

海藻酸钠固定瑞士乳杆菌条件优化

郭宇星¹, 潘道东^{1,2,*}, 刘洋¹, 王翠翠¹

(1.南京师范大学金陵女子学院, 江苏 南京 210097; 2.宁波大学海洋学院, 浙江 宁波 315211)

摘要:采用海藻酸钠固定瑞士乳杆菌, 制备具有血管紧张素转化酶(ACE)抑制活性的酸乳, 通过单因素试验和 $L_9(3^4)$ 正交试验确定其最优固定条件。结果表明, 最优固定条件是1.5g/100mL海藻酸钠溶液、菌液浓度1:10(m/V)、0.1mol/L CaCl_2 溶液、固定时间1h。将固定化的瑞士乳杆菌与传统酸乳发酵剂(保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌)复配接入到11g/100mL牛乳中, 在37℃条件下发酵至凝乳, 凝乳时间为8h, pH值为4.2, 凝乳状态好, 口感柔和、细腻, 成品酸乳ACE抑制活性为70.3%。

关键词:固定化; 海藻酸钠; 瑞士乳杆菌; 血管紧张素转移酶抑制活性

Optimization of Conditions for Immobilization of *Lactobacillus helveticus* Using Sodium Alginate

GUO Yu-xing¹, PAN Dao-dong^{1,2,*}, LIU Yang¹, WANG Cui-cui¹

(1. Ginling College, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China;

2. School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: In this study, *Lactobacillus helveticus* was immobilized using sodium alginate and used to product yogurt with ACE inhibitory activity. As determined using one-factor-at-a-time method in combination with an $L_9(3^4)$ orthogonal array design, the optimal immobilization conditions were sodium alginate concentration 1.5 g/100 mL, cell concentration 1:10 (m/V), CaCl_2 concentration 0.1 mol/L, and immobilization time 1 h. The immobilized strain and traditional yogurt starter consisting of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* were used together to ferment 11 g/100 mL milk power solution at 37 °C until coagulation was completed. Good coagulation was achieved after 8 h of fermentation. The pH of the yogurt obtained with a gentle and smooth taste was 4.2 and the ACE inhibitory activity 70.3%.

Key words: immobilization; sodium alginate; *Lactobacillus helveticus*; ACE inhibiting activity

中图分类号: TS252.54

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)05-0188-05

血管紧张素转化酶(angiotensin-I converting enzyme, EC3.4.15.1, ACE)抑制肽指的是一类具有抑制ACE活性的肽类物质。ACE抑制肽在人体血压调节过程中起着重要的生理作用, 所以又被称之为降血压肽。来源于乳蛋白的ACE抑制肽, 其降压效果虽不及合成药物强烈, 但无副作用, 安全可靠^[1-6]。乳源ACE抑制肽主要是乳蛋白质水解物和一些乳酸菌发酵乳制品, 在众多乳酸菌中, 瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus*)蛋白水解能力较强, 制作的酸乳含有高活性的ACE抑制肽^[7]。如Nakamura等^[8-9]用*Lactobacillus helveticus*和*Saccharomyces cerevisiae*作为发酵剂制作了一种名为Calpis的酸

乳饮料, 原发性高血压小鼠(SHR)长期服用Calpis后, 可抑制血压上升。Yamamoto等^[10]报道从瑞士乳杆菌CPN4菌株的发酵乳中分离到具有抑制ACE活性及降高血压功能的乳蛋白水解肽。在国内, 潘道东等^[11-12]采用瑞士乳杆菌JCM1004制备酸乳, 并且从酸乳中分离到ACE抑制肽, 通过SHR动物实验表明此发酵乳抗血压升高的作用比较显著。

海藻酸钠是由 α -L-古洛糖醛酸钠(α -L-gulonate, 简称G)和 β -D-甘露糖醛酸钠(β -D-mannuronate, 简称M)1、4连接的长链线性多糖, 海藻酸盐分子链G块容易与 Ca^{2+} 作用, 2条分子链G块间形成一个洞, 结合 Ca^{2+}

