

凝结芽孢杆菌发酵乳的工艺优化

肖兰芳, 赵珊, 刘冬梅*, 吴晖

(华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要: 该研究对凝结芽孢杆菌发酵乳生产工艺进行了优化。以凝结芽孢杆菌 13002、保加利亚乳杆菌 CGMCC 1.290、嗜热链球菌 CGMCC 1.2741 共发酵的新型发酵乳为研究对象, 以不同菌种复配比、菌种接种量、发酵基低聚果糖添加量进行单因素实验, 再以感官评分为响应值, 通过 Box-Behnken 中心组合建立数学模型研究发酵乳的最佳生产工艺。结果表明, 菌种复配比(凝结芽孢杆菌:嗜热链球菌:保加利亚乳杆菌=1:1) 3:1、低聚果糖添加量 1.50%、接种量 1.50% 为最佳工艺条件。在该优化条件下, 测定发酵乳的平均滴定酸度值为 90.59, 与模型预测酸度值(93.25)拟和率达 97.15%, 说明此凝结芽孢杆菌发酵乳具有一定的竞争优势, 为新型发酵乳研发提供理论基础和拓展思路。

关键词: 凝结芽孢杆菌; 发酵乳; 工艺优化; 响应面

文章编号: 1673-9078(2022)07-90-97

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.7.1111

Optimization of Preparation of Fermented Milk by *Bacillus coagulans*

XIAO Lanfang, ZHAO Shan, LIU Dongmei*, WU Hui

(School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The production process of *Bacillus coagulans* fermented milk was optimized. The new fermented milk co-fermented with *Bacillus coagulans* 13002, *Lactobacillus bulgaricus* CGMCC 1.290 and *Streptococcus thermophilus* CGMCC 1.2741 was used as the research object. The single factor experiment was conducted with different strain compound ratio, strain inoculation amount and fermentative oligosaccharides addition amount. Sensory score was used as the response value. Box-behnken center combination was used to establish a mathematical model to study the optimal production process of fermented milk. The results showed that the optimal technological conditions of fermented milk were as follows: bacteria compound ratio (*Bacillus coagulans*: (*Streptococcus thermophilus*: *Lactobacillus bulgaricus*=1:1)) 3:1, oligosaccharides addition amount 1.50%, inoculation amount 1.50%. Under the optimized conditions, the average titrated acidity of fermented milk was determined to be 90.59, and the fitting rate with the acidity predicted by the model (93.25) was 97.15%, indicating that *Bacillus coagulans* fermented milk has certain competitive advantages, providing theoretical basis and expanding ideas for the development of new fermented milk.

Key words: *Bacillus coagulans*; fermented milk; process optimization; the response surface method

引文格式:

肖兰芳,赵珊,刘冬梅,等.凝结芽孢杆菌发酵乳的工艺优化[J].现代食品科技,2022,38(7):90-97

XIAO Lanfang, ZHAO Shan, LIU Dongmei, et al. Optimization of preparation of fermented milk by *Bacillus coagulans* [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(7): 90-97

长期以来, 发酵乳、奶酪常被用作益生菌乳制品载体^[1]。研究发现, 发酵乳与人的长寿和健康密切相关^[2], 研究人员致力于通过添加益生菌、益生元和各种植物提取物等增值成分, 赋予发酵乳额外的益生性

收稿日期: 2021-10-07

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31771908); 广东省自然科学基金面上项目 (2021A1515012451); 广州市科技计划项目 (201903010015)

作者简介: 肖兰芳 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品微生物利用与控制, E-mail: lanfangx2021@163.com

通讯作者: 刘冬梅 (1972-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品微生物的利用与控制研究, E-mail: liudm@scut.edu.cn

质, 使得益生性发酵乳在过去 20 多年里赢得了巨大的市场^[3,4]。目前, 在发酵乳及其饮品中已商业化应用的益生菌主要为 *Lactobacillus* spp.^[5,6]、*Bifidobacterium* spp., 代表性的菌种有 *Lactobacillus acidophilus*、*Lactobacillus plantarum*、*Lactobacillus rhamnosus*、*Lactobacillus casei*、*Animal Lactobacillus* subspecies、*Bifidobacterium lactis*、*Bifidobacterium longum* 等。为促进益生菌的生长和活力, 常在益生菌发酵乳及其乳饮料中添加棉子糖^[7]、低聚果糖^[8]和菊粉^[9]等益生元。益生元的刺激作用取决于益生菌的种类和食物基质的性质。例如, 乳饮料中 *B. animalis* Bb-12 和 *Lb.*

