

姚芳,肖香,董英. 响应面法优化具有抑菌活性的大麦乳酸菌发酵工艺[J]. 江苏农业科学,2016,44(11):296-301.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.11.089

响应面法优化具有抑菌活性的大麦乳酸菌发酵工艺

姚芳^{1,2},肖香²,董英²

(1. 江苏农牧科技职业学院,江苏泰州 225300; 2. 江苏大学食品与生物工程学院,江苏镇江 212013)

摘要:通过单因素试验探讨了乳酸菌添加量、发酵温度、发酵时间、料液比、提取液对大麦乳酸菌发酵物抑菌效果的影响;并以大肠杆菌为指标菌,进一步通过响应面分析对大麦乳酸菌发酵液抑菌效果的发酵条件进行优化。结果表明,大麦乳酸菌发酵液最佳抑菌效果出现在料液比 1:7(g:mL)、发酵温度 30.5℃、菌种添加量 27.5 g/kg、发酵时间 25.5 h。在此条件下,抑菌圈直径为 17.52 mm,与模型预测值 17.56 mm 基本一致。

关键词:大麦;乳酸菌;抑菌活性;发酵条件

中图分类号: TS201.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)11-0296-06

微生物污染导致的食品腐败变质,是食品贮藏保鲜过程中的关键问题。目前延长食品保藏期的主要方法是添加化学防腐剂或一些物理方法,如干燥、冷藏、热处理等^[1]。而物理的保藏方法强度过大会降低食品品质,已知的化学防腐剂具有一定危害,因此生物防腐成为研究热点。近年来,乳酸菌的生物转化功能越来越受到人们关注,尤其是其代谢产物的抑菌功能^[2-3]。

大麦是我国传统的药食兼用作物,产量位居世界粮食作

物第4位,但我国大麦的主要用途是啤酒酿造和饲料工业,仅有 10% 左右的大麦用于食用,利用率十分低下^[4]。已有研究表明,大麦含有 β -葡聚糖、黄酮、多酚类化合物、大麦芽碱等多种活性成分,具有清除自由基、抗衰老、抑菌、降血糖、降血脂、抗癌等功能^[4-6]。但是,目前有关大麦微生物转化利用的研究较少,其活性功能尚不明确。大麦是乳酸菌发酵的良好基质^[7],经乳酸菌发酵后大麦中叶酸、 γ -氨基丁酸、可溶性膳食纤维等营养活性成分含量显著升高^[8];大麦中含有的多酚类物质^[9]经乳酸菌发酵后,由结合态转化为游离态,从而发酵产物的多酚明显增加^[10]。Funamoto 等发现,大麦烧酒蒸馏后的残留物具有抗肿瘤和免疫活性^[11-12];Baek 等发现,用 2 株乳酸菌发酵大米粉制作的年糕,其发酵产物对霉菌具有抑制作用^[13],Ross 等认为,乳酸菌发酵碳水化合物能够产生丰富的有机酸类(如乳酸、乙酸、丙酸、苯甲酸、香草酸等),能够抑制部分致病菌及腐败菌的生长^[14-15]。这些酸的抑菌效果是通过降低体系 pH 值、抑制菌体生长和代谢而实现的^[16]。

收稿日期:2016-03-11

基金项目:江苏省普通高校研究生科研创新计划(编号: CXZZ13-0694);江苏农牧科技职业学院科研课题(编号: NSFYB1304)。

作者简介:姚芳(1980—),女,四川仪陇人,博士研究生,讲师,主要从事食品功能成分提取及其生物活性研究。E-mail: 46268809@qq.com。

通信作者:董英,教授,主要从事食品营养与安全研究。Tel: (0511)88797202;E-mail: ydong@ujs.edu.cn。

- 变化的研究[J]. 中国农业科学,2004,37(5):773-775.
- [8] 王玉瑾. 水果在加工存放过程中还原型和氧化型 V_C 含量的变化[J]. 食品科学,1995,16(3):8-9.
- [9] 朱丹,卢立新. 绿茶中维生素 C 氧化动力学模型研究[J]. 食品与生物技术学报,2007,26(3):66-69.
- [10] 高梦祥,喻萍萍. 苹果中维生素 C 氧化动力学模型研究[J]. 长江大学学报:自然科学版,2008,5(3):69-71.
- [11] 刘云,徐良,张旦民. 酸枣汁 V_C 降解动力学研究[J]. 食品科学,1987(12):1-4.
- [12] 焦凌霞,李保国,高愿军,等. 水果加工中热烫处理对 V_C 保存率的影响[J]. 河南职业技术师范学院学报,2004,32(1):42-44.
- [13] 朱维军,陈月英. 大枣加工中氧化型维生素 C 和还原型维生素 C 的变化[J]. 果树学报,2006,23(3):465-467.
- [14] 陆道礼. 草莓汁加工贮藏过程中维生素 C 变化规律的研究[J]. 粮油加工与食品机械,2004(8):61-62.
- [15] 高愿军,郝莉花,张鑫,等. 猕猴桃汁维生素 C 降解动力学研究[J]. 农业工程学报,2006,22(5):157-160.
- [16] 焦凌霞,高愿军. 温度对猕猴桃 V_C 降解途径和降解速度影响的研究[J]. 安徽农业科学,2006,34(12):2847-2850.

