

合浦珠母贝黏液细菌F35的鉴定及其抗菌物质分析

张 岩^{1,2}, 吴燕燕^{1,*}, 李来好¹, 杨贤庆¹, 陈胜军¹, 戚 勃¹

(1.中国水产科学研究院南海水产研究所, 国家水产品加工技术研发中心, 农业部水产品加工重点实验室, 广东 广州 510300; 2.上海海洋大学食品学院, 上海 201306)

摘 要: 利用Zobell 2216E培养基从合浦珠母贝黏液中分离得到菌株F35, 菌株对6种常见的食源性致病菌均有抑制作用。通过对菌株F35细菌形态观察、生理生化特性并结合16S rRNA基因序列分析, 鉴定该菌为甲基营养型芽孢杆菌(*Bacillus methylotrophicus*)。其发酵液排除酸类物质和过氧化氢的干扰后, 分别经过4种蛋白酶处理, 蛋白酶酶解发酵液对指示菌的抑制作用均有不同程度的下降, 表明菌株F35抗菌成分为蛋白或多肽类物质, 具有开发为新型天然食品防腐剂的潜力。

关键词: 合浦珠母贝黏液; 细菌F35; 鉴定; 抗菌成分

Identification and Antibacterial Components of Bacterial Strain F35 Isolated from *Pinctada fucata* Mucus

ZHANG Yan^{1,2}, WU Yan-yan^{1,*}, LI Lai-hao¹, YANG Xian-qing¹, CHEN Sheng-jun¹, QI Bo¹

(1. Key Laboratory of Aquatic Product Processing, Ministry of Agriculture, National Research and Development Center for Aquatic Product Processing, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China; 2. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract : Bacterial strain F35, isolated from *Pinctada fucata* mucus using Zobell 2216E medium, had an inhibitory effect on six common foodborne pathogens. The strain was identified as *Bacillus methylotrophicus* based on its morphological, physiological and biochemical characteristics and 16S rRNA sequence. After removal of acids and hydrogen peroxide, its fermentation supernatant was treated separately with four proteases. Compared with the fermentation supernatant, all the resulting hydrolysates showed a decrease in inhibitory effect against *Listeria monocytogenes*. In conclusion, the antibacterial substances of strain F35 are protein or polypeptide and thus have great potential to be developed as new natural food preservatives.

Key words : *Pinctada fucata* mucus; bacteria F35; identification; antibacterial component

中图分类号: Q939.11

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)21-0217-04

食品微生物是影响食品安全的重要因素,近年来由食源性致病菌引起的疾病越来越多^[1]。随着经济与社会的发展,人们对食品安全的要求越来越高,添加食品防腐剂是当前抑制食源性致病菌的重要措施之一,因此,现代食品工业的发展离不开防腐剂的保驾护航^[2]。长期以来,由于化学合成的食品防腐剂成本低,在食品工业生产中一直占据主导地位,但化学合成防腐剂的超标使用,容易对人体产生毒副作用^[3]。在人们对食品安全的认识和要求逐步提高的背景下,这类化学防腐剂的使用受到了越来越严峻的挑战。所以开发抗菌性强、抑菌谱

广、安全无毒的天然食品防腐剂已成为各国科技工作者的发展方向和研究热点^[4-6]。微生物源天然食品防腐剂是利用微生物的发酵代谢产物来抑制食品腐败及病原微生物的生长繁殖^[7],从而达到防腐保鲜的目的,目前已经应用于食品行业的微生物源天然食品防腐剂有乳酸链球菌素、纳他霉素等^[8]。2006年Sun Lijun等^[9]从内生植物中分离到一株产类细菌素的解淀粉芽孢杆菌ES-2,对多种致病菌有较强的抑制作用,利用电喷雾离子化碰撞诱导解离质谱技术对抗菌物质进行了分析和鉴定,发现抑菌物质是由抗菌肽类物质Fengcin、Surfactin系列组分组成,

收稿日期: 2012-06-11

基金项目: 广东省科技计划项目(2011B031200009; 2011A020102005); “十二五”国家科技支撑计划项目(2012BAD28B05); 海南省重点科技计划项目(ZDXM20100005)

