

冷藏原料乳中微生物及品质的动态变化规律

邱月¹, 程婧祺¹, 何梦丽¹, 关宁², 赵颖¹, 杨鑫焱¹, 满朝新¹, 姜毓君^{1*}

(1. 东北农业大学食品学院, 黑龙江哈尔滨 150030) (2. 国家乳业技术创新中心, 内蒙古呼和浩特 010000)

摘要: 该研究采用了三代 16S rDNA 高通量测序技术监测了低温贮藏期间 (4 °C, 8 d) 的原料乳微生物动态群落结构和丰度, 结合数据库分析原料乳中微生物功能基因代谢途径。结果表明, 原料乳在低温贮藏过程中, 嗜冷菌逐渐成为优势菌, 它们的主要代谢途径碳水化合物代谢、脂质代谢和氨基酸代谢等与原料乳的品质变化密切相关, 氨基酸的合成和代谢以及脂肪转运代谢丰度提高最终导致乳品风味、质地、组织趋于劣变状态。冷藏过程中以嗜冷菌为主的优势微生物大量繁殖并产生的耐热酶, 水解原料乳中的蛋白质和脂肪, 引起牛奶品质劣变。

关键词: 原料乳; 冷藏; 微生物; 品质变化

文章编号: 1673-9078(2024)10-181-190

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.10.1050

Dynamic Changes of Microorganisms and Quality in Refrigerated Raw Milk

QIU Yue¹, CHENG Jingqi¹, HE Mengli¹, GUAN Ning², ZHAO Ying¹, YANG Xinyan¹, MAN Chaoxin¹,
JIANG Yujun^{1*}

(1. College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030 China)

(2. National Center of Technology Innovation for Dairy, Hohhot 010000, China)

Abstract: In this study, the dynamic community structure and abundance of microorganisms in raw milk during low-temperature storage (4 °C, 8 days) were monitored by third-generation 16S rDNA high-throughput sequencing technology, and the metabolic pathways of microbial functional genes in raw milk were analyzed in combination with the database. The results showed that during the low-temperature storage of raw milk, psychrophilic bacteria gradually became dominant bacteria, and their main metabolic pathways, such as carbohydrate metabolism, lipid metabolism and amino acid metabolism, were closely related to the quality changes of raw milk. The increases in the synthesis and metabolism of amino acids and fat transport metabolism eventually led to the deterioration of the flavor, texture and organization of dairy products. During the refrigeration process, the dominant microorganisms dominated by psychrophilic bacteria multiplied in large numbers and produce heat-resistant enzymes, which hydrolyze the protein and fat in the raw milk, causing the deterioration of milk quality.

Key words: raw milk; cold storage; microorganisms; change of quality

引文格式:

邱月,程婧祺,何梦丽,等.冷藏原料乳中微生物及品质的动态变化规律[J].现代食品科技,2024,40(10):181-190.

QIU Yue, CHENG Jingqi, HE Mengli, et al. Dynamic changes of microorganisms and quality in refrigerated raw milk [J].

Modern Food Science and Technology, 2024, 40(10): 181-190.

收稿日期: 2023-09-04

基金项目: 国家乳业技术创新中心支持项目 (2021- 国家乳创中心 -11)

作者简介: 邱月 (2000-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学, E-mail: 2388965110@qq.com。

通讯作者: 姜毓君 (1971-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 乳品科学, E-mail: yujun_jiang@163.com

乳制品作为一种富含蛋白质、脂肪、矿物质等的食物,已成为中国膳食结构中主要的食物,原料乳是其质量保障的关键因素。原料乳作为液态乳生产的原料是其品质保障的基础,其营养丰富特点可至其中的腐败微生物随着储藏时间的延长而大量繁殖。原料乳 pH 值呈中性,营养丰富,是微生物良好的生长培养基。奶牛乳房中的乳汁被认为是无菌状态,在挤入贮奶罐,经过冷链运输直到乳制品加工厂之前存在被多种微生物污染的可能性,一些耐热或可以产生耐热水解酶的微生物可能会导致终产品出现酸苦味、脂肪上浮、胀包等品质问题。原料乳中的微生物结构将影响终产品的质量安全,原料乳中腐败微生物主要包括嗜冷菌和耐热菌^[1,2],其中嗜冷菌可以在原料乳低温储藏过程中大量繁殖,其产生的耐热酶在热处理后仍会分解乳制品中的蛋白质、脂肪等营养物质,导致牛奶腐败。耐热菌主要是通过产生耐热芽孢在高温处理条件下存活,待条件适宜后继续破坏乳品质。目前已知的嗜冷菌主要包括假单胞菌、不动杆菌以及乳球菌等^[3],地衣芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、短小芽孢杆菌等耐热菌是原料乳中的优势菌种^[4,5]。

已有研究报道,针对原料乳中微生物多样性分析时,多采用二代微生物测序技术,主要聚焦于群落整体多样性变化^[6],而 16S 三代微生物测序技术不仅能够提供更全面且细致的菌株级别分析结果,也能够探索属内物种的协作或竞争关系。屠大伟等^[7]运用 16S rRNA 基因的高通量测序技术对来自 4 个牧场液态奶的细菌群落结构进行研究,得出的结果为牧场间微生物丰度差异较为明显并成功检出芽孢杆菌属、不动杆菌属等嗜冷菌。韩闯等^[8]利用高通量测序技术对婴儿配方奶粉加工过程中微生物多样性进行研究,可以得出经过杀菌过程微生物多样性减少,并且可以根据加工过程中各取样点对为微生物总数进行排序。本研究采用了 PacBio 测序平台上的第三代微生物多样性技术。该技术利用单分子实时测序 (Single Molecule Real-Time Sequencing, SMRT) 方法对 marker 基因进行测序,然后对循环共识序列 (Circular Consensus Sequencing, CCS) 序列进行过滤、聚类或去噪处理,并进行物种注释和丰度分析,以揭示样品的物种组成。在此基础上,进一步进行了 α 多样性分析、 β 多样性分析、显著物种差异分析、相关性分析和功能预测分析等,以

挖掘样品之间的差异和相关性。通过这些分析,我们可以更详细地了解样品微生物组成的多样性及其在不同样品之间的差异。

本研究基于三代 16S rDNA 技术对采集的原料乳在储藏期 2、4、6、8 d 进行微生物多样性分析,并对其理化性质变化以及感官品质变化进行研究,由此以期得出微生物冷藏过程中丰度以及代谢途径的变化与原料乳理化性质变化之间的关系,为原料乳的储藏及后续加工处理提供一定的科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

