

直投式泡菜乳酸菌发酵剂冷冻保护的研究

申彤, 姜雷, 杨洁

(新疆大学生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830064)

摘 要: 以蔗糖、甘露醇、山梨醇、麦芽糖、谷氨酸钠为保护剂对筛自泡菜的嗜酸乳杆菌 S1 的冻干保护效果进行研究, 结果表明, 乳糖为最佳保护剂, 菌体存活率可达到了 70% 以上, 其次是麦芽糖、山梨醇、蔗糖、甘露醇。对冻干前后及未加保护剂的菌体作电镜观察表明, 所选保护剂对菌体有很好的保护作用。

关键词: 冻干保护; 乳酸菌; 乳糖

Study on Freeze-dried Protection on *L. acidophilus* Isolated from Chinese Sauerkraut Juice

SHEN Tong, JIANG Lei, YANG Jie

(College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830064, China)

Abstract: Experiments of Freeze-dried protection on S1 (*Lactobacillus acidophilus*) isolated from the Chinese Sauerkraut juice with sucrose, lactose, mannitol, sorbitol, maltose, and sodium glutamate as protectants, showed that the best protection agent is lactose. The S1 survival rate is more than 70%, secondly is maltose, sorbitol, sucrose and mannitol. The electron microscopis observations showed that the protection agent chosen has good protection function on the bacteria.

Key words freeze-dried protection; lactic acid bacteria; lactose

中图分类号: Q939.11

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)05-0106-03

酸泡菜为蔬菜的主要加工方式之一, 历史悠久, 风味独特, 深受众多消费者的喜爱, 且主导发酵的乳酸菌往往是益生菌, 其代谢产物及菌体本身对人体有保健作用, 因此乳酸菌除应用于相当成熟的乳制品工业外, 近年来与乳酸菌相关的产品研究开发越来越多, 如植物原料的乳酸发酵饮料、青贮饲料、乳酸发酵肉制品、乳酸菌素片等, 以往采用自然发酵方式的酸泡菜, 也开始采用纯种乳酸菌或混合菌种发酵, 以保证安全正常的生产和优良可口的风味^[1]。在应用乳酸菌时都需要大量的菌种, 乳酸菌营养要求复杂, 较难保存, 为了生产和管理方便, 可仿效乳品行业, 也制成直投式乳酸菌发酵剂(DVS, Direct Vat Set), 既可方便生产, 减少污染, 也适合于不同规模的工厂以及家庭、餐饮行业使用。目前, 国内较大规模的酸牛奶生产厂家逐渐遗弃了传统的发酵剂, 而代之以一次性直投式乳酸菌菌种。真空冷冻干燥技术在应用于食品工业, 它适宜于热敏性及易氧化性物质的干燥。被干燥的物料能保持原有的形态, 复水后易恢复原有的特性, 利用该方法制备的乳酸菌干燥品具有便于贮藏, 携带方便, 复水性

好等许多优点。但是, 要制备出单位重量含活菌数高, 复水后活力强的高效浓缩型乳酸菌发酵剂的粉状制品, 必须降低冷冻干燥过程对乳酸菌细胞膜的损伤作用^[2]。据资料报道, 将乳酸菌培养液直接进行冷冻干燥, 细菌存活率仅有 10%~30% 左右, 若将乳酸菌细胞悬浮于适宜的介质中进行冷冻干燥, 乳酸菌的存活率可达到 70% 以上^[3]。本研究以筛自泡菜汁的嗜酸乳杆菌 S1 为供试菌, 确定了适合的离心条件和适宜的冷冻干燥介质, 以降低冷冻干燥过程中对菌体的损伤。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 乳酸菌种

乳酸菌 S1 (*Lactobacillus acidophilus*) 微生物实验室分离和保藏。

1.1.2 MRS 琼脂计数培养基

1.1.3 抗冷冻化合物

乳糖、蔗糖、甘露醇、山梨醇、甘油、麦芽糖、

收稿日期: 2005-07-28

作者简介: 申彤(1971-), 女, 讲师, 硕士研究生, 主要从事生物工程的研究。



谷氨酸钠。

1.2 仪器与设备

贺利式离心机(Heraeus)、超低温冰箱、冷冻干燥机 CHRIST ALPHA 1-型、M200 日立牌电镜扫描仪、手提式高压蒸汽消毒器、电子秤 ACS-6C 型。

1.3 方法

1.3.1 研究工艺路线

乳酸菌增殖培养基→灭菌→冷却→接种 S1 菌→离心分离→加保护剂→预冷冻→冷冻干燥→检验^[4]

