

L.lactis KLDS4.0325 产细菌素发酵培养基的响应面优化

王娜娜, 李婉, 于上富, 刘飞, 霍贵成*

(东北农业大学乳品科学教育部重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150030)

摘要:以分离自新疆牧民家庭自制酸马奶中的乳酸乳球菌 KLDS4.0325 为研究对象, 以大肠杆菌为指示菌, 以抑菌圈直径为考察指标, 通过单因素实验(碳源、氮源及复合氮源)、Plackett-Burman、最陡爬坡实验和 Box-Behnken 实验优化其产细菌素培养基。PB 实验结果表明, 对细菌素产量影响显著的因素有蔗糖、蛋白胨、抗坏血酸钠; 经 Box-Behnken 实验优化后培养基配方为: 128.99 g/L 蔗糖, 17.59 g/L 蛋白胨, 10 g/L 酪蛋白胨, 10 g/L 磷酸氢二钾, 60 g/L 碳酸钙, 1.5 g/L 硫酸镁, 1.49 g/L 抗坏血酸钠, 1.5 g/L β -甘油磷酸钠, 乙酸钠、氯化钠、硫酸锰各为 1.0 g/L; 该条件下抑菌圈直径为 24.76 mm, 效价可达 5000 U/mL, 比优化前提高了 3.31 倍。并经验证实验证明该配方下的实验结果与预测值吻合, 因此该回归模型是切实可行的。

关键词:细菌素, 乳酸乳球菌, 响应面分析法

Optimization of fermentation medium for bacteriocin production of *L.lactis* KLDS4.0325 by response surface methodology

WANG Na-na, LI Wan, YU Shang-fu, LIU Fei, HUO Gui-cheng*

(Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: The fermentation medium composition of *L.Lactis* KLDS4.0325 isolated from self-made koumiss Xinjiang were optimized for bacteriocin production by single factor experiment (carbon source, nitrogen source, different mixed nitrogen sources), Plackett-Burman, The steepest grade test and Box-Behnken design double-plate method. The inhibitory zone diameter (mm) was used as evaluation index and quantified against *Escherichia coli* ATCC 25922. PB Experiment results showed that sucrose, peptone and sodium ascorbate had significant influence on bacteriocin production. And finally the optimal combination of the medium constituents for bacteriocin production was determined as: 128.99 g/L sucrose, 17.59 g/L peptone, 10 g/L casein peptone, 10 g/L K_2HPO_4 , 60 g/L $CaCO_3$, 1.5 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.49 g/L sodium ascorbate, 1.5 g/L β -glycerophosphate, $CH_3COONa \cdot 3H_2O$, NaCl, $MnSO_4$ respectively 1.0 g/L. Under the optimal culture condition, the inhibitory zone diameter was 24.76 mm and the bacteriocin inhibitory activity was increased by 3.31 times and reached up to 5000 U/mL. Meanwhile, the consistent results between the prediction and experiments indicated the established model in this study is feasible.

Key words: bacteriocin; *Lactococcus lactis*; response surface methodology

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2016)07-0137-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2016.07.019

细菌素是细菌核糖体合成的抗菌多肽或蛋白, 能抑制或杀死与产生菌亲缘关系相同或相近的微生物^[1], 它可以作为生物防腐剂应用于食品工业。近几年, 由于细菌素无毒无害(能在胃肠道内被蛋白酶消化), 人们越来越关注其作为生物防腐剂在食品工业中的应用^[2]。现阶段由于细菌素产量的优化和活性的提高能节约生产成本, 因此人们以研究其生产和纯化为主^[3]。

响应面法是一种数据统计方法, 能快速分析影响因子及因子间的相互作用, 该方法已成功地应用在生物技术的许多方面, 包括细菌素产量研究^[4], 刘国荣等^[5]通过响应面法优化弯曲乳杆菌 RX-6 产细菌素的发酵条件, 使效价较优化前提高了 2.46 倍; 魏晋梅等^[6]优化了干酪乳杆菌产细菌素培养基, 使抑菌性能较优化前有了显著提高。因此, 改变菌株的培养基成分、发酵条件及细菌生长期等因

