

酸奶制品发生后酸化主要发酵剂菌确定及性质研究

郭清泉¹ 张兰威² 夏秀芳³

1(华南理工大学化工所 广州 510640) 2(东北农业大学食品学院 哈尔滨 150030)

3(黑龙江八一农垦大学食品学院 密山 158308)

摘 要 将培养物中保加利亚乳杆菌与嗜热链球菌调节为相同 pH 值(4.50),起始相同菌数 7.4×10^7 个/mL 后,分别贮存(25℃)贮存第 11 d,嗜热链球菌的 pH 值为 4.57,保加利亚乳杆菌的为 3.85。将保加利亚乳杆菌确定为导致后酸化发生的主要发酵剂菌,是其细胞壁或细胞膜的性质保护了乳糖酶活性。

关键词 酸奶,后酸化,发酵剂菌

酸奶是含活菌的乳制品,正常发酵结束后,在产品贮存、运输、销售、食用前这一过程中,菌体仍要生长繁殖,发生后酸化,即酸奶的 pH 值继续下降,以至出现消费者不可接受的过酸味及感官质量下降,使酸奶的保质期在 5℃ 只有 7 d 左右。朱滨华等人通过研究酸奶制品在贮存过程中菌数、酸度与贮存时间的变化关系,认为酸奶变质主要是由于乳酸菌后酵继续产酸所致^[1]。

本研究设计一种实验方法来确定导致酸奶制品发生后酸化的主要菌,并通过在酸性条件下超声波处理主要菌菌体前后乳糖酶活性变化,对导致后酸化主要发酵剂菌的菌体性质进行了研究。

1 材料与设备

1.1 试验材料

菌种:保加利亚乳杆菌(CH9-3)、嗜热链球菌(CH9-9)由东北农业大学食品学院提供。

脱脂乳粉:澳大利亚进口。

邻硝基酚(ONP):中国医药集团上海化学试剂公司。

邻硝基酚-β-D-半乳糖苷(ONPG):Sigma 公司出品。

MRS 培养基、M17 培养基:其配方见参考文献[2],配料中所用化学试剂均为分析纯,

生物试剂为进口或国产。

其他所用化学试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

pHS-25 型酸度计:上海科学仪器厂制造;721 分光光度计:上海科学仪器厂;离心机:北京医用离心机厂;超速离心机:上海安亭科学仪器厂;超声波仪: Cole-Parmer 公司;双筒电光显微镜: Olympus。

2 实验方法

2.1 脱脂乳培养基制备

取 10% 脱脂乳经 0.07 MPa 灭菌 20 min,冷却后备用。

2.2 引起后酸化主要发酵剂菌确定

保加利亚乳杆菌与嗜热链球菌在脱脂乳培养基中分别培养(37℃),将样品适当稀释后,采用显微镜直接计数法^[2]测定其菌数,然后用灭菌脱脂乳调整为相同菌数 7.4×10^7 个/mL,用灭菌乳酸调为相同 pH 值 4.50,分别测定其在贮存第 1、2、4、7、11 d(样品贮存温度 25℃)的 pH 值、菌数变化。

2.3 酸性条件下发酵剂菌经超声波处理前后乳糖酶活性变化

将保加利亚乳杆菌于 MRS 液态培养基中培养(37℃) 24 h,于 4℃, $11\ 400 \times g$ 离

心 10 min, 用磷酸盐缓冲液 (pH 7.0, 0.1 mol/L KH_2PO_4 、0.5 mmol/L MgSO_4 、0.1 mmol/L MnCl_2) 洗涤沉淀 2 次, 分别用 pH 为 3.5、4.0、4.5 的磷酸盐缓冲液将菌体溶解, 充分混匀后将菌悬液分成 2 部分, 一部分先经过超声波处理 (15 kHz, 10 min) 后, 静止, 于 0、1、2、3 h, 37℃ 下测定乳糖酶活性, 将另一部分菌悬液先于 37℃ 下静止培养, 于 0、1、2、3 h, 测定乳糖酶活性 (测定前用超声波进行细胞破壁处理, 以释放乳糖酶)。

2.4 ONP 标准曲线的绘制^[3]

取 6 支试管分别加入 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ONP 溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL, 用上述磷酸盐缓冲液补足 1 mL, 于 37℃ 水浴 10 min, 然后分别加入 4 mL 0.5 mol/L Na_2CO_3 , 以第 1 个管为空白, 测量 420 nm 处的吸光度, 重复 3~4 次, 取平均值。以 ONP (μg) 为横坐标, 吸光度 (OD 值) 为纵坐标绘标准曲线。

2.5 乳糖酶液活性的测定^[4]

采用 ONPG 为酶作用底物, 生成有色产物 ONP, 通过比色法来测定。

具体方法为: 取 1 mL 酶液 (适当稀释, 使 OD 值在 0.3 以内), 在 37℃ 下水浴 5 min, 加入已预热至 37℃ 的含 20 mmol/L MONPG 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 1.0 mL (使温度对 K_m 的影响最小), 在 37℃ 下水浴 10 min, 然后立即加入 3 mL 0.5 mol/L Na_2CO_3 来终止反应。于 420 nm 处测定 OD 值, 测定 3 次取平均值。空白样为加入酶液后先加入 Na_2CO_3 , 再加入 1.0 mL 20 mmol/L ONPG 磷酸盐缓冲液, 之后操作相同, 于 420 nm 处测定 OD 值。

