

两种抗氧化剂在两歧双歧杆菌发酵过程中的化学去胁迫作用

李 丹, 赵新淮

(东北农业大学乳品科学教育部重点实验室, 黑龙江哈尔滨, 150030)

摘 要 采用向发酵液中添加适当的抗氧化剂的方法, 消除发酵液中残存的氧对两歧双歧杆菌的胁迫作用, 以达到其发酵液中产生更多活菌体的目的。结果表明, 在发酵过程中, 添加 3.2 g/L 或 1.6 g/L 的异抗坏血酸钠和抗坏血酸盐, 可有效地减少氧对两歧双歧杆菌的胁迫作用, 使发酵液中的活菌数分别增加到 1.06×10^9 CFU/mL、 1.29×10^9 CFU/mL。

关键词 两歧双歧杆菌, 抗氧化剂, 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增加特殊功能。但是, 只有在乳酸菌存在达到一定的数量时才能发挥其功能作用, 所以需要在相应的产品中保持较高水平的活菌体。但是, 在乳酸菌培养时, 由于有许多不利因素会对乳酸菌的繁殖产生抑制作用, 会抑制双歧杆菌的生长, 因此, 就不能无限制地提高发酵液中乳酸菌活菌体的数量, 这使得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作用进行研究。例如, 2003 年 Akshat Talwalkar 研究了氧的存在对双歧杆菌的氧化胁迫作用, 着重对过氧化物酶系统进行了研究, 证实了氧对双歧杆菌的毒性作用^[1], 但是, 他并没有进一步研究如何消除胁迫。Gomes 等研究发现, 牛乳水解物对两歧双歧杆菌和嗜酸乳杆菌的生长和产酸有明显地促进作用^[2]。体外研究显示, α -乳清蛋白和糖巨肽(glycomacropeptide)能显著促进短乳杆菌、两歧双歧杆菌、婴儿双歧杆菌和乳酸乳杆菌的生长^[3]。

国内也有一些对双歧杆菌活菌数提高的研究报道, 2003 年吴克刚等对婴儿双歧杆菌的体外增殖培养进行了初步研究。主要研究了厌氧培养方法、碳源、氮源以及一些生物材料提取物对婴儿双歧杆菌体外增殖的影响^[4]。体外增殖研究结果表明: 盐水瓶厌氧培养最有利于双歧杆菌生长; 乳糖和大豆蛋白胨分别是双歧杆菌的适宜碳源和氮源; 培养基中添加玉米等提取物能明显促进双歧杆菌增殖。但他的这些研究结果也都是基于向双歧杆菌培养基中增添更多的营养物质。河南农业大学的种克等也曾采用优化的

胡萝卜复合汁增菌培养基来提高双歧杆菌的活菌数^[5]。

整体上看, 利用一些特殊的抗氧化剂例如异抗坏血酸钠或抗坏血酸盐, 来提高双歧杆菌活菌数, 是国内尚未被研究或利用的一个可能手段。所以, 针对氧对两歧双歧杆菌繁殖过程中产生的胁迫作用, 采用向发酵液中添加适当化学物质的方法, 部分消除影响两歧双歧杆菌生长的胁迫作用, 以达到提高活菌数量的目的, 为今后两歧双歧杆菌的规模化、高密度培养提供一种可能的简便技术手段, 即化学去胁迫作用。

2 材料与方法

2.1 材 料

两歧双歧杆菌(*B. bifidum*), 为本实验室保藏菌种。其他实验材料如脱脂乳粉、大豆蛋白胨、低聚果糖、酵母粉、多价胨、酪蛋白胨、琼脂粉、葡萄糖、吐温 80 等均为国产。

2.2 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-3C 型精密 pH 计(上海); 厌氧培养箱(上海); 微量进样器; 远红外线恒温干燥箱(天津); 全自动发酵罐(Biotech)。

2.3 实验方法

2.3.1 菌种的活化

将冷冻保存的两歧双歧杆菌接种于 TPY 液体培养基和琼脂平板上, 37℃ 条件下厌氧培养 48~72 h 进行活化。使用前按 5% 的量接种到 12% 的脱脂乳培养基中, 37℃ 厌氧培养 24 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。

