

含嗜酸乳杆菌的新鲜干酪的研制

林超, 王伟, 陈雪, 李婷婷, 杨丽杰

(东北农业大学乳品科学教育部重点实验室, 食品学院, 黑龙江哈尔滨 150030)

摘要: 以实验室菌种和商业发酵剂分别制作 1、2 和 3、4 四组干酪, 其中 2、4 两组另添加了嗜酸乳杆菌 (KLDS-AD1), 观察 4℃ 冷藏 20 d 内 KLDS-AD1 在新鲜干酪中的活菌数变化, 模拟人体胃肠道环境中 KLDS-AD1 的存活情况及贮存期间各组新鲜干酪的理化性质进行了研究。结果表明: 含 KLDS-AD1 的两组干酪贮存期间均有较高的活力且在模拟胃肠道环境中具有较好的耐受性; KLDS-AD1 的添加对干酪的品质没有不良的影响, 并且 KLDS-AD1 与商业发酵剂组做出的干酪感官评价最高, 具有良好的生产开发前景。以实验菌株发酵剂与商业菌株发酵剂做出的干酪在质地, 感官方面有一定的差异性。

关键词: 嗜酸乳杆菌; 新鲜干酪; 益生菌

文章编号: 1673-9078(2013)1-122-126

The Development of Fresh Cheese with *Lactobacillus Acidophilus*

LIN Chao, WANG Wei, CHEN Xue, YANG Li-jie

(Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education, College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030)

Abstract: The survival of *Lactobacillus acidophilus* (KLDS-AD1) in the simulation gastrointestinal tract environment and the physicochemical properties of the fresh cheese were studied during storage at 4℃. Four cheese-making trials were prepared, two supplemented with Laboratory strains (1#, 2#) and two with commercial culture (3#, 4#). *Lactobacillus acidophilus* was added in 2# and 4#. The results showed that KLDS-AD1 in the two groups (2#, 4#) have a high vitality during cheese storage and well tolerated in the simulated gastrointestinal tract environment; The addition of KLDS-AD1 showed little adverse impact on the quality of the cheese. The cheese with commercial culture and KLDS-AD1 had the best texture and sensory quality, showing good prospects for production and development. In addition, the texture of the cheese made by the experimental culture showed difference in sensory quality with that by commercial culture.

Key words: *Lactobacillus acidophilus*; fresh cheese; probiotic

益生菌是一种当摄入量足够时, 对宿主健康有益的微生物^[1]。由于它们对健康有益, 因而广泛应用于发酵乳制品中^[2]。通常含有益生菌的食物被归类为“功能性食品”, 这类食品受到发达国家的普及和广泛接受^[3]。益生菌食品为了发挥它们在食用者体内的益生作用, 必须能够通过含有盐酸、胆汁的胃肠道而存活下来^[4]。干酪作为益生菌食品的载体与其它发酵奶制品相比有较好的优势, 干酪的存在为对抗胃肠道内的高酸性环境起到缓冲作用, 同时由于成熟干酪本身较高的 pH 值, 产生了一个更有利益生菌在整个胃肠道存活的环境。当然, 干酪是一种几乎没有乳糖的食品, 对于乳糖不耐症的患者来说是一种理想的选择。因此, 益生菌干酪的开发具有重要的意义和商业价值。目前,

收稿日期: 2012-08-14

基金项目: 教育部长江学者和创新团队发展计划资助项目 (IRT0959)

作者简介: 林超 (1987-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 乳品科学与微生物
通讯作者: 杨丽杰 (1956-), 女, 教授, 硕士, 研究方向: 食品营养及食品中生物活性成分的作用与机制

