功能性开菲尔酸奶复合发酵剂的研制

刘慧¹,李平兰²,熊利霞¹,易欣欣¹,王翠霞¹

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

要:本文利用开菲尔粒中分离的乳球菌和乳杆菌采用混合发酵法研制开菲尔酸奶复合发酵剂。针对影响发酵 剂品质的三个因素,采用三因素三水平 L₉(3⁴)正交试验确定了功能性开菲尔酸奶复合发酵剂的最佳发酵条件: 球菌和 杆菌的接种比例为 2:1,接种量为 3%,发酵温度为 43℃。用此发酵剂制作成品酸奶,凝乳时间短,凝固结实, 口感细腻,甜酸度适中,有浓郁的酯香风味。

关键词: 开菲尔粒; 复合发酵剂; 酸奶

Preparation of Compound Starter of Functional Kefir Yogurt

LIU Hui¹, LI Ping-lan², XIONG Li-xia¹, YI Xin-xin¹, WANG Cui -xia¹ (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: In this paper, functional Kefir yogurt starter was produced by Lactococcus and Lactobacillus isolated from Kefir grains. The optimal fermentation conditions were determined by the three factors and two levels orthogonal experiments L₉(3⁴) . The optimal fermentation conditions were as follows: 2:1 of Cococus and Bacillus; 3% amount of inoculation; fermentation temperature 43°C. The Kefir yogurt products had excellent texture, smooth taste, moderate sweetness and acidities, dense alcohol and ester aroma, and short solidify time.

Key words: Kefir grains; compound culture; yogurt

文献标识码: A 中图分类号: TS252.54

文章编号: 1002-6630(2005)12-0139-05

开菲尔粒(Kefir Grains 缩写为 KG)是由数种乳酸菌与 酵母菌等微生物之间的共生作用而形成的特殊粒状结 构。其中大约有50%的成分是黏性多糖(由1:1比例的半 乳糖和葡萄糖),此外,还有大量的水和少量蛋白质、 脂肪和其它成分。人们直接将开菲尔粒添加到经加热灭 菌、冷却后的牛乳中,使之发酵而生成具有爽快酸味 和起泡性的酒精性保健饮料——开菲尔。

开菲尔对人体不仅具有较高的营养作用,而且其乳 酸菌、醋酸菌和酵母菌的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、过敏症、肥胖症等均有一定疗效。此外,有 文献报道开菲尔发酵乳中含有抑制癌细胞增殖的胞外多 糖和溶解癌细胞的四碳二羧酸,可降低癌症的发病率。 最近研究证实,该饮品具有较好的降血脂和降血糖功 效,其活菌对结核分枝杆菌、大肠杆菌、志贺氏菌、 沙门氏菌等病原菌均有强烈抑制作用,经常食用开菲尔

可在人体胃肠道中保持益生菌群的优势作用,减少肠道 疾病的发生,最终达到人体健康和长寿的目的。

由于传统开菲尔发酵剂的制备,一旦不使用开菲尔 粒就无法继续增殖、传代。即使采用增殖后的开菲尔 粒的滤液制备发酵剂,不仅连续传代时活力不稳定,而 且也易发生杂菌污染或因开菲尔粒共生菌群失衡,而使 开菲尔的风味等品质性能下降,从而使传统开菲尔饮品 难以实现工业化生产。因此,笔者从开菲尔粒中高通 量分离、筛选出发酵性能优良的乳球菌和乳杆菌,并 将之组合制备纯培养复合发酵剂,以解决传统开菲尔酸 奶发酵剂的活力差,凝乳时间较长,以及开菲尔酸奶 品质不稳定等问题,这对功能性开菲尔酸奶在我国迅速 产业化具有十分重要意义与长远的应用前景。

