

# 微生物制剂的制备研究

胡筱红<sup>1</sup>, 贾建波<sup>2</sup>

(1. 淮安市质检所, 江苏 淮阴 223001) (2. 淮阴工学院生化系, 江苏 淮阴 223001)

**摘要:** 研究了嗜热链球菌、双歧杆菌和植物乳杆菌在冷冻干燥条件下, 保护剂对细胞冻干存活率和冻干发酵剂活菌含量的影响, 得出最高活菌含量, 嗜热链球菌为  $1.2 \times 10^9$  个/g, 双歧杆菌为  $8.4 \times 10^8$  个/g, 植物乳杆菌为  $1.4 \times 10^9$  个/g。采用最适保护剂制成的试验菌株冻干发酵剂在 42 °C 乳中发酵 10 h, 发现其细胞生长曲线、产酸曲线及 pH 值下降曲线与冻干前对照发酵剂相比, 均无明显变化。在贮藏试验的研究中, 发现 4 °C 以下贮存, 存活率较高, 混合菌的贮存期明显高于单一菌。在人工胃液中的存活率, 混合菌也明显好于单一菌。

**关键词:** 合生素; 益生菌; 保护剂

**中图分类号:** Q933; **文献标识码:** A; **文章篇号:** 1673-9078(2007)05-0046-04

## Study on the Preparation of Synbiotics

HU Xiao-hong<sup>1</sup>, JIA Jian-bo<sup>2</sup>

(1. Huai'an Quality Testing Institute, Huaiyin 223001, China)

(2. Department of Bioengineering and Chemical Engineering, HuaiYin Institute of Technology, Huaiyin 223001, China)

**Abstract:** The effects of the protective agent on the survival rate of cells and the living cell number of freeze-drying starter were studied during the freeze-drying of *S. thermophilus*, *Bifidobacterium* and *Lactobacillus planetarium*. The highest survival cell contents of the above-mentioned bacteria were  $1.2 \times 10^9$ /g,  $8.4 \times 10^8$ /g and  $1.4 \times 10^9$ /g, respectively. The freeze-drying starters with suitable protective agent were fermented in milk medium at 42 °C for 10 h and their growth curves, acid-producing curves and the pH value curves with or without freeze-drying had no obvious difference. It was also found that the storage of complex bacteria was better than that of the single bacteria below 4 °C. The survival percentage of the complex bacteria was higher than that of the single in the artificial gastric juice.

**Key words:** synbiotics; probiotic bacteria; protective agent

合生素(Synbiotics)是益生菌(Probiotic bacteria)和益生元(Prebiotics)的混合制剂, 用来调整微生态平衡, 提高宿主健康水平或增加进健康状态的益生菌。合生素既可发挥益生菌的生理活性, 又可选择性地增加这种菌的数量使益生菌的作用更显著持久, 它是微生态调节剂今后发展的一个方向。

但是, 目前绝大多数微生态活菌剂存在活菌含量低、益生菌易受外界环境因素的影响, 常温下货架寿命短等问题。

嗜热链球菌、植物乳杆菌代谢可产生有机酸、多肽、过氧化氢、双乙酰等多种天然抑菌物质, 可降解聚胆盐、降解毒性胺, 具有维持肠道菌群平衡、提高机体免疫能力、促进营养物质吸收等多种功能。双歧杆菌具有提高机体免疫能力、保持肠道菌群平衡, 增进消费者健康。

本文对三种可作微生态制剂的嗜热链球菌、植物乳杆菌和双歧杆菌进行研究, 为提高活菌含量和延长

活菌保藏时间进行了初步的探讨。

### 1 材料和方法

#### 1.1 试验材料

菌种: 嗜热链球菌、两歧双歧杆菌, 由淮阴工学院生物工程实验室提供; 植物乳杆菌, 从当地产腌菜中分离筛选获得。

嗜热链球菌的选择性培养基: 牛肉浸膏 0.5%, 酵母浸膏 0.25%, 蔗糖 2.5%, Vc 0.20%, 乳粉水解液 6.0%, 柠檬酸三铵 0.4%, 七水磷酸镁 0.01%, 琼脂 1.5%, pH 7.0~7.2。

