

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2020.08.031

植物乳杆菌 M1-NTG300 产细菌素培养条件优化

Optimizing conditions of producing bacteriocin by
Lactobacillus plantarum M1-NTG300

安宇¹ 王颖^{1,2} 易华西³ 张东杰¹

AN Yu¹ WANG Ying^{1,2} YI Hua-xi³ ZHANG Dong-jie¹

(1. 黑龙江八一农垦大学食品学院, 黑龙江 大庆 163319; 2. 国家杂粮工程技术研究中心,

黑龙江 大庆 163319; 3. 中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东 青岛 266000)

(1. College of Food Science, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang 163319, China;

2. National Coarse Cereals Engineering Research Center, Daqing, Heilongjiang 163319, China;

3. College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao, Shandong 266000, China)

摘要:以植物乳杆菌素的效价作为特征性考察指标,对植物乳杆菌 M1-NTG300 产细菌素培养条件进行优化。通过响应面分析结合实际值确定培养基最佳组分为:葡萄糖浓度 3.5%、蛋白胨浓度 3.5%、吐温 80 浓度 0.35%、氯化镁浓度 0.20%,此培养条件下植物乳杆菌 M1-NTG300 所产细菌素的效价为 1 269.4 IU/mL,细菌素效价提高了 19.8%。

关键词:植物乳杆菌;细菌素;培养基

Abstract: Taking the potency of phytolactin as a characteristic index, the culture conditions for bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* M1-NTG300 were optimized. Through response surface analysis combined with actual values, the optimal components of the culture medium were determined to include 3.5% glucose concentration, 3.5% peptone, 0.35% Tween 80, and 0.20% magnesium chloride. Under the control of these culture conditions, The titer of bacteriocin, produced by *L. plantarum* M1-NTG300 was 1 269.4 IU/mL, which was increased by 19.8%.

Keywords: *Lactobacillus plantarum*; bacteriocin; culture medium optimization

细菌素是某些细菌代谢时,经核糖体合成机制产生

的多肽或前体多肽,抑菌活性较突出^[1-2]。对同种近缘菌株呈狭窄活性抑制谱,常附着于敏感细胞特异性结合位点,通过抑制细胞生长代谢所必需的组分合成,致使敏感细胞死亡,从而起到抑菌效果^[3-4]。现阶段,以乳酸链球菌素(Nisin)为代表天然防腐剂克服了生产上的诸多不足,以易消化和降解,使用无蓄积性毒害作用、零残留、遗传稳定性良好等特点,逐步成为研究者和消费者的关注热点^[5-6]。

在微生物发酵工艺中,菌种的培养基组分是影响其菌种生长代谢和增殖的决定性因素^[7-8]。对发酵条件的控制直接有利于开发菌株的发酵潜力,因此确定合适培养基配比和适合菌种生长增殖的发酵条件就显得重要^[9]。除受菌株自身遗传学特质影响外,细菌素产量不仅对生长环境有限制和要求,某些类细菌素还需外围干预和诱导才能更好地分泌和蓄积^[10]。其中生长环境多从培养基中氮源和碳源等功能成分的比例,或培养环境中各条件因素的均衡或特定配比考究,来完成目标物质的产生和释放。目前对菌株发酵培养条件的优化研究,主要集中在对培养环境(培养温度、时间、pH等)的优化^[11-13],以及对培养基营养成分中单一成分来源的优化研究^[14-15],而对培养基中多种营养成分的最优筛选及与刺激因子协同作用效果的研究仍较少报道。研究以课题组前期通过复合诱变法(微波-常压室温等离子体-亚硝基胍诱变)获得的在仍保持降胆固醇能力的基础上,可产细菌素的植物乳杆菌 M1-NTG300 为研究对象,拟通过对培养基中多种营养成分及刺激因子的筛选与组合,优化其发酵条件,以便提高细菌素的产量,为其应用提供理论参考依据。

基金项目:国家重点研发计划项目(编号:2018YFE0206300);国家“十二五”支撑计划项目(编号:2015BAD16B05)

