

应用数学统计法优化副干酪乳杆菌 HD1.7 固定化细胞制备和产细菌素发酵

陈建伟, 李秀凉, 殷博¹, 刘国明, 王昆, 平文祥*

(¹ 黑龙江大学生命科学学院, 微生物黑龙江省高校重点实验室, 哈尔滨 150080)

摘要 【目的】应用数学统计法对副干酪乳杆菌 HD1.7 的固定细胞制备和发酵条件进行优化, 以提高细菌素产量。【方法】用 2^{6-2} 部分因子分析法筛选对细菌素产量影响显著的因子, 发现海藻酸钠浓度、接种量和发酵时间对细菌素的产生影响显著。利用最陡爬坡法逼近最大响应区域。用 Box-Behnken 设计确定最佳海藻酸钠浓度、接种量和发酵时间, 并进行分批重复发酵。【结果】固定化生产细菌素的最佳条件是海藻酸钠浓度 2.8%、CaCl₂ 浓度 5%、固定化时间 4 h、菌体包埋量 1/20、发酵时间 63 h 和固定化细胞的接种量 8.2%, 在此基础上用固定化细胞进行分批重复发酵, 每批细菌素的发酵周期为 24 h。【结论】通过对固定化细胞制备和发酵条件的优化, 固定化细胞在 327 h 的分批重复发酵中细菌素的总体产量比游离细胞提高了 19%, 发酵液中无明显细胞渗漏现象且实现了细胞的重复利用, 为细菌素的进一步研究和最终提取奠定了基础。

关键词: 数学统计法, 副干酪乳杆菌 HD1.7, 固定化, 细菌素, 优化

中图分类号: Q933-3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2009)05-0664-08

细菌素是由某些细菌在代谢过程中通过核糖体合成机制产生的一类具有抑菌生物活性的多肽、蛋白质或蛋白质复合物, 能抑制或杀死多种革兰氏阳性细菌, 包括金黄色葡萄球菌、李斯特菌等在内的引起食品腐败、变质的致病菌和腐败菌, 而不影响食品性状, 甚至能改善食品特性^[1]。因此使得细菌素具有潜在的作为天然食品防腐剂而受到广泛关注。截至目前已发现的细菌素有几十种, 然而只有 Nisin 一种被公认为安全, 并在乳制品、罐头制品及高蛋白食品等的防腐保鲜中得到了广泛应用。目前, 国内外学者进行了大量的研究, 以期筛选出广谱高效的细菌素及其产生菌^[2]。

固定化细胞是在固定化酶的研究和应用的基础发展起来的新技术^[3], 具有反应速度快、自动化以及

实现细胞的重复使用等特点, 因此在食品饮料、酶制剂、抗生素、辅酶等的发酵生产中具有广泛的应用^[4]。响应面分析相关数学统计法是利用合理的试验设计了解各影响因素之间的关系, 并建立相应的数学模型, 通过对数学模型的分析而达到优化目的, 从而减少试验次数以最经济的方式获取所需结论。目前已广泛地应用于农业、生物、食品、化学、制造等领域^[5]。

本实验室分离得到一株产细菌素的菌株, 经 16S rDNA 鉴定为 *Lactobacillus paracasei* HD1.7(副干酪乳杆菌 HD1.7, 简称 *Lb.p.* HD1.7)。该细菌素的相对分子质量初步确定为 14000 左右, 安全无毒^[6], 能杀死或抑制金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、蜡状芽孢杆菌、沙门氏菌、铜绿假单胞菌、幽门螺杆菌等病原

基金项目: 黑龙江省科技公关项目(2005G4192-00); 黑龙江发改委重大攻关课题[2002]1199)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-451-86608046; E-mail: wenxiangping@yahoo.cn

作者简介: 陈建伟(1983-)男, 黑龙江省鸡西市人, 硕士研究生, 主要从事微生物方面的相关研究。E-mail: cjlw983617@yahoo.cn

收稿日期: 2008-11-19 修回日期: 2009-02-07

菌和食品腐败菌,甚至能够有效地作用于大肠杆菌^[7],具有 Nisin 所不具备的抗革兰氏阴性菌活性,从而显示出了其独特的优越性,因而是一株在防腐剂领域很有应用前景并值得加以研究的细菌素产生菌。本文以海藻酸钙为材料,对 *Lb. p.* HD1.7 菌细胞进行固定化,采用响应面等相关数学统计方法对影响细菌素的关键因素进行考察和评估后,同时对产细菌素条件和细胞循环使用次数进行优化,并在此基础上,进行分批重复发酵,以期为该细菌素的进一步研究和应用打下坚实的基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种:发酵菌株 *Lb. p.* HD1.7 和指示菌 *Micrococcus luteus*(藤黄微球菌)均为黑龙江大学微生物重点实验室保存。

