

文章编号:1673-1689(2006)06-0079-04

# 杆菌肽发酵的培养基优化及影响其检测的因素

雷波

(重庆师范大学 生命科学学院, 重庆 400047)

**摘要:** 通过对影响杆菌肽抑菌圈大小的各种因素的研究, 从而得到提高地衣芽孢杆菌发酵杆菌肽的产量及测量的最佳效果。研究结果表明豆芽汁培养基发酵的杆菌肽产量最高, 并且在豆芽汁中加糖量为 2 g/dL 时, 抑菌圈最大。管碟法测定时, 培养基的厚度影响最为显著, 下层厚度 10 mL, 上层 5 mL 最佳, 上层培养基的酸碱度为 7.0, 指示菌的浓度在  $10^8$  cfu/mL 时, 抑菌圈最清晰, 直径最大, 平均直径为 2.52 cm。

**关键词:** 杆菌肽; 抑菌圈; 培养基; 管碟法

**中图分类号:** R 978.16

**文献标识码:** A

## Culture Medium Optimization of Bacterian Fermentation and Influences its Factor Measured

LEI Bo

(College of Life Science, Chongqing Normal University, Chongqing 400047, China)

**Abstract:** In order to increase the production of bacterian, the optimum fermentation conditions were developed by the inhibition zone size. When bean sprout was used as nitrogen source, the biggest inhibition zone was observed, and this indicated that the highest output of bacterian. Furthermore, when 2 g/dL sucrose was supplemented to the fermentation medium, the inhibition zone size was biggest. By using cup-plate method, the influences of the thickness, pH value of culture medium and the designation cell density on the inhibition zone size were investigated. The optimum thickness of bottom and upper layer, pH was 10 mL, 5 mL, and 7, respectively. When the designation cell density was  $10^8$  cfu/mL, the diameter of inhibition zone was achieved at the biggest (2.52 cm).

**Key words:** bacterian; inhibition zone; culture medium; cup-plate method

杆菌肽标准品为类白色或淡黄色的粉末; 无臭, 味苦; 有吸湿性; 易被氧化剂破坏, 在溶液中能被多种重金属盐类沉淀。在水中易溶, 在乙醇中溶解, 在丙酮、氯仿或乙醚中不溶。对革兰氏阳性菌特别对金黄色葡萄球菌和链球菌属具杀菌作用。

由于杆菌肽局部外用刺激性小, 过敏反应少, 常用以治疗敏感菌引起的感染。杆菌肽锌还是很好的促生长类药物饲料添加剂, 并增强动物的抵抗能力<sup>[1]</sup>。测定杆菌肽效价的国际常用方法是管碟法, 是利用抗生素在特定实验菌的琼脂培养基内的扩

收稿日期: 2006-04-13; 修回日期: 2006-06-10.

基金项目: 重庆市微生物重点课程建设项目(重师大教通[2003]16号).

作者简介: 雷波(1977-), 男, 重庆市人, 现代生物教育与技术硕士研究生.

散作用,形成一定浓度的含抗生素的球型区,抑制了试验菌的繁殖而呈现出透明的抑菌圈,将已知效价的标准溶液和未知效价的供试品溶液在相同条件下进行培养,比较两者的抑菌圈的大小,利用各种不同的计算原理,就可以准确地测定出供试品的效价。虽然使用标准样品比较,但是由于各种因素的影响使得抑菌圈在相同剂量下偏小,不规则,那对低剂量的效价难于测定,使效价测定的误差更大,为此,作者通过对影响测定抑菌圈大小的各种因素进行比较试验及分析,得出产杆菌肽的优化培养基及效价测定的最佳条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 指示菌及发酵菌菌种来源** 指示菌:金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*; 发酵试验菌地衣芽孢杆菌 *B. licheniformis*;均由重庆师范大学应用微生物研究所提供。

### 1.1.2 培养基成分

1) 固体培养基。下层培养基:牛肉膏 3 g、蛋白胨 10 g、氯化钠 5 g、琼脂 20 g、水 1 000 mL、pH 7.2、121 °C/30 min 灭菌。上层培养基:牛肉膏 3 g、蛋白胨 10 g、氯化钠 5 g、琼脂 8 g、水 1 000 mL、pH 7.2、121 °C/30 min 灭菌。

