

# 乳酸菌产细菌素生物学特性的研究及 培养条件的优化

肖 珊<sup>1,2</sup>, 李轩伊<sup>2</sup>, 王志贤<sup>2</sup>, 蔡嘉铭<sup>2</sup>, 陶 冶<sup>2</sup>, 王 波<sup>1</sup>, 蔡燕雪<sup>1</sup>, 王际辉<sup>1,2\*</sup>

(1. 东莞理工学院化学工程与能源技术学院, 食品营养健康工程与智能化加工研究中心, 东莞 523808;

2. 大连工业大学生物工程学院, 大连 116034)

**摘要:** **目的** 研究乳酸菌产细菌素的生物学特性并优化培养条件。**方法** 将实验室保藏的 EF2(植物乳杆菌)和 PP2(嗜酸乳杆菌)2 株乳酸菌进行混合发酵, 采用牛津杯法分析细菌素的生物学特性, 并通过单因素实验和正交实验优化了 EF2 和 PP2 混合发酵产细菌素的培养条件。**结果** 细菌素在酸性、中性、弱碱性条件下活性较强; 耐高温, 属于热稳定性物质, 它对胰蛋白酶、胃蛋白酶、蛋白酶 K 和中性蛋白酶敏感, 对  $\alpha$ -淀粉酶和木瓜蛋白酶不敏感, 是广谱细菌素。EF2、PP2 混合发酵产细菌素的最佳培养基成分为葡萄糖 20 g/L、蛋白胨 12.5 g/L、牛肉膏 15 g/L、酵母膏 5 g/L、 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  2 g/L、无水乙酸钠 5 g/L、柠檬酸三铵 2 g/L、 $MgSO_4$  0.2 g/L、 $MnSO_4$  0.05 g/L、Tween-80 2 mL/L、蒸馏水 1 L。最佳培养条件为: 初始 pH 为 6.5、接种量 4%, 装液量 100 mL/250 mL, 发酵温度 35 °C, 在此条件下, 细菌素抑菌活性比优化前提高了 1.36 倍。**结论** 乳酸菌 EF2 和 PP2 混合培养得到的细菌素为具有较好抗性的广谱细菌素, 并通过单因素实验和正交实验确定了 2 株乳酸菌混合培养产细菌素的优化条件。

**关键词:** 乳酸菌; 细菌素; 抑菌活性; 生物学特性; 培养条件优化

## Study on the biological characteristics of bacteriocin production by mixed fermentation and optimization of culture conditions

XIAO Shan<sup>1,2</sup>, LI Xuan-Yi<sup>2</sup>, WANG Zhi-Xian<sup>2</sup>, CAI Jia-Ming<sup>2</sup>, TAO Ye<sup>2</sup>, WANG Bo<sup>1</sup>,  
CAI Yan-Xue<sup>1</sup>, WANG Ji-Hui<sup>1,2\*</sup>

(1. Engineering Research Center of Health Food Design & Nutrition Regulation, School of Chemical Engineering and Energy Technology, Dongguan University of Technology, Dongguan 523808, China;

2. College of Biological Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China)

**ABSTRACT: Objective** To study the biological characteristics of bacteriocin production by mixed fermentation and optimize the culture conditions. **Methods** After the mixed fermentation of *Lactobacillus* EF2 (*Lactobacillus plantarum*) and PP2 (*Lactobacillus acidophilus*) were preserved in laboratory, the biological characteristics of bacteriocin were analyzed by oxford cup method. The single factor and orthogonal experiment were used to optimize the

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(31201386)、东莞理工学院高层次人才科研启动项目(GC300501-139)、东莞理工学院高层次人才(创新团队)科研启动项目(KCYCXPT2017007)

**Fund:** Supported by the National Natural Science Foundation of China (31201386), Dongguan Institute of Science and Technology High Level Talent Research Start Project (GC300501-139), and the Institute of Science and Technology Innovation, DGUT (KCYCXPT2017007).

\***通讯作者:** 王际辉, 教授, 主要研究方向为营养与食品安全。E-mail: wangjihui@dgut.edu.cn

\***Corresponding author:** WANG Ji-Hui, Professor, Engineering Research Center of Health Food Design & Nutrition Regulation, Dongguan 523808, China. E-mail: wangjihui@dgut.edu.cn

culture conditions of bacteriocin production by mixed fermentation. **Results** The bacteriocin had the following characteristics: higher activity in acidic, neutral and weak alkaline, high temperature resistance, sensitive to trypsin, pepsin and proteinase K and neutral proteinase and insensitive to  $\alpha$ -amylase and papain. The bacteriocin was broad-spectrum, it could inhibit both Gram-negative and Gram-positive bacteria. The optimal formula of bacteriocin production was glucose 20 g/L, peptone 12.5 g/L, beef extract 15 g/L, yeast extract 5 g/L,  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  2 g/L, anhydrous sodium acetate 5 g/L, triammonium citrate 2 g/L,  $MgSO_4$  0.2 g/L,  $MnSO_4$  0.05 g/L, Tween-80 2 ml/L, water 1 L. The optimal fermentation conditions were: initial pH 6.5, inoculum dose 4%, the volume of liquid 100 mL/250 mL, fermented temperature 35 °C, and the antibacterial activity increased by 1.36 times than non-optimized. **Conclusion** The bacteriocin produced by the mixed culture of *Lactobacillus* EF2 and PP2 is a broad-spectrum bacteriocin with good resistance, and the optimal conditions of bacteriocin production are obtained by single factor experiment and orthogonal experiment.

