

文章编号:1673-1689(2006)06-0102-05

植物乳杆菌 HO-69 产抗菌肽的培养条件

杨颖, Dinesh THAPA, 陈卫*, 张灏, 汤坚

(江南大学 食品科学与安全教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘要: 对 *L. plantarum* HO-69 产抗菌肽的营养和培养条件进行了研究。实验结果表明, MRS 培养基是其产抗菌肽的最适培养体系。以碳源、氮源、缓冲盐等为研究因子, 对 MRS 设计部分因子重复实验, 采用回归分析确定 K_2HPO_4 和牛肉膏为抗菌肽产生的显著影响因子, 综合考虑抗菌肽活力与纯化的难度, 确定 K_2HPO_4 与牛肉膏的质量浓度分别为 12 g/L 与 16 g/L, 蛋白胨质量浓度为 6 g/L。响应面分析确定 HO-69 产抗菌肽的最适培养条件为: 起始 pH 值 6.61, 36.12℃ 发酵 13.87 h, 在此条件下发酵液的效价由 80 AU/mL 提高到 320 AU/mL, 抗菌肽的产量增加为原来的 4 倍。

关键词: 植物乳杆菌; 抗菌肽; 培养条件; 回归分析; 响应面分析

中图分类号: TS 201.3

文献标识码: A

Study on Bacteriocin Production Condition of *Lactobacillus Plantarum* HO-69

YANG Ying, Dinesh THAPA, CHEN Wei*, ZHANG Hao, TANG Jian

(Key Laboratory of Food Science and Safety, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The culture conditions of *Lactobacillus plantarum* HO-69 producing antipeptide were studied. MRS broth was the suitable media. Influence of carbon, nitrogen source and buffer on antipeptide production was evaluated using a fractional factorial design. Regression analysis showed that dipotassium hydrogen phosphate and beef extract plays key role on antipeptide production. The optimal concentrations of K_2HPO_4 , beef extract and peptone were 12 g/L, 16 g/L and 6 g/L, respectively. The optimum fermentation parameters from Response Surface Methodological experiment were: 13.87 h fermentation time, culture temperature of 36.12℃ and an initial pH of 6.61. The optimized medium and fermentation condition allowed antipeptide production to be increased from 80 AU/mL to 320 AU/mL, yield 400% times of original conditions.

Key words: *Lactobacillus plantarum*; antipeptide; culture condition; regression analysis; response surface methodology

乳杆菌是应用广泛的益生菌, 通过产生有机酸、过氧化氢^[1]、双乙酰、细菌素^[2-3]等抑菌物质调

节宿主肠道^[4]、阴道^[5]、尿道^[6]的菌群平衡, 预防和治疗由于微生态失衡而造成的腹泻、感染。乳杆菌

收稿日期: 2006-03-25; 修回日期: 2006-05-30.

基金项目: 江苏省高新技术研究计划项目(BG2004322).

作者简介: 杨颖(1978-), 女, 山东潍坊人, 工学博士; * 为通讯作者.

产生的活性物质细菌素,大部分属于抗菌肽范畴,是公认具有开发价值的天然生物制剂。由于产酸、耐酸特性,口腔中乳杆菌的应用研究还较少。植物乳杆菌 HO-69(*L. plantarum* HO-69)是作者从健康成年人口腔中筛选出来的,其产生的抗菌肽对变形链球菌等革兰氏阳性菌、大肠杆菌等革兰氏阴性菌具有抑制作用。文中通过回归分析、响应面分析等,分析菌株生长和产抗菌肽的主要影响因子,确定了 *L. plantarum* HO-69 产抗菌肽的最适营养和生长条件。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌种 实验菌:*L. plantarum* HO-69,分离自健康宿主口腔。指示菌:变形链球菌血清型 G,购买于中国生物制品检定所。

