

不同初始pH 对丙酸杆菌细菌素发酵的影响

马悦培,高红亮,常忠义,孙 帅,冯 略
(华东师范大学生命科学学院,上海 200062)

摘 要:薛氏丙酸杆菌在不同初始 pH 下摇瓶厌氧发酵,测定发酵液的 pH、生物量、还原糖、氨基氮及抑菌活性,探求不同初始 pH 对丙酸杆菌细菌素发酵的影响。将初始 pH 为 6.0,6.5,7.0,7.5,8.0 的培养基分批进行发酵,结果显示:丙酸杆菌在初始 pH 为 6.5 时,发酵第 2d 的生物量为 8.4mg/mL,与其他初始 pH 的差异极显著($P < 0.01$);以酵母菌和恶臭假单胞菌为指示菌,发酵产物细菌素的抑菌活性在第 7d 达到最大,初始 pH6.5 的抑菌活性分别为 19.203AU/mL 和 24.827AU/mL,与其他初始 pH 的差异均极显著($P < 0.01$),说明不同初始 pH 对丙酸杆菌细菌素发酵有很大的影响,其最适初始 pH 为 6.5。

关键词:薛氏丙酸杆菌,细菌素,初始 pH,发酵

Effect of different initial pH on the fermentation of *Propionibacterium shermanii*

MA Yue-pei, GAO Hong-liang, CHANG Zhong-yi, SUN Shuai, FENG Han

(School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract: The effects of different initial pH on the fermentation of *Propionibacterium shermanii* under anaerobic culture situation were studied in this paper. The best initial pH was searched by determining the pH, biomass, reducing sugar, amino nitrogen and inhibitory activity. *Propionibacterium shermanii* was cultured under initial pH6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 respectively. The result showed that the biomass of pH6.5 was 8.4mg/mL which was bigger than the other pH. Using *Saccharomyces.sp* and *Pseudomonas Putida* as indicator strains, the inhibitory activity of pH6.5 were 19.203AU/mL and 24.827AU/mL respectively, which were also the biggest of all initial pH. So the best initial pH of *Propionibacterium shermanii* fermentation was 6.5.

Key words: *Propionibacterium shermanii*; bacteriocin; initial pH; fermentation

中图分类号:TS201.3

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2010)05-0215-03

细菌素是由细菌代谢产生,对同种或近源种有特异性抑制杀菌作用的蛋白质或多肽。细菌素可抑制或杀死某些食物腐败菌,具有一定的热稳定性、无毒、无副作用、无残留、无抗药性,易被人体消化道的蛋白酶降解,在食品工业中作为天然食品防腐剂,具有广泛的应用前景^[1-2]。产细菌素的菌种较多,研究最透彻的是由乳酸菌产生的细菌素,现已分离出多种并对它们的性质进行了分析^[3-5],其中 Nisin 作为一种新型食品防腐剂已被多个国家批准使用。而丙酸杆菌发酵生产细菌素的报道很少,目前报道的仅有五种^[6-9]:即由特氏丙酸杆菌(*P.thoenii*) P127 产生的丙酸杆菌素 PLG-1;由詹氏丙酸杆菌(*P.thoenii*) P126 产生的丙酸杆菌素 *JenseniinG*;由特氏丙酸杆菌(*P.thoenii* 419 或 *P.thoenii* LMG 2792)产生的丙酸杆

菌素 T1;由詹氏丙酸杆菌(*P.jensenii*) DF1 产生的细菌素 SM1 和由詹氏丙酸杆菌(*P.jensenii*) B1264 产生的丙酸杆菌素。薛氏丙酸杆菌(*Propionibacterium shermanii*)最初是从乳制品中分离出来的,是乳酸丙酸杆菌中的一种,其生产的细菌素作为一种天然食品防腐剂,能够抑制革兰氏阴性菌及乳制品中的酵母和霉菌。已有研究表明,细菌素发酵的产量和效价与培养基 pH 密切相关。Coventry 等人发现^[10], Nisin 在较低的 pH 范围内具有活性, pH > 7.0 时几乎不溶解, pH6.4 时 23% 的 Nisin 失活;Liu W 等人发现^[11], Nisin 在 pH2 条件下比在 pH8 时活性高 228 倍;赵玲艳等人研究表明^[12],三种乳酸菌的细菌素粗提液,均在 pH5.0~6.0 之间达到最高的抑菌活性,随着 pH 的升高抑菌活性迅速下降。而不同初始 pH 对细菌素发酵及抑菌活性的影响尚未有人涉及,通过以薛氏丙酸杆菌为实验菌株,研究不同初始 pH 对发酵的影响,探究其发酵生产的最佳初始 pH,可为其发酵工艺的进一步优化控制提供实践依据。