收稿日期: 2011-06-29

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31101314); 江苏省自然科学基金项目(BK2011787);

江苏省教育厅高校自然科学基金项目(10KJB550003);

南京师范大学特聘教授、高层次人才科研启动基金项目(184070H2B08)

作者简介: 郭宇星(1981—), 女, 讲师, 博士, 研究方向为乳品科学。E-mail: yuxingguo1981@yahoo.com.cn

*通信作者: 潘道东(1964—), 男, 教授, 博士, 研究方向为乳品科学。E-mail: daodongpan@163.com

外形形成蛋盒模型, 形成热不可逆凝胶, 具有较好的生物相容性和生物可降解性, 从而将瑞士乳杆菌固定化在凝胶网络中^[13]。瑞士乳杆菌固定化后可重复使用, 并可实现连续化或半连续化发酵生产 ACE 抑制肽^[14-18]。

本实验采用海藻酸钠包埋法将瑞士乳杆菌固定, 采用单因素与正交试验确定海藻酸钠固定瑞士乳杆菌的最优工艺条件, 以固定化瑞士乳杆菌为发酵剂制备高活性降血压肽酸乳, 旨在为降血压肽的高效制备提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 菌种与试剂

瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus*)15019 本实验室筛选保藏; 海藻酸钠 成都市科龙化工试剂厂; Hip-His-Leu 美国 Sigma 公司; 传统酸乳发酵剂(保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌) 市售; 其他试剂均购自上海久亿化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

SA-910 型超净工作台 上海上净净化设备有限公司; PHS-3C 精密 pH 计 上海雷磁仪器厂; 紫外-可见分光光度计 上海棱光技术有限公司; CL-22M 高速冷冻离心机 赛特湘仪离心机仪器有限公司; 立式压力蒸汽灭菌器 上海博迅实业有限公司医疗设备厂; HH-S11-2 电热恒温水浴锅 北京长安科学仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 海藻酸钠固定瑞士乳杆菌单因素条件研究

1.3.1.1 海藻酸钠质量浓度的选择

以海藻酸钠质量浓度 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0g/100mL 的海藻酸钠分别对瑞士乳杆菌进行固定化, 0.100mol/L CaCl_2 作为聚凝剂, 固定时间为 2h, 菌液浓度 1:10, 观察其成珠状况。以固定化瑞士乳杆菌酸乳凝乳时间、凝乳状态为评价指标, 确定最佳海藻酸钠溶液质量浓度。

1.3.1.2 CaCl_2 溶液浓度的选择

以浓度为 0.050、0.075、0.100、0.125、0.150mol/L 的 CaCl_2 溶液作为聚凝剂, 1.5g/100mL 海藻酸钠为载体, 菌液浓度 1:10, 固定化时间为 2h 进行瑞士乳杆菌固定化, 观察其成珠状况。以固定化瑞士乳杆菌酸乳凝乳时间、凝乳状态为评价指标, 确定最佳 CaCl_2 溶液浓度。

1.3.1.3 固定时间的选择

以 1.5g/100mL 海藻酸钠为载体, 0.100mol/L CaCl_2 作为聚凝剂, 菌液浓度 1:10, 对瑞士乳杆菌分别固定 0、0.5、1.0、1.5、2.0h。以固定化瑞士乳杆菌酸乳凝乳时间、凝乳状态为评价指标, 确定最佳的固定化时间。

1.3.1.4 瑞士乳杆菌菌液浓度的选择

选取菌液浓度 1:5、1:10、1:15、1:20、1:25、

1:30 的瑞士乳杆菌菌液, 以 1.5g/100mL 的海藻酸钠为载体, 0.100mol/L CaCl_2 作为聚凝剂, 对瑞士乳杆菌固定 1h。以固定化瑞士乳杆菌酸乳凝乳时间、凝乳状态为评价指标, 确定最佳的瑞士乳杆菌菌液浓度。

