

文章编号:1673-1689(2009)05-0665-05

产胞外多糖乳酸球菌的分离筛选及 在 Mozzarella 干酪中的应用

陆冰^{1,2}, 杨贞耐^{*1}, 张雪¹, 孔保华²

(1. 中国农业科技东北创新中心(吉林省农业科学院)农产品加工研究中心,吉林 长春 130124;2. 东北农业大学 食品学院,黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 从东北传统的发酵制品大酱、糖蒜和辣酱中分离出 116 株乳酸菌,其中 LJ35 和 LJ51 两株菌胞外多糖产量相对较高且稳定,分别为乳酸乳球菌乳酸亚种(*L. lactis* subsp. *lactis*)和乳酸乳球菌乳脂亚种(*L. lactis* subsp. *cremoris*),胞外多糖的产量分别为 62.19 mg/L 和 74.24 mg/L。以菌株 LJ35 和 LJ51 制作 Mozzarella 干酪的研究表明,添加 2% LJ35 或 2% LJ51 作发酵剂制作的 Mozzarella 干酪保水性分别提高了 2.1% 和 3.2%;同时干酪的融化性得到改善,干酪硬度降低,变得柔软。

关键词: 乳酸球菌;分离筛选;胞外多糖;Mozzarella 干酪

中图分类号:TS 252.1

文献标识码:A

Isolation and Screening of Exopolysaccharide-Producing *Lactococci* and Their Application in Mozzarella Cheese

LU Bing^{1,2}, Yang Zhen-nai^{*1}, ZHANG Xue¹, Kong Bao-hua²

(1. Center of Agro-Food Technology, Northeast Agricultural Research Center of China (Jilin Academy of Agricultural Sciences), Changchun 130124, China; 2. College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: Total 116 gram-positive and catalase-negative *lactococci* were isolated from the traditional fermented foods in the Northeast of China including soybean paste, pepper sauce, and sweetened garlic. Among of them, two strains, named LJ35 and LJ51 with stable and higher exopolysaccharide (EPS) production were identified to be *L. lactis* subsp. *lactis* and *L. lactis* subsp. *cremoris*, respectively. It was detected that 62.19 mg/L and 74.24 mg/L EPS was production by strain LJ35 and LJ51, respectively. When strains LJ35 and LJ51 were used to make Mozzarella cheese, it was found that the moisture retention, the melting property, and the texture properties of cheese were improved.

Key words: *Lactococci*, isolation and screening, exopolysacchrides (EPS), Mozzarella cheese

收稿日期:2008-09-26

基金项目:国家自然科学基金项目(30670057);科技部国际合作项目(2006DFA32620);吉林省科技厅重点项目(20060219)。

* 通讯作者:杨贞耐(1965-),男,江西广丰人,博士,研究员,博士生导师,主要从事乳品工艺与乳品生物技术方面的研究。Email:zyang@cjaas.com

乳酸菌胞外多糖是这类细菌生长代谢过程中分泌到细胞壁外的黏液或荚膜多糖。胞外多糖具有独特的物理学特性、良好的流变学特性和生物学活性,且乳酸菌被认为是安全的食品级微生物(generally regarded as safe, GARS),因此乳酸菌胞外多糖已成为乳品研究与开发的热点^[4]。

东北传统的发酵制品如酸菜、糖蒜、大酱等含有丰富的营养成分,乳酸球菌菌群丰富。国内外从传统的发酵制品中分离乳酸球菌多用于工业菌种,对其乳酸发酵性能和细菌素的研究较多,而对乳酸球菌产胞外多糖方面的研究相对较少。韩国学者对泡菜中乳酸球菌进行了深入的研究^[2-5]; Tamang (1996)从作为印度咖喱菜底的泡菜 mesu 中分离得到戊糖片球菌^[6]; Harris (1992)从德国泡菜 sauerkraut 中分离到乳酸球菌乳酸亚种 NCK400 and LJH80,但并未对乳酸球菌胞外多糖做深入的研究^[7]。Smitinont (1999)从传统的泰国发酵食品 nampla(鱼汁)、kapi(虾鱼酱)、thua-nao(豆制品)和 nham(猪肉香肠)分离出 104 株乳酸菌,其中戊糖片球菌 AP-1 和 AP-3 在液体培养基中产糖可达 6.0 g/L 和 2.5 g/L^[8]。因此分离出产胞外多糖的乳酸球菌新品种具有实际意义。

