

DOI:10.3969/j.issn.1000-1298.2010.04.029

长双歧杆菌 BBMN68 冷冻保护剂筛选与优化^{*}

刘松玲¹ 蒋菁莉² 刘爱萍² 郭慧媛¹ 冷小京¹ 任发政¹

(1. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083; 2. 蒙牛乳业(北京)有限责任公司, 北京 101107)

【摘要】 为提高长双歧杆菌 BBMN68 的冷冻保藏效果,以冷冻存活率和菌株活力为评价指标,分别评价了4个类型的18种冷冻保护剂。结果表明,脱脂乳、海藻糖、果糖、甘油、维生素 C、L-Glu 能对 BBMN68 有效保护。采用二次回归正交设计,对筛选得到的6种保护剂进行复配,得到复配保护剂的最优配方(质量分数)为:甘油3%、海藻糖5%、果糖5%、脱脂乳8%、维生素 C 0.05%、L-Glu 0.05%。在复配保护剂的作用下,-80℃保藏期间 BBMN68 菌数稳定,活菌对数值始终保持在 10.5 lg(cfu/mL);冷冻浓缩物作为直投发酵剂应用于酸奶中,在21 d内菌数变化不大,始终保持在 10⁷ cfu/mL 以上。

关键词: 长双歧杆菌 BBMN68 冷冻保护剂 发酵剂 优化

中图分类号: TS205.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2010)04-0140-05

Screening and Optimization of Cryoprotectants for *Bifidobacterium longum* BBMN68

Liu Songling¹ Jiang Jingli² Liu Aiping² Guo Huiyuan¹ Leng Xiaojing¹ Ren Fazheng¹

(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

2. Mengniu Dairy (Beijing) Company of Limited Liability, Beijing 101107, China)

Abstract

To improve the protective efficacy of *Bifidobacterium longum* BBMN68, various cryoprotectants were evaluated and optimized. Based on its viability and activity after frozen, the effects of eighteen cryoprotectants belonging to four different types were evaluated. Six of them including skim milk, trehalose, fructose, glycerol, Vitamin C and L-Glu were proved to be effective. Then the complex formulas made of the six kinds of the selected compounds was optimized by using a quadratic regression orthogonal experiment. And the optimized composition is as follows: skim milk 8%, trehalose 5%, fructose 5%, glycerol 3%, Vitamin C 0.05% and L-Glu 0.05%. With the protection of the optimized cryoprotectants, the stability of starters is good with a stable logarithm value about 10.5 lg(cfu/mL) during storage, and when applied in yoghurt fermentation it presents an excellent performance, with a total counts of culturable cells above 10⁷ cfu/mL during 21 days of storage.

Key words *Bifidobacterium longum* BBMN68, Cryoprotectant, Starter, Optimization

引言

作为一种经典的益生菌,双歧杆菌的益生功能已得到了普遍的认识,在功能食品中的应用也得到了广泛的关注,其中在乳制品中的应用最具有代表

性^[1]。双歧杆菌有效应用于乳品发酵主要依赖于发酵剂的制备和保藏技术^[2]。深冷技术广泛应用于发酵剂的制备,其冷冻效果的关键在于冷冻保护剂的选择。关于冷冻保护剂对菌体的保护作用在乳酸菌中已有大量的研究,并且各种类型保护剂的作

收稿日期:2009-03-12 修回日期:2009-05-25

^{*}“十一五”国家科技支撑计划资助项目(2006BAD04A06)和国家“863”高技术研究发展计划资助项目(2007AA10Z311)

作者简介:刘松玲,博士生,主要从事乳品微生物研究, E-mail: lsling_1219@126.com

通讯作者:任发政,教授,博士生导师,主要从事乳品加工技术与功能乳品研究, E-mail: renfazheng@263.net

用在大量的研究中得到了验证,在适当保护剂的作用下深冷技术能有效地进行发酵剂的制备和保藏^[3-7]。但是大量的研究显示保护剂的效果存在菌株特异性^[8-12]。Leslie等发现海藻糖对大肠杆菌和苏云金杆菌有良好的保护效果^[3],而Linders等的研究中海藻糖对植物乳杆菌却没有保护作用^[13]。保护剂的选择在新开发益生菌株的应用中尤为重要。

长双歧杆菌BBMN68分离自广西巴马长寿老人,已证明具有较强的生理功能^[14]。本文根据保护剂的作用机理分别选择渗透性、半渗透性、非渗透性保护剂和氧化还原保护物质,并通过实验设计对配比进行优化,使不同成分间的相互作用达到最优,从而利用深冷技术制备可用于乳品发酵的直投式双歧杆菌发酵剂。

