乳酸菌发酵剂冻干工艺优化及过程机理分析

沈国华 华 颖 刘大群
（浙江省农业科学院食品加工研究所 杭州 310021）

摘要 为了提高泡菜用直投式乳酸菌发酵剂的生物活性，考察了冻干速度对冻干效果的影响；比较多种保护剂对乳酸菌冻干的保护效果，选择其中冻干效果较好的 4 种保护剂做正交试验；分析冻干工艺的机理，确定最佳的保护工艺和保护剂体系。

关键词 乳酸菌发酵剂；工艺优化；机理
文章编号 1009-7848(2010)03-0152-05

采用人工接种纯菌种腌制蔬菜是对传统自然发酵模式的一种变革，也是发酵技术现代化的一种标志，而研究冻干直投式发酵剂是目前发酵工业的一个热点[1-3]。在蔬菜高活性直投式乳酸菌发酵剂的生产过程中，活菌的冻干工艺和保护剂的选择是关键技术。细胞在冻干过程中，受冷冻和干燥两种因素的激烈作用，直接影响发酵剂的活菌存活率、发酵活力和贮藏稳定性[4-5]，因此深入剖析冻干工艺中每个环节的影响因素及作用机理，对优化冻干过程工艺，确定保护剂复配体系组成，进而为制备高存活率、高活力的蔬菜直投式乳酸菌发酵剂，提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 试验用乳酸菌供试菌株为植物乳杆菌（*Lact. Plantarumt*）和干酪乳杆菌（*Lact. Casei*），分别引自中科院微生物研究所和中国食品发酵研究院。

1.1.2 主要试剂和仪器 冻干保护剂（脱脂乳、淀粉、乳糖、三聚磷酸钾、麦芽糊精、蔗糖、谷氨酸钠、葡萄糖、六偏磷酸钠、VC、山梨醇）为分析纯试剂或生化试剂。

真空冷冻干燥机、全自动菌落计数仪（迅数 V2 型）、超低温冰箱（三洋 MDF-192）。

收稿日期：2010-02-08
作者简介：沈国华，男，1954 年出生，副研究员

1.1.3 培养基配制 番茄汁培养基：用于乳酸菌的培养。其成分组成：蛋白胨 15 g，酵母膏 15 g，葡萄糖 20 g，磷酸二氢钾 4 g，吐温-80 mL，番茄汁 200 mL，蒸馏水 1 800 mL。制法：将以上成分加入蒸馏水中，加热使之完全溶解，调 pH 至 7.0，分装于三角瓶中，121 ℃灭菌 15 min[6]。

MRS 培养基：用于菌落计数。其成分组成：蛋白胨 10 g，牛肉膏 10 g，酵母粉 5 g，K_2HPO_4 2 g，柠檬酸二铵 2 g，乙酸钠 5 g，葡萄糖 20 g，吐温-80 1 mL，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.58 g，$MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.25 g，琼脂 15~20 g，蒸馏水 1 000 mL。制法：将以上成分加入蒸馏水中，加热使之完全溶解，调 pH 至 6.2~6.4，分装于三角瓶中，121 ℃灭菌 15 min。

1.2 方法

1.2.1 活菌体的富集培养与收集 将活化好的乳酸菌接种到 250 mL 液体培养基中，37 ℃静置培养 16~20 h。将菌液移入无菌离心管中，冷冻离心（3 000 r/min，15 min），弃上清液得乳酸菌菌泥[7]。

1.2.2 活菌测定 参见 GB/T 4789.35-2008 测定活菌含量，用迅数 V2 型全自动菌落计数仪计数。

1.2.3 冻干温度（即冻干速度）对冻干效果的影响 将乳酸菌菌泥与 1/10 原发酵液体积的灭菌脱脂乳（12%）混合均匀，平均置于 3 个培养皿中，-60 ℃下预冻 2 h 后取出，分别放在 3 个不同工作温度的真空冻干机中冻干（冷阱温度-80、-60 和-50 ℃），然后进行活菌测定，比较活菌数量，分析冻干速度对冻干效果的影响[8]。

