

活菌制剂活菌数急剧衰降的原因与减缓衰降的方法

唐涌濂 王凌华 张雪洪 黄瑞珊

(上海交通大学生物科学与技术系, 上海 200240)

摘要 市售活菌制剂口服液活菌数急剧衰降的原因是营养缺乏, 特别是缺乏部分氨基酸及某些维生素。增加动物性蛋白胨及强化酵母膏, 添加适量维生素可使活菌数一年后保持在 10^6 / ml 以上。

关键词 活菌制剂, 生长因子

活菌制剂含有人体所需有益活性菌体, 如乳酸菌、双歧杆菌。现活菌制剂有三类。一类为酸奶, 这种制剂由于是用奶粉或鲜牛奶为主要原料, 易腐败, 保质期仅 30d^[1], 限制了它的规模效益及应用。第二类为冻干型制剂, 如“梦思”, “丽珠肠乐”。这种制剂使活菌处于休眠状态, 延缓菌体死亡, 活菌数较高。但该种制剂生产成本高。冻干菌体恢复活性时间长, 因而其效果不如口服液快。第三类为活菌制剂口服液, 这类产品将发酵液直接装瓶而得, 产品保存 2~3 年后仍有活菌检出; 成本低, 营养丰富, 应该成为象鲜牛奶一样的大众化功能性食品。本文探讨活菌制剂口服液活菌数急剧衰降的原因

及延缓菌体死亡的方法。

1 材料和方法

1.1 菌种及来源

青春双歧杆菌 (*Bifidobacterium adolescentis* 简称 BA 菌) 为本系分离筛选并经好氧驯化的耐氧型菌株。

乳链球菌 (*Streptococcus lactis* 简称 SL 菌), 为本系分离筛选的兼性厌氧型菌株。

以上两株菌平板培养基为 (%): 葡萄糖 0.6, 蛋白胨 1.0, 酵母膏 0.5, NaCl 0.5, 琼脂

2.0。

1.2 样品分析

测定方法:活菌数按 GB4789.2-84;蛋白质按 GB5009.5-85;还原糖按 GB5009.7-85;PB 按 GB5009.12-85;As 按 GB5009.11-85;Cu 按 GB5009.13-85;大肠菌按 GB4789.3-84;固体含量用重量法;pH 用 PHS-3 酸度计。

超氧化物歧化酶(SOD)测定:样品加入溶菌酶 1.2 万单位/ml 冰浴中 1h 后,18000r/min 离心,其上清液按邻苯三酚自氧化法^[2]处理。

氨基酸测定:日产 HIACHL-8500 型氨基酸自动分析仪。

维生素测定:岛津 GC-5AG 气相色谱仪。

2 结果和讨论

2.1 乳链球菌与双歧杆菌的 SOD

近年研究证实人体不少疾病的起因均与过剩自由基有关^[3]。SOD 是一种主要的自由基清除剂。测定了 BA 菌与 SL 菌单独发酵的口服液的 SOD,结果如表 1。BA 菌初发酵液菌数为 2.3×10^7 /ml;SL 菌的初发酵液活菌数为 1.08×10^9 /ml。

表 1 口服液中 SOD 含量与保存时间的关系

SL 菌发酵液	初	1 月	1 年	上清液
SOD(u/mg)	1.27	1.05	0.13	0
BA 菌发酵液	初	1 月	1 年	厌氧 BA 菌
SOD(u/mg)	0.418	0.25	0.09	0

测定结果说明,口服液的上清液没有清除自由基的能力;随保存时间的延长,菌体内的 SOD 含量下降,清除自由基的功能减弱;厌氧的双歧杆菌并无 SOD,乳酸链球菌的 SOD 大于青春双歧杆菌。

2.2 市售活菌制剂的状况

市售部分活菌制剂实测的活菌衰减曲线见图 1,相应制剂的主要指标见表 2。由图可知,液态口服液活菌保存在发酵液中,菌体很快死亡,特别是前 20d,菌数按几何级数下降。镜检存放一年的“天微”发现大量菌体自溶,革兰氏染色后部分菌变成阴性。出现这种情况的原因是由于细菌周围的一系列改变,包括营养物质的部分缺乏,pH,代谢产物等。

