

刺梨发酵乳的制备及其理化性质

杨曦澜, 董洁怡, 刘佳玥, 刘冬梅*

(华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要: 刺梨含有丰富的多糖和维生素 C 等营养成分以及超氧化物歧化酶 (SOD), 具有降低慢性疾病风险及发病率的潜力。本研究选用保加利亚乳杆菌德氏乳杆菌 DMLD-H1 (*Lactobacillus delbrueckii* DMLD-H1, 简称 H1) 和嗜热链球菌 DMST-H2 (*Streptococcus thermophilus* DMST-H2, 简称 H2) 为发酵剂菌株, 通过优化菌种比例、接种量和刺梨汁添加量, 确定刺梨发酵乳最佳发酵工艺, 并与商业菌种发酵的发酵乳的各项理化性质进行比较。实验表明, 最佳的刺梨发酵乳发酵条件为: 菌种比例为 H1:H2=1:2, 接种量为 1.0×10^7 CFU/mL, 刺梨添加量为 0.06 g/mL。在此条件下发酵所得的刺梨发酵乳 pH 值为 4.47, 酸度为 76.78 °T, 持水力为 32.94%, 其中分离出 11 种挥发性物质, 蛋白质相对分子质量主要分布在 22~38 ku, 后酸化 4 周后发酵乳的 pH 值降低至 3.89, 活菌数含量为 1.1×10^8 CFU/mL。对比商业发酵乳发现, 刺梨发酵乳能够抑制发酵乳的后酸化作用, 提高持水力, 以及提升发酵乳中的酪蛋白含量; 然而, 刺梨可能会影响发酵乳中原本的风味物质。该研究为一种新型的刺梨发酵乳的开发提供理论依据, 为新型功能性发酵乳的研发提供参考。

关键词: 刺梨; 发酵乳; 保加利亚乳杆菌; 嗜热链球菌

文章编号: 1673-9078(2024)03-153-162

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.3.0411

Preparation and Physicochemical Properties of Roxburgh rose Yogurt

YANG Xilan, DONG Jieyi, LIU Jiayue, LIU Dongmei*

(School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Roxburgh rose is rich in nutrients such as polysaccharides and vitamin C as well as superoxide dismutase (SOD), and has the potential to reduce the risk and incidence of chronic diseases. In this study, *Lactobacillus delbrueckii* DMLD-H1 (H1) and *Streptococcus thermophilus* DMST-H2 (H2) were selected as the fermentation starters. By optimising the strain ratio, inoculation amount and the addition amount of Roxburgh rose juice, the optimal fermentation process for preparing Roxburgh rose yogurt was established. The physicochemical properties of the resulting Roxburgh rose yogurt were then compared with those of the yogurt produced using commercial strains. The results showed that the optimal fermentation conditions for Roxburgh rose yogurt were as follows: H1:H2=1:2; inoculation amount, 1.0×10^7 CFU/mL; addition amount of Roxburgh rose juice, 0.06 g/mL. The pH value of the Roxburgh rose yogurt obtained under such conditions was 4.47, with its acidity being 76.78 °T, and the water-holding capacity being 32.94%. From such a yoghurt, 11 volatile substances were isolated, and the relative molecular masses of proteins were mainly in the range of 22~38 ku. The pH value of the yogurt

引文格式:

杨曦澜, 董洁怡, 刘佳玥, 等. 刺梨发酵乳的制备及其理化性质[J]. 现代食品科技, 2024, 40(3): 153-162.

YANG Xilan, DONG Jieyi, LIU Jiayue, et al. Preparation and physicochemical properties of Roxburgh rose yogurt [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(3): 153-162.

收稿日期: 2023-04-06

基金项目: 广州市科技计划项目 (20212100007; 201903010015); 国家级大学生创新创业训练项目 (202210561135)

作者简介: 杨曦澜 (2001-), 女, 在读本科生, 研究方向: 食品微生物学利用和控制, E-mail: 958296219@qq.com

通讯作者: 刘冬梅 (1972-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品微生物的利用与控制研究, E-mail: liudm@scut.edu.cn

decreased to 3.89 and the viable bacterial count was 1.1×10^8 CFU/mL after 4 weeks of post-acidification. After comparison with the commercial yogurt, it was found that the Roxburgh rose yogurt was able to inhibit yoghurt's post-acidification, improve the water-holding capacity, and increase the casein protein content of the yogurt; however, the Roxburgh rose may affect the original flavour substances in the yogurt. The study provides a theoretical basis for the development of a new type of Roxburgh rose yogurt and a reference for the development of new functional yogurts.

Key words: Roxburgh rose; yogurt; *Streptococcus thermophilus*; *Lactobacillus delbrueckii*

刺梨是我国西南和中南部山区广泛种植的重要农作物，中国刺梨的年产量约为 2 000~3 000 t^[1]。刺梨的果实中内含有丰富的多糖、维生素 C 和超氧化物歧化酶 (SOD) 等营养成分，具有平衡人体的氧化应激，降低如衰老、动脉粥样硬化、糖尿病、癌症、神经退行性疾病和心血管疾病等许多慢性疾病的风险和发病率，抗衰老和抗动脉粥样硬化的潜力^[1]。动物试验表明^[2,3]，乳酸菌发酵的刺梨汁饮品可以有效改善免疫力低下小鼠的肠道菌群的结构与丰富度，提升 *Faecalibaculum rodentium*、*Lactobacillus johnsonii*、*Lactobacillus reuteri*、*Lactobacillus acidophilus* 等有益菌的丰度，降低 *Enterococcus casseliflavus*、*Enterobacter* 等有害菌的丰度^[4]。

国内目前对刺梨发酵乳的研究较少，对刺梨的加工主要是制成果汁^[5]。然而刺梨口感较为酸涩，感官评价较差。刺梨的应用正处于一个萌芽阶段，人们对其认知度不是很高，相关的产品也不完善。

发酵乳是一种由益生菌发酵的乳制品^[6]，相关研究发现，发酵乳与人的健康密切相关^[7]，能够有效降低胃肠道和心血管疾病、癌症的患病风险^[8]，并且对于预防胃肠道感染，降低血清胆固醇水平和抗突变活性等有积极的作用^[9]。由于发酵乳所具备优异的生理与生化特性，在过去的 100 年里，发酵乳一直在不断发展和改进。在发酵剂和益生菌、理化和感官特性、微观结构、质量和安全性以及各种添加成分等方面有了大量的相关研究^[7]。

