

黄 宜,刘振民,莫蓓红,等.干酪中微生物的研究进展[J].江苏农业科学,2016,44(5):359-361.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.05.105

干酪中微生物的研究进展

黄 宜^{1,2},刘振民²,莫蓓红²,郭本恒^{1,2},吴正钧¹

(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. 上海海洋大学食品学院,上海 201306)

摘要:干酪是一种具有丰富营养物质的乳制品,随着人们生活水平的提高,对干酪这种营养健康的食品需求量也会越来越大。干酪中的微生物在其生产和成熟过程中起着非常重要的作用,产生丰富的营养物质,同时也与干酪独特的风味、质地以及功能性营养物质形成有关。主要介绍了微生物在干酪生产过程中的作用和污染微生物对干酪生产和成熟的影响。研究干酪与微生物的关系并控制污染微生物的生长,对干酪制作的质量控制具有重要意义。

关键词:干酪;营养;微生物;污染

中图分类号:TS252.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)05-0359-03

干酪,又名奶酪,有各式各样的味道、口感和形式。分为成熟或未成熟的软质、半硬质、硬质或特硬质、有涂层的干酪。干酪以奶类为原料,含有丰富的蛋白质和脂质,具有很高营养价值^[1]。随着我国人民生活水平的提高,对像干酪这种营养健康食品的需求量越来越多。近 10 年来,我国干酪市场持续升温,进口量不断扩大。据海关信息网(www.haiguan.info)统计,我国干酪进口量从 2004 年的 7 244.1 t 增加到 2013 年的 47 330.9 t,年平均增长率为 23.2%,进口总数量超过 20 万 t。

在干酪生产和成熟过程中微生物菌群起着重要的作用,促进了产品质构和风味形成^[2]。这些微生物主要包括发酵剂微生物和非发酵剂微生物。发酵剂微生物的作用在于干酪生产过程中产酸,用于提高凝乳酶的活性,有助于排除乳清和抑制有害菌生长。非发酵剂菌群主要是指乳酸菌^[3],在切达和荷兰式干酪中最常见的是嗜温乳杆菌,如干酪乳杆菌、副干酪乳杆菌、植物乳杆菌、丙酸杆菌、弯曲乳杆菌。它们对干酪独特风味和眼孔的形成以及增强微生物的生存能力具有重要作用。除了添加的发酵剂外,还存在着一些来自于生产和加工过程中混入的微生物,对干酪也有一定影响。干酪中微生物的特点是大量细菌、酵母和霉菌共存,且许多因素影响它们的生存与生长。

与发酵酸奶相比,由于干酪具有独特的物理和化学特性,如更高的 pH 值、低滴定酸度、高缓冲能力、高脂肪高营养、低氧以及结构紧密。所以在乳制品中,干酪是益生菌进入人体肠道潜在的优良载体。为了保证干酪产品对人体的健康益处,菌群数量需要达到 10⁶ CFU/g 以上且无不良感官性状。因此,将益生菌^[4]添加到不同种类的干酪中研究不同组分和加工方式等因素对干酪产品中益生菌的生存能力和感官特性的影响已经成为了研究热点。干酪中益生菌稳定性的影响因素可以归结为 3 个方面,包括处方因素(菌种及其交互作用,

pH 值和可滴定酸度,过氧化值,分子态氧,生产促进剂和食品添加剂、盐、微胶囊化和成熟的因素)、加工因素(培养温度、热处理、接种的类型和储存温度)、包装材料和系统方面。

1 干酪中主要微生物菌群

1.1 干酪中的发酵剂菌群

大多数干酪在生产过程中都需要添加发酵剂。在天然非霉菌干酪生产过程中,常添加乳酸菌(LAB)^[5]。LAB 为革兰氏阳性菌^[6],过氧化氢酶呈阴性,无芽孢形成,低 GbC 含量且为兼性厌氧型。其形态特征能很好地表达这种细菌的非均质性,因为它们可能出现杆状、球形,单细胞或耦合、四分,或长、短链。由于 LAB 有限的生物合成能力和碳源、氮源的高要求,是只能在营养丰富环境中生长的营养缺陷型菌株,需要一些氨基酸和维生素供其生长。LAB 在干酪中是常用的发酵剂,由于它们的一些代谢特性,对干酪的感官、质地、营养价值和发酵食品的微生物安全性有着显著影响。

