

乳酸菌发酵对超微猪骨粉营养及理化特性的影响

唐 勇¹, 李洪军¹, 眭道惠²

(11 西南农业大学; 21 四川夸克科技发展有限公司)

摘 要: 利用人体肠道有益菌发酵超微粉碎猪骨粉, 通过氨基酸分析仪测定及电镜扫描, 研究发酵过程超微粉碎骨粉中结合钙的游离、蛋白质的降解和分析骨粉的显微结构变化。结果表明, 骨粉的直径大小与发酵产生游离钙离子量和氨基酸的生成量存在显著相关性, 骨粉结合钙最大游离转化率为 3619%, 骨粉蛋白质最大水解率 63%, 从而为猪骨的综合利用与开发生物态补钙制品的研制提供了理论依据。

关键词: 猪骨粉; 乳酸菌; 超微粉碎; 游离钙; 氨基酸

中图分类号: TS26111⁺ 1

文献标识码: A

文章编号: 100226819(2002)0220118205

钙是在人体内含量最多的元素之一, 排序为第 5 位, 也是身体最多的一种阳离子。其对血液凝固、对神经肌肉的兴奋性、细胞的粘着、神经冲动的传递、细胞膜功能的维持、酶反应的激活, 以及激素的分泌等, 都有决定性的影响。猪骨中钙含量丰富(本实验含水率 < 6% 的干燥骨粉含钙量为 4 150 mg/100 g, 而牛奶为 120 mg/100 mL^[1]), 但主要以羟磷灰石 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})$ 的形式存在^[2], 直接食用补钙利用率不高; 在国外, 很早就使用超微粉碎的动物骨粉作为人体的补钙食物, 但结合态的钙制品要消耗胃中一定量的胃酸, 从而引起胃不适感。同时医学界认为好的钙吸收和利用与摄入钙形态, 以及适宜的钙磷比和氨基酸的存在有密切关系^[2]。

利用肠道有益菌——乳酸菌^[3]发酵天然富含蛋白质^[4](1917 g/100 g)和适宜钙磷比的超微猪骨粉, 不仅由于乳酸菌代谢产生的酸使结合态的钙转变成了游离的钙离子, 而且还水解了骨蛋白质提供了辅助钙吸收的氨基酸和磷。同时乳酸菌是肠道有益菌, 若将猪骨经发酵后加工成含有菌体的补钙制品, 可大大地改善肠道的消化吸收功能。

由于骨粉中的钙是沉积在一种纤维状有机基质中, 这种基质是由胶原纤维及少量的粘多糖凝胶组成^[5], 因而乳酸菌对骨粉的作用不仅与所选用的菌株、发酵条件(温度、培养基组分等)有关, 而且还与发酵体系的流动性、骨粉的大小、代谢产生的酸与羟磷灰石钙接触反应的效果等因素有关。本实验采用我们筛选出的适宜乳酸菌菌株用于发酵超微的骨粉, 研究增大骨粉接触比表面积(如 1# 细度的骨粉

直径可达 5 μm , 乳酸菌体 $0.15 \times 2 - 4 \mu\text{m}$ ^[6]), 是否有利于骨粉中的营养物质在发酵过程中的转变(钙游离, 蛋白质的水解), 并测定结合态骨钙的游离化及氨基酸的形成, 同时, 经电镜扫描观察发酵后骨粉颗粒的显微变化, 为开发生物态补钙制剂提供了实验数据和理论依据。

1 实验材料及仪器

1.1 实验材料

乳酸菌 LB 1 (中国科学院微生物菌种保藏中心)

乳酸菌 LB 2 (第三军医大学动物所)

1# ($d < 500 \mu\text{m}$), 2# ($d < 300 \mu\text{m}$), 3# ($d < 170 \mu\text{m}$) 超微猪骨粉(四川夸克科技有限公司提供)

1.2 实验仪器

AA S9542C 型原子吸收分光光度计(北京苏晖公司); HW 28B 型超级微量恒温器(上海浦江分析仪器厂); THZ282 富华恒温回转摇床(江苏); SW 2XJ2 1F 超净工作台(苏净安泰公司); B D RAD “SmartSpectr23000” 分光光度计(德国); BECKMAN 离心机(J22IM, J26M)(美国); BECKMAN 氨基酸分析仪(美国)。