1.1.2 培养基:①种子培养基:酵母粉 0.26%、牛肉膏 0.88%、蛋白胨 1.5%、葡萄糖 2.45%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.06%、吐温 80 0.1%、 $MnSO_4$ 0.005%、 K_2HPO_4 0.2%、乙酸钠 0.5%、柠檬酸铵 0.2%,pH 6.0~6.5。②发酵培养基:种子培养基去除 K_2HPO_4 、乙酸钠和柠檬酸铵。指示菌培养基:牛肉膏蛋白胨培养基^[8]。

1.1.3 主要试剂和仪器:海藻酸钠、蛋白胨、牛肉膏、酵母粉、葡萄糖及各种无机盐均为国产试剂,购自哈尔滨佳实生物科技有限公司,Nisin 购自 Sigma 公司,常温离心机 LG10-2.4A 购自北京医用离心机厂,UV755B 紫外分光光度计和 ZDX-35B 型座式自控电热压力蒸汽灭菌器均购自上海精宏试验设备技术有限公司。

1.2 种子液培养

取 0.24 g 湿的 *Lb. p.* HD1.7 接种于装有 200 mL 种子培养基的 500 mL 三角瓶中,37℃ 恒温静止培养 24 h 后,2227.5 × g 离心 15 min 4℃ 备用。

1.3 固定化细胞的制备

将海藻酸钠溶于生理盐水中,1 × 10⁵ Pa 灭菌 20 min,冷却至室温,与菌体混合均匀,用 1 mL 无菌注射器缓慢滴入一定浓度的 $CaCl_2$ 溶液中,形成 2 mm~2.5 mm 的固定化颗粒,放置一段时间使颗粒稳定成形,再用无菌生理盐水冲洗 3 次,即得到固定化细胞。

1.4 部分因子试验设计(Fractional Factorial Design, FFD)

根据单因素结果(略),依次考察 $CaCl_2$ 浓度/%、

海藻酸钠浓度/%、固定化时间/h、固定化颗粒接种量/%、发酵时间/h 和菌体包埋量(菌胶比,离心后湿菌体重量 g/海藻酸钠胶体体积 mL)对细菌素产量的影响,采用 6 因素 2 水平的 1/4 部分因子试验设计,筛选对细菌素产量影响显著的因素,并通过逐步回归分析,获得多元一次回归方程。

1.5 最陡爬坡试验

按照部分因子设计法筛选影响产细菌素的主要因素,按文献[9]做最陡爬坡试验。

1.6 Box-Behnken 试验设计

根据 Box-Behnken 方案进行试验所获得各自变量实际值 X_i 和统计分析中的编码值 x_i 存在着以下关系: $x_i = (X_i - X_0) / \Delta X_i$, 式中 X_0 为试验中心点处自变量的真实值, ΔX_i 为自变量变化步长。获得用于建立优化细菌素产量与细胞循环使用次数的数学模型的变量编码值(x_i)。利用公式: $Y = c_0 + \sum_{i=1}^n a_i x_i + \sum_{i < j}^n b_{ij} x_i x_j$ (Y 为预测响应值; x_i 和 x_j 为自变量编码水平; c_0 为常数项; a_i 为线性系数; b_{ij} 为二次项系数; n 为因子数)^[10-13]获得所需的优化细菌素产量和细胞循环使用次数的数学模型。根据模型方差分析和可行度分析确定模型的可行性和适用性后,得出产细菌素和细胞循环使用次数的最佳条件,并进行验证试验。

1.7 固定化细胞的增殖和分批重复发酵

将固定化颗粒按 8.2% 的接种量接入发酵培养基中,37℃ 静止培养 63 h,完成菌体的增殖培养后,将固定化颗粒在无菌条件下过滤,经无菌生理盐水和新鲜培养基洗涤后,加入新鲜培养基,37℃ 静止培养 24 h,完成第二个循环,再次更换培养基并在同样条件下培养,进入下一个循环,进行分批重复发酵。测定不同时间间隔内固定化细胞溢出游离细胞数、细菌素活性。并以同等条件下的游离细胞作对照。

