

具有蛋白水解特性的酵母菌改善 商业发酵剂发酵乳特性

李盘盘, 马凤莲, 孙梦莹, 妥彦峰*

(大连工业大学食品学院, 辽宁大连 116034)

摘要: 从新疆传统发酵乳中筛选出具有蛋白水解活性的酵母菌, 对其发酵乳进行蛋白水解和体外自由基清除活力测定; 并与商业酸奶发酵剂(保加利亚乳杆菌 CICC6047 和嗜热链球菌 CICC6038)复配, 研究其在发酵以及冷藏过程中发酵剂活力、蛋白水解、质构变化、酸化能力和体外自由基清除活力的影响。结果发现, 菌株 0807-39 具有较高的蛋白水解活性, 亮氨酸含量达到 0.34 mg/mL, 显著高于其他菌株 ($P<0.05$); 其发酵乳具有较高的 ABTS 和 DPPH 自由基清除率, 分别为 68.13% 和 74.24%; 菌株 0807-39 不产生有害生物胺, 对抗生素耐药敏感, 且不具备溶血性, 是安全性菌株; 经过 26S rDNA 测序, 鉴定为马克思克鲁维酵母菌 (*K. marxianus* DPUL-F15)。 *K. marxianus* DPUL-F15 增加了发酵过程中乳酸菌活菌数量、乳蛋白的水解; 在冷藏过程中, *K. marxianus* DPUL-F15 显著促进发酵乳中 α -酪蛋白和 β -酪蛋白的降解 ($P<0.05$), 分别降低了 0.24 mg/mL 和 1.23 mg/mL; 发酵乳中游离氨基酸的含量增加了 0.1 mg/mL; 加速了发酵乳后酸化, 冷藏 21 d 时酸度达到 120.56 T $^{\circ}$; 冷藏 14 d 时, 有最高 ABTS 和 DPPH 自由基清除活性, 分别为 68.87% 和 71.1%; 同时对质构特性有一定影响。因此, *K. marxianus* DPUL-F15 具有作为一株附属发酵剂的潜力, 提高发酵乳的蛋白水解。

关键词: 蛋白水解; 马克思克鲁维; 菌株活力; 质构特性; 酸化能力; 自由基清除

文章编号: 1673-9078(2023)04-71-80

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.4.0604

Yeasts with Proteolytic Properties Improve the Fermented Milk Properties of Commercial Starters

LI Panpan, MA Fenglian, SUN Mengying, TUO Yanfeng*

(School of Food Science and Technology, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China)

Abstract: A yeast strain with proteolytic activity was screened from traditional fermented milk from Xinjiang and its proteolytic activity and *in vitro* free radical scavenging activity determined before combination with the commercial yogurt starter (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. CICC6047 and *Streptococcus thermophilus* CICC6038) for study of the starter activity, proteolysis, texture change, acidification ability, and *in vitro* free radical scavenging activity during fermentation and cold storage. The results showed the highest proteolytic activity for strain 0807-39, which had a significantly higher leucine content than other strains at 0.34 mg/mL ($P<0.05$), with free radical scavenging rates of 68.13% and 74.24% obtained for ABTS and DPPH, respectively. Strain 0807-39, which was not associated with any harmful biogenic amines, was found sensitive to antibiotic resistance and did not show hemolysis, indicating that the strain is safe. Identification by 26S rDNA sequencing indicated the strain as *K. marxianus*, and it was found to promote the number of live lactic acid bacteria and increase the hydrolysis of milk protein during fermentation. During cold storage, *K. marxianus* DPUL-F15 significantly promoted the degradation of α -casein and β -casein in fermented milk ($P<0.05$), which decreased by 0.24 mg/mL and 1.23 mg/mL respectively. The content of free amino acids in the fermented milk increased by 0.1 mg/mL. The post-acidification of fermented milk was accelerated, with acidity reaching 120.56 T $^{\circ}$ after 21 days in storage, and

引文格式:

李盘盘,马凤莲,孙梦莹,等.具有蛋白水解特性的酵母菌改善商业发酵剂发酵乳特性[J].现代食品科技,2023,39(4):71-80.

LI Panpan, MA Fenglian, SUN Mengying, et al. Yeasts with proteolytic properties improve the fermented milk properties of commercial starters [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(4): 71-80.

收稿日期: 2022-05-13

基金项目: 兵团重大科技项目 (2018AA009-02)

作者简介: 李盘盘 (1995-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 乳与乳制品, E-mail: 1293318974@qq.com

通讯作者: 妥彦峰 (1977-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 乳品科学与技术, E-mail: tuoyf@dlpu.edu.cn

the highest scavenging activities of 68.87% and 71.1% were observed for ABTS and DPPH free radicals, respectively, after 14 days in cold storage. The strain was also found to influence the texture characteristics. The results indicate that *K. marxianus* DPUL-F15 has the potential to be used as an auxiliary starter that can improve proteolysis in fermented milk.

Key words: proteolysis; *K. marxianus*; strain activity; texture characteristic; acidification ability; free radical scavenging

原料乳经过特定发酵剂的发酵,不但提升了原料的生物利用度,而且发酵会产生一些的生物活性代谢物,如某些维生素、生物活性肽、胞外多糖、短链脂肪酸和具有功能特性的微量氨基酸,这些营养和活性物质对人体健康起到关键作用^[1]。牛奶发酵涉及许多代谢途径,特别是原料乳中的大分子乳蛋白在特定发酵剂水解酶系统的作用下会产生生物活性肽,而奶制品的抗氧化能力归结于这些活性肽^[2]。抗氧化活性的增加归因于水溶性肽的产生且抗氧化活性与蛋白水解程度相关^[3,4]。Cui 等^[5]发现 *Lactobacillus reuteri* WQ-Y1 的酪蛋白和乳清蛋白水解物具有潜在的抗氧化活性,其产生的乳源肽具有清除 DPPH 和 ABTS 自由基的能力。

大多数发酵乳发酵剂以乳酸菌为主,例如,乳球菌、乳杆菌和明串珠菌等。乳酸菌具有较好的蛋白水解系统,它将蛋白质水解成为小分子的氨基酸与生物活性多肽等物质从而提高发酵乳功能特性;同时,乳酸菌所含有丰富的乳糖酶可以将原料乳中的乳糖代谢为葡萄糖、半乳糖、乳酸等提升发酵乳的吸收特性。然而,传统发酵乳中除了以乳酸菌发酵剂,还以酵母菌为附属发酵剂。大量的研究表明,一些酵母菌具有产生 β -半乳糖苷酶的能力,可以将原料乳中的乳糖进行转化,在与乳酸菌协同的作用下,能够提高乳糖的分解量,减少发酵所需时间^[6];同时,一些酵母菌也具有产生生物活性多肽的能力。Chavse 等^[7]从传统的哥伦比亚发酵乳中分离出具有在牛奶发酵过程中产生生物活性肽潜力的酵母菌株。一些具有蛋白水解活性的酵母在发酵乳中活性肽的产生中也起到重要的协同作用^[8]。有研究发现,乳酸菌与酵母共同培养后,其抗氧化活性增强,且所有发酵乳都具有较好的质地和芳香特性,并具有良好的口感^[9]。Ahtesh 等^[10]发现马克斯克鲁维酵母 LAF4 与益生菌按一定比例复配,在 37 °C 下发酵 12 h,蛋白水解率较高并能产生较多血管紧张素转换酶抑制肽。本研究拟从传统新疆发酵乳中筛选具有蛋白水解活性的酵母菌株,对其进行蛋白水解活性和体外自由基清除活力测定;通过与商业发酵剂复配,研究其在发酵以及冷藏过程中发酵剂活力、蛋白水解、质构变化、酸化能力和体外自由基清除活力的影响,从而探究具有蛋白水解活性的酵母菌对发酵乳发酵特性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

