

崔莉,潘超,张晓晓,等. 益生菌抗热牛蒡复合保护剂筛选优化研究[J]. 江苏农业科学,2020,48(18):211-214.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.18.042

益生菌抗热牛蒡复合保护剂筛选优化研究

崔莉¹, 潘超², 张晓晓², 李莹¹

(1. 江苏省农业科学院农产品加工研究所, 江苏南京 210014; 2. 江苏大学食品与生物工程学院, 江苏镇江 212013)

摘要:通过单因素试验从甘油、葡萄糖、凝胶、丰县牛蒡粉、沛县牛蒡粉中,选取葡萄糖、丰县牛蒡粉、沛县牛蒡粉作为副干酪乳杆菌 FM-LP-4 复合抗热保护剂组分,然后采用正交设计对复合保护剂的组分进行优化。结果表明,其最佳复合配方为丰县牛蒡粉 2.0%、葡萄糖 4%、沛县牛蒡粉 2.0%,菌体经 75℃,10 min 热处理后活菌数为 6.33 lg CFU/mL。该结果可为牛蒡功能成分在提高益生菌热耐受研究方面的应用提供数据支持。

关键词:牛蒡;益生菌;抗热保护剂;正交试验;沛县牛蒡粉

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)18-0211-03

牛蒡亦称山牛蒡,为菊科多年生草本植物。牛蒡根茎较长,为 65~100 cm;皮色有浅黄、黑褐色 2 种;肉为灰白色,质脆,稍粗硬,断面呈浅黄色;内皮层环纹明显,气香,味甘甜。牛蒡块根富含菊糖、酚酸、黄酮、维生素 A、维生素 B、牛蒡苷、生物碱等营养成分。现代医学证明,牛蒡具有健脾胃、清热解毒、抗氧化、抑菌、抗疲劳、免疫调节、保护肝脏^[1-3]、促进益生菌生长等多种功效^[4-6]。

20 世纪 80 年代末,江苏省丰县率先引种牛蒡并栽培成功,现已成为全国最大的牛蒡生产基地,种植面积超过 6 666.7 hm²,总产量高达 1.6 亿 kg。牛蒡已成为全国较有影响的特色蔬菜之一,目前牛蒡种植以丰县为中心,不断向全国扩展。抗热保护剂的选择和使用策略一直是工业化大规模生产益生菌产品的热点与难点。Chaikham 等研究发现益生元(菊糖、木糖、低聚果糖等)对益生菌的耐热性有保护作用^[7]。Li 等检测发现牛蒡菊糖能够显著增强双歧杆菌的活性^[8]。本研究通过探索牛蒡全粉的益生菌耐热保护作用,深入研究牛蒡的保健功效成分,以期为提高牛蒡附加值提供科技支撑。

1 材料与方法

试验于 2019 年 7 月 12 日至 2019 年 8 月 17 日

收稿日期:2019-11-09

基金项目:江苏省苏北科技专项资金(编号:XZ-SZ201836)。

作者简介:崔莉(1978—),女,内蒙古鄂尔多斯人,博士,副研究员,从事营养功能食品加工关键技术研究。E-mail:clisu1@163.com。

通信作者:李莹,博士,副研究员,主要从事食品营养与健康研究。E-mail:hijoly@163.com。

在江苏省农业科学院农产品加工研究所进行。

1.1 试验材料

试验材料:副干酪乳杆菌 FM-LP-4,江苏省农业科学院农产品加工研究所食品生物工程研究室保藏。蔗糖、甘油、明胶均为食品级。

用 0.067 mol/L 磷酸盐缓冲溶液(pH 值 6.98)将明胶溶解,配制成所需浓度的溶液,于 114℃灭菌 10 min,冷却后于 4℃冰箱中保存备用。使用前在 37℃水浴中预热 10 min。蔗糖、甘油使用无菌水配制成所需浓度的溶液,经无菌微孔滤膜过滤(现用现制)。配制的保护剂溶液在确认无菌后方可使用。MRS 肉汤培养基(北京陆桥技术股份有限公司):用于菌体扩大培养。MRS 固体培养基:在液体培养基的基础上加入 1.5% 的琼脂即可,用于菌落计数。

