

不同保护剂影响植物乳杆菌冻干菌粉 发酵活力的研究

赵延胜^{1,2}, 吴超¹, 王慧², 周洪斌², 董英^{1,*}

(1. 江苏大学 食品与生物工程学院, 江苏 镇江 212013; 2. 镇江出入境检验检疫局 检验检疫综合技术中心, 江苏 镇江 212000)

摘要:以植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum* CGMCC 6016, *L. P. dy-1*) 为分析对象, 研究不同冻干保护剂、贮藏温度和贮藏时间对冻干菌粉活菌数及发酵活力的影响。研究分别采用 10% 和 22.4% 的纯菊粉、菊粉复合保护剂、脱脂乳复合保护剂制备冻干菌粉。结果显示, 在 -20℃ 贮藏 8 个月, 其活菌数均可保持在 10^{10} CFU/g 以上; 4℃ 贮藏 8 个月, 仅菊粉复合保护剂组活菌数维持在较高水平, 为 $(0.94 \pm 0.17) \times 10^{10}$ CFU/g; 不同保护剂制备的冻干菌粉在 -20℃ 下贮藏 6 个月或 4℃ 下贮藏 4 个月, 可维持较高的产酸活力, 其中, 菊粉复合保护剂组的细胞活力下降最为缓慢。流式细胞术 (flow cytometry, FCM) 与 pH 值测定法对细胞活力分析结果的关联度较好, R^2 值为 0.77, 可快速评价保护剂作用下冻干植物乳杆菌细胞的增殖; FCM 分析结果显示, 与脱脂乳复合保护剂相比, 菊粉保护剂组与直接活化组的细胞增殖活力最为接近。

关键词:冻干保护剂; 植物乳杆菌; 发酵活力; 流式细胞术; 菊粉

Effect on the Fermentation Activity of Freeze-dried *Lactobacillus plantarum* by Cryoprotectant

ZHAO Yan-sheng^{1,2}, WU Chao¹, WANG Hui², ZHOU Hong-bin², DONG Ying^{1,*}

(1. School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, Jiangsu, China;
2. Inspection and Quarantine Technology Center, Zhenjiang Entry-exit Inspection Quarantine Bureau, Zhenjiang 212000, Jiangsu, China)

Abstract: The influences on the viable count of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* CGMCC 6016 (*L. P. dy-1*) during storage by different cryoprotectant were studied. And the fermentation activity of freeze-dried *L. P. dy-1* affected by cryoprotectant was analyzed with the flow cytometry method (FCM). The results were as follows: 10% of inulin, 22.4% of inulin, inulin composite protective agent and skim milk composite protective agent were used as cryoprotectant to protect the freeze-dried *L. P. dy-1*. The viable count of *L. P. dy-1* was still higher than 10^{10} CFU/g after 8 months stored in -20℃, while only the viable count of inulin composite protective agent group kept a level higher than $(0.94 \pm 0.17) \times 10^{10}$ CFU/g after 8 months stored in 4℃. The freeze-dried LAB with cryoprotectant could keep high acid production activity storage in -20℃ for 6 months and 4℃ for 4 months respectively. Among the cryoprotectant groups, the cell activity of the inulin composite protective agent group has the slowest decline. The correlation degree R^2 between the results of pH value and FCM was 0.77, which indicated that FCM was suitable for the study of cell activity of freeze-dried *L. P. dy-1*. Compared with the freeze-dried *L. P. dy-1* added with skim milk composite protective agent, the bacteria prepared with inulin cryoprotectant could keep a higher fermentation activity and similar cell proliferation activity with the direct activation group.

