

# 接种体对西藏灵菇乳质量和抑菌特性的影响

焦 慧, 师俊玲\*

(西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100)

**摘 要:** 前期研究发现,“西藏灵菇”的菌粒接种体对牛乳的发酵速度显著大于发酵液接种体,但是菌粒的生长速度较慢,而且不易形成。为了探讨菌粒形成对“西藏灵菇”乳发酵过程的必要性,本实验对比菌粒接种体和发酵液接种体发酵所得乳制品在凝乳时间、感官品质、质构特性、发酵特性及抑菌活性等方面的异同。结果发现,以菌粒为接种体时发酵速度快、凝乳时间短,产品质量和抑菌活性均显著优于发酵液接种体。

**关键词:** 西藏灵菇; 菌粒; 发酵液; 接种体; 抑菌活性

## Effect of Tibetan Mushroom Inoculum on Quality and Anti-bacterial Activity of Fermented Milk

JIAO Hui, SHI Jun-ling\*

(College of Food Science and Engineering, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

**Abstract:** Our previous investigations demonstrated that granular inoculum of Tibetan mushroom exhibits much higher fermentation rate to milk than liquid inoculum. However, long time is required for the formation of granular inoculum. In order to explore the necessity of granular inoculum of Tibetan mushroom for milk fermentation, the effects of granular inoculum and liquid inoculum on curding time, sensory evaluation, textural properties, fermentation characteristics and antibacterial activity of fermented milk were investigated and compared. Results indicated that granular inoculum of Tibetan mushroom exhibited higher fermentation rate, shorter curding time, better product quality and stronger anti-bacterial activity of fermented milk than liquid inoculum.

**Key words:** Tibetan mushroom; Tibetan mushroom granule; fermentation liquid; inoculum; antibacterial activity

中图分类号: TS205.5; TQ929; Q815 文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)05-0155-05

“西藏灵菇”是由多种微生物共生形成的一种不规则的、含有黏性多糖的混合物,很像目前流行的开菲尔(Kefir)。这种混合物呈淡黄色,形状如蒸熟的米粒,其菌块呈菜花状,具有一定弹性和风味,看上去很像雪莲,故称为“西藏雪莲”<sup>[1]</sup>。在此菌粒上栖息的乳酸菌、酵母菌、醋酸菌可形成一个稳定的共生体系<sup>[2-3]</sup>(在本实验中简称为菌粒)。以此菌粒为发酵剂发酵牛乳,能同时进行乳酸发酵和酒精发酵,并对多种物质进行转化,从而使制品不仅营养丰富,而且兼具酸味和酒味<sup>[4-7]</sup>。据报道,由其发酵的牛奶具有防止肠道感染、消炎、降血糖和血脂、降胆固醇、抗肿瘤等多种功效<sup>[8-13]</sup>。

目前为止,“西藏灵菇”多以相互传送菌粒进行民间流传,尚未见工业化生产。为了使其实现工业化,邵东燕等<sup>[4]</sup>曾致力于“西藏灵菇”纯种发酵过程的研究

与探索,并分离获得了可用于发酵的纯种发酵剂。研究发现,使用这些纯种发酵剂虽然能够发酵得到与“西藏灵菇”发酵乳相近的产品,但是,在整个发酵过程中无菌粒形成。虽然人们已对“西藏灵菇”的发酵机理有了一定的了解<sup>[12-5,15-16]</sup>,但尚无数据说明菌粒在整个发酵过程的重要性和必要性。

基于此,本实验拟通过对比菌粒和发酵液为接种体时所得发酵乳的食用品质和抑菌活性,阐明菌粒形成对“西藏灵菇”发酵乳质量和功能活性的影响,从而为实际生产提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

#### 1.1.1 接种体及其制备

收稿日期: 2009-06-24

基金项目: 农业部公益性行业项目(nyhyzx07-009)

