

产细菌素嗜盐四联球菌的筛选及鉴定

王琳琳¹, 邹远军¹, 项松涛², 张云玲¹, 郑一敏¹, 胥秀英¹

(1. 重庆理工大学药学与生物工程学院, 四川重庆 400054) (2. 西南大学药学院, 四川重庆 400715)

摘要: 从传统露天酿造工艺的酱油中分离出 12 株乳球菌, 对其进行形态、生理生化特性研究及 16S rDNA 序列分析, 鉴定为嗜盐四联球菌。在排除酸作用后, WZ-3 菌株发酵液对革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌具有较好的抑菌活性, 经胃蛋白酶、胰蛋白酶处理后, 发酵液抑菌活性略有下降。因此初步认为该菌株为产细菌素的嗜盐四联球菌。

关键词: 嗜盐四联球菌; 16S rDNA; 鉴定; 细菌素

文章编号: 1673-9078(2013)5-982-985

Identification and Screening of Bacteriocin-producing *Tetragenococcus halophilus*

WANG Lin-lin¹, ZOU Yuan-jun¹, XIANG Song-tao², ZHANG Yun-ling¹, ZHENG Yi-min¹, XU Xiu-ying¹

(1. School of Pharmacy and Bioengineering, Chongqing University of Technology, Chongqing 400054, China)

(2. College of Pharmaceutical sciences, Southwest university, Chongqing 400715, China)

Abstract: Twelve strains lactococcus was isolated from the traditional Chinese soy. the physiological and biochemical characteristics and the 16SrDNA sequence of the screened strain were then analyzed, based on which the strain was identified as *Tetragenococcus halophilus*. The supernatant of WZ-3 strain eliminate the organic acids exhibited strong antibacterial activity against the gram-positive and gram-negative bacteria. The antibacterial activity decreased slightly after treatment with pepsin and trypsin, therefore, we think the strain was a bacteriocin-producing *Tetragenococcus halophilus*.

Key words: *Tetragenococcus halophilus*; 16S rDNA; identification; bacteriocin

嗜盐四联球菌(*Tetragenococcus halophilus*)属于乳酸菌科中四联球菌属, 以前被归类为嗜盐片球菌属, 现在已单列为四联球菌属(*Tetragenococcus*)^[1], 广泛存在于盐渍的产品中, 如凤尾鱼腌渍品^[2]、日本酱油^[1,3-5]、印度尼西亚酱油^[6]等。而盐水四联球菌(*Tetragenococcus muriaticus*)作为四联球菌属的新种, 从日本传统的发酵鱼酱油中分离到^[7]。

乳酸菌是促成酱油风味物质形成的重要微生物。自然发酵酱油中的乳酸菌主要有 2 大类群嗜盐(halophilic)和非嗜盐(non-halophilic)乳酸菌。嗜盐类群中主要是嗜盐四联球菌(*Tetragenococcus halophilus*), 而非嗜盐乳酸菌主要是肠球菌属(*Enterococcus sp.*)、乳杆菌属(*Lactobacillus sp.*)和片球菌属(*Pediococcus sp.*)等的某些种^[8]。

中国在盐渍产品上有悠久历史, 但在国内很少发

现从中国传统盐渍产品中分离筛选嗜盐四联球菌并分析其特性的研究, 国内几大菌种保藏中心如中国工业微生物菌种保藏中心(CICC)、中国普通微生物菌种保藏中心(CGMCC)等目前为止都未见到耐盐度高于 18% 的乳酸菌, 目前使用较多的耐盐乳酸菌是沪酿 108 植物乳杆菌, 其耐盐度最高也仅能达到 10%^[9]。在日本等国家已经将这种嗜盐性乳酸菌用于豆酱和酱油的工业生产^[10]。

