

贾宏信, 龚广予. 干酪乳杆菌 LC2W 对切达干酪蛋白质降解的影响[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(12): 261–264.

干酪乳杆菌 LC2W 对切达干酪蛋白质降解的影响

贾宏信^{1,2}, 龚广予¹

(1. 光明乳业股份有限公司技术中心乳业生物技术国家重点实验室, 上海 200436; 2. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306)

摘要:将益生菌干酪乳杆菌 LC2W 作为切达干酪的附属发酵剂, 研究其在干酪成熟过程中对干酪蛋白质降解的影响。通过干酪内水溶性氮 (WSN)、12% 三氯乙酸可溶性氮 (TCA-SN) 和 5% 磷钨酸可溶性氮 (PTA-SN) 的测定以及 pH 值 4.6 水不溶性蛋白的 Urea-PAGE 图谱和 pH 值 4.6 水溶性多肽的肽谱确定乳杆菌对干酪蛋白质降解的影响。结果表明, 随着成熟时间的延长, 干酪内 WSN、TCA-SN 和 PTA-SN 的含量逐渐增大, 到干酪成熟 180 d 时试验组干酪的 WSN 和 PTA-SN 含量显著高于对照组干酪; Urea-PAGE 图谱和多肽肽谱表明, 菌株 LC2W 影响干酪蛋白质降解可能是通过提高 α -酪蛋白降解速率或为多肽降解提供相应的肽酶来实现的。

关键词:切达干酪; 益生菌; 干酪乳杆菌 LC2W; 蛋白质降解

中图分类号:TS201.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2013)12-0261-04

切达干酪的成熟要经历复杂的化学和生化反应, 这些反应包含糖酵解、脂质降解和蛋白质降解。蛋白质降解对干酪形成独特的风味和质构起着重要作用^[1]。添加的凝乳酶、原料奶、发酵剂和非发酵剂乳酸菌等都是蛋白质降解所需酶的来源。凝乳酶、原料奶中的胞浆素和酸性蛋白酶可以将酪蛋白降解为大分子或中等分子的多肽。但是凝乳酶活性会在干酪的熟化过程中被灭活, 另外凝乳酶的活性也会受到干酪中盐的抑制。因此在干酪成熟中发挥重要作用的蛋白水解酶, 应该是来自于干酪内微生物自溶或分泌产生的蛋白酶或多肽酶^[2-3]。来自微生物的蛋白酶不但能把酪蛋白降解为大分子多肽和中等分子量的多肽, 而且来自微生物的多肽酶可以进一步把这些多肽降解为小分子多肽和氨基酸等一些与切达干酪风味有关的小分子物质^[3-4]。

过去几十年, 非发酵剂乳杆菌对干酪蛋白质水解影响的研究已报道很多, 如副干酪乳杆菌和嗜酸乳杆菌 La-5 对米纳斯新鲜奶酪 (Minas fresh cheese)^[5-6], 嗜酸乳杆菌对土耳其白奶酪 (Turkish white cheese)^[7], 唾液乳杆菌、副干酪乳杆菌、嗜酸乳杆菌、干酪乳杆菌、双歧杆菌和瑞士乳杆菌对切达干酪 (Cheddar cheese)^[2,8-10], 嗜酸乳杆菌和干酪乳杆菌对派特格司奶酪 (Pategrás cheese)^[11-12]等。本研究主要是针对干酪乳杆菌 LC2W 作为切达干酪的附属发酵剂影响切达干酪蛋白质降解的研究。通过对切达干酪 pH 值 4.6 水溶性氮 (WSN)、12% 三氯乙酸可溶性氮 (TCA-SN) 以及 5% 磷钨酸可溶性氮 (PTA-SN) 的测定, pH 值 4.6 水不溶性蛋白的 Urea-PAGE 分析以及 pH 值 4.6 水溶性多肽的 RP-HPLC 分析来确定 LC2W 在干酪成熟过程中是否对干酪的蛋白质降解产生重要影响。

