



## 喷雾干燥法制备植物乳杆菌 MA2 发酵剂

李 骞, 栾天奇, 王艳萍

(食品营养与安全教育部重点实验室, 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

**摘要:** 对一株 Kefir 源植物乳杆菌 MA2 喷雾干燥法制备发酵剂的工艺进行初步研究, 通过正交实验对保护剂的配方进行优化, 确定保护剂的配方为: 谷氨酸钠 20 g/L, 海藻糖 50 g/L, 乳糖 50 g/L, 脱脂乳 100 g/L. 通过响应面分析方法对喷雾干燥的条件进行优化, 确定喷干最适条件为: 进口温度 151.63 °C, 进料流量 62.07 mL/h, 保护剂与菌泥比例 (g : L) 3.38 : 1. 按上述条件得到干菌粉的活菌数为  $2.11 \times 10^9 \text{ g}^{-1}$ . 4 °C 冷藏保存半年后活菌数仍能达到  $1.02 \times 10^9 \text{ g}^{-1}$ , 凝乳时间 14 h, 胆固醇移除率 32.0%, 为实现乳酸菌发酵剂的高效生产提供实验基础.

**关键词:** 植物乳杆菌; 喷雾干燥; 发酵剂

中图分类号: TS201.3

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2011)05-0019-04

## Starter *Lactobacillus plantarum* MA2 Preparation Technology by Using Spray Dying Method

LI Qian, LUAN Tian-qi, WANG Yan-ping

(Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Ministry of Education, College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** The *Lactobacillus plantarum* starter preparation technology by using spray dying method was studied. The starter was *Lactobacillus plantarum* MA2 isolated from Kefir grains. The protectants used in spray dying were optimized by orthogonal experiment and the optimum properties of protectants were as follows: sodium glutamate 20 g/L, trehalose 50 g/L, lactose 50 g/L and skim milk 100 g/L. The conditions of spray dying were optimized by response surface analysis, and the best conditions were as follows: inlet temperature 151.63 °C, injective flow of mixture 62.07 mL/h, proportion of protectant and cell 3.38 : 1. The *Lactobacillus plantarum* powder has prepared by spray dying. The number of live bacteria is  $2.11 \times 10^9 \text{ g}^{-1}$ . After cold storage at 4 °C for half year, the living bacteria amount of bacterium powder is  $1.02 \times 10^9 \text{ g}^{-1}$ , the time of milk-solidifying was 14 h, and the percentage of cholesterol removed was 32.0%. This result achieved the intended purpose of efficient preparation the fermentation starter.

**Keywords:** *Lactobacillus plantarum*; spray dying; starter

Kefir 粒是由多种乳酸菌与酵母菌等微生物之间的共生作用而形成的特殊粒状结构<sup>[1]</sup>, 具有多种生理保健功能<sup>[2]</sup>. 本实验室通过传统的分离纯化方法和 PCR-DGGE 技术, 从 Kefir 粒中筛选出一株具有降胆固醇功能的植物乳杆菌 MA2. 该菌在 Kefir 乳发酵的整个阶段都处于优势地位, 适合作为代替 Kefir 粒的纯发酵剂; 而且易于培养, 有较高的凝乳活力, 因此具有较好的市场前景和开发价值.

目前发酵剂的生产主要采用真空冷冻干燥和喷

雾干燥两种方法. 实验室前期对冷冻干燥的方法进行过研究, 虽然冻干菌粉具有较高的活力, 但是生产时间长、产量较小、成本较高, 不适合大批量的生产. 因此本实验采用了传统的喷雾干燥方法进行研究, 旨在找到一种高效率、低成本生产植物乳杆菌发酵剂的方法. 喷雾干燥在食品工业中, 是一种生产率高、操作费用低的工艺<sup>[3]</sup>. 不仅可以保留菌株的活性和功能, 还能较长时间的保藏, 在大批量的发酵剂生产中普遍采用喷雾干燥的方法. 但是喷雾干燥过程

收稿日期: 2011-02-24; 修回日期: 2011-06-15

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金资助(20091208110001); 天津市应用基础及前沿技术研究计划项目(08JCYBJC01900)

作者简介: 李 骞(1984—), 男, 天津人, 硕士研究生; 通信作者: 王艳萍, 教授, 博士, ypwang@tust.edu.cn.

