

# 功能低聚糖对植物乳杆菌 ZDY2013 发酵乳发酵特性及冷藏效果的影响

张娜<sup>1</sup>, 占英<sup>1</sup>, 孟迎平<sup>1</sup>, 李一娟<sup>1</sup>, 陶雪莹<sup>1</sup>, 魏华<sup>1,2</sup>, 张志鸿<sup>1,2\*</sup>

(1. 南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 江西南昌 330047)

(2. 南昌大学中德联合研究院, 江西南昌 330047)

**摘要:** 为探究功能低聚糖对植物乳杆菌 ZDY2013 发酵乳的发酵特点和冷藏期功能的影响, 选取具有益生元特性的低聚木糖、低聚异麦芽糖及其组合物为发酵乳中碳水化合物, 评价发酵乳中植物乳杆菌发酵特性和 pH 值变化, 同时对发酵乳的持水性及冷藏期抗氧化活性进行解析。结果表明: 植物乳杆菌能利用不同浓度功能低聚糖进行代谢; 相比葡萄糖, 发酵乳中添加低聚糖更有利于植物乳杆菌的生长, 尤其是其组合物浓度为 3.0% 时, 能显著提高发酵乳中活菌数及降低发酵乳 pH 值; 冷藏期 (21 d) 内, 各组发酵乳活菌数呈下降趋势, 但均高于  $10^8$  cfu/g, pH 值在 7 d 后比较稳定, 而持水性不断增强; 发酵乳 DPPH 自由基清除能力在第 7 d 最强, 而 ABTS<sup>+</sup> 和羟自由基的清除能力呈下降趋势, 且添加同浓度的组合物优于葡萄糖。该研究结果将为功能低聚糖及植物乳杆菌 ZDY2013 在乳品开发中的应用提供理论依据。

**关键词:** 功能低聚糖; 植物乳杆菌; 发酵乳; 冷藏期; 抗氧化活性; 蛋白水解活性

文章编号: 1673-9078(2021)11-34-42

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.11.0770

## Effects of Functional Oligosaccharides on Fermentation Characteristics and Cold Storage of Fermented Milk Using *Lactobacillus plantarum* ZDY2013

ZHANG Na<sup>1</sup>, ZHAN Ying<sup>1</sup>, MENG Yingping<sup>1</sup>, LI Yijuan<sup>1</sup>, TAO Xueying<sup>1</sup>, WEI Hua<sup>1,2</sup>, ZHANG Zhihong<sup>1,2\*</sup>

(1.State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

(2.Jiangxi-OAI Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

**Abstract:** To investigate the effects of functional oligosaccharides on the fermentation characteristics and cold storage of milk fermented using *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*) ZDY2013, the fermentation characteristics and pH variations of *L. plantarum* in the fermented milk were evaluated upon adding different prebiotic carbohydrates, namely xylo-oligosaccharides, isomaltose oligosaccharides, and their composites, into the fermented milk. At the same time, the water holding capacity and antioxidant activity of the fermented milk during cold storage were analyzed. The results revealed that *L. plantarum* can be metabolized with different functional oligosaccharides at different concentrations. Compared with glucose, oligosaccharides added to the fermented milk were found to be more beneficial for the growth of *L. plantarum*. More specifically, at the composite concentration of 3.0%, the number of viable bacteria in the fermented milk increased significantly, while the pH of the fermented milk reduced. During 21 days of cold storage, the number of viable

引文格式:

张娜, 占英, 孟迎平, 等. 功能低聚糖对植物乳杆菌 ZDY2013 发酵乳发酵特性及冷藏效果的影响[J]. 现代食品科技, 2021, 37(11): 34-42

ZHANG Na, ZHAN Ying, MENG Yingping, et al. Effects of functional oligosaccharides on fermentation characteristics and cold storage of fermented milk using *Lactobacillus plantarum* ZDY2013 [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(11): 34-42

收稿日期: 2021-07-22

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (32101915)

作者简介: 张娜 (1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 益生菌功能研究, E-mail: 1964900720@qq.com

通讯作者: 张志鸿 (1988-), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向: 益生菌与肠道健康, E-mail: a Zhangzhihong@163.com

bacteria in each experimental group reduced, but it was higher than  $10^8$  cfu/g. Meanwhile, the pH was relatively stable after 7 days of cold storage, and the water holding capacity increased continually. All the experimental groups exhibited the strongest DPPH radical scavenging abilities on day 7, while the ABTS and hydroxyl radical scavenging abilities are declined. Additionally, at the same concentration, the addition of oligosaccharide composites outperformed that of glucose. The results of this study will provide a theoretical basis for the application of functional oligosaccharides and *L. plantarum* ZDY2013 in the development of dairy products.

**Key words:** functional oligosaccharides; *Lactobacillus plantarum*; fermented milk; cold storage period; antioxidant activity; proteolytic activity

益生菌是指摄入一定量后对人体产生有益健康作用的一类活的微生物。目前,研究和应用广泛的益生菌主要包括乳酸杆菌和双歧杆菌,其中益生菌开发的乳制品广受欢迎。乳品是益生菌递送的最常见食品基质,能有效保护菌株免受食品加工、储存和胃肠道环境损伤,并促进其抵达肠道发挥益生功效<sup>[1]</sup>。研究表明,每天摄入一定量含  $10^9\sim 10^{11}$  cfu 活菌的发酵乳能有效预防肠道炎症、II 型糖尿病和心血管疾病等<sup>[2-4]</sup>。

植物乳杆菌 ZDY2013 是一株分离于自然发酵酸豆角的具有自主知识产权的优势乳酸杆菌,其能够耐受胃肠道的酸和胆盐环境,顺利通过胃肠道消化系统,并能调节肠道菌群来改善宿主健康<sup>[5]</sup>。另外,前期研究发现,利用植物乳杆菌 ZDY2013 制作的发酵乳能预防食源性致病菌污染,并能防止产肠毒素蜡样芽孢杆菌对小鼠造成肠道菌群稳态失衡<sup>[6,7]</sup>。

