

doi:10.6041/j.issn.1000-1298.2018.09.036

植物乳杆菌 LPL-1 产细菌素发酵培养基优化

王瑶^{1,2} 李琪^{1,2} 李平兰^{1,2}

(1. 中国农业大学北京食品营养与人类健康高精尖创新中心, 北京 100083;
2. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要: 乳酸细菌素是细胞在转录翻译过程中通过核糖体机制合成,并分泌到菌体体外的一类具有抑菌活性的蛋白质,细菌素具有无抗药性、无毒副作用及易被人体降解的特点,因此是一种天然的食品防腐保鲜剂。为了提高植物乳杆菌 LPL-1 所产细菌素的产量,以单增李斯特菌为指示菌,相对抑菌效价为效应值,通过响应面法对发酵培养基组成进行优化,确定了最优培养基组成。利用单因素试验与 Plackett-Burman 试验,确定了主要影响因素为葡萄糖质量分数、胰蛋白胨质量分数与吐温-80 体积比,最陡爬坡试验与 Box-Behnken 响应面试验确定了最优培养基组成为:葡萄糖质量分数 2.08%、酵母粉质量分数 0.51%、胰蛋白胨质量分数 1.02%、牛肉膏质量分数 1%、吐温-80 体积比 1.02 mL/L、磷酸氢二钾质量浓度 3 g/L、乙酸钠质量分数 0.5%、硫酸镁质量浓度 0.2 g/L、硫酸锰质量浓度 0.3 g/L、柠檬酸氢二铵质量浓度 2 g/L、蒸馏水体积 1 L。在此条件下细菌素效价(752.11 AU/mL)比优化前(286.67 AU/mL)提高了 1.62 倍。因此,发酵培养基的优化为菌种与细菌素的产业化应用奠定了基础。

关键词: 植物乳杆菌 LPL-1; 植物乳杆菌素; 发酵培养基; 响应面

中图分类号: TS201.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2018)09-0311-07

Optimization of Fermentation Medium of *Lactobacillus plantarum* LPL-1 for Plantaricin LPL-1 Production by Response Surface Methodology

WANG Yao^{1,2} LI Qi^{1,2} LI Pinglan^{1,2}

(1. Beijing Advanced Innovation Center for Food Nutrition and Human Health, China Agricultural University, Beijing 100083, China
2. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: Bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB) are ribosomally synthesized peptides or proteins that inhibit or kill the closely related species. Based on the merits of easy degradation by proteases, non-resistance and non-toxic side effects, plantaricin LPL-1 is a promising natural and safe biological preservative for food preservation industry. Aiming at the improvement of plantaricin LPL-1 from *Lactobacillus plantarum* LPL-1, the inhibitory activity (AU/mL) against *Listeria monocytogenes* 54002 was used as effect index, and the optimized medium composition was determined by response surface methodology. The major factors were determined as glucose, yeast extract and Tween-80 by single factor tests and Plackett-Burman tests. Based on the results of the steepest grade test and response surface methodology, the optimal medium composition was followed as glucose 2.08%, yeast extract 0.51%, tryptone 1.02%, beef extract 1%, Tween-80 1.02 mL/L, K₂HPO₄ 3 g/L, NaAc 0.5%, MgSO₄ 0.2 g/L, MnSO₄ 0.3 g/L, tri-ammonium citrate 2 g/L, and ddH₂O 1 L. Under the optimal conditions, the inhibitory activity reached up to 752.11 AU/mL which was increased by 1.62 times. Finally, the research provided insight into the potential use of bacteriocin as a food preservative in the food industry.

Key words: *Lactobacillus plantarum* LPL-1; plantaricin LPL-1; fermentation medium; response surface

收稿日期: 2018-05-11 修回日期: 2018-06-11
基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31671831)和公益性行业(农业)科研专项(201303014)
作者简介: 王瑶(1989—),男,博士生,主要从事食品微生物研究,E-mail: wangyao897@126.com
通信作者: 李平兰(1964—),女,教授,博士,主要从事食品微生物研究,E-mail: lipinglan@cau.edu.cn

0 引言

乳酸细菌素是乳酸菌在转录翻译过程中通过核糖体机制合成,并分泌到菌体体外的一类具有抑菌活性的蛋白质,细菌素具有无抗药性、无毒副作用及易被人体降解的特点,因此不仅是一种天然的食品防腐保鲜剂^[1-2],而且具有取代抗生素的潜力^[3]。目前已经报道了许多新的细菌素及产生菌(如植物乳杆菌 LPL-1 的植物乳杆菌素 LPL-1^[4]、动物双歧杆菌 B04 的 bifidocin A^[5]与类植物乳杆菌 L-ZS9 的 paraplantaricin L-ZB1^[6]等),但其细菌素的产量严重制约了其工业化生产及应用。

