

藏灵菇源乳酸菌复合发酵剂分批发酵条件的优化

贾 慧¹, 钟思琼², 孙 勇³, 刘 慧^{1,*}

(1.北京农学院食品科学与工程学院, 北京 102206; 2.华中农业大学食品科学技术学院, 湖北 武汉 430070;

3.北京市食品研究所, 北京 100162)

摘 要: 利用筛选自藏灵菇产胆盐水解酶的干酪乳杆菌 J1、嗜热链球菌 Tx 和乳酸乳球菌乳酸亚种 P5 研究发酵条件与生长因子对酸奶复合发酵剂活菌数及球杆菌比例的影响。采用 5L 自动发酵罐进行四因素三水平(L₉(3⁴))正交试验, 确定分批发酵的优化条件。结果表明: 在发酵温度 40℃、发酵液 pH6.5、发酵时间 6h 的条件下, 以 5% 胡萝卜汁为生长因子时, 复合发酵剂活菌数最高, 为 6.7×10^9 CFU/mL。在此优化条件下, 发酵剂的活菌数是优化前的近 70 倍。

关键词: 乳酸菌; 复合发酵剂; 发酵; 条件优化

Optimization of Batch Fermentation Conditions for Starter Cultures of Lactic acid Bacteria from Tibetan Kefir

JIA Hui¹, ZHONG Si-qiong², SUN Yong³, LIU Hui^{1,*}

(1. College of Food Science and Engineering, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China;

2. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

3. Beijing Food Research Institute, Beijing 100162, China)

Abstract: *Lactobacillus casei* J1, capable of producing bile salt hydrolase, *Streptococcus thermophilus* Tx and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* P5 that were isolated from Tibetan Kefir, were used to explore the effect of fermentation conditions and growth factors on total viable count of lactic acid bacteria and ratio between *Lactococcus* and *Lactobacillus*. Meanwhile, key batch fermentation conditions were optimized by orthogonal array design method in a 5 L automatic fermentor. The results showed that the optimal fermentation conditions were fermentation 40 °C for 6 h in a medium at pH 6.5 added with carrot juice as growth factor at 5%. Under these fermentation conditions, the highest total viable count of lactic acid bacteria, 6.7×10^9 CFU/mL was obtained, which revealed an approximately 70-fold increase compared to pre-optimization.

Key words: lactic acid bacteria; compound starter culture; fermentation; conditions optimization

中图分类号: TQ920.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)07-0242-05

藏灵菇(又称开菲尔粒)是由多种乳酸菌、醋酸菌和酵母菌等微生物经过共生作用而形成的特殊粒状结构的发酵乳制品。乳酸菌菌群是藏灵菇中含量最多、活力最高的一部分, 属于益生菌, 主要存在于人体肠道中。当其在人体肠道中达到一定数量时, 能够改善或调节肠道微生物菌群的平衡^[1]。经研究发现, 藏灵菇中的乳酸菌在生长代谢过程中产生的生物活性物质, 可以降低机体肠道 pH 值, 抑制腐败菌的生长和产毒作用, 并有助于降低血清胆固醇水平, 提高机体抗氧化能力及抑制肿瘤细胞的形成^[2]。因此, 国内有关藏灵菇源益生乳酸菌

的研究逐渐增多, 但将其作为酸奶复合发酵剂进行分批发酵的研究尚未见报道。Graziela 等^[3]的研究表明高数量的活菌细胞是益生菌产品发挥功效的必要条件。因此, 本实验利用筛选自藏灵菇产胆盐水解酶的干酪乳杆菌 J1、嗜热链球菌 Tx 和乳酸乳球菌乳酸亚种 P5 这 3 株乳酸菌, 采用 5L 自动发酵罐进行正交试验优化, 研究发酵条件与生长因子对功能性酸奶复合发酵剂活菌数及球杆菌比例的影响, 确定分批发酵的优化条件, 旨在提高降胆固醇功能性酸奶复合发酵剂的活菌数量, 为制备直投式干粉发酵剂提供参考。