Mozzarella 干酪是 pasta filata 中的重要成员,起源于意大利。Pasta filata 干酪以其独特的可塑性和鲜凝乳在热水中揉捏处理而著名。Mozzarella 干酪随着比萨饼快餐的流行而推广,并被广大消费者所接受^[9-10]。利用产胞外多糖的发酵剂可以改善 Mozzarella 干酪的物理特性和功能特性。胞外多糖具有优越的结合水的特性,因而有利于干酪加工期间水分的保持,改善 Mozzarella 干酪的质地、融化性和拉伸性^[11]。

作者从东北传统发酵制品种分离筛选产胞外多糖乳酸球菌,并作为发酵剂用于 Mozzarella 干酪的加工,研究胞外多糖对干酪保水性和质构的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原料 豆酱、糖蒜、蒜茄子和辣椒酱,取自公主岭当地不同家庭制作的发酵制品。

1.1.2 菌种 保加利亚乳杆菌、嗜热链球菌(中国农业科技东北创新中心农产品加工中心保藏菌种)。

1.2 主要仪器

超净工作台 BNC-1360;北京东联哈尔滨仪器

制造公司制造;高压蒸汽灭菌器 MLS-3780;日本 Sanyo 制造;显微镜图像处理系统 BX51+DP71;日本 Olympus 制造;高速冷冻离心机 Evolution RC;德国 Eppendorf 制造;冻干机 Freezone. 6 Freeze Dry System;美国 Labconco 制造;物性测试仪 TA XT2i;英国 Stable Micro Systems 制造。

1.3 方法

1.3.1 原料的预处理 糖蒜、豆酱、辣椒酱、蒜茄子各 5 g,加入 25 mL 灭菌后的生理盐水,浸泡 15 min 后摇匀,菌液备用。

1.3.2 乳酸球菌的分离和纯化 取稀释后菌液 1 mL 接种于 6 mL 高压灭菌的 12% 复原脱脂乳中,37 °C 厌氧培养 12~36 h,凝乳均匀时取出。以无菌生理盐水逐级稀释,取 0.1 mL 涂布于 M₁₇ 培养基,37 °C 厌氧培养 48 h。挑取过氧化氢酶阴性、革兰氏染色阳性和细胞形态为球形的典型产粘菌落,反复在 M₁₇ 培养基进行反复划线培养,获得纯菌落。并将纯化后的菌种穿刺接种于 M₁₇ 半固体斜面培养基,37 °C 培养 24 h 后置 4 °C 冰箱,短期保存。

1.3.3 胞外多糖的定量分析 采用苯酚-硫酸法^[12]。

1.3.4 乳酸球菌的鉴定 对产胞外多糖乳酸球菌进行生理生化和糖发酵试验^[13]。

1.3.5 Mozzarella 干酪加工工艺 牛乳→过滤、净化→标准化→巴氏杀菌(63 °C, 30 min)→冷却至 37 °C→添加发酵剂(3%)→发酵→添加 CaCl₂→添加凝乳酶→凝乳→凝块切割→静置→加温搅拌→排乳清→堆积→加盐→热烫拉伸。

1.3.6 干酪保水性的测定 称取干酪样品 1 g 左右,放入 eppendorf 管,置冻干机中冷冻干燥约 24 h,计算失水量占干酪质量的百分率。

1.3.7 干酪融化性 将 10 g 干酪放入一个长为 250 mm,直径 24 mm,厚度为 3 mm 的试管。将干酪压实并用带孔的胶皮塞封口。4 °C 下干酪存放 4 h,游标卡尺测量其长度。然后将其放入预热至 110 °C 的烘箱中,加热 100 min,然后冷却到 22 °C,游标卡尺记录此时的长度。两次长度差即为干酪的融化长度^[14]。

1.3.8 干酪质构的测定 质构仪测定的主要为硬度、弹性和粘聚性这 3 个指标。将块状去其表层约 5 mm 厚度,在同一水平线上取 3 个圆柱形样本,大小为直径 15 mm,高 10 mm,室温下放置 30 min。以质构剖面分析方法^[15]测定干酪的硬度、粘聚性和弹性。物性仪设置参数如下:触发力 0.2 N;测试前速度 2.0 mm/s;测试速度 1.0 mm/s;测试后速

度 2.0 mm/s;下压距离 8 mm;探头 P/0.5s。

2 结果与讨论

2.1 产胞外多糖乳酸球菌的筛选

从东北传统的发酵制品大酱、糖蒜、辣酱和蒜茄子中分离出 116 株球菌,其菌落呈圆形、粘稠的乳白色或淡黄色,表面光滑有光泽、边缘整齐、脐状隆起,细胞单在、成对、呈短或长链排列。革兰氏染色阳性、过氧化氢酶阴性。初步鉴定为乳酸球菌。挑选产粘情况较好的 60 余株菌,通过苯酚硫酸法测定其胞外多糖的产量,其中有 8 株产量相对较高且稳定,达 50 mg/L 左右,见表 1。

