

# 功能性开菲尔牛奶酒最佳发酵条件的研究

刘 慧<sup>1</sup>, 李平兰<sup>2</sup>, 王少君<sup>1</sup>, 赵金红<sup>1</sup>

(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)

**摘 要:** 本文利用开菲尔粒中分离的酵母菌和乳球菌采用两步发酵法研制开菲尔牛奶酒。针对影响牛奶酒制品最终品质的三个因素, 采用三因素三水平  $L_9(3^4)$  正交试验确定了功能性开菲尔牛奶酒的最佳发酵条件。成品开菲尔牛奶酒口感细腻、酸度适中, 风味柔和, 有浓郁的醇香和酯香味。

**关键词:** 开菲尔粒; 牛奶酒; 发酵

## Optimization of the Fermentation Conditions of the Functional Kefir Fermented Milk Koumiss

LIU Hui<sup>1</sup>, LI Ping-lan<sup>2</sup>, WANG Shao-jun<sup>1</sup>, ZHAO Jin-hong<sup>1</sup>

(1.College of Food Science, Beijing Agricultural College, Beijing 102206 2.College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

**Abstract:** In this paper, fermented milk koumiss was produced through two step fermentation, using lactococcus and yeasts which are separated from Kefir grains. For three factors which affect quality of fermented milk koumiss ultimately, the optimal fermentation conditions of Kefir fermented milk koumiss are determined by using orthogonal experiments  $L_9(3^4)$ . Final products are as follow: smooth taste, mild acidity, gentle flavor, denseness alcohol and ester aroma.

**Key words:** Kefir grains; fermented milk koumiss; fermentation

中图分类号 TS218

文献标识码 A

文章编号 1002-6630(2004)10-0126-04

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。由于开菲尔粒中乳酸菌和醋酸菌的代谢作用, 使开菲尔饮品不仅富含蛋白质、L(+) 乳酸和 B 族维生素等营养物质, 而且其代谢活性物质和抗菌物质对胃肠道疾病, 代谢异常疾病, 高血压、贫血、心脏病、过敏症、肥胖症等均有一定的疗效。据报道, 开菲尔粒中的活菌对志贺氏菌, 沙门氏菌等病原菌均有强烈的抑制作用, 经常食用开菲尔制品可在人体胃肠道中保持有益菌群的优势作用。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。最近研究证实, 开菲尔饮品还具有较好的降血脂和降血糖的功效。因此, 大规模开发功能性 Kefir 饮品具有极好的市场前景。

牛奶酒是一种古老的乳酸——酒精发酵乳饮料, 它不仅具有营养和生理保健功效, 而且由于产生的二氧化碳、乙醇和芳香性物质使其具有风味独特的特点。传统牛奶酒生产是以牛乳为原料, 添加上次制备好的牛奶酒作为发酵剂进行自然发酵, 其主要微生物菌群是酵母

菌和乳酸菌。本文以牛乳为主要原料, 利用笔者从开菲尔粒中分离的两株发酵乳糖能力强的酵母菌和一株乳球菌制备生产发酵剂, 模仿开菲尔粒的菌群和发酵特性, 采用两步发酵法对开菲尔牛奶酒的最佳发酵工艺条件进行了初步研究, 为这一古老而新型的开菲尔发酵饮品, 由民间流传走向大规模商品化生产提供实践性指导意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种** K1 酵母菌、M<sub>3</sub> 酵母菌、S2 乳球菌均从开菲尔粒中分离。开菲尔粒来自我国吉林省白城市普通家庭。

**1.1.2 试剂** 蒙牛纯鲜牛奶 市售 白砂糖 市售 脱脂无糖奶粉 由北京三元食品有限公司提供。培养基 马铃薯乳糖培养基、YEPD 培养基(见参考文献 3)。

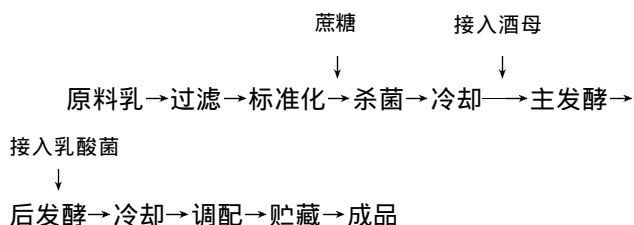
### 1.2 方法

#### 1.2.1 工艺流程

收稿日期: 2004-07-02

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。



## 1.2.2 操作要点

### 1.2.2.1 原料要求及处理

原料乳应为不含有抗生素或防腐剂的新鲜优质牛乳, 总干物质含量不低于11.5%, 脂肪含量 $\geq 3.3\%$ , 非脂肪干物质含量 $\geq 8.1\%$ , 蛋白质含量 $\geq 2.9\%$ 。原料乳杀菌条件是90~95℃杀菌10~15min。杀菌后冷却至30℃进行接种发酵。

