

植物乳酸菌类细菌素特性研究 及其产生条件的优化

解俊梅, 文 汉*

(安徽农业大学生命科学学院, 安徽合肥 230036)

摘 要:通过单因素实验和正交实验优化了乳酸菌产乳酸菌素的培养条件并分析了其特性。结果表明:植物性乳酸杆菌生长的最佳培养条件组合是温度 30℃, 培养基初始 pH 为 6.0, 接种量 4%, 种龄 12h, 厌氧条件下, 培养时间 40h; 乳酸菌菌素对革兰氏阴性菌和酵母菌的抑菌作用最大的最佳培养条件组合是温度 28℃, 培养基初始 pH 为 7.0, 接种量 2%, 种龄 10h, 厌氧条件下, 培养时间 24h。乳酸菌菌素革兰氏阳性菌的抑菌作用最大的最佳培养条件组合是温度 28℃, 培养基初始 pH 为 6.5, 接种量 1%, 种龄 6h, 厌氧条件下, 培养时间 40h。在排除酸性产物和过氧化氢的干扰后, 该乳酸菌发酵液对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌等革兰氏阳性菌和大肠杆菌、鸡白痢沙门氏菌等革兰氏阴性菌具有较好的抑制作用, 而且对部分真菌也有抑制作用; 经胰蛋白酶、胃蛋白酶和木瓜蛋白酶处理后发酵液抑菌活性略有下降, 表明乳酸菌素为非蛋白成分或起抑菌作用的非单一物质。它具有很好的热稳定性, 在酸性条件下稳定且活性高, 对蛋白酶敏感性低, 且具有较广的抑菌谱。

关键词:发酵条件优化, 正交实验, 指示菌, 类细菌素

Characteristics and optimization producing conditions of bacteriocin-like from *Lactobacillus plantum*

XIE Jun-mei, WEN Han*

(School of Life Science, Anhui Agriculture University, Hefei 230036, China)

Abstract: Lactobacillus production of lactic acid bacteria bacteriocin culture conditions was optimized by single factor experiment and orthogonal and its characteristics was analyzed. The results showed that: the best vegetative growth of lactic acid bacteria was a combination of culture conditions at 30℃, initial pH 6.0 with inoculum amount of 4%, seed age 12h, anaerobic conditions for 40h. *Lactobacillus streptozotocin* on Gram-negative bacteria and yeast inhibition optimum culture conditions for the largest combination of the temperature 28℃, initial pH 7.0 with inoculum amount of 2%, seed age 10h, anaerobic conditions for 24h. Gram-positive lactic acid bacteria *Streptomyces* antibacterial effects had the best combination of culture conditions of temperature 28℃, initial pH 6.5 medium, inoculum 1%, seed age 6h, anaerobic conditions for 40h. Without effect of organic acids and hydrogen peroxide, the cell-free liquid culture of *Lactobacillus* showed high inhibitory activity against gram-positive bacteria, including *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* Rosenbach and gram-negative bacteria, such as *Escherichia coli* and *Salmonella typhimunius*, but also inhibited some fungi. Therefore, the inhibitory substance produced by the lactic acid bacteria was assumed bacteriocin-like substance. Lactic acid bacteria showed it was stable to heat, active at low pH, not sensitive to proteinase and broad antibacterial spectrum.

Key words: optimization of fermentation conditions; orthogonal test; indicator bacteria; bacteriocin-like substance

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2011)11-0093-06

乳酸菌(*lactic acid bacteria*, LAB)是一群杆状或球状的革兰氏阳性细菌。最新的研究资料表明,已报道的乳酸菌有 23 个属,广泛存在于人和动物的肠道和其他与外界相通的生理环境中,许多食品、饲料,以及自然界的许多物料中也有乳酸菌的存在^[1]。乳酸菌产生具有抑菌或杀菌效果的有机酸、过氧化

氢、双乙酰和细菌素。细菌素(bacteriocin)是某些细菌在代谢过程中通过核糖体合成机制产生的具有抑菌活性的肽类或蛋白质,一般只对亲缘关系较近的细菌有毒害作用,而对革兰氏阴性菌和真菌无效。如乳酸菌素(LAB of Bacteriocins)中 nisin 被公认为安全且是唯一被批准使用的食品生物防腐剂,在乳制品及罐头制品中得到了广泛的应用^[2]。但是,后来的很多研究表明,乳酸菌产生很多类似细菌素混合物,这些混合物能够广泛地抑制病原菌和腐败菌。

