

动物双歧杆菌冻干保护剂配方优化及 酸对菌粉存活率的影响

范洪臣¹, 柴利平^{1*}, 韩雪², 丁钊凡¹, 茜琳¹, 秦琦²

(1. 哈尔滨商业大学食品工程学院, 黑龙江省普通高校食品科学与工程重点实验室, 哈尔滨 150076; 2. 哈尔滨美华生物技术股份有限公司, 哈尔滨 150076)

摘要: **目的** 筛选动物双歧杆菌冻干菌粉保护剂, 优化冻干保护剂配方, 探究菌悬液制备过程中有机酸积累对菌粉存活率的影响。**方法** 以菌粉中动物双歧杆菌存活率为指标, 通过发酵培养、离心收集菌泥、制备菌悬液、预冻和冷冻干燥的菌粉制备工艺, 通过单因素实验和正交实验优化冻干保护剂。根据单因素实验探究冻干前菌悬液制备条件和最适 pH。**结果** 最佳保护剂组合为 5.00% 麦芽糊精、6.00% 海藻糖、0.15% 抗坏血酸、1.50% 谷氨酸钠、1.00% 甘油。通过对菌悬液制备过程中菌粉活菌数的研究确定菌悬液制备和冻干条件, 菌悬液 pH 6.5, 无菌水洗涤 2 次菌, 4°C 菌悬液融合 30 min, 在 -80°C 预冻 2 h, -40°C 下干燥 24 h, 获得的冻干菌粉活菌数为 1.38×10^{12} CFU/g, 菌粉最高存活率可达 98.60%。**结论** 本研究优化后的保护剂组合可以制备高活性动物双歧杆菌菌粉, 提高经济效益。

关键词: 动物双歧杆菌; 冷冻干燥; 存活率; 保护剂优化

Formulation optimization of lyophilized protective agent for *Bifidobacterium animalis* and its effect on the survival rate of bacterial powder

FAN Hong-Chen¹, CHAI Li-Ping^{1*}, HAN Xue², DING Ke-Fan¹, XI Lin¹, QIN Qi²

(1. Key Laboratory of Food Science and Engineering of Heilongjiang Provincial General Universities, School of Food Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China;
2. Harbin Meihua Biotechnology Co., Ltd., Harbin 150076, China)

ABSTRACT: Objective To screen the protective agent of freeze-dried powder of *Bifidobacterium animalis*, optimize the formula of freeze-dried protective agent, and explore the influence of organic acid accumulation on the survival rate of powder during the preparation of bacterial suspension. **Methods** The survival rate of *Bifidobacterium animalis* in bacterial powder was taken as the index, and the lyophilized protectant was optimized by single-factor test and orthogonal test by fermentation culture, centrifugation collection of bacterial sludge, preparation of bacterial suspension, pre-freezing and freeze-drying of bacterial powder. According to the single-factor test, the preparation conditions and optimal pH of the freeze-dried prebacterial suspension were explored. **Results** The best combination of protective agents was 5.00% maltodextrin, 6.00% trehalose, 0.15% ascorbic acid, 0.15% sodium

基金项目: 中央支持地方高校改革发展资金人才培养项目、国家重点研发计划项目(2021YFD2100902-3)

Fund: Supported by the Talents Training Project Supported by the Central Government for the Reform and Development of Local Colleges and Universities, and the National Key Research and Development Program of China (2021YFD2100902-3)

*通信作者: 柴利平, 硕士研究生, 主要研究方向为食品微生物。E-mail: 1328048612@qq.com

*Corresponding author: CHAI Li-Ping, Master Student, School of Food Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China. E-mail: 1328048612@qq.com

glutamate, and 1.00% glycerol, and the preparation conditions and lyophilization conditions of bacterial suspension were determined by studying the number of viable bacteria of acid to bacterial powder during the preparation of bacterial suspension, the pH of the bacterial suspension was 6.5, the bacterial sludge was washed twice with sterile water, the bacterial suspension was fused for 30 min at 4°C, prefrozen at -80°C for 2 h, dried at -40°C for 24 h, and the viable bacteria number of lyophilized bacterial powder was 1.38×10^{12} CFU/g. The highest survival rate of bacterial powder could reach 98.60%. **Conclusion** The optimized combination of protective agents in this study can prepare high-activity *Bifidobacterium animalis* powder and improve economic benefits.

KEY WORDS: *Bifidobacteria animalis*; freeze-dried; survival rate; protective agent optimization

0 引言

动物双歧杆菌(*Bifidobacteria animalis*)是益生菌家族成员之一,具有促进免疫调节、身体发育、调节肠道菌群结构、抗肿瘤、抗氧化、降低胆固醇等生物功能^[1-2]。目前益生菌大多以菌粉呈现在消费者面前,便于运输、保藏和后期产品的加工利用,并且最大程度地保证了菌活性,便于使用且效果显著^[3]。益生菌菌粉制备的两种常见工艺是喷雾干燥和冷冻干燥,其中真空冷冻干燥工艺制备菌粉具有活菌率高、复水稳定性好和冻干成品保存期长等优点,使其成为最重要的制备工艺^[4-6]。尽管真空冷冻干燥制备菌粉优点突出,但是没有好的制备工艺条件,菌粉存活率也不会高。其中菌泥中菌体浓度、保护剂种类和浓度、菌泥与保护剂混合比例是真空冷冻干燥过程影响存活率的关键因素^[7-8]。无保护剂情况下,敏感蛋白结构的改变、菌体细胞关键酶活性、细胞膜完整性和流动性的破坏导致菌活性非常低^[9]。研究表明没有一种单一保护剂可以大幅提高冻干存活率,且由于菌种之间蛋白、酶和脂等结构成分不同,因此应用的保护剂种类也不同^[10]。如赵禹彤^[11]以 19%麦芽糊精、12%草菇多糖提取物和 10%鱼胶原蛋白肽作为保护剂,冷冻干燥后可以提高罗伊氏乳杆菌 F-9-35 的存活率;王琳^[12]以 15.80%脱脂乳、5.73%乳糖和 0.42%谷氨酸钠作为保护剂,冷冻干燥后可以使干酪乳杆菌存活率达到 92.4%;蒋文鑫等^[13]得出棉子糖和山梨糖醇作为保护剂对短双歧杆菌保护效果最好。冻干保护剂主要包括糖类、多元醇、氨基酸、抗氧化、混合物 5 大类:糖类可抑制细胞膜发生相变而保持液晶态稳定,如蔗糖、海藻糖、乳糖、果糖、透明质酸等^[14];多元醇类有机聚合物可保护菌体胞内免受缺水损伤和维持细胞活力,如甘油、山梨醇、甘露醇等^[15];氨基酸类可在细胞膜和细胞壁间形成缓冲层,如脯氨酸、半胱氨酸、谷氨酸等^[3];抗氧化类保护剂可以保护菌体胞内参与代谢的酶活力,如谷氨酸钠、抗坏血酸和抗坏血酸钠等^[16];复杂混合物类保护剂防止由于冻干过程细胞壁蛋白质损坏而引起的胞内物质泄漏而导致细胞死亡,如脱脂乳粉、麦芽糊精和酵母浸粉等^[17]。其中甘油、脱脂乳、海藻糖是益生菌中应用较多