1.1.2 培养基 MRS、APT、CM、ELB、SM 液体培养基^[7]。

1.2 实验方法

1.2.1 抑菌效果测定 *L. plantarum* HO-69 的发酵上清液以 1 mol/L 的 NaOH 调节 pH 值为 5.5,以 0.22 μm 的微孔滤膜过滤除菌,相同 pH 的 MRS 液体培养基为对照。采用双层杯碟法检测抑菌活力,标准培养皿中倾倒混合指示菌的 SM 培养基 10 mL,确保每个培养皿中混菌培养基的厚度均一,牛津杯加液量 100 μL ,厌氧培养 24 h 后观察抑菌效果,测量抑菌圈直径,进行 6 次平行实验取平均值。以 2 倍稀释法确定优化前后发酵液的效价。以培养基为稀释剂对样品进行 2 倍稀释,定量取样,以双层杯碟法进行抑菌实验,观察不到抑菌圈出现的最低浓度定义为一个活力单位(AU),此时的稀释倍数即是最大稀释倍数,抑菌物质效价(AU/mL)=最大稀释倍数 $\times$ 10。

1.2.2 最适培养体系选择 *L. plantarum* HO-69 分别接种到 MRS、APT、CM 与 ELB 液体管中,37 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 18 h,测定发酵液的 OD₆₀₀ 与上清液的抑菌活性。

1.2.3 培养基营养条件的优化 微生物的生长和代谢产物的积累受培养基组分如碳源、氮源、无机盐、生长因子等多种因素的影响。在多因子起作用的复杂体系中,快速找到主要影响因子并进行优化是关键。多因子实验设计的常规方法是每次改变一个因子进行单因素实验,但此方法实验次数多,对于具有交互作用的多因子实验可能导出错误的结论^[8-9]。部分重复因子实验在不丢掉主要信息的

前提下,能够大大减少实验次数,估计主要影响因子以及部分交互作用^[9]。回归分析是统计技术的统称,其用于培养基发酵可以快速、准确地从众多成分中找出主要影响因子,并标识正、负影响,根据实验拟合的回归方程能有效地确定爬坡路径,逼近最大响应区域。这方面的报道国内还较少。

1.2.4 最适培养条件的选择 采用响应面分析,设计 3 因素 3 水平的响应面分析试验,确定 *L. plantarum* HO-69 产生抗菌肽的培养条件。采用国际常用的统计软件 SAS 对实验数据进行分析,采用 Matlab 绘制响应面图形。

2 结果与讨论

2.1 最适培养体系

培养基的组分对于抗菌肽的产生具有很大的影响^[10]。以往的培养基优化,多数只是从碳源、氮源、生长因子方面考虑,进行单因素试验,没有综合考虑各因素之间的交叉影响,首先选定一个合适的培养体系。试验中将 *L. plantarum* HO-69 分别接种在 MRS、APT、CM 以及 ELB 培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 18 h,测定 OD₆₀₀ 和发酵液效价。试验结果如图 1 所示。

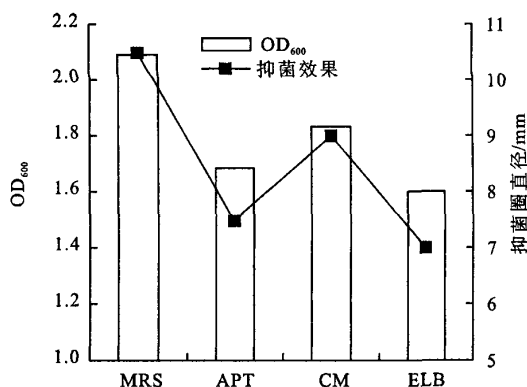


图1 *L. plantarum* HO-69 在不同的培养基中的生长和产抗菌肽情况

Fig. 1 The growth and antipeptide production of *L. plantarum* HO-69 in different media

由图 1 可见,菌株在 MRS 培养基中 OD 值最高,发酵液的抑菌效果也最强。在 CM 培养基中的情况次之。其原因可能是 MRS 培养基葡萄糖浓度高,且有机氮源种类多,包括蛋白胨、牛肉膏与酵母粉,与多数文献报道有机复合氮源有利于抗菌肽的产生^[11-13] 相符合。而 CM 培养基中含有较高浓度的 K_2HPO_4 ,具有一定的缓冲作用,有利于抗菌肽的产生。ELB 培养基中虽然菌体生长较好,但其抑菌活力却很弱,可能是其虽然含有大量的胰酶,碳