中菌体容易因为高温和脱水失活,因此常通过优化喷雾干燥条件和添加保护剂的方法,提高菌体的存活率<sup>[4]</sup>.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

Kefir 粒来自于西藏传统农家.

植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) MA2, 由本实验室从 Kefir 发酵乳中分离纯化得到.

MRS 培养基 (g/L): 葡萄糖 20, 蛋白胨 10, 牛肉膏 10, 酵母膏 5,  $K_2HPO_4$  2, 柠檬酸铵 5, 醋酸钠 5, 吐温 1, 无水  $MgSO_4$  0.05. pH 6.3, 121 °C 高压灭菌 20 min.

喷雾干燥保护剂: 脱脂乳 (天津雀巢公司)、谷氨酸钠 (天津市北方天医化学试剂厂)、海藻糖 (上海试剂二厂)、乳糖 (上海试剂二厂).

仪器: YC-015 型喷雾干燥机, 上海雅程仪器设备有限公司; 高压灭菌锅, 日本 Yamato 公司; HF safe-900 型超净工作台, 上海力申科学仪器有限公司; DY-2 型厌氧培养箱, 浙江义乌冷冻机总厂; SmartSpec<sup>TM</sup> 3000 紫外分光光度计, 美国 Bio-Rad 公司.

### 1.2 菌种活化培养、收集

将活化好的植物乳杆菌 MA2, 按 3% 接菌量接入到 MRS 液体培养基中, 37 °C 培养 24 h 后, 4 500 r/min、4 °C 离心 15 min, 弃上清液, 收集菌体.

### 1.3 悬浮液制备

结合实验室前期实验结果和相关文献<sup>[5]</sup>, 选取不同比例海藻糖、谷氨酸钠、乳糖, 溶解到 100 g/L 脱脂乳中制成喷雾干燥保护剂, 并将保护剂与菌体按照比例混合, 制得悬浮液.

### 1.4 喷雾干燥

#### 1.4.1 喷雾干燥条件单因素实验

(1) 喷雾干燥进口温度对喷雾干燥样品的影响: 将喷雾干燥机进口温度分别控制在 120、140、160、180、200 °C 进行喷雾干燥, 测定干菌粉的活菌数.

(2) 喷雾干燥进样流量对喷雾干燥样品的影响: 将喷雾干燥机进样流量控制为 55、60、65、70、75 mL/h 进行喷雾干燥, 测定干菌粉的活菌数.

(3) 保护剂与菌体配比对喷雾干燥样品的影响: 将保护剂与菌泥 (g : L) 分别按 1 : 3、1 : 1、3 : 1、5 : 1、10 : 1 的比例混合后, 在最优进口温度和进料流量条

件下进行喷雾干燥, 测定干菌粉的活菌数.

#### 1.4.2 喷雾干燥条件响应面分析

根据单因素预实验, 确定喷雾干燥工艺优化中的 3 个主要因素: 喷干进口温度、进样流量、保护剂和菌泥比例. 应用 CCD 设计 3 因素 3 水平的响应面分析实验.

### 1.5 干菌粉保藏期实验

将干菌粉无菌真空包装 4 °C 冷藏保存, 第 1 月每 7 d 测定活菌数、凝乳时间和胆固醇移除率, 保藏 180 d 后再次测定.

## 2 结果与讨论

### 2.1 进口温度的影响

喷雾干燥进口温度对发酵剂活力具有明显影响. 当温度过低时, 不能将样品中水分干燥, 导致喷出的样品黏稠, 不易收集并容易被污染, 严重影响发酵剂质量; 当喷干温度过高时, 会导致样品中的菌体大量死亡, 影响发酵剂的质量<sup>[6]</sup>. 所以选取进口温度为 120、140、160、180、200 °C, 喷雾干燥后测定样品的活菌数, 结果如图 1 所示.

