

直投式乳酸菌发酵剂的研制

方义川¹, 杨虹坤², 何谦³, 韩笑², 刘秉杰⁴, 李适云², 杨益衡⁴, 胡文锋²

(1. 汕头鱼露厂有限公司, 广东汕头 515021) (2. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)

(3. 暨南大学生命科学技术学院, 广东广州 510632) (4. 东莞石龙津威饮料食品有限公司, 广东东莞 523320)

摘要: 本研究旨在研制出一种菌活高、使用简单, 无需复杂的无菌操作技术与设备的直投式乳酸菌发酵剂, 可用于发酵乳、泡菜以及动物饲料发酵和生产。本发酵剂以嗜酸乳杆菌LH1F为菌种, 实验过程优化番茄汁增菌培养基的配方, 细胞数目达 4.25×10^{10} CFU/mL。最佳的抗冷冻保护剂的配方为: 脱脂奶粉2.5%, 甘油1%, 葡萄糖2.5%, 蔗糖1%, Vc 2.5%。真空冷冻干燥的条件为4000 r/min, 20 min离心获得菌体后真空冷冻干燥6 h。通过优化的直投式乳酸菌发酵剂的活菌数可以达到 1.27×10^{12} CFU/g; 于4 °C存放三个月后, 乳酸菌活菌数仍达到 3×10^{10} CFU/g。因此, 经过优化乳酸菌发酵条件及保护剂配方, 所得的冻干型直投式菌种可用于乳品及动物饲料的发酵。

关键词: 直投式发酵剂; 乳酸菌; 优化

文章编号: 1673-9078(2012)8-990-994

Development of a Directed Vat Set Starter of Lactic Acid Bacteria

FANG Yi-chuan¹, YANG Hong-kun², HE Qian³, HAN Xiao²

LIU Bin-jie⁴, LI Shi-yun², YANG Yi-hong⁴, HU Wen-feng²

(1. Shantou Fish Sauce CO., Ltd, Shantou 515021, China) (2. Department of Bioengineering, College of Food Science, South China Agricultural University, Wushan Street, Guangzhou, 510642, China)

(3. College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou, 510632, China)

(4. Dongguan Shilong Jingwei Beverage and Food Co., Ltd, Dongguan 523320, China)

Abstract: A Directed Vat Set (DVS) of lactic acid bacteria (LAB) was developed for the fermentation and production of fermented soft drink and animal feed. *Lactobacillus acidophilus* LH1F was used as test strain. The cultural media for the *L. acidophilus* LH1F growth and the ingredients of anti-freeze protectants for lyophilization of LAB cells were optimized by orthogonal tests. The highest cell concentration of 4.25×10^{10} CFU/mL was found using tomato juice enrichment medium. The optimized anti-freeze protectants recipe contained skimmed milk powder 2.5%, glycerol 1%, glucose 2.5%, sucrose 1% and Vitamine C 2.5%. After 6 hours lyophilization, the number of viable LAB cells of DVS was about 1.27×10^{12} CFU/g. The cell number still maintained 3×10^{10} CFU/g after three months preservation at 4 °C.

Key words: DVS; lactic acid bacteria; optimization

直投式乳酸菌发酵剂(Directed Vat Set, DVS)是采用筛选的优质乳酸菌种进行液体高密度培养后, 经过菌体细胞分离, 与保护剂介质混溶制备高浓度菌悬液, 再经冷冻干燥, 无菌包装后制成的一系列高浓度和标准化的发酵剂菌种^[1]。直投式乳酸菌发酵剂是目前发酵工业的一个研究热点^[2], 因为其具有以下优点: 活菌数

收稿日期: 2012-06-13

项目基金: 广东省科技厅工业攻关重大项目(2008A010900003); 广东省教育部产学研结合项目(2009B090300106、2010B09400038); 广东省科技厅省部产学研结合项目(2011B090400221); 广东省科技厅农业攻关项目(2010B020412001)

