

崔莉,李莹,冯进,等. 热激联合牛蒡抗热保护剂对益生菌奶粉中益生菌喷雾干燥活性的影响[J]. 江苏农业科学,2021,49(10):166-169.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.10.031

热激联合牛蒡抗热保护剂对益生菌奶粉中益生菌 喷雾干燥活性的影响

崔莉,李莹,冯进,柴智

(江苏省农业科学院农产品加工研究所,江苏南京 210014)

摘要:提高益生菌抗热性的研究一直是工业化喷雾干燥生产益生菌奶粉的热点与难点,研究益生菌 FM-LP-4 的热激预处理条件,优化菌体经热激预处理后使用牛蒡复合抗热保护剂的喷雾干燥工艺。结果表明,适宜进行热激的益生菌培养时间段为 10~11 h,最适热激温度为 55 ℃,热激时间为 25 min。喷雾干燥的最优工艺为:出口温度 80 ℃,进口温度 170 ℃,进料速率 0.8 L/h,此时活菌数为 4.64×10^9 CFU/mL。热激菌体加牛蒡复合抗热保护剂经优化的喷雾干燥工艺获得益生菌奶粉,其中益生菌活菌数比对照提高约 1 个数量级。

关键词:牛蒡;益生菌;热激;喷雾干燥;奶粉

中图分类号:TS252.51 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2021)10-0166-04

中国已经赶超日本、美国成为全球第一大奶粉消费国。随着人们营养保健意识的不断提高和消费观念的转变,具有营养保健功能的高端乳制品日益成为新的消费引擎。益生菌奶粉为含有益生菌的奶粉,具有改善人体肠道宿主环境的作用。目前,我国市场上高档的功能性益生菌乳制品已出现,然而,大多以发酵乳的形式出现,需冷链运输,且保质期短。功能性益生菌奶粉的研制,突破了运输壁垒,扩大消费区域,具有广阔的市场化前景。

益生菌奶粉常采用将奶粉和冻干益生菌粉混合的方法制备,冷冻干燥的高成本是其瓶颈。若能

采用喷雾干燥 1 次制备益生菌奶粉,则有望大幅降低成本。喷雾干燥过程对益生菌带来脱水、氧化和热损伤,造成活菌数大量下降。有学者提出,多种方法来提升喷雾干燥益生菌的活性,主要有加强对细胞结构的保护、提升益生菌的外界应激抗性,优化喷雾干燥参数,筛选应用抗热保护剂等^[1]。益生菌在外界应激下会生成应激蛋白用于修复受损细胞,提升菌体应激抗性。热激处理是利用上述特性,通过模拟外界应激条件以增加菌体对应激环境的耐受能力,是一种较常用的提升菌体耐热能力的途径。

喷雾干燥抗热保护剂的筛选已成为相关学者关注热点,合适的保护剂能有效提高益生菌在干燥、储藏和体内消化过程等严苛环境下的存活率。Chaikham 等研究发现,益生元(菊糖、木糖和低聚果糖等)对益生菌的耐热性有保护作用^[2]。牛蒡块根富含菊糖、酚酸、黄酮、牛蒡苷及多种维生素等营养

收稿日期:2020-06-11

基金项目:江苏省苏北科技专项(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,从事食品营养与健康研究。E-mail:hijoly@163.com。

[20]安彦新,郭金,王秀伟,等. 人血浆肌醇气相色谱质谱联用检测方法的优化及应用[J]. 中国优生与遗传杂志,2017,25(10):28-31,83.

[21]中华人民共和国卫生部. 保健食品中肌醇的测定:GB/T 5009.196-2003[S]. 北京:中国标准出版社,2003

[22]招启文,张可冬,陈晓,等. 气相色谱-质谱联用测定固体运动饮料中肌醇的含量[J]. 食品工业,2017,38(7):286-288.

[23]曾静,时逸吟,张孝刚,等. 固相萃取-气相色谱法测定婴幼儿配方奶粉中肌醇含量[J]. 检验检疫学刊,2014,24(2):40-

43,34.

[24]侯建霞,汪云,程宏英,等. 毛细管电泳电化学检测分离测定荞麦中的手性肌醇和肌醇[J]. 分析测试学报,2007,26(4):526-529.

