

益生菌在发酵乳中的氨基酸代谢特征、发酵特性和贮藏特性

杨 阳, 郭 帅, 武 婷, 冯 超, 徐 盛, 王记成, 张和平*

(内蒙古农业大学 乳品生物技术与工程教育部重点实验室 农业农村部奶制品加工重点实验室
内蒙古乳品生物技术与工程重点实验室 呼和浩特 010018)

摘要 目的:以复合益生菌发酵牛乳(PFM)为研究对象,对其氨基酸代谢特征、发酵特性和贮藏特性进行评估。方法:将乳双歧杆菌 V9、副干酪乳杆菌 PC-01 和植物乳杆菌 P-8 复合发酵,以商业发酵剂(含嗜热链球菌和保加利亚乳杆菌)为对照,利用光学微流变仪监测发酵期间的流变学参数,发酵结束时的游离氨基酸含量以及贮藏期间活菌数、酸度等理化指标。结果:在发酵过程中,益生菌发酵乳具有高黏性因子、高固液平衡值、低弹性因子和低流动状态的特征;在发酵结束时共检出 14 种游离氨基酸,其中 8 种游离氨基酸含量显著升高,分别是苯丙氨酸(0.93 mg/kg)、缬氨酸(3.3 mg/kg)、丙氨酸(22.6 mg/kg)、赖氨酸(12.6 mg/kg)、苏氨酸(3.8 mg/kg)、丝氨酸(3.5 mg/kg)、脯氨酸(35.4 mg/kg)和亮氨酸(5.4 mg/kg)。贮藏结束时,PFM 组中乳酸杆菌活菌数高达 2.34×10^8 CFU/mL,双歧杆菌达 3.43×10^7 CFU/mL;与对照组(FM)相比,pH 值、滴定酸度和持水力无显著差异,黏度显著降低($P < 0.01$),感官评价评分显著升高($P < 0.05$)。结论:益生菌发酵乳具有优异的发酵及贮藏特性,这为益生菌在发酵乳制品工业生产中的应用提供数据支持。

关键词 益生菌发酵乳;微流变;益生菌;游离氨基酸

文章编号 1009-7848(2023)07-0045-11 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2023.07.006

发酵乳是以生牛乳或复原乳为原料,经巴氏杀菌后添加发酵剂,在一定条件下发酵制得对人体有益的凝乳状产品。在发酵过程中,乳酸菌可产生如乳酸、有机酸、氨基酸、B 族维生素及酶类等对人体具有潜在健康作用的代谢物质^[1]。益生菌(Probiotics)是一类可促进宿主肠道内微生物菌群生态平衡,且对宿主健康或生理功能产生有益作用的活性微生物^[2],又被称为活菌制剂、生态制剂和微生态调节剂。目前益生菌主要有两大类,即乳杆菌类和双歧杆菌类^[3]。

发酵乳作为益生菌发挥健康作用的理想载体,展示出发酵乳和益生菌的双重益生功效^[4]。益生菌发酵乳(本文指发酵菌种不含嗜热链球菌和保加利亚乳杆菌)不仅在益生菌数量上保持较高水平,而且含有更多的生物活性物质^[5]。此外,能显著改善肠道微生态平衡,调节机体免疫力,降低血清中胆固醇含量,提高机体抗氧化能力,延缓衰老等^[5]。

本试验所选菌株为乳双歧杆菌 V9(*Bifidobac-*

terium animalis subsp. V9 (V9)、副干酪乳杆菌 PC-01 (*Lactocaseibacillus paracasei* PC-01 (PC-01) 和植物乳杆菌 P-8 (*Lactiplantibacillus plantarum* P-8(P-8))。其中,V9 分离自内蒙古自治区健康蒙古族儿童肠道^[6];PC-01 分离自西藏拉萨地区当雄县龙仁乡自然发酵酸牦牛奶^[7];P-8 分离自内蒙古自治区草原牧民家庭中的自然发酵酸牛乳^[8]。所述菌种对酸和胆盐均具有较强的耐受性,同时具有抗菌、抗氧化和免疫调节作用,是益生菌发酵乳开发的理想菌株^[6-8]。将上述 3 株益生菌应用于复合益生菌发酵牛乳中,对其发酵特性、贮藏特性进行评价,为益生菌发酵乳制品工业生产提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 材料和设备

1.1.1 试验菌株 试验所用 V9、PC-01 和 P-8 直投式发酵剂均由内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室提供。对照发酵剂,科汉森(中国)有限公司,含保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌,依推荐量添加。

1.1.2 试验材料 试验材料见表 1。

收稿日期: 2022-07-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(31771954)

第一作者: 杨阳,女,硕士生

通信作者: 张和平 E-mail: hepingdd@vip.sina.com

表1 试验原料表

Table 1 List of test materials

试验材料名称	生产厂家
牛乳	蒙牛乳业(集团)股份有限公司
白砂糖	广西凤糖生化股份有限公司
MRS肉汤培养基	英国 Oxoid 公司
L-半胱氨酸盐酸盐	北京酷来搏科技有限公司
万古霉素	北京陆桥技术有限公司

1.1.3 试验仪器与设备 FE28 型 pH 计, 梅特勒(上海)有限公司; Brookfield DV-2T 型黏度计, 美国 Brookfield 公司; 微流变仪 Rheolaser Master, 法国 Formulaction 公司; NSC-II A-1200 型无菌工作台, 苏州苏净有限公司; SRH60-70 型高压均质机, 上海申鹿均质机有限公司; 电热恒温水浴锅, 天津知署科技有限公司; 恒温培养箱, 上海恒科技仪器有限公司; 日立 L-8900 高速氨基酸分析仪, 北京华旭世纪科技有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 发酵乳的制备 以牛乳和白砂糖为基料制备发酵乳, 将牛乳(94%, V/V)通过水浴的方式预热至 65 °C 后, 添加白砂糖(60 g/L), 65 °C 搅拌 15 min 直至完全溶解, 于 65 °C, 20 Mpa 条件下均质, 95 °C 杀菌 5 min, 冷却至(37±0.5)°C 接种发酵, 发酵完成后进行无菌灌装, 放置于 10 °C 条件下储存 28 d, 每隔 7 d 检测相关指标。试验分为 2 组, 以商业发酵剂为对照组(Fermented milk, FM), 试验组为益生菌发酵乳(PFM), 具体接种量见表 2。

