

doi:10.3969/j.issn.2095-6002.2016.01.007

文章编号:2095-6002(2016)01-0042-08

引用格式: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].食品科学技术学报,2016,34(1):42-49.



CAO Yongqiang, WANG Ji, ZHAO Xiao, et al. Optimization of fermentation conditions of *Lactobacillus Plantarum* YW11 for exopolysaccharides production[J]. Journal of Food Science and Technology, 2016,34(1):42-49.

植物乳杆菌 YW11 生产胞外多糖的发酵条件研究

曹永强, 王 辑, 赵 笑, 杨贞耐*

(北京工商大学 食品学院/食品质量与安全北京实验室, 北京 100048)

摘 要:对实验室从西藏灵菇中筛选出的一株植物乳杆菌 YW11 发酵产胞外多糖的条件进行优化。首先通过单因素实验对发酵条件进行初步优化,然后利用二水平正交试验直观分析确定影响因素的主次顺序。以胞外多糖产量作为响应值,采用 3 因素 3 水平的响应面分析法,建立二次多项式回归方程的预测模型,从而确定植物乳杆菌 YW11 产胞外多糖的最优条件。单因素实验结果表明,发酵时间为 18 h、碳源为乳糖(质量浓度为 15 g/L)、氮源为大豆蛋白胨(质量浓度为 15 g/L)、发酵温度为 32 ℃、接种量为 3%、pH 值为 6.0。直观分析确定影响植物乳杆菌 YW11 产胞外多糖主要发酵因素为大豆蛋白胨质量浓度、pH 值、接种量,响应面法优化其较佳值为:大豆蛋白胨质量浓度为 13.50 g/L,接种量为 2.70%,pH 值为 6.27。验证实验表明,在优化的发酵条件下得到植物乳杆菌 YW11 胞外多糖产量为 131.26 mg/L,与理论预测值(129.915 mg/L)相接近。

关键词:植物乳杆菌;胞外多糖;发酵条件;响应面分析

中图分类号:TS201.1

文献标志码:A

胞外多糖(exopolysaccharide, EPS)是微生物(如细菌、酵母、真菌等)在生长代谢过程中分泌到细胞壁外形成的长链、高分子聚合物。近年来,随着人们生活水平的不断提升以及健康意识的加强,研究与开发具有特殊功能的新型微生物 EPS 逐渐成为食品乃至医药领域研究的热点。在食品工业中,乳酸菌胞外多糖作为天然的稳定剂越来越多地应用于发酵乳制品生产,以改进产品的理化特性,如防止乳清析出、凝乳断裂等,提高产品的黏稠度和凝乳强度,改善产品的口感、流变性、稳定性、乳化性和风味等^[1]。此外,胞外多糖作为菌体的天然屏障,对菌体有一定的保护作用,从而提高菌体在不利生长环境中的耐受性,同时胞外多糖还有利于提高菌体对肠道表面的非特异性黏附作用。研究发现,胞外多糖具有多种生物学活性,如抗氧化、抗肿瘤、抑菌、抗

诱变、免疫调节、降胆固醇、治疗糖尿病及调节胃肠道菌群平衡等功能^[2]。由于产自乳酸菌的胞外多糖对机体没有毒副作用,且来源安全可靠,因此乳酸菌胞外多糖已成为近年来食品科学研究的热点。

影响乳酸菌胞外多糖合成的因素不仅与乳酸菌自身的遗传特性有关,亦与其生长环境因素相关,包括培养基的组成(如碳源、氮源、碳氮比(C/N)等)、培养基的初始 pH 值、接种量、发酵温度和时间等^[3]。本课题组前期工作中从西藏灵菇分离筛选到一株产胞外多糖的植物乳杆菌 YW11,并对此纯化的胞外多糖的结构及理化特性进行了研究,体外实验表明该胞外多糖具有抑制结肠癌细胞 HT-29 生长的活性^[4]。因此,本研究着力于分析不同因素包括培养基的碳源、氮源、接种量、发酵温度、发酵时间和培养基初始 pH 值等对植物乳杆菌 YW11 发酵

收稿日期:2015-03-25

基金项目:国家自然科学基金面上项目(31371804);北京市教委科研计划重点项目(KZ201310011011)。

作者简介:曹永强,男,硕士研究生,研究方向为乳品生物技术;

* 杨贞耐,男,教授,博士,主要从事乳品加工及其交叉学科理论及应用方面的研究。通信作者。

产胞外多糖的影响,并采用响应面分析法对发酵条件进行优化,以期提高此种具有生物活性的胞外多糖的产量,为其在发酵乳制品中的应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

植物乳杆菌 YW11 (NCBI 检索号:KM265361) 分离于西藏灵菇样品,本课题组实验室保藏。

三氯乙酸(trichloroacetic acid, TCA)、葡萄糖、乳糖、麦芽糖、果糖、蔗糖、半乳糖、大豆蛋白胨、胰蛋白胨、酪蛋白胨、蛋白胨、浓硫酸、重蒸酚、无水乙醇均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

CR21G III 型立式高速冷冻离心机,日本 HITA-CHI 公司;Elx800 型酶标仪,美国伯腾仪器有限公司;MLS-3750 型高压蒸汽灭菌器,日本三洋公司;S20 型数显 pH 计,上海梅特利-托利多公司;THZ-D 型恒温培养箱,上海一恒仪器科技有限公司。

