

罗伊氏乳杆菌 LTR1318 的培养工艺优化

潘海博¹, 覃璐琪¹, 梅丽华¹, 饶川艳¹, 聂梦琳¹, 莫明规², 李全阳¹

(1. 广西大学轻工与食品工程学院, 广西南宁 530004) (2. 柳州市康小乐牛奶有限公司, 广西柳州 545006)

摘要: 为了尽可能提高在有限营养成分和培养条件下罗伊氏乳杆菌 LTR1318 的活菌数, 本文利用单因素试验、Plackett-Burman 试验和最陡爬坡试验筛选出了限制 LTR1318 生长的三种关键营养成分, 以试验得到的活菌数值作为训练样本对 RBF 径向基人工神经网络进行训练, 并结合遗传算法对三种组分和含量进行优化, 再将其用于 5 L 发酵罐, 对接种量、温度、初始 pH 和转速四种条件下的使用效果进行检测。结果表明, 低聚果糖、胰蛋白胨和 L-半胱氨酸对 LTR1318 的活菌数起关键作用, 最佳添加量分别为 10.16 g/L, 12.07 g/L 和 0.65 g/L。此条件下摇瓶培养的最大活菌数为 60.33×10^9 CFU/mL。另外, 5 L 发酵罐上的最佳工艺条件为: 接种量 4%, 温度 37 °C, 初始 pH 7.0, 转速 100 r/min。综合培养组分优化和发酵条件优化下发酵罐培养的活菌数达到 91.33×10^9 CFU/mL, 比未进行优化时提高了 12.69 倍。上述结果与目前有关罗伊氏乳杆菌活菌数优化的研究报道对比认为, 本成果具有一定的优势, 5 L 发酵罐培养的活菌数也达到国内外先进水平。该成果对这类益生菌菌株的工业化生产和制品后续开发具有一定的指导作用。

关键词: 人工神经网络; 遗传算法; 高密度培养; 发酵罐; 工艺优化

文章编号: 1673-9078(2020)10-59-67

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.10.0350

Optimization of Culture Process for *Lactobacillus reuteri* LTR1318

PAN Hai-bo¹, QIN Lu-qi¹, MEI Li-hua¹, RAO Chuan-yan¹, NIE Meng-lin¹, MO Ming-gui², LI Quan-yang¹

(1.College of Light Industry and Food Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China)

(2.Liuzhou Kangxiaole Dairy CO., Ltd, Liuzhou 545006, China)

Abstract: In order to improve the viable cell count of *Lactobacillus reuteri* LTR1318 under limited nutrient components and culture conditions, single factor experiment, Plackett-Burman design and steepest ascent experience were used to screen out three key nutrient components that limit the growth of LTR1318. Box-Behnken design was used with these three components as factors. The radial basis function (RBF) was trained with the obtained viable cell count samples. The three components and their contents were optimized with genetic algorithm in this work. Furthermore, the four fermentation conditions of inoculum concentration, temperature, initial pH and speed were investigated. The results showed that fructooligosaccharide, tryptone and L-cysteine played a key role in the viable cell count of LTR1318. The optimal addition amounts were 10.16 g/L, 12.07 g/L and 0.65 g/L, respectively. Under these conditions, the maximum viable cell count was 60.33×10^9 CFU/mL. In addition, the optimum technological conditions on the 5 L fermentor were obtained as follows: inoculum concentration of 4%, temperature of 37 °C, initial pH of 7.0 and speed of 100 r/min. The number of viable cell reached 91.33×10^9 CFU/mL under comprehensive optimization of culture components and fermentation conditions, which was 12.69 times higher than that of origin culture. The above results were compared with the current domestic researches on the optimization of the viable count of *L. reuteri*. It was found that the culture components optimized by RBF artificial neural network coupled with genetic algorithm in this work had better proliferation effect on LTR1318. The culture conditions of the 5 L fermentor showed the superiority of the viable count of *L. reuteri* as compared with domestic, and high density culture of the strain was realized. The results will provide a certain guideline for the industrial production of related probiotic strains and the subsequent development of products.

引文格式:

潘海博,覃璐琪,梅丽华,等.罗伊氏乳杆菌 LTR1318 的培养工艺优化[J].现代食品科技,2020,36(10):59-67

PAN Hai-bo, QIN Lu-qi, MEI Li-hua, et al. Optimization of culture process for *Lactobacillus reuteri* LTR1318 [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(10): 59-67

收稿日期: 2020-04-17

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31871802); 广西重点研发计划项目 (桂科 AB18221065)

作者简介: 潘海博 (1993-), 男, 硕士, 研究方向: 健康长寿食品研发与作用机制

通讯作者: 李全阳 (1964-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品营养与健康长寿

Key words: artificial neural network; genetic algorithms; high cell density; fermentor; optimization technical

罗伊氏乳杆菌是哺乳动物和禽类胃肠道、人类泌尿生殖道和母乳中的天然共生菌^[1],可分泌抑制多种病原微生物的非蛋白类物质-罗伊氏素^[2]、合成维生素B₁₂在内的多种B族维生素^[3]和抗炎性组胺^[4]等有益物质,将其作为膳食补充剂促进人体健康已获得世界的广泛认可^[5-8]。随着罗伊氏乳杆菌在保健食品领域越来越广泛地应用,提高罗伊氏乳杆菌培养物的活菌含量,对提升生产效率、降低成本及其制品的进一步推广有重要意义。