发酵剂菌群主要是在干酪生产过程中产酸,同时对干酪成熟也起着一定推动作用。干酪生产过程中一个关键点是乳酸菌乳糖代谢为乳酸,酸化的速度和程度影响凝乳的效果和控盐率。LAB 能够快速发酵乳糖产生高浓度乳酸,提高凝乳酶活性^[7]。这些 LAB 包括中温发酵剂乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)和明串珠菌属(*Leuconostoc* spp.),嗜热发酵剂包括嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)、德氏乳杆菌(*Lactobacillus delbrueckii*)和瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus*)等。

1.2 干酪中的非发酵剂菌群

干酪生产过程中非发酵剂菌群^[8]对干酪的成熟发挥重要作用,可以使干酪的成熟时间缩短至几个月或几周。这些微生物能够降解蛋白质和脂肪,加速蛋白质的次级水解进程,对干酪的风味和质地的形成极为重要^[9]。常见的非发酵剂菌群通常包括肠球菌(*Enterococcus*)、乳酸杆菌(*Lactobacillus*)、乳酸乳球菌(*Lactococcus*)、明串珠菌(*Leuconostoc*)、片球菌属(*Pediococcus*)和链球菌(*Streptococcus*)等。

1.3 微生物在干酪的食品安全性中的作用

现今,几乎所有的食品中都会添加食品添加剂,各种各

收稿日期:2015-04-27

基金项目:国家科技支撑计划(编号:2013BAD18B02)。

作者简介:黄 宜(1988—),男,硕士,研究方向为食品工程、食品生物技术。E-mail:huangyi59@163.com。

通信作者:刘振民,博士,教授级高级工程师,研究方向为乳及乳制品的研究与开发。E-mail:liuzhenmin@brightdairy.com。

样食品剂添加使用广泛,导致人们对食品添加剂的危害性产生担忧。干酪中乳酸菌在生产过程中能够产生有机酸(丙酸、丁酸、醋酸等)降低环境的 pH 值,抑制有害微生物的生长^[10],对干酪中微生物稳定性提供保护作用,从而减少食源性致病菌和食品腐败菌的生长和生存的风险。在干酪中乳酸菌的作用能够替代食品添加剂,延迟食品货架期^[11],且不会产生不利因素。

乳酸菌产生的细菌素^[12]是一类具有活性的多肽或蛋白质物质,抑菌范围不局限于同源性微生物,且产生菌自身有免疫作用。产生细菌素使乳酸菌具有重要的生物保鲜能力,即所谓的“生物保藏”,是指使用微生物和其代谢物加强和提高食品的安全性和保质期。有研究发现,细菌粪肠球菌在干酪成熟过程中表现出比其他的 NSLAB 菌株产生更持久的细菌素能力,能够有效抑制真菌污染物的生长代谢和次级代谢产物。此外,蛋白质和脂肪分解能力强的菌株可以有效抑制致病菌(金黄色葡萄球菌和大肠杆菌)的生长,对李斯特菌^[13]也有一定抑制作用。

2 微生物对干酪品质的影响

2.1 干酪风味的产生

干酪的风味是非常复杂的,涉及数百种化合物,是在微生物产生的多种酶共同作用下形成的^[14]。成熟过程中发生生化变化,初次变化包括糖酵解、脂肪、蛋白质水解,形成独特的初级风味物质,从而产生挥发性香气化合物的前体,然后通过二次生化变化,如脂肪酸和氨基酸的代谢形成重要的次生代谢产物,包括风味形成所必需的一些化合物的代谢。分解代谢反应和侧链修饰可能会产生酮酸、氨、胺、醛、酸和醇等,形成了干酪基本的味道和香气。如切达干酪中,最为重要的物质有乙酸、丁酸、己酸、辛酸、硫化氢、谷氨酸、羰基化合物等,这些化合物的产生与生产过程中所用的发酵菌种有关。还有一些非挥发性化合物,乳游离氨基酸和肽与蛋白酶和肽酶水解系统有关^[15]。因此,干酪的风味是一个多组分混合体系。

