

# 甘南牧区牦牛曲拉中乳酸菌的 分离、鉴定及性能研究

文鹏程<sup>1</sup>, 曹磊<sup>1</sup>, 马瑞娟<sup>1</sup>, 朱妍丽<sup>1</sup>, 杨敏<sup>2</sup>, 张忠明<sup>1</sup>, 张卫兵<sup>1,\*</sup>

(1. 甘肃农业大学食品科学与工程学院, 甘肃兰州 730070;

2. 甘肃农业大学理学院, 甘肃兰州 730070)

**摘要:**为探究甘南牧区牦牛曲拉中乳酸菌的性能,本研究以甘肃省甘南地区藏族牧民家庭传统手工制作的牦牛乳曲拉样品为研究对象,以纯培养方法对曲拉中的乳酸菌分离鉴定,并研究曲拉中乳酸菌的性能。结果表明:从9份以自然条件发酵的牦牛曲拉中分离出97株乳酸菌,经过初步筛选得到6株乳酸菌菌株,通过16S rDNA分子鉴定,菌株Q1为嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*),菌株Q2为耐久肠球菌(*Enterococcus durans*)、菌株G1、G2、G3、G4为瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus*);对6株乳酸菌进行性能研究表明,这6株菌凝乳时间在4~7 h之间,凝乳时的滴定酸度在73.42~89.38 °T之间变化,酸乳冷藏期酸度增加了14.22~20.93 °T,活菌数含量均大于10<sup>7</sup> CFU/mL,黏度为5.42~7.84 Pa·s。研究结果可为乳酸菌的应用提供理论依据。

**关键词:**曲拉,乳酸菌,分离,性能

## Isolation, Identification and Characterization of Lactic Acid Bacteria from Qula in Gannan

WEN Peng-cheng<sup>1</sup>, CAO Lei<sup>1</sup>, MA Rui-juan<sup>1</sup>, ZHU Yan-li<sup>1</sup>,

YANG Min<sup>2</sup>, ZHANG Zhong-ming<sup>1</sup>, ZHANG Wei-bing<sup>1,\*</sup>

(1. College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;

2. College of Science, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

**Abstract:** To investigate the performance of lactic acid bacteria in Qula in Gannan. In this study, the Qula sample, which was traditionally hand-made by Tibetan herders in Gannan, Gansu Province, was used as the research object. The lactic acid bacteria in the Qula were isolated and identified by pure culture method, and the performance of lactic acid bacteria was studied. The results showed that there were 97 strains of lactic acid bacteria were isolated from 9 Qula fermented under natural conditions. Six strains of lactic acid bacteria were obtained through preliminary screening. The strains were identified by 16S rDNA, strain Q1 was *Streptococcus thermophilus*, and strain Q2 was *Enterococcus durans*, strains G1, G2, G3, and G4 were *Lactobacillus helveticus*. The performance studies on 6 strains showed that the curd time of these 6 strains was between 4~7 h, the titratable acidity during curd was between 73.42~89.38 °T, and the acidity of yogurt during the cold storage increased by 14.22 to 20.93 °T, the viable counts were all greater than 10<sup>7</sup> CFU/mL, the viscosity was 5.42~7.84 Pa·s. The research results can provide a theoretical basis for the application of lactic acid bacteria.

**Key words:** Qula; lactic acid bacteria; isolation; performance

中图分类号: TS252.54

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2020)13-0112-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020.13.018

引文格式: 文鹏程, 曹磊, 马瑞娟, 等. 甘南牧区牦牛曲拉中乳酸菌的分离、鉴定及性能研究[J]. 食品工业科技, 2020, 41(13): 112-117.

牦牛曲拉, 又称奶渣, 是将牦牛乳脱脂后, 在自然条件下进行发酵使酪蛋白凝结、干燥后制成的一种发酵乳制品<sup>[1-2]</sup>。曲拉不仅是藏区牧民储藏食品蛋白的重要手段, 而且也是制作酸奶的发酵剂<sup>[3]</sup>。由

于曲拉加工环境相对开放, 因此多种微生物参与了发酵过程<sup>[4]</sup>。

目前, 国内外对于乳及制品中乳酸菌的分离鉴定有一定的研究, 但对于牦牛曲拉中乳酸菌的分离

收稿日期: 2019-09-09

作者简介: 文鹏程(1982-), 男, 博士, 主要从事乳品微生物方面的研究, E-mail: wenpch@126.com。

\* 通讯作者: 张卫兵(1974-), 男, 博士, 教授, 主要从事乳品微生物和乳品加工方面的研究, E-mail: 45330301@qq.com。

基金项目: 企业研究转化与产业化专项(2018-SF-C29); 国家自然科学基金项目(31560442, 31760466); 伏羲青年英才培育计划(Gaufx-02Y01); 甘肃农业大学青年导师基金(GAU-QNDS-201717)。

