

开菲尔微生物生态的研究进展

杨远剑

(中国农业科学院农产品加工所, 北京 100081)

摘要: 开菲尔粒是传统的开菲尔发酵剂, 它的结构组成菌特别复杂, 所以一直是人们研究的热点。本文主要介绍了开菲尔粒的组成、结构、菌相及其分布、相互关系、保存, 开菲尔微生物生态制品的保健功能及其加工工艺, 并对开菲尔粒的研制现状与展望进行了综述。

关键词: 开菲尔; 微生物生态

Advanced Research on Kefir Micro-ecology

Yang Yuan-jian

(Institute of Agro-food Science and Technology Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: Kefir grains is traditional kefir starter, and it always is the researchful hotspot because of its very complicated compositive microorganism. The article mainly introduced the constitute, the configuration, the microorganism, the microorganism's distribution and mutual relation, the preservation of kefir grains, and the health function and the processing technology of kefir microecological products, and its research status quo and prospect were introduced as also.

Key words: Kefir; Micro-ecology

中图分类号: TS201.3 文献标志码: A 文章编号: 1001-8123 (2008)05-0029-05

开菲尔(Kefir)是高加索地区原产传统的酒精性发酵乳饮料, 以牛奶、羊奶为原料, 以开菲尔粒(Kefir grains, 简称为KG)或开菲尔粒中必需菌相为发酵剂, 经过发酵而生成的具有爽快的酸味和起泡性的酒精性保健饮料, 有“发酵乳制品中的香槟”之美称^[1]。Kefir来源于土耳其语“Kef”, 有安宁、幸福之意, 还有爽快美好风味之意。Kefir这种发酵乳制品无论从理化特征还是微生物学菌相特征上, 与普通酸奶或用其他纯种乳酸菌发酵剂制成的乳制品都有很大的不同, 最显著的特征是除乳酸菌参与发酵外, 还伴有由酵母菌引起的轻微的酒精发酵。KG是传统的Kefir发酵剂, 可用

于家庭和工业化Kefir的生产, 它是一个复杂的微生物体系, 上面栖息着大量益生菌。正是由于这些益生菌的相互作用, 使得Kefir有着特殊的营养功能及保健功能, 对胃肠道疾病、便秘、代谢异常疾病、高血压、贫血、心脏病、过敏症、肥胖症等均有一定疗效。

1 Kefir的微生物生态

1.1 KG的组成和结构

KG是由多种乳酸菌、酵母菌等微生物经强烈的相互作用而形成的特殊粒状结构, 其外形不规则, 多数呈花椰菜状, 也有少量的薄片状和旋涡状或纸卷样等结构, 表面卷曲, 不平整或高度扭

曲,多为白色或浅黄色(有时受到污染时会呈浅黄色),具有一定的弹性和特殊的酸味,直径3~20mm不等^[2]。KG大约50%的成分是由乳酸菌自身代谢向胞外分泌并蓄积的黏性多糖(半乳糖和葡萄糖之比为1:1,并以六个单糖为重复单元形成的分子量在100万以上的大分子物质),它可作为微生物固定化的支撑体或栖息的多糖基质^[3],除此之外,KG还有大量水和少量蛋白质、脂肪及其它成分,其比例大约为890~900g/kg的水、2g/kg的脂类、30g/kg的蛋白质、60g/kg的糖类和7g/kg的矿物质^[4]。KG不溶于水,具有胶黏性,在乳中呈胶冻状的膨胀体。具有活性的KG浮在乳的表面,可生长分裂并将其特性传给下一代以产生新粒。当它在乳中生长繁殖时,观察不到特性上的变化,仅看到KG由小变大,其数量的增加依赖于原粒的分裂,但在没有原粒的条件下人们无法合成新的KG。有报道称,KG在连续培养十七代后即可增殖一倍,但当乳的浓度为12%,培养温度为22℃,KG的接种量为5%,不清洗时,KG以一个最快的速度增长,在连续培养十一代后其增殖量可以达到一倍以上^[5]。

