

芽菜酵母菌株的发酵条件优化研究

孙俊秀¹, 范文教^{1*}, 康建平², 谢文渊², 王郁³, 罗素琴³

(1. 四川旅游学院, 四川成都 610100;

2. 四川省食品发酵工业研究设计院, 四川成都 611130;

3. 四川宜宾碎米芽菜有限公司, 四川宜宾 644002)

摘要: 以前期筛选、驯化的宜宾芽菜酵母菌株GD9为研究对象, 在单因素实验的基础上, 采用Box-Behnken实验设计和响应面法对该菌株的发酵条件进行优化。结果表明, 芽菜酵母菌株GD9的最佳发酵条件为: 发酵培养时间22h、发酵温度26℃、发酵液pH3.7, 在此条件下OD₆₂₀可达2.05; 同时, 建立的响应面模型可准确预测不同响应条件下该菌株的生长表达量。

关键词: 芽菜, 酵母菌, 发酵, 优化

Optimization of fermentation condition for yeast strains of Yacai

SUN Jun-xiu¹, FAN Wen-jiao^{1*}, KANG Jian-pin², XIE Wen-yuan², WANG Yu³, LUO Su-qin³

(1. Sichuan Tourism University, Chengdu 610100, China;

2. Sichuan Academy of Food & Fermentation Industries, Chengdu 611130, China;

3. Sichuan Yibin suimi-yacai Co., Ltd., Yibin 644002, China)

Abstract: Yeast strains GD9 of Yacai which was obtained by screening and domestication used as objective strain in this study. Based on single factor experiment, the optimized fermentation condition for yeast strains GD9 of Yacai was studied by using Box-Behnken condition and response surface methodology. Result showed that the optimized fermentation condition for yeast strains GD9 of Yacai as follow: inoculation time 22h, fermentation temperature 26℃ and pH 3.7, and under this optimal condition, OD₆₂₀ of the GD9 strains reached 2.05. Furthermore, the established response surface model could accurately predict the different response conditions on OD₆₂₀ of the GD9 strains.

Key words: Yacai; yeast strains; fermentation; optimization

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2014)02-0183-04

宜宾芽菜以香、甜、嫩、鲜等独特风味而闻名特点, 与“涪陵榨菜”、“南充冬菜”、“内江大头菜”并称为四川四大腌菜^[1]。目前, 宜宾芽菜主要采用传统的固态发酵腌菜工艺, 即由叶用芥菜的叶柄为原料, 经划条、盐腌再经加红糖、腌渍等工艺加工而成^[2]。高盐高糖和发酵周期长是该工艺生产存在的两个主要问题。高盐高糖容易引发糖尿病、高血压等疾病, 从而影响人们身体健康, 严重限制芽菜产品的推广; 发酵周期长则会导致生产成本增加, 不利于芽菜产业的良性发展^[3]。

针对现有宜宾芽菜传统工艺生产方法存在的问题, 通过低盐低糖芽菜发酵的相关菌种选育、制种、复合菌种快速发酵, 在保持芽菜传统的香气、口感的前提下, 大幅度缩短其发酵周期, 降低芽菜的生产成本, 形成一种快速发酵制作宜宾芽菜的方法是可行的^[4]。本文在前期研究筛选驯化出的芽菜发酵酵母菌株GD9的基础上, 采用单因素实验、Box-Behnken设

计的响应面方法, 对芽菜发酵酵母的发酵条件进行系统优化, 为双低芽菜发酵复合菌种的制种和优化等研究工作提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与仪器

芽菜发酵酵母菌株GD9 四川省食品发酵工业研究设计院提供, 该菌株为项目组选育双低芽菜发酵菌种的目标菌株之一, 经宜宾芽菜样品分离经过一级、二级、三级筛选, 再逐级驯化而来, 经鉴定为双孢结合酵母(*Zygosaccharomyces bisporus*); 改良的MRS液体培养基 胰蛋白胨10g、牛肉膏10g、酵母膏5g、柠檬酸钠1g、葡萄糖20g、硫酸锰0.2g, 121℃灭菌25min; 麦芽汁 四川省食品发酵工业研究设计院提供。

