

嗜酸乳杆菌应用于保健产品的研究进展

作者：董卉

上海交通大学研究生学号：5050809392

摘要

嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) 属于乳杆菌属, 革兰氏阳性杆菌, 主要生存于小肠中, 能够分泌抗生素类物质, 例如嗜酸乳菌素(acidolin)、嗜酸杆菌素(acidophilin)、乳酸菌素(1aetocidon)等, 可对肠道致病菌产生拮抗作用, 调整肠道内的菌群平衡, 具有较高的营养保健作用, 是益生菌类保健产品中常见的菌种之一。本文对可应用于保健产品之中的嗜酸乳杆菌的保健性能、生产特性进行了介绍, 同时介绍了近年来, 对于提高产品中嗜酸乳杆菌稳定性的研究进展。

关键词: 嗜酸乳杆菌, 保健性能, 生产特性, 稳定性

ABSTRACT

Lactobacillus acidophilus, a kind of Gram-positive bacteria, belongs to the *Lactobacillus* strain. One of the most important bacteria strains of the health products, L.A, mainly existing in the small intestine, could secrete antibiotic substances, such as acidolin, acidophilin, 1aetocidon and so on, which could antagonize pathogenic bacteria and adjust microflora balance in the intestine. Therefore, *L. acidophilus* has significant health care function. This article represents the health-care function and productive characteristics of L.A, and the development of improvement of L.A stability in production in recent years.

Key words: *Lactobacillus acidophilus*, health-care function, productive characteristics, stability

1. 引言

近年来, 随着生活节奏的加快、生活水平的提高, 包括益生菌、维生素、矿物质、天然中草药、氨基酸葡萄糖与补药等在内的具有保健作用的功能性食品, 受到了人们越来越多的关注。在所有的功能性健康产品中, 肠道健康产品以其“已病治病, 未病防病, 无病保健”的独特优点, 在市场上呈现出良好的开发潜力。寄生于人体中的微生物, 数量巨大、种类繁多。作为人体的四大菌库(肠道、口腔、皮肤、阴道)之一, 肠道中包含的细菌总数高达 10^{14} cfu, 是人体组织细菌数量的10-20倍。微生物与宿主、微生物与微生物之间相互促进、相互制约的关系, 可直接影响人体健康: Hooper等人研究表明, 微观生态平衡与人的免疫力、营养吸收、血管形成等密切相关, 对宿主的身体健康有较大的影响^[1]。

肠道健康产品主要有三大类: 益生菌类产品、益生元类产品于合生素类产品。其中, 在人们对市场上一些保健类产品持怀疑态度的情况下, 益生菌类产品以其独特的优势——见效快的近期效果(例如治疗急慢性腹泻、便秘^[2], 改善胃功能^[3]等), 显著的远期效果(例如降低人体内的毒素水平^[4], 提高人体免疫力^[5], 帮助肝细胞生长以起到对肝脏的保护作用), 赢得了人们的信赖, 从而占据了市场优势。英国Leatherhead Food International Company公司

的相关报告认为，益生菌乳制品将主导欧洲和澳大利亚保健食品市场，在绝大多数国家，其市场将会越来越大^[6]。

益生元是指能够选择性地刺激肠道内一种或几种有益菌的增殖与活性，从而发挥有益作用，提高宿主健康水平的物质。它们并不为宿主所消化，即经口服摄入后，益生元通过食管、胃和小肠，到达大肠后才被定居其中的有益菌吸收利用，促进有益菌的增殖并抑制有害菌的生长，维持肠道内微生态的平衡。目前常用的益生元包括低聚果糖（Fructooligosaccharide，FOS）、低聚半乳糖（Galactooligosaccharide，GOS）、菊粉（inulin）和聚葡萄糖（polydextrose）等多种低聚糖与膳食纤维。值得注意的是，虽然膳食纤维在小肠中普遍能够不被消化吸收，但是并非所有的膳食纤维都属于益生元，这是因为益生元必须能并只能被有益菌分解利用。益生元应具备以下三个条件：

- （1）在胃与肠道中不能水解，对胃酸和哺乳动物酶具有耐受力。
- （2）可以选择性地被肠道中的微生物代谢利用。
- （3）能够刺激肠道中有益菌的增殖，并提高其活力。

