

文章编号:1673-1689(2006)02-0013-04

乳酸杆菌冻干发酵剂

熊强, 陆利霞*, 孙芸, 于修鑑, 熊晓辉

(南京工业大学 制药与生命科学学院, 江苏 南京 210009)

摘要:以乳酸杆菌为菌种,进行单因素和响应面法实验优化得到制备冻干发酵剂的复合保护剂为:脱脂乳粉 9.7 g/dL,半胱氨酸 0.03 mol/L,谷氨酸钠 3.2 g/dL,所得冻干发酵剂存活率为 89.5%。且该冻干发酵剂于 4 ℃保存 6 个月后的存活率为 66.4%。

关键词:乳酸杆菌;冻干保护剂;冻干发酵剂

中图分类号:TS 202.3

文献标识码:A

Studied on the Freeze-Dried Starter of *Lactobacillus* sp.

XIONG Qiang, LU Li-xia*, SUN Yun, YU Xiu-jian, XIONG Xiao-hui

(College of Life Science and Pharmacy, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

Abstract: This paper studied on the freeze-dried starter of *Lactobacillus* sp.. Based on the results of single and response surface methodology, the optimum combination cryoprotectant was developed containing: skimmed milk 9.7%, L-cystein 0.03 mol/L, and sodium glutamine 3.2%. The survival rate of *lactobacillus* sp was maintained at 89.5% using this combined protector. The survival rate of the starter could stay at 66.4% when storing it at 4 ℃ for six months.

Key words: *Lactobacillus* sp; cryoprotectant; freeze-dried starter

直接式发酵剂活力强、用量少、污染低、品种多,便于运输、保藏,使用方便,在西方发达国家已得到广泛应用。但乳酸菌浓缩发酵剂较难长期保存^[1],因此乳酸菌的保藏成了热门的研究课题。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^[2-3]。

作者在实现乳酸杆菌高密度培养的基础上^[4],进一步研制直投式发酵剂。以乳酸杆菌为菌种,比较了蔗糖、乳糖、谷氨酸钠、半胱氨酸、壳聚糖、脱脂奶粉、甘油、维生素 C 等对乳酸菌的冻干保护效果,从而筛选良好的冻干保护剂,以期最大限度地发挥

保护剂的保护功能,提高乳酸菌的存活率,旨在为研制开发高效冻干直接式发酵剂提供依据。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株 乳酸杆菌(*Lactobacillus* sp.),作者所在实验室分离保藏。

1.1.2 培养基 种子培养基(组分 g/dL):葡萄糖 2.0,蛋白胨 1.0,牛肉膏 0.5,酵母膏 0.5。pH 6.5~6.7。

计数培养基(组分 g/dL):葡萄糖 1.0,胰胨

收稿日期:2005-05-18; 修回日期:2005-09-02。

基金项目:国家 863 计划项目(2002AA248041);江苏省高技术研究计划项目(BG2004322);江苏省高校自然科学基金项目(04KJB550045)

作者简介:熊强(1970-),男,江苏南京人,讲师,工学硕士;*通讯作者。

1.0,牛肉膏 1.0,酵母膏 1.0,琼脂 1.5, pH 6.5~6.7。

发酵培养基(组分 g/dL):葡萄糖:乳糖(1:1) 2.0,牛肉膏 1.0,柠檬酸钠 0.5,吐温 80 0.05,氯化钠 0.25,硫酸镁 0.1, pH 6.5。

1.1.3 主要仪器设备 Thermo Savant 冷冻干燥机,美国 Thermo Electron Co 制造。

1.2 实验方法

1.2.1 乳酸杆菌发酵液制备 参照文献[4]培养至对数生长期末期终止发酵。

1.2.2 冻干发酵剂制备

1)冻干菌悬液制备:乳酸杆菌培养到一定时间后,将发酵液于 6 000 r/min 离心 20 min,弃上清液,以无菌水制成一定浓度的均匀菌悬液。

2)保护剂的配制与添加:将不同保护剂配成一定浓度的溶液,灭菌后添加到已装有菌悬液的各冻干瓶中,制成与离心前发酵液浓度相同的菌悬液。

3)冷冻干燥:将添加有不同冻干保护剂菌悬液的冻干瓶置于超低温冰箱中急速冷冻,以保证形成小的冰晶和冻结完全。之后立即放入真空冷冻干燥机中进行干燥,冻干结束后立即用密封带密封冻干瓶,用于检测活菌数。

