

生香酵母C42真空冷冻干燥保护剂的筛选和优化

任蓓蕾,李志辉,田洪涛,杜萍萍,张莹莹,马雯,锁然,何俊萍,檀建新*

(河北农业大学食品科技学院,河北省农产品加工工程技术中心,河北保定 071000)

摘要:为了获得生香酵母C42的冷冻干燥保护剂,应用Plackett-Burman(PB)、最陡爬坡和Box-Behnken(BBD)三种实验设计法对真空冷冻干燥制备生香酵母C42活性干酵母的保护剂进行了优化。结果表明最优的保护剂配方为:2.90%甘油,10.33%棉籽糖,9.63%谷氨酸钠,所得酵母菌的存活率为 $80.56\% \pm 1.19\%$,为该菌种的保存和后续研究应用打下坚实基础。

关键词:生香酵母,冷冻干燥,响应面法,保护剂

Screening and optimization of vacuum freeze-drying protective agent formula for an aroma-producing yeast strain C42

REN Bei-lei, LI Zhi-hui, TIAN Hong-tao, DU Ping-ping, ZHANG Ying-ying, MA Wen, SUO Ran, HE Jun-ping, TAN Jian-xin*

(Agricultural University of Hebei, College of Food Science and Technology, Baoding 071000, China)

Abstract: To obtain the vacuum freeze-drying protective agents for an aroma-producing yeast strain C42, Plackett-Burman (PB), the steepest ascent experiment and BBD were used to screen the protective agent formula by vacuum freeze-drying method. As a result, the survival rate of aroma-producing yeast strain C42 was $80.56\% \pm 1.19\%$ under the optimal freeze-drying conditions which consisted of 2.90% of glycerin, 10.33% of raffinose and 9.63% sodium glutamate, which laid a firm foundation for preservation, the further research and application of the yeast strain C42.

Key words: aroma-producing yeast; freeze-drying; response surface method; protective agents

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)10-0158-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.10.024

高活性干酵母是一种结合生物工程、酵母产业和干燥应用技术发展起来的高科技、高效能产品,具有含水量低,易于运输保存,发酵性能好,稳定性高的优点^[1]。现代活性干酵母的研究主要集中在生物工程酵母菌的构建、发酵动力学研究和AADY技术的研究三个方面。最初的菌株筛选是从自然界中直接筛选目标菌株。现代酵母工业中,更多的研究集中在采用生物工程改造技术选育出专一性强、发酵力高的酿酒酵母新品种。然后利用干燥技术制备成高活性干酵母用于生产。为防止酵母菌受到危害,干燥过程中常加入一定的保护剂。为了获得好的保护效果,需要进行科学的实验设计,首先查阅文献获得能影响酵母生物量的保护剂组分,然后采用Plackett-Burman (PB) 实验设计,从中选择出主要的因素,并对主要的因素进行单因素实验(最陡爬坡实验),再采用Box-Behnken (BBD) 进行

实验,对实验结果进行分析,得到最优的实验结果^[2-3]。

生香酵母是一类在发酵过程中能产生使人愉悦的香味物质的酵母菌的统称。其在发酵过程中能够合成多种物质如酯、酸、高级醇和醛等产物,对调味品和酒的风味、质地和色泽的形成起到重要的作用^[4-6]。本课题组前期工作筛选到一株产乙酸乙酯能力较为突出的酵母菌,鉴定并命名为异常威克汉逊酵母(*Wickerhamomyces anomalus*) C42,具有较强的潜在应用价值^[7-8]。本文利用PB、最陡爬坡实验和BBD探讨了该酵母菌真空冷冻干燥过程中保护剂的添加种类和添加量,得到了最优的保护剂配方和真空冷冻干燥工艺,为该菌种的保存及生产提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

异常威克汉姆酵母 C42 (*Wickerhamomyces*

收稿日期:2014-07-07

作者简介:任蓓蕾(1987-),女,硕士研究生,研究方向:食品微生物学。

* 通讯作者:檀建新(1968-),男,博士,教授,研究方向:微生物资源开发与利用。

基金项目:国家农业科技成果转化基金(2012GB2A200030);国家自然科学基金(31171725,31071494)。

anomalous C42) 河北农业大学食品科技学院微生物实验室保存;除蜂蜜外,甘油、棉籽糖、吐温80、蔗糖、谷氨酸钠、V_C、木糖醇及其他试剂 均为分析纯,北京化学试剂公司、Sigma公司;麦芽汁 河北省保定市生力啤酒厂;麦芽汁液体培养基 115℃, 15min灭菌备用。

