

空间罗伊氏乳杆菌直投式酸奶发酵剂的应用研究

高铭杰¹, 聂彦芬¹, 张红星¹, 谢远红¹, 郝红炜², 刘 慧^{1*}

¹北京农学院食品科学与工程学院; 微生物制剂关键技术开发北京市工程实验室; 食品质量与安全北京实验室; 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, 北京 102206; ²富乐顿生物工程科技(北京)有限公司, 北京 100022

摘要:为优化空间诱变罗伊氏乳杆菌 SS23-52 直投式酸奶发酵剂的发酵条件。以活菌数量为指标, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验优化高密度发酵条件, 以及单因素试验确定冻干保护剂配方和直投式发酵剂的接种量。结果表明, SS23-52 菌株优化发酵条件为: 发酵温度 37 °C, 接种量 3%, 发酵时间为 16 h, 活菌数量达到 1.60×10^{10} CFU/mL, 比优化前提高了 1.68 倍; 确定保护剂配方为 10% 脱脂奶粉 + 5% 麦芽糊精(质量体积百分比), 冻干后菌种存活率为 98.67%。利用优化后的罗伊氏乳杆菌纯种直投式发酵剂制备酸奶, 确定发酵剂接种量为 1.0%, 可于 3.5 h 凝固牛乳, 感官评分为 58.65 分。显示出空间诱变罗伊氏乳杆菌 SS23-52 直投式发酵剂活力高, 冻干后存活率高, 凝乳时间可与普通酸奶发酵剂媲美。

关键词:空间诱变; 罗伊氏乳杆菌; 直投式发酵剂; 优化发酵条件

中图分类号: TS252.42

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019) Suppl-0136-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.S.024

Application of directed vat set yogurt starters by space *Lactobacillus reuteri*

GAO Ming-jie¹, NIE Yan-fen¹, ZHANG Hong-xing¹, XIE Yuan-hong¹, HAO Hong-wei², LIU Hui^{1*}

¹College of Food Science and Engineering, Beijing University of Agriculture Beijing Engineering Laboratory of Probiotics Key Technology Development Beijing Laboratory of Food Quality and Safety, Food Science and Engineering College, Beijing University of Agriculture Beijing Key Laboratory of Agricultural Product Detection and Control of Spoilage Organisms and Pesticide Residue, Beijing 102206, China; ²Fullerton Bioengineering Technology Co. Ltd, Beijing 100022, China

Abstract: To optimize the fermentation conditions of direct-feeding yoghurt starter by space mutagenesis *Lactobacillus reuteri* SS23-52. Viable count index, optimization of high density fermentation conditions by orthogonal experiment $L_9(3^4)$, using single factor test to determine the formula of freeze-drying protectant and the inoculation amount of direct starter. The results showed that the best fermentation conditions of the strain SS23-52 were as follows: fermentation temperature 37 °C, inoculations size 3%, fermentation time 16 h, improved by 1.68 times before optimization. The optimal amounts of cryoprotectants formula were skimmed milk powder 10% + maltodextrin 5% (mass volume percent), the survival rate of the strain is 98.67%. The yoghurt was prepared with the optimized direct inoculation starter of lactobacillus *Lactobacillus reuteri* SS23-52, the inoculation volume was determined to be 1.0%, the milk could be solidified at 3.5 h, and the sensory score was 58.65. So the space mutagenesis *Lactobacillus reuteri* SS23-52 direct inoculation starter had high activity, high survival rate after freeze-drying, and curd time can be as good as ordinary yogurt starter.

