

奶豆腐中乳酸菌的分离鉴定及风味特性研究

洋洋¹, 乌有娜¹, 双全¹, 王玉荣², 郭壮²

(1. 内蒙古农业大学 食品科学与工程学院, 呼和浩特 010018; 2. 湖北文理学院 食品科学技术学院, 湖北 襄阳 441053)

摘要:通过传统分离方法从内蒙古锡林郭勒盟正蓝旗奶豆腐中初步分离纯化出33株疑似乳酸菌菌株,经16S rRNA序列分析比对分析,确定33株疑似乳酸菌的种属分别为德式乳杆菌(*Lactobacillus delbrueckii*)、发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecium*)、乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)、戊糖片球菌(*Lactobacillus pentosus*)、格氏乳杆菌(*Lactobacillus garvieae*),且德式乳杆菌(*Lactobacillus delbrueckii*)和乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)为锡林郭勒盟正蓝旗奶豆腐中的优势乳酸菌类群。同时用电子舌和电子鼻技术对其奶豆腐风味品质进行了评价,结果发现,奶豆腐是由酸味、涩味、苦味、咸味、鲜味5个基本为组成,其中苦味的差异最大的,其奶豆腐样品是对W1S(甲烷)、W5S(氮氧化合物)、W1W(有机硫化物、萜类物质)是比较明显的,其余传感器物质上比较稳定。

关键词:奶豆腐;乳酸菌;分离鉴定;电子舌;电子鼻

中图分类号:Q93.331

文献标识码:A

文章编号:1001-2230(2021)09-0019-04

doi:10.19827/j.issn1001-2230.2021.09.004

Research on Separation and Identification of Lactic Acid Bacteria in Dried Milk Cake and Flavor Characteristic Traits

YANG Yang¹, WU Youna¹, SHUANG Quan¹, WANG Yurong², GUO Zhuang²

(1. School of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China ;2. College of Food Science and Technology, Hubei University of Arts and Science, Xiangyang 441053, China)

Abstract:33 suspected *Lactobacillus* strains were preliminarily isolated and purified from Zhenglan Banner dried milk cake of Xilingol League in Inner Mongolia by traditional separation methods. After sequence analysis by 16S rRNA, the 33 suspected *Lactobacillus* strains were identified as *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus fermentum*, *Enterococcus faecium*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus pentosus*, and *Lactobacillus garvieae*. *Lactobacillus delbrueckii* and *Lactococcus lactis* were the dominant *Lactobacillus* groups in Zhenglanqi dried milk cake of Xilin Gol League. At the same time using electronic tongue and electronic nose technology for its dried milk cake flavor quality was evaluated, the results found that dried milk cake is by the acidity, the acerbity, bitter and salty, freshness of five basic for, one of the biggest differences in bitter, the dried milk cake samples of W1S (methane), W5S (nitrogen oxides), W1W (organic sulfide, terpenoids) is obvious, the rest of the sensor material is stable.

Key words: dried milk cake; *Lactic acid bacteria*; separation and identification; electronic tongue; electronic nose

0 引言

内蒙古传统奶豆腐是蒙古族、哈萨克族等少数民族喜欢食用的一种传统乳制品,蒙语可称为“Hurood”^[1-2],奶豆腐是以羊奶或者是牛奶中本身的环境中的微生物自然发酵而形成的^[3]。当然在制作传统奶豆腐中乳酸菌时候发挥着至关重要的作用^[4]。另外奶豆腐的营养价值较高,但人们对于传统乳制品的消费是甚少^[5],主要原因是奶豆腐的感官品质^[6]较差。研究发现,奶豆腐中的微生物主要包括乳酸菌^[7-9]、霉菌^[10-11]、酵母菌^[12]等3大菌群,其中乳酸菌对传统奶豆腐感官品质的改善发挥着重要的作用^[13-15]。

本研究从内蒙古锡林郭勒盟正蓝旗采集奶豆腐样品,对其中的乳酸菌进行分离鉴定,采用电子鼻和

电子舌对食品的风味和滋味进行评价,以期为后续的传统奶豆腐的相关产业化生产提供支持。

1 材料与方法

1.1 样品来源

本实验采集的样品来自于内蒙古锡林郭勒盟正蓝旗长虹乳制品厂,研究人员于2019年3月,在内蒙古锡林郭勒盟正蓝旗长虹乳制品厂、正蓝旗各个奶食店等地区采集。将采集的样品立即放置在低温保存,及时带回实验室进行乳酸菌的分离纯化等研究。

