

L. Lactis KLDS4.0325 细菌素理化性质的研究

王娜娜, 于上富, 杜金城, 霍贵成

(东北农业大学乳品科学教育部重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150030)

摘要: 该研究以分离自新疆牧民家庭自制酸马奶中的乳酸乳球菌 KLDS4.0325 为研究对象, 以双层平板法为检测方法, 以抑菌圈直径为检测指标, 以大肠杆菌为指示菌, 对该菌株所产细菌素进行提取、纯化及理化特性分析, 首先无细胞发酵上清液通过 60% 饱和度硫酸铵溶液盐析得到细菌素粗提液, 然后细菌素粗提液通过 SP Sepharose Fast Flow 阳离子交换层析法得到纯化的细菌素样品, 其比活力可达 51.02 IU/mg, 较优化前提高了约 18 倍, 并通过 tricine-SDS-PAGE 蛋白电泳测定分子量约为 3.4 ku; 最后, 对细菌素样品的生物学特性进行研究, 通过温度、pH 和各种酶的敏感性试验得出, 细菌素样品热稳定性强, 在 pH 2~10 的范围抑菌圈直径变化不大, 有较高的稳定性, 经蛋白酶处理后, 抑菌活性消失, 但经淀粉酶处理后仍能保持较高的稳定性, 这也说明该细菌素是蛋白类物质。

关键词: 细菌素; 乳酸乳球菌; 纯化; 特性

文章编号: 1673-9078(2016)12-133-138

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.12.021

Physicochemical Characterization of a Bacteriocin from *Lactococcus lactis* KLDS4.0325

WANG Na-na, YU Shang-fu, DU Jin-cheng, HUO Gui-cheng

(Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: A bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* KLDS4.0325 isolated by Xinjiang herdsman from self-made koumiss was purified and characterized. The double-plate method was used for detection. The diameter of the inhibition zone (mm) was used as the evaluation index, and it was quantified against *Escherichia coli* ATCC 25922. The bacteriocin produced by this strain was extracted, purified, and subjected to physicochemical analysis. The bacteriocin crude extract was extracted from the cell-free fermentation supernatant by precipitation with 60% ammonium sulfate. This was followed by SP Sepharose FF cation exchange chromatography to obtain purified bacteriocin samples. The specific activity of the purified bacteriocin was estimated to be 51.02 IU/mg and the inhibitory activity was increased by 18 folds. The molecular mass of the purified bacteriocin was estimated using tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and was found to be approximately 3.4 ku. Additionally, the biological characteristics of the bacteriocin were studied by sensitivity experiments of temperature, pH, and various enzymes. The results showed that the bacteriocin was heat-stable and its inhibition zone diameter showed insignificant changes when pH of incubation was increased from 2.0 to 10.0, showing good stability. The inhibitory activity of the bacteriocin was found to be sensitive to proteolytic enzymes such as pepsin, trypsin, papain, α -chymotrypsin, and proteinase K, indicating that it is a type of protein.

Key words: bacteriocin; *Lactococcus lactis*; purification; characterization

在搜寻食品生物防腐剂的过程中, 有关乳酸菌产细菌素的研究倍受欢迎, 为了研究细菌素的化学特性、抑菌性能以及它们在食品体系中的功效, 纯化和大量收集高浓度的细菌素是必不可少的。目前, 很多研究采用硫酸铵饱和溶液盐析沉淀细菌素, 该方法已应用

收稿日期: 2015-12-20

基金项目: 国家 863 项目 (2011AA100902); 国家自然科学基金项目 (31401512)

作者简介: 王娜娜 (1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学

通讯作者: 霍贵成 (1958-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品科学

在片球菌, 乳杆菌和乳球菌等菌株细菌素的提取中, 但该方法提取的细菌素中仍含大量的杂蛋白, 不利于抑菌活性的表达, 因此需要进一步的纯化, 该阶段常用的方法有柱层析法, 包括离子交换层析、凝胶层析、疏水层析。其中离子交换层析法是利用蛋白质所带电荷与离子交换柱结合关系的强弱来分离蛋白的层析方法, 在细菌素纯化中广泛使用。由于细菌素在酸性条件下比较稳定, 所以离子层析时大多选择 pH 值为 5~7 左右的缓冲体系, 在这种情况下多数细菌素带正电荷, 故细菌素的纯化中多使用阳离子交换剂, 如

