

植酸对生防细菌L-227-03 生长、发酵及抑菌能力的影响

鲁燕汶, 安德荣, 盛存波, 陈 丽

(西北农林科技大学 植保学院 植保资源与病虫害治理教育部重点实验室, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 研究了植酸(PA)对生防细菌L-227-03 生长、发酵及抑菌能力的影响。结果表明: (1)在发酵6 h 添加0.006% PA, 18 h 添加0.004% PA 对L-227-03 菌株细胞生长的促进作用最强, 达到最佳的添加效果。(2)添加PA 能提高L-227-03 菌株细胞增殖速度, 促进菌株提前6 h 进入对数生长期, 稳定期延长6 h。(3)添加PA 发酵后, 生防细菌L-227-03 的抑菌活性增强, 皿内抑菌圈直径最大达24 mm, 较对照大6 mm, 萝卜块根防效试验和盆栽防效试验的最高防效分别为82.34%和82.37%, 较对照提高了13.39%和12.26%; 菌体发酵液的耐保藏能力也有所提高, 发酵液的有效期限延长3~6个月。(4)PA 能缓和pH 变化对菌体生长的影响, 提高菌体对盐的耐受力。

[关键词] 植酸; 生防细菌; 细菌生长; 细菌发酵; 抑菌能力

[中图分类号] S481

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)07-0045-05

植酸(Phytic Acid, PA)又名环己醇磷酸酯或肌醇六磷酸酯, 属于维生素B 族, 是一种天然存在的含磷有机化合物, 主要以钙、镁、钾的复合盐形式存在于米糠、麸皮、谷物和种子中。由于植酸特殊的环状结构和极强的螯合效应, 决定了其在食品、医药、化工和环保等方面的特殊生理和药理作用^[1]。此外, PA 及其盐作为一种发酵促进剂对某些微生物的代谢具有促进效应。据报道^[1-2], PA 能促进某些酶、抗生素等的生物合成, 如PA 盐对蜡状芽孢杆菌草状变种(*Bacillus cereus* var. *mycoides*)的 α -1, 6-葡萄糖苷酶和 β -淀粉酶, 隐球菌属(*Cryptococcus*)某些种的磷酸酶, 枯草芽孢杆菌[*Bacillus subtilis* (AJ-3205 #)]、绿脓假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)和灰色链霉菌(*Streptomyces griseus*)等的蛋白酶, 桔青霉(*Penicillium citrinum* Thom.)的核糖核苷酸的产生都具有明显的促进作用, 并能使小单胞菌属(*Micromonospora*)的某些种, 如(*M. saganensis*)庆大霉素产量提高7倍^[1-3]。而有关PA 对生防菌代谢及发酵影响的研究还未见报道。

本研究通过在生防细菌L-227-03(尚无商品制剂)发酵的培养基中添加PA, 探讨了其作为促酶剂提高L-227-03 菌体繁殖速度及其对L-227-03 发酵及抑菌能力的影响, 以为PA 在生防细菌发酵工业

中的应用提供理论依据和实践经验。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 菌 种 生防细菌L-227-03 菌株, 通过特定筛选程序(平皿拮抗性测定、发酵液复筛拮抗性测定及盆栽防效试验观察)筛选自西藏拉萨菜园土, 属芽孢杆菌属, 对大白菜软腐病菌(*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*)有较强抑制作用。大白菜软腐病菌2# 由本实验室保存。

1.1.2 培养基及试剂 生防细菌L-227-03 发酵培养基、病原菌培养基均选用肉汤蛋白胨培养基; PA 为分析纯, 由山西万荣县里望植酸厂生产, 含量 $\geq 90\%$; 其他试剂均为分析纯。

PA 母液的制备: 量取PA 原液20 mL, 用4 mol/L NaOH 调节pH 值为7.0, PA 含量为72%, 置于阴暗处备用。

1.2 方 法

1.2.1 培养条件 用灭菌竹签按无菌操作法从斜面管中挑取少许供试细菌, 接种于一级摇瓶, 在30℃, 120 r/min 培养48~56 h 后, 按10% 接种量接种于二级摇瓶中, 30℃, 120 r/min 培养48 h; 按5% 接种量接种于发酵摇瓶(装液量50 mL/250 mL)