作者简介: 方义川(1957-), 男, 工程师, 主要从事鱼露生产工作

通讯作者: 何谦(1981-), 硕士; 胡文锋(1964-), 博士, 副教授

含量高($10^{10} \sim 10^{12}$ CFU/g)、活力高、接种量少(万分之一)、保质期长、产品质量稳定, 且在生产时不需要经过活化、扩培等预处理工作而直接应用于生产, 大大提高劳动生产率与产品质量^[3], 同时减少发酵工业的生产成本与生产周期。目前这种直投式发酵剂已被广泛应用于酸奶的发酵与生产。受此启发, 不少研究者试图借鉴直投式酸奶发酵剂的方法, 制备其他用途的直投式发酵剂, 包括肉制品发酵剂, 泡菜发酵剂等^[4-6]。

本课题也是受到直投式酸奶发酵剂的启发, 旨在开发一种直投式乳酸菌饲料发酵剂, 用于饮品及动物饲料发酵, 生产一种发酵饲料。同 DVS 一样, 直投式饲料发酵剂使用简单, 无需复杂的无菌操作技术与设备, 适于在基层农户推广。同时, 经直投式饲料发

酵剂的乳酸菌发酵后,可提高饲料转化率^[7]、促进动物生长^[8]、改善动物胃肠道健康水平、减少抗生素的使用,大大降低动物药残和耐药性等方面的风险,从而提高肉类制品的食品安全性。

目前,在动物饲料发酵方面,由于发酵水平和发酵条件,菌种的纯度等,常造成发酵质量参差不齐等问题^[9]。而开发一种高细胞含量、高活性的直投式饲料发酵剂用于饲料发酵成为一个重要课题。

1 材料与方法

1.1 菌种

嗜酸乳杆菌 LH1F (*Lactobacillus acidophilus* LH1F strain), 由华南农业大学食品学院生物工程系应用微生物研究室提供。

1.2 主要仪器与试剂

Alpha 1-2 LD plus 真空冷冻干燥机, CHRIST; 5810(R)高速冷冻离心机, Eppendorf; AL104 电子天平, MettlerToledo; 手提式不锈钢蒸汽消毒锅, 上海三申医疗器械有限公司; 超净工作台, 苏净集团苏州安泰空气技术有限公司。

脱脂奶粉, 内蒙古伊利实业集团股份有限公司; 甘油, 天津市富宇精细化工有限公司; DMSO, 天津市博迪化工有限公司; 葡萄糖, 广东光华化学厂有限公司; 蔗糖, 天津市启轮化学科技有限公司; 乳糖, 上海伯奥生物科技有限公司; 抗坏血酸 (Vc), 上海伯奥生物科技有限公司。

1.3 培养基

1.3.1 种子培养基

MRS液体培养基。

1.3.2 增菌因子

番茄汁为生长因子供体:

西红柿→热水烫皮→切块→榨汁→过滤→备用

1.3.3 菌种活化与细胞计数培养基

固体 MRS 培养基。

1.4 方法与步骤

1.4.1 乳酸菌发酵剂的制备

1.4.1.1 乳酸菌的活化与制种

接甘油种 (活化) →倒平板→挑单菌落→抑菌试验→制备一级种→制二级种→于 37℃, 静止培养 18h。

1.4.1.2 细胞离心与干燥

将培养完毕的菌悬液在无菌条件下 4℃, 4000 r/min 离心 20 min。离心后收集菌体于冻干烧瓶中, 添加冷冻保护剂, 挂瓶于真空冷冻干燥机开始干燥。干燥时间约 6h。

1.4.1.3 乳酸菌发酵剂活菌数测定

定时测定制备的冻干菌粉中嗜酸乳杆菌的数量。采用稀释倒平板法, 用生理盐水进行稀释。取合适稀释倍数的菌悬液, 接种于 MRS 固体培养基, 37℃ 培养 48h。

1.4.2 乳酸菌增殖培养基优化

在 MRS 培养基的基础上, 对乳酸菌培养基成分与配比进行筛选。葡萄糖 (A)、蛋白胨 (B)、番茄汁 (C) 和 CaCO₃ (D) 为试验因素, 设计 L₉(3⁴) 正交试验。改良的 MRS 为 (m/V): 葡萄糖、蛋白胨、番茄汁和 CaCO₃ 的添加量如表 1 所示, 酵母膏 5 g/L、柠檬酸二铵 2 g/L、吐温 80 1 mL/L、MgSO₄·7H₂O 0.58 g/L、MnSO₄·4H₂O 0.25 g/L。培养基 pH 6.2~6.4。

