

一株布氏乳杆菌所产类细菌素的初步纯化 与部分特性

贡汉生 孟祥晨* 刘红娟

(东北农业大学乳品科学教育部重点实验室 食品学院 哈尔滨 150030)

摘要: 从分离自内蒙古传统乳制品的 67 株乳酸菌中筛选得到一株产生类细菌素的布氏乳杆菌 KLDS1.0364, 对其所产类细菌素进行初步分离纯化, 同时研究其所产类细菌素的生物学特性。KLDS1.0364 无细胞发酵上清液经阳离子交换树脂纯化后, 采用 tricine-SDS-PAGE 测定类细菌素分子量, 并测定了类细菌素的部分特性。KLDS1.0364 产生的类细菌素分子量约为 21.6kD, 对热和 pH 值稳定, 可被多种蛋白酶失活, 不能被过氧化氢酶和 α -淀粉酶失活。KLDS1.0364 产生的类细菌素的作用方式是杀菌, 且抑菌谱广, 可抑制多种革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和真菌。

关键词: 布氏乳杆菌, 类细菌素, 纯化, 特性

Purification and Biological Characteristics of Bacteriocin-like Substance Produced by *Lactobacillus buchneri* KLDS1.0364

GONG Han-Sheng MENG Xiang-Chen* LIU Hong-Juan

(Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education, Food Science & Technology College,
Northeast Agricultural University, Harbin 150030)

Abstract: The purpose of this study is to obtain effective and stable bacteriocin-like substance from lactic acid bacteria. *Lactobacillus buchneri* KLDS1.0364, which was isolated from fermented cream, a traditional dairy product in Inner Mongolia, could produce bacteriocin-like substance. The bacteriocin-like substance produced by KLDS1.0364 was partially purified and the characteristics were studied. The bacteriocin-like substance was purified by SP-Sepharose fast flow cation exchange chromatography. The molecular weight of the bacteriocin-like substance was 21.6kD, as determined by tricine-SDS-PAGE. The bacteriocin-like substance remained stable after 30 min at 121 °C and after 2 h of incubation during pH 2~10. Complete inactivation of antimicrobial activity was observed after treatment of the bacteriocin-like substance with several proteinases. Treatment with catalase and α -amylase did not result in any changes of antimicrobial activity. The mode of action of the bacteriocin-like substance is bactericidal. It exhibited a broad spectrum of antagonistic activity against various species of Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria and fungi.

Keywords: *Lactobacillus buchneri*, Bacteriocin-like substance, Purification, Characteristics

乳酸菌产生的很多代谢产物,如有机酸、过氧化氢、双乙酰和细菌素等可以抑制食品中腐败微生物和致病微生物的生长,从而可作为天然的食品防腐剂。细菌素是由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生物活性的蛋白质、多肽或前体多肽;这些物质可以杀灭或抑制与之相同或相似生境的其他微生物^[1]。类细菌素指不符合或不完全符合细菌素定义的蛋白类拮抗物质^[2],它不仅能抑制革兰氏阳性菌,而且对革兰氏阴性菌和真菌也有抑制作用。这一特性决定了类细菌素具有比细菌素更广泛的应用前景。

我国内蒙古自治区拥有几千年的乳制品生产历史,生产的传统乳制品中含有丰富的乳酸菌资源。发酵稀奶油,在当地又称为焦克,是内蒙古的一种传统乳制品。鲜牛乳经自然发酵凝固后撇出上层脂肪,装入布袋中,吊挂排除酪乳,同时进一步通过自然发酵形成发酵稀奶油。由于形成发酵稀奶油的过程中未使用人工发酵剂,所以其中的乳酸菌均为野生型乳酸菌。

