

冻干高活力纳豆芽胞杆菌菌粉保护剂的筛选和优化

胥振国^{1*} 蔡玉华¹ 向敏¹ 胡翰林¹ 黄鹤春²

- (1. 合肥职业技术学院 生物应用技术系 安徽 合肥 238000)
(2. 安徽省富硒香生物食品集团有限公司 安徽 合肥 238000)

摘要: 【目的】对冻干高活力纳豆芽胞杆菌菌粉保护剂进行筛选和优化研究,提高菌粉活菌存活率。【方法】采用单因素实验和正交实验设计,通过测定活菌存活率,筛选出最佳保护剂的配方;并研究采用优化后冻干保护剂制备的菌粉在-20℃、4℃、25℃下的保存稳定性。【结果】纳豆芽胞杆菌的有效保护剂是:脱脂乳粉、甘露醇、L-抗坏血酸钠。最佳冷冻干燥保护剂配方是:脱脂乳粉 10%+甘露醇 4%+L-抗坏血酸钠 1%,存活率达到 91.63%。菌粉在-20℃、4℃、25℃下保存 12 个月后,存活率分别为:88.79%、70.16% 和 10.52%,说明菌粉在-20℃和 4℃下保存稳定性较好,25℃下稳定性比较差。【结论】对纳豆芽胞杆菌冻干菌粉保护剂的优化,对纳豆芽胞杆菌的应用、活菌产品的质量稳定及新产品的研发均有一定的指导意义。

关键词: 纳豆芽胞杆菌, 冻干保护剂, 冻干菌粉, 保存稳定性

Screening and optimization of the cryoprotectants for high active *Bacillus natto* powder

XU Zhen-Guo^{1*} CAI Yu-Hua¹ XIANG Min¹

HU Han-Lin¹ HUANG He-Chun²

(1. Department of Biotechnology, Hefei Vocational and Technical College, Anhui, Hefei 238000, China)

(2. Anhui Fuxixiang Biological Food Group Co. Ltd., Anhui, Hefei 238000, China)

基金项目: 安徽省教育厅自然科学研究(产学研)项目(No. KJ2011B106); 医学检验技术专业“中央财政支持提升服务能力”建设项目资助(No. 教育部教职成厅函[2011]71号)

*通讯作者: Tel: 86-551-65631995; 信箱: xuzg0551@163.com

收稿日期: 2013-01-10; 接受日期: 2013-03-25

Abstract: [Objective] Study on the technology of selection and optimization of *Bacillus natto* freeze-dried powder, in order to increase the survival rates of living bacteria. **[Methods]** Single factor and orthogonal experimental designs were taken to measure the survival cells and then screened the protection agent formulations. And the storage stabilities of optimized lyoprotectant powder prepared at protection agent formulations. And the storage stabilities of optimized lyoprotectant powder prepared at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ were tested. **[Results]** The effective protecting agents of *Bacillus natto* were: skimmed milk powder, mannitol, L-sodium ascorbate. The best protectants formula: 10% skim milk powder, 4% Mannitol and 1% L-sodium ascorbate, the results showed that the survival rate could reach to 91.63%. The survival rates of fungus powder conserved at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 12 months were 88.79%, 70.16% and 10.52%, respectively. The storage stability of bacteria powder at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ were excellent, while that at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ was poor. **[Conclusion]** The freeze-dried powder protective of *Bacillus natto* was optimized, which provided a guidance for application of *Bacillus natto*, stabilization of quality of live bacterial product and development of novel live bacterial products.

Keywords: *Bacillus natto*, Cryoprotectant, Freeze-dried powder, Storage stability