2) 发酵培养基。豆芽汁培养基:豆芽 200 g、蔗糖 20 g、水 1 000 mL、pH 7.5。黄豆粉培养基:黄豆 40 g、玉米粉 15 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1 g、 $\text{CaCO}_3$  0.4 g、 $\text{MgSO}_4$  0.1 g、泛酸钙 1 g、 $\beta$ -丙氨酸 0.1 g、半胱氨酸 1 g、水 1 000 mL、pH 7.5。蛋白胨水培养基:牛肉膏 3 g、蛋白胨 10 g、氯化钠 5 g、琼脂 20 g、水 1 000 mL、pH 7.5。

**1.1.3 杆菌肽标准品** 美国 Sigma-Aldrich 公司产品。

**1.1.4 设备** 离心机,电子天平 JA-FA9 (FA1004A),多功能微生物自动测量仪 (ZY-300IV),高压灭菌锅,酸度计 pH S-2C,培养皿,牛津杯,振荡培养箱,生化培养箱 HSP-1500,细菌过滤器,Pipette 取液器。

### 1.2 方法

**1.2.1 杆菌肽的制备** 将地衣芽孢杆菌接种于装有 100 mL 豆芽汁培养液(经过初步筛选后,确定的一种培养基)中振荡培养,37 °C 发酵 48 h<sup>[2]</sup>,离心后用细菌过滤器除菌即得杆菌肽发酵液。

**1.2.2 指示菌的活化与菌悬液的制备** 将葡萄球菌接种于牛肉膏蛋白胨上,活化培养 24 h 后用 5

mL 无菌水将菌苔洗入到 95 mL 带玻璃珠的无菌水中,把指示菌制成  $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$ 、 $10^{10}$  cfu/mL 不同浓度的菌悬液。

**1.2.3 抑菌圈的测定** 采用上下层培养基的厚度不同,加入同一发酵液测定抑菌圈的大小;同时采用不同 pH 值的上层培养基,加入同一发酵液测定抑菌圈的大小;再采用不同浓度的指示菌,加入同一发酵液测定抑菌圈的大小。双碟法测定杆菌肽的影响因素的实验统一使用美国 Sigma-Aldrich 公司购得的杆菌肽标准品<sup>[3]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 培养基的优化

**2.1.1 培养基原料的影响** 地衣芽孢杆菌用不同的培养基发酵产生的杆菌肽的量不同,选用豆芽汁培养基,肉汤胰蛋白胨培养基,肉汤鱼蛋白胨培养基(此三种实验室常用),黄豆粉培养基(目前工业生产选用)进行对比研究,结果如图 1。

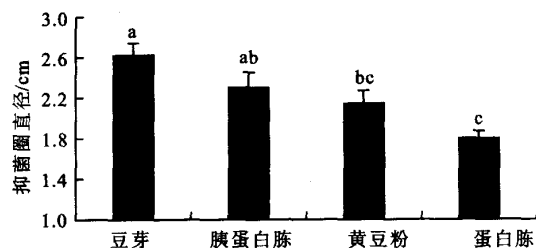


图1 不同成分培养基的影响

Fig.1 Effect of different culture medium on the inhibition zone size

从图 1 可知,豆芽汁培养基发酵的杆菌肽所得抑菌圈最大,与其他发酵液差异较显著,说明不同营养成分的培养基,发酵效果不同;通过对加复合盐与未加复合盐的豆芽汁培养基发酵比较,差异不明显,可见豆芽汁培养基营养十分丰富。从不同蛋白胨的肉汤培养基所产杆菌肽的量进行分析,说明不同 N 源对杆菌肽产量影响大。

**2.1.2 碳质量分数的影响** 配制豆芽汁培养基时,分别按 0%、1%、2%、3%、4%、5%、6% 的比例加入蔗糖,得到 7 种不同碳质量分数的豆芽汁培养基,结果如图 2。

图 2 可以看出,以加入质量分数 2% 蔗糖的豆芽汁培养基发酵后所得到的抑菌圈最大,除了与 3% 的差异不显著以外,与其他的比例都显著,原因是培养基中 C 源越高, N 源相对低,控制了菌数的增加,有利于杆菌肽的形成,但如果 C 源过高,杆菌肽的形成反而下降,可能是由于糖浓度过高,增加

