

直投式酸奶发酵剂的发酵工艺及其优化

吴荣荣, 张柏林

(北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083)

摘要: 本研究通过对不同保加利亚乳杆菌与嗜热链球菌菌株的酸度、粘度、乙醛和共生能力等生理学指标的测定, 筛选出 3 对适于发酵生产用的菌株组合, 并以 ST₁ 和 LB₂ 做为进一步研究对象, 获得其最佳增殖培养基为番茄汁 (1.0%)、乳糖 (1.0%)、酵母膏 (0.5%) 和蛋白胨 (1.0%), 42℃ 培养 6h 后其活菌数达到 1.64×10^9 CFU/ml; LB₂-ST₁ 组合的最佳保护剂组成为海藻糖 (2.0%)、甘油 (0.3%)、谷氨酸钠 (5%) 和吐温 80 (0.3%), 经冷冻干燥后其活菌数达到 3.62×10^{11} CFU/g。该组合工业化生产的最佳工艺参数是发酵温度 42.2℃、pH 6.4、86.7r/min 搅拌转速。以 4% 接种量, 1.0% 补料 (脱脂乳), 发酵时间 6h; -40℃, 15h 后, 最终冷冻干燥产品活菌数为 10^{11} CFU/g。

关键词: 乳酸菌; 直投式酸奶发酵剂; 增殖培养; 保护剂; 冷冻干燥

Optimization of Fermentation Parameters for Production of DVS Yogurt Starter Cultures

WU Rong -rong, ZHANG Bo-lin

(College of Biology Science and Technology, Beijing Forest University, Beijing 100083, China)

Abstract: The interactions (including the symbiosis and antagonism) and their capabilities to produce lactic acid, viscosity, and acetaldehyde, between *Streptococcus thermophilus* strains and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains were studied. It was seen that 3 paired strains were more suitable for the production of yogurt. For strains LB₂-ST₁, the optimum media were 1.0% of tomato extract, 1.0% of lactose, 0.5% of yeast extract and 1.0% of peptone. If they were cultivated at 42℃ for 6h. The cell population was up to 1.64×10^9 CFU/ml. The optimal cryoprotectants to improve the viability of strains LB₂-ST₁ were investigated. A combination consisting of trehalose (0.5%), glycerin (0.3%), glutamate-Na (5%) and Sorbitan mono-oleate (0.3%) could produce a very positive effect on promoting the viability of the paired strains LB₂-ST₁. Their viable cells after freeze-drying were 3.62×10^{11} CFU/g. The optimal parameters for the production of yogurt starters were: temperature 42.2℃, pH 6.4, rotating speed 86.7r/min, inoculation 4%, feeding 1.0%, fermentation 6h and freeze-drying -40℃ for 15h. The cells of the production were 10^{11} CFU/g.

Key words lactic acid bacteria; direct-vat-starter (DVS); multiplication; cryoprotectants; lyophilization.

中图分类号: S879.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)02-0178-04

直投式酸奶发酵剂是指发酵活力强, 每克含活菌数在 10^{11} 个以上, 在生产酸奶或发酵乳制品时可以直接接种, 无须中间继代培养过程, 使用方便, 发酵产品质量稳定的一类新型的商品化生产菌种。它的生产和应用促使酸乳及其它发酵乳制品生产专业化、社会化、规范化和统一化, 从而使发酵乳产品的生产走向标准化, 提高发酵乳产品质量, 保障了消费者的利益和健康。

据报道, 自 19 世纪末 20 世纪初, 西方乳业科学家就开始研制浓缩发酵剂, 酸奶发酵剂现已在乳业发达国家实现商业化生产, 并涌现出一批知名发酵剂制造商,

例如: 丹麦 hansen 公司、澳大利亚 csiro 研究所、荷兰 nizo 研究所等, 它们生产的发酵剂性能优良, 种类多样, 已销往世界各地的乳品企业。直投式酸奶发酵剂的制备技术包括以下五个方面: 菌株的选育、增殖培养基筛选、发酵过程控制、菌体的富集浓缩、菌体的制备方式等。对于酸乳发酵剂的研究, 目前国内主要是从增殖培养基筛选、浓缩方法选择和冷冻干燥工艺等方面进行试验性工作, 很少有人关注菌株之间的拮抗作用以及研究工业化生产时发酵过程的控制。

