

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

陈玉梅¹, 常忠义¹, 王疆元², 李颖¹, 贾彩凤¹, 毛玉昌¹, 高红亮¹

(1 华东师范大学 生命科学学院, 上海 200062; 2 上海光明股份有限公司 工业原料事业部, 上海 200072)

[摘要] 初步研究了1株薛氏丙酸杆菌(*Propionibacterium shem anii*)代谢物在不同pH值下的抑菌活性,以及该菌在不同质量浓度乳酸钠和葡萄糖培养时其生物量、还原糖含量、pH值和抑菌活性的变化。结果表明,丙酸杆菌代谢物在pH为6.0时,12 h内对恶臭假单胞菌可完全抑制,随着pH值的升高,代谢物的抑菌活性降低;丙酸杆菌在含15 g/L 乳酸钠+5 g/L 葡萄糖的复合碳源培养基中培养菌体干质量最大,达到3.13 g/L;培养初期还原糖消耗很快,2 d内耗糖占总还原糖的70%以上;pH值是有机酸产生和消耗相平衡的结果,培养基中葡萄糖含量越高,培养液的pH值越低;乳酸钠和葡萄糖对代谢物的抑菌活性有显著影响,在含15 g/L 乳酸钠+5 g/L 葡萄糖的复合碳源培养基中,代谢物抑菌活性最高,达到36.4 AU/mL。说明15 g/L 乳酸钠+5 g/L 葡萄糖的复合碳源培养基是最佳培养基。

[关键词] 丙酸杆菌; 乳酸钠; 葡萄糖; 抑菌活性

[中图分类号] TS202.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)02-0178-05

Effect of sodium lactate and glucose on the growth of *Propionibacterium shem anii* and the antibacterial activity of its metabolites

CHEN Yu-mei¹, CHANG Zhong-yi¹, WANG Jiang-yuan², LI Ying¹,

JIA Cai-feng¹, MAO Yu-chang¹, GAO Hong-liang¹

(1 School of Life Sciences, East China Normal University, Shanghai 200062, China;

2 Ingredients Division, Shanghai Bright Dairy & Food Co. Ltd., Shanghai 200072, China)

Abstract: The antibacterial activity of the metabolites of *Propionibacterium shem anii* was studied at different pH values. The biomass, reducing sugar, pH and antibacterial activity were also studied in the batch fermentation with different concentrations of sodium lactate and glucose. The results showed that the metabolites could retard the growth of *Pseudomonas putida* totally in 12 h at pH 6.0; The antibacterial activity of the metabolites dropped as the pH value increased. The biomass of 3.13 g/L was obtained on a complex carbon sources containing 15 g/L sodium lactate and 5 g/L glucose; the sugar was quickly consumed and 70% sugar was consumed in 2 days with different concentrations of glucose and lactate. The higher the content of glucose in culture medium, the lower the pH value: the lowest pH was obtained with 20 g/L glucose alone and the highest antibacterial activity 36.4 AU/mL was obtained with 15 g/L sodium lactate and 5 g/L glucose. In a word, 15 g/L sodium lactate and 5 g/L glucose is a best culture medium.

Key words: *Propionibacterium shem anii*; sodium lactate; glucose; antibacterial activity

随着人民生活水平的提高, 健康食品、绿色食品 成为消费者的首选, 因此开发安全无毒、性能稳定

° [收稿日期] 2006-01-09

[作者简介] 陈玉梅(1981-), 女, 河北唐山人, 硕士, 主要从事食品微生物研究。

[通讯作者] 高红亮(1973-), 男, 上海市人, 副教授, 博士, 主要从事食品及发酵研究。

高效广谱的天然防腐剂受到普遍关注, 并成为食品科学研究和应用的一个热点。由食品级微生物乳酸菌和丙酸杆菌产生的细菌素, 在食品保存中具有巨大的应用潜力, 已日益受到人们的关注。

由乳酸菌产生的多种细菌素已被分离并进行了性质分析^[1], 其中Nisin已被多个国家批准使用, 而关于丙酸杆菌细菌素的报道很少, 目前仅有5种细菌素被报道^[2], 即由特氏丙酸杆菌(*Propionibacterium thoenii*) P127产生的丙酸杆菌素PLG-1, 由特氏丙酸杆菌(*P. thoenii*, 以前称为詹氏丙酸杆菌(*P. jensenii*)) P126产生的丙酸杆菌素G, 由特氏丙酸杆菌(*P. thoenii*) P419产生的丙酸杆菌素T1, 由詹氏丙酸杆菌(*P. jensenii*) P1264产生的丙酸杆菌素和由詹氏丙酸杆菌(*P. jensenii*) DF1产生的丙酸杆菌素SM1。国内对丙酸杆菌的研究主要集中在菌种分离、鉴定与产酸、产维生素等方面^[3-5], 而对其代谢物抑菌性质的研究报道较少。