Key words: space mutagenesis; *lactobacillus reuteri*; directed vat set yogurt starters; optimize fermentation conditions

益生菌干粉发酵剂作为一种生产型或家用型直投式发酵剂用于制作功能性发酵食品。利用益生菌

干粉发酵剂活力强(活菌数量高)、用量小、类型多样化、贮藏方便等优点,可以简化生产工艺、操作简单、发酵周期短,以及增加产品经济附加值,提高企业经济效益^[1]。目前,我国直投式酸奶发酵剂,存在发酵活力稳定性较差、冻干后菌种存活率较低,发

收稿日期: 2019-03-05 接受日期: 2019-04-25

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金(31201310); 国家重点基础研究发展计划(973计划)(2014CB74 4400)

* 通信作者 E-mail: mxdlh1963@163.com

酵时间较长等问题^[2],因此筛选和开发具有自主知识产权的活力较高、遗传特性稳定、品质优良、适合于中国人的土著益生菌直投式酸奶发酵剂,对促进中国消费者的肠道健康和功能性发酵食品产业发展具有重要意义。王昱敬^[3]以嗜热链球菌和保加利亚乳杆菌为菌种,优化冷冻干燥保护剂为 20 mL/L 甘油、8 g/L 葡萄糖、20 g/L 抗坏血酸时,活菌数为 4.22×10^9 CFU/mL。林海君^[4]以加利亚乳杆菌 L7 和嗜热链球菌 KLDS3.1014 原料菌确定最佳培养条件为:发酵温度是 42.12 °C,接菌量为 2.99%,培养 8 h 后,活菌数达到 2.62×10^9 CFU/mL。本文利用筛选出的具有自主知识产权的发酵性能优良且遗传稳定的空间诱变罗伊氏乳杆菌 SS23-52 菌株制备直投式酸奶发酵剂,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验优化菌株高密度发酵条件,研究确定冻干保护剂配方及其制作酸奶的接种量,以期高活力益生菌直投式发酵剂的产业化提供实践依据。

1 材料和方法

1.1 菌株、培养基

空间诱变罗伊氏乳杆菌 SS23-52(专利菌株保藏代号为 CGMCCNO.15152),由地面菌株 GS23(原菌株代号为 6118)经空间环境诱变的罗伊氏乳杆菌 SS23 中筛选与鉴定,保藏于富乐顿生物工程科技(北京)有限公司空间微生物菌种库。

MRS 培养基^[5]、脱脂乳培养基^[5]、0.85% 生理盐水^[5]、麦芽糊精(西王集团有限公司)、脱脂乳(内蒙古伊利实业集团有限公司)、纯牛奶(内蒙古伊利实业集团股份有限公司)、绵白糖(蔗糖质量含量为 95%)等。

1.2 仪器设备

电热恒温培养箱 黄石市恒丰医疗器械有限公司;SW-CJ-1FD 单人单面净化工作台 苏州净化设备有限公司;BT2202S 电子天平 德国 Sartorius 集团;LS-B50L-I 型立式压力蒸汽灭菌器 江阴滨江医疗设备有限公司;QL-901 型旋涡振荡器 海门市其林贝尔公司;TGL-16C 高速冷冻离心机 上海安亭科学仪器厂;LABCONCO 真空冷冻干燥机(美国)。

1.3 试验方法

1.3.1 发酵条件确定的单因素试验

1.3.1.1 发酵温度的确定

在罗伊氏乳杆菌 SS23-52 发酵剂接种量 2.0% (体积分数),发酵时间 20 h 条件下,设计发酵温度为 33、35、37、39、41 °C。采用 MRS 琼脂培养基以倾

注平板培养法检测发酵液中的活菌数(每个稀释度设 3 次重复),以此确定发酵温度。

1.3.1.2 发酵剂接种量的确定

在步骤 1.3.1.1 确定发酵温度的基础上,设计发酵剂接种量为 2.0%、2.5%、3.0%、3.5%、4.0%,发酵 20 h。采用 MRS 琼脂培养基以倾注平板培养法检测发酵液中的活菌数(每个稀释度设 3 次重复),以此确定发酵剂接种量。

1.3.1.3 发酵时间的确定

在步骤 1.3.1.1 和 1.3.1.2 确定发酵温度和发酵剂接种量基础上,设计发酵时间为 8、12、16、20、24 h。采用 MRS 琼脂培养基以倾注平板培养法检测发酵液中的活菌数(每个稀释度设 3 次重复),以此确定发酵时间。