材料与方法

实验材料 1.1

收稿日期: 2005-09-15

基金项目: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。

开菲尔粒 来自我国吉林省白城市普通家庭;菌种 KL1 乳酸杆菌、KS2 乳酸球菌、KS5 乳酸球菌、Tx 乳酸 球菌均从开菲尔粒中分离;蒙牛牌灭菌乳和白砂糖市售;0.1mol/L 氢氧化钠;0.005% 韧天青标准溶液;0.5% 酚酞由本室制备。

1.2 主要仪器设备

B1-220ASC 型生物显微镜 Motic 实业集团; BS224S 型电子天平(220g/0.1mg) 德国塞多利斯; 微处理器控制全自动高压灭菌锅 台湾; 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; ZDJ-3D 型全自动电位滴定仪 北京先驱威锋公司; DC-1020 高精度循环恒温水浴槽 宁波天恒公司; 冰箱 青岛海尔。

1.3 实验方法

1.3.1 菌种筛选

分离的乳酸菌菌种→镜检→活化→接种→保温培养 →发酵性能指标测定→根据测定结果筛选菌种

将分离菌种(KL1、KS2、KS5、Tx)按常规方法进行革兰氏染色镜检,用试管脱脂乳活化2~3代后,以3%接种量,37℃培养于灭菌脱脂乳中,测定菌种凝乳的酸度、黏度、凝乳时间,同时对发酵培养物进行感官品质评定,从中筛选活力较高的菌种制备发酵剂。

1.3.2 开菲尔酸奶复合发酵剂制备

1.3.2.1 工艺流程

原料奶→灭菌→冷却→接种发酵剂→保温培养→检测

1.3.2.2 操作要点

(1)原料乳的要求 原料乳应为新鲜优质乳,其酸度在18°T以下,杂菌数<5×10°CFU/ml,固体物>11.5%,其中非脂肪干物质>8.5%。且乳中要求无抗生素、防腐剂及其他有害物质。

(2)单一发酵剂的制备

将10ml 脱脂乳装入试管,经0.07MPa灭菌15min,冷却至30℃,分别接种上述筛选出来的优良菌种,适温下培养至乳凝固,再以2%接种量制作发酵剂,适温下培养至牛乳凝固,即为单一菌种发酵剂。

1.3.3 正交试验设计

将从开菲尔粒中筛选出来的优良菌种——乳酸球菌和 乳酸杆菌经活化、扩培,制成单一菌种的发酵剂。根据 接种比例、接种量、发酵温度进行三因素三水平 L₉(3⁴)正 交试验(见表 1),并对成品复合发酵剂进行活力测定(包括 乳凝固时间、韧天青还原试验、酸度测定),通过对试 验结果的极差分析和方差分析确定其最佳发酵工艺条件。

1.3.4 试验指标的测定方法

表 1 开菲尔酸奶复合发酵剂制备因素水平表

Table 1 Factors of preparation of compound starter of Kefir yogurt

水平	因素				
	球菌、杆菌比例	接种量(%)	发酵温度(℃)		
1	2:2	4	37		
2	2:1.5	3.5	40		
_ 3	2:1	3	43		

1.3.4.1 发酵剂凝乳时间的测定

一般以酸度达到 pH4.5 左右, 肉眼观察乳变粘稠, 呈凝胶状态, 即已达到发酵终点。记录培养至牛乳凝固的时间。

1.3.4.2 韧天青还原试验测定发酵剂的活力

韧天青加入正常乳中,乳呈青蓝色,如果牛乳中有发酵剂菌种,可使韧天青还原,由青蓝色→紫色→红色→无色。根据韧天青还原时间快慢判断发酵剂的活力。取 1ml 复合发酵剂加入 9ml 灭菌牛乳试管中,再加入韧天青标准溶液 1ml。同时作不加发酵剂的对照管。将试管置于 37℃水浴保温 30min 后开始观察。其后每5min 观察一次结果。淡粉红色为还原终点,以终点出现的时间作为评价发酵剂活力的指标。(注:在 35min 内还原韧天青的发酵剂的活力很强;在 50min 内还原韧天青的发酵剂活力较差,但可以使用;50~60min 还原韧天青的发酵剂活力很弱,不宜使用。)

