

多株乳酸菌协同发酵制备甜玉米酸奶及稳定性的研究

段善海¹, 缪 铭¹, 李丽莎^{1,2}, 费 颖¹

(1. 哈尔滨商业大学食品工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150076

2. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘 要: 本文研究以甜玉米和牛奶为原料进行乳酸发酵而制得一种具有营养保健功能的食品。通过一系列单因素和正交试验确定甜玉米酸奶生产的最佳工艺条件: 牛奶中加入 18% 的甜玉米, 6% 蔗糖, 3% 混合发酵剂(嗜热链球菌:保加利亚乳杆菌:两歧双歧杆菌=1:2:1)进行培养, 在 42℃ 条件下发酵 5h; 最佳复合稳定剂为黄原胶:卡拉胶:单甘酯=0.2%:0.15%:0.01%。该产品具有独特的风味和良好的营养保健作用, 市场前景广阔。

关键词: 甜玉米; 酸奶; 混合发酵剂; 协同发酵; 复合稳定剂

Study on Synergism Fermentation of Lactic Acid Bacteria Strains and Stability of Sweet Corn Yoghurt with Healthy and Nutritional Function

DUAN Shan-hai¹, MIAO Ming¹, LI Li-sha^{1,2}, FEI Ying¹

(1. College of Food Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

2. School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wu xi 214036, China)

Abstract: This paper introduced a food made of sweet corn and milk through lactic acid fermentation. The parameters of processing technique were determined and the optimal process conditions were recommended through one factor and orthogonal test. The test results showed that the milk added with 18% sweet corn juice, 6% sucrose, inoculated 3% mixed starter culture with 1:2:1 of *L. bulgaricus* and *St. thermophilus* and *B. bifidum* respectively and fermented 5h at 42℃. The optimal formulas of mixed stabilizers was that: Xanthan gum:Kappa Carrageenan gum:Glycerol Monostearate=0.2%:0.15%:0.01%. This new product with flavor and nutrition would find a wide market.

Key words: sweet corn; yoghurt; mixed fermenting agent; synergism fermentation; mixed stabilizers

中图分类号 TS275.4

文献标识码 A

文章编号 1002-6630(2005)11-0278-05

酸奶是以牛乳或乳制品为原料,经均质、杀菌、冷却后,加入特定的微生物发酵剂而制成的产品。它集营养和保健于一体,具有酸甜可口,香气宜人的独特风味,含有大量被誉为“益生菌”的乳酸菌及其分解代谢产物,可有效抑制有害杂菌在肠胃内生长繁殖,达到促进消化、预防疾病、维护健康的功效^{[1][5]}。

甜玉米又称水果玉米,是近年来利用农业遗传基因技术培育出的新型优良品种。其与普通玉米的最大区别在于:在氨基酸组分中,尤以赖氨酸、色氨酸的含量较高,比普通玉米高出 2 倍以上,必需氨基酸组成比例

比较平衡;蛋白质含量也比普通玉米高 3%~4%;在含量丰富的玉米油中,以不饱和脂肪酸如亚油酸的含量最多;胚乳中约含有 10%~15% 的糖分,相当于普通玉米的 2.5 倍。玉米糖如 D-葡萄糖、果糖、低聚糖易被人体吸收而不易转化为脂肪;还含有 B 族维生素、维生素 E、矿物质和膳食纤维等营养素。医学研究认为甜玉米营养价值高,是人们理想的保健食品^[3]。

目前,随着我国人民生活水平的不断提高,对酸奶的品种、质量都提出了更高的要求;同时近几年酸奶在国内市场的销售量日益增长,为满足消费者求新求异

收稿日期:2004-11-29

基金项目:黑龙江省教育厅科学技术研究项目(10511083)

作者简介:段善海(1950-),男,高级工程师,研究方向为食品微生物工程。

的消费需求,开发多种类型的营养保健型酸奶制品势在必行。我们根据甜玉米的理化性质和传统的凝固性型酸奶的加工工艺,研究将甜玉米浆汁添加到牛奶中,经乳酸发酵制得的甜玉米酸奶兼有甜玉米与酸奶的双重营养保健作用。它的研制生产不仅丰富了市场上酸奶的品种,满足人们多层次需要,维护人们的身体健康,还能为甜玉米资源的加工利用开辟一条新的应用途径。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌种

嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*, 简写St);保加利亚乳杆菌(*Lactobacillus bulgaricus*, 简写Lb);两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*, 简写Bb);以上各菌株均由学院食品微生物实验室提供。

1.1.2 培养基^{[2][4]}

A. MRS 培养基:

蛋白胨 10g, 酵母提取物 5g, 肉膏 10g, 柠檬酸二铵 2g, 葡萄糖 20g, K_2HPO_4 2g, 乙酸钠 5g, Tween80 1ml, $MgSO_4 \cdot H_2O$ 0.58g, $MnSO_4$ 0.25g, 水 1000ml; 调 pH 为 6.2~6.4, 121℃ 灭菌 15min。

B. 脱脂乳培养基:

取 128g 合格脱脂乳,加入 1000ml 水溶解,混匀后分装于试管中,置于高压灭菌锅中,115℃,15min 高压灭菌。

C. BSL 培养基(双歧杆菌选择性培养基):

西红柿汁 200ml, 酵母浸膏 6g, 蛋白胨 15g, 葡萄糖 20g, NaCl 5g, Tween80 1ml, 可溶性淀粉 0.5g, BS 添加液 *50ml, 蒸馏水 800ml, 琼脂 1.5g, 调 pH 为 7.0, 121℃ 灭菌 15min。

BS 添加液*: 丙酸钠 30g, 加水 90ml, 充分溶解后加新霉素 400mg, 巴龙霉素 100mg, 氯化锂 6g, 再加蒸馏水定容至 1000ml, 冰箱内保存。

1.1.3 鲜甜玉米 由东北农业大学玉米研究室提供;脱脂乳、蔗糖、柠檬酸、葡萄糖及其他各种辅料:市售的食品级添加剂。

1.2 实验设备与仪器

HR2839/A 型飞利浦搅拌机、HH-B11-420 型恒温培养箱、TXB-M0JG 型精密 pH 计、LD5-10 型离心机、WYT 型糖度计、YXQ-SG46-280 型电热压力蒸汽消毒器、ALC-210.2 型精密电子天平、XSZ-2 型显微镜、日立 835-50 型氨基酸自动分析仪、均质机、标准型净化工作台等。

1.3 工艺流程

甜玉米→清洗去杂→脱粒→磨浆

原料乳→糖溶化→过滤→调配→均质→灭菌→

复合稳定剂

扩大培养←活化←菌种

冷却→接种→发酵→冷藏→成品

1.4 工艺操作要点

1.4.1 甜玉米汁的制备

将乳熟期颗粒饱满的甜玉米剥去外层苞衣和须,用刀切下玉米粒并放入清洁容器中用水清洗干净。加水以浸没过玉米粒为准,用温火煮沸 30min,其目的是使组织软化,提高出汁率,有利于色素溶出,并能钝化酶类,防止打浆时变色。预煮后的玉米粒立即加 2 倍水,用组织捣碎机打浆,再用胶体磨处理制得 120 目的玉米浆液备用。

1.4.2 生产发酵剂的制备

在无菌室中向脱脂乳培养基接入 3%~4% 的菌种,于 42℃ 下发酵,经 3~4 次传代培养使菌种活力充分恢复,然后接种进行扩大培养制成母发酵剂和生产发酵剂。

1.4.3 调配、均质

将甜玉米、鲜奶、蔗糖液、复合稳定剂等按一定比例调配均匀,然后加热到 50~60℃ 左右,在 15~20 MPa 下均质处理,使料液微细化,提高料液粘度,防止脂肪上浮,增强酸奶凝胶体稳定性。

1.4.4 杀菌、冷却

将均质后的乳液加热至 85~90℃,保温 5min 杀菌,杀菌温度不宜过高,以免营养成分损失,灭菌处理后,迅速冷却至 45℃ 待接种。

1.4.5 接种、发酵、冷藏

将生产发酵剂,按 3% 接种量接种于冷却至 42℃ 的乳液中,并充分搅拌,然后送入 42℃ 恒温箱,发酵 5h 左右,迅速移至 0~5℃ 冰箱中进行后发酵冷藏。

1.5 实验方法

1.5.1 感官评分标准^[2]