[收稿日期] 2005-09-06

[基金项目] 西北农林科技大学科技创新团队项目

[作者简介] 鲁燕汶(1980-), 女, 新疆库尔勒人, 在读硕士, 主要从事微生物资源及微生物发酵工艺研究。

[通讯作者] 安德荣(1963-), 男, 陕西大荔人, 教授, 博士生导师, 主要从事植物病毒学和生物制药研究。

中, 150 r/min, 30 °C振荡发酵培养。

1.2.2 测定方法 ①细胞生物量的测定: 用 0.2 mol/L HCl 稀释发酵液 20 倍, 以水作空白对照, 用 721 型分光光度计测定发酵液在 620 nm 处的 OD 值, 比色杯的光程为 1 cm^[4]。②皿内抑菌活性测定: 将滤纸片制成直径 5 mm 大小的圆片, 在发酵液中浸泡 10 min, 滤纸片微淋干后, 置于已涂布病原菌的琼脂平板上, 30 °C 培养 24 h, 观察抑菌圈的有无及大小^[5]。③萝卜块根防效试验: 将新鲜萝卜制成高 1 cm, 直径 1.5 cm 大小的圆柱体, 再将萝卜圆柱体浸泡在供试发酵液中, 20 min 后取出; 用接种针按无菌操作在块根上制造伤口并接种病原菌, 30 °C 保湿培养; 48 h 后观察块根腐烂程度, 判定发酵液的防效^[6]。④盆栽防效试验: 用供试发酵液进行拌种处理, 待白菜培育至 3~4 片叶时, 用针刺法接种病原菌, 30 °C 保湿 48~72 h, 观察植株腐烂状况^[6-7]。

1.3 PA 对 L-227-03 菌株生长的影响

1.3.1 对 L-227-03 菌株细胞生长的影响 以发酵培养基为基础, 在 0, 6, 12, 18 和 24 h 添加适量经灭菌处理的 PA 母液, 使发酵摇瓶内 PA 的终浓度分别为 10%, 1%, 0.1%, 0.01%, 0.001% 和 0.000 1%, 进行 L-227-03 菌株的发酵实验, 以不添加 PA 的发酵液为对照(CK), 发酵 36 h 后测定细胞生物量。

1.3.2 对 L-227-03 增殖及菌体形态的影响 发酵过程中每隔 6 h 取发酵液测定细胞生物量, 同时将菌悬液涂片进行简单染色制片, 在显微镜下观察菌体细胞形态的变化, 30 °C 振荡培养 48 h, 以不添加 PA 的发酵液为对照(CK)。

1.4 对 L-227-03 菌株抑菌效果的影响

将生防菌株 L-227-03 发酵液常温密闭保藏 0, 1, 3, 6, 9 个月后, 分别进行皿内抑菌活性试验、萝卜块根防效试验和盆栽防效试验, 以不添加 PA 的发酵液为对照(CK)。

1.5 对 L-227-03 菌株耐酸碱性能的影响

添加 PA 后, 用 1 mol/L HCl 和 4 mol/L

NaOH 调节培养液 pH 值分别为 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0 和 12.0, 30 °C 振荡培养 24 h, 以不添加 PA 的培养基为对照(CK), 测定 OD₆₂₀。

1.6 对 L-227-03 菌株耐盐性能的影响

发酵培养基中添加 PA 后, 分别添加不同量的氯化钠、磷酸氢二钾、硫酸镁, 调节 pH 值为 7.0。发酵 24 h 后, 将菌悬液稀释 100 倍涂布平板, 统计平板上菌株单菌落数^[7], 以不添加 PA, 但进行同样盐处理的发酵液为对照(CK)。