1 材料与方法

1.1 材料

菌种干酪乳杆菌 LC2W (乳业生物技术国家重点实验室); 无抗生素牛奶 (光明乳业股份有限公司); CHOOZTTM-RA021 发酵剂、MARZYME 150MG 凝乳酶 [丹尼斯克添加剂 (上海) 有限公司]。

1.2 主要试剂及仪器

乙腈和甲醇 (上海安谱); α -酪蛋白、 β -酪蛋白 (Sigma); 40% 丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺 (37.5:1)、尿素、过硫酸铵、Tris、EDTA、去离子甲酰胺和四甲基二己胺 (TEMED) (上海生工生物工程公司); 垂直电泳仪: Mini-PROTEAN Tetra (BIO-RAD); 凯氏定氮仪: KJELTEC2300 (Foss); 色谱仪: Agilent HPLC 1260; 硫酸铜、硫酸钾、硼酸、三氯乙酸、氢氧化钠和三氟乙酸 (国药集团)。

1.3 试验方法

1.3.1 干酪的制作 干酪制作工艺: 原料乳 (200 L) → 标准化 (蛋白/脂肪 = 0.85) → 巴氏杀菌 (68 °C, 15 s, 冷却至 31 °C, 均分为 2 份) → 添加发酵剂 (对照组: 12% 脱脂乳预活化的发酵剂种子液, 加入量 0.8%, 体积比; 试验组: 12% 脱脂乳预活化发酵剂种子液混合离心所得 LC2W (LC2W 终浓度为 3.1×10^9 CFU/mL), 加入量 0.8%, 体积比) 和 CaCl_2 (0.016%, 质量比) → 31 °C 熟化 30 min 左右, 加凝乳酶 (0.001%, 质量比) 凝乳 (31 °C, 40 min) → 切割 → 热烫至 38 °C (约 5 min 升 1 °C) → 排乳清 → 切达化 → 绞碎 → 加盐 (2.5%, 质量比) → 入模压榨成型并真空包装 → 成熟 (温度 6 °C)。切达干酪制作在光明乳业技术中心中试车间进行。

1.3.2 WSN、TCA-SN 和 PTA-SN 的测定方法 WSN: 取干酪 10 g 加 40 mL 去离子水, 高速捣碎机匀浆, 55 °C, 调 pH 值为 4.6 温育 1 h, 然后 4 °C、3 000 r/min 离心 30 min, 去上层脂肪, 上清液用 Whatman 42 号滤纸过滤, 取滤液 10 mL 定氮, 离心沉淀收集到离心管 -20 °C 保存用于 Urea-PAGE 分析。TCA-SN: 混合 24% 三氯乙酸溶液 25 mL 和 25 mL pH 值 4.6 上清滤液, 室温 1 h, Whatman 42 号滤纸过滤, 取 25 mL 滤液

收稿日期: 2013-04-19

基金项目: 国家科技支撑计划 (编号: 2012BAD28B07)。

作者简介: 贾宏信 (1985—), 男, 硕士, 研究方向为食品生物技术。

Tel: (021) 66553530; E-mail: jiahx0607@126.com。

通信作者: 龚广予, 男, 高级工程师。E-mail: gongguangyu@bright-dairy.com。

定氮。PTA-SN:混合 5 mL pH 值 4.6 上清滤液,3.5 mL 3.95 mol/L 硫酸溶液,1.5 mL 33.3% 磷酸钠溶液,4 ℃ 过夜,Whatman 42 号滤纸过滤,取 10 mL 滤液定氮。凯氏定氮法:GB 5009.5—2010。

1.3.3 pH 值 4.6 水不溶性蛋白 Urea-PAGE 分析方法 pH 值 4.6 水不溶性蛋白的溶解依照 Voigt 等的方法^[13]。尿素-聚丙烯酰胺凝胶电泳(Urea-PAGE)依照 Yuceer 等的方法^[14]。