产品感官评分主要根据酸奶的口感、组织状态、乳清析出情况、风味等进行综合评分。样品随机由 20 人综合评审分别打分,取平均分为总感官评分。其中色泽 10 分,口感 30 分,香味 20 分,组织状态 40 分。

1.5.2 酸度的测定^[5]

取 5ml 发酵液注入容量为 150ml 的三角瓶中,用 50ml

蒸馏水稀释,加入2~3滴1%酚酞指示剂,用1.0mol/L NaOH标准溶液滴至微红色,在0.5min不消失为终点。将滴定所消耗的1.0mol/L NaOH标准溶液的毫升数乘以20,即为100ml发酵液的滴定酸度,以乳酸含量(%)或吉尔涅尔度(°T)表示。

1.5.3 乳酸菌活菌计数法:

在厌氧环境下,采用MRS培养基平板记数。

1.5.4 氨基酸含量的测定:

采用日立835-50型氨基酸自动分析仪。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌菌种的筛选

2.1.1 菌株产酸曲线的确定

经过预实验确定选用的各供试菌为嗜热链球菌(*St*)、保加利亚乳杆菌(*Lb*)、两歧双歧杆菌(*Bb*)。将上述三菌株及其等量的种间比经活化、扩培后,分别以1%接种量接种于脱脂乳培养基中,于37℃条件下培养12h,每

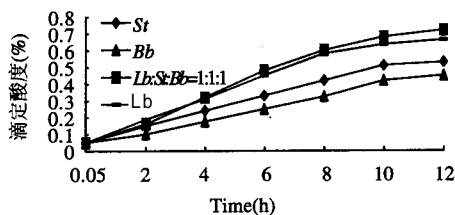


图1 乳酸菌的产酸曲线

Fig.1 Acid produced curve of lactic acid bacteria strains

隔2h测一次产酸量,并制成酸度曲线,如图1所示。

由图1可以看出,由于脱脂乳培养基中含有一定量的糖类、蛋白质等营养物质,所有菌株随发酵时间的延长以一定比例呈上升趋势,产酸量不断增加。就单一菌株而言,以Lb产酸量增加最快,最终产酸量最高,St次之,Bb的产酸率最低。而Lb+St+Bb多菌株组合的产酸速率比单独发酵时的速率都要高,这说明三菌株之间存在一定的互生效应,在共同生长的时,菌种间的生长代谢相互促进。同时由于Lb和St是酸奶制作的主要菌种,它们对酸奶风味的形成起主要作用,而Bb具有特殊的生理作用,所以选用Lb、St和Bb来进行多菌株发酵。

2.1.2 多菌株发酵最适种间比的确定

将上述三菌株以不同的配比进行发酵实验,以1%的接种量接种于脱脂乳培养基中于37℃条件下发酵培养12h,测定产酸量,确定最佳种间比,其不同时间的产酸量见图2。

由图2可见,混合发酵剂中嗜热链球菌:保加利亚乳杆菌:两歧双歧杆菌=1:2:1的比例效果较好,其产酸量

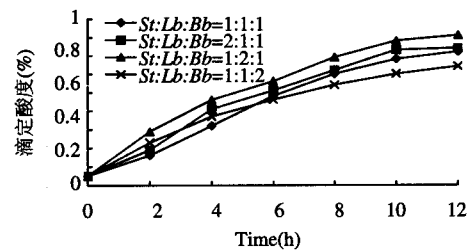


图2 不同种间比产酸曲线

Fig.2 Acid produced curve of various mixed cultures

增长速度最快,最终滴定酸度比其他种间比的高。因为嗜热链球菌分解蛋白质产生甲酸和丙酸又促进了杆菌的生长,杆菌在发酵过程中释放的物质是链球菌基本的生成因素,使球菌生长较快,形成了共生现象。随着酸度上升,杆菌繁殖加快,三者共同作用形成酸奶特有风味。

2.2 发酵工艺条件的选择

2.2.1 甜玉米添加量的确定

甜玉米汁的浓度直接影响到甜玉米汁与牛奶相互溶解的情况,也影响到成品中甜玉米的风味,并且也是决定酸奶营养价值的重要因素。为确定甜玉米汁的浓度,现选用添加甜玉米汁0%、5%、10%、15%、20%、25%到牛奶中并在接种量3%,42℃的条件下发酵4h,