表2 菌种接种量

Table 2 Inoculation amount of strains

分组	V9/ CFU·mL ⁻¹	PC-01/ CFU·mL ⁻¹	P-8/ CFU·mL ⁻¹	商业 发酵剂/ CFU·mL ⁻¹
PFM 组	5×10 ⁶	2.5×10 ⁶	2.5×10 ⁶	-
FM 组	-	-	-	3.0×10 ⁵

注:“-”表示未接种。

1.2.2 微流变学参数变化测定 利用光学微流变仪检测发酵乳发酵期间的凝胶体系稳定性。将 20 mL 样品转移至灭菌玻璃瓶中, 移至测定槽中观测发酵过程中弹性因子(Elastic index, EI)、流

动因子(Fluidity index, FI)、宏观黏度因子(Macroscopic viscosity index, MVI)以及固液平衡值(Solid liquid balance, SLB)随时间的变化情况。设置流变仪温度为 37 °C, 每隔 1 min 采集 1 次数据, 样品发酵结束后停止测定, 根据仪器自带分析软件获取相关流变学参数, 综合评价发酵乳微流变特性^[9]。

1.2.3 活菌数的测定 将制备好的发酵乳于 10 °C 条件下贮藏 28 d, 分别在 1, 7, 14, 21, 28 d 参照国标 GB 4789.2-94^[10]进行活菌计数, 使用选择性培养基, 分别计算菌落总数。

1.2.4 酸度的测定 pH 值采用梅特勒 FE20 型 pH 计测定, 每个样品测定 3 次平行并计算平均值; 滴定酸度(TA)按照国家标准 GB 5009.239-2016 中规定的“酚酞指示剂法”进行检测^[11]。具体方法: 取 5.0 g 发酵乳样品, 加 40 mL 蒸馏水, 滴 2~3 滴酚酞指示剂(0.5%), 充分摇匀后, 用 0.1 mol/L 的 NaOH 标准溶液滴定至微红色, 30 s 内不褪色。记录消耗 NaOH 标准溶液的毫升数, 每个样品测定 3 次平行并计算平均值。

1.2.5 持水力和黏度的测定 持水力: 准确称取 20.0 g 发酵乳样品, 置于有滤纸的漏斗中, 室温静置 2 h 后收集滤液并称重^[12], 按如下公式计算持水力:

$$\text{持水力}(\%) = \{1 - [\text{滤液质量}(\text{g}) / \text{样品质量}(\text{g})]\} \times 100 \quad (1)$$

黏度采用 BROOKFIELD DV-1 VISCOMETER 型黏度计 4# 转子在常温下测定, 转子转速 100 r/min, 扭矩 10%~100%, 测定时间 30 s。每个样品测定 3 次平行并计算平均值。

1.2.6 发酵乳中游离氨基酸检测 使用日立 L-8900 高速氨基酸分析仪进行监测, 色谱柱: 2622#pH 离子交换色谱柱 4.5 mm×60 mm。进样量: 20 μL, 柱温: 57 °C, 流速: 衍生试剂 0.35 mL/min。缓冲液: 0.4 mL/min。

准确称取 3 g 样品于 15 mL 离心管中, 加 0.02 mol/L 的盐酸 5 mL, 旋涡混匀 5 min, 超声提取 5 min, 避光静置 2 h, 4 000×g 离心 10 min, 准确取 1 mL 上清液, 加入 1 mL 6%~8% 磺基水杨酸, 涡旋 1 min, 避光静置 1 h, 15 000×g 离心 15 min, 取上清液用 0.22 μm 的滤膜过滤上机测定。

1.2.7 感官评价 采用评分测验法,选择评价指标为气味、滋味、质地色泽、口感,对 PFM 组和 FM 组进行对比评价。请 10 位有品尝经验、不同性别

的专业人员进行评价,按照样品摆放的顺序从左至右评价员依次品尝样品后打分,将所有数据求平均值。

表 3 感官评价表

Table 3 Sensory tasting table

评分项目	评分标准	分数
气味(30分)	具有发酵乳特殊香气,香气浓郁	25~30
	具有发酵乳特殊香气,香气一般	20~24
	无特殊发酵乳香气或稍有异味	<20
滋味(30分)	酸甜适口,有醇香酸奶气味	25~30
	偏酸或偏甜,无异味	20~24
	较酸或较甜,酸甜不协调,有少量异味	<20
质地、色泽(20分)	无气泡,凝乳均匀,外表光滑,无乳清析出,呈乳白色	25~30
	无气泡,凝乳比较均匀,外表略有粗糙感,少量乳清析出,呈微黄色或淡黄色	20~24
	有气泡,凝乳不均匀,外表粗糙,乳清析出,略带灰色或浅黄色	<20
口感(20分)	口感均匀细腻,爽滑厚实	25~30
	口感不够细腻,适中	20~24
	口感粗糙,质地稀疏	<20

1.2.8 数据分析 微流变数据采用 Rheolaser Master 型光学法微流变分析仪自带的 Smart 软件进行分析;偏最小二乘判别分析(PLS-DA)使用 MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.MetaboAnalyst.ca>) 进行分析;游离氨基酸分析、活菌数、酸度、黏度和持水力的结果用“平均值±标准差”表示,采用 Origin 2020 软件作图。

如图 1 所示,PMF 组和 FM 组的 SLB 最初起伏较大,PMF 组在发酵前期 SLB 处于波动状态,13.5 h 后 SLB 恢复为较低值并出现拐点,随后逐渐增加直至发酵结束,结束时间为 17 h,其弹性模量偏向于液态;FM 组的 SLB 在发酵前期 3.5 h 恢复为较低值,随后逐渐增加直至发酵结束,结束时间为 5.5 h,其弹性模量偏向于固态。PMF 组的 $SLB_{pH=4.6}$ 略高于 FM 组,且达到凝胶点($SLB=0.5$)所需时间更长。

2 结果与分析

2.1 发酵乳发酵过程的微流变学变化

MS-DWS 微流变技术主要根据发酵乳中微粒运动和体积变化来研究其胶凝机理^[5,13]。由于发酵乳在发酵过程中,内部环境酸度会逐渐下降,导致发酵乳中固有的聚集体出现不同变化,酪蛋白颗粒结构发生改变,最终形成以酪蛋白胶粒为基础的凝胶结构^[14-15]。由图 1 可知,各组发酵乳的 SLB、EI、MVI 和 FI 变化趋势相同,而各组发酵乳的这些流变学特性之间可能存在一定差异。