薛氏丙酸杆菌(*P. shem anii*)能在葡萄糖、半乳糖、乳糖、阿拉伯糖等单一碳源培养基上生长。乳酸盐是薛氏丙酸杆菌可高效利用的碳源, 其中乳酸钠是培养丙酸杆菌最常用的碳源^[6]。葡萄糖是工业生产中常用的碳源, 而且有研究表明, 薛氏丙酸杆菌在含有葡萄糖和乳酸盐的组合培养基中能更好地利用乳酸盐, 产生更多的丙酸^[7], 但对丙酸杆菌在复合碳源培养基上产生抑菌代谢物的研究还少见报道。因此, 本试验对1株薛氏丙酸杆菌代谢物在不同pH值下的抑菌活性进行了比较, 并对该菌在不同质量浓度葡萄糖和乳酸钠的复合碳源培养基上的生长、还原糖浓度、pH值和代谢物的抑菌活性进行了初步研究, 以为其工业化生产提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌株 薛氏丙酸杆菌(*P. shem anii*)由华东师范大学微生物学实验室保存; 食品酸败菌恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)为抑菌试验的敏感指示菌, 由上海疾病控制防疫中心提供。

1.1.2 DNS试剂 甲液: 将6.9 g 结晶苯酚溶于15.2 mL 100 g/L NaOH 溶液中, 稀释至69 mL 并加入6.9 g NaHSO₃。乙液: 将255 g 酒石酸钾钠溶于300 mL 100 g/L NaOH 溶液中, 再加入880 mL 10 mL/L 的3,5-二硝基水杨酸溶液。将甲液和乙液混合即得DNS试剂, 室温下放置7~10 d后使用。

1.1.3 仪器设备 PHS-3C 精密酸度计由上海雷磁仪器厂生产, 752 紫外光栅分光光度计由上海第三分析仪器厂生产, power wave xs 酶标检测仪由美国BD-TEK 公司生产。

1.2 方法

1.2.1 丙酸杆菌与恶臭假单胞菌的培养 丙酸杆菌以10 mL/L 接种于SLB 液体培养基(含胰蛋白胨、酵母膏各10.0 g, 乳酸钠16.7 mL, K₂HPO₄ 0.25 g, MnSO₄ 0.005 g 或0.5 mL 浓度为0.1 mol/L 的MnSO₄ 溶液, 蒸馏水定容至1 L, pH 7.0)中, 于30

下厌氧静止培养; 恶臭假单胞菌在LB 液体培养基中于37℃、200 r/min 条件下摇床振荡培养^[8]。

1.2.2 丙酸杆菌代谢物的制备及不同pH 值下的抑菌试验 丙酸杆菌在SLB 培养基中培养3 d 后, 取菌株发酵液, 于8 000 r/min 冷冻离心20 min, 上清液用于抑菌活性测定。将上述代谢产物加入3 倍体积的LB 液体培养基中, 用10 g/L NaOH 调pH 为8.0 后, 再用100 g/L 酒石酸分别调pH 为7.0、6.0 和5.0; 高压灭菌后接入10 mL/L 的恶臭假单胞菌, 于37℃、200 r/min 条件下振荡培养, 隔2 h 取样测OD_{620 nm} 值, 以SLB 培养基为空白对照。

1.2.3 乳酸钠和葡萄糖对丙酸杆菌生长及抑菌活性的影响 以加20 g/L 乳酸钠的SLB 培养基为对照培养基, 以无乳酸钠的SLB 为基础, 分别加入15 g/L 乳酸钠+ 5 g/L 葡萄糖、10 g/L 乳酸钠+ 10 g/L 葡萄糖、5 g/L 乳酸钠+ 15 g/L 葡萄糖和20 g/L 葡萄糖为试验培养基。将丙酸杆菌在上述5 种复合培养基中培养1, 2, 3, 4, 5 d 时, 取样测定以下指标:

(1) 生物量。取丙酸杆菌发酵液于10 000 r/min 离心5 min, 沉淀以去离子水冲洗3 次, 105℃ 烘干至恒重后称其质量。

(2) 还原糖。采用DNS 法测定^[8]。取丙酸杆菌代谢物各1.0 mL, 稀释10 倍后分别加入1.0 mL 蒸馏水和1.5 mL DNS 试剂, 在沸水浴中加热5 min 后立即用流动冷水冷却, 再加入21.5 mL 蒸馏水, 混匀后用分光光度计测OD_{520 nm} 值, 并根据葡萄糖标准曲线计算出还原糖含量。

(3) pH 值。用PHS-3C 精密酸度计测定。

(4) 丙酸杆菌代谢产物抑菌活性(AU)。采用临界稀释法测定^[9]。将丙酸杆菌代谢物用SLB 培养基以2ⁿ 倍稀释, 指示菌株恶臭假单胞菌过夜培养后, 用LB 液体培养基稀释至OD_{620 nm} = 0.8, 再稀释100 倍后, 96 孔酶标板每孔中加50 μL 不同浓度的丙酸杆菌代谢物和150 μL 稀释的指示菌液, 以SLB 培养

基为空白对照, 30 培养, 24 h 后于酶标仪上测定 $OD_{620\text{ nm}}$ 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)。

2 结果与分析

2.1 丙酸杆菌代谢物在不同pH 下的抑菌效果

由图1可知, pH 值越低, 丙酸杆菌代谢产物的抑菌活性越高。当pH 为5.0和6.0时, 在12 h 内可完全抑制恶臭假单胞菌的生长; 随着pH 值的升高, 抑菌活性逐渐降低。但由于pH 为5.0时指示菌生长过于缓慢, 因此在以下测定代谢物抑菌活性的试验中, 均调pH 为6.0。

2.2 乳酸钠和葡萄糖对丙酸杆菌生长及抑菌活性的影响

2.2.1 对丙酸杆菌生物量的影响 由图2可以看出, 以乳酸钠或葡萄糖为单一碳源时, 菌体干重最高分别可达到2.52和2.94 g/L; 在乳酸钠和葡萄糖复合碳源培养基中, 菌体干质量总体上比单一碳源培养基高, 表明乳酸钠与葡萄糖复合碳源更能促进丙酸杆菌的生长, 其中以15 g/L 乳酸钠+ 5 g/L 葡萄糖的复合碳源培养基中菌体干重最高, 在培养3 d 时可达3.13 g/L, 因此这是丙酸杆菌生长的最适复合碳源培养基。

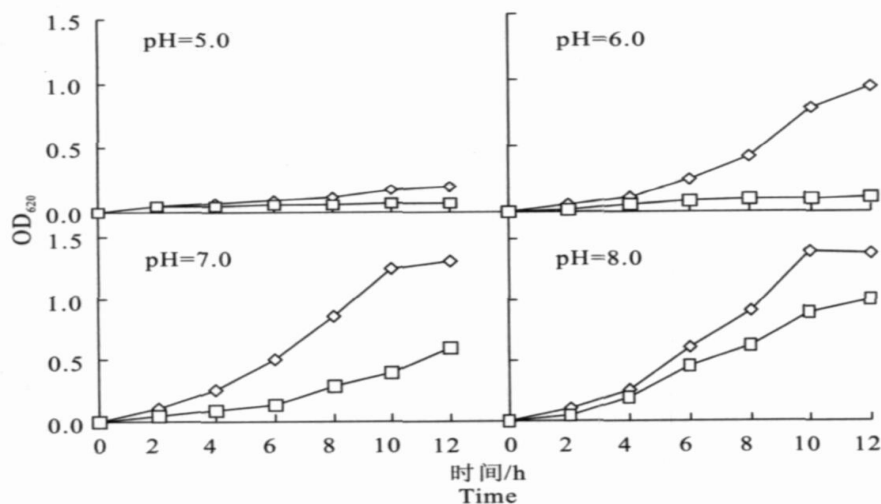


图1 丙酸杆菌代谢物在不同pH 下的抑菌效果

- - - 空白对照; - □ - 加丙酸杆菌代谢物

Fig 1 Antibacterial activity of metabolite of propionibacterium at different pH s

