

牛类芽孢杆菌 BD3526 产抗菌物质培养条件的优化

Optimization on cultivation conditions for antimicrobial substance production by *Paenibacillus bovis* sp.nov. BD3526

花榜清^{1,2} 张秋香¹ 刘振民² 吴正钧²

HUA Bang-qing^{1,2} ZHANG Qiu-xiang¹ LIU Zhen-min² WU Zheng-jun²

(1. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 光明乳业股份有限公司乳业生物技术国家重点实验室, 上海 200436)

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China;

2. State Key Laboratory of Dairy Biotechnology, Bright Dairy and Food Co., Ltd., Shanghai 200436, China)

摘要:为提高牛类芽孢杆菌 BD3526 在麸皮培养基中抗菌物质的产量,以藤黄微球菌为指示菌,抑菌圈直径为指标,分别考察了培养温度、培养时间、种龄、接种量以及麸皮浓度 5 个单因素对抗菌物质产量的影响。其中,培养温度、培养时间、接种量以及麸皮浓度 4 个因素对抗菌物质产量影响显著,故选取该 4 个因素进行响应面法优化。优化后的培养条件为:培养温度 29 ℃、培养时间 73 h、接种量 3.2%、麸皮浓度 4.2%,在该条件下,BD3526 抑菌圈直径为 19.88 mm,抑菌效价相对于优化前提高了 100%。

关键词:牛类芽孢杆菌 BD3526; 抗菌物质; 培养条件

Abstract: In order to increase the production of the antimicrobial substances by *P. bovis* BD3526 in wheat bran broth, the effect of individual fermentation parameter including cultivation temperature, period, inoculum ratio, age of the inoculum and concentration of wheat bran on the inhibitory intensity of the fermented wheat bran broth was determined, employing *Micrococcus luteus* as the indicator. Based on the results of single factor tests, four variables i. e. cultivation temperature, cultivation period, inoculum ratio and concentration of wheat bran were employed to further optimize the fermentation conditions for antimicrobial components production by the strain BD3526 by response surface methodology. The optimal cultivation conditions for BD3526 to produce antimicrobial substance were composed of a cultivation temperature of 29 ℃, a cultivation period of 73 h, an inoculum ratio of 3.2% and a wheat bran concentration of 4.2%. The inhibitory zone of the cultivated wheat bran

broth under the optimal condition on *M. luteus* reached 19.88 mm in diameter, and the potency of bacteriocin produced under the optimal conditions was raised by 100% and 300% as compared to that produced under the original fermentation conditions.

Keywords: *P. bovis* BD3526; antimicrobial substance; cultivation conditions

细菌素是指微生物在代谢过程中通过核糖体合成机制产生的一类具有生物活性的蛋白质或肽类物质,可以杀灭亲缘相近的菌株或抑制其生长^[1]。近年来,细菌素作为有潜力的天然食品防腐剂得到了广泛的研究,乳酸链球菌素(Nisin)是目前唯一应用于食品中的细菌素,其在食品中的应用有助于减少化学防腐剂的使用,降低食品的灭菌强度,有利于产品营养物质的保留,延长食品货架期,使产品具有高品质^[2-3]。乳酸链球菌素在碱性条件下不稳定且难以溶解,从而限制了其应用范围^[4]。本试验所用供试菌株是从西藏自治区牦牛奶中分离得到的,命名为 *P. bovis* BD3526 (CGMCC 8333 = DSM 28815)^[5],前期研究^[6]表明其产生的抗菌物质对藤黄微球菌、金黄色葡萄球菌、单增李斯特杆菌和枯草芽孢杆菌均有抑制作用,且耐酸碱,具有极强的热稳定性,并初步判定其为多肽类抗菌物质,在食品方面有着较大的应用前景。菌株的自身特性是影响其产抗菌物质能力大小的唯一内在因素,此外,发酵条件如培养基中的营养成分^[7-8]、培养温度^[9-10]和培养时间^[11-12]等外在因素对其产抑菌物质的能力大小也具有很大的影响,因此优化发酵条件,是一种有效提高抗菌物质产量的办法^[13-14]。目前还未有关于牛类芽孢杆菌这种新的菌种产抗菌物质能力大小的研究。本试验拟以牛类芽孢杆菌 BD3526 为研究对象,以经济实惠的麸皮为发酵培养基,通过单因素试验得到显著性影响因素,进而通过响应面法优化培养条件,从而获得其产抗菌物质的最佳培养条件,为后期分离纯化以及结构鉴定的研究提供依据。

基金项目:国家“十二五”科技支撑计划(编号:2013BAD18B01);上海市科委项目(编号:16DZ2280600)