植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)是食品发酵工业中常见的益生菌,已经被广泛应用于奶制品、肉制品及果蔬发酵食品中^[7-9]。产细菌素的植物乳杆菌不仅具有益生特性,而且具有抑菌特性,因此在食品发酵与食品防腐保鲜领域具有应用潜力。

植物乳杆菌 LPL-1 (*Lactobacillus plantarum* LPL-1)不仅是一株新的菌种,而且所产细菌素为新的 IIa 类细菌素,有作为天然食品生物防腐剂的巨大应用潜力^[4],然而菌体自身所产细菌素的产量比较低,其合成不仅受到自身诱导肽的调控,而且与培养基的组成及培养条件有关^[10]。本文以植物乳杆菌 LPL-1 为研究对象,通过单因素试验、Plackett-Burman 试验及响应面法优化植物乳杆菌素 LPL-1 的培养基组分,获得该菌种产生细菌素的最佳培养基组成,为该菌种产业化生产细菌素提供一定的实践基础。

1 材料与方法

1.1 菌种、培养基及试剂

植物乳杆菌 LPL-1 分离自发酵鱼,指示菌单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*) ATCC 54002 由实验室保存。MRS 培养基(葡萄糖质量分数 2%、酵母粉质量分数 0.4%、蛋白胨质量分数 1%、牛肉膏质量分数 1%、吐温-80 体积比 1 mL/L、磷酸氢二钾质量浓度 2 g/L、乙酸钠质量分数 0.5%、硫酸镁质量浓度 0.2 g/L、硫酸锰质量浓度 0.1 g/L、柠檬酸氢二铵质量浓度 2 g/L、蒸馏水体积 1 L)各组成成分购自西陇科学股份有限公司。

1.2 细菌素提取

按照 1% 接种量将植物乳杆菌 LPL-1 接种至 100 mL MRS 培养基,37℃ 静止培养 24 h,8 000 r/min 离心 15 min 收集上清液,按照培养基与-20℃ 预冷丙酮体积比 1:3 进行配比,-20℃ 放置 1 h 取出,8 000 r/min 离心 15 min 收集沉淀,后用-20℃ 预冷

的丙酮等体积洗涤脱水,8 000 r/min 离心 15 min 收集沉淀,沉淀室温(20℃)干燥用于计算酶活力。

1.3 抑菌活性的检测

采用牛津杯双层平板扩散法测定细菌素的酶活性^[11]。将提取的细菌素进行 2 倍稀释,取样 100 μL 进行抑菌试验,观察不到抑菌圈出现的最高稀释度定义为 1 个活力单位,其倒数即是原液的细菌素相对抑菌效价,单位为 AU/mL。

相对抑菌效价标准曲线的制作:将已知相对抑菌效价的细菌素稀释为 80%、60%、40% 与 20%,分别取 100 μL 进行抑菌试验,以对应抑菌圈直径为横坐标,相对抑菌效价对数为纵坐标,绘制标准曲线。

1.4 单因素试验

选择不同碳源、氮源、刺激因子、磷酸盐缓冲液及二价离子作为影响抑菌活性的主要因素,通过单因素试验选择 Plackett-Burman(PB)试验的影响因素与水平。

1.4.1 碳源

分别采用 2% 的葡萄糖、蔗糖、α-半乳糖、乳糖、可溶性淀粉及麦芽糖作为 MRS 培养基碳源成分,培养温度 37℃,培养时间 24 h。发酵结束后按照 1.2 节与 1.3 节中方法进行细菌素的提取与活性验证。

1.4.2 氮源

分别采用 1% 的酵母粉、胰蛋白胨、蛋白胨、牛肉膏、大豆蛋白胨及硝酸钠作为 MRS 培养基氮源成分,培养温度 37℃,培养时间 24 h。发酵结束后按照 1.2 节与 1.3 节中方法进行细菌素的提取与活性验证。

1.4.3 刺激因子

分别采用 1 mL/L 的吐温(Tween)-20、吐温-60、吐温-80、聚乙二醇(PEG)-1000、PEG-4000 与 PEG-8000 作为 MRS 培养基刺激因子,培养温度 37℃,培养时间 24 h。发酵结束后按照 1.2 节与 1.3 节中方法进行细菌素的提取与活性验证。

1.4.4 缓冲液

分别采用 2 g/L 的 K₂HPO₄、KH₂PO₄、Na₂HPO₄ 与 NaH₂PO₄ 作为 MRS 培养基缓冲成分,培养温度 37℃,培养时间 24 h。发酵结束后按照 1.2 节与 1.3 节中方法进行细菌素的提取与活性验证。

