

干酪乳杆菌产细菌素的生物学特性分析

于微¹, 高学军², 马春丽², 王琦², 孙婷婷¹, 刘美³, 邹莉^{1*} (1. 东北林业大学林学院, 黑龙江哈尔滨 150040; 2. 东北农业大学乳品科学教育部重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150030; 3. 辽宁辉山乳业集团有限公司, 辽宁沈阳 110164)

摘要 [目的]探讨干酪乳杆菌所产细菌素的生物学特征。[方法]对干酪乳杆菌所产的细菌素分别进行抑菌活性、热敏感性、pH 范围、蛋白酶敏感性、表面活性剂分析。首先排除过氧化氢、有机酸的干扰, 采用牛津杯双层平板法, 检测无细胞发酵上清液的抑菌活性。[结果]细菌素对金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、大肠杆菌、单核增生李斯特菌具有明显的抑制作用; 在 pH 3.0~5.5 稳定性较好; 具有良好的热稳定性; 经胰蛋白酶、胃蛋白酶处理后细菌素失活, 表明抑菌成分为蛋白类物质; 加入 EDTA, 抑菌活性明显增强。[结论]干酪乳杆菌所产细菌素是具有良好的热、酸稳定性和较广抗菌谱的蛋白类物质, 可为其在防腐保鲜等领域的进一步应用提供科学依据。

关键词 干酪乳杆菌; 抑菌活性; 生物学特性

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)32-11542-02

Analysis of Biological Characteristics of Bacteriocin Produced by *Lactobacillus casei*

YU Wei¹, GAO Xue-jun², MA Chun-li², ZOU Li^{1*} et al (1. College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040; 2. Key Lab of Dairy Science, Ministry of Education, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030)

Abstract [Objective] To discuss the biological characteristics of bacteriocin produced by *Lactobacillus casei*. [Method] The antibacterial activity, thermal sensitivity, pH range, proteases sensitivity and surfactants of bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* was analyzed. Firstly exclude the interference from organic acid and hydrogen peroxide, then oxford plate double-layer agar method was used to test the antimicrobial activity of cell-free fermentation supernatant. [Result] The results showed that bacteriocin had potent inhibitory effects on *Staphylococcus aureus*, *Salmonella serovars*, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*; it had good stability between the pH value 3.0 to 5.0; and it also had good stability against heat; Bacteriocin was inactive after treatment with trypsin, pepsin, indicating that the antibacterial component were protein; when EDTA was added, the antibacterial activity became significantly stronger. [Conclusion] The bacteriocin produced by *L. casei* was an antimicrobial protein with good thermal stability, acid stability and a broad antibacterial spectrum, the study can provide scientific basis for further application of it in preservation.

Key words *Lactobacillus casei*; Antibacterial activity; Biological characteristics

细菌素是某些细菌在代谢过程中通过核糖体合成机制产生的一类具有抗菌活性的多肽、蛋白质或者蛋白质复合物, 对同种或近缘的菌种具有抑制作用^[1-2]。乳酸菌是食品安全级微生物 (GRAS), 在生长过程中具有产细菌素的能力^[3], 因此乳酸菌产细菌素作为天然防腐剂已成为研究热点而备受关注^[4-5], 但大多数乳酸菌所产的细菌素抑菌谱较窄、热不稳定、pH 范围较窄^[6], 商业化应用的只有 Nisin 和 pediocinPA 等少数几种乳酸菌细菌素^[7]。

干酪乳杆菌作为益生菌的一种, 具有降胆固醇、缓解乳糖不耐症、增强人体免疫及预防癌症和抑制肿瘤生长等益生菌保健作用^[8]。近年来研究发现, 干酪乳杆菌产生的细菌素具有广谱性, 属于 Class IIb 类细菌素, 通常需要两个肽链的共同作用发挥抑菌活性^[9]。笔者从抑菌活性、热稳定性、pH 范围、蛋白酶敏感性、表面活性剂等方面探讨干酪乳杆菌所产细菌素的生物特性, 旨在为该细菌素将来在防腐保鲜等领域的进一步应用提供科学依据。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株。产细菌素菌株: 干酪乳杆菌, 由东北农业大学生命中心提供。

