

益生菌发酵绿豆乳的菌种筛选

刘晓宇¹, 谷新晰¹, 董慧¹, 许文涛², 田洪涛¹, 罗云波²

(1. 河北农业大学食品科技学院, 河北保定 071001) (2. 中国农业大学食品科技与营养工程学院, 北京 100083)

摘要: 本文以分离自益生菌乳制品、微生态制剂、保健品的 13 株国际公认的益生乳酸菌为试验菌株, 接种于纯绿豆乳培养基中进行发酵。通过检测其凝乳与否、凝乳时间、以及凝乳时 pH、活菌数、感官评价等指标, 筛选适宜发酵绿豆乳的繁殖力强、发酵活性高的益生菌菌株。结果表明: 经过层层筛选得到的干酪乳杆菌 07-211、植物乳杆菌 08-193、瑞士乳杆菌 05-29 等三株益生菌发酵 6h 均可均一凝乳, 有绿豆香, 且凝乳时, 其活菌数分别可达到 3.9×10^8 、 1.6×10^8 、 1.4×10^8 cfu/mL, 凝乳时 pH 分别为 4.16、4.30、4.32, 滴定酸度分别为 83.5、81.0、75.2 °T, 可作为新型绿豆乳制品的发酵菌株。

关键词: 益生菌; 绿豆乳; 发酵; 筛选

文章编号: 1673-9078(2012)7-828-831

Screening of Probiotic Bacteria for Mungbean Milk Fermentation

LIU Xiao-yu¹, GU Xin-xi¹, DONG Hui¹, XU Wen-tao², TIAN Hong-tao¹, LUO Yun-bo²

(1. College of Food Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

(2. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: Strains of probiotic bacteria which were isolated from dairy products, health products and internationally -recognized probiotics were chose as test strains. Through the domestication, their characteristics were studied by evaluating the curd, curd time, sensory quality, viable count of probiotics, and pH value of the fermented mungbean milk to obtain several strains with high reproductively ability and fermentation activity. The result indicates that *Lactobacillus casei* 07-211, *Lactobacillus helveticus* AS 1.1877^T, 05-29 and *Lactobacillus plantarum* AS.1.2986, 07-191 were screened from 13 strains of lactic acid bacteria for mungbean milk fermentation. After a 6-hour fermentation of the mungbean milk fragrance with those three strains, curd could be formed with, the viable cell number reached 3.9×10^8 , 1.6×10^8 and 1.4×10^8 cfu/ml, respectively. The pH values of the fermented soybean milk by these three strains were 4.16, 4.30 and 4.32, respectively, and the acidity values reached 83.5, 81.0 and 75.2 °T, respectively. This research can provide reference for development of functional probiotics yoghurt.

Key words: probiotic bacterias; fermentation; mungbean milk; screen

随着国民经济的增长和人民生活水平的提高, 人们对食品健康日益关注。饮食结构中膳食搭配逐渐由动物蛋白—肉、蛋、奶转移至一些低能量、低热量的植物蛋白上来。我国绿豆资源丰富, 在中国已有两千多年的栽培史。绿豆是一种具有药食两用的食材, 其营养成分十分丰富: 蛋白质含量 22%~25%, 赖氨酸含量高达 6.9%, 富含无机盐、维生素, 是一种优质的植物蛋白^[1,2]。绿豆乳经乳酸菌发酵, 可使其营养物质更易被人体消化吸收, 产品中含有的活菌及其代谢产物能有效抑制人体肠道内有害菌的生长, 提高人体免疫力, 增强抗病能力, 降低血清中胆固醇含量^[3]。

收稿日期: 2012-03-28

基金项目: 山东省淄博市科学技术发展计划项目 (2010GG10048), 河北省石家庄市科学技术研究与发展计划项目 (1117272A)

作者简介: 刘晓宇 (1983-), 女, 在读硕士, 从事工业微生物的应用研究

通讯作者: 田洪涛 (1963-), 男, 教授, 博士生导师, 从事食品微生物及发酵工程教学与科研工作

目前发酵绿豆乳的乳酸菌种多采用酸奶菌即保加利亚乳杆菌与嗜热链球菌^[4], 然而酸奶菌虽然对人体健康有益, 但用其发酵绿豆乳存在生长活力弱, 产酸不足等缺点, 加之不能定植在人体肠道中, 从而对人体健康的有益作用大打折扣。因此筛选适宜发酵绿豆乳的高效益生菌菌株势在必行。目前国际公认的与人体存在共生关系的益生菌主要有: 双歧杆菌、嗜酸乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、干酪乳杆菌、罗伊氏乳杆菌、格式乳杆菌、植物乳杆菌、发酵乳杆菌、瑞士乳杆菌等^[5]。

