

提高乳酸菌细菌素合成量方法的研究进展

满丽莉¹, 向殿军², 布日额¹, 王思珍¹, 张春兰¹, 宫晓旭²

(1. 内蒙古民族大学生命科学院, 内蒙古通辽 028042)

(2. 内蒙古民族大学农学院, 内蒙古通辽 028042)

摘要: 细菌素是某些细菌通过核糖体合成机制产生的蛋白质或多肽, 能够抑制与其亲源关系相同或相近的微生物, 某些细菌素在食品加工和发酵过程中能抑制致病菌和腐败菌。乳酸菌被认为是一般公认安全, 其细菌素具有安全性高、稳定性好、抑菌谱广等优点, 作为一种新型食品防腐剂备受关注, 但商品化的乳酸菌细菌素十分有限, 仅限于 Nisin 和 Pediocin PA-1 等少数几种, 合成量低是细菌素在食品中应用受限的主要原因之一。从不同原料中筛选高产菌株、发酵培养基和发酵条件优化、诱变育种、原生质体融合、基因工程方法、群体感应系统调控六个方面, 论述了增加乳酸菌细菌素合成量的方法, 以期为实现乳酸菌细菌素的工业化生产提供一定的借鉴。

关键词: 乳酸菌; 细菌素; 合成量; 方法

文章编号: 1673-9078(2019)04-293-300

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.4.400

Research Progress on Methods to Increase the Bacteriocin Synthesis in *Lactic acid bacteria*

MAN Li-li¹, XIANG Dian-jun², BU Ri-e¹, WANG Si-zhen¹, ZHANG Chun-lan¹, GONG Xiao-xu²

(1. College of Life Science, Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao 028042, China)

(2. College of Agriculture, Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao 028042, China)

Abstract: Bacteriocins are antibacterial protein or polypeptide produced by ribosomal synthesis in some bacteria that are active against the microorganisms with common or similar genetic relationship. Some bacteriocins can inhibit the pathogenic bacteria and spoilage bacteria during food processing and food fermentation. *Lactic acid bacteria* are generally considered to be safe, more attention has been paid to bacteriocins produced by *lactic acid bacteria* (LAB) due to their potential use as a new food bio-preservatives with high safety, good stability and broad antibacterial spectrum. However, commercialized bacteriocins are limited in number, e.g. Nisin and pediocin PA-1, low synthetic amount is one of the main reasons for the limited application of bacteriocin in food. Increasing methods of bacteriocin synthesis in *lactic acid bacteria* were summarized from six aspects including screening of high yield strains from different materials, optimization of fermentation medium and fermentation conditions, mutation breeding, protoplast fusion, genetic engineering method, and regulation of quorum sensing system. It will provide some reference for realizing the industrial production of bacteriocin.

Key words: *Lactic acid bacteria*; bacteriocin; synthetic amount; method

食品安全问题及食源性疾病均为全球性问题, 近 75% 的食源性疾病是由致病菌如大肠杆菌、沙门氏菌等所引发的, 物理方法、化学防腐剂、物理和化学防腐剂相结合等被应用于食源性致病菌及腐败菌的控制, 但这些方法可能导致食品营养和感官特性的改变及对人体产生毒害。为防止食品腐败变质、确保食品安全、延长食品货架期, 寻求天然、安全、高效的生

收稿日期: 2018-12-04

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金资助 (2018MS03060); 内蒙古民族大学博士科研启动基金资助 (BS403)

作者简介: 满丽莉 (1981-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品微生物

通讯作者: 向殿军 (1978-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 生物技术

物防腐剂是目前食品研究的热点问题之一^[1]。

细菌素是某些细菌在代谢过程中通过核糖体合成机制产生的一类具有生物活性的前体多肽、多肽或蛋白质, 当其达到一定数量时可以抑制或杀灭与之相同或相似生境的其他微生物, 通常其所产细菌素不会对菌体本身造成伤害^[2]。乳酸菌通常被认为一般公认安全, 而且大多数的产细菌素乳酸菌来源于天然食品, 因此乳酸菌细菌素更适合在食品中应用, 具有良好的 pH 稳定性、热稳定性及对酸、盐、酶的耐受性^[3,4]。乳酸菌细菌素具有高效、广谱、安全等优点, 能有效地抑制食品中的致病菌和腐败菌^[5-8], 是一种具有巨大应用潜能的生物防腐剂^[9]。但目前商品化的乳酸菌细

菌素仅限于少数几种,合成量低是细菌素应用受限的主要原因之一。因此,本文论述了增加乳酸菌细菌素合成量的方法,为实现乳酸菌细菌素的工业化生产提供理论参考,有利于食品安全和人民健康。