日本“乳等省令”明确规定乳酸菌饮料活菌数应在 1×10^6 /ml 以上,我国尚无活菌数的法规,不少口服液不标活菌数,其实这是一项重要指标。

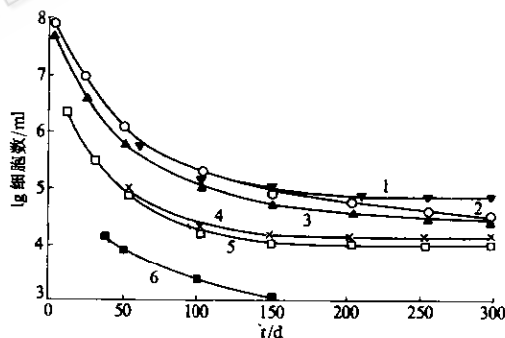


图 1 市售口服液活菌衰减曲线

1. 双歧天宝, 2. 昂立一号, 3. 天微, 4. 三株, 5. 五株王, 6. 851

表 2 市售口服液菌种及主要指标

口服液名称	菌种	生产日期	pH	蛋白质(%)	还原糖(%)	固形物(%)
三株	双歧杆菌、嗜酸乳杆菌、SL 菌	1995.02.09	3.30	0.531	0.51	2.41
双歧天宝	双歧杆菌、乳酸杆菌、乳链球菌	1995.01.17	3.84	0.720	0.45	2.10
五株王	双歧杆菌、乳杆菌、乳链球菌	1995.01.05	3.44	0.740	0.40	2.31
851	851 菌	1994.01.05	9.0	1.71	0.10	1.72
昂立一号	昂立一号菌	1993.09.29	3.90	0.788	0.30	1.65
天微	交大一号菌	1994.04.02	3.80	0.714	0.26	1.46

目前市售口服液所用乳酸菌一般为乳酸球菌属及双歧杆菌属,这两类菌都需要葡萄糖。产品中均有还原糖,说明葡萄糖不是活菌数衰减的控制因素。各口服液发酵生产中一般用自来水,须在培养基中另添加 Na、Mg、K、Ca 离子,故活菌数不致因这些常量元素缺乏而很快死亡。天微与昂立生产中还添加 Fe、Cu、Zn、Se、Mo、B 等微量元素,例如天微发酵液中 [Cu] 0.56mg/kg, [Zn] 7.9mg/kg, [Fe] 10.09mg/kg, [Se] 0.34mg/kg^[4]。而另一些口服液还添加锗、碘等元素,但仍不能避免活菌的很快死亡。

2.3 蛋白质中氨基酸对活菌存活的影响

测定了发酵原料与存放 3 个月发酵液的氨基酸分布,结果如表 3。

由表 3 说明,两种菌发酵液中均没有精氨酸与酪氨酸,而鸟氨酸增加,说明这两种菌有精氨酸酶,可以利用精氨酸使之分解成鸟氨酸。两种菌依靠氨基化作用生成天冬氨酸、谷氨酸、丙氨酸,使这些氨基酸增加。乳酸菌和双歧菌都需要 B₆^[6],组氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、精氨酸的合成都与 B₆ 有关,因而这些氨基酸均减少。

双歧菌中脯氨酸降为 0,而谷氨酸大量增加,证明双歧菌利用脯氨酸生成谷氨酸。

市售口服液蛋白质含量并不少,特别是 851,但其蛋白质来源主要是植物性蛋白,其中的精氨酸、酪氨酸含量并不高,所以引起活菌体迅速死亡。在天微口服液中曾有意加入植物性复合氨基酸,使其总蛋白含量增加一倍,但并没有使活菌减缓死亡,一年后总活菌数也仅 10⁴/ml。现有口服液工艺中,一般以黄豆、豆芽汁作主蛋白来源,辅以蛋白胨。这种工艺造成乳酸菌由于培养基中精氨酸、酪氨酸耗尽引起菌体迅速死亡。双歧菌由于培养基中脯氨酸、酪氨酸、精氨酸耗尽而引起菌体迅速死亡。若两种菌共同发酵,由于两种菌在谷氨酸与脯氨酸相互转化上正好相反,它们之间的转化本来是可逆的^[6],可不外加脯氨酸。苯丙氨酸亦有类似情况。

2.4 维生素对活菌存活的影响

表 3 乳酸菌与双歧菌发酵液氨基酸分布

氨基酸	原料(%)	乳酸菌发酵液(%)	双歧菌发酵液(%)
牛磺酸	0.63	0.75	0.68
天冬氨酸	6.94	10.75	4.26
苏氨酸	3.20	3.12	2.46
丝氨酸	3.67	4.12	3.80
谷氨酸	6.50	26.60	27.10
脯氨酸	1.90	12.40	0.00
甘氨酸	4.10	4.10	2.46
丙氨酸	7.40	8.00	8.90
胱氨酸	0.70	0.50	2.05
缬氨酸	6.34	5.40	8.10
甲硫氨酸	2.64	1.60	2.73
异亮氨酸	2.20	4.25	5.90
亮氨酸	12.60	7.40	8.20
酪氨酸	4.70	0.00	0.00
苯丙氨酸	7.80	4.75	10.54
鸟氨酸	0.26	2.90	7.12
赖氨酸	9.43	2.60	3.15
组氨酸	4.30	1.00	2.46
精氨酸	15.41	0.00	0.00

