

酸马奶中乳酸菌与酵母菌的共生发酵特性

闫彬, 贺银凤*

(内蒙古农业大学食品科学与工程学院, 内蒙古 呼和浩特 010018)

摘要: 对内蒙古锡盟地区酸马奶中分离出的 1 株乳酸菌和 1 株酵母菌进行混合培养, 初步确定双菌混合发酵的最佳培养条件: 双菌发酵计数乳酸菌活菌数的最佳发酵温度为 30℃ 摇床培养 12h 再转到 37℃ 静置培养, 最佳发酵时间为 20h, 脱脂乳中添加的营养成分最优配方为蛋白胨 1g/100mL、蔗糖 0.5g/100mL、酵母浸粉 0.5g/100mL; 双菌发酵计数酵母菌活菌数的最佳发酵温度为 37℃ 静置培养 8h 再转到 30℃ 摇床培养, 最佳发酵时间为 32h, 脱脂乳中添加的营养成分最优配方为蛋白胨 0.5g/100mL、蔗糖 0.5g/100mL、酵母浸粉 0.5g/100mL; 选用乳酸菌与酵母菌质量比 1:1 作为菌种配比。同时在最佳生长条件下探讨乳酸菌与酵母菌的相互作用关系以及后发酵对二者共生作用的影响, 结果表明, 促进乳酸菌生长的活性物质生成的时间为 12h 以前(即将酵母菌在 5 号配方中 30℃ 摇床培养), 促进酵母菌生长的活性物质生成的时间应为 16h 以前(即将乳酸菌在 1 号配方中 37℃ 静置培养), 在后发酵过程中, 乳酸菌与酵母菌双菌培养的活菌数都极显著高于单菌培养($P < 0.01$)。

关键词: 乳酸菌; 酵母菌; 相互作用

Symbiotic Fermentation Characteristics of Lactic Acid Bacteria and Yeast Isolated from Koumiss in Inner Mongolia

YAN Bin, HE Yin-feng*

(College of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China)

Abstract: The co-cultivation of a strain of lactic acid bacteria and a strain of yeast isolated from koumiss in Ximeng region of Inner Mongolia was studied. The best fermentation conditions of two-strain system were preliminarily explored. The optimal conditions for maximum viable cell count of lactic acid bacteria were shake culture at 30 °C for 12 h and then stationary culture at 37 °C for another 20 h in a medium based on skim milk with the addition of 1 g/100 mL peptone, 0.5 g/100 mL sucrose and 0.5 g/100 mL yeast extract powder, while maximum viable cell count of yeast was achieved after stationary culture at 37 °C for 8 h and then shake culture at 30 °C for another 32 h in skim milk with the addition of 0.5 g/100 mL peptone, 0.5 g/100 mL sucrose and 0.5 g/100 mL yeast extract powder. The inoculum was a mixture of lactic acid bacteria and yeast at a ratio of 1:1 (m/m). In addition, the effect of secondary fermentation on the symbiotic interaction between the two species of microorganisms was explored under the optimal growth conditions. Active substances promoting the growth of lactic acid bacteria were formed during the first 12 h of shake culture of yeast in medium No. 5 at 30 °C, while those promoting the growth of yeast were formed during the first 16 h of stationary culture of lactic acid bacteria in medium No. 1 at 37 °C. During the secondary fermentation, the viable cell counts of yeast and lactic acid bacteria in co-cultures were both significantly higher than those in pure cultures ($P < 0.01$).

Key words: lactic acid bacteria; yeast; interaction

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)07-0131-07

传统酸马奶也叫马奶酒, 蒙语称为“策格”, 它的制作和饮用历史悠久, 文化内涵丰富。酸马奶是马乳经乳酸菌、酵母菌发酵后的制品。酸马奶中由于含有大量酵母菌和有机酸, 故可以活化胰腺机能, 促进消化, 增进食欲; 由于酵母细胞和乳酸菌的生命活力, 酸马奶能够杀死腐败菌并具有抑制其他微生物包括结核杆菌的

性能。另外, 由于酸马奶中含有丰富的多不饱和脂肪酸、VB₁、VB₁₂、VC 以及神经系统交换必需的微量元素和钙等物质, 使得它具有一定的防病治病功效^[1]。

除了酸马奶, 乳酸菌和酵母菌共同发酵制品还有牛奶奶酒、葡萄酒、发酵乳饮料、酸奶油、奶酪^[2]、黄油^[3]、酥油^[4]、面包、火腿等, 深受世界各地人们喜

收稿日期: 2011-05-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(31060222)

作者简介: 闫彬(1982—), 女, 硕士研究生, 研究方向为乳酸菌的开发与应用。E-mail: a20261jia128@163.com

* 通信作者: 贺银凤(1960—), 女, 教授, 博士, 研究方向为食品科学技术。E-mail: heyinf@yahoo.com.cn

爱。乳酸菌与酵母菌在成品的质地、风味、生物活性和医疗功能方面起着不可替代的作用。因此,研究发酵制品中乳酸菌与酵母菌的协同生长机理,对更广泛地挖掘益生菌功能具有重要的理论意义和实际应用价值,并对发酵制品行业的发展有着深远的指导意义。