1.3.2 海藻酸钠固定瑞士乳杆菌条件优化

以海藻酸钠溶液质量浓度、 CaCl_2 溶液浓度、固定时间和瑞士乳杆菌菌体浓度做四因素三水平正交试验 ($L_9(3^4)$), 以固定化瑞士乳杆菌酸乳凝乳时间为评价指标, 确定各因素对结果的影响大小, 选出最优的固定方法, 每个试验做 3 组平行。

1.3.3 固定化瑞士乳杆菌制备富含 ACE 抑制肽酸奶

按照优化的海藻酸钠固定化条件制备固定化瑞士乳杆菌, 与传统酸乳发酵剂(保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌)复配制备 ACE 抑制肽酸乳。采用 Minitab 14 软件进行双因子方差分析和主成分分析观察固定化瑞士乳杆菌和传统酸乳发酵剂对发酵酸乳感官、凝乳时间、pH 值及 ACE 抑制活性的影响。

将乳粉配制成 11g/100mL 的复原乳, 按一定比例接入酸乳发酵剂, 37℃ 培养至凝乳取出, 测定酸乳的凝乳时间、终产品 pH 值、ACE 抑制活性、感官评分。酸乳发酵剂分 4 组: A 组: 未固定瑞士乳杆菌; B 组: 固定化瑞士乳杆菌; C 组: 未固定瑞士乳杆菌+传统酸乳发酵剂; D 组: 固定化瑞士乳杆菌+传统酸乳发酵剂, 发酵剂总接种量都为体积分数 3%。每组实验做 3 组平行。

1.4 瑞士乳杆菌菌体制备

将瑞士乳杆菌菌体冻干粉(−80℃ 冷藏)接种于 MRS 培养基, 连续活化 3 代, 按 3mL/100mL 接种量接种于 1L MRS 培养基中, 37℃ 条件下扩大培养至生长对数期取出, 4℃、4500r/min 离心 20min 收集菌体沉淀。用 50mmol/L Tris-HCl(pH7.1)缓冲液洗涤菌体, 4℃、4500r/min 离心 20min 弃上清液, 重复洗涤 3 次, 收集菌体备用。

1.5 海藻酸钠固定瑞士乳杆菌

取一定量的瑞士乳杆菌菌液加入到一定质量浓度的海藻酸钠溶液中, 用无菌玻璃棒搅拌均匀, 静置片刻, 用 10mL 注射器吸取混合液, 以 10cm 左右的高度逐滴注入到一定浓度的 CaCl_2 溶液中, 形成胶珠, 浸泡一段时间使之固定化, 然后取出用无菌生理盐水洗去胶珠表面的 CaCl_2 溶液, 于 4℃ 冰箱中贮存备用。

1.6 酸乳的制备

将 11g 乳粉缓慢加入到 100mL 温度为 50~60℃ 的热水中, 加热至 95℃, 保温 20min 进行杀菌处理, 降至室温备用。将发酵剂接入到 11g/100mL 复原乳中, 于 37℃ 恒温发酵至凝乳, 记录凝乳时间, 观察凝乳状态, 测

定酸乳 pH 值, 进行感官评分, 测定酸乳 ACE 抑制肽活性。

1.7 指标测定

1.7.1 酸乳 pH 值测定

采用 pH 计进行精确测量。

1.7.2 感官评定方法

以口感、组织状态、凝乳状态为感官评定指标。由于这三者在评定酸乳产品质量中的重要性有所不同, 故分别对其赋予不同的权重: 口感 30%, 组织状态 30%, 凝乳状态 40%。由 8 位具有感官评定经验的评价人员进行评定, 满分为 100 分, 具体感官评定标准参照表 1。