SP-Sepharose、CM-SephadexC-25 和 CM-SephadexC-50 等。

近几年,人们发现先用硫酸铵沉淀细菌素,然后通过阳离子交换层析法收集细菌素,如细菌素 pediocin PA-1,细菌素保留率可达到 75%,该法适用于小规模工业化生产中,而且无细胞发酵上清液可以循环多次以便充分纯化^[1]; Ghrairi 等^[2]通过阳离子交换层析和高效液相色谱法纯化 *E. faecium* MMT21 所产细菌素; Saint Hubert 等^[3]通过疏水相互作用层析法和阳离子交换层析法大规模纯化细菌素 carnocin KZ 213,经纯化纯度可达 95%,效价可达 8500 UA/g;此外,Corsetti 等^[4]研究抗 *Listeria innocua* 菌株细菌素对蛋白酶、胰蛋白酶、淀粉酶及脂肪酶等的敏感性,经研究发现该细菌素可被蛋白酶和胰蛋白酶降解,对淀粉酶及脂肪酶稳定,不受温度和 pH 影响,能较好的应用于工业化生产;李转羽等^[5]研究 *Lactobacillus plantarum* 所产乳酸菌素的功能特性,发现该乳酸菌素分子量在 4.6~6.5 ku 之间,对 pH 不敏感,对热稳定,对蛋白酶敏感,可阻碍多种食源性致病菌的生长繁殖。但目前报道的研究中多以乳杆菌产细菌素为主,对乳球菌产细菌素的研究较少,且主要抑制革兰氏阳性致病菌,抑制革兰氏阴性致病菌的研究较少,因此本试验以大肠杆菌为指示菌,纯化 *L.lactis* KLDS4.0325 所产细菌素,并研究其功能特性,为开发新型细菌素提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

1.1.1 菌种

乳酸乳球菌 KLDS4.0325 东北农业大学教育部重点实验室工业微生物菌种保藏中心(KLDS-DICC)保藏;大肠杆菌 *Escherichia coli* ATCC 25922 黑龙江省微生物研究所。

1.1.2 培养基

基础发酵培养基:葡萄糖 128.99 g/L,蛋白胨 17.59 g/L,酪蛋白胨 10 g/L,磷酸氢二钾 10 g/L,硫酸镁 1.5 g/L,抗坏血酸钠 1.49 g/L,β-甘油磷酸钠 1.5 g/L,乙酸钠、氯化钠、硫酸锰分别为 1.0 g/L,灭菌条件:115℃,20 min。其中碳酸钙 121℃单独灭菌 15 min;LB 培养基:10 g/L 胰蛋白胨、5 g/L 酵母浸粉和 10 g/L 氯化钠。

1.1.3 主要试剂与设备

Nisin(乳酸链球菌素)标准品、过氧化氢酶美国 sigma 公司;α-糜蛋白酶、木瓜蛋白酶、胃蛋白酶和胰

蛋白酶:北京博奥拓科技有限公司;超低分子量蛋白质标准品:北京天根生化科技有限公司;牛血清白蛋白上海联硕生物科技有限公司;SP Sepharose Fast Flow 填料、COLUMN XK 16/20 层析柱:瑞典 GE Healthcare 公司;AKTA purifier 100 蛋白质多肽分离纯化仪:瑞典 GE Healthcare 公司;GL-21M 高速冷冻离心机:上海市离心机械研究所;CHRISTALPHA1-4 型冻干机:MarinChrist 德国。

1.2 方法

1.2.1 Nisin 效价曲线的绘制

Nisin 为商业化乳链菌素,参考 Cabo 等^[6]的方法,以大肠杆菌为指示菌,以不同浓度的 Nisin 标准液做抑菌试验,可得到不同浓度 Nisin 和其抑菌圈直径大小的线性关系,进一步根据此标准曲线确定所分离细菌素的抑菌活性。

