

基于 MTT 比色和响应面法优化侧孢短芽孢杆菌最大活菌数培养条件

Optimization of culture conditions for maximum viable count of *Brevibacillus laterosporus* based on MTT colorimetry and response surface methodology

宋 鹏 李理想 赵 彪 王泽乐 孙兴鑫

SONG Peng LI Lixiang ZHAO Biao WANG Zele SUN Xingxin

(河南科技大学农学院, 河南 洛阳 471000)

(College of Agriculture, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471000, China)

摘要:目的: 探索获得侧孢短芽孢杆菌 (*Brevibacillus laterosporus*) 最大活菌数的最佳培养基成分及培养条件。

方法: 在建立 MTT 比色法与平板计数法的相关回归方程基础上, 对获得最大活菌数的侧孢短芽孢杆菌最适培养基成分(碳源、氮源、无机盐)和培养条件(初始 pH、温度、接种量、磷酸二氢钾)进行优化。**结果:** MTT 比色法与平板计数法对活菌数测定结果表现出显著的线性关联 ($R^2 > 0.999$); 麦芽糖、氯化钙、初始 pH、磷酸二氢钾为显著影响因子, 最佳发酵条件为麦芽糖 8.75 g/L、氯化钙 0.17 g/L、初始 pH 7.07、磷酸二氢钾 3.73 g/L, 此条件下活菌数为 8.12×10^8 CFU/mL, 与理论活菌数 (8.25×10^8 CFU/mL) 无显著差异。**结论:** 基于 MTT 比色和响应面法优化侧孢短芽孢杆菌最大活菌数培养条件, 优化后的活菌数较优化前提高了 3.02 倍。

关键词: MTT 比色法; 响应面法; 侧孢短芽孢杆菌; 活菌数; 培养条件; 优化

Abstract: **Objective:** This study aimed to explore the optimal medium composition and culture conditions for obtaining the maximum viable count of *Brevibacillus laterosporus*. **Methods:** Based on establishing the correlation regression equation between the MTT colorimetric method and plate counting method, the optimal medium composition (carbon source, nitrogen source, inorganic salt) and fermentation conditions (initial pH,

temperature, inoculation amount, KH_2PO_4) for obtaining the maximum viable count of *B. laterosporus* were optimized.

Results: A significant linear correlation for viable count determination between MTT colorimetry and plate counting ($R^2 > 0.999$) was found; Maltose, CaCl_2 , initial pH and KH_2PO_4 were the significant factors. The optimal fermentation condition was 8.75 g/L maltose, 0.17 g/L CaCl_2 , 7.07 initial pH and 3.73 g/L KH_2PO_4 . Under the control of these conditions, the number of viable counts was 8.12×10^8 CFU/mL. However, no significant difference from the theoretical number (8.25×10^8 CFU/mL) was found. **Conclusion:** Based on MTT colorimetry and response surface methodology, the culture conditions for the maximum viable count of *B. laterosporus* were optimized and the number of viable counts was higher than before optimization increased by 3.02 times.

Keywords: MTT colorimetry; response surface methodology; *Brevibacillus laterosporus*; viable count; culture condition; optimization

侧孢短芽孢杆菌 (*Brevibacillus laterosporus*) 是一种可产芽孢的兼性厌氧细菌, 具有广谱抑菌活性^[1], 可产生抗菌肽、蛋白酶、几丁质酶、芽孢菌胺、肽类抗生素、聚酮化合物等物质^[2], 在植物抗逆促生^[3]、降解重金属^[4]、改善根际微生态环境^[5]和抑制食源性致病菌^[6]等方面效果显著, 具有较高的应用价值。MTT 商品名为噻唑蓝, 其作用于活细胞线粒体中的呼吸链, 可以形成蓝紫色结晶甲臜, 使用二甲基亚砷溶解后, 测定溶液吸光值可以间接反映活细胞数量。有研究^[7-8]表明, 在 $10^7 \sim 10^9$ CFU/mL 细胞浓度范围内, 吸光值与活细胞数成正比。利用 MTT 比色法检测细胞活性灵敏度高、成本低廉、操作简便, 主要

基金项目: 河南省科技攻关项目(编号: 232102110040); 河南省高等学校重点科研项目(编号: 22A210003); 国家级大学生创新创业训练计划项目(编号: 202310464089)

作者简介: 宋鹏(1980—), 男, 河南科技大学副教授, 博士。

E-mail: songpeng0826@126.com

收稿日期: 2023-07-09 **改回日期:** 2023-11-22

用于药物对体外培养细胞的毒性测定及细胞活性的测定^[9-10]。菌株传统优化方法主要为线性回归分析和正交试验,其回归精度低,不连贯,而响应面法可以弥补以上不足^[11-12],具有周期短、精度高的优点,被广泛应用于食品、生物、化工等领域。

目前,微生物培养以活菌数为测定指标的研究多采用比浊法,利用分光光度计测定菌液吸光值,然后通过标准曲线计算得出^[13]。这种方法虽然快速简便,但是无法区分细菌是否存活,结论有一定的误差。而利用 MTT 比色法测定微生物活菌数并进行发酵条件优化的研究尚未见报道。研究拟以侧孢短芽孢杆菌活菌数为研究对象,建立 MTT 比色法测定发酵液活菌数的标准曲线,通过响应面法对培养基成分和发酵条件进行优化,以期为微生物活菌制剂发酵工艺优化及规模生产提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

侧孢短芽孢杆菌 HA-2:CGMCC NO. 24130,河南科技大学农学院特色生物资源开发与利用实验室;

琼脂粉、胰蛋白胨、酵母浸粉、氯化钠、葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、可溶性淀粉、牛肉膏、硫酸铵、蛋白胨、硝酸铵、氯化钙、氯化钾、氯化镁、硫酸镁、磷酸二氢钾、噻唑蓝、二甲基亚砷、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠等:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

基础培养基:10 g/L 胰蛋白胨,5 g/L 酵母粉,10 g/L NaCl,初始 pH 7.0;按 2%接种量接种至装有 30 mL 基础培养基的三角瓶中,9 层纱布封口,摇床转速 160 r/min,30 °C 培养 18 h;

MTT 溶液:配制 pH 7.2、0.2 mol/mL 的 PBS 缓冲液,121 °C 灭菌 15 min 待用;称取 0.5 g MTT 用 PBS 缓冲液定容至 100 mL,121 °C 灭菌 15 min,现配现用,-4 °C 避光保存。