刺梨由于其所具有丰富的维生素 C 和 SOD，作为抗氧化剂能有效抑制牛奶的氧化，为发酵菌种提供了厌氧环境；加上刺梨本身酸度偏高，能有效抑制有害菌的生长；其中的成分也同样具备稳定剂、乳化剂等效果，减少了食品添加剂的使用^[10]。因此，研究在发酵乳中添加刺梨汁以做成刺梨发酵乳的相关工艺提升空间较大。本研究通过单因素试验确定了菌种比例、接种量以及刺梨添加量对刺梨发酵乳理化指标的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

全脂奶粉，雀巢（中国）有限公司；白砂糖，太古糖业有限公司；保加利亚乳杆菌德氏乳杆菌 DMLD-H1 (*Lactobacillus delbrueckii* DMLD-H1，简称 H1) 和嗜热链球菌 DMST-H2 (*Streptococcus thermophilus* DMST-H2，简称 H2)，华南理工大学食品科学与工程学院实验室筛选保藏的菌株；商业菌种，丹麦科汉森有限公司；金刺梨汁，春归保健康科技有限公司；MRS 培养基、生理盐水，按标准方法配制。

1.2 仪器与设备

恒温水浴锅，上海精宏实验设备有限公司；MK3 超净工作台，上海日岛科学仪器有限公司；FA2004B 分析天平，上海精科科学仪器有限公司；KDC-40 恒温培养箱，科大创新股份有限公司中佳分公司；SHZ-88A 立式高压灭菌锅，江苏太仓市实验设备厂；FiveEasy Plus 型 pH 计，梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 刺梨发酵乳制作工艺流程

配制原乳液：将全脂奶粉、白砂糖、水以 25:16:200 的质量比溶解；在 85 °C 下巴氏灭菌 20 min，获得原乳液。将灭菌完成的原乳液降温至 40~50 °C，在超净工作台中分别接入发酵菌种与刺梨汁，摇晃均匀。将接种后的牛奶放入恒温培养箱中 42 °C 恒温发酵，得到发酵乳^[11]。

1.3.2 刺梨发酵乳发酵工艺的确定

1.3.2.1 菌种比例优化的单因素实验

据 1.3.1 配制的原乳液，以牛奶计，接种量为 1.0×10^7 CFU/mL（以下同），不添加刺梨汁的条件下接种 H1:H2 的比例分别 1:1、1:2、1:3，以商业菌种

为对照组, 恒温 42 ℃ 发酵 4~8 h, 并进行 pH 值和滴定酸度的测量以确定最优的菌种比例。

1.3.2.2 接种量优化的单因素实验

据 1.3.1 配制的原乳液和 1.3.2.1 得出的菌种最优配比, 在不添加刺梨汁的条件下接种量分别为 5.0×10^6 、 1.0×10^7 CFU/mL, 以商业菌种为对照组, 恒温 42 ℃ 发酵 4~8 h, 并进行 pH 值和滴定酸度的测量以确定最优的接种量。

表 1 菌种比例优化的单因素实验

Table 1 Single-factor experiment for strain ratio optimization

序号	菌种比例 (H1:H2)	接种量 /(CFU/mL)	刺梨汁添加量 /(g/mL)
CK1	商业菌种	1.0×10^7	0
A1	1:1	1.0×10^7	0
B1	1:2	1.0×10^7	0
C1	1:3	1.0×10^7	0

表 2 接种量优化的单因素实验

Table 2 Single-factor experiment for inoculation volume optimization

序号	菌种比例 (H1:H2)	接种量 /(CFU/mL)	刺梨汁添加量 /(g/mL)
CK2	商业菌种	5.0×10^6	0
S2	1:2	5.0×10^6	0
CK3	商业菌种	1.0×10^7	0
S3	1:2	1.0×10^7	0

1.3.2.3 刺梨汁添加量的单因素实验

据 1.3.1 配制的原乳液在 1.3.2.1 得出的菌种最优配比和 1.3.2.2 得出的最优接种量的条件下, 分别添加含量为 0、0.06、0.08、0.10 g/mL 的刺梨汁, 以商业菌种为对照组, 恒温 42 ℃ 发酵 4~8 h, 并进行 pH 值和滴定酸度的测量以确定最优的接种量。

表 3 刺梨汁添加量优化的单因素实验

Table 3 Single-factor experiment for the amount of *Roxburgh rose* juice added optimization

序号	菌种比例 (H1:H2)	接种量 /(CFU/mL)	刺梨汁添加量 /(g/mL)
CK4	商业菌种	1.0×10^7	0
SP4	1:2	1.0×10^7	0
CK5	商业菌种	1.0×10^7	0.06
SP5	1:2	1.0×10^7	0.06
CK6	商业菌种	1.0×10^7	0.08
SP6	1:2	1.0×10^7	0.08
CK7	商业菌种	1.0×10^7	0.10
SP7	1:2	1.0×10^7	0.10

1.3.2.4 发酵乳基本理化性质的筛选

(1) pH 值的测定: 取适量的发酵乳样品于锥形瓶中, pH 计校准后, 测定发酵乳样品的 pH 值, 待示数稳定后读数并记录^[12]。

(2) 滴定酸度的测定^[13]: 酸度按照 GB 5009.239-2016《食品安全国家标准 食品酸度的测定》方法测定。

1.3.3 刺梨发酵乳理化性质的评定

在已确定发酵配方的条件下, 对刺梨发酵乳进行理化性质的测定。如表 4, CKS、EGS 是商业菌种发酵的发酵乳; CK、EG 是实验菌种发酵的发酵乳。

表 4 刺梨发酵乳发酵具体配方

Table 4 Fermentation specific recipe of *Roxburgh rose* yogurt

序号	总活菌数 /(CFU/mL)	H1:H2	刺梨汁含量 /(g/100 mL)
CKS	1.0×10^7	商业菌种	0
EGS	1.0×10^7	商业菌种	6
CK	1.0×10^7	1:2	0
EG	1.0×10^7	1:2	6

1.3.3.1 后酸化曲线的绘制

将制备好的发酵乳样品存放于 4 ℃ 冰箱中, 于贮藏期内 (0~4 周) 内每隔一周测定样品 pH 值变化情况, 并在第 4 周检测发酵乳中的活菌数含量。活菌数的测定参照 GB4789.2-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定》的方法, 采用稀释平板计数法计算发酵乳样品中的活菌数情况^[14]。