了培养液的粘稠度,使发酵液溶解氧减少,并降低了菌体细胞膜的通透性,影响了菌的正常代谢,导致杆菌肽产量下降。

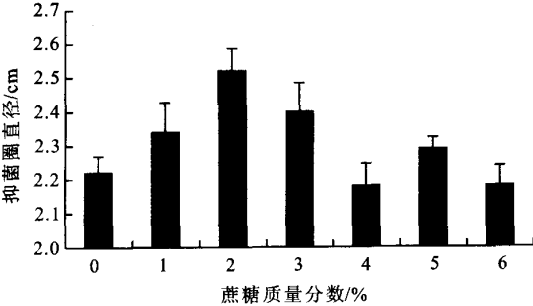


图 2 培养基中蔗糖质量分数的影响

Fig. 2 Effect of sucrose concentration on the inhibition zone size

2.2 双碟法测定杆菌肽的影响因素

2.2.1 培养基体积对抑菌圈的影响 下层 20 mL 不变,上层分别取 5.0、7.5、10.0、12.5、15.0 mL 与下层 10 mL 不变,上层分别取 5.0、7.5、10.0、12.5、15.0 mL 两种处理进行比较,其结果见图 3。

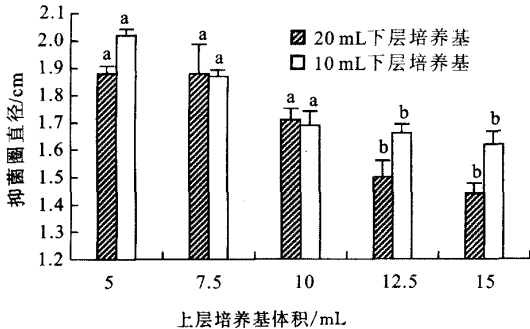


图 3 培养基体积对抑菌圈的影响

Fig. 3 Effect of culture medium thickness on the inhibition zone size

从图 3 可看出两种条件下都是上层量越少抑菌圈越大,上层量为 5 mL 的与 10 mL 后的差异显著。说明杆菌肽在牛津杯中的球形扩散过程中,上层培养基越薄,越有利于杆菌肽的横向扩散,以及培养基越薄,指示菌数相对更少一些,故而抑菌圈大。由于上层量为 5 mL 不容易铺满上层,并且冷却快,未铺平就凝固了,所以在添加上下层时最好将环境温度升高一些。所以可以根据情况,在不需要低计量效价测定时可选用上层 7.5 mL 到 10.0 mL。需要低计量效价测定时选用上层 5.0 mL。同时,下层为 10 mL 的普遍比下层 20 mL 效果好。考虑到节省材料和更好效果,下层的量以 10 mL 为好,既可起到支撑作用,又可节省药品。

2.2.2 上层培养基 pH 值对抑菌圈的影响 分别配制 pH 值为 6.5、7.0、7.5、8.0 共 4 种上层培养基,进行抑菌圈的大小测定试验,结果如图 4。

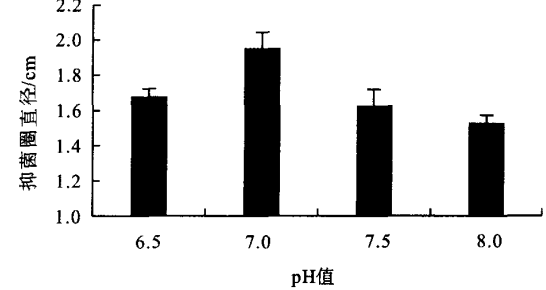


图 4 上层培养基的 pH 值对抑菌圈的影响

Fig. 4 Effect of pH value on the inhibition zone size

从图 4 可知,当上层培养基 pH 值为 7.0 时,抑菌圈的直径最大,并与 pH 6.5、pH 7.5、pH 8.0 差异显著。说明上层培养基的 pH 值对抑菌圈的直径有影响。这可能与该菌最适 pH 和杆菌肽的稳定性有关,因为该菌的生长条件中,最适生长 pH 值是 7.4。当 pH 值 7.0 时,既避开了该菌的最适生长 pH 值,又对杆菌肽的稳定性影响最小。

2.2.3 指示菌浓度对抑菌圈的影响 采用金黄色葡萄球菌作指示菌,把菌悬液分别稀释为  $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$ 、 $10^{10}$  cfu/mL 不同浓度的菌悬液,然后按照 1 mL/dL 分别加入到 100 mL 上层培养基中,实验结果如图 5。

