

对单增李斯特菌有抑制作用的乳酸菌的筛选鉴定及其细菌素的研究

朱传胜, 高玉荣, 徐国栋

(黑龙江八一农垦大学食品学院, 黑龙江大庆 163319)

摘要: 本文采用双层平板法从中国东北地区发酵酸黄瓜中进行产抑制单核增生李斯特氏菌细菌素的乳酸菌的筛选和鉴定, 对其产生的细菌素进行了分离纯化、分子量测定及稳定性研究。在排除有机酸和过氧化氢的影响后, 从东北发酵酸黄瓜中筛选到一株对单核增生李斯特氏菌仍有抑制作用的乳酸菌 ZLG85, 酶解实验发现该抑菌物质可完全被胃蛋白酶、胰蛋白酶和中性蛋白酶降解, 确定该抑菌物质为细菌素。经形态和生理生化实验初步鉴定该菌株为明串珠菌属; 16S rDNA 序列同源性分析将乳酸菌 ZLG85 鉴定为肠膜明串珠菌肠膜亚种。理化分析表明该细菌素的热稳定性很强, 121 °C 处理 30 min 后相对抗菌活性仍为 93.77%, pH 值在 2.0~10.0 范围内处理 4 h 后相对抗菌活性在 80% 以上。N-羟甲基甲基甘氨酸-SDS-PAGE 电泳确定肠膜明串珠菌素 ZLG85 的分子质量约为 2.5 kDa。因此, 肠膜明串珠菌素 ZLG85 是一种稳定性强的新型抗李斯特氏菌的乳酸菌细菌素。

关键词: 肠膜明串珠菌素; 菌种鉴定; 生物稳定性; 分子量

文章编号: 1673-9078(2014)5-87-91

Screening of *Lactic acid bacteria* for Production of Anti-*Listeria* Bacteriocin

ZHU Chuan-sheng, GAO Yu-rong, XU Guo-dong

(College of Food Science, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China)

Abstract: By double agar diffusion methods, the strain producing bacteriocin with inhibitory activity against *Listeria monocytogenes* was screened and identified from Chinese northeast fermented cucumber. And the bacteriocin was separated and purified and its molecular mass and stability were researched. After eliminating the effects of organic acids and hydrogen peroxide, the strain of *Lactobacillus* spp. ZLG85 which still had activity against *Listeria monocytogenes* was screened. The inhibitory activity was degraded sharply by pepsin, trypsin and neutral protease in enzymatic hydrolysis, which was confirmed that ZLG85 can produce bacteriocin. By appearance detection, physiological and biochemical characteristics analysis and 16S rDNA gene sequence homology analysis, ZLG85 was identified as *Leuconstoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*. Physical and chemical analysis showed that the mesentericin ZLG85 was heat-stable. Its relative inhibitory activity was 93.77% after incubation at 121 °C for 30 min, and above 80% after incubation 4 h within a wide pH range from 2.0 to 10.0. The molecular weight of mesentericin ZLG85 was 2.5 kDa conformed by tricine-SDS-PAGE electrophoresis. Mesentericin ZLG85 is a new kind of bacteriocin with strong stability against *Listeria monocytogenes*.

Key words: mesentericin; identification; biological stability; molecular weight

乳酸菌细菌素 (Bacteriocins) 是由乳酸乳球菌属、乳酸菌属、乳酸片球菌属、肉食杆菌属、明串珠菌属、肠球菌属和链球菌属等代谢产生的一种活性物质。1976 年, Tagg 等人将细菌素定义为具有抑制近缘菌株生长功能的蛋白质化合物。对乳酸菌细菌素后续的研究发现其抑菌物质还能抑制革兰氏阴性菌的生长, 因此, 细菌素被重新定义为由核糖体合成的具有

收稿日期: 2013-12-18

基金项目: 黑龙江省高校动物医学重点实验室开放课题 (AMKL2012010)