的冻干保护剂^[18]。

菌粉存活率除了保护剂影响外,很多研究表明在冷冻干燥之前制备菌悬液过程中,菌利用保护剂营养产生的有机酸对活菌率影响也很大^[19]。同时乳酸菌在发酵过程中菌体细胞会自己携带一部分酸,降低保护剂菌悬液的 pH。有机酸能够以未解离的分子形式与细胞膜的磷脂高度互溶,从而通过被动扩散进入细胞内部,破坏细胞膜,酸化细胞质^[20]。在冻干过程中,有机酸会对菌体细胞造成损伤,降低菌粉存活率。动物双歧杆菌在发酵培养过程中极易产生有机酸,pH 变化较大,同时双歧杆菌曝光在空气中时随着时间和接触面的增加,死亡率也提高,冻干过程中对菌体破坏较大。为了获得高活性菌粉,本研究主要通过单因素实验和正交实验研究动物双歧杆菌制备过程中保护剂配方的优化和酸在菌粉制备过程中对存活率的影响,以期获得高存活率的动物双歧杆菌冻干菌粉。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

Bifidobacterium animalis 111 由哈尔滨美华生物技术股份有限公司提供。

麦芽糊精、海藻糖、抗坏血酸、谷氨酸钠(食品级,山东腾源化工科技有限公司);甘油(分析纯,天津市光复科技发展有限公司);氢氧化钠、硫酸镁、硫酸锰(分析纯,天津市天力化学试剂有限公司);乳酸(分析纯,天津市恒兴化学试剂制造有限公司);MRS 培养基(生物试剂,北京奥博星生物技术有限公司);吐温-80(分析纯,天津市瑞金特化学品有限公司);半胱氨酸(分析纯,黑龙江东泰科技开发有限公司)。

1.2 仪器与设备

DHP 微生物恒温培养箱(上海一恒科学仪器有限公司);DL-CJ-1NDII 洁净工作台(北京东联哈尔仪器制造有限公司);YXQ-A 立式压力蒸汽灭菌器(上海博讯医疗生物仪器股份有限公司);VORTEX 2 漩涡混匀器[德国 IKA(中国)有限公司];BSA124S-CW 分析天平(精度 0.0001 mg,北京赛多利斯仪器系统有限公司);FE28-standad 台式 pH 计[梅特勒-

托利多科技(中国)有限公司]; BLBI0-5SJ-2 5L 发酵罐(上海百伦生物科技有限公司); CN-SN2105 水浴锅(巩义市予华仪器有限公司); HH-S4 电磁炉(哈尔滨市当地家电商场); LGJ-10C9 冷冻干燥机(北京四环科学仪器科学仪器厂有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物双歧杆菌冻干菌粉的制备工艺流程

活化→增殖培养→离心收集菌体→菌悬液制备→预冻→真空冷冻干燥→冻干菌粉。

操作要点:

(1)活化与增殖培养

在-80℃冰箱取出菌种,置于室温下溶解,接种于100 mL MRS 液体培养基中37℃下培养20 h,根据梯度稀释在固体培养基涂布,挑取单菌落接种到250 mL MRS 培养基中37℃下培养20 h,活化2次。取第2次活化菌种以2%的接种量到5 L 发酵罐发酵培养基中,恒pH 5.8 增殖培养20 h。

(2)离心收集菌体

500 mL 无菌离心管中加入150 mL 动物双歧杆菌菌液,25℃、8000 r/min 离心20 min,弃上清液,得到菌泥。

(3)菌悬液的制备

收集离心的菌体,加入配制好的保护剂(前期实验结果:菌泥质量与保护剂体积比为2:3,涡旋混匀,得到菌悬液,室温放置1 h,使保护剂和菌体充分融合。

(4)菌悬液的真空冷冻干燥

将充分混合后的冻干菌悬液置于-80℃冰箱预冻2 h,取出后立即放入冷冻干燥机中,将样品置于冷冻干燥机中持续冻干24 h(冷冻干燥机要预先开启,使冷阱温度降至-55℃,避免因温度突然上升而致菌体受损,工作时真空度降至20 Pa),快速升温至常温,取出样品,使用生理盐水对冻干菌粉复水,计算其活菌数。

