

文章编号:1673-1689(2009)04-0559-05

活性乳酸菌乳饮料高活菌数发酵工艺的优化

陈健凯¹, 潘裕添², 林洵¹, 黄小梅¹

(1. 漳州职业技术学院 食品与生物工程系, 福建 漳州 363000; 2. 漳州师范学院 生物科学与技术系, 福建 漳州 363000)

摘要: 探索了获取高活菌数的发酵乳饮料的发酵条件。以温度、营养、接种量为试验因素, 通过单因素试验和正交试验方法, 考察以上3因素在乳酸菌乳饮料发酵过程中对试验指标乳酸菌数影响的显著性。结果表明, 发酵温度对试验结果影响极显著($P < 0.01$), 营养浓度影响显著($P < 0.05$), 接种量影响不显著($P > 0.05$)。进一步的正交试验结果表明, 高活菌数的乳饮料的最优化发酵工艺组合为发酵温度 29 °C, 奶粉加入量(营养浓度)10 g/dL, 接种体积分数 5%。

关键词: 发酵乳饮料; 高活菌数; 发酵条件; 优化

中图分类号: 252.41

文献标识码: A

Optimized the Fermentation Conditions for Highly Active *Lactococcus* in Fermented Milk Beverage

CHEN Jian-kai¹, PAN Yu-tian², LIN Xun¹, HUANG Xiao-mei¹

(1. Department Faculty of Food and Bioengineering, Zhangzhou Institute of Technology, Zhangzhou 363000, China; 2. Department of Bioengineering, Zhangzhou Teachers College, Zhangzhou 363000, China)

Abstract: In this study, the environmental conditions (temperature, nutrition, inoculation volume) of highly active lactococcus in fermented milk beverage were studied by single factor experiment. It was found that temperature play key roles on the experiment result ($P < 0.01$), followed by the nutrition ($P < 0.05$), however, without any significant influence was observed on inoculation volume ($P > 0.05$). The optimum conditions for highly active lactococcus fermentation are 29 °C of fermentation temperature, 10 g/dL of nutrition, and 5% of inoculation volume.

Key words: fermented milk beverage, highly active *lactococcus*, fermentation condition, optimization

乳酸菌饮料是酸乳类的产品, 以新鲜牛奶或乳粉为原料, 经乳酸菌发酵加工制成的具有相应风味的活性乳酸菌乳饮料。乳酸菌乳饮料含有牛奶的营养, 具有酸乳的功能, 由于其乳糖大部分被降解,

适于有乳糖不耐受的消费者; 饮料中的乳酸菌对维持肠道内菌群平衡, 刺激肠道运动, 改善排便, 抑制有害菌增殖, 减少有害物质生成, 治疗肠道功能紊乱有较好的效果^[1]; 乳酸菌饮料不仅有营养、保健

收稿日期: 2008-08-23

基金项目: 福建省教育厅科研项目(JB06150)。

作者简介: 陈健凯(1969-), 女, 广东潮阳人, 副教授, 从事食品微生物学方面的研究。Email: cjk22@126.com

的功能,同时酸甜可口,更具有饮料的特点,增加了消费者选择的优势,深受广大消费者的喜爱,成为乳制品工业发展最快的产品之一。2006年全球的发酵乳饮料市场增长了9.3%,大大超过了其他乳制品的增长率。

活性乳酸菌饮料的口感风味和乳酸菌的数量是构成产品质量的主要因素。研究表明^[2],益生菌在人体中的存活和增殖能力对益生菌的益生作用有着重要影响,要获得所期望的益生菌的保健功效,益生菌必须达到足够数量。我国国家标准对乳酸菌乳饮料中的活菌数规定:乳酸菌数 $\geq 10^6$ 个/mL。日本发酵乳与乳酸菌饮料协会规定:乳中益生菌数至少为 10^7 个/mL,以确保进入人体后有足够的活菌发挥保健功能。然而,目前许多研究发现,进入货架上的产品中益生菌的数量,会由于自身的生长特性及周围环境因素的影响,呈一定的下降趋势。因此,要获得所期望的保健效果,必须提高食品中乳酸菌的数量,以确保乳酸菌通过消化道后仍大量存活,进入肠道后发挥益生作用。

作者对构成乳酸菌质量的风味和乳酸菌数量进行研究考察。经过大量试验表明,不同发酵条件下的乳酸菌乳饮料,发酵终点pH值范围一般在3.9~4.1,经后工序的调配之后,在风味上差别不大,所以作者重点考察乳酸菌数,通过合理试验设计,正确的试验方法,找出能获得最高乳酸菌数量的发酵工艺条件组合。