近几十年,已经从乳杆菌中分离出几十种细菌素,而且不断有新的乳杆菌素被分离出来,如最近从植物乳杆菌中分离出 bacteriocin ST8KF^[3]和 bacteriocin AMA-K^[4]。但据我们所知,目前发现的产生细菌素的布氏乳杆菌很少,只有 Yildirim 等^[5]在 2002 年和常峰等^[6]在 2005 年各发现了一株产细菌素的布氏乳杆菌。本研究的主要目的在于对从分离自内蒙古传统乳制品的 67 株乳酸菌中筛选出的一株产生类细菌素的布氏乳杆菌 KLDS1.0364 所产类细菌素进行分离纯化,同时研究其所产类细菌素的生物学特性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌株:布氏乳杆菌 KLDS1.0364,分离自内蒙古自治区传统发酵稀奶油,乳品科学教育部重点实验室工业微生物菌种保藏中心(KLDS-DICC)冻干保藏。

指示菌菌株及来源:大肠杆菌(*Escherichia coli*)ATCC25922 购自黑龙江省微生物研究所,金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)ATCC25923、单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)NIPBP54002 和沙门氏菌(*Salmonella*) ATCC14028

购自中国药品生物制品检定所,荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)As 1.1082 购自中科院微生物所保藏中心,葡萄酒酵母(*Saccharomyces ellipsoideus*)分离自葡萄酒发酵液中;红酵母(*Rhodotorula* sp.)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、灰绿青霉(*Penicillium glaucum*)分离自土壤中,其他指示菌由 KLDS-DICC 提供。

1.1.2 培养基:乳酸菌选用 MRS 培养基(Oxoid, 英国),单核细胞增生李斯特氏菌选用 TSA+YE 培养基,酵母和霉菌选用马铃薯蔗糖培养基,其他指示菌选择营养肉汤培养基(北京奥博星)。

1.1.3 主要试剂和仪器:Nisin、过氧化氢酶、胃蛋白酶、 α -糜蛋白酶和胰蛋白酶购自 Sigma 公司,蛋白酶 K(Amresco, 美国),木瓜蛋白酶(德国), α -淀粉酶(北京奥博星),tricine-SDS-PAGE 试剂(Amresco, 美国),硫酸铵(天津申泰)。GL-21M 高速冷冻离心机(上海市离心机械研究所),CHRIST ALPHA 1-4 型冻干机(Marin Christ, 德国),ÄKTA purifier100 蛋白多肽分离纯化仪、SP Sepharose fast flow (1.6 cm \times 20 cm)(GE healthcare, 瑞典),DYY-6C 型电泳仪、DYCZ-28A 型电泳槽(北京六一厂)。

1.2 方法

1.2.1 无细胞发酵上清液的制备:将乳酸菌活化培养后,以 1%接种量接种于 MRS 液体培养基中,30 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养到稳定期(OD_{600} 1.9),12000 $\times g$, 4 离心 15 min,收集上清液^[7],用 6 mol/L NaOH 调 pH 值到 6.5,以中和有机酸的干扰^[8]。上清液用 0.22 μm 滤膜过滤,除去菌体及其他杂质,无细胞上清液通过冷冻干燥方法浓缩,冻干后加入原体积 1/10 的灭过菌的 MilliQ 水,溶解后放入 -20°C 冰箱中备用。

1.2.2 抑菌活性测定:抑菌活性测定采用琼脂扩散法。1.2%的素琼脂,按每平皿 10 mL 倾倒在无菌平皿中晾干;制备含 0.7%琼脂适宜指示菌生长的软琼脂培养基,冷至 50 $^{\circ}\text{C}$ 左右,每 100 mL 接入 0.6 mL 过夜培养的指示菌菌液,在底层有琼脂的平皿上倾倒 6 mL 含有指示菌的软琼脂培养基晾干;用打孔器在涂有指示菌的培养基上打孔,孔直径 6 mm;在孔中加入 50 μL 无细胞发酵上清液,超净工作台上放置 3 h;置于适宜培养条件下进行培养;用游标卡尺测量抑菌圈直径。

