

冻干嗜酸乳杆菌菌粉制备及特性研究*

袁亚宏, 岳田利, 高振鹏, 王丽威

(西北农林科技大学 食品科学与工程学院, 陕西 杨陵 712100)

[摘要] 通过对嗜酸乳杆菌发酵曲线的测定, 初步掌握了该菌的生长、繁殖和代谢规律。在此研究基础上进行的发酵试验结果表明, 采用 20 g/kg 接种量, 37 ℃ 恒温静置培养 6 h, 活菌数最多, 菌龄处于对数生长期末期, 适宜冻干; 对几种复合保护剂的保护效果进行研究, 得到冻干复合保护剂的最佳配比为: 蔗糖 40 g/kg, 甘油 10 g/kg, L-cys 1 g/kg 和 Vc 1 g/kg。

[关键词] 嗜酸乳杆菌; 活性菌粉; 发酵曲线; 冻干保护剂

[中图分类号] TS201.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2003)06-0139-04

嗜酸乳杆菌属乳杆菌属, 乳杆菌种, 革兰氏阳性(G⁺)厌氧或兼性厌氧无芽孢杆菌^[1]。嗜酸乳杆菌在肠道中发酵, 产生乳酸、醋酸及抗菌素, 具有整肠作用, 对防治和治疗慢性便秘、腹泻等肠道疾病有一定疗效。近年来, 还发现嗜酸乳杆菌具有降低血液中胆固醇含量和抑制某些癌细胞生长的作用^[2], 使嗜酸乳杆菌的研究和应用更加引人注目。

由于嗜酸乳杆菌具有保健作用, 近年来关于这方面的研究越来越多, 现已成为活菌制剂的研究热点。活菌制剂在消费之前应当维持较高的活菌水平, 而当前的许多产品都不能有效地防止活菌数的衰减。如何提高活菌量并延长活菌保藏期, 已成为活菌制剂产品研究开发的技术关键。利用真空冷冻干燥技术生产活菌制剂是多种保藏方法中较为理想的一种, 但冷冻和干燥过程会造成部分微生物细胞的损伤、死亡及某些酶蛋白分子的钝化^[3,4], 而且如果冻干工艺中保护剂选择不当, 则发酵活力随之下降。本研究在对嗜酸乳杆菌发酵曲线进行分析的基础上, 对其抗冻保护剂的组成及浓度进行了研究, 以期最大限度地发挥保护剂的保护功能, 减少菌体在冷冻干燥过程中的死亡, 提高细胞的存活率, 为高效冻干发酵剂的研制开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌种

嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)由西北农林科技大学食品科学与工程学院提供, 在脱脂乳

中转接 3~4 次, 至凝乳时间不再缩短为止, 活化好的菌种经镜检确定无杂菌污染后, 保存于 4 ℃ 的冰箱中, 每 7 d 转接 1 次, 备用。

1.2 培养基

发酵培养基 脱脂乳(NFM)固形物含量 86 g/L, 115 ℃ 灭菌 15 min。

活菌计数培养基^[4] 采用改良的MRS培养基, 蛋白胨 10 g, 葡萄糖 20 g, 酵母浸膏 5 g, 牛肉膏 10 g, 柠檬酸铵 2 g, MgSO₄·7H₂O 0.2 g, K₂HPO₄ 2 g, 乙酸钠 5 g, MnSO₄·4H₂O 0.05 g, Tween 80 mL, 琼脂 15 g, L-cys 盐酸盐 0.5 g, 蒸馏水 1 L, 115 ℃ 灭菌 15 min。

NP 稀释液^[5] 巯基乙醇酸钠 0.3 g, 蛋白胨 1.0 g, 磷酸氢二钠 1.5 g, 磷酸氢二钾 0.2 g, NaCl 8.0 g, 蒸馏水 1 L, 121 ℃ 灭菌 15 min。

1.3 仪器与设备

恒温培养箱、冷冻离心机、灭菌锅、真空冷冻干燥机。

1.4 测定方法

酸度用酸碱滴定法^[6]测定; 还原糖按 GB 5009.7-85^[6]方法测定; 氨基酸的测定采用 121 MB 型氨基酸分析仪, 测定样品中游离氨基酸和结合氨基酸的含量; 总菌数采用血球计数板显微镜下直接计数^[7]; 活菌数采用改良MRS 固体培养基, 以倾注法测定^[7]。