SW-CJ-ID型单人净化工作台 苏州净化设备有限公司; MJX-250B-Z型霉菌培养箱 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; SIGMA-3K15型离心机 德国; FD-1型冷冻干燥机 北京博医康技术公司; TU-1810型紫外可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司; MDF-U32V型超低温冰箱 日本SANYO公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种生长曲线的测定 挑取适量斜面保存的生香酵母C42, 接种到麦芽汁液体培养基中, 30℃, 200r/min振荡培养24h活化。然后按1%接种量接种到麦芽汁液体培养基中, 30℃, 200r/min振荡培养, 每隔2h取培养液, 在560nm波长处测定菌液的吸光值^[9], 重复测三次, 取平均值。

1.2.2 菌体离心条件的确定 选择适宜的离心条件不但能使菌体的存活率达到最大, 还能保留菌体的活性。实验中设计不同的离心速率和时间(见表1)优化C42菌体收集的离心条件(离心温度设定为-4℃)^[10-11]。并采用稀释涂布法计算离心前后C42的活菌数, 计算离心存活率如下:

$$R_c(\%) = (N_t/N_0) \times 100 \quad \text{式(1)}$$

式(1)中, R_c为存活率; N_t为沉淀中的活菌数; N₀为初始活菌数。

表1 离心条件的因素和水平

Table 1 Factors and levels of centrifugation condition

离心速率(r/min)	4500	5000	5500
	15	15	15
离心时间(min)	20	20	20
	25	25	25

1.2.3 冷冻干燥保护剂的筛选及验证

1.2.3.1 PB实验 离心收集C42菌体, 以预实验优化获得的10%脱脂乳为支撑底物, -80℃预冻3h, 进行真空冷冻干燥^[12-13]。采用稀释涂布法分别计算冻干前后C42的活菌数, 计算冻干存活率。

$$R_c(\%) = (C_t/C_0) \times 100 \quad \text{式(2)}$$

式(2)中, R_c为存活率; C_t为冷冻干燥后的活菌数; C₀为冷冻干燥前的活菌数。

对其中冻干过程中的8种保护剂进行Plackett-Burman (PB) 筛选(如表2)^[7-8, 14-16]。响应变量为C42的存活率, 共进行12次实验, 每个实验重复3次。

1.2.3.2 最陡爬坡实验 按照PB实验结果筛选出对该酵母菌株冷冻干燥过程的保护效应影响最显著的三个因素, 参照文献^[15, 17]设计最陡爬坡实验, 逼近响应面的最佳值区域。

1.2.3.3 BBD实验 在PB实验和最陡爬坡实验基础

表2 Plackett-Burman实验因素和水平

Table 2 Range of different factors investigated with Plackett-Burman

因素	代码	编码水平	
		-1	1
蜂蜜(%)	X ₁	2.5	5
棉籽糖(%)	X ₂	2.5	5
谷氨酸钠(%)	X ₃	2.5	5
甘油(%)	X ₄	1	2
吐温80(%)	X ₅	1	2
V _C (%)	X ₆	0.5	1
木糖醇(%)	X ₇	2.5	5
蔗糖(%)	X ₈	2.5	5
空白	空白	-1	1
空白	空白	-1	1
空白	空白	-1	1

表3 Box-Behnken Design实验因素与水平表

Table 3 Factors and levels of Box-Behnken Design

因素	编码水平(%)		
	-1	0	1
A 甘油(%)	2	3	4
B 棉籽糖(%)	5	10	15
C 谷氨酸钠(%)	5	10	15

上, 设计BBD实验方案(表3), 对三个影响显著的保护剂的添加量进行优化。每个实验重复3次。

根据BBD优化的实验条件进行验证实验。重复3次。

1.2.4 数据处理与统计分析 实验根据Box-Behnken模型的中心组合原理, 主要采用Design-Expert 8.0.6 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, USA) 中Plackett-Burman (PB)、Central Composite Design (CCD)、Box-Behnken Design (BBD) 进行实验设计、数据分析及模型的建立。每个实验处理3次重复, 差异显著性水平为0.01和0.05。