2 实验设计

2.1 超微猪骨粉的制备

市售鲜猪骨——加热熬煮去脂——高压蒸煮(0.11 MPa, 40 min)——烘干至含水率 < 6%——超微粉碎, 分别获得 3 种直径的骨粉颗粒(1#, 2#, 3#), 用于研究骨粉的大小与乳酸菌发酵骨粉理化特性的变化关系。

2.2 乳酸菌发酵猪骨粉

使用无有机氮培养基研究骨粉发酵, 消除外源物质对骨粉中钙和蛋白质变化的影响; 超微粉碎骨

收稿日期: 2001211227 修订日期: 2002201204

基金项目: 重庆市科委攻关项目部分内容(2000201215)

作者简介: 唐勇, 硕士生, 四川成都人, 重庆市西南农业大学食品科学学院, 400716

粉混合培养基高温灭菌(121 °C, 20 min), 然后于 44 °C 接种乳酸菌, 间歇振荡培养发酵。

21211 发酵骨粉的游离钙测定

发酵体系中添加不同超微粉碎粒度的骨粉, 接种发酵培养, 移取 2 mL 发酵物离心(离心力 3 000 g, 5 min)除去大颗粒沉淀, 取上清液再离心(离心力 5 000 g, 15 min)除去菌体^[7], 然后吸取上清液 50 mL 硝化, 钙原子吸收测定(AOAC)。

21212 发酵骨粉的氨基酸测定

发酵体系中添加不同粒度的骨粉 10%, 接种菌株发酵(见表 1), 在培养 20 h、40 h 测定氨基酸的量, 研究骨粉大小及菌株复配与氨基酸形成的关系。

表 1 不同骨粉添加及菌株接种实验组设计

Table 1 The design of comparing factors concerning bone powder diameter and strains of inoculated lactobacillus

组别编号	骨粉粒度/μm	乳酸菌菌种	发酵时间/h
Blank	300	未接种	灭菌静置 40 min
300C20	300	LB1, LB2	20
300C40	300	LB1, LB2	40
500C40	500	LB1, LB2	40
300S40	500	LB1	40

氨基酸测定方法 发酵液离心(5 000 g, 15 min), 吸取 0.16 mL 清液加入 0.14 mL 10% 磺基水杨酸混匀, 使蛋白质沉淀, 高速离心(15 000 g, 25 min)。取上清液进样分析。

213 发酵骨粉的电镜扫描研究

将特定实验组中的骨粉干制进行电镜扫描, 放大倍数为 1 000~ 3 500 倍, 从其显微结构变化直观地分析乳酸菌发酵对骨粉显微结构的影响。

3 实验结果与分析

311 骨粉结合钙的游离

骨粉中钙通常是以羟磷灰石 $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)$ 的形式存在, 它是固态不溶的。接种乳酸菌可以产生一定量的有机酸(本实验中总酸度= 0.1004 mol/100 mL), 将其转化为游离的钙离子, 但是骨粉中的钙是与其他物质相互包裹在一起的, 如胶原纤维、粘多糖、蛋白质等, 同时微生物代谢的酸并非强酸而且有限, 骨粉钙的转化效果还可能与乳酸菌对骨粉的生理代谢(如蛋白酶代谢分解束缚钙的蛋白质)使 $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)$ 易于暴露出来再与酸作用有关。从图 1 可以清楚地发现骨粉颗粒越小(比表面积越大), 骨粉添加量越多, 发酵液单位体积中游离钙量越大; 使用 SPSS 统计软件分析实验结果, 对骨粉颗粒(1

#, 2#, 3#)和初始添加量(10%, 20%)两因素影响游离钙量变化进行方差分析, 由 R²Squared 分析发现这两种因素模型对因变量的变异贡献为 99.16%, Manova(多元方差分析)得骨粉颗粒的 $F = 1.45915$ ($F_{0.101, 2, 12} = 6193$)与骨粉添加量的 $F = 9.6714$ ($F_{0.101, 1, 12} = 9133$), 因此不仅说明了两种因素都对骨粉的发酵产生游离钙量影响显著, 而且前者的作用大于后者。所以要尽可能的转化骨中的结合钙, 就与骨粉的比表面积及乳酸菌与骨粉接触的几率有关。但单靠提高骨粉量并不能提高游离钙转化率, 实验结果如表 2。超微骨粉中钙含量为 41150 mg/100 g。

