

动物乳杆菌的分离鉴定及其抑菌蛋白的特性分析

李明雄¹ 李妮¹ 李征¹ 向文良¹ 杨志荣¹ 罗璠^{1,2*}

(1. 四川大学生命科学学院 四川省资源微生物与微生物技术重点实验室 四川 成都 610064)

(2. 西南民族大学生命科学与技术学院 四川 成都 610064)

摘要: 通过滤纸片法从健康肉猪猪大肠、小肠中分离得到 212 株抗生物物质产生菌, 以杯碟法复筛, 得到 1 株对溶壁微球菌(*Micrococcus lysodeikticus*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)等革兰氏阳性菌和大肠杆菌(*Escherichia coli*)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)等革兰氏阴性菌以及部分真菌如禾谷镰刀霉(*Fusarium graminearum*)均有强烈抑制作用的乳酸菌。经形态学、生理生化特征及 16S rDNA 序列同源性分析等手段鉴定该菌株为动物乳杆菌(*Lactobacillus animalis*)。排除酸和过氧化氢的干扰后, 该菌株的发酵上清液对指示菌仍有明显抑菌活性; 用蛋白酶处理该菌株的发酵上清液后, 抑菌活性丧失; 发酵液粗提物具有较好的热稳定性(经 121°C 处理 20 min 仍有较强抑菌活性)以及较宽的抑菌活性 pH 值范围(3.5~5.5), 因此初步认为该菌株产生一类具有广谱抑菌活性的类细菌素物质。

关键词: 猪肠道, 动物乳杆菌, 类细菌素, 鉴定, 抑菌特性

Screening and Identification of *Lactobacillus Animalis* Strain and Its Inhibitory Protein Characteristics

LI Ming-Xiong¹ LI Ni¹ LI Zheng¹ XIANG Wen-Liang¹
YANG Zhi-Rong¹ LUO Fan^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Microbial-resource and Microbial-technique, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610064, China)

(2. College of Life Sciences and Technoligy, Southwest University for Nationalitise, Chengdu, Sichuan 610064, China)

Abstract: A bacteriocin-like substance producing strain T12 was screened from 212 lactic acid bacteria isolated from intestine of healthy pigs by paper disk test and was identified as *Lactobacillus*. The supernatant of T12 exhibited strong inhibitory activity against the gram-positive bacteria, including *Micrococcus lysodeikticus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus*. A strong activity was also observed against the gram-negative bacteria and some eumycete, such as *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Fusarium graminearum*. Through detection of its appearance, physiological and biochemical characteristics and 16S rDNA gene sequence homology analysis, it was identified as *Lactobacillus animalis*. Eliminated the organic acids and hydrogen peroxide the fermented production exhibited strong inhibitory activity

against indicat bacterias still; the inhibitory activity was totally lost after treatment with protease; The bacteriocin-like substance was heat-stable even at the autoclaving temperature (121°C for 20 min) and was active over a wide pH range (3.5~5.5). The protein nature and restricted spectrum of the substance points to its being bacteriocin-like substance.

Keywords: Pig intestinal tract, *Lactobacillus animalis*, Bacteriocin-like substance, Identification, Characterization

抗生素的应用给畜牧生产的发展做出了巨大贡献, 饲用抗生素可抑制畜禽消化道内有害微生物的生长和繁殖, 增强畜禽的抗病能力, 促进动物生长。但是, 抗生素在杀死病原菌的同时, 肠道内的正常菌群也遭到破坏, 导致菌群失调, 增加了动物肠道疾病的发病率^[1,2]。因此越来越多的研究者注意到尽早研究建立维持动物肠道菌群平衡的有效措施是取代抗生素的可行途径。大量研究表明, 益生菌的应用是建立和维持动物肠道菌群平衡的最有效方式之一^[3,4]。

