

不同破碎方法提取嗜酸乳杆菌细菌素的研究

张 帅

(哈尔滨商业大学 食品工程学院, 哈尔滨 150040)

摘要:采用微波法、珠磨法、超声波法、反复冻融法、石英砂研磨法分别对嗜酸乳杆菌进行细胞破碎分离细菌素,通过研究嗜酸乳杆菌产细菌素抑菌活性来确定最佳细胞破碎物理方法.结果表明,超声波破碎法抑菌圈直径最大,为20.94 mm,细胞破碎效果最好.

关键词:嗜酸乳杆菌;细菌素;细胞破碎;物理方法;抑菌圈

中图分类号:TS201

文献标识码:A

文章编号:1672-0946(2013)04-0432-03

Study on bacteriocin extracted by different cell disruption methods

ZHANG Shuai

(School of Food Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

Abstract: Bacteriocin was separated and got after the cell of *Lactobacillus acidophilus* was disrupted by the microwave test, bead mill test, ultrasonication, freezing and thawing test, and quartz sand grinding test. The better physical method of the cell disruption was studied by the bacteriostatic activity of bacteriocin. The result showed that the diameter of inhibition zone by ultrasonication was the largest, which was 20.94 mm, so the effect of the cell disruption was best.

Key words: *Lactobacillus acidophilus*; bacteriocin; cell disruption; physical method; inhibition zone

嗜酸乳杆菌是乳酸菌家族中极为重视研究与开发的益生菌之一,被视为第3代酸乳发酵剂菌种,它是人体肠道中的重要微生物,与人体健康息息相关^[1].当其达到一定数量时,可以起到健康促进效果.嗜酸乳杆菌产生的细菌素能抑制大肠杆菌DNA合成,能有效地抑制广谱性革兰氏阳性、革兰氏阴性细菌、酵母和真菌产生的毒性氧化代谢物^[2],其应用前景越来越受到人们的广泛关注,然而在细菌素的研究中仍存在许多问题,例如细菌素的分离提取.

自20世纪80年代初以来,生物技术发生了质的飞跃,生物产品的数量越来越多,许多具有重大应用价值的产品应运而生^[3].很多产物都是来源

于微生物胞内物质,分离提取这类产物时,必须将细胞破壁,使产物得以释放,才能进一步提取.因此细胞破碎是提取胞内产物的关键性步骤,破碎技术的研究更加引起基因工程专家和生物工程学者的关注^[4].

1 实验材料与主要仪器

1.1 实验材料与试剂

嗜酸乳杆菌(哈尔滨商业大学食品工程学院提供),大肠杆菌,蛋白胨,酵母提取物,牛肉膏,葡萄糖,桔子汁,乙酸钠,柠檬酸二铵,油酸,吐温80, K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 营养琼脂粉,蒸馏水(均为分析纯).

收稿日期:2013-03-30.

基金项目:黑龙江省科技攻关计划项目(GA07B401-2),哈尔滨商业大学2012年度国家级大学生创新创业训练计划项目(201210240046).

作者简介:张帅(1980-),男,硕士,讲师,研究方向:食品生物技术.

1.2 实验仪器

DL-5-B 离心机(上海安亭科学仪器厂); JY92-II 超声波细胞粉碎机隔音箱(宁波新芝生物科技股份有限公司); SP-721E 可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司); DHP-9162 电热恒温培养箱(上海一恒科技有限公司); HD-1630 超净操作台(哈尔滨仪器五厂); DHG-9123A 电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司); THZ-82A 恒温培养振荡器(江苏荣华仪器制造有限公司).

2 实验方法

2.1 嗜酸乳杆菌的活化

实验室保藏的嗜酸乳杆菌菌种处于休眠状态, 将其活化. 在超净操作台内用无菌移液管移取 2 mL 嗜酸乳杆菌菌悬液, 接入到装有灭过菌的 100 mL MRS 培养基的 250 mL 三角瓶中, 于 37 °C 下恒温培养 24 h, 待用.

将活化后的嗜酸乳杆菌菌种按 2% 接种量进行扩大培养. 在超净操作台内用无菌移液管吸取 4 mL 活化后的嗜酸乳杆菌菌悬液, 接种到装有灭过菌的 100 mL 增培培养基的 250 mL 三角瓶中, 于 37 °C 下恒温培养 24 h, 待用^[5-6].