收稿日期: 2012-01-29

基金项目: 北京市自然科学基金项目(5092008; 5062006); 北京市重点学科建设项目(PXM2009_014207_078172)

作者简介: 贾慧(1986—), 男, 硕士研究生, 研究方向为功能性发酵食品。E-mail: jhdqqyx@qq.com

* 通信作者: 刘慧(1963—), 女, 教授, 硕士, 研究方向为食品微生物学与功能性发酵食品。E-mail: foodlh@263.net

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)J1、嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)Tx、乳酸乳球菌乳酸亚种(*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*)P5均由北京市自然科学基金课题组从藏灵菇中筛选,并确定为产胆盐水解酶及科学降血清胆固醇的菌株^[4]。

1.1.2 培养基

活化与发酵培养基:纯牛奶,由蒙牛乳业股份有限公司提供。

生长因子:胡萝卜汁,胡萝卜煮熟榨汁;番茄汁,番茄直接榨汁;生啤酒,由燕京啤酒集团公司提供。

改良MRS培养基^[2,5]:将MRS培养基^[6]中的10g蛋白胨以5g乳酪蛋白水解物和5g胰蛋白胨替代,其他成分不变,调节pH值为6.5。

1.1.3 仪器与设备

BIOF6005GBN型微生物自动发酵罐发展 上海高机生物工程有限公司;BS224S型电子天平 德国赛多利斯集团;MLS-3750全自动高压蒸汽灭菌锅 日本Sanyo公司;BCN-1360B型无菌超净工作台 哈尔滨东联公司;GHP-9160型恒温培养箱 上海一恒科学仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 菌种活化与扩大培养

将干酪乳杆菌J1、嗜热链球菌Tx和乳酸乳球菌乳酸亚种P5这3株乳酸菌分别以2%的接种量移入装有10mL灭菌牛奶(纯牛奶于115℃灭菌15min)的试管中,37℃培养至牛乳凝固。如此传代培养3次得到活化后的菌种,冷藏备用。将活化后的菌株以3%接种量分别接种于装有100mL灭菌牛奶的三角瓶中,37℃培养12h至牛乳凝固,得到扩大培养液,冷藏备用。

1.2.2 发酵方法

将2L纯牛奶投入5L自动发酵罐中,加入生长因子,利用发酵罐灭菌系统于115℃灭菌15min,待发酵罐温度降至接种温度,将J1、Tx和P5这3株菌种的菌液以体积比为3:2:1接种于发酵罐内,总接种量为纯牛奶体积的4%~5%,利用发酵罐控温系统维持发酵温度,并利用发酵罐流加系统自动加入灭过菌的10g/100mL Na₂CO₃溶液^[6],以控制和维持一定的发酵液pH值,发酵期间根据实验设计于一定时间取样,采用平板菌落计数法测定发酵液中的活菌数。

1.2.3 菌落计数方法

于无菌超净工作台将待测样品摇匀,吸取1mL加入

装有9mL灭菌生理盐水的试管中,将其标为10⁻¹,以漩涡振荡器混匀。按上述操作顺序,制成10⁻²~10⁻⁸梯度稀释菌液。根据预计活菌数选择3个适当稀释梯度,吸取0.1mL待测稀释菌液加入改良MRS培养基平板中,无菌涂布棒涂匀,静置10min,于37℃倒置培养48h,进行菌落计数^[6]。

1.2.4 发酵时间的确定

在发酵温度40℃、发酵液pH6.5、无生长因子的条件下,进行发酵实验,于发酵时间2、4、5、6、7、8h取样,测定不同发酵时间发酵液中的活菌数量,同时观察改良MRS培养基平板上球菌和杆菌的菌落特征,分别计数球菌和杆菌的菌落数量,据此得出球菌、杆菌菌落数比例^[7],以确定最适发酵时间。

1.2.5 发酵温度的确定

在发酵液pH6.5,无生长因子的条件下,选取发酵温度37、40、43℃^[8],进行3批次发酵实验,发酵至最适时间取样并测定活菌数,同时观察菌落特征,计算球菌、杆菌菌落数比例,以确定最适发酵温度。