营养组分和发酵条件对微生物的生长繁殖有至关重要的作用。碳源、氮源、缓冲盐和生长因子是营养体系的主要组成部分,对乳酸菌的生长速率、代谢能力和生物量的积累有显著影响。国内的刘金玲^[9]等通过摇瓶培养,发现罗伊氏乳杆菌增殖培养基中最佳的碳源为葡萄糖2.10%、蔗糖3.00%,氮源为牛肉膏1.50%、酵母粉1.40%,最佳培养时间为10 h,活菌数达到 4.2×10^{10} CFU/mL。姚国强^[10]等的研究表明,蔗糖2%为碳源、大豆蛋白胨1.50%、酵母粉1.00%和酵母蛋白胨1.50%为复合氮源,Na₂HPO₄/一水柠檬酸为缓冲体系和L-半胱氨酸0.50 g/L为生长因子培养7~8 h时,*L. reuteri* IMAU10240的活菌数最高,达到 7.57×10^9 CFU/mL。国外的Atilola^[11]等对植物源氮源和动物源氮源对罗伊氏乳杆菌的增菌效果进行了研究,发现在37℃、培养15 h后,植物源氮源对4株罗伊氏乳杆菌DSM 20016、SD 2112、CF 2-7F和MF 2-7F的促生长效果菌高于动物源氮源,活菌数分别达到了10.05 lg(CFU/mL)、9.92 lg(CFU/mL)、9.93 lg(CFU/mL)和9.68 lg(CFU/mL)。上述结果表明,不同罗伊氏乳杆菌菌株间具有显著不同的营养组分利用能力和生长特性,故在“株”水平上进行研究更为有效。

相关报道表明,不同罗伊氏乳杆菌菌株的基因组中存在多种碳水化合物代谢酶编码基因,对碳源和氮源的利用能力存在显著不同并与宿主生境密切相关^[12,13]。这种代谢类型造成的差异使得研究人员不得不重新确定其最适培养组分。罗伊氏乳杆菌的培养基多数采用MRS培养基或TPY培养基,营养成分复杂且与目的产物之间存在非线性关系,常规方法筛选的配方和工艺参数效果难尽人意。人工神经网络技术(Artificial Neural Network, ANN)在发酵领域内的逐步应用为解决非线性函数关系的问题提供了一种有效模型^[14]。径向基人工神经网络(Radial Basis Function, RBF)便是其中的一种主要模型,可通过“局部逼近”的求解方式使输出结果只与函数关系中参数的上下调

有关^[15,16]。以生物界中自然选择自然遗传机制建立起的遗传算法(Genetic Algorithms, GA),可通过模拟繁殖、杂交、变异、竞争、选择的方式求解目标函数的极值问题^[17],正适合具体的罗伊氏乳杆菌菌株发酵培养配方筛选和工艺参数的优化问题。

为此,本研究拟以自主分离的广西巴马健康百岁老人体内罗伊氏乳杆菌LTR1318为发酵菌株,以TPY为基础培养基(参考该菌更适于TPY而不是MRS培养基的前期研究结果),利用单因素试验、Plackett-Burman试验和最陡爬坡试验筛选出限制LTR1318生长的关键营养组分,以径向基人工神经网络耦合遗传算法对该菌株的培养基组分进行优化,并进一步对其在5 L发酵罐上的扩大效果进行验证。

1 材料与方法

1.1 原料

罗伊氏乳杆菌(*Lactobacillus reuteri*) LTR1318,分离纯化自广西巴马瑶族自治县健康百岁老人的粪便,已保藏于中国典型培养物保藏中心(保藏号:CCTCC M 2019017)。

1.1.1 材料与试剂

TPY培养基(g/L):水解酪蛋白10.0,大豆蛋白胨5.0,酵母粉2.0,葡萄糖5.0,L-半胱氨酸0.5,磷酸氢二钾2.0,氯化镁0.5,硫酸锌0.25,氯化钙0.15,氯化铁0.000001,琼脂15.0,吐温801.0。

葡萄糖、低聚果糖、蔗糖、麦芽糖、甘油,天津市科密欧化学试剂有限公司;可溶性淀粉,上海广瑞科技有限公司;牛肉膏、大豆蛋白胨、胰蛋白胨、酪蛋白、柠檬酸铵、吐温80、L-半胱氨酸,北京奥博星生物技术有限公司;酵母粉,琼脂,北京索莱宝科技有限公司;马铃薯、玉米和黄瓜,购自校园菜市。

1.1.2 主要仪器设备

DNP-9082BS型电热恒温培养箱,上海新苗医疗器械制造有限公司;SW-CJ型超净工作台,苏净安泰苏净集团苏州安泰空气技术有限公司;DSX-208B型高温高压灭菌锅,上海申安医疗器械厂;TG16-WS型台式高速离心机,湖南湘仪试验室仪器开发有限公司;UV-5200型分光光度计,上海元析仪器有限公司;MS104TS型分析天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;5JG机械搅拌玻璃型5 L发酵罐,上海保兴生物设备工程有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株的活化与培养

用接种环沾取保存于 -80°C 的罗伊氏乳杆菌 LTR1318, 在 TPY 平板上划线培养, 挑取形态良好的单菌落至 TPY 液态培养基, 37°C 恒温培养 14 h。

1.2.2 活细胞计数

将发酵完成的培养液摇匀后梯度稀释, 分别取 10^{-7} 、 10^{-8} 和 10^{-9} 的 0.1 mL 稀释液涂布于 TPY 琼脂培养基, 37°C 恒温培养 14 h 后平板计数, 计数方法参照朱振军^[18]等。

1.2.3 培养组分的确定

在 TPY 基础培养基中分别加入葡萄糖、低聚果糖、甘油、乳糖、蔗糖和可溶性淀粉六种糖, 摇瓶下 37°C 恒温静置培养 14 h, 以活菌数为评价指标筛选出最适碳源。以同样的方法依次确定适合罗伊氏乳杆菌 LTR1318 的最佳氮源、缓冲体系和生长因子。氮源候选因素为: 大豆蛋白胨、牛肉膏、酪蛋白胨、酵母粉、胰蛋白胨和柠檬酸铵; 缓冲体系的候选因素为: KH_2PO_4 -NaOH、 K_2HPO_4 -柠檬酸钠-乙酸钠、 Na_2HPO_4 - KH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 -柠檬酸、柠檬酸-柠檬酸钠和 Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 ; 生长因子候选因素为: 马铃薯汁、玉米汁、黄瓜汁、L-半胱氨酸和吐温 80。上述四种营养物质的添加量与 TPY 基础培养基相应的添加量一致。其中, 生长因子中蔬菜汁的制备方法为: 将清洗干净的 100 g 新鲜蔬菜切碎, 加入 100 mL 蒸馏水煮沸 5 min, 榨汁、过滤并定容至 200 mL。