将冻干后的菌粉稀释定容至与冻干前相同体积, 测定冻干前后菌液中的活菌数, 按下面公式计算

* [收稿日期] 2003-04-28

[基金项目] 陕西省科技攻关项目(2002K03-G4-01, 2002K03-G4-04)

[作者简介] 袁亚宏(1971-), 女, 甘肃天水人, 讲师, 在读博士, 主要从事食品工程技术研究。

存活率

存活率= 冻干后样品中菌液(稀释)的活菌数/冻干前样品中菌液的活菌数 × 100%

1.5 试验工艺流程

菌种活化——

牛乳 脱脂 灭菌 冷却 发酵培养基 发酵 菌悬液 冷冻干燥 包装 成品

保护剂 保护剂

1.6 工艺操作要点

发酵培养基的制备 选择固形物含量高, 不含抗菌素的健康牛乳, 进行理化检测和固形物含量测定。3 500 r/min 离心 10 min, 滤掉脂肪层。

灭菌 将脱脂乳放于灭菌锅中, 于 115 灭菌 15 min, 冷却至 40 接种。

菌种活化 每次进行镜检, 确定无杂菌污染后再进行下一次。

发酵 将接种后的脱脂乳于恒温培养箱中培养, 按照试验方案设计进行各种指标的测定, 并观察记录凝乳时间。

保护剂的添加 甘油、蔗糖等在发酵前进行添加, Vc, L-cys 等在菌液中添加。

冷冻升华干燥 将样品盛于培养皿中, 置于干燥仓中降温, 使样品冻结。此过程进行 3 h, 料温为 - 30 ; 此时开始给补水器供冷媒液, 补水器降温低于 - 40 后, 开启真空泵抽真空, 当干燥仓、补水器内的真空度降至 30 Pa 时, 开启加热系统, 并控制加速度 < 50% (温度不超过 0 , 采用手调加热速度; 温度超过 0 , 采用自动调节加热速度), 加热 8 h 后, 板温和料温均比较恒定, 且在 40 左右停止加热。此过程由于物料盛入表面皿而未与干燥盘接触, 所以热传递慢, 降温、加热过程温差较大。

技术条件 冻结。冻结温度为 - 25 ~

- 30 , 降温时间 130 min。 升华。真空度 30 Pa。

1.7 试验方案设计

发酵曲线测定 新鲜牛乳经离心脱脂, 115 灭菌 20 min, 按 20 g/kg 接种量接种, 37 恒温静置培养 36 h, 每隔 4 h 取样, 定量检测还原糖、乳酸、蛋白质的代谢情况及活菌数(N)的变化情况。

最佳收获期的确定 根据生长曲线所确定的对数生长期范围, 固定接种量, 在这个时间范围内每隔 1 h, 进行活菌计数。

冻干保护剂的优选 试验中选择蔗糖、甘油、维生素 C、L-半胱氨酸作为保护剂, 这几种物质结构上都具有与蛋白质(胞壁蛋白与乳蛋白)的亲合能力, 但由于分子构型的不同, 亲合能力存在差异。有研究证明^[8,9], 复合保护剂要比单种保护剂效果好。因此, 设计了蔗糖(0, 40, 80 g/kg)、甘油(0, 10, 20 g/kg)、L-半胱氨酸(0, 0.5, 1.0 g/kg)、Vc(0, 0.5, 1.0 g/kg)4 因素 3 水平正交试验方案, 以研究不同保护剂的作用效果及确定最佳保护剂配比。