**KEY WORDS:** *Lactobacillus*; bacteriocin; antibacterial activity; biological characteristics; culture conditions optimization

## 1 引言

乳酸菌是能利用碳水化合物发酵产生大量乳酸的一类细菌<sup>[1]</sup>。在生长代谢中,除了可以产生有机酸、过氧化氢和双乙酰外,还可以产生具有抑菌活性的蛋白质类物质—细菌素(bacteriocin)<sup>[2-5]</sup>。细菌素是某些细菌通过核糖体合成机制产生的抑菌物质<sup>[6]</sup>。与抗生素相比,其具有无残留、不产生抗药性和易被人体消化道中的蛋白酶降解等诸多优点<sup>[7-9]</sup>。其中,乳酸链球菌素(Nisin)是应用范围最广,唯一被 FDA 认定为食品级安全微生物(generally regarded as safe, GRAS)的细菌素产品,因此也受到越来越多的关注<sup>[10]</sup>。但研究表明, Nisin 的抑菌谱较窄,大多只对革兰氏阳性菌具有抑制作用,对革兰氏阴性菌没有抑制作用。在 pH 为 6 的条件下, Nisin 的抑菌活性丧失 90%,极大限制了 Nisin 在食品、医药以及饲料等行业中的应用<sup>[11]</sup>。

乳酸菌代谢产细菌素受多种因素影响,不但与其自身遗传因素有关,发酵工艺也会在很大程度上影响其产量,如培养基成分和培养条件等。培养基中的碳源和氮源是微生物生长代谢所必需的一类营养物质, Tween-80 作为刺激因子,可以促进细菌素的产生<sup>[12]</sup>。Mg、Mn 等微量元素作为酶的激活剂和活性物质的组成成分,对细菌的生长具有促进作用<sup>[13-15]</sup>。本研究将 EF2 和 PP2 两株乳酸菌进行混合发酵,研究细菌素的生物学特性,并通过单因素实验和正交实验优化其培养基成分和培养条件,为提高细菌素的产量提供理论依据。

## 2 材料与方法

### 2.1 实验材料

#### 2.1.1 菌株

产细菌素菌株: 乳酸菌 EF2(植物乳杆菌)和 PP2(嗜酸

乳杆菌)均为本实验室保藏;

指示菌菌株: 铜绿假单胞菌为实验室保藏。

#### 2.1.2 培养基

(1)乳酸菌 EF2 和 PP2 培养基(MRS 培养基)

MRS 液体培养基: 葡萄糖 20 g/L、蛋白胨 10 g/L、牛肉膏 10 g/L、酵母膏 5 g/L、无水乙酸钠 5 g/L、 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  2 g/L、柠檬酸三铵 2 g/L、 $MgSO_4$  0.2 g/L、 $MnSO_4$  0.05 g/L、吐温 80 1 mL/L、蒸馏水 1 L、pH 6.2~6.4。

MRS 固体培养基: 向上述 MRS 液体培养基中加入琼脂粉 20 g。

(2)铜绿假单胞菌培养基(LB 培养基)

LB 液体培养基: 胰蛋白胨 10 g/L、酵母浸粉 5 g/L、氯化钠 10 g/L、蒸馏水 1 L、pH 7.0~7.2。

LB 固体培养基: 向上述 LB 液体培养基中加入琼脂粉 20 g。

## 2.2 实验方法

### 2.2.1 指示菌悬液的制备

挑取 3 环铜绿假单胞菌接入 100 mL LB 液体培养基中, 30 °C、180 r/min 摇床培养 24 h, 4 °C 冰箱保存备用。

### 2.2.2 乳酸菌产细菌素发酵上清液的制备

分别挑取 3 环已活化的 EF2 和 PP2 接种于 100 mL MRS 液体培养基中, 30 °C 条件下静置培养 24 h 后作为种子液备用。

按 1:1(V:V)的比例(下同)、3%的接种量将上述种子液混合接入 100 mL MRS 发酵培养基中, 30 °C 条件下静置培养 24 h 后离心(8000 r/min, 15 min, 4 °C), 弃去沉淀, 4 °C 保存备用。

### 2.2.3 细菌素抑菌活性的测定

采用牛津杯法<sup>[13]</sup>对 EF2 和 PP2 两株乳酸菌混合发酵产细菌素的抑菌活性进行测定。

### 2.2.4 细菌素生物学特性的研究

(1)pH 稳定性实验<sup>[16,17]</sup>

取 10 mL 发酵上清液于试管中, 调节上清液 pH 至

2~12, 37 °C水浴 6 h后将各发酵液 pH 调回 6.5, 用无菌水补足总体积, 使其终体积相等<sup>[16,18]</sup>, 采用牛津杯法进行抑菌实验, 观察 pH 对细菌素抑菌活性的影响。

