

# 面包乳杆菌 (*Lactobacillus panis*) C-M<sub>2</sub>细菌素的分离纯化及特性分析

单成俊<sup>1,2</sup>, 胡彦新<sup>1,2</sup>, 夏秀东<sup>2</sup>, 刘小莉<sup>2</sup>, 李莹<sup>2</sup>, 王英<sup>2</sup>, 章建浩<sup>1</sup>, 周剑忠<sup>1,2,\*</sup>

(1.南京农业大学食品科技学院, 江苏 南京 210095; 2.江苏省农业科学院农产品加工研究所, 江苏 南京 210014)

**摘要:** 本实验对面包乳杆菌C-M<sub>2</sub>所产的新型细菌素进行分离纯化和特性研究。通过乙酸乙酯萃取、阳离子交换层析和半制备液相三步分离纯化该细菌素。最终细菌素的比活力达到5 044.96 AU/mg, 纯化倍数为79.8倍, 但回收率仅为0.35%。通过液相色谱-串联质谱法分析, 该细菌素的分子质量为863.52 D, 氨基酸序列为MVKKTS<sub>AV</sub>, 它是一种新型的II类细菌素。该细菌素具有广泛的抑菌谱, 可以抑制革兰氏阳性和阴性的食品腐败菌。该细菌素对热和pH值稳定, 即使在121 °C灭菌15 min, 仍保留82.1%的抑菌活性, 在pH 6条件下保留85.6%的抑菌活性。它不能被多种蛋白酶失活, 不能被脂肪酶和淀粉酶失活, 这些结果表明该细菌素具有作为食品生物防腐剂的潜在应用价值。

**关键词:** 面包乳杆菌; 细菌素; 分离纯化; 抑菌特性

## Purification and Characterization of the Bacteriocin Produced by *Lactobacillus panis* C-M<sub>2</sub>

SHAN Chengjun<sup>1,2</sup>, HU Yanxin<sup>1,2</sup>, XIA Xiudong<sup>2</sup>, LIU Xiaoli<sup>2</sup>, LI Ying<sup>2</sup>, WANG Ying<sup>2</sup>, ZHANG Jianhao<sup>1</sup>, ZHOU Jianzhong<sup>1,2,\*</sup>

(1. College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. Research Institute of Agricultural Product Processing, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** The present study aimed to purify and characterize a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus panis* C-M<sub>2</sub>. The bacteriocin was purified through sequential ethyl acetate extraction, cation exchange chromatography and semi-preparative high-performance liquid chromatography (RP-HPLC). Finally, the specific activity reached 5 044.96 AU/mg and the purification fold was 79.8, but the recovery was only 0.35%. The bacteriocin had a molecular mass of 863.52 D and its N-terminal sequence was MVKKTS<sub>AV</sub> as determined by LC-MS/MS, showing low similarity with other class II bacteriocins reported earlier. It showed a good stability to heat and pH and retained 82.1% of the original antibacterial activity even after exposure to 121 °C for 15 min and retained 85.6% of the original activity at pH 6. The bacteriocin could be totally inactivated after treatment with protease, but it was not sensitive to lipase or amylase. These results indicate the potential of the bacteriocin for application in food preservation.

**Key words:** *Lactobacillus panis*; bacteriocin; purification; antimicrobial activity

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201720004

中图分类号: R996.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2017) 20-0020-07

引文格式:

单成俊, 胡彦新, 夏秀东, 等. 面包乳杆菌(*Lactobacillus panis*) C-M<sub>2</sub>细菌素的分离纯化及特性分析[J]. 食品科学, 2017, 38(20): 20-26. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201720004. <http://www.spkx.net.cn>

SHAN Chengjun, HU Yanxin, XIA Xiudong, et al. Purification and characterization of the bacteriocin produced by *Lactobacillus panis* C-M<sub>2</sub>[J]. Food Science, 2017, 38(20): 20-26. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201720004. <http://www.spkx.net.cn>

细菌素由某些细菌在代谢过程中通过核糖体合成机制产生, 是一类对亲缘关系相近的乳酸菌和非乳酸菌的革兰氏阳性细菌或革兰氏阴性细菌具有抑菌生物活性的蛋

白质或多肽, 而产生菌多所产的细菌素具有免疫性<sup>[1-2]</sup>。由于细菌素能被人胃肠道分泌的蛋白酶降解, 对人体无毒副作用, 所以细菌素作为生物食品防腐剂比化学防腐

收稿日期: 2016-11-14

基金项目: 江苏省水产三新工程项目 (Y2015-29)

作者简介: 单成俊 (1978—), 男, 博士研究生, 研究方向为食品生物技术。E-mail: chengjun\_shan@163.com

\*通信作者: 周剑忠 (1965—), 男, 研究员, 博士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: zjzluck@126.com

剂更安全且天然,并且细菌素具有高效、耐高温、无抗药性等特点,能较好地适应工业化生产<sup>[3-5]</sup>。因此,细菌素在天然食品防腐剂、饲料添加剂、益生菌及开发新药等领域具有广阔的应用前景。

根据细菌素的化学结构、分子质量大小和稳定性将细菌素分为四大类<sup>[6-7]</sup>:第I类nisin为代表的羊毛硫抗生素,一般为小分子(<5 kD)且热稳定的、含羊毛硫氨酸的多肽;第II类是小分子、热稳定、不含羊毛硫氨酸的多肽(<10 kD),分为3个亚类:II a(如pediocin)、II b(如lactocin G)、II c(如lactocin B);第III类热敏感的大分子蛋白(>30 kD);第IV类复合细菌素,除蛋白质外还包含其他化学成分(如碳水化合物、脂类等)。其中I类和II类细菌素作为生物防腐剂在食品工业领域应用的最为广泛<sup>[8-9]</sup>。

