

戊糖乳杆菌 31-1 菌株产细菌素发酵条件优化*

吕燕妮 李平兰** 周伟

(中国农业大学食品科学与营养工程学院 北京 100083)

摘要: 对戊糖乳杆菌 31-1 产细菌素的条件进行了优化, 分别研究了培养温度, 培养基起始 pH 值, 培养基碳源、氮源, 刺激因子等因素对细菌素产量的影响。组合因素优化结果得到最佳培养基与培养条件为: 乳糖 30g、胰胨 15g、豆胨 20g、牛肉膏 30g、蛋白胨 20g、吐温 80 1mL、磷酸氢二钾 2g、乙酸钠 5g、柠檬酸铵 2g、硫酸镁 0.58g、硫酸锰 0.25g、蒸馏水定容至 1000mL, 30℃ 培养 24h, 培养起始 pH 为 6.5。在此条件下培养细菌素效价可达到 640AU/mL, 与起始培养基相比细菌素产量提高了 8 倍。

关键词: 戊糖乳杆菌, 细菌素, 优化

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 03-0013-07

Optimization of Bacteriocin Produced by *Lactobacillus pentosus* 31-1*

LV Yan-Ni LI Ping-Lan** ZHOU Wei

(College of Food Science & Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083)

Abstract: To optimize bacteriocin production, researching was done on the respect of incubation condition and the media components. And the optimum incubation time was 24h, the optimum temperature was 30℃, the optimum broth initial pH was 6.5. The optimum media component was; lactose 30g, tryptone 15g, soybean peptone 20g, meat extract 30g, peptonethe 20g, Tween 80 1mL, K_2HPO_4 2g, NaAc 5g, Tri-Ammonium citrate 2g, $MgSO_4$ 0.58g, $MnSO_4$ 0.25g, H_2O 1.000mL. Production of bacteriocin under the optimum broth was 640AU/mL, 8 times than MRS media.

Key words: *Lactobacillus pentosus*, Bacteriocin, Optimization

细菌素作为一种蛋白类抑菌物质, 由于其所具有的潜在的食品生物防腐剂的前景而受到了广泛的研究。被公认为安全并已在全世界广泛使用的 nisin 在乳制品及罐头制品中得到了广泛的应用。目前新型细菌素的发现层出不穷, 但在我国目前仍只有 nisin 得到了一些研究, 并在浙江天台银象生物化工厂实现了工业化生产。

作者从我国传统发酵肉制品云南宣威火腿中分离出了一株产细菌素的戊糖乳杆菌 (*Lactobacillus pentosus*) 菌株 31-1^[1], 本文就 31-1 菌株产细菌素的发酵条件进行了研究, 以期为该细菌素的进一步研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 基础培养基

MRS 培养基。

*北京市自然科学基金资助项目 (No. 6052015)

科技部“十五攻关”项目 (No. 2001BA501A11)

** 通讯作者 Tel: 010-62737664, E-mail: lipinglan@cau.edu.cn

收稿日期: 2004-07-20, 修回日期: 2004-08-25

1.2 抑菌实验方法

抑菌实验采用管碟法^[1], 效价分析采用标准曲线法^[1], 每个平板上成三角形放置 3 个重复, 重复三个平板, 最后取平均值。处理与对照均为稀释至合适倍数(使在标准曲线范围内)的样品。

1.3 试验菌

戊糖乳杆菌 31-1 (分离自宣威火腿), 指示菌: 植物乳杆菌 *L. plantarum* Lactacel MC Nov 8 (本实验室保藏)。

2 试验内容

2.1 最佳产细菌素培养条件的确定

2.1.1 菌株 31-1 生长曲线的测定及抑菌活性曲线的测定: 接种于 MRS 培养基, 30℃ 培养, 测 OD_{600} , 活菌数, pH 值、抑菌效价。