表 1 培养基成分配比正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels for the medium optimization

水平	因素			
	A [葡萄糖 (g/L)]	B [蛋白胨 (g/L)]	C [番茄汁 (mL/L)]	D [CaCO ₃ (g/L)]
1	15	5	50	2
2	20	10	100	4
3	25	15	150	6

将已活化并处于对数生长期 (培养 12h 左右) 的嗜酸乳杆菌 LH1F 菌种按 3% (V/V) 接入各组培养基 (按照表 2 L₉(3⁴) 正交试验方案配制), 于 37℃ 培养 24h, 按照 1.4.1.3 进行活菌数测定。经比较选出最优配比。

1.4.3 冻干保护剂及其复合配方的优化筛选

菌体冷冻干燥的存活率受多方面的影响, 包括起始的细胞菌液浓度, 保护介质和再水合条件^[10], 其中保护介质是一个重要环节。一种保护效果好的保护剂要求在冷冻干燥过程中可以提供保护作用, 并且有良好的自身稳定性和有利于再水合, 还可以方便有效地除去冻干材料中的多余溶剂。

出于对保护剂成本及保护效果的综合考虑, 通过参考其他文献^[11,12], 本试验选定五种成分作为预选保护剂, 分别为: 脱脂奶粉、葡萄糖、蔗糖, 以及乳糖、甘油、DMSO 及 Vc 中的任意两种。即脱脂奶粉、葡萄糖、蔗糖是固定组分, 乳糖、甘油、DMSO 及 Vc 两两组合, 以获得更好的冷冻效果。因此采用 L₈(4×2⁴) 正交表, 分四组进行保护剂的配方筛选。

1.4.4 冻干发酵剂保藏期间活菌数的变化

将保存于 4℃ 的冻干发酵剂分别于一周、一个月、三个月后取出进行活菌数检测, 观察冻干发酵剂在保藏期中的活菌数变化, 作为日后确定该直投式发酵剂保质期提供依据。

2 结果与分析

2.1 增殖培养基的配方优化

按照表 2 进行试验, 优化组分配比, 另添加酵母膏 5 g/L、柠檬酸二铵 2 g/L、吐温 80 1 mL/L、MgSO₄·7H₂O 0.58 g/L、MnSO₄·4H₂O 0.25 g/L, pH 6.2~6.4。具体如表 2 所示:

表 2 培养基成分分配比 L₉(3⁴) 正交试验方案与结果

Table 2 Results for the L₉(3⁴) orthogonal test for medium optimization

试验号	因素				活菌数/ (×10 ⁸ CFU/mL)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	3
2	1	2	2	2	2
3	1	3	3	3	13
4	2	1	2	3	6
5	2	2	3	1	35
6	2	3	1	2	7
7	3	1	3	2	185
8	3	2	1	3	425
9	3	3	2	1	6
k1	6	619.6	1420	14.6	
k2	16	1429	4.6	619.6	
k3	2035	8.6	632.6	1423	
R	2029	1420.4	1415.4	1408.4	
方案	A3	B2	C1	D3	

由表 2 进行直观分析可看出 8 号培养的细胞浓度最大, 达 4.25×10¹⁰ CFU/mL, 其最优组合方案为 A₃B₂C₁D₃。即优化的培养基配方为: 葡萄糖 25 g/L、蛋白胨 10 g/L、番茄汁 50 mL/L、CaCO₃ 6g/L、酵母膏 5 g/L、柠檬酸二铵 2 g/L、吐温 80 1 mL/L、MgSO₄·7H₂O 0.58 g/L、MnSO₄·4H₂O 0.25 g/L、水 1000 mL, pH6.2~6.4。

比较各因素的极差大小为 R_A>R_B>R_C>R_D, 对活菌数影响的主次顺序为 ABCD, 由此看出, 葡萄糖在培养基的含量对菌体的生长繁殖有着最为重要的影响, 且其浓度在适当的范围内提高, 活菌数也随之升高。蛋白胨作为氮源, 构成生物体的蛋白质、核酸及其他氮素化合物的材料, 一般情况下, 碳氮比偏小, 使菌体过分旺盛生长和繁殖, 易造成菌体提前衰老自溶; 碳氮比过大, 菌体繁殖数量少。