乳酸菌是肠道常居菌, 畜禽服用乳酸菌后, 可以改变肠道内环境, 抑制有害菌繁殖, 调整胃肠道菌群平衡, 同时乳酸菌发酵糖类产生大量的酸、过氧化氢、丁二酮和细菌素等多种抑菌物质, 降低肠道pH值, 抑制致病菌的生长^[5,6]。目前关于乳酸菌产细菌素的研究已深入到分子水平, 但对乳酸菌产类细菌素的研究较少。此外, 目前生产上应用的产益生菌菌株大多数来源于土壤、水和乳制品等, 在畜牧生产中应用效果不显著, 其中一个重要原因是从以上环境中获得的微生物菌株在动物肠道中难以存活^[7]。相反, 从动物肠道内筛选出的肠道固有微生物经过长期的选择和适应, 可以较好地肠道环境中生长和增殖。

本实验从健康猪肠道中分离筛选得到一株不仅对革兰氏阳性菌, 而且对革兰氏阴性菌及部分真菌都有明显抑制作用的产类细菌素乳酸菌, 根据其形态学特征、生理生化特征及 16S rDNA 序列分析结果进行鉴定, 并对该菌株所产抑菌物质的生物学特性进行了初步研究, 丰富了产类细菌素微生物菌群的研究, 以期益生菌群在畜牧业生产方面的研究和应用提供一定的理论基础和依据。

1 材料与方法

1.1 材料

健康肉猪大肠、小肠。

1.2 菌种

1.2.1 革兰氏阴性指示菌: 大肠杆菌(*E. coli*), 鼠伤寒沙门氏菌(*S. typhimurium*)。

1.2.2 革兰氏阳性指示菌: 金黄色葡萄球菌(*S. aureus*), 溶壁微球菌(*M. lysodeikticus*), 枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*), 蜡状芽孢杆菌(*B. cereus*)。

1.2.3 真菌: 黄曲霉(*Aspergillus flavus*), 禾谷镰刀霉(*F. graminearum*), 赤霉(*Gibberella fujikuroi*), 米曲霉(*Aspergillus oryzae*), 啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。以上菌株均由四川省资源微生物与微生物技术重点实验室提供。

1.3 试剂和培养基

1.3.1 试剂: 胰蛋白酶(Amersco 公司)、木瓜蛋白酶(Sigma 公司)、蛋白酶 K(Sigma 公司); 质粒抽提试剂盒(TIANprep MiNi Plasmid Kit); *E. coli* DH5 感受态细胞(Tiagen 公司); 其他试剂均为市售分析纯。

1.3.2 培养基: 改良MRS培养基^[8]; 牛肉膏蛋白胨培养基^[8]; 蓝白斑LB筛选培养基^[9]。

1.4 分析方法

1.4.1 分离培养: 取新鲜猪大肠、猪小肠内容及肠壁物质, 用无菌生理盐水梯度稀释至 10^{-10} , 分别取 10^{-7} ~ 10^{-5} 三个梯度的稀释液 0.1 mL涂布于改良MRS固体培养基, 30°C培养 48 h, 待长出菌落后用无菌牙签挑取单菌落接种于MRS斜面, 作纯培养, 将纯化后的菌株 4°C保藏备用。

1.4.2 细菌数测定: 采用血球板计数法和平板菌落计数法(CFU/mL)。

1.4.3 抑菌试验: 采用牛津杯法, 将各指示菌培养到指数期, 经无菌水稀释到 10^8 CFU/mL, 取 100 μ L涂布牛肉膏蛋白胨培养基平板。向牛津杯中加入 200 μ L 乳酸菌发酵上清液, 平板在室温下扩散 3 h, 于 36°C 下培养 16 h, 测抑菌圈直径。

1.4.4 排除干扰因素: 采用中和法排除酸的干扰; 加入适量的过氧化氢酶(10 mg/mL), 30°C水浴保温 1 h, 排除过氧化氢的抑菌作用。

1.4.5 蛋白酶处理:按 1 mg/mL 的量加入蛋白酶, 调节 pH 值至各蛋白酶的最作用 pH 值(蛋白酶 K pH 值 7.6, 胰蛋白酶、木瓜蛋白酶 pH 值 7.0), 37°C 水浴 1 h 后将 pH 值调回对照 pH 值 4.5, 以牛津杯法测定发酵上清液抑菌活性。