到目前为止,已经发现有百余种乳酸菌素,但真正用于商业化的却只有nisin和pediocin PA-1,其余仅限于实验室研究<sup>[10]</sup>。主要是因为乳酸菌素的性质(抑菌谱窄、pH值敏感性、热稳定性差)和分离纯化方法等诸多因素限制了乳酸菌素的获取及其工业化生产<sup>[11-12]</sup>。因此筛选具有广谱、耐酸碱、热稳定性好的乳酸菌细菌素仍然是目前的首要任务。

本研究室从发酵玉米粉中分离得到一株产广谱细菌素的乳酸菌C-M<sub>2</sub>。本实验主要对该乳酸菌C-M<sub>2</sub>进行16S rDNA分子鉴定、所产的细菌素进行分离纯化、结构鉴定以及生物学特性的研究,以期为进一步研究该细菌素的合成调控机制研究和在食品保鲜、生物防腐提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

乳酸菌C-M<sub>2</sub>(*Lactobacillus panis* C-M<sub>2</sub>)分离于发酵玉米粉,指示菌金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC25923和大肠杆菌(*Escherichia coli*) ATCC25922均保藏于江苏省农业科学院农产品加工所食品生物工程研究室。

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、蛋白酶K 美国Sigma公司;MRS培养基、LB培养基(配方参考文献[13]) 北京奥博星生物技术责任有限公司;柠檬酸、柠檬酸钠、盐酸等均为国产分析纯;乙腈、三氟乙酸和甲醇均为色谱纯。

### 1.2 仪器与设备

UV-900 AKTA蛋白纯化系统 瑞典GE公司;1525高效液相色谱 美国Waters公司;FDU-1200冷冻干燥机 日本Eaely公司;3K15冷冻离心机 美国Sigma公司;SW-CJ-2G超净工作台、LRH-150生化培养箱 苏州净化

设备有限公司;DSX-280B立式压力蒸汽灭菌器 上海申安医疗器材厂。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 菌种的活化和培养流程<sup>[14]</sup>

菌种(甘油管)  $\xrightarrow{\text{划线}}$  MRS平板  $\xrightarrow{\text{培养24~36 h}}$  挑取典型的单菌落于含5 mL MRS试管  $\xrightarrow{\text{扩大培养(28 h)}}$  含100 mL MRS三角瓶  $\xrightarrow{\text{扩大培养(28 h)}}$  含1 L MRS三角瓶  $\xrightarrow{\text{离心(8 000 r/min, 10 min)}}$  发酵上清液

#### 1.3.2 菌种的16S rDNA鉴定

参照文献[15]进行分子鉴定。用细菌基因组提取试剂盒(Bacterial DNA Kit (200), OMEGA)提取菌株C-M<sub>2</sub>的DNA,以通用的DNA引物作为PCR的模板,反应体系为25  $\mu$ L(表1)。聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增条件:94  $^{\circ}$ C预变性5 min,94  $^{\circ}$ C变性1 min,55  $^{\circ}$ C退火1 min,72  $^{\circ}$ C延伸1 min,共进行30个循环,最后72  $^{\circ}$ C延伸10 min。将PCR扩增后的产物进行琼脂糖凝胶电泳,电压为100 V,电泳结束后用凝胶成像仪观察条带,将观察到的条带用DNA胶回收试剂盒进行切胶回收,并由上海生工生物工程股份有限公司完成测序。

表1 PCR扩增体系及用量  
Table 1 Composition of PCR reaction system used in this study

PCR扩增体系	用量/ $\mu$ L
2 $\times$ Taq Primx	12.5
DNA模板	1
引物27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')	1
引物1492R (5'-TACGGYTACCTGTTCACGACTT-3')	1
ddH <sub>2</sub> O	9.5

#### 1.3.3 细菌素的提取

采用乙酸乙酯萃取的方法<sup>[16]</sup>提取细菌素。将发酵上清液与乙酸乙酯等体积混合置于摇床(120 r/min, 2 h),让细菌素充分融入有机相中,随后将混合液置于分液漏斗中静置2 h、收集有机相(上层液体)、水相(下次液体)重复上述的操作,共萃取4次。将4次萃取获得的有机相合并后在45  $^{\circ}$ C旋转蒸发除去乙酸乙酯。旋转蒸发后获得的细菌素粗提物用柠檬酸缓冲液(20 mmol/L, pH 4)进行复溶。以金黄色葡萄球菌为指示菌,采用琼脂扩散牛津杯法<sup>[17-18]</sup>测定其抑菌活性。

#### 1.3.4 细菌素的分离纯化

##### 1.3.4.1 细菌素的SP Sepharose Fast Flow阳离子交换层析<sup>[19]</sup>

将用乙酸乙酯萃取获得的细菌素用0.22  $\mu$ m的过滤膜过滤。配制20 mmol/L、pH 4的柠檬酸缓冲液和含有1 mol/L NaCl的柠檬酸缓冲液。首先用20 mmol/L、pH 4的柠檬酸缓冲液平衡层析柱,以2.0 mL/min的流速、3 mL的上样量、含1 mol/L NaCl的柠檬酸缓冲液进行梯度洗脱。在280 nm波长处紫外检测收集蛋白峰。将收集的