2 结果与分析

2.1 PA 对 L-227-03 菌株生长的影响

2.1.1 对 L-227-03 菌株细胞生长的影响 不同浓度 PA 对 L-227-03 菌株细胞生长的影响见表 1。由表 1 可知, 对不同浓度 PA, 0.01% PA 对菌株细胞生长的促进效果最好; 对不同添加时间, 发酵 6 和 18 h 时添加 PA 对菌体细胞生长的促进效果较好。将 0.01% PA 于 6 和 18 h 分批量添加, 以发酵初次添加 0.01% PA 为对照, 结果(表 2)表明, 在发酵 6 h 添加 0.006% PA, 18 h 添加 0.004% PA 对 L-227-03 菌株细胞生长的促进作用最强, 达到最佳的添加效果。

2.1.2 对 L-227-03 增殖及菌体形态的影响 由图 1 可知, 添加 PA 后, L-227-03 菌株生长的迟缓期由最初的 12 h 缩短至 6 h; 发酵 6 h 后即进入对数生长期, 较 CK 提前 6 h, 此期内菌株细胞大量增殖, 增殖速度较 CK 有所提高; 稳定期为发酵 18~36 h, 较 CK 延长 6 h, 发酵 24 h 菌株细胞量达到最大值, 比 CK 提前 6 h; 于发酵 36 h 后进入衰亡期, 但进入速度明显落后于 CK。添加 PA 发酵 24 h 的 L-227-03 菌株具有最佳的生长、发酵性能, 有助于缩短菌株发酵时间, 提高菌株利用效率。观察菌体细胞形态发现, L-227-03 菌株在添加 PA 的培养液中生长旺盛, 繁殖更迅速, 细胞形态大小均一, 菌体产生芽孢的时间推迟。这进一步说明, 添加 PA 对 L-227-03 的生长、繁殖有促进作用。

表 1 PA 对 L-227-03 菌株细胞生长的影响

Table 1 Effect of PA on cell growth of strain L-227-03

PA 浓度/% Concentration of PA	OD 值 Number of OD				
	0 h	6 h	12 h	18 h	24 h
10	0.024	0.174	0.168	0.197	0.129
1	0.192	0.258	0.249	0.262	0.222
0.1	0.305	0.350	0.315	0.354	0.303
0.01	0.347	0.384	0.361	0.388	0.368
0.001	0.329	0.360	0.343	0.357	0.338
0.000 1	0.310	0.344	0.326	0.349	0.317

表 2 分批量添加 PA 对 L-227-03 菌株生长的影响

Table 2 Effect of batch adding PA on growth of L-227-03

PA 添加量 Addition of PA		OD 值 Number of OD	PA 添加量 Addition of PA		OD 值 Number of OD
6 h	18 h		6 h	18 h	
CK	CK	0.357	0.005	0.005	0.376 b B
0.002	0.008	0.364 f E	0.006	0.004	0.388 a A
0.003	0.007	0.369 d CD	0.007	0.003	0.367 e D
0.004	0.006	0.371 c C			

注: 数据后字母表示差异显著性水平, 其中小写字母为 $\alpha=0.05$ 水平, 大写字母为 $\alpha=0.01$ 水平 (DUNCAN 检验)。
Note: The letter indicates significant level. Small letter means $\alpha=0.05$ and capital letter means $\alpha=0.01$ (DUNCAN test).