1.4.5 二价离子

分别采用 0.2 g/L 的 MgSO₄、MnSO₄、ZnSO₄、FeSO₄与 CuSO₄作为 MRS 培养基缓冲成分,培养温度 37℃,培养时间 24 h。发酵结束后按照 1.2 节与 1.3 节中方法进行细菌素的提取与活性验证。

1.5 Plackett-Burman 试验

根据单因素试验结果,利用 Design-Expert 10.0

设计 Plackett – Burman 试验 ($N = 12$)。具体设计与相应区间如表 1 所示,根据各因素的贡献率与 P 值确定主要影响因素。

表 1 Plackett – Burman 试验设计

Tab.1 Design of Plackett – Burman experiment

因素	编码	
	-1	1
葡萄糖质量分数/%	1.5	2.5
酵母粉质量分数/%	0.4	0.6
吐温-80 体积比/($\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.8	1.2
硫酸镁质量浓度/($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.2	0.3
硫酸锰质量浓度/($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.2	0.3
磷酸氢二钾质量浓度/($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	1.5	3.0

1.6 最陡爬坡试验

根据 Plackett – Burman 试验分析的显著性、贡献率及效应值设计试验的方向与步长。最陡爬坡试验具体设计方案如表 2 所示。

表 2 最陡爬坡试验设计

Tab.2 Design of the steepest grade test

试验序号	葡萄糖质量 分数/%	酵母粉质量 分数/%	吐温-80 体积 比/($\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$)
1	1.0	0.2	0.25
2	1.5	0.3	0.5
3	2.0	0.5	1.0
4	2.5	0.8	1.5
5	3.0	1.0	2.0

1.7 Box – Behnken 响应面试验

由最陡爬坡试验的拐点确定响应面试验的中心点及相应区间,采用 Design-Expert 10.0 软件设计试验方案,优化葡萄糖、酵母粉质量分数与吐温-80 体积比,以相对抑菌效价为响应值进行 17 组试验,具体设计方案如表 3 所示。模型对酶活力进行二次多元回归拟合,生成等高线图与响应面曲线图,获得最佳发酵参数,对模型进行方差分析,确定其可信度。

表 3 Box – Behnken 试验设计

Tab.3 Design of Box – Behnken experiment

因素	编码		
	-1	0	1
葡萄糖质量分数/%	1.5	2.0	2.5
酵母粉质量分数/%	0.25	0.50	0.75
吐温-80 体积比/($\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.5	1.0	1.5

1.8 模型的验证

利用响应面模型优化的最佳条件进行发酵试验,比较模型预测值与试验值,验证模型的有效性。

1.9 数据处理与分析

每个试验重复 3 次,取平均值。采用 SPSS 23.0 进行单因素方差分析与显著性差异分析,Design-

Expert 10.0 进行 Plackett – Burman 与 Box – Behnken 试验设计。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 碳源

碳源是菌体代谢与生长的主要元素,不同碳源对植物乳杆菌 LPL-1 产植物乳杆菌素 LPL-1 的影响如图 1 所示(图中不同字母表示差异显著,下同)。Lb. plantarum LPL-1 可以利用多种碳源,方差结果显示不同种类的碳源对细菌素的活性具有显著性影响($P < 0.05$)。以葡萄糖为碳源时,所获得细菌素相对抑菌效价达到 286.67 AU/mL,明显高于其它碳源。由于不同碳源的结构不同,Lb. plantarum LPL-1 对蔗糖、半乳糖、乳糖、淀粉与麦芽糖利用率比较低,因此确定葡萄糖为 Lb. plantarum LPL-1 产植物乳杆菌素 LPL-1 的最佳碳源。

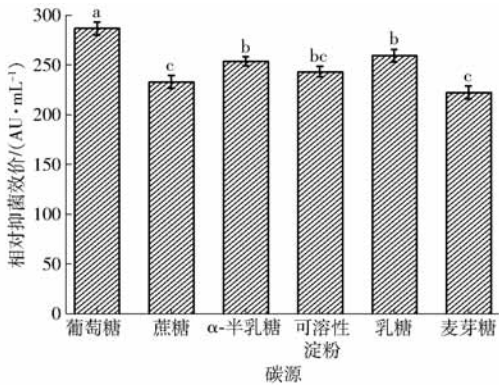


图 1 碳源对植物乳杆菌 LPL-1 产乳杆菌素 LPL-1 的影响

Fig.1 Influence of carbon source on activity of plantaricin LPL-1 from Lb. plantarum LPL-1

不同类型乳酸菌利用碳源的差异性比较大,如戊糖乳杆菌 31-1^[12]、植物乳杆菌 ST23LD^[13]与酸乳片球菌 C20^[14]的最佳碳源分别为乳糖、山梨醇与麦芽糖。本文的最优碳源是葡萄糖,导致菌体利用不同碳源的原因可能是菌体来源、所处的生长环境及内部代谢途径的不同。

