

开菲尔粒中酵母菌的分离及其发酵性能的研究

刘 慧¹, 李平兰^{2,*}, 宫 品¹, 王 磊¹

(1.北京农学院食品科学系, 北京 102206; 2.中国农业大学食品与营养工程学院, 北京 100083)

摘 要: 本文分别对开菲尔滤液和洗液中酵母菌的分离方法及其在牛乳中的发酵性能进行了研究。结果表明: 从滤液和洗液中分离筛选出不同类型的乳糖发酵性酵母。它们在牛乳中发酵产酒精能力较强, 确定了其在牛乳中的最佳发酵条件是: 发酵温度为 28℃, 发酵时间为 60h, 接种量为 3%。

关键词: 开菲尔粒; 酵母菌分离; 发酵性能

Study on the Isolation Method and Yeast Fermentation Capability of Kefir Grains

LIU Hui¹, LI Ping-lan^{2,*}, GONG Pin¹, WANG Lei¹

(1.Department of Food Science, Beijing Agricultural College, Beijing 102206, China;

2.College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agriculture University, Beijing 100083, China)

Abstract: Studies were made on the yeast isolation from the kefir filtrates and lotiones and its fermentation capability of the cow milk. Results indicate that different lactose-fermentative yeast can be isolated from the filtrates and lotiones. The yeast has the ability of improving alcohol production, and the optimum conditions of fermentation are obtained: temperature 28℃, time 60h, inoculum concentration 3%.

Key words: Kefir grains; yeast isolation; fermentation capability

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)02-0097-04

开菲尔粒是一种传统的酒精发酵乳饮料——开菲尔(Kefir)的发酵剂, 可用于家庭或工业化的开菲尔生产。被誉为“乳中之香槟”的 Kefir 饮品不仅富含蛋白质、L(+)乳酸和 B 族维生素等营养元素, 而且其代谢活性物质和抗菌物质对胃肠道疾病, 便秘、代谢异常疾病, 高血压、贫血、心脏病、结核病、过敏症、肥胖症等均有一定的疗效。此外, Kefir 饮品中含有抑制癌细胞增殖的荚膜多糖, 可降低癌症的发病率。因此, 大规模开发功能性 Kefir 饮品具有极好的市场应用前景。

开菲尔粒是乳酸菌与酵母菌之间的共生作用而形成的特殊粒状结构。在开菲尔粒基质上栖息着乳酸球菌、乳酸杆菌、明串珠菌、酵母菌和醋酸菌等微生物。由于使用开菲尔粒作为工作发酵剂很难保证发酵乳制品的风味等品质性能的稳定性, 从而限制了传统开菲尔发酵乳制品的工业化生产。本文重点研究从开菲尔粒中分离培养酵母菌的方法, 并对其发酵性能进行初步检测, 从中筛选出酒精产量高的菌株; 并通过正交试验, 确定其在牛乳中的最佳发酵条件, 为开菲尔饮品的工业化生产

提供前提依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

开菲尔粒 来自我国吉林省白城市普通家庭; 脱脂无糖奶粉 北京三元食品有限公司提供; 培养基 马铃薯蔗糖培养基、豆芽汁培养基、马丁氏培养基、YEPD 培养基^[1]本室制备; 蒙牛牌灭菌乳 市售。

1.2 主要仪器设备

130 万像素数码显微摄像系统、K-400 型四档变倍体视显微镜 Motic 实业集团; OLYMPUS 三目生物显微镜 日本; BS224S 型电子天平(220g/0.1mg) 德国塞多利斯; 奥利龙 868 型酸度计 美国; HZQ-Q 型全温振荡培养箱 德国; 微处理器控制全自动高压灭菌锅 台湾; NDJ-8S 数字粘度计 上海天平厂; SW-CJ-1FD 型无菌超净工作台 苏州安泰空气技术有限公司; GHP-9160 型隔水式恒温培养箱、DHG-9145A 型电热恒温鼓风干燥箱 上海一恒; SHT- II 型数显搅拌控温电热套 武

收稿日期: 2004-05-08

* 通讯作者

基金项目: 北京市教育委员会农业应用新技术北京市重点实验室资助项目(KF2003-06)

作者简介: 刘慧(1963-), 女, 副教授, 硕士, 研究方向为食品微生物与发酵。

汉精华；冰箱 青岛海尔。

1.3 方法

1.3.1 操作流程

开菲尔粒→活化→滤液(洗液)→稀释→平板接种→分离培养→镜检→斜面纯粹培养→保种→发酵性能初步测试→筛选优良菌株→酒精发酵试验最佳条件的确定

1.3.2 操作要点

1.3.2.1 开菲尔粒的活化

开菲尔粒按 5% 的比例接种至灭菌脱脂乳中，于 25℃ 培养 16~20h 至牛乳凝固。

1.3.2.2 稀释液的制备

分别取开菲尔粒滤液或洗液 5ml 注入带若干玻璃珠的 45ml 灭菌生理盐水中，充分振荡 30min，再吸取上述稀释液 1ml 注入 9ml 灭菌生理盐水中。重复以上操作，制备 10^{-4} ~ 10^{-5} 的稀释菌液。