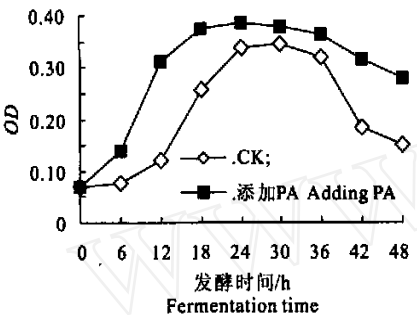


图 1 PA 对 L-227-03 细胞增殖的影响
Fig 1 Effect of PA on proliferation of strain L-227-03

2.2 PA 对 L-227-03 菌株抑菌效果的影响

由图 2 可知, 添加 PA 的 L-227-03 菌株发酵液

对大白菜软腐病菌有很好的抑制作用, 其抑菌圈直径最大可达 24 mm, 较 CK 大 6 mm; 发酵液保藏 6 个月仍有较好的抑菌活性, 而 CK 的有效抑菌期为 3 个月。萝卜块根防效试验和盆栽防效试验中的防治效果也有明显提高, 最高防效分别为 82.34% 和 82.37%, 较 CK 分别提高了 13.39% 和 12.26%; 保藏 9 个月的发酵液对大白菜软腐病仍有微弱的防治效果, 较 CK 的有效防效期延长约 6 个月。添加 PA 的 L-227-03 菌株发酵液, 在皿内抑菌活性试验、萝卜块根防效试验及盆栽防效试验中, 对大白菜软腐病菌的抑制能力均较 CK 有所提高, 表现出一致性; 同时, 添加 PA 对菌体发酵液的保藏亦有一定的促进效果, 能够相对延长发酵液的有效期限。但是, 对发酵液保藏的促进作用是否由添加 PA 直接引起, 仍需要进一步验证。

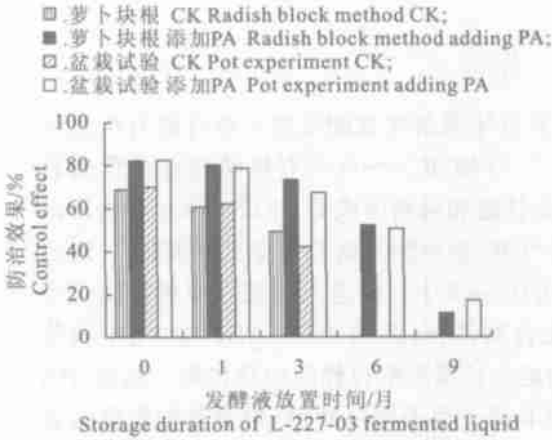
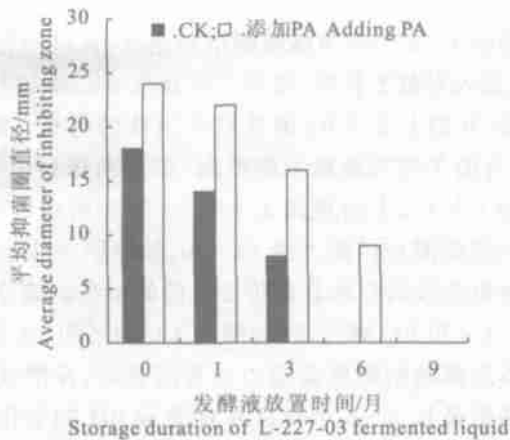


图 2 PA 对 L-227-03 菌株发酵液抑菌效果的影响

Fig 2 Effect of PA on antagonism of L-227-03 fermented liquid

2.3 PA 对 L-227-03 菌株耐酸碱性能的影响

图 3 表明, pH 7.0 是 L-227-03 菌株最佳的生长 pH。pH 为 4.0~12.0 时, 与 CK 相比, 添加 PA 的培养液中 L-227-03 菌株生长较旺盛。添加 PA 后, pH 的变化对菌株生长的影响有所缓和, 这种趋势在碱性条件下表现的更为明显。

2.4 PA 对 L-227-03 菌株耐盐性能的影响

由表 3 可知, PA 的添加有助于提高 L-227-03 菌株对无机盐的耐受力, 尤其是对硫酸镁盐的耐受力显著增强, 这可能是由于 PA 易与镁离子发生螯合作用, 从而阻止了过量金属离子对菌株的毒害作用。