1.2.3 保存性实验 将冻干后的发酵剂于 4 ℃冰箱保存,6 个月时取出检测活菌数,并计算存活率。

1.2.4 乳酸杆菌活菌数的计数方法 参照文献[4],梯度稀释倾注平板法。

1.2.5 乳酸杆菌存活率的计算

$$\text{细胞存活率} = \frac{\text{冻干后样品中的活菌数}}{\text{冻干前样品中的活菌数}} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 冻干保护剂(单因素多水平)筛选试验

比较蔗糖、乳糖、壳聚糖、脱脂乳粉、甘油、谷氨酸钠、半胱氨酸等对乳酸杆菌的冻干存活率,结果见表 1。

由表 1 可以看出,在加入保护剂之后,乳酸菌的存活率均有不同程度的提高,即多选择的保护剂均对乳酸菌有一定的保护作用。以半胱氨酸的效果最为显著,冻干存活率达 80.3%。脱脂乳粉、谷氨酸钠等对乳酸菌具有良好的保护作用。蔗糖和乳糖可抑制菌表面自由基的产生,对乳酸杆菌也有较好的保护作用^[5],这与卢兴安等^[6]研究结果一致。

表 1 冻干保护剂的筛选结果

Tab.1 Screening results of cryoprotectants for *Lactobacillus* sp.

冻干保护剂	浓度	冻干前活菌数/ ($\times 10^{10}$ cfu/mL)	冻干后活菌数/ ($\times 10^{10}$ cfu/mL)	存活率/%
蔗糖	5 g/dL	188	69	36.7
蔗糖	10 g/dL	188	78	41.5
蔗糖	20 g/dL	188	89	47.3
乳糖	5 g/dL	188	37	19.7
乳糖	10 g/dL	188	106	56.4
乳糖	20 g/dL	188	92	49.2
壳聚糖	5 g/dL	188	148	48.7
脱脂乳粉	12 g/dL	188	124	66.0
甘油	10 g/dL	188	85	45.2
谷氨酸钠	5 g/dL	188	132	70.2
半胱氨酸	0.04 mol/L	188	151	80.3
维生素 C	0.04 mol/L	188	67	35.6
对照	—	188	22	11.7

2.2 不同悬浮基质对冷冻保护效果的影响

微生物冻干需在一定的悬浮介质中进行,不同乳酸菌有不同适宜的悬浮介质,悬浮介质的特性在整个冻干过程中对细胞活力都有重要的影响。从表 2 可以看出,同一冻干保护剂在不同的悬浮介质中存活率也有明显的差异。新鲜培养基优于脱脂乳粉,以下试验均选择新鲜培养基为冻干悬浮介质。

表 2 不同悬浮介质对存活率的影响

Tab.2 Effect of different suspension medium on the survival rate

冻干保护剂	浓度	新鲜培养基		12 g/dL 的脱脂乳粉	
		活菌数(cfu/mL)	存活率/%	活菌数(cfu/mL)	存活率/%
蔗糖	10 g/dL	4.9×10^{11}	53.3	1.2×10^{10}	1.34
乳糖	10 g/dL	2.2×10^{11}	23.9	1.9×10^{11}	20.7
壳聚糖	5 g/dL	4.1×10^{11}	44.0	4.6×10^{11}	50.0
甘油	10 g/dL	4.8×10^{10}	5.2	8.6×10^{10}	9.4
谷氨酸钠	5 g/dL	6.8×10^{11}	73.9	5.7×10^{11}	61.9
半胱氨酸	0.04 mol/L	7.5×10^{11}	81.5	6.1×10^{11}	66.3
对照	—	1.9×10^{10}	2.0	2.9×10^{10}	3.2