纳豆芽胞杆菌(*Bacillus natto*)最初是在 1905 年由日本东京大学的泽村教授从纳豆中分离得到的, 对人体无病原性的安全菌株^[1], 该菌株不仅具有促进机体乳酸菌、双歧杆菌等益生菌的增殖, 增强机体免疫的功能, 还具有抗病原菌、防癌等保健功能, 被誉为“超级健康食品”^[2-3]。纳豆芽胞杆菌能产生一种具有溶解纤维蛋白活性的酶, 可促使血浆中 t-PA 含量显著增加, 从而有助于提高人体内的纤溶酶活性, 使纳豆芽胞杆菌具有溶解血栓的作用^[4], 并且还有稳定肠道温度和 pH 的作用^[5]。但现在存在一个最为关键的问题就是市场上销售的纳豆芽胞杆菌菌粉在销售和贮存过程中活菌数量大大下降, 导致效用降低, 不能达到产品预期的目的。目前市场上制备的纳豆芽胞杆菌活菌粉大多采用冷冻干燥技术。但冷冻干燥过程中, 冷冻和水分蒸发会对纳豆芽胞杆菌造成细胞损伤、机械损伤、死亡及一些蛋白酶分子的钝化等一系列的损伤。如果直接冷冻纳豆芽胞杆菌菌液, 会使纳豆芽胞杆菌的活菌数目大幅

度下降。所以纳豆芽胞杆菌冷冻干燥成菌粉的关键在于有效保护剂的使用。保护剂可以尽可能保护其生物活性和生理生化特性, 从而减轻冷冻干燥过程中对菌体的损害^[6]。

本实验以前期筛选并经过 16S rDNA 等鉴定的一株纳豆芽胞杆菌 F3^[7]为研究对象, 采用单因素试验及正交试验设计, 系统研究将其冻干为菌粉的最佳抗冻保护剂的配方及菌粉的保存稳定性, 以期最大限度地发挥保护剂的保护功能, 减少菌体在冷冻干燥过程中的死亡, 提高细胞的存活率, 为纳豆芽胞杆菌的应用、活菌产品的质量稳定及新产品的研发等打下基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 纳豆芽胞杆菌 F3, 本院微生物学实验室保存。

1.1.2 培养基: (1) 种子培养基: 蛋白胨 1%, NaCl 0.5%, 牛肉膏 0.5%, pH 7.2-7.4; (2) 发酵培

培养基: 豆饼粉 1.0%, 葡萄糖 1.5%, NaCl 0.5%, 无水 CaCl₂ 0.5%, MnSO₄ 0.1%, pH 7.4; (3) 保护剂溶液的配制: 根据质量与体积比和体积与体积比配制所需浓度的溶液。

1.2 主要试剂和仪器

1.2.1 试剂: 豆饼粉、脱脂乳粉为食品级, 市场购买; 牛肉膏、蛋白胨、葡萄糖、氯化钠、氢氧化钠、琼脂、氯化钠、CaCl₂、MnSO₄、甘油、麦芽糖、蔗糖、β-环糊精、甘露醇、乙醇 95%、L-抗坏血酸钠, 以上试剂均为生化级, 购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2.2 仪器: 隔水式电热恒温培养箱, 上海培因实验仪器有限公司; 超低温冰箱, 日本三洋; 电热恒温水浴锅, 上海跃进医疗器械厂; 真空冷冻干燥机, 北京思达兴业仪器有限公司; 日立高速微型离心机, 上海汗诺仪器有限公司等。

1.3 方法

1.3.1 冻干保护剂单一因素试验: 取一环活化的菌种, 接种于装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中, 250 r/min、37 °C 培养 18 h, 得到种子液; 将种子液以 4% 接种量接种于装有 50 mL 液体发酵培养基的 250 mL 三角瓶中, 300 r/min、

37 °C 培养 32 h。再将发酵液以 5 000 r/min 离心 10 min, 收集菌泥, 用灭菌的生理盐水将菌泥稀释至一定浓度保存备用。

根据相关文献报道^[8-11], 并结合实验室前期对冻干保护剂的研究, 选取脱脂乳粉、甘露醇、蔗糖、β-环糊精、葡聚糖、L-抗坏血酸钠 6 种材料作为筛选对象, 将预先配制不同浓度(表 1) 6 种保护剂分别加入到调制好的菌液中, 搅拌均匀, 并测定菌液中的纳豆芽胞杆菌的活菌数。吸取 3 mL 保护剂的纳豆芽胞杆菌菌液注入无菌安培瓶中, 在 -20 °C 预冷冻 24 h。