2.2 抑菌实验

在无菌平皿中倒入融化后并灭过菌的营养琼脂(4.5%), 充分冷却凝固后, 吸取稀释度为 10^{-2} 的大肠杆菌菌悬液 0.1 mL 涂布到营养琼脂平板上, 再用无菌镊子夹取灭过菌的牛津杯放在含有指示菌的培养基上, 于 37 °C 下恒温培养 24 h. 观察抑菌圈, 并测其直径大小.

2.3 微波法对分离细菌素的影响

分别对 20 mL 扩培后的嗜酸乳杆菌菌液微波处理 2、4、6、8、10 min, 每次间歇用流水冷却, 将破碎后的发酵液于 4 800 r/min 离心机中离心 30 min. 菌体沉淀弃去. 收集上清液作抑菌实验.

2.4 珠磨法对分离细菌素的影响

分别添加 20 个玻璃珠于锥形瓶中, 置于 20 °C, 各放于 60、90、120、150、180 r/min 摇床处理 3 h, 将破碎后的发酵液于 4 800 r/min 离心机中离心 30 min. 菌体沉淀弃去. 收集上清液作抑菌实验.

2.5 超声波法对分离细菌素的影响

分别于 400 W 功率下超声破碎 10、20、30、40、50 min, 将破碎后的发酵液于 4 800 r/min 离心机中离心 30 min. 菌体沉淀弃去. 收集上清液作抑菌实验.

2.6 反复冻融法对分离细菌素的影响

在 -20 °C 冰箱中分别冷冻 5、10、15、20、25 min, 再放入沸水浴中 5、10、15、20、25 min, 反复冻融 3 次, 将破碎后的发酵液于 4 800 r/min 离心机中离心 30 min. 菌体沉淀弃去. 收集上清液作抑菌实验.

2.7 石英砂研磨法对分离细菌素的影响

分别加入 1、2、3、4、5 g 石英砂于锥形瓶中, 研磨 20 min, 将破碎后的发酵液于 4 800 r/min 离心机中离心 30 min. 将上清液与菌体分离, 菌体灭菌后弃去. 收集上清液作抑菌实验.

3 结果与讨论

3.1 微波法对分离细菌素的影响结果

微波破碎细胞技术是基于微波加热的选择性、瞬时性和高效性. 通过对生物材料进行适宜的微波处理而实现细胞破碎的一种细胞破碎手段. 由图 1 可知, 微波处理 8 min 时, 其抑菌圈直径最大, 说明此时抑菌效果较好, 故嗜酸乳杆菌菌体采用微波处理 8 min 时, 破碎效果较好.

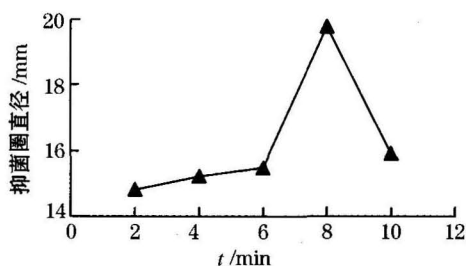


图 1 微波法的抑菌圈直径

3.2 珠磨法对分离细菌素的影响结果

由图 2 可知, 玻璃珠在剧烈的震荡过程中可以实现目标产物细菌素的快速释放, 珠磨处理在 120 r/min 时, 其抑菌圈直径最大, 为 17.9 mm, 抑菌效果较好, 即可知 120 r/min 时, 嗜酸乳杆菌菌体破碎效果较好. 但珠磨法易产生较多的热量, 可能因此增加产物活性的损失.

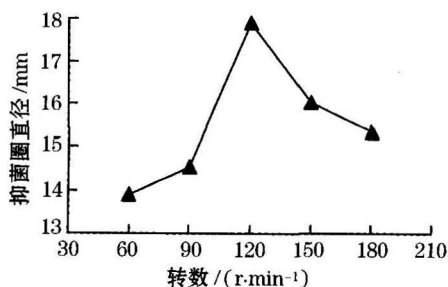


图 2 珠磨法的抑菌圈直径

3.3 超声波法对分离细菌素的影响结果

超声破碎在实验室规模应用较普遍,处理少量样品时操作简便,液量损失少.由图3可知,超声处理40 min时,其抑菌圈直径最大,抑菌效果较好,即可知40 min时,嗜酸乳杆菌菌体破碎效果较好.