基金项目: 江苏大学高级人才专项(13JDG038); 江苏省博士后科研资助计划项目(1601094B)

作者简介: 赵延胜(1985—), 男(汉), 讲师, 博士, 研究方向: 食品营养与安全。

* 通信作者: 董英(1954—), 女(汉), 教授, 博导, 学士, 研究方向: 食品营养与安全。

Key words: cryoprotectant; *Lactobacillus plantarum*; fermentation activity; storage stability; flow cytometry; inulin

引文格式:

赵延胜,吴超,王慧,等.不同保护剂影响植物乳杆菌冻干菌粉发酵活力的研究[J].食品研究与开发,2019,40(12):19-24
ZHAO Yansheng, WU Chao, WANG Hui, et al. Effect on the Fermentation Activity of Freeze-dried *Lactobacillus plantarum* by Cryoprotectant[J]. Food Research and Development, 2019, 40(12): 19-24

采用真空冷冻干燥技术可以提高乳酸菌的保藏期,是制备高效直投式乳酸菌发酵剂最常用的技术手段^[1]。但经过冻干处理后,菌体在贮藏期间其极易遭受冷冻、氧化、融化等过程的损伤,从而影响其贮藏特性^[2]。冻干保护剂的添加可以一定程度上降低菌体在冻干过程中的损伤,提高冻干菌粉的贮藏和发酵性能^[3]。目前,活菌数和细胞活力是评价菌体贮藏稳定性的重要指标,而冻干保护剂的研究和开发一般多关注于冻干和贮藏过程中菌体细胞的存活率,对于保护剂影响贮藏期间乳酸菌细胞发酵活力的作用研究相对较少。

本文在前期研究工作基础上^[4],以植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum* CGMCC 6016, *L. P. dy-1*)为研究对象,分析不同冻干保护剂对冻干菌体贮藏期间活菌数的影响,并结合流式细胞术(flow cytometry, FCM)分析保护剂对菌体冻干后发酵活力的影响;在此基础上,研究贮藏过程中冻干菌粉发酵活力的变化,比较不同保护剂对冻干菌粉的保护效果,为进一步开发乳酸菌功能性保护剂,以及提高直投式乳酸菌发酵剂的贮藏稳定性,提供理论与试验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

L. P. dy-1:由江苏大学食品生物制造实验室自行分离;3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)、甘油、酒石酸钾钠、结晶酚、亚硫酸钠、盐酸、乙醇、氢氧化钠、甲醇、百里酚酞、果糖等均为二级试剂:医药(集团)上海化学试剂有限公司;二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO):上海生工生物工程公司;羟基荧光素二醋酸琥珀酰亚胺酯[5-(and 6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, CFSE]:e-Bioscience公司。

1.2 仪器与设备

DHG-9240A型鼓风干燥箱:上海一恒科技有限公司;HJ-3控温磁力搅拌器:金坛市医疗仪器厂;

YX400Z高压灭菌锅:上海三申医疗器械有限公司;SW-CJ-ID型超净工作台:苏州净化设备有限公司;JLQ-S1型菌落计数器:江苏锡山市金诚仪器厂;7200型分光光度计:上海天达仪器有限公司;FD-8真空冷冻干燥机:北京博医康实验仪器有限公司;5430R高速冷冻离心机:德国Eppendorf公司;FACSCalibur型流式细胞仪:美国Becton Dickinson公司。

1.3 试验方法

1.3.1 冻干菌粉的制备

直投式发酵剂的制备流程如下:

菌种活化→扩培→菌体浓缩分离→与保护剂混合→分装、预冻→冻干

选用质量浓度分别为10%的菊粉、22.4%的菊粉、菊粉复合保护剂和脱脂乳复合保护剂制备冻干菌粉^[5],将制备好的冻干菌粉经真空包装后,分别于-20℃和4℃条件下贮藏。

1.3.2 冻干菌粉发酵样品的制备

前期试验研究表明,添加不同保护剂制备的冻干菌粉发酵MRS培养基(营养富集培养基)时,细胞活力无显著性差异,而发酵营养匮乏培养基时菌体产酸能力不同^[4]。因此本试验选用10%质量浓度的菊芋浸汁用于测定冻干菌体的细胞活力,其制备过程参考程新等方法^[5],但不添加任何碳氮源及矿物元素。在34℃条件下,按以下方式发酵10%菊芋浸汁^[6]:

1)直接活化发酵:取-20℃保存菌种,按5%接种量接入MRS液体培养基中,34℃、12h活化培养两次后(活菌数为 2×10^9 CFU/mL~ 3×10^9 CFU/mL),以5%接种量加入10%菊芋浸汁。

2)直投式发酵:采用1.3.1中添加不同保护剂制备的乳酸菌冻干菌粉(活菌数为 2×10^{10} CFU/g~ 6×10^{10} CFU/g)以0.5 g/L的接种量加入10%菊芋浸汁。

1.3.3 无细胞发酵液的制备

每隔3h取1.3.2中的发酵液于无菌离心管中,在4℃、3 996×g离心10 min后,取上清液保存于4℃,用于还原糖、总糖的测定。

1.3.4 发酵液分析方法

发酵液还原糖和总糖的测定采用 DNS 比色法。还原糖测定:吸取无细胞发酵液 2 mL,准确加入 2 mL DNS,沸水浴 3 min 后立即冷却,加入 6 mL 蒸馏水,混合均匀后于 540 nm 波长处测定吸光值。根据标准曲线计算样品中还原糖含量。总糖测定:吸取无细胞发酵液 5 mL,用 6 mol/L 的盐酸调节 pH 值至 2.0,沸水浴中水解 1 h,然后用 6 mol/L NaOH 调至 pH 值为 8 左右,定容至 10 mL。准确吸取样品 2 mL,之后操作与还原糖测定法相同。

pH 值和活菌数的测定分别采用 pH 计和梯度稀释平板计数法。

1.3.5 乳酸菌增殖的测定方法

将制备的冻干菌粉直投发酵 10 % 菊芋浸汁,初始接菌量控制在 1×10^7 CFU/mL~ 3×10^7 CFU/mL,立即取 1 mL 菌液,4 ℃、3 996×g 离心 5 min,再用磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered solution,PBS)洗涤 2 次后,重悬至 1 mL,加入 100 μL 浓度为 50 μmol/L 的 CFSE,37 ℃避光孵育 10 min 后,离心、洗涤 2 次。最终悬浮于 1 mL 灭菌的 10 % 菊芋浸汁中,34 ℃培养,并分别在 6、12 h 取样,离心、洗涤,重悬于等体积的 PBS 中,过 200 目滤网,采用流式细胞仪对样品进行检测。检测光源为氩离子激光,激发光和发射光波长分别为 488 nm 和 630 nm,检测器波长为 530 nm,不设门,圈定待检测的目标细胞,并通过 CellQuest 软件分析细胞数据。

1.3.6 数据处理方法

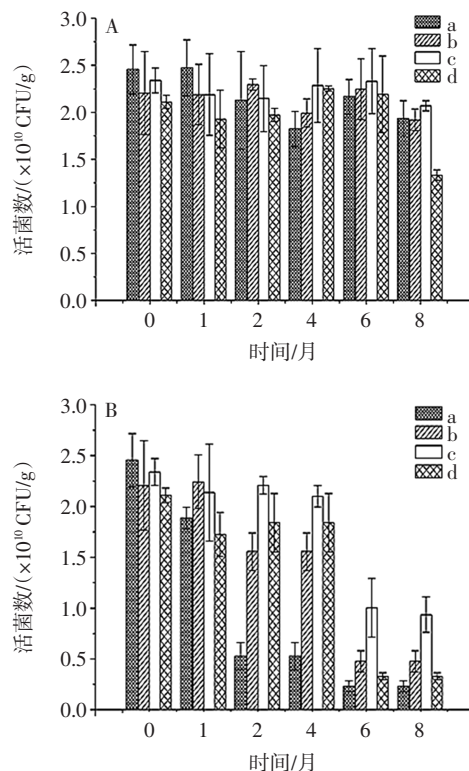
采用 SPSS 17.0 软件对所得数据进行处理和分析。

2 结果与讨论

2.1 保护剂对冻干菌粉贮藏期活菌数的影响

在冻干菌粉贮藏过程中,温度是影响菌体存活率的关键因素之一^[7]。高温及干燥条件会导致生物体内发生非酶褐变,引起菌体失活。研究报道表明,高温会加速冻干制品的融化、含水量变化和相变的发生等问题,因此温度升高,冻干样品的贮藏稳定性变差。保护剂对 *L. P. dy-1* 冻干菌粉贮藏期间活菌数的影响见图 1。