1 材料与amp;方法

1.1 原料与培养基

1.1.1 原料 雀巢脱脂奶粉(蛋白质质量分数 $\geq 32\%$),葡萄糖,白砂糖,所有原材料均为食用级市售。

1.1.2 培养基 MRS培养基和MRSA培养基。

1.1.3 菌种 干酪乳杆菌,从养乐多乳饮料中分离纯化。

1.2 仪器

立式压力蒸气灭菌器 YXQ-2S-50S11;上海博迅实业有限公司医疗设备厂制造;生化培养箱 SPX-250B;上海福玛实验设备有限公司制造;电热恒温水浴锅 HH.S11-6;上海跃进医疗器械厂制造;PHS-25型酸度计;冰柜 BDX-262;江苏白雪电气股份有限公司制造。

1.3 实验方法

1.3.1 菌种活化 乳酸菌饮料 \rightarrow 分离纯化 \rightarrow 斜面 \rightarrow 活化(37℃、48h) \rightarrow 15 mL 试管(液体牛奶培养万方数据

基于37℃至凝乳) \rightarrow 100 mL 锥形瓶(牛奶培养基37℃至凝乳) \rightarrow 250 mL 锥形瓶(牛奶培养基37℃至凝乳)

1.3.2 工艺流程 脱脂奶粉+水+蔗糖+葡萄糖 \rightarrow 溶解 \rightarrow 均质(25~30 MPa) \rightarrow 分装锥形瓶 \rightarrow 杀菌(115℃、15 min) \rightarrow 冷却(30℃) \rightarrow 接种 \rightarrow 发酵 \rightarrow 中止 \rightarrow 调配(加糖、无菌水调甜酸口感) \rightarrow 冰柜冷藏(5℃)。

1.3.3 操作要点

1) 国家标准对乳酸菌饮料中蛋白质质量分数的规定为,发酵乳饮料的蛋白质质量分数不得低于1%。本试验用的脱脂奶粉蛋白质 $\geq 32\%$,所以料水比,即发酵液的水与后期加入的调配水的总量与奶粉的比例为奶粉:水=10:300,发酵液中还加入蔗糖,葡萄糖,蔗糖:葡萄糖:奶粉=10:1:10,调配用蔗糖则根据实际口感加入。

2) 发酵时间控制,根据乳酸菌数量的曲线,呈下降时即中止发酵。

1.3.4 乳酸菌乳饮料发酵工艺条件的筛选 根据积累的试验经验,影响发酵型乳饮料乳酸菌数量的因素中,较显著的有温度、营养浓度(奶粉加入量)和接种体积分数。在单因素预试验中,确定发酵的基本参数为:发酵温度31℃,发酵液的营养质量浓度为10 g/dL(即每100 mL 发酵液中加入10 g 奶粉),接种体积分数5%。分别变动基本参数中的单一因素如温度、营养液质量浓度、接种量进行单因素试验考察。根据等比法确定4个水平,测定相应发酵条件下的乳酸菌总数,考察单因素变化对发酵型乳饮料乳酸菌数的影响。

1.3.5 发酵温度单因素试验 发酵温度分别取20、25、31、39℃,其它发酵条件为营养液质量浓度10 g/dL,接种体积分数5%。在以上的发酵条件下,每天测试乳酸菌数量,考察各温度对发酵乳饮料的乳酸菌数影响的显著性。

1.3.6 发酵液营养浓度单因素试验 发酵液营养质量浓度即奶粉的加入量,分别取:5、7、10、14 g/dL。其它发酵条件为:发酵温度31℃,接种体积分数5%。每天测试乳酸菌数量,考察营养质量浓度对发酵乳饮料的乳酸菌数影响的显著性。

1.3.7 接种体积分数单因素试验 接种体积分数分别取3%、5%、8%、14%,发酵温度31℃,营养液质量浓度10 g/dL。每天测乳酸菌数量,考察接种体积分数对发酵乳饮料的乳酸菌数的影响。

1.3.8 乳酸菌乳饮料发酵的正交试验 在单因素预试验基础上,以发酵温度、营养液质量浓度为考

察因素,采用二因素无重复交叉试验方法进行正交试验,实验设计见表 1。

表 1 正交试验因素水平设计

Tab. 1 Factors and levels of orthogonal experiment

温度 A/℃	发酵液营养质量浓度 B/(g/dL)		
	B ₁ (8)	B ₂ (10)	B ₃ (12)
A ₁ (27)	A ₁ B ₁	A ₁ B ₂	A ₁ B ₃
A ₂ (29)	A ₂ B ₁	A ₂ B ₂	A ₂ B ₃
A ₃ (31)	A ₃ B ₁	A ₃ B ₂	A ₃ B ₃
A ₄ (33)	A ₄ B ₁	A ₄ B ₂	A ₄ B ₃
A ₅ (35)	A ₅ B ₁	A ₅ B ₂	A ₅ B ₃

