

具有优良发酵特性德氏乳杆菌 保加利亚亚种的筛选及其益生特性

王磊¹, 高宗露¹, 宗丽娜¹, 吕田¹, 鲁茂林¹, 王文琼¹, 陈大卫¹, 徐粉林², 顾瑞霞¹

(1. 扬州大学江苏省乳品生物技术与安全控制重点实验室, 江苏扬州 225127)

(2. 维维食品饮料股份有限公司, 江苏徐州 221000)

摘要: 本研究对 10 株实验室保存的德氏乳杆菌保加利亚亚种产酸能力, 产黏能力, 产香能力和贮藏期稳定性进行测定, 并通过测定乳酸菌对抗生素的耐药性、抑菌能力、 β -半乳糖苷酶 (β -Gal) 活性、 α -半乳糖苷酶 (α -Gal) 活性和乳酸脱氢酶 (LDH) 活性探究菌株的益生特性。单菌株发酵实验结果表明: 菌株 KSDB-1 凝乳时间短 (6.3 h), 凝乳酸度为 76.02 °T, 具有较好的产酸能力, 同时黏度和持水力分别为 1305.67 mPa.s 和 50.55%, 显著高于其他菌株 ($p < 0.05$); 菌株 HDS-13、DDB14、KSDB-1 具有较好的产香能力较好, 其中菌株 HDS-13 的双乙酰含量为 2.88 mg/L, 乙醛含量达到了 30.08 mg/L, 可有效改善酸奶的风味。益生特性实验结果表明: 10 株供试菌株对大部分抗生素表现为敏感, 具有较高的安全性; 菌株 HDS-13、DDB-14、HDB-1、HDS-18、KSDB-1 对 6 株致病菌均具有一定的抑制能力, 能有效抑制肠道致病菌的生长; 菌株 HDS-12 和 KSDB-1 乳酸脱氢酶活力较高; 菌株 HDS-12, HDB-17 β -半乳糖苷酶活力较高; 菌株 DDS-15 α -半乳糖苷酶活力显著高于其他菌株 ($p < 0.05$), 达到了 1.33 U/mg。综合得出: 菌株 KSDB-1 发酵特性良好, 具有一定的益生特性, 作为酸奶发酵剂具有潜在的工业应用前景。

关键词: 德氏乳杆菌保加利亚亚种; 酸乳; 发酵特性; 贮藏期; 益生特性

文章编号: 1673-9078(2021)05-43-51

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.5.1022

Screening of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* with Superior Fermentation Properties and Its Probiotic Properties

WANG Lei¹, GAO Zong-lu¹, ZONG Li-na¹, LYU Tian, LU Mao-lin¹, WANG Wen-qiong¹, CHEN Da-wei¹,
XU Fen-lin², GU Rui-xia¹

(1. Jiangsu Key Laboratory of Dairy Biological Technology and Safety Control, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China)(2. Weiwei Food and Beverage Co. Ltd., Xuzhou 221000, China)

Abstract: The acid-producing, viscosity-increasing, and aroma-producing capacities and laboratory storage stabilities of ten strains of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* were measured. The probiotic characteristics of the strains were also explored by monitoring their antibiotic resistance, antibacterial activities, and β -galactosidase (β -gal), α -galactosidase (α -gal), and lactate dehydrogenase (LDH) activities. Single-strain fermentation experiments show that the strain KSDB-1 had a short coagulation time (approximately 6.3 h), a lactic acid degree of 76.02 °T upon coagulation, and good acid-producing ability. The viscosity and water holding capacity (1305.67 mPa.s and 50.55%, respectively) were significantly higher than those of other strains ($p < 0.05$). Aroma production of strains HDS-13, DDB14, and KSDB-1 was superior. Strain HDS-13 displayed a diacetyl content of 2.88 mg/L and an acetaldehyde content of up to 30.08 mg/L. These attributes could effectively improve the flavor of the yoghurt product. Probiotic tests show that all the ten tested strains were sensitive to most antibiotics and thus would be relatively

引文格式:

王磊,高宗露,宗丽娜,等.具有优良发酵特性德氏乳杆菌保加利亚亚种的筛选及其益生特性[J].现代食品科技,2021,37(5):43-51

WANG Lei, GAO Zong-lu, ZONG Li-na, et al. Screening of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* with superior fermentation properties and its probiotic properties [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(5): 43-51

收稿日期: 2020-11-04

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31972094; 31701627); 国家重点研发计划课题 (2019YFF0217602); 江苏省高等学校自然科学研究重大项目 (19KJA140004); 成都市重大科技应用示范项目 (2019-YF09-00055-SN); 江苏省科技计划项目-苏北科技专项 (XZ-SZ201850)

作者简介: 王磊 (1994-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 乳品科学; 通讯作者: 顾瑞霞 (1969-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 乳品科学

safe to use. Strains HDS-13, DDB-14, HDB-1, HDS-18, and KSDB-1 could inhibit six pathogenic bacteria and effectively inhibited the growth of pathogenic intestinal bacteria. The LDH activities of strains HDS-12 and KSDB-1 were relatively high. The β -gal activities of strains HDS-12 and HDB-17 were relatively greater than that of the other strains. The α -gal activity of strain DDS-15 was significantly higher than those of other strains ($p < 0.05$), reaching 1.3263 U/mg. The collective data indicate that strain KSDB-1 has excellent fermentation properties and, to a certain degree, satisfactory probiotic properties. DDS-15 has potential in industrial application for yogurt fermentation.

