

# 云南撒尼地区乳饼及酸乳清中优良乳酸菌的筛选和发酵性能研究

杨玉森, 潘红梅, 殷建忠, 付强, 冯月梅, 王松梅, 吴志霜, 吴少雄  
(昆明医科大学公共卫生学院营养与食品科学系, 云南昆明 650500)

**摘要:** 选取 SDC4-1、MDC3-1、WDC3-1 3 株从云南撒尼地区乳饼和酸乳清中分离鉴定的乳酸菌株, 用耐酸、耐胆盐实验筛选其中的优势菌株; 并用产酸能力、后酸化、产乙醛能力、蛋白水解酶测定和  $\beta$ -半乳糖苷酶测定等实验研究优势菌株的发酵性能。3 株菌均能耐酸, 其中 MDC3-1 耐酸能力最高, 达 254%, WDC4-1 最低, 为 52%, 但仅 SDC4-1 可耐受胆盐, 在 0.5% 的胆盐中, 4 h 后的存活率为 81%, SDC4-1 是优势菌。SDC4-1 发酵性能实验中, SDC4-1 菌株具有很好的凝乳状态, 发酵酸奶口感风味浓郁, 在贮藏过程中活菌数含量高, 冷藏 15 d 后活菌数达到了 9.79 lgCFU/g, 远超国家标准。产酸较快, 13 h 时, 酸度已达 82.0 °T, 后酸化性好, 产乙醛能力较好, 蛋白水解能力强, 产  $\beta$ -半乳糖苷酶的量高, 达 7.7  $\mu\text{g}/\text{mol}$ , 能保证酸奶在冷藏过程中品质稳定, 因而筛选出具有优良发酵特性的菌株 SDC4-1 可以为发酵食品提供更广泛的素材。

**关键词:** 乳饼; 酸乳清; 优良乳酸菌; 发酵性能

文章编号: 1673-9078(2015)11-107-112

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.11.018

## Fermentation Capacity of Superior Lactic Acid Bacteria Identified from Milk Cake and Acid Whey from Sani Area of Yunnan Province

YANG Yu-sen, PAN Hong-mei, YIN Jian-zhong, FU Qiang, FENG Yue-mei, WANG Song-mei, WU Zhi-shuang, WU Shao-xiong

(Department of Nutrition and Food Science, School of Public Health, Kunming Medical University, Kunming 650500, China)

**Abstract:** The lactic acid bacterial strains SDC4-1, MDC3-1, and WDC3-1 were isolated from milk cake and acid whey obtained from Sani area of Yunnan province. A superior strain was identified based on acid resistance and bile salt tolerance tests. The fermentation capability of the superior strain was studied in terms of acid production, post-acidification acetaldehyde production, protease activity, and  $\beta$ -galactosidase assay. All three strains were found to be acid tolerant; MDC3-1 showed the strongest acid resistance with a survival rate of 81%; WDC4-1 showed the weakest acid resistance, with survival rate of 52%. However, only SDC4-1 was tolerant to bile, and the survival rate was 81% after being in contact with 0.5% bile salt for 4 hours. Therefore, SDC4-1 was considered the superior strain. In the fermentation test that followed, SDC4-1 strain showed a perfect curd consistency and the fermented yoghurt was rich in flavors. Additionally, high viable count was noted during the storage period, reaching 9.79 lg CFU/g after a 15-day cold storage, which is far more than the national standard. SDC4-1 showed increased rate of acid production, where acidity reached 82.0 °T after 13 hours. Meanwhile, SDC4-1 exhibited good post-acidification, good acetaldehyde-producing ability, strong proteolytic activity, and high  $\beta$ -galactosidase production (up to 7.7  $\mu\text{g}/\text{mol}$ ), while maintaining stable yoghurt quality during cold storage. Therefore, the selected strain, SDC4-1, showing good fermentability, can be considered for use in the preparation of fermented food.

**Key words:** milk cake; acid whey; superior lactic acid bacteria; fermentability

收稿日期: 2014-11-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31260372)

作者简介: 杨玉森 (1987-), 男, 在读硕士, 研究方向: 食品营养与健康  
并列第一作者: 潘红梅 (1975-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 营养与食品卫生学; 殷建忠 (1970-), 男, 硕士, 教授, 研究方向: 营养与食品安全  
通讯作者: 吴少雄 (1965-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品营养与健康

乳酸菌广泛存在于人畜肠道, 其绝大部分是人体内必不可少的且具有重要生理功能的菌群, 对维护人体健康有重要作用<sup>[1]</sup>。研究表明, 乳制品中乳酸菌, 具有产酸、产香等优良生产性能和(或)耐酸、耐胆盐等益生特性<sup>[2-4]</sup>, 可影响机体营养状态、生理功能、药物效应、毒性反应、免疫应答、肿瘤发生、衰老应