2.2 冻干保护剂配方

本试验分别选用脱脂奶粉、葡萄糖、蔗糖、乳糖、甘油、DMSO 及 Vc 七种材料作为受试保护剂, 采用 L₈(4×2⁴) 正交表, 分四次来对保护剂配方进行筛选, 经

比较得出最优冷冻保护剂配方。保护剂优化试验如表 3~表 6 所示。

表 3 第一组保护剂 L₈(4×2⁴) 正交试验方案与结果

Table 3 Results for the L₈(4×2⁴) orthogonal test for the optimization of anti-freeze protectants recipe 1#

试验号	因素					活菌数/ (×10 ⁹ CFU/g)
	A(脱脂奶粉/%)	B(甘油/%)	C(葡萄糖/%)	D(蔗糖/%)	E(乳糖/%)	
1	1(10)	1(2.5)	1(2.5)	1(2.5)	1(2.5)	44
2	1	2(1)	2(1)	2(1)	2(1)	0
3	2(5)	1	1	2	2	4
4	2	2	2	1	1	0
5	3(2.5)	1	2	1	2	2
6	3	2	1	2	1	28
7	4(1)	1	2	2	1	9.5
8	4	2	1	1	2	2
k1	22	14.88	19.5	12	20.38	
k2	2	7.5	2.88	10.38	4	
k3	15	/	/	/	/	
k4	5.75	/	/	/	/	
R	20	7.38	16.63	1.63	16.38	
方案	A ₁	B ₁	C ₁	D1	E ₁	

表 4 第二组保护剂 L₈(4×2⁴) 正交试验方案与结果

Table 4 Results for the L₈(4×2⁴) orthogonal test for the optimization of anti-freeze protectants recipe 2#

试验号	因素					活菌数/ (×10 ¹¹ CFU/g)
	A(脱脂奶粉/%)	B(DMSO/%)	C(葡萄糖/%)	D(蔗糖/%)	E(乳糖/%)	
1	1(10)	1(2.5)	1(2.5)	1(2.5)	1(2.5)	0
2	1	2(1)	2(1)	2(1)	2(1)	1
3	2(5)	1	1	2	2	4
4	2	2	2	1	1	10
5	3(2.5)	1	2	1	2	0
6	3	2	1	2	1	0
7	4(1)	1	2	2	1	4.2
8	4	2	1	1	2	0.2
k1	0.5	2.05	1.05	2.55	4.3	
k2	7	2.8	3.8	2.3	1.3	
k3	0	/	/	/	/	
k4	2.2	/	/	/	/	
R	7	0.75	2.75	0.25	3	
方案	A4	B2	C2	D1	E1	

由表 3 分析可得出该试验中 1 号保护剂的保护效果最佳, 从该正交表中我们筛选出 1 号保护剂与后续的试验配比进行比较。

分析表 4 中的极差大小可知,对考查指标影响的大小顺序为: A 取 4 水平, E 取 1 水平, C 取 2 水平, B 取 2 水平, D 取 1 水平。但试验表中并无该组合,按照优选顺序来排列选择确定该试验表中优选方案为 7 号。

表 5 第三组保护剂 L₈(4×2⁴) 正交试验方案与结果

Table 5 Results for the L₈(4×2⁴) orthogonal test for the optimization of anti-freeze protectants recipe 3#

试验号	因素					活菌数/ (×10 ¹⁰ CFU/g)
	A(脱脂奶粉/%)	B(DMSO/%)	C(葡萄糖/%)	D(蔗糖/%)	E(Vc/%)	
1	1(10)	1(2.5)	1(2.5)	1(2.5)	1(2.5)	0
2	1	2(1)	2(1)	2(1)	2(1)	26.4
3	2(5)	1	1	2	2	33
4	2	2	2	1	1	39
5	3(2.5)	1	2	1	2	0.1
6	3	2	1	2	1	0.6
7	4(1)	1	2	2	1	3.15
8	4	2	1	1	2	30
k1	13.2	9.06	15.9	17.3	10.69	
k2	36	24	17.16	15.79	22.38	
k3	0.35	/	/	/	/	
k4	16.575	/	/	/	/	
R	35.65	14.94	1.26	1.49	11.69	
方案	A ₄	B ₂	C ₂	D ₁	E ₂	

