

响应面法优化植物乳杆菌和凝结芽孢杆菌 冻干保护剂的研究

王世宽, 洪玉程, 袁先铃

(四川理工学院生物工程学院, 四川 自贡 643000)

摘 要:采用单因素实验和响应面实验设计联用的方法,筛选优化植物乳杆菌和凝结芽孢杆菌真空冷冻干燥的保护剂配方。单因素实验结果表明:脱脂奶粉、麦芽糖和谷氨酸钠 3 种保护剂效果较好,能够显著提高菌种对冷冻干燥环境的耐受能力。以细胞存活率为响应值,混合保护剂的最佳配方为脱脂奶粉 7.06%、麦芽糖 6.46% 和谷氨酸钠 6.70%,植物乳杆菌冷冻干燥存活率达到 92.95%,凝结芽孢杆菌的冷冻干燥存活率达到 94.1%。

关键词:植物乳杆菌;凝结芽孢杆菌;真空冷冻干燥;保护剂;响应面法

中图分类号:TS201.3

文献标志码:A

直投式发酵剂是一种不需活化和扩增便能直接应用于生产的新型发酵剂,具有活菌含量高、菌种保质期长等优点,也防止了菌种退化和污染,提高了发酵制品工业的劳动生产率和产品质量^[1]。由于菌种对热刺激的敏感性,直投式发酵剂工艺上多采用真空冷冻干燥法,冷冻和干燥过程中会使部分细胞损伤、死亡及某些蛋白酶分子钝化^[2]。为了提高菌种冻干后的存活率,冻干前加入保护剂减少冻干损伤是必要的,使其最大限度发挥保护功能,提高发酵菌剂的存活率^[3]。不同的保护剂各有优缺点,单一保护剂往往不能满足菌体抵抗外界恶劣环境的条件,而复配保护剂中各保护剂在冷冻干燥中则发挥各自的特性并能起到增效作用^[4]。

本研究以凝结芽孢杆菌和植物乳杆菌为试验菌株,采用单因素实验选择几种效果较好的冻干保护剂,再以植物乳杆菌为试验菌株,采用 Design-Expert 软件的中心组合设计方法设计响应面实验对几种保护剂的最佳水平和交互作用进行研究探讨^[5],然后对凝结芽孢杆菌进行冷冻干燥实验,从而筛选出适用于两菌种的优良复合保护剂。

1 材料与方 法

1.1 材料与设备

凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*),四川理工学院实验室保藏;植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*),购于四川微生物菌种中心;MRS 固体培养基;MRS 液体培养基;MJ-250 生化培养箱(上海美谱达仪器有限公司);LGJ-02 冷冻干燥机(上海久世环保科技有限公司);0.22 μm 滤膜(上海海凡滤材有限公司);TDL-5C 型离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.2 试验方法

1.2.1 工艺流程

菌种活化→富集培养→离心收集菌体→加保护剂→活菌计数→预冻→真空冷冻干燥→冻干粉→活菌计数

1.2.2 试验设计

通过单因素试验确定对细胞冻干存活率影响突出的几个因素;然后利用响应面设计方法中的 Box-Behnken Design 进行试验。

收稿日期:2013-05-16

基金项目:四川省教育厅项目(cc12x07);四川理工学院研究生创新基金项目(y2011022)

作者简介:王世宽(1964-),男,重庆江北人,教授,硕士,主要从事农产品贮藏与加工方面的研究,(E-mail)wksuse@suse.edu.cn

1.2.3 菌体制备

菌种以5%的接种量接种于MRS液体培养基中,30℃下培养18-22h,镜检无杂菌后,等量分装于无菌离心管中,4000 r/min,4℃离心15 min,弃上清液收集菌体。

1.2.4 保护剂的制备

预先将脱脂奶粉、麦芽糖、蔗糖、可溶性淀粉、硫酸锰、甘露醇、谷氨酸钠、L-半胱氨酸分别取一定量溶解于100 mL无菌水的试管中,其中,氨基酸类和糖类保护剂溶液用0.22 μm孔径的滤膜过滤除菌,其它保护剂溶液115℃,灭菌15 min,备用。