1.3.2 冻干保护剂的优化

(1)保护剂单因素筛选

5类不同保护剂中选择15种单一保护剂,对不同类型保护剂配制不同浓度的保护剂水溶液,根据存活率筛选出最理想的保护剂,见表1。

(2)不同类型保护剂对冻干菌粉存活率的影响

通过1.3.2(1)中实验结果筛选出麦芽糊精、海藻糖、谷氨酸钠、甘油、抗坏血酸。分别以1.00%、5.00%、10.00%、15.00%和20.00%确定麦芽糊精质量浓度的最优添加范围,以2.50%、5.00%、7.50%、10.00%、12.50%确定海藻糖质量浓度的最优添加范围,以0.01%、0.05%、0.10%、0.15%、0.20%确定抗坏血酸质量浓度的最优添加范围,以0.10%、0.50%、1.00%、1.50%、2.00%确定谷氨酸钠质量浓度和0.10%、0.50%、1.00%、1.50%、2.00%确定甘油质量浓度的最优添加范围,以菌粉存活率为指标,确定不同保护剂质量浓度的添加范围。

表1 单一保护剂筛选

类型	保护剂名称	质量浓度/%
混合物	脱脂乳粉	15.00
	麦芽糊精	15.00
	酵母浸粉	15.00
多元醇类	甘油	1.00
	山梨醇	1.00
	甘露醇	1.00
	海藻糖	5.00
糖类	乳糖	5.00
	果糖	5.00
氨基酸类	丙氨酸	0.40
	脯氨酸	0.40
	谷氨酸钠	0.40
	抗坏血酸	0.05
抗氧化类	半胱氨酸	0.05
	L-半胱氨酸盐酸盐	0.05
空白	生理盐水	0.90

(3)保护剂正交实验

依据上述单因素实验确定麦芽糊精、海藻糖、谷氨酸钠、抗坏血酸、甘油的最佳质量浓度的添加范围,用SPSS 20.0 软件设计五因素四水平共16个实验点的正交实验。以麦芽糊精(A)、海藻糖(B)、抗坏血酸(C)、谷氨酸钠(D)、甘油(E)作为正交设计的自变量,以动物双歧杆菌冻干菌粉存活率作为因变量,每个因素的4个水平分别以1、2、3、4编码,每个实验点做3次平行实验来减小实验误差。正交实验因素与水平设计见表2。

表2 正交实验因素与水平设计

水平	因素				
	A/%	B/%	C/%	D/%	E/%
1	5.00	3.00	0.01	0.50	0.50
2	10.00	6.00	0.05	1.00	1.00
3	15.00	9.00	0.10	1.50	1.50
4	20.00	12.00	0.15	2.00	2.00

1.3.3 不同pH菌悬液对冻干菌粉存活率的影响

选择菌泥与上述优化的保护剂水溶液,添加比例为2:3后融合,调节pH分别为7.0、6.5、6.0、5.5、5.0、4.5、4.0,将所有样品放入超低温冰箱(-80℃),预冻2 h后按1.3.1(4)进行真空冷冻干燥。

1.3.4 菌悬液融合时间不同对冻干菌粉存活率的影响

选择菌泥与上述优化的保护剂水溶液,添加比例为2:3后分别在10、20、30、40、50、60 min融合,将所有样品放入超低温冰箱(-80℃),预冻2 h后按1.3.1(4)进行真空冷冻干燥。

1.3.5 菌悬液充分融合 0.5 h 后的 pH 变化

样品 1、2 是通过选择原菌液同体积的无菌生理盐水、无菌蛋白胨水溶液(10 g/L)和无菌水分别洗涤两次收集到的菌泥(洗涤液 pH 为 7.0),以 4 g/L 菌泥与保护剂以 2:3 的比例混合,在常温(25°C)和 4°C 下放置 1 h,测定 pH。样品 3、4 是通过选择原菌液同体积的无菌生理盐水、无菌蛋白胨水溶液(10 g/L)和无菌水(洗涤液 pH 为 7.0)分别在常温和低温(8°C)静置 5 h(前期实验优化结果)后离心收集菌泥,再以 4 g/L 菌泥与保护剂按 2:3 比例混合,常温下充分融合 1 h 后测定 pH,不同样品条件设计见表 3。

1.3.6 不同处理组对冻干菌粉存活率的影响

根据上述制备的菌悬液的另一份样品在超低温冰箱(-80°C)预冻 2 h 后再将样品放入已经预先降温至-40°C 的真空冷冻干燥机中,冻干完成后,样品用无菌生理盐水复

原至冻干前质量,测定冻干存活率。

1.3.7 菌粉活菌计数

采用稀释梯度平板计数法,先称量一定量的菌粉,通过生理盐水复水,再通过梯度稀释进行平板计数法计算^[21]。

1.3.8 冻干后菌体存活率的计算

冻干后菌体存活率计算见式(1):

$$\text{菌体存活率}/\% = \frac{N}{N_1} \times 100 \quad (1)$$

公式(1)中, N ——冻干菌粉复溶后的活菌数, CFU/mL; N_1 ——冻干前离心收集菌泥的活菌数, CFU/mL。

1.4 数据统计分析

每次实验重复 3 次。实验设计与数据统计分析采用 SPSS 20.0 软件,数据绘图采用 Origin 8.6 软件。

表 3 不同样品实验条件的设计
Table 3 Design of experimental conditions for different samples

不同处理	洗涤液		
	无菌水	无菌生理盐水	无菌蛋白胨水溶液
样品 1	菌悬液常温融合 30 min	菌悬液常温融合 30 min	菌悬液常温融合 30 min
样品 2	菌悬液在 4°C 融合 30 min	菌悬液在 4°C 融合 30 min	菌悬液在 4°C 融合 30 min
样品 3	常温静置 5 h 后收集菌泥 常温融合 30 min	常温静 5 h 后收集菌泥 常温融合 30 min	常温静置 5 h 后离心 常温融合 30 min
样品 4	8°C 静置 5 h 后收集菌泥 常温融合 30 min	8°C 静置 5 h 后收集菌泥 常温融合 30 min	8°C 静置 5 h 后收集菌泥 常温融合 30 min