1 材料与方法

1.1 菌种

长双歧杆菌BBMN68 (*Bifidobacterium longum* BBMN68,中科院微生物所菌种保藏中心保藏号:CGMCC2265)分离自广西巴马长寿老人粪便。

1.2 材料

MRS培养基(北京奥博星生物技术有限公司);甘油、二甲基亚砷(DMSO)(天津市登峰化学试剂厂);山梨醇、甘露醇、肌醇、蔗糖、海藻糖、果糖、可溶性纤维素、 β -环糊精、L-谷氨酸(北京世纪华林科技有限公司);工业用脱脂乳粉(新西兰OCC公司);其他试剂为化学纯试剂。

1.3 主要设备

DELTA 320型pH计,瑞士Mettler Toledo公司;DNP-9082型微生物多用培养箱,北京六一仪器厂;XSZ-4G型显微镜,重庆光学仪器厂;ZDX-35BI型座式自动电热压力蒸汽灭菌器,上海申安医

疗器械厂;3K30型高速冷冻离心机,德国Sigma公司;L1523型发酵罐,瑞士Bioengineering公司。

1.4 实验方法

1.4.1 菌株培养

将保藏的菌种接MRS培养基活化两代,镜检培养液菌体形态,将活化菌株接种15L发酵罐,接种量1%(10^7 cfu/mL)。于37℃,pH值6.5,搅拌转速220 r/min条件下厌氧培养15h后离心收集菌体。

1.4.2 发酵剂制备流程

高密度发酵菌液于4000 r/min,10 min离心收集菌体,加保护剂重悬到原菌液体积的1/5,迅速冷冻于-80℃超低温冰箱。

1.4.3 菌株计数

冷冻浓缩物于PBS中10倍梯度稀释,于MRS琼脂培养基中培养48h,计数。

1.4.4 菌株活力测定

冷冻浓缩物接种于质量分数为10%脱脂乳粉中,接种量体积分数为1%,37℃培养7h,测定滴定酸度(°T)。

1.5 数据分析

采用Excel和SAS对数据进行t检验和回归分析。

2 结果与讨论

2.1 保护剂单独使用的效果评价

以脱脂乳为基础添加不同类型保护剂,对冷冻后存留活菌数的影响如表1所示。在渗透性保护剂中,与对照组相比,在甘油存在条件下冷冻后活菌数有一定的提高,甘油的效果好于DMSO。Zdenek总结了保护剂中添加不同比例的DMSO对菌株的冷冻保护作用及毒性^[15],本研究中DMSO的副作用可能是由于对菌株的毒性。

表1 单一保护剂对冷冻后活菌数的影响

Tab.1 Effects of the protectants on the colony forming unit of the strain after frozen

对照		渗透性保护剂 (质量分数3%)		半渗透性保护剂 (质量分数5%)		非渗透性保护剂 (质量分数10%)		氧化保护物质 (质量分数0.05%)	
种类	活菌对数 /lg(cfu/mL)	种类	活菌对数 /lg(cfu/mL)	种类	活菌对数 /lg(cfu/mL)	种类	活菌对数 /lg(cfu/mL)	种类	活菌对数 /lg(cfu/mL)
脱脂乳	5.87 ± 1.47	甘油	8.91 ± 1.44 *	甘露醇	8.55 ± 0.38	糊精	7.25 ± 2.56	维生素C	11.50 ± 2.8 *
		DMSO	5.56 ± 0.56	山梨醇	8.42 ± 0.50	淀粉	7.09 ± 1.69	Cys	7.12 ± 2.98
				肌醇	8.90 ± 2.83	纤维素	8.57 ± 2.33	L-Glu	9.37 ± 1.31 *
				海藻糖	9.53 ± 1.11 *	酵母粉	9.36 ± 1.33		
				蔗糖	7.18 ± 0.29				
				麦芽糖	8.40 ± 0.46				
				葡萄糖	7.80 ± 0.52				
				果糖	9.42 ± 0.92 *				

注: * 效果显著好于对照组。

从总体上看,半渗透性保护剂对菌体有较好的保护作用。海藻糖(双糖)的效果最好,其次是果糖(单糖),其效果好于其他的糖并且优于醇类保护剂。研究认为,糖类的保护作用是因为在冷冻过程中由于糖类形成氢键能力较强,稳定蛋白质的高级结构,防止蛋白质变性,使其即使在低温冷冻和干燥失水的情况下,仍保持蛋白质结构与功能完整性^[16]。