本实验将从内蒙古锡盟地区酸马奶酒中分离得到的乳酸菌和酵母菌中优选出的共生性较好的菌株,在脱脂乳中以单菌株发酵为对照,确定双菌混合发酵最佳的培养条件,并在最佳培养条件下探讨二者的共生相互作用,为进一步探讨乳酸菌和酵母菌共生产过程中的生物信号系统提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌株与培养基

内蒙古锡盟地区酸马奶中分离出的1株乳酸菌和1株酵母菌,乳酸菌编号为1-3-2(简记为L11),酵母菌编号为6-4(简记为Y12)^[1],由内蒙古农业大学“酸马奶酒中抗菌因子的研究”课题组提供。

葡萄糖-酵母膏-蛋白胨(YEPD)琼脂培养基、MRS琼脂培养基、孟加拉红培养基、改良CHALMERS培养基均按文献[5]配制。

1.2 仪器与设备

BCN-1360微生物洁净工作台、HZQ-X100振荡培养箱 哈尔滨市东联电子技术开发有限公司;HV-25高压锅 日本Hirayama公司;BCD-221BSY冰箱 青岛海尔股份有限公司;SKP-01电热恒温培养箱 湖北省黄合恒丰医疗器械有限公司;SK-1快速混匀器 常州国华电器有限公司;Sartorivts PB-10 pH仪 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司。

1.3 方法

1.3.1 菌种的活化

将从酸马奶中分离出的两株冻干菌种接种于灭菌脱脂乳培养基中,活化3代后备用。酵母菌于30℃活化,每一代活化24h,菌落数为 3.60×10^7 ;乳酸菌于37℃活化,每一代活化24h,菌落数为 7.80×10^8 CFU/mL。

1.3.2 乳酸菌与酵母菌共生发酵最佳温度的确定

将乳酸菌与酵母菌按质量比1:1(总接种量为4%)接入灭菌脱脂乳中先37℃静置培养8h后转到30℃、130r/min摇床培养至36h。每隔4h测定乳酸菌与酵母菌的活菌数,绘制生长曲线。

将乳酸菌与酵母菌按质量比1:1总接种量为4%)接入灭菌脱脂乳中先30℃摇床培养12h后转到37℃静置培养至36h。每隔4h测定乳酸菌与酵母菌的活菌数,绘制生长曲线。

以单菌发酵作为对照:乳酸菌在灭菌脱脂乳中37℃静置培养,酵母菌在灭菌脱脂乳中30℃摇床培养。每隔4h分别测定活菌数,绘制生长曲线。

1.3.3 脱脂乳培养基配方的优化

在脱脂乳中添加3种营养物质:酵母浸粉、蔗糖和蛋白胨。这3种营养物质的添加量分别设为0.5g/100mL和1g/100mL水平,考虑到因素间的交互作用,选用L₈(2⁷)正交表设计正交试验(表1)^[6],优化脱脂乳培养基。测定指标:双菌发酵在30℃摇床培养12h再转到37℃静置培养至20h,测乳酸菌活菌数,以单菌乳酸菌37℃静置培养至20h测定的活菌数作为对照;双菌发酵在37℃静置培养8h再转到30℃摇床培养至32h,测定酵母菌活菌数,以单菌酵母菌30℃摇床培养至32h测定的活菌数作为对照。对数据进行方差分析,以确定双菌发酵的最佳配方。

表1 正交试验因素水平设计

Table 1 Factors and levels in orthogonal array design

水平	因素		
	A 蛋白胨质量 浓度/(g/100mL)	B 蔗糖质量 浓度/(g/100mL)	C 酵母浸粉质量 浓度/(g/100mL)
1	0.5	0.5	0.5
2	1.0	1.0	1.0

1.3.4 不同接种比例对乳酸菌与酵母菌共生作用的影响

在双菌混合培养的最佳温度、最佳时间和最优配方组合培养基中考察菌种质量比的单因素试验,将乳酸菌与酵母菌质量比分别设为1:1、1:2和2:1(总接种量为4%、4.5%和4.5%),以单菌发酵作为对照进行活菌计数,以确定最佳接种比例。

1.3.5 优化条件下混菌培养的发酵特性

在选定的乳酸菌与酵母菌共生培养的最佳温度和发酵配方条件下,按照最佳的接种比例将乳酸菌与酵母菌接种到灭菌脱脂乳中培养,每隔4h测定活菌数及pH值,乳酸菌培养到36h,酵母菌培养到40h,绘制生长曲线,以确定促生长活性物质生成的最佳时间段。

1.3.6 后发酵对乳酸菌与酵母菌共生作用的影响

双菌在30℃摇床培养至12h,以此作为发酵终点计乳酸菌活菌数,再将样品冷藏于4℃冰箱中,48h时测乳酸菌活菌数(以单菌培养为对照);双菌在37℃静置培养8h再转到30℃摇床培养至16h,以此作为发酵终点计酵母菌活菌数,再将样品冷藏于4℃冰箱中,48h时测酵母菌活菌数(以单菌培养为对照),判断后发酵对乳酸菌与酵母菌之间相互作用的影响。