研究较少。我国是最早应用乳酸菌发酵的国家之一,累积了大量的传统发酵乳制品,并且各族人民都有自己独特的发酵制作方式,因此保留了各种各样的传统发酵乳品。并且在不同类型的发酵乳制品中富含了许多优良的益生菌<sup>[5-6]</sup>。与其他地域特征相比,中国藏区的高原牧区普遍具有海拔较高、气温低及昼夜温差大的特殊生态环境。在这种相对恶劣的环境条件下,这些地区发酵乳制品中的乳酸菌依然能够存活并繁衍下来,其生物学性能得到优化,因此,从其中分离出性状优良的菌株,为开发具有优良性能的乳酸菌发酵剂具有重要的应用价值<sup>[7]</sup>。

本研究采用采自于甘肃省甘南藏族自治州牧民家庭传统方法制作的曲拉样品中分离乳酸菌菌株,并利用形态学分析结合分子生物学 16S rDNA 序列同源性分析,确定分离乳酸菌的分类地位,并研究乳酸菌的发酵性能。研究可为青藏高原极端环境条件下的传统牦牛曲拉中乳酸菌种质资源的开发利用提供重要的科学依据和理论支撑,对乳酸菌的工业化应用及乳酸菌发酵剂制备提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

氢氧化钠 天津市大茂化学试剂厂;过氧化氢 天津市大茂化学试剂厂;酚酞 北京中科百奥生物技术公司;氯化钠 北京中科百奥生物技术公司;革兰氏染色剂 青岛海博生物技术有限公司;MRS agar 培养基、MRS 肉汤培养基 购自青岛海博生物技术有限公司;脱脂乳粉 黑龙江完达山乳业。

SW-CJH-2FD 型超净工作台 苏州净化设备有限公司;YX-280A 型高压灭菌锅 上海三申医疗器械有限公司;HG303-4 型电热恒温培养箱 上海一恒科学仪器有限公司;Primo Star 型显微镜 德国卡尔蔡司公司;PHS-3C 型 pH 计 上海仪电科学仪器有限公司;754PC 型紫外可见分光光度计 上海光谱仪器有限公司;AL204 型分析天平 上海 Mettler-Toledo 公司;LV DV-1 型转式数显黏度计 上海万磁仪器有限公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 曲拉样品的采集 曲拉样品于 2016 年 10 月采自于甘肃省甘南藏族自治州合作市那吾乡玛岗村、卡四河村和绍玛村三个村庄的 9 个不同牧民家庭。将所有样品置于自封袋中编号,并置于冰盒中运输至实验室以备试验。

1.2.2 乳酸菌菌株的分离纯化 参照张蓓<sup>[4]</sup>的方法。称取 10 g 曲拉样品于 90 mL 生理盐水中按照 10 倍梯度稀释,取适宜稀释度的稀释液 0.1 mL 涂布于 MRS 琼脂培养基 37 ℃ 培养。挑取具有乳酸菌典型特征的菌落,反复划线培养直至镜检为纯菌株。然后进行 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 酶试验和革兰氏染色并镜检。

1.2.3 菌种的保藏 选择革兰氏阳性, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 酶试验阴性的菌株于 -80 ℃ 下保藏 (MRS 液体培养基菌悬液 + 15% 甘油), 作为供试菌株。

#### 1.2.4 初筛

1.2.4.1 菌株遗传稳定性的测定 参照张兰威<sup>[8]</sup>的

方法测定。将菌株活化后以 3% 接种量接种于 12% (W/V) 灭菌脱脂乳中 37 ℃ 培养,记录凝乳时间,并观察凝乳状态是否良好。连续传代 20 次,淘汰活力差及凝乳性状不稳定的菌株。

1.2.4.2 凝乳时间的测定 将菌株活化后以 3% 接种量接种于 12% (W/V) 灭菌脱脂乳中 37 ℃ 培养,记录凝乳时间。重复 3 次试验取平均值。

1.2.4.3 各菌株凝乳酸度的测定 将菌株活化后以 3% 接种量接种于 12% (W/V) 灭菌脱脂乳中 37 ℃ 培养,待凝乳后立刻置于 4 ℃ 冷藏 24 h 后测定酸度,酸度参考国标: GB/T 5009.239-2016《食品酸度的测定》的方法测定,用吉尔涅尔度(°T)表示。重复 3 次试验取平均值。