1.2.2 蛋白标准曲线的绘制

采用考马斯亮蓝法绘制牛血清白蛋白(BSA)浓度标准曲线。

1.2.3 抑菌活性测定

制备无细胞发酵上清液,即菌液 10000 r/min,4℃离心 15 min,收集上清液,用 6 mol/L NaOH 调 pH 值到 6.5,以排除有机酸的干扰;加入过氧化氢酶使其终浓度为 5.0 mg/mL,37℃水浴 2 h,以排除过氧化氢的干扰,然后经 0.22 μm 滤膜过滤,除去菌体及其它杂质,然后冷冻干燥浓缩后备用。采用双层平板法测定其抑菌活性,即下层为 1.2%的琼脂,按每平皿 10 mL 倾倒在无菌平皿中,洗净工作台中放置过夜;上层为含 0.7%琼脂的 LB 软琼脂培养基,冷却至 50℃左右;按 2%接种大肠杆菌菌液(约 10⁸ cfu),在底层有琼脂的平皿上倾倒 10 mL 含有指示菌的软琼脂培养基,晾干后打孔,在孔中加入 50 μL 无细胞发酵上清液,洗净工作台上放置 3 h;置 37℃培养箱中培养过夜,用游标卡尺测抑菌圈直径大小。

1.2.4 硫酸铵粗提细菌素

1.2.4.1 饱和硫酸铵溶液的配制

在预热至 50~60℃的蒸馏水中添加过量的硫酸铵,趁热滤去沉淀,室温下平衡 24 h 左右,待有晶体析出时即达 100%饱和度。

1.2.4.2 硫酸铵饱和溶液沉淀细菌素

按 1.2.3 所述制备无细胞发酵上清液,然后分别用饱和度为 40%、50%、60%、70%和 80%的硫酸铵溶液粗提无细胞发酵上清液中的细菌素,4℃下磁力搅拌器最小转速下搅拌过夜,然后 10000 r/min,4℃离心 10 min,将沉淀溶于 1/40 体积的 ddH₂O 中,以为

大肠杆菌指示菌,采用双层平板法分别测定沉淀复溶液与冻干后的盐析上清液的抑菌圈直径大小,并以无菌培养基经硫酸铵溶液沉淀后的沉淀复溶液与冻干后的盐析上清液作对照,选取硫酸铵溶液的最佳饱和度,确保在此饱和度下,盐析上清液几乎无抑菌活性,细菌素几乎被完全沉淀。

1.2.5 阳离子交换层析法纯化细菌素

选取 SP Sepharose™Fast Flow 填料, COLUMN XK 16/20 层析柱,在 0.4 mL 上样量, 0.4 mL/min 流速, 0.02 mol/L 的乙酸钠为平衡缓冲液(pH 为 4.0), 0.02 mol/L 乙酸钠+1.0 mol/L 氯化钠为洗脱缓冲液(pH 为 4.0), 215 nm 波长的条件下,对硫酸铵饱和溶液沉淀后的细菌素粗提液样品进行层析纯化,测定收集液的蛋白浓度及抑菌圈直径大小。

1.2.6 纯化细菌素的分子量估测

采用 Tricine-SDS-PAGE 方法估测细菌素的分子量^[7]。

1.2.7 细菌素的生物学特性研究

1.2.7.1 细菌素对温度的敏感性

取等量已初步纯化的细菌素样品(约 6000 IU/mL),分别在 20 °C、40 °C、60 °C、80 °C、100 °C 和 121 °C 下保持 10 min 和 30 min, 4 °C 下放置数分钟后做抑菌实验,测定抑菌圈直径大小,观察不同温度处理后,细菌素样品抑菌圈直径的变化。

1.2.7.2 细菌素对 pH 的敏感性

取等量已初步纯化的细菌素样品(约 6000 IU/mL),用 3 mol/L 的盐酸或氢氧化钠溶液调节 pH 分别为 2~10, 37 °C 下温育 2 h,取出 4 °C 下放置数分钟后做抑菌实验,测定抑菌圈直径大小,观察不同 pH 处理后,细菌素样品抑菌圈直径的变化。

