

产广谱细菌素乳酸菌的筛选和鉴定*

张艾青 刘书亮** 敖 灵

(四川农业大学食品科学系 雅安 625014)

摘要 :以大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、藤黄微球菌、铜绿假单胞杆菌和枯草芽孢杆菌为指示菌,从分离自四川传统发酵食品中的 267 株乳酸菌中,采用平板打孔法初筛、牛津杯法复筛(排除酸、过氧化氢干扰以及胰蛋白酶和木瓜蛋白酶处理),筛选出 1 株分离自醪糟的具有较强抑菌作用的产广谱细菌素的乳杆菌菌株 P158,结合形态学、生理生化特性和 16S rDNA 序列同源性分析,该菌株被鉴定为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)。

关键词 :乳酸菌 细菌素 抑菌实验 16S rDNA

中图分类号 :Q939 **文献标识码** :A **文章编号** :0253-2654(2007)04-0757-04

Screening and Identification of Broad-spectrum Bacteriocin-producing Lactic Acid Bacterium*

ZHANG Ai-Qing LIU Shu-Liang** AO Ling

(Food Science of Sichuan Agriculture University, Ya'an 625014)

Abstract :The text has isolated 267 strains LAB from the traditional fermentative food in Sichuan. Using agar plate proliferation experiment and double-layer agar plate proliferation experiment (eliminating the effects of organic acid and H_2O_2 , decreased after treatment with trypsin and papain) to screen a LAB of Bacteriocins P158 which has antibacterial action to *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*. P158 was isolated from fermented glutinous rice. Through detection of its appearance, physiological and biochemical characteristics and 16S rDNA gene sequence homology analysis, it was identified as *Lactobacillus plantarum*.

Key words :Lactic Acid Bacterium, Bacteriocins, Antibacterial experiment, 16S rDNA

乳酸菌素(Bacteriocins of LAB)是在乳酸菌(Lactic acid bacterium, LAB)代谢过程中合成并分泌到环境中的一类对革兰氏阳性菌(尤其是亲缘性较近的细菌)具有抑制作用的杀菌蛋白或多肽。截至目前已发现的乳酸菌细菌素有 40 余种,分别是由乳球菌[乳球菌素(L. actococcin) nisin]、片球菌[片球菌素(Pediocin)]、明串珠菌[明串珠菌素(Carnocin)]、乳杆菌[乳杆菌素(Lactocin)、植物乳杆菌素(Plantaricin)]、双歧杆菌[双歧杆菌素(Bifidoxin)]、肠球菌[肠球菌素(Enterocin)]、肉食杆菌[肉食杆菌素(Carnobacteriocin)]等属的菌株产生

的^[3-6]。其中,尤以被公认为安全(GRAS)并已在全世界广泛使用的 nisin 在乳制品及罐头制品中得到了广泛的应用。由于乳酸菌素所具有的潜在的食品生物防腐剂的前景,因而目前新型乳酸菌素的发现层出不穷,在我国只有 nisin 得到了一些研究,但 nisin 的抑菌谱较窄,而选育出具有较强的既能抑制 G^+ 菌又能抑制 G^- 菌的广谱细菌素乳酸菌菌株具有很好的应用价值。本文从醪糟中选育出 1 株具有较强抑菌作用的广谱细菌素乳酸菌菌株,经系统鉴定为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*),为其应用和深入研究细菌素提供了重要的基础材料,现报道如

* 四川省教育厅项目(No.005208)

** 通讯作者 Tel 0835-2882306, E-mail: lsliang999@163.com

收稿日期 2006-12-31, 修回日期 2007-03-28

下。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

乳酸菌菌株共 267 株,分离自四川传统发酵食品(泡菜、榨菜、酱菜、腌菜、豆瓣、醪糟、腐乳)自然发酵酸奶、市售酸奶、自制泡菜及香肠,根据形态学特征初定为乳酸菌;指示菌有大肠杆菌(*Escherichia coli*) ATCC25922、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC25923、藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*) 10209、铜绿假单胞杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*) ATCC27853、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),保存于四川农业大学农产品加工及贮藏工程省级重点实验室。

