

响应面法优化植物乳杆菌LPL-1产细菌素 发酵条件及细菌素理化性质分析

王 瑶, 李 琪, 李平兰*

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

教育部-北京市功能乳品重点实验室, 北京 100083)

摘 要: 为提高新型植物乳杆菌LPL-1所产细菌素(植物乳杆菌素LPL-1)的产量, 以单核细胞性李斯特菌为指示菌, 相对抑菌效价为响应值, 通过响应面法对发酵条件进行优化, 确定了最优发酵条件。利用单因素试验与Plackett-Burman试验, 确定主要影响因素为温度、发酵时间与初始pH值, 通过最陡爬坡试验与Box-Behnken响应面试验, 确定最优发酵条件为发酵温度31 ℃、培养基初始pH 6.40、发酵时间32 h、接种量0.5%、装液量60%, 在此条件下细菌素效价(674.29 AU/mL)比优化前(292.02 AU/mL)提高了1.31倍。通过对细菌素理化性质的分析, 证明了细菌素具有热稳定性(100 ℃, 30 min)、酸碱稳定性(pH 2~10)、蛋白酶敏感性与抑菌性, 同时利用二硫键变性剂对细菌素结构中的二硫键进行变性处理, 证明二硫键对其抑菌特性的重要性。因此, 通过细菌素发酵条件的优化与理化性质的分析, 为菌种与细菌素的产业化生产与应用提供了理论支持。

关键词: 植物乳杆菌LPL-1; 植物乳杆菌素LPL-1; 发酵条件; 响应面法; 理化性质

Optimization of Fermentation Conditions for Plantaricin Production by *Lactobacillus plantarum* LPL-1 by Response Surface Methodology and Its Physicochemical Properties

WANG Yao, LI Qi, LI Pinglan*

(Beijing Advanced Innovation Center for Food Nutrition and Human Health, Key Laboratory of Functional Dairy, Co-constructed by Ministry of Education and Beijing Municipality, College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: The present study aimed at improving plantaricin production by *Lactobacillus plantarum* LPL-1. Fermentation conditions were optimized by response surface methodology (RSM). The inhibitory activity (AU/mL) against *Listeria monocytogenes* 54002 was used as response variable. Using one-factor-at-a-time method and Plackett-Burman design, temperature, fermentation time and initial medium pH were identified as main factors that influence plantaricin production. The optimal fermentation conditions were determined as 31 ℃, 6.40, 32 h, 0.5% and 60% for temperature, initial medium pH, time, inoculum size and medium volume in flasks, respectively using path of steepest ascent and RSM with Box-Behnken design. The antibacterial activity of plantaricin produced under the optimized conditions was 674.29 AU/mL, which increased by 2.31 times compared with that before optimization. It was also found that the crude plantaricin extracted from the fermentation broth had obvious inhibitory effect on Gram-positive bacteria, and it was stable to heat (100 ℃, 30 min), acid-base conditions (pH 2~10) and sensitive to protease. Meanwhile, the disulfide bonds of bacteriocin were broken by disulfide bond denaturants, which proved the importance of disulfide bonds for bacteriocins. Conclusively, the present study provides insights into the potential use of bacteriocin as a food preservative in the food industry.

Keywords: *Lactobacillus plantarum* LPL-1; plantaricin LPL-1; fermentation conditions; response surface methodology; physicochemical properties

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201822016

中图分类号: TS201.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2018)22-0101-09

收稿日期: 2018-05-31

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31671831); “十三五”国家重点研发计划重点专项(2018YFD0401200)

第一作者简介: 王瑶(1989—), 男, 博士研究生, 研究方向为食品微生物。E-mail: wangyao897@126.com

*通信作者简介: 李平兰(1964—), 女, 教授, 博士, 研究方向为食品微生物。E-mail: lipinglan@cau.edu.cn

引文格式:

王瑶, 李琪, 李平兰. 响应面法优化植物乳杆菌LPL-1产细菌素发酵条件及细菌素理化性质分析[J]. 食品科学, 2018, 39(22): 101-109. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201822016. <http://www.spkx.net.cn>

WANG Yao, LI Qi, LI Pinglan. Optimization of fermentation conditions for plantaricin production by *Lactobacillus plantarum* LPL-1 by response surface methodology and its physicochemical properties[J]. Food Science, 2018, 39(22): 101-109. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201822016. <http://www.spkx.net.cn>

乳酸细菌素是菌体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或多肽, 具有无毒副作用、无抗药性及易被人体降解的特点, 是一种天然的食品防腐保鲜剂^[1-2]。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产生的植物乳杆菌素LPL-1^[3]、动物双歧杆菌B04产生的双歧杆菌素A^[4]与类植物乳杆菌L-ZS9产生的类植物乳杆菌素L-ZB1^[5]等, 但细菌素的产量严重制约了其工业化生产及应用^[6]。