收稿日期:2009-05-07

作者简介:马悦培(1983-),男,在读研究生,研究方向:丙酸杆菌细菌素发酵。

1 材料与方法

1.1 实验材料

薛氏丙酸杆菌 (*Propionibacterium shermanii*)、酵母菌 华东师范大学生命科学学院微生物学实验室分离并保存;恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) 上海疾病控制防疫中心提供;丙酸杆菌培养基 SLB 种子培养基^[9]:胰蛋白胨 10g,酵母提取物 10g,60% 乳酸钠 16.7mL, K_2HPO_4 0.25g, $MnSO_4$ 0.005g,加蒸馏水至 1000mL, pH7.0;发酵培养基^[13]:15g 乳酸钠和 5g 葡萄糖代替种子培养基中的乳酸钠作为碳源,其他成分不变;指示菌培养基 LB 培养基^[14]:蛋白胨 5.0g,牛肉膏 3.0,乳糖 5.0g,加蒸馏水至 1000mL, pH7.0;YPD 培养基^[15] 胰蛋白胨 20.0g,葡萄糖 20.0g,酵母粉 10.0g,加蒸馏水至 1000mL, pH5.3。

1.2 实验方法

1.2.1 丙酸杆菌厌氧发酵 10% 的酒石酸和 10% 的 NaOH 调节发酵培养基的初始 pH 为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0,分别按 10% 的接种量将活化的丙酸杆菌种子接种于发酵培养基中,30℃ 深层静置培养。

1.2.2 丙酸杆菌代谢物制备 每 24h 定时取样,5000r/min 离心 20min,取上清;测定 pH 后用 10% NaOH 调至 pH7.0,再用 10% 酒石酸调至 pH5.3,置于 4℃ 保藏。

1.2.3 pH 测定 用 PHS23C 精密酸度计测定。

1.2.4 生物量测定 取丙酸杆菌发酵液 10mL,10000r/min 离心 5min,沉淀用去离子水冲洗 3 次,105℃ 烘干至恒重后称其质量。

1.2.5 还原糖测定 DNS 法^[14]:取丙酸杆菌代谢物各 1.0mL,稀释 10 倍后分别加入 1.0mL 蒸馏水和 1.5mL DNS 试剂,在沸水浴中加热 5min 后立即用流动冷水冷却,再加入 21.5mL 蒸馏水,混匀后用分光光度计测 OD_{520nm} 值,并根据葡萄糖标准曲线计算出还原糖含量。

1.2.6 氨基氮测定 比色法^[16]:吸取 2mL 丙酸杆菌代谢物于 10mL 比色管中,分别加入 4mL 乙酸钠-乙酸缓冲溶液及 4mL 显色剂,用水稀释至刻度,混匀。置于 100℃ 水浴中加热 15min 取出,水浴冷却至室温后,移入 1cm 比色皿内,400nm 波长处测量吸光度,根据标准曲线计算氨基氮的含量。

1.2.7 丙酸杆菌素抑菌活性测定 临界稀释法^[17]:将丙酸杆菌代谢物用 SLB 培养基以 2n 倍稀释,指示菌株过夜培养后,用各自的液体培养基稀释至 $OD_{620nm} = 0.8$,再稀释 100 倍后,96 孔酶标板每孔中加 50 μ L 不同浓度的丙酸杆菌代谢物和 150 μ L 稀释的指示菌液,以 SLB 培养基为空白对照,30℃ 培养,24h 后于酶标仪上测定 OD_{620nm} 值将读数为对照值一半时的代谢物稀释倍数的倒数作为一个抑菌活性单位 (AU)。

1.2.8 统计分析 采用 SAS 8.1 统计软件对数据进行显著性分析。

2 结果与讨论

2.1 不同初始 pH 对发酵液 pH 的影响

如图 1 所示,pH 在发酵的第 1d 下降最快,分别从不同的初始 pH 降到 5.2 左右。发酵第 2~4d,各组

发酵液的 pH 降低趋于平缓,且变化趋势相似,此后 pH 稳定在 4.4 左右。

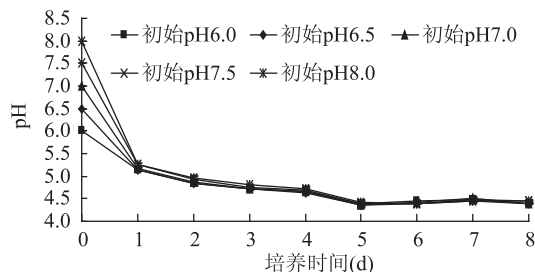


图1 薛氏丙酸杆菌不同 pH 发酵时 pH 的变化

2.2 不同初始 pH 对发酵液生物量的影响

如图 2 所示,各组发酵液中菌体生物量均在发酵开始前 2d 增长最快,在第 2d 达到峰值;第 3d 菌体生物量略有下降;发酵第 4~5d 菌体生物量大幅下降。发酵第 6~8d 菌体生物量稳定在一定范围内,下降趋势变缓。初始 pH 为 6.5 的发酵液,第 2d 产生的生物量最多,高达 8.4mg/mL,较其他初始 pH 发酵液产生的生物量有极显著差异 ($P < 0.01$)。对比发酵液中还原糖和氨基氮含量变化(图 3、图 4),发酵液中的还原糖和氨基氮在初期被大量消耗,发酵后期营养成分得不到有效补充,导致发酵后期生物量含量下降。