把预冷冻的安培瓶放入超低温真空冷冻干燥机冻成干粉状。通过测定冻干菌粉中的菌体存活率来反映各单一保护剂的保护效果。

1.3.2 冻干保护剂的正交试验: 根据单因素试验结果, 考虑到在做正交试验方差分析时, 应留下空白列, 以确保随机误差引起的离差平方和, 故采用 4 因素 3 水平(包括一空白列) L₉(3⁴) 设计正交组合优化保护剂的复配。正交实验影响因素水平见表 2。

1.3.3 纳豆芽胞杆菌存活率测定: 采用双层平板计数方法^[11]测定冻干菌粉中的菌体存活率, 平行进行 3 次实验。

表 1 单一保护剂质量浓度
Table 1 The agent concentration of single protective

保护剂 Cryoprotectants	保护剂浓度 Concentration of cryoprotectans (% W/V)				
脱脂乳粉 Skim milk powder	1	5	10	15	18
蔗糖 Sucrose	1	3	4	5	7
甘露醇 Mannitol	1	3	5	7	9
β-环糊精 β-Cyclodextrin	1	3	4	5	7
葡聚糖 Glucosan	1	3	4	5	7
L-抗坏血酸钠 L-sodium ascorbate	1	2	3	4	5

1.3.4 纳豆芽胞杆菌菌粉的保存稳定性测定: 将获得的菌粉分别置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的条件下保存12个月, 分别于0、2、4、6、8、10、12个月进行活菌数测定, 平行进行3次实验。通过计算保存期菌体的存活率, 以确定最佳菌粉保存条件。

2 结果与分析

2.1 各种冻干保护剂对菌体存活率的影响

本研究所采用的不同浓度6种保护剂及不加保护剂的对照组共36组单因素试验, 通过测定纳豆芽胞杆菌菌液在冻干前后活菌数目, 考查单

一保护剂对菌体的保护作用, 见图1。由图1可以看出: 6种保护剂对纳豆芽胞杆菌的冻干过程均有一定的保护作用, 菌体存活率最高可达74.26%; 不加保护剂时, 冻干的菌体最高存活率只有13.36%。由图1变化趋势可以看出, 随着保护剂添加量的增加, 菌体的存活率不断提高, 但达到一定浓度时, 保护剂的效果达到最大值, 此后再增加保护剂浓度保护效果反而降低。这说明菌粉冻干保护剂的浓度不是越大越好, 而是存在一个最佳浓度。

其中以脱脂乳粉保护剂浓度5%–15%保护效果最显著, L-抗坏血酸钠浓度选1%–3%, 甘露醇

表2 正交试验影响因素水平表
Table 2 Factors level of orthogonal experiment

水平 Level	因素 Factors			
	脱脂乳粉 A Skim milk powder A	甘露醇 B Mannitol B	L-抗坏血酸钠 C L-sodium ascorbate C	空列 E Empty columns E
1	5	3	1	—
2	10	4	2	—
3	15	5	3	—

