

单一干酪乳杆菌 KL1 发酵益生菌酸奶 工艺条件的研究

张 敏, 张子豪, 康建依, 刘 慧, 谢远红, 易欣欣, 高秀芝*

(北京农学院食品科学与工程学院, 农产品有害微生物及农残安全检测与控制北京市重点实验室,
食品质量与安全北京实验室, 微生物制剂关键技术开发北京市工程实验室, 北京 102206)

摘要:应用单因素实验及正交实验, 确定单一干酪乳杆菌 KL1 发酵酸奶的最佳原料乳, 并对其益生菌酸奶发酵工艺条件进行优化。筛选得到的最佳原料乳为 M_2 , 同时通过添加 M_6 改善酸奶的色泽与组织状态; 采用三因素三水平 $L_9(3^4)$ 正交实验优化酸奶的发酵工艺条件, 接种量是影响 KL1 发酵酸奶品质的最主要因素, 确定干酪乳杆菌 KL1 发酵酸奶的优化条件如下: 接种量为 6.0%, M_6 添加量 1.0%, 葡萄糖添加量 1.5%, 37 °C 下发酵酸奶 22 h, 优化后的益生菌酸奶的活菌数量较对照组高 10 倍。

关键词: 益生菌酸奶, 干酪乳杆菌 KL1, 正交实验, 感官评定

Study on the fermentation conditions of probiotics yogurt with single *Lactobacillus casei* KL1

ZHANG Min, ZHANG Zi-hao, KANG Jian-yi, LIU Hui, XIE Yuan-hong, YI Xin-xin, GAO Xiu-zhi*

(Faculty of Food Science and Engineering, Beijing University of Agriculture, Beijing Key Laboratory of Agricultural Product Detection and Control of Spoilage Organisms and Pesticide Residue, Beijing Laboratory of Food Quality and Safety, Beijing Engineering Laboratory of Probiotics Key Technology Development, Beijing 102206, China)

Abstract: Based on the single factor and orthogonal experiment, the optimal pure raw milk and fermentation conditions *Lactobacillus casei* KL1 fermented yogurt were determined. The optimized screening of raw milk was M_2 , at the same time by adding milk powder (M_6) to improve color and structure of yogurt. Using three factors and three levels of $L_9(3^4)$, the optimization of fermentation process of yoghurt orthogonal experiment, inoculation amount was the main factor affecting the quality of yoghurt fermentation KL1, the following optimized conditions of *Lactobacillus casei* KL1 fermented yogurt determined that the inoculation rate was 6.0%, the amount of M_6 1.0%, glucose 1.5%, 37 °C for 22 h, the number of viable bacteria in probiotic yogurt was about 10 times as high as that of the optimized yogurt before the fermentation.

Key words: probiotic yogurt; *Lactobacillus casei* KL1; orthogonal experiment; sensory evaluation

中图分类号: TS252.54

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2017)21-0104-06

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2017.21.022

益生菌(Probiotics)是一类对宿主有益的活性微生物, 是定植于人体肠道、生殖系统内, 能产生确切健康功效从而改善宿主微生态平衡、发挥有益作用的活性有益微生物的总称。人体、动物体内有益的细菌或真菌主要有: 酪酸梭菌、乳酸菌、双歧杆菌、嗜酸乳杆菌、放线菌、酵母菌等^[1]。益生菌具有良好的降低血清胆固醇^[2]、促进肠道消化系统健康^[3]、提高人体免疫力^[4]等作用已经逐渐成为国际上的热门研究课题。乳制品尤其以酸奶为代表的发酵乳制品是益生菌最佳的载体之一。目前国内常用的酸奶主要是利用嗜热链球菌和保加利亚乳杆菌发酵生产, 该

产品对人体胃肠酸环境耐受性较差, 酸奶进入胃肠道后, 成活率仅有 0.065% 和 0.01%^[5]。研究表明, 在发酵乳制品中添加益生菌, 除了保健功能外, 还可改善发酵乳的风味和质地^[6]。

干酪乳杆菌 KL1 来源于藏灵菇, 该菌具有调节人体肠道酸碱度从而改善肠道中微环境的作用, 还具有抗肿瘤、降血清胆固醇、增强人体免疫力等多种生理功能^[7-9]。刘慧等^[10]对干酪乳杆菌 KL1 中产胆盐水解酶乳酸菌降胆固醇作用机理方面的研究做出了突出贡献, 郭志华等^[11]对干酪乳杆菌 KL1 的益生特性做出进一步研究, 张晶等^[12]利用干酪乳杆菌

收稿日期: 2017-03-22

作者简介: 张敏(1992-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品微生物, E-mail: 2317909305@qq.com。