MPC 琼脂培养基,青岛海博生物;PCA 琼脂培养基,青岛海博生物;二硫苏糖醇 (Dithiothreitol, DTT),上海阿拉丁生物科技股份有限公司;蛋白胨盐,青岛海博生物;PBS 缓冲液,生物风公司;四硼酸二钠,美国 Sigma 公司;三氯乙酸 (Trichloroacetic Acid, TCA),上海阿拉丁生物科技股份有限公司;乙二胺四乙酸 (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid, EDTA),Solarbio 公司;丝氨酸, Solarbio 公司;1 mol/L Tris-HCl (pH 值 8.0), Solarbio 公司;Chelex-100,美国 Sigma 公司;NP-40,北京博奥拓达科技有限公司;十二烷基硫酸钠 (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS),美国 Sigma 公司;Qubit™ds DNA HS Assay Kit,赛默飞世尔科技公司

1.2 仪器与设备

精密电子天平 (0.000 1 g),梅特勒-托利多国际贸易有限公司;生物超净工作台,上海力新仪器有限公司;高压蒸汽灭菌锅,上海博迅实业有限公司医疗设备厂;电子舌,日本 INSENT 公司;电子鼻,日本 INSENT 公司;涡旋振荡器,Mo-Bio 公司;ZQPW-70 型恒温培养摇床,天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司;电热恒温水浴锅,天津市泰斯特仪器有限公司;恒温金属浴,天津市泰斯特仪器有限公司;PCR 扩增仪,美国 Applied Biosystems 公司;CM-700d 分光测色仪,日本柯尼卡美能达;粒度及电位分析仪,英国马尔文仪器有限公司;酶标仪, Molecular Devices 公司;电热恒温培养箱,天津泰林仪器有限公司;高速冷冻离心机, Sigma 公司;Pac Bio RS II 测序仪, PacBio Biosciences 公司。

1.3 方法

1.3.1 样品采集及微生物培养

1.3.1.1 样品采集

原料乳常乳样品来自于华北地区某一牧场,采集时间为2022年11月份,奶牛品类为荷斯坦牛,胎龄及牛头数为1胎(175)、2胎(83)、3胎(67)、4胎(20)、5胎(19)6胎(3)8胎(1)。

采样时采取无菌操作,样品采集后立即至于4℃条件下运送至实验室。到达实验室后立即在超净工作台中无菌分装至50 mL 无菌离心管中并继续4℃下冷藏。

1.3.1.2 微生物培养

对原料乳进行嗜冷菌计数、嗜温耐热菌计数和嗜热耐热菌计数,细菌计数冷藏时间点为0、2、4、6和8 d。

(1) 嗜冷菌

嗜冷菌计数及菌株浓度计算按照 NY/T 1331-2007《乳与乳制品中嗜冷菌、需氧芽孢及嗜热需氧芽孢数的测定》^[9]进行测定。

(2) 嗜温耐热菌和嗜热耐热菌

将9 mL 质量分数为0.1% 无菌蛋白胨盐溶液置于15 mL 无菌离心管中,加入1 mL 在65℃下加热30 min 的原料乳样品,使用涡旋振荡器混合均匀后,将样品梯度稀释至 10^{-3} 。在不同梯度的样品中分别取100 μ L,在提前制备的PCA_A 平板计数培养基上进行均匀涂布,将培养基倒置培养。培养环境为需氧条件,嗜温耐热菌培养温度为37℃;嗜热耐热菌培养温度为55℃。每个梯度的样品分别设置三个平行。在恒温培养箱中培养48 h后,选取菌落数为30~300的平板对嗜温耐热菌进行计数并进行菌株浓度的计算。

1.3.2 基因组DNA提取

采用一步水浴法进行菌液DNA的提取,具体如下:将1 mL LB 菌悬液在12 000 r/min,4℃下离心2 min,去除上清液,向沉淀中加入300 μ L DNA 提取液,涡旋混匀,在56℃下水浴30 min,随后100℃金属浴10 min。将菌液和DNA 提取液在12 000 r/min,4℃下离心2 min,取上清液为DNA,保存在-20℃以便后续分析。

1.3.3 高通量测序

使用 Qubit™ dsDNA HS Assay Kit 对基因组DNA 定量以确定PCR 扩增体系中模板DNA 含量,使用细菌通

用引物 27-F : 5'-AGRGTTYGATYMTGGCTCAG-3' ; 1492-R : 5'-TASGGHTACCTTGTTASGACTT-3' 进行PCR 反应以扩增16S rDNA 基因的全长。扩增产物经过琼脂糖凝胶电泳检测后使用核酸纯化试剂盒对DNA 进行纯化回收,PacBio Sequel II 测序平台用于完成高通量测序。

1.3.4 原料乳理化性质变化

1.3.4.1 蛋白质水解度

采用邻苯二甲醛法即 OPA 试剂法^[10]。

1.3.4.2 pH值测定

pH 的测定方法参照 GB 5009.237-2016《食品安全国家标准食品 pH 值的测定》^[11]的酚酞指示剂法。

1.3.4.3 Zeta-电位

使用马尔文纳米粒度及电位分析仪测定原料乳 Zeta 电位。

1.3.4.4 粒径

采用马尔文纳米粒度及电位分析仪检测原料乳的粒径大小。

1.3.5 低温贮藏过程中微生物对原料乳感官品质的影响

1.3.5.1 色泽

使用 KONICA MINOLTAS 分光测色仪测量乳样 CIE 参数 L^* 、 a^* 、 b^* , 根据得到的 L^* 、 a^* 、 b^* 值计算 ΔE 。

原料乳储藏期间颜色的变化用色差 ΔE_{ab} 表示, ΔE_{ab} 计算公式如下:

$$\Delta E_{ab} = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (1)$$

式中:

ΔL^* — L^* 的测量值与初始测量值的差值;

Δa^* — a^* 的测量值与初始测量值的差值;

