入模不易成型, 压榨后凝乳易松散或有空隙	15~24
凝乳时间 (满分 30 分)	<10 min 或 >60 min	00~10
	10~20 min 或 40~60 min 之间	11~20
	20~40 min	21~30
乳清 OD 值 (满分 20 分)	>2.5	00~05
	2.5~2.0 之间	10~15
	小于 2.2	16~20
产品得率 (满分 20 分)	<15%	00~08
	15%~20%	16~20
	大于 20%	09~14

1.3.3.1 干酪产品得率计算

干酪产品的得率按下式计算: 产品得率=终产品质量/原料质量×100%。

1.3.3.2 干酪凝乳时间的确定

从加入凝乳酶到凝乳可以切割所需要的时间。

1.3.3.3 乳清 OD 值的测定

根据乳清浓度, 适度稀释后在 480 nm 处测定^[6]。

1.3.4 响应面优化设计

选取单因素实验最优点为中心点, 利用 SAS 9.0 软件, 采用响应面法中的 Box-Behnken 实验设计优化双蛋白干酪加工工艺。根据 Box-Behnken 中心组合设计原理, 选用影响凝乳特性的 4 个主要因素: X_1 凝乳酶添加量, X_2 氯化钙添加量, X_3 豆乳添加量, X_4 凝乳时间。每一个自变量水平分别以 -1、0、1 进行编码, 以凝乳效果评分为响应值 (Y), 实验因素及水平设计见表 2, 数据采用 SAS 9.0 软件分析^[7-8]。

表 2 中心组合 Box-Behnken 方案设计因素水平表

Table 2 Center combination Box-Behnken scheme design factors level table

因素	水平		
	-1	0	1
X_1 (凝乳酶添加量/%)	0.015	0.020	0.025
X_2 (氯化钙添加量/%)	0.02	0.04	0.06
X_3 (豆乳添加量/%)	15	20	25
X_4 (凝乳温度/°C)	20	30	40

2 结果与讨论

2.1 响应面优化实验结果

Box-Behnken 的 4 因素 3 水平实验中共有 27 个实验点, 其中实验 1~24 个是分析因子实验, 实验 25~27 是零点实验, 凝乳效果评分 (Y) 为响应值, 实验结果如表 3 所示。

表 3 响应面法实验设计及结果

Table 3 The response surface method experimental design and results

实验号	X_1	X_2	X_3	X_4	凝乳得分(Y)
1	-1	-1	0	0	76
2	-1	1	0	0	79
3	1	-1	0	0	77
4	1	1	0	0	82
5	0	0	-1	-1	73
6	0	0	-1	1	75
7	0	0	1	-1	82
8	0	0	1	1	83
9	-1	0	0	-1	79
10	-1	0	0	1	78
11	1	0	0	-1	77
12	1	0	0	1	84
13	0	-1	-1	0	72
14	0	-1	1	0	81

转下页

接上页

15	0	1	-1	0	77
16	0	1	1	0	82
17	-1	0	-1	0	73
18	-1	0	1	0	78
19	1	0	-1	0	81
20	1	0	1	0	83
21	0	-1	0	-1	78
22	0	-1	0	1	81
23	0	1	0	-1	79
24	0	1	0	1	85
25	0	0	0	0	88
26	0	0	0	0	87
27	0	0	0	0	88

表 4 回归方程的方差分析结果

Table 4 Regression equation of the results of variance analysis

参数	自由度	平方和	均方	F 值	P 值
模型	14	454.7685	32.48347	9.488071	0.000192
X ₁	1	36.75	36.75	10.73428	0.006625
X ₂	1	30.08333	30.08333	8.787018	0.011826
X ₃	1	120.3333	120.3333	35.14807	0.0001
X ₄	1	27	27	7.88641	0.0158
X ₁ ×X ₁	1	104.037	104.037	30.3881	0.000134
X ₁ ×X ₂	1	1	1	0.292089	0.598773
X ₁ ×X ₃	1	2.25	2.25	0.657201	0.433334
X ₁ ×X ₄	1	16	16	4.673428	0.051544
X ₂ ×X ₂	1	92.59259	92.59259	27.0453	0.000222
X ₂ ×X ₃	1	4	4	1.168357	0.300984
X ₂ ×X ₄	1	2.25	2.25	0.657201	0.433334
X ₃ ×X ₃	1	149.3426	149.3426	43.62137	0.0001
X ₃ ×X ₄	1	0.25	0.25	0.073022	0.791577
X ₄ ×X ₄	1	66.89815	66.89815	19.54023	0.000835
残差	12	41.08333	3.423611		
失拟项	10	40.41667	4.041667	12.125	0.078545
纯误差	2	0.666667	0.333333		
总和	26	495.8519			