国外对于益生菌干酪的研究较多, L. Ong^[5]等人将双歧杆菌、嗜酸乳杆菌等益生菌分别添加到切达干酪中来研究 4℃ 成熟六个月益生菌的存活率、对蛋白质分解模式及产品中的有机酸的变化。实验结果表明所有益生菌存活于生产加工的过程中, 并在成熟后维持大于 3.16×10^8 CFU/g 以上, 进一步说明切达干酪是益生菌的有效载体。Flávia C.A. Buriti^[5]等人研究了嗜酸乳杆菌在 Minas 新鲜干酪贮藏期间对其质构和感官特性的影响。实验结果表明在贮藏期间嗜温 O 型发酵剂中添加嗜酸乳杆菌的活菌数从 1.09×10^7 CFU/g 变化至 8.53×10^7 CFU/g, 含有乳酸的干酪里面的嗜酸乳杆菌从 2.88×10^6 CFU/g 变化至 3.38×10^7 CFU/g, 并且表现出较好的感官品质。A. Kasımoğlu^[6]等人研究了在不同包装 (真空或盐渍) 下, 嗜酸乳杆菌在土耳其白色干酪成熟过程中对其感官特性和组成成分的影响, 并以不加嗜酸乳杆菌的干酪作为对照, 发现真空包装下的嗜酸乳杆菌的数量大于 10^7 CFU/g, 并且在此包装下的益生菌干酪蛋白水解度最大, 感官评价最好。

本文以实验室保藏的嗜酸乳杆菌（已证实此嗜酸乳杆菌具有耐酸，耐胆盐，抑制致病菌等作用）和乳酸乳球菌为研究对象，生产制备农家干酪，对其理化指标、质构、感官品质进行了测定和评价，并模拟人体胃、肠道环境观察嗜酸乳杆菌的存活情况，为开发益生菌干酪和益生菌附属发酵剂奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株：保藏于东北农业大学教育部乳品科学重点实验室菌种库，嗜酸乳杆菌 KLDS-AD1，乳酸乳球菌乳酸亚种 KLDS4.0424，乳酸乳球菌乳脂亚种 KLDS4.1002。

直投式发酵剂，来自科汉森 R-707（包含菌种 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 和 *Lactococcus Lactis* subsp. *lactis*）；凝乳酶，由科汉森提供；原料乳，为新鲜无抗牛乳，来源于东北农业大学农场养殖的荷斯坦奶牛。

1.2 仪器

BCN1360 型生物洁净工作台；SPX-150B 生化培养箱；HIRAYAMA HVE-50 形高压灭菌锅；DELTA 320 pH 计；TA.XT-2i 型质构仪，英国 stable micro system 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 新鲜干酪的制作工艺

本实验分为四组：实验组 1 为实验室发酵剂（KLDS4.1002 与 KLDS4.0424，比例 1:1），实验组 2 为实验室发酵剂（KLDS4.1002 与 KLDS4.0424，比例 1:1）与嗜酸乳杆菌 KLDS-AD1 组合，实验组 3 为商业发酵剂，实验组 4 为商业发酵剂与嗜酸乳杆菌 KLDS-AD1 组合。

工艺流程：

脱脂乳→杀菌(63℃, 30 min)→冷却(32℃)→接种发酵剂及嗜酸乳杆菌→添加氯化钙、凝乳酶→培养至凝乳→切割→静置 30 min→水浴热烫→排乳清→水洗→堆积(30~60 min)→加盐(1%)→包装

1.3.2 干酪中理化指标的检测

干酪水分测定-直接干燥法（GB/T 5009.3-2010）；蛋白质含量的测定-凯式定氮法（GB/T 5009.5-2010）；灰分含量的测定-（GB/T 5009.4-2010）；干酪盐分的测定-（QB/T 3777）。

干酪 pH 值的测定方法：将样品与蒸馏水按 3:10 的比例进行混合均匀，然后用数显 pH 计测定。

干酪中滴定酸度的测定方法：采用 GB 5413.34-2010 方法

1.3.3 干酪中嗜酸乳杆菌活菌数检测

干酪中嗜酸乳杆菌活菌数通过添加 1% 的克林霉素溶液（浓度为 0.005%）MRS 选择培养基通过涂布法进行检测。

1.3.4 模拟胃肠道条件观察干酪中嗜酸乳杆菌的存活情况

模拟胃液：胃蛋白酶 3 g/L，加入到 0.5%（m/V）无菌生理盐水中，用浓盐酸调 pH 分别至 2.0、3.0、4.0，用 0.22 μm 的滤器过滤除菌后备用。

模拟肠液：胰酶 1 g/L，加到 0.5%（m/V）无菌生理盐水中，用 0.1 mol/L NaOH 调 pH 至 8.0，分别添加 0.1%、0.3%、0.5% 的牛胆盐，用 0.22 μm 的滤器过滤除菌后备用。

