

文章编号:1671-1513(2012)03-0030-05

# 嗜温乳酸菌与白地霉混合发酵酸乳的研究

高鑫, 王昌禄, 陈勉华, 王玉荣, 李风娟

(天津科技大学食品营养与安全教育部重点实验室/食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

**摘要:**与高温发酵酸乳相比,嗜温乳酸菌与霉菌联合发酵酸乳有更丰富的风味物质,且嗜温发酵酸乳粘稠、细腻,香气浓郁、纯正,酸甜适口。采用编号为3-7和3-9的嗜温乳酸菌与1株产香白地霉联合发酵生产酸乳,通过混料试验设计,得到酸乳发酵剂的优化菌种体积配比(乳酸菌3-7:乳酸菌3-9:白地霉)为50:5:45时,其风味、质地和气味较佳。该酸乳具有很高的有效营养成分,其胞外多糖质量浓度高达643.2 mg/L,具有较高的生理功能。其中白地霉不仅能与乳酸菌互利共生产生真菌胞外多糖,而且其产生的香气成分还能有效地提高呈香型物质的种类和含量,改善酸乳的风味质量。

**关键词:**嗜温乳酸菌;白地霉;功能性酸乳;胞外多糖

**中图分类号:**TS252.54

**文献标志码:**A

随着人们生活水平的不断提高和健康消费观念的加强,近年来围绕风味优良、功能性显著等方面开发的酸奶产品愈加受到消费者的欢迎<sup>[1-2]</sup>。目前,国内市场上的酸乳产品主要是以保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌为主要菌株发酵的高温发酵酸乳<sup>[3]</sup>,品种单一,过分依赖增稠剂,乳化剂等食品添加剂来保持酸乳的质构特性。

嗜温乳酸菌主要是最适生长温度介于20~30℃的一类乳酸菌,最常见的是乳球菌和明串珠菌。研究表明,采用嗜温乳酸菌发酵的酸乳风味柔和,在较低温度下能产生更多的风味物质<sup>[4-5]</sup>,产胞外多糖能力更强<sup>[6-11]</sup>。

白地霉(*Geotrichum candidum*)是一种常见真菌,属于半知菌亚门、丛梗孢科、卵形孢霉族、地霉属<sup>[12]</sup>。白地霉细胞内含有丰富的蛋白质和脂肪,可供食用及饲用。据报道<sup>[13-17]</sup>,部分白地霉具有突出的产香能力,是一种具有应用潜力的工业微生物,国外普遍用它来生产乳酪<sup>[18-20]</sup>,国内多用食品工业废弃物来发酵生产白地霉,作为菌体蛋白使用。

本研究拟利用筛选的2株嗜温乳酸菌及1株能够发酵牛乳产生胞外多糖(exopolysaccharides, EPS)

的产香白地霉进行混合发酵,在实验室条件下制备富含胞外多糖的功能性酸乳,确定混合发酵酸乳的生产工艺并对其品质进行评价。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

实验用4株乳酸菌(编号为3-2,3-3,3-7,3-9)及白地霉均筛自新疆伊犁地区哈萨克族牧民自制传统发酵乳制品。

### 1.2 仪器

DV-III+型流变仪,美国Brookfield公司;GC-2010型气相色谱仪,日本岛津公司;4000GC/MS型气相色谱质谱联用仪,美国瓦里安公司。

### 1.3 混料试验设计软件

本试验中混料试验的设计采用Design expert 8.0软件<sup>[21-22]</sup>。

### 1.4 方法

#### 1.4.1 菌落计数

乳酸菌计数方法参见文献<sup>[23]</sup>,霉菌计数方法参见文献<sup>[24]</sup>。

收稿日期:2012-01-31

基金项目:国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAD04A06)。

作者简介:高鑫,女,硕士研究生,研究方向为功能性发酵酸乳;

王昌禄,男,教授,博士生导师,主要从事食品生物技术方面的研究。通讯作者。

### 1.4.2 EPS 提取

用饱和 NaOH 调样液 pH 值至 8.0, 4 000 r/min 离心 15 min, 上清液用 HCl 调节 pH 值至 4.6, 3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min. 调 pH 值至 7.5, 加入 1/10 体积的胰酶液(质量浓度为 3 g/L, 现配现用), 40 °C 水浴酶解 2.5 h 后, 2 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min. 加入 1/3 体积的 Sevag 液振荡 30 min, 3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min, 去除沉淀, 重复 3 次. 加入 3~5 倍体积的 95% 的乙醇, 充分振荡(多糖呈絮状沉淀析出), 3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min, 收集沉淀. 洗涤干燥: 将沉淀用丙酮洗涤脱水两次, 真空干燥得粗多糖.

