

黑曲霉孢子粉真空冷冻干燥保护剂配方优化

王 华¹, 贺金梅^{1,2}

(1. 中国农业科学院柑桔研究所, 重庆 400712; 2. 西南大学食品科学学院, 重庆 400715)

摘 要: 采用单因素试验和混合均匀试验设计, 对黑曲霉孢子粉真空冷冻干燥保护剂配方进行筛选和优化。通过Design-Expert软件对实验数据进行回归分析, 得到保护剂最佳配方为脱脂奶粉6.43 g/100 mL、蔗糖13.03 g/100 mL、甘油6.88 g/100 mL, 孢子存活率预测值为88.82%, 实际值为87.03%。

关键词: 黑曲霉; 保护剂; 均匀试验设计; 存活率

Optimization of Cryoprotectant Formulation for Vacuum Lyophilization of Spore Power of *Aspergillus niger*

WANG Hua¹, HE Jin-mei^{1,2}

(1. Citrus Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 400712, China;
2. College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: A cryoprotectant composed of skim milk powder, sucrose and glycerol for vacuum lyophilized spore power of *Aspergillus niger* was developed and its formulation was optimized by one-factor-at-a-time and uniform design. By regression analysis of the experimental data, the optimal cryoprotectant formulation (per 100 mL of cryoprotectant) found to consisted of 6.43 g of skim milk powder, 13.03 g of sucrose, and 6.88 g of glycerol. The predicted survival rate of spore with the addition of the optimized cryoprotectant after freeze-drying was 88.82%, which was close to the actual value of 87.03%.

Key words: *Aspergillus niger*; cryoprotectant; uniform design; survival rate

中图分类号: Q93.336

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2014)01-0159-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201401031

与液态微生物菌剂相比, 固态微生物活菌剂, 具有保藏期长、不易污染, 在运输、贮藏、质量控制等方面有其独特的优势^[1-2], 还可直接作为发酵剂、添加剂研制开发其他双歧保健食品和医药制剂等优点, 因而受到愈来愈多的关注^[3]。

目前关于菌种保藏的方法有真空冷冻干燥、喷雾干燥、流化床干燥、喷雾冷冻干燥等, 在众多的保藏方法中, 因真空冷冻干燥法是在低温、真空条件下进行的, 有利于提高菌种的成活率和保存时间。但真空冷冻干燥过程中, 冷冻和干燥两个过程会造成部分微生物细胞的死亡、损伤及某些酶蛋白分子的钝化^[4], 具体表现在以下几个方面: 冷冻过程中水结冰时体积增大以及冰晶的机械作用, 易破坏细胞内蛋白质活性部位一些较弱的化学键; 水结冰后溶质浓度增加、pH值变化、离子强度增加、相分离; 干燥过程中除去了与蛋白质、磷脂等生物大分子结合的大部分水分子, 易导致蛋白质分子变性失活, 细胞膜结构和功能改变。因此, 为减少冷冻和干燥过程中对细胞活性的影响, 通常加入不同类型的保护剂。保护剂可以改变微生物干燥时的物理、化学环境,

减轻或防止干燥或复水对细胞的损害, 尽可能保持微生物原有的各种生理生化特性和生物活性^[5-6], 进而达到保护的目, 表1列出了常用的保护剂类型以及保护机理^[7-18]。本实验以黑曲霉为发酵菌种, 采用均匀试验设计, 对黑曲霉冷冻干燥保护剂进行优化。

表1 保护剂类型及其保护机理
Table 1 Cryoprotectant types and corresponding protection mechanisms

保护剂类型	常用保护剂	保护机理
糖类	葡萄糖、蔗糖、乳糖、海藻糖 ^[7-10,12]	玻璃态假说、水替代假说
多羟基化合物	甘油、甘露醇、山梨醇肌醇、聚乙二醇 ^[10-11,13]	玻璃态假说、水替代假说
蛋白质类	蛋白胨、脱脂奶粉、卵清蛋白 ^[11-15]	优先化作用、玻璃态假说和水替代假说
氨基酸类	L-谷氨酸钠、甘油、L-半胱氨酸盐 ^[13,16-17]	玻璃态假说
聚合物	阿拉伯胶、 β -环状糊精、吐温-80 ^[2,18]	优先化作用、玻璃态假说