收稿日期: 2010-11-19 * 通讯联系人

作者简介: 解俊梅(1981-),女,硕士研究生,研究方向: 次生代谢产物。

人们把陆续发现的一些不符合或不完全符合细菌素定义的拮抗物质,称为类细菌素(bacteriocin-like substance)。类细菌素对革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌和真菌等都具有抑制作用,因此应用前景更为广泛。尽管有人认为在发酵食品和活菌制剂中直接使用产细菌素的乳酸菌比添加细菌素更加节约成本,但随着国内市场的发展,作为极具潜力的生物防腐剂的细菌素倘若作为保健品或更高级别的产品功效成分出现,对其加强基础研究,包括进行提取、纯化及结构鉴定是必要的。国外对许多细菌素的研究都包括了提取、纯化和结构鉴定等方面的工作。本研究运用牛津杯扩散法作为检测方法,对乳酸菌所产的具有广谱抑菌活性物质的特性及产生条件进行了研究,以期为其应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

植物乳酸菌(*Lactobacillus plantum*)、酵母菌(yeast)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、鸡白痢沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)及枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* Rosenbach) 安徽农业大学生命科学学院生物化学实验室提供;胰蛋白酶、过氧化氢酶 AMRESCO 公司;胃蛋白酶 BIOSHARP 公司;木瓜蛋白酶;MRS 培养基、LB 培养基、牛肉膏蛋白胨培养基、PDA 培养基。

1.2 实验方法

1.2.1 指示菌悬液的制备 参考文献[2]的方法。

1.2.2 发酵液的制备 参考文献[3]的方法。

1.2.3 抑菌实验^[2,7] 取发酵液 150 μ L,按文献[2,7]进行抑菌实验。

1.2.4 乳酸菌生长曲线的制作^[4] 将收集的每个培养时间下的发酵液,pH调至4.0做抑菌实验,测定抑菌圈直径。

1.2.5 发酵液的抑菌谱测定^[2] 以金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、鸡白痢沙门氏菌和两种不同的大肠杆菌及酵母菌、黑曲霉菌为指示菌,牛津杯双层培养基法做抑菌实验。

1.2.6 培养条件优化

1.2.6.1 单因素实验^[4] a.培养温度对抑菌物质产量的影响:分别将接种乳酸菌的 MRS 液体培养基置于不同的温度(27、30、37、42 $^{\circ}$ C)下培养 48h,测定菌体生长,做抑菌实验测定抑菌圈直径。

b.培养基初始 pH 对抑菌物质产量的影响:将 MRS 液体培养基初始 pH 分别调至 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0 接种,37 $^{\circ}$ C 培养 48h,测定菌体生长,做抑菌实验测定抑菌圈直径。

c.培养时间对抑菌物质产量的影响:分别以 1% 的接种量接种数支于 MRS 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养,在不同时间(0~68h)取样,测 OD 值和 pH,做抑菌实验测定抑菌圈直径。

d.接种量对抑菌物质产量的影响:分别以 0.5%、1.0%、2.0%、4.0%、8.0% 的接种量接入 MRS 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养 48h,测定菌体生长,做抑菌实验测

定抑菌圈直径。

e.种龄对抑菌物质产量的影响:分别将 6、8、10、12、14、16、18、20、22、24h 的不同种龄的乳酸菌种子接入 MRS 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养 48h,测定菌体生长,做抑菌实验测定抑菌圈直径。

f.供氧量对抑菌物质产量的影响:有氧培养:以 1% 接种量接种于纱布塞的三角瓶中,37 $^{\circ}$ C 培养 48h;厌氧培养:以 1% 接种量于 E_p 管中,37 $^{\circ}$ C 培养 48h,测定菌体生长。

1.2.6.2 正交实验确定培养条件的最佳组合 通过单因素实验确定了最佳培养温度、培养基初始 pH、最佳接种量、最佳种龄、最佳培养时间、最佳供氧条件。为了进一步确定最佳培养条件的组合,取五种影响因子培养温度、培养基初始 pH、接种量、种龄、培养时间,各因子各取 4 个水平。因素水平表见表 1,采用 L₁₆(4⁵) 正交表安排实验^[4]。

表 1 培养条件优化正交设计实验因素水平表

水平	因素				
	温度 ($^{\circ}$ C)	pH	接种量 (%)	种龄 (h)	培养时间 (h)
1	28	5.5	0.5	6	24
2	30	6.0	1	8	32
3	37	6.5	2	10	40
4	42	7.0	4	12	12

1.2.6.3 抑菌实验 同 1.2.3。

1.2.7 乳酸菌产抑菌物质特性的研究^[2-5]