### 1.4.3 粗多糖纯度测定

采用苯酚-浓硫酸法测定胞外多糖含量, 用葡萄糖作标准曲线. 准确吸取葡萄糖标准溶液(1 mg/mL), 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.12 mL(相当于葡萄糖 0.0, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120 μg) 及各样品备用液 0.1 mL 置于 10 mL 比色管中, 用蒸馏水补足 1.0 mL, 分别加入 1.0 mL 5.0% 苯酚水溶液, 摇匀后静止 2 min, 迅速加入 5 mL 浓硫酸, 静止 10 min, 置于 30 °C 水浴中保温 15 min, 取出, 置冷水中冷却, 以空白管为对照, 用紫外分光光度计在波长 490 nm 处测定光密度. 以葡萄糖浓度为横坐标, 光密度值为纵坐标绘制标准曲线, 计算胞外多糖含量.

### 1.4.4 白地霉挥发性香气成分分析

采用气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)对白地霉产生的挥发性风味物质进行测定. 气相色谱条件, 色谱柱型号为 VF-5ms(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm), 进样口温度为 250 °C, 载气为 He, 99.999%, 初始温度 40 °C, 保持 3 min, 以 4 °C/min, 升至 150 °C, 保持 1 min, 以 8 °C/min, 升至 250 °C, 保持 6 min. 质谱条件的质量分离器为离子阱; 离子源为 EI; 电离能量为 70 eV; 离子阱温度为 220 °C; 传输线温度为 280 °C; 溶剂延迟时间 1 min. 扫描方式为全扫描; 扫描范围为 50~500 m/z; 检索谱库为 NIST05.

## 2 结果与分析

### 2.1 混料试验对菌种比例的确定

发酵酸乳在一般情况下, 接种量是一定的, 最终发酵乳的产品特征指标与接种菌株比例有关. 因此, 混料回归设计比较适合本实验中菌种配比的研究. 利用 Design expert 8.0 软件进行混料试验设计, 初始参数设置见表 1, 软件生成的混料试验见表 2.

表 1 混料试验参数设定

Tab. 1 Parameters of mixture design

菌株	最低值	最高值	响应值
3-3	0	0.9	质地
3-2	0	0.9	风味
3-1	0	0.9	气味
3-7	0.05	0.95	总分
3-9	0.05	0.95	

注: 菌株 3-1 为白地霉.

表 2 混料试验

Tab. 2 Mixture design

试验 次数	菌株				
	3-3	3-2	3-1	3-7	3-9
1	0	0	0.9	0.05	0.05
2	0	0.225	0.225	0.275	0.275
3	0	0.45	0	0.5	0.05
4	0	0	0.9	0.05	0.05
5	0	0	0	0.5	0.5
6	0	0	0	0.95	0.05
7	0.45	0.45	0	0.05	0.05
8	0.09	0.09	0.54	0.14	0.14
9	0.9	0	0	0.05	0.05
10	0	0.45	0.45	0.05	0.05
11	0	0	0	0.05	0.95
12	0	0	0.45	0.5	0.05
13	0.09	0.09	0.09	0.14	0.59
14	0.9	0	0	0.05	0.05
15	0.45	0	0.45	0.05	0.05
16	0	0	0	0.05	0.95
17	0.45	0	0	0.5	0.05
18	0	0.9	0	0.05	0.05
19	0	0.9	0	0.05	0.05
20	0	0	0.45	0.05	0.5
21	0	0.45	0	0.05	0.5
22	0.45	0	0	0.05	0.5
23	0.09	0.54	0.09	0.14	0.14
24	0	0	0	0.95	0.05
25	0.54	0.09	0.09	0.14	0.14

注: 菌株 3-1 为白地霉.

