

产细菌素乳酸菌的筛选及细菌素相关基因的分析

张旭 赵斌 张香美 李平兰*

(中国农业大学 食品科学与营养工程学院,北京 100083)

摘要 试验利用溶钙圈法及牛津杯双层平板法,从国内外优良发酵肉品中分离筛选产细菌素的乳酸菌,通过形态学、生理生化学鉴定,16S rDNA 及种间特异性基因 PCR 扩增将菌株鉴定到种,并对其细菌素相关基因进行分析,初步确定细菌素种类。结果表明:在排除有机酸、过氧化氢等干扰因素后,从分离纯化到的 92 株乳酸菌中筛选到一株对指示菌仍有明显抑制作用的菌株 L-ZS9,该菌株所产抑菌物质对蛋白酶(酸性蛋白酶、蛋白酶 K、胰蛋白酶、胃蛋白酶和中性蛋白酶)敏感,而 α -淀粉酶对其活性基本无影响,因而确定 L-ZS9 为细菌素产生菌。经鉴定 L-ZS9 为类植物乳杆菌,进一步对菌株细菌素相关基因进行 PCR 扩增表明,L-ZS9 含有 II b 类细菌素 Plantaricin EF, Plantaricin JK, II c 类细菌素 Plantaricin A 及 Plantaricin N 基因编码序列,此外 *plnE*、*plnF*、*plnJ* 和 *plnK* 的序列分析结果显示,*plnF* 和 *plnK* 的成熟肽序列与 *Lactobacillus plantarum* C11(X94434)相应的细菌素成熟肽序列完全相同,*plnE* 和 *plnJ* 的成熟肽序列仅出现一处氨基酸突变,因而确定类植物乳杆菌 L-ZS9 为天然的多种细菌素产生菌。

关键词 乳酸菌; 筛选; 细菌素; 类植物乳杆菌

中图分类号 TS 251

文章编号 1007-4333(2013)04-0168-10

文献标志码 A

Screening of bacteriocin producing lactic acid bacteria and the analysis of bacteriocin related genes

ZHANG Xu, ZHAO Bin, ZHANG Xiang-mei, LI Ping-lan*

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

Abstract In order to obtain a bacteriocin producing strain, lactic acid bacteria were separated and screened with dissolve calcium circle and oxford cup double-plate method from premium fermentation meat. Morphological, physiological biochemistry method, 16S rDNA and specific gene PCR amplification were used to identify the strain to species, and the bacteriocin related gene was analyzed to determine bacteriocin types. The results showed that, after eliminating organic acid, hydrogen peroxide and other interference factors, L-ZS9 still had antibacterial activity among the 92 strains and its antibacterial substances were sensitive to protease (acid protease, protease K, trypsin, pepsin, neutral protease), while insensitive to alpha amylase. Therefore, L-ZS9 was recognized as bacteriocin producing bacteria and identified as *Lactobacillus paraplantarum*. Further bacteriocin related gene PCR amplification showed that L-ZS9 contained II b plantaricins EF, JK, II c plantaricin A and plantaricin N encoding gene. The mature peptide sequences of *plnF*, *plnK* were identical with *Lactobacillus plantarum* C11 (X94434) and only one amino acid mutation occurred in *plnE*, *plnJ* mature peptide sequences. Therefore, the *Lactobacillus paraplantarum* L-ZS9 was a nature multi-bacteriocinogenic strain.

Key words lactic acid bacteria; screening; bacteriocin; *Lactobacillus paraplantarum*

收稿日期: 2013-01-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(31071591); 产业技术体系北京市创新团队项目(SCGWZJ 20121105-2)

第一作者: 张旭, 硕士研究生, E-mail: zhangxu19901218@163.com

通讯作者: 李平兰, 教授, 博士, 主要从事益生菌及其活性代谢产物研究, E-mail: lipinglan@cau.edu.cn

乳酸菌细菌素是乳酸菌在代谢过程中通过核糖体途径合成的一类具有抗菌活性的多肽类物质^[1]。乳酸菌产生的细菌素除了具有能被人体内的蛋白酶降解、不在体内蓄积等优点之外,还具有较好的稳定性及适合工业化生产的特点^[2],因而在开发食品天然防腐剂领域有广阔的应用前景。I类细菌素 Nisin 在食品领域中得到较为普遍的应用,已成功地将其应用到乳制品^[3]、啤酒^[4]等食品生产中,并取得了较好的防腐效果。II类细菌素的开发为当前研究的热点,该类细菌素又可划分为3类:II a类,类片球菌素样细菌素,具有保守的N-末端 YGNGVXC 保守序列^[5];II b类,为双肽细菌素,需两个肽的共同作用才能有效地发挥抑菌效果^[6];II c类,其他未经修饰的抗菌活性肽^[7]。

由于II a类细菌素具有很强的抗李斯特菌活性,且具有较稳定的理化性质,目前II a类细菌素已经在食品防腐领域和发酵剂领域得到广泛的研究,产II a类细菌素戊糖乳杆菌 31-1,分离自我国传统发酵肉制品宣威火腿,其所产细菌素有较好食品加工耐受特性,本课题组已将其添加到托盘包装的冷却猪肉中延长冷却肉保鲜期^[8]并将其作为发酵剂菌株,开发具有生物防腐功能的新型肉品发酵剂^[9]。目前对于II b、II c类细菌素的研究较少,且II b类细菌素的抑菌机理及靶细胞识别机制尚未十分明确。因此筛选出能够合成多种细菌素的天然菌株对于研究各类细菌素的作用机理以及调控机制具有重要意义。本研究拟从多种国内外优质发酵肉中分离筛选产细菌素乳酸菌,对菌株进行鉴定,并进行抑菌谱的测定以及细菌素相关基因的分析,旨在确定所产细菌素的种类,揭示该类细菌素作用机理并探讨其在食品防腐领域中的应用。