1.2 培养基的配制

半合成培养基(semi-defined medium, SDM)是由去离子水 1 000 mL、胰蛋白胨 10 g、酵母氮源 6.7 g、 K_2HPO_4 2 g、 $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ 5 g、 CH_3COONa 5 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g、 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.05 g、葡萄糖 20 g、吐温 80 1 mL, 1 mol/L 乙酸溶液调节 pH 值至 6.6, 121 °C 灭菌 15 min 制成。

1.3 植物乳杆菌 YW11 EPS 的分离提取

将植物乳杆菌 YW11 连续活化两代后接种至 SDM 培养基中, 37 °C 静置培养 16 h, 发酵结束后, 于 100 °C 水浴加热 15 min, 以灭活可能存在的降解多糖的酶类。发酵液中的 EPS 参考 Sahlan 等^[5]的方法进行分离提取。向植物乳杆菌 YW11 发酵液中加入质量分数 80% 的 TCA, 调节 TCA 质量分数到 4%, 于常温下搅拌 2 h 后, 4 °C, 10 000 r/min, 离心 45 min, 去除发酵液中的细胞和蛋白。将上清液转移出来, 加入上清液两倍体积的无水乙醇, 4 °C 静置 12 h, 10 000 r/min, 4 °C, 离心 30 min。用蒸馏水溶解沉淀, 装入分子截流量为 8 000 ~ 14 000 u 的透析袋中, 每 8 h 换一次蒸馏水, 透析 24 h^[6]。

1.4 EPS 含量测定

采用苯酚-硫酸法测定 EPS 含量, 以葡萄糖为标准品, 测定 490 nm 处的吸光度值。本实验测得的葡萄糖标准曲线回归方程为: $y = 0.0075x - 0.0063$, $R^2 = 0.9991$ 。

1.5 不同因素对植物乳杆菌 YW11 产 EPS 的影响

EPS 的产量不仅取决于产 EPS 微生物自身的遗传特性, 也与发酵过程中微生物所处的环境状况有关^[7]。对植物乳杆菌 YW11 发酵条件相关的 8 个因素(包括培养基的碳源及其质量浓度、氮源及其质量浓度、接种量、发酵温度、发酵时间、培养基初始 pH 值)分别进行研究。

以 EPS 产量为指标, 以 SDM 培养基为基础培养基, 将 SDM 培养基中的碳源(葡萄糖)分别以等量的乳糖、半乳糖、麦芽糖、蔗糖、果糖、葡萄糖替换; 选取乳糖质量浓度分别为 5, 10, 15, 20, 25, 30 g/L; 将 SDM 培养基中的氮源(胰蛋白胨)分别以等量的大豆蛋白胨、普通蛋白胨、酪蛋白胨、胰蛋白胨替换; 选取大豆蛋白胨质量浓度分别为 5, 10, 15, 20, 25, 30 g/L; 选取接种量分别为 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6% (其他发酵条件: 发酵温度 37 °C, 发酵时间 16 h, pH 值 6.6); 选取发酵温度分别为 22, 27, 32, 37, 42 °C (其他发酵条件: 接种量 1%, 发酵时间 16 h, pH 值 6.6); 选取发酵时间分别为 6, 12, 18, 24, 30 h (其他发酵条件: 接种量 1%, 发酵温度 37 °C, pH 值 6.6); 选取培养基初始 pH 值分别为 4, 5, 6, 7, 8, 9 (其他发酵条件: 接种量 1%, 发酵温度 37 °C, 发酵时间 16 h)。

1.6 二水平正交试验设计

结合单因素实验, 针对影响植物乳杆菌 YW11 胞外多糖产量的因素, 设计 $L_8(2^7)$ 正交试验, 确定影响因素的主次顺序。

1.7 响应面试验设计

根据响应面优化分析原理(Box-Behnken design, BBD), 通过 Design-Expert 8.0.5b 软件设计响应面试验, 研究植物乳杆菌 YW11 产 EPS 的最佳发酵条件。得到最优条件后, 通过验证实验, 验证模型的有效性。

2 结果与分析

2.1 不同因素的影响结果

2.1.1 碳源对 EPS 产量的影响

碳源为微生物生长提供最主要碳素和能量。由于不同微生物的酶系存在差异, 因此微生物对不同种类碳源的利用程度也存在相应差异^[8]。为了筛选最适碳源, 分别选用 6 种不同碳源(葡萄糖、果糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖、半乳糖)按 20 g/L 的添加量

替代 SDM 培养基中的基础碳源, EPS 产量结果如图 1。

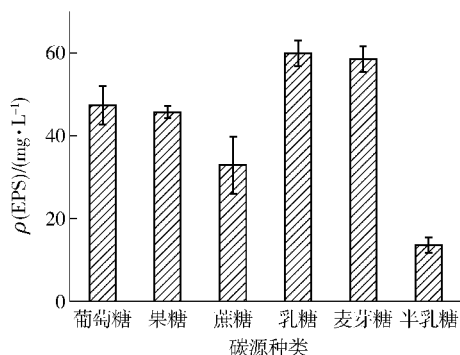


图 1 不同碳源对植物乳杆菌 YW11 EPS 产量的影响

Fig. 1 Effect of different carbon sources on yields of EPS from *Lactobacillus plantarum* YW11