1 筛选细菌素高产菌株

1.1 从不同原料中筛选细菌素高产菌株

国内外研究者对从不同原料中筛选具有优良性状的产细菌素乳酸菌进行了大量研究。Gaaloul 等^[10]从生牛乳中筛选到可抑制乳酸乳球菌、粪肠球菌、大肠杆菌、副溶血性弧菌、保加利亚乳杆菌、单核细胞增生李斯特菌、沙门氏菌等的粪肠球菌 GGN7。De Carvalho 等^[11]从巴西肉制品筛选到可抑制粪肠球菌、尿肠球菌、李斯特菌、表皮葡萄球菌的清酒乳杆菌 2a。Nayyeri 等^[12]从淡干酪不同生产阶段中筛选到 19 株可抑制扩展青霉菌和胶红酵母的植物乳杆菌。刘国荣等^[13]从母乳婴儿粪便中分离出 1 株对革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌均表现出较强抑菌活性的鼠李糖乳杆菌 BL-1。张国强等^[14]从泡菜中分离到 2 株对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌均具有强抑菌活性的短乳杆菌 SD-22。但从不同材料中筛选到的乳酸菌所产细菌素的合成量有限,无法满足其工业化生产的需求,可将筛选到具有良好性状的菌株作为研究基础,通过其他方法进一步提高细菌素合成量。

1.2 运用不同方法筛选细菌素高产菌株

目前国内外应用最广泛的方法是琼脂扩散法,此法结果直观、操作简便,但筛选工作量大、准确性稍差,难于实现高通量筛选。后来陆续出现了微孔板生物测定法、生物荧光法、基于 PCR 技术的快速筛选方法。微孔板生物测定法操作简单、周期短,但误差大。生物荧光法准确快速,但不适合产广谱细菌素乳酸菌的筛选。基于 PCR 技术的筛选方法快速灵敏,但存在特异性差或特异性靶点较少等缺点。为了高效、快速筛选出细菌素高产乳酸菌,寻求高通量筛选方法显得尤为重要^[15]。

2 发酵培养基及发酵条件优化

发酵培养基和发酵条件对乳酸菌细菌素的合成均有不同程度的影响,大多数情况下,研究者为了更好地提高细菌素合成量,采用单因素试验、响应面法、旋转正交设计等多种方法对发酵培养基与发酵条件同时优化。Turgis 等^[16]从人体肠道中分离到乳酸片球菌 MM33 和乳酸乳球菌 MM19,乳酸片球菌 MM33 的细

菌素合成量优化是以 TGE 培养基为基础,20 g/L 果糖为碳源,20 g/L 豌豆蛋白胨为氮源,45 °C,起始 pH 6.0,细菌素合成量达到 51237 AU/mL,较优化前的 17067 AU/mL 提高了 3 倍,乳酸乳球菌 MM19 的细菌素合成量优化是以 MRS 培养基为基础,20 g/L 葡萄糖为碳源,15 g/L 小麦蛋白胨 E 430 为氮源,30 °C,起始 pH 9.0,细菌素合成量达到 42691 AU/mL,较优化前的 6400 AU/mL 提高了 6.7 倍。Todorov 等^[17]从面团中分离到植物乳杆菌 ST31,最适温度 30 °C,最适 pH 6.0,以 MRS 培养基为基础,1.5%牛肉膏和 1.0%酵母浸膏为氮源,2.0%葡萄糖为碳源,细菌素合成量可达 6400 AU/mL,添加生物素、泛酸、硫胺素有利于细菌素合成,细菌素合成量最高可达 6400 AU/mL,而甘油显著抑制细菌素的合成。Abo-Amer 等^[18]从埃及干酪中筛选出一株嗜酸乳杆菌 AA11,通过单因素确定其细菌素合成的适宜温度为 30 °C,最适 pH 6.5,以 M17 培养基为基础,4%的酵母浸膏为氮源,细菌素合成量达到 24492 AU/mL,较对照提高 4 倍,KH₂PO₄、CaCl₂、NH₄PO₄ 抑制细菌素合成,而 MnSO₄ 可增加细菌素合成,维生素添加不能使细菌素合成量提高。Kumar 等^[19]从芒果泡菜中筛选到干酪乳杆菌 LA-1,运用响应面法建模确定最佳发酵条件,适宜 pH 7.19,温度 33.3 °C,发酵时间 22.2 h,接种量 1.82 O.D, MRS 为发酵培养基,细菌素合成量达到 4652.15 AU/mL,提高了 2 倍。Kanmani 等^[20]从鱼肠道中筛选到尿肠球菌 MC13,通过响应面法优化细菌素合成量,适宜温度 35 °C, pH 6.5,蛋白胨 40 g/L,牛肉浸膏 30 g/L,酵母浸膏 40 g/L,乳糖 24 g/L,甘油 5.8 g/L, Tween-80 3 g/L,柠檬酸铵 1.0 g/L, K₂HPO₄ 2.5 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.10 g/L, MnSO₄·7H₂O 0.05 g/L,磷酸二氢钾 2.0 g/L,细菌素合成量达到 36100 AU/mL,提高了 2 倍。王琳琳等^[21]研究了从泡菜中分离到肠膜明串珠菌,适宜培养基为 MRS 培养基,发酵温度 30 °C,起始 pH 6.4,接种量 3%,接种种龄 24 h,发酵时间 24 h。相关报道显示温度和初始 pH 对乳酸菌细菌素合成具有重要影响,但由于菌株差异导致影响的程度不尽相同。不同乳酸菌对营养物质的种类及浓度需求不同,目前细菌素发酵培养基的优化多以 M17、MRS、TGE 培养基为基础,但经济成本相对较高,因此,应用某些工业副产物发酵乳酸菌细菌素成为热点问题之一,以期降低生产成本。综上所述,发酵条件和发酵培养基优化存在菌株特异性,能在一定程度上提高细菌素合成量,但增幅有限,仅能提高几倍,且不能阐明细菌素合成量增幅的调控机制,无法从根本上提高乳酸菌细菌素的合成量^[22]。