表 1 感官评定标准
Table 1 Sensory evaluation standards

指标	评分细则	分值段	分值	喜欢程度
口感	滋味纯正, 口感细腻润滑	20~30		
组织状态	无或少量乳清析出, 均匀细腻	20~30	70~100	很喜欢
凝乳状态	产品均匀一致, 表面柔滑晶莹, 无乳清析出或有微量析出	30~40		
口感	口感粗糙, 尚能接受	10~19		
组织状态	有乳清析出, 均匀细腻	10~19	40~67	较喜欢
凝乳状态	表面柔滑, 少量乳清析出	20~29		
口感	难以接受	0~9		
组织状态	有大量乳清析出, 有大块颗粒状凝块	0~9	0~37	不喜欢
凝乳状态	表面粗糙, 大量乳清析出	0~19		

1.7.3 ACE 抑制活性测定

采用 Cushman 等^[9]的方法, 用含有 0.3mol/L NaCl 的 0.1mol/L 硼酸盐缓冲液(pH8.3)将 Hip-His-Leu 配成 5.0mmol/L 的溶液。在 10mL 试管中加入 200μL 的 5.0mmol/L Hip-His-Leu 溶液和 200μL 样品, 于 37℃ 保温 3min 后, 再加入 20μL ACE 溶液(溶解于蒸馏水中, 活力为 0.1U/mL), 混匀后在 37℃ 保温 30min, 再加入 250μL 的 1.0mol/L 盐酸溶液以终止反应, 再加入 1.7mL 醋酸乙酯, 经 15s 振荡混匀后, 静置 5min, 用移液管吸取 1.0mL 醋酸乙酯层, 120℃ 烘箱烘干, 加入 1.0mL 蒸馏水, 混匀后在 228nm 波长处测定吸光度。

$$\text{ACE 抑制活性} / \% = \frac{B-A}{B} \times 100$$

式中: A 为添加 ACE 抑制肽时, ACE 和 Hip-His-Leu 反应的吸光度; B 为不添加 ACE 抑制肽时, ACE 和 Hip-His-Leu 反应的吸光度。

2 结果与分析

2.1 海藻酸钠固定化瑞士乳杆菌单因素条件研究

2.1.1 海藻酸钠质量浓度的选择

表 2 海藻酸钠溶液质量浓度对成珠状况的影响

Table 2 Effect of sodium alginate concentration on microcapsule formation

海藻酸钠质量浓度/(g/100mL)	成珠状况
1.0	成珠很容易, 很软, 强度很低
1.5	成珠容易, 强度适中
2.0	成珠较容易, 较硬, 强度较高
2.5	成珠较难, 强度高
3.0	成珠困难, 强度太高

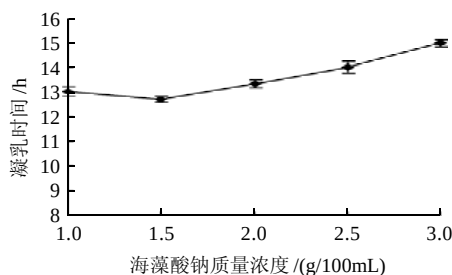


图 1 海藻酸钠溶液质量浓度对固定化瑞士乳杆菌活力的影响

Fig.1 Effect of sodium alginate concentration on coagulation activity of immobilized *Lactobacillus helveticus*

海藻酸钠溶液浓度会影响所成胶珠的大小, 从而影响成胶强度和发酵速度。表 2 和图 1 结果表明, 海藻酸钠溶液质量浓度为 1.0g/100mL 时, 凝乳时间较短, 该质量浓度时成珠较易, 但成珠太软, 易破裂; 海藻酸钠溶液质量浓度为 1.5g/100mL 时, 凝乳时间最短, 其成珠也较容易, 且胶珠强度适中, 说明此时固定化瑞士乳杆菌活力较高; 海藻酸钠溶液质量浓度大于 1.5g/100mL 时, 发酵速度变慢, 凝乳时间延长, 成珠也越困难, 强度高, 不利于生产使用。由此可见, 海藻酸钠质量浓度太小, 凝胶的孔径较大, 固定化菌体容易流失, 固定化效率不高, 所以酸乳凝乳时间长。而当海藻酸钠质量浓度过高, 溶液黏性增强, 固定化操作不便, 且成珠困难, 而且海藻酸钠浓度越大, 凝胶的孔径越小, 瑞士乳杆菌菌体和底物的接触几率越小。所以综合考虑凝乳时间、成珠状况, 瑞士乳杆菌固定化选用质量浓度 1.5g/100mL 的海藻酸钠溶液包埋为宜。

