

pH吸附法纯化乳酸片球菌素的研究

康牧旭,周志江*

(天津大学农业与生物工程学院,天津 300072)

摘要:将乳酸片球菌 PA003 接种于 MRS 液体培养基,37℃ 静置培养 16h 产生片球菌素。通过建立效价标准曲线来测定片球菌素的效价,为了确定片球菌素对产生菌细胞的 pH 吸附特性,研究在不同的 pH 条件下,片球菌素对产生菌细胞吸附率的大小。结果表明,在不同的 pH 条件下片球菌素活性较为稳定,而且对产生菌细胞的吸附率不同,pH6.0 时吸附率可达 60%,而在 pH 小于 3.0 或 pH 大于 10.0 时,吸附率为 0。这一结果表明了片球菌素对细胞的吸附是具有 pH 依赖性的,这一特性将有助于对片球菌素的分离纯化。

关键词:乳酸片球菌,细菌素,吸附-解吸

Study on purification of pediocin by pH-based adsorption and desorption

KANG Mu-xu, ZHOU Zhi-jiang*

(School of Agriculture and Bioengineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: Fresh culture of *Pediococcus acidilactici* strain was inoculated in MRS broth and cultivated at 37℃ for 16h. Standard curve of antimicrobial activity was established, so that antimicrobial activity of pediocin could be determined. To determine the pH-adsorption character of pediocin onto producing bacteria, the adsorption rate was studied under different pH conditions. The result indicated that the activity of pediocin under different pH conditions was comparatively stable and the adsorption rate was 60% at pH6.0, while no pediocin was adsorbed below pH3.0 or above pH10.0. The finding suggests that the adsorption of pediocin onto the cells was pH-dependent and this character could be helpful to the abstraction of the pediocin.

Key words: *Pediococcus acidilactici*; bacteriocin; adsorption-desorption

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2009)07-0094-03

乳酸菌细菌素是指乳酸菌在代谢过程中由核糖体合成的一类具有抑菌活性的多肽或蛋白质复合物,其抑菌活性主要针对革兰氏阳性细菌和一些亲缘关系相近的乳酸菌种类,特别是食物的腐败菌和食源的致病菌,而对革兰氏阴性细菌和真菌一般则无效^[1]。到目前为止,已报道的乳酸菌细菌素约有 60 余种,除 Nisin 研究最为广泛深入,并在 50 多个国家得到应用外,其他仅限于实验室研究。对于乳酸片球菌素的研究主要包括分离纯化研究、物理化学性质研究、生物特性研究、基因水平上的翻译表达研究、毒性研究、免疫学上的特性研究、食品上的应用研究等^[2]。本实验室从发酵酸菜中分离得到一株乳酸片球菌^[3],可以分泌乳酸片球菌素,并且已经对这种片球菌素的理化性质^[4]做了一定的研究,但是对这种片球菌素的进一步研究很大程度上依赖于建立一种好的纯化方法。在细菌素的纯化过程中,最常用的方法包括硫酸铵沉淀、凝胶层析、离子交换层析、

反相高效液相色谱等,然而这些方法存在步骤繁多、耗时、回收率低的问题^[5]。Bhunia A K 等在研究乳酸片球菌素 AcH 的过程中发现了片球菌素对敏感指示菌 *Lactobacillus plantarum* NCD0955 细胞的吸附具有 pH 依赖性^[6]; Yang R 等人第一次借用细菌素的以上特性建立了快速纯化方法^[7]。目前采用这种方法已经纯化出很多细菌素,是用于初步纯化的良好方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

细菌素产生菌乳酸片球菌 (*Pediococcus acidilactici*) PA003 本实验室分离得到;指示菌单核细胞增多症李氏杆菌 (*Listeria monocytogenes*) CVCC1595 购于中国兽药监察中心。乳酸片球菌用 MRS 培养基^[8]培养,单核细胞增多症李氏杆菌用营养肉汤培养基培养。把 1.5% 琼脂粉加入到 MRS 中制备固体培养基,0.8% 的琼脂粉加入到营养肉汤培养基中制备软琼脂培养基。