1.2.7.1 温度对发酵液中抑菌物质效价的影响 将发酵液分两组,一组在 121 $^{\circ}$ C 高压锅内处理 20min,另一组不经过高温湿热处理,分别加入 1 号、2 号牛津杯中,分别以大肠杆菌、鸡白痢沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、酵母菌作为指示菌进行抑菌实验。

1.2.7.2 蛋白酶对发酵液上清抑菌效价的影响^[8] 将发酵液分成 4 管,其中三管分别加入胃蛋白酶(3mg/mL)、木瓜蛋白酶(3mg/mL),胰蛋白酶(3mg/mL) 3 管同时在 37 $^{\circ}$ C 下水浴 2h,以未处理的发酵液和同相应酶终浓度的无菌水溶液作对照,处理后样液的 pH 调至原发酵液的 pH。再分别以枯草芽孢杆菌等活菌为指示菌进行抑菌实验。

1.2.7.3 发酵液抑菌物质中过氧化氢干扰的排除 取乳酸菌发酵液 2mL,加过氧化氢酶到终浓度为 15mg/mL,37 $^{\circ}$ C 处理 2h,以未处理的发酵液和同过氧化氢酶浓度的无菌水溶液作对照,处理后样液的 pH 调至原发酵液的 pH,分别以枯草芽孢杆菌等活菌为指示菌进行抑菌实验。

1.2.7.4 酸对发酵液抑菌效价的影响 用 pH 计测量发酵液的 pH 为 3.75,分别配制 pH 为 3.75 的盐酸和乳酸,利用牛津杯双层培养基平板法测定发酵液及盐酸和乳酸的抑菌活性。

1.2.7.5 观察不同 pH 对发酵液抑菌活性的影响 用 1mol/L 的乳酸调节发酵液上清的 pH,使上清的 pH 分别为 3.0、4.0、4.5、5.0、6.0,以枯草芽孢杆菌等活菌为指示菌进行抑菌实验。

表2 乳酸菌发酵液的抑菌谱($\bar{X} \pm s$) $n=3$

指示菌	大肠杆菌1	大肠杆菌2	鸡白痢沙门氏菌	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	酵母菌	黑曲霉
抑菌圈直径(mm)	28.5 ± 0.71	21.0 ± 1.87	23.7 ± 0.82	25.8 ± 2.16	25.8 ± 0.41	28.8 ± 0.32	0

2 结果与分析

2.1 生长曲线

图1显示,乳酸菌菌株在培养2h后即进入对数生长期,8h以后进入稳定期并一直持续下去,在30~38h,菌数有波动,38h后菌数又趋于稳定。图上未见明显的延滞期和衰亡期。

细菌的生长过程中,各个时期的长短取决于菌种特性和培养条件。延滞期长短取决于菌种遗传性状、种龄、接种前后培养条件的差异等,自几分钟到数小时不等。图中未见明显的延滞期是因为此乳酸菌菌株接种后的培养条件与之前进行活化的培养基均为MRS培养基,缩短或消除了延滞期,还可能是因为接种的菌株种龄处于对数生长期,大大缩短了菌株适应新环境的时间。2~8h是该乳酸菌菌株生长的对数期。8h以后进入稳定期,由图1可以看出,该菌株稳定期时间较长。图中未见明显衰亡期可能是因为取样的68h内培养基营养还未耗尽,菌株生长速率与死亡率仍平衡。30~38h内菌数有波动可能是因为培养基性质变化所致。

2.2 抑菌谱的测定

从表2中数据可知,乳酸菌发酵液即对革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌、鸡白痢沙门氏菌,革兰氏阴性菌大肠杆菌、沙门氏菌及真菌有明显的抑菌作用。从而得知,乳酸菌发酵液有广泛的抑菌谱。

2.3 培养条件优化

2.3.1 培养时间对抑菌物质产量的影响 由图1可知,抑菌物质在2h时开始产生,在对数生长期抑菌物质产量持续增加,但在进入稳定期后产量却没有明显增加,而呈上下波动。发酵液对大肠杆菌的抑菌活性在2~6h内持续增加,在20h达到第一个极大值(28.5mm),后又急速减小,但从培养时间上看,对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的影响不同,对大肠杆菌的抑菌圈在16h有个快速下降,而对枯草芽孢杆菌的抑菌圈在22h有个快速下降,而后它们再波动着上升,至抑菌圈大小出现了最大值31.17mm和32.17mm后再下降。

