

## 植物乳杆菌 NMGL2 的安全性评价及其产细菌素发酵条件优化

任青霞<sup>1</sup>, 户行宇<sup>1</sup>, 张敏<sup>2</sup>, 周增佳<sup>1</sup>, 杨贞耐<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>北京工商大学 北京老年营养与健康教育部重点实验室 北京食品营养与人类健康高精尖创新中心 北京 100048

<sup>2</sup>农业农村部规划设计研究院 北京 100125)

**摘要** 目前乳酸菌发酵产细菌素的含量较低,因此优化产细菌素的发酵条件是最直接的方式。对分离自内蒙古传统干酪的植物乳杆菌 NMGL2 的抗生素药敏性、溶血性以及全基因组序列进行分析,结果表明该菌株无明显毒力作用,不携带高毒力因子,抗性基因无转移风险。对植物乳杆菌 NMGL2 产细菌素的发酵条件进行研究,以金黄色葡萄球菌为指示菌,通过单因素实验以及基于接种率、发酵起始 pH 值、培养温度 3 个因素的 Box-Behnken 法三因素三水平的响应面分析,确定植物乳杆菌 NMGL2 产细菌素的最佳发酵条件是:发酵起始 pH 7.0,接种率 1.3%,培养温度 37℃。验证试验结果显示在此优化发酵条件下获得对指示菌(金黄色葡萄球菌)的抑菌圈直径为 13.8 mm,与模型预测值(13.4 mm)基本吻合,拟合率达到 96.64%,证明该模型可靠有效。本研究为植物乳杆菌 NMGL2 发酵生产细菌素及其应用提供了技术参考。

**关键词** 植物乳杆菌 NMGL2; 全基因组测序; 安全性; 细菌素; 发酵条件优化

**文章编号** 1009-7848(2024)09-0184-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.09.017

植物乳杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*)是至今应用广泛的乳酸菌菌种之一<sup>[1-2]</sup>。乳酸菌通常具有 GRAS(公认安全性)地位,随着不同来源植物乳杆菌菌株的分离,新菌株的安全性在一定程度上受到关注<sup>[3-4]</sup>。从生化(表型)和遗传水平(基因型)上对菌株进行安全性评价,包括菌株的耐药性和毒性,以及耐药基因的水平转移等<sup>[5-6]</sup>,对于植物乳杆菌新菌株的安全应用具有重要意义。

乳酸菌被广泛研究的重要原因之一是其自身能产生抗菌物质,应用于肉类、乳制品和海鲜等食品中能起到防腐、保鲜和抑菌作用<sup>[7]</sup>。抗菌物质中特别是细菌素,具有高效抑菌、无毒无害、无抗药性、不易残留和稳定性强的特点<sup>[8]</sup>,其本质是由乳酸菌细胞中的核糖体合成的一类具有抑菌活性的蛋白质<sup>[9]</sup>。细菌素作为一种天然防腐剂可以成为人工合成防腐剂或抗生素的潜在替代品<sup>[10]</sup>。然而,目前乳酸菌发酵产细菌素的含量较低,严重制约了其提取纯化,致其研究应用受到限制<sup>[11]</sup>。细菌素的产生受多种因素的影响,包括菌株、接种率、pH 值和温度等<sup>[12-13]</sup>。这不仅取决于其中一种因素,而是多种因素组合的影响<sup>[14-15]</sup>。通过优化组合这些因

素,可有效提高细菌素的产量。

植物乳杆菌 NMGL2 是从内蒙古传统干酪中分离的 1 株益生菌,前期研究表明其可产细菌素且对食源性致病菌具有良好的抑菌效果<sup>[6]</sup>。本文首先从表型和基因型方面研究植物乳杆菌 NMGL2 抗生素的耐药性和毒性,然后采用单因素实验和响应面分析相结合的方法优化发酵起始 pH 值、培养温度、接种率和装液量等因素,研究植物乳杆菌 NMGL2 发酵产细菌素的最佳培养条件,为实现植物乳杆菌 NMGL2 细菌素的发酵生产提供技术参考。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料与仪器

**1.1.1 菌株与培养基** 植物乳杆菌 NMGL2 保存于北京工商大学食品与健康学院乳制品实验室;指示菌为金黄色葡萄球菌(CMCC 26071),来源于中国工业微生物菌种保藏管理中心;MRS 肉汤培养基、LB 肉汤培养基,北京奥博星生物技术有限公司;琼脂粉(生化试剂),国药集团化学试剂有限公司。

**1.1.2 仪器** FE20 型数显 pH 计,上海梅特勒托利多仪器有限公司;Infinite M200 PRO NanoQuant 酶标仪,瑞士 Tecan 公司;全自动超高清抑菌圈分析仪 Scan 4000,法国 interscience;

收稿日期: 2023-09-18

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32272296)

第一作者: 任青霞,女,硕士生

通信作者: 杨贞耐 E-mail: yangzhenai@th.btbu.edu.cn

HZQ-Q; 恒温培养箱和 HWS12 型恒温水浴锅, 上海一恒科学仪器有限公司; MLS-3750 高压蒸汽灭菌锅, 日本 Sanyo 公司; CR21 III 低温冷冻离心机, 美国 Bio-Rad 公司。

## 1.2 试验方法

1.2.1 植物乳杆菌 NMGL2 和指示菌的培养 将植物乳杆菌 NMGL2 按体积分数 2% 接种至无菌的 MRS 液体培养基中摇匀, 37 °C 恒温培养箱静置培养 24 h 进行活化后与 50% 甘油 1:1 混合保存在 -80 °C 中, 使用前传代培养 2 次。

