

网络优先数字出版时间: 2016-05-12

网络优先数字出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/45.1075.N.20160512.1516.008.html>

# 具有快速凝乳性能的水牛奶奶酪菌种筛选\*

## Strains Screening for Rapid Milk Clotting of Buffalo Milk into Cheese

甘敏鑫<sup>1</sup>, 吴健程<sup>1</sup>, 刘兴胥<sup>1</sup>, 吕 军<sup>1,2\*\*</sup>

GAN Minxin<sup>1</sup>, WU Jiancheng<sup>1</sup>, LIU Xingxu<sup>1</sup>, LV Jun<sup>1,2</sup>

(1. 南宁市新科健生物技术有限责任公司, 广西南宁 530003; 2. 广西科学院生物研究所, 广西南宁 530007)

(1. Nanning Newkergen Biotechnology Sciences Co. Ltd., Nanning, Guangxi, 530003, China; 2. Biology Institute, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China)

**摘要:**【目的】提高水牛奶产业的经济效益, 为广西水牛奶奶酪工业化生产提供参考。【方法】采用平板筛选法从鲜水牛奶和黄牛奶中分离出能够生产水牛奶奶酪的菌种, 对筛选到的菌株进行初步的发酵性能试验, 并测定其传代稳定性、乳酸和双乙酰含量。【结果】筛选到 1 株能在 4.5 h 内使水牛奶凝固的菌株; 该菌株在最佳发酵温度 37℃ 下, 经过厌氧发酵 4.5 h 即可使水牛奶完全凝固, 所获得凝乳的黏度为 109.2 Pa·S, 酸度为 47.3°T, 双乙酰含量为  $2.826 \times 10^{-3}$  g/L, 乳酸含量为 11.59%。【结论】该菌株产酸能力强、产香性能高、黏度和酸度大、有合适的蛋白质水解特性。

**关键词:** 水牛奶 凝乳 双乙酰 奶酪

中图分类号: S879.1 文献标识码: A 文章编号: 1002-7378(2016)02-0146-05

**Abstract:**【Objective】The objective of this study is to screen strains that can produce cheese from buffalo milk and scalper milk.【Methods】Pure microbial species were isolated from the fresh buffalo milk and cattle milk, which could made buffalo milk coagulate from 4 to 6 h. Then their genetics stability, lactic acid content and diacetyl content were tested.【Results】With preliminary fermentation experiments, the strain 22 was chosen for further experiments, which showed strong acid-producing, high fragrance production, high viscosity and appropriate protein hydrolysate properties.【Conclusion】The results showed that the optimal fermentation condition is at 37℃, for 4.5 h. The resulting cheese has viscosity 109.2 Pa·S, acidity 47.3°T, diacetyl content  $2.826 \times 10^{-3}$  g/L and lactic acid 11.59%.

**Key words:** buffalo milk, curd, diacetyl, cheese

收稿日期: 2015-11-02

修回日期: 2015-11-10

作者简介: 甘敏鑫(1985—), 女, 工程师, 主要从事生物技术研究。

\* 广西自然科学基金青年科学基金项目(2013GXNSFBA019113)资助。

\*\* 通讯作者: 吕 军(1981—), 男, 助理工程师, 主要从事发酵工程研究, E-mail: 304943290@qq.com。

## 0 引言

【研究意义】水牛奶占全球牛奶总产量的 12%, 其营养价值高, 能提供比普通牛奶更多的单位体积能量, 且组分中含有大量的维生素 A 和 D, 如应用于日常饮食中, 将是解决微量元素及优质动物性蛋白质摄入量的一条良好途径。由于具有极高的总固体含量、脂肪、蛋白质、钙胶体及较大尺寸的酪蛋白胶束和脂肪等特点<sup>[1-2]</sup>, 水牛奶是最适合用于发酵乳