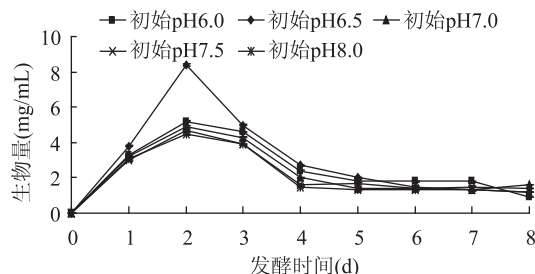


图2 薛氏丙酸杆菌不同 pH 发酵时生物量的变化

2.3 不同初始 pH 对发酵液还原糖的影响

各组发酵液中的还原糖在发酵开始的第 1~2d 由初始 26.5mg/mL 降至 7.5mg/mL 左右,发酵第 3~8d 中,还原糖消耗趋势变缓,各组均仅从 7.5mg/mL 降至 5.4mg/mL 左右(图 3),说明不同初始 pH 对碳源消耗影响很小。

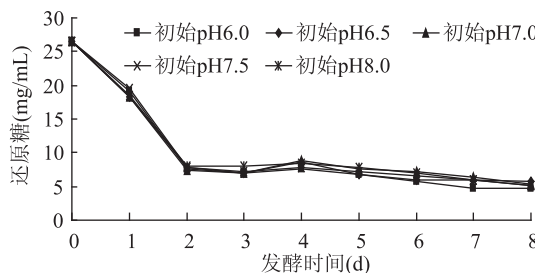


图3 薛氏丙酸杆菌不同初始 pH 发酵时还原糖的变化

2.4 不同初始 pH 对发酵液中氨基氮的影响

由图 4 可发现,各组发酵液中的氨基氮利用情况与碳源利用情况相似,均在发酵第 1~2d 中迅速被消耗,从初始的 0.078g/100mL 降至 0.025g/100mL 左右,发酵第 3~8d 氨基氮的消耗趋势变缓,各组均仅从 0.025g/100mL 降至 0.020g/100mL。不同初始 pH 对氮源消耗的影响也很小。

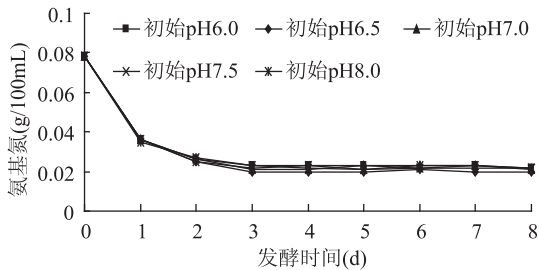


图4 薛氏丙酸杆菌不同初始 pH 发酵时氨基氮的变化

2.5 不同初始 pH 发酵的丙酸杆菌素对酵母菌的抑菌效价

不同初始 pH 发酵产生的丙酸杆菌素对酵母菌的抑菌效价在发酵第 6~7d 达到最大值(图 5)。初始 pH6.5 和 7.0 发酵产生的细菌素对酵母菌的抑菌效价明显高于其他初始 pH 的抑菌效价。初始 pH6.5 发酵产生的丙酸杆菌素在发酵第 7d 达到对酵母菌抑菌效价的最大值 19.203 AU/mL, 较其他各组有极显著差异 ($P < 0.01$)。

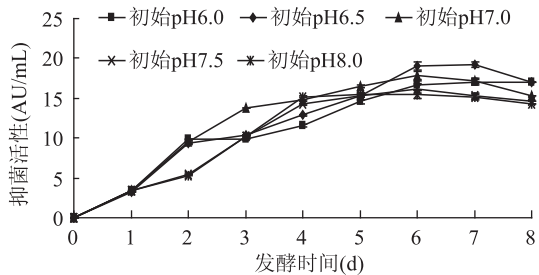


图5 薛氏丙酸杆菌不同初始 pH 发酵时对酵母菌抑菌效价的影响

2.6 丙酸杆菌素对恶臭假单胞菌的抑菌效价

如图 6, 不同初始 pH 发酵产生的丙酸杆菌素对恶臭假单胞菌的抑菌效价在整个发酵周期中均呈上升趋势, 并且在发酵第 7d 达到最大值。初始 pH6.5 发酵第 7d 产生的丙酸杆菌素对恶臭假单胞菌的抑菌效价与其他各组有极显著差异 ($P < 0.01$), 高达 24.827 AU/mL。