乳饮料发酵按表 1 的正交试验设计的 15 种发酵条件进行,接种体积分数均取 5%。每天测试 15 种条件下的乳酸菌菌落数,共测 7 d,以每种发酵条件下测得的 7 次乳酸菌落数的平均值为每种发酵条件测定的试验结果,结果中的乳酸菌落数取其对数值。

1.3.9 乳酸菌落数的测定方法 乳酸菌菌落总数的测定采用中华人民共和国国家标准《食品卫生微生物学检验》GB/T4789.35—2003 乳酸菌饮料中乳酸菌检验进行测定。在该试验中,乳酸菌落总数均取其对数值表示。

2 结果与讨论

2.1 发酵温度单因素试验

图 1 为不同温度对乳酸菌落数的影响。可以看出,不同的温度下测得的乳酸菌落数差别较大。为考察温度对乳酸菌数量的影响是否显著,对试验结果进行 SPSS11.5 单因素方差分析。方差分析的统计结果 $P(0.000) < 0.01$,反映温度这一因素对试验结果影响显著,不同的发酵温度下的乳酸菌数存在极显著差异,故进行新复极差的 Duncan 法进行多重两两比较,结果见表 2。

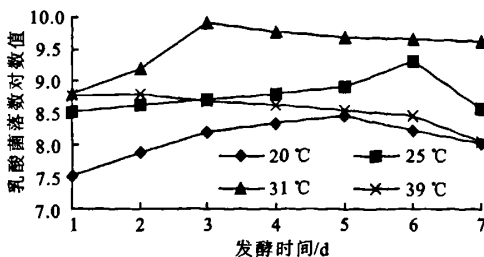


图 1 温度对乳酸菌数的影响

Fig. 1 Effect of temperatures on Lactococcus' volumns

表 2 不同温度间乳酸菌均数的多重比较

Tab. 2 Post hoc multiple comparisons for means of Lactococcus in different temperatures

发酵温度	显著水平=0.05			
	N	1	2	3
1	7	8.094 3		
4	7		8.565 7	
2	7		8.772 9	
3	7			9.520 0
Sig		1.000	0.224	1.000

注:以上各栏为乳酸菌数均值结果。N 为样本数。其中 1 为 20 °C,2 为 25 °C,3 为 31 °C,4 为 39 °C。

从每组均数值和组间差异显著性看,4 与 3,2 与 3 差异显著。1 水平即发酵温度取 20 °C 时,乳酸菌的均值为 8.094 3,为 4 个水平中乳酸菌数均值中最低的,说明发酵温度太低,不利于干酪乳杆菌的生长繁殖;4 水平(39 °C)的乳酸菌数的均值为 8.565 7,2 水平(25 °C)的乳酸菌数的均值为 8.772 9,3 水平(31 °C)的结果均值为 9.520 0,反映出在预试验中,最佳的发酵温度是 31 °C,25 °C 和 39 °C 对发酵结果并不理想。所以确定正交试验中温度因素的水平范围为 27~35 °C,分别取 27、29、31、33、35 °C。

2.2 营养液质量浓度单因素试验

图 2 为不同营养液质量浓度对乳酸菌落数的影响。可以看出,不同的营养液质量浓度,测得的乳酸菌落数有一定差别。经方差分析 $P(0.010) < 0.05$,表明营养液质量浓度对试验结果影响显著。进一步进行 Duncan 法两两多重比较,结果见表 3。从每组均数值和组间差异显著性看,3 水平均数值最高,乳酸菌均数为 9.5200,2 水平次之,1 和 4 水平乳酸菌均数值较低。据组间差异性分析,营养液质量浓度取 1 水平(4 g/dL)和 4 水平(14 g/dL),试验结果均不理想,反映发酵液中牛奶体积分数过高或过低,均不利于乳酸菌的生长繁殖。方差分析结果表明,营养液质量浓度范围在 8~12 g/dL 之间,水平分别取 8、10、12 g/dL。