2.3.2 抗氧化剂对两歧双歧杆菌的化学去胁迫作用

第一作者: 硕士研究生(赵新淮教授为通讯作者)。

收稿日期: 2007-03-28, 改回日期: 2007-06-21

2.3.2.1 异抗坏血酸钠的去胁迫作用

配制一定浓度的异抗坏血酸钠溶液,灭菌后备用。

在 20 mL 已灭菌的脱脂乳培养基中添加一定量的异抗坏血酸钠溶液,然后按 5% 的量接种,每组 4 个平行样,置 37℃ 厌氧培养 24 h 后计数。

2.3.2.2 抗坏血酸盐的去胁迫作用

配制一定浓度的抗坏血酸,将其 pH 调制 7.0,灭菌后备用。

在 20 mL 已灭菌的脱脂乳培养基中添加一定量的抗坏血酸盐溶液,然后按 5% 的量接种,每组 4 个平行样,置 37℃ 厌氧培养 24 h 后计数。

2.3.3 验证实验

配制 1.6 L 12% 脱脂乳培养基,115℃ × 15 min 灭菌备用。按照上述异抗坏血酸钠和抗坏血酸盐的最佳添加量(使发酵液中的两歧双歧杆菌活菌数增加量最多),分别添加至脱脂乳培养基中,按 5% 的接种量接种,在发酵罐中进行扩大培养。37℃、100 r/min 条件下培养 24 h 后,菌落计数。

2.3.4 活菌数的测定

选用 TPY 培养基,采用平板菌落计数法测定发酵液中的活菌数。

3 结果与讨论

通过模拟实验证明,在两歧双歧杆菌发酵过程中,有机酸对两歧双歧杆菌的胁迫作用很微弱。将发酵液 pH 调至 6.21 时,活菌数只减少 3%,发酵液的 pH 调节到 5.60 时,活菌数只减少 13%,所以发酵过程中有机酸的产生,不是影响活菌水平提高的重要因素。因此,在培养双歧杆菌时,需要从除去氧胁迫作用方面入手,提高双歧杆菌活菌体的密度。

3.1 两种抗氧化剂去胁迫作用机制

氧对两歧双歧杆菌的氧化胁迫作用机理见图 1。糖酵解过程中,6-磷酸果糖激酶为 1 个重要的限速酶^[6]。当 pH 下降时, H⁺ 对 6-磷酸果糖激酶有抑制作用,正常的糖酵解过程被干扰。此外,由于 O₂ 可以通过过氧化氢酶的作用转变成 H₂O₂,培养基中氧含量的增加导致 H₂O₂ 逐渐积累,对 6-磷酸果糖激酶产生毒害作用,抑制了 6-磷酸果糖激酶发挥作用,最终导致糖酵解作用被抑制,以至于影响了双歧杆菌的生长。

氧化还原电位对双歧杆菌这种专性厌氧微生物的生存有明显的影响;过氧化还原电位高时,会导致

菌体立即死亡。分子氧对专性厌氧微生物的毒害作用,是由于提高了环境的氧化还原电位^[7]。发酵液中存在了还原性物质,如抗坏血酸盐、异抗坏血酸钠这 2 种抗氧化剂,可以使发酵液保持较低的氧化还原电位,或者是与氧发生化学反应消耗发酵液中残留的氧,因而有利于专性厌氧微生物的繁殖。这就是 2 种抗氧化剂对两歧双歧杆菌化学去胁迫作用机制。

这 2 种抗氧化剂的去胁迫作用,是否可以用于其他双歧杆菌,还有待于今后的进一步研究。

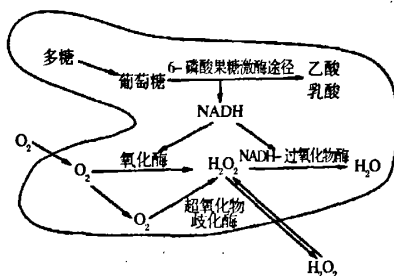


图 1 两歧双歧杆菌的氧化胁迫作用机理

3.2 异抗坏血酸钠和抗坏血酸盐的化学去胁迫作用

在食品中,异抗坏血酸钠主要用于 2 个方面,一是作为抗氧化剂,用于果蔬菜等各种加工制品、啤酒、葡萄酒、碳酸饮料、冷冻水产品及马铃薯制品等;第二方面是用于香肠、火腿等肉类腌制品,以促进亚硝酸盐在腌制过程中的显色作用和延长货架期。

将无菌异抗坏血酸钠和无菌蒸馏水配制成溶液,在发酵前,向 20 mL 脱脂乳发酵液中分别添加 10 mg、20 mg、30 mg、40 mg 水平的异抗坏血酸钠。在 5% 接种量、厌氧培养 24 h 后,发现两歧双歧杆菌活菌数随着异抗坏血酸钠添加量的增加而增加,后来趋于平缓,活菌体比对照增加了 170%,如图 2。其原因是,由于异抗坏血酸钠的强还原性,消耗了发酵液中残留的氧,从而使双歧杆菌免受氧的毒害;而未添加异抗坏血酸钠的对照样中,残留氧对两歧双歧杆菌的生长产生了一些影响。

