

响应面法优化植物乳杆菌冻干保护剂

韩德权¹, 杨丽娟¹, 孙庆申¹, 吴桐¹, 孙红书²

(1. 黑龙江大学生命科学学院, 微生物黑龙江省高校重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150080;

2. 哈尔滨弘泰生物技术有限公司, 黑龙江 哈尔滨 150521)

摘要: 采用响应面法对植物乳杆菌冻干保护剂配比进行优化。在单因素试验的基础上, 首先利用 Plackett-Burman 设计法研究保护剂对响应值的影响程度, 发现脱脂乳、甘油和 VC 对细胞存活率的影响显著, 然后利用最陡爬坡法逼近最大响应区域, 最后在上升最高点处由中心组合试验和响应面分析确定其最优保护剂复配比例, 即脱脂乳、甘油和 VC 的质量浓度分别为 13.68g/100mL、1.97g/100mL 和 0.20g/100mL, 并通过实验测得优化后的细胞存活率为 85.01%, 与预测值 84.85% 非常接近, 植物乳杆菌含菌量为 4.98×10^{10} CFU/g, 而加单一保护剂时的细胞存活率最高值为 52%, 存活率提高了 63.48%。

关键词: 植物乳杆菌; 冷冻干燥; 保护剂; 响应面法

Response Surface Methodological Approach for Optimization of Compound Protectant Formulation for Lyophilized *Lactobacillus plantarum*

HAN De-quan¹, YANG Li-juan¹, SUN Qing-shen¹, WU Tong¹, SUN Hong-shu²

(1. Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Microbiology, College of Life Science, Heilongjiang University, Harbin 150080, China; 2. Harbin Hongtai Biotechnology Co. Ltd., Harbin 150521, China)

Abstract: The formulation of protectant for lyophilized *Lactobacillus plantarum* was optimized by means of response surface methodology. First, based on the single factor experiments, Plackett-Burman design was used to evaluate the importance of ingredients of compound protectant formula affecting cell viability of *Lactobacillus plantarum*. Second, steepest ascend method was used to obtain the maximum response regions of the most important ingredients. Finally, central composite design combined with response surface methodology was employed to investigate the optimal compound protectant formula. Results indicated that the most important ingredients included skimmed milk, glycerol and vitamin C, and their optimal amounts in 100 mL of protectant formula were skimmed milk 13.68 g, glycerol 1.97 g and vitamin C 0.20 g. The optimal cell survival rate was observed to be 85.01% using the optimal compound protectant, which was very close to the expected value (84.85%) and also exhibited an increase of 63.48% compared with using a single protectant, and the number of living *Lactobacillus plantarum* was 4.98×10^{10} CFU/g.

Key words: *Lactobacillus plantarum*; lyophilization; protectant; response surface methodology

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)05-0219-06

植物乳杆菌是酸菜等蔬菜发酵的主要微生物之一^[1], 其冻干菌粉可直接应用于家庭及工厂的蔬菜发酵中。用植物乳杆菌发酵蔬菜的亚硝酸盐含量远远低于自然发酵蔬菜, 并且使用方便, 产品质量稳定。在家庭以及工厂规模化生产中拥有广阔的市场前景。而在植物乳杆菌冻干菌粉的制作过程中, 选择合适的冻干保护剂具有重要意义。本实验采用响应面法对植物乳杆菌冻干菌粉的

冻干保护剂的优化进行研究, 旨在为工业化生产蔬菜发酵剂提供必要的参数。

1 材料与方法

1.1 材料

植物乳杆菌由本实验室分离并保藏; MRS 培养基(用于菌种的保藏、活化, 制备种子液和活菌计数); 脱

收稿日期: 2009-07-09

基金项目: 黑龙江省科技厅重大攻关项目(GA07B401; GA07B401-1; GA07B401-4)

作者简介: 韩德权(1960—), 男, 教授, 硕士, 研究方向为生物制药、保健食品材料。

E-mail: handequan2003@yahoo.com.cn

脂乳、蔗糖、葡萄糖、乳糖、甘油、山梨醇、VC、硫酸锰均为分析纯。

1.2 工艺流程

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

1.3 操作要点

菌体的培养及收集：采用MRS液体培养基37℃培养48h后收集菌体，将菌液移入无菌离心管中，4000r/min离心20min，弃上清液，用0.9g/100mL无菌生理盐水洗涤沉淀菌体，再以同样的条件离心20min，弃上清液即得乳酸菌菌泥。

