

传统干酪中一株产 IIa 类细菌素乳酸菌的分离与鉴定

刘国荣, 周 康, 李平兰*, 张金兰, 周 伟
(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘 要: 从内蒙古传统干酪中分离到一株产抑菌活性物质的乳酸菌 M-2, 其对单核细胞增生李斯特氏菌、金黄色葡萄球菌等食品中常见致病菌和腐败菌都有抑制作用。排除有机酸、H₂O₂ 等的干扰后, 仍有抑菌活性; 进一步硫酸铵沉淀、透析及浓缩处理后, 其抑菌活性显著增强; 用蛋白酶 K 处理后, 其抑菌活性消失, 因此确定该抑菌活性物质为蛋白类物质, 进而确定乳酸菌 M-2 为细菌素产生菌。通过生理生化实验和 16S rRNA 基因序列分析对该菌株进行了鉴定。PCR 扩增得到 1675bp 的 16S rRNA 序列, 并将其通过 BLAST 软件在 NCBI 网站中进行同源性比, 同时, 通过 Bioedit 7.0 和 Treedrawing 软件绘制系统发育树。结果显示, M-2 的 16S rRNA 序列和数据库中的屎肠球菌 SF 菌株的序列的同源性为 99.87%。在细菌系统发育分类学上, M-2 菌株归属屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*)。这与生理生化实验初步鉴定结果一致。根据细菌素的分类原则, 将该细菌素归类为 IIa 类细菌素。

关键词: 乳酸菌; IIa 细菌素; 屎肠球菌; 16S rRNA; 鉴定

Isolation and Identification of A Class IIa Bacteriocin-producing Lactic Acid Strain from Traditional Cheese

LIU Guo-rong, ZHOU Kang, LI Ping-lan*, ZHANG Jin-lan, ZHOU Wei
(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: A lactic acid bacteria strain, M-2, producing inhibitory activity substance, is isolated from Inner Mongolia traditional cheese. The bacteriocin shows a strong antimicrobial activity against most of the tested spoilage and food-borne pathogenic bacteria, such as *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and so on. After eliminating some interference factors such as the organic acids, hydrogen peroxides and so on, the antimicrobial activity still exists. By ammonium sulphate precipitation, dialysis and concentration, this substance is inactivated when treated with proteinase K. M-2 is identified *Enterococcus faecium* on the base of physiological and biochemical characteristics and 16S rRNA gene sequences. The sequence fragment of 1675 bp 16S ribosomal RNA is amplified from total DNA of strain M-2 by PCR. The sequence analysis is completed by the application of BLAST on the websites of NCBI and the phylogenetic tree is drawn with Bioedit 7.0 with treedrawing. The results show that M-2 shares 99.87% 16S rRNA sequence homology with *Enterococcus faecium* strain SF. In phylogenetic framework of bacteria classification, strain M-2 belongs to *Enterococcus faecium*. According to classification of bacteriocins, the bacteriocin belongs to class IIa bacteriocins.

Key words: LAB; class IIa bacteriocin; *Enterococcus faecium*; 16S rRNA; identification

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)05-0185-05

目前, 食品中使用的大多是化学防腐剂, 影响人体健康, 它的应用越来越受到众多国家的限制。乳酸菌细菌素具有安全、无毒、适用性广、性能稳定等优点, 因此, 开发其作为高效广谱食品生物防腐剂, 以替代目

前广泛使用的化学防腐剂已成为现代食品工业的热点。

本实验从内蒙古传统干酪中分离到一株产细菌素的乳酸菌, 为了确定该菌在分类学上的地位, 对其进行生理生化指标和 16S rRNA 序列鉴定, 并基于对

收稿日期: 2006-11-30

*通讯作者

基金项目: 国家“863”重大项目(2006AA10A208); 北京市自然科学基金资助项目(6052015);

国家自然科学基金资助项目(30671482)

作者简介: 刘国荣(1983-), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品微生物。

16SrDNA 的分析构建了全生命系统发育树。根据细菌的分类原则^[1], 将该菌株所产生的细菌素归类为 IIa 类细菌素。

IIa 类细菌素, 主要包括肠球菌素(enterocin)、片球菌素(pediocin)等小分子细菌素, 由于其对食源性病原单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)有强烈的抑制作用, 同时还具有较好的物理化学性质, 因此被认为是最有希望应用于多种工业用途的细菌素。