#### (2)热稳定性实验<sup>[19]</sup>

将发酵上清液分别置于 50、60、70、80、90、100、121 °C条件下处理 20 min, 冷却至室温, 以未经处理的发酵上清原液作为对照进行抑菌实验, 观察温度对 EF2、PP2 混合发酵产细菌素抑菌活性的影响。

#### (3)酶敏感性实验<sup>[20]</sup>

将胃蛋白酶、胰蛋白酶、蛋白酶 K、木瓜蛋白酶、 $\alpha$ -淀粉酶和中性蛋白酶用磷酸缓冲液溶解, 并调至各酶最适 pH, 按 1:1(V:V)的比例分别加入到发酵上清液中, 使各酶终浓度为 2 mg/mL。37 °C水浴处理 2 h, 取出放入 100 °C水浴中处理 5 min, 使酶的活性丧失<sup>[21]</sup>。取出冷却后, 加入相同体积磷酸缓冲液的发酵上清液为对照进行抑菌实验, 观察不同酶处理后发酵上清液对铜绿假单胞菌的抑菌活性。

#### (4)抑菌谱的测定

测定 EF2 和 PP2 混合发酵产细菌素对 2 株 G<sup>+</sup>和 5 株 G<sup>-</sup>的抑菌效果。

### 2.2.5 培养基成分的优化

#### (1)单因素实验

对 MRS 培养基中的碳源、氮源、Tween-80 和金属离子进行单因素实验, 改变其中一个条件, 固定其他条件配制培养基, 确定 EF2 和 PP2 混合发酵产细菌素的抑菌活性。各因子的水平梯度分别为: 碳源为 2%的葡萄糖、蔗糖、乳糖、淀粉; 碳源质量分数 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%; 氮源添加量为 A: 2.0%蛋白胨、B: 2.0%牛肉膏、C: 1.0%蛋白胨+1.0%牛肉膏、D: 1.5%蛋白胨+0.5%牛肉膏、E: 0.5%蛋白胨+1.5%牛肉膏; Tween-80 添加量为 0%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%; MgSO<sub>4</sub> 质量分数 0.01%、0.015%、0.02%、0.025%、0.03%; MnSO<sub>4</sub> 质量分数 0.001%、0.003%、0.005%、0.007%、0.009%。配制培养基, 混合接入 EF2 和 PP2 种子液, 30 °C条件下静置培养 24 h 后进行抑菌实验, 研究各因子对 EF2 和 PP2 两株乳酸菌混合发酵产细菌素抑菌活性的影响, 从而选取正交实验的因素和水平。

#### (2)培养基成分正交实验

分析单因素实验结果, 将单因素实验确定的最佳碳源、氮源和 Tween-80 按 L<sup>9</sup>(3<sup>4</sup>)正交表进行实验, 正交因素及水平如表 1 所示。

表 1 正交实验因素水平  
Table 1 Factors and levels of orthogonal test

水平	$\omega$ /%			
	葡萄糖(A)	蛋白胨(B)	牛肉膏(C)	Tween-80(D)
1	1.50	1.00	1.00	0.10
2	2.00	1.25	1.25	0.20
3	2.50	1.50	1.50	0.30

### 2.2.6 发酵条件的优化

#### (1)单因素实验

以优化后的 MRS 发酵培养基为基础, EF2 和 PP2 混合发酵的基本培养条件为: 初始 pH6.2~6.4, 接种量 3%, 装液量 100 mL/250 mL, 培养温度 30 °C。改变其中一个条件, 固定其他条件, 确定 EF2 和 PP2 混合发酵产细菌素的抑菌活性。各因子水平梯度分别为: 初始 pH 5.0~8.0; 接种量 1%、2%、3%、4%、5%、7%、9%、11%; 装液量<sup>[22]</sup>50、75、100、125、150、175、200 mL/250 mL; 培养温度 25、30、35、40 °C。静置培养 24 h 后进行抑菌实验, 研究各因子对混合发酵产细菌素抑菌活性的影响, 从而选取正交实验的因素和水平。

#### (2)发酵条件正交实验

将单因素实验确定的最佳初始 pH 值、接种量、装液量和培养温度按 L<sup>9</sup>(3<sup>4</sup>)正交表进行实验, 正交因素及水平如表 2 所示。

表 2 正交实验因素水平  
Table 2 Factors and levels of orthogonal test

水平	初始 pH(A)	接种量/(%) (B)	装液量 /mL(C)	温度 /°C(D)
1	5.5	3	100	30
2	6.0	4	125	35
3	6.5	5	150	40