乳粉水解液: 50 g 乳粉中加入 30 mL, 12 mol/L 的盐酸沸水浴至完全液化后调 pH 至中性过滤, 取滤液定容至 150 mL。

双歧杆菌发酵培养基: 蛋白胨 2.0%, 葡萄糖 1.0%, 酵母汁 0.5%, 牛肉膏 0.5%,  $K_2HPO_4$  0.3%, HCl-半胱氨酸 0.1%, pH 7.0,  $0.7 \times 10^5$  MPa, 杀菌 15min。

主要仪器设备: 恒温培养箱、振荡培养箱、冷冻

收稿日期: 2007-02-25

离心机、超低温冰箱、真空冷冻干燥机。

### 1.2 试验方法

工艺流程：菌种分离纯化→菌种活化→液体培养基培养→离心收集菌体→菌体混合→选择保护剂制备悬浮液→分装→冷冻→真空冷冻干燥→活菌粉→添加 10%低聚木糖（质量比）→胶囊→不同温度下贮存实验→模拟人工胃液实验。

酸度测定：酸度滴定法<sup>[1]</sup>。

菌数测定：血球计数板计数法<sup>[2]</sup>。

存活率测定：取一定量待测菌粉加入一定量灭菌 PBS 缓冲液，室温静置复水 20 min，再进行活菌数测定。

干剂中菌的存活率=（瓶内干剂复水后活菌数）/（瓶内原有菌体悬浮液的活菌数）×100%

每克活菌粉的活菌数=（瓶内干剂复水后活菌数）/（干剂的质量）

## 2 结果与讨论

### 2.1 生长曲线的绘制

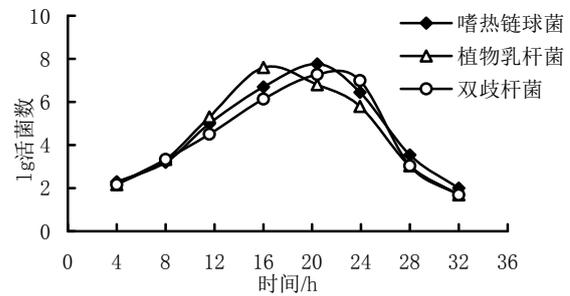


图1 嗜热链球菌、植物乳杆菌、双歧杆菌生长曲线图

由图1可看出，嗜热链球菌、植物乳杆菌、双歧杆菌的最适培养时间分别为16~23 h、15~20h、20~24h。

### 2.2 保护剂的选择

表1 不同保护剂在冻干过程中对菌存活及冻干菌粉活菌含量的影响

保护剂	嗜热链球菌		植物乳杆菌		双歧杆菌		混合菌	
	1	2	1	2	1	2	1	2
20%脂脱乳	56.68	6.9	54.34	7.2	55.73	4.3	56.79	7.9
20%脂脱乳+Vc	66.61	7.6	67.88	8.3	68.92	5.9	69.32	8.8
20%脂脱乳+蔗糖	62.38	7.5	70.12	8.1	69.88	6.2	70.96	8.6
20%脂脱乳+乳糖	69.45	8.8	73.45	9.2	70.12	6.17	74.52	10.1
20%脂脱乳+1%甘油	70.12	9.2	76.23	1.1	72.12	7.3	78.25	10.3
20%脂脱乳+1%谷氨酸钠	68.92	8.6	74.15	9.8	69.43	6.9	75.85	11.2
混合保护剂	78.45	12	80.25	14	83.32	8.7	85.12	14.6

注：（1）1为细胞冻干存活率%；2为菌粉活菌含量(×10<sup>8</sup>个/g)；

（2）以脱脂乳粉为基质是因为在干燥时，乳清蛋白能在菌体外形成蛋白膜，对细胞加以保护；

（3）对于不同菌的保护剂，其Vc、蔗糖和乳糖的浓度各不相同，嗜热链球菌：Vc为1%，蔗糖为5%，乳糖为5%；植物乳杆菌：Vc为1.5%，蔗糖为4%，乳糖为5%；双歧杆菌：Vc为1.5%，蔗糖为6%，乳糖为4%。