Δb^* — b^* 的测量值与初始测量值的差值。

1.3.5.2 滋味

量取35 mL 样品于取样杯中,封口膜密封,室温平衡30 min 后对样品进行检测。每个样品测定4次,选取稳定的后3次数据结果进行分析。

1.3.5.3 气味

量取30 mL 样品于烧杯中,室温平衡30 min 后,吸取15 mL 于顶空进样瓶中进行电子鼻检测。

1.4 数据处理与统计学分析

所有试验均平行测定3次,数据以平均值士标准差(Mean \pm SD)表示。采用 SPSS 程序对数据进行差异显著性分析, $P < 0.05$ 为差异显著, $P > 0.05$

为差异不显著。采用 Origin Pro 2019 软件作图。

使用 Usearch 软件对 OTU 分类序列进行物种丰度计算, 获得 OTU 分类序列矩阵并绘制群落结构分布柱状图。以 SILVA 为参考数据库使用朴素贝叶斯分类器结合比对的方法对特征序列进行分类学注释, 可得到每个特征对应的物种分类信息, 进而在各水平 (Phylum, Class, Order, Family, Genus, Species) 统计各样品群落组成, 利用 QIIME 软件生成不同分类水平上的物种丰度表, 再利用 R 语言工具绘制成样品各分类学水平下的群落结构图。

2 结果与分析

2.1 原料乳低温储藏过程中微生物水平

随着冷藏时间的增加, 原料乳中主要可培养微生物的变化见表 1, 结果显示: 原料乳冷藏 8 d 内, 嗜冷菌数显著变化 ($P < 0.05$), 呈上升趋势。嗜温耐热菌数显著变化 ($P < 0.05$), 在第 2 天到第 4 天呈上升趋势, 在第 4 天后, 由于嗜冷菌在低温贮藏环境下逐渐增加并成为优势菌种, 导致嗜温耐热菌数呈下降趋势。冷藏天数为 0 时, 原料乳中存在嗜热耐热菌, 浓度为 $3.80 \lg \text{CFU/mL}$, 但在冷藏贮存过程中, 嗜热耐热菌不能检出, 由此可知低温贮藏对此类菌种有很好的抑制作用。牛奶中低丰度的菌, 无法与快速生长的优势菌竞争导致嗜热耐热菌不生长, 因此无法检出^[12]。同时, 单因素方差分析显示嗜冷菌数在冷藏 4 d 与 6 d 无显著性差异。

表 1 原料乳 4 °C 冷藏下细菌计数结果

冷藏天数	细菌计数/(lg CFU/mL)		
	嗜冷菌数	嗜温耐热菌数	嗜热耐热菌数
0-A1	3.90 ± 0.01^d	—	3.80 ± 0.48
2-A2	4.83 ± 0.12^e	3.59 ± 0.08^b	—
4-A3	5.35 ± 0.19^b	3.76 ± 0.03^a	—
6-A4	5.44 ± 0.03^b	3.33 ± 0.01^c	—
8-A5	5.90 ± 0.06^a	3.21 ± 0.02^d	—

注: 同一列中不同字母表示存在显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.2 高通量多样性测序信息和 OUT 聚类

经 16S 三代测序数据处理后, 共得到 37 089 条高质量测序序列, 样品平均序列长度 1 448.8 bp, OTU 微生物物种分类结果显示, 原料乳中微生物共分为 8 门、9 纲、19 目、33 科、52 属。

韦恩图是一种可视化方法, 通过将特征代表的物种进行比较, 突出显示不同环境中微生物的共有性, 并直观地展示样品之间特征重合的情况。参考图 1, 韦恩图可以帮助我们更清晰地了解不同环境样品中微生物的交集和差异。韦恩图结果表明五个样品共检测出 OTUs 数目为 73, 其中五个样品共有 OTUs 数目为 9, 特有 OTUs 数目分别为 3、5、20、5、0, 说明储藏期第 4 天的微生物群落丰富度高于其他几天, 且微生物群落丰富度随着储藏期时间不同发生变化。

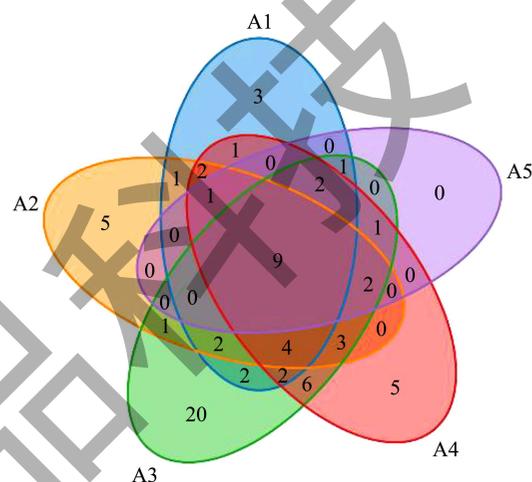


图 1 原料乳中微生物特征 Venn 图

Fig.1 Microbiological characterisation of raw milk Venn diagram

2.3 原料乳样品微生物分类注释

可以根据不同的分类层次 (如域、门、纲、目、科、属和种) 对原料乳微生物群落进行分组, 并绘制属水平和种水平上的条形图, 展示它们的相对丰度分布。在绘制图表时, 对于相对丰度小于 1% 的细菌群落, 可以将其归类为 "Others" 类别, 以简化图表并突出其他更丰富的微生物群落。在图 2 中可以看出, 属水平上, 原料乳中的主要菌属为水栖菌属 (*Enhydrobacter*)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、乳球菌属 (*Lactococcus*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 等。随着储存期时间延长, 不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 的丰富度增加, 乳球菌属 (*Lactococcus*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、水栖菌属 (*Enhydrobacter*) 的丰富度降低。在储藏期第 8 天, 不动杆菌属和假单胞菌属的数量分别占整体菌属数量的 69.16% 和 9.25%, 是原料乳中的两种优势菌属。在低温 (4 °C) 冷藏条件下, 观察到原料乳中嗜冷

菌的生长和繁殖速度较快，并逐渐成为主导菌群^[1]。特别是假单胞菌属和不动杆菌属细菌具备引起腐败的潜力。为了有效控制原料乳中嗜冷菌的增长，建议缩短从乳液挤出到灭菌的整体时间，以减少嗜冷菌繁殖的机会^[13]。这样的措施有助于确保原料乳的品质和延长其货架寿命。