1.3.4.3 发酵剂酸度的测定

采用 0.1 mol/L 氢氧化钠滴定法测定。以吉尔涅尔度(°T)为酸度单位。

1.3.5 验证试验设计与方法

根据正交试验最佳参数组合制作复合发酵剂,测定 发酵剂凝乳时间、活力和酸度,再以此发酵剂制作酸 奶,进行感官评定,以验证试验结果的正确性。

2 结果与讨论

2.1 菌种筛选试验

表 2 菌种筛选试验结果
Table 2 Results of strain screening

菌种名称	发酵剂酸度(°T)	凝乳时间(h)	组织状态ª	风味。
KL ₁	56.17	19	一般	一般
KS_2	54.85	6	一般	较好
KS ₅	53.64	9	不佳	差(有苦味)
Тx	54.46	8	较好	较好

注: a: 组织状态分为好、较好、一般、不佳、差五个标准,主要依据凝乳情况。

b: 风味分为好、较好、一般、较差、差五个标准。

筛选优良菌种是配制复合发酵剂的关键。菌种筛选 主要从以下三方面考虑:

表 3 开菲尔酸奶复合发酵剂三因素三水平 L₂(3⁴)正交试验结果
Table 3 Orthogonal experiments L₂(3⁴) of compound starter of functional Kefir yogurt

		-	<u></u>	素			指标	
试验	号	A 球菌、杆菌比例	B 接种量(%)	C 发酵温度(℃)	空列	凝乳时间(min)	韧天青还原时间(min)	发酵剂酸度 (°T)
1		1	1	1	1	436	60	53.58
2		1	2	2	2	344	55	55.20
3		1	3	3	3	289	50	55.90
4		2	1	2	3	342	55	54.82
5		2	2	3	1	292	51.67	55.32
6		2	3	1	2	429	56.67	53.71
7		3	1	3	2	290	48.33	57.17
8		3	2	1	3	427	55	55.37
9		3	3	2	1	335	50	54.56
凝	\mathbf{K}_1	1069	1068	1292	1063			
固	K_2	1063	1063	1021	1063	$D_a > D_a > D_b$		
时	\mathbf{K}_3	1052	1053	871	1058	Rc > Ra > Rb		•
间	R	5.6	5	137.7	1.6			
还	Kı'	165	163.33	171.67	161.67			
预 工原	K2'	163.34	161.67	160	160	Dia > Dia > Dib		
大时	K_3	153.33	156.67	150	160	R'c > R'a > R'b		
韧天青还原时间	R'	11.67	6.66	21.67	1.67	•		
us.	Kı"	164.68	165.57	162.66	163.46			
发 教 酵	K2"	163.85	165.89	164.58	166.08	$D''_0 \sim D''_0 \sim D''_b$		
^刑 度	K3"	167.1	164.17	168.39	166.09	R"c > R"a > R"b		
呼	R"	3.25	1.72	5.73	2.63			

注: 表中数据均为 n=3 之测定平均值。

- 2.1.1 产酸力:由于乳酸菌在乳中发酵乳糖产生乳酸,导致乳的pH值下降,使乳酪蛋白在等电点附近处形成沉淀凝聚物。判断此因素的标准为以3%的接种量将乳酸菌接种至灭菌乳中,置于37℃保温发酵,发酵6~8h凝固,pH值达到4.4~4.7为佳^[5]。
- 2.1.2 产香性:酸乳中主要风味物质有双乙酰、乙醛等。前者可使发酵乳制品具有坚果仁的香气和风味^[6],后者是一种芳香性物质,只有酸度达到一定程度时才开始形成(即冷藏后熟阶段形成)。虽然他们含量极少,但在保持发酵乳制品风味平衡方面有重要作用。因此所选择的菌种应有产生以上香气能力。
- 2.1.3 产粘性:菌种在发酵过程中产生的粘性物质——胞外多糖,可提高发酵乳凝固的稳定性,使发酵乳具有良好的组织状态。