- [17] 王梦泽,薛少平,王佳,等. 草莓浑浊汁维生素 C 降解动力学模型[J]. 农业工程学报,2010,26(3):353-357.
- [18] 詹耀轩,高晗,高愿军,等. 山楂汁贮藏中 V_C 降解规律研究[J]. 河南农业科学,2007(3):82-84.
- [19] 高愿军. 水果加工中还原型 V_C 与氧化型 V_C 变化及控制研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2004.
- [20] 羊金梅,覃超凤,余瑞林,等. 分光光度法测定梨和苹果中维生素 C 的含量[J]. 安徽医药,2005,9(3):205-206.
- [21] 库尔班江,赛丽曼. 碘量法测水果蔬菜中维生素 C 的含量[J]. 伊犁师范学院学报:自然科学版,2007(3):28-32.
- [22] 贺利锋,王金鹏,于博,等. 蔬菜品质相关酶高温瞬时失活动力学[J]. 农业工程学报,2009,25(9):339-344.
- [23] 佟懿,谢晶. 动力学模型预测鲳鱼货架寿命的实验研究[J]. 食品科学,2009,30(10):265-268.
- [24] 郭松年,董周永,孙海燕,等. 石榴汁花色苷热稳定性及其降解动力学研究[J]. 农业工程学报,2008,24(3):256-259.
- [25] Chen C R, Ramaswamy H S. Color and texture change kinetics in ripening bananas[J]. LWT - Food Science and Technology, 2002, 35(5):415-419.

此外,乳酸菌抑菌蛋白及其衍生物的抑菌能力的研究也有不少报道^[17-18]。然而,利用植物乳杆菌发酵大麦,研究其发酵产物抑菌活性,国内外未见报道。本研究以抑菌圈直径为追踪指标,对影响大麦乳酸菌发酵液抑菌活性的各因素进行研究,采用响应面法优化具有抑菌活性的乳酸菌发酵大麦的最佳工艺,旨在提升大麦的生理活性功能,为大麦的高效利用和天然抑菌产品的开发开辟新途径。

1 材料与方法

1.1 试验材料

大麦:新鲜脱壳大麦,购自江苏省盐城市双增农化科技有限公司。

乳酸菌:植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum* Dy-1, CGMCC No. 6016),由江苏大学食品与生物工程学院实验室分离贮藏。

菌种:金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、青霉菌(*Penicillium expansum*),均为江苏农牧科技职业学院食品科技学院实验室保藏菌种。

1.2 培养基

MRS 培养基:1.0% 牛肉膏、0.5% 酵母膏、1.0% 蛋白胨、2.0% 葡萄糖、0.5% 乙酸钠、0.2% 柠檬酸铵、0.2% K_2HPO_4 、0.058% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.025% $MnSO_4 \cdot H_2O$ 、0.1% 吐温 80、1 L 蒸馏水,pH 值 6.2~6.4,琼脂 1.5%,115 ℃ 灭菌 25 min,用于培养乳酸菌。

牛肉膏蛋白胨培养基:0.3% 牛肉膏、1.0% 蛋白胨、0.5% NaCl、1.5% 琼脂、1 L 水,pH 值 7.0~7.2,115 ℃ 灭菌 25 min,用于培养大肠杆菌和金黄色葡萄球菌。

PDA 培养基:马铃薯 20%(去皮切块后煮沸 30 min,取滤液),葡萄糖 2.0%,琼脂 1.5%,蒸馏水定容至 1 L,115 ℃ 灭菌 25 min,用于培养霉菌。

牛肉膏、酵母膏、蛋白胨、琼脂为生化试剂,其他为分析纯,均购自中国医药(集团)上海化学试剂有限公司,马铃薯购自市场。

1.3 试验仪器

高速万能粉碎机,天津市华鑫仪器厂;SPX-250S-II 型生化培养箱,上海新苗医疗器械制造有限公司;SW-CJ-2FD 型双人单面垂直净化工作台,吴江市亚泰净化设备有限公司;台式冷冻干燥机,美国 LABCONCO 公司;PRIMOR 型高速冷冻离心机,美国 Thermo Fisher 公司;BS-IE 型振荡培养箱;上海一恒科技有限公司;AUTOCLAVE-G154DWS 型高压蒸汽灭菌锅,上海申胜生物技术有限公司;AL204 型电子天平,上海跃进医疗器械厂;EL3002 型电子天平,上海申胜生物技术有限公司;0~150 mm 游标卡尺,无锡锡工量具有限公司。