1.3.4 pH 值 4.6 水溶性多肽的 RP-HPLC 分析方法 样品液:pH 值 4.6 水溶液过滤液,以 0.45 μm 滤膜过滤后作为上样液,进样量 5 μL。检测器:紫外 214 nm。柱温 37 ℃,流速 0.8 mL/min。流动相:乙腈在水里的梯度洗脱,0 min 95% 溶液 A[水:三氟乙酸(TFA)1 000:1,体积比]和 5% 溶液 B(乙腈:TFA 1 000:0.9,体积比),42 min 60% 溶液 A 和 40% 溶液 B,55 min 45% 溶液 A 和 55% 溶液 B,60 min 30% 溶液 A 和 70% 溶液 B,60.5 min 回到初始状态,运行 9.5 min。分析柱:250 mm×4.6 mm Venusil XBP C₁₈(T),5 μm,300 Å (Agela 公司)。

1.3.5 数据处理 WSN、TCA-SN 和 PTA-SN 的平均值、标准偏差和显著性分析用 SPSS 17.0 进行处理,显著水平 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 WSN、TCA-SN 和 PTA-SN 的测定结果

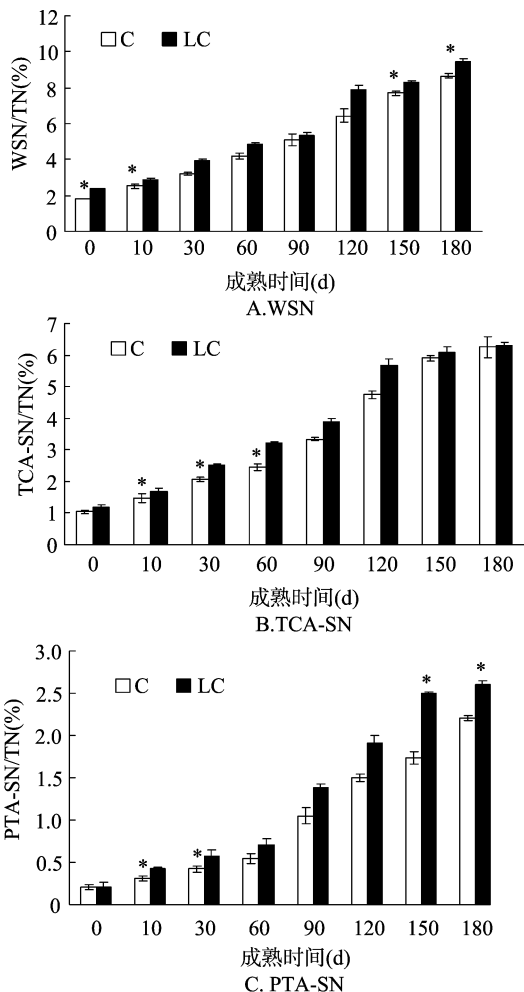
图 1 显示添加 LC2W 切达干酪(LC 干酪)和无 LC2W 添加切达干酪(C 干酪)成熟过程中的 WSN(主要为水溶性多肽,游离氨基酸等非大分子蛋白氮),TCA-SN(主要为中小肽,游离氨基酸氮),PTA-SN(主要为游离氨基酸氮)占干酪总氮(TN)百分比的变化都是呈现递增的趋势。同时结果表明添加 LC2W 菌株的干酪,3 种类型的氮含量都高于不添加 LC2W 菌株干酪的氮含量,这说明 LC2W 菌株为切达干酪蛋白质水解提供了相应的酶。在整个成熟期内(180 d),添加 LC2W 菌株干酪和无添加 LC2W 菌株干酪相比,WSN/TN 比值在干酪成熟 0、30、120、180 d 时存在显著性差异($P < 0.05$),TCA-SN/TN 比值在干酪成熟 30、60、90 d 时存在显著性差异,PTA-SN/TN 比值在干酪成熟 10、30、150、180 d 时存在显著性差异。这一结果表明,菌株 LC2W 影响切达干酪的蛋白质降解,特别是对成熟干酪内游离氨基酸的含量影响较大。

