

植物乳杆菌代谢产细菌素的培养基优化

佟世生¹, 解洛香², 徐乐², 胡涛², 刘萍²

(1. 北京城市学院生物医学部, 北京 100083) (2. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要: 本文对植物乳杆菌代谢产细菌素的培养基进行一系列优化。结果显示, 不同培养基对菌株生长和细菌素产量有重要的影响, 其中以碳源的影响最为显著。综合考虑, 5%糖蜜、0.5%酵母膏、2%胰蛋白胨、0.4% KH₂PO₄、0.1% MgSO₄·7H₂O、0.5% CaCO₃、0.05% MnSO₄和0.3%吐温 80 是植物乳杆菌生长和代谢产细菌素的最优培养基组合。

关键词: 植物乳杆菌; 细菌素; 培养基优化

文章编号: 1673-9078(2012)2-152-155

Culture Medium Optimization of *Lactobacillus Plantarum* for Bacteriocin Production

TONG Shi-sheng¹, XIE Luo-xiang², XU Le², HU Tao², LIU Ping²

(1.College of Biological Medicine, Beijing City University, Beijing 100083, China)

(2.College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: In this paper, the culture medium of *Lactobacillus plantarum* for bacteriocin production was optimized. The results showed that the culture medium had an important effect on germ formation and production of bacteriocin, in which carbon source was significant. Overall, 5% molasses, 0.5% yeast extract, 2% tryptone, 0.4% KH₂PO₄, 0.1% MgSO₄·7H₂O, 0.5% CaCO₃, 0.05% MnSO₄ and 0.3% Tween 80 were the optimal combination of culture medium.

Key words: *Lactobacillus plantarum*; bacteriocin; culture medium optimization

随着饲用抗生素的普及甚至滥用, 其所带来的负面效应日益突出。欧盟自 2006 年起全面禁止抗生素作为饲料添加剂; 美国近年来几乎冻结了所有新型抗生素的审批; 我国政府也先后颁布了一系列饲料药物添加剂使用规范^[1,2]。饲用抗生素的淡出是畜牧业发展的必然趋势, 而开发利用可选择性促进肠道有益菌增殖、改善肠道内环境、提高动物机体免疫力, 同时不为肠道内酶所分解、不产生耐药性、无残留的微生态发酵饲料是畜牧业可持续发展的必然选择^[3]。其中发酵菌种的有效性将直接关系到发酵的成功与否, 是发酵饲料的关键因素之一。因大多饲料生产厂和养殖场不具备培养微生态发酵饲料所用菌种的条件, 所以具有足够数量和活力的发酵剂的生产和供应成为先决条件。

细菌素是某些细菌产生的具有抗菌活性的多肽、蛋白质或蛋白质复合物, 最早由 Jacob 于 1953 年提出^[4]。国外对乳酸菌细菌素的研究比较早, 目前报道的文献资料也非常多。而国内的研究起步比较晚, 除了

收稿日期: 2011-10-24

作者简介: 佟世生 (1970-), 男, 博士, 副教授, 研究领域为食品营养与安全、食品加工和贮藏工程、有机食品、食品功能成分提取及软科学研究

通讯作者: 刘萍

Nisin 的研究, 很少见到其他乳酸菌细菌素的报道。本文以植物乳杆菌为研究对象, 针对发酵工艺条件 (碳源、氮源、无机盐及表面活性剂等) 与菌株生长和抑菌物质产生的关系进行了相关研究, 为微生态发酵饲料专用发酵剂的工业化生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

菌种: 植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum* LT2-6), 工厂引进; 大肠杆菌 (*Escherichia coli* BL21 (DE3)), 中国农业大学食品科学与营养工程学院酶与发酵工程实验室保藏。

培养基: MRS 培养基 (20 g 葡萄糖、10 g 胰蛋白胨、10 g 牛肉膏、5 g 酵母粉、5 g 无水乙酸钠、2 g K₂HPO₄、2 g 柠檬酸二铵、0.5 g 七水硫酸镁、0.25 g 一水硫酸锰, 适量蒸馏水溶解后定容至 1 L, pH 值调至 6.5)^[5]、LB 培养基 (胰蛋白胨 10 g、酵母膏 5 g、氯化钠 10 g, 适量蒸馏水溶解后定容至 1 L, pH 值调至 7.4)。

