

双歧杆菌在冷冻乳中存活特性的研究

田洪涛¹ 张 麓² 张柏林¹ 贾英民¹

(¹河北农业大学食品科学系 保定 071001)

(²中国农业大学食品科学与工程学院 北京 100094)

摘要: 研究了冷冻温度、冷冻时间、基质 pH 以及培养基组成、培养温度、菌龄对两歧双歧杆菌在冷冻乳中存活率的影响。结果表明: -20°C 与 -35°C 冷冻对细胞存活率无显著影响 ($P > 0.05$); 冷冻起始至完全冻结, 细胞存活率差异显著 ($P < 0.05$), 而冻结后细胞存活率并不随冷冻时间延长而存在显著差异 ($P > 0.05$); 冷冻基质最适 pH 值为 5.5~8.0; 培养基组成中, 吐温 80、甘油、蛋白胨、酵母粉可极显著提高细胞抗冷冻性 ($P < 0.01$); 进一步采用正交试验筛选出抗冷冻培养基 (M_{CC}); 32°C 较 37°C 培养的菌体细胞的抗冷冻性略有增强, 而统计分析差异不显著 ($P > 0.05$); 细胞最佳收获菌龄为对数后期或稳定初期。本文还对细胞抗冷冻性进行了初步探讨。

关键词: 两歧双歧杆菌, 冷冻乳, 存活率, 抗冷冻性

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)02-0115-05

STUDIES ON THE SURVIVAL CHARACTERISTICS OF BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM IN FROZEN MILK

TIAN Hong-Tao¹ ZHANG Chi² ZHANG Bo-Lin¹ JIA Ying-Min¹

(Department of Food Science, Hebei Agriculture University, Baoding 071001)¹

(Institute of Food Science and Technology, China Agriculture University, Beijing 100094)²

Abstract: Freezing temperature, freezing time, medium pH, and medium constituents, cultivation temperature, and cell age, these factors were studied so as to disclose their effects on the survival rate of *Bifidobacterium bifidum* (Bb) in frozen milk. The results indicated that freezing temperature at -20°C , or -35°C did not exert influences on cell survival rate significantly ($P > 0.05$); Cell survival rates of samples appear noteworthy difference from initial freezing to complete freezing ($P < 0.05$), and cell survival rates did not appear noteworthy difference as freezing time was lengthened ($P > 0.05$); Optimal pH of frozen medium was from 5.5 to 8.0; some medium constituents enforced markedly freezing-resistance of cells, for example, Tween 80, glycerine, pepton, yeast extract ($P < 0.01$); Furthermore, freezing-resistance medium (M_{CC}) was screened by orthogonal experiment; freezing resistance of bacterial cells was slightly stronger at cultivation temperature, 32°C than 37°C , and difference of statistical analysis was not significant ($P > 0.05$); Optimal cell age of harvesting was in later log phase or initial stationary phase. Finally, cell freezing-resistance was initially discussed in the article.

Key words: *Bifidobacterium bifidum*, Frozen milk, Survival rate, Freezing-resistance

鉴于双歧杆菌(*Bifidobacteria*)对人体健康的促进效果,国内外相继研制开发出多种双歧杆菌活菌制剂,其中双歧酸奶发展最快。但是,双歧杆菌对营养要求苛刻、专性厌氧、对酸敏感等生理特性^[1]给双歧酸奶的保藏带来困难,4℃~10℃冷藏,活菌保藏期(活菌数 $\geq 10^6$ cfu/mL)只有5~7d。尽管某些学者采用提高基质pH值^[4]、人工驯化耐氧菌株^[5]、筛选耐酸菌株^[6]等方法,活菌冷藏期最多可延长至15~21d。为了延长活菌保藏期,双歧冷冻酸奶在发达国家已经问世。然而,至今只发现Laroia^[7]和Modler^[8]曾先后采用提高基质pH值的方法延长双歧冷冻酸奶(-29℃)活菌保藏期的报道。本实验以脱脂牛乳为冷冻基质,研究了菌体存活特性及其影响因素,以探明菌体存活的最佳条件,并对菌体的抗冷冻性进行了初步探讨,以期为发展双歧冷冻酸奶及延长活菌保藏期提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种:两歧双歧杆菌(*B. bifidum*),简称Bb,由中国农业大学食品微生物教研室提供,已经过数百代体外传代培养,具有一定的耐氧性。