1.3.2 乳酸菌增殖

选用改良的 MRS 培养基对 S1 菌进行增殖培养, 经过 35℃, 16h 培养, 使培养液菌数达到 10^9 个/ml。

1.3.3 离心分离

为使菌体与培养液分离, 以免有害代谢产物的影响, 并达到冷冻干燥需要的含菌量, 对培养液进行离心分离, 选择四组离心条件进行对照实验, 对菌泥进行计量, 并对菌泥中的活菌进行计数, 以做出合理的选择。

1.3.4 菌悬液的制备

将 S1 菌培养液, 分装于离心管中, 在贺利式离心机(Heraeus)中, 4℃, 以 4000r/min, 离心 20min, 弃去上清液, 在菌泥中分别加入配制并灭菌后的保护剂, 体积比为菌泥:保护剂 1:3, 菌悬液配制好后进行活菌计数。

1.3.5 预冷冻

取 1ml 菌悬液加入小干燥瓶中, 将胶塞盖上, 放入超低温冰箱, -40℃下, 24h 预冻。

1.3.6 冷冻干燥

-60℃, 0.001mbar, 干燥 16h。

1.3.7 产酸能力的测定

为测定冷冻干燥后, 乳酸菌的产酸能力, 选择泡菜及乳酸发酵饮料常用的蔬菜胡萝卜为测试原料。

配胡萝卜汁:

菜水比 1:3, 将胡萝卜清洗切片, 加水煮至 20min, 打浆, 最后 115℃, 15min 灭菌备用。

1.3.8 接种后培养产酸

从复水后的菌液中移取 1ml 的菌液至灭好菌的胡萝卜汁中, 于 37℃培养 16h。

1.3.9 用滴定法测定发酵胡萝卜汁的酸度。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌养液离心条件的选择

根据乳制品乳酸菌的研究资料, 选择四种离心条件加以考察, 检测离心后菌泥的质量, 菌泥中的活菌数,

表 1 离心条件筛选实验结果

Table 1 The result screening on centrifugal condition

实验号	转速 (r/min)	时间 (min)	离心后菌泥的质量 (g)	菌落总数 (CFU/ml)
1 [#]	4000	10	0.073	1.4×10^9
2 [#]	6000	10	0.150	2.7×10^9
3 [#]	4000	20	0.184	5.3×10^9
4 [#]	6000	20	0.166	1.6×10^9

确定最佳离心条件。

从离心后菌泥的质量可以看出 $3^{\#} > 4^{\#} > 2^{\#} > 1^{\#}$, 但不能确定在此离心条件下得到的菌体受到的机械损伤的情况, 于是将上述离心管中的菌泥稀释后进行活菌计数, 结果表明 $3^{\#}$ 的离心条件下, 活菌数最多, 这和离心出菌泥量一致, 说明在此条件下离出的菌泥量最多, 而且离心对细胞的损伤小, 活菌数也最多, 因此确定离心条件为 20min, 4000r/min。

2.2 乳酸菌抗冻干保护剂的选择

冻干保护剂可分为两种: 一是小分子量的化合物, 如氨基酸、有机酸、低分子的糖类和糖醇类等; 二是大分子的物质, 如蛋白质、多糖、聚乙烯吡咯烷酮和其他的合成聚合物等^[4]。本研究选择的保护剂为较常见的: 乳糖、蔗糖、甘露糖、山梨醇、甘油, 麦芽糖, 谷氨酸钠, 以及加一个空白作对照。从表 2 的实验数据可以看出, 各种冻干保护剂对不同保护作用有一定差异, 其中乳糖的保护作用最为显著, 冻干后的活菌数仍然可以达到 3.8×10^9 , 存活率达到 70% 以上, 因此通过活菌计数的方法, 可以选择乳糖作为菌株 S1 的冻干保护剂。

表 2 冻干保护剂的筛选试验结果

Table 2 The result screened on protection agent

冻干保护剂	浓度 (W/W)	冻干前菌数 (CFU/ml)	冻干后菌数 (CFU/ml)	存活率 (%)
乳糖	5%	5.0×10^9	3.5×10^9	71.6
	10%	5.0×10^9	3.8×10^9	76.0
蔗糖	5%	5.0×10^9	2.8×10^9	57.4
	10%	5.0×10^9	2.9×10^9	58.6
甘露糖	5%	5.0×10^9	2.8×10^9	56.0
	10%	5.0×10^9	2.8×10^9	57.4
山梨醇	5%	5.0×10^9	3.1×10^9	63.2
	10%	5.0×10^9	3.0×10^9	60.8
麦芽糖	5%	5.0×10^9	3.3×10^9	66.8
	10%	5.0×10^9	3.4×10^9	69.6
谷氨酸钠	5%	5.0×10^9	2.6×10^9	52.0
	10%	5.0×10^9	2.5×10^9	50.2
空白(生理盐水)	0.7%	5.0×10^9	2.0×10^9	40.0

