

液芯微囊发酵剂连续接种稳定性分析

卢俭^{1,2}, 王英³, 周剑忠³, 李伟¹, 董明盛^{1,*}

(1.南京农业大学食品科技学院, 江苏 南京 210095; 2.南京卫岗乳业有限公司, 江苏 南京 210095;

3.江苏省农业科学院农产品加工研究所, 江苏 南京 210014)

摘要:为使液芯微胶囊作为酸奶发酵剂得到较好应用,对连续接种过程中的牛奶中菌体密度、发酵时间、胶囊强度和破损率、牛奶的稀释率以及发酵牛奶的感官评定进行研究。结果显示:随着连续接种时间的延长,牛奶中菌体密度、胶囊强度、稀释率和感官评定总分呈下降趋势,胶囊破损率提高,接种牛奶的发酵时间在延长。结合实际酸奶工业生产,液芯胶囊的连续接种使用期限为24d。

关键词:液芯微胶囊;连续接种;稳定性

Stability Analysis of Liquid-core Starter Microcapsules for Continuous Inoculation in Milk

LU Jian^{1,2}, WANG Ying³, ZHOU Jian-zhong³, LI Wei¹, DONG Ming-sheng^{1,*}

(1. College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Nanjing Weigang Dairy

Co. Ltd., Nanjing 210095, China; 3. Institute of Agro-product Processing, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences,

Nanjing 210014, China)

Abstract: In this study, we investigated the application of liquid-core starter microcapsules in yogurt. Cell density, fermentation time, the strength and rupture of liquid-core microcapsules, milk dilution and sensory evaluation of fermented milk were studied during continuous inoculation of milk. The results showed that as the continuous inoculation time was prolonged, cell density, the strength of liquid-core microcapsules, the dilution ratio of milk and sensory evaluation scores of ferment milk were decreased; the breakage rate of microcapsules was increased and the fermentation time of milk was prolonged. In industrial yogurt production, the continuous inoculation time of liquid-core microcapsules should be 24 days.

Key words: liquid-core microcapsules; continuous inoculation; stability

中图分类号: TS201.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)21-0154-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201321032

生物液芯微囊是指将辅酶、酶、蛋白质等大分子物质,或者微生物、动植物细胞包封在具有一层亲水性的半透膜内,所形成的球状液芯微囊。采用生物微囊化技术将发酵菌株包裹在球状的微囊内,通过连续培养,制备高密度的微囊化发酵剂,这种发酵剂细胞密度可超过 10^{10} CFU/g。从培养基中分离细胞无需经过超滤或冷冻离心,而用普通的离心或微过滤就可进行,因此大大降低了生产成本,更重要的是减轻离心对菌体的伤害。另外,细胞包裹后还可以防止氧对益生菌厌氧菌或兼性厌氧菌的损伤,防止噬菌体感染,起到发酵剂制备工艺过程对细胞的保护作用^[1-4]。将微囊化发酵剂装入特定的

生物反应器可进行连续接种,特别适合多菌种参与的发酵,如藏灵菇发酵奶、开菲尔的生产等。

Roy等^[5]以乳清渗透物为原料,利用海藻酸钙凝胶包埋固定化瑞士乳杆菌连续发酵生产乳酸,并对它的发酵动力学进行了研究。Prévost等^[6-8]利用钙凝胶包埋固定化唾液链球菌嗜热亚种和德氏乳杆菌保加利亚亚种进行连续接种并发酵生产酸奶,可以使发酵时间减少50%~60%,而且包囊菌在整个包囊过程以及以后的贮藏过程中能够保持很高的活性。荷兰乳品研究所与斯托克-阿姆斯特丹公司合作^[6]研制成第一台连续化生产酸奶的样机,经过预杀菌的牛乳在一个连续的流动中被发酵成酸

收稿日期: 2013-04-28

基金项目: 国家“863”计划项目(2011AA100903; 2013BAD18B01-4); 国家自然科学基金青年基金项目(31201422);