保护剂的除菌处理：将蔗糖、葡萄糖、乳糖、山梨醇、甘油、硫酸锰和VC分别灭菌待用。其中蔗糖、葡萄糖、乳糖、山梨醇、甘油、硫酸锰、脱脂乳在115℃下保温15min杀菌，VC采用膜孔径为0.22μm的滤菌器除菌^[2]。

保护剂的添加：将离心后的菌体与10mL按所需质量浓度(g/100mL)配制好的保护剂混合，保护剂调菌浓度至 10^{10} CFU/mL并在漩涡混合器上混匀，制成细胞悬液。

冻干菌粉的制备：取1mL菌悬液分装入无菌带塞的小瓶中，放在-40℃下预冻，8h后取出在真空冻干机中冻干，冻干条件为1Pa压力-45℃下干燥24h^[3]，然后置于-5℃低温冰箱中保存备用。

冻干菌粉的复水处理：按照文献[4]的方法进行。冻干菌粉从冰箱中取出，加入无菌水，使其与冻干前菌悬液的体积相等，于30℃水浴振荡融化10min，制成菌悬液备用。

测定方法：采用平板计数法，厌氧37℃培养48h，测定冻干前后活菌总数，并计算存活率。

$$\text{存活率}/\% = \frac{B}{A} \times 100$$

式中：A为冻干前1mL液体样的活菌数/(CFU/mL)；B为1mL液体样冻干后的活菌数/(CFU/mL)。

1.4 冻干保护剂优化方法

采用单因素试验、Plackett-Burman设计、最陡爬坡试验、中心组合设计、响应面分析法。本研究的试验设计、数据分析及模型建立分别采用SAS软件(Version 9.0)和Origin7.0软件来进行。

1.5 菌粉中含菌量测定

$$\text{含菌量}/(\text{CFU/g}) = \frac{\text{存活率} \times 10^{10}/(\text{CFU/mL}) \times 10/\text{mL}}{\text{冻干后菌粉质量/g}}$$

2 结果与分析

2.1 单因素选取复合试验因素水平

本研究中结合实验成本，根据文献[5-6]的方法选择常用的对乳酸菌保护效果较好的8种保护剂，比较它们对菌株的冻干保护效果。

2.1.1 脱脂乳质量浓度的选择

脱脂乳中的乳清蛋白在菌体表面形成蛋白膜对细胞加以保护，并且可以固定冻干的酶类，防止由于细胞壁蛋白质损坏而引起的胞内物质泄漏^[7]。从图1可以看出，在一定的质量浓度范围内，随着脱脂乳质量浓度的增加，细胞存活率明显提高。但脱脂乳质量浓度高于12g/100mL时，存活率变化不明显，且保护剂含量增高易出现冻干不彻底现象。因此，脱脂乳的添加量确定为12g/100mL。

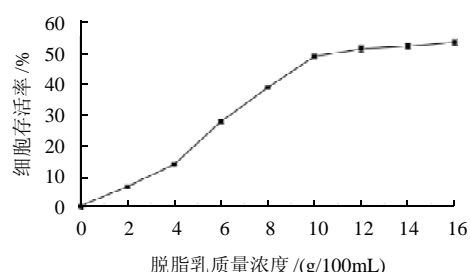


图1 脱脂乳质量浓度对细胞存活率的影响

Fig.1 Effect of skimmed milk amount on cell survival rate of *Lactobacillus plantarum*

2.1.2 糖质量浓度的选择

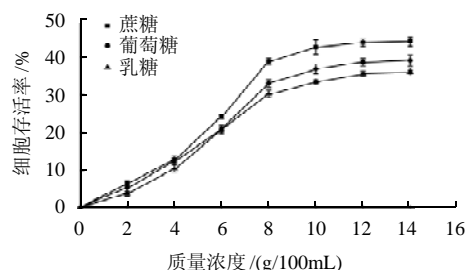


图2 蔗糖、葡萄糖和乳糖质量浓度对细胞存活率的影响

Fig.2 Effect of sucrose, glucose, and lactose amounts on cell survival rate of *Lactobacillus plantarum*