源种类也比较多,但有机氮源种类没有 MRS 多,缓冲盐的含量也比较低。选择 MRS 培养基为 *L. plantarum* 的培养体系。

2.2 培养基营养条件的优化

2.2.1 主要影响因子的选择 MRS 培养基一共有 10 个组分,如果对所有组分进行分析,可能事倍功半。选取质量浓度大于 2 g/L 的蛋白胨、牛肉膏、酵母浸膏、葡萄糖、 K_2HPO_4 和 CH_3COONa 6 个主要组分,进行部分因子重复实验,能够在减少工作量的前提下最大程度地反映培养基组分对菌株生长和抗菌肽产生的影响。部分因子重复实验需要 16 次,在中心点增加 4 次实验(由于预试验中发现 K_2HPO_4 的含量对于抗菌肽的活力具有较多的影响,将其中心值设定为 4 g/L,以便于试验设计),共进行 20 次实验。HO-69 的接种量为 1%,37 ℃ 静置培养 18 h,实验设计^[9,14]及结果见表 1。不同的培养条件下菌体生长和抗菌肽的活力变化很大,OD₆₀₀ 从 1.301 到 2.798 不等,抑菌圈直径从 6.50 mm 到 16.33 mm 不等。 K_2HPO_4 对菌体生长和抗菌肽的活力都有很大的影响。部分因子重复实验的回归分析结果见表 2。

对 OD₆₀₀ 的回归分析结果表明,除去 CH_3COONa 外,6 个因子皆为正影响,其中 K_2HPO_4 与酵母粉的影响显著。而对抑菌活力回归分析的结果则表明,葡萄糖、酵母粉、 K_2HPO_4 、牛肉膏 4 个因素为正影响,而蛋白胨与乙酸钠为负影响,其中 K_2HPO_4 与牛肉膏是高度显著的正影响因子,说明最适合抗菌肽积累的因子的质量浓度还可增加。菌体与抗菌肽的回归方程分别表示为:

$$Y_{OD}=0.913\ 1+0.008\ 5x_1+0.001\ 5x_2+0.022\ 8x_3+0.022\ 8x_4+0.008\ 7x_5-0.010\ 7x_6$$
$$Y=3.460\ 4+0.069\ 1x_1-0.113\ 9x_2+0.072\ 2x_3+1.524\ 8x_4+0.201\ 4x_5-0.194\ 7x_6$$

由此可见,对于 *L. plantarum* HO-69 而言,抗菌肽的积累与菌体的生长并不完全同步。以下研究采用抑菌活力为优化指标。

表 1 部分重复因子实验设计与结果

Tab. 1 Fractional Factorial experiments design

标号	影响因子质量浓度/(g/L)						OD ₆₀₀	抑菌圈直径/mm
	<i>x</i> ₁	<i>x</i> ₂	<i>x</i> ₃	<i>x</i> ₄	<i>x</i> ₅	<i>x</i> ₆		
1	15	5	2.5	2	5	2.5	1.301	8.17
2	25	5	2.5	2	15	7.5	1.495	9.33
3	15	15	2.5	2	15	2.5	1.413	8.00
4	25	15	2.5	2	5	7.5	1.402	7.00
5	15	5	7.5	2	15	7.5	1.625	10.17
6	25	5	7.5	2	5	2.5	1.581	10.00
7	15	15	7.5	2	5	7.5	1.826	6.50
8	25	15	7.5	2	15	2.5	1.976	10.50
9	15	5	2.5	6	5	7.5	2.181	12.00
10	25	5	2.5	6	15	2.5	2.240	16.33
11	15	15	2.5	6	15	7.5	2.020	14.67
12	25	15	2.5	6	5	2.5	2.409	13.17
13	15	5	7.5	6	15	2.5	2.798	16.00
14	25	5	7.5	6	5	7.5	2.622	15.00
15	15	15	7.5	6	5	2.5	2.398	14.17
16	25	15	7.5	6	15	7.5	2.682	15.50
17	20	10	5	4	10	5	2.202	10.17
18	20	10	5	4	10	5	2.165	9.33
19	20	10	5	4	10	5	2.172	9.67
20	20	10	5	4	10	5	2.253	10.00