作者简介: 朱传胜 (1988-), 男, 在读硕士研究生, 研究方向为食品微生物

通讯作者: 高玉荣 (1970-), 女, 博士, 教授, 研究方向为食品微生物与发酵工程

广谱抗菌性质的天然多肽^[1]。其中, 尤以被公认为安全并已在全世界广泛使用的乳酸链球菌素 (nisin) 在乳制品及罐头制品中得到了广泛的应用。Orberg 等在 1984 年报道了三株肠膜明串珠菌葡聚糖亚种和两株未知明串珠菌产生的细菌素。这些细菌素可以抑制一些乳酸菌的生长, 这成为明串珠菌产细菌素的较早报道^[2]。随着研究的进一步深入, 已有越来越多的关于明串珠菌产细菌素的报道。

单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) 是一种嗜冷微生物, 能在 1~45 °C 的范围内和低 pH 条件下生长, 且高耐盐, 广泛存在于各类肉制品和速煮食品中, 在欧美、东南亚以及我国, 由其导致的食物

中毒时有发生^[3]。食入被李斯特菌污染的食品后,健康成人个体出现轻微类似流感症状;孕妇、婴儿和免疫力低下的人群食入被李斯特菌侵染的食品将导致呕吐、出血性皮肤病、自然流产、脑膜炎、败血症直至死亡,且致死率高达27%~34%^[4]。因此控制*L.monocytogenes*的生长是食品加工中较为棘手的一个问题。目前筛选得到的对*L.monocytogenes*有抑制作用的乳酸菌细菌素有乳杆菌素sakacin、明串珠菌素以及乳酸片球菌素等。

发酵食品中含有各种乳酸菌,国内外很多学者从发酵食品中筛选了产细菌素的乳酸菌^[5-8]。本实验以发酵酸黄瓜为原料,进行产抑单增李斯特氏菌细菌素的乳酸菌的筛选鉴定及其细菌素的初步研究,为天然食品防腐剂的开发奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 指示菌

指示菌菌株:单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*),黑龙江八一农垦大学食品学院4033实验室保藏菌种。

1.1.2 培养基

MRS液体培养基(g/L):鱼肉蛋白胨10,酵母浸粉5,牛肉膏10,葡萄糖20,柠檬酸铵2,三水乙酸钠5,磷酸氢二钾2,结晶硫酸镁0.58,硫酸锰0.25,吐温-80 1 mL,碳酸钙(粉)10,蒸馏水1 L, pH 6.5, 121 °C湿热灭菌20 min。固体培养基则在此基础上加入2%的琼脂。

单核细胞增生李斯特氏菌培养基(g/L):鱼肉蛋白胨20,酵母浸粉6,氯化钠5,磷酸氢二钾2.5,葡萄糖2.5,蒸馏水1 L, pH值6.5, 121 °C湿热灭菌20 min。半固体/固体培养基则在此基础上加入0.75%/2%的琼脂。

1.2 方法

1.2.1 发酵酸黄瓜中乳酸菌的分离

吸取1 mL发酵酸黄瓜汁,用无菌生理盐水进行梯度稀释,选取适当浓度涂布到MRS固体培养基上,30 °C恒温培养箱培养,挑选有透明溶钙圈的菌落多次纯化,之后转接单菌落于斜面。

1.2.2 抑单增李斯特氏菌乳酸菌的初筛

将1.2.1中筛选得到的乳酸菌活化后,以2%接种量接种于MRS液体培养基中,30 °C恒温培养箱培养,挑选有透明溶钙圈的菌落多次纯化,之后转接单菌落

于斜面。

恒温培养箱培养静置48 h后,4000 r/min离心20 min去菌体,收集上清液,用4 mol/L的NaOH调节pH值至6.0,以排除有机酸的干扰^[9],采用双层琼脂扩散法以单核细胞增生李斯特氏菌为指示菌做抑菌试验^[10]。选取产生明显抑菌圈的菌株做下一步的复筛实验。

1.2.3 产细菌素乳酸菌的复筛

分别用过氧化氢酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶和中性蛋白酶在各自作用的最适pH值下处理发酵上清液,使各酶的质量浓度终为5 mg/mL,37 °C水浴4 h后,再将pH值调回6.0,用20 mmol/mL PBS缓冲液将体积补至同一体积,以不加酶处理的发酵上清液做为对照,采用双层琼脂扩散法,测定发酵上清液对单增李斯特氏菌的抑菌活性的影响。