2.2 干酪质地的形成

在干酪的熟化过程中,组织中的一系列结构成分会产生不同的物理化学变化过程。这些变化可以通过剩余的凝乳、微生物菌群和代谢产生的酶以及在矿物质平衡上的变化来进行调节。其中包括:剩余的乳糖会转变成乳酸、乙酸和丙酸;酪蛋白水解生成了很多种氨基酸和缩氨酸,并且氨基酸会通过转化形成胺、乙醇、乙醛和 NH_3 ;甘油三酯通过水合作用生成游离脂肪酸,进一步降解后生成酮和乙醇;脂肪球的凝结会导致脂肪槽的形成,在所有类型的干酪中都有发生;通过改善副酪蛋白的水合作用,如其水解性、干酪的 pH 值升高和酪蛋白连接钙的溶解性。

因此,干酪是极其复杂的体系,包含了化学、生物和生化等多方面变化,如酪蛋白水解水合、组织的膨胀、脂肪的凝结和水解,都会使干酪的质地发生一系列变化。干酪的质地性质包括基本性质、二级性质和三级性质。二级性质和三级性质是对干酪基本性质的延伸。基本性质包括组成、微观结构和宏观结构以及它的分子性质。二级和三级性质还包括许多其他的性质,如弹性、硬度、脆性和柔软度,这些特性和内在的流变特性是直接相关的。这些流变学特性决定了干酪在受外力咬、挤压、咀嚼、磨碎过程中的变化。由于干酪的质地受

流变学特性的影响,因此它们的关系是很密切的^[16]。

2.3 益生菌功能性营养物质

益生菌定义为“活的微生物,当达到足够的数量会赋予人体健康的益处”。益生菌影响人体健康,是通过改善肠道菌群的平衡,改善黏膜对病原体的防御。额外的健康益处包括增强免疫反应、降低血清胆固醇、维生素合成、抗癌活性、抗菌活性。从营养学的角度来看,干酪含有丰富的营养物质,如蛋白质、维生素、矿物质和短链脂肪酸,是健康饮食重要的部分^[17]。其中,维护骨骼健康的钙和人体必需的氨基酸非常丰富,其组成对肌肉结构的发展不可缺少,这些因素都导致了医疗卫生机构鼓励干酪的消费。此外,在干酪成熟过程中,来自于牛奶、发酵剂和次级微生物菌群中的蛋白酶和肽酶将酪蛋白水解成了很多肽类。部分肽类在结构上类似于内源性肽、激素、神经递质或抗生素,在有机体中发挥了至关重要的作用。它们中的一些也可以在肠胃消化道中不被消化掉或作为最终的前体肽的形式存在。在受体相同的情况下,部分肽的衍生物比内源性肽有更强的相互作用,能在有机体中发挥激动或拮抗作用。

3 干酪中的主要污染微生物对干酪的影响

3.1 噬菌体对干酪生产过程的影响

在很多干酪生产过程中,乳业工厂在热处理的牛奶中添加微生物发酵剂控制发酵过程。这些对噬菌体敏感的高浓度菌群在干酪工厂中是无处不在的。噬菌体能够通过空气循环传播并且在干酪生产设施中也是普遍存在的。化学食品和生物技术产品是通过大规模的微生物发酵制成的。因为大量的微生物细胞是在发酵罐中培养的,大部分工业都经历过噬菌体污染的问题^[19]。噬菌体的大量产生一直是工业的困扰,因为它们能减慢发酵过程且对产品质量不利,会导致额外的花费和延时。乳品行业几十年来一直都在努力控制噬菌体的量。