2.1.2 氮源

氮源是微生物合成的主要因素,可以分为有机氮源与无机氮源。有机氮源被微生物酶解为小分子物质,被菌体吸收转化后进一步合成代谢,最终形成菌体所必需的营养物质;无机氮源不仅可以调节外部环境的 pH 值,而且可以参与菌体的代谢,但是其利用速率比较快^[15]。本文利用有机氮源与无机氮源不同组合,测定菌体产乳杆菌素 LPL-1 的活性,结果如图 2 所示,有机氮源比无机氮源更能促进乳

杆菌素 LPL - 1 的产生,有机氮源降解的营养成分有可能促进了细菌素合成蛋白的表达。方差结果显示,酵母粉与胰蛋白胨更能促进细菌素的合成,但是两者之间差异不显著,复合氮源的使用可以更大提高细菌素的活性,因此采用不同氮源比例(胰蛋白胨与酵母粉质量比)1:1、1:2、2:1进行复配,结果如图3所示。

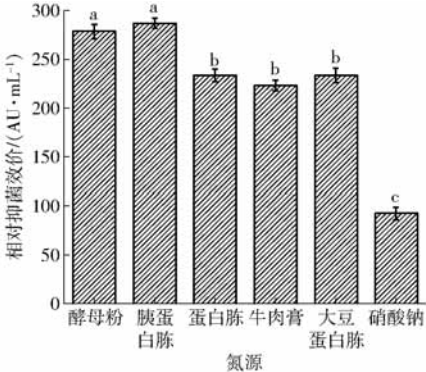


图2 氮源对植物乳杆菌 LPL - 1 产乳杆菌素 LPL - 1 的影响

Fig.2 Influence of nitrogen source on activity of plantaricin LPL - 1 from *Lb. plantarum* LPL - 1

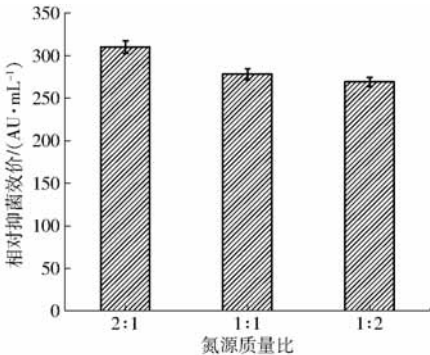


图3 氮源质量比对植物乳杆菌 LPL - 1 产乳杆菌素 LPL - 1 的影响

Fig.3 Influence of nitrogen ratio on activity of plantaricin LPL - 1 from *Lb. plantarum* LPL - 1

由图3可知,氮源比例为2:1时,乳杆菌素 LPL - 1 相对抑菌效价最高,因此,确定最优氮源比例为2:1,并以此为基础进行 Plackett - Burman 与响应面试验。

2.1.3 刺激因子

刺激因子主要是表面活性剂类的物质,它可以影响细胞膜的通透性^[16],进而影响细菌素的合成与分泌,不同种类的刺激因子对乳杆菌素 LPL - 1 的影响如图4所示,不同刺激因子对细菌素的产生差异性明显($P < 0.05$),吐温-80为刺激因子时,细菌素的相对抑菌效价达到310.83 AU/mL,明显高于其它刺激因子($P < 0.05$),因此确定吐温-80为最佳刺激因子。

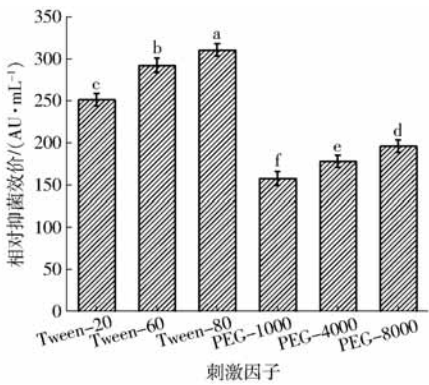


图4 刺激因子对植物乳杆菌 LPL - 1 产乳杆菌素 LPL - 1 的影响

Fig.4 Influence of surfactants on activity of plantaricin LPL - 1 from *Lb. plantarum* LPL - 1

GARVER 等^[17]初步证实了吐温-80对细菌素影响的重要性;庄绪亮等^[18]研究了吐温-80对Nisin产生的影响,确定了吐温-80对细菌的产生具有刺激作用;本文同样初步证明了吐温-80对植物乳杆菌素活性的影响。

2.1.4 二价离子

二价离子通常作为酶反应活性中心的辅基,对菌体蛋白质的转录翻译具有重要影响^[19],不同种类的二价离子对细菌素活性的影响如图5所示,不同离子对细菌素的产生差异性明显($P < 0.05$),硫酸镁与硫酸锰对细菌素活性影响明显,因此确定其为最佳影响因子。

