

两株乳酸菌发酵上清液 对 *E.coli* 作用分析及培养条件优化

张铁男, 王 艳

(哈尔滨商业大学食品工程学院省高校食品科学与工程重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150076)

摘要:以植物乳杆菌和保加利亚乳杆菌为研究对象, 以大肠杆菌为指示菌, 通过琼脂扩散法首先分析植物乳杆菌和保加利亚乳杆菌的发酵上清液对大肠杆菌的抑菌活性差异, 然后再观察不同培养温度、葡萄糖浓度、pH 和培养时间对植物乳杆菌发酵上清液抑菌效果的影响。结果显示, 植物乳杆菌在 35℃, 8% 葡萄糖, pH 为 9 时, 发酵上清液抑菌效果较好。经过正交优化实验得出最佳条件组合为: 培养温度 35℃, 培养基 pH7, 葡萄糖浓度 8%, 培养时间 36h, 抑菌圈直径为 (1.451 ± 0.016) cm。研究还发现, 保加利亚乳杆菌发酵上清液对大肠杆菌无抑制作用。

关键词:植物乳杆菌, 保加利亚乳杆菌, 大肠埃希氏菌, 抑菌活性

Analysis and optimization of against *E.coli* by fermented supernatant from two *Lactobacillus*

ZHANG Tie-nan, WANG Yan

(Key Laboratory of Food Science and Engineering, College of Food Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

Abstract: In this study, using *E.coli* as the indicator bacteria the antibacterial activity against *E.coli* of the fermented supernatant of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus bulgaricus* by the agar diffusion was investigated. Then, the effect of culture temperature, glucose concentration, pH and cultivating time on the antibacterial activity of the *Lactobacillus plantarum* were studied. The results showed that when *Lactobacillus plantarum* were incubated at 35℃, glucose concentration 8% and pH9, the antibacterial activity of its fermentation supernatant fluid was pretty good. Orthogonal test was used to analyze the optimum culture conditions for planting *Lactobacillus*. The optimum culture conditions for its antibacterial activity were estimated to be, cultivation temperature at 35℃, incubating for 36h, glucose concentration 8% and pH7, and the bacteriostatic circle was measured at (1.451 ± 0.016) cm in diameter. In addition, the results of this study suggested that *Lactobacillus bulgaricus* had no bacteriostasis to *E.coli*.

Key words: *Lactobacillus plantarum*; *Lactobacillus bulgaricus*; *Escherichia coli*; antibacterial activity

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)15-0049-04

长期以来, 乳酸菌广泛应用于乳制品和植物发酵食品中^[1]。乳酸菌在新陈代谢过程中能够产生抑菌物质, 如有机酸、过氧化氢、双乙酰、细菌素和类细菌素, 可作为天然的食品防腐剂。细菌素是由某些细菌在代谢过程中产生的一类具有抑菌生物活性的蛋白质、多肽或前体多肽, 这些物质可以抑制与之种属亲缘关系较近的其他微生物^[2]。乳链菌肽(nisin)是由某些乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)代谢过程中

产生的一种细菌素, 呈细长型的两亲性阳离子多肽, 它对革兰氏阳性菌有着广泛的抑菌作用, 是已被批准正式使用的食品天然防腐剂。如果经胰蛋白酶、胃蛋白酶和蛋白酶 K 处理后发酵液抑菌活性略有下降, 表明该活性物质为非蛋白成分或起抑菌作用的不是单一物质, 该活性物质不同于一般细菌素, 属于类细菌素。类细菌素是指不符合或不完全符合细菌素定义的蛋白类拮抗物质^[3], 它不仅能抑制革兰氏阳性菌, 而且对革兰氏阴性菌和真菌也有抑制作用, 并且已有研究证明类细菌素能与敏感细菌的细胞膜磷脂结合增加其通透性而具有抑菌活性^[4-5], 另外类细菌素还能抑制 DNA 的合成^[6]。最近从植物乳杆菌中分离出 bacteriocin ST8KF^[7] 和 bacteriocin AMA-K^[8]。本研究发现保加利亚乳杆菌发酵上清液对大肠埃希氏菌(*E.coli*)没有抑制作用, 而植物乳杆菌发酵上清