SLB 表示产品偏向固态或液态的与时间对应的函数关系。当发酵乳的 SLB 变化范围在 0~0.5 之间,表现出弹性模量,偏向于固态质地;在 0.5~1.0 之间,则表现出黏性模量,偏向于液态质地^[16-17]。

MVI 作为直接反映黏性模量的时间函数,可以显示出发酵乳的黏度变化^[16-17]。由图 1 可知,PMF 组和 FM 组的 MVI 变化趋势是一个多级过程,PMF 组发酵前期 13 h 和 FM 组发酵前期 3.5 h 时样品黏度无明显变化,处于低黏度的初始停滞阶段;随发酵时间延长,样品黏度迅速上升,进入黏度快速变化阶段;随后,各发酵乳样品 MVI 分别在 17 h 和 5.5 h 时上升至最大值,进入高黏度阶段,此时的发酵乳形成了较为稳定的凝胶体系^[15]。而 PMF 组在发酵结束时,相比于 FM 组具有更稳定的凝胶体系。

EI 作为直接反映弹性模量的时间函数,可以快速、简便地表征一个样品的凝胶硬度。EI 值与凝

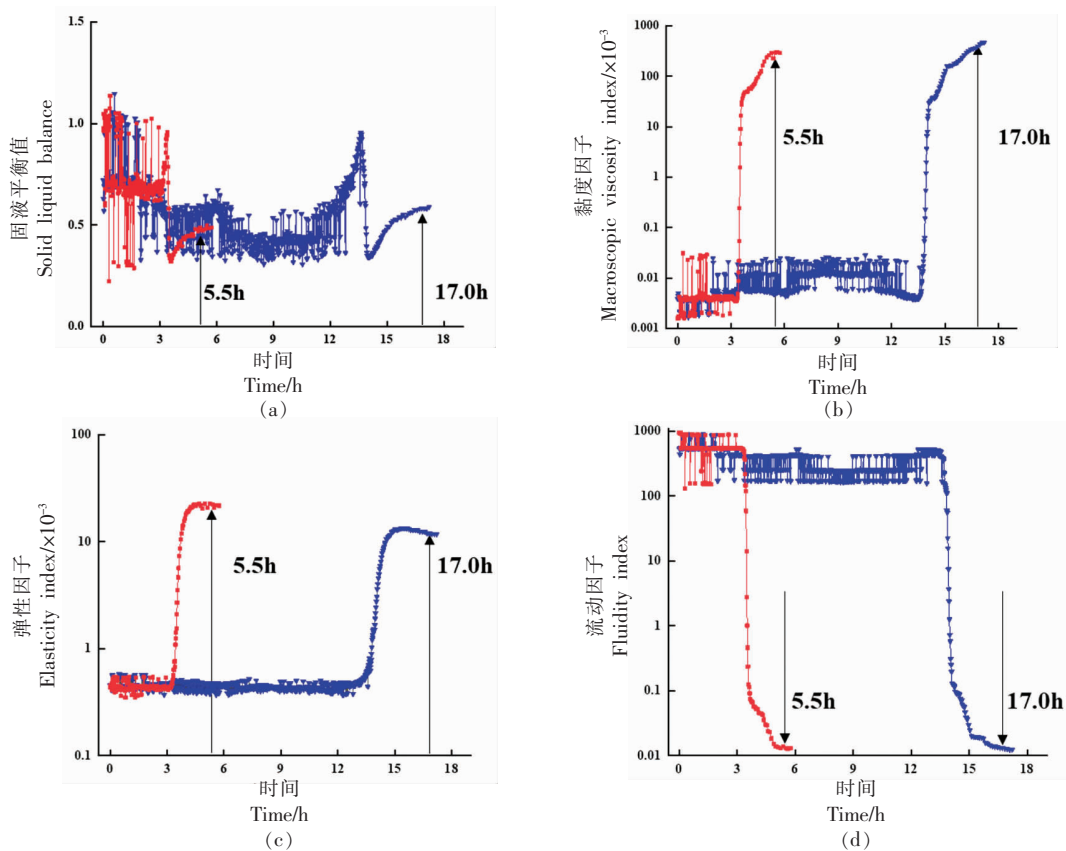


图1 发酵过程的微流变学变化

Fig.1 Microrheological changes during fermentation

胶弹性变化呈正比, EI 值越大, 凝胶结构越强, 样品越稳定^[18-19]。如图 1 所示, 随着发酵时间的延长, PMF 组和 FM 组的 EI 值明显升高, PMF 组在发酵 0~13 h 内保持稳定, FM 组在发酵 0~3 h 内保持稳定, 两者均无明显差异, 此时酸乳中酪蛋白还未形成凝胶的网状结构。当 PMF 组发酵 13 h, FM 组发酵 3 h 后, EI 值出现拐点, 达到凝胶点; 由于发酵乳中酪蛋白完全解离并迅速聚集形成凝胶结构, EI 值明显升高且达到最大值^[20]。随后, 二者的 EI 值略微下降, 而 FM 组的 EI 值最大, 说明添加益生菌后的发酵乳其弹性有一定程度的下降。

FI 变化能表征发酵乳的流动性, 反映发酵乳中微观粒子的运动快慢, FI 值越大则样品流动性越强^[21]。其中高流动因子(约 10 Hz)为液态性质, 低流动因子(约 10^{-2} Hz)为固态性质。结合图 1 中流动因子的变化趋势可知, 在发酵过程中, 发酵乳样品的 FI 变化可以分为 3 个阶段。PMF 组在发酵前期(0~13 h), FI 值处于波动状态, 样品处于相对

稳定的高流动性状态; 随后出现拐点, 流动性快速下降, 发酵乳初步形成较为稳定的凝胶结构, 进入低流动性阶段。而 FM 组与 PMF 组流动因子的变化趋势相同, 且 FM 组从相对稳定的高流动性状态变为低流动状态所需时间为 5.5 h。

综上所述, 在发酵终点时, PFM 组的 MVI 值大于 FM 组, 表现出高黏性因子的特征, 有利于益生菌发酵乳形成稳定的凝胶结构; PFM 组的 SLB 值大于 FM 组, 表现出高固液平衡值的特征, 说明添加益生菌后的发酵乳黏弹性更大, 有利于产品的稳定; PFM 组的 EI 值小于 FM 组, 表现出低弹性因子的特征, 说明益生菌发酵乳的弹性较低; PFM 组的 FI 值小于 FM 组, 表现出低流动状态的特征, 说明益生菌发酵乳具有更高的黏性液体特征。