1.2.4 培养组分的优化

1.2.4.1 Plackett-Burman 试验

将单因素筛选试验中显著影响其活菌数的培养组分作为候选对象, 通过 Plackett-Burman 试验设计进一步明确影响 LTR1318 增殖的关键组分。

1.2.4.2 最陡爬坡试验

依照 Plackett-Burman 试验设计的结果, 确定最陡爬坡的方向和步长。

1.2.4.3 Box-Behnken Design 响应面试验

根据 Plackett-Burman 设计和最陡爬坡设计的得到的因素和中心点, 通过 Design Expert 软件进行三因素三水平的响应面设计。

1.2.4.4 RBF 径向基神经网络模型的建立

采用 MATLAB R2019a 构建 RBF 神经网络模型。输入样本变量, 即由 Box-Behnken Design 试验设计下得到的罗伊氏乳杆菌 LTR1318 的活菌数实测值, 输出变量为罗伊氏乳杆菌 LTR1318 活菌数的预测值。随后对输入和输出变量进行归一化处理, 确定模型精度,

选择不同的权值和阈值训练模型。通过模型的输出结果反馈模型精度并评估其泛化能力, 进一步优化模型的权值和阈值进而校正预测结果。训练完成后的输出样本, 用于下一步非线性函数输出结果的预测。RBF 径向基神经网络的拟合流程见图 1。

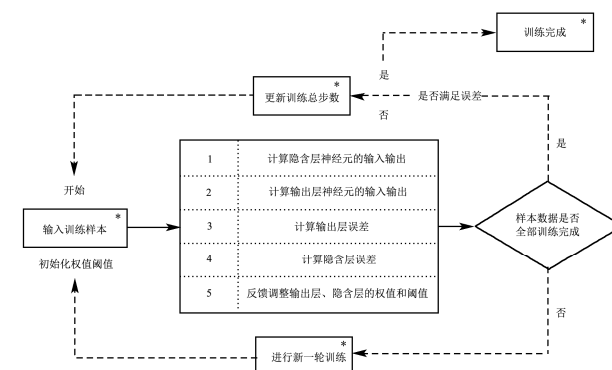


图 1 RBF 径向基神经网络训练拟合流程

Fig.1 RBF neural network training fitting process

1.2.4.5 遗传算法寻优设计

MATLAB 的 GA 工具箱用于实现遗传算法寻优的代码设计^[19]。经过 RBF 径向基神经网络训练后的预测结果作为个体适应度值, 变量上下限分别对应 Box-Behnken Design 试验设计下的因素的最高和最低水平。通过运行的遗传算法寻优程序代码, 模拟生物的选择、交叉和变异等现象寻找函数的全局最优值及对应输入值。初始种群数, 交叉概率, 变异概率和进化代数的取值根据实际试验设计进行选取, 其他参数选择默认值。遗传算法极值的寻优逻辑如图 2。

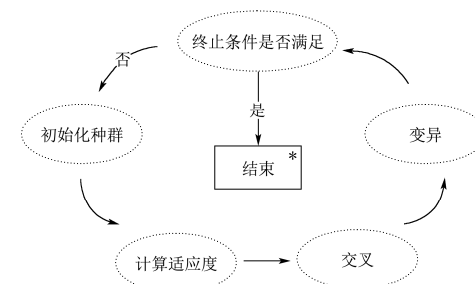


图 2 RBF 遗传算法极值寻优的实现逻辑

Fig.2 Implementation logic of genetic algorithm extreme value optimization

1.2.4.6 验证试验

采用遗传算法寻优得到最大值下的培养基组分条件, 对罗伊氏乳杆菌 LTR1318 的实际培养结果与预测值进行对比。

1.2.5 发酵罐培养条件优化

在 RBF 径向基神经网络和遗传算法寻优得到的最优培养基的基础上进行 5 L 发酵罐扩大培养。5 L 发酵罐装液量为 2.5 L, 种子液活菌数为 63.33×10^9 CFU/mL, 接种量以发酵罐实际装液量为基准进行添

加, 通气量 1:2 (V/V)。以活菌数值为评价指标, 对罗伊氏乳杆菌 LTR1318 在 5 L 发酵罐内的接种量、温度、初始 pH 和搅拌的转速四个参数进行优化, 以确定 LTR1318 的发酵罐最佳培养工艺。初始及培养过程中的 pH 值通过流加 10% 氨水维持恒定, 其他参数与设定值保持一致。

1.2.6 数据分析与处理

Design Expert 8.0.6 用于 Plackett-Burman 和响应面试验的设计与分析; SPSS 19.0 和 Graphpad Prism 7.0 用于方差分析和作图; Matlab2019a 数学软件进行人工神经网络和遗传算法寻优代码的实现, SmartDraw 绘图软件用于流程图和逻辑图的绘制。所有试验进行三次重复。

2 结果与讨论

2.1 培养组分的确定

碳源、氮源、缓冲体系和生长因子是微生物生长的主要组成部分, 对菌体生物量的积累有显著影响。图 3 为 4 种营养组分的单因素试验结果, 反映了不同营养物对罗伊氏乳杆菌 LTR1318 的促生长情况。