1 材料与方法

1.1 菌种与培养基

黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 2281 中国工业微生物菌种保藏中心。

收稿日期: 2013-06-25

基金项目: 国家现代农业(柑橘)产业技术体系建设专项(CARS-27-05C)

作者简介: 王华(1963—), 男, 研究员, 本科, 研究方向为柑橘深加工及贮藏。E-mail: wanghua40@126.com

菌种活化培养基: 5 °Bé麦芽汁琼脂培养基: 5 °Bé麦芽汁1 000 mL、琼脂15 g, 自然pH值; 菌落计数培养基(PDA培养基): 马铃薯300 g/L、葡萄糖20 g/L、琼脂20 g/L、氯霉素0.1 g/L。

1.2 材料、试剂与仪器

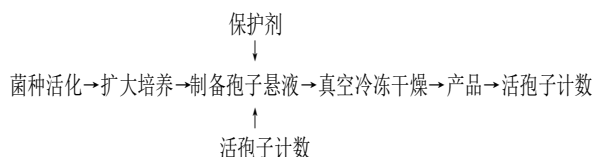
脱脂奶粉 市售。

蔗糖(分析纯) 国药集团化学试剂有限公司; 聚乙二醇(分析纯) 天津天泰精细化学品有限公司; L-谷氨酸钠(生化试剂)、甘油、乳糖、 β -环状糊精、硫酸锰、甘氨酸(均为分析纯) 成都市科氏化工试剂厂。

ZHWY-200B恒温振荡培养箱 上海智城分析仪器制造有限公司; H1850R高速冷冻离心机 湘仪离心机仪器有限公司; VFD-2000冷冻干燥机 北京博医康实验仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 工艺流程



1.3.2 菌种培养和孢子收集

菌种经过活化、扩大培养后, 用无菌水洗下孢子, 制备孢子悬液。

1.3.3 活孢子计数

稀释平板菌落计数法^[19], 28~30 °C培养48 h。

1.3.4 冻干后样品的处理及孢子存活率计算

向冻干后样品中加入10 mL无菌的生理盐水, 于37 °C培养箱中放置15 min^[20-21]; 然后采用稀释平板菌落计数法测定样品中的活孢子数。

$$\text{存活率}/\% = \frac{\text{冻干后样品的活孢子数}/(\text{CFU/mL}) \times 5}{\text{冻干前悬液中的活孢子数}/(\text{CFU/mL})} \times 100$$

1.3.5 真空冷冻干燥工艺

黑曲霉活化后, 直接用无菌水洗下孢子, 显微镜计数并调整其浓度为 1×10^9 CFU/mL的孢子悬液, 活孢子数用稀释平板菌落计数法测定。于无菌的培养皿中加入2 mL孢子悬液, 然后按保护剂与悬液体积比为2:1的比例加入保护剂, 保护剂与悬液平衡时间30 min; 冷冻干燥各参数为: 预冻温度-40 °C、预冻时间2 h、升华温度-30 °C、解析温度25 °C、干燥时间24 h、真空度3~10 Pa。

1.3.6 保护剂筛选

采用蔗糖、脱脂奶粉、乳糖、聚乙二醇、L-谷氨酸钠、甘油、 β -环状糊精、硫酸锰、甘氨酸9种保护剂, 将上述保护剂用蒸馏水分别配成不同质量浓度的溶液, 121 °C灭菌20 min后于4 °C冰箱中备用。以蒸馏水作对照, 测定冻干前后活孢子数, 计算孢子存活率, 每组试验进行3次重复。

1.3.7 均匀设计试验

根据单因素试验结果, 以孢子冻干存活率为试验指标, 对黑曲霉冷冻干燥保护剂效果较好的3种保护剂蔗糖、甘油、脱脂奶粉进行混合均匀试验设计^[22], 以确定真空冷冻干燥黑曲霉孢子粉保护剂最佳配方, 每组试验进行3次重复。

2 结果与分析

2.1 单一保护剂实验

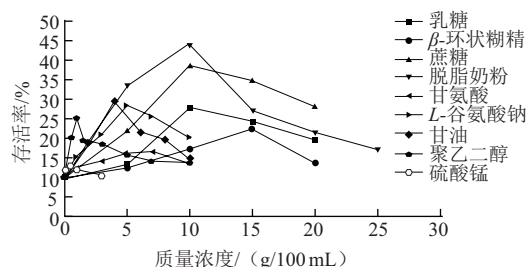


图1 保护剂对黑曲霉孢子冻干存活率的影响

Fig.1 Effect of cryoprotectant type on survival rate of *Aspergillus niger* spores