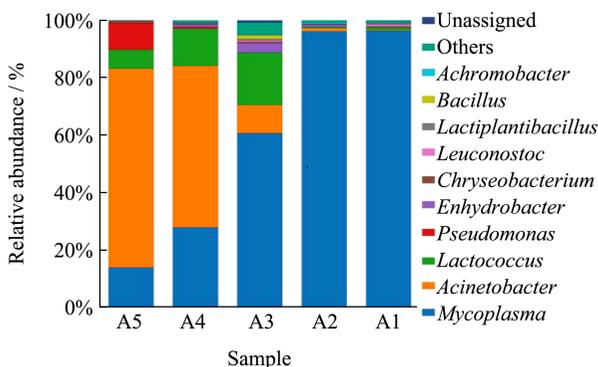


图2 原料乳中微生物物种分布图

Fig.2 Distribution of microorganisms in raw milk

2.4 Alpha多样性分析

使用 QIIME2 2020.6 软件对样品 Alpha 多样性进行分析，结果如表 2 所示。Alpha 多样性反映的是单个样品物种丰富度及物种多样性。Chao1 和 Ace 指数衡量物种丰富度即物种数量的多少，据表 2 可知，微生物数量在储藏 48 h 后降低，随后随时间变化呈现先升高后降低的变化趋势，这可能是由于嗜温耐热菌与嗜热耐热菌的丰富度在原料乳冷藏 48 h 后呈现大幅降低，冷藏 72 h 后，原料乳中嗜冷菌大量繁殖使物种多样性增加^[14]。Shannon 和 Simpson 指数用于衡量物种多样性，指数值越大，说明样品的物种多样性越高，原料乳在冷藏 48 h 后微生物物种多样性升高，说明前 48 h 是微生物快速生长的时间段。储藏时间超过 48 h 后，Shannon 和 Simpson 指数变化趋势与 Chao1 和 Ace 指数相同。因此，原料乳在牧场采集之后应尽快加工，避免存放时间过长引起腐败微生物生长。

表 2 Alpha多样性指数统计

Table 2 Alpha diversity index statistics

Sample ID	Feature	ACE	Chao 1	Simpson	Shannon
A1	30	40.33	41.00	0.07	0.36
A2	30	37.94	37.20	0.08	0.37
A3	55	61.23	59.00	0.59	2.10
A4	38	82.06	55.50	0.59	1.64
A5	16	26.64	37.00	0.49	1.43

2.5 Beta多样性分析

研究使用 R 语言工具进行了 PCoA 分析，并生成了如下图 3 所示的坐标图。图中样品之间的距离越近，说明它们在相似性方面更为接近。本研究基于 Weighted Unifrac 距离来进行 PCoA 分析。主坐标成分 1 (PCoA1)、主坐标成分 2 (PCoA2) 的贡献率分别为 84.85% 以及 14.54%。由 PCoA 图可知，储藏第 0 天以及第 2 天的牛奶中微生物多样性组成相似性较大，呈现一定的聚集性。储藏第 4、6、8 天样品聚类结果分散程度更高，与储藏第 0 天以及第 2 天的微生物多样性组成差异较为明显，表明随着储藏天数的增加，微生物群落结构存在明显变化。

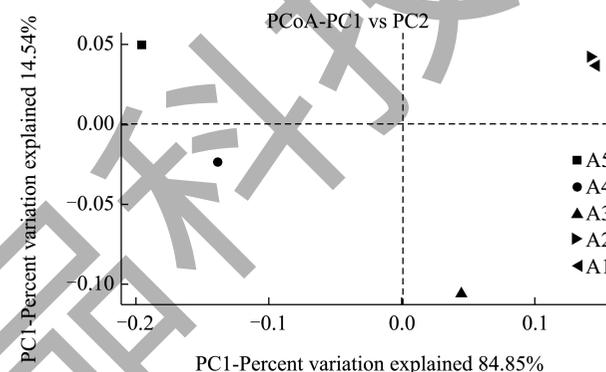


图3 原料乳中微生物 PCoA 分析图

Fig.3 Microbiological PCoA analysis of raw milk

2.6 原料乳低温贮藏过程中理化性质变化

2.6.1 原料乳低温贮藏过程中蛋白水解度的变化

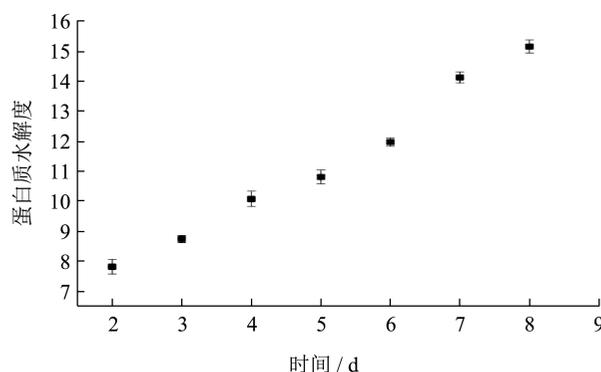


图4 原料乳 4 °C 冷藏下蛋白水解度变化

Fig.4 Change of proteolysis in raw milk under refrigeration at 4 °C

在原料乳的低温贮藏过程中，嗜冷菌数量呈上升趋势，其繁殖到一定数量后产生大量耐热蛋白酶会水解原料乳中的 κ -酪蛋白等，使乳中的蛋白质含量降低。原料乳在低温贮藏过程中蛋白质水解度变

化见图4,随着冷藏天数的增加,原料乳中蛋白质水解度呈上升趋势,由第2天的7.81%增加到第8天的15.15%。在冷藏储存期间,微生物尤其是嗜冷菌会通过产生蛋白酶水解乳中蛋白质,为其生长提供营养物质^[15]。

2.6.2 原料乳低温贮藏过程中pH值的变化

正常牛乳的pH值在6.4~6.8之间^[16],pH值的变化能够反映原料乳中蛋白质的稳定性。原料乳低温贮藏期间pH值变化如图5所示。随着低温贮藏天数的增加,原料乳pH值呈下降趋势,由第2天的6.68降至第8天的6.05。推测可能是在贮藏过程中,原料乳中的抗菌物质逐渐减少,同时微生物数逐渐增多,产生有机酸,导致原料乳pH值降低^[17]。同时也说明微生物会导致原料乳在低温贮藏过程中蛋白质的稳定性逐渐降低。

