

嗜酸乳杆菌高密度培养时的化学去胁迫

李 丹, 赵新淮

(乳品科学教育部重点实验室, 东北农业大学, 黑龙江哈尔滨, 150030)

摘 要 采用向发酵液中添加适当的碱或碱性盐等物质的方法, 消除了影响嗜酸乳杆菌生长的有机酸的胁迫作用, 达到单位体积的发酵液内含有更多活菌体的目的。结果表明, 在发酵过程中, 添加一定量的柠檬酸钠可减少乳酸对嗜酸乳杆菌的胁迫作用, 从而提高了活菌密度。

关键词 嗜酸乳杆菌, 高密度培养, 去胁迫

乳酸菌(如双歧杆菌属和乳杆菌属)具有许多优良特性并可以为一些食品提供特殊功能, 例如赋予特殊的食疗作用^[1]。乳酸菌的存在只有达到一定的数量时才能发挥其功能, 所以需要在相应的产品中保持活菌体的数量在一定的水平。但是, 在乳酸菌的培养过程中, 由于乳酸菌的代谢物质会对乳酸菌的繁殖产生抑制作用, 例如产生的乳酸就会改变发酵液的 pH, 从而影响乳酸菌继续繁殖, 因此, 就不能无限制的提高发酵液中乳酸菌活菌体的数量。从而, 高密度培养乳酸菌成为当今的研究热点。

国外已经有一些研究人员对益生菌培养过程中所存在的胁迫问题进行了研究。例如, 2003 年 Akshat Talwalkar 研究了氧的存在对嗜酸乳杆菌的氧化胁迫作用, 着重对过氧化酶系统进行了研究, 证实了氧对嗜酸乳杆菌的毒性作用^[2], 但是, 并没有进一步研究如何消除胁迫。2004 年 Kobayashi 等通过改变培养条件的方法培养 *Tetragenococcus*^[3], 但此方法繁琐, 效果仍然不理想。

2005 年陆利霞等研究了乳酸杆菌的半连续高密度培养, 探讨了更换新鲜培养基对菌体浓度、解除代谢产物抑制等的影响^[4]; 2003 年韩向红等研究了不同添加剂, 例如胡萝卜汁、大豆浸汁、玉米汁, 对嗜热链球菌和保加利亚乳杆菌活菌数的影响^[5], 其结果也不尽如人意。

为了能够在单位体积发酵液内拥有更多的嗜酸乳杆菌活菌体, 针对嗜酸乳杆菌繁殖过程中产生乳酸的问题, 我们采用向发酵液中添加适当的化学物质的方法, 部分消除了影响嗜酸乳杆菌生长的胁迫作用, 达到了提高活菌数量的目的, 为今后嗜酸乳杆菌的规模化、高密度培养提供一种可能的简便技术手段——

化学去胁迫。

1 材料与方法

1.1 材 料

嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) 为实验室保藏菌种。其他实验材料如脱脂乳粉、蛋白胨、酵母提取物、牛肉膏、琼脂粉、葡萄糖、吐温 80 等均为国产。

1.2 仪器设备

电热蒸气压力消毒器(上海三三医疗器械有限公司); 无菌操作台(苏州医用器械厂); 光学显微镜(O-lympus); 精密电子天平(上海); pH S-3C 型精密 pH 计(上海); 微量进样器; 隔水式电热恒温培养箱(上海); 远红外线恒温干燥箱(天津)。

1.3 实验方法

1.3.1 菌种的活化

将冷冻干燥保存的嗜酸乳杆菌, 使用前按 2% 的量接种到 12% 的脱脂乳培养基中, 37℃ 恒温培养至凝固(大约 16 h), 每次使用前, 菌株在脱脂乳培养基中再活化 2 次, 以便菌株活力得到充分恢复。活化后的菌种于 4℃ 冰箱保存。