如图 3 所示, 对罗伊氏乳杆菌 LTR1318 增菌效果明显的碳源、氮源、缓冲体系和生长因子分别是: 低聚果糖, 胰蛋白胨, 柠檬酸-柠檬酸钠, 马铃薯汁和 L-半胱氨酸 ($p < 0.05$), 活菌数分别达到了 10.33×10^9 、 10.67×10^9 、 10.67×10^9 、 10.33×10^9 和 11.00×10^9 CFU/mL。研究表明, 组合氮源比单一氮源更有利于菌株生长^[20], 因此本研究选择两种氮源。据此, 将低聚果糖、胰蛋白胨、酵母粉、柠檬酸-柠檬酸钠、马铃薯汁和 L-半胱氨酸作为罗伊氏乳杆菌 LTR1318 的优化培养基组分。在碳源的利用程度上, 刘金玲^[9]等和姚国强^[10]等人的优化结果显示罗伊氏乳杆菌对麦芽糖、蔗糖和水苏糖的代谢能力最强, 对低聚果糖的利用能力较弱。而本研究中的罗伊氏乳杆菌 LTR1318 对低聚果糖有最高的代谢活性, Rattanaprasert^[21]等也发现将低聚果糖作为唯一碳源时罗伊氏乳杆菌表现出明显的生长优势。因此推测其基因组内可能存在包括果糖苷酶、菊粉酶等在内的多种糖苷水解酶编码基因和基因簇^[22]。同时, 低聚果糖作为一种益生元对增强肠道益生菌的竞争力起到重要作用, 较强的代谢能力也有助于促进其在宿主肠上皮细胞的定植^[23,24]。在氮源利用方面, 朱战波等^[25]筛选出罗伊氏乳杆菌的最适氮源为大豆蛋白胨和酵母浸粉, 与本研究采用复合氮源的方法一致, 但所筛选的最佳氮源不同。Atilola^[11]等发现植物氮源对罗伊氏乳杆菌的增菌效果强于动物氮

源, 这与本文及秦鹏^[26]等的结论相反, 表明不同株的罗伊氏乳杆菌在氮源利用上存在偏好性。对缓冲盐和生长因子的需求方面, 本研究与已有报道无明显差异^[27]。

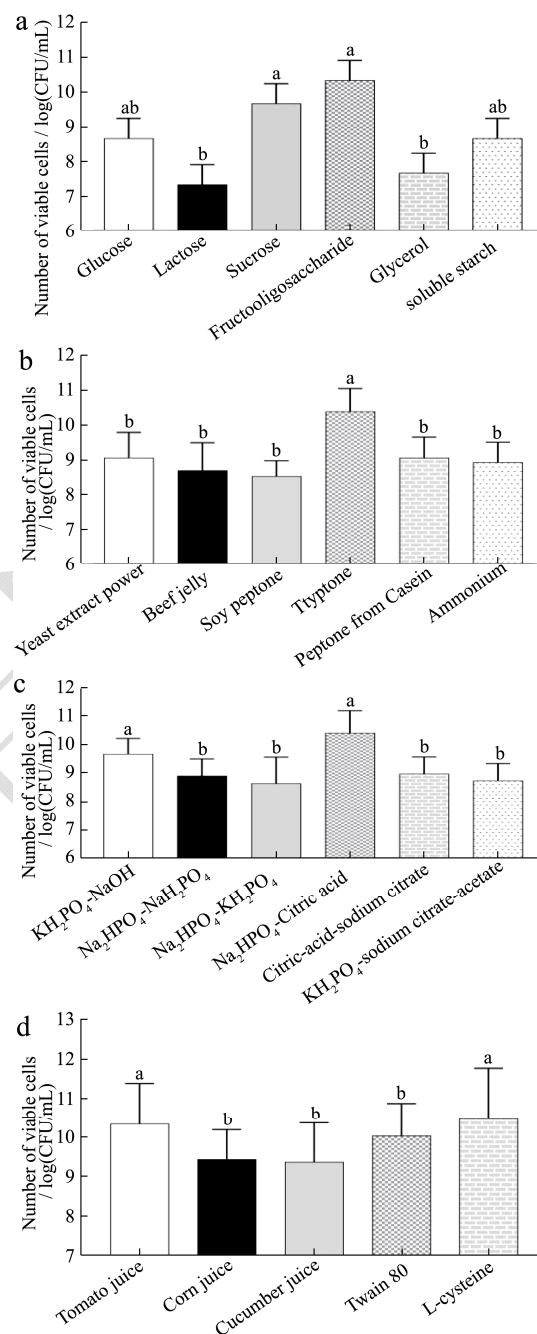


图 3 (a) 碳源对罗伊氏乳杆菌 LTR1318 活菌数的影响; (b) 氮源对罗伊氏乳杆菌 LTR1318 活菌数的影响; (c) 缓冲体系对罗伊氏乳杆菌 LTR1318 活菌数的影响; (d) 生长因子对罗伊氏乳杆菌 LTR1318 活菌数的影响

Fig.3 (a) Effect of carbon source on the number of viable *L. reuteri* LTR1318; (b) Effect of nitrogen source on the number of viable *L. reuteri* LTR1318; (c) Effect of buffer system on the number of viable *L. reuteri* LTR1318; (d) Effect of growth factor on the viable count of *L. reuteri* LTR1318

2.2 培养组分的优化

2.2.1 Plackett-Burman 试验

以2.1筛选出的组分为Plackett-Burman 试验因素，每个因素选取两个水平进行 Plackett-Burman 试验设计。试验设计因素及水平见表 1，试验结果见表 2，显著性分析见表 3。

由表 3 知，低聚果糖、柠檬酸、马铃薯汁和胰蛋白胨为正效应，其余影响因素效应为负效。其中，显著影响罗伊氏乳杆菌 LTR1318 增殖 ($p<0.05$)。故选择低聚果糖、胰蛋白胨和 L-半胱氨酸进行最陡爬坡试验，以确定三种成分的最佳浓度范围。