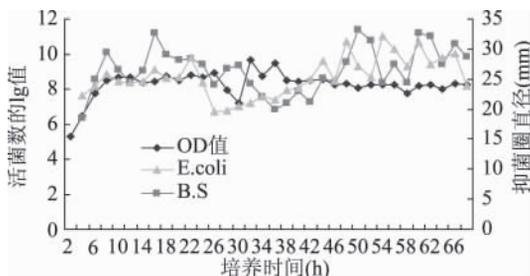


图1 培养时间对培养过程中抑菌作用的影响

这可能是由于稳定期的细胞体积变小,培养基性质如pH发生较大变化,而使抑菌物质产量上下波动。还可知,抑菌物质的产生在对数期内随着细胞

数量的增长而增长,进入稳定期后并不是趋于稳定,而是一直在变化。另外,由图可知,发酵液对大肠杆菌的抑菌活性24~42h内持续增加,而对B.S的抑菌活性却上下波动,由此可知此乳酸菌菌株在同一时间产生的抑菌物质对大肠杆菌和枯草杆菌的抑菌活性变化并不一致,这可能是由于抑菌物质对这两种细菌的抑菌机制不同,仍需继续研究。

抑菌物质的产生在进入稳定期后上下波动,可能是由于抑菌物质的产生是乳酸菌菌株的一种应激调节,是细胞对不良环境的一种应激反应。另外,也有可能是抑菌物质的合成受分解代谢产物或终产物的阻遏抑制,由于胞外代谢产物的累积使得抑菌物质的进一步合成受到抑制,而当分泌到培养基内的抑菌物质分解失活导致产量下降又进一步促使抑菌物质的产生。

2.3.2 培养基初始pH对抑菌物质产量的影响 由图2可以看出,此乳酸菌菌株最适生长pH为6.0。在pH为7.5条件下产生的抑菌物质对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的抑菌活性最大。在其他条件下,细菌素产量虽有波动,但抑菌活性都很大,说明此乳酸菌菌株的抑菌物质的产生有较宽的pH范围。这也说明,抑菌物质的产生与菌体的细胞生长并不是呈现严格的正比关系,而是都具有其最适pH及其能够耐受的pH范围。

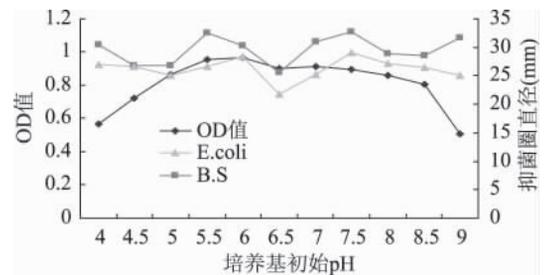


图2 培养基初始pH对培养过程中抑菌作用的影响

2.3.3 培养温度对抑菌物质产量的影响 如图3所示,培养温度在37℃时菌体生长最好,同时抑菌物质活性在37℃培养时达到最高,培养温度超过37℃,抑菌物质产量开始下降。说明此乳酸菌在最适生长温度下抑菌物质产量最高。培养温度超过37℃,发酵液对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的抑菌活性都有不同程度的下降,这可能是随着培养温度的上升,抑菌物质的产生受到了抑制。

2.3.4 接种量对抑菌物质产量的影响 图4显示,接种量为1%时,发酵液对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的抑菌活性均为最大。由此可知,接种量为1%时抑菌物质的产量最大。当接种量超过1%时,发酵液对两种细菌菌株的抑菌活性有不同程度的下降,可能是由于随着接种量的增大,培养基内乳酸菌之间生长竞争加剧,培养基性质改变,环境条件恶化,使乳酸