1.2.3 标准效价曲线的绘制:按 Cobe 等^[9]的测定方法绘制效价曲线,以确定乳酸菌产细菌素的效

价。指示菌为金黄色葡萄球菌 ATCC25923, Nisin 标准品纯度为 2.5%。

1.2.4 阳离子交换纯化类细菌素: 无细胞发酵上清液 1L(未冻干浓缩), 用饱和度为 70% 的硫酸铵盐析, 在 4℃ 条件下用磁力搅拌器最小转速搅拌过夜, 10000 g, 4℃ 离心 30 min, 沉淀溶于 1/40 体积 0.02 mol/L 的乙酸铵缓冲液(pH6.5)。收集到的样品用 1 kD 的 RC 型透析袋 4 透析 48 h 后用 SP Sepharose fast flow 阳离子交换树脂(体积 1.6 cm × 20 cm)分离纯化; 平衡缓冲液为 0.02 mol/L 乙酸钠(pH5.0), 洗脱缓冲液选择含 0.5 mol/L NaCl 的 0.02mol/L 乙酸钠溶液(pH5.0); 上样量 0.5 mL, 流速 1 mL/min, 检测波长 215 nm。收集到的样品经透析、冻干浓缩后用 1.2.2 方法测定抑菌活性。

1.2.5 类细菌素提取液中蛋白质含量的测定: 细菌素提取液中蛋白质含量按 GB5009.5-2003 中第一法测定。

1.2.6 类细菌素分子量的测定: 采用 tricine-SDS-PAGE^[10]方法测定细菌素分子量。

1.2.7 类细菌素对温度、pH 值和酶的敏感性: 取等量无细胞发酵上清液(pH6.5), 分别在 60℃、80℃、100℃ 和 121℃ 保持 10 min 和 30 min, 用冰冷却后做抑菌实验。无细胞发酵上清液用 3 mol/L HCl 和 3 mol/L NaOH 分别调 pH 值 2~10, 37℃ 下温育 2h, 做抑菌实验。无细胞发酵上清液用 HCl、NaOH 调

节 pH 为以下各酶的最适作用 pH 值, 按终浓度 1 mg/mL 分别加入胃蛋白酶、胰蛋白酶、蛋白酶 K、 α -糜蛋白酶、木瓜蛋白酶、过氧化氢酶和 α -淀粉酶, 37℃ 下温育 2 h。将 pH 值调回到 6.5, 按 1.2.2 方法做抑菌实验, 各试验重复 3 次, 用冻干浓缩相同倍数的 MRS 培养基与样品相同的处理后做对照。

1.2.8 类细菌素对指示菌的作用方式: 取 20 mL 无细胞发酵上清液加入到 100 mL 培养到稳定期(测定 OD_{600})的金黄色葡萄球菌 ATCC25923 的菌液中, 每间隔 1h 从每份中取少量测定 OD_{600} , 同时取 1 mL 梯度稀释后用平板计数法测定活菌数。

1.2.9 类细菌素的抑菌谱: 选取有代表性的革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和真菌做指示菌, 用 KLDS1.0364 的无细胞发酵上清液(pH6.5)按 1.2.2 方法进行抑菌实验。

2 结果与分析

2.1 KLDS1.0364 的抑菌效果

从分离自内蒙古传统乳制品的 67 株乳酸菌中筛选得到一株产类细菌素的布氏乳杆菌 KLDS1.0364, 该菌株所产的代谢产物具有明显的抑菌活性, 其无细胞发酵上清液对六种指示菌的抑制作用见表 1, KLDS1.0364 产生的抑菌物质对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌都有抑制作用, 初步确定其产生的抑菌物质为类细菌素。

表 1 布氏乳杆菌 KLDS1.0364 的代谢产物对指示菌的抑制作用

Table 1 Effect of antimicrobial activities of bacterocin-like substance produced by KLDS1.0364 on indicators

| 菌株 Strain | 抑菌活力(抑菌圈直径: 单位 mm) Antimicrobial activity (the diameter of the inhibition zones: unit mm) | | | | | |
|--------------|--|----------------------------|-----------------------------------|------------------------------|------------------------|---------------------------|
| | 金葡球菌 <i>S. aureus</i> | 枯草杆菌 <i>B. subtilis</i> | 单增李斯特菌 <i>L. monocytogenes</i> | 假单胞菌 <i>P. fluorescen</i> | 大肠杆菌 <i>E. coli</i> | 沙门氏菌 <i>Salmonella</i> |
| KLDS1.0364 | 13.69±0.47 | 10.23±0.10 | 9.92±0.14 | 9.19±0.62 | 9.08±0.11 | 10.55±0.25 |

注: 直径为 6.0 mm±0.2 mm 的孔中加入 50 μ L 无细胞发酵上清液。

Note: Wells (6 mm±0.2 mm) were filled with 50 μ L of cell-free culture supernatant.

