

戊糖乳杆菌31-1菌株所产细菌素的理化及生物学特性

吕燕妮 李平兰 孙成虎 周伟

(中国农业大学 食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要 研究了本组纯化的戊糖乳杆菌 31-1 菌株所产细菌素的理化及生物学特性及其对敏感菌株的抑菌作用, 发现该细菌素在 80 °C 热处理 15 min 后活性基本不变, 121 °C 处理 15 min 仍保持一定活性; 在 pH 2~8 范围内 37 °C 处理 4 h 保持稳定, 当 pH > 9 时活性逐渐降低。胃蛋白酶、胰蛋白酶、蛋白酶 K、木瓜蛋白酶、中性蛋白酶均可使该细菌素完全失活; α -淀粉酶可使其部分失活; 酸性蛋白酶、溶菌酶不能使其失活。该细菌素抑菌效果明显, 在 3~5 h 内可减少敏感菌细胞数 $10^2 \sim 10^3$ 个。测定了其抑菌谱, 该细菌素可抑制乳杆菌属、链球菌属、片球菌属中的大部分菌株, 还可抑制金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、芽孢杆菌中的部分菌株。该细菌素是一种具有良好热、酸稳定性的蛋白活性物质, 用于食品防腐将具有较高的安全性。

关键词 戊糖乳杆菌; 细菌素; 理化特性

中图分类号 Q 939.117.06

文章编号 1007-4333(2006)01-0039-05

文献标识码 A

Characterization of Bacteriocin produced by *Lactobacillus pentosus* 31-1

L üYanni, Li Pinglan, Sun Chenghu, Zhou Wei

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract This study reports the characterization, spectrum of bacteriocin produced by *Lactobacillus pentosus* 31-1. This bacteriocin remained active when heated at 80 °C for 15 min, and partly active at 121 °C for 15 min. It was also active after incubation in pH 2-8 environment for 4 h at 37 °C, but only partially inactive media above pH 9. Treatment with pepsin, proteinase K, trypsin, papain, neutral proteinase fully inactivated the bacteriocin, but was part-inactivated by α -amylase. The mechanism of activity of bacteriocin is bactericidal, as shown by an obvious decrease of about 2-3 orders of magnitude in the viable cell numbers of *L. plantarum* over a period of 3-5 h. The bacteriocin had a broad spectrum, including most strains from *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, especially including *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis* and *B. megaterium*. Bacteriocin produced by *Lactobacillus pentosus* 31-1 was an active protein with stability to heat and acid, which will have good potential application in food preservation.

Key words *Lactobacillus pentosus*; bacteriocin; characterization

细菌素是蛋白类抑菌物质,因其潜在的食品生物防腐剂前景而受到关注。被公认为安全的细菌素 nisin 在乳制品及罐头等制品中已有了广泛应用^[1]。

乳酸菌产生的细菌素多只对近源乳酸菌菌株有抑制作用,但也有一些(如 nisin、pediocin PA-1)对食品中常见的腐败菌如芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌有抑制作用,这些细菌素具有潜在的作为食品生物

防腐剂应用的前景^[2-3]。乳酸菌细菌素的热稳定范围广,60~100 °C 热处理 30 min(如 lactocin 27、lactocin S 等),或 121 °C 灭菌 15~20 min(如 lactacin B、nisin 等)细菌素活性都不会明显损失^[4],但大多细菌素仅在酸性或中性条件下稳定存在,某些细菌素在 pH 8.0 以上即失活(如 nisin、pediocin AcH)^[1,3],因此在酸性食品中才能稳定发挥作用。本研究旨在

收稿日期: 2005-05-19

基金项目:北京市自然科学基金资助项目(6052015),科技部“十五”科技攻关项目(2001BA501A11)

作者简介:吕燕妮,硕士研究生;李平兰,副教授,博士,通讯作者,主要从事食品微生物学与发酵工程研究, E-mail: lipinglan@sina.com

探讨戊糖乳杆菌(*Lactobacillus pentosus*)菌株 31-1^[5-6] 细菌素特性,以及对指示菌细胞的杀菌效果等。

1 实验材料

1) 菌株。

产细菌素菌株:戊糖乳杆菌 31-1 菌株(分离自市售云南宣威火腿)^[5]。

指示菌株:植物乳杆菌 *L. plantarum* Lactacel MC Nov 8(本实验室保藏)。

乳酸菌以 MRS 液体培养基 37 培养 18 h,芽孢杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌等以 LB 液体培养基 37 培养 18 h。