1.4 试验方法

1.4.1 大麦乳酸菌发酵物的制备 将新鲜的大麦脱壳磨粉过筛,按料液比 1:7(g:mL)混合均匀,添加 2% 的乳酸菌冻干粉,搅拌均匀,30 ℃ 发酵 1 d,8 000 r/min 离心 20 min,收集上清液,冷冻干燥后,即为大麦乳酸菌发酵物。

1.4.2 样品抑菌液的制备 将大麦乳酸菌发酵物冻干粉用蒸馏水配制成 50 mg/mL 的溶液,在超净台中过 0.22 μm 的

膜,即得样品抑菌液。

1.4.3 供试菌悬液的制备 无菌条件下,用划线法将供试菌种(大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、青霉菌)分别接种到相应培养基上,将大肠杆菌、金黄色葡萄球菌用牛肉膏蛋白胨培养基置 36 ℃ 恒温培养箱中培养 1 d,将青霉菌用 PDA 培养基置 30 ℃ 恒温培养箱中培养 2 d,用接种环挑取适宜的菌落,用无菌生理盐水梯度稀释,获得 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ CFU/mL 的菌悬液。

1.4.4 抑菌效果的测定 采用打孔法^[19]测定抑菌效果,具体方法:在直径 9 cm 的培养皿中倒入灭菌后的培养基,凝固后加入 200 μL 相应的供试菌悬液,涂布均匀,用直径 6 mm 的打孔器在涂布好菌液的平板上打 4 个分布均匀的小孔,对 3 个孔中加入 100 μL 的样品抑菌液,对另 1 个孔加空白对照液。将细菌于 37 ℃ 恒温培养 1 d,将真菌于 28 ℃ 恒温培养 2 d,采用十字交叉法测定抑菌圈 2 个垂直方向的直径,取其平均值为测定结果,抑菌圈直径越大说明抑菌效果越好。每项抑菌试验重复 3 次。以上操作均在无菌超净台上完成。

1.4.5 单因素试验 以大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、青霉菌为供试菌,以抑菌圈直径为指标,研究提取溶剂、料液比、菌种添加量、发酵时间、发酵温度对大麦乳酸菌发酵液抑菌活性的影响,每组试验重复 3 次。

1.4.6 响应面试验 根据单因素试验结果设定因素水平,采用 Design-Expert 8.05b 软件中的 Box-Behnken 法设计试验方案,选取影响抑菌效果的 4 个主要因素(料液比、发酵时间、菌种添加量、发酵温度)进行 4 因素 3 水平的响应面试验,以大肠杆菌的抑菌圈直径为响应值,因素水平见表 1。

表 1 大麦乳酸菌发酵工艺响应面优化试验的因素水平

水平	因素			
	X_1 : 料液比 (g:mL)	X_2 : 发酵时间 (h)	X_3 : 菌种添加量 (g/kg)	X_4 : 发酵温度 (℃)
-1	1:6	20	10	26
0	1:7	24	20	30
1	1:8	28	30	34

1.5 数据分析

采用 Design-Expert 8.05b 软件对数据进行二次多元回归拟合,利用 F 检验对数据进行方差分析以评价模型的统计意义。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 提取剂的选择 采用蒸馏水、甲醇、乙醇、丙酮、乙酸乙酯等 5 种提取剂对大麦乳酸菌发酵物中的抑菌活性物质进行提取,制成 50 mg/mL 的溶液,以大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、青霉菌为供试菌,分别以相应的提取剂为空白溶液,研究不同大麦乳酸菌发酵提取液的抑菌性能,扣除空白溶液抑菌圈后的结果见表 2。

由表 2 可知,不同大麦乳酸菌发酵提取液对供试菌的抑菌效果顺序为大肠杆菌>金黄色葡萄球菌>青霉菌,水提取液对 3 种供试菌的抑菌效果最好,且与其他溶剂提取液相比有显著差异。说明水提取液中有有效抑菌物质较多,且水提取液能代表大麦乳酸菌发酵液中所有成分,因此后续试验直接

