



乳酸菌发酵降解牛骨粉的研究

向聪¹, 马美湖², 胡子骥¹

(1、湖南农业大学食品科学技术学院; 长沙 410128)

(2、华中农业大学食品科学技术学院; 武汉 430070)

摘要: 本实验利用两种乳酸菌发酵牛骨粉, 在不同时间下, 利用乳酸菌对不同浓度 and 不同粒度的骨粉进行发酵实验, 发现发酵后骨粉液中离子钙含量明显提高, 总结出在一定时间、一定骨粉浓度下乳酸菌发酵骨粉产生离子钙的最佳条件。研究结果显示, 在本实验条件下, 选用乳酸菌即保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌以 2:1 比例接种发酵骨粉液的最佳生产条件是蔗糖添加量 5%, 乳酸菌接种量 3%, 骨粉粒度 120 目, 接种骨粉浓度 20%。

关键词: 乳酸菌发酵; 骨粉; 牛骨利用; 离子钙; 氨基酸态氮;

On the Bone Paste Fermented by lactic Acid Bacteria

XIANG Cong¹, MA Mei-hu², HU Zi-ji¹

(1、College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128)

(2、College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract: In this experiment, two lactic acid bacteria are used to ferment bone paste. Bone paste with different concentrations and different granularities is fermented by lactic acid bacteria at different times, from which we can get a conclusion of the best conditions when the lactic acid bacteria fermented bone paste produce calcium ions at certain time and with certain concentrations of bone paste. The study on bone paste liquid fermented by lactic bacteria L.b:S.t=2:1 showed that the optimization of the manufacturing procedure: sugar concentration 5%, lactic bacteria 3%, diameter of bone powder 120, initial intakes of bone powder 20%.

Key words: Lactic bacteria; Fermentation; Bone utilization; Calcium ions; Amino acid nitrogen;

中图分类号: TS251.94 文献标志码: B 文章编号: 1001-8123 (2007)12-0031-06

0 前言

自 20 世纪 80 年代中期以来, 我国就成为世界上的畜牧养殖大国。据联合国粮农组织 (FAO) 统计, 2002 年中国畜禽屠宰数是水牛 4193 万头, 山羊及绵羊 22319 万头, 猪 57634 万头, 禽 913 万只。按骨骼占动物体的 11~27% 计算, 数量相当可观。

因此, 由于我国畜禽饲养量很大, 畜禽骨骼资源极其丰富, 数量极其巨大, 同时大量骨蛋白和骨钙被浪费, 对环境造成严重环境污染。开展对畜骨的利用研究, 具有重大的社会、经济和环保意义^[1]。

钙是骨骼组织的主要构成物, 而且在机体的生长发育过程中自始至终支持着整个机体结构,

项目: 国家“十一五”科技支撑重大专项“畜禽屠宰加工设备与骨血产品开发及产业化示范”(2006BAD05A16) 内容
作者简介: 向聪, 女, 1981 年—, 硕士研究生, 研究方向为畜产食品科学与生物技术。
通讯作者: 马美湖 mameihuh@yeah.com.cn

它不仅是机体完整性的一个不可缺少组成部分,而且在机体各种生理学和生物化学的过程中起着重要的作用^[2]。钙离子包括对血液凝固、对神经肌肉的兴奋性、细胞的粘着、神经冲动的传递、细胞膜功能的维持、酶反应的激活,以及激素的分泌等,都有决定性的影响^[3]。根据有关部门的调查发现,目前人体缺钙已成为一个全球性的问题,尤其是儿童、老人和孕妇的缺钙更为严重。所以,寻找一种有效的补钙产品或方法,对于消除因缺钙而导致的各种疾病,提高人的身体素质有重要意义^[4]。