保加利亚乳杆菌 (*L. bulgaricus* subsp. CICC6047) 和嗜热链球菌 (*S. thermophilus* CICC6038), 为大连工业大学大连市益生菌功能研究重点实验室保藏菌株; 10 株酵母菌菌株, 分离于新疆传统发酵乳制品中(发酵牛乳和奶酪); 脱脂乳粉, 来自于三元乳业; DPPH、ABTS、硫酸亚铁、邻二氮菲, 美国 SIGMA 公司; MRS 培养基、MC 培养基、YPD 培养基, 天津市大茂化学试剂厂; PBS, 美国 Gibco 公司; 邻苯二甲酸(OPA), 天津市瑞金特化学品有限公司; N,N-二甲基甲酰胺、丙烯酰胺, 上海阿拉丁生化科技有限公司; 三羟甲基甲烷、盐酸胍、四硼酸钠, 上海阿拉丁生化科技有限公司。

1.2 仪器与设备

MLS-3751L-PC 型高压蒸汽灭菌锅, 日本松下公司; SW-CJ-1FD 型超净工作台, 苏州安泰公司; HWS24 型电热恒温水浴锅, 上海一恒有限公司; pH 计, Mettler Toledo 有限公司; SpectraMax M2e 型多功能酶标仪, 美国 MD 公司; DYY-6D 型电泳仪, 北京六一有限公司; GDS-8000 型凝胶成像仪, 美国 UVP 公司; 安捷伦色谱分析仪, 安捷伦生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 菌株培养与活化

将保藏于-80 °C 的酵母菌菌株连续活化 3 代至菌株活性稳定。然后在 4 °C、3 500 r/min 的条件下离心 10 min 收集菌体, 经 PBS 洗涤 2 次, 重悬于灭菌脱脂乳中, 调整菌浓度为 1×10^7 CFU/mL 备用。将重悬有菌株的脱脂乳以 4% (V/V) 的比例接种到脱脂乳培养基中 37 °C 培养, 直至凝乳, 并在脱脂乳培养基中活化 2~3 代备用。

1.3.2 脱脂乳发酵

称取 12% 的脱脂乳粉加入 88 mL 去离子水均匀混合, 105 °C 灭菌 15 min, 静置冷却备用。将活化的发酵乳按 4% 接种量接种于灭菌后的 12% 的脱脂乳, 37 °C 发酵 24 h。

1.3.3 酵母菌发酵乳的体外自由基清除活性

将发酵完成的发酵乳室温下混匀 30 min。调整发酵乳 pH 值为 4.6, 3 500 r/min 离心 10 min (4 °C), 收集上清液; 调节 pH 值为 7.0 再次离心过 0.45 μm 滤膜, 获得乳清样品冷藏至 -80 °C 备用。采用 Jang 等^[11]所描述的实验方法, 测定 DPPH 和 ABTS⁺ 自由基清除能力; 参考 Chen 等^[12]所描述的实验方法, 对清除羟自由基活性进行测定。

1.3.4 发酵乳蛋白水解活性的测定

取 3 mL 发酵乳样品, 加入 3 mL $m=12\%$ TCA, 3 500 r/min 离心 30 min, 去沉淀, 上清液过滤, 保存。样品蛋白水解活性的测定使用 (邻苯二甲醛) OPA 法, 参考 Yue 等^[13]描述的方法进行测定。

1.3.5 菌株安全性及其菌株鉴定

1.3.5.1 抗生素耐药性

采用药敏纸片法对酵母菌的抗生素敏感性进行测定。将活化两代的菌株离心 (4 °C, 3 500 r/min) 弃去上清液, PBS 洗涤 2 次, 重悬于 $m=0.85\%$ 的生理盐水中并调整菌浓度为 1×10^7 CFU/mL。取 100 μL 菌悬液于 15 mL YPD 培养基中, 混合均匀后倾注到培养皿中, 静置冷却后取药敏纸片 (氟康唑, 克霉素, 两性霉素 B, 伊曲康唑, 酮康唑, 益康唑, 咪康唑) 贴于表面, 静置 5 min 后翻转平皿, 37 °C 恒温培养, 24 h 后用刻度尺量取抑菌圈直径。

1.3.5.2 溶血性

将酵母菌菌株接种到含有 2% (V/V) 的羊血的哥伦比亚固体培养基上, 在 37 °C 培养 48 h。阳性对照组为单增李斯特菌阴性, 空白组为鼠李糖杆菌, 观察平板是否存在溶血现象。

1.3.5.3 生物胺

菌株生物胺的测定参照 GB 5009.208-2016《食品安全国家标准食品中生物胺的测定》。

样品前处理: 在菌株培养基中加入 $m=0.005\%$ 吡哆醛-5-磷酸和 $m=0.2\%$ 的 7 种前体氨基酸 (精氨酸、赖氨酸、酪氨酸、鸟氨酸、组氨酸、苯丙氨酸和色氨酸)。将菌株在培养基活化五次。然后将活化的菌株接种到脱羧酶培养基中培养 4 d, 然后取菌株培养液, 10 000 r/min 离心 30 min, 除去菌体并过 0.22 μm 滤膜, 备用。

1.3.5.4 菌株鉴定

取分离纯化后的单独菌落涂片并进行结晶紫染色, 使用显微镜观察基本菌株形态, 大致确认其为酵母菌。通过对 26S rDNA 进行测序和扩增。扩增片段的测序是在上海美吉生物制药技术公司进行的, 并对序列进行了 BLAST 工具分析, 并与 GenBank 数据库

中的序列进行了比较。

1.3.6 酵母菌对发酵乳菌株活力、蛋白水解、酸化能力以及体外自由基清除活力的测定

1.3.6.1 发酵乳的制备

商业发酵剂和酵母菌按 10:1 的比例, 接种量为 3% (体积分数) 接种, 37 °C 进行发酵。同时制备商业发酵剂发酵乳 (保加利亚乳杆菌:嗜热链球菌=1:1, 接种量 3% (体积分数), 发酵温度 37 °C)。发酵过程中每 1 h 取样一次至凝乳完全。之后冷藏于 -4 °C 冰箱后熟 21 d, 每隔 7 d 取样备用。

1.3.6.2 菌落计数和质构分析

取 1 mL 的样品接到 9 mL 的无菌的生理盐水中, 进行梯度稀释 (10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7})。取 1 mL 稀释液接种于 MC 培养基、MRS 培养基、YPD 培养基对发酵乳中菌种进行计数。以活菌数来表示酵母菌与乳酸菌间的相互作用。参考范维等^[14]的方法, 使用质构仪对冷藏期间的发酵乳质构特性进行测定。

1.3.6.3 酵母菌对发酵乳发酵过程中蛋白水解, 酸化能力的影响

使用 OPA 法和 pH 计对发酵乳进行蛋白水解活性和酸化能力测定。使用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。根据蛋白浓度将样品使用 PBS 适当稀释, 取稀释样品 50 μL 加入 50 μL 的 5×上样缓冲溶液均匀混合, 并沸水浴 1 min。使用 15% (m/V) 分离胶和 5% 的浓缩胶进行 SDS-PAGE 电泳。电泳结束后, 使用考马斯蓝染液进行染色 2 h。然后使用脱色液脱色。通过 Image J 软件对蛋白条带进行扫描和定量。