2.2 pH 值 4.6 水不溶性蛋白 Urea-PAGE 分析结果

由图 2 pH 值 4.6 水不溶性蛋白 Urea-PAGE 图谱可以看出,在整个成熟期内 α-酪蛋白发生了较为显著的降解,而 β-酪蛋白并无明显的降解发生。对比 2 种不同干酪在相同的时间内 α-酪蛋白的降解,发现在干酪成熟 180 d 时,添加 LC2W 菌株的切达干酪 α-酪蛋白降解明显。这一结果和干酪成熟 180 d 时表现出添加 LC2W 菌株的干酪较无添加 LC2W 菌株干酪 WSN 含量高的结果一致,说明切达干酪内加入 LC2W 菌株能提高 α-酪蛋白的降解速率。

2.3 LC2W 对切达干酪水溶性多肽的影响

由图 3 至图 5 可以看出随着干酪成熟时间的不断增加,2 种干酪的水溶性多肽含量和种类都在增加,特别是峰 b、c、d、



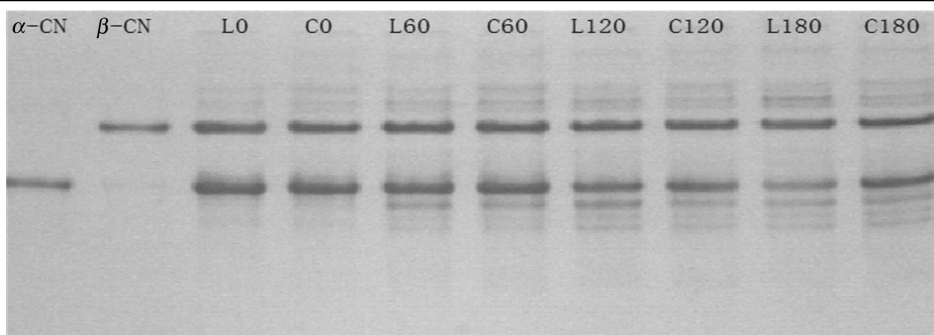
C—对照组干酪不加干酪乳杆菌 LC2W; LC—添加干酪乳杆菌 LC2W 的切达干酪。*表示 $P < 0.05$

图1 切达干酪成熟过程(6 ℃成熟180 d)中pH值4.6水溶性氮(WSN)、12%三氟乙酸可溶性氮(TCA-SN)和5%磷酸钠可溶性氮(PTA-SN)占干酪总氮(TN)的变化情况

f、j、l 等的峰高增加明显,这说明随着成熟时间的增加干酪内蛋白质的降解程度在增加。在干酪成熟 0 d 时添加菌株 LC2W 的干酪和无添加该菌株的干酪水溶性多肽的肽谱图几乎一致,到干酪成熟 90 d 后,2 种干酪的肽谱图存在明显的差异,如图 4、图 5 中的峰 a、c、d、e、f、I、j、k、l、m 较添加菌株 LC2W 干酪峰值高,而峰 a、b、s 的值却较低。这些进一步说明 LC2W 的加入影响了干酪内多肽的降解,可能为干酪内多肽的降解提供了相应的肽酶。

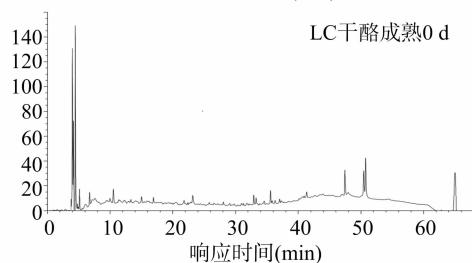
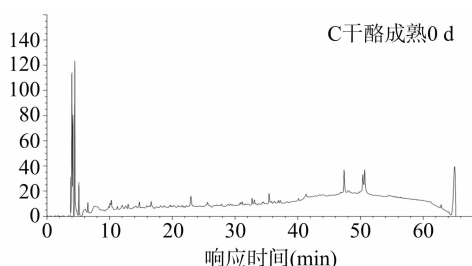
3 讨论

一般认为乳杆菌之所以能在切达干酪内生长,是因为乳杆菌具有产生大量蛋白酶和肽酶的能力。而干酪乳杆菌被证明能产生二肽酶、三肽酶、羧肽酶、氨肽酶和肽链内切酶^[15]。这些酶可以加速干酪内蛋白质的降解,进而提高干酪内小分子肽和游离氨基酸的含量。图 1 结果显示,干酪内的水溶性肽和游离氨基酸的含量都较对照组高,表明干酪乳杆菌 LC2W 的加入可以提高切达干酪的蛋白质降解而有利于切达



