

喷雾干燥法制备鲁氏酵母发酵剂的研究

周亚男, 王英琪, 刘红, 刘伟, 全志刚, 王欣卉, 寇芳, 李志江*, 杨宏志*

(黑龙江八一农垦大学 食品学院, 黑龙江 大庆 163319)

摘要: 利用喷雾干燥法可批量制备产业化、规模化用量的鲁氏酵母, 显著缩短发酵周期, 增加收益。本研究利用 YDP 培养基及 20 L 微生物发酵罐制备鲁氏酵母菌悬液, 通过研究不同生长时间鲁氏酵母及培养基残糖含量、细胞干重的变化确定最佳喷雾干燥时间。采用单因素及正交试验对保护剂及喷雾干燥条件进行优化。研究表明: 在发酵罐培养时间 27 h 时, 细胞干重达到最大 18 g/L, 此时为最佳喷雾干燥时间。保护剂最佳配比为脱脂奶粉 10%、海藻糖 5%、谷氨酸钠 1.5%。确定最佳喷雾干燥条件为进口温度 115 ℃, 进料流量 15% (蠕动泵转速占比), 保护剂与菌泥比例 1:1 (g/L), 按照上述条件得到发酵剂的存活率达到 83% 以上。

关键词: 鲁氏酵母; 保护剂优化; 喷雾干燥工艺

Study on Preparation of *Zygosaccharomyces rouxii* Fermentation Agent by Spray Drying

ZHOU Ya-nan, WANG Ying-qi, LIU Hong, LIU Wei, QUAN Zhi-gang, WANG Xin-hui,

KOU Fang, LI Zhi-jiang*, YANG Hong-zhi*

(College of Food Science, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, Heilongjiang, China)

Abstract: The use of spray drying method can be batch preparation of industrial, large-scale amount of *Zygosaccharomyces rouxii*, significantly shorten the fermentation cycle, increase revenue. The study was preparation of the suspension of *Zygosaccharomyces rouxii* on YDP and microbial fermentor. By studying the growth curve of *Zygosaccharomyces rouxii* yeast at different growth times and residual sugar content and cell dry weight and total number of viable bacteria. The single factor and orthogonal experiments were used to optimize the protective agent and spray drying conditions. Research indicates, culture time 27 h in microbial fermentor, cell dry weight was 18 g/L. The best proportion of protective agent were 10 percent of skim milk powder and five percent of trehalose and 1.5 % of sodium glutamate. Determine the best spray drying conditions were 115 ℃ of inlet temperature and 15 % of feed flow and 1:1 (g/L) ratio of preservative to bacteria, The survival rate of the starter was 83 % or more according to the above conditions.

Key words: *Zygosaccharomyces rouxii*; protection agent optimization; spray drying process

鲁氏酵母(*Zygosaccharomyces rouxii*)是传统豆酱中增香的微生物。作为最常见的嗜高渗透压酵母菌,在豆酱的后期发酵过程中,协同球拟酵母(*Torulopsis*)、假丝酵母(*Candida*)、对风味物质的产生起到重要作用^[1]。豆酱的酿造过程中离不开酵母菌的作用,自然条件下发酵的酵母菌含量有限,而且豆酱发酵周期长,鲁氏酵母发酵剂如果能够大量的应用到豆酱后熟

发酵阶段中,可缩短周期、增加风味物质、提高企业经济效益。

目前发酵剂的生产主要采用真空冷冻干燥和喷雾干燥^[2]。相关研究表明,真空冷冻干燥冻干的菌粉虽活力高,但产量较小,成本较高,不适合批量生产,而且产品呈块状不利于发酵使用。喷雾干燥是一种生产效率高,操作费用低的常用干燥技术,其应用广泛,产业化程度高,有广阔发展前景^[3-5]。研究发现,用喷雾干燥技术制备益生菌、乳酸双歧杆菌、醋酸菌发酵剂,最终获得发酵剂存活率均可达到 83% 以上^[6-8]。在喷雾干燥过程中进口温度过高,使发酵剂内细胞脱水导致热灭活,为使鲁氏酵母生存的最大化,合理的优化喷雾干燥工艺是提高发酵剂存活率的关键。因此研究以制作

