

植物乳杆菌素产生条件及分离方法的优化

姜黎明, 罗义勇, 王良才, 李晓然, 柳陈坚

(昆明理工大学生命科学与技术学院, 云南昆明 650500)

摘要: 目前植物乳杆菌常规发酵产生的植物乳杆菌素产量一般较低, 优化植物乳杆菌素的产生条件和分离纯化方法是提高其产量的有效途径。本文以3株 *Lb. plantarum* 为实验材料, 研究了发酵时间、温度、培养液初始 pH 值和培养基成分等因素对 Plantaricin 产量的影响。基于优化培养条件的研究结果, 再探究五种不同 Plantaricin 的分离纯化方法, 使两者达到最佳组合。研究发现: (1) 发酵时间在 28~35 h 内, 温度 30~37 °C, 培养液初始 pH 在 6.5~7.0, 10 g/L 葡萄糖和 10 g/L 蔗糖为碳源, 10 g/L 蛋白胨、5 g/L 牛肉膏和 5 g/L 酵母粉为氮源, 2 g/L 磷酸氢二钾、0.2 g/L 硫酸镁、0.05 g/L 硫酸锰、2 g/L 柠檬酸铵和 5 g/L 乙酸钠为无机盐, 1 mL/L 吐温-80 为乳化剂, 优化后 Plantaricin 产量较优化前提高了 1.5 倍以上; (2) 最佳分离方法为超滤法。发酵液通过超滤法分离后, 回收率达到了 71%。本研究为获得尽量多的 Plantaricin 以及 Plantaricin 工业化开发利用提供理论基础和技术支撑。

关键词: 植物乳杆菌素; 产生条件; 分离方法; 优化

文章编号: 1673-9078(2014)10-218-225

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.10.037

Optimization of Production Conditions and Separation Methods for Plantaricin

JIANG Li-ming, LUO Yi-yong, WANG Liang-cai, LI Xiao-ran, LIU Chen-jian

(College of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

Abstract: At present, the yield of plantaricin produced by *Lactobacillus plantarum* through conventional fermentation is relatively low. Therefore, optimization of plantaricin production conditions and methods of isolation and purification is an effective approach to improve its yield. In this study, three strains of *L. plantarum* were chosen as fermentation agents and the effects of fermentation time, temperature, initial pH of the culture, and medium composition on the production of plantaricin were investigated. Based on the results of such optimization techniques, five different methods for separation and purification of plantaricin were explored and the best combination was identified as follows: fermentation time of 28~35 h; temperature at 30 °C~37 °C; initial pH of the culture medium at 6.5~7.0; 10 g/L glucose and 10 g/L sucrose as carbon sources; 10 g/L peptone, 5 g/L beef cream, and 5 g/L yeast powder as nitrogen sources; 2 g/L potassium hydrogen phosphate, 0.2 g/L magnesium sulfate, 0.05 g/L manganese sulfate, 2 g/L ammonium citrate, and 5 g/L sodium acetate as inorganic salts; and 1 mL/L tween-80 as emulsifier. Under these optimized culture conditions plantaricin yield increased by at least 1.5 times. The optimal separation method identified as ultrafiltration, where the recovery rate reached 71% after fermentation broth was extracted by ultrafiltration. Results from this study thus provide theoretical and technical evidence for increasing plantaricin yield which will be useful for industrial applications.

Key words: plantaricin; production conditions; separation methods; optimization

细菌素 (*Bacteriocin*) 是由某些细菌通过基因编码、核糖体合成的具有抗菌生物活性的蛋白质或多肽。植物乳杆菌素 (*Plantaricin*) 是由植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*, *Lb. plantarum*) 产生并分泌到胞外的细菌素, 具有对热较稳定, 分子量一般小于

收稿日期: 2014-04-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31160309)

作者简介: 姜黎明 (1989-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品与制药应用微生物; 罗义勇, 并列第一作者

通讯作者: 柳陈坚 (1968-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 应用微生物、食品营养与安全

10 kDa 的生物学特性^[1]。利用乳酸菌 (包括 *Lactobacillus*、*Bifidobacterium* 和 *Lactococcus* 等益生菌) 发酵来保存食品和饮料有着悠久的历史, 乳酸菌发酵产生的细菌素和其它的抑菌物质, 比如有机酸、环二肽、过氧化氢和双乙酰等, 不仅抑制病原微生物的生长, 同时还能提高食品的风味和良好的感官^[2]。本研究室之前的研究显示 *Plantaricin* 抑菌范围广, 不仅能抑制同种或近亲源关系的细菌, 还能抑制很多病原菌如大肠杆菌、单核增生李斯特菌、金黄色葡萄球菌、藤黄微球菌、沙门氏菌和铜绿假单胞菌等菌株。因此, *Plantaricin* 可以作为生物防腐剂应用在食品工

业上。

迄今为止,只有乳酸链球菌素(*nisin*)在食品行业得到了广泛的应用,细菌素产量的低下成为限制细菌素生产和应用的重要因素。提高细菌素的产量一般可以从以下2个方面着手:1)通过选育或基因工程改造获得细菌素高产菌株;2)优化细菌素产生菌株的生长条件以及提高细菌素的分离纯化效率。前者虽然具有产量改变明显的优点,但耗时较长,且如果将该来源的细菌素应用到食品工业,存在着安全隐患;后者则是最直接也是最经济的方法,并且安全性较高。

Plantaricin 的产量主要取决于细菌的遗传特性,然而培养条件对细菌素的产量亦有很大影响,并且 *Plantaricin* 一般被认为是初级代谢产物,在菌体的指数生长中期开始合成并分泌,并于指数生长末期或静止生长前期达到最大值^[3]。因此,控制好培养时间、温度、发酵液初始 pH 值、培养基成分等培养条件,能够使 *Plantaricin* 的产量达到最高。