R²=0.9171, R²_{Adj}=0.8205

采用 SAS 9.0 软件对表 3 中的凝乳得分进行多元回归分析, 得到凝乳效果对凝乳酶添加量 (X₁)、氯化钙添加量 (X₂)、豆乳添加量 (X₃)、凝乳温度 (X₄) 的二次回归模型, 该式表达了凝乳效果 (Y) 与各因素之间的变化规律, 其二次多元回归模型为:

$$Y_1 = -469.63 + 1941.667 \times X_1 + 912.5 \times X_2 + 9.1 \times X_3 + 25.68519 \times X_4 - 44166.67 \times X_1 \times X_1 - 10416.67 \times X_2 \times X_2 - 0.211667 \times X_3 \times X_3 - 0.393519 \times X_4 \times X_4$$

对该模型进行方差分析, 结果见表 4。

由表 4 可知, 对双蛋白干酪凝乳效果评分变化所建立的回归模型 (P<0.05) 显著, 实验数据与模型不相符的情况 (P>0.05) 不显著, 说明模型选择正确, 模型相关系数 R²=0.9171, 矫正相关系数 R²_{Adj}=0.8205 说明响应值的变化能较好的描述各因素与影响值之间的实验结果, 模型拟合程度好, 实验误差小, 可有效分析和预测双蛋白干酪的凝乳效果。在各因素所选择的水平范围内, 一次项 X₁、X₂、X₃、X₄, 二次项 X₁²、X₂²、X₃²、X₄² 对凝乳效果的影响显著, 交互项不显著。

2.2 响应面分析

响应面和等值线可以直观的看到各因素间的交互作用情况, 其中等值线的形状可以反映因素间交互作用的强弱。圆形表示两因素间交互作用不明显, 椭圆形则表示较明显, 具体结果见图 1~图 6。

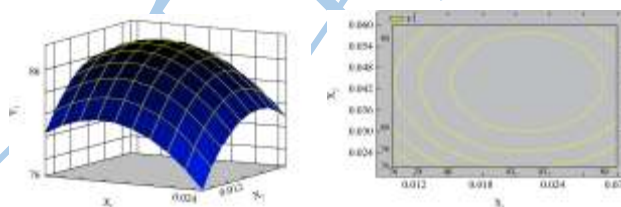


图 1 Y=f(X₁, X₂) 的响应面和等值线图

Fig.1 The response surface and equivalence value maps of Y=f(X₁, X₂)

由图 1 可以看出, 凝乳酶添加量、氯化钙添加量对凝乳效果的影响呈现相似变化趋势, 添加量过高或过低均不利于得到良好凝乳, 两个因素之间的交互作用不显著。

在原料乳中可溶性钙、胶体钙和络合钙之间的平衡对于凝乳的形成具有重要意义, 由于杀菌、添加豆乳等原因导致乳中钙的失衡, 故需要添加额外的钙盐恢复平衡。在双蛋白干酪的加工中, 豆乳的加入弥补了部分 Ca²⁺ 的不足, 但仍需加入一定量的 Ca²⁺, 以促进凝乳, 缩短工艺时间, 改善凝乳质地, 优化品质。随着氯化钙添加量的逐渐增大, 凝乳时间缩短, 凝乳弹性先增加后减弱, 当添加量为 0.06% 时, 排出乳清后的凝乳颗粒硬度较大, 粘结性差, 压榨时不易成型, 导致产品中存在空隙, 结构变得粗糙, 且凝乳时间随着氯化钙添加量的增加显著缩短, 但凝乳块口感差且有苦味; 添加量为 0.04% 时, 凝乳效果达到最佳, 凝乳富于弹性, 乳清清晰, 凝乳时间满足工艺要求; 添加量为 0.02% 时, 凝乳块弹性较差, 凝乳有少许碎屑溢出, 乳清排出困难, 凝乳时间较长, 压榨结束后仍有乳清析出^[9]。

凝乳酶在混合干酪的加工过程中主要起凝乳和分解蛋白质的重要作用, 部分凝乳酶进入凝块中, 有利

于干酪的成熟，由于凝乳酶的种类和添加量的不同，凝乳效果和蛋白质分解的程度也有所差异，从而影响双蛋白干酪的出品率和感官品质^[10-11]。从图中分析可知随着凝乳酶添加量的增加，凝乳时间逐渐缩短，凝乳酶添加量为 0.025% 时，凝乳质地较硬，弹性差，凝乳块粗糙，脆易碎，口感有轻微苦味。可能的原因是因为随着凝乳酶加入量的增加，酶和底物酪蛋白之间形成酶-底物络合物的几率增加，进攻 Phe-Met 键的速度增加，与大豆蛋白质结合后剩下的有效酶量增加，从而使凝乳第一阶段反应速度加快；与此同时，凝乳酶量的增加也加快了对大豆蛋白的分解作用，可使大豆球蛋白分子变小，从而削弱了空间阻碍作用，使酪蛋白相互靠拢变得容易，从而缩短凝乳时间，增加凝乳硬度。但过量的凝乳酶加入会导致混合干酪发酵过渡，产生苦味，降低终产品品质^[12-13]。当凝乳酶添加量为 0.015% 时，凝乳块柔软，弹性较差，切割时有凝乳碎末产生，蛋白质等营养成分随着乳清流失，压榨结束后仍有少量乳清析出。

