

响应面法优化以菊芋全粉为碳源的双歧杆菌增殖培养条件

于济洋^{1,2}, 李新华^{1,*}, 王 秋³, 张 明^{2,4}, 秦 宁¹, 郑凤娥², 王 琳¹

(1.沈阳农业大学食品学院, 辽宁 沈阳 110866; 2.沈阳产品质量监督检验院食品安全所, 辽宁 沈阳 110022;

3.中国农业科学院农产品加工研究所, 北京 110193; 4.辽宁大学生命科学院, 辽宁 沈阳 110036)

摘 要:以菊芋全粉、菊粉和葡萄糖作为培养基碳源, 研究其对双歧杆菌生长情况的影响, 并研究菊芋全粉的发酵性能, 运用Design-Expert 8.0设计实验并以响应面分析的方法进行发酵条件优化。结果表明: 菊芋全粉、菊粉作为单一碳源对双歧杆菌具有增殖作用, 利用菊芋全粉对双歧杆菌的增殖作用要优于菊粉和葡萄糖, 双歧杆菌的增殖数量分别为菊粉的5.3倍、葡萄糖的16.8倍, 菊芋全粉作为双歧杆菌培养基的碳源的最优发酵条件为: 菊芋全粉添加量21g/L、温度36℃、接种量10%。

关键词: 菊芋全粉; 双歧杆菌; 优化; 响应面法

Optimization of Culture Conditions for Bifidobacterial Enrichment with Whole Powder of *Jerusalem artichoke* Tubers as Carbon Source by Response Surface Analysis

YU Ji-yang^{1,2}, LI Xin-hua^{1,*}, WANG Di³, ZHANG Ming^{2,4}, QIN Ning¹, ZHENG Feng-e², WANG Lin¹

(1. College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China;

2. Food Safety Institute, Shenyang Product Quality Supervision and Inspection Institute, Shenyang 110022, China;

3. Institute of Agro-products Processing Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 110193, China;

4. School of Life Science, Liaoning University, Shenyang 110036, China)

Abstract: The best carbon source for bifidobacterial growth was selected from inulin, glucose and whole powder of *Jerusalem artichoke* Tubers, and the bifidobacterial enrichment culture conditions based on the selected carbon source were optimized by experimental design using Design-Expert 8.0 and response surface analysis. Both inulin and glucose were good bifidobacterial growth promoters when used as sole carbon sources; however, whole powder of *Jerusalem artichoke* Tubers was more effective in promoting bifidobacterial growth, providing a 5.3-fold and 16.8-fold increase in bifidobacterial populations after enrichment culture compared to inulin and glucose, respectively. When whole powder of *Jerusalem artichoke* Tubers was used as the carbon source, the optimal culture conditions were 36 °C, 21 g/L of carbon source concentration and 10% of inoculum concentration.

Key words: whole powder of *Jerusalem artichoke* Tubers; *Bifidobacterium*; optimization; response surface analysis

中图分类号: TQ920.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)23-0261-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201323053

双歧杆菌(*Bifidobacterium*)是一种人体肠道中重要的生理性细菌, 大量科学研究证明, 双歧杆菌对人体有多种生理调节作用。多年来, 富含双歧杆菌品的产品开发备受关注, 因此双歧杆菌增殖专一性碳源的选择和标准化增殖培养基的优化将成为该领域研究的重要方向^[1-4]。

菊芋(*Jerusalem artichoke*), 俗称鬼子姜、洋姜, 菊科, 向日葵属, 多年生草本植物, 是著名的食药兼用块茎作物。鲜菊芋中富含丰富的营养物质, 水分含量为

79.8%、碳水化合物为16.6%(其中78%为菊芋多糖, 即菊粉)、蛋白质1.0%、脂肪1.0%、粗纤维16.6%, 还有少量的硫胺素、核黄素、尼克酸、抗坏血酸及钾、镁、铁、钙、磷等矿物质元素和多种氨基酸等^[5-8]。菊芋中的菊粉是一种线性直链多糖, 聚合度为2~60, 平均聚合度为10, 其聚合度大小主要受原料和生产工艺影响^[9-12]。