细菌素的分离方案一般有硫酸铵沉淀法、有机溶剂萃取法、有机溶剂沉淀法、超滤法和 pH 依赖的吸附法等^[4],不同种类的细菌素使用不同分离纯化方法直接影响其回收率,因此合理的分离纯化方法是大量获取细菌素关键,并且一个理想的分离方案应该能够适用于大规模生产,细菌素回收率应高于 50%^[5]。

为了从发酵上清液中获得大量的 *Plantaricin*,本实验以 3 株 *Lb. plantarum* 为研究对象,探讨发酵时间、温度、培养液初始 pH 值、培养基成分对细菌素产生的影响;同时探讨五种不同 *Plantaricin* 分离纯化方法的效率;通过培养条件优化及最佳分离纯化方法探讨,以期明确 3 株 *Lb. plantarum* 最优的 *Plantaricin* 产生条件与最佳的分离纯化方法,为 *Plantaricin* 进一步纯化和工业化开发利用提供理论依据和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 菌株与培养基

3 株 *Plantaricin* 产生菌株 (*Lb. plantarum* QB3-1、*Lb. plantarum* AY-01、*Lb. plantarum* Yml5-2) 由本实验室从云南省传统发酵食品分离获得,按 1.0×10^6 CFU 浓度保存在 -80°C 冰箱中,作为实验的种子液备用。作为抑菌实验的指示菌为藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus* 10209) 为本实验室保存菌株。*Lb. plantarum* 培养用 MRS 培养基 (OXOID, 英国); *M. luteus* 培养用 LB 培养基 (广东环凯微生物科技有限公司, 中国)。

1.2 试剂与仪器

主要试剂:葡萄糖、磷酸氢二钾 (K_2HPO_4)、柠檬酸铵 ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7(\text{NH}_4)_3$)、乙酸钠 (NaAc)、硫酸镁 (MgSO_4)、硫酸锰 (MnSO_4)、硫酸铵 ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) 和吐温-80 为国产分析纯,购置广东西陇化工公司。蛋白胨、牛肉膏和酵母粉均为英国 OXOID 公司。考马斯亮蓝 G-250, 德国艾普利公司;牛血清白蛋白 (BSA) 和 *Nisin* 标准品 (10^6 IU/g), 美国 Sigma 公司。

主要设备与仪器:紫外分光光度计,德国 Genova 公司;超滤膜包 VIVA FLOW 50 (3 kDa) 德国赛多利斯公司;蠕动泵,德国赛多利斯公司;超滤管 (1 kDa), 美国 GE 公司。

1.3 方法

1.3.1 标准曲线的绘制

1.3.1.1 *Nisin* 效价标准曲线

称取 500 mg *Nisin* 标准品 (10^6 IU/g), 溶于 50 mL 0.02 mol/L 无菌盐酸溶液,配制成 10^4 IU/mL 的 *Nisin* 标准液,再用 0.02 mol/L 无菌的盐酸溶解,配成效价分别为 1.0×10^4 、 5×10^3 、 2.5×10^3 、 1.25×10^3 、 1.0×10^3 和 1.0×10^2 IU/mL 的备用液。采用牛津杯法检测不同效价 *Nisin* 的抑菌活性^[4]。同一效价的 *Nisin* 备用液做三个平行平板,三个平板的平均值作为最终的抑菌值。以抑菌圈直径 (mm) 为横坐标,效价的对数值 (\lg 效价) 为纵坐标,绘制效价标准曲线,得到相应方程式及线性系数。计算样品的效价时,取 200 μL 发酵上清液加入牛津杯中,测定其对 *M. luteus* 10209 的抑菌圈直径,如果测得的抑菌圈直径不在 *Nisin* 标准曲线范围内,则适当稀释或浓缩样品,每个样品同上做三个重复,取平均值,将平均值代入标准曲线公式,计算获得样品效价,以下实验计算样品效价时均采用此方法。

1.3.1.2 蛋白含量标准曲线

因 *Plantaricin* 分子量较小,故采用 Bradford 法^[6] 测蛋白含量,配制溶液 A 和溶液 B。以溶液 B 为母液,用超纯水稀释成浓度分别为 10、20、30、40、50、60、70、80、90 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准液。取不同浓度的标准液 5 mL,分别加入 10 支具塞试管中,再加 1 支以超纯水为对照的试管,向每个试管加 5 mL 溶液 A,在紫外分光光度计上测定 A_{280} 值,以 BSA 含量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 为横坐标, A_{280} 值为纵坐标,绘出标准曲线,得到相应方程式及线性系数。计算样品蛋白含量时,分别加入 1 mL 待测样品液体和 5 mL 溶液 A,在紫外分光光度计上测定 A_{280} 值,每个样品做三个重复,取平均值,将平均值代入标准曲线公式计算可得样品蛋白含量,以下实验计算蛋白含量时均采用此方法。

1.3.2 发酵条件对 *Plantaricin* 产生的影响

1.3.2.1 发酵时间

按 1% (V/V) 的接种量将 3 种 *Lb. plantarum* 种子液接种到 MRS 培养基中, 在 37 °C 静止发酵 48 h, 每隔 2 h 取 5 mL 样品, 9000 r/min 离心 30 min, 收集上清液, 用磷酸缓冲液 (PBS) 调上清液 pH 6.8 后, 加过氧化氢酶分别排除有机酸和过氧化氢等非细菌素成分干扰, 采用牛津杯法测定每个样品的抑菌值, 计算抑菌效价, 确定每个样品的最佳发酵时间。

