

# Plackett-Burman和Box-Behnken试验优化嗜热链球菌Q4F8产胞外多糖工艺

刘 刚, 梁 琪\*, 宋雪梅, 张 炎

(甘肃农业大学食品科学与工程学院, 甘肃省功能乳品工程实验室, 甘肃 兰州 730070)

**摘 要:**嗜热链球菌Q4F8是通过诱变筛选获得的产胞外多糖突变株, 为实现工业化应用, 对其发酵工艺进行优化, 以提高胞外多糖产量。本研究以GM<sub>17</sub>为基础培养基, 通过单因素筛选试验、响应面优化中的Plackett-Burman试验和Box-Behnken试验分析法对培养基和培养条件进行优化。结果表明, 影响嗜热链球菌合成胞外多糖的因素主次顺序为pH值>培养温度>乳糖质量分数。其最佳工艺参数为pH 6.90、培养温度42 ℃和乳糖质量分数1.51%, 且在该条件下胞外多糖产量达到191.47 mg/L, 较原始菌株提高了1.3 倍。通过对原始菌株Q4进行复合诱变筛选及培养条件和培养基优化, 使菌株胞外多糖产量显著提高 ( $P<0.01$ ), 为该菌株和其他链球菌的工业化发酵提供参考, 其胞外多糖具有较好抑菌能力, 为功能性乳酸菌的开发和利用提供应用潜能。

**关键词:**嗜热链球菌; 胞外多糖; Plackett-Burman; Box-Behnken; 发酵工艺

## Optimization of Extracellular Polysaccharide Production by *Streptococcus thermophilus* QF48 Using Plackett-Burman and Box-Behnken Design

LIU Gang, LIANG Qi\*, SONG Xuemei, ZHANG Yan

(Functional Dairy Product Engineering Laboratory of Gansu Province, College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

**Abstract:** *Streptococcus thermophilus* Q4F8 is a mutant strain producing extracellular polysaccharide, which was obtained through mutagenesis screening. In order to realize industrial application, its fermentation process was optimized to improve the yield of extracellular polysaccharide. In this study, GM17 was taken as the basic medium and the medium components and culture conditions were optimized through the combined use of one-factor-at-a-time method, Plackett-Burman design (PBD) and response surface methodology based on Box-Behnken design (BBD). The results showed that the influence of pH, culture temperature and lactose concentration on the synthesis of exopolysaccharides by *S. thermophilus* decreased in that order. The optimum process parameters were as follows: pH 6.90, 42 ℃, and 1.51% lactose. Under the optimized conditions, the yield of extracellular polysaccharide was 191.47 mg/L, a 2.3-fold increase compared to that of the original strain ( $P<0.01$ ). The extracellular polysaccharide of mutant Q4F8 had good antimicrobial activity. This strain holds a great potential as a functional starter culture.

**Keywords:** *Streptococcus thermophilus*; exopolysaccharide; Plackett-Burman; Box-Behnken; fermentation process

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181008-028

中图分类号: TS252.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2019) 20-0136-08

引文格式:

刘刚, 梁琪, 宋雪梅, 等. Plackett-Burman和Box-Behnken试验优化嗜热链球菌Q4F8产胞外多糖工艺[J]. 食品科学, 2019, 40(20): 136-143. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181008-028. <http://www.spkx.net.cn>

LIU Gang, LIANG Qi, SONG Xuemei, et al. Optimization of extracellular polysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* QF48 using Plackett-Burman and Box-Behnken design[J]. Food Science, 2019, 40(20): 136-143. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181008-028. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2018-10-08

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目 (31660468)

第一作者简介: 刘刚 (1981—) (ORCID: 0000-0001-7588-1947), 男, 硕士研究生, 研究方向为乳品微生物。

E-mail: 305262045@qq.com

\*通信作者简介: 梁琪 (1969—) (ORCID: 0000-0003-3814-7510), 女, 教授, 博士, 研究方向为食品品质、食品科学。

E-mail: liangqi@gsau.edu.cn

乳酸菌胞外多糖(exopolysaccharide, EPS)是乳酸菌生长和代谢过程中产生到外界环境中的复杂长链、高分子聚合物,是荚膜多糖或细胞壁外分泌的黏液多糖的总称<sup>[1]</sup>。研究表明, EPS具备功能方面的多种特性,在生理上, EPS表现出良好的抗氧化活性、增强免疫、抗氧化、抗肿瘤细胞产生等;在物化特性上, EPS是一种安全无毒的增稠剂、稳定剂和黏性发酵剂应用于乳品行业<sup>[2]</sup>;在酸奶中, EPS可以改善酸乳的质地和口感,使酸乳的持水力提高<sup>[3]</sup>。

全球每年7万 t多糖用于食品领域中作为增稠剂和稳定剂。乳酸菌EPS有广阔的工业应用价值,但由于其EPS产量低,乳酸菌菌株稳定性差,因而在工业生产中规模性应用受到限制<sup>[4]</sup>,因此,乳酸菌EPS产量的提高是目前急需解决的难题。要想解决这一难题,就必须筛选高产菌株及其发酵条件进行优化。微生物EPS不仅受到自身菌落的影响,而且受到温度、压力和光照强度等生长环境的显著影响,其培养条件、培养基成分的不同,不仅造成乳酸菌EPS产量有影响,甚至会影响其结构和功能性质。目前乳酸菌EPS研究中,优化后乳酸菌菌株EPS产率在17.8%~28.75%有不同程度的提高<sup>[5]</sup>。因此,通过优化发酵工艺可有效提高菌株EPS产量。此外,响应面分析法已广泛应用于许多生物技术过程,如培养条件和一些生物物质生产的优化<sup>[6]</sup>,它克服了传统方法的不足,在培养条件和工艺参数方面取得了良好的优化效果<sup>[7]</sup>。