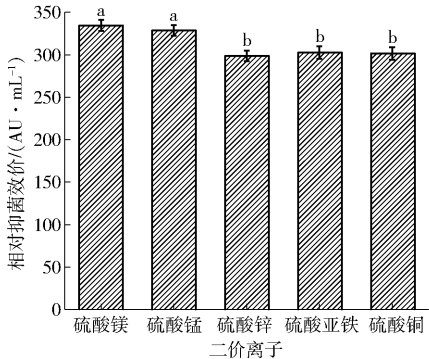


图5 二价离子对植物乳杆菌 LPL - 1 产乳杆菌素 LPL - 1 的影响

Fig.5 Influence of divalentions on activity of plantaricin LPL - 1 from *Lb. plantarum* LPL - 1

2.1.5 缓冲液

在培养基体系中,缓冲液主要起到稳定 pH 值作用^[20],促进菌体生长,同时磷又是菌体内糖类、蛋白质与能量等主要营养物质的组成元素,因此本文分析了不同缓冲体系对细菌素活性的影响,结果如图6所示,磷酸氢二钾为细菌素发酵最佳缓冲液,方差分析结果显示,缓冲液之间对该细菌素的活性影响差异并不显著($P > 0.05$),在后期的 Plackett -

Burman 试验中,选择磷酸氢二钾作为考察因素进行重复验证。

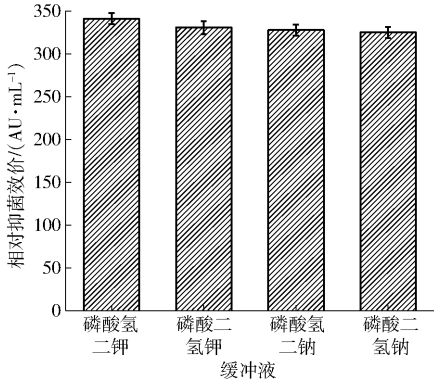


图 6 缓冲液对植物乳杆菌 LPL-1 产乳杆菌素 LPL-1 的影响

Fig.6 Influence of buffer on activity of plantaricin LPL-1 from *Lb. plantarum* LPL-1

2.2 Plackett – Burman 试验

以单因素试验为基础,根据 Plackett – Burman 试验的贡献率与显著性确定主要影响因素,为后续的 Box – Behnken 响应面试验奠定基础。以葡萄糖质量分数(A)、酵母粉质量分数(B)、吐温-80 体积比(C)、硫酸锰质量浓度(D)、硫酸镁质量浓度(E)与磷酸氢二钾质量浓度(F)为考察因素(A ~ F 为编码值),设置 -1 与 1 的不同水平(表 4、5),以相对抑菌效价为响应值(表 4),利用 Design-Expert 10.0 进行设计与分析,结果如表 4 与表 5 所示。根据 Design-Expert 10.0 数据分析,模型方差 $P < 0.05$,说明数据模型具有可信度,葡萄糖质量分数(A)、酵母粉质量分数(B)与吐温-80 体积比(C)贡献率最高,并且具有显著性差异,因此,选择以上 3 个因素进行最陡爬坡试验确定中心点,同时磷酸氢二钾质量浓度为正效应,硫酸镁质量浓度为负效应,硫酸锰质量浓度为正效应,因此,选择磷酸氢二钾质量浓度

表 4 Plackett – Burman 试验结果

Tab.4 Results of Plackett – Burman experiment						
试验序号	A	B	C	D	E	F
						相对抑菌效价/ (AU·mL ⁻¹)
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	1	1	1	-1
3	-1	-1	-1	1	-1	1
4	-1	1	1	1	-1	-1
5	1	1	-1	-1	-1	1
6	-1	-1	1	-1	1	1
7	1	1	-1	1	1	1
8	-1	1	1	-1	1	1
9	-1	1	-1	1	1	-1
10	1	1	1	-1	-1	-1
11	1	-1	-1	-1	1	-1
12	1	-1	1	1	-1	1

3 g/L,硫酸镁质量浓度 0.2 g/L、硫酸锰质量浓度 0.3 g/L,其余因素按照培养基初始比例进行添加,牛肉膏质量分数 1%、乙酸钠质量分数 0.5%、柠檬酸氢二铵质量浓度 2 g/L。

表 5 Plackett – Burman 试验效应分析

Tab.5 Effect analysis of Plackett – Burman experiment			
因素	效应值	贡献率/%	P
A	1.17	37.57	<0.000 1
B	0.96	25.45	0.000 2
C	1.10	33.20	<0.000 1
D	0.05	0.08	0.594 2
E	-0.24	1.61	0.054 6
F	0.06	0.10	0.551 8

