

- . Biochemistry, 1999, 38: 11624 - 11633.
- [12] Kyung H Choi et al. Amino - acid sequence and glycan structures of cysteine proteases with proline specificity from ginger rhizome *Zingiber officinale* [J]. Eur J Biochem, 2000, 267: 1516 - 1526.
- [13] Freni K Tavaría et al. Storage and lyophilization effects of extracts of *Cynara Cardunculus* on the degradation of ovine and caprine caseins [J]. Food Chemistry, 2001, (72): 79 - 88.
- [14] 纪丽莲, 丁红罕. 生姜凝乳的研制 [J]. 中国乳品工业, 1997, 25(2): 9 - 11.
- [15] 张平等. 生姜蛋白酶的部分纯化及其酶学性质的研究 [J]. 天津农学院学报, 2001, 8(3): 19 - 23.
- [16] Sofia V silva et al. Comparative catalytic activity of two plant proteinase upon caprine caseins in solution [J]. Food Chemistry, 2000, 71: 207 - 214.
- [17] 钱嘉渊译. 酶的测定方法 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1991.
- [18] 韩雅珊. 食品化学实验指导 [M]. 1992.
- [19] 范明等. 蛋白质技术手册 [M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [20] Antonio J Trujillo et al. Proleolytic activities of some milk clotting enzymes on ovine casein [J]. Food Chemistry, 2000, 71: 449 - 457.
- [21] Rawlings ND, Barrett A J. Families of cysteine peptidases [M]. Methods Enzymol, 1994, 244: 461 - 486.

燕麦生物乳的研制

贾建波

(淮阴工学院生物工程系, 淮安 223001)

摘要: 本文探讨了以燕麦和脱脂奶粉为主要原料, 燕麦经双酶水解所得的糖化液, 配以脱脂奶粉, 经杀菌冷却, 以鼠李糖乳杆菌和两歧双歧杆菌为发酵剂, 接种发酵而成的含有活性成分且具有保健功能的生物乳, 它的活菌数高达 10^{11} 个/ml, 酸度为 90°T , β -葡萄糖含量是 180mg/L 。

关键词: 燕麦; 鼠李糖乳杆菌; 两歧双歧杆菌; 生物乳

Abstract: This text has studied a new functional food product. Commercially rolled oat and fat - free milk were used as raw materials. The enzymatic milk of oat starch was first carried out by α - amylase and saccharification enzyme hydrolysis, then it was mixed with fat - free milk. After sterilization and cooling, *Lactobacillus rhamnosus* and *B. bifidum* were cultivated the mash for fermentation. This product contained not only probiotics of live bacteria but healthy components. The living bacteria amounted to 10^{11} cfu/ml, the acidity was 90°T , the concentration of β - polyglucose was 180mg/L .

Key words: oat; *Lactobacillus rhamnosus*; *B. bifidum*; biolacto

中图分类号: TS275.4

文献标识码: A

文章编号: 1002 - 6630(2003)02 - 0079 - 04

燕麦属禾本科植物, 生长在寒冷地区。它是一种全价营养谷物, 富含蛋白质、矿物质、维生素及膳食纤维等现代营养素, 而且含有人体必需的八种氨基酸。燕麦中还含有保健作用的亚油酸和生物活性成分——皂苷^[1], 同时含有活性多糖——葡聚糖。两歧双歧杆菌和鼠李糖乳杆菌是益生菌, 它们能定殖在宿主肠粘膜上形成生物屏障, 它具有保持或提高肠道微生态平衡, 刺激正常菌群生长, 抑制有害细菌, 提高肠道抵抗疾病能力, 提高免疫力, 抗肿瘤, 降低胆固醇水平等生理功能^[2,3]。在欧洲和日本含有益生菌的 AB 食品和 ABC 食品

已有了一定市场, 在国内随着人们营养保健意识的提高, 燕麦的营养保健功能和益生菌产品也被人们逐渐认识, 国内对燕麦保健品开发也有了研究, 但以燕麦为原料进行深加工, 开发含新型益生菌鼠李糖乳杆菌的生物发酵乳产品的研究还未见报道。本研究利用生物发酵技术, 以两歧双歧杆菌和鼠李糖乳杆菌为发酵菌种, 对燕麦生物乳生产工艺作了初步探讨。

1 试验材料和方法

1.1 菌种 两歧双歧杆菌(*B. bifidum*) 本校生物工

收稿日期: 2002 - 09 - 18

基金项目: 山东省教育厅资助(J99D51)