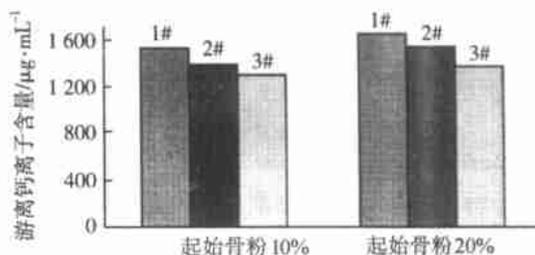


图 1 不同骨粉粒度对微生物发酵产生游离钙离子的影响

Fig 1 The influence of different diameters of bone powder and initial intake of bone powder on Ca^{2+} produced by fermentation

表 2 不同起始骨粉量及粒度发酵所得的游离钙

Table 2 The different results of Ca^{2+} produced from different initial intakes and diameters of bone powder

粒度	骨粉量/%	起始骨粉中钙总量 $\bar{m}g \cdot (100 mL)^{-1}$	发酵液体中钙含量 $\bar{m}g \cdot (100 mL)^{-1}$	钙离子转化率/%
1#	10	415	15313	3619
1#	20	830	16510	1919
2#	10	415	13813	3313
2#	20	830	15410	1816
3#	10	415	13015	3114
3#	20	830	13712	1615

312 发酵过程中骨蛋白质的分解与氨基酸的形成

31211 骨粉中蛋白质的变化

利用紫外光测定蛋白质法^[8]监测溶液中蛋白质的变化, 结果见图 2。高压蒸煮可以使骨粉中的蛋白质溶解在培养液中, 经过接种发酵, 随着微生物生长代谢, 其蛋白酶降解了溶液中的可溶性蛋白质。同时也可发现生长后期(本实验菌株的对数生长期为 44 h, 17 h)蛋白质的降解更快, 可以推测这段时期是乳酸菌产生胞外蛋白酶的高峰期。

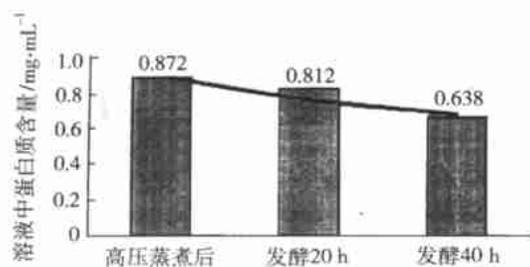


图 2 不同发酵段蛋白质的变化

Fig 2 The descending of protein during the fermentation

31212 氨基酸的变化

通过氨基酸分析仪测定溶液中游离氨基酸的变化, 实验结果见表 3。

表 3 不同实验组发酵所得的氨基酸

Table 3 The comparison of amino acid produced in the fermentation by different groups Lg mL⁻¹

AA 种类	Blank	300C20	300C40	500C40	300S40
磷酸丝氨酸	161735	131837	131736	141315	141617
牛磺酸	21876	151286	151143	141893	141273
天门冬氨酸	111365	471496	4813	541071	35137
苏氨酸	715	71412	81375	81814	61751
丝氨酸	7134	71551	8131	81496	6191
谷氨酸	361705	8301832	8801662	9411271	9061479
脯氨酸	81063	181632	211103	221956	161371
甘氨酸	151506	151902	161516	171433	151229
丙氨酸	171059	361139	621628	611833	681099
缬氨酸	61268	21625	21735	21669	21528
半胱氨酸	21907	01953	11838	11442	21437
蛋氨酸	21673	0	0	0	0
异亮氨酸	31998	0	0	41348	51075
亮氨酸	91041	41528	161516	171587	131024
酪氨酸	91975	0	0	0	0
苯丙氨酸	61174	71609	41583	41665	31119
γ-氨基丁酸	3015	131683	81621	81556	111314
鸟氨酸	91384	201897	221143	221113	241066
赖氨酸	91766	51696	51738	51949	51525
组氨酸	31855	131575	181522	291656	161155
精氨酸	41371	0	0	0	0
总和	2321061	10621653	11551469	12411067	11671342