Key words: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*; yogurt; fermentation property; storage period; probiotic property

乳酸菌 (Lactic acid bacteria, LAB) 是指一类可以利用碳水化合物发酵产生乳酸的细菌, 被认为是安全 (Generally Regarded as Safe, GRAS) 的益生菌, 在益生菌中占有重要地位^[1]。欧美等一些发达国家较早对乳酸菌进行了研究, 这些国家不但成立了自己的乳酸菌菌种资源库, 而且研发出了拥有自主知识产权的优势乳酸菌及其发酵制剂^[2]。由于我国对乳酸菌的研究工作起步较晚, 只有很少的具有自主知识产权的乳酸菌及其发酵剂^[3]。目前, 国内学者已扩大了对乳酸菌资源的研究, 并且筛选出了一些优良的乳酸菌, 这大大加快了我国乳制品行业的发展。

德氏乳杆菌保加利亚亚种 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) 简称保加利亚乳杆菌, 是乳杆菌属的模式种^[4], 在发酵过程中可经同型乳酸发酵将乳糖转化为乳酸^[5], 并且将蛋白质降解为肽类和氨基酸^[6], 为乳制品提供了独特的质地、风味^[7], 同时赋予乳制品特殊的食疗功效^[8], 也提高了乳制品功能特性以及营养价值^[9,10]。

德氏乳杆菌保加利亚亚种是工业生产发酵乳制品最主要的酸乳发酵剂菌种之一^[11], 筛选出具有优良发酵性能的德氏乳杆菌保加利亚亚种菌株具有潜在的经济价值, 对乳酸菌资源的开发利用具有重要的战略意义。本研究旨在通过对传统发酵制品中分离出的德氏乳杆菌保加利亚亚种的发酵和益生特性进行研究, 以期筛选出具有优良发酵特性的乳酸菌菌株, 为国内酸乳发酵剂生产提供指导和菌种资源,

1 材料与amp;方法

1.1 材料与设备

1.1.1 试验材料

试验菌株: 10 株德氏乳杆菌保加利亚亚种 (分离自传统发酵乳制品, 由扬州大学乳品生物技术与工程江苏省重点实验室提供)。

病原指示菌: 大肠杆菌 (*Escherichia coli* CICC10012)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* CICC10201)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis* CICC10012)、蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*

CICC102311)、肠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella enterotyphi* WX29)、布氏假单胞菌 (*Pseudomonas brenneri* CICC1027), 购自中国工业微生物菌种保存管理中心。

全脂乳粉、脱脂乳粉, 新西兰乳业有限公司; 白砂糖, 超市购买; β -半乳糖苷酶 (β -Gal) 活性检测试剂盒、 α -半乳糖苷酶 (α -Gal) 活性检测试剂盒, 北京索莱宝科技有限公司; 乳酸脱氢酶 (LDH) 活性检测试剂盒、蛋白定量检测试剂盒, 南京建成生物工程研究所; 药敏试纸, 杭州天和微生物试剂有限公司。

1.1.2 试验设备

蒸汽灭菌锅 SX-500, 日本 TOMY 公司; 超净工作台 SW-CJ-1F, 苏州净化设备有限公司; 高压均质机 GYB60-08, 上海东华高压均质机厂; 电子天平 PL2002, 梅特勒公司; 恒温水浴锅 HH6, 国华电器有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株的活化及全脂乳的制备

1.2.1.1 菌株活化及菌悬液的制备

将菌种保藏管中的德氏乳杆菌保加利亚亚种接种于 MRS 液体培养基中, 转接活化 2 次后, 按 3% 的接种量接种于 12% 的脱脂乳培养基中。待凝乳后, 置于 4 °C 冰箱冷藏备用。

1.2.1.2 全脂乳的制备

将蒸馏水预热至 50 °C, 加入 12% 全脂乳粉混匀, 待温度上升至 60 °C 时, 加入质量分数为 6.5% 的蔗糖溶解搅拌, 使其充分混合, 经过均质 (20 MPa, 循环 2 次) 处理, 接着将均质好的全脂乳分装于 500 mL 蓝盖瓶中, 95 °C 杀菌 15 min, 最后将全脂乳急冷于 4 °C 冷藏备用。

1.2.2 样品的制备

将供试菌株照 1.2.1.1 的方法得到脱脂乳培养基, 按照 2% 的接种量接种于全脂乳培养基中, 37 °C 水浴 10 min 后, 立即置于 37 °C 培养箱中恒温发酵, 观察其凝乳情况, 并对菌株发酵过程及贮藏期间各时间点 (贮藏 0 d、1 d、7 d、14 d) 取样, 用于后续各项发酵特性指标的测定。

1.2.3 凝乳时间的测定

表1 抗生素耐药性的判断标准

Table 1 Criteria for judging antibiotic resistance

| 抗生素种类 | 纸片效价/ μg | 抑菌圈直径/mm | | |
|----------------|---------------------|----------|-------------|--------|
| | | S (敏感) | I (中介) | R (耐药) |
| 青霉素 (P) | 10.00 | 29.00 | - | 28.00 |
| 头孢唑啉 (CS) | 30.00 | 15.00 | - | 14.00 |
| 头孢唑啉(先锋) (KZ) | 30.00 | 15.00 | - | 14.00 |
| 氯霉素 (C) | 30.00 | 18.00 | 13.00~17.00 | 12.00 |
| 万古霉素 (VA) | 30.00 | 17.00 | 15.00~16.00 | 14.00 |
| 四环素 (T) | 30.00 | 19.00 | 15.00~18.00 | 14.00 |
| 复方新诺明 (CO SMZ) | 23.75 | 16.00 | 11.00~15.00 | 10.00 |
| 氨苄西林 (AMP) | 10.00 | 29.00 | - | 28.00 |
| 克拉霉素 (CLA) | 15.00 | 13.00 | 11.00~12.00 | 10.00 |
| 链霉素 (SM) | 10.00 | 15.00 | 12.00~14.00 | 11.00 |
| 环丙沙星 (CIP) | 5.00 | 21.00 | 16.00~20.00 | 15.00 |
| 利福平 (RD) | 5.00 | 20.00 | 17.00~19.00 | 16.00 |

将活化好的菌株以 2% 的接菌量接种到全脂乳培养基中, 于 37 °C 条件下恒温发酵, 记录菌株发酵全脂乳至凝乳的时间。

1.2.4 滴定酸度的测定

称取 5.00 g 左右酸乳样品, 记录质量 m , 用 40.00 mL 蒸馏水稀释, 并加酚酞指示剂, 用 0.1 mol/L 的 NaOH 滴定至微红色, 并在 30 s 内不变色, 记录体积 V , 计算样品酸度。

$$\text{酸度}/(^{\circ}\text{T}) = \frac{V}{M} \times 100$$

1.2.5 pH 的测定

用 pH 计测定发酵乳的 pH 值。

1.2.6 黏度的测定

终止发酵, 调整温度至 4 °C, 采用 PV-2 黏度仪测定发酵乳样品的黏度 (4 号转子, 30 r/min), 稳定后读取数值。

1.2.7 持水力的测定

在发酵及贮藏期间各时间点, 准确称取 10 g 发酵乳样品, 于 4 °C 离心 10 min, 转速为 4500 r/min, 倾去上清液后将离心管倒置。

$$\text{持水力}/\% = \frac{\text{离心沉淀物质量}}{\text{样品质量}} \times 100\%$$

1.2.8 乳酸菌产香能力的测定

1.2.8.1 双乙酰含量测定

参考蔡晶晶等人方法测定^[12]。按照参考的测定方法绘制双乙酰标准曲线。然后取待测乳样品, 用 16% 三氯乙酸溶液等体积与其混合, 混匀后静置 10 min, 5500 r/min 离心 10 min 后取上清液。取上清液 10 mL, 等体积加入 2 个试管中, 向 1 号试管中加入 1% 的邻