各个蛋白峰4℃透析脱盐后真空冷冻干燥。以金黄色葡萄球菌为指示菌,采用琼脂扩散牛津杯法测定其抑菌活性。

#### 1.3.4.2 半制备高效液相色谱纯化<sup>[20]</sup>

取适量阳离子层析柱纯化后获得的活性峰样品溶于5%的乙腈中(含有0.1%三氟乙酸)。色谱柱的条件设定为:平衡液A:超纯水+0.1% TFA,洗脱液B:纯乙腈+0.1% TFA,流速2.0 mL/min,上样量0.1 mL,进行梯度洗脱。洗脱程序为:0~5 min, 5% B; 5~25 min, 5%~25% B; 25~35 min, 25%~50% B; 35~45 min, 50% B; 45~50 min, 50%~0% B。在280 nm波长紫外检测处收集蛋白峰,将收集的各个蛋白峰真空冷冻干燥除去乙腈。以金黄色葡萄球菌为指示菌,采用琼脂扩散牛津杯法测定其抑菌活性。

#### 1.3.4.3 细菌素纯度的检测

利用分析性高效液相色谱来检测细菌素的纯度是否达到95%以上。将经过半制备高效液相色谱纯化后获得的活性峰样品溶于5%的乙腈中(含有0.1%三氟乙酸),流速为0.8 mL/min,上样量为20 μL,按照1.3.4.2节洗脱程序进行洗脱。

#### 1.3.5 质谱分析

采用液相色谱-串联质谱法测定该细菌素的分子质量和氨基酸序列<sup>[21]</sup>。将通过冷冻干燥的半制备液相获得细菌素样品悬浮于含0.2%的甲酸的超纯水中,以0.3 mL/min的流速,上样量为5 μL,洗脱程序为在40 min内乙腈体积分数从5%升到35%。一级质谱在正离子模式下进行 $m/z$  300~1 800全扫描,通过DDA(dependent acquisition mode)收集数据。二级质谱采用CID(collision-induced dissociation)捕捉二级质谱中的b和y离子,通过Peaks 7.0软件进行数据采集和分析。

#### 1.3.6 细菌素效价的测定

面包乳杆菌细菌素效价的测定按照参考文献[22-23]的方法,采用二倍稀释法,将发酵上清液用pH 5.0的柠檬酸缓冲液进行二倍稀释,以金黄色葡萄球菌为指示菌,采用琼脂扩散牛津杯法,吸取100 μL进行抑菌实验,用对指示菌显示没有抑菌圈的最高稀释浓度定义为一个活力单位(AU),稀释浓度的倒数就是细菌素的效价(AU/mL)。计算公式如下所示:

$$Y/(\text{AU/mL}) = 2^n \times \frac{1\ 000}{x}$$

式中:Y为细菌素的效价/(AU/mL);n为对指示菌显抑菌圈的孔数;x为每孔中的细菌素液加样体积/μL。

#### 1.3.7 细菌素蛋白含量的测定

采用考马斯亮蓝G-250染色法<sup>[24]</sup>测定细菌素蛋白含量。

#### 1.3.8 抑菌谱的测定

采用琼脂扩散牛津杯法,将经过SP Sepharose Fast

Flow阳离子交换层析纯化后获得的细菌素用于测定面包乳杆菌C-M<sub>2</sub>的抑菌谱。

#### 1.3.9 细菌素对温度、pH值、蛋白酶敏感性的测定

将经过SP Sepharose Fast Flow阳离子交换层析纯化后获得的细菌素分别置于37、60、80、100℃水浴锅中水浴30 min和121℃处理15 min,考察不同温度对细菌素抑菌活性的影响。

将经过SP Sepharose Fast Flow阳离子交换层析纯化后获得的细菌素分别溶于pH 2~5的柠檬酸缓冲液(20 mmol/L)和pH 6~9的磷酸缓冲液(20 mmol/L),然后置于37℃水浴锅中4 h后,测定其残留活性。考察不同的pH值对细菌素抑菌活性的影响。

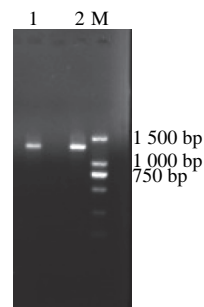
将经过SP Sepharose Fast Flow阳离子交换层析纯化后获得的细菌素分别溶于各种酶的最适pH值的缓冲液中。按质量浓度1 mg/mL分别加入蛋白酶K(20 mmol/L的磷酸盐缓冲液,pH 7)、胃蛋白酶(20 mmol/L的醋酸盐缓冲液,pH 2)、胰蛋白酶(20 mmol/L的磷酸盐缓冲液,pH 7)、木瓜蛋白酶(20 mmol/L的磷酸盐缓冲液,pH 7)、脂肪酶(20 mmol/L的磷酸盐缓冲液,pH 7)、α-淀粉酶和β-淀粉酶(20 mmol/L的磷酸盐缓冲液,pH 6),在37℃水浴2 h后,将上述酶处理过的细菌素溶液于100℃水浴5 min使酶失活。考察不同种类的酶对细菌素抑菌活性的影响。上述经过各种处理后的细菌素溶液采用琼脂扩散牛津杯法测定其抑菌活性,其中以金黄色葡萄球菌为指示菌,以未做任何处理的细菌素溶液作为空白对照。

