

内蒙古优质传统酸牛奶中乳球菌的发酵特性研究

魏冉冉, 方伟, 霍贵成

(东北农业大学, 乳品科学教育部重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150030)

摘要: 通过酸度测定, 从内蒙古优质传统酸牛奶中分离的 11 株乳球菌中筛选出 7 株发酵酸乳凝乳时间短和凝乳状态好的乳球菌, 进一步研究这 7 株乳球菌在乳中的发酵特性。测定菌株在凝乳前的产酸特性、冷藏 24 h 后的质构特性及 4 °C 冷藏期间的产酸特性及活菌数变化。结果表明: 菌株 KLDS 4.1109 和 KLDS 4.1110 产酸能力、后酸化能力及质构特性最好, 且其在 4 °C 冷藏期间活菌数都能维持在 10⁶ cfu/mL 以上。可见菌株 KLDS 4.1109 和 KLDS 4.1110 能成为新型发酵菌种, 具有很大的开发潜力。

关键词: 酸牛奶; 乳球菌; 发酵特性

文章篇号: 1673-9078(2012)11-1459-1462

Study on Fermentation Characteristics of *Lactococcus* Separated from the Traditional Fermented Milk of Inner Mongolia

WEI Ran-ran, FANG Wei, HUO Gui-cheng

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

Abstract: According to acidity determination, 7 *Lactococcus* strains were screened from 11 strains isolated from the high quality traditional fermented milk of Inner Mongolia. The fermentation characteristics of these strains were studied, including ability of producing acid before the milk congeal, textural features after 24 h storage at 4 °C and ability of producing acid and the change of viable count during the storage period at 4 °C. Strains KLDS 4.1109 and KLDS 4.1110 showed high capability of acid producing, postacidification and textural features, and the viable count all exceeded 10⁶ cfu/mL during the storage period at 4 °C. The strains KLDS 4.1109 and KLDS 4.1110 may be used as new fermentation strains with great development potential.

Key word: fermented milk; *Lactococcus*; fermentation characteristics

酸奶生产所用发酵剂菌种除传统的保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌外, 还逐渐开发出一些添加嗜酸乳杆菌、双歧杆菌、鼠李糖乳杆菌、植物乳杆菌的多菌株组配发酵剂用于酸奶生产。目前我国酸奶发酵剂菌种多从国外引进, 国内乳酸菌资源的收集筛选、分类鉴定、菌种稳定性和安全性评估研究还比较薄弱, 因此, 对国内自然发酵酸牛奶中乳酸菌资源进行收集和筛选, 开发出具有自主知识产权的酸奶发酵剂具有重要的生产意义^[1]。

内蒙古地区牧民长期饮用的酸牛奶, 就是以鲜牛奶为原料, 未经任何处理在自然环境中发酵而成的乳制品。发酵的过成不需要商品发酵剂而是用前一天的酸奶做天然发酵剂接种到新鲜的奶中使其自然发酵成酸奶, 其味清酸爽, 开胃增食, 是农牧民野外、农耕、放牧的理想食品。常和奶油混合用来拌炒米或其他米

饭吃。如加入少许白糖, 夏季尤为酸甜可口, 为牧区夏季日常饮用食品之一^[2]。由于其是自然发酵, 未经任何处理, 因此其微生态环境未遭破坏, 而且由于其特殊的制作方法使其形成了自己的特色, 使其中的乳酸菌的生物学特性和基因多样性得到了很好的保留, 因此这些丰富的乳酸菌资源有待于开发和利用。

在分析内蒙古优质传统酸牛奶中乳酸菌多样性的过程中发现, 乳酸球菌属为优势菌属, 其中乳酸乳球菌亚种为优势菌种。考虑到酸牛奶独特的优良品质与其中的优势微生物不无关系, 因此有必要研究这些乳球菌的发酵特性, 以便从中筛选性状优良的菌株, 开发制成发酵剂, 为开发应用地域特色的乳酸菌制品奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株

