



弱后酸化瑞士乳杆菌的筛选及发酵特性研究

杨玲¹, 仵红岩¹, 贾洪利¹, 张彦位¹, 孙策¹, 路江浩¹, 何方², 齐世华^{1*}

1 河北一然生物科技股份有限公司, 河北 石家庄 050000

2 四川大学华西公共卫生学院, 四川 成都 610041

杨玲, 仵红岩, 贾洪利, 张彦位, 孙策, 路江浩, 何方, 齐世华. 弱后酸化瑞士乳杆菌的筛选及发酵特性研究. 微生物学报, 2022, 62(3): 824–835.

Yang Ling, Wu Hongyan, Jia Hongli, Zhang Yanwei, Sun Ce, Lu Jianghao, He Fang, Qi Shihua. Isolation and characterization of a *Lactobacillus helveticus* strain with reduced post-acidification. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(3): 824–835.

摘要:【目的】在大健康背景下, 发酵乳凭借其优良的营养和保健功能备受青睐。后酸化是发酵乳在贮存、运输和销售等过程中活性乳酸菌继续代谢产酸导致的, 严重影响产品的感官品质, 降低菌株的存活率。本文通过筛选弱后酸化的瑞士乳杆菌, 改善发酵乳的后酸化问题。【方法】本研究以瑞士乳杆菌 L551 为出发菌株, 硫酸新霉素为筛选压力, 筛选弱后酸化的瑞士乳杆菌。以鲜牛奶为基料, 比较弱后酸化菌株与原始菌株发酵特性之间的差异。【结果】筛选得到了弱后酸化瑞士乳杆菌 L551-1, 其发酵过程产酸变慢, 42 °C 发酵 7–8 h 产酸速度为 9 °T/h, 较原始菌株 (19 °T/h) 降低 53%; 42 °C 发酵 24 h 酸度为 155 °T, 较原始菌株 (259 °T) 降低 40%; 发酵乳 4 °C 存储 21 d 的酸度为 122 °T, 较原始菌株 (158 °T) 降低 23%。采用气相色谱-质谱联用仪 (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) 比较两菌株发酵乳的挥发性风味物质组成和含量, 未见显著差异。【结论】通过硫酸新霉素筛选获得的弱后酸化瑞士乳杆菌 L551-1 可显著改善后酸化问题, 这对直投式发酵剂的开发与应用具有重要意义。

关键词: 瑞士乳杆菌; 后酸化; 发酵特性; 发酵乳; 风味物质

*Corresponding author. Tel: +86-311-85178678; E-mail: yiting2268@126.com

Received: 27 August 2021; Revised: 18 October 2021; Published online: 13 January 2022

Isolation and characterization of a *Lactobacillus helveticus* strain with reduced post-acidification

YANG Ling¹, WU Hongyan¹, JIA Hongli¹, ZHANG Yanwei¹, SUN Ce¹, LU Jianghao¹, HE Fang², QI Shihua^{1*}

¹ Hebei Inatural Biotech Co., Ltd., Shijiazhuang 050000, Hebei, China

² West China School of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan, China

Abstract: [Objective] Fermented dairy are favored for their excellent nutrition and health functions concomitantly. Post-acidification is caused by the continuous metabolism of active lactic acid bacteria during the process of storage, transportation and sales, which seriously affects its sensory quality and the number of viable strains. This study screened the low-post-acidification *Lactobacillus helveticus* to resolve the post-acidification of its fermented dairy. [Methods] In this study, *Lactobacillus helveticus* L551 was used as the original strain. Using neomycin sulfate as the selection pressure select the weakly acidified *Lactobacillus helveticus*. Comparing the difference of fermentation characteristics between the weakly acidified strain and the original strain. [Results] The acid production rate of weakly acidified *Lactobacillus helveticus* L551-1 was slowed down. The acid production rate of 7–8 h at 42 °C was 9 °T/h, which was 53% lower than the original strain (19 °T/h); the acidity of fermentation at 42 °C for 24 h was 155 °T, which was 40% lower than that of the original strain (259 °T); the post-acidification of fermented milk was 122 °T stored at 4 °C for 21 days, which was 23% lower than the original strain (158 °T). Using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) compared the composition and type of volatile flavor compounds in fermented milk of the two strains, and there was no significant difference. [Conclusion] Through neomycin sulfate, the weakly post-acidified *Lactobacillus helveticus* L551-1 was obtained, which can significantly improve the post-acidification problem of fermented milk, and have a great significance to the development and application of direct starter.

Keywords: *Lactobacillus helveticus*; post-acidification; fermentation properties; fermented dairy; flavor substances

发酵乳指牛乳等动物乳经乳酸菌发酵而制成的一大类乳制品^[1]。目前,我国发酵乳产量以年平均 25%的速度增长,因其含有大量活性益生菌,兼备营养与保健功能,越来越被消费者喜爱^[2]。发酵乳在贮存、运输和销售等过程中,活性乳酸菌仍继续代谢产酸,会导致后酸化现象。后酸化会严重影响发酵乳的品质,降低益生菌的存活率,缩短产品的保质期,是乳品领域面临的重大关键共性难题,严重制约着发酵乳产业的发展^[3]。目前发酵乳后酸化控制

主要包括调整发酵剂中球杆菌比例和筛选弱后酸乳酸菌两种方法,其中筛选弱后酸的乳酸菌是从根本上解决发酵乳后酸化问题的关键^[4]。

瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus*)作为益生菌,在调节肠道菌群平衡、保护肝脏、降低血清胆固醇和降血压方面发挥着重要作用^[5-7]。瑞士乳杆菌具有出色的产酸、耐酸和蛋白水解能力,广泛应用于发酵乳制品的生产,但这些特性也不可避免地导致了发酵乳的后酸化问题^[8]。H⁺-ATPase 是乳酸菌抵御酸胁迫抗性的关键酶,