基金项目:黑龙江八一农垦大学研究生创新科研项目(YJSCX2017-Y53)

作者简介:周亚男(1993—),女(汉),硕士研究生,研究方向:农产品加工及贮藏工程。

* 通信作者:李志江(1977—),男,副教授,博士,研究方向:食品发酵与酿造;杨宏志(1963—),男,教授,博士,研究方向:农产品加工及贮藏工程。

传统豆酱应用的鲁氏酵母为发酵剂,研究保护剂优化及喷雾干燥法制备鲁氏酵母的工艺,为工业化制备鲁氏酵母发酵剂提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鲁氏酵母:中国工业微生物菌种保藏管理中心;YPD 液体培养基:青岛高科技工业园海博生物技术有限公司;平板计数琼脂:Xiya Reagent 生物技术有限公司;海藻糖(食品级):山东天力药业有限公司;谷氨酸钠(食品级):Biosharp 生物技术有限公司;脱脂乳粉(食品级):伊利乳业有限公司;氯化钠(分析纯)、葡萄糖(分析纯)、DNS(3,5-二硝基水杨酸试剂):天津市东丽区天大化学试剂厂。

1.2 仪器与设备

20 L 微生物发酵罐:上海洋格生物工程设备有限公司;754 紫外、可见分光光度计:上海光谱有限公司;生物显微镜:重庆光学仪器厂;全温振荡器:哈尔滨市东联电子技术开发有限公司;电热恒温鼓风干燥箱:上海一恒科学仪器有限公司;LDZM 立式压力蒸汽灭菌锅:上海申安医疗器械厂;YM-6000Y 小型喷雾干燥机:上海豫明仪器有限公司;DGG-9140A 型电热恒温鼓风干燥机:上海森信实验仪器有限公司;R2140 型分析天平:瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司;Centrifuge 5403 R 低温离心机:Eppendorf 生命科技有限公司;FA25model 均质机:上海佛鲁克流体机械制造有限公司。

1.3 方法

1.3.1 鲁氏酵母发酵液的制备

活化微量鲁氏酵母冻干粉,经 28℃,180 r/min,全温振荡器中培养 3 d~4 d,细胞总数达 10⁸ CFU/mL 时作为种子备用。取 5%已活化好的种子加入装有 100 mL 培养液的三角瓶中,相同条件下培养 30 h~36 h。取三角瓶内培养的鲁氏酵母为微生物发酵罐批量制备的菌种,发酵罐培养条件(经实验室摇床培养条件优化所得)为温度 28℃、500 r/min、pH 5、DO 值设定 30%,接种量 5%,接种后发酵罐内液体总体积为 10 L,连续培养 30 h。每 3 h 取样测定细胞干重、培养基残糖浓度、活菌总数监测鲁氏酵母的生长曲线。

1.3.2 菌体洗涤

将鲁氏酵母从菌体发酵液中分离,采用 4 500 r/min,低温 4℃离心 20 min。用 2.5%的氯化钠溶液对分离的菌体洗涤,同时在 4 500 r/min,低温 4℃离心 20 min 条件下,去除上清液,保留菌体。

1.3.3 酵母菌菌落总数、培养基残糖含量及细胞干重测定方法

菌落总数测定:GB 4789.2-2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定》;培养基残糖含量测定:3,5-二硝基水杨酸比色法^[9];细胞干重测定:取 5 mL 菌体发酵液于离心管中(离心管提前干燥并称重),8 000 r/min 离心 10 min,收集菌体将收集到的菌体用去离子水洗涤两次离心,放入干燥箱中于 80℃干燥恒重,称重并计算细胞干重^[10]。

1.3.4 酵母菌存活率的测定

参照文献[11]的方法计算酵母菌存活率,如公式(1):

酵母菌存活率/% = $\frac{\text{喷雾干燥后发酵剂中酵母菌的活菌总数}}{\text{发酵液的酵母菌的活菌总数}} \times 100$ (1)