金黄色葡萄球菌 (CMCC 26071) 作为指示菌按 1% 接种至无菌的 LB 液体培养基中混匀, 于 37 °C 培养 24 h 活化后备用。

1.2.2 无细胞上清液的制备 植物乳杆菌 NMGL2 按体积分数 2% 接种率接种到 MRS 液体培养基, 37 °C 条件下静置培养 28 h, 离心取上清, 排除酸和过氧化氢的干扰后过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜得到无细胞发酵上清, 检测其抗菌活性。

1.2.3 琼脂扩散法测定抑菌活性 采用琼脂扩散法来测试样品抑菌活性: 向无菌培养皿中倒入 8 mL 1.5% 的琼脂作为底板, 凝固后将无菌牛津杯依次垂直摆放在琼脂底板表面, 向冷却至 45 °C 左右含 0.75% 琼脂的 LB 培养基中加入 1 mL 指示菌 (*Staphylococcus aureus* CMCC 26071), 倾倒入 8 mL 含指示菌的培养基于底层琼脂上, 待充分冷却凝固后拔出牛津杯, 取 100  $\mu\text{L}$  样品加在各孔中, 每个样品做 3 个平行, 4 °C 冰箱中扩散 2 h 后移至 37 °C 培养箱中过夜培养, 使用全自动超高清抑菌圈分析仪 Scan 4000 测量抑菌圈直径。

1.2.4 药敏性试验 纸片扩散法 (K-B 法) 测试植物乳杆菌 NMGL2 的药敏性。取 1 mL 培养好的植物乳杆菌 NMGL2 菌悬液加入到冷却至 45 °C 的无菌 MRS 固体培养基中, 摇匀后倾倒入无菌培养皿中, 待凝固后使用无菌镊子让标准药敏纸片紧贴于培养基上, 放入 37 °C 培养箱中培养 24 h 后, 测量各药敏纸片形成的抑菌圈直径, 每种药敏纸片进行 3 次平行试验。依据不同抗生素的抑菌圈标准判断植物乳杆菌 NMGL2 对所用抗生素的敏感程度, 其敏感程度分为敏感 (S), 耐药 (R) 或中介度 (I)。本研究使用的药敏纸片包括  $\beta$ -内酰胺类的青霉素和阿莫西林、氨基糖甙类的阿米卡星和

庆大霉素、大环内酯类的红霉素和阿奇霉素、喹诺酮类的诺氟沙星和恩诺沙星、氯霉素类的氯霉素、利福霉素的利福平、磺胺类的复方新诺明、林可酰胺类的林可霉素。

1.2.5 溶血性试验 取活化后的植物乳杆菌 NMGL2 的菌悬液, 平板划线接种于哥伦比亚血琼脂平板上, 37 °C 厌氧培养 48 h 后观察平板上生长菌落的溶血情况。以具有溶血性的金黄色葡萄球菌为阳性对照。若菌落周围由于红细胞的不完全破裂形成草绿色环, 则为  $\alpha$  溶血; 若菌落周围由于红细胞的完全破裂形成界限分明、完全透明的溶血环, 则为  $\beta$  溶血; 若菌落周围的培养基没有变化, 即为不溶血, 属于  $\gamma$ -型溶血。

1.2.6 全基因组测序分析植物乳杆菌 NMGL2 的致病系统 植物乳杆菌 NMGL2 按 2% (V/V) 接种至 MRS 液体培养基, 37 °C 条件下静置培养 24 h 后 4 °C、8 000 $\times g$  离心 10 min 取菌体, 然后送至上海美吉生物科技有限公司进行全基因组测序。将得到的全基因组序列通过 Diamond 软件与 VFDB 毒力基因数据库和 CARD 抗生素抗性基因数据库进行比对, 预测毒力基因和耐药基因。

## 1.2.7 单因素实验

1.2.7.1 接种率 将植物乳杆菌 NMGL2 分别按体积分数 0.5%, 1%, 2%, 4%, 8%, 10% 的接种率分别接种于 100 mL 装有 100% 无菌 MRS 液体培养基的锥形瓶中, 发酵起始 pH 为 7, 37 °C 温度下静置培养 24 h 后, 测定发酵上清液的抑菌活性。每组试验做 3 次平行取其平均值。

1.2.7.2 发酵起始 pH 值 将植物乳杆菌 NMGL2 按体积分数 1% 分别接种于 100 mL 装有 100% 无菌 MRS 液体培养基的锥形瓶中, 发酵起始 pH 值分别为 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 37 °C 温度下静置培养 24 h 后, 测定发酵上清液的抑菌活性。每组试验做 3 次平行取其平均值。

1.2.7.3 培养温度 将植物乳杆菌 NMGL2 按体积分数 1% 接种于 100 mL 装有 100% 无菌 MRS 液体培养基的锥形瓶中, 发酵起始 pH 为 7.0, 分别在 25, 30, 35, 37, 40, 45 °C 温度下静置培养 24 h 后, 测定发酵上清液的抑菌活性。

1.2.7.4 发酵容器装液量 将植物乳杆菌 NMGL2 按体积分数 1% 分别接种于 100 mL 装有 10%,

20%,40%,60%,80%,100%无菌 MRS 液体培养基的锥形瓶中,发酵起始 pH 为 7.0,37 °C 温度下静置培养 24 h 后,测定发酵上清液的抑菌活性。每组试验做 3 次平行取其平均值。

1.2.8 Box-Behnken 响应面分析试验 根据接种率、发酵起始 pH 值、发酵容器装液量、培养温度进行的单因素实验结果,利用 Box-Behnken 的中心组合试验设计原理,确定中心组合试验因素与水平,并以抑菌圈直径为响应值进行三因素三水平的响应面分析试验,优化植物乳杆菌 NMGL2 产细菌素的发酵条件。试验因素水平及编码如表 1。