1.5 菌株的鉴定

1.5.1 形态学和生理生化特征:根据《乳酸细菌分类鉴定及试验方法》^[8]的乳酸菌种鉴定方法进行鉴定。

1.5.2 基因组DNA提取:参考《乳酸细菌基础、技术和应用》^[10]的方法提取菌株基因组DNA。

1.5.3 16S rDNA的PCR扩增:PCR反应体系(50 μ L): 10 \times PCR缓冲液, 5.0 μ L; Mg²⁺(5 mmol/L), 3.0 μ L; dNTP(各 2.5 mmol/L), 4.0 μ L; 引物(10 μ mol/L)各 2.0 μ L; Taq DNA聚合酶 0.5 μ L; 模板DNA 2.0 μ L; 去离子水 33.5 μ L。扩增条件: 94°C 4 min; 94°C 1 min, 45°C 1.5 min, 72°C 2 min, 26 个循环; 72°C 10 min; 4°C 终止反应。取PCR产物进行 1%的琼脂糖凝胶电泳。

1.5.4 产物克隆与序列测定:扩增后PCR产物用 Tiangen公司的凝胶回收试剂盒纯化。回收片段连接到pMD18-T载体, 转化*E. coli* DH5⁻, 经蓝白斑筛选, 质粒双酶切验证获得阳性克隆。重组质粒由上海英骏(Invitrogen)生物技术有限公司测定序列。

1.5.5 序列分析和系统树的构建:测序结果在NCBI 网页上用Blast进行比对, 找到与GenBank中同源性高的相关基因序列, 用Clustal X 1.83 软件对同源性较高的的序列进行多重比对, 再通过MEGA 3.1 软件用N-J构建系统进化树^[11,12]。

2 结果与分析

2.1 菌株筛选

利用改良 MRS 培养基从健康肉猪大肠和小肠

中分离得到 212 株乳酸菌, 进一步利用滤纸片法初筛得到对大肠杆菌及金黄色葡萄球菌均有抑制作用的 60 株菌, 采用牛津杯法复筛得到 1 株具有较强抑菌活性的菌株, 暂编号为 T12。在排除酸、过氧化氢等因素干扰后 T12 仍具有较强抑菌活性(见图 1, 未标记的牛津杯为排除酸、过氧化氢影响后的抑菌效果图), 因此, 选择菌株 T12 作为供试菌株进行下一步研究。

2.2 菌株 T12 所产抑菌物质的确定

2.2.1 酸抑制作用的排除:T12 菌株发酵上清液对指示菌的抑制作用, 可能是它代谢合成的类细菌素, 也可能是酸性末端产物如乳酸、乙酸等的作用结果。为了排除酸性末端产物的干扰, 将培养 24 h 的菌株发酵液离心, 取发酵上清液调节 pH 至 4.5 后, 进行抑菌试验, 抑菌结果如表 1 所示。结果表明, pH 为 4.5 的乳酸和盐酸不能抑制指示菌的生长, 而 pH 为 4.5 的菌株发酵上清液仍具有强烈的抑菌作用, 说明排除酸干扰后的发酵上清液中仍有抑菌活性物质存在。

2.2.2 过氧化氢作用的排除:乳酸菌代谢产生的过氧化氢也可以抑制细菌的生长, 尤其是革兰氏阴性细菌的生长, 因此必须排除过氧化氢的干扰。以溶壁微球菌(*M. lysodeikticus*)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)、大肠杆菌(*E. coli*)为指示菌, 取经过过氧化氢酶处理后的 T12 菌株发酵上清液, 进行抑菌试验, 抑菌结果如表 2 所示, 和对照相比, 经过过氧化氢酶处理后的发酵上清液仍表现出较强的抑菌活性, 这表明发酵上清液对革兰氏阴性细菌的抑制作用不是过氧化氢作用的结果。