1.3.2 正交试验发酵条件优化

在单因素试验结果基础上,设计发酵温度、发酵剂接种量、发酵时间三因素三水平 $L_9(3^4)$ 正交试验(见表 1),以 2 L 液体 MRS 为发酵培养基,控制发酵体系 pH6.8,搅拌转速为 120~150 rpm,采用 MRS 琼脂培养基以倾注平板培养法检测发酵液中的活菌数量(每个稀释度设 3 次重复),通过极差分析和 K 值分析确定较优的高密度发酵条件。

表 1 正交实验因素水平

Table 1 Orthogonal experimental factor level

水平 Level	A 发酵温度 Fermentation temperature (°C)	B 接种量 Inoculum size (%)	C 发酵时间 Fermentation time (h)
1	34	2.0	12
2	37	3.0	16
3	40	4.0	20

1.3.3 验证试验

在上述正交试验得出的优化发酵条件基础上,将空间罗伊氏乳杆菌 SS23-52 发酵剂按 3% 接种量移入 2 L 液体 MRS 培养基中,于 37 °C 搅拌发酵 16 h,其他发酵条件与正交试验相同,同时以对照条件(发酵温度 37 °C、接种量 2%、发酵时间 20 h)为对照组,测定发酵液中的活菌数量,以验证优化发酵条件结果的优越性。

1.3.4 确定保护剂配方

将空间罗伊氏乳杆菌 SS23-52 发酵剂按 3% 接种量接种于含有 2.4 L 液体 MRS 培养基的 5 L 全自

动发酵罐中,根据正交试验优化条件进行高密度发酵。将发酵液均分为8份后于4℃离心弃上清液,收集菌泥,分别于8种(1号15%脱脂奶粉、2号15%麦芽糊精、3号5%脱脂奶粉+10%麦芽糊精、4号10%脱脂奶粉+5%麦芽糊精、5号20%脱脂奶粉、6号20%麦芽糊精、7号5.5%脱脂奶粉+14.5%麦芽糊精、8号14.5%脱脂奶粉+5.5%麦芽糊精)30 mL 无菌冻干保护剂均匀混合^[6],得到浓缩活菌制剂;将浓缩活菌制剂于-80℃预冻后于-55℃、真空度0.13~0.16 mBar的条件下,冻干至完全干燥状态,得到冻干活菌制剂。采用MRS培养基以倾注平板培养法检测冻干前浓缩活菌制剂的活菌数和冻干后还原浓缩活菌制剂的活菌数,以及冻干后的活菌数(每个稀释度设3次重复),并按公式(1)计算菌种存活率,以此确定较优保护剂配方。

$$\text{菌种存活率}(\%) = A/B \times 100 \quad (1)$$

A—冻干后还原浓缩活菌制剂的活菌数的对数值(CFU/mL)

B—冻干前浓缩活菌制剂的活菌数的对数值(CFU/mL)

1.3.5 SS23-52 菌株直投式发酵剂在纯种酸奶中的应用试验

将SS23-52菌株直投式发酵剂以0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0‰(质量千分数)的接种量接入含适量绵白糖的灭菌牛乳中,于37℃发酵至牛乳凝固,记录凝乳时间,并根据国标GB5009.239—2016^[7]的方法测定酸奶4℃后熟后(置于4℃,12 h)的酸度、pH和活菌数量,并由10名具有食品专业知识的人员对成品益生菌酸奶按表2进行感官评价。

表2 酸奶感官评价标准
Table 2 Standard for quality of yogurt

项目 Project	满分 Total points	评分标准 Standard for evaluation
色泽 Colour	10	微黄色或乳白色,色泽均匀5~10分;深黄色或惨白色,色泽不均匀<5分
滋味和气味 Taste and smell	10	浓郁的发酵香味与炒麦香味7~10分;发酵香味与炒麦香味较淡3~7分;无发酵香味与炒麦香味<3分
组织状态 Texture	10	凝乳结实,无上浮物、分层或沉淀现象7~10分;凝乳不太结实,无上浮物或沉淀现象、基本不分层3~7分;不凝乳,有浮物、分层或沉淀现象<3分
活菌数 Bacterial Counts	10	>10 ⁶ CFU/mL,10分
凝乳时间 Curd time	10	凝乳时间3~4 h,7~10分;凝乳时间4~5 h,3~7分;凝乳时间>5 h,<3分
酸甜度 Acidity and sweetness	10	酸甜适中7~10分;偏酸或偏甜3~7分;过酸或过甜<3分

