

乳制品中益生菌存活力的影响因素与提高方法

苏旭东, 李雅乾, 田洪涛, 种克, 万红兵

(河北农业大学食品科技学院, 河北 保定 071001)

摘要: 提高乳制品中益生菌的存活力是目前益生菌乳制品研制与开发的技术关键。本文根据益生菌的生理特性并结合国内外益生菌乳制品研究开发进展, 探讨了菌种(株)、菌种(株)之间的相互关系、营养基质、生产工艺、氧及氧化还原电位等因素对乳制品中益生菌存活力的影响, 提出了相应的改进方法与技术措施, 以期为进一步发展益生菌乳制品提供科学依据。

关键词: 益生菌; 乳制品; 存活力

中图分类号: TS252.54; 文献标识码: A; 文章篇号: 1673-9078(2007)01-0111-04

The Influential Factors and Improving Methods of Probiotics Viability in Fermented Milk Products

SU Xu-dong, LI Ya-qian, TIAN Hong-tao, CHONG Ke, WAN Hong-bing

(Food Science and Technology Institute of Agriculture University of Hebei, Baoding 071001, China)

Abstract: At present, the key technology for preparation of probiotic fermented dairy products concerns the improvement of the viability of probiotic in it. According to the physiology characteristics of probiotics and the advances in the development of probiotic fermented products at home and abroad, the effect of factors such as stains, relationship between strains, nutritional medium, possessing technology, oxygen and redox potential, on the probiotics activity in fermented milk were investigated and discussed in the paper. Moreover, the corresponding strategies to improve the activity of the cells were put forward, which could provide scientific evidence for further development of probiotic fermented milk products.

Key words: Probiotics; Dairy products; Viability

酸奶是由保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌等乳酸菌共同发酵而成, 其营养保健功能及良好的口味赋予酸奶巨大的消费市场。但是, 研究表明: 许多酸奶菌在胃酸环境中不能存活且在肠道中不能定殖并抑制其它病原菌^[1]。益生菌具有调节肠道菌群的平衡, 抑制肠道致病菌的感染, 防治肿瘤, 降低血清胆固醇水平, 促进消化, 提高机体免疫功能等健康功效^[2,3], 并且益生菌的某些菌株能耐受胃酸环境并能定殖在肠粘膜表面起到益生作用。益生菌乳制品的研制与开发顺应了消费趋势, 因此, 发酵乳中添加益生菌(双歧杆菌、嗜酸乳杆菌)引起科研工作者和乳品生产企业的极大关注。

益生菌乳制品在饮用之前, 其益生菌含量必须达到 1×10^6 cfu/mL 以上才能达到保健功效, 而新鲜的益生菌乳制品活菌数量要求不得低于 1×10^7 cfu/mL^[4,5], 才能补偿益生菌在通过人体胃肠道时活菌数的损失。

收稿日期: 2006-07-20

作者简介: 苏旭东, 助教

通讯作者: 田洪涛教授, 硕士生导师

然而, 调查结果显示: 市场上大部分益生菌乳制品活菌含量很低, 作为典型益生菌的双歧杆菌和嗜酸乳杆菌在乳制品中的活菌数经常被忽视^[6,7]。所以, 商品化的益生菌乳制品发展最重要的一点是产品在货期中益生菌的活菌数量达到上述规定要求, 并且保证乳制品中益生菌在贮藏期间具有稳定的益生特性。

本文根据益生菌的生理特性并结合国内外益生菌乳制品研究开发进展, 探讨了影响乳制品中益生菌存活力的主要因素, 提出了相应的改进方法与技术措施, 为大力发展益生菌乳制品、进一步提高益生菌乳制品的产品质量提供了科学依据。

1 不同菌种(株)在乳制品中的存活力的差别

目前, 应用于乳制品中的益生菌主要是乳杆菌属(*Lactobacillus*)和双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)的菌株^[8-9]。乳杆菌属包括: 植物乳杆菌(*L.plantarum*)、嗜酸乳杆菌(*L.acidophilus*)、约氏乳杆菌(*L.johnsonii*)、干酪乳杆菌(*L.casei*)、鼠李糖乳杆菌(*L.rhamnosus* GG)、格氏乳杆菌(*L.gasseri*)、罗伊氏乳杆菌