1 材料与仪器

1.1 样品

国外优质发酵肉(购于比利时)、哈尔滨红肠(购于哈尔滨),手工制内蒙古风干牛肉(购于内蒙古),样品取回后贮藏于4℃冰箱备用。

1.2 菌株

抑菌实验指示菌植物乳杆菌 p12 本实验室保藏;菌株 L-ZS9 为本研究分离得到。

1.3 培养基

乳酸菌培养用培养基:MRS培养基^[10]。

乳酸菌分离筛选用培养基:MRS固体培养基

(加0.5%碳酸钙)。

芽孢杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌等培养用培养基:LB培养基^[10]。

1.4 主要药品试剂及仪器设备

PCR反应用各类试剂购于北京博迈德科技发展有限公司;分析纯购于北京蓝弋化工产品有限公司。本研究室使用仪器为:TC-512型PCR仪 英国TECHNE公司;BG-Power 300型电泳仪 美国BAYGENE公司;SX-300型凝胶成像系统 上海小源科技有限公司。

2 试验方法

2.1 乳酸菌的分离及纯化

在无菌条件下分别取样品表层和5 mm以下的内部瘦肉部分,切碎,用组织捣碎机绞碎,称取25 g加入到225 mL的无菌生理盐水中,震荡均匀,以10倍系列稀释,分别取不同稀释度于平皿中,以MRS(含0.5%碳酸钙)培养基倒平板^[10],37℃培养48 h。挑取具有溶钙圈,形状不同的单个菌落进行革兰氏染色,选取革兰氏阳性菌,分别接种于MRS液体培养基,37℃培养,将筛选得到的乳酸菌编号后于MRS固体培养基上划线纯化保存待用。

2.2 产细菌素乳酸菌的筛选

2.2.1 初筛

采用对峙法进行初筛,取过夜培养的新鲜指示菌植物乳杆菌 p12,用无菌生理盐水稀释至 10^6 CFU/mL,取0.5 mL与冷却至50℃的MRS固体培养基混匀倒平板。待培养基凝固后,将所分离的乳酸菌点种于平板中,37℃培养箱中培养24 h,观察乳酸菌菌落周围是否存在抑菌圈并用十字测量法测量乳酸菌菌落直径及其产生的抑菌圈直径。

2.2.2 复筛

将初筛出的抑菌效果好的乳酸菌菌株,接种于装有10 mL MRS液体培养基,37℃下培养24 h。发酵液经10 000 r/min离心10 min取得上清液,测定该发酵上清液的抑菌活性。发酵上清液抑菌活性的测定采用牛津杯双层平板法^[11]。待培养基凝固后,将牛津杯轻置于平板上,每个牛津杯中加入100 μ L 无菌离心上清液滤液,于4℃冰箱中扩散5 h,37℃培养24 h后观察抑菌圈,十字交叉法测量抑菌圈直径,以未接种的培养基上清液作为空白对照,每次处理3次重复。

2.3 菌株产细菌素的确定

乳酸菌在生长过程中产生的许多物质均具有抑菌能力,如有机酸、过氧化氢等,因此在细菌素产生菌的筛选中要排除这些干扰因素。

2.3.1 排除有机酸的干扰

发酵上清液对指示菌的抑制作用,可能是乳酸菌素,也可能是酸性物质,如乳酸等有机酸作用的结果。为排除酸及酸性末端产物的干扰,将 12 000 r/min 离心 10 min 的上清液用 2.5 mol/L 的 NaOH 溶液中和至 pH 达 6.5~7.0,通过牛津杯双层平板法进行抑菌试验,向牛津杯中加入中和前后的发酵上清液 100 μ L,并在水平条件下将平板放于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中扩散 5 h,置于 37 $^{\circ}$ C 下培养 24 h,分别检测两者的抑菌活性,比较中和酸前后抑菌圈的差异,每次处理 3 次重复。

2.3.2 过氧化氢作用的检测与排除

将过氧化氢酶溶解于 50 mmol/L 的磷酸缓冲液(pH 7.0)中配成母液,加入到经酸排除的试验菌株上清液中使过氧化氢酶的最终浓度达到 5 mg/mL,37 $^{\circ}$ C 水浴 2 h 后取出,检测过氧化氢酶处理后上清液的抑菌活性,设 3 个平行实验,求均值。

2.3.3 排除离心上清液残留菌体细胞的影响

将离心上清液用微孔滤膜(Φ 25 mm,孔径 0.22 μ m)的细菌过滤器过滤除菌后进行抑菌实验,排除离心上清液中残留的菌体细胞对抑菌试验的影响。

2.3.4 蛋白酶敏感试验

将蛋白酶 K(EC. 3. 4. 21. 14)、胰蛋白酶、胃蛋白酶、 α -淀粉酶、酸性蛋白酶、中性蛋白酶分别溶解在 50 mmol/L 的磷酸缓冲液(pH 7.6、2.0)中配成母液,加入试验菌株发酵上清液中,使其终浓度为 1 mg/mL,调节 pH 至各酶的最适作用范围,37 $^{\circ}$ C 水浴 2 h 后取出,再将 pH 调回至 6.5~7.0,并用缓冲液稀释相同倍数的发酵上清液作为对照,检测各种蛋白酶对乳酸菌发酵上清液抑菌活性的影响。

2.3.5 不同处理温度对抑菌物质活性影响

分别取 1.0 mL 试验菌株发酵上清液于 Eppendorf 管(2 mL/管)中,水浴处理 60 $^{\circ}$ C 30 min,80 $^{\circ}$ C 30 min,100 $^{\circ}$ C 30 min 及 121 $^{\circ}$ C 15 min,以未进行热处理的发酵上清液为对照,pH 调至 6.5~7.0,分别测定抑菌活性。