江苏省自然科学基金项目(BK2011651); 教育部博士点基金项目(新教师类)(20110097120028);

农业科技成果转化资金项目(2012GB23600639); 江苏高校优势学科建设工程项目(PAPD)

作者简介: 卢俭(1971—),男,高级工程师,博士研究生,研究方向为食品生物技术。E-mail: lu_j@wg dairy.com.cn

*通信作者: 董明盛(1961—),男,教授,博士,研究方向为食品微生物与生物技术。E-mail: dongms@njau.edu.cn

奶。苏伟等^[9]用海藻酸钠作为包埋剂,把含有德氏乳杆菌保加利亚亚种和唾液链球菌嗜热亚种的2种菌株发酵剂固定化包埋形成含菌胶珠,将其放入牛乳中进行发酵,制成酸度、风味达到发酵乳要求的酸奶,与传统方法相比,能降低材料消耗,减轻生产过程的劳动量,可回收重复使用,生产成本低等特点。施安辉^[10]通过对酸奶发酵的单菌种与双菌种固定化,研究了酸奶发酵最适pH值、发酵温度、发酵时间、固定化方式等,得出了利用固定化技术生产酸奶的最佳技术条件,与传统的间歇生产酸奶的工艺相比,具有简化菌种制备,菌种可以反复利用,发酵设备使用效率高、便于自动化控制等优点。

目前,我国大多数大型乳品加工企业采用国外进口的直投式酸奶发酵剂,其质量稳定、生产易行且菌体密度达到 10^{11} CFU/g,然而直投式发酵剂价格昂贵,生产成本低^[11-12]。因此小型和中型乳品加工企业生产酸奶时只能采用成本较低的传统继代式酸奶发酵剂,但由于在传代过程中的污染及各种菌种比例失衡等原因,因而易导致产品质量较差。液芯微囊发酵剂是一种完全有别于这两种发酵剂的一类新型发酵剂,既可用于牛奶直投式发酵,也可用于牛奶的连续接种,无需乳品企业扩培,简化了生产工艺,同时液芯微囊发酵剂的生产不需冷冻离心、冷冻干燥等高能耗处理,降低了生产成本,有着很强的市场竞争力^[13-14]。通过连续接种发酵剂,可以使牛奶中的营养物质逐步水解,并从微囊内流出,但乳酸菌被固定在微囊内继续发挥作用,每吨牛奶的发酵成本随着连续接种时间的延长而降低,因此连续接种发酵剂在使用过程中的稳定性对降低发酵奶的成本有重要的作用^[15-18]。本实验通过对连续接种牛奶中的乳酸菌细胞密度、胶囊强度和破损率、酸奶的发酵时间和稀释率等反映连续接种稳定性的因素进行研究,确定微胶囊接种发酵剂连续使用的最佳时间,为微胶囊发酵剂的工业化应用提供理论依据和技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌种

嗜热链球菌FM-108(*Streptococcus thermophilus* FM-108)和保加利亚乳杆菌(*Lactobacillus bulgaricus* FM-6),由江苏省农业科学院农产品加工研究所食品生物技术研究室保藏。

1.1.2 试剂与培养基

脱脂奶粉、乳清粉 荷兰DV营养公司;壳聚糖(食品级) 浙江金壳生物化学有限公司;食品级胶体(海藻酸钠、黄原胶) 河南恒泰实业有限公司;其他试剂均为国产分析纯。

MRS液体培养基^[8]:蛋白胨10.0g、牛肉膏10.0g、酵母膏5.0g、葡萄糖20.0g、吐温-80 1.0mL、无水乙酸钠5.0g、柠檬酸三铵2.0g、 K_2HPO_4 2.0g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.58g、 $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.25g,加蒸馏水至1000mL, pH 6.2~6.6。MRS固体培养基:液体培养基加入1.5%~2%琼脂。