苯二胺溶液 0.25 mL, 2 号试管不加, 充分混匀后于黑暗处使其反应 30 min, 然后向 2 个试管中加入 4.0 mol/L 的盐酸进行终止反应 (1 号试管加 1.0 mL, 2 号试管加 1.25 mL), 混匀后以 2 号试管作为对照液, 在 335 nm 波长测定吸光值。

1.2.8.2 乙醛含量测定

参考任然等人方法测定^[4]。取 1% NaHSO₃ 溶液 2 mL 置于三角锥形瓶中, 加入处理后试样上清液 10 mL, 混匀后在室温下放置 1 h, 然后加入 1% 淀粉溶液 1 mL, 用 0.1 mol/L 碘液滴定至接近淡蓝紫色, 再用 0.01 mol/L 碘液滴定至淡蓝紫色, 并且在 30 s 内淡蓝紫色不褪去, 以上的滴定均不计数。然后加入 20 mL 1 mol/L 的 NaHCO₃, 充分振荡混匀, 使溶液蓝紫色消失, 最后用 0.01 mol/L 碘液滴定至蓝紫色终点, 记录消耗标准碘液的体积, 每个样品有两个平行, 并同时做空白试验。

$$M = \frac{(V_1 - V_2) \times 0.22 \times C \times 10^6}{10}$$

其中: M : 乙醛含量, mg/L; V_1 : 滴定样品消耗碘标准溶液体积, mL; V_2 : 滴定空白消耗碘标准溶液体积, mL; C : 碘标准溶液的浓度, mol/L; 10: 样品称样量, mL; 0.22: 乙醛反应化学基本单位, g。

1.2.9 抗生素耐药性的测定

表 1 为抗生素耐药性的判断标准。利用药敏纸片琼脂扩散法 (K-B 法) 对分离的乳酸菌进行青霉素、头孢唑啉、头孢唑啉(先锋)、氯霉素、万古霉素、四环素、复方新诺明、氨苄西林、克拉霉素、链霉素、环丙沙星和利福平 12 种抗生素的耐药性敏感试验。将待测菌株活化二代, 将菌液 10000 r/min 4 °C, 离心 5

min, 并以无菌生理盐水调整菌液浓度至 $OD_{600}=0.5$, 取菌液 200 μL 涂布, 待培养基上的菌液略干后, 以无菌操作取出药敏纸片, 贴于接好同种乳酸菌诱导的 LB 固体平板内, 同时设空白药敏纸片为对照。然后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养 24 h, 测量并记录抑菌圈直径。根据美国临床和试验室标准化研究所制定的《抗菌药物敏感性试验执行标准》(2017 年版) 评价试验乳酸菌对抗生素的耐药性。

1.2.10 抑菌能力的测定

将致病菌活化 2 代, 以生理盐水调整菌液浓度至 $OD_{600}=0.5$, 冷藏备用, 无菌操作下, 将灭菌 LB 培养基倾倒入平板, 冷却至培养基完全凝固, 后将活化好的二代致病菌稀释 100 倍, 分别取稀释完成的蜡样芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、假单胞菌、沙门氏菌及大肠杆菌 100 μL 注于完全凝固平板上, 用涂布棒涂抹均匀, 用打孔器在每个平板上均匀打孔, 吸取供试菌株发酵液 200 μL 加入小孔中, 将加样平板正置于 18 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱扩散 12 h, 移至 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养 12 h, 测量并记录抑菌圈直径。

1.2.11 酶活能力的测定

1.2.11.1 粗酶液的制备

取 10.00 mL 发酵液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 采用 8000 r/min 离心 2 min, 收集菌体。用 pH 7.0 的磷酸盐缓冲液洗涤菌体 2 次, 最后加入 10.00 mL 缓冲液, 反复吹打使其重悬。冰浴中用超声破碎仪破壁制备粗酶液, 超声脉冲功率为 25 W, 脉冲持续时间 5 s, 间隙 5 s, 破壁 10 min。离心除去细胞碎片, 所得上清液为粗酶液。

1.2.11.2 β -半乳糖苷酶 (β -Gal) 活性测定

β -半乳糖苷酶活性测定按试剂盒说明书方法测定。

1.2.11.3 乳酸脱氢酶 (LDH) 活性测定

乳酸脱氢酶 (LDH) 活性测定按试剂盒说明书方法测定。

1.2.12 数据分析

所有试验重复测定三次, 各项指标的数据均用 Origin 2018 软件处理作图, 并采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。测量数据均以 Mean \pm S.D 表示, $p<0.05$ 认为有显著差异。

2 结果与分析

2.1 单菌株发酵特性的研究

2.1.1 单菌株产酸曲线的测定

图 1 为单菌株发酵酸乳的产酸曲线。产酸曲线表

明菌株的产酸速度和产酸量。产酸快慢决定着发酵周期的长短, 产酸能力反应菌株的发酵活力^[13]。供试菌株发酵过程中, 0~2 h 内 pH 值和酸度变化缓慢, 2~16 h 内快速下降, 16 h 后趋于稳定。由图 1b 可知不同供试菌株发酵酸乳产酸速率有所不同, 其中菌株 KSDB-1、HDS-12、DDB-14、HDS-18 发酵 48 h 后酸度可达到 200 $^{\circ}\text{T}$ 以上, 具有较好的产酸能力。