一个酶活力单位 (U) 定义为, 在 37℃ 每分钟释放 1 μmol ONP 所需的酶量。

3 结果与讨论

3.1 引起后酸化主要发酵剂菌确定

酸奶贮存过程中嗜热链球菌发酵乳其 pH 值先由 4.5 上升为 4.745, 之后又下降, 到贮存第 11 d, pH 值为 4.57, 比最初的 pH 值

有所增加。而保加利亚乳杆菌发酵乳的 pH 值呈逐渐下降趋势, 到贮存第 11 d, pH 值为 3.85。与此同时, 嗜热链球菌发酵乳菌数在贮存初期先增加, 而后又逐渐下降, 这与酸奶样品的贮存温度和乳介质 pH 值有关。保加利亚乳杆菌发酵乳菌数变化趋势与嗜热链球菌发酵乳相似, 但因菌体所处乳介质 pH 值较低, 其菌数要较嗜热链球菌发酵乳少, 在贮存第 11 d 仅存 $2.56 \times 10^6/\text{mL}$, 减少了 96.51%。

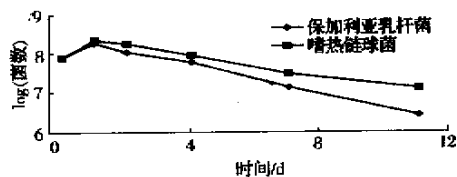


图 1 酸奶在贮存期间菌数的变化

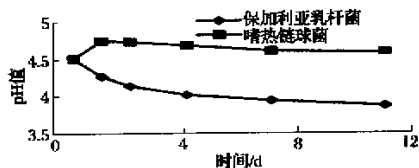


图 2 酸奶在贮存期间 pH 值变化

由以上试验结果可以推断, 嗜热链球菌在贮存过程中因继续生长繁殖, 其具有一定的分解蛋白质能力^[5], 故在贮存初期乳介质 pH 值有所增加, 但随贮存时间的延长, 菌体将乳糖代谢产生乳酸的能力又大于分解蛋白质能力, 故宏观表现为 pH 值又下降。但在贮存第 11 d, 嗜热链球菌发酵乳的 pH 值还要高于最初的 pH 值。保加利亚乳杆菌发酵乳菌数虽然低于嗜热链球菌发酵乳, 但它将发酵乳的 pH 值由 4.50 下降到 3.85。

因将保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌发酵乳的起始 pH 值调整为相同 4.50, 起始菌数调整为相同 7.40×10^7 个/mL, 故由以上分析可以断定, 保加利亚乳杆菌在导致酸奶在贮存过程中发生后酸化起了决定性作用, 同时也说明菌数与酸度并不存在一一对应关系, 而主要是菌体产酸能力决定了介质酸度下

降。

3.2 酸性条件下发酵剂菌经超声波处理前后乳糖酶活性变化

保加利亚乳杆菌在超声波处理前后乳糖酶活性有较大变化,未经过超声波处理在酸性条件下培养的菌体的乳糖酶活力无论在 pH 值为 4.5、4.0、3.5,其酶活都大于先经过超声波处理的菌体的酶活($p < 0.01$),并随处理时间的延长,酶活性损失相对较小,尤其当 pH 值 < 4.0 时,其酶活在一定时间内仍然存在。而先经过超声波处理的菌体的酶活很

快丧失,当 pH 值在 3.5 时,无论先经过超声波处理还是未经过超声波处理的保加利亚乳杆菌,其乳糖酶活性都很低。

此实验结果说明,当环境介质 pH 值 > 3.5 时,保加利亚乳杆菌细胞壁或细胞膜对胞内乳糖酶有保护作用,能保证菌体细胞内 pH 值在维持乳糖酶活性范围内,促进其不断发酵乳糖产生乳酸。而当环境介质 pH 值下降到 3.5 时,丧失了对细胞质的调节作用,使保加利亚乳杆菌细胞内外 pH 值趋于一致,从而使乳糖酶活性受到抑制作用。

正因为保加利亚乳杆菌细胞壁或细胞膜对乳糖酶活性有保护作用,造成了酸奶制品在贮存过程的酸性条件下乳糖酶仍有较大活性,继续发酵乳糖产生乳酸导致了后酸化现象发生。现在可以进一步确定,保加利亚乳杆菌是导致酸奶制品发生后酸化的主要菌,是保加利亚乳杆菌细胞壁或细胞膜的性质保护了细胞内乳糖酶所处介质的 pH 值与细胞外 pH 值不一致,从而使乳糖酶活性受到的影响小。Shan 通过对几种乳酸菌的研究也发现了保加利亚乳杆菌的这种特性^[6]。