1.3.2.3 平板接种与分离培养

将上述 10^{-4} ~ 10^{-5} 的稀释菌液分别以倾注法和涂布法接种于平皿上，并按以下方法分别培养。

①有氧培养：将上述平皿倒置于 28℃ 温箱中培养 2~3d。

②水封培养：在水盆中置一支架，将平皿倒置于其上，放入点燃的蜡烛，以大烧杯罩住平皿和支架，并使之下口没入盆中水面以下。将整个装置放入 28℃ 培养箱中，持续培养 2~3d。

1.3.2.4 斜面纯粹培养

根据酵母菌的菌落特征和水浸片镜检结果，将上述平皿目的菌落分别划线接种于相应斜面培养基上，置 28℃ 培养 2~3d。

1.3.2.5 发酵性能试验

①发酵性能的初步测试 将上述斜面菌种挑取 3 环分别接入 10ml 灭菌乳中，28℃ 培养约 24h，观察产气情况。吸取产气管的培养液 1ml 移入装有 100ml 灭菌乳的锥形瓶中，28℃ 摇床培养 24h，根据培养期间的产气情况和感官检验，保留产气较快和具有纯正发酵乳香的

菌种。将锥形瓶棉塞更换为无菌带有 U 形玻璃导管的胶塞，并将其开口一端浸入水中，于 28℃ 厌氧培养 48h 后，测定发酵液的酒精含量、酸度、粘度和活菌数。

②筛选优良菌株与扩大培养 根据以上测定指标筛选酒精产量高、产酸能力较强及活菌数较高的菌株。酵母的制备按斜面菌种→ 10ml 乳清改良培养基→ 100ml 灭菌乳流程扩大培养。

③酒精发酵试验最佳条件的确定

根据酵母菌在牛乳中的培养温度、培养时间和接种量进行 ($L_9(3^4)$) 正交试验(见表 1)，并对发酵液的酒精含量、酸度和粘度进行测定。对其结果进行极差分析和方差分析，以确定最佳发酵工艺条件。

表 1 酒精发酵试验因素表

Table 1 The factorial levels of ethanol fermentation test

水平	因 素		
	培养温度(℃)A	培养时间(h)B	接种量(%)C
1	25	48	1
2	28	60	3
3	31	72	5

1.3.3 试验指标的测定

1.3.3.1 酒精度的测定 采用附温比重瓶法测定。

1.3.3.2 酸度和粘度的测定 酸度采用 0.1mol/L NaOH 滴定法测定；粘度采用数字式粘度计测量。

1.3.3.3 酵母细胞数的测定 采用显微镜直接计数法测定。以上试验指标的测定次数均为 $n=3$ 。

2 结果与讨论

2.1 酵母菌的分离

本试验为了从开菲尔粒中分离出乳糖发酵性酵母，设计并采用了含有乳糖的选择性培养基。采用不同的选择性培养基对酵母菌的分离效果有明显影响。由表 2 可知，马铃薯、豆芽汁和 YEPD 培养基上的酵母菌落特征明显，出芽率高；而马丁氏培养基上酵母菌落不占优势，出芽率低。故从开菲尔粒中分离酵母菌宜采用马

表 2 从开菲尔粒中分离酵母菌的菌落特征与菌体形态。

Table 2 Clone characterization on yeast isolation of kefir grains

菌种代号	检样	培养基	菌落特征	菌体形态
K1	滤液	马铃薯	乳白色，微隆起，表面光滑，不透明，有光泽的圆形菌落。	卵圆形、出芽率高
K2	滤液	豆芽汁	乳白色，隆起，表面光滑，不透明，有光泽的圆形菌落。	椭圆形、出芽率高
K3	滤液	马丁氏	边缘为红色中间白色，微隆起，表面光滑，半透明，有光泽的圆形菌落。酵母菌的菌落不占优势。	椭圆形、出芽率低
K7	洗液	YEPD	边缘为红色中间白色，微隆起，表面光滑，不透明，有光泽的圆形菌落。	柱状、出芽率高
K8	洗液	YEPD	乳白色，微隆起，表面光滑，不透明，有光泽的圆形菌落。	椭圆形、出芽率高