作者简介: 贾建波(1964 -), 男, 高级实验师, 研究方向: 微生物。

程实验室保藏菌种;鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*) 江南大学生物工程学院提供。

1.2 试验仪器

高压液相色谱分析仪(Waters),恒温水浴锅(HH4型),高速组织捣碎机(DS-1型),粉碎机(JSFD-100-®(型),全自动电热压力蒸汽灭菌锅(LDZX型),显微镜(奥林巴斯BX-41型),恒温培养箱(DNP-9052型),厌氧培养箱(Wmzk-02型),均质机(GYB-500-6S型),分光光度计(7230G型),冰箱。

1.3 实验方法

1.3.1 检测方法

双歧杆菌活菌计数 采用BL选择性培养基^[4]稀释平板法,38℃ 24h厌氧培养;

鼠李糖乳杆菌活菌计数 采用MRS培养基^[5]稀释平板法,38℃ 24h厌氧培养;

酸度测定 以吉尔涅尔度(°T)表示^[6];

OD值测定 发酵菌悬液离心,取沉淀稀释物,采用7230G型分光光度计测OD₆₀₀值;

还原糖测定 DNS分光光度定糖法^[7];

β-葡聚糖的测定 高压液相色谱法^[8];

$$\beta\text{-葡聚糖利用率} = \frac{\text{发酵前液中原有}\beta\text{-葡聚糖量} - \text{发酵液中剩余}\beta\text{-葡聚糖量}}{\text{发酵前液中原有}\beta\text{-葡聚糖量}}$$

低聚木糖测定方法 见文献[10],

$$\text{低聚木糖利用率} = \frac{\text{发酵前液中原有低聚木糖量} - \text{发酵液中剩余低聚木糖量}}{\text{发酵前液中原有低聚木糖量}}$$

1.3.2 工艺流程

燕麦→浸泡→粉碎→液化→灭酶→糖化→灭酶→过滤→去渣
→调配→均质→杀菌冷却→接种→发酵→成品

↑
脱脂奶粉

↑
鼠李糖乳杆菌+双歧杆菌→活化→混合

1.3.3 调浆酶解试验

将燕麦与水以1:30混合,调浆燕麦液先用α-淀粉酶在80℃,pH=6.0下液化30min,再煮沸灭酶,然后再进行正交试验L₆(3⁴)(如表1),优化糖化工艺,看其对还原糖量提高的影响。

表2 L₆(3⁴)发酵正交试验

水平	发酵液(ml):脱脂粉量(g) 接种量(%) 培养方式 温度(℃)			
	A	B	C	D
1	100:6	4	生化箱培养	36
2	100:8	5	摇床培养	38
3	100:10	6	厌氧箱培养	40

表1 糖化工艺优化试验L₆(3⁴)

水平	糖化酶量(U/g) 糖化温度(℃) pH值 糖化时间(min)			
	A	B	C	D
1	60	55	5.0	20
2	80	60	5.5	30
3	100	65	6.0	40

1.3.4 发酵条件的确定

经过双酶水解的燕麦糖化过滤醪液,配以不同比例的脱脂奶粉,对发酵液的浓度加以调整,对影响发酵条件:脱脂乳用量、接种量、培养方式和培养温度进行正交设计(如表2),看其对两菌活菌数和酸度的影响,以确定最佳四个工艺参数。鼠李糖乳杆菌和双歧杆菌最适生长温度在30~40℃和37~41℃范围内^[9],选择36、38、40℃作为培养温度。不同生长环境会有不同的代谢途径,不同代谢产物对微生物自身生长也会有不同影响。所以我们选择普通生化箱、厌氧、摇床培养方式,接种量选择4%、6%、8%,醪液与脱脂粉的比例确定为100:6、100:8、100:10三水平。

1.3.5 发酵时间对OD值和活菌数及酸度的影响

将鼠李糖乳杆菌和双歧杆菌以1:1比例混合,按最佳条件接种发酵,在30h内每隔3h测一次OD值和鼠李糖乳杆菌和双歧杆菌的活菌数及酸度,以确定初步发酵时间。

1.3.6 添加低聚木糖对发酵乳活菌数增殖的影响

在发酵中利用益生菌对发酵底物具有一定选择性,采取添加低聚木糖的方法,添加量为1000mg/L,在30h内每隔3h测一次OD值和两菌活菌数及酸度,看其对发酵乳中活菌数增殖和酸度影响,以确定最佳发酵时间。