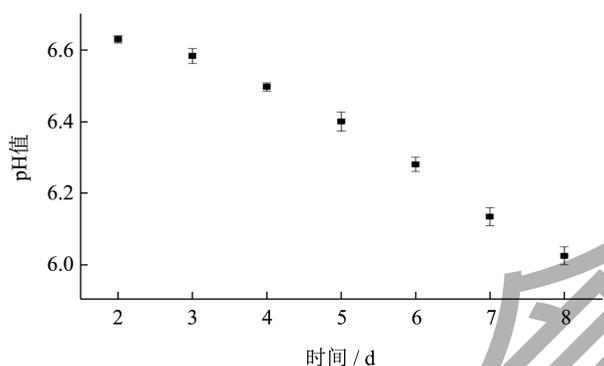


图5 原料乳4 °C冷藏下pH值变化

Fig.5 Change of pH in raw milk under refrigeration at 4 °C

2.6.3 原料乳低温贮藏过程中粒径的变化

原料乳低温贮藏期间粒径变化如图6所示。随着低温贮藏天数的变化,原料乳蛋白质中磷酸钙逐渐从酪蛋白胶束中解离出来^[18]。解离出来的钙离子可以与蛋白质络合形成“钙桥”,将相邻的酪蛋白紧密连接起来,粒径也随之增大^[19]。随着低温贮藏天数的增加,峰明显右移,粒径逐渐增大,粒径大小由第2天的2 500~5 000 nm,逐渐增加到第8天的5 000~7 000 nm。Alexandros等^[20]比较了储藏第0天与储藏第7天原料乳中蛋白质微观大小,发现蛋白质的平均体积直径1.49增加至2.19。可能是在贮藏过程中,微生物数量增加,产生的脂肪酶会逐渐将原料乳中的乳脂肪球膜破坏,乳脂肪球聚集,导致粒径增大,同时产生的蛋白酶会导致酪蛋白胶束不稳定,蛋白酶很容易裂解 κ -酪蛋白,而后带电的多肽会通过重新排列和聚集形成凝胶网络,进而

原料乳粒径增大^[21]。

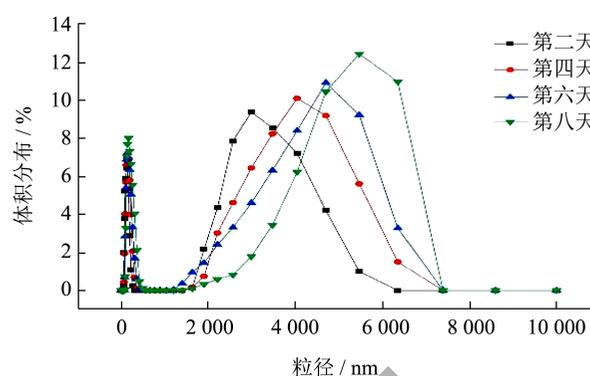


图6 原料乳4 °C冷藏下粒径变化

Fig.6 Change of particle size in raw milk under refrigeration at 4 °C

2.6.4 原料乳低温贮藏过程中Zeta电位的变化

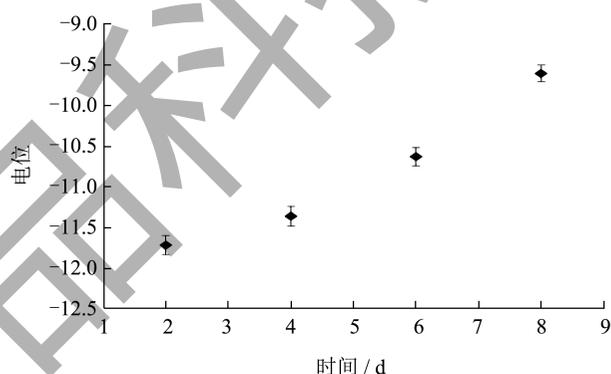


图7 原料乳低温贮藏期间电位变化

Fig.7 Change of Zeta-potential in raw milk during storage

根据图7可知,原料乳是一个带负电的体系,随着储藏时间的增加,原料乳的Zeta电位呈上升趋势,则电位绝对值呈下降趋势,电位的降低可能与微生物产生的脂肪酶、蛋白酶破坏了原料乳中的脂肪球膜和蛋白质有关,在第2天到第4天,电位绝对值变化较慢,可能是因为脂肪酶水解产生的小分子脂肪酸附着在胶束表面,抵消了胶束失稳产生的电位下降,导致电位绝对值暂时变化较小^[22],在第4天到第8天,电位下降趋势增加。同时电位的降低也说明原料乳在低温贮藏过程中,体系的稳定性逐渐降低,更易产生沉淀和凝胶。Isabelle等^[23]将荧光假单胞菌加入到UHT牛奶中,92 d后发现UHT牛奶zeta电位绝对值由16.6 mV降低为14.0 mV,表明荧光假单胞菌产生的耐热蛋白酶影响UHT乳在储存期间稳定性。

2.6.5 电子舌检测原料乳味觉的变化

随着贮藏时间的增加,原料乳的苦味值呈显著

上升的趋势 ($P < 0.05$), 由最初的 3.45 变为了 3.88, 酸味值、涩味值也呈显著上升的趋势 ($P < 0.05$)。咸味值、鲜味值、涩味回味值以及鲜味回味值贮藏前后无显著性变化 ($P > 0.05$), 结果见图 8。原料乳的苦味显著增加的原因可能是在低温贮藏期间, 原料乳中的抑菌物质减少, 且微生物的数量逐渐增加, 分解乳中的蛋白质、脂肪等营养物质, 产生醛类、醇类、硫化物、苦味肽等副产物, 同时这些副产物还可以进一步参与乳中的酶催化反应和脂质氧化反应, 使原料乳的风味发生改变^[24]。

