

一株降糖鼠李糖乳杆菌发酵豆乳条件优化

郭敏¹, 陈佩^{2,3*}, 张秋香¹, 张灏¹ (1. 江南大学食品学院, 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏无锡 214122; 2. 陕西理工学院生物科学与工程学院, 陕西汉中 214122; 3. 陕西广播电视大学, 陕西西安 710062)

摘要 [目的] 研究一株具有降糖作用的鼠李糖乳杆菌发酵生产酸豆乳的工艺条件。[方法] 以产品的酸度、感官评定值为主要指标, 采用单因素和正交试验对降糖鼠李糖乳杆菌发酵生产酸豆乳进行条件优化。[结果] 试验表明, 降糖鼠李糖乳杆菌酸豆乳的最佳工艺条件为: 豆水比 1:7 g/ml、蔗糖 7%、接种量 5%、37℃ 发酵 8 h。[结论] 试验得出的工艺条件合理可行, 为具有降糖作用的鼠李糖乳杆菌在酸豆乳中的应用提供了一定的技术参考。

关键词 鼠李糖乳杆菌; 豆乳; 工艺研究

中图分类号 S509.9 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)34-092-03

Optimizing Soymilk Fermentation Conditions for *Lactobacillus rhamnosus* with Hypoglycemic Effect

GUO Min¹, CHEN Pei^{2,3*}, ZHANG Qiu-xiang¹ et al (1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122; 2. School of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong, Shaanxi 723001; 3. Shaanxi Radio & TV University, Xi'an, Shaanxi 710119)

Abstract [Objective] In order to get the optimum fermentation conditions of a strain of *Lactobacillus rhamnosus* with hypoglycemic effect in soymilk. [Method] Single factor and orthogonal experiments were performed with several index such as acidity and sensory evaluation value of the products. [Result] The results showed that the best fermentation conditions were: bean: water = 1:7 g/ml, 7% sucrose, inoculum size 5%, temperature 37℃, fermented for 8 h. [Conclusion] This study provides a certain reference for the application of the lactobacillus with hypoglycemic effect in sour soymilk fermentation.

Key words *Lactobacillus rhamnosus*; Soybean milk; Process condition

酸豆乳是一种以大豆为原料, 经乳酸菌发酵而成的豆制品。大豆含有丰富的蛋白质、膳食纤维、脂肪、人体所必需的氨基酸及大豆异黄酮等成分^[1], 通过乳酸菌的发酵作用后不仅保留了大豆的营养价值, 而且在改变产品的质构后还能提高风味和保藏特性, 也可以将大豆异黄酮转化为活性成分, 同时产生多种功能性的多肽^[2(7-12)]。因而将豆乳作为有益乳酸菌的食物载体可赋予产品特定的健康属性。

鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*) 是人体正常菌群之一, 肠道粘着率高, 定殖能力强, 并具有高效降胆固醇, 促进细胞分裂的作用, 可起到调节肠道菌群、预防和治疗腹泻、排除毒素、预防龋齿、提高机体免疫力及抗癌等重要的生理保健功能^[3-4]。笔者以江南大学食品学院食品科学与技术国家重点实验室分离出的一株具有降糖作用的鼠李糖乳杆菌为发酵剂^[5], 发酵生产豆乳, 以产品的酸度、感官评定值为主要指标, 在单因素和正交试验的基础上, 得出最佳工艺参数, 以期对具有潜在降糖作用的鼠李糖乳杆菌在酸豆乳中的应用提供一定的技术参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 供试原料。 脱脂奶粉, 光明乳业股份有限公司; 全脂奶粉, 双城雀巢有限公司; 大豆, 超市购买。

1.1.2 菌株。 鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*), 由江南大学食品学院食品科学与技术国家重点实验室分离获得。

1.1.3 主要仪器与设备。 DM2000 显微镜, 德国 Leica 公司; 5415R 离心机, 德国 Eppendorf 公司; 恒温培养箱, 上海一恒

科技有限公司; 320-S pH 计、EL204 电子天平, 梅特勒-托利多仪器上海有限公司; MLS-3750 灭菌锅, 日本 Sanyo 公司; SW-CJ-1CV 超净台, 苏州安泰空气技术有限公司; UV-2100 紫外可见分光光度计, 尤尼科上海有限公司; NDJ/79 型粘度仪, 同济大学机电厂; 手动移液枪, 美国 Rainin 公司。