1.3.6 数据处理

每个试验重复三次,利用Excel 2007和SPSS 18软件对结果进行分析,并结合Duncan氏法做多重比较,结果用平均值±标准差表示。

2 结果与分析

2.1 发酵温度的确定

温度是影响高密度发酵液中生物产量的重要因素。由图1可知,在发酵温度为31~37℃之间时,发酵液活菌数逐渐升高,而在发酵温度在37~43℃之间时,发酵液活菌数逐渐下降。说明空间罗伊氏乳杆菌SS23-52的较适宜发酵温度在34~40℃之间,其中温度为37℃时,发酵液活菌数最高,为8.57×10⁸ CFU/mL。故确定空间罗伊氏乳杆菌SS23-52发酵温度为37℃。

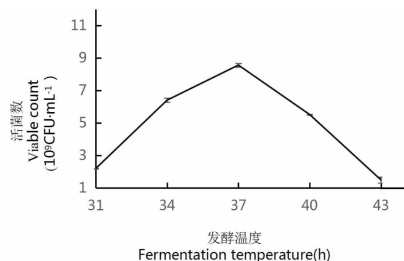


图1 发酵温度对SS23-52菌株生长的影响

Fig. 1 Effect of fermentation temperature on the growth of SS23-52 strain

2.2 发酵接种量的确定

接种量的大小决定生产菌种在发酵罐中的繁殖速度和生物产量。若接种量过低,菌体繁殖速度缓慢,若接种量过高,菌体消耗培养基中的营养物质过

快,造成后期生物产量降低。由图2可知,在接种量为1%~3%之间时,发酵液活菌数逐渐升高,而在3%~5%之间时,发酵液活菌数逐渐下降。说明空间罗伊氏乳杆菌 SS23-52 的较适宜接种量在2%~4%之间,其中接种量为3%时,发酵液活菌数最高,为 7.72×10^8 CFU/mL。故确定空间罗伊氏乳杆菌 SS23-52 发酵接种量为3%。

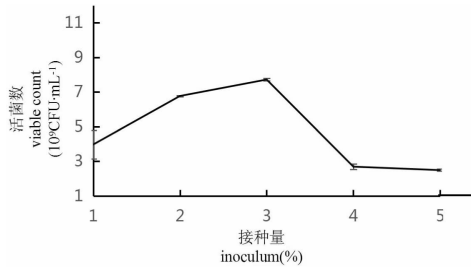


图2 接种量对 SS23-52 菌株生长的影响

Fig. 2 Effect of fermentation inoculum on the growth of SS23-52 Strain

2.3 发酵时间的确定

发酵时间的长短直接影响发酵液中菌体的生物产量。如发酵时间过短,菌体尚未达到生命力极为旺盛的对数生长期,而对数生长期的末期菌体生物量才达到最高峰,故较短的发酵时间会造成生物产量降低,如发酵时间过长,菌体生长进入衰亡期,出现菌体自溶导致生物量下降。由图3可知,在发酵

时间为8~16 h之间时,发酵液活菌数逐渐升高,而在发酵时间在16~24 h之间时,发酵液活菌数逐渐下降。说明空间罗伊氏乳杆菌 SS23-52 的较适宜发酵时间在12~20 h之间,其中发酵时间为16 h时,发酵液活菌数最高,为 7.53×10^8 CFU/mL。故确定空间罗伊氏乳杆菌 SS23-52 发酵时间为16 h。