1.8 细菌素活性的测定

将发酵液用 1 mol/L HCl 调 pH 为 2.0,4℃ 静置 1 h,使细菌素解吸附。2227.5 × g 离心 15 min,取 10 mL 上清液,用 1 mol/L NaOH 调 pH 为 4.0。发酵液上清液中细菌素效价的分析采用琼脂扩散法^[14],所有试验均重复 3 次,并以空白培养基作为对照。

2 结果

2.1 显著影响因子的筛选

用部分因子分析法筛选影响细菌素产量的主要

因素,试验设计及结果见表1。采用 SAS8.1 软件对试验数据进行分析(表2、3),获得多元一次拟合回归方程: $Y = 414.49 + 4.72X_1 - 11.825X_2 + 1.635X_3 - 10.03X_4 - 13.45X_5 - 6.43X_6$, 此模型的 P 值为 0.040423 小于 0.05, 证明此模型显著, 其中

95.25% 的数据可以用此模型解释 ($AdjR^2 = 95.25%$); P 值小于 0.05 的因素有海藻酸钠浓度、接种量和发酵时间, 表明 3 种因素对细菌素产量影响显著。

表 1 N = 16 的部分因子试验结果

Table 1 Experimental results for FFD as N = 16

Run	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	Y(AU/mL)
1	1(5%)	-1(2%)	-1(2h)	-1(5%)	-1(56h)	-1(1/20)	215.6
2	1	-1	-1	-1	1(66h)	-1	210.7
3	-1(3%)	1(3.25%)	-1	-1	1	1(1/15)	195.56
4	1	1	-1	-1	-1	1	199.7
5	-1	-1	1(4h)	-1	1	1	220.68
6	1	-1	1	-1	-1	1	227.56
7	-1	1	1	-1	-1	-1	215.22
8	1	1	1	-1	1	-1	213.06
9	-1	-1	-1	1(10%)	-1	1	216.64
10	1	-1	-1	1	1	1	199.1
11	-1	1	-1	1	1	-1	195.22
12	1	1	-1	1	-1	-1	218.9
13	-1	-1	1	1	1	-1	188.5
14	1	-1	1	1	-1	-1	226.48
15	-1	1	1	1	-1	1	191.66
16	1	1	1	1	1	1	181.34

X₁: the concentration of CaCl₂, X₂: the concentration of sodium alginate, X₃: immobilization time, X₄: inoculation volume, X₅: culture time, X₆: the density of entrapped cells, Y: bacteriocin activity.

表 2 回归方程方差分析表

Table 2 Variance analysis of regression equation

Source	DF	SS	MS	F	Pr ob > F
Model	13	3016.978	232.0752	24.15814	0.040423
Error	2	19.213	9.6065		
Total	15	3036.191			

$R^2 = 99.37%$ $AdjR^2 = 95.25%$

表 3 回归方程系数显著性检验

Table 3 Regression coefficients and their significance of the squadratic model

Term	Estimate	Std Err	T	Prob > t
X ₁	4.72	1.549718	3.045716	0.093006
X ₂	-11.825	1.549718	-7.63042	0.016745
X ₃	1.635	1.549718	1.055031	0.402044
X ₄	-10.03	1.549718	-6.47215	0.023051
X ₅	-13.45	1.549718	-8.679	0.013017
X ₆	-6.43	1.549718	-4.14914	0.053471

2.2 最陡爬坡路径

由表 3 可知海藻酸钠浓度、发酵时间、接种量有显著负效应, 其添加量应减少。而其他因素的取值则根据正效应因素均取较高值、负效应因素均取较低值(即 CaCl₂ 浓度 5%、固定化时间 4 h、菌体包埋

量 1/20)。变化步长则根据各因素效应值的大小确定, 以能快速、经济地逼近最大细菌素产生区域。试验设计及结果见表 4, 由表 4 可知最优条件在第 2 组和第 4 组之间, 故采用海藻酸钠浓度 2.75%、发酵时间 62 h、接种量 8% 为后续响应面试验的中心点。

表 4 最陡爬坡试验设计及结果

Table 4 Experimental designs and the results of steepest ascent

No.	Sodium alginate/%	Culture time /h	Inoculation volume/%	Bacteriocin /AU/mL
1	3.25	66	10	207.48
2	3	64	9	215.60
3	2.75	62	8	258.26
4	2.5	60	7	235.93
5	2.25	58	6	227.89
6	2	56	5	235.66

