

# 一种乳酸菌多糖对酸乳凝胶的影响机理

李全阳<sup>1</sup>, 夏文水<sup>2</sup>, 祝丽香<sup>3</sup>, 代养勇<sup>1</sup>, 陈伟<sup>1</sup>

(1. 山东农业大学食品学院, 泰安 271018; 2. 江南大学食品学院, 无锡 214036;  
3. 山东农业大学科技学院, 泰安 271018)

**摘要** 以乳酸菌菌株和由粘性乳酸菌分泌的胞外多糖为原料制备不同的酸乳凝胶, 并用电子显微镜和质构仪等手段对其微观结构和质构特性进行了观测. 发现在酸乳体系中, 中性乳酸菌多糖与乳酪蛋白是相斥的, 多糖对酸乳凝胶的影响主要是利用其自身分子形成的空间位垒, 干扰酪蛋白微球之间的相互链接方式, 从而动态影响酪蛋白微球立体网状结构的构建. 提出酸乳乳酸菌胞外多糖对酸乳凝胶结构的影响不仅与其分子大小及结构有关, 还与胞外多糖添加到酸乳体系中的方式、时间、速度、浓度有关. 进一步解释了酸乳制作中, 粘性发酵剂所能达到的效果不容易用直接添加增稠剂的方法替代的原因.

**关键词** 胞外多糖; 酸乳凝胶; 空间位垒效应; 机理

中图分类号 O629.12

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2007)05-0868-04

近几十年来, 人们对粘性乳酸菌的兴趣与日俱增, 因乳酸菌及其产生的乳酸菌胞外多糖(Lactic acid bacteria exopolysaccharide, LAB EPS)具有公认的安全性<sup>[1]</sup>, 有些多糖还有保健特性<sup>[2]</sup>, 并被广泛地用作食品工业中的增稠剂和稳定剂等. 研究发现, 干酪生产中粘性多糖分泌的菌株可以改善产品的质构, 增加出品率, 降低挈达干酪(Cheddar cheese)中脂肪的含量<sup>[3]</sup>. 在酸乳生产中, 采用粘性乳酸菌则可明显增加制品的粘性<sup>[4]</sup>及持水力<sup>[5]</sup>.

本文以分离得到的粘性和非粘性菌株<sup>[6]</sup>为发酵剂, 先分离粘性胞外多糖, 再制备含有不同种类(内源性、外源性)和数量EPS的酸乳, 进一步对酸乳凝胶的质构特性和结构特性进行研究, 探索酸乳中EPS对酸乳特性的影响和作用机理.

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

按文献[6]方法分离酸乳生产菌株嗜热链球菌SGX03-3(粘性嗜热链球菌菌株)、SGX03-4(非粘性嗜热链球菌菌株)以及SGX03-1(非粘性保加利亚乳杆菌菌株).

SPX智能生化培养箱(南京盈鑫实验仪器有限公司); Hsc-20R-A冷冻离心机(图们离心机厂); TA.XT2i物性仪(英国Stable Micro System公司); QUANTA-200扫描电镜(FEI公司)等.

### 1.2 实验过程

1.2.1 粘性和非粘性酸乳的制备 配制全脂奶粉复原乳(12.0%, 12 g/100 mL), 于4℃下静置2 h后, 加热至95℃保持5 min, 冷却至43℃, 分别接入质量分数为3%的SGX03-3和SGX03-4发酵剂, 分装到灭菌容器中, 于40℃下培养发酵至80℃T, 取出, 放入4℃冰箱中, 后熟48 h后测定. 由粘性发酵剂制作的酸乳称为粘性酸乳, 由非粘性发酵剂制作的酸乳称为非粘性酸乳.

1.2.2 粘性LAB EPS回添实验 取脱脂奶粉制成11.0%(11.0 g/100 mL)的复原乳, 于4℃下静置2 h后, 加热至95℃保持5 min, 冷却至43℃. 接入质量分数为3%的SGX03-3发酵剂, 于40℃培养发酵至80℃T, 取出, 放入4℃冰箱中, 48 h后分离多糖, 方法见文献[7]. 用粗多糖溶液配制EPS含量为粘性酸乳3倍EPS的全脂复原乳(12.0%), 4℃下静置2 h后, 加热95℃保持5 min, 冷却至43℃.

