

新疆传统发酵酸奶中乳酸菌的分离鉴定及 复合菌株发酵剂的研制

亥比拜木·阿不迪克热木,古丽皮艳·托乎提,凯迪日亚·阿布拉,努尔古丽·热合曼*

(新疆师范大学 生命科学学院,新疆 乌鲁木齐 830017)

摘 要:为研制具有优良发酵性能的酸奶复合发酵剂,采用传统分离方法从酸奶样品中分离得到17株乳酸菌,经鉴定,8株为副干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei*),1株为鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*),8株为嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*),并对其中的14株乳酸菌进行发酵性能评价,筛选出5株乳酸菌:鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*) HM-4-2,副干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei*) HM-6-2、HM-5-5,嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*) LH-6-4、HM-6-4。将副干酪乳杆菌、鼠李糖乳杆菌和嗜热链球菌按不同比例进行组合,并对复合菌株的发酵性能进行研究。结果表明,副干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei*) HM-5-5、鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*) HM-4-2、嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*) LH-6-4之间比例为1:1:1时,发酵乳酸度适中,产香能力最佳,感官评分最高,可作为发酵剂用于酸乳的生产。研究结果为功能性乳制品的开发及其工业化生产提供了理论基础和技术方案。

关键词:酸奶;分离鉴定;乳酸菌;发酵特性;复合发酵剂

中图分类号:TS252.1

文献标识码:A

文章编号:1008-9659(2025)03-0029-13

酸奶因其独特的风味和营养价值受到消费者的喜爱,其不仅保留了原奶的营养成分,还在抗氧化、增强人体免疫力、降低胆固醇、抗肿瘤及调节肠道菌群、改善乳糖吸收和乳糖不耐受性降低、抗有害微生物活性、改善蛋白质和脂质消化率等方面发挥着重要作用^[1-2]。由于地理环境和人为因素的影响,不同地区同种发酵食品和同一地区不同工艺发酵食品的乳酸菌多样性存在较大差异^[3]。麦日艳古·亚生等人^[4]从塔什库尔干塔吉克自治县传统奶酪和酸奶样品中分离出的乳酸菌以明串菌属(*Leuconostoc*)为优势菌属,其次为乳杆菌属(*Lactobacillus*);孙洁^[5]对锡林郭勒盟19份酸奶样品中分离的优势乳酸菌菌种以乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)为主;阿克苏地区手工酸奶中分离纯化的乳酸菌菌株以干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)、副干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei*)、乳酸片球菌(*Pediococcus acidilactici*)为主^[6];Wu等人^[7]以新疆伊犁传统发酵酸奶为研究对象,分离鉴定出3株发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)和2株德氏乳杆菌(*Lactobacillus delbrueckii. bulgaricus*);林杨等人^[8]从新疆阿克苏传统酸乳中发现肠球菌属(*Enterococcus*)、乳植杆菌属(*Lactiplantibacillus*)、链球菌属(*Streptococcus*)。Li等人^[9]从哈萨克传统发酵乳制品中分离出戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecium*)和植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)。

传统发酵酸奶制作工艺简单,一般以鲜牛奶为原料,并对鲜牛奶进行消毒,降温至40℃后,添加少量天然酸奶发酵剂并置于适当的温度发酵10 h左右后,在4℃条件下经3~4 h后熟而成。因传统发酵乳制品中微生物种类复杂多变,且大多在家庭小作坊中以传统工艺制作而成,发酵条件和工艺不规范,缺乏标准化的乳酸菌发酵剂,导致产品质量参差不齐。目前对新疆维吾尔自治区拜城县布隆乡、黑英山乡传统发酵酸奶中的优势微生物菌群和特性鲜有报道。因此,分离鉴定蕴含的乳酸菌并制备本土化酸奶发酵剂具有重要的现

[收稿日期]2024-06-03

[修回日期]2024-09-27

[基金项目]国家自然科学基金项目(32060528)。

[作者简介]亥比拜木·阿不迪克热木(1996-),女,硕士研究生,主要从事应用微生物学方面研究,E-mail:3298244808@qq.com.

*[通讯作者]努尔古丽·热合曼(1972-),女,教授,主要从事应用微生物学方面研究,E-mail:nurgulum@163.com.

实意义。

乳酸菌是一类没有孢子的革兰氏阳性菌的总称^[10],它既是牛奶快速酸化的发酵剂,也是在乳制品后熟过程中起重要作用的次生微生物群,在传统发酵乳制品的口感、质地和香气的形成过程中至关重要^[9],是传统发酵乳制品重要的发酵剂。因此,开展对优良乳酸菌的筛选工作,在发酵剂研制过程中尤为重要。本研究从阿克苏地区拜城县原生态传统发酵酸奶中分离乳酸菌菌株,并测定其在牛乳中的发酵性能,以期获得性能良好的乳酸菌菌株并确定最佳复配比例,为传统乳制品中微生物资源的挖掘以及研发具有自主知识产权的酸奶发酵剂打下基础。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料与试剂

1.1.1 实验样品

2份手工酸奶样品,采自新疆阿克苏地区拜城县布隆乡(BL)和黑英山乡(HY)。

1.1.2 实验试剂

西域春牌纯牛奶,购买于乌鲁木齐市观园路100号未来超市;TIANampBacteria DNA Kit 细菌基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)(天根生化科技有限公司);2×SanTaq PCR Mix 预混液(上海生工生物工程股份有限公司);双乙酰标准品、邻苯二胺(上海麦克林生化科技有限公司);亮氨酸标准品,坛墨质检;四硼酸钠、邻苯二甲醛、二硫苏糖醇、苯酚、三氯乙酸均为分析纯(天津市致远化学试剂有限公司)。

1.1.3 主要仪器与设备

HPX-9272ME 型电热恒温培养箱(上海博讯实业有限公司);LNB48+型 PCR 仪(上海皓庄仪器有限公司);UV-5100B 型紫外分光光度计(上海元析仪器有限公司);BLF6 型离心机(上海一恒科技有限公司);DYY-6C 型电泳仪(上海一恒科技有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 乳酸菌的分离鉴定

乳酸菌的分离纯化与形态学观察:用 MRS、Lee 氏培养基用于乳酸菌的分离;采用梯度稀释法稀释样品后涂布于 MRS、Lee 氏平板,在 37℃ 条件下培养 48 h,选择 30~300 个菌落的平板,记录形态不一致的几个菌落形态,通过三线接种法进一步纯化^[5]。将分离纯化后的细菌进行革兰氏染色^[11],并将纯培养物用 40% 的甘油保存。

细菌的分子生物学鉴定与构建系统发育树:用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提总 DNA,并参照文献[9]的方法,以提取的 DNA 为模板,用 16S rDNA 通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACGYTACCTTGTTACGACTT-3') 进行 PCR 扩增,扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后送至生工生物工程股份有限公司进行测序分析。PCR 扩增体系^[12]如表 1 所示。

表 1 细菌 16S rDNA 序列 PCR 扩增体系及扩增程序

PCR 扩增体系		PCR 扩增程序		
MIX 混合物	13.5 μ L	预变性	94℃	5 min
DNA 模板	2 μ L	变性	94℃	1 min
上游引物 27F	0.5 μ L	退火	58℃	1 min
下游引物 1492R	0.5 μ L	延伸	72℃	2 min
dd H ₂ O	补充至 25 μ L	再延伸	72℃	10 min
总计	25 μ L	冷却	4℃	10 min

1.2.2 乳酸菌单菌发酵乳制备

将活化好的各乳酸菌接种于 MRS 液体培养基中,连续传三代后,每一个单菌株菌悬液($OD_{600} = 2$)按 3% 的比例分别接种于灭菌的脱脂牛奶中活化两次,然后再接种于全脂乳中制备单菌发酵乳^[13],在 37℃ 发酵至终点并于 4℃ 冷藏 4 h 后测指标。