本研究从传统露天酿造工艺的酱油中分离出了嗜盐乳球菌, 采用传统分类方法如形态、生理生化特性对其进行了初步研究, 通过 16S rDNA 序列分析鉴定以确定其是否为嗜盐四联球菌, 目前为止, 由乳酸菌所产生的细菌素大概有 40 余种, 但是由嗜盐四联球菌所产生的细菌素到国内还没有发现, 本课题就是在发现此空缺的前提下筛选产细菌素的嗜盐四联球菌, 为以后开发新型的天然食品防腐剂提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料

收稿日期: 2012-12-06

基金项目: 国家重大新药创制专项-“治疗幽门螺旋杆菌消化性溃疡 I 类新药研制”(2010ZX09401-306-2-23)

通讯作者: 郑一敏(1963-), 男, 教授, 主要从事天然药物物质基础与新药评价研究

酱油（全国不同地方的传统酿造工艺的酱油）供试菌：大肠杆菌、金黄色葡萄球菌。

1.1.2 培养基

基础培养基（MRS）：蛋白胨 1%，牛肉膏 1%，酵母提取物 0.5%， K_2HPO_4 0.2%，柠檬酸三钠 0.5%，乙酸钠 0.5%，葡萄糖 2%， K_2HPO_4 0.2%，吐温-80 0.1%， $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.058%， $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.025%加水定容至 1000 mL，pH=7.0。搅拌均匀后 121 °C 灭菌 15 min。

分离培养基（12% NaCl+ MRS琼脂培养基）：在 1000 mL基础培养基（MRS）中添加NaCl 120 g，加入 10% 琼脂粉搅拌均匀后加热，于 121 °C 灭菌 15 min。

1.1.3 仪器

SPX-150B-Z型数显培养箱，上海博讯实业有限公司医疗设备厂；SP-DJ系列水平净化工作台，上海浦东物理光学仪器制造厂；XSZ-G光学生物显微镜；HI650高速台式离心机，长沙湘仪离心机仪器有限公司；GL-21M高速冷冻离心机，长沙湘仪离心机仪器有限公司；BCD-649WADV型电冰箱，青岛海尔股份有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 嗜盐乳酸菌的分离与纯化

样品处理：取样品 25 g，加入 225 mL 0.85% 无菌生理盐水，浸泡 15 min 后摇匀。然后取 1 mL 溶液注入装有 9 mL 无菌生理盐水的试管中，在无菌条件下从 10^{-1} 逐次稀释到 10^{-6} ，备用。取稀释度为 $10^{-1} \sim 10^{-6}$ 的样品液 1 mL 倾注于平皿中，待分离培养基冷却至不烫手时，倒入平皿与菌悬液混匀，冷却后在 30 °C 培养 2~4 d，挑取不同外观的菌落进行镜检，针对镜检为球菌的菌落进行菌种保藏。为下一步筛选产细菌素的嗜盐四联球菌做准备。

1.2.2 嗜盐乳酸菌属的鉴定

嗜盐乳酸菌属的鉴定参见文献^[1]。

1.2.3 产细菌素的嗜盐乳酸菌筛选

不同培养时间各菌株抑菌活性的变化：将纯化后得到的嗜盐菌株分别接种于含 7% NaCl 的 MRS 液体培养基中 30 °C 培养 36 h。待有丰富菌体长出后按 5% 的接种量接种于 10% NaCl MRS 液体培养基中，分别培养 12 h、24 h、36 h 和 48 h 后在排除有机酸的影响的前提下测定发酵液的抑菌活性。对具有较强抑菌活性的菌株进行耐盐性比较。每株菌做 2 个重复。初选菌株的耐盐性试验：将筛选得到的具有较强抑菌活性的菌株再按 5% 的接种量接种于含 25% NaCl、初始 pH=7.0 的 MRS 液体培养基中，30 °C 培养 36 h、48 h 和 60 h，然后测定发酵液抑菌活性。筛选出抑菌活性最强的菌株作为优选发酵用菌株。针对优选发酵菌株，