1.2.4.4 保水率的测定 参照 Riener 等<sup>[9]</sup>的方法测定。将菌株活化后以 3% 接种量接种于 12% (W/V) 灭菌脱脂乳中 37 ℃ 培养,待凝乳后立刻置于 4 ℃ 冷藏 24 h 后测定。取 10 mL 样品装入离心管中,在 13200 r/min、4 ℃ 的条件下离心 20 min 倾去上清液,按公式计算保水率。重复 3 次试验取平均值。

$$\text{保水率}(\%) = \frac{M_1 - M_2}{M_1 - M} \times 100$$

式中:M 为空离心管质量,g;M<sub>1</sub> 为装入样品后离心管质量,g;M<sub>2</sub> 为倾去上清液后离心管质量,g。

1.2.4.5 感官评价 参照生庆海等<sup>[10]</sup>的方法。将凝乳后的脱脂乳冷藏 24 h,由感官评价小组成员对其进行评价,感官评价成员均受过专业感官培训,共 7 人。感官评分标准如表 1 所示。

表 1 发酵乳感官评价标准

Table 1 Standards for sensory evaluation of fermented milk

项目	特征	评分(分)
色泽 (10分)	呈均匀乳白色、微黄色	10~8
	淡黄色	7~6
	浅灰色或灰白色	5~4
	绿色、黑色斑点或霉菌生长、异常颜色	3~0
滋味和气味 (40分)	具有酸牛乳特有的滋味和气味,酸味、甜味比例适当	50~35
	过酸或过甜	34~20
	有苦味	19~10
	有涩味	9~5
组织状态 (50分)	异常滋味或气味	4~0
	组织细腻、均匀、表面光滑、无裂纹、无气泡、无乳清析出	50~40
	组织细腻、均匀、表面光滑、无裂纹、无气泡、有少量乳清析出	39~30
	组织粗糙、有裂纹、无气泡、有少量乳清析出	29~20
组织状态 (50分)	组织粗糙、有裂纹、有气泡、乳清析出	19~10
	组织粗糙、有裂纹、有大量气泡、乳清析出严重、有颗粒	9~0

表2 初筛结果

Table 2 Results of preliminary screening

编号	菌体形态	凝乳时间(h)	滴定酸度(°T)	保水率(%)	感官评价(分)
G1	杆	5.29 ± 0.33 <sup>b</sup>	76.42 ± 0.28 <sup>c</sup>	78.13 ± 0.08 <sup>e</sup>	78.15 ± 1.67 <sup>c</sup>
G2	杆	4.71 ± 0.27 <sup>b</sup>	81.59 ± 0.24 <sup>c</sup>	81.11 ± 0.06 <sup>b</sup>	81.92 ± 1.75 <sup>b</sup>
G3	杆	6.57 ± 0.43 <sup>a</sup>	73.42 ± 0.28 <sup>f</sup>	80.45 ± 0.10 <sup>d</sup>	75.66 ± 1.26 <sup>c</sup>
G4	杆	4.72 ± 0.15 <sup>b</sup>	80.47 ± 0.44 <sup>d</sup>	80.89 ± 0.06 <sup>c</sup>	82.05 ± 1.74 <sup>b</sup>
Q1	球	5.05 ± 0.36 <sup>b</sup>	87.36 ± 0.34 <sup>b</sup>	81.04 ± 0.02 <sup>bc</sup>	84.69 ± 2.33 <sup>ab</sup>
Q2	球	6.29 ± 0.29 <sup>a</sup>	89.38 ± 0.26 <sup>a</sup>	82.63 ± 0.03 <sup>a</sup>	85.71 ± 1.64 <sup>a</sup>

注:同列不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

1.2.5 菌株分子生物学鉴定 将筛选菌株的鉴定工作委托甘肃金博研生物科技有限公司完成。采用DNA提取试剂盒提取菌株的DNA。再PCR扩增其16S rDNA片段,反应体系共50  $\mu$ L,PCR反应过程为:预变性95  $^{\circ}$ C 5 min;再95  $^{\circ}$ C 30 s,58  $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 1.5 min,共35个循环,终延伸72  $^{\circ}$ C 5 min。完成后用琼脂糖凝胶电泳检测,并使用凝胶回收试剂盒回收目的产物进行DNA测序。将测定的16S rDNA序列登录NCBI进行BLAST比对,并运用MEGA 6.0软件构建系统发育树。

### 1.2.6 乳酸菌菌株性能研究

1.2.6.1 乳酸菌菌株生长特性研究 参照周德庆<sup>[11]</sup>的方法测定。将乳酸菌活化后以3%接种量接种到MRS液体培养基中37  $^{\circ}$ C培养。在24 h内每隔2 h取样,测定菌株的OD<sub>600 nm</sub>值,以未接种的MRS液体培养基做空白对照。重复三次试验取平均值。

1.2.6.2 乳酸菌酸化能力的测定 参照Franciosi等<sup>[12]</sup>的方法测定。将乳酸菌活化后以3%接种量接种于12% (W/V)灭菌脱脂乳中37  $^{\circ}$ C培养。在24 h内每隔2 h测定其滴定酸度。重复三次试验取平均值。