鲜骨粉中含有人体所需的多种营养物质,除含有大量钙质,还含有大脑生长活动不可缺少的磷脂质、磷蛋白以及其它生命活动所需物质,如软骨素,骨胶原和多种氨基酸、维生素等。但是,如果直接应用骨粉,它的吸收率很有限。为了更有效的利用骨粉的营养成分,我们首先把骨粉制成培养液,然后接入乳酸菌经发酵使原有的化合钙即羟磷灰石 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})$ 变为易于机体吸收的离子钙,蛋白质部分转化为氨基酸^[5]。

乳酸菌的种类很多,它是一类具有很好保健作用的益生菌,具有调节人体胃肠平衡,增强人体免疫力,可用来提高动物机体的免疫力,提高其抗病性并能促进生长发育,延缓衰老等功能,无任何毒副作用和药物残留^[6]。在实验中我们选用了保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌这两种乳酸菌来发酵骨粉。乳酸菌利用鲜骨粉中的糖及其它成分进行生长代谢不断的产生乳酸,在酸性环境中钙离子溶解度会增大,更有利于吸收^[7]。当营养液为酸性时不但可以抑制肠道有害菌的生长繁殖,而且使口感也较好。此外这种酸性环境不利于不耐酸的微生物生长,可以延长骨粉产品及营养液的保存时间^[8]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

保加利亚乳杆菌(*Lactobacillus bulgaricus*, 下文简称A)、嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*, 下文简称B):由湖南农业大学食品科技学院微生物教研室提供。

1.1.2 主要原料和培养基

牛骨骨粉:1#(50目),2#(80目),3#(120目)由长沙市马王堆蔬菜批发市场提供。

脱脂乳活化培养基^[9]:脱脂牛乳100mL,碳酸钙0.05g,酵母膏5g;115℃,15min灭菌备用。

1.1.3 试剂,主要实验仪器和设备

分析试剂:柠檬酸氢二氨,磷酸氢二钾,NaOH,甲醛,EDTA,氰化钾,蔗糖

主要实验仪器和设备:不锈钢手提式蒸汽灭菌锅,电子分析天平,净化工作台,高速离心机,鼓风干燥箱,水浴恒温振荡器,恒温生化培养箱,高速中药粉碎机

1.2 实验方法

1.2.1 骨粉的制备工艺

新鲜牛骨→加热熬煮去脂→高压蒸煮(0.1MPa,40min)→去骨髓、骨油→风干(75℃,10h)→捣碎→粗磨→细磨→超微粉碎→过筛,分别获取3种直径的骨粉颗粒(1号50目,2号80目,3号120目)^[10]。

1.2.2 种子培养液的制备

成分^[11]:鲜骨粉15%、蔗糖5%、脱脂乳10%、蒸馏水70%。

制法:将上述各成分混合后,装入瓶内,121℃灭菌15min。

1.2.3 乳酸菌种的活化

将保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌分别接入脱脂乳培养基中,40.5℃温箱内培养6~10h,至脱脂乳凝固后置入冰箱备用,连续活化三次。

1.2.4 发酵液的制备

成分^[12]:鲜骨泥、蔗糖、蒸馏水。

1.2.5 菌种配比的筛选

在无菌操作台上吸取接种量为3%的乳酸菌菌种,分别将A菌、B菌、A:B=1:1、A:B=2:1和A:B=1:2的五种不同比例的菌种接入发酵液中并培养24h、48h和72h,并测定其离子钙和氨基酸态氮的含量,选取含量最高的做为以下实验的菌种。

1.2.6 乳酸菌发酵骨粉方法

将选取的菌种以3%的比例在无菌条件下接种于种子液内,于40.5℃温箱内培养24小时,然后把培养好的种子液接种于发酵液中(其发酵条件根据以下生产条件优化水平而定),于40.5℃温箱内培养24h,36h和48h后,依次进行离子钙含量和游离氨基酸含量的测定。以下生产条件优化试验均用此方法。