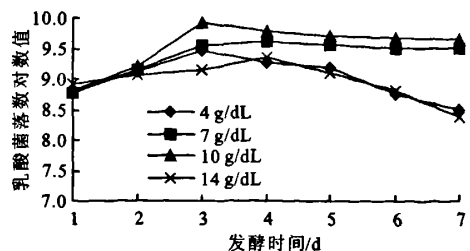


图 2 营养液质量浓度对乳酸菌数的影响

Fig. 2 Effect of nutritions on Lactococcus's volumns

表3 不同营养液质量浓度间乳酸菌均数的多重比较

Tab. 3 Post Hoc Multiple Comparisons for means of *Lactococcus* in different nutritions

营养液 质量浓度	N	显著水平=0.05		
		1	2	3
1	7	8.961 4		
4	7	9.008 6	9.008 6	
2	7		9.371 4	9.371 4
3	7			9.520 0
Sig		0.794	0.053	0.413

注:以上各栏为乳酸菌数均值结果。N为样本数。其中1为4 g/dL,2为7 g/dL,3为10 g/dL,4为14 g/dL。

2.3 接种体积分数单因素试验

图3为不同接种体积分数对乳酸菌落数的影响。可以看出,不同的接种量测得的乳酸菌落数差别不大。方差分析的统计结果见表4,P值(0.639) > 0.05,表明接种体积分数这一因素对试验结果的影响不显著。4种不同水平的接种体积分数的试验结果间不显著,因此在正交试验设计中,不把接种体积分数列为试验因素之一。

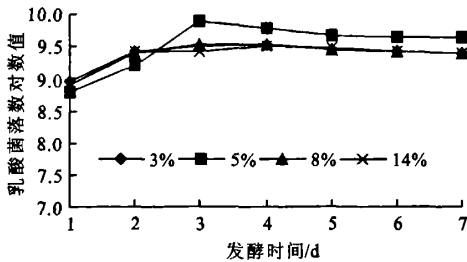


图3 接种体积分数对乳酸菌数的影响

Fig. 3 Effect of inoculation volumns on *Lactococcus*' volumns

表4 不同接种体积分数的乳酸菌均数的方差分析

Tab. 4 ANOVN for *Lactococcus* in different inoculation volumns

项目	平方和	df	均方 MS	F 值	P 值
组间差异	0.117	3	0.039	0.572	0.639
组内差异	1.640	24	0.068		
总差异	1.757	27			

2.4 发酵乳饮料高活菌数最佳工艺条件的确定

通过单因素预试验,对实验结果有较显著影响的因素主要有发酵温度和营养液质量浓度,接种体积分数的影响不显著,所以在正交试验中,考察的因素为发酵温度和营养质量浓度,其中发酵温度为重点考察因素,在水平上多取几个试验水平进行考万方数据

察,接种体积分数均取5%,结果见表5。

比较试验中A、B因素中R值,可以看出两因素对乳酸菌数的影响顺序为A>B,优化组合为A₂B₂,与实际试验中的较优组合一致。即欲获得高乳酸菌数的发酵乳饮料的最优化发酵工艺条件为发酵温度29℃,奶粉加入量(营养浓度)10 g/dL,接种体积分数5%,每毫升发酵液中能获得对数值为9.57的乳酸菌数。

表5 正交试验结果和极差分析

Tab. 5 Results of orthogonal experiment and ranges analyze

试验号	A (温度)	B(营养液 质量浓度)	乳酸菌数的 对数
1	1	1	9.25
2	1	2	9.26
3	1	3	9.38
4	2	1	9.49
5	2	2	9.57
6	2	3	9.52
7	3	1	9.48
8	3	2	9.52
9	3	3	9.47
10	4	1	9.30
11	4	2	9.31
12	4	3	9.23
13	5	1	9.16
14	5	2	9.06
15	5	3	9.05

K₁(平均) 9.30 9.33

K₂(平均) 9.53 9.34

K₃(平均) 9.49 9.33

K₄(平均) 9.28

K₅(平均) 9.09

R 0.44 0.01

优水平 A2 B2

3 结 语

通过单因素试验,对影响乳酸菌数的因素—发酵温度、营养液质量浓度、接种体积分数分别进行考察,通过方差分析和Duncans法两两比较,结果显示,温度对试验结果影响极显著,营养液质量浓度对试验结果影响显著,接种体积分数对试验结果影响不显著。所以在正交试验中,因素设计为发酵

温度和营养液质量浓度,其中温度为重点考察因素,设计时温度取了5个水平,营养液质量浓度取3个水平。

2)通过正交试验及结果极差分析,发酵高活菌数的乳酸菌乳饮料的最优化工艺组合为 A_2B_2 。与实际试验结果相符合。即获得高乳酸菌数的发酵乳饮料的最优化发酵工艺条件为:发酵温度 $29\text{ }^\circ\text{C}$,奶粉加入量(营养液质量浓度) 10 g/dL ,接种体积分数 5% ,每毫升发酵液中能获得对数值为 9.57 的乳酸菌数。