1.4 指标测定

当一种产品中存在多种微生物的时候,它们之间必然会有相互作用,其类型通常是依据各种微生物活菌数的变化来判断的。

1.4.1 活菌数测定

在无菌操作条件下,将充分混匀后菌液吸取1mL加入9mL灭菌生理盐水的试管中,制成1:10的均匀稀释液。再吸取其中1mL加入9mL灭菌生理盐水中,并依

次做 10 倍递增稀释, 取适当稀释度的发酵液进行平板倾注法计数。

乳酸菌单菌计数采用 MRS 琼脂培养基, 酵母菌单菌计数采用 YEPD 琼脂培养基。乳酸菌与酵母菌混合培养计数乳酸菌数采用改良 CHALMERS 培养基, 乳酸菌与酵母菌混合培养计数酵母菌数采用孟加拉红琼脂培养基。

每个样做两个稀释度, 每个稀释度做两个重复, 乳酸菌的菌落数用 30~300CFU/mL 的平板计数, 酵母菌的菌落数用 10~150CFU/mL 的平板计数, 取平均值。乳酸菌在 37℃ 培养 1d, 酵母菌在 30℃ 摇床培养 2d。

1.4.2 pH 值的测定

采用 Sartorius PB-10 pH 仪测定。

1.4.3 数据统计分析

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SAS 9.0 软件的 ANOVA 进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌与酵母菌共生发酵最佳温度的确定

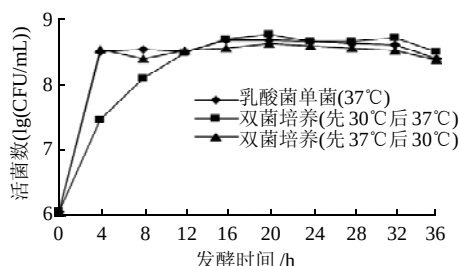


图1 乳酸菌在双菌混合培养不同温度下的生长曲线
Fig.1 Growth curve of lactic acid bacteria in mixed cultivation at different temperatures

图1表明, 与乳酸菌单菌培养相比, 双菌发酵(先 37℃ 后 30℃)中的乳酸菌活菌数在 4h 以后开始低于单菌培养的活菌数, 而双菌发酵(先 30℃ 后 37℃)中的乳酸菌适应期和对数生长期较长并生长缓慢, 到 12h 活菌数与单菌培养的活菌数相当, 之后进入稳定生长期, 活菌数继续上升至 20h 时达到最大值。可以看出, 乳酸菌与酵母菌共生发酵, 酵母菌在适宜的温度 30℃ 条件下首先旺盛生长, 酵母菌在发酵过程中水解脱脂乳中的乳糖、蛋白质等为乳酸菌提供了许多营养因子, 例如氨基酸, B 族维生素和丙酮酸盐等其他物质^[1], 之后转到 37℃ 乳酸菌最适生长温度条件下, 乳酸菌利用这些营养物质开始大量繁殖, 比单独乳酸菌发酵的活菌数明显增多, 到 20h 达到最大值。而且, 酵母菌大分子物质能诱导乳酸菌中氨基肽酶的合成, 使氨基酸及小分子缩氨酸(缩氨酸是 2~50 个氨基酸连接, 它表现出不同于蛋白质的活性和机能)含量增加, 从而促进乳酸菌的生长。酒精发

酵或酵母菌自溶产生的吡喃甘露糖可以吸收中链脂肪酸, 解除其对乳酸菌的毒害作用, 还可能增加乳酸菌的 α -葡萄糖苷酶、 β -葡萄糖苷酶、N-乙酰基 β -葡萄糖脱水酶及肽酶的活性, 间接地促进了乳酸菌的生长^[7]。

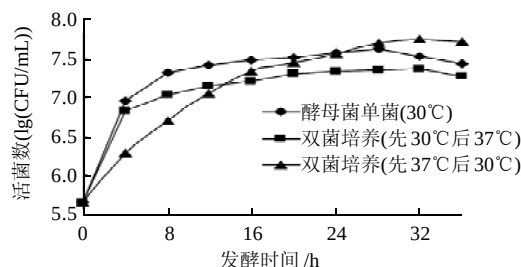


图2 酵母菌在双菌混合培养不同温度条件下的生长曲线
Fig.2 Growth curve of yeasts in mixed cultivation at different temperatures

图2表明, 与酵母菌单菌培养相比, 双菌发酵(先 30℃ 后 37℃)中的酵母菌在 0~4h 生长速率与单菌相当, 但在 4h 之后活菌数明显低于单菌培养。双菌发酵(先 37℃ 后 30℃)中的酵母菌由于先在 37℃ 条件下培养, 适应期和对数生长期与单菌相比较长, 并且生长速率缓慢, 到 24h 活菌数与单菌相当, 培养到 32h, 酵母菌活菌数达到最大值, 之后进入稳定生长期。可以看出, 乳酸菌与酵母菌共生发酵, 乳酸菌在适宜的温度 37℃ 条件下首先旺盛生长, 乳酸菌将乳糖分解成半乳糖和葡萄糖这些易于吸收的单糖, 为酵母菌提供碳源^[8], 并为酵母菌提供一个适宜的 pH 值生长环境, 之后转到 30℃ 酵母菌最适生长温度条件下, 酵母菌开始大量繁殖, 比单独酵母菌发酵明显加快, 数量也开始增多, 到 32h 达到最大值。