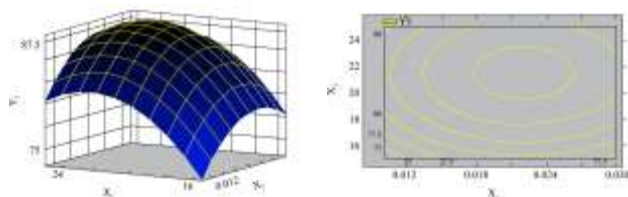


图 2 $Y=f(X_1, X_3)$ 的响应面和等值线图

Fig.2 The response surface and equivalence value maps of $Y=f(X_1, X_3)$

结合表 4 数据，由图 2 可以看出，凝乳酶添加量和豆乳添加量对凝乳效果均有显著性影响，伴随凝乳酶、豆乳添加量增加凝乳效果降低，且豆乳添加量对凝乳效果的影响更加明显，但两者的交互作用不显著。在牛乳中添加豆乳，对酪蛋白凝胶体系的形成有重要影响，实验表明，随着豆乳添加量的增加，混合凝乳时间延长，凝乳效果下降。当豆乳添加量大于 20% 时，凝乳时间大幅增加，凝乳质地松软，强度减弱，缺乏弹性，效果变差，豆乳添加量达到 30% 时，双蛋白干酪几乎不能凝乳，口感有明显豆腥味。可能的原因是大豆蛋白替代了部分酪蛋白，酪蛋白含量的下降本身就会降低凝乳特性；同时蛋白凝胶结构的改变也引起凝乳特性的降低，大豆蛋白与酪蛋白的结构不同，纯牛乳的酪蛋白凝胶体系变为酪蛋白与大豆蛋白的混合凝胶体系，而凝乳酶特征作用于酪蛋白，在大豆蛋白阻碍作用下，豆乳添加量过大时，凝乳效果显著降低。

由图 3 可知，氯化钙添加量、豆乳添加量对双蛋白干酪的凝乳均有显著性影响 ($P < 0.05$)，且豆乳的添加量对于干酪的凝乳效果影响更为显著，但两者交

互作用不明显。在干酪凝乳过程中，一方面 Ca^{2+} 可以直接与酪蛋白结合使酪蛋白所带电荷减少，有利于凝胶的形成；另一方面 Ca^{2+} 可间接促进磷酸钙的沉淀促使 H^+ 的释放，降低 pH 值，缩短凝乳时间^[14-15]。在双蛋白混合体系中，豆乳的加入可弥补原料乳的 Ca^{2+} 的不足，因此相较于传统干酪氯化钙的添加量有所降低。