合生素又称合生元，由Gibson（1995）首先提出，是指益生菌与益生元的混合制剂^[7]。作为新一代的微生态调节剂，此类产品优势明显，具有益生菌与益生元的双重作用，主要体现在：可发挥益生菌的生理活性，同时能沟通过选择性地提高益生菌的数量来延长益生菌的效用时间；刺激肠道内外源性及内源性细菌的定植和生长；改善肠道内菌群结构，增加有益菌的代谢；吸附肠道病原菌，对动物起保健作用；诱导肠腔内系统性免疫，改善宿主体质^[8]。由于合生素的使用效果相当于或优于抗生素，而其成本低于抗生素等抗菌药物，并且不存在药物残留的问题，是今后肠道健康产品发展的潜力方向，因此益生菌-益生元在健康促进方面的作用是当前对肠道健康产品的研究中的热点。

2. 嗜酸乳杆菌的保健性能

2.1 益生菌类保健产品

按照FAO/WHO（Food and Agriculture Organization/World Health Organization）的定义，益生菌是指服用一定数量后对宿主有益的活的微生物。益生菌包括嗜酸乳杆菌（*Lactobacillus acidophilus*）、植物乳杆菌（*Lactobacillus plantarum*）、鼠李糖乳杆菌（*Lactobacillus rhamnosus*）、长双歧杆菌（*Bifidobacterium longum*）、短双歧杆菌（*Bifidobacterium breve*）、婴儿双歧杆菌（*Bifidobacterium infantis*）与嗜热链球菌（*Streptococcus thermophilus*）等多种菌株，每种菌株都具有其独特的免疫调节功能^[9]。此外，还有一些酵母菌与酶亦可归入益生菌的范畴。

从广义上来说，益生菌经由口或其他粘膜途径进入宿主体内之后，其中的活菌、死菌及益生菌的代谢产物，可以调节粘膜表面上微生物或者酶的平衡，以及提高系统特异性或非特异性的免疫活性，从而缓解由微观生态失调而引起的肠道功能紊乱，改善人体的健康状态。