因此, 双菌发酵时计数乳酸菌活菌数的最佳发酵温度定为 30℃ 摇床培养 12h 再转到 37℃ 静置培养, 最佳发酵时间定为 20h; 双菌发酵时计数酵母菌活菌数的最佳发酵温度定为 37℃ 静置培养 8h 再转到 30℃ 摇床培养, 最佳发酵时间定为 32h。

2.2 脱脂乳培养基配方的优化

在脱脂乳培养基中添加一定比例的营养物质, 有助于研究乳酸菌与酵母菌之间的共生相互作用。酵母浸粉是由酵母自溶和酶解及发酵过程中产生的氨基酸、核苷酸、生物肽等混合物提纯精制而成, 酵母浸粉含有必需氨基酸、维生素及核糖核酸、烟酸、谷胱甘肽等, 符合二者共生时的条件。由于乳酸菌水解蛋白能力较弱, 更倾向于从牛乳蛋白获取必需氨基酸, 因此添加一定量的大豆蛋白胨, 在酵母菌水解蛋白胨生成维生素等营养因子的条件下, 乳酸菌被激活。碳水化合物是酵母菌可以利用的主要营养物质, 酵母菌可以发酵麦芽糖、蔗糖等, 可是牛奶中这些糖含量很少, 会导致二者对碳源的竞争而影响研究二者的共生关系, 因此添加

蔗糖可供酵母菌做碳源利用提高发酵效率。酵母菌可以将蔗糖水解为葡萄糖和果糖,乳酸菌可以利用葡萄糖和果糖这类单糖进行发酵,同时酵母菌又可以利用葡萄糖、蔗糖,这样既丰富了基质碳源,又减小了二者对营养物质的竞争力,也暗示了二者之间的共生关系。

从表2可以看出,在8种配方组合中,乳酸菌在混合培养条件下长势略好于单菌培养,但其中乳酸菌在配方3、4、7中混合培养的活菌数没有对照长势好,究其原因,可能酵母菌在蔗糖含量较高(1g/100mL)的基质中长势旺盛,消耗了较多的营养物质,影响了乳酸菌对碳源和氮源的需求,妨碍了乳酸菌的正常生长,并且可能由于蔗糖量过多改变了乳酸菌所能利用的水分活度,影响到酶活力进而影响菌体的生长。比较 R 值大小,得出诸因素及其交互作用对试验结果影响的主次顺序, B 因素为最大,其次是 $A \times B \times C$ 、 $B \times C$ 、 C 因素,再次为 $A \times B$ 、 $A \times C$ 和 A 因素。对于 B 因素,由于 $k_1 > k_2$,选定 B_1 为最佳水平;对于 A 和 C 两因素,由于二者的交互作用超过了 A 和 C 单独作用对乳酸菌促生长的影响,通过对二者的搭配效果分析得出最好搭配为 A_2C_1 ,因此最优水平组合为 $B_1A_2C_1$ 。

从表3可以看出,在8种配方组合中,酵母菌在混合培养条件下长势均优于单独培养。比较 R 值大小,得出诸因素及其交互作用对试验结果影响的主次顺序, $A \times B$ 的交互作用最大,其次是 C 、 $B \times C$ 、 $A \times C$,再次为 B 、 A 、 $A \times B \times C$ 。由于 $A \times B$ 的交互作用超过了 A 和 B 单独作用对酵母菌促生长的影响,通过对二者的搭配效果分析得出最好搭配为 A_1B_1 。对于 C 因素,由于 $k_1 > k_2$,选定 C_1 为最佳水平,因此最优水平组合为 $A_1B_1C_1$,即蛋白胨0.5g/100mL、蔗糖0.5g/100mL、酵母浸粉0.5g/100mL。

表4 乳酸菌培养正交试验方差分析结果

Table 4 Analysis of variance for the experimental results of orthogonal array design for optimizing medium formula for lactic acid bacteria

方差来源	偏差平方和	自由度	均方	F 值	显著性
B	162.00	1	162.00	45.21	***
C	36.13	1	36.13	10.08	*
$B \times C$	72.00	1	72.00	20.09	**
$A \times B \times C$	98.00	1	98.00	27.35	**
A	3.13	1			
误差项 $A \times B$	4.50	1	3.58		
$A \times C$	3.13	1			

注: ***,极显著($F > F_{0.01}$); **,显著($F_{0.05} < F < F_{0.01}$); *,较显著($F_{0.1} < F < F_{0.05}$)。下同。

表2 脱脂乳培养基中乳酸菌培养配方优化正交试验设计结果与分析

Table 2 Orthogonal array design and results for optimizing medium formula for lactic acid bacteria