* 通讯作者: 高秀芝(1977-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品微生物与生物技术, E-mail: gxz@bua.edu.cn。

基金项目: 2016 年北京农学院协同创新建设项目; 北京市叶类蔬菜产业创新团队(BAIC07-2017)。

KL1 和乳酸菌制成降胆固醇蛋乳发酵饮料,张倩^[13]等将其干酪乳杆菌 KL1 作为酸奶发酵剂进行分批发酵,但将单一干酪乳杆菌 KL1 直接用于发酵酸奶的研究尚未见文献报道。

因此,本研究以单一益生菌——干酪乳杆菌 KL1 作为发酵菌种,以感官评定指标、活菌数指标以及酸度等作为评价指标,应用不同品牌的原料乳发酵制备酸奶,以及确定 KL1 发酵酸奶的最佳原料乳;其次通过正交实验优化干酪乳杆菌 KL1 发酵益生菌酸奶的工艺条件。本研究将为干酪乳杆菌 KL1 的工业化生产提供理论依据和实践指导。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

菌种 干酪乳杆菌 KL1 来源于实验室保藏菌种, -80 ℃ 冻存;原料 9 种不同品牌原料乳或乳粉样品,分别编号为 M₁(三元极致低脂纯牛奶)、M₂(三元纯牛奶)、M₃(欧德堡超高温灭菌脱脂牛奶)、M₄(欧德堡超高温灭菌高脂牛奶)、M₅(伊利高蛋白脱脂高钙奶粉)、M₆(伊利全脂甜奶粉)、M₇(伊利纯牛奶)、M₈(蒙牛高钙牛奶)、M₉(蒙牛低脂高钙牛奶),其中 M₅ 和 M₆ 为乳粉;白砂糖、葡萄糖、NaOH、酚酞、MRS 培养基、琼脂等;原料乳、乳粉及白砂糖均购于超市,其它试剂购于北京畅华志诚科技有限公司;培养基 改良 MRS 培养基^[13](将 MRS 培养基中的鱼蛋白胨以 0.5% 的胰蛋白胨和 0.5% 乳酪蛋白水解物替代,其他成分不变),灭菌脱脂乳等。

MLS-3750 全自动高压灭菌锅 日本三洋公司;GHP-9160 型恒温培养箱 上海一恒科学仪器有限公司;BS224S 型精密电子天平 德国赛多利斯公司;BCD-301 型冰箱 青岛海尔股份有限公司;电磁炉 广东美的集团股份有限公司;BCN-1360B 型无菌超净工作台 哈尔滨市东联电子技术开发有限公司;Scientz-11L 无菌均质器 宁波新芝生物科技有限公司;PHB-4 便携式酸度计 上海仪电科学仪器股份有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种活化及发酵剂制备 先用改良 MRS 液体培养基活化干酪乳杆菌 KL1, 37 ℃ 培养 18 h,然后将干酪乳杆菌 KL1 以 3% 的接种量接种于装有 10 mL 灭菌牛奶的试管中,振荡摇匀,于 37 ℃ 培养至牛乳成凝固状态。如此传代培养至第 3 次,得到活化菌种,冷藏备用。

1.2.2 酸奶发酵单因素实验

1.2.2.1 发酵制备酸奶样品 分别将 9 种原料(m_{乳粉}:m_水 为 1:5 复溶)经 115 ℃ 杀菌 15 min,加 5% 的白砂糖,冷却至 42 ℃ 后接入 4% 干酪乳杆菌 KL1 发酵剂。分装,于 37 ℃ 下培养 22 h^[14-15],转移至 4 ℃ 冰箱中冷藏。将 9 种酸奶分别编号为 Y₁、Y₂、Y₃、Y₄、Y₅、Y₆、Y₇、Y₈、Y₉。

1.2.2.2 酸奶中干酪乳杆菌 KL1 计数 分别取 25 mL 酸奶样品于 225 mL 灭菌生理盐水中,充分混匀,制成 10⁻¹ 的样品稀释液。取 10⁻¹ 样品液 1 mL,沿管壁缓慢注于 9 mL 稀释液中,混合均匀,制成 10⁻²

的样品液,并依次制成 10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸、10⁻⁹ 稀释度的样品液。

分别取 10⁻⁷、10⁻⁸、10⁻⁹ 稀释度的样品液 1 mL,倾注 MRS 平板。每个梯度做 3 个平行,同时做空白对照。待琼脂凝固后,37 ℃ 倒置培养 48 h,选取无蔓延菌落生长的平板用于计数,参照 GB 4789.35-2010 记录并计算 Y₁~Y₉ 酸奶的干酪乳杆菌 KL1 菌数^[16]。