使用 SPSS 统计分析, 经过乳酸菌发酵骨粉后, 溶液中氨基酸总量有显著性变化 (见表 4), 发酵体系中的氨基酸都是来源于骨粉中的蛋白质 (见 212), 对比 31211 中蛋白质的变化 (初始发酵液中含蛋白质 01872 mg·mL⁻¹, 发酵后最高氨基酸总量 11241 mg·mL⁻¹) 以及谷氨酸的大量生成 (骨中含有钙化沉积的 γ-羧基谷氨酸^[5] 及非胶原蛋白) 可以说明乳酸菌不仅降解了高压蒸煮从骨粉中离解出来的

蛋白质, 而且还直接作用于骨粉, 使其蛋白质脱离骨颗粒而水解, 这种现象证实了 311 中对乳酸菌发酵使羟磷灰石脱开蛋白质等结合物束缚的推测。

表 4 SPSS 统计分析实验组之间显著性变化

Table 4 The statistic analysis of amino acid amount produced by different groups

(I) 实验组	(J) 实验组	均方差 (I-J)	标准误差	p
Blank	300C20	- 8281246 3	31038 2	1000
	300C40	- 9231546 3	31038 2	1000
	500C40	- 100 91046 3	31038 2	1000
	300S40	- 9291046 3	31038 2	1000
300C20	Blank	8281246 3	31038 2	1000
	300C40	- 951300 0	31038 2	1000
	500C40	- 1801800 0	31038 2	1000
	300S40	- 1001800 0	31038 2	1000
300C40	Blank	9231546 3	31038 2	1000
	300C20	951300 0	31038 2	1000
	500C40	- 851500 0	31038 2	1000
	300S40	- 51500 0	31038 2	1100
500C40	Blank	100 91046 3	31038 2	1000
	300C20	1801800 0	31038 2	1000
	300C40	851500 0	31038 2	1000
	300S40	801000 0	31038 2	1000
300S40	Blank	9291046 3	31038 2	1000
	300C20	1001800 0	31038 2	1000
	300C40	51500 0	31038 2	1100
	500C40	- 801000 0	31038 2	1000

P 为假设样本均数相同, $p > 0105$ 承认假设, 两组之间无显著性变化; $p < 0105$, 则有显著性变化

从统计分析中可以发现, 300C40 与 300S40 方差比较 $p = 011$, 说明实验选用的乳酸菌对蛋白质的代谢无明显的协同增效作用; 而骨粉的粒度是氨基酸生成的显著影响因素 (500C40 与 300C40 的方差比较 $p = 0$)。这种结论不仅在宏观的物质代谢量之间比较可以证实, 而且在骨粉的显微结构变化分析中同样得到了印证。

实验还发现乳酸菌对精氨酸、酪氨酸和蛋氨酸需求量很大, 将蒸煮过程产生的这类氨基酸代谢殆尽, 这为今后调整发酵培养组分提供了科学的依据; 同时按照猪骨含水率 60%, 蛋白质含量 12%^[4] 为标准, 以初始超微粉碎骨粉添加量 10% 计算, 蛋白质水解为氨基酸的百分率最高为 63%, 而且产生了 6 种必需的氨基酸, 两种特殊氨基酸 (牛磺酸, 鸟氨酸), 提高了营养价值。

313 发酵骨粉的电镜扫描外观结构分析

将实验中分解蛋白质产生氨基酸量较高的发酵

骨粉干燥(90 , 100 m in) 进行电镜扫描。



1# 超微粉碎骨粉($\times 2\ 500$ 倍)
(The magnified exterior of
bone powder of 1# at the
multiple of 2 500)

2# 发酵后的骨粉($\times 2\ 500$ 倍)
(The magnified exterior of fermented
bone powder of 2# at the
multiple of 2 500)

1# 发酵后的骨粉($\times 2\ 500$ 倍)
(The magnified exterior fermented
bone powder of 1# at the
multiple of 2 500)

图 3 发酵骨粉的电镜扫描外观结构图

Fig 3 Microstructures of fermented hog bone powder by electron microscopy

从图 3 可发现, 发酵前后骨粉的表面变化明显, 这可能是乳酸菌代谢过程中将骨粉中的物质代谢溶解了。根据前面的钙和蛋白质的研究, 可以推测这种“侵蚀”是代谢的胞外酶降解了骨粉中的有机大分子和代谢产生的酸对结合钙的溶解, 使结合紧密的骨粉颗粒变化疏松, 甚至崩溃。同时发现 1# 直径颗粒的发酵骨粉表面“侵蚀”程度大于 2# 直径颗粒的发酵骨粉, 这是其比表面积大, 易于乳酸菌及代谢产物(如水解酶, 有机酸等)接触作用所致。

