

枯草芽孢杆菌 Prob1822 喷雾干燥制备益生菌粉工艺优化

肖怀秋^{1,2},李玉珍^{1,*},赵谋明²,林亲录³,刘 军¹,周 全¹,姜明姣⁴

(1.湖南化工职业技术学院制药与生物工程学院,湖南株洲 412000;

2.华南理工大学食品科学与工程学院,广东广州 510640;

3.中南林业科技大学食品科学与工程学院,湖南长沙 410004;

4.湖南中威制药有限公司,湖南株洲 412000)

摘 要:为优化枯草芽孢杆菌喷雾干燥工艺参数,以菌体存活率为评价指标,利用单因素实验研究了保护剂用量、入口温度、进料速率、进风量和出口温度对菌体存活率的影响。结果表明,进料速率、进风量和出口温度为重要因素;采用中心复合响应面优化技术研究了进料速率(X_1)、进风量(X_2)、出口温度(X_3)对菌体存活率的影响并构建了多元非线性回归方程;方差与回归分析表明,进料速率(X_1)与进风量(X_2)影响不显著($P>0.05$),出口温度(X_3)影响极显著($P<0.01$)。喷雾干燥最优参数为进料速率 600 mL/h,进风量 80 m³/h 和出口温度 52 ℃,优化条件下验证试验结果为 96.64% ± 1.43%,与模型预测值基本一致。试验结果表明,热诱激预处理和复合抗热保护剂的使用可提高菌体热耐受性,显著提高喷雾干燥后菌体存活率,研究结果可为枯草芽孢杆菌的喷雾干燥提供理论支持。

关键词:枯草芽孢杆菌,益生菌,喷雾干燥,菌体存活率,含水量

Optimization of Spray Drying Parameters for the Probiotic Powder Preparation of *Bacillus subtilis* Prob 1822

XIAO Huai-qiu^{1,2}, LI Yu-zhen^{1,*}, Zhao Mou-ming², LIN Qin-lu³, LIU Jun¹, ZHOU Quan¹, JIANG Ming-jiao⁴

(1.School of Pharmaceutical and Bioengineering, Hunan Chemical Vocational Technology College, Zhuzhou 412000, China;

2.School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China;

3.College of Food Science and Engineering, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China;

4.Hunan Zonwe Pharmaceutical Co., Ltd., Zhuzhou 412000, China)

Abstract: To optimize the spray drying parameters, the cell survival rate (CSR) was taken as the evaluation index. The single factor experiments (SFE) was carried out to investigate the effects of protectant amount, inlet temperature, feeding speed, air intake rate and outlet temperature on CSR of *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) during spray drying. SFE results indicated that the feeding speed, air intake rate and outlet temperature were the most important factors. And meanwhile, a central composite design response surface methodology (CCD-RSM) was applied to explore the effects of feeding speed (X_1), air intake rate (X_2) and outlet temperature (X_3) on CSR, and a multivariate non-linear regression equation was established. ANOVA and regression analysis showed that the feeding speed (X_1) and air intake (X_2) had no significant effect ($P>0.05$), while the outlet temperature (X_3) had a significant effect on CSR ($P<0.01$). The optimal parameters of spray drying were confirmed by optimizing the model as feeding speed of 600 mL/h, inlet air rate of 80 m³/h and outlet temperature of 52 ℃. Under the optimized conditions, the confirmative test result was 96.64% ± 1.43%, which was well agreement with the predicted value. All results indicated that thermal-induced shock treatment and utilization of anti-thermal protectant could provide better protection of *B. subtilis* from thermal damages and maintain a higher survival rate. And the experimental results could also provide theoretical support for spray drying of *Bacillus subtilis*.

收稿日期:2019-05-20

作者简介:肖怀秋(1981-),男,硕士,副教授,研究方向:食品生物技术与肠道益生菌,E-mail:xiaohuaiqiu@163.com。

*通讯作者:李玉珍(1981-),女,硕士,副教授,研究方向:植物蛋白酶法改性及益生菌生理功能,E-mail:yuzhenli@163.com。

基金项目:湖南省自然科学基金科教联合基金项目(2017JJ5020)。

inhibitory activities on xanthine oxidase[J]. Industrial Crops and Products, 2018(118):296-301.

[20] Zhang L, Tu Z, Wang H, et al. Antioxidant activity and

phenolic acids profiles of *Artemisia selengensis* Turcz extracted with various methods by HPLC-QTOF-MS/MS[J]. Journal of Food Biochemistry, 2016, 40(4):603-612.

Key words: *Bacillus subtilis*; probiotics; spray drying; cell survival rate (CSR); water content (WC)

中图分类号: TS201.3

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2020)02-0114-07

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2020.02.019

引文格式: 肖怀秋, 李玉珍, 赵谋明, 等. 枯草芽孢杆菌 Prob1822 喷雾干燥制备益生菌粉工艺优化[J]. 食品工业科技, 2020, 41(2): 114-120.