作者简介: 焦慧(1986—),女,硕士研究生,主要从事食品生物技术研究。E-mail: jiaohui5005@126.com.cn

\* 通信作者: 师俊玲(1972—),女,教授,博士,主要从事食品生物技术研究。E-mail: sjlshi2004@yahoo.com.cn

“西藏灵菇”菌粒由西北农林科技大学食品科学与工程学院食品生物工程教研室菌种室保藏和提供。

发酵液接种体的制备：按100g/L的接种量将西藏灵菇菌粒接种于灭菌的脱脂乳中，28℃静置培养24h，获得新菌粒和发酵液，即分别为实验用菌粒接种体和发酵液接种体。

### 1.1.2 原病微生物指示菌

肠致病性大肠杆菌(*enteropathogenic Escherichia coli*, EPEC)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、沙门氏菌(*Salmonella*)由西北农林科技大学食品科学与工程学院食品生物工程教研室菌种室保藏。

### 1.1.3 牛乳和培养基

鲜牛乳：采自西北农林科技大学畜牧养殖厂。

脱脂乳：将鲜牛乳置4000r/min条件下离心10min而得。

营养琼脂：牛肉膏3g、蛋白胨10g、NaCl 5g、琼脂15g、水1L，pH 7.2~7.4。用于抑菌活性检测时培养病原菌。

### 1.1.4 试剂

葡萄糖(分析纯)、NaOH(分析纯)、CuSO<sub>4</sub>(分析纯) 西安化学试剂厂；蛋白胨(生化试剂)、牛肉膏(生化试剂)、NaCl(分析纯) 北京奥博星生物技术有限公司；琼脂(生化试剂) 日本进口。

### 1.2 仪器与设备

SPX-300B 生化培养箱 上海跃进医疗器械厂；HH. CP-T 型 CO<sub>2</sub> 培养箱 上海福玛实验设备有限公司；ES-315 全自动高压灭菌锅 广州东南科仪有限公司；TAXT. Plus/50 质构仪 Stable Micro Systems 公司；AIR TECH 超净工作台 苏净集团安泰公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 发酵条件与过程

将活化后的菌粒按100g/L接种于灭菌的脱脂乳中，并且将发酵液按体积分数10%接种于灭菌的脱脂乳中，28℃静置培养，取不同发酵时间的样品用于指标的测定。

#### 1.3.2 抑菌活性检测

以大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌为指示菌，在营养琼脂培养基上涂布接种100μL上述病原菌悬液。再分别吸取由菌粒接种体发酵16、18、20、22、24、26h的发酵乳液，和用发酵液接种体发酵16、18、20、22、24、26h的发酵乳液200μL注入牛津杯中，于37℃下培养24h后根据十字交叉法，用直尺测定其抑菌圈直径。其中指示菌在接种前均在营养肉汤液体培养基中进行活化，直至含菌数达到10<sup>6</sup>~10<sup>7</sup>CFU/mL。每个样品设3个重复。

#### 1.3.3 发酵乳的质构特性分析

采用A/BE探头，用质构仪进行检测。具体检测条件为：前测试速度，1.0mm/s；测试速度，1.0mm/s；后测试速度，10.0mm/s；测试进程，30mm；触发类型，自动-10g；数据采集速率，400pps。检测前，将产品摇匀，保证产品质量均一、稳定，再进行测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 凝乳时间

接种菌粒的样品一般在16~18h时就出现明显的凝乳现象，部分样品甚至会出现发酵过度，轻微乳清析出等现象；接种发酵液的样品需要20~22h才能出现明显凝乳现象。分析其原因，主要有以下几个方面：1)菌粒中的活菌较多。西藏灵菇是一种共生菌粒，菌粒上栖息着乳酸菌、酵母菌和醋酸菌等微生物。发酵过程中，部分微生物从西藏灵菇菌粒上脱落，进入牛乳中，并在其中生长繁殖<sup>[2-3,5,15]</sup>，所以发酵后的发酵液可以作为新的发酵剂进行牛乳发酵。但是，接种量相同时，菌粒中所含有的活菌数量会多于发酵液中的活菌数。2)菌粒的形式更利于各种菌的共生和繁殖。菌粒是多种菌的共生体，是各种菌在长期的竞争共生中自然形成的。所以，以菌粒的形式共生更有利于各种菌的生长繁殖，并且可以达到最佳的类群分布，更有利于发酵过程的进行。3)菌粒的形成利于产酸菌的生长。相对于发酵液中的微生物来讲，菌粒中的微生物处于一种相对缺氧的状态，这样更有利于兼性厌氧的乳酸菌生长和产酸。