PHS-3B 精密 pH 仪 上海雷磁仪器厂;KDC-160HR 高速冷冻离心机 科大创新股份有限公司中佳分公司;紫外凝胶成像仪 GIS-2009 上海天能科

收稿日期:2008-11-10 * 通讯联系人

作者简介:康牧旭(1984-),男,在读硕士,研究方向:食品安全。

基金项目:国家自然科学基金项目(30571378)。

技有限公司; HVE-50 高压蒸汽灭菌锅器 日本 Hirayama 公司。

1.2 片球菌素效价分析方法

抑菌实验采用牛津杯双层平板法^[9]进行;片球菌素效价测定采用二倍稀释法^[10]与标准曲线法^[11]结合的方法。将发酵液离心取上清液,并透过无菌硝酸纤维素膜得到片球菌素提取液,将提取液用5mmol/L的磷酸钠缓冲液(pH6.5)进行二倍稀释,取样50 μ L进行抑菌实验,观察不到抑菌圈出现的最高稀释度定义为一个活力单位(AU, arbitrary units),其倒数即是样品的细菌素效价值(AU/mL)。在一定的浓度范围内,效价的对数值与抑菌圈直径成直线函数的关系,因而可用已知效价值的片球菌素溶液的不同浓度所对应的抑菌圈直径制作抑菌效价标准曲线,对应即可将抑菌圈直径转换为效价,在一定浓度范围内可以精确表示片球菌素效价。以不同浓度与中心浓度的片球菌素液抑菌圈直径的差值为横坐标,对应的效价对数值为纵坐标,绘制标准曲线。未知效价的样品稀释至此浓度范围内,同理以此法得出与中心浓度的片球菌素液抑菌圈直径的差值,根据标准曲线计算可得效价。

1.3 pH 稳定性实验^[7]

分别取2.0mL的片球菌素提取液于10个试管中,用5%的磷酸和1mol/L NaOH调pH分别为2.0~11.0,4 $^{\circ}$ C放置12h,调pH至中性(pH7.0)后,用牛津杯双层平板法测抑菌活性(以抑菌圈直径表示)。

1.4 吸附用细胞的制备^[7]

将乳酸片球菌 PA003 按 1% (V/V) 接种量接种于 100mL MRS 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养 16h,8000r/min,离心 10min,收集培养好的产生菌细胞。用 5mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH7.4)冲洗细胞,将洗净的细胞重悬于 1.0mol/L NaCl 中,用 5% 的磷酸调 pH 至 2.0,在 4 $^{\circ}$ C 震荡 1h,以确保细胞表面已没有吸附的片球菌素。8000r/min,离心 10min 收集菌体细胞并重悬于 10mL 无菌水中。

1.5 片球菌素对产生菌的吸附实验^[7]

将 1mL 640AU/mL 效价的片球菌素提取液与 1.8mL 5mmol/L 磷酸盐缓冲液混合,用 5% 的磷酸和 1mol/L NaOH 调 pH 在 2.0~11.0 之间,然后取 0.1mL 产生菌细胞悬液与上述混合物混合,于 30 $^{\circ}$ C 缓慢震荡 2h,离心后检测上清液中的效价。对照 1 是用 1mL 的水代替 1mL 的片球菌素的片球菌素提取液,对照 2 是用 0.1mL 的水代替加入的细胞悬液。

片球菌素的吸附率

$$= 1 - \frac{\text{上清液中的效价} - \text{对照 1 的效价}}{\text{对照 2 的效价}} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 片球菌素效价分析

由二倍稀释法确定了乳酸片球菌培养 16h 后离心取上清的效价为 640AU/mL,且在 64~640AU/mL 的范围内,抑菌圈直径差与效价对数值呈线性关系,可绘出效价标准曲线(见图 1)。

2.2 pH 稳定性分析

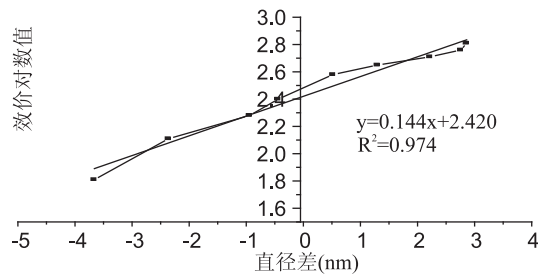


图 1 片球菌素效价标准曲线

我们利用牛津杯双层平板法测定了不同 pH 下片球菌素的抑菌圈直径,以便对片球菌素在不同 pH 条件下的活性进行分析,结果见图 2。

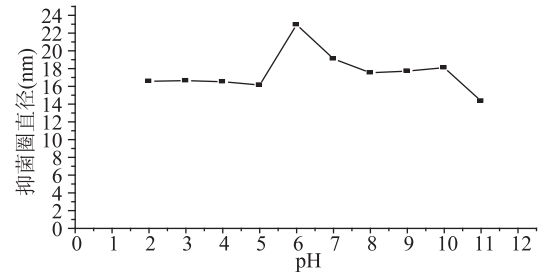


图 2 片球菌素的 pH 稳定性

由图 2 可以看出,在 pH 为 2.0~11.0 范围内,在 pH 为 6 时乳酸片球菌素的活性最大,pH 偏碱性时乳酸片球菌素的活性比 pH 偏酸时的活性大,乳酸片球菌素的抑菌活性较为稳定,从而说明该片球菌素可以用 pH 依赖的吸附解吸法进行纯化。