表 2 不同大麦乳酸菌发酵提取液的抑菌活性

供试菌	抑菌圈直径 (mm)				
	水提取液	甲醇提取液	乙醇提取液	丙酮提取液	乙酸乙酯提取液
大肠杆菌	9.40 ± 0.36a	6.53 ± 0.35d	6.42 ± 0.36d	7.52 ± 0.38c	2.60 ± 0.43g
金黄色葡萄球菌	8.65 ± 0.43b	5.20 ± 0.48e	5.72 ± 0.54e	7.24 ± 0.34c	2.42 ± 0.42g
青霉菌	5.65 ± 0.36e	1.30 ± 0.45h	2.10 ± 0.49g	3.30 ± 0.28f	1.85 ± 0.31h

注:数据后不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。

用大麦乳酸菌发酵液为样品。

2.1.2 料液比对大麦乳酸菌发酵液抑菌活性的影响 设定 20 g/kg 的乳酸菌接种量,30 ℃ 发酵 1 d,以大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、青霉菌为供试菌,研究不同料液比对大麦乳酸菌发酵液抑菌活性的影响。由图 1 可知,随料液比增加,大麦乳酸菌发酵液对 3 种供试菌的抑菌活性呈先增强后减弱的趋势,料液比为 1 g : 7 mL 时对青霉菌的抑菌效果最好,在料液比为 1 g : 8 mL 时大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌效果最好,这可能是因为含水量少不利于乳酸菌对大麦的充分发酵,含水量太多会导致大麦乳酸菌发酵液中的抑菌活性物质的相对含量减少,从而减弱了抑菌效果。因此,选择料液比 1 g : 6 mL、1 g : 7 mL、1 g : 8 mL 进一步优化。

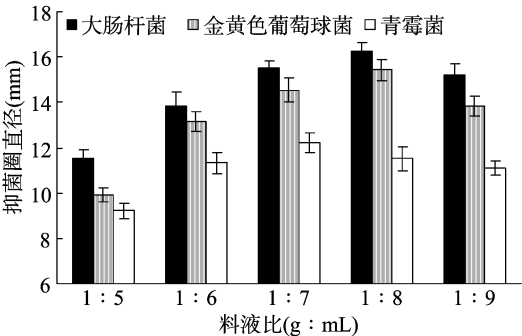


图1 料液比对大麦乳酸菌发酵液抑菌活性的影响

2.1.3 发酵时间对大麦乳酸菌发酵液抑菌活性的影响 设定料液比为 1 g : 7 mL,乳酸菌接种量为 20 g/kg,30 ℃ 发酵,以大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、青霉菌为供试菌,研究不同发酵时间对大麦乳酸菌发酵液抑菌活性的影响。由图 2 可知,随着发酵时间延长,大麦乳酸菌发酵液对 3 种供试菌的抑菌活性呈先增强后缓慢减弱的趋势,发酵时间在 20 h 时对金黄色葡萄球菌的抑菌效果最好,在 24 h 时大肠杆菌、青霉菌的抑菌效果最好,这可能是因为发酵时间短时产生的抑菌活性成分少,发酵时间太长会导致一些抑菌活性成分又被代谢利用,因此选择发酵时间为 20、24、28 h 进一步优化。

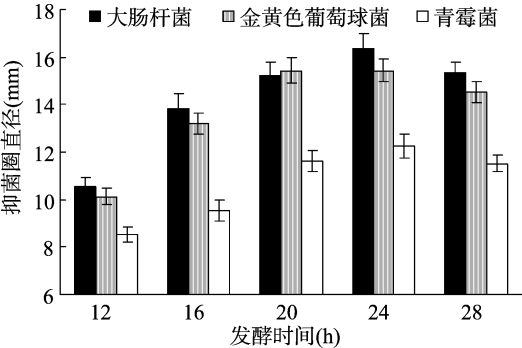


图2 发酵时间对大麦乳酸菌发酵液抑菌活性的影响

2.1.4 菌种添加量对大麦乳酸菌发酵液抑菌活性的影响 设定料液比为 1 g : 7 mL,30 ℃ 发酵 1 d,以大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、青霉菌为供试菌,研究不同菌种添加量对大麦乳酸菌发酵液抑菌活性的影响。由图 3 可知,随着乳酸菌接种量增加,大麦乳酸菌发酵液对 3 种供试菌的抑菌活性呈先增强后平缓的趋势,在菌种添加量为 20 g/kg 时,对 3 种供试菌的抑菌活性达到较大;随着接种量继续增加,抑菌效果并未有明显变化。乳酸菌接种量是影响大麦发酵产抑菌物质的关键因素,乳酸菌接种量小,产生的代谢产物少;乳酸菌接种量大时,发酵产物迅速积累,酸度也迅速上升,当酸度上升至一定水平时,乳酸菌生长受到影响^[20],抑菌物质的量也会趋于平稳。因此,选择乳酸菌接种量为 10、20、30 g/kg 进一步优化。