益生菌(probiotics)是指具有维持人体内菌群平衡,对人体健康产生有益作用的微生态制剂^[1]。口服足量活性益生菌有助于缓解急性慢性胃肠炎、治疗腹泻、改善消化,缓解乳糖不耐症等症状^[2],在减少病原菌在肠内定植和生长、提升免疫力、缓解神经发育障碍等方面具有显著功能^[3]。枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是益生菌的重要来源之一^[4],其活菌制剂口服液可用于肠炎、支气管炎和腹泻等疾病治疗和预防^[5]。

喷雾干燥由于受热时间短、料温低和生理活性物质活性损失小而广泛应用于益生菌菌体干燥^[6],具有干燥时间极短,产品分散性和溶解性好,生产过程简单,设备成本低等优点,特别适用于工业化连续生产。提升益生菌喷雾干燥菌体存活率是实现益生菌微生态制剂长期保存和提高益生菌生理功能的重要基础,常用策略有增强菌体热耐受性、使用抗热保护剂和优化喷雾干燥工艺^[7]。研究表明,热诱激能增强菌体热耐受性,特别是稳定期细胞,但要注意热诱激温度选择^[8]。范娜等研究发现,糖类与蛋白质联用作为复合抗热保护剂能增强菌体热耐受性^[9]。肖怀秋等对喷雾干燥前的 *Bacillus subtilis* Prob1822 益生菌菌体进行了热诱激预处理,确定了最佳热诱激条件,并进行了复合抗热保护剂对菌株抗热保护的影响,优化得到复合抗热保护剂配方(海藻糖 9.0%、蔗糖 5.0% 和脱脂奶粉 6.8%),在复合抗热保护剂保护下菌体存活率达 95.24% ± 0.84%^[7]。除热诱激处理和使用抗热保护剂外,对喷雾干燥工艺参数优化也是提升菌体存活率的重要策略。

本试验选择热诱激预处理和使用复合抗热保护剂,以菌体存活率为评价指标,通过单因素实验筛选对菌体存活率影响较重要的 3 个因素,结合中心复合响应面优化技术对进料速率(X_1)、进风量(X_2)和出口温度(X_3) 3 个关键因素的水平进行优化,建立了因素与响应值的数学模型和回归方程,获得了菌体喷雾干燥的最优参数,为枯草芽孢杆菌喷雾干燥制备益生菌菌粉提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) Prob1822 实验室保藏;海藻糖 食品级, 海北鹏宇生物科技有限公司;蔗糖 食品级, 市售;脱脂奶粉 食品级, 伊利集团;其它试剂为国产分析纯。

UV-2500 紫外可见分光光度计 日本岛津公司;BBS-SSC 超净工作台 济南腾览仪器有限公司;DH-360 电热恒温培养箱 北京科伟永兴仪器有限公司;LDZX-50FAS 立式压力蒸汽灭菌器 上海申安医疗器械厂;KRH-PJ-10L 发酵罐 江苏镇江科海

生物工程设备有限公司;SP-1500 喷雾干燥机 上海顺仪实验设备有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 培养基配制方法 菌种活化采用牛肉膏蛋白胨固体斜面培养基,种子培养采用牛肉膏蛋白胨液体培养基。牛肉膏蛋白胨培养基组成为牛肉膏 3 g/L、蛋白胨 10 g/L、NaCl 5 g/L, pH7.4, 固体培养基加入 15~20 g 琼脂;发酵培养基^[10]组成为冷榨花生粕蛋白胨 12 g/L、酵母膏 5 g/L、NaCl 5 g/L, pH7.4。所有培养基配制完成后均于 131 ℃ 灭菌 20 min,经检验无菌后备用。

1.2.2 菌种活化、菌悬液制备及喷雾干燥 取冷冻保存(-18 ℃)的枯草芽孢杆菌菌种 1 环转接于牛肉膏蛋白胨固体斜面培养基,于 37 ℃ 恒温培养 24 h 进行菌种活化培养;活化完成后,用接种环从斜面刮取两环菌种接种至牛肉膏蛋白胨培养基中进行种子培养(100 mL/250 mL),37 ℃、120 r/min 恒温振荡培养 24 h;按 5% (v/v) 接种量将种子液接种于发酵罐中,37 ℃、120 r/min 恒温培养至稳定期(26 h);4000 r/min 离心 15 min,弃上清液,沉淀用无菌水洗涤并重新悬浮,上述操作重复 3 次;菌悬液于 55 ℃ 热诱激 10 min,并按预定百分比(w/v,以菌悬液体积为基准)加入复合抗热保护剂(海藻糖:蔗糖:脱脂奶粉=0.43:0.34:0.33, w/w),充分混匀后再进行喷雾干燥制备益生菌菌粉。

1.2.3 活菌计数与益生菌存活率计算 准确称取 1.0000 g 喷雾干燥后收集的菌粉用稀释平板法进行活菌计数;选取 3 个相邻稀释度的菌液 0.1 mL 倾入牛肉膏蛋白胨琼脂平板上,涂布均匀后于 37 ℃ 倒置培养 48 h,记录培养皿上菌落数量(CFU),菌落数以 CFU/g 计。菌体存活率计算公式:

菌体存活率(%) = 喷雾干燥后总活菌数($\text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$)/喷雾干燥前总活菌数($\text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$) × 100

1.2.4 水分含量的测定 水分含量根据 GB 5009.3-2016 直接干燥法测定。准确称取喷雾干燥后收集的菌粉 10.0000 g 置于 101~105 ℃ 干燥箱中,瓶盖斜支于瓶边,干燥 2~4 h 后,盖好取出,放入干燥器内冷却至室温称量,记录质量,然后再放入 101~105 ℃ 干燥箱中继续干燥 1 h,取出冷却后称重,重复此过程直至前后两次质量差不超过 2 mg,即为恒重。

$$\text{含水量}(\%) = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_3} \times 100$$

式中: m_1 为称量瓶和试样的质量,g; m_2 为称量瓶和干燥后试样的质量,g; m_3 为称量瓶的质量,g。

1.2.5 单因素实验

1.2.5.1 复合抗热保护剂用量 在入口温度 80 ℃,进风量 50 m³/h,出口温度 55 ℃,进料速率 400 mL/h 条件下,考察复合抗热保护剂用量(0.5%、10%、