2.3 最陡爬坡试验

根据 Plackett – Burman 试验结果设计主要因素的最陡爬坡试验,葡萄糖质量分数、酵母粉质量分数、吐温-80 体积比为显著因素。根据这 3 个因素的取值高低水平、效应值,以细菌素相对抑菌效价为响应值,设定这 3 个因素的变化方向及步长。最陡爬坡试验结果呈现先增高后降低的趋势,在 3 号试验点(表 2)处出现最高点,该点处葡萄糖质量分数为 2%、酵母粉质量分数为 0.5%、吐温-80 体积比为 1 mL/L,此时植物乳杆菌 LPL-1 产细菌素相对抑菌效价达到最大,最大值为 583.23 AU/mL。该点即为下一步 Box – Behnken 试验设计的中心点。

2.4 Box – Behnken 响应面试验

利用 Design-Expert 10.0 软件对葡萄糖质量分数、酵母粉质量分数、吐温-80 体积比设计三因素三水平的 Box – Behnken 试验,试验结果见表 6。对 Box – Behnken 试验结果进行方差分析,由表 7 可

表 6 Box – Behnken 试验结果

Tab.6 Results of Box – Behnken experiment				
试验 序号	因素			相对抑菌效价/ (AU·mL ⁻¹)
	葡萄糖质量 分数/%	酵母粉质量 分数/%	吐温-80 体积 比/(mL·L ⁻¹)	
1	1.5	0.50	1.5	140.76 ± 5.62
2	2.0	0.50	1.0	823.27 ± 5.63
3	1.5	0.75	1.0	196.05 ± 5.98
4	2.5	0.25	1.0	427.50 ± 6.02
5	2.5	0.75	1.0	372.98 ± 4.99
6	2.0	0.25	1.5	200.89 ± 5.31
7	2.0	0.50	1.0	825.28 ± 5.54
8	2.0	0.50	1.0	786.03 ± 5.64
9	2.0	0.75	1.5	346.70 ± 5.75
10	1.5	0.25	1.0	149.97 ± 3.98
11	2.0	0.50	1.0	774.63 ± 6.11
12	2.5	0.50	0.5	226.95 ± 5.65
13	2.5	0.50	1.5	271.74 ± 5.87
14	2.0	0.75	0.5	226.91 ± 5.88
15	1.5	0.50	0.5	95.32 ± 3.92
16	2.0	0.50	1.0	713.05 ± 6.22
17	2.0	0.25	0.5	166.93 ± 4.75

知,所选择的回归模型的 P 值小于 0.05,表明整体模型对试验结果具有显著的影响,具有可信度;而失拟项的 P 值为 0.299,大于 0.05,失拟项检验不显著,说明未知因素对试验结果的影响较小,残差主要由随机误差引起,模型选择适当;该模型的相关系数 $R=0.983\ 8$,校正相关系数 0.963 0,信噪比大于 4,

表明模型可信度很高。细菌素相对抑菌效价 Y 对葡萄糖质量分数、酵母粉质量分数和吐温-80 体积比的多元二次回归方程为

$$Y=784.458+89.629\ 2A+24.669\ 4B+30.500\ 6C-25.151\ 7AB-0.153\ 076AC+21.458BC-274.751A^2-223.076B^2-326.02C^2$$

表 7 Box-Behnken 试验结果分析
Tab.7 Result analysis of Box-Behnken experiment

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
模型	1.167×10^6	9	1.296×10^5	47.23	<0.000 1	**
A	64 267.15	1	64 267.15	23.41	0.001 9	**
B	4 868.64	1	4 868.64	1.77	0.224 7	
C	7 442.31	1	7 442.31	2.71	0.143 6	
AB	2 530.42	1	2 530.42	0.92	0.369 0	
AC	0.094	1	0.094	3.415×10^{-5}	0.995 5	
BC	1 841.78	1	1 841.78	0.67	0.439 7	
A^2	3.178×10^5	1	3.178×10^5	115.80	<0.000 1	**
B^2	2.095×10^5	1	2.095×10^5	76.33	<0.000 1	**
C^2	4.475×10^5	1	4.475×10^5	163.04	<0.000 1	**
残差	19 214.16	7	2 744.88			
失拟项	10 843.20	3	3 614.40	1.73	0.299 0	
纯误差	8 370.96	4	2 092.74			
矫正总和	1.186×10^6	16				

注:**表示 $P<0.01$ 。

2.5 响应面立体分析及等高线图

由回归方程所做的响应面立体图与等高线图如图 7 所示,主要反映了葡萄糖、酵母粉与吐温-80 之间的相互作用,通过方程可知,二次项系数为负值,表明方程具有最大值。利用 Design-Expert 10.0 分

析计算,最适发酵培养基为葡萄糖质量分数 2.08%、酵母粉质量分数 0.51% 与吐温-80 体积比 1.02 mL/L,由于胰蛋白胨与酵母粉的最优质量比为 2:1,因此胰蛋白胨质量分数确定为 1.02%,此时最大相对抑菌效价为 793.21 AU/mL。

