

植物乳杆菌LPb1耐受性及发酵乳制备条件的优化

周配东¹, 潘道东^{1,2,*}

(1.南京师范大学食品系, 江苏 南京 210097;

2.宁波大学生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211)

摘 要: 模拟人体消化道环境, 即在人工胃液、肠液的环境下对植物乳杆菌LPb1的耐受性进行研究, 结果表明: 在37℃条件下, 用人工胃液处理3h, 收集的菌体再转入人工肠液处理3h, 最后测得菌株存活率仍达88.6%。LPb1与一株嗜热链球菌混合发酵脱脂乳, 与单菌发酵相比, 混合菌产酸效果较好, 发酵乳制品具有良好的持水性能, 且发酵完成后, 4℃冰箱贮存后酸化程度缓慢。通过单因素和响应面分析, 混合发酵最佳发酵条件为: 接种量4.45%、发酵时间8.53h、发酵温度40.40℃。

关键词: 植物乳杆菌LPb1; 耐受性; 响应曲面分析

Gastrointestinal Tolerance of *Lactobacillus plantarum* LPb1 and Optimization of Fermentation for Yogurt Production

ZHOU Pei-dong¹, PAN Dao-dong^{1,2,*}

(1. Department of Food Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China;

2. Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: The tolerance of *Lactobacillus plantarum* LPb1 in stimulated human digestive environment such as artificial gastric and intestinal fluid was tested. *Lactobacillus plantarum* LPb1 was first trrsyrf with artificial gastric juice for 3 h, then with artificial intestinal juice for another 3 h at 37 °C, the survival rate of *Lactobacillus plantarum* LPb1 cells was 88.6%. LPb1 mixed with a strain of *Streptococcus thermophilus* was inoculated into skim milk to produce yogurt. The results showed the combination starter produced acid well and the final products had good water retention property, meanwhile the yogurt was weak in post-acidifying activity at the storage temperature (4 °C). Taking sensory evaluation as indicators, the optimum fermentation conditions were inoculums size of 4.45% of mixed culture, fermentation temperature 40.40 °C, and fermentation time 8.53 h.

Key words: *Lactobacillus plantarum* LPb1; tolerance; response surface analysis (RSA)

中图分类号: Q93-3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)21-0240-05

发酵乳制品在乳制品中占有重要地位, 筛选优良乳酸菌, 并进行发酵剂研究与开发, 为世界各国所重视^[1]。乳杆菌属乳酸菌是一类广泛应用于食品发酵、工业乳酸生产及医疗保健等领域, 是与人类生活密切相关的有益微生物^[2]。植物乳杆菌与人类的生活关系密切, 是种常见于奶油、肉类及许多蔬菜发酵制品中的乳酸菌, 调节肠道微生物菌群的平衡, 增强机体免疫力, 降低胆固醇发挥有益作用^[3-5]。植物乳杆菌在乳酸应用方面的研究较少, 其中李霞等^[6]将一株植物乳杆菌与嗜热链球菌、保加利亚乳杆菌混合发酵做了研究。

益生菌首先要以活菌状态通过胃才有可能进入肠道^[7], 并短时间定植在人体肠道内发挥益生作用。本实验研究了植物乳杆菌LPb1对人工模拟的消化道环境的耐受情

况, 确立了LPb1与嗜热链球菌混合发酵酸奶的最佳加工工艺参数, 旨在为乳酸菌的开发应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

植物乳杆菌LPb1 本实验室保存; 嗜热链球菌由酸奶分离得到。

1.1.2 培养基

供菌株LPb1的增殖、计数: MRS培养基^[8]; 供嗜热链球菌的筛选和增殖: M17培养基^[9]; 以上培养基115℃杀菌20min。

收稿日期: 2012-03-18

基金项目: 宁波市重大科技攻关项目(2011c11017); 宁波市2010年度创新基金项目(2010C92024);

浙江省自然科学基金重点项目(Z3110211)

作者简介: 周配东(1985—), 男, 硕士研究生, 研究方向为农产品加工。E-mail: zhoupeidong2009@163.com

*通信作者: 潘道东(1964—), 男, 教授, 博士, 研究方向为畜产品加工。E-mail: daodongpan@163.com

发酵脱脂乳培养基: 10g/100mL的脱脂奶粉, 5g/100mL的蔗糖, 95℃杀菌15min。

1.1.3 试剂与仪器

光明脱脂奶粉、某品牌酸乳 市售; 胃蛋白酶、胰蛋白酶 美国Sigma公司; 胆盐 国药集团化学试剂有限公司; 其他试剂购于上海生工生物技术有限公司。

恒温培养箱 上海精宏实验设备有限公司; 温控摇床 太仓市博莱特实验仪器厂; 3K30高速冷冻离心机 德国Sigma公司; PP-15-P11 pH计 德国Sartorius公司。