1.3.2.2 发酵温度

将 3 种 *Lb. plantarum* 种子液按 1% (V/V) 接种到 MRS 培养基中, 分别在 24、26、28、30、32、34、36、37、38、40、42、44 和 45 °C 等不同温度下静止发酵至最佳发酵时间, 离心取上清液各 5 mL, 同上排除非细菌素成分干扰, 测定每个样品的抑菌值, 计算

抑菌效价, 确定每株 *Lb. plantarum* 的最佳发酵温度。

1.3.2.3 培养液初始 pH 值

将 MRS 培养基的初始 pH 值用 PBS 分别调为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 和 8.5。3 株 *Lb. plantarum* 在上面确定的最佳发酵时间和温度下静止发酵, 每株菌在不同发酵液初始 pH 值下取 5 mL 样品, 离心收集上清液, 同上排除非细菌素成分干扰, 测定其抑菌值, 计算抑菌效价, 确定每株 *Lb. plantarum* 最佳发酵液初始 pH 值。

1.3.2.4 培养基成分

为了探究碳源、氮源、无机盐和乳化剂吐温-80 浓度对 *Lb. plantarum* 产生 *Plantaricin* 的影响, 我们利用以下正交实验 (表 1), 测定每个样品的抑菌值, 计算抑菌效价, 确定每个菌种的最佳培养基成分及配比。

1 培养基成分正交实验因素表

Table 1 An orthogonal representation of experimental medium composition factors

水平	因素			
	A(碳源)	B(氮源)	C(无机盐)	D 吐温-80
1	2% 葡萄糖	2% 蛋白胨	0.05% K ₂ HPO ₄ , 0.02% MgSO ₄ , 0.005% MnSO ₄	0.05%
2	1% 葡萄糖, 1% 蔗糖	2% 牛肉膏	0.1% K ₂ HPO ₄ , 0.02% MgSO ₄ , 0.005% MnSO ₄	0.1%
3	1% 葡萄糖, 1% 乳糖	2% 酵母膏	0.1% K ₂ HPO ₄ , 0.02% MgSO ₄ , 0.005% MnSO ₄ , 0.2% C ₆ H ₅ O ₇ (NH ₄) ₃	0.2%
4	1% 葡萄糖, 1% 麦芽糖	1% 蛋白胨, 0.5% 牛肉膏, 0.5% 酵母膏	0.2% K ₂ HPO ₄ , 0.02% MgSO ₄ , 0.005% MnSO ₄ , 0.2% C ₆ H ₅ O ₇ (NH ₄) ₃ , 0.5% NaAc	0.1%

注: 1% 表示 100 mL 培养基中含 1 g (固体) 或 1 mL (液体)。

1.3.2.5 数据分析

根据以上不同水平的实验结果, 计算各水平的抑菌效价, 得出各因素同一水平下的平均值 \bar{k}_i , 计算个因素的极差 R 值 ($R = \max(\bar{k}_i) - \min(\bar{k}_i)$), 根据极差大小, 判断因素的主次影响顺序, R 越大, 表示该因素的水平变化对试验指标的影响越大, 因素越重要。除此之外, 还要做正交实验方差分析, 做 F 检验。

1.3.3 生长特性曲线

将 3 株 *Lb. plantarum* 置于其最佳培养条件进行培养, 随后间隔 2 h 观察其 OD₆₀₀ 吸光值、pH 值、CFU 及抑菌效价的动态变化, 明确其生长特性及其相互变化关系。

1.3.4 *Plantaricin* 分离方法探究

1.3.4.1 (NH₄)₂SO₄ 沉淀法

采用不同饱和浓度的 (NH₄)₂SO₄ 梯度沉淀蛋白质^[7]。3 株 *Lb. plantarum* 在上面确定的最佳发酵条件下静止发酵, 分别取发酵液各 500 mL, 在 4 °C、9000 r/min 下离心 30 min, 将获得上清液置冰水浴中, 边搅

拌边缓慢向其中添加不同饱和度的 (NH₄)₂SO₄ 粉末, 确定每个样品的硫酸氨最佳沉淀浓度。将最佳 (NH₄)₂SO₄ 沉淀溶液转至截留分子量 1 kDa 的透析袋中, 置 4 °C 柠檬酸缓冲液 (pH 4.5) 中透析, 每隔 2~4 h 更换一次透析液, 最后用 1% BaCl₂ 检测透析液是否有沉淀, 确定透析终点。测定上清液和透析溶液的抑菌值, 为了确定透析溶液的抑菌因子是 *Plantaricin*, 采用向透析溶液中加入蛋白酶 K 做对照, 检测加了蛋白酶 K 的透析溶液是否具有抑菌活性。用 Bradford 法测定上清液和透析溶液的总蛋白质含量, 同时计算 *Plantaricin* 比活性和回收率。

1.3.4.2 有机溶剂萃取法

分别取 3 株 *Lb. plantarum* 发酵液各 500 mL, 参照 Cheeseman 等^[8]所方法, 离心 30 min (4 °C、9000 r/min) 获得上清液, 用盐酸调 pH 2.0, 并置于冰浴中, 随后按 10% 比例 (V/V) 向上述上清液中加入正丙醇, 再按 300 g/L 浓度加入 NaCl, 充分搅拌后静止 1h, 吸出并保留有机相, 向水相中按 30 mL/L 的比例加入正