图2是不同质量浓度的蔗糖、葡萄糖和乳糖对细胞存活率的影响。当蔗糖质量浓度低于8g/100mL时，随着蔗糖质量浓度的增加，细胞存活率提高幅度明显，高于10g/100mL几乎无变化，因此，蔗糖的添加量确定为10g/100mL。

随着葡萄糖质量浓度的增加，细胞存活率明显提高。但质量浓度高于10g/100mL时，细胞存活率提高幅度较小，因此，葡萄糖的添加量确定为10g/100mL。

随着乳糖质量浓度的增加，细胞存活率明显提高。但质量浓度高于10g/100mL时，菌体存活率提高幅度较小。因此，乳糖的添加量确定为10g/100mL。

2.1.3 甘油质量浓度的选择

甘油属低分子中性物质,在溶液中易结合水分子,发生水合作用,使溶液的黏度增加,从而弱化了水的结晶过程,减轻了细胞外溶质质量浓度升高所造成的细胞损伤。同时,甘油进入细胞后,使细胞内溶质浓度升高,细胞内压力接近于细胞外压力,减少了细胞脱水的程度和速度^[7]。随着甘油质量浓度的增加,细胞存活率明显提高。质量浓度为5g/100mL时最高达39.6g/100mL,见图3。但达到5g/100mL以上时不易冻干,所制成的菌粉较黏稠,无法研磨成粉末状。因此,甘油的添加量确定为4g/100mL。

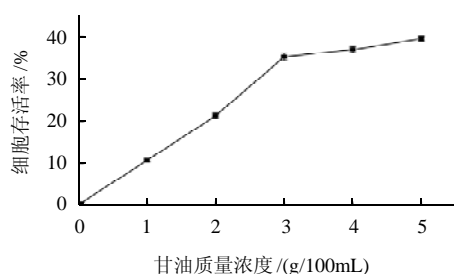


图3 甘油质量浓度对细胞存活率的影响

Fig.3 Effect of glycerol amount on cell survival rate of *Lactobacillus plantarum*

2.1.4 山梨醇质量浓度的选择

山梨醇质量浓度低于3g/100mL时,细胞存活率明显提高。质量浓度高于4g/100mL时几乎无变化,见图4。因此,山梨醇的添加量确定为4g/100mL。

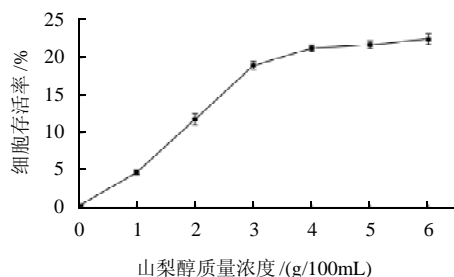


图4 山梨醇质量浓度对细胞存活率的影响

Fig.4 Effect of sorbitol amount on cell survival rate of *Lactobacillus plantarum*

2.1.5 VC和硫酸锰质量浓度的选择

VC单独使用对细胞的冻干保护作用不明显,随着VC质量浓度的增加,细胞存活率最高只有7.1g/100mL,但抗氧化剂VC能降低保护剂的氧化还原电位,并消耗实验过程中的部分氧气,和其他保护剂同时使用会加强保护效果,根据实验结果VC质量浓度选择1g/100mL(图5)。

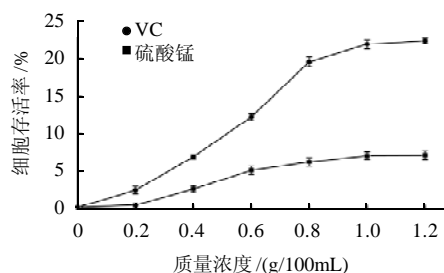


图5 VC和硫酸锰质量浓度对细胞存活率的影响

Fig.5 Effect of vitamin C and $MnSO_4$ amounts on cell survival rate of *Lactobacillus plantarum*