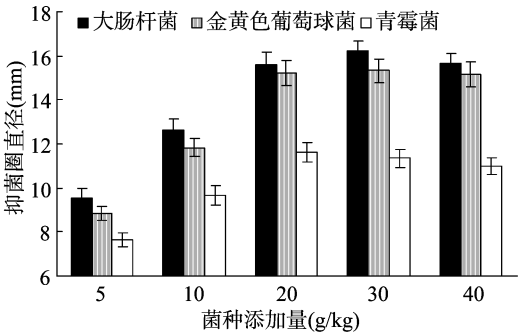


图3 菌种添加量对大麦乳酸菌发酵液抑菌活性的影响

2.1.5 发酵温度对大麦乳酸菌发酵液抑菌活性的影响 设定料液比为 1 g : 7 mL,乳酸菌接种量为 20 g/kg,发酵 1 d,以大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、青霉菌为供试菌,研究不同发酵温度对大麦乳酸菌发酵液抑菌活性的影响。

由图 4 可知,随着发酵温度升高,大麦乳酸菌发酵液对 3 种供试菌的抑菌活性呈先增强后减弱的趋势。在发酵温度为 30 ℃ 时,对 3 种供试菌的抑菌活性达到最大;但发酵温度为 26 ~ 38 ℃ 时抑菌圈直径变化不显著,可能是因为乳酸菌在此温度范围内都能生长。温度偏低时,乳酸菌生长缓慢,发酵时间延长;温度偏高时,会影响发酵过程中某些酶的活性,降低

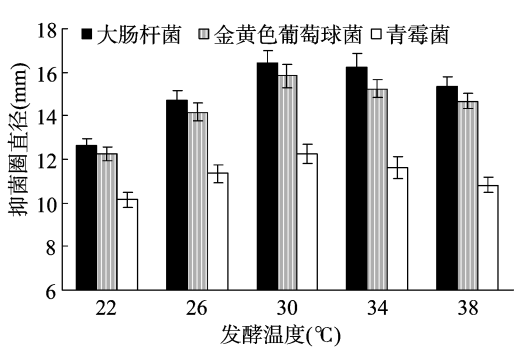


图4 发酵温度对大麦乳酸菌发酵液抑菌活性的影响

抑菌物质的产生。因此,选择发酵温度为 26、30、34 ℃ 进一步优化。

2.2 大麦乳酸菌发酵工艺的响应面试验分析

2.2.1 响应面分析方案及结果 大麦乳酸菌发酵工艺条件的响应面分析试验根据 Box – Behnken 设计进行了 29 组试验,其中 5 组中心点重复试验,结果见表 3,回归模型的方差分析见表 4。

利用 Design Expert 8. 05b 软件对表 3 数据进行二次多元回归拟合,得到对 4 个影响大麦乳酸菌发酵液抑菌效果因素的二次多项回归方程如下: $Y = -357.593\ 27 + 321.259\ 17X_1 + 3.486\ 31X_2 + 3.288\ 42X_3 + 3.337\ 81X_4 + 0.356\ 25X_1X_2 + 0.075X_1X_3 - 0.218\ 75X_1X_4 - 0.044\ 375X_2X_3 - 2.968\ 75 \times 10^{-3}X_2X_4 + 0.016\ 875X_3X_4 - 94.491\ 67X_1^2 - 0.077\ 182X_2^2 - 0.412\ 42X_3^2 - 0.047\ 964X_4^2$ 。

从表 4 可知,该模型的 *F* 值为 102. 85, *P* 值小于 0. 000 1, 显著性检验结果表明二次回归模型对抑菌圈直径的影响高度显著。试验中一次项 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 和二次项 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 、 X_4^2 对抑菌圈直径的影响极显著,说明各试验因素对响应值的影响不是简单的线性关系,料液比、发酵时间、菌种添加量、发酵温度对大麦乳酸菌发酵液的抑菌效果有极显著影响。由统计学计算出的模型相关系数 R^2 值为 0. 990 4,说明模型有很好的精密度;模型校正决定系数 R^2_{Adj} 为 0. 980 7,说明该模型能解释 98. 07% 响应值的变化,仅有总变异的 1. 93% 不能用此模型来解释,说明该模型与实际试验的拟合程度好,用该模型对具有抑菌活性的大麦乳酸菌发酵工艺条件进行优化是合适的。 R^2_{Pred} 为 0. 944 9,说明该模型预测性良好,能很好地预测影响大麦乳酸菌发酵液抑菌效果的各因素对抑菌圈直径的影响。