2.3 Box-Behnken 试验结果

根据以上结果, 获得影响细菌素产量的主要因素及变量水平的数据(表 5)。采用 SAS8.1 软件进行 Box-Behnken 试验对影响细菌素产量和细胞循环使用的关键工艺参数进行最佳水平探索。共 15 次试验, 其中 12 个析因试验, 3 个为中心点处重复试

验的细菌素产量和细胞循环使用次数的结果见表 6。

表 5 Box-Behnken 试验设计因素水平及编码

Table 5 Levels and codes of variables for Box-Behnken

Factors	Encode	Levels		
		-1	0	1
Sodium alginate/%	X ₁	2.5	2.75	3
Inoculation volume/%	X ₂	7	8	9
Culture time/h	X ₃	60	62	64

表 6 Box-Behnken 试验设计及细菌素与细胞循环使用次数的实测值与预测值

Table 6 Box-Behnken experimental design and measured and predicted values of bacteriocin and the number of cell cycle

Run	X ₁	X ₂	X ₃	Y ₁ : bacteriocin(AU/mL)		Y ₂ : the number of cell cycle	
				Measured value	Predicted value	Measured value	Predicted value
1	0	-1	-1	159.4	159.72	12.3	12.15
2	-1	-1	0	190.53	184.61	11.3	11.21
3	1	-1	0	231.71	232.19	12.7	12.81
4	0	0	0	301.93	290.13	12.6	12.47
5	0	1	-1	168.84	163.72	11.3	11.18
6	0	0	0	283.41	290.13	12.4	12.47
7	-1	0	1	200.66	201.46	11	10.96
8	0	-1	1	211.33	216.45	11.3	11.43
9	0	1	1	264.5	264.19	11.5	11.65
10	-1	0	-1	169.82	175.43	10.6	10.84
11	-1	1	0	216.25	215.77	11.6	11.49
12	1	0	-1	165.95	165.15	12	12.04
13	1	0	1	301.93	296.32	11.9	11.66
14	0	0	0	285.05	290.13	12.4	12.47
15	1	1	0	246.85	252.77	11.7	11.79

得到各因素的回归系数(表 7)。并获得拟合二次多项式回归方程：

细菌素产量优化数学模型：

$$Y_1 = 290.13 + 21.1475X_1 + 12.93375X_2 + 39.30125X_3 - 30.11125X_1^2 - 2.645X_1X_2 + 26.285X_1X_3 - 38.68375X_2^2 + 10.9325X_2X_3 - 50.42875X_3^2 \quad (1)$$

细胞循环使用次数优化数学模型：

$$Y_2 = 12.46667 + 0.475X_1 - 0.1875X_2 - 0.0625X_3 - 0.433333X_1^2 - 0.325X_1X_2 - 0.125X_1X_3 - 0.208333X_2^2 + 0.3X_2X_3 - 0.658333X_3^2 \quad (2)$$

上述模型方程既表达了单个因素对细菌素产量(Y₁)或细胞循环使用次数(Y₂)的作用也再现了两因素的交互作用。

对回归方程(1)的统计分析结果如表 7 所示,结果表明回归模型显著(P=0.000218),失拟项不显著(P=0.6764),其中单一 X₁、X₂ 或 X₃ 对细菌素产量有极显著的正效应(P<0.01),二次项有极显著的负效应(P<0.01),X₁ 与 X₂、X₂ 与 X₃ 的交互作用对细菌素的产量无显著影响(P>0.05)。对回归方程(2)的方差分析结果表明,回归模型显著(P=0.008216),失拟项不显著(P=0.1503),其中单一 X₁ 对细胞循环使用次数有极显著的正效应(P<0.01),X₁²、X₁ 与 X₂、X₂ 与 X₃ 的交互作用显著(P<0.05),X₃² 对细胞循环使用次数有非常显著的负效应(P=0.002596)。方程(1)决定系数 R²=0.9892,方程(2)决定系数 R²=0.9523,可以看出表示数学模型预测得到的结果的点与实际试验结果很接近(表 6)表明两个数学模型能很好的解释和预测海藻酸钠浓度、接种量和发酵时间这些条件变化时对细菌素产量和细胞循环使用次数的影响。