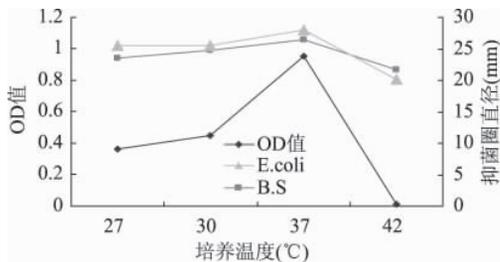


图3 培养温度对培养过程中抑菌作用的影响

菌群体生长下降,因而抑菌物质产量下降。

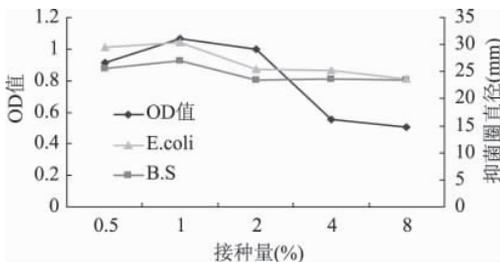


图4 接种量对培养过程中抑菌作用的影响

2.3.5 种龄对抑菌物质产量的影响 由图5可知,当种龄为6h时,此乳酸菌菌株生长量最大;种龄为8h时,发酵液对大肠杆菌的抑菌活性最大,种龄大于8h则抑菌物质产量开始下降;种龄为6h时,发酵液对枯草芽孢杆菌的抑菌活性最大,种龄大于6h则抑菌物质产量开始下降。由此说明,接种对数期的种子不仅可以获得很高的菌体生长量,还可以获得很高产量的抑菌物质。这是因为对数期种子生命力最为旺盛,接种后大大缩短了菌株适应新环境的时间,因而迅速生长,并迅速合成抑菌物质。此外,在同样条件下产生的抑菌物质对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的抑菌活性并不一致,这可能是由于抑菌物质对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的抑菌机理不同所致。

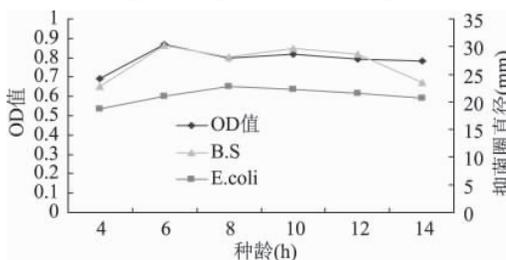


图5 种龄对培养过程中抑菌作用的影响

2.3.6 供氧量对菌体生长的影响 供氧量对菌体生长的影响实验结果如表3,结果表明,厌氧条件下乳酸菌菌株生长要优于好氧条件。

表3 供氧量对菌体生长的影响

培养条件	有氧	厌氧
OD ₆₀₀	1.0	1.4

2.3.7 正交实验确定培养条件的最佳组合 正交实验因素水平如表1。正交实验结果如表4所示,由R₁的值可知,温度对乳酸菌菌株的生长影响最大,各因素主次关系为温度>种龄>接种量>培养基初始pH。根据正交实验极差分析结果和进一步的验证实验,确定乳酸菌菌株生长的最佳培养条件组合是温度30℃,培养基初始pH为6.0,接种量4%,种龄12h,培养时间40h。

由R₂的值可知,温度对乳酸菌菌株产细菌素对大肠杆菌的抑菌作用的影响最大,各因素的主次关系为温度>培养时间>种龄>培养基初始pH>接种量。根据正交实验极差分析结果和进一步的验证实验,确定乳酸菌菌株产抑菌物质对大肠杆菌的抑菌作用最大的最佳培养条件组合是温度28℃,培养基初始pH为7.0,接种量2%,种龄10h,培养时间24h。

由R₃的值可知,温度对乳酸菌菌株产细菌素对B.S.的抑菌作用的影响最大,各因素的主次关系为温度>培养时间>接种量>种龄>培养基初始pH。根据正交实验极差分析结果和进一步的验证实验,确定乳酸菌菌株产抑菌物质对B.S.的抑菌作用最大的最佳培养条件组合是温度28℃,培养基初始pH为6.5,接种量1%,种龄6h,培养时间40h。

2.4 抑菌物质的特性分析^[6-9]

2.4.1 温度对发酵液中抑菌物质活性的影响 实验结果表明,发酵液经高温处理和未经高温处理都有抑菌作用,高温高压对发酵液的抑菌效果基本上没有影响。因此,抑菌物质耐高温湿热。实验结果见表5。

2.4.2 蛋白酶对发酵液上清的抑菌活性的影响 从实验结果可以看到,经过蛋白酶处理的发酵液、蛋白酶并高温处理的发酵液以及未经处理的发酵液都有抑菌活性,而蛋白酶溶液没有抑菌活性,可排除蛋白酶溶液对实验的干扰。

蛋白酶处理、蛋白酶并高温处理与未处理的发酵液抑菌圈相比,只是略微的缩小,说明发酵液中的抑菌物质对胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、胃蛋白酶不敏感,对高温也不敏感,发酵液中抑菌物质不是蛋白类。

以酵母菌为指示菌的实验抑菌圈更大,可能是由于指示菌菌液浓度不同造成的实验误差,也可能是说明酵母菌对此种抑菌物质更为敏感。实验结果见表6。

2.4.3 发酵液中抑菌物质的过氧化氢排除 过氧化氢酶溶液对三种指示菌均没有抑菌作用,经过过氧化氢酶处理的发酵液依然有抑菌作用,未过氧化氢酶处理的发酵液也有抑菌活性,经过过氧化氢酶处理的发酵液比未经处理的发酵液的抑菌圈直径小一些,说明发酵液中有抑菌作用的物质是混合物,少量的过氧化氢也有抑菌作用。实验结果见表7。