1.2 KG的菌相

KG黏性多糖基质中的菌相极其复杂,且来源不同或培养条件不同时KG中所含菌相也不相同,主要包括乳酸菌、酵母菌,以及少量的醋酸菌等,此外也有报道称发现过双歧杆菌。

1.2.1 乳酸菌

乳酸菌的数量约为 $10^8 - 10^9$ cfu/g,是KG中数量和种类最多的微生物,在Kefir发酵中起主要作用。乳酸菌主要包括乳球菌属、乳杆菌属和明串珠菌属。

1.2.1.1 乳球菌属(*Lactococcus*)

球形或卵圆形,直径0.5~1.0 μm,一般成对或呈链状排列,不运动,无芽孢,革兰氏阳性,最适生长温度30~35℃,包括嗜温同型发酵乳球菌和嗜温异型发酵乳球菌^[6]。嗜温同型发酵乳球菌包括乳酸乳球菌乳酸亚种(*L.lactis subsp.lactis*)、乳酸乳球菌乳脂亚种(*L.lactis subsp.cremoris*)等,它们是KG中最多的,同时也是最具活力的一部分菌群,在发酵初期的几个小时内使乳糖按非氧化途径生产乳酸,迅速提高了乳制品的酸度,但当酸度达到115°T时即被抑制。

1.2.1.2 乳杆菌属(*Lactobacillus*)

乳杆菌呈杆状,在KG中以短杆菌为主,不运

动,无孢子,革兰氏阳性,最适生长温度为37~42℃,产酸能力较强,分解蛋白质生成氨基酸的能力也较强,能使牛乳变粘稠。Kefir中的乳杆菌包括嗜酸乳杆菌(*L.acidophilus*)、德氏乳杆菌(*L.delbrueckii*)、德氏乳杆菌乳酸亚种(*L.delbrueckii subsp.lactis*)、德氏乳杆菌保加利亚亚种(*L.delbrueckii subsp.bulgaricus*)、瑞士乳杆菌(*L.helveticus*)、马乳酒样乳杆菌(*L.kefiranofaciens*)、干酪乳杆菌(*L.casei*)、发酵乳杆菌(*L.fermentum*)、短乳杆菌(*L.brevis*)、高加索奶乳杆菌(*L.kefir*)、布氏乳杆菌(*L.buchneri*)、嗜热乳杆菌(*L.thermophilus*)等,其中前6种属于同型乳酸发酵菌,后5种属于兼性异型乳酸发酵菌^[7]。德氏乳杆菌保加利亚亚种和瑞士乳杆菌可以利用乳糖产生乳酸,并且随温度升高,数量增加也较快。德氏乳杆菌保加利亚亚种、瑞士乳杆菌、短乳杆菌和干酪乳杆菌几乎出现于所有的KG中,一般含量不超过 $10^2 \sim 10^3$ cfu/g,KG的基质物质很可能就由这些菌产生^[8]。La.Riviere(1963)首次发现了KG干重的25%是由短乳杆菌(*L.brevis*)或高加索奶乳杆菌(*L.kefir*)分泌的胞外多糖所构成。

1.2.1.3 明串珠菌属(*Leuconostoc*)

肠膜明串珠菌肠膜亚种(*L.mesenteroides subsp.mesenteroides*)、肠膜明串珠菌葡聚糖亚种(*L.mesenteroides subsp.dextranicum*)为嗜温异型乳酸发酵菌,最适生长温度为20~30℃,可利用蔗糖合成大量荚膜葡聚糖,参与Kefir特殊风味的形成,并产生多量B族维生素,生长过甚时,可观察到气体出现^[9]。提高温度并有酵母存在时,肠膜明串珠菌葡聚糖亚种(*L.mesenteroides subsp.dextranicum*)活力增强。Rosi和Rossi(1978)分离出*L.mesenteroides*,同时发现它可以产生胞外多糖;Hontebeyrie(1973)运用免疫法和DNA杂交技术发现除*L.dextranicum*外*L.mesenteroides*有别于其它任何一种明串珠菌,故命名为*L.mesenteroides subsp.dextranicum*^[10]。