作者简介:花榜清,女,江南大学在读硕士研究生。

通信作者:张秋香(1979—),女,江南大学副教授,博士。

E-mail: zhangqx@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2017-01-05

1 材料与方法

1.1 菌种

供试菌株 *P. bovis* BD3526 (CGMCC 8333 = DSM 28815)、指示菌藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*) CGMCC1.1848;乳业生物技术国家重点实验室;

P.bovis BD3526 生长培养基(TYC 固体培养基):胰酪蛋白胨 15 g/L,酵母提取物 5 g/L,蔗糖 50 g/L,无水乙酸钠 20 g/L,氯化钠 1 g/L,碳酸氢钠 2 g/L,硫酸钠 0.1 g/L,*L*-胱氨酸 0.2 g/L,十二水合磷酸氢钠 2 g/L,琼脂 12 g/L;

P.bovis BD3526 种子液培养基(TYC 液体培养基):胰酪蛋白胨 15 g/L,酵母提取物 5 g/L,蔗糖 50 g/L,无水乙酸钠 20 g/L,氯化钠 1 g/L,碳酸氢钠 2 g/L,硫酸钠 0.1 g/L,*L*-胱氨酸 0.2 g/L,十二水合磷酸氢钠 2 g/L;

发酵培养基(麸皮溶液培养基):小麦麸皮 40 g/L;
指示菌培养基(营养琼脂):牛肉膏 1 g/L,酵母膏 2 g/L,蛋白胨 5 g/L,氯化钠 5 g/L,琼脂 15g/L。

1.2 试剂

营养琼脂:上海盛思生化科技有限公司;
胰酪蛋白胨、酵母抽提物:上海拜力生物科技有限公司;
无水乙酸钠、蔗糖、氯化钠、碳酸氢钠、硫酸钠、十二水合磷酸氢钠:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;
L-胱氨酸:上海阿拉丁生化科技股份有限公司;
小麦麸皮:蛋白质 18.6%,脂肪 6.2%,总碳水化合物 63.9%,水分 7.89%,灰分 3.38%,市售。

1.3 仪器与设备

隔水式恒温培养箱:GNP-9270 型,上海精宏实验设备有限公司;
超净工作台:TH-CB-402 型,美国 Labconco 公司;
高压蒸汽杀菌锅:HVE-50 型,日本 Hirayama 公司;
电子天平:TE612-L 型,美国 Sartorius 公司。

1.4 方法

1.4.1 菌株的培养

(1) 供试菌株的培养:将菌株划线接种于 TYC 琼脂平板,30 ℃ 好氧培养 48 h,备用。

(2) 指示菌的培养:指示菌划线接种于营养琼脂固体平板上,30 ℃ 好氧培养 48 h,挑取单菌落于 15 mL 营养肉汤中,于 30 ℃、180 r/min 摇床中培养 20 h,菌液稀释备用。

1.4.2 发酵种子液的制备 挑牛类芽孢杆菌 BD3526 在 TYC 琼脂平板上的单菌落,接种到 20 mL TYC 液体培养基中,于 30 ℃、180 r/min 摇床中培养 16 h,即得种子液。

1.4.3 发酵液的制备 将 *P.bovis* BD3526 TYC 种子液按 3.0 mL/100 mL 接入 40 g/L 麸皮培养基中,装量为 50 mL/250 mL 锥形瓶,于 30 ℃、180 r/min 摇床培养 72 h,即得发酵液。

1.4.4 牛类芽孢杆菌 BD3526 计数方法 取 1 mL 培养后的 BD3526 样品用无菌生理盐水进行 10 倍系列稀释,取 0.1 mL 经过稀释后的菌悬液,采用倾注倒平板的方法、以营养琼脂为培养介质进行计数。待营养琼脂平板凝固后,于 30 ℃ 好

氧培养 24 h 取出,进行计数。

1.4.5 抑菌活性的测定 将发酵液在 6 000 g 下离心 10 min,将菌体和麸皮去除,发酵液上清 60 ℃ 水浴 30 min,将部分菌体灭活,测定发酵上清液的抑菌活性。抑菌活性的测定采用牛津杯法^[15]。将培养好的指示菌菌液与融化后、冷却至 45 ℃ 的营养琼脂混合,使指示菌终浓度为 10⁶ CFU/mL,将培养基倒入平板。待琼脂完全凝固后,在培养基表面放置牛津杯(内径 6 mm、外径 8 mm、高 10 mm 的圆形光滑小管),在杯中加入 100 μL 待检样品,置 30 ℃ 培养 48 h,观察结果。