制品的牛奶。此外,水牛奶不需要浓缩或者制成奶粉便可做为优质的乳制品。水牛奶所具有的优良理化特点和高营养价值使得水牛奶乳制品具有广阔的开发前景。【前人研究进展】乳制品在发酵过程中,由于各种微生物共存,导致产品容易变质,而乳酸菌产生的乳酸则具有良好的抗微生物作用<sup>[3]</sup>。在乳制品中,双乙酰对于发酵乳制品的风味与香味尤为重要<sup>[4-5]</sup>,它已被美国食品药品监督管理局批准为一种调味品,并用于生产各种口味的食品<sup>[6]</sup>。刘文俊<sup>[7]</sup>测定单菌酸奶发酵期间的发酵时间、滴定酸度、pH值、乳酸含量、双乙酰含量等指标,研究菌种发酵、产酸特性和风味物质产量形成的菌株特异性,同时进行产酸、风味物质产量特性的变化规律和相关性分析,并提出乳酸菌发酵过程是个动态的完整过程。因此平均产酸速率是衡量菌株发酵、产酸特性的重要指标。【本研究切入点】广西水牛奶资源丰富,但产品的品种单一,目前只有鲜牛奶和酸奶上市,市面上尚无水牛奶奶酪产品。【拟解决的关键问题】从鲜水牛奶和黄牛奶中筛选能够在短时间内促进水牛奶奶酪凝结的菌株,对筛选到的菌株进行初步的发酵性能试验,并测定其传代稳定性、乳酸和双乙酰含量。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

样品:市面售买的水牛奶和黄牛奶。

斜面培养基为 MRS 培养基、M17 培养基、E 培养基和 SL 培养基,配方参考文献<sup>[8-10]</sup>,平板培养基在斜面培养基中分别加入 0.2%(W/V)碳酸钙。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 菌种的分离与纯化

将水牛奶和黄牛奶稀释一定倍数后,吸取 0.1 mL 分别涂布于 MRS, M17, E, SL 平板培养基上,静置于 37℃ 培养箱中培养 48 h,挑选各平板上产酸透明圈明显的菌落划线接入新的平板中进行纯化,对筛选到的菌株进行革兰氏染色后在显微镜下观察其形态,并分别接入对应的 MRS, M17, E, SL 斜面培养基中,37℃ 静置培养 24 h,保存备用。

#### 1.2.2 种子液的制备及菌种凝乳性能初测

纯菌种分别经对应的 MRS, M17, E, SL 斜面培养 24 h 后,挑取一环菌体加入装有 5 mL 水牛奶的试管中,37℃ 过夜静置培养活化,再以 3%(V/V)的接种量将试管中已经凝固的水牛奶转接入 5 mL 的新鲜水牛奶试管中,37℃ 静置培养,每小时观察一次水牛奶的凝乳效果,并记录凝固时间,凝固后对其进

行感官评定。

#### 1.2.3 温度对凝乳的影响

参照 1.2.2 节制备发酵种子液,分别在 31℃、34℃、37℃、40℃、43℃ 下进行静置发酵 6 h 后测定凝乳黏度和酸度。其中,黏度采用 NDJ-8S 数显粘度计测定;酸度测定:准确吸取 10 mL 凝乳,用 25 mL 蒸馏水稀释,加入 0.5 mL 5 g/L 的酚酞指示剂,混匀后用 0.1 mol/L 的 NaOH 标准溶液滴定,直至微红色在 1 min 之内不消失为止。把滴定时消耗的 NaOH 体积(mL)乘以 10,即得凝乳酸度。