本实验以甘肃藏区牦牛乳中筛选得到的嗜热链球菌Q4<sup>[8]</sup>为野生菌株,诱变后得到的突变株Q4F8为优化菌株,以EPS含量为响应值,优化培养条件及培养基组成,旨在进一步提高EPS的产量,为乳酸菌类多糖的工业化生产提供理论支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

#### 1.1.1 菌株

嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*) Q4由甘肃省功能乳品工程实验室分离纯化并于-80℃超低温冰箱冷冻保藏。

#### 1.1.2 培养基

GM<sub>17</sub>培养基:多聚蛋白胨5 g,植物蛋白胨5 g,酵母膏2.5 g,牛肉膏5 g,乳糖5 g,抗坏血酸钠0.5 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.25 g,磷酸二氢钾5 g,琼脂15 g,蒸馏水1 000 mL,调节pH 6.9±0.2,于121℃高温灭菌20 min。

脱脂乳培养基:12%的脱脂乳,于115℃灭菌15 min。

#### 1.1.3 试剂

葡萄糖、蔗糖、乳糖、半乳糖、大豆蛋白胨、胰

蛋白胨、鱼蛋白胨、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、硫酸二乙酯(diethyl sulfate, DES)、Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、98%无水乙醇、浓硫酸、氯化钠、三氯乙酸、苯酚等均作为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

723型可见分光光度计 上海光谱仪器有限公司;  
PHS-3C pH计 上海仪电科学仪器股份有限公司;  
YX280型手提式不锈钢压力蒸汽灭菌锅 上海三申医疗器械有限公司;  
SW-CJ-2FD型双人单面净化工作台 苏州净化设备有限公司;  
紫外灯 南京华强电子有限公司;  
LVDV-1数字旋转黏度计 上海方瑞仪器有限公司;  
TGL-20M台式高速冷冻离心机 长沙湘仪离心机仪器有限公司;  
85-2控温磁力搅拌器 金坛市恒丰仪器厂;  
DW-86L386立式超低温保存箱 青岛海尔特种电器有限公司;  
电热恒温培养箱、电热恒温水浴锅 上海一恒科学仪器有限公司;  
GZX-GF101-2-BS-II电热恒温鼓风干燥箱 上海跃进医疗器械有限公司;  
NRY-200恒温摇床 上海南荣实验室设备有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 菌株的活化与菌悬液制备<sup>[9]</sup>

取实验室甘油管中冻藏的嗜热链球菌菌株Q4解冻,脱脂乳中培养3次。将活化后的菌2环接种于装有GM<sub>17</sub>液体培养基30 mL的250 mL三角瓶中,37℃恒温培养24 h,形成种子液。按3%种子液转接到另一瓶GM<sub>17</sub>液体培养基中,相同条件下,培养至对数生长期的培养液,取出菌液4 000 r/min、4℃冷冻离心15 min。收集菌体并用0.85%无菌生理盐水洗涤,最后将菌体悬浮于无菌生理盐水中且调整细胞浓度为10<sup>8</sup> CFU/mL作为待处理细菌悬浮液,于4℃冰箱保藏备用。

#### 1.3.2 菌株EPS含量测定

葡萄糖标准曲线的绘制参照萨如拉等<sup>[10]</sup>的方法并稍作修改。已有研究证实,在加热条件下采用酸-乙醇沉淀的方法,多糖提取率可以提高60%<sup>[11]</sup>。多糖在浓硫酸的作用下先水解为单糖,并迅速脱水生成糖醛衍生物,然后与苯酚生成橙黄色化合物,通过比色法测定糖含量,葡萄糖标准曲线的回归方程为: $y=0.0091x-0.001$ ,  $R^2=0.9981$ 。

参照文献[12-13]的方法并稍作修改。将10 mL GM<sub>17</sub>发酵液(发酵30 h)在95℃水浴锅中加热10 min,以此达到去酶活性的目的;待冷却后置于冷冻离心机中4℃、8 000 r/min离心。15 min后收集上清液并加入5 mL 12% TCA溶液,封口膜封口,放在160 r/min摇床上反应1 h并且让其静置30 min。再次4℃、8 000 r/min冷冻离心15 min后收集上清液,将3倍体积的无水乙醇加入到上清液中,封存于4℃冰箱隔夜沉淀(24 h);取沉淀4℃、8 000 r/min冷冻离心15 min,然后沉淀用去离子水

溶解沉淀物,与去离子水中透析3 d,每4 h换水一次,冷冻干燥得粗多糖。EPS含量的测定采用硫酸-苯酚法<sup>[14]</sup>。

### 1.3.3 菌株的诱变筛选<sup>[15]</sup>

采用改装的超净工作台进行紫外和DES的复合诱变,筛选出遗传性能稳定的EPS高产诱变菌株。最佳紫外诱变条件为:诱变距离25 cm,诱变时间150 s;最佳DES诱变条件为:DES体积分数1.0%,诱变温度36 °C,诱变时间26 min。

### 1.3.4 菌株特性分析

为得到活力优良的菌株,需要将菌株的生长情况、OD值等进行测定,将诱变前和诱变后活化的菌株,按3%的比例接种于GM<sub>17</sub>培养基,37 °C恒温培养,每2 h取样,测定菌液的pH值、OD<sub>600 nm</sub>、活菌数,连续测定至24 h,以时间和生长特性作图绘制嗜热链球菌的生长曲线。

### 1.3.5 培养基单因素试验

在GM<sub>17</sub>液体培养基基础上,选择不同的碳源和氮源,其他选择的培养条件为选择连续活化3代的菌株、接种量3%、培养温度37 °C、初始pH 6.9和培养时间30 h,并测定EPS含量,以EPS为指标确定该嗜热链球菌产EPS的最佳培养条件。