1.2 主要药品及培养基

胰蛋白酶(Amersco 公司)、木瓜蛋白酶(Sigma 公司)、各种糖(醇)类药品均为分析纯(国产或 Sigma 公司、Fluka 公司);Bacterial DNA out 抽提试剂盒(四川省绵阳天泽基因工程有限公司);溶菌酶(10 mg/mL), $2 \times \text{long Taq PCR MasterMix}$ (北京天为时代科技有限公司);改良 MRS 液体培养基^[7](乳酸菌发酵)、肉汤培养基(指示菌)、营养琼脂培养基(抑菌实验)。

1.3 16S rDNA 的 PCR 扩增引物^[8]

由上海英骏生物技术有限公司合成:

上游引物:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';下游引物:5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3'。

1.4 广谱抑菌乳酸菌的初筛

用接种环挑取保存的乳酸菌接种于装有 1mL 改良 MRS 液体培养基的无菌 EP 管中,密封,30℃ 静置培养 72h,培养液以 10000r/min 离心 1min,得发酵上清液,制备含指示菌 10^6 个/mL 的抑菌平板,用 6mm 打孔器在平板上均匀打出 5 个小孔,每孔里定量加入 100 μ L 不同乳酸菌菌株发酵上清液,标注菌株号,于 37℃ 培养箱中正置培养 16h,选取小孔周围有明显抑菌圈的菌株做复筛实验。

1.5 产广谱细菌素乳酸菌的复筛

1.5.1 酸抑制作用的排除 挑取初筛菌株接种于 1mL 改良 MRS 液体活化后,再以 1% 接种量接种于改良 MRS 液体,30℃ 静置培养 48h,10000r/min 离心 1min 后,测其 pH 值,并用 1mol/L NaOH 和 1mol/L HCl 将其上清液调至已确定的对照 pH 值,用牛津杯

法做对各种指示菌的抑菌实验。

1.5.2 过氧化氢作用的排除 挑取乳酸菌发酵产物排除酸后仍有抑菌效果的菌株,接种于 1mL 改良 MRS 液体活化后,再以 1% 接种量接种于改良 MRS 液体,30℃ 静置培养 48h,10000r/min 离心 1min 后其上清液于 80℃ 水浴 10min,用牛津杯法做对各种指示菌的抑菌实验。

1.5.3 蛋白酶解检测 用胰蛋白酶、木瓜蛋白酶对筛选出的菌株进行酶分解实验,先用 1mol/L NaOH 和 1mol/L HCl 分别调发酵液到胰蛋白酶、木瓜蛋白酶的最适作用 pH7.0,按 0.5mg/mL 加入胰蛋白酶、木瓜蛋白酶,37℃ 水浴 2h,再将 pH 调回对照 pH 值 4.5,牛津杯法做对各种指示菌的抑菌实验。

1.6 具有较强抑菌作用的产广谱细菌素乳酸菌菌株(编号 P158)的鉴定

1.6.1 形态学及生理生化试验 根据分离菌的菌落和菌体形态特征、革兰氏染色以及生理生化反应,参照文献^[7]进行初步鉴定。

1.6.2 16S rDNA 的遗传学鉴定 细菌总 DNA 的提取方法:将 P158 菌接于 10mL MRS 液体培养基,37℃ 静置培养 24h,收获菌体,按 Bacterial DNA out 抽提试剂盒使用手册提取其总 DNA。并利用 PCR 技术扩增其 16S rDNA 片段。PCR 反应体系(25 μ L)为:上下游引物各 1 μ L(10 μ mol/L),模板 DNA 1 μ L, $2 \times \text{long Taq PCR MasterMix}$ 12.5 μ L(包括:0.1U long Taq polymerase/ μ L,500 μ mol/L dNTPs each,20mmol/L pH 8.3 Tris-HCl,3mmol/L MgCl₂),超纯水 9.5 μ L。PCR 扩增程序为:95℃ 预变性 5min;94℃ 45s,56℃ 45s,72℃ 1min30s,循环 30 次;72℃ 延伸 10min,4℃ 保温。PCR 产物电泳并送上海英骏(invitrogen)生物技术有限公司进行序列测定。得到的 PCR 产物序列通过 BLAST 在 GenBank + EMBL + DDBJ + PDB 基因库中进行同源性比较,并将其鉴定到种。