具体做法：取 0.5 g 干酪样品分别添加到模拟胃液和肠液中，放在 37℃ 培养 4 h，分别于 0 h、1 h、2 h、3 h、4 h 取样，梯度稀释，涂布测定其活菌数。

1.3.5 贮存期干酪质构评价

取贮存 10 d 的干酪样品，室温下放置 0.5 h，进行 TPA 分析。测量前探头下降速度为 2.0 mm/s，测试速度为 1.0 mm/s，测量后探头回程速度为 2.0 mm/s，下压变形为 10 mm，间隔时间 10 s，触发力为 1.0 g，探头类型为 p/0.5。

1.3.6 感官评价

新鲜干酪的保质期一般为 3 周左右，本实验选取 4℃ 贮存 10 d 的新鲜干酪进行感官评价。随机选取 10 名专业人员，男女各半，进行感官评价，评分标准依据《农家干酪感官质量评鉴细则》并略有改动，进行评定。

表 1 新鲜干酪的感官评分标准

Table 1 The sensory evaluation standards for fresh cheese

项目	特征	得分
色泽	色泽呈白色，光	15
	滑柔软有光泽	
组织状态	质地均匀，柔软潮	30
	湿，组织极细腻	
滋味和气味	具有该种干酪特有气味，具有温和奶香味，稍有酸味	55

2 结果与分析

2.1 新鲜干酪的理化指标的测定结果

新鲜干酪部分理化指标见表 2 所示，可以看出各实验组干酪的水分、蛋白质、灰分差异显著，主要是由于每组发酵剂菌种代谢能力不同而导致；另外在搅拌和水洗过程中，水分、蛋白质、灰分会随乳清的排出量的不同而表现出差别，这与董成^[7]等人得到的结

论一致。盐分含量在这四组干酪中差距不显著，主要因为加盐是包装前的最后一个步骤，因此含量较恒定。

表 2 新鲜干酪的理化指标测定结果

Table 2 The physico-chemical properties for fresh cheese

组别	水分	蛋白质	盐分	灰分
实验组 1	72.76±0.01 ^d	24.45±0.01 ^b	0.93±0.00	1.12±0.00 ^f
实验组 2	73.07±0.02 ^c	25.15±0.05 ^a	0.92±0.01	1.23±0.02 ^e
实验组 3	73.84±0.02 ^b	23.30±0.06 ^d	0.91±0.02	1.25±0.01 ^a
实验组 4	74.51±0.01 ^a	24.16±0.08 ^c	0.93±0.01	1.18±0.01 ^b

注：不同字母代表各组间差异显著性，P<0.05。

2.2 贮存期间嗜酸乳杆菌在新鲜干酪中活菌数的变化情况

表 3 贮存期间干酪中嗜酸乳杆菌的活菌数变化

Table 3 The changes of survival *Lactobacillus acidophilus* during cheese storage

贮存天数/d	活菌数/(10 ⁸ cfu/g)	
	实验组 2	实验组 4
0	5.40±0.01 ^a	5.41±0.01 ^a
5	4.46±0.05 ^b	4.36±0.03 ^b
10	2.52±0.06 ^c	2.68±0.03 ^c
15	1.15±0.22 ^d	1.16±0.04 ^d
20	0.84±0.01 ^e	0.90±0.03 ^e

注：不同字母代表各组间差异显著性，P<0.05。

从表 3 可以看出实验组 2 和实验组 4 中的嗜酸乳杆菌在贮存 20 d 后其活菌数均有不同程度的下降，组 2 中的嗜酸乳杆菌从最初的 5.40×10⁸ CFU/g 降至 0.84×10⁸ CFU/g，而组 4 也由 5.41×10⁸ CFU/g 降至 0.90×10⁸ CFU/g，说明干酪中的嗜酸乳杆菌在低 pH 值环境条件下仍能保持较高的活菌数；但在整个贮存期间嗜酸乳杆菌的活菌数始终均大于 10⁷ CFU/g，符合益生菌产品所要求的大于 10⁶ CFU/g 的推荐水平^[8]。