表 1 8 株菌胞外多糖产量

Tab. 1 EPS yield of eight strains of lactococcus

菌株	EPS/(mg/L)
LJ03	39.42
LJ19	56.23
LJ28	45.74
LJ35	62.19
LJ51	74.24
DJ04	48.18
DJ06	41.53
DJ24	53.68

来源于辣酱的 LJ35 和 LJ51 两株菌胞外多糖的产量较高,分别为 62.19 mg/L 和 74.24 mg/L。按照《伯杰氏细菌鉴定手册》(第八版)和《乳酸细菌分类鉴定及试验手册》对这两株菌进行硝酸盐还原试验、联苯胺试验、明胶液化试验、pH 9.6 生长、H₂S 产生试验、NaCl 生长试验、精氨酸水解试验、吡啶产生试验、葡萄糖产气等试验并结合厌氧特性,初步确定为乳球菌属,见表 2。这两株菌能在 10 ℃ 生长,但不能在 45 ℃ 生长,不能耐受 6.5% NaCl。其中 LJ51 能利用麦芽糖产酸,还原 0.1% 美兰牛乳,但不能利用蜜二糖产酸,不能水解淀粉。与乳酸乳球菌乳酸亚种的性质相似;LJ35 在 10 ℃ 生长,还原 0.1% 美兰牛乳,但不能利用麦芽糖产酸,与乳酸乳球菌乳脂亚种相似。初步确定 LJ35 为乳酸乳球菌乳亚种(*L. lactis* subsp. *lactis*),LJ51 为乳酸乳球菌乳脂亚种(*L. lactis* subsp. *cremoris*)。

2.2 乳酸球菌胞外多糖对 Mozzarella 干酪保水性的影响

如表 3 所示,LJ35 和 LJ51 都可以提高 Mozzarella 干酪的保水性。添加 1% 或 2% 的 LJ35 发酵剂制作的 Mozzarella 干酪保水性分别提高了 0.9% 和 2.1%;以 1% 或 2% LJ51 菌种作发酵剂制作的 Mozzarella 干酪保水性分别提高了 1.1% 和 3.2%。

LJ51 在提高 Mozzarella 干酪保水性方面要优于 LJ35,这可能与 LJ51 比 LJ35 胞外多糖产量高有关。Mozzarella 干酪水分质量分数与产糖发酵剂的添加量成正比关系。有关利用产胞外多糖乳酸菌提高 Mozzarella 干酪水分质量分数的研究,国外也有报道^[16-17]。

表 2 LJ35 和 LJ51 的鉴定结果

Tab. 2 Identification of LJ35 and LJ51

实验项目	LJ35	LJ51
革兰氏染色试验	+	+
H ₂ O ₂ 酶试验	-	-
运动性试验	-	-
H ₂ S 试验	-	-
葡萄糖产气	-	-
10 ℃ 生长试验	+	+
45 ℃ 生长试验	-	-
硝酸盐还原	-	-
吡啶试验	-	-
4% NaCl 耐盐试验	+	+
6.5% NaCl 耐盐试验	-	-
1% 美兰牛乳试验	+	+
柠檬酸盐利用试验	-	-
牛奶分解		
还原	+	+
凝固	+	+
产酸	+	+
胨化	-	-
葡萄糖	+	+
果糖	+	+
乳糖	+	+
棉子糖	-	-
松三糖	-	-
蜜二糖	-	-
甘露醇	+	+
蔗糖	+	+
半乳糖	+	+
山梨醇	+	+
D-木糖	-	-
水杨苷	-	+
七叶苷	+	+

表 3 菌种 LJ35 和 LJ51 对 Mozzarella 干酪水分质量分数的影响

Tab. 3 Effect of strain LJ35 and LJ51 on the moisture content of Mozzarella cheese

水分质量分数/%	LJ35 干酪保水性	LJ51 干酪保水性
0	48.2 ^a	48.2 ^a
1	49.1 ^b	49.3 ^b
2	50.3 ^c	51.4 ^d

注:a、b、c、d 在同一行字母中,相同则表示差异不显著,不同则表示差异显著($P < 0.05$)