菌株 KLDS 4.1101、KLDS 4.1102、KLDS 4.1103、KLDS 4.1104、KLDS 4.1105、KLDS 4.1106、KLDS

收稿日期: 2012-06-28

基金项目: 教育部长江学者和创新团队发展计划资助 (IRT0959)

作者简介: 魏冉冉 (1986-), 女, 硕士生, 主要方向: 乳品科学与微生物

通讯作者: 霍贵成 (1958-), 男, 教授, 博导, 主要方向: 乳品安全与监控

4.1107、KLDS 4.1108、KLDS 4.1109、KLDS 4.1110 及 KLDS 4.1111 分离自经筛选的内蒙古优质传统发酵酸牛奶，并经鉴定为乳酸球菌属。

1.1.2 仪器设备

氢氧化钠、酚酞、恒温培养箱、冰箱、碱式滴定管、Delta 320 精密 pH 计、分析天平、TA.XT Plus Texture Analyser 质构仪、蒸汽灭菌器、超净工作台。

1.1.3 各种培养基

10%脱脂乳培养基、M17 培养基：购于青岛海博有限公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株的筛选

产酸性能筛选：菌株用 5 mL，110 °C 灭菌 10 min 的 10%脱脂乳，按 3%接种，30 °C 发酵，发酵至 pH 值 4.6 左右，记录凝乳时间及凝乳状态。

1.2.2 发酵特性研究

将甘油冻存的供试菌至 M17 液体培养基中，活化两代后，经离心用灭菌生理盐水配制为供试菌悬液，按 5×10^6 cfu/mL 的接种量转接到灭菌脱脂乳中，30 °C 发酵至 pH 值 4.6 左右，然后转至 4 °C 冰箱中冷藏，供以下实验使用^[3]。

1.2.2.1 供试菌在发酵乳中不同时期产酸量的测定：

酸度(°T)的变化：分别在下列情况下取乳样 10 g，测定其酸度，测定方法参照 GB 5413.34-2010。

(1)接种培养的菌株发酵至乳样 pH 4.6 左右，每隔 1.5 h 取一定量乳样。

(2)发酵至 pH 4.6 左右后进行 4 °C 冷藏，冷藏期间 0、3、6、9、12、15 d 取一定量乳样。

1.2.2.2 质构特性的测定

质构仪参数：探头 AEC，盘径 35 mm，压力模式，感应力 Auto-5 g，测试速度 1.0 mm/s，测试距离 15 mm(样品厚度约 60 mm)。

操作方法：将装有 100 mL 酸奶的小烧杯置于质构仪中心位置(酸奶从 4 °C 冰箱中取出后立即测试)，读取各项指标数值，每个样品重复测定 3 次。

1.2.2.3 供试菌在发酵乳中活菌数的变化：

发酵结束后，转至 4 °C 条件下冷藏保存，在 0、3、6、9、12、15 d 取乳样，以稀释平板计数法做活菌计数^[4,5]，测定在 15 d 贮藏过程中供试菌株在冷藏发酵乳中活菌数的变化。

2 结果与讨论

2.1 菌株筛选

组配优良酸奶发酵剂，单菌株的生长繁殖力和发酵产酸性能是最重要的基本特性，选择生长繁殖速度

快和前产酸能力强的菌种，尤为重要^[6]。本实验对 11 株乳酸球菌采用单菌发酵，30 °C 发酵 10%的脱脂乳，记录其在凝乳至 pH 值 4.6 左右时的凝乳时间，筛选出凝乳时间短、凝乳结构好 7 株乳酸球菌，结果见表 1。