从图 1 可以看出,采用不同保护剂制备的冻干菌粉在 -20 ℃贮藏 8 个月,活菌数均保持在 10^{10} CFU/g 以上,且不同处理组无显著差异;而在 4 ℃下贮藏 1 个月后,不同保护剂组的活菌数则发生变化,尤其 4 ℃下贮藏 6 个月时的活菌数下降最为显著。表明低温更有利于菌体活菌数的保持,该结果与已有研究报道一致^[8]。



A.贮藏温度-20 ℃;B.贮藏温度 4 ℃;a.10 % 菊粉组;b.22.4 % 菊粉组;c.菊粉复合保护剂组;d.脱脂乳复合保护剂组。

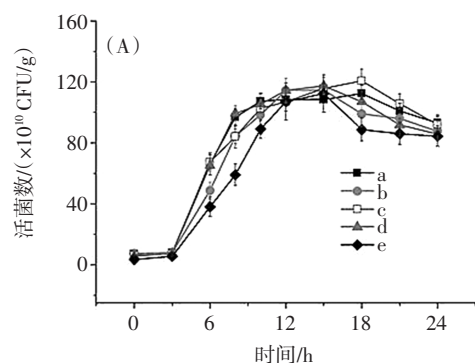
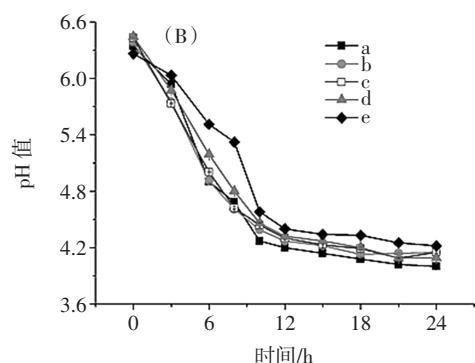
图 1 保护剂对 *L. P. dy-1* 冻干菌粉贮藏期间活菌数的影响
Fig.1 Effect on the viable count of freeze-dried *L. P. dy-1* during storage by cryoprotectant

此外,保护剂的种类也会影响冻干菌粉贮藏期间活菌数的变化。如图 1 所示,4 ℃贮藏 1 个月,活菌数均保持在 1.7×10^{10} CFU/g 以上;菊粉复合保护剂组、22.4 % 菊粉组和脱脂乳复合保护剂组分别在 4 ℃贮藏 6 个月、4 个月和 4 个月,活菌数仍能够维持在 10^{10} CFU/g 以上,但 8 个月后菌粉活菌数降低约 1 个数量级。菌粉的贮藏稳定性强弱顺序为:菊粉复合保护剂组>22.4 % 菊粉组>脱脂乳复合保护剂组>10 % 菊粉组。试验结果表明,采用菊粉复合保护剂制备的冻干菌粉贮藏稳定性最佳,且分别在 -20 ℃和 4 ℃保藏 8 个月后,活菌数可分别达到 $(2.07 \pm 0.05) \times 10^{10}$ CFU/g 和 $(0.94 \pm 0.17) \times 10^{10}$ CFU/g,较其他保护剂组高。

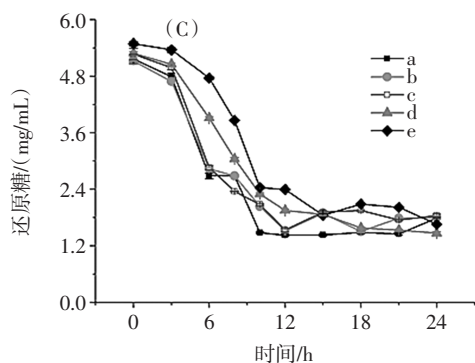
2.2 保护剂对冻干菌粉发酵活力的影响

以直接活化发酵组作为对照,采用不同保护剂制备冻干菌粉发酵 10 % 菊芋浸汁培养基,发酵过程中 *L. P. dy-1* 活菌数、pH 值、还原糖及总糖的动态变化如图 2 所示。