1.1.2 指示菌。金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) ATCC25923、沙门氏菌 (*Salmonella*) ATCC14028、大肠杆菌

(*Escherichia coli*) ATCC25922、单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) NICBP54002, 中国药品生物制品检定所。

1.1.3 仪器与设备。电热恒温鼓风干燥箱 DH-101-3BS, 天津市中环实验电炉有限公司; 精密电子天平, 瑞士梅特勒-托利多; 高压灭菌锅 HVE-50, 日本 HIRAYAMA; 梅特勒-托利多 Delta320pH 计, 瑞士梅特勒-托利多; 电热恒温培养箱 DHP-9272, 上海一恒科技有限公司; 各种规格移液枪, 芬兰雷勃公司; 牛津杯, 哈尔滨赛拓公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株活化。菌株于 -80 °C 冷冻保存, 使用前将干酪乳杆菌菌液接种于 MRS 液体培养基于 37 °C 过夜培养, 菌液在固体培养基中三区划线, 活化传代 2 次以上, 用接种环挑平板中长大的单菌落进行镜检。指示菌接种于 LB 培养基中 37 °C 过夜培养^[10]。

1.2.2 无细胞发酵上清液的制备。干酪乳杆菌的发酵液经 12 000 r/min, 4 °C 离心 15 min, 用 6 mol/L NaOH 调 pH 至 7.0, 中和有机酸的干扰。过氧化氢酶加入到无细胞发酵上清液中, 使过氧化氢酶的终浓度为 5.0 mg/ml, 37 °C 水浴 2 h 后取出, 排除过氧化氢酶的干扰。上清液经 0.22 μm 滤膜过滤去除菌体及杂质, 保存于 4 °C 冰箱中备用。

1.2.3 细菌素抑菌活性的测定。采用牛津杯琼脂扩散法^[11]检测细菌素的抑菌活性。在无菌状态下, 将指示菌悬浊液均匀涂在 LB 平板上, 培养皿于操作台内干燥 30 min, 待菌液完全吸收。每个平板内均匀放入 4 个内径为 6 mm 牛津杯, 下压使其无间隙, 将 200 μl 乳酸菌无细胞发酵液滴入牛津杯孔内, 平板在指示菌的最适温度下过夜培养, 用游标卡

作者简介 于微(1982-), 女, 黑龙江哈尔滨人, 博士研究生, 从事食品生物技术研究。

收稿日期 2014-10-08

尺测量平板上抑菌圈的大小^[12],每组设3个平行,重复3次试验,确保试验的准确性。

1.2.4 pH对抑菌活性的影响。取1 ml无细胞发酵上清液,分别用1 mol/L的NaCl和NaOH将pH调为3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0,测定其对金黄色葡萄球菌的抑菌活性。

1.2.5 温度对抑菌活性的影响。取1 ml无细胞发酵上清液,分别于37、60、80、100、121 °C处理15 min,测定其对金黄色葡萄球菌的抑菌活性。

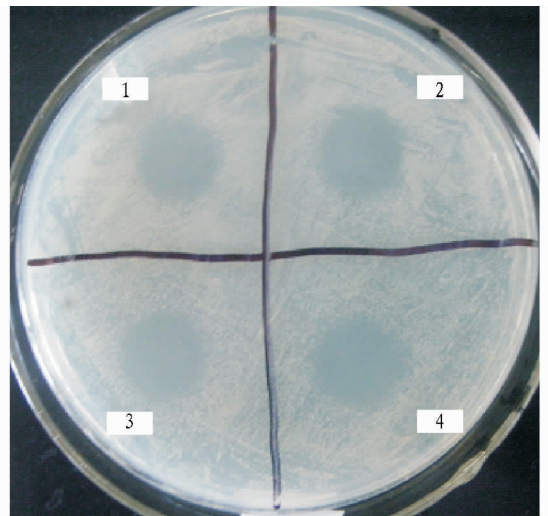
1.2.6 蛋白酶对抑菌活性的影响。取1 ml无细胞发酵上清液,将pH调至各种酶的最适pH条件下,按照1.0 mg/ml的浓度分别加入胃蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、蛋白酶K和 α -淀粉酶,在各自适宜的温度下处理2 h使酶失活,检测抑菌活性的变化情况。