3)将优化工艺制得的乳酸菌乳饮料调配后放在 $5\text{ }^\circ\text{C}$ 冰柜中,在规定的货价保质期间(30 d)进行乳酸菌数测定。从超市上购买几种不同品牌、不同生产日期的乳酸菌乳饮料同时进行乳酸菌数测定。结果显示,在 $2\sim 10\text{ }^\circ\text{C}$ 下的货价保质期间,优化工

艺制得的乳酸菌乳饮料,在发酵结束后进行调配,乳酸菌数由 $9.57(3.7\times 10^9)$ 降为 6.3×10^8 ,到保质期后期乳酸菌数保持在 5×10^8 ,乳酸菌数只是在同一对数级内小幅下降;市售不同品牌的乳酸菌乳饮料,乳酸菌数变化规律大致相同,一般只是在同一对数级内小幅下降或下降一个对数值,在保质期后期乳酸菌数为 $(1\sim 8)\times 10^5\text{ cfu/个}$,有的甚至为 10^4 。

4)试验中所用的乳酸菌为干酪乳杆菌,通过试验,其最适的生长繁殖温度为 $29\text{ }^\circ\text{C}$ 。如果发酵使用的菌种不是干酪乳杆菌,如保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌等,则最适生长繁殖温度还有待试验确定。试验中所用脱脂奶粉的蛋白质质量分数为 $\geq 32\%$,蛋白质质量分数对奶粉在发酵液中的加入量有一定影响。

参考文献(References):

- [1] 杨汝德,陈琼.乳酸菌发酵制品研究的现状与发展[J].广州食品工业科技,2003,19(11):79-83.
Yang Ru-de,Chen Qiong. Progress in fermented goods of *Lactobacillus*[J]. *Science and Technology of Guangzhou Food Industry*, 2003,19(11):79-83.
- [2] 宋昆冈.乳酸菌乳饮料国内外发展趋势[J].食品工业科技,2005,7:11.
Song Kun-gan. Development tendency of fermented milk beverage at home and abroad[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2005,7:11.
- [3] 张明江,孟祥晨.提高食品中益生菌数量的两大新技术[J].现代食品科技,2006,21(4):90-92.
Zhang Ming-jiang, Meng Xiang-chen. Two new technologies of improving probiotics quantity of the food[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2006,21(4):90-92.
- [4] 梁永海.刺五加发酵乳饮料的生产工艺[J].食品与生物技术学报,2007,26(2):34-37.
LIANG Yong-hai. A research of main fermentation technology condition during the production of fruit wine from *Hazelnut* [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2007,26(2):34-37.
- [5] 肖小妮.活性乳酸菌饮料生产工艺技术研究[J].现代食品科技,2005,2:111.
Xiao Xiao-ni, Manufacture technics of drink of containing live lactobacillus[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2005,2:111.
- [6] 曹永梅.保护剂在冷冻干燥双歧杆菌中的作用[J].食品与发酵工业,2000,26(2):40-45.
CAO Yong-mei. Effect of cryoprotectant on freeze-dried bifidobacteria[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2000,26(2):40-45.
- [7] 郭本恒.乳制品微生物学[M].北京:中国轻工业出版社,2001:77.
- [8] 孔保华.乳品科学与技术[M].北京:科学出版社,2004:46.
- [9] 秦米迈 A Y,罗宾逊 R K.酸乳科学与技术[M].北京:中国农业出版社,2003:62-66.
- [10] 王福源.现代食品发酵技术[M].北京:中国轻工业出版社,2003:10.
- [11] 张水华.食品分析[M].北京:中国轻工业出版社,2004:83.
- [12] 贾英民.食品微生物学[M].北京:中国轻工业出版社,2006:176-185.
- [13] SHAH N P. Probiotic bacteria; selective enumeration and survival in dairy foods[J]. *Dairy Sci*, 2000,83:894-907.
- [14] 杜连祥.工业微生物学实验技术[M].天津:天津科学技术出版社,1992.
- [15] 何冬梅,朱海明.活性乳酸菌饮料对人体肠道菌群影响的研究[J].中国微生态学杂志,2006,18(6):454-456.
HE Dong-nei, ZHU Hai-ming. Influence of active *Lactobacillus* beverage on intestinal flora of human[J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2006,18(6):454-456.

(责任编辑:李春丽)