分别选择质量分数为0.5%的4种碳源(葡萄糖、蔗糖、乳糖、半乳糖)、0.5%的3种氮源(胰蛋白胨、大豆蛋白胨、鱼蛋白胨)、3个碳氮比(乳糖-鱼蛋白胨-胰蛋白胨1:1:1、1:2:2、2:1:1)、5个碳源质量分数(1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%) and 5个pH值(5.5、6.0、6.5、7.0、7.5)做对比试验,以EPS含量为指标确定最佳碳源、最佳氮源、最佳碳氮比和最佳碳源质量分数。

### 1.3.6 培养条件单因素试验

在GM<sub>17</sub>培养基中,不同的培养条件下采用硫酸苯酚法测定菌体产生的EPS含量,确定该嗜热链球菌产EPS的最佳培养条件。

分别选择5个接种量水平(1%、2%、3%、4%和5%)、5个培养温度水平(27、32、37、42 °C和47 °C)、5个培养时间水平(20、24、28、32 h和36 h)做对比试验,以EPS含量为指标确定最佳接种量、最佳培养温度和最佳培养时间。

### 1.3.7 Plackett-Burman (PB) 试验设计

根据单因素试验结果,选取乳糖质量分数( $X_1$ )、pH值( $X_2$ )、接种量( $X_3$ )、培养温度( $X_4$ )和培养时间( $X_5$ )5个因素的水平值,以EPS产量为响应值进行2水平的PB试验设计及数据处理,确定显著性影响因素。PB试验因素与水平设计见表1。

表1 PB试验设计因素与水平  
Table 1 Factors and levels used for Plackett-Burman design

因素	水平	
	-1	1
$X_1$ 乳糖质量分数/%	1.0	2.0
$X_2$ pH	6.0	7.0
$X_3$ 接种量/%	3	5
$X_4$ 培养温度/°C	37	47
$X_5$ 培养时间/h	24	32

### 1.3.8 Box-Behnken试验设计

根据PB试验设计结果,选取乳糖质量分数、初始pH值和培养温度为影响EPS含量的3个主要因素,以EPS产量为响应值,根据Box-Behnken的设计原理<sup>[16]</sup>,进行3因素3水平响应面试验。Box-Behnken试验因素与水平见表2。

表2 Box-Behnken试验设计因素与水平  
Table 2 Factors and levels of Box-Behnken design

因素	水平		
	-1	0	1
$X_1$ 乳糖质量分数/%	1.0	1.5	2.0
$X_2$ pH	6.0	6.5	7.0
$X_3$ 培养温度/°C	37	42	47

### 1.3.9 EPS抑菌性实验

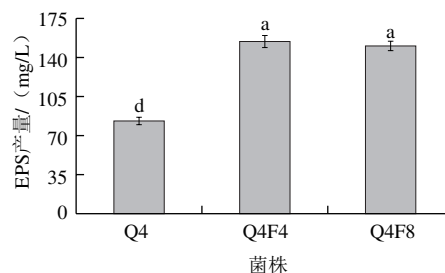
制备双层琼脂平板,分别涂布大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌,采用牛津杯打孔法打孔,取真空冷冻干燥的EPS溶解于蒸馏水中,加入预先制备好的孔径中,于4 °C扩散4 h,置于37 °C培养,测量抑菌圈直径。

### 1.4 数据统计分析

本研究涉及的数据除葡萄糖标准曲线外,均重复3次。采用Design-Expert 8.0.6软件进行PB试验和Box-Behnken试验设计及数据处理,用Origin 8.0软件进行绘图处理,SPSS 19.0软件对数据进行统计分析,采用ANOVA,并选用Duncan多重比较进行显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 复合诱变选育高产EPS菌株



字母不同表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), 下同。

图1 复合诱变菌株选育

Fig. 1 Exopolysaccharide yields of the original and mutant strains

对实验室保藏的菌株Q4在最佳条件下进行先化学(DES)后紫外的复合诱变,经过菌落特征和黏度的初筛(筛选菌落直径大、边缘整齐、显微镜观察为链球状的菌落),EPS的复筛以及菌株的稳定性分析,筛选出1株稳定性良好的高产EPS嗜热链球菌菌株Q4F8,突变株比原始菌株产量提高80.95%(图1)。

## 2.2 菌株的生长特性分析

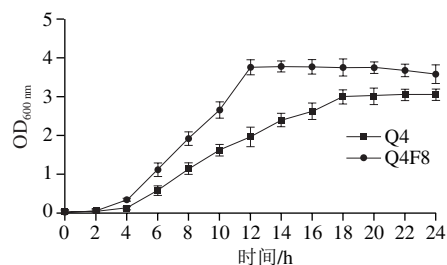
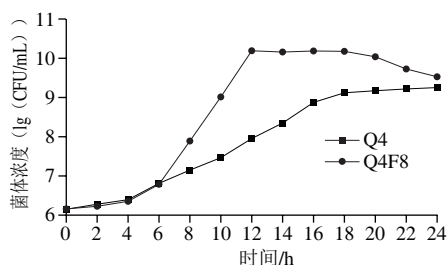


图2 嗜热链球菌的生长曲线

Fig. 2 Growth curves of *Streptococcus thermophilus* Q4 and Q4F8

由图2可以看出,经诱变后菌株比初始菌株对数期提前,且达到稳定期时诱变菌株比原始菌株菌体浓度和OD值均有所提高,说明发酵活力和生物量都有不同程度的提高。突变株更有利于吸收外界环境营养,能更好地繁殖和产生代谢产物。