acidophilus La-5 的生长不受菊粉或玉米纤维的影响,但聚葡萄糖显著刺激了这些益生菌在冷藏条件下的生长^[10]。

凝结芽孢杆菌,作为新一代益生菌制剂,已有大量文献证实其在食品中应用的安全性^[11,12]。其可分泌多种代谢产物,如脂肪酶^[13]、木质素^[14],也可与其它菌群相互协调从而调节肠道菌群的平衡^[15]、促进机体消化吸收营养物质^[16]、增强机体免疫力^[17],进而调节机体的生理功能。美国 FDA 早在 1992 年批准凝结芽孢杆菌为安全可食用的益生菌,目前其已广泛应用到巧克力、面包、饮料^[18]等食品中。国内自 2016 年确定其可应用于食品后逐渐打开市场,已开发的产品有口服液、胶囊、乳酸及药品^[16],还有相关研究人员将其应用到益生菌糖果^[19]、发酵饮料^[20]及发酵乳^[21,22]等食品中。此外,动物实验^[23]表明凝结芽孢杆菌 13002+低聚果糖(BCS+FOS)可恢复环磷酰胺(CTX)所引起的血清免疫球蛋白水平的降低,调节细胞因子水平,具有较好的益生特性。本文通过单因素、响应面试验探索添加低聚果糖的凝结芽孢杆菌发酵乳的发酵工艺,希望为新型发酵乳研发提供理论基础和拓展思路。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*) 13002^[23-25],由本课题组从中国传统自制发酵泡菜中分离筛选得到,并于 2013 年保存于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,编号 CGMCC NO.7431;保加利亚乳杆菌(*Lactobacillus bulgaricus*) CGMCC 1.290,嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*) CGMCC 1.2741,购于广东省微生物菌种保藏中心。

全脂奶粉,雀巢(中国)有限公司;白砂糖,太古糖业有限公司;oligo-低聚果糖,量子高科(中国)生物工程有限公司;Volatile Free Acid Mix, SUPELCO;25%戊二醛,上海信裕生物工程有限公司;甲醛、无水乙醇、乙酸异戊酯、乳酸、浓硫酸(均为分析纯),广州市丛源试剂有限公司;海藻糖,广州蓝泽生物科技有限公司。

SPX-350B 型生化培养箱,上海坤天实验室仪器有限公司;TG 16G 型高速冷冻离心机,河北北弘实业有限公司;RHB80 型手持折光仪,石家庄泰斯特仪器设备有限公司;680 型多功能酶标仪,美国 Bio-Rad 伯乐;FiveEasy Plus 型 pH 计,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;LGJ-10A 型冷冻干燥机,上海豫明仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 发酵剂制备

将凝结芽孢杆菌 13002 干粉溶于无菌生理盐水,按 3% (V/V) 接种于其液体培养基中,经 2~3 次活化培养后用无菌生理盐水洗涤离心(8000 r/min, 4 °C, 10 min) 三次,取菌泥。按菌泥:保护剂(10%的脱脂奶粉及 10%的海藻糖溶于 0.9%的无菌生理盐水)=1:3 (m/m) 混匀,冷冻干燥,收集冻干粉,凝结芽孢杆菌冻干粉活菌数为 61.50×10^9 CFU/g, -20 °C 下保存,备用。同上方法得保加利亚乳杆菌冻干粉活菌数为 1.00×10^9 CFU/g,嗜热链球菌冻干粉活菌数为 1.00×10^9 CFU/g, -20 °C 下保存,备用。

发酵乳的制备过程:将 12 g 全脂奶粉和 8 g 白砂糖混匀,加入 100 mL 无菌生理盐水,85 °C 水浴灭菌 30 min,冷却后接种发酵剂,43 °C 发酵 4 h,4 °C 后熟 12 h。

1.2.2 发酵乳的工艺优化

1.2.2.1 菌种复配比优化

将凝结芽孢杆菌(BCS)与传统发酵剂(保加利亚乳杆菌+嗜热链球菌,SL)按 1:0、5:1、3:1、1:1、1:3、1:5、0:1 的比例,总接种量 1% (m/V),43 °C 发酵 4 h,4 °C 后熟 12 h,探究菌种复比对发酵乳品质的影响,并进行相关基本理化性质及感官的测定。

1.2.2.2 接种量优化

添加 4% (m/V) 低聚果糖,将凝结芽孢杆菌(BCS)与传统发酵剂(SL)按 3:1 的比例,按不同的总接种量 0.2%、0.5%、0.8%、1.0%、2.0% (m/V),43 °C 发酵 4 h,4 °C 后熟 12 h,对发酵乳进行相关基本理化性质及感官的测定,探究得出最优菌种接种量。

1.2.2.3 低聚果糖添加量优化

添加低聚果糖 0、1.0%、2.0%、4.0%、6.0%、8.0% (m/V),将凝结芽孢杆菌(BCS)与传统发酵剂(SL)按 3:1 的比例,总接种量 1.0% (m/V),43 °C 发酵 4 h,4 °C 后熟 12 h,探究低聚果糖添加量对发酵乳品质的影响,并进行相关基本理化性质及感官的测定。

1.2.2.4 响应面法优化工艺

表 1 发酵工艺的因素水平设计

Table 1 Factor level design of fermentation process

水平	因素		
	A 菌种配比	B 低聚果糖/%	C 接种量/%
-1	2:0.5:0.5	1.0	0.5
0	3:0.5:0.5	1.5	1.0
1	4:0.5:0.5	2.0	1.5