1.2.7 发酵骨粉液生产条件优化试验设计

本设计选乳酸菌接种量、蔗糖添加量、骨粉粒度、骨粉液浓度为4个因素,各取3个水平,乳酸菌接种量(3%、5%、8%),蔗糖添加量(3%、5%、8%),骨粉粒度(50目、80目、120目),骨粉浓度(10%、15%、20%),具体情况如下表1所示,

表1 乳酸菌发酵骨粉液生产条件优化水平

水平	因素			
	A/(%)	B/(%)	C/目	D/(%)
1	3	3	50	10
2	5	5	80	15
3	8	8	120	20

注:A为乳酸菌接种量,B为蔗糖添加量,C为骨粉粒度,D为骨粉浓度。(下表中均如此)

1.2.7.1 乳酸菌接种量的设计(乳酸菌的接种量为变量,其它因素不变)

表2 不同乳酸菌接种量发酵骨粉液生产条件优化水平

水平	因素			
	A/(%)	B/(%)	C/目	D/(%)
实验I组	3	5	120	15
实验II组	5	5	120	15
实验III组	8	5	120	15

1.2.7.2 蔗糖添加量的实验设计(蔗糖的添加量为变量,其它的因素为定量)

表3 不同蔗糖添加量发酵骨粉液生产条件优化水平

水平	因素			
	A/(%)	B/(%)	C/目	D/(%)
实验I组	3	3	120	15
实验II组	3	5	120	15
实验III组	3	8	120	15

1.2.7.3 骨粉粒度的实验设计(骨粉的粒度为变量,其它因素为定量)

表4 不同骨粉粒度发酵骨粉液生产条件优化水平

水平	因素			
	A/(%)	B/(%)	C/目	D/(%)
实验I组	3	5	50	15
实验II组	3	5	80	15
实验III组	3	5	120	15

1.2.7.4 骨粉浓度的实验设计(以骨粉浓度为变量,其它因素为定量)

表5 不同骨粉浓度发酵骨粉液生产条件优化水平

水平	因素			
	A/(%)	B/(%)	C/目	D/(%)
实验I组	3	5	120	10
实验II组	3	5	120	15
实验III组	3	5	120	20

1.2.8 测定方法

1.2.8.1 离子钙含量的测定

先标定:准确标准溶液10mL于100mL三角瓶中,加水10mL,用2mol/L的NaOH溶液调至中性(约1mL),加入1%KCN1滴,0.05mol/L柠檬酸钠溶液2mL,2mol/L NaOH 2mL,钙指示剂5滴,用EDTA溶液滴定至溶液由酒红色变为纯蓝色为终点。记录EDTA标准溶液用量V(mL),按下式计算每毫升EDTA标准溶液相当于钙的毫克数T。

$$T=0.2 \times 10/V$$

准确吸取洋液5mL(视Ca含量而定),注入100mL三角瓶中,加水15mL,用2mol/L的NaOH溶液调至中性,加入1%KCN1滴,0.05mol/L柠檬酸钠溶液2mL,2mol/L NaOH 2mL,钙指示剂5滴,用EDTA溶液滴定至溶液由酒红色变为纯蓝色为终点。记录EDTA标准溶液用量。以蒸馏水代替样品作空白试验^[13]。结果计算:

$$\text{钙}(\text{mg}/100\text{g}) = (V - V_0) T \times 100/m \times (V_1/V_2)$$

T—每毫克EDTA标准液相当于钙的毫克数;

V—滴定洋液消耗EDTA溶液体积,mL;

V_0 —滴定空白消耗EDTA溶液体积,mL;

V_1 —测定时取洋液体积,mL;

V_2 —洋液定容的总体积,mL;

m—样品质量,g;