通过消耗 ATP 将胞内 H^+ 排至胞外, 维持胞内 pH 的相对恒定, 保证菌株正常生长代谢产酸^[9]。因此, 筛选低活性 H^+ -ATPase 的乳酸菌, 可以降低菌株的酸胁迫抗性, 弱化菌株代谢产酸能力, 进而改善发酵乳的后酸化问题^[10]。硫酸新霉素属于氨基糖苷类抗生素, 进入细胞后通过与 30S 核糖体亚基结合来抑制菌株的生长^[11]。硫酸新霉素的摄取是一个耗能过程, 低活性 H^+ -ATPase 的菌株因供能不足, 无法摄入该抗生素, 而表现出抗性^[12]。目前, 关于硫酸新霉素筛选低活性 H^+ -ATPase 突变株的报道主要集中于植物乳杆菌^[13]、保加利亚乳杆菌^[14]和乳酸乳球菌^[15]等。因此, 本文应用硫酸新霉素筛选低活性 H^+ -ATPase 的瑞士乳杆菌突变株, 以期改善发酵乳货架期的后酸化问题, 为直投式发酵剂开发与应用储备菌株资源。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

瑞士乳杆菌 L551 来源于河北一然生物科技股份有限公司菌株资源库(YMCC), 分离自西藏那曲地区传统发酵乳制品, 保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 保藏编号为 CGMCC NO.15604。

1.2 主要试剂和仪器

脱脂奶培养基(12%脱脂乳粉); MRS 培养基(北京陆桥技术股份有限公司); 硫酸新霉素(阿拉丁公司); 脱脂奶粉(新西兰恒天然有限公司); 鲜牛乳(君乐宝牛奶); NaCl、NaOH(国药集团化学试剂有限公司); 细菌基因组提取试剂盒(生工生物工程(上海)股份有限公司); Prime STAR Max Premix (TaKaRa); DL-CJ-2ND II 超净工作台(北京东联哈尔仪器制造有限公司); YJGY-70-60 均质机(天津市特斯达食品机械科技有限公司); BPH-9272 型精密恒温培养箱(上

海一恒科学仪器有限公司); FE28 型 pH 计(梅特勒-托利多仪器有限公司); 7890A-5975C 气相色谱-质谱联用仪(GC-MS) (美国安捷伦公司); 固相微萃取(SPME)手动进样手柄、50/30 μ m DVB/CAR/PDMS 萃取头(Supelco 公司); 5078HW-1 数显恒温磁力搅拌器(杭州仪表电机有限公司); JJ200 型电子天平(常熟市双杰测试仪器厂); YXQ-100SII 立式压力蒸汽灭菌器(上海博讯实业有限公司医疗设备厂); BWS-27G 精密恒温水槽(上海一恒科学仪器有限公司)。

1.3 弱后酸化菌株的筛选^[15]

取 -80°C 冻存的瑞士乳杆菌 L551, 快速融解后转接至新鲜 MRS 培养基中, 37°C 静置培养 24 h, 以 3%接种量连续传代培养 2 次; 将菌液振荡混匀, 取 100 μL 于含有硫酸新霉素(400 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和溴甲酚紫指示剂(pH 5.2 黄色-pH 6.8 紫色)的 MRS 平板涂布培养, 37°C 培养 72 h; 挑取显色圈较小的单菌落于脱脂奶培养基, 37°C 培养 18 h; 以 3%接种量转接至脱脂奶培养基, 每 1 小时测定 pH, 持续至 24 h, 以时间为横坐标, pH 为纵坐标绘制菌株的 pH 曲线。挑选产酸能力较弱的菌株。以产酸能力较弱的菌株为出发菌株重复上述筛选步骤, 最终获得理想的弱后酸化瑞士乳杆菌。

1.4 H^+ -ATPase 基因分析

1.4.1 基因组 DNA 提取

取 -80°C 冻存的瑞士乳杆菌 L551, 快速融解后转接至新鲜 MRS 培养基中, 37°C 静置培养 24 h, 以 3%接种量传代培养 1 次; 将菌液振荡混匀, 取 500 μL 菌液 8 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 使用细菌基因组提取试剂盒提取总 DNA。

1.4.2 PCR 扩增 H^+ -ATPase 基因

H^+ -ATPase 共包含 8 个亚基, 编码基因分别为 *atpA*、*atpB*、*atpC*、*atpD*、*atpE*、*atpF*、*atpG*

和 *atpH*^[3]。从 GenBank 数据库中查找瑞士乳杆菌 *H*⁺-ATPase 编码基因的序列信息,应用 Primer Premier 5.0 设计基因的扩增引物(表 1),并委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行引物合成。PCR 反应体系:模板 1 μ L,上、下游引物各 2 μ L,Prime STAR Max Premix 25 μ L,ddH₂O 20 μ L。PCR 反应程序:98 $^{\circ}$ C 3 min;98 $^{\circ}$ C 10 s,48 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,33 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.4.3 琼脂糖凝胶电泳

配置 1%的琼脂糖凝胶,取 5 μ L PCR 扩增产物点样并进行电泳,于凝胶成像仪观察目的条带。

1.4.4 PCR 产物纯化与测序

PCR 产物委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行纯化与测序。

1.5 弱后酸菌株发酵特性验证

1.5.1 发酵基料制备

取 94%的新鲜牛乳,搅拌升温至 60 $^{\circ}$ C,加入 6%白砂糖,搅拌至完全溶解;60–65 $^{\circ}$ C、

(0.018–0.020) $\times 10^3$ Pa 下均质;取 500 mL 基料于不锈钢缸子中 95 $^{\circ}$ C 巴氏杀菌 5 min;冷水中降温至 42 $^{\circ}$ C。

1.5.2 发酵过程产酸对比

弱后酸化菌株和原始菌株在脱脂奶培养基中进行活化,以 3%接种量接种于牛乳基料中,42 $^{\circ}$ C 水浴锅恒温发酵,分别于发酵 0、2、4、6、7、8、10、12、14、16、18、20、22、24 h 测定发酵乳的酸度。参照 Q/HBYR 0003S 采用滴定法测定发酵乳的酸度,以 0.5%酚酞作为指示剂,用 0.1 mol/L 的 NaOH 标准溶液滴定,用吉尔涅尔度($^{\circ}$ T)表示。

1.5.3 发酵乳货架期后酸和活菌数对比

弱后酸化菌株和原始菌株在脱脂奶培养基中进行活化,以 3%接种量接种于牛乳基料中,42 $^{\circ}$ C 水浴锅恒温发酵至酸度达 100 $^{\circ}$ T,破乳 800 r/min 持续 3 min,降温,4 $^{\circ}$ C 过夜后熟。分装发酵乳分别于 4 $^{\circ}$ C 和 25 $^{\circ}$ C 存储,并于 0、3、7、14、21 d 测定产品的滴定酸度和活菌数。参照 GB 4789.35-2016 测定发酵乳中乳酸菌的活菌数。