1.2.2 酵母菌

KG中的酵母菌分为乳糖发酵型和乳糖非发酵型,数量约为 10^6 cfu/g,在KG菌相组成中占5%~10%。不同来源的KG中有不同种类和数量的酵母菌,这可能是由于培养条件不同所致。Kefir中的醇味、酯香和CO₂,是由于酵母菌的存在而产生,

这是 Kefir 与其他发酵乳制品最明显的区别。但若酵母菌过量则会导致产生大量 CO_2 、乙醇和酵母臭。实际上 Kefir 中酵母菌数量不足,这是因为酵母菌繁殖世代时间较乳酸菌长,且不耐酸、易受 Kefir 中其它菌产生的丁二酮和一些其它成分的抑制所致^[11]。乳糖发酵性酵母包括乳酸酵母(*Saccharomyces lactis*)、脆壁酵母(*Saccharomyces fragilis*)、马克斯克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*)、乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)、脆壁克鲁维酵母(*Kluyveromyces fragilis*)、乳酒假丝酵母(*Candida kefir*)、酒香酵母(*Bretanomyces anomalus*)等;乳糖非发酵性酵母包括啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、德氏酵母(*S.delbrueckii*)等。

1.2.3 醋酸菌

有关醋酸菌的研究报道极少,纹膜醋酸杆菌(*Acetobacter aceti*)和恶臭醋酸杆菌(*A.rancens*)被认为在维持 KG 菌相平衡和互生方面有重要作用。Rosi (1978)报道纹膜醋酸杆菌(*Acetobacter aceti*)是 KG 中唯一存在的醋酸菌。据 Bavina (1973)报道,醋酸菌通过提高制品的粘度,来提高制品的稳定性,但高桥富士雄研究表明,醋酸菌对酵母菌有轻微的刺激作用^[12]。现阶段所研制的各种 Kefir 发酵剂均未使用醋酸菌,这可能是其酵母数量过低的原因之一。

1.3 KG 的菌相分布

KG 是由特有的粘性多糖类物质形成的网络结构,分有很多片层,不同片层有不同的菌相分布。有关 KG 的菌相分布普遍存在两种观点,一种观点是苏联学者所坚持, Bottazzi^[13]和 Zeynep^[14]也曾证实的,认为乳糖非发酵性酵母在 KG 的内部深层,乳糖发酵性酵母在 KG 的表层,嗜温型乳球菌、嗜温及嗜热乳杆菌、醋酸菌聚集在 KG 表面,表面部分乳杆菌占优势,随着向内部深入,酵母/杆菌比例逐渐加大直至酵母占绝对优势,这一观点主要是基于扫描电镜观察结果而形成。另一观点是基于扫描电镜和透射电镜联合使用观察结果而形成,KG 除具有花椰菜结构外,同时还具有细小薄片状、纸卷样及绕卷纸样结构,微生物不是随机地排列在其上,它们的排列有着特殊的规律和高度的序列性,其基质由大量的纤维质碳水化合物组成。微生物栖息其上,薄片状的 KG 一边较为光滑和平整,另一

边高度卷曲、粗糙,显示了其不对称性,酵母和短杆菌占据着高度卷曲的一面,另一面几乎全是短杆菌,在此之间的区域里有大量的弯曲长杆菌^[15]。两种观点的差异可能是因为所选材料和方法不同所致,但共同点在于都认为 KG 上的微生物分布是有规律的。可能第一种观点所认为的中心部位(酵母优势部位)正是第二种观点所描述的高度卷曲部分,由于一系列折叠过程使它变成了 KG 的中心部位。张列兵、苑伍申^[16]等人运用扫描电镜和透射电镜对 KG 表面超微结构和微生物的分布进行了研究,结果表明:KG 表面(光滑,平整一侧)栖息着乳球菌、杆菌和酵母(可能还有醋酸菌),稍向内延伸进入 KG 基质即可发现大量不具有完整细胞结构的微生物,并确由多糖构成,这些微生物不仅大量自解,而且也很难与外界沟通,表明 KG 基质内的微生物很难进入乳中,所以 KG 作为发酵剂而言,其表面的微生物可能具有更为重要的意义。