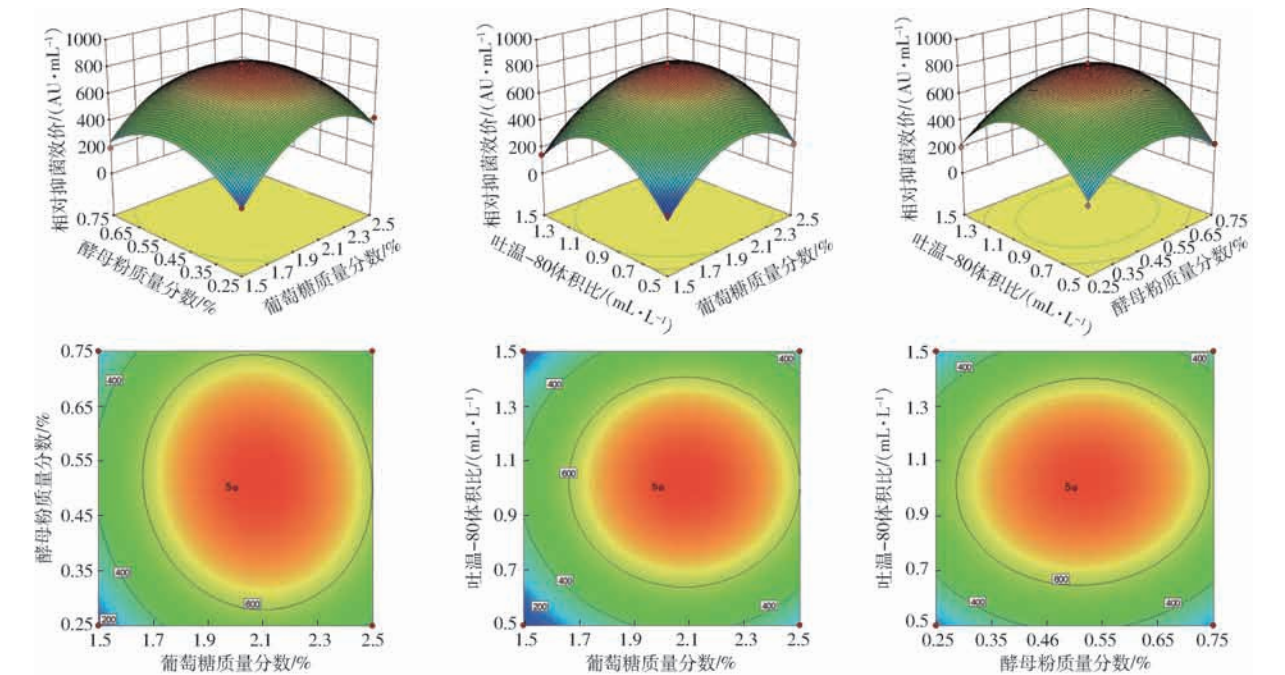


图 7 Box-Behnken 试验的响应面三维图和等高线图

Fig.7 Response surface three-dimensional diagrams and counter maps of Box-Behnken experiments

2.6 回归模型的验证

为了验证回归方程的准确性,利用优化后培养基的条件(葡萄糖质量分数 2.08%、酵母粉质量分数 0.51%、胰蛋白胨质量分数 1.02%、牛肉膏质量分数 1%、吐温-80 体积比 1.02 mL/L、磷酸氢二钾质量浓度 3 g/L、乙酸钠质量分数 0.5%、硫酸镁质量浓度 0.2 g/L、硫酸锰质量浓度 0.3 g/L、柠檬酸氢二铵质量浓度 2 g/L、蒸馏水体积 1 L)进行 3 次重复性验证,细菌素的平均相对抑菌效价为 (752.11 ± 4.98) AU/mL,与预测值的拟合率达到 94.7%,表明预测值与实际值具有良好的拟合性,优化后培养基可用,同时优化后细菌素相对抑菌效价 (752.11 AU/mL) 比优化前 (286.67 AU/mL) 提高了 1.62 倍,说明本试验优化的培养基明显提高了细菌素的产量。

3 结束语

在单因素试验基础上,利用 Plackett - Burman 试验确定了主要影响因素为葡萄糖质量分数、酵母粉质量分数与吐温-80 体积比,最陡爬坡试验确定了中心点,响应面 Box - Behnken 试验建立了二次多项式回归模型,最终确定发酵培养基为:葡萄糖质量分数 2.08%、酵母粉质量分数 0.51%、胰蛋白胨质量分数 1.02%、牛肉膏质量分数 1%、吐温-80 体积比 1.02 mL/L、磷酸氢二钾质量浓度 3 g/L、乙酸钠质量分数 0.5%、硫酸镁质量浓度 0.2 g/L、硫酸锰质量浓度 0.3 g/L、柠檬酸氢二铵质量浓度 2 g/L、蒸馏水体积 1 L。在此条件下细菌素相对抑菌效价 (752.11 AU/mL) 比优化前 (286.67 AU/mL) 提高了 1.62 倍。