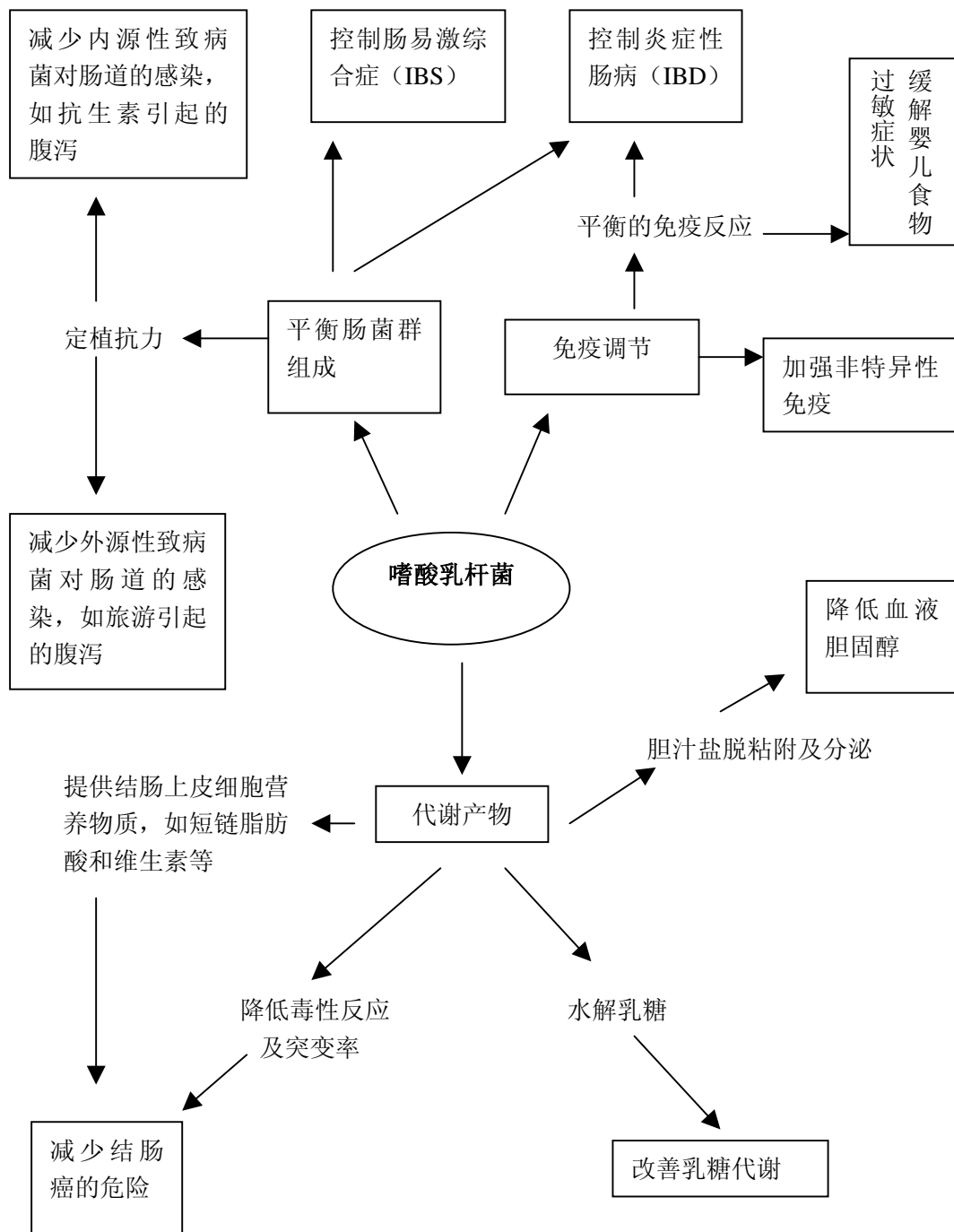


图 1 嗜酸乳杆菌的保健性能

2.2 嗜酸乳杆菌的保健性能

嗜酸乳杆菌属于乳杆菌属，革兰氏阳性杆菌，杆菌的末端呈现圆形。实验乳杆菌主要生存于小肠中，能够分泌抗生素类物质，例如嗜酸乳菌素(acidolin)、嗜酸杆菌素(acidophilin)、乳酸菌素(1aetocidon)等，可对肠道致病菌产生拮抗作用，调整肠道内的菌群平衡，具有较高的营养保健作用，是益生菌类保健产品中常见的主要菌种之一。嗜酸乳杆菌的具体保健性能如图 1 所示。

3. 嗜酸乳杆菌的生产特性

需要注意的是，并非所有的益生菌菌种均可应用于保健产品的生产。可用于生产中的益生菌菌种，必须符合一定的条件，例如安全性，良好的功能性等。其中研究表明，在嗜酸乳杆菌中已鉴定出多种菌种具有良好的生产特性，如表 1 所示。

表 1 嗜酸乳杆菌的生产特性

评价方面	特性
安全性	(1) 来源于人体 (2) 分离自健康人胃肠道 (3) 具有长期的非致病菌历史 (4) 与感染性心内膜炎症或胃肠功能紊乱疾病无关 (5) 不具有脱胆汁盐性能 (6) 不携带有任何可转移的耐药基因
功能性	(1) 耐酸性能 (2) 耐胆汁盐性能 (3) 与上皮细胞的粘附和胃肠道中的定植 (4) 免疫激活性能而没有炎症影响 (5) 对致病菌的拮抗作用 (6) 抗突变和抗肿瘤性能
技术性能	(1) 良好的发酵性能，主要指发酵过程中具有良好的生长、代谢性能 (2) 噬菌体抗性 (3) 加工过程中具有较高的存活率 (4) 在产品和贮藏过程中具有良好的稳定性

4. 嗜酸乳杆菌的稳定性

4.1 益生菌的稳定性因素

近年来人们对健康的关注与日俱增，益生菌类保健产品的种类、数量亦越来越多，因此，益生菌类保健产品在市场上制胜的关键在于令消费者迅速地感受到功效。研究证实，益生菌的生理活性与其活菌数量有着密切的关系。一般来说，所含益生菌的活菌数量越高，产品见效越快、功效越强，但是由于益生菌受自身的生长特性及周围环境因素的影响，易导致产品生产、销售和消费过程中活菌数量的下降。许多国家都有相关的益生菌产品的活菌数标准，如国际乳联(International Dairy Federation)规定产品中双歧杆菌的活菌数要大于 10^6 cfu/mL，日本发酵乳制品和乳酸菌饮料协会(The Fermented Milks and Lactic Acid Bacteria Beverages Association)规定，新鲜乳制品中的活菌数必须至少达到 10^7 cfu/mL、益生菌含量至少应为 10^6 cfu/mL，或者每天摄入的活菌数至少为 10^8 cfu^[10]。2001 年我国卫生部规定，活菌类益生菌保健食品在其保存期内活菌数目不得少于 10^6 cfu/mL (g) (真菌类和益生菌类保健食品评审规定，卫法监发(2001) 84 号)。这也意味着，益生菌必须保持能够在加工、储存和吸收的过程中继续存活的能力。因此，益生菌类产品在加工与储存过程中的活菌稳定性问题，越来越引起技术研发人员、企业和消费者的关注。