2 结果与分析

2.1 初筛结果

从 267 株乳酸菌中筛选出对 5 种指示菌都有抑菌作用的菌株 64 株(见图 1),抑菌率达 23.97%。测试菌株的发酵产物对铜绿假单胞杆菌抑制效果最好,抑菌率达 84.27%,其次为大肠杆菌,抑菌率为 79.40%,效果最差的为枯草芽孢杆菌,抑菌率为

30.34% ,而对金黄色葡萄球菌和藤黄微球菌的抑菌率分别为 53.18% 和 65.17%。初步说明此次筛选的乳酸菌发酵产物对 G^- 菌效果好于 G^+ 菌。细菌素的抑菌谱一般比较窄,只作用于同种的其它菌株或亲缘关系很近的种。大多数 G^- 菌的细菌素只作用于亲缘很近的种,而 G^+ 菌细菌素的抑菌谱则比较宽,不仅作用于不同属的其它 G^+ 菌,而且能够作用于 G^- 菌^[9,10]。本研究筛得的乳酸菌菌株具有广谱抑菌作用。

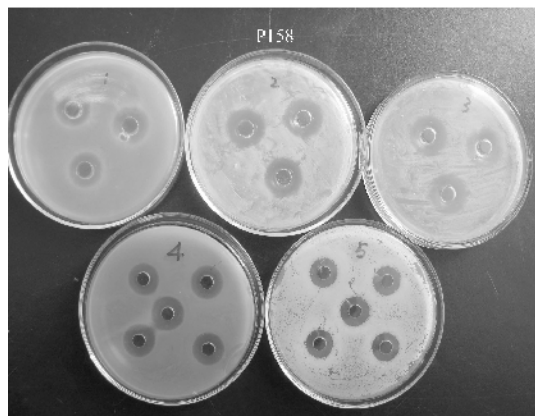


图 1 P158 菌株对 5 种指示菌的抑制作用

1 *E. coli* 2 *S. aureus* 3 *M. luteus* 4 *P. aeruginosa* 5 *B. subtilis*

2.2 复筛结果

2.2.1 酸抑制作用的排除 :用乳酸和盐酸分别调蒸馏水、MRS 液体培养基的不同 pH 值对 5 种指示菌的抑菌结果是 :用乳酸和盐酸调蒸馏水 pH 值在 3.0 ~ 6.0 都没有抑菌效果 ;乳酸和盐酸调 MRS 液体培养基在 pH 3.0 下都有抑菌效果 ,pH 4.0 对大肠杆菌、藤黄微球菌、铜绿假单胞杆菌都有抑菌效果 ,而对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌没有抑菌效果 ,pH 4.5 以上都没有抑菌效果 ,故选择 pH 4.5 作为酸排除的对照。

挑取对五种指示菌都有抑菌效果的 64 株乳酸菌进行酸作用的排除实验 ,调其发酵上清液 pH 值为 4.5 ,用牛津杯法进行抑菌实验。结果表明 ,36 株菌周围有较大的抑菌圈 ,对指示菌在一定程度上有抑制作用 ,测其发酵上清液 pH 值主要集中在 pH 4.0 左右 ,最低 pH 3.65 ,最高 pH 4.5 ,说明乳酸菌产酸能力很强 ,但排除酸作用后它们仍有抑菌活性物质存在。