应用蛋白酶（胃蛋白酶、胰蛋白酶）水解试验，测定优选菌株发酵所产活性成分是否为细菌素。每株菌做 2 个重复。

1.2.4 优选菌株种的鉴定

依据《伯杰氏细菌鉴定手册》第九版中有关嗜盐乳酸菌的描述进行鉴定。

2 实验结果

2.1 嗜盐乳酸菌的分离

嗜盐乳酸菌分离的原理是：嗜盐乳酸菌可以在高盐的培养基上生长，而非嗜盐乳酸菌不能生长或者生长不好。在 12% NaCl+MRS 琼脂培养基中，12% NaCl 对非嗜盐乳酸菌及其他杂菌具有抑制作用，而较高的初始 pH 对乳杆菌和片球菌具有抑制作用。采用平板分离法分离菌株，并对分离得到的菌株进行多次纯化，总共得到 12 株嗜盐乳酸菌，编号为 WZ-1~12。

2.2 嗜盐乳酸菌属的鉴定

对所有分离得到的 12 株嗜盐乳酸菌进行了属的鉴定。鉴定结果为所有菌株在固体培养基上菌落呈灰白色、湿润凸起无光泽；显微镜下观察为二联、四联球菌，无单生细胞，不形成链状；革兰氏染色阳性，不运动，不形成芽孢；兼性厌氧，同型发酵，利用葡萄糖产酸；接触酶和氧化酶阴性；不水解精氨酸、不还原硝酸盐。生长需要 NaCl，可在 18% NaCl 培养基中生长，也可以耐 20~26% 的 NaCl；可利用 D-核糖、果糖、海藻糖产酸，不能利用 D-木糖、乳糖、山梨醇、糊精和淀粉产酸。根据试验结果可以确定分离得到的 12 株嗜盐乳酸菌均为四联球菌属乳酸菌。

2.3 产细菌素的四联球菌筛选

2.3.1 不同培养时间各菌株抑菌活性的变化

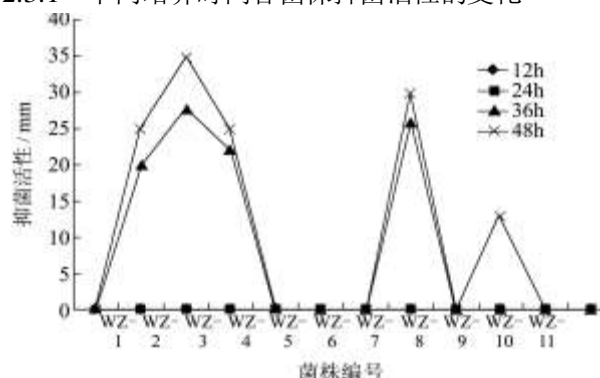


图 1 不同培养时间各菌株抑菌活性的变化

Fig.1 Changes of antibacterial activity for each strain at different cultivation time

注：抑菌活性测定方法：打孔法；供试菌：革兰氏阳性细菌（金黄色葡萄球菌），革兰氏阴性细菌（大肠杆菌）。

由图 1 可以看出，筛选出的 12 株耐盐菌中，除去

酸作用后, 具有抑菌活性的菌株仅有 5 株, 且 5 株中 WZ-3 的抑菌活性最强。

2.3.2 初选菌株耐盐性比较

初选菌株在高盐 (25% NaCl 的 MRS 培养基) 中生长特性发生了显著的变化。所有菌株达到产细菌素的时间都相对延后, 活性也大大降低。

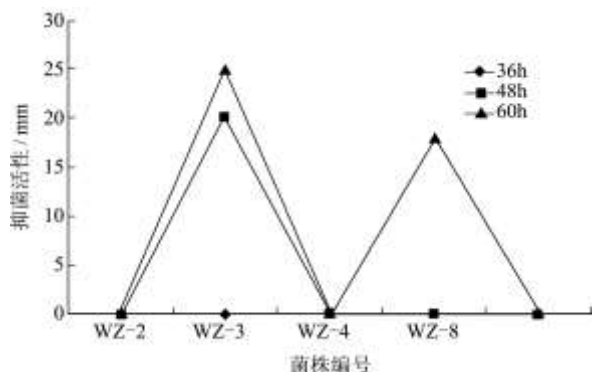


图 2 菌株耐盐性比较

Fig.2 The comparison of salt resistance for each strain

由图 2 可以看出: 四株产细菌素的耐盐菌株中仅 2 株在高盐环境下可以生长并产生细菌素, 且细菌素的活性明显弱于低盐环境, 表明高盐对菌株的生长以及产活性成分具有一定的抑制作用。

