

影响乳酸菌冷冻干燥抗性因素的研究

朱益波,王立梅,罗 兵,孙海燕

(常熟理工学院生物与食品工程系,江苏 常熟,215500)

摘 要 研究了生长培养基、菌体收获菌龄、预培养条件、保护剂等因素对保加利亚乳杆菌(*Lactobacillus bulgaricus*)冷冻干燥存活率和活力的影响。确定了加有1%生长因子和1%CaCO₃的NFM培养基(10%的脱脂乳),可使保加利亚乳杆菌的对数生长期延长。菌体的最佳收获菌龄为4.5 h;保护剂组成为:3%NFM+3%乳糖+3%甘油;40℃预培养1 h,其存活率可达75.5%,具有较为理想的效果。此外,在优化的试验条件下研制的冻干酸奶发酵剂制备的酸奶,达到了预定的标准。

关键词 保加利亚乳杆菌,保护剂,冻干存活率,冷冻干燥,嗜热链球菌,预培养

发酵剂是影响整个酸奶生产和保证发酵乳产品质量稳定的关键因素之一。液体发酵剂使用方便,价格低廉,大小生产厂家均可自行调制,这极大地扩充了酸奶生产领域。但在酸奶生产的进一步集约化、规模化发展中,传统发酵剂的多次活化和扩培的繁琐工艺越来越不能满足生产要求^[1]。伴随着低温干燥技术的发展,西方研究人员已开发出用量少,邮寄储存方便,可直接投入生产的多功能商品化发酵剂,即冷冻干燥乳酸菌发酵剂。它的使用简化了乳品企业的生产工艺,提高了产品质量,避免了因微生物技术力量的不足而造成菌种质量不佳等问题^[2],这使冻干乳酸菌发酵剂的研究成为近年来乳品工业中研究的热点。

冷冻干燥制造菌粉,要求悬浮液首先在-20~-80℃冻干然后直接升华,使菌粉干燥。具有以下特点:(1)酸奶生产中可直接使用,无需做任何预培养。生产厂家可省去菌种保存、活化、扩大培养制备母发酵剂等大量工序和投资。(2)为家庭自制酸奶创造条件。(3)干菌粉体积小,便于运输、储存。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原料与试剂

脱脂乳粉、全脂奶粉、番茄、蔗糖,均为市售;葡萄糖、乳糖、蛋白胨、牛肉膏、酵母膏、CaCO₃、NaCl、L-谷氨酸钠、吐温-80、甘油、酚酞、NaOH,均为生化纯或分析纯试剂。

第一作者:硕士,讲师。

收稿日期:2007-10-18,改回日期:2008-03-20

1.1.2 实验菌株

保加利亚乳杆菌(*Lactobacillus bulgaricus*),嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*),实验室保藏。

1.1.3 培养基组成

10%脱脂乳(NFM)培养基:10g 脱脂乳粉;水 90 mL(115℃灭菌 15 min)。

复水培养基(100 mL):0.1%蛋白胨。

改良 TJA 培养基(改良番茄汁琼脂培养基,1 000 mL):50 mL 番茄汁,5 g 酵母膏,10 g 牛肉膏,20 g 乳糖,2 g 葡萄糖,2 g K₂HPO₄,1 g 吐温 80,5 g 乙酸钠,15 g 琼脂,pH 6.8,121℃灭菌 20 min。

生长因子(100 mL):20 g 酵母膏,10 g 吐温-80。

1.1.4 主要设备和仪器

10-1 型干燥箱,上海实验仪器厂;隔水式电热恒温培养箱,上海跃进医疗器械厂;SP-250A 生化培养箱,南京实验仪器厂;MP2000 型电子天平,上海第二天平仪器厂;KLG-IV 冷冻干燥机,中国科学院上海分院科学仪器厂;T6L-16C 离心机 上海安婷科学仪器厂;pH 计-梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;超低温冰箱 Asheville, North Carolina, USA。

1.2 方法

1.2.1 酸奶发酵剂生产工艺流程

活化培养→接种→发酵培养→调节培养物 pH 值→离心→悬浮→预培养→预冻→冻干→保藏

1.2.2 菌种活化培养

将保加利亚乳杆菌保存在 10%的脱脂乳中,每隔 1 周传代 1 次,每次使用前均传入 NFM 培养基中,42℃恒温培养至凝乳且有少量乳清析出。

1.2.3 发酵培养

将活化培养后的保加利亚乳杆菌以 3% 的接种量分别接入加 1% 生长因子和 1% CaCO_3 的 NFM 培养基、只加 1% 生长因子的 NFM 培养基中,在 42℃ 下发酵培养,通过测定不同时间下酸度、pH 值、活菌数,绘制生长曲线,从而确定培养基和收获菌龄。