1.3.6.4 酵母菌对发酵储藏过程中蛋白的影响

样品和标准溶液制备: 试剂 A: 0.1 mol/L 三羟甲基甲烷、6 mol/L 盐酸胍、19.5 mmol/L 二硫苏糖醇和 5.37 mmol/L 柠檬酸钠 4 种溶液按 1:1 配置。试剂 B: 4.5 mol/L 盐酸胍溶液和 0.1% 三氟乙酸水溶液。分别称取适量标准品或样品, 加入 2 mL 试剂 A 混匀, 缓慢摇动避免产生气泡, 室温孵育 1 h, 离心 5 min。然后加入 6 mL 试剂 B 稀释, 混匀, 用 0.22 μm 滤膜过滤。

色谱条件: Agilent Zorbax 300sB-C 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: A 相为 0.1% TFA-水溶液, B 相 0.1% TFA-乙腈溶液; 流速: 1.2 mL/min; 柱温: 室温; 检测波长: 220 nm。

1.3.6.5 发酵乳体外自由基清除活力测定

具体方法参考 1.3.3。

1.3.7 数据分析

利用 SPSS 20.0 对实验结果进行相关的统计学分析。在 95% 水平用 ANOVA 分析方法进行数据显著性分析, $P < 0.05$ 表示差异显著。

表 1 酵母发酵脱脂乳的自由基清除活性以及蛋白水解活性

Table 1 Antioxidant activity and proteolytic activity of fermented milk by yeast

菌株	羟自由基清除率/%	ABTS ⁺ 自由基清除率/%	DPPH 自由基清除率/%	亮氨酸质量浓度/(mg/mL)
0807-50	23.17±0.29 ^{de}	65.21±1.64 ^a	58.18±1.10 ^d	0.25±0.03 ^{bcd}
0807-39	42.26±0.43 ^{ab}	68.13±1.96 ^{ab}	74.24±0.67 ^a	0.34±0.09 ^a
27-65	32.69±2.04 ^{bcd}	48.07±0.31 ^{de}	62.21±0.59 ^c	0.14±0.012 ^{de}
27-78	47.04±0.65 ^a	61.87±1.28 ^c	53.99±1.11 ^e	0.20±0.09 ^{bcd}
30-4	31.63±1.81 ^f	63.89±2.60 ^{bc}	74.05±0.33 ^a	0.29±0.03 ^{bc}
0803-98	11.72±1.33 ^g	47.97±1.09 ^{de}	53.65±0.42 ^e	0.12±0.05 ^{ef}
0807-6	23.79±1.10 ^{def}	51.94±4.93 ^d	46.22±0.88 ^{fg}	0.10±0.01 ^{ef}
0811-9	45.70±3.16 ^a	42.71±1.24 ^{ef}	56.32±1.43 ^{de}	0.18±0.04 ^{cde}
0807-37	33.45±2.97 ^{bcd}	40.56±2.66 ^f	48.62±0.94 ^f	0.31±0.08 ^b
0807-12	38.95±1.45 ^{abc}	46.44±2.84 ^{def}	45.18±1.42 ^g	0.28±0.12 ^{bc}

注：表中小写字母表示组内显著差异 ($P<0.05$)，表 2、4 同。

2 结果与分析

2.1 酵母菌发酵乳的蛋白水解和体外自由基清除活性

如表 1 所示，所有酵母菌发酵乳都具备清除自由基的能力；且不同酵母菌发酵乳中游离氨基酸的含量具有差异，这与不同菌株水解蛋白的能力不同有关。酵母菌菌株 0807-39 的发酵乳亮氨酸质量浓度，达到 0.34 mg/mL，显著高于其他菌株 ($P<0.05$)；且酵母菌菌株 0807-39 的发酵乳 ABTS⁺ 自由基清除率和 DPPH 自由基清除率，分别为 68.13% 和 74.24%，显著高于其他菌株 ($P<0.05$)，也具有较高的羟自由基清除率，达到 42.26%。菌株 0807-39 在复原脱脂乳中具有高于其他菌株的水解蛋白能力、其发酵乳具有较高自由基清除能力。研究发现，具有蛋白水解活性的马克思克鲁维酵母菌发酵乳铁蛋白能产生具有抗高血压活性的多肽，大鼠口服多肽抑制了血管紧张素转换酶活性，并能有效降低收缩压^[15]。因此，酵母菌菌株 0807-39 可能具有发酵牛乳产生功能性多肽的潜在能力。

2.2. 菌株安全性评价

进一步对菌株 0807-39 的安全性进行研究。参照美国临床实验室标准委员会 (NCCLS) 提供的 MIC 判度标准对酵母菌菌株 0807-39 抗生素敏感性进行判定^[16]。表 2 显示酵母菌菌株 0807-39 对咪康唑，伊曲康唑和酮康唑均表现出敏感性，而对氟康唑具有抗性。Liu 等^[17]通过抗生素敏感性实验发现 984 个酵母菌分离株中有 374 个 (38%) 显示对氟康唑中度敏感或耐药。

表 2 酵母菌菌株 0807-39 抗生素敏感性

Table 2 Antibiotic sensitivity of yeast 0807-39

抗生素种类	含量/ μg	抑制圈直径/mm	敏感性
氟康唑	25	4.76±0.31 ^b	R
克霉素	15	21.16±0.34 ^c	S
两性 B	25	9.50±0.92 ^a	I
伊曲康唑	8	29.56±0.80 ^a	S
酮康唑	15	33.13±0.27 ^a	S
益康唑	10	40.86±1.06 ^a	S
咪康唑	10	28.60±0.68 ^a	S

注：R 表示无抗性；I 表示中等敏感性；S 表示具有敏感性。

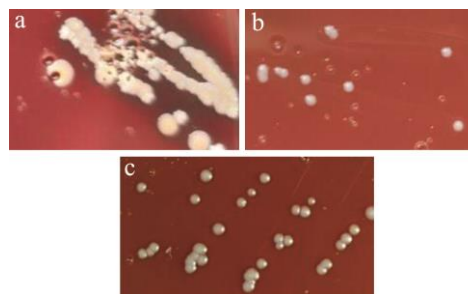


图 1 在含 5% 羊血的哥伦比亚肉汤培养基上生长的单增李斯特菌 (阳性对照)、鼠李糖乳杆菌 (阴性对照) 以及菌株 0807-39 的溶血活性

Fig.1 Hemolytic activity of listeria monocytogenes (positive control), LGG (negative control) and yeast strains 0807-39 grown on Columbia broth medium containing 5% sheep blood

注：a: 阳性对照；b: 阴性对照；c: 0807-39。放大倍数：1×

进一步对菌株 0807-39 的溶血性进行评价。图 1 中阳性对照显示了单增李斯特菌周围的透明无色区，而鼠李糖乳杆菌，酵母菌菌株 0807-39 在哥伦比亚琼脂上未产生透明区域，为 γ 溶血，表明它是非溶血性的。Majak 等^[18]发现来源于开菲尔的乳酸克鲁维酵母和单孢链霉菌均表现出较低的 α -溶血和蛋白水解活

性,且具有潜在的益生菌特征:胃肠液耐受、自聚集和疏水性;而 Youn 等^[19]发现开菲尔中的 *K. marxianus* A4 和 A5 都不具有溶血特性。