#### 1.2.4 菌种的稳定性

参照 1.2.2 节制备发酵种子液,在 37℃ 下发酵 4.5 h,观察凝乳状态并测定其黏度和酸度,进行 5 次传代。

#### 1.2.5 双乙酰含量的测定<sup>[11]</sup>

邻苯二胺和双乙酰反应生成 2,3-二甲基喹啉啉,利用反应生成物的盐酸盐在紫外分光光度计 335 nm 波长下有最大吸收值,可对双乙酰进行定量测定。

取纯化后的菌种经斜面培养 24 h 后,挑取一环菌体加入装有 5 mL 水牛奶的试管中,于 37℃ 静置培养 18 h 进行活化。再以 2%(V/V)的接种量接于 100 mL 水牛奶中,于 37℃ 静置发酵 4.5 h 后,将凝乳置于蒸馏瓶中,加入 50 mL 蒸馏水蒸馏。当蒸馏液为 50 mL 时,停止蒸馏,在蒸馏液中加入 50 mL 蒸馏水。吸取 10 mL 于具塞比色管中,向管内加入 0.5 mL 1%(V/V)邻苯二胺溶液,摇匀后于暗处放置 20 min,然后加入 2 mL 4 mol/L 盐酸溶液,摇匀,在 335 nm 下以蒸馏水为空白对照,用紫外分光光度计测定其吸光值。

#### 1.2.6 乳酸的测定

取凝乳 1 g(精密称定),加入 50 mL 蒸馏水和 25 mL 1 mol/L 的 NaOH 溶液,煮沸 5 min,加入酚酞指示剂 2 滴,趁热用 0.5 mol/L 硫酸标准溶液滴定,以蒸馏水为空白对照。乳酸的实际含量  $W$  (mg)计算公式如下:

$$W = 90.08 \times (V_0 - V) \times C \times 2,$$

式中, $V$  表示滴定样品所消耗的硫酸体积(mL), $V_0$  为空白试样滴定所消耗的硫酸体积(mL), $C$  为硫酸浓度(mol/L)。

乳酸溶液的重量百分浓度为

$$\text{乳酸}(\%) = (W/W_1) \times 100\%,$$

式中, $W$  为乳酸的实际含量(mg), $W_1$  为称取样品的重量。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌落形态

从水牛奶和黄牛奶中分离得到 27 株菌株,这些菌落在 4 种培养基上生长的形态主要有圆形白色表面光滑、蘑菇状白色表面光滑、圆形透明表面光滑和片状淡黄表面褶皱等。前 3 种有产酸与不产酸两种,后者不产酸。其中 SL、MRS 培养基上的菌落产酸透明圈较大(图 1),M17 培养基上的产酸菌落极少,E 培养基上的产酸菌落虽较多,但经过发酵培养 6 h 后,可以使牛奶凝结的却极少。

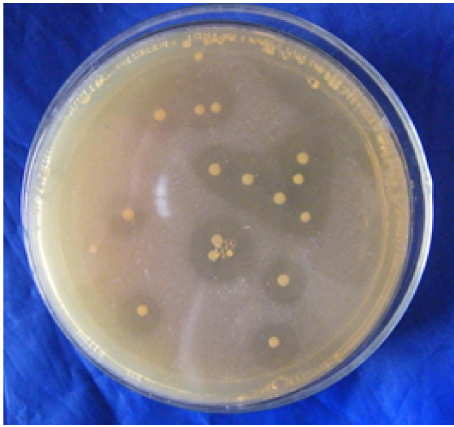


图 1 产透明圈的菌落(MRS 培养基)

Fig.1 Colony which produced transparent circle(MRS culture medium)

在显微镜下观察分离得到的 27 株菌株的形态,结果如图 2 所示,有 8 株(分别为 12~15 号、17~19 号和 22 号)呈链球状排列,为革兰氏阳性;有 12 株(分别为 1~2 号、4~8 号、10~11 号、16 号、20~21 号)呈球形或近似球形,为革兰氏阳性;有 7 株(分别为 3 号、9 号、23~27 号)一般呈杆状,也有近卵圆形的,菌体大多平直,亦有稍弯曲的,菌体两端多钝圆,少数是平截状或尖突状,为革兰氏阳性。

### 2.2 凝乳性能

如表 1 所示,经初步筛选得到的 27 株菌株,其促使牛奶凝固的时间为 4~6 h,凝固后的 pH 值为 3.8~5.5。经过 3 次传代发酵培养,发现 22 号菌株的产酸能力强、产香性能高、黏度和酸度大、有适当的蛋白质水解性能,因此,选取 22 号菌株进行初步的发酵性能研究。

