

类细菌素产生菌的筛选及发酵条件的研究

李 凜,罗俊成,胡欣洁,王忠彦,胡 承

(四川大学生命科学学院,四川 成都 610064)

摘要: 用滤纸片法从酒糟与黄水中初筛得到 150 株抗菌物质产生菌,再用杯碟法复筛得到一株类细菌素产生菌 LL18-4,经鉴定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。LL18-4 产类细菌素最适条件为:以 1%葡萄糖为碳源,2%牛肉膏为氮源,1%酒糟浸出液为生长因子,培养基初始 pH6.5,37℃静置培养 96 h,最适条件下效价为 164 u/mL。对该类细菌素生物学特性进行初步研究,该类细菌素对蛋白酶 K 敏感,酸性条件下热稳定性强,中性或碱性条件下不具备热稳定性,抑菌活性 pH 范围是 5.5~7.5。

关键词: 微生物; 类细菌素; 枯草芽孢杆菌; 发酵条件

中图分类号:TS261.1;TQ920 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2005)04-0034-04

Study on Selection of Bacteriocin-like Substance Producing Strain and the Fermentation Conditions

LI Lin, LUO Jun-cheng and HU Xin-jie et al.

(Life Science College of Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610064, China)

Abstract: 150 bacteriocin producing strains were obtained through preliminary screening in distiller's grains and yellow water by paper filtering method. Then bacteriocin producing strain LL18-4 was obtained through secondary screening by cylinder plate method and such strain was identified as *bacillus subtilis*. The optimal conditions for LL18-4 to produce bacteriocin included the following: 1% glucose as carbon source, 2% beef extract as nitrogen source, 1% distiller's grains lixivium as growth factor, initial pH value for culture medium as 6.5, 96 h standing culture at 37℃, and valence as 164 u/mL. Primary study of biological properties of such strain indicated that such strain sensitive to protease K and had strong heat stability under acidity conditions and lost heat stability under neutral conditions or alkalinity conditions and bacteriostasis activity pH ranged between 5.5 to 7.5. (Tran. by YUE Yang)

Key words: microbe; bacteriocin; *bacillus subtilis*; fermentation conditions

枯草芽孢杆菌是自然界广泛存在的一种细菌,它能产生杆菌肽、大环脂、环脂、类噬菌体颗粒等十几种抗菌物质^[1],长期以来被广泛地运用于水产养殖^[2]、畜禽业生产^[3]、食品工业^[4]、医药行业^[5]等方面。类细菌素是细菌在代谢过程中生成的具有抑菌活性的多肽或蛋白质,它能抑制革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和真菌^[6,7]。目前国内关于枯草芽孢杆菌产抗菌物质的研究已经达到分子水平^[8],但绝大多数是针对枯草芽孢杆菌产抗菌物质抑制真菌的研究^[9],关于枯草杆菌产类细菌素同时抑制细菌及真菌的研究国内目前尚没有报道。笔者从酒糟与黄水中筛得一株产类细菌素的菌株,经鉴定为枯草芽孢杆

菌,并对其发酵条件及所产类细菌素作了初步的研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

四川某浓香型酒厂新鲜酒糟及黄水。

1.1.2 供试指示菌

金黄色葡萄球菌;金黄色葡萄球菌 A309(青霉素敏感型);大肠杆菌;绿脓杆菌;黑曲霉(本实验室保存);鸟链球菌;表皮葡萄球菌;粪链球菌(华西附二院保存)。

1.1.3 培养基

筛选培养基(g/L):牛肉膏 5.0,蛋白胨 10.0,氯化钠

收稿日期:2004-11-10

作者简介:李凜(1980-),男,湖北人,硕士研究生,研究方向为食品与发酵。

5.0,自然 pH。

指示菌培养基(g/L):牛肉膏 1.5,酵母膏 6.0,葡萄糖 1.0,蛋白胨 10.0,自然 pH。

种子培养基(g/L):牛肉膏 5.0,酵母膏 6.0,葡萄糖 1.0,蛋白胨 10.0,氯化钠 5.0,自然 pH。

1.2 方法

1.2.1 初筛方法

将样品用无菌水适当稀释,取一定量涂布于固体筛选培养基上,30℃倒置培养 72 h,待长出单菌落后用无菌牙签挑取单菌落接种于装有 1 mL 筛选培养基的 1.5 mL EP 管中密封,30℃静置培养 72 h,用滤纸片法^[10]进行初筛,挑取滤纸片周围具有较大抑菌圈且抗菌谱较广的菌株进行复筛。