TU1901型紫外可见分光光度计 北京普析通用仪器公司; 恒温培养箱 成都特思特仪器有限公司; GL-22MC型高速冷冻离心机 长沙湘仪离心机厂。

1.2 菌种活化

菌株活化: 25℃下于10mL10°Brix麦芽汁中振荡培养10h。

1.3 菌株生长表达量测定

将菌株活化后按照设定的培养条件接种(接种

收稿日期: 2013-06-13 * 通讯联系人

作者简介: 孙俊秀(1963-), 女, 教授, 主要从事烹饪原科学、食品化学等方面的研究。

基金项目: 四川省科技厅科技支撑项目(2008NZ0039)。

量: 1×10^6 cfu/mL) 培养一定时间, 于波长620nm处测光吸收值(OD_{620}), 以空白的培养基为参照, 作为菌株生长表达量。

1.4 单因素实验设计

1.4.1 培养时间因素 将菌株GD9经活化后接入液体培养基中, 于160r/min摇床上室温培养, 以液体培养基为参照, 在设定的时间范围内, 每隔4h测定菌株生长表达量。

1.4.2 发酵温度因素 菌株GD9经活化后接入液体培养基中, 在设定的温度范围内, 以3°C为单位梯度, 于160r/min摇床上恒温培养24h, 以液体培养基为参照测定菌株生长表达量。

1.4.3 发酵pH因素 菌株GD9经活化后接入液体培养基中, 在设定的pH范围内, 以0.3为单位梯度, 于160r/min摇床上27°C恒温培养24h, 以液体培养基为参照测定菌株生长表达量。

1.5 响应面实验设计

根据培养时间、发酵温度和pH三个单因素实验结果, 利用Box-Behnken的中心组合设计原理, 采用3因素3水平设计实验方案。其中, 响应变量Y为菌株GD9生长表达量(OD_{620}), 响应因素 X_1 为培养时间, X_2 为发酵温度, X_3 为发酵液pH。具体实验因素水平见表1。

表1 Box-Behnken实验因素和水平设计

Table 1 Factors and levels in response surface Box-Behnken analysis

响应因素	水平		
	-1	0	1
X_1 发酵时间 (h)	20	24	28
X_2 发酵温度 (°C)	24	27	30
X_3 发酵液pH	3.4	3.7	4.0

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果及分析

2.1.1 培养时间对菌株GD9生长表达量的影响 不同发酵培养时间对菌株GD9生长表达量的影响如图1所示。由图1可知, 菌株GD9生长较快, 在培养8h后就进入对数生长期, 12h后菌体密度急剧上升, 20h后菌株进入稳定期, 其吸光度A值基本趋于稳定, 32h后菌株逐渐进入衰亡期, 吸光度A值逐渐萎缩。菌株GD9

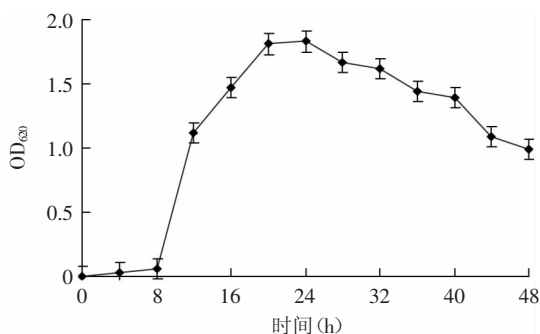


图1 培养时间对菌株GD9生长表达量的影响

Fig.1 Effects of inoculation time on the expression of growth quantity of GD9 strains