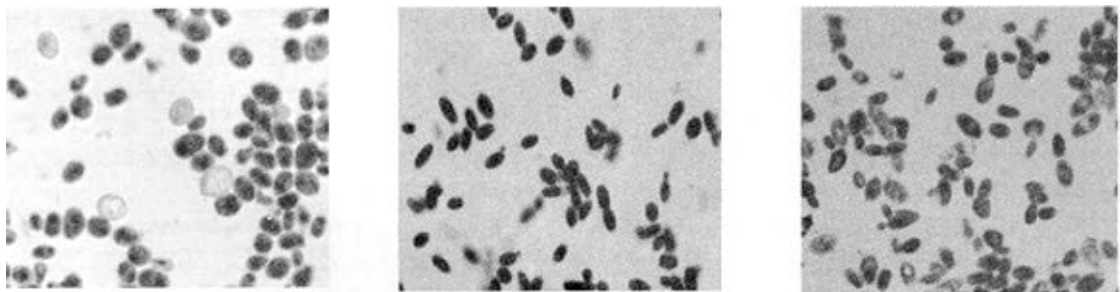


图1 K1酵母菌
Fig.1 Yeast K1

图2 K7酵母菌
Fig.2 Yeast K7

图3 K8酵母菌
Fig.3 Yeast K8

表3 分离酵母菌发酵牛乳性能测试结果

Table 3 The results of the fermentation capability test on milk							
菌种代号	酒精度(%)	酸度(° T)	粘度(mPa · s)	产 CO ₂	产气速度	风味品质	口感
K1	1.6	50.80	3.68	+	快	有乳香, 醇香较浓	杀口
K2	1.4	53.65	3.25	+	较快	有乳香, 醇香较淡	较杀口
K3	1.2	45.80	3.18	+	较慢	同 K2	同 K2
K7	1.8	42.30	3.73	+	快	同 K2	同 K2
K8	1.8	62.30	3.56	+	快	同 K2	同 K2

表4 分离酵母菌的酒精发酵 (L₉(3⁴)) 正交设计与试验结果

Table 4 The results of orthogonal test for ethanol fermentation (L ₉ (3 ⁴)) on yeast isolation							
试验号	培养温度(°C)A	培养时间(h)B	接种量(%)C	误差	乙醇含量(%)	酸度(° T)	粘度(mPa · s)
1	1	1	1	1	1.070	68.50	3.13
2	1	2	2	2	1.180	56.75	3.45
3	1	3	3	3	1.680	59.35	3.68
4	2	1	2	3	1.565	36.50	3.05
5	2	2	3	1	2.170	50.80	3.33
6	2	3	1	2	2.225	69.10	3.73
7	3	1	3	2	1.310	42.30	3.20
8	3	2	1	3	1.455	53.65	3.25
9	3	3	2	1	2.030	61.30	3.56
酒 含 量 K ₁	3.92	3.93	4.74	5.26	R _A > R _B > R _C		
精 K ₂	5.95	4.80	4.77	4.71			
含 K ₃	4.79	5.93	5.16	4.70			
量 R	2.03	2.00	0.42	0.56			
K ₁ '	219.25	147.30	191.25	180.60	R _A ' > R _B ' > R _C '		
酸 K ₂ '	156.40	161.20	154.55	168.15			
度 K ₃ '	157.25	189.75	52.45	149.50			
R'	62.85	42.45	38.80	31.10			
K ₁ ''	10.01	9.38	10.06	10.02	R _B '' > R _A '' > R _C ''		
粘 K ₂ ''	10.26	10.03	10.11	10.38			
度 K ₃ ''	10.11	10.97	10.21	9.88			
R''	0.25	1.59	0.15	0.40			

注：表中数据为 n=3 测定之平均值。

铃薯、豆芽汁和 YEPD 天然培养基。

2.2 发酵性能的初步测试

采用不同的选择性培养基分别从开菲尔滤液和洗液中分离出 8 株酵母菌。它们均能发酵乳糖产生 CO_2 ，但生长特性与发酵性能差异较大。由表 3 可见，K1、K7 和 K8 菌株发酵牛乳速度快，且乳香、酯香和醇香浓郁，酒精度与酸度均较高。故 K1、K7 和 K8 菌株为具有应用价值的菌种。

2.3 酒精发酵试验最佳条件的确定

酵母菌的发酵性能受发酵温度、时间和接种量的影响。由表 4 可知，分别以发酵液的酒精含量、酸度和粘度为指标，则 $R_A > R_B > R_C$ ， $R_A' > R_B' > R_C'$ ， $R_B'' > R_A'' > R_C''$ 。即发酵温度是影响酵母菌发酵性能的主要因素，发酵时间次之，接种量相对影响较小。