2.3 响应面法优化冻干保护剂配方

2.3.1 实验设计 根据 Box-Behnken 的中心组合设计原理,以脱脂乳粉、谷氨酸钠、半胱氨酸 3 个因素为自变量,以乳酸菌的存活率为响应值设计了三因素三水平共 15 个实验点的响应面分析实验^[7]。根据单因素实验结果,实验因素和水平见表 3。

表 3 实验因素和水平

Tab. 3 Factors and levels in the design

因素	水平		
	-1	0	1
x_1 (脱脂乳粉)	8 g/dL	10 g/dL	12 g/dL
x_2 (半胱氨酸)	0.02 mol/L	0.03 mol/L	0.04 mol/L
x_3 (谷氨酸钠)	1 g/dL	3 g/dL	5 g/dL

2.3.2 实验结果 响应面实验设计及结果见表 4。15 个试验点可分为两类,其一是析因点,自变量取值在 x_1, x_2, x_3 , 所构成的三维顶点,共有 12 个析因点;其二是零点,为区域的中心点,零点试验重复 3 次,用以估计试验误差。

表 4 响应面实验设计及结果

Tab. 4 RSA design chart and results

试验号	x_1	x_2	x_3	Y
	脱脂乳粉	半胱氨酸	谷氨酸钠	存活率/%
1	-1	-1	0	67.8
2	-1	0	-1	85.1
3	-1	0	1	77.6
4	-1	1	0	69.3
5	0	-1	-1	59.5
6	0	-1	1	76.4
7	0	1	-1	65.4
8	0	1	1	75.3
9	1	-1	0	64.1
10	1	0	-1	87.7
11	1	0	1	71.9
12	1	1	0	65.9
13	0	0	0	89.5
14	0	0	0	88.9
15	0	0	0	87.8

通过 Statistica 6.0 软件,拟合二次回归模型,并对其进行分析以确立最优响应因子水平,分析结果见表 5。

根据表 5,拟合的二次回归方程为:

$$Y = 68.65556 + 3.99167x_1 + 1.01250x_2 +$$

$$0.43750x_3 + 5.26667x_1^2 + 8.34583x_2^2 + 1.44583x_3^2 + 0.07500x_1x_2 - 2.07500x_1x_3 - 1.75000x_2x_3$$

表 5 回归方程中回归系数的估计值

Tab. 5 Parameter estimates of the regression equation

变量	标准偏差	T 检验	p	参数估计值
常数项	4.05758	16.92032	0.000013	68.65556
(1) x_1 (L)	10.02735	0.79616	0.462051	3.99167
x_1 (Q)	8.29432	1.26994	0.259995	5.26667
(2) x_2 (L)	5.63488	0.35937	0.733998	1.01250
x_2 (Q)	4.14716	4.02484	0.010072	8.34583
(3) x_3 (L)	5.63488	0.15528	0.882673	0.43750
x_3 (Q)	4.14716	0.69726	0.516720	1.44583
1L by 2L	7.96893	0.01882	0.985710	0.07500
1L by 3L	7.96893	-0.52077	0.624757	-2.07500
2L by 3L	7.96893	-0.43921	0.678844	-1.75000

2.3.3 确定各因素的最优水平 进一步对响应值 Y 与各因素 x_1, x_2, x_3 进行响应面三维和等高线分析。结果表明响应面的稳定点在所试验的范围之内,即得到各因素的最优值分别为: $x_1 = 0.097, x_2 = 0.030, x_3 = 0.032$ 。

2.3.4 验证实验 根据回归分析结果和响应面的稳定点,确定脱脂乳粉、半胱氨酸、谷氨酸钠的浓度分别为 9.7 g/dL, 0.03 mol/L, 3.2 g/dL。验证实验结果见表 6。冻干前活菌数为 1.43×10^{12} cfu/mL。表 6 的结果表明,由响应面优化得到的复合保护剂作用于乳酸杆菌有很好的保护作用。