植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 是食品发酵工业中常见的益生菌, 并且是GRAS (generally regarded as safe) 微生物成员^[7], 已经被广泛应用于奶制品、肉制品及果蔬发酵食品中^[8-9]。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, 在微生物菌群中, 细菌素可以作为抗菌肽, 抑制有害菌群的增殖^[10], 植物乳杆菌素Y^[11]、植物乳杆菌素163^[12]与植物乳杆菌素JLA-9^[13]等可以明显抑制食源性腐败菌单核细胞性李斯特菌、沙门菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌与志贺菌等, 因此可以应用于食品的防腐保鲜; 可以作为定植肽, 促进有益菌群的定植^[14], 肠道菌素SN11^[15]不仅可以作为饲料添加剂, 而且可以调节动物的肠道菌群, 促进有益菌定植, 因此可以应用于饲料加工领域; 同时又能作为信号肽, 增强免疫细胞的免疫性, 抑制肿瘤细胞的增殖^[16], 大肠杆菌素可以抑制肿瘤细胞DNA酶的活性, 对癌症具有一定的抑制作用^[17], 因此可以用于医疗健康领域。与抗生素不同, 细菌素不仅对食源性致病菌具有抗菌性, 而且对人体内蛋白酶具有敏感性, 因此, 天然的细菌素不仅具有取代抗生素的潜力^[18], 而且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, 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^[19], 而且与培养基的组成及培养条件有关。本研究以植物乳杆菌LPL-1为研究对象, 采用MRS培养基为基础培养基, 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的发酵条件, 获得该菌种产生细菌素的最佳发酵条件, 并探究其生化特性, 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 材料与试剂

植物乳杆菌LPL-1分离自发酵鱼, 指示菌单核细胞性李斯特菌 (*Listeria monocytogenes* ATCC 54002) 由实验室保存。MRS培养基各组成成分购自西陇科学股份有限公司。

1.2 仪器与设备

DNP-9162恒温培养箱 上海精宏试验设备有限公司;
YXQ-LS-S高压蒸汽灭菌锅 上海博迅实业有限公司;
TG-22高速离心机 湖南平凡科技有限公司; SCL-1300垂直洁净工作台 北京赛伯乐实验仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 细菌素的提取

按照1%的接种量将植物乳杆菌LPL-1接种至100 mL MRS培养基, 37 °C静置培养24 h, 8 000 r/min离心15 min收集上清液, 按照1:3比例加入-20 °C预冷的丙酮, -20 °C放置1 h取出, 8 000 r/min离心15 min收集沉淀, 后用-20 °C预冷的丙酮等体积洗涤脱水, 8 000 r/min离心15 min收集沉淀, 沉淀室温干燥用于计算酶活力。

1.3.2 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抑菌活性^[20]。将提取的细菌素进行二倍稀释, 取样100 μ L进行抑菌实验, 观察不到抑菌圈出现的最高稀释度定义为一个活力单位 (1 AU), 其倒数即是原液的细菌素相对抑菌效价值 (AU/mL)。

效价值标准曲线的制作: 将已知效价值的细菌素稀释为80%、60%、40%与20%, 分别取100 μ L进行抑菌实验, 以对应抑菌圈直径为横坐标, 效价值对数为纵坐标, 绘制标准曲线, 标准曲线的回归方程为 $y=0.105x+0.919$ ($R^2=0.996$)。

1.3.3 单因素试验

选择发酵温度、发酵初始pH值、装液量、接种量与发酵时间作为影响抑菌活性的主要因素, 通过单因素试验选择Plackett-Burman试验的影响因素与水平。

1.3.3.1 发酵温度的影响

分别以1%接种量接种植物乳杆菌LPL-1, 发酵初始pH 6.0, 培养温度分别设为25、30、37、40、45 °C, 培养时间24 h。发酵结束后检测抑菌活性。

1.3.3.2 发酵初始pH值的影响

分别设置pH 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0与7.5,以1%接种量接种植物乳杆菌LPL-1,培养温度30℃,发酵24 h结束后,检测抑菌活性。

1.3.3.3 装液量的影响

分别设置20%、40%、60%、80%与100%的装液量,以1%接种量接种植物乳杆菌LPL-1,发酵初始pH 6.0,培养温度30℃,发酵24 h结束后,检测抑菌活性。

1.3.3.4 接种量的影响

分别设置0.5%、1%、1.5%、2%、3%与5%的接种量接种植物乳杆菌LPL-1,发酵初始pH 6.0,培养温度30℃,发酵24 h结束后,检测抑菌活性。

1.3.3.5 发酵时间的影响

以1%接种量接种植物乳杆菌LPL-1、发酵初始pH 6.0、培养温度30℃,每隔4 h取样并测定发酵液的抑菌活性和OD_{600 nm}。

1.3.4 Plackett-Burman试验

根据单因素试验的结果,从各试验因素的最大响应区间中选择高低两个水平,利用Design-Expert 10.0软件设计Plackett-Burman试验,试验次数选择N为12。考察发酵温度、初始pH值、接种量、装液量和发酵时间5个因素对植物乳杆菌LPL-1产细菌素的影响,具体设计及响应区间如表1所示。通过各试验的结果以及Design-Expert 10.0软件对各因素的方差、效应值和贡献率3个指标进行分析,为下一步的研究从选取的因素中筛选出最重要的3个显著因素。

表1 Plackett-Burman试验设计
Table 1 Code and level of independent variables used for Plackett-Burman design

因素	水平	
	-1	1
A发酵温度/℃	25	35
B初始pH	6	7
C接种量/%	0.5	1
D发酵时间/h	28	36
E装液量/%	60	90

1.3.5 最陡爬坡试验

表2 最陡爬坡试验设计
Table 2 Steepest ascent design

试验号	A发酵温度/℃	B初始pH	C发酵时间/h
1	25	7.0	28
2	28	6.7	30
3	30	6.5	32
4	34	6.3	34
5	37	6.0	36