表 1 Plackett-Burman 试验设计筛选各因素及水平

Table 1 Variance analysis of regression equation of

Plackett-Burman design			
变量编码	变量/(g/L)	水平	
		-1	+1
A	低聚果糖	8	12
B	酵母粉	5	7.5
C	柠檬酸	0.3	0.45
D	马铃薯汁	100	150
E	L-半胱氨酸	0.5	0.75
F	柠檬酸钠	5.5	8.25
G	胰蛋白胨	10	15

表 2 Plackett-Burman 试验结果

Table 2 The results of Plackett-Burman design

试验号	变量编码							活菌数/($\times 10^9$ CFU/mL)
	A	B	C	D	E	F	G	
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	42.33 $\pm$ 3.06
2	1	1	-1	-1	-1	1	-1	43.67 $\pm$ 3.79
3	-1	-1	-1	1	1	1	-1	55.67 $\pm$ 4.16
4	-1	1	1	-1	1	-1	-1	40.33 $\pm$ 3.51
5	1	-1	-1	-1	1	1	1	45.67 $\pm$ 3.79
6	-1	1	-1	1	-1	-1	1	40.67 $\pm$ 3.06
7	1	1	-1	1	1	-1	1	48.00 $\pm$ 3.00
8	1	1	-1	1	1	-1	1	47.33 $\pm$ 3.51
9	1	-1	1	-1	-1	-1	1	47.00 $\pm$ 3.00
10	-1	1	1	-1	1	1	1	56.33 $\pm$ 3.21
11	-1	-1	1	1	-1	1	1	47.33 $\pm$ 3.06
12	1	-1	1	1	1	-1	-1	41.67 $\pm$ 4.16

表 3 Plackett-Burman 试验主效应分析

Table 3 The main effect analysis of every factors in Plackett-Burman design

变异来源	平方和	自由度	F 值	回归系数	P 值	显著性
A-低聚果糖	168.81	1	56.45	3.81	0.0017	*
B-酵母粉	5.75	1	1.92	-0.77	0.2379	
C-柠檬酸	3.12	1	1.04	0.52	0.3649	
D-马铃薯汁	21.82	1	7.30	1.37	0.0540	
E-L-半胱氨酸	42.18	1	14.10	-1.91	0.0199	*
F-柠檬酸钠	0.48	1	0.16	-0.20	0.7095	
G-胰蛋白胨	37.38	1	12.50	1.80	0.0241	*

注：*表示差异显著 ($p<0.05$)。

2.2.2 最陡爬坡试验

根据 2.2.1 确定的显著因素结果，进一步利用最陡爬坡试验使显著因素逼近最佳响应区域，确定爬坡的方向和步长，试验结果如表 4 所示。

由表 4 可知，低聚果糖，胰蛋白胨和 L-半胱氨酸

的添加量对 LTR1318 的活菌数有显著影响。在胰蛋白胨 12 g/L，低聚果糖 10 g/L，L-半胱氨酸 0.6 g/L 时活菌数最大，达到 56.33×10^9 CFU/mL，故将该条件作为 Box-Behnken Design 设计的中心点进行后续优化试验。

表 4 最陡爬坡试验设计

Table 4 Steepest ascent experimental design and results

试验组	胰蛋白胨/(g/L)	低聚果糖/(g/L)	L-半胱氨酸/(g/L)	活菌数/(10 ⁹ CFU/mL)
A	10	8	0.50	50.67±3.21
B	11	9	0.55	56.00±3.61
C	12	10	0.6	56.67±3.21
D	13	11	0.65	52.33±2.08
E	14	12	0.7	42.67±3.51
F	15	13	0.75	19.33±1.53

2.2.3 RBF 神经网络建模

表 5 Box-Behnken Design 因素水平及编码

Table 5 Box-Behnken Design factor level and coding

编码值	因素/(g/L)	水平		
		-1	0	+1
X ₁	胰蛋白胨	11.00	12.00	13.00
X ₂	低聚果糖	9.00	10.00	11.00
X ₃	L-半胱氨酸	0.55	0.60	0.65

表 6 径向基神经网络模型训练和测试样本数据集

Table 6 Training and testing sample data of RBF artificial

neural network

样本编号	因素水平			数据实测值/ (×10 ⁹ CFU/mL)
	X ₁	X ₂	X ₃	
1	0	0	0	62.67±2.31
2	0	0	0	63.00±3.46
3	1	-1	0	52.00±2.65
4	-1	-1	0	51.67±3.21
5	-1	0	1	56.33±2.52
6	0	-1	-1	56.67±3.79
7	-1	1	0	51.33±3.06
8	0	0	0	61.33±4.04
9	1	0	1	59.33±3.21
10	1	1	0	57.33±3.51
11	0	1	1	59.67±3.21
12	0	0	0	63.00±3.61
13	-1	0	-1	54.33±3.21
14	0	1	-1	59.67±2.52
15	0	-1	1	53.67±2.89
16	1	0	-1	60.33±3.79
17	0	0	0	62.67±3.21

RBF 神经网络具有最佳逼近和全局最优的性能，可在低维空间内的线性不可分问题在高维空间内线性可分。本研究所采取的策略是对 Box-Behnken Design 试验的 17 组数据进行随机划分，数据集的 80%为训练集，20%为测试集。最大训练次数为 100 次，学习步长为 0.05，学习目标精度为 10⁻⁵。

Box-Behnken Design 试验设计的因素水平如表 5，神经网络模型的训练和测试数据集如表 6，模型的预测效果如图 4。

根据表 7，响应面模型极显著 ($p<0.01$)，失拟项不显著 ($p>0.05$)，确定系数 $R^2=0.98$ ，说明所构建响应面模型的拟合度良好。同时，胰蛋白胨 (X_1)，低聚果糖 (X_2) 对罗伊氏乳杆菌 LTR1318 的生长影响显著 ($p<0.05$)， X_1 和 X_2 的二次方影响极显著 ($p<0.01$)。经 Design-Expert 软件拟合表 6 中的数据，可得变量与响应值之间的二阶方程如下：

$$Y=62.5340+1.9163X_1+1.7488X_2-0.2500X_3+1.4175X_1X_2-0.7500X_1X_3+0.7500X_2X_3-4.6458X_1^2-4.8058X_2^2-0.3083X_3^2$$

式中 Y：LTR1318 的活菌数 (CFU/mL)； X_1 ：胰蛋白胨添加量 (g/L)； X_2 ：低聚果糖添加量 (g/L)； X_3 ：L-半胱氨酸添加量 (g/L)。