发酵乳制品中添加益生元(如牛蒡多糖、菊粉和功能低聚糖等)被认为是提高产品质量、货架期和功能的有效策略,主要表现为提高乳酸菌在产品贮藏过程中的存活率、改善发酵乳风味<sup>[8]</sup>和增强其功能特性(抗肥胖、抗菌、抗糖尿病、缓解氧化应激等)<sup>[9-12]</sup>。例如,虞娇娇等<sup>[13]</sup>发现低聚果糖和低聚半乳糖可以显著增加发酵乳中乳酸菌活菌数,同时改善发酵乳的粘稠度;Madhu 等<sup>[11]</sup>研究发现,发酵乳中添加低聚果糖可以促进植物乳杆菌 CFR 2194 和发酵乳杆菌 CFR 2192 的生长代谢,提高发酵乳的抗氧化活性。抗氧化活性一直被认为是乳制品的一种基本营养特性<sup>[1]</sup>,其可延长发酵乳的保质期及保护机体免受氧化损伤<sup>[14]</sup>。

低聚木糖具有良好的抗氧化活性<sup>[15]</sup>,且可改善 II 型糖尿病<sup>[16]</sup>、抗肥胖和增强机体免疫力等益生功能;低聚异麦芽糖可显著促进体内双歧杆菌活性,提高肠道免疫和减少腹泻<sup>[17]</sup>等益生性。然而,添加低聚木糖和低聚异麦芽糖对发酵乳功能特性的影响报道甚少。为此,本文在发酵乳中添加低聚木糖、低聚异麦芽糖或者两种低聚糖的组合物来探究其对植物乳杆菌 ZDY2013 发酵特性及对发酵乳的影响,同时对冷藏期发酵乳抗氧化活性进行解析。本研究将为功能低聚糖乳制品的研发与工艺优化提供参考,并为植

物乳杆菌 ZDY2013 功能应用提升研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

#### 1.1.1 菌株

植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) ZDY2013 为本团队分离于自然发酵酸豆角,保存于食品科学与技术国家重点实验室。

#### 1.1.2 试剂与培养基

邻苯二甲醛、三氯乙酸、 $\beta$ -巯基乙醇、邻菲罗啉均为分析纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH)、2,2'-联氨基-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐 (ABTS)、低聚异麦芽糖(纯度 $\geq 90\%$ )、低聚木糖,上海源叶生物科技有限公司;过氧化氢、硫酸亚铁、过硫酸钾、四硼酸钠,十二烷基硫酸钠,甲醇,乙醇、四硼酸钠、十二烷基硫酸钠等均为国产分析纯;脱脂乳,金薄金生态科技有限公司;MRS 肉汤培养基,北京索莱宝科技有限公司。

Basal MRS (BMRS) 培养基配方: 10.0 g 蛋白胨、5.0 g 牛肉膏、5.0 g 酵母膏、3.0 g 氯化铵、4.0 g 磷酸氢二钾、2.6 g 磷酸二氢钾、0.102 g 七水硫酸镁、0.05 g 四水硫酸锰、0.5 g 半胱氨酸和 1.0 g 吐温-80,加去离子水至 1000 mL,加热溶解,调 pH 至 6.2,121 °C 灭菌 15 min,常温保存备用。

### 1.2 仪器与设备

厌氧培养箱,美国 Gene Science 公司;台式高速冷冻离心机,德国 Eppendorf 公司;PHS-3E pH 计,上海伟业仪器厂;立式蒸汽灭菌锅,上海博讯仪器有限公司;电热恒温水浴锅,上海精宏实验设备有限公司;电子天平,德国 Sartorius 公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 发酵期实验方法

##### 1.3.1.1 样品配制

配置含 12 g/100 mL 脱脂乳液体、BMRS 培养基, 10%、15%、20%、25%、30% (*m/V*) 葡萄糖、低聚木糖、低聚异麦芽糖和低聚木糖与低聚异麦芽糖组合 (1:1) 溶液, 灭菌 (115 °C、20 min) 后分装待用。

### 1.3.1.2 菌株活化

从-80 °C 冰箱中取出冻存菌株, 用接种环进行划线至 MRS 平板中, 37 °C 静置培养 36 h, 取活化后的单菌落接种于 5 mL MRS 肉汤培养基, 37 °C 静置培养 12 h。传代培养两次, 接种量为 1%。

### 1.3.1.3 培养基发酵液中菌株浓度和 pH 值测定

将上述活化后的植物乳杆菌 ZDY2013 接种至 4 mL BMRS 培养基中, 加入 1 mL 10% (*m/V*) 不同低聚糖使得其终浓度为 2.0% (*m/V*), 阳性对照组加入同浓度的葡萄糖, 接种量为 1%, 厌氧培养 24 h, 每隔 3 h 测定发酵液 OD<sub>600</sub> 值和 pH 值, 比较不同种类低聚糖对菌株生长的影响。

### 1.3.1.4 发酵乳的 pH 值及植物乳杆菌生长量的测定

在 12% (*m/V*) 脱脂乳液体中分别加入灭菌后 15%、20%、25%、35% (*m/V*) 的葡萄糖、低聚糖 (低聚异麦芽糖、低聚木糖或两种低聚糖的组合物), 使发酵乳中葡萄糖或低聚糖的终浓度为 1.5%、2.0%、2.5% 和 3.0% (*m/V*), 其中低聚糖组合物的混合比为 1:1, 葡萄糖组为阳性对照组。取活化后的菌株以体积分数 2% 接种量接种于上述脱脂乳中, 37 °C 静置培养 12 h 后测定发酵乳活菌数和 pH 值。

### 1.3.1.5 发酵乳中菌株生长曲线

根据 1.3.1.4 实验结果, 以最高活菌计数为指标, 选取 2 种适宜浓度的低聚糖添加量作为菌株的生长条件, 在 BMRS 培养基中分别加入菌种生长适宜浓度的低聚糖, 静置培养 0~24 h 时, 每隔 3 h 取出发酵乳, 测定发酵乳活菌数和 pH 值, 测定菌株生长曲线。

## 1.3.2 冷藏期发酵乳指标测定

根据 1.3.1.5 实验结果, 选取菌株生长进入稳定期时间为发酵结束时间, 并进行 4 °C 贮藏, 贮藏期的 1 d、7 d、14 d、21 d 测定发酵乳中活菌数、pH 值、持水性、抗氧化活性及蛋白水解能力。

### 1.3.2.1 冷藏期发酵乳 pH 值及活菌数变化

对冷藏期的发酵乳样品 (葡萄糖组为对照组) 进行取样, 采用梯度稀释法对植物乳杆菌 ZDY2013 进行活菌计数; 使用电子 pH 计测定冷藏期各阶段样品的 pH 值。