1.2.3 优良乳酸菌菌株的筛选

(1)感官评价测定:同实验室小组10名同学及老师参照唐凯伟等人^[14]的方法,对发酵乳的色泽、滋味、气味和组织状态等方面进行感官评定及打分。

(2)产酸能力、持水力和活菌数测定:发酵乳酸度及持水力参照文献^[15]的方法测定,菌种活力采用MRS培养基平板计数法^[16]。

(3)产香能力测定:参照刘宁宁等人^[17]的方法,分别采用邻苯二胺比色法和碘滴定法测定双乙酰、乙醛的含量。

(4)蛋白质水解能力测定:参照马雨璇等人^[18]的方法测定,以亮氨酸为标准计算浓度。

(5)产胞外多糖(Exopolysaccharides, EPS)能力测定:参照文献^[19]的方法测定。

1.2.4 复合菌种发酵剂的研制

(1)乳酸菌比例优化:按表2中的组合比例以3%的接种量制备发酵乳,37℃发酵至pH值降至4.2左右,于4℃冷藏4 h后进行感官评价,确定最佳复配比例。实验菌株为A1(HM-5-5)、A2(HM-6-2)、C(HM-4-2)、B1(HM-6-4)、B2(LH-6-4)。

表2 乳酸菌间比例的优化

A1CB2组	组号	A2CB1组	组号
1:1:1	A1	1:1:1	B1
2:1:1	A2	2:1:1	B2
3:1:1	A3	3:1:1	B3
3:2:1	A4	3:2:1	B4
3:3:2	A5	3:3:2	B5
2:3:1	A6	2:3:1	B6
3:3:1	A7	3:3:1	B7
2:3:3	A8	2:3:3	B8
1:2:1	A9	1:2:1	B9
3:2:3	A10	3:2:3	B10

(2)发酵温度优化:在优化出复配比例为1:1:1菌株的基础上,在接种量为3%的条件下选取37℃、39℃、41℃、42℃、43℃、45℃等六个梯度,培养至凝乳,于4℃冷藏4 h,以发酵乳的感官品质和持水力为衡量指标,确定最佳发酵温度。

(3)接种量优化:在发酵温度为37℃的条件下,选取3%、4%、5%、6%、7%、10%六个梯度,培养至凝乳后,于4℃冷藏4 h,以发酵乳的感官品质和持水力为衡量指标,确定最佳发酵时间。

(4)发酵时间优化:设定发酵温度为37℃,接种量为4%,选取发酵时间为8 h、10 h、12 h、15 h、18 h、24 h六个梯度,培养至凝乳,于4℃冷藏4 h后,通过发酵乳的感官品质和持水力为衡量指标,确定最佳发酵时间。

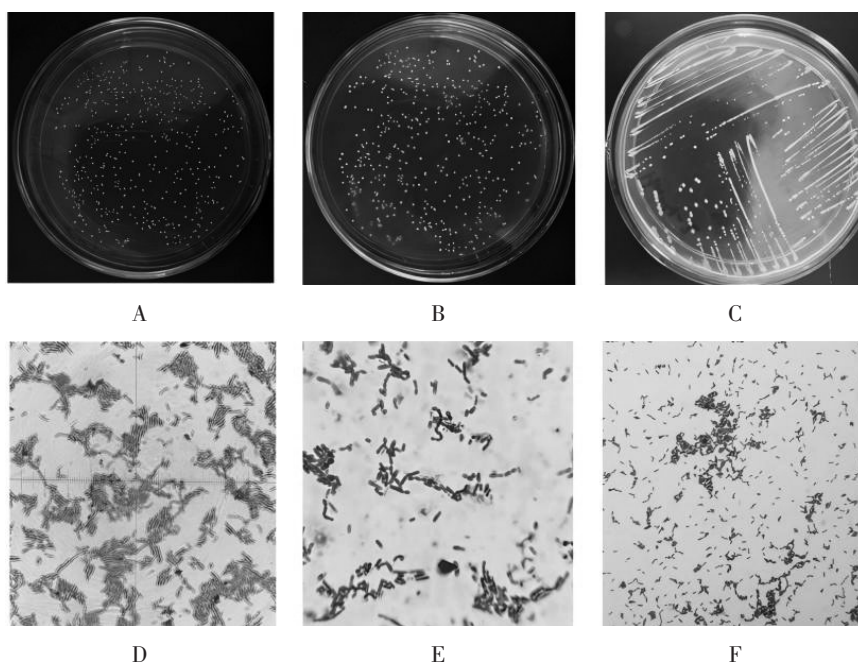
1.3 数据处理

所有实验重复3次,结果以平均值±标准差表示,使用IBM SPSS Statistics 20进行统计分析,采用单因素方差分析进行均数比较,并用Graphpad prisim软件绘图。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌的分离

经过平板划线、显微镜观察、革兰氏染色实验,从BL样品中分离出6株疑似乳酸菌,从HY样品中分离出11株疑似乳酸菌。部分菌落形态图和菌落显微形态如图1所示。由图1可知,分离的乳酸菌菌落在MRS和Lee氏培养基上呈乳白色或淡黄色,表面凸起,边缘整齐,不透明。在显微镜下观察细胞形态为杆状,部分菌株为链球状。

图1 细菌菌落形态及显微形态图($\times 100$ 油)

A: HM-4-2 菌落形态图; B: LH-6-4 菌落形态图; C: HM-5-5 菌落形态图;
D: HM-4-2 显微形态图; E: LH-6-4 显微形态图; F: HM-5-5 显微形态图。

2.2 乳酸菌的分子鉴定

从 17 株细菌 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳图观察到一条清晰明亮的条带, 条带位于 1000~2000 bp 之间, 说明目的片段扩增成功。各菌株 PCR 产物序列测序完成后, 将获得的 16S rDNA 序列在 NCBI 中进行相似性比对分析, 找到最高同源性的菌株, 并构建系统发育树, 结果如图 2 所示。结果表明, 从两份样品中分离出的 17 株乳酸菌基因序列同源性均 $\geq 99\%$, 因此将 17 株细菌鉴定为 2 个属, 3 个种。其中, HM-4-5、HM-5-5、HM-5-4、HM-5-6、HM-6-2、HM-6-1、B-6-5、B-5-7 被鉴定为副干酪乳杆菌 (*Lactocaseibacillus paracasei*); HM-4-2 被鉴定为鼠李糖乳杆菌 (*Lactocaseibacillus rhamnosus*); LB-4-1、LH-6-1、LH-4-1、HM-6-4、LB-6-2、BM-5-5、LH-6-4、BM-4-4 被鉴定为嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*)。