表1 甜玉米最佳添加量的单因素实验表

Table 1 The optimal adding sweet corn amount of one factor test

组数	甜玉米 (%)	凝乳时间 (h)	发酵终点 酸度(°T)	活菌数 (lg(cfu)/ml)	感官评定结果
1	0	5.0	102.8	4.0	凝乳组织差,有较少乳清析出,口感差,不香
2	5	5.5	91.5	3.8	凝乳组织较软,有乳清析出,口感较差,香味平淡
3	10	6.0	88.1	4.2	凝乳组织较好,有少量乳清析出,口感好,微香
4	15	6.0	95.7	4.3	凝乳组织很好,有很少乳清析出,口感好,香味浓
5	20	6.5	86.9	3.6	凝乳组织差,有较少乳清析出,口感一般,香味浓
6	25	6.5	85.3	3.5	凝乳组织差,有乳清析出,口感差,香味浓

分别记录其中菌数(表1)。

由于甜玉米的添加量对产品质量的影响不仅在于产品的风味营养,同时也会对产品的稳定性产生影响。由表2可以看出,在一定含量内随着甜玉米汁添加量的增多,乳酸菌的数量也随之增加,这是由于甜玉米中含有的丰富的营养物质。但当甜玉米含量增加到20%的时候菌数有所下降,同时产品的乳清析出明显增加。这是由于甜玉米添加过多破坏了酸奶凝胶的连续性,酸乳无法维持其网状结构,从而造成大量的乳清析出。所

以甜玉米的最佳添加量应为 1.5% 左右。

2.2.2 促生长物质选择与确定

为了提高乳酸菌发酵剂的产酸量, 保证菌种活力和加快发酵速度, 对大豆汁培养液进行适当的营养补充。我们选用西红柿汁、异麦芽低聚糖、麦芽汁作为补充物质, 各添加 0.3% 到脱脂乳培养基中, 37℃ 条件下培养 12 h, 每隔 2 h 测一次活菌数并绘制生长曲线, 结果

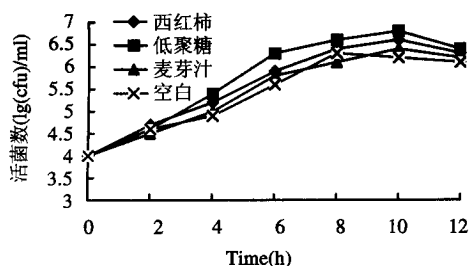


图3 添中促生长物之后的生长曲线

Fig.3 The growth curves of strains added various growth improvers

如图 3 所示。

由图 3 明显看出, 所有添加物对乳酸菌的生长有一定的促进作用, 其中加入异麦芽低聚糖后, 其活菌数增加尤为明显, 这是因为低聚糖促使双歧杆菌更好的生长繁殖, 所以选择在脱脂乳培养基中添加异麦芽低聚糖作为营养物质。同时以不同的添加量分别为 0.25%、0.3%、0.35% 添加到脱脂乳培养基中, 以乳酸菌最终活菌数为

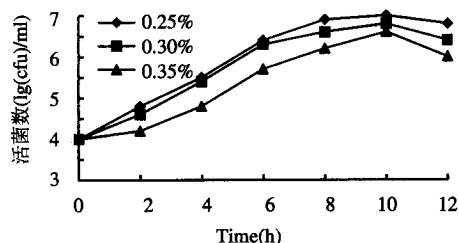


图4 不同含量促生产物质的生长曲线

Fig.4 The growth curves of strains added different amounts of improver

指标, 确定最佳添加量, 结果见图 4。

由图 4 看出, 当异麦芽低聚糖添加量为 0.25% 时, 活菌数增加最多, 这说明其添加量是有一定的限度, 当加入过多时原料乳中的水分活度降低, 并增加了乳中溶质的反渗透作用, 从而影响甚至抑制了乳酸菌的增加, 延长发酵时间。

