

文章编号:1673-1689(2007)05-0110-06

海洋细菌 Bn-103 产抑菌物质发酵条件 及部分理化性质

张超, 祖国仁, 孔繁东, 刘阳

(大连轻工业学院 生物与食品工程学院, 辽宁 大连 116034)

摘要: 对从海泥中分离到的一株海洋细菌 Bn-103 产抑菌物质的培养基、发酵条件及所产抑菌物质的热稳定性、pH 值稳定性进行了初步研究。结果表明, 海洋细菌 Bn-103 适宜培养基成分组合为: 葡萄糖 1 g/dL, 蛋白胨 0.1~0.3 g/dL, 酵母膏 0.1 g/dL, 海水添加量 60%~80%; 培养基初始 pH 5.0~7.0; 接种体积分数 2%~4%; 发酵时间 48~72 h; 抑菌物质 80 °C 处理 90 min, 保留活性 80% 以上, pH 值稳定在 pH 3~8 之间。

关键词: 海洋细菌; 抑菌物质; 发酵条件

中图分类号: TQ 920.1

文献标识码: A

Study on The Fermentation Conditions and Characteristics of Antibacterial Substance Produced by a Marine Bacteria Bn-103

ZHANG Chao, ZU Guo-ren, KONG Fan-dong, LIU Yang

(School of Biological and Food Engineering, Dalian Institute of Light Industry, Dalian 116034, China)

Abstract: The manuscript investigated the culture medium and fermentation conditions on the antibacterial substance produced strain Bn-103 which was isolated from oozed sea water. Its stability to the pH and temperature were also investigated. The result showed that the optimum medium for strain Bn-103 was: 1 % glucose, 0.1~0.3 g/L peptone, 0.1 g/L yeast extract, 60~80% sea water. The best pH was 5.0~7.0 the inoculate ratio was 2%~4%, fermentation time was 48~72 h. The antibacterial substance was treated under 80 for 90 min, the activity remained up to 80%, it is stable between the pH 3 to 8.

Key words: marine bacteria; antibacterial substance; fermentation condition

微生物是自然界中生物的一大类群, 与人类生活密切相关。一些具有抑菌生物活性的物质, 如乳酸菌细菌素、杆菌肽等, 可以杀死或抑制食物中一

些腐烂菌和病原菌, 在食品的防腐保鲜方面起重要作用^[1-2]。近几年来, 研究者逐渐将目光转移到海洋微生物。由于独特的生存环境及海洋生物物种间

收稿日期: 2007-01-06.

作者简介: 张超(1981-), 男, 山西栖霞人, 生物活性物质硕士研究生. Email: superman19811106@sohu.com

通讯作者: 祖国仁(1963-), 男, 吉林四平人, 副教授, 工学硕士, 主要从事微生物活性物质方面的研究.

Email: rgz321@163.com

的生态作用远比陆生物种复杂和广泛^[3],因此,赋予海洋生物的活性远比陆生生物要强,尤其重要的是这些物质化学结构丰富多样,许多分子结构新颖独特,是陆生生物所不具有的^[4]。丰富的海洋生物资源无疑是天然药物筛选的重要来源。从天然产物中寻找新的抗肿瘤活性物质已成为抗癌新药开发的研究热点。据估计,目前只有不足 5% 的海洋微生物可以鉴定,已发现的活性物质只占总数的 1%。因此,海洋微生物资源的研究开发和应用越来越受到世界各国特别是沿海国家的重视^[5-8]。作者报导一株海洋细菌 Bn-103 产抑菌物质的发酵条件及其部分理化性质。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株 海洋细菌 Bn-103:从大连黑石礁海域海泥中分离得到;指示菌:藤黄八叠球菌(*Sarcina lutea*),大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*);由大连轻工业学院生物与食品工程学院微生物教研室保藏。

1.1.2 培养基

- 1) 指示菌培养基:牛肉膏蛋白胨培养基^[9]。
- 2) 发酵培养基:葡萄糖 10 g,蛋白胨 2 g,酵母膏 1 g,海水 600 mL,蒸馏水 400 mL^[10]。
- 3) 种子培养基:同发酵培养基。
- 4) 试管斜面培养基:发酵培养基加 2 g/dL 琼脂。