1.4 KG 菌相的相互关系

KG 最大的特点就是环境的适应能力和抗污染能力强,其中的菌相经长期的相互适应和协同使 KG 形成了整体“战斗力”,能够抑制杂菌和致病菌的滋生,特有的粘性多糖能够保护 Kefir 不受外界微生物的侵染,如霉菌侵染不到 KG 内层,它释放的酶也不能把 KG 的片层结构分解破坏。

KG 菌相之间存在密切的互生关系,在分解蛋白胨生成维生素的条件下,乳酸菌被酵母菌和醋酸菌激活,而且只有在乳酸菌存在时,乳糖非发酵型酵母和醋酸菌才能生长。乳酸菌通过作用于乳糖产生乳酸,为酵母菌和醋酸菌生长提供了良好的生长环境,当同型发酵乳酸菌生长受到抑制时,可使酵母菌积累酒精速度减慢。它们在牛乳中发酵、代谢产生的乳酸、乙醇、 CO_2 等物质,形成 Kefir 乳品良好的口感和风味,其中生成的丁二酮、乙醛、羟丁酮、丙醛等各种挥发性羰基化合物与 Kefir 的风味有密切关系^[17]。

1.5 KG 的保存

KG 可重复使用,在多次使用过程中,KG 在不断地生长和增殖。对暂停使用的 KG,可以将其加入鲜牛奶中保存,或用凉水洗净后放入无菌水中保存,一般保存温度为 4°C ,期限 8~10 天。采用冷冻干燥的方法可延长 KG 的保存时间,使其保存期限达 12~18 个月,这是因为冷冻干燥降低了 KG

的含水量,使其中的微生物暂时处于休眠状态。Garrote^[18]等人将KG分别在-80℃、-20℃、4℃条件下保存,研究表明:-80℃下保存对KG中菌群的影响最小,且用-80℃下保存的KG发酵生产的Kefir品质明显好于其他两者;保存过程中酵母数量有所下降,在-80℃条件下减少得最少,杆菌在4℃下减少得最多,其原因可能是菌相间的互生关系被破坏,从而影响了各菌的生长;在-80℃和-20℃下保存的KG在牛奶中可以继续增殖,且效果优于连续培养的KG,而在4℃下保存的KG却不能良好增殖。冷桂华^[19]等人对从KG中分离出的各菌种单独进行冷冻干燥,并检测菌种冻干后再复合的发酵效果,研究表明:利用复合保护剂10%海藻糖+5%山梨醇+10%甘油+5%低聚异麦芽糖在冷冻时可有效地保护细胞,很好地保存了各菌种的特性,再以优化比例复合发酵,冻干制剂发酵时的接种量可以达到产业化要求,发酵产品的质量指标和冻干前相差不大。

2 KG 微生物制品的保健功能及加工工艺

2.1 Kefir 的保健功能

KG 微生物制品即 Kefir 被誉为神奇的发酵乳,以营养特殊和保健功能卓越而著称。Kefir 是以牛奶为原料的发酵食品,所以不但具有牛奶所含有的全部营养素,而且由于多种益生菌的相互作用使其营养比原乳有了很大提高,是营养丰富、易于消化的保健食品。Kefir 营养成分除蛋白质、少量乳糖以及一定量的脂类成分外,还含有多种氨基酸(如脯氨酸、亮氨酸和赖氨酸等)、有机酸(如醋酸、乳酸、甲酸和丙酸等)、维生素(如VB1, VB2, VB12, 生物素、泛酸以及VK)和风味成分(如乙醛、丙酮、丙醛、乙醇和2-丁酮等)以及多种人体必须的矿物元素(如Ca, K, P, Mg, Fe等)^[20]。Kefir 的保健功能概括起来有以下几个方面^[21]:(1)调节循环和呼吸系统功能。(2)改善消化机能,提高钙的利用。(3)帮助增强免疫系统,提高抗癌效果。(4)具有抗菌消炎的功能。(5)具有抗疲劳功能。(6)具有恢复肝脏功能。(7)多种维生素可以维持人体营养平衡。