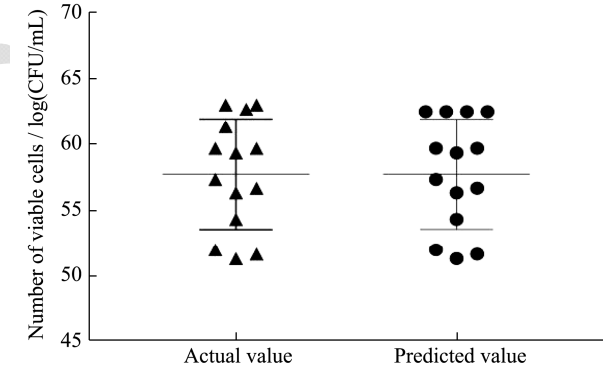


图 4 RBF 径向基神经网络的预测结果

Fig.4 Prediction results of RBF neural network

观察图 4 中实际值和预测值发现，除了 2 个训练样本的预测值与实际值出现的偏离外，其余样本的预测值与实际值误差较小，正负误差均在 1%范围内。神经网络模型的确定系数 $R^2=0.99$ ，模型拟合度较好。结果表明，经过训练的 RBF 径向基神经网络模型稳定，泛化能力和预测能力出色，可准确地预测多因素相互作用下的非线性函数输出。RBF 以“局部逼近”的策略进行学习训练，比目前发酵优化过程应用最广泛的误差逆向传播人工神经网络 (Back Propagation, BP) [28] 采用的“全局逼近”策略具备更强的实时性、更少的

计算量和更快的训练速度^[29,30]，且已被多位数学家证明了 RBF 在优化此类映射问题上的适用性。这也在本

研究建立的人工神经网络预测的 LTR1318 活菌数值上得到了验证。

表 7 响应面模型显著性分析

Table 7 Saliency analysis of response surface model						
变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	268.38	9	29.82	30.60	<0.0001	**
胰蛋白胨 (X ₁)	29.38	1	29.38	30.14	0.0009	*
低聚果糖 (X ₂)	24.47	1	24.47	25.10	0.0015	*
L-半胱氨酸 (X ₃)	0.50	1	0.50	0.51	0.4970	
X ₁ X ₂	8.04	1	8.04	8.25	0.0239	
X ₁ X ₃	2.25	1	2.25	2.31	0.1725	
X ₂ X ₃	2.25	1	2.25	2.31	0.1725	
X ₁ ²	90.88	1	90.88	93.25	<0.0001	**
X ₂ ²	97.24	1	97.24	99.78	<0.0001	**
X ₃ ²	0.40	1	0.40	0.41	0.5421	
残差项	6.82	7	0.97			
失拟项	4.80	3	1.63	3.40	0.1479	>0.05
误差	1.92	4	0.48			
总和	275.21	16				

注: *表示差异显著 ($p<0.05$); **表示差异极显著 ($p<0.01$)。

2.2.4 遗传算法极值寻优

RBF 径向基神经网络建模成功后，再建立以胰蛋白胨，低聚果糖和 L-半胱氨酸三个因素为自变量，最优活菌数为因变量的个体适应度函数，通过遗传算法寻找适应度函数极值。由 Box-Behnken Design 试验得到变量的上下限分别为[11 9 0.55]和[13 11 0.65]，通过 Matlab2019a 设计的遗传算法主程序模拟物种进化过程中的选择、交叉和变异得到图 5。其中，初始种群数 25、交叉概率 0.8，变异概率 0.01，进化代数 50 代，其余参数为默认值。

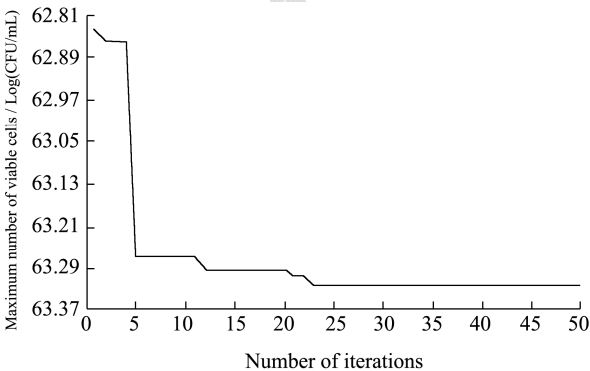


图 5 RBF 遗传算法极值寻优轨迹

Fig.5 Genetic algorithm extremum optimization trajectory

由图 5 可知，适应度曲线经历了数次向下的迭代寻优，个体适应度所处平台时间逐步延长，表明个体

的适应能力随着适应度函数的减小而增强。经过 30 多次的迭代之后，适应度曲线最终趋于平稳，迭代结束。由遗传算法迭代程序运行结束后的输出结果可得，活菌数的最大预测值为 63.32×10^9 CFU/mL。对应的低聚果糖，胰蛋白胨和 L-半胱氨酸的最优值分别为 10.16 g/L，12.07 g/L 和 0.65 g/L。此时，由神经网络模型耦合遗传算法预测得到罗伊氏乳杆菌 LTR1318 的最优培养基组分培养后，活菌数实测值为 $60.33\pm3.21\times10^9$ CFU/mL，与遗传算法得到的预测值拟合率为 95.28%，该结果与本研究未优化培养组分前的活菌数 6.67×10^9 CFU/mL 相比提高了 8.04 倍。结果表明，经过 RBF 人工神经网络耦合遗传算法优化后的培养基各因素参数比较可靠。