参 考 文 献

- 1 CLEVELAND J, MONTVILLE T J, NES I F, et al. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation [J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 71(1): 1 - 20.
- 2 YANG S C, LIN C H, SUNG C T, et al. Corrigendum: antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals[J]. Frontier in Microbiology, 2014, 5(22): 683.
- 3 COTTER P D. Bacteriocins—a viable alternative to antibiotics? [J]. Nature Reviews Microbiology, 2013, 11(2): 95 - 105.
- 4 WANG Y, SHANG N, QIN Y, et al. The complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* LPL-1, a novel antibacterial probiotic producing class IIa bacteriocin [J]. Journal of Biotechnology, 2018, 266: 84 - 88.
- 5 LIU G, REN L, SONG Z, et al. Purification and characteristics of bifidocin A, a novel bacteriocin produced by *Bifidobacterium animals* BB04 from centenarians' intestine [J]. Food Control, 2015, 50: 889 - 895.
- 6 GUI M, ZHAO B, SONG J, et al. Paraplantaricin L-ZB1, a novel bacteriocin and its application as a biopreservative agent on quality and shelf life of rainbow trout fillets stored at 4°C [J]. Applied Biochemistry & Biotechnology, 2014, 174(6): 2295 - 2306.
- 7 DALIE D K D, DESCHAMPS A M, RICHARDFORGET F. Lactic acid bacteria-potential for control of mould growth and mycotoxins: a review [J]. Food Control, 2010, 21(4): 370 - 380.
- 8 KANMANI P, SATISH K R, YUVARAJ N, et al. Probiotics and its functionally valuable products—a review [J]. Critical Reviews in Food Science & Nutrition, 2013, 53(6): 641 - 658.
- 9 DEEGAN L H, COTTER P D, HILL C, et al. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension [J]. International Dairy Journal, 2006, 16(9): 1058 - 1071.
- 10 ABBASILIASI S, TAN J S, IBRAHIM T A T, et al. Fermentation factors influencing the production of bacteriocins by lactic acid bacteria: a review [J]. RSC Advances, 2017, 7: 29395 - 29420.
- 11 DELAADO A, BRITO D, FEVEREIRO P, et al. Bioactivity quantification of crude bacteriocin solutions [J]. Journal of Microbiological Methods, 2005, 62(1): 121 - 124.
- 12 吕燕妮,李平兰,周伟. 戊糖乳杆菌 31-1 菌株产细菌素发酵条件优化 [J]. 微生物学通报, 2005, 32(3): 13 - 19.
LÜ Yanni, LI Pinglan, ZHOU Wei. Optimization of bacteriocin produced by *Lactobacillus pentosus* 31-1 [J]. Microbiology China, 2005, 32(3): 13 - 19. (in Chinese)
- 13 TODOROV S D, DICKS L M. Effect of medium components on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* strains ST23LD and ST341LD, isolated from spoiled olive brine [J]. Microbiological Research, 2006, 161(2): 102.
- 14 HALAMI P M, CHANDRASHEKAR A. Enhanced production of pediocin C20 by a native strain of *Pediococcus acidilactici* C20 in an optimized food-grade medium [J]. Process Biochemistry, 2005, 40(5): 1835 - 1840.
- 15 RATNAM B V V, NARASIMHA R M, DAMODAR R M, et al. Optimization of fermentation conditions for the production of ethanol from sago starch using response surface methodology [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2003, 19(5): 523 - 526.
- 16 朱凤,陈长华,张琪. 吐温-85 对螺旋霉素发酵过程的影响 [J]. 中国医药工业杂志, 2008, 39(3): 176 - 178.
- 17 GARVER K I, MURIANA P M. Detection, identification and characterization of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from retail food products [J]. International Journal of Food Microbiology, 1993, 19(4): 241 - 258.
- 18 庄绪亮,张洪勋,马桂荣,等. 不同发酵条件下 Tween80 对乳酸链球菌 SM526 产 Nisin 的影响 [J]. 过程工程学报, 2000, 21(2): 145 - 148.
- 19 沈慧,秦海宏,王福佛,等. 低锌浓度培养基对 Caco2 细胞二价金属离子转运体 mRNA 表达的影响 [J]. 中华预防医学杂志, 2006, 40(1): 55 - 57.
- 20 谢英,覃倩倩,张京声,等. 植物乳杆菌 LB-B1 产细菌素发酵条件的优化 [J]. 中国酿造, 2010, 29(10): 22 - 25.