作者简介:安宇,男,黑龙江八一农垦大学讲师,博士。

通信作者:王颖(1979—),女,黑龙江八一农垦大学教授,博士生导师,博士。E-mail:wychen156@163.com
张东杰(1966—),男,黑龙江八一农垦大学教授,博士生导师,博士。E-mail:byndzj@126.com

收稿日期:2020-07-12

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

植物乳杆菌 M1-NTG300:实验室诱导分离保藏菌种;

指示菌:金黄色葡萄球菌、荧光假单胞杆菌,黑龙江八一农垦大学食品微生物实验室;

MRS 培养基、LB 培养基、蛋白胨:生化试剂(BR),青岛海博生物技术有限公司;

葡萄糖、吐温 80、氯化镁:分析纯,天津市永大化学试剂有限公司。

1.2 主要仪器

电热恒温培养箱:DRP-9082 型,北京东联哈尔仪器制造有限公司;

生化培养箱:SHP-250 型,赛多利斯科学仪器有限公司;

紫外可见分光光度计:722 型,赛多利斯科学仪器有限公司;

超净工作台:BCN-1360 型,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;

立式压力蒸汽灭菌器:LDZX-75KBS 型,上海申安医疗器械厂;

台式多管架离心机:TD5A 型,北京东联哈尔仪器制造有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 无细胞发酵上清液的制备 对出发菌株活化 24 h 以后,用 2% 的接菌浓度($10^8 \sim 10^9$ CFU/mL)接入 MRS 培养基中培养 16 h 后(37 °C),离心(8 000 r/min, 5 min),除去菌体,用 NaOH(5 mol/L)调上清液 pH 至 6.0~6.5,过滤膜(0.22 μ m),得到无细胞发酵上清液。

1.3.2 抑菌活性的测定 加热指示菌固体培养基,待其融化冷却至 45~50 °C 后倒板,平板凝固后将牛津杯平均分布于内。加热指示菌半固体培养基使其融化,冷却至 45~50 °C。稀释指示菌液浓度至 10^{-2} ,在 600 nm 下检测发酵液的 OD 值。用移液枪吸取 50 μ L 指示菌液接入指示菌半固体培养基中后倒板。在平板完全凝固时拔出牛津杯,并于孔中添加 50 μ L 发酵液。在 30 °C 条件下培养 24 h,观察是否有抑菌圈生成^[16-17]。游标卡尺测量抑菌圈的直径,采用 Nisin 效价标准曲线计算效价^[18]。

1.3.3 单因素试验设计

(1) 碳源浓度的影响:选择葡萄糖作为培养基中的碳源,浓度分别为 2%~4% 等差分配,37 °C 培养 24 h,以原 MRS 液体培养基平行对照。在葡萄糖浓度不同的 MRS 液体培养基中,接种 M1-NTG300 测抑菌性^[19]。

(2) 氮源浓度的影响:选择蛋白胨作为培养基中的氮源,浓度分别为 2%~4% 等差分配,37 °C 培养 24 h,以原

MRS 液体培养基平行对照。在蛋白胨浓度不同的 MRS 液体培养基中,接种 M1-NTG300 测抑菌性。

(3) 不同浓度刺激因子的影响:选择吐温 80 作为培养基中的刺激因子,浓度分别为 0.20%~0.40% 等差分配,37 °C 培养 24 h,以原 MRS 液体培养基平行对照。在吐温 80 添加量不同的 MRS 液体培养基中,接种 M1-NTG300 测抑菌性。

(4) 金属离子浓度的影响:选择不同浓度 $MgCl_2$ 作为培养基中的金属离子,浓度分别为 0.05%~0.25% 等差分配,37 °C 培养 24 h,以原 MRS 液体培养基平行对照,接种 M1-NTG300 测抑菌性。

1.3.4 响应面优化试验 根据单因素试验的结果,通过 Box-Behnken 进行响应面法的试验设计,对试验进行进一步的优化。

2 结果与分析

2.1 培养基组分单因素试验

2.1.1 碳源浓度对细菌素产量的影响 如图 1 所示,当葡萄糖浓度不同时,细菌素分泌量及抑菌活性的增加在一定范围内呈正相关,而随葡萄糖浓度的继续增大,细菌素效价和抑菌效果反而降低,分析原因可能是适宜浓度葡萄糖有利于细菌代谢繁殖,而外界葡萄糖浓度过高时渗透压升高,导致细菌渗透作用失水而发生质壁分离影响其生长^[20]。综上,优选 3.5% 作为最佳葡萄糖浓度。