2.3 新鲜干酪在贮存期间 pH 值及滴定酸度的变化情况

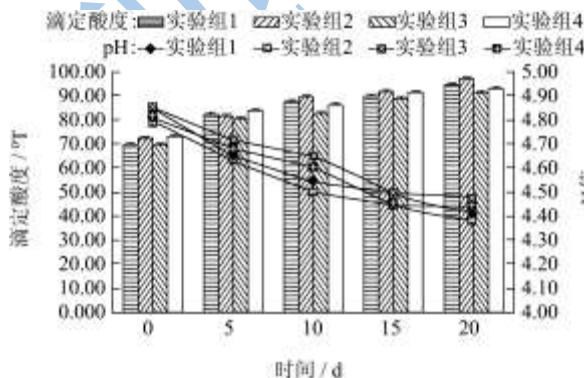


图 1 4 °C 贮藏期内新鲜干酪 pH 值及滴定酸度的变化

Fig.1 The changes of pH and titratable acidity of fresh cheese during storage at 4°C

四组干酪在 4 °C 条件下，贮存 20 d 的 pH 值和滴定酸度的变化情况如图所示，各组 pH 值都有所降低，滴定酸度有所增加，主要由于贮存期间发酵剂继续分解代谢干酪中残存的乳糖，引起干酪的 pH 下降和滴定酸度随之增加。在贮存期间实验室发酵剂制备的干酪与商业发酵剂做出的干酪作比较，pH 值始终是前者小于后者，表明实验室发酵剂产酸能力较强，明显高于商业发酵剂。嗜酸乳杆菌的添加进一步促进干酪的 pH 值下降和滴定酸度增加。

2.4 模拟胃肠道条件观察干酪中嗜酸乳杆菌的存活情况

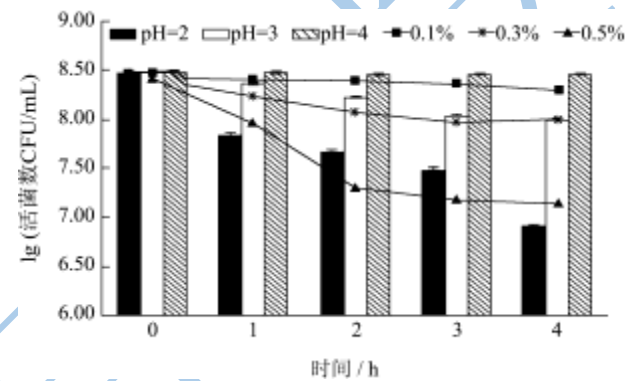


图 2 实验组 2 干酪在模拟胃液，肠液中活菌数的变化情况

Fig.2 The survival of *Lactobacillus acidophilus* in simulated gastro-intestinal tract in the experimental group 2

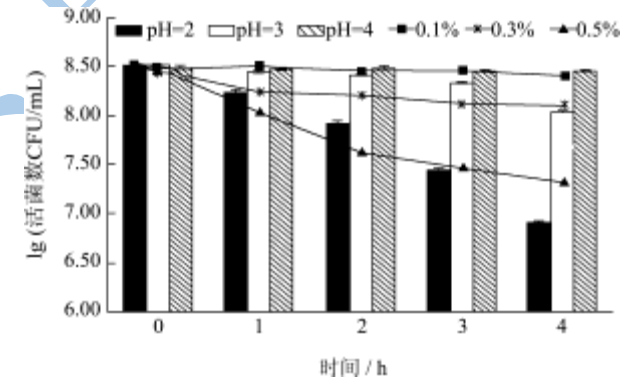


图 3 实验组 4 干酪在模拟胃液，肠液中活菌数的变化情况

Fig.3 The survival of *Lactobacillus acidophilus* in simulated gastro-intestinal tract in the experimental group 4

嗜酸乳杆菌是人体肠道内重要的益生菌^[9]，要想使其在人体肠道定植并发挥益生作用必须要耐受体内的低酸和高胆盐环境。研究指出，胃液中的 pH 值可低至 1.5，食物摄入以后可能高至 6 或以上，但 pH 值一般的波动范围在 2.5~3.5^[10]。通常来说，食物停留的时间一般为 2~4 h^[11]。小肠内的 pH 值为 8 左右，食物通过小肠的时间一般为 1~4 h，人们把是否能耐受浓度为 0.15~0.3% 的胆盐作为其选择益生菌的条件。本实验模拟人体胃肠道环境，观察两组含嗜酸乳杆菌的干酪（实验组 2 和实验组 4）在不同 pH 值及胆盐环境