2) 主要试验材料。

木瓜蛋白酶、中性蛋白酶(芽孢杆菌来源)、蛋白酶 K(EC. 3. 4. 21. 14)、胰蛋白酶、胃蛋白酶、 α -淀粉酶、酸性蛋白酶、溶菌酶。

2 实验方法

抑菌实验采用管碟法^[5],以二倍稀释法确定效价。效价定义为有明显抑菌圈出现的样品最高稀释度的倒数^[5,7],以 AU/mL 表示。

2.1 细菌素理化特性的测定

1) 对热的稳定性。将细菌素粗提液(效价 1 280 AU/mL)分别取 0.6 mL 于小离心管中,进行水浴热处理,以未热处理的样品为对照,测其抑菌活性。

2) 对酸的稳定性。分别取 0.3 mL 细菌素粗提液于试管中,用 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 将其 pH 分别调至 2, 3, ..., 11, 12, 保持最终容积为 1.5 mL,以重蒸水同比稀释的细菌素液为对照,37 温育 4 h,调 pH 至中性(6.5~7.5),然后测抑菌活性。

3) 对蛋白酶的敏感性。将不同蛋白酶与经 SP Sepharose FF 阳离子层析纯化后的细菌素样品(效价 320 AU/mL)混和,使酶的终质量浓度为 1 mg/mL,其中胃蛋白酶和酸性蛋白酶 pH 调至 2~3,其他蛋白酶均调至 6~7(在其最适 pH 范围内),同时以同比稀释的细菌素液作为对照,37 温育 4 h,然后检测抑菌活性。

2.2 对指示菌细胞抑制作用的测定

将新鲜培养 14 h 的指示菌细胞用 pH 7.0 的生理盐水清洗 2 次,使其以一定活菌数浓度悬浮于生理盐水中,加入细菌素液 1 mL(效价 1 280 AU/mL),置于 37 培养,以不接细菌素的同浓度细胞

悬浮液为对照,每隔一定时间测活菌数。

2.3 细菌素抑菌谱测定

分别以中和后的离心上清液(效价 640 AU/mL)、细菌素粗提液(1 280 AU/mL)、纯化液^[5](320 AU/mL)对各种细菌做抑菌实验。

3 结果与讨论

3.1 细菌素的理化特性

1) 对热的稳定性。实验结果(图 1)表明:细菌素在 80 15 min 的热处理条件下活性基本不变,100 处理 15 min 其活性仍保留 50%,121 15 min 高温处理后仍保持部分活性,说明该细菌素具有较好的热稳定性。食品加工中常用的巴氏杀菌条件为 65~80、15 min,该细菌素在巴氏杀菌条件下基本不会失活,因此在食品加工中将有较好的应用前景。

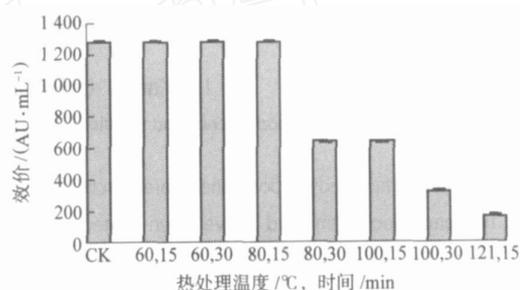


图 1 细菌素对热的稳定性

Fig. 1 Heat stability of bacteriocin

2) 对酸的稳定性。实验结果(图 2)表明: pH 2~8 时细菌素活性保持稳定,pH 9 时,其活性有所降低,pH 12 时其活性仍保持 50%。

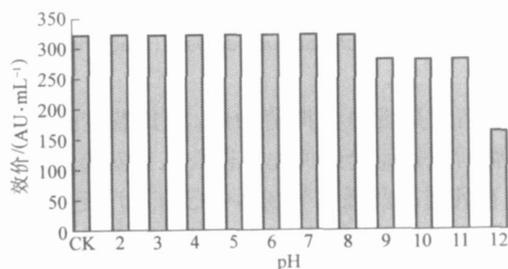


图 2 细菌素对酸的稳定性

Fig. 2 pH stability of bacteriocin

大部分细菌素在酸性条件下稳定,在中性或碱性条件下即失活。此细菌素在酸性条件下保持稳定,且在碱性条件下只有部分失活,说明其具有较好的酸稳定性,故可在酸性、中性食品中使用。

3) 对蛋白酶的敏感性。细菌素对蛋白酶的敏感

性试验结果(表 1)表明:胃蛋白酶、胰蛋白酶、蛋白酶 K、木瓜蛋白酶、中性蛋白酶可使该细菌素完全失活, - 淀粉酶可使其部分失活,酸性蛋白酶、溶菌酶不能使其失活。表明该细菌素是一种蛋白类物质,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。该细菌素可被 - 淀粉酶部分降解,说明细菌素分子的活性结构中可能含有碳水化合物成分,当然还有可能是粗制淀粉酶制剂中含有蛋白酶