收稿日期: 2012-02-09

作者简介: 张铁男(1977-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 营养与食品安全。

基金项目: 国家自然科学基金(20873034, 21073050); 黑龙江省杰出青年基金(JC201106); 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12521138)。

液可以抑制大肠埃希氏菌的生长。由于细菌素仅对革兰氏阳性菌有抑制作用,类细菌素除了对革兰氏阳性菌有抑制作用外,还可以抑制革兰氏阴性菌和真菌的生长,同时作为指示菌的大肠埃希氏菌又属于革兰氏阴性菌,因此可以推断保加利亚乳杆菌发酵上清液中的类细菌素含量很低或者没有,进一步探索了关于植物乳杆菌发酵上清液抑制大肠埃希氏菌生长繁殖的最佳发酵条件。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*, 23508)、保加利亚乳杆菌 (*Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*, 20356) 中国工业微生物菌种保藏管理中心;大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) 标准菌株 ATCC 25922 中国药品生物制品鉴定所;MRS 培养基 Oxoid, 英国;EC 肉汤培养基 奥博星, 中国;抑营养琼脂半固体培养基 奥博星, 中国。

超纯水仪 Milli-Q® Biocel™ Millipore, USA; 3K30 台式高速冷冻离心机 Sigam, USA; TDL80-2B 微量台式离心机 上海安亭, 中国; HZQ-F160A 振荡生化培养箱 上海恒科技, 中国; DL-CJ-1E 无菌操作台 北京东联哈尔, 中国。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种的复苏 分别将放有植物乳杆菌、保加利亚乳杆菌和大肠埃希氏菌菌种的 1.5mL 离心管从 -20℃ 冰箱中取出, 放至无菌操作台上, 待其中冰块融化, 分别将乳酸菌加入已标记好的两支装有 10mL MRS 培养基中, 大肠杆菌加入装有 10mL EC 肉汤的试管中, 放入生化培养箱, 在 37℃ 条件下培养 24h。

1.2.2 指示菌浓度测定 在抑菌分析研究中联合使用平板计数法和吸光值法确定指示菌特定浓度。菌悬液做十倍稀释后取 0.1mL 进行平板计数, 并在 460nm 波长下分别测定其对应的 OD 值, 观察菌悬液浓度为 1.0×10^8 cfu/mL 的稀释倍数, 后续抑菌活性分析中指示菌的菌悬液均采用此稀释倍数进行稀释。

1.2.3 无细胞发酵上清液制备 将保加利亚乳杆菌和植物乳杆菌复苏活化后, 以 1% 的接种量接种于 MRS 液体培养基中, 37℃ 振荡培养 (120r/min) 到稳定期 ($OD_{600} \geq 1.9$)^[9], 12000 × g, 4℃ 离心 15min, 收集上清液, 用 5mol/L NaOH 中和发酵上清液中有有机酸对抑菌活性分析的影响, 将 pH 调到 6.5^[10]。上清液用 0.22μm 滤膜过滤, 除去菌体及其他杂质, 无细胞上清液通过冷冻干燥方法浓缩, 加入原体积 1/10 的超纯水溶解冻干产物, 放入 -20℃ 冰箱中备用。

1.2.4 抑菌活性测定 使用琼脂扩散法测定两株乳酸菌发酵上清液的抑菌活性。在灭菌平皿中倒入 10mL 含有 2% 琼脂的 EC 肉汤培养基, 冷却至 50℃ 左右后加入浓度为 10^8 cfu/mL 的指示菌液 1mL, 待其充分冷却凝固后, 用打孔器在含有指示菌的培养基上打孔, 孔径为 8mm。在孔中加入 200μL 乳酸菌的无细胞发酵上清液, 4℃ 下静置 30min, 待发酵上清液充分扩散后放入培养箱中, 37℃ 静置培养 24h, 观察