砂糖要求洁白、干燥、有光泽, 甜味纯正, 不应有任何异味和结块现象。加糖方法是将蔗糖(加入量为6%)溶解于少量的温热原料乳中, 再经过滤与大量原料乳混合均匀即可。

### 1.2.2.2 单一菌种的活化及发酵剂的制备

将K1酵母菌、M<sub>3</sub>酵母菌、S2乳球菌分别培养制成单一菌种的发酵剂, 接种时按比例混合。

酒母制备流程: 斜面菌种→10ml牛乳→200ml原料乳→待发酵乳

表1 开菲尔牛奶酒发酵工艺条件试验因素水平表

水平	因素		
	A 后发酵温度(℃)	B 后发酵时间(h)	C 接种量(%)
1	20	36	4
2	23	54	6
3	26	72	8

将菌种于试管斜面(马铃薯乳糖培养基或YEPD培养基)上28℃培养24h, 而后取两环接种到10ml灭菌牛乳中, 28℃培养至大量气泡产生时(高泡期), 再以2%~3%的接种量移入200ml原料乳(115℃下灭菌15min)中, 28℃摇床振荡培养至菌数达到 $(6\sim 7) \times 10^7$ 个/ml时即为酒母。

乳球菌发酵剂的制备: 将S2乳球菌用蜗卷环接种于装有10ml灭菌牛乳试管中, 于35℃培养活化, 再以1%~2%接种量移入200ml牛乳中, 于30℃培养至牛乳凝固时即为乳酸菌发酵剂。

### 1.2.2.3 试验设计

本试验采用两步发酵法制备牛奶酒, 即先接种酒母于30℃进行有氧主发酵22~24h, 再接入乳酸菌于较低温条件下静置厌氧后发酵一定时间。在酵母菌K1和M<sub>3</sub>按1:1比例、乳球菌接种量为2%的前提下, 根据开菲尔牛奶酒的后发酵温度、后发酵时间和酒母接种量进行三因素三水平L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交试验(见表1), 并对成品牛奶酒

表2 开菲尔牛奶酒发酵工艺三因素三水平L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交试验结果

试验号	后发酵温度(℃)A	后发酵时间(h)B	接种量(%)C	误差	酒精度(%)	pH值	评定总分
1	1	1	1	1	2.850	5.33	31
2	1	2	2	2	2.940	5.30	37
3	1	3	3	3	3.293	5.24	36
4	2	1	2	3	2.795	5.32	45
5	2	2	3	1	2.968	5.24	46
6	2	3	1	2	3.118	5.13	41
7	3	1	3	2	2.970	5.25	38
8	3	2	1	3	3.175	5.07	35
9	3	3	2	1	3.378	4.75	30
酒精度	K <sub>1</sub>	9.083	8.615	9.143	9.196	R <sub>B</sub> > R <sub>A</sub> > R <sub>C</sub>	
	K <sub>2</sub>	8.881	9.083	9.113	9.028		
	K <sub>3</sub>	8.881	9.789	9.231	9.263		
	R	0.642	1.174	0.118	0.235		
pH值	K' <sub>1</sub>	15.87	15.90	15.53	15.32	R' <sub>A</sub> > R' <sub>B</sub> > R' <sub>C</sub>	
	K' <sub>2</sub>	15.69	15.61	15.37	15.68		
	K' <sub>3</sub>	15.07	15.12	15.73	15.63		
	R'	0.80	0.78	0.36	0.36		
评定总分	K'' <sub>1</sub>	104	114	107	107	R'' <sub>A</sub> > R'' <sub>C</sub> > R'' <sub>B</sub>	
	K'' <sub>2</sub>	132	118	112	116		
	K'' <sub>3</sub>	103	107	120	116		
	R''	29	11	13	9		

注: 表中数据为n=3测定之平均值

进行酒精度、pH 值的测定与感官品质评定, 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 试验指标的测定

1.3.1 酒精度的测定 采用附温比重瓶法测定。测定次数为  $n=3$ 。

1.3.2 pH 值的测定 采用奥利龙 868 型(美国)pH 计测量, 测定次数为  $n=3$ 。

### 1.3.3 开菲尔牛奶酒感官评定

按国家标准 GB16321-1996, 对开菲尔牛奶酒的感官品质进行评定。

评定项目: 色泽 1~5 分; 滋味和气味(包括口感滑润、醇香、酯香、酸度情况, 以及有无涩味、苦味情况) 1~30 分; 组织状态 1~15。总分为 50 分。