### 2.2 发酵乳的感官品质

接种菌粒发酵所得产品的乳块光滑细腻，有怡人的香味，酸味和醇味较重；接种发酵液发酵所得产品结实度不够，摇动之后乳块容易散开，闻起来有酸味、发涩，产品的具体特性见表1。

表1 发酵乳的感官品质

Table 1 Sensory quality of fermented milk with granular or liquid inoculum of Tibetan mushroom

样品	风味	组织状态	色泽
菌粒发酵	酸味和香味都较重，有明显酒味，没有异味	浓度均匀一致，黏性适中	白色中带奶油色，色泽均匀
发酵液发酵	酸味和香味都较淡，有轻微酒味，有涩味	组织结构松散，不结实，黏性较差	白色中带奶油色，色泽均匀

结合相关理论分析，在发酵过程中微生物利用牛乳中的营养成分进行生长，同时产生一系列的代谢产物。乳酸菌分解乳糖生成葡萄糖和半乳糖，产生乳酸；降解蛋白质，生成氨基酸。酵母菌完全适应了周围环境之后，利用乳糖、半乳糖和葡萄糖进行厌氧发酵，产生

大量的乙醇<sup>[16]</sup>。微生物的发酵过程赋予产品特殊的风味,因为酵母菌、醋酸菌、明串珠菌等参与发酵,所以制品中除含有少量乙醇和CO<sub>2</sub>外,还有不同程度的酵母味。由于菌粒和发酵液里面微生物类群有差异,所以发酵过程中产物的种类及数量可能也会有差异,导致最终产品的口感和风味不完全相同。

### 2.3 发酵乳的质构特性

表2 发酵乳的质构特性

Table 2 Textural properties of fermented milk with granular or liquid inoculum of Tibetan mushroom

接种体	发酵时间/h	结实度/g	稠度/gs	黏性/gs
菌粒	16	62.1	747.7	-25.5
	18	63.2	757.5	-26.0
	20	64.3	773.2	-29.8
	22	62.6	743.8	-27.1
	24	61.0	732.3	-26.4
发酵液	20	49.0	575.3	-11.0
	22	47.3	607.7	-16.3
	24	53.9	654.7	-19.7
	26	50.1	629.8	-17.3
	28	48.4	621.0	-16.6

由表2可得,在发酵过程中,两种接种体所得发酵乳的结实度、稠度和黏性均呈先上升后下降的趋势,3个指标在同一时间达到峰值;其中以菌粒为接种体所得发酵乳在20h时达到峰值,以发酵液为接种体所得发酵乳在24h时达到峰值。对比此时所得产品的感官性状可知,此时所得产品细腻、黏稠,口感较好。此前发酵不充分和此后发酵过度时所得产品的稠度小;发酵不充分时,产品的气味和口感较差,酸味较淡;发酵过度时,乳清析出,乳块的均匀程度差,产品的稠度下降。整体而言,由菌粒接种体发酵所得发酵乳的口感、质地和黏稠性都优于发酵液接种体,更能激发人们的食欲。

结合肉眼观察结果可以发现,乳的最大结实度、稠度和黏性出现的时间点(20h和24h)均比肉眼可见凝乳现象的时间点(分别为16~18h和20~22h)延迟了2h。这可能是因为肉眼观察到只是表面和最外层乳的状态,而看不到乳的内部结构。而质构仪检测结果则是整个乳体的均匀状态,其反映的结果更为可靠一些。据此推断,通过质构仪检测指标可以更为确切地确定最佳发酵时间。

### 2.4 发酵过程中的pH值和酸度变化

由图1、2可得,发酵过程中,随着接种体中微生物的生长和代谢,发酵乳中酸度增大,pH值降低;而且两者均是在前期变化幅度较大,后期变化幅度逐渐变小;酸度增加趋势与pH值下降的趋势基本吻合;菌粒发酵变化幅度较大,且数值明显高于发酵液发酵。对

于以菌粒为接种体的发酵体系而言,pH值和酸度的变化速度由快转慢的时间点可以明显地确定为20h和22h,而在以发酵液为接种体的发酵体系中,这种转折不明显。发酵相同时间时,接种菌粒的发酵乳的pH值显著低于而酸度则显著高于接种发酵液的发酵乳。这再次说明,以菌粒为接种体的发酵强度较高。