1.2 方法

1.2.1 对模拟人体消化道环境的耐受力^[10-11]

人工胃液的配制: 准确量取质量浓度为100g/L的盐酸16.4mL, 加蒸馏水稀释, 调节pH值为3.0, 然后加入0.35%胃蛋白酶和0.2% NaCl, 充分溶解后, 用孔径0.20μm微孔滤膜过滤除菌, 制得人工胃液备用。

人工肠液的配制: a胰液: NaHCO₃ 1.1%、NaCl 0.2%, 胰蛋白酶0.1%, 调节pH 8.0; b胆汁: 胆汁盐0.2%, 调节pH8.0。人工肠液为a液:b液体积比2:1, 用孔径0.22μm微孔滤膜过滤除菌, 备用。

步骤: 将过夜培养的LPb1菌液稀释涂布计数, 取1mL菌液加入9mL人工胃液, 振荡均匀, 37℃静置培养3h后稀释涂布计数; 4200r/min离心20min, 倒去上清液, 加入10mL人工胰液, 悬浮振荡, 37℃静置培养, 每隔3h, 稀释涂布计数。

$$\text{存活率}/\% = \frac{\text{处理后的活菌数}/(\text{CFU}/\text{mL})}{\text{初始活菌数}/(\text{CFU}/\text{mL})} \times 100$$

1.2.2 嗜热链球菌的筛选

市售酸奶→生理盐水稀释不同梯度→涂布M17固体平板→37℃培养48h→镜检(链球形)→两步划线纯化得单菌落→斜面及甘油管低温保存

1.2.3 菌株之间的拮抗作用情况

将假定的抑制菌菌株(杆菌或球菌)在MRS(或M17)液体培养基中37℃厌氧培养16~18h, 培养液在4℃、4200r/min离心20min, 用孔径0.45μm微孔滤膜过滤除菌后, 4℃保存。

取过夜培养的球菌或杆菌30μL平板涂布, 用镊子夹取无菌滤纸片放于平板上, 吸取对应的无细胞发酵液60μL于滤纸片上, 超净台放置0.5h, 置于培养箱中37℃静置培养, 48h后观察结果。

1.2.4 混合发酵剂的制备

各挑取LPb1和嗜热链球菌斜面接种, 活化3次, 37℃过夜静置培养的脱脂乳作为种子液, 再分别以2%的接种量接到脱脂乳中过夜培养, 两者以同体积混合, 即为混合发酵剂。

1.2.5 酸度滴定

取10mL乳样于三角瓶内, 加0.5mL酚酞试剂, 将乳样用标定过的0.1004mol/L NaOH标准溶液滴定, 时时摇动, 直至出现粉红色且30s粉红色不消失为止, 即达到滴定终点, 读NaOH溶液消耗量, 读数至小数点后2位。每消耗0.1mL NaOH为1°T(吉尔涅尔度)^[12]。

1.2.6 单因素发酵条件优化

1.2.6.1 接种量对发酵乳制品的影响

向脱脂乳中按体积分数接入2%、3%、4%、5%的混合发酵剂, 42℃发酵8h后, 测定酸度, 并进行感官评定。经过训练过的5名感官评定人员按照统一的评价指标: 凝乳口感、风味(气味和滋味)、组织状态(质构与流变), 每一指标满分为10分, 进行打分, 求其平均值, 进行感官评价^[13-14]。

1.2.6.2 发酵时间对发酵乳品质的影响

向脱脂乳中接入4%混合发酵剂, 42℃条件下分别发酵5、7、9、11h后, 测定酸度, 并进行感官评价。

1.2.6.3 发酵温度对发酵乳品质的影响

向脱脂乳中接入4%的混合发酵剂, 分别于38、40、42、44℃发酵9h后, 测定酸度, 并进行感官评价。

1.2.7 中心组合发酵条件优化

接种量、发酵温度和发酵时间对酸乳的品质有交互影响作用, 选择Box-Behnken设计试验, 通过Design Expert7.1.3软件分析来确定最优发酵条件。以接种量、发酵温度和发酵时间3个因素为自变量, 感官评分为响应值, 因素水平设计见表2。