1.2.4 冻干保护剂的筛选 将乳酸菌菌泥与 1/10

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

原发酵液体积的灭菌脱脂乳(12%)混合,根据不同含量加入不同的保护剂,冻干后比较活菌数量,挑选 4 种效果比较好的保护剂,做 $L_9(3^4)$正交试验,确定最佳的保护剂体系组成[8]。

2　结果与讨论

2.1　冻干速度对冻干效果的影响

玻璃化(vitrification)是指物质以非晶态形式存在的一种状态。在此状态下物质的黏度极大,具有液体的性质。由于这种非晶体结构的扩散系数很低, 故在这种结构中分子运动和分子变性反应非常微弱,不利的化学反应被抑制,从而提高了被保存物质的稳定性。

降温时冻干体系变化过程如图 1 所示。初始浓度为 A 的溶液(A 点)从室温开始冷却时,随着温度的下降,溶液过冷到 B 点,开始析出冰晶,但结晶潜热的释放又使溶液局部温度升高。溶液沿着平衡的熔融线不断析出冰晶, 冰晶周围剩余的未冻溶液随温度的下降,浓度不断升高。当温度下降到融融线(Ta)与玻璃化转变曲线(Tg)的交点时,溶液中剩余的水分不再结晶(即不可冻水),此时溶液达到最高冻结浓缩状态,浓度较高,以非晶态基质的形式包围在冰晶周围, 形成镶嵌着冰晶的玻璃体[3,9]。

当冻干机的工作温度较低 (冻干速度较快)

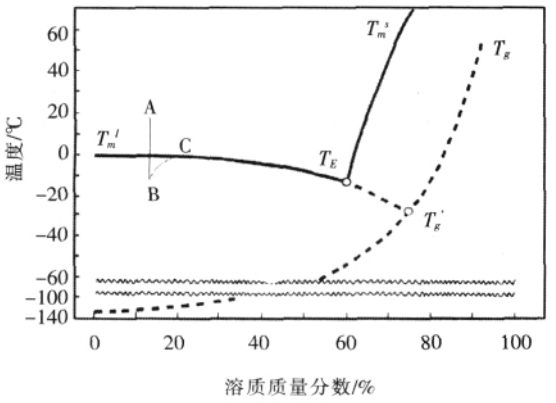

图 1　冻干途径示意图

Fig.1　Digram of freeze drying pathway

时,最高冻结浓缩状态就会提前达到。提高冷冻速度会影响温度-组成关系,且冷冻速度越快,体系的 $Tg(Tg')$越高,从而使体系在较高的温度下保持稳定的玻璃态(见图 2)。

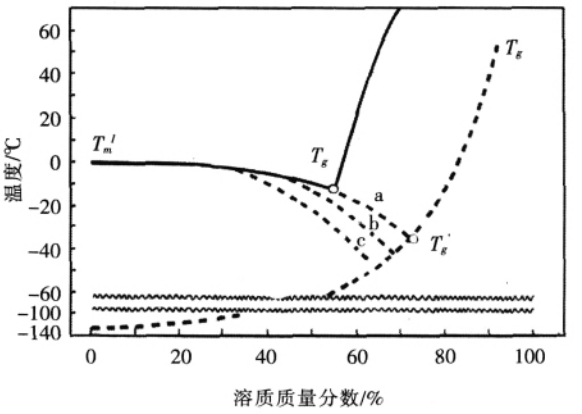

图 2　冷冻速度对 Tg 的影响(其中 a、b、c 的温度依次升高)