1.2 仪器与设备

酶标仪:Infinite E Plex 型,瑞士 Tecan 公司;

高速冷冻离心机:5810R 型,德国 Eppendorf 公司;

高压灭菌锅: SX-700 型,日本 TOMY 公司;

洁净工作台: SW-CJ-1BU 型,苏州安泰空气技术有限公司;

恒温培养振荡器: ZWYR-D2403 型,上海智城分析仪器制造有限公司;

生化培养箱: TPH-160S 型,宁波莱福科技有限公司;

pH 计: PP60 型,德国 Sartorius 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 MTT 比色法及与平板计数法线性关系的确定

将 5 mL 侧孢短芽孢杆菌菌液加入 35 mL 生理盐水中,4 °C、3 500 r/min 离心 10 min,去除上清液。重复此

清洗过程一次后,将离心所得菌泥复溶于 5 mL 生理盐水中,制成菌悬液。取 100 μ L 菌悬液于 96 孔板中,每个样品重复 6 次,每孔加入 20 μ L MTT 溶液静置培养 5 h,吸弃上清液,每孔加入 150 μ L 二甲基亚砷,低速振荡 10 min,测定 570 nm 处菌液的吸光值^[14]。

分别制备菌数为 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 CFU/mL 的侧孢短芽孢杆菌菌悬液 10 mL 于试管中。每支试管摇匀后平均分为 A 和 B 两管。A 管采用 MTT 比色法测定菌液的吸光值,将其作为线性拟合方程中的自变量,B 管稀释后涂布于基础培养基琼脂平板,统计活菌数,将其作为线性拟合方程中的因变量,进而建立 MTT 比色法与平板计数法的相关回归方程。

1.3.2 单因素试验 从基础培养基成分及发酵条件出发,利用 MTT 比色法测定各单因素试验发酵液吸光值^[15]。分别考察碳源(葡萄糖、可溶性淀粉、果糖、麦芽糖)、氮源(硫酸铵、牛肉膏、蛋白胨、硝酸铵)和无机盐(氯化钙、氯化镁、硫酸镁、氯化钾)对侧孢短芽孢杆菌活菌数的影响。在最佳碳源、氮源及无机盐的基础上,分别研究碳源添加量(0~18.0 g/L)、氮源添加量(0~16.0 g/L)和无机盐添加量(0~0.33 g/L),确定最佳培养基成分及其添加量。分别考察初始 pH(3.5~10.5)、发酵温度(24~39 °C)、接种量(1.0%~8.0%)和磷酸二氢钾添加量(0.5~7.5 g/L)对侧孢短芽孢杆菌活菌数的影响,确定最佳发酵条件。

1.3.3 响应面优化

(1) Plackett-Burman 试验:选取影响侧孢短芽孢杆菌活菌数的 7 因素为自变量,发酵液中活菌数为响应值,选用 $N = 12$ 的 Plackett-Burman 设计。各因素选取高(+1)和低(-1)两个水平,筛选显著影响因子。

(2) 最陡爬坡试验和 Box-Behnken 试验:通过 Plackett-Burman 试验结果中多个显著影响因子的系数值确定步长及方向,其因素系数值为正值选取高水平,负值选取低水平,以活菌数结果的最大值作为 Box-Behnken 试验起始中心点。以 Plackett-Burman 试验筛选出的显著因子作为自变量,发酵液中侧孢短芽孢杆菌活菌数为响应值,设计多因素多水平的响应面试验,建立多元二次回归数学方程拟合自变量与响应值之间的函数关系,获得侧孢短芽孢杆菌活菌数的最佳发酵参数。

1.3.4 验证实验 通过响应面试验获得的理论最佳发酵条件培养 18 h 进行验证,得到的侧孢短芽孢杆菌活菌数平均值与理论最大值进行比较,验证模型的可靠性。

1.4 数据分析

使用 IBM SPSS 22.0 软件进行显著性分析和方差分析,采用 Design-Expert 10 软件进行响应面分析,采用

Origin 2021 软件作图。

2 结果与分析

2.1 MTT 比色法与平板计数法的线性关系

由图 1 可知,侧孢短芽孢杆菌菌悬液浓度与活菌数的线性回归拟合方程为 $y=3.113\ 5x-0.128\ 8$,相关系数为 0.999 7,说明 MTT 比色法与平板计数法结果具有非常显著和强的线性相关性,能够准确、快速反映侧孢短芽孢杆菌的活菌数,同时表明 MTT 比色法具有较好的实用性和可行性,可用于后续侧孢短芽孢杆菌活菌数的测定,与高琼^[16]的研究结果相似。

2.2 单因素试验

2.2.1 碳源 由图 2 可知,以麦芽糖为碳源时,侧孢短芽孢杆菌活菌数显著高于其他碳源的 ($P<0.05$)。当麦芽糖添加量为 0~10.0 g/L 时,活菌数随麦芽糖添加量的增加逐步增加,当麦芽糖添加量为 10.0~18.0 g/L 时,侧孢短芽孢杆菌活菌数逐渐下降,可能与麦芽糖呈微弱酸性有关,过多的麦芽糖会导致发酵液 pH 降低,不利于微生物生长。这与吴丽媛^[17]的结果一致,因此选择麦芽糖最

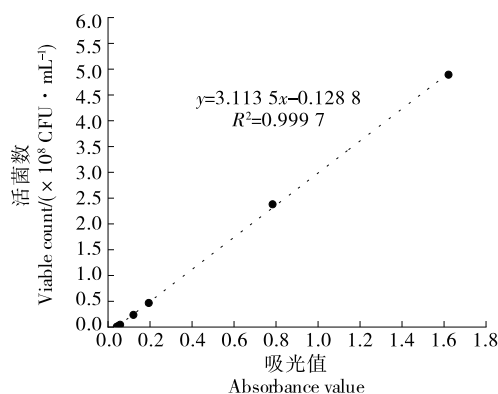
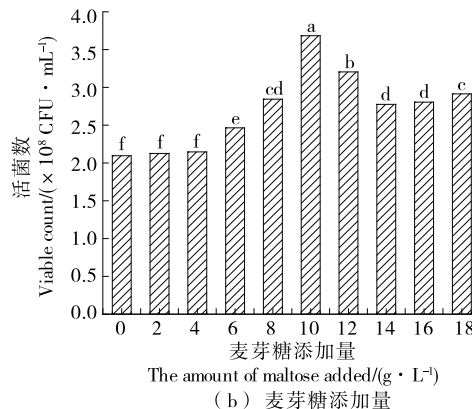
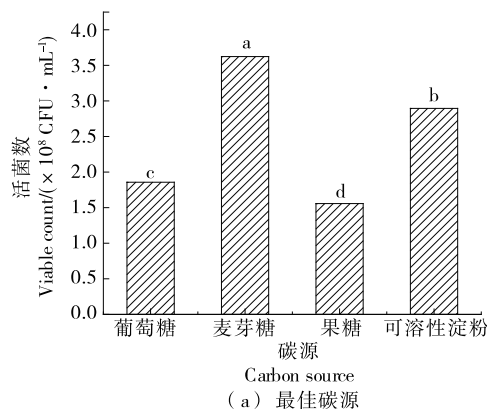