由图1可知, 没有添加任何保护剂的孢子冻干存活率只有10.07%, 孢子冻干存活率随着各种保护剂添加量的增加而增加; 当乳糖、蔗糖、 β -环状糊精、脱脂奶粉、L-谷氨酸钠、甘氨酸、聚乙二醇、甘油、硫酸锰的质量浓度分别为10、10、15、10、5、7、1、4、0.5 g/100 mL时, 孢子冻干存活率最大, 分别为27.81%、38.42%、22.49%、43.91%、28.51%、16.73%、25.05%、29.38%、12.75%。由于高质量浓度的保护剂会加速细胞内的蛋白质聚合, 形成较强玻璃化结构, 反而不利于细胞的保存, 且复水效果不好^[23], 所以, 当保护剂的质量浓度超过它们的最佳浓度后, 孢子冻干存活率随着各种保护剂添加量的增加反而下降。

其中蔗糖、脱脂奶粉、甘油对黑曲霉孢子冻干保护效果较好。蔗糖、甘油属于渗透型保护剂, 脱脂奶粉属于非渗透型保护剂^[24]。蔗糖、甘油能透过细胞壁, 进入细胞内, 使细胞内溶质浓度升高, 细胞内压力接近于细胞外压力, 降低细胞外干燥或冻结引起的细胞脱水皱缩的程度和速度, 从而减少对细胞的损伤。脱脂奶粉主要是保护细胞的表面免受伤害, 在冻干时使溶液呈过冷状态, 降低溶液结冰的速度, 避免细胞在冷冻或加热时由于盐类浓缩, 使细胞脱水而导致细胞发生细胞壁和细胞膜的塌陷、渗透压性休克、蛋白质变性等不良后果^[25]。另外, 蔗糖、甘油又是亲水性保护剂, 它们的羟基基团可与蛋白质形成氢键, 从而代替蛋白质极性基团周围的水分子, 使蛋白质表面形成一层水化膜保护氢键, 进而稳定蛋白质的高级结构, 防止蛋白质因干燥而变性^[26]。

单因素试验研究表明,其他几种保护剂对黑曲霉孢子的保护效果都比较差,然而,即便是最佳质量浓度的脱脂奶粉,孢子最大冻干存活率也只有43.91%,难以达到工业化生产冻干孢子粉的目的。通常情况下,几种保护剂复合使用,保护效果要比单一保护剂的效果好。根据单因素试验结果,选用蔗糖、脱脂奶粉、甘油3种保护剂进行混合均匀试验设计,以冻干存活率为试验指标,以确定真空冷冻干燥黑曲霉孢子粉保护剂最佳配方。

2.2 均匀设计试验

通过对脱脂奶粉、蔗糖、甘油3种保护剂对黑曲霉孢子冻干存活率的影响进行均匀试验设计,结果如表2所示。利用Design-Expert软件对表2中的试验数据进行回归分析,得到二次回归方程: $Y=2.373\ 40+6.846\ 02X_1+18.745\ 47X_3+0.788\ 991X_1X_2-1.421\ 04X_1X_3-0.737\ 71X_2X_3-0.571\ 88X_1^2$ 。

表2 黑曲霉孢子冻干保护剂均匀试验设计方案及结果
Table 2 Uniform design and results for cryoprotectant optimization for *Aspergillus niger* spores

试验号	X_1 脱脂奶粉/(g/100 mL)	X_2 蔗糖/(g/100 mL)	X_3 甘油/(g/100 mL)	冻干存活率/%
1	1 (1)	1 (4)	1 (3)	55.42
2	2 (2)	2 (8)	2 (5)	73.95
3	3 (3)	3 (12)	3 (7)	72.73
4	4 (4)	4 (16)	1	66.92
5	5 (5)	1	2	78.12
6	6 (6)	2	3	81.09
7	7 (7)	3	1	86.75
8	8 (8)	4	2	79.88
9	9 (9)	1	3	57.36
10	10 (10)	2	1	74.01
11	11 (11)	3	2	77.04
12	12 (12)	4	3	64.69