2.3.6 硫酸铵沉淀处理

将在 30 mL MRS 液体培养基培养 24 h 的试验菌株发酵液 10 000 r/min 离心 12 min 取得上清液,

向其中加入硫酸铵固体粉末至饱和度为 70%,缓慢搅拌 1 h 后,放置 4 $^{\circ}$ C 冰箱中沉降过夜。10 000 r/min 离心 12 min,弃上清,沉淀复溶于原体积 1/10 的磷酸盐缓冲液(25 mmol/L,pH 7.4)中,测定蛋白溶液中的抗菌活性,同时以含有相同饱和度的硫酸铵溶液和磷酸盐缓冲液作为对照。

2.4 产细菌素菌株的鉴定

2.4.1 形态学鉴定

挑取少量的目标菌株于 MRS 固体培养基平板上划线,37 $^{\circ}$ C 培养 20 h 观察单菌落形态,继续培养至 24 h 后进行革兰氏染色,记录菌体形态。

2.4.2 生理生化鉴定

糖醇发酵采用 API 50CHL 试剂盒,结果与《常见细菌系统鉴定手册》^[12]对照。

2.4.3 16S rDNA 鉴定

采用通用引物(16S-F: 5'-AGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 16S-R: 5'-CTTGTTACGACTT-CACCC-3'),细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒(北京博迈德科技发展有限公司),取培养 12 h 的新鲜目标菌株菌液,按照试剂盒说明,进行菌体基因组 DNA 的提取。PCR 采用 25 μ L 反应体系,ddH₂O 14.25 μ L,10 \times Buffer 2.5 μ L,10 mmol/L dNTP 2.0 μ L,10 μ mol/L 上引物 2.5 μ L,10 μ mol/L 下引物 2.5 μ L,Taq 酶 0.25 μ L,DNA 模版 1.0 μ L,其中空白对照不加入 DNA 模版。

2.4.4 PCR 反应条件

94 $^{\circ}$ C 变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,47 $^{\circ}$ C 引物复性 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,30 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。所得 PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳在标准条件下进行检测后送至北京博迈德科技发展有限公司测序,测序结果经处理后到 GenBank 比对,建立系统发育树。

2.4.5 recA 基因种间特异性鉴定

以菌株 DNA 为模版,以 paraF(5'-GTCACA-GGCATTACGAAAAC-3'), planF(5'-CCGTTT-ATGCGGAACACCTA-3'), pentF(5'-CAGTGG-CGCGTTGATATC-3')及 pREV(5'-TCGGGA-TTACCAAACATCAC-3')为引物进行多重 PCR 扩增 recA 基因,空白对照中以 ddH₂O 代替基因组 DNA,以 *L. plantarum* pl2、*L. pentosus* 31-1 基因组模版为阳性对照。反应体系参照 Torriani 等^[13]的研究。将 PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳在标准条件下进行检测,并送至北京博迈德科技发展有限

公司测序,测序结果经处理后到 GenBank 比对。

2.5 L-ZS9 抑菌谱的测定

选取乳杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌等 19 株菌为指示菌。以 70% 硫酸铵沉淀处理后的 L-ZS9 发酵上清液进行抑菌实验。其中乳酸菌以 MRS 液体培养基 37 °C 培养,芽孢杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌等以 LB 液体培养基 37 °C 培养。

2.6 L-ZS9 产细菌素种类的确定及细菌素基因簇分析

由于类植物乳杆菌与植物乳杆菌基因同源性较

高,根据 *L. plantarum* C11(X94434)、NC8(AF522077)、WCFS1(AL935253)、J23(DQ323671)和 J51(DQ340868)等已发表的序列设计引物,PCR 扩增细菌素结构基因已知的植物乳杆菌细菌素基因 *plnA*、*plnEF*、*plnJK*、*plnN*、*plW*、*plNC8*、*pln423*、*plnl. 25β* 以及负责细菌素转运和分泌的 ABC-转运蛋白基因 *plnG* 和 *plnH*,引物序列及退火温度见表 1。采用细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒(北京博迈德科技发展有限公司),取培养 12 h 的新鲜目标菌株菌液,按照试剂盒说明,进行菌体基因组 DNA 的提取。

表 1 L-ZS9 细菌素相关基因 PCR 扩增引物

Table 1 Specific PCR primers used for detection of genes involved in L-ZS9

目的基因 Target gene	引物序列(5'-3') Primer sequences	退火温度/°C Annealing temperature	片段长度/bp Fragment length
<i>plnG</i> -F	TGCGGTTATCAGTATGTCAAAG	52.8	453
<i>plnG</i> -R	CCTCGAAACAATTTCCCCC		
<i>plnH</i> -F	TCTTACACGATCAAGGCAAC	53.4	526
<i>plnH</i> -R	TGTGCCATTACTTACCTGTTTC		
<i>plW</i> -F	TCACACGAAATATTTCCA	55.0	165
<i>plW</i> -R	GGCAAGCGTAAGAAATAAATGAG		
<i>plNC8</i> -F	GGTCTGCGTATAAGCATCGC	60.0	207
<i>plNC8</i> -R	AAATTGAACATATGGGTGCTTTAAATTCC		
<i>plnEF</i> -F	GGCATAGTTAAAATTCCCCC	53.2	428
<i>plnEF</i> -R	CAGGTTGCCGCAAAAAAAG		
<i>plnJK</i> -F	AATCGCAGTGACTTCCAGAAC	52.0	794
<i>plnJK</i> -R	AATCAAGGAATTATCACATTAGTC		
<i>plnA</i> -F	GTACAGTACTAATGGGAG	53.0	450
<i>plnA</i> -R	CTTACGCCAATCTATTATACG		
<i>plnN</i> -F	ATTGCCGGGTTAGGTATCG	51.9	146
<i>plnN</i> -R	CCTAAACCATGCCATGCAC		
<i>pln423</i> -F	TATGATGAA AAAAATTGAAAAAT	50.0	197
<i>pln423</i> -R	CCAAAGATAATCCCCCCCAT		
<i>plnl. 25β</i> -F	TTAGCATTGATTGATGGAGGA	50.0	249
<i>plnl. 25β</i> -R	GCATCCTATGTGAGGCTGCTG		