2.4.4 发酵液中抑菌物质酸的抑菌作用排除 发酵液的pH为3.75,相同pH的盐酸和乳酸溶液对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和酵母菌都没有抑菌作用;发酵液对这三种指示菌均有抑菌活性,说明发酵液中的抑菌物质不是酸类。实验结果见表8。

表8 发酵液中抑菌物质酸的抑菌作用的排除($\bar{X} \pm s$), n=3

指示菌	大肠杆菌	枯草芽孢杆菌	酵母菌
乳酸 pH3.75	0.0	0.0	0.0
盐酸 pH3.75	0.0	0.0	0.0
发酵液 pH3.75	22.3 ± 1.5	22.4 ± 2.0	19.5 ± 1.7

2.4.5 观察不同pH对发酵液抑菌活性的影响 数据表明起抑菌作用的物质在pH≥4.5时,基本无抑菌作用,在pH3.0~4.5时,有明显的抑菌作用。抑菌圈在相应的抑菌范围内随着pH增大有所减小,说明这种抑菌物质依赖酸作用。实验结果见图6。

表4 培养条件优化正交设计实验结果

实验号	因素					结果		
	温度(°C)	pH	接种量(%)	种龄(h)	时间(h)	OD 值	抑菌圈(<i>E.coli</i>)直径(mm)	抑菌圈(<i>B.S</i>)直径(mm)
1	1	1	1	1	1	0.3553 ± 0.0116	29.83 ± 1.607	32.33 ± 5.008
2	1	2	2	2	2	0.9013 ± 0.0092	27.50 ± 1.323	34.67 ± 8.083
3	1	3	3	3	3	0.9607 ± 0.0347	32.00 ± 1.233	36.50 ± 8.322
4	1	4	4	4	4	0.9103 ± 0.0248	30.67 ± 1.156	36.67 ± 9.452
5	2	1	2	3	4	0.8860 ± 0.0465	24.67 ± 2.516	32.67 ± 4.163
6	2	2	1	4	3	0.9670 ± 0.0026	23.00 ± 1.732	30.00 ± 3.464
7	2	3	4	1	2	0.9077 ± 0.0422	21.33 ± 1.323	31.00 ± 4.440
8	2	4	3	1	2	0.8430 ± 0.0279	24.67 ± 2.082	22.67 ± 2.516
9	3	1	3	4	2	0.7893 ± 0.0315	20.33 ± 0.577	23.17 ± 1.893
10	3	2	4	3	1	0.8117 ± 0.0186	22.67 ± 1.155	24.33 ± 2.082
11	3	3	1	2	4	0.7220 ± 0.0095	22.17 ± 1.258	26.83 ± 0.764
12	3	4	2	1	3	0.6397 ± 0.0493	21.83 ± 1.258	30.67 ± 1.527
13	4	1	4	2	3	0.5633 ± 0.0219	21.33 ± 1.527	28.33 ± 2.309
14	4	2	3	1	4	0.3553 ± 0.0251	20.00 ± 1.000	26.83 ± 4.481
15	4	3	2	4	1	0.9013 ± 0.0187	21.33 ± 0.577	24.83 ± 0.289
16	4	4	1	3	2	0.9607 ± 0.0123	20.50 ± 1.500	25.33 ± 0.577
K ₁₁	0.7825	0.6485	0.6270	0.6018	0.6312	T = 9.290	T = 386.3	T = 466.8
K ₂₁	0.9009	0.7962	0.7354	0.7574	0.7655			
K ₃₁	0.7407	0.7763	0.7744	0.7805	0.7827			
K ₄₁	0.5116	0.7148	0.7988	0.7959	0.7563			
R ₁	0.3893	0.1477	0.1718	0.1941	0.1515			
K ₁₂	30.00	24.04	23.88	23.25	24.63			
K ₂₂	23.42	23.29	23.83	23.92	22.42			
K ₃₂	21.75	24.21	24.25	24.96	24.54			
K ₄₂	20.79	24.42	24.00	23.83	24.38			
R ₂	9.208	1.125	0.4167	1.708	2.208			
K ₁₃	35.04	29.13	28.63	30.21	26.04			
K ₂₃	29.08	28.96	30.71	28.13	28.54			
K ₃₃	26.25	29.79	27.29	29.71	31.38			
K ₄₃	26.33	28.83	30.08	28.67	30.75			
R ₃	8.792	0.9583	3.417	2.083	5.333			