2.1.2 不同培养温度及培养基起始 pH 值对细菌素产生的影响: 分别在 30℃、37℃、42℃ 3 个温度下, 培养基起始 pH 4.0、5.0、6.0、6.5、7.0、8.0、9.0、10.0 的培养条件下培养至稳定期 (24h), 做抑菌实验。

2.2 培养基营养成份的影响

2.2.1 不同碳源对细菌素产量的影响: 碳源分别采用山梨醇、木糖、葡萄糖、半乳糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、纤维二糖, 可溶性淀粉取代 MRS 中的葡萄糖成分, 仍以 2% (质量比) 的含量添加。在以上实验确定的最佳培养条件 (即 30℃、起始 pH6.5) 下培养 24h。

2.2.2 不同氮源对细菌素产量的影响: 氮源分别选取有机氮源蛋白胨、胰蛋白胨、大豆蛋白胨、牛肉膏, 无机氮源柠檬酸铵、硝酸钠代替 MRS 培养基中的氮源成分进行单因素试验, 以 2% (质量比) 的含量添加。

2.2.3 刺激因子对细菌素产量的影响: 通常文献报道, 表面活性剂可刺激细菌素的产生及提高产量, 因此在 MRS 培养基中不加入吐温 80 与 MRS 培养基作对比验证吐温 80 对细菌素产生的影响^[2,4]。然后选用吐温 80、吐温 20、聚乙二醇 6000 作为刺激因子取代 MRS 培养基中的吐温 80 成份。吐温 80 设 0、0.1%、0.6%、1.5% 的 4 个水平; 吐温 20 与聚乙二醇分别设 0、0.1% 水平, 采用 L8 ($4^1 \times 2^4$) 正交表设计实验方案。

2.3 碳、氮源因素组合优化设计

对单因素筛选出的碳、氮源含量采用 5 因素 4 水平正交试验组合优化实验, 并采用前面优化出的最佳培养条件及刺激因子最佳组合, 确定产细菌素的培养基。

2.4 数据处理与分析

以上试验所得数据重复 3 次, 单因素试验采用 t 检验法进行显著性分析, 取 5% 为显著性标准。

3 结果与分析

3.1 最佳产细菌素培养条件的确定

3.1.1 菌株 31-1 的生长曲线及抑菌活性曲线测定: 31-1 在起始 pH 6.5 的 MRS 培养基中 30℃ 下培养的生长曲线及抑菌活性曲线 (图 1)。

由图 1 可见, 31-1 在培养 2、3h 即进入对数生长期, 并在 14h 左右进入稳定期,

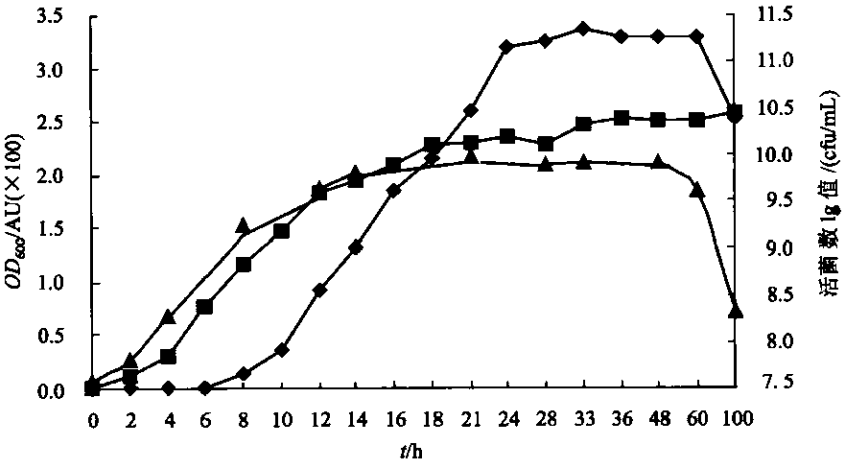


图1 31-1 生长曲线及抑菌活性曲线
■-OD₆₀₀, ◆-效价值 AU, ▲-活菌数 lg 值

在60h以后进入衰亡期。在对数生长后期(8h)细菌素开始产生,在进入稳定期后细菌素产量持续增加,在稳定中期(24h)细菌素产量基本维持稳定,达到320AU/mL。