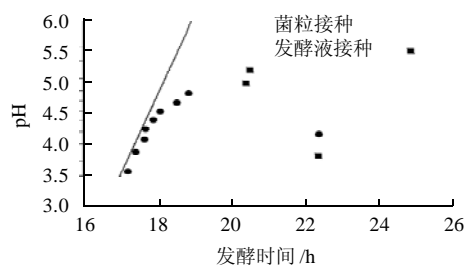


图1 发酵过程中发酵乳的pH值变化

Fig.1 pH change of milk during fermentation with granular inoculum or liquid inoculum of Tibetan mushroom

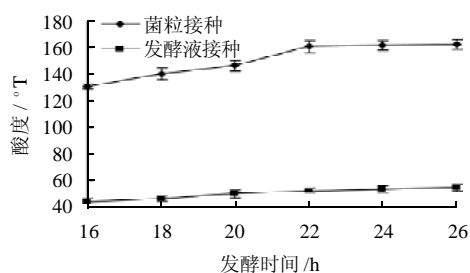


图2 发酵过程中发酵乳的酸度变化

Fig.2 Acidity change of milk during fermentation with granular inoculum or liquid inoculum of Tibetan mushroom

综合而言,用菌粒接种体和发酵液接种体发酵所得产品在凝乳前后酸度和pH值的差异较大,菌粒发酵的样品酸度和pH值明显比发酵液发酵时效果要好。说明菌粒发酵时产生有机酸的量多,酸度升高的得快,发酵乳pH值下降的快,在酸性条件下,有利于蛋白质凝固,凝乳时间明显比发酵液发酵时短,发酵乳酸度大,口感和风味也相对较好。

综合分析以菌粒为接种体时的pH值和酸度变化,以及乳的质构特性变化特点可以发现:20h以前,随着酸度的增大和pH值的降低,乳的结实度、稠度和黏性不断增大。这说明,酸度增大和pH值降低是导致乳的结实度、稠度和黏性增大的主要原因。分析其中作用机制,可对其过程解释如下:随着发酵过程的进行,高酸度导致乳酪蛋白产生凝聚,形成一定胶体结构;之后,随着发酵过程的继续进行,酸度过大,乳酪蛋白聚集程度增大,破坏了乳中已形成的胶体结构,形成乳块,导致乳清析出,乳的均一性降低,结实度、稠度和黏性同时降低。

## 2.5 发酵过程中还原糖含量的变化

还原糖是接种体中微生物生长和代谢的重要碳源。在不外加糖的条件下,乳中的还原糖主要是乳糖。随着发酵过程的进行,微生物会消耗乳中的糖分进行生长,同时产生代谢产物。由图3可见,不管以什么为接种体,乳中还原糖含量在发酵过程中呈一直减小趋势,相对而言,菌粒发酵比发酵液发酵糖耗速度较高一些,总的耗糖量也较大。这也说明,以菌粒为接种体时,体系中微生物的生长速度较快,菌体总量较大。这可能是菌粒发酵速度较快的根本原因。

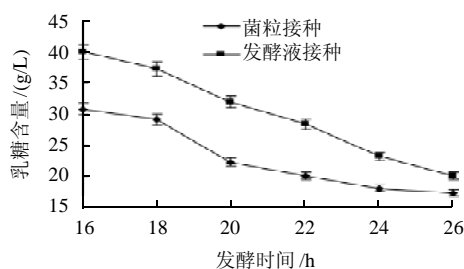


图3 发酵过程中乳糖含量的变化

Fig.3 Lactose content change of milk during fermentation with granular inoculum or liquid inoculum of Tibetan mushroom

进一步分析可以发现,乳糖含量随着发酵时间的延长而逐渐下降,但下降幅度逐渐减小。其原因主要是,在发酵前期,除了乳酸菌利用乳糖产生乳酸以外,一部分产乳糖酶的酵母菌也可以直接利用乳糖进行酒精发酵,乳糖含量迅速下降。但在后期,各种菌的增长速率都有所降低,乳糖的利用率也就有所下降,直至趋于稳定。