益生菌的稳定性问题可以从菌种筛选、发酵条件、离心保护剂和冻干保护剂等几个方面考虑。市场上大多数产品中的益生菌菌株主要指乳杆菌和双歧杆菌，来源于人体肠道中的正

常菌群，通常按照以下步骤进行筛选：

(1) 从粪便中分离出生生菌；

(2) 经生理生化结合分子生物学技术（例如基因组 DNA 提取技术、16s rDNA PCR 扩增技术、测序与序列分析技术等）来鉴定益生茵菌株；

(3) 所筛选出的益生茵除了具有良好的肠上皮细胞粘附性能，耐酸性能，活茵或代谢产物对肠道致病菌的拮抗作用，还必须满足一些技术性能，如良好的发酵性能，传代稳定性，并具有稳定的活性和生理功能^[11]。

4.2 嗜酸乳杆菌菌株选取

研究茵种的选择及获取过程一般为：直接从健康婴儿粪便中获得若干株乳杆菌，根据益生茵功能评价技术筛选获得一优良茵株，经表型和基因型鉴定为嗜酸乳杆菌；取茵龄控制在稳定期，生长良好、新鲜的茵种斜面，制备冷冻管，冷冻管制备后置于 4℃ 冰箱内，干燥、避光保藏。若冷冻管内的茵种存活率低或冷冻管保存超过 5-10 年，则需重新分离、筛选、复壮，制备新的冷冻管。当冷冻管进行恢复培养时，通过平板划线来分离、纯化茵种，斜面、平板置于 36±1℃ 恒温箱中培养 48-72 小时。分离纯化后，经鉴定合格的生产用茵种至产品传代不应超过 5 代。生产用茵种可用斜面或甘油管作短期保存：斜面置于 4℃ 下保存，保存期限一般不超过 3 个月；甘油管置于 -18℃ 冰箱内保存，保存期限一般不超过 1 年。

4.3 嗜酸乳杆菌的发酵条件

发酵密度的高低是影响嗜酸乳杆菌在后期加工、储藏过程中活性与稳定性的重要因素，因此，优化包括培养液的成分、pH、发酵时间与温度等因素在内的发酵条件，是提高嗜酸乳杆菌活茵数的基础。查阅文献，总结研究及生产中使用的发酵条件如表 2 所示。其中，MRS 培养基（配方如表 3 所示，需调节 pH6.2-6.4，用高压锅在 121℃ 灭菌 15min）是最常使用的嗜酸乳杆菌的发酵培养基，我们可在 MRS 培养基的基础上，分别采用单因素试验法优化培养基的成分，正交试验设计法优化各成分的用量，以缩短培养时间并提高活细胞密度^[12]。有研究表明，培养基在灭菌消毒的过程中，含有的葡萄糖非常易于与“磷元素”发生反应，形成有毒性的棕黑色物质，从而营养成分被大量破坏，发酵产酸、产茵变缓慢。而双糖对热的稳定性好于单糖，可应用于嗜酸乳杆菌的生产。

4.4 嗜酸乳杆菌的浓缩富集

用于浓缩富集茵体的方法主要有超滤分离法^[13]与离心分离法。由于超滤法对设备要求较高，而且条件不易控制，容易使茵种被污染，目前人们较常使用高速离心法，根据物质的沉降系数、密度、质量的不同，应用强大的离心力使物质得到分离、浓缩、纯化。虽然离心法具有操作简便、不易污染的优点，但是由于离心后，上清液中残留一部分茵体，导致茵体数量上的损失。更重要的是，在离心的过程中，离心力的剪切作用会对茵体细胞造成一定的机械损伤，甚至会导致茵体的死亡^[14]。因此，离心转速、离心时间和离心温度等离心条件，对茵体的离心残存率具有直接的影响。

表 2 常用发酵条件

条件	内容
碳源	葡萄糖、蔗糖、乳糖、益生元（作为辅助碳源）
氮源	蛋白胨、大豆粉、肉膏、玉米浆，以及其他有机或无机含氮化合物
营养源	适当的豆芽汁、番茄汁、胡萝卜汁、麦芽汁、蔬菜汁与无机盐
pH	起始 pH 在 5.0-9.0 之间
发酵温度	35-38°C
发酵时间	发酵终点以 pH 在 3.0-5.0 间为计