[25]王波,刘阿静,王彦淳,等. 在线渗析-双柱串联离子色谱法直接检测婴幼儿奶粉中的肌醇[J]. 分析实验室,2015,34(2):212-215.

[26]黄伟梁,梁富荣. 肌醇硅烷化反应的质谱研究[J]. 华南预防医学,2002,28(6):52-53.

功能成分。现代医学证明,牛蒡具有抗氧化、抑菌、抗疲劳、免疫调节、保护肝脏^[2-3]、促进益生菌生长等多种功效^[4-5]。雷张腾将菊糖作为保拉迪酵母的复合冻干保护剂成分,并认为菊糖中的羟基通过与细胞膜磷脂和蛋白质以氢键结合,对菌体起到保护作用^[6]。崔莉等通过单因素和正交设计优化获得 FM-LP-4 牛蒡复合抗热保护剂配方(丰县牛蒡粉 2.0%、葡萄糖 4%、沛县牛蒡粉 2.0%),菌体在复合保护剂保护下经 75 °C 热处理 10 min 后活菌数为 2.12×10^6 CFU/mL^[7]。本研究在获得保护剂配方的基础上,探讨热激处理和喷雾干燥工艺参数优化对益生菌奶粉中益生菌 FM-LP-4 的耐热保护作用。

1 材料与方法

1.1 试验材料

副干酪乳杆菌 FM-LP-4 为研究室保藏。试验时间为 2019 年 7 月 12 日至 8 月 17 日。明胶,用 PBS 溶解后灭菌备用,使用前水浴加热溶解。蔗糖和甘油:需经微孔滤膜过滤。陆桥 MRS 肉汤培养基。MRS 固体培养基,在液体培养基的基础上加入 1.5% 琼脂。

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;上海第三分析仪器厂;高压蒸汽灭菌锅,上海申安医疗器械厂;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;HYG-A 全温摇瓶柜,太仓实验设备厂;FW100 高速万能打粉机,天津市泰斯特仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 菌种活化及扩大培养 将副干酪乳杆菌 FM-LP-4 冻干菌种接入液体培养基中,34 °C 振荡培养 24 h,活化 2~3 次。活化好的种子液以 5% 的接种量接种于 MRS 液体培养基中,同样条件扩大培养后菌液离心取菌泥,用无菌生理盐水或牛奶冲洗,制成活菌数为 10^{10} CFU/mL 的菌悬液。

1.3.2 活菌数测定 按照 GB 4789.35—2010,采用稀释涂布平板计数法。

1.3.3 牛蒡复合抗热保护剂的制备 牛蒡超微粉的制备:将丰县和沛县牛蒡于 60 °C 下干燥 4 h,至水分 6% 以下,经粉碎机超低温粉碎,过 325 目筛得牛蒡超微粉。牛蒡复合抗热保护剂配方为丰县牛蒡

粉 2.0%、葡萄糖 4%、沛县牛蒡粉 2.0%。

1.3.4 抗氧化能力的测定

1.3.4.1 DPPH 自由基清除能力的测定 参考 Shen 等的方法^[8],略做改进。1 mL 经热激预处理菌液溶解到 9 mL 95% 乙醇溶液,取 2 mL 样品混合溶液加 2 mL 0.16 mmol/L DPPH 溶液,25 °C 水浴加热 0 min,在 517 nm 处测试样吸光度(D_i),用蒸馏水代替上述体系中样品混合溶液测得空白吸光度(D_0),用 95% 乙醇代替上述体系中 DPPH 溶液。测得样品本底吸光度(D_j),清除率 = $1 - (D_i - D_j) / D_0 \times 100\%$,其中 D_0 取 0.552。

1.3.4.2 OH 自由基清除能力的测定 参考 Shen 等的方法^[8],略做改进。1 mL 经热激预处理菌液溶解到 9 mL 95% 乙醇溶液,取 4 mL 样品混合溶液加入 8.8 mmol/L H_2O_2 、9 mmol/L $FeSO_4$ 和 9 mmol/L 水杨酸各 0.5 mL,混匀,37 °C 水浴加热 30 min,在 510 nm 处测定吸光度(D_i'),用蒸馏水代替体系中样品混合溶液,测得空白吸光度(D_0'),用蒸馏水替代 HO 溶液,测得样品本底吸光度(D_j'),清除率 = $1 - (D_i' - D_j') / D_0' \times 100\%$,其中 D_0' 取 0.602。