1.3.3.2 挥发性组分的测定

采用固相微萃取气相色谱-质谱法 (SPME-GC-MS) 对发酵乳样品中的挥发性风味产物进行了分析^[15]。取 5 g 待测发酵乳样品于顶空萃取瓶中, 加入磁力转子, 置于仪器中, 将经过老化的萃取头插入顶空瓶中, 推入萃取纤维头吸附 30 min, 温度为 60 ℃; 将已完成吸附的纤维头缩回, 并从顶空瓶中拔出, 迅速插入 GC-MS 仪器进样口, 推出纤维头进行 GC-MS 检测。该色谱柱填充物中含有质量分数为 5% 的角鲨烯、90% 的聚乙二醇-300 和 5% 的癸二酸二乙酯 (V/V)。

GC 条件如下: 进样口衬管直径 0.75 mm, 氦气作载气, 流速 2.25 mL/min; 色谱柱起始柱温为 40 ℃ (保持 5 min), 以 10 ℃/min 的速率从 40 ℃ 升温到 140 ℃ (保持 1 min), 再以 5 ℃/min 升温到 220 ℃ (保持 3 min), 最后以 8 ℃/min 升温到 240 ℃, 保持 3 min; 进样口温度 240 ℃, 分流进样, 分流

比为 10:1；MS 条件如下：EI 离子源，电离电压 70 eV，离子源温度 230 ℃，接口温度为 240 ℃，质谱扫描范围为 35~450 u。

1.3.3.3 持水力的测定

取适量样品对质量进行称重并记为 m_1 ，进行 4 000 r/min 离心 10 min 处理，分离出乳清，称量剩余物质的质量，记为 m_2 。发酵乳样品的持水力^[16]计算公式为：

$$W = \frac{m_2}{m_1} \times 100\% \quad (1)$$

式中：

W ——样品持水力，%；

m_1 ——称取的适量样品的质量，g；

m_2 ——离心后除乳清外的物质质量，g。

1.3.3.4 蛋白质种类及相对分子质量的测定

将样品稀释后得到 4 mg/mL 的待测样品，煮沸 5 min 后，10 000 r/min 离心 5 min。上样量为 10 μ L，分离胶、浓缩胶的质量分数分别为 12.5% 和 3%，浓缩胶电流为 20 mA，分离胶电流为 30 mA。电泳完毕后凝胶用考马斯亮蓝 R250 染色 40 min，过夜脱色至透明后确定根据 Marker 蛋白确定样品的蛋白质种类和相对分子质量^[17]。

1.3.4 数据处理与分析

所有试验均重复 3 次，采用系统软件 Origin 2021 进行数据分析；采用 SPSS 软件进行显著性分析， $P < 0.05$ 认为差异显著。

2 结果与讨论

2.1 最佳刺梨发酵乳发酵工艺条件

2.1.1 不同接种比例下的发酵乳 pH 值和酸度随时间的变化关系

考虑到发酵乳的发酵活力与生产效率，GB 5009.239-2016《食品安全国家标准 食品酸度的测定》中规定滴定酸度不小于 70 °T 作为发酵完成的标准，因而在本发酵条件优化实验中采用滴定酸度作为主要评价指标，pH 值作为辅助指标对刺梨发酵乳的发酵工艺进行筛选确定。

在不同菌种比例下的发酵乳酸度和 pH 值随发酵时间的变化曲线如图 1 和图 2，所测 4 个样品之间酸度和 pH 值在发酵时间达到 5 h 时都具有显著性差异。根据张芳芳等^[18]的研究表明，菌种比例 H1:H2 在 0:1.5 到 2:0 之间，随着球菌减少、杆菌增

加，pH 值呈现先减小后增大的趋势，而滴定酸度，感官评价值，还原糖的转化率呈现先增加后减小的趋势，由此可知在接种量一定的条件下，杆菌与球菌的比例过高和过低都会影响发酵乳的品质。

由图 1 和图 2 可知，在 42 ℃ 下恒温发酵 5 h 的发酵乳，在菌种比例 H1:H2=1:2 时酸度更高，达到了 81.99 °T；并且 pH 值更低，达到了 4.46，与张芳芳等的研究中所得出的 pH 值为 4.18~4.36，滴定酸度处于 89.30~78.31 °T 的结论大致相符。相比于其他 3 个样品，菌种比例 H1:H2=1:2 时发酵得更完全，即发酵所需的时间更短，生产效率更高，故在后续的筛选中选用 H1:H2=1:2 的菌种比例。

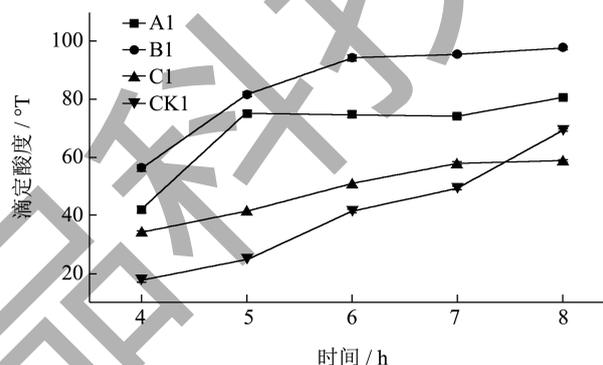


图 1 不同菌种比例下的发酵乳酸度随发酵时间的变化曲线

Fig.1 Variation curve of yogurt acidity with fermentation time for different strain ratios

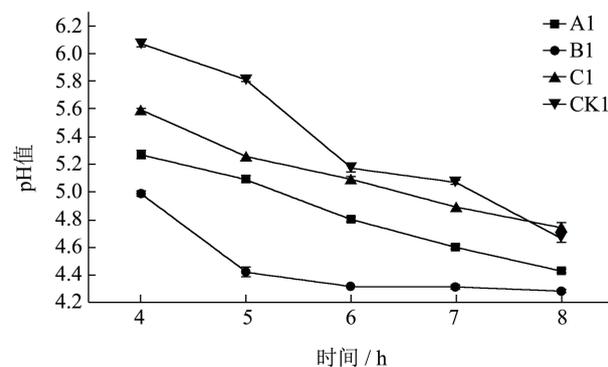


图 2 不同菌种比例下的发酵乳 pH 值随发酵时间的变化曲线

Fig.2 Variation curve of yogurt pH value with fermentation time for different strain ratios

2.1.2 不同接种量下的发酵乳 pH 值和酸度随时间的变化关系

在不同菌种比例下的发酵乳酸度和 pH 值随发酵时间的变化曲线如图 3 和图 4，除去 CK2 和 S3 样品的 pH 值在发酵 5 h 时显著性差异不明显 ($P \leq 0.07$)，其余样品在发酵时间相同时均具有显著