根据Plackett-Burman试验所得到的显著因素及效应值来设计最陡爬坡试验的变化方向和变化步长。在所选

择的显著因素中,若效应值为正,则变化方向表现为增加;若效应值为负,则变化方向表现为减少,最陡爬坡试验具体设计方案如表2所示。

1.3.6 Box-Behnken响应面试验

以最陡爬坡试验中的拐点作为中心点,以Plackett-Burman试验中的显著影响因素为试验因素,以细菌素相对抑菌效价为响应值,通过Design-Expert 10.0软件设计3因素3水平Box-Behnken响应面试验。具体方案如表3所示。对效价值进行二次多元回归方程拟合,得到各因素与响应值之间函数关系的回归方程,根据试验生成的等高线和响应面图确定最优的发酵条件。

表3 Box-Behnken试验设计
Table 3 Code and level of independent variables used for Box-Behnken design

因素	水平		
	-1	0	1
A发酵温度/℃	25	30	35
B初始pH	6	6.5	7
C发酵时间/h	28	32	36

1.3.7 模型的验证

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

1.3.8 植物乳杆菌素LPL-1生化特性分析

1.3.8.1 热稳定性

分别于25、60、80℃与100℃加入粗提的细菌素样品,处理15 min和30 min,取出,恢复室温(25℃)后进行抑菌实验,测定抑菌活性,并以25℃保存的细菌素样品为对照,计算各处理组细菌素的相对抑菌效价保留率,研究温度对细菌素抑菌活性的影响。

1.3.8.2 酸碱稳定性

用3 mol/L的盐酸或氢氧化钠溶液调节磷酸缓冲液pH值为2、3、4、5、6、7、8、9、10,再溶解粗提得到的细菌素沉淀,得到相应pH值处理的细菌素溶液,进行抑菌实验,测定抑菌活性,研究细菌素样品在不同pH值处理后抑菌活性的变化。

1.3.8.3 蛋白酶敏感性

将粗提的细菌素调节到各酶的最适pH值,分别加入胃蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、蛋白酶K,添加量为1.0 g/L,反应时间3 h,将pH值调回到7做抑菌实验,测定抑菌圈直径大小,研究样品对酶的敏感性。

1.3.8.4 细菌素二硫键特性

将粗提的细菌素样品调节pH值至6.5,利用0.01 mol/L二硫苏糖醇对二硫键进行变性。37℃放置2 h后,进行抑菌实验,测定抑菌圈直径大小,研究二硫键的重要性。

1.3.8.5 抑菌谱分析

将各种待测菌双层平板法培养,进行牛津杯双层琼

脂平板扩散抑菌实验,测量抑菌活性,研究该细菌素对不同种类细菌的抑制作用。

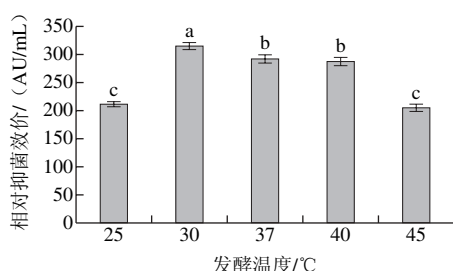
1.4 数据处理与分析

每个实验重复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 单因素试验结果

2.1.1 发酵温度的影响



字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

图1 发酵温度对植物乳杆菌LPL-1产细菌素的影响

Fig. 1 Effect of fermentation temperature on bacteriocin production from *L. plantarum* LPL-1

如图1所示,菌株在30℃恒温发酵时,细菌素的产量最高,相对抑菌效价为315.02 AU/mL,与其他温度处理组具有显著差异,所以选择30℃为最佳发酵温度,进行Plackett-Burman试验。

据报道,菌体产细菌素的最适温度差异较大,例如,屎肠球菌RZS C5产细菌素的最适温度为35℃^[21],戊糖乳杆菌31-1产细菌素的最适温度为30℃^[22],扩展短杆菌ATCC 9175产细菌素的最适温度为28℃^[23],本研究植物乳杆菌LPL-1的最适产生温度为30℃。

2.1.2 初始pH值的影响

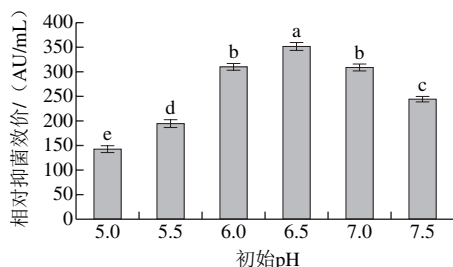


图2 初始pH值对植物乳杆菌LPL-1产细菌素的影响

Fig. 2 Effect of initial medium pH value on bacteriocin production from *L. plantarum* LPL-1

如图2所示,菌株在初始pH值为6.5时,细菌素的产量最高,相对抑菌效价达到了351.80 AU/mL,与其他pH

值条件具有显著差异,并且对比于培养温度优化的结果有显著提高,所以确定培养基初始pH 6.5为最佳,进行Plackett-Burman试验。pH值不仅影响了菌体的生长,而且在发酵后期对细菌素与菌体的黏附性具有影响^[24]。

2.1.3 装液量的影响

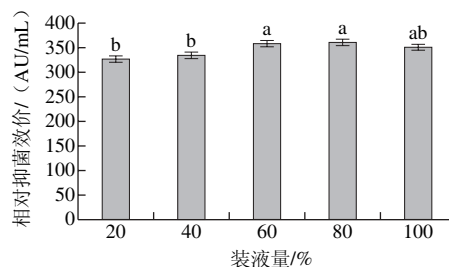


图3 装液量对植物乳杆菌LPL-1产细菌素的影响

Fig. 3 Effect of medium volume in flasks on bacteriocin production from *L. plantarum* LPL-1