采用 25 μL 反应体系:2×Taq PCR MasterMix 12.5 μL,上引物 0.5 μL,下引物 0.5 μL,DNA 1.0 μL,ddH₂O 10.5 μL,其中空白对照用 ddH₂O 补足。PCR 反应条件为:94 °C 变性 5 min;94 °C 变性 30 s,47 °C 引物复性 1 min,72 °C 延伸 2 min,30 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min。所得 PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳在标准条件下进行检测,将与预期大小相符的 PCR 产物进行纯化后,送至北京博迈德科技发展有限公司测序,将测序结果登陆 NCBI

网站进行 BLAST 比对。

3 结果与分析

3.1 乳酸菌的分离

本实验共从 10 种不同的样品中分离得到 92 株乳酸菌。为保证所得菌株的多样性及安全性,所以尽量考虑从相对安全、且可能具有较多乳酸菌的食品中选取样品。具体结果见表 2。

表2 乳酸菌的来源及数量

Table 2 Source and the number of lactic acid bacteria isolation

菌种来源 Source of bacteria	菌株数 Strain number	菌种来源 Source of bacteria	菌株数 Strain number
SALAMI MET LOOK	10	SALAMI STICKS	8
CABANOSSI	5	GRATIS	8
SALAMI ZONDER LOOK	8	SAUCISSON SEC PUR	11
ARGA SALAMI STICKS	11	SAUCISSON SEC AU	11
哈尔滨红肠	10	内蒙古风干牛肉	10

3.2 产细菌素菌株的筛选

3.2.1 初筛

利用对峙培养法从分离得到的 92 株乳酸菌中筛选出 23 株对植物乳杆菌 p12 有抑制效果的菌株。试验过程中发现部分乳酸菌生长比较迅速,形成直径较大菌落,直接测量抑菌圈大小对于筛选结果有一定影响。因此,通过计算抑菌圈直径与乳酸菌菌落直径的比值大小确定抑菌效果。根据试验结果,最终选取比值在 4.9 以上的 6 株菌株进行进一步的复筛试验(表 3)。

表3 抗 p12 优良菌株的初筛结果

Table 3 Source and the number of lactic acid bacteria isolation

菌株编号 Strain number	抑菌直径/mm Inhibitor diameter	菌落直径/mm Colony diameter	比值 Ratio
L-ZS3	11.32	2.28	4.96
L-ZS4	12.16	2.06	5.90
L-ZS9	12.58	2.02	6.23
L-ZS10	10.34	1.78	5.81
L-ZS7	11.28	2.12	5.32
L-ZS8	12.04	2.40	5.02

3.2.2 复筛

将初筛的 6 株菌株于 37 °C 进行液体培养 24 h,离心取其上清液,采用牛津杯双层平板法进行复筛,抑菌效果如图 1 所示。L-ZS3:(11.74±0.31) mm, L-ZS4:(12.12±0.18) mm, L-ZS9:(13.34±0.33) mm, L-ZS10:(12.48±0.20) mm, L-ZS7(11.34±0.06) mm, L-ZS8(12.54±0.22) mm。以 L-ZS9(分离自 SAUCISSON SEC PUR)抑菌效果最好,将其作为后续试验所用菌。

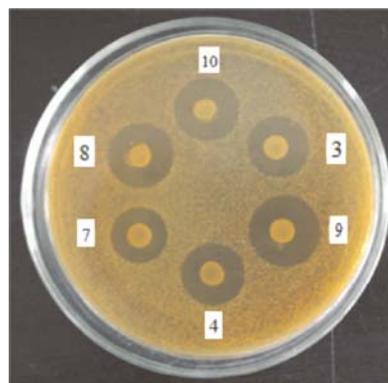


图1 菌株复筛效果图

Fig. 1 Inhibitor zone of antimicrobial lactic acid bacteria

3.2.3 不同处理对 L-ZS9 发酵上清液抑菌活性的影响

对 L-ZS9 菌株所产抑菌物质进行不同处理,排除干扰因素后,其抑菌效果如表 4 所示。

从表中可以看到,菌株 L-ZS9 发酵上清液在中和前后,去除 H₂O₂ 及菌体细胞,其抑菌直径无明显变化,α-淀粉酶处理对其抑菌活性基本无影响,说明 L-ZS9 所产细菌素无糖基化结构,或其活性不依赖于糖基化。而在蛋白酶 K、酸性蛋白酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶和中性蛋白酶处理后,发酵上清液的抑菌活性消失,因而可以确定 L-ZS9 发酵上清液中的抑菌活性物质为蛋白类物质。通过测定不同热处理条件下,发酵上清液的抑菌活性可知,菌株所产抑菌物质为热稳定蛋白,80 °C 处理 30 min 对其抑菌活性基本无影响,121 °C 高温下部分失活,但仍有一定的抑菌效果。硫酸铵通常用于蛋白质的盐析,一般细菌素在 60% 饱和度时即有大部分沉淀。本研究用 70% 饱和度硫酸铵处理 L-ZS9 发酵上清液进行抑菌实验,从结果可以看到上清液抑菌直径明显增大,