## 2.3 培养基成分对嗜热链球菌Q4F8产EPS的影响

### 2.3.1 碳源种类对EPS的影响

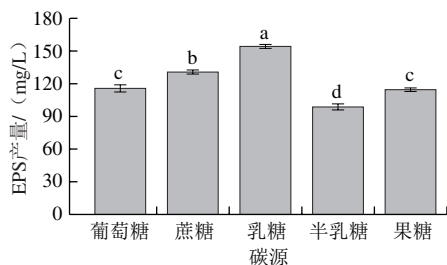


图3 碳源对Q4F8菌株EPS产量的影响

Fig. 3 Effect of carbon sources on EPS yield of Q4F8

除菌株自身遗传因素外,其培养基组成(碳源、氮源)也会对乳酸菌EPS产量造成很大影响<sup>[17]</sup>。因此,可通过优化EPS的合成条件提高菌株产EPS能力。由图3可知,嗜热链球菌Q4F8可利用多种碳源合成EPS。

其中半乳糖作为碳源时,EPS产量最少,为98.68 mg/L,并且和其他碳源相比存在显著差异( $P<0.05$ )。当碳源为乳糖时,Q4F8 EPS产量最高,达到154.21 mg/L( $P<0.05$ )。说明嗜热链球菌Q4F8利用可分解乳糖,利用乳糖能力强,这与Cheirsilp<sup>[18]</sup>和Desaia<sup>[19]</sup>等的研究一致,以乳糖为碳源时,EPS产量最高。

### 2.3.2 氮源种类对EPS的影响

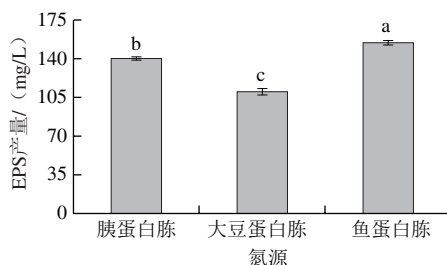


图4 氮源对Q4F8菌株EPS产量的影响

Fig. 4 Effect of nitrogen sources on EPS yield of Q4F8

乳酸菌合成EPS时,氮源是必须的营养成分,氮源种类和添加量的不同都会对菌株分泌EPS造成不同影响<sup>[20-21]</sup>。由图4可以看出,多种氮源对菌株的发酵产糖有不同影响。当氮源为鱼蛋白胍时,该菌株合成EPS最大,其次为胰蛋白胍,最后是大豆蛋白胍,3种氮源对菌株Q4F8合成EPS具有显著性差异( $P<0.05$ ),说明嗜热链球菌Q4F8利用动物蛋白胍作氮源的能力优于植物蛋白胍。氮源通过影响乳酸菌的生长,使菌体的密度增加,从而影响EPS的产量<sup>[22]</sup>。

### 2.3.3 碳氮比对EPS的影响

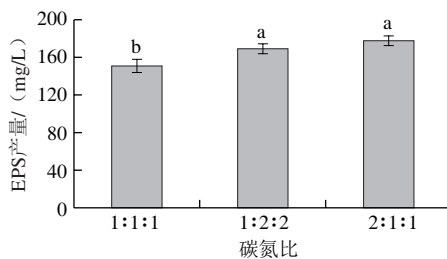


图5 碳氮比对Q4F8菌株EPS产量的影响

Fig. 5 Effects of carbon to nitrogen ratio on EPS yield of Q4F8

碳氮比对菌株的生长和代谢有直接影响,碳氮比相对低时,有利于菌体生长,相反,碳氮比相对较高时则变化不显著,但当碳氮比过高时,相当于渗透压升高,影响了菌体的生长代谢功能<sup>[23]</sup>。由图5可以看出,不同碳氮比对菌株Q4F8合成EPS存在显著性差异( $P<0.05$ )。而当碳氮比在1:2:2和2:1:1时,其无差异显著性( $P>0.05$ )。考虑到EPS产量的差别,碳氮比在2:1:1的条件下其EPS要高于1:2:2,其次从原料的经济基础上考虑。因此,选择碳氮比2:1:1为最佳碳氮比进行下一步试验。



## 2.3.4 碳源（乳糖）质量分数对EPS的影响

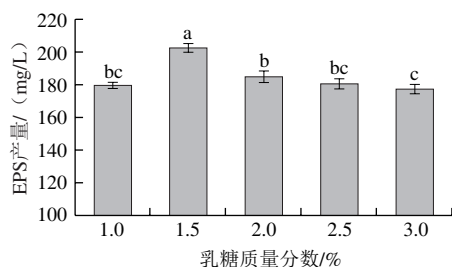


图6 乳糖质量分数对Q4F8菌株EPS产量的影响

Fig. 6 Effect of lactose concentration on EPS yield of Q4F8

碳源是乳酸菌菌株细胞生长及其重要的能量来源，对EPS产量有很大影响<sup>[24]</sup>，碳源影响EPS合成相关的酶从而对EPS的合成造成影响。如图6所示，不同质量分数乳糖对菌株Q4F8合成EPS的影响存在显著性差异（ $P < 0.05$ ）。乳糖溶液在1.0%~1.5%范围内，菌株合成EPS的能力呈上升趋势，其中1.5%时EPS最高。乳酸菌菌株细胞中含有碳源的反馈抑制体系<sup>[25]</sup>，当乳糖高于1.5%时，其EPS产量呈现下降趋势，表现出高浓度抑制EPS合成的现象。

## 2.4 发酵条件对嗜热链球菌Q4F8产EPS的影响

## 2.4.1 初始pH值对菌株Q4F8产EPS的影响

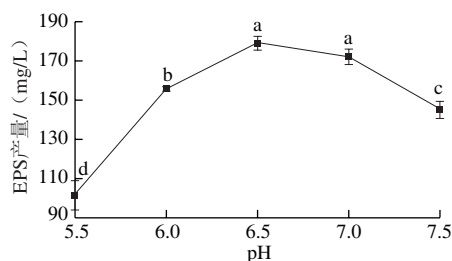


图7 pH值对Q4F8菌株EPS产量的影响

Fig. 7 Effect of pH value on EPS yield of Q4F8

不同的乳酸菌其生长特性与合成EPS都有最适的pH值范围。pH值对菌体的代谢影响主要是通过影响细胞膜功能和营养物质的离子化程度影响代谢<sup>[23]</sup>。由图7可以看出，pH值太高或太低都不利于其EPS的合成，在pH 5.5~6.5时变化差异显著（ $P < 0.05$ ），菌株Q4F8合成EPS在pH 6.5时达到最大值，初始pH值大于6.5时，其EPS产量降低水平不明显（ $P < 0.05$ ）。说明菌株Q4F8在中性环境下，更有利于其代谢产物的积累，其最适pH值为6.5。