根据 Box-Behnken 试验的 15 个试验结果经计算

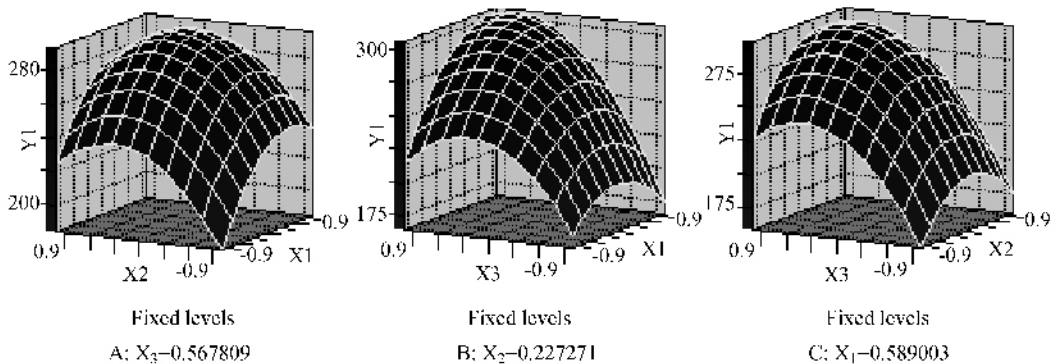


图 1 细菌素效价的响应面

Fig.1 Response surface methodology of bacteriocin activity. A : sodium alginate(X₁) vs. inoculation volume(X₂) with constant levels of culture time(X₃); B : sodium alginate vs. culture time with constant levels of inoculation volume(X₂); C : inoculation volume vs. culture time with constant levels of sodium alginate(X₁).

求解方程(1)与(2),细菌素产量与细胞循环使用次数最大预测值分别为 310.601 AU/mL 和 13 次(如图 1、2)。通过对两方程联合求解,同时获得最大预测的细菌素产量与细胞循环使用次数为 308.97 AU/mL 和 12.2 次。此时海藻酸钠浓度为 2.9%、接种量为 8.2%、发酵时间为 63 h。为了进一步验证试

验结果,在优化条件下进行重复试验 3 次,分别得到细菌素产量与细胞循环使用次数分别为 307.78 AU/mL 和 12.1 次、311.12 AU/mL 和 12 次、310.32 AU/mL 和 12.1 次,试验结果验证了方程的可靠性与统计学方法的有效性。

表 7 基于 Box-Behnken 试验的各因素回归系数和统计学分析结果

Table 7 Results of the regression coefficients of factors and their statistical analysis based on Box-Behnken design

Response	Source	DF	SS	MS	F	Pr > t	Estimate	StdErr
Y ₁	X ₁	1	3577.734	3577.734	44.99052	0.001115	21.1475	3.152815
	X ₂	1	1338.255	1338.255	16.82875	0.009334	12.93375	3.152815
	X ₃	1	12356.71	12356.71	155.3874	0.0001	39.30125	3.152815
	X ₁ ²	1	3347.769	3347.769	42.09867	0.001297	-30.11125	4.640818
	X ₁ X ₂	1	27.9841	27.9841	0.351904	0.578851	-2.645	4.458754
	X ₁ X ₃	1	2763.605	2763.605	34.75273	0.001997	26.285	4.458754
	X ₂ ²	1	5525.289	5525.289	69.48131	0.000406	-38.68375	4.640818
	X ₂ X ₃	1	478.0782	478.0782	6.011902	0.0578	10.9325	4.458754
	X ₃ ²	1	9389.756	9389.756	118.0775	0.000115	-50.42875	4.640818
	Lack of Fit	3	187.40	62.47	0.59	0.6764		
	Error	5	397.6098	79.52196				
	Total	14	36934.21					
	Model	9	36536.6	4059.622	51.05033	0.000218		
Y ₂	X ₁	1	1.805	1.805	34.82315	0.001988	0.475	0.080493
	X ₂	1	0.28125	0.28125	5.426045	0.067263	-0.1875	0.080493
	X ₃	1	0.03125	0.03125	0.602894	0.472589	-0.0625	0.080493
	X ₁ ²	1	0.693333	0.693333	13.37621	0.014635	-0.433333	0.118483
	X ₁ X ₂	1	0.4225	0.4225	8.151125	0.035614	-0.325	0.113835
	X ₁ X ₃	1	0.0625	0.0625	1.205788	0.322211	-0.125	0.113835
	X ₂ ²	1	0.160256	0.160256	3.091764	0.13902	-0.208333	0.118483
	X ₂ X ₃	1	0.36	0.36	6.945338	0.046231	0.3	0.113835
	X ₃ ²	1	1.600256	1.600256	30.87311	0.002596	-0.658333	0.118483
	Lack of Fit	3	0.23	0.078	5.81	0.1503		
	Error	5	0.259167	0.051833				
	Total	14	5.429333					
	Model	9	5.170167	0.574463	11.08289	0.008216		