1.2 工艺流程 酸豆乳的制作工艺流程如下所示^[2(7-12)]: 大豆→去杂→热烫灭酶(4 min)→浸泡(0.5% NaHCO₃ 溶液, 12 h)→清洗→去皮(豆水比 1:7)→热水磨浆(80℃)→过滤→调浆(7% 蔗糖)→均质→杀菌(121℃, 15 min)→接种→发酵→低温后熟→酸豆乳。

1.3 方 法

1.3.1 发酵用菌种的处理。 将菌株接种于 MRS 液体培养基中, 活化 3 代后, 6 000 r/min 离心 15 min, 菌体用灭菌生理盐水洗涤 3 次后制成菌悬液于 4℃ 保存备用。

1.3.2 接种量对酸豆乳的影响。 取 20 ml 豆乳(豆水比 1:7 g/ml), 将菌液按照 1%、3%、5% 和 7% (V/V) 的接种量分别接种到豆乳中, 37℃ 厌氧培养 8 h, 发酵结束后测定其酸度和活菌数。

1.3.3 发酵温度对酸豆乳的影响。 取 20 ml 豆乳(豆水比 1:7 g/ml), 按照 5% (V/V) 的接种量接种入豆乳中, 分别于 33、37、42、45℃ 条件下厌氧培养 8 h, 发酵结束后测定其酸度和活菌数。

1.3.4 发酵时间对酸豆乳的影响。 取 20 ml 豆乳(豆水比 1:7 g/ml), 按照 5% (V/V) 的接种量接种入豆乳中, 于 37℃ 条件下厌氧培养 6、8、10、12 h, 发酵结束后测定其酸度和活菌数。

1.3.5 正交试验酸豆乳发酵条件优化。 在单因素试验的基础上, 以接种量、发酵温度和发酵时间为因素取不同的水平

作者简介 郭敏(1983-), 女, 青海西宁人, 实验师, 从事食品生物技术研究。* 通讯作者, 副教授, 博士, 从事食品生物技术研究。

收稿日期 2015-10-30

(表 1),以感官评分作为评定指标进行正交试验,确定酸豆乳的最优发酵条件。

表 1 正交试验影响因素及水平

水平	因素		
	接种量(A)//%	发酵温度(B)//%	发酵时间(C)//h
1	3	37	6
2	5	42	8
3	7	45	10

1.3.6 酸豆乳储藏稳定性分析。将发酵结束的酸豆乳在 4℃下静置储藏 21 d。每隔 7 d 取样品测定其 pH、酸度、活菌数及脱水收缩率^[6]。

1.4 指标测定 pH 的测定^[7]:用 pH 计测定(发酵样品温度 20℃)。

滴定酸度的测定^[7]:称取 10.0 g 样品放于 100 ml 的三角瓶中,加入 20 ml 去离子水和 0.5 ml 0.5% 的酚酞指示剂,充分摇匀后,用 0.1 mol/L 的 NaOH 标准溶液滴定样品直至出现微红色,并且红色在 1 min 内不消失为止。记录消耗的 NaOH 溶液的体积(ml)并乘以 10,即得滴定酸度(°T),重复试验 3 次取算术平均值。

活菌数测定^[8-9]:将 0.5 g 样品用灭菌的生理盐水梯度稀释至一定倍数后,利用 MRS 培养基测定发酵乳样品中的活菌数,并计数。

黏度的测定^[10]:在 25℃下,利用黏度计(10×转子)测定发酵乳样品的黏度,重复试验 3 次取算术平均值。

脱水收缩率的测定^[9]:称取 15.0 g 酸豆乳样品,置于带有滤纸的漏斗中,21℃放置 90 min,收集滤液并称重。

$$\text{脱水收缩率}(\%) = [\text{滤液重}(\text{g}) / \text{样品重量}(\text{g})] \times 100\%$$

酸豆乳感官评价^[11]:感官评定小组由 10 名经过专业培训的研究生志愿者组成,按照表 2 各项指标进行评价。

表 2 酸豆乳感官评价标准

指标	标准	得分
色泽	色泽均匀,呈乳白色,有光泽	18~25
	色泽均匀,颜色较淡,微有光泽	10~17
	白色或微黄,无光泽	< 9
气味	酸豆乳的特征香味,无豆腥味,无异味	18~25
	酸豆乳特征香味平淡,略有豆腥味	10~17
	有较浓不良风味	< 9
滋味	酸豆乳特有的滋味,口感细腻	18~25
	滋味平淡,口感粗糙	10~17
	有苦涩味,颗粒感明显	< 9
组织	凝乳良好,均匀一致,没有乳清析出	18~25
	较少乳清析出,无分层	10~17
	大量乳清析出,明显分层	< 9