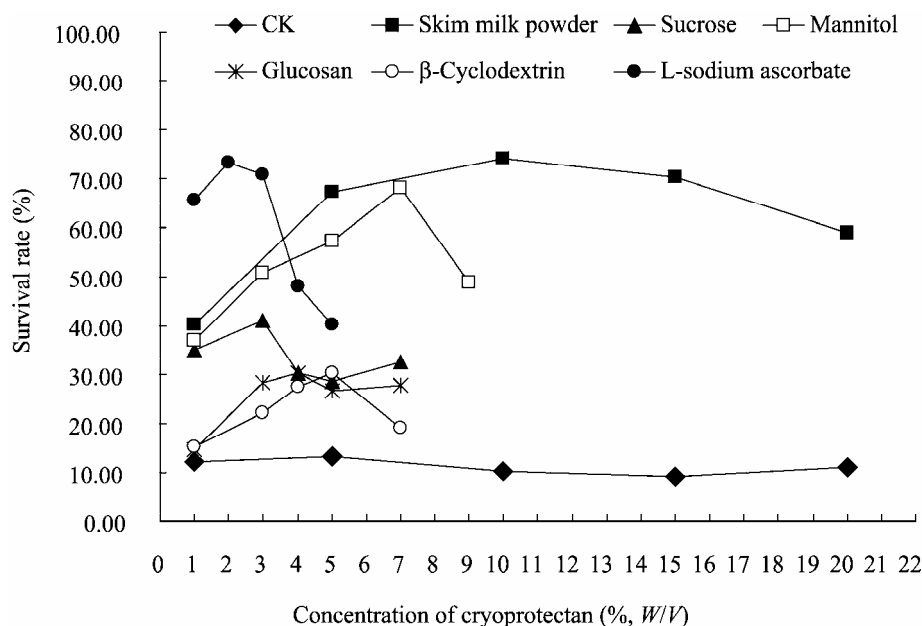


图1 不同冻干保护剂对细菌冻干存活的影响

Fig. 1 The survival effect of freeze-dried bacterial by different cryoprotectant

浓度选为 3%–7%时菌粉冻干存活率较高;而蔗糖、葡聚糖和 β -环糊精保护效果较差,故正交实验中删除这 3 个单因素。

2.2 冻干保护剂正交组合优化实验组合结果

从表 3 实验结果分析可知,脱脂乳粉对菌体的存活率影响最大,其次是甘露醇和 L-抗坏血酸钠,保护剂最优组合为 $A_2B_2C_1$,即脱脂乳粉 10%、甘露醇 4%、L-抗坏血酸钠 1%,此时活菌粉存活率为 91.63%,大于各单一因素的存活率,优化效果明显;说明单一保护剂并不能满足冷冻干燥制备高活菌数菌粉的需求,复合保护剂中的各单一保护剂在纳豆芽胞杆菌菌体冷冻干燥过程中发挥着各自作用,同时相互间又具有协同作用,从而能显著提高菌体存活率。3 种因素的保护剂保护效果大小为:脱脂乳粉>甘露醇>L-抗坏血酸钠。

由表 4 可知,因素 A 的 F 值大于 F 临界值($F_{0.01}(2,2)=99.00$)即 P 值 <0.01 ,说明脱脂乳粉对

试验结果影响极显著;因素 B 的 F 值大于 F 临界值($F_{0.05}(2,2)=19.00$),即 P 值 <0.05 ,说明甘露醇对试验结果影响显著;因素 C 的 F 值大于 F 临界值($F_{0.10}(2,2)=9.00$),即 P 值 <0.10 ,说明 L-抗坏血酸钠对试验结果有一定影响。所以因素 A 为主要因素,因素 B 和因素 C 为次要因素。因此方差分析与极差分析结果一致。

2.3 菌粉的保存稳定性实验结果

以优化的保护剂配方进行菌粉保存稳定性试验,从表 5 中可知,冻干的纳豆芽胞杆菌菌粉在 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 和 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 保存下,其活菌数目均在下降,但 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 下降趋势比较缓慢,12 个月内在 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 存活率分别为 88.79%和 70.16%,活菌数均在 1.0×10^8 CFU/g 以上,说明这两种温度下保存稳定性较好。但在 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 活菌存活率下降速度剧烈,此温度下保存 12 个月后,存活率降至 10.52%,说明稳定性比较差,即其适宜在低温度条件下保存,而不适宜在常温或更高条件下保存。

表 3 正交试验及结果分析表
Table 3 Result analysis of orthogonal experiment

No.	因素 Factors				存活率 Survival rate (%)
	A	B	C	E	
1	1	1	1	1	72.22
2	1	2	2	2	71.19
3	1	3	3	3	65.17
4	2	1	2	3	70.79
5	2	2	3	1	74.94
6	2	3	1	2	72.58
7	3	1	3	2	56.22
8	3	2	1	3	61.61
9	3	3	2	1	53.55
k_1	43 505.62	39 692.59	42 605.09	40 284.50	
k_2	47 659.27	43 155.91	38 231.98	39 996.00	
k_3	29 371.10	36 595.69	38 545.47	39 033.90	
R	46.93	16.44	10.88	3.14	
因素主次 Secondary factors	A>B>C				
最优方案 Optimal scheme	$A_2B_2C_1$		91.63%		

表 4 正交试验方差分析表

Table 4 The result of variance analysis for orthogonal experiment design

方差来源 Sources of variance	离差平方和 Sum of deviation square	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significance
A	409.00	2	204.50	227.22	<0.01	**
B	45.07	2	22.54	25.04	<0.05	*
C	24.85	2	12.43	13.81	<0.10	
空列(误差) Empty column (Error)	1.81	2	0.90			
总和 Sum	480.73	8				