通过 Design Expert 8.0 进行试验设计, 将试验结果输入软件, 通过对试验数据的分析, 软件预测了优化后的菌种比例, 并通过试验对此比例进行验证,

最终确定采用2株乳酸菌(3-7和3-9)与白地霉按体积比50:5:45的比例(总接种量按5%接种)进行接种,在该条件下,发酵乳在质地及风味上都优于其他配比。经鉴定,菌株3-7为乳酸乳球菌乳酸亚种(*Lactococcus Lactis* subsp. *lactis*),菌株3-9为乳酸乳球菌乳脂亚种(*Lactococcus Lactis* subsp. *cremaris*)。

前期试验数据显示,乳酸菌3-7单菌发酵酸乳具有较好的风味,乳酸菌3-9单菌发酵酸乳具有较好的质地,且乳酸菌3-9是高产EPS菌株。白地霉除具有优良的产香特性外,也具有很高的产EPS能力。从最终优化的菌种配比中可以看出,只需较少量乳酸菌3-9即可使酸乳具有很好的凝乳效果,很少量白地霉即可改善发酵乳的气味。

## 2.2 乳酸菌、霉菌联合发酵酸乳工艺

### 2.2.1 联合发酵酸乳工艺

乳酸菌3-7→30℃活化24h→接种于5mL无菌脱脂乳→约10h凝乳;乳酸菌3-9→30℃活化24h→接种于5mL无菌脱脂乳→约6h凝乳;白地霉→孢子悬浮液→接种于5mL无菌脱脂乳→30℃,200 r·min<sup>-1</sup>,48h;乳酸菌3-7、乳酸菌3-9和白地霉以体积比50:5:45,按接种量5%接种于无菌全脂牛乳中,30℃培养12h,4℃后发酵8h,即得到产品。

### 2.2.2 菌落计数

为保证试验的可重复性,有必要对接种时各个菌液的浓度进行测定,以确定接种时各个种子液中活菌的数目。测定结果:乳酸菌3-7为 $2.0 \times 10^8$ 个/mL,乳酸菌3-9为 $1.6 \times 10^8$ 个/mL,白地霉菌为 $9.3 \times 10^6$ 个/mL。

## 2.3 发酵乳特征指标检测

### 2.3.1 黏度测量结果

采用流变仪。在4℃下测试黏度,转子型号为RV5,分别在16 r/min的速度下测定3次,每15s取值一次,每个样品做两个平行试样,结果计算算术平均值。实验测得发酵乳的黏度为8600 mPa·s。

### 2.3.2 EPS含量的测定结果

按1.4.2和1.4.3方法,对乳酸菌3-7和3-9与白地霉单菌发酵所得酸乳以及乳酸菌霉菌联合发酵所得酸乳进行EPS含量测定,结果见表3。表3显示,乳酸菌3-9和白地霉发酵所得酸乳有很高的EPS含量,而乳酸菌与霉菌联合发酵能促进酸乳EPS产量的进一步提高,所得发酵乳EPS含量高达643.2 mg/L,可赋予发酵乳更高的有效营养成分。

表3 发酵乳EPS含量

Tab.3 Concentration of EPS

发酵菌株	乳酸菌3-7	乳酸菌3-9	白地霉	联合发酵
$\rho(\text{EPS})/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	NA	434.3	341.6	643.2