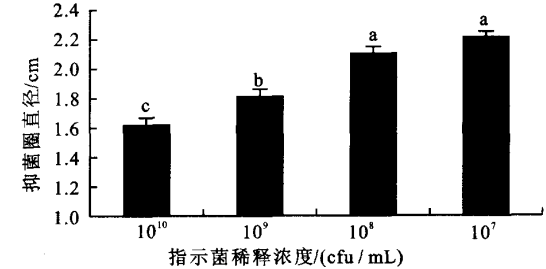


图 5 指示菌浓度的影响

Fig. 5 Effect of the designation germ density on the inhibition zone size

从图 5 可知,指示菌浓度的影响对抑菌圈的大小影响非常显著,浓度越高抑菌圈越小,当菌悬液稀释到  $10^{-2}$  和  $10^{-3}$  时抑菌圈直径较大,都与  $10^{-1}$  的差异显著,与原液差异极显著。但由于菌数  $10^{-3}$  太少,有的边缘已不太明显,并且它与稀释到  $10^{-2}$  的抑菌圈直径差异不明显,因此稀释到  $10^{-2}$  时(此浓度的菌悬液用平板活菌计数法计数得  $10^8$  cfu/mL),所得的抑菌圈效果最好。这可能是由于指示菌浓度过大,菌数太多,直接影响抑菌作用;而被抑制的菌数太少,抑菌圈边缘就不整齐,甚至显示不出来。

### 3 结 论

综上所述,通过对不同培养基发酵的杆菌肽产量的研究以及对影响杆菌肽测定中抑菌圈大小的因素研究,发现以豆芽汁培养基作发酵液效果较好,其加入蔗糖的量为2 g/dL时,达到最佳;管碟法

测定中,培养基的体积,酸碱度及指示菌浓度对抑菌圈的大小都有显著影响。其最佳条件是:培养基体积为下层10 mL,上层5~10 mL为宜;对于微量杆菌肽的测定,上层培养基用5 mL的薄层法最好;上层培养基的pH值为7.0;指示菌浓度为 $10^8$  cfu/mL。在上述条件下,发酵液抑菌圈的平均直径最大为2.52 cm。

### 参考文献:

- [1] Ravindran V, Thomas D. Performance and welfare of broilers as affected by stocking density and zinc bacitracin supplementation[J]. *Animal Science Journal*, 2006, 77(1): 110—116.
- [2] 胡尚勤. 整肠生菌发酵中杆菌肽高产的代谢调控[J]. 重庆师范大学学报: 自然科学版, 2004, 21(4): 46—48.
- [3] Jorgensen J H, Turnidge J D, Washington J A. Manual of Clinical Microbiology[M]. Washington D C: American Society for Microbiology, 1999.
- [4] Cotter G, Adley C. Comparison and evaluation of antimicrobial susceptibility testing of enterococci performed in accordance with six national committee standardized disk diffusion procedures[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, 39: 3753—3756.
- [5] Huys G, Haene K. Influence of the culture medium on antibiotic susceptibility testing of food-associated lactic acid bacteria with the agar overlay disc diffusion method[J]. *J Letters in Applied Microbiology*, 2002, 34(6): 402—406.
- [6] Gevers D, Huys G, Devlieghere F. Isolation and identification of tetracycline resistant lactic acid bacteria from pre-packed sliced meat products[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2000, 23: 279—284.
- [7] Okerman L, Croubels S. Inhibition tests for detection and presumptive identification of tetracyclines, beta-lactam antibiotics and quinolones in poultry meat[J]. *Food Additives & Contaminants*, 2001, 18(5): 385—393.
- [8] Müjdat A, Nese K, Recep K. Effects of dietary supplementation with organic acids and Zinc bacitracin on ideal microflora, pH and performance in broilers[J]. *Tr J of Veterinary and Animal Sciences*, 1999, 23: 451—455.
- [9] Andrews J M. The BSAC working party on susceptibility testing BSAC standardized disc susceptibility testing method[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2001, 48: 43—57.

(责任编辑: 朱 明)

(上接第44页)

### 参考文献:

- [1] 孔建, 马桂荣, 刘稳, 等. 益生菌生产菌——乳链球菌 SB900 的分离及生物特性研究[J]. 微生物学报, 1995, 35(6): 450—454.
- [2] Sarah Flynn, Douwe van Sinderen, Gerardine M, et al. Characterization of the genetic locus responsible for the production of ABP-118, a novel bacteriocin produced by the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* UCC118[J]. *Microbiology* 2002, 148, 973—984.
- [3] 周德庆. 微生物学教程[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002. 5, 151—152.
- [4] 宁正祥. 食品成分分析手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998.
- [5] 天津轻工业学院. 工业发酵分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1980.

(责任编辑: 杨 萌)