本研究利用本实验室现有菌种资源, 以分离自益生菌乳制品、微生态制剂、保健品的 13 株国际公认的益生乳酸菌为试验菌株, 接种于纯绿豆乳培养基进行发酵。通过检测其凝乳与否、凝乳时间、以及凝乳时 pH、活菌数感官评价等指标, 筛选适宜发酵绿豆乳的繁殖力强、发酵活性高的益生菌菌株, 以期开发益生菌发酵绿豆乳制品提供科学依据。

1 材料与方法

1.1.1 菌种

05-281: 鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosum*) 分离自益生菌乳制品; 05-28: 鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosum*) AS 1.2466^T, 购自中科院微生物所; 05-21: 干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*) 分离自益生菌乳制品; 07-211: 干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*); 08-193: 植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) Z11, 分离自泡菜; 05-19: 植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 99105, 分离自益生菌保健品; 07-191: 植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) AS.1.2986, 分离自保健品; 05-171: 嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) La3, 分离自益生菌乳制品; 05-172: 嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) La4, 丹尼斯克发酵剂; 05-173: 嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) 分离自益生菌乳制品; 05-29: 瑞士乳杆菌 (*Lactobacillus helveticus*) AS 1.1877^T, 购自中科院微生物所; 05-272: 罗伊氏乳杆菌 (*Lactobacillus reuteri*) 分离自丹尼斯克发酵剂; 05-271: 罗伊氏乳杆菌 (*Lactobacillus reuteri*) 分离自丹尼斯克发酵剂。

1.1.2 试剂

酵母膏、牛肉膏、葡萄糖、蛋白胍购自北京双旋; 乳糖、醋酸钠、磷酸氢二钾、柠檬酸、氯化钠购自天津红星; 吐温 80 购自上海聚源, 以上试剂均为分析纯或生化试剂。

0.9%的生理盐水: 用于益生菌活菌计数的稀释液。

1.1.3 培养基

MRS 液体和固体培养基^[6]: 参照文献配制。115 °C 灭菌 20 min, 冷却备用。其中液体培养基用于菌种活化, 固体培养基用于菌种活菌数检测和纯化。

12%复原脱脂乳培养基 (脱脂乳与蒸馏水质量体积比为 1:7): 新西兰工业化脱脂奶粉, 加蒸馏水制成 12%的复原脱脂乳液, 调节 pH 值 6.5, 112 °C 灭菌 10 min, 冷却后, 置于冰箱备用。用于检测菌种活力。

绿豆乳培养基 (豆与蒸馏水质量体积比为 1:9): 用于菌种的活化和筛选。制作工艺如下:

选豆 (挑选表面光泽无霉烂变质的绿豆) 121 °C 烘烤 10 min → 1:1 蒸馏水浸泡, 50 °C 浸泡热烫至绿豆饱和为止 → 手搓去皮 → 豆水比 1:9 打浆 → 胶体磨磨浆 → 糊化 → 加入淀粉酶 70 °C 水浴酶解 30 min → 20 MPa 均质机均质 10 min → 分装 10 mL 螺口管, 得到绿豆乳培养基 → 115 °C 灭菌 10 min → 4 °C 冰箱备用

1.1.4 主要仪器设备

FLC 超净台 (哈尔滨市东联公司); YXQG02 型电热式蒸汽消毒器 (山东新华医疗器械厂); FOM-Z150-2 型磨浆机 (镇江市丹徒区纪中电器厂); SIS60-70 实验型高压均质机 (上海申鹿均质机有限公司); SPX-150B-Z 型生化培养箱 (上海博讯实业有限公司); PHS-3C 酸度计 (上海般特仪器有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种活化

将备选出的 13 株益生菌分别在 MRS 液体培养基中活化: 按体积比 1:100 接种于液体培养基中 (活菌数约 10⁶ 数量级), 37 °C 培养, 活化 1~3 次, 使培养时间在 12~18 h 内活菌数达到 1×10⁹ cfu/mL 以上。将活化好的液体菌种按体积比 1:100 接种试管脱脂乳培养基中 37 °C 培养, 活化 1~3 次, 使凝乳时间达到 3~6 h。