## 2 结果与讨论

开菲尔牛奶酒的品质受后发酵温度、后发酵时间和接种量的影响。

由表 2 可知, 若以开菲尔牛奶酒的酒精度为指标, 则  $R_B > R_A > R_C$ , 即后发酵时间是影响开菲尔牛奶酒精度的最主要因素, 后发酵温度次之, 接种量在三者中影响最小。又由表 3 开菲尔牛奶酒酒精度方差分析可

知, 后发酵温度之间及后发酵时间之间的差异对产品的酒精度影响分别为极显著和较显著, 而接种量为不显著。

若以开菲尔牛奶酒的 pH 值作为指标, 则  $R'_A > R'_B > R'_C$ , 即后发酵温度是影响开菲尔牛奶酒 pH 值的最主要因素, 后发酵时间次之, 接种量相对影响较小。又由表 4 开菲尔牛奶酒 pH 值方差分析可知, 后发酵温度之间及后发酵时间之间的差异对产品 pH 值影响分别为较显著和显著, 而接种量为不显著。

若以开菲尔牛奶酒的感官评定总分为指标, 则  $R_A'' > R_B'' > R_C''$ , 即后发酵温度是影响开菲尔牛奶酒感官品质的最重要因素, 接种量次之, 后发酵时间相对影响较小。又由表 5 开菲尔牛奶酒感官评定方差分析可知, 后发酵温度之间的差异对开菲尔牛奶酒感官品质影响较显著, 而后发酵时间之间及接种量之间的差异对牛奶酒感官品质的影响均不显著。

综上所述, 后发酵温度是影响开菲尔牛奶酒品质的主要因素, 后发酵时间次之, 接种量相对影响最小。

### 2.1 后发酵温度对开菲尔牛奶酒品质的影响

本试验利用从开菲尔粒中分离的酵母菌和乳球菌采用两步发酵法制备牛奶酒, 即先接种酒母进行主发酵一段时间, 再接入乳酸菌在适当温度条件下进行后发酵一

表3 开菲尔牛奶酒酒精度方差分析

方差来源	平方和(SS)	自由度(df)	均方和(Ms)	F 值	F 临界值
后发酵温度 A	0.0718	2	0.359	11.61*	$F_{0.05}(2,4)=6.94$
后发酵时间 B	0.2329	2	0.165	37.87*	$F_{0.01}(2,4)=18.00$
接种量 C	0.0025	2			$F_{0.10}(2,4)=4.32$
	0.0123		4	0.0031	
误差 e	0.0098	2			
总和	0.3170	8			

表4 开菲尔牛奶酒pH值方差分析

方差来源	平方和(SS)	自由度(df)	均方和(Ms)	F 值	F 临界值
后发酵温度 A	0.11739	2	0.05870	4.991*	$F_{0.05}(2,4)=6.94$
后发酵时间 B	0.10362	2	0.05181	4.406*	$F_{0.01}(2,4)=18.00$
接种量 C	0.02169	2			$F_{0.10}(2,4)=4.32$
	0.04704		4	0.01176	
误差 e	0.02535	2			
总和	0.26805	8			

表5 开菲尔牛奶酒感官评定总分方差分析

方差来源	平方和(SS)	自由度(df)	均方和(Ms)	F 值	F 临界值
后发酵温度 A	180.67	2	90.34	10.04*	$F_{0.10}(2,2)=9.00$
后发酵时间 B	20.67	2	10.34	1.15	$F_{0.05}(2,2)=19.00$
接种量 C	28.67	2	14.34	1.59	
误差 e	18.00	2	9.00		
总和	248.1	8			

定时间。发酵温度直接影响生产菌种的繁殖速度、代谢活力和代谢途径,从而影响发酵最终产物的生成,继而影响产品的风味品质的优劣。若后发酵温度较高,虽然高温可促进乳球菌繁殖(笔者对S2乳球菌进行了发酵性能试验,其最佳发酵温度为37℃),代谢旺盛,使之发酵乳糖产生乳酸能力增强,但产酸过快容易导致乳清析出,同时高温后发酵容易出现酵母菌衰老及菌体自溶现象,从而导致产品苦味增加,使产品风味变劣。此外,较高温度的后发酵不利于产品口味柔和与风味物质的产生。若发酵温度较低,虽然低温有利于酵母菌生长,使之发酵糖类产生乙醇能力增强,但在低温条件下乳球菌生长缓慢,产酸能力降低,导致产品酸味不足,从而影响产品的风味品质。由表2中 $K_{A3} > K_{A1} > K_{A2}$ 可知, $A_3$ 水平产酒精度较高,而 $A_2$ 水平较差;又由 $K'_{A3} < K'_{A2} < K'_{A1}$ 可知, $A_3$ 水平产酸最好, $A_1$ 水平最差;由 $K''_{A2} > K''_{A1} > K''_{A3}$ 可知, $A_2$ 水平最佳, $A_3$ 水平最差。综合上述各指标的K值分析,确定 $A_2$ 或 $A_3$ 为最佳水平。但考虑低温后发酵有利于产品风味物质的产生,可以提高产品的风味品质,根据感官评定结果综合考虑最终选 $A_2$ 为最佳水平,即确定开菲尔牛奶酒的最佳发酵温度为23℃。