2 结果与分析

2.1 接种量对酸豆乳的影响 由图 1 可知,随着接种量的增加,产品的酸度和活菌数呈先上升后下降的趋势,接种量为 5% 时,酸度和活菌数达到最大值,随着接种量的增加,酸度和活菌数逐渐下降。合适的接种量可以缩短延滞期,使菌种达到最好的生长状态。接种量较少,产酸受到抑制,不能

很快形成有利于菌种生长的环境;而接种量过大时,菌丝生长过快,发酵液黏度增加,造成溶氧量不足从而影响发酵产酸^[12](67-74)]。从试验结果看,当接种量为 3% 和 5% 时,酸度和活菌数都达到最大值,故确定 3% 和 5% 为较优接种量。

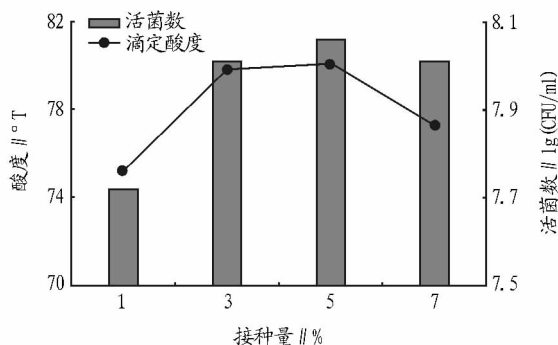


图 1 接种量对酸豆乳酸度及活菌数的影响

2.2 发酵温度对酸豆乳的影响 发酵温度对菌种的生长及最终发酵产物的生成有很大的影响,合适的发酵温度可以使菌种达到最快的生长速度和获得最高的发酵产率。因为菌种生长和发酵产物的形成都是一系列酶促反应的结果,发酵温度过低,菌种生长慢,产酸低;发酵温度过高时,酶本身极易失活,温度越高,酶失活越快,从而影响发酵产量^[12](67-74)]。从图 2 可以看出,随着发酵温度的上升,产品的酸度和活菌数呈先上升后下降的趋势,当发酵温度在 33 时,酸度和活菌数都相对较低。故确定 42℃左右为较适发酵温度。

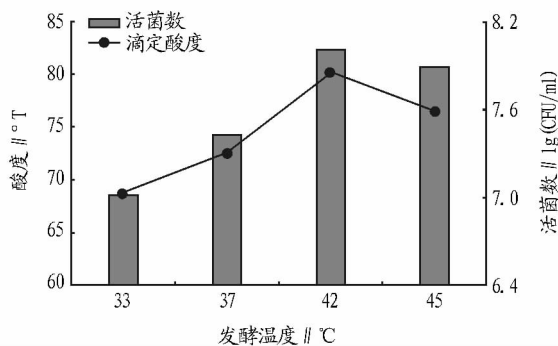


图 2 发酵温度对酸豆乳酸度及活菌数的影响

2.3 发酵时间对酸豆乳的影响 由图 3 可知,随着发酵时间的延长,产品的酸度和活菌数基本呈递增趋势。当发酵时间在 8 和 12 h 时,酸度达到较高值,活菌数在 12 h 时达到最

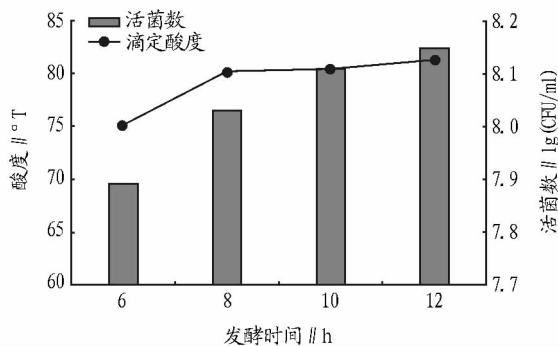


图 3 发酵时间对酸豆乳酸度及活菌数的影响

大。因为在前期试验中,该菌在 12 h 时达到稳定期,故活菌数达到最大值。但是发酵时间过长会有较多乳清析出^[13],故综合考虑确定 8 h 为较适发酵时间。

2.4 正交试验设计及结果 在单因素试验结果基础上,采用 $L_9(3^3)$ 正交试验设计,试验结果见表 3。

表 3 正交试验结果

试验号	因素			感官得分
	A	B	C	
1	1	1	1	75
2	1	2	2	78
3	1	3	3	74
4	2	1	2	86
5	2	2	3	81
6	2	3	1	78
7	3	1	3	76
8	3	2	1	75
9	3	3	2	72
k_1	75.7	79.0	76.0	
k_2	81.7	78.0	78.7	
k_3	74.3	74.7	77.0	
R	7.4	4.3	2.7	