2 结果与分析

2.1 发酵曲线分析

发酵过程中还原糖(以葡萄糖计)、乳酸、氨基酸及活菌数的变化如图 1~ 3 所示。

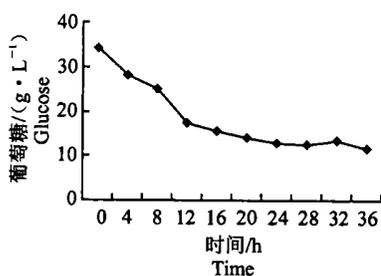


图 1 发酵过程中还原糖的变化趋势
Fig. 1 The change of reducing sugar

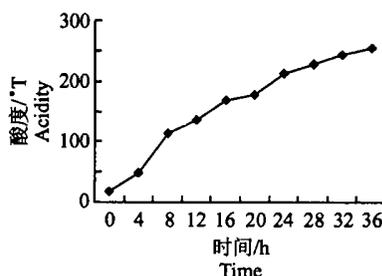


图 2 发酵过程中酸度的变化
Fig. 2 The change of acidity

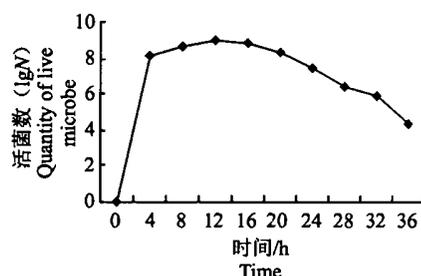


图 3 发酵过程中活菌数的变化
Fig. 3 The change of live microbes

从图 1~ 3 代谢底物、产物的变化情况可以看出, 在发酵前 16 h, 还原糖转化较快, 这说明 16 h 以后细菌的生长受到低酸度的抑制。从生长曲线可以

明显看到对数生长期、稳定期和衰亡期, 而观察不到迟滞期, 这是因为此菌株迟滞期特别短, 而试验时间间隔为 4 h, 初步推断该菌的对数生长期处于 8 h 之

前, 稳定期在 8~ 16 h, 16 h 以后菌体衰亡速率大于生长繁殖速率, 开始进入衰亡期。这是由于培养基中可利用的营养物质水平差, 体系的 pH 值过低, 抑制了细菌的生长。综合生长曲线和代谢底物、产物曲线, 可以初步确定在 20 g/kg 接种量, 37 °C 下试验

菌株的最佳收获期应在 4~ 8 h。在这个基础上再进行单因素试验, 确定了该菌株的收获期在培养后 6 h。

由发酵过程中氨基酸的测定结果(图 4, 5)发现, 除色氨酸之外, 其他 17 种氨基酸都可检测到。

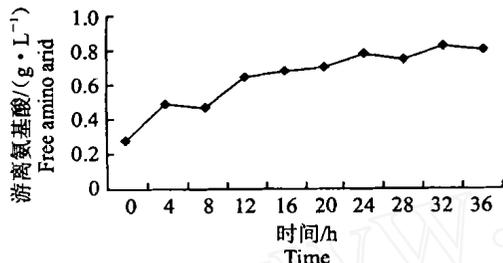


图 4 发酵过程中游离氨基酸的变化

Fig 4 The change of amino acid

由图 4, 5 可见, 发酵过程中, 随着发酵时间的延长, 游离氨基酸的总量逐渐增多, 前 16 h 增加最快, 其中脯氨酸、丙氨酸增加较快, 发酵初始时脯氨酸含量为 36.5 mg/L, 发酵 16 h 后可达到 166.1 mg/L, 丙氨酸也由 26.97 mg/L 增加到 178.1 mg/L, 而结合氨基酸逐渐减少。这说明嗜酸乳杆菌具有一定的蛋白酶活性和肽酶活性。从游离氨基酸和结合氨基酸的测定结果可以看出, 脱脂牛乳经灭菌后, 游离氨

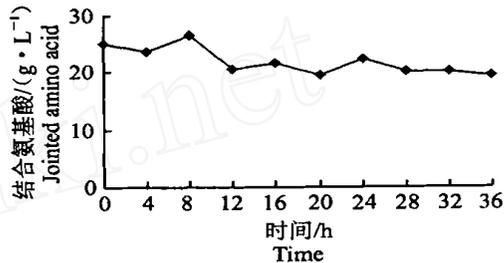


图 5 发酵过程中结合氨基酸的变化

Fig 5 The change of jointed amino acid

基酸明显增多, 这是由于乳中蛋白酶和肽酶共同作用的结果。

2.2 冻干保护剂优选结果

对表 1 的正交试验结果进行分析发现, 最佳组合为 A₂B₂C₃D₃。因而, 确定本次试验的最佳保护剂配比为: 蔗糖 40 g/kg, 甘油 10 g/kg, L-cys 1 g/kg, Vc 1 g/kg。