（4）混合保护剂是上述各保护剂一定配比的组合。

有文献报道<sup>[5]</sup>，保护剂各有优缺点，单一保护剂不能满足菌体抵抗外界恶劣的条件，以一定比例复配的保护剂效果较好，因为它们之间具有互补作用<sup>[5]</sup>。由表1可知，保护效果最好的均为混合保护剂。对于嗜热链球菌、植物乳杆菌、双歧杆菌和这三种菌的混合菌，其冻干细胞存活率分别可达78.45%，80.25%，83.32%，85.12%；冻干菌粉活菌含量分别可达1.2×10<sup>9</sup>个/g，1.4×10<sup>9</sup>个/g，8.7×10<sup>8</sup>个/g，1.46×10<sup>9</sup>个/g。

### 2.3 发酵活力的变化

选取冻干前脱脂乳培养基培养的菌体，将活菌数为1×10<sup>7</sup> mL<sup>-1</sup>左右的活菌接入20%脱脂乳培养基中，42℃恒温发酵，定时取样，测定乳酸度、pH值，另取混合保护剂制成的菌粉，加入一定量生理食盐水，37℃复水15 min，亦按1×10<sup>7</sup> mL<sup>-1</sup>左右的活菌数接入

20%脱脂乳培养基中，42℃恒温发酵，定时取样，测定乳酸度、pH值。

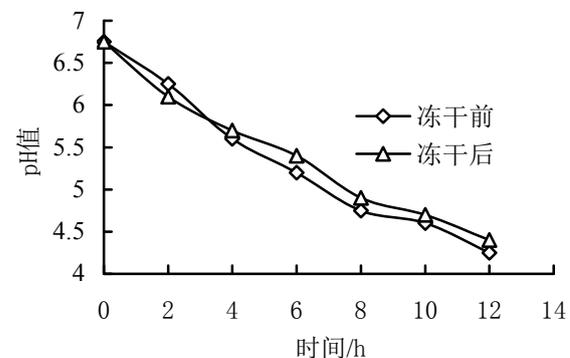


图2 冻干前后嗜热链球菌发酵产酸曲线

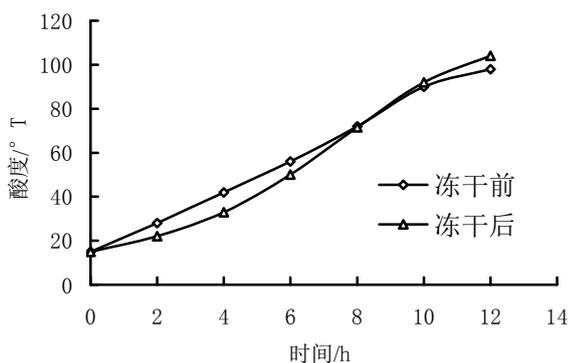


图3 冻干前后嗜热链球菌发酵 pH 下降曲线

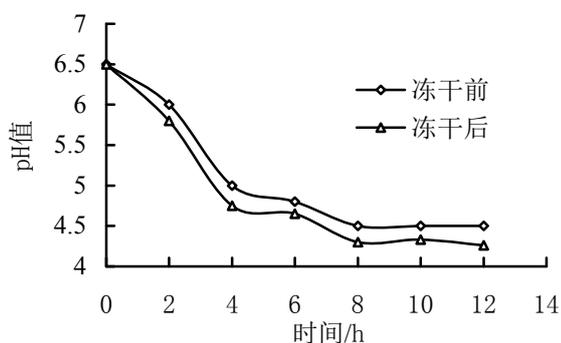


图4 冻干前后植物乳杆菌发酵产酸曲线

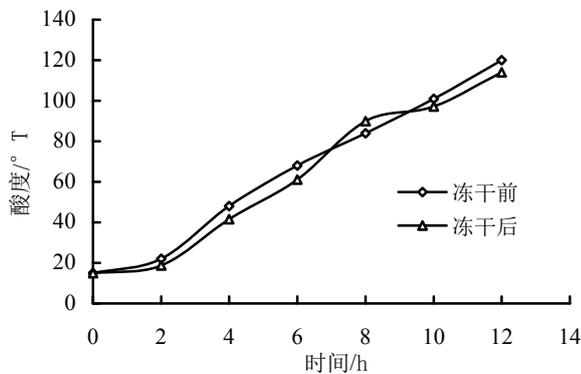


图5 冻干前后植物乳杆菌 pH 下降曲线

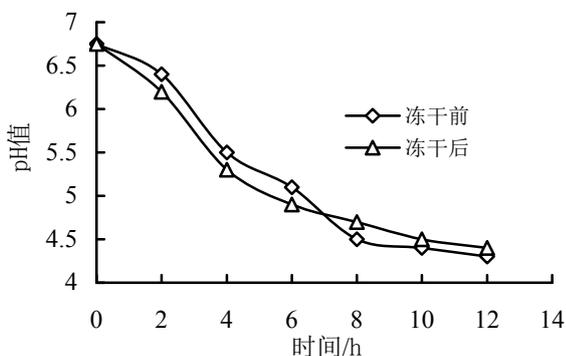


图6 冻干前后双歧杆菌发酵产酸曲线