1.2.8.2 游离氨基酸含量的测定

移取含氨基酸约20~30mg的样品溶液2份,分别置于250mL锥形瓶中,各加50mL蒸馏水,其中1份加入3滴中性红指示剂,用0.1mol/L氢氧化钠标准溶液滴定至由红色变为琥珀色为终点;另1份加入3滴百里酚酞指示剂及中性甲醛20mL,摇匀,静置1分钟,用0.1mol/L氢氧化钠标准溶液滴定至淡蓝色为终点。分别记录两次所消耗的碱液mL数^[14]。结果计算:

$$\text{氨基酸态氮}(\%) = (V_2 - V_1) \times c \times 0.014 \times 100/m$$

c—氢氧化钠标准溶液的浓度,mol/L;

V_1 —用中性红作指示剂滴定时消耗氢氧化钠标准溶液体积,mL;

V_2 —用百里酚酞做指示剂滴定时消耗氢氧化钠标准溶液体积,mL;

m—测定用样品溶液相当于样品的质量;

0.014—氮的毫摩尔质量,g/mmol。

2 结果与分析

2.1 牛骨中不同部位的主要成分测定结果

为了有利于对牛骨骼进行发酵降解研究,对不同部位的牛骨中主要成分的含量进行了测定,并将其列表进行对比^[15]。结果见表6所示。

表6 牛骨中不同部位的主要营养成分(%)

	水分	蛋白质	脂肪	钙	灰分
牛肋骨	68.32	15.66	14.00	0.642	1.88
牛颈骨	67.25	18.76	8.85	0.660	0.301
牛臂骨	54.26	14.55	29.67	0.642	2.90
牛尾骨	69.11	14.42	17.54	0.173	0.494

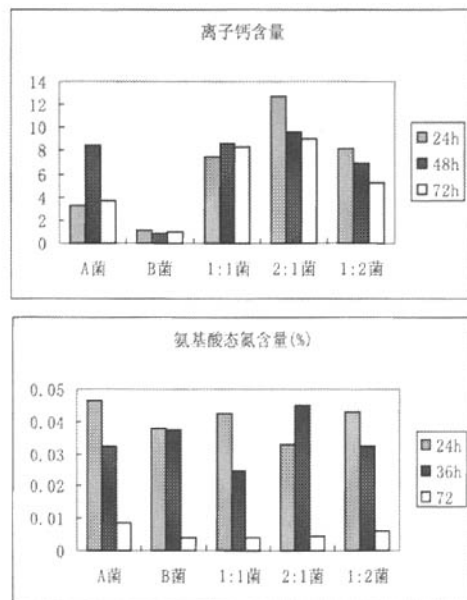
由于牛肋骨中蛋白质和钙的含量都较高,因此以下实验菌用牛肋骨进行发酵。

2.2 不同菌种发酵的实验结果

乳酸菌利用碳水化合物发酵产生乳酸,同时分泌肽链端解酶等水解蛋白质生成氨基酸乳酸的生成使发酵制品的pH值降低至4.8~5.2,不仅可以抑制其它微生物污染,同时增加培养物的酸度,使骨粉中钙受到酸作用而成为离子,乳酸菌发酵还能产生丁二酮,丁二酮能有效抑制某些病原菌和革兰氏阴性菌。

本试验选择两种纯菌种作为菌种发酵骨粉,接种于灭菌骨粉中,于40.5℃发酵。结果如下图1。

图1 不同菌种发酵骨粉的指标测定结果



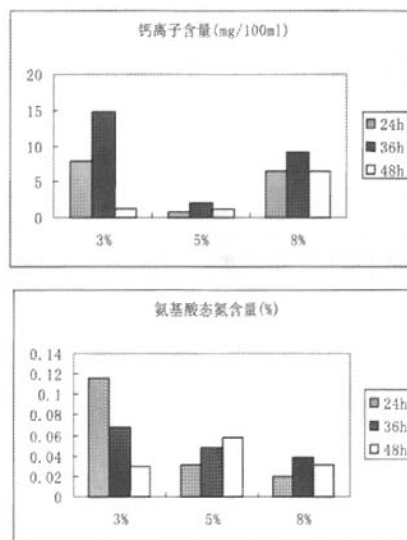
由上图可知,在发酵时间为24h、48h和72h三个时段中,菌种为A:B=2:1离子钙含量都比其他菌种丰富,其中发酵时间为24h的菌种发酵液离