由 1.2.2.1~1.2.2.3 的实验结果,通过 Box-Behnken

软件进行 3 因素 3 水平的随机实验设计, 如表 1 所示。

1.2.3 发酵乳基本理化指标测定

1.2.3.1 pH 的测定

取适量的发酵乳样品于锥形瓶中, pH 计校准后, 测定发酵乳样品的 pH, 待示数稳定后读数并记录。

1.2.3.2 滴定酸度的测定

酸度按照 GB 5009.239-2016《食品安全国家标准 食品酸度的测定》方法测定。

1.2.3.3 可溶性固形物的测定

用纯水校正阿贝折光仪, 把待测发酵乳样品 1~2 滴滴在折光计的磨砂(样品)面上, 从折光计上直接读出可溶性固形物含量值。

1.2.3.4 持水力测定

取适量发酵乳样品, 记为 m_1 , 3500 r/min 离心 10 min, 将分离乳清倾倒掉, 称量剩余物质的质量, 记为 m_2 。计算公式如下:

$$\text{持水力} / \% = \frac{m_2}{m_1} \times 100\% \quad (1)$$

1.2.4 发酵乳的感官特性

表 2 发酵乳感官评价指标表

Table 2 The sensory evaluation indexes of yogurt

项目	特征	分值
色泽	色泽均匀一致, 呈乳白色	20~16
	色泽均匀一致, 呈微黄色	15~11
	色泽不均匀一致, 呈乳白色或微黄色	10~6
	色泽异常	5~0
滋味	口感顺滑, 奶味醇厚, 酸甜可口	30~23
	口感顺滑, 奶味一般, 酸甜一般	22~16
	微有颗粒感, 奶味一般, 偏酸	15~8
气味	颗粒感严重, 奶味轻微或无, 太酸	7~0
	奶味醇厚, 酸味适中	20~16
	奶味醇厚, 偏酸或少酸	15~11
	奶味轻微, 偏酸或少酸	10~6
质构	有异味	5~0
	组织细腻、均匀, 粘度适中	30~22
	组织细腻、均匀, 较稠或较稀	21~14
	组织均匀, 微有颗粒感, 较稠或较稀	13~7
	组织不均匀, 颗粒感严重	6~0

感官评定小组成员的组成: 选定华南理工大学在读本科生、研究生、教师等 20 人。发酵乳样品的感官评价从色泽、滋味、气味、质构 4 个方面进行, 评价前对参与人员进行了相关评定内容的介绍及注意事

项, 评定过程中不告知样品类别、不互相探讨, 感官评价指标如表 2 所示。

1.2.5 数据处理与分析

所有试验均重复 3 次; 采用 Design-Expert 8.0.6 Trial 软件进行响应面分析; 采用 SPSS 软件进行显著性分析, 数据表示为平均值±标准偏差, $p < 0.05$ 认为差异显著。

2 结果与讨论

2.1 菌种复配比对发酵乳品质的影响

不同菌种复配比的发酵乳的基本理化性质及感官评分如表 3、图 1 所示。由表 3 可知, 仅接种凝结芽孢杆菌进行发酵时, 酸度仅为 60.42 °T, 与传统发酵剂 1:1 进行复配发酵时, 酸度显著提高, 即适量的传统发酵剂可启动凝结芽孢杆菌的发酵, 提高发酵乳的酸度值, 可能与干酪乳杆菌和凝结芽孢杆菌偶联发酵从而提高凝结芽孢杆菌活菌数^[26]原理一致; 与发酵乳 pH 值的对比中发现, 复配比为 1:3 时 pH 值最低, 而酸度值较低, 说明 pH 值与口感的酸度值并不对应, 结合感官评价, 配比为 1:3 时酸度适中, 并不是最酸的发酵乳。

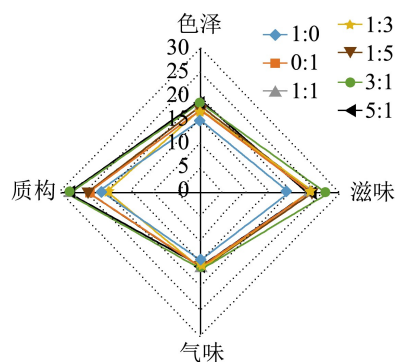


图 1 不同菌种复配比制备的发酵乳的感官评价

Fig.1 Sensory evaluation of fermented milk prepared with different mixture ratio of bacteria

如图 1 所示为菌种不同复配比下发酵乳的感官评价结果, 主要从色泽、质构、滋味、气味四方面进行评价。由表 3、图 1 可知, 凝结芽孢杆菌占比太高, 发酵乳酸度及风味不足, 凝结芽孢杆菌占比太低, 持水力较低、凝乳状态差, 当复配比为 5:1 与 3:1 时, 其酸度适中, 凝乳状态良好, 结合感官评分, 复配比为 3:1 时, 发酵乳滋味、色泽及凝乳状态均处于较优水平。因此, 选择菌种复配比的范围为 2:1~4:1。