1.2.2 生长曲线的测定

将活化好的试管脱脂乳菌液以 2% 分别接种于试管绿豆乳培养基中, 最适温度培养 16 h, 分别取 0 h、2 h、4 h、6 h、8 h、10 h、12 h、16 h 为监测点, 活菌计数, 适温培养 36~48 h, 记录活菌数, 绘制生长曲线。每个实验两个平行, 重复三次。

1.2.3 测定方法

1.2.3.1 感官指标

色泽、组织状态: 取适量样品置于洁净烧杯中, 在自然光下观察色泽和组织状态; 滋味和气味: 先闻气味, 然后用温开水漱口, 通过品尝确定样品滋味和气味。

1.2.3.2 pH 值测定

PHS-3C 酸度计直接测定。

1.2.3.3 滴定酸度

0.1 mol/L NaOH 标准溶液滴定^[7]: 称取 5 g 样品, 置于 150 mL 锥形瓶中, 用 40 mL 新煮沸冷却到 40 °C 的蒸馏水稀释均匀, 滴 3 滴 ρ=10 g/L 酚酞指示剂, 然后用 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液滴定, 至微红, 并在 30 s 内红色不消失, 所用 NaOH 溶液的毫升数×20 即为该样品的酸度值(°T), 每个样品, 重复测三次, 求平均值。

1.2.3.4 活菌计数

平皿菌落计数法^[6]: 30 °C 或 37 °C 有氧培养 36~48 h, 每个实验两个平行, 重复三次。

1.2.4 统计分析方法

设立空白对照, 每个实验重复三次。实验结果利用 SPSS 软件进行分析, 即 F 检验分析处理间差异显著性, 然后再方差分析处理间显著基础上, 用最小极差法即邓肯氏新复极差法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 13 株益生菌在纯绿豆乳中凝乳观察及产酸研究

将活化好的脱脂乳菌液以 2% 分别接种于试管绿豆乳培养基中, 最适温度下静置培养 12 h, 观察是否凝乳及 pH 的变化情况。结果见表 1。

表 1 13 株益生菌在绿豆乳培养基中培养 12h 后的情况

Table 1 The effect of 13 strains of probiotic bacteria on mungbean milk fermentation at 12 h

菌株	凝乳情况	pH	初始 pH	ΔpH
鼠李糖乳杆菌 05-281	+	4.80	6.67	1.87
鼠李糖乳杆菌 05-28	+	4.86	6.67	1.81
干酪乳杆菌 05-21	+	4.57	6.67	2.10
干酪乳杆菌 07-211	+	4.16	6.67	2.51
植物乳杆菌 08-193	+	4.30	6.67	2.37
植物乳杆菌 05-19	+	4.38	6.67	2.29
嗜酸乳杆菌 05-171	+	4.49	6.67	2.18
嗜酸乳杆菌 05-172	+	4.56	6.67	2.11
嗜酸乳杆菌 05-173	+	4.36	6.67	2.31
瑞士乳杆菌 05-29	+	4.32	6.67	2.35
罗伊氏乳杆菌 05-272	+	4.82	6.67	1.85
罗伊氏乳杆菌 05-271	+	4.78	6.67	1.89
植物乳杆菌 07-191	+	4.89	6.67	1.78

注: “-”表示未凝乳, “+”表示凝乳。

产酸性能是衡量发酵性能的重要指标。由表 1 可知: 13 株益生菌在纯豆乳中最适温度下培养均能发酵产酸并凝乳, 但 pH 变化量不尽相同。益生菌可以利用绿豆乳中的单糖产生乳酸, pH 会降低, 故可以根据产乳酸量即 pH 变化量来反映菌种在培养基中的生长情况。表中, 各菌 pH 值差异显著性分析差异均不显著 ($p>0.05$), 但综合考察 12 h 各菌 pH 值和 pH 值变化量, 植物乳杆菌 08-193 pH 4.30, pH 变化量 2.37; 瑞士乳杆菌 05-29 pH 4.32, pH 变化量 2.35; 干酪乳杆菌 07-211 pH 4.16, pH 变化量 2.51; 嗜酸乳杆菌 05-173 pH 4.36, pH 变化量 2.31。13 株益生菌中终止 pH 值与初始 pH 变化量较大的四株菌从大到小依次为干酪乳杆菌 07-211、植物乳杆菌 08-193、瑞士乳杆菌 05-29、嗜酸乳杆菌 05-173。说明该四株菌在纯豆乳培养基中生长的最好。将这四株菌作为下一步复筛的菌种。