1.4.6 抗菌物质的效价测定 采用二倍稀释法测定抗菌物质的效价。取牛类芽孢杆菌 BD3526 发酵上清液,用灭菌的生理盐水进行 2 倍梯度稀释,以能够出现抑菌圈的最高稀释度为一个活力单位(1 AU),其倒数即为原发酵液的效价值(AU/mL)。

1.4.7 培养温度和时间对抗菌物质产量的影响 在 40 g/L 麸皮发酵培养基(50 mL/250 mL 三角瓶)中,以 3.0 mL/100 mL 接种量接入活化的牛类芽孢杆菌 BD3526,分别置于 20,25,30,35 ℃ 摇床中进行培养,摇床转速为 180 r/min,分别取不同培养时间点的发酵液进行抗菌物质活性和活菌数量的测定。

1.4.8 种龄对抗菌物质产量的影响 将培养 9,12,15,18,21,24,27 h 的种子液以 3.0 mL/100 mL 的接种量接种到 40 g/L 麸皮培养基中(50 mL/250 mL 三角瓶),于 30 ℃、180 r/min 培养 72 h,发酵结束后,测定活菌数和抗菌活性。

1.4.9 接种量对抗菌物质产量的影响 在 40 g/L 麸皮发酵培养基(50 mL/250 mL 三角瓶)中,分别接入 1.0,2.0,3.0,4.0,5.0 mL/100 mL 活化的牛类芽孢杆菌 BD3526,在 30 ℃、180 r/min 条件下摇床培养 72 h 后,取发酵液进行抗菌活性和活菌数量测定。

1.4.10 麸皮浓度对抗菌物质产量的影响 将 BD3526 种子液按 3.0 mL/100 mL 的接种量分别接入麸皮浓度为 10,20,30,40,50 g/L 的麸皮培养基中(50 mL/250 mL),于 30 ℃、180 r/min 摇床培养 72 h 后,取样测定抗菌物质活性和活菌数。

1.4.11 抗菌物质产量影响因素的响应面优化 在单因素试验结果的基础上,选取显著影响因素,以抗菌物质的抑菌圈直径为响应值,设计响应面试验。每组试验重复 3 次。

1.5 数据处理和分析方法

采用 Design Expert 8. 0 与 SPSS 17.0 软件进行数据处理,并进行显著性分析,其中 P<0.05 表示差异显著,P>0.05 表示差异不显著;运用 Excel 对试验数据绘制表格;运用 Origin 8.0 对试验数据进行绘图。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 培养温度和时间对抗菌物质产量的影响 由图 1 可知,在不同的培养温度和时间下,BD3526 抗菌物质的产量差异显著。当菌株 BD3526 的培养温度为 20 ℃ 时,发酵液活性极低,直到 60 h 才检测出活性,图 2 中此温度下 BD3526 的

活菌数明显较少,菌体处于半休眠状态。随着温度的升高,抗菌物质的抗菌活性增强,当温度为 30 ℃ 时,菌体进入稳定期最早,抗菌效果最好,然而随着温度的继续升高,抗菌物质的产量明显下降。当菌株 BD3526 的培养温度为 25,30,35 ℃ 时,均在 24 h 时检测出活性,随着培养时间的延长抗菌物质产量持续增加,72 h 时产量达到最大值。此后,抗菌物质的抑菌圈直径明显下降,可能是菌体自身产的蛋白酶降解了部分抗菌物质^[16]。在培养时间为 72 h 时,不同培养温度下 BD3526 抗菌物质产量有明显的差异,在 30 ℃ 和 35 ℃ 下,BD3526 的活菌数差异不大,但抗菌物质产量差异较大,表明菌株在适当的培养温度下(25~35 ℃)活菌数的多少对抗菌物质产量没有影响。在本试验中不同培养温度和时间下,菌株 BD3526 所产抗菌物质的生物活性均存在显著差异($P<0.05$),且在 30 ℃,72 h 的培养条件下抗菌活性最大,因此选取培养温度 30 ℃,培养时间 72 h 作为下一步响应面试验的中心试验点。

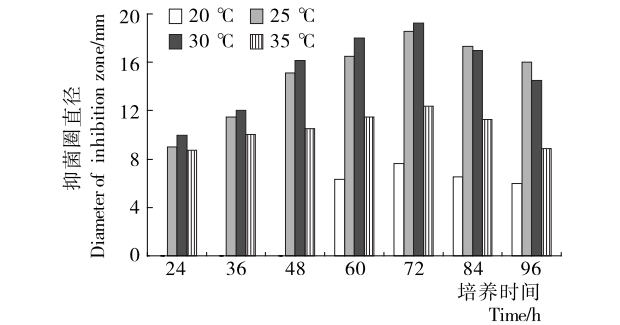


图 1 不同培养温度和时间下发酵液的抑菌圈直径
Figure 1 Diameter of inhibition zone of fermented wheat bran broth with obtained under different cultivation temperature and period