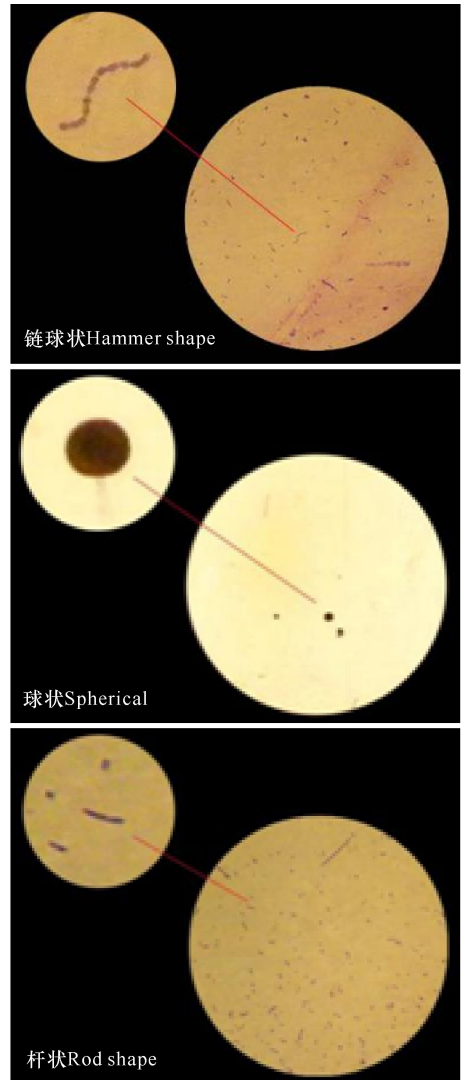


图 2 显微镜镜检结果

Fig. 2 Result of microscopic examination

### 2.3 温度对凝乳的影响

如图 3 所示,22 号菌株对发酵温度的变化敏感,发酵温度过高或者过低时其凝乳黏度和酸度均有所下降,当发酵温度为 37℃ 时,其发酵产物的黏度和酸度均最高,其中黏度值为 109.2 Pa·S,酸度值为 47.3°T。

### 2.4 菌种的稳定性及凝乳中双乙酰和乳酸含量

如表 2 所示,22 号菌株经过 5 次传代后,其理化性质与第一代相近,表明该菌株传代的稳定性好。采用 22 号菌株进行发酵,获得的凝乳中双乙酰的含量为  $2.827 \times 10^{-3}$  g/L,乳酸的含量为 11.59%。