随着生物技术的飞速发展, 16SrDNA 序列分析技术在微生物分类鉴定及分子检测中得到了广泛的应用。16SrDNA 既具有保守区域, 又具有高度区域, 是生物的种属鉴定和系统的重要分子基础, 以 16SrDNA 为目的的现代分子生物学技术能精确地揭示微生物种类和遗传的多样性, 从而 16SrDNA 序列分析成了微生物分类鉴定主要依据。该方法克服了传统微生物通过生理生化指标进行鉴定的限制, 操作方便、检测快速、准确且灵敏度高, 已被广泛应用到菌种鉴定、群落对比分析、群落中系统发育及种类多样性的评估等领域, 是一种客观且可信度高的分类方法^[2]。Woese 与 Olsen 等基于对 16SrDNA 的分析构建了现已公认的全生命系统发育树^[3-5]。16SrDNA 系统发育分析, 具有准确、快速、灵敏的优点, 正成为目前菌种鉴定的有效手段。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

1.1.1 样品

内蒙古传统干酪, 样品取回后贮藏于 4℃ 以备分析所用。

1.1.2 培养基和试剂

培养基: MRS 固、液体培养基、TSA 培养基、TSAYE 培养基、TSB 培养基、TSBYE 培养基、LB 培养基。

碳酸钙、2.5mol/L NaOH、2.5mol/L HCl、0.2mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ (pH7.0)、过氧化氢酶、硫酸铵固体北京蓝弋化工产品有限公司; Nisin 浙江银象生物工程有限公司; 克隆载体 pEASY-T 大连宝生物工程有限公司; HiFi 酶、dNTP、氨苄西林(Amp)、氯仿、苯酚上海生工生物工程技术服务有限公司; 胶回收试剂盒 天为时代生物工程有限公司。

1.1.3 指示菌

Staphylococcus aureus 1.128、*Staphylococcus aureus* 1885 C56005、*Staphylococcus aureus* 26112、*Staphylococcus aureus* 1.89 均由中国普通微生物菌种保藏中心提供; *Listeria monocytogenes* LM54002 由中国药品生物制品鉴定所提供; *E. coli* DH5 α 由广西大学动物科学技术学院寄生虫实验室保存。

1.1.4 PCR 引物

在以大肠杆菌(*E. coli*) 16S rRNA 设计的 PCR 通用引物 27F 和 1492R 的基础上^[6], 进行个别碱基的调整, 得到引物 16SF: 5' GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG3'; 16SR: 5' CGGCTACC TTGTTACGACTT 3' 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.1.5 仪器设备

YX-280D 自动蒸汽消毒器 江阴市滨江医疗设备厂; HH·S21-8 电热恒温水浴锅 北京长安科学仪器厂; 101-2A 型电热鼓风干燥箱 天津市泰斯特仪器有限公司; SCL-1300 型垂直流洁净工作台 北京赛伯乐实验仪器有限公司; E 系列生物显微镜 麦克奥迪实业集团有限公司; DNP-9162 型电热恒温培养箱 上海精宏实验设备有限公司; pHs-25 型酸度计 上海精密科学仪器有限公司; 722S 分光光度计 上海棱光技术有限公司; TGL-20M 高速冷冻离心机 长沙非凡仪器仪表有限公司; 牛津杯(10×7.8×6mm) 河南新乡美乐食品机械厂; 透析袋(3000~6000Da) 江苏省海门市盛峰科实验器材厂; Biofuge Stratos 全能台式高速冷冻离心机 上海安亭科学仪器厂; 电泳仪 北京市六一仪器厂; -70℃ 超低温冰箱 美国 REVCO; PCR 仪 华粤企业集团有限公司; 电子分析天平 北京赛多利斯天平有限公司; WFH-201B 型全封闭多功能紫外透射反射仪 上海迪奥生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 产细菌素乳酸菌的筛选