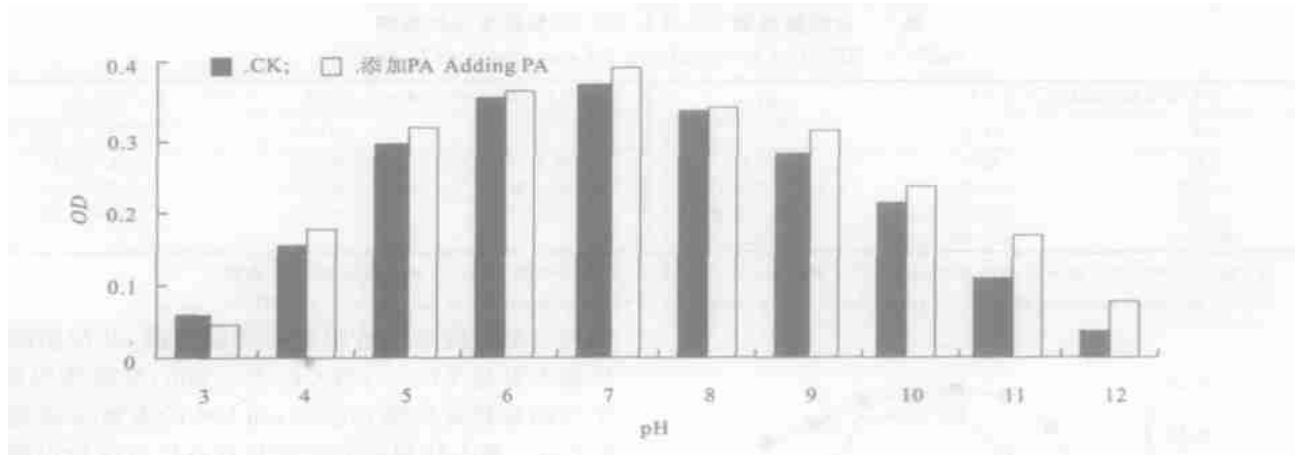


图 3 PA 对 L-227-03 菌株耐酸碱性能的影响

Fig 3 Effect of PA on the acid and alkali resistance of L-227-03

表 3 PA 对 L-227-03 菌株耐盐性能的影响

Table 3 Effect of PA on salt-tolerance of L-227-03

NaCl/%	CK	添加 PA Adding PA	K ₂ HPO ₄ /%	CK	添加 PA Adding PA	MgSO ₄ /%	CK	添加 PA Adding PA
0.5	+++	+++	0.05	+++	+++	0.05	+++	+++
1	+	+-	0.1	+	++	0.1	+	++
2	-	+	0.2	-	+	0.2	-	+-
5	-	-	0.5	-	-	0.5	-	+
10	-	-	1.0	-	-	1.0	-	-

注: + + +, 生长菌落数≥100; + +, 生长菌落数 50~ 100; + -, 生长菌落数 20~ 50; +, 生长菌落数 0~ 20。

Note: + + +, Number of colonies≥100; + +, Number of colonies 50- 100; + -, Number of colonies 20- 50; +, Number of colonies 0- 20

3 讨 论

PA 是近年来新发现的重要天然含磷有机化合物,是种子、谷物 60%~ 80% 有机磷储存的重要仓库^[8]。磷是核酸和磷脂的成分,组成多磷化合物及许多酶的活性基,微生物对磷的需要量也很高,一般为 0.005~ 0.01 mol/L。磷进入细胞后即迅速同化为有机磷化合物,同时形成 ATP,ADP 等,用于调节微生物细胞生长及发酵过程的能量代谢。同时,PA 还是一种非离子型表面活性剂,积累在细胞膜的表面,可以改善氧的通透性及物质传递性,从而加快菌体繁殖速度,进而加快营养物质的消耗及产物的生成和分泌^[9-10]。此外,由于 PA 具有极强的螯合作用,因而在使用时其用量过多或过少效果均不好,而应控制在适量范围内。

本研究结果表明,在发酵 6 h 添加 0.006% PA,18 h 添加 0.004% PA 对 L-227-03 菌株细胞生长的促进作用最强,达到最佳的添加效果;添加 PA