的稳定期为20~28h, 在该时期内菌体密度最高。

2.1.2 发酵温度对菌株GD9生长表达量的影响 不同发酵温度对菌株GD9生长表达量的影响如图2所示。发酵温度是酵母菌最为敏感的因素之一。一般认为酵母菌生长的最适温度在25~32°C之间^[5]。由图2可知, 过低或过高的温度都不利于菌株GD9达到最佳生长表达量。在培养24h后, 发酵温度在24~30°C时, 菌体吸光度值均在1.5以上, 发酵温度在27°C时, 吸光度值最高, 为1.96, 说明该发酵温度下菌株GD的菌体密度最高。

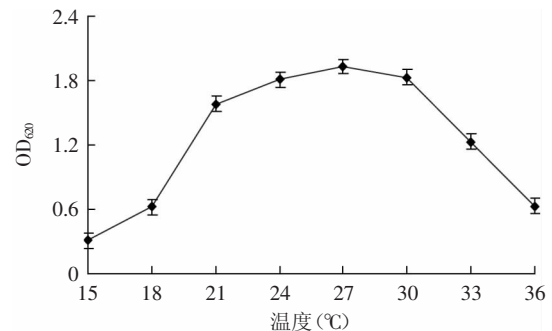


图2 发酵温度对菌株GD9生长表达量的影响

Fig.2 Effects of fermentation temperature on the expression of growth quantity of GD9 strains

2.1.3 发酵pH对菌株GD9生长表达量的影响 不同发酵pH对菌株GD9生长表达量的影响如图3所示。pH是芽菜发酵生产工艺中最关键的因素之一^[6]。一般来说, 在芽菜发酵初期, 发酵液的pH范围为6.5~7.0之间; 随着发酵的进行, 特别是进入发酵后熟期, 发酵液的pH会急剧下降^[7]。从图3可以看出, 菌株在培养24h后, 发酵液pH范围在3.1以下, 因其发酵环境的过酸性影响了酵母菌株的生长, 其吸光度值很低。此后, 随着发酵液pH的逐渐升高, 菌株GD9的菌体密度逐步升高, 在pH为3.7时菌体吸光度值达到峰值为2.01, 之后呈急剧下降趋势。结果表明, 发酵pH范围在3.4~4.0时, 菌株GD9具有较高的生长表达量, 且pH为3.7时达到峰值。

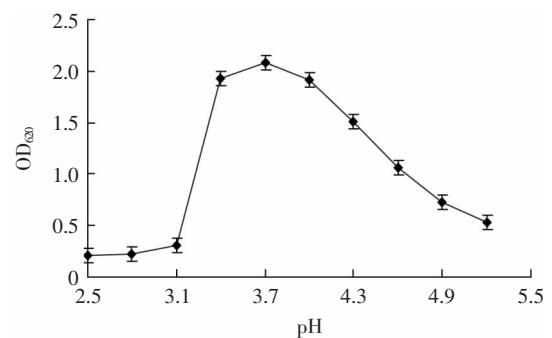


图3 发酵pH对菌株GD9生长表达量的影响

Fig.3 Effects of fermentation pH on the expression of growth quantity of GD9 strains

2.2 Box-Behnken实验结果及分析

2.2.1 响应面实验结果 根据设计的实验方案, 以

不同的培养时间、发酵温度和pH进行15次实验。其中12个实验点为析因点,自变量取值由 X_1 、 X_2 、 X_3 构成;余下为区域中心点,中心点实验重复3次用于估计实验误差。实验方案采用以菌株GD9生长表达量(OD_{620})为响应值,利用Box-Behnken设计矩阵回归拟合响应值与各个响应因素之间的回归方程,具体响应数据结果见表2。

表2 Box-Behnken设计矩阵响应数据结果
Table 2 Results of Box-Behnken design matrix and responses data

实验号	X_1	X_2	X_3	Y: OD_{620}
1	1	0	1	1.68
2	1	0	-1	1.71
3	0	1	-1	1.69
4	-1	0	-1	1.86
5	-1	1	0	1.76
6	-1	0	1	1.81
7	0	0	0	1.99
8	0	-1	1	1.85
9	0	0	0	2.01
10	0	1	1	1.75
11	-1	-1	0	1.92
12	1	1	0	1.75
13	1	-1	0	1.79
14	0	-1	-1	1.79
15	0	0	0	2.00