由表3可知,本试验的四个目标菌种中,KL1的酸度较其他三种菌要高,但组织状态、风味一般,产酸慢,凝乳时间较长; KS2可以提供较佳的风味,且产酸较快,凝乳时间最短; Tx可以提供优良的组织状态,风味较好,且凝乳时间较短。KS5凝乳时间次之,凝固组织状态不佳,且有类似于青霉素的苦味。综合考虑上述菌种的优缺点,本试验筛选菌种为 KL1、KS2、Tx。他们分别为复合发酵剂提供较高的酸度,较佳的风味及优良的组织状态。

2.2 开菲尔酸奶复合发酵剂制备

表 4 凝乳时间方差分析
Table 4 Variance analysis of the solidify time

变异来源	SS	ďf	MS	F	F a (0.01)
接种比例	496	2	24.8	9.018	F _{0.01(2,2)} =99
接种量	38.9	2	19.45	7.073	
发酵温度	30353.6	2	15176.8	5515.564**	
误差	5.5	2	2.75		
总变异	30447.6	8			

表 5 韧天青还原时间方差分析

Table 5 Variance analysis of resazurin natriumsalz reduction time test

变异来源	SS	ďf	MS	F	Fa
接种比例	26.592	2	13.296	43.03*	$F_{0.05(2,2)}=19$
接种量	8.012	2	4.006	12.96	$F_{0.01(2,2)}=99$
发酵温度	78.42	2	38.21	123.66**	
误差	0.618	2	0.309		
总变异	113.642	8			:

表 6 发酵剂酸度方差分析

Table 6 Variance analysis of acidities of starter

变异来源	SS	ďf	MS	F	F a (0.05)
接种比例	1.90	2	0.95	1.24	$F_{0.05(2,2)}=19$
接种量	0.56	2	0.28	< 1	
发酵温度	5.67	2	2.844	3.72	
误差	1.53	2	0.76		
总变异	9.69	8			

开菲尔酸奶复合发酵剂发酵性能的优劣主要受球杆菌比例、接种量及发酵温度三个因素的影响。根据 R 值大小可以直观分析出各试验因素的主次顺序,再利用方差分析法进行检验。

由表 3 可知,若以开菲尔酸奶复合发酵剂的凝乳时间为指标,则 Rc > Ra > Rb,即发酵温度是影响复合发酵剂凝乳时间的最主要因素,接种比例次之,接种量相对影响较小。又由表 4 凝乳时间方差分析可知,发酵温度之间 F=5515.564 > Fo.01(2,2)=99,其差异对产品的影响高度显著;发酵剂接种比例的差异对产品的影响不显著;而发酵剂接种量的差异对产品凝乳时间的影响更小。

由表 3 可知,若以开菲尔酸奶复合发酵剂的活力为指标,则 R'c > R'a > R'b,即发酵温度是影响复合发酵剂活力的最主要因素,接种比例次之,接种量相对影响较小。又由表 5 韧天青还原时间方差分析可知,发酵温度之间 F=123.66 > Fo.01(2,2)=99,其差异对产品的影响高度显著;发酵剂接种比例之间 F=40.03 > Fo.05(2,2)=19,其差异对产品影响显著;而发酵剂接种量的差异对发酵剂的活力影响不显著。

由表 3 可知,若以开菲尔酸奶复合发酵剂的酸度为指标,则 R"c > R"a > R"b,即发酵温度是影响复合发酵剂凝乳时间的最主要因素,接种比例次之,接种量相对影响较小。又由表 6 发酵剂酸度方差分析可知,发酵温度、接种比例、接种量之间对发酵剂影响均不显著。但相对来说,发酵温度为主要因素,接种比例次之,接种量对发酵剂无影响。