#### 1.4 数据分析

每组实验重复3次,数据的结果表示为 $\bar{x} \pm s$ 。采用SAS 8.0软件进行单因素方差分析和差异显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 乳酸菌菌种的鉴定



M.标准蛋白的分子质量;1、2.菌株C-M<sub>2</sub>的16S rDNA PCR扩增产物。

图1 16S rDNA PCR扩增产物

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA

用1.0%的琼脂糖凝胶对菌株C-M<sub>2</sub>的16S rDNA产物进行电泳,在1 500 bp附近获得一条荧光条带(图1),



回收的DNA片段经测序后,共获得1 485个碱基,将该序列通过NCBI中BLAST进行同源性分析,发现该菌与面包乳杆菌*Lactobacillus panis* strain C17(基因登录号:EF412978.1)同源性高达99%,因此可以把该菌鉴定为面包乳杆菌。

## 2.2 细菌素的分离纯化

表2 细菌素的分离纯化

Table 2 Summary of purification steps of the bacteriocin

纯化步骤	体积/mL	效价/ (AU/mL)	蛋白质浓度/ (mg/mL)	比活力/ (AU/mg)	纯化 倍数	回收率/%
上清液	1 000	320	5.06	63.22	1.0	100.00
乙酸乙酯萃取	25	3 585.45	1.42	2 524.96	39.9	28.01
SP Sepharose Fast Flow阳离子交换层析	5	2 038.72	0.58	3 515.03	55.6	3.19
半制备液相色谱	1	1 109.89	0.22	5 044.96	79.8	0.35

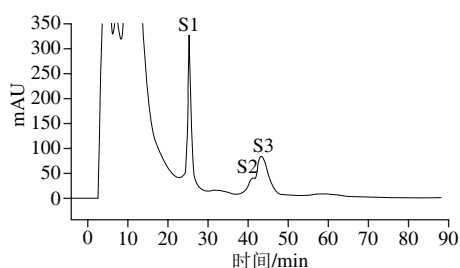


图2 细菌素的SP Sepharose Fast Flow阳离子交换层析图谱

Fig. 2 Ion-exchange chromatography of the bacteriocin on SP Sepharose fast flow column

由于大多数乳酸菌细菌素带正电并且在酸性条件下稳定,本实验经过乙酸乙酯粗提的细菌素由SP Sepharose Fast Flow阳离子交换树脂分离后得到3个洗脱峰(图2),S2和S3两个洗脱峰相连,分离度很差,对金黄色葡萄球菌的抑制能力很差,故本实验不对此洗脱条件进行进一步的优化。而S1洗脱峰较窄且高、分离度较好,能与其他杂质蛋白分开。并且S1洗脱峰对金黄色葡萄球菌的抑菌活性最好,故选择S1洗脱峰做下一步的纯化工作。经过乙酸乙酯萃取和阳离子交换树脂分离纯化后,细菌素的比活力达到3 515.03 AU/mg,纯化倍数为55.6倍,回收率为3.19%(表2)。由于该细菌素可以被阳离子交换树脂吸附,说明该细菌素是一种带正电的多肽<sup>[25]</sup>。

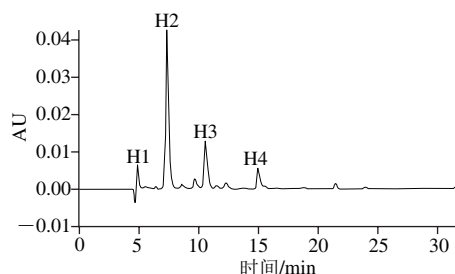


图3 *lactocin C-M<sub>2</sub>*的半制备高效液相色谱图

Fig. 3 Semi-preparative HPLC chromatogram of the bacteriocin

反相高效液相色谱是根据分子疏水性的不同来达到分离抗菌肽的目的,具有灵敏度高、速度快、分辨率好,并且经反相高效液相色谱分离得到的样品可以直接进行质谱分析<sup>[26]</sup>。本实验将经过阳离子纯化后获得的活性峰S1合并后用节流分子质量为500 D透析袋透析除盐、真空浓缩后通过半制备液相进行分离纯化后得到4个洗脱峰(图3),将4个洗脱峰合并、冻干后测定其活性,结果显示H2洗脱峰对金黄色葡萄球菌的抑菌活性最好。经过分析液相分析H2,在9.5 min左右出现一个单峰(图4),在其他时间没有出现明显的吸收峰,表明该样品已为色谱纯,并将该细菌素命名为*lactocin C-M<sub>2</sub>*。经过半制备液相纯化后的细菌素比活力达到5 044.96 AU/mg,纯化倍数为79.8倍。