2 结果与分析

2.1 单一保护剂筛选结果分析

由表 4 得出 15 种不同的保护剂中山梨醇和甘露醇的保护效果与空白组没有显著性且保护效果相当,其余保护剂的保护效果均显著高于空白组,具有很好的保护效果。从以上的实验结果来看,脱脂乳粉与酵母浸粉冻干保护效果相当,麦芽糊精冻干保护效果最好,存活率达到 44.34%。可能是因为麦芽糊精具有一定的表面活性,在冻干过程中可优先从蛋白表面析出,可以提高玻璃化温度,抑制小分子物质结晶,从而对菌体细胞起到保护作用^[22]。乳糖、果糖、丙氨酸、脯氨酸、半胱氨酸和 L-半胱氨酸盐酸盐的冻干保护效果相当($P>0.05$)。海藻糖、甘油、谷氨酸钠和抗坏血酸的冻干保护作用相当($P>0.05$),对动物双歧杆菌的菌体存活率效果较好。海藻糖、甘油、谷氨酸钠、抗坏血酸在本研究中菌存活率高,与文献报导的结果一致^[23]。根据冻干保护效果和应用成本考虑,选择麦芽糊精、海藻糖、甘油、谷氨酸钠、抗坏血酸为单一保护剂,进行下一步优化实验。

表 4 单一保护剂筛选结果

Table 4 Single protective agent screening results		
类型	保护剂名称	存活率/%
混合物	脱脂乳粉(15.00%)	23.31±0.52 ^b
	麦芽糊精(15.00%)	44.34±1.18 ^a
	酵母浸粉(15.00%)	29.60±0.56 ^b
多元醇类	甘油(1.00%)	32.40±1.23 ^a
	山梨醇(1.00%)	10.24±0.23 ^c
	甘露醇(1.00%)	8.96±0.15 ^c
	海藻糖(5.00%)	30.20±1.16 ^a
	糖类	乳糖(5.00%)
氨基酸类	果糖(5.00%)	25.56±0.31 ^b
	丙氨酸(0.40%)	21.86±0.25 ^b
	脯氨酸(0.40%)	19.12±0.35 ^b
	谷氨酸钠(0.40%)	28.56±1.23 ^a
	抗坏血酸(0.05%)	24.23±0.86 ^a
抗氧化类	半胱氨酸(0.05%)	15.96±0.23 ^b
	L-半胱氨酸盐酸盐(0.05%)	20.24±0.25 ^b
空白	生理盐水(0.90%)	5.00±0.05 ^c

注:不同的字母上标表示差异性显著($P<0.05$)。

2.2 不同添加量单一保护剂对菌粉存活率的影响

2.2.1 不同麦芽糊精添加量对菌粉存活率的影响

麦芽糊精作为单一保护剂时, 随着添加量的增加菌粉存活率呈现出先上升后下降的趋势, 当质量浓度为 15.00% 时存活率最高为 44.50%。这可能是因为麦芽糊精是较好的表面活性剂, 抑制细胞结晶。相反, 过量加入麦芽糊精会导致菌体存活率降低, 这可能是高质量浓度麦芽糊精包裹了菌体细胞导致菌体丧失了自身保护的启动^[22]。综上, 选取 5.00%~20.00% 的麦芽糊精添加量进行正交实验。

2.2.2 不同海藻糖添加量对菌粉存活率的影响

海藻糖作为单一保护剂时, 随着添加量的增加菌粉存活率呈现出先上升后下降的趋势, 海藻糖质量浓度为 5.00% 时菌粉存活率最高为 32.50%。海藻糖被称为“生命之糖”, 能有效地提高菌体冻干存活率, 然而, 高海藻糖质量浓度反而不利于菌体的存活, 可能是因为过高质量浓度的海藻糖会导致玻璃化结构过强, 影响菌体自身的结构, 导致其存活率降低。另外, 过高质量浓度的海藻糖使得成本提高^[24]。综上, 选取 3.00%~12.00% 的海藻糖添加量进行正交实验。

2.2.3 不同抗坏血酸添加量对菌粉存活率的影响

当加入抗坏血酸作为单一保护剂时, 随着添加量的增加菌粉存活率呈现出先上升后下降的趋势, 抗坏血酸质量浓度为 0.05% 时存活率最高为 24.50%。研究表明, 抗氧化剂类保护剂可以保护菌体细胞内参与代谢的酶活力^[16], 抗坏血酸作为抗氧化类保护剂可以减少空气中的氧对菌体的破坏, 动物双歧杆菌是完全厌氧益生菌, 适量的抗坏血酸有明显的保护作用, 若添加过量会对细胞有酸化作用, 导致菌体丧失活性^[25]。综上, 选择 0.01%~0.15% 的抗坏血酸添加量进行后续正交实验。

2.2.4 不同谷氨酸钠添加量对菌粉存活率的影响

谷氨酸钠作为单一保护剂时, 随着添加量的增加菌

粉存活率呈现出先上升后下降的趋势, 谷氨酸钠质量浓度为 0.75% 时存活率最高为 35.00%。这可能是因为谷氨酸钠是一种小分子保护剂, 亲水性极强, 其与菌体蛋白质极性基团形成的氢键代替了周围的水分子, 在蛋白质表面形成保护膜, 避免氢键联结位置暴露于周围环境中, 在冻干过程中保护菌体蛋白质结构和功能的完整性^[26]。若加入过量的谷氨酸钠导致菌体渗透压增加, 则会降低菌粉存活率^[27]。综上, 选取 0.50%~2.00% 谷氨酸钠的添加量进行后续正交实验。