研究表明菊粉有许多生理功能, 特别是能选择性促进双歧杆菌的生长, 调整肠道内微生物区系的组成和功能,

收稿日期: 2013-07-25

作者简介: 于济洋(1982—), 男, 工程师, 博士研究生, 研究方向为农产品深加工与质量安全。E-mail: yu_jiyang@126.com

*通信作者: 李新华(1955—), 男, 教授, 研究方向为农产品深加工与转化。E-mail: lixh.syau@163.com

菊粉中低聚果糖更能有效促进双歧杆菌的生长^[13-16]。张建平等^[17]将菊粉酶解并研究其对双歧杆菌的促进作用,许威等^[18]研究了菊粉酸解动力学,郑晓丽等^[19]研究了菊芋膜分级技术,其目的之一就是制备低聚菊粉,以期研究对益生菌的促进作用。但是低聚菊粉与菊芋全粉相比增加了工艺流程和制备成本,二者对双歧杆菌增殖作用的比较研究也未见报道,同时由于菊粉的加工需要脱蛋白、除杂等复杂工艺,制备成本高,而且获得的产品中可能会有化学试剂的残留,导致菊粉使用时可能会有一定的安全隐患。将不易贮存的鲜菊芋经干燥、粉碎后制成以菊粉为主要成分的菊芋全粉,不但便于保藏,而且工艺简单,同时保留了菊芋中大量的营养物质,作为一种膳食纤维复合物,也已被正式认可。因此利用菊芋全粉作为双歧杆菌培养基原料具有重要的理论价值和应用前景。

本实验利用菊芋全粉、菊粉作为单一碳源分别取代MRS培养基中的葡萄糖成分发酵培养双歧杆菌,并对不同碳源的增殖效果进行比较,进一步研究菊芋全粉对双歧杆菌的影响,同时对主要条件进行优化获得最佳发酵培养条件。本研究结果既为双歧杆菌的发酵增殖提供了一种快速高效、绿色安全的培养基碳源物质,也为菊芋全粉的应用提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与菌种

菊芋全粉和菊粉由实验室自制。

双歧杆菌(长双歧杆菌ATCC15707、两歧双歧杆菌ATCC29521、短双歧杆菌ATCC15700、婴儿双歧杆菌ATCC15697、青春双歧杆菌ATCC15703,菌种比例为1:1:1:1:1)由沈阳产品质量监督检验院食品安全所菌种保藏中心提供。

1.2 仪器与设备

1374生物安全柜 赛默飞世尔科技有限公司; KQ-250DB数控超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司; HZQ-X100A恒温振荡培养箱 上海一恒科技有限公司; LDZX-50FB立式压力蒸汽灭菌器 上海申安医疗器械厂; DK-S22电热恒温水浴锅 上海精宏实验设备有限公司; VORTEX3旋涡混匀器 德国IKA公司。

1.3 培养基

乳酸菌琼脂培养基(MRS琼脂培养基): 蛋白胨10.0g/L、牛肉膏粉5.0g/L、酵母膏粉4.0g/L、葡萄糖20.0g/L、吐温80 1mL/L、磷酸氢二钾2.0g/L、乙酸钠5.0g/L、柠檬酸三铵2.0g/L、硫酸镁0.2g/L、硫酸锰0.05g/L、琼脂15g/L, pH 7.0(20~25℃), 121℃灭菌20min, 4℃保存备用(用于活菌检测计数)。

乳酸菌肉汤培养基(MRS肉汤培养基): MRS琼脂培养基中的蛋白胨以酪蛋白酶消化物替代, 其他成分相同(用于菌种增菌培养)。

实验用培养基: 将乳酸菌肉汤培养基中的葡萄糖替换为实验用碳源适量(15、20、25、30g/L)。菊粉代替葡萄糖, 以下称为菊粉肉汤培养基; 菊芋全粉代替葡萄糖, 以下称为菊芋全粉肉汤培养基(用于菌种的增殖培养)。