随着硫酸锰质量浓度的增加,细胞存活率明显提高。质量浓度达1g/100mL后细胞存活率提高不明显,见图5。因此,硫酸锰的添加量确定为1g/100mL。

2.2 Plackett-Burman 试验筛选主要影响因素

不同保护剂对菌种的保护效果是不同的,单一保护剂并不能满足冷冻干燥的要求,不能满足菌体抵抗外界恶劣条件的要求,所以一般按一定配方混合使用。复配保护剂中各保护剂在冷冻干燥中均发挥着各自的作用;同时相互间又具有协同作用;且微生物细胞结构和大小存在差异性;如果复配保护剂中各保护剂的比例及质量浓度达到协调时,将会加速干燥且能在干燥和保存期间维持较高的细胞存活率,达到最佳保护效果^[8]。因此,通过Plackett-Burman试验筛选出对存活率影响显著的几种保护剂,并对其进行复配。

表1 Plackett-Burman 试验设计及结果

Table 1 Plackett-Burman experimental design matrix and corresponding response of cell survival rate of *Lactobacillus plantarum*

序号	X ₁ 脱脂乳	X ₂ 蔗糖	X ₃ 葡萄糖	X ₄ 乳糖	X ₅ 甘油	X ₆ 山梨醇	X ₇ VC	X ₈ 硫酸锰	细胞存活率 / %
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	78.1
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	80.3
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	60.1
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	80.9
5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	70.4
6	1	1	1	-1	1	1	-1	1	74.9
7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	64.8
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	53.3
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	60.1
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	72.1
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	63.2
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	64.7

选用 $N=12$ 的Plackett-Burman实验设计,对8个因素进行研究,每个因素取-1、+1两个水平。实验设计及结果如表1所示,各因素所代表的参数水平及分析结果见表1和表2。

由表2中的 t 检验可知,对结果产生正效应的因素

为脱脂乳、蔗糖和山梨醇,产生负效应的因素为葡萄糖、乳糖、甘油、VC和硫酸锰。在99%的水平上脱脂乳、甘油、VC差异显著,其他因素在这个水平上差异都不显著。负效应的因素固定在-1水平,正效应的因素固定在+1水平,所以选取脱脂乳、甘油、VC这3个因素作为中心组合试验的研究对象。

表2 Plackett-Burman 试验分析结果

Table 2 Significance test of ingredients of compound protectant formula

因素 编码	名称	水平		显著性		
		-1	1	t 检验	Pr > t	重要性排列
X ₁	脱脂乳	10	12	19.19002	0.000309	1
X ₂	蔗糖	8	10	0.393417	0.720304	7
X ₃	葡萄糖	8	10	-0.30599	0.779617	8
X ₄	乳糖	8	10	-1.31139	0.281063	5
X ₅	甘油	3	4	-9.57315	0.002418	2
X ₆	山梨醇	3	4	1.398817	0.256326	4
X ₇	VC	0.6	1	-4.76472	0.017557	3
X ₈	硫酸锰	0.8	1	-1.26768	0.294365	6

2.3 最陡爬坡试验研究最大响应值的响应区域

由于响应面拟合方程只在考察的紧接邻域里才能充分近似真实情形,在其他区域,拟合方程与被近似的函数方程毫无相似之处,拟合几乎是毫无意义的。所以,必须首先尽可能逼近最大细胞存活率区域后才能建立有效的响应面拟合方程。最陡爬坡法以实验值变化的梯度方向为爬坡方向,根据各因素效应值的大小确定变化步长,能快速、有效地逼近最高存活率区域。

根据 Plackett-Burman 试验分析的结果确定下一步的最陡爬坡试验。从表3可知,脱脂乳有显著正效应,应增加,甘油、VC有显著负效应,应减少。试验设计及结果见表3,从表3可以清楚地看出,4号试验脱脂乳、甘油、VC质量浓度分别为13.5g/100mL,2.1g/100mL,0.3g/100mL时细胞存活率达到最大值,然后随着质量浓度的变化细胞存活率不断降低。4号试验的质量浓度接近最大响应区域,利用该质量浓度作为中心组合试验的中心点。

表3 最陡爬坡试验及结果

Table 3 Steepest ascend design for skimmed milk, glycerol and vitamin C and corresponding response of cell survival rate of *Lactobacillus plantarum*

序号	脱脂乳质量 浓度/(g/100mL)	甘油质量浓度/ (g/100mL)	VC质量浓度/ (g/100mL)	细胞存活 率/%
1	12	3	0.6	79.7
2	12.5	2.7	0.5	81.2
3	13	2.4	0.4	82.3
4	13.5	2.1	0.3	84.2
5	14	1.8	0.2	83.1
6	14.5	1.5	0.1	82.7