由表 3 的分析可知,各因素的影响顺序为:A > B > C,即接种量的影响最大,其次为发酵温度,影响最小的是发酵时间。最佳组合为 $A_2B_1C_2$,即接种量为 5%,发酵温度 37 °C,发酵时间为 8 h。

2.5 验证试验 按正交试验得出的最优的配比参数组合制作酸豆乳,另选正交试验中感官综合评分最高的 3 组配方制作酸豆乳与其进行比较,分别测定其酸度、活菌数、黏度及感官值,其结果见表 4。

表 4 验证试验结果

试验号	水平组合	酸度	活菌数	黏度	感官评分
		°T	lg(CFU/ml)	mPa · s	
1	$A_2B_2C_3$	78.1 ± 0.4	8.01 ± 0.4	120.3 ± 0.2	81
2	$A_2B_3C_1$	80.1 ± 0.2	8.06 ± 0.7	135.6 ± 0.4	78
3	$A_1B_2C_2$	79.5 ± 0.3	8.03 ± 0.2	114.3 ± 0.1	78
4	$A_2B_1C_2$	82.3 ± 1.1	8.23 ± 0.6	149.5 ± 0.4	86

由表 4 可知,最优水平组合 $A_2B_1C_2$ 在酸度、活菌数、黏度及感官评定各项指标均最佳,说明最佳参数工艺可靠。

2.6 酸豆乳储藏稳定性分析 酸豆乳在 4 °C 下储藏 28 d,储藏期间酸豆乳的 pH、酸度、活菌数的变化和脱水收缩率结果如图 4~7 所示。从图 4~7 中可知,随着储藏时间的延长,活菌数和 pH 逐渐将降低,酸度上升,这是因为在储藏前期,酸豆乳中的活菌的生长代谢使产品 pH 逐渐降低,酸度升高,而随着储藏时间的延长,体系可利用碳源减少,菌体生长进入衰亡期,从而活菌数逐渐降低^[14]。脱水收缩率随着冷藏时间增加总体呈下降趋势,但变化不明显。综合以上指标,在储藏过程中,存在后酸化现象,其余指标变化不大,可通过进一步的技术研究使该菌更适合酸豆乳发酵。