1.2 仪器与设备

SW-CJ-ID 型净化工作台,苏州净化设备有限公司;YX280 手提式不锈钢压力蒸汽灭菌器,上海三申医疗器械有限公司;H1850R 型高速冷冻离心机,长沙湘仪离心机仪器有限公司;HH-4 数显恒温水浴锅,国华电器有限公司;XDW 超微粉碎机,济南达微机械有限公司;HYG-A 全温摇瓶柜,太仓试验设备厂;FW100 高速万能打粉机,天津市泰斯特仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 菌种活化及扩大培养 将副干酪乳杆菌 FM-LP-4 菌种由 MRS 固体斜面培养基接入液体培养基中,37℃恒温振荡培养 24 h,反复活化 2~3 次。将活化好的纯菌种以 5% 的接种量接种于 MRS 液体培养基中,于 37℃恒温振荡进行扩大培养。扩

大培养的菌液于 10 ℃ ,6 000 r/min 离心 15 min,弃上清液,用无菌生理盐水冲洗沉淀,制成活菌数为 9 lg CFU/mL 的菌悬液。

1.3.2 活菌数测定 按照 GB 4789.35—2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验》,采用稀释涂布平板计数法,每个样品选取 3 个稀释梯度,每个梯度做 3 个平行试验,求取平均值。

1.3.3 牛蒡超微粉的制备 牛蒡片干燥温度选择:称量新鲜牛蒡片,每份 10 g,分别放置在 50、60、70、80 ℃ 等 4 个温度,放置不同时间测量其水分含量,平行测定 3 次。牛蒡超微粉的制备:将牛蒡放于筛选得到的干燥温度和时间下,直至含水量在 6% 以下,经超微粉碎机粉碎,过 325 目筛得牛蒡超微粉。

1.3.4 抗热保护剂筛选 将菌悬液加入含不同保护剂的 MRS 液体培养基中,于 75 ℃ 恒温水浴中保温 10 min。测定保温前后活菌数,并计算存活率。保护剂的浓度如表 1 所示。试验结果采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,以筛选出相应温度下的最佳乳酸菌抗热保护剂及配比。

表 1 单一保护剂对菌体抗热性的影响单因素试验设计

保护剂种类	保护剂浓度(%)
甘油	0、1、3、5、7、9
葡萄糖	0、2、4、6、8、10
明胶	0、0.1、0.5、1.0、1.5、2.0
丰县牛蒡粉	0、0.1、0.5、1.0、1.5、2.0
沛县牛蒡粉	0、0.1、0.5、1.0、1.5、2.0

1.3.5 复合保护剂对菌体抗热性的影响 根据单因素试验结果,以乳酸菌活菌数为考察指标,采用正交试验 $L_9(3^4)$ 对丰县牛蒡粉(A)、葡萄糖(B)、沛县牛蒡粉(C)等 3 种不同抗热保护剂进行考察,因素水平表见表 2。试验结果采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,以筛选出相应温度下的最佳乳酸菌抗热保护剂及配比。

表 2 抗热保护剂正交试验的因素水平

水平	因素		
	A:丰县牛蒡粉 浓度(%)	B:葡萄糖 浓度(%)	C:沛县牛蒡粉 浓度(%)
1	1.0	4	1.0
2	1.5	6	1.5
3	2.0	8	2.0

2 结果与分析

2.1 牛蒡片最优干燥时间和温度的确定

由表 3 可知,将牛蒡片经 50、60、70、80 ℃ 温度

干燥后,达到水分含量在 6% 以下的时间分别为 6、4、3、3 h。牛蒡片在 70、80 ℃ 温度下干燥所需时间虽短,只要 3 h,但是牛蒡片出现外部焦糊而内部未完全干燥的现象比较严重,因此选择 60 ℃、4 h 为适宜的干燥温度和时间。