2.2.3 酶解检测:以未经酶液处理的原液为对照, 取 T12 菌株的发酵上清液进行蛋白酶 K、胰蛋白酶、和木瓜蛋白酶酶解实验, 结果如图 2 所示, 经蛋白

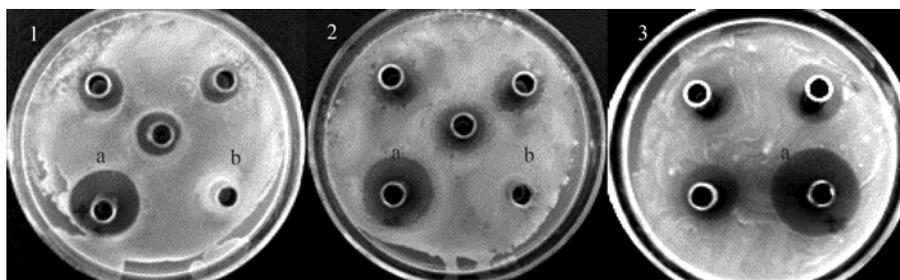


图 1 T12 菌株对 3 种指示菌的抑制作用

Fig. 1 Results of antibacterial from supernatant of T12 with three indicators

注: 1: 大肠杆菌; 2: 金黄色葡萄球菌; 3: 溶壁微球菌; a: 未经处理的发酵液; b: MRS 液体培养基对照。

Note: 1: *E. coli*; 2: *S. aureus*; 3: *M. lysodeikticus*; a: Untreated supernatant; b: MRS liquid medium control.

表1 排除酸作用的抑菌试验结果
Table 1 Results of antibacterial by supernatant without acid

样品 Sample	抑菌圈平均直径 (mm) Average diameter of inhibition zone (mm)		
	溶壁微球菌 <i>M. lysodeikticus</i>	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	大肠杆菌 <i>E. coli</i>
	发酵上清液 The supernatant fluid fermented by T12	22.10	20.00
pH 为 4.5 的发酵液 pH 4.5 of the supernatant	17.00	13.50	13.33
pH 为 4.5 的乳酸 pH 4.5 of the lactic acid	-	-	-
pH 为 4.5 的盐酸 pH 4.5 of the hydrochloric acid	-	-	-

注: -: 不抑制。

Note: -: No inhibition.

表2 过氧化氢酶处理后的抑菌试验结果
Table 2 Results of antibacterial after treatment with hydrogen peroxidase

样品 Sample	抑菌圈平均直径 (mm) Average diameter of inhibition zone (mm)		
	溶壁微球菌 <i>M. lysodeikticus</i>	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	大肠杆菌 <i>E. coli</i>
对照 Control	22.00	21.85	22.10
过氧化氢酶处理的发酵液 Supernatant treated with catalase	21.00	21.00	21.25
活性下降百分率 (%) Percentage of activity decrease	4.55	3.89	3.85

表3 不同温度对菌株发酵产物抑菌活性的影响

Table 3 Effects of various temperatures on inhibition activity of fermented production

温度(°C) Temperature (°C)	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>		大肠杆菌 <i>E. coli</i>	
	抑菌圈平均直径(mm) Average diameter of inhibition zone (mm)	活性下降百分率(%) Percentage of activity decrease (%)	抑菌圈平均直径(mm) Average diameter of inhibition zone (mm)	活性下降百分率(%) Percentage of activity decrease (%)
45	21.67	2.39	22.70	1.73
60	21.50	3.15	22.45	2.81
80	21.43	3.47	22.10	4.33
100	21.37	3.74	21.85	5.41
121	21.00	5.41	21.40	7.36
对照 Control	22.20	0.00	23.10	0.00