1.2.9 数据统计分析 所有试验均设置 3 个平行试验,数据结果表示为平均值±标准偏差。利用 SPSS 20.0 统计学软件中的单因素方差分析评价不同处理间的显著差异( $P \leq 0.05$ ),利用 originPro 2023 进行绘图,不同的字母表示每个参数之间的显著差异( $P \leq 0.05$ ),相同的字母表示每个参数之间的均值没有显著差异( $P > 0.05$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 抗生素耐药性

了解益生菌菌株的抗生素耐药性,避免所携

表 1 植物乳杆菌 NMGL2 产细菌素优化的发酵条件的因子水平表

Table 1 The factors and levels of optimization of fermentation conditions to product bacteriocin by *L. plantarum* NMGL2

变量	水平		
	-1	0	1
A(发酵起始 pH)	6.5	7	7.5
B(接种率)/%	0.5	1	2
C(培养温度加水量)/°C	35	37	40

带耐药基因在食品中或食用后在肠道中发生水平转移导致的潜在健康危害,对于菌株的安全使用至关重要<sup>[16]</sup>。本研究根据抑菌圈直径的大小判断植物乳杆菌 NMGL2 对抗生素的敏感程度。结果如表 2 所示,植物乳杆菌 NMGL2 对阿米卡星、庆大霉素、诺氟沙星、恩诺沙星和林可霉素耐药,对其它抗生素敏感或中度敏感。这与其它植物乳杆菌菌株对抗生素耐药性的结果相似<sup>[17-19]</sup>,说明植物乳杆菌 NMGL2 与已报道的植物乳杆菌菌株具有一些类似的药敏特性和体外安全性。

表 2 植物乳杆菌 NMGL2 对抗生素的药敏性

Table 2 Antibiotic susceptibility of *L. plantarum* NMGL2

抗生素种类	抗生素名称	抑菌圈直径/mm			耐药性
		耐药(R)	中介(I)	敏感(S)	
β-内酰胺类	青霉素	≤13	14~17	≥18	S
	阿莫西林	≤19	20~27	≥28	S
氨基糖甙类	阿米卡星	≤14	15~16	≥17	R
	庆大霉素	≤12	13~14	≥15	R
大环内酯类	红霉素	≤13	14~22	≥23	S
	阿奇霉素	≤13	14~17	≥18	I
氟喹诺酮类	诺氟沙星	≤12	13~16	≥17	R
	恩诺沙星	≤13	14~16	≥17	R
氯霉素类	氯霉素	≤12	13~17	≥18	S
利福霉素	利福平	≤16	17~19	≥20	I
磺胺类	SXT 复方新诺明	≤18	19~25	≥26	I
林可酰胺类	林可霉素	≤14	15~20	≥21	R

注:S:敏感;I:中度敏感;R:耐药。

有关乳酸菌的抗生素抗性研究的传统方法如滤纸片扩散法存在一定的缺陷,比如对不同抗生素抗性的临界值不统一<sup>[20]</sup>。采用分子生物学方法

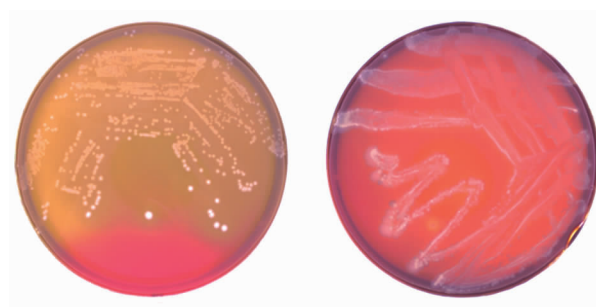
可以从基因水平分析乳酸菌中是否存在抗性基因<sup>[21]</sup>。通过与抗生素抗性基因数据库(CARD)比对,植物乳杆菌 NMGL2 中共鉴定出 162 个耐药基



因,其中染色体上 156 个耐药基因,其介导的耐药性通常是垂直传播。质粒 A 中存在 5 个不同的耐药基因,其中携带 1 个可水平转移的耐药基因为介导四环素类耐药的 *tet(A)* 基因,质粒 B 中只存在 1 个耐药基因。据报道,尽管含有质粒的益生菌有可能通过与质粒接合引起耐药基因水平转移的风险,如转移到共生菌或致病菌中<sup>[22]</sup>,但绝大部分益生菌菌株对抗生素的耐药性是非转移性的,且该菌株质粒上还少量耐药基因。进一步基于药敏试验结果,确定 14 个林可酰胺类耐药基因,按耐药机制分为 5 个外排泵系统耐药基因(3 个 *lmrB*, 2 个 *lmrD*)、7 个抗生素靶点保护系统耐药基因(1 个 *mrC*, 1 个 *lsaC*, 1 个 *lsaA*, 1 个 *tva* (A), 1 个 *vmlR*, 2 个 *optRA*)、1 个抗生素失活耐药基因(*lin*)和 1 个抗生素靶点改变系统耐药基因(*Erm(K)*)。另外确定 23 个氟喹诺酮类耐药基因均是外排泵系统相关耐药基因。没有鉴定出氨基糖甙类相关的耐药基因。一般来说,基因型和表型并不完全重合。虽然大环内酯类的抗性蛋白注释量较高,但植物乳杆菌 NMGL2 对大环内酯类抗生素敏感,表明该抗性未得到有效表达。因此,并非所有的抗性基因均会表达出相应的抗性。