1.2.4 形态学及生理生化试验

根据分离菌的菌落和菌体形态特征,革兰氏染色特征以及生理生化反应结果,参照凌代文等人的《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》进行初步鉴定^[11]。

1.2.5 产细菌素乳酸菌的16S rDNA序列同源性分析鉴定

乳酸菌基因组DNA的提取使用大连宝生物有限公司的细菌基因组提取试剂盒。PCR扩增的引物分别为上游引物(5'-GAGCGGATAACAATTTTCACACAGG-3'),下游引物(5'-CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC-3')。PCR反应体系(50 μL):DNA模板1 μL,PCR Premin 25 μL,上下游引物各0.5 μL,16S-free H₂O 37 μL。PCR扩增条件:94 °C预变性5 min,94 °C变性1 min,55 °C退火1 min,72 °C延伸1.5 min,共30个循环,最后72 °C延伸5 min。PCR纯化产物送大连宝生物工程有限公司纯化测序。得到的PCR产物序列在GenBank中利用BLAST与已知细菌的16SrDNA序列进行比较鉴定,寻找与目的基因序列同源性最高的已知分类地位的菌种。然后从GenBank数据库中提取已知的标准菌株的16S rDNA基因序列,与测定菌株的16S rDNA序列共同用DNA star软件以ClustalW进行校准排齐,利用PAUP 4.0软件构建系统进化树。

1.2.6 热稳定、酸碱稳定性实验

将发酵上清液调pH值至6.0,分别做如下处理:60、70、80、90、100 °C下分别处理30 min和60 min,121 °C处理30 min后,以未处理的发酵上清液作为空白对照,测定发酵上清液对单增李斯特氏菌的抗菌活性^[12]。

将1 mL发酵上清液用4 mol/L HCl和NaOH分别

调整至 pH 值 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0, 作用 12 h 后调回 6.0, 用 PBS 缓冲液补至最大体积, 以补至相同体积的发酵上清液作为空白对照, 测定 pH 值对细菌素抗菌活性的影响。

1.2.7 Tricine-SDS-PAGE 电泳确定细菌素的分子质量

采用冷乙醇沉淀的方法初步提取发酵上清液中的细菌素。采用 Sephadex G-25 凝胶层析柱中度纯化粗提细菌素。蛋白电泳采用双层胶, 胶浓度(质量分数)分别为浓缩胶 16.5%, 分离胶 16.5%。电泳过程中温度保持在 4 °C 左右。电泳结束后, 将胶切成两半, 带有 Marker 的一半胶染色脱色, 另一半用无菌蒸馏水漂洗 1 h 后, 小心地铺在接有单核细胞增生李斯特菌的固体培养基上, 4 °C 扩散 4 h 后, 37 °C 培养 12 h 与染色的半块胶对比, 确定其分子质量^[13]。

1.2.8 数据统计分析方法

采用 Excel 2003 进行数据处理, 所有实验重复三次, 结果采用平均值±百分比形式表示。

2 结果与讨论

2.1 酸黄瓜中乳酸菌的分离

采用微生物学方法, 从酸黄瓜中分离乳酸菌共 200 株, 形态学观察其中包括乳球菌 132 株, 乳杆菌 68 株。

2.2 抑菌乳酸菌的初筛

采用双层琼脂扩散法, 从 200 株乳酸菌中筛选出 6 株对单核细胞增生李斯特氏菌抑菌效果较好的菌株。六株菌的抑菌圈直径见表 1。

表 1 初筛结果

Table 1 Results of preliminary screening

菌株编号	抑菌圈直径/mm
ZLG3	14.84±0.57
ZLG5	13.58±0.42
ZLG16	16.58±0.68
ZLG85	19.12±0.84
ZLG93	13.96±0.77
ZLG94	17.26±0.38