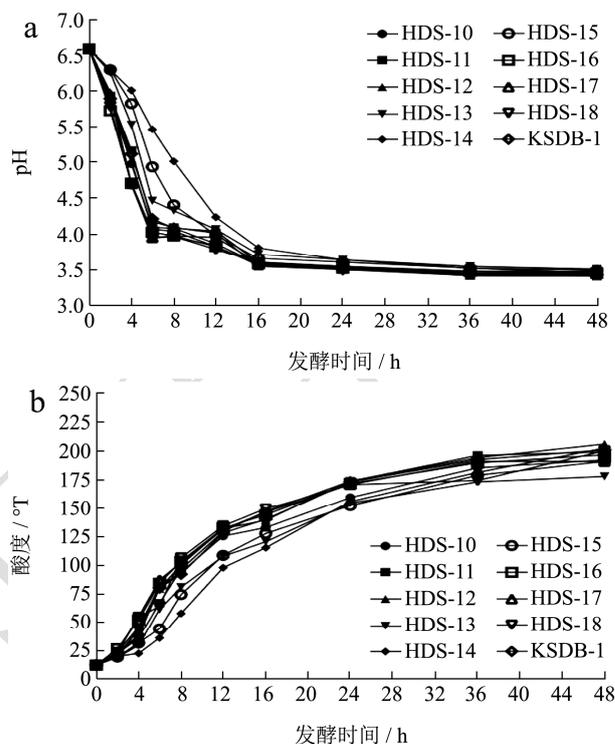


图 1 单菌株发酵酸乳的产酸曲线

Fig.1 Acid production curve of yoghurt fermented by single strain

2.1.2 单菌株发酵性能测试

表 2 不同德氏乳杆菌保加利亚亚种发酵性能初筛

Table 2 Number and fermentation time of different *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains

| 菌株编号 | 凝乳时间/h | 酸度/ $^{\circ}\text{T}$ |
|--------|-------------------------------|--------------------------------|
| HDS-10 | 5.20 \pm 0.20 ^e | 57.47 \pm 2.30 ^{ab} |
| HDS-11 | 5.62 \pm 0.41 ^c | 54.70 \pm 1.81 ^{ab} |
| HDS-12 | 8.42 \pm 0.62 ^c | 57.77 \pm 2.69 ^{ab} |
| HDS-13 | 8.43 \pm 0.63 ^c | 60.92 \pm 0.44 ^{ab} |
| DDB-14 | 12.51 \pm 0.14 ^a | 54.78 \pm 1.62 ^{ab} |
| DDS-15 | 11.01 \pm 0.65 ^b | 43.59 \pm 0.74 ^c |
| HDS-16 | 6.84 \pm 0.15 ^d | 52.33 \pm 2.01 ^b |
| HDB-17 | 6.54 \pm 0.26 ^d | 61.36 \pm 0.25 ^{ab} |
| HDS-18 | 6.83 \pm 0.27 ^d | 55.10 \pm 0.81 ^{ab} |
| KSDB-1 | 6.34 \pm 0.13 ^d | 76.02 \pm 0.88 ^a |

不同德氏乳杆菌保加利亚亚种的发酵时间由表 2 所示, 发酵时间是衡量乳酸菌发酵性能的重要指标,

发酵时间过长会增加其他微生物的感染率。在实际生产过程中，发酵时间过长还会增加生产成本、降低生产效率，严重影响企业的经济效益。10株供试菌株发酵酸乳的发酵时间在5~12.5h之间，其中发酵时间低于8h的菌株有8株；滴定酸度在59.65 °T~77.76 °T之间，其中菌株KSDB-1的滴定酸度最高达到了77.76 °T，显著高于其他供试菌株 ($p < 0.05$)，具有较好的产酸能力。

2.1.3 单菌株产香性能测试

不同德氏乳杆菌保加利亚亚种发酵酸乳产香能力如图2所示。乙醛和双乙酰是构成酸乳典型风味的重要化合物，其含量以及两者之间的比例会对酸乳的风味产生较大的影响。一般认为当酸奶中乙醛含量在23 mg/L~40 mg/L时，才能产生具有良好风味的酸乳^[14]。研究表明乙醛与双乙酰的含量比值大于3:1时，酸乳的风味最佳^[15]。10株供试菌株乙醛和双乙酰含量比值均大于3:1。菌株HDS-13、DDB14、KSDB-1具有较

好的产香能力较好，其中菌株HDS-13的双乙酰含量为2.88 mg/L，乙醛含量达到了30.08 mg/L，能显著改善酸乳的风味。

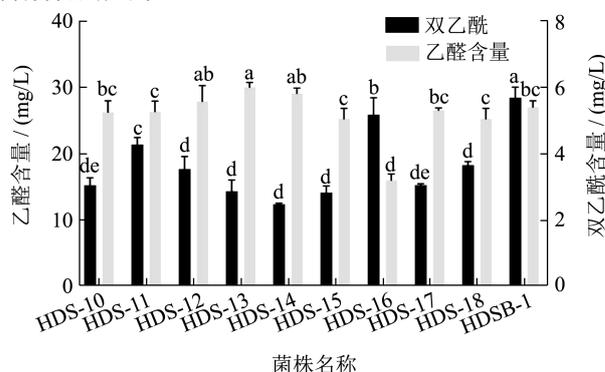


图2 不同德氏乳杆菌保加利亚亚种产香性能测试
Fig.2 Aroma production performance test of different *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains

2.2 酸乳的贮藏稳定性

表3 不同德氏乳杆菌保加利亚亚种发酵酸乳贮藏期间酸度的变化 (°T)