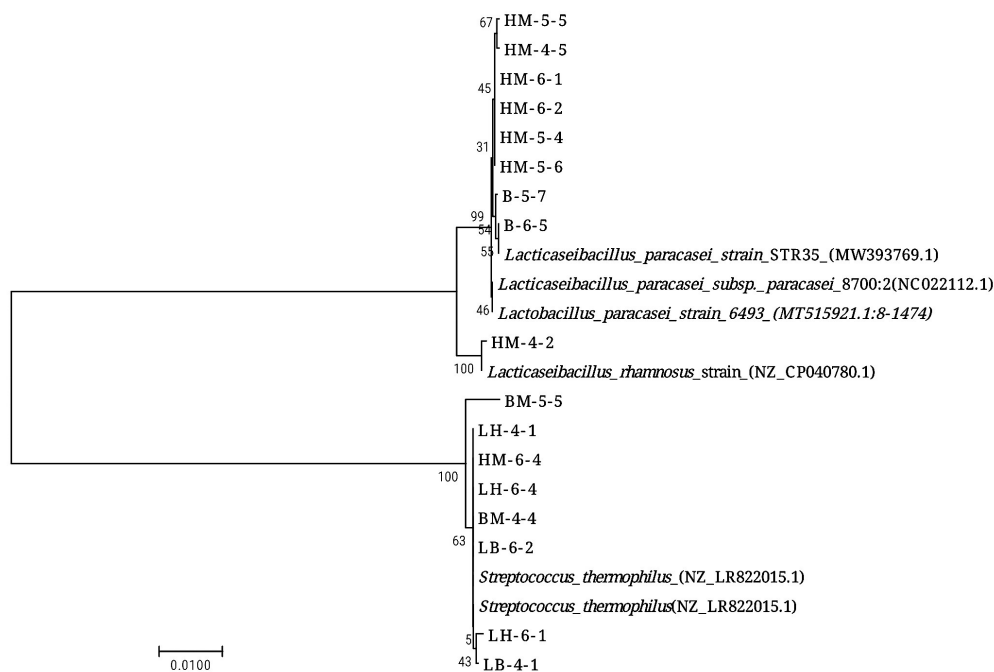


图2 细菌系统进化树

2.3 优良乳酸菌菌株筛选

2.3.1 感官评分

对分离获得的14株乳酸菌制备单菌发酵乳从组织状态、色泽、风味、口感4个方面进行感官评价。由表3可知,菌株HM-5-4、HM-5-6、LH-6-1的组织状态较差,具有明显乳析出现象,说明发酵性能差,发酵时易受外界干扰使组织状态不正常;菌株HM-5-4、LH-6-1的色泽评分最低,其余菌株的发酵乳均呈乳白色,色泽比较均匀;菌株LH-4-1的风味最佳;口感反映了感官评价人员对产品的接受程度,过酸或过甜都会影响口感评价得分。菌株HM-6-4、HM-5-5、LH-6-4的口感评分最佳。综合评定,菌株HM-6-4、HM-5-5、LH-6-4的感官评定总分较高,可被筛选为复配发酵剂菌株。

表3 14株乳酸菌发酵乳的感官评价结果

菌株	感官评分				
	组织状态	色泽	风味	口感	总分
HM-6-4	27.80±1.69 ^a	18.80±1.23 ^{ab}	17.20±1.22 ^{ab}	26.20±1.75 ^{ab}	90.00±4.10 ^a
HM-5-5	27.30±1.25 ^a	19.00±1.15 ^a	17.80±2.25 ^{ab}	26.90±1.37 ^a	91.00±3.82 ^a
HM-4-5	25.30±4.19 ^{abc}	18.30±1.70 ^{abc}	18.10±1.72 ^{ab}	24.90±2.02 ^{ab}	86.60±6.80 ^{abc}
LH-6-4	27.10±2.08 ^a	18.90±0.99 ^{ab}	18.60±1.58 ^{ab}	25.40±2.50 ^{ab}	90.00±4.57 ^a
LH-4-1	25.40±2.32 ^{abc}	19.30±2.26 ^a	19.10±3.28 ^a	24.80±2.82 ^{abc}	88.60±7.32 ^{ab}
BM-4-4	24.80±2.90 ^{abc}	17.70±1.70 ^{bc}	16.70±1.77 ^{ab}	24.40±1.78 ^{abc}	83.60±7.50 ^{bcd}
HM-4-2	25.00±3.80 ^{abc}	18.40±0.84 ^{abc}	17.90±1.6 ^{ab}	25.90±2.42 ^{ab}	87.20±7.05 ^{ab}
BM-5-5	23.70±2.90 ^{bc}	18.30±1.42 ^{abc}	17.20±1.62 ^{ab}	23.80±4.02 ^{bc}	83.00±5.96 ^{bcde}
LB-4-1	25.40±1.41 ^{abc}	18.60±1.17 ^{abc}	18.40±1.27 ^{ab}	24.60±1.90 ^{abc}	87.00±1.76 ^{ab}
HM-6-2	26.70±1.70 ^{ab}	18.30±1.06 ^{abc}	17.80±1.93 ^{ab}	25.90±2.73 ^{ab}	88.70±5.47 ^{ab}
HM-6-1	25.80±1.81 ^{abc}	18.00±2.05 ^{abc}	17.90±2.28 ^{ab}	25.00±1.41 ^{ab}	86.70±4.47 ^{ab}
HM-5-4	24.00±2.87 ^{bc}	15.80±1.32 ^d	16.50±1.90 ^b	23.40±3.92 ^{bc}	79.70±8.53 ^c
LH-6-1	22.80±3.96 ^c	15.90±2.00 ^d	16.60±1.95 ^b	21.80±4.34 ^c	77.10±10.03 ^c
HM-5-6	23.10±5.57 ^c	17.40±1.83 ^c	16.80±2.04 ^{ab}	23.40±3.80 ^{bc}	80.70±9.30 ^c

注:同一列中字母不同代表显著性差异($P < 0.05$)。

2.3.2 乳酸菌产酸能力和持水力

酸度是筛选优良乳酸菌的重要指标,包括产酸与后酸化两个方面。酸度直接影响生产效率、感官属性、凝乳时间、凝乳状态及货架期。适宜的酸度能够促进凝乳,有助于酸乳中柔和风味^[20]。优良乳酸菌不仅需要有较强的产酸能力,还需要有较弱的后酸化能力。后酸化过高会使产品出现过重的酸味,在储藏过程中就会造成产品质量下降,货架期变短^[21]。由表4可知,14株菌株酸度在110~126 °T之间,均符合GB 5009.239-2016《食品安全国家标准 食品酸度的测定》中规定的要求。4 °C冷藏21 d后完成发酵阶段,均呈逐渐下降的趋势,在116~129 °T之间,菌株HM-5-6、LH-6-1、HM-4-5的滴定酸度变化较大,故排除。

表4 单菌发酵乳的发酵时间、持水力、酸度的测定

序号	菌株	发酵时间(h)	滴定酸度(°T)	后发酵酸度(°T)	持水力(%)
1	HM-6-4	17.20±0.35 ^{ab}	118.67±1.15 ^d	122.93±1.006 ^d	78.95±0.17 ^b
2	HM-5-5	18.13±0.08 ^{cde}	114.67±1.15 ^{fg}	116.80±1.06 ^b	80.34±0.65 ^a
3	HM-4-5	17.16±0.19 ^{ab}	114.55±1.08 ^{fg}	123.33±0.58 ^{cd}	73.27±0.89 ^d
4	LH-6-4	17.46±0.06 ^{gab}	116 ^{ef}	118.33±0.58 ^{fg}	75.56±0.47 ^c
5	LH-4-1	18.22±0.13 ^{cd}	116 ^{ef}	117.67±0.58 ^{ab}	72.02±0.43 ^e
6	BM-4-4	18.06±0.06 ^{de}	122.67±1.15 ^b	127.33±1.15 ^b	69.18±0.78 ^b
7	HM-4-2	15.93±0.28 ⁱ	126 ^a	127.33±1.15 ^b	71.63±0.52 ^{ef}

续表

序号	菌株	发酵时间(h)	滴定酸度(°T)	后发酵酸度(°T)	持水力(%)
8	BM-5-5	19.45±0.53 ^a	120.67±0.31 ^e	124.33±0.58 ^e	71.64±0.41 ^e
9	LB-4-1	16.97±0.42 ^b	124.00±0.20 ^b	129.33±1.15 ^a	68.84±0.54 ^b
10	HM-6-2	17.67±0.72 ^{efg}	116.67±1.41 ^e	118.50±0.50 ^{fg}	71.57±1.81 ^{ef}
11	HM-6-1	17.84±0.45 ^{def}	114 ^g	118.93±1.01 ^{fg}	70.32±0.67 ^g
12	HM-5-4	18.65±0.36 ^{bc}	116.63±0.90 ^e	120.67±1.15 ^e	70.53±0.51 ^{fg}
13	LH-6-1	17.97±0.43 ^{def}	111.33±2.31 ^b	118.30±0.61 ^{fg}	71.82±0.25 ^e
14	HM-5-6	19.09±0.10 ^{ab}	110.67±1.15 ^b	119.50±0.50 ^{ef}	71.48±0.85 ^{ef}