1.2 培养基与试剂

培养基:MRS固体培养基和MRS液体培养基, MRS固体培养基和MRS液体培养基均由国药集团化学试剂有限公司所提供。

试剂:提取DNA所用试剂,PCR扩增和电泳检测所用试剂,细菌基因组DNA试剂,由武汉天一辉远生物科技有限公司合成。

收稿日期:2020-11-30

作者简介:洋洋(1996-),女,硕士,研究方向为食品微生物技术。

通讯作者:双全

1.3 仪器与设备

DYY-12 水平电泳仪,北京市六一仪器厂; DCode™ System、UV PCDS8000 凝胶成像分析系统,美国 BIO-RED 公司; Veriti™96 孔梯度 PCR 扩增仪,美国 AB 公司; SA402B 电子舌,武汉高科南新贸易有限公司; PEN3 电子鼻,德国 Aisense 公司。

1.4 乳酸菌的分离纯化及保存

奶豆腐、酸马奶等样品中的乳酸菌计数方法是采用涂布培养法。奶豆腐样品使用刀具切成粉末,称取 1 g 到 15 mL 无菌石蕊牛乳中,37 °C 培养 24 h,再用涂布平板法对样品进行稀释涂布,37 °C 培养 48 h,获得样品中的不同菌落,观察并记录菌落形态(颜色、大小、形态等),挑取不同的特征菌落,于对应的固体培养基上划线 2~3 次,直至获得纯培养物。经革兰氏染色,过氧化氢酶实验,将疑似乳酸菌的纯培养物在 30% 甘油里保藏,以待后续实验。

1.5 DNA 的提取及纯度的检测

采用 CTAB 法提取分离菌株的基因组 DNA^[10],按照 MVEOBIANG-A^[11]等方法提取乳酸菌总 DNA 在 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳上跑胶检测。

表 1 PCR 反应体系^[10](25 μL)及扩增程序

体系成分	含量/μL	扩增程序	时间
通用引物 27f、1495r	0.5	94 °C 预变性	5 min
10×PCR buffer	2.5	94 °C 变性	1 min, 30 个循环
dNTP mixture	2	58 °C 退火	1 min, 30 个循环
rTaq DNA 聚合酶	0.2	72 °C 延伸	2 min, 30 个循环
DNA 模板	0.5	72 °C 末端延伸	10 min
ddH ₂ O	18.8	4 °C 保存	

扩增完成之后,将 PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测到,如在 1 500 bp 处有明亮条带且无拖尾现象,即 PCR 扩增成功,再使用 PCR 清洁试剂盒对 PCR 产物进行纯化,PCR 产物连接到 pMD18-T 载体后,进行克隆并送由武汉呢天一辉远生物科技有限公司进行测序。

1.6 同源性分析

将测序得到的 16S rRNA 基因序列在 NCBI 的 GenBank 数据库进行 BLAST 对比,根据各个菌株的序列同源性选取相似度较高的模式菌株,再使用 Mega5.0 的邻接法构建系统发育树,再进行所分离菌株的系统发育关系。

1.7 奶豆腐的滋味和风味品质评价

1.7.1 奶豆腐滋味品质的评价

将奶豆腐切成粉末称取 30 g 放入样品瓶中,加等体积的纯水稀释 5 倍,3 000 g 离心 10 min,去上清液待用。将上清液放入样品瓶后按照王玉荣等方法^[12]使用 SA402B 电子舌对其鲜味、苦味、酸味、苦味和咸味及后味 A(涩的回味)、后味(苦的回味)和丰度(鲜的回味)进行测定。

1.7.2 奶豆腐风味品质的评价

将奶豆腐样品进行预处理后,10 g 放入样品瓶中置于 40 °C 恒温水浴锅中加热 30 min,参照杨成聪^[13]的

方法,使用 PEN3 电子鼻对其风味进行评价,其中测试时间为 60 s,然后取 49、50、51 的数据再进行分析。

1.8 数据分析

本实验使用主成分分析对奶豆腐的滋味整体结构的差异性分析,使用 MAGA5.0 构建系统发育树,使用 Origin2017 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌的分离鉴定