收稿日期: 2015-10-16

作者简介: 王娜娜(1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学, E-mail: wnana1990@163.com。

* 通讯作者: 霍贵成(1958-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品微生物与生物技术, E-mail: ghuo58@126.com。

基金项目: 国家 863 项目(2011AA100902); 国家自然科学基金(31401512)。

素可提高细菌素产量,从而促进其工业化生产及应用。

乳酸乳球菌 KLDS4.0325 是东北农业大学乳品科学教育部重点实验室从中国新疆牧民家庭自制的酸马奶中分离的一株乳酸乳球菌,于 2013 年完成全基因组测序并将序列上传到 Genbank 数据库,登录号为 NC_022593.1^[7],分析全基因组序列发现其含有细菌素合成基因簇,并经前期实验验证该菌株有产细菌素的能力。因此本研究通过响应面法优化 KLDS4.0325 产细菌素的培养基组分,提高其产细菌素的能力,从而为该菌株的工业化生产提供切实的理论依据。

1 材料与方

1.1 材料与仪器

乳酸乳球菌 KLDS4.0325 东北农业大学教育部重点实验室工业微生物菌种保藏中心(KLDS-DICC)保藏;大肠杆菌 *Escherichia coli* ATCC 25922 黑龙江省微生物研究所。

基础发酵培养基:20 g/L 蛋白胨、100 g/L 葡萄糖、10 g/L 磷酸氢二钾、0.5 g/L 硫酸镁、60 g/L 碳酸钙,灭菌条件:115 °C,灭菌 20 min。其中碳酸钙单独灭菌 121 °C, 15 min; LB 培养基:10 g/L 胰蛋白胨、5 g/L 酵母浸粉、10 g/L 氯化钠。

Nisin 标准品、过氧化氢酶 美国 sigma 公司; GL-21M 高速冷冻离心机 上海市离心机械研究所; 恒温培养振荡器 ZHWY-100B SPX-150B、生化培养箱 上海佳胜实验设备有限公司; CHRISTALPHA1-4 型冻干机 MarinChrist 德国。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株的活化及 KLDS4.0325 生长曲线的测定

乳酸乳球菌 KLDS4.0325 活化两代,以 2% 接种量接入 M₁₇ 培养基中,置于 30 °C 培养箱中培养,每 2 h 取样一次,测定 OD₆₀₀、活菌数及 pH。

1.2.2 效价测定 细菌素效价的测定:根据 Cabo 等^[8]的方法以大肠杆菌 ATCC25922 为指示菌,绘制标准效价曲线。

1.2.3 抑菌活性测定 参考于微等人^[9]的方法制备无细胞发酵上清液,即菌液 10000 r/min, 4 °C 离心 15 min,收集上清液,用 6 mol/L NaOH 调 pH 到 6.5,以排除有机酸的干扰;加入过氧化氢酶使其终浓度为 5.0 mg/mL,37 °C 水浴 2 h,以排除过氧化氢的干扰,然后经 0.22 μm 滤膜过滤,除去菌体及其它杂质,然后冷冻干燥浓缩后备用。采用双层平板法^[10]测定无细胞发酵上清液的抑菌活性。

1.2.4 单因素实验 所有单因素实验选取基础发酵培养基,初始 pH 为 7.0,条件均为 2% 接种量,120 r/min,30 °C 发酵 20 h。分别选取 100 g/L 的麦芽糖、半乳糖、乳糖、果糖、甘露醇、蔗糖替代发酵培养基中的葡萄糖作为唯一碳源,通过抑菌实验,确定最佳碳源;在最佳碳源的基础上,进一步确定最佳氮源。在最佳氮源的基础上进行氮源复配,共设计 12 组,分别为(1)蛋白胨与酪蛋白胨各 10 g/L;(2)蛋白胨与牛肉膏各 10 g/L;(3)15 g/L 蛋白胨 + 5 g/L 酪蛋