收稿日期: 2006-10-19.

基金项目: 山东农业大学博士基金(批准号: 23240)资助.

联系人简介: 李全阳(1964年出生), 男, 博士, 教授, 主要从事生物活性成分研究. E-mail: liquanyang@sdau.edu.cn

接入质量分数为 3% 的 SGX03-4 发酵剂, 分装后于 40 °C 发酵至 80 °T, 取出, 放入 4 °C 冰箱中, 48 h 后测试.

1.2.3 酸乳硬度、粘滞性、粘聚度、抗流性的测定及电镜观察 用物性仪测定后熟的粘性( $T_a$ )、非粘性( $T_b$ )和添加 3 倍 EPS( $T_c$ )的 3 种酸乳样品, 选用高 3.5 cm, 直径为 2.5 cm 的圆筒, 穿入速度 2 mm/s, 穿入距离 20 mm, 上升速度 2 mm/s, 每种样品做 3 个平行测定.

取上述 3 种酸乳(凝胶状态), 放入戊二醛溶液中固定 4 h 以上, 再转入锶酸溶液中固定 4 h 以上. 用磷酸缓冲液洗涤, 乙醇梯度脱水, CO<sub>2</sub> 临界点干燥, 喷金, 用 QUANTA-200 扫描电镜观察.

## 2 结果与讨论

### 2.1 酸乳质构特性

表 1 为 3 种酸乳硬度、粘滞性、粘聚度和抗流性的差异, 其中  $T_b$  的硬度和粘滞性最高;  $T_a$  的粘聚度和抗流性最高;  $T_c$  的 4 项指标都是最低的. 这说明配方相同时, 粘性酸乳相对比较柔软而富有弹性, 粘稠性较好; 额外加入粘性酸乳的 EPS, 则会显著降低产品的硬度和粘滞性, 使乳凝胶变得更加稀软.

Table 1 Measuring results of three yogurt samples by texturometer

Sample	Hardness/g	Tackiness/g	Cohesiveness/g	Anti-flowage/g
$T_a$	90.4 ± 4.2	853.6 ± 50.1	30.3 ± 2.1	171.5 ± 3.2
$T_b$	105.6 ± 3.1	885.4 ± 36.8	23.7 ± 1.9	144.7 ± 18.7
$T_c$	31.4 ± 2.8	180.6 ± 19.5	5.4 ± 0.9	22.1 ± 1.4

### 2.2 酸乳凝胶的显微结构

3 种酸乳凝胶结构见图 1 ~ 图 4. 在 SGX03-4 菌株发酵形成的非粘性酸乳凝胶中, 酪蛋白相互凝集形成了酪蛋白聚集体, 这些聚集体多数情况下是由许多酪蛋白微球相互结合在一起构成直径粗壮的簇状物(图 1), 簇状物之间相互链接, 连续性良好. 乳酸菌则生长在簇状物形成的不规则网孔中.

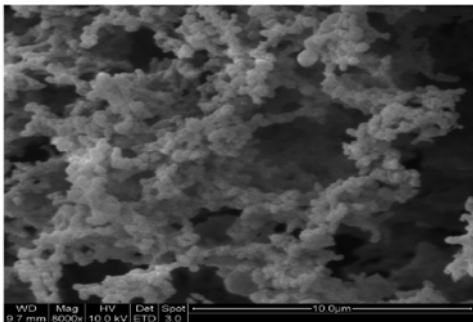


Fig. 1 SEM image of non-ropy yogurt (SGX03-4) (8000 ×)

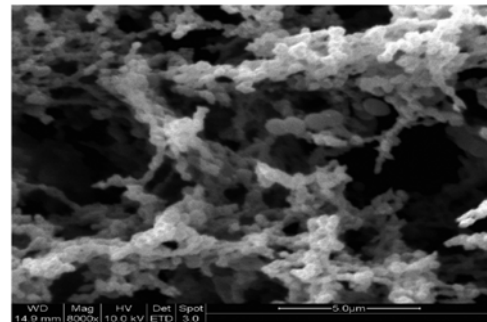


Fig. 2 SEM image of ropy yogurt(SGX03-4) (8000 ×)