### 1.3.2.2 持水性

持水性的测定参考文献<sup>[18]</sup>并稍作修改。称取空的 10 mL 离心管质量记为  $W_0$ , 加入 5 mL 成品发酵乳 (葡萄糖组为对照组) 质量记为  $W_1$ 。在 3000 r/min,

4 °C 的条件下离心 10 min。弃去上清液, 称取质量记为  $W_2$ , 平行测定 3 次。持水力计算公式如下:

$$\text{持水力} / \% = \frac{W_2 - W_0}{W_1 - W_0} \times 100\%$$

### 1.3.2.3 抗氧化活性

#### (1) DPPH 自由基清除能力

对发酵乳 (葡萄糖组为对照组) 进行 8000 r/min 离心 10 min, 再用 0.44 μm 滤膜过滤, 获得发酵乳清; 取 1.5 mL DPPH 溶液 (0.2 mmol/L, 95% 甲醇作为溶剂) 与 0.5 mL 的发酵乳清样品或 95% 甲醇 (对照) 混合均匀, 在室温下反应 30 min。4 °C 条件下 8000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 于 517 nm 处测定吸光值。DPPH 自由基清除率计算公式<sup>[19]</sup>如下:

$$\text{清除率} / \% = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\%$$

式中:

$A_0$ —95% 甲醇 (对照) 存在时的吸光值;

$A_1$ —加入乳清样品的吸光值。

#### (2) ABTS<sup>+</sup>自由基清除能力

参照 Perna 等<sup>[20]</sup>的方法并作修改。先用 95% 乙醇溶液将 ABTS 溶液稀释到 OD<sub>734</sub>=0.700±0.020 ( $A_0$ )。将 150 μL 乳清样品与 3 mL ABTS 溶液混合摇匀, 避光反应 30 min 后, 在 734 nm 处测吸光度  $A_1$ , 通过添加 150 μL 乙醇溶液代替样品作为空白对照, 测得吸光度为  $A_0$ , 每个样品平行测定 3 次。ABTS<sup>+</sup>自由基清除能力计算公式如下:

$$\text{清除率} / \% = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\%$$

式中:

$A_0$ —未添加样品的吸光度;

$A_1$ —添加不同样品反应后的吸光度。

#### (3) 羟自由基清除能力

参照文献<sup>[21]</sup>所述方法测定。首先将 2.5 mmol/L 邻-菲罗琳溶液中, 0.02 mol/L PBS (pH 7.4) 和蒸馏水等体积混合, 混合均匀后, 加入等体积 2.5 mmol/L FeSO<sub>4</sub> 溶液和 20 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液, 充分混匀后, 37 °C 恒温水浴 1 h。根据 536 nm 处吸光度变化判断受试物清除羟自由基的能力。羟自由基清除率按下式计算。

$$\text{清除率} / \% = \frac{A_a - A_1}{A_b - A_1} \times 100\%$$

式中:

$A_a$ —发酵乳清代替蒸馏水的吸光度;

$A_1$ —混合液的吸光度;

$A_b$ —蒸馏水代替 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液的吸光度。

1.3.2.4 蛋白水解力

邻苯二甲醛 (OPA) 溶液的配制参考 Church 等<sup>[22]</sup>的方法。OPA 溶液的配制: 混合 100 mmol/L 四硼酸钠 25 mL、20% 十二烷基硫酸钠 2.5 mL、40 mg OPA 溶解于 1 mL 甲醇、β-巯基乙醇 100 μL, 最后用去离子水稀释到体积为 50 mL。OPA 试剂现配现用。发酵乳样品 (葡萄糖组为对照组) 2.5 mL 与 0.75% 三氯乙酸 5 mL, 混合均匀并静置 10 min, 4000 r/min 离心 10 min (4 °C), 收集上清液。取上清液 150 μL, 加入 OPA 试剂 3 mL, 混匀, 室温下反应 10 min 后于 340 nm 测定吸光值。发酵乳样品 A<sub>340</sub> 的值与蛋白水解力呈正比例关系, 值越大, 说明产生的游离氨基越多, 从而反映蛋白的水解程度越高。

1.4 数据处理

数据处理采用 Graphpad prism 8.0 软件进行分析, 实验结果均为平行测定三次的值, 用均数±标准差 (mean±SD) 表示。采用双因素方差分析 (Two-Way ANOVA) 的 Tukey 多重检验比较数据平均值的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 不同碳源对植物乳杆菌 ZDY2013 体外代谢的影响

植物乳杆菌 ZDY2013 全基因组测序结果显示其具有多种碳水化合物代谢相关酶<sup>[23]</sup>, 说明其可以代谢多种碳水化合物。据研究发现, 功能低聚糖代替培养基中的葡萄糖可以显著促进乳酸杆菌的生长<sup>[24,25]</sup>。选取低聚木糖、低聚异麦芽糖及其组合物改良的培养基对植物乳杆菌进行体外发酵, 发现植物乳杆菌能以低聚木糖、低聚异麦芽糖及其组合物为碳源进行生长代谢, 且低聚异麦芽糖优于低聚木糖 (图 1a)。然而, 菌株进入生长稳定期的生物量均不及以葡萄糖为碳源时, 这可能是由于葡萄糖是小分子碳源, 易于被代谢。植物乳杆菌 ZDY2013 利用不同碳源代谢前 3 h 比较缓慢, 而进入稳定期的时间均为 9 h。与此结论相一致的是, 发酵上清 pH 值在 3 h 内无明显变化, 在 9 h 之后均进入稳定期 (图 1b)。另外本研究发现, 葡萄糖为碳源时, 进入稳定期的 pH 值最低, 而低聚木糖为碳源时最高, 这与代谢最终生物量高低相反, 说明植物乳杆菌 ZDY2013 代谢能力越强, pH 值越低, 这可能是由于其代谢产有机酸的原因<sup>[6]</sup>。综上所述, 不同碳源对植物乳杆菌 ZDY2013 的代谢有影响,