白胨;(4)15 g/L 蛋白胨 + 5 g/L 牛肉膏;(5)18 g/L 蛋白胨 + 2 g/L 酪蛋白胨;(6)18 g/L 蛋白胨 + 2 g/L 牛肉膏;(7)蛋白胨、酪蛋白胨、牛肉膏分别为 6.67 g/L;(8)蛋白胨、酪蛋白胨、牛肉膏分别为 10、5、5 g/L;(9)蛋白胨、酪蛋白胨、牛肉膏分别为 12、4、4 g/L;(10)蛋白胨、酪蛋白胨、牛肉膏分别为 16、2、2 g/L;(11)蛋白胨、酪蛋白胨、牛肉膏分别为 14、4、2 g/L;(12)蛋白胨、酪蛋白胨和牛肉膏分别为 12、6、2 g/L,确定最佳组合。

1.2.5 Plackett-Burman 实验 根据单因素实验结果,选出蔗糖、蛋白胨以及酪蛋白胨进行 Plackett-Burman 实验设计,并选出磷酸氢二钾、硫酸镁、氯化钠、β-甘油磷酸钠、硫酸锰、抗坏血酸钠、乙酸钠一同为考察对象,实验设计见表 1,选出对抑菌圈直径影响较显著的因素。

表 1 PB 实验因素与水平

Table 1 Factors and levels of PB experiment

变量编号	变量(g/L)	水平	
		低水平(-1)	高水平(+1)
A	蔗糖	55	110
B	蛋白胨	10	15
C	酪蛋白胨	10	15
D	磷酸氢二钾	10	15
E	硫酸镁	1.5	3.0
F	氯化钠	0.5	1.5
G	β-甘油磷酸钠	1.0	2.0
H	硫酸锰	0.5	1.0
J	抗坏血酸钠	0.5	1.5
K	乙酸钠	0.5	1.5

1.2.6 最陡爬坡实验 根据 Plackett-Burman 实验结果,确定各因素的显著性及各显著因素的正负效应,设计最陡爬坡实验的变化路径与变化步长。

1.2.7 中心组合实验 根据上述实验结果确定主要影响因素及其水平进行 Box-Behnken 实验设计,并用 Design-Expert 软件分析实验数据。

表 2 BBD 实验因素及水平

Table 2 Factors and the level table of BBD experiment

因素(g/L)	水平		
	-1	0	1
X ₁ 蔗糖	90	110	130
X ₂ 蛋白胨	12	15	18
X ₃ 抗坏血酸钠	1.2	1.5	1.8

1.2.8 验证实验 为了验证该模型是否可行,以最优培养基配方做验证实验,重复三次,结果取平均值。

1.2.9 数据统计分析 文中所有实验均进行三次重复实验,文中图表运用 Excel 2003 软件进行绘制;数据处理采用 SPSS 软件和 Design-Expert 软件进行统计学分析。

2 结果与讨论

2.1 KLDS4.0325 的生长曲线

由图1可知, KLDS4.0325 在 0~4 h 活菌数增长最快, 而 4~8 h 内活菌数增长趋势变缓; 在 8~20 h 期间, 活菌数基本稳定, 此阶段为稳定期, 细胞代谢产物积累达到最高峰, 是生产的收获期; 在 20~24 h 期间, 活菌数稍有下降, 此阶段为衰亡期。菌株 OD₆₀₀ 变化趋势与活菌数对数值基本一致。pH 由初始 7.0 慢慢下降, 在 8 h 左右开始趋于稳定, 说明菌株生长已进入稳定期。综上, 选取 20 h 为菌株的发酵终点。

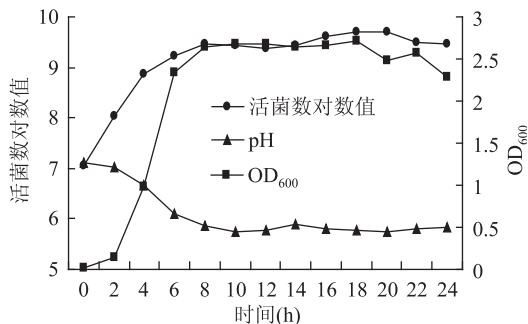


图1 KLDS4.0325 的生长曲线
Fig.1 The grow curve of KLDS4.0325

2.2 细菌素效价标准曲线

细菌素效价标准曲线见图2, 由图2可知, 效价的对数与抑菌圈直径呈线性相关, 回归方程为 $Y = 6.021X + 10.62$, Y 表示抑菌圈直径, X 表示效价对数值, 相关系数 0.994, 符合进一步实验要求。