## 3 结果与分析

### 3.1 细菌素生物学特性的研究

#### 3.1.1 pH 稳定性实验

实验结果如图 1 所示, 随着发酵上清液 pH 的升高, 抑菌圈直径逐渐增大, 当 pH 达到 7 时, 抑菌活性最大, 抑菌圈直径达到(14.78±0.16) mm。继续增大 pH, 抑菌圈直径又逐渐下降, 在 pH 为 12 时, 无抑菌圈出现。说明 EF2 和 PP2 混合发酵产生的细菌素在酸性、中性、弱碱性条件下活性较强。因此, 当细菌素作为食品、饲料等添加剂时, 应注意其活性 pH, 要尽可能的使其抑菌活性达到最大。

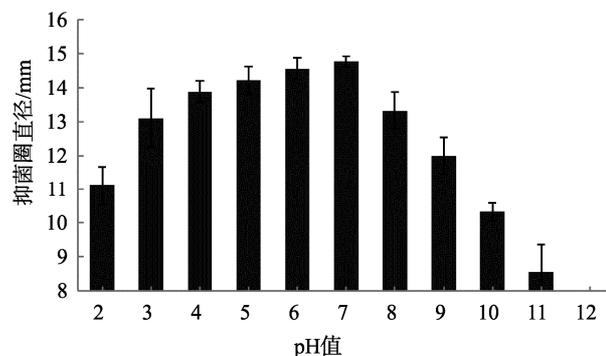


图 1 pH 对细菌素活性的影响(n=3)  
Fig.1 Effect of pH value on the antibacterial activity of bacteriocin(n=3)

### 3.1.2 热稳定性实验

实验结果如表 3 所示, 将发酵上清液经过不同温度处理 20 min 后, 在 50~100 °C, 抑菌活性变化不大, 当温度达到 121 °C 时, 抑菌活性有所减小, 但仍保留 83% 左右的活性。因此, EF2 和 PP2 混合发酵产生的细菌素具有良好的热稳定性。食品加工等行业中常用巴斯德灭菌温度 (65~80 °C, 20 min) 进行灭菌。而细菌素在 121 °C, 20 min 条件下仍能保持 83% 的抑菌活性, 说明细菌素作为食品、饲料等添加剂具有较好的应用前景<sup>[18]</sup>。

表 3 热处理对细菌素抑菌特性的影响( $n=3$ )  
Table 3 Effect of heat treatment on bacteriostatic characteristics of bacteriocin ( $n=3$ )

处理条件	抑菌圈直径/mm
对照	21.89±0.83
50 °C	20.11±0.57
60 °C	21.11±1.13
70 °C	19.78±1.75
80 °C	20.44±0.16
90 °C	20.33±0.54
100 °C	19.56±0.68
121 °C	17.76±1.25

注: 表中数据为平均值±标准差( $n=3$ ), 下同。

### 3.1.3 酶敏感性实验

实验结果如表 4 所示, 向发酵上清液中加入胰蛋白酶时, 抑菌活性完全丧失; 加入中性蛋白酶、胃蛋白酶和蛋白酶 K 时, 抑菌活性分别丧失了 88%、91% 和 73%, 加入  $\alpha$ -淀粉酶时, 活性基本无变化, 而加入木瓜蛋白酶, 其活性与对照相比保留了 96% 的活性。因此 EF2 和 PP2 混合发酵产生的细菌素对胰蛋白酶、胃蛋白酶、蛋白酶 K 和中性蛋白酶敏感, 对  $\alpha$ -淀粉酶和木瓜蛋白酶不敏感, 说明该细菌素是一类具有抑菌活性的蛋白类物质, 这与李平兰等<sup>[19]</sup>的研究结果相似。

表 4 酶对细菌素抑菌特性的影响( $n=3$ )  
Table 4 Effect of different enzymes on bacteriocin activity( $n=3$ )

酶	抑菌圈直径/mm
对照	11.67±0.27
胃蛋白酶	8.33±0.27
胰蛋白酶	8.00±0.00
蛋白酶 K	9.00±0.27
$\alpha$ -淀粉酶	11.89±0.96
中性蛋白酶	8.44±0.16
木瓜蛋白酶	11.22±0.42

### 3.1.4 抑菌谱

实验结果如表 5 所示, EF2 和 PP2 混合发酵产生的细菌素既可以较好地抑制革兰氏阳性菌(枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌), 并且对革兰氏阴性菌(大肠杆菌、铜绿假单胞菌、痢疾志贺菌、宋内志贺菌、甲型副伤寒沙门菌)也有较好的抑制作用。以上结果说明, 该细菌素具有广谱抑菌活性。

表 5 EF2、PP2 混合发酵产细菌素抑菌谱( $n=3$ )  
Table 5 Antimicrobial spectrum of bacteriocin from mixed fermentation of EF2 and PP ( $n=3$ )

指示菌	染色特性	抑菌圈直径/mm
枯草芽孢杆菌	G <sup>+</sup>	13.56±0.31
金黄色葡萄球菌	G <sup>+</sup>	11.22±0.42
大肠杆菌	G <sup>-</sup>	16.78±0.16
铜绿假单胞菌	G <sup>-</sup>	18.00±0.47
痢疾志贺菌	G <sup>-</sup>	12.56±0.31
宋内志贺菌	G <sup>-</sup>	15.00±0.27
甲型副伤寒沙门菌	G <sup>-</sup>	16.22±0.57