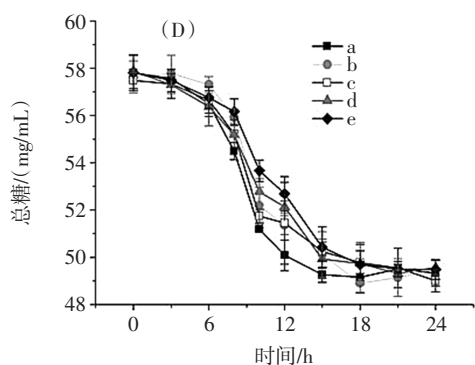
保护剂是影响冻干后植物乳杆菌产酸能力的重要因素。由图 2 可知,相比直接活化组,添加保护剂的乳酸菌冻干后发酵 10 % 菊芋浸汁的活力均有所下降,

(A) 发酵过程中 *L. P. dy-1* 活菌数的变化

(B) 发酵过程中 pH 值的变化



(C) 发酵过程中还原糖的变化



(D) 发酵过程中总糖的变化

a. 直接活化组; b. 10% 菊粉组; c. 22.4% 菊粉组; d. 菊粉复合保护剂组; e. 脱脂乳复合保护剂组。

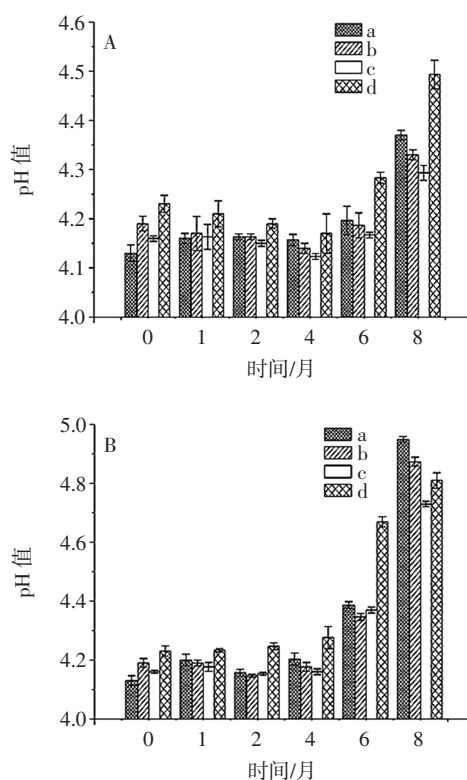
图2 保护剂对 *L. P. dy-1* 冻干菌粉发酵活力的影响Fig.2 Effect on the fermentation activity of freeze-dried *L. P. dy-1* by cryoprotectant

表现在发酵过程中活菌数的增长和产酸(pH 值)速度有所降低,其中脱脂乳复合保护剂组中的活菌数一直处于最低水平,且 pH 值相对较高;菊粉保护剂组相互之间无显著性差异,且在活菌数和产酸变化上较接近于活化组。

在整个发酵过程中,还原糖和总糖的含量越来越少,这与 *L. P. dy-1* 的迅速生长和产酸相符合;发酵 12 h 后,还原糖含量变化缓慢,可能是由于总糖的分解,*L. P. dy-1* 消耗的速度和分解产生的速度相均衡。在发酵后期,发酵液中还原糖和总糖含量几乎不变,这可能由于酸的积累造成 *L. P. dy-1* 代谢速度降低。从试验结果可以看出,直接活化组的还原糖和总糖降低速度稍高于冻干组,菊粉复合保护剂组的糖代谢速率高于脱脂乳复合保护剂组,这与图 2A、图 2B 的结果相一致。