1.2.5 活菌计数

平板混菌计数法(参照GB/T4789.2-2003)。

1.2.6 真空冷冻干燥

在无菌操作台上,将离心所得菌泥样品用灭菌后的保护剂溶液冲洗到无菌培养皿中,放在-80℃条件下预冻2h,待样品完全冻结后迅速转移到冷冻干燥机中冷冻干燥24h,菌粉含水量3%-5%即可收获成品。

1.3 菌种存活率的计算

$$\text{存活率} = \frac{\text{冻干后样品测得的活菌数}}{\text{冻干前样品测得的活菌数}} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 保护剂单因素实验

根据保护剂对菌体冷冻干燥的保护机理,结合有关文献报道^[6-7],选取脱脂奶粉、麦芽糖、蔗糖、可溶性淀粉、硫酸锰、1甘露醇、谷氨酸钠、L-半胱氨酸作为冷冻干燥保护剂,以存活率为指标,考察对凝结芽孢杆菌与植物乳杆菌的冻干保护作用,结果见表1。

表1 保护剂单因素实验结果

保护剂	植物乳杆菌存活率(%)	凝结芽孢杆菌存活率(%)
脱脂奶粉10%	78.3	82.5
麦芽糖10%	70.4	74.6
蔗糖10%	25.6	42.1
可溶性淀粉10%	22.8	34.7
硫酸锰5%	33.7	56.9
甘露醇10%	52.3	47.6
谷氨酸钠5%	51.2	65.3
L-半胱氨酸5%	23.3	17.6

由表1可以看出,8种保护剂对植物乳杆菌的保护作用影响大小次序为:脱脂奶粉>麦芽糖>甘露醇>谷氨酸钠>硫酸锰>蔗糖>L-半胱氨酸>可溶性淀粉;对凝结芽孢杆菌的影响大小次序为:脱脂奶粉>麦芽糖>谷氨酸钠>硫酸锰>甘露醇>蔗糖>可溶性淀粉>L-

半胱氨酸,其中脱脂奶粉、麦芽糖和谷氨酸钠对两种菌种都有较好的冻干保护作用,存活率均能达到50%以上,进而对这三种物质组成的复配保护剂的比例做更深入的研究。

2.2 响应面优化设计结果与分析

根据单因素实验结果,选取脱脂奶粉、麦芽糖和谷氨酸钠为试验因素,以植物乳杆菌为试验菌种,利用Box-Behnken中心组合设计,设计3因素3水平的响应曲面试验,以存活率作为考核指标,试验因素与水平见表2,结果见表3。

表2 响应面试验因素与水平

水平	实验因素		
	A 脱脂奶粉	B 麦芽糖	C 谷氨酸钠
-1	5%	6%	2%
0	10%	9%	6%
1	15%	12%	10%

表3 响应曲面实验结果

序号	A 脱脂奶粉(w/v)	B 麦芽糖(w/v)	C 谷氨酸钠(w/v)	存活率实测值(%)	存活率预测值(%)
1	10	12	10	81.2	81.0
2	5	9	2	78.3	80.2
3	10	12	2	74.5	73.5
4	10	9	6	89.8	90.5
5	15	6	6	85.6	86.5
6	15	9	2	76.7	77.9
7	5	9	10	89.3	88.0
8	5	6	6	92.1	92.3
9	10	9	6	91.2	90.5
10	15	9	10	84.7	82.8
11	10	6	10	86.4	87.4
12	15	12	6	81.2	83.4
13	5	12	6	83.5	82.6
14	10	6	2	87.0	84.8

对表3中数据进行回归拟合分析,得出冷冻干燥存活率对脱脂奶粉、麦芽糖、谷氨酸钠冷冻保护剂的二次多项回归方程模型:

$$Y = +90.5 - 1.88A - 3.84B + 3.14C + 1.05AB - 0.75AC + 1.82BC - 2.46A^2 - 2.44B^2 - 5.79C^2$$

其中,Y为响应值冷冻干燥菌种存活率,A、B、C分别为脱脂奶粉、麦芽糖、谷氨酸钠单位体积溶质质量浓度。

为了检验模型的有效性,对模型进行方差分析结果表明(表4),多元相关系数为 $R^2 = 0.9344$,对方程的系数显著性进行检验,结果表明各因子系数均有意义;表明冷冻干燥存活率的实测值与预测值之间具有较好的拟合度;Prob(p) > F值并且 < 0.0001 模型显著,可用来进行响应面分析。