1.2.2.3 酸奶的酸度测定 pH 的测定:取各酸奶样品 25 g,加入 225 mL 蒸馏水,混匀后,用 pH 计测定其 pH。酸度的测定^[17]:取各酸奶样品 10 mL 于 150 mL 三角瓶中,再加入 20 mL 蒸馏水和 0.5 mL 的 0.5% 酚酞溶液,摇匀,用 0.1 mol/L (近似值)氢氧化钠溶液滴定至微红色,并在 30 s 内不褪色为止,记录 0.1 mol/L (近似值)氢氧化钠所消耗的毫升数(A)。两次平行实验结果差值不得大于 0.5 °T。

$$\text{吉尔涅尔度}(\text{°T}) = A \times F \times 10 \quad \text{式(1)}$$

式(1)中:A-滴定时消耗的 0.1 mol/L (近似值)氢氧化钠的毫升数;F-0.1 mol/L (近似值)氢氧化钠的校正系数;10-酸奶的稀释倍数。

1.2.2.4 酸奶的感官评价 酸奶感官评定小组为专业的评价人员构成,共有 15 人。采用描述性的检测方法分别对样品的组织状态、口感、气味和色泽进行细致的描述,评分标准采用百分制^[17]。以感官评价的结果作为酸奶的评定标准,酸奶感官评定表如表 1 所示。

1.2.2.5 最佳原料乳的确定 综合 9 种酸奶的活菌数、酸度以及感官评价的结果,确定最佳干酪乳杆菌 KL1 发酵酸奶的原料乳。

1.2.2.6 单因素酸奶发酵实验 应用 1.2.2.5 确定的原料乳,经 115 ℃ 杀菌 15 min,加 5% 的白砂糖,冷却至 42 ℃ 后,分装,乳粉 M₆ 添加可改善酸奶的色泽与组织状态,单因素实验考察接种量、葡萄糖添加量与 M₆ 添加量三个因素对酸奶发酵的影响:固定 M₆ 添加量 1.0% 与葡萄糖添加量 1.0%,考察不同 KL1 接种量(2.0%、4.0%、6.0%、8.0%)对酸奶感官品质的影响;固定 M₆ 添加量 1.0% 与接种量 4.0%,考察不同葡萄糖添加量(0.5%、1%、1.5%、2%)对酸奶感官品质的影响;固定接种量 4.0% 与葡萄糖添加量 1.0% 考察不同 M₆ 添加量(0.5%、1%、1.5%、2%)对酸奶感官品质的影响。

1.2.3 酸奶发酵正交实验 基于该菌种的前期研究结果^[14-15],在 37 ℃ 条件下,干酪乳杆菌 KL1 可以高产胞外多糖和胆盐水解酶,牛乳凝固作为酸奶发酵的终止标志,因此本实验不再针对培养温度 37 ℃ 和发酵时间进行发酵条件的优化。结合单因素实验结果,对接菌量、M₆ 添加量以及葡萄糖添加量等影响因素进行正交实验分析,采用 L₉(3⁴) 正交实验设计,正交实验因素水平选择见表 2,每组实验重复 3 次。对正交实验得到的酸奶分别进行酸度测定、感官评价以及活菌数测定。

正交实验验证实验中,普通发酵条件组合设为对照组,正交实验得到的感官指标优化组、活菌数量指标优化组以及正交实验感官最佳组作为验证组,

表1 酸奶感官评定表^[19]
Table 1 Yogurt sensory evaluation table^[19]

项目	标准	分值 (分)
组织状态 (30分)	质地均匀,无沉淀, 无乳清析出,无气泡, 粘稠度和流动性适宜	25~30
	质地较均匀,无沉淀, 无明显乳清析出,粘稠度 和流动性较适宜	15~24
	质地不均匀,有乳清析出, 但无明显分层, 粘稠度和流动性一般	10~14
	质地非常不均匀,有明显 乳清洗出,并出现严重分层, 甚至有结块现象出现	<10
	酸甜适宜,口感细腻柔和	25~30
	酸甜度较好,口感较细腻柔和	15~24
	酸甜度一般,口感不细腻	10~14
	酸度或甜度明显不适,口感粗糙	<10
	酸奶香气非常浓郁,无异味	16~20
	酸奶香味较浓郁,无异味	11~15
气味 (20分)	酸奶香味淡,无异味	6~10
	酸奶香味淡,有异味	<6
色泽 (20分)	色泽均匀一致,呈乳白色	16~20
	色泽较均匀一致,呈微黄色	11~15
	色泽略有不均匀,呈微黄色	6~10
	色泽较不均匀,呈黄色	<6

表2 正交实验因素水平表
Table 2 Factors and levels table of orthogonal experiment

水平	因素		
	A 接种量 (%)	B M ₆ 添加量 (%)	C 葡萄糖添加量 (%)
1	2.0	0.5	0.5
2	4.0	1.0	1.0
3	6.0	1.5	1.5