2.3.3 WZ-3 抑菌活性成分的初步研究

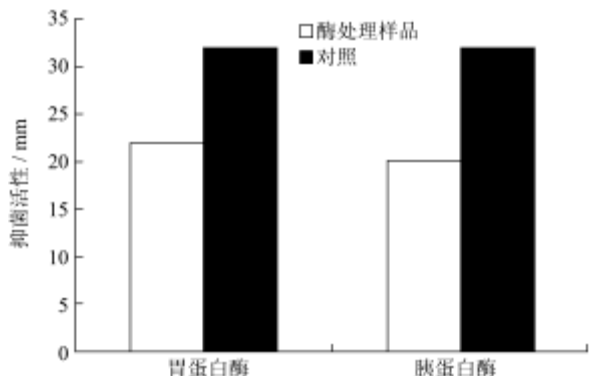


图 3 酶处理后 WZ-3 发酵液活性

Fig.3 The activity of WZ-3 treated with enzyme

WZ-3 在排除酸作用后, 依然具有较强的抑菌活性, 为了证明 WZ-3 所产活性成分为细菌素, 本文用胃蛋白酶和胰蛋白酶对 WZ-3 的发酵液进行处理, 取 WZ-3 发酵液 5 mL, 分别加入胃蛋白酶和胰蛋白酶, 使酶的终浓度为 1 mg/mL, 再在各个酶的最适温度 (37 °C) 和最适 pH (胃蛋白酶 2.5, 胰蛋白酶 7.5~8.0) 对样品进行 3 h 的处理, 处理后的样品经高温煮沸 5 min, 使酶失活。以未加酶的样品经同样的方法处理后作对照, 测抑菌活性。(平板扩散法) 结果见图 3。由图 3 可以看出: WZ-3 发酵液经胃蛋白酶、胰蛋白酶处理后, 活性有所降低, 由此可知, WZ-3 菌株所产活性成分为细菌素。

2.4 优选嗜盐乳酸菌菌株 WZ-3 种的鉴定

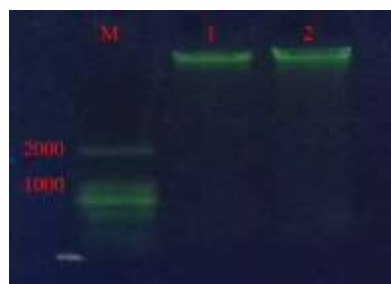


图 4 WZ-3 基因组 DNA 电泳图

Fig.4 Electrophoretogram of DNA of WZ-3

注: M-DNA Marker DL2000; 1 和 2-WZ-3 基因组 DNA。

用 16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit (D310, Takara) 对提取所得 WZ-3 基因组 DNA 进行 16S rDNA 的 PCR 反应, PCR 反应后产物使用 Takara MiniBEST DNA Fragment Purification Kit Ver.3.0 (DV822A, TaKaRa) 回收, 1% 琼脂糖电泳结果显示单一条带 (见图 5)