表4 不同处理对抑菌活性的影响

Table 4 Inhibitory activity after different treatments

处理 Different treatments	抑菌直径/mm Inhibitor diameter	不同处理 Different treatments	抑菌直径/mm Inhibitor diameter
中和前 Without neutralization	12.48±0.20	中和至 6.0~6.5 Neutralization to 6.0~6.5	10.40±0.26
去除菌体细胞 Eliminating bacteria cells	12.06±0.22	H ₂ O ₂ 酶处理后 Catalase treatment	11.58±0.70
70%硫酸铵沉淀 70% Ammonium sulfate precipitation	19.92±0.08	α-淀粉酶 α-amylase	12.28±0.28
蛋白酶 K 处理 Proteinase K treatment	0	酸性蛋白酶 Acidic protease	0
胃蛋白酶处理 Pepsase treatment	0	胰蛋白酶 Trypsin	0
中性蛋白酶 Neutral protease	0	60 °C 30 min	12.36±0.32
80 °C 30 min	12.08±0.76	100 °C 30 min	8.24±0.18
121 °C 15 min	5.36±0.82		

进一步验证抑菌物质为蛋白类物质,从而确定 L-ZS9 为产细菌素菌株。

3.3 产细菌素菌株的鉴定

菌株 L-ZS9 菌落为微小圆形白色菌落,菌落凸起,全缘,如图 2,革兰氏染色后其在显微镜下为短链式生长的革兰氏阳性菌,细胞呈杆状,无芽孢,如图 3。

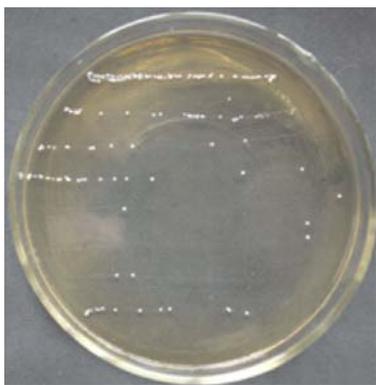


图2 菌株 L-ZS9 菌落形态图

Fig. 2 Morphology characteristic of L-ZS9

糖醇发酵结果与植物乳杆菌各项结果相符,16S rDNA 序列鉴定结果如图 4 所示,菌株 L-ZS9 菌株与类植物乳杆菌同源性达 99%。



图3 菌株 L-ZS9 菌体形态图(10×100)

Fig. 3 Characteristic of L-ZS9 cell

由于植物乳杆菌、类植物乳杆菌及戊糖乳杆菌的相似度较高,本研究通过 *recA* 基因扩增进行种间特异性鉴定。目前已有研究报道,以 *paraF*/*planF*/*penF*/*pREV* 为引物进行多重 PCR 扩增, *L. paraplantarum* 的 PCR 产物为 107 bp, *L. pentosus* 产物为 218 bp, *L. plantarum* 产物为 318 bp。阳性对照组 *L. plantarum* pl2、*L. pentosus* 31-1 电泳条带与预期结果相符,结果如图 5 所示,空白对照未出现条带, L-ZS9 只有以 *paraF*/*pREV* 为引物得到约

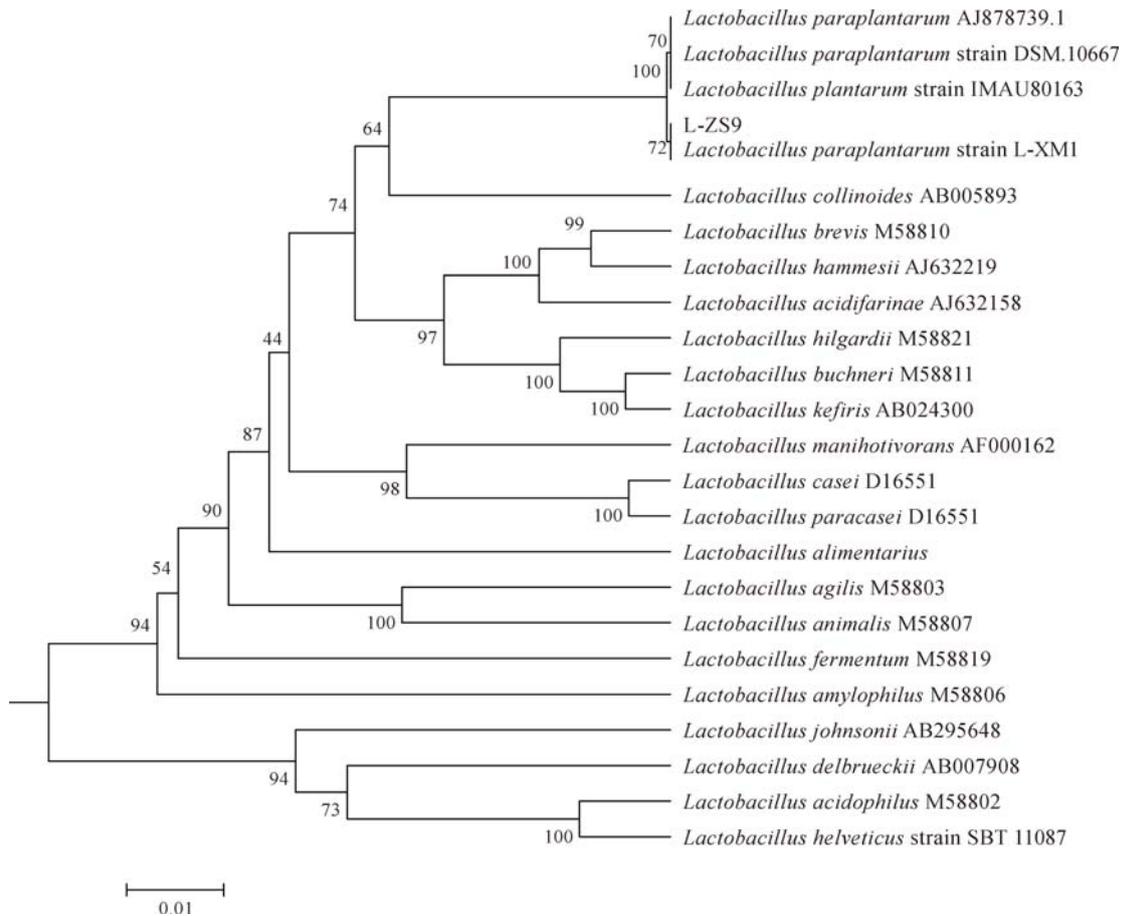


图4 菌株 L-ZS9 16S rDNA 系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequence of strain L-ZS9