1.1.3 仪器 YXQ-SG46-280SA 手提式高压消毒器:上海市医疗仪器厂制造;ZHWY-2102C 空气恒温振荡器:上海智城分析仪器制造有限公司制造;TGL-16G 高速离心机:上海安亭科学仪器厂制造;HH-6 型恒温水浴锅:江苏金坛市中大仪器厂制造;牛津杯等。

1.2 实验方法

1.2.1 抑菌试验—管碟法 将指示菌培养基 20 mL 倒入灭菌的平皿,凝固后,滴入 0.1 mL 指示菌菌液(指示菌体浓度 2.5×10^9 cfu/mL,稀释倍数 10^{-3}),用三角刮刀涂匀后,于培养皿中放入无菌牛津杯,滴入离心后(16 000 r/min 离心 15 min)的发酵液 80 μ L,以空白培养基作对照,30 $^{\circ}$ C 下培养 48 h,测定抑菌圈大小(抑菌圈为测量值减去空白值),每个试验点做 6 个平行样,以平均值作为最终试验值^[11]。

1.2.2 培养条件试验

1) 培养基配方优化设计:以发酵培养基中对海洋细菌 Bn-103 生长和产抑菌物质影响较大的因

素,葡萄糖、蛋白胨和海水添加量为试验因素,设计 3 个水平,进行 $L_9(3^4)$ 正交试验,见表 1。

表 1 正交试验因素水平表
Tab. 1 The orthogonal experiment

水平	因 素		
	葡萄糖质量 浓度/(g/dL)	蛋白胨质量 浓度/(g/dL)	海水 添加量/%
1	0.5	0.1	40
2	1.0	0.2	60
3	1.5	0.3	80

2) 发酵条件试验:海洋细菌 Bn-103 活化菌株一环接入种子培养基,28 $^{\circ}$ C,180 r/min 摇床振荡 24 h,取一定量加入 250 mL 发酵三角瓶中,28 $^{\circ}$ C 摇床振荡一定时间,按方法 1.2.1 测定不同条件的抑菌活性。

1.2.3 海洋细菌 Bn-103 发酵液中抑菌物质部分理化性质

- 1) 热稳定性试验:离心后的发酵液分别置于不同的水浴中处理不同时间,测定抑菌活性。
- 2) pH 值稳定试验:离心后的发酵液分别调至不同 pH 值,处理一定时间,测定抑菌活性。

2 结果与分 析

2.1 培养基配方各组分优化

按方法 1.2.2 培养基配方优化设计进行正交试验,测定不同组合的抑菌效果,结果见表 2。

由表 2 的极差大小可知,各因素影响主次顺序为:对大肠埃希氏菌 $C>A>B$,即海水添加量>葡萄糖>蛋白胨;抑菌效果最好的因素水平组合 $A_2B_3C_2$,即葡萄糖 1 g/dL,蛋白胨 0.3 g/dL,海水添加量 60 g/dL;对藤黄八叠球菌 $C>B>A$,即海水添加量>蛋白胨>葡萄糖;抑菌效果最好的因素水平组合 $A_2B_1C_3$,即葡萄糖 1 g/dL,蛋白胨 0.1 g/dL,海水添加量 80%。从试验结果可知,影响海洋细菌 Bn-103 发酵产抑菌物质的首要因素是海水的添加量,其次才是碳源或氮源,培养基配方中海水添加量的多少影响培养基中无机元素的含量。当培养基中碳源含量相同,有较高的海水添加量和较低的蛋白胨质量分数时,海洋细菌 Bn-103 产抑菌物质对革兰氏阳性细菌藤黄八叠球菌抑菌效果较好;而有较高的海水添加量和较高的蛋白胨质量分数时,则对革兰氏阴性细菌大肠埃希氏菌抑菌效果较好。图 1,2 为海洋细菌 Bn-103 产抑菌物质分别对大肠埃希氏菌和藤黄八叠球菌的抑菌效果。