本研究从优良菌株选育、菌株生理学特性测试、

收稿日期: 2005-03-31

基金项目: 黑龙江省科技攻关项目 (2004AA6BN022)

作者简介: 吴荣荣 (1976-), 女, 在读博士生, 主要从事乳酸菌的生理、生化和分子生物学研究。

廉价培养基筛选、发酵过程控制及冷冻干燥等关键技术入手,旨在生产出价格低廉、发酵特性接近国外同类产品的直投式酸奶发酵剂,并优化其工业化生产工艺。

1 材料与方法

1.1 菌株

本实验中所采用的乳酸菌供试菌株详见表1。

表1 实验用菌株			
Table 1 Strains used in this present study			
编号	代号	菌种名称	来源
1	LB ₁	保加利亚乳杆菌	丹麦汉森
2	LB ₂	保加利亚乳杆菌	丹麦汉森
3	LB ₃	保加利亚乳杆菌	法国罗地亚
4	LB ₄	保加利亚乳杆菌	法国罗地亚
5	LB ₅	保加利亚乳杆菌	意大利
6	Y-5	保加利亚乳杆菌	河北保定新天香乳业公司
7	Y-6	保加利亚乳杆菌	河北保定新天香乳业公司
8	LB ₆	保加利亚乳杆菌	河北农业大学发酵剂研究室
9	ST ₁	嗜热链球菌	河北农业大学发酵剂研究室
10	ST ₂	嗜热链球菌	河北农业大学发酵剂研究室
11	ST ₃	嗜热链球菌	河北农业大学发酵剂研究室
12	ST ₄	嗜热链球菌	河北农业大学发酵剂研究室

1.2 培养基

12% 复原脱脂乳、M17 培养基、MRS 培养基和改良TJA 培养基。

1.3 仪器与设备

752 紫外分光光度计;恒温培养箱;粘度计;pH 计;高速管式分离机;冷冻干燥机;摇床;10 L 发酵罐;300 L 发酵罐及其它辅助设备。

1.4 拮抗试验

对任意两对供试菌株做交叉拮抗实验。

1.5 酸度测定

取乳样10ml,加入20ml 蒸馏水和2~3 滴酚酞试剂,用标定过的0.1004mol/L NaOH 溶液进行滴定,酸度被换算到吉尔涅尔度(°T)。

1.6 粘度测定

采用NDj-4 型旋转粘度计进行测定,单位采用mPa·s。

1.7 乙醛测定

采用蒸馏比色法,单位采用mg/L。

1.8 增殖培养基正交试验设计 见表2。

1.9 保护剂正交试验设计 见表3。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌生理特性研究

2.1.1 拮抗实验

由表4 可以看出,仅有嗜热链球菌ST₁ 的无细胞发

表2 混和菌株增殖培养基L₉(3⁴)试验方案
Table 2 Media for the multiplication of mixed strains according to L₉(3⁴)

试验号	番茄汁	乳糖	酵母膏	蛋白胨	番茄汁	乳糖	酵母膏	蛋白胨
1	1	1	1	1	1(1.0%)	1(0.0%)	1(0.3%)	1(0.5%)
2	1	2	2	2	1(1.0%)	2(1.0%)	2(0.5%)	2(1.0%)
3	1	3	3	3	1(1.0%)	3(2.0%)	3(0.8%)	3(1.5%)
4	2	1	2	3	2(2.5.0%)	1(0.0%)	2(0.5%)	3(1.5%)
5	2	2	3	1	2(2.5%)	2(1.0%)	3(0.8%)	1(0.5%)
6	2	3	1	2	2(2.5%)	3(2.0%)	1(0.3%)	2(1.0%)
7	3	1	3	2	3(4.0%)	1(0.0%)	3(0.8%)	2(1.0%)
8	3	2	1	3	3(4.0%)	2(1.0%)	1(0.3%)	3(1.5%)
9	3	3	2	1	3(4.0%)	3(2.0%)	2(0.5%)	1(0.5%)