## 2.6 发酵乳的抑菌活性

对不同发酵时期的发酵乳的抑菌活性进行检测,可以发现:以菌粒为接种体所得发酵乳对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌均有不同程度的抑菌作用(图4~6)。其中,对沙门氏菌的抑制作用最强,抑菌圈直径为14.4~19.2mm;其次为大肠杆菌,抑菌圈直径为13.1~18.0mm,但抑菌圈较为模糊;对金黄色葡萄球菌的抑制作用最差,抑菌圈直径仅为12.0~14.5mm,且抑菌圈较模糊。发酵乳对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的最大抑菌活性出现在22h,对沙门氏菌的最大抑菌活性出现在24h。然而,此时的产品已经出现了轻微的发酵过度。

以发酵液为接种体时,所得发酵乳对3种病原菌也有一定程度的抑菌作用,但其抑菌活性普遍低于以菌粒为接种体发酵所得产品。以发酵液为接种体时,发酵乳对大肠杆菌的抑制作用最强,抑菌圈直径为12.5~15.4mm,24h时抑菌活性最强;其次为沙门氏菌,抑菌圈直径为

10.2~13.7mm,22h时抑菌效果最好;对金黄色葡萄球菌的抑菌效果最差,抑菌圈直径为8.9~11.2mm,22h时抑菌效果最好(图4~6)。与菌粒接种不同的是,此时的产品均未出现发酵过度。

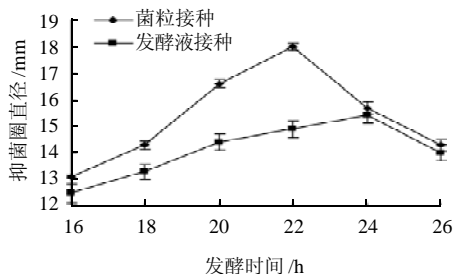


图4 不同时期发酵乳对大肠杆菌的抑菌作用

Fig.4 Antimicrobial effect of fermented milks obtained at different time points against *Escherichia coli*

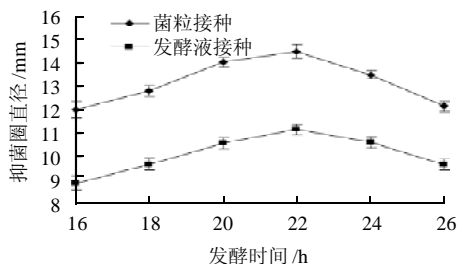


图5 不同时期发酵乳对金黄色葡萄球菌的抑菌作用

Fig.5 Antimicrobial effect of fermented milks obtained at different time points against *Staphylococcus aureus*

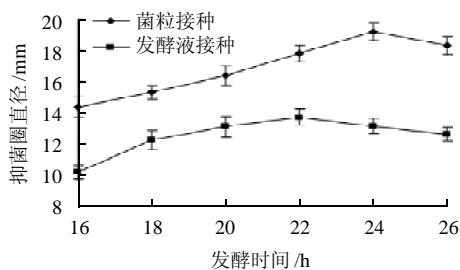


图6 不同时期发酵乳对沙门氏菌的抑菌作用

Fig.6 Antimicrobial effect of fermented milks obtained at different time points against *Salmonella*

对比以菌粒为接种体和以发酵液为接种体时所得发酵乳的抑菌活性可以发现,以菌粒为接种体所得发酵乳对沙门氏菌的抑菌活性较大,而以发酵液为接种体对大肠杆菌的抑菌活性较大,两者对金黄色葡萄球菌的抑菌活性均为最弱。由此说明,两个体系中的微生物菌群间的比例和物质代谢有所不同。以菌粒为接种体有利于沙门氏菌拮抗菌的生长及其抑菌活性物质的产生,而以发酵液为接种体有利于大肠杆菌拮抗菌的生长及其抑菌活性物质的产生。无论以什么为接种体,体系中的金

黄色葡萄球菌拮抗菌及其抑菌活性的产生都不占优势。总体而言,以菌粒为接种体所得发酵乳的抑菌活性高于以发酵液为接种体。

进行分析可知,发酵乳的抑菌作用与乳酸菌的益生作用以及各菌种在发酵过程中产生的代谢物质有关。据报道主要是由乳酸菌引起的有关细菌素与酵母菌产生的抑菌化合物之间的协调作用,其次是发酵产生的乳酸与乙酸抑制病原菌的协同作用<sup>[15]</sup>。此外,在发酵过程中产生的CO<sub>2</sub>、乙醇和醋酸增强了乳酸的抑菌效果,起到了增效作用<sup>[15]</sup>。菌粒与发酵液中乳酸菌的含量可能有差别,益生菌的抗性作用不同,细菌素的产量也可能存在差异;此外,乳酸、乙酸、乙醇、CO<sub>2</sub>和醋酸含量是导致发酵乳酸度变化的主要原因,菌粒发酵乳的酸度明显比发酵液发酵高,说明菌粒发酵乳中这几种物质的含量高,抑菌作用自然就会比发酵液发酵乳效果好。