1.4 方法

1.4.1 菌种的活化

在100mL三角瓶中装入50mL乳酸菌肉汤培养基, 121℃灭菌20min。采用脆裂法开启安瓿管, 利用无菌吸管吸取5.0mL培养基至安瓿管, 充分洗涤冻干菌粉至三角瓶, 然后塞紧橡皮塞, 恒温36℃, 定时摇晃小三角瓶, 厌氧振荡培养36h得双歧杆菌母液。

1.4.2 接种和培养

取培养基于121℃灭菌20min, 冷却至室温接入双歧杆菌, 接种量为10%, 培养温度36℃, 培养时间48h。用1mL无菌吸管取实验用菌种母液匀液, 沿管壁缓慢注于装有9mL生理盐水、乳酸菌肉汤培养基、菊粉肉汤培养基、菊芋全粉肉汤培养基的无菌试管中(共12组, 每组3个平行), 振荡20s, 使菌液混匀, 放入厌氧缸中厌氧培养, 放置36℃的恒温培养箱中培养, 每4h取出1组试管进行平板计数, 培养36h。

1.4.3 菌落总数的测定

采用平板计数法测定: 用1mL无菌吸管吸取培养后的样品菌液匀液1mL, 沿管壁缓慢注于装有9mL生理盐水的无菌试管中, 涡旋振荡器振荡20s, 使稀释液混匀。另取1mL无菌吸管, 按上述操作继续进行稀释。做10倍递增样品匀液, 用生理盐水将实验用菌种母液稀释至 10^{-5} ~ 10^{-7} 。取稀释液0.1mL, 涂布于乳酸菌琼脂培养基, 放置36℃的恒温培养箱中倒置厌氧培养36h后, 计算菌落总数。

1.4.4 发酵条件优化实验设计

运用Design-Expert 8.0实验设计, 对菊芋全粉碳源培养基增殖双歧杆菌的发酵条件进行三因素三水平的响应面分析试验, 实验设计如表1所示。变量为菊芋全粉的添加量(15、20、25g/L)、发酵温度(30、35、40℃)、接种量(8%、10%、12%)。

表1 Design-Expert 8.0试验设计表

Table 1 Variables and their levels for response surface experimental design

编码及水平	A菊芋全粉质量浓度/(g/L)	B发酵温度/℃	C接种量/%
-1	15	30	8
0	20	35	10
1	25	40	12

2 结果与分析

2.1 不同碳源对于双歧杆菌的发酵性能的影响

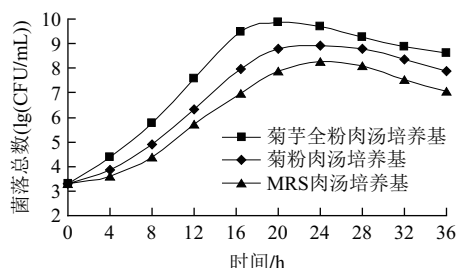


图1 双歧杆菌在不同碳源培养基上发酵的生长曲线

Fig.1 Bifidobacterial growth curves in media containing different carbon sources

由图1可知,在以菊芋全粉作为碳源的培养基中,双歧杆菌生长最快,在4h时最先达到生长对数期,而且在16h时进入菌种生长的稳定期,菌落总数为 $9.50(\lg(\text{CFU/mL}))$ ($3.2 \times 10^9 \text{CFU/mL}$);在菊粉作为碳源的培养基中,双歧杆菌生长较快,在20h时进入生长稳定期,菌落总数为 $8.78(\lg(\text{CFU/mL}))$ ($6.0 \times 10^8 \text{CFU/mL}$);双歧杆菌在葡萄糖为碳源的培养基中生长最慢,在8h时进入生长对数期,在24h时进入生长稳定期,菌落总数为 $8.29(\lg(\text{CFU/mL}))$ ($1.9 \times 10^8 \text{CFU/mL}$)。由此可知,菊芋全粉对双歧杆菌具有良好的发酵性能,其作为碳源对双歧杆菌的增殖效果是菊粉的5.3倍,是葡萄糖的16.8倍。