表 3 中列出了酵母菌菌株 0807-39 在含有前体氨

表 3 酵母菌菌株生物胺产量 (μg/mL)

菌株	色胺	苯乙胺	腐胺	尸胺	组胺	酪胺	亚精胺	精胺	总胺
0807-39	5.73±0.21	ND	ND	ND	ND	1.32±0.14	ND	ND	7.05

注: ND 表示未检测到。

2.3 菌株鉴定

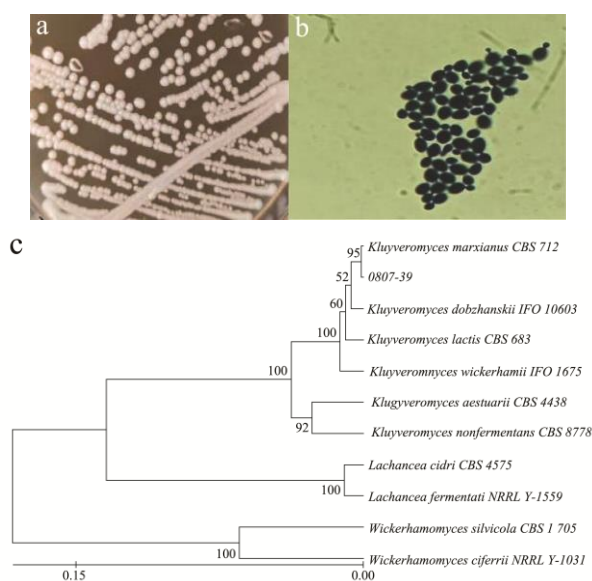


图 2 0807-39 菌落形态、细胞形态和系统发育树

Fig.2 0807-39 colony morphology, cell morphology and phylogenetic tree

注: a: 菌落形态,放大倍数 1×; b: 细胞形态,放大倍数 1000×; c: 系统发育树,显示了用 26S rDNA 基因序列推断出的菌株 0807-39 的相对位置。

对酵母菌菌株 0807-39 进行 26S rDNA 的扩增和测序。其菌落形态图 2a 和菌体形态图 2b 具有酵母菌的典型特征。从图 2c 可以看出,0807-39 的 26S rDNA 测序显示了与马克思克鲁维酵母的 95% 同源性(基于 NCBI 数据库)因此鉴定为为马克思克鲁维酵母菌。

综上所述,酵母菌菌株 0807-39 不产生有害生物胺,对抗生素耐药敏感,且不具备溶血性,是安全性菌株,且经过 26S rDNA 进行测序和扩增,鉴定为马克思克鲁维酵母菌。菌株 0807-39 命名为 *K. marxianus* DPUL-F15。

2.4 *K. marxianus*DPUL-F15 对发酵乳中菌株

活力和发酵乳质构的影响

基酸培养液中产生的生物胺含量,只检测到了色胺和酪胺。有研究指出食品中生物胺的总含量低于 100 mg/kg 时,不会危害人体健康^[20]。酵母菌菌株 0807-39 在培养液中产生的生物胺总量低于 100 mg/kg 认为是安全的。

进一步研究 *K. marxianus* DPUL-F15 与商业发酵剂 (*L. bulgaricus* subsp. CICC6047 和 *S. thermophilus* CICC6038),复配后在复原脱脂乳中的发酵性能。

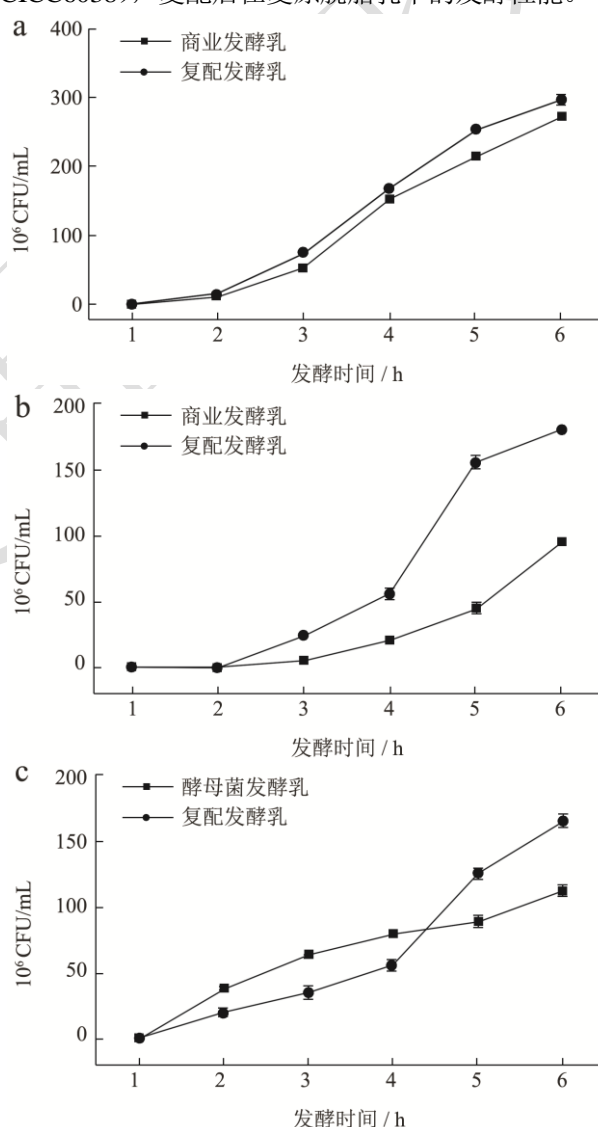


图 3 发酵乳发酵过程中活菌数变化

Fig.3 Bacterial colony changes during fermentation

注: a: 嗜热链球菌 (*S. thermophilus*); b: 保加利亚乳杆菌 (*L. bulgaricus*); c: 马克思克鲁维酵母 (*K. marxianus*)。

图 3 显示了发酵乳发酵过程中,*K. marxianus* DPUL-F15、*L. bulgaricus* subsp. CICC6047 和 *S. thermophilus*

CICC6038 在活菌数随时间变化的趋势。复原脱脂乳在发酵过程中, 3 种不同菌的活菌数均呈增加趋势。发酵过程中, 嗜热链球菌活菌数显著高于保加利亚杆菌活菌数, 且发酵 2 h 以后, 单独采用商业发酵剂发酵乳中两种乳酸菌的活菌数显著低于复配发酵剂发酵乳中乳酸菌活菌数。酵母菌的添加促进了乳酸菌的活菌数增加, 可能因为 *K. marxianus* 具有产生 β -半乳糖苷酶的能力^[21], 与乳酸菌联合发酵相互作用下, 它可以将发酵乳中的乳糖转化为半乳糖和葡萄糖等, 除了能提高乳糖的利用率, 其代谢产物也促进了乳酸菌活菌数的增加; 酵母菌具有的蛋白酶系, 可能代谢蛋白水解产生具有促进乳酸菌生长繁殖的小分子多肽和氨基酸^[22]。Sameh 等^[23]发现马克斯克鲁维酵母与 XPL-1 益生菌发酵剂共发酵时, 酵母菌显著促进了乳酸菌的生长, 其中嗜热链球菌活菌数达到 8.42~8.84 log CFU/mL, 马克斯克鲁维酵母活菌数达到 7.87 log CFU/mL, 同时产生了大量的醇、酮、酸和酯, 显著改善了豆乳的风味品质。与商业发酵剂相比, 复配发酵乳中的酵母菌活菌数在 3 h 之前呈缓慢趋势增加随后呈快速增加趋势。这种现象可能是由于营养需求、原料利用率和发酵剂的微生物的相互作用造成的^[23]。综上所述, 添加马克斯克鲁维酵母菌, 可以改善乳酸菌菌株的活力, 这离不