2.2 发酵结束时游离氨基酸的含量

在 PFM 组和发酵初始(0 h)共检测出 14 种游离氨基酸, 分别是苏氨酸(THR)、异亮氨酸(ILE)、

亮氨酸(LEU)、赖氨酸(LYS)、苯丙氨酸(PHE)、缬氨酸(VAL)、天门冬氨酸(ASP)、丝氨酸(SER)、丙氨酸(ALA)、脯氨酸(PRO)、谷氨酸(GLU)、甘氨酸(GLY)、酪氨酸(TYR)和精氨酸(ARG)。对其进行

总体分析, 生成了游离氨基酸聚类热图(图 2)。PFM 组相比于原奶, 其 THR、ILE、LEU、LYS、PHE、VAL、ASP、SER、ALA、PRO 和 ARG 的含量均显著升高; 而 GLU、GLY 和 TYR 的含量均下降。

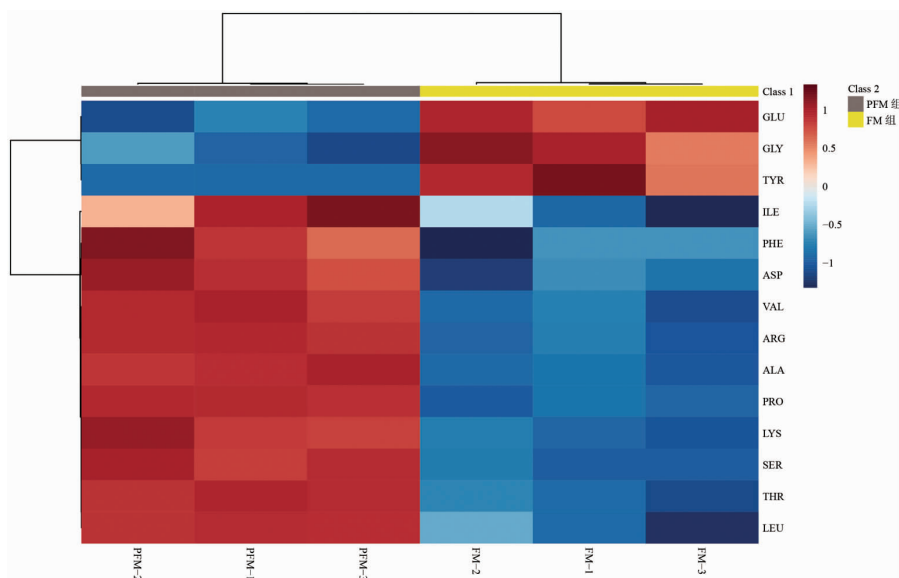
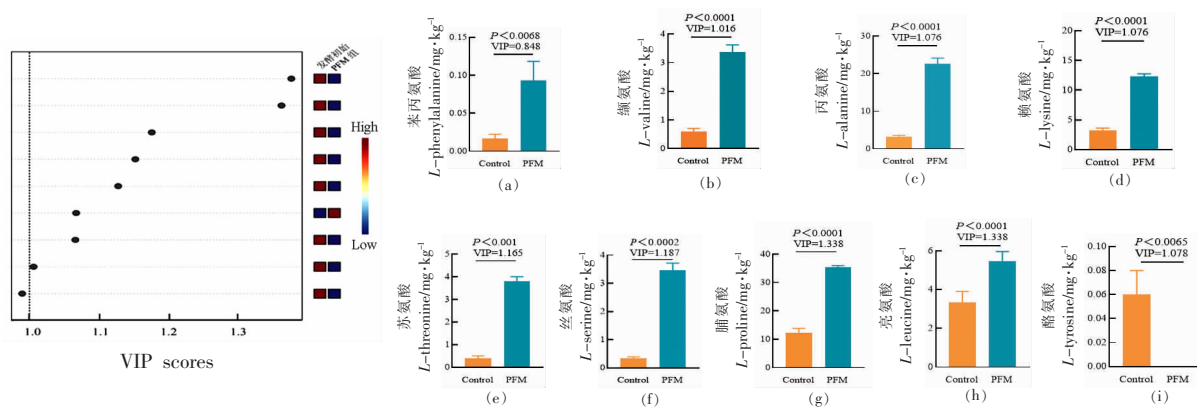


图 2 聚类分析样品中游离氨基酸代谢物差异

Fig.2 Cluster analysis of free amino acid metabolites in samples



注:图中“VIP”为“变量投影重要性”,表示为含量显著变化的游离氨基酸。

图 3 VIP 游离氨基酸的 PLS-DA 图

Fig.3 The PLS-DA diagram of VIP free amino acids

如图 3 所示, 利用 PLS-DA 对其差异代谢物进行区分。R2Y 和 Q2 分别为拟合优度和预测能力参数,验证 PLS-DA 模型的准确性和可预测性。R2Y 定义为模型解释的数据中方差的比例, 表示拟合的优度;Q2 定义为模型可预测数据中的方差

比例,表示预测能力。R2Y 和 Q2 大于或等于 0.5 的模型被认为适合于识别分析。该模型中 R2Y 和 Q2 值分别为 0.997 和 0.994,表明该模型具有较好的准确性和可预测性。结果显示,共有 9 种游离氨基酸同时满足 P 值<0.05 和 VIP 值>1。PFM 组游

离氨基酸含量显著升高的有 PHE 为 0.93 mg/kg, VAL 为 3.3 mg/kg, ALA 为 22.6 mg/kg, LYS 为 12.6 mg/kg, THR 为 3.8 mg/kg, SER 为 3.5 mg/kg, PRO

为 35.4 mg/kg, LEU 为 5.4 mg/kg; 游离氨基酸含量显著下降的有 TYR, FM 组含量为 0.6 mg/kg, PFM 组含量为 0.06 mg/kg。