图 1 MTT 比色法与平板计数法的线性关系

Figure 1 Linear relationship between the MTT colorimetry and the plate counting method

佳添加量为 10.0 g/L。

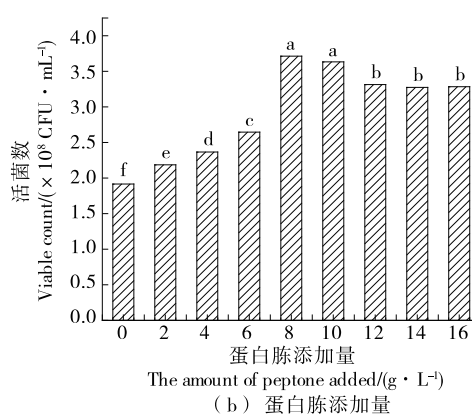
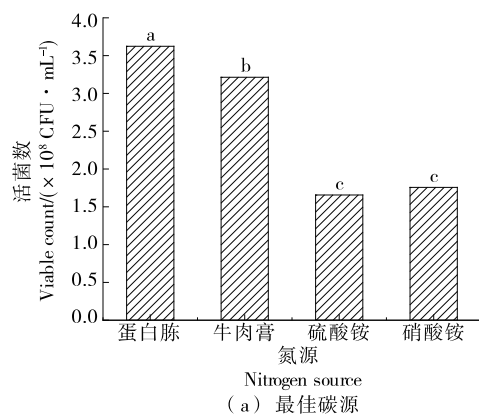
2.2.2 氮源 由图 3 可知,蛋白胨、牛肉膏、硫酸铵和硝酸铵可以促进侧孢短芽孢杆菌快速繁殖。以蛋白胨为氮源时,活菌数达最大值 3.72×10^8 CFU/mL。随着蛋白胨添加量的升高,侧孢短芽孢杆菌活菌数缓慢上升,当添加



字母不同表示差异显著 ($P<0.05$)

图 2 最佳碳源种类及其添加量的确定

Figure 2 Determination of the best carbon source species and the amount of addition



字母不同表示差异显著 ($P<0.05$)

图 3 最佳氮源种类及其添加量的确定

Figure 3 Determination of the best nitrogen source species and the amount of addition

量为 8.0~10.0 g/L 时活菌数最大,但无显著性差异,随后活菌数开始下降,与陈丹霞等^[18]的结果相似。这可能是蛋白胨为微生物提供氮源、碳源、维生素、生长因子等营养物质,可以促进侧孢短芽孢杆菌的生长繁殖。综上,选择 8.0 g/L 为最佳蛋白胨添加量。

2.2.3 无机盐 由图 4 可知,氯化钾、氯化钙、硫酸镁和氯化镁可促进侧孢短芽孢杆菌的生长繁殖,其中氯化钙

的促进作用最为显著,较氯化镁提升了 76.88% ($P < 0.05$)。随着氯化钙添加量的增加,侧孢短芽孢杆菌活菌数显著增加。当氯化钙添加量为 0.17 g/L 时,其对侧孢短芽孢杆菌活菌数的促进效果最佳,与李茂琳等^[19]的研究结果一致。其原因可能与 Ca^{2+} 的存在改变侧孢短芽孢杆菌的细胞膜通透性,调节细胞内部物质交换、酸碱度和渗透压有关。因此,选择 0.17 g/L 氯化钙为最佳无机盐添加量。

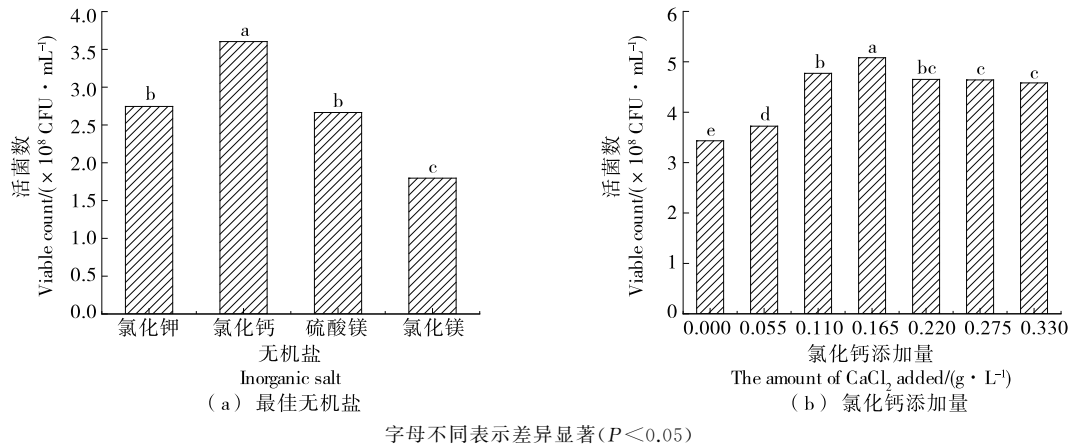


图 4 最佳无机盐种类及其添加量的确定

Figure 4 Determination of optimal inorganic salt species and the amount of addition

2.2.4 发酵温度 由图 5 可知,当发酵温度为 24~34 $^{\circ}\text{C}$ 时,侧孢短芽孢杆菌活菌数逐渐上升,与侧孢短芽孢杆菌在低温条件下菌株生长受到抑制有关。当发酵温度为 34~39 $^{\circ}\text{C}$ 时,侧孢短芽孢杆菌活菌数逐渐下降,可能是由于侧孢短芽孢杆菌胞内热敏性酶活性降低,导致代谢受阻。范海延等^[20]发现侧孢短芽孢杆菌的最佳培养温度为 30~35 $^{\circ}\text{C}$ 。因此,选择最佳发酵温度为 34.5 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.2.5 接种量 由图 6 可知,当接种量为 1.0%~6.0% 时,侧孢短芽孢杆菌活菌数随接种量的提高而增加,当接种量为 6.0% 时,侧孢短芽孢杆菌活菌数最大可达 3.73 $\times$