表5 温度对发酵液中抑菌物质活性的影响($\bar{X} \pm s$) $n = 3$

指示菌	大肠杆菌	枯草芽孢杆菌	酵母菌
高温灭菌后抑菌圈(mm)	26.5 ± 0.9	21.8 ± 1.0	25.8 ± 1.2
未高温处理的抑菌圈(mm)	28.7 ± 3.2	25.2 ± 2.7	26.4 ± 1.1

表6 蛋白酶对发酵液上清抑菌活性的影响($\bar{X} \pm s$) $n = 3$

指示菌	蛋白酶的处理方式	蛋白酶处理	蛋白酶并高温处理	未处理	蛋白酶溶液
大肠杆菌	胃蛋白酶处理(mm)	17.6 ± 4.2	16.3 ± 1.3	18.7 ± 2.4	0.0
	胰蛋白酶处理(mm)	14.7 ± 0.6	18.3 ± 0.6	19.1 ± 0.6	0.0
	木瓜蛋白酶处理(mm)	17.5 ± 1.2	18.8 ± 0.9	18.0 ± 3.2	0.0
枯草芽孢杆菌	胃蛋白酶处理(mm)	15.4 ± 1.5	15.9 ± 1.3	18.5 ± 2.1	0.0
	胰蛋白酶处理(mm)	16.3 ± 0.4	17.6 ± 3.1	17.1 ± 2.5	0.0
	木瓜蛋白酶处理(mm)	14.0 ± 1.3	17.7 ± 0.1	16.6 ± 0.8	0.0
酵母菌	胃蛋白酶处理(mm)	25.9 ± 0.2	14.0 ± 2.3	29.7 ± 0.6	0.0
	胰蛋白酶处理(mm)	28.3 ± 0.6	25.4 ± 1.8	24.1 ± 2.1	0.0
	木瓜蛋白酶处理(mm)	20.7 ± 2.4	21.0 ± 1.7	17.3 ± 3.0	0.0

表7 发酵液中抑菌物质的过氧化氢的排除($\bar{X} \pm s$) $n = 3$

编号	1	2	3	4
大肠杆菌抑菌圈(mm)	0.0	20.6 ± 1.5	24.1 ± 0.2	0.0
枯草芽孢杆菌抑菌圈(mm)	0.0	19.7 ± 1.2	18.8 ± 0.7	0.0
酵母菌抑菌圈(mm)	0.0	16.3 ± 1.0	23.4 ± 1.2	0.0

注: 1-无菌 MRS 液体培养基; 2-6mg/mL 过氧化氢酶处理过的乳酸发酵液; 3-未经处理的发酵液; 4-6mg/mL 的过氧化氢酶水溶液。

(下转第 100 页)

表1 PEF处理的Glu/Gly溶液在贮藏期的美拉德反应变化

贮藏温度 ($^{\circ}\text{C}$)	不同处理 吸光度	贮藏时间(d)			
		0	7	14	21
5	一般对照	0.013 ± 0.0008	0.081 ± 0.0024	0.101 ± 0.0084	0.106 ± 0.0029
	热对照	0.014 ± 0.0022	0.059 ± 0.0035	0.097 ± 0.0048	0.105 ± 0.0033
	PEF	0.030 ± 0.0005	0.128 ± 0.0201	0.150 ± 0.0052	0.180 ± 0.0039
25	一般对照	0.013 ± 0.0004	0.137 ± 0.0028	0.161 ± 0.0078	0.194 ± 0.0104
	热对照	0.014 ± 0.0005	0.140 ± 0.0006	0.152 ± 0.0026	0.212 ± 0.0021
	PEF	0.030 ± 0.0008	0.188 ± 0.0167	0.229 ± 0.0216	0.294 ± 0.0010
37	一般对照	0.015 ± 0.0010	0.166 ± 0.0013	0.191 ± 0.0148	0.208 ± 0.0078
	热对照	0.015 ± 0.0010	0.169 ± 0.0006	0.202 ± 0.0295	0.247 ± 0.0014
	PEF	0.031 ± 0.0024	0.231 ± 0.0143	0.287 ± 0.0006	0.315 ± 0.0122