注:*x*₁为葡萄糖质量浓度,*x*₂为蛋白胨质量浓度,*x*₃为酵母粉质量浓度,*x*₄为 K_2HPO_4 质量浓度,*x*₅为牛肉膏质量浓度,*x*₆为 CH_3COONa 质量浓度,上清液测定抑菌圈。

表 2 部分重复因子实验对菌体生长和抑菌活性的回归分析结果

Tab. 2 Fractional Factorial regression analysis for antipeptide and OD₆₀₀

变量	OD ₆₀₀ 回归分析				抑菌效果回归分析			
	参数估计	标准误差	<i>t</i> 值	<i>Pr</i> > <i>t</i>	参数估计	标准误差	<i>t</i> 值	<i>Pr</i> > <i>t</i>
截距	0.913 1	0.379 0	2.41	0.031 5	3.460 4	1.714 0	2.02	0.064 6
<i>x</i> ₁	0.008 5	0.013 9	0.61	0.552 2	0.069 1	0.062 8	1.10	0.291 5
<i>x</i> ₂	0.001 5	0.013 9	0.10	0.918 3	-0.113 9	0.062 8	-1.81	0.092 9
<i>x</i> ₃	0.022 8	0.015 0	2.50	0.023 0	0.072 2	0.068 0	1.06	0.307 3
<i>x</i> ₄	0.022 8	0.034 7	6.21	<0.000 1	1.524 8	0.157 1	9.71	<0.000 1
<i>x</i> ₅	0.008 7	0.013 9	0.63	0.542 1	0.201 4	0.062 8	3.21	0.006 9
<i>x</i> ₆	-0.010 7	0.027 8	-0.39	0.705 2	-0.194 9	0.125 6	-1.55	0.144 9
综合	<i>F</i> =6.95		<i>Pr</i> > <i>F</i> 0.001 8		<i>F</i> =18.95		<i>Pr</i> > <i>F</i> <0.000 1	

注:*x*₁为葡萄糖质量浓度,*x*₂为蛋白胨质量浓度,*x*₃为酵母粉质量浓度,*x*₄为 K_2HPO_4 质量浓度,*x*₅为牛肉膏质量浓度,*x*₆为 CH_3COONa 质量浓度。

2.2.2 主要影响因子含量的确定 对于抗菌肽积累的回归分析表明,K₂HPO₄与牛肉膏是高度显著的正影响因子,为寻求抗菌肽积累的较佳组合,逐步增加两者的含量,所得发酵上清液测定抑菌活力,实验设计和结果见表 3。

表 3 K₂HPO₄与牛肉膏的质量浓度对抑菌活性的影响
Tab. 3 Effects of K₂HPO₄ and beef extract concentration on antipeptide

标号	质量浓度/(g/L)		抑菌圈直径/ mm	预测值/ mm
	<i>x</i> ₄	<i>x</i> ₅		
1	6	11.5	13.17	13.39
2	8	13.0	16.33	16.75
3	10	14.5	19.33	20.10
4	12	16.0	21.67	23.45
5	14	17.5	22.33	26.89
6	16	19.0	23.17	30.15

注:*x*₄为 K₂HPO₄质量浓度,*x*₅为牛肉膏质量浓度,上清液直接测定抑菌圈。

由表 3 可知,K₂HPO₄与牛肉膏的质量浓度逐渐增加,抑菌活性逐渐增强,当 K₂HPO₄的质量浓度增加为 12 g/L,牛肉膏的质量浓度增加为 16 g/L 时,抑菌圈直径达到 21.67 mm,之后随着两者质量浓度增加,抑菌圈直径增加缓慢。考虑到生产成本,且氮源含量过高,会为后续的分离纯化带来麻烦,因此 K₂HPO₄与牛肉膏的质量浓度分别为 12 g/L 与 16 g/L 为较佳组合。随着两者质量浓度增加,实际测量值与预测值差值逐渐增大,说明该方程不适合 K₂HPO₄与牛肉膏的质量浓度过高的情况。