图 5 16S rDNA PCR 扩增后电泳图

Fig.5 Electrophoretogram of PCR amplification of 16S rDNA

注: M-DNA Marker DL2000; 1-PCR 扩增产物; 2-PCR 回收产物; 3-阳性对照; 4-阴性对照。

WZ-3 菌株的 16SrDNA 序列(大小为 511 bp):

```
CATGCAAGTCGAACGCTGCTTAAGAAGAACTT
CGGTTTTTCTTAAGCGGAGTGGCGGACGGGTG
AGTAACACGTGGGAACCTATCCATCAGCGGGG
GATAACACTTGGAACAGGTGCTAATACCGCATA
TGGCTTTTTTTCACCTGAAAGAAAGCTCAAAGG
CGCTTACAGCGTCACTGATGGCTGGTCCCGCG
GTGCATTAGCCAGTTGGTGAGGTAACGGCTCAC
CAAAGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGT
GATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCA
GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC
GGCAATGGACGCAAGTCTGACCGAGCAACGCC
GCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGC
TCTGTTGTCAGCAAAGAACAGGAGAAAGAGGC
AATGCTTTTTCTATGACGGTAGCTGACCAGAAAG
CCACGGCTAACTACGTGCCAGCCGCCGCGGTAA
```

TTCGTCGTGACTGGGAA

与 Genbank 数据比较发现其与嗜盐四联球菌 (*Tetragenococcus halophilus*) 的相似度为 99%。

3 结论

从自然发酵而成的酱油中分离得到的 12 株嗜盐菌株, 经过初步鉴定均为四联球菌属乳酸菌。通过对分离纯化得到的菌株不同时间内抑制革兰氏阳性和阴性细菌的能力以及耐盐性进行了比较, 从 12 株嗜盐乳酸菌中筛选出 1 株产活性成分能力强, 并在 25% NaCl 的高盐培养基中仍具有良好生长性能的菌株 WZ-3, 经过对 WZ-3 菌株的进一步生理生化鉴定以及 16 Sr DNA 序列的测定, 确定该菌株为嗜盐四联球菌。且所产活性成分为细菌素, 这就为以后进一步研究细菌素的结构以及应用提供了理论依据。

参考文献

- [1] Kobayashi T, Kimura B, Fujii T. Differentiation of *Tetragenococcus* populations occurring in products and manufacturing processes of puffer fish ovaries fermented with rice-bran [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2000, 56(2/3): 211-218
- [2] M arcelo V, Aida P de RuiHolgado, Jorge J Sanchez, et al. Isolation and characterization of *Pediococcus halophilus* from salted Anchovies (*Engraulis anchoita*) [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1985, 49(3): 664-666
- [3] H e rve Robet, C la ire Lemarrec, C arloso B lanco, et al. G lycine betaine, carmitine, and cho line enhance salinity tolerance and prevent the accumulation of sodium to a level inhibiting growth of *tetragenococcus halophila* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66 (2): 509-517
- [4] Fum io Noda, Ka zuya H aysh, i Take jūM izunum a. An tagonism between osmophilic lactic acid bacteria and yeasts in brine fermentation of soysauce [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1980, 40(3): 452-457
- [5] Chiyuki Kanbe, Kinji Uchida. Citrate metabolism by *Pediococcus halophilus* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1987, 53(6): 1257-1262
- [6] Roling W, H M van Verseveld. Characterization of *Tetragenococcus halophila* populations in Indonesian soy mash (kecap) fermentation [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(4): 1203-1207
- [7] Satom iM, K im ura B, M izoiM. *Tetragenococcus muriaticus* sp. nov., a new moderately halophilic lactic acid bacterium solated from fermented squid liver sauce [J]. *Int J Syst Bacteriol*, 1997, 47(3): 832-836
- [8] ONDA T, YANAGIDAI, UCHIMURA T, et al. Analysis of lactic acid bacterial flora during Miso fermentation [J]. *Food Sci Technol Res*, 2003, 9(1): 17-24
- [9] MONGKOLWAI H. Technology transfer for small and medium soy sauce fermentation factories in Thailand: a consortium approach [J]. *Food Res Int*, 1997, 30(8): 555-563
- [10] 杨汝德, 潘力, 郭迪. 耐高渗透压乳酸菌在酱油酿造中的应用研究 [J]. *现代食品科技*, 2005, 4: 37-40
- [11] 凌代文, 东秀珠. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999