1.2.7 表面活性剂对抑菌活性的影响。取1 ml无细胞发酵上清液,分别加入吐温-20、吐温-80、SDS、尿素、Triton X-100、EDTA,使各物质的终浓度为1 mg/ml,进行抑菌试验,未加表面活性剂的无细胞发酵上清液为对照。

2 结果与分析

2.1 细菌素的抑菌活性分析 由图1可知,干酪乳杆菌产生的细菌素对金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、大肠杆菌、单核增生李斯特菌4种致病菌均有明显的抑制作用,并且对革兰氏阳性菌生长的抑制作用明显大于对革兰氏阴性菌的抑菌效果,对金黄色葡萄球菌的抑菌效果最明显,抑菌圈直径可达到18.0 mm左右,对单核增生李斯特菌抑菌圈直径为17.6 mm,对革兰氏阴性菌沙门氏菌、大肠杆菌的抑菌圈直径分别为

16.0、15.5 mm。以上抑菌效果表明,干酪乳杆菌所产的细菌素可以抑制部分革兰氏阳性、阴性菌的生长,是一种广谱型抑菌物质。



注:1. 大肠杆菌;2. 李斯特菌;3. 沙门氏菌;4. 金黄色葡萄球菌。

图1 无细胞发酵上清液对几种菌的抑菌效果

2.2 pH对抑菌活性的影响 由表1可知,干酪乳杆菌所产的细菌素在pH为3.0~5.5有明显的抑菌效果,当pH=4.0时抑菌效果最明显,可推测其为最适pH,当pH>4.0时,随着pH的增加抑菌圈直径逐渐减小,抑菌活性降低,当pH=6.0时,细菌素的抑菌效果消失。由此可见,干酪乳杆菌所产细菌素在酸性条件下保持稳定状态,且具有较高的抑菌活性,这与许多乳酸菌细菌素特性相似。

表1 pH对细菌素抑菌活性的影响

样品	抑菌圈直径//mm						
	pH 3.0	pH 3.5	pH 4.0	pH 4.5	pH 5.0	pH 5.5	pH 6.0
发酵上清液	16.0 ± 0.18	16.25 ± 0.11	16.5 ± 0.15	15.80 ± 0.25	14.75 ± 0.21	14.05 ± 0.12	-
无菌水	10.85 ± 0.22	10.06 ± 0.12	-	-	-	-	-

注:表中“-”表示无抑菌作用。

2.3 温度对抑菌活性的影响 经不同温度处理无细胞发酵上清液20 min后,如图2所示,随温度的升高,抑菌活性呈逐渐下降的趋势,这可能是高温影响细菌素的分子结构,从而使细菌素抑菌活性降低。在37~100 °C范围内,抑菌圈直径均能达到15.00 mm以上,保持很高的抑菌活性,但是经121 °C处理后,抑菌圈直径明显小于以上不同温度处理的结果,抑菌效果降低,但仍保持80%的抑菌活性。由此可见,干酪乳杆菌所产细菌素具有良好的热稳定性。

2.4 蛋白酶对抑菌活性的影响 通常细菌素由于自身的蛋白质特性对一些蛋白酶敏感,如胰蛋白酶、胃蛋白酶等,在部分蛋白酶作用后,抑菌活性降低或完全失去活性。由表2可知,经胰蛋白酶和胃蛋白酶处理后该细菌素抑菌活性分别降低了34.0%、33.0%,失去抑菌活性,经木瓜蛋白酶和蛋白酶K处理后该细菌素的抑菌效果无明显影响,经 α -淀粉酶处理后抑菌活性下降16.0%,说明该细菌素是一种蛋白类物质,对胰蛋白酶和胃蛋白酶敏感,作为食品防腐剂可被人体降