表 3 MRS 培养基配方表

组成成分	含量 (每 1000mL 溶液中)
蛋白胨	10.0g
牛肉浸膏	10.0g
酵母膏	5.0g
葡萄糖	20.0g
吐温 8 0	1.0mL
磷酸氢二钾	2.0g
醋酸钠	5.0g
柠檬酸氢二铵	2.0g
七水合硫酸镁	0.25g
四水合硫酸锰	0.05g
琼脂粉	14.0g

4.4 嗜酸乳杆菌的干燥稳定性

冷冻干燥或喷雾干燥是生产嗜酸乳杆菌干菌粉的最后一步。由于冷冻干燥的整个过程都在低温下进行，相比于喷雾干燥，冻干的菌体更易存活，所以产品生产中常采用冷冻干燥法，包括三个步骤：预冻结、升华干燥（或称第一干燥阶段）和解析干燥（或称第二干燥阶段）。冷冻干燥法具有显著的优势：低温下蛋白质、微生物等热敏性物质不会变性或失活，微生物的生长和酶的作用也受到抑制；干燥后制品的体积和形状变化小，有利于保持其原有结构，并且干燥后的制品疏松多孔，呈海绵状，复水性好；干燥在真空条件下进行，可保护易氧化物质，保存期长^[15]。然而，冷冻干燥过程仍将不可避免地对生物分子和微生物造成损伤，主要包括冷冻损伤和干燥损失。冷冻损伤发生在预冻结过程中。环境温度的降低使得细胞内外的自由水形成冰晶，在这过程中产生的机械力可以刺穿或破坏细胞膜，引起细胞内物质的外泄，造成细胞死亡。同时，冷冻过程会造成细胞电解质浓度的增加与pH值的改变，当离子渗透的屏障被破坏后，渗透压发生改变，可引起蛋白质的变性，最终导致细胞死亡。在干燥过程中，因结合水的失去，细胞膜的结构、性质和功能会产生变化，从而影响到微生物的生命活动。除去大部分结合水后，磷脂双层膜相互靠近时可发生膜融合现象，膜的相变温度也将升高，易在室温下从液晶相转变为凝胶相或六角Ⅱ相，而在某些温度下相邻的磷脂不完全相变时，会产生侧向相分离现象。膜融合、相变、侧向相分离等现象均会导致膜完整性的破坏，造成细胞的损伤甚至死亡^[16]。

目前，为了提高嗜酸乳杆菌的冻干残存率，添加冷冻干燥保护剂是实际生产中一种经济

实用的方法。冷冻干燥保护剂可以改变样品冻干时的物理、化学环境，减轻或防止冷冻干燥或复水对菌体的损害，尽可能保持菌体原有的各种生理生化特性和生物活性^[17]。

目前，对益生菌保护剂的研究相对较少。C.Desmond等人（2002）研究了阿拉伯胶对鼠李糖乳杆菌NFBC338的保护作用，证实阿拉伯胶被用作鼠李糖乳杆菌NFBC338的保护剂后，在鼠李糖乳杆菌的喷雾干燥、储存过程以及宿主的吸收过程中，均具有良好的应用性^[18]。在Maria Saarela等人（2006）的研究中，不同的纤维载体，如小麦糊精、聚葡萄糖、菊粉与燕麦粉等，对鼠李糖乳杆菌具有不同的影响，其中，小麦糊精与聚葡萄糖被证明是鼠李糖乳杆菌的潜在保护剂，可提高鼠李糖乳杆菌在冷冻干燥与储存过程中的活性和稳定性^[19]。Jen-Hong Tsen等人（2002）的研究表明，采用卡拉胶包埋来细胞固定化冻干后的嗜酸乳杆菌，可以提高细胞在宿主肠道中对胃酸和胆盐的耐受性，使得肠道中细胞的活性与稳定性得到加强^[20]。在Ki-Yong Lee等人（1999）的研究中，海藻酸钙被用作长双歧杆菌在胃酸溶液和胆盐溶液中的保护载体，结果表明随着海藻酸钙浓度的提高，长双歧杆菌的死亡率显著降低^[21]。Lian等人（2002）研究了明胶、阿拉伯胶和可溶性淀粉等载体的添加，对四种双歧杆菌在喷雾干燥中的作用，作者得出结论，四种菌株的存活率随着添加载体的不同而产生不同程度的提高^[22]。上海交大昂立生物医药研究院科研人员通过多年来对嗜酸乳杆菌稳定性的研究发现，在嗜酸乳杆菌发酵与冻干的过程中，一些胶体在保护细胞活性的方面具有潜在的生产应用性：不仅能可以提高嗜酸乳杆菌在冻干过程中的存活率，还可以影响其菌体在保藏期间的稳定性，在商业开发方面显示出较佳的潜力。

