发酵米线重金属镉消减菌株的组合优化

卢 露,吴卫国,傅亚平
(湖南农业大学 食品科技学院,湖南 长沙 410128)

摘 要:基于 Design - Expert 软件,通过中心组合实验和响应面分析,以发酵米线重金属镉(Cd)的消减百分率为指标,研究发酵米线最佳镉消减菌株配比。在单因素实验基础上,通过中心组合实验和响应面分析确定最佳镉消减菌株配比,即植物乳杆菌、酿酒酵母和嗜酸乳杆菌添加量(V/V)分别为2.84%、2.31%、3.00%,通过验证实验测得该比例添加量下镉的消减百分率为79.94%,与方程预测值80.87%相近。发酵米线最终产品中重金属镉含量为0.08 mg/kg(以大米水分含量折算),比大米镉含量国家食品安全标准值低60%。研究表明,发酵米线重金属镉的消减百分率的提高可以通过发酵菌株的组合优化来实现。

关键词:发酵米线;镉消减;植物乳杆菌;酿酒酵母;嗜酸乳杆菌
中图分类号:TS 213.3 **文献标识码**:A **文章编号**:1007 - 7561(2015)03 - 0085 - 05

Optimization of combination of cadmium reduction strains in fermented rice noodle

LU Lu;WU Wei - guo;FU Ya - ping
(College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha Hunan 410128)

Abstract: The optimal ratio of cadmium abate bacterial strain in fermented rice noodle was studied based on the Design - Expert software, by central composite design and response surface analysis. The amount of cadmium (Cd) reduction in fermented rice noodle was taken as an indicator. The optimal ratio of cadmium abate bacterial strain was determined by central composite experiment and response surface analysis on the basis of single factor test. The optimal add volume (V/V) were: *L. plantarum* 2.84%, *S. cerevisiae* 2.31% and *L. acidophilus* 3.00%. The cadmium abatement rate was 79.94% detected by verification test, which was close to the result of predictive value of the equation 80.87%. The cadmium content in final product fermented rice noodle was 0.08 mg/kg(converted by rice moisture content), which was 60% lower than the national food safety standard value of the cadmium content in rice. The results showed that the improvement of cadmium reduction percentage in the fermented rice noodlecan be achieved through combinatorial optimization of fermentation strains.

Key words: fermented rice noodle; abatement of cadmium; *L. plantarum*; *S. cerevisiae*; *L. acidophilus*

发酵米线是一类传统食品,主要以大米为原料,经微生物作用改善质构、风味,再经糊化形成具有一定形状和韧性的米制品。因其营养合理、易于消化、食用方便等优势,深受消费者喜爱;尤其在湖南、广西、云南等地,发酵米线的消费量很大。

制作发酵米线最重要的原料是大米。近年来,由于工业的发展,种植水稻的土壤受到污染,导致大米重金属镉超标严重。张良运[1]等人的调查发现:南方30%以上的大米镉含量超出国家食品安全标准值(国家食品安全标准值为0.2 mg/kg)。大米及其米制品镉超标的现状亟需改善,而近几年国内外的有关研究(如水稻育种、土壤改良等方法)均未能取得显著成效加以推广。

大米加工制成米制品后,其重金属的含量或有较大程度的降低。刘晶[2]等人研究发现:浸泡可减少大米中重金属元素含量,提高其食用安全性。浸泡是制作发酵米线最关键的步骤之一,故通过浸泡发酵以消减重金属的可行性高,而通过发酵消减大米制品中重金属的相关研究鲜见报道。浸泡发酵过程中起主要作用的是几类微生物,包括植物乳杆菌(*lactobacillus plantarum*)、嗜酸乳杆菌(*lactobacillus acidophilus*)、酿酒酵母(*saccharomyces cerevisiae*)

收稿日期:2014 - 08 - 26
基金项目:2014年湖南省研究生科研创新项目(CX2014b321);湖南省高等学校"2011"协同创新中心项目(湘教通[2013]448号)
作者简介:卢露,1992年出生,女,湖南永州人,在读硕士.
通讯作者:吴卫国,1968年出生,男,湖南桃江人,教授,博士生导师.