## 2.2 溶血性

溶血性检测是评价乳酸菌体外安全性的重要指标。使用哥伦比亚血琼脂平板检测植物乳杆菌 NMGL2 的溶血情况,由图 1 看出,阳性对照组金



(a)植物乳杆菌 NMGL2

(b)阳性对照

注:阳性对照为金黄色葡萄球菌。

图 1 植物乳杆菌 NMGL2 溶血性试验

Fig.1 Hemolytic test of *L. plantarum* NMGL2

黄色葡萄球菌出现明显的细胞破裂溶解以及透明的溶血圈,属于  $\gamma$ -溶血。植物乳杆菌 NMGL2 既无草绿色环也无透明溶血圈,说明该菌株无溶血性,具有体外安全性。本试验结果与其它一些研究所报道的植物乳杆菌未检测出溶血现象一致<sup>[19,23]</sup>。

通过比对 VFDB 核心数据库,在植物乳杆菌 NMGL2 中注释了 270 个毒力因子。其中,毒素占攻击性毒力因子的 33.75%,27 种毒素的种类及其在 DNA 上的位置见表 3。溶血试验显示,植物乳杆菌 NMGL2 属于  $\gamma$ -型溶血。这表明植物乳杆菌 NMGL2 的溶血素/溶细胞素基因不表达,或轻微表达而无溶血作用。另外许多研究表明一些毒力因子可能对益生菌发挥益生作用十分重要,不应被视为恶性毒力因子<sup>[24-25]</sup>。

表 3 植物乳杆菌 NMGL2 中 27 个毒素基因位点

Table 3 Genes site of 27 toxin in *L. plantarum* NMGL2

毒素	基因数量	基因位点
$\alpha$ -溶血素 (VF0 225)	3	gene 0 275, gene 1 535, gene 2 447
$\beta$ -溶血素/溶细胞素 (CVF171)	13	gene 0 415, gene 1 474, gene 1 674, gene 1 708, gene 1 897, gene 1 898, gene 2 280, gene 2 476, gene 2 538, gene 2 564, gene 2 652, gene 2 744, gene 3 196
大肠杆菌素 (VF0 573)	1	gene 1 701
溶细胞素 (VF0 356)	2	gene 2 598, gene 2 660
溶血素 III (CVF793)	1	gene 2 901
溶血素 (VF0 207)	1	gene 0 380
RTX 毒素 (CVF263)	4	gene 0 962, gene 1 132, gene 1 434, gene 1 449
TcdA (VF0 376)	1	gene 3 123
Cya (VF0 028)	1	gene 1 008

## 2.3 可移动元件分析

为了进一步评估植物乳杆菌 NMGL2 中耐药

基因或毒力基因的水平基因转移,分析了移动元件如基因组岛,前噬菌体,CRISPR-Cas,整合子和

插入序列(如表4)。其中噬菌体是最有可能通过转化/偶联和转导过程参与细胞间遗传交换的载体<sup>[6]</sup>,在植物乳杆菌 NMGL2 的基因组中鉴定出6个噬菌体序列(均位于染色体中),然而,这些噬菌体序列没有整合酶蛋白,也没有一个耐药基因或毒力基因位于噬菌体区域内。插入序列分析中鉴定出两种类型的插入序列(ISP1 和 IS1310)分别起源于植物乳杆菌和海氏肠球菌的转座酶,在 IS 元件区域同样没有鉴定出耐药基因或毒力基因。因此,植物乳杆菌 NMGL2 中存在的耐药基因或毒力基因转移到其它细菌的风险较低,该菌株对功能性和可转移的 AMR 特性没有安全问题。

## 2.4 单因素实验

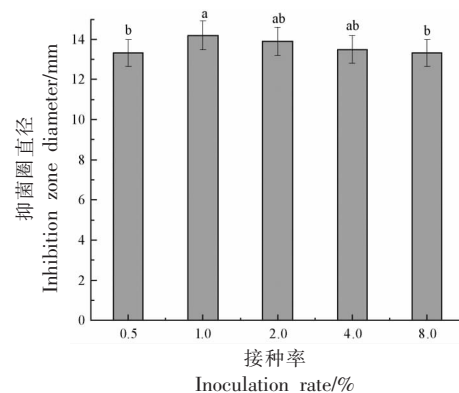
**2.4.1 接种率** 如图2,接种率的变化对植物乳杆菌 NMGL2 发酵产细菌素有一定影响( $P < 0.05$ )。在接种率为1%时抑菌圈直径达到最大(14.20 mm±0.61 mm)。随着接种率的增加,抑菌圈直径开始减小,可能是植物乳杆菌 NMGL2 生长竞争作用,菌体代谢能力减弱,从而导致合成细菌素达到饱和,甚至蛋白质开始降解使得抑菌活性也就随之降低。因此,植物乳杆菌 NMGL2 发酵产生细菌素的最适接种率为1%。

**2.4.2 发酵起始 pH 值** 如图3,发酵起始 pH 值对植物乳杆菌 NMGL2 发酵产细菌素影响显著( $P < 0.05$ )。发酵起始 pH 值在3~7时,随着发酵起始 pH 值增加,抑菌圈直径也随之变大,由(12.43±0.32) mm 增加到(13.93±0.32) mm,pH=7 时抑菌圈直径达到最大。发酵起始 pH 值持续增加后抑菌圈直径反而开始减小,说明过酸或过碱的条件都会影响植物乳杆菌 NMGL2 发酵合成细菌素的抗菌活性,这可能是极端酸碱环境条件下影响了细菌素的合成机制,如转录翻译;也可能是植物乳杆菌 NMGL2 代谢的细菌素在不同 pH 值环境中被菌体不同程度的吸附。因此,pH 7 为植物乳杆菌 NMGL2 发酵产生细菌素的最适发酵起始 pH 值。

**2.4.3 培养温度** 如图4,培养温度对植物乳杆菌 NMGL2 发酵产细菌素影响显著( $P < 0.05$ )。随着培养温度的上升,抑菌圈直径不断增加,直到培养温度为 37 °C 时达到最大(13.80 mm±0.10 mm)。然而当温度达到 45 °C 后抑菌圈直径明显下降到 11.83 mm±0.15 mm。可能是高温抑制了细菌菌体