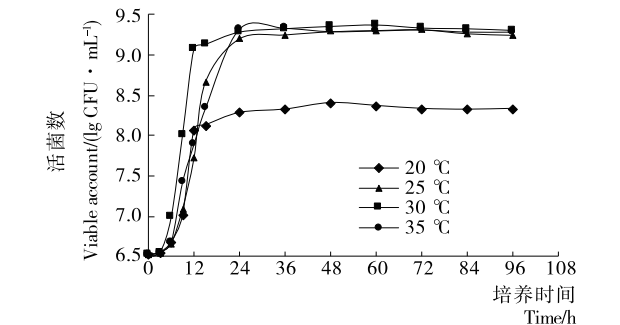


图 2 不同培养温度和时间下发酵液的活菌数
Figure 2 Viable account of fermented wheat bran broth with obtained under different cultivation temperature and period

2.1.2 种龄对抗菌物质产量的影响 由图 3 可知,在 18 h 内随着接种菌龄的增大,抗菌物质的产量逐渐变大。之后,抗菌物质的产量有所降低,方差分析结果显示种龄在 12~27 h 对该抗菌物质的产量影响并不显著($P>0.05$)。因此,在后期的响应面优化试验中未选择种龄作为考察因素。

2.1.3 接种量对抗菌物质产量的影响 由图 4 可知,随着接种量的增加,抗菌物质的产量也逐渐增大,当接种量为 3% 时

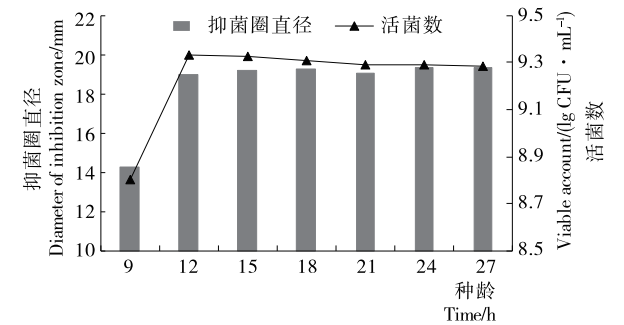


图 3 不同种龄下发酵液的抑菌圈直径及活菌数
Figure 3 Diameter of inhibition zone of fermented wheat bran broth with different inoculum age

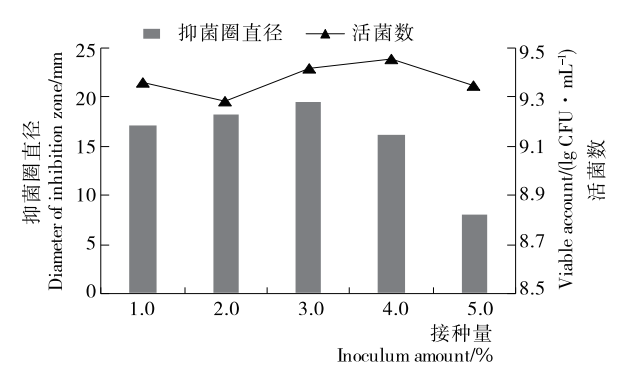


图 4 不同接种量下发酵液的抑菌圈直径及活菌数
Figure 4 Diameter of inhibition zone of fermented wheat bran broth with different inoculum amount

该抗菌物质的抑菌活性最高,随后抗菌活性随接种量增加而下降,接种量对 BD3526 产抗菌物质的影响显著($P<0.05$)。因此选择接种量为 3% 进行下一步的响应面试验。

2.1.4 麸皮浓度对抗菌物质产量的影响 由图 5 可知,随着麸皮浓度的增加,抑菌圈的直径逐渐变大,抗菌物质的产量逐渐增加,当麸皮的浓度达到 4% 时产量最大,继续增加麸皮浓度,抑菌圈直径明显变小,在前期的研究^[17]中发现麸皮浓度的增加有利于 BD3526 产胞外多糖,导致发酵液黏度增加,从而影响溶氧,可能菌体发酵产抗菌物质的能力大小与通氧量有关。因此选择麸皮浓度为 4% 进行下一步的响应面试验。