子钙含量最丰富,A:B=2:1的菌种是随着发酵时间的延长离子钙含量而降低。从氨基酸态氮整体来看,菌种为A:B=2:1发酵时间为48h的氨基酸态氮含量是第二位的。因此综合以上结果,在以下的实验中均选定A:B=2:1的菌种来接种发酵骨粉液。

2.3 不同乳酸菌接种量对发酵结果的影响

骨粉中钙通常是以羟磷灰石 $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)$ 的形式存在,它是固态不溶的。接种乳酸菌可以产生一定量的有机酸,将其转化为游离的钙离子,但是骨粉中的钙是与其他物质相互包裹在一起的,如胶原纤维、粘多糖、蛋白质等,同时微生物代谢的酸并非强酸而且有限,菌种接种量的多少直接影响乳酸菌活菌数的多少。实验测定结果见图2。

图2 不同乳酸菌接种量发酵骨粉的指标测定结果

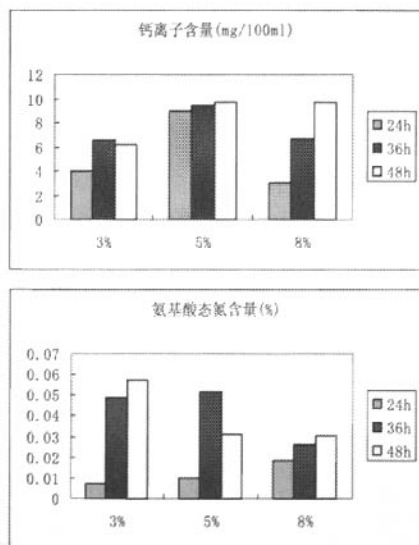


根据上图可知,在发酵36h,接种量为3%时的离子钙含量比其他两组离子钙含量丰富,乳酸菌离子钙含量最丰富。在发酵时间为24h,测得接种量为3%时的氨基酸态氮含量是所有发酵液中含最丰富的,达到0.1163%。同时,在培养36h后,发酵液中离子钙含量和氨基酸态氮含量随时间的延长而降低。所以,当乳酸菌接种量为3%时,是发酵骨粉的最佳接种量。

2.4 不同蔗糖添加量对发酵实验结果的影响

蔗糖可直接被微生物吸收、进入分解途径,降解为简单的含碳化合物,释放能量,供给微生物细胞合成代谢所需的能源和碳源。随着糖分的不断消耗,浓度越小,微生物大量繁殖,骨粉溶液的酸度提高,钙离子浓度也提高。测定结果见图3。

图3 不同蔗糖添加量发酵骨粉指标的测定结果

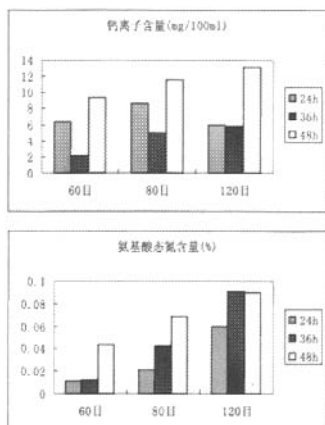


由图3可知,蔗糖添加量为3%时,离子钙含量最丰富的是发酵时间为36h,达到9.748mg/100mL。可以看出蔗糖的添加量不同,离子钙的含量基和氨基酸态氮含量则是随着发酵时间的延长而降低。原因是随着蔗糖量的增加,高浓度的蔗糖的渗透压大于微生物细胞渗透压,抑制了微生物的生长与繁殖,溶出钙的含量减少。在氨基酸态氮含量测定中,5%的蔗糖添加量培养36h达到较大值。所以综合来看蔗糖添加量为5%时,是骨粉发酵的最佳添加量。