1.2.2 复筛方法

初筛菌种用平板涂布法纯化,挑出单菌落接入装有 50 mL 种子培养基的 150 mL 锥形瓶中,30℃静置培养 72 h,按 1%的接种量接种于装有 50 mL 筛选培养基的 150 mL 锥形瓶中,30℃静置培养 72 h,取发酵上清液测效价。

1.2.3 类细菌素效价的定义及测定

以对金黄色葡萄球菌具有相同抑菌效果的硫酸庆大霉素标准品的效价来定义此类细菌素的效价。取 72 h 发酵液 10000 r/min 离心 10 min,取上清液以杯碟法^[10]测效价。

1.2.4 排除酸及过氧化氢干扰

采用中和法排除有机酸的干扰,采用过氧化氢酶法排除过氧化氢的干扰^[11]。

2 结果与讨论

2.1 菌种筛选

从 8 批酒糟和黄水中共分离得到 2500 多个单菌落,通过初筛得到 150 株抗菌物质产生菌,再经过复筛得到一株对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌及真菌都具有抑制作用,特别是对金黄色葡萄球菌具有强抑制作用的菌株,将此菌株编号 LL18-4。LL18-4 的抗菌谱见表 1。

表 1 LL18-4 的抗菌谱

指示菌	LL18-4
金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	+++
金黄色葡萄球菌 A309 (<i>Staphylococcus aureus</i> A309)	++
大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)	+
绿脓杆菌 (<i>Pseudomonas pyocyanea</i>)	+
鸟链球菌 (<i>Streptococcus avium</i>)	+
表皮葡萄球菌 (<i>Staphylococcus epidermidis</i>)	++
粪链球菌 (<i>Streptococcus faecalis</i>)	+
黑曲霉 (<i>Aspergillus niger</i>)	+

2.2 菌种鉴定

LL18-4 的形态特征和培养特征为:菌体细胞呈 G⁺ 杆状,胞内原生质均匀,中生芽孢,孢囊不膨大,芽孢椭圆,细胞大小为 0.7~0.8 μm×2.0~2.2 μm。30℃培养 24 h,菌落圆形,表面粗糙,质地皱褶,边缘波浪形,不透明,液体培养产生菌膜。经过进一步的生理生化试验(见表 2),将此菌鉴定为枯草芽孢杆菌^[12,13]。

表 2 菌株的生理生化特征

生理生化特征	LL18-4 菌株
过氧化氢酶	+
葡萄糖产酸	+
葡萄糖产气	—
V·P	+
硝酸盐还原试验	+
卵黄反应	—
需氧性试验	兼性厌氧
明胶水解	+
阿拉伯糖	+
木糖	+
甘露醇	+
7%NaCl	生长
酪素水解	+
淀粉水解	+
美蓝染色	细胞内没有不着色颗粒
H ₂ S	+

2.3 LL18-4 产类细菌素发酵条件的优化

2.3.1 碳源对 LL18-4 产类细菌素的影响

以筛选培养基为基础,各加入 2%葡萄糖、乳糖、麦芽糖、蔗糖、马铃薯淀粉、可溶性淀粉作碳源,30℃静置培养 72 h 测效价,结果见表 3。由表 3 可知,以葡萄糖为碳源产类细菌素效价最高,测得效价为 82 u/mL。

表 3 碳源对 LL18-4 产类细菌素的影响 (u/mL)