2.3 贮藏时间及温度对冻干菌粉发酵活力的影响

在贮藏期间,*L. P. dy-1* 冻干菌粉的发酵活力变化如图 3 所示。



A. 贮藏温度为 -20 °C, B. 贮藏温度为 4 °C; a. 10% 菊粉组; b. 22.4% 菊粉组; c. 菊粉复合保护剂组; d. 脱脂乳复合保护剂组。

图3 *L. P. dy-1* 冻干菌粉贮藏期间 pH 值的变化Fig.3 Variation in the pH value of fermentation freeze-dried *L. P. dy-1* with different storage time

冻干菌粉在 -20 °C 保藏 6 个月和 4 °C 保藏 4 个月,均能够维持较高的产酸活力;随着贮藏时间的延

长,菌粉的产酸能力明显下降,这可能与贮藏过程中活菌数的变化有关^[9];本试验结果同时表明,低温贮藏更有利于菌体活力的维持,该结果与已有研究报道相一致^[10]。

2.4 流式细胞术对冻干菌粉发酵活力的评价

CFSE 是一种能透过细胞膜且在胞内被酯酶转化的非极性分子,当细胞分裂时,CFSE 标记物能够平均分配到两个子代细胞中,使细胞的 CFSE 荧光强度减半。FCM 已被作为一种技术广泛应用于细胞领域^[11],而且可以快速的测定冻干后菌体的存活率^[12],并描述冻干菌体的生理状态^[13]。因此,可利用 CFSE 荧光强度的 2 倍递减特性,结合流式细胞术(CFSE-FCM)检测 *L. P. dy-1* 的增殖。试验分别采用直接活化 *L. P. dy-1*、菊粉保护剂冻干菌粉、脱脂乳复合保护剂冻干菌粉发酵 10 % 菊芋浸汁,分析测定发酵液中 pH 值和菌体荧光强度如图 4。

如图 4 所示,3 组 *L. P. dy-1* 被显著区分,左边 pH 值最低的为直接活化组,中间 3 组稍高 pH 值的为菊

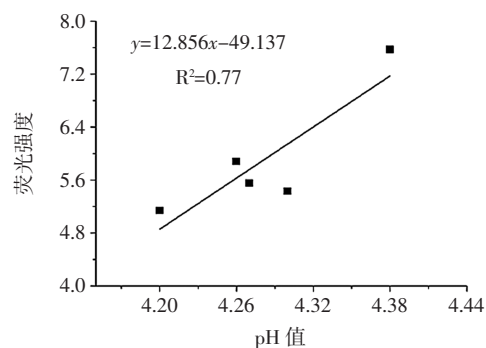
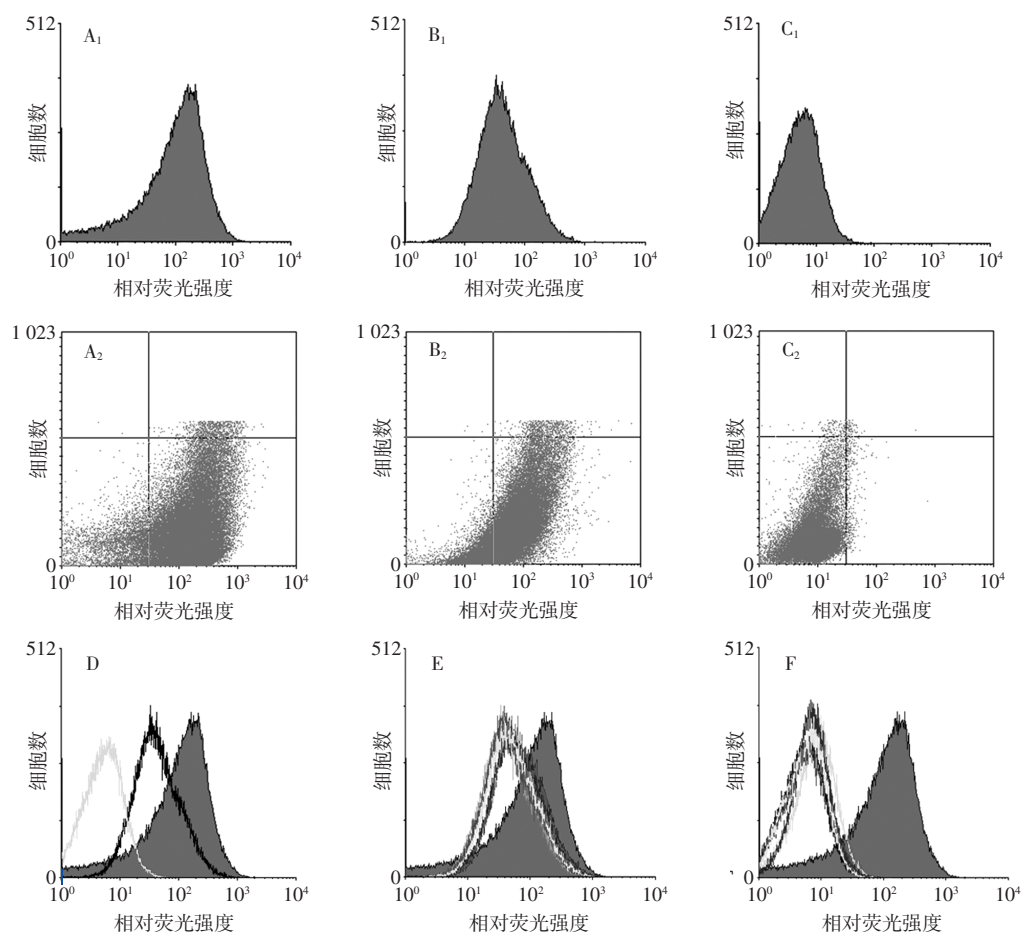