表 1 菌株筛选的结果

菌株	pH 值	滴定酸度	凝乳时间/h	凝乳状态
KLDS 4.1101	6.08	ND	>12	-
KLDS 4.1102	6.01	ND	>12	-
KLDS 4.1103	5.27	ND	>12	-
KLDS 4.1104	4.54	80.68	9.0 左右	比较细腻,少量乳清
KLDS 4.1105	4.59	80.68	7.5 左右	比较细腻,少量乳清
KLDS 4.1106	4.61	78.08	7.5 左右	比较细腻,少量乳清
KLDS 4.1107	6.06	ND	>12	-
KLDS 4.1108	4.62	75.47	7.5 左右	均匀细腻,无乳清
KLDS 4.1109	4.63	77.03	7.5 左右	均匀细腻,无乳清
KLDS 4.1110	4.60	72.35	7.5 左右	均匀细腻,无乳清
KLDS 4.1111	4.54	73.39	7.5 左右	比较细腻,少量乳清

注：“ND”表示未进行测定，“-”表示未进行记录。

由表 1 可以看出除了菌株 KLDS 4.1101、KLDS 4.1102、KLDS 4.1103 和 KLDS 4.1107 接种到 10%脱脂乳发酵 12 h 仍未凝乳，故只测定了最终的 pH 值，不凝乳可能是由于菌株一直用 M17 传代，不适应脱脂乳的生长环境而使产酸能力下降^[7]。而其他菌株的凝乳时间均在 12 h 内，凝乳酸度均达到了 GB 5413.34-2010 中对酸乳制品的酸度大于 70 °T 的要求且凝乳状态较好。

2.2 菌株产酸特性

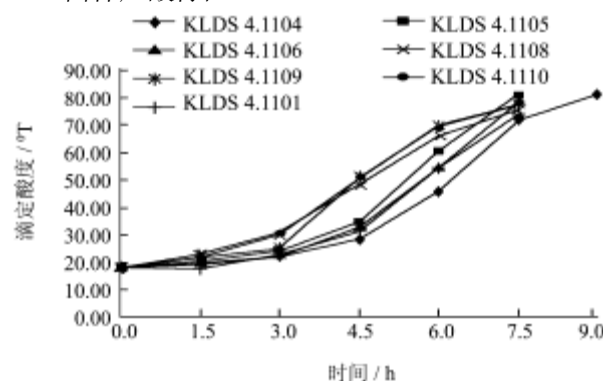


图 1 7 株乳酸菌发酵 10%脱脂乳的产酸特性

Fig.1 Acid-producing activities of 7 *Lactococcus* strains cultured in 10% skim milk

产酸能力是乳酸菌的重要性质，筛选的首要特性应该是检测菌种的产酸能力，产酸力高的菌株可以缩短发酵时间^[8]。酸乳中的酸度主要来源于乳酸菌发酵乳糖生成乳酸，酸度影响酸乳加工周期长短、生产效率高低及风味优劣，是一个重要的质量指标。不同菌

株产酸能力不同,一般通过绘制酸奶在制作过程中酸度随时间变化的曲线来确定产酸能力的强弱^[9,10]。

由图 1 可以看出在发酵初期乳球菌产酸速率很低,而当产酸速率达到一定的峰值后,产酸速率逐渐达到平稳。这是因为乳酸菌的增长遵循细菌的生长规律,在培养初期,乳酸菌处于延滞期,生长缓慢,因而产酸速率很低,当处于对数生长期时,乳酸菌生长加快,同时产酸速率也加快,当处于稳定期后,虽然乳酸菌还在生长,但由于受自身代谢产物的影响,特别是酸度的影响,菌株产酸速率逐渐下降,达到一个较恒定的值^[11]。菌株 KLDS 4.1104 在发酵 9 h 左右脱脂乳的 pH 才打到 4.6 左右,说明其产酸能力相对于其他菌株相对较弱,菌株 KLDS 4.1108、KLDS 4.1109 和 KLDS 4.1110 在 3.0~6.0 h 产酸速率达到最大,随后达到平稳,而其他四株菌在 4.5~7.5 h 产酸速率打到最大,随后还有上升的趋势,由此说明菌株 KLDS 4.1108、KLDS 4.1109 和 KLDS 4.1110 在发酵前期产酸能力较强更适合工业菌株的标准,因为发酵后期产酸能力较强的菌株有可能会比较强的后酸化。