2.2.5 不同甘油添加量对菌粉存活率的影响

甘油作为单一保护剂时, 随着添加量的增加菌粉存活率呈现出先上升后下降的趋势。甘油质量浓度为 1.00% 时, 动物双歧杆菌的冻干存活率最高为 32.00%。这可能是因为甘油作为优良的冻干保护剂, 不仅可以减少冷冻过程中的冰晶产生, 还可以与细胞膜上的蛋白质结合, 从而维持细胞结构的完整性, 减少菌体死亡^[28-29]。但过多甘油加入, 会使得效果降低, 从而减少菌粉存活率。综上, 选取 0.50%~2.00% 的甘油添加量进行后续正交实验。

2.3 正交实验结果分析

不同组合冻干保护剂对动物双歧杆菌冻干存活率的影响如表 5 所示, 菌粉存活率最优的组合为 $A_1B_2C_4D_3E_2$, 即 5.00% 麦芽糊精、6.00% 海藻糖、0.15% 抗坏血酸、1.50% 谷氨酸钠、1.00% 甘油, 此条件下冻干存活率为 97.36%。对上述正交实验结果进行方差分析, 结果如表 6 所示, 麦芽糊精、海藻糖、抗坏血酸、谷氨酸钠、甘油对动物双歧杆菌冻干菌粉存活率都有显著影响, 且影响程度依次为麦芽糊精>甘油>抗坏血酸>谷氨酸钠>海藻糖。优化后保护剂配方重复 3 次验证实验, 优化保护剂制备的冻干菌粉存活率为 97.36%, 冻干菌粉活菌数为 1.00×10^{12} CFU/g。

表 5 正交实验结果
Table 5 Orthogonal experimental results

实验序号	A/%	B/%	C/%	D/%	E/%	存活率/%
1	1(5.00)	1(3.00)	1(0.01)	1(0.50)	1(0.50%)	84.75
2	1	2(6.00)	2(0.05)	2(1.00)	2(1.00%)	97.18
3	1	3(9.00)	3(0.10)	3(1.50)	3(1.50%)	74.01
4	1	4(12.00)	4(0.15)	4(2.00)	4(2.00%)	88.14
5	2(10.00)	1	2	3	4	85.31
6	2	2	1	4	3	57.63
7	2	3	4	1	2	61.58
8	2	4	3	2	1	42.94
9	3(15.00)	1	4	4	2	52.54
10	3	2	4	3	1	67.23
11	3	3	1	2	4	83.05
12	3	4	2	1	3	64.41

表 5(续)

实验序号	A/%	B/%	C/%	D/%	E/%	存活率/%
13	4(20.00)	1	4	3	2	70.62
14	4	2	3	1	4	80.23
15	4	3	2	4	1	57.63
16	4	4	1	3	2	85.31
K_1	344.08	293.22	310.74	290.97	252.55	
K_2	247.46	302.27	304.53	223.17	367.23	
K_3	267.23	276.27	197.18	382.48	196.05	
K_4	293.79	280.8	340.11	255.94	336.73	
k_1	114.69	97.74	103.58	96.99	84.18	
k_2	82.49	100.76	101.51	74.39	122.41	
k_3	89.08	92.09	65.72	127.49	65.35	
k_4	97.93	93.6	113.37	85.31	112.24	
R	15.44	8.67	47.64	53.10	57.06	
影响主次						$E>D>C>A>B$
最优水平						$A_1B_2C_4D_3E_2$
标准差						15.126

表 6 正交实验方差分析

Table 6 Variance analysis of orthogonal experiment

来源	III 型平方和	df	均方	F	显著性
校正模型	9407.584	15	627.172	97.988	**
截距	204583.823	1	204583.823	31963.626	**
麦芽糊精	3976.236	3	1325.412	207.079	**
海藻糖	425.348	3	141.783	22.152	**
抗坏血酸	1456.012	3	485.337	75.828	**
谷氨酸钠	1331.444	3	443.815	69.340	**
甘油	2845.135	3	948.378	148.172	**
误差	198.416	31	6.401		

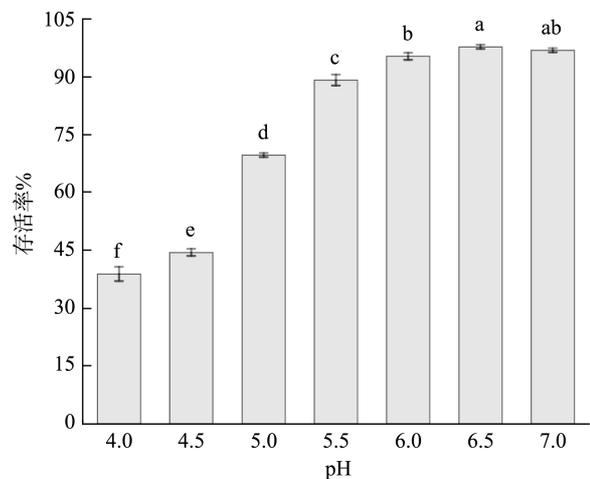
2.4 不同 pH 菌悬液对冻干菌粉活性的影响

由图 1 可知, pH 小于 6.0 时, 冻干菌粉存活率随 pH 降低而降低, pH 小于 5.5 时冻干菌粉存活率随 pH 降低而明显下降, pH 为 6.5 时菌粉存活率最高, 可达 98.34%。保护剂 pH 处于低 pH 时冻干菌体存活率降低, 说明酸的积累会导致菌体在冷冻干燥过程中大量丧失活性^[20]。因此, 为了在保护剂与菌泥充分融合过程中减少酸积累, 得到高存活率的菌粉, 通过实验探究降低菌泥中菌体自身携带的有机酸和菌悬液在充分融合过程中利用保护剂中的营养物质产生有机酸, 避免酸过量积累对菌体细胞造成严重的伤害^[30]。

2.5 不同菌悬液融合时间对冻干菌粉存活率的影响

由图 2 可知, 随着菌悬液融合时间的增加, 冻干菌粉存活率呈现先升后降的趋势, 融合时间为 30 min 时菌粉存活率最高为 97.64%。这可能是因为菌悬液融合时间短时保护剂与菌泥没有充分融合, 降低了菌体的抵抗力。当融合时间长时菌体细胞利用保护剂营养物质代谢产酸或自身细