装液量主要影响发酵过程的溶氧,植物乳杆菌LPL-1为兼性厌氧菌,溶氧对细菌素发酵的影响对细菌素的规模化生产具有参考价值。如图3所示,当装液量为80%时,细菌素效价值最高,为361.27 AU/mL,与60%、100%组无显著差异,基于Plackett-Burman试验对影响因素的重复性验证,选择装液量为考察因素进行重复性验证,并且选择80%装液量为Plackett-Burman试验的中心点。

2.1.4 接种量的影响

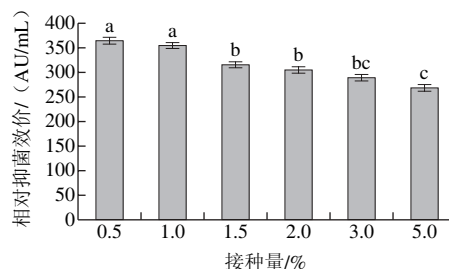


图4 接种量对植物乳杆菌LPL-1产细菌素的影响

Fig. 4 Effect of inoculum amount on bacteriocin production from *L. plantarum* LPL-1

如图4所示,随着接种量的增加,细菌素的抑菌活性呈下降趋势,当按0.5%接种量接种发酵时,细菌素的抑菌效价最大,为364.67 AU/mL,但与初始接种量1%无显著差异。基于Plackett-Burman试验对影响因素的重复性验证,选择接种量为考察因素进行重复性验证,并且选择0.5%接种量最低水平,1%为最高水平,进行Plackett-Burman试验的重复性验证。

2.1.5 发酵时间的影响

如图5所示,在稳定期之前,细菌素产量随着发酵时间的延长而增大,在32 h时达到最大值,细菌素相对抑菌效价为220.33 AU/mL,进入稳定期后,细菌素产量先维

持稳定,而后开始下降,表现出与植物乳杆菌LPL-1菌株的生长曲线的一致性。选择32 h作为最佳发酵时间。发酵时间的延长不仅会降低发酵液的pH值,促进菌体对细菌素的黏附,降低其效价^[24],而且对产业化的生产成本具有重要影响。

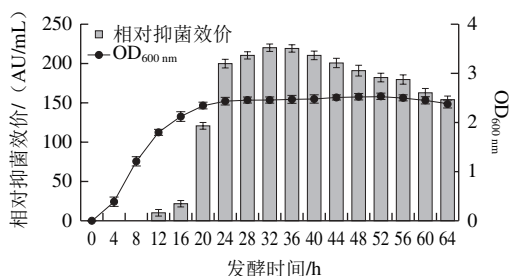


图5 植物乳杆菌LPL-1的生长与抑菌活性曲线

Fig. 5 Growth curve and bacteriocin production of *L. plantarum* LPL-1

2.2 Plackett-Burman试验结果

在单因素基础上, Plackett-Burman试验主要考察单因素的贡献率与效应值,从而确定主要影响因素。试验考察发酵温度、初始pH值、接种量、发酵时间、装液量5个因素对植物乳杆菌LPL-1产细菌素的贡献率。根据各单因素试验结果选择的高低两个水平,将响应区间取值转化为编码值“−1”和“1”,其中“−1”代表低水平值,“1”代表高水平值,试验设计与结果如表4所示。

表4 Plackett-Burman试验设计与结果
Table 4 Plackett-Burman design with experimental results

试验号	A发酵温度	B初始pH值	C接种量	D发酵时间	E装液量	相对抑菌效价/(AU/mL)
1	1	−1	−1	−1	1	359.71±5.67
2	−1	1	−1	1	1	215.45±5.01
3	−1	−1	1	1	−1	284.51±5.65
4	−1	−1	1	−1	1	242.55±5.08
5	1	−1	1	1	−1	412.86±5.76
6	−1	−1	−1	−1	−1	317.98±5.07
7	−1	1	1	1	−1	255.80±5.19
8	1	1	−1	−1	−1	246.09±4.78
9	−1	1	1	−1	1	173.74±4.56
10	1	1	1	−1	−1	237.90±4.67
11	1	−1	1	1	1	417.88±5.53
12	1	1	−1	1	1	324.19±5.66

用Design-Expert 10.0软件对Plackett-Burman试验结果进行效应分析和方差分析,结果如表5所示。

由表5可见,发酵温度、发酵时间2个因素的效应值为正,应该增加;而初始pH值、接种量、装液量3个因素的效应值为负,应该减小。其中,效应值大小表示各因素对该试验结果影响的大小,与因素对该试验贡献率的结果保持相关性,由贡献率的大小可得到这5个因素对模型影响的大小依次为:初始pH值>发酵温度>

发酵时间>装液量>接种量。试验整体因素模型P值为0.005 3, $P<0.05$,说明整体模型对试验结果有显著影响, Plackett-Burman试验的结果具有可信度。因此,最终选择发酵温度、初始pH值和发酵时间3个因素进行下一步的最陡爬坡试验,其余2个因素则根据每一因素的效应值进行取值,即选择接种量0.5%、装液量60%。

表5 Plackett-Burman试验效应分析
Table 5 Effect analysis of independent variables in Plackett-Burman design

因素	水平		效应	贡献率/%	P值
	−1	1			
A发酵温度/℃	28	32	84.7667	32.95	0.004
B初始pH值	6	7	−97.053 3	43.194 3	0.002 1
C接种量	0.5	1	−1.2	0.006 603	0.951 1
D发酵时间	28	36	55.453 3	14.101 3	0.025 4
E装液量	60	80	−3.603 33	0.059 541	0.854 1