2.2 Kefir 的加工工艺^[22]

原料乳→均质→巴式杀菌(90~95℃, 5~10min)→冷却(18~24℃)→接种(18~24℃)(工作发酵剂:①直接将Kefir grains按5%~10%的量

接入;②由Kefir grains接种制备的母发酵剂经过滤制成工作发酵剂(不含Kefir grains);③直投式冷冻干燥Kefir粉末发酵剂。)→发酵(20~24℃, 18~24h)→凝乳→凝乳搅拌分装→后熟(3~10℃, 12~24h)→成品。

3 KG 的研究现状与展望

由于Kefir独特的风味及营养、保健功效,它的研究、开发和工业化生产都得了人们的广泛关注。在没有原粒的条件下人们无法合成新的KG,因此KG仍是现代Kefir生产最为安全、可靠的发酵剂。KG的结构组成菌如此复杂,以致人们仍不能很好地认识它,所以有关KG的研究一直是Kefir研究的热点。

3.1 KG 的研究与开发

许多国家如前苏联、日本、德国从20世纪初就开始研究KG,但至今也没有人为地仿制成功。虽然许多国家也有工业化生产的Kefir问世,其口感和作用也与传统Kefir基本相似,但仍不能形成Kefir。目前在KG的研究及应用存在着一些问题,概括起来主要有以下几个方面:

(1)在不使用原粒的情况下不能生成新KG的成粒机理。用传统的KG做发酵剂存在增殖难、传代难的问题,而且极易发生菌相失衡,使发酵乳的风味和品质发生变化,失去原有的优良特征,因此也限制了它的工业化生产。有人曾用KG的发酵液做发酵剂,进一步扩大发酵,但存在染菌、菌种比例容易变化和菌种退化等问题;用Kefir分离的单菌进行发酵虽解决了纯培养增菌和防止染菌的问题,但发酵产物无论在感官品质还是在理化指标上和Kefir相比,均达不到理想的效果^[23]。

(2)不同地区、不同来源甚至相同来源,不同培养条件的KG在菌相及其比例等方面都有许多不同,且并不是所有的KG都能表现出良好的发酵特性以生产出优质Kefir,所以使用KG进行生产可能会导致产品质量不稳定。南斯拉夫、澳大利亚、德国等国家就有因使用KG生产而导致Kefir质量不稳定的报道。

(3)KG是由薄片状结构发生扭曲、卷曲和再卷曲所形成的致密结构,内部微生物大量自解,存活率很低,它们通过何种途径进入乳中应引起重视,但至今仍未见相关的研究报道。

(4) 发酵过程中, 游离脯氨酸、亮氨酸、赖氨酸、鸟氨酸、组氨酸的含量明显增加, 但不知清楚是哪一种菌或哪几种菌共同作用的结果。

(5) KG 菌相的互生关系和比例关系不稳定, 对大规模工业化生产而言, 它存在着易变, 不易控制, 粒的回收、清洗及再处理后的使用都显得过于麻烦等缺点。

近些年来, 人们在研究 KG 的基础上, 进行了 Kefir 纯培养发酵剂的研制和开发。现阶段开发的 Kefir 发酵剂主要是乳酸菌和酵母菌的有效复合, 解决了纯培养增殖、直接接种发酵菌相不稳定和容易染菌的问题, 发酵产物在感官品质和理化功能成分上和 Kefir 比较接近, 但不完全相同, 原因可能是未使用醋酸菌, 破坏了菌种之间的互生关系, 此外菌种不同比例的优化组合还有待进一步研究^[23]。

3.2 展望

运用现代先进的生物技术、高科技手段和现代化设备, 以筛选性状优良的菌种组合, 并注重菌种之间的互生关系, 研究开发既能保持传统风味, 又能简化工艺和稳定生产的高活力纯培养发酵剂已是 Kefir 产品由民间流传走向大规模商品化生产的必然发展趋势。