2.2.2 过氧化氢作用的排除 :排除酸干扰后 ,利用 H_2O_2 对热不稳定的特性 ,挑取对五种指示菌仍有较

好抑菌效果的 36 株乳酸菌进行 H_2O_2 作用的排除 ,结果表明 ,36 株乳酸菌中只有 3 株水浴后抑菌圈的变化较大 ,其余几乎无变化。表明 H_2O_2 在乳酸菌的代谢产物中只占很少部分 ,其余菌株中排除 H_2O_2 作用后仍有抑菌活性物质存在。

2.2.3 酶解检测 :挑取抑菌效果好的 P156、P158、P174、P186 四株菌进行胰蛋白酶、木瓜蛋白酶酶解实验 ,结果表明 ,P156、P174 两株菌株不能被胰蛋白酶、木瓜蛋白酶酶解 ,说明它们不含有能被胰蛋白酶、木瓜蛋白酶水解的蛋白质类物质 ,但其仍有较好的抑菌效果 ,表明其代谢产物中含有其他抑菌活性成分 ,有待进一步研究。P158、P186 菌株能被胰蛋白酶、木瓜蛋白酶较好的酶解 (见图 2) ,说明其具有蛋白质类物质 ,是一类细菌素。

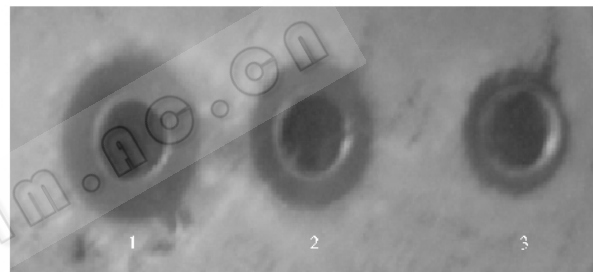


图 2 蛋白酶处理后抑菌实验结果

1、发酵液 2、胰蛋白酶酶解液 3、木瓜蛋白酶酶解液

2.3 具有较强抑菌作用的产广谱细菌素乳酸菌菌株 P158 的鉴定结果

2.3.1 个体形态和菌落特征 :该菌大小为 $2\mu m \sim 2.5\mu m \times 1.1\mu m$,革兰氏阳性杆菌 ,两端钝圆 ,单个排列或短链状排列 (见图 3) ,无芽孢、无鞭毛 ,无荚膜。在 MRS 平板上表现为菌落直径 2mm、圆形、凸起、边

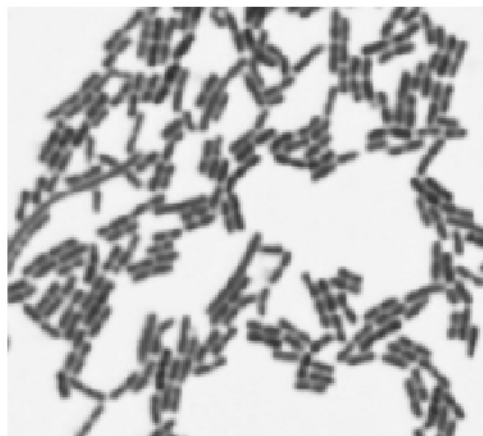


图 3 P158 的细胞形态图($\times 1000$)

缘整齐、表面光滑、乳白色、不透明的光滑型菌落。

2.3.2 生理生化特性:接触酶阴性,发酵葡萄糖产酸、产气,无运动性,不产硫化氢,pH 4.5、15℃能生长,确定为乳杆菌属(*Lactobacillus*)。能发酵阿拉伯糖、纤维二糖、葡萄糖、果糖、乳糖、木糖、半乳糖、麦芽糖、松三糖、蜜二糖、棉籽糖、海藻糖、核糖、蔗糖、甘露醇、鼠李糖、葡糖酸盐、七叶灵水解、MR 试验均为阳性,V-P、吡啶、明胶液化、淀粉水解、硝酸盐还原试验均为阴性,牛奶分解酸凝。

综合以上形态学及生理生化特性,对照《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》,初步将 P158 菌株鉴定为植物乳杆菌(*L. plantarum*)。

