

嗜酸乳杆菌 NX2-6 冻干发酵剂的研究

刘建丽,郭丽娜,张 充,吕凤霞,别小妹,陆兆新,赵海珍*
(南京农业大学食品科技学院,江苏南京 210095)

摘要:为制备嗜酸乳杆菌 NX2-6 高活性发酵剂,研究了其高密度发酵后真空冷冻干燥时不同冷冻保护剂对其存活率的影响。通过离心条件的选择,获得了最大浓度的嗜酸乳杆菌 NX2-6。进而采用单因素实验和正交实验设计,以冻干后的菌体存活率为指标,考察了 10 种冻干保护剂对嗜酸乳杆菌 NX2-6 冷冻干燥的保护效果,以获得对嗜酸乳杆菌 NX2-6 真空冷冻干燥的最佳保护剂配方。实验结果表明,嗜酸乳杆菌 NX2-6 在 8000r/min 的条件下离心 10min (4℃),所得的活菌数最多。实验确定嗜酸乳杆菌 NX2-6 的最佳保护剂配方为以 15% 麦芽浸粉,3% 谷氨酸钠和 7% 菊糖作为复合保护剂,在此条件下嗜酸乳杆菌 NX2-6 的冻干存活率高达 82.43%。

关键词:嗜酸乳杆菌,真空冷冻干燥,离心,保护剂,存活率

Study on freeze-drying protective agents formula of *Lactobacillus acidophilus* NX2-6

LIU Jian-li, GUO Li-na, ZHANG Chong, LV Feng-xia, BIE Xiao-mei, LU Zhao-xin, ZHAO Hai-zhen*

(College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: For the preparation of Directed Vat Set (DVS) of *Lactobacillus acidophilus* NX2-6, the effect of different protective agents on the survival rate of *Lactobacillus acidophilus* NX2-6 during the vacuum freeze-drying was investigated. Influences of centrifugation conditions on the survival rate of *Lactobacillus acidophilus* NX2-6 were first examined. Then single-factor experiments and orthogonal experiments were carried out to obtain the optimum protective agents formula according to the survival rate of *Lactobacillus acidophilus* NX2-6 after vacuum freeze-drying. The results showed that most optimum centrifugation conditions for preparing the suspension were 8000r/min and 10min (at 4℃). The optimal protective agent formula for *Lactobacillus acidophilus* NX2-6 were as following: malt extract powder 15%, sodium glutamate 3% and inulin 7%. Using this protective agent formula, the survival rate of *Lactobacillus acidophilus* NX2-6 after vacuum freeze-drying was up to 82.43%.

Key words: *Lactobacillus acidophilus*; vacuum freeze-drying; centrifugation; protective agent; survival rate

中图分类号: TS252.54

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2014)23-0154-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2014.23.023

乳酸菌直投式发酵剂生产过程中,菌体细胞浓缩分离及干燥技术是其中关键技术。菌体分离技术是制备浓缩型冻干乳酸菌发酵剂的重要中间环节,常用的分离方法有超滤和离心。离心分离较超滤简便、有分离速度快、效率高、设备清洗和消毒方便、操作时卫生条件好、不易染菌等优点^[1],适合大规模的分离过程。研究表明,离心过程中的机械作用及离心上清中菌体残留等都会造成菌体损失甚至死亡^[2],因此,应选择适当的离心工艺以减少活菌数量的损失。

冷冻干燥是目前乳酸菌保藏最稳定及最广泛使用的技术^[3]。嗜酸乳杆菌制品一般需要真空冷冻干燥,才能达到长期有效地保存,保持其有效的活菌制

品活菌数^[4]。此法能最大限度地保存菌体活性,干燥样品具有很好的保存性,在冷藏条件下可保存数年^[5]。冷冻干燥过程中,菌体受多种环境因素影响,菌体自身抵抗力、菌体浓度、生长条件、保护剂、冷冻速率、贮存条件(温度、大气压、相对湿度)及复水条件都会显著影响菌体存活率^[6],而选择合适的保护剂是其中的关键。不同保护剂保护效果不同,单一保护剂不足以保护菌体抵抗不良的冻干环境,通常将保护剂复配使用。