表3 保护剂L₉(3⁴)试验方案
Table 3 Cryo-protectants designed for improving the viability of starter cultures

试验号	海藻糖	甘油	谷氨酸钠	吐温80	海藻糖	甘油	谷氨酸钠	吐温80
1	1	1	1	1	1(0.5%)	1(0.3%)	1(5.0%)	1(0.3%)
2	1	2	2	2	1(0.5%)	2(0.5%)	2(10.0%)	2(0.5%)
3	1	3	3	3	1(0.5%)	3(1.0%)	3(15.0%)	3(1.0%)
4	2	1	2	3	2(1.0%)	1(0.3%)	2(10.0%)	3(1.0%)
5	2	2	3	1	2(1.0%)	2(0.5%)	3(15.0%)	1(0.3%)
6	2	3	1	2	2(1.0%)	3(1.0%)	1(5.0%)	2(0.5%)
7	3	1	3	2	3(2.0%)	1(0.3%)	3(15.0%)	2(0.5%)
8	3	2	1	3	3(2.0%)	2(0.5%)	1(5.0%)	3(1.0%)
9	3	3	2	1	3(2.0%)	3(1.0%)	2(10.0%)	1(0.3%)

表4 嗜热链球菌与保加利亚乳杆菌的相互作用效果
Table 4 Interaction among strains from *S.thermophilus* and *L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

球菌	杆菌							
	LB ₁	LB ₂	LB ₃	LB ₄	LB ₅	Y-5	Y-6	LB ₆
ST ₁	—	—	—	—	—	—	—	—
ST ₂	++	++	++	++	++	++	++	++
ST ₃	+	+	+	+	+	+	+	+
ST ₄	+	+	+	+	+	+	+	+

* 注:—表示无影响, +表示微弱抑制, ++表示抑制。

酵液对8 株保加利亚乳杆菌无抑制作用,这意味着32 对试验组合中,仅有8 对菌株间存在共生作用,即75% 的嗜热链球菌和保加利亚乳杆菌菌株间存在不同程度的抑制作用。Vinderola 和Mocchivitti 的研究表明,约80% 的酸奶菌株组合间存在非协同生长现象^[1],Bielecka 和Majkaowska 则报道了近97.9% 酸奶菌株组合间存在非协同生长现象^[2],这些研究结果与我们的结论是相吻合的。

一般认为,乳酸菌在生长过程中除以乳酸作为最终代谢产物外,还能够产生细菌素、其它形式的有机酸、H₂O₂、乙醇和罗伊氏素(reuterin)等多种抑菌物质。这些抑菌物质不仅能控制食品腐败菌和病原菌的生长和存活,延长食品的货架期,而且对近缘相关的种或菌株也有生长抑制作用。Van de Guchte和Ehrlich(2001)的研究指出,德氏乳杆菌可以产生除乳酸外的多种抑菌物

质, 包括过氧化氢和细菌素等生长抑制因素^[3]。Vinderola 等(2002)最近的调查表明, 德氏保加利亚乳杆菌对嗜热链球菌菌株表现出强烈的抑制作用^[1]。

2.1.2 酸度测定

表5 保加利亚乳杆菌与嗜热链球菌混合培养的酸化活力(42℃, 3h)
Table 5 Acidifying activity of paired strains from *S.thermophilus* and *L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* incubated at 42℃ for 3h