2.3.1 发酵温度对分离酵母菌的发酵性能的影响

发酵温度对酵母菌的生长和代谢活动影响较大。若温度过低，将影响酵母在牛乳中的生长和发酵速度，从而降低发酵液的酒精含量；反之，温度过高，酵母菌早衰和菌体自溶，亦会导致酒精含量的降低。由表 4 中 $K_{A2} > K_{A3} > K_{A1}$ ， $K_{A1}' > K_{A3}' > K_{A2}'$ ， $K_{A2}'' > K_{A3}'' > K_{A1}''$ 可知， A_2 水平最好， A_1 水平较差，故最终选 A_2 为最佳水平，即确定酵母菌的最佳发酵温度为 28°C 。

2.3.2 发酵时间对分离酵母菌的发酵性能的影响

发酵时间对发酵乳的品质有一定影响。在有氧条件下发酵前期酵母菌大量繁殖，发酵乳的酸度和粘度增加变化不大；当进入厌氧发酵阶段酵母菌产生大量的酒精和 CO_2 ，发酵乳的酸度和粘度增加变化明显。若发酵时间较短，则发酵乳的酒精含量不足，粘度较低；但发酵时间过长，容器底部易产生大量粘性块状物，而影响产品的感官品质。由表 4 中， $K_{B3} > K_{B2} > K_{B1}$ ， $K_{B3}' > K_{B2}' > K_{B1}'$ ， $K_{B3}'' > K_{B2}'' > K_{B1}''$ 可知， B_3 水平最好，而 B_1 水平较差。故最终选 B_3 为最佳水平，即确定酵母菌的最佳发酵时间为 60h。

2.3.3 接种量对分离酵母菌的发酵性能的影响

接种量对发酵乳的品质有一定影响。若接种量太少，则菌体细胞增长缓慢，发酵时间延长，而且酵母菌产生的乙醇含量达不到产品要求的指标；如果接种量太多，在发酵前期培养基营养成分消耗过快，尤其利用乳糖大量繁殖菌体，将导致发酵后期酵母菌产乙醇含量的降低；同时接种量太多又会导致大量酵母菌体早衰和自溶现象。由表 4 中， $K_{C3} > K_{C2} > K_{C1}$ ， $K_{C1}' > K_{C2}' > K_{C3}'$ ， $K_{C3}'' > K_{C2}'' > K_{C1}''$ 可知， C_2 为最佳水平， C_1 水平较差。故最终选 C_2 为最佳水平，即确定酵母菌的最佳发酵接种量为 3%。

3 结 论

3.1 采用马铃薯、豆芽汁和 YEPD 天然培养基分离酵母菌效果好，其菌落特征明显，出芽率高。

3.2 采用不同的选择性培养基分别从开菲尔滤液和洗液中分离出 8 株酵母菌。其中 K1、K7 和 K8 菌株为具有应用价值的菌种。

3.3 发酵温度是影响酵母菌发酵性能的主要因素，发酵时间次之，接种量相对影响较小。

3.4 采用 $(L_9(3^4))$ 正交试验设计，经极差分析和方差分析，确定最佳发酵条件组合是 $A_2B_2C_2$ 。即发酵温度为 28°C ，发酵时间为 60h，接种量为 3%。发酵产品口感细腻，醇香、乳香和酯香浓郁，有一定粘度和杀口，无乳清分离，呈均匀一致的起泡性乳浊液。

参考文献：

- [1] 刘慧, 李铁晶. 新编食品微生物学实验指导[M]. 东北农业大学, 2000. 107-108.
- [2] 郭本恒. 益生菌[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004. 452-459.
- [3] 程涛. 开菲尔粒基质和产生开菲尔基质的微生物[J]. 中国乳品工业, 1996, 24(6): 39-42.
- [4] 余东霞. 一种新型的发酵乳—Kefir[J]. 中国乳品工业, 1999, 21(1): 94-96.

信 息

韩国将禁止使用含有乙基己基胺的食品包装保鲜膜

据海外媒体报道，韩国食药厅近日表示，考虑到乙基己基胺(DEHA)可能损害人的内分泌系统，韩国计划于 2005 年上半年修改“食具及容器包装标准”，严禁使用含有乙基己基胺的食品包装保鲜膜，该标准也将适用于进口产品。该厅已要求韩国国内企业从 2005 年 1 月中旬开始采用替代原材料生产食品包装保鲜膜。

乙基己基胺(DEHA)是一种添加在合成树脂材料中可增加产品柔韧性和弹性的化学物质，在聚氯乙烯中的含量为 40%~50%。美国、日本和世界自然保护基金会(WWF)已将该物质列为可能会损害人体内分泌系统的物质。