而低聚异麦芽糖相比低聚木糖具有更强的促进代谢能力。

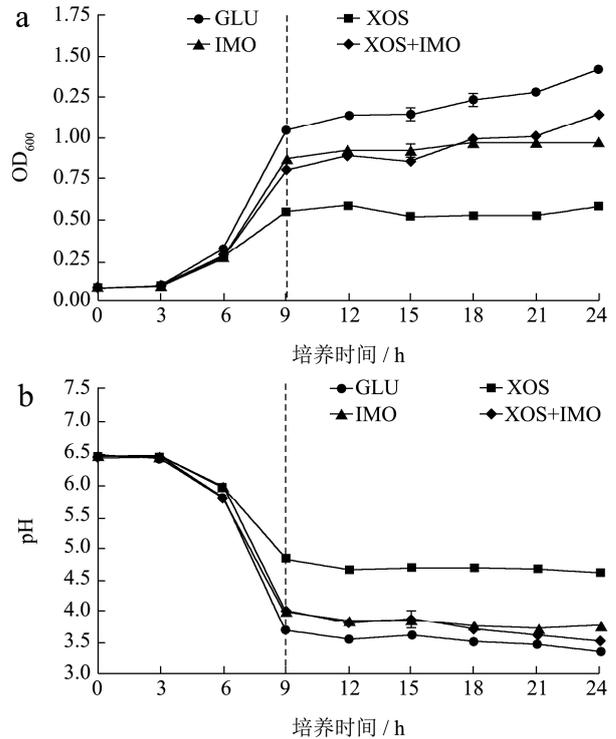


图 1 不同碳源对植物乳杆菌 ZDY2013 生长代谢的影响

Fig.1 The effect of carbon sources on metabolism of *L.*

*plantarum* ZDY2013

注: a: 生长曲线; b: pH 变化。GLU: 葡萄糖; XOS: 低聚木糖; IMO: 低聚异麦芽糖。

2.2 不同碳源浓度对植物乳杆菌 ZDY2013 发酵乳的影响

2.2.1 发酵乳中活菌数的差异

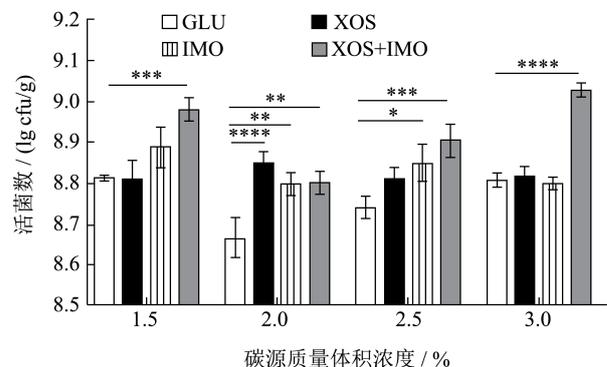


图 2 不同碳源浓度对发酵乳中活菌数的影响

Fig.2 The effect of concentrations of different carbon sources on the viable count of *L. plantarum* ZDY2013 in fermented milk

注: GLU: 葡萄糖, XOS: 低聚木糖, IMO: 低聚异麦芽糖。\**p*<0.05, \*\**p*<0.01, \*\*\**p*<0.001, \*\*\*\**p*<0.0001。图 3 同。

在传统发酵乳制品中添加益生元（如功能低聚糖）来开发功能性乳制品是未来乳品行业发展新趋势。本研究发现，脱脂牛奶中添加同质量浓度的低聚木糖、低聚异麦芽糖及其组合物有利于维持植物乳杆菌 ZDY2013 在发酵乳中的活菌浓度（图 2）。相比葡萄糖，添加 1.5%和 3.0%两种低聚糖的组合糖提高植物乳杆菌 ZDY2013 在发酵乳中的浓度最显著，分别达到  $9.33 \times 10^8$  cfu/g ( $p < 0.001$ ) 和  $1.05 \times 10^9$  cfu/g ( $p < 0.0001$ )。随着低聚糖添加量的增加，发酵乳中活菌数并非一直递增，尤其是单独添加低聚木糖、低聚异麦芽糖时，植物乳杆菌的浓度均在  $10^8$  cfu/g 左右，说明低聚糖添加量与发酵乳活菌数并非呈现线性增长关系。综上结果表明，低聚木糖和低聚异麦芽糖的混合糖最适宜维持植物乳杆菌 ZDY2013 在发酵乳中的浓度。

### 2.2.2 发酵乳 pH 的差异

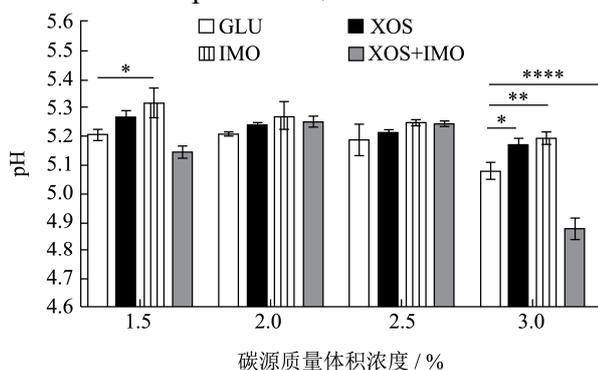


图 3 不同碳源浓度对发酵乳 pH 的影响

Fig.3 The effect of concentrations of different carbon sources on pH in fermented milk

发酵乳最终 pH 值可以判定发酵乳的环境是否适合乳酸菌生存。由图 3 可知，当糖浓度为 2.0%或者 2.5%时，发酵乳的 pH 无显著性差异，均在 pH 5.20 左右；当糖浓度为 1.5%或者 3.0%时，低聚木糖和低聚异麦芽糖的组合组 pH 值均低于其他 3 个组，其中浓度为 3.0%时有显著差异 ( $p < 0.0001$ )；随着低聚糖添加量的增加，发酵乳的最终 pH 值并未发生明显变化，除低聚木糖和低聚异麦芽糖的组合物浓度为 3.0%时 pH 为 4.87，其余组 pH 值在 5.07~5.19 之间。说明低聚糖的添加量不容易影响发酵乳的最终酸碱环境，结合前期研究证实的植物乳杆菌 ZDY2013 具有耐受酸能力的结论<sup>[6]</sup>，表明该菌株在发酵乳环境中将保持良好活力。