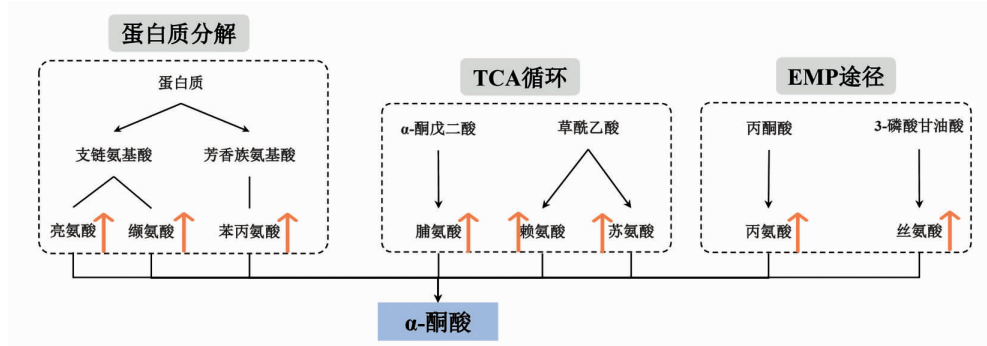


图4 差异氨基酸代谢途径

Fig.4 The metabolism pathway of amino acids

氨基酸是构成蛋白质的基本单位,其种类和数量是考察食品营养价值的重要指标之一。氨基酸类型与含量是影响发酵乳风味的因素之一^[22],进而影响人体健康,其主要来源于发酵乳发酵过程中蛋白质分解^[23]、三羧酸循环(TCA循环)^[24]以及糖酵解途径(EMP途径)^[25]。根据图4可知,蛋白质分解为多肽,在肽酶的作用下分解为LEU、VAL和PHE。LEU、VAL属于支链氨基酸,LEU能更快的分解,转化为葡萄糖,防止肌肉损伤^[26],而VAL作为肌肉代谢和协调所必需,在保持身体氮平衡上具有重要的作用^[27];PHE属于芳香族氨基酸,对发酵乳滋味具有重要的作用,使得发酵乳的香味更加浓郁^[28]。PRO通过TCA循环,由 α -酮戊二酸催化还原形成;LYS和THR通过TCA循环,以草

酰乙酸为碳架合成。PRO产生的代谢物具有花香,与发酵乳风味密切相关^[29];LYS作为人体的必需氨基酸之一,起到调节人体代谢平衡,增进食欲,促进幼儿发育等作用^[30];THR能够促进血红蛋白合成,增进食欲,促进生长^[31]。ALA通过糖酵解途径,由丙酮酸衍生而来,可为机体提供碳骨架、氮,以及能量等^[32];而SER在糖酵解途径中,以3-磷酸甘油酸为碳架合成,作为一种功能性氨基酸,在调控机体免疫功能、微生态平衡等方面发挥重要作用^[33]。

2.3 发酵乳贮藏过程的活菌数变化

乳酸菌活菌数可直接影响发酵乳的品质、特性及口感^[34]。如图5所示,PFM组乳酸杆菌和双歧杆菌活菌数均有所下降,28d结束时乳酸杆菌活

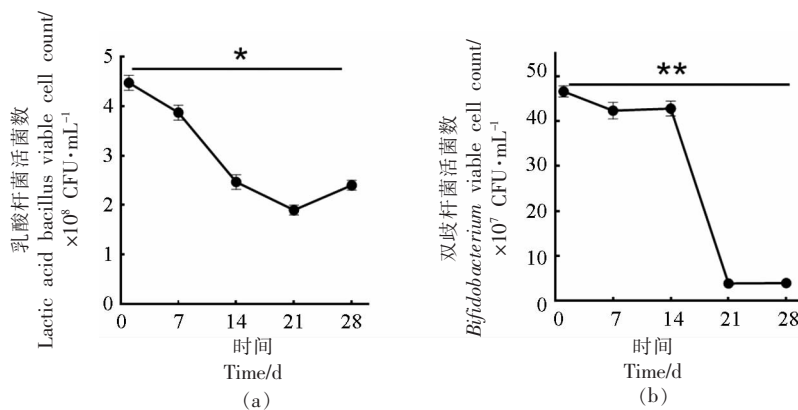


图5 贮藏过程的活菌数变化

Fig.5 Changes of viable cell counts during storage

菌数达 2.4×10^8 CFU/mL ($P < 0.05$)、双歧杆菌活菌数达 3.9×10^7 CFU/mL ($P < 0.01$)。总体分析,PFM 组活菌数下降可能是由于发酵乳酸度升高抑制乳酸菌生长,使乳酸菌总数减少。国家标准 GB 19302-2010 规定^[35],发酵乳中乳酸菌活菌数应在 10^6 CFU/mL 以上,而本试验菌株在贮藏期间活菌数均维持在 10^8 CFU/mL 以上。

2.4 发酵乳贮藏过程的酸度变化

发酵乳酸度的变化由图 6 可知,在贮藏前期(1~7 d),PFM 组和 FM 组 pH 值均明显下降,滴定酸度的变化趋势与之相反。这是由于在贮藏初期,菌种生长代谢能力旺盛,在 α -半乳糖苷酶作用下,继续分解剩余碳水化合物产酸,导致酸度增加幅度较大^[36],随贮藏期的延长,菌种代谢受到抑制,pH 值和 TA 值变化趋势逐渐平缓^[37]。PMF 组 pH 值在 7 d 内由贮藏 1 d 的 4.46 下降到 4.15,随后保持在 4.0 左右,28 d 达 3.97;FM 组 pH 值在 7 d 内由贮藏 1 d 的 4.28 下降到 4.04,随后保持在 4.0 左右,28 d 达 3.96。各组发酵乳滴定酸度在贮藏期间均呈上升趋势,在贮藏 1~7 d,PMF 组滴定酸度由 84°T 上升到 110°T , $\Delta\text{pH}=26^\circ\text{T}$;FM 组由 91°T 上升到 100°T , $\Delta\text{TA}=9^\circ\text{T}$;贮藏后期二者趋于平稳,最终都保持在 108°T 左右,组间无显著差异。

2.5 发酵乳贮藏过程的黏度和持水力变化

黏度的产生是由于发酵乳中菌体持续产酸使

pH 值下降到酪蛋白凝固点,同时菌体不断分泌黏多糖,最终使发酵乳呈现均一黏稠状态^[38]。如图 7 所示,在 28 d 贮藏期间内黏度变化趋势为 PFM 组先增大后减小,14 d 时达到最大值 $726 \text{ mPa}\cdot\text{s}$,这可能与所选益生菌完成发酵后依旧保持较高活性,胞外多糖继续积累所致^[39]。随着贮藏期继续延长,PFM 组黏度开始下降,可能是由于贮藏过程中,菌体持续产酸,导致发酵乳中乳酸含量增加到一定浓度时,使菌体代谢受到抑制,乳酸生成速度下降,限制黏度继续上升^[40];而 FM 组则呈持续下降趋势,由 1 d 的 $1002 \text{ mPa}\cdot\text{s}$,下降到 $260 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ 。