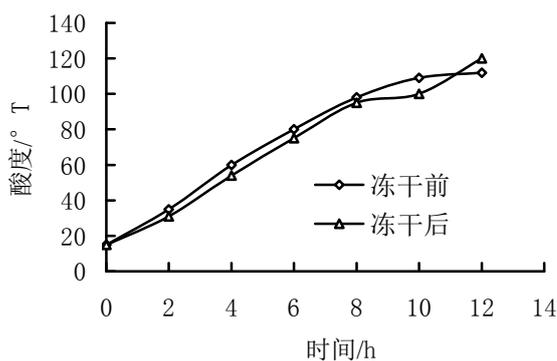


图7 冻干前后双歧杆菌 pH 下降曲线

由图 2~7 可看出，嗜热链球菌、植物乳酸菌和双歧杆菌冻干前后在脱脂乳中 42 °C 发酵 12 h 的产酸曲线和 pH 值下降曲线均无明显变化，表明适宜菌体存活的保护剂能够有效防止冻干后发酵剂的生物活性损失。

## 2.4 保护剂保护机理的分析

### 2.4.1 冷冻干燥对菌体造成的伤害

菌体在冷冻干燥过程中和贮存期活力损失的主要原因是冷冻冲击、细胞壁通透性的改变和代谢损伤<sup>[3]</sup>。

### 2.4.2 冷冻干燥时影响菌体死亡率的关键因素<sup>[6]</sup>

冷冻干燥中微生物死亡的可能性表达为：

$$P = \int_s \rho_s dS$$

$P$ ：微生物死亡的可能性； $S$ ：微生物暴露于外界培养基的区域； $\rho_s$ ：可能发生于细胞壁的损伤密度。当细胞的生理条件和胞外环境没有改变时，则  $\rho_s$  为常数。因此上式可变为：

$$P = \rho_s S$$

说明微生物死亡的可能性与暴露于外部的区域及细胞膜的通透性有关，即影响上述因素的冻干条件都会影响到菌体的死亡率。

### 2.4.3 保护剂的作用

保护剂的保护作用与它们的化学结构有密切关系<sup>[3]</sup>，如甘油、低分子糖和醇等，可以与菌表面自由基联结起来，避免菌体暴露在介质中，还可与蛋白质形成氢键取代水，保证其稳定性。脱脂奶粉、可溶性淀粉等高分子保护剂，能溶于水，溶液可呈过冷状态，即在冰点以下的相同温度下该溶液中的溶质（电解质）浓度较小，蛋白质的盐析变性也较少。

### 2.5 菌粉在不同温度下贮存的活菌含量的变化

单一菌种均选择由混合保护剂制成的菌粉，混合菌种均由该三种菌种按 1:1:1 的比例混合，各菌粉活菌在 4 °C，25 °C 下贮存的变化见表 2 和表 3。

表2 4℃贮存活菌含量( $\times 10^9$ 个/g)