在非渗透性保护剂的研究中,冷冻后产品的均一度差,保护剂的效果不明显。非渗透性保护剂是一些大分子物质,溶解度差,由于脱脂乳中含有较高比例的大分子物质,本身对菌体具有较好的非渗透保护作用,所以在复配保护剂的配方优化实验中,将脱脂乳比例作为一个因素而不再考虑其他大分子化合物。

双歧杆菌是专性厌氧微生物,对氧极其敏感,所以降低双歧杆菌存在体系中的氧化还原电势对其活力的保持尤为重要。这一点在实验中得到了证实,3种物质均提高了冷冻后的活菌数。根据单因素实验结果选定脱脂乳、海藻糖、果糖、甘油、维生素C、L-Glu为复配保护剂配方。

2.2 复配保护剂的配方优化

复配保护剂配方的二次回归正交旋转组合实验设计的因素水平如表2所示。不同保护剂组合对菌株活力的影响如表3所示。33个实验中前27个为析因点,后5个为中心点,可用来估计实验中的随机误差,对实验设计进行拟合检验。由F检验结果:总回归系数 $F_R = 16.4638 (p = 0.0028 < 0.01)$ 达到了极显著水平,说明回归方程极显著。但是有些因素未达到显著水平,由于回归正交实验具有正交性保证了实验因素的列与列之间没有互作用存在,因此可将未达到0.25显著水平的因素剔除,将其平方和和自由度并入误差项进行第二次方差分析,以提高检验的精确度。

表2 二次回归正交旋转组合实验设计因素水平

Tab.2 Factor levels of quadratic regression orthogonal rotating experiment design

水平	因素					
	脱脂奶 质量分 数 $x_1/\%$	甘油体 积分 数 $x_2/\%$	海藻糖 质量分 数 $x_3/\%$	果糖质 量分 数 $x_4/\%$	维生素C 质量分 数 $x_5/\%$	L-Glu 质量分 数 $x_6/\%$
2	12	5	10.0	10.0	0.100	0.100
1	10	4	7.5	7.5	0.075	0.075
0	8	3	5.0	5.0	0.050	0.050
-1	6	2	2.5	2.5	0.025	0.025
-2	4	1	0	0	0	0

表3 不同保护剂组合对菌株活力的影响

Tab.3 Effect of composition of various protectants on the activity of the strain

实验号	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	滴定酸度/ $^{\circ}$ T
1	-1	-1	-1	-1	1	1	49.47
2	1	-1	-1	-1	-1	1	43.03
3	-1	1	-1	-1	-1	1	52.56
4	1	1	-1	-1	1	1	51.82
5	-1	-1	1	-1	1	-1	52.83
6	1	-1	1	-1	-1	-1	49.97
7	-1	1	1	-1	-1	-1	48.90
8	1	1	1	-1	1	-1	46.28
9	-1	-1	-1	1	1	-1	51.09
10	1	-1	-1	1	-1	-1	39.34
11	-1	1	-1	1	-1	-1	46.05
12	1	1	-1	1	1	-1	42.91
13	-1	-1	1	1	1	1	47.16
14	1	-1	1	1	-1	1	49.22
15	-1	1	1	1	-1	1	50.09
16	1	1	1	1	1	1	48.30
17	-2	0	0	0	0	0	47.33
18	2	0	0	0	0	0	43.32
19	0	-2	0	0	0	0	46.44
20	0	2	0	0	0	0	50.73
21	0	0	-2	0	0	0	52.72
22	0	0	2	0	0	0	49.92
23	0	0	0	-2	0	0	46.92
24	0	0	0	2	0	0	51.03
25	0	0	0	0	-2	0	54.34
26	0	0	0	0	2	0	42.63
27	0	0	0	0	0	-2	49.49
28	0	0	0	0	0	2	51.23
29	0	0	0	0	0	0	48.85
30	0	0	0	0	0	0	50.08
31	0	0	0	0	0	0	50.39
32	0	0	0	0	0	0	51.73
33	0	0	0	0	0	0	50.25