仪器设备: TU-1901 紫外可见分光光度计、CLM-HS-225 恒温箱、280B 手提式高压灭菌锅等。

1.2 方法

1.2.1 发酵液的制备

将冷冻保藏的植物乳杆菌活化三代后接种到 MRS 培养基, 于 37 °C 条件下静置培养 24 h。将种子液按 4% 接种量接入发酵培养基 (优化碳源、氮源、无机盐及表面活性剂), 于 37 °C 条件下静置发酵培养 48 h。待发酵结束后将发酵液 4000 r/min 离心 5 min, 调 pH 值至 7.0, 再用细菌过滤器 (0.22 μm) 过滤, 若经平板检验无菌长出, 即可得无菌发酵液。

1.2.2 菌体生物量测定

将发酵液用蒸馏水稀释到适当浓度, 用 TU-1901 紫外可见分光光度计测定其在 600 nm 波长条件下的吸光值 OD₆₀₀。

1.2.3 大肠杆菌菌悬液的制备

选取大肠杆菌作为指示菌, 通过营养琼脂斜面保存在 4 °C 冰箱中。使用时可挑取斜面上的单菌落接入 LB 液体培养基, 于 37 °C、160 r/min 条件下振荡培养 8 h, 此时培养基中含菌量约为 10⁷ cfu/mL, 备用。

1.2.4 抑菌试验

本试验中植物乳杆菌细菌素产量的测定采用的是滤纸片法。具体操作如下: 准确吸取 100 μL 指示菌菌悬液 (约 10⁷ cfu/mL) 于 15mL 约在 45 °C 的无菌 LB 固体培养基中, 充分混匀后倒平板。待其凝固后, 轻轻放入牛津杯, 加入 100 μL 待测无菌发酵液。4 °C 放置 4 h 后, 置于 37 °C 静置培养过夜, 观察是否有抑菌圈产生并用游标卡尺 (精度 0.02 mm) 测量抑菌圈直径的大小 (包括滤纸片的直径)。

1.2.5 单因素试验

表 1 正交试验因素水平表

Table 1 The orthogonal experiment

水平	因素			
	碳源	氮源	无机盐	吐温 80
1	葡萄糖	酵母膏 2.5%	0.4% KH ₂ PO ₄ +0.1% MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.3%
	4%			
2	糖蜜	酵母膏 1.5%+ 胰蛋白胍 1%	0.4% KH ₂ PO ₄ +0.1% MgSO ₄ ·7H ₂ O+0.5% CaCO ₃	0.4%
	5%			
3	蔗糖	酵母膏 0.5%+ 胰蛋白胍 2%	0.4% KH ₂ PO ₄ +0.1% MgSO ₄ ·7H ₂ O+0.5% CaCO ₃ +0.05% MnSO ₄	0.5%
	6%			

本实验主要研究了碳源、氮源、无机盐和表面活性剂对菌体生物量和细菌素产量的影响。以 MRS 培养基为基础, 改变其中的碳源种类及浓度、氮源种类及浓度、无机盐浓度或表面活性剂浓度, 同时设定对照组进行实验, 测定菌体生物量和发酵液的抑菌效果。

1.2.6 正交试验

根据单因素试验结果, 按 L₉ (3⁴) 正交表进行正交实验, 优化植物乳杆菌的菌体生物量和细菌素产量的工艺, 正交试验因素水平表见表 1。

2 结果与分析

2.1 碳源对菌体生长和抑菌物质产生的影响

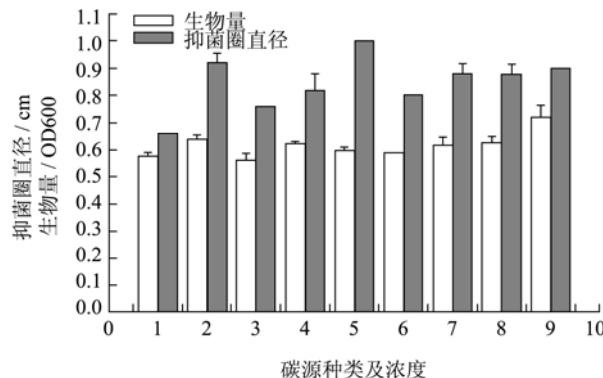


图 1 碳源对菌株生长及细菌素产量的影响

Fig.1 Effect of carbon sources on germ formation and production of bacteriostatic substance