激等<sup>[5-9]</sup>。乳酸菌要发挥其健康促进作用,需在肠道内达到一定数量,且能耐受机体酸碱物质和酶的作用,胃酸和胆汁酸对其影响较大,故耐酸和耐胆盐是筛选益生乳酸菌的主要技术指标。

食用发酵乳制品是人类获得益生乳酸菌的方式之一。发酵性能是乳酸菌作为发酵剂必须具备的,良好的风味是食品感官的重要组成部分,菌株决定发酵乳制品的风味,选择不同的菌株就会有不同的风味,乳酸菌的产酸和生香作用,使乳酸菌发酵乳制品具有独特的风味。乳饼是一种用山羊奶制作的风味独特、营养丰富的高蛋白、高脂肪的滋补营养食品,优质蛋白质达20%以上,与西方的奶酪有异曲同工之妙。云南撒尼羊山奶乳饼的制作和食用已有600多年的历史,经过长期的自然驯化,乳饼及酸乳清中富含的乳酸菌及其生物学特性得到了很好地保存。迄今为止,有关撒尼羊山奶乳饼中乳酸菌研究较少,立足于资源保护,应尽快发掘、收集、保存蕴藏在传统山羊奶乳饼及酸乳清中的丰富乳酸菌资源,本研究选取3株从云南撒尼地区乳饼和酸乳清中分离鉴定的特有乳酸菌株进行耐酸和耐胆盐实验筛选其中的优势菌,并研究其发酵性能,为保存开发传统山羊奶乳饼及酸乳清中的丰富乳酸菌资源提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株

选取MDC3-1(乳酸乳球菌乳亚种)、SDC4-1(植物乳杆菌)和WDC3-1(乳明串珠菌)3株本实验室从云南撒尼地区乳饼和酸乳清中分离鉴定的乳酸菌。

#### 1.1.2 培养基

MRS(De Man-Rogosa-Sharpe broth)培养基, LB(肉汤)培养基(Luria-Bertani broth medium)培养基, MRSA(De Man-Rogosa-Sharpe Agar)培养基, 脑心浸液(肉汤)培养基, 脱脂乳培养基。

#### 1.1.3 实验试剂

灭菌0.9%生理盐水, 浓盐酸, 牛胆盐, 氯化钡, 浓硫酸, 纯牛奶, 脱脂奶, 蛋白胨, 牛肉膏, 酵母提取物, 磷酸氢二钾, 柠檬酸二铵, 硫酸镁, 硫酸锰, 碳酸氢钠, 琼脂, 亚硫酸氢钠, 邻苯二胺, 碘, 乙酸钠, 碘化钾, 酚酞指示剂, 淀粉指示剂, 葡萄糖, 吐温80, 甲醛, 氢氧化钠等。(以上试剂均为分析纯)

#### 1.1.4 主要仪器

BHC-1000IIA/B3 单人单面生物安全柜, GRX-9123A 干热灭菌消毒箱, 高压灭菌锅, 恒温空气

浴摇床, GHP-9160 隔水式生物恒温培养箱, Sigma3-18K 4℃台式冷冻高速离心机, GENOVA 分光光度计, PH510 酸度计, SC-329GA 立式4℃低温冰箱, MDF-U32V 立式超低温冰箱, TR-1A 温控恒温水浴槽, GL-3250A 加热磁力搅拌器, 1-14 微量台式高速离心机, Vortex-Genie2 旋涡混合器, PR-2、PR-20、PR-100、PR-200、PR-1000 单道移液器, SI-234 电子天平, BOY-KS723 便携式微量pH酸度计, 50 L SX-500 全自动高压灭菌器。

## 1.2 方法

### 1.2.1 优良乳酸菌的筛选

#### 1.2.1.1 耐酸实验

取10 μL前期实验分离乳酸菌纯菌种接种于5 mL 灭菌MRS肉汤培养基中,置于(36±1)℃摇床培养24 h后取纯菌株24 h MRS培养液25 μL,分别接种于pH 2.0、pH 2.5、pH 3.0、pH 6.2四种MRS肉汤培养基中,混匀后用灭菌0.9% NS分别配制4种菌液的一系列10倍梯度稀释液。将接种了菌液的4种不同pH值的MRS肉汤培养基置于(36±1)℃摇床培养,计时1 h。取四个系列的三个适宜稀释度的稀释液各25 μL,涂布于MRSA培养基上,每个稀释度各涂两块,同时,在另一灭菌平板上滴加等量稀释用的NS做为空白对照。涂布均匀后,标记,倒置培养。计算菌株在pH 2.0 / pH 2.5 / pH 3.0 MRS肉汤培养基中培养0 h、1 h、2 h的存活率(菌落计数按照《食品卫生微生物学检验》中GB/T 4789.2-2003、GB/T 4789.35-2003、GB/T 4789.15-2003执行,存活率=实验组菌落数/空白组菌落数)。