表 3 牛蒡片最优的干燥时间和温度

干燥温度 ℃)	干燥时间 (h)	含水量 (%)
50	5	11.09
	6	1.29
	7	1.15
	8	1.15
	9	0.48
60	4	1.79
	5	1.12
	6	1.11
	7	0.85
	8	0.48
70	3	1.43
	4	1.43
	5	1.17
	6	0.70
	7	0.48
80	2	14.82
	3	1.40
	4	1.01
	5	0.45
	6	0.49

2.2 单一保护剂对菌体抗热性的影响

加入不同保护剂于 75 ℃ 保温 10 min 后,菌体存活率见表 4。由表 4 可以看出,加入保护剂经热处理过的菌体均呈现出一定的存活率。5 种保护剂中,丰县牛蒡粉的保护效果最好,菌体经热处理后存活菌数最高,为 5.91 lg CFU/mL,其他保护剂的保护效果降序排列为沛县牛蒡粉、葡萄糖、明胶、甘油。效果较好的 3 种保护剂的最适使用浓度分别为丰县牛蒡粉 1.5%,沛县牛蒡粉 1.5%,葡萄糖 6%。

其中,使用 2 种牛蒡粉的存活菌数量随着保护剂浓度的增大而逐渐提高,但使用浓度大于 1.5% 后,菌体存活率开始下降;而使用葡萄糖、明胶、甘油的存活菌数量,都呈现出随保护剂用量的增加而先上升后下降的趋势。Li 等采用葡萄糖作为冷冻干燥保护剂,在添加浓度为 2.0%、4.0%、8.0% 时,益生菌 *Lactobacillus casei* Zhang 的活菌数从初始的

表4 单一保护剂对菌体存活率的影响

保护剂种类	保护剂浓度(%)	保温前活菌数(lg CFU/mL)	保温后活菌数(lg CFU/mL)
甘油	0	9.59	0
	1	9.59	3.31
	3	9.59	3.72
	5	9.59	3.91
	7	9.59	3.84
	9	9.59	3.77
葡萄糖	0	9.38	0
	2	9.38	3.84
	4	9.38	4.13
	6	9.38	4.27
	8	9.38	4.02
	10	9.38	3.91
明胶	0	9.47	0
	0.1	9.47	3.47
	0.5	9.47	3.97
	1.0	9.47	4.08
	1.5	9.47	3.94
	2.0	9.47	3.54
沛县牛蒡粉	0	9.65	0
	0.1	9.65	3.83
	0.5	9.65	4.11
	1.0	9.65	4.31
	1.5	9.65	4.57
	2.0	9.65	4.49
丰县牛蒡粉	0	9.83	0
	0.1	9.83	5.21
	0.5	9.83	5.45
	1.0	9.83	5.64
	1.5	9.83	5.91
	2.0	9.83	5.87

8.02 lg CFU/mL 分别下降到 2.01、2.87、3.20 lg CFU/mL,确定 8.0% 为适宜的菌体保护剂浓度^[9]。程艳薇等得出干酪乳杆菌高温驯化抗热保护剂的最佳配比是明胶 1.5 g/dL、蔗糖 6 g/dL、甘油 3 mL/dL,50 ℃ 生长良好,菌活量可以达到要求,能达到实际生产中所需的菌量^[10]。陈合等经优化确定了干酪乳杆菌 L61 抗热保护剂的组成及最适添加量为脱脂乳 18 g/L、葡萄糖 6%、甘油 13 mL/L,在 75 ℃,10 min 下存活率可达到 8.46%^[11]。曾海英等研究发现添加 3% 甘油、6% 蔗糖、2% 明胶作抗热保护剂,可提高植物乳杆菌 1L-2 的高温存活率,55 ℃ 培养,活菌数可达 2.2 × 10⁸ CFU/mL^[12]。范娜

等研究表明,海藻糖、明胶、甘油均能够提高菌体的抗热存活率,3 种保护剂之间存在交互作用,其最佳复合配方为海藻糖 16%、甘油 6%、明胶 0.14%,75 ℃ 保温 30 min,菌体存活率可达 16.58%,活菌数为 1.66 × 10⁸ CFU/mL^[13]。