2.2 标准效价曲线

以细菌素效价的对数为纵坐标, 抑菌圈直径(不含孔径)为横坐标, 作细菌素的标准效价曲线(图 1)。标准效价的对数与抑菌圈直径之间成线性关系, 回归方程为 $y=0.2422x+0.5993$, Y 表示效价的对数值, X 表示抑菌圈直径(不含孔径), $R^2=0.9898$ 。

2.3 类细菌素的初步分离纯化结果

硫酸铵沉淀的类细菌素由阳离子交换树脂分离,

得到的曲线见图 2, 用 7 倍柱体积(柱体积 25 mL)的平衡缓冲液洗脱下未结合的杂蛋白后, 梯度洗脱细菌素, 收集各峰的洗脱液冻干浓缩后测定抑菌活性, 最终确定 200 mL 后出现的第一个峰为类细菌素峰。

对 KLDS1.0364 产生的类细菌素纯化, 首先收集 1 L 无细胞发酵上清液, 硫酸铵沉淀后得到粗提液 25 mL, 粗提液透析后通过阳离子交换树脂层析, 收集有活性的洗脱液再次透析, 冻干浓缩得到和粗

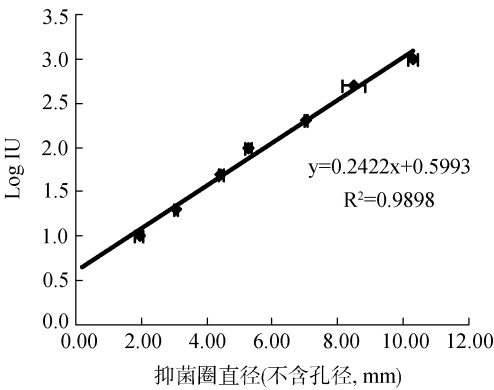


图1 标准效价曲线
Fig. 1 Activity assay standard curve

提液相同体积的纯化液，分别测定类细菌素无细胞发酵上清液、粗提液和纯化液的抑菌活力和蛋白浓度，见表2。经过阳离子交换柱纯化后，类细菌素的比活力大幅增加，达到了54.53 IU/mg，是无细胞发酵上清液的41.63倍。

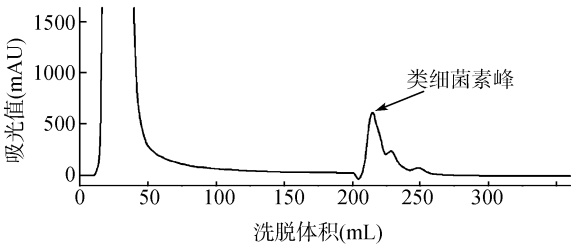


图2 KLDS1.0364产细菌素洗脱曲线(215 nm)
Fig. 2 Cation-exchange chromatogram of the active bacteriocin-like substance of KLDS1.0364 on SP Sepharose fast flow gel (215 nm).

2.4 类细菌素的分子量估测

Tricine-SDS-PAGE 电泳后形成的电泳条带见图3，用凝胶成像系统自带软件结合maker分析，KLDS1.0364产生的类细菌素分子量约为21.6 kD。

2.5 类细菌素对温度、pH值和酶的敏感性

KLDS1.0364产生的类细菌素表现出良好的热

| 表2 KLDS1.0364产类细菌素纯化表 | | | | | | |
|---|-----------------------|-------------------------------|--------------------------------|---|----------------------------------|--------------------|
| Table 2 Purification of bacteriocin-like substance produced by KLDS1.0364 | | | | | | |
| 样品 Samples | 体积(mL) Volume (mL) | 总蛋白(mg) Total protein (mg) | 总活力(IU) Total activity (IU) | 比活力(IU/mg) Specific activity (IU/mg) | 纯化倍数 Multiple of purification | 得率(%) Yield (%) |
| 无细胞发酵上清液 Cell-free supernatants | 1000.00 | 22033.40 | 28961.30 | 1.31 | 1.00 | 100.00 |
| 粗提液 Crude extraction | 25.00 | 4904.25 | 21043.00 | 4.29 | 3.27 | 72.66 |
| 纯化液 Pure extraction | 25.00 | 220.25 | 12009.25 | 54.53 | 41.63 | 41.98 |