验证比较酸奶最佳发酵条件的优越性。

1.3 数据处理

利用 Excel 2007 和 SPSS 18 分析软件对数据进行统计分析,并结合 Duncan 氏法做多重比较,所有实验均重复三次,结果用平均值 ± 标准差表示。

2 结果与分析

2.1 干酪乳杆菌 KL1 发酵酸奶样品中活菌数量、酸度及 pH

干酪乳杆菌 KL1 发酵原料乳样品制备酸奶,9 种酸奶样品活菌数量、酸度及 pH 测定结果如表 3 所示,9 种酸奶益生菌的活菌数量均在 8.0 log CFU/g 以上,其中 Y₂ 和 Y₆ 酸奶活菌数量显著高于其它 7 种酸奶的活菌数量,活菌数量达到 9.0 log CFU/g 以上,根据统计数据分析 Y₂ 与 Y₆ 与其他 7 种样品之间存在显著性差异($p < 0.05$),由数据可以看出 Y₂ 的活菌

数量又高于 Y₆ 的活菌数量,在 9 种酸奶中活菌数量最高为 9.27 log CFU/g;9 种酸奶中,Y₂ 和 Y₆ 的酸度明显低于其它 7 种酸奶。酸奶发酵的终止酸度越高,其酸化速度越快,保质期相对缩短,不利于酸奶的长时间储藏,故 Y₂ 和 Y₆ 的酸度适中,且保质期相对与其它 7 种酸奶样品更长;从酸奶的 pH 来看,虽然 Y₅ 的 pH 与其他 8 种样品酸奶的 pH 之间存在显著性差异,但由于 Y₅ 样品的活菌数量低于 Y₂ 和 Y₆,酸度大于 Y₂ 和 Y₆,而 9 种酸奶的 pH 在 4~5 之间,所以综合考虑 Y₂ 和 Y₆ 要优于 Y₅。

表3 酸奶中活菌数量、酸度及 pH
Table 3 Cells of lactic acid bacteria,acidity and pH of yogurt

酸奶 样品	活菌数量 (log CFU/g)	酸度(°T)	pH
Y ₁	8.57 ± 0.14 ^{bc}	124.00 ± 9.17 ^a	4.21 ± 0.10 ^c
Y ₂	9.27 ± 0.07 ^a	92.67 ± 7.57 ^{de}	4.51 ± 0.11 ^b
Y ₃	8.37 ± 0.10 ^d	114.33 ± 13.20 ^{abc}	4.35 ± 0.10 ^{bc}
Y ₄	8.47 ± 0.20 ^{cd}	108.33 ± 6.11 ^{bc}	4.27 ± 0.13 ^c
Y ₅	8.57 ± 0.03 ^{bc}	107.33 ± 5.0 ^{bcd}	4.75 ± 0.10 ^a
Y ₆	9.13 ± 0.03 ^a	91.33 ± 12.90 ^e	4.38 ± 0.05 ^{bc}
Y ₇	8.69 ± 0.05 ^b	121.00 ± 3.00 ^{ab}	4.39 ± 0.08 ^{bc}
Y ₈	8.69 ± 0.05 ^b	104.33 ± 6.03 ^{cde}	4.52 ± 0.07 ^b
Y ₉	8.47 ± 0.15 ^{cd}	117.67 ± 4.51 ^{abc}	4.41 ± 0.16 ^{bc}

注:用 Duncan 法进行多重比较;同列标有不同字母者表示组间差异显著($p < 0.05$);标有相同小写字母者表示组间差异不显著($p > 0.05$);表 4 同。

2.2 干酪乳杆菌 KL1 发酵酸奶样品感官评定结果

如表 4 所示,虽然采用相同发酵菌种,但不同原料乳样品发酵后得到的益生菌酸奶感官评定指标得分不同。其中 Y₂ 和 Y₆ 酸奶样品感官评定单个指标得分和感官评定总分均明显高于其它几种酸奶,而酸奶的口感指标与组织状态指标相比其它两个评定指标更为重要,9 种酸奶样品中口感指标 Y₂ 得分最高,通过统计学分析得出 Y₂ 与 Y₆ 在口感方面与其他几种样品酸奶具有显著性差异($p < 0.05$)。组织状态指标 Y₆ 得分最高,通过统计学分析得 Y₆ 与其他 8 种样品之间存在显著性差异($p < 0.05$),但是 M₆ 是原料乳粉,相比原料乳来说成本高^[17],酸奶发酵工艺相比原料乳还要增加复水步骤。

综合干酪乳杆菌 KL1 发酵酸奶的活菌计数结果、酸度、pH 以及感官评定结果,最终选择 M₂ 为最佳原料乳样品,同时通过添加 M₆ 来弥补其在色泽以及组织状态方面的不足。