1.2.6 发酵液pH值的确定

在发酵温度40℃,无生长因子的条件下,选取pH6.2、6.5、6.8^[9],进行3批次发酵实验,发酵至最适时间,取样并测定活菌数,同时观察菌落特征,计算球菌、杆菌菌落数比例,以确定最适发酵液pH值。

1.2.7 生长因子的确定

在发酵温度40℃,发酵液pH6.5的条件下,依次选取添加量为纯牛奶体积5%的胡萝卜汁、番茄汁、燕京生啤酒为生长因子^[10],进行3批次发酵实验,并在相同条件下以不添加生长因子为对照,发酵至最适时间,取样并测定活菌数,以确定最适生长因子。

1.2.8 发酵条件优化

根根单因素试验结果,选择发酵时间、温度、发酵液pH值和胡萝卜汁添加量为影响因素,设计四因素三水平(L₉(3⁴))正交试验。在5L自动发酵罐中,以2L纯牛奶为基础培养基,将J1、Tx和P5这3株菌种的菌液以体积比为3:2:1接种于发酵罐内,总接种量为纯牛奶体积的4%~5%,按表1进行正交试验,每组试验重复3次,以测定复合发酵剂活菌数为指标,分析确定高活菌数复合发酵剂的优化发酵条件。

表1 优化发酵条件正交试验设计因素水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal tests for optimizing fermentation conditions

水平	因素			
	A 发酵时间/h	B 发酵温度/℃	C 发酵液pH	D 胡萝卜汁添加量/%
1	5	37	6.2	3
2	6	40	6.5	5
3	7	43	6.8	7

1.2.9 验证实验

根据正交试验结果选择高活力复合发酵剂的优化发酵条件进行实验,检测发酵剂的活菌数量,并与对照组(以4%~5%的总接种量将J1、Tx和P5这3株乳酸菌以体积比3:1:2的比例接种于装有500mL灭菌纯牛奶的三角瓶中(添加1%胡萝卜汁),于37℃保温发酵12h)进行比较,由此验证比较高活菌数复合发酵剂发酵条件的优越性。

2 结果与分析

2.1 发酵时间对复合发酵剂活菌数的影响

在制作普通酸奶时,为了避免球菌、杆菌比例失衡所导致的发酵时间延长,以及产品酸度不足(球菌占优势)或尖酸而涩(杆菌占优势)等问题,先是分别制备单一菌种发酵剂,再以球菌、杆菌菌落数(下同)1:1比例接种发酵,从而保证球、杆菌之间的共生关系,如此可以缩短发酵时间,提高产品适口性。本实验采用的3株乳酸菌中球菌、杆菌之间亦存在一定的共生关系。当3株乳酸菌在牛乳中分别单独培养时,凝乳时间较长;而3株乳酸菌按球菌、杆菌菌落数1:1的比例混合培养时,凝乳时间明显缩短^[11]。因此,只有保证复合发酵剂混合菌种的球菌、杆菌比例为1:1的前提下,才能在酸奶发酵中维持球菌、杆菌的比例平衡的共生关系。据此,可用球杆菌比例作为优化复合发酵剂发酵条件的考察指标。

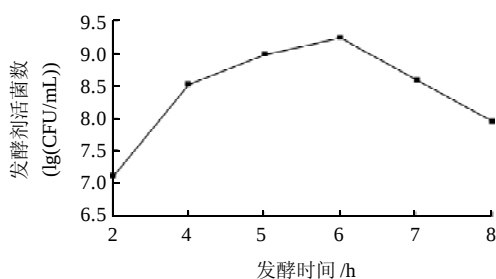


图1 发酵时间对发酵剂活菌数的影响

Fig.1 Effect of fermentation time on total viable count of lactic acid bacteria

将乳酸球菌和乳酸杆菌混合为复合发酵剂进行发酵时,初期球菌生长速度较快,杆菌生长速度较慢。当乳酸菌生长繁殖至一定程度时,球菌所产生的代谢产物可刺激杆菌快速生长,从而达到球菌、杆菌数量平衡。由图1可知,乳酸菌经过适应期后,迅速进入对数生长期^[11],发酵剂活菌数于6h达到最大值,即 1.7×10^9 CFU/mL。由于杆菌J1菌株在改良MRS平板上的菌落特征为表面粗糙、雪花状、边缘不规则、扁平,而球菌Tx和P5菌株的菌落特征为表面光滑、边缘整齐、呈圆形、凸起,因此,可根据计数不同特征的菌落数量计算球菌杆菌的比例。