有无抑菌圈。形成的抑菌圈用游标卡尺进行测量, 读数精确至 0.001cm。

1.2.5 培养基成分设计与及培养条件优化 以 MRS 培养基作为基础培养基, 葡萄糖浓度分别为 4%、6%、8%, 分析葡萄糖浓度对无细胞发酵上清液抑菌效果的影响。同时, 对培养条件中的温度分别设置在 35、37、39℃, 培养基初始 pH 分别调整为 5、7、9 和分别培养 24、48、72h, 进行单因素分析及正交优化实验, 确定无细胞发酵上清液抑菌的最佳培养条件。

1.2.6 统计分析 抑菌直径使用统计软件 SPSS 13.0 进行分析, 采用结合 Bonferroni post hoc 假设检验的单因素方差分析和多重比较, 每个样品做 3 个平行样取其平均值, 所有数值均采用 $\bar{d} = \bar{X} \pm SD$ 表示, $p < 0.05$ 认为是统计学差异显著, 并以星号 (*) 加以标注。

2 结果与讨论

2.1 指示菌浓度的确定

平板计数法和吸光值法相结合的研究显示, 指示菌浓度为 1.0×10^8 cfu/mL 时, 460nm 波长下测定其 OD 值为 0.508, 后续抑菌活性分析中使用的指示菌菌液吸光值均调至 0.508, 确保在抑菌活性分析实验中实验结果具有可比性。

2.2 植物乳杆菌与保加利亚乳杆菌发酵上清液抑菌活性的比较

在 MRS 培养基中 37℃ 培养传至三代的植物乳杆菌和保加利亚乳杆菌的无细胞发酵液上清液, 经琼脂扩散法分析抑菌活性可知, 在相同的培养条件下, 植物乳杆菌可得到明显的抑菌圈, 抑菌直径为 $d = (1.236 \pm 0.032)$ cm。而保加利亚乳杆菌没有抑菌圈(见图 1)。



图 1 植物乳杆菌与保加利亚乳杆菌发酵上清液抑菌活性的比较

Fig.1 Comparison of antibacterial activity by fermented supernatant fluid from *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus bulgaricus*

2.3 植物乳杆菌无细胞发酵上清液抑菌作用优化

2.3.1 培养温度的选择 当培养温度为可变因素, 其他四个因素不变时, 即葡萄糖浓度为 2%、培养基 pH 为 7、培养时间为 24h, 培养温度分别为 35、37、39℃, 其结果如表 1。结果显示, 培养温度为 35℃ 与其他组相比统计学差异显著。

2.3.2 葡萄糖浓度的选择 当葡萄糖浓度为可变因素, 其他四个因素不变时, 即培养温度为 37℃、培养基 pH 为 7、培养时间为 24h, 葡萄糖浓度分别为 4%、

6%和8%,其结果如表2。结果显示葡萄糖浓度为8%的抑菌直径最大。

表1 培养温度对无细胞发酵上清液抑菌作用的影响

Table 1 Effect of culture temperature on antibacterial activity by fermented supernatant fluid

培养温度 (°C)	三次平行实验抑菌直径 (cm)			$\bar{d} = \bar{X} \pm SD$ (cm)
35	1.210	1.231	1.243	1.228 ± 0.017*
37	1.156	1.173	1.162	1.164 ± 0.009
39	1.132	1.121	1.127	1.127 ± 0.006

注: $p < 0.05$ 以*标注表示统计学差异显著,表2~表3同。

表2 葡萄糖浓度对无细胞发酵上清液抑菌作用的影响

Table 2 Effect of glucose concentration on antibacterial activity by fermented supernatant fluid

葡萄糖浓度 (%)	三次平行实验抑菌直径 (cm)			$\bar{d} = \bar{X} \pm SD$ (cm)
4	1.174	1.182	1.172	1.176 ± 0.003
6	1.273	1.258	1.310	1.280 ± 0.027
8	1.310	1.297	1.345	1.317 ± 0.025*