## 2.4.2 接种量对菌株Q4F8产EPS的影响

由图8可知，当接种量在1%~4%时，由于培养基中营养丰富，伴随着接种量的增加，菌株合成EPS的能力也在增加。当接种量超过4%时，菌株合成EPS的能力呈下降趋势，在营养成分一定时，接入过多菌种，其营养

物质加速消耗，用于合成EPS的能力不足，导致EPS产量下降，与Raza等<sup>[26]</sup>报道的结果一致。当接种量为3%时，EPS产量最高。

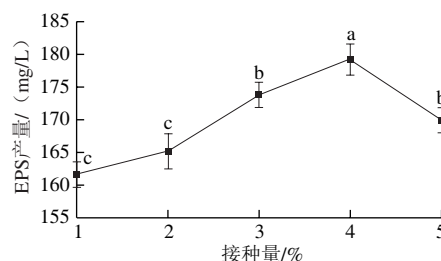


图8 接种量对Q4F8菌株EPS产量的影响

Fig. 8 Effects of inoculum amount on EPS yield of Q4F8

## 2.4.3 培养温度对菌株Q4F8产EPS的影响

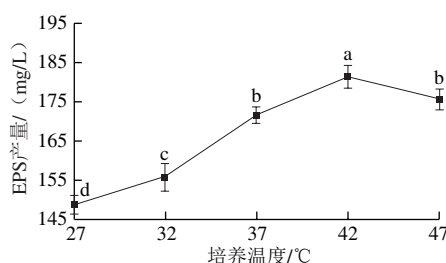


图9 培养温度对Q4F8菌株EPS产量的影响

Fig. 9 Effects of fermentation temperature on EPS yield of Q4F8

由图9可以看出，培养温度对嗜热链球菌Q4F8合成EPS的影响差异显著（ $P < 0.05$ ）。随着温度的升高，合成EPS产量增加，当温度为42℃时，EPS产量最大，随后随着温度的升高，EPS产量呈下降趋势。说明低温和高温环境都会抑制乳酸菌EPS的合成，低温时菌体生长缓慢，数量不足，进而影响其合成，高温时可能导致合成EPS的酶活性下降。因此，本试验选择42℃为最佳培养温度。

## 2.4.4 培养时间对菌株Q4F8产EPS的影响

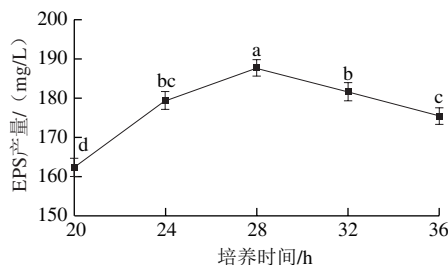


图10 培养时间对Q4F8菌株EPS产量的影响

Fig. 10 Effect of fermentation time on EPS yield of Q4F8

如图10所示，随着时间的延长，EPS产量呈现先增大后减小的趋势，下降可能是由于酶解条件或者营养环境恶化等参数的改变所致<sup>[27]</sup>。随着时间的延长合成EPS产量呈现显著性差异（ $P < 0.05$ ），Q4F8在培养28h时，其

EPS产量达到最大值。随着培养时间的延长, 菌体出现自溶现象, 分解出代谢多糖的酶, 进而降低EPS产量。

## 2.5 PB试验结果

表3 PB试验设计及结果

Table 3 Plackett-Burman design with experimental results

试验号	$X_1$ 乳糖质量分数	$X_2$ pH	$X_3$ 接种量	$X_4$ 培养温度	$X_5$ 培养时间	EPS产量/(mg/L)
1	-1	1	1	1	-1	164.40
2	-1	-1	1	-1	1	147.18
3	1	-1	-1	-1	1	159.56
4	1	1	1	-1	-1	180.29
5	-1	1	1	-1	1	162.42
6	-1	1	-1	1	1	161.25
7	1	-1	1	1	-1	171.28
8	1	-1	1	1	1	179.05
9	1	1	-1	1	1	187.62
10	-1	-1	-1	1	-1	147.77
11	1	1	-1	-1	-1	166.81
12	-1	-1	-1	-1	-1	135.75

PB试验根据2水平的试验设计, 通过比较2水平因素的差异性和整体的差异性确定因素之间的显著性, 筛选因素达到节约试验耗材、提高试验响应值的目的<sup>[28]</sup>。PB试验设计及响应值见表3。利用Design-Expert 8.0.6软件对表3数据进行处理, 由表4可知, 模型 $F$ 值为55.41, 表明该模式具有重要意义,  $R^2=0.978\ 8$ , 说明存在97.88%的试验数据可用该模型解释。对合成EPS影响极显著( $P<0.01$ )的因素依次为 $X_1>X_2>X_4>X_3$ ,  $X_5$ 对合成EPS影响显著( $P<0.05$ )。因此, 选取乳糖质量分数、pH值和培养温度3个因素进行Box-Behnken试验。

表4 PB试验方差分析

Table 4 Analysis of variance of experimental results from Plackett-Burman design

来源	平方和	自由度	均方	$F$ 值	$P$ 值
模型	2 430.72	5	486.14	55.41	<0.000 1**
$X_1$ 乳糖质量分数	1 320.08	1	1 320.08	150.47	<0.000 1**
$X_2$ pH值	563.04	1	563.04	64.18	0.000 2**
$X_3$ 接种量	175.27	1	175.27	19.98	0.004 2**
$X_4$ 培养温度	293.44	1	293.44	33.45	0.001 2**
$X_5$ 培养时间	78.90	1	78.90	8.99	0.024 0*
残差	52.64	6	8.77		
总和	2 483.36	11			
$R^2=0.978\ 8$		$R^2_{Adj}=0.961\ 1$			