- - - CK; - □ - Metabolite of propionibacterium

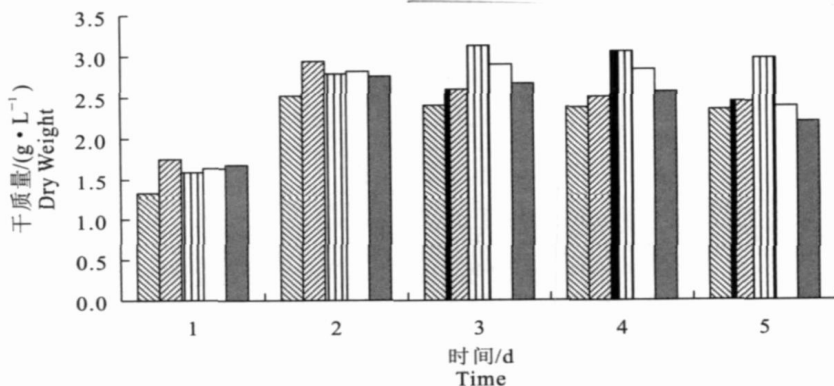


图2 不同质量浓度乳酸钠和葡萄糖培养丙酸杆菌的生物量变化

▨ .20 g/L 乳酸钠; ▤ .20 g/L 葡萄糖; ▧ .15 g/L 乳酸钠+5 g/L 葡萄糖;

□ .10 g/L 乳酸钠+10 g/L 葡萄糖; ■ .5 g/L 乳酸钠+15 g/L 葡萄糖

Fig.2 Variation of biomass of propionibacterium in different concentrations of sodium lactate and glucose

▨ .20 g/L sodium lactate; ▤ .20 g/L glucose; ▧ .15 g/L sodium lactate+5 g/L glucose;

□ .10 g/L sodium lactate+10 g/L glucose; ■ .5 g/L sodium lactate+15 g/L glucose

2.2.2 对丙酸杆菌消耗还原糖的影响 图3表明, 在5种培养基中, 无论用乳酸钠还是用葡萄糖作碳源, 在发酵过程中, 还原糖均不断被分解利用, 2 d内耗糖达总糖的70%以上; 以后还原糖含量表现出随培养时间的推进而缓慢减少的趋势, 但大多在第3天或第4天又略有上升, 推测是由于后期发酵液的pH很低, 使培养液中的碳水化合物水解所致。

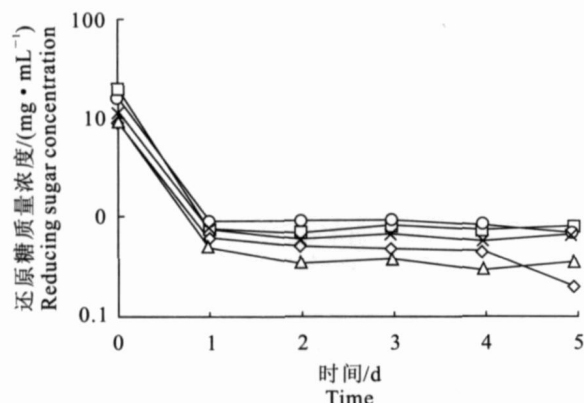


图3 不同质量浓度乳酸钠和葡萄糖培养丙酸杆菌时的还原糖浓度变化

- - . 20 g/L 乳酸钠; - □ - . 20 g/L 葡萄糖; - - . 15 g/L 乳酸钠 + 5 g/L 葡萄糖; - × - . 10 g/L 乳酸钠 + 10 g/L 葡萄糖; - ○ - . 5 g/L 乳酸钠 + 15 g/L 葡萄糖

Fig. 3 Variation of reducing sugar of propionibacterium at different concentrations of sodium lactate and glucose

- - . 20 g/L sodium lactate; - □ - . 20 g/L glucose; - - . 15 g/L sodium lactate + 5 g/L glucose; - × - . 10 g/L sodium lactate + 10 g/L glucose; - ○ - . 5 g/L sodium lactate + 15 g/L glucose

2.2.4 对丙酸杆菌代谢物抑菌活性的影响 丙酸

2.2.3 对丙酸杆菌生长过程中pH值的影响 乳酸钠和葡萄糖对pH的影响是有机酸产生和消耗不断平衡的结果。由图4可知, 随着葡萄糖浓度的增加, pH下降较为明显。以20 g/L的乳酸钠为碳源时, pH先降后升; 而以20 g/L的葡萄糖为碳源时, pH值在丙酸杆菌培养2 d时即降低到4.10, 其后一直保持在3.55以下。