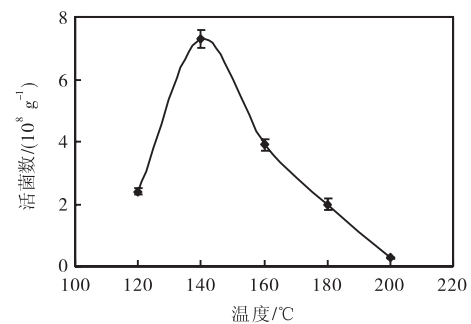


图 1 进口温度对发酵剂的影响

Fig.1 Influence of inlet temperature on starter

图 1 中, 140 °C 进口温度下得到的发酵剂活菌数最高, 达到  $7.3 \times 10^8 \text{ g}^{-1}$ , 发酵剂呈乳白色, 粉状, 具有乳香味; 当进口温度达到 200 °C 时, 活菌数降低到  $2.7 \times 10^7 \text{ g}^{-1}$ , 发酵剂呈淡黄褐色, 有细小的块状物, 说明部分样品因温度过高失活性.

### 2.2 进样流量的影响

喷雾干燥时的进样流量对发酵剂的活力同样具有影响<sup>[7]</sup>. 选择 55、60、65、70、75 mL/h 5 个不同流量进样, 对样品的活菌数进行检测, 结果如图 2 所示. 由图 2 可知, 当进样流量为 60 mL/h 时, 样品活菌数最高达到  $8.7 \times 10^8 \text{ g}^{-1}$ .

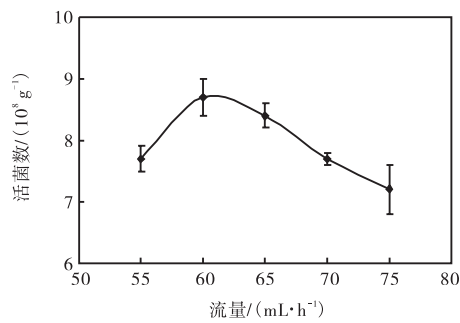


图2 进样流量对发酵剂的影响

Fig.2 Influence of injective flow on starter

### 2.3 保护剂与菌泥比例的影响

首先进行喷雾干燥保护剂的优化. 在进口温度 140 °C、进样流量 60 mL/h 的条件下, 以 100 g/L 脱脂乳为载体, 选取海藻糖、乳糖、谷氨酸钠, 进行 3 因素 3 水平的正交实验, 喷干后测样品活菌数. 实验结果及主效应分析见表 1.

表 1 保护剂优化实验设计及结果

Tab.1 Design and results of the optimum protectants

实验号	谷氨酸钠/(g·L <sup>-1</sup> )	海藻糖/(g·L <sup>-1</sup> )	乳糖/(g·L <sup>-1</sup> )	活菌数/(10 <sup>9</sup> g <sup>-1</sup> )
1	30	50	30	1.21
2	10	40	50	1.07
3	30	30	50	0.98
4	10	50	40	1.14
5	20	50	50	1.45
6	30	40	40	1.15
7	20	40	30	1.33
8	20	30	40	1.06
9	10	30	30	0.90
<i>k</i> <sub>1</sub>	1.037	0.980	1.147	
<i>k</i> <sub>2</sub>	1.280	1.183	1.117	
<i>k</i> <sub>3</sub>	1.113	1.260	1.167	
<i>R</i>	0.046	0.033	0.540	
<i>F</i>	20.791	29.209	0.851	

由表 1 可知, 3 个因素的保护效果依次为: 海藻糖 > 谷氨酸钠 > 乳糖, 最佳保护剂组成为: 谷氨酸钠 20 g/L, 海藻糖 50 g/L, 乳糖 50 g/L, 脱脂乳 100 g/L.

将优化后的保护剂与离心得到的菌泥 (g : L) 分别按 1 : 3、1 : 1、3 : 1、5 : 1、10 : 1 比例混匀, 进行喷雾干燥, 测定样品活菌数, 结果如图 3 所示.

由图 3 可知, 保护剂与菌泥比例为 3 : 1 时, 样品的活菌数最高, 达到  $8.5 \times 10^8$  g<sup>-1</sup>. 当保护剂过少时, 不能对菌体起到有效保护的作用, 导致部分菌体喷干过程中死亡, 影响了样品的活菌数. 当保护剂过多时, 样品中菌体的比例变小, 所以活菌数略有下降.