作者简介: 张岩(1988—),女,硕士研究生,研究方向为海洋生物资源利用。E-mail: zhangyan_job@163.com

*通信作者: 吴燕燕(1969—),女,研究员,博士,研究方向为水产品加工与质量安全控制。E-mail: wuyy1028@yahoo.com.cn

并且使用安全,已经实现产业化中试生产。芽孢杆菌抗菌肽富含系列抗菌活性成分,克服了乳酸链球菌素抗菌谱窄的局限性,具有更广阔的应用价值。芽孢杆菌产生的抗菌肽将为食源性致病菌安全控制提供新的思路,成为继乳酸链球菌素之后研究人员关注的又一热点。

本研究从合浦珠母贝黏液中筛选出一株对多种食源性致病菌具有较强抑菌作用的菌株F35,并对其抗菌成分进行初步分析,为下一步筛选安全性高、抑菌活性强和抑菌谱广的天然食品防腐剂提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

菌株F35分离于合浦珠母贝黏液中。

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)、大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) 广东环凯微生物科技有限公司; Zobell 2216E琼脂 青岛海博生物技术有限公司; 营养肉汤 广东环凯微生物科技有限公司; 细菌通用引物 深圳华大基因科技有限公司; 过氧化氢酶 上海源叶生物科技有限公司; 胰蛋白酶、胃蛋白酶、菠萝蛋白酶、木瓜蛋白酶 美国Sigma公司。

1.2 仪器与设备

DYY-7C电泳仪 北京六一仪器厂; Biometra型PCR仪 美国Biometra公司; YXQ-LS-50SI立式压力蒸汽灭菌锅、SW-CJ-2F洁净工作台、SPX-250B-Z生化培养箱 上海博迅实业有限公司医疗设备厂; HZQ-R恒温摇床 东联电子技术开发有限公司; 尼康YS100双目电光生物显微镜 日本尼康公司; T15A34高速冷冻离心机 日本日立公司。

1.3 菌株F35抑菌活性测定

1.3.1 菌株F35发酵液的制备

将菌株F35接种于50mL营养肉汤中,并在28℃条件下培养24h;吸取1mL活化好的菌液,接种于200mL液体发酵培养基^[10]中,于28℃培养24h,经12000r/min离心15min,收集上清液,备用。

1.3.2 抑菌活性测定^[11-12]

将已经灭菌的牛津杯摆放在倒有素琼脂的平皿中,再倾倒含有指示菌的培养基,待凝固后,用镊子拔去牛津杯。在牛津杯的孔中加入约200μL无细胞发酵上清液,在4℃冰箱中扩散4h,置于培养箱培养一定时间后,观察是否有抑菌圈,并测量其大小,抑菌圈越大,代表菌株F35对该指示菌的抑菌能力越强。

1.4 菌株F35的鉴定

1.4.1 菌株F35形态结构及生理生化特性鉴定

将菌株F35接种于Zobell 2216E琼脂上,28℃培养

48h,观察菌落形态特征。然后挑取单个菌落进行涂片及革兰氏染色,用普通光学显微镜观察菌体形态。按照东秀珠等^[13]的方法,对菌株F35进行生理生化实验。

1.4.2 菌株F35的16S rRNA基因序列测定与系统发育分析

1.4.2.1 16S rRNA基因PCR扩增及检测

菌株F35的16S rRNA基因PCR扩增采用菌落PCR法。采用50μL反应体系进行PCR扩增,PCR扩增采用16S rRNA基因细菌通用引物^[14]: Eubac 27F: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG1-3'; Eubac 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'。PCR扩增体系: 10×PCR buffer 5μL、Taq DNA polymerase(5U/μL)0.3μL、dNTPs(10.0mmol/L)1μL、Mg²⁺(2.5mmol/L)4μL、Eubac27F(20μmol/L)及Eubac1492R(20μmol/L)各1μL、F35微量菌体、ddH₂O 35.7μL,混匀后进行16S rRNA基因PCR扩增,其中PCR反应条件为94℃预变性2min;94℃变性10s,55℃退火15s,68℃延伸90s,循环35次;72℃总延伸10min。10℃保存。将菌株F35扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,通过紫外灯观察,初步判断PCR产物是否为目标片段。

1.4.2.2 16S rRNA序列测定及系统发育树构建

将扩增成功的PCR产物寄送深圳华大基因科技有限公司进行测序。测序所得序列提交GeneBank注册,并将该序列应用NCBI数据库中进行相似性分析,选取同源性较高的模式菌株,采用MEGA 4.0软件,用邻接法进行系统进化树构建^[15-16],重复取样1000次进行自展值分析以评估系统进化树的拓扑结构稳定性^[17]。

1.5 菌株F35代谢产物抗菌成分初步分析

1.5.1 酸类物质及过氧化氢抑制作用的排除^[18]