开菌株之间的相互作用以及菌种各自酶系的表达。

表 4 显示了不同发酵剂发酵乳在冷藏过程中不同菌种活菌数的变化。两种发酵乳在储藏期间, 乳酸菌活菌数均呈下降趋势。酵母菌的添加, 促进了乳酸菌活菌数的下降速率增加, 但活菌数仍高于国家标准 (10^6 CFU/mL)。可能由于乳酸菌在发酵后期由于营养物质的减少, 促使乳酸菌不能正常代谢生长或者死亡, 而 *K. marxianus* 可以利用半乳糖进行代谢生长, 或死亡的乳酸菌细胞破裂, 内容物流出从而提供了酵母菌的生长^[24]。这表明乳酸菌对酵母菌具有促进作用。

由表 5 可知, 冷藏过程中, 两种发酵乳质构特性持续下降, 但是复配发酵乳显著高于乳酸菌发酵乳 ($P<0.05$)。主要是因为 *K. marxianus* 在低温下仍然可以进行代谢, 通过分泌蛋白酶等, 联合乳酸菌降解蛋白破坏凝胶结构, 并产生 CO_2 , 使发酵乳质地下降。研究表明酵母菌在低温环境中, 仍具有一定的蛋白水解活性^[25]; 同时酵母菌在发酵和冷藏期间活菌数逐渐增加也增加了氧气的消耗, 促进了凝胶结构的增强。Sameh 等^[23]发现马克斯克鲁维酵母菌复配乳酸菌发酵豆乳后, 发酵乳具有最高的黏性值为 30.56, 高归黏性因子于潜在的益生菌生物的代谢活性, 有助于所生产的凝胶具有更高的塑性。

表 4 发酵乳冷藏过程中活菌数的变化

Table 4 Bacterial colony changes during cold storage

冷藏/d	商业发酵剂发酵乳		酵母菌复配发酵剂发酵乳		
	嗜热链球菌/ (10^6 CFU/mL)	保加利亚乳杆菌/ (10^6 CFU/mL)	嗜热链球菌/ (10^6 CFU/mL)	保加利亚乳杆菌/ (10^6 CFU/mL)	马克斯克鲁维酵母/ (10^5 CFU/mL)
1	298±5.00 ^a	235±3.20 ^a	295±11.20 ^a	178±5.50 ^a	120±6.50 ^d
7	265±6.20 ^b	210±10.50 ^b	280±12.20 ^{ab}	153±6.40 ^b	156±8.50 ^c
14	101±4.80 ^c	153±6.20 ^c	167±10.50 ^c	145±4.50 ^c	173±3.70 ^b
21	65±2.50 ^d	54.5±5.40 ^d	56±4.20 ^d	46.5±3.20 ^d	185±5.40 ^a

表 5 冷藏期间发酵乳质构变化

Table 5 Changes of texture of fermented milk during cold storage

冷藏 时间/d	硬度/g		粘性/g		黏性/g		咀嚼度/(g.sec)	
	复配发酵乳	商业发酵乳	复配发酵乳	商业发酵乳	复配发酵乳	商业发酵乳	复配发酵乳	商业发酵乳
1	130.34±3.55 ^{aA}	91.42±6.07 ^{abB}	219.41±4.30 ^{aA}	157.33±6.38 ^{abB}	67.94±1.17 ^{aA}	48.71±3.68 ^{abB}	90.68±4.21 ^{aA}	61.12±6.28 ^{abB}
7	130±5.03 ^{aA}	105±6.48 ^{abB}	219.16±2.49 ^{aA}	179.14±5.32 ^{abB}	59.79±3.65 ^{bA}	49.58±3.84 ^{abB}	79.13±5.86 ^{bA}	62.1±3.44 ^{abB}
14	117±14.05 ^{ba}	96.87±10.23 ^{abB}	167.71±7.94 ^{bA}	161.9±7.01 ^{bA}	40.64±2.89 ^{cb}	46.22±2.70 ^{aA}	56±8.92 ^{bB}	64.49±7.13 ^{aA}
21	105.26±6.33 ^{ba}	92.96±8.96 ^{abA}	172.47±2.17 ^{ba}	156.38±10.43 ^{abB}	42.12±5.85 ^{ca}	43.88±2.55 ^{ba}	62.41±4.53 ^{ca}	55.11±5.68 ^{bb}

注: 不同小写字母表示组内差异显著; 不同大写字母表示组间差异显著 ($P<0.05$)。

2.5 *K. marxianus* DPUL-F15 对发酵乳发酵过

程中蛋白水解、酸化能力的影响

乳酸菌和酵母菌所释放的蛋白酶可以将蛋白质降

解为小肽以及氨基酸。在后熟过程中, 通过测定游离氨基酸来评估蛋白的水解度。由图 4a 所示, 复配发酵乳和商业发酵乳在发酵过程中游离氨基的含量均呈增加趋势。发酵过程中, 复配发酵乳的亮氨酸含量显著高于商业发酵剂发酵乳 ($P<0.05$), 发酵终点亮氨酸

含量达到 0.52 mg/mL, 而商业发酵乳亮氨酸含量为 0.46 mg/mL。这主要因为在发酵的过程中, 乳酸菌具有强大的蛋白水解系统, 它将蛋白质水解成为小分子的氨基酸与生物活性多肽等物质; 另一方面, 具有蛋白水解活性的酵母菌在与乳酸菌的相互作用下增强了其蛋白水解系统, 使发酵乳可以产生更多的氨基酸以及多肽^[26]。有研究表明, 马克斯克鲁维酵母 SP-1 与益生菌复配发酵可以产生较多的游离氨基酸, 其中必需氨基酸和非必需氨基酸的含量分别为 113.86 和 125.03 mg/100 g^[23]。Fatah 等^[27]发现马克斯克鲁维酵母菌 LAF4 与与益生菌联合作用时, 37 °C 发酵下发酵乳产生多肽活性最高, 达到 60%。