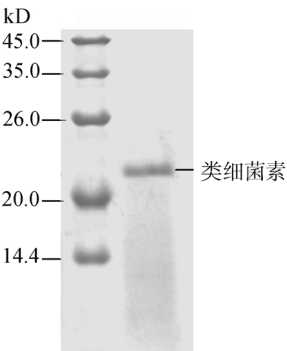


图3 KLDS1.0364产细菌素的电泳图谱
Fig. 3 Tricine-SDS-PAGE of bacteriocin-like substance produced by KLDS1.0364

稳定性，无细胞发酵上清液在80℃，30min的热处理条件下活性不变，随着温度的继续升高和加热时间的延长，KLDS1.0364产生类细菌素的抑菌活性呈明显上升趋势(表3)。无细胞发酵上清液在pH2.0~pH10.0时，对金黄色葡萄球菌ATCC25923均

有抑菌活性。KLDS1.0364的无细胞发酵上清液经胃蛋白酶、胰蛋白酶、蛋白酶K、α-糜蛋白酶、木瓜蛋白酶处理后活性丧失(图4)，说明该抑菌物质为蛋白类

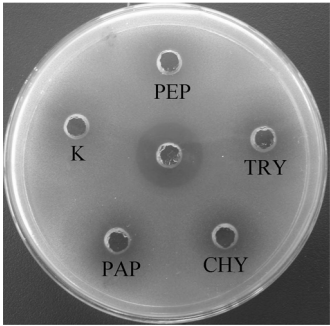


图4 KLDS1.0364产类细菌素对蛋白酶的敏感性
Fig. 4 The sensitivity of bacteriocin-like substance produced by KLDS1.0364 to proteinase
注: PEP-胃蛋白酶; TRY-胰蛋白酶; CHY-糜蛋白酶; PAP - 木瓜蛋白酶; K-蛋白酶K, 中间为对照
Note: PEP-pepsin; TRY-trypsin; CHY-α-chymotrypsin; PAP-papain; K-proteinase K, Middle-control.

| 表 3 KLDS1.0364 产生的类细菌素对温度、pH 值和酶的敏感性 | | | | | |
|--|------------|------------------|------------|------------------------------|------------|
| Table 3 Factors affecting the antimicrobial activity of bacterocin-like substance produced by KLDS1.0364 | | | | | |
| 抑菌活力(抑菌圈直径: 单位 mm) | | | | | |
| Antimicrobial activity (the diameter of the inhibition zones: unit mm) | | | | | |
| 温度 + 时间 Temperature+Time | KLDS1.0364 | pH 值 pH value | KLDS1.0364 | 酶(1mg/mL) Enzyme (1mg/mL) | KLDS1.0364 |
| 室温 Room temperature | 13.53±0.58 | pH 2.0 | 31.55±0.21 | 对照 Control | 14.48±0.06 |
| 60 10min | 13.20±0.40 | pH 3.0 | 29.25±0.53 | 胃蛋白酶 Pepsin | — |
| 60 30min | 12.92±0.42 | pH 4.0 | 28.74±0.48 | 胰蛋白酶 Trypsin | — |
| 80 10min | 12.17±0.35 | pH 5.0 | 21.43±0.73 | 木瓜蛋白酶 Papain | — |
| 80 30min | 12.32±0.82 | pH 6.0 | 12.52±0.51 | 蛋白酶 K Proteinase K | — |
| 100 10min | 12.62±0.37 | pH 7.0 | 9.59±0.18 | α-糜蛋白酶 α-Chymotrypsin | — |
| 100 30min | 20.13±0.59 | pH 8.0 | 10.73±0.85 | 过氧化氢酶 Catalase | 14.41±0.39 |
| 121 10min | 21.76±0.65 | pH 9.0 | 11.67±0.41 | α-淀粉酶 α-amylase | 14.46±0.26 |
| 121 30min | 21.84±0.74 | pH 10.0 | 13.63±0.35 | | |

注：直径为 6.0 mm±0.2 mm 的孔中加入 50 μL 无细胞发酵上清液，“—”代表没有明显抑菌圈。
Note: Wells (6 mm±0.2 mm) were filled with 50 μL of cell-free culture supernatant, “—”no inhibitory zone observed.