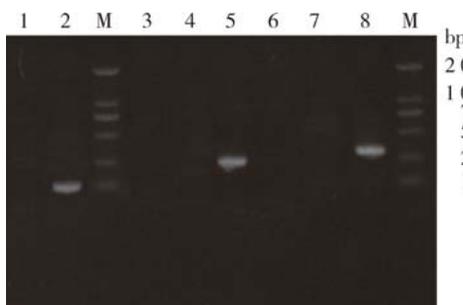


图5 菌株 L-ZS9 *recA* 基因 PCR 产物电泳图

Fig. 5 Agarose gel electrophoresis of the PCR product of *recA* gene

2:以 paraF/pREV 为引物, L-ZS9 *recA* 基因 PCR 产物; 4, 5: 以 penF/pREV 为引物 L-ZS9, 31-1 *recA* 基因 PCR 产物; 7, 8: 以 planF/pREV 为引物 L-ZS9, pl2 *recA* 基因 PCR 产物; M: DL2000 Marker; 1, 3, 6: 阴性对照。

2: L-ZS9 PCR product with paraF/pREV; 4, 5: L-ZS9, 31-1 PCR product with penF/pREV; 7, 8: L-ZS9, pl2 PCR product with planF/pREV; M: DL 2000 Marker; Lane 1, 3, 6: the negative control of PCR.

100 bp 大小的条带, 将 paraF/pREV 为测序引物对菌株进行测序, BLAST 结果表明该产物与 *L. paraplantarum recA* 基因同源性 100%。因此确定目标菌株为类植物乳杆菌, 将其命名为 *L. paraplantarum* L-ZS9。

3.4 L-ZS9 抑菌谱的测定

L-ZS9 细菌素抑菌谱结果见表 5。从表中可以看到, L-ZS9 所产细菌素具有广谱抑菌活性, 除对本研究所用指示菌植物乳杆菌 p12 具有较好的抑制作用外, 对食品中常用病原菌金黄色葡萄球菌、大肠杆菌也具有良好的抑制作用, 因此在开发食品天然防腐剂及发酵剂领域具有较广阔的应用前景。

3.5 L-ZS9 产细菌素种类的确定及细菌素基因簇分析

通过设计并合成 10 对细菌素合成及调控相关基因的特异性引物, 以 L-ZS9 菌体基因组 DNA 为模版进行 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳结果如图 6 所示, 只有以 *plnG-F/R*、*plnH-F/R*、*plnEF-F/R*、

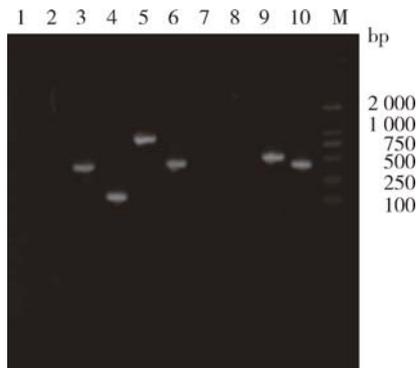
plnJK-F/R 以及 *plnA*-F/R、*plnN*-F/R 为引物的 PCR 产物大小与预期片段长度相同,其余 4 对引物均未得到相应的电泳条带,说明类植物乳杆菌 L-ZS9 基因组 DNA 中含 II b 类双肽细菌素

Plantaricin EF, Plantaricin JK 的编码基因 *plnEF* 和 *plnJK*, II c 类细菌素 Plantaricin A 的编码基因 *plnA*,以及 Plantaricin N 的细菌素编码基因 *plnN*,说明类植物乳杆菌 L-ZS9 是一株能够合成多种细菌

表 5 L-ZS9 所产细菌素抑菌谱

Table 5 Antimicrobial spectrum of bacteriocin produced by L-ZS9

指示菌 Indicators	抑菌直径/mm Inhibitor diameter	指示菌来源 Sources of indicators
<i>L. plantarum</i> ATCC 6538	18.30±0.04	ATCC
<i>L. plantarum</i> 1,577	17.42±0.12	CGMCC
<i>L. plantarum</i> pl2	19.48±0.26	本实验室
<i>L. plantarum</i> B12	15.04±0.10	本实验室
<i>L. bulgaricus</i> S-1	16.18±0.34	本实验室
<i>L. bulgaricus</i> S-2	14.52±0.40	本实验室
<i>L. curvatus</i> L17 120528	12.46±0.38	本实验室
<i>Streptococcus thermophilus</i>	14.70±0.12	本实验室
<i>Streptococcus cremoris</i> AS1,9	13.20±0.28	CGMCC
<i>S. aereu</i> ATCC 6538	10.58±0.16	ATCC
<i>S. aureus</i> 1885 C56005	10.12±0.54	CVCC
<i>Listeria monocytogenes</i> 54002	0	NICPBP
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 3309	0	ATCC
<i>Salmonella</i> 1,1552	0	CGMCC
<i>Bacillus megaterium</i>	9.84±0.16	本实验室
<i>Bacillus subtilis</i>	13.24±0.52	本实验室
<i>E. coli</i> K99 C83529(O141;K99)	10.28±0.24	CVCC
<i>E. coli</i> ATCC 80739	9.46±0.08	ATCC
<i>E. coli</i> 1,90	0	CGMCC



1: *plnI*; 25β; 2: *plnA23*; 3: *plnA*; 4: *plnN*; 5: *plnJK*; 6: *plnEF*; 7: *plnNC8*; 8: *plnW*; 9: *plnH*; 10: *plnG*; M: DL2000 Marker.