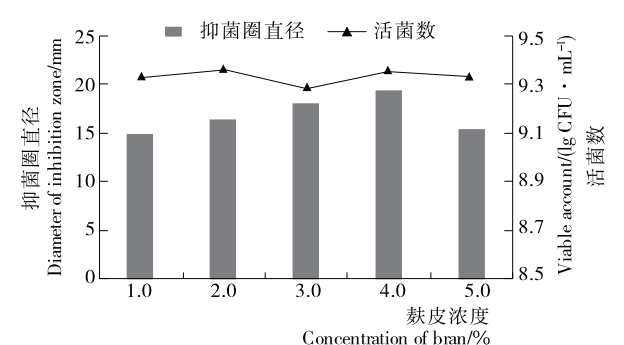


图 5 不同麸皮浓度下发酵液的抑菌圈直径及活菌数
Figure 5 Diameter of inhibition zone of fermented wheat bran broth with different concentration of bran

2.2 抑菌物质产量影响因素的响应面优化

2.2.1 试验结果 在单因素试验结果的基础上,选取培养温度、培养时间、接种量和麸皮浓度 4 个显著影响因素,以抗菌物质的抑菌圈直径为响应值,设计 4 因素 3 水平响的应面试验,见表 1,试验结果见表 2。

表 1 Box-Behnken 试验设计因素水平及编码
Table 1 Factors and their coded levels in Box-Behnken design

水平	A 接种量/ %	B 麸皮 浓度/%	C 培养 时间/h	D 培养 温度/℃
−1	2	3	60	25
0	3	4	72	30
1	4	5	84	35

表 2 发酵条件优化的中心组合设计试验及结果
Table 2 Experimental design and results of central composite design for optimization of fermentation conditions

试验号	A	B	C	D	抑菌圈 直径/mm
1	1	1	0	0	19.04
2	0	0	1	1	16.60
3	1	0	1	0	15.30
4	0	0	0	0	20.22
5	0	0	−1	−1	15.68
6	0	0	0	0	19.88
7	0	1	1	0	17.16
8	0	−1	−1	0	15.38
9	1	0	0	−1	18.52
10	−1	1	0	0	17.16
11	0	0	−1	1	13.46
12	0	0	1	−1	16.54
13	0	0	0	0	19.68
14	0	−1	0	1	17.48
15	0	−1	1	0	16.48
16	1	0	0	1	17.02
17	0	1	0	1	16.80
18	0	−1	0	−1	18.00
19	−1	0	0	1	16.02
20	0	0	0	0	19.52
21	1	0	−1	0	15.82
22	1	−1	0	0	17.64
23	0	0	0	0	19.68
24	−1	0	−1	0	13.06
25	0	1	0	−1	18.08
26	−1	0	1	0	15.82
27	−1	0	0	−1	16.96
28	0	1	−1	0	16.22
29	−1	−1	0	0	17.58

2.2.2 影响抗菌物质产量因素的回归模型建立与显著性分析 利用 Design Expert 8.0 软件对表 2 中的数据进行多元回归拟合,获得的抑菌圈直径(Y)对培养温度、培养时间、接种量和麸皮浓度二次多项式回归模型方程为

$$Y=19.8+0.56A+0.16B+0.69C-0.53D+0.46AB-0.82AC-0.14AD-0.04BC-0.19BD+0.57CD-1.48A^2-0.6B^2-3.03C^2-1.33D^2。$$
(1)

回归模型的决定系数为 0.943 2,说明该模型能够解释 94.32%的变化。失拟项值为 0.144 6,没有达到显著水平,说明非试验因素对试验结果的影响不大,表明该模型能准确模拟各因素对抗菌物质产量的影响。因此,可用此模型对 BD3526 代谢产抗菌物质的发酵条件进行分析和预测。由 F 值(见表 3)可以看出,各因素对抗菌物质产量的影响顺序为:培养时间>接种量>培养温度>麸皮浓度。

表 3 抗菌物质发酵条件优化的回归分析(方差分析)[†]
Table 3 Regression analysis (ANOVA) for optimization of fermentation conditions of antibacterial peptide

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	86.37	14	6.17	34.21	<0.000 1
A	3.79	1	3.79	20.99	0.000 4
B	0.30	1	0.30	1.67	0.217 4
C	5.71	1	5.71	31.68	<0.000 1
D	3.41	1	3.41	18.93	0.000 7
AB	0.83	1	0.83	4.59	0.050 2
AC	2.69	1	2.69	14.92	0.001 7
AD	0.078	1	0.078	0.43	0.520 4
BC	6.40E−03	1	6.40E−03	0.035	0.853 3
BD	0.14	1	0.14	0.80	0.386 0
CD	1.30	1	1.30	7.21	0.017 8
A ²	14.23	1	14.23	78.93	<0.000 1
B ²	2.31	1	2.31	12.79	0.003 0
C ²	59.70	1	59.70	331.08	<0.000 1
D ²	11.45	1	11.45	63.52	<0.000 1
残差	2.52	14	0.18		
失拟项	2.23	10	0.22	3.08	0.144 6
纯误差	0.29	4	0.072		
总和	88.90	28			