表 3 不同菌种复配比对发酵乳基本理化性质及感官的影响

Table 3 Effects of different mixture ratio of bacteria on basic physicochemical properties and sensory perception of fermented milk

复配比	pH	酸度/°T	可溶性固形物/%	持水力/%	感官评分
1:0	4.95±0.01 ^d	60.42±0.14 ^a	14.50±0.50 ^b	47.45±0.53 ^a	69
5:1	4.33±0.01 ^c	86.06±0.81 ^d	14.17±0.29 ^b	64.00±0.14 ^c	86
3:1	4.33±0.01 ^c	84.62±0.54 ^c	14.01±0.01 ^b	56.44±0.89 ^b	90
1:1	4.28±0.01 ^b	86.11±0.44 ^d	14.27±0.25 ^b	53.36±0.16 ^a	83
1:3	4.23±0.01 ^a	85.06±0.20 ^c	13.17±0.29 ^a	58.79±0.73 ^b	78
1:5	4.24±0.01 ^a	86.15±0.61 ^d	13.03±0.06 ^a	59.45±0.27 ^c	82
0:1	4.29±0.02 ^b	79.03±0.32 ^b	13.20±0.26 ^a	52.20±0.67 ^a	81

注：表中复配比为凝结芽孢杆菌：传统发酵剂的比例值。

表 4 不同接种量对发酵乳基本理化性质及感官的影响

Table 4 Effects of different inoculations on basic physicochemical properties and sensory perception of fermented milk properties of fermented milk

接种量/%	pH	酸度/°T	可溶性固形物/%	持水力/%	感官评分
0.2	4.55±0.03 ^d	66.94±0.49 ^a	15.37±0.63 ^a	48.06±0.42 ^a	75
0.5	4.41±0.01 ^c	74.82±0.23 ^b	15.84±0.75 ^{ab}	50.62±0.57 ^a	79
0.8	4.39±0.01 ^b	78.11±0.27 ^c	16.23±0.25 ^{ab}	51.50±0.15 ^a	79
1.0	4.38±0.02 ^b	78.21±0.60 ^c	15.86±0.71 ^{ab}	50.82±0.53 ^a	85
2.0	4.32±0.01 ^a	89.24±0.52 ^d	16.82±0.32 ^b	49.18±0.25 ^a	82

2.2 接种量对发酵乳品质的影响

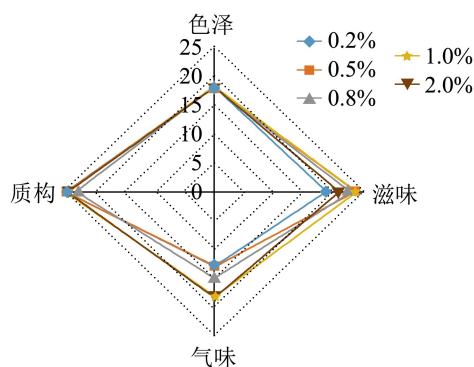


图 2 不同接种量制备的发酵乳的感官评价

Fig.2 Sensory evaluation of fermented milk prepared with different inoculations

如表 4、图 2 所示，为不同接种量对发酵乳基本理化性质及感官品质的影响，可知，发酵乳的 pH 随接种量的增加逐渐降低，酸度随接种量的增加而逐渐升高，且各组之间存在显著性差异，酸度值由 66.94 °T 升高至 89.24 °T，其口感及风味产生显著变化，与钱志伟等^[27]试验中随发酵剂添加量增加山药香蕉风味酸奶发酵加速，产酸量增加的结果一致。相比较而言，各组可溶性固形物及持水力则变化较为平稳，可溶性固形物保持在 16%左右，持水力保持在 50%左右。当接种量为 1%、2%时，发酵乳的气味、滋味较为突出，且酸度适中，凝乳效果良好，综合感官评分高于 80

分，综合生产成本考虑，发酵乳最宜接种量为 1%。因此，选择菌种接种量的范围为 0.5%~1.5%，高于山药香蕉风味酸奶的发酵剂接种量 0.2%^[27]。

2.3 低聚果糖添加量对发酵乳品质的影响

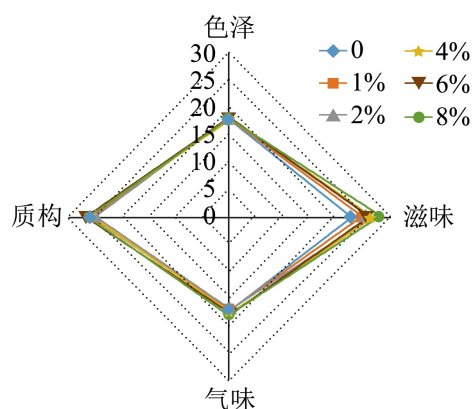


图 3 不同低聚果糖添加量制备的发酵乳的感官评价

Fig.3 Sensory evaluation of fermented milk prepared with different amounts of oligofructose