丙醇, 搅拌后静止分层, 再次吸出有机相及两相之间的沉淀。将两次得到的正丙醇溶液混合, 10000 r/min 离心 20 min, 弃去沉淀后得到正丙醇提取液, 使用旋转蒸发仪将其置于 50 °C 旋转蒸干, 得到的沉淀用 5 mL 的柠檬酸缓冲液 (pH 4.5) 溶解, 得 *Plantaricin* 粗提样品, 测定该粗提样品的抑菌活性, 同时按上述方法检测其是否是 *Plantaricin*。最后测定 *Plantaricin* 粗提样品蛋白含量, 计算 *Plantaricin* 粗提样品的比活和回收率。

1.3.4.3 有机溶剂沉淀法

分别取 3 株 *Lb. plantarum* 发酵液各 500 mL, 离心 30 min (4 °C、9000 r/min) 获得上清液, 随后在 60 °C 下将上清液旋蒸至 50 mL, 并不断在浓缩的上清中加入固体 NaCl 至饱和, 按 1:3 体积比加入正丙醇充分混匀, 5000 r/min 离心 15 min 后, 取上层溶液并再次重复上述步骤。最后按 4:1 体积比在上层液中加入丙酮溶液, 充分混匀后离心 (8000 r/min、15 min) 收集沉淀。在沉淀中加入 5 mL 柠檬酸缓冲液 (pH 4.5), 待充分溶解后 4 °C 保存备用。随后分别测定溶解溶液的抑菌活性, 同上检测溶解溶液抑菌因子是否是 *Plantaricin*, 最后检测溶解溶液的蛋白含量, 计算出纯化倍数及回收率。

1.3.4.4 pH 吸附法

参照 Yang^[9]所用方法, 分别取 3 株 *Lb. plantarum* 发酵液各 500 mL, 置 70 °C 恒温水浴处理 30 min 使酶失活, 冷却至室温后, 用 4 mol/L 的 NaOH 溶液调节 pH 6.0, 室温电磁搅拌 30 min 使 *Plantaricin* 吸附至细胞上, 离心 30 min (4 °C、8000 r/min) 收集沉淀; 用 5 mmol/L 500 mL PBS 洗涤两次, 离心收集沉淀后, 悬浮于 5 mL 100 mmol/L NaCl 溶液中。使用 5% PBS 将悬浮液 pH 调整为 2.0, 置于 4 °C 电磁搅拌 12 h, 随后离心 30 min (4 °C、10000 r/min), 收集上清液并用 0.22 μm 无菌滤膜过滤。检测处理后的上清液抑菌活性, 同上检测抑菌因子是否是 *Plantaricin*, 然后用 Bradford 法测定蛋白含量, 计算出抑菌效价、回收率和纯化倍数。

1.3.4.5 超滤法

分别取 3 株 *Lb. plantarum* 发酵液各 500 mL, 离心 30 min (4 °C、9000 r/min) 获得上清液, 用 3 kDa 超滤膜包浓缩至最小体积, 分别检测浓缩液和滤过液的抑菌活性和蛋白含量, 以确定 *Plantaricin* 的分子量范围。若滤过液中活性高, 则继续用 1 kDa 超滤管滤至最小体积, 若浓缩液中活性高, 则用 10 kDa 超滤膜包浓缩至最小体积, 确保 *Plantaricin* 能被有效截留, 以上各部分浓缩液及滤过液均检测抑菌活性及蛋白含

量, 同上检测抑菌因子是否是 *Plantaricin*, 最后计算截留 *Plantaricin* 抑菌效价、回收率和纯化倍数。

2 结果与讨论

2.1 标准曲线的绘制

Nisin 效价标准曲线 (图 1a) 和蛋白含量标准曲线 (图 1b) 如下所示, 两个标准曲线具有良好线性关系, 相关系数均在 0.995 以上, 符合作为标准曲线的要求。

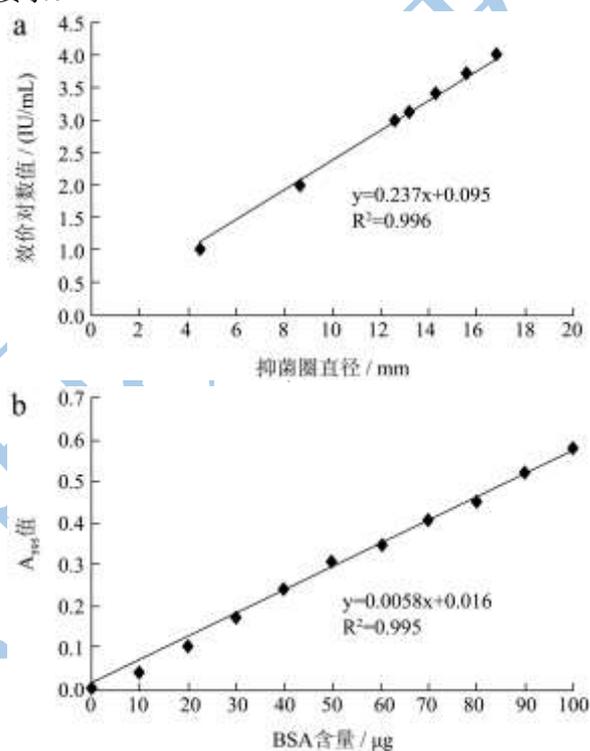


图 1 Nisin 效价标准曲线 (a) 和蛋白含量标准曲线 (b)