注:同一列中字母不同代表显著性差异($P<0.05$)。

持水力是评价酸乳凝胶性、乳清析出量和酸乳品质的重要指标。持水力越高越有助于提升酸乳质构稳定性,持水力过低会导致乳清析出,直接影响酸乳的组织状态和口感^[22]。由表4可知,各菌株持水力有明显差异($P<0.05$),范围在68.84%~80.34%之间,菌株HM-5-5的持水力最高,为80.34%。菌株LB-4-1、BM-4-4的持水力较低,分别为68.84%、69.18%,可能是酸度过高使柠檬酸盐及磷酸钙的增容作用增加,络合水分子析出从而降低持水力。

2.3.3 菌种活力

由表5可知,在冷藏第21天,各菌株的活菌数与第1天相比有下降的趋势,但在冷藏21天后,该14株菌株的菌种活力均高于7.85 log CFU/mL,符合GB 19302-2010《食品安全国家标准 发酵乳》中规定的指标要求,且有研究表明,发酵乳的活菌数高于6 log CFU/mL才能够发挥益生功能^[23],因此,这14株菌株被认为具有较好的菌种活力。

表5 冷藏期间单菌发酵乳活菌数的变化

菌株	活菌数(log CFU/mL)	
	第1天	第21天
HM-6-4	9.33±0.04 ^{bc}	8.61±0.06 ^d
HM-5-5	9.33±0.04 ^{bc}	9.03±0.03 ^a
HM-4-5	9.11±0.01 ^{cd}	8.77±0.05 ^{bc}
LH-6-4	9.80±0.58 ^a	9.07±0.05 ^a
LH-4-1	9.11±0.01 ^{cd}	8.66±0.10 ^{bcd}
BM-4-4	9.31±0.01 ^{bcd}	7.85±0.05 ^f
HM-4-2	9.41±0.02 ^b	9.06±0.11 ^a
BM-5-5	9.25±0.01 ^{bcd}	8.03±0.04 ^e
LB-4-1	9.29±0.03 ^{bcd}	9.05±0.01 ^a
HM-6-1	9.06±0.05 ^{de}	8.62±0.08 ^{cd}
HM-6-2	8.84±0.10 ^e	8.73±0.28 ^{bcd}
HM-5-4	9.27±0.03 ^{bcd}	8.11±0.08 ^e
LH-6-1	9.30±0.07 ^{bcd}	8.80±0.11 ^b
HM-5-6	9.32±0.02 ^{bcd}	9.01±0.06 ^a

注:同一列中字母不同代表显著性差异($P<0.05$)。

2.3.4 产香能力

乙醛、双乙酰是发酵乳中重要的风味物质,二者质量浓度与比例直接影响着消费者的可接受度。相关研究认为,当酸乳中乙醛浓度超过5 mg/L时更容易被感知,且其对产品风味的贡献随浓度的增加而增大^[24],但超过30 mg/L时会产生令人不愉快的青草臭味^[17]。由图3可知,菌株HM-5-6酸乳样品的乙醛质量浓度最高,为32.27 μg/mL,其次是BM-5-5与HM-4-5,分别为22.26 μg/mL、22 μg/mL,三者与其他菌株之间差异显著

($P<0.05$)。双乙酰是乳酸菌柠檬酸代谢的产物^[25],风味阈值较低,质量浓度低也可使酸乳具有浓郁的奶油香味,但质量浓度过高会引起酸乳风味不佳^[17]。菌株 LH-4-1 的双乙酰浓度最高,为 13.61 $\mu\text{g/mL}$,其次是 LB-4-1 与 HM-5-4,分别为 12.23 $\mu\text{g/mL}$ 、12.33 $\mu\text{g/mL}$,三者与其他菌株之间差异显著($P<0.05$)。当乙醛浓度处于适宜范围时,乙醛与双乙酰质量浓度比值比 3 越大,则发酵乳的风味越好^[26]。图 3 表明,菌株 HM-6-2 的乙醛与双乙酰的质量浓度比最高,为 5.09,菌株 HM-4-2 和菌株 LH-6-4 的产香能力优异,故将鼠李糖乳杆菌 HM-4-2 和嗜热链球菌 LH-6-4 作为符合发酵剂的产香菌株。

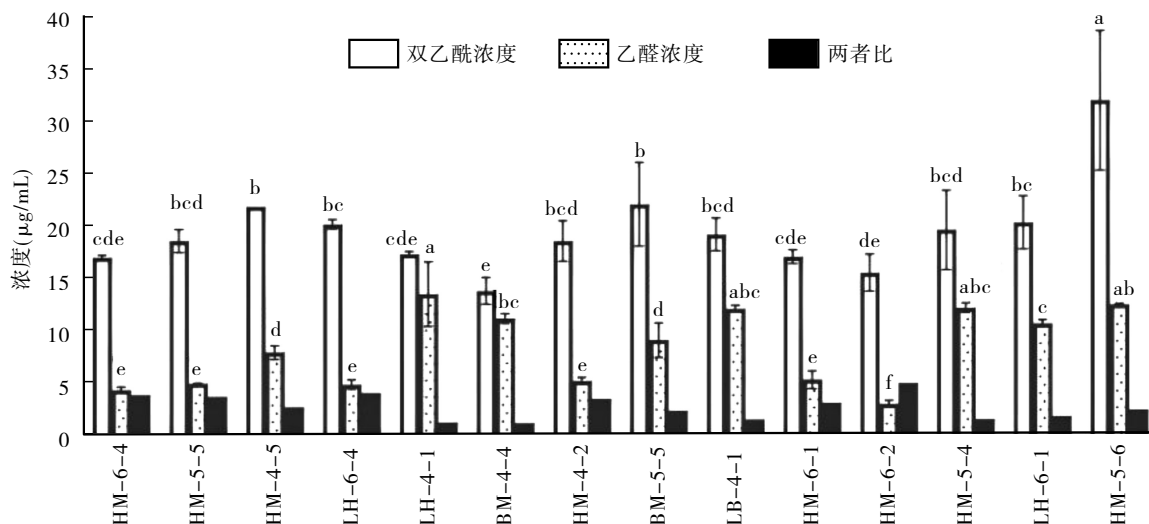


图3 14株乳酸菌发酵乳的乙醛、双乙酰浓度

2.3.5 蛋白质水解能力

游离氨基氮是由乳酸菌在发酵过程中分泌的蛋白酶、肽酶作用而产生的,发酵乳中游离氨基氮浓度可反映发酵乳中蛋白质水解程度^[27],其浓度越高,说明蛋白类物质越容易被人体吸收,但水解能力超过一定范围反而会影响酸乳的质地和口感^[28]。由图4可知,不同菌株之间蛋白水解能力具有一定差异($P<0.05$),其中菌株 HM-6-4、HM-5-5、LH-6-4、HM-6-2、HM-4-2 的蛋白水解能力极强,质量浓度为 415.99~532.56 $\mu\text{g/mL}$,与其他菌株具有显著差异($P<0.05$),且游离氨基氮含量大于李先胜等人^[29]报道过的商业发酵剂制备发酵乳中氨基氮质量浓度,为 409.50 mg/L ,也大于开菲尔乳杆菌 BCK1 制备的发酵乳中游离氨基氮质量浓度,为 349.70 mg/L ^[30]。菌株 HM-5-4 的最低,为 102.84 $\mu\text{g/mL}$,显著低于其他菌株的蛋白水解能力($P<0.05$),其余菌株的游离氨基氮浓度均在 166~394 $\mu\text{g/mL}$ 之间,均具有显著性差异($P<0.05$)。综合比较认为,菌株 HM-6-2、HM-5-5、HM-6-4、LH-6-4、HM-4-2 的蛋白水解能力表现优异,可在一定程度上提升发酵乳制品的风味与品质,因此选择乳酸