本实验研究了离心条件和不同冷冻保护剂对嗜酸乳杆菌 NX2-6 冷冻干燥的影响,通过比较离心后的菌体存活率和冻干前后活菌数的变化,筛选出适合嗜酸乳杆菌 NX2-6 的离心条件和真空冷冻干燥复合保护剂,以期为嗜酸乳杆菌高密度发酵剂的生产提供理论和技术依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

嗜酸乳杆菌 NX2-6 本实验室从内蒙古锡林浩

收稿日期:2014-03-31

作者简介:刘建丽(1987-),女,硕士研究生,研究方向:食品微生物。

*通讯作者:赵海珍(1975-),女,博士,副教授,研究方向:食品生物技术。

基金项目:国家十二五科技支撑计划(2011BAD23B05)。

特市牧民家庭中以传统发酵方法制作的酸马奶样品中分离获得;脱脂乳培养基 脱脂乳 100g, 酵母膏 1g, 蒸馏水 1000mL, pH 自然, 121℃ 灭菌 7min; 计数培养基 MRS 基础培养基^[7], 121℃ 灭菌 15min。

ALPHA 1-4 LD plus 冷冻干燥机 德国 Christ 公司; Centrifuge 5804 R 离心机 德国 Eppendorf 公司。

1.2 实验流程

菌种活化→扩大培养→离心收集菌体→加入保护剂→预冻→真空冷冻干燥→复水

1.3 离心条件的确定

为了使冷冻干燥时的样品中有足够的菌体细胞, 分别选择不同的转速和时间进行离心。测定离心前发酵液中活菌数记为离心前活菌数, 离心后迅速弃上清, 加入灭菌生理盐水至离心前体积, 梯度稀释, 混匀, 测得离心后沉降菌体活菌数。计算菌体离心后存活率, 确定获得高浓度菌体细胞所需要的离心条件。

离心后菌体存活率(%) = 离心后沉降菌体活菌数(CFU/mL) / 初始发酵液活菌数(CFU/mL) × 100

1.4 冷冻干燥方法

以 8000r/min 转速离心 10min, 所得菌体经灭菌生理盐水清洗两次, 获得菌泥。按照菌泥: 保护剂(mL/mL) = 1:3 的比例加入灭菌保护剂, 混匀获得菌悬液。取 1mL 菌悬液测定活菌数。另取 1mL 菌悬液加入灭菌离心管中, 先放入 -70℃ 冰箱预冻 12h, 以保证形成细小冰晶并冻结完全, 再进行真空冻干 24h。

1.5 复水

将冷冻干燥后的冻干粉用灭菌脱脂乳培养基(pH 自然) 37℃ 复水 15~20min, 用灭菌生理盐水进行梯度稀释。

1.6 $L_9(3^4)$ 正交实验

根据单因素实验结果筛选适宜的保护剂因子, 确定麦芽浸粉、谷氨酸钠和菊糖为考察因素, 每个因素取三个浓度水平, 按 $L_9(3^4)$ 正交表设计三因素三水平正交实验。以菌体冻干存活率为指标, 每组实验重复三次, 结果取平均值, 确定适宜的保护剂组合, 并通过验证实验对最终获得的最佳组合条件进

行验证, 检验其可靠性, 实验设计见表 1。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交实验因素及水平
Table 1 $L_9(3^4)$ orthogonal experiment designs

水平	因素		
	A 麦芽浸粉 (%, w/v)	B 谷氨酸钠 (%, w/v)	C 菊糖 (%, w/v)
1	5	1	4
2	10	3	7
3	15	5	10

1.7 冻干存活率的计算

将冻干菌粉用脱脂乳培养基复水, 梯度稀释, 采用 MRS 培养基倾注平板法, 37℃ 培养 48h, 计数, 检测冻干前每毫升样品中冻干后的活菌数。实验重复 3 次, 每次 3 个平行。