低聚果糖是由 2~10 个单糖通过糖苷键连接形成直链或支链的低度聚合糖，因其特有糖苷键和糖基，不易被单胃动物自身分泌的消化酶水解，且到达肠道后能被有益微生物利用从而促进肠道有益菌群生长和增殖^[28]。研究发现，低聚果糖对凝结芽孢杆菌具有体外增殖作用^[29]。因此，在发酵乳中添加低聚果糖作为碳源、改善口感。且前期研究表明低聚果糖可刺激凝结芽孢杆菌

13002 的生长, 如表 5、图 3 所示, 为不同低聚果糖添加量对发酵乳基本理化性质及感官品质的影响。

由表 5 可知, 添加低聚果糖的发酵乳的各项品质均优于未添加低聚果糖的组别, 尤其是可溶性固形物的含量, 添加低聚果糖后显著上升, 且感官评分结果表明, 未添加低聚果糖的发酵乳感官评分最低, 可见发酵乳中添加一定量的低聚果糖能够改善其味道与口感。pH 值随着低聚果糖添加量的增加逐渐降低, 而酸度随低聚果糖添加量的增加先升高后降低, 在低聚果糖添加量为 1.0%、2.0% 时, 其酸度口感适宜, 且综合经济利益与生产效率方面考虑, 发酵乳中低聚果糖添加量范围为 1.0%~2.0%。添加适量的低聚果糖可改善发酵乳口感、降低 pH 值、增加酸度, 与孙敏等^[30]的

试验结果相一致, 其中添加 3% 的低聚果糖可有效降低低脂凝固型发酵乳与全脂发酵乳的差异。

2.4 发酵乳响应面优化

为使发酵乳酸度适中、具有良好的持水性、凝乳时间快、色泽及口感好、香气浓郁, 通过 2.2 单因素试验, 确定发酵菌种复配比 (A) 为 2:1~4:1, 低聚果糖添加量 (B) 为 1%~2%, 发酵剂接种量 (C) 为 0.5%~1.5%。根据 Box-Behnken 设计的中心组合原理, 选取 3 个因子响应的 3 个水平, 使用 Design-Expert 8.0.6 软件设计 3 因素 3 水平响应面实验, 以滴定酸度为指标, 确定凝结芽孢杆菌发酵乳的最佳发酵工艺参数。表 6 为发酵乳响应面分析试验设计及结果。

表 5 不同低聚果糖添加量对发酵乳基本理化性质及感官的影响

Table 5 Effects of different oligofructose additions on basic physicochemical properties and sensory properties of fermented milk

低聚果糖/%	pH	酸度/°T	可溶性固形物/%	持水力/%	感官评分
0	4.45±0.01 ^c	78.18±0.25 ^c	13.67±0.58 ^a	49.19±0.32 ^b	83
1.0	4.38±0.02 ^b	80.78±0.13 ^d	14.67±0.29 ^b	48.77±0.56 ^{ab}	86
2.0	4.35±0.01 ^a	80.60±0.19 ^d	14.87±0.33 ^b	48.74±0.63 ^a	85
4.0	4.37±0.01 ^{ab}	74.73±0.47 ^{ab}	15.86±0.31 ^c	49.90±0.72 ^b	89
6.0	4.36±0.01 ^{ab}	74.09±0.63 ^a	17.50±0.50 ^d	47.33±0.26 ^a	89
8.0	4.35±0.01 ^a	74.99±0.68 ^b	18.69±0.60 ^e	50.23±0.74 ^c	90

表 6 发酵乳响应面分析试验设计及结果

Table 6 Fermented milk response surface analysis test design and results

组别	A	B	C	酸度/°T	感官评分	pH	活菌数/lg(CFU/mL)
1	1	-1	0	91.49	85	4.03	8.30
2	0	1	1	93.29	83	4.00	8.41
3	0	1	-1	81.41	80	4.09	8.64
4	0	0	0	91.06	88	4.02	8.56
5	0	-1	1	90.96	84	3.99	8.59
6	1	0	1	91.63	88	4.05	8.37
7	-1	1	0	88.66	84	4.06	8.55
8	0	0	0	92.26	89	4.07	8.73
9	1	1	0	89.11	88	4.09	8.84
10	0	0	0	92.85	87	4.06	8.69
11	-1	0	1	90.43	91	3.99	8.54
12	1	0	-1	84.90	88	4.17	8.71
13	0	0	0	92.55	85	4.03	8.58
14	-1	0	-1	85.43	90	4.11	8.73
15	0	0	0	92.25	91	4.04	8.90
16	0	-1	-1	86.98	85	4.13	8.85
17	-1	-1	0	90.94	85	4.06	8.63

如表 7 所示, 为响应面回归模型方差分析。由表 7 可知, 各因素对发酵乳的滴定酸度的影响大小依次为: C>B>A, 即接种量>低聚果糖>菌种配比。回归模

型的 $p < 0.0001$, 失拟项的 p 值为 0.30, 说明该回归方程极显著。失拟检验不显著, 说明未知因素对试验结果干扰很小, 不需要引入更高次数的项, 模型恰当。