#### 1.2.1.2 胆汁耐受实验

取10 μL前期实验分离乳酸菌纯菌种接种于5 mL 灭菌MRS肉汤培养基中,置于(36±1)℃摇床培养24 h。取纯菌株24 h MRS培养液25 μL,分别接种于猪胆盐质量分数依次为0、0.1%、0.3%、0.5%的四种MRS肉汤培养基中。混匀后用灭菌0.9% NS分别配制4种菌液的一系列10倍梯度稀释液。将接种了菌液的4种不同猪胆盐浓度的MRS肉汤培养基置于(36±1)℃摇床培养,计时2 h。取四个系列的三个适宜稀释度的稀释液各25 μL,涂布于MRSA培养基上,每个稀释度各涂两块,同时,在另一灭菌平板上滴加等量稀释用的NS做为空白对照。涂布均匀后,标记,倒置培养。计算菌株在添加0.1% / 0.3% / 0.5%猪胆盐的MRS肉汤培养基中培养0 h、2 h、4 h的存活率(菌落计数按照《食品卫生微生物学检验》中GB/T 4789.2-2003、GB/T 4789.35-2003、GB/T 4789.15-2003

执行, 存活率=实验组菌落数/空白组菌落数)。

## 1.2.2 发酵性能研究

### 1.2.2.1 活菌数测定

根据待检样品活菌数的估计, 选择 2~3 个连续的适宜稀释度, 每个稀释度吸取 0.1 mL 样品匀液分别置于 2 个 MRS 琼脂平板, 使用 L 形棒进行表面涂布。36 °C ± 1 °C, 厌氧菌培养 1~15 d 后计数平板上所有菌落数。从样品稀释到平板涂布要求在 15 min 内完成。

### 1.2.2.2 产酸能力的测定

将活化后的菌株按 2% 的接种量接种到灭菌鲜奶中, 37 °C 发酵 2 h 后, 每隔 1 h 测定 1 次, 滴定酸度, 以测定菌种的产酸能力。

酸度测定: 取 10 mL 乳样于三角瓶内, 加入 40 mL 去 CO<sub>2</sub> 水, 加 0.5 mL 0.5% 酚酞试剂, 将标定过的 0.1 mol/L NaOH 标准溶液滴定, 时时摇动, 直至出现粉红色 (1 分钟内不消失) 为止, 即达到滴定终点, 读出 NaOH 溶液消耗量。每消耗 0.1 mL NaOH 为 1 °T (道尔尼克度)。

### 1.2.2.3 后酸化能力的测定

将活化后的菌株按 2% 的接种量接种到牛奶后, 37 °C 发酵至凝乳后, 冷却, 4 °C 冷藏。测定酸奶在冷藏过程中第 1、3、5、7、10 d 后的滴定酸度, 通过酸奶在冷藏过程中滴定酸度的变化来判断菌种后酸化能力的强弱。

### 1.2.2.4 乙醛含量的测定

酸奶样品中的乙醛在酸性条件下<sup>[10-11]</sup>与亚硫酸氢钠发生加成反应生成, 其剩余的亚硫酸氢钠被碘氧化, 在碱性条件下乙醛亚硫酸氢钠与碘定量反应, 根据反应当量关系计算乙醛含量。精确量取 2.00 mL NaHSO<sub>3</sub> 溶液于 250 mL 锥形瓶中, 加入处理后乳样 10 mL 摇匀, 在室温放置 1 h 后, 加入 1 mL 1% 淀粉溶液, 用 0.1 M 碘液滴至接近终点 (接近终点时滴速要慢否则容易滴定过量, 下一步操作无法进行), 再用 0.01 M 碘液滴定至终点 (淡蓝紫色, 30 秒不退色为终点), 不计数。再加 20 mL 1M NaHCO<sub>3</sub>, 振荡混匀半分钟 (溶液蓝色退去), 再用 0.01 M 碘标准溶液滴定至溶液至终点, 记录消耗的标准碘液的体积, 同时做空白试验。

### 1.2.2.5 蛋白酶水解活力测定 (OPA 法)

将活化传代的乳酸菌供试菌株, 以 1% 的接种量接种于灭菌脱脂乳中, 在 37 °C 厌氧培养 24 h, 然后准确称取 5.0 g 样品于 30 mL 离心管中, 再加入 16% 的三氯乙酸 5 mL, 充分混匀, 于 4 °C 离心 (1000 r/min) 5 min, 吸取上清液 1 mL 加入 5 mL 的离心管, 再加入 3 mL OPA 试剂, 反复震荡混匀, 在室温下反应 2 min, 340 nm 处测定其吸光值, 用测得的值在标准曲