1.3.2 高密度培养嗜酸乳杆菌时化学胁迫作用的确

将活化后的嗜酸乳杆菌按 2% 的量接种到 20 mL 脱脂乳培养基中, 每组有 4 个平行样, 37℃ 培养。在发酵过程中(约 6 h 后), 人为向发酵液中分别添加一定量的柠檬酸或乳酸溶液, 调整发酵液 pH 至一定值后, 继续培养, 24 h 后计数。

1.3.3 碱性盐对嗜酸乳杆菌培养的

1.3.3.1 柠檬酸钠对嗜酸乳杆菌的化学去胁迫作用
将柠檬酸钠配制成为一定浓度的溶液, 灭菌后备用。

(1) 在 20 mL 已灭菌的脱脂乳培养基中添加一

第一作者: 硕士研究生(赵新淮教授为通讯作者)。

收稿日期: 2006-09-19, 改回日期 2006-11-06

定量的柠檬酸钠溶液,将发酵液的 pH 分别调至 6.7~7.1,然后按 2% 的量接种,每组 4 个平行样,置 37℃ 恒温培养 24 h 后计数。

(2) 将活化后的嗜酸乳杆菌按 2% 的量接种到 20 mL 脱脂乳培养基中,置 37℃ 培养。发酵 6 h 后,向发酵液中添加一定量的柠檬酸钠溶液,将 pH 分别调至 5.9~6.5 等,然后 37℃ 继续培养,24 h 后计数。

1.3.3.2 CaCO_3 对嗜酸乳杆菌的化学去胁迫

在已灭菌的脱脂乳培养基中添加一定量已灭菌的 CaCO_3 悬浮液,同时按 2% 的量接种,37℃ 恒温培养。在发酵液凝固前,每隔一段时间摇动发酵液,使 CaCO_3 与发酵液充分混匀。24 h 后计数。

1.3.4 活菌数的测定

选用 MRS 培养基,采用传统的平板计数法。

2 结果与讨论

2.1 有机酸对嗜酸乳杆菌高密度培养的化学胁迫

图 1 为乳酸对嗜酸乳杆菌高密度培养所产生的化学胁迫作用示意图。

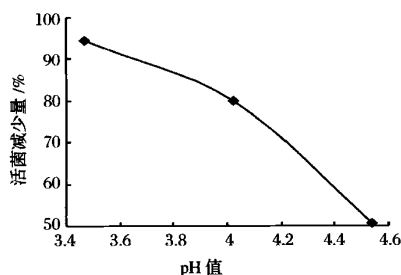


图 1 乳酸对嗜酸乳杆菌发酵的胁迫作用

用无菌乳酸调整发酵液的 pH 至 3.47、4.02 和 4.54,与对照样相比,发酵后发酵液中嗜酸乳杆菌整体数量大大降低,尤其是当发酵液的 pH 为 3.47 时,活菌数减少了 94.4%,显示出乳酸确实为抑制嗜酸乳杆菌高密度培养的一个关键因素,是一个重要的化学胁迫因子。因此在高密度培养嗜酸乳杆菌时,非常有必要消除乳酸的胁迫。

相比之下,添加无菌柠檬酸溶液,将发酵液 pH 分别调至 3.53~4.48 时,发酵后嗜酸乳杆菌的菌数随着柠檬酸添加量的不同呈现不规则的变化。添加少量的柠檬酸,有助于嗜酸乳杆菌的繁殖,嗜酸乳杆菌整体数量增加;但是过多地添加柠檬酸(pH(3.8)),就会产生胁迫,例如调整发酵液的 pH 至 3.5,发酵液中嗜酸乳杆菌活菌数仅为对照样的 64.7%,如图 2 所示。