表 7 响应面回归模型方差分析

Table 7 Response surface regression model analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	170.9323	9	18.99248	31.58828	<0.0001	significant
A-A	0.348507	1	0.348507	0.579637	0.4713	
B-B	7.808593	1	7.808593	12.98725	0.0087	
C-C	95.14626	1	95.14626	158.2472	<0.0001	
AB	0.003126	1	0.003126	0.005199	0.9445	
AC	0.750703	1	0.750703	1.248569	0.3007	
BC	15.60007	1	15.60007	25.94602	0.0014	
A ²	5.132481	1	5.132481	8.536338	0.0223	
B ²	4.560853	1	4.560853	7.585608	0.0283	
C ²	37.74013	1	37.74013	62.76936	<0.0001	
残差	4.208756	7	0.601251			
失拟差	2.373679	3	0.791226	1.724671	0.2994	not significant
纯误差	1.835077	4	0.458769			
总和	175.1411	16				

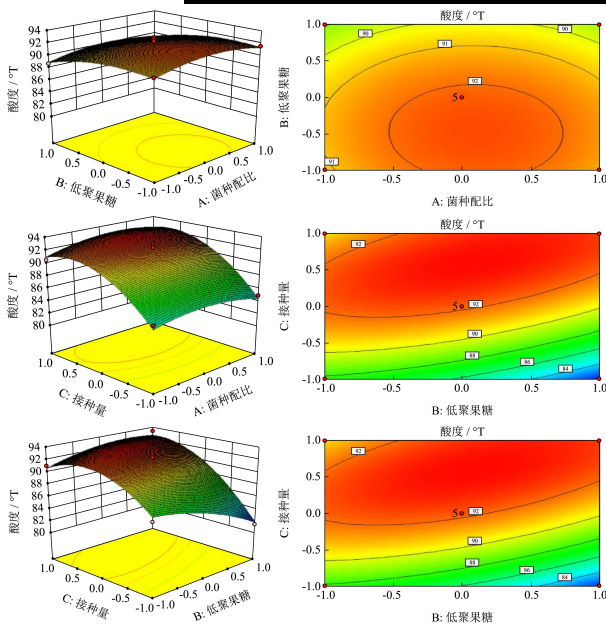


图 4 各因子响应面曲线及其等高线

Fig.4 The response surface and contour line of different factors

通过软件分析可知，滴定酸度（Y）对自变量发酵剂菌种复配比（A）、低聚果糖添加量（B）、接种量（C）的多元回归方程：

$$Y=92.19-0.21A-0.99B+3.45C-0.03AB+0.43AC+1.97BC-1.10A^2-1.04B^2-2.99C^2 \quad (2)$$

该方程表达了发酵乳的滴定酸度和 3 个自变量之间的关系是显著的，即这种方法是可靠的。回归方程交互项系数中 BC 的交互系数比较大，说明低聚果糖添加量和接种量之间的交互效应大，而 AC、AB 的交互系数相对较小，说明发酵剂菌种复配比和接种量、低聚果糖添加量和菌种复配比之间的交互效应较小。

通过软件分析可知，该模型的决定系数 R^2 及 R^2_{Adj} 均>0.9，说明该方程与实际情况拟和良好，较好地反映了酸度与菌种配比、低聚果糖添加量、接种量的关系。说明该模型相关性良好，实验稳定可信度较高。

为了检验方程的有效性，对测定的发酵乳中的滴定酸度的数学模型继续进行方差分析，并进一步检测各因子的偏回归系数。结果表明，一次项中 C 的回归系数高度显著， $p<0.0001$ ，说明接种量对发酵乳的滴定酸度有高度显著作用。B 的回归系数仅次于 C，说明低聚果糖的添加量对发酵乳的滴定酸度的影响仅次于发酵剂接种量。具体响应曲面如图 4 所示。

2.5 验证实验

使用 Design-Expert 8.0.6 软件处理试验数据后，预测发酵乳的最佳工艺条件为：菌种复配比（凝结芽孢杆菌：传统发酵剂（A）3.22:1、低聚果糖添加量（B）1.56%、接种量（C）1.315%，理论滴定酸度值为 93.25。考虑实验实际情况，对发酵工艺参数调整为：菌种复配比（凝结芽孢杆菌：传统发酵剂（A）3:1、低聚果糖添加量（B）1.50%、接种量（C）1.50%。进一步验证预测值，在最佳发酵工艺参数下，多次进行平行试验，测定发酵乳的平均滴定酸度值为 90.59，与模型预测酸度值（93.25）拟和率达 97.15%，说明该模型可行性较高。

3 结论

将凝结芽孢杆菌 13002 用于发酵乳的发酵，通过单因素及响应面试验确定了最优发酵工艺为：菌种复

配比(凝结芽孢杆菌:传统发酵剂,即BCS:SL)3:1、低聚果糖添加量1.50%、接种量1.50%、总接种量 1.00×10^9 CFU/100 mL、43 °C发酵4 h后4 °C发酵12 h,并验证预测值,在最佳发酵工艺参数下,进行三次平行试验,与预测值拟和率达97.15%,模型具有较高的可行性,为定制发酵剂的制备提供了新的可能性。