图 6 L-ZS9 细菌素合成相关基因 PCR 产物电泳图

Fig. 6 Agarose gel electrophoresis of L-ZS9 bacteriocin related gene PCR product

素的天然菌株。

菌株 L-ZS9 所编码的细菌素中, Plantaricin A 只有单一肽链^[14], 通常作为基因调控的诱导因子, 抑菌特性只是其次要功能, Plantaricin A 抑菌谱范围较窄, 抑菌能力低于 Plantaricin EF、JK 等其他植物乳杆菌素 10~100 倍^[15], 仅具有微弱的抑菌能力, 其抑菌谱范围仍有待进一步研究。此外, 目前人工合成的 Plantaricin N 未表现出抑菌活性, *plnN* 是否为变异的细菌素合成基因, 编码不含前导肽的细菌素前体物质, 以及对细菌素的合成是否具有其他作用仍有待进一步研究^[16]。同时 L-ZS9 所产细菌素对热不敏感, 具有较好的热稳定性, 因而初步推断 L-ZS9 发酵上清液所产生的抑菌效果中, II b 类细菌素 Plantaricin EF 和 Plantaricin JK 起到重要

的作用。将 *plnEF* 和 *plnJK* 的 PCR 产物纯化测序后,将测序结果进行 NCBI 比对。对 *plnEF* 序列进行分析,得到该片段存在 2 条全长为 171 和 159 bp 的开放阅读框序列,进行 BLAST 比对,分别与 *Lactobacillus plantarum* C11 的 *plnE*、*plnF* 的开放阅读框基因同源性分别达 98.84% 和 99.38%,两段基因所编码的成熟肽分别与 plantaricin E 相差一个氨基酸序列,而与 Plantaricin F 氨基酸序列完全相同。对 *plnJK* 序列进行分析,得到该片段存在 2

条全长为 168 和 174 bp 的开放阅读框序列,与 *Lactobacillus plantarum* C11 的 *plnJ*、*plnK* 基因同源性达 97.04% 和 96.00%,所编码的成熟肽分别与 Plantaricin J 仅相差 1 个氨基酸,与 Plantaricin K 序列完全相同。此外,本实验扩增得到了负责细菌素转运和分泌的 ABC-转运蛋白相关基因 *plnG* 和 *plnH*,进一步 PCR 扩增得到了细菌素 *plnEF* 的免疫基因 *plnI*,以及细菌素 *plnJK* 的免疫基因 *plnL*。该结果显示类植物乳杆菌 L-ZS9 是一株能

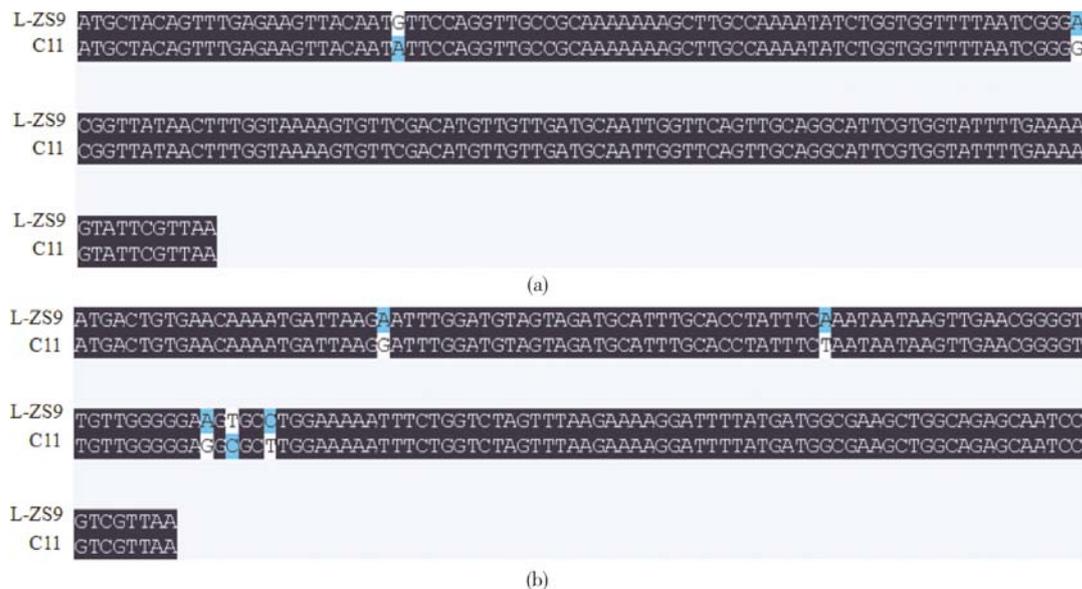


图 7 类植物乳杆菌 *plnE*、*plnJ* 核苷酸序列比对分析 (a) *plnE* 基因; (b) *plnJ* 基因

Fig. 7 *L. paraplantarum* L-ZS9 *plnE* and *plnJ* gene nucleotide sequence alignments

够合成多种细菌素的天然菌株。

4 讨论

本研究从多种国内外发酵肉品中分离筛选到 1 株产细菌素的类植物乳杆菌 L-ZS9。对细菌素编码基因的 PCR 扩增结果显示, L-ZS9 含有 II b 类双肽细菌素 Plantaricin EF, Plantaricin JK, II c 类细菌素 Plantaricin A 以及 Plantaricin N 的基因编码序列,为 1 株天然的多种细菌素产生菌,因而在新型肉品发酵剂的开发及食品防腐领域中具有广阔的应用前景。同时,菌株 L-ZS9 所产生的 II b、II c 类细菌素目前研究和应用较少,且抑菌机理尚未十分明确。在本实验中, II b 类植物乳杆菌素 Plantaricin EF 和 Plantaricin JK 对类植物乳杆菌 L-ZS9 发酵上清液的抑菌效果起到重要作用, II b 类细菌素的抑菌能力依赖于双肽的协同作用^[17],单独的 Plantaricin