3 诱变育种

国内外研究人员通过紫外线诱变、常压室温等离子体诱变、 ^{60}Co γ 射线诱变、亚硝基胍诱变、硫酸二乙酯诱变等方法以期获得细菌素高产菌株。Han 等^[23]通过紫外线诱变提高乳酸片球菌的细菌素合成量,距紫外线 65 cm 处诱变处理 35 s,细菌素合成量最高提高 1.32 倍。高钰淇等^[24]分别通过紫外线(照射时间 20 s)、 ^{60}Co γ 射线(辐照剂量 2.0 kGy)、硫酸二乙酯(0.7%处理 10 min)分别对嗜酸乳杆菌进行诱变,诱变菌株的细菌素合成量最高达 6230.79 U/mL,提高了 2.21 倍。王芳等^[25]通过常压室温等离子体、亚硝基胍诱变及基因组改组获得植物乳杆菌 JLA-9 的突变株 F4-2,细菌素合成量达到 7374.76 IU/mL,相对于原始菌株提高了 2.35 倍。郑雯等^[26]从自制乳酪中分离的植物乳杆菌进行 0.5%甲基磺酸乙酯诱变,对单核增生李斯特菌的抑菌效价由 458 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 提高到 682 $\mu\text{g}/\text{mL}$,比诱变前提高 1.49 倍。诱变育种具有方便快捷、收效大等优点,但只能小幅度地提高细菌素合成量,且具有不定向性,正突变较少,所以诱变育种需与大规模的筛选工作相配合才能获得良好效果。有些诱变菌株具有活力差及遗传不稳定等特点,易出现衰退现象。

4 原生质体融合

原生质体融合属于杂交育种的方法之一,能完整且大量传递遗传信息,重组效率高、操作简单,能克服诱变育种出现的菌株衰退现象,育种的定向性及自觉性均高于诱变育种,目前原生质体融合技术研究主要集中于酵母菌和霉菌育种^[27-30],对乳酸菌育种的研究相对较少。姜雄韬等^[31]利用原生质体融合技术获得植物乳杆菌 ZJQ 与植物乳杆菌 ZJ316 的原生质体融合子,成功提高了细菌素合成量。石海波等^[32]将副干酪乳杆菌 HD1.7 和小白链霉菌通过原生质体融合技术获得细菌素合成量增加的融合菌株。Stoyanova 等^[33]将从俄罗斯不同地区的生乳和乳制品中分离的两株低产细菌素的乳酸菌,利用原生质体融合获得具有广谱抑制细菌和真菌活性的菌株,同时细菌素合成量显著提高,达到 2500~3700 IU/mL。原生质体融合方法具有很多独特的优点,但仍存在亲本细胞核的真正融合、遗传标记的选择、杂种的鉴定、融合菌株性状优化等问题^[34,35]。

5 基因工程方法

5.1 乳酸菌细菌素合成相关基因的自体过量

表达

目前对乳酸菌细菌素合成相关基因的自体过量表达研究主要集中于商品化细菌素 nisin。Cheigh 等^[36]通过导入多拷贝基因增加乳酸乳球菌乳酸亚种 A164 的 nisinZ 合成量,涉及与细菌素合成相关基因 nisinZ(结构基因,负责编码细菌素 nisinZ 前体肽)、nisRK(编码双组分调控系统,负责细菌素 nisinZ 的合成调控)、nisFEG(编码免疫蛋白,负责菌体对细菌素 nisinZ 的自体保护)的过量表达,过量表达 nisinZ 可使细菌素合成量达到 25000 AU/mL, nothern 杂交结果显示 nisinZ 的过量表达能促进 nisinZ 的转录,过量表达 nisinFEG 亦可使细菌素合成量达到 25000 AU/mL,提高了 1.56 倍,但细菌素 nisinZ 的合成速度明显低于过量表达 nisinZ 的菌株。某些乳酸菌细菌素合成相关基因的自体过量表达能在一定程度上提高细菌素的合成量,亦与基因工程菌株的生长有关。

5.2 乳酸菌细菌素的异源表达

5.2.1 乳酸菌细菌素在乳酸菌中的异源表达

目前乳酸菌细菌素的异源表达研究主要集中于乳酸菌、大肠杆菌和酵母菌。以乳酸菌作为宿主异源表达细菌素,表达量不高,且筛选标记可能存在安全性问题,是研究报道相对较少的主要原因。Ni 等^[37]将从乳酸乳球菌乳酸亚种 ATCC11454 中克隆的 nisinA、nisRK 和 nisFEG 成功融合到质粒 pMG36e 中,将重组质粒通过电转化导入乳酸乳球菌 LS01 中,以红霉素为筛选标记,构建的基因工程菌株的 nisin 合成量达到 2470 IU/mL,提高了 1.68 倍。Martín 等^[38]将从屎肠球菌 P13 克隆的 entP(编码信号肽的基因)融合到从屎肠球菌 PLBC21 克隆的成熟细菌素编码基因 entA 中,连接到表达载体 pMG36c,分别导入乳酸乳球菌乳酸亚种 IL1403 和乳酸乳球菌乳脂亚种 NZ9000 中,以氯霉素为筛选标记,抑菌活性分别提高 2.3 倍和 2.4 倍。选择安全的筛选标记是亟待解决的问题之一,Liu 等^[39]从屎肠球菌 LM-2 中克隆细菌素结构基因 entP,连接到质粒 pLEB590 中,以乳酸乳球菌 MG1614 为异源表达宿主,成功构建了食品级细菌素表达系统,纯化细菌素的抑菌活性提高 3.9 倍,有利于乳酸菌细菌素在食品中的应用。