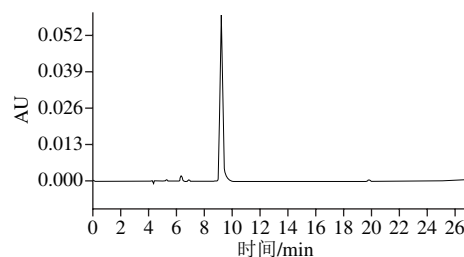


图4 *lactocin C-M<sub>2</sub>*的反相高效液相色谱图

Fig. 4 Analytical RP-HPLC chromatogram of the bacteriocin

在纯化的过程中发现,最终该细菌素的回收率非常低,仅有0.35%,回收率低主要的原因是该细菌素的提取采用有机溶剂乙酸乙酯萃取的方法,由于乙酸乙酯的极性较正丁醇小,采用该方法致使一部分细菌素残留在发酵的上清液中导致提取率大幅降低,虽可以通过重复提取实验提高回收率,但前期实验发现随着提取重复次数的增加,提取效率也在逐渐降低,为了降低工作量和实验成本,本实验只提取了4次,导致回收率降低。又由于乙酸乙酯较正丁醇更容易从细菌素的混合液中除去且获得细菌素纯度较高,故本实验采用乙酸乙酯萃取该细菌素。另外一个原因是通过阳离子交换树脂纯化,阳离子树脂具有高度的选择性,而细菌素在不同的pH值缓冲液中可能带正电荷或负电荷以及所带电荷的数量不同,并且现在发现的可以产细菌素的乳酸菌,一般可以产生多种细菌素,不同的细菌素在同一pH值条件下所带电荷不同,而在实验过程中只会针对其中的一种细菌素进行分离纯化,导致部分细菌素不能吸附在阳离子柱上,除此之外,离子交换柱在纯化的过程中还可以除去很大一部分不带电的杂蛋白,进而使回收率很低。后期可以通过优化面包乳杆菌C-M<sub>2</sub>产细菌素的发酵条件和纯化过程(比如找更合适提取该细菌素的有机溶剂)来提高该细菌素最终的回收率。除此之外,来源于半制备液相分离的组分H3也可以抑制金黄色葡萄球菌的生长,说明面包乳杆菌C-M<sub>2</sub>可以产生多种细菌素,这大

大地增加了其开发和应用价值。相类似的结果也出现在其他产细菌素的乳酸菌中,例如Izquierdo等<sup>[27]</sup>从软奶酪中分离的*Enterococcus faecium* WHE81、Yi Lanhua等<sup>[28]</sup>从江水白菜中分离的*Lactobacillus coryniformis* XN8都可以产生至少两种细菌素。

2.3 质谱分析

经过高效液相色谱检测后具有抑菌活性的细菌素样品进行质谱分析,得到一级质谱图(未列出),显示该细菌素的分子质量为863.52 D。对863.52 D的峰进行高效液相色谱-串联质谱分析,得到二级质谱图(图4)。通过Peaks 7.0软件对该细菌素的二级质谱片段进行分析得出该细菌素的氨基酸序列为MVKKTSAV。序列的推断过程见表3。将该细菌素的氨基酸序列在NCBI(National Center for Biotechnology Information)进行比对,未找到与该细菌素完全一样的序列,说明该细菌素是一种新型的细菌素。

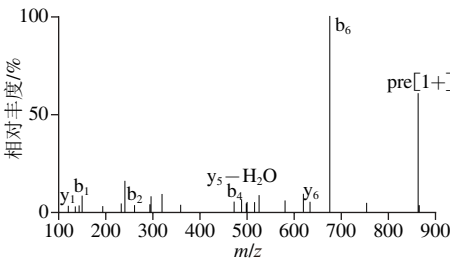


图5 细菌素的二级质谱图

Fig. 5 Tandem mass spectrum of the bacteriocin

表3 细菌素氨基酸序列的推断

Table 3 Predicted b-ion and y-ion fragments and sequence of the bacteriocin

#	b	b-H <sub>2</sub> O	b-NH <sub>3</sub>	b (2+)	序列	y	y-H <sub>2</sub> O	y-NH <sub>3</sub>	y (2+)	#
1	132.17	114.04	115.02	66.52	M					8
2	231.02	213.11	214.09	116.06	V	732.46	714.45	715.43	366.73	7
3	359.21	341.20	342.18	180.11	K	633.27	615.38	616.37	317.20	6
4	487.20	469.30	470.28	244.15	K	505.30	487.20	488.27	253.15	5
5	588.35	570.34	571.33	294.68	T	377.20	359.19	360.18	189.10	4
6	675.35	657.38	658.36	338.19	S	276.16	258.14	259.13	138.58	3
7	746.42	728.41	729.40	373.71	A	189.12	171.11	172.10	95.06	2
8					V	118.08	100.08	101.06	59.54	1

2.4 lactocin C-M<sub>2</sub>的抑菌谱

由表4可知, lactocin C-M<sub>2</sub>和大多数的乳酸菌细菌素具有相类似的特性,对与它们亲缘关系较近的乳酸菌具有抑制作用<sup>[29]</sup>,例如戊糖片球菌、植物乳杆菌、短乳杆菌、瑞士乳杆菌、发酵乳杆菌。同时lactocin C-M<sub>2</sub>还可以抑制常见的致病菌和腐败菌,如金黄色葡萄球菌、志贺菌、枯草芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、单核细胞性李斯特菌、大肠杆菌、铜绿假单胞菌和沙门菌,可广泛应用于食品的防腐杀菌处理。尤其lactocin C-M<sub>2</sub>可以抑制单核细胞性李斯特菌的生长,说明