注:表中数据为平均数 \pm 标准差, $n=3$ 。

期模拟溶液美拉德反应的后效应影响更强。

参考文献

- [1]李菲,董文宾,高洁,等.浓缩苹果汁的褐变与控制措施[J].饮料工业,2007,10(11):5-7.
- [2]赵光远,张勇,邹青松,等.热协同超高压加工鲜榨苹果汁贮藏过程中色泽稳定性研究[J].食品与发酵工业,2008,34(5):185-189.
- [3]Zhong K,Chen F,Wang Z F,et al.Inactivation and kinetic model for the Escherichia coli treated by a coaxial pulsed electric field[J].European Food Research and Technology,2005,221(6):472-478.
- [4]Zhong K,Chen F,Wu J H,et al.Kinetics of inactivation of escherichia coli in carrot juice by pulsed electric field[J].Journal of Food Process Engineering,2005,28:595-609.
- [5]徐娅莉,曾新安,王德培,等.脉冲电场对食品中酶的影响

- [J].食品研究与开发,2005,26(6):72-76.
- [6]Vega-Mercado H,Martin-Belloso O,Qin B L,et al.Non-thermal food preservation: PEF[J].Trends in Food Science and Technology,1997,8(5):151-157.
- [7]廖小军,钟葵,王黎明,等.高压脉冲电场对橙汁大肠杆菌和理化性质的影响效果[J].食品科学,2003,24(6):59-61.
- [8]钟葵,廖小军,梁楚霖,等.脉冲电场和热处理对鲜榨苹果汁贮藏期品质的影响[J].食品与发酵工业,2004,30(8):49-54.
- [9]M Del P B,Jorge C,Silvia L R,et al.Nonenzymatic browning in liquid model systems of high water activity: Kinetics of color changes due to Maillard's reaction between different single sugars and glycine and comparison with caramelization browning[J].Journal of Food Science,1987,52(4):1063-1067.
- [10]郭际,蔡长河,曾庆孝.模型溶液研究荔枝干制过程中的非酶褐变反应[J].食品工业科技,2007,28(5):71-74.

(上接第97页)

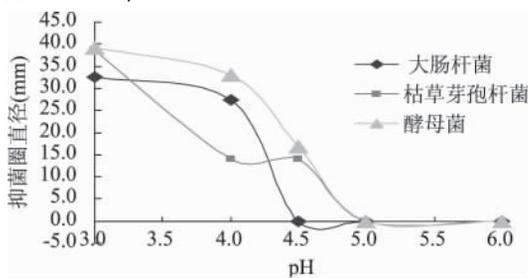


图6 pH对发酵液的抑菌活性的影响

3 结论

经过一系列的实验,证明本研究所采用的植物乳酸菌能够产生抑菌物质。该抑菌物质对革兰氏阳性菌枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和革兰氏阴性菌大肠杆菌、鸡白痢沙门氏菌及酵母菌均有抑菌作用,具有广谱性;此物质耐高温,对胰蛋白酶、胃蛋白酶和木瓜蛋白酶不敏感,在 $\text{pH} < 4.5$ 对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌及部分真菌有抑制作用,是非过氧化氢物质;从初步实验结果判断,该物质为非蛋白成分或非单一物质,不符合细菌素的定义,推测其为类乳酸菌素。由于该植物乳酸菌所产抑菌物质能抑制包括大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌等在内的常见食源性和人畜共患病的腐败菌和病原菌,因此在调节肠道微生态、食物防腐和医药等领域都有一定应用潜力。

本实验还证明,抑菌物质在细胞刚刚开始生长时就有产生,且产量很高。这意味着在发酵工业生产中,只需将此乳酸菌菌株培养2~8h,就能获得很高的抑菌物质产量。这也决定了此乳酸菌菌株在将来有很广阔的应用前景。

参考文献

- [1]张刚.乳酸细菌-基础、技术和应用[M].北京:化学工业出版社,2006.
- [2]张艾青,刘书亮,詹莉,等.产广谱细菌素乳酸菌的筛选[J].中国酿造,2007,167(2):45-48.
- [3]储卫华,曹映海,高国锋.筛选产类细菌素及类细菌素特性研究[J].微生物学杂志,2006,26(1):23-25.
- [4]张国强,师俊玲,杨自文.乳酸杆菌SD-22产抑菌物质发酵条件的优化[J].中国食品学报,2009,9(1):137-142.
- [5]胡淑敏,季明杰.产广谱细菌素乳酸菌的筛选[J].山东大学学报,2008,43(7):61-64.
- [6]牟广庆,李霞,李慧,等.广谱乳酸菌素的研究[J].生物工程,2008,29(11):469-472.
- [7]Virginia SO,Aida AP,Maria EN.Characterization of bacteriocin-like substance produced by a vaginal lactobacillus salivarius strain[J].Appl Environ Microbiol,1999,65(5):5631-5635.
- [8]凌代文,陈秀珠.乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M].北京:中国轻工业出版社,1999.