Table 3 Changes in titration acidity during storage of fermented yoghurt by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains (°T)

| 菌株名称 | 0d | 1d | 7d | 14 d | 后酸化程度(1~14 d) |
|--------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| HDS-10 | 57.47±2.30 ^{ab} | 67.58±1.29 ^c | 66.69±2.31 ^d | 68.74±0.32 ^d | 1.12±0.97 ^c |
| HDS-11 | 54.70±1.81 ^{ab} | 62.45±0.54 ^e | 63.97±0.50 ^e | 68.61±2.05 ^d | 6.15±0.51 ^c |
| HDS-12 | 57.77±2.69 ^{ab} | 66.42±1.51 ^{cd} | 67.13±1.45 ^d | 67.66±0.04 ^d | 1.18±0.47 ^e |
| HDS-13 | 60.92±0.44 ^{ab} | 70.14±0.75 ^b | 71.80±0.18 ^c | 79.79±1.85 ^b | 9.56±1.10 ^b |
| DDB-14 | 54.78±1.62 ^{ab} | 63.45±1.18 ^e | 78.32±0.15 ^b | 80.08±0.11 ^b | 16.55±1.07 ^a |
| DDS-15 | 43.59±0.74 ^c | 46.65±0.58 ^g | 45.91±0.39 ^f | 47.80±1.26 ^f | 1.15±0.68 ^e |
| HDS-16 | 52.33±2.01 ^b | 65.56±1.23 ^d | 64.00±1.05 ^e | 69.47±0.15 ^d | 3.84±1.08 ^d |
| HDB-17 | 61.36±0.25 ^{ab} | 65.07±0.94 ^d | 72.43±1.51 ^c | 75.33±2.83 ^c | 10.23±1.09 ^b |
| HDS-18 | 55.10±0.81 ^{ab} | 59.27±0.30 ^f | 65.92±0.45 ^{de} | 63.77±0.19 ^e | 4.43±0.11 ^d |
| KSDB-1 | 76.02±0.88 ^a | 82.76±0.10 ^a | 90.90±1.43 ^a | 92.12±1.64 ^a | 9.34±0.54 ^b |

表4 不同德氏乳杆菌保加利亚亚种发酵酸乳贮藏期间黏度的变化 (mPa·s)

Table 4 Changes in viscosity during storage of fermented yoghurt by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains (mPa·s)

| 菌株名称 | 0 d | 1 d | 7 d | 14 d |
|--------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| HDS-10 | 690.00±13.23 ^e | 796.67±7.64 ^e | 871.7±7.6 ^{cd} | 711.0±10.1 ^d |
| HDS-11 | 731.67±80.98 ^{de} | 816.67±2.89 ^e | 848.3±2.9 ^{cd} | 615.7±10.3 ^e |
| HDS-12 | 388.33±16.07 ^f | 461.67±28.43 ^d | 538.3±2.9 ^{de} | 514.3±10.3 ^f |
| HDS-13 | 883.33±2.89 ^{bcd} | 936.67±7.64 ^b | 888.3±2.9 ^{cd} | 514.3±5.7 ^f |
| DDB-14 | 1031.67±20.21 ^b | 1440.00±5.00 ^a | 1235.7±7.5 ^b | 1079.0±9.2 ^b |
| DDS-15 | 215.00±13.23 ^g | 428.33±58.59 ^d | 553.3±15.3 ^e | 348.7±5.5 ^g |
| HDS-16 | 831.67±10.41 ^{ode} | 945.00±70.89 ^b | 1068.3±2.9 ^{bc} | 1055.7±1.2 ^b |
| HDB-17 | 976.67±59.23 ^{bc} | 1410.00±15.00 ^a | 1275.0±5.0 ^b | 1128.7±7.5 ^a |
| HDS-18 | 665.00±13.23 ^e | 745.00±5.00 ^e | 700.0±91.6 ^{de} | 515.2±3.3 ^f |
| KSDB-1 | 1305.67±75.01 ^a | 1503.33±6.51 ^a | 1538.33±2.89 ^a | 1030.00±5.00 ^c |

2.2.1 单菌株发酵酸乳贮藏期间酸度的变化

不同供试菌株发酵酸乳样品4 °C贮藏期间酸度值

的变化如表3所示，10株供试菌株发酵酸乳贮藏1 d时酸度在46.65 °T~82.76 °T之间，其中菌株KSDB-1

和菌株 HDS-13 发酵的酸乳酸度显著高于其他供试菌株 ($p<0.05$), 分别为 82.76 °T 和 70.14 °T。乳酸菌后酸化是导致酸乳贮藏期品质变化主要原因之一, 其中德氏乳杆菌保加利亚亚种是导致发酵乳发生后酸化的主要菌株^[16]。10 株供试菌株发酵酸乳表现出不同程度的后酸化程度, 其中菌株 DDB-14 和菌株 HDB-17 发酵的酸乳贮藏 1~14 d 后酸化程度显著高于其他菌株 ($p<0.05$) 其余菌株后酸化能力相对弱, 符合优良乳酸菌发酵剂具有的特点。

2.2.2 单菌株发酵酸乳贮藏期间黏度的变化

不同供试菌株发酵酸乳样品 4 °C 贮藏期间黏度值的变化如表 4 所示, 黏度是评定酸乳质量的重要指标之一, 选择产黏性好的菌株能够改善发酵乳的组织状态, 但是黏度较大对工业化生产不利^[17]。10 株供试菌株发酵完成后黏度值在 215 mPa·s 到 1395.67 mPa·s 之间, 其中菌株 DDB-14 和菌株 KSDB-1 具有较好的

产黏能力, 发酵完成时的黏度分别在 1031.67 mPa·s 和 1305.67 mPa·s, 显著高于其它菌株 ($p<0.05$)。大多数菌株贮藏 1 d, 黏度达到峰值, 贮藏 7 d 后黏度值开始出现小幅度下降。

2.2.3 单菌株发酵酸乳贮藏期间持水力的变化

不同供试菌株发酵酸乳样品 4 °C 贮藏期间持水力的变化如表 5 所示, 持水力的强弱直接影响着发酵乳乳清的析出程度^[18]。10 株供试菌株发酵酸乳的持水力在 35%~50%之间, 贮藏 1 d 持水力达到峰值, 贮藏 14 d 后出现不同程度的下降, 这可能是因为贮藏期间发酵乳酸度的变化, 造成发酵乳组织结果发生变化从而导致持水力的变化^[19]。菌株 DDB-14、HDB-17 和 KSDB-1 贮藏 1 d 后持水力分别 54.83%、50.82%和 56.55%, 其贮藏 7 d 后差异不显著 ($p<0.05$), 说明这些菌株发酵乳样品贮藏期间能保持良好的组织稳定性。

表 5 不同德氏乳杆菌保加利亚亚种发酵酸乳贮藏期间持水力的变化 (%)