表2 发酵时间对发酵剂球菌、杆菌比例的影响

Table 2 Effect of fermentation time on ratio between *Lactococcus* and *Lactobacillus*

发酵时间/h	2	4	5	6	7	8
球、杆菌菌落数比例	1.2:1	1.5:1	1.3:1	1.1:1	0.8:1	0.7:1

由表2可知,将球菌、杆菌以菌落数比例1:1混合发酵后,初期球菌迅速生长繁殖,球菌、杆菌比例于2h达到1.2:1,4h达到1.5:1;之后杆菌生长速度加快,球菌、杆菌比例不断缩小,于5h达到1.3:1,6h达到1.1:1;之后球、杆菌比例逐渐失衡,导致总活菌数降低。因此,选取最适发酵时间为6h。

2.2 发酵温度对复合发酵剂活菌数的影响

发酵温度是影响菌株生长繁殖的重要因素之一。发酵温度不同,菌株的生长状况明显不同。若发酵温度偏低,则乳酸球菌生长占优势,引起球菌杆菌共生关系失衡,乳酸杆菌生长缓慢,导致发酵剂总活菌数降低;若发酵温度偏高,则乳酸杆菌生长占优势,同样导致球菌杆菌平衡关系被打破,乳酸球菌生长受阻,发酵剂总活菌数降低^[12]。

表3 发酵温度对发酵剂活菌数的影响

Table 3 Effect of fermentation temperature on total viable count of lactic acid bacteria

发酵温度/℃	发酵剂活菌数/(10^9 CFU/mL)	球菌、杆菌菌落数比例
37	7.2	1.4:1
40	17	1.1:1
43	4.3	0.8:1

由表3可知,当发酵温度为40℃时,发酵剂活菌数最高,为 1.7×10^9 CFU/mL,此时球菌、杆菌菌落数比例为1.1:1,表明球菌、杆菌生长繁殖较为平衡;当发酵温度为37℃时,发酵剂活菌数次之,为 7.2×10^8 CFU/mL,此时球菌、杆菌菌落数比例为1.4:1,表明球杆菌共生关系失衡;当发酵温度为43℃时,发酵剂活菌数最低,为 4.3×10^8 CFU/mL,此时球菌、杆菌菌落数比例为0.8:1,表明球菌、杆菌平衡关系已被打破。由此说明J1、Tx和P5这3株乳酸菌最适生长温度均在40℃附近,此时乳酸杆菌与乳酸球菌生长趋势基本平衡,且发酵剂活菌数最高。因此,选取最适发酵温度为40℃。

2.3 发酵液pH值对复合发酵剂活菌数的影响

发酵液pH值对菌株生长繁殖有较大影响。在适当pH值条件下,有些乳酸杆菌和球菌将会在生长繁殖过程中形成共生关系,可在短时间内互相促进生长繁殖,发酵乳糖产生乳酸^[11]。当发酵液pH值高于菌种最适生长pH值时,乳酸球菌生长占优势,球杆菌平衡关系失衡,发酵剂总活菌数降低;而当发酵液pH值低于菌种

最适生长 pH 值时, 乳酸杆菌生长繁殖较快, 球菌、杆菌共生关系被打破, 乳酸球菌生长缓慢, 导致发酵剂总活菌数降低^[13]。

表 4 发酵液 pH 值对发酵剂活菌数的影响

Table 4 Effect of initial medium pH on total viable count of lactic acid bacteria