## 3.2 培养基成分的优化

### 3.2.1 单因素实验

以抑菌圈直径为指标, 确定 EF2 和 PP2 混合发酵产细菌素的最佳培养基成分, 得到的单因素实验结果如图 2, EF2 和 PP2 混合发酵所产细菌素的最佳培养基成分为葡萄糖 2%, 蛋白胨 1.0%, 牛肉膏 1.0%, Tween-80 0.2%, MgSO<sub>4</sub> 0.02%, MnSO<sub>4</sub> 0.005%。

### 3.2.2 培养基成分正交实验结果

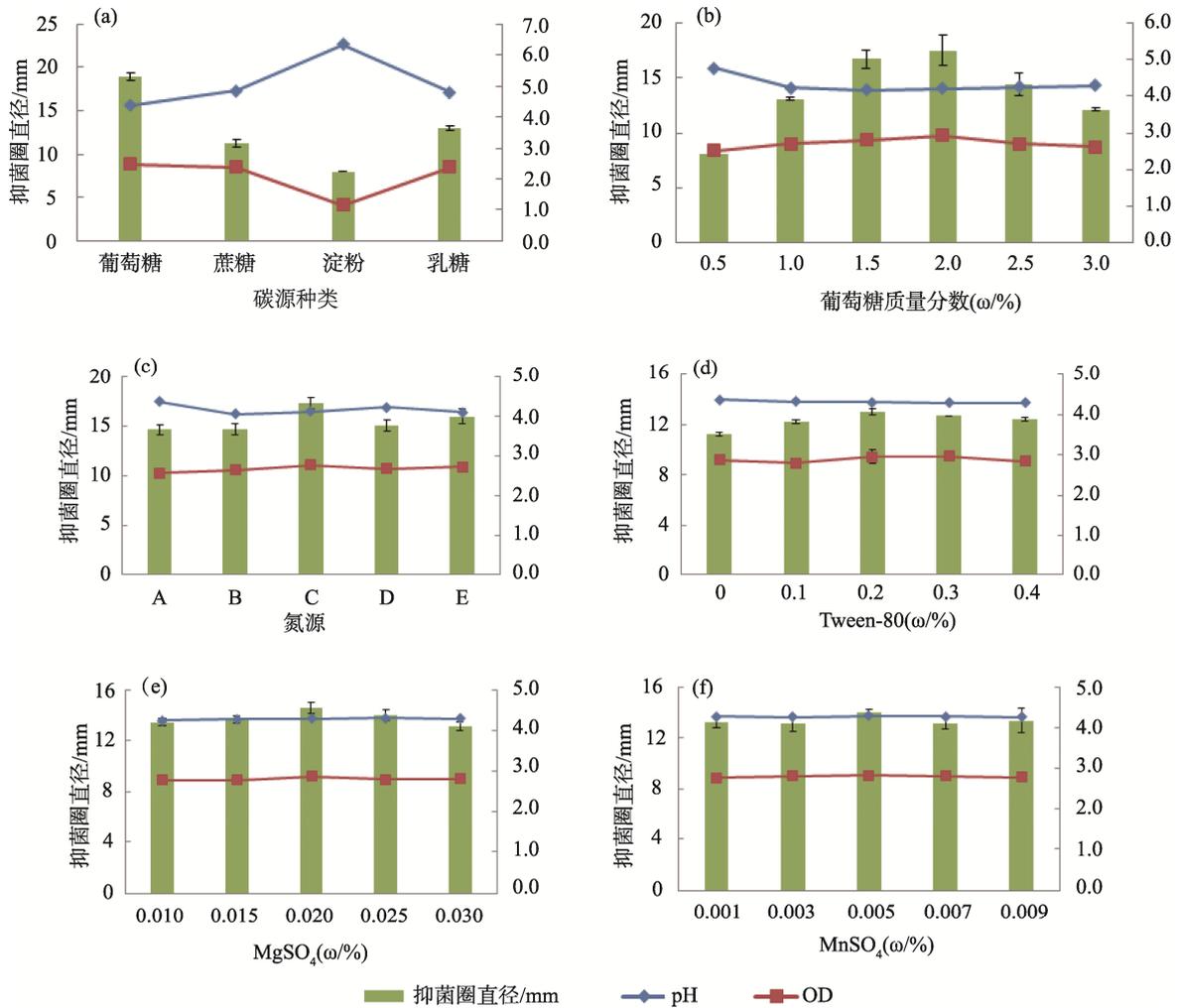
将单因素实验优化的 A 葡萄糖、B 蛋白胨、C 牛肉膏、D Tween-80 四个因素进行正交实验, 以抑菌圈直径为指标, 实验结果如表 6 所示。