注: \*.差异显著( $P<0.05$ ); \*\*.差异极显著( $P<0.01$ )。下同。

## 2.6 Box-Behnken试验设计结果

Box-Behnken试验设计水平及响应值见表5, 对其数据进行处理, 方差分析见表6。该模型差异极显著( $P<0.01$ )。模型的失拟项无显著性差异( $P=0.216\ 6>0.05$ ), 说明所选的模型拟合程度好, 可较好地拟合试

验结果。确定系数 $R^2$ 为0.995 4, 和调整确定系数 $R^2_{Adj}$ 为0.989 4基本接近, 表明模型的回归方程和相关性都很好。因此, Box-Behnken设计是可靠的, 该模型可较好地应用于嗜热链球菌合成EPS的理论预测。模型一次项 $X_1$ 对响应值EPS产量影响达到显著水平( $P<0.05$ ), 一次项 $X_2$ 、 $X_3$ 对响应值EPS产量影响达到极显著水平( $P<0.01$ ); 交互项 $X_1X_2$ 、 $X_1X_3$ 对响应值EPS产量影响不显著( $P>0.05$ ),  $X_2X_3$ 对响应值EPS产量影响达到极显著水平( $P<0.01$ ); 平方项 $X_1^2$ 、 $X_2^2$ 、 $X_3^2$ 对响应值EPS产量影响达到极显著水平( $P<0.01$ ); 3个因素对合成EPS的影响大小依次为:  $X_2>X_3>X_1$ , 表明, 3个因素并不是简单的线性关系。经修正不显著项后, 多元回归拟合模型的二次多项式方程为:

$$Y = -883.16 + 087.42X_1 - 63.12X_2 + 51.79X_3 - 1.03X_2X_3 - 55.52X_1^2 + 9.25X_2^2 - 0.53X_3^2$$

表5 Box-Behnken试验设计及结果

Table 5 Box-Behnken design with experimental results

试验号	$X_1$ 乳糖质量分数	$X_2$ pH	$X_3$ 培养温度	EPS产量/(mg/L)
1	1	0	1	158.17
2	0	1	-1	178.53
3	0	0	0	181.03
4	-1	0	1	157.00
5	0	0	0	182.49
6	0	0	0	182.34
7	-1	-1	0	163.66
8	-1	1	0	174.58
9	0	-1	1	169.60
10	-1	0	-1	151.94
11	1	-1	0	168.28
12	1	0	-1	154.07
13	1	1	0	177.00
14	0	-1	-1	162.42
15	0	0	0	182.93
16	0	0	0	183.44
17	0	1	1	175.38

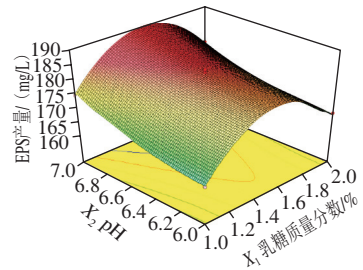
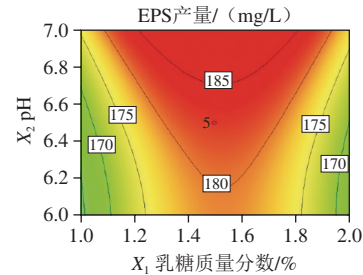
表6 Box-Behnken试验方差分析

Table 6 Analysis of variance of experimental results from Box-Behnken design

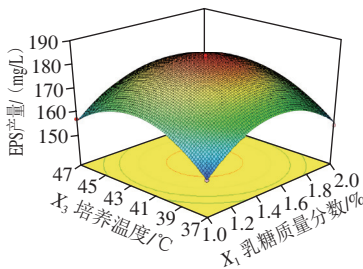
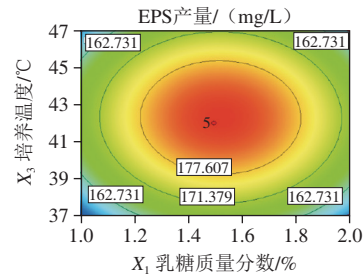
来源	平方和	自由度	均方	$F$ 值	$P$ 值
模型	1 920.84	9.000	213.43	167.19	<0.000 1**
$X_1$ 乳糖质量分数	13.34	1.000	13.34	10.45	0.014 4*
$X_2$ pH	215.68	1.000	215.68	168.96	<0.000 1**
$X_3$ 培养温度	21.74	1.000	21.74	17.03	0.004 4**
$X_1X_2$	1.21	1.000	1.21	0.95	0.363 1
$X_1X_3$	0.23	1.000	0.23	0.18	0.686 1
$X_2X_3$	26.68	1.000	26.68	20.90	0.002 6**
$X_1^2$	811.07	1.000	811.07	635.36	<0.000 1**
$X_2^2$	22.49	1.000	22.49	17.62	0.004 0**
$X_3^2$	741.97	1.000	741.97	581.23	<0.000 1**
残差	8.94	7.000	1.28		
失拟项	5.68	3.000	1.89	2.32	0.216 6
纯误差	3.26	4.000	0.81		
总和	1 929.77	16.000			
$R^2=0.995\ 4$		$R^2_{Adj}=0.989\ 4$			