E, Plantaricin F, Plantaricin J, Plantaricin K 仅有微弱的抑菌活性,只有 2 条肽链协同作用后其抑菌活性才能明显增强,抑菌能力增大约 1 000 倍^[16],由于本实验中的类植物乳杆菌 L-ZS9 同时含有 *plnE*、*plnF*、*plnJ*、*plnK* 基因,双肽协同发挥抑菌作用,因而所产生的细菌素具有较强的抑菌效果,同时其对食品中常见致病菌金黄色葡萄球菌及大肠杆菌具有较显著的抑菌效果,因而具有良好的应用前景。目前对于 II b 类细菌素对靶细胞的识别机制尚未研究清楚,本实验可通过进一步将 L-ZS9 所产 II b 类细菌素进行分离纯化及高效异源表达,推动 II b 类细菌素作用机制的进一步研究及在食品防腐保鲜领域的广泛应用。

L-ZS9 *plnA* 基因所编码的 Plantaricin A 具有双重作用,除作为 II c 类细菌素外,其主要功能为充当细胞代谢过程中重要的信号分子,目前以

Lactobacillus plantarum C11 的 *plnA* 基因研究最为透彻。Plantaricin A 在水溶液中无固定结构,但当与细胞膜接触后,其 12-21 位(C 末端)氨基酸残基 α -螺旋化,这一结构的改变对其完成信号分子的功能具有重要意义^[18], *Lactobacillus plantarum* C11 中,Plantaricin A 作为信号分子诱导与细菌素合成相关的群体感应调控系统(Quorum Sensing, QS),控制菌株细菌素的合成^[19],且许多产 II 类细菌素的乳酸菌通过信号分子介导 QS 系统,调控其细菌素的合成^[20]。因此,本实验筛选得到的菌株 *Lactobacillus parplantarum* L-ZS9 对下一步研究类植物乳杆菌中 Plantaricin A 的信号分子功能以及 Plantaricin A 抑菌谱范围的确定,细菌素合成过程调控机理的揭示具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Konisky J. Colicine and other bacteriocins with established modes of action[J]. *Annu Rev Microbiol*, 1982, 36: 125-144
- [2] Cleveland J, Thomas J M, Ingolf F N, et al. Bacteriocin: Safe, natural antimicrobials for food preservation [J]. *Inter Food Microbiol*, 2001, 71(1): 1-20
- [3] Martinez B, Rodriguez A. Antimicrobial susceptibility of Nisin resistant *Listeria monococcy* to genes of dairy origin[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2005, 66(5): 6-10
- [4] 丁燕, 杜金华. 乳酸链球菌素(Nisin)的特性及其在啤酒工业中的应用[J]. *酿酒*, 2002, 29(1): 41-44
- [5] 刘国荣, 周康, 李平兰. 传统干酪中一株产 II 类细菌素乳酸菌的分离与鉴定[J]. *食品科学*, 2007, 28(5): 185-190
- [6] Garneau S, Martin N I, Vederas J C. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria[J]. *Biochimie*, 2002, 84(5/6): 577-592
- [7] Klaenhammer T R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria[J]. *FEMS Microbiol Rev*, 1993, 12(1/2/3): 39-85
- [8] Zhang J, Liu G, Li P, et al. Pentocin 31-1, a novel meat-borne bacteriocin and its application as biopreservative in chill-stored tray-packaged pork meat [J]. *Food Control*, 2009, 21(2): 198-202
- [9] Liu G, Griffiths M W, Shang N, et al. Applicability of bacteriocinogenic *Lactobacillus pentosus* 31-1 as a novel functional starter culture or coculture for fermented sausage manufacture[J]. *J Food Prot*, 2010, 73: 292-298
- [10] 吕燕妮. 戊糖乳杆菌 31-1 菌株产细菌素研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2004
- [11] 张金兰. 戊糖乳杆菌素的纯化鉴定及对托盘包装冷却肉的防腐保鲜效果研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2009
- [12] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 289-294
- [13] Torriani S, Felis G E, Dellaglio F. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(8): 3450-3454
- [14] Nissen-Meyer J, Larsen A G, Sletten K, et al. Purification and characterization of plantaricin A, a *Lactobacillus plantarum* bacteriocin whose activity depends on the action of two peptides[J]. *J Gen Microbiol*, 1993, 139: 1973-1978
- [15] Hauge H H, Mantzilas D, Moll G N, et al. Plantaricin A is an amphiphilic alpha-helical bacteriocin-like pheromone which exerts antimicrobial and pheromone activities through different mechanisms[J]. *Biochemistry*, 1998, 37: 16026-16032
- [16] Anderssen E L, Diep D B, Nes I F, et al. Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: Two new two-peptide bacteriocins, plantaricins EF and JK, and the induction factor plantaricin A[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64: 2269-2272
- [17] Nissen-Meyer J, Rogne P, Opegard C, et al. Structure-function relationships of the non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by Gram-positive bacteria[J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2009, 10: 19-37
- [18] Kristiansen P E, Fimland G, Mantzilas D, et al. Structure and mode of action of the membrane-permeabilizing antimicrobial peptide pheromone plantaricin A[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280: 22945-22950
- [19] Diep D B, Johnsborg O, Risøen P A, et al. Evidence for dual functionality of the operon *plnABCD* in the regulation of bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* [J]. *Mol Microbiol*, 2001, 41: 633-644
- [20] 张香美, 李平兰. 产 II 类细菌素乳酸菌群体感应及其应用[J]. *微生物学报*, 2011, 51(9): 1152-1157

责任编辑: 袁文业