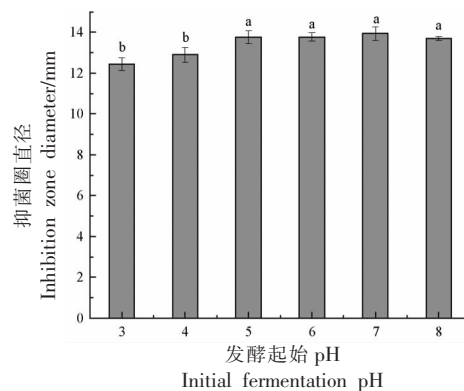
表4 移动元件以及相关的耐药基因和毒力基因统计数据  
Table 4 Mobile elements and associated antibiotic resistance genes and virulence factor related

gene statistics			
可移动元件	数量	耐药基因	毒力基因
基因组导	9	5	7
噬菌体	0	0	0
CRISPR-Cas	10	0	0
整合子	0	0	0
插入序列	9	0	0



注:小写字母不同表示差异显著( $P < 0.05$ )。

图2 接种率对植物乳杆菌 NMGL2 发酵产细菌素的影响  
Fig.2 Effect of inoculation rate on bacteriocin production by *L. plantarum* NMGL2

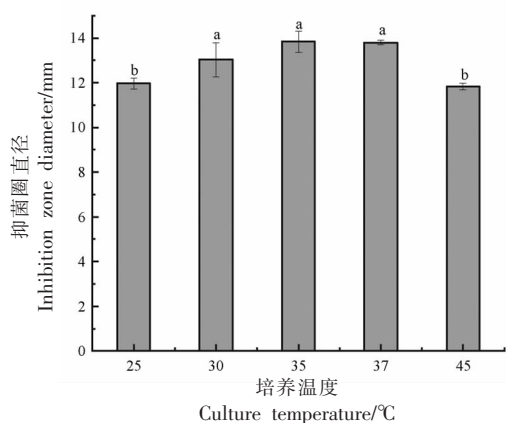


注:小写字母不同表示差异显著( $P < 0.05$ )。

图3 发酵起始 pH 值对植物乳杆菌 NMGL2 发酵产细菌素的影响

Fig.3 Effect of initial fermentation pH on bacteriocins produced by *L. plantarum* NMGL2

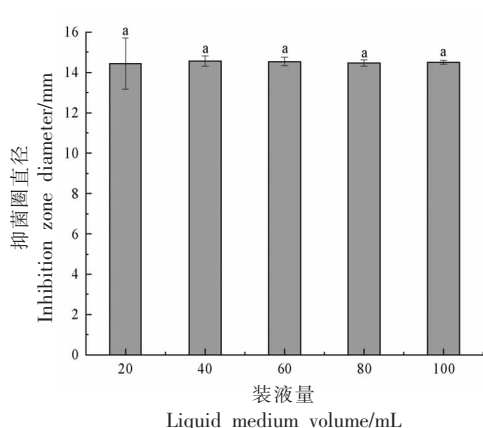
的生长,同时也抑制了细菌素合成过程中酶的活性,从而导致细菌素的抗菌活性降低。因此,37 °C 为植物乳杆菌 NMGL2 发酵产生细菌素最适培养



注:小写字母不同表示差异显著( $P < 0.05$ )。

图4 培养温度对植物乳杆菌 NMGL2 发酵产细菌素的影响

Fig.4 Effect of culture temperature on bacteriocin production by *L. plantarum* NMGL2



注:小写字母不同表示差异显著( $P < 0.05$ )。

图5 装液量对植物乳杆菌 NMGL2 发酵产细菌素的影响

Fig.5 Effect of liquid medium volume on bacteriocin production by *L. plantarum* NMGL2

温度。

2.4.4 装液量 如图5,装液量对植物乳杆菌 NMGL2 发酵代谢细菌素无明显影响( $P > 0.05$ )。

## 2.5 响应面分析

2.5.1 构建回归模型和方差分析 根据单因素实验结果,植物乳杆菌 NMGL2 发酵产细菌素的最佳培养条件为:接种率1%,发酵起始 pH 7.0,培养温度 37 °C。使用 Box-Behnken 中心组合试验设计三因素三水平 17 个试验组合的方案,进一步研究接种率、发酵起始 pH 值和培养温度对植物乳杆菌 NMGL2 发酵产细菌素的影响,以抑菌圈直径为响应值。中心组合试验方案及结果如表5所示。

根据 Minitab 软件中的分析响应曲面设计进行模型汇总和回归拟合分析,得到二次多项式回归方程: $Y = -203.5 + 44.42A + 7.83B + 3.04C - 2.768A^2 - 1.310B^2 - 0.0295C^2 - 0.798AB - 0.1264AC - 0.0303BC$

式中: $Y$ 为抑菌圈直径; $A$ 为发酵起始 pH 值; $B$ 为接种率; $C$ 为培养温度。

对回归模型进行方差分析,对各项进行显著性检验(见表6), $P < 0.0001$ 说明回归模型是极显著的, $P = 0.501 > 0.05$ 说明失拟项不显著,回归模型的决定系数为  $R^2 = 96.64%$ , $R^2$ 用于衡量模型预测能力, $R^2$ 越接近1表示预测效果越好,模型拟合程度越好,表明试验误差小<sup>[26]</sup>;二次多项式回归方程系数的显著性分析表明:一次项  $A$  具有显著性,