的耐受性,结果如图2、图3所示。

从图2、图3可以看出,不同低酸及高胆盐环境下嗜酸乳杆菌 KLDS-AD1 活菌数的变化趋势较为相近,这与菌株本身的耐受性密切相关。结果进一步指出两组干酪在 pH 值为 2 的条件下经过 4 h,活菌数下降了两个数量级,而在 pH 为 3 的条件下,活菌数下降幅度相对较小,当 pH 为 4 时,干酪中的活菌数几乎是没受影响。田芬等^[12]研究嗜酸乳杆菌 KLDS-AD1 菌株在 pH 2.5 的环境中经过 4 h,活菌数下降 2 个数量级,一方面说明嗜酸乳杆菌 KLDS-AD1 具有良好的耐酸性,同时经一部看出干酪做为益生菌的载体对其有一定的保护作用。

当胆盐浓度为 0.1% 条件,经过 4 h,两组干酪中的活菌数的基本无变化,而当胆盐浓度升至 0.3% 和 0.5% 时,经过 4 h,两组干酪中嗜酸乳杆菌的活菌数都开始下降,浓度为 0.3% 条件下,活菌数下降幅度较小,在胆盐浓度为 0.5% 的条件下嗜酸乳杆菌的下降幅度相对较大,但活菌数仍然维持在 10^7 CFU/g 以上,

可能是由于该株嗜酸乳杆菌对胆盐有良好的抗性,同时干酪作为载体也发挥着良好的保护作用。

2.5 贮存期干酪质构评价

干酪的质地是评价干酪品质的一项重要指标。表 3 中列出了实验组的干酪 TPA 检验的质构参数。4 组干酪质地的各项参数均有差异,这说明嗜酸乳杆菌和发酵剂直接影响干酪的质地都有一定影响。从表 3 可以看出 A 组的硬度最大,由前面可知 A 组的水分含量低于其他组,可能是干酪的硬度与其水分含量有关,与 Awad 等^[13]曾报道的硬度下降与干酪水分升高有关的结论一致。粘着性严重影响着口感,粘度越大,咀嚼时口腔的舒适感越差^[14]; 1、2 组与 3、4 组相比具有一定的差异性,导致干酪的口感变差,这可能与乳杆菌能产生粘液物质增加其粘着性有关。1、2 组与 3、4 组干酪在弹性,凝聚性,胶粘度,咀嚼性方面均有一定差异性,即使用实验室发酵剂生产出的干酪所得到的指标值要高于商业发酵剂生产出的干酪;另外,嗜酸乳杆菌的添加没有对干酪的质地产生负面影响。

表 3 四组新鲜干酪的质构评价结果

Table 3 The results of texture evaluation of the four cheese groups

组别	硬度/g	粘着性(g.s)	弹性/g	凝聚性	胶粘度	咀嚼性
实验组 1	147.31±1.47 ^a	-28.72±5.99 ^b	0.48±0.02 ^c	0.36±0.02 ^b	52.17±1.68 ^a	25.10±1.93 ^b
实验组 2	110.47±6.52 ^b	-31.01±3.02 ^b	0.68±0.00 ^a	0.42±0.01 ^a	45.72±3.08 ^b	30.95±2.17 ^a
实验组 3	106.66±2.11 ^b	-13.20±0.32 ^a	0.47±0.01 ^c	0.27±0.01 ^c	28.72±1.44 ^c	13.38±1.07 ^c
实验组 4	96.63±0.18 ^c	-12.75±0.44 ^a	0.54±0.01 ^b	0.33±0.01 ^b	31.94±1.26 ^c	17.18±0.86 ^c

注:不同字母代表各组间差异显著性, $P < 0.05$ 。

2.6 新鲜干酪的感官评价结果

四组干酪的感官评价结果如表所示,可以看出第 4 组干酪的感官评价分数最高,具有干酪特有的滋味和气味,质地均匀,软硬适度,其他三组干酪也在人们的接受范围之内,但 1、2 组在滋气味方面的得分要

低于 3、4 组,说明实验室发酵剂与商业发酵剂在感官特性方面还有一定的差距。另外,2、4 组的感官评价分数要高于他们的对照组,说明把嗜酸乳杆菌菌株添加到干酪中不会产生不良影响,可以用于生产中。