15% 和 20% ,w/v)对喷雾干燥的影响,测定菌体存活率和含水量,以菌体存活率为主要评价指标。

1.2.5.2 入口温度 在复合抗热保护剂添加量 15% ,进风量 50 m³/h,出口温度 55 ℃,进料速率 400 mL/h 条件下,考察入口温度(60、80、100、120 和 140 ℃)对喷雾干燥的影响,测定菌体存活率和含水量,以菌体存活率为主要评价指标。

1.2.5.3 进料速率 在复合抗热保护剂添加量 15% ,入口温度 100 ℃,进风量 50 m³/h,出口温度 55 ℃条件下,考察进料速率(200、400、600、800 和 1000 mL/h)对喷雾干燥的影响,测定菌体存活率和含水量,以菌体存活率为评价指标。

1.2.5.4 进风量 在复合抗热保护剂添加量 15% ,入口温度 100 ℃,进料速率 600 mL/h,出口温度 55 ℃条件下,考察进风量(30、50、70、90 和 110 m³/h)对喷雾干燥的影响,测定菌体存活率和含水量,以菌体存活率为主要评价指标。

1.2.5.5 出口温度 在复合抗热保护剂添加量 15% ,入口温度 100 ℃,进料速率 600 mL/h,进风量 90 m³/h 条件下,考察出口温度(50、55、60、65 和 70 ℃)对喷雾干燥的影响,测定菌体存活率和含水量,以菌体存活率为主要评价指标。

1.2.6 中心复合响应面优化喷雾干燥工艺参数 对进料速率(X_1 , mL/h)、进风量(X_2 , m³/h)和出口温度(X_3 , ℃)进行中心复合响应面优化,各因素设计 5 个水平,即 $\pm r$ (上下星号臂), ± 1 (上下水平点)和 0(中心点, $N = 3$)。本试验星号臂 $r = 1.682^{[1]}$ 。试验因素水平与编码如表 1 所示。

表 1 中心复合响应面优化设计因素水平与编码
Table 1 Experimental levels and codes for CCD-RSM

编码水平 Z_j	试验因素		
	X_1 进料速率 (mL·h ⁻¹)	X_2 进风量 (m ³ ·h ⁻¹)	X_3 出口温度 (℃)
上星号臂(+1.682)	800	110	65
上水平(+1)	659.45	101.89	60.95
零水平(0)	600	90	55
下水平(-1)	540.55	78.11	49.05
下星号臂(-1.682)	400	70	45
变化区间(Δ_j)	59.45	11.89	5.95

注: $r = 1.682$, z 为编码值, x 为试验值。零水平 $Z_{0j} = (Z_{1j} + Z_{2j})/2$, $\Delta_j = (Z_{2j} - Z_{0j})/r$, 编码线性变换 $x_j = |Z_j - Z_{0j}|/\Delta_j$ 。

1.3 数据处理

试验结果均采用($n = 3$)标示;均数多重比较采用 SPSS Statistics 25 最小显著性差异法(LSD)进行,显著性水平选用 $\alpha = 0.05$ 和 $\alpha = 0.01$, $P < 0.01$ 为差异极显著,用“**”表示; $0.01 < P < 0.05$ 为差异显著,用“*”表示; $P > 0.05$ 为差异不显著,用“ns”表示。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

2.1.1 复合抗热保护剂用量 复合抗热保护剂用量对菌体存活率和含水量的影响如图 1 所示。

由图 1 可看出,复合抗热保护剂在一定范围内

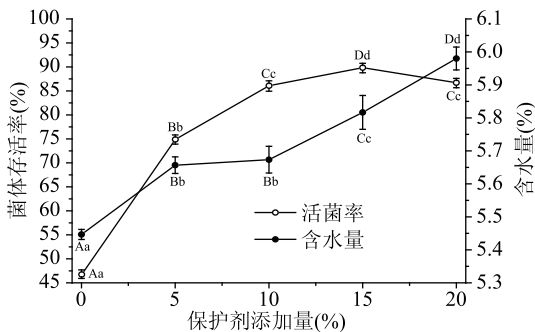


图 1 复合保护剂用量对菌体存活率与含水量的影响

Fig.1 Effects of anti-thermal compound protectant's usage on CSR and WC

注:标注相同字母表示差异不显著($P > 0.05$),不同字母表示差异显著($0.01 < P < 0.05$)或极显著($P < 0.01$);小写字母和大写字母分别对应显著性水平 $\alpha = 0.05$ 和 $\alpha = 0.01$,图 2~图 5 同。

(0~15%),随着使用量的增加,喷雾干燥后菌体存活率呈上升趋势;复合抗热保护剂添加量 15% 与不添加保护剂相比,菌体存活率存在极显著差异($P < 0.01$),菌体存活率达到最高($89.77\% \pm 0.99\%$),比未添加保护剂的对照存活率提高了 91.78%,样品含水量为 $5.82\% \pm 0.05\%$;复合抗热保护剂进一步增加时,菌体存活率反而下降,且样品含水量进一步增加,达到了 $5.98\% \pm 0.03\%$,主要是由于抗热保护剂添加过量时,喷雾干燥基质中含糖量较高,不利于菌体雾化,且料液黏度较大,干燥过程中水分失去速率较慢,使菌体热接触时间延长,菌体存活率呈下降趋势^[12]。因此,后续研究中复合抗热保护剂添加量均为 15%。