2.3 干酪乳杆菌 KL1 发酵酸奶单因素实验

干酪乳杆菌 KL1 的接种量对酸奶感官品质的影响如图 1 所示,在接菌量为 2.0%~6.0% 之间,随着接菌量的增加,所制酸奶的感官评分越高,但当接菌量为 8.0% 时,酸奶的感官评分下降,酸奶出现结块现象,同时有大量的乳清析出,进而影响感酸奶官评定的分数,由实验结果得出,接菌量为 6.0% 时酸奶感官品质最佳。

不同葡萄糖添加量对酸奶感官品质的影响结果

表 4 酸奶感官评定结果
Table 4 Results of sensory evaluation of yogurt

酸奶样品	感官评定分数(分)				
	组织状态(30 分)	口感(30 分)	气味(20 分)	酸甜度(20 分)	总分(100 分)
Y ₁	19.67 ± 0.58 ^d	21.00 ± 1.00 ^d	15.00 ± 1.00 ^b	17.33 ± 1.15 ^{bcd}	73.00 ± 1.91 ^{cd}
Y ₂	26.00 ± 1.00 ^b	28.00 ± 1.00 ^a	18.33 ± 0.58 ^a	19.00 ± 1.00 ^{ab}	91.33 ± 1.83 ^a
Y ₃	23.67 ± 0.58 ^c	15.33 ± 1.15 ^f	14.33 ± 1.53 ^a	15.67 ± 0.58 ^{de}	69.00 ± 2.08 ^{de}
Y ₄	18.00 ± 1.00 ^{de}	24.67 ± 0.58 ^{bc}	15.67 ± 0.58 ^b	16.67 ± 0.58 ^{cd}	75.00 ± 1.42 ^c
Y ₅	16.67 ± 1.15 ^{ef}	19.00 ± 1.00 ^e	14.67 ± 0.58 ^b	17.33 ± 1.53 ^{bcd}	67.67 ± 2.24 ^f
Y ₆	29.00 ± 1.00 ^a	26.33 ± 1.53 ^{ab}	18.67 ± 0.58 ^a	19.33 ± 0.58 ^a	93.33 ± 2.00 ^a
Y ₇	24.33 ± 0.58 ^{bc}	23.67 ± 0.58 ^c	15.00 ± 2.00 ^b	18.33 ± 1.53 ^{abc}	81.33 ± 2.38 ^b
Y ₈	18.67 ± 1.15 ^d	21.00 ± 1.00 ^d	15.00 ± 1.00 ^b	17.00 ± 1.00 ^{cd}	71.67 ± 2.08 ^{cde}
Y ₉	16.00 ± 2.00 ^f	25.00 ± 1.00 ^{bc}	15.67 ± 2.08 ^b	14.33 ± 0.58 ^e	71.00 ± 3.11 ^{cde}

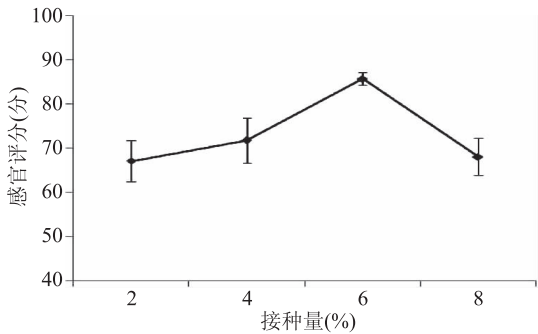


图 1 不同接种量对酸奶感官品质的影响
Fig.1 Effect of different inoculation amount on sensory quality of yoghurt

如图 2 所示,在葡萄糖添加量为 1.5% 时,感官评分 70 分,较其它添加量略高,当葡萄糖的添加量达到 2% 时,感官评分最低,出现下降的原因是添加 2% 的葡萄糖所制成的酸奶甜度增大,影响酸奶的口感,由实验结果得出,葡萄糖添加量为 1.5% 酸奶感官品质最佳。

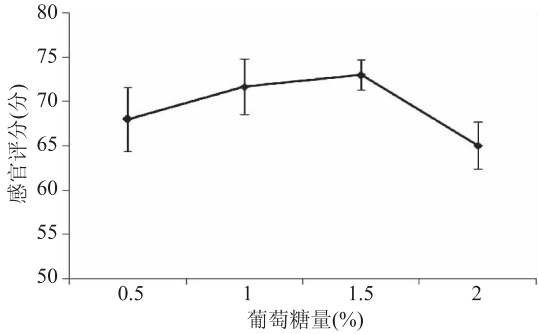


图 2 不同葡萄糖添加量对发酵酸奶感官品质的影响
Fig.2 Effect of different glucose content on sensory quality of yoghurt