根据表 6 分析可知, 各因子对 EF2 和 PP2 混合发酵产细菌素影响的大小依次为: A(葡萄糖)>C(牛肉膏)>B(蛋白胨)>D(Tween-80), 最佳培养基成分为 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>D<sub>2</sub>, 在实验的 9 个处理中, 抑菌效果最好的培养基成分为 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>D<sub>1</sub>。对这 2 种培养基成分进行验证, 实验结果显示当培养基成分为 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>D<sub>2</sub> 时, 其抑菌圈直径为(14.00±0.27) mm, 培养基成分为 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>D<sub>1</sub> 时, 抑菌圈直径为(11.78±0.31) mm, A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>D<sub>2</sub> 条件下产生的细菌素抑菌效果明显高于 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>D<sub>1</sub> 的抑菌效果。因此选择 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>D<sub>2</sub> 作为产细菌素的最佳生产条件, 即葡萄糖 2.0%、蛋白胨 1.25%、牛肉膏 1.5%、Tween-80 0.2%, 培养基中其他成分相同。

## 3.3 发酵条件的优化

### 3.3.1 单因素实验

以优化后的培养基成分为基础, 抑菌圈直径为指标, 采用牛津杯法确定 EF2 和 PP2 混合发酵产细菌素的最佳培养条件, 得到的单因素实验结果见图 3。



注: (c)图中 A: 2.0%蛋白胨; B: 2.0%牛肉膏; C: 1.0%蛋白胨+1.0%牛肉膏; D: 1.5%蛋白胨+0.5%牛肉膏; E: 0.5%蛋白胨+1.5%牛肉膏;

图(a)~(f)中右侧纵坐标为 pH 值。

图 2 培养基营养组分的单因素实验结果(n=3)

Fig.2 Results of single-factor experiment about medium composition(n=3)

表 6 正交实验结果分析  
Table 6 Results of analysis of orthogonal test

编号	A	B	C	D	抑菌圈直径/mm
1	1	1	1	1	10.33
2	1	2	2	2	11.67
3	1	3	3	3	10.78
4	2	1	2	3	11.56
5	2	2	3	1	12.67
6	2	3	1	2	11.22
7	3	1	3	2	11.22
8	3	2	1	3	10.33
9	3	3	2	1	10.78
Ij	32.78	33.11	31.88	33.78	
IIj	35.45	34.67	34.01	34.11	
IIIj	32.33	32.78	34.67	32.67	
Rj	3.12	1.89	2.79	1.44	

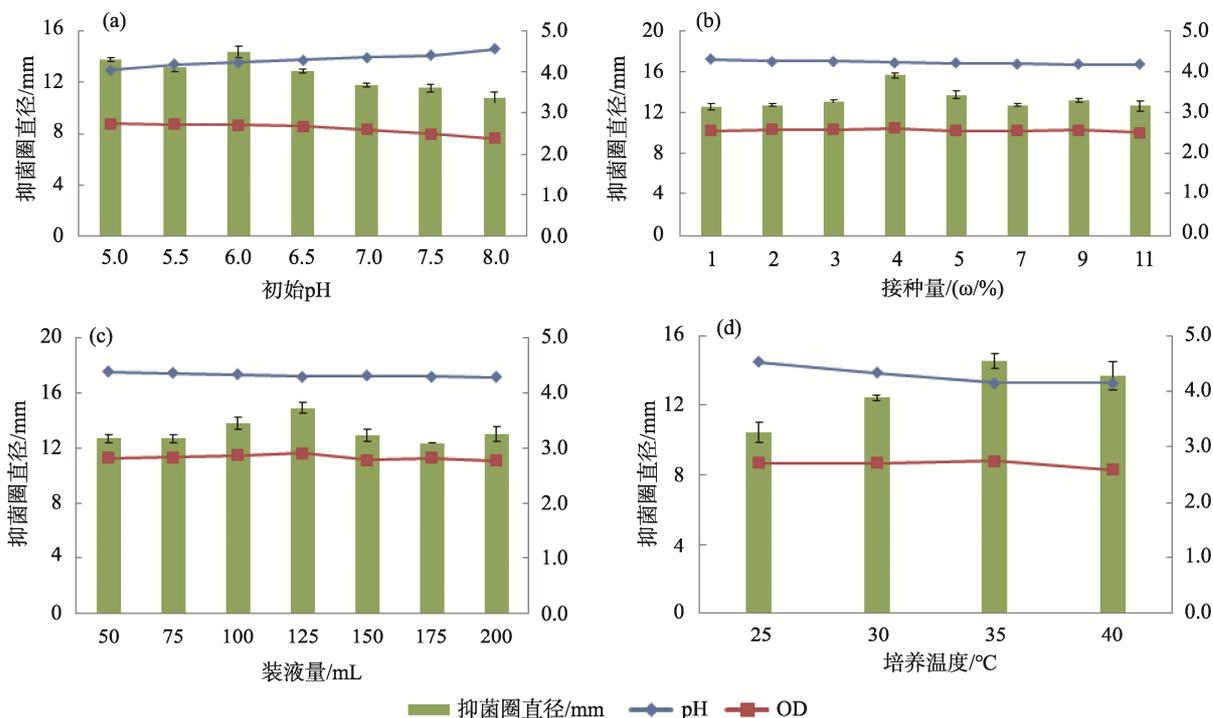


图 3 发酵条件的单因素实验结果(n=3)