2.2.3 发酵最佳工艺条件确定

在 42℃, $n(\text{Lb}):n(\text{St}):n(\text{Ba})=1:2:1$ 的条件下, 添加 0.25% 的异麦芽低聚糖及 0.3% 的稳定剂, 确定影响产品质量的关键因素。根据单因素实验和酸奶配方, 采用 $L_9(3^4)$ 正交实验确定最佳发酵工艺, 并对实验结果进行分

表2 正交实验因素水平表

Table 2 The factor and levers of orthogonal test

水平	因素			
	A 甜玉米(%)	B 蔗糖(%)	C 发酵时间(h)	D 接种量(%)
1	12	6	4	2
2	15	7	5	3
3	18	8	6	4

表3 实验结果及分析表

Table 3 Result of orthogonal test and analysis

实验序号	因素				感官评分	滴定酸度 °T	活菌数 lg(cfu)/ml
	A	B	C	D			
1	1	1	1	1	79	98	3.9
2	1	2	2	2	82	93	4.5
3	1	3	3	3	86	104	5.2
4	2	1	2	3	84	99	4.3
5	2	2	3	1	93	112	5.6
6	2	3	1	2	88	103	5.0
7	3	1	3	2	95	119	5.8
8	3	2	1	3	89	107	4.6
9	3	3	2	1	85	95	3.7
K_1	247/295	258/316	252/296	261/317	$T=781/930$		
K_2	265/314	260/300	255/299	265/315			
K_3	269/321	263/314	274/335	255/298			
k_1	82.3/98.3	86/105.3	84/98.7	87/105.7	$\bar{X}=86.8/103.3$		
k_2	88.3/104.7	86.7/100	85/99.7	88.3/105			
k_3	89.7/107	87.7/104.7	91.3/111.7	85/99.3			
极差 R	7.4/8.7	1.7/4.7	7.3/13	3.3/6.4			
优水平	A_3/A_3	B_3/B_1	C_3/C_3	D_2/D_1			

析, 见表 2、3。

表 5 表明: 甜玉米汁、蔗糖、发酵时间和接种量对甜玉米酸奶的感官质量均有不同程度的影响, 其中甜玉米汁和发酵时间是影响甜玉米酸奶感官质量的显著因子, 各因素对甜玉米酸奶感官质量的影响主次顺序为: $A > C > D > B$; 而对酸奶滴定酸度的顺序影响是 $C > A > D > B$, 即发酵时间影响最大, 其次是甜玉米和接种量, 影响最小的为蔗糖。通过对照试验得出甜玉米酸奶生产的最佳工艺参数为 $A_3B_1C_2D_1$, 即甜玉米 18%、蔗糖 6%、发酵时间 5 h、接种量 3%。

2.3 产品稳定性实验设计

在甜玉米酸奶的生产过程中, 由于其稳定性受其物化、胶化特性影响而被破坏, 易出现分层现象甚至产生沉淀, 影响产品质量。通过添加适当的稳定剂乳化剂能够减轻乳蛋白在加热灭菌和发酵产酸时产生的 "热变性"、"酸变性" 而导致蛋白质颗粒快速凝集沉淀, 使乳清析出减少, 酸奶胶体保持稳定, 有助蛋白质凝聚反应缓慢有序地进行以致形成细腻稠密的蛋白质网状结构。在使用稳定剂时, 一般来讲复合稳定剂要比单一稳定剂效果好, 使用量少。本试验在选择稳定剂前, 通过多次实验筛选, 最后采用黄原胶和卡拉胶为复合稳定剂, 并同时添加乳化剂单甘酯, 其对比对酸奶质地

表4 稳定剂的选择

Table 4 The selection of stabilizers

序号	稳定剂用量(%)	感官评价
1	黄原胶 0.3%	稍有糊口感, 有少量乳清析出, 均一无沉淀
2	卡拉胶 0.3%	圆滑稍粘, 有少量乳清析出, 均一无沉淀
3	黄原胶 0.15% + 卡拉胶 0.15% + 单甘酯 0.01%	圆滑爽口, 有较少乳清析出, 均一无沉淀分层
4	黄原胶 0.2% + 卡拉胶 0.1% + 单甘酯 0.01%	细腻圆滑爽口, 有较少乳清析出, 均一无沉淀
5	黄原胶 0.25% + 卡拉胶 0.05% + 单甘酯 0.01%	胶块状不易吸食、有粘附口感, 无乳清析出