参 考 文 献

- 1 朱滨华,马兴胜等.黑龙江商学院学报,1997,13(1):11~16
- 2 刘 慧编.食品微生物学实验手册.哈尔滨:东北农业大学统编教材,1994
- 3 陈铁涛著.克鲁维酵母培养特性及透性化细胞乳糖酶的研制与应用.哈尔滨:东北农业大学硕士学位论文,1998
- 4 Wei-Jen Lin. J. Dairy Sci., 1989(72):351~359
- 5 Greenberg N A. J. Food Sci., 1982(47):1824~1835
- 6 Shan N, Jelen P. J. Food Sci., 1990,55(2):506~509

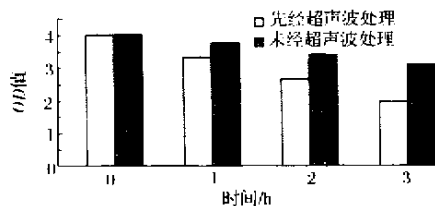


图3 pH4.5下超声波处理前后乳糖酶活性变化

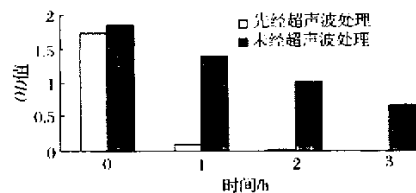


图4 pH4.0下超声波处理前后乳糖酶活性变化

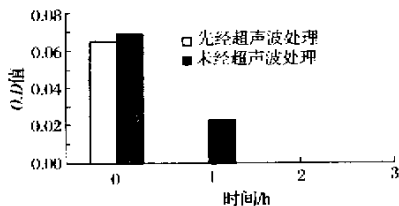


图5 pH3.5下超声波处理前后乳糖酶活性变化

Determination and Property Research on Main Starter Bacteria of Yogurt to Induce Postacidification

Guo Qingquan¹ Zhang Lanwei² Xia Xiufang³

¹(Institute of Chemical Engineering , South China University of Technology , Guangzhou , 510640)

²(College of Food Science , Northeast Agricultural University , Haerbing , 150030)

³(Heilongjiang August First Land Reclamation University , Mishan , 158308)

ABSTRACT *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* were incubated respectively in the storage temperature 25℃. The cultures of *S. thermophilus* and *L. bulgaricus* are in the same condition (the count of bacteria is 7.4×10^7 cfu/mL pH 4.50). At the eleventh day of storage , the culture pH value of *S. thermophilus* is 4.57 , otherwise , *L. bulgaricus* is 3.85 . *S. thermophilus* is confirmed mainly to occur postacidification . *S. thermophilus* 's cell wall or cell membrane protects the activity of β -galactosidase .

Key words yogurt , postacidification , starter bacteria

(上接第 23 页)

表 1 2001 年和 2000 年“五率”指标比较

	出糖率/%		产酸率/%		转化率/%		提取率/%		精制率/%	
	2001 年	2000 年	2001 年	2000 年	2001 年	2000 年	2001 年	2000 年	2001 年	2000 年
最高企业指标	99.98	99.90	12.25	11.94	62.60	62.00	99.98	99.56	98.83	97.30
前 5 位企业平均	99.81	99.84	11.26	10.69	60.11	59.44	98.24	97.95	97.80	96.82
最低企业标准	91.29	95.00	8.05	7.88	53.72	52.32	84.59	82.30	88.47	90.95
行业平均指标	97.81	98.10	9.50	9.22	57.26	55.79	94.20	93.66	95.06	94.65

出糖率 > 99% 以上的厂 2001 年为 8 家 , 比上年减少 1 家 , 产酸率 > 10% 的厂 2001 年为 11 家 , 比上年增加 7 家 , 转化率 > 57% 的厂 2001 年为 13 家 , 比上年增加 5 家 , 提取率 > 95% 的厂 2001 年为 7 家 , 比上年减少 2 家 , 精制率 > 96% 的厂 2001 年为 7 家 , 比上年增加 2 家。

技术指标的提高 , 在于新菌种、新工艺、新设备的采用和管理水平的提高。

4. 经济效益

2001 年利润总额约为 36 772.92 万元(其中河南莲花味精集团第 4 季度利润数尚未收到 , 因而只作推算) , 比上年的 40 872.42 万元下降 10.03%。

利润下降原因是 : 销售价格的大幅度下降和费用的大幅度上升。

5. 评述与展望

综上所述 , 不难看出 (1) 味精产量增长幅度总体略有放慢 , 但少数地区超常发展 (2) 技术指标提高幅度比前几年更快 , 部分骨干企业技术指标大步提高 , 成本大幅下降 , 接近国际水平 , 显露竞争实力 (3) 行业经济效益仍然较好 , 但有些企业滑坡 (4) 不少企业产品结构调整取得明显成效 , 味精之外产品已崭露头角。

纵观行业态势 , 认为 : 味精行业就总体而言还是有利可图 , 但竞争将进一步加剧。行业竞争出现了新格局。据悉 , 国内有些地区已经或正在上味精大项目 , 有些原本生产味精的企业极力开拓或转向其他行业与产品 , 还有不少民营企业挤进味精行业 , 以争一席之地。

全国味精行业会统组 祁国伟