2 结果与讨论

2.1 糖化条件对还原糖的影响

由表3可知,影响糖化主次因素分别为:C>A>D>B,最佳糖化条件为:A₂B₁C₂D₂,即酶用量为80U/g,温度55℃,pH=5.5,时间30min。经测定,未经酶解的燕麦调浆液还原糖量为零,而按优化工艺糖化的糖化液还原糖量为8.97%,同时测定β-葡聚糖量为798mg/L。

2.2 发酵条件的确定

从表4可知影响发酵主次因素为C>A>B>D,最佳发酵工艺参数为:A₂B₁C₃D₂,即醪液(ml):脱脂奶粉量(g)为100:8,接种量为4%,培养方式为厌氧培养,发酵温度38℃。

表3 L₉(3⁴)糖化条件对还原糖量的影响

序号	A(U/g)	B(°C)	C	D(min)	RS(%)
1	60	55	5.0	20	6.25
2	60	60	5.5	30	7.20
3	60	65	6.0	40	5.35
4	80	55	5.5	40	7.57
5	80	60	6.0	20	7.05
6	80	65	5.0	30	6.73
7	100	55	6.0	30	7.02
8	100	60	5.0	40	5.54
9	100	65	5.5	20	6.86
K ₁	18.80	20.84	18.32	20.16	
K ₂	21.35	19.79	21.63	20.95	
K ₃	19.42	18.94	19.42	18.46	
R	2.55	2.10	0.90		

* RS: 还原糖含量。

2.3 发酵时间对活菌数与 OD 值及酸度的影响

由表 5 可知, 鼠李糖乳杆菌发酵到 6h, 活菌数达到对数末期, 进入稳定期, 活菌数对数值为 10.9, 发酵 15h 燕麦中的 β-葡聚糖有 75% 被两菌利用而不再升高, 转移为生长能量的能力, 从而其活菌数增加。这与鼠李糖乳杆菌处于菌体生长稳定末期和衰亡初期相一致, 而双歧杆菌在 9h 活菌数对数值仅达到 7.4, 鼠李糖乳杆菌增殖高, 时间短, 而双歧杆菌增殖低, 时间长。这与两种菌都能充分利用醪液中还原糖和脱脂奶粉中乳糖外, 可能还与两菌本身分解 β-1,3 或 β-1,4 糖苷键的酶活力强弱有关, 鼠李糖乳杆菌含酶活力高, 分解利用葡聚糖能力强, 而双歧杆菌含酶活力低,

利用葡聚糖能力弱。OD 值 6h 达到最大为 1.95, 以后基本保持不变, 这与菌落生长曲线不一致, 说明一直升高的酸度及其代谢产物对菌的生长具有抑制和杀菌作用。由表 5 看出, 发酵 9h 时两菌活菌数最大, 酸度为 98°T, 初步确定发酵时间为 9h。

2.4 添加低聚木糖对发酵乳活菌数增殖的影响

由表 6 可知, 低聚木糖可使双歧杆菌的活菌数增多, 且发酵时间缩短, 6h 就可使活菌数达到最大, 而鼠李糖乳杆菌活菌数与表 5 相比基本没有变化。表 6 可知, 发酵 12h 对低聚木糖的利用率高达 78% 不再升高, 这与双歧杆菌处于菌体稳定末期, 衰亡初期相一致。它具有较强分解低聚木糖利用能力, 所以它的活菌数明显增加, 而鼠李糖乳杆菌不能利用低聚木糖, 因而相比较, 鼠李糖活菌数没有变化。OD 值 6h 达到最高, 以后基本保持不变, 原因同上, 不同的是生酸幅度要大一点。经过发酵 6h, 总菌数达 10¹¹ 个/ml, 酸度达 90 OT, 较低酸度既适口又有利于活菌保存。由此看出最佳发酵时间为 6h。