注: 抑菌圈直径包含牛津杯孔径 8±0.02 mm。

由表 1 可知, 6 株菌中 ZLG85 对单核细胞增生李斯特氏菌的抑菌效果最好, 后续实验将以乳酸菌 ZLG85 为研究对象。

2.3 产细菌素乳酸菌的复筛

表 2 菌株 ZLG85 抑菌物质对蛋白酶的敏感性

Table 2 The sensitivity of anti-bacterial substance of strain

ZLG85 to enzymes	
酶/(mg/mL)	残留活性/%
发酵上清液(对照)	100
过氧化氢酶处理	98.64
胃蛋白酶处理	0
胰蛋白酶处理	0
中性蛋白酶处理	0

由表 2 可见, 编号为 ZLG85 的菌株发酵上清液用胃蛋白酶、胰蛋白酶和中性蛋白酶处理后抑菌圈完全消失, 表明发酵上清液中含有的这种抑菌物质可以被人体内的蛋白酶所降解, 不会在人体内残留。而用过氧化氢酶处理的发酵上清液和未做处理上清液的抑菌圈大小基本一致, 为 18.86 mm, 表明发酵上清液中存在的抑菌物质是细菌素, 而非过氧化氢。

2.4 形态及生理生化特性

2.4.1 ZLG85 形态观察



图 1 ZLG85 的菌落形态

Fig.1 The colonial morphology of ZLG85



图 2 ZLG85 放大 1000 倍的菌体形态

Fig.2 The cell morphology of ZLG85 magnified 1000 times

由图 1 可以看出, ZLG85 菌落形态为突起状, 圆形, 表面光滑, 边缘整齐, 灰白色, 半透明, 菌落较小。

由图 2 可以看出, 革兰氏染色后油镜观察 ZLG85 菌体形态为革兰氏阳性并且呈球状, 成链状。

2.4.2 ZLG85 的生理生化特性

生理生化实验结果见表 3。

综合以上形态学及生理生化特性, 对照《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》初步将 ZLG85 菌株鉴定为明串珠菌属 (*Leuconostoc*)。

表3 菌株生理生化实验结果

Table 3 Result of physiological and biochemistry experiments

实验指标	结果	实验指标	结果	实验指标	结果	实验指标	结果
接触酶	-	葡萄糖	+	果酒	-	麦芽糖	+
淀粉水解	+	七叶苷	+	石蕊牛奶	-	甘露糖	+
明胶液化	-	V-P 试验	-	硫化氢	-	蔗糖	+
精氨酸产氨	+	果糖	+	半乳糖	+	葡聚糖	+
棉籽糖	+	核糖	+	水杨苷	+	海藻糖	+
纤维二糖	+	葡萄糖酸	-	乳糖	+	蜜二糖	+
马尿酸盐	-	木糖	+	阿拉伯糖	+	甘露醇	+

2.5 ZLG85 的 16S rDNA 序列同源性分析鉴定

结果

以菌株 ZLG85 的 DNA 为模板, 采用 16SrDNA 引物进行 PCR 扩增, 得到约 1500 bp 的特异性扩增产物, 见图 3。

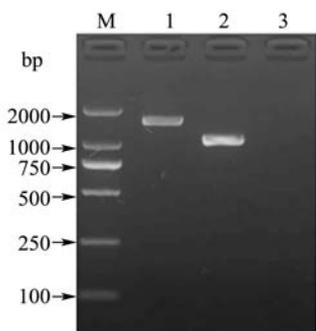


图3 ZLG85 的 16SrDNA PCR 产物

Fig.3 The 16SrDNA PCR products of ZLG85

注: M-DNA Marker DL 2 000; 1-16SrDNA 扩增产物; 2-正对照; 3-负对照。

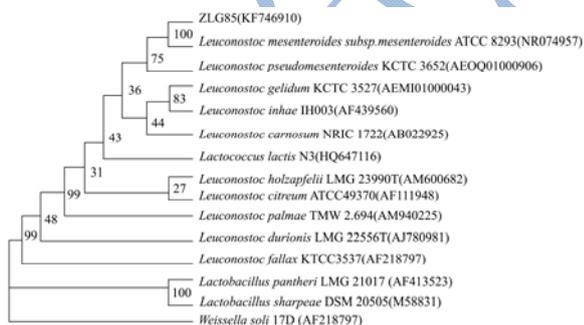


图4 肠膜明串珠菌 ZLG85 系统发育树

Fig.4 Phyletic evolution tree of ZLG85

2.6 热稳定性、酸碱稳定性

由表 4 可知, 温度相同, 细菌素相对抗菌活性随着处理时间的增长呈下降趋势; 处理时间相同, 温度越高, 相对抗菌活性下降越多。在 pH 值 2.0~10.0 范围内, 相对抗菌活性均在 80% 以上, 可见明串珠菌素