2.1.2 入口温度 入口温度是喷雾干燥的重要参数,对干燥速率、产品形貌及产品稳定性等有重要影响^[13]。入口温度对菌体存活率和含水量影响如图 2 所示。

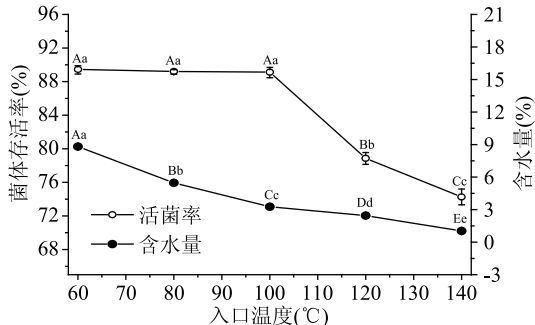


图 2 入口温度对菌体存活率和含水量的影响

Fig.2 Influence of inlet temperature on CSR and WC

由图 2 可以看出,入口温度 60、80 和 100 ℃时,菌体存活率分别为 $89.40\% \pm 0.40\%$ 、 $89.15\% \pm 0.28\%$ 和 $89.07\% \pm 0.61\%$,差异不显著($P > 0.05$);入口温度 120 和 140 ℃时,菌体存活率分别为 $78.85\% \pm 0.71\%$ 和 $74.26\% \pm 0.94\%$,相比入口温度 100 ℃时分别下降了 11.47% 和 16.63%,菌体存活率差异极显著($P < 0.01$)。随着入口温度的提高,喷雾干燥菌体粉末的含水量也越低,存在极显著差异($P < 0.01$);

综合考虑到入口温度对菌体存活率、产品含水率的影响以及喷雾干燥过程温差,后续试验喷雾干燥入口温度均为 100 ℃。

2.1.3 进料速率 进料速率过快常造成干燥不完全或菌体结块,产品含水量高,若进料速率过低时,益生菌菌体热接触时间较长,影响菌体存活率^[14]。进料速率对菌体存活率和含水量的影响如图 3 所示。

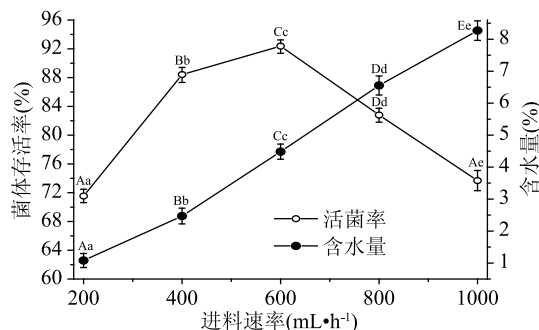


图3 进料速率对菌体存活率和含水量的影响

Fig.3 Effects of feeding speed on CSR and WC

由图 3 可看出,在 200~600 mL/h 的进料速率范围内,随着进料速率的增加菌体存活率呈上升趋势,进料速率为 600 mL/h 时,菌体存活率最高 92.31% ± 0.93%,与其它进料速率存在极显著差异 ($P < 0.01$);进料速率提升至 800 和 1000 mL/h 时,菌体存活率分别下降至 82.77% ± 0.97% 和 73.69% ± 1.40%;研究发现,随着进料速率提升,喷雾干燥产品的含水量呈线性上升趋势,表明进料速率较大时,产品干燥不完全。因此,进料速率宜选择 600 mL/h 为好。鉴于进料速度对产品存活率有显著影响,选定为重要的响应面因素进行进一步优化。

2.1.4 进风量 进风量对菌体存活率和含水量的影响如图 4 所示。

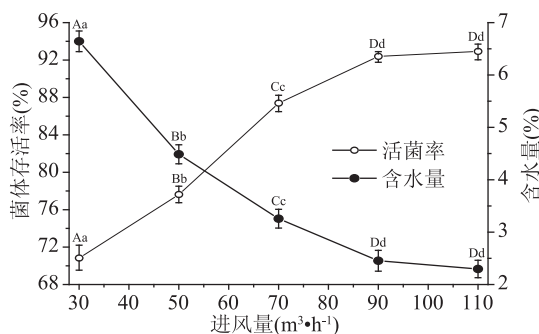


图4 进风量对菌体存活率和含水量的影响

Fig.4 Influence of air intake on CSR and WC

由图 4 可以看出,进风量在 30~90 m³/h 范围内,随着进风量增加,菌体存活率呈上升趋势,这是由于进风量增加,水分移除速率加快,有利于菌体干燥^[7]。进风量在 30~90 m³/h 范围内,菌体存活率呈现极显著差异 ($P < 0.01$);进风量 90 和 110 m³/h 差异不显著 ($P > 0.05$);进风量为 90 m³/h 时,菌体存活率最高 92.33% ± 0.57%。因此,进风量选择 90 m³/h 较好。鉴于进风量对菌体存活率有显著影响,选定作为响应面重要因素进行进一步优化。