用于*L. bulgaricus* FM-6培养的乳清增殖培养基(g/L):乳清粉97.15、大豆蛋白粉20、酵母粉7.55、 $CaCO_3$ 8.03、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3、 $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.02, pH 6.2~6.6。用于*S. thermophilus* FM-108的乳清增殖培养基(g/L):乳清粉103、大豆蛋白粉10、酵母粉6.8、碳酸钙7.2、硫酸镁0.3、硫酸锰0.02, pH 6.2~6.6。

1.2 方法

1.2.1 *S. thermophilus* FM-108、*L. bulgaricus* FM-6微囊制备

通过恒流泵提供的动力,使用平底针头,分别将*S. thermophilus* FM-108和*L. bulgaricus* FM-6的菌悬液与2.24g/L黄原胶和39.8g/L $CaCl_2$ 混合后逐滴加入连续搅拌的20g/L海藻酸钠溶液中,反应30min后使用适量的蒸馏水稀释海藻酸钠溶液,从稀释后的溶液中过滤出海藻酸钙液芯微胶囊,洗涤后转移到10g/L的 $CaCl_2$ 溶液中进行20min的硬化处理后,用蒸馏水洗掉表面残留的 $CaCl_2$,再将微胶囊放入预配好的3.19g/L的壳聚糖溶液中浸泡,浸泡38min后滤出微胶囊,再次使用蒸馏水进行冲洗,最后将制得*S. thermophilus* FM-108和*L. bulgaricus* FM-6微囊保存在配制好的生理盐水中备用。图1描述了液芯微胶囊的制备过程。

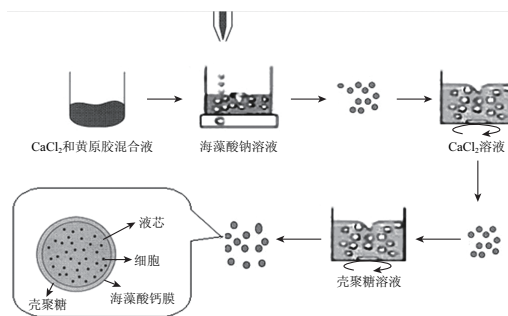


图1 液芯微囊制备流程

Fig.1 Flow chart of liquid-core microcapsule preparation

1.2.2 微囊化*S. thermophilus* FM-108和*L. bulgaricus* FM-6的增殖培养

参考文献^[8]报道的方法。将*S. thermophilus* FM-108、*L. bulgaricus* FM-6微囊加入装有灭菌乳清增殖培养基中,在pH6.5、37℃条件下,进行补料连续培养,每隔10h,将容器中的培养基排出,在向其中补加新鲜灭菌乳清增殖培养基,共6次,增殖培养时间为60h。

1.2.3 牛奶连续接种

将经增殖培养的*S. thermophilus* FM-108、*L. bulgaricus*

FM-6胶囊分别装入无菌柱式生物反应器中,控制柱内牛奶的温度和pH值,用无菌接收装置收集两个反应器中流出的含菌牛奶,检测接种奶中*S. thermophilus* FM-108和*L. bulgaricus* FM-6细胞密度的总和,并将已接种牛奶置于44℃发酵,凝乳后取出,在4℃冷藏,记录发酵时间。同时记录稳定状态下补料泵的流量(V_f),并根据流量计算罐中牛奶的稀释率(D_f),其中 D_f 为 V_f 与无菌柱式生物反应器内胶囊有效体积的比值。

1.2.4 含菌奶中细胞计数

参照国家标准GB/T 16347—1996《乳酸菌饮料中乳酸菌的微生物学检验》方法。

1.2.5 液芯微胶囊机械强度的测定

采用正面按压法测量。将胶囊放在电子天平上,用适当大小的砝码对其正面逐渐加压直至破裂,天平显示的压力发生由小变大,再突然变小的突变,记录此时承受的最大正面压力即该微胶囊的机械强度。每批微胶囊随机取20个,用破裂压力的平均值表征其机械强度^[14]。