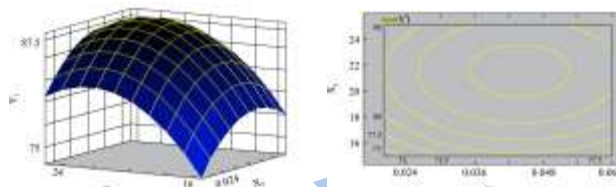


图 3 $Y=f(X_2, X_3)$ 的响应面和等值线图

Fig.3 The response surface and equivalence value maps of $Y=f(X_2, X_3)$

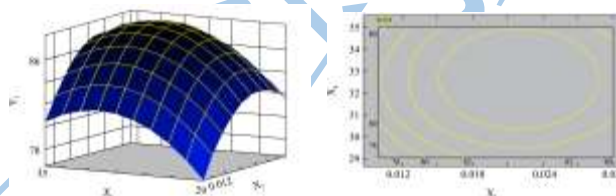


图 4 $Y=f(X_1, X_4)$ 的响应面和等值线图

Fig.4 The response surface and equivalence value maps of $Y=f(X_1, X_4)$

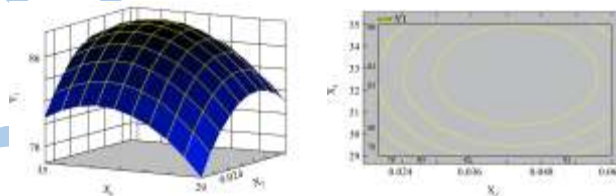


图 5 $Y=f(X_2, X_4)$ 的响应面和等值线图

Fig.5 The response surface and equivalence value maps of $Y=f(X_2, X_4)$

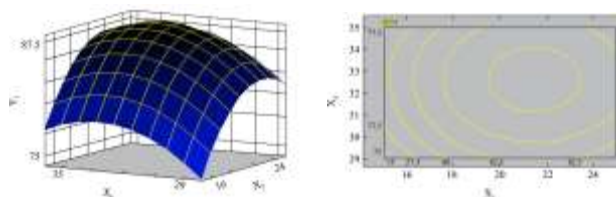


图 6 $Y=f(X_3, X_4)$ 的响应面和等值线图

Fig.6 The response surface and equivalence value maps of $Y=f(X_3, X_4)$

图 4~6 表明，凝乳温度对双蛋白干酪的凝乳有显著影响 ($p < 0.05$)，但和凝乳酶添加量、氯化钙添加量、豆乳添加量之间没有显著交互作用，且凝乳温度偏低和偏高均不利于获得良好凝乳效果。凝乳温度升高，凝乳硬度增大，弹性变差，温度偏低，则凝乳柔软，弹性较差，放置时有少量乳清析出。凝乳温度偏低，则凝乳时间延长，甚至无法获得满足工艺要求的

凝乳。

2.3 最优工艺的确定及验证实验

在以上实验结果分析的基础上,利用 SAS 9.0 软件分析得到 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 的优化值为 0.02%、0.04%、20%、32 °C,此条件下理论凝乳效果得分 87.67。为检验响应面法所得结果的可靠性,采用上述优化条件,3 次制作 Camembert 干酪,评价凝乳效果,得到平均值 88.00,与预测值基本吻合。

因此,利用响应面法得到的优化结果具有利用价值。

3 结论

用响应面法对双蛋白干酪加工工艺进行优化,建立了凝乳酶添加量,氯化钙添加量、豆乳添加量、凝乳温度对凝乳效果的二次回归方程模型,经检验,模型准确有效,可以用该模型分析预测上述因素对凝乳效果的影响。结合前期单因素实验数据和响应面优化模型确定双蛋白干酪加工工艺为:豆乳添加量为 20% (V/V),氯化钙添加量 0.04%,凝乳酶添加量为 0.02%,凝乳温度为 32 °C。在此条件下,理论凝乳效果得分为 87.67,验证值为 88.00。

参考文献

- [1] 陈伟.软质奶酪加工工艺及质量控制方法研究[D].西安:西北农林科技大学,2006
- [2] 郭本恒.现代乳品加工学[M].北京:中国轻工业出版社,2001
- [3] 龙菊.高大毛霉液体发酵应用研究及腐乳安全性评价[D].贵阳:贵州大学,2008
- [4] 周圣伟,汪建明.我国干酪市场需求与供给的影响因素分析[J].食品与发酵工业,2004,30(7):93-96
- [5] 郭善广,陈伟,王志江,等.Camembert 奶酪加工过程中主要理化特性研究[J].食品与机械,2009,25(2):26-29,81
- [6] 崔旭海.豆乳干酪工艺优化及成熟特性的研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2006
- [7] 彭勇胜,王江之,黄程,等.响应面法优化姬松茸多糖的提取工艺[J].现代食品科技,2011,27(9):1119-1122
- [8] 徐春泽,王泽南,占子奇,等.响应面法对产甘露醇发酵乳杆菌发酵条件的优化[J].现代食品科技,2012,28(2):168-171
- [9] Raynal-Ljutovac K, Park Y, Gaucheron F, et al. Heat stability and enzymatic modifications of goat and sheep milk [J]. Small Ruminant Research, 2007, 68(1): 345-347
- [10] 李星科.干酪发酵剂的筛选及干酪加工工艺研究[D].石河子:石河子大学,2007
- [11] Uprehi P, Metzger L E. Influence of calcium and phosphorus, lactose and salt-to-moisture ratio on Cheddar Cheese quality: Proteolysis during ripening [J]. Journal of Dairy Science, 2006, 89(2): 444-453
- [12] 杨宝进.对不同凝乳酶制作羊奶干酪效果的研究[J].郑州轻工业学院学报, 1998, 2(13): 105-107
- [13] 顾瑞霞,谢继志.干酪制造和成熟过程中的蛋白质水解[J].中国乳品工业,1992,20(1):24-29
- [14] Fontecha J, Pelaez M, Juarez T et al. Biochemical and Microbiological Characteristics of Artisanal Hard Goat's Cheese [J]. Dairy Sci, 1990, 73: 1150-1157
- [15] Pastonno A J. Effect of chemical parameters on structure-function relationships of cheese [J]. Utah State University, 2002, 72-72, 101-105