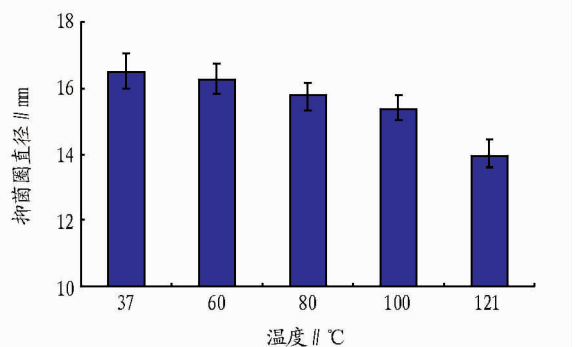


图2 温度对细菌素抑菌活性的影响

解,不会引起不良反应。

2.5 表面活性剂对抑菌活性的影响 由表3可知,经吐温-20、吐温-80、尿素和Triton X-100处理后,对金黄色葡萄球菌和沙门氏菌抑制作用无显著性变化($P>0.05$),但是加入SDS作

(下转第11570页)

- [7] 王宏记,王海军,曾又枝,等. 省级气象信息综合数据库系统的设计与实现[J]. 暴雨灾害,2008,27(3):283-286.
- [8] 王旻燕,邓莉,赵芳,等. CIMISS 中气象卫星数据存储和服务模型[J]. 安徽农业科学,2012(8):4785-4789.
- [9] 马永征,南凯,阎保华. 基于 MDS 的数据网格信息服务体系结构[J]. 微电子学与计算机,2003(8):1-3.
- [10] 王国复,李集明,邓颖,等. 中国气象科学数据共享服务网总体设计与建设[J]. 应用气象学报,2004,15(S1):10-16.

- [11] 李集明,沈文海,王国复. 气象信息共享平台及其关键技术研究[J]. 应用气象学报,2006,17(5):621-628.
- [12] 李集明,熊安元. 气象科学数据共享系统研究综述[J]. 应用气象学报,2004,15(S1):1-9.
- [13] 沈文海,赵芳,高华云,等. 国家级气象资料存储检索系统的建立[J]. 应用气象学报,2004,15(6):727-736.
- [14] 王宏伟,方群,陈伟. 基于内存数据库的 OPC 监测系统的设计与实现[J]. 计算机技术与发展,2013,23(7):242-248.

(上接第 11543 页)

用后,抑菌活性增强,这可能是因为 SDS 与蛋白结构中的内部疏水区作用使得蛋白结构打开。EDTA 本身对金黄色葡萄球菌、沙门氏菌有一定的抑菌作用,因此无细胞发酵上清液与抗菌物质同时作用时抑菌效果明显,说明 EDTA 可以增强细菌素的抑菌活性。

表 2 不同蛋白酶对细菌素抑菌活性的影响

检测项目	抑菌圈直径/mm			平均 mm	变化率/%
	重复 1	重复 2	重复 3		
CK	16.22	16.02	15.80	16.01	-
胃蛋白酶	10.58	10.20	11.05	10.61	34.0
胰蛋白酶	10.42	11.02	10.85	10.76	33.0
木瓜蛋白酶	15.20	14.80	14.85	14.95	6.6
蛋白酶 K	14.90	14.52	15.00	14.81	7.0
α -淀粉酶	13.20	13.58	13.80	13.53	16.0

注:“CK”表示未经蛋白酶处理的无细胞发酵上清液。

表 3 表面活性剂对细菌素抑菌活性的影响

表面活性剂 (1 mg/ml)	抑菌圈直径/mm	
	金黄色葡萄球菌	沙门氏菌
未添加表面活性剂	13.02 ± 0.05	12.25 ± 0.15
吐温-20	13.47 ± 0.11	12.58 ± 0.09
吐温-80	13.18 ± 0.22	12.40 ± 0.17
尿素	13.15 ± 0.12	12.80 ± 0.09
Triton X-100	13.55 ± 0.18	12.50 ± 0.22
SDS	15.25 ± 0.23	14.86 ± 0.25
EDTA	16.62 ± 0.32	16.42 ± 0.28