线<sup>[12]</sup>上即可查得对应的氨基酸微克数。测定时应采用空白管经常校零, 以消除系统误差。

### 1.2.2.6 β-半乳糖苷酶活性的测定

首先通过蓝白斑<sup>[13]</sup>实验, 对 3 株菌是否具有产 β-半乳糖苷酶进行确定, β-半乳糖苷酶存在于细胞内, 可乳糖分解为葡萄糖和半乳糖, 以防止乳糖不耐受, 本实验采用超声破壁法, 利用超声波对乳酸菌进行破壁, 邻硝基苯 β-D 一吡喃半乳糖 (ONPG) 为酶作用底物, 生成黄色产物 ONP, 通过比色法<sup>[14]</sup>测酶活。

酶活性计算公式:

$$U(GAL) = (A/0.777 \times 30) \times m$$

注: A 为反应生成的 ONP 吸光值, A=A (反应液)-A (底物)-A (酶提取液); 0.777 为 1 μmol 邻硝基苯的吸光值; m 为反应体系中的酶蛋白量, 单位为 mg。

### 1.2.2.7 感官评价

取适量试样于 50 mL 烧杯中, 在自然光下观察色泽和组织状态, 闻气味, 然后漱口, 品尝样品的滋味。最后计算各样品平均分 (具体参照 GB19302-2010)。

## 1.2.3 实验数据分析

采用 SPSS17.0 软件处理和分析实验数据, 取对数值, 结果表示为均值 ± 标准差。

## 2 结果与讨论

### 2.1 结果

#### 2.1.1 分离株的耐酸性

3 株菌株 (见表 1) 进行酸性耐受实验。

表 1 酸性环境对乳酸菌分离株 MDC3-1 生存的影响

Table 1 Effect of acidic environment on strain MDC3-1

培养基	平板菌落数/(lgCFU/g)			存活率/%		
	0 h	1 h	2 h	0 h	1 h	2 h
pH 6.2	6.41 ± 0.03	6.52 ± 0.16	6.67 ± 0.01	100	100	100
pH 2.0	6.43 ± 0.03	6.65 ± 0.01	6.88 ± 0.01	104	131	159
pH 2.5	6.44 ± 0.09	6.75 ± 0.02	6.96 ± 0.02	108	165	193
pH 3.0	6.47 ± 0.07	6.73 ± 0.02	6.09 ± 0.08	114	158	254

注: 数据结果为: 均值 ± 标准差 (n=3)。

表 2 酸性环境对乳酸菌分离株 SDC4-1 生存的影响

Table 2 Effect of acidic environment on strain SDC4-1

培养基	平板菌落数/(lgCFU/g)			存活率/%		
	0 h	1 h	2 h	0 h	1 h	2 h
pH 6.2	6.87 ± 0.02	6.83 ± 0.02	6.56 ± 0.02	100	100	100
pH 2.0	8.71 ± 0.09	8.62 ± 0.12	8.55 ± 0.16	71	57	50
pH 2.5	8.73 ± 0.23	8.76 ± 0.20	8.75 ± 0.20	79	84	82
pH 3.0	9.80 ± 0.08	9.86 ± 0.10	9.87 ± 0.15	86	101	107

注: 数据结果为: 均值 ± 标准差 (n=3)。



表3 酸性环境对乳酸菌分离株 WDC3-1 生存的影响

Table 3 Effect of acidic environment on strain WDC3-1

培养基 pH 值	平板菌落数/(lgCFU/g)			存活率/%		
	0 h	1 h	2 h	0 h	1 h	2 h
pH 6.2	7.3±0.03	8.3±0.03	8.9±0.02	100	100	100
pH 2.0	5.2±0.05	4.7±0.10	4.5±0.02	71	57	50
pH 2.5	5.8±0.07	5.1±0.09	4.6±0.04	79	61	52
pH 3.0	6.3±0.01	5.4±0.04	4.6±0.03	86	65	52

实验结果表明,选取的3株乳酸菌分离株在 pH 2.0、pH 2.5、pH 3.0 的酸性环境处理 0 h、1 h、2 h 均表现出不同程度的耐受能力,其中 MDC3-1 经处理后涂布培养的存活率最高,高达 254%,WDC4-1 经处理后涂布培养的存活率最低,为 52%,SDC4-1 经处理后涂布培养的存活率略有升高,为 107%;菌落数高于倪学勤等的研究<sup>[15]</sup>,人体胃内 pH 值约为 1.8~3.2,食物在胃部的停留时间一般为 1~2 h,因而三株乳酸菌都可在人体内存活。结果见表 1,表 2,表 3。

3 株耐酸性乳酸菌分离株中,活菌数最低的 WDC3-1 在 pH 2.0 处理 2 h 后仍能达到  $4.5 \times 10^6$  cfu/g,高于刘长建等<sup>[4]</sup>研究的酸耐受菌株植物乳杆菌 II 32 经 pH 2.0 处理 2 h 后的活菌数  $10^5$  cfu/g。对比后可以说明本实验选取的 3 株乳酸菌具有强的耐酸能力,能够保证一定数量的活菌体顺利通过胃酸环境到达肠内。正常人体小肠中胆汁盐含量在 0.03%~0.3% 范围内波动<sup>[16]</sup>。