1.3.4.3 Fe^{3+} 还原力的测定^[9] 1 mL 经热激预处理菌液溶解到 9 mL 95% 乙醇溶液。取 2 mL 样品混合溶液加入 10 g/L 铁氰化钾溶液和 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 值 6.6)各 2 mL,于 50 °C 保温 20 min,加入 2 mL 1 g/mL 三氯乙酸溶液,混匀,3 000 r/min 离心 10 min,取 2 mL 上清液,加入 2 mL 蒸馏水和 0.4 mL 1 g/L 三氯化铁溶液,室温反应 10 min,于 700 nm 处测定吸光度。

1.3.5 热激条件

1.3.5.1 热激菌体培养时间的选择 根据 FM-LP-4 生长曲线,选择对数期菌数较多的时间段作为热激菌体培养最佳时间段。

1.3.5.2 耐热曲线 选择 45、50、55、60 °C 为热处理温度,将益生菌液在上述温度下水浴,每隔 5 min 测定活菌数,以热处理时间为横坐标、活菌数为纵坐标绘制其耐热曲线。

1.3.5.3 不同热激条件对菌体抗氧化活性的影响 在选定的热激条件下对 FM-LP-4 热激处理,测定抗氧化活性变化,选择菌体抗氧化活性较高的热激条件。

1.3.6 喷雾干燥条件对益生菌奶粉中益生菌活菌数的测定的影响 经热激预处理菌液离心得菌泥,溶解于不同浓度含牛蒡复合抗热保护剂无菌牛奶

中,采用正交试验 $L_9(3^4)$ 对出口温度(A)、进口温度(B)、进料速率(C)3项喷雾干燥工艺参数对益生菌奶粉中益生菌活菌数的测定的影响进行检测,正交试验因素水平见表1。试验结果采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,以筛选出最佳喷雾干燥条件。

表1 喷雾干燥工艺优化正交试验因素水平

水平	A:出口温度(°C)	B:进口温度(°C)	C:进料速率(L/h)
1	80	130	0.4
2	95	150	0.6
3	110	170	0.8

1.3.7 数据统计分析 用 Microsoft Excel 1997—2003 进行数据整理和作图分析,采用 SAS V8 统计进行方差分析,并应用 t 检验进行样品间的显著性差异分析($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 FM-LP-4 亚致死热激条件确定

2.1.1 最佳耐热时间的选择 从图1可以看出,10~12 h 的 FM-LP-4 生长速率最快,此时 LA 达到对数生长期,并在培养 12 h 的时候达到了菌数的最大值,Corcoran 等认为,对数生长期的菌体较稳定生长期的菌体可塑性强,应对胁迫情况提升抗逆性好,可以很快调整体内代谢途径以适应不利环境^[10-11]。张书猛等研究比较嗜酸乳杆菌在不同菌体生长期的耐热性,提出其在稳定期即培养 11 h 时,抗热性能较优^[12]。结合相关研究,选择 10~12 h 为热激菌体培养最佳时间段。

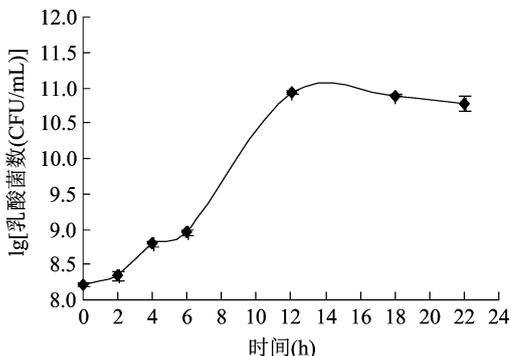


图1 FM-LP-4 在 MRS 中的生长曲线

2.1.2 FM-LP-4 耐热曲线 从图2可以看出,FM-LP-4 在 60 °C 条件下处理 15 min 基本失活。在 45、50、55 °C 条件下,处理 25 min 时,菌数均有较明显的下降,但依然保持较好的存活率。石榴榴研究发现,干酪乳杆菌 1.12.8 在 50 °C 热处理 25 min