表 1 细菌素对蛋白酶的敏感性

Table 1 Effect of various enzyme on purified bacteriocin

蛋白酶种类	残留活性抑制菌圈直径/mm	是否失活
胃蛋白酶(pepsin)	0	+
蛋白酶 K(proteinase K)	0	+
胰蛋白酶(trypsin)	0	+
木瓜蛋白酶(papain)	0	+
溶菌酶(lysozyme)	16.3	-
- 淀粉酶(- amylase)	12.4	(+)
酸性蛋白酶(acid proteinase)	16.2	-
中性蛋白酶(nutral proteinase)	0	+
CK	16.4	

注: + 表示完全失活, - 表示完全不失活, (+) 表示部分失活。

的成分而使细菌素失活,此问题有待于进一步确证。

3.2 细菌素对指示菌细胞的抑制作用

细菌素对指示菌的抑菌作用见图 3,可以看出,无论指示菌起始菌数高低,细菌素的杀菌效果是一致的,即与对照相比,2 组实验的活菌数均直线下降,3~5 h 活菌数下降 $10^2 \sim 10^3$ 个,说明该细菌素有较强的杀菌作用。

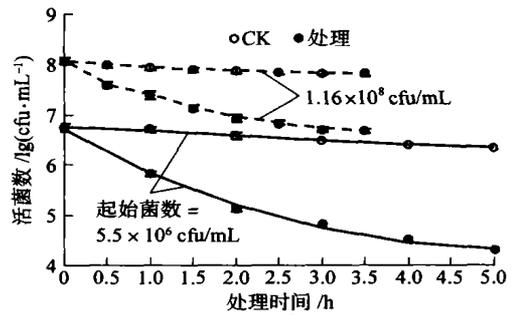


图 3 细菌素对敏感细胞的抑菌作用

Fig. 3 Antimicrobial action mode of bacteriocin

3.3 细菌素的抑菌谱测定

细菌素的抑菌谱测定结果(表 2)表明,该细菌素对实验所用 2 株保加利亚乳酸杆菌、10 株植物乳杆菌、1 株弯曲乳杆菌、1 株乳酸乳杆菌、2 株青贮饲料来源的乳杆菌、3 株嗜酸乳杆菌、1 株嗜热链球菌、

表 2 戊糖乳杆菌菌株 31-1 所产细菌素的抑菌谱

Table 2 Antimicrobial spectrum of bacteriocin produced by 31-1

指示菌	抑菌圈直径/mm			来源
	原发酵上清液	细菌素粗提液	细菌素纯品液	
保加利亚乳杆菌 (<i>Lactobacillus bulgaricus</i> S-1)	16.80	21.30	15.20	本实验室保藏
保加利亚乳杆菌 (<i>L. bulgaricus</i> S-2)	16.90	21.10	15.10	益尔康乳品厂菌种
植物乳杆菌 (<i>L. plantarum</i> ACTT 6538)	17.20	22.30	16.30	ACTT 菌种保藏中心
植物乳杆菌 (<i>L. plantarum</i> 1.557)	17.62	22.54	16.50	中国普通微生物菌种保藏中心
植物乳杆菌 (<i>L. P. Fermentang</i> BN1005)	16.40	21.64	15.90	本实验室保藏
植物乳杆菌 (<i>L. P. lactacel</i> MC Nov8)	16.88	22.12	16.40	本实验室保藏
植物乳杆菌 (<i>L. P. UW</i> ACTT LP1)	16.70	21.84	15.86	本实验室保藏
植物乳杆菌 (<i>L. plantarum</i> PL1)	18.20	22.40	16.10	本实验室保藏
植物乳杆菌 (<i>L. plantarum</i> PL2)	18.40	22.96	16.40	本实验室保藏
植物乳杆菌 (<i>L. plantarum</i> B25)	13.00	15.60	9.80	分离自酸白菜
植物乳杆菌 (<i>L. plantarum</i> B12)	12.70	15.20	9.30	分离自酸白菜
植物乳杆菌 (<i>L. plantarum</i> D37)	18.50	22.40	15.40	分离自酸豆角
弯曲乳杆菌 (<i>L. curvatus</i> L17 120528)	16.80	19.80	9.60	本实验室保藏
德氏乳杆菌乳亚种 (<i>L. delbrueckii subsp. lactis</i>)	14.30	16.60	11.10	本实验室保藏