ZLG85 具有较好的耐酸碱能力。

表4 热处理和酸碱处理对抗菌活性的影响

Table 4 Effect of heat and pH on the antimicrobial activity

加热	相对抗菌活性/%	pH	相对抗菌活性/%
60 °C, 30 min	99.75	2.0	85.36
60 °C, 60 min	83.94	3.0	88.83
70 °C, 30 min	89.04	4.0	93.53
70 °C, 60 min	75.94	5.0	96.16
80 °C, 30 min	82.12	6.0	99.94
80 °C, 60 min	72.48	7.0	96.95
90 °C, 30 min	73.99	8.0	89.14
90 °C, 60 min	67.63	9.0	83.71
100 °C, 30 min	65.68	10.0	80.90
100 °C, 60 min	58.44	11.0	76.88
121 °C, 30 min	93.77		

2.7 Tricine-SDS-PAGE 电泳确定细菌素的分子质量

子质量

将中度纯化的细菌素样品电泳后, 做胶上样品抑菌试验, 实验结果如图 5 所示。

通过抑菌条带位置和 Marker 条带比对可知此细菌素的分子质量约为 2.5 kDa, 是一种小分子肽。目前国内报道的肠膜名串珠菌素有两种。Yann Hécharde^[14] 等人从羊奶中分离出一株肠膜明串珠菌 Y105, 产生的明串珠菌素 Y105 分子量为 2.5~3.0 kDa, 但明串珠菌素 Y105 只能抑制李斯特氏菌属的生长; Maria AP^[15] 等人从肉制品中筛选出一株肠膜明串珠菌 TA33a, 利用反向高效液相色谱分离出三种细菌素 A-TA33a、B-TA33a、C-TA33a, A 和 C 除分子量不同外均能抑制李斯特菌和乳酸菌的生长, B 分子量 3 466 Da, 能抑制明串珠菌和魏斯氏菌的生长。上述两种明串珠菌素抑菌谱较窄, 只能抑制特定革兰氏阳性菌的生长, 在后续实验中发现 ZLG85 的抑菌谱较广, 除了对革兰氏

阳性菌有抑制作用,对部分革兰氏阴性菌,如沙门氏菌、弗氏志贺氏菌也有抑制效果。因此,明串珠菌素 ZLG85 是一种新型广谱的细菌素。

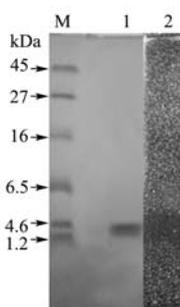


图5 Tricine-SDS-PAGE 电泳分析及电泳后抑菌活性的检测

Fig.5 Tricine-SDS-PAGE analysis and detection of antibacterial activity after Tricine-SDS-PAGE

注: M-超低分子量彩虹预染 Marker; 1-经考马斯亮蓝染色的条带; 2-抑李斯特菌条带。

3 结论

3.1 从自然发酵的酸黄瓜中分离出 200 株乳酸菌菌株,经筛选后得到 1 株具有良好的抑制单核增生李斯特氏菌生长活性的菌株 ZLG85,排除有机酸和 H_2O_2 的干扰因素后确定其产生的抑菌物质为细菌素。参考《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》对该菌株进行了形态及生理生化鉴定;以该菌的 DNA 为模板利用 PCR 扩增技术对该菌 16S rDNA 进行核苷酸序列分析,测序结果在 NCBI 网站中应用 BLAST 软件在基因库中进行同源性搜索,鉴定该菌为肠膜明串珠菌肠膜亚种。