Table 5 Changes in water-holding capacity during storage of fermented yoghurt by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains

| 菌株名称 | 持水力 (%) | | | |
|--------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
| | 0 d | 1 d | 7 d | 14 d |
| HDS-10 | 31.93±2.01 ^{cd} | 37.24±0.06 ^c | 37.18±0.46 ^c | 33.36±0.01 ^c |
| HDS-11 | 33.71±0.31 ^c | 36.03±1.69 ^{cd} | 38.50±0.67 ^c | 20.60±0.01 ^e |
| HDS-12 | 21.03±1.01 ^e | 23.38±2.84 ^c | 23.98±0.01 ^e | 20.76±0.01 ^e |
| HDS-13 | 42.91±1.21 ^b | 44.51±0.37 ^b | 42.88±0.01 ^b | 32.39±0.87 ^c |
| DDB-14 | 49.70±0.53 ^a | 54.83±1.54 ^a | 51.81±0.18 ^a | 49.90±1.32 ^{ab} |
| DDS-15 | 20.49±0.41 ^e | 24.91±0.01 ^e | 24.09±0.79 ^e | 20.39±0.68 ^e |
| HDS-16 | 42.37±1.25 ^b | 49.99±0.26 ^a | 50.20±2.65 ^a | 50.57±0.83 ^a |
| HDB-17 | 44.10±0.92 ^b | 50.82±0.69 ^a | 51.67±2.06 ^a | 52.21±0.01 ^a |
| HDS-18 | 29.44±0.63 ^d | 31.19±2.65 ^d | 30.37±1.68 ^d | 27.61±0.87 ^d |
| KSDB-1 | 50.55±0.45 ^a | 56.55±1.65 ^a | 52.66±0.98 ^a | 47.01±1.54 ^b |

表 6 不同德氏乳杆菌保加利亚亚种对 12 种抗生素耐药性的结果

Table 6 Results of resistance of different *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* to 12 antibiotics

| 菌株编号 | P | CS | KZ | C | VA | T | CO SMZ | AMP | CLA | SM | CIP | RD |
|--------|---|----|----|---|----|---|--------|-----|-----|----|-----|----|
| HDS-10 | S | S | S | S | S | S | R | S | S | R | R | S |
| HDS-11 | S | S | S | S | S | S | R | S | S | R | I | S |
| HDS-12 | S | S | R | S | S | S | R | S | S | R | I | S |
| HDS-13 | S | S | S | S | S | S | R | S | S | R | I | S |
| DDB-14 | R | S | S | S | S | S | R | S | S | S | R | S |
| DDS-15 | R | S | S | S | S | S | I | R | S | I | R | S |
| HDS-16 | S | S | S | S | S | S | S | S | S | R | R | S |
| HDB-17 | S | S | S | S | S | S | R | S | S | R | R | S |
| HDS-18 | S | S | S | S | S | S | R | R | S | S | R | S |
| KSDB-1 | S | S | S | S | S | S | R | S | S | S | R | S |

注: 青霉素, P; 头孢唑啉, CS; 头孢唑啉先锋, KZ; 氟康唑, C; 万古霉素, VA; 四环素, T; 复方新诺明, CO SMZ; 氨苄西林, AMP; 克拉霉素, CLA; 链霉素, SM; 环丙沙星, CIP; 利福平, RD。

表 7 不同德氏乳杆菌保加利亚亚种发酵上清液中抑菌能力的测定

Table 7 Determination of bacteriostatic capacity in fermentation supernatants of different *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

| 菌株编号 | 大肠杆菌 | 金黄色葡萄球菌 | 枯草芽孢杆菌 | 蜡状芽孢杆菌 | 伤寒沙门氏菌 | 假单胞菌 |
|--------|------|---------|--------|--------|--------|------|
| HDS-10 | ++ | - | - | + | - | + |
| HDS-11 | ++ | - | + | + | + | + |
| HDS-12 | + | + | - | ++ | + | + |
| HDS-13 | ++++ | ++++ | +++ | +++ | ++++ | +++ |
| DDB-14 | ++++ | ++++ | ++++ | + | ++++ | +++ |
| DDS-15 | ++ | ++ | + | + | + | + |
| HDS-16 | + | - | - | + | - | - |
| HDB-17 | + | +++ | +++ | +++ | ++ | +++ |
| HDS-18 | ++++ | +++ | +++ | ++ | + | +++ |
| KSDB-1 | ++++ | ++++ | +++ | ++ | ++++ | ++ |

注: -: 阴性 (=8 mm); +: 阳性 (8~12 mm); ++: 12~16 mm; +++: 16~20 mm; ++++: >20 mm。

2.3 乳酸菌抗生素耐药性测定

不同德氏乳杆菌保加利亚亚种的抗生素耐药性结果如表 6 所示, 乳酸菌的食用历史长达数千年, 是世界公认的“GRAS”的微生物^[20]。但近年来, 越来越多的研究表明, 对人和动物体内具有特殊生理功能有益菌群的乳酸菌也产生了耐药性^[21]。10 株供试菌株对头孢唑啉、氯霉素、万古霉素、四环素、克拉霉素、利福平均敏感, 对青霉素、头孢唑啉先锋、氨苄西林普遍敏感, 对复方新诺明、链霉素和环丙沙星耐药率较高。综合可知, 10 株供试菌株可以认为是比较安全的, 可以作为有益的菌株进一步应用于食品工业中。

2.4 乳酸菌培养上清液抑菌能力测定

不同德氏乳杆菌保加利亚亚种发酵上清液中抑菌能力如表 7 所示。在发酵过程中, 乳酸菌能够将糖转化为乳酸, 并且有些能够产生抗菌活性代谢物, 如过氧化氢、细菌素等, 从而抑制腐败菌及食源性致病菌的繁殖^[22]。10 株供试菌株普遍对 6 种致病菌呈现不同程度的抑制能力, 其中菌株 HDS-13、DDB-14、HDB-1、HDS-18、KSDB-1 对 6 种致病菌抑制能力显著高于其他菌株 ($p<0.05$), 说明这些供试菌株对细菌具有广谱抑菌特性, 能有效抑制肠道致病菌的生长。

2.5 相关酶活能力测定

不同德氏乳杆菌保加利亚亚种相关酶活能力如图 3 所示。乳酸脱氢酶是糖代谢途径中的关键酶, 可以催化丙酮酸与乳酸之间的可逆反应, 其活性大小与微生物的产酸能力有关^[3]。由图 3a 可知, 10 株供试乳酸脱氢酶酶活在 0.12855~0.3586 U/mg 之间, 其中菌株 HDS-12 和 KSDB-1 乳酸脱氢酶活力显著高于其他菌