2 结果与分析

2.1 菌种生长曲线的绘制

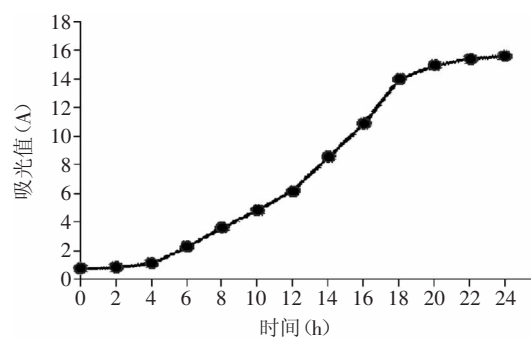


图1 酵母菌C42的生长曲线

Fig.1 Growth curve of yeast strain

图1为生香酵母C42的生长曲线图, 由图1可知, 菌株C42在麦芽汁液体培养基中培养4h后开始进入对

表4 Plackett-Burman design实验结果(N=12)
Table 4 Response values of Plackett-Burman design (N=12)

实验号	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	空白	空白	空白	存活率(%)
1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	50.00
2	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	61.05
3	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	33.32
4	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	42.1
5	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	34.21
6	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	68.42
7	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	49.11
8	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	56.16
9	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	57.89
10	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	50.36
11	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	43.84
12	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	63.16

数生长期,至18~20h时趋于稳定,进入稳定期。考虑到冷冻干燥时,菌株的生物量及活性,选择对数末期稳定初期进行菌体的离心收集,即18~20h最为适宜。

2.2 离心条件的确定

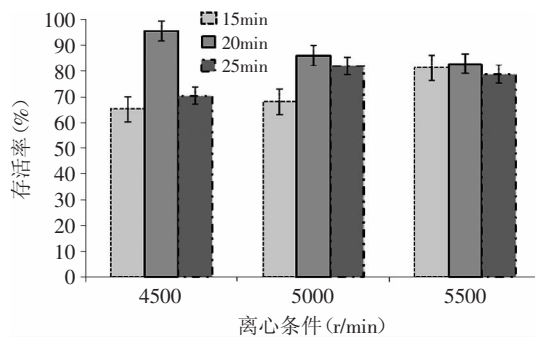


图2 离心条件对酵母菌C42存活率的影响

Fig.2 Effect of centrifugation condition on the survival of C42

离心条件对酵母存活率有一定影响。实验中选定3个离心速率,3个离心时间,对比离心后菌体存活率的影响,结果如图2所示,在4500r/min的离心条件下离心20min时C42的存活率最高,达到95.5%。因此菌体最适离心收集条件为4500r/min, 20min。

2.3 Plackett-Burman (PB) 实验设计结果

PB实验结果和不同影响因子的效应分析见表4、表5。由表4和表5可知,对冷冻干燥后菌株C42存活率影响显著的因素为甘油($p=0.0044$)、棉籽糖($p=0.0012$)和谷氨酸钠($p=0.0059$)。因此选择这3个因子作为影响菌株C42存活率的关键因素。而其他因子的 p 值均大于0.05,差异不显著,故不作考虑。

2.4 最陡爬坡实验结果

根据PB实验筛选出棉籽糖、谷氨酸钠、甘油三个对提高酵母菌C42存活率影响显著的因素,进行最陡爬坡实验,实验结果如表6所示。由表6可以看出,3%甘油、10%谷氨酸钠、10%棉籽糖得到的酵母菌的存活率最高为63.70%。

2.5 Box-Behnken Design 实验设计结果

根据BBD实验设计原理,设计3因素3水平的响

表5 不同影响因子的效应分析

Table 5 The analyses of the significance of different factors

因素	效应值	均方和	影响(%)
X ₁	-1.15	3.94	0.29
X ₂	13.30	530.94	39.16
X ₃	10.10	305.83	22.56
X ₄	10.68	341.97	25.22
X ₅	2.03	12.32	0.91
X ₆	-3.84	44.16	3.26
X ₇	-1.90	10.87	0.80
X ₈	1.01	3.08	0.23
空白	3.83	44.08	3.25
空白	2.66	21.17	1.56
空白	-3.54	37.52	2.77

表6 最陡爬坡实验设计及结果

Table 6 Steepest ascent design and response values

实验号	甘油 (%)	谷氨酸钠 (%)	棉籽糖 (%)	酵母菌存活率 (%)
1	1	20	0	30.00
2	2	15	5	39.98
3	3	10	10	63.70
4	4	5	15	36.17
5	5	0	20	32.00