1.5.4 菌株后酸稳定性跟踪

弱后酸化菌株和原始菌株在脱脂奶培养基中以 3%接种量连续传代培养,共传 10 代,参照 1.5.3 方法,测定 25 $^{\circ}$ C 存储货架期内发酵乳的后酸稳定性。

1.5.5 发酵乳挥发性风味物质测定^[16–17]

(1) GC 条件

色谱柱(DB-WAX 聚乙二醇);升温程序起始温度为 35 $^{\circ}$ C,保持 6 min;然后以 8 $^{\circ}$ C/min 的速率升至 80 $^{\circ}$ C,保持 2 min;再以 5 $^{\circ}$ C/min 的速率升至 110 $^{\circ}$ C;最后以 10 $^{\circ}$ C/min 的速率升至 210 $^{\circ}$ C,保留 10 min;载气(He)流速为 1.0 mL/min;进样口温度:250 $^{\circ}$ C (适用于 DVB/CAR/PDMS 萃取头)。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 PCR primers

Primers	Sequences
<i>atpAF</i>	CGGTATCGCTCAAACTT
<i>atpAR</i>	ACTTTCTTCATAGCCTTAATCT
<i>atpBF</i>	ATGGAGAAATCATTTGTT
<i>atpBR</i>	TTATTCTGTAGTAACCTTCTT
<i>atpCF</i>	TTAGTGACCTTTAGTGTTGT
<i>atpCR</i>	ATGGCAGATCCAGAAAAG
<i>atpDF</i>	TTGAGTGAAGGTGAAATCGTT
<i>atpDR</i>	CTACTTTTCTAGTAATGCTTTAGCT
<i>atpEF</i>	ATGTCAGAAGCTTTTAAATACCT
<i>atpER</i>	TTAAAGGAAAAGAATCAAGAAG
<i>atpFF</i>	ATGACTATTCAAACATTATTGTC
<i>atpFR</i>	TTAATCATCCAACCTCTTAAT
<i>atpGF</i>	TTACTCTAAGGCATTTGCACC
<i>atpGR</i>	ATGCCTGCATCTTACTTGAGT
<i>atpHF</i>	TTAATTTTCATCAATTATTTGTC
<i>atpHR</i>	ATGGCTTTAAGTAGAGAAGAAGT

(2) MS 条件

EI 离子源：电子轰击能量为 70 eV；离子源温度为 230 °C。全扫描模式，质量扫描范围 m/z ：35–500 AMU，无溶剂延迟。

(3) SPME 萃取方法

取发酵乳样品 7 mL，加入 1 mL 饱和 NaCl 溶液，60 °C 条件下用 50/30 μm 的 DVB/CAR/PDMS 萃取头顶空恒温萃取 30 min，然后将萃取头在 250 °C 进样口热解析 5 min，进样，进行 GC-MS 分析。

(4) 定性分析

利用本地 NIST 08 标准库自动检索各组分质谱数据，利用面积归一化法计算各组分

峰面积(即离子色谱图中每种风味物质组分峰面积)。

1.6 数据处理

应用 Excel 和 Origin 2018 进行数据处理及绘图，每组样品 3 个平行。

2 结果与分析

2.1 弱后酸化瑞士乳杆菌的筛选

以瑞士乳杆菌 L551 为出发菌株，经过 10 次逐步筛选，获得弱后酸化菌株 L551-1。比较 L551-1 和 L551 的显色圈、生长曲线(MRS 培养基)和产酸曲线(脱脂奶培养基)，结果分别如图 1 和图 2 所示。

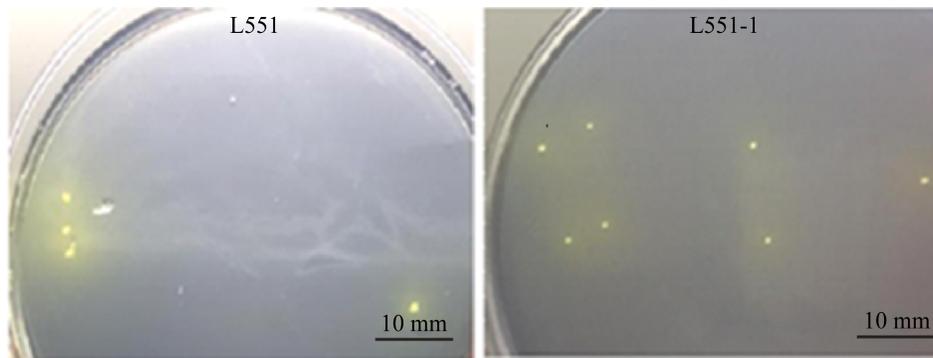


图 1 L551 和 L551-1 的显色圈对比

Figure 1 Comparison of color circles of L551 and L551-1.

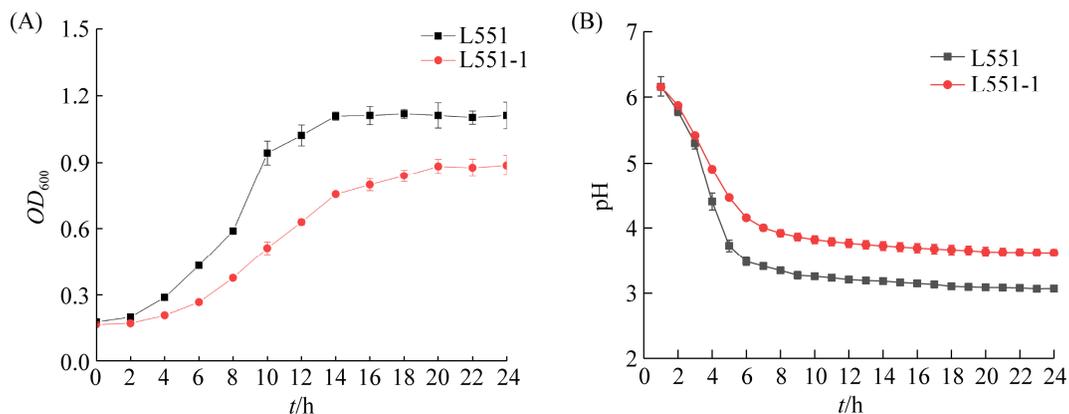


图 2 L551 和 L551-1 的生长曲线(A)和 pH (B)曲线

Figure 2 The growth (A) and pH (B) curves of L551 and L551-1.