(*L.reuteri*)、卷曲乳杆菌 (*L.crispatus*)；双歧杆菌属包括：嗜热双歧杆菌 (*B.thermophilum*)、两歧双歧杆菌 (*B.bifidum*)、长双歧杆菌 (*B.longum*)、婴儿双歧杆菌 (*B.infantis*)、短双歧杆菌 (*B.breve*)、青春双歧杆菌 (*B.adolescentis*)、动物双歧杆菌 (*B.animalis*)、假长双歧杆菌 (*B.pseudolongum*)。

益生菌的重要特性之一是能够通过胃酸和肠道胆盐环境而存活，其不同菌种或同一菌种的不同菌株对胃酸和胆盐的耐受能力不同。Clark 等人研究了婴儿双歧杆菌、青春双歧杆菌、长双歧杆菌、两歧双歧杆菌在酸性条件下的存活，证实：长双歧杆菌的存活力最强，且能耐受 4.0% 浓度的胆盐^[10,11]。而 Ibrahim 和 Bezkorovainy 研究发现：长双歧杆菌的耐胆盐能力很低^[12]。Lankapughra 和 Shah 对嗜酸乳杆菌和双歧杆菌在酸和胆汁中的生存状况进行了分析，结果表明：3 株嗜酸乳杆菌在酸性条件下存活最好(澳大利亚联邦科学与工业研究组织提供菌株)；2 株嗜酸乳杆菌表现出良好的耐胆盐性；在 9 个双歧杆菌菌株中，长双歧杆菌和假长双歧杆菌对酸的耐受性最好，长双歧杆菌、假长双歧杆菌和婴儿双歧杆菌表现出良好的耐胆盐性，而婴儿双歧杆菌在酸性中几乎不能生存^[13]。

益生菌的另一个重要特性是具有对人体肠黏膜的黏附性并能够定殖在肠道中。研究表明：双歧杆菌能较好的黏附在肠粘膜上并能够定殖在肠道。Bemet 等报道，短双歧杆菌、婴儿双歧杆菌和三株从人体分离的双歧杆菌菌株对人体大肠癌-2 细胞 (Caco-2) 细胞及体外培养的 HT290-MTX 细胞所分泌的粘膜具有高度的黏附性；嗜酸乳杆菌 LA1 对 Caco-2 细胞及体外培养的 HT29-MTX 细胞分泌的粘膜具有相似的黏附性^[14]。

由此可见，在益生菌乳制品的研制开发中，应选择耐胃酸和耐胆盐的益生菌种(株)，还应考虑菌株在肠道中的定殖能力以及根据不同群体和年龄的消费者选择适宜的人源性菌种(株)，以有利于提高益生菌的存活能力。

2 菌种(株)之间相互作用对存活力的影响

目前，在益生菌乳制品的研制开发中，关于促进益生菌生长及发酵活力的研究报道很多，而涉及乳酸菌和益生菌之间以及益生菌之间相互作用的研究报道很少。最近 Vinderola 等人研究了 24 株乳酸菌(嗜热链球菌、保加利亚乳杆菌)和 24 株益生菌(干酪乳杆菌、嗜酸乳杆菌、双歧杆菌)之间相互作用，发现嗜酸乳杆菌的生长繁殖力能被双歧杆菌和干酪乳杆菌抑

制，双歧杆菌和干酪乳杆菌能抑制乳酸菌的生长，而乳酸菌对双歧杆菌和干酪乳杆菌的生长不能产生任何影响^[15]。

菌种(株)之间的共生或拮抗作用都可能导致发酵乳产品生产和冷藏期间菌群变化。一般保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌混合发酵时具有共生效应，这是由于保加利亚乳杆菌分解蛋白质产生的氨基酸(主要是丝氨酸)可促进嗜热链球菌的生长；而嗜热链球菌通过丙酮酸代谢产生甲酸可促进保加利亚乳杆菌的生长。但生产实践中发现，发酵性能优良的保加利亚乳杆菌菌株和嗜热链球菌菌株存在生物拮抗关系，致使发酵不能顺利进行。