5.2.2 乳酸菌细菌素在大肠杆菌中的异源表达

以大肠杆菌为异源宿主表达乳酸菌细菌素的研究较多,许多第二类乳酸菌细菌素均可在大肠杆菌中表达,如: mundticin KS^[40]、divergicin V41^[41]、enterocin P^[42]、pediocin PA-1^[43]、enterocin A^[44]等。此方法具有

成本低、操作简单、易于控制等优点,但表达的异源蛋白质由于折叠不当,易形成非生产性聚集体,即包涵体,无法成功分泌到胞外,导致提纯困难、操作步骤复杂、成本增加,有些由于前导序列问题使细菌素表达量较低或无活性。但也有较为成功的实例,如Chen等^[45]应用重叠延伸PCR法从清酒乳杆菌中克隆细菌素 sakacin P 编码基因,构建重组质粒 pET28a-sakP,转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) 中,细菌素 sakacin P 在异丙基- β -D-硫代半乳糖苷的诱导下,在大肠杆菌中成功表达,采用低温诱导蛋白质表达的方法使重组蛋白折叠最小化,37 °C对单核细胞增生李斯特菌 ATCC35152 的抑菌圈直径仅为 5 mm,而 20 °C 高达 20 mm。大肠杆菌作为异源表达宿主,所表达的细菌素在食品中应用的安全性有待进一步考虑。

5.2.3 乳酸菌细菌素在酵母中的异源表达

以酵母作为异源宿主表达乳酸菌细菌素的研究相对较少,主要集中于毕赤氏酵母和酿酒酵母作为宿主,如细菌素 HirJM79、Pediocin PA-1、Enterocin P 在毕赤氏酵母中的表达^[46-48],Plantaricin 423 在酿酒酵母中的表达^[49]。酵母菌作为宿主表达乳酸菌细菌素具有成本低、繁殖速度快、纯化简便等优点,但常由于宿主特异性导致表达产物-细菌素活性较低或无活性。综上所述,基因工程方法是真正意义上的理性选育,应用于乳酸菌细菌素高产基因工程菌的构建具有可行性,但存在表达产物活性低、安全性等普遍问题,寻找高效食品级表达系统有利于细菌素在食品工业中的广泛应用。

6 群体感应系统提高乳酸菌细菌素合成量

群体感应亦称为细胞与细胞的交流或细胞密度依赖的基因表达,是细菌根据菌体密度进行胞间或胞内信息传递,调控基因表达的机制。利用信号分子感知菌体密度,当信号分子达到一定浓度可启动相应基因表达,以调控相应的生物学功能。群体感应系统的调控作用通过信号分子和双组分调控系统(组氨酸蛋白激酶和感应调节蛋白)构成的三组分系统共同实现^[50-52]。大多数 II 类和小部分 I 类乳酸菌细菌素的生物合成由群体感应系统调控,乳酸菌群体感应系统大致分为两类,一类为种内信号感应系统,另一类为种群间信号感应系统。

6.1 种内群体感应系统

种内群体感应系统为寡肽介导的群体感应系统,其信号分子为自诱导肽,目前种群内群体感应系统对乳酸菌细菌素的调控研究主要集中于第 I 类细菌素和

第 II 类细菌素^[53]。研究最广泛的是乳酸乳球菌所产的乳酸链球菌素-nisin,属于第 I 类细菌素,亦是目前实现商品化并广泛应用于食品中的乳酸菌细菌素之一,种群内群体感应系统对乳酸链球菌素合成的调控是通过细菌素自身、组氨酸蛋白激酶和反应调节蛋白共同实现的,乳酸链球菌素同时发挥抑菌活性和自体诱导活性两种功能。当 Nisin 作为信号分子积累到一定的浓度时,组氨酸蛋白激酶会感知 Nisin 并在一个保守的组氨酸残基上发生磷酸化,将磷酸基团传递给反应调节蛋白的一个保守天冬氨酸残基上,磷酸化后的反应调节蛋白结合特定基因的启动子,实现细菌素合成基因的表达^[54]。种内群体感应系统对第 II 类细菌素的调控与第 I 类细菌素相似,不同点在于自诱导肽是由与细菌素结构基因相邻的基因编码,其随着细菌素编码基因的转录形成单独的转录物,转录物以较低的速率表达并分泌到胞外^[55]。植物乳杆菌 NC8 所产 plantaricin NC8 受种内群体感应系统的调控,其自诱导肽为 PINC8IF,组氨酸蛋白激酶为 PINC8HK,反应调节蛋白为 PlnD^[56];清酒乳杆菌 Lb706 所产细菌素 sakacin A 是由 *orf4* 基因编码的自诱导肽、组氨酸蛋白激酶为 SapK、编码反应调节蛋白 SapR 实现调控^[57]。