1.1.2 脱脂牛乳粉:市售优品质。

1.1.3 培养基:改良MRS液体和固体:用于菌种活化培养和活菌计数,文中用Mc表示;抗冷冻培养基:本实验中筛选,用于菌种活化培养,文中用M_{CC}表示。

1.1.4 其它化学试剂均采用分析纯。

1.1.5 主要仪器设备:医用低温冰箱(SANYO日本)、Hungate厌氧装置等。

1.2 实验方法

1.2.1 实验路线:菌种活化与培养→离心收集菌体→接种于12%复原脱脂牛乳中,接种量 $10^8 \sim 10^9$ cfu/mL以上→冷冻保藏→检测活菌数量→计算细胞冷冻存活率→统计分析并检验处理间差异显著性。(每组实验增加一组重复)

1.2.2 12%复原脱脂乳的制备:将脱脂牛乳粉用蒸馏水配成12%复原脱脂牛乳液,分装厌氧

管, 1×10^5 Pa 10min灭菌,作为冷冻基质备用。

1.2.3 不同pH值12%复原脱脂乳的调配:首先将乳酸、乙酸分别配成10%的水溶液,二者等体积混和,即得摩尔比1:1.5、总酸浓度10%的混和酸。然后用上述10%混和酸和10%Ca(OH)₂经磁力搅拌和pH计将12%复原脱脂牛乳调配成pH8.0,6.5,5.5,5.0,4.5,4.2的梯度系列,分装厌氧管, 1×10^5 Pa 10min灭菌,作为冷冻基质备用。

1.2.4 检测方法:活菌计数:采用Hungate厌氧滚管技术,37℃培养48h。吸光度:721型分光光度计($\lambda = 600$ nm)测定。

2 结果与分析

2.1 冷冻温度和冷冻时间对细胞存活的影响

Bb在Mc中经37℃活化培养后,离心收集菌体,接种于12%复原脱脂乳基质中,分别置-20℃和-35℃冷冻,观察样品达到完全冻结的时间为:-20℃ 2h,-35℃ 0.5h,并对冻结后样品定时取样进行活菌计数,计算细胞冷冻存活率,结果见图1。

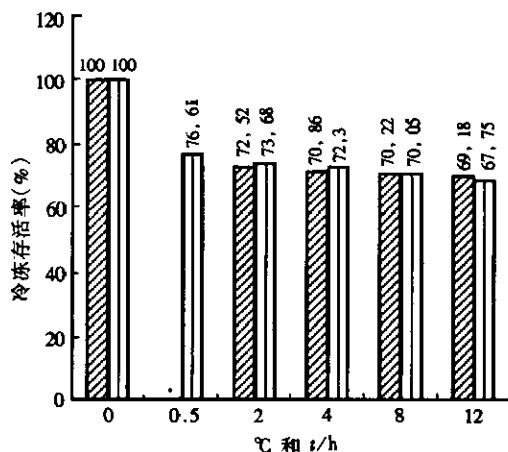


图1 冷冻温度和冷冻时间对Bb冷冻存活率的影响

■ (-20℃) □ (-35℃)

对图1 -20℃和-35℃冷冻Bb的冷冻存活率进行方差分析: $F_{2h} = 3.12$, $F_{12h} = 0.02$,二者均小于 $F_{0.05(1,11)} = 61$,表明:-20℃和-35℃不同温度冷冻对Bb存活无显著影响($P > 0.05$)。