### 2.2.3 发酵乳中菌株的生长

根据图 2 结果，我们确定质量浓度为 1.5%和 3.0%的低聚糖组合物为发酵乳的适宜添加量，在此进一步对植物乳杆菌在该条件下的代谢特性进行测定，

结果如图 4。植物乳杆菌 ZDY2013 在两种条件下的生长动力学曲线相似，浓度均在 12 h 达到稳定，分别为  $7.94 \times 10^8$  cfu/g 和  $1.05 \times 10^9$  cfu/g，相比体外发酵约推迟 3 h（图 1），说明菌株在添加低聚糖的发酵乳中生长代谢缓一点。特别的是，发酵乳的 pH 值均呈持续下降的趋势，且变化基本一致，说明菌株在发酵乳中持续产有机酸。

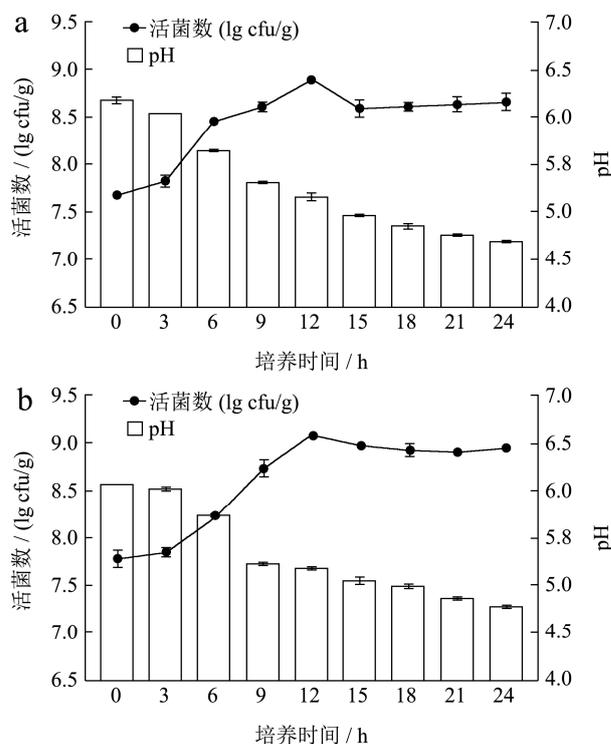


图 4 植物乳杆菌 ZDY2013 在低聚糖发酵乳中的生长特性

Fig.4 The growth characterization of *L. plantarum* ZDY2013 in oligosaccharides fermented milk

注：a: 1.5%（低聚木糖+低聚异麦芽糖）；b: 3.0%（低聚木糖+低聚异麦芽糖）。

### 2.3 冷藏期低聚糖发酵乳活菌数和 pH 变化

上述结果表明添加功能低聚糖组合物有利于提高发酵乳中植物乳杆菌的浓度以及降低发酵乳 pH 值。为进一步探究这种特征可以维持多久，测定了冷藏期发酵乳中的活菌数和 pH 值。结果如图 5a 所示，无论添加的是不同浓度低聚糖组合物还是对照的葡萄糖，活菌数在冷藏期均出现下降，下降趋势类似，且在第 21 d 出现显著差异 ( $p < 0.0001$ )，但是下降均不到一个数量级，这说明发酵乳在储存期有效维持了植物乳杆菌较高活菌浓度 ( $2.34 \times 10^8$  cfu/g 以上)，这一结果与虞娇娇等<sup>[13]</sup>研究结果类似，其发现添加低聚果糖的发酵乳在冷藏期对瑞氏乳杆菌 MB2-1 具有一定的保护作用。发酵乳 pH 值在冷藏期也均发生相同下降趋势，不同的是 pH 值在第 7 d 即发生显著

下降 ( $p < 0.0001$ ), 随后 pH 值处于维持状态 (图 5b)。然而, 添加低聚糖组合物的发酵乳冷藏期的 pH 值高于对照的葡萄糖 (pH 4.80 左右), 尤其是添加 1.5% 组合物的组, pH 值停留着 5.20 左右。这可能是由于在低温条件下植物乳杆菌代谢葡萄糖的能力更强, 产生的有机酸更多, 而添加益生元低聚糖能防止发酵乳在冷藏期的后酸化, 改善其风味和质量<sup>[26]</sup>。

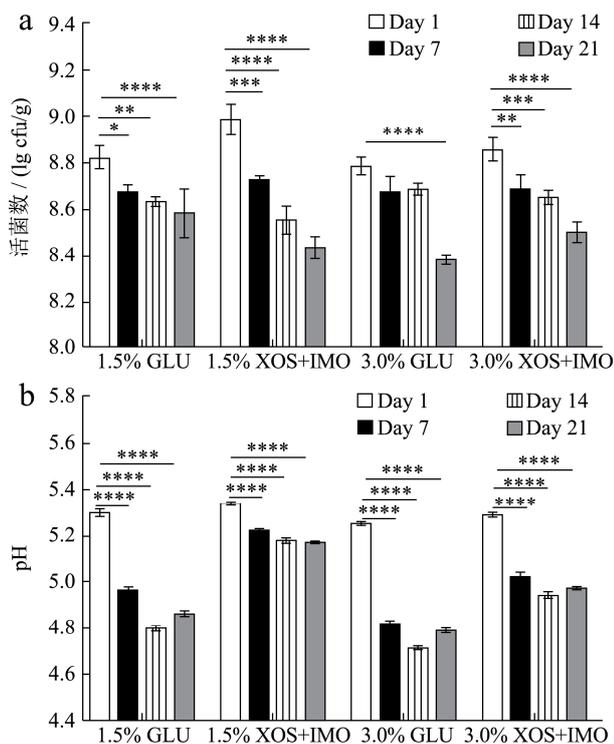


图 5 冷藏期发酵乳中的活菌数和 pH 变化

Fig.5 Viable bacteria counts and pH value of fermented milk during refrigerated storage

注: a: 生长曲线; b: pH 变化; GLU: 葡萄糖; XOS+IMO: 低聚木糖+低聚异麦芽糖。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ 。