等[3-4],若能根据自然浸泡发酵中的优势微生物种类,选取具有重金属消减作用的菌种,进行接种发酵,使米制品镉含量降低至符合国家标准,不仅能控制发酵米线的品质,还能保证产品的食用安全性,促进发酵米线产业的健康发展。本研究通过中心组合实验和响应面分析,研究发酵消减大米制品中镉含量的最佳菌种配比。两种或两种以上菌种配比参与发酵,可促进两特定菌种间的互利共生、营造更好的增殖环境、提供更多代谢产物,或可以更好地降低发酵米线中的重金属镉。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

镉含量为0.4 mg/kg的原料米:湖南省粮油科学研究设计院提供;植物乳杆菌:湖南农业大学食品科技学院保藏;酿酒酵母:广东省微生物菌种保藏中心斜面保藏;嗜酸乳杆菌:广东省微生物菌种保藏中心冻干粉;镉标准溶液(100 μg/mL):国家标准物质研究中心;硝酸(优级纯)、过氧化氢(30%优级纯):国药集团化学试剂有限公司;高氯酸(优级纯):天津市鑫源化工有限公司;去离子水:河南新源科技有限公司;MRS肉汤:广东环凯微生物科技公司;酵母膏:天津市英博生化试剂有限公司;蛋白胨:天津市北辰方正试剂厂;葡萄糖:上海国药集团。

电砂浴锅:北京市永光明医疗仪器有限公司;AA7000石墨炉原子吸收光谱仪:岛津公司;磨浆机:美的公司;蒸锅:浙江苏泊尔股份有限公司;101A-3ET电热鼓风干燥箱:上海实验仪器厂有限公司;无菌操作台:苏州佳宝净化工程设备有限公司;恒温培养箱:常州欧邦电子有限公司;高压灭菌锅:上海晓科科学仪器有限公司;研钵:景德镇市大成窑炉材料经营部。

1.2 实验方法

1.2.1 菌悬液的制备

植物乳杆菌[5]:取5 mL实验室保存的植物乳杆菌菌液在无菌条件下接种到灭菌的MRS肉汤中,37 ℃恒温培养24~36 h,平板计数、稀释至浓度达到10^7 cfu/mL左右时,即为菌悬液。

酿酒酵母[6]:在无菌条件下用接种环刮取酿酒酵母斜面菌,接种到自制YPD培养基(1%酵母膏、2%蛋白胨、2%葡萄糖)中,30 ℃恒温培养24~36 h,平板计数、稀释至浓度达到10^7 cfu/mL即可。

嗜酸乳杆菌[5]:内含嗜酸乳杆菌冻干粉的安培瓶开封后,用无菌吸管或移液枪吸取1 mL灭菌的MRS肉汤注入安培管内,振荡使冻干粉全部溶解后,吸取全部悬液,接种到2~3支5 mL的灭菌MRS肉汤中,在37 ℃下培养24~36 h,直至菌液浑浊产生白色沉淀。按上述方法扩大培养,平板计数、稀释至浓度达到10^7 cfu/mL,即得菌悬液。

1.2.2 发酵米线的制备

工艺流程[7]:原料→磨粉→浸泡发酵→过滤(取滤渣)→磨浆→糊化→冷却回生→成型→干燥→成品。

具体制备过程:原料米用小型粉碎机打磨成粉,过60目筛;取原料米粉20 g,加入80 mL去离子水混合均匀,然后添加相应比例的发酵剂,在相应的恒温条件下发酵12 h;取出过滤,滤渣加少量水用磨浆机或研钵研磨成浆;米浆装盘置于蒸锅中加热糊化,然后放置室温冷却回生,待表面收缩冷却后取出切片,并置于鼓风干燥箱内干燥为成品,干燥温度为60 ℃。

1.2.3 重金属镉的检测[8]

准确称取样品1.000 0 g(精确至小数点后4位)至50 mL的直口锥形瓶中,加入7 mL浓硝酸、2 mL高氯酸和2 mL过氧化氢,摇匀,在锥形瓶瓶口放置弯颈漏斗和坩埚盖,静置过夜,次日,在电砂浴锅上升温加热,90 ℃保持30 min,150 ℃保持60 min,250 ℃消解至澄清透明,然后在电热板上赶酸至剩余1 mL消解液,用去离子水定容至25 ml,上机检测[8]。标准溶液使用国家标准物质研究中心提供的镉标准溶液(100 μg/mL)),逐级稀释至浓度为0、2.0、4.0、6.0、8.0 μg/L的镉标准溶液。