2.1.5 出口温度 出口温度对菌体存活率和含水量的影响如图 5 所示。

的影响如图 5 所示。

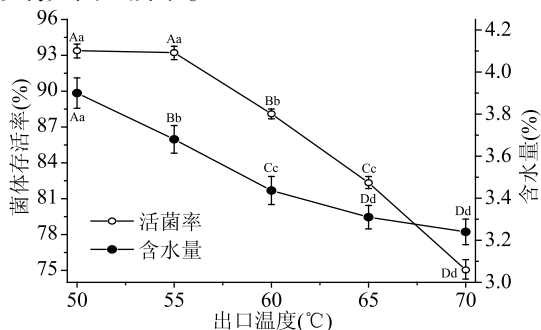


图5 出口温度对菌体存活率和含水量的影响

Fig.5 Effects of outlet temperature on CSR and WC

由图 5 可看出,随着出口温度的提高,菌体存活率呈显著下降趋势;出口温度为 50 和 55 ℃ 时菌体存活率差异不显著 ($P > 0.05$),分别为 93.36% ± 0.58% 和 93.2% ± 0.56%;随着温度的进一步提高,菌体存活率呈显著下降趋势;与出口温度 55 ℃ 相比,存在极显著性差异 ($P < 0.01$),特别是出口温度 70 ℃ (75.09% ± 0.81%),相比 55 ℃ 时菌体存活率下降了 19.43%。Teixeira 等^[8]研究认为,喷雾干燥温度 64 ℃ 以下可引起细胞膜亚细胞结构损伤,超过 65 ℃ 可引起细胞壁和蛋白质等细胞结构和生物大分子损伤,甚至引发核糖体不可逆损伤^[7]。因此,出口温度不宜过高。随着出口温度的提高,喷雾干燥后菌粉含水量呈显著下降趋势,除 65 和 70 ℃ 之间喷雾干燥后菌粉含水量差异不显著 ($P > 0.05$) 外,其它温度间差异均极显著 ($P < 0.01$);综合考虑菌体存活率和含水量,选择出口温度为 55 ℃ 较好。鉴于出口温度对菌体存活率有显著影响,选定作为响应面重要因素进行进一步优化。

2.2 响应面优化喷雾干燥工艺参数

根据各因素对菌体存活率影响的显著性分析结果,确定进料速率 (X_1 , mL/h)、进风量 (X_2 , m³/h) 和出口温度 (X_3 , ℃) 为重要因素,进一步应用中心复合响应面优化技术研究对菌体存活率的影响,试验安排与试验结果(含模型预测值)如表 2 所示。

2.2.1 序贯分析优选数学模型 通过对各阶数学模型进行序贯分析(sequential analysis, SA)来优选构建数学模型(表 3)。

由表 3 可看出,一阶线性数学模型与二因素交互关系模型均不显著 ($P > 0.05$),且失拟项显著 ($P < 0.05$),说明数据拟合效果差,需用更高阶数学模型进行数据拟合;由表 3 可看出,二阶数学模型极显著 ($P < 0.01$),失拟项不显著 ($P = 0.7731 > 0.05$),说明用二阶数学模型进行数据拟合和结果预测是可行性,不会造成数据失真。模型 $R^2_{Adj} = 0.9757$,说明模型可解释总变异 97.57%,仅有 2.43% 变异无法用模型解释。三阶数学模型不显著 ($P > 0.05$),失拟项不显著 ($P = 0.7249 > 0.05$),不宜用于数据拟合,且三阶数学模型回归方程较为复杂,应用受限。对表 2 数据进行二阶多元非线性回归拟合可求出回归方程,即:

$$Y = 96.74 + 0.39X_1 - 0.33X_2 - 3.16X_3 + 0.44X_1X_2 + 1.53X_1X_3 - 0.060X_2X_3 - 3.59X_1^2 - 0.089X_2^2 - 3.04X_3^2$$

表3 数学模型构建的序贯分析

Table 3 Sequential analysis for mathematical model building

项目	自由度	平方和	均方和	F 值	P 值	R ²	R ² _{Adj}	失拟项 P 值
一阶线性数学模型	11	242.41	22.04	24.13	0.1061 ^{ns}	0.3650	0.2185	0.0404 [*]
二因素交互关系模型	8	222.25	27.78	30.42	0.8248 ^{ns}	0.4174	0.0679	0.0322 [*]
二阶数学模型	5	2.26	0.45	0.49	<0.0001 ^{**}	0.9894	0.9757	0.7731 ^{ns}
三阶数学模型	1	0.15	0.15	0.16	0.5975 ^{ns}	0.9949	0.9726	0.7249 ^{ns}
纯误差	2	1.83	0.91					

注: ** 表示差异极显著($P < 0.01$); * 表示差异显著($0.01 < P < 0.05$); ns表示差异不显著($P > 0.05$)。表4 同。

表4 模型方差分析与回归分析表

Table 4 ANOVA analysis and regression analysis of model

方差来源	平方和	自由度	均方和	F 值	P 值
回归模型	380.550	9	42.280	72.520	<0.0001 ^{**}
X ₁	2.100	1	2.100	3.600	0.0996 ^{ns}
X ₂	1.500	1	1.500	2.580	0.1524 ^{ns}
X ₃	136.790	1	136.790	234.610	<0.0001 ^{**}
X ₁ X ₂	1.530	1	1.530	2.630	0.1491 ^{ns}
X ₁ X ₃	18.610	1	18.610	31.910	0.0008 ^{**}
X ₂ X ₃	0.029	1	0.029	0.049	0.8305 ^{ns}
X ₁ ²	145.240	1	145.240	249.090	<0.0001 ^{**}
X ₂ ²	0.090	1	0.090	0.150	0.7066 ^{ns}
X ₃ ²	104.160	1	104.160	178.630	<0.0001 ^{**}
残差	4.080	7	0.580		
失拟项	2.260	5	0.450	0.490	0.7731 ^{ns}
纯误差	1.830	2	0.910		
总误差	384.640	16			

表2 中心复合响应面优化试验设计结果(含模型预测值)