通常认为细菌素的产生与生长相联系,有的细菌素在细胞刚开始生长时即有产生,而有的细菌素则在对数生长后期或稳定期才会产生,在生长一定时期抑菌活性降低,这种降低可能是由于细菌素吸附到产生菌细胞表面,引起发酵液中细菌素活性的下降^[2]。但本细菌素似乎没有吸附在细胞表面上,在稳定期间(24~60h)活性基本没有变化。但也有可能是在衰亡期时才吸附到细胞表面活性下降(60~100h),也可能是细菌素发生了分解失活,这仍需继续进行研究。

3.1.2 培养温度对细菌素产生的影响:31-1 菌株接种于 MRS 培养基在不同培养温度下培养时细胞的生长及细菌素产生情况见表1。

表1 培养温度对细菌素产生的影响

温度(℃)	30	37	42
OD ₆₀₀	2.31±0.0086	2.338±0.0027	2.155±0.0037
最终 pH 值	4.14±0.0026	3.96±0.0019	3.99±0.0053
效价 AU/mL	138±1.1514	80±1.5385	98±0.5622

由表1可看出,在不同温度下培养时,31-1 菌株的生长与细菌素产生都有很大不同,在37℃培养时,虽然最终pH值降到3.96,OD₆₀₀达到2.338,细胞生长量很高,但细菌素活性却没有在30℃培养时高。这与资料报道某些细菌素在低于最适生长温度的条件下反而有较高细菌素产量相符合,说明细菌素的产生或许是一种应激调节,对不适于其最佳生长环境的一种应激反应^[3,4]。这种应激调节可能是细菌素的合成机制决定的,也许是环境信号传递至细胞膜,然后细菌素合成机制对此信号作出的应激调节,以适应不良环境。另外也有可能是细菌素的合成受分解代谢产物(如乳酸)的阻遏抑制,由于胞外代谢产物的累积使得细菌素的进一步合成受到抑制^[3,5,6]。

3.1.3 培养起始 pH 值对细菌素产生的影响:31-1 接种于不同起始 pH 值的 MRS 培养基在30℃下培养时细胞的生长及细菌素产生情况见表2。

表 2 初始 pH 对细菌素产生的影响

起始 pH	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5
<i>OD</i> ₆₀₀	1.603 ±0.008	2.033 ±0.027	2.183 ±0.025	2.261 ±0.037	2.255 ±0.023	2.274 ±0.019	2.317 ±0.076	2.32 ±0.049	2.327 ±0.053	2.368 ±0.012
最终 pH	3.55 ±0.006	3.67 ±0.001	3.78 ±0.002	3.85 ±0.004	3.89 ±0.007	3.90 ±0.006	3.92 ±0.013	3.93 ±0.008	3.98 ±0.007	4.06 ±0.009
效价 AU/mL	0	37.0 ±0.86	44.0 ±0.753	59.1 ±0.935	62.0 ±1.036	80.0 ±0.82	74.4 ±0.694	67.3 ±0.835	59.4 ±0.637	50.3 ±0.776

结果表明培养起始 pH 值对细菌素的产生有明显的影 响, 在 pH 6.5 时细菌素有最大产量, 偏酸或偏碱性的条件都不利于细菌素的产生。但值得注意的是当在 pH 4 时, 虽然细胞仍有生长, 但却没有细菌素的产生。这说明了细菌素的产生与细胞的生长并不是完全成正比, 细菌素在一定 pH 条件下才会合成, 这可能与细菌素的合成机制有关, 可能由于酸性条件使得细菌素的转录翻译过程受阻。但有的细菌素却只有在较低的 pH 条件下才会产生 (pH 5.0), 无疑细菌素产生的最佳 pH 条件是有菌株特异性的^[2-4]。