Fig.1 Nisin titer standard curve and protein content standard curve

2.2 发酵条件对 *Plantaricin* 产生的影响

2.2.1 发酵时间

一般来说, 细菌素在指数末期或停滞前期分泌达到最大值, 故控制菌体生长时间对细菌素的产生相当重要。从图 2a 中可以看出, 3 株 *Lb. plantarum* 在 12 h 后开始产生 *Plantaricin*, 随着发酵时间的进行, *Plantaricin* 具有先快速增加到最大值, 然后缓慢减少逐渐平稳的趋势, 3 株 *Lb. plantarum* 最佳发酵时间一般都在 28~36 h 范围内, 且分别在 28 h (*Lb. plantarum* AY-01)、34 h (*Lb. plantarum* Yml5-2) 和 36 h (*Lb. plantarum* QB3-1) 时产生的 *Plantaricin* 最多。Anthony 等人^[10]报道地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis* AnBa9) 产细菌素的最佳发酵时间为 24 h; 而解俊梅

和文汉^[11]发现其研究的 *Lb. plantarum* 在厌氧条件下培养 40 h 时产生的细菌素最多。这些结果表明不同细菌或同种细菌不同菌株产生细菌素最多时培养时间是不相同的,由此可见控制发酵时间对细菌素的产生具有重要作用。

2.2.2 发酵温度

温度高低对菌体在发酵液中的生长速率、氧在培养液中的溶解度以及能量传递速率有很大影响,从而影响细菌素的合成。从图 2b 中可以看出,不同 *Lb.plantarum* 最佳发酵温度有所不同,但一般都在 30~40 °C 之间,温度低于 25 °C 或高于 45 °C 都不利于细菌素的产生。Hwanhlem 等^[12]研究乳酸乳球菌产细菌素最多的温度为 25.59 °C, Anthony 等^[10]发现 *B. licheniformis* AnBa9 产细菌素最多的发酵温度是 43 °C,由此可见发酵温度对任何菌种产细菌素都有重要影响,温度太低或过高都不利于细菌素的产生。

2.2.3 培养液初始 pH

一般来说,培养液中的初始 pH 对微生物菌体的生长和细菌素的产生都有影响。由图 2c 可知,培养液初始 pH 在 6.0~7.0 时比较适合菌体产生细菌素,这与李景良^[13]研究的培养液最佳初始 pH 相似。*Lb.plantarum* 在过酸或过碱性条件下产细菌素受阻,可能有两方面的原因: 1) 超出正常范围的 pH 可以通过影响菌体细胞膜的电荷状况造成膜渗透性的变化或者通过改变营养物的离子化程度影响菌体对养分的吸收方式使菌体生长受阻; 2) pH 值会影响细胞内各种酶的活性,而酶促反应都有最适 pH, 不适 pH 值就会导致细菌素合成受阻。然而我们还发现, *Lb.plantarum* QB3-1 和 *Lb.plantarum* AY-01 在酸性环境培养时还有一定的抑菌效应,而 *Lb.plantarum* Yml5-2 被彻底抑制了,这可能是由于 *Lb.plantarum* QB3-1 和 *Lb.plantarum* AY-01 对酸有一定的耐受性。

2.2.4 培养基成分

在确定最佳发酵时间、温度和培养基初始 pH 的情况下,利用正交实验对培养基成分中影响 Plantaricin 产生的主次因素进行研究,因碳源、氮源、无机盐和吐温-80 他们之间的影响很小,故不考虑交互作用。

对试验结果方差分析,计算各列各水平对应数据之和 K_{1j} 、 K_{2j} 、 K_{3j} 及其平方 K_{1j}^2 、 K_{2j}^2 、 K_{3j}^2 , 计算各列偏差平方和及自由度,根据以上计算,进行显著性检验,列出方差分析表,结果见下表 2,碳源的影响最显著,氮源和无机盐的影响显著程度次之,吐温-80 影响不显著。因素主次顺序碳源-无机盐-氮源-吐温-80。

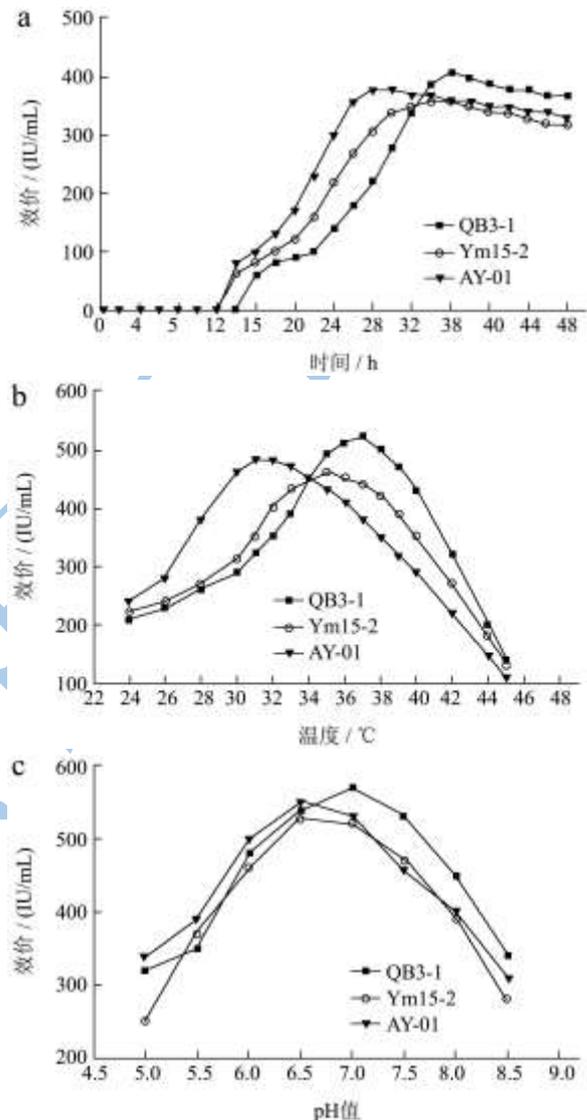


图 2 发酵时间 (a)、温度 (b)、初始 pH 值 (c) 对产植物乳杆菌素的影响

Fig.2 The effects of fermentation time (a), temperature (b), and initial pH value (c) on plantaricin production