1.2.6.3 乳酸菌后酸化能力的测定 参照Franciosi等<sup>[12]</sup>的方法测定。将乳酸菌活化后以3%接种量接种到12% (W/V)灭菌脱脂乳中37  $^{\circ}$ C培养,待凝乳后立刻放入4  $^{\circ}$ C冷藏,测定冷藏期1、5、10、15、20和25 d时的滴定酸度。重复三次试验取平均值。

1.2.6.4 冷藏期黏度的变化 参照Celik等<sup>[13]</sup>的方法测定。对4  $^{\circ}$ C冷藏1、5、10、15、20和25 d的样品测定黏度。重复三次试验取平均值。

1.2.6.5 冷藏期乳酸菌活菌数的变化 参照Ng等<sup>[14]</sup>的方法测定。对4  $^{\circ}$ C冷藏1、5、10、15、20和25 d的样品以平板计数法测定活菌数。重复三次试验取平均值。

## 1.3 数据处理

全部试验数据采用Microsoft Excel 2010和SPSS 18.0 (SPSS Inc., USA)数据处理系统进行分析,采用ANOVA进行方差分析,用Duncan's法进行多重显著性分析和标准偏差( $\pm$ SE)计算,利用Origin 8.0软件进行绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 乳酸菌分离纯化及初筛结果

从9份牦牛曲拉样品中共分离出97株G<sup>+</sup>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

试验阴性菌株,暂定为乳酸菌。将所分离菌株连续传代20次后,确定菌株的遗传稳定性,在剔除遗传不稳定菌株后从中选择凝乳时间在8 h之内、滴定酸度大于70  $^{\circ}$ T的菌株。并通过初步筛选,得到6株发酵性能较好的菌株,将菌株重新进行编号分别为G1、G2、G3、G4、Q1、Q2,结果见表2。由表2可以看出,这6株菌的凝乳时间较短,在4~7 h之间,凝乳后4  $^{\circ}$ C冷藏24 h的滴定酸度在73.42~89.38  $^{\circ}$ T之间;6株菌的保水率在78.13%~82.63%之间,发酵乳感官评价评分在75.66~85.71分之间,说明这6株菌发酵乳的总体感官状态良好。筛选结果表明,这6株菌初步具有制备发酵剂的潜力。

### 2.2 菌株16S rRNA序列分析

将筛选出的6株菌进行分子生物学鉴定。将所有菌株分别进行PCR扩增后产物的琼脂糖凝胶电泳结果见图1。从图1可以看出,6条目的片段都在1500 bp左右,且条带清晰。

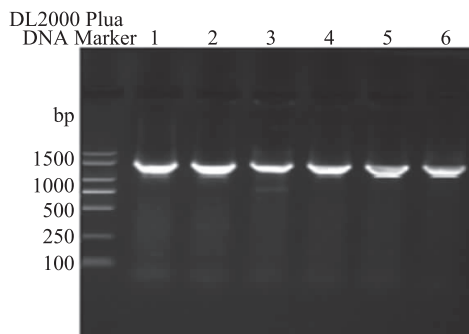


图1 菌株16S rRNA扩增产物电泳图

Fig.1 The PCR-production of 16S rRNA gene  
注:1:G1;2:G2;3:G3;4:G4;5:Q1;6:Q2。

将扩增产物测定所得序列,通过BLAST,同GenBank数据库中已知菌株序列比对,用MEGA 6.0软件进行序列分析,构建系统发育树,结果如图2所示。对菌株G1、G2、G3和G4的序列分析,其序列长度为1766 bp,与瑞士乳杆菌 *Lactobacillus helveticus* IMAU60208相符且在同一个分支上,其相似度和同源性均为100%,可将其鉴定为瑞士乳杆菌 (*Lactobacillus helveticus*);菌株Q1的序列长度为1383 bp,与嗜热链球菌 *Streptococcus thermophilus* M4相符且在同一个分支上,其相似度和同源性均为100%,可将其鉴定为嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*);菌株Q2的序列长度为1209 bp,与耐久肠球菌 *Enterococcus durans* NBRC 100479(T)相符,