2.4 固定化细胞的分批发酵和重复使用试验

固定化细胞经 63 h 的增殖培养后,进行分批重复发酵完成第 2~12 循环(即 0~264 h)的培养,并以游离细胞作对照,如图 3 所示。游离细胞发酵培养 48 h,细菌素产量达到最大,约为 438 AU/mL,而后继续培养细菌素产量基本不变。与游离细胞相

比,固定化细胞每 24 h 细菌素产量达到最大,细菌素的生产周期缩短 1/2,其活性约为 308 AU/mL,为游离状态的 70%。细菌素产量与增殖后基本一致,在第 2~8 个循环(即 0~168 h)固定化细胞溢出的游离细胞数较少($OD_{600} < 0.09$),而后稍有增加,固定化细胞仍保持完整,直至 12.2 个循环(约 268 h),

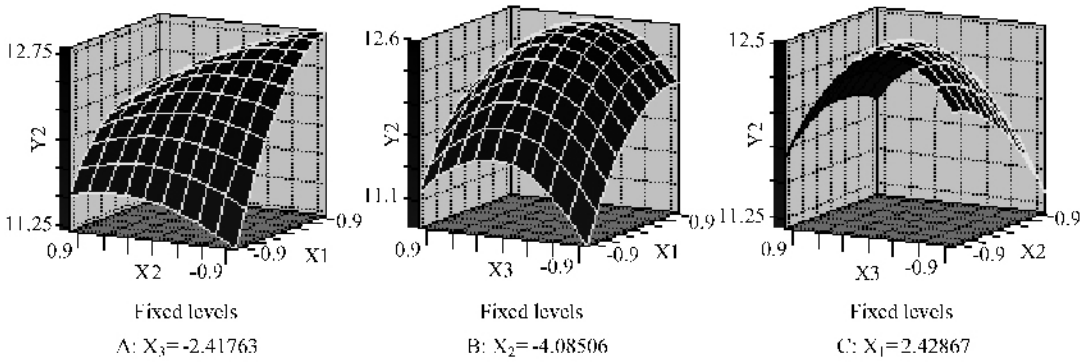


图2 细胞循环使用次数的响应面

Fig.2 Response surface methodology of the number of cell cycle. A: sodium alginate(X_1) vs. inoculation volume(X_2) with constant levels of culture time(X_3); B: sodium alginate vs. culture time with constant levels of inoculation volume; C: inoculation volume vs. culture time with constant levels of sodium alginate

固定化细胞外游离细胞明显增多($OD_{600} = 0.36$),固定化细胞开始破碎。

发酵周期缩短 1/2,固定化细胞可持续发酵 12 个循环。

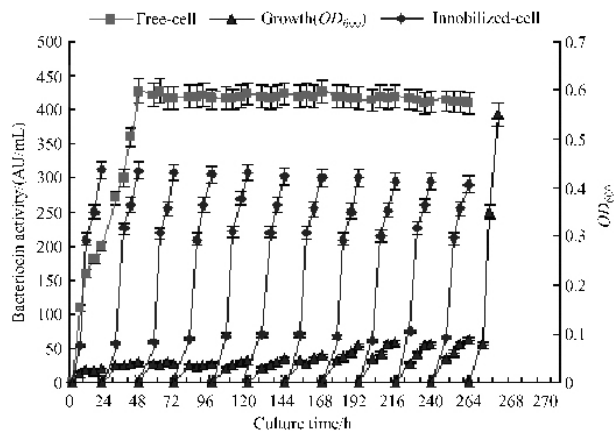


图3 固定化细胞的分批发酵

Fig.3 Bacteriocin production by immobilized beads in repeated batch fermentation.

3 结论

细胞固定化技术已成功地应用于生产微生物酶和其他蛋白质,但此技术用于生产细菌素的国外研究报道较少^[15]。本文以海藻酸钙为包埋剂,利用统计学方法对 *Lb.p.* HD1.7 固定化细胞发酵生产细菌素的条件进行了优化,从而以最经济的方式高效、准确地得到固定化细胞生产细菌素的最佳条件,即海藻酸钠浓度 2.8%、 $CaCl_2$ 浓度 5%、固定化时间 4 h、菌体包埋量 1/20、发酵时间 63 h 和固定化细胞的接种量 8.2%。在此基础上,用固定化细胞进行分批重复发酵,每批细菌素产量约为游离发酵的 70%,