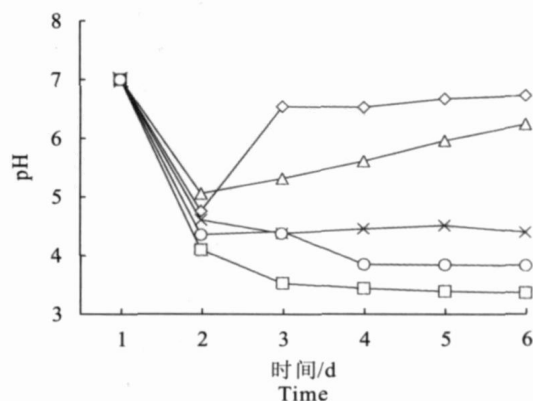


图4 不同质量浓度乳酸钠和葡萄糖培养丙酸杆菌时的pH值变化

- - . 20 g/L 乳酸钠; - □ - . 20 g/L 葡萄糖; - - . 15 g/L 乳酸钠 + 5 g/L 葡萄糖; - × - . 10 g/L 乳酸钠 + 10 g/L 葡萄糖; - ○ - . 5 g/L 乳酸钠 + 15 g/L 葡萄糖

Fig. 4 Variation of pH at different concentrations of sodium lactate and glucose

- - . 20 g/L sodium lactate; - □ - . 20 g/L glucose; - - . 15 g/L sodium lactate + 5 g/L glucose; - × - . 10 g/L sodium lactate + 10 g/L glucose; - ○ - . 5 g/L sodium lactate + 15 g/L glucose

杆菌代谢物在5种培养基中的抑菌活性见图5。

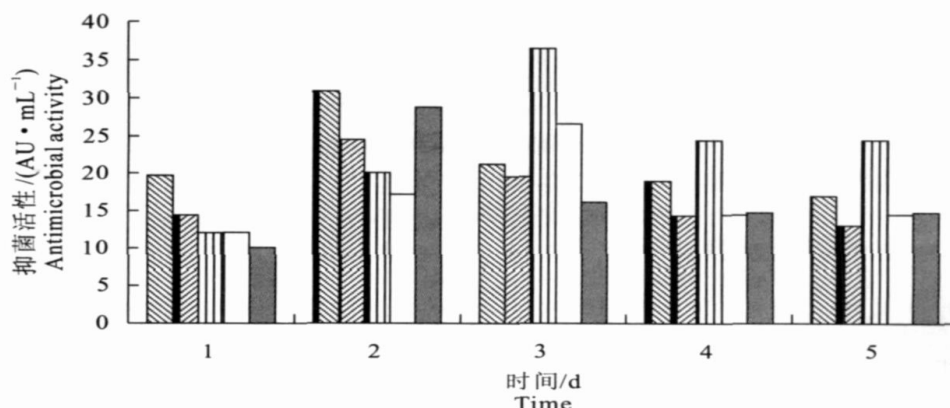


图5 不同质量浓度乳酸钠和葡萄糖培养丙酸杆菌的抑菌活性比较

▨ . 20 g/L 乳酸钠; ▨ . 20 g/L 葡萄糖; ▨ . 15 g/L 乳酸钠 + 5 g/L 葡萄糖; □ . 10 g/L 乳酸钠 + 10 g/L 葡萄糖; ▨ . 5 g/L 乳酸钠 + 15 g/L 葡萄糖

Fig. 5 Comparison of antimicrobial activity of propionibacterium metabolites in different concentrations of sodium lactate and glucose

▨ . 20 g/L sodium lactate; ▨ . 20 g/L glucose; ▨ . 15 g/L sodium lactate + 5 g/L glucose; □ . 10 g/L sodium lactate + 10 g/L glucose; ▨ . 5 g/L sodium lactate + 15 g/L glucose

由图5可知,在以20 g/L 乳酸钠为碳源的培养基中,丙酸杆菌代谢物的抑菌活性最高,可达31.2 AU/mL,以后逐渐降低;在含20 g/L 葡萄糖的培养基中,丙酸杆菌代谢物的抑菌活性也在第2天最高,为24.5 AU/mL。丙酸杆菌代谢物在复合碳源培养基中抑菌活性较大,其中在含15 g/L 乳酸钠+5 g/L 葡萄糖的培养基中,丙酸杆菌代谢物在第3天有最大抑菌活性36.4 AU/mL。因此,若仅考虑丙酸杆菌代谢物的抑菌活性,则含15 g/L 乳酸钠+5 g/L 葡萄糖的培养基是最优的复合碳源培养基。