将菌株F35发酵上清液中和至pH 7.0,进行抑菌实验,将中和好的发酵液及对照液进行抗菌活性测定。以单核增生李斯特氏菌为指示菌,用牛津杯法进行抑菌实验,实验重复3次。

加入10mg/mL的过氧化氢酶溶液至发酵液中使过氧化氢酶终质量浓度为2mg/mL^[19],37℃处理24h,灭菌蒸馏水作对照,用0.22μm滤膜过滤除菌,以单核细胞增生李斯特氏菌为指示菌,用牛津杯法进行抑菌实验,实验重复3次。

1.5.2 抗菌物质对蛋白酶的敏感性实验

用1mol/L NaOH和1mol/L HCl分别调节待酶解的发酵上清液到胰蛋白酶、胃蛋白酶、菠萝蛋白酶、木瓜蛋白酶各自的最适作用pH值,分别为pH7.8、2.0、7.0、6.0。按最终质量浓度2mg/mL^[19]加入胰蛋白酶、胃蛋白酶、菠萝蛋白酶、木瓜蛋白酶,37℃酶解12h,将酶解作用后的酶解液的pH值再调回至原pH值,以单核增生李斯特氏菌为指示菌,用牛津杯法做抑菌实验,实验重复3次。

1.5.3 活性下降率计算^[20]

活性下降率反映了菌株F35发酵上清液经不同处理方

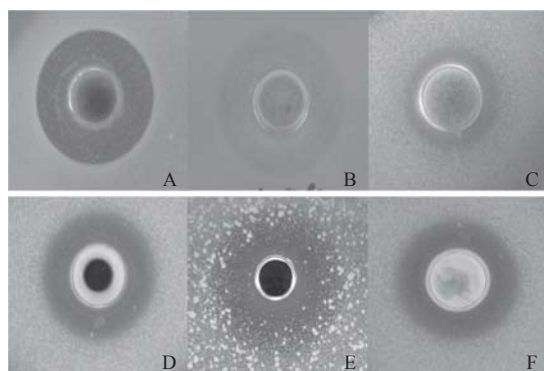
法处理后活性变化率。菌株F35发酵上清液经上述不同方法处理后,活性下降率按下述公式计算。

$$\text{活性下降率}/\% = \frac{d_1 - d_2}{d_1 - 7.80} \times 100$$

式中: d_1 为原发酵液抑菌直径; d_2 为不同处理方式后发酵液直径; 7.80为牛津杯外径。

2 结果与分析

2.1 菌株F35的抑菌活性测定



A. *Listeria monocytogenes*; B. *Staphylococcus aureus*;
C. *Escherichia coli*; D. *Salmonella typhimurium*;
E. *Pseudomonas aeruginosa*; F. *Vibrio parahaemolyticus*.

图1 菌株F35的抑菌谱

Fig.1 Antimicrobial spectrum of strain F35

由图1可知,菌株F35对6种食品中常见的致病菌均有不同程度的抑制作用,其中对单核细胞增生李斯特菌的抗菌作用最强,而对大肠杆菌的抗菌作用相对较弱,但抑菌直径仍达(11.12±0.19)mm。可知菌株F35发酵液具有抑菌谱广、抑菌活性强的特点。

2.2 菌株F35的鉴定结果



A. 菌落形态; B. 革兰氏染色结果(40×100)。

图2 菌株F35形态特征

Fig.2 Photomicrograph of strain F35 colonies and individual cells

菌株F35在Zobell 2216E琼脂培养24h,菌落呈白色,边缘圆滑,湿润,表面平整,不透明,有黏性,随着培养时间的延长,菌落表面形成褶皱,见图2A;在显微镜(40×100)放大倍数下,细胞末端圆滑,细胞多单个,部分呈链状排列,芽孢位于顶部,有卵型芽孢,包囊膨大,为革兰氏染色阳性菌,见图2B。

菌株F35的明胶水解、硝酸盐还原、淀粉水解、酪胺水解、V-P反应、接触酶、厌氧生长以及利用蔗糖、麦芽糖、葡萄糖、核糖等均为阳性;苯丙氨酸脱氨酶、吲哚产生、柠檬酸盐利用、酪氨酸水解均为阴性;菌株F35在5℃和50℃以及5% NaCl条件下不能生长。结合菌株F35形态学鉴定,通过东秀珠等^[13]编著的《常见细菌鉴定手册》比对,初步鉴定菌株F35为芽孢杆菌属(*Bacillus*)。