2.3 pH 对片球菌素吸附产生菌的影响

首先调节添加片球菌素的菌悬液 pH 为 2.0~11.0 之间,然后通过吸附实验来观察片球菌素对产生菌的吸附作用。根据片球菌素的吸附率公式来计算不同 pH 时乳酸片球菌素对产生菌和指示菌的吸附率,实验结果见图 3。

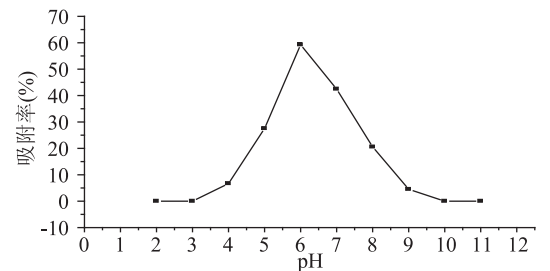


图 3 乳酸片球菌素对产生菌的吸附率

由图 3 可知,对于产生菌而言,在 pH6.0 时吸附率最大,达到 60%,当 pH 小于 3.0 或 pH 大于 10.0 时,吸附率为 0,这与 Yang R 等人研究的 pediocin AcH 对产生菌的吸附情况近似^[5],考虑到在 pH 为 10 时乳酸片球菌素的活性比 pH 为 3 时大,且由于极端 pH 会影响片球菌素的一级结构,如造成 N 端封闭等,而 pH10 更接近中性,所以本研究确定的提取条件为 pH6.0 吸附,pH10.0 解吸。

3 结论

本实验室研究的乳酸片球菌是从酸白菜中分离出的菌株,其产生的片球菌素具有抑制单核细胞增多症李氏杆菌的作用,该细菌素具有安全、天然、抑

(下转第 99 页)

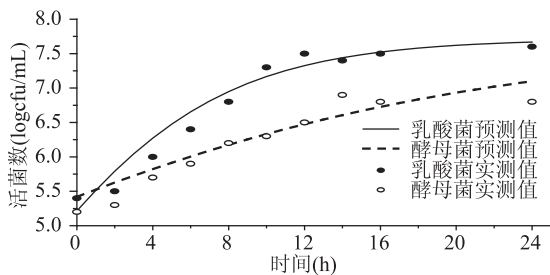


图5 混菌发酵过程中细胞浓度预测值与实测值的拟合

3 结论

酵母菌和乳酸菌之间可能存在着相互作用的机制,从而共同影响产品的品质,但该机制未被广泛研究,对其认识仍很模糊。混菌培养的微生物可能竞争生长养分,也可能产生促进或抑制对方生长的代谢产物,从而在微生态系统中表现出不同的微生物种间相互作用类型。本研究表明,在小米混菌发酵过程中,酿酒酵母对植物乳杆菌的生长有促进作用,可能是酵母菌为乳酸菌提供了氨基酸和维生素等生长因子。植物乳杆菌的存在对酿酒酵母有一定的抑制作用,可能是因为植物乳杆菌在小米汁中有更好的生长优势,影响了酿酒酵母对营养物质的利用。

此外,微生物在代谢上的彼此相互影响,可能导致发酵过程中影响感官品质的化合物呈现不同的变化趋势。本实验中,酵母菌对乳酸菌发酵产酸并没有产生显著影响,但酵母菌主要代谢产物乙醇产量却显著增加。更为复杂的情况,如次级代谢的相互影响,一种微生物产生的代谢物可能被另一种微生物代谢利用,还有待进一步研究。

发酵动力学模型可用于进行最佳发酵生产工艺条件的控制,预测反应趋势,还可以为工厂的实验比拟放大提供理论依据。本研究在对 Lotka-Voherra 种间竞争模型改进的基础上,构建了乳酸菌与酵母菌混菌培养生长动力学模型,结果表明,该模型求得的预测值与实测值拟合较好,可以有效预测混菌培养