[†] P<0.05,差异显著; P<0.01,差异极显著。

2.2.3 响应面分析 4 个显著因素(发酵时间、发酵温度、接种量和麸皮浓度)对抗菌物质产量的交互作用可以由响应面图和等高线图直观地看出(图 6)。其中各图表示当 A、B、C、D 中任意两个变量取零水平时,其余两个变量对抗菌物质产量的交互影响。

由图 6 可知,培养温度、培养时间、接种量和麸皮浓度两两之间均有比较明显的交互作用,其中培养时间与接种量、培养时间与培养温度之间的交互作用最明显。回归方程存在稳定点,即极大值点。通过软件分析得出 BD3526 产抗菌物质的最佳条件为:培养温度 28.91 ℃、培养时间 73.44 h、接

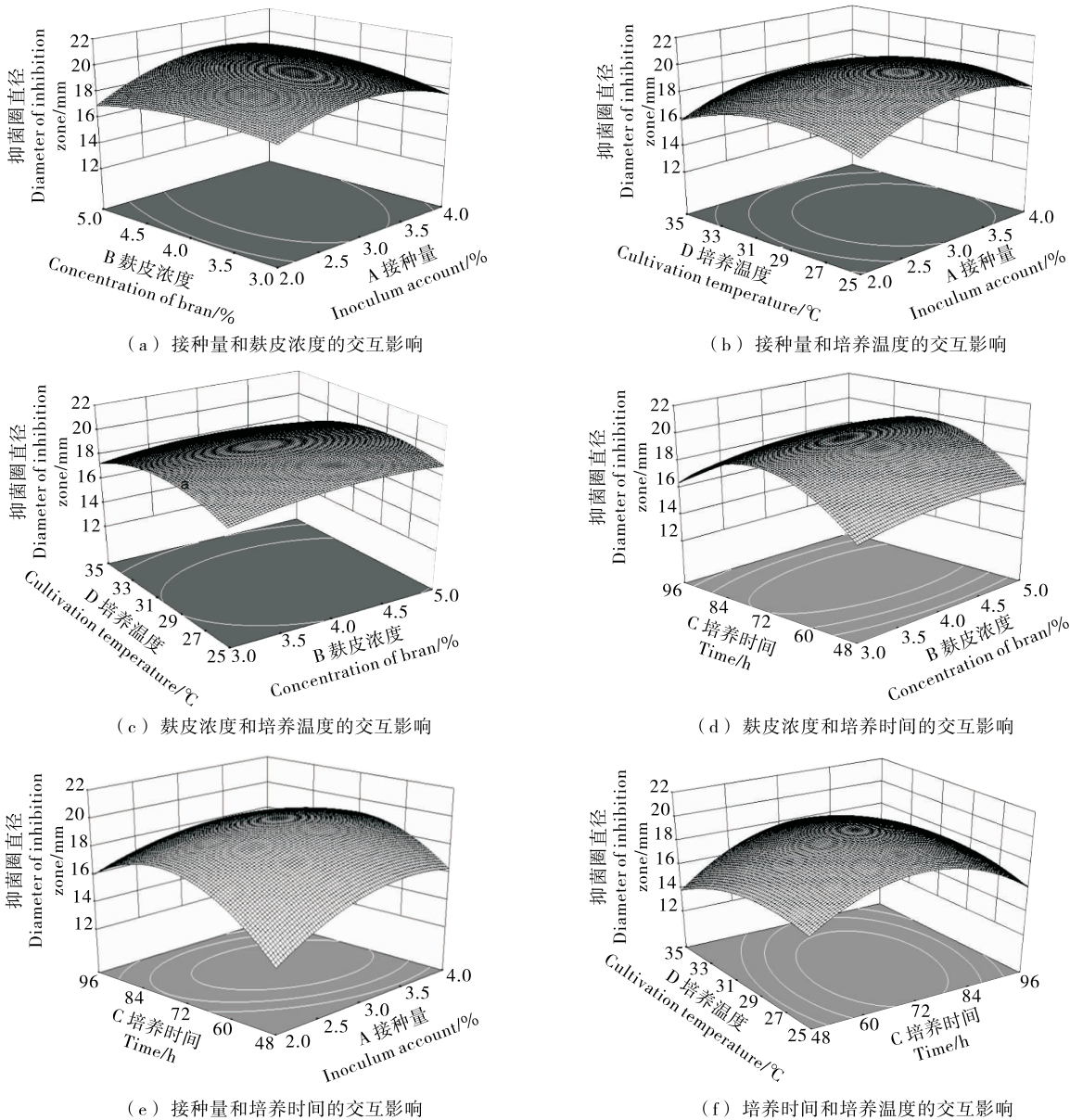


图 6 4 种因素对 BD3526 抗菌物质产量影响的响应面

Figure 6 Response surface for the effects of four factors on bacteriocin-like production by *P. bovis* BD3526