Table 2 Experimental design and results of CCD-RSM(with predicted values)

序号	X ₁	X ₂	X ₃	菌体存活率(%)	
				实测值	预测值
1	-1	1	1	84.96	84.11
2	0	0	-1.682	93.61	93.46
3	1	1	1	88.65	88.82
4	-1	1	-1	93.54	93.61
5	0	0	0	97.29	96.74
6	1.682	0	0	87.51	87.25
7	0	0	0	95.65	96.74
8	-1	-1	-1	95.37	95.03
9	1	-1	1	88.97	88.73
10	0	0	0	97.32	96.74
11	0	0	1.682	82.43	82.82
12	0	1.682	0	95.47	95.93
13	-1.682	0	0	85.42	85.93
14	1	1	-1	92.52	92.22
15	-1	-1	1	85.64	85.77
16	1	-1	-1	91.21	91.89
17	0	-1.682	0	97.26	97.04

2.2.2 模型方差分析与回归分析 模型方差分析与回归分析结果如表4。

由表4 可看出,模型极显著($P < 0.01$);模型信

噪比是评价和应用模型进行数据拟合和结果预测受干扰的程度,数值越大,表明模型越抗干扰,常要求 $SNR > 4$ 。本模型 $SNR = 24.29 \gg 4$,说明模型噪音小,可靠性较高;模型变异系数(C.V)是衡量模型精密度和可靠性的重要评价指标,数值越小表示模型精密度越高,本模型 $C.V = 0.84\%$,数值较小,表明模型精密度和准确度均较高。各阶系数显著性分析发现,一次项 X_3 、交互作用项 X_1X_3 及二次项 X_1^2 、 X_3^2 影响极显著($P < 0.01$), X_1 、 X_2 、 X_1X_2 、 X_2X_3 和 X_2^2 影响不显著($P > 0.05$)。

2.2.3 模型诊断与因素重要性解析 残差分析是基于模型无法解释全部变异的理论基础上进行的。模型选择合适,残差呈随机均匀分布且呈正态概率分布^[15]。由图6 可看出,模型内部t 化残差呈随机独立均匀分布且符合正态概率分布,说明模型残差是符合要求的。

微扰曲线(perturbation plot)可在响应面优化曲面特定区域比较各试验因素对响应值的影响。如曲线陡直,则表明该因素对响应值敏感,若曲线平缓,则表明对响应值影响不敏感^[15]。由图7 可以看出,因素 X_3 (出口温度)对菌体存活率最敏感,为最重要因素,其次为 X_1 (进料速率),因素 X_2 (进风量)曲线较为平缓,为最不重要因素,与因素的显著性分析结果完全一致。

2.2.4 模型交互作用项影响分析 其它因素保持在中心水平时,观察两个因素交互作用对响应值的影

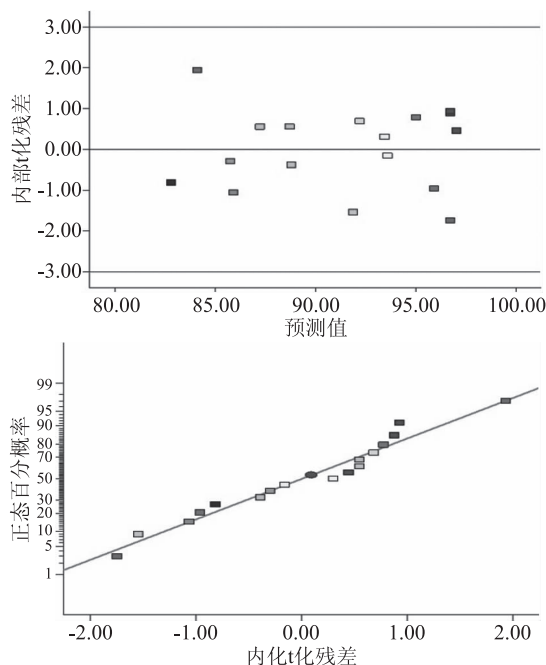


图6 模型内部t化残差图和t化残差正态分布概率图

Fig.6 Internally studentized residuals plot and normal probability plot of model

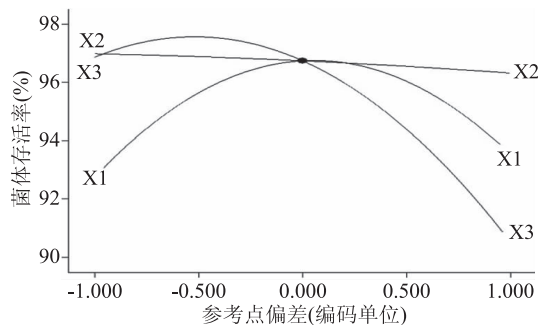


图7 模型微扰曲线

Fig.7 Perturbation plot of model

响可得到其等高线图(图8)。等高线图呈圆形表示因素间交互作用不明显,椭圆形则表示交互作用显著。由图8可以看出, X_1X_3 等高线图为椭圆形,影响极显著($P < 0.01$),交互作用项 X_1X_2 和 X_2X_3 影响不显著($P > 0.05$)。

2.2.5 模型求解与验证试验 应用 Design Expert 优化模块求得方程最优解,即 $X_1 = -0.12$, $X_2 = -1$, $X_3 = -0.54$,经转换可得到因素实际水平为进料速率为 598.81 mL/h,进风量为 78.11 m³/h 和出口温度为 51.79 ℃。为方便操作,将参数修约为进料速率 600 mL/h,进风量 80 m³/h 和出口温度 52 ℃,优化条件下验证试验结果为 96.64% ± 1.43%,与模型预测理论值 97.82% 比较接近。