2.3 最陡爬坡试验结果

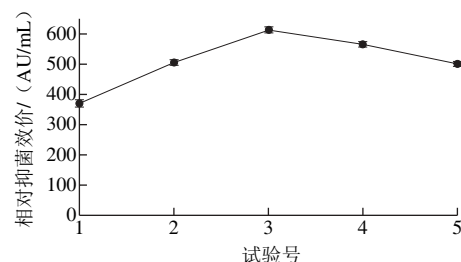


图6 最陡爬坡试验结果

Fig. 6 Results of steepest ascent design

如图6所示,最陡爬坡试验结果呈现先增高后降低的趋势,在3号试验点处出现最高点,该点处发酵温度30℃、初始pH 6.5、发酵时间32 h,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612.37 AU/mL。该点即为下一步培养条件Box-Behnken试验设计的中心点。

2.4 Box-Behnken响应面试验结果

利用Design-Expert 10.0软件对发酵温度、初始pH值、发酵时间设计3因素3水平的Box-Behnken试验,结果见表6,方差分析结果如表7所示,所选择的回归模型的P值小于0.000 1,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0.727 9,大于0.05,失拟项检验不显著,模型选择适当;该模型的决定系数为0.999 4,校正决定系数0.998 7,表明模型可信度很高。细菌素相对抑菌效价(Y)对发酵温度(A)、初始pH值(B)和发酵时间(C)的多元二次回归方程为:

$$Y=685.33+38.37A-5.11B+10.84C-21.54AB-21.34AC+0.048BC-220.27A^2-211.89B^2-185.64C^2$$

表 6 Box-Behnken试验设计与结果
Table 6 Box-Behnken experiment with experimental results

试验号	A发酵温度/℃	B初始pH	C发酵时间/h	相对抑菌效价/(AU/mL)
1	35	7	32	260.71±4.56
2	30	6.5	32	685.79±5.04
3	30	6	28	278.72±4.26
4	35	6	32	320.28±6.54
5	30	6.5	32	689.14±7.18
6	30	6	36	300.84±4.75
7	35	6.5	36	305.06±6.54
8	25	6.5	36	274.93±5.32
9	30	6.5	32	684.92±6.23
10	30	7	36	296.97±4.62
11	30	7	28	274.66±5.01
12	30	6.5	32	672.51±5.89
13	25	6.5	28	205.04±4.96
14	25	6	32	202.55±3.18
15	30	6.5	32	694.22±6.78
16	25	7	32	229.13±4.45
17	35	6.5	28	332.59±3.92

表 7 回归模型方差分析结果
Table 7 Analysis of variance for the regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	6.19×10^5	9	6.87×10^4	1396.78	<0.000 1
A发酵温度	11 777.21	1	11 777.21	239.39	<0.000 1
B初始pH值	209.29	1	209.29	4.25	0.078 1
C发酵时间	940.61	1	940.61	19.12	0.003 3
AB	1 855.46	1	1 855.46	37.71	0.000 5
AC	2 370.38	1	2 370.38	48.2	0.000 2
BC	9.31×10^{-3}	1	9.31×10^{-3}	1.89×10^{-4}	0.989 4
A ²	2.04×10^5	1	2.04×10^5	4 152.35	<0.000 1
B ²	1.89×10^5	1	1.89×10^5	3 842.35	<0.000 1
C ²	1.45×10^5	1	1.45×10^5	2 949.51	<0.000 1
残差	344.38	7	49.2		
失拟项	87.68	3	29.23	0.46	0.727 9
纯误差	256.7	4	64.18		
矫正总和	6.19×10^5	16			

2.5 响应面试验结果

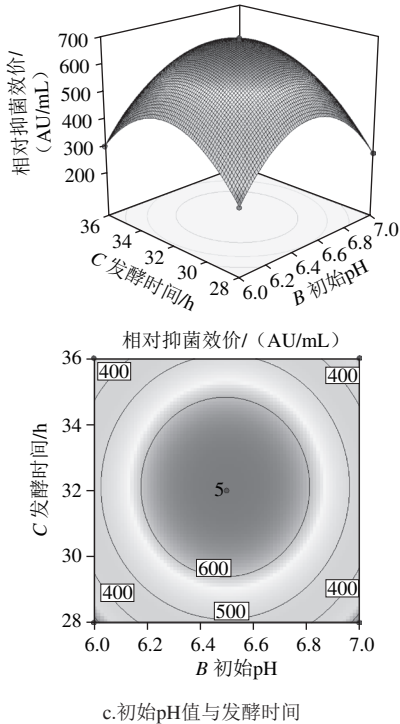
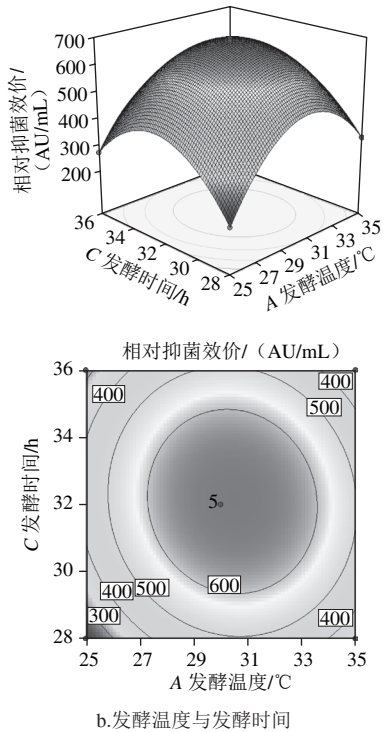
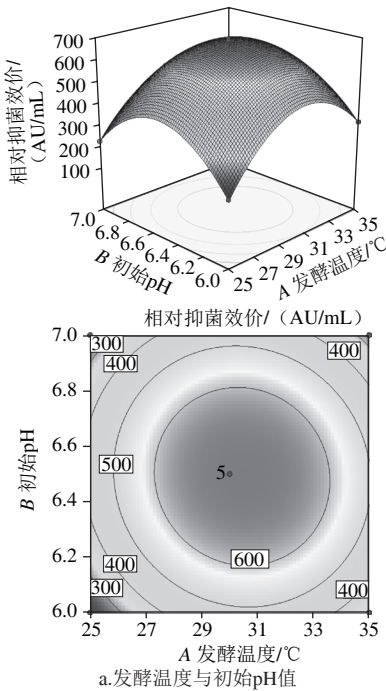