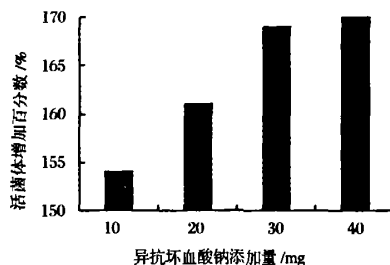


图 2 异抗坏血酸钠对两歧双歧杆菌的去胁迫作用

向 20 mL 发酵液中分别添加 10 mg、20 mg、30 mg、40 mg 的抗坏血酸盐,结果表明,当抗坏血酸盐的添加量为 20 mg 时,发酵液中的活菌数水平达到最大,比对照样增加了 242%。总体上看,添加抗坏血酸盐于发酵液中,同样可以部分除去氧对两歧双歧杆菌的胁迫作用(如图 3)。

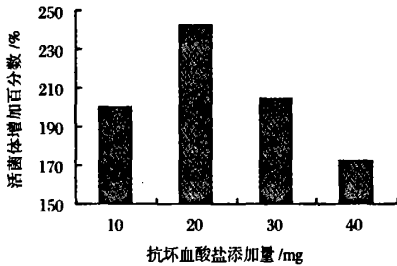


图 3 抗坏血酸盐对两歧双歧杆菌的去胁迫作用

3.3 化学去胁迫作用的验证

根据上述抗氧化剂对双歧杆菌去胁迫作用,按照效果最好的条件进行发酵罐验证实验。验证结果显示,添加异抗坏血酸钠和抗坏血酸盐,最终活菌数分别为 1.06×10^9 CFU/mL、 1.29×10^9 CFU/mL,分别比对照样增加了 2 倍、2.6 倍,增加幅度,与先前实验结果相近,这 2 种抗氧化剂对双歧杆菌培养的去胁迫作用,是肯定的。

4 结 论

(1)在发酵液中添加抗氧化剂,用来消除培养过程中氧对两歧双歧杆菌所产生的胁迫作用。向两歧双歧杆菌发酵液中添加 3.2 g/L 的异抗坏血酸钠,或者添加 1.6 g/L 的抗坏血酸盐,其活菌数分别比对照样增加 1~2 倍,均能产生确切的化学去胁迫作用。

(2)在发酵罐中进行扩大培养(发酵液体积 1.6 L),

按照上述的添加量添加抗氧化剂异抗坏血酸钠或抗坏血酸盐,结果也是两歧双歧杆菌的活菌数,均比对照样显著增加,最终活菌数分别为 1.06×10^9 CFU/mL、 1.29×10^9 CFU/mL,实验结果与前期结果相近。

(3)存在于益生菌高密度培养中的一些胁迫作用,很有可能通过简单化学方法而得以除去。化学去胁迫作用的概念,如果能够应用于其他微生物的高密度培养,将是一种简单、有效的新途径。

参 考 文 献

- 1 Talwalkar A. Studies on the Oxygen Toxicity of Probiotic Bacteria with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp[D]. University of Western Sydney. 2003. 51~54
- 2 Gomes A M P, Malcata F X, Klaver F A M. Growth enhancement of *Bifidobacterium Lactis* Bo and *Lactobacillus acidophilus* Ki by milk hydrolyzates[J]. Journal of Dairy Science. 1998, 81(11): 2 817~2 825
- 3 Janer C, Pelaez C, Requena T. Caseinom acropeptide and whey protein concentrate enhance *Bifidobacterium lactis* growth in milk[J]. Food Chemistry, 2004, 86(2): 263~267
- 4 吴克刚,黄通旺. 双歧杆菌体外增殖培养的初步研究[J]. 广州食品工业科技, 2003, 19: 6~8
- 5 种 克,田洪涛,王占武,等. 双歧杆菌胡萝卜复合汁增殖培养基的优化筛选[J]. 河北农业大学学报, 2006, 29(4): 60~63
- 6 王镜岩,朱圣庚,徐长法. 生物化学(第三版)[M]. 北京:高等教育出版社, 2003. 92~111
- 7 Marie-Pierre Bolduc, Yves Raymond, Patrick Fustier, et al. Sensitivity of bifidobacteria to oxygen and redox potential in non-fermented pasteurized milk[J]. International Dairy Journal, 2006, 16: 1 038~1 048

Chemical Destressing Effect of Two Antioxidants on *B. bifidum* during Fermentation

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 level of living *B. bifidum* in culture during fermentation, some antioxidants were added to eliminate oxygen residue in culture and defy stressing effect from oxygen on *B. bifidum*. The results showed that sodium D-isoascorbate or sodium ascorbate, used at addition level of 3.2 g/L or 1.6 g/L respectively, both could decrease the stressing effect of oxygen efficiently and enhance the number of *B. bifidum* in culture to 1.06×10^9 CFU/mL and 1.29×10^9 CFU/mL.

Key words *B. bifidum*, antioxidants, destressing