表5 中心组合试验设计方案及结果

Table 5 Design and results of central composite tests

试验号	因素			抑菌圈直径/mm
	A	B	C	
1	-1	-1	0	11.50
2	1	-1	0	12.20
3	-1	1	0	12.40
4	1	1	0	11.85
5	-1	0	-1	12.30
6	1	0	-1	12.65
7	-1	0	1	12.45
8	1	0	1	12.20
9	0	-1	-1	12.65
10	0	1	-1	12.57
11	0	-1	1	12.33
12	0	1	1	12.60
13	0	0	0	13.37
14	0	0	0	13.20
15	0	0	0	13.17
16	0	0	0	13.25
17	0	0	0	13.55

$B$ 、 $C$ 不显著;二次项  $A^2$  和  $B^2$  极显著, $C^2$ 不显著;交互项  $AB$  显著, $AC$  和  $BC$ 不显著。各项因子对植物乳杆菌 NMGL2 代谢产生细菌素抑菌圈直径影响的大小依次是  $A$ (发酵起始 pH) $>C$ (培养温度) $>B$ (接种率)。综上,该模型能较好的反映出响应值

抑菌圈直径与自变量发酵起始 pH 值、接种率和培养温度之间的关系，故可以采用该模型对植物乳杆菌 NMGL2 所产细菌素的发酵条件进行分析和优化。

表 6 回归模型方差分析

Table 6 Analysis of variance for regression models

来源	自由度	平方和	均方	F 值	P 值	显著性
模型	9	4.750 85	0.527 87	22.37	<0.0001	***
A	1	0.097 43	0.097 43	4.13	0.082	*
B	1	0.004 23	0.004 23	0.18	0.685	
C	1	0.065 04	0.065 04	2.76	0.141	
A <sup>2</sup>	1	1.561 76	1.561 76	66.18	<0.0001	***
B <sup>2</sup>	1	1.443 07	1.443 07	61.15	<0.0001	***
C <sup>2</sup>	1	0.071 53	0.071 53	3.03	0.125	
AB	1	0.377 26	0.377 26	15.99	0.005	**
AC	1	0.101 82	0.101 82	4.31	0.076	
BC	1	0.007 13	0.007 13	0.3	0.6	
残差	7	0.16519	0.023 6			
失拟项	3	0.068 19	0.022 73	0.94	0.501	
纯误差	4	0.097	0.02425			
总和	16	4.916 05				

2.5.2 曲面图和等值线图 由三维曲面图和二维等值线图可反应发酵起始 pH 值、接种率和培养温度的两两交互作用对响应值抑菌圈直径的影响，曲面图的坡度越陡峭则说明两者的交互作用对响应值抑菌圈直径的影响越显著，等值线呈椭圆

圆形说明两者的交互作用对响应值抑菌圈直径的影响越显著<sup>[13]</sup>。如图 6,分别为植物乳杆菌 NMGL2 产细菌素抑菌圈直径与发酵起始 pH 值、接种率和培养温度的三维空间响应面图和等值线图,表明了任意两个影响因子取零水平时其余两个自变

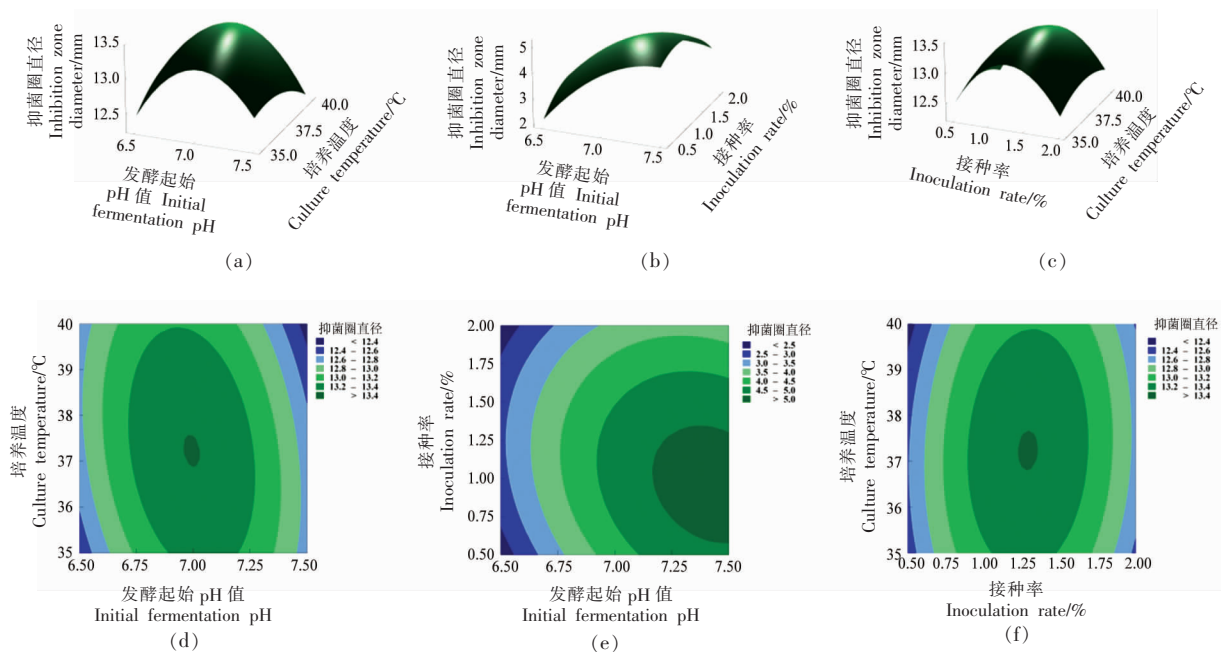


图 6 Box-Behnken 试验的三维空间响应面图和等值线图

Fig.6 3D spatial response surface and contour plot of the Box-Behnken experiment



量对植物乳杆菌 NMGL2 发酵产细菌素的影响。发酵起始 pH 值和接种率交互与响应值抑菌圈直径构成的三维空间曲面图较其它两个图陡峭,且等值线图的中心圆环更扁。说明发酵起始 pH 值和接种率交互作用对植物乳杆菌 NMGL2 发酵产细菌素影响最明显,这也与二次多项式回归方程的显著性检验结果一致。