注: 1: 对照, 2: 4% 葡萄糖, 3: 6% 葡萄糖, 4: 2.5% 糖蜜, 5: 5% 糖蜜, 6: 7.5% 糖蜜, 7: 2% 蔗糖, 8: 4% 蔗糖, 9: 6% 蔗糖。

作为微生物生长的必需营养物质之一, 碳源一方面为微生物生长提供能量, 另一方面可同化成为微生物的组成成分, 如细胞壁等。由图 1 可以看出, 保持其它物质及浓度不变的条件下, 植物乳杆菌对蔗糖的利用较为有效, 其中 6% 蔗糖作为碳源最有利于菌体的生长, 比对照组提高了 22%; 但是糖蜜作为碳源能有效促进抑菌物质产生, 其中 5% 糖蜜的抑菌圈直径约是对照组的 8 倍。综合考虑, 采用 5% 糖蜜作为植物乳杆菌的碳源。

2.2 氮源对菌体生长和抑菌物质产生的影响

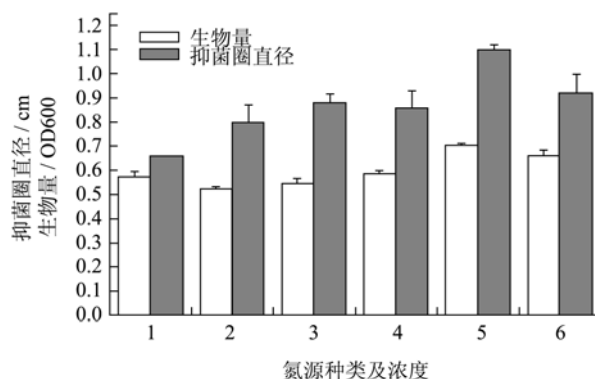


图 2 氮源对菌株生长及细菌素产量的影响

Fig.2 Effect of nitrogen sources on germ formation and production of bacteriostatic substance

注: 1: 对照, 2: 1% 胰蛋白胍, 3: 2% 胰蛋白胍, 4: 4% 胰蛋白胍, 5: 1.5% 酵母膏+1% 胰蛋白胍, 6: 0.5% 酵母膏+2% 胰蛋白胍。

氮源对微生物的生长和目标产物的积累有重要的影响,一方面可同化成为微生物的组成成分,如蛋白质等;另一方面也是目标产物,如氨基酸中氮的主要来源等。由图2结果可以看出,保持其它物质及浓度不变的条件下,植物乳杆菌可有效利用各有机氮源,其中以复合氮源的效果较好。当采用1.5%酵母膏和1%胰蛋白胨作为氮源时,发酵液的抑菌效果最佳,抑菌圈直径约是对照组的9倍,因此确定1.5%酵母膏和1%胰蛋白胨作为培养基的氮源。

2.3 无机盐对菌体生长和抑菌物质产生的影响

无机盐对微生物的生长和目标产物的生产非常重要。由图3~6分别可以看出,保持其它物质及浓度不变的条件下, KH_2PO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 CaCO_3 和 MnSO_4 对植物乳杆菌代谢产细菌素均有重要的影响,但对菌体的生长均影响不大。综合考虑,0.4% KH_2PO_4 、0.1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.5% CaCO_3 和 0.05% MnSO_4 的效果最佳,故确定为该发酵培养基的无机盐组合。