3 结论与讨论

该研究得出的一株降糖鼠李糖乳杆菌发酵豆乳的最佳

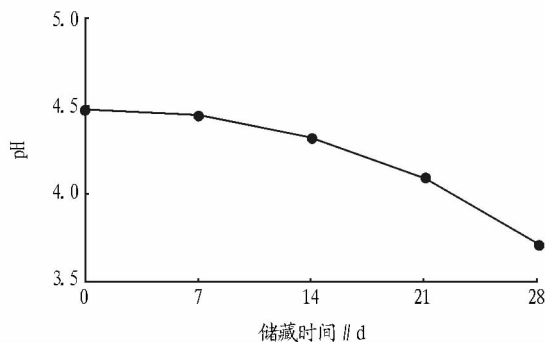


图 4 储藏期 pH 的变化

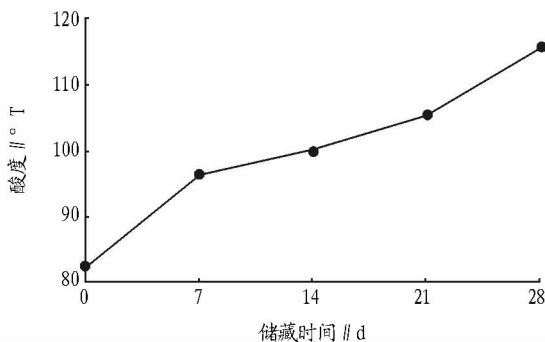


图 5 储藏期酸度的变化

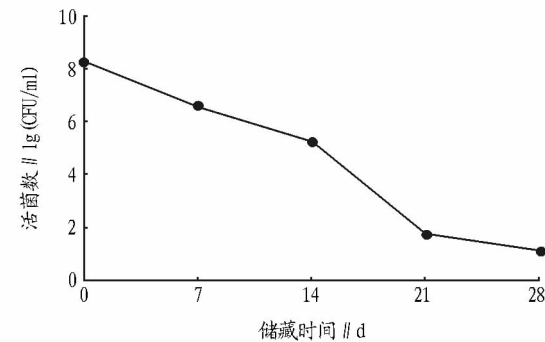


图 6 储藏期活菌数的变化

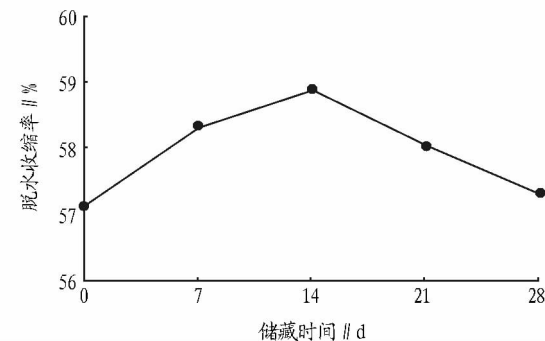


图 7 储藏期脱水收缩率的变化

工艺参数为:豆:水 = 1:7 g/ml,蔗糖的添加量 7%,鼠李糖乳杆菌接种量 5%,发酵温度 37 °C,发酵时间 8 h。

储藏过程中,产品存在后酸化现象,随着冷藏时间延长 pH 降低,酸度提高,活菌数逐渐降低,脱水收缩性逐渐降低。可通过进一步的技术研究使该菌更适合酸豆乳发酵。

(下转第 179 页)

老病区引进该抗性苗进行试种、扩繁及示范推广,可有效控制紫色卷叶病。

2.3.5 抗性苗抗病性不遗传后代。经与中国热带农业科学院南亚热带作物研究所合作检测,未发现该抗性苗 DNA 突变,表明其抗病性不遗传性。因此,该抗性苗不宜作组培,否则抗性物质不断稀释而失去抗性,与接种试验结果^[6]一致。

2.4 抗性苗原种抗病能力 2010~2015 年对广东省湛江农垦有关剑麻农场引进抗性苗原种在大田种植及作母株钻心繁殖种苗 581.2 万株,可供大田种植 1 300 hm²,通过近 6 年的大田跟踪调查发现该抗性苗未发生紫色卷叶病,并且长势良好。而本地苗及广西珠芽作的组培苗发病较重,发病率达 60% 以上,如 2015 年 1~6 月仅湛江农垦东方红农场因近年种植非抗性苗病害严重而淘汰 30 hm²。

2.5 抗性苗 2 代母株抗病能力 2014 年 1~3 月钻心前 1、2 代抗性苗经粉蚧危害后仍未发生紫色卷叶病,钻心 5 个月后抗性苗第 1 代母株(92 258 株)未发现病株,2 代母株育 91 655 株,其中有 211 株发病,发病率达 0.23%,而 2 代母株繁育的 548 株腋芽苗及走茎苗均未发生病害,可能与 2 代母株不断传送抗性物质给后代有关,故应选择抗性苗原种作繁殖母株。

2.6 抗性苗经疏植后起苗上山种植剩余老茎长出的走茎苗抗病情况 结果表明:无地上绿色部分的老茎长出的走茎苗在大田经粉蚧自然危害后,发病率达 11.21%~23.50%,平均为 15.72%(表 1),未发生病害的走茎苗经大田疏植(苗圃)培育仍有零星植株发病,表明抗性苗没有地上部(绿色植株),仅余头部少量老茎长出的走茎苗,其抗性减弱。因此,该苗不宜使用。

表 1 抗性苗老茎长出的走茎苗发病率

调查点	调查总数//株	发病数//株	发病率//%
①	570	71	12.46
②	600	141	23.50
③	580	65	11.21
平均			15.72

2.7 抗性苗种植大田收割后该麻田长出的走茎苗抗病能力 结果表明:抗性麻田收获叶片后长出的走茎苗平均发病

率为 27.66%。收获叶片后会使植株抗性物质流失(尤其常防虫,缺少粉蚧危害),导致走茎苗抗性下降,所以该走茎苗不宜采用。为保证抗性苗种植大田后植株抗性不断增强,最好在粉蚧严重危害的冬、春季防治 1~2 次,保持粉蚧适当危害,不致于招引“煤烟病”而影响光合作用和严重消耗植株养分,有利于抗性苗继续提高或保持抗病性。

2.8 病母株遗传病害给后代的可能性 2015 年 10 月 5 日(即非抗性苗的病母株钻心剥叶 64 d 后)调查。结果表明:病母株共 42 株,已繁育出腋芽苗 8 株、走茎苗 34 株(繁殖出的腋芽苗及走茎苗株高达 15~20 cm),均未发病,即该病不能遗传给后代。