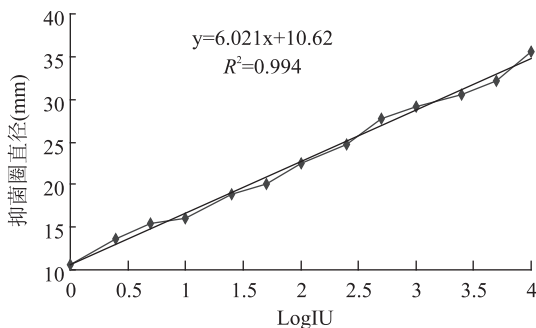


图2 标准效价曲线
Fig.2 Standard titer curve

2.3 单因素实验

2.3.1 碳源选择 碳源既是构成微生物细胞的主要元素, 还能细胞生命活动提供所需的能量来源。由图3可知, 蔗糖作为碳源时抑菌圈直径最大(23.47 mm), 该结果与 V.Suganthi^[11]、闵钟燮^[12] 等人的研究结果相一致, 这可能与菌株合成细菌素时碳源代谢机制有关, 同时以蔗糖为碳源能有效降低工业化生产成本; 而菌株对甘露醇的利用率最低, 这可能因为菌株合成细菌素时对碳源骨架和所需能量类型有要求。因此, 确定蔗糖为最佳碳源。

2.3.2 氮源选择 在最佳碳源的基础上, 选择最佳氮源, 结果如图4, 蛋白胨作为氮源时抑菌圈直径最大, 细菌素产量最高, 该结果与安俊莹^[13]、韩曦^[14] 等人的研究结果相一致, 其次是酪蛋白胨和牛肉膏, 略低于蛋白胨, 但为了满足微生物各种因子的需求, 需进行氮源复配。故选取蛋白胨、酪蛋白胨和牛肉膏进行复配。

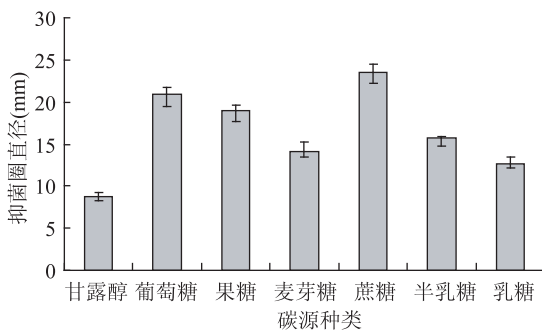


图3 不同碳源对抑菌圈直径的影响
Fig.3 Effect of different carbon sources on inhibitory zone diameter

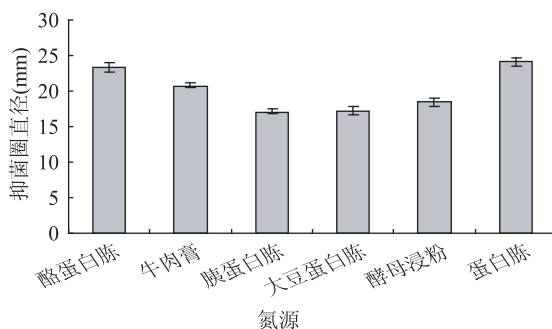


图4 不同氮源对抑菌圈直径的影响
Fig.4 Effect of different nitrogen sources on inhibitory zone diameter

2.3.3 氮源复配 尽管单独添加蛋白胨时细菌素产量很高, 但多种氮源同时使用对菌株生长及细菌素合成都有益处; 另一方面, 氮源复配可以降低培养基成本, 有益于工业化生产。由图5可知, 第1组即 10 g/L 的蛋白胨与 10 g/L 的酪蛋白胨的配比效果最好, 且抑菌圈直径高于单独使用蛋白胨做氮源。这可能由于蛋白胨和酪蛋白胨组合能为菌株提供更为全面的生长因子等微量营养物质, 从而促进细菌素的合成, 与 *Lactobacillus acidophilus*^[15] 相比, 牛肉膏添加量的改变对其抑菌圈直径影响不显著, 这可能由于菌株不同对营养因子类型需求不同。综上, 选取 10 g/L 蛋白胨与 10 g/L 酪蛋白胨复配进行后续实验。