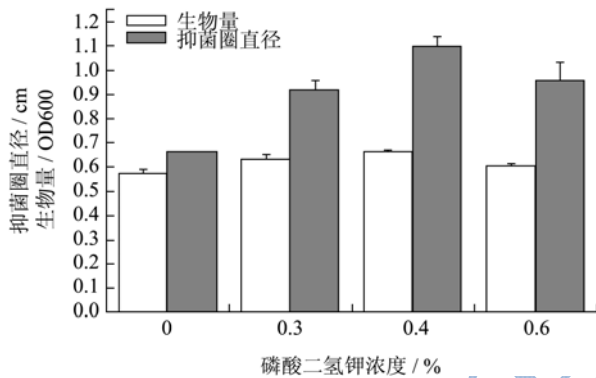


图3 磷酸二氢钾对菌株生长及细菌素产量的影响

Fig.3 Effect of KH_2PO_4 on germ formation and production of bacteriocin

注: 1: 对照, 2: 0.3% KH_2PO_4 , 3: 0.4% KH_2PO_4 , 4: 0.6% KH_2PO_4

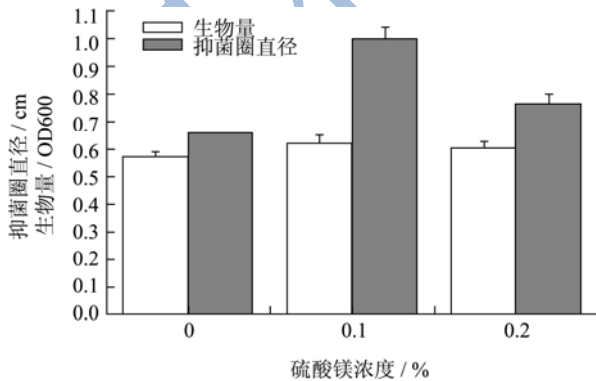


图4 硫酸镁对菌株生长及细菌素产量的影响

Fig.4 Effect of MgSO_4 on germ formation and production of bacteriocin

注: 1: 对照, 2: 0.1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3: 0.2% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

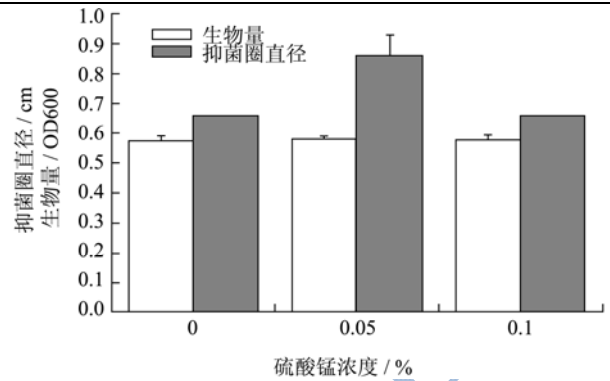


图5 硫酸锰对菌株生长及细菌素产量的影响

Fig.5 Effect of MnSO_4 on germ formation and production of bacteriocin

注: 1: 对照, 2: 0.05% MnSO_4 , 3: 0.1% MnSO_4

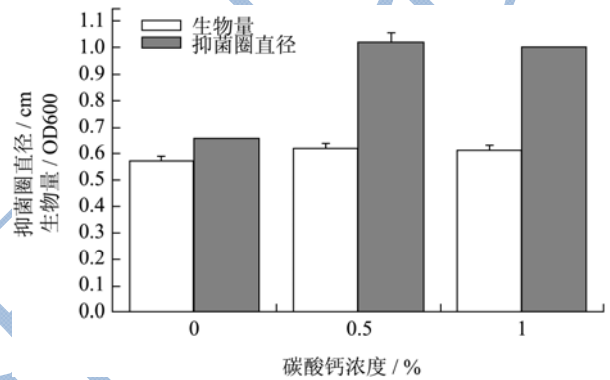


图6 碳酸钙对菌株生长及细菌素产量的影响

Fig.6 Effect of CaCO_3 on germ formation and production of bacteriocin

注: 1: 对照, 2: 0.5% CaCO_3 , 3: 1% CaCO_3

2.4 表面活性剂对菌体生长和抑菌物质产生的影响

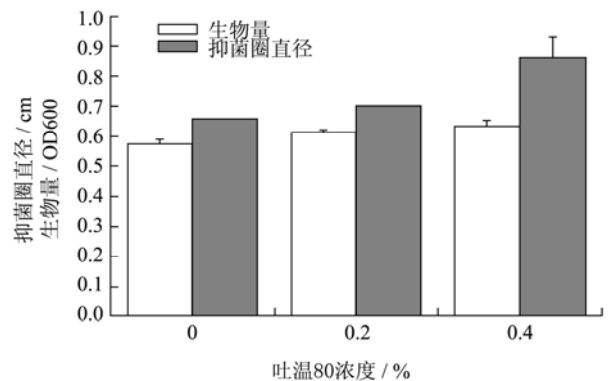


图7 吐温 80 对菌株生长及抑菌物质产生的影响

Fig.7 Effect of Tween 80 on germ formation and production of bacteriostatic substance