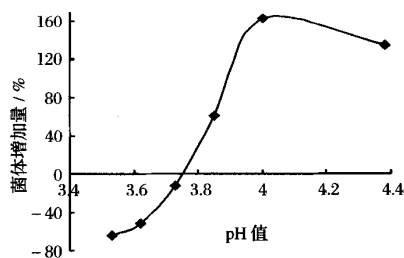


图 2 柠檬酸对嗜酸乳杆菌发酵的胁迫

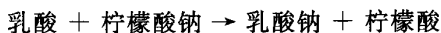
当柠檬酸添加量很少, pH 相对较高时, *L. acidophilus* 通过柠檬酸含量的增加促进了三羧酸循环的进行,从而使菌体代谢更加旺盛,菌体数量有所增加。而当柠檬酸添加量逐渐增加, pH 较低时,柠檬酸不能完全通过代谢过程消耗掉,它对发酵液 pH 的影响占了主导地位,对菌体繁殖产生抑制作用,导致活菌数降低。

发酵液中有有机酸含量的增加,例如乳酸,对嗜酸乳杆菌的繁殖产生胁迫作用^[6],而存在少量的柠檬酸,则不会抑制嗜酸乳杆菌的繁殖,反而有一定的促进作用。

2.2 柠檬酸钠和碳酸钙对嗜酸乳杆菌高密度培养的化学去胁迫

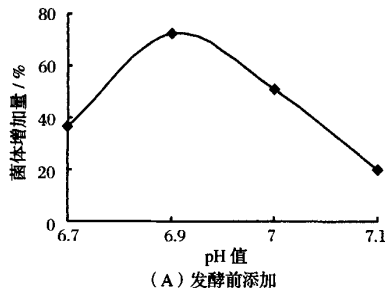
2.2.1 柠檬酸钠对嗜酸乳杆菌高密度培养的化学去胁迫

在发酵前,利用无菌柠檬酸钠溶液调整发酵液的 pH 至 6.7~7.1。接菌发酵后发现,随着柠檬酸钠添加量的增加,发酵液中嗜酸乳杆菌活菌数量逐渐增加; pH 6.9 时,发酵液中嗜酸乳杆菌活菌数量比对照增加了 72.5%,达到了最高值;如果进一步增加柠檬酸钠添加量,可能由于发酵液 pH 过高而不利于嗜酸乳杆菌的生长,导致了发酵液中嗜酸乳杆菌活菌数量减少(如图 3A 所示)。由此表明,发酵前,向发酵液中添加柠檬酸钠至 pH 6.9,能消除嗜酸乳杆菌的代谢产物乳酸对其产生的化学胁迫,从而使发酵液中的嗜酸乳杆菌活菌密度数量达到最大。即下列反应以及产物柠檬酸,对嗜酸乳杆菌的繁殖产生有益作用:



同时,还尝试了在发酵中期加入柠檬酸钠来消除乳酸的化学胁迫。在发酵液培养 6 h 后(此时发酵液的 pH 约 5.7~5.8),利用无菌柠檬酸钠液将发酵液 pH 调至 5.9~6.5。当 pH 调至 5.9 时,发酵液中存在的乳酸,部分被柠檬酸钠所中和,有利于嗜酸乳杆菌的继续繁殖,发酵液中嗜酸乳杆菌活菌数增加了

106.7%(如图 3B 所示)。但是,过度的柠檬酸钠,pH 增大,导致发酵液的环境不是最有利于嗜酸乳杆菌的



繁殖,相应地减少了发酵液中嗜酸乳杆菌活菌的数量。

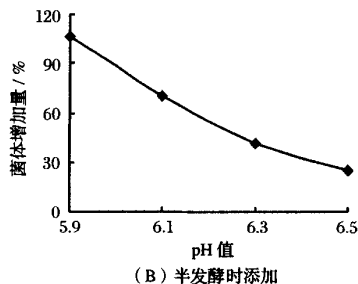


图 3 柠檬酸钠对嗜酸乳杆菌发酵的去胁迫作用

2.2.2 CaCO_3 对嗜酸乳杆菌高密度培养的化学去胁迫作用

与之相似,发酵前向发酵液中添加 CaCO_3 悬浮液,同样也可以去除嗜酸乳杆菌高密度培养中的化学胁迫作用,如图 4 所示。数据表明,发酵后发酵液中嗜酸乳杆菌活菌数量随 CaCO_3 添加量的增加而增加,当 CaCO_3 添加量为 100 mg 时,发酵液中活菌数比空白样增加了 101.7%。利用添加的 CaCO_3 与乳酸反应,生成乳酸钙,不会存在食品安全问题。