表 4 响应面法对冷冻保护剂选择的 ANOVA 分析结果

因素	平方和	自由度	均方和	F 值	P 值	显著性
模型	491.40	9	20.16	26.33	<0.0001	* *
A	98.13	1	98.13	11.43	0.0103	*
B	137.81	1	137.81	22.56	0.0041	* *
C	118.75	1	118.75	18.41	0.0052	* *
AB	41.07	1	41.07	4.43	0.1031	
AC	22.25	1	22.25	3.22	0.1536	
BC	63.32	1	63.32	9.10	0.0480	*
A ²	55.40	1	55.40	17.06	0.0253	*
B ²	56.01	1	56.01	16.00	0.0285	*
C ²	127.18	1	127.18	44.89	<0.0001	* *
残差	25.39	4	6.35			
失拟	24.41	3	8.14	5.30		
纯误差	0.98	1	0.98			
总和	386.79	13				

图 1、图 2、图 3 是由多元回归方程式所作的响应曲面三维图和等高线图。可以对任何两个因素的交互作用进行分析和评价,以确定最佳因素水平范围。

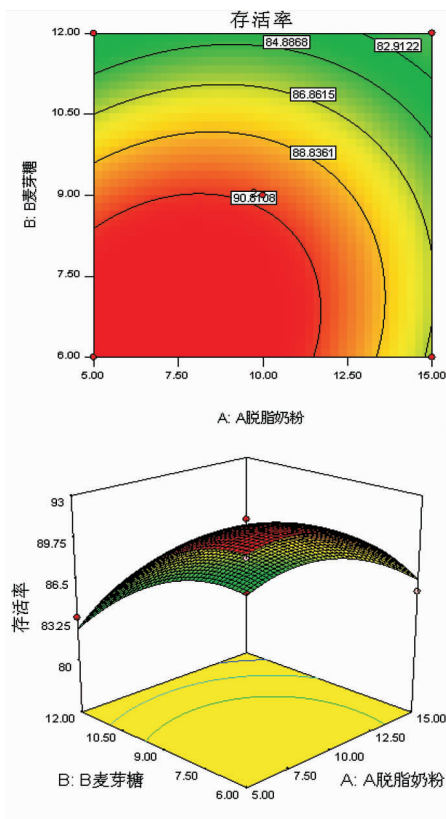


图 1 脱脂奶粉和麦芽糖对冷冻干燥存活率交互影响

利用 Expert Design 7.0 软件以存活率最大值为目标优化出方案,得出唯一最优方案为:脱脂奶粉 7.06%,麦芽糖 6.46%,谷氨酸钠 6.70% 为组合保护剂使用时,能使植物乳杆菌冷冻干燥存活率达到 92.95%。

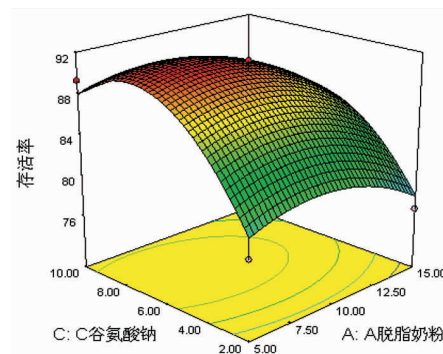
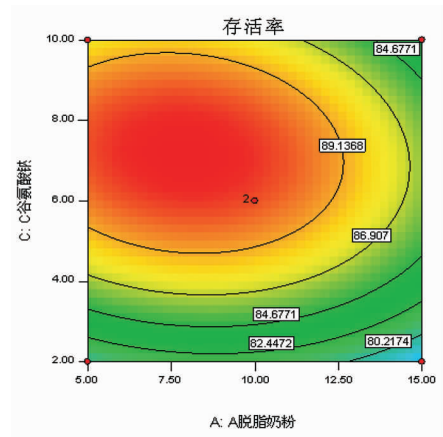