混和菌	ST ₁ : LB ₁	ST ₁ : LB ₂	ST ₁ : LB ₃	ST ₁ : LB ₄	ST ₁ : LB ₅	ST ₁ : Y-5	ST ₁ : Y-6	ST ₁ : LB ₆
酸度(° T)	81	80	84	68	77	77	78	68

资料研究表明混合发酵剂在42℃, 3h在乳中生长产酸在80° T 以上, 认为其酸化活力良好。在生产中一般选择产酸能力较弱或中等的发酵剂。由表5 可知ST₁和LB₁、ST₁和LB₃、ST₁和LB₂等菌株组合适合用于发酵乳的生产^[4]。

2.1.3 粘度测定

表6 发酵奶的粘度
Table 6 The viscosity of fermented milks manufactured with yogurt starter cultures

混和菌	ST ₁ : LB ₁	ST ₁ : LB ₂	ST ₁ : LB ₃	ST ₁ : LB ₄	ST ₁ : LB ₅	ST ₁ : Y-5	ST ₁ : Y-6	ST ₁ : LB ₆
粘度(mPa·s)	4800	4400	2200	2600	1400	4500	5500	1000

由表6 混和菌发酵乳的粘度测定结果中可以看出, 其中ST₁和Y-6 粘度最高, 达到5500mPa·s, ST₁和LB₆粘度最低, 仅有1000mPa·s。在酸乳干物质含量不太高时, 产粘菌株显得尤为重要。因此, ST₁和Y-6、ST₁和LB₁、ST₁和LB₂、ST₁和Y-5 四对菌株组合适合用于发酵乳的生产。

2.1.4 乙醛测定

表7 发酵乳的乙醛含量
Table 7 The acetaldehyde levels of fermented milks manufactured with yogurt starter cultures

混和菌	ST ₁ : LB ₁	ST ₁ : LB ₂	ST ₁ : LB ₃	ST ₁ : LB ₄	ST ₁ : LB ₅	ST ₁ : Y-5	ST ₁ : Y-6	ST ₁ : LB ₆
乙醛(mg/L)	19.5	24.8	15.8	18.5	20.7	17.0	20.7	27.5

一般酸乳发酵剂产生的芳香物质有乙醛、丁二酮、乙偶姻和挥发性酸。酸乳的典型风味与乙醛浓度呈显著的正相关性。当利用混和菌株发酵剂制备发酵乳时, 乙醛含量通常变化在2.0~41.0mg/L 范围内。表7 显示, ST₁和LB₆发酵乳的乙醛含量最高, 达到27.5mg/L, ST₁和LB₃产量最低, 仅有15.8mg/L。因此, 就乙醛含量而言, ST₁和LB₆、ST₁和Y-6、ST₁和LB₁、ST₁和LB₂四对菌株组合适合于发酵乳的生产^[4]。

2.2 增殖培养基及保护剂筛选

2.2.1 增殖培养基筛选结果

表8 LB₂-ST₁ 试验结果(42℃)
Table 8 Media available for the multiplication of the paired strains LB₂-ST₁ incubated at 42℃

试验号	番茄汁	乳糖	酵母膏	蛋白胨	菌数(×10 ⁷ CFU/ml)
1	1	1	1	1	100
2	1	2	2	2	164
3	1	3	3	3	112
4	2	1	2	3	84
5	2	2	3	1	89
6	2	3	1	2	87
7	3	1	3	2	115
8	3	2	1	3	93
9	3	3	2	1	68
T ₁	376	299	280	257	
T ₂	260	346	316	366	
T ₃	276	267	316	289	
M ₁	125.3	99.7	93.3	85.6	
M ₂	86.7	115.3	105.3	122	
M ₃	92	89	105.3	96.3	
R	38.6	26.3	12	36.4	