2.3 菌株后酸化特性

酸乳的后酸化是指酸乳在正常发酵结束后,在贮存、产品运输、销售、食用前这一过程中,乳酸菌仍在生长繁殖,继续分解残存的乳糖产生乳酸,使酸乳的酸度进一步升高,以至于出现了消费者不可接受的过酸味及感官质量下降的现象^[12]。一般采用的防治措施是选择产酸弱的菌种、培养温度采用最下限、发酵好的酸奶迅速冷却、控制好贮藏条件等^[13~14]。因此,为保证酸奶有较长的货架期,必须对乳酸菌后酸化能力进行测定和控制^[14~15],因此研究菌株的后酸化能力就有着重要的意义。

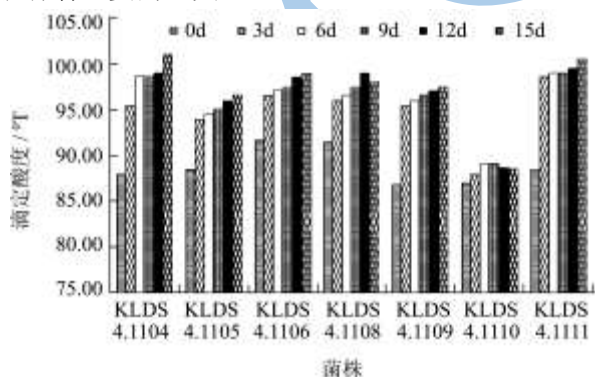


图 2 7 株乳球菌冷藏过程中的产酸特性

Fig.2 Acid-producing activity of 7 *Lactococcus* strains under cold storage condition

由图 2 可以看出各菌株均在贮存初期酸度变化大,后期酸度增加幅度很小甚至酸度保持不变,菌株 KLDS 4.1108 和菌株 KLDS 4.1110 出现酸度降低的现

象,可能是由于贮存时间过长,有杂菌污染的缘故。由于球菌有后酸化弱的特点,所以 7 株菌均表现出了后酸化弱的特点,尤其是 KLDS 4.1106、KLDS 4.1109 和 KLDS 4.1110 相对于其他菌株有着更弱的后酸化性能,而且总的酸度也不高,因此 KLDS 4.1106、KLDS 4.1109 和 KLDS 4.1110 可以作为弱后酸化菌株应用到工业生产中。

2.4 质构特性

在酸奶的加工与储藏过程中,如灌装过程、后酸化等,都会影响到酸奶的品质及质地,导致蛋白沉淀、乳清析出、分层等不良现象,严重影响产品的可接受性。增稠剂的添加可改善酸奶的质地、防止乳清分离,但一些欧洲国家(如法国、荷兰)明令禁止普通酸奶中添加增稠剂。而提高乳的总固形物含量,改善质构的同时又增加了成本。一些乳酸菌菌株能够产生胞外多糖(EPS),这有助于改善酸奶的组织状态和粘稠度^[16]。因此选择产黏菌株作为酸奶发酵剂已成为改善酸奶质构缺陷的优选方法。

表 2 7 株乳球菌发酵脱脂乳的质构特性

Table 2 Texture characteristics of 7 *Lactococcus* strains cultured in 10% skim milk

菌株	硬度/g	黏度/(g·s)	凝聚性/g	粘性指数/(g·s)
KLDS 4.1104	53.84aA	1318.39aA	20.79aA	48.22aA
KLDS 4.1105	53.13aA	1308.33aA	20.57aA	48.90aA
KLDS 4.1106	53.80aA	1382.90aA	20.61aA	50.58aA
KLDS 4.1108	65.82aA	1609.89aA	28.71abA	70.30aA
KLDS 4.1109	83.33bA	1640.00aA	39.06bB	60.62aA
KLDS 4.1110	64.73abA	1572.78aA	25.22aA	74.93aA
KLDS 4.1111	60.25abA	1543.91aA	17.26aA	39.43aA