2.5.3 回归模型优化和验证 二次多项式回归方程中二次项系数都为负数,且曲面图开口向下,说明方程存在极大值。通过最大化的响应优化处理得到最佳发酵条件:发酵起始 pH 7.0,接种率 1.3%,培养温度 37 °C,优化后预测的抑菌圈直径为 13.4 mm,是优化前的 1.02 倍。验证试验结果显示在此优化发酵条件下获得对指示菌(金黄色葡萄球菌)的抑菌圈直径为 13.8 mm,与预测值拟合率达到 96.64%,证明此模型有效且可靠,得到试验条件能够提高抗菌肽产量。但是本研究对细菌素产量的优化提高只考虑了发酵条件,未把培养基成分(如碳源、氮源和糖等)作为考虑对象,在一定程度上还未达到最优效果,未来还需进一步加强发酵培养基优化研究,为实际的工业化应用提供更可靠的科学支撑。

### 3 结论

本研究通过对植物乳杆菌 NMGL2 的抗生素药敏性和溶血性分析,以及基于全基因组测序的毒力因子、耐药基因和可移动元件的系统分析,明确了该菌株的安全性。在此基础上,通过单因素试验和响应面法分析对植物乳杆菌 NMGL2 产细菌素的发酵条件进行了研究,确定了菌株发酵产细菌素的最佳培养条件为:发酵起始 pH 7.0,接种率 1.3%,培养温度 37 °C。本研究为植物乳杆菌 NMGL2 及其产细菌素的应用奠定了技术基础。

### 参 考 文 献

- [1] LIU Y W, LIONG M T, TSAI Y C. New perspectives of *Lactobacillus plantarum* as a probiotic: The gut-heart-brain axis [J]. *Journal of Microbiology*, 2018, 56(9): 601-613.
- [2] ZHANG M, JANG Y Y, CAI M, et al. Characterization and ACE inhibitory activity of fermented milk with probiotic *Lactobacillus plantarum* K25 as analyzed by GC-MS-Based metabolomics approach [J]. *Journal of Microbiology And Biotechnology*, 2020 (6): 903-911.
- [3] 杜雪晴, 陈武, 李婉萍, 等. 华南虎源乳酸菌的分离筛选及体外益生特性研究 [J]. *野生动物学报*, 2023, 44(2): 320-329.  
DU X Q, CHEN W, LI W P, et al. Isolation and screening of lactic acid bacteria from south China tiger and its probiotic characteristics *in vitro* [J]. *Chinese Journal of Wildlife*, 2023, 44(2): 320-329.
- [4] BERNARDEAU M, VERNOUX J. P, HENRI-DUBERNET S, et al. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 126(3): 278-285.
- [5] ZHANG Z Y, LIU C, ZHU Y Z, et al. Safety assessment of *Lactobacillus plantarum* JDM1 based on the complete genome [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2012, 153(1): 166-170.
- [6] WEI C, LUO K, WANG M Y, et al. Evaluation of potential probiotic properties of a strain of *Lactobacillus plantarum* for shrimp farming: From beneficial functions to safety assessment [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 854131.
- [7] DE VUYST L, LEROY F. Bacteriocins from lactic acid bacteria: Production, purification, and food applications [J]. *Journal of Molecular Microbiology And Biotechnology*, 2007, 13(4): 194-199.
- [8] 杜琨. 乳酸菌细菌素抑菌特性及在食品中的应用研究进展 [J]. *中国酿造*, 2022, 41(7): 16-20.  
DU K. Research advances of antimicrobial properties of bacteriocins from lactic acid bacteria and the application in food [J]. *China Brewing*, 2022, 41(7): 16-20.
- [9] LEWIS B B, PAMER E G. Microbiota-based therapies for *Clostridium difficile* and antibiotic-resistant *Enteric Infections* [J]. *Annual Review of Microbiology*, 2017, 71(1): 157-178.
- [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.  
LIU G R, ZHANG J Y, WANG C T, et al. Optimization of fermentation conditions for bacteriocin production from *Bifidobacterium animal* B04 by response surface methodology [J]. *Food Science*, 2013,