2.2.2 响应面因素间的交互作用分析 根据回归模型,将任意 2 个因素固定在零水平,可以得到体现另外 2 个因素及其

表 3 Box – Behnken 试验设计及结果

序号	X_1 : 料液比	X_2 : 发酵时间	X_3 : 菌种添加量	X_4 : 发酵温度	平均直径 (mm)
1	1	0	0	1	15. 60
2	0	0	-1	1	14. 50
3	1	0	-1	0	14. 75
4	-1	1	0	0	15. 30
5	1	0	0	-1	15. 35
6	0	0	1	-1	16. 90
7	1	0	1	0	16. 75
8	0	-1	-1	0	13. 10
9	0	0	-1	-1	14. 32
10	0	1	0	-1	15. 60
11	0	1	1	0	17. 15
12	0	-1	0	-1	13. 85
13	0	-1	1	0	16. 00
14	-1	0	1	0	16. 45
15	0	1	0	1	15. 98
16	0	0	0	0	17. 00
17	-1	0	-1	0	14. 48
18	1	-1	0	0	13. 95
19	-1	0	0	-1	14. 70
20	0	0	0	0	16. 94
21	0	0	1	1	17. 35
22	-1	0	0	1	15. 30
23	0	0	0	0	16. 96
24	0	0	0	0	16. 95
25	0	-1	0	1	14. 42
26	0	1	-1	0	14. 96
27	-1	-1	0	0	13. 72
28	0	0	0	0	16. 92
29	1	1	0	0	16. 10

交互作用影响的响应面曲线图及对应的等高线图(图 5)。

表 4 回归模型方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值	显著性
模型	41. 73	14	2. 98	102. 85	<0. 000 1	**
X_1	0. 54	1	0. 54	18. 70	0. 000 7	**
X_2	8. 42	1	8. 42	290. 41	<0. 000 1	**
X_3	17. 50	1	17. 50	603. 70	<0. 000 1	**
X_4	0. 49	1	0. 49	16. 98	0. 001 0	**
X_1X_2	0. 08	1	0. 08	2. 80	0. 116 3	
X_1X_3	2.25×10^{-4}	1	2.25×10^{-4}	7.76×10^{-3}	0. 931 0	
X_1X_4	0. 031	1	0. 01	1. 06	0. 321 4	
X_2X_3	0. 13	1	0. 13	4. 35	0. 055 8	
X_2X_4	9.03×10^{-3}	1	9.03×10^{-3}	0. 31	0. 585 6	
X_3X_4	0. 02	1	0. 02	0. 63	0. 441 4	
X_1^2	5. 79	1	5. 79	199. 83	<0. 000 1	**
X_2^2	9. 89	1	9. 89	341. 31	<0. 000 1	**
X_3^2	1. 10	1	1. 10	38. 07	<0. 000 1	**
X_4^2	3. 82	1	3. 82	131. 81	<0. 000 1	**
残差	0. 41	14	0. 03			
失拟项	0. 40	10	0. 04	45. 71	0. 101 1	
纯误差	3.52×10^{-3}	4	8.80×10^{-4}			
总和	42. 14	28		$R^2 = 0. 990\ 4$	$R^2_{Adj} = 0. 980\ 7$	$R^2_{Pred} = 0. 944\ 9$