性差异。根据张芳芳等^[18]的研究表明,随着接种量的增加,发酵乳的pH值逐渐减小,滴定酸度逐渐增大。还原糖转化率、感官评价值呈现先增后减的趋势,接种量的质量分数为2%时,还原糖转化率及感官评价值均达到最高值,分别为9.06%和97,此时的pH值和滴定酸度分别为4.20和88.71 °T。

由图3和图4可知,在菌种比例H1:H2=1:2的条件下42 °C恒温发酵5 h的发酵乳,在接种量为 1.0×10^7 CFU/mL牛奶时酸度更高,达到了81.99 °T;并且pH值更低,达到了4.46,此时的发酵乳接种总量的质量分数约为2%,与张芳芳等的研究相一致。对比4个样品,只有CK2在pH值上相对于实验菌种pH值更低,达到了4.24。但实验结果表明在接种量为 1.0×10^7 CFU/mL时发酵乳样品发酵得更完全,故在后续的筛选中选用 1×10^7 CFU/mL的接种量。

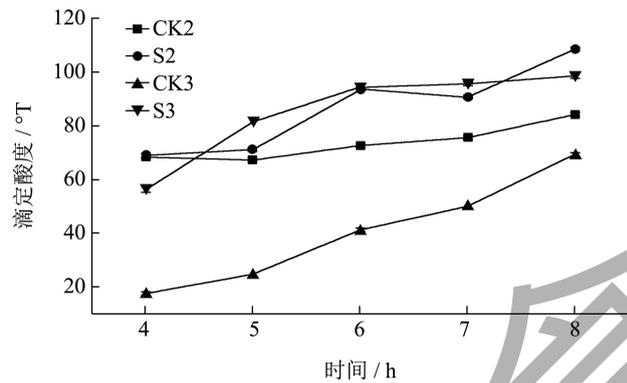


图3 不同接种量下的发酵乳酸度随发酵时间的变化曲线

Fig.3 Variation curve of yogurt acidity with fermentation time at different inoculum levels

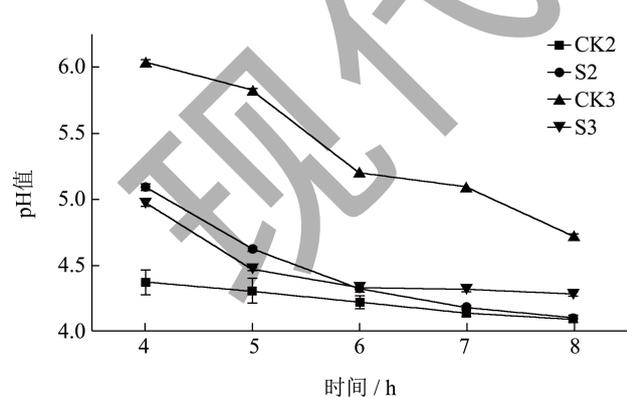


图4 不同接种量下的发酵乳pH值随发酵时间的变化曲线

Fig.4 Variation curve of yogurt pH value with fermentation time at different inoculum levels

2.1.3 不同刺梨汁添加量下的发酵乳pH值和酸度随时间的变化关系

在不同菌种比例下的发酵乳酸度和pH值随发

酵时间的变化曲线如图5和图6。根据黄群等^[19]的研究表明,刺梨汁在添加量为0.10 g/mL的情况下的刺梨酸奶感官评分最高,但过高的添加量会导致发酵乳的色泽和风味产生影响,可能的原因是刺梨汁本身由于富含Vc,口感偏酸,且色泽偏黄,过多的添加量导致发酵乳发酸以及产品的色泽发黄,对于后续的后酸化难以控制;但过少的添加量也会导致发酵乳中的刺梨风味过淡。王倩玉等^[5]的研究与之不同,认为刺梨的添加量在0.04 g/mL时的感官评分达到最高,能使发酵乳具有刺梨独特的果香味,使得酸奶清香可口,过多刺梨汁的添加会影响酸奶本身的组织状态。故对比发酵时间在5 h,酸度在70~90 °T的样品,发现SP4、SP5、CK4样品在滴定酸度与pH值上均有显著性差异。

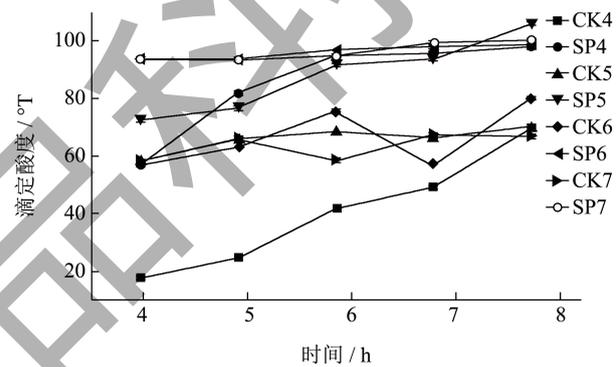


图5 不同刺梨汁添加量下的发酵乳酸度随发酵时间的变化曲线

Fig.5 Variation curve of yogurt acidity with fermentation time for different Roxburgh rose juice additions

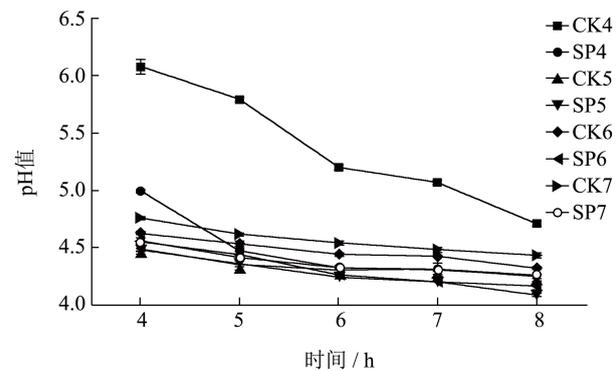


图6 不同刺梨汁添加量下的发酵乳pH值随发酵时间的变化曲线

Fig.6 Variation curve of yogurt pH value with fermentation time for different Roxburgh rose juice additions

由图5和图6可知,在菌种比例H1:H2=1:2,接种量为 1.0×10^7 CFU/mL的条件下42 °C恒温发酵5 h的发酵乳,在刺梨汁添加量为0.06 g/mL时酸度