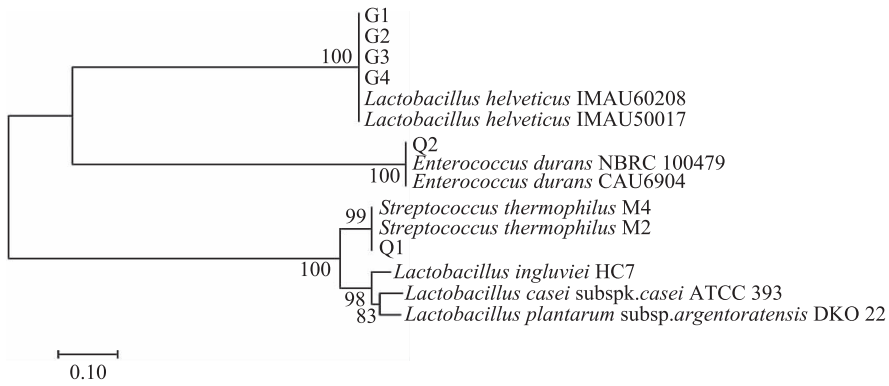


图2 试验菌株与其他乳酸菌的系统发育树

Fig.2 The phylogenetic tree of test strains and other lactic acid bacteria

其相似度和同源性均为100%，可将其鉴定为耐久肠球菌(*Enterococcus durans*)。

### 2.3 乳酸菌性能研究

2.3.1 菌株生长特性研究 乳酸菌需要具有稳定的遗传特性,对乳酸菌生长曲线测定,主要是测定菌体细胞数的增加量,用菌体进入稳定期的时间长短来确定菌体生长速率<sup>[15]</sup>。生长曲线可提供菌体的最佳收获时间,即在OD值最大处收集菌体,能获得高数量和活力的菌体。

6株乳酸菌的生长特性如图3所示。由图3可以看出,所有菌株经过较短的适应期后进入对数期,并经过一段时间后进入稳定期,符合微生物生长周期。在生长的前2h内,各菌株的OD值增幅较平缓;然后进入对数生长期,生长加快,达到生长稳定期时OD值达到最大值并保持相对稳定状态,乳酸菌开始累积次级代谢产物。其中,菌株G2和G4在液体培养基中生长速率较快,在10~12h左右进入稳定期达生长高峰,菌株G1在12~14h达到生长稳定期,菌株G3和Q1在液体培养基中生长比较缓慢,在14h左右达到生长稳定期,菌株Q2在液体培养基中生长缓慢,在14~16h才达到生长高峰进入稳定期。

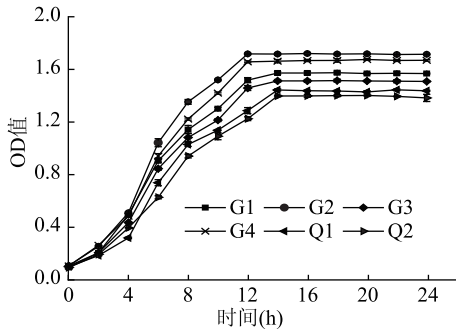


图3 菌株在液体培养基中的生长曲线(OD值)

Fig.3 Growth curve of strains in culture medium(OD value)

2.3.2 菌株酸化能力测定 乳酸菌的产酸能力强弱对发酵乳的生产制作具有很大的影响。若菌株发酵产酸太快,导致凝乳时间短,酸乳凝胶形成过快,会影响酸乳的组织状态及风味物质的形成<sup>[16-17]</sup>;若菌株的产酸能力太弱,导致凝乳时间过长,虽然对风味形成具有一定的作用,但浪费能源和时间,增大生产成本<sup>[18-19]</sup>。

乳酸菌菌株的酸化能力如图4所示。由图3菌株的生长特性可知,所有乳酸菌菌株在分别在10~16h先后进入稳定期。而从图4可以看出滴定酸度在稳定期依然增大,说明菌株在进入稳定期后菌株依然生长繁殖,只是菌株的生长率和死亡率达到了动态平衡。从图4还可以看出,在发酵前2h,各菌株产酸能力很低,随着发酵时间增长,乳酸菌的产酸速率达到一定值并且产酸速率逐渐达到稳定。一般认为用作酸奶发酵剂的乳酸菌菌种的产酸能力应该在70~110<sup>o</sup>T之间较好。菌株G1、G2和G4在发酵8h时已经达到所需的滴定酸度,在整个发酵周期内酸度均大于110<sup>o</sup>T,因此,G1、G2和G4具有很强的酸化能力。菌株G3、Q1、Q2在10~12h内达到所需滴定酸度,发酵过程中酸度达到最大值时在88.39~99.27<sup>o</sup>T之间,说明这3株菌的产酸能力相对较低。总体而言,6株菌的酸化能力强弱为G2>G4>G1>G3>Q2>Q1。本试验中菌株凝乳时滴定酸度在73.42~89.38<sup>o</sup>T之间变化,高于杨俊俊<sup>[7]</sup>的研究结果64.17~69.49<sup>o</sup>T。而吴均<sup>[20]</sup>的研究发现,不同乳酸菌在发酵凝乳时酸度最大为86.92~92.31<sup>o</sup>T,与本文的研究结果较一致。这表明了不同乳酸菌之间产酸能力的差异性。