1.3.5 保护剂优化试验

1.3.5.1 保护剂的单因素试验

利用喷雾干燥法制备鲁氏酵母发酵剂时,对保护剂的选择要符合国家标准,即能入口使用、又对身体无害。适当的保护剂可以减轻和防止喷雾干燥对菌体的损害,尽可能保持菌体原有特性,提高存活率^[12]。分别选择 6%、8%、10%、12%、14%的脱脂奶粉作为赋形剂。1%、3%、5%、7%、9%的海藻糖作为内源保护剂,1%、1.5%、2%、2.5%、3%的谷氨酸钠作为抗氧化保护剂(表 1)。分别添加到经处理的发酵液中,以鲁氏酵母菌的存活率为检验指标,进行单因素试验。

表 1 不同保护剂添加量
Table 1 Different amount of protective agent added

编号	保护剂		
	脱脂奶粉/%	海藻糖/%	谷氨酸钠/%
1	6	1	1
2	8	3	1.5
3	10	5	2
4	12	7	2.5
5	14	9	3

1.3.5.2 保护剂的正交试验

根据单因素试验对喷雾干燥的保护剂进行优化。喷雾干燥的进料温度 115℃,进料流量 15%(蠕动泵转速占比),以鲁氏酵母菌的存活率为检验指标,分别选取海藻糖、谷氨酸钠、脱脂奶粉进行三因素三水平的正交试验。表 2 为喷雾干燥保护剂优化试验因素水平表。

1.3.5.3 验证性试验

以正交试验优选的最佳条件进行重复性试验,比

表2 喷雾干燥保护剂优化试验因素水平表

Table 2 Factors and levels of orthogonal experiment for protective agent formula optimization

水平	A 脱脂奶粉 质量分数/%	B 海藻糖 质量分数/%	C 谷氨酸钠 质量分数/%
1	8	3	1.5
2	10	5	2
3	12	7	2.5

较各试验组存活率,分析判断试验的可重复性。

1.3.6 喷雾干燥条件单因素试验

1.3.6.1 喷雾干燥进口温度试验

采用进料流量 13 % (蠕动泵转速占比)、保护剂与菌泥比例为 4:1 (g/L)、进料温度分别选择 110、115、120、125、130 °C 进行试验,以酵母菌存活率为检验指标。

1.3.6.2 喷雾干燥保护剂与菌泥比例试验

采用进料流量 13 % (蠕动泵转速占比)、进料温度 120 °C,保护剂与菌泥比例分别选择 1:3、1:1、4:1、8:1、12:1 (g/L) 进行试验,以酵母菌存活率为检验指标。

1.3.6.3 喷雾干燥进料流量试验

采用进料温度 120 °C、保护剂与菌泥比例为 4:1 (g/L),进料流量分别选择 12 %、13 %、14 %、15 %、16 % 进行试验,以酵母菌存活率为检验指标。

2 结果与讨论

2.1 鲁氏酵母培养基残糖含量、细胞干重测定

采用 20 L 微生物发酵罐制备鲁氏酵母发酵液,经实验室条件优化,确定最佳的培养条件。鲁氏酵母的生长曲线如图 1 所示,发酵周期 30 h。

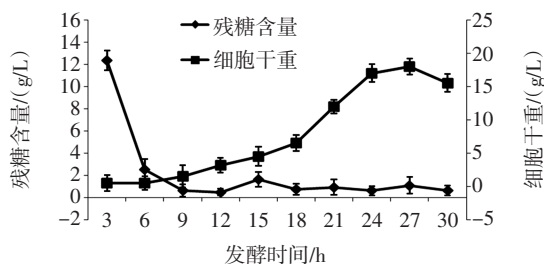


图1 鲁氏酵母发酵罐生长曲线

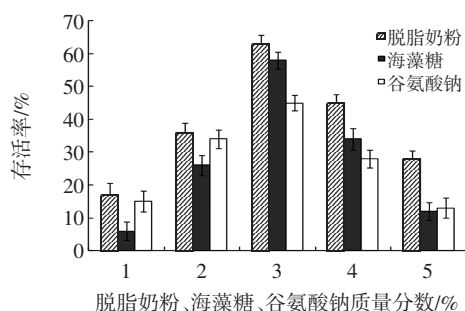
Fig.1 Growth curve of *Zygosaccharomyces rouxii* on fermented