2.1.2 CaCl₂ 溶液浓度的选择

表 3 CaCl₂ 溶液浓度对成珠状况的影响

Table 3 Effects of CaCl₂ concentration on microcapsule formation

CaCl ₂ 溶液浓度/(mol/L)	成珠状况
0.050	成珠很容易, 强度很低
0.075	成珠容易, 强度适中
0.100	成珠容易, 较硬, 强度较高
0.125	成珠较难, 强度高
0.150	成珠困难, 很硬, 强度太高

CaCl₂ 溶液的浓度影响凝胶珠的凝固时间以及凝胶珠的表面强度。CaCl₂ 中的钙离子与海藻酸根离子螯合形成不溶于水的海藻酸钙凝胶, 从而将细胞固定。表 3 和

图2结果表明,用浓度为0.1mol/L CaCl_2 溶液作为聚凝剂时成珠容易,硬度适中,凝乳时间较短。随着 CaCl_2 浓度的增加,酸乳凝乳时间变长,说明固定化瑞士乳杆菌活力较低,可能是由于盐的高渗透压作用引起细胞脱水,致使微生物活性部分丧失,也可能由于过高的 CaCl_2 浓度使得海藻酸钠网格状结构致密,使底物向内扩散和产物向外扩散变得更加困难,表现为凝乳时间变长。 CaCl_2 量太少又会导致凝胶强度太小,包埋不完全,从图中也可以看到, CaCl_2 浓度小于0.1mol/L 时,酸乳凝乳时间较长。综合考虑成珠状况以及凝乳时间,瑞士乳杆菌固定化采用0.1mol/L CaCl_2 作为聚凝剂为宜。

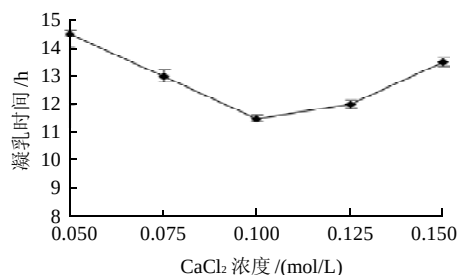


图2 CaCl_2 溶液浓度对固定化瑞士乳杆菌活力的影响
Fig.2 Effect of CaCl_2 concentration on coagulation activity of immobilized *Lactobacillus helveticus*

2.1.3 固定时间的选择

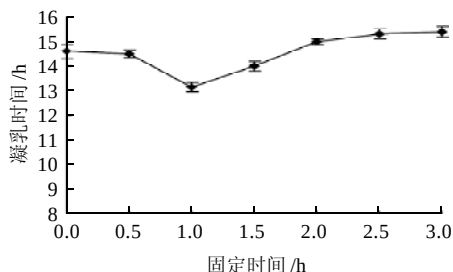


图3 固定时间对固定化瑞士乳杆菌活力的影响
Fig.3 Effect of immobilization duration on coagulation activity of immobilized *Lactobacillus helveticus*