表 2 方差分析表

Table 2 Analysis of variance results

因素	平方和	自由度	均方	F 值	Fa	显著水平
A	35.4	3	11.7	67.6	$F_{0.05}(3,4)=46.19$	***
B	23.69	3	11.8	52.34		**
C	27.48	3	13.74	54.67	$F_{0.01}(3,4)=28.71$	**
D	15.39	3	7.7	23.45		*

从表 3 也可以看出: *Lb. plantarum* QB3-1 产细菌

素的最显著影响因素是碳源,极差 R 值最大,其次是

无机盐, 再是氮源和吐温-80 (表 2)。 *Lb.plantarum* Yml5-2 具有和 *Lb.plantarum* QB3-1 相同的结果, 即影响 *Plantaricin* 产生的因素顺序为: 碳源>无机盐>氮源>吐温-80, 而 *Lb.plantarum* AY-01 最显著影响因素是碳源, 吐温-80 影响最小, 无机盐和氮源的影响相近, 本次研究的结果与佟世生等人^[4]研究的相似, 都是碳源影响最显著, 吐温-80 影响最小。不同培养基成分对菌株生长和抑菌物质产生有重要影响, 碳源是培养基成分中对 *Plantaricin* 产生的首要影响因素, 这可能是因为菌体代谢糖类形成的酸性物质或菌体衰亡形成的碱性环境, 可能有利于抑菌物质的产生和积累, 又或是菌体代谢糖类形成的物质能为抑菌物质的产生提

供前体, 这都将有待于进一步的研究。无机盐离子作为菌体生长和参与细菌素合成所必须, 其种类和浓度的增加在一定范围内均有利于细胞的生长。吐温-80 的含量对细菌素的合成影响最小, 而且不是其合成所必须, 但一定浓度的吐温-80 有助于细菌素的产生。

对表 1 和表 2 分析发现, 3 株 *Lb.plantarum* 产生 *Plantaricin* 的最优培养基成分为碳源: 10 g/L 葡萄糖和 10 g/L 蔗糖; 氮源: 10 g/L 蛋白胨、5 g/L 牛肉膏和 5 g/L 酵母粉; 无机盐: 2 g/L K_2HPO_4 、0.2 g/L $MgSO_4$ 、0.05 g/L $MnSO_4$ 、2 g/L 柠檬酸铵和 5 g/L NaAc; 乳化剂: 1 mL/L 吐温-80。

表 3 $L_{16}(4^4)$ 培养基成分正交实验结果

Table 3 $L_{16}(4^4)$ Orthogonal experiment results of culture medium composition

试验号	A(碳源)	B(氮源)	C(无机盐)	D(吐温 80)	E(空列)	结果 (效价对数值)
1	1	2	3	3	2	2.52±0.05
2	2	4	1	2	2	3.91±0.12
3	3	4	3	4	3	3.25±0.06
4	4	2	1	1	3	2.33±0.03
5	1	3	1	4	4	2.08±0.05
6	2	1	3	1	4	3.31±0.11
7	3	1	1	3	1	2.64±0.08
8	4	3	3	2	1	3.27±0.12
9	1	1	4	2	3	3.52±0.14
10	2	3	2	3	3	3.16±0.09
11	3	3	4	1	2	2.74±0.07
12	4	1	2	4	2	2.46±0.05
13	1	4	2	1	1	2.81±0.04
14	2	2	4	4	1	3.62±0.15
15	3	2	2	2	4	2.88±0.07
16	4	4	4	3	4	3.63±0.13
k_1	2.65±0.23	2.83±0.05	2.72±0.16	2.94±0.15	3.09±0.32	
k_2	3.48±0.45	3.26±0.36	2.82±0.04	3.37±0.31	2.91±0.16	
k_3	2.83±0.07	2.75±0.12	3.24±0.34	3.16±0.17	3.07±0.26	
k_4	2.88±0.14	3.36±0.43	3.38±0.28	2.85±0.06	2.98±0.27	
极差 R	0.83	0.61	0.66	0.52		
因素主次顺序			A>C>B>D			
优水平	A ₂	B ₄	C ₄	D ₂		
优组合			A ₂ B ₄ C ₄ D ₂			

注: 正表中的 1、2、3、4 指各因素对应的水平, 例如 A1 指碳源的 1 水平, 即 2% 葡萄糖。结果数值以平均值±标准差表示, n=3。

2.3 生长特性曲线

3 株 *Lb.plantarum* 在最佳培养条件进行发酵, 其抑菌效价分别达到了 650 IU/mL (*Lb. plantarum* QB3-1)、580 IU/mL (*Lb. plantarum* AY-01) 和 530