试验号	A	B	$A \times B$	C	$A \times C$	$B \times C$	$A \times B \times C$	单菌培养计数 L11/ (10^6 CFU/mL)	双菌培养计数 L11/ (10^6 CFU/mL)	菌落数增幅/ (10^6 CFU/mL)
1	1	1	1	1	1	1	1	13.00 ± 0.33	15.50 ± 1.33	2.50 ± 0.33
2	1	1	1	1	2	2	2	5.50 ± 0.75	12.00 ± 0.00	6.50 ± 0.19
3	1	2	2	1	1	2	2	10.50 ± 0.75	6.50 ± 0.08	-4.00 ± 0.17
4	1	2	2	2	2	1	1	8.50 ± 2.08	6.50 ± 0.75	-2.00 ± 0.59
5	2	1	2	1	2	1	2	7.50 ± 0.75	16.00 ± 0.00	8.50 ± 0.19
6	2	1	2	2	1	2	1	7.50 ± 0.75	8.50 ± 0.08	1.00 ± 0.15
7	2	2	1	1	2	2	1	20.50 ± 0.75	5.50 ± 4.08	-15.00 ± 3.69
8	2	2	1	2	1	1	2	3.50 ± 0.08	7.00 ± 1.33	3.50 ± 0.52
K_1	3.00	18.50	-2.5	-8.00	3.00	12.50	-13.50			
K_2	-2.00	-17.50	3.50	9.00	-2.00	-11.50	14.50			
k_1	0.75	4.63	-0.63	-2.00	0.75	3.13	-3.38			
k_2	-0.50	-4.38	0.88	2.25	-0.50	-2.88	3.63			
R	1.25	9.00	1.50	4.25	1.25	6.00	7.00			

表3 脱脂乳培养基中酵母菌培养配方优化正交试验设计结果与分析

Table 3 Orthogonal array design and results for optimizing medium formula for yeast

试验号	A	B	$A \times B$	C	$A \times C$	$B \times C$	$A \times B \times C$	单菌培养计数 Y12/ (10^6 CFU/mL)	双菌培养计数 Y12/ (10^6 CFU/mL)	菌落数增幅/ (10^6 CFU/mL)
1	1	1	1	1	1	1	1	49.50 ± 2.08	155.50 ± 2.08	106.00 ± 0.00
2	1	1	1	1	2	2	2	84.00 ± 1.33	199.50 ± 0.08	115.50 ± 0.52
3	1	2	2	1	1	2	2	47.00 ± 1.33	137.50 ± 2.08	90.50 ± 0.19
4	1	2	2	2	2	1	1	53.50 ± 2.08	123.50 ± 0.75	70.00 ± 0.59
5	2	1	2	1	2	1	2	62.00 ± 0.33	148.00 ± 0.33	86.00 ± 0.00
6	2	1	2	2	1	2	1	80.00 ± 1.33	155.00 ± 0.33	75.00 ± 0.33
7	2	2	1	1	2	2	1	61.00 ± 0.00	175.50 ± 0.08	114.50 ± 0.03
8	2	2	1	2	1	1	2	68.00 ± 1.33	155.00 ± 0.33	87.00 ± 0.33
K_1	382.00	382.50	423.00	397.00	358.50	349.00	365.50			
K_2	362.50	362.00	321.50	347.50	386.00	395.50	379.00			
k_1	95.50	95.63	105.75	99.25	89.63	87.25	91.38			
k_2	90.63	90.50	80.38	86.88	96.50	98.88	94.75			
R	4.87	5.13	25.37	12.37	6.87	11.63	3.37			

从表4可以看出,双菌培养计乳酸菌活菌数的最优配方组合是5号,即最优水平组合为 $B_1A_2C_1$ 。蛋白胨1g/100mL、蔗糖0.5g/100mL、酵母浸粉0.5g/100mL,方差分析可知, B 因素对双菌培养中乳酸菌的生长影响极显著, B 与 C 的交互作用和 A 、 B 与 C 的交互作用对其影响显著,而 C 因素对其影响较显著。这说明碳源(蔗糖)对双菌培养中乳酸菌的影响最大,可以解释为双菌先在30℃培养,酵母菌将蔗糖分解为单糖供乳酸菌利用,丰富了基质碳源。

表5 酵母菌培养正交试验方差分析结果

Table 5 Analysis of variance for the experimental results of orthogonal array design for optimizing medium formula for yeast

方差来源	偏差平方和	自由度	均方	F值	显著性
$A \times B$	1283.00	1	1283.00	27.32	**
C	301.30	1	301.30	6.42	*
$A \times C$	89.56	1	89.56	1.91	ND
$B \times C$	265.30	1	265.30	5.65	*
A	42.56	1	46.97		
B	47.56	1			
$A \times B \times C$	17.81	1			
误差	33.00	0			

注:ND.不显著。

由表5方差分析可知, A 与 B 的交互作用对双菌培养中酵母菌的生长影响显著, C 因素和 B 与 C 的交互作用对其影响较显著, A 与 C 的交互作用对其没有影响。蛋白胨与蔗糖的交互作用对双菌培养中酵母菌的影响显著,可以解释为双菌培养在37℃乳酸菌优先生长,通过利用基质中的碳源和氮源产生易于酵母菌吸收的单糖、游离氨基酸以及多种维生素(VB_1 、 VB_6 、 VB_{12} 、叶酸等)^[9],这些小分子物质为酵母菌的生长提供了丰富的营养来源。

2.3 不同接种比例对乳酸菌与酵母菌共生作用的影响

在5号配方脱脂乳培养基中,双菌在30℃摇床培养12h再转到37℃静置培养至20h,计乳酸菌活菌数,以单菌乳酸菌在5号配方中37℃静置培养作为对照。在1号配方脱脂乳培养基中,双菌在37℃静置培养8h再转到30℃摇床培养至32h,计酵母菌活菌数,以单菌酵母菌在1号配方脱脂乳培养基中30℃摇床培养作为对照。结果见表6、7。