注: 图(a)~(d)中右侧纵坐标为 pH 值。

Fig.3 Results of single-factor experiment(n=3)

实验结果显示, EF2 和 PP2 混合发酵所产细菌素的最佳培养条件为初始 pH=6, 接种量 4%, 装液量 125 mL/250 mL, 培养温度 35 °C。

### 3.3.2 正交实验结果

将单因素实验优化的 A 初始 pH、B 接种量、C 装液量、D 培养温度 4 个因素进行正交实验, 以抑菌圈直径为指标, 实验结果如表 7 所示。

表 7 正交实验结果分析  
Table 7 Results of analysis of orthogonal test

编号	A	B	C	D	抑菌圈直径/mm
1	1	2	3	3	12.33
2	1	3	2	2	13.33
3	1	1	1	1	12.00
4	2	2	2	1	13.67
5	2	3	1	3	12.33
6	2	1	3	2	15.33
7	3	1	2	3	12.22
8	3	2	1	2	15.44
9	3	3	3	1	13.22
Ij	37.66	39.55	39.77	38.89	
IIj	41.33	41.44	39.22	44.10	
IIIj	40.88	38.88	40.88	36.88	
Rj	3.67	2.56	1.66	7.22	

各因子对抑菌效果影响的大小依次为: D(培养温度)>A(初始 pH)>B(接种量)>C(装液量), 最佳培养基成分为 A2B2C3D2, 在实验的 9 个处理中, 抑菌效果最好的发酵条件为 A3B2C1D2。对这 2 种培养条件进行验证, 实验结果显示, 当培养条件为 A2B2C3D2 时, 其抑菌圈直径为(13.56±0.31) mm, 当培养条件为 A3B2C1D2 时, 其抑菌圈直径为(14.78±0.42) mm。因此选择 A3B2C1D2 为最佳培养条件, 即培养基初始 pH 为 6.5, 接种量为 4 mL, 装液量为 100 mL, 培养温度为 35 °C。

## 4 结论与讨论

实验结果表明, EF2 和 PP2 两株乳酸菌混合发酵所产细菌素在酸性、中性、弱碱性条件下活性较强, 耐高温, 属于热稳定性物质。它对胰蛋白酶、胃蛋白酶、蛋白酶 K 和中性蛋白酶敏感, 对 α-淀粉酶和木瓜蛋白酶不敏感, 是广谱细菌素。最佳培养基成分为: 葡萄糖 20 g/L、蛋白胨 12.5 g/L、牛肉膏 15 g/L、酵母膏 5 g/L、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 2 g/L、无水乙酸钠 5 g/L、柠檬酸三铵 2 g/L、MgSO<sub>4</sub> 0.2 g/L、MnSO<sub>4</sub> 0.05 g/L、Tween-80 2 mL/L、蒸馏水 1 L。最佳培养条件为: 初始 pH 为 6.5、接种量 4%、装液量 100 mL/250 mL, 发酵温度 35 °C, 此条件下抑菌活性比优化前提高了 1.36 倍。综上, 本研究结果表明乳酸菌 EF2 和 PP2 混合培养得到的细菌素为具有较好抗性的广谱细菌素, 并通过单因素实验和正交实验确定了 2 株乳酸菌混合培养产细菌素的优化条件, 将为新型广谱细菌素的开发和应用提供理论依据。