瑞士乳杆菌代谢产酸使得溴甲酚紫呈现黄色, 如图 1 所示, L551 菌株显色圈较大、颜色呈亮黄色, 其中心亮点的直径大约在 1.74–2.12 mm; 而菌株 L551-1 显色圈明显偏小, 颜色较暗, 其中心亮点的直径大约在 0.86–1.18 mm, 表明 L551-1 的产酸能力明显减弱。生长曲线显示, 与 L551 相比, L551-1 对数期生长速率和稳定期的菌量均明显降低。pH 曲线显示, L551 前期 pH 下降迅速, 发酵 3–4 h, pH 降至 4.5, 后期 pH 趋于稳定, 24 h 的 pH 为 3.07; L551-1 前期 pH 下降明显减慢, 发酵 4–5 h, pH 降至 4.5, 后期 pH 趋于稳定, 但 24 h 的 pH 为 3.57–3.67, 较 L551 明显升高。综上, 筛选获得的 L551-1 的产酸能力显著降低。

2.2 弱后酸化菌株 H^+ -ATPase 的基因分析

2.2.1 H^+ -ATPase 编码基因

以出发菌株 L551 与弱后酸化菌株 L551-1 的基因组为模板, 经 PCR 扩增和凝胶电泳, 获得 H^+ -ATPase 编码基因, 结果如图 3 所示, L551 和 L551-1 均成功扩增出全部的 H^+ -ATPase 编码基因, 其中同一个基因中 L551 来源的占左侧泳道, L551-1 来源的占右侧泳道。

2.2.2 测序结果分析

(1) 变异位点查找

应用 DNAMAN 对测序结果进行拼接和比对, 结果如表 2 所示, 弱后酸化菌株 L551-1 的

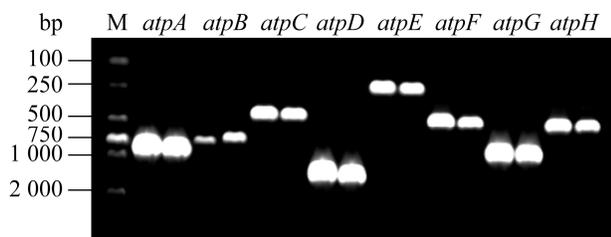


图 3 L551 和 L551-1 的 H^+ -ATPase 基因

Figure 3 The genes of H^+ -ATPase of L551 and L551-1. Left: L551; Right: L551-1.

表 2 基因序列分析

Table 2 The analysis of gene sequence similarity

Genes	Length/bp	The variable sites
<i>atpA</i>	931	0
<i>atpB</i>	723	0
<i>atpC</i>	447	0
<i>atpD</i>	1 375	0
<i>atpE</i>	228	4
<i>atpF</i>	503	0
<i>atpG</i>	1 017	0
<i>atpH</i>	568	0

atpE 基因上存在 4 个变异位点, 其他 7 个基因均未见突变。

(2) *atpE* 基因的序列分析

H^+ -ATPase 的 F_0 基团在细胞膜上形成质子通道, *atpE* 编码 F_0 基团的 c 亚基, c 亚基参与物质运动的环的形成^[18]。弱后酸化菌株 L551-1 的 *atpE* 基因存在 4 个变异位点, 如图 4 所示。

(3) *atpE* 基因编码氨基酸序列分析

应用 NCBI 中 Open Reading Frame Finder 工具, 预测 L551 与 L551-1*atpE* 基因的开放阅读框, 并通过 DNAMAN 对氨基酸序列进行比对, 结果显示 *atpE* 基因序列改变使得编码氨基酸序列发生改变, L551-1 增加第 1–15 和 55–67 位点氨基酸, 16 位点由蛋氨酸(M)突变为亮氨酸(L), 43 位点由蛋氨酸(M)突变为异亮氨酸(I)。因此, *atpE* 基因突变是 L551-1 产酸能力减弱的原因(图 5)。

2.3 弱后酸化菌株发酵特性验证

2.3.1 发酵过程的产酸对比

对比出发菌株 L551 与弱后酸化菌株 L551-1 发酵过程中滴定酸度的变化, 结果如图 6 所示。

发酵前期 L551 与 L551-1 产酸基本一致, 6 h 后 L551-1 的酸度开始明显低于 L551; 以 100 °T 作为发酵乳的终点酸度, L551 需发酵 7 h, 而 L551-1 需发酵 8 h; L551 发酵 6–7 h, 酸度增长速度很快, 为 19 °T/h, 不利于生产中

```

L551-1atpE.seq ASSEMBLYFSEQTENCESINTCNTIGSATGTCAGAAGCTTTTAAATACCTTGCTGCATCC
L551-atpE.seq ASSEMBLYFSEQTENCESINTCNTIGSATGTCAGAAGCTTTTAAATACCTTGCTGCATCC
*****

L551-1atpE.seq A-CTCGCAGCTGGTTTAGCAGCTTTAGCTGCTGCATTGGGTAACGGTAAAGTTATTTCAA
L551-atpE.seq A-CTCGCAGCTGGTTTAGCAGCTTTAGCTGCTGCATTGGGTAACGGTAAAGTTATTTCAA
*****

L551-1atpE.seq AACTCTTGAAGGTATGGCTCGTCAACCTGAAAGTGCAGATAACTTAAAGAGCAACAATATT
L551-atpE.seq AACTCTTGAAGGTATGGCTCGTCAACCTGAAAGTGCAGATAACTTAAAGAGCAACAATGTT
*****

L551-1atpE.seq TATCGGTGTTGGTTTGGTTCGAAAGCCGTTCCATTTTAGCTATCGTTGTTGCCTTCTTGAT
L551-atpE.seq TATCGGTGTTGGTTTGGTTCGAAAGCCGTTCCGATTTCAGCTATCGTTGTTGCCTTCTTGAT
*****

L551-1atpE.seq TTTTTCCTTTAAA
L551-atpE.seq TTTTTCCTTTAAA
*****
    
```

图 4 L551 和 L551-1 的 *atpE* 基因序列比对结果

Figure 4 The *atpE* gene sequence alignments of L551 and L551-1.

```

L551-1atpE.seq ASSEMBLYFSEQUENCESINTCNTIGSMLHPLAAGLAALAAALGNGKVISKTLEGMARQP
L551-atpE.seq ASSEMBLYFSEQUENCESINTCNTIGS-----MNGKVISKTLEGMARQP
*****

L551-1atpE.seq ESADNLRATIFIGVGLIEAVPIILAIVVAFLIFSFK
L551-atpE.seq ESADNLRATIFIGVGLIEAVPI-----
*****
    
```

图 5 L551 和 L551-1 的 *atpE* 基因编码氨基酸序列比对结果

Figure 5 The amino acid sequence alignments of L551 and L551-1 for *atpE*.