lactocin C-M<sub>2</sub>具有II类细菌素的特性。但是lactocin C-M<sub>2</sub>对供试的酵母菌和霉菌没有抑制作用。

表4 细菌素的抑菌谱  
Table 4 Antimicrobial spectrum of the bacteriocin

指示菌	来源	培养基和 培养条件	抑菌圈
<b>G<sup>+</sup></b>			
金黄色葡萄球菌( <i>Staphylococcus aureus</i> )	ATCC25923	LB, 37℃	+++
志贺菌( <i>Shigella flexneri</i> )	CMCC51606	LB, 37℃	++
枯草芽孢杆菌( <i>Bacillus subtilis</i> )	CICC23759	LB, 37℃	++
蜡样芽孢杆菌( <i>Bacillus cereus</i> )	CICC21474	LB, 37℃	++
单核细胞性李斯特菌( <i>Listeria monocytogenes</i> )	CMCC54004	BHI, 37℃	++
戊糖片球菌( <i>Pediococcus pentosaceus</i> )	本实验室保藏	MRS, 37℃	+
植物乳杆菌( <i>Lactobacillus plantarum</i> )	本实验室保藏	MRS, 37℃	+
短乳杆菌( <i>Lactobacillus brevis</i> )	本实验室保藏	MRS, 37℃	+
瑞士乳杆菌( <i>Lactobacillus helveticus</i> )	本实验室保藏	MRS, 37℃	+
发酵乳杆菌( <i>Lactobacillus fermentum</i> )	本实验室保藏	MRS, 37℃	+
<b>G<sup>-</sup></b>			
大肠杆菌( <i>Escherichia coli</i> )	ATCC25922	LB, 37℃	+++
铜绿假单胞菌( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> )	ATCC15442	LB, 37℃	++
沙门菌( <i>Salmonella</i> )	ATCC51812	LB, 37℃	++
<b>酵母菌</b>			
酿酒酵母( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	本实验室保藏	PDA, 28℃	-
毕赤酵母属( <i>Pichia</i> sp.)	CICC32806	PDA, 28℃	-
假丝酵母( <i>Candida</i> sp.)	CICC32933	PDA, 28℃	-
<b>霉菌</b>			
白地霉( <i>Geotrichum candidum</i> )	CICC1364	PDA, 30℃	-
点青霉( <i>Penicillium notatum</i> )	CICC40211	PDA, 30℃	-

注: ATCC.美国菌株保藏中心; CMCC.中国医学微生物菌种保藏中心; CICC.中国工业微生物菌种保藏管理中心。+++ .抑菌圈直径>18 mm; ++.抑菌圈直径11~18 mm; +.抑菌圈直径<10 mm; -.无抑制作用。

2.5 lactocin C-M<sub>2</sub>对温度、pH值、蛋白酶敏感性

表5 细菌素对温度、pH值、酶的敏感性

Table 5 Effects of heat, pH and enzymes on antibacterial activity of the bacteriocin

酶	残留活性/%	pH	残留活性/%	温度/℃	残留活性/%
对照(未加酶)	100.0	2	99.8±1.2	对照(室温)	100.0
蛋白酶K	0.0±0.0	3	99.8±1.4	37	98.5±1.3
胃蛋白酶	0.0±0.0	4(对照) <sup>a</sup>	100.0	60	95.2±1.5
木瓜蛋白酶	0.0±0.0	5	96.8±2.8	80	93.6±1.2
胰蛋白酶	0.0±0.0	6	85.6±2.3	100	90.6±0.9
脂肪酶	100.0±1.8	7	65.6±2.4	121	82.1±1.9
α-淀粉酶	100.0±1.6	8	44.3±1.8		
β-淀粉酶	100.0±1.7	9	40.34±1.5		

注: a. lactocin C-M<sub>2</sub>经阳离子交换柱纯化后的具有活性的峰的pH值为4.0。

由表5可知, lactocin C-M<sub>2</sub>经过各种蛋白酶处理后抑菌活性完全消失,但是该细菌素经脂肪酶和淀粉酶处理后抑菌活性基本保持不变,说明lactocin C-M<sub>2</sub>是蛋白类抑菌物质,并且可以被蛋白酶降解而不会在体内残留,可以安全地应用到食品的防腐方面。

lactocin C-M<sub>2</sub>在酸性条件下(pH 2~6)抑菌活性比较稳定,在pH 6的条件下,该细菌素仍保留85.6%的抑菌活性。但lactocin C-M<sub>2</sub>在碱性条件下抑菌活性丧失比

较明显,在pH 9的条件下,该细菌素只有初始抑菌活性的40%。结果显示lactocin C-M<sub>2</sub>在酸性条件下抑菌活性升高,而在碱性条件下抑菌活性降低。这可能是有由于在极端pH值条件下,在强的分子内静电相互作用下诱导氨基和羧基基团的解离,终导致蛋白质变性,从而使该细菌素的活性降低<sup>[30]</sup>。

lactocin C-M<sub>2</sub>在37、60、80、100 °C条件下处理30 min后,抑菌活性保持在90%以上。即使在121 °C灭菌15 min后,抑菌活性仍保留82.1%。说明细菌素lactocin C-M<sub>2</sub>具有良好的热稳定性。由于延长食品保质期通常会采取加热或者创造酸性、碱性环境的方法,以达到杀死或抑制腐败微生物,而细菌素lactocin C-M<sub>2</sub>具有良好的稳定性和耐酸碱性,该优势使得它在食品加工和食品的生物保鲜中均具有广泛的应用前景。由于lactocin C-M<sub>2</sub>具有小分子质量、热稳定、不含羊毛硫氨酸、可以抑制单核细胞性李斯特菌的生长等特点,因此lactocin C-M<sub>2</sub>属于II类细菌素。

### 3 讨论

目前,16S rDNA序列是编码核糖体RNA小亚基16S rRNA的基因,是当今细菌分类学中最常用且有效的分子分析方法。本实验中利用16S rDNA基因序列对从发酵玉米粉分离出来的一株产细菌素的乳酸菌C-M<sub>2</sub>进行鉴定,最终鉴定该菌为面包乳杆菌。根据目前报道,尽管已经成功的从各种材料中分离出很多面包乳杆菌,其功能也各式各样,例如Grahame<sup>[31]</sup>发现*Lactobacillus panis* PM1可以产1,3-丙二醇,但是这是第一次发现可以产细菌素的面包乳杆菌。