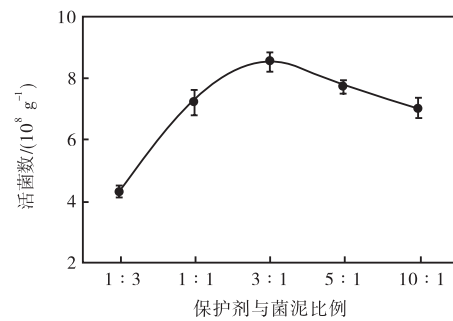


图3 保护剂与菌泥比例对发酵剂的影响

Fig.3 Influence of proportion of protectants and cells

### 2.4 喷雾干燥条件响应面分析

以植物乳杆菌 MA2 为研究对象, 根据 CCD 实验设计表<sup>[8]</sup>, 进行了 20 组实验, 其结果见表 2.

表 2 CCD 设计及结果

Tab.2 Results of CCD experiments

实验号	进口温度/°C	流量/(mL·h <sup>-1</sup> )	保护剂与菌泥比例	活菌数/(10 <sup>9</sup> g <sup>-1</sup> )
1	173.64	60.00	3.00	1.55
2	160.00	65.00	5.00	1.37
3	106.36	60.00	3.00	0.84
4	140.00	60.00	3.00	1.88
5	160.00	65.00	1.00	1.66
6	140.00	60.00	3.00	2.01
7	140.00	60.00	3.00	1.67
8	140.00	60.00	6.36	1.29
9	120.00	55.00	1.00	0.71
10	120.00	65.00	5.00	1.12
11	140.00	60.00	3.00	1.76
12	120.00	65.00	1.00	0.79
13	140.00	60.00	3.00	1.94
14	140.00	68.41	3.00	1.63
15	160.00	55.00	5.00	1.49
16	120.00	55.00	5.00	0.65
17	160.00	55.00	1.00	1.04
18	140.00	60.00	0.88	0.78
19	140.00	51.59	3.00	1.03
20	140.00	60.00	3.00	1.94

通过 Design Expert 软件对表 2 实验数据进行二次多项回归拟合, 获得发酵剂活菌数对进口温度、流量、保护剂与菌泥比例的二次多项式回归方程为

$$Y = 1.82 + 0.26A + 0.15B + 0.15C - 0.22A^2 - 0.17B^2 - 0.34C^2$$

式中: *Y* 为预测响应值; *A*、*B*、*C* 分别为进口温度、进样流量、保护剂与菌泥比例的编码值. 该二次回归方程方差分析结果见表 3.

根据回归方程, 得到响应面图, 如图 4—图 6 所示.

表 3 CCD 实验方差分析

Tab.3 Variance analysis of CCD experiments

来源	SS	DF	MS	F	P	显著性
模型	3.32	9	0.55	5.82	0.005 5	
A	0.89	1	0.89	13.97	0.003 9	*
B	0.031	1	0.31	4.88	0.041 7	*
C	0.26	1	0.26	4.11	0.070 2	
AB	0.000 31	1	0.000 31	0.004 9	0.945 5	
AC	0.001 5	1	0.001 5	0.024	0.880 6	
BC	0.015	1	0.015	0.24	0.634 4	
A <sup>2</sup>	0.67	1	0.67	10.59	0.008 7	**
B <sup>2</sup>	0.41	1	0.41	6.42	0.029 7	*
C <sup>2</sup>	1.06	1	1.06	16.68	0.002 2	**
残差	0.64	10	0.054			
失拟项	0.055	5	0.11	6.81	0.027 6	
纯误差	0.082	5	0.016			
合计	3.97	19				

注：“\*”表示在  $\alpha=0.05$  水平上显著；“\*\*”表示在  $\alpha=0.01$  水平上显著

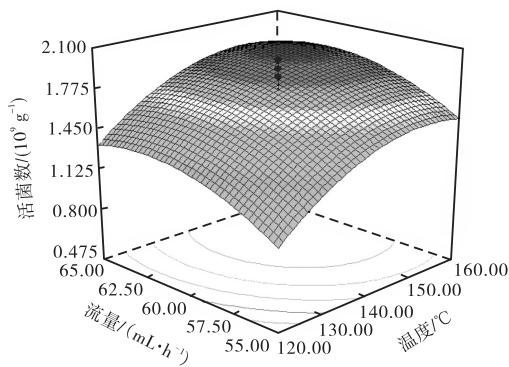


图 4 进口温度、进样流量对活菌数的影响 (C=0)