能提高 L-227-03 菌株细胞增殖速度,促进菌株提前 6 h 进入对数生长期,使稳定期延长 6 h,添加 PA 发酵 24 h 的 L-227-03 菌株具有最佳的生长、发酵性能,有助于缩短菌株发酵时间,提高菌株利用效率;添加 PA 后,生防细菌 L-227-03 的抑菌活性增强,皿内抑菌圈直径最大达 24 mm,较对照大 6 mm,萝卜块根防效试验和盆栽防效试验的最高防效分别为 82.34% 和 82.37%,较对照高 13.39% 和 12.26%;菌体发酵液的耐保藏能力也有所提高,发酵液的有效期限延长 3~ 6 个月;PA 能缓和 pH 的变化对菌株生长的影响,特别是在碱性条件下表现更为明显;添加 PA 有助于提高 L-227-03 菌株对盐的耐受力,尤其是对硫酸镁盐的耐受力显著增强。

目前,普遍认为植酸促酵原理是打破细胞内酶合成的“反馈平行”,改善细胞膜通透性,增加膜内外物质交换,能量转化,代谢调节等^[11],其是否还存在其他作用机理,还有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] 李 丹. 植酸及其生物学活性研究现状[J]. 国外医学卫生学分册, 2004, 31(2): 104-108
- [2] El-Batal A L, Karem H Abdel. Phytases production and phytic acid reduction in rapeseed meal by *Aspergillus niger* during solid state fermentation[J]. Food Research International, 2001, 34: 715-720
- [3] Larsson M, Sandberg A S. Phytate reduction in oats during malting[J]. Journal of Food Science, 1992, 57: 994-997.
- [4] 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
- [5] 安德荣. 生物制药的原理及方法[M]. 北京: 中国科学文化出版社, 2002: 144-148
- [6] 张素华, 李树正. 杀菌剂生物测定新方法——萝卜块根法[J]. 天津农业科学, 1999, 5(1): 25-27.
- [7] 方中达. 植病研究方法[M]. 第3版. 北京: 中国农业出版社, 1998
- [8] Purva Vats, Banerjee U C. Studies on production of phytase by a newly isolated strain of *Aspergillus niger* var. *teigham* obtained from rotten wood-logs[J]. Process Biochemistry, 2002, 38: 211-217.
- [9] Vraart J R, Schouten Y, Gooijer C, et al. Evaluation of phytic acid as a buffer additive for the separation of proteins in capillary electrophoresis[J]. Journal of Chromatography, 1996, 768: 307-313
- [10] Paivi Ekholm, Lissa V irkki, M aija Y linnen, et al. The effect of phytic acid and some nature chelating agents on the solubility of mineral elements in oat bran[J]. Food Chemistry, 2003, 80: 165-170
- [11] Reddy N R, Sathe S K, Salunkhe D K. Phytases in legumes and cereals[J]. Advanced Food Research, 1982, 82: 91-92

Effects of phytic acid on the growth, fermentation and antagonism of biocontrol bacterium L-227-03

LU Yan-wen, AN De-rong, SHENG Cun-bo, CHEN Li

(Key Laboratory of Plant Protection Resources and Pest Management Ministry of Education, College of Plant Protection, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The effects of Phytic Acid (PA) on the growth, fermentation and antagonism of biocontrol bacterium L-227-03 were studied. The results showed that: (1) The optimum addition of PA was adding 0.006% after fermented 6 h and adding 0.004% after fermented 18 h, which best promote the cells growth of strain L-227-03. (2) PA accelerated cells proliferation rate, made exponential phase ahead of schedule for 6 h and stationary phase extended for 6 h. (3) After PA was added, the antagonism of L-227-03 was advanced, the biggest inhibiting zones in plate was 24 mm, bigger than CK by 6 mm, the strongest control effect of radish method and pot experiment were 82.34% and 82.37%, better than CK by 13.39% and 12.26%; After PA was added, fermented liquid ability of storage was improved and the time of fermented liquid preservation was prolonged by 3-6 months. (4) PA depressed the influence of pH and enhanced the salt-tolerance of this strain.

Key words: Phytic Acid; biocontrol bacterium; growth; fermentation; antagonism