### 2.4 冷藏期低聚糖发酵乳持水性变化

持水性是评价发酵乳质量的一个重要指标, 其与蛋白、固形物的含量相关, 良好品质的发酵乳持水性高, 乳清析出少, 质地均一粘稠。本研究发现, 添加低聚糖的发酵乳持水性相比对照组更高, 且随着冷藏时间的延长, 发酵乳的持水性显著提高 (图 6;  $p < 0.0001$ )。当低聚糖组合物添加浓度为 1.5% 时, 发酵乳的持水性从第 7 d 开始一直保持在 90% 以上, 而浓度为 3.0% 时, 持水性略低, 从第 14 d 开始达到约 90%, 这可能是渗透压差异导致的。整体而言, 添加低聚糖更能改善发酵乳品质, 且不一定要高浓度, 这对生产实践具有一定的指导意义, 添加适当浓度的低聚糖才有利于增强发酵乳持水性。发酵乳良好的持

水性主要是冷藏过程中, pH 值变低, 小分子肽和酪蛋白增加, 后者在酸性的环境下相互作用形成三维空间胶体结构, 包容更多的水分子, 从而提高了发酵乳的持水力<sup>[27,28]</sup>。

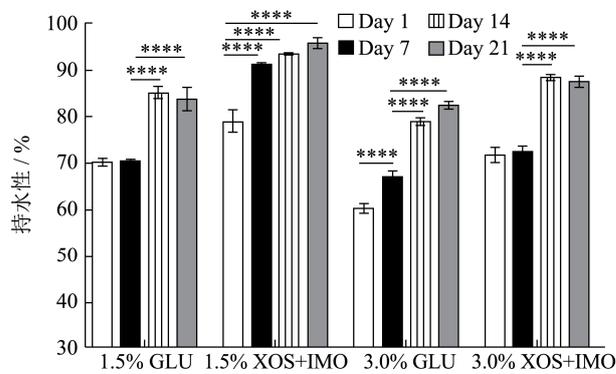


图 6 发酵乳在冷藏期间的持水性

Fig.6 Water holding capacity of fermented milk during refrigerated storage

注: GLU: 葡萄糖; XOS+IMO: 低聚木糖+低聚异麦芽糖。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ 。

### 2.5 冷藏期低聚糖发酵乳抗氧化活性变化

发酵乳具有多种益生特性, 抗氧化活性是发酵乳的一项重要功能, 决定其货架期和品质。图 7 为添加了功能低聚糖的植物乳杆菌发酵乳在冷藏期的抗氧化活性变化。添加不同浓度低聚糖组合物及对照组的发酵乳在冷藏期 DPPH 自由基清除率均高于 60%, 尤其是第 7 d 均达到最高 90% 左右 (图 7a)。类似的 ABTS<sup>+</sup> 自由基清除率也从第 7 d 开始, 由 70%~80% 下降到 40%~50% (图 7b;  $p < 0.0001$ )。这些结果与 Habibi Najafi 等<sup>[29]</sup>观察到含有菊粉和小麦纤维的发酵乳在冷藏期自由基清除率下降, 以及李思宁等<sup>[30]</sup>在发酵乳冷藏期发现的 DPPH 自由基清除率的变化趋势相似。这可能是由于冷藏期具有清除这些自由基的生物活性肽发生水解和裂解导致的<sup>[29]</sup>。另外, 同等碳源浓度条件下, 添加低聚糖的发酵乳自由基清除能力强于添加葡萄糖的发酵乳 ( $p < 0.05$ ), 这可能与低聚糖能改善植物乳杆菌在发酵乳中的浓度和代谢产物的活性有关<sup>[10,31,32]</sup>, 也可能与低聚木糖本身的抗氧化活性相关<sup>[15]</sup>。不同于 DPPH 自由基和 ABTS<sup>+</sup> 自由基清除能力的变化, 冷藏期发酵乳清除羟自由基的能力持续下降 (图 7c;  $p < 0.0001$ )。相同质量浓度的碳源条件下, 添加低聚糖组合物的羟自由基的清除能力整体好于葡萄糖, 尤其是浓度为 3.0% 时的第 1 d 和第 7 d; 而浓度为 1.5% 时, 添加低聚糖组合物的发酵乳冷藏两周后的羟自由基清除能力依然能维持 70% 左右, 说明发酵乳中添加适量的功能低聚糖, 有

利于增强其抗氧化活性<sup>[30,33]</sup>。

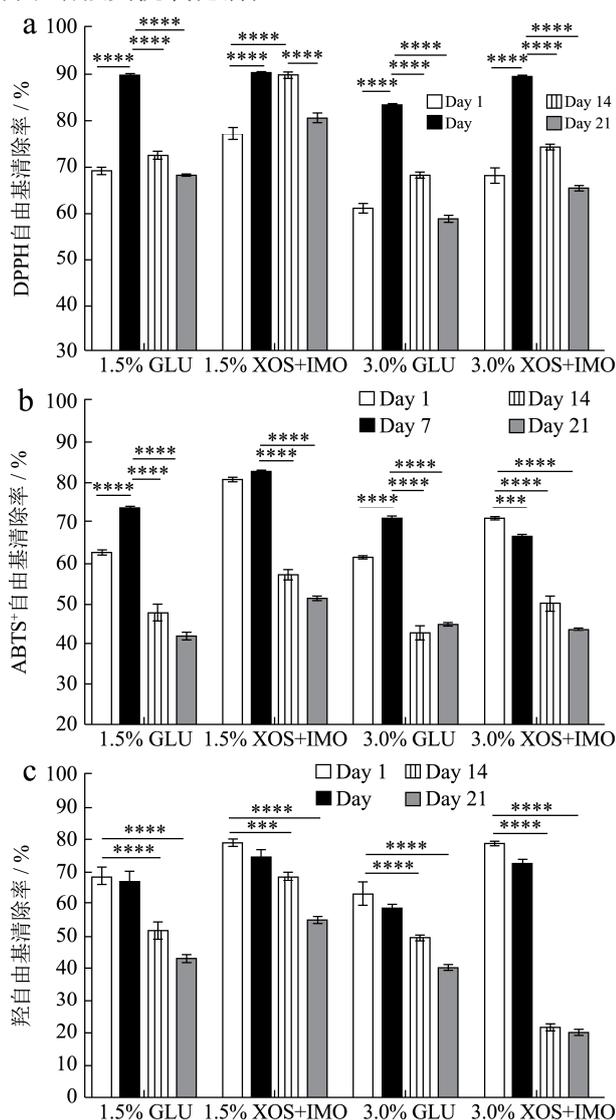


图7 发酵乳在冷藏期间的抗氧化活性

Fig.7 Antioxidant activity of fermented milk during refrigerated storage

注: a: DPPH 自由基清除率; b: ABTS<sup>+</sup> 自由基清除率; c: 羟自由基清除率; GLU: 葡萄糖; XOS+IMO: 低聚木糖+低聚异麦芽糖。\**p*<0.05, \*\**p*<0.01, \*\*\**p*<0.001, \*\*\*\**p*<0.0001。