3.2 培养基营养成分的优化

3.2.1 碳源对细菌素产量的影响: 31-1 接种于以不同糖为碳源的培养基中在 30℃ 下培养时的细胞生长及细菌素产生情况见表 3。

表 3 碳源对细菌素产量的影响

碳源	活菌数 (lg)	<i>OD</i> ₆₀₀	最终 pH 值	效价 (AU/mL)
山梨醇	9.551 ±0.536	1.917 ±0.006	4.00 ±0.0026	131.0 ±1.563 *
木糖	8.170 ±0.841	0.948 ±0.0006	5.16 ±0.0003	40.0 ±0.45
葡萄糖	9.471 ±0.486	2.116 ±0.0018	3.85 ±0.0072	80.0 ±0.492
半乳糖	9.433 ±0.593	2.128 ±0.0029	3.78 ±0.0034	97.2 ±0.796
果糖	9.346 ±0.872	2.108 ±0.0073	3.86 ±0.0083	70.4 ±0.84
蔗糖	8.889 ±0.253	1.843 ±0.0003	4.50 ±0.0007	34.0 ±0.026
麦芽糖	9.544 ±0.479	2.138 ±0.005	3.70 ±0.0067	80.0 ±0.59
乳糖	9.591 ±0.893	2.086 ±0.0043	3.78 ±0.0039	109.7 ±0.865 *
纤维二糖	9.532 ±0.789	2.138 ±0.009	3.68 ±0.0049	51.2 ±0.157
淀粉	8.699 ±0.218	2.458 ±0.053	5.97 ±0.0005	20.5 ±0.063

注: * 表示与葡萄糖处理相比差异显著 ($P < 0.05$)

由表 3 可见不同碳源对 31-1 菌株细胞生长量的影响基本上与对细菌素产生的影响成线性正相关, 山梨醇作为最易被利用的碳源, 细菌素产量最高的同时生长量也很高; 31-1 菌株对五碳糖的利用较弱, 生长较差, 对多糖淀粉很难利用。对单糖、双糖 (除蔗糖外) 均可很好利用, 但其中细菌素产量和细胞生长最好的是乳糖, 这可能与细菌素的碳源代谢机制有关。

细菌素可在不同碳源的培养基中产生, 不同的细菌素的 最佳碳源也不同, *L. lactis* IO-1 产生的 nisin Z 可以葡萄糖、木糖、蔗糖为碳源产生, 然而以葡萄糖为碳源的产量 (4,000IU/mL) 高于木糖 (3,000IU/mL); 碳源对 pediocin AcH 产量的影响从高到低依次为葡萄糖 > 蔗糖 > 木糖 > 半乳糖; 然而对于 enterocin 1146 来说却是蔗糖比葡萄糖为

碳源的产量更高，果糖和乳糖可以引起细胞生长量的增加却不能使细菌素产量增加^[2,5]。

统计分析结果表明山梨醇与乳糖与葡萄糖对照相比均达到了 5% 的显著水平，而且考虑到山梨醇的价格昂贵，因此从成本的角度出发，选择乳糖为最佳碳源。

3.2.2 氮源对细菌素产量的影响：31-1 接种于不同氮源物质的培养基中在 30℃ 下培养时的细胞生长及细菌素产生情况见表 4。

表 4 氮源对细菌素产量的影响

氮源	胰蛋白胨	大豆蛋白胨	牛肉膏	蛋白胨	柠檬酸铵	硝酸钠
活菌数 (lg)	9.2504 ± 0.831	9.4563 ± 0.736	9.3424 ± 0.619	9.2253 ± 0.825	7.2787 ± 0.263	7.6020 ± 0.153
AU/mL	148.2 ± 1.869	108.8 ± 1.546	143.2 ± 1.827	97.1 ± 1.238	0	0
OD ₆₀₀	1.786 ± 0.0037	2.232 ± 0.0167	2.087 ± 0.0080	1.834 ± 0.0068	0.078 ± 0.0006	0.062 ± 0.0008
pH 值	3.88 ± 0.0072	3.66 ± 0.0081	3.74 ± 0.0049	3.81 ± 0.0075	5.78 ± 0.0018	5.49 ± 0.002