1.2.7.3 细菌素对酶的敏感性

取等量的已初步纯化的细菌素样品(约 6000 IU/mL),用 3 mol/L 的盐酸或氢氧化钠溶液调节 pH 到各酶的最适 pH,按酶的终浓度为 1.0 mol/L 分别加入胃蛋白酶、胰蛋白酶、蛋白酶 K、 α -糜蛋白酶和木瓜蛋白酶,37 °C 下温育 2 h 后,将 pH 值调回到 6.5 做抑菌实验,测定抑菌圈直径大小,观察不同酶处理后,细菌素样品抑菌圈直径的变化。

1.2.8 数据统计分析

文中所有试验均进行三次重复试验,文中图表运用 Excel 2003 软件进行绘制;数据处理采用 SPSS 软件进行统计学分析。

2 结果与讨论

2.1 Nisin 效价标准曲线

Nisin 的效价标准曲线见图 1,由图 1 可知,效价的对数与抑菌圈直径呈线性相关,回归方程为 $Y=6.0211X+10.624$, Y 表示抑菌圈直径, X 表示效价对数值,相关系数 0.9944,符合进一步试验要求。因此,已知纯化细菌素的抑菌圈直径大小,根据此标准曲线,可得出对应纯化细菌素的抑菌活性。

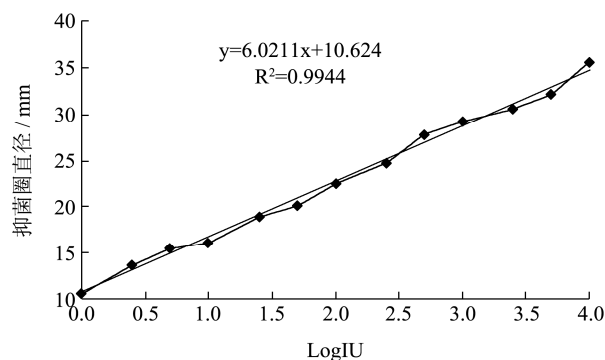


图1 Nisin的标准效价曲线

Fig.1 Standard titer curve for Nisin

2.2 蛋白质标准曲线的绘制

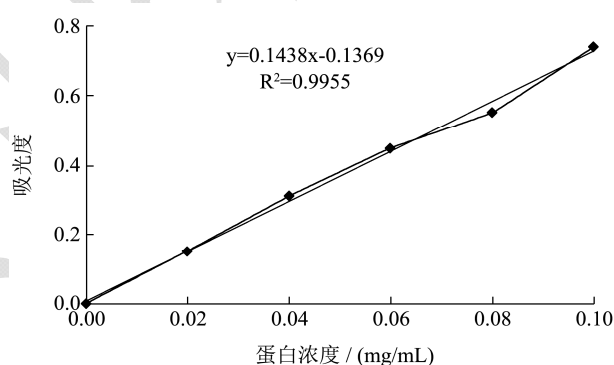


图2 BSA 标准曲线

Fig.2 Standard Curve for BSA

以吸光值为纵坐标,牛血清白蛋白浓度为横坐标,绘制蛋白浓度标准曲线,结果如图 2 所示。由图 2 可知蛋白质浓度与吸光度具有良好的线性关系,回归方程为 $Y=0.1438X-0.1369$, Y 表示吸光度, X 表示 BSA 的蛋白浓度,且 R^2 值为 0.9955,符合进一步试验要求。

2.3 硫酸铵饱和溶液粗提细菌素

由表 1 可知,随着硫酸铵溶液饱和度的增加,沉淀中的抑菌圈直径变大,无细胞发酵上清液中的细菌素越来越多的被沉淀出来,沉淀对大肠杆菌的抑菌活性越来越强,而上清液的抑菌圈直径逐渐减小,当硫酸铵溶液饱和度为 60%时,沉淀的抑菌圈直径可达 17.37 mm,上清液的抑菌圈直径仅 2.07 mm,基本无抑菌活性,这与 *Lactobacillin* XH2 的结果较一致^[8],且由表 2 可知,经 SPSS 数据分析软件分析其结果显