2.3 响应面分析最适作用条件

确定发酵条件的常规方式是进行单因素实验,但不能很好地反映各条件之间的交互作用,而响应面分析包含实验设计、建模、因子效应评估,以及最佳操作条件的选择,能够反映多个工艺条件之间的协同作用,可以寻求多因素作用的最优工艺参数,目前在生物技术领域应用较广,但在优化抗菌肽培养条件方面还较少。试验中研究了起始 pH、培养温度与发酵时间 3 个主要因素^[15]对抗菌肽积累的影响,试验设计与结果见表 4。

对表 4 中的数据进行响应面分析,得到关于抗菌肽的三元二次方程:

$$Y = -600.614 0 + 5.076 4x_1 + 23.821 8x_2 + 46.270 8x_3 - 0.178 2x_1x_1 - 0.0416 7x_2x_1 - 0.317 1x_2x_2 + 0.208 3x_3x_1 - 0.041 7x_3x_2 - 3.604 2x_3x_3$$

表 4 响应面分析试验设计与结果
Tab. 4 Response Surface Methodology(RSM) design

标号	因 素			抑菌圈 直径/ mm
	<i>x</i> ₁ 时间/h	<i>x</i> ₂ 温度/℃	<i>x</i> ₃ 起始 pH	
1	12	34	6.5	16.33
2	12	40	6.5	14.67
3	18	34	6.5	14.00
4	18	40	6.5	10.67
5	15	34	5.5	13.17
6	15	34	7.5	14.50
7	15	40	5.5	9.67
8	15	40	7.5	10.50
9	12	37	5.5	13.50
10	18	37	5.5	10.17
11	12	37	7.5	15.17
12	18	37	7.5	14.00
13	15	37	6.5	17.83
14	15	37	6.5	18.00
15	15	37	6.5	18.17

注:发酵液进行两次二倍稀释后测定抑菌圈。

SAS 分析结果表明,模型的 R² 等于 0.981 8, *Pr* > *F* 为 0.000 8, *F* 值为 30.05,因此方程显著,在本次试验的因素水平范围内,方程能够反映抗菌肽的变化,为抗菌肽发酵提供了合适的模型。此方程所对应的抛物线开口向下,有最大值点。分析表明 *L. plantarum* HO-69 的最适培养条件为发酵时间 13.87 h、培养温度 36.12 ℃、起始 pH 6.61,此时抑菌圈直径为 18.89 mm。图 2 是通过 Matlab 绘出的温度与时间对应的三维拟合面与等高线,证实响应面分析具有最大值。

为证实预测结果,在上述试验条件点进行 3 次重复试验,实际测量值的平均值为 18.17 mm,能够较好地拟合所得模型。

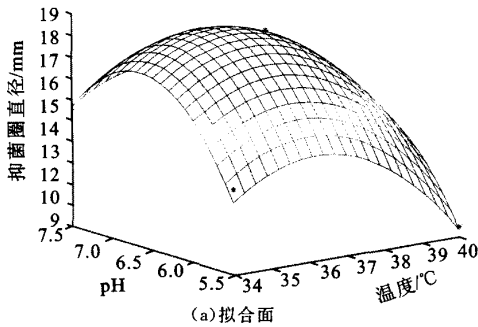
以 2 倍稀释法测定优化前后发酵液的效价,其效价分别为 80 AU/mL 与 320 AU/mL,说明通过优化营养条件与发酵条件,抗菌肽的活力得到了很大的提高,本实验所采用的优化方案设计合理,所得培养条件适合抗菌肽的积累。

3 结 论

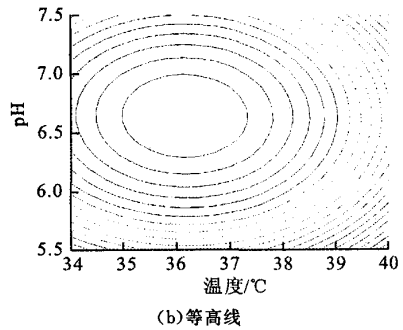
L. plantarum HO-69 在 MRS 培养基中生长情况最好,发酵液的抑菌活力也最强,其原因可能是 MRS 培养基中葡萄糖质量浓度高,有机氮源种