5. 参考文献

- [1] Hooper, L.V. et al. Molecular Analysis of Commensal Host-Microbial Relationships in the Intestine[J]. Science, 2001; 291: 881 – 884.
- [2] Arunachalam K D. PhD Role of Bifidobacteria in Nutrition, Medicine and Technology.[J] Nutrition Research, 1999, 19 (10):1559-1597.
- [3] 丁怀谦. 益生菌与胃肠保健功效[J]. 食品工业(台湾), 2000, 32(10):1-7.
- [4] SANDERS M E. Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health[J]. J Nutr, 2000, 130:384-390.
- [5] Perdigón G, Locascio M, Medici M et al. Interaction of bifidobacteria with the gut and their influence in the immune function[J]. Biocell, 2003, 27(1): 1-9.
- [6] Leatherhead Food International Company. Functional Food Markets, Innovation and Prospects[R]. England: LFIC, 2000.
- [7] 王玉燕, 牛钟相, 朱瑞良. 益生元的作用机理及应用研究[J]. 中国饲料, 2001, 11:15-17.
- [8] 苗晓微, 李娜, 吴健, 张敏. 合生素的研究进展[J]. 饲料工业, 2005, 26(14):6-9.
- [9] G. Kalantzopoulos. Fermented products with probiotic qualities[J]. Anaerobe, 1997, 3:185-190.
- [10] Robinson, R.K. Survival of Lactobacillus acidophilus in fermented products[J]. Suid Afrikaanse Tydskrif Vir Suiwelkunde, 1987, 19(1): 25-10727.
- [11] Mattila-Sandholm T., et al. Technological challenges for future probiotic foods[J]. International Dairy Journal 2002, 12:173-182.
- [12] 杜鹏, 李良, 霍贵成. 长双歧杆菌增菌培养基的优化[J]. 研究与探讨, 2004, 25:78-80.
- [13] 乔发东. 超滤技术制备浓缩发酵剂的研究[J]. 中国畜产与食品, 1998(3):112.
- [14] 杜鹏, 刘芳, 霍贵成. 离心条件对双歧杆菌存活力的影响[N]. 山东大学学报(理学版), 2008, 43(7):40-44.
- [15] 田洪涛, 王占武, 张柏林, 等. 双歧杆菌微生态制剂保藏技术研究现状[J]. 食品与发酵工

- 业,1999,26(3):74-77.
- [16] Castro HP Teixelra. Evidence of membrane damage in *Lactobacillus bulgaricus* following freeze drying[J]. *J Applied microbiology*, 1997,82:87-94.
- [17] Crowe J. The trehdose myth revisited: Introduction to a symposium on stabilization of cells on the dry state[J]. *Cryobiology*,2001,43(2):89-105.
- [18]
- [19]
- [20] C.Desmond, R.P. Ross, E.O'Callaghan, G.Fitzgerald and C.Stanton. Improved survival of *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spray-dried powders containing gum acacia[J]. *J Applied microbiology*,2002,93:1003-1011.
- [21] Maria Saarela, Ilkka Virkajärvi, Liisa Nohynek, Anu Vaari, Jaana Mättö. Fibres as carriers for *Lactobacillus rhamnosus* during freeze-drying and storage in apple juice and chocolate-coated breakfast cereals[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2006,112:171-178.
- [22] Jen-Horng Tsen, Hsiu-Hua Chen, and V. An-Erl King. Survival of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* immobilized in k-carrageenan gel[J]. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 2002,48:237-241.
- [23] Ki-Yong Lee and Tae-Ryeon Heo. Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution[J]. *Applied and environmental microbiology*,2000,66(2):869-873.
- [24] Lian, W.C., Hsiao, H.C. and Chou, C.C. Survival of *Bifidobacterium* after spray-drying[J]. *International Journal of Food Microbiology*,2002,74:79-86.