一般而言,细菌素生产与细菌生长基本同步^[16]。与游离细胞相比,固定化增殖细胞最大细菌素产量推迟了 15 h,这与孔健等^[17]的发现相符。其原因可能是固定化细胞内部的微环境、营养物质的运输、代谢产物的反馈抑制作用等因素影响了菌体的生长和细菌素的产生。而第 2~12 个循环中,细菌素的生产周期明显缩短,可见通过固定化细胞的增殖,获得高度密集体积小的生产菌集合体,促使代谢速度加快,发酵周期大为缩短。固定化细菌进行分批发酵生产某些蛋白质类物质时,其产量往往高于游离细胞的发酵水平^[18],但用海藻酸钙固定 *Lb.p.* HD1.7 后,其生产性能降低,原因可能是:海藻酸钙为多聚物,包围在细胞外,影响了物质的扩散,同时 Ca^{2+} 可以与细胞膜成分络合,改变细胞的微环境和生理状态。

据报道海藻酸钙颗粒的循环使用次数从三次到十几次不等^[19]。试验中,通过对细胞循环使用次数的优化,得到了稳定性较好的固定化颗粒,经过 12 个循环的分批重复发酵,颗粒中细胞渗透到固定化珠外的程度仍比较低,得到了较稳定的细菌素活力,说明用固定化 *Lb.p.* HD1.7 生产细菌素是可行的。常规的游离细胞发酵,该细菌素的发酵周期为 48 h,其活力为 438 AU/mL,而经固定化发酵,可进行持续发酵 12 个周期,除第 1 个发酵周期为 63 h 外,第 2~12 个发酵周期均为 24 h,细菌素效价基本不变,约为 308 AU/mL,这表明每 100 mL 发酵液经游离发

酵 48 h, 细菌素的产量为 4.38×10^4 AU, 而经过 327 h (约 7 个发酵周期) 的培养, 细菌素的产量为 31×10^4 AU, 而在同等时间内固定化细胞细菌素的产量为 37×10^4 AU, 细菌素产量提高了 19%。优化结果使细菌素总体产量获得提高、发酵液中游离细胞较少且实现了细胞的重复利用, 有利于该细菌素的分离纯化。尽管细菌素产量仍然较低, 还有许多地方需要完善, 但本文的研究为该细菌素的最终提取和应用提供了一种新的技术和方法。

参考文献

- [1] 张建飞, 李巧贤. 细菌素的研究与应用. 饲料工业 (*Feed Industry*) 2008, 29(4): 7-8.
- [2] 周志江, 韩焯, 韩雪, 等. 从酸白菜中分离出一株产细菌素的乳酸片球菌. 食品科学 (*Food Science*) 2006, 27(4): 89-92.
- [3] 焦中高, 任平国, 徐启宏, 等. 固定化乳酸乳球菌 DL-203 发酵生产 Nisin 的研究. 食品工业科技 (*Science and Technology of Food Industry*), 2005, 10: 148-153.
- [4] Ellaiah P, Prabhakar T, Ramakrishna B, et al. Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry* 2004, 39: 525-528.
- [5] 曹小红, 蔡萍, 李凡, 等. 利用响应面法优化 *Bacillus natto* TK-1 产脂肽发酵培养基. 中国生物工程杂志 (*China Biotechnology*) 2007, 27(4): 59-65.
- [6] 李秀凉, 陈建伟, 张玉娟, 等. 利用 RSM 法优化副干酪乳杆菌 HD1.7 产细菌素发酵培养基. 黑龙江大学自然科学学报 (*Journal of Natural Science of Heilongjiang University*) 2008, 5(5): 621-624.
- [7] Caridi A. Selection of *Escherichia coli*-inhibiting strains of *Lactillus paracasei* subsp. *Paracasei*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2002, 29: 303.
- [8] 沈萍. 微生物学实验. 北京: 高等教育出版社, 2001.
- [9] Pan CM, Fan YT, Xing Y, et al. Statistical optimization of process parameters on biohydrogen production from glucose by *Clostridium* sp. Fanp2. *Bioresource Technology*, 2008, 99(8): 3146-3154.
- [10] Montgomery DC. Design and analysis of experiments. New York: John Wiley & Sons, 1991.
- [11] Vladimir Wsoll. Central composite design a powerful optimization technique for enantioresolution of the rac-11-dihydrooracin-the principal metabolite of the cytostatic drug roacin. *Journal of Biochemical and Biophysical methods*, 2002, 54(3): 377-390.
- [12] Kammoun R, Naili B, Bejar S. Application of a statistical design to the optimization of parameters and culture medium for amylase production by *Aspergillus oryzae* CBS819.72 grown on gruel (wheat grinding by-product). *Bioresource Technology*, 2008, 99(13): 5602-5609.
- [13] Wang YH, Jing a CF, Yang B, et al. Production of a new sea anemone neurotoxin by recombinant *Escherichia coli*: optimization of culture conditions using response surface methodology. *Process Biochemistry*, 2005, 40(8): 2721-2728.
- [14] 李秀凉, 雷虹, 孟博, 等. 肽类抑菌物质效价的测定. 食品科技 (*Food Science and Technology*), 2006, 3: 113-115.
- [15] Desjardins P, Meghrou J, Lacroix C. Effect of aeration and dilution rate on nisin Z production during continuous fermentation with free and immobilized *Lactococcus lactis* UL719 in supplemented whey permeate. *International Dairy Journal* 2001, 11: 943-951.
- [16] 李景良, 宋达丰, 顾青. 植物乳杆菌 ZJ316. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2008, 48(6): 818-823.
- [17] 孔健, 庄续亮, 马桂荣. 固定化乳酸乳球菌连续生产 Nisin 的研究. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2001, 41(6): 731-735.
- [18] Jamuna R, Ramakrishna SV. Continuous synthesis of thermostable α -amylase by *Bacillus* cells immobilized in calcium alginate. *Enzyme and Microbial Technology*, 1992, 14(1): 36-41.
- [19] 魏东芝, 王筱兰, 陈少欣, 等. 固定化嗜热脂肪芽孢杆菌连续合成半乳糖寡糖的研究. 生物工程学报 (*Chinese Journal of Biotechnology*), 2000, 16(3): 392-395.