表 1 复合保护剂正交试验表

Table 1 The orthogonal experiment of compound protectants

序号 No.	蔗糖/(g · kg ⁻¹) Sugar	甘油/(g · kg ⁻¹) Glycerin	L-cys/ (g · kg ⁻¹)	Vc/ (g · kg ⁻¹)	存活率/% Survival rate
1	1(20)	1(0)	1(0)	1(0)	35.1
2	1	2(10)	2(0.5)	2(0.5)	56.8
3	1	3(20)	3(1.0)	3(1.0)	65.7
4	2(40)	1	2	3	62.5
5	2	2	3	1	73.8
6	2	3	1	2	70.4
7	3(80)	1	3	2	63.8
8	3	2	1	3	73.2
9	3	3	2	1	65.5
K ₁	167.6	161.4	178.7	174.4	
K ₂	206.7	203.8	184.8	191.0	
K ₃	202.5	201.6	203.3	201.4	
k ₁	55.87	53.80	59.57	58.13	
k ₂	68.90	67.90	61.60	63.63	
k ₃	67.50	67.20	67.77	67.13	
优水平 Optimal level	A ₂	B ₂	C ₃	D ₃	
R _j	39.10	14.10	8.20	9.00	
主次顺序 Primary and secondary order			ABDC		

3 结论与讨论

1) 在本试验条件下, 采用 20 g/kg 接种量, 37 恒温静置培养 6 h, 活菌数最多, 菌龄处于对数生长期末期, 为最佳收获期。

2) 在试验条件下, 加入 40 g/kg 蔗糖, 10 g/kg

甘油, 1 g/kg L-cys 和 1 g/kg Vc 作为冻干保护剂, 菌粉存活率可高达 70% 以上, 说明产品可作为高效发酵剂或人体微生态调节剂。

3) 嗜酸乳杆菌具有一定的肽酶活性和蛋白酶活性, 但活力较弱, 如果在培养基中添加一定量的蛋白水解酶, 其增殖效果会更好。

[参考文献]

- [1] 布坎南 R E. 伯杰氏细菌鉴定手册[M]. 第 8 版. 北京: 科学出版社, 1984.
- [2] 顾瑞霞. 乳酸菌与人体健康[M]. 北京: 科学出版社, 1989.
- [3] 吕为群. 乳酸菌在冷冻干燥过程中存活率的影响因素探讨[J]. 中国乳品工业, 1993, 21(5): 217- 220.
- [4] 杨洁彬, 凌代文. 乳酸菌——生物学基础及应用[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.
- [5] 张香美, 江汉湖, 董明盛. 双歧杆菌与嗜酸乳杆菌混合培养时微生态关系研究[J]. 安徽农业技术师范学院学报, 1999, 13(2): 5- 10.
- [6] 樊明涛. 食品分析与检验[M]. 西安: 世界图书出版公司, 1998. 57- 121.
- [7] 程丽娟. 微生物学实验技术[M]. 陕西杨陵: 天则出版社, 1993.
- [8] 曹永梅, 张 灏, 许时婴, 等. 保护剂在冷冻干燥双歧杆菌中的作用[J]. 食品与发酵工业, 2000, 26(2): 40- 45.
- [9] 吕 兵, 张国农, 林金资. 酸奶发酵剂速效干剂制备中保护剂的研究[J]. 中国乳品工业, 1999, 24(2): 3- 5.

Research on of production quality and quality of *Lactobacillus acidophilus* powder

YUAN Ya-hong, YUE Tian-li, GAO Zhen-peng, WANG Li-wei

(College of Food Science and Engineering, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The growth, reproduction and metabolic pattern of *Lactobacillus acidophilus* were studied basically by measuring its fermentation curve. The result showed that the number of live microbes was the greatest when amount of inoculation was 20 g/kg and cultivated 6 h at 37 °C constant temperature. The age of microbe was in the stage of the telophase of logarithm growth, it was suitable for freeze-drying. The optimal compound protectants were as following: sucrose 40 g/kg, glycerin 10 g/kg, L-cys 1 g/kg, Vc 1 g/kg. Then live microbe was obtained by fermenting.

Key words: *Lactobacillus acidophilus*; active microbe powder; fermentation curve; protectants for freeze-drying