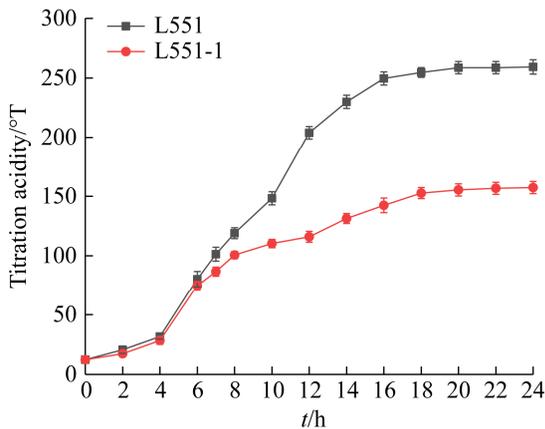


图 6 L551 和 L551-1 发酵过程的产酸曲线

Figure 6 The acidity curves of L551 and L551-1 during fermentation.

终点酸度的控制，而 L551-1 在发酵终点阶段，酸度增长速度较为缓和，为 9 °T/h，对实际生产更为有利；发酵至 24 h，L551 酸度高达 259 °T，而 L551-1 仅为 155 °T，较 L551 降低 40%。综上，发酵过程中弱后酸化瑞士乳杆菌 L551-1 的产酸能力显著降低。

2.3.2 发酵乳货架期后酸和活菌数对比

(1) 发酵乳后酸对比

对比出发菌株 L551 与弱后酸化菌株 L551-1 发酵乳货架期后酸差异，结果如图 7 示。

4 °C 存储条件下，L551 发酵乳的货架期酸度增长幅度大，100 °T 发酵终止后，经 4 °C 过

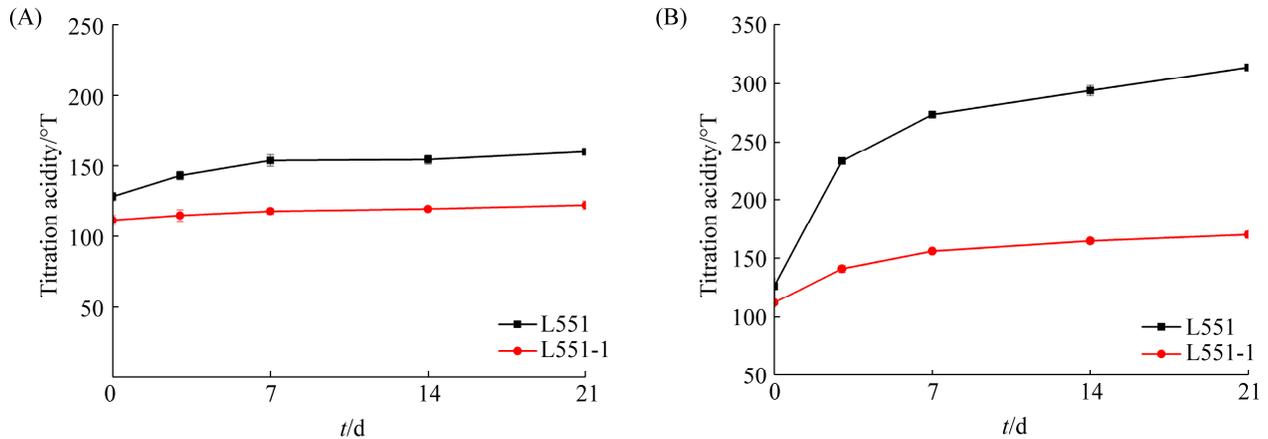


图 7 L551 和 L551-1 货架期后酸曲线

Figure 7 Post-acidification curves of L551 and L551-1 during shelf life. A: 4 °C; B: 25 °C.

夜后熟，酸度即达到 128 °T，4 °C 存储 7 d 达到 153 °T，21 d 达到 159 °T；L551-1 发酵乳的货架期酸度增长明显减缓，经 4 °C 过夜后熟，酸度为 111 °T，4 °C 存储 7 d 为 117 °T，14 d 为 119 °T，21 d 为 122 °T。综上所述，在 4 °C 存储，L551-1 发酵乳的后酸化明显减弱。

25 °C 存储条件下，L551 发酵乳的货架期酸度增长幅度很大，25 °C 存储 3 d，L551 酸度为 235 °T，7 d 达到 273 °T，21 d 高达 314 °T，后酸化严重；而 L551-1 发酵乳的后酸化现象明显减弱，25 °C 存储 3 d 酸度为 145 °T，7 d 为

156 °T，21 d 为 167 °T，较出发菌株 L551 降低 147 °T。综上所述，在 25 °C 存储，L551-1 发酵乳的后酸化显著减弱。

(2) 发酵乳活菌数对比

对比出发菌株 L551 与弱后酸化菌株 L551-1 发酵乳货架期活菌数的差异，结果如图 8 所示。

4 °C 存储条件下，发酵乳的活菌数逐渐下降，L551 在 7 d 内的活菌数维持在 1.00×10^9 CFU/mL，14 d 降至 7.80×10^8 CFU/mL，21 d 为 6.85×10^8 CFU/mL；L551-1 初始活菌数为