参考文献

- [1] Granato D, Branco G F, Cruz A G, et al. Probiotic dairy products as functional foods [J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2010, 9(5): 455-470
- [2] Aryana K J, Olson D W. A 100-year review: yogurt and other cultured dairy products [J]. *Journal of Dairy Science*, 2017, 100(12): 9987-10013
- [3] Champagne C P, Da Cruz A G, Daga M. Strategies to improve the functionality of probiotics in supplements and foods [J]. *Current Opinion in Food Science*, 2018, 22: 160-166
- [4] Fazilah N F, Ariff A B, Khayat M E, et al. Influence of probiotics, prebiotics, synbiotics and bioactive phytochemicals on the formulation of functional yogurt [J]. *Journal of Functional Foods*, 2018, 48: 387-399
- [5] Huang Y, Zhao S, Yao K, et al. Physicochemical, microbiological, rheological, and sensory properties of yoghurts with new polysaccharide extracts from *Lactarius volemus* Fr. using three probiotics [J]. *International Journal of Dairy Technology*, 2020, 73(1): 168-181
- [6] Huang Y Y, Yu J J, Zhou Q Y, et al. Preparation of yogurt-flavored bases by mixed lactic acid bacteria with the addition of lipase [J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2020, 131: 109577
- [7] Martinez-Villaluenga C, Frias J, Gomez R, et al. Influence of addition of raffinose family oligosaccharides on probiotic survival in fermented milk during refrigerated storage [J]. *International Dairy Journal*, 2006, 16(7): 768-774
- [8] Oliveira R P S, Florence A C R, Silva R C, et al. Effect of different prebiotics on the fermentation kinetics, probiotic survival and fatty acids profiles in nonfat symbiotic fermented milk [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2009, 128(3): 467-472
- [9] Varga L, Szigeti J, Gyenis B. Influence of chicory inulin on the survival of microbiota of a probiotic fermented milk during refrigerated storage [J]. *Annals of Microbiology*, 2006, 56(2): 139-141
- [10] Allgeyer L C, Miller M J, Lee S Y. Drivers of liking for yogurt drinks with prebiotics and probiotics [J]. *Journal of Food Science*, 2010, 75(4): S212-S219
- [11] Endres J R, Qureshi I, Farber T, et al. One-year chronic oral toxicity with combined reproduction toxicity study of a novel probiotic, *Bacillus coagulans*, as a food ingredient [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2011, 49(5): 1174-1182
- [12] Endres J R, Clewell A, Jade K A, et al. Safety assessment of a proprietary preparation of a novel probiotic, *Bacillus coagulans*, as a food ingredient [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2009, 47(6): 1231-1238
- [13] Kanwar S S, Ghazi I A, Chimni S S, et al. Purification and properties of a novel extra-cellular thermotolerant metalloproteinase of *Bacillus coagulans* MTCC-6375 isolate [J]. *Protein Expression and Purification*, 2006, 46(2): 421-428
- [14] Ou M S, Ingram L O, Shanmugam K T. l(+)-Lactic acid production from non-food carbohydrates by thermotolerant *Bacillus coagulans* [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2011, 38(5): 599-605
- [15] 李新波. 饲用乳酸菌制剂研究概述[J]. *饲料研究*, 2012, 5: 5-7, 20
LI Xinbo. Research overview of lactic acid bacteria preparation for feeding [J]. *Feed Research*, 2012, 5: 5-7, 20
- [16] De Clerck E, Rodriguez-Diaz M, Forsyth G, et al. Polyphasic characterization of *Bacillus coagulans* strains, illustrating heterogeneity within this species, and emended description of the species [J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2004, 27(1): 50-60
- [17] 罗毅, 戴晋军. 芽孢杆菌的作用原理及在蛋鸡中的应用[J]. *饲料研究*, 2009, 4: 37-38
LUO Yi, DAI Jinjun. The action principle of *Bacillus* and its application in laying hens [J]. *Feed Research*, 2009, 4: 37-38
- [18] 赵珊, 李清兰, 黄燕燕, 等. 胡萝卜木瓜混合发酵果蔬汁的制备及其抗氧化性能研究[J]. *食品科技*, 2019, 44(1): 146-153
ZHAO Shan, LI Qinglan, HUANG Yanyan, et al. Development and oxidation resistance of mixed fermented fruit-vegetable juice of carrot and papaya [J]. *Food Science and Technology*, 2019, 44(1): 146-153
- [19] 王祯, 何志勇, 陈洁, 等. 凝结芽孢杆菌在益生菌糖果中应用的可能性[J]. *食品与发酵工业*, 2012, 38(6): 66-69
WANG Zhen, HE Zhiyong, CHEN Jie, et al. Research on the potential application of *Bacillus coagulans* probiotics candy production [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2012, 38(6): 66-69
- [20] 黄翠华. 一种陈皮发酵饮料的制备工艺研究及品质分析[D]. 广州: 华南农业大学, 2016