2.3.3 培养基初始 pH 的选择 当培养基 pH 为可变因素,其他四个因素不变时,即培养温度为 37°C、葡萄糖浓度为 2%,培养时间为 24h,培养基初始 pH 分别为 5、7 和 9,其结果如表 3。结果显示,pH 为 9 与其他组相比统计学差异显著。

表3 培养基初始 pH 对无细胞发酵上清液抑菌作用的影响

Table 3 Effect of medium initial pH on antibacterial activity by fermented supernatant fluid

pH	三次平行实验抑菌直径 (cm)			$\bar{d} = \bar{X} \pm SD$ (cm)
5	1.124	1.117	1.104	1.115 ± 0.010
7	1.174	1.124	1.170	1.157 ± 0.025
9	1.184	1.244	1.318	1.249 ± 0.067*

2.2.4 培养时间的选择 当培养时间为可变因素,其他四因素不变,即培养温度为 37°C、葡萄糖浓度为 2%、培养基 pH 为 7,培养时间分别为 12、24 和 36h,其结果如表 4。结果显示,不同培养时间统计学差异不显著。

表4 培养时间对无细胞发酵上清液抑菌作用的影响

Table 4 Effect of culture time on antibacterial activity by fermented supernatant fluid

时间 (h)	三次平行实验抑菌直径 (cm)			$\bar{d} = \bar{X} \pm SD$ (cm)
12	1.154	1.190	1.156	1.167 ± 0.020
24	1.304	1.226	1.224	1.251 ± 0.046
36	1.220	1.262	1.288	1.257 ± 0.034

2.2.5 正交实验结果与分析 采用正交实验对植物乳杆菌培养条件中的培养温度、葡萄糖浓度、培养基初始 pH、培养时间进行优化,找到其最佳组合,正交实验结果如表 5。

通过表 5 中各因素的极差 R 可以看出,影响抑菌直径的因素顺序为 A > C > B > D,抑菌直径处于最佳的培养条件为 A₁B₃C₂D₃。

由表 5 可知,因素 A、B、C 对植物乳杆菌抑菌直径结果影响较大,即培养温度、葡萄糖浓度、培养基初始 pH 对植物乳杆菌抑菌直径结果影响较大,因素 D 对植物乳杆菌抑菌直径影响较小,即培养时间对

植物乳杆菌抑菌直径结果影响较小。

表5 植物乳酸杆菌发酵上清液的

抑菌活性正交优化实验结果

Table 5 Results of orthogonal optimization of antibacterial activity by fermented supernatant fluid from *Lactobacillus plantarum*

实验号	因素				实验指标 抑菌直径 (cm)
	A 培养 温度	B 葡萄糖 浓度	C 培养基 初始 pH	D 培养 时间	
1	1(35°C)	1(4%)	1(5)	1(12h)	1.182
2	1	2(6%)	2(7)	2(24h)	1.329
3	1	3(8%)	3(9)	3(36h)	1.440
4	2(37°C)	1	2	3	1.297
5	2	2	3	1	1.192
6	2	3	1	2	1.172
7	3(39°C)	1	3	2	1.045
8	3	2	1	3	0.906
9	3	3	2	1	1.243
K ₁	3.951	3.524	3.260	3.617	T = K ₁
K ₂	3.661	3.427	3.869	3.546	+ K ₂ + K ₃
K ₃	3.194	3.885	3.677	3.643	= 10.806
k ₁	1.317	1.175	1.087	1.206	
k ₂	1.220	1.142	1.290	1.182	
k ₃	1.069	1.285	1.226	1.214	
R	0.252	0.143	0.203	0.032	
影响程度	A > C > B > D				
最佳组合	A ₁ B ₃ C ₂ D ₃				