著。因此,选取 60%饱和度的硫酸铵溶液沉淀细菌素,后将沉淀复溶于 1/40 已灭菌的 ddH₂O 中保存备用。并通过 10000 r/min, 4 ℃, 离心 10 min 收集沉淀,然

表 1 不同饱和度的硫酸铵沉淀细菌素结果

Table 1 Results of bacteriocin precipitation using different saturations of ammonium sulfate

硫酸铵溶液的饱和度	抑菌圈直径/mm				
	40%	50%	60%	70%	80%
上清液	5.43±0.19 ^c	4.10±0.10 ^b	2.07±0.15 ^a	1.99±0.15 ^a	2.21±0.15 ^a
沉淀	12.49±0.41 ^a	13.79±0.25 ^b	17.37±0.33 ^c	16.79±0.37 ^c	16.78±0.34 ^c

表 2 不同饱和度硫酸铵沉淀细菌素的分析结果

Table 2 Analysis results of bacteriocin precipitation by different saturations of ammonium sulfate

沉淀硫酸铵饱和度	N	alpha=0.05 的子集			上清液硫酸铵饱和度	N	alpha=0.05 的子集		
		1	2	3			1	2	3
40%	3	12.4933			70%	3	1.9867		
50%	3		13.7933		60%	3	2.0667		
80%	3			16.7800	80%	3	2.2067		
70%	3			16.7933	50%	3		4.1000	
60%	3			17.3667	40%	3			5.4267
显著性		1.000	1.000	0.119	显著性		0.181	1.000	1.000

2.4 细菌素分离纯化结果

2.4.1 阳离子交换层析纯化细菌素的结果

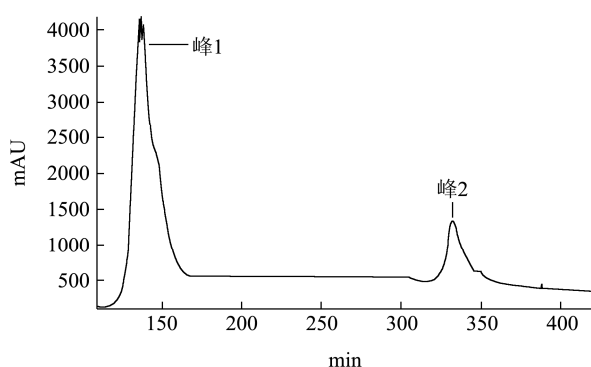


图 3 KLDS4.0325 所产细菌素的洗脱曲线

Fig.3 Elution curves of bacteriocin produced by KLDS4.0325

对硫酸铵沉淀得到的细菌素粗提样品进行阳离子交换层析纯化,结果如图 3 所示,抑菌试验结果见表 3。

表 3 收集液的抑菌圈直径

Table 3 Inhibition zone diameter of collected fluid

名称	抑菌圈直径/mm
峰 1	-
峰 2	13.54±0.13

注:“-”代表没有抑菌圈。

由图3可知,平衡层析柱60 min后开始进样,层析柱先经平衡缓冲液平衡至250 min,期间出现一个杂质峰峰1,然后换成洗脱缓冲液洗脱至340 min时出现峰2,继续洗脱曲线趋于平稳,并未再发现其他峰;同时,

分别收集两个峰的洗脱液冻干浓缩后做抑菌试验,由表3可知,峰1没有抑菌活性,这也表明这个峰为杂质峰,而峰2的抑菌圈直径为13.54 mm,对大肠杆菌有抑菌活性,因此确定该峰下的收集液中含有细菌素,所以大量收集峰2的洗脱液液,冻干后备用。

2.4.2 细菌素样品的纯化结果

表 4 细菌素的纯化结果

Table 4 Results of purification of bacteriocin

样品	抑菌活性 (IU/mL)	蛋白含量 (mg/mL)	比活力 (IU/mg)
无细胞发酵上清液	5000.00	1689.19	2.96
60%硫酸铵溶液沉淀	5277.89	502.18	10.51
阳离子交换层析液	1221.96	23.95	51.02