表1 发酵乳的感官评定标准
Table 1 Standards for sensory evaluation of fermented yogurt

评分标准	凝乳口感	风味(气味和滋味)	组织状态
1~2分	水性较大或较多硬块状结构, 难以下咽	无酸乳清香味, 腐败味、苦涩味、酸味、酵母味强烈	与发酵前组织状态相似或有大量凝块, 黏合度较大, 有气泡, 表面龟裂, 颜色深黄
2~4分	有少量硬块, 不细腻	酸乳香味较弱, 甜度、苦涩味、酸味较大, 无腐败味及酵母味	酸乳淅沥, 分层明显或有较多凝块, 组织不均匀, 黏稠, 有大量乳清析出, 黄色较重
4~6分	有微量硬块, 细腻, 口感一般	酸乳香味温和, 稍有苦涩味	稀糊状, 质地均匀, 无弹性, 有少量乳清析出
6~8分	无硬块, 细腻, 口感良好	酸乳清香, 酸甜适中, 无杂味	有适当的硬度, 均匀细腻, 有弹性, 有微量乳清析出,
8~10分	细腻爽滑, 口感良好, 回味悠长	清香浓郁, 酸甜可口, 无杂味具有市售酸奶固有的风味	有适当的硬度, 均匀光滑、细腻, 富有弹性, 表面无变色、龟裂、气泡等现象, 无乳清析出, 轻轻倾斜容器凝乳不流动

表2 发酵乳制备条件优化试验因素水平设计表
Table 2 Factors and levels of Box-Behnken design

水平	因素		
	x_1 接种量/%	x_2 发酵时间/h	x_3 发酵温度/℃
-1	3.5	7	38
0	4.0	9	40
1	4.5	11	42

2 结果与分析

2.1 对模拟人体消化道环境的耐受力

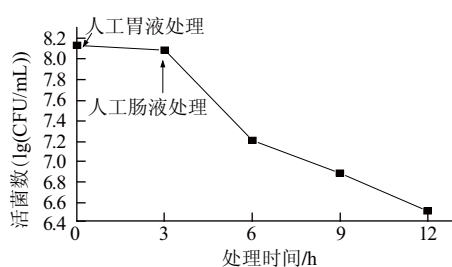


图1 LPb1在人工胃肠液中的生长情况

Fig.1 Growth curve of *Lactobacillus plantarum* LPb1 in artificial gastrointestinal fluid

由图1可知, 用人工胃液处理菌液, 活菌数有所下降, 但下降不明显, 3h后存活率可以达到99.4%。后续用人工肠液处理, 活性菌体的数量有明显下降, 用人工肠液处理3h, 存活率仍可以达到88.6%。这一结果与 Petros 等^[15]的研究相似。总的来看, 大部分LPb1菌株可以耐受模拟的人体肠道环境而存活下来。

2.2 嗜热链球菌的筛选

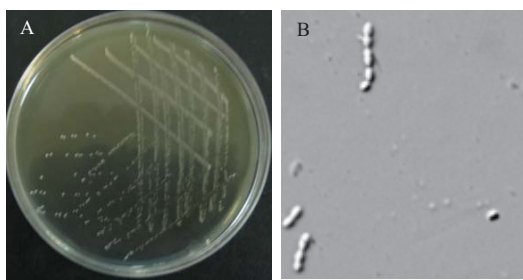


图2 36h菌落形态(A)和电子显微镜下的菌体形态(B)(×630)

Fig.2 Colony morphology and mycelial morphology of the strain SPQ(×630)

由图2可知, 菌株在平板上长出乳白色, 圆形, 表面光滑、湿润、边缘整齐, 隆起菌落; 电子显微镜下观察, 菌株菌体成链球形, 初步认定此菌株为嗜热链球菌, 并命名为嗜热链球菌SPQ。