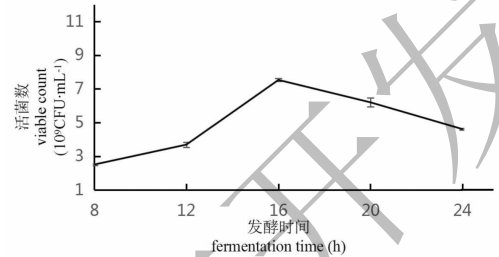


图3 发酵时间对 SS23-52 菌株生长的影响

Fig. 3 Effect of fermentation time on the growth of SS23-52 Strain

2.4 正交试验优化发酵条件

由表3可见,根据正交试验极差分析可知,不同发酵条件对发酵液活菌数的影响顺序为:发酵温度 > 发酵时间 > 接种量;根据正交试验 K 值分析 $KA_2 > KA_3 > KA_1, KB_2 > KB_3 > KB_1, KC_2 > KC_3 > KC_1$ 可知,菌株 SS23-52 高密度发酵条件的最优组合为 $A_2B_2C_2$,即发酵温度 37 °C、发酵剂接种量 3%、发酵时间 16 h。

表3 SS23-52 菌株正交试验 $L_9(3^3)$ 发酵剂发酵条件优化结果

Table 3 SS23-52 orthogonal test $L_9(3^3)$ optimization result of starter

组别 Group	发酵温度 Fermentation temperature (°C) A	接种量 Inoculum size (%) B	发酵时间 Fermentation time (h) C	活菌数 Viable count ($\times 10^9$ CFU/mL)
1	1	1	1	7.90 ± 0.03
2	1	2	2	6.70 ± 0.01
3	1	3	3	5.40 ± 0.12
4	2	1	2	7.60 ± 0.06
5	2	2	3	11.0 ± 0.11
6	2	3	1	6.20 ± 0.08
7	3	1	3	6.80 ± 0.05
8	3	2	1	5.30 ± 0.07
9	3	3	2	9.70 ± 0.03
K1	20.00	22.30	19.40	$A_2B_2C_2$
K2	24.80	23.00	24.00	RA > RC > RB
K3	21.80	21.30	23.20	
k1	6.67	7.43	6.47	
k2	8.27	7.67	8.00	
k3	7.27	7.10	7.73	
R	4.80	1.70	4.60	

2.5 验证试验

由表4可知,罗伊氏乳杆菌 SS23-52 菌株的活菌数优化前后相差较大,优化后活菌数提升至 1.60

$\times 10^{10}$ CFU/mL,是优化前活菌数的 1.68 倍,说明采用该优化条件可以提升发酵剂活菌数。

表4 发酵剂发酵条件优化结果与初始发酵条件结果对照

Table 4 Comparison of optimization results between starter cultures and initial culture conditions

组别 Group	A 发酵温度 Fermentation temperature ($^{\circ}\text{C}$)	B 接种量 Inoculum size (%)	C 发酵时间 Fermentation time (h)	活菌数 Viable count ($\times 10^{10}$ CFU/mL)
SS23-52 菌株优化条件 Optimization conditions of SS23-52 strain	37	3.0	16	1.60 \pm 0.02
SS23-52 菌株对照条件 SS23-52 Strain control condition	37	2.0	20	0.95 \pm 0.05

2.6 保护剂的筛选

4号冻干护剂组合的空间罗伊氏乳杆菌 SS23-52 存活率最高,为 98.67%;8号冻干保护剂组合的菌种存活率次之,为 97.67%;1号、2号、3号、5号冻干保护剂组合菌种存活率在 91.49~95.86%之间,6号和7号冻干保护剂组合菌种存活率最小,分

别为 86.33% 和 86.90%。故确定空间罗伊氏乳杆菌 SS23-52 的冻干保护剂较优组合配方为:4号 5 g/100mL 麦芽糊精 + 10 g/100mL 脱脂奶粉,其菌种存活率可达 98% 以上,冻干发酵剂的活菌数为 4.4×10^{10} CFU/g。

表5 不同组合保护剂对发酵液活菌数存活率的影响

Table 5 Effect of different combination protectant on survival rate of viable bacteria in fermentation broth