IU/mL (*Lb. plantarum* Yml5-2) (图 3), 相对于未优化培养条件 (图 2a), 效价提高了 1.5~2 倍。

由图 3a 可知, *Lb.plantarum* QB3-1 在发酵 12 h 左右开始大量产酸, 28 h 后发酵液 pH 基本稳定在 3.4 左右, 菌体生物量在发酵 32 h 后达到最大值, 发酵 36

h 后细菌素分泌达到最大值,由此可见,菌体最多的时期并不是产细菌素最多的时期。

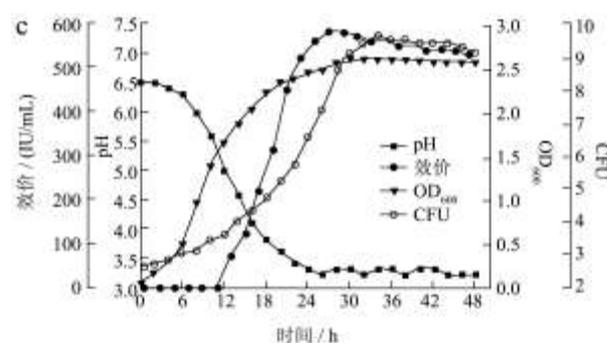
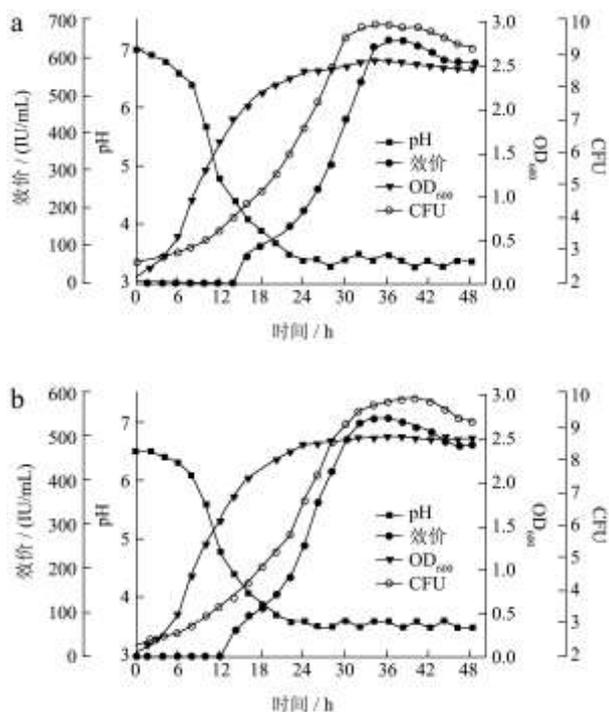


图3 *Lactobacillus plantarum* QB3-1 (a)、Yml5-2 (b)和 AY-01 (c) 的生长特性曲线

Fig.3 Characteristic growth curve for *Lactobacillus plantarum* QB3-1 (a), Yml5-2 (b), and AY-01 (c)

另外, 3株 *Lb.plantarum* 的最佳温度也存在较大差异, *Lb.plantarum* QB3-1 和 *Lb.plantarum* Yml5-2 分别在 37 °C 和 34 °C 时效价较高, 而 *Lb.plantarum* AY-01 在 32 °C (图 3c) 发酵能获得较高的抑菌效价, 这与李景良等人^[14]研究结果相似, 与最高效价的温度所不同, 之前研究的菌体最佳生长温度是 35 °C, 该结果也说明 *Lb.plantarum* 生长的最佳温度与 *Plantaricin* 产量的最佳培养温度不是一致的。

表 4 植物乳杆菌素提取分离表

Table 4 The table of extraction and separation for bacteriocin

方法	菌株	总蛋白 /mg	效价 (IU/mL)	总效价 /IU	比活/ (IU/mg)	纯化 倍数	回收率 /%	回收率平均值 /%
上清液	QB3-1	1230.46	652.16	3.26×10 ⁵	265.01	1.00	100	
	Yml5-2	968.57	536.69	2.68×10 ⁵	277.05	1.00	100	100
	AY-01	1095.78	586.37	2.93×10 ⁵	267.56	1.00	100	
(NH ₄) ₂ SO ₄ 沉淀法	QB3-1	68.52	3148.24	9.44×10 ⁴	1377.70	4.54	28.97	
	Yml5-2	55.47	2752.56	8.25×10 ⁴	1487.29	5.37	30.78	28.52±2.51
	AY-01	62.75	2521.48	7.56×10 ⁴	1205.49	4.50	25.82	
有机溶剂 萃取法	QB3-1	94.47	1846.47	1.85×10 ⁴	195.83	0.74	5.67	
	Yml5-2	103.58	2025.32	2.03×10 ⁴	196.26	0.71	7.57	6.34±1.07
	AY-01	84.62	1687.64	1.69×10 ⁴	199.72	0.75	5.77	
有机溶剂 沉淀法	QB3-1	223.14	2418.13	2.90×10 ⁴	130.04	0.49	8.90	
	Yml5-2	188.53	3246.82	3.90×10 ⁴	207.44	0.75	14.55	10.65±0.28
	AY-01	241.27	2078.38	2.49×10 ⁴	103.32	0.39	8.50	
pH 依赖的吸 附法	QB3-1	205.46	1575.36	3.15×10 ⁴	153.66	0.57	9.66	
	Yml5-2	135.34	2433.18	4.87×10 ⁴	360.74	1.30	18.18	16.48±8.44
	AY-01	158.32	3167.52	6.34×10 ⁴	500.45	1.50	21.6	
超滤法	QB3-1	747.75	4552.45	2.28×10 ⁵	305.22	1.15	69.82	
	Yml5-2	562.43	4062.29	2.03×10 ⁵	361.21	1.30	75.74	71.96±0.35
	AY-01	687.32	4137.36	2.06×10 ⁵	299.72	1.12	70.31	

注: 回收率平均值数值以平均值±标准差表示。

2.4 细菌素的分离

3株 *Lb.plantarum* 在最佳培养条件下培养, 上清液中的 *Plantaricin* 用5种方案进行分析纯化, 确定抑菌因子均为 *Plantaricin*。测定每种方案所获得物质的蛋白总活力和效价, 计算回收率和纯化倍数。