Fig.2　Effect of freeze-drying speed on Tg

为比较冻干机速度对冻干过程及效果的影响,选用 3 台不同工作温度的冻干机。比较同一批浓缩菌液,结果见表 1。

表 1　不同冻干温度对菌数密度的影响

Table 1　Effect of freeze drying temperature on bacterial density

冻干机温度/°C	菌数密度/cfu·mL^{-1}
−50	1.66×10^9
−60	1.80×10^9
−84	2.04×10^9

当对体系的冷冻速度较低时, 细胞内游离水大部分渗透到细胞外结冻, 直到细胞内含物形成共溶物后才停止,这种方式被称为“胞外冻结”。虽然对细胞的伤害总是伴随着体系中冰晶的形成,但是细胞外形成的冰晶本身或者冰晶形成的过程不会对细胞造成大的伤害。用这种方式进行冷冻,细胞内 90%以上的水分渗透到细胞外, 导致细胞收缩,势必影响细胞活性。然而细胞结构还与原来的相似, 对细胞产生的伤害远远小于胞内冻结所产生的伤害。

当体系的冻干速度足够高时, 细胞内的游离水来不及外渗就在细胞外冻结了。胞内冻结形成

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

的冰晶会损伤细胞质膜。如果细胞质膜破裂,细胞内含物外泄,导致细胞死亡。当冷冻速度超过细胞最适的冷冻速度时,细胞的存活率迅速下降。

由表1可以看出,-84 ℃尚未超过细胞的最适冷冻速度,所选3个冻干温度下的冻干速度对发酵剂活菌存活率的影响与理论基本吻合,只是不特别明显。可见,单纯的从冻干条件方面来改善发酵剂的生产工艺是远远不够的,因此需要了解并优化冻干过程的保护体系。

2.2 冻干保护剂的单因素试验

保护剂(非渗透性和渗透性)可以改变生物样品冻干时的物理、化学环境,减轻或者防止冷冻干燥或复水对细胞的损害。改变体系的组成可以提高体系的玻璃化转变温度(见图3),从而最大限度地减少冻干工艺过程对菌体的损伤。

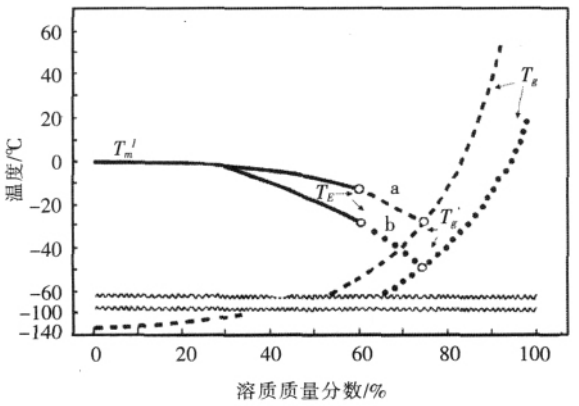

图3 溶质对 *Tg* 的影响示意图

Fig.3 Effect of solute on *Tg*

一般来说,非渗透性或渗透性保护剂在单独使用时对细胞的保护效果不理想,将其以合适的比例复配使用,效果会较好。

选用多种保护剂,比较单因子在冻干过程中对菌体的保护效果。结果见表2。

由表2可知,与对照组(不作任何冻干保护)相比,所有处理均显示出不同程度的保护效果,其中脱脂乳、麦芽糊精、VC、三聚磷酸盐的保护效果较好。脱脂乳和麦芽糊精作为非渗透性保护剂(细胞外液抗冻保护剂),主要保护菌体表面免受伤害。由于其本身不能进入菌体细胞膜,所以在冻干时使溶液呈过冷状态,从而降低溶液的结冰速度。