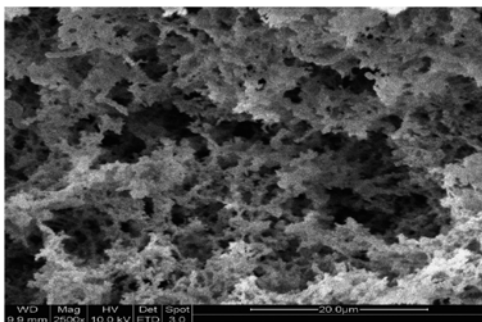


Fig. 3 SEM image of Yogurt fermented by SGX03-4 and 3 times SGX03-3 EPS added(2500 ×)

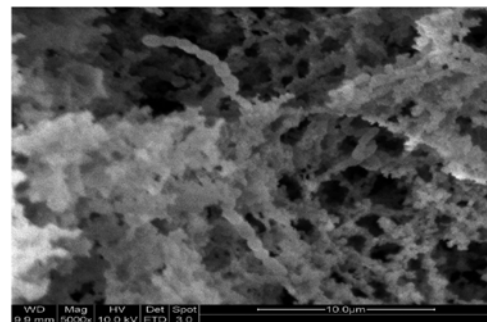


Fig. 4 SEM image of Yogurt fermented by SGX03-4 and 3 times SGX03-3 EPS added(5000 ×)

由 SGX03-3 菌株发酵形成的粘性酸乳凝胶中, 簇状物不如非粘性酸乳的粗壮, 但连续性仍然较好, 在簇状物之间分布着很多网孔, 有的网孔像非粘性酸乳那样较大, 还有很多细小的网孔, 甚至出

现许多单个酪蛋白相互结合成单体串珠状簇状物(图2),这在非粘性酸乳中基本上看不到. SGX03-3菌株生长在较大的网孔中(图2). 原料中加入3倍外源粘性EPS,再经非粘性菌株发酵形成的酸乳的电镜观察发现,酪蛋白凝集物非常细碎,仅形成细丝状或片状结构(图3和图4),凝集物之间的连续性很差(图3),酪蛋白簇状物相互链接形成的立体网状结构的连续性也很差(图4).

### 2.3 胞外多糖对酸乳凝胶特性影响的机理分析

酸乳的制作就是牛乳中的酪蛋白在乳酸菌形成的乳酸作用下,相互凝集构成立体网状结构的过程. 固定配方和工艺时,影响立体网状结构的诸因素中,酪蛋白微球、乳脂肪球、乳清蛋白微球以及体系的温度都是相对固定的(常量),而乳酸菌菌体及其代谢产生的EPS则是变量.

**2.3.1 EPS含量、分子量和分子结构对酸乳凝胶的影响** 图1~图4显示,酸乳凝胶形成的主体是原料乳中的酪蛋白,在发酵过程中EPS的分泌量在109~380 mg/L之间<sup>[7]</sup>,因此其自身粘度对体系的总粘度贡献很小. 前期研究发现,粘性菌株SGX03-3产生的EPS结构为 $\rightarrow 3)-\alpha-D-Galp-(1\rightarrow 3)-\beta-D-Galp-(1\rightarrow 3)-\beta-D-Glcp-(1\rightarrow 6)-\beta-D-Glcp-(1\rightarrow$ <sup>[8]</sup>. 这是一种中性多糖,不含有氨基、乙酰氨基、羧基,酸乳体系是酸性介质(pH为4.0上下),因此这种中性多糖与酸乳体系其它成分的范德华和氢键作用力较小,而且LAB EPS和蛋白微球之间是相互排斥的<sup>[9]</sup>. SGX03-3菌株形成的粘性胞外多糖EPS03-1gm相对分子量较大<sup>[10]</sup>,每个EPS03-1gm分子在介质中都是很长的“细丝”. 各个糖单元之间的糖苷键在一定程度上能自由旋转,因而形成比较舒展的大“无规线团”. 含有许多糖单位的EPS高分子长链在介质中会有多种形态,并不断变化,高分子长链之间还会发生相互作用,而且多糖自身能够形成网络<sup>[11]</sup>.