物质，无细胞发酵上清液经过氧化氢酶和 α-淀粉酶处理后抑菌活性未丧失，可排除过氧化氢的干扰并可说明类细菌素中没有碳水化合物部分起抑菌作用。

2.6 类细菌素对指示菌的作用方式

接入无细胞发酵上清液的菌液 OD₆₀₀ 在 5 h 后和对照相比未发生明显变化，说明指示菌总数变化不大。指示菌的起始菌数为 8.17×10⁸cfu/mL，接入 KLDS1.0364 无细胞发酵上清液(pH6.5)后，活菌数急剧减少，和接入相同处理的 MRS 培养基对照相比，5 h 后活菌数减少了 97.67%，减少约两个数量级，见图 5。

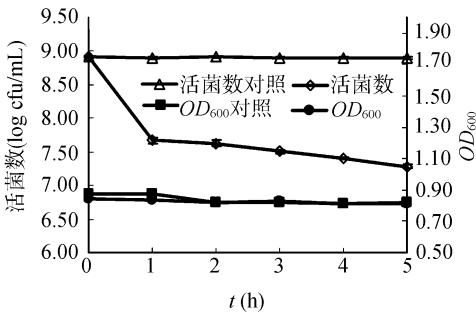


图 5 KLDS1.0364 产类细菌素对金黄色葡萄球菌 ATCC25923 的作用
Fig. 5 Effect of bacterocin-like substance produced by KLDS1.0364 on non-growing cells of *S. aureus* ATCC25923

2.7 类细菌素的抑菌谱

由表 4 可见 KLDS1.0364 的无细胞发酵上清液对 42 株指示菌中的 30 株有不同程度的抑制作用，能抑制多种革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和部分真菌，是一种广谱的类细菌素。

3 讨论

由于各种乳酸菌产细菌素的特性不同，所以分离方法也有很大差别。细菌素的提取一般根据其分子量、疏水性和阳离子性的特点来进行。乳杆菌产生细菌素的分离纯化方法有很多，如有人应用了硫酸铵沉淀、阳离子交换层析、疏水作用层析、反相高效液相色谱纯化了 Curvacin A, sakacin P, lactosinS 和 bavaricin A^[11], acidocin D20079 纯化则应用了硫酸铵沉淀、阳离子交换层析和凝胶层析的方法^[12]。

细菌素应用在食品工业中，首先要考虑到它的热稳定性，因为热加工是食品加工中最常用的方法，KLDS1.0364 产生的类细菌素对热稳定。不同的细菌素适用的 pH 范围不同，大多数在酸性环境下稳定，作用效果也较好。但很多细菌素在中性或碱性条件下，抑菌活性减弱或丧失。如 nisin 在低 pH 值下有很强的活性，但在 pH7 以上时，活性丧失^[13]。

表 4 KLDS1.0364 产类细菌素的抑菌谱

Table 4 Antimicrobial spectrum of bacteriocin-like substance produced by KLDS1.0364