海藻酸钠在 CaCl_2 溶液中交联的时间长短也会对固定化瑞士乳杆菌细胞活性产生影响。由图3可见,固定时间小于1h 时,由于固定时间太短,凝胶强度太小,包埋不完全,瑞士乳杆菌活力较低,表现为酸乳凝乳时间较长。固定时间为1h 时,凝胶小球强度合适,凝乳时间最短,说明此时瑞士乳杆菌包埋量最适。当固定时间继续延长时,酸乳凝乳时间反而下降,而且所得固定化凝胶小球的强度越高,说明凝胶小球内部的结构紧密,不利于基质的传递,从而使细胞失活率增大。这与唐三三等^[20]报道的相一致,海藻酸钠与 CaCl_2 形成凝胶是 Ca^{2+} 通过海藻酸钠胶囊由外向内置换 Na^+ 而形成海藻酸钙,因而需要一定量的置换时间,但如果固定化时间太长,交联程度高,形成的凝胶结构太紧密,从而影响到反应速率。

2.1.4 瑞士乳杆菌菌液浓度的选择

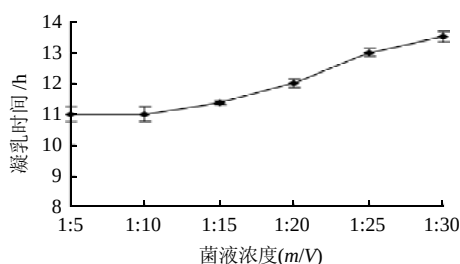


图4 瑞士乳杆菌菌液浓度的选择
Fig.4 Effect of *Lactobacillus helveticus* cell concentration on its coagulation activity

由于海藻酸钙小球容积一定,瑞士乳杆菌菌体包埋量也是一定的。由图4可知,当瑞士乳杆菌菌液浓度为1:10 时,酸乳凝乳时间最短,此时再增加瑞士乳杆菌菌体,凝乳时间也不再变化,说明在此实验条件下瑞士乳杆菌饱和菌液浓度为1:10。

2.2 固定化瑞士乳杆菌条件优化

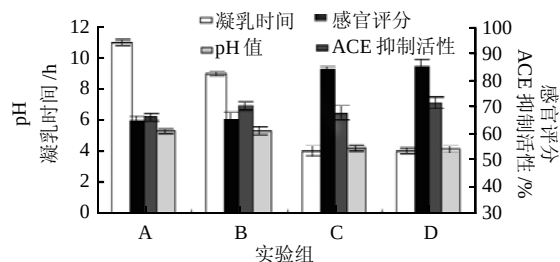
表4 $L_9(3^4)$ 正交试验表

Table 4 $L_9(3^4)$ orthogonal experimental design table

试验号	A 海藻酸钠溶液质量浓度 / (g/100mL)	B CaCl_2 溶液浓度 / (mol/L)	C 固定时间 / h	D 菌液浓度	凝乳时间 / h
1	1(1.0)	1(0.05)	1(1)	1(1:10)	10.5 ± 0.21
2	1	2(0.10)	2(2)	2(1:20)	11.5 ± 0.15
3	1	3(0.15)	3(3)	3(1:30)	12.5 ± 0.15
4	2(1.5)	1	3	3	13.5 ± 0.12
5	2	2	1	1	10.0 ± 0.13
6	2	3	2	2	11.0 ± 0.15
7	3(2.0)	1	2	2	11.5 ± 0.12
8	3	2	3	3	12.0 ± 0.10
9	3	3	1	1	11.2 ± 0.17
k_1	11.500	11.833	11.167	10.567	
k_2	11.500	11.167	12.067	11.333	
k_3	11.567	11.567	11.333	12.667	
R	0.067	0.666	0.900	2.100	

从表4可知,各因素对固定化瑞士乳杆菌发酵酸乳凝乳时间影响的主次顺序依次为: $D > C > B > A$, 即菌液浓度 > 固定时间 > CaCl_2 溶液浓度 > 海藻酸钠溶液质量浓度。最优固定化瑞士乳杆菌条件为 $A_1B_2C_1D_1$ 和 $A_2B_2C_1D_1$, 在9组试验中,最优的固定化条件为 $A_2B_2C_1D_1$, 故进行验证实验,实验重复3次。在 $A_1B_2C_1D_1$ 条件下,固定化瑞士乳杆菌凝乳时间为 $(9.5 \pm 0.15)\text{h}$, 在 $A_2B_2C_1D_1$ 条件下凝乳时间为 $(10.0 \pm 0.15)\text{h}$ 。故最后确定海藻酸钠固定瑞士乳杆菌的条件为海藻酸钠溶液质量浓度 1.5g/100mL, CaCl_2 浓度 0.1mol/L, 固定化时间 1h, 瑞士乳杆菌菌液浓度 1:10。

