

瑞士乳杆菌 M14-1 所产细菌素的分离纯化及抑菌特性分析

董雨馨¹, 谢远红¹, 张 策², 金君华¹, 张红星^{1*}

¹农产品有害微生物及农残安全检测与控制北京市重点实验室 北京农学院食品科学与工程学院, 北京 102206;

²北京市经济管理学校, 北京 100142

摘要: 瑞士乳杆菌 M14-1 发酵上清液经硫酸盐沉淀后得到粗蛋白提取物, 再经离子交换、C₁₈ 固相萃取进行进一步纯化后得到高纯度的纯化产物。研究细菌素 M14-1 酶敏感性、酸碱稳定性、热稳定性、抑菌谱以及细菌素产量与菌株生长关系。研究发现细菌素 M14-1 对蛋白酶 K、胰蛋白酶、胃蛋白酶敏感, 对过氧化氢酶不敏感。该细菌素热稳定性较差, 121 °C 处理 15 min 后, 活性下降。细菌素 M14-1 在 pH2.0 ~ 10.0 内具有抑菌活性。抑菌谱结果表明细菌素 M14-1 抑菌谱较窄, 仅对单增李斯特氏菌有较好的抑制效果。瑞士乳杆菌 M14-1 在发酵 16 h 后达到稳定期, 而细菌素 M14-1 最佳收获时间为瑞士乳杆菌 M14-1 发酵 12 h 后。

关键词: 细菌素; 瑞士乳杆菌; 理化特性; 分离纯化

中图分类号: Q939.92

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.8.026

Isolation, Purification and Characterization of Bacteriocin M14-1, a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus helveticus*

DONG Yu-xin¹, XIE Yuan-hong¹, ZHANG Ce², JIN Jun-hua¹, ZHANG Hong-xing^{1*}

¹Food Science and Engineering college, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China;

²Beijing Economic Management School, Beijing 100142, China

Abstract: The fermentation supernatant of bacteriocin M14-1 was purified by sulfate precipitation and crude protein extract was obtained. High-purity product was purified by cation exchange and solid phase extraction. The bacteriocin enzyme sensitivity, pH stability, thermal stability, antimicrobial spectrum, bacteriocin production and growth of the strain were studied. Bacteriocin M14-1 was sensitive to protease K, trypsin and pepsin, but insensitive to catalase. As result of bacteriocin M14-1 poor thermal stability, inhibition activity was decreased after 121 °C for 15 min. The bacteriocin had good antibacterial activity in pH2.0-10.0. The antimicrobial spectrum showed that bacteriocin of *L. helveticus* M14-1 only inhibited the growth of *L. monocytogenes*. *L. helveticus* M14-1 reached stable stage for 16 h of fermentation. The optimal harvest time for bacteriocin was 12 h.

Key words: bacteriocin; *Lactobacillus helveticus*; physicochemical characteristics; isolation and purification

乳酸菌在代谢过程中会产生乳酸、过氧化氢、双乙酰和细菌素等抑菌物质^[1]。其中, 有机酸、过氧化氢、细菌素均有抑菌作用^[2]。其中, 细菌素是一类由核糖体合成的一类具有抑菌活性的蛋白质、多肽或前体多肽^[3]。相关研究表明, 细菌素应用到乳制品中既可以保证乳品营养不受损失又可以延长货架期。添加细菌素的奶酪与未添加的对照组相比单增李斯特氏菌数降低了 10⁴ cfu/mL^[4]。在储藏期第二天, 300 MPa 超高压和乳酸菌素菌株联合应用

于乳酪中可使 60 天后大肠杆菌菌数从原来的 10⁶ cfu/mL 降低到 10² cfu/mL^[5]。

乳酸菌产生的细菌素具有稳定、无毒、不改变食品本身风味等特点^[6]。而乳酸菌作为益生菌, 不仅能够提高食品中营养物质的利用率, 而且具有抗高血压、抗肿瘤、抗氧化活性等免疫调节作用^[7], 还能抑制食品中有害菌的生长。因此乳酸菌细菌素的开发成为符合消费要求的食品防腐剂的研究热点^[8]。

单核细胞增生李斯特氏菌(简称单增李斯特氏菌)是一种常见的食源性致病菌^[9]。食入李斯特氏菌污染的食品后, 健康的成人会出现类似轻微流感的症状, 而妊娠期妇女、婴儿和抵抗力弱的人群则会呕吐、出血性皮疹、脑膜炎、败血症等疾病, 甚至死

收稿日期: 2017-09-04 接受日期: 2018-01-23

基金项目: 北京市属高等学校高层次人才引进与培养计划(CIT&T CD20140315)

* 通信作者 E-mail: hzhang511@163.com

亡^[10]。因此用细菌素作为天然生物防腐剂抑制李斯特氏菌的生长成为了未来的研究方向。

本文对瑞士乳杆菌 M14-1 所产生的细菌素进行分离纯化,并对其生物学性质进行了一系列的研究,如酸碱稳定性、热稳定性、酶敏感性。本文旨在为食品中天然安全生物防腐剂的研究与应用奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验菌株