| 指示菌名称 Indicator strain | 菌株编号 Strain number | 抑菌作用 Antimicrobial activity | 指示菌名称 Indicator strain | 菌株编号 Strain number | 抑菌作用 Antimicrobial activity |
|---|-----------------------|--------------------------------|--|-----------------------|--------------------------------|
| 嗜热链球菌 <i>S. thermophilus</i> | KLDS3.0203 | + | 短乳杆菌 <i>L. brevis</i> | KLDS1.0409 | — |
| 乳酸乳球菌乳酸亚种 <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> | KLDS4.0303 | + | 布氏乳杆菌 <i>L. buchneri</i> | KLDS1.0405 | — |
| 乳酸乳球菌乳脂亚种 <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> | KLDS4.0316 | + | 布氏乳杆菌 <i>L. buchneri</i> | KLDS1.0406 | + |
| 粪肠球菌 <i>E. faecalis</i> | KLDS6.0316 | + | 鼠李糖乳杆菌 <i>L. rhamnosus</i> | KLDS1.0385 | + |
| 粪肠球菌 <i>E. faecalis</i> | KLDS6.0319 | + | 鼠李糖乳杆菌 <i>L. rhamnosus</i> | KLDS1.0359 | + |
| 屎肠球菌 <i>E. faecium</i> | KLDS6.0332 | + | 棒状乳杆菌棒状亚种 <i>L. coryniformis</i> ssp. <i>coryniformis</i> | KLDS1.0321 | — |
| 屎肠球菌 <i>E. faecium</i> | KLDS6.0333 | + | 棒状乳杆菌棒状亚种 <i>L. coryniformis</i> ssp. <i>coryniformis</i> | KLDS1.0449 | + |
| 德氏乳杆菌保加利亚亚种 <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> | KLDS1.9201 | + | 食品乳杆菌 <i>L. alimentarius</i> | KLDS1.0442 | — |
| 德氏乳杆菌德氏亚种 <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> | KLDS1.0324 | — | 食品乳杆菌 <i>L. alimentarius</i> | KLDS1.0378 | — |
| 德氏乳杆菌德氏亚种 <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> | KLDS1.0325 | + | 金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i> | ATCC25923 | + |
| 嗜酸乳杆菌 <i>L. acidophilus</i> | KLDS1.0380 | + | 金黄色葡萄球菌 <i>S. aureu</i> | / | + |
| 嗜酸乳杆菌 <i>L. acidophilus</i> | KLDS1.0327 | + | 藤黄微球菌 <i>M. luteus</i> | / | + |
| 干酪乳杆菌 <i>L. casei</i> | KLDS1.0319 | + | 枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i> | / | + |
| 干酪乳杆菌 <i>L. casei</i> | KLDS1.0415 | + | 单细胞增生李斯特菌 <i>Listeria monocytogenes</i> | NICBPB 54002 | + |
| 副干酪乳杆菌 <i>L. paracasei</i> | KLDS1.0201 | + | 大肠杆菌 <i>E. coli</i> | ATCC25922 | + |
| 干酪乳杆菌干酪亚种 <i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> | KLDS1.0407 | + | 荧光假单胞菌 <i>P. fluorescens</i> | As 1.8202 | + |
| 植物乳杆菌 <i>L. plantarum</i> | KLDS1.0314 | — | 沙门氏菌 <i>Salmonella</i> | ATCC14028 | + |
| 植物乳杆菌 <i>L. plantarum</i> | KLDS1.0317 | — | 葡萄酒酵母 <i>S. ellipsoideus</i> | / | + |
| 耐酸乳杆菌 <i>L. acetotolerans</i> | KLDS1.0340 | — | 红酵母 <i>Rhodotorula</i> | / | — |
| 耐酸乳杆菌 <i>L. acetotolerans</i> | KLDS1.0346 | — | 黑曲霉 <i>A. niger</i> | / | + |
| 短乳杆菌 <i>L. brevis</i> | KLDS1.0408 | — | 灰绿青霉 <i>P. glaucum</i> | / | + |

注：“+”为可产生明显的抑菌圈；“—”为不能产生明显的抑菌圈；“/”表示指示菌暂无编号。
Note: “+” clear inhibitory zone observed; “—”no inhibitory zone observed; “/” no strain numers.