种量 3.22%、麸皮浓度 4.25%，在此条件下 BD3526 抑菌圈直径为 19.967 mm。为了更便于操作，将参数修正为培养温度 29℃、培养时间 73 h、接种量 3.2%、麸皮浓度 4.2%，牛类芽孢杆菌 BD3526 采取上述修正后的条件进行培养，测得其产抗菌物质的平均抑菌圈直径为 19.88 mm，比预测值低 1.9%，说明该模型能较好地预测试验结果。

2.3 抗菌物质效价的测定

由于牛类芽孢杆菌 BD3526 采取上述修正后的条件进行培养，测得抗菌物质的抑菌圈直径与优化前相近，故而通过测定培养条件优化前后抗菌物质的效价来比较两者的差异，将 BD3526 在优化后的培养条件下，培养后测得其产抗菌物质的效价为 200 AU/mL，较优化之前所得抑菌物质效价 100 AU/mL 提高了 1 倍，因此利用响应面法对牛类芽孢杆菌 BD3526 产抗菌物质条件进行优化具有一定的意义。

3 结论

单因素试验结果显示：牛类芽孢杆菌 BD3526 产有抗菌物质的最佳发酵温度 30℃、最佳发酵时间 72 h、最佳接种量为 3%、最佳麸皮浓度为 4%。在此试验基础上，利用响应面法对其发酵条件进行进一步优化，经验证，该模型合理可靠。通过模型分析并将其产抗菌物质的培养条件进行修正后得到的最佳培养条件为：培养温度 29℃、培养时间 73 h、接种量 3.2%、麸皮浓度 4.2%，采取上述优化条件进行培养，BD3526 抑菌圈直径为 19.88 mm，通过测定效价得出优化培养条件下 BD3526 产抗菌物质效价为 200 AU/mL，较优化之前所得抗菌物质效价(100 AU/mL)提高了 1 倍。因此，利用响应面法对牛类芽孢杆菌 BD3526 产抗菌物质条件进行优化对后期进一步的试验研究具有一定的指导意义。菌体发酵产抗菌物质能力的大小除了与以上研究的发酵条件有关外，

培养基的营养成分对其产量也有很大的影响,因此后续试验可以考虑研究碳源、氮源和无机盐的种类及其添加量对牛类芽孢杆菌 BD3526 产抗菌物质能力大小的影响,从而更全面地探讨影响牛类芽孢杆菌 BD3526 产抗菌物质能力的因素。

参考文献

[1] ANGIOLILLO L, CONTE A, NOBILE M A D. Food Additives; Natural Preservatives [M]// Encyclopedia of Food Safety.[S.l.]: Elsevier, 2014; 474-476.

[2] 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.

[3] 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): 1 058-1 071.

[4] 贡汉生, 孟祥晨. 乳酸菌细菌素分类与作用机制[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(1): 105-109.

[5] GAO C, HAN J, LIU Z, et al. *Paenibacillus bovis* sp. nov., isolated from raw yak (*Bos grunniens*) milk [J]. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 2016, 66(3): 1 413-1 418.

[6] 刘玉娟, 韩瑯, 吴江, 等. 类芽孢杆菌 BD3526 抑菌活性物质的初步分离及性质测定[J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(7): 1 176-1 180.

[7] 苏芳, 李莉, 罗斌, 等. 戊糖乳杆菌 WH12-2-1 产细菌素条件的优化[J]. 中国乳品工业, 2010, 38(3): 10-15.

[8] OH S, RHEEM S, SIM J, et al. Optimizing conditions for the growth of *Lactobacillus casei* YIT 9018 in tryptone-yeast extract-glucose medium by using response surface methodology [J]. Applied & Environmental Microbiology, 1995, 61(11): 3 809-3 814.

[9] 胡敏, 郝林, 贾丽艳. 枯草芽孢杆菌产细菌素发酵条件的优化 [J]. 食品科学, 2014, 35(9): 198-202.

[10] 刘国荣, 张郡莹, 王成涛, 等. 响应面法优化双歧杆菌 B04 代谢产细菌素的发酵条件[J]. 食品科学, 2013, 34(3): 147-152.