对不同冷冻时间Bb的冷冻存活率进行方

差分析: $F_{-20^{\circ}\text{C}} = 25.76 > F_{0.01(4,4)} = 15.98$, $F_{0.01(5,5)} = 10.97 > F_{-35^{\circ}\text{C}} = 9.35 > F_{0.05(5,5)} = 5.05$, 表明: 冷冻时间对 Bb 存活的影响达到极显著 (-20°C) 和显著 (-35°C) 水平。新复极差测验结果得出: 两冷冻温度下, 冷冻起始至完全冻结, 细胞存活率差异极显著 (-20°C) 或显著 (-35°C), 而冻结后的细胞存活率随冷冻时间延长无显著差异。基于上述结果, 后续冷冻实验均采用 -20°C 12h 进行。

2.2 培养基中营养成分对细胞存活的影响

拟采用 Mc (去掉吐温 80) 为基础培养基, 向其中分别加入吐温 80 (0.1%)、油酸 (0.1%)、甘油 (0.1%)、 V_C (0.05%)、 V_E (0.05%)、蛋白胨 (1%)、酵母粉 (0.5%), 配成多种培养基。Bb 经活化接种于上述培养基中, 37°C 恒温培养后, 离心收集菌体, 再接种于 12% 复原脱脂乳基质中, 置 -20°C 冷冻 12h。对 Bb 经不同培养基培养后在脱脂乳中的冷冻存活率进行方差分析: $F = 98.30 > F_{0.01(13,13)} = 3.85$, 表明: 培养基中的营养成分对细胞抗冷冻性影响达到极显著水平。新复极差测验结果得出: 在 Mc 培养基中添加吐温 80、甘油、蛋白胨、酵母粉可极显著提高 Bb 的抗冷冻性 ($P < 0.01$); 添加油酸明显降低了 Bb 的抗冷冻性 ($P < 0.01$); 添加 V_C 、 V_E 对 Bb 的抗冷冻性无显著影响 ($P > 0.05$)。

2.3 利用正交试验筛选抗冷冻培养基

根据 2.2 实验结果, 在 Mc 培养基 (去掉吐温 80, 蛋白胨, 酵母粉) 的基础上, 以吐温 80 (A)、甘油 (B)、蛋白胨 (C)、酵母粉 (D) 为四因素, 每因素的水平为: A(%): 1 (0.05) 2 (0.10) 3 (0.15); B(%): 1 (0.05) 2 (0.10) 3 (0.15); C(%): 1 (1.00) 2 (1.50) 3 (2.00); D(%): 1 (0.05) 2 (0.75) 3 (1.00), 采用 $L_9 3^4$ 正交试验筛选 Bb 抗冷冻培养基。结果表明: 四因素中, 对 Bb 冷冻存活率的影响顺序为: 酵母粉 (D) > 蛋白胨 (C) > 吐温 80 (A) > 甘油 (B)。最佳培养基配比为: $A_2 B_1 C_2 D_3$, 即 Bb 的抗冷冻培养基为: 在 Mc 培养基 (去掉吐温 80, 蛋白胨, 酵母粉) 中加入吐温 80 0.10%、甘油 0.05%、蛋白胨 1.50%、酵母粉 1.00%。以下实验均采用此培养基 (M_{CC})。

2.4 基质 pH 对细胞存活的影响

Bb 经活化并在 M_{CC} 中 37°C 培养后, 离心收集菌体, 分别接种于 pH8.0~4.2 梯度的 12% 复原脱脂乳中, 置 -20°C 冷冻 12h, 冷冻存活率结果见图 2。