3 营养基质的影响

益生菌由于缺乏蛋白酶，在乳中生长很慢^[16]。若在乳中添加微营养因子后，可以促进益生菌的生长，缩短发酵凝乳时间，提高益生菌的存活力。Dave 和 Shah 研究了在乳中添加乳清粉、乳清蛋白浓缩物、胰蛋白酶和半胱氨酸对益生菌活性的影响，结果表明：半胱氨酸的添加显著提高了嗜酸乳杆菌的存活；乳清蛋白浓缩物与其它物质相比，对双歧杆菌的存活更有促进作用^[17]。Bruno 等人研究了玉米浆、淀粉、菊粉、乳糖等促生长因子对 5 株双歧杆菌(婴儿双歧、长双歧、动物双歧等)生长的影响，发现：玉米浆对双歧杆菌具有显著的生长促进作用，而且有利于双歧杆菌的存活^[18]。Dave 和 Shah 对 L-半胱氨酸的添加量对酸奶菌和益生菌的生长和存活测试表明：添加 50 mg/L 的 L-半胱氨酸促进了嗜热链球菌的生长并缩短了 pH 值降低到 4.5 的发酵时间。半胱氨酸是一种含硫氨基酸，在提供氨基氮的同时降低了氧化还原电位，这两方面都有利于厌氧型益生菌的生长^[17]。

上述结果提示：根据益生菌不同菌种(株)所具有的生理生化特性，在乳中添加适宜的营养因子，可以促进益生菌的生长繁殖力、提高益生菌的发酵活力、改善益生菌的存活力。

4 生产工艺的影响

4.1 接种量的影响

pH 值是影响乳制品中益生菌存活力的重要因素。嗜酸乳杆菌在 pH 值 4.0 以下停止生长，而双歧杆菌比嗜酸乳杆菌更不耐酸，在 5.0 以下生长缓慢^[19,20]。Lankapughra 等人报道了 9 株双歧杆菌在 pH 值 3.7~4.3 的酸乳基质中 4 °C 保藏 7 d 后，只有 3 株存活^[21]。Klaver 等人研究了 17 株双歧杆菌在发酵乳中 4 °C 贮藏 1 周

后,其中 14 株完全丧失活性^[16]。而乳产品发酵凝乳时 pH 值一般在 4.2~4.6 左右,所以,在酸奶菌和益生菌混合发酵过程中,为了防止酸奶菌产酸过快及凝乳过早而抑制益生菌的增殖,生产中通常采用加大益生菌的接种量(5%~10%)而减小酸奶菌的接种量(0.5%),使益生菌提前近入对数增殖期,以提高益生菌在乳制品的活菌含量。

4.2 发酵及生产方式的影响

在酸奶菌和益生菌混合发酵的乳制品中,酸奶菌为发酵乳制品提供了良好的风味,但在发酵过程中,酸奶菌往往比益生菌生长繁殖快,其产生的酸和过氧化氢等抑制了益生菌的生长,不利于益生菌的存活。Lankaputhra 和 Shah 提出了二步发酵法,即开始先接种益生菌发酵 2 小时,然后再用酸奶菌进行发酵,可使益生菌成为乳制品中的优势菌群,其活菌数量较一步发酵法提高 4~5 倍;其乳产品贮藏 6 周后,活菌数仍高达 10^7 cfu/mL 以上^[21]。

将微胶囊化的益生菌添加到酸奶菌发酵的乳制品中制成益生菌乳制品是近年来的一项新兴技术。由于微胶囊避免了基质中酸、氧及过氧化氢等对益生菌的直接伤害,延缓了益生菌的内外物质交换,减慢了益生菌的代谢速率,提供了有利于益生菌存活的微环境,使益生菌的存活力得以提高。Adhikari 等人研究了微胶囊化双歧杆菌在酸乳中的存活,乳产品贮藏 1 个月后,胶囊化长双歧杆菌比非胶囊化的活菌数高出 2 个数量级^[22]。