冻干存活率(%) = 冻干后单位体积样品活菌数(CFU/mL) / 冻干前单位体积样品活菌数(CFU/mL) × 100

2 结果与分析

2.1 离心条件的选择

离心浓缩可使菌体与代谢产物及乳酸盐等有害物质分离, 可提高冷冻干燥后的菌体存活率。本实验在 4℃ 条件下以不同离心转速和离心时间, 研究不同离心条件对菌体存活率的影响。选择了 4000、6000、8000r/min 三种离心转速, 每种离心转速对应三种不同的离心时间, 离心结束后添加生理盐水制成与离心前等体积的菌悬液, 并稀释计数, 记为离心后沉降菌体活菌数。结果见表 2。

离心力越小、离心时间越短, 菌体沉降率越低, 而增大离心力和延长离心时间, 均可显著提高菌体沉降率^[8]。胡仲秋等^[9]研究表明, 延长离心时间同时增大离心力, 离心损失率和离心存活率逐渐降低。因此, 应从菌体沉降率和离心存活率两方面考虑以确定离心力及离心时间, 以获得最大的活菌数。根据表 2 中的差异显著性分析结果, 在 8000r/min 的条件下离心 10min 和 6000r/min 的条件下离心 20min 所得活菌数最高, 但从生产周期方面考虑, 8000r/min 的条件下离心 10min 的离心条件效果更好, 在此条件下, 离心后的活菌数可达 9.85×10^9 CFU/mL, 菌体

表 2 不同离心条件下嗜酸乳杆菌 NX2-6 的菌体存活率

Table 2 The survival rate of *Lactobacillus acidophilus* NX2-6 obtained at different centrifugal conditions

转速(r/min)	时间(min)	离心前活菌数(×10 ⁹ CFU/mL)	离心后活菌数(×10 ⁹ CFU/mL)	菌体存活率(%)
4000	10	10.40 ± 0.20	8.20 ± 0.30	78.85 ± 2.88 ^c
4000	20	10.40 ± 0.20	9.50 ± 0.30	91.35 ± 2.88 ^{ab}
4000	30	10.40 ± 0.20	9.13 ± 0.17	87.79 ± 1.60 ^{ab}
6000	10	10.40 ± 0.20	9.45 ± 0.25	90.87 ± 1.92 ^{ab}
6000	20	10.40 ± 0.20	9.70 ± 0.30	93.27 ± 3.37 ^a
6000	30	10.40 ± 0.20	8.75 ± 0.25	84.13 ± 1.92 ^b
8000	5	10.40 ± 0.20	9.30 ± 0.20	89.42 ± 1.92 ^{ab}
8000	10	10.40 ± 0.20	9.85 ± 0.35	94.71 ± 2.40 ^a
8000	15	10.40 ± 0.20	9.60 ± 0.30	92.31 ± 2.88 ^{ab}

注: 标有不同字母表示差异极显著($p < 0.01$); 标有相同字母表示处理间差异不显著($p > 0.05$), 表 3、表 4 同。

存活率高达 94.71%。

2.2 冻干保护剂的选择

菌体冷冻干燥后的存活率受多种因素的影响,而保护介质是其中重要的影响因素。良好的保护剂要求其在冻干过程中能提供菌体保护作用,降低菌体死亡,同时能有较好的自身稳定性且有利于再水合,还可方便有效的除去冻干材料中的多余溶剂^[10]。本实验中研究了对嗜酸乳杆菌冷冻干燥保护效果较好的大分子、盐类、糖类及单分子多种保护剂,以筛选适合嗜酸乳杆菌 NX2-6 的冻干保护剂。

表3 各种冻干保护剂对嗜酸乳杆菌 NX2-6 存活率的影响
Table 3 The influences of different protective agents on the survival rate of *Lactobacillus acidophilus* NX2-6