续表 2

指示菌	抑菌圈直径/mm			来源
	原发酵上清液	细菌素粗提液	细菌素纯品液	
短乳杆菌 (<i>L. brevis</i>)	0	0	0	本实验室保藏
干酪乳杆菌 (<i>L. casei</i> 99108)	0	0	0	本实验室保藏
乳杆菌 L1	16.70	21.00	14.20	青贮饲料
乳杆菌 L2	17.30	21.20	15.40	青贮饲料
绿色乳杆菌 (<i>L. viridescens</i>)	0	0	0	本实验室保藏
嗜酸乳杆菌 (<i>L. acidophilus</i> AL)	18.80	22.00	14.70	本实验室保藏
嗜酸乳杆菌 (<i>L. acidophilus</i> 99101)	13.42	19.20	9.60	本实验室保藏
嗜酸乳杆菌 (<i>L. acidophilus</i> 1)	15.80	17.50	16.30	本实验室保藏
嗜热链球菌 (<i>Streptococcus thermophilus</i>)	14.36	16.20	11.30	益尔康乳品厂菌种
乳脂链球菌 (<i>S. cremoiss</i> AS1.9)	13.20	17.80	9.20	中国普通微生物菌种保藏中心
乳酸链球菌 (<i>S. lactis</i> CICC 6018)	16.70	20.60	12.10	中国工业微生物菌种保藏中心
戊糖片球菌 (<i>Pediococcus pentosaceus</i>)	9.80	11.80	0	本实验室保藏
金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	11.10	16.10	9.70	本实验室保藏
金黄色葡萄球菌 (<i>S. aureus</i> 1.128)	0	0	0	中国普通微生物菌种保藏中心
金黄色葡萄球菌 (<i>S. aureus</i> ACTT 6538)	9.80	13.56	6.80	ACTT 菌种保藏中心
金黄色葡萄球菌 (<i>S. aureus</i> 1885 C56005)	11.00	14.56	6.80	中国兽医药品监察所
金黄色葡萄球菌 (<i>S. aureus</i> 26923)	0	0	0	中国药品生物制品检定所
沙门氏杆菌 (<i>Salmonella</i> C79-13 鸡白痢血清型)	0	0	0	中国兽医药品监察所
沙门氏杆菌 (<i>S.</i> C500)	0	0	0	中国兽医药品监察所
沙门氏杆菌 (<i>S.</i> 1.1552)	0	0	0	中国普通微生物菌种保藏中心
枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)	12.50	17.70	7.60	本实验室保藏
蕈状芽孢杆菌 (<i>B. mycooides</i>)	0	0	0	本实验室保藏
蜡样芽孢杆菌 (<i>B. cereus</i>)	13.60	19.06	9.50	本实验室保藏
巨大芽孢杆菌 (<i>B. megaterium</i>)	7.80	10.60	6.90	本实验室保藏
大肠杆菌 K12 (<i>Escherichia coli</i> K12)	0	0	0	中国农业大学微生物与生物技术国家重点实验室赠
大肠杆菌 (<i>E. coli</i> ACTT 80739)	0	0	0	ACTT 菌种保藏中心
大肠杆菌 (<i>E. coli</i> CMCC(B)44102)	0	0	0	卫生部药品生物制品检定所
大肠杆菌 (<i>E. coli</i> 1)	0	0	0	本实验室保藏
大肠杆菌 (<i>E. coli</i> 2)	0	0	10.90	本实验室保藏
大肠杆菌 (<i>E. coli</i> K88 C83901 血清型 O8:K87(B), K88ab)	0	0	0	中国兽医药品监察所
大肠杆菌 (<i>E. coli</i> K99 C83529 O141:K99)	0	0	0	中国兽医药品监察所
大肠杆菌 (<i>E. coli</i> 987p C83695 O132:987p:H21)	0	0	0	中国兽医药品监察所

1 株乳脂链球菌、1 株乳酸链球菌、1 株戊糖片球菌、
5 株金黄色葡萄球菌中的 3 株、大肠杆菌中的 1 株、

1 株枯草芽孢杆菌、1 株蜡样芽孢杆菌、1 株巨大芽
孢杆菌均有不同程度的抑制作用,对短乳杆菌、干酪

乳杆菌、绿色乳杆菌、沙门氏杆菌、蕈状芽孢杆菌没有抑制作用。3 种样品中细菌素的抑菌活性也有不同,但基本来说效价较大的细菌素粗提液(2 560 AU/mL)抑菌活性也较大。值得注意的是,只有细菌素纯品液对大肠杆菌 *E. coli* 2 具有抑制作用。另外,在对戊糖片球菌抑制作用中,发酵上清液和细菌素粗提液均有抑制作用,而纯化液却没有,因此可以推测,不同纯化阶段细菌素结构可能不同,进而造成其抑菌活性有所不同。