KLDS1.0364 产生的类细菌素在 pH2~10 之间均有抑菌活性。细菌素大都是蛋白类物质，可被一些蛋白酶水解而丧失活性。Todorov 和 Dicks^[14]发现的 8 株乳酸菌产生的细菌素都能被蛋白酶 K、链酶蛋白酶、木瓜蛋白酶、糜蛋白酶、胰蛋白酶和胃蛋白酶完全失活。KLDS1.0364 产生的类细菌素可被胃蛋白酶、

胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、糜蛋白酶和蛋白酶 K 完全失活，说明其产生的类细菌素是蛋白类物质，且由于可被蛋白酶降解而不会在体内残留，具有较高的安全性。
细菌素的抑菌作用可能是杀菌，也可能是抑制微生物的生长和繁殖。KLDS1.0364 的无细胞发酵上

清液接入处于稳定期的金黄色葡萄球菌培养液中 5h 后活菌数减少了 97.67%, 说明 KLDS1.0364 产生的类细菌素的作用方式是杀菌。其他乳酸菌产生的细菌素有与之相似的作用方式, 如 *Lactococcus* MMT24^[15]。

4 结论

布氏乳杆菌 KLDS1.0364 分离自内蒙古传统乳制品发酵稀奶油, 其产生的类细菌素可以抑制多种革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和真菌。类细菌素对热、pH 值、过氧化氢酶和 α -淀粉酶稳定, 可被多种蛋白酶失活, 其分子量约为 21.6 kD。综上, KLDS1.0364 产生的类细菌素是具有良好的热、酸稳定性的蛋白活性物质, 具有良好的开发前景。

参 考 文 献

- [1] Deegan LH, Cotter PC, Hill C, *et al.* Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal*, 2006, **16**(9): 1058–1071.
- [2] Virginia SO, Aida AP, Maria E. N-Characterization of a bacteriocin-like substance produced by avaginalactobacilluslivariusstrain. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**(5): 5631–5635.
- [3] Powell JE, Witthuhn RC, Todorov SD, *et al.* Characterization of bacteriocin ST8KF produced by a kefir isolate *Lactobacillus plantarum* ST8KF. *International Dairy Journal*, 2007, **17**: 190–198.
- [4] Todorov SD, Nyati H, Meincken M, *et al.* Partial characterization of bacteriocin AMA-K, produced by *Lactobacillus plantarum* AMA-K isolated from naturally fermented milk from Zimbabwe. *Food Control*, 2007, **18**: 656–664.
- [5] Yıldırım Z, Avsar YK, Yıldırım M. Factors affecting the adsorption of buchnericin L. B., a bacteriocin produced by *Lactobacillus buchneri*. *Microbiological Research*, 2002, **157**(2): 103–107.
- [6] 常 峰, 梁 波, 朱何东, 等. 布氏乳杆菌 CF10 所产类细菌素 Lactobacillin FC-10 的初步研究. *酿酒科技*, 2005, **6**: 36–39.
- [7] Collado MC, Gonzalez A, Gonzalez R. Antimicrobialpeptides are amongthe antagonistic metabolites produced by *Bifidobacterium* against *Helicobacter pylori*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2005, **25**: 385–391.
- [8] Nieto-Lozano JC, Reguera-Useros JI, Peláez-Martínez M C, *et al.* Effect of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* against *Listeria monocytogenes* and *Clostridium perfringens* on Spanish raw meat. *Meat Science*, 2006, **72**: 57–61.
- [9] Cabo ML, Murado MA, Gonzalez, MP, *et al.* A method for bacteriocin quantification. *Journal of Applied Micrology*, 1999, **87**: 907–914.
- [10] Schagger H, von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kD. *Anal Biochem*, 1987, **166** (2): 368–379.
- [11] Carolissen-Mackay M, Arendse G, Hastingsb JW, *et al.* Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. *International Journal of Food Microbiology*, 1997, **34**: 1–16.
- [12] Deraz SF, Karlsson EN, Hedström M, *et al.* Purification and characterisation of acidocin D20079, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079. *Journal of Biotechnology*, 2005, **117**: 343–354.
- [13] Delves-Broughton J, Blackburn P, Evans RJ, *et al.* Applications of the bacteriocin nisin. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1996, **69**: 193–202.
- [14] Todorov SD, Dicks LMT. Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria Comparison of the bacteriocins. *Process Biochemistry*, 2006, **41**: 11–19.
- [15] Ghrairi T, Frère J, Berjeaud JM. Lactococcin MMT24, a novel two-peptide bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* isolated from rigouta cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, **105**: 389–398.