综上所述,发酵温度是影响开菲尔酸奶复合发酵剂 性能的主要因素,接种比例次之,接种量相对影响较小。

2.2.1 接种比例对开菲尔酸奶发酵剂品质的影响

2.2.2 接种量对开菲尔酸奶复合发酵剂品质的影响

接种量影响三种乳酸菌的共生关系。如果接种量适当将引起菌种共生关系失衡,导致凝乳时间延长。由表3中 K_{B3} < K_{B2} < K_{B1}, K'_{B3} < K'_{B2} < K'_{B1} 及 K''_{B2} > K''_{B1} < K''_{B3} 以发酵剂凝乳时间、韧天青还原时间指标分析可知,最佳水平为 B₃;以发酵剂酸度指标分析可知,最

佳水平为B₂。但由于考虑若加大接种量,发酵剂的凝乳时间并没有因此而缩短,反而降低了其发酵性能,故选择B₃为最佳水平,即最佳接种量为3%。

2.2.3 发酵温度对开菲尔酸奶复合发酵剂品质的影响

发酵温度影响复合发酵剂的发酵性能。当发酵温度低于正常温度时,乳酸球菌的生长占优势,酸奶中 L(+)乳酸的量比较多,不仅使发酵剂的酸度较低,而且因菌种共生关系失衡,导致凝乳时间延长。如果发酵温度高于正常温度,则乳酸杆菌占优势,此时酸奶中 D(-)乳酸的量就多,不仅使发酵剂尖酸而涩,而且亦因菌种共生关系失衡,导致凝乳时间延长。由表 3 中 Kc3 < Kc2 < Kc1, K'c3 < K'c2 < K'c1 及 K"c3 > K"c2 > K"c1 可知,以发酵剂凝乳时间、韧天青还原时间及发酵剂酸度指标分析可知,最佳水平为 C3,即最佳发酵温度为43℃。

综上所述,开菲尔酸奶复合发酵剂制备条件最佳水平研究试验,主要是从凝乳时间、韧天青还原时间和发酵剂酸度指标综合考虑。经以上分析得知,确定开菲尔酸奶复合发酵剂最佳工艺条件为 A₃B₃C₃,即发酵剂球菌、杆菌接种比例为 2:1,发酵剂接种量为 3%,发酵温度为 43℃。

2.3 验证试验结果分析

2.3.1 最佳组合发酵剂测评结果

表 7 最佳开菲尔酸奶复合发酵剂测评指标

Table 7 Sesults of characteristics of optimal compound starter

复合发酵剂性能	发酵剂凝固时间	发酵剂活力	发酵剂酸度 (°T)	
及百及解刑性化 	(min)	(min)		
X	27	41.67	57.67	

注:表中数据均为 n=3 之测定平均值。

由表 7 可知,根据正交试验分析出的最佳参数得到的复合发酵剂各项指标均有所提高,效果理想。并且由表 2 可知,三种单一菌种在制作纯发酵剂时凝乳时间长且酸度较低。但由表 7 可知,经过最佳复合发酵剂制备的条件进行复合后,发酵剂的凝乳时间缩短显著(KLi缩短 866min、KS₂、缩短 86min、Tx 缩短 206min),且其酸度也有所提高,这就说明对开菲尔粒进行高通量的筛选后,得到的此三种菌有着共生关系。

2.3.2 酸奶产品的感官评定结果

由表8可知,用最佳开菲尔酸奶复合发酵剂制作酸

表 8 成品酸奶感官评价
Table 8 Results of sensory evaluation of the finial yogurt

序号	组织状态	色泽	口感	风味	乳清析出情况
1	结实	乳白色	细腻滑爽	尚可	很少
2	较结实	乳白色	细腻	脂香味	很少
3	结实	乳白色	细腻滑爽	酯香味	无