保护剂 (w/v)	冻干前活菌数 ($\times 10^9$ CFU/mL)	冻干后活菌数 ($\times 10^9$ CFU/mL)	冻干存活率 (%)
脱脂乳 10%	26.25 \pm 0.25	14.55 \pm 0.55	55.43 \pm 2.10 ^d
麦芽浸粉 10%	32.25 \pm 1.75	21.90 \pm 0.30	67.91 \pm 0.62 ^a
乳糖 7%	30.75 \pm 2.25	15.08 \pm 0.52	49.04 \pm 1.71 ^e
蔗糖 10%	31.25 \pm 1.75	11.70 \pm 0.40	37.44 \pm 1.28 ^f
麦芽糖 10%	31.00 \pm 3.00	9.65 \pm 0.25	31.13 \pm 0.81 ^g
海藻糖 10%	34.25 \pm 2.75	18.40 \pm 0.20	53.72 \pm 0.58 ^d
菊糖 10%	35.75 \pm 3.25	21.15 \pm 0.25	59.16 \pm 0.70 ^c
谷氨酸钠 5%	31.75 \pm 2.25	20.40 \pm 0.20	64.25 \pm 0.63 ^b
甘露醇 5%	30.00 \pm 0.50	0.45 \pm 0.04	1.50 \pm 0.10 ⁱ
甘油 10%	31.25 \pm 2.45	4.65 \pm 0.35	14.88 \pm 0.96 ^h

根据表 3 中的显著性分析结果,10% 脱脂乳与 10% 海藻糖对菌体冻干保护的作用相当,对菌体存活率影响差异不显著($p > 0.05$),而其它冻干保护剂对菌体的保护效果差异显著($p < 0.05$)。大分子中麦芽浸粉的保护效果最好,糖类中菊糖的保护效果较好,谷氨酸钠也能有效提高菌体成活率,而小分子物质甘露醇和甘油的保护效果不佳。许多研究发现谷氨酸钠可提高大多数乳酸菌冷冻和冷冻干燥的存活

率,这是因为谷氨酸钠氨基基团与微生物蛋白质的羟基基团之间的反应稳定了蛋白质的结构,且保留了较大的水分含量^[11]。大分子保护剂,如脱脂乳、可溶性淀粉、麦芽浸粉等在冻干过程中使溶液呈过冷状态,降低了溶液结冰速度,避免在冻干过程中由于盐类浓缩导致细胞脱水进而导致渗透压性休克、细胞壁和细胞膜的塌陷、蛋白质变性等不良后果^[12],并且对低分子保护剂有促进作用^[13];低分子保护剂有较强亲水性,结构上有 3 个以上氢键,对糖、醇而言有 5 个以上羟基,可与菌体细胞膜磷脂中的磷酸基团或与菌体蛋白质极性基团形成氢键,以保持菌体结构与功能的完整性^[14]。

2.3 冻干保护剂浓度范围的确定

对筛选出来的麦芽浸粉、谷氨酸钠、菊糖三种冻干保护剂进行添加浓度的单因素实验,确定其适宜的添加水平,结果见表 4。高的菌体密度可增加对冷冻损伤的保护作用,但由于添加不同保护剂的菌悬液粘度不同,吸取菌悬液时移液管壁残留菌体量不同,会造成冷冻前活菌数的差别(仍保持同一数量级),故为提高实验精度,本实验对各菌悬液样品分别测三次冷冻前菌体浓度,结果取平均值,作为冻干前活菌数。由表 4 可以看出,不同浓度保护剂对菌体的冻干保护效果并没有出现浓度依赖关系,且每种保护剂在不同添加浓度下对菌体冻干存活率的影响差异显著($p < 0.05$)。单独以麦芽浸粉、谷氨酸钠或菊糖做冻干保护剂时,最适添加浓度分别为 15%、5%、11%。

2.4 正交实验

为获得高活力、活菌数含量高的嗜酸乳杆菌发酵剂,单一保护剂不足以保护菌体抵抗不良的冻干环境,而复配保护剂中各成分在冷冻干燥中均发挥各自的作用,同时相互间又可能有协同作用^[15]。而复配保护剂中,只有各保护剂成分搭配合理,才能取得最佳的保护效果。因此在单因素实验基础上