2.4 响应面试验优化最佳保护剂配比

根据最陡爬坡试验,响应变量Y值逼近最大存活率,以4号试验条件为中心点施行中心组合试验,中心组合试验的设计及响应值结果如表4、5所示。

表4 中心组合试验因素及水平

Table 4 Variables and levels in central composite design

因素	水平		
	-1	0	+1
X ₁	13	13.5	14
X ₅	1.8	2.1	2.4
X ₇	0.2	0.3	0.4

表5 中心组合试验设计及结果

Table 5 Central composite design matrix and corresponding response of cell survival rate of *Lactobacillus plantarum*

序号	X ₁	X ₅	X ₇	Y/%
1	-1	-1	-1	82.5
2	-1	-1	1	81.2
3	-1	1	-1	80.8
4	-1	1	1	81.7
5	1	-1	-1	83.8
6	1	-1	1	82.1
7	1	1	-1	82.5
8	1	1	1	81.5
9	-1.68179	1	1	81.1
10	1.68179	1	1	82.5
11	1	-1.68179	1	82.9
12	1	1.68179	1	82.3
13	1	1	-1.68179	84.7
14	1	1	1.68179	82.9
15	1	1	1	84.4
16	1	1	1	84.7
17	1	1	1	83.9
18	1	1	1	85.1
19	1	1	1	84.1
20	1	1	1	84.6

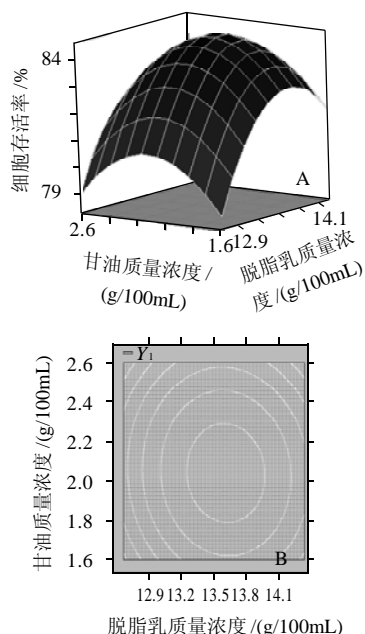
以存活率Y₁为因变量,因素X₁、X₅、X₇为自变量的回归方程为:

$$Y_1 = 84.48655 + 0.443333X_1 - 0.300879X_5 - 0.448655X_7 - 1.072736X_1^2 - 0.0875X_1X_5 - 0.2875X_1X_7 - 0.789892X_5^2 + 0.3625X_5X_7 - 0.365627X_7^2$$

用F检验评价方程,得到概率水平在99%的条件下回归是显著的($P < 0.000168$)。方程的确定系数 $R^2 = 92.44\%$,说明92.44%的试验数据可以用这个方程解释。图7~9显示方程的三维响应面,证实了拟合面有真实的最大值。

通过软件计算得到,脱脂乳质量浓度为13.68g/100mL,甘油质量浓度为1.97g/100mL,VC质量浓度为0.20g/100mL时,预测细胞存活率最大值为84.85%。为了验证预测值,在这个点做重复实验,3次实验的平均细胞存活率

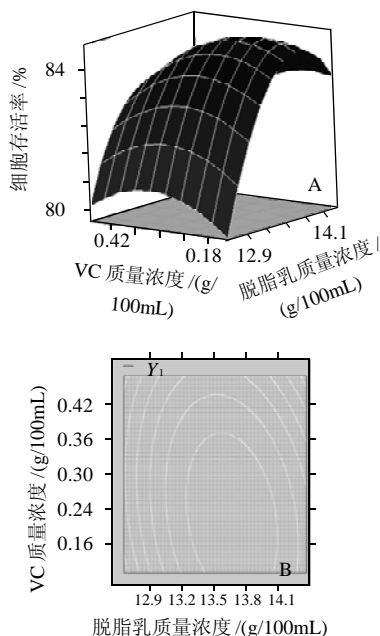
为85.01%。基本与数学模型得到的最大细胞存活率符合,说明响应面法优化得到的数学模型与实验数据拟合的较好。



固定水平: VC 质量浓度 0.30000015g/100mL。

图6 脱脂乳与甘油交互作用对细胞存活率影响的响应面图(A)和等高线图(B)