表 4 四组新鲜干酪的感官评价结果

Table 4 The sensory scores of the four cheese groups

组别	滋味和气味	组织状态	色泽	总分
实验组 1	46.80±0.92 ^b	26.00±1.25 ^{ab}	12.00±0.94 ^a	84.80±2.39 ^c
实验组 2	47.30±1.16 ^b	26.80±0.79 ^a	11.90±0.88 ^a	86.00±1.05 ^{bc}
实验组 3	50.10±0.99 ^a	25.00±1.05 ^b	11.90±1.10 ^a	87.00±2.36 ^{ab}
实验组 4	50.80±1.23 ^a	25.70±1.16 ^b	11.70±0.82 ^a	88.20±1.99 ^a

注:不同字母代表各组间差异显著性, $P < 0.05$ 。

3 结论

含嗜酸乳杆菌的两组干酪在整个贮存期间其活菌数始终大于 10^7 CFU/g; 四组新鲜干酪中 pH 值都有所降低,滴定酸度有所增加,嗜酸乳杆菌的添加对其有影响但差异不显著;通过模拟胃肠道条件可知,干酪

中的嗜酸乳杆菌对体内低酸高胆盐环境具有较好的耐受性,商业发酵剂和嗜酸乳杆菌制作的干酪质地,感官表现比较突出,嗜酸乳杆菌的添加对新鲜干酪的产品质量不会有负面影响,因此,将嗜酸乳杆菌添加到干酪中具有较好的开发价值。另外,从干酪的质构和感官评价方面可知,实验菌株发酵剂与商业菌株发酵

剂做出的干酪的质地, 感官评价相比具有一定的差异性, 虽然实验室发酵剂做出干酪的弹性, 凝聚性及咀嚼性等要高于商业发酵剂组但在风味方面却相差很远, 通过添加产香性能较好的菌种能弥补不足, 这还需要进一步深入研究。

参考文献

- [1] FAO/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report. http://www.fao.org/es/ESN/food/foodandfood_probio_en.stm, 2002
- [2] 贡汉生, 孟祥晨. 益生菌的安全性评价[J]. 现代食品科技, 2005, 21(4): 76-79
- [3] L Ong, A Henriksson, NP Shah. Development of probiotic Cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Bifidobacterium spp.* and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid [J]. International Dairy Journal, 2006, 16, 446-456
- [4] C Stanton, C Desmond, M Coakley, et al. Challenges facing development of probiotic-containing functional foods [A]. In: E. R. Farnworth. Handbook of fermented functional foods [C]. Boca Ranton, LA, USA: CRC Press. 2003, 27-51
- [5] Flávia C A Buriti, Juliana S da Rocha, Susana M I Saad. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage [J]. International Dairy Journal, 2005, 15: 1279-1288
- [6] A Kasimoğlu, M Göncüoğlu, S Akgün. Probiotic white cheese with *Lactobacillus acidophilus* [J]. International Dairy Journal, 2004, 14: 1067-1073
- [7] 董成, 张和平, 赵树平, 等. 利用 *Lactobacillus casei* Zhang 开发益生菌新鲜干酪[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(6): 140-145
- [8] Terri D Boylston, Celso G Vinderola, Hamid B Ghoddusi, et al. Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards [J]. International Dairy Journal, 2004, 14: 375-387
- [9] 郑坚强, 司俊玲. 改善嗜酸乳杆菌酸乳风味的研究[J]. 现代食品科技, 2006, 22(2): 13-19
- [10] Yang Huang, Michelle C Adams. In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria [J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 91: 253-260
- [11] Smith T. The digestive system [A]. In: Smith T. The Human Body [C]. Ken Fin Books, Collingwood, 1995: 150-173
- [12] 田芬, 陈俊亮, 粘靖祺, 等. 嗜酸乳杆菌和双歧杆菌的益生特性研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(7): 139-142
- [13] AWAD S. Texture and flavour development in Ras cheese made from raw and pasteurised milk [J]. Food Chemistry, 2006, 97(3): 394-400
- [14] 李帆, 甘伯中, 刘兴龙, 等. 白牦牛乳软质干酪的加工及其质构特性的研究[J]. 食品工业科技, 2010, 4: 248-251