株 ($p<0.05$), 分别为 0.3586 U/mg 和 0.3473 U/mg。

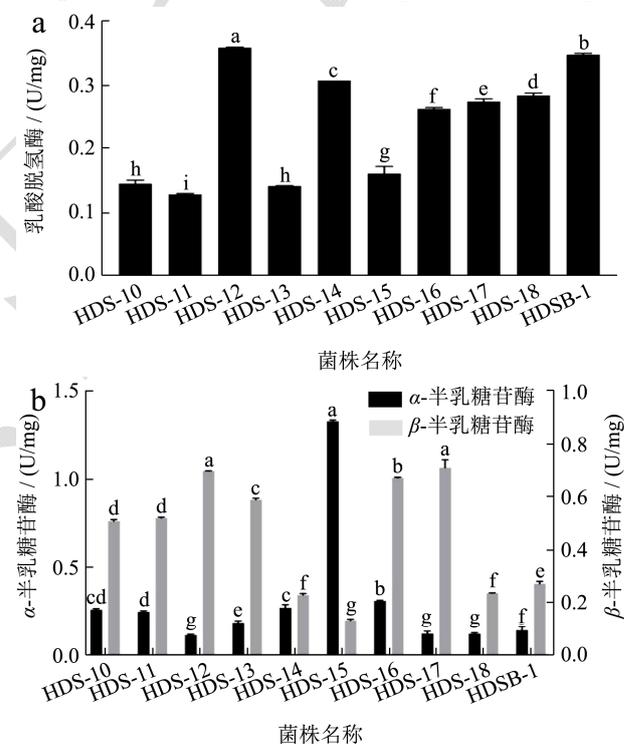


图 3 不同德氏乳杆菌保加利亚亚种相关酶活能力的测定

Fig.3 Determination of related enzyme activity of different

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus*

β -半乳糖苷酶能水解乳糖为葡萄糖和半乳糖, 生产低乳糖食品, 以缓解乳糖不耐症, 同时又具有转半乳糖基活性, 可用于低聚半乳糖的合成^[23]。由图 3b 可知, 10 株供试菌株 β -半乳糖苷酶酶活在 0.1320~0.7093 U/mg 之间。其中菌株 HDS-12, HDB-17 β -半乳糖苷酶活力显著高于其他菌株 ($p<0.05$), 分别为 0.6967 U/mg 和 0.7093 U/mg。

α -半乳糖苷酶又称蜜二糖酶, 属于外切糖苷酶类, 水解酶的一种, 该酶在食品工业、轻化工领域有较高

的应用价值,被认为是最有应用潜力的酶制剂之一,可用于生产能够促进肠道益生菌增值的益生元 α -低聚半乳糖^[24]。由图 3b 可知,10 株供试 α -半乳糖苷酶酶活在 0.1113~1.3263 U/mg 之间,其中菌株 DDS-15 β -半乳糖苷酶活力显著高于其他菌株($p<0.05$),为 1.3263 U/mg,未来可对其进一步研究。

3 结论

本文通过单菌株发酵特性和益生特性实验对实验室保存的 10 株德氏乳杆菌保加利亚亚种进行了分析研究,并筛选出性能较好的菌株 KSDB-1。菌株 KSDB-1 凝乳时间为 6.3 h,凝乳酸度为 76.02 °T,表现出较好的产酸能力,同时黏度和持水力分别为 1305.67 mPa·s 和 50.55%,表现出较好的产黏能力和组织稳定性,贮藏 15 d 内后酸化程度较弱,各指标相对稳定,且具有良好的产香能力,对大部分抗生素表现为敏感,具有较高的安全性,能有效抑制肠道致病菌的生长,乳酸脱氢酶活力较高,适合对其培养基和高密度发酵工艺进行进一步优化,以期将其应用于工业化生产中。

参考文献

- [1] 毛开云,陈大明,范月蕾,等.益生菌产业竞争态势分析研究[J].竞争情报,2018,14(2):30-34
MAO Kai-yun, CHEN Da-ming, FAN Yue-lei, et al. Analysis of competitive situation of probiotic industry [J]. Competitive Intelligence, 2018, 14(2): 30-34
- [2] 吴霓.复合益生菌发酵技术及其发酵乳饮料稳定性研究[D].长沙:湖南农业大学,2019
WU Ni. Fermentation technology of compound probiotics and stability of fermented milk beverage [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2019
- [3] 蒋艾廷,李宝坤,金丹,等.喷雾干燥对德氏乳杆菌代谢酶活与可培养性的影响[J].食品与生物技术学报,2019,38(11):115-121
JIANG Ai-ting, LI Bao-kun, JIN Dan, et al. Effects of spray drying on the activity and culturability of metabolic enzymes of *Lactobacillus delbrueckii* [J]. Journal of Food and Biotechnology, 2019, 38(11): 115-121
- [4] 任为一.德氏乳杆菌保加利亚亚种发酵乳中挥发性风味物质指纹图谱的构建[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2019
REN Wei-yi. Construction of fingerprint of volatile flavor substances in fermented milk of *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaria* [D]. Huhehot: Inner Mongolia Agricultural University, 2019
- [5] Sorensen K I, Curic-Bawden M, Junge M P, et al. Enhancing the sweetness of yoghurt through metabolic remodeling of carbohydrate metabolism in *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* [J]. Appl Environ Microbiol, 2016, 86(12): 3683-3692
- [6] Arioli S, Della Scala G, Remagni M C, et al. *Streptococcus thermophilus* urease activity boosts *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* homolactic fermentation [J]. International Journal of Food Microbiology, 2017, 247: 55-64
- [7] DAN Tong, REN Wei-yi, LIU Yang, et al. Volatile flavor compounds profile and fermentation characteristics of milk fermented by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* [J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 2183
- [8] WU Nan, XU Wei-han, LIU Kang-ling, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from *Lactobacillus delbrueckii* QS306 fermented milk [J]. Journal of Dairy science, 2019, 102(7): 5913-5921
- [9] Hunsche C, Cruces J, De La Fuente M. Improvement of redox state and functions of immune cells as well as of behavioral response in aged mice after two-week supplementation of fermented milk with probiotics [J]. Current Microbiology, 2019, 76(11): 1278-1289
- [10] Fara Agustina, Sabater Carlos, Palacios Jorge, et al. Prebiotic galactooligosaccharides production from lactose and lactulose by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CRL450 [J]. Food & Function, 2020, 11(7): 5875-5886
- [11] Khubaib Ali, Muhammad Huzaifa Mehmood, Muhammad Ahmad Iqbal, et al. Isolation and characterization of exopolysaccharide-producing strains of *Lactobacillus bulgaricus* from curd [J]. Food Science & Nutrition, 2019, 7(4): 1207-1213
- [12] 蔡静静,张亚川,李谓,等.新疆伊犁地区乳制品中乳酸菌发酵和益生特性及其复合发酵方案优化[J].食品科学,2020,41(18):172-179
CAI Jing-jing, ZHANG Ya-chuan, LI Zhan, et al. Fermentation and probiotic characteristics of lactic acid bacteria in dairy products from Ili region of Xinjiang and optimization of their compound fermentation scheme [J]. Food Science, 2020, 41(18): 172-179
- [13] 白长胜,孟维珊,李进,等.自然界中大豆秸秆发酵用优良乳酸菌的分离筛选[J].现代畜牧科技,2020,10:8-11
BAI Chang-sheng, MENG Wei-shan, LI Jin, et al. Isolation and screening of excellent lactic acid bacteria for soybean straw fermentation in nature [J]. Modern Animal Husbandry Science & Technology, 2020, 10: 8-11