表6 5号脱脂乳培养基配方中确定乳酸菌接种比例的单因素试验结果

Table 6 Viable cell counts of lactic acid bacteria and yeast after co-culture in medium formula No.5

菌落数/(10 ⁶ CFU/mL)	L11:Y12 菌种质量比		
	1:2	1:1	2:1
单菌培养乳酸菌数	6.50 ± 0.08	7.45 ± 1.33	7.00 ± 0.33
双菌培养乳酸菌数	7.00 ± 0.33	10.50 ± 0.08	4.00 ± 0.33
菌落数增幅	0.5 ± 0.02 ^a	3.05 ± 0.52 ^b	-3 ± 0 ^c

注:同行小写字母不同表示不同接种比例对二者共生作用的影响差异极显著($P < 0.01$)。表7同。

从表6可以看出,乳酸菌与酵母菌接种质量比设为1:2、1:1和2:1时结果有极显著差异($P < 0.01$)。与乳酸菌单菌培养相比,乳酸菌与酵母菌接种质量比为1:2时对乳酸菌的促生作用不很明显,可能由于酵母菌在生长代谢中过多地消耗了基质中的营养物质而导致乳酸菌生长缓慢;乳酸菌与酵母菌接种质量比为2:1时,表现为抑制乳酸菌的生长,也许是双倍乳酸菌竞争酵母菌分解营养物质产生的小分子质量代谢产物而导致乳酸菌生长迟缓;乳酸菌与酵母菌接种质量比为1:1时,双菌培养促进乳酸菌生长作用较好。

表7 1号脱脂乳培养基配方中确定酵母菌接种比例的单因素试验结果

Table 7 Viable cell counts of lactic acid bacteria and yeast after co-culture in medium formula No.1

菌落数/(10 ⁶ CFU/mL)	L11:Y12 菌种质量比		
	1:2	1:1	2:1
单菌培养酵母菌数	53.50 ± 0.08	61.00 ± 0.33	45.00 ± 1.33
双菌培养酵母菌数	130.00 ± 0	185.50 ± 0.75	166.00 ± 1.33
菌落数增幅	6.5 ± 0.02 ^a	124.5 ± 0.05 ^b	121 ± 0 ^c

从表7可以看出,与酵母菌单菌培养相比,乳酸菌与酵母菌混合培养按质量比1:2、1:1、2:1接种时,均表现为促进酵母菌生长的作用,其中乳酸菌与酵母菌接种质量比为1:1时,菌落数增幅最多,促生长作用最好。因此,在5号配方和1号配方培养基进行双菌混合培养时,均选用乳酸菌与酵母菌接种质量比为1:1。

2.4 优化条件下混菌培养的发酵特性

在选定的最佳培养温度、最佳配方脱脂乳培养基和最佳接种比例基础上研究促生长活性物质生成的最佳时间段。

在5号配方培养基中双菌混合培养36h作乳酸菌的生长曲线,每隔4h测pH值和乳酸菌活菌数,以单菌乳酸菌发酵作为对照。在1号配方培养基中双菌混合培养40h作酵母菌的生长曲线,每隔4h测pH值和酵母菌活菌数,以单菌酵母菌发酵作为对照。结果见图3~6。

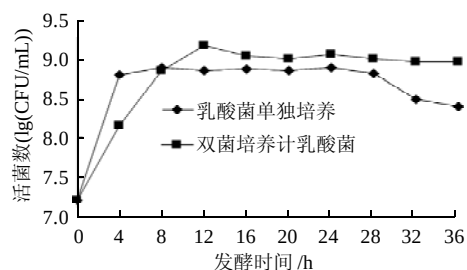


图3 5号配方培养基中乳酸菌在双菌混合培养中的生长曲线
Fig.3 Growth curve of lactic acid bacteria during co-culture in medium formula No.5

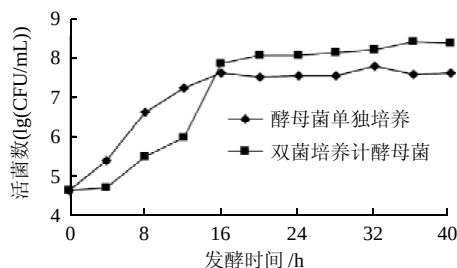
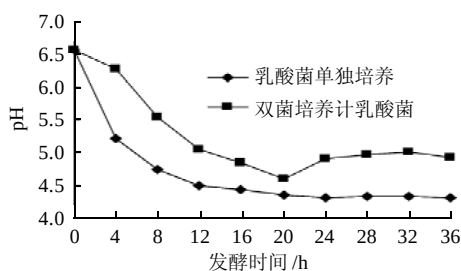