图 4 pH 值与 CFSE-FCM 测定菌体荧光强度的线性关系

Fig.4 Linear relationship between pH value and the fluorescence intensity of cells CFSE-FCM measured

粉保护剂组,右边 pH 值最高的为脱脂乳复合保护剂组。pH 值与 CFSE-FCM 的荧光强度之间表现出良好的相关性, R^2 值达到 0.77,说明这两种测定指标均可用于植物乳杆菌细胞活力的分析。

将不同处理组的 *L. P. dy-1* 冻干菌粉发酵 10 % 菊芋浸汁,采用 CFSE-FCM 分析其细胞增殖情况,结果如图 5 所示。



A₁、B₁、C₁.直接活化发酵 0、6、12 h 的直方图;A₂、B₂、C₂.直接活化发酵 0、6、12 h 的散点图;D.直接活化不同发酵时间的重叠直方图;E.不同处理的 *L. P. dy-1* 冻干后发酵 6 h 的直方图;F.不同处理的 *L. P. dy-1* 冻干后发酵 12 h 的直方图。

图 5 CFSE 标记 *L. P. dy-1* 培养 0、6、12 h 后荧光强度的变化

Fig.5 The fluorescence intensity of CFSE-labeled cells in cultured 0, 6, 12 h

由试验结果可以看出,不同发酵时间的菌体细胞荧光强度有明显的差异,图 A₁~C₁ 和图 A₂~C₂ 表示随着发酵时间的延长,CFSE 标记 *L. P. dy-1* 细胞的直方图和散点图明显向左迁移,说明荧光强度明显减弱。图 5 中 E 和 F 代表不同保护剂制备的冻干菌粉发酵 10% 菊芋浸汁 6 h 和 12 h 时的直方图,各组之间的差异如表 1 所示。

表 1 *L. P. dy-1* 随发酵时间荧光强度的变化情况

Table 1 The fluorescence intensity of cells CFSE-FCM measured in different periods

发酵时间/h	直接活化组	10% 菊粉组	22.4% 菊粉组	菊粉复合保护剂组	脱脂乳复合保护剂组
0	120.86	120.86	120.86	120.86	120.86
6	42.29	52.01	47.27	50.82	63.1
12	5.14	5.88	5.43	5.55	7.57