2.1.2 氮源浓度对细菌素产量的影响 如图 2 所示,细菌素效价及抑菌活性随蛋白胨浓度的增加一定范围内呈上升趋势。蛋白胨浓度为 3.0% 时,植物乳杆菌素效价和抑菌活性均较好。蛋白胨浓度大于 3.0% 时,细菌素随浓度增加小幅度下降。这可能是由于培养基中蛋白胨浓度或高,导致膜内外渗透压不同,细胞膜内水分进入营养液,导致细胞生长受影响^[21]。综上,最佳蛋白胨浓度为 3.0%。

2.1.3 刺激因子添加量对细菌素产量的影响 如图 3 所示,细菌素效价及抑菌活性与吐温 80 浓度在一定范围内呈正相关,吐温 80 不仅能提高细胞膜的通透性,减少表面张力,还能促进营养物质透壁代谢,增多的营养类物质

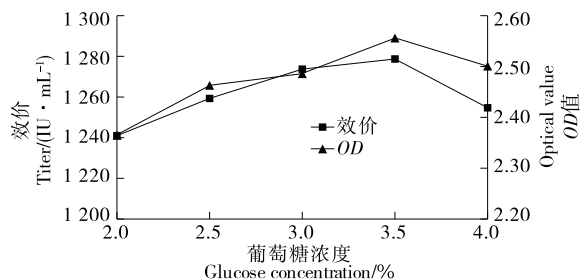


图 1 碳源对细菌素产量的影响

Figure 1 The effect of carbon source on the production of bacteriocins

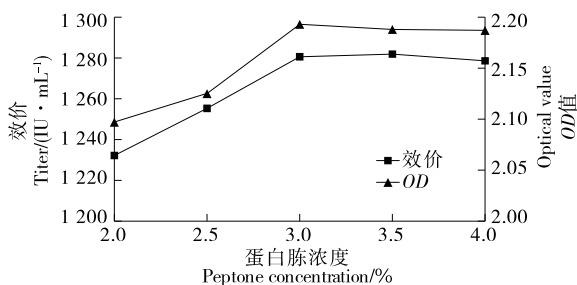


图 2 氮源对细菌素产量的影响

Figure 2 The effect of nitrogen source on the production of bacteriocins

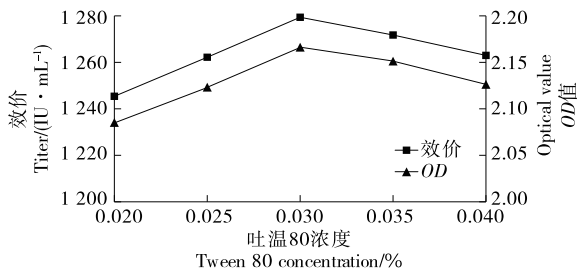


图 3 刺激因子对细菌素产量的影响

Figure 3 The effect of stimulating factor on the production of bacteriocins

对产生细菌素具有正向促进作用^[22]。吐温 80 浓度为 0.30% 时细菌素的产量最高, 抑菌效果最显著。之后, 细菌素效价和抑菌性随吐温 80 浓度增大反而迅速减小, 吐温 80 浓度过高会造成细菌生长停滞甚至死亡^[23]。综上, 选择浓度为 0.30% 的吐温 80 为最佳刺激因子。

2.1.4 金属离子浓度对细菌素产量的影响 由图 4 可知, 随着 MgCl₂ 浓度的增加, 植物乳杆菌素效价和抑菌活性呈先上升而后下降的趋势。当 MgCl₂ 添加量高达 0.20% 时, 细菌素的抑菌效果最佳, 且效价最大。这可能是由于 MgCl₂ 对细菌细胞的结构稳定性起重要作用^[24-25], 但 MgCl₂ 浓度过高会造成体系渗透压增大, 而细菌调节体内 Mg²⁺ 能力有限^[26]。因此 0.20% MgCl₂ 可以作为优产细菌素的最佳浓度。