发酵液 pH	发酵剂活菌数/(10 ⁸ CFU/mL)	球菌、杆菌菌落数比例
6.2	8.3	0.8:1
6.5	17	1:1
6.8	6.5	1.3:1

由表 4 可知, 当发酵液 pH6.5 时, 发酵剂活菌数最高, 为 1.7×10^8 CFU/mL, 此时球菌、杆菌菌落数比例为 1:1, 表明球菌、杆菌生长繁殖较为平衡; 当发酵液 pH6.2 时, 发酵剂活菌数次之, 为 8.3×10^8 CFU/mL, 此时球、杆菌比例为 0.8:1, 表明球菌、杆菌共生关系失衡; 当发酵液 pH6.8 时, 发酵剂活菌数最低, 为 6.5×10^8 CFU/mL, 此时球菌、杆菌比例为 1.3:1, 表明球杆菌平衡关系已被打破。因此, 选取最适发酵液 pH 值为 6.5。

2.4 生长因子对复合发酵剂活菌数的影响

表 5 生长因子对发酵剂活菌数的影响

Table 5 Effect of growth factors on total viable count of lactic acid bacteria

生长因子	对照组	新鲜胡萝卜汁	新鲜番茄汁	燕京生啤酒
发酵剂活菌数 / (10 ⁹ CFU/mL)	1.7	6.7	2.3	2.1

胡萝卜汁中富含胡萝卜素、番茄红素、氨基酸、维生素以及铜、锌等无机盐, 可刺激乳酸菌生长繁殖; 番茄汁富含番茄红素和 VC, 对乳酸菌的生长繁殖有促进作用; 燕京生啤酒含有麦芽汁的各种氨基酸、肽类以及葡萄糖、麦芽糖、糊精等营养物质, 可促进乳酸菌生长繁殖^[10, 12]。由表 5 可知, 不添加生长因子的对照组, 发酵剂活菌数最低, 为 1.7×10^9 CFU/mL; 以胡萝卜汁为生长因子的发酵剂活菌数最高, 达到 6.7×10^9 CFU/mL, 明显高于对照组; 以番茄汁为生长因子的发酵剂活菌数为 2.3×10^9 CFU/mL, 以燕京生啤酒为生长因子的发酵剂活菌数为 2.1×10^9 CFU/mL, 两者与对照组相比差异较小, 表明番茄汁和燕京生啤酒对 3 株乳酸菌生长繁殖的促进效果不明显。因此, 选取最适生长因子为 5% 胡萝卜汁。

2.5 藏灵菇源乳酸菌复合发酵剂的发酵条件优化

由表 6 极差分析可知, 对复合发酵剂的活菌数影响因素的顺序为: $D > A > B > C$, 即胡萝卜汁添加量影响最大, 发酵时间次之, 发酵液 pH 值影响最小; 由直观分析得出复合发酵剂分批发酵条件的最优组合为

$A_2B_2C_2D_2$, 在该条件下所得发酵剂中活菌数为 6.7×10^9 CFU/mL, 经验证实验, 较 9 组试验最高组所得的活菌数(6.27×10^9 CFU/mL)高, 故确定复合发酵剂最佳发酵条件为: 发酵时间 6h、发酵温度 40℃、发酵液 pH6.5、胡萝卜汁添加量 5%。

表 6 优化发酵条件 L₉(3⁴) 正交试验结果

Table 6 Orthogonal array design matrix and experimental results for optimizing fermentation conditions

试验号	因素				发酵剂活菌数 / (10 ⁹ CFU/mL)
	A 发酵时间 / h	B 发酵温度 / °C	C 发酵液 pH	D 胡萝卜汁添加量 / %	
1	1	1	1	1	0.89
2	1	2	2	2	6.27
3	1	3	3	3	0.48
4	2	1	2	3	2.45
5	2	2	3	1	2.57
6	2	3	1	2	2.92
7	3	1	3	2	0.87
8	3	2	1	3	0.65
9	3	3	2	1	0.52
k_1	2.55	1.39	1.49	1.33	
k_2	2.65	3.16	2.97	3.34	
k_3	0.67	1.31	1.30	1.19	
R	1.98	1.85	1.67	2.15	