3.2 明串珠菌素 ZLG85 具有很强的热稳定性和酸碱稳定性,在 121 °C 处理 30 min 后,相对抗菌活性仍高达 93.77%,甚至高于 100 °C 处理 30 min 的抗菌活性,产生这种现象的原因可能是与这种细菌素的结构,相对分子质量、交联结构的稳定性以及是否存在相对较强的疏水性区域等因素有关。另外,该细菌素在 pH 2~10 条件下也具有较稳定的稳定性。

3.3 Tricine-SDS-PAGE 电泳分析表明肠膜明串珠菌素 ZLG85 分子质量约为 2.5 kDa,不同于目前已发现的明串珠菌素,因此,肠膜明串珠菌素 ZLG85 是一种稳定性强的新型抗李斯特氏菌的乳酸菌细菌素。

参考文献

[1] Nabil BO, Hikmate A, Ismail F et al. Bacteriocins: Natural weapons for control of food pathogens [J]. Management of Microbial Resources in the Environment, 2013: 471-494

[2] Orberg PK, Sandine WE. Common occurrence of plasmid DNA and vancomycin resistance in *Leuconostoc spp* [J].

Applied and Environment Microbiology, 1984, 48(6): 1129-1133

[3] Arques JL, Rodriguez E, Gaya P, et al. Effect of combinations of high pressure treatment and bacteriocin producing lactic acid bacteria on the survival of *Listeria monocytogenes* in rawmilk cheese [J]. International Dairy Journal, 2005, 15: 893-900

[4] Xiraphi N, Georgalaki M, Rantsiou K, et al. Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* E131 [J]. Meat Science, 2008, 80: 194-203

[5] Yurong Gao, Shiru Jia, Qiang Gao, et al. A novel bacteriocin with a broad inhibitory spectrum produced by *Lactobacillus sake* C2, isolated from traditional Chinese fermented cabbage [J]. Food Control, 2010, 21: 76-81

[6] Todorov SD, Dicks LMT. Pediocin ST18, an antilisterial bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* ST18 isolated from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria [J]. Process Biochem, 2005, 40: 365-370

[7] Ruiz-Barba JL, Caballero-Guerrero B, Maldonado-Barragán A, et al. Coculture with specific bacteria enhances survival of *Lactobacillus plantarum* NC8, an autoinducer-regulated bacteriocin producer, in olive fermentations [J]. Food Microbiology, 2010, 27(3): 413-417

[8] Zhang H, Liu L, Hao Y, et al. Isolation and partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* BM-1 isolated from a traditionally fermented Chinese meat product [J]. Microbiology and Immunology, 2013, 57(11): 746-755

[9] Collado MC, Gonzalez A, Gonzalez R, et al. Antimicrobial peptides are among the antagonistic metabolites produced by *Bifidobacterium* against *Helicobacter pylori* [J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2005, 25: 385-391

[10] Marugg DJ, Gonzalez FC, Kunka SB, et al. Cloning, expression, and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1992, 58(8): 2360-2367

[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

Ling Dai-wen, Dong Xiu-zhu. *Lactic acid bacteria* classification, identification and experimental methods [M]. Beijing: China Light Industry Press, 1999

[12] 张红星,刘丽,谢远红,等.产细菌素的戊糖片球菌的筛选及其细菌素的理化性质研究[J].现代食品科技, 2011, 2(27): 135-138

- Zhang Hong-xing, Liu Li, Xie Yuan-hong, et al. Screening of bacteriocin-producing *Pediococcus pentosaceus* strain and study on physicochemical characteristics of bacteriocin [J]. Modern Food Science and Technology, 2011, 2(27): 135-138
- [13] Jamuna M, Jeevaratnam K. Isolation and partial characterization of bacteriocins from pediococcus species [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2004, 65: 433-439
- [14] Héchard Y, Dérijard B, Letellier F et al. Characterization and purification of mesentericin Y105, an anti-Listeria bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides* [J]. Microbiology, 1992, 12(138): 2725-2731
- [15] Maria AP, Francois K, Anne MR. Multiple bacteriocin producti on by *Leuconostoc mesenteroides* TA33a and other *Leuconosto/ Weissella* strains [J]. Current Microbiology, 1997, 35(6): 331- 335

现代食品科技