组别 Group	冻干前浓缩液活菌数 Number of live bacteria in concentrated live bacteria preparation before freeze-drying $\times 10^9$ (CFU/mL)	冻干后还原浓缩液活菌数 Number of viable bacteria in concentrated viable bacterial preparations after freeze-drying $\times 10^9$ (CFU/mL)	存活率 Survival rate (%)	冻干粉活菌数 Lyophilized starter Number of living bacterium $\times 10^{10}$ (CFU/g)
1	27	10	95.86	5.0
2	69	8.8	91.74	4.4
3	40	9.8	94.20	4.9
4	12	8.8	98.67	4.4
5	7.6	1.1	91.49	0.6
6	84	2.7	86.33	1.4
7	51	2.0	86.90	1.0
8	6.6	3.9	97.67	1.9

2.7 冻干菌粉接种量的确定

由表7可知,不同接种量条件下,冻干菌粉制备酸奶的凝乳时间均在 4.0 h 以下,随着接种量的加大凝乳时间缩短,pH 降低、酸度升高,说明后酸化程度明显降低。接种量为 1.0 g/1 000 mL 和 1.5 g/1 000 mL,感官得分较高分别为 58.65 分和 58.58 分。接种量过大,酸度升高较多,感官评分降低。故确定接种量在 1.0~1.5 g/1 000 mL 时,凝乳时间为 3.40 ± 0.10 h 左右,有浓郁的炒麦香味,且凝乳时间明显快于较市售酸奶,市场价值较大。

3 结论

乳酸菌活菌数量的高低易受到发酵温度、时间和接种量等因素的影响,因此采用高密度发酵来提高活菌数量。乔成亚^[8]通过对干酪乳杆菌 LC2W 发酵条件的优化,提高了活菌数量达到 5.15×10^8 CFU/mL。胡丹丹等^[9]以植物乳杆菌为发酵剂优化工艺条件,活菌数达 10^9 CFU/mL。本研究采用正交试验优化罗伊氏乳杆菌 SS23-52 菌株发酵条件,高于文献中的活菌数,为 1.60×10^{10} CFU/mL。

在冷冻干燥过程中造成部分微生物细胞的损

表7 冻干菌粉接种量优化结果

Table 7 Optimization results of inoculation of freeze-dried fungus powder

接种量 Inoculum size (g/1 000mL)	凝乳时间 Curd time (h)	pH Potential of hydrogen	酸度 Acidity (σ T)	活菌数 Viable count ($\times 10^9$ CFU/mL)	感官分数 sensory evaluation
0.5	4.00	4.65 \pm 0.01	49.15 \pm 0.50	2.00 \pm 0.02	54.85 \pm 0.02
1.0	3.50	4.61 \pm 0.04	54.71 \pm 0.05	3.20 \pm 0.01	58.65 \pm 0.12
1.5	3.30	4.50 \pm 0.01	57.49 \pm 0.06	4.80 \pm 0.03	58.58 \pm 0.58
2.0	3.20	4.49 \pm 0.01	73.17 \pm 0.03	5.20 \pm 0.03	57.55 \pm 0.06
2.5	3.20	4.45 \pm 0.01	80.47 \pm 0.02	5.90 \pm 0.04	55.59 \pm 0.10

注:表中数据感官评价为 $n=10$ 的平均值;满分60。

Note: The sensory evaluation of the data in the table is the average value of $n=10$; Full score is 60 points.