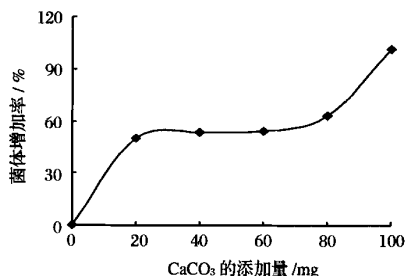


图 4 发酵前添加 CaCO_3 对嗜酸乳杆菌的去胁迫

虽然, CaCO_3 对嗜酸乳杆菌高密度培养的化学去胁迫,可能优于柠檬酸钠的作用效果,因为 CaCO_3 难溶于水,不会大幅度改变发酵液的 pH,不会给嗜酸乳杆菌的生长环境带来大的影响。然而,正因为 CaCO_3 在水中的溶解度很低,导致其在发酵液中的分散性不好,不能够与乳酸充分接触,不能有效地中和乳酸。因此,嗜酸乳杆菌仍会受到乳酸的化学胁迫作用的影响,从而导致 CaCO_3 的作用效果不是十分理想,尤其是在较低的添加水平时,作用效果的增加幅度有限,只有在较高的添加量下才能显示出较高的作用效果。

实验中并没采用 NaOH 和 NH_3 作为化学去胁迫试剂,其原因是:(1) NaOH 属强碱,即使少量添加,也会使 pH 变化非常大,不利于嗜酸乳杆菌的生

长;(2)根据解剖学,高浓度的 NH_4^+ 可导致细胞损伤性变化:细胞电子密度降低,线粒体、内质网等细胞肿胀,细胞内成分开始出现增生修复现象等^[7],所以虽然有可能产生化学去胁迫作用,但是也可能同时产生细胞损伤。此外, NH_3 还可能产生食品品质方面的问题,例如风味。

3 结 论

(1)作为嗜酸乳杆菌代谢过程中的产物,乳酸含量过高可以抑制嗜酸乳杆菌的进一步繁殖,产生了胁迫,因为用乳酸降低发酵液的 pH,发酵后发酵液中的活菌数减少。过多地添加柠檬酸,也能导致胁迫作用的存在。因此,欲实现嗜酸乳杆菌的高密度培养,需要消除相应的胁迫作用。

(2)在嗜酸乳杆菌培养中,利用柠檬酸钠在发酵前或半发酵时期调至发酵液的 pH,能够消除胁迫作用,提高发酵液中的活菌数。在半数发酵期将发酵液的 pH 调节至 5.9,效果最好,活菌数可增加 1 倍。另外, CaCO_3 也能产生一定的效果, CaCO_3 添加量为 5g/L 时,发酵液中活菌数也能增加 1 倍。二者对嗜酸乳杆菌的高密度培养,均能产生确切的化学去胁迫作用。

(3)化学去胁迫的方法,可以为今后嗜酸乳杆菌以至其他益生菌(如双歧杆菌)规模化的高密度培养提供一种有效的途径。

参 考 文 献

- 郭本恒. 嗜酸乳杆菌在乳品中的应用技术[J]. 食品工业, 1999(1): 18~19
- Talwalkar A. Studies on the Oxygen Toxicity of Probiotic Bacteria with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. [M]. University of Western Sydney, 2003. 51~54