由图 1 可知,在发酵初期 3 h~9 h,菌体生长缓慢,在发酵 18 h 时进入对数期,菌体数量快速增长,细胞干重在 27 h 时达到最大 18 g/L,活菌总数可达到 3.11×10^8 CFU/mL,此时培养基残糖含量为 0.991 g/L。发酵 30 h 时,由于培养基的营养物质几乎耗尽,酵母菌活力下降,及自身降解,细胞干重下降。故后续试验中,为保证存活率,选择培养 27 h 时的发酵液进行喷雾干燥

试验。

2.2 保护剂优化的单因素试验

本研究以鲁氏酵母菌的存活率为检验指标进行单因素试验。3 种不同保护剂对酵母存活率的影响如图 2 所示。



图中 1、2、3、4、5 代表为 1 组数据,具体数值见 1.3.5。

图2 脱脂奶粉、海藻糖、谷氨酸钠分别对鲁氏酵母菌存活率的影响

Fig.2 The effects of skim milk powder, trehalose and sodium glutamate on the survival rate of *Zygosaccharomyces rouxii*

随保护剂含量的增加,酵母菌存活率均呈先上升后下降趋势,当脱脂奶粉、海藻糖、谷氨酸钠依次添加量为 10 %、5 %、2 % 时酵母菌对应存活率最高,依次为 63 %、58 %、45 %。脱脂奶粉中的蛋白质能够提供保护性外模^[13],能为干粉提供较轻的多孔无定型结构且复水性强^[14],Carlise^[15]等研究表明,脱脂奶粉作为包裹剂在喷雾干燥过程中对细胞的存活率有较好的效果。由图中可以看出海藻糖对应的存活率略低于脱脂奶粉。海藻糖作为糖类保护剂二糖代表,许多酵母细胞中存在海藻糖并持有特殊的海藻糖载体^[16],并通过水取代作用和玻璃态机制维持细胞膜的稳定性并降低细胞膜磷脂分子的相转变温度,从而使细胞膜在高温脱水的过程中不发生相转变而处于流动态^[17],是较好的内源性保护剂。同时,谷氨酸钠能与水密切作用使干粉保留了适当的水分,满足了微生物维持生命的最低需求^[18],可作为抗氧化剂保护酵母菌在高温和贮藏过程中不被氧化^[19-20]。从图中能够看出,单一的保护剂对酵母菌的存活率不能达到理想效果,而复合保护剂的使用,是目前研究的大方向。

2.3 保护剂优化正交试验结果

正交试验结果及分析见表 3。

由表 3 正交试验结果所示:通过直观分析法可得,在试验选定的因素水平中 $R_A > R_B > R_C$,各因素对试验结果影响水平由大到小的排列顺序为 $A > B > C$,最佳组合方式为 $A_2B_2C_1$,脱脂奶粉 10 %、海藻糖 5 %、谷氨酸钠 1.5 %。

表 3 正交试验结果及分析

Table 3 Results and analysis of orthogonal experiment

因素	A 脱脂奶粉 质量分数	B 海藻糖 质量分数	C 谷氨酸钠 质量分数	D 空列	存活 率/%
1	1	1	1	1	56
2	1	2	2	2	65
3	1	3	3	3	26
4	2	1	2	3	53
5	2	2	3	1	72
6	2	3	1	2	64
7	3	1	3	2	35
8	3	2	1	3	34
9	3	3	2	1	45
K ₁	147	144	153.9		
K ₂	189	171	153.0		
K ₃	114	135	132.9		
平均值 K ₁	49	48	51.3		
平均值 K ₂	63	57	51		
平均值 K ₃	38	45	44.3		
极差 R	25	12	7		
主次顺序	A>B>C				

2.4 验证性试验结果分析

以进料温度 115℃、进料流量 13%(蠕动泵转速占比)、保护剂组合(脱脂奶粉 10%、海藻糖 5%、谷氨酸钠 1.5%)为条件进行验证性试验,结果鲁氏酵母存活率为 78%,高于正交试验中的 9 个试验组。