10^8 CFU/mL。当接种量 $> 6.0\%$ 时,发酵液中初始菌体密度偏高,营养消耗过快,活菌数随接种量的增加而减少,与杨旭等^[21]的研究结果一致。因此,选择 6.0% 为最佳接种量。

2.2.6 初始 pH 由图 7 可知,升高初始 pH 可促进侧孢短芽孢杆菌活菌数增加,当 pH 为 7.5 时,侧孢短芽孢杆菌活菌数最大。而在偏碱性 (pH 9.5~10.5) 和偏酸性 (pH 3.5~4.5) 条件下,侧孢短芽孢杆菌活菌数的生长繁殖均受到抑制。刘蒲临等^[22]发现侧孢短芽孢杆菌的最佳 pH 为 6.0~8.0。因此,选择最佳发酵初始 pH 为 7.5。

2.2.7 磷酸二氢钾 由图 8 可知,当磷酸二氢钾添加量

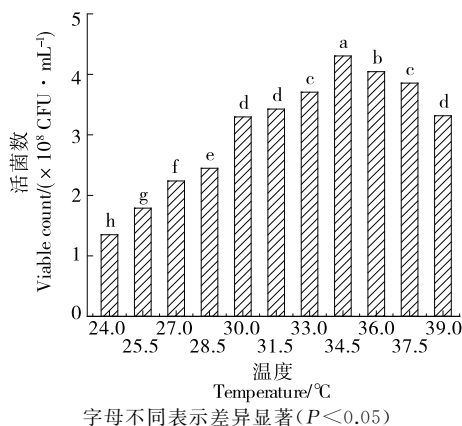


图 5 最佳发酵温度的确定

Figure 5 Determination of the optimal fermentation temperature

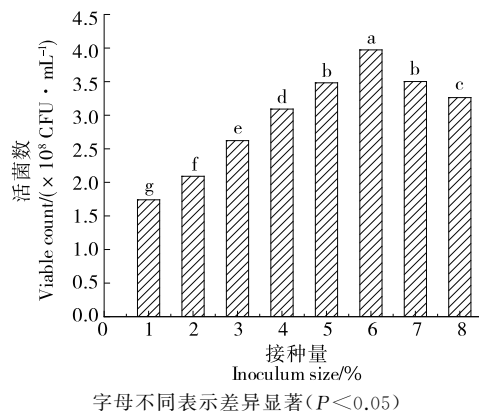
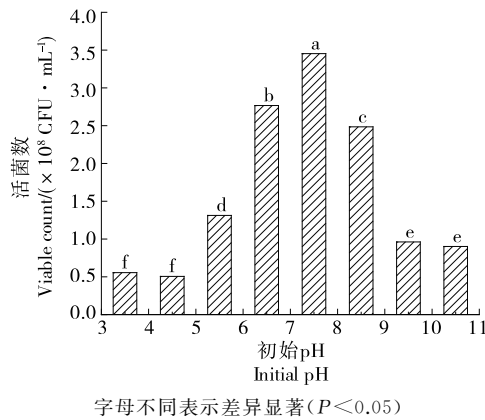


图 6 最佳接种量的确定

Figure 6 Determination of the optimal inoculum

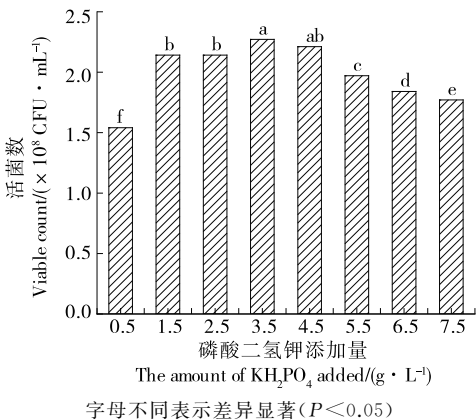


字母不同表示差异显著($P<0.05$)
图 7 最佳初始 pH 的确定
Figure 7 Determination of the optimal initial pH

为 0~3.5 g/L 时,侧孢短芽孢杆菌活菌数逐渐增加;当添加量为 3.5 g/L 时,侧孢短芽孢杆菌活菌数达最大值(2.27×10^8 CFU/mL),较优化前提高了 12.38% ($P<0.05$)。当添加量 >3.5 g/L 时,侧孢短芽孢杆菌活菌数减少。磷酸二氢钾作为缓冲物质,在微生物发酵过程中对发酵液 pH 起缓冲作用,利于侧孢短芽孢杆菌的生长繁殖,与卜雯丽等^[23]的结果相同,其最佳添加量不同可能与不同菌株因其自身特性对发酵培养基成分及发酵条件具有一定的选择性有关。因此,选择 3.5 g/L 为磷酸二氢钾最佳添加量。

2.3 响应面优化

2.3.1 Plackett-Burman 试验 根据微生物生长所需营养



字母不同表示差异显著($P<0.05$)
图 8 最佳磷酸二氢钾添加量的确定
Figure 8 Determination of the optimal amount of KH_2PO_4

成分的基本特点,结合前期单因素试验,分别选取麦芽糖、蛋白胨、氯化钙、磷酸二氢钾添加量及发酵条件中发酵温度、接种量和初始 pH 作为试验因素。各因素设 2 个水平见表 1,试验设计及结果见表 2。

由表 3 可知, X_1 、 X_3 、 X_6 和 X_7 是构建模型的主要影响因素($P<0.05$),因此选择 X_1 、 X_3 、 X_6 和 X_7 进一步进行优化试验。

2.3.2 爬坡试验 为了逼近 X_1 、 X_3 、 X_6 和 X_7 的最大响应区域,根据表 3 设计爬坡试验方案,试验结果见表 4 所示。在试验 3 条件下,侧孢短芽孢杆菌活菌数最高为 8.13×10^8 CFU/mL,因此选择试验 3 条件作为试验中心点。