2.7 各因素之间响应面交互作用分析

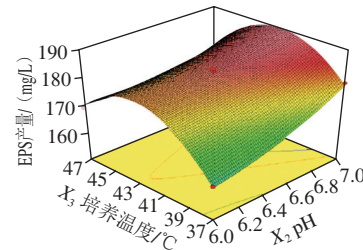
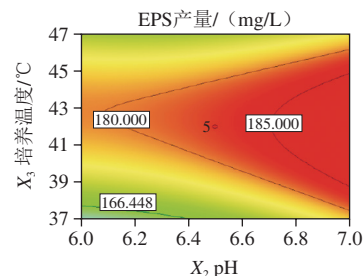
采用Design-Expert 8.0.6软件对试验结果进行响应面图绘制,通过响应面可直观地分析各因素及因素相互之间的交互作用对响应值的影响<sup>[29]</sup>。各因素之间响应面3D图和等高线图能直观反映出其相互作用的强弱,椭圆形的等高线表示两因素之间的交互作用存在显著性差异,圆形则表示两因素之间交互作用无显著性差异<sup>[30-31]</sup>。



a. 乳糖质量分数和pH值



b. 乳糖质量分数和培养温度



c. pH值和培养温度

图 11 各因素交互作用对EPS产量影响的等高线和响应面图

Fig. 11 Contour and response surface plots showing the interactive effects of various factors on EPS production

图11a可以看出,当培养温度控制在0水平时,乳糖质量分数和pH值的等高线近似圆形,表明乳糖质量分数和pH值的交互作用对EPS的合成影响不显著;固定乳糖质量分数为一定值,EPS随着pH值的升高变化不明显,表明乳糖质量分数和pH值的交互作用对EPS的合成影响不显著;随着乳糖质量分数的增加,EPS产量先增加后减小,乳糖质量分数1.40%~1.60%之间,EPS产量最大。

图11b可以看出,固定pH值制在0水平时,乳糖质量分数和培养温度的等高线近似圆形,表明乳糖质量分数和培养温度的交互作用对EPS的合成影响不显著;乳糖质量分数固定时,随着培养温度的升高,EPS产量呈现先增后减小的趋势,培养温度在39~40 °C之间,EPS产量最大。

图11c可以看出,乳糖质量分数为0水平时,培养温度和pH值的等高线为椭圆形,表明培养温度和pH值的交互作用对EPS的合成影响达到显著水平;固定培养温度为一定值,其随着pH值的升高,其EPS呈现增加的趋势。

2.8 发酵条件的优化及验证结果

对回归模型进行优化分析,获得嗜热链球菌Q4F8合成EPS的最佳工艺条件为pH 6.90、培养温度为42 °C、乳糖质量分数1.51%,并且在此条件下EPS产量的理论预测值为189.98 mg/L。在最优条件下进行3 次重复验证实验,获得的EPS产量为191.47 mg/L,与响应面优化预测的结果基本一致,响应面分析方法得到的嗜热链球菌合成EPS的工艺条件真实,在一定程度上具有实际应用价值。

2.9 EPS抑菌性分析

表 7 EPS抑菌性实验

Table 7 Antimicrobial activity of the EPS produced by Q4F8

致病菌	大肠杆菌	沙门氏菌	金黄色葡萄球菌
抑菌圈直径/mm	14.209±0.853	13.452±1.131	13.146±0.830

从表7得出,突变株具有较好的抑制食品中常见的三大致病菌滋生的效果,其中突变株产生的EPS对大肠杆菌抑菌效果最好到达(14.209±0.853) mm。从而在生产中以提高发酵乳制品的货架期和益生性能有明显的效果。



### 3 结 论

突变株有效提高了自身的生长性能, 对环境的适应能力更强, 更有利于自身菌体的生长及次生代谢产物的生产, 尤其是EPS的产生。本研究从碳源和氮源种类、碳源质量浓度、碳氮比、接种量、pH值、培养温度和培养时间对EPS影响的单因素基础上, 联和采用PB试验和Box-Behnken试验的方法, 建立了嗜热链球菌Q4F8发酵EPS条件的多项式模型, 经显著性检验分析和响应面分析, 其最佳工艺参数为pH 6.90、培养温度42℃和乳糖质量分数1.51%, 获得的理论值为189.98 mg/L。经验证实实际值为191.47 mg/L, 证明该模型准确可靠。该研究为今后对此菌株EPS结构、生理功能和机理研究奠定了基础, 同时也为嗜热链球菌Q4F8产EPS的工业化制备和应用提供理论参考。突变株产生的EPS能有效抑制食品中常见的三大致病菌滋生, 可更好地用于发酵工业及其食品产业中, 以提高发酵产品的货架期和益生性能, 为今后在功能性乳酸菌发酵剂的研究及其产品的贮藏性方面提供进一步的研究基础。