2.3 固定化瑞士乳杆菌制备富含 ACE 抑制肽酸乳



注: A.未固定瑞士乳杆菌; B.固定化瑞士乳杆菌; C.未固定瑞士乳杆菌+传统酸乳发酵剂; D.固定化瑞士乳杆菌+传统酸乳发酵剂。

图5 海藻酸钠固定瑞士乳杆菌制备酸乳的凝乳实验

Fig.5 Comparison of properties of yogurts made using different fermentation starters

由图5可知,采用海藻酸钠固定瑞士乳杆菌制备的酸乳 ACE 抑制活性为 70.3%,与未固定化瑞士乳杆菌制备的酸乳 ACE 抑制活性相比有所提高。但用单一瑞士乳杆菌发酵酸乳,酸乳凝乳时间较长,凝乳状态不好,而且大量的乳清析出,而将瑞士乳杆菌与传统酸乳发酵剂进行复配发酵,酸乳凝乳时间缩短了近 4h,酸乳 pH 值由原来 5.3 降至 4.8,并且感官评分也较高,产品 ACE 抑制活性不受影响。从表 5 可以看到,瑞士乳杆菌有无固定化对酸乳 ACE 抑制活性有显著影响;而有无添加传统酸乳发酵剂对酸乳的感官评分和 pH 值有显著影响。综上,固定化瑞士乳杆菌对于酸乳的 ACE 抑制活性有较大影响,传统酸乳发酵剂对酸乳品质有较大影响,添加传统酸乳发酵剂可提高酸乳的凝乳时间、降低酸乳 pH 值、提高其感官品质。所以,采用固定化瑞士乳杆菌和传统酸乳发酵剂共同发酵,可制备出具有高 ACE 抑制活性,且感官品质良好的酸乳。

表5 凝乳实验双因子方差分析 P 值
Table 5 P-value obtained in two-way ANOVA

因子	感官评分	ACE 抑制活性	凝乳时间	pH 值
瑞士乳杆菌固定	0.258	0.023*	0.500	0.500
传统酸乳发酵剂	0.010*	0.066	0.105	0.028*

注: *. $P < 0.05$, 差异显著。

3 结 论

瑞士乳杆菌是近些年研究较多的用于制备 ACE 抑制肽的菌种,但采用游离瑞士乳杆菌不能连续生产 ACE 抑制肽,例如瑞士乳杆菌每次需活化、扩大培养后制成工作发酵剂才能使用;终产品分离提纯也较繁琐。因此,本实验通过单因素和正交试验确定了海藻酸钠固定瑞士乳杆菌的最优条件为:海藻酸钠溶液质量浓度 1.5g/100mL, CaCl_2 溶液浓度为 0.1mol/L,固定化时间为 1h,瑞士乳杆菌菌液浓度为 1:10,并得到影响海藻酸钠固定化瑞士乳杆菌条件的各因素主次顺序依次为:瑞士乳杆菌菌液浓度>固定时间> CaCl_2 溶液浓度>海藻酸钠溶液质量浓度。

以固定化瑞士乳杆菌为发酵剂制备高活性降血压肽酸乳,得到固定化瑞士乳杆菌制备富含 ACE 抑制肽酸乳的最佳工艺条件为:将乳粉配制成 11g/100mL 的复原乳,接入固定化瑞士乳杆菌和传统酸乳发酵剂,在 37℃ 培养至凝乳取出,凝乳时间为 8h, pH 值为 4.2,凝乳状态好,口感柔和、细腻, ACE 抑制活性为 70.3%。