很多细菌素在纯化过程中也有抑菌谱改变的现象,经过疏水层析纯化后其活性大幅提高,或原对某些菌没有抑制作用,纯化后却对其产生了抑制作用,如 pediocin L50 和 plantaricin C^[8]。这可能是纯化过程中细菌素分子在溶剂的作用下转化为具有更高活性的分子形式;或者是其三维空间结构发生了变化^[9],在纯化过程中细菌素有更多的抑菌活性位点外露,从而拓宽了抑菌谱;另外也有可能是 2 种细菌素的复合物^[10]。这种现象有待于继续研究。

4 小 结

戊糖乳杆菌 31-1 菌株所产的细菌素在 80 ℃ 热处理 15 min 后活性无明显变化,在 121 ℃ 15 min 的高温下能保持一定活性;在 pH 2 ~ 8 范围内活性保持稳定,当 pH = 9 时,活性逐渐降低,在 pH 12 的碱性条件下活性仍保持有 50%。胃蛋白酶、胰蛋白酶、蛋白酶 K、木瓜蛋白酶、中性蛋白酶均可使该细菌素完全失活,α-淀粉酶可使其部分失活,酸性蛋白酶、溶菌酶不能使其失活。充分说明该细菌素是一种具有良好的热、酸稳定性的蛋白活性物质,用于食品制作具有较高的安全性。

31-1 菌株所产细菌素抑菌谱较广,不仅可抑制实验所采用的乳杆菌属、链球菌属、片球菌属中的大部分菌株,还可抑制金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、芽孢杆菌中的部分菌株,其抑菌作用效果明显,在 3 ~ 5 h 内可明显减少敏感菌细胞数 $10^2 \sim 10^3$ 个。以上结果说明,该细菌素作为食品防腐剂开发具有很好的应用前景,可在多种酸性、中性食品,以及经巴氏杀菌处理的食品中使用,且该细菌素可抑制多种乳酸菌,还可应用在其他乳制品、饮料等多种食品中以

防止乳酸菌污染。该细菌素可在某种程度上抑制金黄色葡萄球菌、芽孢杆菌以及大肠杆菌,说明其抑菌谱也较广。近年来的研究发现,细菌素某些结构位点的突变或化学改造可大大提高其抑菌活性,并可扩展其抑菌谱;因此应在对该细菌素结构研究的基础上,进一步发现其抑菌作用机理,以及抑菌活性基团的功能,并进一步对其进行改造,以更好地将其应用于食品防腐中。

参 考 文 献

- [1] Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, et al. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation[J]. *Int J Food Microbiol*, 2001, 71: 1-20
- [2] 刘毅. 天然食品防腐剂-抗菌肽[J]. *食品科学*, 1999, 11: 18-21
- [3] Aymerich M T, Garriga M, Monfort J M, et al. Bacteriocin-producing *Lactobacillus* in Spanish-style fermented sausages: characterization of bacteriocins[J]. *Food Microbiol*, 2000, 17: 33-45
- [4] Chen H, Hoover D G. Bacteriocins and their food applications[J]. *Comprehensive Rev Food Science and Food Safety*, 2003, 2: 82-100
- [5] 吕燕妮,李平兰,江志杰. 乳酸菌 31-1 菌株产细菌素的初步研究[J]. *中国食品学报*, 2003(增刊): 130-133
- [6] 吕燕妮,李平兰,周伟. 戊糖乳杆菌细菌素 31-1 的纯化[J]. *肉品卫生*, 2005, 23(1): 26-29
- [7] 吕燕妮,李平兰. 戊糖乳杆菌 31-1 菌株产细菌素发酵条件优化[J]. *微生物学通报*, 2005, 32(3): 13-19
- [8] Gonzalez B, Pilar A. Detection, purification, and partial characterization of plantaricin C, a bacteriocin produced by a *Lactobacillus plantarum* strain of dairy origin[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60(6): 2158-2163
- [9] Hikmate Abriouel, Eva Valdivia, Antonio Galvez, et al. Influence of physico-chemical factors on the oligomerization and biological activity of bacteriocin AS-48[J]. *Current Microbiology*, 2000, 42: 89-95
- [10] Nissen-Meyer J L. Purification and characterization of plantaricin A, a *Lactobacillus plantarum* bacteriocin whose activity depends on the action of two peptides[J]. *J Gen Microbiol*, 1999, 139: 1973-1978