后,活菌数下降不到 1 个数量级;60 °C 热处理 25 min,菌体数量下降了约 1 个数量级^[13],因此确定 60 °C 25 min 为其热激处理条件。

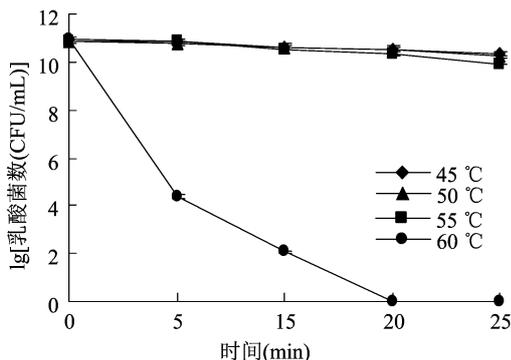


图2 FM-LP-4 在不同热激温度下的存活

L. plantarum 299v 在喷雾干燥前经过 49.5 °C 的亚致死温度处理 30、60 min 于室温下贮藏 180 d,其存活性显著增强,并推测热应激引起的保护作用有可能是生成了热休克蛋白^[14]。*L. acidophilus* 以 50 °C、*L. rhamnosus* 以 52.5 °C 亚致死预处理 12 min 后,均能够耐受随后的 92 °C 的喷雾干燥出口温度,而通常乳酸菌能够耐受的温度为 85~90 °C^[15]。经过亚致死温度(52 °C, 15 min)预处理后再喷雾干燥将使 *L. casei* Nad、*L. plantarum* 8329 的菌数下降 0.16、0.49 lg(CFU/mL),而未经预处理直接喷雾干燥其菌数下降 0.85、0.95 lg(CFU/mL)^[16]。

2.1.3 不同热激温度对抗氧化活性的影响 从表2可以看出,FM-LP-4 在 55 °C 条件下处理 25 min 时,各项抗氧化指标均高于 50 °C。张书猛等选取 40、45、50、55、60 °C 进行 30 min 热激处理,研究其热激后的菌数变化,发现在 45 °C 时菌体具有较高的活菌数,存活率也较高,并且具有较好的发酵性能^[12],所以选择 45 °C 作为热激温度。从图2、表2可以看出,FM-LP-4 在 55 °C 条件下的存活率较高,而且抗氧化活性最高,推测其经热激休克后产生了热适应,故选择 55 °C 处理 25 min 为最佳热激条件。

表2 热激温度对抗氧化活性的影响

热激温度(°C)	DPPH 自由基清除能力(%)	OH 自由基清除能力(%)	Fe ³⁺ 还原力(%)
45	83.32 ± 0.59	92.31 ± 1.33	73.21 ± 1.04
50	83.88 ± 1.08	94.84 ± 1.81	79.88 ± 0.46
55	89.11 ± 0.98	96.51 ± 1.69	89.88 ± 0.48

2.2 含 FM-LP-4 奶粉的喷雾干燥工艺确定

2.2.1 喷雾干燥正交试验 含 FM-LP-4 奶粉的

喷雾干燥工艺参数 $L_9(3^4)$ 正交试验因素水平取值及结果见表 3。经直观分析比较 3 个因素的极差 R 值可知各因素对喷雾干燥后菌存活的影响程度为 $A > B > C$, 由各因素的均值大小可知最佳组合为 $A_1B_3C_3$, 即喷雾干燥工艺参数为: 出口温度 $80\text{ }^\circ\text{C}$, 进口温度 $170\text{ }^\circ\text{C}$, 进料速率 0.8 L/h 。

表 3 喷雾干燥正交试验结果

试验号	A: 出口温度 ($^\circ\text{C}$)	B: 进口温度 ($^\circ\text{C}$)	C: 进料速率 (L/h)	\lg [活菌数 (CFU/mL)]
1	80	130	0.4	9.21
2	80	150	0.6	9.62
3	80	170	0.8	9.67
4	95	130	0.6	9.31
5	95	150	0.8	9.53
6	95	170	0.4	9.65
7	110	130	0.8	8.91
8	110	150	0.4	9.19
9	110	170	0.6	9.11
k_1	9.500	9.143	9.350	
k_2	9.497	9.447	9.347	
k_3	9.070	9.477	9.370	
R	0.430	0.334	0.023	
优水平	A_1	B_3	C_3	