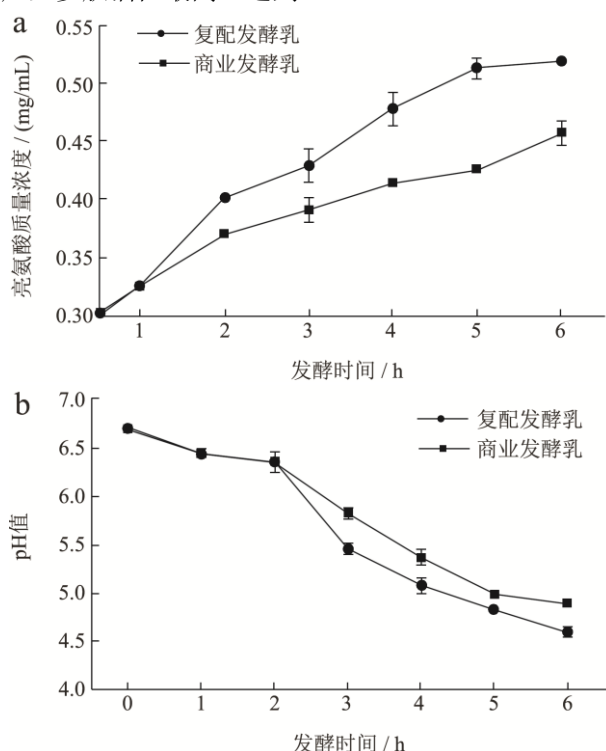


图4 发酵过程中亮氨酸含量(a)和pH(b)的变化

Fig.4 Changes in leucine content and pH during fermentation

由图4b显示发酵乳发酵过程中pH值的变化。在发酵过程中, 两种发酵乳的pH值随着发酵的进行呈降低的趋势。发酵前2h无显著性差异, 2h后pH值下降速率增加, 但商业发酵乳的pH值显著低于复配发酵乳; 发酵终点时, 商业发酵乳的pH值为4.89, 而复配发酵乳pH值达到4.6, 且复配发酵乳具有较好的凝乳特性, 有少量乳清析出。因为酵母菌发酵后期快速生长, β -半乳糖苷酶代谢乳糖产生小分子物质, 如, 葡萄糖和半乳糖通过无氧或有氧代谢, 产生大量酸性物质, 从而加快凝乳速度。

图5所示显示两种发酵乳的电泳图。两种发酵乳在发酵过程中, α -酪蛋白、 β -乳清蛋白、 κ -酪蛋白和 β -酪蛋白含量均呈下降趋势, 且所有发酵乳中酪蛋白

的含量都最高。在商业发酵乳中添加酵母菌, 发酵前3h, 所有蛋白均无显著性变化; 但发酵3h以后, 酵母菌促进了酪蛋白(α -酪蛋白、 κ -酪蛋白和 β -酪蛋白)的水解, 而抑制 β -乳清蛋白的降解; 发酵6h时, β -乳清蛋白几乎不存在。可能是酵母菌的添加加强了发酵乳蛋白水解。Chen等^[28]发现乳酸可以诱导马克斯克鲁维酵母通过三羧酸循环、糖酵解途径和细胞应激反应发生自溶, 释放蛋白质和肽。也有研究表明 *K. marxianus* 通过牛奶中的蛋白质代谢, 产生风味物质, 并可以改善牛奶的消化吸收^[29]。

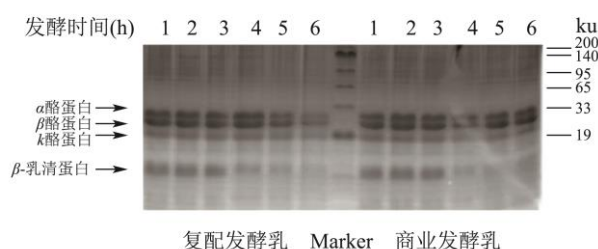
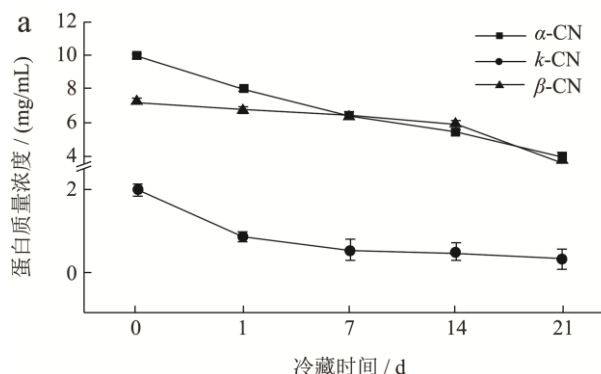


图5 不同发酵乳发酵过程中蛋白变化

Fig.5 Protein changes in different fermented milk during fermentation

2.6 *K. marxianus* DPUL-F15 对发酵乳冷藏期间蛋白降解的影响

图6显示了发酵乳冷藏过程中蛋白含量的变化。两种发酵乳后熟过程中, 酪蛋白(α -酪蛋白、 κ -酪蛋白和 β -酪蛋白)含量均逐渐下降; 添加 *K. marxianus* 后, 对 α -酪蛋白和 β -酪蛋白酪蛋白代谢具有显著作用 ($P < 0.05$)。冷藏21d时, 与商业发酵乳相比, 酵母菌显著促进了 α -酪蛋白和 β -酪蛋白的降解 ($P < 0.05$), 分别降低了 0.24 mg/mL 和 1.23 mg/mL; κ -酪蛋白的降解没有显著差异。有研究表明, 添加马克斯克鲁维酵母菌, 可以降低发酵乳蛋白含量、促进发酵乳中乳蛋白降解, 并对发酵与储藏过程中蛋白的水解产生一定影响, 且混合发酵乳(1 015.50)中肽类型的数量显著高于乳酸菌发酵(1 203.50)^[29]。



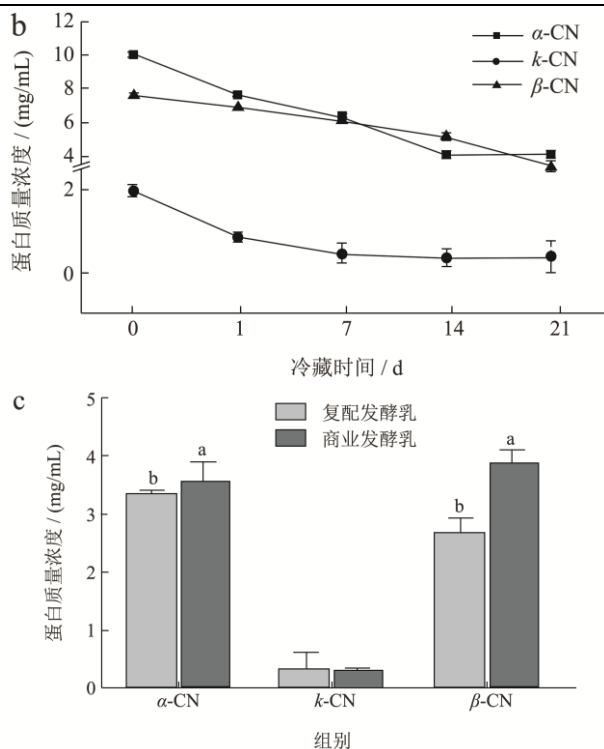


图6 发酵乳冷藏过程中商业发酵乳(a)、复配发酵乳(b)以及冷藏21 d时(c)蛋白含量的变化

Fig.6 Changes in protein content of the commercial fermented milk (a), the compound fermented milk (b) during cold storage and refrigerated for 21 d (c) of all fermented milk