由图 1 看出,植物乳杆菌 YW11 在 6 种碳源下均能产生 EPS,但其产量存在显著差异。其中以乳糖为碳源时, EPS 产量最高为 59.98 mg/L,其次为麦芽糖、葡萄糖、果糖、蔗糖,半乳糖产量最低为 13.62 mg/L。牛乳中存在大量乳糖,便于微生物利用且成本较低,因此,选择乳糖作为碳源进行下一步研究。

2.1.2 碳源质量浓度对 EPS 产量的影响

碳源质量浓度对 EPS 的合成也有着重要的影响。为了得到最佳的乳糖质量浓度,分别选用不同质量浓度的乳糖 (5 ~ 30 g/L) 添加到 SDM 培养基中,结果如图 2。

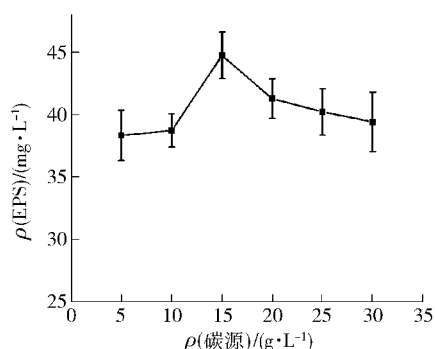


图 2 乳糖质量浓度对植物乳杆菌 YW11 EPS 产量的影响

Fig. 2 Effect of lactose concentrations on yields of EPS from *Lactobacillus plantarum* YW11

由图 2 可知,随着乳糖质量浓度的增加, EPS 的产量呈现先增加后降低的趋势,在乳糖质量浓度为 15 g/L 时, EPS 的产量达到最高 (44.74 mg/L)。在乳糖质量浓度较低时,乳糖仅为微生物的生长提供能量和碳元素,此时 EPS 的产量较低,随着乳糖质量浓度的增加,微生物的生长完成, EPS 的产量随即

增加。当乳糖质量浓度过大时,由于打破了适合微生物生长的 C/N,菌株生长缓慢, EPS 的产生受到抑制,导致产量随之下降。故选取乳糖质量浓度为 15 g/L 进行下一步实验。

2.1.3 氮源对 EPS 产量的影响

氮源的主要作用是微生物细胞生长和代谢提供氮素及能量。为了筛选到最适合植物乳杆菌 YW11 产 EPS 的氮源,分别选用 4 种不同氮源 (普通蛋白胨、酪蛋白胨、大豆蛋白胨、胰蛋白胨) 按 10 g/L 的质量浓度替代 SDM 培养基中的基础氮源,结果如图 3。

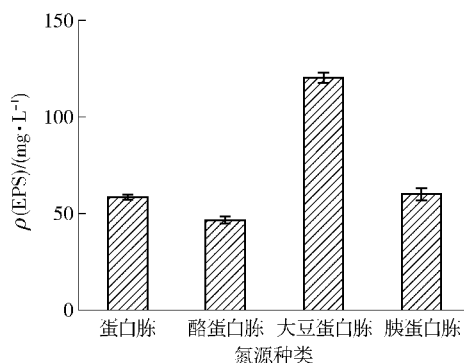


图 3 不同氮源对植物乳杆菌 YW11 EPS 产量的影响

Fig. 3 Effect of different nitrogen sources on yields of EPS from *Lactobacillus plantarum* YW11

由图 3 看出,植物乳杆菌 YW11 利用 4 种不同种类的氮源都能产生 EPS,但 EPS 的产量有显著差异。其中,氮源为大豆蛋白胨作时, EPS 产量最高为 120.01 mg/L,其次为胰蛋白胨、普通蛋白胨,酪蛋白的产量最低为 46.57 mg/L。因此选用大豆蛋白胨作为氮源进行下一步实验。

2.1.4 氮源质量浓度对 EPS 产量的影响

氮源质量浓度对 EPS 的合成有着重要的影响。为了得到最佳的大豆蛋白胨质量浓度,分别选用不同质量浓度的大豆蛋白胨 (5 ~ 30 g/L) 添加到 SDM 培养基中,结果见图 4。

如图 4,随着大豆蛋白胨质量浓度的增加, EPS 的产量也发生变化。当大豆蛋白胨质量浓度增加到 15 g/L 时, EPS 的产量达到最大 (109.82 mg/L); 在 15 ~ 25 g/L 质量浓度范围内, EPS 的产量相对稳定,然而当继续增加质量浓度时, EPS 的产量有所降低,在 30 g/L 为 100.84 mg/L。Li 等^[9]研究也发现了低质量浓度氮源可促进 EPS 产生,而高质量浓度氮源抑制 EPS 产生,从而进一步表明 C/N 对 EPS 的生产有着重要影响。因此,选用 15 g/L 的大豆蛋白胨质

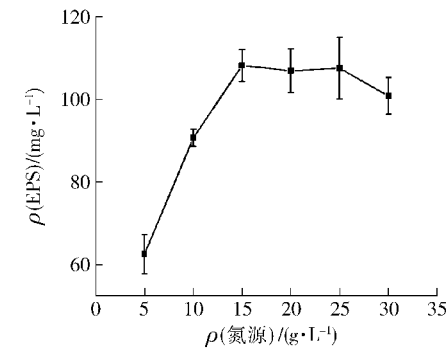


图4 大豆蛋白胨质量浓度对植物乳杆菌 YW11 EPS 产量的影响

Fig. 4 Effect of soy peptone concentrations on yields of EPS from *Lactobacillus plantarum* YW11
量浓度进行下一步实验。