注:比活力=抑菌活性/蛋白含量。

用 ddH₂O 稀释适当倍数,采用考马斯亮蓝测定蛋白浓度的方法,分别测定无细胞发酵上清液、60%硫酸铵溶液沉淀和阳离子交换层析液在 595 nm 下的吸光度,然后根据图 2 中 BSA 浓度标准曲线,得出它们对应的蛋白浓度;并采用双层平板法分别测定它们的抑菌圈直径大小,然后根据图 1 中 Nisin 的效价标准曲线,得到对应的效价值,然后分别计算比活力,结果见表 4。由表 4 可知,样品经阳离子交换层析后比活力较无细胞发酵上清液提高了约 18 倍,且与王辉等^[9]采用相同方法得到的细菌素的比活力相比高出一倍,说明通过阳离子交换层析法可有效纯化乳酸乳球菌 KLDS4.0325 所产细菌素,可显著提高其抑菌活力,因此,可以通过该纯化方法得到对大肠杆菌有较强抑

菌活力的细菌素样品。

2.5 细菌素分子量测定

纯化的细菌素样品经过 Tricine-SDS-PAGE 电泳后, 结果如图 4。由图 4 可知, 细菌素样品经蛋白电泳染色脱色后, 仅有一条较为清晰的条带, 说明离子交换层析法纯化的细菌素样品已达到了电泳纯度, 结合蛋白标准品 marker 可知, 细菌素样品的分子量大小约为 3.4 ku, 与多数乳杆菌^[10]所产细菌素分子量大小相比, 分子量较低。

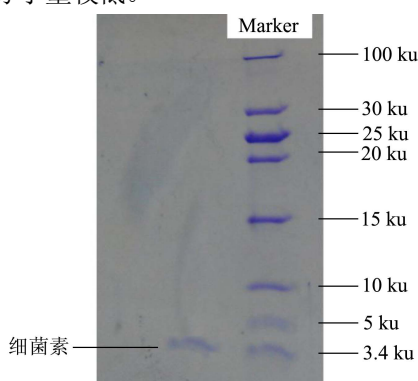


图 4 KLDS4.0325 所产细菌素的 Tricine-SDS-PAGE

Fig.4 Tricine-SDS-PAGE results of bacteriocin produced by KLDS4.0325

2.6 细菌素生物学特性研究

2.6.1 细菌素对温度的敏感性

由表 5 可知, 随温度的升高, 抑菌圈直径基本没有变化, 表明细菌素样品对大肠杆菌的抑菌活性基本

保持不变, 不受高温环境的影响, 当温度为 121 °C 时, 抑菌圈直径略有减小, 但细菌素样品对大肠杆菌抑菌活性的保留率仍然可达 90% 以上, 这说明高温处理细菌素样品并不会造成其抑菌活性的减弱或消失; 另一方面, 在相同温度下对细菌素样品处理不同时间, 细菌素样品的抑菌圈直径没有明显变化, 表明细菌素样品对温度的稳定性同样不受时间的影响, 通过 SPSS 软件对数据进行统计学分析, 其结果见表 6, 且试验结果显著。综上说明该细菌素样品长时间高温处理也能保持有较好的热稳定性, 该结果与大多数研究结果相一致^[11,12]。

表 5 细菌素对温度敏感性试验

处理温度/°C	处理时间/min	抑菌圈直径/mm
20	10	25.7±0.13 ^c
	30	25.7±0.13 ^c
40	10	24.22±0.50 ^{ab}
	30	24.29±0.42 ^b
60	10	24.83±0.21 ^b
	30	24.16±0.14 ^b
80	10	24.80±0.46 ^b
	30	24.02±0.20 ^b
100	10	24.07±0.05 ^a
	30	24.11±0.09 ^b
121	10	23.92±0.16 ^a
	30	23.23±0.17 ^a

表 6 细菌素对温度敏感性试验的分析结果

Table 6 Sensitivity of bacteriocin to temperature

10 min 温度/°C	N	alpha=0.05 的子集			30 min 温度/°C	N	alpha=0.05 的子集		
		1	2	3			1	2	3
121	3	23.9200			121	3	23.2267		
100	3	24.0667			80	3	24.0200		
40	3	24.2200	24.2200		100	3	24.1133		
80	3		24.8000		60	3	24.1600		
60	3		24.8333		40	3	24.2867		
20	3			25.7067	20	3			25.7067
显著性		0.349	0.069	1.000	显著性		1.000	0.153	1.000