Statistical methods to optimize immobilization and bacteriocin production by *Lactobacillus paracasei* HD1.7

Jianwei Chen, Xiuliang Li, Bo Yin, Guoming Liu, Kun Wang, Wenxiang Ping*

(Education Department Key Microbiology Lab, College of Life Science, Heilongjiang University, Harbin 150080, China)

Abstract [Objective] To enhance bacteriocin production by *Lactobacillus paracasei* HD1.7 immobilized with calcium alginate gel by statistical methods. **[Methods]** A 2^{6-2} two-level fractional factorial design was employed first where 6 variables were studied for their influence on bacteriocin production. The concentration of sodium alginate, inoculation volume and culture time were the most significant variables to improve bacteriocin production. The greatest response area was estimated by the design of steepest ascent approach. A three-level Box-Behnken factorial design was employed for maximizing the bacteriocin production and the number of cell cycle. The repeated batch fermentation using immobilized cells was done. **[Results]** The optimal condition for bacteriocin production and the number of cell cycle was with sodium alginate 2.8%, CaCl_2 5%, immobilization time 4 h, the density of entrapped cells 1/20, culture time 63 h and inoculation volume 8.2%. The period of fermentation was 24 h of a batch fermentation after 63 h and bacteriocin production was 70% of free-cell fermentation. **[Conclusion]** After optimizing, the total production of bacteriocin was increased by 19% using the batch fermentation during 327 hours, the beads were intact with little cell leakage and repeatedly used, which laid foundation for the high study of bacteriocin and finally extracted.

Keywords: the method of mathematic statistics; *Lactobacillus paracasei* HD1.7; immobilization; bacteriocin; optimization

(本文责编:张晓丽,谷志静)

Supported by the Programs for Science and Technology Development of Heilongjiang Province(2005G4192-00) and the Important Items of Heilongjiang Development and Reform Commission([2002]1199)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-451-86608046; E-mail: wenxiangping@yahoo.cn

Received: 19 November 2008/Revised: 7 February 2009

科学出版社新书推介(2009-04)

探索大脑 优化人生

唐一源 编著

978-7-03-023185-7 ¥38.00 2009年2月出版

内容简介:本书结合作者的科研探索,尝试用简单的语言来介绍脑科学的最新进展以及在人生各方面的可能应用。首先概述了大脑如何影响我们每天的思想、情绪、行为和人际关系,并扩展到管理领域;其次,提出如何调整大脑和优化人生,并提供给读者基于作者多年科研实践探索而总结的整体身心调节法;最后,介绍了单光子/正电子断层脑扫描技术的基本原理。本书适合于从事医学、心理学、教育学、管理学等领域研究的专业人员及社会各界人士阅读参考。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址 北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编:100717

联系人:周文宇 联系电话:010-64031535

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn> 欢迎致电索要书目