类多,有利于肽类物质的生成与积累。选择 MRS 为基础培养体系。

对 MRS 的主要成分进行部分因子重复实验,回归分析的结果表明抗菌肽的积累与菌体的生长并不完全同步, K_2HPO_4 与牛肉膏是抗菌肽产生的高度显著正影响因子,合适的质量浓度分别为 12 g/L 与 16 g/L,蛋白胨为负影响因子,适合质量浓度为 6 g/L。



(a)拟合面



(b)等高线

图2 温度与时间对应的三维拟合面与等高线

Fig. 2 Response surface of temperature and fermentation time

研究培养基起始 pH 值、培养温度与发酵时间对抗菌肽产生的影响,响应面分析确定抗菌肽产生的最适培养条件为 13.87 h、36.12℃、起始 pH 值 6.61,此时抑菌圈实际测量值的平均值为 18.17 mm,与模型预测值 18.89 mm 接近。

经过营养条件与发酵条件的优化,发酵液的效价从 80 AU/mL 提高到 320 AU/mL。

参考文献:

- [1] McGroarty J A, Tomeezek L, Pond D G, et al. Hydrogen peroxide production by lactobacillus species; correlation with susceptibility to the spermicidal compound Nanoxynol-9[J]. *Journal of Infectious Disease*, 1992(165):1142—1144.
- [2] Kanatani K, Oshimura M, Sano K. Isolation and characterization of acidocin A and cloning of the antipeptide gene from *Lactobacillus acidophilus*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995(61):1061—1067.
- [3] Van Reenen C A, Dicks L M T, Chikindas M L. Isolation, purification and Partial characterization of plantaricin 423, a antipeptide produced by *Lactobacillus plantarum*[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 1998 (84): 1131—1137.
- [4] Tannock G W. The microecology of lactobacilli inhabiting the gastrointestinal tract[J]. *Advances in Microbial Ecology*, 1990(11): 147—171.
- [5] Andreu A, Stapleton A E, Fennell C J, et al. Hemagglutination, adherence and surface properties of vaginal lactobacillus species[J]. *Journal of Infectious Disease*, 1995(171):1234—1237.
- [6] Nader-Macias M E, Siliva-Ruiz C, Lopez-Bocanera M E, et al. Behaviour of lactobacilli on prevention and therapeutic effects on urinary tract infections (UTI) in mice[J]. *Aerobe*, 1996 (2): 85—93.
- [7] 杨洁彬,郭兴华. 乳酸菌-生物学基础及应用[M]. 北京:中国轻工业出版社,1996: 78—81.
- [8] Box G E P, Hunter W G, Hunter J S. Statistics for experimenters; an introduction to design, data, analysis, and model building[M]. New York: Wiley, 1978.
- [9] 李露,白景华. 抗菌肽发酵培养基的优化及动力学分析[J]. 生物工程学报, 2001, 17(2): 187—192.
- [10] Tagg J R, Dajani A S, Wannamaker L W. Antipeptide of Gram-positive bacteria[J]. *Bacteriologic Review*, 1976(40): 722—756.
- [11] 张秀明,张文生. 培养条件对乳酸乳球菌 N302 合成乳酸链球菌素等影响[J]. 南开大学学报:自然科学版, 2005, 38(3): 88—92.
- [12] 吕燕妮,李平兰. 戊糖乳杆菌 31-1 菌株产抗菌肽发酵条件的优化[J]. 微生物学通报, 2005, 32(3): 13—19.
- [13] Yang R, Ray B. Factors influencing production of antipeptides by lactic acid bacteria[J]. *Food Microbiol*, 1994(11):281—291.
- [14] DeoSouza M C, Roberto I C, Milagres A M F. Solid-state fermentation for xylanase production by *thermoascus aurantiacus* using response surface methodology[J]. *Applied Microbiol Biotechnol*, 1999(52):768—772.
- [15] Vera Carolissen-Mackay, Gottlieb Arends, John W Hastings. Purification of antipeptide of lactic acid bacteria: problems and points[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 1997(34):1—16.

(责任编辑:秦和平,李春丽)