2.5 喷雾干燥单因素试验条件结果与分析

2.5.1 不同进料温度对鲁氏酵母存活率的影响

不同的进料温度对存活率的影响如图 3 所示。

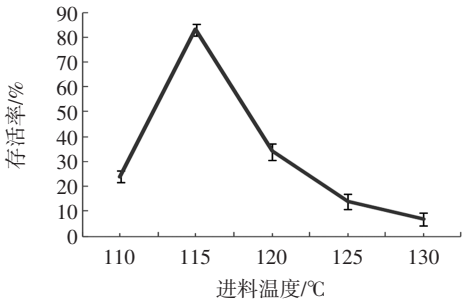


图 3 进料温度对发酵剂的影响

Fig.3 Influence of inlet temperature on starter

由图 3 可知,进料温度为 115℃时鲁氏酵母的存活率达到最高,为 83%,发酵剂呈乳白色、粉粒状,具有一定酱香味产生。当进口温度达到 120℃时,存活率为 34%呈现明显下降趋势,此时喷雾干燥机出料口处出现焦糊现象,制得的发酵剂颜色偏黄,有焦糊气味产生。故选择进口温度为 115℃进行试验。

2.5.2 不同进料流量对发酵剂存活率的影响

选择 5 个不同的流量进样,对发酵剂中酵母菌的

存活率进行检测,结果如图 4 所示。

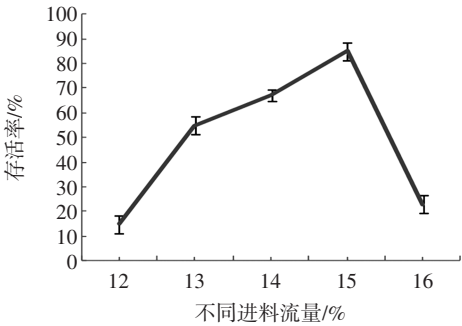


图 4 进料流量对发酵剂的影响

Fig.4 Influence of injective flow on starter

由图 4 可知,当进料流量为 15%时,存活率达到最高 85%。此后随着进料流量的增大,经雾化后的液滴数量大量增加,不能瞬间进行干燥,导致发酵剂内的活菌数降低,故选择进料流量为 15%。

2.5.3 保护剂与菌泥对鲁氏酵母存活率的影响

通过对喷雾干燥保护剂的优化,采用脱脂奶粉 10%、海藻糖 5%、谷氨酸钠 1.5%复合保护剂进行试验。将保护剂与离心的菌泥分别按照 1:3、1:1、4:1、8:1、12:1(g/L)比例混合,进行喷雾干燥,测得样品存活率,结果如图 5 所示。

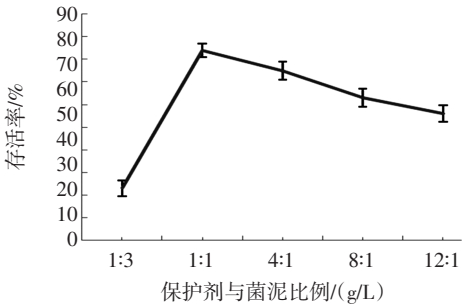


图 5 保护剂与菌泥比例对发酵剂的影响

Fig.5 Influence of proportion of protectants cells

由图 5 可知,当保护剂与菌泥比例 1:1(g/L)时,样品存活率最高,达到 84%。当保护剂与菌泥 1:3(g/L)时含量过低,不能达到保护效果,导致酵母菌在干燥过程中死亡,影响干燥结果。当保护剂与菌泥 12:1(g/L)时含量过高,粉状颗粒中的菌体比例变小,存活率呈现平缓下降趋势。

3 结论

本文探究了利用喷雾干燥法制备鲁氏酵母发酵剂的最佳条件,鲁氏酵母发酵罐培养最佳时间为 27 h,此时细胞活力最强、活菌总数达到最大 3.11×10⁸ CFU/g、细胞干重达到最大 18 g/L。保护剂优化采用三因素三