研究表明,菊芋全粉和菊粉均可促进双歧杆菌的增殖,其中菊粉可促进双歧杆菌增殖的结论与文献报道^[20-22]一致,而菊芋全粉可促进双歧杆菌增殖的研究结果在此前未见报道。诸多文献曾报道^[23-25]低聚果糖可促进双歧杆菌增殖,而本实验研究的菊芋全粉中直链多糖占主要成分,究其原因除了菊芋全粉对双歧杆菌具有一定专一选择性外,还可能是菊芋全粉中除菊粉外的营养成分和功能成分能有效增进菌体生长繁殖,另外文献报道低聚果糖促进双歧杆菌增殖的研究对象仅是长双歧杆菌,而本实验研究的对象是双歧杆菌,双歧杆菌中长双歧杆菌、两歧双歧杆菌、短双歧杆菌、婴儿双歧杆菌、青春双歧杆菌分别对菊芋全粉的发酵选择性能还将进一步开展研究。

2.2 菊芋全粉培养基对双歧杆菌发酵条件的筛选

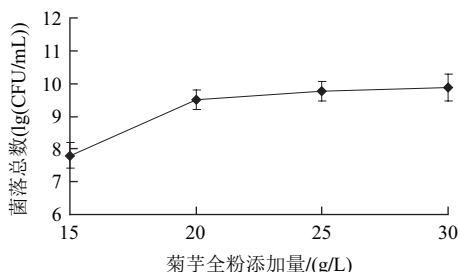


图2 不同菊芋全粉质量浓度对双歧杆菌发酵的影响

Fig.2 Effect of different carbon source concentrations on bifidobacterial growth

由图2可知,碳源对于菌种发酵的影响是比较明显的。随着菊芋全粉的添加量增多,双歧杆菌的长势越好;当菊芋全粉的质量浓度达到 25g/L 时,菌种的菌落总数与质量浓度为 20g/L 的菊芋全粉的培养基的菌落总数相差不大,随着碳源添加量的增加,双歧杆菌的增殖趋于平稳。