注:表中肩标小写字母不同表示差异显著 $P < 0.05$, 大写字母不同表示差异极显著 $P < 0.01$ 字母相同表示差异不显著 $P > 0.05$ 。

从表 2 中可以看出,对不同菌株发酵乳的质构特性进行了方差分析,其中硬度指标和凝聚性指标菌株之间存在显著差异性,而黏度指标和粘性指数指标各菌株之间差异性不显著 $P > 0.05$ 。硬度指标菌株 KLDS 4.1109 与 KLDS 4.1104、KLDS 4.1105 和 KLDS 4.1106、KLDS 4.1108 之间差异性显著 $P < 0.05$, KLDS 4.1110 和 KLDS 4.1111 与其他菌株之间存在不显著性差异 $P > 0.05$ 。凝聚性指标菌株 KLDS 4.1109 与 KLDS 4.1104、KLDS 4.1105、KLDS 4.1106、KLDS 4.1110 和 KLDS 4.1111 之间差异性极显著 $P < 0.01$, 菌株 KLDS 4.1108 与其他菌株之间差异性不显著 $P > 0.05$, 菌株 KLDS 4.1109 的质构特性最佳,硬度为 83.33 g、黏度为 1640.00 g·s、凝聚性为 39.06 g、粘性指数为 60.62

g·s。

2.5 冷藏期间的活菌数

乳酸菌活菌数是体现活性乳酸菌制品具有保健功能的重要指标之一^[17]。据报道当酸奶被饮用时,其中的乳酸菌活菌数的含量必须要大于 10^6 cfu/mL,才会有乳酸菌在人体肠道中存活从而发挥乳酸菌对人体的保健作用^[18]。在国家标准 GB 4789.35-2010 中也明确规定,酸牛奶中的活性乳酸菌数应大于 10^6 cfu/ml。因此酸奶中含有大量的活性乳酸菌也是体现酸奶保健功能的重要指标。随着贮藏时间的延长乳酸菌数会发生变化^[19],冷藏中,各菌株在发酵乳中的活菌数变化如图 3。

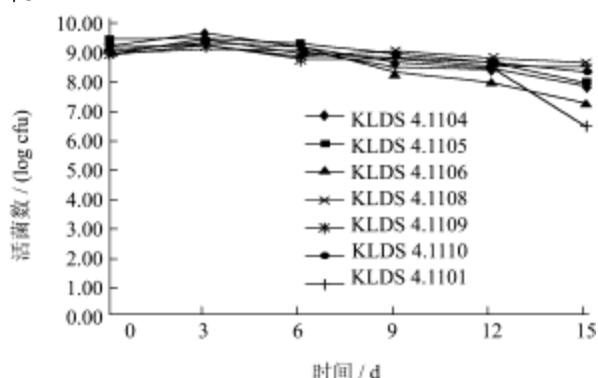


图 3 7 株乳球菌发酵脱脂乳冷藏期间的活菌数变化

Fig.3 The CFU variation trend of 7 *Lactococcus* strains cultured in 10% skim milk during storing

通过图 3 可以看出,冷藏初期菌数都有增加,随着时间的延长又以不同的趋势下降,但活菌数都能维持在 10^6 cfu/mL 以上。各菌株在 0~3 d 菌数增幅都比较小,在 3~12 d 菌数有所减少,但减少幅度缓慢,12~15 d 菌株 KLDS 4.1111 的菌数出现了明显的减少,其他菌数减少幅度仍然比较缓慢,分析原因,可能是由于各菌株发酵时培养时间稍长,至凝乳时已基本达到生长高峰期,故在贮存前期,菌数增加缓慢,且由于球菌后酸化弱,能保持较好的生长环境,而使菌株衰亡速率减缓,在贮存后期菌株 KLDS 4.1111 出现明显的减少可能是在贮存后期,由于营养物质的消耗和大量代谢物质的积累,以及长期的高酸度环境下,菌株逐渐衰退或死亡。