综上,采用海藻酸钠固定瑞士乳杆菌制备高 ACE 抑制活性的酸奶是可行的,此项工作为降血压肽的高效制备提供了研究基础。后续工作将开展固定化瑞士乳杆菌生物反应器的研究,用于连续生产 ACE 抑制肽,这对功能性食品市场的开发具有一定的意义。

参考文献:

- [1] YAMAMOTO N, TAKANO T. Antihypertensive peptides derived from milk proteins[J]. Molecular Nutrition and Food Research, 1999, 43 (3): 159-164.
- [2] PIHLANTO-LEPPÄLÄ A. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides[J]. Trends in Food Science and Technology, 2001, 11(9/10): 347-356.
- [3] 吴玲, 潘道东. 发酵乳抗高血压特性的研究[J]. 食品科学, 2005, 26 (9): 446-459.
- [4] 吕桂善, 霍贵成. 乳及乳制品中的抗高血压活性肽[J]. 中国乳品工业, 2002, 30(5): 53-56.
- [5] 郭宇星, 陈庆森. 微生物发酵法制备乳源性 ACE 抑制肽的研究新进展[J]. 食品科技, 2003(3): 12-16.
- [6] 于志鹏, 赵文竹, 刘博群, 等. 血管紧张素转化酶抑制肽研究进展[J]. 食品科学, 2010, 31(11): 308-311.
- [7] 吴正钧, 叶锦, 郭本恒. 乳酸菌的抗高血压作用[J]. 乳业科学与技术, 2004, 27(1): 1-8.
- [8] NAKAMURA Y, YAMAMOTO N, SAKAI K, et al. Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk[J]. Journal of Dairy Science, 1995, 78(4): 777-783.
- [9] NAKAMURA Y, YAMAMOTO N, SAKAI K, et al. Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme[J]. Journal of Dairy Science, 1995, 78 (6): 1253-1257.
- [10] YAMAMOTO N, MAENO M, TAKANO T. Purification and characterization of an antihypertensive peptide from a yogurt-like product fermented by *Lactobacillus helveticus* CPN4[J]. Journal of Dairy Science, 1999, 82(7): 1388-1393.
- [11] 潘道东, 徐德闯, TANOKURA M. 瑞士乳杆菌 JCM 1004 发酵乳对高血压影响的研究[J]. 营养学报, 2005, 27(3): 253-255.
- [12] PAN Daodong, LUO Yongkang, TANOKURA M. Antihypertensive peptides from skimmed milk hydrolysate digested by cell-free extract of *Lactobacillus helveticus* JCM1004[J]. Food Chemistry, 2005, 91(1): 123-129.
- [13] 金锋. 微孔淀粉-海藻酸钠固定木瓜蛋白酶的研究[J]. 中国酿造, 2009(7): 83-85.
- [14] 施安辉. 利用固定化细胞连续发酵生产酸牛奶[J]. 生物工程学报, 1995, 11(2): 203-204.
- [15] 陈晔, 韩玉洁. 海藻酸钙固定化乳酸菌发酵制备 L-乳酸的研究[J]. 食品工业科技, 2008, 29(1): 98-101.
- [16] 贺银凤, 午日娜, 王建华. 乳酸菌的固定化方法及其发酵特性的研究[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(5): 16-18.
- [17] 王树宁, 刘玺, 潘润淑, 等. 乳酸菌固定化技术研究[J]. 山西食品工业, 1998(1): 25-29.
- [18] 赵春燕, 张颖, 王丹, 等. 乳酸菌细胞固定化发酵的研究进展[J]. 中国酿造, 2009(5): 11-14.
- [19] CUSHMAN D W, CHEUNG H S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung[J]. Biochemical Pharmacology, 1971, 20(7): 1637-1648.
- [20] 唐三三, 衣杰荣, 丁勇. 海藻酸钠法固定化酪氨酸酶的研究[J]. 湖南农业科学, 2009(6): 12-14.