表 2 正交试验因素水平结果
Tab.2 The result of orthogonal experiment

试验号	因 素			试验结果	
	A 葡萄糖	B 蛋白胨	海水	抑菌圈直径/mm	
	质量浓度/(g/dL)	质量浓度/(g/dL)	添加量/%	大肠杆菌	八叠球菌
1	1(0.5)	1(0.1)	1(40)	12.7	19.2
2	1	2(0.2)	2(60)	18.9	21.5
3	1	3(0.3)	3(80)	17.8	23.4
4	2(1.0)	1	3	15.3	25.6
5	2	2	1	14.1	17.8
6	2	3	2	19.1	22.3
7	3(1.5)	1	2	15.9	22.5
8	3	2	3	11.1	20.4
9	3	3	1	12.3	17.6
大 肠 杆 菌	K ₁	49.4	45.9	39.1	
	K ₂	48.5	44.1	53.9	
	K ₃	39.3	49.2	44.2	
	k ₁	16.5	14.6	13.0	Σ=137.2
	k ₂	16.2	14.7	18.0	
	k ₃	13.1	16.4	14.7	
	R	3.4	1.8	5.0	
八 叠 球 菌	K ₁	64.1	67.3	54.6	
	K ₂	65.7	59.7	66.3	
	K ₃	60.5	63.3	69.4	
	k ₁	21.4	22.4	18.2	Σ=190.3
	k ₂	21.9	19.9	22.1	
	k ₃	20.2	21.1	23.1	
	R	1.7	2.5	4.9	



图 1 大肠埃希氏菌
Fig.1 Escherichia coli

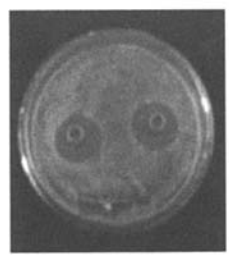


图 2 藤黄八叠球菌
Fig.2 Sarcina lutea

2.2 培养基初始 pH 值对海洋细菌 Bn-103 产抑菌活性物质的影响

对发酵培养基调取初始 pH 值,分别为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 按 1.2.2 方法进行抑菌试验,结果见表 3。

表 3 培养基初始 pH 值对 Bn-103 产抑菌物质的影响
Tab.3 Effect of initial pH to the production of antibacterial substance by Bn-103

培养基 初始 pH 值	抑菌圈直径/mm	
	藤黄八叠球菌	大肠埃希氏菌
4.0	19.8	10.1
5.0	23.7	15.4
6.0	24.2	20.5
7.0	20.6	20.4
8.0	15.8	10.8
9.0	14.2	9.7

不同种类的微生物都有其最适生长 pH 值范围,而且同一种微生物在不同的生长阶段和不同的生理、生化过程中也有不同的最适 pH 值要求。研究其规律,控制发酵过程中的 pH 值,促使微生物产生有益的物质十分必要。由表 3 可见,海洋细菌 Bn-103 在培养基初始 pH 值 5.0~6.0 时,发酵产抑菌物质对藤黄八叠球菌抑菌效果较好,以 pH 6.0 抑菌效果最好;而在 pH 6.0~7.0 对大肠埃希氏菌抑菌效果较好。

2.3 接种量对菌株 Bn-103 产抑菌活性物质的影响

将活化的海洋细菌 Bn-103 接入装有种子培养基的三角瓶中,在一定温度下培养一定时间,分别选取体积分数 1%、2%、4%、6%、8%、10% 接种量进行抑菌试验,结果见表 4。

表 4 接种量对 Bn-103 产抑菌活性物质的影响
Tab.4 Effect of the inoculate ratio on the production of antibacterial substance by Bn-103

接种体积分数/%	抑菌圈直径/mm	
	藤黄八叠球菌	大肠埃希氏菌
1	23.2	12.4
2	25.6	16.5
4	23.4	19.7
6	21.5	12.3
8	21.2	11.5
10	20.8	10.2

在一定基质中,接种量的多少直接影响微生物的生长,进而影响微生物代谢产物的量。选取生长对数期种子大量接种,使微生物迅速繁殖产生大量菌体,有利于产生较高代谢产物;但培养基质有限,接种量过高时,也影响其生长和代谢产物的产生,而从生产实际考虑也是不经济的,因此采用体积分数 2% 和 4% 的接种量。

2.4 培养基装液量对菌株 Bn-103 产抑菌活性物质的影响

选取发酵培养基装液量分别为 25、50、75、100、125、150 mL,进行抑菌试验,结果见表 5。

表 5 培养基装液量对 Bn-103 产抑菌活性物质的影响
Tab.5 Effect of volume of culture medium on the production of antibacterial substance by Bn-103

装液量/mL	抑菌圈直径/mm	
	藤黄八叠球菌	大肠埃希氏菌
25	23.5	11.3
50	28.9	14.5
75	26.2	18.2
100	21.5	22.8
125	18.2	19.5
150	16.8	15.2