剔除不显著因素后,对显著因素进行方差分析(表4),总回归达到极显著水平,失拟检验不显著($p = 0.759$),两种检验均通过,方程相关系数 R^2 为0.9744,说明所选建模型有效,可以用回归方程进行预测,回归方程为

$$Y = 49.06 - 1.94X_1 + 0.73X_2 - 2.28X_3 - 2.92X_5 - 0.53X_1^2 + 3.91X_1X_2 + 0.73X_1X_3 + 0.96X_1X_6 - 0.68X_2X_3 + 1.31X_2X_6 + 1.06X_3X_4 - 0.85X_3X_5 - 1.17X_3X_6 - 0.70X_4^2 + 3.04X_4X_6 - 0.60X_5X_6$$

表 4 复配保护剂各成分对保护效果的影响

Tab.4 Role of components in the whole protective action

变异来源	自由度	方差	均方	F 值	p 值
X_1	1	90.44	90.44	66.61**	0.0001
X_2	1	13.01	13.01	9.58*	0.0069
X_3	1	41.68	41.68	30.70**	0.0001
X_5	1	68.56	68.56	50.50**	0.0001
X_1^2	1	8.78	8.78	6.46*	0.0217
X_1X_2	1	81.67	81.67	60.15**	0.0001
X_1X_3	1	8.69	8.69	6.40*	0.0223
X_1X_6	1	14.76	14.76	10.87**	0.0045
X_2X_3	1	7.49	7.49	5.52**	0.0320
X_2X_6	1	27.75	27.75	20.44**	0.0003
X_3X_4	1	18.00	18.00	13.26**	0.0022
X_3X_5	1	11.61	11.61	8.55**	0.0099
X_3X_6	1	22.07	22.07	16.25**	0.0010
X_4^2	1	15.00	15.00	11.05**	0.0043
X_4X_6	1	49.43	49.43	36.41**	0.0001
X_5X_6	1	5.87	5.87	4.32*	0.0540
回归	16	377.50	23.59	17.38**	0.0001
残差	16	21.72	1.36		
失拟	12	14.21	1.18	0.63	0.7590
纯误差	4	7.51	1.88		
总平方	32	399.22			
R^2			0.9744		

注: * 表示 0.05 显著水平, ** 表示 0.01 显著水平。

表 5 深冷发酵剂 -80℃ 保藏期间双歧杆菌活菌对数值变化

Tab.5 Variations in colony forming unit of bifidobacterium during storage at -80℃

贮藏时间/d	0	7	15	30	90	150	210	270
活菌对数值/ $\lg(\text{cfu/mL})$	10.49 ± 1.13	10.57 ± 1.09	10.52 ± 1.12	10.45 ± 0.96	10.53 ± 1.37	10.47 ± 0.99	10.56 ± 1.12	10.61 ± 1.10

表 6 酸奶发酵与贮藏过程中双歧杆菌活菌对数值变化

Tab.6 Variations in colony forming unit of bifidobacterium during the fermentation and subsequent storage

时间/d	发酵		4℃ 贮藏			
	0	4	1.5	7	14	21
活菌对数值/ $\lg(\text{cfu/mL})$	8.08	8.26	8.15	7.41	7.34	7.18

3 结束语

对 18 种冷冻保护剂单独使用的效果评价证明, 脱脂乳、海藻糖、果糖、甘油、维生素 C、L-Glu 对 BBMN68 保护作用良好。与大量文献报道 DMSO 的

通过软件 SAS 8.2 分析, 得到复配保护剂的最优配方(质量分数)为: 甘油 3%、海藻糖 5%、果糖 5%、脱脂乳 8%、维生素 C 0.05%、L-Glu 0.05%。

根据预测的最优条件处理菌体, 实验所得的滴定酸度是 $(50.61 \pm 0.76)^\circ\text{T}$ ($n = 4$), 与预测结果 50.26°T 相差 2.4%, 方程预测精度较高。

2.3 冷冻浓缩物在保藏期间的菌数变化

表 5 为冷冻浓缩物在 -80℃ 冷藏期间的菌数变化。由图可知, 菌数变化不显著, 实验范围内发酵剂性能稳定, 可以达到生产用发酵剂的要求。

2.4 冷冻浓缩物在发酵过程中的稳定性

表 6 为冷冻浓缩物用于发酵乳, 在发酵过程中和发酵后酸奶 4℃ 贮藏过程中活菌数变化。与初始接种量相比, 发酵终点菌数保持稳定, 发酵过程中发酵剂产酸未影响菌株的存活。贮藏过程中从第 7 天开始菌数有所下降, 与接种菌数相比有显著差异 ($p < 0.01$), 但在保质期内 (21 d) 活菌对数值大于 7, 符合对益生菌的要求。Jayamanne 等对 10 种市售益生菌酸奶中益生菌菌数的稳定性的研究中发现, 所有样本购买初菌数均大于 10^6 cfu/mL , 但是保质期末期只有 5 种保持这一水平。对产品中益生菌的耐酸和耐氧性能进行研究发现菌株对酸和氧的耐受能力直接影响到其在保藏过程中的稳定性^[17]。如何进一步提高产品中益生菌数量和稳定性还有待研究。