表 5 菌粉的保存稳定性实验结果

Table 5 The experimental results of powder storage stability

时间 Time (months)	-20 °C 活菌数 Living bacteria count at -20 °C ($\times 10^9$ CFU/g)	-20 °C 存活率 Survival rate at -20 °C (%)	4 °C 活菌数 Living bacteria count at 4 °C ($\times 10^9$ CFU/g)	4 °C 存活率 Survival rate at 4 °C (%)	25 °C 活菌数 bacteria count at 25 °C ($\times 10^9$ CFU/g)	25 °C 存活率 Survival rate at 25 °C (%)
0	3.56 \pm 0.13	100.00	3.560 \pm 0.09	100.00	3.560 \pm 0.11	100.00
2	3.50 \pm 0.10	99.89	3.390 \pm 0.12	98.05	3.170 \pm 0.10	84.06
4	3.47 \pm 0.09	99.01	2.850 \pm 0.14	93.07	1.030 \pm 0.14	53.86
6	3.41 \pm 0.16	98.34	2.020 \pm 0.13	88.04	9.160 \pm 0.13	39.00
8	3.07 \pm 0.14	95.73	1.170 \pm 0.11	83.07	0.430 \pm 0.14	26.83
10	2.31 \pm 0.12	92.69	9.910 \pm 0.10	78.30	0.073 \pm 0.13	19.89
12	1.67 \pm 0.11	88.79	0.358 \pm 0.13	70.16	0.011 \pm 0.09	10.52

3 结论与讨论

本研究先通过单因素试验,从 6 种保护剂中筛选出纳豆芽胞杆菌的有效冷冻干燥保护剂影响活菌率因素的主次顺序为:脱脂乳粉>甘露醇>L-抗坏血酸钠,其中脱脂乳粉对菌体存活率影响最显著,这可能由于是在冷冻干燥过程中,脱脂乳粉可固定冻干酶类,在菌体细胞外形成的蛋白膜对菌体加以保护,并可为冻干的纳豆芽胞杆菌菌体提供一种轻而多孔的结构,增强了菌体的复水性,从而提高了菌体的冷冻干燥存活率^[13]。

为进一步优化保护剂的最优配方组合,采用 4 因素 3 水平(包括一空白列) $L_9(3^4)$ 设计正交组合优化保护剂的复配,获得最佳冷冻干燥保护剂配方是:脱脂乳粉 10%、甘露醇 4%、L-抗坏血酸钠

1%,此时获得的冻干菌粉菌体存活率为 91.63%。当脱脂乳粉浓度小于 10%时,菌体存活率随着脱脂乳粉浓度的增加而显著提高,可能是由于纳豆芽胞杆菌菌体细胞被保护的面积随着浓度的增加而增大,菌体表面暴露在外界的面积就减少,从而增强了保护效果;但添加脱脂乳粉的浓度超过 10%时,随着其浓度的增加保护效果反而变得不明显,这可能是由于菌体表面被脱脂乳粉完全覆盖,保护作用完全显现^[14]。本研究中甘露醇对纳豆芽胞杆菌菌体的保护作用与其浓度有关。低浓度的甘露醇通过无定型结构的形成而阻止菌体细胞内蛋白质分子的聚集,但高浓度的甘露醇则易于形成较强的玻璃化结晶,加速了菌体细胞内的蛋白质的聚集^[15],而结晶态的甘露醇则失去对菌体的保护功能。此外本研究中的 L-抗坏血酸

钠是水溶性强抗氧化剂,能减少纳豆芽胞杆菌菌粉冻干过程中环境中氧气对冻干菌粉的影响,在冷冻干燥过程中对菌体蛋白质起到一定的保护作用^[16]。而葡聚糖、 β -环糊精和蔗糖作为糖类冻干保护剂可能对纳豆芽胞杆菌菌体仅仅只起到保护层的作用,故较其它保护剂作用效果差。