2.3 冻干保护剂对菌体产酸能力的影响

乳酸菌在冷冻干燥过程中, 除发生致死损伤外, 还会发生生理损伤, 使其代谢特性发生变化, 产酸能

表3 冻干保护剂对菌体产酸能力的影响

Table 3 The effect of protection agent on the ability of producing acid of bacteria

保护剂	乳糖		蔗糖		甘露糖		山梨醇		麦芽糖		谷氨酸钠		空白(生理盐水)
浓度(W/W)	5%	10%	5%	10%	5%	10%	5%	10%	5%	10%	5%	10%	0.75%
酸度(g/L)	18.90	23.14	23.41	18.27	15.57	15.03	16.47	20.71	16.47	19.53	18.9	20.97	14.4

力下降,因此在筛选保护剂时,除采用菌落总数作为可靠的评价指标外还应测定保护剂对菌体产酸能力的影响具体结果见表3。表3的结果表明,冻干保护剂对乳酸菌S1的产酸力有一定影响,本试验选取发酵16h为测定时间,结果使各试验组的酸度无明显差异,其原因是受伤的菌体在短时间得以修复而恢复了产酸力,从另一侧面也说明真空冷冻干燥法对菌体的破坏性损伤很小,产酸力与菌存活率之间有一定的相关性。以乳糖为保护剂的产酸力也较高,结合菌落计数的试验结果最终确定乳糖为乳酸菌S1的最佳保护剂^[5]。

2.4 电镜观察

对未冷冻干燥前的S1菌、干燥后未加保护剂的S1菌及加入乳糖保护剂的S1菌作透射电镜观察,结果见图1、2、3。

从图片中可以看出,冻干时若有良好的保护基质,菌体的形态可以保持不变或变化很小,未加任何保护剂的菌体表面不圆整,细胞壁有明显的断裂现象,细胞质皱缩与壁分离,细胞解体,镜检时发现大量细胞残片(见图3)。以乳糖为保护剂的菌体表面

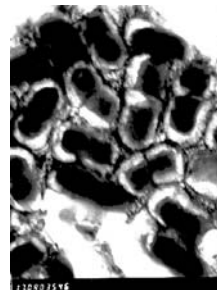


图3 未加保护剂的透射电镜图

Fig.3 The morphology of transmission electron microscope not adding protection agent

光滑圆整,细胞外形受到的冻干影响较小,很好保持了未干燥前菌体的形态(见图2),菌体干燥后存活率较高。

3 结论

3.1 在4000r/min 20min的离心条件下,离出的菌泥量最多,计算出的活菌数也最多,因此确定离心条件为4000r/min 20min。

3.2 对乳糖、蔗糖、甘露糖、山梨醇、麦芽糖,谷氨酸钠的冷冻保护效果的比较研究表明,乳糖的冻干保护效果最好,其次为麦芽糖、山梨醇。

3.3 观察以乳糖为保护剂的冻干的菌体形状变化不大,而未加保护剂的冻干菌体损伤严重,出现中间断裂、菌体溶解的现象,表明所选保护剂在菌体冷冻干燥过程中所起的作用确实很明显。

参考文献:

- [1] 陈仲翔,董英.泡菜工业化生产的研究进展[J].食品科技,2004,(4):33-35.
- [2] 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.
- [3] 刘宇峰,等.直接使用型酸奶发酵剂的研制[J].中国乳品工业,1995,23(6):274-279.
- [4] 袁亚宏,岳田利,高振鹏,等.冻干高活力乳酸菌粉保护剂的研究[J].西北农林科技大学学报,2003,31(10):82-88.
- [5] 谭周进,肖克宇,肖启明,等.乳酸菌计数培养基和培养方法的筛选[J].湖南农业大学学报,2001,27(5):98-100.
- [6] 张建国,等.乳酸菌冻干伤害与保护[J].食品工业科技,2003,(1):103-105.
- [7] 吕加平,骆承庠.乳酸菌发酵剂冻干保护剂筛选及应用的研究[J].东北农业大学学报,1998,29(4):371-379.

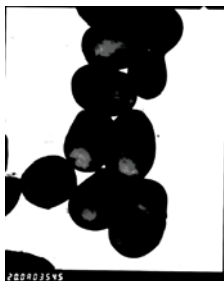


图2 乳糖为保护剂的透射电镜图

Fig.2 The morphology of transmission electron microscope using lactose as protection agent