- [14] 丹彤,张和平.发酵乳中风味物质的研究进展[J].中国食品学报,2018,18(11):287-292
DAN tong, ZHANG He-ping. Research progress of flavor substances in fermented milk [J]. Chinese Journal of Food Science, 2018, 18(11): 287-292
- [15] Zourari A, Accolas J P, Desmazeaud M J. Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria. A review [J]. Le Lait, 1992, 72(1): 1-34
- [16] 王成凤,李柏良,岳莹雪,等.弱后酸化保加利亚乳杆菌 KLDS1.1011 的筛选及其全基因组注释研究[J/OL].食品工业科技, <https://kns.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?Dbcode=CAPJ&dbname=CAPJLAST&filename=SPKJ20200929000&v=7DXe8UTgAmyQQYdjLkqwXYNxsdJLqPqOyTL7xKm7hdX7%25mmd2FkVXEJw5UII1XADfA6T3>
WANG Cheng-feng, LI Bai-liang, YUE Ying-xue, et al. Screening and genome-wide annotation of weakly acidified *Lactobacillus bulgaricus* KLDS1.1011 [J/OL]. Food Industry Science and Technology, <https://kns.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?dbcode=CAPJ&dbname=CAPJLAST&filename=SPKJ20200929000&v=7DXe8UTgAmyQQYdjLkqwXYNxsdJLqPqOyTL7xKm7hdX7%25mmd2FkVXEJw5UII1XADfA6T3>
- [17] 任敏.具有优良发酵特性乳酸乳球菌乳酸亚种的筛选[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2019
REN Min. Screening of *Lactococcus lactis* subspecies with excellent fermentation characteristics [D]. Huhehot: Inner Mongolia Agricultural University, 2019
- [18] 韩永佳.功能型酸奶的理化特性、抗氧化活性及微观结构的研究[D].合肥:合肥工业大学,2016
HAN Yong-jia. Study on physicochemical properties, antioxidant activity and microstructure of functional yoghurt [D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2016
- [19] 靳汝霖.具有优良发酵特性嗜热链球菌的筛选及其发酵乳中关键性风味物质的研究[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2018
JIN Ru-lin. Screening of *Streptococcus thermophilus* with excellent fermentation characteristics and Study on key flavor substances in fermented milk [D]. Huhehot: Inner Mongolia Agricultural University, 2018
- [20] Colombo M, Nero L A, Todorov S D. Safety profiles of beneficial lactic acid bacteria isolated from dairy systems [J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2020, 51(2): 787-795
- [21] Tkhruni F N, Aghajanyan A E, Balabekyan T R, et al. Characteristic of bacteriocins of *Lactobacillus rhamnosus* BTK 20-12 potential probiotic strain [J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2020, 12(2): 716-724
- [22] 刘树昕,吴爱娟,甄妮,等.广谱抑菌乳酸菌的筛选及其细菌素相关基因分析[J].食品科学,2020,41(6):101-107
LIU Shu-xin, WU Ai-juan, ZHEN Ni, et al. Screening of broad-spectrum bacteriostatic lactic acid bacteria and their bacteriocin-related gene analysis [J]. Food Science, 2020, 41(6): 101-107
- [23] Gyawali R, Oyeniran A, Zimmerman T, et al. A comparative study of extraction techniques for maximum recovery of β -galactosidase from the yogurt bacterium *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* [J]. J Dairy Res, 2020: 1-4
- [24] 刘德海,权淑静,杨文玲,等.高产 α -半乳糖苷酶菌株的筛选鉴定及发酵培养基的优化[J].中国酿造,2019,38(12):80-86
LIU De-hai, QUAN Shu-jing, YANG Wen-ling, et al. Screening and identification of high-producing strains of alpha-galactosidase and optimization of fermentation medium [J]. Brewing in China, 2019, 38(12): 80-86

(上接第8页)

- [23] 黄龔,孙清华,胡旭姣.白芨多糖对动物实验性胃溃疡的影响[J].现代中西医结合杂志,2009,18(6):612-613
HUANG Yan, SUN Qing-hua, HU Xu-jiao. Effects of *Bletilla striata* polysaccharides on animal gastric ulcer [J]. Modern Journal of Integrated Chinese Traditional and Western Medicine, 2009, 18(6): 612-613
- [24] 武桂娟,刘泓雨,苏晓悦,等.白芨多糖对大鼠应激性溃疡作用机制的探讨[J].中医药学报,2011,39(3):39-41
WU Gui-juan, LIU Hong-yu, SU Xiao-yue, et al. Mechanism of polysaccharide from *Bletilla striata* on stress ulcer in rats [J]. Acta Chinese Medicine and Pharmacology, 2011, 39(3): 39-41