表2 不同保护剂对冻干效果的影响

Table 2 Effect of different protectants on freeze drying result

冻干保护剂	用量/%	复水后活菌数/ cfu·mL^{-1}
脱脂乳	5	3.6×10^{10}
淀粉	5	1.9×10^{10}
乳糖	5	4.7×10^{9}
三聚磷酸钾	0.5	2.2×10^{10}
麦芽糊精	5	2.3×10^{10}
蔗糖	5	6.7×10^{9}
谷氨酸钠	0.5	1.6×10^{10}
葡萄糖	5	5.9×10^{9}
六偏磷酸钠	0.5	9.3×10^{9}
Vc	0.5	2.4×10^{10}
山梨醇	5	1.7×10^{10}
对照	-	3.7×10^{9}

在特定温度下,可避免由于盐类浓缩、细胞脱水而使细胞受到伤害。VC和无机盐作为渗透性保护剂,渗入到细胞内部,在体系中结合水分子,发生水合作用,使体系的粘性增加。在冻干过程中体系的冰晶增长速度减缓,降低了水转化成冰的比例。同时,保护剂进入细胞内部,提高了细胞内部压力,降低了细胞外结冰引起的细胞脱水程度和速度,抑制了细胞内冰晶的生长,从而减少对细胞的伤害。

2.3 冻干保护剂的正交试验

菌体活力的保持与所添加物质的营养、功能、形态等多种因素有关。由于不同的保护剂对不同菌种的保护效果不同,所以使用单一的保护剂很难得到理想的保护效果。复配保护剂中的各种保护剂在冷冻干燥中发挥着各自的作用,同时它们相互间又具有协同作用。需要特别说明的是,复配保护剂中,只有各种成分的配比合理时,才能取得最佳的保护效果[5]。

从单因子(脱脂乳、麦芽糊精、VC、三聚磷酸盐)试验中选择表现较为突出的4种物质做正交试验,期望通过正交试验获取高菌数的冻干保护剂配方。正交试验结果见表3。

由表3中的极差分析可知,影响乳酸菌冻干存活率的主次因素顺序是:三聚磷酸盐>VC>脱脂乳>麦芽糊精。由直观分析可知,为求得较高的存

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

活率，最佳的保护剂组成是：15%脱脂乳、5%麦芽糊精、5%VC 和 1%三聚磷酸盐。最佳组合所得菌数密度高达 3.0×10^{11} cfu/mL。

表 3　冻干保护剂的正交试验

Table 3　Orthogonal test for protectants of freeze drying

试验编号	脱脂乳	麦芽糊精	VC	三聚磷酸盐	菌数/cfu·mL^{-1}
1	5%	5%	1%	0.5%	1.2×10^{10}
2	5%	10%	3%	1%	3.4×10^{10}
3	5%	15%	5%	1.5%	7.5×10^{10}
4	10%	5%	3%	1.5%	5.3×10^{10}
5	10%	10%	5%	0.5%	6.5×10^{10}
6	10%	15%	1%	1%	2.6×10^{11}
7	15%	5%	5%	1%	3.0×10^{11}
8	15%	10%	1%	1.5%	1.4×10^{11}
9	15%	15%	3%	0.5%	1.5×10^{10}
K_1	4.03×10^{10}	1.22×10^{11}	1.37×10^{11}	3.07×10^{10}	
K_2	1.27×10^{11}	7.97×10^{10}	3.47×10^{10}	1.98×10^{11}	
K_3	1.52×10^{11}	1.17×10^{11}	1.47×10^{11}	9.0×10^{10}	
级差 R	1.11×10^{11}	4.37×10^{10}	1.12×10^{11}	1.67×10^{11}	

3　结论

1）冻干机工作温度/冻干速度对发酵剂的冻干效果有一定的影响，但不显著。

2）最佳的保护剂为一个复配体系，其组成是：15%脱脂乳、5%麦芽糊精、5%VC 和 1%三聚磷酸盐，在此条件下获得的菌数密度高达 3.0×10^{11} cfu/mL。