表 1 响应面试验因素与水平
Table 1 Response surface test factors and levels

水平	X_1 麦芽糖添加量/ ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	X_2 蛋白胨添加量/ ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	X_3 氯化钙添加量/ ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	X_4 发酵温度/ $^{\circ}\text{C}$	X_5 接种量/ %	X_6 初始 pH	X_7 磷酸二氢钾添加量/ ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
-1	6	6	0.05	33	4	6.5	1.5
1	12	12	0.22	36	7	8.5	4.5

表 2 Plackett-Burman 试验设计及结果
Table 2 Design and result of Plackett-Burman experiments

试验号	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	活菌数/ $(\times 10^8 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1})$
1	1	1	-1	1	1	1	-1	5.69
2	-1	1	1	-1	1	1	1	5.10
3	1	-1	1	1	-1	1	1	5.63
4	-1	1	-1	1	1	-1	1	5.02
5	-1	-1	1	-1	1	1	-1	4.49
6	-1	-1	-1	1	-1	1	1	5.12
7	1	-1	-1	-1	1	-1	1	5.28
8	1	1	-1	-1	-1	1	-1	5.64
9	1	1	1	-1	-1	-1	1	5.14
10	-1	1	1	1	-1	-1	-1	4.15
11	1	-1	1	1	1	-1	-1	4.05
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	4.58

表 3 Plackett-Burman 试验显著性分析[†]

Table 3 Significance analysis of Plackett-Burman experiments

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	3.24	7	0.46	8.20	0.029 9 *
X ₁	0.19	1	0.19	14.10	0.022 6 *
X ₂	0.02	1	0.02	1.52	0.125 5
X ₃	0.13	1	0.13	9.92	0.028 1 *
X ₄	0.22	1	0.22	16.87	0.526 6
X ₅	0.00	1	0.00	0.02	0.486 6
X ₆	0.01	1	0.01	0.61	0.013 8
X ₇	0.40	1	0.40	30.45	0.030 8 *

[†] * 表示差异显著($P<0.05$); ** 表示差异极显著($P<0.01$)。

2.3.3 Box-Behnken 试验 为确定 X₁、X₃、X₆ 和 X₇ 的交互作用,进行四因素三水平响应面试验,试验因素水平见表 5,试验设计及结果见表 6。

采用 Design-Expert 10 软件进行响应面回归过程数据分析,建立二次响应面回归模型,得到二次多项式回归方程:

$$Y=8.16-0.46X_1-0.063X_3+0.013X_6+0.044X_7-0.93X_1X_3-1.10X_1X_6+0.19X_1X_7-1.40X_3X_6+0.013X_3X_7-0.61X_6X_7-0.75X_1^2-0.66X_3^2-0.79X_6^2-0.37X_7^2。(1)$$

由表 7 可知,模型 P 值为 0.000 1,失拟项 P 值为

表 4 爬坡试验结果

Table 4 Results of the climbing experiments

试验号	X ₁ 麦芽糖添加量/ (g · L ⁻¹)	X ₃ 氯化钙添加量/ (g · L ⁻¹)	X ₆ 初始 pH	X ₇ 磷酸二氢钾添加量/ (g · L ⁻¹)	活菌数/ (×10 ⁸ CFU · mL ⁻¹)
1	6.0	0.22	6.5	2.5	5.16
2	7.5	0.18	7.0	3.0	6.93
3	9.0	0.14	7.5	3.5	8.13
4	10.5	0.10	8.0	4.0	7.69
5	12.0	0.05	8.5	4.5	7.08

表 5 Box-Behnken 试验因素水平

Table 5 Box-Behnken test factor level

水平	X ₁ 麦芽糖添加量/(g · L ⁻¹)	X ₃ 氯化钙添加量/(g · L ⁻¹)	X ₆ 初始 pH	X ₇ 磷酸二氢钾添加量/(g · L ⁻¹)
-1	7.5	0.10	7.0	3.0
0	9.0	0.14	7.5	3.5
1	10.5	0.18	8.0	4.0

0.979 6,说明该模型失拟不显著, $R^2=0.996\ 6$, R^2_{Adj} (0.993 2)和 R^2_{Pre} (0.989 8)的差值<0.2,表明方程拟合较好,Box-Behnken 模型可信度和精确度较高,该模型 X₁、X₁X₃、X₁X₆、X₁X₇、X₃X₆、X₆X₇、X₁²、X₃²、X₆²和 X₇²($P<0.001$)影响极显著。

2.4 响应面结果分析

由图9可知,氯化钙与磷酸二氢钾之间交互作用较

表 6 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 6 Design and result of Box-Behnken experiments

试验号	X ₁	X ₃	X ₆	X ₇	活菌数/ (×10 ⁸ CFU · mL ⁻¹)	试验号	X ₁	X ₃	X ₆	X ₇	活菌数/ (×10 ⁸ CFU · mL ⁻¹)
1	-1	-1	0	0	6.35	16	0	1	1	0	5.24
2	1	-1	0	0	7.22	17	-1	0	-1	0	5.91
3	-1	1	0	0	8.10	18	1	0	-1	0	7.26
4	1	1	0	0	5.23	19	-1	0	1	0	8.21
5	0	0	-1	-1	6.33	20	1	0	1	0	5.18
6	0	0	1	-1	7.52	21	0	-1	0	-1	7.19
7	0	0	1	1	7.65	22	0	1	0	-1	7.02
8	0	0	1	1	6.41	23	0	1	0	1	7.25
9	1	0	0	-1	7.65	24	0	1	0	1	7.13
10	1	0	0	-1	6.32	25	0	0	0	0	8.25
11	-1	0	0	1	7.34	26	0	0	0	0	8.23
12	1	0	0	1	6.78	27	0	0	0	0	8.20
13	0	-1	-1	0	5.36	28	0	0	0	0	7.94
14	0	1	-1	0	8.04	29	0	0	0	0	8.16
15	0	-1	1	0	8.15						

表 7 响应面结果的方差分析[†]