5 氧及氧化还原电位的影响

嗜酸乳杆菌是微好氧菌,而双歧杆菌则是专性厌氧菌。双歧杆菌,由于细胞内缺乏过氧化氢酶,氧存在时,细胞无法分解代谢所产生过氧化氢,而过氧化氢对碳水化合物代谢系统中的果糖-6-磷酸解酮酶的活性存在阻碍作用^[29]。因此,双歧杆菌必须进行厌氧培养与发酵,而且,需要在乳基质中添加还原剂如葡萄糖、半胱氨酸、抗坏血酸等降低氧化还原电位后才能生长。Brunner 等人试验表明:双歧杆菌发酵乳在冷藏条件下,酸奶中溶解氧含量在 1 mg/L 以上,活菌保藏期缩短 3 倍^[23];Klaver 等人研究发现:在除氧的乳基质中,双歧杆菌的存活力显著提高^[16]。

据马田三夫报道:自然界中存在耐氧性双歧杆菌菌株,当从厌氧培养转向好氧培养时,仍可进行缓慢生长。有些菌株可经人工耐氧驯化后可以在有氧的环境中生长^[24]。傅晓超等人采用人工驯化的双歧杆菌耐氧菌株生产的酸奶 4~10 °C 冷藏条件下,活菌保藏期

(活菌数 $\geq 1 \times 10^6$ cfu/mL) 可达 15~21 d^[25]。而 Klaver 研制的双歧杆菌酸奶,5~7 °C 冷藏,活菌保藏期(活菌数 $\geq 1 \times 10^6$ cfu/mL) 5~7 d^[16]。驯化后的双歧杆菌耐氧菌株是否发生变异而改变其特有的生物学功能以及在人体肠道的定植能力,需要对驯化后的菌株进行形态学、生理学和临床效果的分析鉴定,尤其对菌株的耐氧机理应进行深入研究。

含有双歧杆菌的乳制品在贮藏中,氧很容易通过包装容器进入产品中。Dave 和 Shah 对比了塑料容器和玻璃容器制得的发酵乳中益生菌存活性,发现:在塑料容器中制得的发酵乳中溶氧量比玻璃容器制得的发酵乳中溶氧量高,玻璃容器中发酵乳的双歧杆菌活菌数比在塑料杯中高 1.6 倍;4 °C 保藏 15 d 后,玻璃容器中发酵乳的双歧杆菌存活率比在塑料杯中高 30%~70%^[17]。所以,选择利于隔氧的适宜包装材料或容器尤为重要。

6 结论

随着对益生菌研究的深入和人们健康意识的增强,益生菌乳制品的研制与开发在世界范围内方兴未艾。但由于益生菌具有特殊的生物学特性,所以,提高乳制品中益生菌的活菌含量和存活力是目前益生菌乳制品研制与开发的技术关键。综上所述,菌种(株)选择、菌种(株)之间的相互关系、营养基质、生产工艺、氧及氧化还原电位等诸多因素影响了制品中益生菌的存活力,深入研究并全面了解这些因素与益生菌存活力之间的相互关系,在此基础上,选育出耐酸、耐胆盐、耐氧、定殖能力强并适合不同群体和年龄消费者的人源性益生菌菌株;根据菌种(株)之间存在的生态效应,确定发酵菌种(株)的合理搭配及比例;在乳中添加适宜的营养因子,对发酵培养基进行改良;适当加大益生菌的接种量;采用二步发酵法或微胶囊化技术;选择利于隔氧的包装材料或容器等改进方法与技术措施,均有助于提高乳制品中益生菌的存活力、延长益生菌乳制品的活菌保存期。

参考文献

- [1] Chen R M, Wu J J, et al. Increase of Intestinal Bifidobacterium and Suppression of Coliform Bacteria with Short-Term Yogurt ingestion [J]. J Dairy Sci, 1999, 82: 2308-2314.
- [2] Jurgen Schrezenmeir, Michael de Vrese. Probiotics Prebiotics and Synbiotics—approaching a definition[J]. Am J Clin Nutr, 2001. 79: 361-364.