### 2.1.2 分离株的胆汁耐受能力

3 株乳酸菌分离株进行胆汁耐受实验。

表 4 胆盐对乳酸菌分离株 SDC4-1 生存的影响

Table 4 Effect of bile salt on strain SDC4-1

培养基胆盐浓度/%	平板菌落数/(lgCFU/g)			存活率/%		
	0 h	2 h	4 h	0 h	2 h	4 h
0	6.44±0.12	6.68±0.07	6.97±0.11	100	100	100
0.1	6.41±0.18	6.63±0.16	6.91±0.10	97	90	85
0.3	6.41±0.10	6.59±0.23	6.91±0.04	93	87	84
0.5	6.38±0.18	6.59±0.17	6.89±0.06	90	83	81

注:数据结果为:均值±标准差(n=3)。

MDC3-1, WDC3-1 经处理涂布培养后发现无菌株存活,不能耐受胆盐。SDC4-1 可在胆盐浓度分别为 0.1%、0.3%、0.5% 的碱性环境中存活,处理 0 h、2 h、4 h 表现出不同程度的耐受能力,其处理后涂布培养存活率为 81%;处理 4 h 后活菌数仍可达  $10^6$  cfu/g,正常人体小肠中胆汁盐含量在 0.03%~0.3% 范围内波动,由此可知,植物乳杆菌 SDC4-1 具有很强的抗胆汁盐能力,到达小肠部位时能够存活并生长。

综上可知,菌株 SDC4-1 即耐酸又耐胆盐是优势

菌,其有望开发应用于食品加工、医疗保健和微生态制药等领域。

### 2.1.3 活菌计数结果

表 5 冷藏 MRSA 乳酸菌数动态监测 (lgCFU/g)

Table 5 Colony count of lactic acid bacteria on MRSA

菌株	1 d	5 d	10 d	15 d
SDC4-1	12.86±0.03	12.89±0.05	11.58±0.19	9.79±0.05

注:数据结果为:均值±标准差(n=3)

将在 5 °C 连续储存 15 d 的酸奶分别在 1 d、5 d、10 d 和 15 d 检测活菌数(见表 5)。从冷藏 1~15 d,菌株 SDC4-1 活菌数随时间延长而下降,活菌数高峰出现在 1~5 d,之后由于酸度增加,以及冷藏条件和基质成分变化,不利于乳酸菌生长,活菌数开始下降,与敖晓琳的研究相当<sup>[10]</sup>。GB19302-2010 对酸牛乳中乳酸菌的数量要求是不低于 6 lgCFU/g,SDC4-1 发酵奶冷藏 15 d 后活菌数达到了 9.79 lgCFU/g,远超国家标准。活菌数是体现活性乳酸菌制品具有保健性重要指标之一,产品中具有高的活菌数才能确保最终有较多的乳酸菌进入人体发挥其功能。

### 2.1.4 产酸能力测定结果

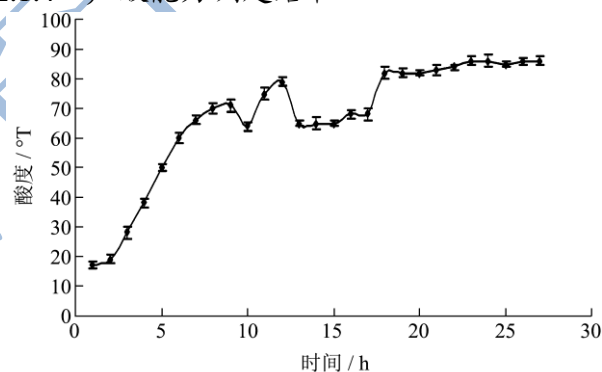


图 1 SDC4-1 发酵乳中酸度值动态监测

Fig.1 Dynamic monitoring of acidity value of SDC4-1 in fermented milk

由 SDC4-1 菌株发酵乳中酸度值动态监测图 1 可知:SDC4-1 在发酵 2~13 h 间产酸量线性增加,到 13 h 时,酸度已达 82.0 °T;14~17 h 间酸度稍微降低,可能与菌株生长规律有关;18 h 以后的酸度变化不大,最终酸度为 86 °T,已达到生产上所需酸度 75~90 °T 范围内。SDC4-1 产酸能力较强,但是所需时间较长,超过 7 h 达到生产酸度值范围,这与它的凝乳时间基本相符,是该菌株所特有的。酸度是影响酸奶加工周期的长短、生产效率的高低和风味优劣的一个重要的质量指标,产酸能力是酸奶生产用菌种筛选的重要考量指标,一般以产酸能力中等,同时前产酸力较强,后产酸较弱为优良菌种筛选标准。