细菌素的分离纯化与其特性研究密切相关。乳酸菌细菌素一般均带有正电荷、疏水特性等特点。细菌素的初步分离方法可以采取盐析法、有机溶剂沉淀法和pH值吸附法等,进一步纯化方法有凝胶过滤层析、离子交换层析、疏水相互作用层析,精度纯化一般采用反相高效液相色谱。本实验采取乙酸乙酯萃取、阳离子交换层析和制备液相三步法成功的从菌株C-M<sub>2</sub>上清液中分理处细菌素lactocin C-M<sub>2</sub>,与张瑜<sup>[32]</sup>所分离细菌素的纯化过程类似,同时也说明本实验分离的出细菌素是小分子质量的细菌素。但细菌素最终纯化倍数为79.8倍,回收率为0.35%,说明纯化过程中目的蛋白损失较大。今后应继续对该细菌素的分离纯化条件进行优化,为将来的精细纯化及应用提供理论支持。将lactocin C-M<sub>2</sub>序列提交到APD数据库(Antimicrobial Peptide Database)进行比对,只找到与其相识度为38.46%和37.5%的抗菌肽Uperin 7.1和Fusaricidin A,说明该细菌素是一种新型抗菌肽。

由于食品加工过程中对采用热加工,所以细菌素对热的稳定性好坏是衡量其潜在应用价值的标准。lactocin

C-M<sub>2</sub>具有良好的热稳性,即使在121 °C灭菌15 min后,抑菌活性仍保留82.1%,其热稳定性优于pentocin LP818<sup>[8]</sup>。不同的细菌素适用的pH值范围不同,大多数在酸性环境下抑菌活性较好。但在中性或碱性条件下,抑菌活性减弱或丧失。如nisin在低pH值条件下有很强的抑菌活性,但在pH 7以上时,活性丧失。而lactocin C-M<sub>2</sub>在pH 9的条件下仍保留40.34%的抑菌活性,但该细菌素耐酸碱性不及步氏乳杆菌KLDS1.0364<sup>[33]</sup>所产的细菌素。同时与步氏乳杆菌KLDS1.0364所产的细菌素一样,lactocin C-M<sub>2</sub>对供试的蛋白酶敏感,对非蛋白酶不敏感,说明其产生的类细菌素是蛋白类物质,具有较高的安全性。该细菌素对供试的大部分G<sup>+</sup>菌株和G<sup>-</sup>菌株均具有较强抑制作用,对多数致病菌和食品腐败菌抑菌作用明显,特别是对*Listeria monocytogenes*和G<sup>-</sup>菌株较强的抑制作用,所以其具有作为食品生物防腐剂的潜在应用价值。

### 4 结论

面包乳杆菌C-M<sub>2</sub>分离于发酵玉米粉,其产生的细菌素(命名为lactocin C-M<sub>2</sub>)经过乙酸乙酯萃取、阳离子交换层析和半制备液相三步成功的从菌株培养液中提取和纯化出该菌所产的细菌素,最终该细菌素的比活力达到5 044.96 AU/mg,纯化倍数为79.8倍,回收率为0.35%。该细菌素的分子质量为863.52 D,氨基酸序列为MVKKTSAY,并且是一种新的II类细菌素。该细菌素具有广泛的抑菌谱,它不仅可以抑制与其亲缘关系较近的乳酸菌的生长,同时它还可以抑制革兰氏阳性和阴性的致病菌。该细菌素对热、pH值、淀粉酶和脂肪酶具有良好的稳定性,但对多种蛋白酶敏感。综上,面包乳杆菌C-M<sub>2</sub>所产的细菌素在食品保鲜和生物防腐具有良好的应用前景。

### 参考文献:

- [1] MILIONI C, MARTÍNEZ B, DEGL'INNOCENTI S, et al. A novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LpU4 as a valuable candidate for bio-preservation in artisanal raw milk cheese[J]. Dairy Science & Technology, 2015, 95(4): 479-494.
- [2] GÁLVEZ A, ABRIOUEL, LÓPEZ R L, et al. Bacteriocin[J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 120(1): 51-70.
- [3] 武朋朋, 刘国荣, 杨晓渊, 等. 抗猪链球菌戊糖乳杆菌素的纯化及特性研究[J]. 中国农业大学学报, 2011, 16(5): 121-126.
- [4] CLEVELAND J, MONTVILLE T J, NES I F, et al. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation[J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 71(1): 1-20. DOI:10.1016/S0168-1605(01)00560-8.
- [5] 沈雷, 赵乙桢, 刘等. 清酒乳杆菌ZJ220产细菌素的研究[J]. 食品学报, 2015, 15(7): 39-45. DOI:10.16429/j.1009-7848.2015.07.006.