胞膜在发酵期携带的酸对其产生了毒害作用。因此, 选择 30 min 菌悬液融合时间进行后续实验^[31]。



注: 图中不同小写字母代表差异显著, $P < 0.05$, 下同。

图 1 不同 pH 菌悬液对冻干菌粉存活率的影响

Fig.1 Effects of different pH of protective agents on the survival rates of lyophilized bacterial powder

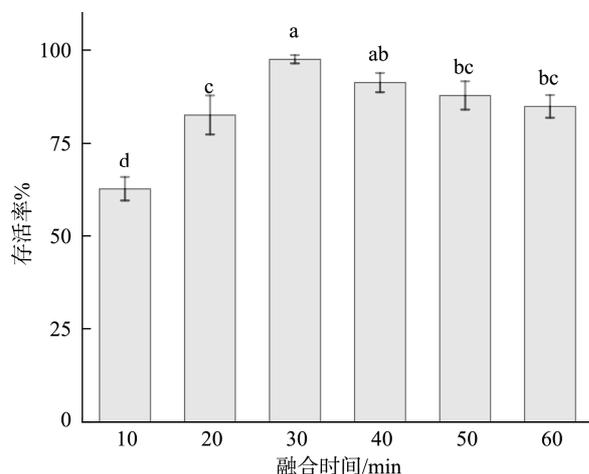


图 2 菌悬液不同融合时间对冻干菌粉的影响

Fig.2 Effects of different fusion times of bacterial suspension on lyophilized bacterial powder

2.6 不同样品制备菌悬液 30 min 后的 pH 变化

图 3 为样品 1、样品 2、样品 3、样品 4 在菌悬液制备过程中菌泥与保护剂以 2:3 的比例融合 1 h 后的 pH 变化。在样品 1(洗涤两次后常温下融合 30 min)的条件下菌悬液制备时的 pH 明显低于样品 2(洗涤两次后 4°C 融合 30 min)的 pH 变化, 样品 1 的 pH 在 5.0 以下, 样品 2 的 pH 在 6.0 以上。样品 3(原菌液同体积洗涤液在 8°C 下静置 5 h 后收集菌泥在常温下融合 30 min)与样品 4(原菌液同体积洗涤液在常温下静置 5 h 后收集菌泥常温下融合 30 min) pH 略高于样品 1 条件下的菌悬液, 低于样品 2 条件下制备的菌悬液 pH, 且 pH 大于 5.0。通过图 3 可以看到当菌悬液经过不同处理条件融合后, 洗涤液无菌水、无菌生理盐水、无菌蛋白胨水溶液之间的 pH 变化几乎没有明显的区别, 样

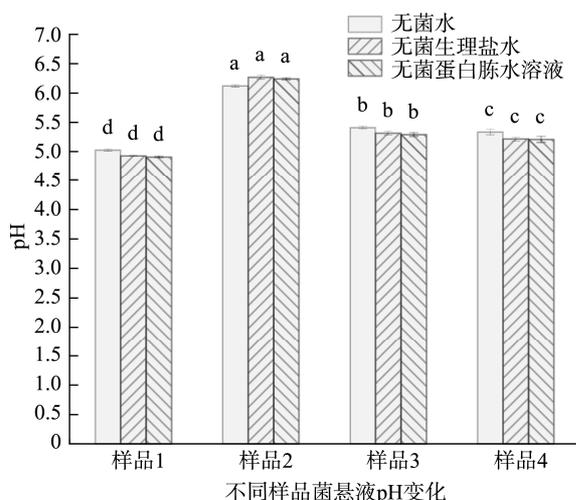


图 3 不同条件处理样品菌悬液制备 1 h 后的 pH 变化

Fig.3 Change of pH after 1 h preparation of bacterial suspension of different treatment samples

品 2 中洗涤液无菌水的 pH 变化比无菌生理盐水和无菌蛋白胨水溶液的略低, 样品 1、样品 3、样品 4 条件下制备菌悬液时 pH 变化高于无菌生理盐水和无菌蛋白胨水溶液。可以表示菌株在低温 4°C 下融合时不易产酸, 在常温下能够继续产酸导致菌悬液 pH 降低, 使用无菌水洗涤菌泥后在低温下进行菌悬液制备时 pH 变化较小^[32]。

2.7 不同处理样品对菌粉冻干存活率的影响

由图 4 可知, 实验样品 1、样品 2、样品 3 和样品 4 中样品 1 对冻干菌粉存活率影响显著, 这也与图 1 中 pH 越小冻干菌粉存活率越低相对应, 同时与图 3 所示样品 1 条件下的菌悬液 pH 降低趋势相符合, 表明 pH 小于 5.0 时对冻干菌粉存活率影响较明显。而从图 4 中可知, 菌悬液在样品 2 和样品 3 条件下的菌粉存活率基本相同, 但是样品 4 条件下冻干存活率低于样品 2 与样品 3。说明在样品 2 和样品 3 两种情况下进行菌悬液充分融合可以提高菌粉存活率, 避免在菌悬液融合阶段由于菌体在发酵阶段积累的酸和融合时菌体利用保护剂产生的酸大量积累而导致菌悬液 pH 降低, 导致菌粉存活率下降。

根据图 4 可知, 3 种洗涤液中无菌水洗涤菌泥对菌粉存活率影响最小。从样品 1 中可以看到, 在同一条件下 3 种洗涤液中无菌水对冻干菌粉存活高于另外 2 种洗涤液。通过样品 2、3、4 中也可以看到无菌水洗涤液对动物双歧杆菌冻干菌存活率有积极作用, 所以选择洗涤液无菌水可以降低成本, 动物双歧冻干菌粉存活率较高。