注:“**”表示极显著($P < 0. 01$)。

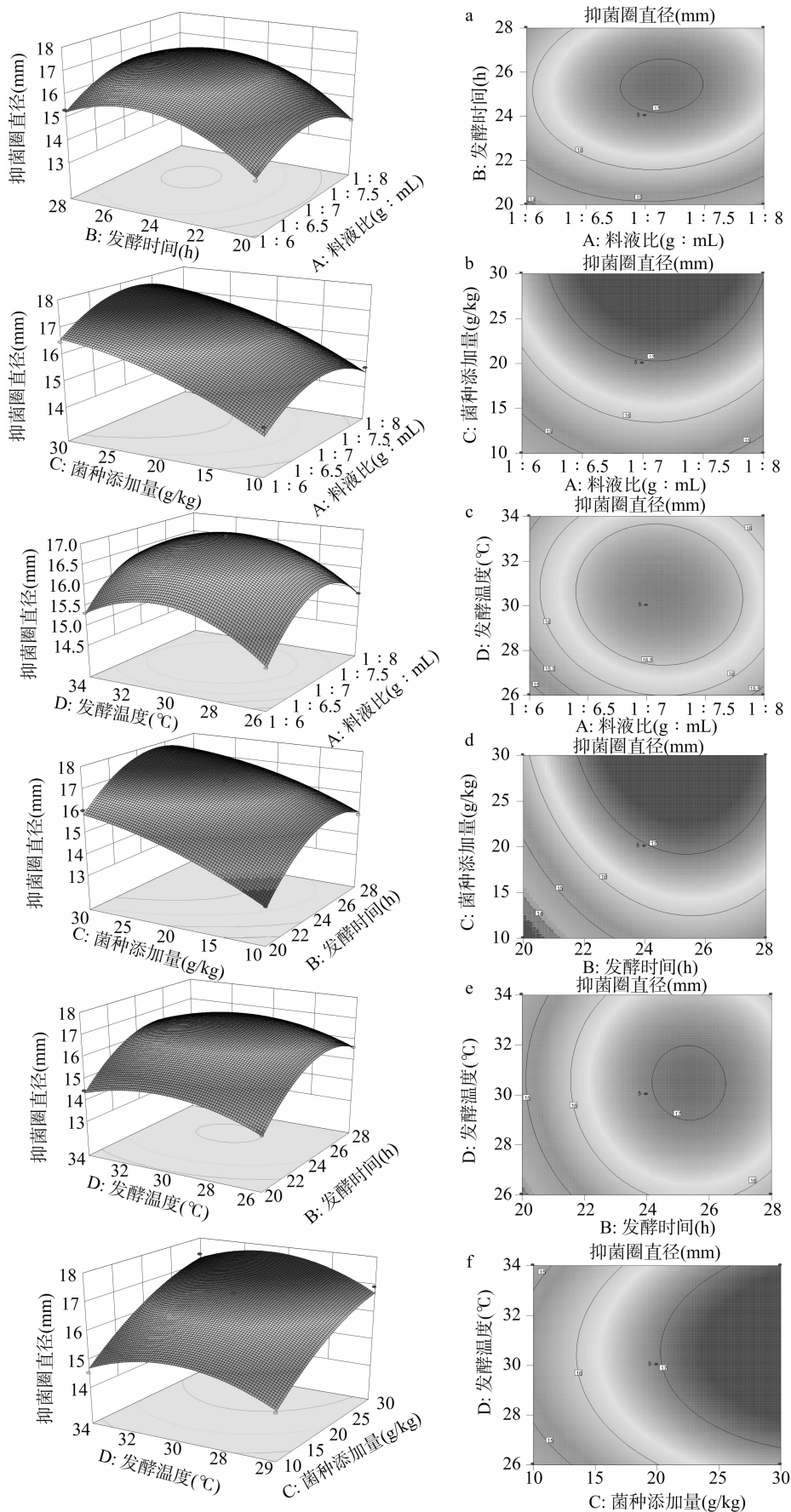


图5 各因素两两交互作用对大麦乳酸发酵液抑菌效果影响的响应曲面及等高图

曲面图的形状可反映出单因素对响应值的影响,曲面越陡峭,影响越显著,拟合的响应面图和等高线图比较直观地反映了各因素间的交互作用。由图5可知,以大肠杆菌的抑菌圈直径为响应值,各因素对大麦乳酸菌发酵液抑菌效果的影响顺序为菌种添加量>发酵时间>料液比>发酵温度,与表4中 F 值分析结果一致。菌种添加量、料液比、发酵温度过高或过低和发酵时间过长或过短,都不能使大麦乳酸菌发酵液的抑菌效果达到最大,只有其取某个适中值时,才可使抑菌圈直径达到最大值。沿菌种添加量轴线等高线相对密集,表明菌种添加量对抑菌效果的影响最大。图5-a、图5-d中等高线密度分布不均匀,呈椭圆形,说明发酵时间和料液比、发酵时间和菌种添加量的交互作用较强,影响较显著。

2.3 验证试验

根据 Box-Behnken 试验所得的大麦乳酸菌发酵工艺参数结果和二次多项回归方程,利用 Design Expert 8.05b 软件中的“Optimization”模块分析得出优化结果,即获得较好抑菌效果的工艺参数为料液比 1 g : 7 mL,发酵时间 25.5 h,菌种添加量 27.5 g/kg,发酵温度 30.53 °C,大麦乳酸菌发酵液对大肠杆菌的抑菌圈直径预测可达到 17.56 mm。考虑实际操作便利,将发酵工艺参数修正为料液比 1 g : 7 mL,发酵时间 25.5 h,菌种添加量 27.5 g/kg,发酵温度 30.5 °C。采用修正后的发酵工艺参数进行 3 次平行验证试验,结果测得抑菌圈直径为 17.52 mm,可见该模型能较好地预测具有抑菌活性的大麦乳酸菌发酵工艺参数,具有实用价值。