- 3 Kobayashi T, Kajiwara M. . Effect of culture conditions on lactic acid production of *Tetragenococcus* species [J]. Journal of Applied Microbiology, 2004, 96: 1 215~1 221
- 4 陆利霞. 乳酸杆菌半连续式高密度培养的研究[J]. 食品工业科技, 2005, 26(12): 47~49
- 5 韩向红. 不同添加剂对冷藏期酸奶品质和活菌数的影响[J]. 海南师范学院学报, 2003, 16(3): 74~77
- 6 Miyoshi A, Rochat T. Oxidative stress in *Lactococcus lactis* [J]. Genetics and Molecular Research, 2003, 2(4): 348~359
- 7 李夏青. 氨对星形胶质细胞超微结构的影响[J]. 解剖学杂志, 1999, 22(5): 433~435

Chemical De-stressing Effect on High-density Fermentation of *Lactobacillus acidophilus*

Li Dan, Zhao Xinhui

(Key Laboratory of Dairy Science of Ministry of Education, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

ABSTRACT In order to increase the number of living bacterium, the proper alkali or alkali salt was added to ferment liquid to eliminate stressing effect of organic acid on *Lactobacillus acidophilus*. The results showed that citrate sodium added to ferment liquid could decrease the stressing effect and enhance density of *Lactobacillus acidophilus* during fermentation.

Key words *Lactobacillus acidophilus*, high density culture, destressing

政策法规标准

婴儿营养食品国家标准蛋白质偏高

国家相关部门将对《婴儿营养食品国家标准》进行修改。目前执行的《婴儿营养食品国家标准》是1997年颁布的,并于1999年正式实施。受当时条件所限,部分家庭对婴儿的饮食结构不是十分了解,更不注重其营养成分的搭配,所以,国家在制定该标准过程中,提高了包括蛋白质在内的某些成分的含量标准。

在国家标准中规定的每100g婴儿食品中蛋白质含量为 $\geq 18\text{g}$,由于该标准是在1990年代制定的,国家考虑到当时农村消费者在婴儿食品中会添加米粉和豆粉等,所以提高了蛋白质含量。但是,事过境迁,人们的生活质量从总体上有了很大的提高,现行的标准中某些成分的含量已经远远超出了婴儿所需的范围,应该即时修改。

婴儿的肝、肾、肠胃功能发育还不完全,很多高蛋白的物质还不能完全吸收,如果在食品中蛋白质含量过高,则会加重婴儿的肠胃负担,影响其发育。同时,如果儿童饮食结构中蛋白质的含量偏高,会导致儿童处于过度兴奋状态,引起多动导致儿童偏食,引起肥胖等症状。一些生产厂商为了达到该标准,人为地添加人工合成的蛋白质,影响婴儿的发育和健康。

从2006年8月16日起,修订该标准工作已正式启动,预计在半年内完成。新标准对食品成分的规定,将全面与国际先进标准接轨。同时,还具有很强的操作性。标准的重新制定,可以更好地促进幼儿食欲、使营养成分相互影响提高营养价值,保证营养平衡,从而保障婴儿的身体健康以及更好的发育。该标准的重新修订,使得一些企业意识到要从牧场、水质、原材料等源头上来控制产品质量,确保婴儿的健康。

行业动态

我国软包装罐头企业首次通过欧洲双认证

大连凯富隆食品有限公司在辽宁检验检疫局的大力帮扶下,终于获得了甜玉米、萝卜、马铃薯3种产品及其种植基地的EUREPGAP认证证书,这是我国软包装罐头生产企业首次通过EUREPGAP产品和基地的双认证,同时意味着今后该公司的上述产品可以顺利摆上欧洲超市的货架,拥有了通往欧洲市场的“通行证”。大连凯富隆食品有限公司主要从事农副产品的深加工,现已开发出80余个品种、近200个规格产品,年生产加工能力24 000t。其自行研究开发的保鲜食品加工技术被列入国家级星火计划项目。目前,凯富隆真空软包装保鲜食品全部出口日本,部分产品占据日本同类产品市场的80%以上。获悉该公司通过EUREPGAP认证的消息后,日本、欧洲的多家客户主动提出增加订单数量和品种,产品出口价格有望成倍增长。