EPS分子较小时,其自身形成的空间位垒较小,而分子大小与酪蛋白微球相近或更小时,空间位垒效应就不存在了. 因此,小分子EPS对酸乳结构的影响力非常有限,即使浓度较高,也不会有明显效果,此时EPS对酪蛋白之间的凝聚作用影响很小,所以在很少干扰的情况下形成的酪蛋白簇状物较粗,网孔较大(图1),因此,这种酸乳的硬度较大(表1). EPS03-1gm是一种很大的分子,会产生较大的空间位垒效应,从而显著“干扰”酪蛋白的运动范围和连接方式. 由于大分子的EPS对酪蛋白之间凝聚作用的影响,所以在其“干扰”下形成的酪蛋白簇状物较细,网孔较多、较小(图2).

以上分析说明:在酸乳体系中,中性多糖与酪蛋白之间产生相斥作用的条件下,LAB EPS会利用其自身分子大小形成的空间位垒作用干扰酪蛋白微球的连接方式,从而影响酪蛋白立体网状结构的构建. 这种影响力与分子的大小和结构直接相关,但与分子的数量关系比较间接. 对以前发现的EPS含量与酸乳样品的粘度及其它指标相关性很差<sup>[7]</sup>的原因进行了解释,也对Sandrine等<sup>[12]</sup>提出的EPS的含量与酸乳的流变特性没有相关性的观点进行了补充. Hassan等<sup>[13]</sup>认为EPS<sup>+</sup>和EPS<sup>-</sup>之间流变学特性和微观结构的差异都是由于EPS的存在产生的,而本研究认为造成酸乳微观结构差异的原因主要与EPS的分子大小和结构有关,而与其含量没有直接的关系.

**2.3.2 内源EPS对酸乳的影响** 由于EPS主要是在原料乳体系的pH<5.0以后产生的<sup>[10]</sup>,而酪蛋白的絮凝在pH=5.2时就开始了<sup>[14]</sup>. 在酸乳凝胶形成的过程中,内源性EPS由乳酸菌代谢缓慢而均匀地分泌出来,它是在酪蛋白开始凝集以后伴随着凝胶构建过程进行的,所以内源性EPS的位垒效应也是从无到有逐渐增大的,使正在形成中的大的凝集体的进一步加粗和联合受到一定程度的妨碍,而在分割小区内又增加了凝集体碰撞结合的几率. 因此,在LAB EPS渐进产生和逐步形成“网络”的干扰下,酪蛋白絮凝形成的立体网状结构才能连续而且细密(图2). 若LAB EPS的分子较小,则空间位垒效应很小,对酪蛋白簇状物的形成影响力也就很小. 因此内源性大分子EPS是通过渐进的、温和的空间位垒效应作用,使得酸乳酪蛋白凝集形成连续且细密的立体网状结构.

**2.3.3 外源EPS对酸乳影响** 分析图3和图4发现,原料中预先加入大分子量的EPS会导致形成的酸乳凝胶连续性较差,酪蛋白相互之间仅仅形成丝状、片状细密的松散结构. 说明外源的EPS严重干扰了酸乳立体网状结构的形成. 在乳酸菌发酵之前,将分子量很大的LAB EPS加入到原料乳中,在酪蛋白絮凝之前,形状极不对称的EPS会发生扩散、缔合,当EPS达到一定浓度时还会逐渐形成网络结构<sup>[11]</sup>. 分子越大,EPS网络形成所需要的浓度越低,加入EPS的浓度越高,则形成的网络越完善、致密. 这时在酸乳酪蛋白发生凝集之前,大分子的EPS即完成了对原料乳的空间分割作用,在这种对酪

蛋白具有强大的空间位垒和排斥作用的 EPS 网络提前形成的条件下,酪蛋白絮凝构建立体网状结构时,只能形成细碎的不连续的结构,这种微观结构的凝乳宏观表现则会非常稀软。