2.1.5 接种量对 EPS 产量的影响

接种量大小决定了微生物菌种在发酵过程中生长繁殖的速度,进而影响 EPS 的产量。选用不同接种量的植物乳杆菌 YW11 (1% ~ 6%) 进行发酵, EPS 产量的结果见图 5。

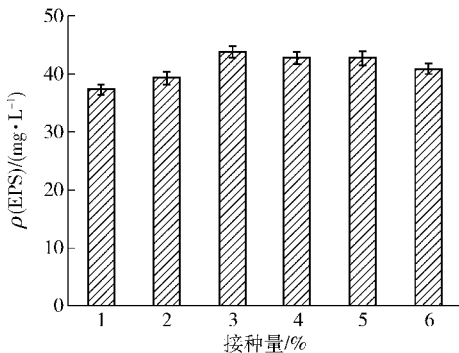


图5 接种量对植物乳杆菌 YW11 EPS 产量的影响
Fig. 5 Effect of inoculum dose on yields of EPS from *Lactobacillus plantarum* YW11

由图 5 可知,随着接种量的增加,EPS 的产量呈现先上升后降低的趋势,在接种量为 3% 时,EPS 的产量达到最大为 45.04 mg/L,在接种量达到 6% 时,EPS 的产量为 40.83 mg/L,介于最大值最小值之间。接种量过大,发酵前期会导致菌体生长过快,菌体浓度过高,发酵中后期会因营养物质消耗而影响 EPS 的前体物质,从而降低 EPS 的产量;若接种量过小,则会导致细菌数量不足,生长过程的延滞期拉长,细菌内部某些维生素和辅酶等微量元素会与周围环境发生过多的扩散从而导致生长要素损失,细菌活性降低^[10],因此选用接种量为 3% 进行下一步实验。

2.1.6 发酵温度对 EPS 产量的影响

温度是影响微生物生长繁殖和 EPS 合成的重要因素,不同温度下 EPS 的产量见图 6。

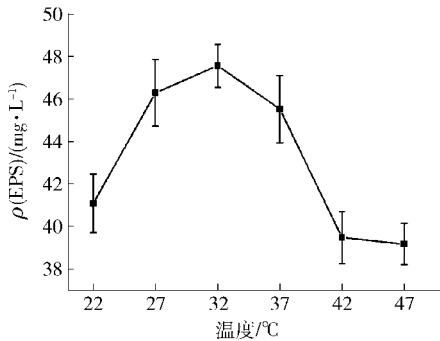


图6 发酵温度对植物乳杆菌 YW11EPS 产量的影响
Fig. 6 Effect of fermentation temperatures on yields of EPS from *Lactobacillus plantarum* YW11

由图 6 可以看出,随着发酵温度的升高,植物乳杆菌 YW11 的 EPS 产量呈现先升高后降低的趋势。在 22 °C 时,EPS 的产量较低为 41.08 mg/L,可能由于微生物多糖属于次级代谢产物,发酵温度过低,微生物菌体生长缓慢,菌体质量浓度不高,从而影响次生代谢产物 EPS 的含量。同时,低温会使类异戊二烯脂质载体发生钝化现象,也会导致 EPS 的产量降低。随着发酵温度的增加,EPS 的产量逐渐增加,在 32 °C 时达到最大为 47.60 mg/L。但是随着温度继续增加,EPS 的产量出现下降趋势,在 47 °C 时 EPS 产量最低为 39.17 mg/L,这可能是由于发酵温度过高,稳定期提前到来,且温度过高使得类异戊二稀脂质载体失活等原因,导致多糖产量降低^[11],因此选取最适发酵温度为 32 °C。

2.1.7 发酵时间对 EPS 产量的影响

不同的发酵时间对 EPS 产量的影响如图 7。

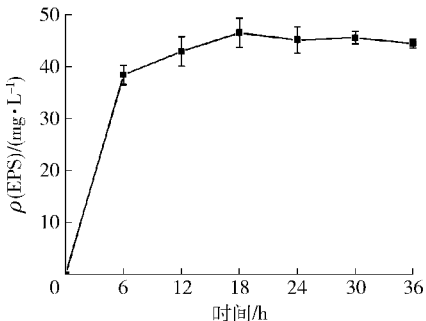


图7 发酵时间对植物乳杆菌 YW11 EPS 产量的影响
Fig. 7 Effect of fermentation time on yields of EPS from *Lactobacillus plantarum* YW11

从图 7 可以看出,在植物乳杆菌 YW11 的生长期(6~18 h),随着发酵时间的延长,EPS 的产量增长速度较快,在 18 h 时,EPS 的产量达到最高为 46.51 mg/L。然而,18 h 后,EPS 的产量呈现小幅度下降,随着发酵时间的继续延长,EPS 的产量趋于稳定,在 36 h,EPS 产量为 44.48 mg/L。因此发酵时间选为 18 h。Zhang 等^[12]和 Wang 等^[13]的研究发现随着发酵时间的延长,植物乳杆菌 C88 和 70810 的 EPS 产量均呈现出下降趋势,并推断这可能是由于培养时间过久,培养基中营养成分缺乏以及发酵后期细菌产生了可降解多糖的酶所致。