和 pH 值更为适宜, 分别达到了 76.78 °T 和 4.33。对比 8 个样品, 只有样品 CK4、SP4 和 SP6 相对添加量为 0.06 g/mL 的发酵乳酸度更高, 其中 SP6 的酸度达到了 93.44 °T, 由于发酵乳在低温 (2~5 °C) 下也存在缓慢发酵和产酸, 可能会导致最终的产品口感偏酸。综合考虑发酵风味、口感和经济成本, 在后续的筛选中选用刺梨汁的添加量为 0.06 g/mL。

综合考虑 2.1.1、2.1.2 和 2.1.3 以及现有的文献研究, 可得刺梨发酵乳发酵的最佳条件为: 总活菌数为 1.0×10^7 CFU/mL, 菌种配比 H1:H2=1:2, 刺梨加入量为 0.06 g/mL, 在 42 °C 下恒温发酵 4~5 h。在此条件下发酵出来的发酵乳 pH 值为 4.47, 酸度为 76.78 °T, 满足酸度在 70~90 °T 的发酵乳口感较好, 国家标准中对发酵乳酸度的要求是 ≥ 70 °T, pH 值一般在 4.50 左右发酵较好^[20]。

表 5 刺梨发酵乳发酵具体配方

Table 5 Fermentation specific recipe of *Roxburgh rose* yogurt

序号	总活菌数 (CFU/mL)	H1:H2	刺梨汁含量 (g/100 mL)
CKS	1.0×10^7	商业菌种	0
EGS	1.0×10^7	商业菌种	6
CK	1.0×10^7	1:2	0
EG	1.0×10^7	1:2	6

2.2 刺梨发酵乳的理化性质

2.2.1 发酵乳后酸化曲线与活菌数

2.2.1.1 发酵乳的后酸化曲线

刺梨发酵乳 pH 值随贮藏时间变化的后酸化曲线如图 7, 4 个样品在后酸化第 4 周时均具有显著性差异, 且每个样品的贮藏第 0 周和第 4 周的 pH 值也具有显著性差异。由图 7 可知, 4 °C 贮藏条件下 H1 和 H2 发酵的发酵乳在加入了刺梨汁后在后续酸化的过程中 pH 值降低程度更大, 而使用了商业菌种的发酵乳在加入刺梨汁后的后酸化程度反而控制得比不加刺梨的发酵乳样品更好。

根据 Xu 等^[21]的研究, 嗜热链球菌与保加利亚乳杆菌德氏乳杆菌亚种单独发酵的酸化能力较弱, 在共培养条件下, 它们的酸化能力得到提升, 并表现出协同效应。球菌与杆菌比例为 1:2 的条件下, 在保藏 21 d 后酸度从 72 °T 升高到 86 °T, 对于发酵乳而言, 处于风味较好的阶段。刺梨汁本身酸度偏高, 添加后对于发酵乳的酸度有一定的增高, 因而 pH 值有所降低。

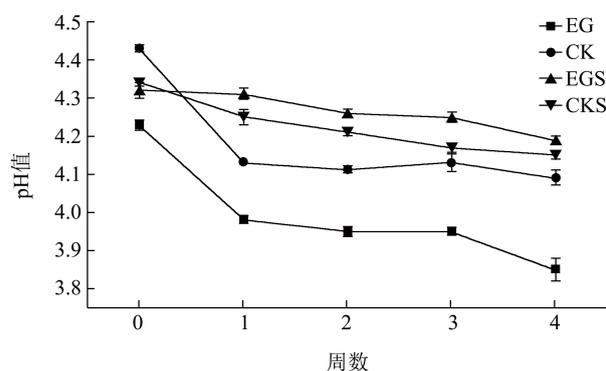


图 7 刺梨发酵乳的后酸化曲线

Fig.7 Post-acidification curve of *Roxburgh rose* yogurt

由图 7 知, 发酵乳样品在第 0~1 周时, 实验菌种发酵的酸奶样品 pH 值发生了较大的变化, 这与 Xu 等的结论相同。在 CK 和 EG 两个样品中, 不加刺梨汁的发酵乳 pH 值在后几周趋于稳定, 而加入了刺梨汁的发酵乳 pH 值仍旧以较缓的趋势下降。相比而言, 商业菌种发酵的发酵乳无论是否添加刺梨汁, pH 值下降的程度都不大, 但添加了刺梨汁的商业菌种发酵的发酵乳在后酸化控制上比未添加的商业菌种发酵的发酵乳更好。

2.2.1.2 贮存 4 周后发酵乳的活菌数和后酸化情况

表 6 后酸化 4 周后发酵乳的活菌数含量

Table 6 Live bacterial count of yogurt after 4 weeks post acidification

序号	活菌数/($\times 10^8$ CFU/mL)
CKS	7.60 ± 0.05^a
EGS	1.90 ± 0.06^c
CK	3.70 ± 0.09^b
EG	1.10 ± 0.02^d

注: 表中上标不同字母分别表示同一列数据之间具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

由表 6 可以看出, 所测的 4 个样品都具有显著性差异。而加入了刺梨汁的发酵乳对活菌数有一定影响, 但符合国家标准中对乳酸菌活菌数含量 $\geq 1.0 \times 10^6$ CFU/mL 的要求。

根据 Tong 等^[22]的研究, 无论是实验室分离的菌种, 还是采用商业菌种, 在发酵完成后的 8 h 内活菌数都达到了 10^7 CFU/mL 的, 且随着时间的延长活菌数总量还在缓慢增长。本实验中刺梨汁中含有的 Vc 可能会对菌种的生长繁殖有一定的抑制作用, 在 4 °C 下低温保藏 4 周后添加了刺梨汁的发酵乳不如未添加的发酵乳所含的活菌数多。Tong 等同样表明, 商业菌种和实验室菌种发酵的发酵乳, 在

放置相同小时后不添加刺梨汁的发酵乳之间的活菌数并没有太大的差异。

如表 6 所示,证实了上述研究结果,添加了刺梨汁对发酵乳的活菌数有一定影响,用商业菌种、实验菌种发酵的刺梨发酵乳都和普通发酵乳一样,活菌数数量级控制在 10^8 CFU/mL。上述发酵乳在 4 周后酸化后的活菌数含量都符合国家标准《GB19302-2010 发酵乳》的相关要求。