3 讨论与建议

新菠萝灰粉蚧蔓延迅速,其引发的紫色卷叶病危害更严重,甚至失收,有待进一步开展病原鉴定,以指导生产。

推广种植原种抗性苗及原种抗性苗作母株繁殖材料。抗性苗在当地种植后至收获叶片前其走茎苗可采用,收获叶片后(又常防虫)其麻园长出的走茎苗抗性下降,不宜采用;疏植苗起苗后剩余老茎长出的走茎苗抗性下降,不宜采用;抗性苗为非基因突变引起,不宜作组培扩繁。

种植抗性苗宜冬、春季防治粉蚧 1~2 次,不宜常防虫,否则,不利于生态环境保护及植株抗性保持。但非抗性苗应不断防虫,以控制紫色卷叶病;不防虫,发病快且严重,恢复较一致,再次发病也快,可逐渐产生抗性,幼龄麻可校仿,而中老年麻不可。

参考文献

- [1] 陈泽坦. 新菠萝灰粉蚧的发生为害及控制[C]. 中国热带作物学会剑麻学术研讨会交流的论文, 2008.
- [2] 黄标, 邓业余, 赵家流. 剑麻粉蚧综合防治技术试验与示范初报[C]//中国热带作物学会. 现代热带农业发展论坛论文集. 北京: 中国农业出版社, 2009: 341-348.
- [3] 何衍彪, 詹儒林, 赵艳龙. 菠萝粉蚧及菠萝凋萎病研究进展[J]. 广东农业科学, 2007(2): 47-50.
- [4] 谢钟琛, 谢文龙, 肖文生, 等. 福建柑橘黄龙病爆发成因及其危害流行规律[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2007, 33: 99-103.
- [5] 黄标, 邓业余, 郑立权, 等. 剑麻粉蚧生物学特性与发生规律的研究初报[C]//中国热带作物学会. 现代热带农业发展论坛论文集. 北京: 中国农业出版社, 2009: 349-353.
- [6] 黄标, 杨荣, 夏李虹, 等. 剑麻抗病种苗引进试种及抗病效应初报[C]//中国热带作物学会 2014 年年度会议论文集. 中国热带作物学会, 2014: 79-85.
- [7] 迟非非. 能够缓解慢性酒精性肝损伤的益生菌的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2012.
- [8] 毛健, 宁佳, 赵建新, 等. 不同酸奶发酵剂菌株发酵性质的评价[J]. 中国乳品工业, 2010(12): 4.
- [9] 陈晓华. 拮抗幽门螺杆菌益生菌的筛选及其干预机制的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2011.
- [10] 郭壮. 益生菌 *L. casei* Zhang 对发酵乳质地、风味及感官特性的影响[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2009.
- [11] 马成杰, 杜昭平, 华宝珍, 等. 植物乳杆菌 ST-III 在豆乳中的发酵特性及发酵豆乳的贮藏稳定性[J]. 食品科学, 2013, 34(5): 151-155.
- [12] 何国庆. 食品发酵与酿造工艺学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 67-74.
- [13] 姜涛. 嗜酸乳杆菌发酵豆乳工艺及其凝胶特性的研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2008.
- [14] 林海知. 凝固型酸豆乳品质改良及冷藏稳定性研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2011.

(上接第 94 页)

参考文献

- [1] 甘晶. 鼠李糖乳杆菌发酵生产酸豆乳营养成分的分析[D]. 长春: 吉林农业大学, 2012.
- [2] 王水泉, 包艳, 张延超, 等. 具有潜在益生特性的发酵乳杆菌在豆乳中的发酵特性[J]. 中国乳品工业, 2010(5): 7-12.
- [3] EMILY K Y, LAM L, HELEN P S, et al. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG enhances gastric ulcer healing in rats[J]. European journal of pharmacology, 2007, 565: 171-179.
- [4] 郭本恒. 益生菌[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 345-378.
- [5] 陈佩, 党辉, 张秋香, 等. 1 株具有潜在降糖作用的益生菌的筛选[J]. 中国食品学报, 2014, 11(14): 27-32.
- [6] 张丽芳, 田洪涛, 苑社强, 等. 干酪乳杆菌发酵大豆乳产品的质量分析及稳定性的研究[J]. 现代食品科技, 2009, 25(5): 519-522.
- [7] 迟非非. 能够缓解慢性酒精性肝损伤的益生菌的研究[D]. 无锡: 江南