由表 4 可见，无机氮源无法满足细菌的生长及细菌素的产生，有机氮源对细菌素的产生有重要影响，且不同氮源差异较大。统计分析结果表明，4 种有机氮源胰蛋白胨、大豆蛋白胨、牛肉膏、蛋白胨之间无显著性差异，对实验指标均有很大影响，因此选取这四种氮源物质进行下一步实验。

由于乳酸菌是一类对营养要求比较苛刻的细菌，仅仅无机氮源无法满足细菌生长的营养要求，而且碳源对细胞生长及细菌素产量的限制不如有机氮源对其的影响明显^[2]。Kim 等人发现增加有机氮源的含量会使 nisin 的产量有很大提高^[2,5]。有机氮源的种类也影响细菌素的产量，这可能与细菌素合成机制有关，可能某些氮源物质中丰富的成分诱导了细菌素基因的启动^[5-8]。

3.2.3 刺激因子对细菌素产量的影响：在培养基中加入刺激因子会刺激细菌素的产生，通常这些刺激因子指一些表面活性剂之类的物质，如吐温 80，吐温 20，聚乙二醇 6000 也是一种表面活性剂。本试验即对这些表面活性剂对细菌素产量的影响进行研究。通常认为吐温 80 的刺激作用是由于阻止了细菌素吸附在产生菌细胞表面^[2,3]，因此本实验先对吐温 80 在 MRS 培养基中存在与否对 31-1 菌株产细菌素情况的研究。

试验结果发现在不加吐温 80 的培养基中细菌素根本无法产生，虽然细胞生长正常，与加吐温 80 的培养基中的生长量无明显差异。说明吐温 80 对细菌生长没有什么促进作用，但却对细菌素的产量有很重要的影响，验证了前人的报道。

为了增加细菌素产量，将常用的几种表面活性剂选择不同水平进行正交试验，表 5 为几种刺激因子的正交试验结果。

表 5 刺激因子 L8 (4¹ × 2⁴) 正交试验结果

处理号	因素			效价 (AU/mL)
	A (吐温 80)	B (吐温 20)	C (聚乙二醇)	
1	1 (0)	1 (0)	2 (0.1%)	0
2	3 (0.6%)	2 (0.1%)	2	53.09
3	2 (0.1%)	2	2	103.80
4	4 (1.5%)	1	2	30.06
5	1	2	1 (0)	50.26
6	3	1	1	65.49

续表 5

7	2	1	1	83.75
8	4	2	1	30.27
R1	50.26	179.3	229.77	
R2	187.55	237.42	186.95	
R3	118.58			
R4	60.33			
极差 R	137.283	58.12	42.82	

注：以上数值为 3 次试验重复的平均值

由上表可知，将因素按影响主次排列为 $A > B > C$ ，由 R 值来看，最佳组合为 $A_2B_2C_1$ ，即采用 0.1% 吐温 80 加 0.1% 吐温 20，不添加聚乙二醇，即可得到细菌素产量的较高值。由于因素 B 的极差与因素 A 的极差相比很小，因此可以认为吐温 80 的作用远大于吐温 20，因此剔除次要因素，只要有 0.1% 的吐温 80 即可起到很好的效果。

3.3 碳源、氮源正交优化组合

将优选出的最佳碳源乳糖、最佳氮源胰蛋白胨、豆胨、牛肉膏、蛋白胨作为 5 因素，分别取 4 个水平，设计正交试验 $L_{16}(5^4)$ ，表头设计及结果见表 6^[9,10]。