2.6.2 细菌素对 pH 的敏感性

由于不同食品会有不同的 pH, 因此, 为了能让细菌素样品在各种食品中发挥最大功效, 需对其所耐受的酸碱环境进行探索, 结果见图 5。如图 5 所示, 当调节细菌素样品的 pH 在 2.0~7.0 之间时, 随 pH 的增大, 细菌素样品的抑菌圈直径逐渐变大, 细菌素样品对大肠杆菌的抑菌活性逐渐增强; 当 pH 在 7.0~10.0

之间, 随 pH 的增大, 细菌素样品的抑菌圈直径逐渐变小, 表明细菌素的抑菌活性逐渐减弱。综上说明细菌素样品在酸性及中性环境中能保持较好的抑菌活性, 在碱性环境中抑菌活性有所下降, 但对大肠杆菌的抑菌作用并未受到显著影响, 在 pH 为 10.0 时, 抑菌活性保留率仍在 79% 以上, 该结果与李亚玲^[13]的研究结果相符。因此说明该细菌素样品具有较好的酸碱

稳定性。

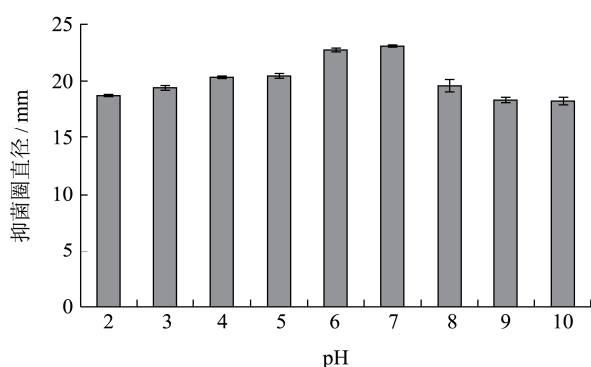


图5 细菌素对 pH 敏感性试验

Fig.5 Sensitivity test of bacteriocin to pH

2.6.3 细菌素对酶的敏感性

由于细菌素本身为多肽类物质，人体内存有各种各样的消化酶，因此需对细菌素样品进行各种酶的敏感性试验，试验结果如表 7 所示。由表 7 可知，细菌素样品经蛋白酶处理后，抑菌圈直径消失，表明细菌素样品对大肠杆菌无抑菌作用，细菌素样品经淀粉酶处理后，抑菌圈直径基本不变，细菌素保留率高达 95% 以上，该结果与 Neha Gautam 等人^[14]的研究结果相一致。综上可知，细菌素样品对蛋白酶敏感，对淀粉酶较稳定，这也说明细菌素样品中起主要抑菌活性的物质为蛋白类物质，另一方面，细菌素样品进入人体肠道后可以被蛋白酶等多种酶类分解小分子物质排除体外，不会在体内产生富集效应，不会引起人体的不适反应，从而有利于其在食品中的应用。

表 7 细菌素对酶的敏感性试验

Table 7 Sensitivity test of bacteriocin to enzymes

样品	抑菌圈直径/mm			
	试验 1	试验 2	试验 3	平均值
未处理组	20.44	20.82	20.08	20.45
胃蛋白酶	-	-	-	-
胰蛋白酶	-	-	-	-
蛋白酶 K	-	-	-	-
木瓜蛋白酶	-	-	-	-
α -糜蛋白酶	-	-	-	-
淀粉酶	19.98	20.24	20.38	20.20

注：“-”代表无明显的抑菌圈。

3 结论

本文对乳酸乳球菌 KLDS 4.0325 所产细菌素进行分离纯化，依次经 60%饱和度硫酸铵溶液粗提和阳离子交换层析法纯化，得到的细菌素样品比活力为 51.02 IU/mg，较优化前提高了约 18 倍，经 Tricine-SDS-PAGE 测定分子量约为 3.4 ku；最后又研究纯化细菌