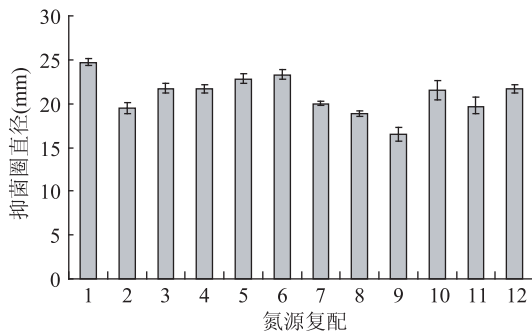


图5 氮源复配对抑菌圈直径的影响
Fig.5 Effect of different mixed nitrogen sources on inhibitory zone diameter

2.4 Plackett-Burman 实验

PB 实验能分析各因素对抑菌圈直径影响的显

表4 Plackett-Burman 实验的回归分析表

Table 4 Regression analysis table of Plackett-Burman design

项目	平方和	自由度	均方	F 值	p 值	显著性
模型	125.91	10	12.59	558.77	0.0329	*
A	64.22	1	64.22	2849.92	0.0119	*
B	26.11	1	26.11	1158.62	0.0187	*
C	0.30	1	0.30	13.35	0.1701	
D	0.026	1	0.026	1.16	0.4764	
E	1.94	1	1.94	85.92	0.0684	
F	0.065	1	0.065	2.86	0.3398	
G	2.45	1	2.45	108.64	0.0609	
H	0.012	1	0.012	0.53	0.5982	
J	27.36	1	27.36	1214.25	0.0183	
K	3.43	1	3.43	152.43	0.0515	*

注: * 表示在 $p < 0.05$ 水平上差异显著。

著性,其结果见表3,回归分析见表4。通过F检验分析模型显著性,当 $\text{Prob} > F$ 值小于0.05时,则该因素对抑菌圈直径有显著影响,F值越大表示该因素对抑菌圈直径影响越大。由结果可知,因素A、B、J对抑菌圈直径有显著影响,其中因素A蔗糖对抑菌圈直径影响最大,其次为因素B蛋白胨和因素J抗坏血酸钠,其它因素不显著,因素E、F、G对抑菌圈直径的影响为负效应,其它因素为正效应。因此,选择A蔗糖、B蛋白胨、J抗坏血酸钠进行最陡爬坡实验设计,优化其添加量。

表3 Plackett-Burman 实验结果

Table 3 The results of Plackett-Burman experimental design

标号	水平										抑菌圈直径 (mm)
	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	
1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	16.41
2	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	19.05
3	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	18.96
4	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	19.49
5	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	22.70
6	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	18.43
7	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	22.25
8	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	25.99
9	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	18.13
10	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	19.33
11	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	25.51
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	14.91

2.5 最陡爬坡实验

最陡爬坡实验可根据各因素的变化路径及步长确定各因素的中心值,实验设计及结果见表5,由于因素A、B、J对抑菌圈直径的影响均为正效应,添加量为从小到大,由表可知,当蔗糖、蛋白胨和抗坏血酸钠添加量逐渐增大时,抑菌圈直径呈现增大后减小的趋势,实验4即蔗糖、蛋白胨和抗坏血酸钠添加量分别为110、15和1.5 g/L时,抑菌圈直径最大。因此选取实验4各水平为中心值进行后续实验设计。