由表3可得回归方程显著性检验 $F=122.71>F_{0.01(6,5)}=10.67$,即回归方程显著。由表4中标准回归系数的绝对值,可得各因素对黑曲霉冻干存活率影响的主次顺序为 $X_3>X_1>X_1X_3>X_1X_2>X_2X_3>X_1^2$ 。

对回归方程求偏导,得最优条件为 $X_1=6.43$ 、 $X_2=13.02$ 、 $X_3=6.88$,即当脱脂奶粉、蔗糖、甘油的质量浓度分别为6.43、13.03、6.88 g/100 mL时,黑曲霉孢子冻干存活率最大,达到88.82%。按照保护剂的最佳配方,3次重复实验黑曲霉孢子冻干存活率平均值为87.03%,即冻干粉中的活孢子数为 4.3×10^9 CFU/g,与预测值接近,无显著差异,说明所建立回归模型合理。而丁春杰等^[27]对黑曲霉菌丝体真空冷冻干燥进行研究,发现当采用10 g/100 mL海藻糖和10 g/100 mL脱脂乳的复合保护剂时,能最大限度地提高菌丝体成活率,冻干菌粉中菌丝体含量也达到 10^9 CFU/g。海藻糖在高温、高寒、高渗透、高压及干燥失水等恶劣环境条件下在细胞表面能形成独特的保护膜,有效地保护蛋白质分子不

变性失活,进而提高细胞存活率,保护效果好。但海藻糖成本较高,而本实验采用较低成本的脱脂奶粉、蔗糖、甘油作为复合保护剂,冻干菌粉中孢子含量也达到 4.3×10^9 CFU/g。

由于仪器、操作人员不同、环境因素等影响,本实验结果存在误差,对于工业化大规模生产黑曲霉孢子粉,还需根据冻干设备性能、产量、能源、成本等诸多因素确定最佳的冻干保护剂配方。

表3 黑曲霉孢子冻干保护剂回归方差分析
Table 3 Analysis of variance for the regression model for cryoprotectant optimization for *Aspergillus niger* spores

变异来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
回归	993.94	6	165.66	122.71	<0.000 1
剩余	6.74	5	1.35		
总变异	1 000.68	11			

表4 黑曲霉孢子冻干保护剂优化回归系数显著性检验
Table 4 Significance test of the regression coefficients for cryoprotectant optimization for *Aspergillus niger* spores

变异来源	回归系数	标准回归系数	T'值	P值
常数	2.373 40			
X_1	6.846 02	3.271 06	15.46	0.004 2
X_3	18.745 47	45.359 75	8.36	0.014 0
X_1X_2	0.788 991	0.080 95	8.30	0.014 2
X_1X_3	-1.421 04	-0.417 96	-5.22	0.034 9
X_2X_3	-0.737 71	-0.107 02	-4.71	0.042 2
X_1^2	-0.571 88	-0.033 93	-10.40	0.009 1

3 结 论

本研究采用单因素试验和混合均匀设计试验,对黑曲霉孢子粉真空冷冻干燥保护剂配方进行了筛选和优化。单因素试验结果表明,蔗糖、脱脂奶粉、甘油的保护效果较好;通过回归分析得到黑曲霉孢子粉真空冷冻干燥保护剂的二次回归方程: $Y=2.373\ 40+6.846\ 02X_1+18.745\ 47X_3+0.788\ 991X_1X_2-1.421\ 04X_1X_3-0.737\ 71X_2X_3-0.571\ 88X_1^2$ 。保护剂最佳配方为脱脂奶粉6.43 g/100 mL、蔗糖13.03 g/100 mL、甘油6.88 g/100 mL,3次验证实验黑曲霉孢子冻干存活率平均值为87.03%。

参考文献:

- [1] FU Nan, CHEN Xiaodong. Towards a maximal cell survival in convective thermal drying process[J]. Food Research International, 2011, 44: 1127-1149.
- [2] 南君勇. 真空冷冻干燥技术制备酵母菌粉的研究[D]. 天津: 天津大学, 2007.
- [3] BAYROCK D, INGLEDEW W M. Mechanism of viability loss during fluidized bed drying of baker's yeast[J]. Food Research International, 1997, 30(6): 417-425.
- [4] 田洪涛, 贾英民, 马雯, 等. 嗜热链球菌真空冷冻干燥前后发酵活力变化[J]. 中国乳品工业, 2001 (6): 17-19.