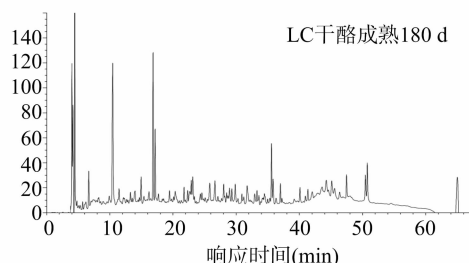
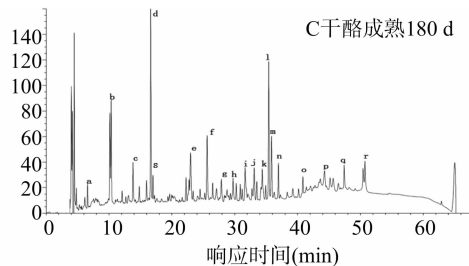
α -CN、 β -CN 分别代表标准品 α -酪蛋白和 β -酪蛋白；C0、C60、C120、C180 分别代表成熟时间为 0、60、120、180 d 无 LC2W 菌株添加干酪；L0、L60、L120、L180 分别代表成熟时间为 0、60、120、180 d 添加 LC2W 菌株的干酪

图2 切达干酪 pH 值 4.6 水不溶性蛋白的 Urea-PAGE 图谱



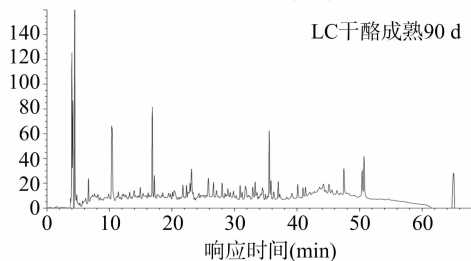
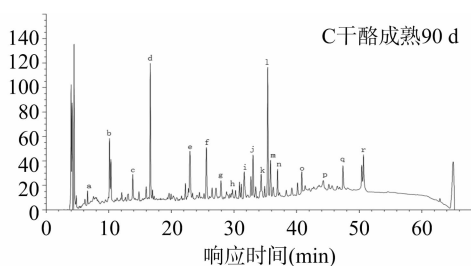
C—无 LC2W 菌株添加切达干酪；LC—添加 LC2W 菌株的切达干酪

图3 干酪成熟 0 d 时 pH 值 4.6 水溶性多肽的反相液相色谱



C—无 LC2W 菌株添加切达干酪；LC—添加 LC2W 菌株的切达干酪

图5 干酪成熟 180 d 时 pH 值 4.6 水溶性多肽的反相液相色谱



C—无 LC2W 菌株添加切达干酪；LC—添加 LC2W 菌株的切达干酪

图4 干酪成熟 90 d 时 pH 值 4.6 水溶性多肽的反相液相色谱

干酪的成熟,同时也表明 LC2W 在切达干酪内能产生肽酶提高多肽的降解。在干酪成熟 10、60、90、120 d 时,WSN 的含量在 2 种干酪中无显著性差异($P>0.05$),这一结果与 Ong 等^[2]

研究益生菌双歧乳杆菌、干酪乳杆菌、副干酪乳杆菌和嗜酸乳杆菌对切达干酪 WSN 的影响结果一致,Ong 认为干酪内水溶性多肽主要是由干酪内残余的凝乳酶和胞浆素降解酪蛋白产生的,这是产生这一结果的主要原因。到干酪成熟后期,添加 LC2W 的干酪 WSN 的含量比对照组有显著提高,这也许是因为干酪内微生物产生的蛋白酶参与了蛋白质的降解。