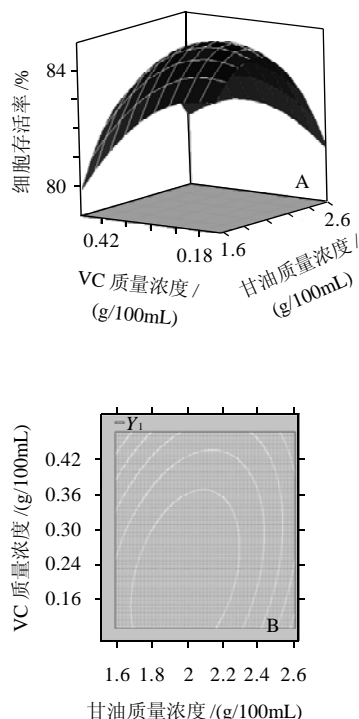
Fig.6 Response surface and contour plots describing the interactive effects of skimmed milk and glycerol on cell survival rate of *Lactobacillus plantarum*



固定水平: 甘油质量浓度 2.10000045g/100mL。

图7 脱脂乳与VC交互作用对细胞存活率影响的响应面图(A)和等高线图(B)

Fig.7 Response surface and contour plots describing the interactive effect of skimmed milk and vitamin C on cell survival rate of *Lactobacillus plantarum*



固定水平: 脱脂乳质量浓度 13.50000075g/100mL。

图8 甘油与VC交互作用对细胞存活率影响的响应面图(A)和等高线图(B)

Fig.8 Response surface and contour plots describing the interactive effect of glycerol and vitamin C on cell survival rate of *Lactobacillus plantarum*

脱脂乳及甘油对菌体有较好的保护作用,VC增强了保护剂的抗氧化作用,因而三者结合可有效提高植物乳杆菌的抗冻干能力。

2.5 蔬菜发酵剂中含菌量测定结果

含菌量/(CFU/g) = $85.681\% \times 10^{10} \times 10/1.72 = 4.98 \times 10^{10}$

3 结论

在植物乳杆菌冻干保护剂的优化过程中,在确定各单一保护剂的最佳质量浓度基础上通过 Plackett-Burman 设计研究了各种保护剂对细胞存活率的影响程度,找出了影响显著的3个因素:脱脂乳、甘油、VC。然后通过最陡爬坡试验逼近最大响应区域。最后设计中心组合试验,拟合出一个三元二次多项式方程,找出了最佳值。最佳配方以脱脂乳质量浓度为13.68g/100mL、甘油质量浓度为1.97g/100mL、VC质量浓度为0.20g/100mL时,得到最大细胞存活率85.01%。与不加保护剂时的细胞存活率0.2%相比有极显著提高,与加单一保护剂时的最高值52%相比提高了63.48%。蔬菜发酵剂含菌量为 4.98×10^{10} CFU/g。

参考文献:

- [1] MUNDT J O. Lactic acid bacteria associated with raw plant food material [J]. J Milk and Food Technol, 1970, 33: 550-553.
- [2] 董英, 林泽营, 周国磊, 等. 泡菜乳酸菌冻干保护剂的研究[J]. 食品工业, 2007(1): 10-12.
- [3] ABADIAS M, BENABARRE A, TEIXIDO N, et al. Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake* [J]. Int J Food Microbiol, 2001, 65(3): 173-182.
- [4] 熊泽, 仇敏, 邵伟, 等. 瑞士乳杆菌冻干发酵剂制备中保护剂的选择 [J]. 冷饮与速冻食品工业, 2006, 12(3): 20-24.
- [5] 蒲丽丽, 刘宁, 霍贵成. 嗜热链球菌冻干保护剂保护作用的研究[J]. 食品科技, 2007(7): 32-34.
- [6] 徐丽萍. 嗜酸乳杆菌冻干菌粉保护剂选择的研究[J]. 食品工业科技, 2007, 28(5): 119-122.
- [7] 纪振杰, 郭德军. 利用响应面法优化双歧杆菌冻干保护剂的配比[J]. 中国生物制品学杂志, 2008, 21(9): 813-816.
- [8] 徐致远, 刘荣, 郭本恒, 等. 保护剂在乳酸菌冻干过程中的应用[J]. 乳业科学与技术, 2006(4): 155-157.