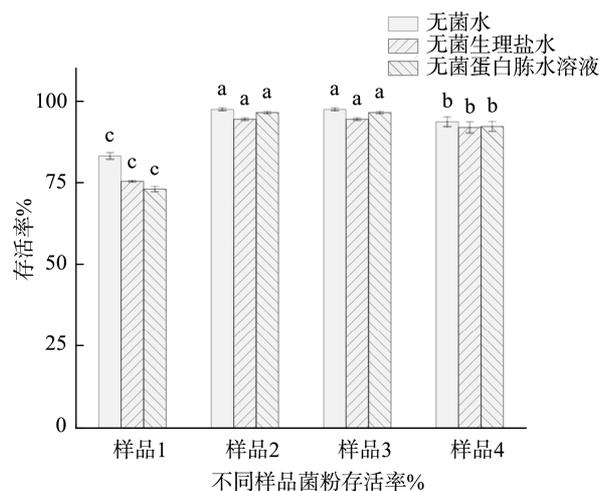


图 4 不同条件处理样品对冻干菌粉存活率的影响

Fig.4 Effects of samples treated under different conditions on the viability of lyophilized bacterial powder

3 结 论

本研究通过单因素实验、正交实验对动物双歧杆菌冻干保护剂配方进行了优化, 并且探究了保护剂 pH 和菌悬

液制备的不同处理中有机酸的变化对菌粉存活率的影响,根据实验结果,动物双歧杆菌的保护剂优化组合为:5.00%麦芽糊精、6.00%海藻糖、0.15%抗坏血酸、1.50%谷氨酸钠和1.00%甘油,冻干存活率为97.36%。菌悬液pH为6.5时菌粉存活率最高为98.34%。为了避免菌悬液制备过程中高浓度菌体产酸引起pH降低,导致冻干菌粉活性大量丧失,在制备菌悬液时将样品置于低温(4℃)下30 min。在收集菌泥时,洗涤液选择无菌水最佳,同时无菌水更经济。通过上述方法制备的动物双歧杆菌冻干菌粉的存活率可达到98.60%,冻干菌粉活菌数是 1.38×10^{12} CFU/g。优化后的冻干保护剂配方组合与菌悬液制备条件的冻干工艺可大幅提高冻干菌粉活性,降低生产成本,提高产品经济效益。

参考文献

- [1] 闫爽. 长双歧杆菌遗传与表型多样性及其与免疫调节功能的相关性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2019.
YAN S. Study on genetic and phenotypic diversity of *Bifidobacterium longum* and its correlation with immunomodulatory function [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2019.
- [2] 颜准, 吴朝君, 张小兰, 等. 动物双歧杆菌乳亚种 M8 胞外多糖的分离纯化和分子特征[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(2): 33–39
YAN Z, WU CJ, ZHANG XL, et al. Isolation, purification and molecular characteristics of M8 exopolysaccharides of *Bifidobacterium animalis* milk subsp. [J]. Food Ferment Ind, 2022, 48(2): 33–39.
- [3] 于平, 胡淳玉, 黄星星, 等. 产肌醇的植物乳杆菌 ZJ2868 菌粉制备工艺[J]. 中国食品学报, 2021, 21(9): 142–149.
YU P, HU CY, HUANG XX, et al. Preparation process of inositol-producing *Lactobacillus plantarum* ZJ2868 powder [J]. Chin J Food Sci, 2021, 21(9): 142–149.
- [4] JI C, SUN M, YU J, et al. Trehalose and tween80 improve the stability of marine lysozyme during freeze-drying [J]. Biotechnol Biotech Equip, 2009, 23(3): 1351–1354.
- [5] COSTA E, USALL J, TEIXIDO N, et al. Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze-drying [J]. J Appl Microbiol, 2010, 89(5): 793–800.
- [6] POWELL KA. Biocontrol product fermentation, formulation and marketing [M]. US: Springer, 1992.
- [7] BOZOLU TF, OZILGEN M, BAKIR U. Survival kinetics of lactic acid starter cultures during and after freeze drying [J]. Enzyme Microbiol Technol, 1987, 9(9): 531–537.
- [8] 刘栋. 罗伊氏乳杆菌 LT018 高密度培养及其冻干技术的研究[D]. 南宁: 广西大学, 2017.
LIU D. Study on high-density culture of *Lactobacillus reuteri* LT018 and its lyophilization technology [D]. Nanning: Guangxi University, 2017.
- [9] SUN X, GAO L, WANG S, et al. Use of beta-galactosidase liposome model as a novel method to screen freeze-drying cryoprotectants [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2013, 29(10): 1907–1912.
- [10] 周莉, 平洋, 谭静, 等. 益生菌冻干保护剂及工艺优化研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(15): 6208–6212.
ZHOU L, PING Y, TAN J, et al. Research on probiotic lyophilization protectant and process optimization [J]. J Food Saf Qual, 2021, 12(15): 6208–6212.
- [11] 赵禹彤. 罗伊氏乳杆菌冻干保护剂的筛选及在发酵乳中的应用[D]. 长春: 吉林大学, 2020.
ZHAO YT. Screening of lyophilized protective agent of *Lactobacillus reuteri* and its application in fermented milk [D]. Changchun: Jilin University, 2020.
- [12] 王琳. 干酪乳杆菌冷冻干燥保护剂筛选及作用机理研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2012.
WANG L. Screening and mechanism of action of freeze-drying protectant for *Lactobacillus casei* [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2012.
- [13] 蒋文鑫, 崔树茂, 毛丙永, 等. 短双歧杆菌冻干保护剂的优选及高密度冻干工艺优化[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(9): 31–36.
JIANG WX, CUI SM, MAO BY, et al. Optimization of lyophilized protective agent and optimization of high-density lyophilization process of *Bifidobacterium breve* [J]. Food Fermentat Ind, 2020, 46(9): 31–36.
- [14] SABNA BS, VENEY T, RAMASANY M, et al. Evaluation of GABA production and probiotic activities of *Enterococcus faecium* BS5 [J]. Probiotics Antimicrob Proteins, 2021, 13(4): 1–12.
- [15] 张玲, 张楠驰, 魏勇, 等. 响应面法优化羊源解淀粉芽孢杆菌冻干保护剂配方[J]. 西南民族大学学报(自然科学版), 2022, 48(1): 22–32.
ZHANG L, ZHANG NC, WEI Y, et al. Optimization of lyophilized protective agent formulation of *Bacillus amyliolyticus* by response surface method [J]. J Southwest Minzu Univ (Nat Sci Ed), 2022, 48(1): 22–32.
- [16] BODZEN A, JOSSIER A, DUPONT S, et al. Design of a new lyoprotectant increasing freeze-dried *Lactobacillus* strain survival to long-term storage [J]. BMC Biotechnol, 2021, 21(1): 66.
- [17] 苏安分, 霍贵成, 杨丽杰. PVP K-30 对嗜酸乳杆菌的冻干保护研究[J]. 食品科技, 2011, 36(7): 250–254.
SU ANF, HUO GC, YANG LJ. Lyophilized protection of PVP K-30 against *Lactobacillus acidophilus* [J]. Food Sci Technol, 2011, 36(7): 250–254.
- [18] LI B, TIAN F, LIN X, et al. Effects of cryoprotectants on viability of *Lactobacillus reuteri* CICC6226 [J]. Appl Microbiol Biot, 2011, 92(3): 609–616.
- [19] CARPENTER CE, BROADBENT JR. External concentration of organic acid anions and pH: Key independent variables for studying how organic acids inhibit growth of bacteria in mildly acidic foods [J]. J Food Sci, 2009, 74(1): 12–15.
- [20] 崔树茂. 乳酸菌的生长抑制和冻干存活的影响因素及规律[D]. 无锡: 江南大学, 2017.
CUI SM. Influencing factors and laws of growth inhibition and lyophilized survival of lactic acid bacteria [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2017.
- [21] 沈萍, 范秀容, 李光武, 等. 微生物学实验 3 版[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999.
SHEN P, FAN XR, LI GW, et al. Microbiology experiment 3rd ed [M].