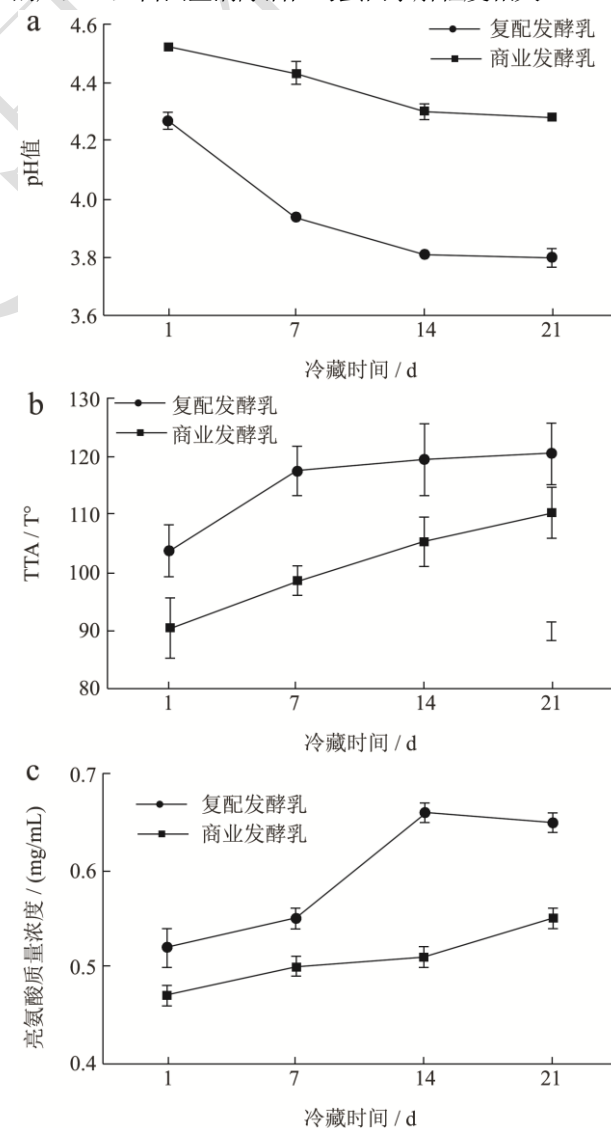
注: 柱上小写不同字母表示组间差异性 ($P < 0.05$)。

2.7 *K. marxianus* DPUL-F15 对发酵乳的冷藏

期间酸化能力、蛋白水解活性以及自由基清除活力的影响

由图 7a、7b 可知, 所有发酵乳在冷藏期间 pH 值呈下降趋势, 但是酵母菌复配发酵乳的 pH 值显著高于商业发酵乳的 pH 值 ($P < 0.05$), 冷藏 21 d 时, 商业发酵乳和复配发酵乳 pH 值分别为 4.28 和 3.80; 冷藏期间, 两种发酵乳的 TTA 都呈上升趋势, 且复配发酵乳的 TTA 显著高于商业发酵乳的 TTA ($P < 0.05$); 复配发酵乳在冷藏 21 d 时酸度达到 120.56 T°; 相比商业发酵乳酸度增加了 10.28 T°。说明酵母菌的添加, 增加发酵乳的后酸化。可能因为乳酸菌在冷藏过程中, 仍然可以利用残存的糖类进行缓慢发酵加剧发酵乳的后酸化。由于后酸化会影响发酵乳口感, 因此在以 *K. marxianus* 为发酵剂的开发新产品时, 可以通过在发酵乳中添加谷氨酰胺转氨酶, 或通过基因工程来控制 β -半乳糖苷酶的表达, 降低发酵乳后酸化^[30]。由图 7c 可知, 所有发酵乳中亮氨酸的含量都呈增加的趋势; 在冷藏 7~14 d 的过程中,

酵母菌复配发酵乳中游离氨基酸亮氨酸的含量迅速增加, 由 0.55 mg/mL 增加到 0.65 mg/mL, 而商业发酵乳中亮氨酸的含量只增加了 0.05 mg/mL; 且复配发酵乳在 14 d 以后呈缓慢下降的趋势, 但是整体增加趋势显著高于商业发酵乳 ($P < 0.05$)。表明添加马克斯克鲁维酵母菌, 可以提高发酵乳中游离氨基酸的含量。Zhang 等^[29]发现马克斯克鲁维酵母与乳酸菌共培养时, 冷藏期间总游离氨基酸含量增加了 16.30%。由图 7d、7e 可知, 冷藏期间发酵乳 ABTS⁺ 和 DPPH 自由基清除活性均呈增加趋势, 且在冷藏 1~14 d 过程中, 复配发酵乳的自由基清除率均显著高于商业发酵乳 ($P < 0.05$)。冷藏 14 d 均有最高体外自由基清除活性分别为 68.87% 和 71.1%。Amit 等^[31]从奶酪中分离的 *K. marxianus* 具有水解乳蛋白和增强抗氧化的能力。综上所述, *K. marxianus* DPUL-F15 的添加, 增加了发酵乳的蛋白水解活性以及自由基清除活性。由于菌株的相互协同作用, 改善了菌株活力从而促进乳蛋白的代谢; 而自由基清除活性的增加归因于水溶性肽的产生, 且自由基清除活性与蛋白水解程度相关^[5]。



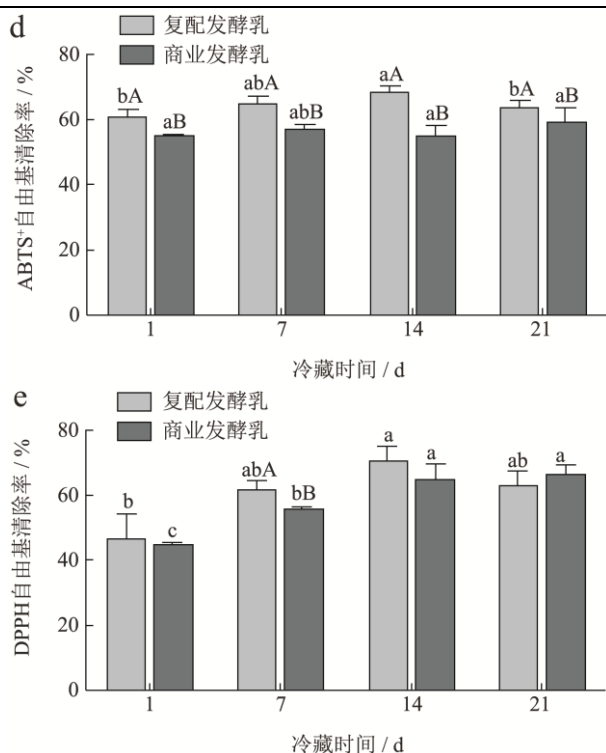


图7 *K. marxianus* 对发酵乳的冷藏期间酸化能力 (a, b) 蛋白水解活性 (c) 以及体外自由基清除活力 (d, e) 的影响

Fig.7 Effects of *K. marxianus* on acidification ability (a, b) proteolytic activity (c) and free radical scavenging activity (d, e) of fermented milk during cold storage

注: 柱上不同小写字母表示组内差异性; 柱上不同大写字母表示组间差异性 ($P < 0.05$)。

3 结论

本研究从传统新疆发酵乳中筛选具有蛋白水解活性的酵母菌, 与商业发酵剂复配, 研究其在发酵以及冷藏过程中对发酵剂活力、蛋白水解和体外自由基清除活力等的影响。结果表明, 菌株 0807-39 具有高于其他菌株蛋白水解活性, 其亮氨酸含量达到 0.34 mg/mL, 且其发酵乳具有较高的 ABTS⁺ 和 DPPH 自由基清除率, 分别达到 68.13% 和 74.24%; 菌株 0807-39 是一株安全性菌株且鉴定为马克思克鲁维酵母菌。*K. marxianus* DPUL-F15 促进了发酵过程中乳酸菌活菌数量、增加乳蛋白的水解, 发酵终点亮氨酸含量为 0.52 mg/mL; 在冷藏过程中, 显著促进发酵乳中 α -酪蛋白、 β -酪蛋白的降解 ($P < 0.05$), 分别降低了 0.24、1.23 mg/mL, 同时, 发酵乳中游离氨基酸的含量增加; 冷藏 14 d 时, 有最高 ABTS⁺ 和 DPPH 自由基清除活性, 分别为 68.87% 和 71.1%。因此, 本实验筛选的 *K. marxianus* DPUL-F15 具有作为一株附属发酵剂的潜力, 提高发酵乳的蛋白水解。对于 *K. marxianus* DPUL-F15 复配商业发酵乳水解蛋白产生何种活性物