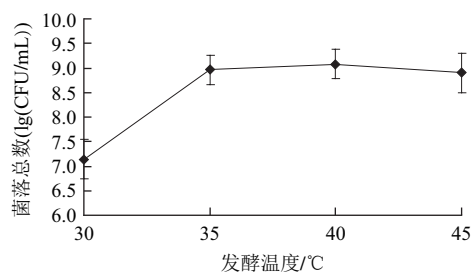


图3 不同发酵温度对双歧杆菌发酵的影响

Fig.3 Effect of different fermentation temperatures on bifidobacterial growth

由图3可知,发酵温度对于菌种的发酵有较大的影响。当温度由 30°C 上升至 35°C 时,双歧杆菌的长势变化是十分明显的;当温度过高时,菌种的长势有所下降。

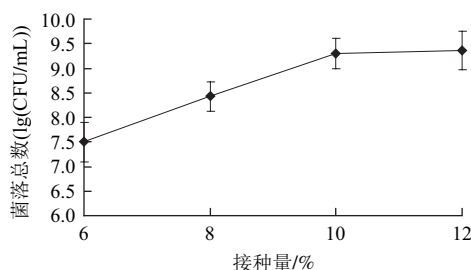


图4 不同接种量对双歧杆菌发酵的影响

Fig.4 Effect of different inoculum concentrations on bifidobacterial growth

由图4可知,培养基要提供足够的空间和营养物质让菌种利用并进行发酵,10%的菌种接种量在培养基的发酵中性价比是最好的,以相对较少的接种量获得相差不大的菌种量。

2.3 菊芋全粉培养基对双歧杆菌发酵条件的优化

2.3.1 二次多项式模型的建立与分析

根据表2实验数据进行拟合,得到一个二元多次式。该方程为描述响应变量(R)与自变量(A 、 B 、 C)的经验模型: $R = 1.848 \times 10^9 + 1.895 \times 10^8 A + 1.617 \times 10^8 B + 1.581 \times 10^8 C + 1.560 \times 10^8 AB + 2.097 \times 10^8 AC + 1.377 \times 10^8 BC - 8.075 \times 10^8 A^2 - 8.802 \times 10^8 B^2 - 7.808 \times 10^8 C^2$ 。由表3可知,回归模型具有高度的显著性($P < 0.0001$),而失拟项差异不显著($P = 0.2388 > 0.05$), $R^2 = 0.9977$, $R^2_{\text{Adj}} = 0.9948$,而且 A 、 B 、 C 均达到极显著水平($P < 0.001$),表明此模型对实验的拟合度很好,可以对双歧杆菌得率进行很好的分析和预测,而且该模型适用于优化以菊芋全粉作为碳源的培养基对双歧杆菌的发酵条件。因素 AB 、 AC 、 BC 、 A^2 、 B^2 、 C^2 对双歧杆菌的发酵得率具有极显著的影响。

响($P<0.01$)。由 F 值可知,各因素对双歧杆菌得率的影响依次为:碳源>发酵温度>接种量。

表2 Design-Expert 8.0试验设计及其结果
Table 2 The experimental design arrangement with Design-Expert 8.0 and results

试验号	A菊芋全粉质量浓度	B发酵温度	C接种量	菌落总数/(CFU/mL)
1	-1	-1	0	7.46×10^6
2	0	0	0	1.82×10^9
3	1	0	1	8.76×10^8
4	0	-1	1	1.45×10^7
5	1	0	-1	9.26×10^7
6	0	1	1	6.28×10^8
7	1	-1	0	4.37×10^6
8	-1	0	1	7.23×10^6
9	-1	0	-1	6.28×10^7
10	0	-1	-1	2.14×10^7
11	0	0	0	1.78×10^9
12	-1	1	0	4.16×10^6
13	1	1	0	6.25×10^8
14	0	1	-1	8.41×10^7
15	0	0	0	1.90×10^9
16	0	0	0	1.86×10^9
17	0	0	0	1.88×10^9

表3 二次多项式模型的系数及其方差分析
Table 3 Coefficients and ANOVA for the developed quadratic polynomial model

变异来源	自由度	平方和	F 值	P
模型	9	1.063×10^{19}	342.60	<0.0001
A	1	2.874×10^{17}	83.40	<0.0001
B	1	2.092×10^{17}	60.69	0.0001
C	1	2.000×10^{17}	58.03	0.0001
AB	1	9.732×10^{16}	28.24	0.0011
AC	1	1.760×10^{17}	51.06	0.0002
BC	1	7.585×10^{16}	22.01	0.0022
A^2	1	2.746×10^{18}	796.79	<0.0001
B^2	1	3.262×10^{18}	946.62	<0.0001
C^2	1	2.567×10^{18}	744.87	<0.0001
残差	7	2.412×10^{16}		
失拟项	3	1.484×10^{16}	2.13	0.2388
纯误差	4	9.280×10^{15}		
总误差	16	1.065×10^{19}		

2.3.2 菊芋全粉质量浓度、发酵的温度、接种量对双歧杆菌得率的影响

由图5可知,菊芋全粉质量浓度、发酵温度、接种量3个影响因素中菊芋全粉质量浓度或温度较低时,适量的增加质量质量浓度或者提高温度均可以促进菌体的生长,可以使双歧杆菌增殖,但在实验范围内,菊芋全粉质量浓度、发酵温度和接种量之间存在着最佳值,超过最佳值后,增加任意组分的菊芋全粉质量浓度或者提高发酵温度,均不能提高菌种的单位菌落总数,甚至使菌种的单位菌落总数有所下降。该模型说明菊芋全粉对双歧杆菌具有良好的发酵性能,双歧杆菌可以较好的利用菊芋全粉中的丰富的碳水化合物,菊芋全粉可作为培养基中的碳源,对双歧杆菌有较好的增殖作用。