乳品工业根据选择的发酵剂菌种大量生产发酵乳制品。例如,乳酸链球菌的几个菌株被广泛用于牛奶生产干酪中。发酵剂的菌群量在大型工业发酵罐中能够高达 10^9 CFU/mL。噬菌体在乳品环境中普遍存在,若发酵剂中对噬菌体敏感的宿主细胞占优势,任何一个发酵罐中的烈性噬菌体都会开始感染,使得它的繁殖体最终会溶解大量的发酵剂细胞,并且会减慢发酵过程,从而使产品质量低劣。现今,控制食品中噬菌体的量已经取得了重大进展,由于已经有了一些方法将噬菌体控制在低水平上。例如,一个标准的干酪生产工厂将几株乳酸链球菌循环使用来阻止噬菌体的积累。尽管如此,在制作干酪过程中噬菌体感染使得生产过程一直具有相当大的风险,因为噬菌体菌群会时时进化且通过多种途径扩散。噬菌体的来源和它们的分散途径必须要有清晰的认识,单一的处理措施难以限制它们的增殖。

因此,抗噬菌体发酵剂的研究一直都是当今研究的热点,在乳制品行业具有巨大的发展潜力。将生物工程和基因工程相结合,研究细菌的噬菌体抗性机理,为研发抗噬菌体菌株的育种提供了良好的前景。

3.2 梭状芽孢杆菌对干酪的影响

干酪产气只有在成熟晚期才明显发生。这是由于梭状芽孢杆菌发酵乳酸产生丁酸、乙酸、二氧化碳和大量氢气所致。这是半硬质和硬质干酪变质的主要原因之一,导致干酪外观、质

构和风味出现瑕疵。*Clostridium tyrobutyricum* 为革兰氏阳性菌,厌氧,是能够产生孢子的细菌,被认为是奶酪晚期产气^[20]的首要原因。然而,发现其他的梭菌菌种,如 *Clostridium sporogenes*、*Clostridium beijerinckii* 和 *Clostridium butyricum* 也会使干酪出现这种显著的瑕疵^[21]。

晚期产气最常见的控制方法是通过对牛乳进行离心除菌和微过滤,添加硝酸盐或溶菌酶。然而,通过离心除菌,孢子的减少数量还不足以减少干酪中晚期产气。相对于离心除菌减少95%的孢子,微过滤能减少达到99%,但只适用于脱脂牛奶,因为牛奶的脂肪球过大,无法通过微滤膜。另外,减少晚期产气的方法是在干酪生产工程中使用乳酸菌(LAB)细菌素。乳酸菌细菌素能够有效抑制梭状芽孢杆菌的生长,常用于再制干酪中。添加溶菌酶或添加 NO_3^- 也能够有效减少干酪晚期产气,对不同的菌种具有不一样的效果。欧洲食品安全局(EFSA)建议尽量减少使用硝酸盐和亚硝酸盐作为食品添加剂的使用,是为了保持潜在的致癌物质亚硝胺保持在低的水平。通常情况下是结合几种方法,最优化控制干酪中的晚期产气。

4 结语

干酪是一种既营养又健康的高蛋白食品,是全人类饮食文化中不可缺少的一部分,具有广阔的前景。近十几年来,干酪作为食品配料的使用量增加迅速,主要用在面包、汉堡、披萨等西式食品中。随着我国对外交流的加强,西方饮食文化逐渐渗入到我国人民的日常生活之中,人们对干酪的认识逐渐加深。干酪具有丰富的营养价值和出色的功能特性,必将被国内越来越多的消费者接受。干酪中微生物的菌种和数量一直处于动态变化中,所起的作用无可替代,不仅加工工艺会对微生物产生影响,生产过程中其所产生的物质和干酪中的营养物质也会对其产生影响。我国干酪的研究工作起步较晚,与国际还有较大差距。研究微生物与干酪的作用关系、改善生产工艺具有广阔的前景。

参考文献:

- [1] Karimi R, Sohrabvandi S, Mortazavian A M. Review article: sensory characteristics of probiotic cheese [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2012, 11(5): 437–452.
- [2] Fitzsimons N A, Cogan T M, Condon S, et al. Phenotypic and genotypic characterization of non-starter lactic acid bacteria in mature cheddar cheese [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(8): 3418–3426.
- [3] Karimi R, Mortazavian A M, da Cruz A G. Viability of probiotic microorganisms in cheese during production and storage: a review [J]. Dairy Science & Technology, 2011, 91(3): 283–308.
- [4] Kieroneczyk A, Skeie S, Langsrud T, et al. Cooperation between *Lactococcus lactis* and nonstarter *Lactobacilli* in the formation of cheese aroma from amino acids [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(2): 734–739.
- [5] Feutry F, Oneca M, Berthier F, et al. Biodiversity and growth dynamics of lactic acid bacteria in artisanal PDO Ossau – Iraty cheeses made from raw ewe's milk with different starters [J]. Food Microbiology, 2012, 29(1): 33–42.
- [6] Ayad E H. Starter culture development for improving safety and quality of Domiati cheese [J]. Food Microbiology, 2009, 26(5): 533–541.
- [7] Burns P, Cuffia F, Milesi M, et al. Technological and probiotic role of adjunct cultures of non-starter lactobacilli in soft cheeses [J]. Food Microbiology, 2012, 30(1): 45–50.
- [8] 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.
- [9] Speranza B, Sinigaglia M, Corbo M R. Non starter lactic acid bacteria biofilms: a means to control the growth of *Listeria monocytogenes* in soft cheese [J]. Food Control, 2009, 20(11): 1063–1067.
- [10] Settanni L, Franciosi E, Cavazza A A, et al. Extension of tosele cheese shelf-life using non-starter lactic acid bacteria [J]. Food Microbiology, 2011, 28(5): 883–890.
- [11] Alegría A, Delgado S, Rocas C, et al. Bacteriocins produced by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from traditional, starter-free cheeses made of raw milk [J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 143(1/2): 61–66.
- [12] dal Bello B, Cocolin L, Zeppa G, et al. Technological characterization of bacteriocin producing *Lactococcus lactis* strains employed to control *Listeria monocytogenes* in cottage cheese [J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 153(1/2): 58–65.
- [13] Callon C, Saubusse M, Didiene R, et al. Simplification of a complex microbial antilisterial consortium to evaluate the contribution of its flora in uncooked pressed cheese [J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 145(2/3): 379–389.
- [14] Pappa E C, Massouras T, Sotirakoglou K A. Formation of volatile compounds in Teleme cheese manufactured with mesophilic and thermophilic dairy starters [J]. Small Ruminant Research, 2013, 111(1/3): 110–119.
- [15] Dimitrov Z. Characterization of bioactive peptides with calcium-binding activity released by specially designed cheese starter [J]. Biotechnology and Biotechnological Equipment, 2009, 23(S1): 927–930.
- [16] Charlet M, Duboz G, Faurie F, et al. Multiple interactions between *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus delbrueckii* strongly affect their growth kinetics during the making of hard cooked cheeses [J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 131(1): 10–19.
- [17] Fortin M H, Champagne C P, St-Gelais D A, et al. Effect of time of inoculation, starter addition, oxygen level and salting on the viability of probiotic cultures during Cheddar cheese production [J]. International Dairy Journal, 2011, 21(2): 75–82.
- [18] Verreault D, Gendron L, Rousseau G M, et al. Detection of airborne lactococcal bacteriophages in cheese manufacturing plants [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(2): 491–497.
- [19] Carmen Martinez – Cuesta M, Bengoechea J, Bustos I A, et al. Control of late blowing in cheese by adding lactacin 3147 – producing *Lactococcus lactis* IFPL 3593 to the starter [J]. International Dairy Journal, 2010, 20(1): 18–24.
- [20] Garde S, Gaya P, Arias R, et al. Enhanced PFGE protocol to study the genomic diversity of *Clostridium* spp. isolated from Manchego cheeses with late blowing defect [J]. Food Control, 2012, 28(2): 392–399.
- [21] Garde S, Arias R, Gaya P, et al. Occurrence of *Clostridium* spp. in ovine milk and manchego cheese with late blowing defect: identification and characterization of isolates [J]. International Dairy Journal, 2011, 21(4): 272–278.