2.3 LPb1与SPQ拮抗结果分析

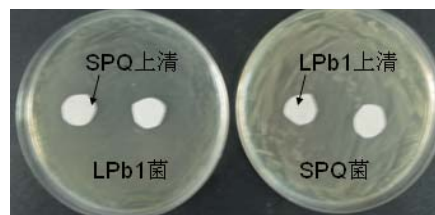


图3 LPb1菌与SPQ菌的拮抗结果

Fig.3 Antagonism test between strain LPb1 and strain SPQ

由图3可知, LPb1菌与嗜热链球菌不发生拮抗作用, 为混合发酵酸奶的研究打下基础。

2.4 酸度滴定

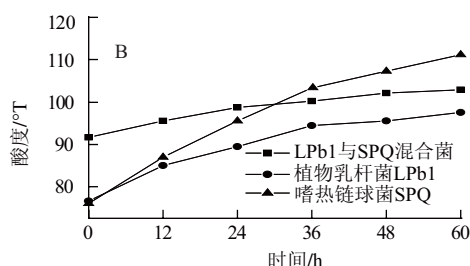
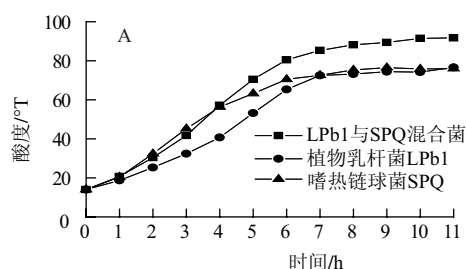


图4 LPb1与SPQ及其混合菌在冷藏前(A)和冷藏后(B)的发酵酸度滴定曲线

Fig.4 Acidification rate of strain LPb1, SPQ and the combined starter of them

图4a显示混合菌产酸速度较快, 且最后的滴定酸度较大, 混合发酵11h时酸度已达到91.7°T。把发酵11h的酸奶贮存在4℃冰箱里测定的酸度变化如图4b所示, 混合菌的酸度曲线比较平稳, 增长缓慢, 而单菌发酵的酸奶则酸度有一个上升的过程。

2.5 酸乳发酵条件的单因素试验

2.5.1 接种量对发酵乳制品的影响

表3 接种量对发酵酸乳品质的影响
Table 3 The influence of inoculum size on yoghurt quality

接种量/%	酸度/°T	感官品质			总分
		凝乳口感	风味	组织状态	
2	62	4.4	4.8	5	14.2
3	69	5.6	5.6	5.4	16.6
4	75	6.6	6.6	5.8	19
5	80	6.6	6	4.6	17.2

表3显示, 接种量对酸乳品质影响较大, 接种量偏低

会导致产酸偏低,凝乳不好,香味淡,偏甜;接种量偏高时虽然凝乳状态好,但酸度过高导致样品偏酸,且摇匀后凝乳有硬块,综合分析接种量为4%较为适宜。

2.5.2 发酵时间对发酵乳品质的影响

表 4 发酵时间对发酵乳品质的影响

Table 4 The influence of fermentation time on yogurt quality

发酵时间/h	酸度/°T	感官品质			总分
		凝乳口感	风味	组织状态	
5	65	4.6	4.4	4.6	13.6
7	72	5.6	6.0	6.6	18.2
9	80	6.0	6.6	6.6	19.2
11	85	6.2	5.6	6.0	17.8

表4显示,发酵时间影响发酵程度。综合凝乳口感、风味、组织状态三方面因素,发酵时间为9h较为适宜。

2.5.3 发酵温度对发酵乳品质的影响

表 5 发酵温度对发酵乳品质的影响

Table 5 The influence of fermentation temperature on yogurt quality

发酵温度/°C	酸度/°T	感官品质			总分
		凝乳口感	风味	组织状态	
38	85	5.6	5.4	6.2	17.2
40	80	6.4	7.0	6.6	20.0
42	77	6.2	6.4	6.2	18.8
44	75	6.0	5.6	6.0	17.6

表5显示,温度过高或过低都会影响菌株的生长,从而影响产品酸度,口感、风味和组织状态。综合感官评价,在4%接种量发酵9h时,发酵温度为42℃时产品质量较好。

2.6 发酵酸乳最佳发酵条件的响应曲面分析

试验设计与结果见表6。利用Design Expert 7.1.3软件对表中数据进行二次多元回归拟合,得到发酵酸乳感官得分预测值对编码自变量 x_1 、 x_2 和 x_3 的二次多项回归方程:

$$Y = 19.60 + 0.63x_1 - 0.20x_2 + 0.38x_3 - 0.25x_1^2 + 0.6x_2^2 - 0.95x_3^2 - 0.45x_1x_2 - 1.3x_1x_3 - 0.285x_2x_3$$