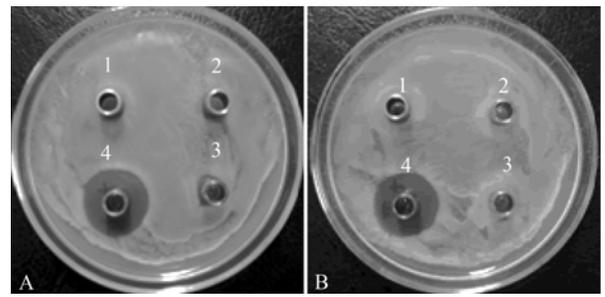


图2 蛋白酶处理后的抑菌试验结果

Fig. 2 Results of antibacterial from supernatant after treatment with protease

注: A: 大肠杆菌; B: 金黄色葡萄球菌; 1: 胰蛋白酶; 2: 木瓜蛋白酶; 3: 蛋白酶 K; 4: T12 发酵液。

Note: A: *E. coli*; B: *S. aureus*; 1: Trypsase; 2: Caroid; 3: Protease K; 4: Supernatant of T12.

酶 K、胰蛋白酶、和木瓜蛋白酶处理后的发酵上清液完全丧失抑菌活性,说明 T12 菌株的发酵上清液中的抑菌物质是一种蛋白质或多肽。根据以上,说明 T12 发酵产生的抑菌物质是一种类细菌素。

2.3 菌株 T12 抑菌物质特性分析

2.3.1 菌株 T12 粗提液热稳定性: 将 T12 发酵粗提液在不同温度条件下保持 20 min, 以未经处理的粗提液为对照, 以金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)、大肠杆菌(*E. coli*)为指示菌做抑菌试验, 结果如表 3 所示, 随着处理温度的不断升高, T12 发酵粗提液的抑菌活性几乎不发生变化, 粗提液在 121°C 处理 20 min 后仍然保持较高的抑菌活性, 说明 T12 产生的类细菌素是一类具有良好热稳定性的蛋白质小肽。

2.3.2 不同 pH 值对 T12 粗提液抑菌活性的影响: 将 T12 发酵上清液用 1 mol/L NaOH 和 1 mol/L HCl 调至不同的 pH 值 3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5 和 7.0, 以未调 pH 值的发酵上清液为对照, 用牛津杯法做抑菌试验。试验重复 3 次。结果如表 4 所示, T12

表4 不同 pH 值对菌株发酵产物抑菌活性的影响
Table 4 Effects of various pH on inhibitory activity of fermented production

pH 值 pH value	大肠杆菌 <i>E. coli</i>		溶壁微球菌 <i>M. lysodeikticus</i>	
	抑菌圈平均直径 (mm) Average diameter of inhibition zone (mm)	活性下降百分率 (%) Percentage of activity decrease (%)	抑菌圈平均直径 (mm) Average diameter of inhibition zone (mm)	活性下降百分率 (%) Percentage of activity decrease (%)
对照 Control	21.50	0.00	27.75	0.00
pH 3.5	21.33	0.79	26.50	4.50
pH 4.0	15.83	26.37	24.83	10.52
pH 4.5	13.33	38.00	18.10	34.77
pH 5.0	-	100.00	11.67	57.95
pH 5.5	-	100.00	10.66	61.59
pH 6.0	-	100.00	-	100.00
pH 6.5	-	100.00	-	100.00
pH 7.0	-	100.00	-	100.00

注: -: 不抑制。

Note: -: No inhibition.

菌株发酵上清液的抑菌活性随着 pH 值的升高而下降: pH 4.5 时, 随着 pH 值的升高, 抑菌活性逐渐下降, 但仍表现出一定的抑菌活性; pH 5.0 时, 丧失对大肠杆菌的抑制活性, 对溶壁微球菌的抑菌活性下降了 57.95%; pH 5.5 时, 对溶壁微球菌抑菌活性下降 61.59%; pH 6.0 时对这两种指示菌的抑菌活性完全丧失。这说明菌株 T12 发酵上清液中的抑菌物质在酸性条件下稳定, 能表现出明显抑菌活性的 pH 值范围是 3.5~5.5。此外, 结果还表明菌株 T12 对革兰氏阴性菌的抑菌 pH 范围较窄, 而对革兰氏阳性菌的抑菌 pH 范围较宽。