### 3 结 论

本实验对以“西藏灵菇”菌粒和发酵液为接种体时,发酵乳的发酵速度、特性、产品质量和抑菌活性进行了对比。结果发现,接种体不同时,发酵乳的这些特性均有很大不同。其中,以菌粒为接种体时,发酵速度快、产酸快,所得产品的口感好、品质佳、抑菌活性高,其各项指标都显著高于以发酵液为接种体。由此证明,菌粒的形成对“西藏灵菇”乳的生产、产品质量和功能性是必要的。

有关菌粒形成及其在发酵过程、产品质量和功能性上优势的研究还有待于进一步探索。此外,以发酵液为接种体具有灵活、易于工业化生产等优点,具有很大的工业化生产潜力,可以进一步探究和验证工业化生产的可行性。

### 参考文献:

- [1] 周剑忠,黄开红,董明盛,等.开菲尔粒和西藏灵菇中细菌和酵母群落结构的比较[J].江苏农业学报,2008,24(5):634-639.
- [2] 刘宇峰,王金英,曲晓军,等.西藏灵菇菌的菌相菌学的研究[J].中国乳品工业,2005,33(9):35-39.
- [3] 周剑忠,董明盛,江汉湖.PCR-DGGE指纹技术与分离技术结合筛选藏灵菇奶发酵过程的优势菌[J].中国农业科学,2006,9(8):1632-1638.
- [4] 杨宝兰,郑明珠.开菲尔粒在牛乳中发酵特性的研究[J].中国医学检验杂志,2004,5(4):308-309.
- [5] 周剑忠,董明盛,江汉湖,等.藏灵菇发酵奶发酵特性的研究[J].食品科学,2006,27(8):29-33.
- [6] 薄芯,李京霞.西藏灵菇发酵奶发酵过程中部分维生素和乙醛的转化[J].中国乳品工业,2007,35(8):28-30.
- [7] 薄芯,李京霞.西藏灵菇发酵奶发酵过程中部分营养物质的转化[J].中国乳品工业,2008,36(11):21-24.
- [8] 刘宇峰,夏海华,孙建华,等.藏灵菇奶对肿瘤的抑制作用[J].畜牧兽医科技信息,2005(6):56-58.
- [9] 岳丽红,程广东,王长平,等.西藏灵菇酸奶对衰老模型小鼠抗氧化作用的研究[J].佳木斯大学学报:自然科学版,2008,26(3):430-432.
- [10] 王春敏,李立秋,杨春佳,等.藏灵菇奶对寻常性痤疮的治疗作用观察[J].中国微生物学杂志,2005,17(2):151-152.
- [11] DINIZ R O, GARLA L K, SCHNEEDORF J M, et al. Study of anti-inflammatory activity of Tibetan mushroom, a symbiotic culture of bacteria and fungi encapsulated into a polysaccharide matrix[J]. Pharmacological Research, 2003, 47: 49-52.
- [12] 李丽秋,王春敏,宋淑贤,等.西藏灵菇奶对抗生素相关性腹泻小鼠肠道菌群的调整作用[J].中国微生态学杂志,2004,16(4):197-200.
- [13] 薄芯,李京霞.西藏灵菇奶一般毒性和生殖毒性的初步探索[J].中国乳品工业,2007,35(8):28-30.
- [14] 邵东燕,李海潮,师俊玲,等.西藏灵菇牛奶酒纯种复合发酵剂的研究[J].食品科技,2008,26(5):23-25.
- [15] 杨希娟,樊明涛,师俊玲.西藏灵菇发酵乳抑菌活性的动态研究[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2007,35(8):131-138.
- [16] 杨希娟,师俊玲,樊明涛.西藏灵菇牛乳发酵液中的菌相与物质变化[J].中国食品学报,2007,7(4):42-46.