2.1.8 pH 值对 EPS 产量的影响

培养基初始 pH 值是微生物在确定的发酵环境中代谢活动的综合指标,pH 值通过改变酶活性从而间接控制微生物的代谢。不同 pH 值下 EPS 产量的变化如图 8。

从图 8 可以看出,在不同的 pH 值下,植物乳杆菌 YW11 EPS 的产量各不相同。在 pH 值为 4 时,EPS 产量较低,这可能是由于低 pH 值抑制了菌体的生长,从而影响 EPS 的分泌;在 pH 值 6.0 时,EPS 的产量达到最大为 42.99 mg/L。研究表明,在 pH 值 5.8~6.2 时,乳酸菌 EPS 合成量最大,若 pH

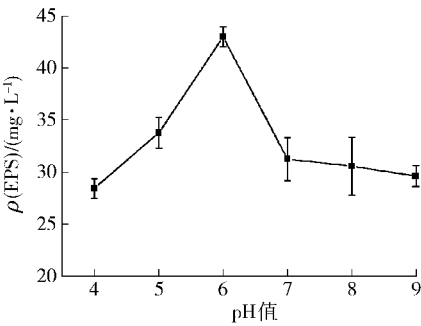


图 8 pH 值对植物乳杆菌 YW11 EPS 产量的影响
Fig.8 Effect of pH on yields of EPS from *Lactobacillus plantarum* YW11

值的降低,则会导致多糖的合成由于失去类异戊二烯脂中间体而受到阻碍^[14]。Shu 等^[15]研究发现,微生物产 EPS 的最适 pH 值在中性偏酸;此后,随着 pH 值继续升高,EPS 产量降低较为显著。因此,选取 pH 值 6.0 进行下一步实验。

2.2 正交试验筛选发酵条件显著性

在单因素实验基础上,对影响植物乳杆菌产胞外多糖的 6 个因素(大豆蛋白胨质量浓度、pH 值、接种量、乳糖质量浓度、发酵时间、发酵温度)进行二水平正交设计,结果如表 1。

表 1 二水平正交试验安排、EPS 产量与极差分析

Tab.1 Experimental design, results, and intuitive analysis of two-level orthogonal design

因素	$\rho(\text{乳糖})/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	$\rho(\text{大豆蛋白胨})/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	接种量/%	pH 值	温度/ $^{\circ}\text{C}$	时间/h	空白	$\rho(\text{EPS})/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$
实验 1	5	5	1	4	32	18	1	43.65
实验 2	5	5	1	6	47	36	2	68.76
实验 3	5	15	3	4	32	36	2	60.21
实验 4	5	15	3	6	47	18	1	75.59
实验 5	15	5	3	4	47	18	2	44.89
实验 6	15	5	3	6	32	36	1	49.61
实验 7	15	15	1	4	47	36	1	79.68
实验 8	15	15	1	6	32	18	2	95.56
均值 1	62.05	51.73	71.91	57.11	62.26	64.92	62.13	
均值 2	67.43	77.76	57.58	72.38	67.23	64.57	67.36	
极差	5.38	26.03	14.34	15.27	4.97	0.36	5.22	

空白列为误差项,空白列中的 1 和 2 表示 1 水平和 2 水平

分析表明,各因素对 EPS 产量影响的重要性由大到小依次为大豆蛋白胨质量浓度、pH 值、接种量、碳源质量浓度、发酵温度、发酵时间。选取影响最显著的 3 个因素(大豆蛋白胨质量浓度、pH 值、接种量)作为考察的重点,通过响应面法进一步分析。

2.3 植物乳杆菌 YW11 产 EPS 主要影响因素的响应面分析结果

根据 BBD 原理,设计 3 因素 3 水平的响应面分析实验。通过 Design-Expert 响应面设计软件分析,共有 17 个实验点(见表 2),以大豆蛋白胨质量浓

度、pH 值、接种量 3 个因素为自变量,以 EPS 产量作为响应值。

表 3 回归方程的方差分析

Tab. 3 ANOVA analysis for regression equation

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	17 558. 30	9	1 950. 92	119. 79	<0. 000 1	* *
X_1	7 065. 43	1	7 065. 43	433. 82	<0. 000 1	* *
X_2	923. 02	1	923. 02	56. 67	0. 000 1	* *
X_3	342. 77	1	342. 77	21. 05	0. 002 5	*
X_1X_2	112. 10	1	112. 10	6. 88	0. 034 2	*
X_1X_3	139. 76	1	139. 76	8. 58	0. 022 0	*
X_2X_3	40. 68	1	40. 68	2. 50	0. 158 0	
X_1^2	2 696. 10	1	2 696. 10	165. 54	<0. 000 1	* *
X_2^2	2 906. 038	1	2 906. 038	178. 43	<0. 000 1	* *
X_3^2	2 393. 82	1	2 393. 82	146. 98	<0. 000 1	* *
残差	114. 01	7	16. 29			
失拟项	69. 87	3	23. 29	2. 11	0. 241 6	
纯误差	44. 13	4	11. 03			
总和	17 672. 31	16				

* 表示差异显著, $P < 0. 05$; * * 表示差异极显著 $P < 0. 01$

2. 3. 2 响应面交互作用分析

图 9 至图 11 是由 Design-expert 8. 0. 5b 软件分析得到的响应面及等高线图,分别表示 X_1 、 X_2 、 X_3 中任意一个变量的水平固定为零时,其余两个变量对 EPS 产量的交互影响。等高线图中,圆形表示两个因素交互作用不显著,椭圆表示这两个因素交互作用显著。