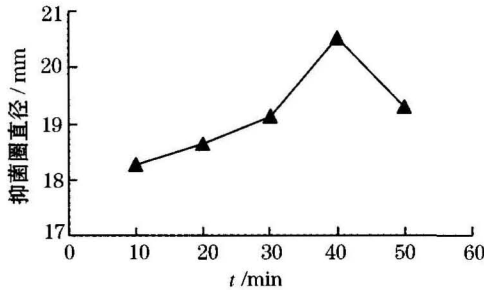


图3 超声法的抑菌圈直径

3.4 反复冻融法对分离细菌素的影响结果

由图4可知,多次冻融能增大细胞壁的通透性,能将胞内物质释放.反复冻融处理20 min时,其抑菌圈直径最大,抑菌效果较好,即可知25 min时,嗜酸乳杆菌菌体破碎效果较好.

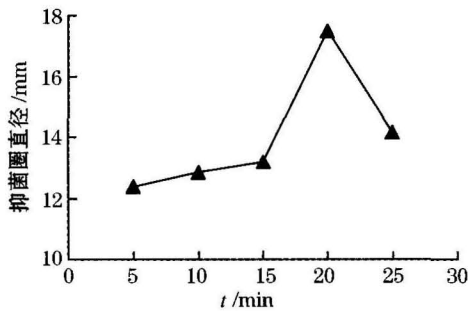


图4 反复冻融法的抑菌圈直径

3.5 石英砂研磨法对分离细菌素的影响结果

由图5可知,石英砂研磨处理添加量为4 g时,其抑菌圈直径较大,但其透明度不高,可能由于手动研磨的缘故,使细胞无法完全破壁,胞内物质不能完全释放出来.故石英砂加入量为4 g时,嗜酸乳杆菌菌体破碎效果较好.

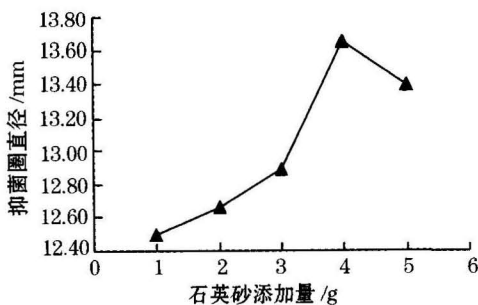


图5 石英砂研磨法分离细菌素的抑菌效果

3.6 五种方法抑菌圈平均直径对比图

由图6可知,实验的5种物理方法微波法、珠磨法、超声波法、反复冻融法、石英砂研磨法中,超声波破碎法抑菌圈平均直径最大,嗜酸乳杆菌菌体破碎效果最好.

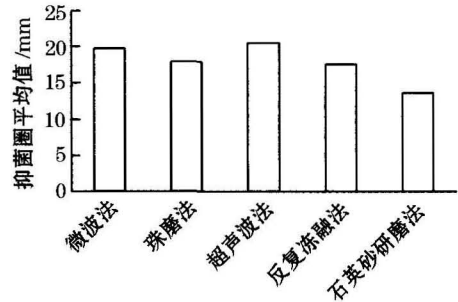


图6 五种方法的抑菌圈平均直径

4 结语

本实验以嗜酸乳杆菌为菌种,采用对其进行细胞破碎分离细菌素的实验方法,通过抑菌效果对比分析,研究得出最佳细胞破碎方法.结果表明,通过抑菌实验,超声波法在超声破碎30 min时,抑菌圈平均直径达到最大,细胞破碎效果最好.其他依次为微波法、珠磨法、反复冻融法,石英砂研磨法.

参考文献:

- [1] 单春乔,刘秋晨,林 洋,等.嗜酸乳杆菌产细菌素生物学特性的研究[J].微生物学杂志,2009,2(1):90-93.
- [2] 郑 虹. Bacillus subtilis FB123 所产细菌素的分离纯化及表征[D].福州:福建师范大学,2006.
- [3] 叶 巍,霍贵成.乳酸菌细菌素应用研究进展[J].乳业科学与技术,2006,2:56-58.
- [4] 李宏君,尹际彤,杨启东.细胞破碎方法简述[J].黑龙江医药,2002,15(2):124.
- [5] 樊明涛,杨 媛.嗜酸乳杆菌增殖培养基的研究[J].食品工业科技,2000,5(2):25-27.
- [6] 韩玉洁,陈 晔,孔 琪,等.固定化乳酸菌发酵制备L-乳酸的初步研究[J].哈尔滨商业大学学报:自然科学版,2009,25(1):43-46,79.