### 2.1.5 后酸化能力测定

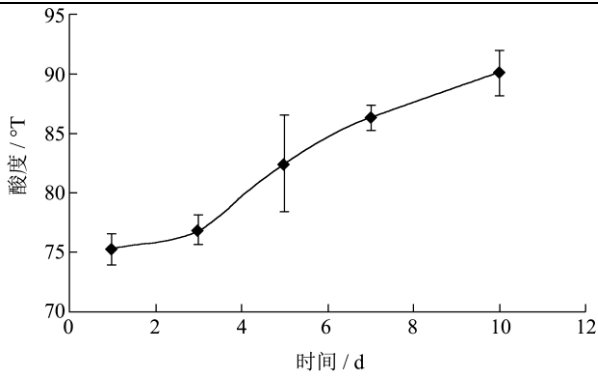


图2 后酸化能力 (°T)

Fig.2 Post-acidification capacity

由图2可知: 经过24 h的冷藏后, SDC4-1的后酸化能力一直都处于上升趋势, 变化幅度在2~4 °T, 在冷藏过程中酸度变化幅度不大, 后酸化能力比较稳定, 第10 d的酸度达到90.0 °T。SDC4-1菌株在发酵过程中产酸能力强, 酸度高, 且具有较稳定的后酸化能力, 适合作为酸奶发酵剂。酸奶后酸化程度对酸奶产品的保质期以及口感影响很大, 后产酸较弱为优良菌种筛选标准之一。

### 2.1.6 乙醛含量的测定结果

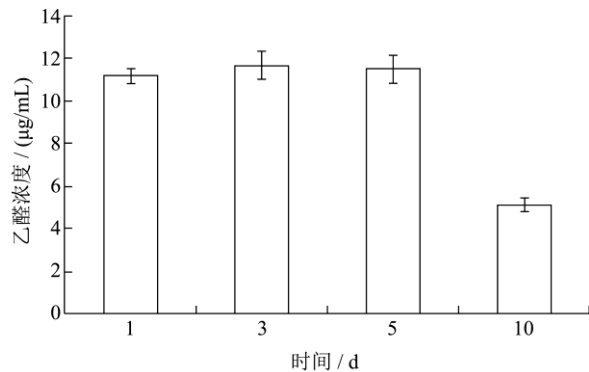


图3 乙醛含量的测定

Fig.3 Acetaldehyde content

SDC4-1 乳酸菌发酵乳中的乙醛含量测定如图3, 在发酵(4 °C冷藏)1、3、5、10 d后测定菌株 SDC4-1 产乙醛量分别达到了11.2 µg/mL、11.7 µg/mL、11.5 µg/mL、5.1 µg/mL; 虽然在第10 d有所降低, 可能是同该菌株的生长特性有关, 但乙醛产量还是很高, 在优质酸奶乳酸菌产乙醛范围内(发酵24 h后达10~15 µg/mL)<sup>[18]</sup>。乙醛是酸奶中的芳香物质主要成分之一, 优质的酸奶必须具有良好的滋气味和芳香味; 因此, 选择能产生良好滋气味和芳香味的乳酸菌是很重要的一项标准。

### 2.1.7 菌株的蛋白水解活力测定

本研究采用 OPA 法(标准曲线  $y = 0.0126x - 0.0127, R^2 = 0.998$ )测定 SDC4-1 菌株发酵脱脂乳中游离氨基酸(酪氨酸)的含量。从图4中

看出, 在发酵期的前10 h, 菌株产生的游离氨基酸量低, 但发酵10 h后随着发酵时间的延长吸收利用底物的速度加快, 蛋白水解活性逐步上升, 游离酪氨酸达到42.55 µg/mL后就较为稳定。乳制品中蛋白质水解后产生的各种氨基酸和肽是重要的风味成分, 也是许多风味物质的前体物质; 肽和氨基酸的释放影响产品的物理结构, 发酵乳制品中的乳蛋白较高分解可以增加乳类的营养价值; 因此, 使用乳酸菌做为发酵剂发酵乳制品时, 其产蛋白水解酶活高低成为了一个很重要的指标。