碳源种类	效价	碳源种类	效价
葡萄糖	82	蔗糖	75
乳糖	69	马铃薯淀粉	73
麦芽糖	77	可溶性淀粉	0

2.3.2 氮源对 LL18-4 产类细菌素的影响

以筛选培养基为基础,以 2%葡萄糖为碳源,各加入 2%牛肉膏、蛋白胨、豆粉、尿素、硫酸铵、氯化铵、硝酸钠作氮源,30℃静置培养 72 h 测效价,结果见表 4。由表 4 可知,以牛肉膏为氮源产类细菌素效价最高,测得效价为 85 u/mL。

表 4 氮源对 LL18-4 产类细菌素的影响 (u/mL)

氮源种类	效价	氮源种类	效价
牛肉膏	85	硫酸铵	0
蛋白胨	75	氯化铵	0
豆粉	0	硝酸钠	0
尿素	0		0

2.3.3 生长因子对 LL18-4 产类细菌素的影响

以筛选培养基为基础,以2%葡萄糖为碳源,以2%牛肉膏为氮源,各加入2%酵母膏、麦芽浸膏、玉米膏、酒糟浸出液作生长因子。由于LL18-4是从酒糟中筛得,因此将酒糟浸出液作为生长因子的一种。30℃静置培养72h测效价,结果见表5,由表5可知,以酒糟浸出液为生长因子产类细菌素效价最高,效价为98 u/mL。

表5 生长因子对LL18-4产类细菌素的影响(u/mL)

生长因子种类	效价	生长因子种类	效价
酵母膏	86	玉米膏	62
麦芽浸膏	78	酒糟浸出液	98

2.3.4 正交实验

通过上述单因素实验,可以看出葡萄糖、牛肉膏、酒糟浸出液对LL18-4产类细菌素有较大影响。运用正交实验对以上3个因素进行处理,采用 $L_3(3^3)$ 正交表安排实验(见表6),结果显示葡萄糖1%,牛肉膏2%,酒糟浸出液1%,NaCl 0.5%为最佳配方,测得效价为105 u/mL。

表6 正交实验因素、水平设计表 (%)

因素	A	B	C
	葡萄糖	牛肉膏	酒糟浸出液
1	1	1	1
2	2	2	2
3	3	3	3

2.3.5 不同培养温度对LL18-4产类细菌素的影响

以最佳配方培养基,1%接种量,于不同温度下静置培养72h测效价,结果如图1。由图1可知,37℃为LL18-4产类细菌素的最好培养温度。

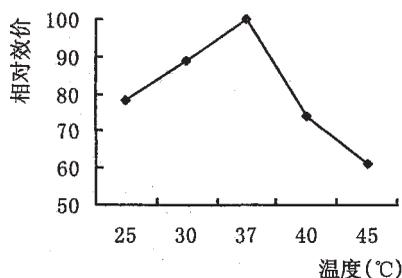


图1 不同温度对LL18-4产类细菌素的影响

2.3.6 不同的初始pH对LL18-4产类细菌素的影响

将最佳配方培养基的pH分别调至5~9,1%接种量,另用自然pH6.5做对照,37℃静置培养72h测效价,结果见图2。由图2可知,自然pH6.5为LL18-4产类细菌素的最好初始pH。