### 2.6 冷藏期低聚糖发酵乳蛋白水解活性变化

乳酸菌在发酵牛乳期间,分泌的胞外蛋白水解酶会水解牛乳蛋白,释放游离氨基酸和小分子的肽,而结构稳定的抗氧化肽能发挥抗氧化活性<sup>[34]</sup>。测定添加功能低聚糖的植物乳杆菌发酵乳在冷藏期的蛋白水解活性可间接反映其抗氧化活性。实验结果如图8所示,随着冷藏时间延长,不同处理组的发酵乳蛋白水解活性持续增强,其在第14和21d与第1d有显著性差异(*p*<0.0001),推测其释放了更多的游离氨基和肽。冷藏期间,添加1.5%或3.0%低聚糖组合物

的发酵乳的蛋白水解活性均高于含相同浓度葡萄糖的发酵乳,且在相同时间点,添加1.5%低聚糖组合物的发酵乳的水解活性最高,这些结果与图7抗氧化能力更强结论一致。

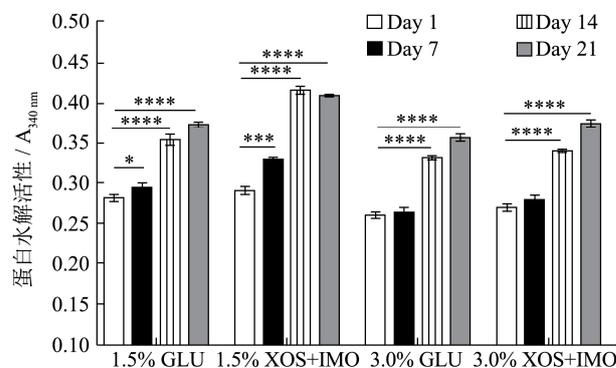


图8 发酵乳在冷藏期间的蛋白水解活性

Fig.8 Proteolytic activity of fermented milk during refrigerated storage

注: GLU: 葡萄糖; XOS+IMO: 低聚木糖+低聚异麦芽糖。\**p*<0.05, \*\**p*<0.01, \*\*\**p*<0.001, \*\*\*\**p*<0.0001。

### 3 结论

植物乳杆菌 ZDY2013 发酵乳具有预防乳品被杂菌污染和恢复由产肠毒素蜡样芽孢杆菌引起肠道稳态紊乱的功能。本文选用该菌能利用的低聚木糖、低聚异麦芽糖作为益生元添加在乳品中进行植物乳杆菌 ZDY2013 发酵,分析其对发酵乳活菌数和 pH 值的影响,并评价发酵乳在 4 °C 冷藏期活菌数、pH 值、持水性、以及抗氧化活性的变化特点。结果表明,添加低聚木糖和低聚异麦芽糖组合物的发酵乳能显著改善植物乳杆菌的活菌数,维持菌株生存的较好环境,提高其品质,增强其货架期内抗氧化活性。本研究为具有益生元特性的功能低聚糖在发酵乳中的应用,及植物乳杆菌 ZDY2013 的功能深度开发奠定基础。

### 参考文献

[1] Hutkins R W, Savaiano D A. Yogurt, cultured fermented milk, and health: a systematic review [J]. Nutrition Reviews, 2021, 79(5): 599-614

[2] Companys J, Pedret A, Valls R M, et al. Fermented dairy foods rich in probiotics and cardiometabolic risk factors: a narrative review from prospective cohort studies [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2020, 61(12): 1-10

[3] Yan S, Yang B, Ross R P, et al. *Bifidobacterium longum* subsp. Longum YS108R fermented milk alleviates DSS