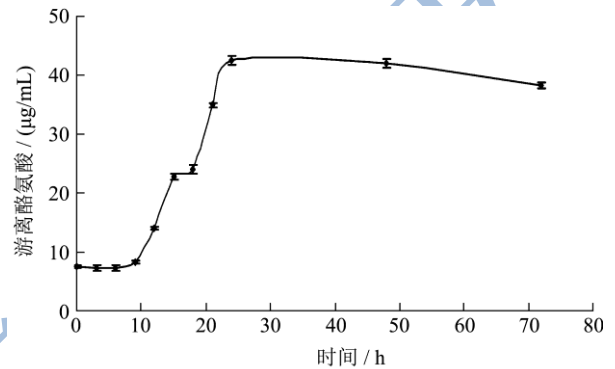


图4 蛋白水解活力测定

Fig.4 Determination of proteolytic activity

### 2.1.8 β-半乳糖苷酶活力的测定

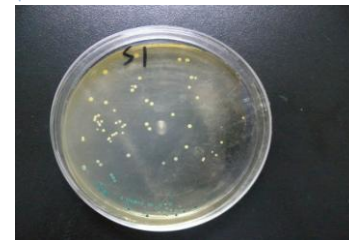


图5 蓝白斑筛选实验

Fig.5 Blue-white screening test

注: 菌株为SDC4-1 (S1)。

将20 µg/mL浓度的X-gal溶液(X-gal需溶于DMF中配成), 用微量移液器吸取后均匀涂于MRSA培养基生长的菌落上, 置于室温观察。1 h后涂有X-gal溶液的菌落表面白色变为浅蓝色, 24 h转为深蓝色, 而同一平板上没有涂X-gal溶液的菌落表面依然为白色。由图5可知: SDC4-1有蓝白斑现象, 因而该株乳酸菌可产生β-半乳糖苷酶。测得SDC4-1产β-半乳糖苷酶量为7.7 µg/mol, 乳酸菌内普遍存在着β-半乳糖苷酶活性, 能水解乳类中的乳糖生成半乳糖和葡萄糖, 再将葡萄糖代谢为乳酸、乙酸等, 以利于乳类的消化吸收。利用具有β-半乳糖苷酶活性的乳酸菌作为发酵剂, 不仅可以降低乳糖含量, 缓解乳糖不耐症, 而且可以生成低聚乳糖, 使发酵乳的品质进一步高值化。

## 2.1.9 感官评价

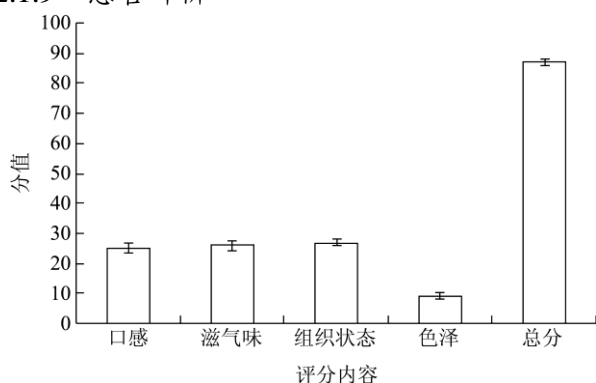


图6 感官评价结果

Fig.6 Sensory evaluation

SDC4-1 乳酸菌发酵乳的感官评价得到分数见图6, 总分达到 87。参照 GB19302-2010, SDC4-1 综合口感、滋气味和色泽等方面, 较适宜于用作发酵奶菌株。

## 3 结论

优良菌株筛选中, 3 株乳酸菌都具有耐酸能力, 能够保证一定数量的活菌体顺利通过胃酸环境到达肠内, 但仅有植物乳杆菌 SDC4-1 具有很强的抗胆汁盐能力, 菌体到达小肠部位能够存活并生长, 因而 SDC4-1 是优良乳酸菌; 在优良乳酸菌 SDC4-1 发酵性能实验中, SDC4-1 菌株具有很好的凝乳状态, 发酵酸奶口感风味浓郁, 在贮藏过程中活菌数含量高, 产酸较快, 后酸化性好, 产乙醛能力较好, 产  $\beta$ -半乳糖苷酶的量高, 能保证酸奶在冷藏过程中品质稳定, 因而筛选出具有优良发酵特性的菌株 SDC4-1 可以为发酵食品提供更广泛的素材。

## 参考文献

- [1] Coman Mm, Cecchini C, Verdenelli Mc, et al. Functional foods as carriers for *SYNBIO*, a probiotic bacteria combination [J]. *Int. J. Food Microbiol.*, 2012, 16, 157(3): 346-52
- [2] 邵亚东,孟和毕力格.传统发酵乳制品中乳酸菌产双乙酰特性的研究[D].内蒙古:内蒙古农业大学,2007  
SHAO Ya-dong, MENHE Bilige. Studies on produced diacetyl by lactic acid bacteria in traditional fermented dairy product [D]. Inner Mongolia: Inner Mongolia Agricultural University, 2007
- [3] 邢慧敏,张和平.少数民族自然发酵乳制品中乙醛高产乳酸菌的筛选及发酵条件的优化[D].内蒙古:内蒙古农业大学,2007  
XING Hui-min, ZHANG He-ping. The screening of lab

strains isolated from minority natural fermented dairy products with high- acetaldehyde producing and optimizing their fermentation conditions [D]. Inner Mongolia: Inner Mongolia Agricultural University, 2007