TCA-SN 包含中小分子的肽、氨基酸和小分子的含氮化合物(胺、尿素和铵),而 PTA-SN 主要由非常小的肽、氨基酸和更加小的含氮化合物组成,因此 PTA-SN 含量可作为游离氨基酸的含量指标^[16]。添加菌株 LC2W 的干酪 TCA-SN 的含量一直高于对照组,特别是在干酪成熟 30、60、90 d 时两者的含量存在显著性差异,说明 LC2W 的加入可为水溶性多肽降解为中小分子肽提供相应的肽酶。切达干酪内 PTA-SN 含量在加入 LC2W 后高于未加入 LC2W 菌株的含量(图 1-Ⅲ),这进一步说明 LC2W 在干酪内有肽酶的产生,而且这些酶可能在干酪成熟前期(10、30 d)已发挥了作用,因为这一时期干酪内的 PTA-SN(或者游离氨基酸)的含量明显得到了提高。切达干酪内加入其他乳杆菌(长双歧杆菌 1941、乳双歧杆菌 LAFTI B94、干酪乳杆菌 279、副干酪乳杆菌 LAFTI L26、嗜酸乳杆菌 4962、嗜酸乳杆菌 LAFTI L10)也同样提高了游离氨基

酸的含量^[2,8],另外派特格司奶酪内加入乳杆菌(干酪乳杆菌、副干酪乳杆菌、嗜酸乳杆菌、双歧杆菌)^[11,17-18],Cremoso 干酪加入乳杆菌(干酪乳杆菌、植物乳杆菌、鼠李糖乳杆菌)^[12],Ras 干酪加入乳杆菌(瑞士乳杆菌、干酪乳杆菌、德士乳杆菌)^[19]等也得到了与切达干酪类似的结果。

2 种干酪蛋白质的 Urea - PAGE 图谱和水溶性多肽图谱进一步表明,LC2W 的加入的确对干酪的蛋白质降解产生了影响,如加速了 α - 酪蛋白的降解(图 2),降低了干酪内一些多肽的含量[添加 LC2W 菌株的干酪肽谱上某些峰(图 4、图 5 中峰 c、d、e、f、l、j、k、l、m)峰值较低]。添加了菌株 LC2W 的干酪,某些水溶性多肽的降低也许可以解释这一干酪内 PTA - SN(图 1 - III)含量显著性提高这一事实。另外水溶性多肽的肽谱随着干酪成熟时间在变化也说明多肽的产生和降解处在动态之中,Hynes 等^[20]认为添加某一菌株后干酪内某些肽峰的降低或消失表明这些峰所代表的多肽可以被所加入的乳杆菌作为基质代谢或降解。根据这一解释,我们可以推测菌株 LC2W 在切达干酪内产生了降解多肽的肽酶。Bergamini 研究^[11,18]派特格司奶酪蛋白质降解时也发现,乳杆菌(干酪乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、副干酪乳杆菌、嗜酸乳杆菌)的加入会对水溶性多肽的图谱产生影响,说明这些菌株参与了干酪内的蛋白质水解。

4 结论

在切达干酪成熟过程中,添加干酪乳杆菌 LC2W 会对切达干酪的蛋白质降解产生影响,能够提高其 WSN、TCA - SN、PTA - SN 的含量,特别是在成熟后期可以显著提高干酪内 WSN 和 PTA - SN 的含量。通过对干酪内 WSN、TCA - SN、PTA - SN 的测定,蛋白质 Urea - PAGE 分析和多肽 RP - HPLC 分析可以确定干酪内蛋白质降解的程度和蛋白质降解的动态变化趋势。干酪乳杆菌 LC2W 对干酪内蛋白质降解的影响是通过加速 α - 酪蛋白的降解速率和降解干酪内某些多肽来实现的,表明干酪乳杆菌 LC2W 在切达干酪内很可能具有分泌肽酶降解多肽为游离氨基酸的能力。

参考文献:

- [1] Sousa M J, Ardö Y, McSweeney P L H. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening[J]. International Dairy Journal, 2001, 11(4-7): 327 - 345.
- [2] Ong L, Henriksson A, Shah N P. Proteolytic pattern and organic acid profiles of probiotic Cheddar cheese as influenced by probiotic strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. paracasei*, *Lb. casei* or *Bifidobacterium* sp[J]. International Dairy Journal, 2007, 17(1): 67 - 78.
- [3] Settanni L, Moschetti G. Non - starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits[J]. Food Microbiology, 2010, 27(6): 691 - 697.
- [4] Lynch C M, Muir D D, Banks J M, et al. Influence of adjunct cultures of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* or *Lactobacillus plantarum* on Cheddar cheese ripening[J]. Journal of Dairy Science, 1999, 82(8): 1618 - 1628.
- [5] Souza C B, Saad S I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* La - 5 added solely or in co - culture with a yoghurt starter culture and implications on physico - chemical and related properties of minas fresh cheese during storage[J]. LWT - Food Science and Technology, 2009, 42(2): 633 - 640.
- [6] Buri F A, da Rocha J S, Assis E G, et al. Probiotic potential of Minas fresh cheese prepared with the addition of *Lactobacillus paracasei* [J]. LWT - Food Science and Technology, 2005, 38(2): 173 - 180.
- [7] Kasimoğlu A, Gönçüoğlu M, Akgün S. Probiotic white cheese with *Lactobacillus acidophilus* [J]. International Dairy Journal, 2004, 14(12): 1067 - 1073.
- [8] Ong L, Henriksson A, Shah N P. 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(5): 446 - 456.
- [9] Gardiner G, Ross RP, Collins JK, et al. Development of a probiotic cheddar cheese containing human - derived *Lactobacillus paracasei* strains[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(6): 2192 - 2199.
- [10] Madkor SA, Tong PS, El Soda M. Ripening of cheddar cheese with added attenuated adjunct cultures of lactobacilli [J]. Journal of Dairy Science, 2000, 83(8): 1684 - 1691.
- [11] Bergamini C V, Hynes E R, Candioti M C, et al. Multivariate analysis of proteolysis patterns differentiated the impact of six strains of probiotic bacteria on a semi - hard cheese[J]. Journal of Dairy Science, 2009, 92(6): 2455 - 2467.
- [12] Milesi M M, Gabriel V, Nora S, et al. Influence on cheese proteolysis and sensory characteristics of non - starter lactobacilli strains with probiotic potential[J]. Food Research International, 2009, 42(8): 1186 - 1196.
- [13] Voigt D D, Chevalier F, Qian M C, et al. Effect of high - pressure treatment on microbiology, proteolysis, lipolysis and levels of flavour compounds in mature blue - veined cheese[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2010, 11(1): 68 - 77.
- [14] Yüceer Y K, Tuncel B, Guneser O, et al. Characterization of aroma - active compounds, sensory properties, and proteolysis in Ezine cheese[J]. Journal of Dairy Science, 2009, 92(9): 4146 - 4157.
- [15] Peterson S D, Marshall R T. Nonstarter lactobacilli in cheddar cheese: a review [J]. Journal of Dairy Science, 1990, 73(6): 1395 - 1410.
- [16] Ardö Y. Evaluating proteolysis by analysing the N content of cheese fractions[J]. International Dairy Federation, 1999, 337: 4 - 9.
- [17] Bergamini C V, Hynes E R, Palma S B, et al. Proteolytic activity of three probiotic strains in semi - hard cheese as single and mixed cultures: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* and *Bifidobacterium lactis* [J]. International Dairy Journal, 2009, 19(8): 467 - 475.
- [18] Bergamini C V, Hynes E R, Zalazar C A. Influence of probiotic bacteria on the proteolysis profile of a semi - hard cheese[J]. International Dairy Journal, 2006, 16(8): 856 - 866.
- [19] Sameh A, Nour A, El S M. Evaluation of isolated starter lactic acid bacteria in Ras cheese ripening and flavour development[J]. Food Chemistry, 2007, 104(3): 1192 - 1199.
- [20] Hynes ER, Bergamini CV, Suárez VB, et al. Proteolysis on reggianito argentino cheeses manufactured with natural whey cultures and selected strains of *Lactobacillus helveticus* [J]. Journal of Dairy Science, 2003, 86(12): 3831 - 3840.