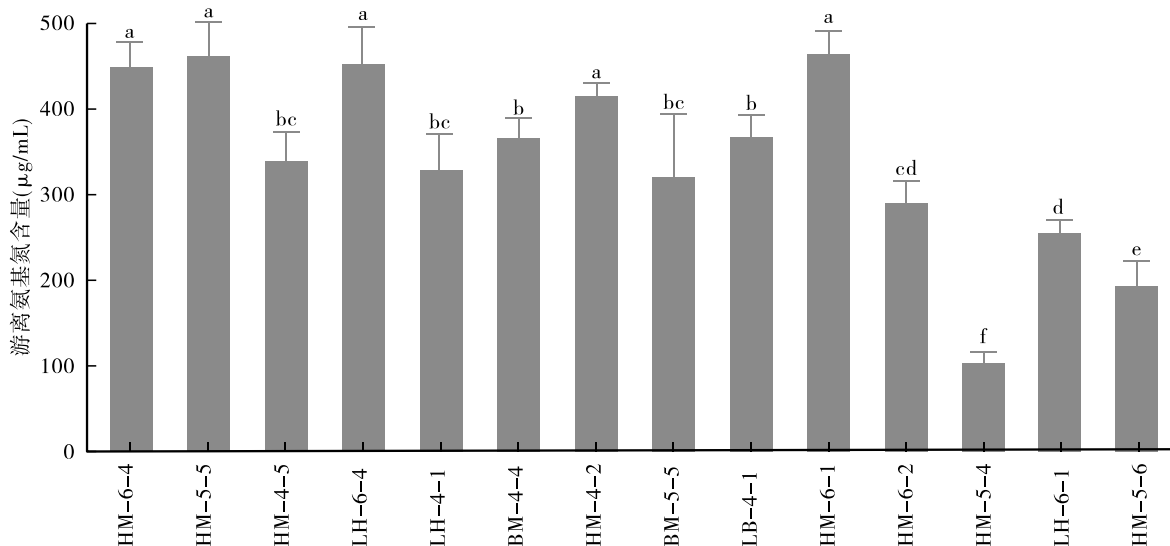


图4 14株乳酸菌发酵乳中氨基氮浓度

菌 HM-6-2、HM-5-5、HM-6-4、LH-6-4、HM-4-2 作为酸奶风味复合发酵剂的复配菌种。

2.3.6 产胞外多糖能力

乳酸菌产胞外多糖是指乳酸菌在生长代谢过程中分泌到细胞外的多糖,在食品工业中用作增稠剂和增黏剂,可以增加发酵乳的黏性,保持其持水力,对减少脱水收缩和乳清析出有很好的作用,并且它还能提高发酵乳稳定性^[31-32],防止出现发酵乳在加工和运输过程中结构被破坏的情况。由图 5 可知,菌株 HM-5-5 的产胞外多糖能力最佳,EPS 产量为 405.15 mg/L,其次为菌株 HM-6-4,为 397.24 mg/L,产量均高于万金敏^[33]报道的产多糖能力优异的副干酪乳杆菌 GY-L003 胞外多糖产量,为 379.94 mg/L。菌株 LH-6-1 和 HM-5-6 的胞外多糖产量分别为 122.77 mg/L、117.74 mg/L,产胞外多糖能力较弱。由此可知,菌株 HM-5-5、菌株 HM-6-4 是产 EPS 性能较佳的乳酸菌,具有潜在的商业开发价值。

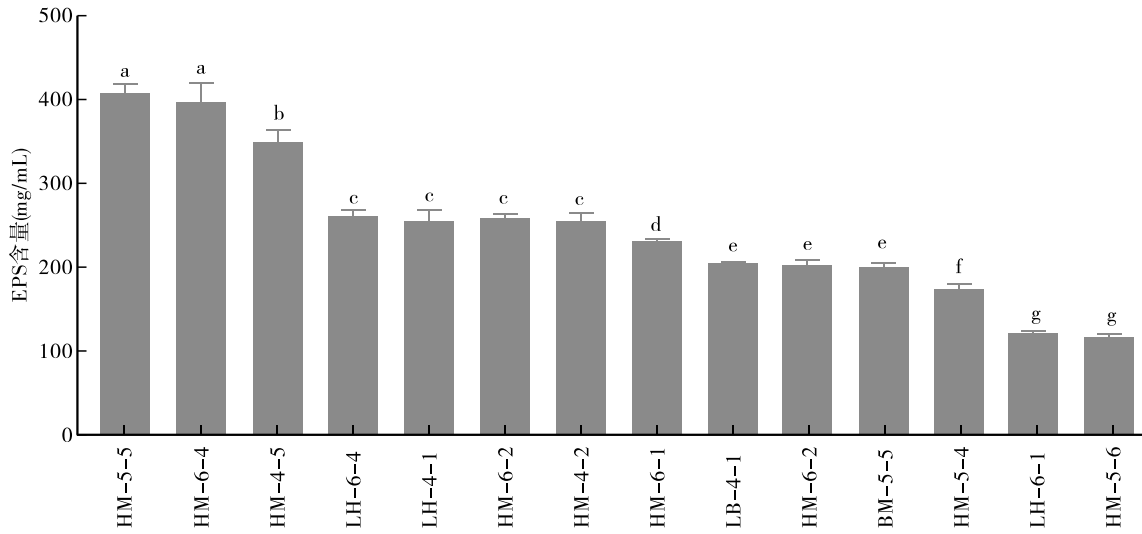


图 5 乳酸菌产胞外多糖能力差异

2.4 复合菌种发酵剂的研制

2.4.1 复配比例的优化

(1)复配比例的初筛

由表 6 可知,不同比例发酵乳的酸度范围为 86.33~144.67 °T,均满足国标要求,复配组 B6 的产酸能力较强,A5 的产酸能力较弱。滴定酸度与感官评分之间的结果比较接近,随着酸度的增加,相应的感官评分值升高,但酸度超过一定范围会影响感官评分,酸度过高可能会引起持水力下降,从而导致乳清析出。乳酸菌活菌数是衡量发酵乳保健功效高低的重要指标。国标上严格要求发酵乳活菌数应高于 6 logCFU/mL。从活菌数看,各复配组的活菌数均高于 8.6 logCFU/mL,均符合国标要求。

表 6 不同复配比例发酵乳的理化指标及感官评价结果

编号	滴定酸度酸(°T)	活菌数(log CFU/mL)	持水力(%)	感官评分
A1	109.13±1.03 ⁱ	9.33±0.01 ^{ab}	79.05±0.93 ^a	89.30±2.86 ^a
A2	97.67±2.52 ^l	9.18±0.02 ^{abc}	75.27±2.30 ^{abc}	86.00±1.41 ^{abc}
A3	108.33±3.21 ⁱ	9.36±0.54 ^a	73.65±2.70 ^{bc}	83.80±5.49 ^{bcde}
A4	102.07±0.60 ^k	9.07±0.06 ^{abc}	75.69±3.07 ^{abc}	85.70±4.26 ^{abcd}
A5	86.33±1.20 ⁿ	8.96±0.05 ^{bcd}	76.31±2.51 ^{abc}	82.20±3.74 ^{de}
A6	104.60±0.53 ^j	9.06±0.03 ^{abc}	75.77±2.29 ^{abc}	83.50±4.76 ^{bcde}
A7	96.90±1.05 ^l	8.61±0.43 ^d	72.86±3.11 ^c	85.50±3.83 ^{bcd}
A8	130.60±1.22 ^e	8.92±0.01 ^{cd}	74.01±1.67 ^{bc}	84.60±3.10 ^{bcd}
A9	103.33±3.05 ^{jk}	9.07±0.01 ^{abc}	78.73±2.67 ^a	84.90±6.40 ^{bcd}