图 7 各因素交互作用的响应面与等高线图
Fig. 7 Response surface and contour plots showing the interactive effects of various factors on bacteriocin production

如图7所示，通过方程可知，二次项系数为负值，其所代表的抛物面开口向下，表明方程具有最大值。利用Design-Expert 10.0分析计算，最适培养条件为发酵温度30.43 °C、初始pH 6.49、发酵时间32.1 h，最大效价为687.16 AU/mL。

2.6 回归模型的验证结果

在上述优化的条件下, 根据实际条件, 设置发酵温度31℃、初始pH 6.40、发酵时间32 h进行3次发酵抑菌实验, 以对优化结果进行进一步的验证。验证实验中细菌素相对抑菌效价的平均值为674.29 AU/mL, 与预测值拟合度达98.13%, 表明优化模型可靠。

2.7 植物乳杆菌素LPL-1生化特性分析

在食品工业中, 热稳定性与酸碱稳定性是影响细菌素活性的重要因素, 蛋白酶敏感性与其安全性有关, 同时植物乳杆菌素LPL-1二硫键结构对其活性影响未知, 因此探究其热稳定性、酸碱稳定性、蛋白酶敏感性与二硫键结构对其活性的影响具有重要意义。

2.7.1 热稳定性

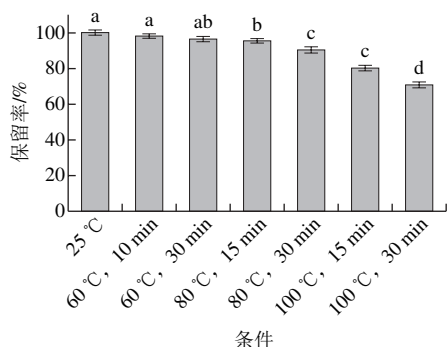


图8 温度对细菌素活性的影响

Fig. 8 Effects of temperature on stability of plantaricin LPL-1

由图8可知, 随着处理温度的升高和处理时间的延长, 细菌素相对抑菌效价保留率逐渐降低, 但仍保持相对抑菌效价。在60℃时, 保留率与对照组无显著差异, 表明该细菌素在60℃时具有良好的稳定性; 在80℃时, 保留率与对照组有显著性差异, 但效价保留率仍在90%以上, 表明细菌素在80℃时活性发生了一定的改变, 但仍呈现出较好的热稳定性; 在100℃时, 细菌素相对抑菌效价保留率发生显著下降, 处理30 min后为70.79%, 细菌素仍具有一定的稳定性。结果验证了植物乳杆菌素LPL-1细菌素的良好耐高温特性, 与植物乳杆菌素JLA-9^[13]、植物乳杆菌素J23^[25]类似, 都具有耐高温特性, 因此有利于其在食品加工中的应用。

2.7.2 酸碱稳定性

由图9可知, 该细菌素在pH 2~10范围内均有活性, 并且随着pH值的上升, 细菌素活性呈下降趋势。细菌素在pH 2~7保持良好的稳定性; 在pH 8~10范围内, 保留率显著下降。结果表明该细菌素适宜的作用条件为pH 2~8, 与细菌素LXA^[26]、植物乳杆菌素K25^[27]相似, 同样适合作为酸性、中性和弱碱性食品中的防腐剂。

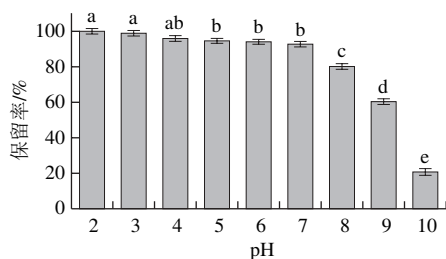


图9 pH值对细菌素活性的影响

Fig. 9 Effects of pH value on stability of plantaricin LPL-1

2.7.3 蛋白酶敏感性

表8 蛋白酶对细菌素活性的影响

Table 8 Effects of proteases on stability of plantaricin LPL-1

蛋白酶种类	温度/℃	pH	效价/(AU/mL)	效价保留率/%
胃蛋白酶	37	2.5	0	0
木瓜蛋白酶	37	6.5	0	0
蛋白酶K	37	7.5	0	0
胰蛋白酶	25	7.6	0	0
胰凝乳蛋白酶	25	7.8	0	0
对照组	37	6	640.97 ± 7.68	100