分析表 5 中的极差大小可知,对考查指标影响的大小顺序为: A 取 4 水平, B 取 2 水平, E 取 2 水平, D 取 1 水平, C 取 2 水平。但试验表中并无该组合,按照优选顺序来排列选择确定该试验表中优方案为 8 号。

分析表 6 中的极差大小可知,对考查指标影响的大小顺序为: A 取 3 水平, B 取 2 水平, E 取 1 水平, C 取 2 水平, D 取 2 水平。但试验表中并无该组合,按照优选顺序来排列选择确定该试验表中优方案为 6 号。

结合国内外的文献报道^[13,14],浓度为 1%~68%的蔗糖溶液可作为冷冻保护剂,它可以用于杆菌和球菌的保护剂,因为蔗糖可以抑制表面自由基的产生,对菌体细胞有较好的保护作用。浓度为 1%~10%的脱脂奶粉溶液也可作为乳酸菌的冷冻保护剂,其原因是:

(1) 提高了细胞的稳定性以降低细胞损伤;(2) 创造了一个多孔的环境有利于再水合;(3) 含有大量的蛋白质给细胞提供了保护性的外衣^[15]。再将以上四组正交试验所筛选出的优方案所对应的活菌数进行比较,得出脱脂奶粉 2.5%,甘油 1%,葡萄糖 2.5%,蔗糖

1%, Vc2.5%的保护效果最优,得到的菌粉活菌数最多,达 1.27×10¹² CFU/g,因此确定该配方为最优直投式乳酸菌发酵剂抗冷冻保护剂。

表 6 第四组保护剂 L₈(4×2⁴) 正交试验方案与结果

Table 6 Results for the L₈(4×2⁴) orthogonal test for the optimization of anti-freeze protectants recipe 4#

试验号	因素					活菌数/ (×10 ¹¹ CFU/g)
	A(脱脂奶粉/%)	B(甘油/%)	C(葡萄糖/%)	D(蔗糖/%)	E(Vc/%)	
1	1(10)	1(2.5)	1(2.5)	1(2.5)	1(2.5)	4.4
2	1	2(1)	2(1)	2(1)	2(1)	8.4
3	2(5)	1	1	2	2	4.3
4	2	2	2	1	1	12.1
5	3(2.5)	1	2	1	2	6.3
6	3	2	1	2	1	12.7
7	4(1)	1	2	2	1	1.5
8	4	2	1	1	2	0.05
k1	6.4	4.13	5.36	5.71	7.68	
k2	8.2	8.31	7.08	6.73	4.76	
k3	9.5	/	/	/	/	
k4	0.77275	/	/	/	/	
R	8.72725	4.19	1.71	1.01	2.91	
方案	A ₃	B ₂	C ₂	D ₂	E ₁	

2.3 直投式乳酸菌发酵剂保藏期间的活菌数变化

制好的发酵剂保存于 4℃冰箱中,分别于 1 周、一个月和三个月后取样测其和菌数,结果如图 1 所示。

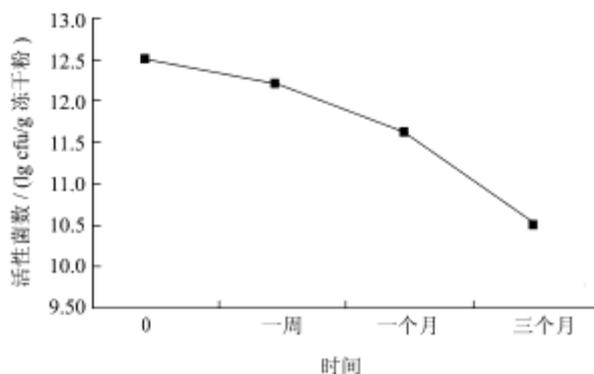


图1 冻干发酵剂在保藏期间活菌数变化

Fig.1 Change of viable counts during storage

乳酸菌浓缩液冻干后其活菌数均能达到 10¹² CFU/g冻干粉以上,乳酸菌冻干发酵剂在4℃,3个月的保藏期间,其活菌总数呈下降的趋势,但3个月还能保持在10¹⁰ CFU/g冻干粉以上,仍能满足直投式乳酸菌发酵剂的活菌数要求,说明用乳酸菌冻干发酵剂在保证乳酸菌活菌力方面有一定的优势,使得直投式乳酸菌发酵剂更易于保存。