应面分析实验,得到的结果如表7所示。对表7的实验结果进行多元回归分析(表8),结果表明所选模型的 $F=100.39$, $p<0.0001$,说明不同处理间差异极显著,可以认为所选用的二次回归方程是适当的; $R^2=0.9923$,说明因变量Y与全体变量之间的线性关系显著, $R^2_{adj}=0.9824$ 说明仅有1.76%的变异不能由该模型解释。精密密度为25.947,失拟项 $F=1.26$, $p=0.3988$,差异不显著,说明实验预测值和实际值相吻合,实验拟合性好,实验误差小。实验根据模型得到优化后的回归方程为: $Y=78.05-4.85A+2.09B-2.55C+5.44AB+3.30AC+1.13BC-24.44A^2-11.18B^2-18.82C^2$

根据表7和表8分析结果,作出双因子相应的响

表7 Box-Behnken Design实验设计与结果
Table 7 Box-Behnken Design and response values

实验号	A	B	C	酵母菌存活率(%)
1	1	-1	0	32.17
2	0	-1	1	41.79
3	0	0	0	77.38
4	1	0	1	29.01
5	0	0	0	77.14
6	1	1	0	45.24
7	-1	0	-1	47.14
8	0	0	0	79.88
9	-1	0	1	34.4
10	0	0	0	75.00
11	1	0	-1	28.57
12	0	0	0	80.83
13	-1	1	0	41.79
14	-1	-1	0	50.48
15	0	1	-1	52.02
16	0	1	1	50.24
17	0	-1	-1	48.10

表8 Box-Behnken Design实验回归模型方差分析
Table 8 Analysis of variance on regression mode of Box-Behnken design

方差来源	均方和	自由度	均方	F值	p-值 Prob>F	显著性
模型	5447.31	9	605.26	100.39	<0.0001	显著
A	188.37	1	188.37	31.24	0.0008	
B	35.07	1	35.07	5.82	0.0466	
C	51.97	1	51.97	8.62	0.0218	
AB	118.37	1	118.37	19.63	0.0030	
AC	43.43	1	43.43	7.20	0.0314	
BC	5.13	1	5.13	0.85	0.3870	
A ²	2515.36	1	2515.36	417.21	<0.0001	
B ²	526.68	1	526.68	87.36	<0.0001	
C ²	1492.01	1	1492.01	247.47	<0.0001	
残差	42.20	7	6.03	1.26	0.3988	不显著
失拟项	20.55	3	6.85			
纯误差	21.66	4	5.41			
校正总和	5489.51	16				

$R^2=0.9923$ $R_{adj}^2=0.9824$

应曲面如图3~图5所示。

图3~图5分别表示A: 甘油与B: 棉籽糖、A: 甘油与C: 谷氨酸钠和B: 棉籽糖与C: 谷氨酸钠对酵母菌存活率的影响的曲面图,由三组图可以看出响应曲面呈伞形,中心突起,说明两因素之间的影响基本呈抛物线型关系,均有一个极大值点,变化趋势都是先增大后减小。即存在适宜的甘油、棉籽糖、谷氨酸钠的浓度使冷冻干燥后酵母菌的存活率达到最高。且AB、AC交互作用显著,BC交互作用不显著,与方差分析结果一致。