### 参考文献:

- BERGILLOS-MECA T, CABRERA-VIQUE C, ARTACHO R, et al. Does *Lactobacillus plantarum* or ultrafiltration process improve Ca, Mg, Zn and P bioavailability from fermented goats' milk? [J]. Food Chemistry, 2015, 187: 314-321. DOI:10.1016/j.foodchem.2015.04.051.
- 陈亚, 梁琪, 张炎, 等. 甘肃藏区牦牛酸乳中优良乳酸菌及其组合发酵性能研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(20): 191-196. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2015.20.032.
- LANEUVILLE S I, TURGEON S, SYLVIE L, et al. Microstructure and stability of skim milk acid gels containing an anionic bacterial exopolysaccharide and commercial polysaccharides[J]. International Dairy Journal, 2014, 37(1): 5-15. DOI:10.1016/j.idairyj.2014.01.014.
- ALHUDHUD M, HUMPHREYS P, LAWS A. Development of a growth medium suitable for exopolysaccharide production and structural characterization by *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* AD011[J]. Microbiological Methods, 2014, 100(1): 93-98. DOI:10.1016/j.mimet.2014.02.021.
- 曹永强, 王辑, 赵笑, 等. 植物乳杆菌YW11生产胞外多糖的发酵条件研究[J]. 北京工商大学学报(自然科学版), 2016, 34(1): 42-49. DOI:10.3969/j.issn.2095-6002.2016.01.007.
- GHOMSHE S M T, AMINZADEH R, ABARZANI M. Use of response surface methodology to study the combined effect of various parameters on hexavalent chromium adsorption[J]. Chemical Engineering Communications, 2014, 201(2): 191-208. DOI:10.1080/0986445.2013.766602.
- 程功, 徐建中, 郭燕凤, 等. 常压室温等离子体诱变选育L-精氨酸生产菌及发酵条件优化[J]. 微生物学通报, 2016, 43(2): 360-369. DOI:10.13344/j.microbiol.china.150391.
- 秦虹, 梁琪, 张卫兵. 甘肃藏区自然发酵牦牛乳中优良乳酸菌的筛选及鉴定[J]. 食品科学, 2013, 34(19): 241-246. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201319050.
- 赵天惠, 张佰清. 耐受性枯草芽孢杆菌的脉冲强光诱变筛选及产酶活力分析[J]. 食品科学, 2018, 39(2): 192-197. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201802030.
- 萨如拉, 芒来, 赵娜, 等. 产胞外多糖乳杆菌的菌种鉴定及其发酵条件优化[J]. 食品科技, 2014, 39(8): 2-8. DOI:10.13684/j.cnki.spkj.2014.08.002.
- NGUYEN A T B, NIGEN M, JIMENEZ L, et al. Performances of different protocols for exocellular polysaccharides extraction from milk acid gels: application to yogurt[J]. Food Chemistry, 2018, 239: 742-750. DOI:10.1016/j.foodchem.2017.06.121.
- 刘晶. Viili中乳酸菌的分离及其胞外多糖的研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2015: 24.
- WANG J, ZHAO X, TIAN Z, et al. Characterization of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW11 isolated from Tibet kefir[J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 125: 16-25. DOI:10.1016/j.carbpol.2015.03.003.
- KANMANI P, SATISH K R, YUVARAJ N, et al. Production and purification of a novel exopolysaccharide from lactic acid bacterium *Streptococcus phocae* PI80 and its functional characteristics activity *in vitro*[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(7): 4827-4833. DOI:10.1016/j.biortech.2010.12.118.
- 郭兴华, 凌代文. 乳酸细菌现代研究实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 2015: 69-70.
- BOX G P, BEHNKEN D W. Some new three level design for the study of quantitative variables[J]. Technometrics, 1960, 2(4): 456. DOI:10.1080/00401706.1960.10489912.
- 邵丽. 产胞外多糖乳杆菌的筛选及其多糖的分离、结构和生物活性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2015.
- CHEIRSILP B, SHIMIZU H, SHIOYA S. Modelling and optimization of environmental conditions for Kefiran production by *Lactobacillus kefirianofaciens*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001, 57(5/6): 639-646. DOI:10.1007/s00253-001-0846-y.
- DESAIA K M, AKOLKARA S K, BADHEB Y P, et al. Optimization of fermentation media for exopolysaccharide production from *Lactobacillus plantarum* using artificial intelligence-based techniques[J]. Process Biochemistry, 2006, 41(8): 1842-1848. DOI:10.1016/j.procbio.2006.03.037.
- 纪鹏, 李伟, 陈晓红, 等. 瑞士乳杆菌MB2-1胞外多糖发酵条件优化[J]. 食品科学, 2014, 35(7): 95-101. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201407020.
- SEESURIYACHAN P, KUNTIYA A, HANMOUNGJAI P, et al. Optimization of exopolysaccharide overproduction by *Lactobacillus confusus* in solid state fermentation under high salinity stress[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2012, 76(5): 912-917. DOI:10.1271/bbb.110905.
- HAN Y E, LIU E, LIU L, et al. Rheological, emulsifying and thermostability properties of two exopolysaccharides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* LPL061[J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 115: 230-237. DOI:10.1016/j.carbpol.2014.08.044.
- 李彦岩, 张彩, 范熠, 等. 一株解淀粉芽孢杆菌产糖条件的优化[J]. 食品科学, 2013, 34(7): 185-189. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201307039.
- XIANG X L, YANG L Y, HUA S, et al. Determination of oligosaccharide contents in 19 cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L.) seeds by high performance liquid chromatography[J]. Food Chemistry, 2008, 111(1): 215-219. DOI:10.1016/j.foodchem.2008.03.039.
- 司天昭, 柳陈坚, 秦晓萌, 等. 植物乳杆菌YM-2菌株胞外多糖生物合成工艺优化[J]. 食品科学, 2017, 38(10): 24-30. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201710005.
- RAZA W, YANG W, JUN Y, et al. Optimization and characterization of a polysaccharide produced by *Pseudomonas fluorescens* WR-1 and its antioxidant activity[J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 90(2): 921-929. DOI:10.1016/j.carbpol.2012.06.021.
- POLAK-BERECKA M, CHOMA A. Physicochemical characterization of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus rhamnosus* on various carbon sources[J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 117: 501-509. DOI:10.1016/j.carbpol.2014.10.006.
- 葛宜元. 试验设计方法与Design-Expert软件应用[M]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学出版社, 2015: 19-21.
- GENG L J, ZHOU W, QU X Y, et al. Optimization of the preparation of pectin from aloe using a Box-Behnken design[J]. Carbohydrate Polymers, 2014: 193-199. DOI:10.1016/j.carbpol.2014.01.069.
- JIA J Q, MA H, ZHAO W R, et al. The use of ultrasound for enzymatic preparation of ACE inhibitory peptides from wheat germ protein[J]. Food Chemistry, 2010, 119(1): 336-342. DOI:10.1016/j.foodchem.2009.06.036Y.
- 赵雯, 腾军伟, 张健, 等. 解淀粉芽孢杆菌GSBa-1胞外多糖的发酵制取、流变学特性和应用[J]. 食品科学, 2017, 38(16): 1-9. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201716001.