2.2 响应面试验

2.2.1 响应面因素水平设计 根据单因素试验结果, 以

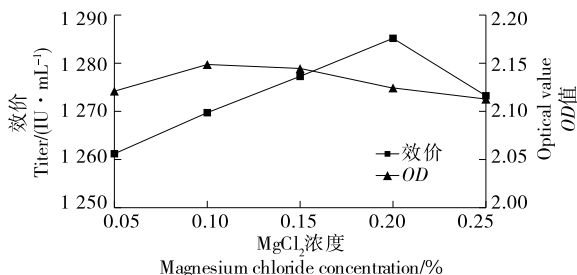


图 4 金属离子对细菌素产量的影响

Figure 4 The effect of metallic ion on the production of bacteriocins

植物乳杆菌素的效价为响应值, 对葡萄糖浓度、蛋白胨浓度、吐温 80 添加量和 MgCl₂ 浓度设计响应面试验, 因素及水平见表 1。

2.2.2 回归方程的建立与方差分析 采用 Design-Expert 8.0.5.0 软件中的 Box-Behnken 程序进行试验设计, 结果见表 2, 方差分析结果见表 3。对表 2 中的试验数据进行分析, 得到的二次回归模型为:

表 1 响应面因素水平表

Table 1 Factors and levels of response surface methodology

水平	A 葡萄糖浓度	B 蛋白胨浓度	C 吐温 80 浓度	D MgCl ₂ 浓度
-1	3.0	2.5	0.25	0.15
0	3.5	3.0	0.30	0.20
1	4.0	3.5	0.35	0.25

表 2 响应面法优化试验设计及结果

Table 2 Experimental design and results of response surface methodology

编号	A	B	C	D	效价/(IU · mL ⁻¹)
1	1	0	0	1	1259.5
2	0	1	0	1	1267.9
3	0	0	-1	-1	1259.3
4	-1	0	0	-1	1263.9
5	0	0	0	0	1269.9
6	0	0	0	0	1270.5
7	0	-1	-1	0	1258.4
8	0	1	-1	0	1265.2
9	-1	0	1	0	1264.2
10	0	1	1	0	1266.5
11	0	0	0	0	1269.4
12	-1	0	-1	0	1267.2
13	1	1	0	0	1267.4
14	0	-1	1	0	1265.7
15	1	0	0	-1	1265.6
16	0	0	0	0	1271.8
17	0	0	-1	1	1265.1
18	-1	-1	0	0	1260.5
19	0	1	0	-1	1259.3
20	1	-1	0	0	1262.3
21	0	0	1	-1	1265.3
22	0	0	0	0	1270.4
23	0	0	1	1	1258.7
24	0	-1	0	-1	1265.1
25	-1	1	0	0	1261.5
26	-1	0	0	1	1264.7
27	0	-1	0	1	1260.4
28	1	0	-1	0	1266.9
29	1	0	1	0	1267.2

表 3 回归模型显著性检验结果[†]

Table 3 Significance test for regression model

项目	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	293.12	14	20.94	2.92	0.027 0	*
A	3.97	1	3.97	0.55	0.469 2	
B	19.76	1	19.76	2.76	0.119 0	
C	2.52	1	2.52	0.35	0.562 6	
D	0.40	1	0.40	0.06	0.815 9	
AB	4.20	1	4.20	0.59	0.456 5	
AC	2.72	1	2.72	0.38	0.547 6	
AD	11.90	1	11.90	1.66	0.218 4	
BC	9.00	1	9.00	1.26	0.281 3	
BD	44.22	1	44.22	6.17	0.026 3	*
CD	38.44	1	38.44	5.36	0.036 2	*
A ²	25.07	1	25.07	3.50	0.082 5	
B ²	70.78	1	70.78	9.88	0.007 2	**
C ²	29.04	1	29.04	4.05	0.063 8	
D ²	102.66	14	102.66	14.33	0.002 0	**
残差	100.33	10	7.17			
失拟	69.34	4	6.93	0.89	0.598 8	
纯差	30.99	28	7.75			