由表8 可看出, 番茄汁是影响菌体收获量的最主要因素, 而酵母膏对菌体收获量的影响最小。从活菌数结果可知, 最佳培养基组合为2号, 即番茄汁为1.0%, 乳糖为1.0%, 酵母膏为0.5%, 蛋白胨为1.0%。为进一步确定实验结果, 按最优条件即番茄汁为1.0%, 乳糖为1.0%, 酵母膏为0.8%, 蛋白胨为1.0%重复进行了两次验证实验, 结果活菌数平均为1.50×10⁹CFU/ml, 表8中2号实验组合活菌数1.64×10⁹CFU/ml, 由此可以看出验证实验结果低于实验中2号组合, LB₂-ST₁的最优培养基组合为2号: 即番茄汁为1.0%, 乳糖为1.0%, 酵母膏为0.5%, 蛋白胨为1.0%。

据报道, 应用超滤浓缩乳作为发酵剂培养基, 其较高的缓冲能力可使活菌数维持在2.5×10⁹CFU/ml 以上(美国专利号: US005098, 721)。张建友等人采用复合培养基培养嗜热链球菌和保加利亚乳杆菌, 菌数可达到10⁸CFU/ml^[5]。显然, 采用本研究所获得的增殖培养基也能达到促进酸乳发酵剂增殖的效果。

2.2.2 保护剂筛选结果

表9 显示, 谷氨酸钠是影响菌体的收获量最重要因素, 而吐温80对菌体收获量的影响最小。就活菌数而言, 最佳的冷冻干燥保护剂组合为1号, 即海藻糖为0.5%, 甘油为0.3%, 谷氨酸钠为5%, 吐温80为0.3%。为进一步证实我们的实验结果, 按最优条件海藻糖为2.0%、甘油为0.3%、谷氨酸钠为5%和吐温80为0.3%, 重复两次进行验证实验, 则选择该保护剂组合冻干后的活菌数平均为3.62×10¹¹CFU/g, 表9中1号实验组合活菌数浓度3.57×10¹¹CFU/g, 由此可以看出验证实验结果高于实验1号组合, 由此LB₂-ST₁保护剂的最优条件为:

表9 LB₂-ST₁ 保护剂试验结果Table 9 Cryoprotectants available for improving the viability of the paired strains LB₂-ST₁

试验号	海藻糖	甘油	谷氨酸钠	吐温 80	菌数($\times 10^{10}$ CFU/g)
1	1	1	1	1	35.7
2	1	2	2	2	16.2
3	1	3	3	3	17.3
4	2	1	2	3	18.7
5	2	2	3	1	14.5
6	2	3	1	2	20
7	3	1	3	2	22.2
8	3	2	1	3	24.5
9	3	3	2	1	26
T ₁	69.2	76.6	80.2	76.2	
T ₂	53.2	55.2	60.9	58.4	
T ₃	72.7	63.3	54	60.5	
M ₁	23.1	25.5	26.7	25.4	
M ₂	17.7	18.4	20.3	19.5	
M ₃	24.2	21.1	18	20.2	
R	6.5	7.1	8.7	5.9	

海藻糖为 2.0%、甘油为 0.3%、谷氨酸钠为 5% 和吐温 80 为 0.3%。

吕加平等研究了乳酸菌发酵剂的冻干保护剂,其选择的最佳保护剂组合的活菌数为 3.8×10^{10} CFU/g^[6]。乔发东等对浓缩乳酸菌发酵剂制造工艺进行了研究,制备的浓缩发酵剂活菌数为 3.0×10^{10} CFU/g^[7]。国外同类产品活菌数基本在 10^{11} CFU/g 以上。显然,采用本研究所获得保护剂也可以使发酵剂最终活菌数量接近国外同类产品的水平。

2.3 最佳工艺参数确定

基于上述结果,为进一步确定工业化生产的最佳工艺参数,我们采用 300L 发酵罐,对不同温度、pH 和搅拌转速下发酵生产酸乳发酵剂的条件进行了测试。以最终发酵剂活菌数作为因变量(Y),以温度(X_1)、pH(X_2)和搅拌速度(X_3)作为自变量,建立多元线性回归方程如下:

$$Y = -32.532 - 0.053X_1 + 2.802X_2 + 0.554X_3$$

($R^2=0.90$, 置信水平: 95%)