6.2 种群间群体感应系统

种群间群体感应系统为 AI-2/LuxS 介导的群体感应系统,目前国内外针对种群间群体感应系统对乳酸菌细菌素合成调控的研究相对较少。乳酸菌与某些革兰氏阳性菌共培养可提高细菌素的合成量,该过程与种群间群体感应系统有关,发现在共培养过程中 AI-2 与细菌素的合成量保持同步性,共培养的诱导作用通常发生在有细菌素合成能力但无抑菌活性的乳酸菌^[58]或用于提高具有抑菌活性乳酸菌的细菌素合成量^[59,60],诱导菌具有特异性,诱导菌和产细菌素乳酸菌可以是亲缘关系较近或较远,诱导菌对细菌素可能具有抗性或敏感性,例如:与植物乳杆菌 J23 共培养的 45 株菌株中有 10 株革兰氏阳性菌能诱导其细菌素合成,其中 6 株诱导菌对细菌素具有敏感性,4 株诱导菌对细菌素具有抗性^[58]。与植物乳杆菌 NC8 共培养的特异性革兰氏阳性菌中 55%能诱导细菌素的合成,其中 6%的诱导菌对细菌素具有敏感性,94%的诱导菌对细菌素具有抗性。

诱导菌通常被乳酸菌认为是一种外部刺激,乳酸菌可通过种群间群体感应系统调控自身行为,适应共培养环境,产生大量细菌素。Tabasco 等研究发现嗜酸乳杆菌 La-5 与诱导菌嗜热链球菌 STY-31 活菌共培养在转录水平上能显著提高细菌素编码基因的表达量,

诱导菌可能被嗜酸乳杆菌 La-5 认为是一种刺激,这种刺激反过来激活细菌素调控机制。我们前期研究发现植物乳杆菌 KLDS1.0391 与诱导菌瑞士乳杆菌 KLDS1.9207 活菌共培养能显著提高细菌素合成量,约提高 20 倍,实时荧光定量 PCR 结果发现共培养中植物乳杆菌 KLDS1.0391 中的组氨酸蛋白激酶编码基因 *plNC8HK*、反应调节蛋白编码基因 *plnD*、AI-2 合成关键酶编码基因 *luxS*、细菌素编码基因表达量均显著上调,说明共培养后细菌素合成量增加与种群间群体感应系统密切相关^[59,60]。通过共培养可大幅度提高乳酸菌细菌素合成量,同时在一定程度上掌握 AI-2/LuxS 介导的种群间群体感应系统对乳酸菌细菌素合成的调控机制,有利于实现乳酸菌细菌素的工业化生产及在食品中的广泛应用。

7 结论

细菌素高产菌株筛选、发酵条件优化、诱变育种是提高乳酸菌细菌素合成量的常用方法,但提高幅度较小、效果不明显。原生质体融合的定向性及自觉性均高于诱变育种,但仍存在杂种鉴定、遗传标记选择等问题。基因工程方法是真正意义上的理性选育,具有可行性,因此备受研究人员的重视,但存在基因沉默、表达产物活性低、安全性等问题,寻找高效食品级表达系统有利于细菌素的广泛应用。利用群体感应系统调控细菌素合成量是基于乳酸菌的生态和代谢,安全性较高,这种调控被认为是在转录水平上的,是最经济的调控方法,但目前调控机制的研究还不够透彻,但随着基因组学、转录组学、蛋白组学等新方法和新技术的应用,有利于调控机制的进一步明确,为实现乳酸菌细菌素的商品化应用提供一定的理论依据及参考价值。

参考文献

- [1] Bali V, Panesar P S, Bera M B, et al. Bacteriocins: recent trends and potential applications [J]. *Critical Reviews in Food Technology*, 2016, 56(5): 817-834
- [2] Cano-Garrido O, Seras-Franzoso J, Garcia-Fruitós E. *Lactic acid bacteria*: reviewing the potential of a promising delivery live vector for biomedical purposes [J]. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14(1): 137
- [3] Gaspar C, Donders G G, Palmeira-de-Oliveira R, et al. Bacteriocin production of the probiotic *Lactobacillus acidophilus* KS400 [J]. *AMB Express*, 2018, 8: 153
- [4] Sadeghi A, Raeisi M, Ebrahimi M, et al. Effects of temperature, pH, and bile salt on antimicrobial activity of bacteriocin-like substances obtained from barley sourdough LAB [J]. *Comparative Clinical Pathology*, 2018, 27(3): 611-619
- [5] Zheng S, Sonomoto K. Diversified transporters and pathways for bacteriocin secretion in gram-positive bacteria [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(10): 4243-4253
- [6] Al-Madboly L A, Abdullah A K. Potent antagonistic activity of Egyptian *Lactobacillus plantarum* against multiresistant and virulent food-associated pathogens [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 347
- [7] Russo P, Arena M P, Fiocco D, et al. *Lactobacillus plantarum* with broad antifungal activity: A promising approach to increase safety and shelf-life of cereal-based products [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2017, 247: 48-54
- [8] Saraoui T, Leroi F, Björkroth J, et al. *Lactococcus piscium*: a psychotrophic lactic acid bacterium with bioprotective or spoilage activity in food—a review [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2016, 121(4): 907-918
- [9] Deegan L H, Cotter P D, Hill C, et al. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension [J]. *International Dairy Journal*, 2006, 16(9): 1058-1071
- [10] Gaaloul N, Braiek O, Hani K, et al. Isolation and characterization of large spectrum and multiple bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* strain from raw bovine milk [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2015, 118(2): 343-355
- [11] De Carvalho KG, Bambilra FHS, Kruger MF, et al. Antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus sakei* sub sp. *Sakei* 362a, a bacteriocinogenic strain isolated from a Brazilian meat product [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2010, 37(4): 381-390
- [12] Nayyeri N, Dovom M R E, Najafi M B H, et al. A Preliminary study on antifungal activity of lactic acid bacteria isolated from different production stages of Lighvan cheese on *Penicillium expansum* and *Rhodotorula mucilaginosa* [J]. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2017, 11(4): 1734-1744
- [13] 刘国荣,宋振芹,任丽,等.一株产广谱细菌素乳酸菌菌株的分离鉴定及其细菌素特性研究[J]. *食品工业科技*, 2015, 36(4): 180-184
LIU Guo-rong, SONG Zhen-qin, REN Li, et al. Study on separation and identification of a broad spectrum of bacteria producing lactic acid bacteria strains and characterization of its bacteriocin [J]. *Science and Technology of Food Industry*,