1.2.1.1 乳酸菌的分离

采用常规平板稀释法挑有碳酸钙溶解圈的单菌落并镜检。

1.2.1.2 产生抑菌活性代谢产物乳酸菌的筛选

采用琼脂点扩散交叉拮抗试验法。

1.2.2 菌株产细菌素的鉴定

除细菌素外, 乳酸菌在生长过程中代谢还可以产生其他具有抑菌作用的物质, 如有机酸、过氧化氢、双乙酰等, 因此在筛选是否产细菌素的菌株时就要排除这些干扰因素, 确定是细菌素引起的抑菌作用。具体为: (1) pH 中和法排除有机酸的干扰; (2) 过氧化氢酶处理排除 H_2O_2 干扰; (3) 细菌滤器出去菌体细胞的干扰。在此基础上, 通过硫酸铵沉淀、透析处理及蛋白酶处理进一步确定抑菌活性物质为蛋白类物质。

1.2.3 细菌素效价分析方法

准确称取 500mg Nisin 标准品(10^6AU/g), 溶于 50ml 无菌的 0.02mol/L 的盐酸稀溶液中, 配成 10^4AU/ml 的 Nisin 标准液, 并置于 4℃ 冰箱中备用。使用时, 以无菌的 0.02mol/L 盐酸为稀释液, 制备所需各种效价的 Nisin 标

准液。

1.2.3.1 标准曲线范围的选择

用0.02mol/L HCl依次将 10^4 AU/ml的Nisin标准液稀释成1000、500、250、100、50、25、10、5、2.5、1.0AU/ml的标准溶液。按照上述抑菌试验方法,依次分别取100 μ l加于已制备好平板的牛津杯中,每个浓度重复三个平板,以抑菌圈直径的校正值为横坐标,Nisin效价的对数为纵坐标,绘制标准曲线。确定抑菌圈直径与对数值有较好的线性关系时,Nisin的效价范围^[7]。

1.2.3.2 标准曲线的制作

根据上一步确定的Nisin效价范围,采用一剂量法制作Nisin效价标准曲线。用0.02mol/L HCl依次将 10^4 AU/ml的Nisin标准液按一定比例稀释成七种浓度(需在效价范围内),分别取100 μ l加于已制备好平板的三个间隔的牛津杯中,同时另外间隔的三个加入中心浓度细菌素液100 μ l,每个浓度重复三个平板,以所得到的对应抑菌圈直径的差数为横坐标,对应的效价值对数为纵坐标,绘制标准曲线^[8-9]。

1.2.3.3 样品效价值的确定

将样品稀释至标准曲线范围内,分别取100 μ l加于三个间隔放置的牛津杯中,以已知效价值的中心浓度细菌素液为对照加入另外三个间隔的牛津杯中,重复三个平板。将样品抑菌圈直径与对照抑菌圈直径的差值代入标准曲线中计算可得样品的效价值。

1.2.4 产细菌素乳酸菌菌株的鉴定

1.2.4.1 菌体形态及生理生化试验

MRS固体平板上观察菌落形态;革兰氏染色后显微镜下观察菌体形态;做各项生理生化试验,包括:产 H_2S 试验,精氨酸产氨试验,精氨酸双水解酶试验,马尿酸水解试验,V-P试验,黄色素,溶血,45℃生长,50℃生长,0.04%亚硝酸盐,0.01%四唑,6.5%NaCl,Lancefield血清群,运动性,糖醇发酵试验。

1.2.4.2 基于16SrRNA基因序列的分子生物学鉴定

(1) 细菌总DNA的制备

方法见文献^[10]。

(2) 16S rRNA的PCR扩增和序列测定

PCR反应体系(50 μ l)如下:取M-2菌株基因组DNA 1 μ l作为PCR反应模板,dNTP(200 μ mol/L)1 μ l,5 μ l 10 \times PCR buffer(含 Mg^{2+}),上述引物(配为10 μ mol/L)各2 μ l,0.5U HiFi酶(5U/ μ l)。PCR扩增条件为:94℃预变性5min;94℃,45s;60℃,30s;70℃,1min;30个循环;72℃延伸10min。PCR产物经1%的琼脂糖凝胶电泳后,采用天为时代胶回收试剂盒进行片段的回收,再与pEASY-T载体连接,转化后的阳性菌提取质

粒进行酶切鉴定,最后送上海生物工程有限公司测序。

(3) 序列分析及系统发育树绘制

PCR产物序列通过BLAST在GenBank+EMBL+DDBJ+PDB基因库中进行同源性搜索。从Genebank中选择了近缘菌株的16SrRNA基因序列,应用Bioedit7.0和Treedrawing软件进行多重比较后构建系统发育树并将其鉴定到种^[3]。