表 6 验证试验结果

Tab. 6 Result of the validation test

平行试验号	平均活菌数/ ($\times 10^{10}$ cfu/mL)	存活率/%
1	125	87.4
2	118	82.5
3	122	85.3
平均		85.1

2.4 冻干发酵剂的保存性实验

将真空冷冻干燥后发酵剂在 4 °C 常压状态下进行贮藏,于 6 个月后测定活菌数。贮藏结果见表 7。由表 7 可知,最终乳酸杆菌冻干发酵剂的存活率为 66.4%,说明该发酵剂的保存性较好。

表7 冻干发酵剂4℃保存6个月后的存活率

Tab. 7 Survival rate of freeze-dried starter stored at 4℃ after six months

时间	活菌数/($\times 10^{10}$ cfu/mL)	存活率/%
起始	149	100.0
6个月后	99	66.4

3 结论

1)在所实验的8种保护剂中,半胱氨酸的保护

作用最好,乳酸杆菌存活率80.3%。采用新鲜培养基作为悬浮介质优于12%的脱脂乳粉。

2)通过响应面优化得到复合冻干保护剂。结果表明:对乳酸菌影响最大的保护剂是半胱氨酸,经过优化取得的最优值分别为:脱脂乳粉9.7 g/dL,半胱氨酸0.03 mol/L,谷氨酸钠3.2 g/dL。活菌存活率最高达到89.5%。

3)该乳酸杆菌冻干发酵剂,在4℃常压状态下进行贮藏,于6个月后的存活率为66.4%,该冻干发酵剂的保存性较好。

参考文献:

- [1] Ana S C, Joana S, Peter Ho, et al. Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria[J]. *Inter Dairy J*, 2004, 14: 835-847.
- [2] Yi-Chieh W, Roch-Chui Y, Cheng-Chun C. Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage[J]. *Inter J Food Micro*, 2004, 93: 209-217.
- [3] 李华, 蔡艳娥, 刘延琳. 真空冷冻干燥微生物的进展[J]. *微生物学通报*, 2002, (3): 78-81.
- [4] 熊晓辉, 于修熾, 熊强, 等. 乳酸菌发酵剂高密度培养的研究[J]. *中国调味品*, 2004, (5): 17-21.
- [5] Paul B C, Danforth P M, Peter R C, et al. Stabilization and preservation of *Lactobacillus acidophilus* in saccharide matrices[J]. *Cryobiology*, 2000, 41: 17-24.
- [6] 卢行安, 陈明生, 袁杰利, 等. 乳酸菌冷冻干燥工艺的研究进展[J]. *中国微生态学杂志*, 2001, 13(1): 58-59, 51.
- [7] 易丹辉. *Statistica 6.0 应用指南*[M]. 北京: 中国统计出版社, 2002. 163-252.

(责任编辑:李春丽)

《江南大学学报(自然科学版)》

征稿、征订启事

《江南大学学报(自然科学版)》(双月刊)是由教育部主管、江南大学(国家“211工程”重点建设高校)主办的自然科学类学术期刊。本刊主要刊载通信与控制工程、信息工程、机械工程、产品系统设计理论、纺织工程、应用化学、材料工程、土木工程、数理科学等学科的学术论文、研究报告,反映学科前沿研究动态的高质量综述。

本刊优先刊登国家自然科学基金和省部级及其以上科研项目析出论文,同时发表与企业及生产实际密切相关的应用性研究成果。热忱欢迎广大高校教学、科研人员及相关领域的学者,在读硕士、博士研究生赐稿。

本刊为A4开本,128页,每册订价8.00元;全年共6期,48.00元;本刊邮发代号:28-189,全国各地邮局均可订阅;亦可向本刊编辑部直接订购。本刊可破季订阅。热忱欢迎广大读者订阅本刊。

地址:江苏省无锡市蠡湖大道1800号 邮编:214122

电子邮箱:xbzrkx@sytu.edu.cn

电话:0510-85913519