瑞士乳杆菌 M14-1 来源于四川泡菜,经过分离鉴定后,冻存于北京农学院食品科学与工程学院食品生物技术研究室。

1.1.2 指示菌菌株

单核细胞增生李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*) CMCC54003、单核细胞增生李斯特氏菌 (*Monocytic Listeria monocytogenes*) CMCC5400、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) ATCC 14028、伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhosa*) CMCC5007、都柏林沙门氏菌 (*Salmonella dublin*) CMCC5076、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) ATCC29213 和 CMCC26001、大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) CMCC44110、志贺氏菌 (*Shigella dysenteriae*) ATCC29243、福氏志贺氏菌 (*Shigella flexneri*) ATCC51572。

1.1.3 培养基^[11]

MRS 培养基:K₂HPO₄ 0.2 g,无水乙酸钠 0.5 g,酵母粉 0.5 g,硫酸镁 0.05 g,牛肉膏 1g,柠檬酸铵 0.2 g,胰蛋白胨 1 g,葡萄糖 2 g,硫酸盐 0.025 g,吐温 80 100 μL,蒸馏水 100 mL。Lis 培养基:胰蛋白胨 1.7 g,大豆蛋白胨 0.3 g,酵母浸粉 0.6 g,氯化钠 0.5 g,K₂HPO₄ 0.25 g,葡萄糖 0.25 g,蒸馏水 100 mL。LB 培养基:胰蛋白胨 1 g,氯化钠 1 g,酵母膏 0.5 g,蒸馏水 100 mL。BPY 培养基:牛肉提取物 0.5 g,氯化钠 0.5 g,蛋白胨 1 g,酵母提取物 0.5 g,葡萄糖 0.5 g,蒸馏水 100 mL。GN 培养基:蛋白胨 1 g,牛肉浸膏 0.3 g,氯化钠 0.5 g,蒸馏水 100 mL。固体培养基均是添加 1.5% ~ 2% 的琼脂。1 × 10⁵ Pa 灭菌 30 min。制备培养基使用的试剂均为国产分析纯级。

1.1.4 主要试剂

过氧化氢酶,胰蛋白酶,胃蛋白酶,Sigma 公司;

蛋白酶 K,天根生物技术有限公司。

1.1.5 主要仪器

DL-CJ-1N 超净工作台,北京东联哈尔仪器制造有限公司;LHS-100CH 恒温恒湿培养箱,上海一恒科技有限公司;MLS-3750 高压蒸汽灭菌锅,Sanyo Electric 公司;UV1800 型紫外分光光度计,日本岛津公司;BIOFUGE STRATOS 台式冷冻离心机,美国 Thermo Scientific。PHS-3B 便携式酸度计,上海雷磁仪器厂;CLASS-VP 高效液相色谱,SHIMADZU;FD-1A-80 冷冻干燥机,德国 CHRIST 公司;Biologic LP 低压层析系统,美国 Bio-Rad 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 上清发酵液的制备

将瑞士乳杆菌 M14-1 以 2% 的接菌量 (OD₆₀₀ 约 2.56) 接菌于 MRS 培养基中,在 37 °C 摇床中培养 12 h。将发酵液离心 (9 000 rpm 离心 15 min) 后取上清。

1.2.2 抑菌平板的制备

以单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC54003 为指示菌。采用管碟法做抑菌实验^[11],将指示菌活化好后 (约 10⁷ cfu/mL) 取 1 mL 菌液倒入 100 mL 融化的李斯特固体培养基中,混匀后倒入平皿中 (约 15 mL)。凝固后放上牛津杯,加入 100 μL pH6.0 的上清发酵液以及酶处理后的发酵液。放入 37 °C 温箱培养 10 h,观察抑菌圈大小^[12]。

1.2.3 牛津杯法测定效价

使用二倍梯度稀释法-管碟法测定样品的效价。在制好的抑菌平板上放入牛津杯,将样品用生理盐水二倍梯度稀释后加入牛津杯中,37 °C 温箱培养 10 h 后观察抑菌圈。效价用每毫升的活力单位 (AU) 表示。AU 的定义是能看到明显的抑菌圈的最高稀释度 (n) 的倒数,AU/mL 计算公式为 AU/mL = 2ⁿ × (1 000/x),n 表示稀释至对指示菌有抑菌活性的最高稀释倍数所需的稀释次数。x 表示管碟法中加入牛津杯内的加样体积 (μL)。本实验中牛津杯中加入 100 μL。