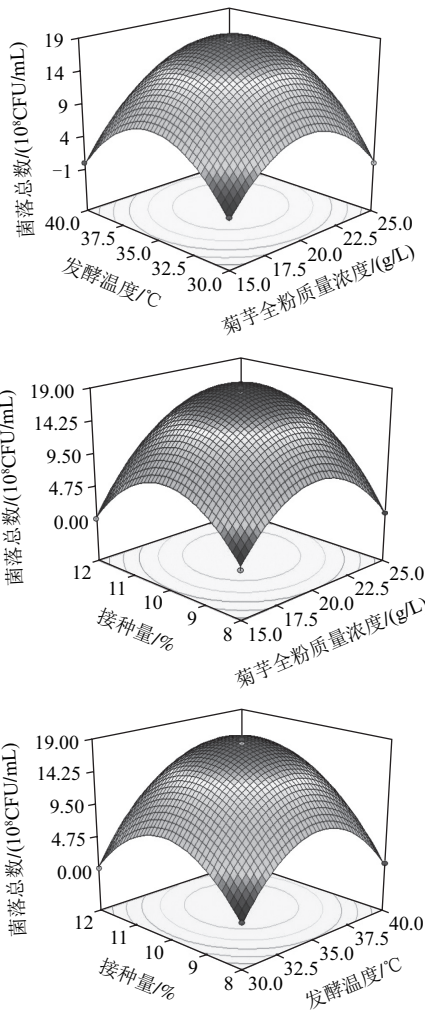


图5 菊芋全粉的质量浓度、发酵温度、接种量对双歧杆菌菌落总数影响的响应面图

Fig.5 Response surface plots for the effects of carbon source concentration, fermentation temperature, inoculum concentration on bifidobacterial growth

2.3.3 最佳工艺条件的预测和验证

通过二次多项回归的预测,得到以菊芋全粉作为碳源的培养基对双歧杆菌发酵的最佳条件是:菊芋全粉质量浓度20.7g/L、发酵温度35.57℃、接种量10.26%,得到菌落总数为 1.88×10^9 CFU/mL。考虑实际操作过程的方便性,将提取工艺参数调整为菊芋全粉质量浓度21g/L、发酵温度36℃、接种量10%,实际测得发酵后的双歧杆菌的菌落总数为 2.10×10^9 CFU/mL。因此,该模型与实际情况基本吻合,说明菊芋全粉作为碳源的培养基优化发酵条件是可行的。

3 结论

菊芋全粉具有良好的发酵性能,可作为双歧杆菌培养基碳源使用,菌种的生长情况优于葡萄糖和菊粉。在

同一条件下, 双歧杆菌的增殖数量分别为菊粉的5.3倍、葡萄糖的16.8倍。通过单因素试验和响应面曲面分析与实际检测结果确定最佳发酵条件为: 菊芋全粉质量浓度21g/L、发酵温度36℃、接种量10%, 在此条件下双歧杆菌的菌落总数达到 2.10×10^9 CFU/mL。本研究结果证明菊芋全粉具有良好的发酵性能, 为菊芋全粉在益生菌培养基中作为碳源的应用前景提供新的研究方向。

参考文献:

- [1] WU Qianqian, YOU H J, AHN H J, et al. Changes in growth and survival of *Bifidobacterium* by coculture with *Propioni bacterium* in soy milk, cow's milk, and modified MRS medium[J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 157(1): 65-72.
- [2] WARD R E. *in vitro* fermentation of breast milk oligosaccharides by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus gasseri*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(6): 4497-4499.
- [3] 吕锡斌, 何腊平, 张汝娇, 等. 双歧杆菌生理功能研究进展[J]. 食品工业科技, 2013, 34(16): 353-358.
- [4] 李俊洁, 陈庆森. 双歧杆菌调理和改善肠道相关疾病作用的研究进展[J]. 食品科学, 2011, 32(23): 326-332.
- [5] 冯大伟, 衣悦涛, 刘广洋, 等. 一种菊芋全粉的制备方法: 中国, CN103005326A[P]. 2013-04-03.
- [6] 田向东. 菊芋全粉的生产方法: 中国, CN101940306A[P]. 2011-01-12.
- [7] PERESSINI D, SENSIDONI A. Effect of soluble dietary fibre addition on rheological and breadmaking properties of wheat doughs[J]. Journal of Cereal Science, 2009, 49(2): 190-201.
- [8] POINOT P, ARVISENET G, GRUA P, et al. Influence of inulin on bread: kinetics and physico-chemical indicators of the formation of volatile compounds during baking[J]. Food Chemistry, 2010, 119(4): 1474-1484.
- [9] MEYER D. Inulin as texture modifier in dairy products[J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(8): 1881-1890.
- [10] 苗晓洁, 董文宾, 代春吉, 等. 菊糖的性质功能及其在食品工业中的应用[J]. 食品科技, 2006, 27(4): 9-11.
- [11] OLIVEIRA R, PEREGO P, OLIVEIRA M, et al. Growth, organic acids profile and sugar metabolism of *Bifidobacterium lactis* in co-culture with *Streptococcus thermophilus*: the inulin effect[J]. Food Research International, 2012, 48(1): 21-27.
- [12] PINHEIRO R, PERGO P, CONVERTI A, et al. The effect of inulin as a prebiotic on the production of probiotic fibre-enriched fermented milk[J]. International Journal of Dairy Technology, 2009, 62(2): 195-203.
- [13] 韩雪, 张兰威. 双歧杆菌增殖因子的筛选及培养基的优化[J]. 食品与生物技术学报, 2005, 24(4): 69-72.
- [14] PRASANNA P, GRANDISON A, CHARALAMPOPOULOS D. Effect of dairy-based protein sources and temperature on growth, acidification and exopolysaccharide production of *Bifidobacterium* strains in skim milk[J]. Food Research International, 2011, 47(1): 6-12.
- [15] KIM Y, FAQIH M N, WANG S. Factors affecting gel formation of inulin[J]. Carbohydrate Polymers, 2001, 46(2): 135-145.
- [16] RAHMAN M, KIM W, ITO T, et al. Growth promotion and cell binding ability of bovine lactoferrin to *Bifidobacterium longum*[J]. Anaerobe, 2009, 15(4): 133-137.
- [17] 张建平, 张泽生, 王金菊. 菊糖及其酶解产物对长双歧杆菌的促生长作用[J]. 天津科技大学学报, 2011, 26(4): 17-20.
- [18] 许威, 罗登林, 陈瑞红. 菊粉酸降解动力学研究[J]. 食品科学, 2012, 33(15): 95-98.
- [19] 郑晓丽, 芦春明, 韩璐. 膜分级菊粉及其部分理化性质[J]. 大连工业大学学报, 2011, 30(5): 337-340.
- [20] 程丹丹, 葛菁萍, 宋刚, 等. 应用响应面法优化乳酸乳球菌DU101发酵培养基[J]. 东北农业大学学报, 2010, 41(2): 116-122.
- [21] NINESS K. Breakfast foods and the health benefits of inulin and oligofructose[J]. Cereal Foods World, 1999, 44(2): 79-81.
- [22] 孙鹏, 赵旭博, 孙先峰. 响应面法优化长双歧杆菌增殖培养基[J]. 食品科学, 2013, 34(5): 207-212.
- [23] CATIA M, CIDALIA P, ADRIAN H, et al. Review on fermented plant materials as carriers and sources of potentially probiotic lactic acid bacteria with an emphasis on table olives[J]. Trends in Food Science and Technology, 2012, 26(1): 31-42.
- [24] 朱俊晨, 李世敏, 魏小青. 双歧杆菌对人体的生理作用及研究进展[J]. 中国微生态学杂志, 2000, 12(1): 53-55.
- [25] 陈晓明, 朱太海. 菊糖的功能及其在食品工业中的应用[J]. 食品科技, 2000, 26(5): 34-35.