2.6 Box-Behnken 实验设计与分析

以最陡爬坡实验结果各因素水平值为中心值,设计Box-Behnken实验,实验设计及结果如表6,分析结果见表7。运用F检验分析模型是否显著,回归方程为 $Y = 23.83 + 1.37X_1 + 0.71X_2 - 0.31X_3 + 0.60X_1X_2 + 0.035X_1X_3 + 0.21X_2X_3 - 0.99X_1^2 - 0.74X_2^2 - 1.29X_3^2$ 。其中Y为抑菌圈直径, X_1 、 X_2 、 X_3 分别为蔗糖、蛋白胨、抗坏血酸钠,对回归模型进行方差分析, R^2 值为0.9530,方差越接近1表示实验值越接近预测值^[16],说明回归方程的拟合程度良好;失拟项为0.4139,大于0.05,因此回归模型适合;表7中的F值可判断各因素的显著性,F值越大,显著性越高,因此,模型一次项 X_1 、 X_2 显著, X_3 不显著;交互项 X_1X_2 显著, X_1X_3 、 X_2X_3 不显著;二次项 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 均显著,且二次项系数为负值,说明该模型抛物线开口向下,有极大值点,根据回归方程可得Y的最大值为24.79 mm,此时蔗糖128.99 g/L,蛋白胨17.59 g/L,抗坏血酸钠1.49 g/L。当蔗糖、蛋白胨和抗坏血酸添加量增大或减少时,抑菌圈直径都会变小。

表5 最陡爬坡实验设计及结果

Table 5 Experimental design and results of the steepest ascent path

标号	水平			抑菌圈直径 (mm)
	A	B	J	
1	50	6	0.6	16.33
2	70	9	0.9	17.31
3	90	12	1.2	21.82
4	110	15	1.5	24.66
5	130	18	1.8	24.37
6	150	21	2.1	23.43
7	170	24	2.4	23.25

图6a~图6c为抑菌圈直径与蔗糖、蛋白胨、抗坏血酸钠的三维空间响应面图,由图6可知各因素交互作用对抑菌圈直径的影响,响应曲面坡度越陡,则该因素对抑菌圈直径影响越显著,图6a表示两个因素交互项显著,蛋白胨添加量不变时,抑菌圈直径随

表7 回归模型方差分析表
Table 7 Variance analysis for regression equation

项目	平方和	自由度	均方	F 值	p 值	显著性
Model	36.19	9	4.02	15.77	0.0007	**
X ₁	14.93	1	14.93	58.56	0.0001	**
X ₂	3.98	1	3.98	15.59	0.0055	**
X ₃	0.78	1	0.78	3.04	0.1248	
X ₁ X ₂	1.45	1	1.45	5.69	0.0484	*
X ₁ X ₃	4.900E-003	1	4.900E-003	0.019	0.8937	
X ₂ X ₃	0.18	1	0.18	0.71	0.4278	
X ₁ ²	4.15	1	4.15	16.26	0.0050	**
X ₂ ²	2.27	1	2.27	8.92	0.0203	*
X ₃ ²	6.98	1	6.98	27.37	0.0012	**
残差	1.79	7	0.26			
失拟项	0.85	3	0.28	3.11	0.4139	不显著
纯误差	0.94	4	0.23			
总误差	37.98	16				

注:表示在 $p < 0.05$ 水平上差异显著, ** 表示在 $p < 0.01$ 水平上差异极显著才。

蔗糖添加量的增加而增大,当蔗糖添加量不变时,增加蛋白胨的添加量,抑菌圈直径也会增大。同理分析图 6b、6c,发现两图中两因素的交互项分别都不显著。

表6 Box-Behnken 实验设计及结果
Table 6 Design and experimental results of Box-Behnken

编号	X ₁	X ₂	X ₃	抑菌圈直径 (mm)
1	1	-1	0	21.91
2	1	0	1	23.10
3	0	-1	1	20.37
4	0	0	0	23.53
5	0	0	0	23.57
6	-1	0	-1	20.07
7	-1	0	1	19.83
8	0	-1	-1	21.87
9	0	1	1	22.17
10	0	0	0	23.35
11	0	0	0	24.41
12	-1	1	0	21.09
13	0	1	-1	22.82
14	0	0	0	24.29
15	1	1	0	24.56
16	-1	-1	0	20.85
17	1	0	-1	23.20