- 34(3): 147–152.
- [11] AKKOC N, GHAMAT A, AKCELIK M. Optimisation of bacteriocin production of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MA23, a strain isolated from Boza[J]. International Journal of Dairy Technology, 2011, 64(3): 425–432.
- [12] VEETIL V N, CHITRA V A. Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* using response surface methodology[J]. Cellular and Molecular Biology, 2022, 68(6):105–110.
- [13] LEAL-SÁNCHEZ M V, JIMÉNEZ-DÍAZ R, MALDONADO-BARRAGÁN A, et al. Optimization of bacteriocin production by batch fermentation of *Lactobacillus plantarum* LPCO10[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(9): 4465–4471.
- [14] RASID N H M, HALID N A, SONG A A L, et al. Effects of individual and combined fermentation factors on antimicrobial activity of nisin by *Lactococcus lactis* ATCC 11454[J]. Molecular Biotechnology, 2023, 65(6): 861–870.
- [15] 杨贞耐, 张敏, 高海娜, 等. 一株耐受低温酸性双胁迫的植物乳杆菌及其应用: CN110591955B[P]. 2021-06-15.  
YANG Z N, ZHANG M, GAO H N, et al. A strain of *Lactobacillus plantarum* tolerant to both low temperature and acidic stress and its application: CN110591955B[P]. 2021-06-15.
- [16] 刘勇, 张勇, 张和平. 世界益生菌安全性评价方法[J]. 中国食品学报, 2011, 11(6): 141–151.  
LIU Y, ZHANG Y, ZHANG H P. World probiotic safety evaluation method[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2011, 11(6): 141–151.
- [17] 张晓妍, 沙沈菲, 郭丽丹, 等. 一株后生元菌株的抑菌特性研究及其细菌素基因簇的挖掘[J]. 食品工业科技, 2022, 43(17): 1–10.  
ZHANG X Y, SHA S F, GUO L D, et al. Antimicrobial properties of a postbiotic strain and gene cluster mining of its bacteriocin [J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(17): 1–10.
- [18] 王晓宇, 吴梦娜, 于巧如, 等. 植物乳杆菌 ST3.5 的分离鉴定及其对霉菌的抑制作用[J]. 食品工业科技, 2023, 44(13): 141–149.  
WANG X Y, WU M N, YU Q R, et al. Isolation and Identification of *Lactiplantibacillus plantarum* ST3.5 and its inhibitory effect on mold[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(13): 141–149.
- [19] 赵丽娜, 李钰炜, 张娜, 等. 新疆赛里木酸奶源降胆固醇植物乳杆菌的筛选鉴定及其安全性研究[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(1): 79–85.  
ZHAO L N, LI Y W, ZHANG N, et al. Screening, identification and safety of cholesterol-lowering *Lactobacillus plantarum* from Sayram Kettek in Xinjing[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(1): 79–85.
- [20] KLARE I, KONSTABEL C, WERNER G, et al. Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pedococcus* and *Lactococcus human* isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use[J]. Antimicrobial Chemotherapy, 2007, 59(5): 900–912.
- [21] FLÓREZ A B, AMMOR M S, MAYO B. Identification of tet(M) in two *Lactococcus lactis* strains isolated from a Spanish traditional starter-free cheese made of raw milk and conjugative transfer of tetracycline resistance to *lactococci* and *enterococci* [J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 121(2): 189–194.
- [22] SVARA F, RANKIN D J. The evolution of plasmid-carried antibiotic resistance[J]. BMC Evolutionary Biology, 2011, 11(1): 130.
- [23] 史梅莓, 伍亚龙, 杨恺, 等. 四川泡菜中潜在益生性植物乳杆菌的筛选及安全性评价[J]. 食品工业科技, 2022, 43(22): 165–172.  
SHI M M, WU Y L, YANG K, et al. Screening and safety evaluation of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* in Sichuan Paocai[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(22): 165–172.
- [24] ARCHIBALD F. *Lactobacillus plantarum*, an organism not requiring iron[J]. FEMS Microbiology Letters, 1983, 19(1): 29–32.
- [25] BECKER K W, SKAAR E P. Metal limitation and toxicity at the interface between host and pathogen [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2014, 38(6): 1235–1249.
- [26] ANTHONY T, RAJESH T, KAYALVIZHI N, et al. Influence of medium components and fermentation conditions on the production of bacteriocin (s) by *Bacillus licheniformis* AnBa9[J]. Bioresource Technology, 2009, 100(2): 872–877.

## Safety Assessment of *Lactiplantibacillus plantarum* NMGL2 and Optimization of Fermentation Conditions of Bacteriocin-producing

Ren Qingxia<sup>1</sup>, Hu Hangyu<sup>1</sup>, Zhang Min<sup>2</sup>, Zhou Zengjia<sup>1</sup>, Yang Zhennai<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Beijing Technology and Business University, Key Laboratory of Geriatric Nutrition and Health of Ministry of Education, Beijing Advanced Innovation Center for Food Nutrition and Human Health, Beijing 100048

<sup>2</sup>Academy of Agricultural Planning and Engineering, Beijing 100125)

**Abstract** Due to the low yield of bacteriocin in lactic acid (LAB) bacteria fermentation, optimizing fermentation conditions of bacteriocin-producing by LAB is the most direct way. Antibiotic resistance tests, hemolysis tests and whole genome sequence analysis showed that *Lactiplantibacillus plantarum* NMGL2 isolated from Inner Mongolian cheese did not carry high virulence factors and had no significant virulence effects and had no risk of metastasis of resistance genes, demonstrating the safety of *L. plantarum* NMGL2 in phenotype and genotype. Then, the fermentation conditions of bacteriocin produced production by *L. plantarum* NMGL2 were optimized, with *Staphylococcus aureus* as the indicator bacteria and the diameter of the antimicrobial ring as the investigation target. First, a single-factor test including inoculation rate, initial fermentation pH, culture temperature and liquid medium volume on bacteriocin production was performed. Based on the results of single-factor test, three significant factors including inoculation rate, initial fermentation pH and culture temperature were optimized by the response surface of the three-factor three-level design of the Box-Behnken method. The optimal fermentation conditions for bacteriocin production by *L. plantarum* NMGL2 were determined and the results showed that the optimal fermentation conditions were initial fermentation pH 7.0, inoculation rate of 1.3%, culture temperature of 37 °C. The verification test results showed that the inhibition zone diameter of the indicator bacteria (*Staphylococcus aureus*) was 13.8 mm under the optimized fermentation conditions, which was basically consistent with the predicted value of the model (13.4 mm), and the fitting rate reached 96.64%, indicating that the model was reliable and effective. This study provide a technical foundation for he production of bacteriocin by *Lactobacillus plantarum* NMGL2 and its application.

**Keywords** *Lactiplantibacillus plantarum* NMGL2; whole genome sequencing; safety; bacteriocins; optimization of fermentation conditions