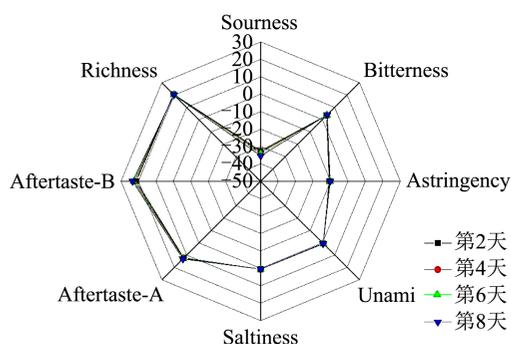


图 8 原料乳低温贮藏期间风味变化雷达图

Fig.8 Radar diagram of raw milk flavor change during storage

2.6.6 电子鼻检测原料乳气味的变化

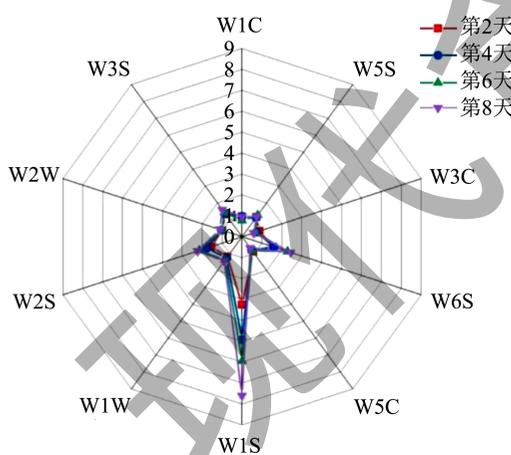


图 9 原料乳低温贮藏期间气味变化雷达图

Fig.9 Radar diagram of raw milk odor change during storage

经过低温贮藏的原料乳气味会发生明显的变化, 通过电子鼻对原料乳气味变化进行表征, 气味检测结果见图 9。随着贮藏时间的增加, 其 W1S 传感器的响应值变化最为显著 ($P < 0.05$), W2S 和 W6S 传感器的响应值也显著增加, 而 W1C、W5S、W3C、W5C、W1W、W2W、W3S 传感器的响应值无显著变化 ($P > 0.05$), 说明在低温贮藏过程中,

随着时间的增加, 甲基类、醇类、醛酮类和氢化物所占比重上升, 说明微生物产生的蛋白酶、脂肪酶等水解原料乳产生了大量甲基类化合物、醇类化合物、醛酮类化合物和氢化物, 进而引起原料乳气味的变化。Li 等^[25]对于冷藏过程中原料乳的气味变化研究中得出, 甲基类化合物、醛酮类化合物含量随冷藏时间的增加而逐渐增加。

2.6.7 原料乳低温贮藏过程中色差的变化

原料乳本身为白色不透明的乳状液。本研究以 ΔE 来表示原料乳低温贮藏期间的颜色变化, 结果见图 10。原料乳 ΔE 随储藏时间的增加线性上升。 ΔE_{ab} 由第 2 天的 47.30 增加到第 8 天的 49.67, 即原料乳的颜色逐渐加深。这可能是随着随着低温贮藏时间的增加, 微生物产生的蛋白酶使乳蛋白发生水解, 疏水基团暴露, 进而使乳蛋白进一步凝聚, 胶束粒径增加, 这会导致原料乳对光的折射率下降^[26], 颜色加深。

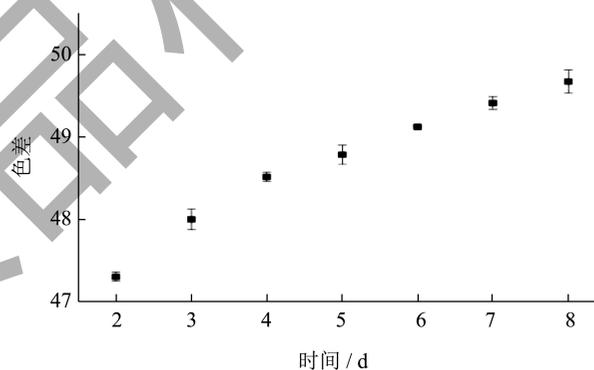


图 10 原料乳低温贮藏期间色差变化

Fig.10 Change of chromatic aberration in raw milk during storage

2.7 细菌功能预测

为了更深入地了解微生物演替产生的原因及其对冷藏原料乳的影响, 我们对微生物群落进行了 COG (Clusters of Orthologous Groups, COG) 功能注释。通过此分析, 我们希望找到与冷藏过程中观察到的微生物变化相关的功能基因和代谢途径。通过对 COG 功能分类进行注释, 我们能够揭示微生物可能进行的功能活动, 并了解它们对冷藏原料乳的质量和稳定性的影响。重点比较了储藏第 2 天 (A2) 与储藏第 6 天 (A4) 的功能丰度差异, 如图 11。除主要功能预测外, 翻译, 核糖体和生物合成、转录、氨基酸转运代谢在储藏第二天中丰度最高。这说明微生物群落为了能够适应低温环境下快

速变换的液体乳环境，抗逆性能提高^[27]。已确认冷休克蛋白存在于多种微生物中，具备感知低温环境的能力，并以 RNA 的分子伴侣形式促进转录和翻译过程^[28]。双组分系统也使微生物能够快速适应多变的环境，应答调控蛋白与 DNA、RNA 等结合，调控转录和代谢过程，并通过与组氨酸激酶相互作用来调节细菌生物膜的形成^[29]。此外，微生物对冷刺激的反应还涉及细菌细胞壁和膜的产生和

变化^[30]。经过原料乳冷藏 24 h 后，A2/A4 样本中的复制、重组与修复、翻译、核糖体结构和生物发生等功能的丰度出现显著差异 ($P < 0.05$)。这表明在冷藏过程中，原料乳中微生物的抗逆能力方面的丰度增加。通过微生物在冷藏环境中的动态变化，不动杆菌属逐渐成为最优势物种，表现出了较强的适应性。邵毅等^[31]研究也指出不动杆菌耐环境胁迫的能力较强。