2.7 验证实验

为检验响应面法所得实验结果的可靠性,以最优化培养基配方做验证实验,重复 3 次,得抑菌圈直径平均值为 24.76 mm,与预测值基本一致,因此证明该方案优化的培养基参数是可靠的,该方案是合理有效的。

响应面法已经成功的应用在许多研究中来提高

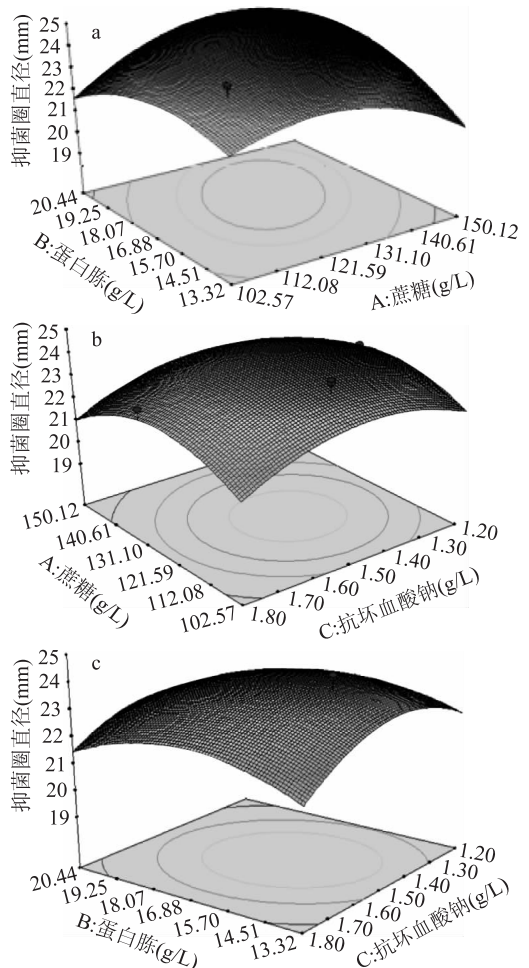


图6 响应面立体分析图

Fig.6 Response surface stereo analysis diagram
细菌素产量^[17-18], V. Suganthi 等^[11] 优化 *Pediococcus pentosaceus* KC692718 产细菌素培养基,使细菌素活性提高了 2 倍; Bing Han 等^[19] 优化 *Lactobacillus plantarum* YJG 产细菌素培养基使其产量提高了 1.4

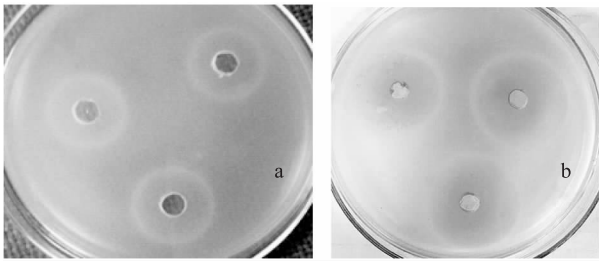


图7 验证实验结果

Fig.7 Result of verification test

注:a为优化前;b为优化后。

倍;葛菁萍等^[20]优化副干酪乳杆菌 HD1.7 产 Paracin1.7 的培养基,优化后效价为 141.648 U/mL,提高了 1.91 倍,但细菌素效价均明显低于本实验菌株,且与 KLDS4.0325 相比,提高倍数也较低。

3 结论

本研究通过单因素实验、Plackett-Burman、最陡爬坡实验和 Box-Behnken 实验优化乳酸乳球菌 KLDS4.0325 产细菌素的培养基组分,经优化细菌素效价为 5000IU/mL,较优化前提高了 3.31 倍,优化后培养基配方为 128.99 g/L 蔗糖,17.59 g/L 蛋白胨,10 g/L 酪蛋白胨,10 g/L 磷酸氢二钾,60 g/L 碳酸钙,1.5 g/L 硫酸镁,1.49 g/L 抗坏血酸钠,1.5 g/L β -甘油磷酸钠,乙酸钠、氯化钠、硫酸锰各为 1.0 g/L,并经验证实验证明该模型合理可靠,同时也为该菌株的进一步研究及工业化生产提供了切实的理论依据。