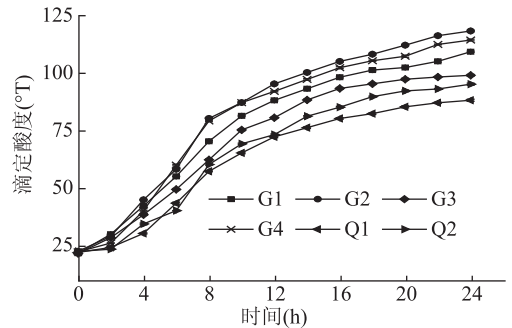


图4 发酵过程中滴定酸度的变化

Fig.4 The titratable acidity variation of yoghurt during fermentation progress

2.3.3 菌株后酸化能力的测定 在贮藏期,乳酸菌的后酸化能力直接决定了酸乳在贮藏期的品质和保质期,菌体仍然繁殖代谢发生后酸化,导致产品过酸,降低保质期。因此,生产中需要后酸化能力较弱的乳酸菌<sup>[12]</sup>。

6株菌冷藏期间酸度的变化如图5所示。由图5

可以看出,所有菌株在冷藏期酸度有逐渐增大的趋势。其中,菌株 G2 和 Q2 在冷藏期间滴定酸度分别增加了 20.93 和 20.24 °T,后酸化能力较强。菌株 G4 和 Q1 滴定酸度增加值分别为 19.79 和 19.13 °T,后酸化能力较弱。菌株 G1 和 G3 在冷藏期间滴定酸度分别增加了 16.02 和 14.22 °T,说明菌株 G1 和 G3 后酸化能力相对更弱。研究表明,不同菌种的后酸化能力存在差异。秦虹等<sup>[21]</sup>对不同乳酸菌后酸化能力研究发现,在冷藏期滴定酸度上升了 13.72~21.16 °T,与本试验的研究结果一致。万金敏<sup>[22]</sup>的研究表明,冷藏期滴定酸度上升了 10.00~17.76 °T,低于本研究的结果。本试验中 6 株菌的后酸化能力强弱各不相同,通常用于生产的发酵剂是由两种或两种以上的菌株组合而成,这样就可以弥补有些菌后酸化能力较强的缺陷<sup>[18]</sup>。

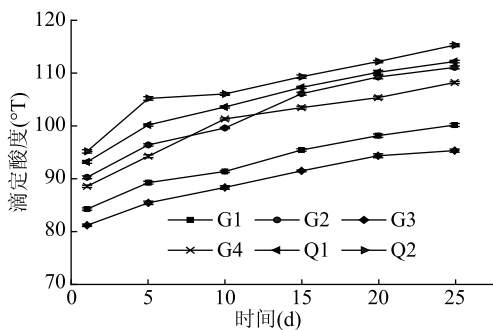


图5 冷藏期间菌株滴定酸度的变化

Fig.5 The acidity variation trend of yogurt during cold storage

2.3.4 冷藏期间黏度的变化 发酵乳具有较好的黏度是评价益生菌的重要标准,黏度会影响产品的组织状态和感官品质,乳酸菌可通过产生大量的胞外多糖改善其黏度,另外,乳酸菌蛋白水解能力对黏度存在一定的影响<sup>[16]</sup>。

不同菌株在冷藏期间黏度的变化如图 6 所示。由图 6 可以看出,冷藏期间所有菌株发酵乳的黏度总体呈现先增大后降低的趋势,所有菌株分别在贮藏 10 和 15 d 时黏度值达到最大,其中菌株 Q2 在整个贮藏周期中黏度一直保持最高,黏度达到最大时为 7.84 Pa·s,产黏性能优良。菌株 Q1、G2 黏度达到最大时分别为 7.46、7.31 Pa·s。菌株 G1、G3、G4 黏度达到最大时分别为 6.85、5.42、6.75 Pa·s,因此,菌株 G3 在整个贮藏期黏度相对较低。但总体而言,在 25 d 冷藏期间内,各菌株所发酵酸乳依然具有较高水平的黏度。本试验 6 株乳酸菌发酵乳黏度在冷藏期间黏度值呈先升高后降低的趋势,这与范瑞等<sup>[23]</sup>的研究结果一致。欧阳霞<sup>[24]</sup>对乳酸菌产黏性能研究发现,所分离菌株的黏度最高为 4 Pa·s,低于本试验的研究结果,说明本试验乳酸菌菌株具有较好的产黏性能。

2.3.5 冷藏期间乳酸菌活菌数的变化 发酵乳中含有大量的活菌数也是评价益生菌的重要指标。国标 GB 5009.239-2016 规定,发酵乳中的活菌数不低于  $10^6$  CFU/mL,并且当活菌数高于这个数量时才能在人肠道中发挥益生作用<sup>[14]</sup>。