2.3 发酵罐培养条件优化

在放大试验过程中，菌体的接种量、培养温度、体系 pH 及搅拌速度等条件，对菌体的生长繁殖、代谢产物的积累等有重要影响。培养过程中的 pH 值通过流加 10%氨水维持恒定，对罗伊氏乳杆菌 LTR1318 在 5 L 发酵罐内的接种量、温度、初始 pH 和转速四个参数进行单因素优化，其他参数与发酵罐初始设定值保持一致，结果如图 6。

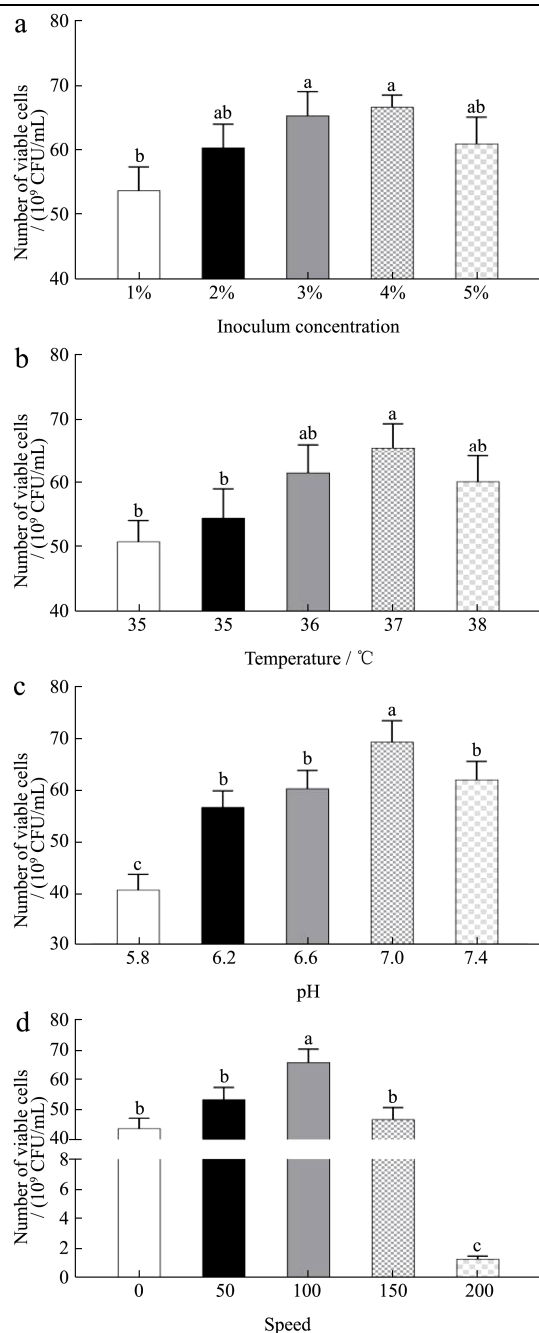


图6 RBF 发酵罐培养条件对罗伊氏乳杆菌 LTR1318 活菌数的影响

Fig.6 Effects of fermentation condition of culture on the viable cell counts of *L. reuteri* LTR1318

根据图6可知,对罗伊氏乳杆菌 LTR1318 生长影响显著的四个因素参数分别为:接种量 4% 温度 37 °C, 初始 pH 7.0, 转速 100 r/min。活菌数分别达到了 67.00×10^9 、 65.67×10^9 、 69.33×10^9 、 65.67×10^9 CFU/mL, 因此以上述培养条件作为上罐最优条件。在培养组分优化后的基础上采用上述培养条件进行验证,得到罗伊氏乳杆菌 LTR1318 的活菌数为 91.33×10^9 CFU/mL。此结果接近 Atilola^[11]等经过植物氮源优化下的最高活菌数 ($10.05 \lg$ CFU/mL), 高于姚国强^[10]等通过响应

面优化试验得到的最大罗伊氏乳杆菌活菌数 (7.57×10^9 CFU/mL) 和采用朱战波^[25]等二次正交旋转变组合法优化罗伊氏乳杆菌发酵培养基得到的最大活菌数 ($OD_{620 \text{ nm}}=1.073$), 满足了高密度培养活菌数的数量级要求^[31]。

3 结论

本研究采用单因素试验、Plackett-Burman 试验和最陡爬坡试验,筛选出了限制 LTR1318 生长的三种关键营养成分:低聚果糖、胰蛋白胍和 L-半胱氨酸。通过径向基人工神经网络建立起培养组分与活菌数的非线性映射目标函数,结合遗传算法优化得到三种营养成分的最佳添加量,分别为 10.16、12.07、0.65 g/L,此时的最大活菌数为 60.33×10^9 CFU/mL。得到 5 L 发酵罐上的最佳工艺条件为:接种量 4%,温度为 37 °C,初始 pH 为 7.0,转速为 100 r/min。综合优化营养成分和发酵条件下的最大活菌数为 91.33×10^9 CFU/mL,比未优化前提高了 12.69 倍。与国内外报道对比发现本研究采用的 RBF 人工神经网络耦合遗传算法优化下的培养组分对罗伊氏乳杆菌 LTR1318 有更好增殖效果,活菌数达到国内外先进水平,实现了高密度培养。这将为该菌株的工业扩大生产、有关产品的后续开发提供重要理论参考。

参考文献

- [1] Martin R, Nauta A J, Ben A K, et al. Early life: gut microbiota and immune development in infancy [J]. *Benef Microbes*, 2010, 1(4): 367-382
- [2] Spinler J K, Sontakke A, Hollister E B, et al. From prediction to function using evolutionary genomics: human-specific ecotypes of *Lactobacillus reuteri* have diverse probiotic functions [J]. *Genome Biology and Evolution*, 2014, 6(7): 1772-1789
- [3] Morita H, Toh H, Fukuda S, et al. Comparative genome analysis of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum* reveal a genomic island for reuterin and cobalamin production [J]. *DNA Research*, 2008, 15(3): 151-161
- [4] Thomas C M, Hong T, Van Pijkeren J P, et al. Histamine derived from probiotic *Lactobacillus reuteri* suppresses TNF via modulation of PKA and ERK signaling [J]. *PloS One*, 2012, 7(2): e31951
- [5] Casas I A, Dobrogosz W J. Validation of the probiotic concept: *Lactobacillus reuteri* confers broad-spectrum protection against disease in humans and animals [J].