(上接第95页)

菌谱广的特性,有作为生物防腐剂而被开发的巨大潜力。本研究着眼于片球菌素对细胞的吸附具有 pH 依赖性,借鉴 Yang R 等人的研究方法,通过比较在不同 pH 条件下片球菌素对产生菌的吸附率大小,得出了最佳的吸附值 pH6.0 和最佳的解析值 pH10.0。通过这一研究结果,可以建立新的、高效的纯化方法,进而对更为细致地研究片球菌素的其他性质打下基础。

参考文献

[1] 刘倩,崔莹光,陈营.一株乳酸菌细菌素的检测及其产生的最佳条件的研究[J].食品研究与开发,2007,28(5):11~14.
 [2] Rodriguez J M, Martinez M I, Kok J. Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria [J]. Critical Review in Food and Nutrition, 2002, 42(2): 91~121.
 [3] 周志江,韩焯,韩雪,等.从酸白菜中分离出一株产细菌素的乳酸片球菌[J].食品科学,2006,27(4):89~91.
 [4] 李亚玲,周志江,韩焯,等.乳酸片球菌细菌素的分离纯化

过程中乳酸菌和酵母菌的生长。

参考文献

[1] Charalampopoulos D, Wang R, et al. Application of cereals and cereal components in functional foods: a review [J]. Int J Food Microbiol, 2002, 79(2): 131~141.
 [2] 赵德安.混合发酵与纯种发酵[J].中国调味品, 2005(3): 45.
 [3] 尹艳军,夏文水,王玉良,等.牛乳经酵母菌和乳酸菌发酵生产低醇乳酒的研究[J].食品与发酵工业, 2005, 31(7): 118.
 [4] 张刚.乳酸细菌-基础、技术和应用[M].北京:化学工业出版社, 2007. 258~259.
 [5] 王禾,刘海霞,韩春然.粟米乳酸发酵饮料乳酸菌种的筛选[J].中国粮油学报, 2001, 16(2): 31.
 [6] Kedia G, Wang R, Patel H, et al. Use of mixed cultures for the fermentation of cereal-based substrates with potential probiotic properties [J]. Process Biochemistry, 2007, 42: 65~70.
 [7] 蒙灼,严静.基于 Lotka-Volterra 种间竞争模型的能源产业竞争系统及实证分析[J].技术经济与管理研究, 2007(5): 41.
 [8] Neviani E, Gatti M, Vanni L, et al. Contribution of Gal lactic acid bacteria to *Saccharomyces cerevisiae* metabolic activity in milk [J]. Int J Food Microbiol, 2001, 69: 91~99.
 [9] Kalmokoff M L, Ingledew W M. Evolution of ethanol tolerance in selected *Saccharomyces* strains [J]. J Am Soc Brew Chem, 1985, 43: 189~196.
 [10] Gadaga T H, Mrtukumira A N, Narvhus J A. Growth characteristics of *Candida kefyr* and two strains of *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* isolated from Zimbabwean naturally fermented milk [J]. Int J Food Microbiol, 2001, 70: 11~19.
 [11] 刘芳,李云飞.猪肉冷藏过程中微生物交互作用模型研究[J].食品科学, 2006, 27(5): 251.
 [12] 殷祚云. Logistic 曲线拟合方法研究[J].数理统计与管理, 2002(1): 32.
 [13] 及理化性质[J].食品工业科技, 2007, 27(8): 94~96.
 [5] 张金兰,程万鹏,畅晓渊,等. pH 吸附法纯化戊糖乳杆菌素 31-1 的研究[J].食品科学, 2007, 28(12): 350~354.
 [6] Bhuniaak, Johnson Mc, Ray B, et al. Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacteria strains [J]. J Appl Bacteriol, 1992, 70: 25~30.
 [7] Yang R, Johnson M C, Ray B. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria [J]. Appl Environ Microbiol, 1992, 58: 3355~3359.
 [8] 凌代文,东秀珠.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. 85~86.
 [9] 张龙翔,张庭芳,李令媛.生化实验方法和技术(第2版)[M].北京:高等教育出版社, 1997. 137.
 [10] Zhu W M, Liu W, Wu D Q. Isolation and characterization of a new bacteriocin *Lactobacillus gasserii* KT7 [J]. J Appl Microbiol, 2000, 88: 877~886.
 [11] 吕燕妮,李平兰,江志杰.乳酸菌 31-1 菌株产细菌素的初步研究[J].中国食品学报, 2003, 37(增): 130~133.