2.3.3 酶的敏感性: 取 3 份等量的 T12 发酵粗提液, 调节 pH 值至各蛋白酶的最适作用 pH 值, 按 1 mg/mL 的量分别加入蛋白酶 K、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶, 37°C 水浴 1 h 后将 pH 值调回对照 pH 值 4.5, 做抑菌试验, 重复 3 次, 以未经处理的发酵上清液为对照。实验结果发现, 经以上 3 种蛋白酶处理后的发酵上清液抑菌活性完全丧失, 表明该抑菌物质对蛋白酶敏感。

2.3.4 菌株 T12 粗提液的抑菌谱: 选用部分革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌、真菌和酵母作为检测指示菌, 采用牛津杯法测定菌株 T12 粗提液的抑菌作用, 确定其抑菌谱。以未调 pH 值的发酵上清液为对照, 试验重复 3 次。结果如表 5 所示, T12 菌株产生的类细菌素物质不仅可以抑制某些致病性革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌, 而且对部分真菌也有抑制作用。

表5 T12 菌株发酵产物的抑菌谱试验结果
Table 5 Inhibitory spectrum of the products from T12 fermented production

试验菌株 Test organism	抑菌圈平均直径 (mm) Average diameter of inhibition zone (mm)	对照 Control
溶壁微球菌 <i>M. lysodeikticus</i>	18.10	22.00
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	13.50	20.00
枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	15.00	23.00
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	13.33	21.50
鼠伤寒沙门氏菌 <i>S. typhimurium</i>	14.67	20.00
蜡状芽孢杆菌 <i>B. cereus</i>	13.50	18.50
禾谷镰刀霉 <i>F. graminearum</i>	12.78	21.00
黄曲霉 <i>A. flavus</i>	-	-
赤霉 <i>G. fujikuroi</i>	-	-
米曲霉 <i>A. oryzae</i>	-	-
啤酒酵母 <i>S. cerevisiae</i>	-	-

注: -: 不抑制。

Note: -: No inhibition.

2.4 菌株鉴定

2.4.1 形态学特征: 革兰氏染色阳性, 两端钝圆, 短棒状, 单个排列或短链状排列, 无芽孢、无鞭毛、无荚膜。菌落形态特征为直径 1 mm~2 mm、圆形、凸起、边缘整齐、表面光滑、乳白色、不透明。

2.4.2 生理生化特征: 接触酶阴性, 发酵葡萄糖产

酸、不产气,无运动性,不产 H_2S , pH 4.5、15°C生长,确定为乳杆菌属(*Lactobacillus*)。MR试验阳性, V-P试验、吲哚试验、明胶液化试验、淀粉水解试验、精氨酸产氨试验和硝酸盐还原试验结果均为阴性,牛奶分解酸凝。发酵糖或醇试验结果见表 6。

2.4.3 16S rDNA 序列分析:以菌株 T12 基因组总 DNA 为模板,采用通用 16S rDNA 引物进行 PCR 扩

增,得到约 1.5 kb 的特异性扩增产物。菌株 T12 的 16S rDNA 序列 (FJ167349)与 GenBank 中已登录的 16S rDNA 序列同源性相比较,结果显示菌株 T12 与乳杆菌属菌株的 16S rDNA 有很高相似性(98%~100%),其中与 *Lactobacillus animalis* ATCC 35046 菌株的 16S rDNA 相似性最高达到 99%。基于 16S rDNA 基因序列构建了与菌株 T12 相近菌种的系统进化树如图 3 所示。系统发育树表明菌株 T12 与 *Lactobacillus animalis* ATCC 35046 菌株的进化距离最近。

在形态学和生理生化鉴定基础上,结合 16S rDNA 序列分析结果显示,菌株 T12 与乳杆菌属中的 *Lactobacillus animalis* 的 16S rDNA 序列同源性高达 99%,形态特征和生理生化特征完全相同^[13],故初步鉴定菌株 T12 为动物乳杆菌 (*L. animalis*)。