并以此获得了本研究酸乳发酵剂发酵参数的最优组合为: 温度: 42.2℃; pH: 6.4; 搅拌转速: 86.7r/min。依照这样的优化组合生产 6 批混合发酵剂,其活

菌数分别是 34×10^{10} 、 35×10^{10} 、 27×10^{10} 、 28×10^{10} 、 30×10^{10} 和 32×10^{10} CFU/g。显然,利用优化组合的发酵生产工艺能够保证最终发酵剂的活菌数量在 10^{11} CFU/g 以上,与国外同类产品接近。

3 结 论

3.1 通过研究不同保加利亚乳杆菌与嗜热链球菌菌株的酸度、粘度、乙醛和共生能力等生理学指标,筛选出 3 对适于发酵生产用的菌株组合,并以其中的 LB₂-ST₁ 组合作为进一步研究酸奶发酵剂工业化生产的基础。

3.2 1.0% 番茄汁、1.0% 乳糖、0.5% 酵母膏和 1.0% 蛋白胨可以促进保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌 LB₂-ST₁ 的联合生长,是其最佳的增殖培养基。海藻糖 2.0%、甘油 0.3%、谷氨酸钠 5% 和 0.3% 吐温 80 能够为该菌株组合提供最好的保护效果,使其在整个冷冻干燥工艺中维持较高的活菌数。

3.3 应用多元线性回归方程确定酸乳发酵剂工业化生产的最佳工艺参数是温度: 42.2℃; pH: 6.4; 搅拌转速: 86.7r/min。以 4% 接种量、1.0% 补料、发酵时间 6h、冷冻干燥 15h 后所获得的 6 批产品活菌数均在 10^{11} CFU/g,符合国外同类产品的标准。

参考文献:

- [1] Vinderola CG, Mocchiutti P, Reinheimer JA. Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products[J]. Journal of Dairy Science, 2002, 85: 4721-4729.
- [2] Bielecka M, Majkowska A, Biedrzycka E. Synergistic yogurt cultures with antibacterial properties[J]. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 1994, 44: 464-473.
- [3] Van de guchte M, Ehrlich S D, Maguin E. Production of growth-inhibiting factors by Lactobacillus delbrueckii[J]. Journal of Applied Microbiology, 2001, 91: 147-153.
- [4] 谢继志. 液态乳制品科学与技术[M]. 北京: 轻工业出版社, 2000.
- [5] 张建友, 李艳武, 赵群波, 等. 冻干乳酸菌菌种增殖培养基的优化[J]. 中国乳品工业, 2002, 30(5): 14-17.
- [6] 吕加平, 骆承庠. 乳酸菌发酵剂冻干保护剂筛选及应用的研究[J]. 东北农业大学学报, 1998, 29(4): 371-379.
- [7] 乔发东, 南庆贤, 兰凤英. 浓缩乳酸菌发酵剂冷冻干燥介质的选择[J]. 中国乳品工业, 1998, 26(4): 13-15.



我国农作物新品种培育取得重大进展

国家 863 计划“优质超高产农作物新品种培育”重大专项日前已超额完成预期目标和任务,我国农作物新品种培育在 5 个方面取得了重大进展。这些进展分别是: 超级稻育种技术不断完善,研究成果继续保持国际领先; 小麦高产优质与杂优化育种进展迅速,实现了高产与优质的重大突破; 玉米杂种优势利用技术体系初步构建,奠定了我国玉米高效育种的技术基础; 油菜隐性上位互作核不育技术研究取得重要突破,解决了杂交油菜选育和制种技术中的世界性难题; 主要农作物分子标记辅助育种技术成功用于种质创新和新品种培育,显著提高了定向育种水平。