3 结论

(1) 通过对还原糖的测定, 得出糖化的最佳条件为: 糖化酶量 80U/g, 糖化温度 55°C, pH5.5, 糖化时间 30min。

(2) 由正交试验得出发酵的最佳条件为: 醪液: 脱脂粉 = 100: 8, 接种量为 4%, 培养方式: 厌氧培养, 温度 38°C。发酵时间 6h。

(3) 在发酵中添加适量低聚木糖, 在最佳发酵工艺条件下, 可增加成品中的活菌数, 并缩短其发酵时

表4 发酵正交试验

序号	A	B	C	D	总活菌数 [log(cuf/ml)]
1	100:6	4	生物箱培养	36	8.1
2	100:6	6	摇床培养	38	9.3
3	100:6	8	厌氧培养	40	10.8
4	100:8	4	摇床培养	40	10.2
5	100:8	6	厌氧培养	36	10.8
6	100:8	8	生物箱培养	38	9.6
7	100:10	4	厌氧培养	38	11.4
8	100:10	6	生物箱培养	40	7.5
9	100:10	8	摇床培养	36	8.9
K ₁	28.2	29.7	25.2	28.8	
K ₂	30.6	27.6	28.4	30.3	
K ₃	27.8	29.3	33.0	28.5	
R	2.8	2.1	7.8	1.8	

表5 未加低聚木糖发酵时间对活菌数、OD值酸度及 β -葡聚糖利用率的影响

时间(h)	3	6	9	12	15	18	21	24	27
活菌数 <i>L. rhamnosus</i>	7.8	10.8	11.0	10.9	10.4	10.0	10.1	9.0	8.6
/log(cuf/ml) <i>B. bifidum</i>	5.6	6.2	7.4	7.2	7.1	6.8	6.0	5.5	5.4
OD值(600nm)	0.8	0.9	1.3	1.2	1.1	1.0	0.9	0.8	0.7
酸度($^{\circ}$ T)	49.8	80.3	100.1	120.3	140.2	149.9	170.1	180.2	200.3
β -葡聚糖利用率(%)	45.3	50.2	55.1	65.3	69.8	70	75.1	75.2	75.4

表6 添加低聚木糖发酵时间对活菌数、OD值酸度及 β -葡聚糖利用率的影响

时间(h)	3	6	9	12	15	18	21	24	27
活菌数 <i>L. rhamnosus</i>	7.8	11.0	10.8	10.6	10.4	10.2	9.8	9.0	8.4
/log(cuf/ml) <i>B. bifidum</i>	7.0	9.8	9.6	9.7	8.6	8.2	8.0	7.9	7.6
OD值(600nm)	1.0	1.8	1.7	1.6	1.6	1.5	1.4	1.3	1.4
酸度($^{\circ}$ T)	60.1	90.2	120.3	130.1	149.8	160.3	180.1	189.9	200.2
低聚木糖利用率(%)	55.0	60.0	70.0	75.1	75.2	75.0	75.2	78.0	78.1
β -葡聚糖利用率(%)	45.3	50.1	55.0	65.2	76.3	76.2	78.1	78.0	75.1

间,经过仅6h发酵,成品酸度为90 $^{\circ}$ T,活菌数高约 10^{11} 个/ml。活性多糖含量为180mg/L。

参考文献:

- [1] 黄艾祥,肖蓉,吴存三. 燕麦及其营养食品的研究[J]. 粮食与饲料工业,2000,(9):49-50.
- [2] Hoskias L C, Dig. Dis[M], 1981, 26: 769.
- [3] Goubach, S I et al. Ann. Med, 1990, 27: 38.
- [4] 郭本恒. 功能性乳制品[M]. 北京:中国轻工业出版社, 2001. 194.
- [5] 陈天寿. 微生物培养基制造与应用[M]. 北京:中国农业出版社, 1995.
- [6] 金世琳. 乳品工业手册[M]. 北京:轻工业出版社, 1980.
- [7] 张龙翔主编. 生物实验方法和技术[M]. 北京:人民教育出版社, 1981.
- [8] M Bekers M et al. Fun ctional beverage of oat Food. Bio, 2001, 15: 4-5.
- [9] R. E 布坎南, N. F 吉本斯等编. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 北京:科学出版社, 1994.
- [10] 贾建波. 低聚木糖产生菌的选育[J]. 广州食品工业科技, 2000, (3): 14.

固定化酶法生产蔗果低聚糖糖浆技术的探讨

何社强

(广东江门生物技术开发中心, 江门 529080)

摘要:本文探讨了固定化酶生产蔗果低聚糖糖浆的生产技术, 研究证明固定化酶可生产60批次, 并对生产过程中pH值、灭菌时间、灭菌温度、不同原料糖源的因素进行了探讨, 对保质期内产品中蔗果低聚糖(GF₁、GF₂、GF₃)含量的变化进行测定。

收稿日期:2002-08-23

作者简介:何社强(1964-),男,工程师。