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	28.10	14	2.01	293.38	<0.000 1 **
X ₁	2.59	1	2.59	377.85	<0.000 1 **
X ₃	0.05	1	0.05	7.03	0.018 9 *
X ₆	0.00	1	0.00	0.31	0.585 4
X ₇	0.02	1	0.02	3.42	0.085 6
X ₁ X ₃	3.50	1	3.50	511.06	<0.000 1 **
X ₁ X ₆	4.80	1	4.80	700.93	<0.000 1 **
X ₁ X ₇	0.15	1	0.15	21.66	0.000 4 **
X ₃ X ₆	7.81	1	7.81	1 141.69	<0.000 1 **
X ₃ X ₇	0.00	1	0.00	0.09	0.766 9
X ₆ X ₇	1.48	1	1.48	215.74	<0.000 1 **
X ₁ ²	3.67	1	3.67	536.91	<0.000 1 **
X ₃ ²	2.84	1	2.84	414.61	<0.000 1 **
X ₆ ²	4.04	1	4.04	589.88	<0.000 1 **
X ₇ ²	0.90	1	0.90	131.60	<0.000 1 **
残差	0.10	14	0.00		
失拟项	0.03	10	0.00	0.21	0.979 6
纯误差	0.06	4	0.02		
总和	28.20	28			

[†] * 表示差异显著 ($P < 0.05$); ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

其他交互作用最弱。当麦芽糖分别与氯化钙、初始 pH 及磷酸二氢钾交互作用,随着氯化钙添加量、初始 pH 及磷酸二氢钾添加量的变化,麦芽糖的最佳添加量为 9 g/L 左右,氯化钙添加量、初始 pH 及磷酸二氢钾添加量分别为 0.11~0.16, 7.3~7.7, 3.2~3.9 g/L;当氯化钙与初始 pH 交互作用时,氯化钙添加量与初始 pH 对活菌数影响成反比;当初始 pH 与磷酸二氢钾交互作用时,活菌数极值点出现在初始 pH 为 7.3~7.8,磷酸二氢钾添加量为 3.5 g/L 或磷酸二氢钾添加量为 3.2~3.9 g/L,初始 pH 为 7.5 的范围内。由表 7 中 F 值可知,各因素对侧孢短芽孢杆菌活菌数的影响强弱为 $X_1 > X_3 > X_7 > X_6$,两因素间除 $X_3 X_7$ 外,均对活菌数的影响显著,两因素间的正负效应大小依次为 $X_3 X_6$ 、 $X_1 X_6$ 、 $X_1 X_3$ 、 $X_6 X_7$ 、 $X_1 X_7$ 、 $X_3 X_7$ 。

2.5 验证实验

使用 Design-Expert 10 软件分析得到各显著因子的最佳组合为麦芽糖添加量 8.75 g/L、氯化钙添加量 0.17 g/L、初始 pH 7.07、磷酸二氢钾添加量 3.73 g/L,此条件下模型预测侧孢短芽孢杆菌活菌数最高为 8.25×10^8 CFU/mL。在此基础上重复 3 次试验,测得侧孢短芽孢杆菌活菌数为 $(8.12 \times 10^8 \pm 0.64)$ CFU/mL,为预测值的 98.42%,表明该模型能够很好地预测实际活菌数。

3 结论

以侧孢短芽孢杆菌活菌数为研究对象,通过 MTT 比色法与平板计数法测定建立了相关回归方程。结果表

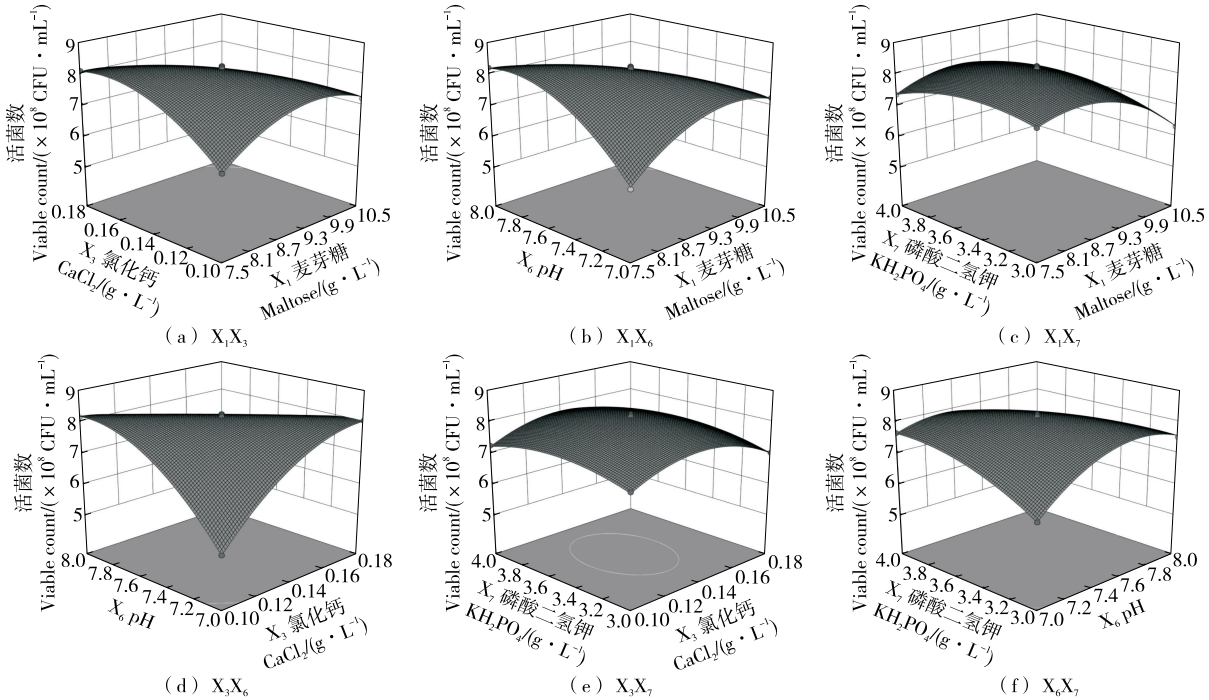


图 9 各因素交互作用的响应面图

Figure 9 Response surface diagram of the interaction of various factors

明,侧孢短芽孢杆菌菌悬液浓度与活菌数之间具有良好线性关系($R^2 > 0.999$),可用于侧孢短芽孢杆菌活菌数的测定。侧孢短芽孢杆菌培养基成分及发酵条件的最佳组合为麦芽糖添加量 8.75 g/L、氯化钙添加量 0.17 g/L、初始 pH 7.07、磷酸二氢钾添加量 3.73 g/L,优化后发酵液中活菌数为 8.12×10^8 CFU/mL,较优化前提高了 3.02 倍。后续将对侧孢短芽孢杆菌产抗菌肽、蛋白酶、几丁质酶等方面开展研究。