4 结 论

1) 本实验通过对超微粉碎猪骨粉接种乳酸菌发酵的研究, 初步探索了发酵产生的游离钙含量变化和蛋白质的水解变化规律。实验表明骨粉颗粒越小, 加入量越大, 发酵产生的游离钙越多, 最高为 165 mg/100 mL; 蛋白质的水解率也随骨粉颗粒的减小而升高(最高达 63%)。这种宏观的变化规律可以从骨粉的显微观察中得到解释, 颗粒直径越小(1#), 其表面侵蚀程度越明显, 说明骨粉中结合的物质转化溶解越充分。因而可以推测乳酸菌对骨粉的作用与骨粉的大小(即比表面积)有相关性, 这为乳酸菌发酵猪骨的工艺设计提供了参考依据。

2) 测定乳酸菌发酵猪骨粉产生的主要营养物质游离钙和氨基酸, 获得了开发猪骨发酵补钙产品的

科学依据; 钙的吸收和利用不仅与摄入绝对量有关, 还与其形态和营养素的协同作用有关。将骨粉中的钙离子化, 同发酵产生的氨基酸和对人体肠道有益的乳酸菌制成复合补钙食品, 将会在目前以人工合成钙为补钙方式的市场中增加生物态补钙新方式。

【参 考 文 献】

- [1] 吴德才. 常见食物一般营养成分[M]. 实用营养手册. 天津: 天津科学出版社, 1990. 744
- [2] 何志谦. 钙[M]. 人类营养学. 北京: 人民卫生出版社, 1999. 262~ 263
- [3] 张柏林. 乳酸菌及其产品促进人体健康的功能性成分[A]. 21 世纪中国食品与农业科学技术讨论会论文集[C], 1999. 45
- [4] 杨桂平. 论述骨味食品的开发[J]. 中国畜产与食品, 1997, (3): 137~ 138
- [5] 闻之梅. 现代营养学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998. 158
- [6] 凌代文. 乳杆菌属[M]. 乳酸菌分类鉴定及实验方法. 北京: 中国轻工业出版社, 1997. 6
- [7] Hames B D, Hooper N M, Houghton J D. Subcellular fractionation [M]. Instant Notes in BIOCHEMISTRY. 北京: 科学出版社, 1999. 15
- [8] A L 伦宁格(美). 吸收光谱[M]. 见: 生物化学. 北京: 科学出版社, 1981. 72

Effect of Fermentation by Lactobacillus on Nutrition and Physiochemical Property of Super-Microsmashing Hog-Bone Powder

Tang Yong¹, Li Hongjun¹, Sui Daohui²

(1. College of Food Science, Southwest Agricultural University, Chongqing 400716, China;

2. Sichuan Quark Science & Technology Development Co., Ltd., China))

Abstract: Super-microsmashing hog-bone powder is inoculated with some kinds of lactobacillus which do good to human's intestine function. Our main study is, detecting the calcium ions free from the bone powder and the hydrolysis of protein in the bone during the fermentation. The analysis is both based on the use of electron microscopy to scan the exterior change of the bone after fermentation and the data acquired from the detection using the Amino Acid Analyzing Equipment. The result is, that diameters of bone powder influence the production of Ca^{2+} and amino acid, the maximum Ca^{2+} ionization rate is 39.6% and the maximum hydrolysis rate of protein is 63% during fermentation by lactobacillus. All done in such research is helpful to develop a new type of food with adequate easily-digesting calcium and beneficial intestine bacillus to supply the calcium for the human.

Key words: hog-bone powder; lactobacillus; super-microsmashing; dissociative calcium; amino acid

本刊编辑部迁址通告——敬告读者、作者

《农业工程学报》编辑部办公地点已于2002年2月搬至农业部规划设计研究院大楼503房间。电话也有变动。新地址及联系方式如下:

编辑部地址: 北京朝阳区麦子店街41号 农业部规划设计研究院《农业工程学报》编辑部

邮 编: 100026

电 话: 010265910066 转 2503(兼传真), 010265910066 转 2023, 010265929451

电 邮: transcsae.agri.gov.cn, tcsae@sohu.com