3 讨论

本试验所用丙酸杆菌代谢物在pH 值较低时有很好的抑菌活性,因此可替代化学防腐剂,特别是可用在酸性食品和酸性饮料中^[10]。用酒石酸来调节pH,是因为其具有金属螯合剂的作用,能促进G⁻细胞膜的渗透能力,增强抑菌物的活性^[11]。江芸等^[12]的研究结果也表明,pH 较低时,Nisin 抑菌活性更高。但是Nisin 一般抑制革兰氏阳性菌,而丙酸杆菌可以抑制革兰氏阴性菌、部分酵母和霉菌。

丙酸杆菌在不同的培养基中生长,其菌体干质量可反映出菌体生长的快慢以及对碳源的利用程度。复合培养基发酵研究表明,薛氏丙酸杆菌在含乳酸盐和葡萄糖的复合培养基上能更好地利用乳酸盐^[13]。本试验结果也表明,在含15 g/L 乳酸钠+5 g/L 葡萄糖的培养基中,丙酸杆菌生长最快。

丙酸杆菌在代谢过程中产生了丙酸、乙酸和乳酸等酸性物质,使pH 值降低^[14],同时其可以利用乳酸作为碳源,因此生长过程中pH 的变化是有机酸消耗和产酸平衡的结果。有资料表明,以葡萄糖作为底物时,细胞内代谢物外流减少,可以平衡细胞外的氧化还原能^[15]。

丙酸杆菌代谢物的抑菌活性在含15 g/L 乳酸钠+5 g/L 葡萄糖的复合碳源培养基中最高,这与丙酸杆菌生长的最适培养基相同。

目前,对该丙酸杆菌代谢物的性质还不太清楚,在以20 g/L 葡萄糖为碳源的培养基中,pH 虽然最低,但其抑菌活性不高,表明起抑菌作用的不是有机酸。因此,对有抑菌活性的代谢物的性质还有待进一

步研究。此外,该丙酸杆菌代谢物的抑菌活性较低,还需通过进一步优化培养条件和菌种改良来提高其抑菌活性。

参考文献

- [1] Stiles M E. Biopreservation by lactic acid bacteria[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 1996, 70: 331-345.
- [2] Helge Holø, Therese Faye, Dag Anders Bredt, et al. Bacteriocins of propionic acid bacteria[J]. EPD Science, 2002, 10: 59-68.
- [3] 陈劲春, 王立仁, 李一, 等. 丙酸杆菌的分离与初步鉴定[J]. 北京化工大学学报, 1999, 26(2): 8-10.
- [4] 仪宏, 王丽丽, 冯惠勇, 等. 丙酸积累对薛氏丙酸杆菌生长及产酸的影响[J]. 微生物学通报, 2003, 30(3): 29-32.
- [5] 刘平, 李晓峰, 谭新敏. 利用大豆黄浆水发酵产生维生素B₁₂的工艺研究[J]. 陕西科技大学学报, 2003, 21(4): 83-85.
- [6] Roberto M C, Mayra de la T. Production of propionate by fed-batch fermentation of *Propionibacterium acidipropionici* using mixed feed of lactate and glucose[J]. International Journal of Food Microbiology, 2002(6): 427-431.
- [7] Marcoux V, Bcaulieu Y C. Production of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* in whey[J]. Bioprocess, 1992, 29: 67-80.
- [8] 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.
- [9] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术[M]. 2版. 北京: 高等教育出版社, 2001: 11-31.
- [10] Holø H, Nilssen O, Nes I F. Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene[J]. Bacteriol, 1991, 173: 3879-3887.
- [11] Henriques M, Quintas C, Loureiro-Dias M C. Extrusion of benzoic acid in *Saccharomyces cerevisiae* by an energy-dependent mechanism[J]. Microbiology, 1997, 143: 1877-1883.
- [12] 江芸, 高峰, 周光宏. 温度、pH 值对Nisin 抑菌活性的影响[J]. 食品科技, 2002(8): 32-34.
- [13] Egli T, Lendenmann U, Snozzi M. Kinetics of microbial growth with mixtures of carbon sources[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 1993, 63: 289-298.
- [14] Piveteau. Metabolism of lactate and sugars by dairy propionibacteria[J]. Lait, 1999, 79(1): 23-24.
- [15] Himmie H, Bories A. Propionic acid fermentation of glycerol and glucose by *Propionibacterium acidipropionici* and *Propionibacterium freudenreichii* spp. *shermanii* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2000, 53: 435-440.