1.2.4 实验设计

采用单因素实验、中心组合设计、响应面分析法,分别以植物乳杆菌、酿酒酵母、嗜酸乳杆菌的添加量为变量,研究其对发酵米线重金属镉消减百分率的影响。利用Design-Expert软件进行实验设计、数据分析和模型建立,确定发酵米线最佳镉消减的菌株配比。

根据不同菌种的最适温度选取的单因素实验条件不同,目的是保证单因素实验能达到最佳效果。单因素实验固定条件如下:植物乳杆菌单因素实验的发酵温度37 ℃、发酵12 h;酿酒酵母单因素实验发酵温度30 ℃、发酵12 h;嗜酸乳杆菌单因素实验的发酵温度37 ℃、发酵12 h。

考虑到植物乳杆菌和嗜酸乳杆菌的最适温度为

37 ℃,酿酒酵母的最适生长温度为30 ℃,但其在37 ℃也能保持良好的生长繁殖水平。故响应面实验的发酵条件确定为:发酵温度37 ℃、发酵12 h。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

发酵米线在发酵过程中,植物乳杆菌、嗜酸乳杆菌和酿酒酵母是优势菌种[9]。研究表明,镉可能通过某些特征基团与蛋白质结合形成大米结合蛋白,通过酶的作用瓦解蛋白质的结构,可能对镉含量的消减有积极作用[10]。本文选择植物乳杆菌、嗜酸乳杆菌、酿酒酵母为考察因素,研究发酵米线镉消减情况。

2.1.1 植物乳杆菌添加量对镉消减百分率的影响

设定植物乳杆菌添加量(V/V)分别为0%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、3.5%,37 ℃发酵12 h。结果见图1。

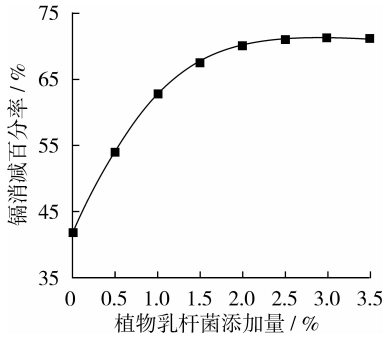

图1 植物乳杆菌添加量对镉消减百分率的影响

在发酵过程中,微生物为维持自身代谢,将大米中的蛋白质作为氮源,破坏蛋白质结构,将其分解成氨基酸和小分子肽,此过程可能对镉的消减百分率影响较大。由图1可知:植物乳杆菌作为发酵米线的优势菌,其添加量对镉的消减有显著的影响,镉消减百分率最高达到71.5%,与无添加组(42%)相比,镉消减百分率提高70%。镉消减百分率随着菌添加量的增加,逐渐提高,在添加量为3.0%时达到最高水平。综合各方面因素,选取2.0%、2.5%、3.0%三个水平进行后续实验。

2.1.2 酿酒酵母添加量对镉消减百分率的影响

设定酿酒酵母添加量(V/V)分别为0%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、3.5%,发酵温度30 ℃、发酵12 h。结果见图2。

由图2可知:酿酒酵母添加量对镉的消减百分率有较大影响,镉消减百分率最高达到了66.2%,无添加组的百分率为39.8%,镉消减百分率提高66.3%。镉消减百分率随着菌添加量的增加而逐渐提高,在添加量为2.0%时达到最高水平。综合各方面因素,选取1.5%、2.0%、2.5%三个水平进行后续实验。

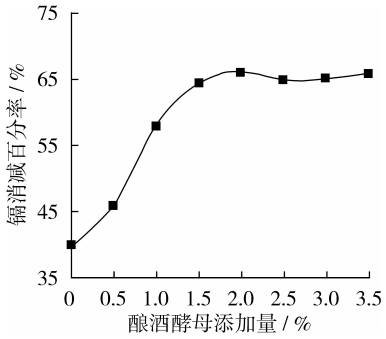

图2 酿酒酵母添加量对镉消减百分率的影响

2.1.3 嗜酸乳杆菌添加量对镉消减百分率的影响

设定嗜酸乳杆菌添加量(V/V)分别为0%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、3.5%,37 ℃发酵12 h。结果见图3。