- induced colitis via anti-inflammation, mucosal barrier maintenance and gut microbiota modulation [J]. *Journal of Functional Foods*, 2020, 73: 104153
- [4] Alihosseini N, Moahboob S, Farrin N, et al. Effect of probiotic fermented milk (kefir) on serum level of insulin and homocysteine in type 2 diabetes patients [J]. *Acta Endocrinologica-Bucharest*, 2017, 13(4): 431-436
- [5] Huang R, Tao X, Wan C, et al. *In vitro* probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum* ZDY 2013 and its modulatory effect on gut microbiota of mice [J]. *Journal of Dairy Science*, 2015, 98(9): 5850-5861
- [6] Zhang Z, Tao X, Shah N P, et al. Antagonistics against pathogenic *Bacillus cereus* in milk fermentation by *Lactobacillus plantarum* ZDY2013 and its anti-adhesion effect on Caco-2 cells against pathogens [J]. *Journal of Dairy Science*, 2016, 99(4): 2666-2674
- [7] Zhang Z, Jin M, Wang K, et al. Short-term intake of *Lactiplantibacillus plantarum* ZDY2013 fermented milk promotes homeostasis of gut microbiota under enterotoxigenic *Bacillus cereus* challenge [J]. *Food Funct*, 2021, 12(11): 5118-5129
- [8] Coman M M, Verdenelli M C, Cecchini C, et al. Effect of buckwheat flour and oat bran on growth and cell viability of the probiotic strains *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501<sup>®</sup>, *Lactobacillus paracasei* IMC 502<sup>®</sup> and their combination SYN BIO<sup>®</sup>, in synbiotic fermented milk [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 167(2): 261-268
- [9] Shafi A, Naeem Raja H, Farooq U, et al. Antimicrobial and antidiabetic potential of synbiotic fermented milk: a functional dairy product [J]. *International Journal of Dairy Technology*, 2019, 72(1): 15-22
- [10] Oh N S, Lee J Y, Oh S, et al. Improved functionality of fermented milk is mediated by the synbiotic interaction between *Cudrania tricuspidata* leaf extract and *Lactobacillus gasseri* strains [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(13): 5919-5932
- [11] Madhu A N, Amrutha N, Prapulla S G. Characterization and antioxidant property of probiotic and synbiotic yogurts [J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2012, 4(2): 90-97
- [12] Fernandez M A, Marette A. Potential health benefits of combining yogurt and fruits based on their probiotic and prebiotic properties [J]. *Advances in Nutrition*, 2017, 8(1): 155S-164S
- [13] 虞姣姣, 马亚芳, 温德兰, 等. 不同质量浓度低聚果糖和低聚半乳糖对发酵乳品质的影响 [J]. *食品科学*, 2015, 36(7): 86-90
- YU Jiaojiao, MA Yafang, WEN Delan, et al. Effects of fructooligosaccharide and galactooligosaccharide at different concentrations on the quality of fermented milk [J]. *Food Science*, 2015, 36(7): 86-90
- [14] Benzie I F F. Evolution of dietary antioxidants [J]. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2003, 136(1): 113-126
- [15] Valls C, Pastor F I J, Vidal T, et al. Antioxidant activity of xylooligosaccharides produced from glucuronoxylan by Xyn10A and Xyn30D xylanases and eucalyptus autohydrolysates [J]. *Carbohydr Polym*, 2018, 194: 43-50
- [16] Khat-Udomkiri N, Toeijing P, Sirilun S, et al. Antihyperglycemic effect of rice husk derived xylooligosaccharides in high-fat diet and low-dose streptozotocin-induced type 2 diabetic rat model [J]. *Food Science & Nutrition* 2020, 8(1): 428-444
- [17] Zhang L, Gu X, Wang J, et al. Effects of dietary isomaltooligosaccharide levels on the gut microbiota, immune function of sows, and the diarrhea rate of their offspring [J]. *Front Microbiol*, 2020, 11: 588986
- [18] 张雪, 张震, 连伟帅, 等. 多种酶复合水解作用改善鹰嘴豆发酵乳的品质 [J]. *现代食品科技*, 2020, 36(9): 88-95
- ZHANG Xue, ZHANG Zheng, LIAN Weishuai, et al. Multiple enzyme hydrolysis improved the quality of fermented chickpea milk [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2020, 36(9): 88-95
- [19] Li W, Hosseinian F S, Tsopmo A, et al. Evaluation of antioxidant capacity and aroma quality of breast milk [J]. *Nutrition*, 2009, 25(1): 105-114
- [20] Perna A, Intaglietta I, Simonetti A, et al. Donkey milk for manufacture of novel functional fermented beverages [J]. *Journal of Food Science* 2015, 80(6): S1352-S1359
- [21] Chen Q, Kong B, Sun Q, et al. Antioxidant potential of a unique LAB culture isolated from Harbin dry sausage: *in vitro* and in a sausage model [J]. *Meat Sci*, 2015, 110: 180-188
- [22] Church F C, Swaisgood H E, Porter D H, et al. Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins [J]. *Journal of Dairy Science*, 1983, 66(6): 1219-1227
- [23] Peng L, Zhao K, Chen S, et al. Whole genome and acid stress comparative transcriptome analysis of

- Lactiplantibacillus plantarum* ZDY2013 [J]. Archives of Microbiology, 2021, 203(6): 2795-2807
- [24] 王凌,谭莎莎,宋蓉,等.复配魔芋寡糖/低聚异麦芽糖增殖嗜酸乳杆菌的协同增效研究[J].现代食品科技,2015, 31(10):151-155  
WANG Ling, TAN Shasha, SONG Rong, et al. Synergistic effect of konjac oligosaccharides/isomalto-oligosaccharide complex on the growth of *Lactobacillus acidophilus* [J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(10): 151-155
- [25] 玛丽娜·库尔曼,巩燕妮,包洪涛,等.降胆固醇乳酸菌的筛选及其益生元干预生长作用分析[J].现代食品科技,2020, 36(4):164-171  
Malina Kuerman, GONG Yaini, BAO Hongtao, et al. Screening of cholesterol-lowering lactic acid bacteria and the effects of prebiotics on their growth [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(4): 164-171
- [26] 刘艳玲,张媛,赵丽娜,等.抗酸乳后酸化的研究进展[J].食品科技,2018,43(9):104-108  
LIU Yanling, ZHANG Yuan, ZHAO Lina, et al. Research progress on postacidification of yogurt [J]. Food Science and Technology, 2018, 43(9): 104-108
- [27] Wang W, Bao Y, Hendricks G M, et al. Consistency, microstructure and probiotic survivability of goats' milk yoghurt using polymerized whey protein as a co-thickening agent [J]. International Dairy Journal, 2012, 24(2): 113-119
- [28] Wang H, Wang C, Wang M, et al. Chemical, physicochemical, and microstructural properties, and probiotic survivability of fermented goat milk using polymerized whey protein and starter culture kefir mild 01 [J]. Journal of Food Science, 2017, 82(11): 2650-2658
- [29] Habibi Najafi M B, Fatemizadeh S S, Tavakoli M. Release of proteolysis products with ACE-inhibitory and antioxidant activities in probiotic yogurt containing different levels of fat and prebiotics [J]. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2018, 25(1): 367-377
- [30] 李思宁,唐善虎,任然.动物双歧杆菌、植物乳杆菌与传统发酵剂共培养对发酵乳抗氧化特性的影响[J/OL].食品科学:1-9[2021-09-10].<http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20200924.1352.006.html>.  
LI Sining, TANG Shanhu, REN Ran. Effects of *Bifidobacterium animalis* and *Lactobacillus plantarum* in co-culture with traditional starters on antioxidant property of fermented milk [J]. Food Science: 1-9[2021-09-10]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20200924.1352.006.html>.
- [31] Kariyawasam K, Yang S J, Lee N K, et al. Probiotic properties of *Lactobacillus brevis* KU200019 and synergistic activity with fructooligosaccharides in antagonistic activity against foodborne pathogens [J]. Food Sci Anim Resour, 2020, 40(2): 297-310
- [32] Oh N S, Lee J Y, Kim Y. The growth kinetics and metabolic and antioxidant activities of the functional synbiotic combination of *Lactobacillus gasseri* 505 and *Cudrania tricuspidata* leaf extract [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(23): 10095-10106
- [33] Sah B N, Vasiljevic T, Mckechnie S, et al. Effect of refrigerated storage on probiotic viability and the production and stability of antimutagenic and antioxidant peptides in yogurt supplemented with pineapple peel [J]. Journal of Dairy Science 2015, 98(9): 5905-5916
- [34] Christensen J E, Dudley E G, Pederson J A, et al. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 1999, 76(1-4): 217-246