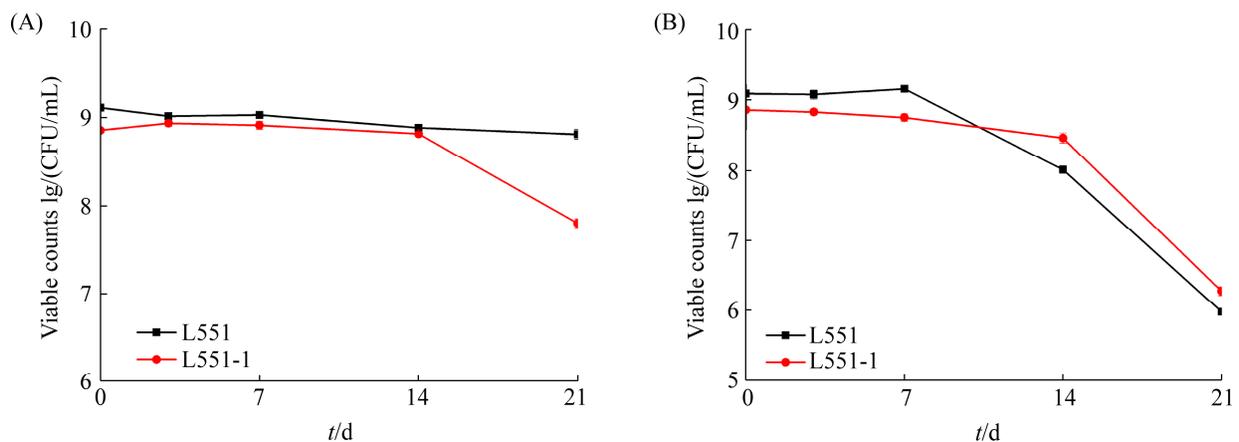


图 8 L551 和 L551-1 货架期活菌数曲线

Figure 8 The viable counts of L551 and L551-1 during shelf life. A: 4 °C; B: 25 °C.

6.85×10^8 CFU/mL, 在第3天达到 8.50×10^8 CFU/mL, 7 d 时与 3 d 持平, 14 d 的活菌数稍有下降, 但仍 $> 1.00 \times 10^8$ CFU/mL 以上, 21 d 降至 7.60×10^7 CFU/mL, 但均满足发酵乳活菌数的国标要求 ($> 1.00 \times 10^6$ CFU/mL)。综上, 在 4 °C 存储, L551 和 L551-1 发酵乳均保持较高水平的活菌数。

25 °C 存储条件下, 发酵乳的活菌数迅速下降, L551 和 L551-1 发酵乳的起始活菌数均大于 1.00×10^8 CFU/mL, 且在前 7 d 内未见明显变化, 其中 L551 维持在 1.00×10^9 CFU/mL 以上, L551-1 维持在 6.30×10^8 CFU/mL 以上; 14 d 活菌数都保持在 1.00×10^8 CFU/mL 以上; 21 d 活菌数衰减严重, L551 降至 9.15×10^5 CFU/mL, L551-1 降至 1.60×10^6 CFU/mL。综上, 在 25 °C 存储, 货架期末 L551 发酵乳的活菌数衰减至 $< 1.00 \times 10^6$ CFU/mL; 而 L551-1 可保证在货架期内活菌数均 $> 1.00 \times 10^6$ CFU/mL, 因此, L551-1 具有开发直投式发酵剂和进行产业化应用的潜力。

2.3.3 后酸稳定性跟踪

出发菌株 L551 与弱后酸化菌株 L551-1 连续传 10 代, 制备发酵乳, 跟踪 25 °C 存储的后酸稳定性, 结果如图 9 示。L551-1 的后酸稳定

性较高, 25 °C 存储 21 d, 后酸 184.5 °T (均值), 较 L551 出发菌株 317 °T (均值) 降低 132.5 °T。

2.3.4 发酵乳挥发性风味物质测定

采用 SPME-GC-MS 法对 L551 和 L551-1 发酵乳样品进行风味物质富集及检测, 图 10 为 L551 与 L551-1 发酵乳的挥发性香气成分总离子流图。

发酵乳的风味由许多挥发性的细菌代谢产物构成^[19]。使用 SPME-GC-MS 分析 L551 和 L551-1 发酵乳的挥发性风味物质, 发现其色谱图十分接近。风味物质组成基本一致(表 3), 主要由酮类和酸类物质组成, 其中脂肪酸类物质响应值较高, 酮类物质响应值较低。酮类物质是由不饱和脂肪酸的 β -氧化降解或热降解、氨基酸降解或微生物代谢产生^[20], 常见的发酵型嗜热链球菌和保加利亚乳杆菌代谢产生的酮类物质包括 2,3-丁二酮、2,3-戊二酮、2-庚酮(水果风味)、2-壬酮和 2-十一酮(水果味、新鲜味)等^[21]。瑞士乳杆菌 L551 和 L551-1 发酵乳中酮类物质只包含 2-庚酮和 2-壬酮, 不同于嗜热链球菌和保加利亚乳杆菌的发酵风味, 表现为水果及草药样香气。L551-1 发酵乳中 2-庚酮的峰面积响应值较高, 说明 L551-1 的水果香气略强。酸类作为酸奶

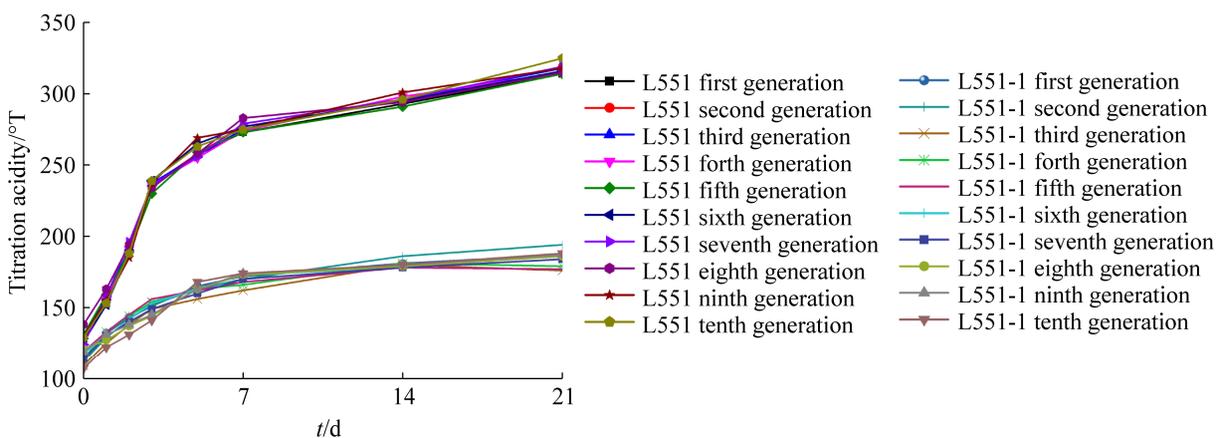


图 9 L551 和 L551-1 的后酸稳定性

Figure 9 The post-acidification stability of L551 and L551-1.