菌株F35的16S rRNA 基因序列分析显示的16S rRNA 碱基为1443bp。其序列为: CTGCTAATACATGCAAGTC GAGCGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGC GGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTG TAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATA CCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAGACATAA AAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGC GGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA AGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCG GCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTAC GGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGA AAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAG GTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAA CAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTA CCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCA GCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGA ATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAA GTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGG GTCATTGGAAACTGGGGAACCTGAGTGCAGAAGAG GAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA GAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTC TCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTG GGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG CCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTCC GCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCG CCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGACTGAACTCAAAG GAATTGACGGGGGCCGCAAGCGGTGGAGCATG TGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAG GTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGT CCCCTTCGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGATGGTT GTCGTGAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTC CCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGC ATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACA AACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCAT GCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGG ACAGAAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGC CAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCT GCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATC GCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCC TTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTA

CACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGCCAGC
CGCCGAAGGTGACAGAG。

将菌株F35的16S rRNA基因序列用RDP II数据库的Classifier程序进行归类,结果表明菌株F35为硬壁菌门(Firmicutes),芽孢杆菌属(*Bacillus*)。将该序列与GenBank相关数据进行BLAST相似性分析,选取同源性较高的模式菌株,用Neighbor-Joining构建系统发育树,构建的系统进化树,见图3。菌株F35的16S rRNA基因序列与GenBank数据库中已知序列中的模式菌株*Bacillus methylotrophicus* CBMB205^T序列最相似性,相似率为99.652%。综合形态学及生理生化鉴定,将菌株F35鉴定为甲基营养型芽孢杆菌(*Bacillus methylotrophicus*)。

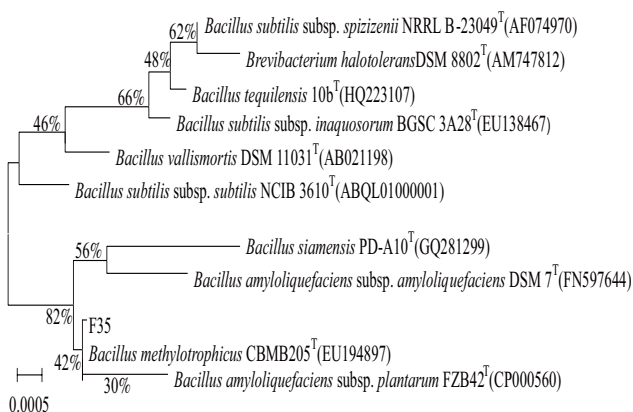


图3 菌株F35的16S rRNA基因序列系统发育树
Fig.3 Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequence of strain F35

2.3 菌株F35代谢产物抗菌成分初步分析

表1 不同处理方式对菌株F35发酵产物抗菌成分的活性影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Table 1 Antibacterial activity of fermentation liquid of strain F35 after pretreated with protease, catalase or neutralization($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

处理方式	处理后上清液 抑菌圈直径/mm	活性下降 率/%
酸作用的排除	24.42 ± 0.28	2.8
过氧化氢酶	24.11 ± 0.31	4.7
胃蛋白酶	7.80 ± 0.00	100
木瓜蛋白酶	18.62 ± 0.11	36.7
胰蛋白酶	8.57 ± 0.10	95.5
菠萝蛋白酶	9.39 ± 0.25	90.7

注:原发酵液抑菌直径为(24.91 ± 0.18)mm。

由表1可知,菌株F35发酵液排除酸的作用后的抑菌作用仅下降2.8%,几乎没有变化,可知菌株F35代谢产物中主要的抗菌物质不是酸类物质;经过过氧化氢酶酶解后,抑菌活性仅下降4.7%,抑菌活性几乎无变化,表明此抑菌效果不是由过氧化氢引起的;菌株F35发酵液的4种蛋白酶酶解液的抑菌活性均有不同程度的变小,其中胃蛋白酶酶解液活性完全消失,活性下降率达100%,木

瓜蛋白酶酶解液活性下降率最低,但也达36.7%。综上可知F35代谢产物的抑菌物质含有蛋白或多肽类物质。

3 结论

3.1 从合浦珠母贝黏液样品中分离得到一株抗菌能力强、抑菌谱广的菌株F35,经分子学鉴定,结合菌株的形态学和生理生化鉴定结果,鉴定该菌株为甲基营养型芽孢杆菌(*Bacillus methylotrophicus*)。