以上分析表明存在适宜的甘油、棉籽糖、谷氨酸钠浓度有利于冷冻干燥过程中保护酵母菌存活率最

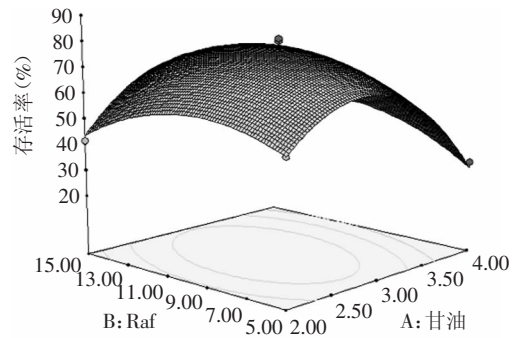


图3 A: 甘油和B: 棉籽糖相应的响应曲面图

Fig.3 Corresponding 3d surface of A-glycerin and B-raffinose

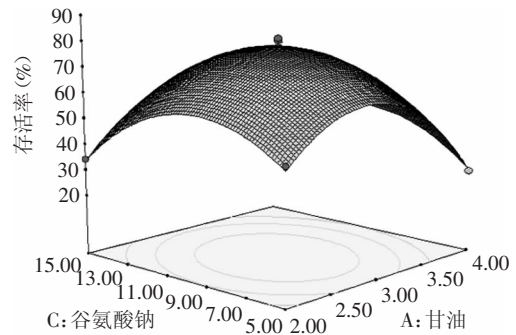


图4 A: 甘油和C: 谷氨酸钠相应的响应曲面图

Fig.4 Corresponding 3d surface of A-glycerin and C-sodium glutamate

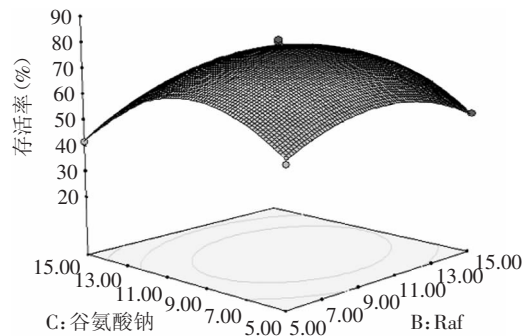


图5 B: 棉籽糖和C: 谷氨酸钠相应的响应曲面图

Fig.5 Corresponding 3d surface of B-raffinose and C-sodium glutamate

大。用Design-Expert 8.0.6软件分析,得出最优实验结果为:甘油浓度2.90%,棉籽糖浓度10.33%,谷氨酸钠浓度9.63%。在此配方的保护作用下,得到模型的最大预测值为78.45%。

按上述得到的最优工艺条件进行验证实验,得到冷冻干燥后的酵母菌存活率为 $80.56\% \pm 1.19\%$,接近预测值78.45%,且三组实验结果差异较小,说明实验结果有较好的重复性。因此可以说明该实验应用响应面优化后得到的实验方案可靠性较高。

3 讨论

3.1 真空冷冻干燥法

真空冷冻干燥法在低温低压下进行,使热敏性成分保留下来不变性,菌种存活率高,而且干制品含水量很低,储存期长,复水性好。该技术以其独特的

优越性越来越多的应用于生物及其他制品的干燥过程中。对于冻干酵母菌粉,也已经有报道:王华等利用冻干技术制备了热带假丝酵母活性干粉,其存活率达到82.73%^[18];西北农林科技大学的王雪峰也是利用真空冷冻干燥技术制备了我国本土优良的酿酒酵母*Saccharomyces cerevisia* LFN518的活性干粉,其存活率达到80%以上^[2]。如果能够确定合理的冻干工艺,优化最佳保护剂配方,经扩大化实验逐步实现大规模、连续化生产,其创造的价值将不可限量。

3.2 脱脂乳浓度的影响

在冷冻干燥过程中,保护剂主要有两个功能:一是作为载体材料和复水受体,提供具有一定物理结构的干燥后残余物;二是在冷冻和干燥过程中保护细胞不受损害。脱脂乳作为最常用的微生物菌体优良保护剂之一,已得到广泛的应用,在冷冻干燥过程中,它能作为支架物质,形成一种轻而多孔的结构,使干燥后容易复水,而且能够保持其他物质的性能。因此,无论是单独使用或者与其他物质混合使用,脱脂乳都能起到很好的保护效果^[13]。因此,本文根据预实验结果选择脱脂乳浓度为10%作为后续保护剂的筛选基础。

3.3 保护剂的优化

在酵母菌干燥的过程中添加保护剂是有效提高酵母菌存活率和性能的最佳方法之一。关于冻干保护剂的保护机理普遍接受的有3种假说:优先替代假说;水替代假说;玻璃态假说。三种假说都在一定程度上说明保护剂保护机理的某些特性。因此,根据不同的假说说明的保护剂机理,冻干保护剂被分为几类:碳水化合物类、聚合物类、蛋白质类、氨基酸类和其他类保护剂。目前常用的保护剂主要有海藻糖、蔗糖、葡萄糖、棉籽糖、二甲基亚砷、甘油、脱脂乳粉等^[19]。本实验中选用8种常用的保护剂种类通过响应面法优化出了生香酵母C42最适的冷冻干燥保护剂配方,制备出了符合国家标准,且不明显低于其他方法制备的活性干酵母存活率。因此,可用于对酵母菌的保存和后续实验的研究。

4 结论

研究了生香酵母C42菌体收集的最佳时间为18~20h,离心收集条件为速率4500r/min,时间20min,并以脱脂乳为支架物质研究了8种保护因素,筛选出了影响最显著的三个因素分别为甘油、棉籽糖、谷氨酸钠。以C42的存活率为响应值Y,通过BBD实验,建立了模型的回归方程,得出优化后的最佳实验方案为:10%脱脂乳,2.90%甘油,10.33%棉籽糖,9.63%谷氨酸钠。在此条件下,冷冻干燥后酵母菌的存活率为80.56%±1.19%。

参考文献

[1] 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.