不同 M₆ 添加量对酸奶感官品质的影响结果如图 3 所示, M₆ 的添加在 0.5% ~ 1.5% 范围时,可以改善酸奶组织状态和感官品质,但随着奶粉添加量不断的增加,对感官品质也会产生不良的影响,主要表现为所制备的酸奶具有更浓的奶香味,影响了酸奶本身的风味,由实验结果得出, M₆ 添加量为 0.5% 时酸奶感官品质最佳。

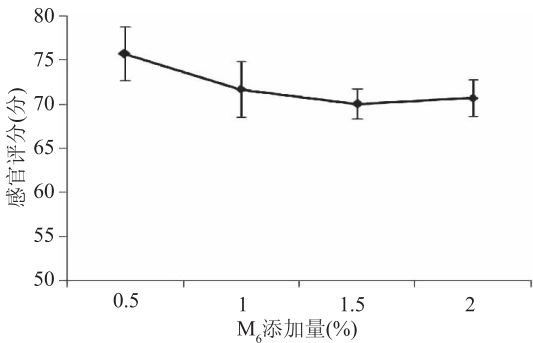


图 3 不同 M₆ 添加量对发酵酸奶感官品质的影响
Fig.3 Effect of different M₆ content on sensory quality of yoghurt

2.4 干酪乳杆菌 KL1 发酵酸奶正交实验

干酪乳杆菌 KL1 发酵酸奶正交实验结果如表 5 所示,从感官评定指标看,影响程度由强到弱依次为接种量 > 葡萄糖添加量 > M₆ 添加量,最优发酵条件为 A₃B₂C₃,即接种量 6.0%、M₆ 添加量 1.0%、葡萄糖添加量 1.5%。菌株 KL1 发酵酸奶条件中,对活菌数量的影响程度由强到弱依次为接种量 > 葡萄糖添加量 > M₆ 添加量,最优发酵条件为 A₃B₂C₁,即接种量 6.0%、M₆ 添加量 1.0%、葡萄糖添加量 0.5%。

2.5 验证实验

如表 6 所示,从对照组、感官指标优化组 A₃B₂C₃、活菌数量指标优化组(正交实验活菌数量最佳组) A₃B₂C₁ 以及正交实验感官最佳组 A₃B₃C₃ 比较结果来看,感官指标优化组 A₃B₂C₃,即接种量 6%、葡萄糖添加量 1.5%、M₆ 添加量 1.0% 条件下进行酸奶发酵,酸奶活菌数量达 9.84 log CFU/g,相比对照组高 10 倍,感官评定总分为 96 分,这两个指标均高于其它几组;从酸度来看 A₃B₂C₃ 组合条件下制备的酸奶酸度适宜。干酪乳杆菌 KL1 发酵的酸奶口感细腻、绵滑、黏稠、均匀,香气浓郁。本研究优化后发酵酸奶活菌数量与 Gorissen 的研究相比,活菌数量和酸奶感官品质与之相当,可以替代进口益生菌功能性酸奶^[18-21]。

3 讨论

国内市场酸奶种类繁多,但国内尚无利用改善肠道微环境、抗肿瘤、降血清胆固醇、增强人体免疫力等

表5 干酪乳杆菌 KL1 发酵酸奶正交实验结果
Table 5 Results of *Lactobacillus casei* KL1 fermented yogurt orthogonal experiment

实验号	误差项	A	B	C	感官评定 (分)	活菌数量 (log CFU/g)
1	1	1	1	1	44	8.84
2	1	2	2	2	58	8.99
3	1	3	3	3	96	9.31
4	2	1	2	3	87	8.79
5	2	2	3	1	64	8.94
6	2	3	1	2	74	9.03
7	3	1	3	2	51	8.80
8	3	2	1	3	68	8.99
9	3	3	2	1	85	9.49
感官 评定	K ₁	198	182	186	193	
	K ₂	225	190	230	183	
	K ₃	204	255	211	251	
	k ₁		60.67	62.00	64.33	
	k ₂		63.33	76.67	61.00	
	k ₃		85.00	70.33	83.67	
	R		24.33	14.67	22.67	
活菌 数量	K ₁	27.14	26.46	26.84	27.4	
	K ₂	27.09	26.97	27.35	26.83	
	K ₃	27.09	27.89	27.13	27.09	
	k ₁		8.82	8.95	9.13	
	k ₂		8.99	9.12	8.94	
	k ₃		9.30	9.04	9.03	
	R		0.48	0.17	0.19	

表6 发酵条件的优化前后比较
Table 6 Comparison of fermentation conditions before and after optimization