总之,LAB EPS 对酸乳凝胶结构的影响作用不仅与其分子大小、结构有关,还与 EPS 添加到乳体系中的方式、时间、速度、浓度有关。同时,酸乳制作时,粘性发酵剂所能达到的效果用添加增稠剂的方法是不容易被代替的。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Doleyres Y. , Schaub L. , Lacroix C. . J. Dairy Sci. [J] , 2005 , **88** : 4146—4156
- [ 2 ] Ruas-Madiedo Patricia, Hugenholtz Jeroen. . Pietermela Zoon. , International Dairy Journal[J] , 2002 , **12** : 163—171
- [ 3 ] Awad S. , Hassan A. N. , Muthukumarappan K. . J. Dairy Sci. [J] , 2005 , **88** : 4204—4213
- [ 4 ] Hassan A. N. , Frank J. F. , Schmidt K. A. , *et al.* . J. Dairy Sci. [J] , 1996 , **79** : 2091—2097
- [ 5 ] Hassan A. N. , Frank J. F. , Schmidt, K. A. , *et al.* . J. Dairy Sci. [J] , 1996 , **79** : 2098—2103
- [ 6 ] LI Quan-Yang(李全阳), XIA Wen-Shui(夏文水). Food Science(食品科学)[J], 2004, **25**(2): 80—84
- [ 7 ] LI Quan-Yang(李全阳), XIA Wen-Shui(夏文水), JIAO En-Feng(焦恩峰), *et al.* . Food and Fermentation Industries(食品与发酵工业)[J], 2006, **32**(3): 116—121
- [ 8 ] LI Quan-Yang(李全阳), XIA Wen-Shui(夏文水). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2007, **28**(4): 655—657
- [ 9 ] Tuinier Grotenhuis R. E. Ten, Holt C. , *et al.* . Phys. Rev. E[J], 1999, **60** : 848—856
- [ 10 ] LI Quan-Yang(李全阳), XIA Wen-Shui(夏文水), ZHANG Jin-Shan(张进山), *et al.* . Food and Fermentation Industries(食品与发酵工业)[J], 2005, **31**(10): 139—141
- [ 11 ] Hassan A. N. , Frank J. F. , Elsoda M. . International Dairy Journal[J] , 2003 , **13** : 755—762
- [ 12 ] Petry Sandrine, Furlan Sylviane, Waghorne Earle, *et al.* . FEMS Microbiology Letters[J] , 2003 , **221** : 285—291
- [ 13 ] Hassan A. N. , Ipsen R. , Janzen T. , *et al.* . J. Dairy Sci. [J] , 2003 , **86** : 1632—1638
- [ 14 ] LUO Cheng-Xiang(骆承庠). Dairy Science and Technology(乳与乳制品工艺学)[M], Beijing: Agricultural Press of China, 1999: 40—49

## Influence Mechanism of a Kind of Exopolysaccharides on Yogurt Curd

LI Quan-Yang<sup>1\*</sup>, XIA Wen-Shui<sup>2</sup>, ZHU Li-Xiang<sup>3</sup>, DAI Yang-Yong<sup>1</sup>, CHEN Wei<sup>1</sup>

(1. College of Food Science, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China;

2. School of Food Science, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China;

3. College of Science and Technology, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

**Abstract** Different yogurt curd samples were manufactured by lactic acid bacteria strains and the ropy-strain exopolysaccharides, furthermore, the microstructure and texture properties of the samples were measured. The results indicate that, the mechanism of lactic acid exopolysaccharides reacting with yogurt curd mainly was space baffle effect resulting from the size of the neutral exopolysaccharides themselves which were exclusive from casein in yogurt curd, the space baffle effect interrupted the link ways of casein micelles and thereby dynamically influence the construction of three-dimensional net structure of casein micelle. A novel view point was brought forward that the influence effect of the lactic acid bacteria exopolysaccharides from yogurt on yogurt curds had great things to do not only with the size and structure of exopolysaccharides but also more importantly with the adding ways, time, speed, concentration of exopolysaccharides. Furthermore, the reasons were made clear that the effect of using ropy starter and making a ropy yogurt could not be replaced by adding stabilizer reagents directly.

**Keywords** Exopolysaccharide; Yogurt curd; Space baffle effect; Mechanism

(Ed. : H, J, Z)