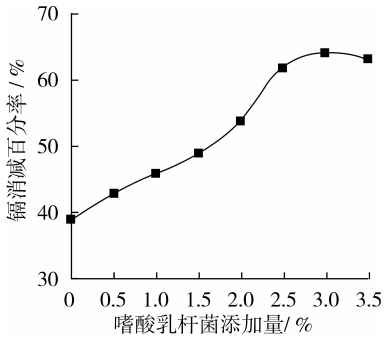

图3 嗜酸乳杆菌添加量对镉消减百分率的影响

由图3可知:嗜酸乳杆菌添加量对镉的消减有较大的影响,最高消减百分率为64%,比无添加组的39%提高了64%。添加量小于1.5%时,消减作用提高不明显;添加量大于1.5%时,随添加量增加镉消减百分率明显提高,至添加量为2.5%时,达到最高消减百分率(64%)。综合考虑,选取2.0%、2.5%、3.0%进行后续实验。

2.2 中心组合设计和响应面分析确定最佳消减剂配比

2.2.1 响应模型的建立与验证

根据Design-Expert软件中的Central-Composite实验原理,综合单因素实验结果,选择植物乳杆菌、酿酒酵母、嗜酸乳杆菌三个因素,采用三因素三水平的响应面分析法。实验设计方案与实验结果见表1。

通过Design-Expert软件,以镉消减百分率为

目标函数,对结果进行多元回归拟合、方差分析及显著性检验。二元回归方程为:

$$Y = 78.38 + 4.38A - 1.97B + 1.42C + 1.72AB - 0.52AC + 4.68BC - 3.57A^2 - 3.18B^2 - 1.09C^2$$

,其中Y为镉消减百分率,A为植物乳杆菌添加量、B为酿酒酵母添加量、C为嗜酸乳杆菌添加量。

表1　中心组合实验设计及结果

实验号	植物乳杆菌/%	酿酒酵母/%	嗜酸乳杆菌/%	镉消减百分率/%
1	2.5	2.0	2.5	77.82
2	2.5	2.0	2.5	77.21
3	3.34	2.0	2.5	75.89
4	2.5	2.0	2.5	78.83
5	2.0	1.5	3.0	66.90
6	3.0	2.5	2.0	68.91
7	2.5	2.0	2.5	78.72
8	2.5	2.0	1.66	73.30
9	2.5	2.0	3.34	77.88
10	3.0	1.5	3.0	71.56
11	2.5	2.0	2.5	78.79
12	2.5	2.84	2.5	66.63
13	2.0	1.5	2.0	72.61
14	2.5	2.0	2.5	78.82
15	2.5	1.16	2.5	72.69
16	3.0	1.5	2.0	78.70
17	2.0	2.5	2.0	55.32
18	3.0	2.5	3.0	79.84
19	1.66	2.0	2.5	61.25
20	2.0	2.5	3.0	68.96

表2　回归模型的方差分析

来源	自由度	平方和	均方	F值	P值	显著性
A	1	262.21	262.21	715.16	<0.000 1	**
B	1	53.11	53.11	144.85	<0.000 1	**
C	1	27.62	27.62	75.34	<0.000 1	**
AB	1	23.53	23.53	64.18	<0.000 1	**
AC	1	2.14	2.14	5.84	<0.000 1	**
BC	1	175.03	175.03	477.39	0.036 2	*
A^2	1	183.37	183.37	500.14	<0.000 1	**
B^2	1	145.89	145.89	397.91	<0.000 1	**
C^2	1	16.97	16.97	46.29	<0.000 1	**
模型	9	848.71	94.08	256.59	<0.000 1	**
失拟项	5	1.31	0.26	0.55	0.734 3	
残差	10	3.67	0.37			
净误差	5	2.36	0.47			
总和	19	850.38				

注:*表示差异显著($P<0.05$),**表示差异极显著($P<0.01$)。

从表2模型的F值大小可得出该模型显著;失拟项的P值为0.734 3,表示该模型的误差不显著;各模型项的P值均小于0.05,表示各项均为显著模拟项;拟合方程的拟合度R^2为0.995 7,拟合度好,表明该模型可靠。