	接种量(%)	M ₆ 添加量 (%)	葡萄糖添加量 (%)	感官评定 分数(分)	活菌数量 (log CFU/g)	酸度 (°T)	pH
对照组	4	0.5	0.5	50	8.86	57.5	6.07
活菌数量指标优化组	6	1.0	0.5	90	9.53	70.0	6.03
感官指标优化组	6	1.0	1.5	96	9.84	72.5	5.64
正交实验感官最佳组	6	1.5	1.5	92	9.66	77.5	5.91

多种生理功能的益生菌酸奶^[18]。藏灵菇源干酪乳杆菌 KL1 具有高产胞外多糖和胆盐水解酶等活性物质的功能^[8],以此菌种作为单一的酸奶发酵菌种发酵生产酸奶,可以填补改善肠道微环境、抗肿瘤、降血清胆固醇、增强人体免疫力等功能性酸奶市场的空白。利用干酪乳杆菌 KL1 发酵生产的酸奶与普通发酵剂发酵生产的酸奶相比较,虽然在活菌数量以及感官评定方面均达到较高的水平,但该酸奶在贮藏期间产品品质变化以及产品的货架期还需要做进一步的实验研究。

4 结论

原料乳 M₂ 为干酪乳杆菌 KL1 的最佳原料乳样品,同时通过添加乳粉 M₆ 来改善在色泽以及组织状态方面的不足。
葡萄糖添加量是影响干酪乳杆菌 KL1 发酵酸奶感官评定指标和活菌数量指标的最主要因素,接菌量稍次之,而奶粉添加量对感官评定和活菌数量的

影响最小,即影响酸奶感官和活菌数量的影响因素顺序为接菌量 > 葡萄糖添加量 > M₆ 添加量。

采用三因素三水平 L₉ (3⁴) 正交实验,确定干酪乳杆菌 KL1 发酵酸奶的优化组合是接种量为 6.0% , M₆ 添加量 1.0% ,葡萄糖量 1.5% ,在优化条件下进行发酵酸奶,酸奶的活菌数量较对照组高 10 倍。

参考文献

[1] 郭本恒,刘振民.益生菌[M].北京:化学工业出版社,2016.
[2] Zhong Z,Zhang W Y,Du R T,et al.Effect of *Lactobadllus casei* Zhang Stimulates Lipid Metabolism in Hypercholesterolemic Rats by affecting gene expression in the live[J].European Journal of Science Lipid and Technology,2012,114(3):244-252.
[3] Zhang Y,Du R T,Wang L F,et al.The Antioxidative Effects of Probiotic *Lactobacillus casei* Zhang on the Hyperlipidemic Rats [J].European Food Research and Technology,2010,231(1):

151-158.

[4] 罗茂春, 胡晓冰. 凝固型平菇酸奶的加工工艺[J]. 食品科学, 2013, 34(12): 38-40.

[5] 张丽萍, 杨晨, 王成强, 等. 干酪乳杆菌在酸奶生产中的应用研究[J]. 中国乳品工业, 2007(2): 24-27.

[6] 郭壮, 王记成, 闫丽雅, 等. 益生菌对酸奶风味、质地及感官特性的影响[J]. 中国乳品工业, 2009, 37(1): 14-20.

[7] 姚晓云, 王昕, 王茜, 等. 藏灵菇发酵乳功能性及藏灵菇中益生菌的应用研究[J]. 农业机械, 2012(24): 145-147.

[8] 王瑞琼, 张红星, 刘慧, 等. 乳酸菌胞外多糖分离纯化方法研究进展[J]. 食品科学, 2008, 29(8): 700-703.

[9] 刘慧, 陈湘宁, 张红星, 等. 藏灵菇酵母菌 M3 耐胃肠道逆环境特性及降胆固醇的实验研究[J]. 中国农学通报, 2009, 25(15): 60-63.

[10] Liu H, Xie Y H, Han T, et al. Studies on the Action Mechanism for Cholesterol-lowering of Lactobacter which yields Bile Salt Hydrolase from Kefir Grains [C]. Advanced Materials Research, 2013(781-784): 1336-1340.

[11] 郭志华, 杨洪. 分离自藏灵菇的乳酸菌的益生特性[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(1): 151-154.

[12] 张晶, 张红星, 刘慧, 等. 藏灵菇源酵母菌和乳酸菌降胆固醇蛋白发酵饮料的研制[J]. 中国酿造, 2013, 32(9): 50-53.

[13] 张倩, 张红星, 白永强, 等. 藏灵菇源干酪乳杆菌发酵剂分

批发酵条件的优化[J]. 中国农学通报, 2015, 31(6): 229-233.

[14] 刘慧, 熊利霞, 韩睿, 等. 藏灵菇源干酪乳杆菌 KL1 高产胞外多糖发酵条件的优化研究[J]. 中国农学通报, 2008, 11(24): 117-121.