2.2 4 株益生菌在纯豆乳中发酵性能的研究

将活化好的试管脱脂乳菌液以 2% 分别接种于试管绿豆乳培养基中, 最适温度培养 12 h, 记录凝乳时间, 测定 12 h 活菌数、pH 值及滴定酸度。结果见表 2。

分析表 2 可知: 通过方差分析与新复极差比较活菌数, 结果显示瑞士乳杆菌、植物乳杆菌和干酪乳杆

菌 12h 活菌数均可达到 10^8 数量级, 但两两间差异不显著 ($p>0.05$), 嗜酸乳杆菌活菌数和这三株菌比较, 活菌数低, 且差异性显著。嗜酸乳杆菌属于第一代益生菌, 对营养要求比较苛刻, 生长缓慢, 本实验也验证了这个观点。本实验为筛选优良发酵绿豆乳菌种, 故舍弃嗜酸乳杆菌 07-173。干酪乳杆菌 07-211, 瑞士乳杆菌 05-29 和植物乳杆菌 08-193 作为下一步试验的备选菌种。

表 2 4 株益生菌菌株在绿豆乳培养基生长发酵性能的分析结果

Table 2 Behaviors of 4 strains of lactic acid bacteria in mungbean milk fermentation

菌株	凝乳时间/h	12 h 活菌数/(cfu/mL)	pH 值	滴定酸度/°T
瑞士乳杆菌 05-29	4.5	1.5×10^{8a}	4.32	75.2
嗜酸乳杆菌 05-173	5.0	6.0×10^{7b}	4.36	76.5
干酪乳杆菌 07-211	4.5	3.8×10^{8a}	4.16	83.5
植物乳杆菌 08-193	5.0	4.0×10^{8a}	4.30	81.0

注: 表中上标字母为邓肯式新复极差测验结果 (小写字母 $\alpha=0.05$; 大写字母 $\alpha=0.01$)。

2.3 3 株益生菌发酵纯豆乳的感官评价

发酵食品的口感是产品质量的重要因素之一, 也决定了是否可以被消费者接受, 而这与发酵菌种产生的风味物质密切相关, 因而通过对 3 株菌的发酵产品进行感官评价选取可以产生良好风味的菌种作为发酵菌株。将活化好的试管脱脂乳菌液以 2% 分别接种于试管绿豆乳培养基中, 培养 6 h, 4 °C 冰箱冷藏后熟 24 h, 进行感官评价, 结果见表 4。

表 3 筛选出的三株菌发酵绿豆乳的感官评价

Table 3 Sensory evaluation of mungbean milk fermented by the three probiotics

菌种	感官评价
干酪乳杆菌 07-211	淡绿色, 均一凝乳, 有豆香, 质地细腻, 酸味适中, 有少许水析出
瑞士乳杆菌 05-29	淡绿色, 均一凝乳, 有豆香, 质地略松软粗糙, 酸味略淡, 有少许水析出
植物乳杆菌 08-193	淡绿色, 均一凝乳, 有豆香, 质地细腻, 酸味略重, 有少许水析出

由表 3 可知, 发酵终止, 3 株菌均能发酵绿豆乳产生均一凝乳状态。相对于干酪乳杆菌与瑞士乳杆菌, 植物乳杆菌发酵产生酸味略重, 产酸量较大, 这与植物乳杆菌具有较强的淀粉水解能力是一致的。其发酵豆乳质地细腻, 酸味可通过添加蔗糖进行口味调节, 且植物乳杆菌最适发酵温度 30 °C, 可节省能量, 降低成本, 有利于工业推广, 因此植物乳杆菌可作为备选菌株; 瑞士乳杆菌发酵绿豆乳质地较为粗糙, 但瑞

士乳杆菌有较强的蛋白酶水解能力,在发酵过程中能产生多种氨基酸和生物活性肽,同时可分泌粘性物质^{[8][9]},因此也作为备选菌株;干酪乳杆菌凝乳状态细腻,酸度适中,有绿豆香味,因此三株菌均选定为后续试验菌株。