- [5] 黄科. 真空冷冻干燥乳酸菌的研究进展[J]. 西安文理学院学报: 自然科学版, 2009, 12(3): 49-52.
- [6] 赵志华, 岳田利, 王燕妮, 等. 酿酒活性干酵母(AADY)的研究[J]. 中国酿造, 2006(11): 1-4.
- [7] 张玉华, 孟一, 凌沛学, 等. 海藻糖和透明质酸对冻干双歧杆菌细胞的保护作用[J]. 食品科学, 2010, 31(7): 236-241.
- [8] 靳志强, 李平兰. 培养基、保护剂和饥饿处理对冻干乳酸菌存活性的影响[J]. 食品科学, 2007, 28(7): 296-298.
- [9] YING Danyang, SUN Jing, SANGUANSRI L, et al. Enhance survival of spray-dried microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG in the presence of glucose[J]. Journal of Food Engineering, 2012, 109(3): 597-602.
- [10] 李宁, 赵珊, 贾英民. 黑曲霉乳糖酶冻干保护剂的研究[J]. 中国酿造, 2010(12): 101-103.
- [11] 黄丽金, 陆兆新, 袁勇军. 酸奶菌种冷冻干燥保护剂的筛选研究[J]. 食品科学, 2005, 26(12): 103-106.
- [12] ABADIAS M, BENABARRE A, TEIXIDO N, et al. Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*[J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 65: 173-182.
- [13] DIANAWATI D, MISHRA V, SHAH N P. Survival of *Bifidobacterium longum* 1941 microencapsulated with proteins and sugars after freezing and freeze drying[J]. Food of Research International, 2013, 51(2): 503-509.
- [14] 郝营, 王卫卫, 马齐, 等. 冻干乳酸双歧杆菌微胶囊的制备及存活性能研究[J]. 食品科学, 2009, 30(9): 163-167.
- [15] 李家鹏, 张学刚, 乔晓玲, 等. 响应面法优化植物乳杆菌冷冻干燥保护剂配方的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(6): 146-150.
- [16] GHANDI A, POWELL I, CHEN Xiaodong, et al. Drying kinetics and survival studies of dairy fermentation bacteria in convective air drying environment using single droplet drying[J]. Journal of Food Engineering, 2012, 110(3): 405-417.
- [17] YANG Chanyuan, ZHU Xiaoli, FAN Daidi, et al. Optimizing the chemical composition of protective agents for freeze-drying *Bifidobacterium longum* BIOMA5920[J]. Chinese Journal of Chemical Engineering, 2012, 20(5): 930-936.
- [18] 张建峰, 耿宏伟, 王丕武. 酿酒活性干酵母生产工艺优化及干燥剂的选择[J]. 食品科学, 2011, 32(9): 213-216.
- [19] 中华人民共和国卫生部. GB 4789.15—2010食品安全国家标准食品微生物学检验霉菌和酵母计数[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [20] 肖冬光, 邹海晏, 程志娟, 等. 酒精活性干酵母的活化与活细胞率的测定[J]. 酿酒科技, 1991(2): 25-27.
- [21] 陈敏, 梁新乐, 励建荣. 葡萄酒活性干酵母复水活化条件的研究[J]. 江苏食品与发酵, 2001(2): 6-9.
- [22] 王钦德. 食品试验设计与统计分析[M]. 2版. 北京: 中国农业大学出版社, 2010: 368-377.
- [23] 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, 2010, 34(6): 561-565.
- [24] ZDENEK H. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms[J]. Cryobiology, 2003, 46(3): 205-229.
- [25] 卢行安, 陈明生, 袁杰利, 等. 乳酸菌冷冻干燥工艺的研究进展[J]. 中国微生态学杂志, 2001, 13(1): 58-61.
- [26] 朱永宁, 泉本腾利. 血红蛋白(Hb)的低温保护剂[J]. 吉林大学自然科学学报, 1999(3): 88-92.
- [27] 丁春杰, 肖更生, 陈卫东, 等. 黑曲霉菌丝体真空冷冻干燥的研究[J]. 现代食品科技, 2008, 24(8): 745-747.