1.2.6 感官评定^[17]

酸奶发酵后在4℃冷藏10h后由10名具有食品专业知识的人员对其进行滋气味、色泽及组织状态的感官评价,具体评分标准见表1。

表1 感官评定评分表
Table 1 Criteria for sensory evaluation of yogurt

指标	标准	分数
口感 (30分)	具有酸乳特有的细腻、润滑及稠厚感、爽口	25~30
	较细腻、润滑、稠厚感不强或稀薄	15~24
	较为粗糙,有砂粒状或沙状口感,或如饮水状	<15
滋味和气味 (40分)	有发酵乳特有的滋气味、酸甜适口,风味协调	35~40
	风味较淡、酸甜适口,勉强接受	20~34
	风味淡薄、气味不协调,不能接受	<20
组织状态 (30分)	凝乳均匀,无杂质,无或有少量乳清析出	25~30
	凝乳较均匀,有乳清析出	15~24
	凝乳不均匀,乳清严重析出	<15

1.3 统计分析

实验数据使用软件SAS 8.0的*t*检验进行显著性分析, $P<0.05$ 表示差异显著, $P<0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 连续接种时间对接种奶中乳酸菌细胞密度的影响

固定无菌柱式生物反应器中牛奶的稀释率,每隔3d检测接种奶中乳酸菌的细胞密度,结果如图2所示,随着连续接种时间的延长,接种牛奶中的细胞密度呈现下降趋势,但在连续接种前24d,细胞密度之间没有显著的差异($P>0.05$),24d时的菌体密度为 1.88×10^8 CFU/mL,但随着连续接种时间的延长,24d和27d菌体密度之间差异极显著($P<0.01$)。连续接种27d时菌体密度仅为 1.41×10^6 CFU/mL,在生产上已不能达到接种量的要求。

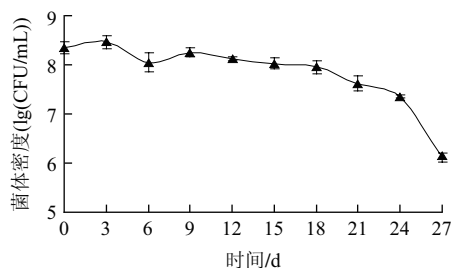


图2 连续接种时间对接种牛奶中菌体密度的影响

Fig.2 Effect of continuous inoculation time on cell density in milk

2.2 连续接种时间对酸奶凝乳时间的影响

固定无菌柱式生物反应器中牛奶的稀释率,每隔3d检测接种奶的发酵时间,结果如图3所示,随着连续接种时间的延长,接种牛奶发酵时间延长,在连续接种至24d时,发酵时间在6h之内,但27d时,牛奶发酵时间延长至7.5h,这是由于随着时间的延长,接种牛奶中的菌体密度下降,发酵时间就会随着增长。在生产上,发酵时间越长,能耗越大,生产成本越高。

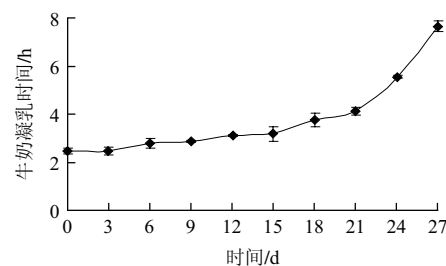


图3 连续接种时间对接种牛奶凝乳时间的影响

Fig.3 Effect of continuous inoculation time on milk fermentation time

2.3 连续接种时间对胶囊强度和破损率的影响

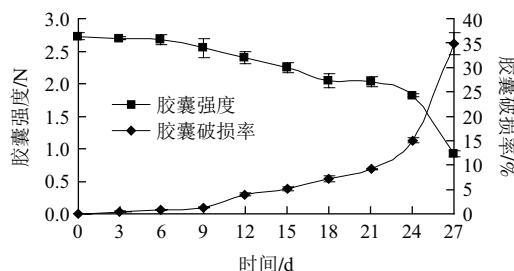


图4 连续接种时间对液芯胶囊强度和破损率的影响

Fig.4 Effect of continuous inoculation time on the strength and breakage rate of liquid-core microcapsules