† * P<0.05; ** P<0.01.

$$Y = 0.58A + 1.28B + 0.46C - 0.18D + 1.02AB + 0.82AC - 1.72AD - 1.50BC + 3.32BD - 3.10CD - 2.47A^2 - 3.80B^2 - 2.62C^2 - 4.48D^2. \quad (1)$$

由表 3 可知,回归模型显著(P<0.05),表明与实际情况拟合度好;模型的失拟项为 0.598 8>0.05,表明在 P=0.05 水平上不显著,说明残差均由随机误差引起,对试验干扰小,证明试验的可靠性。预测值和真实值之间有较好的相关性,试验误差小,因此可用该方程对植物乳杆菌素效价进行预测。由 F 值可知,各因素对植物乳杆菌素效价影响大小先后顺序为:B(蛋白胨浓度)>A(葡萄糖浓度)>C(吐温 80 浓度)>D(MgCl₂ 浓度)。

2.2.3 响应曲面交互作用分析 由图 5 可知,效价随因素值增大而升高,当达到曲面中心点极值时开始下降,蛋白胨浓度(B)和 MgCl₂ 浓度(D)及吐温 80 浓度(C)和 MgCl₂ 浓度(D)两量间交互作用所得到的响应面图曲面较陡峭,且等高线皆为椭圆形,表明 BD、CD 交互作用显著,与表 3 方差分析中显著性试验结果一致。表 3 方差分析表明其他 4 组交互作用均不显著。

2.2.4 模型验证实验 结合回归模型和响应面图分析得出植物乳杆菌素的最佳培养条件是:葡萄糖浓度为 3.476%,蛋白胨浓度为 3.391%,吐温 80 添加量为 0.347%,MgCl₂ 浓度为 0.198%。考虑实际试验条件,确

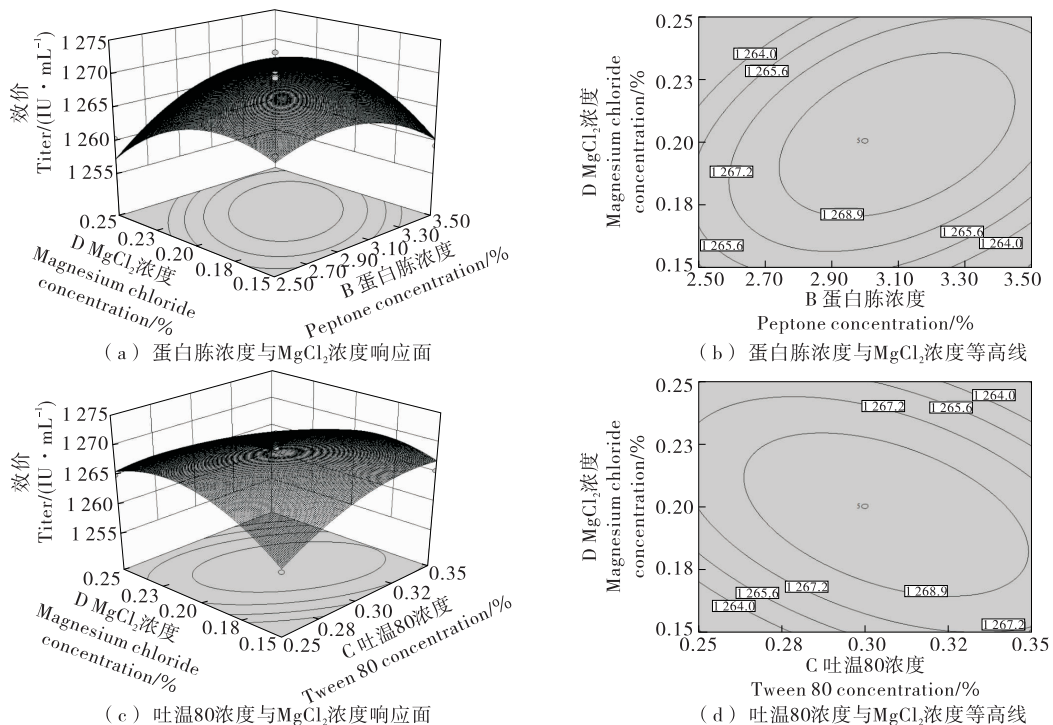


图 5 各因素交互作用对植物乳杆菌素效价影响的响应面及等高线图

Figure 5 Response surface and contour map of the interaction of various factors on the potency of *Lactobacillus plantarum*