## 参考文献

- [1] 陈静, 何连芳, 张玉苍. 嗜酸乳杆菌产细菌素的分离纯化研究[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2011, 2: 68-72.  
Chen J, He LF, Zhang YC. Separation and purification of bacteriocins produced by *Lactobacillus acidophilus* [J]. J Henan Univ Technol (Nat Sci Ed), 2011, 2: 68-72.
- [2] Islam R, Hossain MN, Alam MK, et al. Antibacterial activity of lactic acid bacteria and extraction of bacteriocin protein [J]. Adv Biosci Biotechnol, 2020, 11(2): 49-59.
- [3] 崔磊, 郭伟国. 乳酸菌产生的抑菌物质及其作用机制[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(11): 2578-2584.  
Cui L, Guo WG. Antibacterial substances produced by lactic acid bacteria and their mechanism [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(11): 2578-2584.
- [4] 解俊梅, 文汉. 植物乳酸菌类细菌素特性研究及其产生条件的优化[J]. 食品工业科技, 2011, 32(11): 93-97.  
Xie JM, Wen H. Characteristics and optimization producing conditions of bacteriocin-like from *Lactobacillus plantarum* [J]. Sci Technol Food Ind, 2011, 32(11): 93-97.
- [5] 侯亚文, 易华西, 杨艳艳, 等. 产细菌素乳酸菌筛选方法的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2013, 3: 129-133.  
Hou YW, Yi HX, Yang YY, et al. Advance on the screening method of class IIa bacteriocin-producing lactic acid bacteria [J]. Food Ferment Ind, 2013, 3: 129-133.
- [6] 尚雅婧, 张日俊. 细菌素应用的理论与实践[J]. 饲料与畜牧, 2011, 7: 5-8.  
Shang YJ, Zhang RJ. Theory and practice of bacteriocin application [J]. Feed Husb, 2011, 7: 5-8.
- [7] 陈静, 张玉苍, 何连芳. 乳酸菌产细菌素的研究进展及其应用前景[J]. 安徽农业科学, 2011, 4: 1925-1927.  
Chen J, Zhang YC, He LF. Research progress of bacteriocin producing lactic acid bacteria and its application prospects [J]. J Anhui Agricul Sci, 2011, 4: 1925-1927.
- [8] Beatson SA, Wakker MJ. Tracking antibiotic resistance [J]. Science, 2014, 345(6203): 1454-1455.
- [9] Stanton TB. A call for antibiotic alternatives research [J]. Trend Microbiol, 2013, 21(3): 111-113.
- [10] 王小娜, 宋达峰, 顾青. 产细菌素乳酸菌的鉴定及其特性研究[J]. 中国食品学报, 2011, (3): 181-186.  
Wang XN, Song DF, Gu Q. Identification of bacteriocin-producing *Lactobacillus* and study on its characteristic [J]. J Chin Instit Food Sci Technol, 2011, (3): 181-186.
- [11] 张红星, 刘丽, 谢英, 等. 风干肠中戊糖片球菌所产细菌素 L5-6 的理化特性研究[J]. 中国食品学报, 2011, 1: 75-79.  
Zhang HX, Liu L, Xie Y, et al. A study on physicochemical characteristics of bacteriocin l5-6 produced by *Pediococcus pentosaceus* isolated from dried cured salami [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2011, 1: 75-79.
- [12] 张艾青. 产广谱细菌素植物乳杆菌的初步研究及其在泡菜中的应用[D]. 雅安: 四川农业大学, 2007.  
Zhang AQ. The preliminary study of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* and it's application on pickled vegetable [D]. Yaan: Sichuan Agricultural University, 2007.
- [13] Onifade AA, AL-Sane NA, Al-Musallam AA, et al. A review: Potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources [J]. Bioresou Technol, 1998, 66(1): 1-11.
- [14] 李莉. 戊糖乳杆菌 WH12-2-1 产细菌素的条件优化及其抑菌特性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2009.  
Li L. Optimization of condition of bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* WH12-2-1 and characteristic of its inhibitory activity [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2009.
- [15] 刘冬梅, 李理, 杨晓泉, 等. 用牛津杯法测定益生菌的抑菌活力[J]. 食品研究与开发, 2006, 3: 110-111.  
Liu DM, Li L, Yang XQ. Determination of the antimicrobial activity of probiotic by oxford plate assay system [J]. Food Res Dev, 2006, 3: 110-111.
- [16] 赵玲艳, 邓放明, 杨细平, 等. 细菌素的生物学特性及作为防腐剂在熟肉制品中的应用[J]. 中国食品添加剂, 2005, 3: 72-77.  
Zhao LY, Dong FM, Yang XP, et al. The properties of bacteriocin and its application is meat products [J]. China Food Addit, 2005, 3: 72-77.
- [17] 郝建云, 陶冶, 刘诗文, 等. 嗜酸乳杆菌产细菌素培养条件的优化[J]. 大连工业大学学报, 2016, 35(1): 6-10.  
Hao JY, Tao Y, Liu SW, et al. Optimization of culture conditions for bacteriocin production by *Lactobacillus acidophilus* [J]. J Dalian Polytech Univ, 2016, 35(1): 6-10.
- [18] 沈雷. 植物乳杆菌 ZJ217 产细菌素的研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2013.  
Shen L. The study of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ZJ217 [D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2013.
- [19] 李平兰, 张璇, 江汉湖. 产细菌素植物乳杆菌菌株的筛选及其细菌素生物学特征研究[J]. 食品与发酵工业, 1999, 1: 3-6.  
Li PL, Zhang C, Jiang HH. Screening of bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum* strain and studying on biological characteristics of bacteriocin [J]. Food Ferment Ind, 1999, 1: 3-6.
- [20] 赵乙桢. 植物乳杆菌素 PZJ008 的鉴定、纯化及其作用机制的研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2014.  
Zhao YZ. Identification, purification and characterization of the mode of action of plantaricin PZJ008 [D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2014.
- [21] Gupata A, Tiwari SK. Plantaricin LD1: A bacteriocin produced by food isolate of *Lactobacillus plantarum* LD1 [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2014, 172(7): 3354-3362.
- [22] 李亚玲. 乳酸片球菌细菌素的分离纯化及理化性质研究[D]. 天津: 天津大学, 2007.  
Li YL. Purification and characterization of bacteriocin from a *Pediococcus acidilactici* [D]. Tianjin: Tianjin University, 2007.

(责任编辑: 于梦娇)

## 作者简介

肖 珊, 副教授, 主要研究方向为食品绿色制造及安全控制。

E-mail: xiaoshan@dgut.edu.cn



王际辉, 教授, 主要研究方向为营养与食品安全。

E-mail: wangjihui@dgut.edu.cn