2.3 复合保护剂对菌体抗热性的影响

抗热保护剂配比 L₉(3⁴) 正交试验因素水平及结果见表 5。直观比较 3 个因素的极差(R)大小,可知各因素对热处理后菌存活的影响程度表现为 A > C > B。由活菌数大小可知,最佳组合为 A₃B₁C₃,即抗热保护剂的最佳配比为在基础培养基中添加 2.0% 丰县牛蒡粉、4% 葡萄糖、2.0% 沛县牛蒡粉。

表5 复合抗热保护剂配比正交试验安排及结果

试验号	A	B	C	活菌数
	丰县牛蒡(%)	葡萄糖(%)	沛县牛蒡(%)	(lg CFU/mL)
1	1.00	4	1.00	3.45
2	1.00	6	1.50	3.96
3	1.00	8	2.00	4.15
4	1.50	4	1.50	5.97
5	1.50	6	2.00	5.86
6	1.50	8	1.00	5.75
7	2.00	4	2.00	6.32
8	2.00	6	1.00	6.16
9	2.00	8	1.50	5.89
k ₁	3.853	5.247	5.120	
k ₂	5.860	5.327	5.273	
k ₃	6.123	5.263	5.443	
R	2.270	0.080	0.323	
最优水平	A ₃	B ₂	C ₃	

3 结论

经优化筛选获得副干酪乳杆菌 FM-LP-4 复合抗热保护剂组分为丰县牛蒡粉 2.0%、葡萄糖 4%、沛县牛蒡粉 2.0%,经 75 ℃,10 min 热处理后活菌数为 6.33 lg CFU/mL。

本研究发现不同产地牛蒡粉的抗热效果不同,并得出针对 FM-LP-4 的复合抗热保护剂组成配比,为益生菌抗热保护剂的制备提供了新思路,为牛蒡功能成分在提高益生菌热耐受研究方面的应用提供了数据支持。

参考文献:

[1]朱翠平.不同干燥联合预处理方式对牛蒡脆片品质及抗氧化能力的影响[D].南京:南京农业大学,2016.

戴意强,单成俊,刘小莉,等. 乳酸菌发酵黑莓汁增加胞外多糖工艺初探[J]. 江苏农业科学,2020,48(18):214-218.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.18.043

乳酸菌发酵黑莓汁增加胞外多糖工艺初探

戴意强¹,单成俊¹,刘小莉¹,吴寒¹,王英¹,程先玲²,郗海燕⁴,韩延超⁴,周剑忠¹,夏秀东^{1,3}

(1. 江苏省农业科学院农产品加工研究所,江苏南京 210014; 2. 江苏惠田农业科技开发有限公司,江苏扬州 211400;

3. 江苏今世缘酒业股份有限公司,江苏淮安 223411; 4. 浙江省农业科学院食品科学研究所,浙江杭州 310021)

摘要:为增加黑莓汁中乳酸菌胞外多糖含量,利用产胞外多糖乳酸菌 MB2-1 和 JX5 发酵黑莓汁,并测定发酵过程中黑莓汁的 pH 值、黏度及多糖含量随时间的变化情况,以确定用于发酵黑莓汁的乳酸菌种类和碳源。结果表明,添加葡萄糖作为碳源时,乳酸菌 MB2-1 和 JX5 发酵在 32 h 时胞外多糖产量最高,分别为 2.75 g/L 和 3.06 g/L,说明将乳酸菌 JX5 作为发酵菌株,葡萄糖作为碳源添加到黑莓汁中进行发酵,可增加黑莓汁中乳酸菌胞外多糖含量。

关键词:乳酸菌;黑莓汁;多糖;碳源;发酵;黏度

中图分类号: TS275.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)18-0214-05

黑莓浆果风味独特、营养丰富,含有多多种具有生物活性的化合物,是酿酒和生产果汁、果酱、医疗保健品等的天然原料。黑莓中富含维生素 C、酚酸、鞣花酸、鞣花素、类黄酮(包括花青素)和类胡萝卜素等促进健康的物质,具有抗氧化、代谢调节、消除