质, 以及水解产物的功能仍需进一步研究。

参考文献

- [1] Santiago-López L, Hernández-Mendoza A, Vallejo-Cordoba B, et al. Th17 immune response in inflammatory bowel disease: Future roles and opportunities for lactic acid bacteria and bioactive compounds released in fermented milk [J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 112: 109-117.
- [2] Nasri R, Abdelhedi O, Nasri M, et al. Fermented protein hydrolysates: biological activities and applications [J]. Current Opinion in Food Science, 2022, 43: 120-127.
- [3] 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.
- [4] Panchal G, Sakure A, Hati S. Peptidomic profiling of fermented goat milk: considering the fermentation-time dependent proteolysis by *Lactobacillus* and characterization of novel peptides with antioxidative activity [J]. Journal of Food Science and Technology, 2022, 59(6): 2295-2305.
- [5] Cui L, Yang G, Lu S, et al. Antioxidant peptides derived from hydrolyzed milk proteins by *Lactobacillus* strains: A BIOPEP-UWM database-based analysis [J]. Food Research International, 2022, 156: 111339.
- [6] Yilmaz B, Sharma H, Melekoglu E, et al. Recent developments in dairy kefir-derived lactic acid bacteria and their health benefits [J]. Food Bioscience, 2022, 46: 101592.
- [7] Chaves-López C, Tofalo R, Serio A, et al. Yeasts from Colombian kumis as source of peptides with angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity in milk [J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 159(1): 39-46.
- [8] Oliveira A S, Ferreira C, Pereira J O, et al. Spent brewer's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a potential source of bioactive peptides: An overview [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 208: 1116-1126.
- [9] Agarbati A, Ciani M, Canonico L, et al. Exploitation of yeasts with probiotic traits for kefir production: Effectiveness of the microbial consortium [J]. Fermentation, 2021, 8(1): 9.
- [10] Ahtesh F B, Apostolopoulos V, Stojanovska L, et al. Effects of fermented skim milk drink by *Kluyveromyces marxianus* LAF4 co-cultured with lactic acid bacteria to release angiotensin-converting enzyme inhibitory activities [J]. International Journal of Dairy Technology, 2018, 71(S1): 130-140.

- [11] Jang H J, Kim J H, Lee H-S, et al. Physicochemical analysis of non-fermented probiotic milk with probiotic *Lactobacillus plantarum* Ln1 isolated from Korea traditional fermented food [J]. Food Science and Biotechnology, 2022, 31(6): 731-737.
- [12] Sihag S, Pal A, Ravikant, et al. Antioxidant properties and free radicals scavenging activities of pomegranate (*Punica granatum* L.) peels: An *in-vitro* study [J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2022, 42: 102368.
- [13] Yue Y, Wang S, Lv X, et al. Analysis of the complete genome sequence of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* with post-acidification capacity and its influence on yogurt in storage [J]. Journal of Dairy Science, 2022, 105(2): 1058-1071.
- [14] Elkashef H, Mobdy A A, Hassan A. Texture, microstructure, and antioxidant characteristics of bio-fermented milk fortified with buttermilk nano-powder [J]. International Dairy Journal, 2022, 126: 105248.
- [15] García-Tejedor A, Sanchez-Rivera L, Castelló-Ruiz M, et al. Novel antihypertensive lactoferrin-derived peptides produced by *Kluyveromyces marxianus*: gastrointestinal stability profile and *in vivo* angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibition [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(7): 1609-1616.
- [16] Fernández-Pacheco P, Ramos Monge I M, Fernández-González M, et al. Safety evaluation of yeasts with probiotic potential [J]. Frontiers in Nutrition, 2021, 8.
- [17] Liu Y, Chen Z, Li J, et al. Extensive diversity and prevalent fluconazole resistance among environmental yeasts from tropical China [J]. Genes, 2022, 13(3): 444.
- [18] Gut A M, Vasiljevic T, Yeager T, et al. Characterization of yeasts isolated from traditional kefir grains for potential probiotic properties [J]. Journal of Functional Foods, 2019, 58: 56-66.
- [19] Youn H-Y, Kim D-H, Kim H-J, et al. A combined *in vitro* and *in vivo* assessment of the safety of the yeast strains *Kluyveromyces marxianus* A4 and A5 isolated from Korean kefir [J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2023, 15(1): 129-138.
- [20] Yazgan H, Kuley E, Güven Gökmen T, et al. The antimicrobial properties and biogenic amine production of lactic acid bacteria isolated from various fermented food products [J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2021, 45(1): e15085.
- [21] Xia J, He J, Xu J, et al. Direct conversion of cheese whey to polyamic acid by mixed culture of *Aureobasidium pullulans* and permeabilized *Kluyveromyces marxianus* [J]. Bioresource Technology, 2021, 337: 125443.
- [22] Rai A K, Pandey A, Sahoo D. Biotechnological potential of yeasts in functional food industry [J]. Trends in Food Science & Technology, 2019, 83: 129-137.
- [23] Korma S A, Li L, Ghamry M, et al. Effect of co-fermentation system with isolated new yeasts on soymilk: microbiological, physicochemical, rheological, aromatic, and sensory characterizations [J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2022, 53: 1549-1564.
- [24] Érika De Pádua A, Alessandra B, Luiz Rodrigo Ito M, et al. Cell permeabilization of *Kluyveromyces* and *Saccharomyces* species to obtain potential biocatalysts for lactose hydrolysis [J]. Acta Scientiarum Biological Sciences, 2022, 44(1).
- [25] Merchán A V, Ruiz-Moyano S, Vázquez Hernández M, et al. Characterization of autochthonal yeasts isolated from Spanish soft raw ewe milk protected designation of origin cheeses for technological application [J]. Journal of Dairy Science, 2022, 105(4): 2931-2947.
- [26] Shi H, Zhang M, Wang W, et al. Solid-state fermentation with probiotics and mixed yeast on properties of okara [J]. Food Bioscience, 2020, 36: 100610.
- [27] Ahtesh F B, Apostolopoulos V, Stojanovska L, et al. Effects of fermented skim milk drink by *Kluyveromyces marxianus* LAF4 co-cultured with lactic acid bacteria to release angiotensin-converting enzyme inhibitory activities [J]. International Journal of Dairy Technology, 2018, 71(Suppl.1): 130-140.
- [28] Lo S-C, Yang C-Y, Mathew D C, et al. Growth and autolysis of the kefir yeast *Kluyveromyces marxianus* in lactate culture [J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 14552.
- [29] Zhang D-D, Liu J-L, Jiang T-M, et al. Influence of *Kluyveromyces marxianus* on proteins, peptides, and amino acids in *Lactobacillus*-fermented milk [J]. Food Science and Biotechnology, 2017, 26(3): 739-748.
- [30] Deshwal G K, Tiwari S, Kumar A, et al. Review on factors affecting and control of post-acidification in yoghurt and related products [J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 109: 499-512.
- [31] Rai A K, Kumari R, Sanjukta S, et al. Production of bioactive protein hydrolysate using the yeasts isolated from soft chhurpi [J]. Bioresource Technology, 2016, 219: 239-245.