持水力是评价发酵乳产品品质的重要指标,持水能力的强弱,乳清析出的多少以及发酵乳的组织状态都影响产品感官及风味保留^[41]。如图 7 所示,在 28 d 的贮藏期内,PFM 组和 FM 组持水力均呈现下降趋势。这可能是因为在发酵乳贮藏期间菌种不断代谢需要水的参与^[42],也可能与发酵乳贮藏过程中,较低的 pH 值破坏了凝胶体的结构有关。在贮藏期间 1~14 d 内两组持水力下降幅度最快,PFM 组由 1 d 的 63.85% 下降至 58.8%,FM 组由 1 d 的 67.45% 下降至 58.85%,随后二者有所回升。在贮藏 28 d 后,PFM 组持水力下降至 59.6%,FM 组下降至 57.42%。总体分析,PFM 组在贮藏期间内持水力普遍高于 FM 组,组间无显著差异。

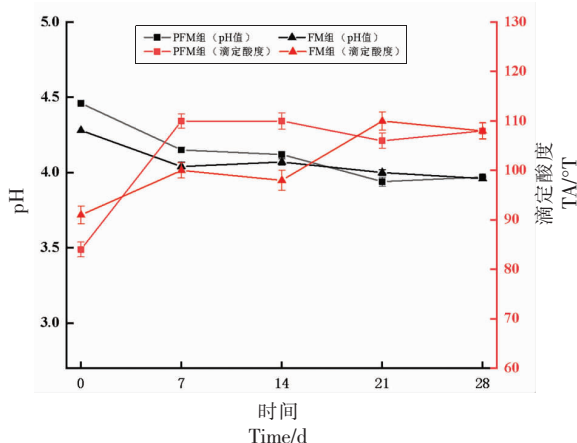


图 6 贮藏过程的酸度变化

Fig.6 Changes of acidity during storage

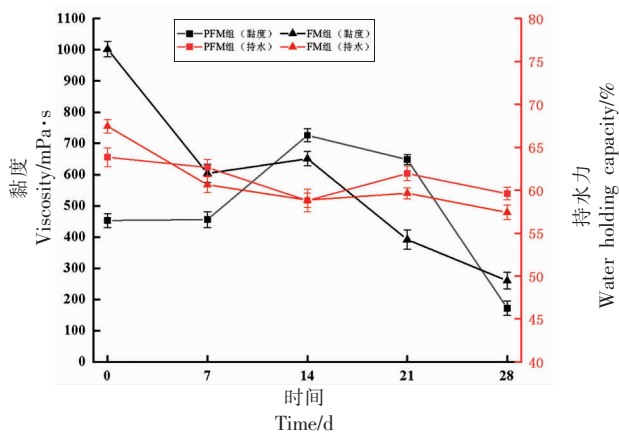


图 7 贮藏过程的黏度和持水力变化

Fig.7 Changes of viscosity and water holding capacity during storage

2.6 发酵乳贮藏过程的感官品质变化

分别将 PFM 组和 FM 组样品在 1,7,14,21,28 d 时进行感官评价,评分结果如图 8 所示:两组在贮藏期间其感官评价得分均有显著下降($P < 0.01$)。贮藏开始时,PFM 组相比于 FM 组得分较高($P < 0.05$),状态光滑细腻,香气浓郁,具有醇香的酸奶味;在 10 °C,1~7 d 贮藏期间,两组样品得分呈上升趋势,这可能是由于在此期间样品黏度较高,持水力较好,有利于发酵乳样品风味保留。在 7~28 d 两组样品感官评分整体出现下降趋势,贮藏结束时 PFM 组得分 87.0 分,FM 组得分 84.1 分。整体上,PFM 组在 10 °C,28 d 的贮藏期间内滋味、气味、质地、色泽以及口感均优于 FM 组。

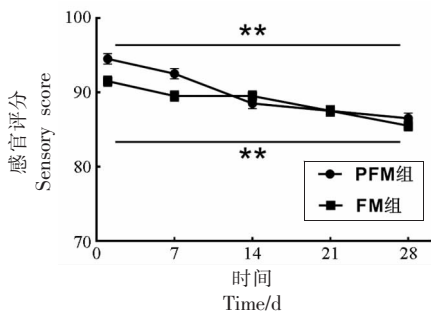


图 8 贮藏期间感官评分结果

Fig.8 Sensory score results during storage

3 结论

益生菌乳双歧杆菌 V9 (*Bifidobacterium animalis subsp. V9*)、副干酪乳杆菌 (*Lactobacillus paracasei* PC-01) 和植物乳杆菌 P-8 (*Lactiplantibacillus plantarum* P-8) 复合发酵牛乳具有较好的流变学特性,利于发酵乳形成紧密的凝胶网络。发酵乳中游离 PHE、VAL、ALA、LYS、THR、SER、PRO 和 LEU 含量显著升高,各检测指标在 10 °C 期间均有较好的稳定性,全贮藏期内活菌数高于 10^8 CFU/mL,具有组织状态细腻和感官得分高的特点。因此,所述研究可为益生菌发酵乳产品开发提供思路,对益生菌在功能性乳制品中的应用具有重要意义。

参 考 文 献

[1] KONG H R, TANG S H, HU P, et al. Current

status and progress of research on sour milk[J]. *Chin Dairy Ind*, 2016, 44(5): 32-35.