参考文献

- [1] HERMANT Y, PALPAL-LATOC D, KOVALENKO N, et al. The total chemical synthesis and biological evaluation of the cationic antimicrobial peptides, laterocidine and brevicidine[J]. Journal of Natural Products, 2021, 84(8): 2 165-2 174.
- [2] 李馨宇, 邹德勇, 杜春梅. 侧孢短芽孢杆菌的研究进展[J]. 中国农学通报, 2018, 34(14): 28-34.
LI X Y, ZOU D Y, DU C M. Research advance in *Brevibacillus laterosporus*[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2018, 34(14): 28-34.
- [3] WANG X N, ZHANG J C, WANG X F, et al. The growth-promoting mechanism of *Brevibacillus laterosporus* AMCC100017 on apple rootstock *Malus robusta*[J]. Horticultural Plant Journal, 2022, 8(1): 22-34.
- [4] ZHAO Z, ZHAO C, DO H, et al. *Brevibacillus laterosporus* ZN5 induces different carbonate precipitations of lead in ammonification and nitrate assimilation processes[J]. Geomicrobiology Journal, 2020, 37(8): 764-773.
- [5] 李理想, 江厚龙, 张艳, 等. 施用侧孢短芽孢杆菌对烟草根际微生态及产量和品质的影响[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2023, 49(2): 159-164.
LI L X, JIANG H L, ZHANG Y, et al. Effects of application of *Brevibacillus laterosporus* on rhizosphere microecology, yield and quality of tobacco[J]. Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences), 2023, 49(2): 159-164.
- [6] WU Y, ZHOU L, LU F, et al. Discovery of a novel antimicrobial lipopeptide, brevicillin V, from *Brevibacillus laterosporus* fmb70 and its application on the preservation of skim milk[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(45): 12 452-12 460.
- [7] 杨培洁, 李腾, 陈晓红, 等. MTT 法测定瑞士乳杆菌 MB2-1 活菌数[J]. 食品科学, 2013, 34(20): 99-102.
YANG P J, LI T, CHEN X H, et al. MTT colorimetric method for *Lactobacillus helveticus* MB 2-1 viable cell counting[J]. Food Science, 2013, 34(20): 99-102.
- [8] 周大祥, 熊书, 谢桂香. 利用 MTT 建立一种快速检测青枯菌活菌的方法[J]. 生物学杂志, 2019, 36(1): 103-106.
ZHOU D X, XIONG S, XIE G X. Establishment of a method for rapid detecting only viable cells of *Ralstonia Solanacearum* by MTT[J]. Journal of Biology, 2019, 36(1): 103-106.
- [9] STOCKERT J C, HOROBIN R W, COLOMBO L L, et al. Tetrazolium salts and formazan products in cell biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives[J]. Acta Histochemica, 2018, 120(3): 159-167.
- [10] 王丹, 黄紫藤, 马越, 等. 蓝莓花色苷对鸡胚成纤维细胞系生长的影响[J]. 食品与机械, 2016, 32(8): 13-16.
WANG D, HUANG Z T, MA Y, et al. Effect of anthocyanins from blueberry on primary chicken embryonic fibroblast[J]. Food & Machinery, 2016, 32(8): 13-16.
- [11] YAP L S, LEE W L, TING A S Y. Optimization of *L-asparaginase* production from endophytic *Fusarium proliferatum* using OFAT and RSM and its cytotoxic evaluation [J]. Journal of Microbiological Methods, 2021, 191: 106358.
- [12] 解万翠, 杨亚东, 杨锡洪, 等. 蜡状芽孢杆菌产中性蛋白酶发酵条件的优化[J]. 食品与机械, 2016, 32(1): 26-30, 129.
XIE W C, YANG Y D, YANG X H, et al. Response surface methodology optimization of fermentation conditions for neutral protease production by *Bacillus cereus*[J]. Food & Machinery, 2016, 32(1): 26-30, 129.
- [13] 游佳欣, 应文俊, 杨倩倩, 等. 杨木酶水解液培养枯草芽孢杆菌试验[J]. 林业工程学报, 2021, 6(4): 94-100.
YOU J X, YING W J, YANG Q Q, et al. The production of *Bacillus subtilis* by fermentation from enzymatic hydrolysate of poplar[J]. Journal of Forestry Engineering, 2021, 6(4): 94-100.
- [14] 吴窃画, 谈书华, 范超超, 等. MTT 法检测细菌细胞数的主要影响因素分析[J]. 微生物学杂志, 2011, 31(3): 67-72.
WU Y H, TAN S H, FAN C C, et al. Analysis of influencing factors on the bacterial cell counting with the MTT method[J]. Journal of Microbiology, 2011, 31(3): 67-72.
- [15] 马林玉, 胡家银, 林焯, 等. MTT 法检测奶牛乳房炎无乳链球菌活菌数的研究[J]. 中国动物传染病学报, 2021, 29(6): 100-104.
MA L Y, HU J Y, LIN X, et al. Development of MTT method for viable count of *Streptococcus agalactiae* causing bovine mastitis[J]. Chinese Journal of Animal Infectious Diseases, 2021, 29(6): 100-104.
- [16] 高琼. 大肠杆菌在土壤中的迁移特性实验研究[D]. 天津: 天津理工大学, 2011: 16-18.
GAO Q. Experimental study on migration characteristics of *Escherichia coli* in soils [D]. Tianjin: Tianjin University of Technology, 2011: 16-18.
- [17] 吴丽媛. 甜瓜细菌性果斑病生防菌的筛选及其抑菌机理的初步研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2013: 18-21.
WU L Y. Screening of biocontrol agent against to *Acidovorax citrulli* and its antibacterial mechanism [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2013: 18-21.
- [18] 陈丹霞, 居晨玉, 郑永标, 等. 培养基组分对细脚拟青霉液体发酵生物量与有机粗提物量的影响[J]. 食用菌, 2012(2): 23-24.
CHEN D X, JU C Y, ZHENG Y B, et al. Effects of culture medium components on liquid fermentation biomass and organic crude extracts of *Paecilomyces tenuipes*[J]. Edible Fungi, 2012(2): 23-24.