- 2015, 36(4): 180-184
- [14] 张国强,樊明涛,师俊凌,等.一株从泡菜中分离的产细菌素乳杆菌的鉴定及细菌素特性研究[J].食品科学,2011,32(3): 171-175
ZHANG Guo-qiang, FAN Ming-tao, SHI Jun-jing, et al. Detection and characterization of abroad-range bacteriocin produced by *Lactobacillus brevis* SD-22, isolated from traditional Chinese pickles [J]. Food Science, 2011, 32(3): 171-175
- [15] 侯亚文,易华西,杨艳艳,等.产细菌素乳酸菌筛选方法的研究进展[J].食品与发酵工业,2013,39(3):29-133
HOU Ya-wen, YI Hua-xi, YANG Yan-yan, et al. Advance on the screening method of class IIa bacteriocin-producing *lactic acid bacteria* [J]. Food and Fermentation Industries, 2013, 39(3): 129-133
- [16] Turgis M, Vu K D, Millette M, et al. Influence of environmental factors on bacteriocin production by human isolates of *Lactococcus lactis* MM19 and *Pediococcus acidilactici* MM33 [J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2016, 8(1): 53-59
- [17] Todorov S, Gotcheva B, Dousset X, et al. Influence of growth medium on bacteriocin production in *Lactobacillus Plantarum* ST31 [J]. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2000, 14(1): 50-55
- [18] Abo-Amer A E. Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus acidophilus* AA11, a strain isolated from Egyptian cheese [J]. Annals of Microbiology, 2011, 61(3): 445-452
- [19] Kumar M, Jain A K, Ghosh M, et al. Statistical optimization of physical parameters for enhanced bacteriocin production by *L. casei* [J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2012, 17(3): 606-616
- [20] Kanmani P, Satishkumar R, Yuvaraj N, et al. The role of environmental factors and medium composition on bacteriocin production by an aquaculture probiotic *Enterococcus faecium* MC13 isolated from fish intestine [J]. Korean Journal of Chemical Engineering, 2011, 28(3): 860-866
- [21] 王琳琳,郑一敏,杨宇清,等.肠膜明串珠菌产细菌素最适发酵条件的筛选[J].西南大学学报(自然科学版),2011,33(2): 82-85
WANG Lin-lin, ZHENG Yi-min, YANG Yu-qing, et al. Screening the best fermentation conditions of bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* [J]. Journal of Southwest University (Natural Science Edition), 2011, 33(2): 82-85
- [22] 章检明,任璐雅,易华西,等.乳酸菌细菌素的高效表达方法研究[J].中国酿造,2014,33(7):29-33
ZHANG Jian-ming, REN Lu-ya, YI Hua-xi, et al. Strategies to increase bacteriocin production by *Lactic acid bacteria* [J]. China Brewing, 2014, 33(7): 29-33
- [23] Han G G, Song A A, KIM E B, et al. Improved antimicrobial activity of *Pediococcus acidilactici* against *Salmonella gallinarum* by UV mutagenesis and genome shuffling [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(13): 5353-5363
- [24] 高钰淇,党丽娟,别小妹,等.不同诱变方法选育嗜酸乳杆菌 NX26 类细菌素高产菌株[J].食品工业科技,2015,36(9): 184-193
GAO Yu-qi, DANG Li-juan, BIE Xiao-mei, et al. Different mutation methods of *Lactobacillus acidophilus* NX2-6 for improving antifungal activity [J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(9): 184-193
- [25] 王芳,陆文俊,杨静,等.高产细菌素植物乳杆菌的诱变选育研究[J].食品工业科技,2017,38(2):191-195
WANG Fang, LU Wen-jun, YANG Jing, et al. Study on screening of high-yield bacteriocin producing *Lactobacillus plantarum* strains induced by mutations [J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(2): 191-195
- [26] 郑雯,孙琳,宋诙.一株植物乳杆菌所产细菌素的性质及诱变筛选[J].食品科技,2014,39(10):12-16
ZHENG Wen, SUN Lin, SONG Hui. Characterization of the antimicrobial activity and mutagenic properties of a bacteriocin produced from *Lactobacillus plantarum* [J]. Food Science and Technology, 2014, 39(10): 12-16
- [27] 潘淼,孙立洁,陈祥松,等.高山被孢霉高产 ARA 的原生质体融合子筛选[J].河南师范大学学报(自然科学版),2017,45(1): 39-46
PAN Miao, SUN Li-jie, CHEN Xiang-song, et al. Screening of protoplast fusion of *Mortierella Alpina* with high yield arachidonic acid [J]. Journal of Henan Normal University (Natural Science Edition), 2017, 45(1): 39-46
- [28] 李红.高效发酵啤酒酵母原生质体融合实验条件的优化[J].中外酒业·啤酒科技,2016,21:33-38
LI Hong. Optimizing process of protoplast fusion in efficient fermentation beer yeast [J]. Beer Technology in Chinese and Foreign · Wine Industry, 2016, 21: 33-38
- [29] Wei W, Wu K, Qin Y, et al. Intergeneric protoplast fusion between *Kluyveromyces* and *Saccharomyces cerevisiae* to produce sorbitol from Jerusalem artichokes [J].