冻干处理后菌体较冻干前(直接活化组)在 6、12 h 的荧光强度总体偏大。当以菊粉作为保护剂时,随着菊粉浓度的增加,制备的冻干菌体的荧光强度减弱,说明高浓度的菊粉有利于菌体的增殖。其中,与脱脂乳复合保护剂组相比,菊粉保护剂组和直接活化组之间荧光强度的差异较小。

3 结论

低温贮藏有利于维持植物乳杆菌冻干菌粉更高的发酵活力:与 4℃ 贮藏条件相比,-20℃ 贮藏能够使植物乳杆菌的活菌数和产酸能力维持在较高水平;在以 10% 菊芋浸汁为发酵培养基条件下,以菊粉作为保护剂制备的植物乳杆菌冻干菌粉能够维持较高的发酵活力,表现在植物乳杆菌生长迅速、产酸能力强、还原糖和总糖的消耗速度快,且总体效果优于脱脂乳复合保护剂制备的植物乳杆菌冻干菌粉。

流式细胞仪能够快速评价不同保护剂处理冻干植物乳杆菌后细胞的增殖,其中菊粉保护剂组和直接活化组的细胞增殖更为接近,优于脱脂乳复合保护剂组。pH 值及 CFSE-FCM 测定法的关联度良好,表明

CFSE-FCM 适合冻干植物乳杆菌细胞活力的研究。

参考文献:

- [1] HAN B, BISCHOF J C. Direct cell injury associated with eutectic crystallization during freezing[J]. Cryobiology, 2004, 48(1): 8-21
- [2] PASSOT S, CENARD S, TRELEA I C, et al. Freeze-drying of lactic acid bacteria: effect of process variables on cell injury[J]. Cryobiology, 2011, 63(3): 320
- [3] PRAKASH O, NIMONKAR Y, SHOUCHE Y S. Practice and prospects of microbial preservation[J]. FEMS Microbiology Letters, 2013, 339(1): 1-9
- [4] 苏萍,董英,程新,等. 植物乳杆菌冻干保护剂的优化及其保护机制[J]. 中国食品学报, 2014, 14(11): 56-63
- [5] 程新,董英,苏萍,等. 以菊芋为主要营养基质的乳酸菌发酵及影响因素[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(11): 91-96
- [6] 赵延胜,肖香,周兴华,等. 冻干保护剂影响植物乳杆菌代谢途径的研究[J]. 现代食品科技, 2016, 32(8): 103-109
- [7] DIANAWATI D, MISHRA V, SHAH N P. Stability of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* and *Lactococcus lactis* ssp. cremoris during storage at room temperature at low aw[J]. Food Research International, 2013, 50(1): 259-265
- [8] 陈俊亮,张慧芸,霍贵成,等. 乳酸乳球菌乳脂亚种冷冻干燥保护剂优化及其贮藏稳定性[J]. 食品科学, 2014, 35(11): 109-114
- [9] 易文芝,刘成国. 基于产酸能力和高活菌数的益生菌复合菌种发酵技术研究[J]. 中国乳品工业, 2013, 41(9): 18-20
- [10] 张丽芳,田洪涛,苑社强,等. 干酪乳杆菌发酵大豆乳产品的质量分析及稳定性的研究[J]. 现代食品科技, 2009, 25(5): 519-522
- [11] 刘新星,霍转转,云慧,等. 流式细胞术在细菌快速检测中的应用[J]. 微生物学通报, 2014(1): 161-168
- [12] MARTIN-DEJARDIN F, EBEL B, Lemetals G, et al. A way to follow the viability of encapsulated *Bifidobacterium bifidum* subjected to a freeze-drying process in order to target the colon: interest of flow cytometry[J]. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2013, 49(2): 166-174
- [13] DA SILVA T L, MARQUES S, ALVES L, et al. The simultaneous utilization of kinetic analysis and flow cytometry in the assessment of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 physiological states produced by increasing oxygen limitation levels and lactic acid accumulation[J]. Biochemical engineering journal, 2013, 74: 54-59

收稿日期:2018-10-18