2.3 乳酸球菌胞外多糖对 Mozzarella 干酪融化性影响

如图 1 可知, Mozzarella 干酪贮藏 7~28 d 期间, 未添加产胞外多糖菌种和添加产胞外多糖菌种 Mozzarella 干酪的融化性都得到了提高。添加 2% 产胞外多糖菌株 LJ35 生产的 Mozzarella 干酪的融化性在 28 d 内有了较为明显的提高, 第 7 天和 28 天拉伸长度分别为 44.32 mm 和 69.48 mm。相比较而言, 添加 2% 产胞外多糖菌株 LJ51 生产的 Mozzarella 干酪的融化特性得到了较大的改善, 拉伸长度为 40.00~77.25 mm, 菌株 LJ35 对 Mozzarella 干酪融化特性的改善效果没有菌株 LJ51 明显, 但两者都要比未添加产胞外多糖菌种 Mozzarella 干酪的融化性要好(32.21~55.24 mm)。本研究结果表明, 发酵剂接种量与干酪的融化特性成正比, 利用产胞外多糖乳酸菌制作 Mozzarella 干酪, 有利于改善其融化性, 与国外报道的一致^[16-17]。

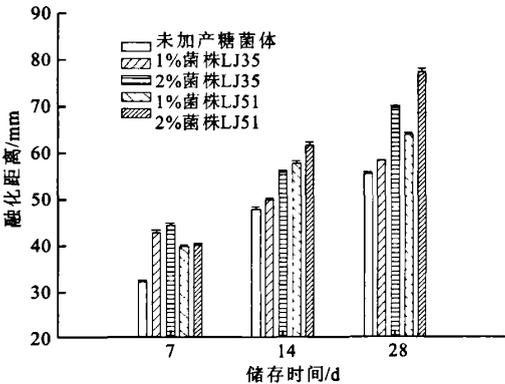


图 1 菌种 LJ35 和 LJ51 对 Mozzarella 干酪融化性的影响

Fig. 1 Effect of strain LJ35 and LJ51 on the melt ability of Mozzarella cheese

2.4 乳酸球菌胞外多糖对 Mozzarella 干酪质构的影响

如图 2 所示可知, 干酪贮藏期间(7~28 d, 4℃), 通过对比未添加产胞外多糖菌种、添加 1% LJ35 菌种、添加 2% LJ35 菌种、添加 1% 和添加 2% 的 LJ51 菌种对 Mozzarella 干酪硬度的影响可知, 添加 1% 和添加 2% 的 LJ51 菌种可使 Mozzarella 干酪硬度明显下降(444.117~268.471 N, 1% LJ51 菌种; 376.325~243.996 N, 2% LJ51 菌种), 7 d 后, 添加产胞外多糖的乳酸菌制作的 Mozzarella 干酪明显变得柔软, 这可能是胞外多糖破坏了蛋白质的网络空间结构, 使其空间结构变得疏松; 从图 2 (b,c) 对添加产胞外多糖的 LJ35 和 LJ51 菌株对 Mozzarella 干酪粘聚性和弹性的研究可知, 其粘聚