(下转第 62 页)

- [9] 肖仕杰, 王巧华, 李春芳, 等. 傅里叶变换中红外光谱的牛奶品质无损检测分级[J]. 光谱学与光谱分析, 2022, 42(4): 1 243-1 249.
- XIAO S J, WANG Q H, LI C F, et al. Non destructive testing and grading of milk quality using Fourier transform mid infrared spectroscopy[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2022, 42(4): 1 243-1 249.
- [10] 王丰霞, 冯骁骄. 凯氏定氮法检测牛奶中蛋白质含量的不确定度评定[J]. 粮食加工, 2022, 47(4): 127-129.
- WANG F X, FENG X J. Evaluation of uncertainty in the determination of protein content in milk by Kjeldahl nitrogen method[J]. Grain Processing, 2022, 47(4): 127-129.
- [11] 夏杨毅, 赵鸾. 高光谱成像技术在肉类安全无损检测的应用研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2020, 39(12): 6-13.
- XIA Y Y, ZHAO L. Research progress on the application of hyperspectral imaging technology in non-destructive testing of meat safety[J]. Food Science and Biotechnology, 2020, 39(12): 6-13.
- [12] 李琴, 朱家明, 郎红, 等. 基于带 RBF 核的 SVM 模型对红酒品质的精准分类[J]. 湖北大学学报(自然科学版), 2021, 43(4): 417-422.
- LI Q, ZHU J M, LANG H, et al. Accurate classification of red wine quality based on SVM model with RBF kernel[J]. Journal of Hubei University (Natural Science Edition), 2021, 43(4): 417-422.
- [13] 胡鹏伟, 刘江平, 薛河儒, 等. BP 神经网络结合变量选择方法在牛奶蛋白质含量检测中的应用[J]. 光电子·激光, 2022, 33(1): 23-29.
- HU P W, LIU J P, XUE H R, et al. The application of BP neural network combined with variable selection method in the detection of milk protein content[J]. Optoelectron Laser, 2022, 33(1): 23-29.
- [14] 殷坤, 刘金明, 张东杰, 等. 基于近红外光谱的大米蛋白质含量快速检测[J]. 食品与机械, 2021, 37(5): 82-88, 175.
- YIN K, LIN J M, ZHANG D J, et al. Rapid detection of rice protein content based on near-infrared spectroscopy[J]. Food & Machinery, 2021, 37(5): 82-88, 175.
- [15] 周雨帆, 李胜旺, 杨奎河, 等. 基于轻量级卷积神经网络的苹果表面缺陷检测方法[J]. 河北工业科技, 2021, 38(5): 388-394.
- ZHOU Y F, LI S W, YANG K H, et al. Apple surface defect detection method based on lightweight convolutional neural network[J]. Hebei Industrial Technology, 2021, 38(5): 388-394.
- [16] 杨双艳, 杨紫刚, 张四伟, 等. 基于近红外光谱和 PSO-SVM 算法的烟叶自动分级方法[J]. 贵州农业科学, 2018, 46(12): 141-144.
- YANG S Y, YANG Z G, ZHANG S W, et al. Automatic tobacco grading method based on near infrared spectroscopy and PSO-SVM algorithm[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2018, 46(12): 141-144.
- [17] 王阳阳, 黄勋, 陈浩, 等. 基于同态滤波和改进 K-means 的苹果分级算法研究[J]. 食品与机械, 2019, 35(12): 47-51, 112.
- WANG Y Y, HUANG X, CHEN H, et al. Apple grading algorithm based on homomorphic filtering and improved K-means[J]. Food & Machinery, 2019, 35(12): 47-51, 112.
- [18] 王立扬, 张瑜, 沈群, 等. 基于改进型 LeNet-5 的苹果自动分级方法[J]. 中国农机化学报, 2020, 41(7): 105-110.
- WANG L Y, ZHANG Y, SHEN Q, et al. Automatic apple classification method based on improved LeNet-5[J]. Journal of Chinese Agricultural Mechanization, 2020, 41(7): 105-110.
- [19] 杨志锐, 郑宏, 郭中原, 等. 基于网中网卷积神经网络的红枣缺陷检测[J]. 食品与机械, 2020, 36(2): 140-145, 181.
- YANG Z R, ZHENG H, GUO Z Y, et al. Defect detection of jujube based on convolutional neural network of net in net[J]. Food & Machinery, 2020, 36(2): 140-145, 181.
- [20] 吴静珠, 李晓琪, 林珑, 等. 基于 AlexNet 卷积神经网络的大米产地高光谱快速判别[J]. 中国食品学报, 2022, 22(1): 282-288.
- WU J Z, LI X Q, LIN L, et al. Rapid hyperspectral discrimination of rice production areas based on AlexNet convolutional neural network[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2022, 22(1): 282-288.

(上接第 35 页)

- [19] 李茂琳, 谭军, 王红英, 等. 一株产胶原蛋白酶细菌的鉴定及产酶条件优化[J]. 食品工业科技, 2019, 40(14): 118-126.
- LI M L, TAN J, WANG H Y, et al. Identification of a collagenase-producing bacterium and optimization of enzyme producing conditions[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(14): 118-126.
- [20] 范海延, 梁胜贤, 王栋, 等. 利用甘薯淀粉生产废水培养侧孢短芽孢杆菌的研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2015(3): 352-356.
- FAN H Y, LIANG S X, WANG D, et al. Production of *Brevibacillus laterosporus* using sweet potato processing wastewater[J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2015(3): 352-356.
- [21] 杨旭, 武天宁, 荀明强, 等. 1 株地衣芽孢杆菌发酵条件研究及其微生物制剂的制备[J]. 饲料研究, 2022, 45(24): 91-96.
- YANG X, WU T N, XUN M Q, et al. Study on fermentation conditions of *Bacillus licheniformis* and preparation of microbial agents[J]. Feed Research, 2022, 45(24): 91-96.
- [22] 刘蒲临, 程德勇, 缪礼鸿. 产几丁质酶侧孢短芽孢杆菌的筛选及其酶学性质研究[J]. 生物技术通报, 2016, 32(6): 174-180.
- LIU P L, CHENG D Y, MIAO L H. Isolation of a chitinase-producing strain *Brevibacillus laterosporus* and its enzymatic properties[J]. Biotechnology Bulletin, 2016, 32(6): 174-180.
- [23] 卜雯丽, 李凤伟, 王杰, 等. 出芽短梗霉固态发酵啤酒糟制备阿魏酰低聚糖和膳食纤维工艺研究[J]. 中国酿造, 2019, 38(5): 38-43.
- BU W L, LI Y W, WANG J, et al. Preparation process of feruloyl oligosaccharides and dietary fiber from brewer's spent grain by solid-state fermentation of *Aureobasidium pullulans* [J]. China Brewing, 2019, 38(5): 38-43.