2.4 3株益生菌在纯豆乳中生长曲线的测定

采用方法 1.2.4,测定 16 h 生长曲线,结果如图 1 所示。

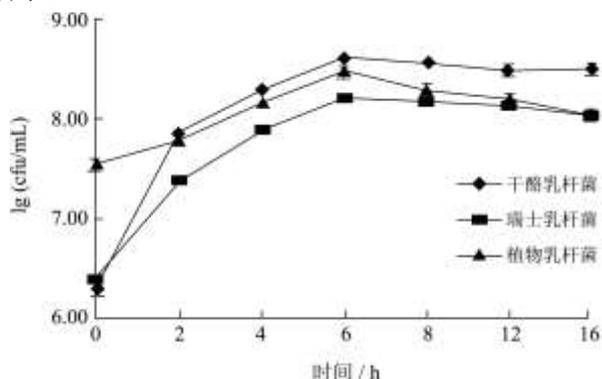


图 1 三株益生菌在绿豆乳培养基中培养 16h 生长曲线

Fig.1 The growth curves of the three probiotics during a 16-h mungbean milk fermentation

由图 1、表 3 可知,干酪乳杆菌在 37 °C 6 h 达到对数末期,最大活菌数为 3.9×10^8 cfu/mL,瑞士乳杆菌在 37 °C 6 h 达到对数末期,最大活菌数为 1.6×10^8 cfu/mL,植物乳杆菌在 30 °C 6 h 达到对数末期,最大活菌数为 3.1×10^8 cfu/mL。3 株菌均在 6 h 达到对数末期,因此可以确定后续试验中可以以 6 h 作为培养终止时间即取样时间进行研究。

3 结论

3.1 目前有关发酵绿豆乳的关注点多集中在酸奶菌即保加利亚乳杆菌与嗜热链球菌的上^[4,10],益生菌菌株尚且鲜有报道^[11]。本研究所选干酪乳杆菌、瑞士乳杆菌、植物乳杆菌均是典型的第二代益生乳酸菌,能定植于人体肠道,改善宿主肠道菌群的组成,有利于人体健康。

3.1 唐劲松等^[4]报道了利用保加利亚乳杆菌与嗜热链球菌混菌发酵绿豆牛乳,发酵时间 12 h。本研究筛选出 3 株发酵性能优良的益生菌菌株,发酵时间 6 h 凝乳结实,可缩短发酵周期,提高设备利用率。张如意^[12]采用酸奶菌以 10% 接种量接种于绿豆与复原乳的

复合培养基中,42 °C 条件下发酵 5~6 h。本研究采用益生菌 2% 接种于纯绿豆乳中 30 °C 或 37 °C 发酵,可降低成本,有利于企业推广。Kamaly^[13] (1998) 采用双歧杆菌发酵豆奶,双歧杆菌属于专性厌氧菌,发酵条件苛刻,操作技术严格,不利于企业生产。本文采用的 3 株益生菌均是兼性厌氧菌,简化生产工艺,为后期好氧发酵提供了可能性。

3.3 本文通过实验并结合方差分析,从国际公认的 13 株益生乳酸菌中筛选出三株发酵纯绿豆乳能力优良,能在 6h 能凝乳,并且凝乳状态良好,活菌数达到 10^8 数量级的益生乳酸菌,为后续的益生菌发酵绿豆产品的研制开发奠定基础。

参考文献

- [1] 李安智.中国食用豆类营养鉴定与评价(第 1 版)[M].北京:中国农业出版社,1993
- [2] 梁琪.豆制品加工工艺与配方[M].北京:化学工业出版社,2007
- [3] 郭本恒.益生菌[M].北京:化学工业出版社,2003
- [4] 唐劲松,张璟晶,牛林.绿豆乳酸菌发酵的研究[J].农业科学,2009,33:114-116
- [5] Sadlers ME. Overview of functional food: emphasis on probiotic bacteria [J]. Int Dairy J, 1998, 8: 341-347
- [6] 凌代文,东秀珠.乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M].北京:中国轻工业出版社,1999
- [7] 大连轻工业学院,华南理工大学,西北轻工业学院等合编.食品分析[M].北京:中国轻工业出版社,2002
- [8] 华朝丽,赵征.瑞士乳杆菌发酵乳的研究[J].食品研究与开发,2004,25(3):46-49
- [9] 闵建,李理.瑞士乳杆菌与干酪乳杆菌在不同原料中的发酵特性研究[J].现代食品科技,2009,11:1269-1274
- [10] 黄鹭强,林清强,周亮,等.纯植物型酸奶的研制[J].福建师范大学学报(自然科学版)2008,24(5):79-85
- [11] 董喜梅,包艳,张勇,等.国内外发酵豆乳研究发展现状[J].大豆科学,2010,29(5):883-888
- [12] 张如意.绿豆酸奶的研制[J].食品与发酵工业,2010,46(4):93-95
- [13] KM Kamaly. Bifidobacteria fermentation of soybean milk [J]. Food Research International 1997, 30(9): 675-682