3）冻干体系的 $Tg(Tg')$ 值和体系的冻干环境通过冻干工艺及保护剂的改变而发生变化，这种变化影响冻干体系的稳定性和冻干效果。

参　考　文　献

[1] 沈国华，刘大群，华颖，等. 保持发酵型风味泡菜长货架期的生产技术研究[J]. 中国食品学报，2009，9(6)：110–115.
[2] 田洪涛，种克，李宁，等. 双歧杆菌酸奶冻干发酵剂不同菌株特性的研究[J]. 中国食品学报，2007，7(3)：69–72.
[3] 贺稚非，向瑞玺，李洪军，等. 泡菜活性直投式乳酸菌发酵剂的研究[J]. 食品科学，2006，27(8)：191–197.
[4] 蒲丽丽，刘宁，张英华，等. 乳酸菌冻干保护及及保护机理的研究进展[J]. 现代食品工业，2005，1：147–148.
[5] 吕加平，骆承庠. 乳酸菌发酵剂冻干保护剂筛选及应用的研究[J]. 东北农业大学学报，1998，29(4)：371–379.
[6] 沈国华，卢英. 优良乳酸发酵菌种特性的研究及菌种筛选[J]. 中国调味品，2002，(3)：22–25.
[7] 黄伟坤. 食品检验与分析[M]. 北京：中国轻工出版社，2000：19–20.
[8] 董英，林泽营，周国磊，等. 泡菜乳酸菌冻干保护剂的研究[J]. 食品工业，2007，1：10–12.
[9] 王璋，许时婴，江波，等.食品化学[M]. 3 版. 北京：中国轻工业出版，2003.

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

Freeze-drying Process Optimization of Lactic Acid Bacteria Starter and Protective Mechanism Analysis

Shen Guohua Hua Ying Liu Daqun
(*Institute of Food Processing, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021*)

Abstract In order to improve bioactivity of lactic acid bacteria in kimchi fermentation process, the effect of freeze-dried speed on the bacteria during freeze-drying was investigated. Protective effect of a variety of protective agents on the lactic acid bacteria during freeze-drying was compared and four kinds of protection agents were choose for orthogonal test. Combined with analysis of the mechanism of freeze-drying process, the best protection technology and the optimal protective agent systems were determined.

Key words Lactic acid bacteria starter; process optimization; mechanism

信息窗

罗伊氏乳杆菌（L. reuteri Protectis）可降低早产儿患胃肠病的几率和减少早产儿住院时间

瑞典斯德哥尔摩2010年5月10日电 /美通社亚洲/——有关瑞特乳酸菌（Reuteri）的最新研究报告已经发表，这项研究表明，与补充 L. rhamnosus 和对照组的婴儿相比，补充罗伊氏乳杆菌（L. reuteri Protectis）的婴儿患胃肠病的几率显著下降。同时，罗伊氏乳杆菌还能大大减少早产儿的住院时间。

我们的研究明确证实了益生菌对早产儿的好处。意大利卡塔尼亚大学（University of Catania）新生儿重症监护室教授 Mario Romeo 表示，有关的罗伊氏乳杆菌的研究结果尤其具有说服力。

除了能够治疗胃肠病（$p<0.05$）和减少住院时间（$p<0.0001$）之外，与 LGG 和对照组相比，补充罗伊氏乳杆菌还可以显著减少抗生素治疗的时间。

Romeo 教授称，研究结果非常有趣，我们认为，这些结果将对早产儿护理产生一定的影响。

研究事实

在这项前瞻性随机研究中，有249名新生儿不间断补充罗伊氏乳杆菌（每日补充量为 10^8 CFU）或 Lactobacillus rhamnosus（相当于 LGG，每日补充量为 6×10^9 CFU），或没有补充任何乳杆菌。早产儿在被送入新生儿重症监护室后的72小时内开始补充益生菌，一直持续六周，或到出院为止。这项研究的目的是为了评估益生菌在预防早产儿患胃肠道念珠菌定植、晚发性败血症和神经并发症的疗效。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net