图4 1号配方培养基中酵母菌在双菌混合培养中的生长曲线

Fig.4 Growth curve of yeast during co-culture in medium formula No.1

由图3可知,与乳酸菌单菌发酵相比较,双菌培养对乳酸菌促生作用最强时是从12h开始。由图4可知,与酵母菌单菌发酵相比较,双菌培养对酵母菌促生作用最强时是从16h开始。由于Tamime等^[10]发现乳酸菌与酵母菌之间存在代谢产物互补机制,也就是说一种菌产生的物质会被另一种菌代谢掉,如乳球菌属新陈代谢产生的乙醛能够被明串珠菌属所利用。因此促进乳酸菌生长的活性物质生成的时间应为12h之前(即将酵母菌在5号脱脂乳培养基配方中30℃摇床培养),促进酵母菌生长的活性物质生成的培养时间应为16h之前(即将乳酸菌在1号脱脂乳培养基配方中37℃静置培养)。

图5 5号配方培养基中乳酸菌在双菌混合培养中pH值的变化趋势
Fig.5 pH change during co-culture of lactic acid bacteria and yeast in medium formula No.5

由图5可知,双菌培养(计L11的pH值)在30℃发酵条件下,酵母菌优先大量繁殖产生较多酸类,表现为pH值下降,12h后转到37℃乳酸菌开始增殖并进行乳酸发酵,pH值继续下降,当pH值降到一定程度后,乳酸菌的活动受到抑制,表现为酸度下降减缓,20h时pH值达到4.59,随着酵母菌的积累和酒精发酵的进行致使pH值开始回升并趋于稳定,到36h时pH值达到4.92。乳酸菌单菌发酵8h时pH值降至4.75,对数生长后期,牛乳凝固,之后进入稳定期,活菌数变化幅度基本不大,但其中各种酶还在起作用,培养基pH值继续降低,到36h时降至4.31。

由图6可知,双菌培养(计Y12的pH值)乳酸菌在37℃适宜环境中优先生长,表现为pH值下降,8h时pH值达到4.65,之后转到30℃酵母菌开始大量繁殖,20h后

pH值逐渐升高,但是在发酵过程中由于乳酸菌的不断积累,pH值仍小于5.0,到28h以后,pH值继续回升,此时乳酸菌会出现自溶,释放出其代谢过程中的丙酮酸等物质^[11],这些成分会被酵母菌直接利用,从而进一步加快酵母菌的生长繁殖,使pH值进一步升高,40h时pH值达到5.15。酵母菌单菌在生长初期代谢产生某些有机酸,pH值由初始6.6降为4h时的6.51,8h以后酵母菌进行酒精发酵,pH值开始回升,在28h时pH值达到最大值(7.89),之后可能是由于发酵产生二氧化碳使pH值逐渐下降,40h时pH值达到7.62。

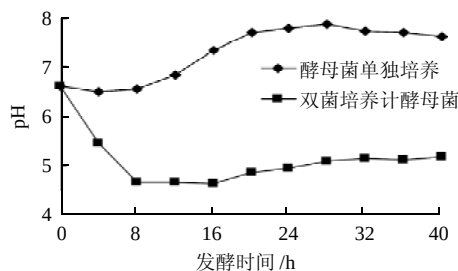


图6 1号配方培养基中酵母菌在双菌混合培养中pH值的变化趋势

Fig.6 pH change during co-culture of lactic acid bacteria and yeast in medium formula No.1

2.5 后发酵对二者共生作用的影响

表8 5号脱脂乳培养基中后发酵对乳酸菌与酵母菌共生作用的影响
Table 8 Effect of secondary fermentation on symbiotic interaction between lactic acid bacteria and yeast in medium formula No. 5

培养方式	发酵终点		4℃冷藏48h后	
	pH	乳酸菌数 / (10 ⁸ CFU/mL)	pH	乳酸菌数 / (10 ⁸ CFU/mL)
单菌培养	4.76 ± 0.00	6.25 ± 0.08 ^a	4.66 ± 0.00	4.55 ± 0.75 ^a
双菌培养	5.76 ± 0.00	12.00 ± 0.33 ^b	5.70 ± 0.00	7.85 ± 0.75 ^b

注: 同列小写字母不同表示双菌培养与单菌培养之间的活菌数差异极显著($P < 0.01$)。表9同。

表9 1号脱脂乳培养基中后发酵对乳酸菌与酵母菌共生作用的影响
Table 9 Effect of secondary fermentation on symbiotic interaction between lactic acid bacteria and yeast in medium formula No. 1

培养方式	发酵终点		4℃冷藏48h后	
	pH	酵母菌数 / (10 ⁶ CFU/mL)	pH	酵母菌数 / (10 ⁶ CFU/mL)
单菌培养	7.17 ± 0.00	43.00 ± 1.33 ^a	7.49 ± 0.00	27.00 ± 1.33 ^a
双菌培养	4.73 ± 0.00	87.00 ± 1.33 ^b	5.34 ± 0.00	45.50 ± 0.75 ^b

由表8可知,在发酵终点时,双菌培养中乳酸菌的活菌数极显著高于单菌培养的活菌数,后发酵结束后促生长作用也表现为差异极显著($P < 0.01$)。同样,由表9可知,对于双菌培养酵母菌而言,不论是在发酵终