表 1 菌株凝乳性能

Table 1 Milk clotting properties of bacterial strains

序号 No.	培养基 Culture medium	凝固时间 Coagulation time(h)	凝固后 pH 值 pH value after coagulation	凝乳气味 Smell of coagulation	凝乳状态* Coagulation state
1	SL	6.0	3.8	酸, 馊 Sour, spoiled	组织细腻, 光滑, 少许清液 Organization fine, smooth, a little liquid
2	SL	6.0	5.1	奶酸 Sour milk	组织细腻, 光滑, 无清液 Organization fine, smooth, no liquid
3	SL	4.0	4.2	奶酸 Sour milk	组织粗糙, 少许清液 Tissue roughness, a little liquid
4	SL	5.0	5.1	奶酸 Sour milk	组织粗糙, 少许清液 Tissue roughness, a little liquid
5	SL	6.0	4.2	奶酸 Sour milk	组织粗糙, 少许清液 Tissue roughness, a little liquid
6	SL	4.5	4.2	奶酸 Sour milk	组织细腻, 光滑, 较多清液 Organization fine, smooth, a lot of liquid
7	SL	6.0	4.3	奶酸 Sour milk	组织细腻, 光滑, 少许清液 Organization fine, smooth, a little liquid
8	SL	4.0	5.5	奶酸 Sour milk	组织细腻, 光滑, 少许清液 Organization fine, smooth, a little liquid
9	SL	5.0	4.2	奶酸 Sour milk	组织细腻, 光滑, 无清液 Organization fine, smooth, no liquid
10	SL	4.5	4.2	较酸 Sour	组织细腻, 光滑, 少许清液 Organization fine, smooth, a little liquid
11	SL	5.0	4.3	奶酸 Sour milk	组织细腻, 光滑, 少许清液 Organization fine, smooth, a little liquid
12	MRS	6.0	3.8	奶酸, 稍甜 Sour milk, sweet	组织细腻, 光滑, 无清液 Organization fine, smooth, a little liquid
13	MRS	4.0	4.2	奶酸 Sour milk	组织粗糙, 少许清液 Tissue roughness, a little liquid
14	MRS	5.0	4.2	酸, 馊 Sour, sour	组织细腻, 光滑, 少许清液 Organization fine, smooth, a little liquid
15	MRS	6.0	4.1	奶酸 Sour milk	组织细腻, 光滑, 少许清液 Organization fine, smooth, a little liquid
16	MRS	4.0	3.9	奶酸, 稍甜 Sour milk, sweet	组织细腻, 光滑, 少许清液 Organization fine, smooth, a little liquid
17	MRS	4.0	4.0	奶酸 Sour milk	组织细腻, 光滑, 无清液 Organization fine, smooth, no liquid
18	MRS	6.0	4.7	奶酸 Sour milk	组织粗糙, 少许清液 Tissue roughness, a little liquid
19	MRS	4.5	3.9	奶酸 Sour milk	组织细腻, 光滑, 少许清液 Organization fine, smooth, a little liquid
20	MRS	5.0	4.2	奶酸 Sour milk	组织细腻, 光滑, 少许清液 Organization fine, smooth, a little liquid
21	MRS	6.0	4.0	奶酸 Sour milk	组织细腻, 光滑, 少许清液 Organization fine, smooth, a little liquid
22	MRS	4.5	4.1	奶酸, 香甜 Sour milk, sweet	组织细腻, 光滑, 少许清液 Organization fine, smooth, a little liquid
23	M17	5.5	4.2	酸, 馊 Sour, sour	组织粗糙, 大量清液 Tissue roughness, a lot of liquid
24	M17	5.0	4.6	奶酸 Sour milk	组织细腻, 光滑, 少许清液 Organization fine, smooth, a little liquid
25	M17	6.0	5.1	酸, 馊 Sour, sour	组织粗糙, 大量清液 Tissue roughness, a lot of liquid
26	M17	5.0	4.3	酸, 馊 Sour, sour	组织细腻, 光滑, 少许清液 Organization fine, smooth, a little liquid
27	E	6.0	4.9	奶酸, 稍甜 Sour milk, sweet	组织细腻, 光滑, 少许清液 Organization fine, smooth, a little liquid

注: \* 为发酵 6 h 后观察结果

Note: \* indicates the result of 6 h fermentation

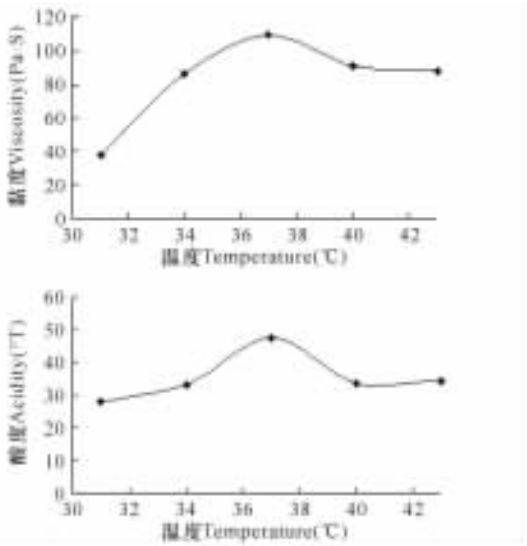


图3 温度对凝乳黏度和酸度的影响

Fig. 3 Effect of temperature on the viscosity and acidity of milk clotting

表2 第22株菌的凝乳理化性质

Table 2 The physicochemical properties of 22th strains of bacteria

传代数 Generation No.	凝乳状态 Coagulation state	黏度 Viscosity(Pa·S)	酸度 Acidity(°T)
1	+++	109.2	47.3
2	+++	108.6	45.5
3	+++	110.3	46.2
4	+++	105.4	45.8
5	+++	108.6	46.4