2.2.6 验证实验 由表 5 可知植物乳杆菌无细胞上清液抑菌活性的最佳培养条件(A₁B₃C₂D₃)与单因素方差分析得出的最佳培养条件(A₁B₃C₃D₃)并不一致,为了确定最佳的抑菌培养条件,将组合方案 A₁B₃C₂D₃ 与 A₁B₃C₃D₃ 同时进行验证,在 A₁B₃C₂D₃ 的培养条件下,抑菌直径为(1.451 ± 0.016) cm,高于 A₁B₃C₃D₃ 培养条件下抑菌直径(1.440 ± 0.005) cm。因此为了使植物乳杆菌发酵上清液对大肠杆菌有最佳的抑菌作用方面考虑,选择最佳的方案是 A₁B₃C₂D₃,即培养温度为 35°C,葡萄糖浓度为 8%,培养基 pH 为 7,培养时间为 36h。

3 结论与讨论

植物乳杆菌和保加利亚乳杆菌的无细胞发酵液上清液经琼脂扩散法分析抑菌活性分析结果表明,在相同的培养条件下,植物乳杆菌的无细胞发酵液上清液对 *E.coli* 具有抑菌作用,而保加利亚乳杆菌的无细胞发酵液上清液对 *E.coli* 没有抑菌作用。Matsusaki 等研究发现,葡萄糖最适合 Nisin Z 类乳酸菌素的生产^[11]。Mulders 的早期研究也表明葡萄糖最适合 *Streptococcin* AFF22 的生产^[12]。本研究发现 8% 的葡萄糖可以对无细胞发酵上清液抑菌作用显著提高,主要原因可能是葡萄糖有利于产生类细菌素,因此选 8% 的葡萄糖作为培养基的碳源。同时也发现葡萄糖为 6% 与 8% 的葡萄糖对无细胞发酵上清液抑菌作用无显著影响,说明葡萄糖的浓度和无细胞发酵上清液抑菌作用并不成正比例关系,主要原因可能是在 MRS 培养基中 8% 的葡萄糖已经出现了饱和现象,渗透压升高不利于植物乳杆菌的生长,自

然也就影响到了植物乳杆菌的代谢。

植物乳杆菌 R260 产细菌素活性随着 pH 的升高呈先上升后下降趋势, pH 为 6.5 时细菌素活性最高^[13]。本研究发现,培养基初始 pH 为 7 时,植物乳杆菌无细胞发酵上清液形成抑菌圈最大,说明培养基初始 pH 除了对植物乳杆菌产细菌素有影响之外,对其产类细菌素也有很大的影响,一般培养基初始 pH 过低或过高不利于菌体产类细菌素。

由表 1 可以得出,培养温度 35℃ 时植物乳杆菌作用最大,随着培养温度的升高,抑菌活性下降。植物乳杆菌最适生长温度是 37℃,但是最适生长温度只能说明该温度利于植物乳杆菌繁殖,不等于利于产类细菌素。类似的研究报道有 Delgado 等人研究发现 *Lactobacillus plantarum* 17.2b 在 32℃ 时菌体生长最快,使无细胞发酵上清液抑菌活性最高则出现在培养温度为 24℃^[14]。当然也有最适生长温度和最高无细胞发酵上清液抑菌活性出现在一个温度点的情况,如 *Lactobacillus brevis* OG1 在 30℃ 时最有利于产细菌素,同时该菌也处在最适生长温度^[15]。*Lactobacillus plantarum* BF001 在 37℃ 时无细胞发酵上清液抑菌活性最高,菌体也处在生长旺盛状态^[16]。

本研究在分析不同因素对植物乳杆菌生长影响时,选取培养温度、葡萄糖浓度、培养基 pH 和培养时间四个影响因素进行单因素的抑菌实验分析,得到了如下结论:最佳为培养温度为 35℃;最佳的葡萄糖浓度是 8%;培养基最佳 pH 为 9,培养时间对无细胞发酵上清液抑菌活性无明显影响。

正交优化方法最后确定能使植物乳杆菌无细胞发酵上清液发挥最大抑菌活性的培养条件是培养温度为 35℃、培养基 pH 为 7、葡萄糖浓度为 8%、培养时间为 36h 时,抑菌直径为 (1.451 ± 0.016) cm。

参考文献

[1] Daeschel M A. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives [J]. Food Technol, 1989, 43 (1): 164-171.