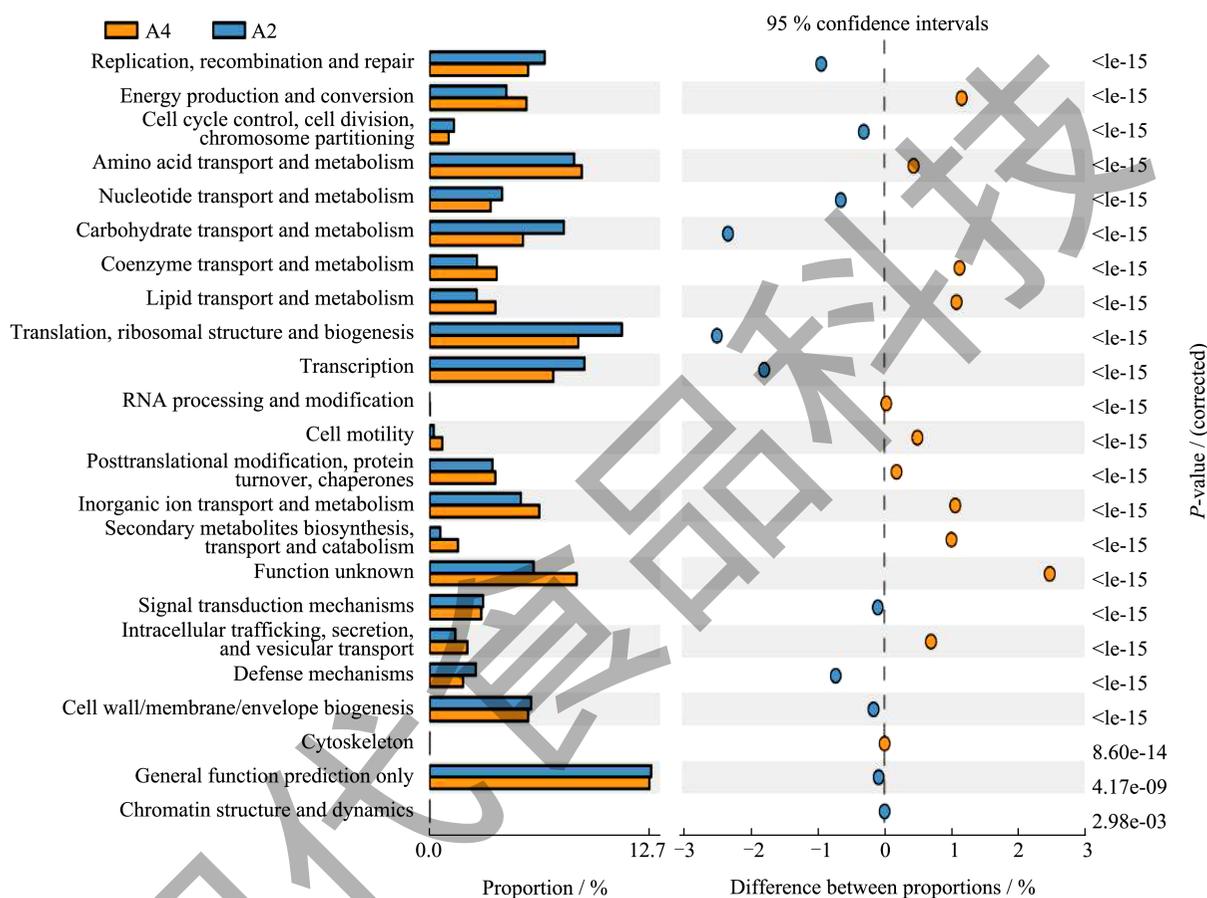


图 11 原料乳储藏第 2 天与第 6 天 COG 功能分类统计图

Fig.11 Statistical plot of COG function classification on day 2 vs. day 6 of raw milk storage

在储藏期第 6 天时，能量生成和转换、无机离子转运代谢、辅酶转运和代谢以及脂肪转运代谢丰富度明显提高。在这个阶段，原料乳中的乳菌落总数和嗜冷菌数显著增加，同时不动杆菌属、金黄杆菌属和假单胞菌属的丰度也有所上升。这可能是由于这些微生物在这个阶段有效利用了原料乳中的碳源和氮源，从而促使它们生长和繁殖。与此同时，原料乳中的氨基酸含量升高，可能是由金黄杆菌属和假单胞菌属产生的蛋白酶分解了蛋白质，导致氨基酸的增加。研究表明^[32]，生乳风味的变化与氨基酸的合成和代谢有关。假单胞菌可以通过蛋白质分

解代谢引起牛奶的腐败。碳水化合物代谢途径在冷藏 6 d 后明显富集。在此期间，发现乳酸菌占主导地位，这与碳水化合物的代谢有显著关系。它水解乳糖，产生葡萄糖和半乳糖，通过糖酵解转化为乳酸或其他有机酸，随后增加生奶的酸度。如果牛奶酸度过高，酪蛋白和乳球蛋白就会沉淀，导致原奶凝固和乳清分离^[33]。当原料乳的酸度过高时，会抑制不耐酸微生物的生长，同时可能导致酪蛋白、乳球蛋白等蛋白质发生沉淀，形成原料乳的凝块，甚至乳清析出^[14]。通过对 COG 代谢通路的分析发现，脂肪转运代谢的丰度增加，说明嗜冷微生物是导致

原料乳中游离脂肪酸和磷脂发生剧烈变化的主要因素。这些变化最终导致乳制品的风味、质地和结构出现不良变化。王媛媛优势微生物与代谢相关性结果表明^[34], 不动杆菌属与脂质代谢显著正相关, 假单胞菌属与氨基酸代谢显著正相关^[35]。

3 结论

原料乳低温贮藏过程中, 嗜冷菌数显著增加 ($P < 0.05$), 嗜冷菌逐渐成为优势菌, 导致耐热菌数量降低。部分微生物(如乳酸菌等)产生有机酸, pH值呈下降趋势。低温贮藏期间, 原料乳中的嗜冷菌产生耐热的蛋白酶和脂肪酶, 使蛋白质和脂肪发生变化, 蛋白水解度呈上升趋势, 原料乳粒径增大, 电位绝对值减小。原料乳中的乳蛋白被蛋白酶水解后进一步凝聚, 使胶束粒径增大, 对光的折射率下降, 颜色变深, 色差呈上升趋势。随着贮藏天数的增加, 原料乳的苦味值、酸味值、涩味值显著增加 ($P < 0.05$), 微生物对原料乳风味的影响主要体现在为产生醛类、醇类、硫化物、苦味肽等副产物, 这些副产物进一步参与乳中的酶催化反应和脂质氧化反应, 使原料乳的气滋味发生改变。本实验采用三代 16S rDNA 技术对原料乳中微生物群落进行分析结果显示, 此原料乳的优势菌属不动杆菌属、假单胞菌属和乳酸菌属等其他主要菌属。在功能预测分析中, 除氨基酸代谢、碳水化合物代谢和膜运输这些与微生物群落有关的主要代谢途径外, 能量生成和转换、无机离子转运代谢、辅酶转运和代谢以及脂肪转运代谢这些代谢途径随储藏时间增加而有所变化, 这与原料乳中嗜冷菌逐渐成为优势菌群有关。