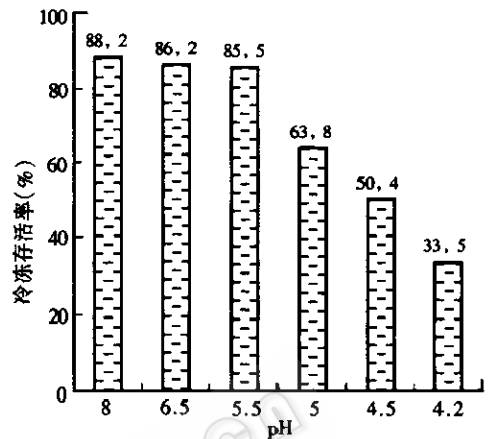


图2 基质pH对Bb冷冻存活率的影响

对 Bb 在不同 pH 脱脂乳中的冷冻存活率进行方差分析: $F = 60.21 > F_{0.01(5,5)} = 10.97$, 表明: 冷冻基质 pH 对 Bb 存活的影响极为显著。新复极差测验结果得出: 基质 $\text{pH} \geq 5.5$, 对菌体存活最为有利; 而基质 $\text{pH} < 5.5$ 时, pH 值越低, 对菌体存活越不利。为延长双歧酸奶的活菌保藏期, 基质 pH 应控制在 5.5 以上。

2.5 培养温度对细胞存活的影响

采用吸光度法对 Bb 进行不同培养温度下生长曲线的测定。结果表明: Bb 在 M_{CC} 中 37°C 和 32°C 培养, 进入稳定生长期的时间分别为 16~18h 和 22~24h。分别选取 Bb 在 M_{CC} 中 37°C 培养 18h 和 32°C 培养 24h 离心收获的菌体细胞, 接种于 12% 复原脱脂乳中, 置 -20°C 冷冻 12h。结果表明: Bb 32°C 培养的冷冻存活率略高于 37°C 培养。方差分析显示: 32°C 与 37°C 培养对 Bb 的抗冷冻性无显著影响 ($P > 0.05$)。

2.6 菌龄对细胞存活的影响

采用 Hungate 厌氧滚管活菌计数法对 Bb 进行 32°C 培养生长曲线的测定。结果表明: Bb 在 M_{CC} 中 32°C 培养, 12~22h 处于对数生长期, 此时最高活菌数达 10^9 cfu/mL 以上 ($5.81 \times 10^9 \text{ cfu/mL}$); 24~48h 基本为稳定生长期; 48h 达到

稳定生长末期或开始进入衰亡期。分别选取 Bb 在 M_{GC} 中 32℃ 培养 12h(对数初期)、16h(对数中期)、24h(对数末期或稳定初期)、48h(稳定末期或衰亡初期)、60h(衰亡期)离心收获的菌体细胞,接种于 12% 复原脱脂乳中,置 -20℃ 冷冻 12h。冷冻存活率结果见图 3。对 Bb 不同菌龄细胞在脱脂乳中的冷冻存活率进行方差分析: $F = 694.36 > F_{0.01(4,4)} = 15.98$, 表明:不同菌龄的 Bb 细胞在脱脂乳中的存活性差异极显著。新复极差测验结果得出:处于对数末期或稳定初期的细胞冷冻存活率最高,而处于衰亡期的细胞冷冻存活率最低。制造双歧冷冻酸奶,细胞最适收获菌龄应为对数末期或稳定初期。