2.2.2 响应面法优化模型的建立及其方差分析 根据Box-Behnken设计矩阵响应数据结果,通过SAS V8 (Statistical Analysis System, Release 8.01)的RSREG

表3 响应面回归结果及方差分析
Table 3 Variance analysis of response surface experiment results

方差来源	平方差	自由度	均方	F值	p值	显著性
模型	0.2561	9	0.0285	48.79	0.0002	**
X_1	0.0221	1	0.0221	37.80	0.0017	**
X_2	0.0242	1	0.0242	41.49	0.0013	**
X_3	0.0032	1	0.0032	5.49	0.0662	
X_1X_2	0.0036	1	0.0036	6.18	0.0556	
X_1X_3	0.0001	1	0.0001	0.17	0.6960	
X_2X_3	0.0064	1	0.0064	10.97	0.0212	*
X_1^2	0.0099	1	0.0099	16.90	0.0093	**
X_2^2	0.0794	1	0.0795	136.16	<0.0001	**
X_3^2	0.1287	1	0.1287	220.55	<0.0001	**
残差误差	0.0029	5	0.0006			
失拟项	0.068	12	0.007	1.89	0.1591	
纯误差	0.0002	1	0.0001			
所有项	0.2590	14				
相应均值	0.0242	均方根	1.7980	R^2	0.9888	
Adeq P	20.71	Adj R^2	0.9685	Pred R^2	0.8340	

注:“**”表示差异极显著 ($p < 0.01$);“*”表示差异显著 ($0.01 < p < 0.05$)。

程序进行二元多次回归拟合分析,得到回归响应值对响应面因素的二元多项回归方程:

$$Y = 2.01 - 0.05X_1 - 0.06X_2 - 0.02X_3 + 0.03X_1X_2 + 0.005X_1X_3 + 0.04X_2X_3 - 0.052X_1^2 - 0.157X_2^2 - 0.187X_3^2$$

该方程回归诊断分析结果及方差分析见表3。从表3可知,模型的信噪比(Adeq P)为20.71,一般认为模型的可接受信噪比大于4,说明模型的拟合度和可信度相当高^[8];模型的校正决定系数Adj R^2 为0.9685,说明该模型能够接受96.85%响应值的变化。同时,由表3也可知,对响应值所建立的回归模型极显著 ($p < 0.01$),其中响应变量 X_1 和 X_2 对响应值均为极显著。

2.2.3 响应面图分析 为了更直观地反映响应因素对响应值的影响,对获得的回归模型进行响应面图分析。响应面图为2个独立变量之间的交互作用,响应曲面的倾斜程度也可以反映出两变量交互作用的大小,倾斜度大说明交互作用大,反之则小。结果如图4~图6,可以看出,3个响应因素在选定的范围内都存在响应极值,且 X_2 和 X_3 交互作用显著,其余交互作用不显著,结果与方差分析的结果一致。由响应面图分析,结合回归模型可以预测出 OD_{620} 最大响应值,即培养时间为21.65h、发酵温度26.22℃、发酵液pH3.675时, OD_{620} 为2.12。

2.2.4 回归模型实验的验证 为了验证预测值与真实值之间的拟合程度,检验该响应面法优化条件的可靠性,采用 OD_{620} 最大响应值的响应因素值进行实验验证,同时考虑实际操作的方便以及放大工艺的

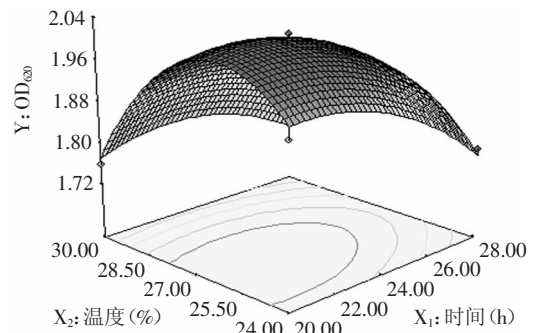


图4 培养时间和温度对 OD_{620} 的三维响应分析图
Fig.4 3D response surface plot of inoculation time and temperature on OD_{620} of the GD9 strains