疲劳、延缓衰老、提高免疫力等作用^[1-2]。因此随着人们生活水平的提高和对健康生活的追求,研究和开发黑莓相关的产品将具有广阔的前景。

胞外多糖(EPS)是一类由特殊微生物在生长代谢过程中分泌到细胞壁外的一类次级代谢产物^[3]。EPS 具有多种生理活性功能,可以增强机体免疫力,具有抗肿瘤、降低血清中胆固醇^[4]、降血压、抗氧化和改善人体肠道微生态环境^[5]等作用。乳酸菌 EPS 是一类来源可靠安全,对人体无毒副作用,并且具有独特的理化和流变学特性的物质,因此可以作为增稠剂、稳定剂、乳化剂应用到食品工业中,已经成为了一种天然安全无公害的食品级添加剂^[6]。

笔者研究了 2 株产胞外多糖乳酸菌在添加不同

收稿日期:2019-09-11

基金项目:江苏省科技计划(编号:BE2018367);江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(18)2017];农业农村部果品产后处理重点实验室、浙江省果蔬保鲜与加工技术研究重点实验室开放课题。

作者简介:戴意强(1995—),男,江苏南京人,硕士研究生,研究方向为食品生物技术。E-mail: yq-dai@foxmail.com。

通信作者:夏秀东,博士,副研究员,研究方向为食品生物技术。E-mail: 86084056@163.com。

[2] 窦培元,栾晓宁,朱连连,等. 牛蒡根中有效成分的含量测定[J]. 山西中医学院学报,2018,19(4):30-33,44.

[3] 许志新. 速溶型牛蒡粉的制备工艺研究[D]. 苏州:苏州大学,2015.

[4] Rubel I A, Pérez E E, Genovese D B, et al. *In vitro* prebiotic activity of inulin-rich carbohydrates extracted from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers at different storage times by *Lactobacillus paracasei*[J]. Food Research International, 2014, 62: 59-65.

[5] Velázquez - Martínez J R, González - Cervantes R M, Hernández - Gallegos M A, et al. Prebiotic potential of *Agave angustifolia* Haw fructans with different degrees of polymerization[J]. Molecules, 2014, 19(8):12660-12675.

[6] Alves Moro T M, Celegatti C M, Aparecida Pereira A P, et al. Use of burdock root flour as a prebiotic ingredient in cookies[J]. LWT - Food Science and Technology, 2018, 90:540-546.

[7] Chaikham P, Kemsawasd V, Seesuriyachan P. Spray drying probiotics

along with maoluang juice plus *Tiliacora triandra* gum for exposure to the *in vitro* gastrointestinal environments[J]. LWT - Food Science and Technology, 2017, 78:31-40.

[8] Li D D, Kim J M, Jin Z Y, et al. Prebiotic effectiveness of inulin extracted from edible burdock[J]. Anaerobe, 2008, 14(1):29-34.

[9] Li H P, Lu M J, Guo H F, et al. Protective effect of sucrose on the membrane properties of *Lactobacillus casei* Zhang subjected to freeze-drying[J]. Journal of Food Protection, 2010, 73(4):715-719.

[10] 程艳薇,谭书明. 乳酸菌抗热保护剂的优化组合[J]. 中国调味品, 2010, 35(7):55-59.

[11] 陈合,寇建波,杨妍,等. 干酪乳杆菌抗热保护剂的 Plackett - Burman 试验研究[J]. 陕西科技大学学报(自然科学版), 2017, 35(4):122-125,137.

[12] 曾海英,谭书明,母应春,等. 常压干燥乳酸菌粉生产菌株高温驯化及抗热保护剂筛选[J]. 贵州农业科学, 2010, 38(8):207-209.

[13] 范娜,陈雪峰. 益生菌抗热保护剂的研究[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(4):94-98.