1.2.4 酸度测定^[3]

采用 NaOH 滴定法。折算成乳酸含量表示。

1.2.5 活菌计数

减式稀释待测样品,用移液管分别吸取上一数量级样品 1 mL 于装有 9 mL 去离子水的试管中,分别得到 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 数量级的稀释样品。按实验需要,取 3 个数量级 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 的样品,吸取 1 mL 稀释液于平板中,倒入融化且温度在 45℃ 以下的改良番茄培养基,摇匀,冷却,凝固后倒置放于厌氧缸中 40℃ 培养箱中培养 48 h 左右,菌落计数。

1.2.6 收获菌龄的确定

根据生长曲线以及酸度、pH 曲线,比较对数生长期后期和稳定期前期的菌体的活菌数、酸度及冻干存活率(不添加保护剂),确定收获菌龄^[4]。

1.2.7 菌体富集

取出培养好的液态发酵剂,用 NaOH 标准液将其 pH 调至 6.8 左右,将样液移入离心管,配平后上机离心。离心(4℃, 8 000 r/min, 20 min)后倒出上清液(用量筒记录其体积),再用生理盐水洗涤,然后补入同体积的保护剂,用于后期实验使用。

1.2.8 预培养

接入菌种→放入 42℃ 培养箱中培养至凝乳后取出→调 pH 至 6.8→冷冻离心→去上清液→用生理盐水洗涤→补入同体积保护剂→以 1 mL 分装于小试管中,在不同温度和时间下预培养→活菌计数→冷冻干燥约 36h→菌粉复水→活菌计数。

1.2.9 冷冻干燥

将预培养后的菌液预冻于超低温冰箱约 12 h,待其固化后迅速转移至冷冻干燥机,冻干约 24 h 后观察冻干情况,满意后即可取出样品,封入塑料袋贮存于干燥器中,4℃ 下保藏备用。

1.2.10 保护剂的选择

选取以下 5 种保护剂:(1)3% NFM+3% 乳糖+3% 甘油;(2)4% NFM+3% 葡萄糖+2% 甘油;(3)4% NFM+3% 蔗糖+2% 甘油;(4)5% NFM+3% 乳糖+2% L-谷氨酸钠;(5)5% NFM+2% 酵母膏+3% 蔗糖作为选择对象。

将离心后的菌泥用生理盐水洗涤 1 次,然后分别添加保护剂至 20 mL 搅匀,活菌计数,冷冻干燥,再活菌计数,计算存活率并进行比较,确定保护剂。

1.2.11 冻干发酵剂的制备

取加 1% 生长因子、1% CaCO_3 的 NFM 培养基 200 mL 于 500 mL 三角瓶,以 3% 的接种量接入活化后的保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌(比例为 1:1),42℃ 恒温发酵培养至凝乳,调 pH 值至 6.8 左右,冷冻离心,用生理盐水洗涤,加入同体积的保护剂,以 1 mL 分装于小试管中预培养,冷冻干燥,4℃ 保藏^[5,6]。

1.2.12 感官评定

在品评人员精神状态良好的情况下,通过视觉、嗅觉、味觉的判断,对各品牌酸奶进行评估。每次品尝前用冷开水漱口,防止样品间的相互影响。

2 结果与讨论

2.1 培养基的确定

由于保加利亚乳杆菌的抗性比嗜热链球菌弱,造成冻干菌粉活力损失的原因主要是保加利亚乳杆菌活性降低,适用于保加利亚乳杆菌的实验因素同样适用于嗜热链球菌,所以选择保加利亚乳杆菌作为实验菌种。

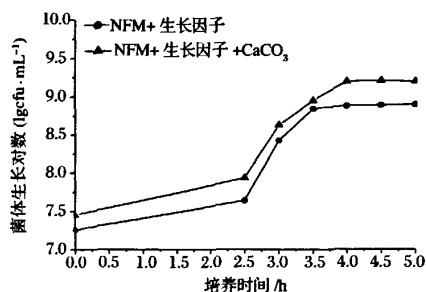


图1 生长曲线

由图1可以看出,培养基中加入 1% CaCO_3 ,保加利亚乳杆菌的对数生长期有所延长,活菌数有所提高。其原因可能为菌体在生长过程中产生乳酸,抑制其生长,而 CaCO_3 与菌体生成的乳酸作用,减弱乳酸对菌体生长的抑制作用。由图2和图3可以看出,pH 值在开始有一个明显的迟缓期,2.5 h 左右变化较大,这说明菌数进入对数生长期后,菌数增加非常快,然后慢慢趋于平稳。酸度一直随着时间的延长而升高,证明乳酸的量随着菌株的生长一直在升高。同时,pH 值随着时间的延长而降低。比较图1、图2和图3可得,加 1% 生长因子、1% CaCO_3 的 NFM 培养基使菌体的活菌数有所提高,而酸度和 pH 值相差不多,所以选择加