3 结论与讨论

单因素结果表明,复合抗热保护剂用量为 15%、入口温度为 100 ℃、进料速率为 600 mL/h、进风量为 90 m³/h 和出口温度为 55 ℃ 条件下,菌体存活率相对较高;优选进料速率、进风量和出口温度为重要因素,并采用中心复合响应面优化技术研究了进料速

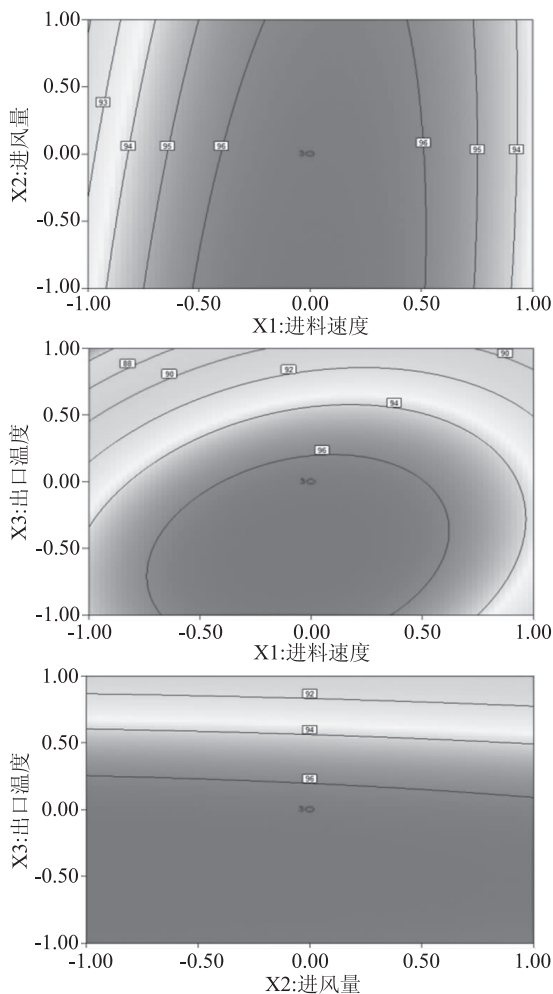


图8 模型因素交互作用项等高线图

Fig.8 Contour plot of the model factors interaction items

率(X_1)、进风量(X_2)和出口温度(X_3)对菌体存活率的影响,构建了三元二阶非线性回归方程;模型方差与回归分析表明,出口温度(X_3)对菌体存活率影响极显著($P < 0.01$),进料速率(X_1)与进风量(X_2)影响不显著($P > 0.05$);模型信噪比 $SNR > 4$,所构建模型噪音小,可靠性较高;模型 $C.V = 0.84\%$,表明模型精密度和准确度均较高。微扰曲线分析发现,出口温度(X_3)对菌体存活率最敏感,为最重要因素。模型最优解求解并转化和修约得到喷雾干燥最优参数为进料速率 600 mL/h,进风量 80 m³/h 及出口温度 52 ℃,该优化条件下验证试验结果为 96.64% ± 1.43%,模型预测理论值为 97.8248%,表明在抗热保护剂的保护作用下菌体可以保持较高的存活率。

喷雾干燥过程中的热损伤和脱水干燥对益生菌亚细胞结构、胞内生物大分子及细胞器可能产生热损伤,常采取添加抗热保护剂进行菌体抗热保护^[16],常用抗热保护剂有糖类和蛋白质^[17]。周竞等^[18]在未添加抗热保护剂条件下对 *B.subtilis* BSD-2 进行喷雾干燥并对喷雾干燥条件进行优化分析,优化条件下菌体存活率为 75%;钟蔚^[19]在未使用抗热保护剂条件下对 *B.subtilis* BS1 进行喷雾干燥,菌体存活率为 89.2%;刘宇等^[20]在未使用抗热保护剂条件下对猪源枯草芽孢杆菌进行喷雾干燥并进行工艺条件优化,

优化条件下菌体平均存活率为 75.7% ;王雪莲等^[21]应用响应面优化技术对生防菌 *B.subtilis* B073 抗热保护剂配方进行优化,优化配方为溶性淀粉(0.46%)、糊精(1.25%)、蔗糖(1.22%)、谷氨酸钠(0.37%),优化条件下菌体存活率为 70%;杨正楠等^[22]以脱脂乳作为喷雾干燥保护剂,喷雾干燥存活率达到 93.6%,脱脂奶粉对菌体的保护效果要显著优于其他保护剂;本试验以海藻糖+蔗糖+脱脂奶粉为复合抗热保护剂进行喷雾干燥并对干燥工艺进行了优化分析,优化条件下菌体存活率高达 96.64% ± 1.43%,研究结论与 Ananta^[23]、Leslie^[24] 和 Hoobin^[25] 等结论相同;由此可说明,抗热保护剂的添加能较好的实现菌体的抗热保护,且不同抗热保护剂对菌体的抗热保护效果存在显著差异,以多糖和蛋白质作为复合抗热保护剂保护效果较好^[26-27]。其可能原因是由于低聚糖等小分子保护剂为多羟基化合物,具有很好的亲水性,可与细胞膜磷脂或蛋白质极性基团形成氢键或水化层,保护细胞膜、细胞器膜及胞内生物大分子结构的完整性,而蛋白质等大分子保护剂则主要通过“包埋”形成天然“隔热屏障”;两种保护剂的保护机制不同,联合使用抗热保护效果更好^[7]。