2.1.1 乳酸菌分离菌株的菌落形态及表型特征

根据乳酸菌的形态学特征,初步从 8 份样品中共分离出 33 株疑似乳酸菌的菌株。在 MRS 固体培养基上菌株的菌落呈现中等大小不一,乳白色,边缘整齐,有一些菌落的表面光滑,而有些粗糙,如图 1。经革兰氏染色实验以及过氧化氢酶实验反应,即为革兰氏阳性菌和过氧化氢酶阴性菌。将 33 株菌初步定为乳酸菌。

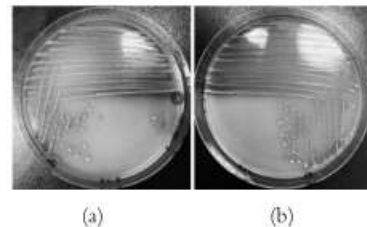


图 1 部分菌株固体培养基菌落形态

2.1.2 系统发育树的构建和乳酸菌鉴定结果



图 2 基于奶豆腐中乳酸菌 16S rDNA 基因的系统发育树

由图2可以看出, NDF4-3、4-5、4-5、4-10、5-1、5-5、5-6、6-1、6-2、6-3、6-5、6-8 菌株与 *Lactobacillus delbrueckii* 聚为一类群, 且从表2可以看出同源率为99%, 故将其鉴定为 *Lactobacillus delbrueckii*。NDF5-2、6-4、6-6、6-7、7-3 菌株与 *Lactobacillus fermentum* 聚为一类群, 且同源率为99%, 因此可以鉴定为 *Lactobacillus fermentum*。NDF2-1、2-3 与 *Enterococcus faecium* 聚为一类群, 且同源率为99%, 因此归为 *Enterococcus faecium*。而 NDF3-1、7-1、7-2、8-1 菌株与 *Pediococcus acidilactici* 聚为一类群, 并且同源率为99%, 所以可鉴定为 *Pediococcus acidilactici*。NDF1-1、1-3、1-5、1-6、2-2、2-4、2-5、3-4、3-5 菌株与 *Lactococcus lactis* 聚为一类群, 并同源率为99%, 因此鉴定 *Lactococcus lactis*。然而 NDF8-3 菌株与 *Lactococcus garvieae* 聚为一类, 且同源率为99%,

因此可以鉴定为 *Lactococcus garvieae*。

2.2 奶豆腐滋味和风味品质的评价

奶豆腐各滋味指标相对强度的箱型图如图3所示。由图3可知, 奶豆腐的滋味品质之间是存在较大的差异, 其酸味、苦味、涩味、咸味、鲜味及后味A(涩的回味)和后味B(苦味的回味)的极差值都是都超过1, 其中奶豆腐的苦味的组内差异是最大的。基于传统电子鼻技术, 奶豆腐的风味指标的强度如表3所示。

由表3可知, 所有奶豆腐的各风味指标之间存在着较大的差异, 响应值存在比较差异较大的传感器为W1S、W5S、W1W, 其说明奶豆腐的挥发性风味物质的主要差异是在氢氧化物和甲烷以及有机硫化物、萜类物质上。