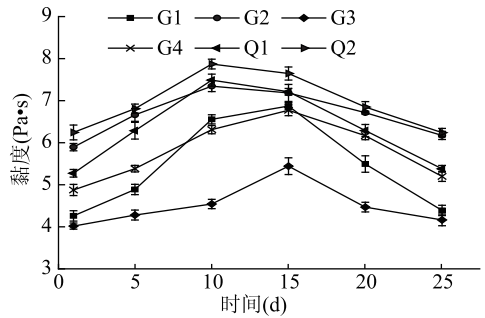


图6 冷藏期间黏度的变化

Fig.6 The viscosity variation trend of yogurt during cold storage

6 株菌发酵乳冷藏期乳酸菌活菌数的变化如图 7 所示。由图 7 可以看出,在冷藏期间,所有乳酸菌菌株发酵乳活菌数呈现先升高后降低的趋势,并且,不同菌株的活菌数在冷藏期间变化存在差异。菌株 Q2 在冷藏期的 15 d 内的活菌数大于其他菌株,在 15 d 之后活菌数迅速下降,说明该菌株耐酸性可能较差,在酸性条件下不利于生长。在冷藏期间,所有菌株的活菌数分别在第 5 和 10 d 达到最大值,并在贮藏期间活菌数均大于  $10^7$  CFU/mL。在 4 °C 冷藏 25 d 之后,菌株 G3 的活菌数最低。本试验中所有菌株发酵的酸乳在贮藏期内活菌数均大于  $10^7$  CFU/mL,而且呈现先增大后减小的趋势,这与 Güler 等<sup>[25]</sup>的研究结果一致。原因是在冷藏初期乳酸菌可以继续利用乳糖等营养物质,使活菌数呈现上升的趋势;但在贮藏后期随着冷藏时间的延长,酸度的继续升高、营养物质的消耗及代谢产物的积累使得活菌数降低<sup>[23]</sup>。吴均<sup>[20]</sup>对从牦牛酸奶中乳酸菌研究发现,所以菌株发酵乳冷藏期活菌数均大于  $10^7$  (CFU/mL),这与本文的研究结果一致,但高于万金敏<sup>[22]</sup>活菌数大于  $10^6$  (CFU/mL) 的研究结果。

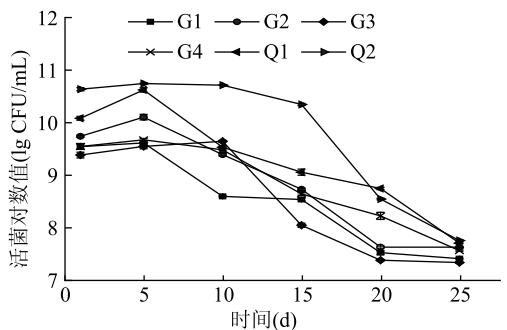


图7 冷藏期间活菌数的变化

Fig.7 The change of LAB counts in the yogurt during cold storage

### 3 结论

从甘南地区采集的 9 份曲拉样品中初步筛选出 6 株性状优良的乳酸菌,以分子生物学方法鉴定这 6 株菌,结果表明:菌株 Q1 为嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*);菌株 Q2 为耐久肠球菌 (*Enterococcus durans*);菌株 G1、G2、G3、G4 为瑞士乳杆菌 (*Lactobacillus helveticus*);对 6 株菌性能研究表明,这 6 株乳酸菌凝乳时间在 4~7 h 之间变化,凝乳时的滴定

酸度在 73.42~89.38 °T 之间变化,乳酸菌菌株发酵乳冷藏期间滴定酸度增加了 14.22~20.93 °T,活菌数含量均大于  $10^7$  CFU/mL,黏度最大时为 5.42~7.84 Pa·s。经综合分析,各菌株性能较为突出,具有开发利用价值。