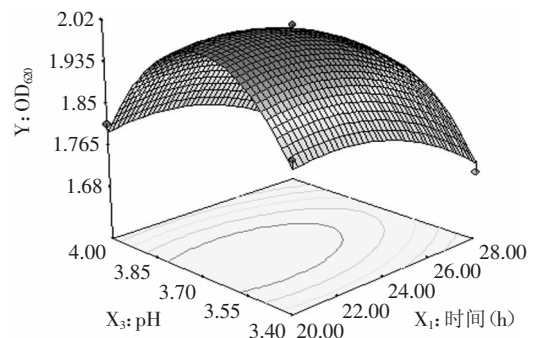


图5 培养时间和发酵液pH对 OD_{620} 的三维响应分析图
Fig.5 3D response surface plot of inoculation time and pH on OD_{620} of the GD9 strains

(下转第191页)

糖提高4.48倍,赖氨酸含量提高4.78倍。灵芝米粉含有丰富的赖氨酸和功能性灵芝多糖,以大米作为基质来培养灵芝菌丝体,即达到强化大米赖氨酸含量,提高多糖含量的目的,同时也降低灵芝培养成本,缩短了培养周期,生长条件易于控制,可大规模生产。灵芝米粉可作为一种新型营养保健产品,也可做为功能性食品基料用于米酒、米醋的酿造中,下一步我们将进行这些产品的研发。

参考文献

[1] 庄毅. 中国药用真菌概况[J]. 中国食用菌, 2001, 20(2):3-5.
 [2] 赵继鼎, 张小青. 中国真菌志·灵芝科[M]. 北京: 科学出版社, 2000:192-195.
 [3] CHEN H S, TSAI Y F, LIN S, et al. Studies on the immunomodulating and anti-tumor activities of *Ganoderma lucidum* (Reishi) polysaccharides[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2004, 12(21):5595-5601.
 [4] BAO X F, WANG X S, DONG Q, et al. Structural features of immunologically active polysaccharides from *Ganoderma lucidum* [J]. Phytochemistry, 2002, 59(2):175-181.
 [5] 毛健, 马海乐. 灵芝多糖的研究进展[J]. 食品科学, 2010, 31(1):295-299.
 [6] 陈志杰, 杨振东, 顾振新. 灵芝发芽糙米果液的工艺研究[J]. 食品科学, 2010, 31(6):8-9.
 [7] 冀宏, 赵黎明. 灵芝发酵型解酒茶饮料的研制[J]. 食品科学, 2008, 29(10):717-719.
 [8] 赵贵红. 仙人掌灵芝保健酒生产技术研究[J]. 酿酒, 2006, 33(2):62-63.
 [9] JAE H K, DAE H L, SEUNG H L, et al. Effect of *Ganoderma lucidum* on the quality and functionality of Korean traditional