[2] 王雪峰. 优良酿酒酵母活性干粉的制备[C]. 杨凌:西北农林科技大学,2010.

[3] 高艳,张婷婷,熊兴耀,等. 酿酒活性干酵母的发展现状与展望[J]. 酿酒科技,2010(12):78-80.

[4] Gobbi M, Comitini F, Domizio P, et al. Non-*Saccharomyces* yeasts in controlled mixed culture fermentation in wine making: the role of metabolic interactions[J]. Journal of Biotechnology, 2010, 150(11):299-300.

[5] Ciani M, Comitini F. Non-*Saccharomyces* wine yeasts have a promising role in biotechnological approaches to winemaking[J]. Annals of Microbiology, 2011, 61(1):25-32.

[6] Querol A, Fleet GH. Yeasts in Food and Beverages[M]. Germany: Springer, 2006: 1-9.

[7] 唐洁,王海燕,徐岩. 酿酒酵母和异常毕赤酵母混菌发酵对白葡萄酒态发酵效率和风味物质影响[J]. 微生物学通报, 2012, 39(7):921-930.

[8] 李志辉,任蓓蕾,朱健辉,等. 一株产香酵母C-42的分离、鉴定及其产乙酸乙酯能力的测定[J]. 食品工业科技, 2014(8): 188-190.

[9] 莫春丽,彭文,曾里,等. 酿酒活性干酵母生理特性的研究[J]. 中国酿造, 2012, 31(2):117-120.

[10] 万红兵,田洪涛,马晓燕,等. 直投式酸奶发酵剂制备过程中乳酸菌离心分离条件的研究[J]. 食品工业科技, 2006, 27(11):69-72.

[11] 王艳辉,张军杰,王颖,等. 山楂-鸭梨复合果酒专用活性干酵母制作工艺研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(30):18771-18773.

[12] Ashwood Smith M S, Warby C. Protective effect of low and high molecular weight compounds on the stability of catalase subjected to freezing and thawing[J]. Cryobiology, 1972(9):137-140.

[13] Berny J F, Hennebert. Viability and stability of yeast cells and filamentous fungus spores during freeze-drying: effects of protect agents and cooling rates[J]. Mycologia, 1991(83):805-815.

[14] 郝学财,余晓斌,刘志钰,等. 响应面法在优化微生物培养基中的应用[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(1):39.

[15] 王琳,刘晓辉,赵征,等. 响应面法对于酪乳杆菌冻干保护剂的优化[J]. 中国乳品工业, 2012, 4(7):28-31.

[16] 刘忠,赵丽丽. 二次响应面法用于L-缬氨酸发酵培养基的优化[J]. 南开大学学报:自然科学版, 2009, 42(1):25.

[17] 汪彬彬,车振朋. Plackett-Burman和Box-Behnken Design实验设计法优化华根霉产糖化酶发酵培养基的研究[J]. 食品科技, 2011, 36(5):41-45.

[18] 王华,贺金梅. 中心组合设计优化热带假丝酵母菌冷冻干燥保护剂[J]. 食品科学, 2013, 34(1):244-247.

[19] 周新丽,张绍志,陈光明. 细胞冷冻干燥保存的损伤、保护机理及保护剂的选择[C]. 上海:第八届全国冷冻干燥学术交流会, 2005.

(上接第157页)

[19] 李佳颖,韩照祥,顾宏新. 洋葱提取液对亚硝酸盐清除作用的研究[J]. 化学工程与装备, 2012(4):25-27.

[20] 李朝阳,刘魁,韩忠宵,等. 大蒜多糖的酶法提取及其抗氧化

性研究[J]. 食品科学, 2008, 29(1):117-120.

[21] 徐胜龙,杨建雄. 柿子醇提取物的体外抗氧化研究[J]. 食品科学, 2008, 29(4):131-134.