2.2.2 发酵乳中含有的挥发性物质

发酵乳的主要感官属性包括质构、色泽、滋味

和气味。在这些属性中,气味在决定消费者对发酵乳的接受度和偏好方面起着重要的作用。人类或其他动物通过嗅觉感知气味,它是由一种或多种挥发性化合物引起的,通常质量浓度很低。发酵乳作为一种重要的发酵食品,其挥发性成分受到广泛研究。研究表明^[23]发酵乳中有超过 90 种不同的挥发性化合物,包括碳水化合物、醇、醛、酮、酸、酯、内酯、含硫化合物、吡嗪和呋喃衍生物。发酵乳的风味是在发酵菌种的作用下形成的,目前保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌已广泛应用于酸奶的工业发酵。

表 7 发酵乳中分离出的挥发性物质
Table 7 Volatile substances isolated from yogurt

风味物质种类	CKS		EGS		CK		EG	
	保留时间 /min	面积百分比						
1,2- 双(甲基硅基)乙烷	3.144	100	—	—	—	—	—	—
乙基硼酸	3.295	59.58	3.295	20.67	—	—	—	—
乙酸乙烯酯	3.92	70.99	3.913	100	—	—	—	—
八甲基环四硅氧烷	4.286	14.51	4.29	7.72	4.293	6.89	4.286	5.13
二氟磷酸	4.546	4.26	—	—	—	—	—	—
硼酸三乙酯	5.303	4.16	—	—	—	—	—	—
2-(乙酰氧基)-2,5-二氢-2,5,5-三甲基-1,3,4-噁二唑	5.409	12.11	5.405	15.68	—	—	—	—
			5.446	23.66	—	—	—	—
3-噻唑烷羧酸, 4-(乙酰氧基)-2-(1,1-二甲基乙基)-, 苯基甲基酯, 1-氧化物	7.169	6.87	—	—	—	—	—	—
十甲基-环戊硅氧烷	8.107	5.24	—	—	—	—	—	—
(三甲基硅)重氮甲烷	8.269	22.13	—	—	8.269	11.85	—	—
2-乙基-4,5-二甲基-1,2-氧硼烷	10.021	12.43	10.014	4.64	—	—	—	—
1-甲基-1-硼杂环庚烷-2,4,6-三烯	10.18	14.56	10.18	10.31	10.187	7.17	10.168	4.23
乙酰氨基酚	10.877	66.95	10.884	20.77	10.877	20.36	10.884	15.35
十二甲基环己基硅氧烷	12.701	8.34	12.704	7.8	—	—	—	—
甜菜碱	13.722	8.33	—	—	—	—	—	—
二乙基硼酰氧基甲基环氧乙烷	16.273	7.42	—	—	—	—	—	—
苯并噻二唑-4-基异硫氰酸酯	16.725	10.22	—	—	—	—	—	—
硫黄素	17.181	5.64	—	—	—	—	—	—
			—	—	19.725	5.65	—	—
吗啉, 4-甲基, 4-氧化物	19.706	11.41	—	—	24.978	10.54	—	—
			—	—	28.671	8.18	—	—
2-异氰酸酯丙酸乙酯	20.739	12.25	—	—	—	—	—	—
乙基硼酸	22.367	4.63	—	—	33.713	30.87	—	—
乙酸	23.478	9.4	—	—	—	—	—	—
砷酸	24.492	10.47	24.477	7.86	—	—	—	—
4-叠氮-4-脱氧-,β-L-的甲基吡喃糖苷	24.982	23.88	—	—	—	—	—	—

续表 7

风味物质种类	CKS		EGS		CK		EG	
	保留时间 /min	面积 百分比	保留时间 /min	面积 百分比	保留时间 /min	面积 百分比	保留时间 /min	面积 百分比
辛酸	28.663	19.02	28.663	19.29	—	—	28.66	11.29
亚甲基双甲基硅烷	—	—	—	—	3.174	19.29	—	—
二甲醚	—	—	—	—	3.287	100	3.287	100
甲基丙基硅烷	—	—	—	—	3.916	7.72	3.916	6.7
2,4-戊二酮	—	—	—	—	7.169	4.97	—	—
六甲基硅烷	—	—	—	—	12.38	7.47	—	—
甲酸酞肼	—	—	19.729	5.29	15.267	16.66	15.274	11.9
癸酸	—	—	—	—	31.701	4.07	—	—
1-乙烯基-5-(1-丙烯亚基)-螺[2.4]庚烷	—	—	7.146	6.06	—	—	—	—
1-甲基-1-硅基环丁烷	—	—	8.258	13.13	—	—	—	—
3,4-壬二烯	—	—	13.526	7.16	—	—	—	—
2-甲基丁基异硫氰酸酯	—	—	16.247	4.89	—	—	—	—
羟基(4-甲氧基苯基)甲基膦酸二乙酯	—	—	16.718	5.78	—	—	—	—
苯甲酰异硫氰酸酯	—	—	20.471	4.46	—	—	17.181	4.36
乙酸	—	—	24.967	71.96	—	—	24.968	45.12
3-四氢唑-1-基丙酸	—	—	27.005	6.65	—	—	—	—
4-甲基戊基 S-2-(二甲氨基)乙基丙基 磷硫酸盐	—	—	—	—	—	—	8.265	9.57
2,4-二甲基-2-戊醇	—	—	—	—	—	—	12.392	4.59
苯甲酸	—	—	—	—	—	—	33.709	13.89

注：“—”表示未分离出该物质。

如表 7 所示,通过顶空固相微萃取-气质联用法测定发酵乳样品的挥发性成分,共鉴定出 43 种挥发性物质,包括醇类 1 种、酮类 1 种、酯类 8 种、酸类 7 种、芳香族类 2 种、碳氢化合物 13 种及其它挥发性成分 22 种;其中商业菌种发酵的酸奶中,未加入刺梨汁的分离出 25 种风味物质,添加了刺梨汁的发酵乳则分离出 21 种风味物质;而使用实验菌种发酵的酸奶中,未添加刺梨汁的分离出 15 种物质,加入了刺梨汁的发酵乳分离出 11 种物质。从分离出的物质种类上看,商业菌种发酵的酸奶所含有的风味物质种类均比实验菌种发酵的酸奶数量要多,而不添加刺梨的酸奶则比添加了刺梨的酸奶含有更多的风味物质种类。

Zhang 等^[23]研究表明,从商业菌种发酵的发酵乳中分离出约 21 种风味物质,其中分离出的乙酸、辛酸、戊酮,以及一些杂环化合物作为典型的发酵乳中存在的风味物质,同样也在本实验的样品中分