2.3.7 不同供氧量对LL18-4产类细菌素的影响

在250 mL锥形瓶中分别装入不同量的最佳配方培养基,自然pH,1%接种量,37℃静置培养72h测效价,结果见图3。由图3可知,最佳供氧量为250 mL锥形瓶

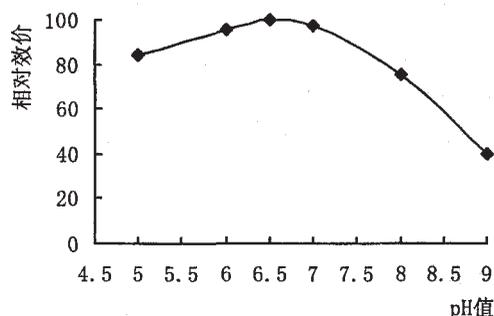


图2 不同初始pH对LL18-4产类细菌素的影响

装100 mL培养基。LL18-4是从酒糟中筛得,白酒发酵过程是一个厌氧发酵过程,因此LL18-4是枯草芽孢杆菌的兼性厌氧菌株。

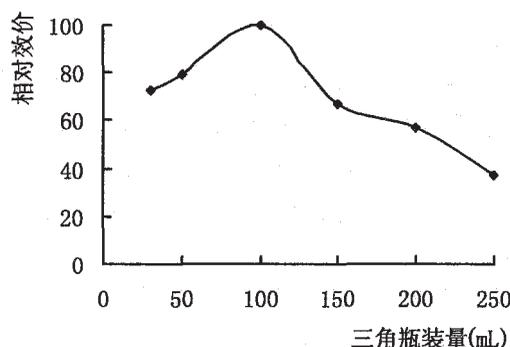


图3 不同供氧量对LL18-4产类细菌素的影响

2.3.8 不同接种量对LL18-4产类细菌素的影响

在250 mL锥形瓶中装入100 mL最佳配方培养基,自然pH,以不同接种量接种,37℃静置培养72h测效价,结果见图4。由图4可知,最佳接种量为1%。

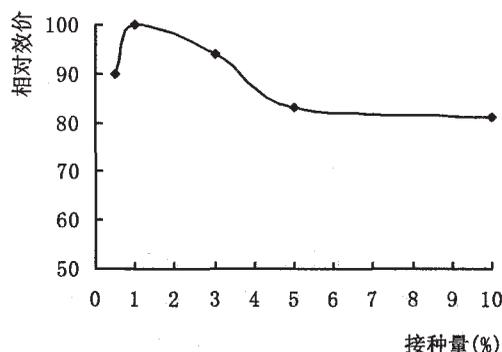


图4 不同接种量对LL18-4产类细菌素的影响

2.3.9 不同培养时间对LL18-4产类细菌素的影响

以最佳配方培养基,自然pH,1%接种量,250 mL锥形瓶装量100 mL,37℃静置培养不同时间测效价,结果见图5。由图5可知,96h为LL18-4产类细菌素的最好培养时间。

2.4 LL18-4产类细菌素的生物学特性

2.4.1 LL18-4产类细菌素对蛋白酶K的敏感性

取两份等量发酵液,一份将pH调至蛋白酶K的最

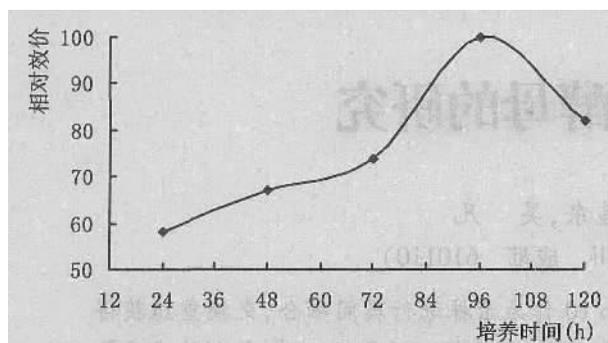


图5 不同培养时间对 LL18-4 产类细菌素的影响

适作用 pH7.6,按 0.5 mg/mL 加入蛋白酶 K,37℃下培养 1 h,再调回原 pH,另一份作对照,见图 6,结果显示 LL18-4 所产类细菌素经蛋白酶 K 处理后,几乎完全丧失抑菌活性。

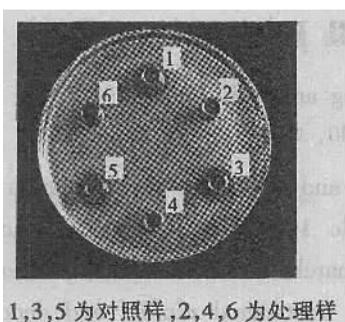


图6 类细菌素对蛋白酶 K 的敏感性

2.4.2 LL18-4 产类细菌素的热稳定性

取两份等量的发酵液调 pH 至 7,一份 121℃保温 20 min,另一份作对照,测效价,结果显示经过热处理的样品几乎完全丧失抑菌活性。证明该类细菌素中性条件下热稳定性很差。

取两份等量的发酵液调 pH 至 6,一份 121℃保温 20 min,另一份作对照,测效价,结果显示经过热处理的样品仍保持 60%左右的抑菌活性。证明该类细菌素在酸性条件下热稳定性较好。