- Microbial Ecology in Health and Disease, 2000, 12(4): 247-285
- [6] HOU Cheng-li, ZENG Xiang-fang, YANG Feng-juan, et al. Study and use of the probiotic *Lactobacillus reuteri* in pigs: a review [J]. Journal of Animal Science and Biotechnology, 2015, 6(1): 14
- [7] McFall-Ngai M. Care for the community [J]. Nature, 2007, 445(7124): 153-153
- [8] Tubelius P, Stan V, Zachrisson A. Increasing work-place healthiness with the probiotic *Lactobacillus reuteri*: a randomised, double-blind placebo-controlled study [J]. Environmental Health, 2005, 4(1): 25
- [9] 刘金玲,李嘉文,张含雪,等.罗伊氏乳杆菌增殖培养基中碳源氮源的优化[J].中国微生态学杂志,2016,28(5):533-537
LIU Jin-ling, LI Jia-wen, ZHANG Han-xue, et al. Optimization of carbon and nitrogen sources of enrichment culture medium for *Lactobacillus reuteri* [J]. Chinese Journal of Microecology, 2016, 28(5): 533-537
- [10] 姚国强,张雪梅,高志敏,等.*Lactobacillus reuteri* IMAU10240 增殖培养基及高密度培养工艺优化[J].食品科学,2017,14: 97-105
YAO Guo-qiang, ZHANG Xue-mei, GAO Zhi-min, et al. Optimization of enrichment medium and high cell density cultivation of *Lactobacillus reuteri* IMAU10240 [J]. Food Science, 2017, 14: 97-105
- [11] Atilola O A, Gyawali R, Aljaloud S O, et al. Use of phytone peptone to optimize growth and cell density of *Lactobacillus reuteri* [J]. Foods, 2015, 4(3): 318-327
- [12] YU Jie, ZHAO Jie, SONG Yu-qin, et al. Comparative genomics of the herbivore gut symbiont *Lactobacillus reuteri* reveals genetic diversity and lifestyle adaptation [J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 9: 1151-1162
- [13] Stefanovic E, Fitzgerald G, McAuliffe O. Advances in the genomics and metabolomics of dairy *Lactobacilli*: a review [J]. Food Microbiology, 2017, 61: 33-49
- [14] Nagata Y, Chu K H. Optimization of a fermentation medium using neural networks and genetic algorithms [J]. Biotechnology Letters, 2003, 25(21): 1837-1842
- [15] 周景文,徐建,陈守文,等.基于径向基神经网络和遗传算法的聚- γ -谷氨酸发酵培养基优化[J].食品科学,2006,27(10): 288-292
ZHOU Jin-wen, XU Jian, CHEN Shou-wen, et al. Based on radius basis function neural network and genetic algorithm [J]. Food Science, 2006, 27(10): 288-292
- [16] Park J, Sandberg I W. Universal approximation using radial-basis-function networks [J]. Neural Computation, 1991, 3(2): 246-257
- [17] 雷英杰,张善文.MATLAB 遗传算法工具箱及应用[M].西安:西安电子科技大学出版社,2014:62-106
LEI Ying-jie, ZHANG Shan-wen. MATLAB genetic algorithm toolbox and application [M]. Xian: Xidian University Press, 2014: 62-106
- [18] 朱振军,黄国宏,梁晓琳,等.罗伊氏乳杆菌的益生特性及安全分析[J].现代食品科技,2016,32(6):315-320
ZHU Zhen-jun, HUANG Guo-hong, LIANG Xiaolin, et al. Analysis of probiotic properties and safety of *Lactobacillus reuteri* [J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(6): 315-320
- [19] 高歌,罗金生.通用遗传算法估算化学及生化反应动力学参数[J].计算机与应用化学,2005,22(10):915-917
GAO Ge, LUO Jin-sheng. Estimating kinetic parameters of chemical and biochemical reaction with general genetical gorithm [J]. Computer and Applied Chemistry, 2005, 22(10): 915-917
- [20] 闫天文,满朝新,刘泳麟,等.一株植物乳杆菌高密度培养的研究[J].中国乳品工业,2014,42(4):33-37
YAN Tian-wen, MAN Chao-xin, LIU Yong-lin, et al. High cell density cultivation of *Lactobacillus plantarum* [J]. China Dairy Industry, 2014, 42(4): 33-37
- [21] Rattanaprasert M, Van Pijkeren J P, Ramer-Tait A E, et al. Genes involved in galactooligosaccharide metabolism in *Lactobacillus reuteri* and their ecological role in the gastrointestinal tract [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2019, 85(22)
- [22] 陈臣,卢艳青,于海燕,等.乳酸菌代谢低聚糖机理的研究进展[J].中国食品学报,2019,19(6):274-283
CHEN Chen, LU Yan-qing, YU Hai-yan, et al. The research progress on mediating oligosaccharides metabolism by lactic acid bacteria [J]. China Food Journal, 2019, 19(6): 274-283
- [23] Willyard, Cassandra. Microbiome: gut reaction [J]. Nature, 2011, 479(7374): S5-S7
- [24] Roberfroid M, Gibson G R, Hoyles L, et al. Prebiotic effects: metabolic and health benefits [J]. British Journal of Nutrition, 2010, 104(S2): S1-S63

(下转第 314 页)