2.5 不同骨粉粒度对发酵实验结果的影响

不同骨粉粒度对发酵实验影响测定结果见下图。

图4 不同骨粉粒度发酵骨粉指标的测定结果



根据图4可以看出,离子钙含量最丰富的是发酵时间为48h,添加量为120目时的发酵液,数值为13.154mg/100mL,氨基酸态氮含量最高是发酵

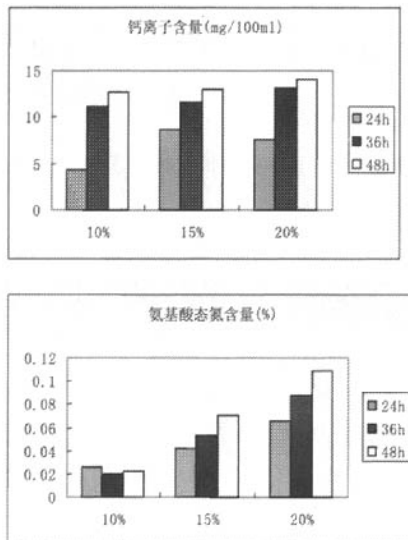
时间为36h,添加量为120目时的发酵液,数值为0.0912%。但是综合来看,发酵120目的骨粉48小时其离子钙和游离氨基酸态氮的含量最高。所以确定为骨粉为120目是发酵的最佳粒度。

添加的骨粉颗粒直径越小,其表面侵蚀程度越明显,说明骨粉中结合的物质转化溶解越充分。因而可以推测乳酸菌对骨粉的作用与骨粉的大小(即比表面积)有相关性。

2.6 不同浓度骨粉对发酵实验结果的影响

添加骨粉的浓度不同,经发酵后离子钙含量和氨基酸态氮的含量上升的幅度也不同。骨粉添加量越多,发酵液单位体积中游离钙含量越大,见图5。

图5 不同骨粉浓度发酵骨粉指标的测定结果



根据上图可知,在添加三种不同浓度骨粉经发酵后,添加量为20%时的离子钙含量和氨基酸态氮含量最丰富的都是发酵时间为48h的发酵液,数值为14.015mg/100mL和0.1089%。

3 结论与讨论

(1) 本实验通过对粉碎牛骨粉接种乳酸菌发酵的研究,初步探索了发酵产生的游离钙含量变化和氨基酸含量变化的规律。乳酸菌的接种量不同、蔗糖添加量不同、骨粉粒度和浓度不同对发酵骨粉指标的测定结果与发酵前指标测定结果相比较离子钙和氨基酸态氮含量也都有明显的提高。

选用乳酸菌A:B以2:1比例接种发酵骨粉液的最佳生产条件是蔗糖添加量5%,乳酸菌接种量3%,骨粉粒度120目,接种骨粉浓度20%。

(2) 通过测定乳酸菌发酵牛骨粉产生的主要营养物质游离钙和氨基酸态氮, 获得了开发牛骨发酵补钙产品的科学依据。骨粉通过乳酸菌发酵后, 经过浓缩、干燥、成型、加入充填剂等不同工序, 可以制成各种高营养价值、风味独特、鲜美、携带方便的食品和流行饮品, 亦可制成新型的补钙胶囊、片剂等保健食品。

参考文献

- [1] 多所高校联合主编.《动物性食品加工》(畜禽骨骼利用部分).中国轻工业出版社, 2003年1月
- [2] 何志谦.钙[M].人类营养学.北京:人民卫生出版社, 1999,(3):262~263.
- [3] 张柏林.乳酸菌及其产品2促进人体健康的功能性成分[A].21世纪中国食品与农业科学技术讨论会论文集[C], 1999,(4):45~48.
- [4] 杨桂平.论述骨味食品的开发[J].中国畜产与食品, 1997,(3):137~138.
- [5] AL 伦宁格(美).吸收光谱[M].见:生物化学.北