图 2 脱脂奶粉和谷氨酸钠对冷冻干燥存活率交互影响的等高线图和三维曲面图

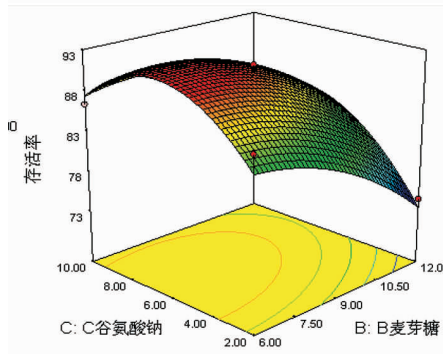
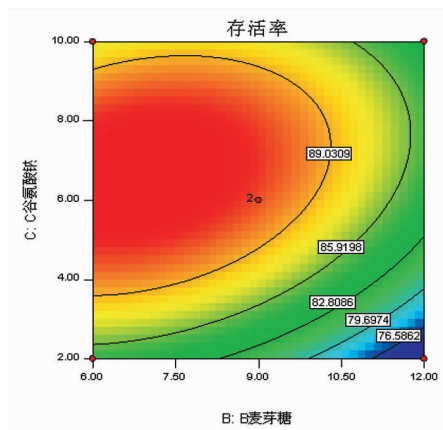


图 3 麦芽糖和谷氨酸钠对冷冻干燥存活率交互影响的等高线图和三维曲面图

2.3 凝结芽孢杆菌冷冻干燥实验

对植物乳杆菌优化的最优复合保护剂组合,脱脂奶粉 7.06%,麦芽糖 6.46%,谷氨酸钠 6.70%,应用于凝结芽孢杆菌冷冻干燥,进行存活率的检测,得出凝结芽孢杆菌冷冻干燥存活率为 94.1%,可见优化得出的保护剂组合配方对凝结芽孢杆菌的冷冻干燥也具有较好的保护效果。

3 结束语

通过响应面分析方法,利用 Expert Design 7.0 软件以存活率最大值为目标,确定对植物乳杆菌和凝结芽孢杆菌具有最佳冻干保护作用的配方为脱脂奶粉 7.06%,麦芽糖 6.46%,谷氨酸钠 6.70%,使物乳杆菌冷冻干燥存活率达到 92.95%,凝结芽孢杆菌的冷冻干燥存活率达到 94.1%。此项研究为植物乳杆菌和凝结芽孢杆菌的复合发酵剂菌粉的实际生产提供了理论参考。

参考文献:

[1] 陈功,余文华,张其圣,等.泡菜直投式菌剂制备及应

用研究[J].四川食品与发酵,2008(4):19-23.

[2] Rumian N, Tsvetkov T D, Angelov M. Investigation of lactobacilli strains during lyophilization[J]. Cryobiology, 1993(30):536-540.

[3] 李宝坤,田丰伟,刘小明,等.冷冻干燥对乳酸菌代谢活力的影响[J].食品工业,2011(9):203-205.

[4] 袁亚宏,岳田利,高振鹏,等.冻干高活力乳酸菌粉保护剂的研究[J].西北农林科技大学学报,2003(31):82-84.

[5] 潘明,谢仁有,洪玉程.响应面法优化甘薯叶 SOD 的提取工艺[J].四川理工学院学报:自然科学版,2012,25(2):5-7.

[6] 张泽生,王婧宜,王馨,等.保加利亚乳杆菌冷冻干燥保护剂的筛选[J].食品工业,2011(6):48-50.

[7] 熊涛,黄锦卿,宋苏华,等.植物乳杆菌真空冷冻干燥保护剂配方优化[J].南昌大学学报:理科版,2010(6):561-565.

Optimization of Cryoprotectants for *Bacillus Coagulans* and *Lactobacillus Plantarum* by Response Surface Methods

WANG Shi-kuan, HONG Yu-cheng, YUAN Xian-ling

(School of Biotechnology Engineering, Sichuan University of Science & Engineering, Zigong 643000, China)

Abstract: The formula of the freeze-dried protectants for *Bacillus coagulans* and *Lactobacillus plantarum* is optimized and selected by the method that combines single factor experiment and response surface experiment design. The single factor experiment shows that the skim milk, maltose and sodium glutamate have outstanding protective effect, which contribute to improve the cell's endurance capacity in freeze-dried environment. By response surface analysis, the quadratic model for the three significant factors is established with cell survival rate as the target response. The optima formula is: the skim milk 7.06%, maltose 6.46% and sodium glutamate 6.70%, with which the cell survival rate for *Lactobacillus plantarum* reaches 92.95% and that for *Bacillus coagulans* reaches 94.1%.

Key words: *Lactobacillus plantarum*; *Bacillus coagulans*; freeze-dried; protectants; response surface methods