从表4可以看出, *Plantaricin* 的5种分离方法中, 硫酸铵沉淀法分离 *Plantaricin* 比活较高, 但回收率提高少, 不是最佳分离方法。有机溶剂萃取或沉淀法比活和回收率都不高, 这可能是有机溶剂容易破坏 *Plantaricin*, 导致降低活性。pH依赖的吸附法回收率也不高, 可能是 *Plantaricin* 不能有效吸附于菌体细胞表面, 导致回收率下降。而用超滤法, 回收率高达75%, 这与 Zacharof 等人^[5]报道相似, 其用超滤法提取细菌素回收率高达68%。总的来说, 采用超滤法分离 *Plantaricin* 能得到较高的回收率, 为本次 *Plantaricin* 最佳分离方法。

3 结论

本研究探讨了不同培养条件(发酵时间、培养温度、培养液初始pH值和培养基成分)对3株 *Lb.plantarum* 产生 *Plantaricin* 的影响, 并获得了一种有效分离纯化 *Plantaricin* 的方案。具体结论为: 1) 发酵时间在28~35 h内, 温度在30~37℃, 培养液初始pH在6.5~7.0, 10 g/L葡萄糖和10 g/L蔗糖为碳源, 10 g/L蛋白胨、5 g/L牛肉膏和5 g/L酵母粉为氮源, 2 g/L K_2HPO_4 、0.2 g/L $MgSO_4$ 、0.05 g/L $MnSO_4$ 、2 g/L柠檬酸铵和5 g/L乙酸钠为无机盐, 1 mL/L吐温80为乳化剂, 是3株 *Lb.plantarum* (*Lb.plantarum* QB3-1、*Lb.plantarum* AY-01、*Lb.plantarum* Yml5-2) 产生 *Plantaricin* 的最优培养条件; 2) 超滤法是最佳的分离纯化方法。培养条件优化后, 细菌素产量提高了1.5倍以上, 发酵液通过超滤法提取分离后, 回收率达到了69%以上, 为 *Plantaricin* 进一步的纯化和工业化开发利用提供理论基础和技术支撑。

参考文献

- [1] José Luis Parada, Carolina Ricoy Caron, Adriane Bianchi, et al. Bacteriocins from *Lactic acid bacteria*: purification, properties and use as biopreservatives [J]. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2007, 50(3): 521-542
- [2] 胡晓清, 潘露, 王汝毅. 发酵蔬菜中乳酸菌的功能性与安全性研究进展[J]. *现代食品科技* 2012, 28(11): 1606-1611
HU Xiao-qing, PAN-Lu, WANG Ru-yi. Reviewed of the functional and security of the lactic acid bacteria in fermented vegetables [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2012, 28(11): 1606-1611
- [3] Maldonado A, Barda-Ruiz J, Jimenez-Diez R. Purification and genetic characterization of plantaricin NC8, a novel culture-inducible two-peptide bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* NC8 [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(5): 383-389
- [4] Myrto-Panagiota Zacharof, Gregory M Coss, Stephen J. Mandale, et al. Separation of *Lactobacilli* bacteriocins from fermented broths using membranes [J]. *Process Biochemistry*, 2013, 48: 1252-1261
- [5] Schöbitz R P, Bórquez P A, Costa M E, Ciampi L R, et al. Bacteriocin like substance production by *Carnobacterium piscicola* in a continuous system with three culture broths. study of antagonism against *Listeria monocytogenes* in vacuum packaged salmon [J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2006, 37: 52-57
- [6] Helder Barbosa, Nigel K H Slater, João C Marcos. Protein quantification in the presence of poly (ethylene glycol) and dextran using the Bradford method [J]. *Analytical Biochemistry*, 2009, 395: 108-110
- [7] 朱旭芬. 基因工程实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006
- [8] Cheeseman G C, Berridge N J. An improved method of preparing nisin [J]. *Biochemical Journal*, 1957, 65(3): 603-608
- [9] YANG R, JOHNSON MC, RAY B. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1992, 58: 3355-3359
- [10] Thangamani Anthony, Thangamani Rajesh, Nagarajan Kayalvizhi, et al. Influence of medium components and fermentation conditions on the production of bacteriocin(s) by *Bacillus licheniformis* AnBa9 [J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100: 872-877
- [11] 解俊梅, 文汉. 植物乳杆菌类细菌素特性研究及其生产条件的优化[J]. *食品工业科技*, 2011, 32(11): 93-97
XIE Jie-mei, WEN-Han. Bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* characteristics research and optimization of its production conditions [J]. *Food Science and Technology*, 2011, 32(11): 93-97
- [12] Noraphat Hwanhlem, Jean-Marc Chobert, Aran H-Kittikun. Bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from mangrove forests in southern Thailand as potential bio-control agents in food: isolation, screening and optimization [J]. *Food Control*, 2014, 41: 202-21
- [13] 李景良, 宋达峰, 顾青. 植物乳杆菌 ZJ316 生产细菌素[J]. *微*

生物学报,2008,48(6):818-823

LI Jing-liang, SONG Da-feng, GU Qing. The production of bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* ZJ316[J].

Journal of Microbiology, 2008, 48(6): 818-823

[14] 佟世生,解洛香,徐乐,等.植物乳杆菌代谢产细菌素的培养

基优化[J].现代食品科技,2012,28(2):152-157

TONG Shi-sheng, XIE Luo-xiang, XU Le, et al. Optimization of culture medium for bacteriocin metabolism produced by

Lactobacillus plantarum [J]. Modem Food Science and

Technology, 2012, 28(2): 152-157

现代食品科技