续表

编号	滴定酸度(°T)	活菌数(log CFU/mL)	持水力(%)	感官评分
A10	91.43±0.51 ^m	9.33±0.56 ^{ab}	73.52±2.40 ^{bc}	84.60±2.97 ^{bcd}
B1	127.33±1.15 ^{de}	9.15±0.03 ^{abc}	74.96±2.78 ^{abc}	86.57±2.36 ^{ab}
B2	128.67±1.15 ^{cd}	9.17±0.01 ^{abc}	76.53±3.60 ^{abc}	78.40±2.50 ^f
B3	125.23±1.36 ^{ef}	9.19±0.06 ^{abc}	77.97±3.35 ^{ab}	86.00±3.26 ^{abc}
B4	112.83±1.04 ^h	9.01±0.04 ^{abd}	76.39±2.00 ^{abc}	84.90±3.84 ^{bcd}
B5	135.19±1.07 ^b	8.90±0.08 ^{cd}	72.24±0.11 ^c	82.30±4.57 ^{cde}
B6	144.67±1.15 ^a	8.82±0.07 ^{cd}	72.72±0.39 ^c	80.10±3.69 ^{ef}
B7	115.57±0.75 ^g	8.96±0.06 ^{abcd}	73.32±1.66 ^c	83.20±3.90 ^{bcd}
B8	111.54±0.79 ^h	9.13±0.02 ^{abc}	74.16±2.02 ^{bc}	84.40±4.60 ^{bcd}
B9	123.00±2.65 ^f	9.04±0.01 ^{abc}	73.37±1.34 ^c	83.60±3.24 ^{bcd}
B10	123.33±0.58 ^f	9.01±0.01 ^{abcd}	72.71±0.55 ^c	83.00±3.37 ^{bcd}

注:同一列中字母不同代表显著性差异($P < 0.05$)。

持水力是评价酸奶品质的重要指标。如表6所示,20组复配发酵乳的持水力范围为72.24%~79.05%,复配组A1的持水力最高,为79.05%,显著高于张亦等人^[34]制备的复合发酵剂的持水能力,为62.31%。复配组B5、B6、B7、B9、B10的持水力相比于其他复配组较低,结合其他指标,不进行下一步复筛试验。感官评分分析结果表明,以复配组A1制作的发酵乳评分最高,此比例下的酸奶在口感、组织、气味、色泽状态上表现良好;复配组B2的评分最低,故排除。

(2)复配比例的复筛

由于感官评分的结果会不可避免地受评分者主观因素的影响,在初筛结果的基础上,采用丁二酮浓度、乙醛浓度及其比例来复筛菌种组合比例。由表7可知,A1组合的乙醛浓度显著高于其他组合,B3的丁二酮浓度最高。不同组合的乙醛与丁二酮含量及比例均有一定的差异。刘宁宁等人^[17]研究表明,乙醛、双乙酰浓度之比在接近2.5:1时可赋予酸乳更协调的风味。

综上所述,A1复配组具有较强的产乙醛和较好的丁二酮生成能力,且二者比例比较适宜,在产香方面表现最为优异,且制备的酸奶口感较好,风味协调。因此,最终筛选的复合发酵剂的初始配方为副干酪乳杆菌(*Lactocaseibacillus paracasei*) HM-5-5:鼠李糖乳杆菌(*Lactocaseibacillus rhamnosus*) HM-4-2:嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*) LH-6-4=1:1:1,此时酸乳的酸度适中,黏稠度较好,组织结构稳定,口感良好。

表7 不同复配比例时发酵乳的乙醛、双乙酰浓度

复配比例	乙醛浓度(μg/mL)	丁二酮浓度(μg/mL)	两者比例
A1	29.57±1.08 ^a	8.99±0.10 ^f	3.06
A2	21.27±1.27 ^{cd}	4.79±0.78 ⁱ	4.44
A3	27.87±1.27 ^b	7.61±0.46 ^g	3.66
A4	14.67±1.27 ^f	6.47±0.05 ^h	1.63
A6	21.80±0.34 ^{cd}	8.50±0.27 ^f	0.39
A7	23.45±2.54 ^c	1.86±0.24 ^j	12.60
A8	18.33±2.54 ^e	9.64±9.64 ^e	1.90
A9	19.07±1.27 ^{de}	10.01±0.08 ^{de}	1.90
A10	22.73±1.27 ^c	9.71±0.02 ^{de}	2.34
B1	16.87±1.27 ^{ef}	11.12±0.37 ^c	1.52

续表

复配比例	乙醛浓度($\mu\text{g/mL}$)	丁二酮浓度($\mu\text{g/mL}$)	两者比例
B2	$16.87 \pm 3.36^{\text{ef}}$	$10.43 \pm 0.51^{\text{d}}$	1.62
B3	$23.46 \pm 2.54^{\text{e}}$	$13.20 \pm 0.62^{\text{a}}$	1.78
B4	$22.00 \pm 2.20^{\text{e}}$	$12.52 \pm 0.24^{\text{b}}$	1.76
B8	$18.33 \pm 1.27^{\text{e}}$	$12.41 \pm 0.18^{\text{b}}$	1.48

注:同一列中字母不同代表显著性差异($P < 0.05$)。

2.4.2 发酵温度对酸奶品质的影响

由图6可知,在37℃条件下酸奶感官评分最高,为86.7分,且随着发酵温度的递增,酸乳的持水力有下降趋势。其中,在37℃、39℃、41℃条件下发酵的酸奶持水力大小没有显著差异($P > 0.05$),但在45℃条件下发酵的酸乳的持水力明显降低($P < 0.05$),这与Yang等人^[35]的研究结果一致。因为在工业过程较高的温度较高,因此缩短了生产时间,导致最终酸奶不期望的特性,例如乳清分离增加^[36],具有较粗糙微观结构的弱蛋白质网络,凝胶硬度,黏度和光滑度以及感官特性的降低^[37]。据此确定酸乳比较理想的温度在37~41℃之间。

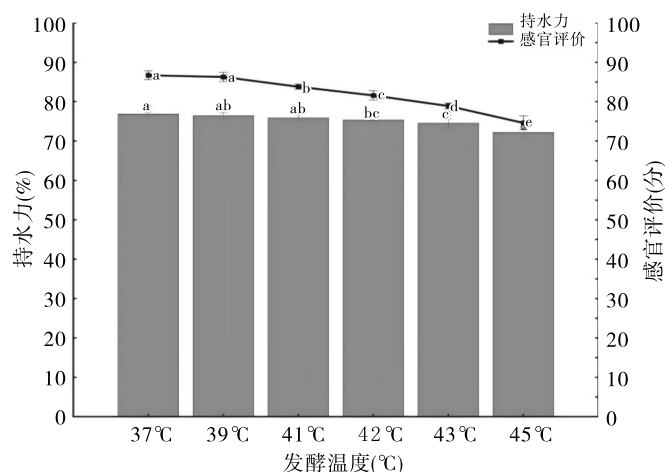


图6 不同发酵温度对酸乳品质的影响

2.4.3 接种量对酸奶品质的影响

由图7可知,在接种量为4%时,感官评分最高,且在5%、6%之间差异不显著($P > 0.05$)。据此确定发酵乳比较理想的接种量在4%~6%之间。

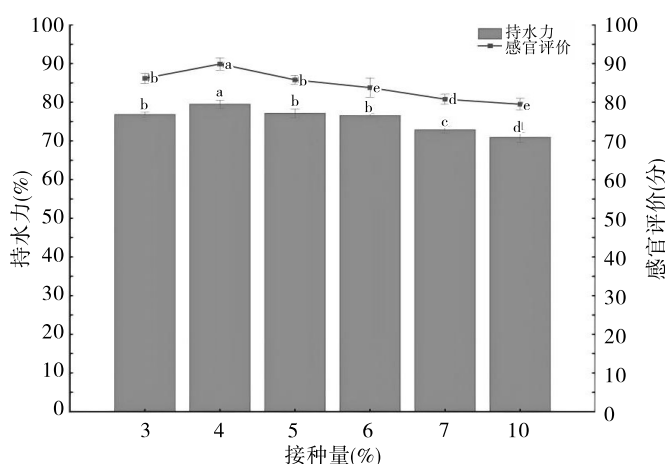


图7 不同接种量对酸乳品质的影响

2.4.4 发酵时间的确定

由图8可知,随着发酵时间的延长,发酵乳的持水力和感官评分先升高再降低,当发酵时间为18 h时产品的感官评分最高,口感良好。据此确定发酵乳比较理想的发酵时间在15~18 h之间。