伤,因此通常在制作冻干菌粉时加入保护剂,形成保护膜以稳定细胞膜结构从而提高菌体的存活率^[10]。单一保护剂因作用效果的局限性而不能满足冷冻干燥的要求,在冻干中常用复合保护剂^[11]。樊振南^[12]等用植物乳杆菌 YI-Y 确定保护剂配方为:山梨醇浓度 1.1 g/100 g,麦芽糊精浓度 24.8 g/100 g,甘油浓度 2.4 g/100 g,该条件下菌体存活率约为 76.08%;李家鹏等^[11]用植物乳杆菌筛选出保护剂配方:3.34% 脱脂乳、1.85% 海藻糖、0.25% 硫酸锰作复合保护剂,菌体存活率为 96.8%;任香芸^[11]等筛选出植物乳杆菌 R23 的冻干保护剂配方:甘油 2.5%,谷氨酸钠 1.0%,苹果酸钠 2.2%,海藻糖 1.0%,山梨醇 1.0%,在此条件下细胞存活率达 95.3%;田文静^[14]利用植物乳杆菌 LIP-1 筛选出最佳冷冻干燥保护剂:甘油 2%、麦芽糖 1%、L-半胱氨酸 2%、乳糖 2%,存活率为 83.80%。仇梓冰^[13]利用植物乳杆菌确定最佳保护剂的配方:脱脂乳 13.0%,海藻糖 7.6%,山梨醇 2.7%,菌粉存活率达 86.28%。本研究使用 10% 脱脂奶粉和 5% 麦芽糊精作为保护剂,罗伊氏乳杆菌存活率为 98.67%,比文献中研究的乳杆菌直投式发酵剂存活率均较高。原因是:脱脂乳等高分子保护剂以包裹形式在菌体表面形成保护层,如乳清蛋白形成的蛋白膜,可减少因细胞壁损伤而引起的胞内物质泄漏,避免菌体暴露于氧气和介质中。此外,脱脂乳中的乳糖与蛋白质中的极性基团或与细胞膜磷脂中的磷酸基团形成氢键,保护细胞膜和蛋白质结构与功能的完整性。麦芽糊精的保护机理与脱脂乳类似。故实践中通常以脱脂乳为基础保护剂再复配其他保护剂制成复合保护剂。

酸奶的凝乳时间越长,后酸化程度越高,将影响酸奶的感官品质^[16]。陈世伟^[17]利用保加利亚乳杆

菌 LB6 菌粉与嗜热链球菌菌粉按 1:1 复配制备酸奶,其凝乳时间为 5 h 左右。刘春娟等^[18]利用罗伊氏乳杆菌 CICC6121、保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌制备酸奶,凝乳时间为 5.16 h。杨丽丽^[19]等利用乳酸乳球菌脂亚种 HM 598685、嗜酸乳杆菌 HM 598684、干酪乳杆菌 HM 598683 菌粉按照 3% 的接种量制作酸奶,凝乳时间为 8 h;刘秀清^[20]将 3 种益生元(低聚木糖、低聚果糖和低聚异麦芽糖)加入脱脂乳中,酸奶的凝乳时间为 12 h。而本研究利用罗伊氏乳杆 SS23-52 直投式发酵剂制备纯种益生菌酸奶,凝乳时间仅为 3.5 h。分析原因是:罗伊氏乳杆菌 SS23-52 菌株通过神舟十一号飞船搭载,在空间环境中,有关基因发生了正突变,导致菌株生长速度加快,同时存活率高^[21,22],从而提高了菌株活力,所以凝乳时间缩短,其发酵性能可与保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌混合发酵的普通酸奶相媲美,因此可以替代同类菌种的益生菌。

本实验通过正交试验优化直投式发酵剂发酵条件,最终确定纯种益生菌酸奶直投式发酵剂发酵条件为:发酵温度 37 $^{\circ}$ C,发酵时间 16 h,接种量 3.0%,活菌数量比优化前提高了 1.68 倍。确定保护剂配方:10% 脱脂奶粉 + 5% 麦芽糊精(质量体积百分比),菌种存活率为 98.67%。

参考文献

- 1 Liu WJ, Yu J, Sun ZH et al. Relationships between functional genes in *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus* isolates and phenotypic characteristics associated with fermentation time and flavor production in yogurt elucidated using multilocus sequence typing[J]. *J Dairy Sci*, 2016, 99: 89-103.
- 2 Li P. Study on the functionality of *Streptococcus thermophilus* and the development and application of its dvs starter[D]. Shijiazhuang: Hebei University of Science & Technology (河