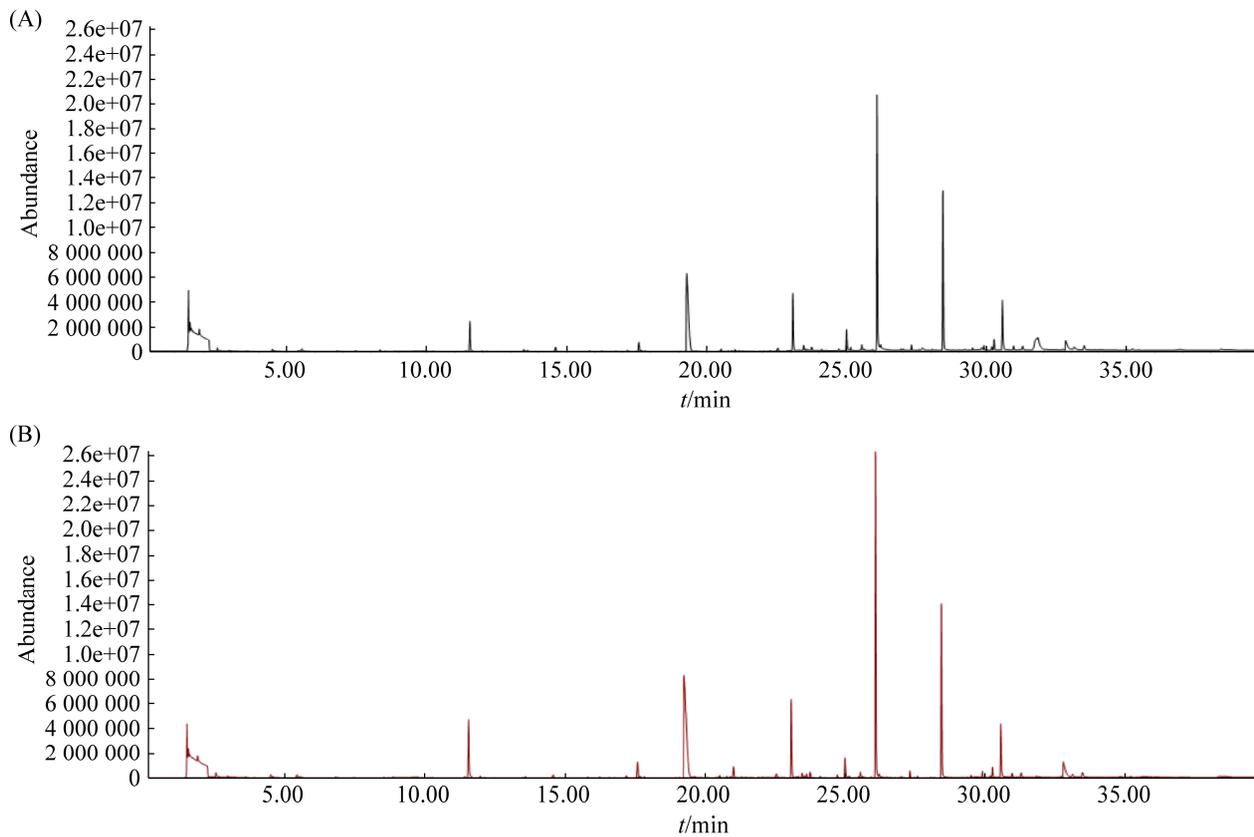


图 10 L551 (A)和 L551-1 (B) GC-MS 香气物质色谱图

Figure 10 GC-MS flavor substances chromatogram of L551 (A) and L551-1 (B).

表 3 各个样品中主要香气物质的峰面积响应值比较($\times 10^7$)

Table 3 Comparison of peak area response values of main aroma substances in various samples ($\times 10^7$)

Compounds	L551	L551-1	Flavor
2-heptanone	0.61	1.17	Fruity, spicy, cinnamon-like
2-hexanone	0.21	0.33	Herbs, cream, resin
Acetic acid	3.24	5.23	Vinegar, sour
Butyric acid	0.97	1.34	Rancid, cheese, sweat, fermented
Hexanoic acid	3.95	5.22	Strong, sour, sweaty, spoiled cheese, goat odor
Octanoic acid	2.28	2.51	Wax, spoiled cheese, grease, stinky cream
Decanoic acid	0.88	0.93	Sour, fat
Benzoic acid	0.39	0.69	Benzene, formaldehyde

的主要风味物质，主要由脂肪分解或氨基酸断裂等途径产生^[22]。L551 和 L551-1 发酵乳的主要酸类物质有乙酸、丁酸、己酸、辛酸、癸酸和苯甲酸，其中 L551-1 中的乙酸和己酸响应值相对偏

高，其他酸类差异较小，说明 L551-1 的酸味和酪味略强。综上所述，L551 和 L551-1 的发酵乳挥发性风味物质组成一致，属于同一发酵风味香型，L551-1 发酵乳的果香味、酸味、酪香味略强。

3 讨论与结论

《中国居民膳食指南》和《新型冠状病毒感染的肺炎防治营养膳食指导》在“通过个人饮食进行科学养生”部分多次提及了具有营养保健功能的发酵乳的重要性。酸奶的营养价值也已得到消费者的广泛认可，而后酸化问题严重制约了发酵乳产品的流通与推广。本研究以硫酸新霉素为筛选压力，获得 1 株弱后酸化瑞士乳杆菌 L551-1。与出发菌株相比，L551-1 发酵过程中产酸变缓，发酵终点酸度较易控制，有助于实际生产与应用；L551-1 发酵乳货架期后酸化问题得到显著改善，有助于改善产品品质，提高活性乳酸菌的存活率；L551-1 发酵乳中风味物质组成和含量未见显著变化，保留了菌株原有的风味特色。本文筛选的弱后酸化瑞士乳杆菌，可作为直投式发酵剂的候选菌株，从根本上解决发酵乳后酸化问题和推动产业化应用。