[11] 陈琳, 孟祥晨. 响应面法优化植物乳杆菌代谢产细菌素的发酵条件[J]. 食品科学, 2011, 32(3): 176-180.

[12] 佟世生, 解洛香, 徐乐, 等. 植物乳杆菌代谢产细菌素的培养基优化[J]. 现代食品科技, 2012, 28(2): 152-155.

[13] 鲁晶晶, 王远亮, 谢梦琴. 植物乳杆菌 LJ-3 产细菌素的响应面优化[J]. 食品与机械, 2014, 30(5): 242-246.

[14] GRATTEPANCHE F, AUDET P, LACROIX C. Milk fermentation by functional mixed culture producing nisin Z and exopolysaccharides in a fresh cheese model [J]. International Dairy Journal, 2007, 17(2): 123-132.

[15] 刘冬梅, 李理, 杨晓泉, 等. 用牛津杯法测定益生菌的抑菌活力 [J]. 食品研究与开发, 2006, 27(3): 110-111.

[16] PALACIOS J, VIGNOLO G, FAR AS M E, et al. Purification and amino acid sequence of lactocin 705, a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL 705 [J]. Microbiological Research, 1999, 154(2): 199-204.

[17] 崔燕丽, 韩瑯, 吴正钧. *Paenibacillus bovis* BD3526 产胞外多糖的培养条件优化[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(5): 108-13.

(上接第 30 页)

综上所述,采用 90% DMSO 溶解淀粉时,DMSO 对 B₁、B₂ 和 B₃ 链均有一定程度的降解,而降解 B₁ 所需的时间比降解 B₂、B₃ 的时间长,因此在溶解过程中 B₁ 链是支链淀粉中相对稳定的链。上述结果表明,当淀粉在 90% DMSO/水体系中溶解性最大时,淀粉分子发生了降解。

3 结论

DMSO 浓度对玉米淀粉溶解有很大影响,当 DMSO 浓度为 90% 时,玉米淀粉溶解性最大,扫描电镜结果亦表明 90% DMSO 溶液对玉米淀粉颗粒结构的破坏最严重。此外,研究表明 90% DMSO 溶液对淀粉分子具有降解作用:随着溶解时间的延长,淀粉分子的分子量和回旋半径逐渐下降;DMSO 对 B₂、B₃ 降解较严重,而 B₁ 链相对稳定。综上,虽然 90% DMSO 为溶解淀粉的最佳溶剂,但是对淀粉分子结构亦有破坏作用。因此需找适合溶解淀粉的溶剂仍是食品领域一项艰巨的任务。

参考文献

[1] 赵冰, 庞宇辰, 梁焕秋, 等. 淀粉结构研究技术进展[C]//“食品工业新技术与新进展”学术研讨会暨 2014 年广东省食品学会年会论文集. 广州: 广东省食品学会, 2014: 4.

[2] HAN J-A, LIM S-T. Structural changes of corn starches by heating and stirring in DMSO measured by SEC-MALLS-RI sys-

tem[J]. Carbohydrate Polymers, 2004, 55(3): 265-272.

[3] JACKSON D S. Solubility behavior of granular corn starches in methyl sulfoxide (DMSO) as measured by high performance size exclusion chromatography[J]. Starch, 1991, 43(11): 422-427.

[4] YOO S H, JANE J. Molecular weights and gyration radii of amylopectins determined by high-performance size-exclusion chromatography equipped with multi-angle laser-light scattering and refractive index detectors[J]. Carbohydrate Polymers, 2002, 49(3): 307-314.

[5] LEE J H, YOU S G, KWEON D K, et al. Dissolution behaviors of waxy maize amylopectin in aqueous-DMSO solutions containing NaCl and CaCl₂ [J]. Food Hydrocolloids, 2014, 35: 115-121.

[6] ZHONG Fang, YOKOYAMA W, WANG Qian, et al. Rice starch, amylopectin, and amylose: molecular weight and solubility in dimethyl sulfoxide-based solvents [J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2006, 54(6): 2 320-2 326.

[7] 胡秀婷. 淀粉醇酸降解制备糊精及糊精的分级与应用研究[D]. 无锡: 江南大学, 2014: 3.

[8] 杨小雨, 刘正辉, 李刚华, 等. 高效液相体积排阻色谱法测定稻米支链淀粉链长的相对分子质量分布[J]. 中国农业科学, 2013(16): 3 488-3 495.

[9] LIU Guo-dong, HONG Yan, GU Zheng-biao, et al. Pullulanase hydrolysis behaviors and hydrogel properties of debranched starches from different sources[J]. Food Hydrocolloids, 2015, 45: 351-360.