3 讨论

乳酸菌的抑菌活性是多方面的,其代谢产物酸、过氧化氢及细菌素类物质都具有抑菌活性^[15]。本实验所分离的乳酸菌 T12 发酵上清液有较强的抑菌活性,在排除乳酸、盐酸等酸作用后,在 pH 4.5 时对溶壁微球菌(*M. lysodeikticus*)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)、大肠杆菌(*E. coli*)等指示菌均有较强抑制作用; pH 5.5 时对溶壁微球菌(*M. lysodeikticus*)仍有抑菌活性。用过氧化氢酶作用发酵上清液,抑

糖/醇 Saccharide or alcohol	结果 Results
葡萄糖 Glucose	+
果糖 Fructose	+
蔗糖 Sucrose	+
D-半乳糖 D-Galactose	+
乳糖 Lactose	+
麦芽糖 Maltose	+
山梨糖 Sorbose	-
鼠李糖 Rhamnose	-
阿拉伯糖 Arabinose	-
核糖 Ribose	-
木糖 Xylose	-
海藻糖 Trehalose	-
山梨醇 Sorbitol	-
肌醇 Inositol	-
甘露醇 Mannitol	-

注: +: 阳性; -: 阴性。

Note: +: Positive; -: Negative.

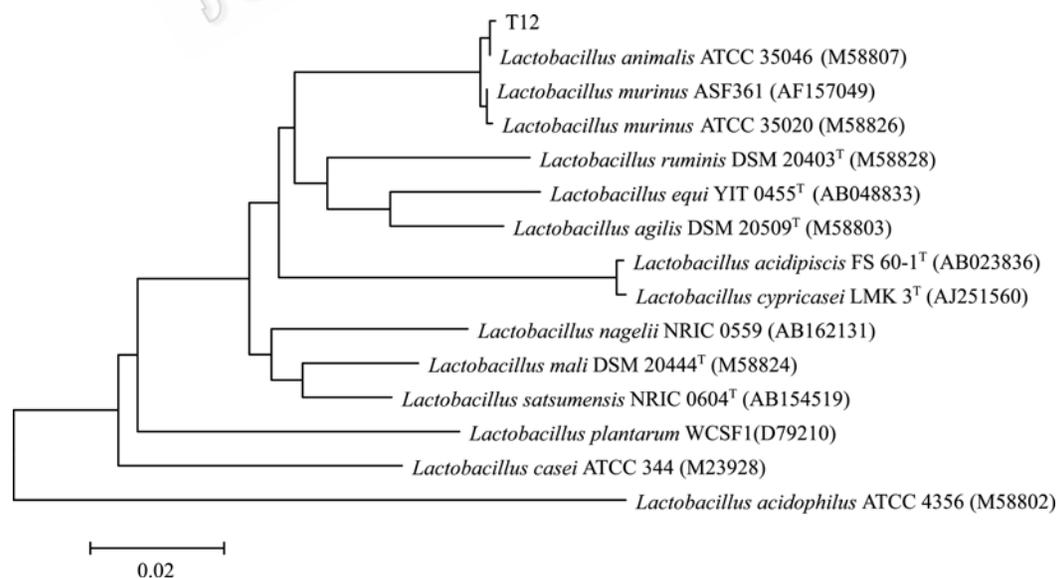


图 3 菌株 T12 基于 16S rRNA 基因序列的 N-J 法系统发育树图

Fig. 3 Neighbour-joining tree showing the phylogenetic position of strain T12 and representatives of some other related taxa based on 16S rRNA sequences

Note: Bar: 0.02 substitutions per nucleotide position.