Fig.4 Influence of inlet temperature and injective flow on the living bacteria (C=0)

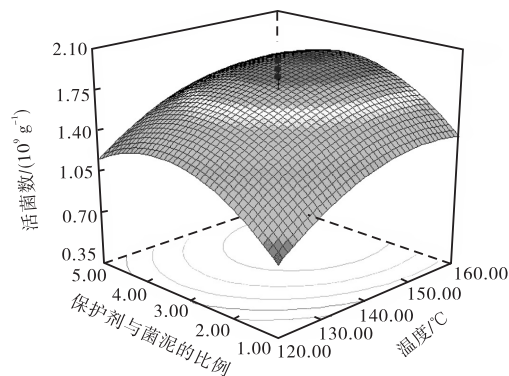


图 5 进口温度、保护剂与菌泥比例对活菌数的影响 (C=0)

Fig.5 Influence of inlet temperature and proportion of protectants and cells on the living bacteria (C=0)

由响应面图和相应等高线图可知：在实验水平范围内，随着进口温度、进样流量、保护剂与菌泥比例的增大，MA2 发酵剂活菌数逐渐增加，但其浓度超出

一定量时，反而抑制发酵剂的活菌数，经软件优化分析后得到喷雾干燥最优条件为：进口温度 151.63 °C，进样流量 62.07 mL/h，保护剂与菌泥比例 3.38 : 1，预测优化后的活菌数将达到  $1.94 \times 10^9 \text{ g}^{-1}$ 。采用此优化条件，进行喷雾干燥，最后得到样品的活菌数为  $2.11 \times 10^9 \text{ g}^{-1}$ ，证明此预测的喷雾干燥条件可行。

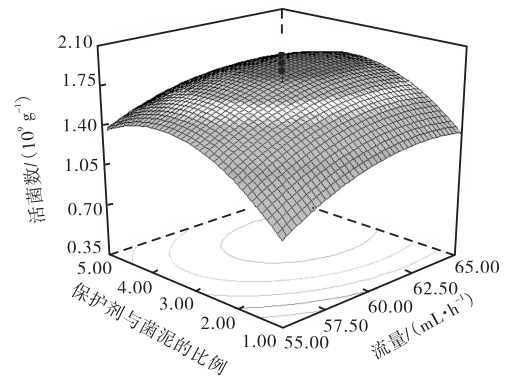


图 6 进样流量、保护剂与菌泥比例对活菌数的影响 (C=0)

Fig.6 Influence of injective flow and proportion of protectants and cells on the living bacteria (C=0)

### 2.5 干菌粉保藏期

将喷雾干燥发酵剂冷藏于 4 °C 冰箱，每 7 d 测定其活菌数和凝乳时间及胆固醇移除率，结果见表 4。

表 4 干菌粉发酵剂的保藏期

Tab.4 Preservation of starter power

保藏时间/d	7	14	21	28	180
凝乳时间/h	12	12.5	12.5	13	14
胆固醇移除率/%	40.6	40.0	38.9	35.8	32.0
活菌数/( $10^9 \text{ g}^{-1}$ )	2.11	2.01	1.85	1.73	1.02

由表 4 可知，喷干发酵剂具有较高的活菌数，并保留了凝乳、降胆固醇特性，保藏 28 d 后仍有较高活菌数和较好的功能特性，活菌数为  $1.73 \times 10^9 \text{ g}^{-1}$ ，菌种存放半年后活菌数仍然能达到  $1.02 \times 10^9 \text{ g}^{-1}$ ，凝乳时间 14 h。由于该菌的显著生物学特性具有降低胆固醇的作用<sup>[9]</sup>，因此本实验在发酵剂保存过程中，同时检测胆固醇移除效果。从结果可以看出胆固醇移除率为 32.0%，凝乳时间 14 h，菌粉仍具有较高活菌数。

### 3 结论

对 MA2 喷雾干燥保护剂和喷雾条件进行优化。保护剂的优化采用 3 因素 3 水平的正交实验，3 种添加物的保护效果依次为：海藻糖 > 谷氨酸钠 > 乳糖，最优组合是谷氨酸钠 20 g/L，海藻糖 50 g/L，乳糖

(下转第 35 页)