点还是后发酵结束以后,双菌培养的酵母菌活菌数均极显著高于单菌培养的活菌数($P < 0.01$)。样品在4℃冰箱冷藏48h与发酵终点相比,单菌培养与双菌培养的样品中的活菌数都有所下降,其中双菌计乳酸菌与双菌计酵母菌的活菌数的降幅均高于单菌培养的活菌数的降幅。可能是双菌培养在后发酵期间营养物质已开始减少,而且双菌竞争营养物质导致菌体因缺乏营养而过早衰亡^[12]。乳酸菌单菌在发酵结束后pH值有所下降,说明乳酸菌在冷藏期间继续发酵产乳酸。而酵母菌单菌在后发酵结束后pH值升至7.49,说明酵母菌在冷藏期间能够继续进行无氧发酵生产乙醇。后发酵结束后双菌计乳酸菌的pH值为5.70,与发酵终点相比变化不大;双菌计酵母菌的pH值在后发酵期间有所升高,由pH4.73升至pH5.34。可能是双菌培养的样品在冷藏期间,乳酸菌发酵产生的乳酸、羧基化合物与酵母菌发酵产生的乙醇等各种醇类相互作用形成酯类,降低酒精度的同时增加了香气^[13]。

3 结 论

3.1 根据双菌混合培养的相互作用机制,双菌发酵时计乳酸菌活菌数的最佳发酵温度定为30℃摇床培养12h再转到37℃静置培养,最佳发酵时间定为20h;双菌发酵時計酵母菌活菌数的最佳发酵温度定为37℃静置培养8h再转到30℃摇床培养,最佳发酵时间定为32h。

3.2 优化脱脂乳培养基,添加3种营养物质:蛋白胨、酵母浸粉和蔗糖。根据正交试验和方差分析得出:双菌培养计乳酸菌活菌数的脱脂乳最优配方组合是5号,即蛋白胨1g/100mL、蔗糖0.5g/100mL、酵母浸粉0.5g/100mL;双菌培养计酵母菌活菌数的脱脂乳最优配方组合是1号,即蛋白胨0.5g/100mL、蔗糖0.5g/100mL、酵母浸粉0.5g/100mL。

3.3 在5号配方培养基和1号配方培养基中将乳酸菌与酵母菌质量比设为1:2、1:1和2:1,分别计数乳酸菌和酵母菌,结果均有极显著差异($P < 0.01$)。根据结果分析在两种配方培养基中均选用乳酸菌与酵母菌质量比1:1作为菌种配比。

3.4 在选定的最佳培养温度、最佳配方脱脂乳培养基和最佳接种两菌质量比基础上研究促生长生物活性物质

生成的最佳时间段。促进乳酸菌生长的活性物质生成的时间为12h以前(即将酵母菌在5号配方中30℃摇床培养),促进酵母菌生长的活性物质生成的时间应为16h以前(即将乳酸菌在1号配方中37℃静置培养)。

3.5 在后发酵结束后乳酸菌与酵母菌双菌培养的活菌数都极显著高于单菌培养($P < 0.01$),同时与发酵终点的活菌数相比,后发酵结束后的乳酸菌与酵母菌单菌培养与双菌培养的活菌数均有所下降。乳酸菌与酵母菌二者之间的共生关系有待于进一步探讨。

参考文献:

- [1] 贺银凤,李少英,母智深,等.酸马奶酒中微生物的分离鉴定及抗菌特性的研究[J].农业工程学报,2002,18(2):91-95.
- [2] ROOSTITA R, FLEET G H. The occurrence and growth of yeast in Camembert and blue-veined cheese[J]. International Journal of Food Microbiology, 1996, 28: 293-404.
- [3] BEYENE F. Present situation and future aspects of milk production, milk handling and processing of dairy products in southern Ethiopia[D]. Norway: Agricultural University of Norway, 1994: 218-227.
- [4] SSERUNJOGI M L, ABRAHAMSEN R K, NARVHUS J. A review paper: current knowledge of ghee and related products[J]. International Journal of Dairy, 1998, 8: 677-688.
- [5] 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,2006:263-267.
- [6] 王钦德,杨坚.食品试验设计与统计分析[M].北京:中国农业大学出版社,2002:341-344.
- [7] GUILLLOUX- BENATIER M, CHASSAGNE D. Comparison of components released by fermented or active dried yeasts after aging on lees in a model wine[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51 (3): 746-751.
- [8] CHEIRSILP B, SHIMIZU H, SHIOYA S. Enhanced kefir production by mixed culture of *Lactobacillus kefirifaciens* and *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Biotechnology, 2003, 100: 43-53.
- [9] 王和平,田瑞华.类开菲尔粒发酵特性的研究[J].乳业科学与技术,2004,27(1):153-155.
- [10] TAMIME A Y, MARSHALL V M E. Microbiology and technology of fermented milks[M]//LAW B A. Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk. London, UK: Blackie Academic & Professional, 1997: 57-152.
- [11] 尹艳军,夏文水,王玉良,等.牛乳经酵母菌和乳酸菌发酵生产低醇乳酒的研究[J].食品与发酵工业,2005,31(7):117-121.
- [12] 廖永红,周晓宏.酵母和乳酸菌发酵生产白啤酒研究[J].食品与发酵工业,2000,26(3):48-52.
- [13] 李雅乾,田洪涛,田益玲,等.双歧杆菌与乳酸菌混合发酵胡萝卜汁牛乳饮料的工艺研究[J].食品与发酵工业,2006,32(6):117-119.