在一定体积的容器和一定摇床转速条件下,培养基装液量的多少会影响氧的含量,通氧量的多少会直接影响菌体的生长和代谢产物的产生。由表 5 可知,当培养基装量为 50 mL/250 mL 时,海洋细菌 Bn-301 发酵产抑菌物质对藤黄八叠球菌抑菌活性较强;当装量为 100 mL/250 mL 时,对大肠埃希氏菌抑菌活性较强。从试验结果可以看出,较强的通氧量有利于产生抑制革兰氏阳性细菌藤黄八叠球菌的活性物质。

2.5 发酵时间、菌体生长量与海洋细菌 Bn-103 产抑菌物质关系

选取发酵时间分别为 24、48、72、120、144、168、192 h,测定其抑菌活性,同时测定其菌体生长的生物量,结果见图 3。

细菌的生长是有一定规律的,一般是接种后过了迟缓期就进入了高速对数生长期,菌体的生物量大量积累,之后进入稳定期,许多重要的代谢产物在此时产生。由图 3 可知,海洋细菌 Bn-103 在 24 h 就开始进入快速生长期,120 h 达到生长高峰,之后进入稳定期。但产生抑菌物质的时间并不是在稳定期,而是从菌体生长就开始了,对大肠埃希氏菌抑菌效果最好的时间是 48 h,对藤黄八叠球菌抑菌

效果最好的时间是在 72 h。

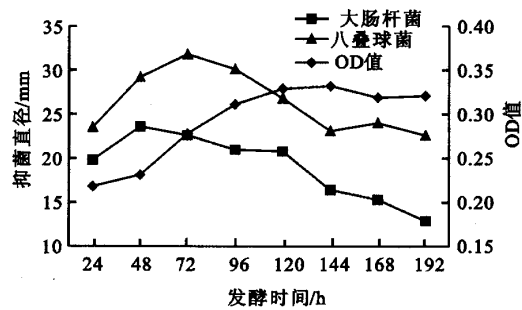


图 3 发酵时间、菌体生长与 Bn-103 产抑菌物质的关系

Fig. 3 The relationship among fermentation time, mycelium growth and production of antibacterial substance by Bn-103

2.6 海洋细菌 Bn-103 产抑菌物质部分理化性质

2.6.1 热稳定性 发酵液离心后,在 70、80、90 ℃ 中水浴。分别放置 30、60、90 min,测定其抑菌活性,结果见表 6。

表 6 Bn-103 产抑菌物质热稳定性试验

Tab. 6 The thermostability experiment of antibacterial substance produced by Bn-103

		抑菌圈直径/mm			
项 目		水浴时间			
		对照	30 min	60 min	90 min
(70 ℃)	藤黄八叠球菌	32.8	32.6	32.8	31.3
	大肠埃希氏菌	23.6	23.7	23.1	22.9
(80 ℃)	藤黄八叠球菌	32.8	32.9	31.8	28.6
	大肠埃希氏菌	23.6	23.5	21.4	19.6
(90 ℃)	藤黄八叠球菌	32.8	29.5	24.0	20.8
	大肠埃希氏菌	23.6	21.3	18.6	16.5

由表 6 可见,随着温度的升高,时间的延长,海洋细菌 Bn-301 抑菌物质的抑菌生物特性变化不大,在 70 ℃ 下处理 90 min,对海洋细菌 Bn-301 产生的抑菌活性物质稳定性影响不大;80 ℃ 处理 90 min 抑菌物质活性仍保留在 80% 以上,90 ℃ 处理 90 min 抑菌物质活性保留为 60%,说明该物质的热稳定性比较强。

2.6.2 pH 值稳定性 发酵液离心后分别调至 pH 值为 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11,室温放置 30 min,测定其抑菌活性,结果见表 7。

从表 7 可见,在 pH 3~8 之间,抑菌物质活性变化不大;当 pH 2 或 pH 9 时,抑菌物质活性明显

降低;当 pH 达到 10 以上时,抑菌物质活性完全丧失。

表 7 Bn-103 产抑菌物质 pH 稳定性试验

Tab. 7 The pH stability experiment of antibacterial substance produced by Bn-103

培养基 初始 pH 值	抑菌圈直径/mm	
	藤黄八叠球菌	大肠埃希氏菌
对照	30.7	22.3
2	19.2	12.0
3	27.1	20.4
4	29.6	21.2
5	31.2	21.8
6	29.4	23.0
7	29.0	20.5
8	28.6	18.6
9	15.2	11.0
10	无	无
11	无	无