2 结果与分析

2.1 产细菌素乳酸菌的筛选

从我国传统干酪中分离出103株产抑菌活性物质的乳酸菌,其中有75个菌株对所测试指示菌有不同程度的抑制作用,只有菌株M-2对*Listeria monocytogenes* 54002表现出较好的抑菌作用,因此,选定其作为下一步试验的测试菌。选定M-2作为下次试验的测试菌,*Listeria monocytogenes* 54002作为下一步试验的指示菌。

2.2 M-2菌株产细菌素的鉴定

将发酵上清液中和至6.0~6.5后做抑菌实验发现中和酸前后抑菌圈大小基本没有差别;向发酵上清液中加入过氧化氢酶,使其最终浓度为1mg/ml,37℃水浴1h,做抑菌实验发现抑菌圈直径和发酵上清原液的抑菌圈直径几乎一致;经细菌滤器过滤除去菌体细胞后做抑菌实验发现抑菌圈大小没有差别。这说明其抑菌活性并不是由有机酸、过氧化氢及菌体细胞引起的。在蛋白酶K处理后,其抑菌活性消失,因此确定该抑菌活性物质为蛋白质。

表1 不同处理对抑菌活性的影响
Table 1 Inhibitory activity after different treatments

处理	抑菌圈直径(mm)	效价值(AU/ml)
1(中和前)	25.44	610.86
2(去除菌体细胞)	24.74	500.58
3(H ₂ O ₂ 酶处理后)	24.26	443.23
4(中和至5.5~6.5)	20.28	161.60
5(60%硫酸沉淀)	20.94	191.03
6(透析袋处理后)	20.32	163.24
7(蛋白酶K处理后)	0	0
8(PBS缓冲液)	0	0
9(饱和硫酸铵溶液)	0	0

2.3 细菌素效价分析方法

2.3.1 效价标准曲线范围选择

根据所测数据,Nisin效价在0~5AU/ml时,抑菌圈直径变化幅度为0.44mm;Nisin效价在5~100AU/ml时,抑菌圈直径变化幅度为2.14mm;在100~1000AU/ml时,抑菌圈直径变化幅度为1.08mm;结合图1,Nisin效价在5~100AU/ml时,其对数值与抑菌圈直径有较好的线性关系,因此标准曲线范围可选为10~100AU/ml。结果如图1所示。

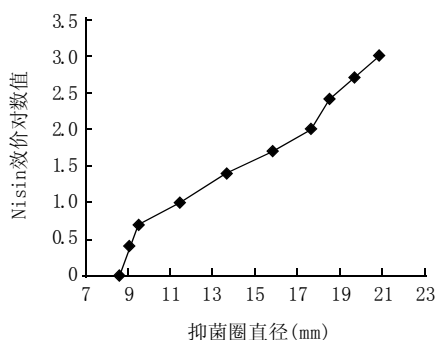


图1 标准曲线范围的选择
Fig.1 Choice of scope of standard curve

2.3.2 效价分析标准曲线

由图1可知Nisin效价在5~100AU/ml范围内,抑菌圈直径差与效价对数值呈良好的线性关系,在试验中最终选择Nisin效价在10~100AU/ml范围内绘制效价标准曲线,结果见图2所示。此标准曲线的线性程度较高(R^2 值0.9767),由此,选取本曲线作为标准曲线,以确定细菌素效价的精确值。

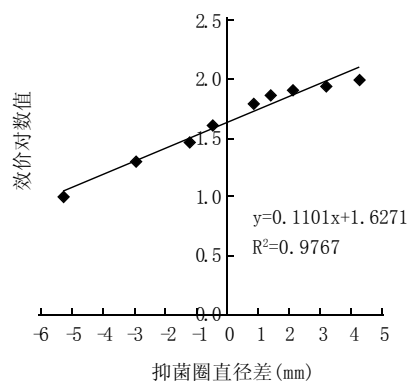


图2 效价标准曲线(10~100AU/ml)
Fig.2 Activity assay standard curve (10~100AU/ml)

2.4 M-2菌株的鉴定

2.4.1 M-2菌株的培养特征及生理生化鉴定

2.4.1.1 M-2菌落特征及个体形态特征

M-2在MRS培养基上菌落形态为微小圆形或梭形白色菌落。在液体培养基中呈成对或短链,细胞卵圆形,0.6 μm × 2.3 μm,不生芽孢,革兰氏阳性,不运动,兼性厌氧。乳酸菌M-2的菌体形态如图3所示。