3 结论

3.1 选择原料易得、价格低廉、易于细胞分离的番茄汁添加于培养基中,通过检测其活菌数,确定了利于嗜酸乳杆菌增菌培养合适培养基为:番茄汁, 50 mL; 葡萄糖, 25 g; 酵母膏, 5 g; 蛋白胨, 10 g; 水, 1000 mL; 柠檬酸二铵, 2 g; 吐温80 1 mL; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.58 g; $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.25 g; $CaCO_3$ 6 g。于37℃培养18 h,细胞浓度可达 4.25×10^{10} CFU/mL。

3.2 本试验采用4℃, 4000 rpm, 20 min离心获得菌体后不预冻,直接挂瓶真空冷冻干燥,6 h便得到干燥的嗜酸乳杆菌冻干粉。不经预冻制备发酵剂能有效控制真空干燥过程出现的发泡现象,不易造成污染,并且制出的冻干菌粉成粉更细、形态更佳。

3.3 通过四个正交试验筛选出最佳的冷冻保护剂配方为:脱脂奶粉 2.5%, 甘油 1%, 葡萄糖 2.5%, 蔗糖 1%, Vc 2.5%。冻干后的发酵剂保存于4℃中,三个月后活菌数还能保持在 3×10^{10} CFU/g。说明用此配方制备的保护剂对嗜酸乳杆菌有良好的保护效果,并且方便易得,可用于工业化大生产。

参考文献

- [1] 魏培培.直投式干酪乳杆菌发酵剂稳定性及应用的研究[D].广州,华南理工大学,硕士毕业论文,2010
- [2] 沈国华,华颖,刘大群.乳酸菌发酵剂冻干工艺优化及过程机理分析[J].中国食品学报,2010,10(3):152-156
- [3] 黄文利,陈卫,陆英,等.益生菌干酪乳杆菌 LC-15 生长及发酵特性研究[J].乳业科学与技术,2007,127(6):282-287
- [4] 陈功,余文华,张其圣,等.泡菜直投式菌剂制备及应用研究[J].四川食品与发酵,2008,44(4):19-23
- [5] 李伟安,张蕾,何书研,等.直投式酸奶发酵剂生产菌株的筛选及特性研究[J].畜牧与饲料科学,2009,30(9):55-56
- [6] 王俊英,徐艺青,宋爽.传统奶酪直投式发酵剂制作工艺的研究[J].现代食品科技,2010,26(11):1243-1245
- [7] Plumed-Ferrer C, Llopis M, Hyvonen P, et al. Characterization of the microbial community and its changes in liquid piglet feed formulations [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2004, 84: 1315-1318
- [8] Carlson D, Poulsen H D. Phytate degradation in soaked and fermented liquid feed, effect of diet, time of soaking, heat treatment, phytase activity, pH and temperature [J]. Animal Feed Science and Technology, 2003, 103: 141-154
- [9] 邓波,徐子伟,李永明,等.液体饲料在养猪生产中的应用[J].粮食与饲料工业,2003,3:35-36
- [10] Costa E, Usall J, Teixido N, et al. Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze-drying [J]. Journal of Applied Microbiology, 2000, 89(5): 793-800
- [11] 张英华,霍贵成,郭鸽.乳酸菌冷冻干燥保护剂的筛选[J].食品科技,2006,11:72-75
- [12] 蒲丽丽,刘宁,张英华,等.乳酸菌冻干保护剂及保护机理的研究进展[J].乳品加工,2005,6:50-52
- [13] Hubalek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms [J]. Cryobiology, 2003, 46: 205-229
- [14] 吴雁军,刘松玲,郭慧媛,等.直投式乳酸菌发酵剂活性影响因素的研究进展[J].中国乳业,2011,113(5):52-55
- [15] Carbalho A, Silva J, Ho P, et al. Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria [J]. International Dairy Journal, 2004, 14: 835-847