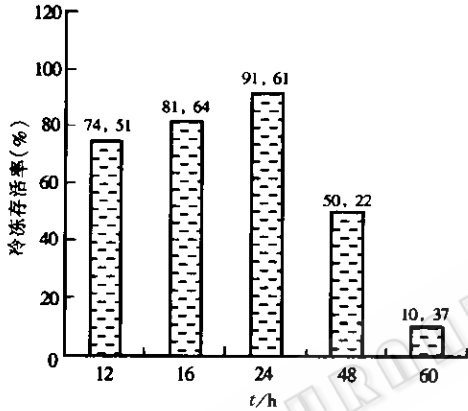


图3 不同菌龄对Bb冷冻存活率的影响

3 讨论

3.1 冷冻过程对细胞存活的影响

冷冻过程中冷冻速度是影响菌体存活的主要因素之一。细胞悬液在 -20℃ ~ -40℃ 1h 左右完全冻结为慢速冻结方式,而在 30min 内完全冻结为快速冻结方式。多数实验表明:快速冻结对细胞损害较大,而慢速冻结可提高细胞存活率。因为慢速冻结,水分有足够时间由胞内渗出,以达到胞内外渗透平衡,防止冰晶在胞内形成而损害细胞^[9]。从我们的研究结果看出: -20℃ 冷冻时,2h 完全冻结,属于慢速冻结方式; -35℃ 冷冻时,0.5h 完全冻结,属于快速冻结方式,二种冻结方式中,两歧双歧杆菌在脱脂乳基质中的冷冻存活率并无显著差别,这可能与脱脂乳保护基质有关,其它双歧菌种是否如

此,应进行相关实验研究。

3.2 基质 pH 对细胞存活的影响

双歧杆菌可经果糖-6-磷酸支路将 2mol 葡萄糖降解为 2mol 乳酸和 3mol 乙酸及少量甲酸,通过产酸代谢降低环境 pH 值,从而抑制人体肠道中腐败菌、致病菌的生长^[1]。所以,相对而言,双歧杆菌具有一定的耐酸性,但酸性环境对菌体的存活却是很不利的。马钢^[2]和 Collins^[3]分别开发的双歧酸奶, pH4.2 时 4℃ 保藏,活菌保藏期只有 5~7d;而 Robinson 将双歧酸奶的 pH 值提高至 5.5, 4℃ 保藏,活菌保藏期被延长至 21d^[4]。Laroia^[7]和 Modler^[8]分别研制的双歧冷冻酸奶(保藏温度 -29℃),为了延长活菌保藏期,基质 pH 被提高到 5.6 和 5.8,说明基质 pH 对菌体存活影响很大,即使低温冷冻也是如此。作者的研究结果与 Laroia^[7]和 Modler^[8]的实验结论基本相符。所以,双歧冷冻酸奶应尽量采取较高基质 pH 值,以利于菌体存活。

3.3 细胞的抗冷冻性

关于细胞内抗性调节机制,有人提出:“细胞膜脂肪酸调节”假说,如低温培养乳酸菌或在培养基中加入不饱和脂肪酸成分,细胞膜中不饱和脂肪酸含量提高,细胞抗性增强^[9,10]。本实验通过研究营养基质和培养条件对两歧双歧杆菌抗冷冻性的影响,观察细胞内在抗性变化,结果表明:细胞抗性首先与自身的生理状态有关,即对数后期和稳定初期的细胞抗性最强;相同菌龄细胞抗性又随营养基质和培养温度的变化而变化,当向 M_c 培养基中加入吐温 80、甘油、蛋白胨、酵母粉后, Bb 的冷冻存活率显著提高 ($P < 0.01$), 32℃ 低温培养较 37℃ 最适温度培养, Bb 抗冷冻性略有增强(冷冻存活率提高 6%~7%,而统计分析差异不显著)。但其作用机制仍有待深入研究和探讨。

参考文献

- [1] Scardovi V. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Baltimore: Williams and Willikins 1986, Vol 2, Section 15.
- [2] 马钢,刘英华,姜莹等. 食品与发酵工业, 1992, (1): 13~17.

- [3] Collins E B, Hall B J. Cultured Dairy Products Journal, 1993, 28(4):1620~1624.
- [4] Robinson R K. CAB, 1990~1991.
- [5] 傅晓超, 胡明明. 食品与发酵工业, 1992, (5): 35~43.
- [6] Martin J H, Chou K M. Cultured Dairy Products Journal, 1992, 27(4): 21~26.
- [7] Laroia S, Martion J H. Cultured Dairy Products Journal, 1991, 26(4):13~21.
- [8] Modler H W, Villa Garcia L. Cultured Dairy Products Journal, 1993, 28(1):4~8.
- [9] 吕为群, 骆承庠, 刘书臣. 中国乳品工业, 1993, 21(5): 217~220.
- [10] 陈明声, 吕 琴. 微生物学通报, 1996, 23(4): 236~238.