2.4.1.2 M-2生理生化特征

乳酸菌M-2的生理生化特征如表2所示。

综合以上培养特征及生理生化特性,根据东秀珠等编著的《常用细菌系统鉴定手册》^[11],初步将M-2菌株鉴定为屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)。

2.4.2 M-2菌株基于16SrRNA基因的分子生物学鉴定

2.4.2.1 16SrRNA基因测序结果

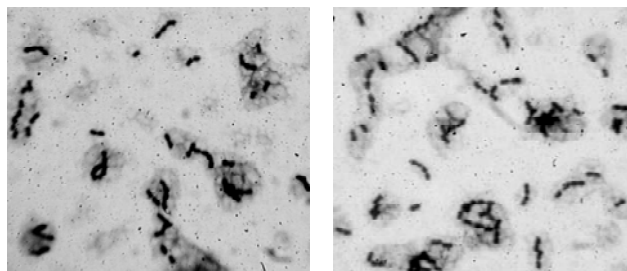


图3 M-2菌体形态照片
Fig.3 Shape of strain M-2

将M-2菌送16SrDNA的PCR反应产物送至上海生物工程技术有限公司进行测序,测得16SrDNA大部分序列共1675bp(图4)。

表2 M-2菌株生理生化特征
Table 2 Physiological and biochemical characteristics of strain M-2

生理生化试验		试验结果	生理生化试验		试验结果
从糖醇产酸	D- 木糖	—	松三糖	—	
	L- 鼠李糖	—	甘油	+	
	蔗糖	+	阿东醇	—	
	乳糖	+	山梨醇一		
	蜜二糖	+	甘露醇	+	
	棉子糖	—			
生长于其它	45℃	+	0. 04% 亚硝酸盐	—	
	50℃	+	0. 01% 四唑	—	
	6. 5% NaCl	+			
	黄色素	—	精 AA 产 NH ₃	+	
	溶血	α	精氨酸双水解酶	+	
	Lancefield血清群	D	马尿酸水解	+	

2.4.2.2 BLAST 同源性搜索比较结果

将所得16S rRNA测定序列,在www.ncbi.nlm.nih.gov网站中使用BLASTN2.2.14 [May -07-2006]在GenBank+EMBL+DDBJ+PDB 基因库中进行同源性搜索,所得结果中同相似性最高的前七个菌株比较结果如表3。从表3可见M-2菌株与4株屎肠球菌16S rRNA序列相似性均达99.60%以上,最高达99.87%,而且分值最高的全部为屎肠球菌。根据同源性比较结果,可以初步确认M-2为屎肠球菌。