参考文献

- [1] Cotter P D, Hill C, Ross R P. Bacteriocins: developing innate immunity for food [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3 (10): 777-788.
- [2] Dominguez A P M, Bizani D, Cladera-Olivera F, et al. Cerein 8A production in soybean protein using response surface methodology [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2007, 35 (2): 238-243.
- [3] Mahrous H, Mohamed A, El-Mongy M A, et al. Study Bacteriocin Production and Optimization Using New Isolates of *Lactobacillus* spp. Isolated from Some Dairy Products under Different Culture Conditions [J]. *Food & Nutrition Sciences*, 2013, (4): 342-356.
- [4] Nespolo C R, Brandelli A. Production of bacteriocin-like substances by lactic acid bacteria isolated from regional ovine cheese [J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2010, 41 (4): 1009-1018.
- [5] 刘国荣,张郡莹,王成涛,等.响应面法优化弯曲乳杆菌

RX-6 代谢产细菌素的发酵培养基组成 [J]. *食品科技*, 2013 (3): 2-8.

[6] 魏晋梅,王玉春,张丽,等.干酪乳杆菌产细菌素培养基的优化 [J]. *食品工业科技*, 2015, 36 (7): 177-181.

[7] Yang X, Wang Y, Huo G. Complete Genome Sequence of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KLDS4.0325 [J]. *Genome Announcements*, 2013, 1 (6): 1-2.

[8] Cabo M L, Murado M A, González M P, et al. A method for bacteriocin quantification. [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 1999, 87 (6): 907-914.

[9] 于微,高学军,马春丽,等.干酪乳杆菌产细菌素的生物学特性分析 [J]. *安徽农业科学*, 2014 (32): 11542-11543.

[10] 贡汉生,孟祥晨.1 株产细菌素乳杆菌的鉴定及其所产抑菌物质的特性 [J]. *山东大学学报:理学版*, 2008 (7): 33-39.

[11] Suganthi V, Mohanasrinivasan V. Optimization studies for enhanced bacteriocin production by *Pediococcus pentosaceus* KC692718 using response surface methodology. [J]. *Journal of Food Science & Technology*, 2015, 52 (6): 1-11.

[12] 闵钟煜,岳喜庆,蔡玮璠,等.屎肠球菌 BC-3 产类细菌素发酵培养基的优化 [J]. *食品科学*, 2010, 31: 162-167.

[13] 安俊莹,刘颖,朱雯娟,等.响应面法优化 *Bacillus amyloliquefaciens* ZJHD-06 产类细菌素发酵培养基 [J]. *食品工业科技*, 2014, 35: 191-195.

[14] 韩曦,朱昆,闵钟煜.响应面法优化产细菌素屎肠球菌 BC-3 发酵培养基 [J]. *中国食品添加剂*, 2015, (5): 99-104.

[15] 陈静,何连芳,张玉苍.嗜酸乳杆菌产细菌素培养基及培养条件的优化 [J]. *中国酿造*, 2010, (12): 75-79.

[16] Liu J, Weng L, Zhang Q, et al. Optimization of glucose oxidase production by *Aspergillus niger* in a benchtop bioreactor using response surface methodology [J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2003, 19 (3): 317-323.

[17] Delgado A, López F A, Brito D. Optimum bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* 17.2b requires absence of NaCl and apparently follows a mixed metabolite kinetics [J]. *Journal of Biotechnology*, 2007, 130 (2): 193-201.

[18] Cladera-Olivera F, Caron G R, Brandelli A. Bacteriocin production by *Bacillus licheniformis* strain P40 in cheese whey using response surface methodology [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2004, 21 (1): 53-58.

[19] Han B, Yu Z, Liu B, et al. Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* YJG, isolated from the mucosa of the gut of healthy chickens [J]. *African Journal of Microbiology Research*, 2011, 5 (10): 1147-1155.

[20] 葛菁萍,由田,高先军,等.响应面法优化副干酪乳杆菌 HD1.7 产 Paracin1.7 发酵培养基 [J]. *中国食品学报*, 2011, 11 (7): 110-117.