定最终植物乳杆菌素的培养条件葡萄糖浓度为 3.5%，蛋白胨浓度为 3.5%，吐温 80 添加量为 0.35%，MgCl₂ 浓度为 0.20%，在此条件下经过 5 次重复性实验验证后得出，植物乳杆菌素的效价为(1 269.4±2.57) IU/mL。效价预测值与理论值 1 270.5 IU/mL 极接近，说明响应面分析所得的回归模型是可靠的。

3 结论

培养基组分单因素试验优化结果显示：植物乳杆菌 M1-NTG300 产细菌素的 MRS 培养基最佳组分为葡萄糖浓度 3.5%、蛋白胨浓度 3.0%、吐温 80 浓度 0.30%、氯化镁浓度 0.20%。在此基础上，采用 Box-Behnken 试验设计对其培养条件进行进一步优化，经验证，该模型合理可靠。通过模型分析并结合实际值进行修正后，得到的最佳培养条件为：葡萄糖浓度 3.5%、蛋白胨浓度 3.5%、吐温 80 浓度 0.35%、氯化镁浓度 0.20%，此条件下植物乳杆菌 M1-NTG300 所产细菌素的效价为 1 269.4 IU/mL，与未进行培养条件优化前所产细菌素的效价(1 082.5 IU/mL)相比，提高了 19.8%。有关研究^[27-30]表明，细菌素的产量与细菌培养条件有关外，还受某些干预细菌素分析的诱导调控因素影响，因此后续试验将考虑从氨基酸诱导、最小初始接菌浓度及信号分子(肽类物质或者蛋白类物质)等方面对进行深入研究，从而更全面探析影响植物乳杆菌 M1-NTG300 产细菌素的因素。