### 参考文献

- [1] 陈梦音,王琳琳,韩玲,等.基于主成分和聚类分析的曲拉品质的综合评价[J].食品科学,2017,38(13):102-107.
- [2] Liu H N, Zhang C, Zhang H, et al. pH treatment as an effective tool to select the functional and structural properties of yak milk caseins[J]. Journal of Dairy Science, 2013, 96(9):5494-5500.
- [3] Zhang B, Tan Z F, Wang Y P, et al. Dynamic changes of the microbial communities during the preparation of traditional Tibetan Qula cheese [J]. Dairy Science & Technology, 2015, 95(2):1-14.
- [4] 张蓓.藏族传统曲拉制作过程中乳酸菌群变化及曲拉中益生性乳杆菌的筛选和功能性评价[D].郑州:郑州大学,2017.
- [5] 廖钰婷,吴均,龙谋,等.西藏牧区自然发酵牦牛奶的乳酸菌菌种筛选及工艺优化[J].食品科学,2015,36(11):140-144.
- [6] 丁武蓉.青藏高原传统发酵牦牛奶中乳酸菌多样性及其益生功能研究[D].兰州:兰州大学,2014.
- [7] 杨俊俊.西藏牦牛奶渣中微生物的分离鉴定及优良乳酸菌的筛选[D].杨凌:西北农林科技大学,2014.
- [8] 张兰成.乳酸菌优良菌株的选育及直投式酸奶发酵剂的研制[D].哈尔滨:东北农业大学,2002.
- [9] Riener J, Noci F, Cronin D A, et al. The effect of thermosonication of milk on selected physicochemical and microstructural properties of yoghurt gels during fermentation[J]. Food Chemistry, 2009, 114(3):905-911.
- [10] 生庆海,张爱霞,马蕊.乳与乳制品感官评价[M].北京:中国轻工业出版社,2009.
- [11] 周德庆.微生物学教程[M].北京:高等教育出版社,2011.
- [12] Franciosi E, Settanni L, Cavazza A, et al. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk[J]. International Dairy Journal, 2009, 19(1):3-11.
- [13] Celik S, Bakirci I. Some properties of yoghurt produced by adding mulberry pekmez (concentrated juice) [J]. International
- (上接第 104 页)
- assisted extraction of phenolics from hibiscus sabdariffa calyces: Kinetic modelling and process intensification[J]. Industrial Crops and Products, 2019, 137:528-535.
- [24] NYT1795-2009 双低油菜籽等级规格[G].北京:中华人民共和国农业行业标准,2009.
- [25] Charlton Anrian, Baxter Nicola, Khan Lockman, et al. Polyphenol/peptide binding and precipitation [J]. Journal of Agriculture Food Chemistry, 2002, 50:1593-1601.
- [26] 徐丹丹.葵花籽绿原酸的提取及富集研究[D].无锡:江

Journal of Dairy Technology, 2003, 56(1):26-29.

- [14] Ng E M, Tong P S. Effects of yogurt starter cultures on the survival of *Lactobacillus acidophilus* [J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 1(145):169-175.
- [15] Ayad E, Nashat S, El-sadek N, et al. Selection of wild lactic acid bacteria isolated from traditional Egyptian dairy products according to production and technological criteria [J]. Food Microbiology, 2004, 21(6):715-725.
- [16] Glerakin M B. The effects of different incubation temperatures on the acetaldehyde content and viable bacteria counts of bio-yogurt made from ewe's milk [J]. International Journal of Dairy Technology, 2010, 58(3):174-179.
- [17] Oliveira M N, Sodini I, Remeuf F, et al. Effect of milk supplementation and culture composition on acidification, textural properties and microbiological stability of fermented milks containing probiotic bacteria [J]. International Dairy Journal, 2001, 11(11-12):935-942.
- [18] Soukoulis C, Panagiotidis P, Kourelis R, et al. Industrial yogurt manufacture: monitoring of fermentation process and improvement of final product quality [J]. Journal of Dairy Science, 2007, 90(6):2645-2654.
- [19] Çakmakçi S, Bülent Ç, Turgut T, et al. Probiotic properties, sensory qualities, and storage stability of probiotic banana yogurts [J]. Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences, 2012, 36(3):231-237.
- [20] 吴均.牦牛酸乳中优良乳酸菌的筛选鉴定及发酵酸乳抗氧化特性研究[D].重庆:西南大学,2014.
- [21] 秦虹,梁琪,张卫兵,等.甘肃藏区自然发酵牦牛乳中优良乳酸菌的筛选及鉴定[J].食品科学,2013,34(19):241-246.
- [22] 万金敏.西藏传统发酵乳制品中优良乳酸菌的筛选及发酵性能研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2017.
- [23] 范瑞,邓毛程,林伟锋.酸乳货架期内乳酸菌活菌数的研究[J].中国酿造,2008(16):50-53.
- [24] 欧阳霞.乳酸菌的分离鉴定及干酪发酵剂的筛选[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2010.
- [25] Güler-akin M B, Akin M S. Effects of cysteine and different incubation temperatures on the microflora, chemical composition and sensory characteristics of bio-yogurt made from goat's milk [J]. Food Chemistry, 2007, 100(2):788-793.
- 南大学,2015.
- [27] 隋晓楠,黄国,刘贵辰.大豆蛋白质-植物多酚互作的影响研究进展[J].中国食品学报,2019,19(7):1-10.
- [28] 刘泽宇,刘焱,罗灿,等.茶多酚对草鱼鱼肉蛋白质流变学特性的影响[J].现代食品科技,2015(6):50-58.
- [29] Wu W, Clifford M, Howell N K. The effect of instant green tea on the foaming and rheological properties of egg albumen proteins[J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2007, 87(10):1810-1819.