- Biotechnology Letters, 2001, 23(10): 799-803
- [30] Agbessi S, Beauséjour J, Déry C, et al. Antagonistic properties of two recombinant strains of *Streptomyces melanosporofaciens* obtained by intraspecific protoplast fusion [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003, 62(2-3): 233-238
- [31] 姜雄韬, 顾青. 产细菌素乳酸菌原生质体融合[J]. 中国食品学报, 2017, 17(7): 214-220
- JIANG Xiong-tao, GU Qing. The genome shuffle of bacteriocin-producing *Lactic acid bacteria* [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2017, 17(7): 214-220
- [32] 石海波, 雷虹, 张铁丹, 等. 通过抗药性筛选产生广谱高效肽类天然防腐剂的融合菌株[J]. 中国食品添加剂, 2006, 3: 82-85
- SHI Hai-bo, LEI Hong, ZHANG Tie-dan, et al. Selective producing broad spectrum and high effect peptide biopreservative fusion hybrids by drug-fast sign [J]. China Food Additives, 2006, 3: 82-85
- [33] Stoyanova L G, Sul'timova T D, Netrusov A I. Establishment of Taxonomic status of new prospective bacteriocin-synthesizing *Lactococci* strains of various origins [J]. Moscow University Biological Sciences Bulletin, 2008, 63(4): 156-162
- [34] 王瑶. 原生质体融合在微生物育种的应用与研究进展[J]. 农村经济与科技, 2016, 27(12): 276
- WANG Yao. Application and research progress of protoplast fusion in microbial breeding [J]. Rural Economy and Technology, 2016, 27(12): 276
- [35] 毛雨, 王丹, 黄占斌, 等. 微生物原生质体融合育种技术及其应用[J]. 中国生物工程杂志, 2010, 30(1): 93-97
- MAO Yu, WANG Dan, HUANG Zhan-bin, et al. Application of microbial protoplast fusion technology in genetic breeding [J]. China Biotechnology, 2010, 30(1): 93-97
- [36] Cheigh C I, Park H, Choi H J, et al. Enhanced nisin production by increasing genes involved in nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 [J]. Biotechnology Letters, 2005, 27(3): 155-160
- [37] Ni Z J, Zhang X Y, Liu F, et al. Effect of co-overexpression of nisin key genes on nisin production improvement in *Lactococcus lactis* LS01 [J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2017, 9(2): 204-212
- [38] Martín M, Gutiérrez J, Criado R, et al. Cloning, production and expression of the bacteriocin enterocin a produced by *Enterococcus faecium* PLBC21 in *Lactococcus lactis* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 76(3): 667-675
- [39] Liu G, Wang H, Griffiths M W, et al. Heterologous extracellular production of enterocin P in *Lactococcus lactis* by a food-grade expression system [J]. European Food Research and Technology, 2011, 233(1): 123-129
- [40] Sakayori Y, Muramatsu M, Hanada S, et al. Characterization of *Enterococcus faecium* mutants resistant to mundticin KS, a class IIa bacteriocin [J]. Microbiology, 2003, 149(10): 2901-2908
- [41] Richard C, Drider D, Elmorjani K, et al. Heterologous expression and purification of active divercin V41, a class IIa bacteriocin encoded by a synthetic gene in *Escherichia coli* [J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(13): 4276-4284
- [42] Gutiérrez J, Criado R, Citti R, et al. Cloning, production and functional expression of enterocin P, a sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* P13, in *Escherichia coli* [J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 103(3): 239-250
- [43] Moon G S, Pyun Y R, Kim W J. Expression and purification of a fusion-typed pediocin PA-1 in *Escherichia coli* and recovery of biologically active pediocin PA-1 [J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 108(1): 136-140
- [44] Nigutová K, Serenčová L, Píknová M, et al. Heterologous expression of functionally active enterolysin A, class III bacteriocin from *Enterococcus faecalis*, in *Escherichia coli* [J]. Protein Expression and Purification, 2008, 60(1): 20-24
- [45] Chen H, Tian F, Li S, et al. Cloning and heterologous expression of a bacteriocin sakacin P from *Lactobacillus sakei* in *Escherichia coli* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 94(4): 1061-1068
- [46] Sánchez J, Borrero J, Gómez-Sala B, et al. Cloning and heterologous production of hiracin JM79, a sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus hirae* DCH5, in *Lactic acid bacteria* and *Pichia pastoris* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(8): 2471-2479
- [47] Beaulieu L, Groleau D, Míguez C B, et al. Production of pediocin PA-1 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* reveals unexpected inhibition of its biological activity due to the presence of collagen like material [J]. Protein Expression and Purification, 2005, 43(2): 111-125
- [48] Gutiérrez J, Criado R, Martín M, et al. Production of enterocin P, an antilisterial pediocin-like bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13, in *Pichia pastoris* [J].

- Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2005, 49(7): 3004-3008
- [49] Van Reenen C A, Van Zyl W H, Dicks L M T. Expression of the immunity protein of plantaricin 423, produced by *Lactobacillus plantarum* 423, and analysis of the plasmid encoding the bacteriocin [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(12): 7644-7651
- [50] Blanchard A E, Liao C, Lu T. An ecological understanding of quorum sensing-controlled bacteriocin synthesis [J]. Cellular and Molecular Bioengineering, 2016, 9(3): 443-454
- [51] Majumdar S, Pal S. Quorum sensing: A quantum perspective [J]. Journal of Cell Communication and Signaling, 2016, 10(3): 173-175
- [52] Singh R P, Desouky S E, Nakayama J. Quorum quenching strategy targeting Gram-positive pathogenic bacteria [J]. Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health, 2016, 901: 109-130
- [53] Gobetti M, De Angelis M, Di Cagno R, et al. Cell-cell communication in food related bacteria [J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 120(1-2): 34-45
- [54] Kleerebezem M. Quorum sensing control of lantibiotic production: Nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis [J]. Peptides, 2004, 25(9): 1405-1414
- [55] Chanos P, Mygind T. Co-culture-inducible bacteriocin production in *lactic acid bacteria* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(10): 4297-4308
- [56] Maldonado A, Ruiz-barba J L, Jiménez-Díaz R. Purification and genetic characterization of plantaricin NC8, a novel coculture-inducible two-peptide bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* NC8 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(1): 383-389
- [57] 满丽莉,孟祥晨,王辉,等.感应系统在乳酸菌产细菌素中的作用[J].食品科学,2011,32(13):360-364
- MAN Li-li, MENG Xiang-chen, WANG Hui, et al. Regulation of bacteriocin synthesis by quorum sensing in *lactic acid bacteria* [J]. Food Science, 2011, 32(13): 360-364
- [58] Rojo-Bezares B, Sáenz Y, Navarro L, et al. Coculture-inducible bacteriocin activity of *Lactobacillus plantarum* strain J23 isolated from grape must [J]. Food Microbiology, 2007, 24(5): 482-491
- [59] Man L L, Meng X C, Zhao R H. Induction of plantaricin MG under co-culture with certain *Lactic acid bacteria* strains and identification of LuxS mediated quorum sensing system in *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0391 [J]. Food Control, 2012, 23(2): 462-469
- [60] Man L L, Meng X C, Zhao R H, et al. The role of *pINC8HK-plnD* genes in bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0391 [J]. International Dairy Journal, 2014, 34(2): 267-274

(上接第 249 页)

- [33] 王倩.内蒙古牛羊肉脂肪酸测定及其特征研究[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2014
- WANG Qian. Determination and characteristics of beef and mutton fatty acids in Inner Mongolia [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2014
- [34] Hu F B, Cho E, Rexrode K M, et al. Fish and long-chain omega-3 fatty acid intake and risk of coronary heart disease and total mortality in diabetic women [J]. Circulation, 2003, 107(14): 1852-7
- [35] Bandarra N M, Rema P, Batista I, et al. Effects of dietary n-3/n-6 ratio on lipid metabolism of gilthead seabream (*Sparus aurata*) [J]. European Journal of Lipid Science & Technology, 2011, 113(11): 1332-1341
- [36] 张洪涛,单雷,毕玉平.n-6 和 n-3 多不饱和脂肪酸在人和动物体内的功能关系[J].山东农业科学,2006,2:115-120
- ZHANG Hong-tao, SHAN Lei, BI Yu-ping. Functional relationship between n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids in humans and animals [J]. Shandong Agricultural Sciences, 2006, 2: 115-120
- [37] 魏永生,郑敏燕,耿薇,等.常用动、植物食用油中脂肪酸组成的分析[J].食品科学,2012,33(16):188-193
- WEI Yong-sheng, ZHENG Min-yan, GENG Wei, et al. Analysis of fatty acid composition in common animal and vegetable edible oils [J]. Food Science, 2012, 33(16): 188-193
- [38] 王华志,王道波,李秋霖,等.油脂中脂肪酸成分与人体健康[J].粮油加工,2010,6:16-19
- WANG Hua-zhi, WANG Dao-bo, LI Qiu-lin, et al. Fatty acid composition in oils and fats and human health [J]. Cereals and Oils Processing, 2010, 6: 16-19