参考文献

- [1] BAUER R, DICKS L M. Mode of action of lipid II-targeting antibiotics [J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 101(2): 201-216.
- [2] 吴焕婷, 邓木兰, 焦冬冬, 等. 一株海洋源细菌素 CAMT2 生物学特性研究[J]. 食品工业科技, 2017, 38(15): 107-111.
- [3] HU Yan-xin, LIU Xiao-li, SHAN Cheng-jun, et al. Novel bacteriocin produced by *Lactobacillus alimentarius*, FM-MM 4, from a traditional Chinese fermented meat Nanx Wudl; Purification, identification and antimicrobial characteristics[J]. Food Control, 2017, 77: 290-297.
- [4] 蒋雨晴, 迟玉杰. 卵白蛋白源抗菌肽的分离纯化与结构鉴定[J]. 食品与机械, 2019, 35(7): 1-6.
- [5] ROJO-BEZARES B, SÁENZ Y, NAVARRO L, et al. Coculture-inducible bacteriocin activity of *Lactobacillus plantarum* strain J23 isolated from grape must[J]. Food Microbiology, 2007, 24(5): 482-491.
- [6] BLAENKA K, JASNA N, LINA J, et al. Coculture-inducible bacteriocin biosynthesis of different probiotic strains by dairy starter culture *Lactococcus lactis*[J]. Mljekarstvo, 2011, 61(4): 273-282.
- [7] 孙树平, 刘志伟, 李京, 等. 辣椒酵素益生菌复合发酵制剂的筛选[J]. 食品与机械, 2019, 35(8): 189-194, 199.
- [8] 胡美忠, 党丽娟, 陆兆新. *Lactobacillus plantarum* 163 产细菌素食品级培养基筛选及发酵条件优化[J]. 食品科学, 2016, 37(15): 165-170.
- [9] SVETOSLAV D T, LEON M T D. Effect of modified MRS medium on production and purification of antimicrobial peptide ST4SA produced by *enterococcus mundtii*[J]. Anaerobe, 2009, 15(3): 65-73.
- [10] 王筱梦, 江芸, 孙芝兰, 等. 1 株产细菌素乳酸菌的鉴定及所产细菌素的诱导合成现象[J]. 食品科学, 2016, 37(21): 170-175.
- [11] 花榜清, 张秋香, 刘振民, 等. 牛类芽孢杆菌 BD3526 产抗菌物质培养条件的优化[J]. 食品与机械, 2017, 33(3): 31-36.
- [12] 刘延波, 张世凯, 赵志军, 等. 高产淀粉酶细菌的分离鉴定及产酶条件优化[J]. 食品与机械, 2020, 36(1): 65-71.
- [13] 陈国忠, 郭秋翠, 谭其秀, 等. 1 株产烟酰胺基化酶海洋细菌 H9 的分离鉴定及培养条件优化[J]. 食品科学, 2017, 38(10): 130-136.
- [14] 李伟栋. 产细菌素乳酸菌的筛选、培养条件优化及生物学特性的研究[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2016: 5-7.
- [15] 刘晓蓉, 范瑞, 朱美娟. 产类细菌素乳酸菌筛选及类细菌素的特性[J]. 中国乳品工业, 2009, 37(6): 8-12.
- [16] 杜雪, 妥彦峰. 生物胶降解菌株的筛选与鉴定[J]. 食品与机械, 2020, 36(5): 64-69.
- [17] LU Xin, YI Lan-hua, DANG Jing, et al. Purification of novel bacteriocin produced by *Lactobacillus coryniformis*, MXJ 32 for inhibiting bacterial foodborne pathogens including antibiotic-resistant microorganisms[J]. Food Control, 2014, 46: 264-271.
- [18] 章检明. 植物乳杆菌 B23 合成细菌素发酵条件优化及诱导调控研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2015: 17.
- [19] SCHIRRU S, FAVARO L, MANGIA N P, et al. Comparison of bacteriocins production from *enterococcus faecium* strains in cheese whey and optimised commercial MRS medium[J]. Annals of Microbiology, 2014, 64(1): 321-331.
- [20] 章检明, 任璐雅, 易华西, 等. 乳酸菌细菌素的高效表达方法研究[J]. 中国酿造, 2014, 7: 29-33.
- [21] SCHMELCHER M, DONOVAN D M, LOESSNERM J. Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials[J]. Future Microbiology, 2012, 7(10): 1 147-1 171.
- [22] 黄桂东, 唐素婷, 程云辉, 等. 酱油渣中乳酸乳球菌分离鉴定及对模拟胃肠环境的耐受性[J]. 食品与机械, 2019, 35(8): 15-19, 26.
- [23] 卢旭. 莲子低聚糖对双歧杆菌增殖效应的研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2012: 34-39.
- [24] 胡敏. 枯草芽孢杆菌 A32 产细菌素发酵条件及其稳定性研究[D]. 晋中: 山西农业大学, 2013: 20-21.
- [25] 李艳, 高静, 何晓燕, 等. 离子液体在虾壳甲壳素提取中的应用研究进展[J]. 食品与机械, 2019, 35(12): 202-207, 214.

(下转第 209 页)