表2 NDF1-NDF8分离菌株16S rDNA基因序列比对结果

样品编号	菌株编号	最相近序列	相似度/%	鉴定结果
NDF1	NDF1-1	<i>Lactococcus lactis</i> NBRC 100933	99	<i>Lactococcus lactis</i>
	NDF1-3	<i>Lactobacillus spentosus</i> DSM 20314	99	<i>Lactobacillus pentosus</i>
	NDF1-5	<i>Lactococcus lactis</i> NBRC 100933	99	<i>Lactococcus lactis</i>
	NDF1-6	<i>Lactococcus lactis</i> NBRC 100933	99	<i>Lactococcus lactis</i>
NDF2	NDF2-1	<i>Enterococcus faecium</i> DSM 20477	99	<i>Enterococcus faecium</i>
	NDF2-2	<i>Lactococcus lactis</i> NBRC 100933	99	<i>Lactococcus lactis</i>
	NDF2-3	<i>Enterococcus durans</i> NBRC 100479	99	<i>Enterococcus durans</i>
	NDF2-4	<i>Lactococcus lactis</i> NBRC 100933	100	<i>Lactococcus lactis</i>
	NDF2-5	<i>Lactococcus lactis</i> NBRC 100933	99	<i>Lactococcus lactis</i>
NDF3	NDF3-1	<i>Pediococcus acidilactici</i> DSM 20284	99	<i>Pediococcus acidilactici</i>
	NDF3-4	<i>Lactococcus lactis</i> NBRC 100933	99	<i>Lactococcus lactis</i>
	NDF3-5	<i>Lactococcus lactis</i> NBRC 100933	99	<i>Lactococcus lactis</i>
NDF4	NDF4-3	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> DSM 26046	99	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
	NDF4-4	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> DSM 20072	99	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
	NDF4-5	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> DSM 20074	100	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
	NDF4-10	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> DSM 20074	99	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
NDF5	NDF5-1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> DSM 20072	99	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
	NDF5-2	<i>Lactobacillus fermentum</i> NBRC15885	99	<i>Lactobacillus fermentum</i>
	NDF5-5	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> DSM 20072	99	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
	NDF5-6	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> DSM 26046	99	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
NDF6	NDF6-1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> DSM 20074	99	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
	NDF6-2	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> DSM 26046	99	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
	NDF6-3	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> DSM 20074	99	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
	NDF6-4	<i>Lactobacillus fermentum</i> NBRC 15885	99	<i>Lactobacillus fermentum</i>
	NDF6-5	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> DSM 20074	99	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
	NDF6-6	<i>Lactobacillus fermentum</i> NBRC 15885	99	<i>Lactobacillus fermentum</i>
	NDF6-7	<i>Lactobacillus fermentum</i> NBRC 15885	99	<i>Lactobacillus fermentum</i>
	NDF6-8	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> DSM 26046	99	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
NDF7	NDF7-1	<i>Pediococcus acidilactici</i> DSM 20284	99	<i>Pediococcus acidilactici</i>
	NDF7-2	<i>Pediococcus acidilactici</i> DSM 20284	99	<i>Pediococcus acidilactici</i>
	NDF7-3	<i>Lactobacillus fermentum</i> NBRC 15885	100	<i>Lactobacillus fermentum</i>
NDF8	NDF8-1	<i>Pediococcus acidilactici</i> DSM 20284	99	<i>Pediococcus acidilactici</i>
	NDF8-3	<i>Lactococcus garvieae</i> JCM 10343	99	<i>Lactococcus garvieae</i>

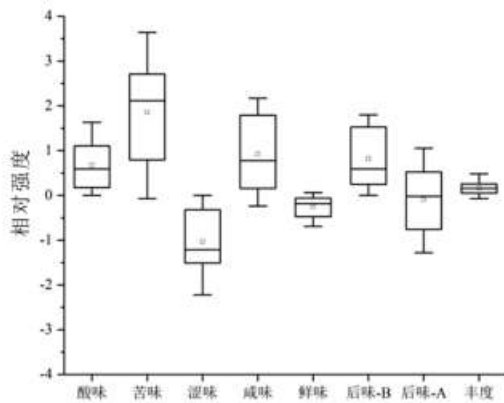


图3 奶豆腐不同滋味的箱型图

表3 化学传感器及其对应的敏感物质类型

金属传感器	性能描述	奶豆腐
W1C	对芳香类物质灵敏	0.32(0.21,0.11-0.95)
W5S	对氢氧化物灵敏	19.49(16.18,5.67-40.06)
W3C	对氨气、芳香类物质灵敏	0.3(0.29,0.18-0.45)
W6S	对氢气有选择性	1.38(1.38,1.23-1.58)
W5C	对烷烃、芳香类物质灵敏	0.36(0.37,0.24-0.49)
W1S	对甲烷灵敏	37.95(34.18,15.56-67.27)
W1W	对有机硫化物、萜类物质灵敏	19.38(18.44,7.36-33.99)
W2S	对乙醇灵敏	14.5(13.92,6.4-25.1)
W2W	对有机硫化物灵敏	2.27(2.23,1.61-3.31)
W3S	对烷烃类物质灵敏	1.66(1.65,1.45-1.98)