- Beijing: Higher Education Press, 1999.
- [22] 张涛, 闫有利. 草鱼肠道拮抗性芽孢杆菌的冻干保护剂优化研究[J]. 水产科学, 2018, 37(2): 244–248.
ZHANG T, YAN YL. Optimization of lyophilized protectant for intestinal antagonistic *Bacillus* in grass carp [J]. Fish Sci, 2018, 37(2): 244–248.
- [23] DOMAGAŁA J. Instrumental texture, syneresis and microstructure of yoghurts prepared from goat, cow and sheep milk [J]. Int J Food Prop, 2009, 12(3): 605–615.
- [24] CAPELA P, HAY TKC, SHAH NP. Effect of cryoprotectants, probiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt [J]. Food Res Int, 2006, 39(2): 205–211.
- [25] 关海滨, 乔俊缠, 包小妹, 等. 保加利亚乳杆菌冻干保护剂的优化[J]. 中国微生态学杂志, 2013, 25(2): 129–131.
GUAN HB, QIAO JC, BAO XM, *et al.* Optimization of lyophilized protectant of *Lactobacillus bulgaricus* [J]. Chin J Microecol, 2013, 25(2): 129–131.
- [26] POLOMSKA X, WOJTATOWICZ M, ZAROWSKAB, *et al.* Freeze-drying preservation of yeast adjunct cultures for cheese production [J]. J Food Nutr Sci, 2012, 62(3): 143–150.
- [27] 张传伟, 朱慧霞, 柴佳太, 等. 低聚木糖复配冻干保护剂的优化及其对双歧杆菌微胶囊性能的影响[J]. 食品工业科技, 2022, 43(21): 245–251.
ZHANG CW, ZHU HX, CHAI JT, *et al.* Optimization of lyophilized protective agent with xylo-oligosaccharide complex and its effect on the performance of bifidobacterium microcapsules [J]. Sci Technol Food Ind, 2022, 43(21): 245–251.
- [28] 田文静, 王俊国, 宋娇娇, 等. 适宜冷冻干燥保护剂提高植物乳杆菌 LIP-1 微胶囊性能[J]. 农业工程学报, 2015, 31(21): 285–294.
TIAN WJ, WANG JG, SONG JJ, *et al.* Proper cryoprotectants improving properties of *L. plantarum* LIP-1 microcapsules [J]. Trans Chin Soc Agric Eng, 2015, 31(21): 285–294.
- [29] TIAN X, LIU H, WANG X, *et al.* Using combined optimization and vacuum freeze drying technology to prepare directed vat setstarter for “Niuganba”, a fermented beef [J]. J Food Process Pres, 2021, 45(9): e15694.
- [30] ZHOU Y, CUI YH, QU XJ. Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: Structure, bioactivity and associations: A review [J]. Carbohydr Polym, 2019, 207: 317–332.
- [31] XIE Y, CAI GL, LIU YF, *et al.* Optimization of fermentation conditions and antioxidant activities of exopolysaccharide from *Bifidobacterium lactis* Bb12 [J]. Food Ferment Ind, 2019, 45(23): 55–59.
- [32] XU YM, CUI YL, YUE FF, *et al.* Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria and *Bifidobacteria*: Structures, physiochemical functions and applications in the food industry [J]. Food Hydrocolloid, 2019, 94: 475–499.

(责任编辑: 张晓寒 郑 丽)

作者简介



范洪臣, 博士, 讲师, 主要研究方向为传统发酵食品。

E-mail: fanhongchen@hrbcu.edu.cn



柴利平, 硕士研究生, 主要研究方向为食品微生物。

E-mail: 1328048612@qq.com