(上接第17页)

于水产品的产地较固定, 有些鱼要经过冷冻运输, 这会使其中的TG含量下降。如果加入TG以提高一些产品的凝胶强度, 即可加工出高品质的水产品。另外, 市场上的一些鱼糜产品, 就是在原料中加入TG来提高鱼糜的凝胶强度的, 这样不仅可以避免原料的浪费, 还可延长产品的贮藏期和使用期, 也可提高产品的口味和新鲜程度。相关的TG生产应用有: 鱼丸、虾丸、蟹棒、鱼糕和鱼卷等。经TG改性后蛋白质的胶凝性、塑性、持水性、稳定性均得到改善, 可提高产品的外观、风味、质地。该技术对于开发利用低值小杂鱼, 减少环境污染, 具有重要意义。

3 总结

TG作为一种新型酶制剂, 应用前景十分广阔。随着国内科研人员对谷氨酰胺转氨酶的发酵生产和应用方面研究的进一步深入, 以及国内食品级谷氨酰胺转氨酶制剂的推出, 利用该酶研究开发出更多的新型食品、提高产品的附加价值、增加经济效益, 将对我国食品工业的发展起着巨大的推动作用。

京: 科学出版社, 1981, 72(2): 唐勇等: 乳酸菌发酵对超微猪骨粉营养及理化特性的影响, 1981,(2):45~48.

- [6] 肖秀芝. 畜骨的综合利用开发[J]. 农产品加工, 2003,(4):35~36.
- [7] 叶明泉, 李春俊, 刘东生等. 鲜骨加工技术研究进展[J]. 食品工业科技, 1999,(1):34~36.
- [8] 贺雅非, 李洪军等. 骨泥营养食品中钙生物利用的研究[J]. 食品科学, 1994,(6):53~56.
- [9] 管国锋, 朱辉, 姚虎卿. 食用级磷酸氢钙生产新技术[J]. 食品工业科技, 1998,(4):61~62.
- [10][11] [12] 李少英, 敖敦格日乐等. 乳酸菌发酵骨泥的研究[J]. 内蒙古农牧学院学报, 1989 (19) 28~30.
- [13] 大连轻工业学院等. 食品分析[M]. 中国轻工业出版社, 2006,(1): 105~108.
- [14] 大连轻工业学院等. 食品分析[M]. 中国轻工业出版社, 2006,(1): 232~234.
- [15] 刘文年. 开发加工利用骨头的可行性研究[J]. 食品科学.

参考文献

- [1] 赵征. 谷氨酰胺转氨酶在鱼糜加工中的应用[J]. 食品开发与研究, 2003, 24(1): 45~48.
- [2] 郑美英, 陈坚, 伦世仪. 谷氨酰胺转氨酶—理化性质、生产方法及其在食品工业中的应用[J]. 生物工程进展, 2004, 21(1): 33~37.
- [3] Motoki M, Seguro K. Transglutaminase and its use for food processing [J]. Trends in Food Science & Technology, 1998, (9): 204~210.
- [4] 吕心, 安丰欣. 谷氨酰胺转氨酶在肉制品中的应用研究[J]. 食品工业科技, 2002(4): 86~8.
- [5] 梁海燕, 马丽珍. 谷氨酰胺转氨酶在肉制品加工中的应用[J]. 肉类研究, 2004(1): 50~52.
- [6] Motoki M, Seguro K. Transglutaminase and its use in food processing [J]. Trends in Food Science & Technology, 1998, 9: 204~210.
- [7] Kuraishi C. The usefulness of transglutaminase for food processing in biotechnology for improved foods and flavors [C]. Washington: American Chemical Society, 1996: 29~38.
- [8] 王仲礼. 日本人的长寿与肉类. 肉类研究, 1995, (3): 52.