- HUANG Cuihua. The research of the fermentation technology of pericarpium citri reticulatae and analysis of quality [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2016
- [21] 吴丹阳. 凝结芽孢杆菌 T242 益生性及功能特性的研究[D]. 大连: 大连工业大学, 2016
- WU Danyang. Study on probiotic properties and functionality of *Bacillus coagulans* T242 [D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2016
- [22] Zhou Q Y, Zhao S, Huang Y Y, et al. *Lactobacillus gasseri* LGZ 1029 in yogurt: rheological behaviour and volatile compound composition [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2021, 56(6): 2992-3003
- [23] Zhao S, Peng X, Zhou Q Y, et al. *Bacillus coagulans* 13002 and fructo-oligosaccharides improve the immunity of mice with immunosuppression induced by cyclophosphamide through modulating intestinal-derived and fecal microbiota [J]. Food Research International, 2021, 140: 109793
- [24] Zhao S, Zhou Q Y, Huang Y Y, et al. Comparative analysis of physicochemical, rheological, sensory and flavour properties of yoghurts using a new probiotic *Bacillus coagulans* 13002 with traditional yoghurt starter [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2021, 56(4): 1712-1723
- [25] Yao K, Zhou Q X, Liu D M, et al. Comparative proteomics of the metabolic pathways involved in L-lactic acid production in *Bacillus coagulans* BCS13002 using different carbon sources [J]. LWT - Food Science and Technology, 2019, 116: 108445
- [26] 马欣, 古绍彬, 吴影. 凝结芽孢杆菌复合干酪乳杆菌发酵南瓜饮料的研制[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(7): 161-167
- MA Xin, GU Shaobin, WU Ying. Preparation of pumpkin beverage fermented by *Bacillus coagulans* combined with *Lactobacillus casei* [J]. Food and Fermentation Industry, 2018, 44(7): 161-167
- [27] 钱志伟, 周志强, 曹乐民, 等. 山药香蕉风味酸奶发酵工艺研究[J]. 河南农业, 2018, 15: 55-57
- QIAN Zhiwei, ZHOU Zhiqiang, CAO Leming, et al. Research on fermentation technology of yam banana flavor yogurt [J]. Henan Agriculture, 2018, 15: 55-57
- [28] Mussatto S I, Mancilha I M. Non-digestible oligosaccharides: a review [J]. Carbohydrate Polymers, 2007, 68(3): 587-597
- [29] 赵雪, 李健. 4 种益生元对凝结芽孢杆菌体外增值作用的影响[C]. 中国食品科学技术学会, 2018: 2
- ZHAO Xue, LI Jian. Effects of four prebiotics on the in vitro proliferation of *Bacillus coagulans* [C]. Chinese Institute of Food Science and Technology, 2018: 2
- [30] 孙敏, 李博, 梅俊. 低聚果糖对低脂凝固型发酵乳品质的影响研究[J]. 中国酿造, 2021, 40(3): 84-89
- SUN Min, LI Bo, MEI Jun. Effects of oligosaccharides on the quality of low fat coagulated fermented dairy products [J]. China Brewing, 2021, 40(3): 84-89
-
- (上接第 246 页)
- [16] 韦帆, 郁志芳, 姜丽. 苏定西兰花烫漂工艺研究[J]. 食品安全导刊, 2020, 27: 142-143
- WEI Fan, YU Zhifang, JIANG Li. Study on hot bleaching process of Suding broccoli [J]. Food Safety Guide, 2020, 27: 142-143
- [17] 乌雪岩. 酸奶感官评价与质构的相关性研究[J]. 中国乳品工业, 2015, 43(10): 52-54
- WU Xueyan. Study on the correlation of yogurt sensory evaluation and mass structure [J]. China Dairy Industry, 2015, 43(10): 52-54
- [18] 李楠, 郭佳丽. 黑小麦芽酸奶工艺优化及其抗氧化活性[J]. 食品工业, 2020, 41(8): 26-30
- LI Nan, GUO Jiali. Optimization and antioxidant activity of black malt yogurt [J]. Food Industry, 2020, 41(8): 26-30
- [19] 冯红霞, 李凯, 韩跃军, 等. 百合希腊式酸奶的研制及其抗氧化活性研究[J]. 中国乳品工业, 2020, 48(9): 58-61
- FENG Hongxia, LI Kai, HAN Yuejun, et al. Development and antioxidant activity of lily Greek yogurt [J]. China Dairy Industry, 2020, 48(9): 58-61
- [20] GB/T 5009, 239-2016, 食品安全国家标准 食品酸度的测定 [S]
- GB/T 5009, 239-2016, National Standard of Food Safety: Determination of Food Acidity [S]
- [21] GB 19302-2010, 食品安全国家标准 发酵乳 [S]
- GB 19302-2010, National Standard of Food Safety: Fermented Milk [S]