表4 冻干保护剂浓度对嗜酸乳杆菌 NX2-6 冻干活菌数的影响

Table 4 Concentrations of different protective agents on the survival rate of *Lactobacillus acidophilus* NX2-6

保护剂	冷冻前活菌数($\times 10^9$ CFU/mL)	冷冻后活菌数($\times 10^9$ CFU/mL)	冻干存活率(%)
麦芽浸粉(%)			
5	29.50 \pm 0.40	15.50 \pm 0.30	52.54 \pm 1.02 ^d
10	34.00 \pm 2.00	21.53 \pm 0.33	63.31 \pm 0.49 ^b
15	25.50 \pm 0.40	17.53 \pm 0.23	68.73 \pm 0.65 ^a
20	34.50 \pm 0.50	20.55 \pm 0.45	59.57 \pm 1.30 ^c
谷氨酸钠(%)			
1	31.00 \pm 2.50	6.25 \pm 0.15	20.16 \pm 0.48 ^d
3	36.50 \pm 1.50	11.88 \pm 0.23	32.55 \pm 0.62 ^c
5	35.00 \pm 3.00	22.73 \pm 0.43	64.94 \pm 0.76 ^a
7	43.00 \pm 2.00	25.95 \pm 0.15	60.35 \pm 0.23 ^b
菊糖(%)			
2	38.00 \pm 3.00	10.65 \pm 0.15	28.03 \pm 0.39 ^d
5	30.00 \pm 2.50	14.70 \pm 0.30	49.00 \pm 1.00 ^c
8	43.00 \pm 4.00	22.65 \pm 0.15	52.67 \pm 0.35 ^b
11	33.50 \pm 1.50	20.15 \pm 0.05	60.15 \pm 0.15 ^a

进一步考察不同冻干保护剂之间的复合效果。按照表 1 的因素和水平表进行 $L_9(3^4)$ 正交实验,得到正交实验直观分析和方差分析结果,如表 5 和表 6 所示。

表 5 $L_9(3^4)$ 正交实验结果及直观分析

Table 5 The $L_9(3^4)$ orthogonal experiment results and visual analysis

实验号	A	B	C	D	冻干存活率 (%)
1	1	1	1	1	54.81
2	1	2	2	2	65.57
3	1	3	3	3	64.17
4	2	1	2	3	64.09
5	2	2	3	1	68.98
6	2	3	1	2	65.02
7	3	1	3	2	73.05
8	3	2	1	3	79.64
9	3	3	2	1	81.84
K_1	61.517	63.983	66.49		
K_2	66.03	71.397	70.50		
K_3	78.177	70.343	68.733		
R	16.66	7.414	4.01		

注: K_1 、 K_2 、 K_3 表示各因素在每一水平下的平均冻干存活率;R 为极差,表示该因素对嗜酸乳杆菌冻干存活率影响的大小。

表 6 $L_9(3^4)$ 正交实验结果方差分析

Table 6 ANOVA analysis of $L_9(3^4)$ orthogonal experiment results

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
麦芽浸粉	445.467	2	147.067	19	*
谷氨酸钠	95.517	2	31.864	19	*
菊糖	24.234	2	8.001	19	
误差	3.03	2			

注:* 表示在 $p < 0.05$ 水平差异显著。

由表 5 可以看出,比较 3 个因素的 R 值大小,得出 3 种冻干保护剂对嗜酸乳杆菌冻干存活率影响的主次顺序为麦芽浸粉 > 谷氨酸钠 > 菊糖,麦芽浸粉对菌体冻干存活率的影响最大。这一点在表 6 的方差分析中也得到了证实,麦芽浸粉和谷氨酸钠对菌体冻干存活率影响显著($p < 0.05$)。比较表 5 中各因素的 K 值,获得最佳冻干保护剂组合为 $A_3B_2C_2$ 。