3 结 论

- 1) 海洋细菌 Bn-103 产抑菌物质适宜培养基成分组合为:对藤黄八叠球菌,葡萄糖 1 g/dL,蛋白胨 0.1 g/dL,酵母膏 0.1 g/dL,海水添加量 80%,蒸馏水 20%;对大肠埃希氏菌,葡萄糖 1 g/dL,蛋白胨 0.3 g/dL,酵母膏 0.1 g/dL,海水添加量 60%;蒸馏水 40%。
- 2) 海洋细菌 Bn-103 在培养基初始 pH 5.0~6.0,接种体积分数 2%,培养基装液量 50 mL/250 mL,对藤黄八叠球菌抑菌效果较好;而在培养基初始 pH 6.0~7.0,接种体积分数 4%,培养基装液量 100 mL/250 mL,对大肠埃希氏菌抑菌效果较好。
- 3) 海洋细菌 Bn-103 培养 24 h 进入对数生长期,120 h 达到生长高峰,对大肠埃希氏菌和藤黄八叠球菌抑菌效果最好的培养时间分别为 48 h 和 72 h。
- 4) 海洋细菌 Bn-103 产抑菌物质对热稳定性较强,在 70 ℃ 下处理 90 min,抑菌物质生物活性变化不大;80 ℃ 处理 90 min 抑菌物质活性仍保留在 80% 以上,90 ℃ 处理 90 min 抑菌物质活性保留为 60%。在 pH 3~8 之间,抑菌物质生物活性差异不

大,当 pH 2 或 pH 9 时,抑菌物质活性降低明显;当 pH 达到 10 以上时,抑菌物质活性完全丧失。

参考文献(References):

- [1] 沈莲清,苏光耀,王向阳.植物乳杆菌素研究进展[J].食品与生物技术学报,2006,25(5):121—126.
SHEN Lian-qing, SU Guang-yao, WANG Xian-yang. Progress on plantaricin by *L. plantarum*[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2006,25(5):121—126. (in Chinese)
- [2] 雷波.杆菌肽发酵的培养基优化及影响其检测的因素[J].食品与生物技术学报,2006,25(6):79—82.
LEI Bo. Culture medium optimization of bacterian fermentation and influences its factor measured[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2006,25(6):79—82. (in Chinese)
- [3] 展翔天,张春光,司玫.海洋微生物活性物质研究进展[J].中国海洋药物杂志,2002,2:44—52.
ZHAN Xiang-tian, ZHANG Chun-guang, SI Mei. Research development of bioactive substance of marine microorganisms [J]. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 2002,2:44—52. (in Chinese)
- [4] Carte B K. Biomedical potential of marine natural products[J]. *Bioscience*, 1996,46(4):271—286.
- [5] 李越中,陈琦.海洋微生物资源及其产生生物活性代谢物的研究[J].生物工程进展杂志,2000,20(5):28—31.
LI Yue-zhong, CHEN Qi. The sources of marine microorganisms and their bioactive metabolites[J]. *Progress in Biotechnology*, 2000,20(5):28—31. (in Chinese)
- [6] 郑忠辉,李军,黄耀坚,等.海洋微生物潜在的抗肿瘤活性物质的初步筛选[J].海洋通报,1999,18(3):20—23.
ZHEN Zhong-hui, LI Jun, HUANG Yao-jian et al. Screening of potential antitumor agents produced by marine microorganisms[J]. *Marine Science Bulletin*, 1999,18(3):20—23. (in Chinese)
- [7] Jensen P R, Fenical W. Strategies for the discovery of secondary metabolites from marine bacteria: ecological perspectives [J]. *Annu Rev Microbiol*, 1994,48:559—584.
- [8] 林维宣.试验设计方法[M].大连:大连海事大学出版社,1995:331.
- [9] 沈萍,范秀容,李广武.微生物学实验[M].北京:高等教育出版社,1999:111—215.
- [10] 林永城.海洋微生物及其代谢产物[M].北京:化学工业出版社,2003:36.
- [11] 马绪荣,苏德模.药品微生物检验手册[M].北京:科学出版社,2000:229—242.

(责任编辑:李春丽)