离得到。乙酸作为发酵乳风味的主要产物,能增加发酵乳的香气,并对产生“奶酪味”具有明显帮助;醛酮类化合物的口感阈值较低,在低质量浓度下也能对乳制品的风味产生重要作用,醛类物质能赋予发酵乳青苹果味或坚果味,酮类物质赋予发酵乳奶油的风味;醇类物质是通过乳糖发酵、氨基酸代谢,以及醛酮的还原产生的,具有脂肪的气味;酯类物质由乳糖发酵和氨基酸代谢产生,能够帮助发酵乳产生良好的风味^[22]。

通过对比发酵乳挥发性物质可以看出,实验菌种的发酵乳有更多的酯类、醇类以及芳香族化合物,但同时也丢失了一部分的酸类化合物。而对比加入刺梨汁和不加入刺梨汁的发酵乳,加入了刺梨汁的发酵乳增加了酯类、酸类,烯炔类和芳香类化合物,但是同时也损失了烷烃类和一部分酸类化合物。

2.2.3 发酵乳的持水力

刺梨发酵乳的持水力如图 8 所示。由图 8 可

以看出, EGS 和 EG 样品之间的显著性差异不明显 ($P \leq 0.10$), 但其余样品都具有明显的显著性差异。在不添加刺梨汁的情况下, 商业菌种发酵的发酵乳的持水力只有 29.21%, 而实验菌种发酵的发酵乳的持水力却达到了 44.05%; 但在添加刺梨后, 商业菌种发酵的发酵乳的持水力有所上升, 达到了 36.26%, 而实验室发酵乳持水力却有所降低, 只有 32.94%。发酵乳的持水力大小对其组织形态有直接影响作用。持水力越高, 发酵乳的凝固状态越好, 在不破乳的情况下能更好地保持产品的风味^[24]。而对比实验菌种与商业菌种, 可以看出实验菌种发酵的酸奶持水力更高, 其稳定性也有所上升; 但在加入刺梨汁后, 实验菌种发酵的酸奶持水力和稳定性反而不如商业菌种发酵的酸奶, 但是仍比不添加刺梨汁的商业菌种发酵乳的持水力要高。

Tong 等^[22]在对商业菌种发酵 4 h 的发酵乳的持水力测定中得到的 WHC 值为 30%, 与本实验的商业菌种发酵的发酵乳的持水力结果相近。研究结果表明, 随着发酵时间的延长, 发酵乳的持水力越弱。可能的原因是由于发酵乳过度发酵导致乳清析出, 造成其稳定性的下降。而其余不同菌种配比发酵的发酵乳持水力都要比商业菌种发酵的发酵乳高, 这一点与本实验的研究结果也保持一致。

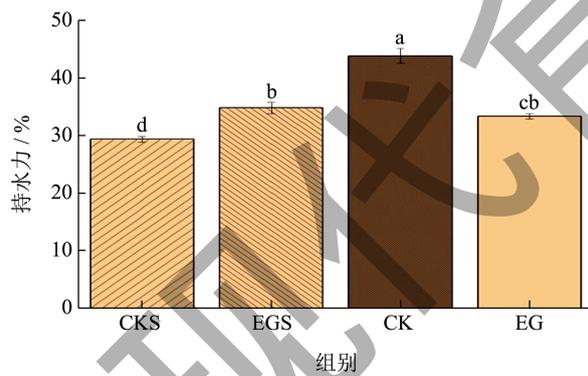


图 8 发酵乳的持水力对比

Fig.8 Comparison of the water retention capacity of yogurt

注: 图中柱上不同字母分别表示数据之间具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.2.4 发酵乳中蛋白质相对分子质量

四个刺梨发酵乳的 SDS-PAGE 电泳, 如图 9 所示, 通过与 Marker 蛋白的对比, 可知发酵乳的蛋白质大多分布在 22~38 ku 之间, 并且不同样品间蛋白质种类并没有太大的差别。根据 Susanti 等^[25]的研究, 可知, 发酵乳中分离出的蛋白主要是酪蛋白。酪蛋白广泛存在于哺乳动物中, 能使人体氨基酸的质量

浓度长时间维持在一定范围, 有助于稳定吸收消化蛋白质。本实验分离出的蛋白质也主要是酪蛋白, 包括了分子量为 33 ku 的 β -酪蛋白和 37 ku 的 α -酪蛋白。从图中可以看出, 添加了刺梨汁的样品电泳条带明显要比未添加刺梨汁的要更明显, 对比商业菌种和实验菌种发酵的酸奶, 可以看出商业菌种发酵乳的蛋白质含量要更多。

理论上, 刺梨含有的有机酸较高, 会与牛乳中的酪蛋白产生凝聚沉淀, 但在实验过程中, 无论是从电泳方法分析的蛋白质含量和对刺梨发酵乳的外观观察中, 都未观察到蛋白质沉淀的现象, 甚至比未添加刺梨汁的发酵乳对于蛋白质的含量还要更高。这可能是由于发酵乳中刺梨汁添加的质量不高, 使得蛋白质依旧能够维持正常的构型, 不被破坏。而刺梨汁添加后对后酸化的抑制作用, 也可能是刺梨发酵乳比起普通发酵乳测得的蛋白质含量更高的原因。然而, 对比发现, 本实验中并没有分离出分子量为 70 ku 的乳氧化酶, 但该物质在 Susanti 等的研究样品中得到分离, 这一差异可能是刺梨中 SOD 对该氧化酶的影响所导致的。

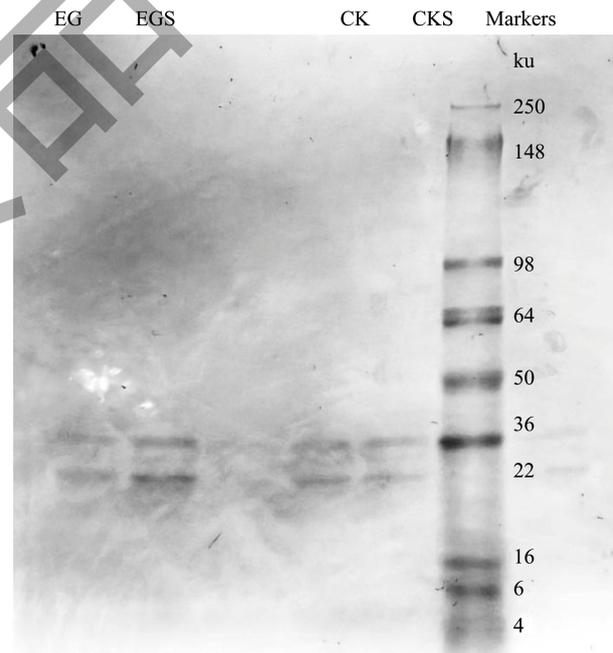


图 9 刺梨发酵乳的 SDS-PAGE 电泳

Fig.9 Protein content of Roxburgh rose yogurt

3 结论

本实验对开发一种新型的刺梨发酵乳提供了参考。由实验得出, 刺梨发酵乳发酵最佳条件: 菌种比例为 H1:H2=1:2, 接种量为 1.0×10^7 CFU/mL, 刺梨添加量为 0.06 g/mL。在此条件下发酵 5 h 所得的刺梨发酵乳 pH 值为 4.47, 酸度为 76.78 °T, 持