2.4.3 不同 pH 对发酵液抑菌活性的影响

将发酵液 pH 分别调至 5.0~8.0,以空白样做对照,测效价,重复 3 次,结果见表 7。由表 7 可知,发酵液抑菌活性的最适 pH 为 6.5,当 pH 上升或下降时,抑菌活性随之下降,当 pH 达到 5.0 和 8.0 时,抑菌活性几乎完全丧失,结果显示抑菌活性的 pH 范围是 5.5~7.5。

3 小结

枯草芽孢杆菌 LL18-4 所产的抑菌物质可以抑制革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌及真菌,抑菌结果经试验排除了酸及过氧化氢的作用,该抑菌物质对蛋白酶 K 敏感,酸性条件下热稳定性好,因此可以初步认为该菌株产生的是类细菌素物质。

通过对 LL18-4 发酵条件的研究,获得了 LL18-4

表7 不同 pH 对发酵液抑菌活性的影响

pH	抑菌圈平均直径 (mm)	
	发酵液	空白对照
5.0	0	0
5.5	9.94	0
6.0	11.86	0
6.5	13.54	0
7.0	10.80	0
7.5	8.54	0
8.0	0	0
未经处理的原液	13.52	0

产类细菌素的最佳发酵条件:以 1%葡萄糖为碳源,以 2%牛肉膏、1%酒糟浸出液为氮源,培养基初始 pH6.5,接种量 1%,37℃静置培养 96 h,发酵产物抑菌活性最高,效价达到 164 u/mL。

由于该类细菌素在酸性条件下热稳定性强,中性或碱性条件下热稳定性差,可以初步推测该类细菌素至少由两种或两种以上的成分组成,笔者目前正在就该类细菌素的具体组成情况进行研究。

参考文献:

- [1] 刘焕利,潘小玫,张学君,等. 产抗菌蛋白芽孢杆菌的筛选及抗菌蛋白性质[J]. 中国生物防治,1995,11(4):160-164.
- [2] 杨兴丽,周晓林,唐启斌. 微生态制剂在水产养殖中的应用[J]. 河南水产,2004(2):13-14.
- [3] 胡东兴,潘康成. 微生态制剂及其作用机理[J]. 中国饲料,2001(3):14-16.
- [4] 丁立孝,何国庆,等. 微生物防腐剂在食品工业中的应用现状与发展前景[J]. 粮油加工与食品机械,2002(11):29-32.
- [5] 齐涵,王淑芬,任秋生,等. 枯草芽孢杆菌 BS₂₂₄ 菌活菌制剂(白天鹅气雾剂)治疗烧伤创面的环境细菌学监测[J]. 中国微生物生态学杂志,1998,10(3):174-176.
- [6] Virginia S. Characterization of a Bacteriocin-like Substance Produced by a Vaginal Lactobacillus Salivarius Strain[J]. Appl Environ Microbiol,1999;65:5631-5635.
- [7] Mcgoarty J. Probiotic Use of Lactobacilli in the Human Female Urogenital Tract[J]. FEMS Immunol Microbiol, 1993,(6)251-264.
- [8] 周冰,张惟才. 枯草芽孢杆菌蛋白质分泌机制研究进展[J]. 生物技术通讯,2004,15(3):281-285.
- [9] 高学文,姚仕义. 枯草芽孢杆菌 B2 菌株产生的抑菌活性物质分析[J]. 中国生物防治,2003,19(4):175-179.
- [10] 田宇,洪芳,胡承,王忠彦. 类细菌素产生菌 HF08 的选育及其发酵条件的研究[J]. 食品与发酵工业,2004,30(3):56-61.
- [11] 侯运华,孔健,等. 一株乳酸菌产类细菌素 Enteriocin LK-S1 的初步研究[J]. 山东大学学报(理学版),2002,37(5):463-468.
- [12] R.E.布坎南,N.E.吉本斯. 伯杰细菌鉴定手册(第八版)[M]. 北京:科学出版社,1984.
- [13] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001.