由图 9 可看出,等高线图呈现椭圆状,表明大豆蛋白胨质量浓度和 pH 值的交互作用显著。将接种量固定为零,大豆蛋白胨质量浓度设定为特定值时,随着 pH 值逐渐增大,EPS 的产量先增加后减小,在 pH 值为 6~7 之间,达到最大。分析等高线图中 pH 值和大豆蛋白胨等高线变化的密集度可知,大豆蛋白胨质量浓度的等高线较为密集,大豆蛋白胨的质量浓度对 EPS 的产量影响强度较 pH 值的影响大。随着大豆蛋白胨的增加,EPS 合成的原料也不断增加,氮源过量,可能会打破原有的 C/N,使植物乳杆菌的生长受到影响,从而导致 EPS 产量降低。同时,当 pH 值发生改变时,微生物生存所需的适宜 C/N 也有可能发生改变,这可能是 pH 值和大豆蛋白胨质量浓度之间存在交互作用的原因之一^[16]。

由图 10 可以看出,等高线呈现椭圆状,故大豆蛋白胨质量浓度和接种量交互作用显著。固定 pH 值为零,大豆蛋白胨质量浓度固定,随着接种量的增

表 2 Box-Behnken 设计方案及响应值

Tab. 2 Box-Behnken design and response values

实验 序号	X_1 ρ (大豆蛋白胨) $/(g \cdot L^{-1})$	X_2 pH 值	X_3 接种量/ %	Y ρ (EPS)/ $(mg \cdot L^{-1})$
1	5	4	2. 5	35. 33
2	20	6	1	89. 77
3	12. 5	6	2. 5	124. 57
4	12. 5	4	4	66. 82
5	12. 5	8	4	91. 13
6	5	8	2. 5	49. 77
7	12. 5	6	2. 5	129. 87
8	12. 5	6	2. 5	127. 57
9	20	4	2. 5	85. 95
10	12. 5	8	1	76. 04
11	12. 5	6	2. 5	119. 06
12	12. 5	4	1	64. 48
13	20	6	4	119. 06
14	12. 5	6	2. 5	123. 97
15	5	6	4	49. 58
16	20	8	2. 5	121. 57
17	5	6	1	43. 93

2. 3. 1 实验模型的建立与显著性分析

将 EPS 的产量作为响应值,Design-Expert 响应面设计软件处理,各变量对响应值的影响可由下列函数关系表示:

$$Y = -282. 06 + 11. 78X_1 + 77. 12X_2 + 44. 4X_3 + 0. 35X_1X_2 + 0. 53X_1X_3 + 1. 06X_2X_3 - 0. 45X_1^2 - 6. 57X_2^2 - 10. 58X_3^2,$$

其中 Y 值表示 EPS 的产量, X_1 、 X_2 、 X_3 分别表示大豆蛋白胨质量浓度、pH 值、接种量 3 个因素。方差分析和各因素的显著性如表 3,在实验设计的水平范围内,模型的 F 值为 119. 79,影响显著。函数的相关系数 $R^2 = 0. 932 8$, R^2 值越接近 1 说明误差的影响越小,表明该函数可以较好地模拟 EPS 的发酵过程。校正系数 R^2_{Adj} 为 0. 985 3,说明 98. 53% 的响应值变化可以用该模型来表示。失拟项的 $F = 2. 11$, $P = 0. 241 6 > 0. 05$,即失拟不显著,表明该函数关系式能充分反映实际情况。以上数据说明回归方程的拟合程度良好。通过比较 F 值,可以看出不同因素对 EPS 产量的影响主次顺序为:大豆蛋白胨质量浓度、pH 值、接种量。其中, X_3 和交互项 X_1X_3 、 X_1X_2 对 EPS 产量的影响作用显著; X_1 、 X_2 和 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 对 EPS 产量影响极显著。

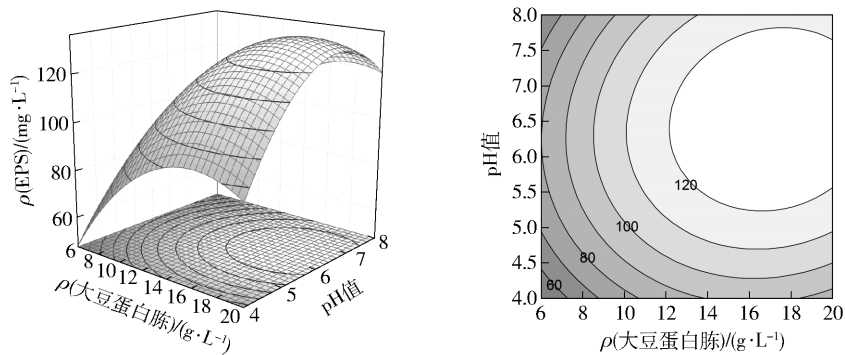


图 9 pH 值和大豆蛋白胨质量浓度对 EPS 产量影响的响应面及等高线

Fig. 9 Response surface and contour plots for effects of pH and soy peptone concentrations on yields of EPS from *Lactobacillus plantarum* YW11