Rice wine, Yakju[J]. J of Bioscience and Bioengineering, 2004, 97(1):24-28.
 [10] 江森, 刘晗, 田禹涵. 灵芝的研究现状及其在调味品中的应用[J]. 中国调味品, 2011, 36(8):4-8
 [11] ZHU L W, ZHONG J J, TANG Y J. Significance of fungal elicitors on the production of ganoderic acid and *Ganoderma lucidum* polysaccharides by the submerged culture of medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* [J]. Process Biochemistry, 2008, 43:1359-1370.
 [12] LEE W, PARK Y, AHN J K, et al. Factors influencing the production of endopolysaccharide and exopolysaccharide from *Ganoderma lucidum* applanatum [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 40:249-254.
 [13] 秦俊哲, 张洁, 陈合等. 灵芝新型固体发酵菌质中活性成分的研究[J]. 食用菌, 2005(1):8-9.
 [14] 韩建荣, 赵文婧, 高宇英. 灵芝固态发酵降解玉米淀粉的初步研究[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(7):59-61.
 [15] 张卫国, 刘欣, 陈永泉. 固态发酵灵芝多糖提取液中灵芝多糖的测定[J]. 现代食品科技, 2006, 22(6):232-234.
 [16] 周云, 郑比杏. 稻米赖氨酸快速测定条件的探索[J]. 氨基酸杂志, 1992(1):38-41.
 [17] 江洁, 盖萌. 羊肚菌菌丝体液体培养产胞外多糖条件的研究[J]. 食用菌, 2010(3):11-17.
 [18] 李云雁, 胡传荣. 实验设计与数据处理[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008:135.
 [19] 徐鹏, 钱竹, 董亮, 等. 灵芝深层发酵生产胞外多糖和灵芝酸的动力学分析[J]. 应用与环境生物学报, 2008, 14(4):562-565.
 [20] 邢栋, 张传君. 从面粉强化到主食营养强化的可行性研究[J]. 粮食加工, 2009, 34(4):31-32.

(上接第185页)

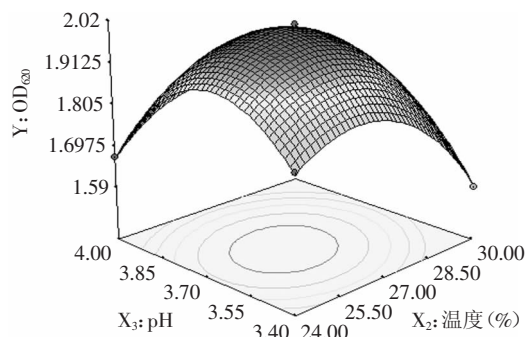


图6 发酵温度和发酵液pH值对OD₆₂₀的三维响应分析图
 Fig.6 3D response surface plot of fermentation temperature and pH on OD₆₂₀ of the GD9 strains

实际情况,验证实验将响应因素值修正为培养时间为22h、发酵温度26℃、发酵液pH3.7,经过3组平行实验测得OD₆₂₀平均值为2.05,与预测结果误差仅为3.3%,可见该模型可靠性度较高。

3 结论

通过单因素实验和响应面实验优化得出芽菜酵母菌株GD9D的最佳发酵条件为:发酵培养时间22h、

发酵温度26℃、发酵液pH3.7,在此条件下OD₆₂₀可达2.05。同时,在实验范围内建立的回归模型可靠有效,可用来预测设定条件范围内菌株GD9生长表达量的响应值,且实验拟合度较好。研究结果可为双芽菜发酵复合菌种的制种和优化等工作提供参考。

参考文献

[1] 邱思. 四川芽菜的现状及发展趋势[J]. 中国调味品, 2012(2):1-3.
 [2] 刘云秀. 宜宾芽菜的研制[J]. 中国调味品, 2007(8):58-59.
 [3] 李博, 雷激, 徐坤, 等. 宜宾芽菜的新工艺[J]. 食品研究与开发, 2010(9):89-92.
 [4] 孙俊秀, 康建平, 王郁, 等. 一种快速发酵制作宜宾芽菜的方法: 中国, CN101940287A[P]. 2011-01-12.
 [5] 江汉湖. 食品微生物学[M]. 北京: 农业出版社, 2002:357-390.
 [6] 徐坤, 雷激, 李博, 等. 芽菜腌制过程中理化指标的动态研究[J]. 中国酿造, 2010(1):29-32.
 [7] 李博. 低盐宜宾芽菜研究及产品质构特性评价[D]. 成都: 西华大学, 2011.
 [8] 黄丽金, 陆兆新, 袁勇军. 响应面法优化唾液链球菌嗜热亚种增殖培养基[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(5):27-31.