[15] 刘慧, 熊利霞, 李金铨, 等. 藏灵菇源干酪乳杆菌 KL1 高产胆盐水解酶发酵条件的优化研究[J]. 食品科学, 2008, 12(24): 114-118.

[16] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准委员会 GB 4789.35-2010 食品微生物学检验 乳酸菌检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.

[17] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准委员会. GB/T 5009.46-2003 乳与乳制品卫生标准的分析方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.

[18] Gorissen L, Weckx S, Vlaeminck B, et al. Linoleate isomerase activity occurs in lactic acid bacteria strains and is affected by pH and temperature[J]. Journal of Applied Microbiology, 2011, 111(3): 593-606.

[19] 于志会, 张雪, 杨贞耐, 等. 植物乳杆菌 C88 在酸奶中的应用[J]. 中国乳品工业, 2013, 7(41): 27-30.

[20] 张兴昌, 孙婷, 陈世贤, 等. 对酸奶中益生菌应用种类和含量的分析[J]. 饮料工业, 2014, 17(2): 35-38.

[21] 余之蕴, 黄宝莹, 李姣, 等. 发酵乳中乳酸菌的保健功能及其存活力影响因素[J]. 中国乳业, 2013(137): 54-57.

(上接第 103 页)

3 结论

异养小球藻藻渣直接进行沼气发酵效果不理想, 需要进行预处理对藻细胞造成实质性破坏, 才能释放出更多的小分子有机物, 从而在沼气发酵中被沼气细菌直接利用, 缩短沼气发酵的分解阶段, 为酸化细菌和产甲烷细菌提供足够的营养, 进而提高沼气发酵的效率和沼气发酵的产量。

酸热法提油法产生的藻渣残余油脂含量较少^[5,7-10], 这显示出其能够有效地对异养小球藻细胞造成破坏, 藻渣中有较多的细胞碎片, 在沼气发酵中能够释放出更多葡萄糖等小分子有机物, 供沼气发酵细菌利用。其它提油法沼气产量较低、沼气生产效率也低, 说明其不适应于进行沼气生产。

生物柴油和沼气联产需要同时兼顾提油工艺和沼气生产工艺。异养小球藻提油方法较多, 有成熟的应用方案, 本文的研究为异养小球藻油脂生产过程中废弃物的资源化利用提供了参考, 为异养小球藻作为原料生产生物柴油和沼气时进行预处理工艺的选择提供了思路。

参考文献

[1] 陈颖, 李文彬, 孙勇如. 小球藻生物技术研究应用现状及展望[J]. 生物工程进展, 1998, 18(6): 12-16.

[2] 孔维宝, 李龙国, 张继, 等. 小球藻的营养保健功能及其在

食品工业中的应用[J]. 食品科学, 2010, 31(9): 323-328.

[3] 史坤, 张旗, 王娜, 等. 小球藻和螺旋藻的营养成分及其降血糖活性比较[J]. 食品研究与开发, 2015(10): 121-125.

[4] 张强. 小球藻活性成分的研究及食品方面的开发进展[J]. 山东青年, 2010(8): 59-60.

[5] 鲁龙, 毕生雷, 金洪波, 等. 强酸破碎小球藻细胞壁工艺条件的优化[J]. 食品与发酵科技, 2016(2): 39-42, 47.

[6] 苑利群. 可再生能源利用的成功探索——改性塑料户用沼气发生器[J]. 城市与减灾, 2007(5): 36-39.

[7] 毕生雷, 张成明, 李十中, 等. 异养小球藻半连续发酵生产油脂工艺探讨[J]. 食品与发酵科技, 2014(5): 36-40, 48.

[8] 鲁龙, 毕生雷, 金洪波, 等. 研磨法破碎小球藻细胞工艺优化[J]. 中国酿造, 2017(1): 116-119.

[9] 邢欢, 许文宗, 张志荣, 等. 绿色木霉对小球藻细胞壁的酶解作用[J]. 微生物学通报, 2015(6): 975-980.

[10] 毕生雷, 张成明, 郑世文, 等. 异养小球藻原料直接制备生物柴油的研究[J]. 中国油脂, 2016(10): 48-52.

[11] 郭萃萍. 稻秆干发酵制沼气工艺参数的研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2012.

[12] 张建鸿, 杨红, 郭德芳, 等. 不同温度下滇池蓝藻沼气发酵的实验研究[J]. 云南师范大学学报: 自然科学版, 2013, 33(3): 17-21.

[13] 许之扬. 餐厨垃圾固态厌氧消化过程内源性抑制效应研究[D]. 无锡: 江南大学, 2014.

权威 · 核心 · 领先 · 实用 · 全面