- [6] MALDONADO-BARRAGÁN A, CABALLERO-GUERRERO B, MARTÍN V, et al. Purification and genetic characterization of gassericin E, a novel co-culture inducible bacteriocin from *Lactobacillus gasseri* EV1461 isolated from the vagina of a healthy woman[J]. BMC Microbiology, 2016, 16(1): 1.
- [7] HU M, ZHAO H, ZHANG C, et al. Purification and characterization of plantaricin 163, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* 163 isolated from traditional Chinese fermented vegetables[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(47): 11676-11682. DOI:10.1021/jf403370y.
- [8] 于雷雷, 王超, 施波, 等. 戊糖乳杆菌素pentocin LPEM818的初步纯化及特性研究[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(2): 17-23.
- [9] 吴轶, 贡汉生, 刘文丽, 等. 一株产细菌素乳杆菌的鉴定及其细菌素编码基因的获得[J]. 食品科学, 2015, 36(11): 110-113. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201511021.
- [10] LV X, HU P, DANG Y, et al. Purification and partial characterization of a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* TN-2 isolated from fermented camel milk (Shubat) of Xinjiang Uygur Autonomous region, China[J]. Food Control, 2014, 43: 276-283.
- [11] 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. DOI:10.1016/j.idairyj.2005.10.026.
- [12] SHARAFI H, MALEKI H, AHMADIAN G, et al. Antibacterial activity and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* HKN01: a new insight into the morphological changes of antibacterial compound-treated *Escherichia coli* by electron microscopy[J]. Journal of Microbiology & Biotechnology, 2013, 23(2): 225-236. DOI:10.4014/jmb.1208.08005.
- [13] 胡盼. 酸驼奶中产细菌素乳酸菌的分离及细菌素特性[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2014.
- [14] 胡彦新, 刘小莉, 王英, 等. 香肠乳杆菌(*Lactobacillus farcimini*) FM-MM4产细菌素发酵条件和培养基优化[J]. 食品工业科技, 2016, 37(10): 255-259; 272. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2016.10.043.
- [15] 易兰花. 西乡浆水产细菌素乳酸菌的分离及细菌素的纯化[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2014.
- [16] 高鹏, 韩金志, 陆兆新, 等. 广谱抗菌乳酸菌的分离鉴定及细菌素的提取和纯化[J]. 食品科学, 2016, 37(11): 160-166. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201611028.
- [17] CHEN C, CHEN X, JANG M, et al. A newly discovered bacteriocin from *Weissella hellenica* D1501 associated with Chinese Dong fermented meat (NanxWudl)[J]. Food Control, 2014, 42: 116-124.
- [18] 陈岑. 希腊魏斯菌D1501抑菌物质研究及其作为保护性发酵剂在新型豆腐中的应用[D]. 南京: 南京农业大学, 2014.
- [19] TAHIRI I, DESBIENS M, BENECH R, et al. Purification, characterization and amino acid sequencing of divergicin M35: a novel class IIa bacteriocin produced by *Carno bacterium divergens* M35[J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 97(2): 123-136. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.04.013.
- [20] H-KITTIKUM A, BISCOLA V, EL-GHAISH, et al. Bacteriocin-producing *Enterococcus faecalis*, KT2W2G isolated from mangrove forests in southern Thailand: purification, characterization and safety evaluation[J]. Food Control, 2015, 54: 126-134.
- [21] LEE M H, LEE J, NAM Y D, et al. Characterization of antimicrobial lipopeptides produced by *Bacillus* sp. LM7 isolated from chungkookjang, a Korean traditional fermented soybean food[J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 221: 12-18.
- [22] LIU G, REN L, SONG Z, et al. Purification and characteristics of bifidocin A, a novel bacteriocin produced by *Bifidobacterium animals* BB04 from centenarians' intestine[J]. Food Control, 2015, 50: 889-895. DOI:10.1016/j.foodcont.2014.10.049.
- [23] 胡盼. 酸驼奶中产细菌素乳酸菌的分离及细菌素特性[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2014.
- [24] 陆健. 蛋白质纯化技术及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [25] 李亚玲, 周志江, 韩烨, 等. 乳酸片球菌抑菌物质细菌素的分离纯化[J]. 食品科学, 2008, 29(2): 271-274. DOI:10.3321/j.issn:1002-6630.2008.02.054.
- [26] 王嘉琦. 一株植物乳杆菌所产细菌素的分离纯化及其特性分析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2015.
- [27] IZQUIERDO E, MARCHIONI E, AOUDE-WEMER D, et al. Smearing of soft cheese with *Enterococcus faecium* WHE 81, a multi-bacteriocin producer, against *Listeria monocytogenes*[J]. Food Microbiology, 2009, 26(1): 16-20. DOI:10.1016/j.fm.2008.08.002.
- [28] YI L H, DANG J, ZHANG L H, et al. Purification, characterization and bactericidal mechanism of a broad spectrum bacteriocin with antimicrobial activity against multidrug-resistant strains produced by *Lactobacillus coryniformis* XN8[J]. Food Control, 2016, 67: 53-62. DOI:10.1016/j.foodcont.2016.02.008.
- [29] WANNUM P, PIWAT S, TEANPAISAN R. Purification, characterization, and optimum conditions of fermencin SD11, a bacteriocin produced by human orally *Lactobacillus fermentum* SD11[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2016: 1-11.
- [30] JANICKE R. Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions[J]. The FEBS Journal, 1991, 202(3): 715-728.
- [31] GRAHAME D. Microbial production and characterization of 1,3-PDO, by a novel *Lactobacillus panis* Strain[D]. Canada, Saskatoon: University of Saskatchewan, 2012.
- [32] 张瑜. LS-8乳酸菌细菌素的分离纯化[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2013.
- [33] 贡汉生, 孟祥晨, 刘红娟. 一株布氏乳杆菌所产类细菌素的初步纯化与部分特性[J]. 微生物学通报, 2008, 35(2): 193-199. DOI:10.3969/j.issn.0253-2654.2008.02.007.