2.5 验证实验

为了验证正交实验所得冻干保护剂最优组合的有效性,按照直观分析得到的保护剂组合 $A_3B_2C_2$ 进行冻干保护验证实验,同时与表 5 中两个最高组合(第 8 和第 9 组)进行了比较实验,结果显示在 $A_3B_2C_2$ 配方保护剂作用下嗜酸乳杆菌 NX2-6 冻干存活率为 82.43% (活菌数高达 2.67×10^{10} CFU/mL),高于第 8、第 9 号实验,说明通过正交实验优化得到的最优冻干保护剂配方是有效的。

3 结论

不同离心条件对菌体离心存活率有较大的影响,而不同冻干保护剂对菌体冻干存活率也有显著影响。通过对不同离心条件的研究,发现在 4°C 和 $8000\text{r}/\text{min}$ 的条件下离心 10min 的菌体存活率最高。

以冻干后嗜酸乳杆菌 NX2-6 的存活率为指标,通过单因素实验和正交优化实验,确定了最佳的冻干保护剂配方,即麦芽浸粉 15%,谷氨酸钠 3%,菊糖 7%,此条件下嗜酸乳杆菌 NX2-6 的冻干存活率达到了 82.43%,活菌数为 2.67×10^{10} CFU/mL,有较为理想的冻干保护效果。其中麦芽浸粉和谷氨酸钠对嗜酸乳杆菌 NX2-6 的冻干存活率影响效果最为显著。

参考文献

- [1]任亚妮,车振明,黄莉.乳酸菌发酵剂中的细胞高密度培养条件及最佳离心条件探索[J].中国调味品,2011,5(6):36-39.
- [2]田洪涛,张柏林,贾英民,等.提高双歧杆菌在离心过程中活菌收得率的研究[J].食品科学,2000,21(6):27-30.
- [3]Carvalho A S, Silva I, Ho P, et al. Survival of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* during storage in the presence of protectants[J]. Biotechnology Letter, 2002,24(19):1587-1591.
- [4]Morgana C A, Herman N, White P A, et al. Preservation of micro-organisms by drying—a review[J]. Journal of Microbiology Methods, 2006,66(2):183-193.
- [5]郭兴华. 益生菌[M]. 北京:北京科学技术出版社,2002:169-170.
- [6]Edward V A, Huch M, Dortu C, et al. Biomass production and small-scale testing of freeze-dried lactic acid bacteria starter strains for cassava fermentation[J]. Food Control, 2011,22(3-4):389-395.
- [7]孙天昊,梁金钟.干酪乳杆菌 LC-STH-13 高密度培养基优化[J].农产品加工. 学刊,2010,299(12):42-47.
- [8]杨玉琢,杜鹃,焦月华.乳酸菌离心工艺条件优化的研究[J].中国乳品工业,2009,37(5):9-11.
- [9]胡仲秋,李志成,蒋爱民,等.离心条件对乳酸菌存活率的影响[J].食品研究与开发,2010,31(2):7-10.
- [10]方义川,杨虹坤,何谦,等.直投式乳酸菌发酵剂的研制[J].现代食品科技,2012,28(8):990-994.
- [11]Fonseca F, Beal C, Corrieu G. Method for quantifying the loss of acidification activity of lactic acid starters during freezing and frozen storage [J]. Journal of Dairy Research, 2000, 67(1):83-90.
- [12]卢行安,陈明生,袁杰利,等.乳酸菌冷冻干燥工艺的研究进展[J].中国微生物学杂志,2001,13(1):58-61.
- [13]吕兵,张国农,林金资.酸奶发酵剂速效干燥剂制备中保护剂的研究[J].中国乳品工业,1996,24(2):3-5.
- [14]陈声明,吕琴.微生物冷冻干燥的抗性机理[J].微生物学通报,1996,23(4):236-254.
- [15]山丽杰.利用真空冷冻干燥技术制备高效浓缩型酸奶发酵剂的研究[D].保定:河北农业大学,2004,33-41.