## 2.2 后发酵时间对开菲尔牛奶酒品质的影响

后发酵时间对开菲尔牛奶酒的品质影响显著。在主发酵阶段酵母菌先利用糖类产生乙醇,而在后发酵阶段乳球菌利用乳糖产生乳酸,乳酸与乙醇作用生成乳酸乙酯,使牛乳酒香气浓郁;同时,乳球菌产生的乳酸使发酵液的pH值降低至5左右,又促进了酵母菌的生长繁殖。若后发酵时间较短,则乳酸菌产生乳酸量不足而导致产品酸度降低;如果发酵时间过长,虽然在一定程度上提高了产品的酒精度和酸度,但是高浓度的酒精不仅抑制了乳酸菌的繁殖,而且后期容易导致酵母菌衰老和菌体自溶,从而使产品苦味增加,适口性变差。由表2中 $K_{B3} > K_{B2} > K_{B1}$ , $K'_{B3} < K'_{B2} < K'_{B1}$ 和 $K''_{B2} > K''_{B1} > K''_{B3}$ 可知, $B_2$ 或 $B_3$ 水平较好。但考虑后发酵时间过长易导致产品感官品质变劣,根据感官评定结果综合考虑最终选 $B_2$ 为最佳水平,即确定开菲尔牛奶酒的最佳后发酵时间为54h。

## 2.3 发酵接种量对开菲尔牛奶酒品质的影响

接种量对开菲尔牛奶酒的品质有一定影响。若接种

量太少,则菌种增长缓慢,发酵时间延长。如果接种量太多,在主发酵阶段使酵母菌生长过快、过密,会因过多地利用糖类而导致后发酵阶段乳球菌产生乳酸量不足,同时,较多的接种量又会导致大量的酵母菌早衰和菌体自溶现象,产生苦味和酵母臭味,从而影响产品风味品质。由表2中 $K_{C3} > K_{C1} > K_{C2}$ , $K'_{C2} < K'_{C1} < K'_{C3}$ 和 $K''_{C3} < K''_{C2} < K''_{C1}$ 可知, $C_2$ 或 $C_3$ 水平较好,根据感官评定结果综合考虑最终选 $C_3$ 为最佳水平,即确定开菲尔牛奶酒的最佳酒母接种量为8%。

综上所述,确定开菲尔牛奶酒的最佳发酵工艺条件组合为 $A_2B_2C_3$ ,即后发酵温度为23℃,后发酵时间为54h,接种量8%。

## 3 结 论

3.1 后发酵温度是影响开菲尔牛奶酒品质的最主要因素,后发酵时间次之,接种量相对影响最小。

3.2 采用 $L_9(3^4)$ 三因素三水平正交设计,经过极差分析和方差分析,确定开菲尔牛奶酒发酵工艺主要技术参数最优先组合为 $A_2B_2C_3$ 。即后发酵温度为23℃,后发酵时间为54h,接种量为8%。

3.3 成品开菲尔牛奶酒组织状态均匀、细腻,呈乳浊液状,无沉淀或具有少量沉淀;口感滑润、细腻,刹口感强,具有产香酵母典型的发酵醇香和浓郁的酯香味,酒体醇厚,风味柔和,苦味和涩味不明显,酸度适中。

## 参考文献:

- [1] 刘慧,谭锋,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).
- [2] 刘慧,李平兰,等.功能性开菲尔酸马奶酒最佳发酵条件的研究[J].食品工业,2004,(1).
- [3] 刘慧,李铁晶.新编食品微生物实验指导[M].东北农业大学,2000.94-111.
- [4] 张列兵.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.
- [5] 张和平,等.利用开菲尔发酵剂制备牛乳酸马奶酒的研究[J].中国乳品工业,1996,24(4),16-18.
- [6] 金世琳.古老而新型的酒精性发酵乳饮料[J].中国乳品工业,1999,27(2):15-22.