参考文献

- [1] Ghosh T, Beniwal A, Semwal A, Navani NK. Mechanistic insights into probiotic properties of lactic acid bacteria associated with ethnic fermented dairy products. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 502.
- [2] 于洁, 张和平. 益生菌发酵乳的研究及产业化进展. *中国食品学报*, 2020, 20(10): 1-7.
Yu J, Zhang HP. Research and industrialization progress on probiotics fermented dairy products. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2020, 20(10): 1-7. (in Chinese)
- [3] Guan CR, Chen X, Zhao RF, Yuan Y, Huang XY, Su JB, Ding XL, Chen X, Huang YJ, Gu RX. A weak post-acidification *Lactobacillus helveticus* UV mutant with improved textural properties. *Food Science & Nutrition*, 2021, 9(1): 469-479.
- [4] 张俊桃, 刘文俊, 孟和毕力格. 酸奶弱后酸化发酵剂乳酸菌育种技术研究进展. *中国微生态学杂志*, 2017, 29(4): 481-486.
Zhang JT, Liu WJ, Meng H. Breeding of lactic acid bacteria with low post-acidification in yoghurt: progress in research. *Chinese Journal of Microecology*, 2017, 29(4): 481-486. (in Chinese)
- [5] Ho SW, El-Nezami H, Shah NP. The protective effects of enriched citrulline fermented milk with *Lactobacillus helveticus* on the intestinal epithelium integrity against *Escherichia coli* infection. *Scientific Reports*, 2020, 10: 499.
- [6] Hassan MU, Nayab H, Shafique F, Williamson MP, Almansouri TS, Asim N, Shafi N, Attacha S, Khalid M, Ali N, Akbar N. Probiotic properties of *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus plantarum* isolated from traditional Pakistani yoghurt. *BioMed Research International*, 2020, 2020: 8889198.
- [7] Myles EM, O'Leary ME, Smith R, MacPherson CW, Oprea A, Melanson EH, Tompkins TA, Perrot TS. Supplementation with combined *Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175 across development reveals sex differences in physiological and behavioural effects of western diet in long-Evans rats. *Microorganisms*, 2020, 8(10): 1527.
- [8] Moser A, Wüthrich D, Bruggmann R, Eugster-Meier E, Meile L, Irmeler S. Amplicon sequencing of the *slpH* locus permits culture-independent strain typing of *Lactobacillus helveticus* in dairy products. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1380.
- [9] Papadimitriou K, Alegria Á, Bron PA, De Angelis M, Gobbetti M, Kleerebezem M, Lemos JA, Linares DM, Ross P, Stanton C, Turrone F, Van Sinderen D, Varmanen P, Ventura M, Zúñiga M, Tsakalidou E, Kok J. Stress physiology of lactic acid bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2016, 80(3): 837-890.
- [10] 张祥. 低 H^+ -ATPase 活性植物乳杆菌突变菌的筛选及其调控机制的研究. 浙江科技学院硕士学位论文, 2017.
- [11] Permata YM, Bachri M, Reveny J, Sibuea FM. Formulation and quantitative analysis of betamethasone valerate and neomycin sulfate cream by high performance liquid chromatography and spectrophotometry. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 2019, 7(22): 3841-3846.
- [12] 孙自顶. 植物乳杆菌的诱变选育及其在酸奶中的应用. 齐鲁工业大学硕士学位论文, 2016.
- [13] 刘飞, 杜鹏, 王玉堂, 刘芳, 霍贵成. 保加利亚乳杆菌 H^+ -ATPase 缺陷型菌株的筛选. *微生物学报*, 2009, 49(1): 38-43.
Liu F, Du P, Wang YT, Liu F, Huo GC. Screening of H^+ -ATPase deficient mutant of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 49(1): 38-43. (in Chinese)

- Sinica*, 2009, 49(1): 38–43. (in Chinese)
- [14] 马霞, 张柏林. 乳酸菌 H⁺-ATPase 延缓酸奶后酸化的应用研究. *乳业科学与技术*, 2008, 31(5): 215–218.
Ma X, Zhang BL. Applied study on H⁺-ATPase of lactic acid bacteria to postpone post-acidification of yogurt. *Journal of Dairy Science and Technology*, 2008, 31(5): 215–218. (in Chinese)
- [15] Koebmann BJ, Nilsson D, Kuipers OP, Jensen PR. The membrane-bound H(+)-ATPase complex is essential for growth of *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(17): 4738–4743.
- [16] Tangyu MZ, Muller J, Bolten CJ, Wittmann C. Fermentation of plant-based milk alternatives for improved flavour and nutritional value. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(23/24): 9263–9275.
- [17] Dan T, Wang D, Wu SM, Jin RL, Ren WY, Sun TS. Profiles of volatile flavor compounds in milk fermented with different proportional combinations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *Molecules*, 2017, 22(10): 1633.
- [18] O’Sullivan E, Condon S. Relationship between acid tolerance, cytoplasmic pH, and ATP and H⁺-ATPase levels in chemostat cultures of *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(6): 2287–2293.
- [19] Kim SY, Hyeonbin O, Lee P, Kim YS. The quality characteristics, antioxidant activity, and sensory evaluation of reduced-fat yogurt and nonfat yogurt supplemented with basil seed gum as a fat substitute. *Journal of Dairy Science*, 2020, 103(2): 1324–1336.
- [20] 宋慧敏. 热处理对牛乳风味及保藏品质的影响. 东北农业大学硕士学位论文, 2015.
- [21] 马媛, 耿伟涛, 王金菊, 王艳萍. 乳酸菌代谢与食品风味物质的形成. *中国调味品*, 2019, 44(1): 159–163, 172.
Ma Y, Geng WT, Wang JJ, Wang YP. Lactic acid bacteria metabolism and formation of food flavor substances. *China Condiment*, 2019, 44(1): 159–163, 172. (in Chinese)
- [22] Ekinci FY, Gurel M. Effect of using propionic acid bacteria as an adjunct culture in yogurt production. *Journal of Dairy Science*, 2008, 91(3): 892–899.

(本文责编 李磊)

齐世华, 2000 年本科毕业于河北农业大学食品科学与工程专业, 2016 年毕业于中国农业大学食品科学与工程专业, 硕士研究生。2020 年获得“高级工程师”技术称号。现就职于河北一然生物科技有限公司任公司副总经理。在此期间, 曾多次承接河北省的科技项目, 完成 9 个项目成果转化, 15 项专利申报, 取得 2 项河北省科学技术成果(国内先进、国际先进), 所参与的项目分别荣获石家庄市科学技术二等奖、河北省科技进步一等奖和吉林省科技进步一等奖。