奶产品,各项感官指标均较理想,且凝乳时间较短,为3~4h左右。说明复合发酵剂的配比较理想。

3 结论

- 3.1 开菲尔酸奶复合发酵剂选取从开菲尔粒中分离的三种菌进行复配,分别为一种乳酸杆菌 KL1 及两种乳酸球菌 KS2、Tx。
- 3.2 发酵温度是影响复合发酵剂品质的最主要因素, 发酵剂接种比例次之,发酵剂接种量影响最小。
- 3.3 本试验采用三因素三水平 L₉(3⁴)正交设计,经极差分析和方差分析确定开菲尔酸奶复合发酵剂的制作条件最佳组合为 A₃B₃C₃,即发酵剂球菌、杆菌接种比例为2:1,发酵剂接种量为 3%,发酵温度为 43℃。
- 3.4 以最佳组合参复合的发酵剂凝乳时间短,活力高,说明进行复合的三种菌存在一定的共生关系。用此发酵剂制作成品酸奶,凝乳时间短,组织凝固状态结实,风味较好且口感细腻,酸度适中。

参考文献:

- [1] 周传云, 聂明, 万佳荣, 等. 古老而新型的发酵奶一开菲尔[J]. 食品与机械, 2003, (5): 46-47.
- [2] 周光宏, 张兰威, 李洪军, 等. 畜产食品加工学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2002. 270-271, 329-333.
- [3] 刘慧, 李铁晶. 新编食品微生物学试验指导[M]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2000. 58-59.
- [4] 许本法, 李宏建, 柴金贞. 酸奶和乳酸菌饮料加工[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994. 15-16.
- [5] 刘慧, 谭峰, 等. 功能性开菲尔酸奶最佳发酵条件的研究 [J]. 食品工业, 2003, (1): 26-27,
- [6] 刘慧, 张秀玲. 引进直投型酸奶发酵剂菌种的分离及其复合发酵性能的研究[J]. 食品科学, 2002, 66-68.
- [7] Anonymous. Kefir yogurt[J]. Chicago: Dairy, 1998, 11-15.
- [8] Koroleva N S. Starter for fermented milk. Section 4 Kefir and kumys starters[J]. International Dairy Federation Bulletin, 1998, 35-40.
- [9] James M Jay. Modern food microbiology[M]. An Aspen Publication, 2000. 1-5.

信息

目本冊发生产冷冻虾脱兔改良剂

日本阿尔斯公司最近生产开发出一种名为"奴美利格林"的系列产品,该产品是一种物理性状改良制剂,用于去除脱壳虾身上的"外围假衣皮"。使用该制剂以后,用流动水洗涤或其它除去脱壳虾"外围假衣皮"的作业就可以省去,因此可以缩短作业过程。该制剂的配比可以根据客户的需要相应调整。

冷冻脱壳虾在解冻加工时,为了提高成品出品率和产品显色的要求,大多需要使用碱性制剂处理。在碱性环境条件下,由于蛋白质溶解,很容易在脱壳虾的周身布满一层"假的衣皮",为此需使用流动水去除这层假性外衣。现在,使用物理性状改良剂"奴美利格林"0.2%~0.5%水溶液浸渍2~10秒钟,就可以免除流动水清洗,节约时间和大量水。其次,由于避免了洗净作业引起的氨基酸等鲜味成分的流失,脱壳虾的品质得到了提高。

改良剂的组成成分为:有机酸及其盐类、糖类、糊精和食盐等,还可以根据不同用途要求配加维生素类和氨基酸类等成分。用过该制剂的产品可以在商标的食品添加剂栏目内用文字"pH调整剂"表示,配加维生素 C的调整剂可用"抗氧化剂(维生素 C)、pH调整剂"表示。

英国科学家发明食品添加剂 让牛放香尾增环保

动物因消化不良从体内排出的气体不仅臭不可闻,而且成为全球变暖的罪魁祸首之一。为此,英国科学家特别于近日攻克了动物臭气难题,发明了一种食品添加剂,可以使牛排放的气体闻起来有玫瑰的香味。当然,这是在最理想的状态下。

不过,这项耗资颇大的动物排放香屁的研究被很多人嗤之以鼻。大多数人认为造成温室效应的气体那么多,有必要花这样的力气去治疗动物的消化不良问题吗?