- [2] EMAMIE A D, RAJABPOUR M, GHANAVATI R, et al. The effects of probiotics, prebiotics and synbiotics on the reduction of IBD complications, a periodic review during 2009-2020[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2021, 130(6): 24-54.
- [3] 韩璐瑶. 益生菌的功能及其在功能食品中的应用[J]. *现代食品*, 2019(12): 101-104.
- HAN L Y. The function of probiotics and its application in functional food [J]. *Modern Food*, 2019 (12): 101-104.
- [4] LI C, SAM K C C, RAMA N. Comparative studies on the effect of probiotic additions on the physicochemical and microbiological properties of yoghurt made from soymilk and cow's milk during refrigeration storage (R2)[J]. *Food Control*, 2021, 119 (1): 107474.
- [5] HILL D, SUGRUE I, TOBIN C, et al. The *Lactobacillus casei* group: History and health related applications[J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 2-7.
- [6] 王记成, 高鹏飞, 周琦, 等. 双歧杆菌 V9 对便秘和腹泻患者的临床研究[J]. *营养学报*, 2011, 33(1): 70-74.
- WANG J C, GAO P F, ZHOU Q, et al. Clinical study of *Bifidobacterium* V9 in patients with constipation and diarrhea[J]. *Journal of Nutrition*, 2011, 33(1): 70-74.
- [7] BAO Q H, LIU W J, JIE Y, et al. Isolation and identification of cultivable lactic acid bacteria in traditional yak milk products of Gansu Province in China[J]. *J Gen Appl Microbiol*, 2012, 58(2): 95.
- [8] BAO Y, WANG Z L, ZHANG Y, et al. Effect of *Lactobacillus plantarum* P-8 on lipid metabolism in hyperlipidemic rat model [J]. *European Journal of Lipid Science & Technology*, 2012, 114(11): 1230-1236.
- [9] HE J, HAN Y, LIU M, et al. Effect of 2 types of resistant starches on the quality of yogurt[J]. *Journal of Dairy Science*, 2019, 7: 10-12.
- [10] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. 食品卫生微生物学检验菌落总数测定: GB/T 4789.2-2003[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004: 2-4.
- Ministry of Health of the People's Republic of China, Standardization Administration of China. Deter-

- mination of the total number of colonies in microbiological examination of food hygiene: GB/T 4789.2-2003[S]. Beijing: China Standards Press, 2004: 2-4.
- [11] 中华人民共和国卫生部. 食品酸度的测定: GB 5009.239-2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 3.
Ministry of Health of the People's Republic of China. Determination of food acidity: GB 5009.239-2016[S]. Beijing: China Standards Press, 2016: 3.
- [12] SAHAN N, YASAR K, HAYALOGLU A A. Physical, chemical and flavour quality of non-fat yogurt as affected by a β -glucan hydrocolloidal composite during storage[J]. Food Hydrocolloids, 2008, 22(7): 1291-1297.
- [13] CHARCHOGLYAN H, BAE J E, KWON H, et al. Rheological properties and volatile composition of fermented milk prepared by exopolysaccharide-producing *Lactobacillus acidophilus* n.v. Er2 317/402 strain Narine[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2017, 22(3): 327-338.
- [14] PANG Z, DEETH H, PRAKASH S, et al. Development of rheological and sensory properties of combinations of milk proteins and gelling polysaccharides as potential gelatin replacements in the manufacture of stirred acid milk gels and yogurt[J]. Journal of Food Engineering, 2016, 169(5): 27-37.
- [15] AMAI A V, ROBINSON R K. 酸乳科学与技术[M]. 姜茂竹, 译 2 版. 北京: 中国农业出版社, 2003: 64-67.
AMAI A V, ROBINSON R K. Yogurt science and technology[M]. Jiang Maozhu, translated. 2nd edition. Beijing: China Agricultural Press, 2003: 64-67.
- [16] 吕瑞鹤. 典型食品乳液体系的微流变学研究[D]. 武汉: 湖北工业大学, 2017.
LÜ R H. Study on micro-rheology of typical food emulsion system [D]. Wuhan: Hubei University of Technology, 2017.
- [17] ROHART A, MICHON C, CONFAC J, et al. Evaluation of ready-to-use SMLS and DWS devices to study acid-induced milk gel changes and syneresis[J]. Dairy Science & Technology, 2016, 96(4): 459-475.
- [18] WANG J, GUO Z, ZHANG Q, et al. Effect of probiotic *Lactobacillus casei* Zhang on fermentation characteristics of set yogurt[J]. International Journal of Dairy Technology, 2010, 63(1): 105-112.
- [19] 刘贺, 庚平, 李君, 等. 蛋白酶对豆浆凝胶过程微流变性质的影响[J]. 食品科学, 2016, 37(3): 1-5.
LIU H, GENG P, LI J, et al. Effect of protease on the micro-rheological properties of soybean milk gel process[J]. Food Science, 2016, 37(3): 1-5.
- [20] 王雅楠, 韩育梅, 何君, 等. 添加益生元对酸乳凝胶过程及微观结构的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(15): 100-105.
WANG Y N, HAN Y M, HE J, et al. Effect of adding prebiotics on the gelation process and microstructure of yogurt[J]. Food Science, 2019, 40(15): 100-105.
- [21] 罗天淇, 蔡森. 辅助发酵菌株对发酵乳品质的影响[J]. 乳业科学与技术, 2019, 42(3): 1-8.
LUO T Q, CAI M. Effect of auxiliary fermentation strains on the quality of fermented milk [J]. Dairy Science and Technology, 2019, 42(3): 1-8.
- [22] 孙慧阳. 西部特色小品种乳及其发酵乳蛋白质及氨基酸分析与评价[D]. 陕西: 西北农林科技大学, 2018.
SUN H Y. Analysis and evaluation of protein and amino acids of small-scale milk with western characteristics and its fermented milk[D]. Shaanxi: Northwest A&F University, 2018.
- [23] 蒋世禄. 蛋白酶能将蛋白质水解成氨基酸吗?[J]. 中学生物教学, 2013(1): 100.
JIANG S L. Can protease hydrolyze protein into amino acids?[J]. Biology Teaching in Middle Schools, 2013(1): 100.
- [24] 张劼. 掌握三羧酸循环, 学好糖、脂肪和氨基酸代谢[J]. 中国教育导刊, 2005(8): 63-64.
ZHANG J. Master the tricarboxylic acid cycle and learn the metabolism of sugar, fat and amino acids well[J]. China Education Guide, 2005(8): 63-64.
- [25] 李玉环, 孙国平, 李俊. PKM2 在肿瘤代谢及进展中的作用[J]. 安徽医科大学学报, 2018, 53(5): 818-821.
LI Y H, SUN G P, LI J. The role of PKM2 in tumor metabolism and progression[J]. Journal of Anhui Medical University, 2018, 53(5): 818-821.
- [26] DAVIS J M, BA ILEY S P. Possible mechanisms of central nervous system fatigue during exercise [J]. Med Sports Exerc, 1997, 29(1): 45-57.
- [27] 徐毅. 维生素 D₃ 对生长兔赖氨酸利用的影响[J]. 中国饲料, 2020, 650(6): 91-95.