- [3] Mary Ellen Sanders. Considerations for Use of Probiotic Bacteria to Modulate Human Health [J]. *J Nutr*, 2000, 130: 384-390.
- [4] Stanton C, Gardiner G, Meehan H, et al. Market potential for probiotics[J]. *An J Clin Nutr*, 2001, 73: 476-483.
- [5] Roy R H D, Gauthier S F. Production of Oligosaccharides in yogurt Containing Bifidobacteria and Yogurt Cultures [J]. *J Dairy Sci*, 2002, 85: 1058-1069.
- [6] Bruhn C M, Brhun J C, Cotter A, et al. Consumer Attitudes Toward Use of Probiotic Cultures[J]. *Journal of Food Science*, 2002, 67: 1969-1972.
- [7] Dallas G, Bifidobacteria H. Activity and Potential Benefits [J]. *Food technology*, 1993, (6):120-124.
- [8] Kunt J H. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms [J]. *Am J Clin Nutr*, 2001, 79: 374-379.
- [9] Bonaparte C, Reuter G. Bifidobacteria in commercial dairy products: which species are used?[J]. *Microecol Ther*, 1997, 26: 181-198.
- [10] Clark P A and Maetin J H. Selection of bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods: III—Tolerance to simulated bile concentrations of human small intestines[J]. *Cult Dairy Prod J*, 1994, 29: 18-21.
- [11] Clark P A, Cotton L N and Maetin J H. Selection of bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods: II—Tolerance to simulated pH of human stomachs [J]. *Cult Dairy Prod J*, 1993, 29: 18-21.
- [12] Ibrahim S A and Bezkorocainy A. Inhibition of *Escherichia coli* by bifidobacteria[J]. *Food Prot*, 1993, 56: 713-715.
- [13] Lankaputhra W E V and Shah N P. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in the presence of acid and bile salts [J]. *Cult Dairy Prod J*, 1995, 30: 2-7.
- [14] Hudait S, Lievin V, Bernet—Camard M F. Antagonistic activity exerted in vitro and in vivo by *Lactobacillus casei* (strain GG) against *Salmonella typhimurium* C5 infection [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63: 513-518.
- [15] Vinderola C G, Mocchiutti P, Reinhermer J A. Interactions Among Lactic Acid Starter and Probiotic Bacteria Used for Fermented Dairy Products[J]. *J Dairy Sci*, 2002, 85:721-729.
- [16] Klaver F, Kingma A M F and Weerkamp A H. Growth and survival of bifidobacteria in milk [J]. *Netherland Milk and Dairy Journal*, 1993, 47: 151—164.
- [17] Dave R I and Shah N P. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter culture [J]. *Int Dairy J*. 1997, 7: 31—41.
- [18] Bruno E A, Lankaputhra W E V and Shan N P. Growth, Viability and Activity of *Bifidobacterium* spp. in skim Milk Containing Prebiotics[J]. *Journal of Food Science*, 2002, 67: 2740—2744.
- [19] Shah N P. Probiotic BacteriaP: Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods [J]. *J Dairy Sci*, 2000, 83: 894—907.
- [20] Shah N P, Lankaputhra W E V, Britz M and Kyle W S A. Survival of *L. acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yoghurt during refrigerated storage[J]. *Int Dairy J*, 1995, 5: 515—521.
- [21] Lankaputhra W E V, Shah N P, et al. Survival of bifidobacteria during refrigerated storage in the presence of acid hydrogen peroxide [J]. *Milchwissenschaft*, 1996, 51: 65-70.
- [22] Adhikari K, Mustapha A, Gyün I U. Viability of Micro-encapsulated Bifidobacteria in Set Yogurt during Refrigerated Storage [J]. *J Dairy Science*, 2000, 83: 1946-1951.
- [23] Brunner J C, Spillman H, Puhan Z. Metabolic activity an survival of bifidobacteria in cultured milk during cold storage [J]. *DMZ Lebenswittelindustrie and Mklchwissenschaft*, 1993, 14(36): 1049-1053.
- [24] 马田三夫. 双歧杆菌在发酵乳上的应用[J]. *应用微生物*, 1983(1): 59-63.
- [25] 傅晓超. 胡明明. 双歧杆菌酸奶制造的中间试验[J]. *食品与发酵工业*, 1992, 18(5): 35-431