表 6 发酵乳制备条件优化试验设计与结果表

Table 6 Test designs and results for the optimization of fermentation conditions

试验号	x_1	x_2	x_3	感官得分	
				实验值	预测值
1	0	0	0	19.8	19.60
2	0	-1	-1	14.6	14.33
3	0	0	0	19.8	19.60
4	1	0	1	18.8	17.90
5	1	-1	0	18.6	18.93
6	0	-1	1	16.4	15.83
7	-1	0	1	15.4	15.45
8	0	0	0	18.8	17.90
9	1	1	0	17.4	18.03
10	-1	1	0	17.6	17.28
11	0	1	-1	16.4	16.98
12	0	0	0	20.4	19.60
13	1	0	-1	16.0	15.95
14	0	1	1	14.4	14.68
15	0	0	0	19.2	19.60
16	-1	-1	0	17.8	17.18
17	-1	0	-1	15.0	15.90

对表6的回归模型进行方差分析,回归模型 $P=0.0048(P<0.01)$,表明模型方程极显著。回归模型的确定系数为0.9173,说明该模型能够解释91.73%的变化;失拟项 $P=0.1575>0.05$,说明方程对实验的拟合度较好,此实验方法可靠。

表 7 回归模型方差分析表

Table 7 Variance analysis of the regression equation

方差来源	平方和	自由度	均方和	F值	P值
回归模型	54.91	9	6.10	8.63	0.0048
残差	4.95	7	0.71		
失拟	3.43	3	1.14	3.01	0.1575
纯误差	0.52	4	0.38		
总误差	59.86	16			
$R^2=0.9173$			$R_{Adj}^2=0.8110$		

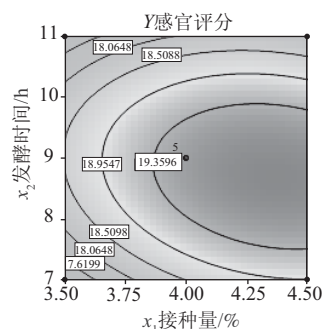
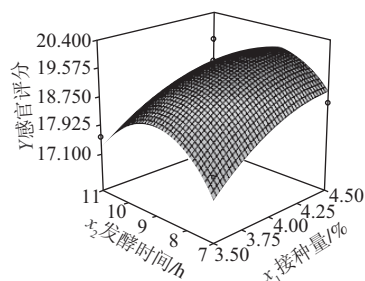


图 5 接种量和发酵时间对发酵乳感官分析得分影响的响应曲面和等高线

Fig.5 Response surface and contour plot of the effects of inoculum size and fermentation time on sensory quality of yogurt

根据回归方程可绘出响应面分析图及其等高线,等高线的形状可以反映出因素间交互效应的强弱,圆形表示两因素间交互作用不显著,而椭圆形则显著。由图5可知,在发酵温度恒定条件下,在选定的条件范围内,感官评分较高值在接种量为3.75%~4.25%和发酵时间为7.5~8.5h的范围内;由图6可知,在接种量一定的条件下,在选定的条件范围内,感官评分较高值在发酵温度39.5~41℃和时间8~9.5h的范围内;由图7可知,当发酵时间恒定,感官评分较高值在发酵温度40~41℃和接种量4%~4.25%的范围内。

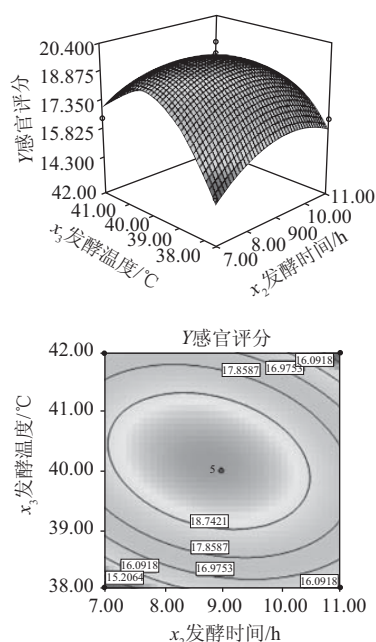


图6 发酵时间和发酵温度对发酵乳感官影响的响应曲面和等高线
Fig.6 Response surface and contour plot of the effects of fermentation time and fermentation temperature on sensory quality of yogurt