* 表中各值为实测值折算的相对比例

对培养基与发酵液的维生素状况进行调查,两株菌共同发酵结果说明两种菌能合成维生素 B₂、B₅、A,而它们的生长都需要 B₁、B₆、B₁₂、E。B 族维生素是组成各种酶的活性基成份,没有它们酶不能活动,因此造成菌体死亡。两种菌生长尚需嘌呤和嘧啶以合成核苷酸。这两种菌不能利用外源的嘌呤和嘧啶合成核苷酸,酵母膏富含核苷酸,同时酵母膏中还有丰富的蛋白质、氨基酸、B₁、B₁₂、微量元素,但由于酵母膏成本较高,不宜多加。

表 4 培养基与发酵液的维生素分布 (mg/100g)

维生素	B ₁	B ₂	B ₅	B ₁₂	E	A	B ₆
原料	0.06	0.04	0.23	0.03	0.03	0.005	0.05
发酵液	0	0.07	0.54	0	0	0.01	0

2.5 添加动物性蛋白胨、维生素、酵母膏后活菌制剂的活菌状态

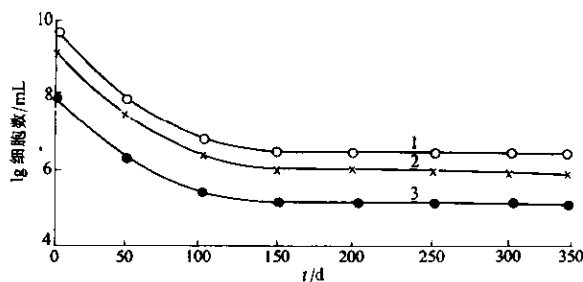


图2 添加生长因子后乳链球菌、青春双歧杆菌、两菌共同发酵液活菌衰减曲线

1. 双菌共同发酵, 2. 乳链球菌, 3. 双歧杆菌

图2为增加动物性蛋白胨、维生素 B_1 、 B_6 、 B_{12} 、E,适当增加原酵母膏量后发酵液的活菌衰减曲线。培养基为:葡萄糖0.5%,动物性蛋白胨0.8%,酵母膏0.5%,NaCl 0.1%,基质植物蛋白5%,中药成份等,0.1%微量元素,0.05%维生素 B_1 、 B_6 、 B_{12} 、E,发酵条件:pH 7.5, $37 \pm 1^\circ\text{C}$, 24h 静止培养,BA菌种量5%,乳酸菌种

量0.5%,共同培养时先投BA菌4h,后投乳酸菌种。动物性蛋白胨为上海大场肉联厂猪骨胨(食品级)。

发酵在 2M^3 发酵罐中进行。结果说明,添加了动物性蛋白胨、维生素、酵母膏等生长因子后,青春双歧杆菌发酵液其活菌数一年后可大于 $5.0 \times 10^5 / \text{ml}$;乳链球菌发酵液其活菌数一年后可大于 $1.0 \times 10^6 / \text{ml}$;两种菌共同发酵发酵液其活菌数一年后可大于 $6.5 \times 10^6 / \text{ml}$ 。

参 考 文 献

- [1] 付晓超,胡明明.食品与发酵工业,1992, 4: 35~43.
- [2] 邹国林等.生物化学与生物物理进展,1986, 4: 71~73.
- [3] 方允中,李文杰主编,自由基与酶,科学出版社,1994.
- [4] 轻工部食品质量监督检测中心上海站检测报告,95-205号,1995,4.
- [5] 俞大维,李季伦主编.微生物学.北京:科学出版社,1985, 100~138.

THE REASON WHY LIVING CELLS ATTENUATE SUDDENLY IN LIVING BACTERIA PREPARATION AND THE METHOD OF SLOWING ITS ATTENUATION

Tang Yonglian Wang Linhua Zhang Xuehong Huang Ruishan

(Department of Biology Science and Technology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240)

Abstract The reason that the number of living cells in living bacteria preparation of oral liquid sold in the market suddenly attenuate is because lack of nutrition, particularly, the partial amino-acid and partial vitamin within the protein. Increasing the animal peptone and the strengthened yeast extract, the number of living cells can be kept at the level of $10^6 / \text{ml}$ after one year's storage.

Key words Living bacteria preparation, Growing factor