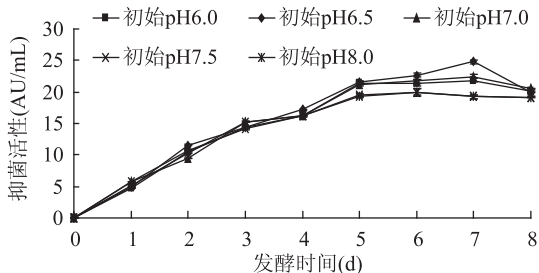


图6 薛氏丙酸杆菌不同初始 pH 发酵时对恶臭假单胞菌抑菌效价的影响

3 结论

丙酸杆菌在生长过程中产生乙酸、丙酸等多种有机酸, 发酵液 pH 是有机酸产生和消耗相互平衡的结果^[13], 因此不同初始 pH 对发酵过程中发酵液 pH 的影响有限; 不同初始 pH 对碳源和氮源的消耗影响也很小。但初始 pH 为 6.5 时, 发酵产生的菌体生物量在发酵第 2d 最高, 达 8.4 mg/mL, 远高于其他初始 pH; 且对酵母菌和恶臭假单胞菌的抑菌效价也均高

于其他实验组, 在发酵第 7d 达到最高值, 分别为 19.203 AU/mL 和 24.827 AU/mL。初始 pH 对薛氏丙酸杆菌发酵生产细菌素的影响主要体现在初期, 其最有利于菌体生长繁殖, 将初始 pH 设定为 6.5 对发酵过程是至关重要的。

参考文献

- [1] 梁新乐, 刘爱琴, 钟立人, 等. 丙酸杆菌的研究进展及其在食品发酵工业中的应用[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(6): 8-10.
- [2] 陈乐乐, 刘宁, 常忠义, 等. 丙酸杆菌代谢物益生因子的研究[J]. 营养健康, 2005, 26(5): 156-159.
- [3] Stiles M E, et al. Biopreservation by lactic acid bacteria[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 1996, 70: 331-345.
- [4] 田文利, 吴琼, 吕红线, 等. 乳酸链球菌素(Nisin)的研究进展[J]. 食品工业, 2000, 21(3): 28-30.
- [5] Stevens K A, Sheldon B W, Klapes N A, et al. Nisin treatment for inactivation of Salmonella species and other Gram-negative bacteria[J]. Appl Environ Microbiol, 1992, 57(3): 613-615.
- [6] Stiles M E, et al. Biopreservation by lactic acid bacteriocins[J]. Antonie Van Leewenhoek, 1996, 70: 331-345.
- [7] Helge H, Therese F, Dag A B, et al. Bacteriocins of propionic acid bacteria[J]. EPD Science, 2002, 10: 59-68.
- [8] Helge Holo, Therese Faye, Dag Anders Bredt, et al. Bacteriocins of propionic acid bacteria[J]. EPD Science, 2002, 10: 59-68.
- [9] 冯吟, 荣邵丰, 贾彩凤, 等. 丙酸杆菌代谢物对恶臭假单胞菌抑菌活性[J]. 兰州大学学报: 自然科学版, 2008, 44(2): 1-4.
- [10] Conventry M J, Muirhead, K Hickey, et al. Characterization of pediocin P02 and comparison with nisin for biopreservation of meat products[J]. Int J Food Microbiol, 1995, 26(2): 4-77.
- [11] Liu W T, Marsh T L, Cheng H, et al. Characterization of microbial diversity determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S RNA[J]. Appl Environ Microbiol, 1997, 63: 516-522.
- [12] 赵玲艳, 邓放明, 杨细平, 等. 细菌素的生物学特性及作为防腐剂在熟肉制品中的应用[J]. 中国食品添加剂, 2005(3): 74-77.
- [13] 陈玉梅, 常忠义, 王疆元, 等. 乳酸钠和葡萄糖对薛氏丙酸杆菌生长及代谢物抑菌活性的影响[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2007, 35(2): 178-182.
- [14] 刘坚真, 陈国寿, 李海波, 等. 国家标准测定食品细菌总数培养基的改进研究[J]. 微生物学通报, 2001, 28(2): 63-67.
- [15] 王弋博. 耐盐酵母菌株的选育[J]. 青海大学学报: 自然科学版, 2002, 20(6): 39-41.
- [16] 中华人民共和国卫生部中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009-2003 酱油卫生标准的分析方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [17] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术[M]. 第二版. 北京: 高等教育出版社, 2001: 11-31.