本研究获得纳豆芽胞杆菌菌粉保护剂优化的配方与曹峰等^[17]所筛选的冻干保护剂相比,通过添加适量的甘露醇,不但对纳豆芽胞杆菌菌体在冷冻干燥时的保护效果更显著,还减少了其它保护剂的添加量,更为工业化生产纳豆芽胞杆菌大大节约了成本。这可能是在纳豆芽胞杆菌菌体冻干过程中的水分子与菌体蛋白质极性基团形成的氢键被甘露醇所具有的多羟基取代了,能够作蛋白质的冻干保护剂^[18],从而起到保护菌体的作用。

此外本研究在获得纳豆芽胞杆菌菌粉的冷冻保护剂最优配方的基础上,进行了菌粉中试生产实验,最终获得的菌粉达到 3.56×10^9 CFU/g 较高水平,在 -20°C 、 4°C 下保存 12 月后平均存活率分别为 88.79%、70.16%,这为纳豆芽胞杆菌的应用、活菌产品的质量稳定及新产品的研发均具有一定的指导意义,并为纳豆芽胞杆菌微生态制剂的工业化生产打下了坚实的基础。

参考文献

- [1] 藤井久雄. 纳豆菌にるら黏物质の生成に関する研究[J]. 日本酿造协会志, 1987, 82(4): 66-72.
- [2] 董小英, 唐胜球. 饲用纳豆菌生物学功能的研究进展[J]. 中国畜牧杂志, 2012, 48(3): 63-66.
- [3] 蒋立文, 周传云, 黄香华. 纳豆菌的研究现状和应用进展[J]. 中国食物与营养, 2007, 6: 24-26
- [4] 陈丽娟, 沙长青, 任永春, 等. 纳豆激酶溶解血栓机制[J]. 中国生物工程杂志. 2003, 23(4): 53-56.
- [5] Zheng ZL, Zuo ZY, Liu ZG, et al. Construction of a 3D model of nattokinase, a novel nucleophilic catalytic. Mechanism for nattokinase[J]. Journal of Molecular Graphics and Modelling, 2005, 23(4): 373-380.
- [6] 张菊, 张志焱, 李金敏, 等. 乳酸链球菌冻干保护剂的筛选和优化[J]. 中国酿造, 2012, 31(6): 147-150
- [7] 胥振国, 蔡玉华, 袁星, 等. 直接用于 PCR 反应的芽胞杆菌基因组 DNA 抽提改良方法的建立[J]. 中国生物制品学杂志, 2012, 25(5): 630-632
- [8] Saarela M, Virkajarvi I, Alakomi HL, et al. Stability and functionality of freeze-dried probiotic *Bifidobacterium* cells during storage in juice and milk[J]. International Dairy Journal, 2006, 16(12): 1477-1482
- [9] Meng XC, Stanton C, Fitzgerald GF, et al. Anhydrobiotics: the challenges of drying probiotic cultures[J]. Food Chemistry, 2008, 106(4): 1406-1416
- [10] Patist A, Zoerb H. Preservation mechanisms of trehalose in food and biosystems[J]. Colloids and Surfaces B, Biointerfaces, 2005, 40: 107-113
- [11] Kurtmann L, Carlsen CU, Risbo J, et al. Storage stability of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* (La-5) in relation to water activity and presence of oxygen and ascorbate[J]. Cryobiology, 2009, 58(2): 175-180
- [12] 王立平. 最大可能数法计数乳品中双歧杆菌数量的研究[J]. 食品科技, 2011, 36(5): 260-263.
- [13] 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.
- [14] 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
- [15] Wu SL, Leung D, Tretyakov L, et al. The formation and mechanism of multimerization in a freeze-dried peptide[J]. International Journal Pharmaceutics, 2000, 200(1): 1-16.
- [16] Wang W. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals[J]. International Journal Pharmaceutics, 2000, 203(1/2): 1-60.
- [17] 曹峰, 董贝磊, 陈晓滨, 等. 保护剂及冷休克处理对纳豆菌冻干后存活率的影响[J]. 食品工业科技, 2008, 29(2): 123-125
- [18] Souillac PO, Middaugh CR, Rytting JH. Investigation of protein/carbohydrate interactions in the dried state. Diffuse reflectance FTIR studies[J]. International Journal Pharmaceutics, 2002, 235(1/2): 207-218.