3 结论

从内蒙古锡林郭勒盟正蓝旗采集了8份奶豆腐样品,通过传统的培养方法,共分离到了33株乳酸菌。对这些乳酸菌进行了鉴定,结果显示它们分别属于德式乳杆菌、发酵乳杆菌、粪肠球菌、乳酸乳球菌、戊糖片球菌、瑞士乳杆菌等6个菌种,归为乳杆菌,肠球菌和片球菌3个乳酸菌属。且奶豆腐样品的挥发性风味物质的主要差异是显示在氢氧化物、甲烷以及有机硫化物和萜类物质上是有较大的差异,而奶豆腐中的苦味组内差异是相对于其它滋味是较大的。

参考文献:

[1] 宝音朝格图.草原乳文化与清代皇室[J].北京档案,2007,0(4):51-52.
 [2] Alegria A, Szczesny P, Mayo B, et al. Biodiversity in Oscypek, a traditional Polish cheese, determined by culture-dependent and -independent approaches[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(6): 1890-1898.

[3] Azat R, Liu Y, Li W, et al. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented Xinjiang cheese[J]. Journal of Zhejiang University-Science B: Biomedicine & Biotechnology, 2016, 17(8): 597-609.
 [4] 张爽.乳酸菌发酵特性及其蛋白酶对凝乳品质影响研究[D].哈尔滨:哈尔滨工业大学,2015.
 [5] 吴强,孙世民,李全海.中国乳品消费特征、因素及趋势判断[J].中国乳品工业,2018,46(4): 43-47.
 [6] 陈丹,曾小群,潘道东,等.特色鲜奶酪加工工艺研究[J].中国食品学报, 2013, 13(11): 15-20.
 [7] Partovi R, Gandomi H, Basti A A, et al. Microbiological and chemical properties of Siahmazgi Cheese, an Iranian Artisanal Cheese: isolation and identification of dominant lactic acid bacteria[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2015, 39(6): 871-880.
 [8] Guidone A, Zotta T, Matera A, et al. The microbiota of high-moisture Mozzarella cheese produced with different acidification methods [J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 216: 9-17.
 [9] Nacef M, Chevalier M, Chollet S, et al. MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of lactic acid bacteria isolated from a French cheese: the Maroilles[J]. International Journal of Food Microbiology, 2017, 247: 2-8.
 [10] Copetti M V. Yeasts and molds in fermented food production: an ancient bioprocess[J].Current Opinion in Food Science, 2019, 25: 57-61.
 [11] Banjara N, Suhr M, Hallen-adams H. Diversity of yeast and mold species from a variety of cheese types[J].Current Microbiology, 2015, 70(6): 792-800.
 [12] Santos M T P G D, B nito M J, Córdoba M D G, et al. Yeast community in traditional Portuguese Serpa cheese by culture-dependent and -independent DNA approaches[J]. International Journal of Food Microbiology, 2017, 262: 63-70.
 [13] 王一迪.新疆伊犁地区原牛乳中乳酸菌的分离鉴定与系统发育研究[D].新疆:石河子大学,2017.
 [14] 敖晓琳,张小平,李斌,等.川西高原牧区自然发酵酸乳中优良乳酸菌性能测定及应用[J].乳品科学与技术,2005(2):56-60.
 [15] 张雪,李达,杨贞耐,等.内蒙古奶豆腐中产胞外多糖乳酸菌的分离筛选[J].食品科学,2010,31(1):141-144.
 [16] 郭壮,蔡宏宇,杨成聪,等.六名襄阳地区青年志愿者肠道菌群多样性的研究[J].中国微生态学杂志, 2017,29(9): 998-1004.
 [17] Mveobiang A, Mestdagh M, Portaelsf. DNA isolation from chloroform/methanol-treated mycobacterial cells without lysozyme and proteinase K[J]. Biotechniques,2001,30(2): 272-274.
 [18] Fang Z G, Yao W C, Lou X Q, et al. Profile and characteristics of culturable airborne bacteria in Hangzhou, southeast of China[J]. Aerosol Air Qual Res, 2016, 16(7): 1690-1700.
 [19] 王玉荣,张俊英,胡欣洁,等.湖北孝感和四川成都地区来源的酒曲对米酒滋味品质影响的评价[J].食品科学,2015,36(16):207-210.
 [20] 杨成聪,刘丹丹,葛东颖,等.基于气相色谱-质谱联用技术结合电子鼻评价浸米时间对黄酒风味品质的影响[J].食品与发酵工业, 2018, 44(8): 265-270.