参考文献

- [1] 张鹏博,李智星,魏勇,等.不同检测时间对原料乳中嗜冷菌检测结果的影响[J].中国乳业,2023,1:77-80.
- [2] 刘祥杰,张家浩,邢潇月,等.异常原料乳中一株短小芽孢杆菌的分离与鉴定[J].中国动物保健,2022,24(11):99-101.
- [3] MARIO V N, CLAUDIA B, MANUEL K, et al. Biodiversity of refrigerated raw milk microbiota and their enzymatic spoilage potential [J]. International Journal of Food Microbiology, 2015, 211(15): 57-65.
- [4] AHMED I, YOKOTA A, YAMAZOE A, et al. Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2007, 57(Pt 5): 1117-1125.
- [5] PATSY S, ANNELIES P, LIEVE H, et al. Incidence and diversity of potentially highly heat-resistant spores isolated at dairy farms [J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(3): 1480-1494.
- [6] 杜兵耀.生乳中微生物风险关键点分析及假单胞菌特征研究[D].兰州:兰州大学,2022.
- [7] 屠大伟,张清平,刘美艳,等.基于高通量测序的液态奶中微生物多样性研究[J].重庆工商大学学报(自然科学版),2023,40(1):15-21.
- [8] 韩闯闯.基于高通量测序分析奶粉加工过程中微生物的研究[D].杭州:浙江科技学院,2023.
- [9] NY/T 1331-2007,乳与乳制品中嗜冷菌、需氧芽孢及嗜热需氧芽孢数的测定[S].
- [10] 张湘渠,张斌,盖丽娜,等.乳蛋白水解度检测方法研究进展[J].乳业科学与技术,2021,44(4):42-45.
- [11] GB 5009.237-2016,食品安全国家标准食品pH值的测定[S].
- [12] LIU S, MOON C D, ZHENG N, et al. Opportunities and challenges of using metagenomic data to bring uncultured microbes into cultivation [J]. Microbiome, 2022, 10(1): 76.
- [13] 梁丽姣,王娉,曲天铭,等.单分子实时测序技术研究不同来源原料乳中群落组成及多样性[J].食品安全质量检测学报,2022,13(4):1123-1131.
- [14] 王媛媛,剧柠,苟萌,等.宏基因组学探究原料乳冷藏过程菌群变化规律[J].农业工程学报,2020,36(22):333-340.
- [15] MANKAI M, BOULARES M, MOUSSA B O, et al. The effect of refrigerated storage of raw milk on the physicochemical and microbiological quality of Tunisian semihard Gouda-type cheese during ripening [J]. International Journal of Dairy Technology, 2012, 65(2): 250-259.
- [16] 王柳.酸乳发酵过程中还原糖和有机酸含量的变化[D].西安:陕西科技大学,2014.
- [17] YUAN H Z, HAN S F, ZHANG S F, et al. Microbial properties of raw milk throughout the year and their relationships to quality parameters [J]. Foods, 2022, 11(19): 3077.
- [18] CHENG Q, DAVID J M. Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: factors affecting particle size [J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(5): 1000-1008.
- [19] MARIJE A, LENE B J, VALENTIN R, et al. Relationship between casein micelle size, protein composition and stability of UHT milk [J]. International Dairy Journal, 2021, 112: 104856.
- [20] ALEXANDROS C S, ELENA S I, MARK L, et al. Effect

- of high pressure processing on the safety, shelf life and quality of raw milk [J]. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2019, 52: 325-333.
- [21] HUCK J R, HAMMOND B H, MURPHY S C, et al. Tracking spore-forming bacterial contaminants in fluid milk-processing systems [J]. *J Dairy Sci*, 2007, 90(10): 4872-4883.
- [22] KUMAR H, FRANZETTI L, KAUSHAL A, et al. *Pseudomonas fluorescens*: a potential food spoiler and challenges and advances in its detection [J]. *Annals of Microbiology*, 2019, 69(9): 873-883.
- [23] ISABELLE G, GAËLLE T, JACQUES F, et al. Proteolysis of casein micelles by *Pseudomonas fluorescens* CNRZ 798 contributes to the destabilisation of UHT milk during its storage [J]. *Dairy Science & Technology*, 2011, 91(4): 413-429.
- [24] JO Y, BENOIST D M, BARBANO D M, et al. Flavor and flavor chemistry differences among milks processed by high-temperature, short-time pasteurization or ultra-pasteurization [J]. *J Dairy Sci*, 2018, 101(5): 3812-3828.
- [25] LI H Q, XI B, YANG X L, et al. Evaluation of change in quality indices and volatile flavor components in raw milk during refrigerated storage [J]. *LWT*, 2022, 165: 113674.
- [26] JIA H X, CHEN W L, QI X Y, et al. The stability of milk-based infant formulas during accelerated storage [J]. *CyTA-Journal of Food*, 2019, 17(1): 96-104.
- [27] ZHAO C C, JONG B E. Shotgun metagenomics approach reveals the bacterial community and metabolic pathways in commercial hongo product, a traditional Korean fermented skate product [J]. *Food Research International*, 2020, 131(C): 109030.
- [28] 张雪,张华方,刘晴,等.微生物冷休克蛋白的生理功能及其潜在应用[J].*生物技术进展*,2015,5(4):279-284.
- [29] 李雷,卫科科,姜卫红,等.细菌双组分系统应答调控蛋白调控策略的多样性[J].*中国科学:生命科学*,2017,47(5): 462-469.
- [30] 叶晶鑫,杨胜平,程颖,等.食品中低温微生物的适冷机制研究进展[J].*微生物学杂志*,2018,38(4):114-119.
- [31] 邵毅,姚春霞,黄柳娟,等.冷鲜鸡肉表面四环素和磺胺耐药菌的菌群多样性分析[J].*农业工程学报*,2019,35(17): 301-308
- [32] DING R X, LIU Y M, YANG S S, et al. High-throughput sequencing provides new insights into the roles and implications of core microbiota present in pasteurized milk [J]. *Food Research International*, 2020, 137: 109586.
- [33] GUO R, JU N, WANG Y Y, et al. Metagenomic reveals succession in the bacterial community and predicts changes in raw milk during refrigeration [J]. *Journal of Food Safety*, 2023, 43: e13028.
- [34] 王媛媛.冷藏原料乳品质变化过程中微生物与乳代谢物关系探究[D].银川:宁夏大学,2021.
- [35] 李璞钰,剧柠,罗玉龙,等.基于UPLC-Q-TOF-MS技术分析原料乳冷藏过程中脂类代谢组学[J].*食品科学*,2021, 42(20):120-127.