注: +表示凝乳效果

Note: + indicates the effect of condensed

### 3 结论

本实验从鲜水牛奶和黄牛奶中成功分离出27株菌株,其形态包括链球状、杆状和球状。其中,以22号菌株的传代稳定性最好,初步的发酵性能结果表明,在37°C下进行发酵,其发酵产物的黏度和酸度均为最佳,分别为109.2 Pa·S和47.3°T,双乙酰含量为 $2.826 \times 10^{-3}$  g/L,乳酸含量为11.59%。

#### 参考文献:

[1] SINDHU J S, ARORA S. Milk|buffalo milk[J]. Encyclopedia of Dairy Sciences, 2011; 503-511. DOI: 10.1016/b978-0-12-3744407-4.00316-2.

[2] HUSSAIN I, YAN J, GRANDISON A S, et al. Effects of gelation temperature on Mozzarella-type curd made from buffalo and cows' milk; 2. Curd yield, overall quality and casein fractions[J]. Food Chem, 2012, 135 (3): 1404-1410. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.05.

110.

[3] BIANCHINI A. Lactic acid bacteria as antifungal agents[M]//HOLZAPFEL W. Advances in Fermented Foods and Beverages. [S. l.: s. n.], 2015; 333-353.

[4] 吕嘉彬, 韩迪, 李成涛. 乳品中双乙酰检测方法研究[J]. 食品科学, 2007, 28(1): 275-277.

LV J L, HAN D, LI C T. Study on determination of diacetyl in dairy[J]. Food Science, 2007, 28(1): 275-277.

[5] 田玉娟, 周康, 韩新锋, 等. 乳制品中高产双乙酰乳酸菌的筛选及鉴定[J]. 食品科学, 2015, 36(3): 162-165.

TIAN Y J, ZHOU K, HAN X F, et al. Isolation and identification of high-level diacetyl-producing lactic acid bacteria from milk products[J]. Food Science, 2015, 36(3): 162-165.

[6] SCHAEFFER V, IANNUCCI A. Diacetyl[M]//Reference Module in Biomedical Sciences Encyclopedia of Toxicology (Third Edition). [S. l.: s. n.], 2014; 47-50.

[7] 刘文俊. 嗜热链球菌和保加利亚乳杆菌产酸、风味特性及其功能基因分型和表达研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2014.

LIU W J. Characteristics of Acid and Flavor-Producing *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*, as Well as Their Functional Gene Typing and Expression[D]. Hohhot Municipality: Inner Mongolia Agricultural University, 2014.

[8] 黄良昌, 吕晓玲, 姚秀玲, 等. 保加利亚乳杆菌浓缩培养的研究[J]. 中国乳品工业, 2002, 30(1): 12-15.

HUANG L C, LV X L, YAO X L, et al. The study on the culture condition of *Lactobacillus bulgaricus* [J]. China Dairy Industry, 2002, 30(1): 12-15.

[9] 曹文海, 任国谱. 嗜热链球菌的检验培养基(M17)的改良[J]. 中国乳业, 2006(1): 46-48.

CAO W H, REN G P. Test medium (M17) of *Streptococcus pneumoniae* [J]. China Dairy, 2006(1): 46-48.

[10] 凌代文. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.

LING D W. Classification and Identification of Lactic Acid Bacteria and Experimental Method[M]. Beijing: China Light Industry Press, 1999.

[11] 吕嘉彬, 李成涛. 酸奶中双乙酰含量的测定方法初探[J]. 中国乳品工业, 2006, 34(1): 21-31.

LV J L, LI C T. Discussion on the determination of diacetyl in yogurt[J]. China Dairy Industry, 2006, 34(1): 21-31.