注: 1: 对照, 2: 0.2%吐温 80, 3: 0.4%吐温 80。

通过降低菌体与培养基接触面之间的表面张力改善微生物细胞膜的通透性,吐温 80 能有效促进营养物质的进入和代谢产物的排出。而且吐温 80 也可能为产细菌素菌株的生长提供脂肪酸,也可能是作为一种类似维生素的物质,促进细菌素的产生。但在细菌素的

纯化过程中,过量的吐温 80 会和硫酸铵反应形成沉淀,使纯化工艺的难度加大^[6]。因此选择合适浓度的吐温 80 对菌体生长和抑菌物质产生以及后面的纯化工作都是至关重要的。由图 7 结果可以看出,保持其它物质及浓度不变的条件下,随着吐温 80 浓度的增加,菌体生长量,尤其细菌素产量都随之增长,最终选择 0.4%作为吐温 80 的最优浓度。

2.5 正交试验确定发酵培养基组成

表 2 L₉(3⁴) 正交试验结果

Table 2 The results of the L₉(3⁴) orthogonal experiment

试验号	碳源	氮源	无机盐	吐温 80	抑菌圈直径/cm
1	1	1	1	1	0.926
2	1	2	2	2	0.862
3	1	3	3	3	0.962
4	2	1	2	3	0.912
5	2	2	3	1	0.950
6	2	3	1	2	0.926
7	3	1	3	2	0.850
8	3	2	1	3	0.812
9	3	3	2	1	0.826
k1	0.917	0.896	0.888	0.901	
k2	0.929	0.875	0.867	0.879	
k3	0.829	0.905	0.921	0.895	
R	0.100	0.030	0.054	0.022	

由试验结果可以看出(表 2),植物乳杆菌代谢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。综合各因素和水平得到植物乳杆菌代谢细菌素的优化培养基组合,即 5%糖蜜、0.5%酵母膏、2%胰蛋白胍、0.4% KH₂PO₄、0.1% MgSO₄·7H₂O、0.5% CaCO₃、0.05% MnSO₄ 和 0.3% 吐温 80。

2.6 验证试验

按 2.5 进行验证试验,抑菌圈直径是 1.246 cm,是初始对照的 2 倍;发酵液稀释三倍后所测得的生物量(OD₆₀₀)是 0.774,比初始对照提高 35%。

3 结论

本文通过一系列的优化试验确定植物乳杆菌生成的最佳发酵工艺为 5%糖蜜、0.5%酵母膏、2%胰蛋白胍、0.4% KH₂PO₄、0.1% MgSO₄·7H₂O、0.5% CaCO₃、0.05% MnSO₄ 和 0.3%吐温 80。同时植物乳杆菌液体发酵培养基组成的研究表明,不同培养基成分对菌株生长和抑菌物质产生有重要影响,其中以碳源的影响最为显著,说明菌体代谢糖类形成的酸性物质中和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,或者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。

参考文献

- [1] 贾鹏辉.发酵饲料用乳酸菌培养条件及保藏工艺的研究[D].无锡:江南大学硕士学位论文,2009
- [2] 罗慧,杨勇,于洪意.益生菌作用机理及其在现代畜牧生产中的应用[J].中国畜牧兽医.2008,35(3):17-20
- [3] 杨雪海,赵娜,魏金涛,李绍章.植物乳杆菌对致病性大肠杆菌的抑制效果研究[J].饲料研究.2011,1:27-28
- [4] 石金舟,陈丽园,陈晓琳.细菌素发酵条件的研究进展[J].中国微生态学杂志.2005,17(5):390-391
- [5] 刘海燕,徐幸莲,卢士玲.Plackett-Burman (PB)优化植物乳杆菌增殖培养基的研究[J].现代食品科技.2008,24(12):1277-1280
- [6] Entian K D. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria and their use in novel industrial application [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1996, 69: 109