[2] Deegan L H, Cotter P C, Hill C, et al. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension [J]. International Dairy Journal, 2006, 16(9): 1058-1071.

[3] Virginia S O, Aida A P, Maria E N. Characterization of a bacteriocin-like substance produced by avaginal *Lactobacillus salivarius* strain [J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65 (12): 5631-5635.

[4] Brätz H, Sahl H G. New insights into the mechanism of action of lantibiotics-diverse biological effects by binding to the same

molecular target [J]. J Antimicrob Chemother, 2000, 46: 1-6.

[5] Heerklotz H, Wieprecht T, Seelig J. Membrane perturbation by the lipopeptide surfactin and detergents as studied by deuterium NMR [J]. J Phys Chem B, 2004, 108: 4909-4915.

[6] Blondelle S E, Lohner K, Aguilar M I. Lipid-induced conformation and lipid-binding properties of cytolytic and antimicrobial peptides: determination and biological specificity [J]. Biochim Biophys Acta, 1999, 1462: 89-108.

[7] Powell J E, Witthuhn R C, Todorov S D, et al. Characterization of bacteriocin ST8KF produced by a kefir isolate *Lactobacillus plantarum* ST8KF [J]. International Dairy Journal, 2007, 17: 190-198.

[8] Todorov S D, Nyati H, Meincken M, et al. Partial characterization of bacteriocin AMA-K, produced by *Lactobacillus plantarum* AMA-K isolated from naturally fermented milk from Zimbabwe [J]. Food Control, 2007, 18: 656-664.

[9] Collado M C, Gonzalez A, Gonzalez R, et al. Antimicrobial peptides are among the antagonistic metabolites produced by *Bifidobacterium* against *Helicobacter pylori* [J]. Int J Antimicrob Agents, 2005, 25: 385-391.

[10] Nieto-Lozano J C, Reguera-Useros J I, Peláez-Martínez M C, et al. Effect of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* against *Listeria monocytogenes* and *Clostridium perfringens* on Spanish raw meat [J]. Meat Science, 2006, 72: 57-61.

[11] Matsusaki H, Endo N, Sonomoto K, et al. Lantibiotic nisin Z fermentative production by *Lactococcus lactis* IO-1: relationship between production of the lantibiotic and lactate and cell growth [J]. Appl Microbiol Biot, 1996, 45(1): 36-40.

[12] Mulders J W, Boerrigter I J, Rollema H S, et al. Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant [J]. Eur J Biochem, 1991, 201(3): 581-584.

[13] 石金舟, 陈丽园, 张明. 植物乳杆菌 R260 产细菌素发酵条件的研究 [J]. 中国微生态学杂志, 2006, 18(5): 341-342.

[14] Delgado A, Arroyo López F N, Brito D, et al. Optimum bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* 17.2b requires absence of NaCl and apparently follows a mixed metabolite kinetics [J]. J Biotechnol, 2007, 130(2): 193-201.

[15] Ogunbanwo S T, Sanni A I, Onilude A A. Influence of cultural conditions on the production of bacteriocin by *Lactobacillus brevis* OG1 [J]. Afr J Biotechnol, 2003, 2(7): 179-184.

[16] Paynter M J, Brown K A, Hayasaka S S. Factors affecting the production of an antimicrobial agent plantaricin F, by *Lactobacillus plantarum* BF001 [J]. Lett Appl Microbiol, 1997, 24(3): 159-165.

因本刊已被《中国知网》(包括“中国知网”优先数字出版库)独家全文收录,所以所付稿酬中已包含该网站及光盘应付的稿酬。