参考文献

- [1] 周传云, 聂明, 万佳蓉. 古老而新型的发酵奶——开菲尔[J]. 食品与机械, 2003, (5): 46-47.
- [2] Garrote GL, Abraham AG, De Antoni GL. Chemical and microbiological characterization of kefir grains. Journal of dairy research, 2001, 68 (4): 639-652.
- [3] P Kooiman. The chemical structure of kefir, the water-soluble polysaccharide of the kefir grain[J]. Carbohydrate Research, 1968, (7): 200-211.
- [4] Garrote G L. Preservation of Kefir Grains, a Comparative Study[J]. Lebensmittel-Technologie, 1997, (30): 77-84.
- [5] 王继伟, 姜岩. 开菲尔粒增殖的最佳工艺条件的研究[J]. 食品科学, 2002, 23(2): 72-75.
- [6] Ohara N, Suzuki M, Okada S. Identification of lactic acid bacteria isolated from freeze-dried kefir grains[J]. Japanese Journal of Food Microbiology, 1997, 13(4): 165-171.
- [7] 刘慧, 李平兰, 张永春, 等. 开菲尔的生理功能、特性及其产品开发研究进展[J]. 食品科学, 2005, 26(5): 252-255.
- [8] Rosi J. The Kefir microorganism: the lactic acid bacteria[J]. Sienza Tecnica Lattiero-Casearia, 1978, 29: 221-227.
- [9] Bavina N A. Dissociation of plaque formation from glucan-induced agglutination in mutants of Streptococcus mutants[J]. Moloch. Prom, 1971, 2: 18-19.
- [10] 张列兵, 丁华, 程涛, 等. 开菲尔粒[J]. 中国乳品工业, 1996, 24(4): 39-42.
- [11] 郭本恒. 功能性乳制品[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2001, 105-106.
- [12] 姜岩. 开菲尔粒增殖工艺及其发酵乳制品生理功能特殊性的研究[D]. 东北农业大学, 2001.
- [13] Bottazzj V, Bianchi F. A note on scanning electron microscopy of microorganisms associated with the kefir granule[J]. Journal of Applied Bacteriology, 1980, 48: 265-268.
- [14] Zeynep G S. Turkish Kefir and Kefir Grains: Microbial Enumeration and Electron Microscopic Observation [J]. Dairy Technology, 2005, 58(1): 25-29.
- [15] Marshall V M, Cole W M, Brooker B E. Observations on the Structure of Kefir Grains and the Distribution of the Microflora[J]. Applied Bacteriology, 1984, 57: 491-497.
- [16] 张列兵, 苑伍申, 程涛等. 开菲尔粒表面超微结构及微生物在开菲尔粒表面分布的研究[J]. 中国乳品工业, 1998, 26 (1): 14-16.
- [17] 刘慧, 李平兰, 张永春, 等. 开菲尔的生理功能、特性及其产品开发研究进展[J]. 食品科学, 2005, 26(5): 252-255.
- [18] Garrote, GL, Abraham A G. Preservation of Kefir Grains, a Comparative Study[J]. U-Technol, 1997, 30: 77-84.
- [19] 冷桂华, 曾文兵. 开菲尔分离菌种冻干发酵剂的研究[J]. 食品工业科技, 2007, 28(1): 135-139.
- [20] 宋欢, 韩燕, 张晓敏, 等. 开菲尔发酵奶的研究进展[J]. 中国乳品工业, 2007, 35(4): 51-55.
- [21] 张慧敏, 李远志. 开菲尔的营养成分、保健功能及其产品研究进展[J]. 现代食品科技, 2004, 21 (4): 118-120.
- [22] 虎砚颖, 黄艾祥. 开菲尔的保健功能及其加工工艺[J]. 中国食物与营养, 2006(4): 458-46.
- [23] 曾友明, 曾文兵, 冯司亮, 等. 开菲尔功能菌组的复合发酵及发酵特性研究[J]. 中国乳品工业, 2007, 35 (3): 26-28.