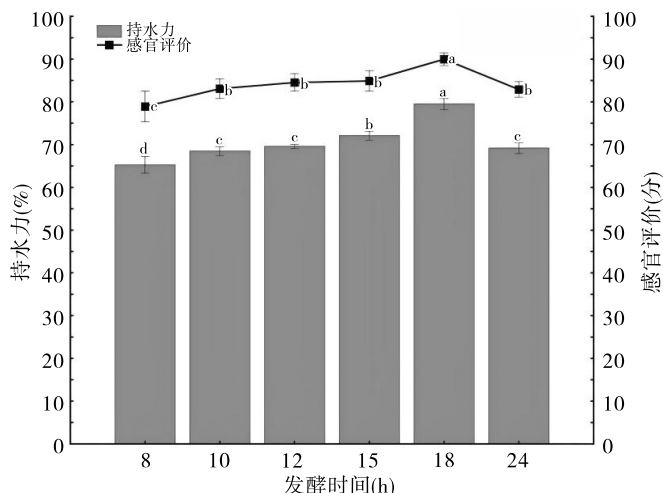


图8 不同发酵时间对酸奶品质的影响

3 结论与讨论

采用传统方法制作的酸奶较好地保留了对环境有抗性的微生物资源,因为长期在自然条件下存活,可能表现出独特的生物学特征,赋予发酵乳制品独特的风味。文章通过传统分离方法对两份样品中可培养细菌进行分离鉴定。在两份样品中分离鉴定了17株细菌,将其归为2个属3个种,均以副干酪乳杆菌和嗜热链球菌为优势菌种,原因可能在于两份样品来源地相近,奶源、手工制作方法极相似,也可能是由于选择的培养基及培养条件仅能检测到易培养的及丰度较大的菌种,从而分离不够全面。副干酪乳杆菌具有丰富的益生特性,广泛用于酸奶发酵、改善酸奶的感官品质和增强酸奶的益生功能^[38-39]。据报道,副干酪乳杆菌改善了脱脂酸奶的脱水收缩率和质地,并且不影响低脂酸奶的感官特性和可接受性^[40-41]。嗜热链球菌作为发酵乳最关键的基础发酵剂之一,具备较强的产胞外多糖能力^[42-43],同时在发酵过程中能产生一些风味物质,赋予酸奶浓郁的风味及细腻顺滑的口感和特有的香气^[44-45]。

目前,随着人们对发酵乳制品消费量不断增加,导致乳制品发酵剂市场不断扩大,但有限数量菌株的过度使用导致了产品同质化。因此,需要提供新风味和质地特性的菌株来拓宽乳制品的口味和香气。乳酸菌(LAB)作为酸奶发酵中最常用的微生物菌群,能够在发酵过程中酸化牛奶,产生细菌素等生物活性物质抑制其他病原微生物的生长,在酸奶制作中发挥着重要作用。本研究对分离出的14株乳酸发酵乳的感官品质、产酸能力、产香能力、蛋白质水解能力、产胞外多糖能力进行检测分析。14株乳酸菌都具有一定的凝乳能力,而发酵时间及特性各不相同,其中,菌株HM-4-2和HM-6-2具有很好的产酸能力;菌株HM-5-5与菌株HM-6-4的产胞外多糖能力较强;菌株HM-4-2和菌株LH-6-4产香能力最佳;菌株HM-6-2展现良好的蛋白水解能力。本研究结果可为酸奶复合发酵剂的研制及新疆地方特色酸奶的工业化生产奠定理论基础及实际应用基础。

参考文献:

- [1] JINAPONG N, SUPHANTHARIKA M, JAMNONG P, et al. Production of Instant Soymilk Powders by Ultrafiltration, Spray Drying and Fluidized Bed Agglomeration[J]. Journal of Food Engineering, 2008, 84(02): 194-205.
- [2] MORELLI L. Yogurt, Living Cultures, and Gut Health[J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 2014, 99(05): 1248S-1250S.
- [3] 麦日艳古·亚生, 伊力米热·热夏提, 努尔古丽·热合曼, 等. 北疆传统发酵生奶酪中乳酸菌的耐受性及益生特性测定[J]. 微生物学通报, 2023, 50(05): 2044-2062.
- [4] 麦日艳古·亚生, 李明源, 王继莲, 等. 塔什库尔干地区传统手工乳制品中乳酸菌多样性及其功能分析[J]. 微生物学通报,