如表8所示, 细菌素经胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、蛋白酶K、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶处理后, 抑菌活性完全丧失, 验证了能被人体中的各种蛋白酶消化, 在一定程度上证明了细菌素具有安全性。

2.7.4 二硫键特性

表9 二硫键变性剂对细菌素活性的影响

Table 9 Effects of disulfide bond denaturants on stability of plantaricin LPL-1

变性剂种类	温度/℃	pH	效价/(AU/mL)	效价保留率/%
二硫苏糖醇	37	6.5	0	0
对照组	37	6.5	640.70 ± 8.55	100

二硫键是二级结构的重要组成, 与蛋白活性有一定关联^[28], 巯基还原剂主要对细菌素的二硫键进行破坏^[29], 如表9所示, 在二硫键经巯基还原剂还原断裂后, 细菌素失去其抑菌活性, 说明二硫键结构对细菌素的抑菌活性至关重要, 具体的断点位置还需深入分析。

2.7.5 抑菌谱分析

如表10所示, 细菌素对植物乳杆菌、唾液乳杆菌和乳酸链球菌具有明显的抑制作用, 以上菌种属于啤酒酿造中常见的污染菌^[30], 表明该细菌素对革兰氏阳性菌具有抑菌能力。其中对食品中常见的腐败菌(单核细胞性李斯特菌)^[31]与致病菌(金黄色葡萄球菌)^[32]具有显著的抑菌效果, 表明了其作为食品防腐剂抑制食源性致病菌的应用潜力。

表 10 抑菌谱分析
Table 10 Antimicrobial spectrum of plantaricin LPL-1

指示菌株	来源	培养基	效价/(AU/mL)
单核细胞性李斯特菌54002	NICBPB	TSYEB	655.25±9.45
单核细胞性李斯特菌19113 (3a)	ATCC	TSYEB	614.51±8.95
单核细胞性李斯特菌19114 (4a)	ATCC	TSYEB	637.53±8.68
金黄色葡萄球菌13565	ATCC	TSB	402.55±7.31
金黄色葡萄球菌6538	CGNCC	TSB	399.84±6.34
金黄色葡萄球菌26112	CVCC	TSB	362.85±7.55
粪肠球菌M2	实验室	MRS	566.94±7.15
植物乳杆菌S-35	实验室	MRS	622.27±8.65
植物乳杆菌γ-35	实验室	MRS	619.14±8.74
唾液乳杆菌	实验室	MRS	598.83±8.36
乳酸链球菌NZ9000	实验室	MRS	615.28±8.65
乳酸链球菌MG1363	实验室	MRS	632.35±8.21
解淀粉芽孢杆菌	实验室	LB	614.51±9.12
短小芽孢杆菌	实验室	LB	637.53±9.32

3 结论

通过单因素试验与Plackett-Burman试验, 确定影响因素对细菌素相对抑菌活性的影响大小为: 发酵初始pH值>发酵温度>发酵时间>装液量>接种量; 通过最陡爬坡试验与Box-Behnken响应面试验, 建立细菌素相对抑菌活性与发酵温度、发酵时间与发酵初始pH值的二次多元回归方程, 确定最优条件为发酵温度31℃、初始pH 6.40、发酵时间32 h、接种量0.5%、装液量60%, 细菌素相对抑菌效价(674.29 AU/mL)比优化前(292.02 AU/mL)提高1.31倍, 经验证实验证明该数据模型合理可靠。通过对植物乳杆菌素LPL-1理化性质的分析, 证明了其具有热稳定性(100℃, 30 min)、酸碱稳定性(pH 2~10)、蛋白酶敏感性与抑菌性, 二硫键对其抑菌活性具有重要影响, 因此植物乳杆菌素LPL-1在食品防腐保鲜领域具有安全应用的潜力。