1%生长因子、1%CaCO₃的NFM培养基。

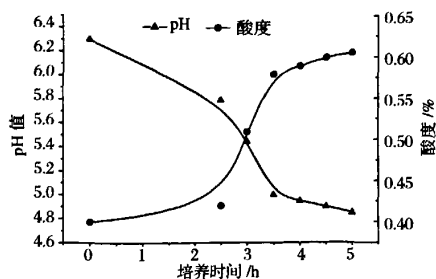


图2 培养过程中酸度、pH值变化曲线

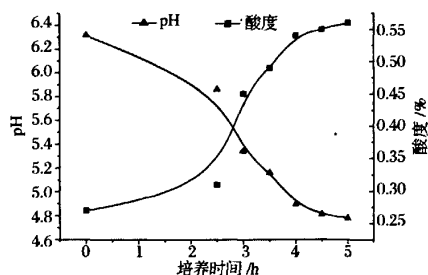


图3 培养过程中酸度、pH变化曲线(加1%CaCO₃)

表2 存活率比较

保护剂种类	冻干前活菌数/cfu · mL ⁻¹	冻干后活菌数/cfu · mL ⁻¹	存活率/%
不加保护剂(蛋白胨-水)	2.51×10 ⁹	2.60×10 ⁸	10.4
3%NFM+3%乳糖+3%甘油	2.51×10 ⁹	1.73×10 ⁹	68.9
4%NFM+3%葡萄糖+2%甘油	2.51×10 ⁹	1.22×10 ⁹	48.6
4%NFM+3%蔗糖+2%甘油	2.51×10 ⁹	1.81×10 ⁹	72.1
5%NFM+3%乳糖+2%L-谷氨酸钠	2.51×10 ⁹	1.11×10 ⁹	44.2
5%NFM+2%酵母膏+3%蔗糖	2.51×10 ⁹	1.46×10 ⁹	58.2

由表3可以看出,添加保护剂1,经冷冻干燥后菌粉的凝乳时间为300 min,与添加其它保护剂获得的菌粉相比,具有较好的效果,结合其冻干后菌体存活率达68.9%,选择保护剂1(3%NFM+3%乳糖+3%甘油)作为选用的保护剂。

表3 冻干后菌粉凝乳时间

保护剂种类	凝乳时间/min
不加保护剂(蛋白胨-水)	420
3%NFM+3%乳糖+3%甘油	300
4%NFM+3%葡萄糖+2%甘油	348
4%NFM+3%蔗糖+2%甘油	318
5%NFM+3%乳糖+2%L-谷氨酸钠	336
5%NFM+2%酵母膏+3%蔗糖	306

2.4 预培养条件的选择

由表4,比较其存活率,可得在40℃下预培养1 h对菌体的复原具有明显的效果。所以,预培养对菌体

2.2 收获菌龄的确定

菌龄对冷冻干燥后菌种的存活率有很大的影响。实验证明,幼龄期菌体和老龄期菌体都不宜进行冷冻干燥,而对数生长期后期和稳定期前期的菌体细胞存活率较高。通过表1,比较酸度、活菌数的对数值及冻干存活率,确定4.5 h为菌体的收获时间。

表1 培养时间与相应结果(测定冻干存活率时未加保护剂)

时间/h	酸度/%	lgcfu/mL	冻干存活率/%
3.5	0.49	8.95	9.8
4.0	0.54	9.20	10.3
4.5	0.55	9.21	10.6
5.0	0.56	9.20	10.4

2.3 保护剂的选择

由表2可看出,添加保护剂对于菌体冻干后的存活率具有明显的作用,比较其存活率,可知保护剂3(4%NFM+3%蔗糖+2%甘油)对提高菌体冻干后的存活率具有较好的作用,其存活率可达72.1%。

的复原具有明显的效果,同时在一定程度上提高菌体的抗冻性,值得在生产中应用。

表4 预培养结果

温度/℃	时间/h	预培养后活菌数/cfu · mL ⁻¹	冻干后活菌数/cfu · mL ⁻¹	存活率/%
4	1	2.49×10 ⁹	1.69×10 ⁹	67.9
	2	2.50×10 ⁹	1.80×10 ⁹	72.0
	3	2.48×10 ⁹	1.78×10 ⁹	71.8
20	1	2.51×10 ⁹	1.76×10 ⁹	70.1
	2	2.53×10 ⁹	1.79×10 ⁹	70.8
	3	2.55×10 ⁹	1.87×10 ⁹	73.3
40	1	2.90×10 ⁹	2.19×10 ⁹	75.5
	2	2.97×10 ⁹	2.15×10 ⁹	72.4
	3	2.74×10 ⁹	1.92×10 ⁹	70.1