在连续接种发酵过程中,液芯微胶囊需具有一定的机械强度,承受培养过程中所受的压力和剪切力,防止微胶囊膜的意外破裂而影响重复使用的次数和使用周期^[18-20]。固定无菌柱式生物反应器中牛奶的稀释率,每隔3d取胶囊样品进行强度和破损率的测定,观察胶囊强度和破损率的变化,结果如图4所示,随着连续接种时间的延长,

胶囊强度逐渐降低,连续接种至21d时,胶囊强度为2N;在0~24d内破损率缓慢增加,而当到27d时,胶囊强度急剧下降,仅为0.9N。胶囊的破损率则随着连续接种时间的延长在逐渐升高,在24d内,破损率缓慢增加,而24~27d时的破损率差异则极显著($P<0.01$)。

2.4 连续接种时间对牛奶稀释率的影响

固定接种牛奶的发酵时间为3h,每隔3d测定无菌柱式生物反应器中牛奶的稀释率,结果如图5所示,随着连续接种时间的延长,在0~18d时无菌柱式生物反应器中牛奶的稀释率呈整体缓慢下降趋势,从0d时的 $35.3h^{-1}$ 下降到18d时的 $30h^{-1}$,18d后牛奶的稀释率下降显著,到27d时稀释率为 $20.3h^{-1}$ 。

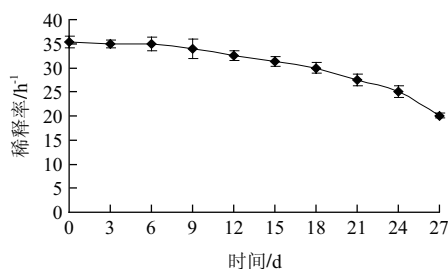


图5 连续接种时间对牛奶稀释率的影响

Fig.5 Effect of continuous inoculation time on the dilution ratio of milk

2.5 连续接种时间对酸奶感官品质的影响

固定无菌柱式生物反应器中牛奶的稀释率,每隔3d对发酵好的牛奶进行感官评定,结果如图6所示,随着连续接种的时间延长,感官评定总分有所下降,这是由于随着胶囊的连续使用,微胶囊内菌体活性下降,同时影响了*S. thermophilus* FM-108和*L. bulgaricus* FM-6的活菌数比例,二者的比例由0d时的1:1变为27d时的3.75:1,最终造成了发酵牛奶中风味物质的改变。并且随着胶囊连续使用时间的延长,胶囊的破损率也在增加,胶囊碎片的增多,也会影响酸奶的感官评定。

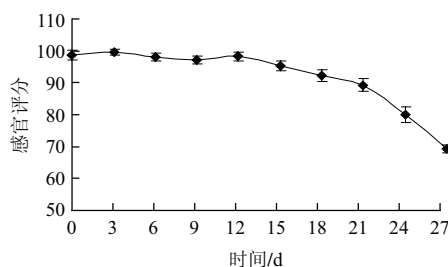


图6 连续接种时间对发酵奶的感官评定的影响

Fig.6 Effect of continuous inoculation time on sensory evaluation scores of fermented milk

3 结论

随着液芯胶囊发酵剂连续接种时间的延长,接种牛奶中菌体密度、胶囊强度、无菌柱式生物反应器中牛奶的稀释率、发酵牛奶的感官评定总分都呈逐渐下降趋势,接种牛奶的发酵时间和胶囊的破损率随着连续接种时间的延长呈延长趋势。结合酸奶实际工业生产,同时考虑生产成本和生产效率,确定液芯胶囊发酵剂连续接种使用时间为24d。