表3 在GenBank中同部分菌株16S rRNA序列进行同源性比较结果

Table 3 Result of identity compared with partial strains in the GenBank database

菌种名	菌株编号	登陆号	分值	相似性(%)
<i>Enterococcus faecium</i>	SF	AY675247.1	3007	99.87
<i>Enterococcus faecium</i>	ML7	AB232955.1	2987	99.86
<i>Enterococcus lactis</i>	CK1026	DQ255948.1	2983	99.80
<i>Enterococcus lactis</i>	CK1025	AY683836.2	2983	99.80
<i>Enterococcus faecium</i>		DQ403193.1	2979	99.60
<i>Enterococcus faecium</i>		AY172570.1	2977	99.67
<i>Enterococcus lactis</i>	CK1114	AY902459.2	2977	99.86

```

1-60      GGTGGGGCCATCTGGATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATT
61-120    GCCCTTTACGGCTACCTTGTACGACTTACCCCAATCATCTATCCACCTTAGCGGGCT
121-180    GCTCCAAAAGGTTACCTCACCAGACTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGGC
181-240    GTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTACCGCGGCGTGCTGATCCGCGATTACTAGCGAT
241-300    TCCGGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAAGTGAAGAGCTTTAAGAGAT
301-360    TAGCTTAGCCTCGCGACTTCGCAACTCGTTGTACTTCCCATTTAGTACACGTGTGTAGCCC
361-420    AGGTCATAAGGGGCGATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGC
421-480    AGTCTTGCTAGAGTGCCCAACTGAATGATGGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGC
481-540    GGGACTTAACCAACATCTCAGCAGACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTT
541-600    TGCCCCCGAAGGGGAAGCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGG
601-660    TTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGCTCAAT
661-720    TCCTTTGAGTTTCAACCTTTCGGGTGCTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTG
721-780    CAGCACTGAAGGGCGGAAACCTCCAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTAC
781-840    CAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCACGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAG
841-900    AGAGCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATATCTACGCATTTACCGCTACACATGG
901-960    AATTCCACTCTCCTTCTTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCAATGACCTCCCCGGTTGA
961-1020   GCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGCTCGCTTACGCCCAATAAAT
1021-1080  CCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCAGCTAGTTAGCCGTGGCT
1081-1140  TTCTGGTTAGATACCGTCAAGGGATGAACAGTTACTCTCATCCTTGTCTTCTCTAACAA
1141-1200  CAGAGTTTTACGATCCGAAAACCTTCTTCACTCAGCGGCGGTTGCTCGGTACAGCTTTCG
1201-1260  TCCATTGCCAAAGATTCCCTACTGCTGCCCTCCGTAAGGAGTTTGGGCGGTGTCTCAGTCC
1261-1320  CAATGTGGCCGATCACCCTCTCAGTTCGGCTATGCATCGTGGCCTTGGTGAGCCGTTAC
1321-1380  TCACCAATAGCTAATGCACCGCGGGTCCATCCATCAGCGACACCCGAAAGCGCCTTTCA
1381-1420  AATCAAAACCATGCGGTTTCGATTGTTATACGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTATC
1421-1480  CCCTTCTGATGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCTGTCGCCACTCTTCTTTTCCG
1481-1540  GTGGAGCAAGCTCCGGTGGAAAAAGAAGCGTACGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCA
1541-1600  GCGTTCGTCTTGAGCCAGGATCAAACCTCTCAAGGGCAATCCAGCACACTGGCGGCCGTT
1601-1653  ACTAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTGGCGTAATCATGTCAAGGTTTCTTGCCGCCA
1661-1675  GTTTCCAATGACCTT

```

图4 M-2 菌 16S rDNA 碱基序列

Fig.4 16S rDNA sequence of M-2 strain

从Genebank 中选择了12个菌株的16S rRNA 基因序列,应用Clustalx 1.83和MEGA 3.1软件进行多重比较后构建的系统发育树见如图5。12株菌均为肠球菌属的不同菌种,其中M-2菌株与*Enterococcus faecium* ML7的亲缘关系最近,且M-2菌株与*Enterococcus faecium* ML7在一个分支中,由此进一步证明,M-2菌株为屎肠球菌。

2.4.2.3 系统发育树的构建(见图5)

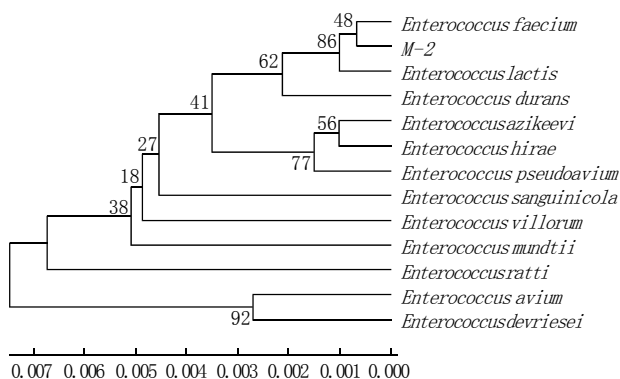


图5 基于16S rDNA序列的系统发育树

Fig.5 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence of isolate and sequences of relating species

3 结 论

3.1 M-2的离心发酵液在排除有机酸、 H_2O_2 等的干扰后,仍有抑菌活性;在进一步硫酸铵沉淀、透析及浓缩处理后,其抑菌活性显著增强;在蛋白酶处理后,其抑菌活性消失,因此确定该抑菌活性物质为蛋白质,进而确定乳酸菌菌株M-2为细菌素产生菌。

3.2 本研究利用16S rRNA基因测序,对分离自内蒙古传统干酪中的产细菌素的乳酸菌M-2菌株进行了细菌分类学鉴定。通过16SrRNA基因序列在GenBank+EMBL+DDBJ+PDB基因库中进行同源性比较,发现与该菌株基因相似性为99.60%以上的菌株有7个,它们中大多数为屎肠球菌。而且在系统发育树中与屎肠球菌属于同一小分支。这一结果与常规的生理生化鉴定结果是一致的。说明本研究的鉴定结果是可靠的。

3.3 根据细菌素的一般分类原则,将该细菌素归类为IIa类细菌素。

参考文献:

- [1] KLAENHAMMER T R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria[J]. FEMS Microbiol Rev, 1993(12): 39-85.