## 2.4 白地霉挥发性香气成分分析

接种量按5%计,将乳酸菌3-7、乳酸菌3-9、白地霉按体积比50:5:45比例混合接种全脂牛乳,采用GC-MS测定其中风味物质,其结果如表4。

表4 白地霉产生的挥发性香气成分GC-MS分析结果

Tab.4 GC-MS results of volatile compounds of

*Geotrichum candidum*

编号	挥发性物质	峰面积比/%	
		乳酸菌3-7和3-9与白地霉混合发酵	乳酸菌3-7和3-9发酵
1	丁酸	1.672	-
2	2-庚酮	2.212	23.28
3	苯甲醛	0.279	0.261
4	己酸正丙酯	47.91	-
5	2-乙基-1-己醇	0.003	1.634
6	苯乙醛	0.132	-
7	庚酸	0.332	-
8	丁酸异戊酯	0.425	-
9	(R)-4-甲基己酸	1.226	-
10	对羟基苯甲醛	0.104	0.189
11	2-壬酮	1.114	15.73
12	3,5-二烯-2-壬酮	0.426	15.18
13	2-十二醇	0.545	-
14	(R)-6-甲基-5-庚烯-2-醇	0.088	0.434
15	苯乙醇	0.651	-
16	辛酸	15.72	-
17	3-癸烯-1-醇	0.065	1.261
18	癸酸	13.56	-
19	十五醛	0.241	0.959
20	$\beta$ -紫罗兰酮	0.049	0.069
21	2-十三烷酮	1.112	4.168
22	月桂酸	8.127	-
23	癸酸丁酯	0.128	15.72
24	2-戊基癸酮	1.939	3.816
25	丁位十二内酯	0.195	2.834
26	9-十四烯酸	0.122	-
27	3,7,11-三甲基-1-十二烷醇	0.919	2.058
28	异十三烷醇	0.266	0.906
29	3-苯氧甲基-4-甲氧基苯甲醛	0.143	0.392

GC-MS 共检测到 29 种化合物,与乳酸菌 3-7 和 3-9 发酵所得酸乳相比,白地霉产生了 12 种新的化合物,其中酸类 7 种,酯类 2 种,醇类 2 种,醛类 1 种. 从面积比来看,含量最高的是己酸正丙酯(47.91%),其次是辛酸(15.72%)、癸酸(13.56%)、月桂酸(8.172%)、丁酸(1.672%), (R)-4-甲基己酸(1.226%). 由此可见,白地霉所产挥发性风味物质主要为酯类及酸类. 可有效提高酸乳中的呈香型物质的种类和含量,改善发酵乳风味.

### 3 结论

白地霉能发酵牛乳产生 EPS,其质量浓度为 341.6 mg/L. 白地霉与乳酸菌 3-7 和 3-9 混合发酵酸乳,其 EPS 质量浓度可达 643.2 mg/L. 由于 EPS 的存在,该酸乳具有细腻粘稠的质构,呈现良好的凝胶稳定性,无需依赖食品添加剂赋予其粘稠、稳定的酸乳质构.

白地霉与乳酸菌 3-7 和 3-9 的最适发酵温度均为 30 °C,是混合发酵酸乳的基础. 在发酵开始阶段,白地霉消耗了发酵体系内的氧气,为兼性厌氧的乳酸菌 3-7 和 3-9 提供了低氧的发酵环境. 白地霉丰富的蛋白酶和脂肪酶将乳酸菌不能利用的大分子物质代谢,为乳酸菌的快速生长提供了良好的营养基础.

对乳酸菌与白地霉的接种比例进行混料试验,确定了乳酸菌 3-7、乳酸菌 3-9 与白地霉的比例为 50:5:45,在该配比下,所得发酵乳具有较佳的质地及风味.

通过 GC-MS 对白地霉所产挥发性风味物质的分析结果显示,白地霉利用牛乳中进行脂肪代谢产生的挥发性风味物质主要为酯类及酸类,可有效地提高牛乳中的呈香型物质的种类和含量,改善发酵乳的风味.

本研究通过对嗜温乳酸菌 3-7 和 3-9 与白地霉的混合发酵的初步研究,得到 EPS 含量高、风味、口感优良的发酵乳,可为今后功能性酸乳生产提供新的思路,通过进一步研究乳酸菌与霉菌间的相互作用,期望更深入了解其发酵机理,生产出优质的新型功能性酸乳.