2.2.2　各因素交互作用对镉消减百分率的响应面分析

在尽可能减少实验次数的条件下,根据响应曲面所具有的特性,能通过方程预测得到与最佳配比接近的结果[11]。为直观反映各个因素对响应值Y的影响,分别将嗜酸乳杆菌、酿酒酵母、植物乳杆菌三个因素中一个固定在0水平,分析另外两个因素对镉的消减百分率的影响。

如图4~图9所示,运用Design-Expert软件绘制各因素交互作用的等高线图和响应面图,从图中可看出:植物乳杆菌和酿酒酵母、植物乳杆菌和嗜酸乳杆菌两组的等高线呈椭圆形,而酿酒酵母和嗜酸乳杆菌,其等高线呈"H"型。故植物乳杆菌和酿酒酵母、植物乳杆菌和嗜酸乳杆菌两组分别存在交互作用;而酿酒酵母和嗜酸乳杆菌两个因素的水平差距较大,而交互作用不明显。为验证该组合实验结果的可靠性,可选取图中响应值周围水平再进行一组实验。

通过图5、图7、图9中显示的方程响应面图,证实拟合曲面的最大值是真实可见的。当酿酒酵母在1.5%~2.0%范围内时,镉消减百分率随植物乳杆菌添加量的增大而升高;当植物乳杆菌的添加量在2.0%~2.9%,嗜酸乳杆菌添加量在1.5%~2.6%时,植物乳杆菌和嗜酸乳杆菌的作用相辅相成,镉消减百分率随植物乳杆菌和嗜酸乳杆菌添加量的增加而升高。