2.6 验证实验结果

经验证, 在优化条件下进行发酵, 复合发酵剂活菌数可达 6.7×10^9 CFU/mL, 为优化前的活菌数(9.6×10^7 CFU/mL)的近 70 倍。而其他相关研究优化后所得活菌数则为优化前的 37~55 倍不等^[14-16], 与之相比, 本实验发酵剂优化后活菌数提高效果更为明显。

3 结 论

3.1 生长因子胡萝卜汁添加量是影响复合发酵剂活菌数量的最主要因素, 发酵时间次之, 发酵温度相对影响较小, 发酵液 pH 值影响最小。即影响复合发酵剂活菌数量的主次因素顺序为: 胡萝卜汁添加量 > 发酵时间 > 发酵温度 > 发酵液 pH 值。

3.2 利用筛选自藏灵菇产胆盐水解酶的干酪乳杆菌 J1、嗜热链球菌 Tx 和乳酸乳球菌乳酸亚种 P5, 采用 5L 自动发酵罐进行四因素三水平(L₉(3⁴))正交设计试验, 确定酸奶复合发酵剂分批发酵的优化条件为: 发酵时间 6h、发酵温度 40℃、发酵液 pH6.5、胡萝卜汁添加量 5%。

3.3 在正交试验得出的优化条件下进行分批发酵, 酸奶复合发酵剂活菌数可达 6.7×10^9 CFU/mL, 是优化前的近 70 倍。可利用该高活力复合发酵剂, 用于制备降胆固醇功能性酸奶的直投式干粉发酵剂。

参考文献:

- [1] 刘慧,熊利霞,张红星,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,2008,24(11):117-121.
- [2] 刘慧,熊利霞,张红星,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,2008,29(12):114-118.
- [3] GRAZIELA B B, MARIA C P, MARCO A Z A. Optimization of probiotic and lactic acid production by *Lactobacillus plantarum* in submerged bioreactor systems[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2011, 37(2): 205-212.
- [4] 冉冉,王世平,刘慧.藏灵菇源酸奶复合菌发酵剂对大鼠降胆固醇的研究[J].营养学报,2009,31(1):59-62.
- [5] 刘慧,张红星,代娟.藏灵菇中嗜热链球菌高产胞外多糖发酵条件的优化研究[J].中国酿造,2007(6):41-45.
- [6] 刘慧.现代食品微生物学实验技术[M].北京:中国轻工业出版社,2006:143-147;263.
- [7] 李艾黎,霍贵成,邓凯波.不同混生模式对酸奶发酵剂球杆菌比例的影响[J].食品工业科技,2011,32(7):201-206.
- [8] BHASKAR N, SURESH P V, SAKHARE P Z, et al. Shrimp biowaste fermentation with *Pediococcus acidolactici* CFR2182: optimization of fermentation conditions by response surface methodology and effect of optimized conditions on deproteinization/demineralization and carotenoid recovery[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 40(5): 1427-1434.
- [9] 丁海兵,潘道东,周配东.高产丁二酮乳球菌的选育及发酵条件优化[J].食品科学,2011,32(21):142-147.
- [10] 杨媛,樊明涛,葛武鹏.嗜酸乳杆菌促生长物质及增菌培养基优化研究[J].西北农业学报,2007,16(6):120-123.
- [11] 刘慧,李平兰,熊利霞,等.功能性开菲尔酸奶复合发酵剂的研制[J].食品科学,2005,26(12):139-143.
- [12] 刘慧.现代食品微生物学[M].2版.北京:中国轻工业出版社,2011:288;364;370-371.
- [13] 刘慧,李平兰,王少君,等.功能性开菲尔牛奶酒最佳发酵条件的研究[J].食品科学,2004,25(10):126-129.
- [14] REDDY G, ALTAF M, NAVEENA B J, et al. Amyolytic bacterial lactic acid fermentation: a review[J]. Biotechnology Advances, 2008, 26(1): 22-34.
- [15] NAVEENA B J, ALTAF M, BHADRAYA K, et al. Direct fermentation of starch to L(+)lactic acid in SSF by *Lactobacillus amylophilus* GV6 using wheat bran as support and substrate: medium optimization using RSM[J]. Process Biochemistry, 2005, 40(2): 681-690.
- [16] 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.