- Catalytic properties of a highly thermoactive polygalacturonase from the mesophilic fungus *Penicillium occitanis* and use in juice clarification[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2016, 127: 56-66.
- [74] MA Yu-ping, HAO Hui, CHEN Zhi-fei, et al. Production, purification and physicochemical properties of an exo-polygalacturonase from *Aspergillus niger* SW06[J]. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2016, 28(4): 622-628.
- [75] JADHAV S R, PATHAK A P. Production and characterization of a thermo-pH stable pectinase from *Bacillus licheniformis* UNP-1: A novel strain isolated from Unapdev hot spring [J]. *Indian Journal of Geo Marine Sciences*, 2019, 48(5): 670-677.
- [76] ANAND G, YADAV S, YADAV D. Purification and biochemical characterization of an exo-polygalacturonase from *Aspergillus flavus* MTCC 7589[J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2017, 10: 264-269.
- [77] BEKLI S, AKTAS B, GENCER D, et al. Biochemical and molecular characterizations of a novel pH- and temperature-stable pectate lyase from *Bacillus amyloliquefaciens* S6 for industrial application [J]. *Molecular Biotechnology*, 2019, 61(9): 681-693.
- [78] HOSSEINI S S, KHODAIYAN F, MOUSAVI S M E, et al. Immobilization of pectinase on the glass bead using poly-aldehyde kefirin as a new safe cross-linker and its effect on the activity and kinetic parameters [J]. *Food Chemistry*, 2020, 309: 125777.
- [79] DENG Zi-yu, WANG Fang, ZHOU Bin, et al. Immobilization of pectinases into calcium alginate microspheres for fruit juice application [J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 89: 691-699.
- [80] SOJITRA U V, NADAR S S, RATHOD V K. Immobilization of pectinase onto chitosan magnetic nanoparticles by macromolecular cross-linker [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 157: 677-685.
- [81] NADAR S S, RATHOD V K. A co-immobilization of pectinase and cellulase onto magnetic nanoparticles for antioxidant extraction from waste fruit peels [J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2019, 17: 470-479.
- [82] FANG Gang, CHEN Hong-gao, ZHANG Yun-peng, et al. Immobilization of pectinase onto $Fe_3O_4@SiO_2-NH_2$ and its activity and stability [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 88: 189-195.
- [83] DAL MAGRO L, DE MOURA K S, BACKES B E, et al. Immobilization of pectinase on chitosan-magnetic particles: Influence of particle preparation protocol on enzyme properties for fruit juice clarification [J]. *Biotechnology Reports*, 2019, 24: 1-11.
- [84] DE OLIVEIRA R L, DIAS J L, DA SILVA O S, et al. Immobilization of pectinase from *Aspergillus aculeatus* in alginate beads and clarification of apple and umbu juices in a packed bed reactor [J]. *Food and Bioproducts Processing*, 2018, 109: 9-18.
- [85] GUO Yin-zhou, LIU Jiang-tao, ZHANG Ke-hu, et al. Synthesis of stimuli-responsive support material for pectinase immobilization and investigation of its controllable tailoring of enzymatic activity [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2017, 121: 188-195.
- [86] ABDEL WAHAB W A, KARAM E A, HASSAN M E, et al. Optimization of pectinase immobilization on grafted alginate-agar gel beads by 2(4) full factorial CCD and thermodynamic profiling for evaluating of operational covalent immobilization [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 113: 159-170.
- [87] ALAGÖZ D, TUKEL S S, YILDIRIM D. Immobilization of pectinase on silica-based supports: Impacts of particle size and spacer arm on the activity [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 87: 426-432.
- [88] REHMAN H U, AMAN A, ZOHRA R R, et al. Immobilization of pectin degrading enzyme from *Bacillus licheniformis* KIBGE IB-21 using agar-agar as a support [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 102: 622-626.
- [89] MAHMOUD K F, ABO-ELMAGD H I, HOUSSEINY M M. Micro- and nano-capsulated fungal pectinase with outstanding capabilities of eliminating turbidity in freshly produced juice [J]. *Food Science and Technology International*, 2018, 24(4): 330-340.
- (上接第 182 页)
- [26] WU Qing-yun, GUO Hua-yan, GENG Hong-li, et al. T273 plays an important role in the activity and structural stability of arginine kinase [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2014, 63: 21-28.
- [27] 易华西. 分泌广谱抗菌肽乳酸菌的筛选及高效表达的调控研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2010: 78-99.
- [28] VÁZQUEZ J A, CABO M L, GONZÁLEZ M P, et al. The role of amino acids in nisin and pediocin production by two lactic acid bacteria: A factorial study [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2004, 34(3): 319-325.
- [29] TABASCO R, GARCÍA-CAYUELA T, PELÁEZ C, et al. *Lactobacillus acidophilus* La-5 Increases Lactacin B production when it senses live target bacteria [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2009, 132(2): 109-116.
- [30] 赵美静, 孟强, 田雨, 等. 植物乳杆菌共培养诱导产细菌素基因座的遗传分析 [J]. *中国食品学报*, 2019, 19(3): 242-249.