参考文献:

- [1] NAZZARO F, ORLANDO P, FRATIANNI F, et al. Microencapsulation in food science and biotechnology[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2012, 23(2): 182-186.
- [2] 包永华, 董明盛. 液芯海藻酸钙包囊固定化技术[J]. 中国酿造, 2008(21): 14-17.
- [3] LIU Shanna, HAN Ye, ZHOU Zhijiang. Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods[J]. Food Research International, 2011, 44(3): 643-651.
- [4] DESAI K, PARK H. Recent development in microencapsulation of foods ingredients[J]. Drying Technology, 2005, 23(7): 1361-1394.
- [5] ROY D J, LEDUY A. Continuous production of lactic acid from whey permeate by free and calcium alginate entrapped *Lactobacillus helveticus*[J]. Journal of Dairy Science, 1987, 70: 506-513.
- [6] PRÉVOST H. Continuous yogurt production with *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in calcium alginate[J]. Biotechnology Letter, 2005, 7: 247-252.
- [7] PRÉVOST H, DIVIÈS C. Cream fermentations by a mixed culture of lactococci entrapped in two-layer calcium alginate gel beads[J]. Biotechnology Letter, 2012, 14: 583-588.
- [8] 王英, 周剑忠, 卢俭, 等. 微囊化乳酸菌高密度培养及释放特性的研究[J]. 江苏农业学报, 2011, 27(3): 658-662.
- [9] 苏伟, 朱秋劲, 陈廷昌, 等. 牛乳固定化菌发酵技术初探[J]. 山东农业生物学报, 2003, 22(5): 408-413.
- [10] 施安辉. 利用固定化细胞连续发酵生产酸牛乳[J]. 生物工程学报, 1995, 11(2): 203-204.
- [11] BURGAIN J, GAIANI C, LINDER M, et al. Encapsulation of probiotic living cells: from laboratory scale to industrial applications[J]. Journal of Food Engineering, 2011, 104(4): 467-483.
- [12] VO T, KASPER F, MIKOS A. Strategies for controlled delivery of growth factors and cells for bone regeneration[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2012, 64(12): 1292-309.
- [13] CHANDRAMOULI V, KAILASAPATHY K, PEIRIS P, et al. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric condition[J]. Journal of Microbiology Methods, 2004, 56(1): 27-35.
- [14] DEGIULIO B, ORLANDO P, BARBA G, et al. Use of alginate and cryo-protective sugars to improve the viability of lactic acid bacteria after freezing and freeze-drying[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2005, 21(5): 739-746.
- [15] 张兰威. 乳酸菌优良菌株的选育及直投式酸奶发酵剂的研制[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2002.
- [16] 周剑忠. 藏灵菇微生物分子生态分析及微囊化发酵剂的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2005.
- [17] 柴隼, 梅乐和, 林东强, 等. 中空海藻酸钙微胶囊的强度和扩散性能[J]. 浙江大学学报: 工学版, 2004, 38(3): 362-367.
- [18] KANMANI P, SATISH KUMAR R, YUVARAJ N, et al. Effect of cryopreservation and microencapsulation of lactic acid bacterium *Enterococcus faecium* MC13 for long-term storage[J]. Biochemical Engineering Journal, 2011, 58(15): 140-147.
- [19] ORTAKCI F, BROADBENT J, MCMANUS W, et al. Survival of microencapsulated probiotic *Lactobacillus paracasei* LBC-1e during manufacture of mozzarella cheese and simulated gastric digestion[J]. Journal of Dairy Science, 2012, 95(11): 6274-6281.
- [20] FAVARO-TRINDADE C, GROSSO C. Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile[J]. Journal of Microencapsule, 2002, 19(20): 485-494.