素样品的生物学特性，通过温度、pH 和酶敏感性试验可知，细菌素样品对热稳定，在 pH 2~10 范围也有较高的稳定性，经蛋白酶处理，对大肠杆菌的抑菌活性丧失，但经淀粉酶处理后仍能保持较高的抑菌活性，总结以上性质，然后根据细菌素的分类可推测该细菌素为 Class II 细菌素。因此，经本试验可得到性能稳定、对大肠杆菌有明显抑菌活性且可分离纯化的乳酸乳球菌类细菌素，同时也为其工业化生产及应用提供了理论依据。

参考文献

- [1] Simha B V, Sood S K, Kumariya R, et al. Simple and rapid purification of pediocin PA-1 from *Pediococcus pentosaceus* NCDC 273 suitable for industrial application [J]. Microbiological Research, 2012, 167(9): 544-549
- [2] Ghrairi T, Frere J, Berjeaud J M, et al. Purification and characterisation of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* from Tunisian rigouta cheese [J]. Food Control, 2008, 19(2): 162-169
- [3] Saint-Hubert C, Durieux A, Bodo E, et al. Large scale purification protocol for carnocin KZ 213 from *Carnobacterium piscicola* [J]. Biotechnology Letters, 2009, 31(4): 519-523
- [4] Corsetti A, Settanni L, Braga T M, et al. An investigation of the bacteriocinogenic potential of lactic acid bacteria associated with wheat (*Triticum durum*) kernels and non-conventional flours [J]. LWT-Food Science and Technology, 2008, 41(7): 1173-1182
- [5] 李转羽,郝艳芳,张红星,等.1株产乳酸菌素植物乳杆菌的鉴定及功能研究[J].中国食品学报,2015,2:207-213
LI Zhuan-yu, HAO Yan-fang, ZHANG Hong-xing, et al. Identification of a bacteriocin-producing *Lactobacillus* and the characteristics of its antimicrobial substance [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2015, 2: 207-213
- [6] Cabo M L, Murado M A, González M P, et al. A method for bacteriocin quantification [J]. Journal of Applied Microbiology, 1999, 87(6): 907-914
- [7] Deraz S F, Eva Nordberg K, Martin H M, et al. Purification and characterisation of acidocin D20079, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079 [J]. Journal of Biotechnology, 2005, 117(4): 343-354
- [8] 段改丽,赵瑞香,杨天佑,等.嗜酸乳杆菌细菌素Lactobacillin XH2分离纯化研究[J].食品工业科技,2014,35(15):163-165
DUAN Gai-li, ZHAO Rui-xiang, YANG Tian-you, et al.

- Separation and purification of *Lactobacillus* XH2 bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(15): 163-165
- [9] 王辉,孟祥晨,胡子毅.植物乳杆菌KLDS1.0391所产细菌素的纯化[J].食品科学,2013,3:59-63
- WANG Hui, MENG Xiang-chen, HU Zi-yi. Purification of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0391 [J]. Food Science, 2013, 3: 59-63
- [10] 贡汉生.四株乳杆菌产细菌素的研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2007
- GONG Han-sheng. Study of Bacteriocins produced by four *Lactobacilli* strains [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2007
- [11] Miao J, Guo H, Ou Y, et al. Purification and characterization of bacteriocin F1, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* FX-6 from Tibetan kefir, a traditional fermented milk from Tibet, China [J]. Food Control, 2014, 42: 48-53
- [12] Chen Y, Wang Y, Chow Y, et al. Purification and characterization of plantaricin Y, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* 510 [J]. Archives of Microbiology, 2014, 196(3): 193-199
- [13] 李亚玲.乳酸片球菌细菌素的分离纯化及理化性质研究[D].天津:天津大学,2007
- LI Ya-ling. Purification and characterization of bacteriocin from a *Pediococcus acidilactici* [D]. Tianjin: Tianjin University, 2007
- [14] Gautam N, Sharma N, Ahlawat O P. Purification and characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus brevis* UN isolated from Dhulliachar: a traditional food product of north east India [J]. Indian Journal of Microbiology, 2014, 54(2): 185-189