2.3 热激、牛蒡复合抗热保护剂和喷雾干燥工艺优化及联合对益生菌抗热性能的影响

从表 4 可知, 牛蒡复合抗热保护剂可以提升益生菌的存活率近 2 倍, 热激联合牛蒡复合抗热保护剂则可以将益生菌的活菌数提高约 1 个数量级。

表 4 热激、抗热保护剂和喷雾干燥工艺优化及联合对益生菌活菌数的影响

处理	喷雾干燥后活菌数 (CFU/mL)
空白对照	$(4.08 \pm 0.08) \times 10^8\text{ c}$
牛蒡复合抗热保护剂	$(8.53 \pm 0.18) \times 10^8\text{ b}$
热激联合牛蒡复合抗热保护剂	$(4.64 \pm 0.16) \times 10^9\text{ a}$

3 结论

FM-LP-4 适宜进行热激的培养时间段为 $10\sim 11\text{ h}$, 最适热激温度为 $55\text{ }^\circ\text{C}$, 热激时间为 25 min 。含 FM-LP-4 益生菌奶粉喷雾干燥的最优工艺为: 出口温度 $80\text{ }^\circ\text{C}$, 进口温度 $170\text{ }^\circ\text{C}$, 进料速率 0.8 L/h , 热激联合牛蒡复合抗热保护处理益生菌经喷雾干燥后活菌数比对照提高约 1 个数量级。

参考文献:

- [1] 傅楠, 陈晓东. 益生菌在喷雾干燥过程中的活性变化与保护策略[J]. 化工进展, 2018, 37(5): 1633-1645.
- [2] Chaikham P, Kemsawad V, Seesuriyachan P. Spray drying probiotics along with maoulang juice plus *Tiliacora triandra* gum for exposure to the *in vitro* gastrointestinal environments[J]. LWT, 2017, 78: 31-40.
- [3] Irene A R, Ethel E P, 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.
- [4] Velázquez-Martínez J R, González-Cervantes R M, Hernández-Gallegos M, et al. Prebiotic potential of agave angustifolia Haw fructans with different degrees of polymerization[J]. Molecules, 2014, 19(8): 12660-12675.
- [5] Moro T M A, Celegatti C M, Pereira A P A, et al. Use of burdock root flour as a prebiotic ingredient in cookies[J]. LWT, 2018, 90: 540-546.
- [6] 雷张腾. 保拉迪酵母菌粉的制备及稳定性研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2017: 17-18.
- [7] 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.
- [8] Shen Y, Zhang H, Cheng L, et al. *In vitro* and *in vivo* antioxidant activity of polyphenols extracted from black highland barley[J]. Food Chemistry, 2016, 194: 1003-1012.
- [9] Benzie I F, Strain J J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay[J]. Analytical Biochemistry, 1996, 239(1): 70-76.
- [10] Corcoran B M, Ross R P, Fitzgerald G F, et al. Enhanced survival of GroESL-overproducing *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 under stressful conditions induced by drying[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(7): 5104-5107.
- [11] Corcoran B M, Ross R P, Fitzgerald G F, et al. Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances[J]. Journal of Applied Microbiology, 2004, 96(5): 1024-1039.
- [12] 张书猛, 吕嘉桡, 侯蓓, 等. 热激处理对嗜酸乳杆菌耐热性的影响[J]. 中国乳品工业, 2011, 39(9): 28-30.
- [13] 胡榴榴. 干酪乳杆菌高密度培养及干燥工艺的研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2014: 52-53.
- [14] Barbosa J, Borges S, Teixeira P. Influence of sub-lethal stresses on the survival of lactic acid bacteria after spray-drying in orange juice[J]. Food Microbiology, 2015, 52: 77-83.
- [15] Anekella K, Orsat V. Optimization of microencapsulation of probiotics in raspberry juice by spray drying[J]. LWT, 2013, 50(1): 17-24.
- [16] Paéz R, Lavari L, Vinderola G, et al. Effect of heat treatment and spray drying on lactobacilli viability and resistance to simulated gastrointestinal digestion[J]. Food Research International, 2012, 48(2): 748-754.