Alcalase 2.4L FG 酶解米渣蛋白动力学特性研究

李积华, 郑为完, 苏冰霞, 张 斌

(南昌大学 食品科学教育部重点实验室, 江西 南昌 330047)

摘 要: 采用 pH-stat 法对 Alcalase 2.4L FG 酶水解米渣蛋白的动力学特性进行了比较系统探讨: (1) 探讨了温度、酶浓度 ($[E]/[S]$)、底物浓度、pH 值和水解时间对水解度的影响, 并确定了比较理想的工艺参数; (2) 探讨了该酶催化水解米渣蛋白反应的动力学参数: $K_m=0.6598\text{mol/L}$, $V_{\max}=0.00351\text{mol/min}\cdot\text{L}$; (3) 探讨了该酶催化水解米渣蛋白反应的初级阶段的动力学特性, 为米渣的进一步开发提供理论依据。

关键词: 米渣; 蛋白; 酶解; 动力学

Study on Hydrolysis Kinetics Rice Dregs with Alcalase 2.4L FG

LI Ji-hua, ZHENG Wei-wan, SU Bing-xia, ZHANG Bin

(Key Laboratory of Food Science, Ministry of Education, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: This paper discussed the hydrolysis kinetics on rice dregs with Alcalase 2.4L FG by pH-stat method: (1) The factors of reaction temperature, enzyme concentration, substrate concentration, pH value and reaction time were studied. (2) The maximum velocity and instant K_m are determined by probing into the relation of the substrate concentration and reaction velocity: $K_m=0.6598\text{mol/L}$, $V_{\max}=0.00351\text{mol/min}\cdot\text{L}$. (3) Kinetics characteristics during the initial step of the enzymatic hydrolysis were discussed.

Key words rice dregs; protein; enzymatic hydrolysis; kinetics

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)05-0190-04

以大米为原料发酵生产乳酸、谷氨酸、柠檬酸及生化药品或水解制备糊精等工序中会产生大量的副产物——米渣。米渣中的蛋白质含量有的高达 70% 以上(干基), 远高于大米蛋白含量。大米蛋白是已知谷物中过敏性最低的蛋白质, 而且具有良好的氨基酸组成配比,

消化率极高, 其品质被公认为是粮食种子蛋白中的最佳者, 是一种优良的植物蛋白, 也是婴儿食品的良好蛋白原料^[1]。但是, 目前国内大部分米渣只是被用作饲料, 造成了蛋白质资源的极大浪费。

大米蛋白中有 75%~90% 是碱溶性谷蛋白, 分子

收稿日期: 2006-04-07

作者简介: 李积华(1979-), 男, 博士研究生, 研究方向为食品科学。

- [2] 龙雯, 陈存社. 16SrRNA 测序在细菌鉴定中的应用[J]. 北京工商大学学报: 自然科学版, 2006, 24(5): 10-12.
- [3] SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Mol Biol Evol, 1987, 4(4): 406-425.
- [4] LEE I Y, SEO I T. Optimization of fermentation conditions for production of exopolysaccharide by *Bacillus polymyxa*[J]. Bioprocess Engineering, 1997(16): 71-75.
- [5] PAULUS H, GRAY E, KIM G J, et al. The biosynthesis of polymyxin B by growing cultures of *Bacillus polymyxa*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1964, 239(3): 865-871.

- [6] 刘志桓. 现代微生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2003.
- [7] 伊守亮, 肖林, 顾正华, 等. 管碟法测定 Nisin 效价[J]. 无锡轻工大学学报, 2003, 23(4): 41-46.
- [8] DELQADO A, BRITO D, FEVEREIRO P, et al. Bioactivity quantification of crude bacteriocin solutions[J]. Microbiological Methods, 2005, 62: 121-124.
- [9] 马绪荣, 苏德模. 药品微生物学检验手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [10] SAMBROOK J, RUSSEL D W. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [11] 东秀珠, 蔡妙瑛. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.