- [4] 刘长建,刘秋,姜波.类植物乳杆菌的耐酸、耐胆盐及降胆固醇特性[J].微生物学报,2009,49(9):1176-1179  
LIU Chang-jian, LIU Qiu, JIANG Bo. Acid and bile tolerance and cholesterol reduction ability lactobacillus paraplantarum. [J]. *Journal of Microbiology*, 2009, 49(9): 1176-1179
- [5] Wang H, Guo B, Wu Z, et al. Screening of a lactobacillus casei with monoamine oxidase-inhibitory activity [J]. *Wei Sheng Wu Xue Bao*, 2010, 50(2): 197-203
- [6] Cukrowska B, Motyl I, Kozáková H, et al. Probiotic lactobacillus strains: *in vitro* and *in vivo* studies [J]. *Folia Microbiol (Praha)*, 2009, 54(6): 533-7
- [7] Cai S, Bay BH, Lee YK, et al. Live and lyophilized lactobacillus species elicit differential immunomodulatory effects on immune cells [J]. *FEMS Microbiol Lett.*, 2010, 302(2): 189-96
- [8] Salva S, Villena J, Alvarez S. Immunomodulatory activity of lactobacillus rhamnosus strains isolated from goat milk: impact on intestinal and respiratory infections [J]. *Int. J. Food Microbiology*, 2010, 3: 18-24
- [9] Enck P, Zimmermann K, Rusch K, et al. The effects of ageing on the colonic bacterial microflora in adults [J]. *Z Gastroenterol*, 2009, 47(7): 653-8
- [10] 敖晓琳,张小平,李诚,等.川西高原牧区自然发酵酸乳中优良乳酸菌性能测定及应用[J].乳业科学与技术, 2005, 27(2): 56-60  
AO Xiao-lin, ZHANG Xiao-ping, LI Cheng, et al. Determining and applying of super lab strains from natural fermented milk in western sichuan plateau [J]. *Dairy Science and Technology*, 2005, 27(2): 56-60
- [11] 王志锋,周玉霞.内蒙古传统乳制品中乳酸菌益生作用的研究[D].内蒙古:内蒙古农业大学,2006  
WANG Zhi-feng, ZHOU Yu-xia. Study on probiotic effects of the lactic acid bacteria from traditional dairy products in inner Mongolia [D]. Inner Mongolia: Inner Mongolia Agricultural University, 2006
- [12] Rhee S J, Lee J E, Lee C H. Importance of lactic acid bacteria in asian fermented foods [J]. *Microb Cell Fact.* 2011, 30(10): Suppl 1: S5
- [13] 魏小雁,冀林立,刘建军,等.酸奶发酵剂菌种的产香物质及发酵特性研究[J].乳业科学与技术,2008,1:21-23

- WEI Xiao-yan, JI Lin-li, LIU Jian-jun, et al. Study on flavor and fermentation characteristics of lactic acid bacteria on the preparing of yoghurt starter [J]. Dairy Science and Technology, 2008, 1: 21-23
- [14] 陆文伟,孔文涛,孔健,等.发酵乳杆菌  $\beta$ -半乳糖苷酶转糖基活性研究[J].山东大学学报:理学版,2008,43(7):83-87
- LU Wen-wei, KONG Wen-tao, KONG Jian, et al. Transgalactosylation activity of beta-galactosidase produced by lactobacillus fermentum k4 [J]. Journal of Shandong University: Natural Science Edition, 2008, 43(7): 83-87
- [15] 倪学勤,曾东,彭媛,等.麦类提取物对 4 株乳酸杆菌耐酸能力的影响[J].浙江大学学报:农业与生命科学版, 2009, 35(3):2555-260
- NI Xue-qin, ZENG Jian, PENG Yuan, et al. Effect of malt, wheat and wheat bran extracts on viability of probiotic lactobacilli under acidic conditions [J]. Journal of Zhengjiang University(Agric and Life Sci.), 2009, 35(3): 2555-260
- [16] Janina Ku Hu, Therese Considine, Harjinder Singh. Interactions of milk proteins and volatile flavour compounds: implications in the development of the protein foods [J]. Journal of Dairy Science. 2006, 71(5): 72-82
- [17] 周先汉,李皖光,许贵强.蜂蜜-乳酸发酵过程中相关酶活力的研究[J].食品科学,2007,28(012):323-327
- ZHOU Xian-han, LI Wan-guang, XU Gui-qiang. Study on activity of enzymes effecting on honey fermentation [J]. Food Science, 2007, 28(12): 323-327
- [18] 甘伯中,杜宁娟,李帆,等.甘南牧区酸奶中乳酸菌的分离与发酵性能研究[J].食品科学,2009,3:204-208
- GAN Bo-zhong, DU Ning-juan, LI Fan, et al. Isolation of lactobacilli from self-made yoghurt by herdsmen in gannan pasturing area and study on their fermentation performances [J]. Food Science, 2009, 3: 204-208