- 2024,51(03):950-969.
- [5] 孙洁. 锡林郭勒鲜奶及酸奶中乳酸菌分离鉴定和微生物多样性[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2023.
- [6] 张可铭,段晓艳,胡露,等. 新疆阿克苏地区手工酸乳中发酵菌株的筛选及其发酵性能研究[J]. 食品工业科技,2023,44(14):121-129.
- [7] WU Y, WU D, LIU D, et al. The Isolation and Identification of *Lactobacillus* from Naturally Fermented Yoghurt [C]//IOP Conference Series:Earth and Environmental Science. IOP Publishing, 2020,565(01):012055.
- [8] 林杨,顾美英,孙建,等. 阿克苏地区传统酸乳中乳酸菌筛选及安全性初步评价[J]. 微生物学杂志,2022,42(01):26-33.
- [9] LI H, GAO J, CHEN W, et al. Lactic Acid Bacteria Isolated from Kazakh Traditional Fermented Milk Products Affect the Fermentation Characteristics and Sensory Qualities of Yogurt [J]. Food Science & Nutrition, 2022,10(05):1451-1460.
- [10] VON W A, AXELSSON L. Lactic Acid Bacteria: An Introduction [M]//Lactic Acid Bacteria. Boca Raton: CRC Press, 2019:1-16.
- [11] 谭啸,章熙东. 革兰氏染色法观察与区分细菌[J]. 生物学教学,2019,44(07):71-72.
- [12] 申磊. 细菌分类学方法研究概况[J]. 安徽农学通报,2011,17(23):64-66.
- [13] MAYO B, ALEKSANDRZAK-PIEKARCZYK T, FERNANDEZ M, et al. Updates in the Metabolism of Lactic Acid Bacteria [J]. Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications, 2010:3-33.
- [14] 唐凯伟,黄晓英,易宇文,等. 保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌单菌发酵与复配发酵对酸奶品质的影响[J]. 食品工业科技,2022,43(23):127-132.
- [15] 巩小芬. 开菲尔粒中优质乳酸菌、酵母菌的分离鉴定与复合开菲尔发酵剂的研制[D]. 镇江:江苏大学,2018.
- [16] 何玉婷. 开菲尔源优质乳酸菌的分离、筛选与酸乳复合菌种发酵剂的研制[D]. 镇江:江苏大学,2020.
- [17] 刘宁宁,郭红敏,葛春美,等. 酸奶中乙醛和双乙酰含量对其风味的影响[J]. 中国食品添加剂,2012,(S1):269-273.
- [18] 马雨璇,吴可非,桑跃,等. 水牛奶中优良乳酸菌的筛选及复合菌株发酵研究[J]. 中国乳业,2016,(05):74-77.
- [19] ROBITAILLE G, TREMBLAY A, MOINEAU S, et al. Fat-free Yogurt Made Using a Galactose-positive Exopolysaccharide-producing Recombinant Strain of *Streptococcus Thermophilus* [J]. Journal of Dairy Science, 2009,92(02):477-482.
- [20] 蔡静静,张亚川,李谓,等. 新疆伊犁地区乳制品中乳酸菌发酵和益生特性及其复合发酵方案优化[J]. 食品科学,2020,41(18):172-179.
- [21] 赵建新,陈洁,田丰伟,等. 中温发酵酸乳的挥发性风味成分与感官特性的研究[J]. 食品工业科技,2008,(12):69-73.
- [22] 卫晓英,李全阳,赵红玲,等. 酸乳发酵剂低温刺激对凝固型酸乳质构影响机理的探讨[J]. 食品工业科技,2009,30(06):170-173.
- [23] MIJAN M A, CHOI K H, KWAK H S, et al. Physicochemical, Microbial, and Sensory Properties of Nanopowdered Eggshell-supplemented Yogurt During Storage [J]. Journal of Dairy Science, 2014,97(06):3273-3280.
- [24] HAMDAN I Y, KUNSMAN JR J E, DEANNE D D, et al. Acetaldehyde Production by Combined Yogurt Cultures [J]. Journal of Dairy Science, 1971,54(07):1080-1082.
- [25] 李志国,宗学醒,闫清泉,等. 奶酪风味形成的研究进展[J]. 乳业科学与技术,2019,42(01):51-54.
- [26] MUIR D D, TAMIME A Y, WSZOLEK M. Comparison of the Sensory Profiles of Kefir, Buttermilk and Yogurt [J]. International Journal of Dairy Technology, 1999,52(04):129-134.
- [27] 范瑞,许静,顾宗珠,等. 酸乳发酵过程的理化特性研究[J]. 中国乳品工业,2007,(10):8-11.
- [28] AMANI E, ESKANDARI M H, SHEKARFOROUSH S. The Effect of Proteolytic Activity of Starter Cultures on Technologically Important Properties of Yogurt [J]. Food Science & Nutrition, 2017,5(03):525-537.
- [29] 李先胜,姜铁民,陈历俊,等. 酵母菌对发酵乳质构和蛋白的影响[J]. 中国乳品工业,2012,40(05):30-33.
- [30] 张亦. 开菲尔粒中乳酸菌的分离、筛选与酸乳直投式发酵剂的研制[D]. 镇江:江苏大学,2022.
- [31] PRASANNA P H P, GRANDISON A S, CHARALAMPOPOULOS D, et al. Microbiological, Chemical and Rheological Properties of Low Fat Set Yoghurt Produced With Exopolysaccharide (Eps) Producing *Bifidobacterium* Strains [J]. Food Research International, 2013,51(01):15-22.
- [32] BACHTARZI N, KHARROUB K, RUAS-MADIEDO P, et al. Exopolysaccharide-producing Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Algerian Dairy Products and Their Application for Skim-milk Fermentations [J]. Lwt, 2019,107:117-124.
- [33] 万金敏. 西藏传统发酵乳制品中优良乳酸菌的筛选及发酵性能研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2017.
- [34] 张亦,王亮,吕自力,等. 一种新型开菲尔风味复合发酵剂的研制[J]. 现代食品科技,2022,38(11):80-89.
- [35] YANG S, YAN D, ZOU Y, et al. Fermentation Temperature Affects Yogurt Quality: A Metabolomics Study [J]. Food Bioscience, 2021,42:101104.
- [36] ELISE J C, ABRAHAMSEN R K, ELLING-OLAU R, et al. Processing of High-protein Yoghurt—A Review [J]. International

- Dairy Journal, 2019, 88: 42–59.
- [37] LOPES R P, MOTA M J, PINTO C A, et al. Physicochemical and Microbial Changes in Yogurts Produced under Different Pressure and Temperature Conditions[J]. Lwt, 2019, 99: 423–430.
- [38] MARTIN F P J, WANG Y, SPRENGER N, et al. Effects of Probiotic *Lactobacillus Paracasei* Treatment on the Host Gut Tissue Metabolic Profiles Probed Via Magic-angle-spinning Nmr Spectroscopy[J]. Journal of Proteome Research, 2007, 6(04): 1471–1481.
- [39] SMOKVINA T, WELS M, POLKA J, et al. *Lactobacillus Paracasei* Comparative Genomics: Towards Species Pan-genome Definition and Exploitation of Diversity[J]. Plos One, 2013, 8(07): e68731.
- [40] PIMENTEL T C, GARCIA S, PRUDENCIO S H. Effect of Long-chain Inulin on the Texture Profile and Survival of *Lactobacillus Paracasei* Ssp. *Paracasei* in Set Yoghurts During Refrigerated Storage[J]. International Journal of Dairy Technology, 2012, 65(01): 104–110.
- [41] PIMENTEL T C, CRUZ A G, PRUDENCIO S H. Influence of Long-chain Inulin and *Lactobacillus Paracasei* Subspecies *Paracasei* on the Sensory Profile and Acceptance of A Traditional Yogurt[J]. Journal of Dairy Science, 2013, 96(10): 6233–6241.
- [42] 刘绒梅, 高达, 孙金威, 等. 传统乳制品中乳酸菌的筛选及发酵性能研究[J]. 中国酿造, 2022, 41(05): 78–83.
- [43] 周晴晴, 李理, 俞赟霞, 等. 高产胞外多糖嗜热链球菌的筛选及其直投式发酵剂的应用[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(05): 81–88.
- [44] PACHEKREPANOL U, LUCEY J A, GONG Y, et al. Characterization of the Chemical Structures and Physical Properties of Exopolysaccharides Produced by Various *Streptococcus Thermophilus* Strains[J]. Journal of Dairy Science, 2017, 100(05): 3424–3435.
- [45] HAN M, WU Y, GUO X, et al. Milk Fermentation by Monocultures or Co-cultures of *Streptococcus Thermophilus* Strains[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2022, 10: 1097013.

Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Traditional Fermented Yogurt in Xinjiang and Preparation of Compound Fermentation Starter

HAIBIBAIMU·Abudikeremu, GULIPIYAN·Tuohuti, KAIDIRIYA·Abula, NUERGULI·Reheman*

(School of Life Sciences, Xinjiang Normal University, Urumqi, Xinjiang, 830017, China)

Abstract: In order to develop yogurt complex starter with good fermentation performance, 17 strains of lactic acid bacteria were isolated from yogurt sample by traditional isolation method, among which 8 strains were *Lactobacillus paracei*, 1 strain was *Lactobacillus rhamnosus* and 8 strains were *Streptococcus thermophilus*. The fermentation performance of 14 strains of lactic acid bacteria was evaluated, and 5 strains were selected: *Lactobacillus rhamnosus* HM-4-2, *Lactobacillus paracei* HM-6-2、HM-5-5, *Streptococcus thermophilus* LH-6-4、HM-6-4. *Lactobacillus paracei*, *Lactobacillus rhamnosus* and *Streptococcus thermophilus* were combined in different proportions, and the fermentation performance of the composite strains was studied. The results showed that when the optimal ratio of *Lactobacillus paracei* HM-5-5、*Lactobacillus rhamnosus* HM-4-2、*Streptococcus thermophilus* LH-6-4 is 1:1:1, the fermentation lactic acid degree was moderate, the aroma production ability was best, and the sensory score was highest, which can be used as a starter for the production of sour milk. The above research results provide a theoretical basis and technical scheme for the development and industrial production of functional dairy products.

Keywords: Yogurt; Isolation and identification; Lactic acid bacteria; Fermentation characteristics; Compound fermentation starter