3 结论

本研究在单因素试验基础上,以大肠杆菌为指标菌,以抑菌圈直径为响应指标,通过四因素三水平的响应分析对大麦乳酸菌发酵工艺进行了优化,建立了大麦乳酸菌发酵工艺的二次多项式回归模型。经方差分析和响应面图得知,各因素对抑菌效果影响的大小顺序为菌种添加量>发酵时间>料液比>发酵温度,料液比、发酵时间、菌种添加量、发酵温度对大麦乳酸菌发酵液的抑菌效果有极显著影响。经回归分析并结合实际操作便利性,确定大麦乳酸菌发酵的最佳工艺为料液比 1 g : 7 mL,发酵时间 25.5 h,菌种添加量 27.5 g/kg,发酵温度 30.5 °C。在此条件下,抑菌圈直径为 17.52 mm,与模型预测值 17.56 mm 基本一致,说明该模型可靠性较高,对乳酸菌发酵大麦的生产实践有一定的指导意义。大麦乳酸菌发酵液可作为一种天然的抑菌产品添加到其他食品中,提升了大麦的使用价值。

参考文献:

- [1] Schnürer J, Magnusson J. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives[J]. Trend Food Sci Technol, 2005, 16(1/2/3): 70-78.
- [2] 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.
- [3] Oliveira R P, Oliveira A L, Glória M A. Screening of lactic acid bacteria from vacuum packaged beef for antimicrobial activity[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2008, 39(2): 368-374.
- [4] Yang Q M, Pan X H, Kong W B, et al. Antioxidant activities of malt extract from barley (*Hordeum vulgare* L.) toward various oxidative

- stress *in vitro* and *in vivo*[J]. Food Chemistry, 2010, 118(1): 84-89.
- [5] Briggs D E. Barley[M]. London: Chapman and Hall, 1978: 89-173.
- [6] Pins J J, Kaur H. A review of the effects of barley β -glucan on cardiovascular and diabetic risk[J]. Cereal Foods World, 2006, 51(1): 8-11.
- [7] Hole A S, Rud Ida, Grimmer S, et al. Improved bioavailability of dietary phenolic acids in whole grain barley and oat groat following fermentation with probiotic *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus johnsonii*, and *Lactobacillus reuteri*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(25): 6369-6375.
- [8] Kariluoto S, Edelmann M, Nyström L, et al. In situ enrichment of folate by microorganisms in beta-glucan rich oat and barley matrices[J]. International Journal of Food Microbiology, 2014, 176(4): 38-48.
- [9] Thondre P S, Ryan L, Henry C K. Barley β -glucan extracts as rich sources of polyphenols and antioxidants[J]. Food Chemistry, 2011, 126(1): 72-77.
- [10] Tijana M, Slavica S, Suzana I. Effect of fermentation on antioxidant properties of some cereals and pseudo cereals[J]. Food Chemistry, 2010, 119(3): 957-963.
- [11] Funamoto K, Komizu Y, Ichihara H, et al. Antitumor and immunostimulatory effects of residual powder from barley-Shochu distillation remnants[J]. Journal of Health Science, 2008, 54(3): 287-293.
- [12] Ohgidani M, Ichihara H, Goto K, et al. Anticancer effects of residual powder from barley-Shochu distillation remnants against the orthotopic xenograft mouse models of hepatocellular carcinoma *in vivo*[J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2012, 35(6): 984-987.
- [13] Baek E, Kim H, Choi H, et al. Antifungal activity of *Leuconostoc citreum* and *Weissella confusa* in rice cakes[J]. Journal of Microbiology, 2012, 50(5): 842-848.
- [14] Ross R P, Morgan S, Hill C. Preservation and fermentation: past, present and future[J]. International Journal of Food Microbiology, 2002, 79(1): 3-16.
- [15] Brosnan B, Coffey A, Arendt E K, et al. Rapid identification, by use of the LTQ orbitrap hybrid FT mass spectrometer, of antifungal compounds produced by lactic acid bacteria[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2012, 403(10): 2983-2995.
- [16] Batish V K, Roy U, Lal R, et al. Antifungal attributes of lactic acid bacteria—a review[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 1997, 17(3): 209-225.
- [17] Coda R, Rizzello C G, Nigro F, et al. Long-term fungal inhibitory activity of water-soluble extracts of *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto and sourdough lactic acid bacteria during bread storage[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(23): 7391-7398.
- [18] Rizzello C G, Cassone A, Coda R, et al. Antifungal activity of sourdough fermented wheat germ used as an ingredient for bread making[J]. Food Chemistry, 2011, 127(3): 952-959.
- [19] 胡 筱, 李春阳, 周 涛. 响应面法优化蓝莓叶抑菌物质的提取工艺[J]. 食品工业科技, 2012, 33(6): 309-312, 316.
- [20] 韩 磊, 殷文政, 岳智慧. 响应面法优化马奶酒对沙门氏菌抑菌效果发酵条件的研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(23): 214-218.