3 讨论

该研究分析干酪乳杆菌所产的细菌素不仅对革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌、单核增生李斯特菌具有抑制作用,对革兰氏阴性菌大肠杆菌、沙门氏菌也具有抑制效果,因大部分乳酸菌的抑菌谱都较窄,只对革兰氏阳性菌具有抑菌性,对革兰氏阴性菌有抑菌性质的很少。现阶段广谱性细菌素的开发成为乳酸菌细菌素研究的热点之一,因此该细菌素作为一种高效广谱的生物活性剂将具有广泛的应用前景。

通常细菌素在适宜 pH 范围内发挥有效的抑菌活性,该试验中干酪乳杆菌产的细菌素在较宽的 pH 范围内具有稳定的抑菌活性,在酸性条件下抑菌活性明显增强,中性条件下细菌素活性未受到明显影响,碱性条件下细菌素失去活性,推测细菌素与酸环境具有协同作用的能力,可应用于酸性及

中性食品的防腐保鲜中。

在食品加工中,热稳定性尤为重要,因为加热是处理食品的常用方法之一。该细菌素经不同温度处理后,仍保持稳定的抑菌活性,说明干酪乳杆菌产的细菌素对热不敏感,可有效减少杀菌时间、杀菌强度对食品的影响,有利于保持食品原有的营养价值、组织状态和风味。

细菌素对蛋白酶敏感性的检测是鉴定细菌素的标准之一,干酪乳杆菌产的细菌素受蛋白酶水解的影响,经胰蛋白酶和胃蛋白酶处理后失去活性,说明该细菌素是蛋白类物质,能被人体中存在的蛋白酶分解,不会在体内积蓄,因此该细菌素具有较高的安全性。

EDTA 加入到干酪乳杆菌产的细菌素后,对金黄色葡萄球菌和沙门氏菌的抑菌效果增强,说明 EDTA 具有增强抑菌活性的能力,对革兰氏阴性菌的抑菌效果明显,这是因为 EDTA 具有穿透细胞膜的能力,可以释放细菌素。

参考文献

- [1] DEEGAN L H, COTTER P D, HILL C, et al. Bacteriocins: biological tools for biopreservation and shelf-life extension[J]. International Dairy Journal, 2006,16(9):1058-1071.
- [2] TODOROV S D, PREVOST H, LEBOIS M, et al. Bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya (*Carica papaya*)— From isolation to application: Characterization of a bacteriocin[J]. World J Microbiol Biotechnol, 2012,48(3):973-984.
- [3] DE VUYSTIL, LEROY F. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications[J]. J Mol Microbiol Biotechnol, 2007,13(4):194-199.
- [4] CLEVELAND J, MONTVILLE T J, NES I F, et al. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation[J]. International Journal of Food Microbiology, 2001,71(1):1-20.
- [5] GÁLVEZ A, ABRIQUEL H, LÓPEZ R L. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation[J]. Int J Food Microbiol, 2007,120(1/2):51-70.
- [6] ANASTASIADOU S, PAPAGIANNI M, FILIOUSIS G, et al. Pediocin SA-1, an antimicrobial peptide from *Pediococcus acidilactici* NRRL B5627: production conditions, purification and characterization[J]. Bioresource Technology, 2008,99(13):5384-5390.
- [7] SOBRINO-LÓPEZ A, MARTÍN-BELLOSO O. Use of Nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products[J]. International Dairy Journal, 2008,18(4):329-343.
- [8] 王英,周剑忠,仇小妹,等. 益生菌干酪乳杆菌 FM10-3 生物学与发酵特性分析[J]. 江苏农业学报,2013,29(3):654-658.
- [9] TAGG J R, DAJANI A S, WANNAMAKER L W. Bacteriocins of gram-positive bacteria[J]. Microbiol Rev., 1995,59(2):171-200.
- [10] 凌代文. 乳酸菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京:中国轻工业出版社,1999:36.
- [11] 李南薇,李宇. 乳酸菌代谢产物对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌抑制作用的研究[J]. 中国酿造,2009(5):49-52.
- [12] ROJO-BEZARES B, SEANZ Y, NAVARRO L, et al. Coculture-inducible bacteriocin activity of *Lactobacillus plantarum* strain J23 isolated from grape must[J]. Food Microbiology, 2007,24(5):482-491.