保护作用相反, 本实验中 DMSO 对菌株有副作用, 保护剂选择中菌株特异性应该引起极大关注。二次回归正交试验对筛选得到的 6 种保护剂进行复配, 得到复配保护剂的最优配方(质量分数)为: 甘油 3%、海藻糖 5%、果糖 5%、脱脂乳 8%、维生素 C 0.05%、L-Glu 0.05%。在复配保护剂的作用下, -80℃ 保藏期间菌数稳定, 冷冻浓缩物作为直投发酵剂应用于酸奶中, 21 d 内菌数保持在对益生菌的要求范围内可以作为生产用发酵剂。酸奶冷藏 7 d 后菌数有所下降, 关于酸奶保藏过程中菌数下降的原因和提高菌体稳定性的途径还有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Van Der Werf M J, Venema K. Bifidobacteria: genetic modification and the study of their role in the colon[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49(1): 378 ~ 383.
- 2 Carvalho A S, Silva J, Ho P, et al. Impedimetric method for estimating the residual activity of freeze-dried *Lactobacillus*

- delbrueckii* ssp. *bulgaricus*[J]. International Dairy Journal, 2003, 13(6): 463 ~ 468.
- 3 Leslie S B, Israeli E, Lighthart B, et al. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(10): 3592 ~ 3597.
 - 4 Carvalho A S, Silva J, Ho P, et al. Effect of additives on survival of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* during storage[J]. Biotechnology Letters, 2002, 24(19): 1587 ~ 1591.
 - 5 Linders L J M, De Jong G I W, Meerdink G, et al. Carbohydrates and the dehydration inactivation of *Lactobacillus plantarum*: the role of moisture distribution and water activity[J]. Journal of Food Engineering, 1997, 31(2): 237 ~ 250.
 - 6 Abadias M, Benabarre A, Teixidó N, et al. Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*[J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 65(3): 173 ~ 182.
 - 7 Carvalho A S, Silva J, Ho P, et al. Effect of different sugars added to the growth and drying medium upon thermotolerance and survival during storage of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*[J]. Biotechnology Progress, 2008, 20(1): 248 ~ 254.
 - 8 Gardiner G E, O'sullivan E, Kelly J, et al. Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(6): 2605 ~ 2612.
 - 9 Carvalho A S, Silva J, Ho P, et al. Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria[J]. International Dairy Journal, 2004, 14(10): 835 ~ 847.
 - 10 Fonseca F, Béal C, Corrieu G. Method of quantifying the loss of acidification activity of lactic acid starters during freezing and frozen storage[J]. Journal of Dairy Research, 2000, 67(1): 83 ~ 90.
 - 11 Carvalho A S, Silva J, Ho P, et al. Survival of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* during storage in the presence of protectants[J]. Biotechnology Letters, 2002, 24(19): 1587 ~ 1591.
 - 12 Mauriello G, Aponte M, Andolfi R, et al. Spray-drying of bacteriocin-producing lactic acid bacteria[J]. Journal of Food Protection, 1999, 62(7): 773 ~ 777.
 - 13 Linders J M, Wolkers F, Hoekstra F A. Effect of added carbohydrates on membrane phase behaviour and survival of dried *Lactobacillus plantarum*[J]. Cryobiology, 1997, 35(1): 31 ~ 40.
 - 14 Yang H Y, Liu S L, Ibrahim S A, et al. Oral administration of live *Bifidobacterium* substrains isolated from healthy centenarians enhanced immune function in BALB/c mice[J]. Nutrition Research, 2009, 29(4): 281 ~ 289.
 - 15 Hubálek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms[J]. Cryobiology, 2003, 46(3): 205 ~ 229.
 - 16 Crowe J H, Crowe L M, Carpenter J F, et al. Interactions of sugar with membranes[J]. Biochimica et Biophysica Acta-Reviews on Biomembranes, 1988, 947(2): 367 ~ 384.
 - 17 Jayamanne V S, Adams M R. Determination of survival, identity and stress resistance of probiotic bifidobacteria in bio-yoghurts[J]. Letters in Applied Microbiology, 2006, 42(3): 189 ~ 194.