水力为 32.94%，其中分离出 11 种挥发性物质，蛋白质相对分子质量主要分布在 22~38 ku，后酸化 4 周后发酵乳的 pH 值降低至 3.89，活菌数含量为 1.1×10^8 CFU/mL。本实验同样发现，添加了刺梨的商业菌种发酵的发酵乳能够在一定程度上抑制发酵乳的后酸化作用，提高商业菌种发酵的发酵乳的持水力。添加了刺梨的实验发酵乳，其中的酪蛋白含量有所提升。然而，刺梨可能会影响发酵乳中原本含有的挥发性物质，对发酵乳的风味造成一定影响。本实验可以为工业化生产刺梨发酵乳提供参考。

参考文献

- [1] 冯丹丹,胡萍,许浩翔,等.乳酸菌发酵刺梨汁体外降血糖、降血脂活性研究[J].食品与发酵工业,2022,48(8):212-219.
- [2] LI X, LI F, ZHANG W, et al. Effect of yogurt on gastrointestinal motility of dyspepsia mice [J]. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 2019, 484: 012002.
- [3] TERZO S, ATTANZIO A, CALYI P, et al. Indicaxanthin from opuntia ficus-indica fruit ameliorates glucose dysmetabolism and counteracts insulin resistance in high-fat-diet-fed mice [J]. Antioxidants (Basel), 2021, 11(1): 80.
- [4] 许浩翔.乳酸菌发酵刺梨汁对小鼠免疫力及肠道微生态影响的研究[D].贵阳:贵州大学,2021.
- [5] 王倩玉,虞云合,彭静,等.刺梨酸奶的研制[J].农产品加工, 2021,538(20):25-29.
- [6] NYANZI R, JOOSTE P J, BUYS E M. Invited review: probiotic yogurt quality criteria, regulatory framework, clinical evidence, and analytical aspects [J]. J Dairy Sci, 2021, 104(1): 1-19.
- [7] ARYANA K J, OLSON D W. A 100-year review: yogurt and other cultured dairy products [J]. J Dairy Sci, 2017, 100(12): 9987-10013.
- [8] SAVAIANO D A, HUTKINS R W. Yogurt, cultured fermented milk, and health: a systematic review [J]. Nutr Rev, 2021, 79(5): 599-614.
- [9] SHIBY V K, MISHRA H N. Fermented milks and milk products as functional foods-a review [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2013, 53(5): 482-496.
- [10] 谢勇,张榕,施伽,等.刺梨凝固型酸奶的发酵工艺研究[J].中国酿造,2017,36(10):181-185.
- [11] 郭水连,赵晓晴,庄钰蓉,等.酶法辅助共发酵奶啤的工艺优化[J].食品与发酵工业,2020,46(24):103-108.
- [12] 肖兰芳,赵珊,刘冬梅,等.凝结芽孢杆菌发酵乳的工艺优化[J].现代食品科技,2022,38(7):90-97.
- [13] ZHOUL Y, PENGMAO D J, MA X L, et al. Effects of selenium-containing exopolysaccharide extracted from *armillaria luteo-virens* on physico-chemical and antioxidant properties of yogurt [J]. Journal of Food and Nutrition Research, 2020, 59(4): 341-51.
- [14] SHORI A B, ALJOHANI G S, AL-ZAHRANI A J, et al. Viability of probiotics and antioxidant activity of cashew milk-based yogurt fermented with selected strains of probiotic *Lactobacillus* spp [J]. Lwt, 2022, 153: 112482.
- [15] LIU A, ZHANG H W, LIU T J, et al. Aroma classification and flavor characterization of *Streptococcus thermophilus* fermented milk by HS-GC-IMS and HS-SPME-GC-TOF/MS [J]. Food Bioscience, 2022, 49: 100947.
- [16] HUANG L, ABDEL-HAMID M, ROMEIH E, et al. Textural and organoleptic properties of fat-free buffalo yogurt as affected by polydextrose [J]. International Journal of Food Properties, 2020, 23(1): 1-8.
- [17] MATTISON C P, ARYANA K J, CLERMONT K, et al. Microbiological, physicochemical, and immunological analysis of a commercial cashew nut-based yogurt [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(21): 8267.
- [18] 张芳芳,缪晓青.蜂蜜酸奶发酵工艺研究[C]//中国蜂产品协会,中国养蜂学会.2013年全国蜂产品市场信息交流会暨中国(浦东)蜂业博览会论文集,2013:11.
- [19] 黄群,麻成金,姚茂君,等.凝固型刺梨百合酸乳的生产工艺[J].食品与发酵工业,2009,35(11):193-196.
- [20] 康林芝,吴居雄,唐惠妍,等.金耳发酵液酸乳制作及品质分析研究[J].食品研究与开发,2020,41(11):141-146.
- [21] XU Z, GUO Q, ZHANG H, et al. Structural characterisation of EPS of *Streptococcus thermophilus* S-3 and its application in milk fermentation [J]. Int J Biol Macromol, 2021, 178: 263-269.
- [22] DAN T, HU H, TIAN J, et al. Influence of different ratios of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus and *Streptococcus thermophilus* on fermentation characteristics of yogurt [J]. Molecules, 2023, 28(5): 2123.
- [23] ZHANG Y C, LIN Q B, ZHONG H N, et al. Identification and source analysis of volatile flavor compounds in paper packaged yogurt by headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry [J]. Food Packaging and Shelf Life, 2022, 34: 100947.
- [24] BIBI A, XIONG Y, RAJOLA M S R, et al. Recent advances in the production of exopolysaccharide (EPS) from *Lactobacillus* spp. and its application in the food industry: a review [J]. Sustainability, 2021, 13(22): 12429.
- [25] SUSANTI R., HIDAYAT E. Profil protein susu dan produk olahannya [J]. Jurnal MIPA, 2016, 39(2): 98-106.