的影响见表4。

由上表结果可知甜玉米酸奶的最佳稳定剂为黄原胶: 卡拉胶: 单甘酯=0.2%:0.15%:0.01%, 产品冷藏3个月尚无分层现象。

表5 酸奶中氨基酸的组成

Table 5 The contrast of amino acid content in yoghurt

单位:mg/100g

名称	甜玉米酸奶	市售酸奶	名称	甜玉米酸奶	市售酸奶
丙氨酸(Ala)	129	83	缬氨酸(Val)	204	173
脯氨酸(Pro)	273	219	亮氨酸(Leu)	319	254
非甘氨酸(Gly)	78	51	必异亮氨酸(Ile)	172	143
必丝氨酸(Ser)	135	95	需苯丙氨酸(Phe)	167	104
需酪氨酸(Tyr)	125	96	氨色氨酸(Trp)	83	—
氨天门冬氨酸(Asp)	252	190	基蛋氨酸(Met)	95	51
基谷氨酸(Glu)	739	612	酸苏氨酸(Thr)	123	87
酸精氨酸(Arg)	136	76	赖氨酸(Lys)	218	201
组氨酸(His)	81	65	合计	1381	1013
合计	1948	1487	氨基酸总量	3329	2500

2.4 产品中氨基酸的组成与评价

由表5 酸奶中氨基酸组成表的结果分析表明, 甜玉米酸奶中氨基酸含量丰富, 总量是市售酸奶的1.332倍。其中必需氨基酸占氨基酸总量39%以上, 必需氨基酸与非必需氨基酸的比值为0.71, 第一必需氨基酸赖氨酸含量达218mg/100g以上, 符合FAO/WHO提出的参考模式, 而且其还含有普通市售酸奶所不具有的色氨酸, 这充分说明所开发的甜玉米酸奶在质量上符合营养要求。

3 产品质量指标

3.1 感官指标

色泽: 乳白色中略带浅黄色、有光泽且色泽均匀一致;

组织状况: 凝块均匀细腻、无分层无气泡、有少量乳清析出;

口感: 细腻爽口, 酸甜适口, 滑润稠厚, 无异味;

风味: 具有浓郁的纯乳酸发酵的奶香味, 并伴有淡淡的甜玉米清香。

3.2 理化指标

总固形物: 12%~14%, 蔗糖: 5%~6%, 酸度 85~110 °T, 蛋白质≥2.9%, 脂肪≥3.1%, 汞(以Hg计)≤0.01mg/kg, 铅(以Pb计)≤0.002mg/kg。

3.3 微生物指标:

乳酸菌 3.7×10^8 个/ml, 大肠菌群数≤80个/100ml, 致病菌未检出。

4 结 论

4.1 菌种的最佳组合为n(Lb):n(St):n(Bb)=1:2:1;

4.2 最佳发酵工艺条件: 脱脂乳中添加18%的甜玉米汁, 加糖6%, 接种量3%, 在42 °C条件下发酵5h;

4.3 最佳稳定剂为黄原胶:卡拉胶:单甘酯=0.2%:0.15%:0.01%;

4.4 本产品营养全面、风味清新独特, 易被人体消化吸收, 特别是氨基酸含量超过市售普通酸奶, 而且不含任何防腐剂、色素、香精等化学合成物质, 具有较高的市场推广价值。

参考文献:

- [1] 许本发, 李宏建, 柴进贞. 酸奶和乳酸菌饮料加工[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994.
- [2] 段善海, 缪铭. 胡萝卜酸奶的开发研究[J]. 食品工业科技, 2004, 25(6): 93-95.
- [3] 李次力, 缪铭, 王冰, 等. 甜玉米汉堡包的研制[J]. 食品工业科技, 2004, 25(7): 101-103.
- [4] 杨洁彬, 郭兴华, 张簏, 等. 乳酸菌-生物学基础及应用[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1996.
- [5] A Y Tamime, R K Robinson. 酸乳科学与技术[M]. 姜竹茂, 译. 北京: 中国农业出版社, 2003.