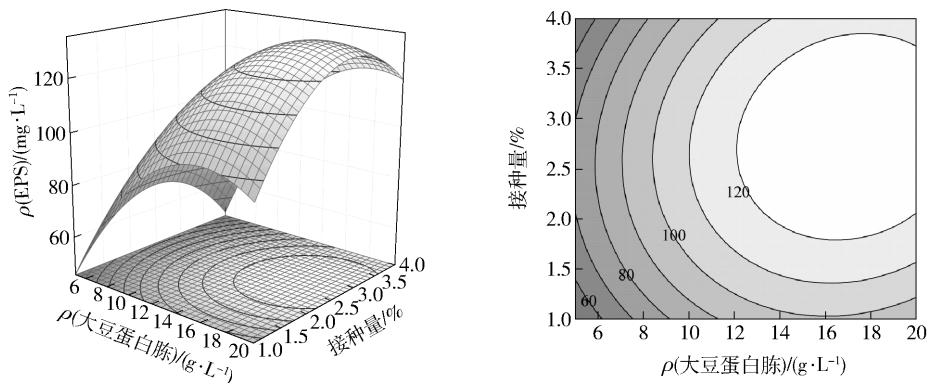


图 10 大豆蛋白胨质量浓度和接种量对 EPS 产量影响的响应面及等高线

Fig. 10 Response surface and contour plots for effects of soy peptone concentrations and inoculum dose on yields of EPS from *Lactobacillus plantarum* YW11

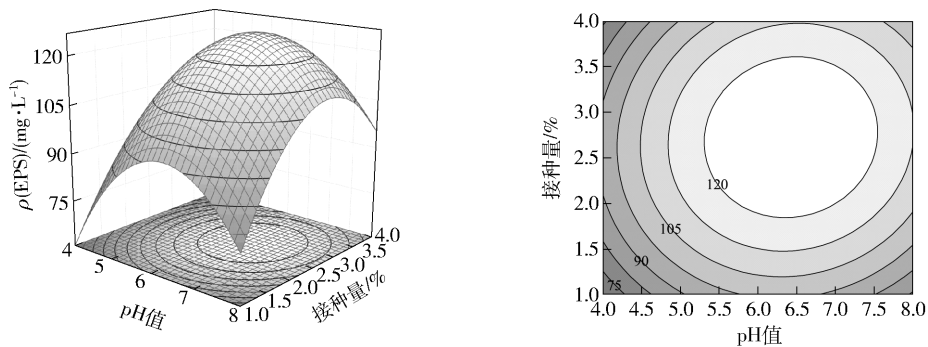


图 11 接种量和 pH 值对 EPS 产量影响的响应面及等高线

Fig. 11 Response surface and contour plots for effects of inoculum dose and pH on yields of EPS from *Lactobacillus plantarum* YW11

加,EPS 的产量呈现先增后减的趋势,且从图中可以看出,大豆蛋白胨的等高线比接种量的等高线密集,表明大豆蛋白胨质量浓度对 EPS 的产量影响较大。

由图 11 可以看出,等高线接近圆形,表明 pH 值和接种量之间的交互作用不显著,固定大豆蛋白胨的质量浓度为零,当 pH 值一定时,随着接种量的

变大,EPS 的产量先大后小。胞外多糖是次级代谢产物,一般都是在乳杆菌对数生长期末期和稳定期产生,接种量过大,产量会下降,这可能与 EPS 吸附到产生菌菌体表面有关^[17]。

由图 9 ~ 11 中的响应面立体图中看出,响应值 Y 存在最大值,该值越大说明发酵水平越高,结合稳

定值的性质,确定最大稳定点。因此,最佳发酵条件为大豆蛋白胨质量浓度 13.50 g/L, pH = 6.27, 接种量为 2.70%。带入拟合的函数式,得到预测的 EPS 产量为 129.915 mg/L。为验证实验结果,采用模型给出的条件进行发酵,3 次平行实验后取平均值,所得结果为 131.26 mg/L,与预测值基本一致,说明该模型能较好地预测实际的发酵情况。

3 结 论

本研究通过响应面法,优化了植物乳杆菌 YW11 产胞外多糖的条件,其高产 EPS 的发酵条件为:大豆蛋白胨质量浓度 13.50 g/L, pH = 6.27、接种量为 2.70%。虽然每个单因素的最佳值与响应面优化后得到的最优值不匹配,但是,发酵因素之间的最优组合可以较大幅度的提高 EPS 的产量,这说明发酵条件之间存在着一定的交互作用,它们共同影响植物乳杆菌的发酵过程。除此之外,改变发酵条件,胞外多糖的化学结构,理化性质,围观结构方面是否存在差异还需进一步实验验证。研究表明,使用响应面法优化发酵条件,较大幅度地提高了具有生物活性的植物乳杆菌 YW11 EPS 的产量,节省了发酵时间,提高了发酵效率,为其在酸奶、干酪及冰淇淋等发酵乳制品中的应用奠定了重要基础。

参考文献:

- [1] ZAHEER A, WANG Yanping, NOMANA A, et al. Characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirifaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir-part II[J]. Food Hydrocolloids, 2013, 30(1): 343–350.
- [2] YANG Zhennai, LI Shengyu, ZHANG Xue, et al. Capsular and slime-polysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* JAAS8 isolated from Chinese sauerkraut: potential application in fermented milk products[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2010, 110(1): 53–57.
- [3] ANN K S, LAWRENCE G W, JOSHUA D S, et al. Variations in exopolysaccharide production by *Rhizobium tropici*[J]. Archives of Microbiology, 2012, 194(3): 197–206.
- [4] WANG Ji, ZHAO Xiao, TIAN Zheng, et al. Characterization of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW11 isolated from Tibet kefir[J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 125: 16–25.
- [5] SAHLAN O, BELMA A, ZEKIYE S. Evaluation of chromium(VI) removal behaviour by two isolates of *Synechocystis* sp. in terms of exopolysaccharide (EPS) production and monomer composition[J]. Bioresource Technology, 2009, 100(23): 5588–5593.
- [6] 王静颖. 乳酸菌胞外多糖的提取纯化及免疫活性研究[D]. 济南: 山东大学, 2007.
- [7] 陈若雯. 高产胞外多糖乳酸乳杆菌的选育及其发酵条件的优化[D]. 武汉: 华中农业大学, 2010.
- [8] KIM H O, LIM J M, JOO J H, et al. Optimization of submerged culture condition for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by *Agrocybe cylindracea* [J]. Bioresource Technology, 2005, 96(10): 1175–1182.
- [9] LI Wei, JI Juan, RUI Xin, et al. Production of exopolysaccharides by *Lactobacillus helveticus* MB2–1 and its functional characteristics *in vitro*[J]. LWT-Food Science and Technology, 2014, 59(2): 732–739.
- [10] 冯美琴. 植物乳杆菌胞外多糖发酵、结构鉴定及其功能特性研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- [11] SALVADOR A, FISZMAN S M. Textural and sensory characteristics of whole and skimmed flavored set-type yogurt during long storage[J]. Journal of Dairy Science, 2004, 87(12): 4033–4041.
- [12] ZHANG Li, LIU Chunhong, LI Da, et al. Antioxidant activity of an exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus plantarum* C88[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 54: 270–275.
- [13] WANG Kun, LI Wei, RUI Xin, et al. Characterization of a novel exopolysaccharide with antitumor activity from *Lactobacillus plantarum* 70810[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2014, 63: 133–139.
- [14] BROADBENT J R, MCMAHON D J, WELKER D L, et al. Biochemistry, genetics, and applications of exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*: a review[J]. Journal of Dairy Science, 2003, 86(2): 407–423.
- [15] SHU Chinghang, LUNG Mingyeou. Effect of pH on the production and molecular weight distribution of exopolysaccharide by *Antrodia camphorata* in batch cultures[J]. Process Biochemistry, 2004, 39(8): 931–937.
- [16] DILEK H, CEREN D, BANU B. Evaluation of lactic acid bacterial strains of boza for their exopolysaccharide and enzyme production as a potential adjunct culture[J]. Process Biochemistry, 2014, 49(10): 1587–1594.
- [17] ZOU Xiang. Optimization of nutritional factors for exopolysaccharide production by submerged cultivation of the medicinal mushroom *Oudemansiella radicata*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2005, 21(6–7): 1267–1271.

Comments on Perfection of Food Safety System of Civil Liability ——and Relevant Provisions of Newly Revised “Food Safety Law”

LIU Junjun, CHEN Hengping

(School of Law, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China)

Abstract: In this paper, the civil liability system about food safety is researched based on the revised “Food Safety Law”. Revised “Food Safety Law” reflects the country’s determination to punish illegal acts of food, and unremitting efforts to create a good environment of food safety. The new “Food Safety Law” strengthens the administrative supervision of food safety, which can help the government to better control all aspects of food production and operation. At the same time, the administrative liability and criminal liability are closer, which will have more deterrent forces for food business criminals. For Chinese food safety problems, much more attentions are paid on executive not civil and the role of civil liability has not been given enough attentions. We should realize the necessity of reconstruction of the food safety civil liability system. From the respect of revised “Food Safety Law”, problems in our existing civil liability system are surveyed. We suggest that civil liability should be added in “Food Safety Law” and the fault-presuming principle should be applied. Meanwhile, the detailed rules of public litigation should be definite.

Key words: food safety; civil liability system; improving measures

(责任编辑:檀彩莲)

(上接第 49 页)

Optimization of Fermentation Conditions of *Lactobacillus Plantarum* YW11 for Exopolysaccharides Production

CAO Yongqiang, WANG Ji, ZHAO Xiao, YANG Zhennai*

(School of Food and Chemical Engineering/Beijing Laboratory of Food Quality and Safety,
Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China)

Abstract: The fermentation conditions for producing exopolysaccharides by *Lactobacillus plantarum* YW11 isolated from Tibetan Kefir were optimized. The experiment factors and levels were firstly selected by the single-factor test. And then, the influences of significant factors were evaluated using a fractional factorial design. Using the yield of exopolysaccharides as the optimization index, a quadratic polynomial regression equation forecasting model was set up by designing a Box-Behnken design involving of three factors and three levels and the method of response surface analysis, thus the optimized extraction conditions were obtained. The optimized results by the single factor test showed that: fermentation time 18 h, carbon source of lactose (15 g/L), nitrogen source of soy peptone (15 g/L), fermentation temperature of 32 °C, inoculation rate of 3% and pH of 6.0. The significant factors at the analysis range were: soy peptone, pH and inoculation rate, and the fermentation conditions optimized by response surface analysis were as follows: soy peptone concentration of 13.50 g/L, inoculation rate of 2.70%, and pH of 6.27. The exopoly saccharides yield under the optimal condition was 131.26 mg/L, near the theoretical value (129.915 mg/L).

Key words: *Lactobacillus plantarum*; exopolysaccharides; fermentation conditions; response surface analysis

(责任编辑:李 宁)