天数	嗜热链球菌	植物乳杆菌	双歧杆菌	混合菌
0	1.29	1.4	0.87	1.16
5	1.059	1.23	0.84	1.09
10	0.949	1.04	0.72	1.01
15	0.869	0.919	0.689	0.919
20	0.759	0.829	0.639	0.849
25	0.629	0.749	0.519	0.789
30	0.59	0.599	0.429	0.639

表3 25℃贮存活菌含量( $\times 10^9$ 个/g)

天数	嗜热链球菌	植物乳杆菌	双歧杆菌	混合菌
0	1.2	1.4	0.87	1.16
5	0.92	1.0	0.65	0.97
10	0.75	0.86	0.51	0.85
15	0.51	0.67	0.42	0.70
20	0.34	0.41	0.22	0.45
25	0.16	0.29	0.06	0.32
30	0.094	0.10	0.04	0.23

由表2和表3可知,在4℃下贮存菌粉的活菌含量明显高于25℃贮存的活菌含量,且混合菌种的贮存明显好于单一菌种。

## 2.6 人工胃中各菌存活情况

上述三种菌及其混合菌在人工胃液的活菌数<sup>[7]</sup>,如表4所示。

由表4可看出,混合菌的存活率最高可达2.0%。但相对而言仍不算太高,就需对微生态制剂作进一步的研究,目前研究得最多的是采用微胶囊包埋技术,

关于这方面的研究很多,本文不作赘述。

表4 各菌在人工胃液中存活的比较

菌名	加胃液前的活菌数	加人工胃液后的活菌数	在胃液中的存活率
嗜热链球菌	$1.2 \times 10^9$ 个/g	$5.2 \times 10^6$ 个/g	0.43%
植物乳杆菌	$1.4 \times 10^9$ 个/g	$6.3 \times 10^6$ 个/g	0.45%
双歧杆菌	$0.87 \times 10^9$ 个/g	$4.9 \times 10^6$ 个/g	0.56%
混合菌	$1.16 \times 10^9$ 个/g	$2.3 \times 10^7$ 个/g	2.0%

## 3 结论

在冷冻干燥过程中,采用混合保护剂保护三种菌体,经研究发现冻干前后产酸曲线和pH下降曲线均无明显变化。混合菌的贮存明显好于单一菌种,混合菌在胃液中的存活率明显好于菌种。

## 参考文献

(上接第36页)

## 参考文献

- [1] Kunshan Gao, Ding hui Zou. Photosynthetic bicarbonate utilization by a terrestrial cyanobacterium, *Nostoc flagelliforme* (Cyanophyceae)[J]. Journal of Phycology, 2001, 37 (5): 768-761
- [2] 唐进年,赵明,张晔明等.念珠藻发菜的水分生理特性[J]. 西北植物学报,2005,25(2):236-243
- [3] Kenji Kanekiyo, Jung-Bum Lee, Kyoko Hayashi, et al. Isolation of an antiviral polysaccharide nostoflan from a terrestrial cyanobacterium *Nostoc flagelliforme*[J]. Journal of Natural Products,2005,68 (7):1037-1041
- [4] 孙培龙,魏红福,杨开等.姬松茸多糖的分离纯化与理化性质研究[J].中草药,2006,37(2):190-191
- [5] 刘志伟,姜华年.菱叶红景天多糖的提取、纯化鉴定及理化特性研究[J].食品科学,2005,26(3):60-63
- [6] 白雪娟,苏建宇,赵树欣等.发菜细胞培养液中多糖含量测定方法的比较研究[J].食品工业科技,2004,25(11):146-150
- [7] 郭振楚.糖类化学[M].北京:化学工业出版社,2005,106-108.
- [8] C.Ganesh Kumar, Han-Seung Joo, Jang-Won Choi, et al. Purification and characterization of an extracellular polysaccharide from haloalkalophilic *Bacillus* sp. I-450 [J]. Enzyme and Microbial Tehnology,2004,34:673-681
- [9] Amit Parkh, Datta Madamwar. Partial characterization of extracellular polysaccharides from cyanobacteria[J]. Bio-resource Technology,2006,97:1822-1827