3 结论

3.1 通过单株发酵脱脂乳测定其滴定酸度并记录其凝乳时间,筛选出 7 株凝乳时间短,凝乳状态良好的乳球菌。测定凝乳时的滴定酸度,7 株乳杆菌凝乳酸度都达到了 GB 5413.34-2010 中对酸乳制品的酸度大于 70°T 的要求,满足了发酵剂菌种的基本要求。

3.2 对 7 株乳球菌的凝乳前的产酸特性、冷藏 24 h

后的质构特性及 4°C 冷藏期间的产酸特性及活菌数变化进行了研究,7 株菌中 KLDS 4.1109 和 KLDS 4.1110 产酸能力较强、后酸化能力较弱、质构特性较好,其在 4°C 冷藏期间活菌数都能维持在 10^6 cfu/mL 以上。可见菌株 KLDS 4.1109 和 KLDS 4.1110 能成为新型发酵菌种,具有能开发成传统乳制品发酵剂的潜力。

参考文献

- [1] 田鸿,张小平,严以兰.川西高原牧区牦牛酸乳中的几株乳杆菌发酵特性及系统发育研究[J].食品科学,2010,31(1):152-156
- [2] 刘计民.内蒙古传统风味民族乳食品简介[J].中国乳品工业,1993,21(5):237-240
- [3] 王东,王与宝,伊大忠,等.凝固型双歧杆菌酸奶在储存过程的变化研究[J].乳业科学与技术,2008,3:126-127
- [4] 田洪涛,种克,李宁.双歧杆菌酸奶冻干发酵剂不同菌株特性的研究[J].中国食品学报,2007,6:69-73
- [5] 韩璞,田洪涛,苑社强,等.发酵大豆乳优良乳酸菌菌种的筛选及其发酵性能的研究[J].现代食品科技,2009,25(3):282-285
- [6] 山丽杰,田洪涛,马雯,等.几株保加利亚乳杆菌与嗜热链球菌在乳中发酵特性及优化搭配的研究[J].中国乳业,2006,9:49-52
- [7] 国立东,王欣,杜鹏,等.传统乳制品中乳酸菌的分离及性能研究[J].食品科学,2006,27(3):60-64
- [8] 马春丽.酸奶高产酸能力生产菌株的诱变选育[D].东北农业大学,2003
- [9] 谢继志.液态乳制品科学与技术[M].北京:中国轻工业出版社,1999
- [10] 李新玲.酸奶生产中常出现的问题及解决办法[J].新畜牧,2002,2:11-12
- [11] 吕兵.新型酸奶发酵剂的研究[J].中国乳品工业,1999,5:9-11
- [12] Hashimoto-H, Oneda-K, et al. Studies on the selection of lactic acid bacteria for the manufacture of fermented milk with high desmutagenic activity [J]. Milk-Science, 1998, 47(2): 101-110
- [13] 徐成勇,郭本恒,郑思聪,等.弱后酸化酸奶发酵剂的筛选[J].中国乳品工业,2007,35(3):12-16
- [14] 郭清泉,张兰威,夏秀芳.酸奶制品发生后酸化主要发酵剂菌确定及性质研究[J].食品与发酵工业,2002,28(4):24-27
- [15] 朱滨华.酸奶变质机理及保鲜研究初探[J].中国乳品工业,1997,13(1):11-16
- [16] 霍贵成.乳酸菌的研究与应用[M].北京:中国轻工业出版社,2007

- [17] THUPPERTZ. Influence of high pressure treatment on the acidification of bovine milk by lactic acid bacteria[J]. *Milchwissenschaft*, 2004, Vol.59, No(5/6):246-249
- [18] Susiluoto.T, Korkeala.H, Bjorkroth. KJ. *Leuconostoc gasicomitatum* is the dominating lactic acid bacterium in retail modified atmosphere packaged marinated broiler meat strip on sell by day[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, No.1:89-97
- [19] 高晓平,黄现青,孙灵霞,等.凝固型酸奶在不同贮藏条件下的品质变化研究[J].*现代食品科技*,2011,27(5):517-519

现代食品科技