性和弹性并没有什么规律性的变化。

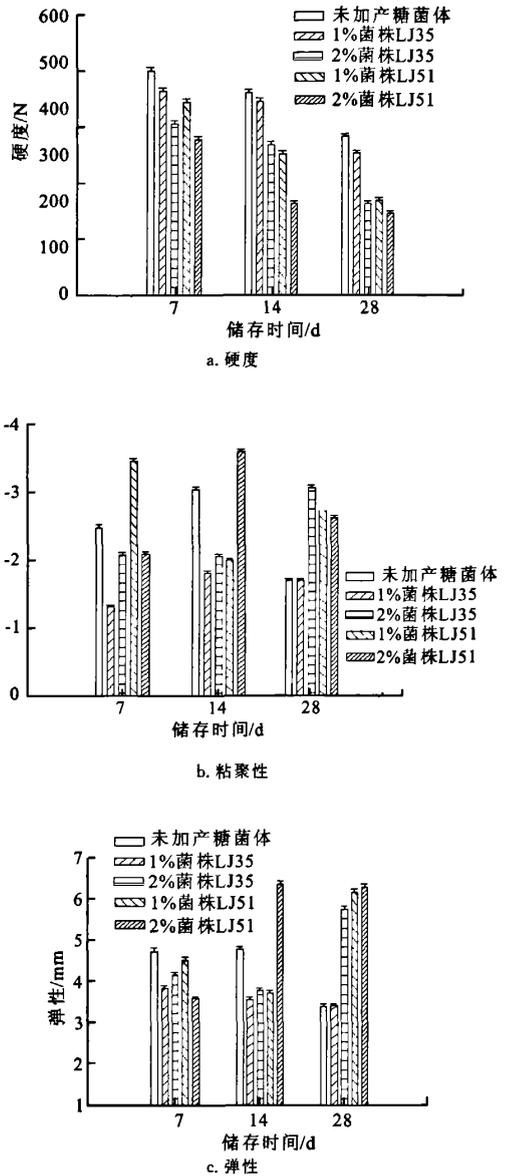


图 2 菌种 LJ35 和 LJ51 对 Mozzarella 干酪硬度、粘聚性和弹性影响

Fig. 2 Effect of strain LJ35 and LJ51 on hardness, cohesiveness and springiness of Mozzarella cheese

3 结 语

从东北传统的发酵制品辣酱中分离出两株产胞外多糖乳酸菌 LJ35 和 LJ51, 经鉴定分别为乳酸乳球菌乳亚种 (*L. lactis* subsp. *lactis*) 和乳酸乳球菌乳脂亚种 (*L. lactis* subsp. *cremoris*), 其胞外多糖的产量为分别 62.19 mg/L 和 74.24 mg/L。产胞外多糖乳酸菌 LJ35 和 LJ51 制作 Mozzarella

干酪的研究表明,添加 2% LJ35 或 2% LJ51 作发酵剂制作的 Mozzarella 干酪保水性分别提高了 2.1% 和 3.2%;同时干酪的融化性得到改善,干酪

硬度降低,变得柔软,但粘聚性和弹性并没有什么规律性的变化。

参考文献(References):

- [1] Mozzi F, Vaningelgem F, Hebert E M, et al. Diversity of heteropolysaccharide-producing lactic acid bacterium strains and their biopolymers[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(6): 4431-4435.
- [2] Kim B, Lee J, Jang J, et al. *Leuconostoc inhae* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from kimchi[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2003, 53: 1123-1126.
- [3] Kim J, Chun J, Han H U. *Leuconostoc kimchii* sp. nov., a new species from kimchi[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2000, 50: 1915-1919.
- [4] Lee J S, Lee K C, Ahn J S, et al. *Weissella koreensis* sp., isolated from kimchi[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2002, 52: 1257-1261.
- [5] Choi H J, Cheigh C I, Kim S B, et al. Production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from Kimchi[J]. *J Appl Microbiol*, 2000, 88(4): 563-571.
- [6] Tamang J P, Sarkar P K. Microbiology of mesu, a traditional fermented bamboo shoot product[J]. *Int J Food Microbiol*, 1996, 29(1): 49-58.
- [7] Harris L J, Fleming H P, Klaenhammer T R. Characterization of two nisin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strains isolated from a commercial sauerkraut fermentation[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58(5): 1477-1483.
- [8] Smitnont T, Tanasakul C, Tanasupawat S, et al. Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria strains from traditional thai fermented foods: isolation, identification and exopolysaccharide characterization[J]. *Int J Food Microbiol*, 1999, 51: 105-111.
- [9] Ralph. The Technology of Dairy Products[M]. UK: The Blackie Publishing Group, 1998.
- [10] Kinstedt P. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology[M]. Chapman and Hall: Academic Press, 1993.
- [11] Broadbent J R, McMahon D J, Welker D L, et al. Biochemistry, genetics, and applications of exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*: a review[J]. *J Dairy Sci*, 2003, 86: 407-423.
- [12] Dubois M, Gillis K A, Hamilton J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances[J]. *Anal Chem*, 1965, 28: 350-356.
- [13] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰氏细菌鉴定手册(第八版)[M]. 北京: 科学出版社, 1994.
- [14] Zisu B, Shah N P. Low-fat Mozzarella as influenced by microbial exopolysaccharides, preacidification, and whey protein concentrate[J]. *J Dairy Sci*, 2005, 88: 1973-1985.
- [15] Pons M, Fiszman S M. Instrumental texture profile analysis with particular reference to gelled systems[J]. *J Texture Study*, 1996, 27: 597-621.
- [16] Petersen B L, Dave R I, McMahon D J, et al. Influence of capsular and ropy exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* on Mozzarella cheese and cheese whey[J]. *J Dairy Sci*, 2000, 83: 1952-1956.
- [17] Perry D M, McMahon D J, Oberg C J. Effect of exopolysaccharide-producing cultures on moisture retention in low fat Mozzarella cheese[J]. *J Dairy Sci*, 1997, 80: 799-805.

(责任编辑:李春丽)