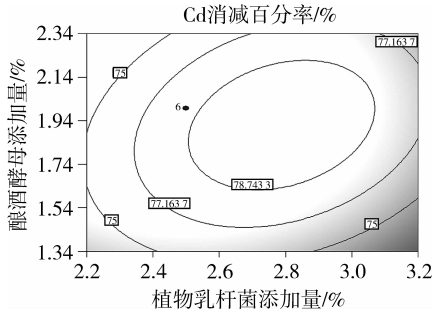

图4　酿酒酵母和植物乳杆菌添加量对镉消减影响的等高线图

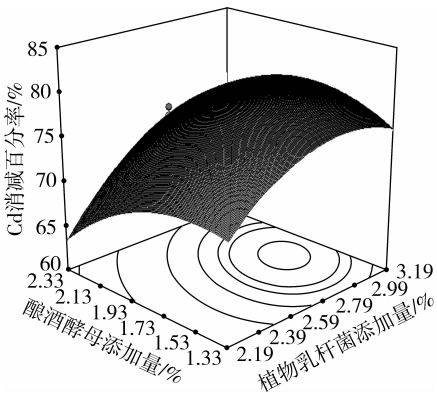

图5　酿酒酵母和植物乳杆菌添加量对镉消减影响的响应面图

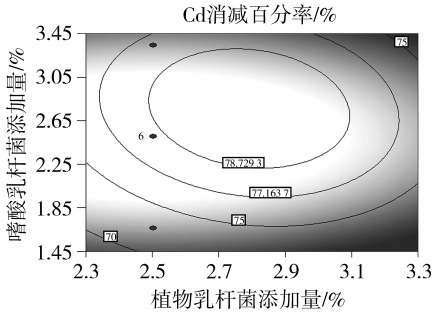

图6 嗜酸乳杆菌和植物乳杆菌添加量对镉消减影响的等高线图

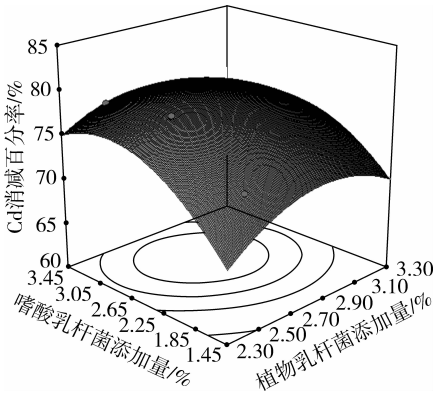

图7 嗜酸乳杆菌和植物乳杆菌添加量对镉消减影响的响应面图

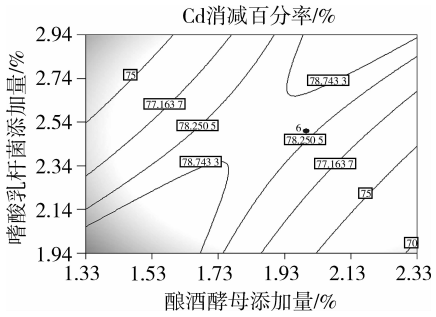

图8 嗜酸乳杆菌和酿酒酵母添加量对镉消减影响的等高线图

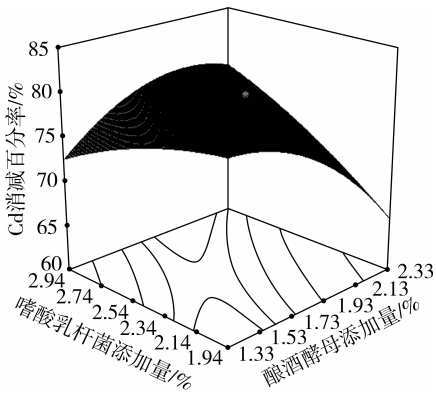

图9 嗜酸乳杆菌和酿酒酵母添加量对镉消减影响的响应面图

2.2.3 验证实验

通过 Design－Expert 软件的预测，得到最佳消减百分率为80.87%。此时优化组合的添加量配比为：植物乳杆菌2.84%、酿酒酵母2.31%、嗜酸乳杆菌3.00%。按照软件预测的优化组合配比进行验证实验，验证实验结果镉消减百分率为79.94%，与回归方程的预测值相近。发酵米线最终产品中重金属镉含量为0.08 mg/kg（以大米水分含量折算）。

3 结论

在发酵米线重金属消减菌株优化组合的选择过程中，先利用单因素实验确定具有较强重金属镉消减能力的实验水平范围，再利用 Design－Expert 软件的 Central－Composite 模型进行组合优化，拟合出三元二次方程并进行响应面分析，通过方程预测，得出优化组合的添加量配比：植物乳杆菌2.84%、酿酒酵母2.31%、嗜酸乳杆菌3.00%，相应的预测结果（镉消减百分率）为80.87%，验证实验表明镉消减百分率为79.94%，与预测结果基本相符，且远远高于无添加组的平均镉消减百分率。最终发酵米线产品的镉含量为0.08 mg/kg，比大米镉含量的国家食品安全标准值0.2 mg/kg低60%。通过发酵菌株的组合优化，提高发酵米线重金属镉消减百分率的方法切实可行。

参考文献：

[1]张良运，李恋卿，潘根兴，等. 南方典型产地大米Cd、Zn、Se含量变异及其健康风险探讨[J]. 环境科学，2009，30(9)：2792－2797.

[2]刘晶，任佳丽，林亲录，等. 大米浸泡过程中重金属迁移规律研究[J]. 食品与机械，2013，(5)：66－67.

[3]易翠平，周慧，佟立涛. 鲜米粉加工过程中的发酵工艺研究进展[J]. 食品与机械，2013，29(5)：223－225.

[4]李纪岳，张爱民，张凤英. 纯种发酵早籼米生产新式扎粉的研究[J]. 安徽农业科学，2009，37(3)：1325－1326.

[5]周显青，陶华堂，王学锋. 植物乳杆菌大米发酵条件的优化[J]. 河南工业大学学报：自然科学版，2013，34(6)：001.

[6]凌杰. 白酒酿造中地衣芽孢杆菌与酿酒酵母的相互作用及应用研究[D]. 无锡：江南大学，2013.

[7]廖卢艳，吴卫国. 不同淀粉糊化及凝胶特性与粉条品质的关系[J]. 农业工程学报，2014，30(15)：332－338.

[8]Santos D，Barbosa F，Tomazelli A，et al. Determination of Cd and Pb in food slurries by GFAAS using cryogenic grinding for sample preparation[J]. Analytical and bioanalytical chemistry，2002，373(3)：183－189.

[9]GB/T5009.15－2003，食品中镉的测定[S].

[10]查燕，杨居荣，刘虹，等. 污染稻麦籽实中镉和铅的分布及其存在形态[J]. 北京师范大学学报：自然科学版，2000，36(2)：268－273.

[11]Li C，Zhao J L，Wang Y T，et al. Synthesis of cyclopropane fatty acid and its effect on freeze－drying survival of Lactobacillus bulgaricus L2 at different growth conditions[J]. World J Microb Biot，2009，25(9)：1659－1665.