3.2 菌株F35代谢产物对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌都有较强的抑菌作用。在排除有机酸和过氧化氢的干扰后,菌株F35发酵上清液仍然具有抑菌活性,可知菌株F35发酵上清液抑菌作用不是由于酸及过氧化氢引起的,而且抗菌物质对蛋白酶敏感,可知菌株F35发酵上清液抑菌物质主要是蛋白或多肽类物质。

3.3 菌株F35蛋白或多肽类代谢产物虽然对多种食源性致病菌具有较强的抑菌作用,但要想开发为一种新型的食品防腐剂,其分子结构鉴定、毒理学及在食品中的应用还有待于深入研究。

参考文献:

- [1] 李来好, 吴燕燕, 李凤霞, 等. 广东省罗非鱼及其养殖环境中食源性致病细菌相分析[J]. 水产学报, 2009, 33(5): 823-831.
- [2] WAGACHA J W, MUTHOMI J W. Mycotoxin problem in Africa: current status, implications to food safety and health and possible management strategies[J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 124(1): 1-12.
- [3] 时威, 谢为天, 张岩, 等. 解淀粉芽孢杆菌发酵液保鲜冷却猪肉的效果研究[J]. 中国酿造, 2011(10): 51-54.
- [4] GALVEZ A, ABRIQUEL H, ROSARIO L L. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation[J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 120: 51-70.
- [5] 吴燕燕, 宫晓静, 李来好, 等. 风味蛋白酶水解合浦珠母贝肉制备抗菌肽人工神经网络法优化工艺[J]. 食品科学, 2011, 32(20): 63-68.
- [6] 宫晓静, 吴燕燕. 海洋无脊椎动物抗菌肽研究进展及其在食品保鲜中的应用[J]. 生物技术通报, 2011(3): 27-32.
- [7] 杨莹莹, 李卓佳, 陈永青, 等. 乳酸杆菌L1对致病弧菌的抑制作用[J]. 南方水产, 2005, 1(1): 62-65.
- [8] 王飞生, 叶荣飞, 陈则华. 天然生物食品防腐剂研究进展[J]. 河北农业科学, 2008, 12(10): 60-62.
- [9] SUN Lijun, LU Zhanxin, BIE Xiaomei, et al. Isolation and characterization of a coproducer of fengycins and surfactins, endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2, from *Scutellaria baicalensis* Georgi[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2006, 22(12): 1259-1266.
- [10] 王莹. 海洋抗菌活性物质产生菌的筛选及系统分类研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2006.
- [11] CHEIKHYOUSSEF A, POGORI N, CHEN Haiqin, et al. Antimicrobial activity and partial characterization of bacteriocin-like inhibitory substances(BLIS)produced by *Bifidobacterium infantis* BCRC 14602[J]. Food Control, 2009, 20(6): 553-559.
- [12] 何爱华, 张曦, 陶琳丽, 等. 6种中草药对4种淡水鱼致病细菌体外抑菌作用的研究[J]. 南方水产科学, 2011, 7(2): 73-76.
- [13] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [14] ZAKIRA N, ADAM H P, FAUZIA Y H, et al. Identification of rice blast disease-suppressing bacterial strains from the rhizosphere of rice grown in Pakistan[J]. Crop Protection, 2009, 28: 1052-1060.
- [15] SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tree[J]. Molecular Biology and Evolution, 1987, 4(4): 406-425.
- [16] 汤健, 刘文广, 林坚士, 等. 9个马氏珠母贝家系的中期生长性状评估[J]. 南方水产科学, 2011, 7(5): 30-36.
- [17] FELSENSTIN J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap[J]. Evolution, 1985, 39: 783-791.
- [18] ASLIM B, YUKSEKDAG Z N, SARIKAYA E, et al. Determination of the bacteriocin-like substances produced by some lactic acid bacteria isolated from Turkish dairy products[J]. LWT-Food Science and Technology, 2005, 38(6): 691-694.
- [19] 李琳, 贾士儒, 谭之磊, 等. 嗜热链球菌 CGMCC 1.1864 所产的一种新型细菌素ST9[J]. 微生物学通报, 2010, 37(3): 349-354.
- [20] HUNYUN Z, BAOHUA K, YOULING L, et al. Antimicrobial activities of spice extracts against pathogenic and spoilage bacteria in modified atmosphere packaged fresh pork and vacuum packaged ham slices stored at 4 °C[J]. Meat Science, 2009, 81: 686-692.