水平的正交试验,3种添加物的保护效果依次为:脱脂奶粉>海藻糖>谷氨酸钠,最佳配方为:脱脂奶粉10%、海藻糖5%、谷氨酸钠1.5%,按照上述条件得到的发酵剂中活菌存活率为72%。通过单因素试验确定了喷雾干燥试验最适条件:进口温度115℃,进料流量15%(蠕动泵转速占比),保护剂与菌泥比例1:1(g/L)。通过上述条件得到的发酵剂中活菌存活率为84%。

参考文献:

- [1] Li X, Kang Y, Yu C, et al. Exponential feeding strategy of high-density cultivation of a salt-tolerant aroma-producing yeast *Zygosaccharomyces rouxii*, in stirred fermenter[J]. Biochemical Engineering Journal, 2016,111:18-23
- [2] 蒋丽,董丹,邢亚阁,等.喷雾干燥法制备冰酒发酵剂的研究[J].中国酿造, 2015(6):62-66
- [3] 张辉,李海梅,程建军,等.鲁氏酵母和球拟酵母活性干酵母的制备研究[J].食品工业科技,2007(8):64-66
- [4] FU WAN-YIN, ETZEL MARK R, et al. Spray Drying of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* C2 and Cellular Injury[J]. Journal of Food Science, 2010, 60(1):195-200
- [5] Fu N, Chen X D. Towards a maximal cell survival in convective thermal drying processes[J]. Food Research International, 2011,44(5):1127-1149
- [6] 张书猛. 喷雾干燥制备益生菌发酵剂的研究[D].西安:陕西科技大学, 2012
- [7] 付博,马齐,王卫卫.乳酸双歧杆菌喷雾干燥工艺研究[J]. 中国乳品工业, 2011(5):10-13
- [8] 谭文乐,肖更生,吴继军,等.醋酸菌喷雾干燥工艺的研究[J]. 现代食品科技, 2010(3):272-276
- [9] 叶勤.发酵过程原理[M]. 北京:化学工业出版社, 2005:108
- [10] Hayashida Y, Nishimura K, Slaughter J C. The importance of the furanones HDMF and HEMF in the flavour profile of Japanese barley miso and their production during fermentation[J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 1998, 78(1):88-94
- [11] 罗佳琦,于晓晨,于才渊.嗜酸乳杆菌喷雾干燥技术的研究[J].干燥技术与设备, 2008(6):273-278
- [12] 李骞,栾天奇,王艳萍.喷雾干燥法制备植物乳杆菌 MA2 发酵剂[J].天津科技大学学报, 2011(5):19-22,35
- [13] 南博. 活性酿酒酵母的真空干燥技术研究[D]. 西安: 西北农林科技大学, 2014
- [14] Abadias M, Benabarre A, Teixidó N, et al. Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*[J]. International Journal of Food Microbiology, 2001,65(3):173-182
- [15] Carlise B, Fritzen-Freire, Elane S, et al. Microencapsulation of Bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics[J]. Food Research International,2012,45(1):306-312
- [16] Liu J, Tian S P, Li B Q, et al. Enhancing viability of two biocontrol yeasts in liquid formulation by applying sugar protectant combined with antioxidant[J].Biocontrol,2009,54(6):817-824
- [17] Perdana J, Fox M B, Chen S, et al. Interactions between formulation and spray drying conditions related to survival of *Lactobacillus plantarum*, WCFS1[J]. Food Research International, 2014,56(2):9-17
- [18] Morichi T. Protective Effect of *Glutamic Acid* and Related Compounds on Bacterial Cells subjected to Freeze-Drying[J]. Journal of General & Applied Microbiology,1963,9(2):149-161
- [19] 熊涛.植物乳杆菌 NCU116 菌剂喷雾干燥制备技术研究[C].乳酸菌与人体健康:第十届乳酸菌与健康国际研讨会摘要汇编,2015:2
- [20] 黄丽金,陆兆新,袁勇军.酸奶菌种冷冻干燥保护剂的筛选研究[J]. 食品科学, 2005(12):103-107

收稿日期:2017-03-19

富强、民主、文明、和谐，
自由、平等、公正、法治，
爱国、敬业、诚信、友善。