菌效果不变, 说明过氧化氢酶未起作用。证明菌株 T12 的抑菌产物中有类细菌素存在。

乳酸菌产生的类细菌素具有一定的热稳定性。Reid 等报道, 乳杆菌(*Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* GR-1)发酵液经 80°C 热处理 2 h 后, 仍对大肠杆菌有抑制作用^[16]。张华辉等也报道 6 株鸡源乳酸菌经 100°C 15 min 热处理后对鸡大肠杆菌、鸡白痢沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的抑菌效果不变^[17]。本实验中乳酸菌发酵上清液经 121°C 处理 20 min 后, 其对金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)、大肠杆菌(*E. coli*)的抑菌效果均为处理前的 92% 以上, 说明菌株 T12 所产生的抑菌物质对热较稳定。

研究表明, 乳酸菌抑菌物质对蛋白酶部分敏感^[18]。本实验中乳酸菌发酵上清液经胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、蛋白酶 K 处理后, 对指示菌金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)、大肠杆菌(*E. coli*)抑菌活性完全丧失, 表明菌株 T12 所产抑菌物质是一类蛋白质或多肽。同时经过对抑菌谱的检测表明菌株 T12 所产抑菌物质具有广谱抑菌活性。这与 Virginia 等报道的从健康成年妇女阴道中分离得到一株产类细菌素的唾液乳酸杆菌(*Lactobacillus salivarius*), 能够杀死革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌且具有热稳定性及对蛋白酶敏感相符^[19]。

综上所述, 本实验筛选得到菌株 T12 所产类细菌素, 具有耐高温、对蛋白酶 K、胰蛋白酶和木瓜蛋白酶敏感、在 pH 值 3.5~5.5 时对部分革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌及部分真菌都有抑制活性等特点。这些特性决定了它在食品防腐和畜牧业饲料加工等方面具有重要的应用价值。本研究组将对 T12 菌株所产类细菌素进行进一步的分离纯化, 并研究其分子生物学特征, 以期为其在畜牧业和饲料加工方面提供理论基础和依据。

参 考 文 献

- [1] 孔 健, 马桂荣, 刘 稳, 等. 益生菌产生菌—乳链球菌 SB900 的分离及生物学特性研究. 微生物学通报, 1995, 5(6): 450-454.
- [2] Kyriakis SC, Tsiloyianni VK, V lemmas J, et al. *Res Vet Sci*, 1999, 67: 223-228.
- [3] 王丽娟. 益生菌的研究及应用进展. 饲料博览, 1999, 11(1): 15-18.
- [4] 将文泓, 薛 红. 一种新型药物和饲料添加剂—动物微生物生态制剂. 兽药与饲料添加剂, 2000, 5(1): 18-20.
- [5] 杨洁彬, 郭兴华, 张 簾. 乳酸菌—生物学基础及应用. 北京: 中国轻工业出版社, 1996, pp.178-179.
- [6] 金世琳. 乳酸菌的科学与技术. 中国乳品工业, 1998, 26(2): 14-20.
- [7] Simon S, Jadamus A, Vahjen W. *J Anim Feed Sci*, 2001, 10: 51-67.
- [8] 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.117-127.
- [9] Joseph S, David WR. *Molecular Clone: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, 2001, p. 1595.
- [10] 张 刚. 乳酸细菌基础、技术和应用. 北京: 化学工业出版社, 2007, pp.173-177.
- [11] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, et al. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, 1997, 24: 4876-4882.
- [12] Kumar SK, Tamura I, Nei M, et al. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform*, 2004, 5: 150-163.
- [13] 希坎南 RE, 吉布斯 NE. 伯杰细菌鉴定手册. 第八版. 北京: 科学出版社, 1984.
- [14] 吴惠芬, 毛胜勇, 姚 文, 等. 猪源乳酸菌及其抑菌特性研究. 微生物学通报, 2005, 32(1): 79-84.
- [15] 李平兰, 张 簾, 江汉湖. 乳酸菌细菌素研究进展. 微生物学通报, 1998, 25(5): 295-298.
- [16] Reid G, Mcgroarty JA, Angotti R, et al. *Can J Microbiol*, 1988, 34: 344-351.
- [17] 张辉华, 曹永长, 毕英佐, 等. 中国兽医杂志, 2001, 37: 8-10.
- [18] Daba H, Pandian S, Gosselin JF, et al. *Appl Environ Microbiol*, 1991, 57: 3450-3455.
- [19] Virginia S. Characterization of a bacteriocin-like substance produced by a vaginal *Lactobacillus salivarius* strain. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65: 5631-5635.