2.3.3 16S rDNA 的遗传学鉴定:以菌株 P158 总 DNA 为模板,采用通用 16S rDNA 引物进行 PCR 扩增,得到约 1.5kb 的特异性扩增产物,见图 4。PCR 产物测序结果表明,测序片断长 1439bp,具有典型的 16S rDNA 的特征。此序列已登录 GenBank,登录号 EF114393。将所得序列在 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 网站中使用 Blastn 2.2.15[Oct-15-2006]在 GenBank + EMBL + DDBJ + PDB 基因库中进行同源性搜索,比对结果表明与登录号 DQ056419、DQ486145 等前 10 株植物乳杆菌(*L. plantarum*)的同源性为 100%~99.86%。

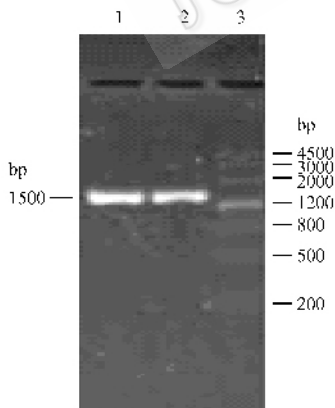


图4 P158 的 16SrDNA 的 PCR 产物电泳图
1、2: PCR 产物 3: DNA Marker III

根据形态学、生理生化特性和 16S rDNA 比对结果,将菌株 P158 鉴定为植物乳杆菌(*L. plantarum*)。

3 结论

关于分离自泡菜、乳品、猪肠道、肉品等生境中的乳酸杆菌细菌素的研究报道较多。本实验从四川传统发酵食品(泡菜、榨菜、酱菜、腌菜、豆瓣、醪糟、腐乳)自然发酵酸奶、市售酸奶、自制泡菜及香肠中获得的 267 株乳酸菌中,研究了这些乳酸菌对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、藤黄微球菌、铜绿假单胞杆菌、枯草芽孢杆菌五种指示菌的抑制作用,并对 64 株具有广谱抑制作用的乳酸菌进行酸、 H_2O_2 排除、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶酶解作用,最后确定 P158 菌株能产生蛋白质类细菌素。经形态学、生理生化指标及 16S rDNA 的系统鉴定,该菌株鉴定为植物乳杆菌(*L. plantarum*)。P158 菌株分离于四川传统发酵食品“醪糟”,自醪糟中分离筛选出产广谱细菌素的植物乳杆菌尚未见文献报道,也未见有关于采用 16S rDNA 序列对产广谱细菌素 *L. plantarum* 的分子鉴定的研究报道。分离菌株对 G^+ 菌和 G^- 菌具有较强的抑制作用,因而具有重要的研究和应用价值。本研究组正在对 P158 菌株细菌素的生物学特性、分离纯化及其分子方向进行深入研究,以期具有较好的应用前景。

参考文献

- [1] Dajani R A S, Wannamaker L W. Bacteriology Review, 1976 **40**: 722~756.
- [2] Jack RW, Tagg J R, Ray B B. Microbiology Review, 1995, **59**: 171~200.
- [3] 杨洁彬, 郭兴华, 凌代文, 等. 乳酸菌-生物学基础及应用. 北京: 中国轻工业出版社, 1996. pp. 1~36.
- [4] 李平兰, 张 鑫, 江汉湖, 等. 微生物学通报, 1998, **25**(5): 295~298.
- [5] Ahne S, Nobaek S, Jeppsson B, et al. Journal of Applied Microbiology, 1998 **85**: 88~94.
- [6] Hosoda M, Hashimoto H, He F, et al. Journal of Dairy Science, 1995 **7**: 945~949.
- [7] 凌代文, 东秀珠. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法. 北京: 中国轻工业出版社, 1999. pp. 6~16, 84~129.
- [8] 刘志恒. 现代微生物学. 北京: 科学出版社, 2002. pp. 62~68.
- [9] Stevens K A, Sheldon B W, Klapes N A, et al. Applied Environment Microbiology, 1991, **57**: 3613~3615.
- [10] Skytta E, Mattila T J. Microbiological Methods, 1991, **14**: 77~88.