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. DOI:10.1016/S0168-1605(01)00560-8.
- [2] YANG S C, LIN C H, SUNG C T, et al. Corrigendum: antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals[J]. Frontiers in Microbiology, 2014, 5(22): 683. DOI:10.3389/fmicb.2014.00683.
- [3] 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. DOI:10.1016/j.jbiotec.2017.12.006.
- [4] 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. DOI:10.1016/j.foodcont.2014.10.049.
- [5] 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℃[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 174(6): 2295-2306. DOI:10.1007/s12010-014-1160-3.
- [6] 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. DOI:10.1016/j.idairyj.2005.10.026.
- [7] KANELLOS T S, BURRIEL A R. The *in vitro* bactericidal effects of the food decontaminants lactic acid and trisodium phosphate[J]. Food Microbiology, 2005, 22(6): 591-594. DOI:10.1016/j.fm.2004.11.013.
- [8] DALIÉ D K D, DESCHAMPS A M, RICHARD-FORGET F. Lactic acid bacteria-potential for control of mould growth and mycotoxins: a review[J]. Food Control, 2010, 21(4): 370-380. DOI:10.1016/j.foodcont.2009.07.011.
- [9] KANMANI P, SATISH K R, YUVARAJ N, et al. Probiotics and its functionally valuable products: a review[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2013, 53(6): 641-658. DOI:10.1080/10408398.2011.553752.
- [10] CORR S C, LI Y, RIEDEL C U, et al. Bacteriocin production as a mechanism for the anti-infective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007, 104(18): 7617-7621. DOI:10.1073/pnas.0700440104.
- [11] CHEN Y S, WANG Y C, CHOW Y S, et al. Purification and characterization of plantaricin Y, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* 510[J]. Archives of Microbiology, 2014, 196(3): 193-199. DOI:10.1007/s00203-014-0958-2.
- [12] HU M, ZHAO H, ZHANG C, et al. Purification and characterization of plantaricin 163, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* 163 isolated from traditional Chinese fermented vegetables[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(47): 11676-11682. DOI:10.1021/jf403370y.
- [13] ZHAO S, HAN J, BIE X, et al. Purification and characterization of plantaricin JLA-9: a novel bacteriocin against *Bacillus* spp. produced by *Lactobacillus plantarum* JLA-9 from Suan-Tsai, a traditional Chinese fermented cabbage[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(13): 2754-2764. DOI:10.1021/acs.jafc.5b05717.
- [14] GILLOR O, GILADI I, RILEY M A. Persistence of colicinogenic *Escherichia coli* in the mouse gastrointestinal tract[J]. BMC Microbiology, 2009, 9(1): 165. DOI:10.1186/1471-2180-9-165.
- [15] SATHIYAVIMAL S, VASANTHARAJ S, JAGANNATHAN S, et al. Partial purification and characterization of enterocin SN11 produced by *Enterococcus hirae* from animal feed samples[J]. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 2016, 8(7): 585-593.
- [16] HEMERT S V, MEIJERINK M, MOLENAAR D, et al. Identification of *Lactobacillus plantarum* genes modulating the cytokine response of human peripheral blood mononuclear cells[J]. BMC Microbiology, 2010, 10(1): 1-13. DOI:10.1186/1471-2180-10-293.
- [17] LANCASTER L E, WINTERMEYER W, RODNINA M V. Colicins and their potential in cancer treatment[J]. Blood Cells Molecules & Diseases, 2007, 38(1): 15-18. DOI:10.1016/j.bcmd.2006.10.006.
- [18] COTTER P D, ROSS R P, HILL C. Bacteriocins: a viable alternative to antibiotics[J]. Nature Reviews Microbiology, 2013, 11(2): 95-105. DOI:10.1038/nrmicro2937.
- [19] 张香美, 李平兰. 产II类细菌素乳酸菌群体感应及其应用[J]. 微生物学报, 2011, 51(9): 1152-1157.

- [20] OLIVEIRA M N, SODINI I, REMEUF R, et al. Manufacture of fermented lactic beverages containing probiotic cultures[J]. Journal of Food Science, 2010, 67(6): 2336-2341. DOI:10.1111/j.1365-2621.2002.tb09550.x.
- [21] LEROY F, VANKRUNKELSVEN S, DE G J, et al. The stimulating effect of a harsh environment on the bacteriocin activity by *Enterococcus faecium* RZS C5 and dependency on the environmental stress factor used[J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 83(1): 27. DOI:10.1016/S0168-1605(02)00316-1.
- [22] 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. DOI:10.3969/j.issn.0253-2654.2005.03.003.
- [23] MOTTA A S, BRANDELLI A. Influence of growth conditions on bacteriocin production by *Brevibacterium linens*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003, 62(2/3): 163-167. DOI:10.1007/s00253-003-1292-9.
- [24] TOMÁS M S J, BRU E, WIESE B, et al. Influence of pH, temperature and culture media on the growth and bacteriocin production by vaginal *Lactobacillus salivarius* CRL 1328[J]. Journal of Applied Microbiology, 2002, 93(4): 714-724. DOI:10.1046/j.1365-2672.2002.01753.x.
- [25] ROJO-BEZARES B, SÁENZ Y, NAVARRO L, et al. Coculture-inducible bacteriocin activity of *Lactobacillus plantarum* strain J23 isolated from grape must[J]. Food Microbiology, 2007, 24(5): 482-491. DOI:10.1016/j.fm.2006.09.003.
- [26] YI L, DANG J, ZHANG L, et al. Purification, characterization and bactericidal mechanism of a broad spectrum bacteriocin with antimicrobial activity against multidrug-resistant strains produced by *Lactobacillus coryniformis* XN8[J]. Food Control, 2016, 67: 53-62. DOI:10.1016/j.foodcont.2016.02.008.
- [27] WEN L S, PHILIP K, AJAM N. Purification, characterization and mode of action of plantaricin K25 produced by *Lactobacillus plantarum*[J]. Food Control, 2016, 60: 430-439. DOI:10.1016/j.foodcont.2015.08.010.
- [28] 徐国恒. 二硫键与蛋白质的结构[J]. 生物学通报, 2010, 45(5): 5-7. DOI:10.3969/j.issn.0006-3193.2010.05.002.
- [29] 邓家欣, 蔡正艳, 陶涛. 聚乙二醇单甲醚-琥珀酰基半胱氨酸的合成[J]. 中国医药工业杂志, 2009, 40(5): 331-333. DOI:10.3969/j.issn.1001-8255.2009.05.005.
- [30] VAUGHAN A, O'SULLIVAN T, VAN S D. Enhancing the microbiological stability of malt and beer: a review[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2012, 111(4): 355-371. DOI:10.1002/j.2050-0416.2005.tb00221.x.
- [31] WARD T J, GORSKI L, BORUCKI M K, et al. Intraspecific phylogeny and lineage group identification based on the *prfA* virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes*[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(15): 4994-5002. DOI:10.1128/jb.186.15.4994-5002.2004.
- [32] MATTHEWS K R, ROBERSON J, GILLESPIE B E, et al. Identification and differentiation of coagulase-negative *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction[J]. Journal of Food Protection, 1997, 60(6): 686-688. DOI:10.4315/0362-028X-60.6.686.