除热诱激增强菌体热耐受性和使用抗热保护剂提高菌体存活率外,对喷雾干燥工艺参数进行优化也可以提高菌体的热耐受性,优化喷雾干燥参数是益生菌喷雾干燥的重要研究内容,也是正确设定喷雾干燥工艺参数的关键所在,本实验也可为枯草芽孢杆菌微生态制剂提供理论与技术支持。

参考文献

- [1] Forster S C, Lawley T D. Systematic discovery of probiotics [J]. Nature Biotechnology, 2015, 33(1): 47-49.
- [2] Floch M H. The role of prebiotics and probiotics in gastrointestinal disease [J]. Gastroenterology Clinics of North America, 2018, 47(1): 179-191.
- [3] Gilbert J, Krajmalnik-Brown R, Porazinska D, et al. Toward effective probiotics for autism and other neurodevelopmental disorders [J]. Cell, 2013, 155(7): 1446-1448.
- [4] Khadieva G F, Lutfullin M T, Mochalova N K, et al. New *Bacillus subtilis* strains as promising probiotics [J]. Microbiology, 2018, 87(4): 463-471.
- [5] Hong H A, Huang J M, Khaneja R, et al. The safety of *Bacillus subtilis* and *Bacillus indicus* as food probiotics [J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 105(2): 510-520.
- [6] Huang S, Vignolles M L, Chen X D, et al. Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria: A review [J]. Trends in Food Science & Technology, 2017, 63: 1-17.
- [7] 肖怀秋, 李玉珍, 林亲录, 等. 枯草芽孢杆菌 Prob1822 复合抗热保护剂的研究 [J]. 中国酿造, 2019, 38(10): 49-54.
- [8] Teixeira P, Castro H, Moh C C, et al. Identification of sites of injury in *Lactobacillus bulgaricus* during heat stress [J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 83(2): 219-226.
- [9] 范娜, 陈雪峰. 益生菌抗热保护剂的研究 [J]. 食品研究与开发, 2011, 32(4): 94-98.
- [10] 肖怀秋, 李玉珍, 林亲录, 等. 冷榨花生粕蛋白脲酶法制

备及其在微生物增殖培养中的应用(英文) [J/OL]. 食品科学: 1-2 [2019-11-26]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.ts.20190301.1549.038.html>

- [11] Davies O L, George E C, Lewis R C. The design and analysis of industrial experiments [M]. London: Longman Group Limited, 1978: 107-112.
- [12] Leslie S B, Israeli E, Lighthart B, et al. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(10): 3592-3597.
- [13] Ishiwu C N, Obiegbuna J E, Iwouno J O. Effect of inlet-air temperature on physico-chemical and sensory properties of spray-dried soy milk [J]. African Journal of Food Agriculture Nutrition & Development, 2014, 14(6): 2239-2253.
- [14] Riveros B, Ferrer J, Rquez R. Spray drying of a vaginal probiotic strain of *Lactobacillus acidophilus* [J]. Drying Technology, 2009, 27(1): 123-132.
- [15] 肖怀秋, 李玉珍, 林亲录, 等. Box-Behnken 响应面优化冷榨花生粕酶解制备花生肽工艺 [J]. 中国粮油学报, 2014, 29(10): 106-111.
- [16] Guergoletto K B, Busanello M, Garcia S. Influence of carrier agents on the survival of *Lactobacillus reuteri* LR92 and the physicochemical properties of fermented juçara pulp produced by spray drying [J]. Lwt-Food Science and Technology, 2017, 80: 321-327.
- [17] 成妮妮. 嗜酸乳杆菌抗热保护剂的研究 [J]. 食品研究与开发, 2003, 24(6): 51-53.
- [18] 周竞, 程辉彩, 崔冠慧, 等. 枯草芽孢杆菌 BSD-2 菌株喷雾干燥工艺优化 [J]. 现代农药, 2016(1): 13-15.
- [19] 钟蔚. 枯草芽孢杆菌微生态制剂制备工艺研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2013.
- [20] 刘宇, 李丹, 王岩, 等. 猪源枯草芽孢杆菌喷雾干燥工艺的优化 [J]. 中国生物制品学杂志, 2013, 26(1): 122-125, 128.
- [21] 王雪莲, 王敏, 张朝正, 等. 生防菌枯草芽孢杆菌 B073 抗热保护剂的研究 [C]//生物产业技术研讨会. 2008.
- [22] 杨正楠, 廖良坤. 枯草芽孢杆菌饲料制剂喷雾干燥制备及稳定性研究 [J]. 饲料广角, 2018(7): 41-44.
- [23] Ananta E, Volkert M, Knorr D. Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG [J]. International Dairy Journal, 2005, 15(4): 399-409.
- [24] Leslie S B, Israeli E, Lighthart B, et al. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(10): 3592-3597.
- [25] Hoobin P, Burgar I, Zhu S C, et al. Water sorption properties, molecular mobility and probiotic survival in freeze dried protein-carbohydrate matrices [J]. Food & Function, 2013, 4(9): 1376.
- [26] Agudelo J, Cano A, González-Martínez C, et al. Disaccharide incorporation to improve survival during storage of spray dried *Lactobacillus rhamnosus* in whey protein-maltodextrin carriers [J]. Journal of Functional Foods, 2017, 37: 416-423.
- [27] Khem S, Small D M, May B K. The behaviour of whey protein isolate in protecting *Lactobacillus plantarum* [J]. Food Chemistry, 2016, 190: 717-723.