- 北科技大学),2018.
- 3 Wang YJ,Zhao FX,Pan XJ,et al. Development on the directed vat set starters of yogurt[J]. The Food Ind(食品工业),2017,38(4):43-47.
 - 4 Lin HJ,Wang HJ,Wang XQ,et al. Optimization of high cell density culture conditions of dvs yogurt starter cultures[J]. The Food Ind(食品工业),2014,35(4):48-51.
 - 5 Liu H. Modern Food Microbiology Test Technology(现代食品微生物学试验技术)[M]. Beijing:China's Light Industry Publishing House,2008:263-263.
 - 6 Xing L,Wu H,Liu DM,et al. Study of cryoprotective agents during freeze-drying *lactobacillus casei subsp. rhamnosus* 719[J]. Chin Dairy Ind(中国乳品工业),2009,37(11):15-17
 - 7 Ministry of Health of the PRC. GB5009. 239—2016. National food safety standard determination of acidity in milk and milk products[S]. Beijing:China standard Publishing House,2016.
 - 8 Qiao CY. Study of the optimal fermentation conditions of *lactobacillus casei* LC2W[D]. Beijing:China Agricultural University(中国农业大学),2017.
 - 9 Hu D,Fan QY,Tang L,et al. Optimization of fermentation process of okra puree with *lactobacillus plantarum*[J]. The Food Ind(食品工业),2018,39(11):18-22.
 - 10 Li H,Luo YE,Liu YL,et al. Research progress of microorganism in vacuum freeze-drying[J]. Microbiol Chin(微生物学通报),2002,29(3):78-81.
 - 11 Ren XY,He ZG,Li WX,et al. Screening of optimal cryoprotectants for *lactobacillus plantarum* R23[J]. J of Chin Inst Food Sci Tech(中国食品学报),2016,16:115-121.
 - 12 Fan ZN,Dong LT,Zhou SM,et al. Optimization of freeze-drying protectantfor *lactobacillus plantarum* YI-Y 2013[J]. Food & Mach(食品与机械),2017,33:126-130.
 - 13 Li JP,Zhang XG,Qiao XL,et al. Optimization of formula of cryoprotectants for *lactobacillus plantarum* by response surface methodology(RSM)[J]. Food Sci(食品科学),2008,29:146-147.
 - 14 Tian WJ,Wang JG,Song JJ,et al. Proper cryoprotectants improving properties of *L. plantarum* LIP-1 microcapsules[J]. Trans of the Chin Society of Agric EI(农业工程学报),2015,31:285-294.
 - 15 Chou ZB,Yu CQ,Zhang DJ,et al. Protective agent optimization and protective effects of plant *lactobacillus* during simulated gastrointestinal tract in vitro[J]. Chin Food Add(中国食品添加剂),2016,10:142-148.
 - 16 Zhou YP,Zhang CM,Kong XZ,et al. Effect of yoghurt starter cultures on the quality of soybean yoghurt[J]. Soyb Sci(大豆科学),2018,37:149-156.
 - 17 Chen SW. Perparation and application freeze-dried *lactobacillus bulgaricus* producing ace inhibitory pepetides[D]. Xi'an:Shanxi University of Science & Technology(陕西科技大学),2015.
 - 18 Liu CJ,Bian X,Zhao SJ,et al. Screening of *lactobacillus reuteri* inhibiting spoilage organisms and its application to yoghurt production[J]. Food Sci(食品科学),2016,7:157-162.
 - 19 Yang LL,Han L,Zhang LJ,et al. Formula of mixed fermentation of lactic acid bacteria and optimization of enrichment medium[J]. Food and Ferm Ind(食品与发酵工业),2011,37:113-116.
 - 20 Liu XQ,Liu L,Li XD,et al. Effects of different probiotics on the activity of *lactobacillus rhamnosus* in yogurt[J]. Mod Agric Sci Technol(现代农业科技),2016,20:262-263.
 - 21 Jie HF,Zhang GL,Li J,et al. Advances in engineered microorganisms for improving metabolic conversion via microgravity effects[J]. Bioengineered,2015,6:251-255.
 - 22 Liu CT. The theory and application of space microbiology: China's experiences in space experiments and beyond[J]. Envir Microbiol,2017,19:426-433.