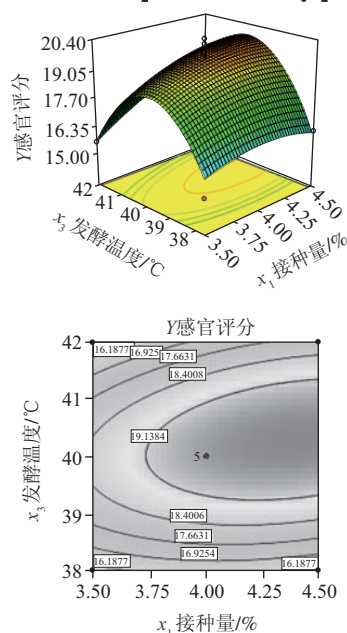


图7 接种量和发酵温度对发酵乳感官影响的响应曲面和等高线
Fig.7 Response surface and contour plot of the effects of inoculum size and fermentation temperature on sensory quality of yogurt

通过Design Expert软件分析得出最佳发酵条件的组合,确定发酵乳最佳发酵条件为:接种量4.45%、发酵时间8.53h、发酵温度40.40℃。为了进一步验证混合菌最优的发酵条件,采用上述条件进行3次重复实验,结果发酵乳感官评分值均达到了21.6,起到了优化效果。

3 结论

益生菌如果要在人体内发挥益生作用,除了具备一定的耐酸碱能力外,还要具备一定的耐高盐、胃蛋白酶、胰蛋白酶的能力^[16]。对模拟人体消化道环境的耐受力实验结果表明,菌株LPb1对模拟的人工消化道环境有一定的抵抗力。从市售的酸奶中筛选一株嗜热链球菌,且它不与LPb1发生拮抗作用。与单菌发酵相比较,混合菌的发酵产酸速度快,发酵乳具有良好的持水性能,4℃贮存,后酸化程度缓慢。通过单因素分析和响应面分析,混合发酵最佳发酵条件为:接种量4.45%、发酵时间8.53h、发酵温度40.40℃。

参考文献:

- [1] MARAGKOUidakis P, MIARIS C, ROJEZ P, et al. Production of traditional Greek yoghurt using *Lactobacillus* strains with probiotic potential as starter adjuncts[J]. International Dairy Journal, 2006, 16(1): 52-60.
- [2] 杨洁彬, 郭兴华. 乳酸菌: 生物学基础及应用[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1996.
- [3] VRIES M, VAUGHAN E E, KLEEREBEZEM M, et al. *Lactobacillus plantarum*-survival functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract[J]. International Dairy Journal, 2006, 16(9): 1018-1028.
- [4] CATALOLUK O, GOGEBAKAN B. Presence of drug resistance in intestinal lactobacilli of dairy and human origin in Turkey[J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 236(1): 7-12.
- [5] 肖仔君, 钟瑞敏. 植物乳杆菌的生理功能与应用[J]. 中国食品添加剂, 2005(2): 87-89.
- [6] 李霞, 于长青. 植物乳杆菌酸奶的加工工艺参数优化研究[J]. 农产品加工, 2010(12): 29-33.
- [7] 杨桂梅, 张永红, 苏娜, 等. 2株猪源益生性肠球菌对酸和胆盐及热的耐受性研究[J]. 北京农学院学报, 2008, 23(4): 29-32.
- [8] DEMAN J C, ROGASA M, SHARPE M E. A medium for the cultivation of lactobacilli[J]. Journal of Applied Bacteriology, 1960, 23(1): 130-135.
- [9] 曹文海, 任国谱. 嗜热链球菌的检验培养基(M17)的改良[J]. 中国乳业, 2006(1): 46-48.
- [10] 中华人民共和国卫生部. 中华人民共和国药典[M]. 广州: 广东科技出版社, 1995: 附录64.
- [11] CHARTERIS W P, KELLY P M, MORELLI L, et al. Development and application of an *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastro intestinal tract[J]. Applied Microbiology, 1998, 84: 759-768.
- [12] 邓鹏超. 乳酸菌的高密度培养及酸奶冻干发酵剂的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.
- [13] 高奇, 张国农. 凝胶型酸奶的制备及其质量评价体系的建立[J]. 中国乳品工业, 2006, 34(1): 17-20.
- [14] 王微. 凝固型原味酸奶质地及微观结构的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2007.
- [15] PETROS A, MARAGKOUidakis P, ZOUMPOPOULOU G, et al. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products[J]. International Dairy Journal, 2006, 16: 189-199.
- [16] 孟丽, 唐善虎, 杨蓉生, 等. 干酪乳杆菌在模拟人体消化道环境及高盐环境中生长活力的研究[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(4): 46-49.