表 6 碳、氮源组合五因素四水平正交试验方案及结果

处理号	因素					效价 (AU/mL)
	乳糖 (%)	胰胨 (%)	豆胨 (%)	牛肉膏 (%)	蛋白胨 (%)	
1	1.5	2	2.5	2	2.5	302.86
2	2.5	3	1.5	2	2	397.03
3	2	3	2.5	2.5	3	282.3
4	3	2	1.5	2.5	1.5	562.34
5	1.5	2.5	1.5	3	3	395.64
6	2.5	1.5	2.5	3	1.5	558.4
7	2	1.5	1.5	1.5	2.5	481.74
8	3	2.5	2.5	1.5	2	588.64
9	1.5	1.5	3	2.5	2	302.86
10	2.5	2.5	2	2.5	2.5	473.34
11	2	2.5	3	2	1.5	342.52
12	3	1.5	2	2	3	516.83
13	1.5	3	2	1.5	1.5	348.60
14	2.5	2	3	1.5	3	317.03
15	2	2	2	3	2	624.90
16	3	3	3	3	2.5	390.12
R1	1349.96	1859.83	1836.75	1736.01	1811.86	
R2	1731.46	1807.13	1963.67	1559.24	1913.43	
R3	1745.8	1800.14	1732.2	1620.84	1648.06	
R4	2057.93	1418.05	1352.53	1969.06	1511.8	
R	707.96	441.78	611.14	409.82	401.63	

注：以上数值为 3 次试验重复的平均值

对上表进行分析，极差分析表明五因素的影响大小顺序为 $A > C > B > D > E$ ，即乳

糖 > 豆胨 > 胰胨 > 牛肉膏 > 蛋白胨, 最佳处理为 $A_4 B_1 C_5 D_4 E_7$, 即乳糖 3%、胰胨 1.5%、豆胨 2%、牛肉膏 3%、蛋白胨 2%, 此处理没有出现在正交表中, 应补做以验证。验证结果发现此处理经 2 倍稀释法测效价达到 640 AU/mL, 比初始 MRS 培养基发酵效价 (80 AU/mL) 翻了 8 倍。

4 结论

试验结果表明细菌素产生的最佳发酵条件为 30℃ 培养 24h, 培养起始 pH 为 6.5, 培养基成分为乳糖 30g、胰胨 15g、豆胨 20g、牛肉膏 30g、蛋白胨 20g、吐温 80 1mL、磷酸氢二钾 2g、乙酸钠 5g、柠檬酸铵 2g、硫酸镁 0.58g、硫酸锰 0.25g, 蒸馏水定容至 1,000mL。在此条件下培养戊糖乳杆菌细菌素效价可达到 640 AU/mL。

参考文献

- [1] 吕燕妮, 李平兰, 江志杰. 中国食品学报, 2003, 增刊: 130 ~ 133.
- [2] Parente E, Ricciardi A. Appl Microbiol Biotechnol, 1999, 52: 628 ~ 638.
- [3] Frederic L, Luc D V. Appl Environ Microbiol, 1999, 65 (3): 974 ~ 981.
- [4] Aasen I M, Moretro T, Katla T, et al. Appl Microbiol Biotechnol, 2000, 53: 159 ~ 166.
- [5] Frederic L, De V L. Appl Environ Microbiol, 2001, 67 (10): 4407 ~ 4413.
- [6] Nel H A, Bauer R, Vandamme E J, et al. J Appl Microbiology, 2001, 91: 1131 ~ 1138.
- [7] Bhunia A K, Johnson M C, Ray B. Appl Environ Microbiol, 1991, 57: 1265 ~ 1267.
- [8] Herranz C, Martinez J M, Rodriguez J M, et al. Appl Environ Microbiol, 2001, 56: 378 ~ 383.
- [9] 吴琼, 吕红线, 王锦, 等. 工业微生物, 2000, 30 (1): 36 ~ 39.
- [10] 陈秀珠, 何松, 龙力红, 等. 微生物学通报, 1995, 22 (4): 215 ~ 217.