- XU Y. Effect of vitamin D₃ on lysine utilization in growing rabbits[J]. *China Feed*, 2020, 650(6): 91-95.
- [28] 蒋滢, 徐颖, 朱庚伯. 人类味觉与氨基酸味道[J]. *氨基酸和生物资源*, 2002(4): 73.
JIANG Y, XU Y, ZHU G B. Human taste and amino acid taste[J]. *Amino Acids and Biological Resources*, 2002(4): 73.
- [29] YVON M, RIJNEN L. Cheese flavour formation by amino acid catabolism[J]. *International Dairy Journal*, 2001, 11(4/5/6/7): 185-201.
- [30] 王振宇, 卢卫红. 天然产物分离技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2012: 60-65.
WANG Z Y, LU W H. Technology of natural products separation [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2012: 60-65.
- [31] 陈荣庆, 刘伟, 皮雄娥, 等. *L*-色氨酸的研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2014(14): 4438-4440.
CHEN R Q, LIU W, PI X E, et al. Research progress of *L*-tryptophan[J]. *Anhui Agricultural Sciences*, 2014(14): 4438-4440.
- [32] JANES B K, BENDER R A. Alanine catabolism in *Klebsiella aerogenes*: Molecular characterization of the dadAB operon and its regulation by the nitrogen assimilation control protein[J]. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(3): 563.
- [33] 何流琴, 金顺顺, 周锡红, 等. 丝氨酸对动物机体健康的影响研究进展[J]. *动物营养学报*, 2020, 32(10): 15-25.
HE L Q, JIN S S, ZHOU X H, et al. Research progress on the effects of serine on animal health[J]. *Acta Sinica Sinica*, 2020, 32(10): 15-25.
- [34] 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. Study on acidogenesis, flavor characteristics and functional gene typing and expression of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2014.
- [35] 中华人民共和国卫生部. 食品安全国家标准-发酵乳: GB 19302-2010[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010: 1-3.
Ministry of Health of the People's Republic of China. National Food Safety Standard-Fermented Milk: GB 19302-2010[S]. Beijing: China Standards Press, 2010: 1-3.
- [36] GARRO M S, VALDEZ G, GIORI G. Temperature effect on the biological activity of *Bifidobacterium longum* CRL 849 and *Lactobacillus fermentum* CRL 251 in pure and mixed cultures grown in soymilk[J]. *Food Microbiology*, 2004, 21(5): 511-518.
- [37] 贾亚婷, 郭艳梅, 蔡逸安, 等. 不同菌种发酵品质与抗氧化能力研究[J]. *中国乳品工业*, 2017, 45(9): 22-25.
JIA Y T, GUO Y M, CAI Y A, et al. Study on fermentation quality and antioxidant capacity of different strains[J]. *China Dairy Industry*, 2017, 45(9): 22-25.
- [38] 闫志国. 发酵乳在贮藏期间的理化性质的变化[J]. *乳业科学与技术*, 2011, 4(2): 74-76.
YAN Z G. Changes of physical and chemical properties of fermented milk during storage[J]. *Dairy Science and Technology*, 2011, 4(2): 74-76.
- [39] 郭帅. 适用于豆乳发酵的嗜热链球菌筛选及其应用研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2018.
GUO S. Screening and application of *Streptococcus thermophilus* suitable for soybean milk fermentation [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2018.
- [40] 范瑞, 林伟锋, 顾宗珠, 等. 乳酸菌活菌数对酸乳理化特性的影响[J]. *中国乳品工业*, 2008, 36(1): 16-18.
FAN R, LIN W F, GU Z Z, et al. Effect of viable lactic acid bacteria number on physical and chemical characteristics of yogurt[J]. *China Dairy Industry*, 2008, 36(1): 16-18.
- [41] 赵新淮. 乳品化学[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 12-15.
ZHAO X H. Dairy Chemistry[M]. Beijing: Science Press, 2007: 12-15.
- [42] 药璐. 益生菌发酵乳发酵工艺优化与品质研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2013.
YAO L. Study on fermentation technology optimization and quality of probiotic fermented milk [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2013.

Amino Acid Metabolism, Fermentation and Storage Characteristics of Probiotics in Fermented Milk

Yang Yang, Guo Shuai, Wu Ting, Feng Chao, Xu Sheng, Wang Jicheng, Zhang Heping*

(Inner Mongolia Agricultural University, Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Ministry of Education, Key Laboratory of Dairy Products Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Inner Mongolia Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Hohhot 010018)

Abstract Objective: In this study, the fermentation and storage characteristics of probiotic fermented milk (PFM) were evaluated. Methods: *Bifidobacterium animalis* subsp. V9 (*Bifidobacterium animalis* subsp. V9), *Lactocaseibacillus paracasei* PC-01 (*Lactocaseibacillus paracasei* PC-01), and *Lactiplantibacillus plantarum* P-8 (*Lactiplantibacillus plantarum* P-8) were mixed fermented with control group compared (containing *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*). Optical microrheometer was used to monitor the rheological parameters during fermentation, the content of free amino acids at fermentation termination, the viable cell count, titrable acidity (TA), and other physical and chemical indexes during storage. Result: The fermented milk of probiotics showed high viscosity factor, high solid-liquid equilibrium value, low elasticity factor, and low flow state. Fourteen kinds of free amino acids were detected at the end of fermentation, among which eight kinds of amino acids were significantly increased, content of phenylalanine (0.93 mg/kg), valine (3.3 mg/kg), alanine (22.6 mg/kg), lysine (12.6 mg/kg), threonine (3.8 mg/kg), serine (3.5 mg/kg), proline (35.4 mg/kg) and leucine (5.4 mg/kg). The viable cell counts of *Lactobacillus* and V9 in PFM group was 2.34×10^8 CFU/mL at storage initial and 3.43×10^7 CFU/mL at the end of storage (28 d), respectively. Compared with the control group (FM), there were no significant differences in pH value, TA, and water holding capacity, and the viscosity was significantly reduced ($P < 0.01$), and sensory taste score was significantly increased ($P < 0.05$). Conclusion: The PFM group has excellent fermentation and storage characteristics, which can provide data support and theoretical basis for the industrial production of probiotic fermented dairy products.

Keywords probiotic fermented milk; micro-rheology; probiotics; free amino acids