2.5 制备酸奶的感官评定

取实验制得酸奶发酵剂以0.5%接种量接入10%灭菌NFM,凝乳后与市场上出售酸奶的指标比

较。

表 5 酸奶感官评定结果

项目	实验奶 A	实验奶 B	燕牌	光明	三鹿	味全
香味	较香	较香	香	较香	一般	香
酸度	0.86	0.83	0.95	0.88	1.05	0.97
色泽	白	白	白	白	白	白
粘度	高	高	高	一般	一般	高
pH	4.86	4.90	4.45	4.90	3.95	4.38
口感	好	好	好	较好	一般	好

根据表 5 比较可知,本工艺条件下制得的酸奶发酵剂制备的酸奶在感官指标方面与同类产品相比有一定的竞争实力。考虑到实验奶中未添加任何香精香料,未经均质,仅使用了 2 种乳酸菌,而其它品牌的酸奶均有过一定程度的辅助加工,因此可以认为,本实验制得的酸奶发酵剂已达到了预定的标准。

3 结 论

(1) 选择加有 1%生长因子、1%CaCO₃ 的 NFM 培养基使菌体的对数生长期延长,活菌数有所提高。

(2) 发酵培养 4.5 h,菌种的活菌数、酸度、冻干存活率都较为理想,选择 4.5 h 作为菌种的收获菌龄。

(3) 选择 3%NFM+3%乳糖+3%甘油作为比较理想的保护剂,其冻干存活率在不经预培养的条件下可达 68.9%。

(4) 选择在 40℃下预培养 1 h,其存活率有所提

高可达 75.5%。

(5) 利用在以上试验条件下制备的冻干酸奶发酵剂制作的酸奶的各项指标均达到了预定的标准。

本试验研制出的菌种活菌数已达预定标准,冻干后干粉发酵剂以 0.5%为接种量,4 h 左右即可凝乳,且各项感官指标良好。但其活性在保存过程中能否很好地维持,还有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Egon Bech Hansen. Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future[J]. International Journal of Food Microbiology,2002,78(1/2):119~131
- 2 Johnson JAC, Etzel MR. Properties of *Lactobacillus-helveticus* CNRZ-32 attenuated by spray-drying freeze-drying, or freezing[J]. Journal of Dairy Science,1995,78(4):761~768
- 3 无锡轻工业学院合编. 食品分析[M]. 北京:轻工业出版社,1983.100~113
- 4 周德庆编著. 微生物学教程[M]. 北京:高等教育出版社,2002.150~178
- 5 张和平,孙天松. 酸奶发酵剂中嗜热链球菌与保加利亚杆菌的生长互补及连续式酸奶的生产[J]. 中国乳品工业,1997,25(3):18~22
- 6 张兰威,刘维. 促进混合培养的保加利亚杆菌和嗜热链球菌生长的物质研究[J]. 中国乳品工业,1999,27(1):27~29

The Study on Factors upon Freeze-drying Livability of *Lactobacillus bulgaricus*

Zhu Yibo¹, Wang Limei, Luo Bing, Sun Haiyan

(Department of Biotechnology and Food Engineering,Changshu Institute of Technology,Changsu 215500,China)

ABSTRACT The paper studied on some factors that affect the frozen drying livability of *Lactobacillus bulgaricus*. The factors could be culture ingredients, the cell collecting time, the condition of preincubation, and the protective medium components. The results showed that the NFM culture with growth factor and 1%CaCO₃ is relative ideal. The selected culture can extend the *Lactobacillus bulgaricus* logarithmic phase and enhance the live cell number. The optimal cell collecting time was 4.5 hour. The strain was respectively preincubated for 1, 2 and 3 hours at 4℃, 20℃, 40℃ after adding protection additive in enriched cell. Then the freeze-drying livability is measured subsequently. It was confirmed that the one-hour preincubation at 40℃ has relative ideal effect. The ideal selected protectant is composed of 3% NFM, 3% lactose and 3% glycerol. Under the mentioned condition, the freeze-drying livability can attached to 75.5%. Additionally, the yogurt produced with the freeze-drying cell powder which is made in the mentioned conditions satisfied the requirements.

Key words *Lactobacillus bulgaricus*, cryoprotectant, freeze-drying, survival liability, *Streptocollus thermophilus*, precondition