### 参考文献:

- [1] 刘国荣,李平兰,王成涛. 乳酸菌细菌素作为天然生物防腐剂在食品工业中的应用进展[J]. 北京工商大学学报:自然科学版,2012,30(2):64-69.
- [2] 张京,陈存社,张颖,等. 产共轭亚油酸乳酸菌的选育和鉴定[J]. 北京工商大学学报:自然科学版,2010,28(5):13-17.
- [3] 李祥. 功能性乳品饮料的市场趋势及其机遇[J]. 食品工程,2008(3):26-27.
- [4] 王伟军,李延华,张兰威,等. 乳酸乳球菌乳亚种丁二酮变种发酵乳风味成分分析[J]. 中国酿造,2009(3):151-153.
- [5] 李延华,王伟军,张兰威,等. 发酵乳中风味物质的研究进展[J]. 中国酿造,2008,14:8-11.
- [6] De Vuyst L, Degeest B. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria[J]. FEMS Microbiol Rev, 1999, 23:153-187.
- [7] Patricia R M, Jeroen H, Pieternela Z. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria[J]. International Dairy Journal, 2002(12):1630-1711.
- [8] Yang Z N. Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: structures and properties[D]. Helsinki: University of Helsinki, 2000:26-29.
- [9] 张英春,冯锐,曹维强. 乳酸菌胞外多糖的合成及生理功能研究进展[J]. 中国甜菜糖业,2008(3):33-36.
- [10] Sebastiani H, Zelger G. Texture formation by thermophilic lactic acid bacteria[J]. Milchwissenschaft, 1998, 53(1):150-191.
- [11] 刘奇. 高产胞外多糖的嗜酸乳杆菌诱变筛选[J]. 中国酿造,2010(6):103-106.
- [12] 刘亚男,冯娜,薛璨花,等. 白地霉的化学成分研究[J]. 热带亚热带植物学报,2008,16(1):57-60.
- [13] Mdaini N, Gargouri M, Hammami M, et al. Production of natural fruity aroma by *Geotrichum candidum* [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2006, 128:227-236.
- [14] 王庆国,刘天明,韩小龙,等. 两株产果香菌株的初步鉴定及香味成分分析[J]. 食品研究与开发,2007,28(6):16-19.
- [15] 许传坤,顾雷,周谨,等. 白地霉发酵香料烟种子开发新型烟用香料研究[J]. 广西农业科学,2004,59(5):422-425.
- [16] Daigle P, Gelinis P, Leblanc D. Production of aroma

- compounds by *Geotrichum candidum* on waste bread crumb [J]. *Food Microbiology*, 1999, 16: 517 - 522.
- [17] Naziha Mdaini, Mohamed Gargouri, Mohamed Hamami. Production of natural fruity aroma by *Geotrichum candidum* [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2006, 128: 227 - 236.
- [18] Marcellino N, Beuquier E, Grappin R, et al. Diversity of *Geotrichum candidum* strains isolated from traditional cheese making fabrications in France [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67: 4752 - 4759.
- [19] Wyder M T. Identification and characterization of the yeast flora in Kefyr and smear ripened cheese. Contribution of selected yeasts to cheese ripening [D]. Zurich: Swiss Federal Institute of Technology, 1998.
- [20] Corsetti A, Rossi J, Gobbetti M. Interactions between yeasts and bacteria in the smear surface-ripened cheeses [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2001, 69: 1 - 10.
- [21] 周剑忠, 黄开红, 董明盛, 等. 混料设计在藏灵菇奶纯培养发酵剂配方设计中的应用 [J]. *中国农业科学*, 2008, 41(3): 816 - 822.
- [22] 单成俊, 周剑忠, 黄开红, 等. 黑莓复合果汁饮料的研制 [J]. *江苏农业科学*, 2009(6): 327 - 329.
- [23] GB 4789. 35—2010. 食品微生物学检验 乳酸菌检验 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [24] GB 4789. 15—2010. 食品微生物学检验 霉菌和酵母计数 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.

## Study on Yogurt by Mixed Fermentation of *Lactococcus Lactis* and *Geotrichum Candidum*

GAO Xin, WANG Chang-lu, CHEN Mian-hua, WANG Yu-rong, LI Feng-juan

(Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Ministry of Education/School of Food Engineering and Biological Technology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** Compared with the high temperature fermented yogurt, mixed fermented yogurt has more volatile compounds and more favorable taste and flavor. In this study, the yogurt was produced by applying two *Lactococcus Lactis* strains and one *Geotrichum candidum* strain together. The optimal combination of strains was 50:5:45 (*v/v*), determined by mixture design. The yogurt has high concentration of exopolysaccharides (up to 643.2 mg/L), which means its high functionality. Besides, the addition of *Geotrichum candidum* not only increased the EPS concentration in the yogurt, but also increased the types of aroma components and improved the flavor of the yogurt.

**Key words:** *Lactococcus lactis*; *Geotrichum candidum*; functional yogurt; exopolysaccharides

(责任编辑:叶红波)