1.2.4 制备细菌素粗提液

瑞士乳杆菌上清液经 75% (516 g/L) 的饱和硫酸盐沉淀 14 h 后 9 000 rpm 离心 15 min,弃上清将沉淀复溶于 10% 体积的超纯水中。用 1 000 D 的透析袋 4 °C 透析 24 h,每 2 h 用去离子水更换一次透析液。经 0.22 μm 滤膜过滤后置于 4 °C 备用。

1.2.5 阳离子交换层析^[13]

以 SP Sepharose™ Fast Flow 为填料,对细菌素进行纯化。以 0.02 M 的柠檬酸-柠檬酸钠为缓冲液 A 液(pH3.0),0.02 M 的柠檬酸-柠檬酸钠(含 2M NaCl)为缓冲液 B 液,上样量为 3 mL。0~30 min 用 100% A 洗脱,30~130 min 用流动相 A 100~0% 梯度洗脱,130~150 min 用 100% B 洗脱,最终 150~180 min 用 100% A 洗脱。流速 1 mL/min。收集到的样品用牛津杯法进行抑菌实验,收集有抑菌圈的样品。

1.2.6 C₁₈固相萃取

以离子交换后的瑞士乳杆菌 M14-1 为样品,选用 Agilent-C₁₈-EWP 柱以表 1 方法进行洗脱。收集上样后、淋洗后和洗脱后的液体,以单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC54003 为指示菌进行抑菌实验。在细菌素溶解中,乙酸铵作为平衡离子的效果比三氟乙酸要好^[14],所以在洗脱液中加入 20 mM 乙酸铵平衡离子。

表 1 C₁₈固相萃取柱除盐操作流程

Table 1 The operation procedure of desalination using SPE C₁₈ Cartridges

步骤 Step	溶剂 Solvent	体积 Volume (mL)
活化 Activation	99% 乙醇	3
平衡 Balance	HPLC 乙腈和水	各 1
上样 Load sample	样品溶液	1
淋洗 Leaching	纯水	1
洗脱 Elution	10%~100% 乙腈(20 mM 乙酸铵)	1

1.2.7 冷冻干燥

样品-35℃预冻 2 h 后,用 Centrifuge5417R 型小型高速冷冻离心机将样品冷冻干燥成粉后置于-80℃超低温冰箱中保存备用。

1.2.8 高效液相色谱检测细菌素纯度

将冷冻干燥后的样品用超纯水复溶,经 0.22 μm 滤膜过滤后用 HPLC-C₁₈ 反相液相色谱,检测纯度并进一步分离纯化。流动相为^[15]:A 液(98% 超纯水+2% 乙腈+1‰ 三氟乙酸)和 B 液(10% 超纯水+90% 乙腈+1‰ 三氟乙酸)。色谱柱选用的是 Agilent 的 ZORBAX 300SB-C₁₈ 柱。进样量为 10 μL,检测波长为 280 nm。洗脱程序如表 2 所示。

1.2.9 酶稳定性实验

将培养好的发酵液放入离心机中 12 000 rpm 离

表 2 C₁₈反相液相色谱操作流程

Table 2 The operation procedure of C₁₈-RP-HPLC

时间 Time (min)	流动相成分 Mobile phase component	流速 Current speed (mL/min)
0~5	5% B	0.5
5~45	5%~45% B	0.5
45~55	45%~80% B	0.5
55~60	80% B	0.5
60~65	80%~5% B	0.5
65~70	5% B	0.5

心 5 min,收集发酵上清液,分别用过氧化氢酶、蛋白酶 K、胃蛋白酶、胰蛋白酶加入 M14-1 的上清发酵液中(酶的终浓度为 1 mg/mL)。分别调节 pH 至各个酶的最适 pH,并置于相应酶的最适温度下反应 2 h 后,将 pH 值分别调回至 6.0 与原发酵液 pH。用 1mol/L NaOH 溶液调节发酵上清原液至 pH6.0 作为对照^[16]。

1.2.10 热稳定性实验

将 M14-1 上清发酵液调节 pH 至 6.0,分别做如下处理:60℃ 10 min、60℃ 30 min、60℃ 90 min、90℃ 30 min、90℃ 60 min、90℃ 90 min、121℃ 15 min。冷却至室温后,用管碟杯法做抑菌实验,以单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC54003 为指示菌。

1.2.11 酸碱稳定性实验

将 M14-1 的上清发酵液分别调节 pH 值至 2、4、6、8、10,37℃ 处理 2 h 后,再调回 pH6.0,用管碟法做抑菌实验,以单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC54003 为指示菌。

1.2.12 抑菌谱^[7]

制作不同指示菌的指示平板(指示菌培养条件详见表 6),取瑞士乳杆菌 M14-1 上清液用管碟法做抑菌实验。

1.2.13 细菌素产量与细菌生长关系

瑞士乳杆菌 M14-1 连续培养 24 h,其间,每隔 2 h 取一次发酵液,测定其 pH 值、OD 值。将上清发酵液二倍梯度稀释,用牛津杯法测定抑菌活性。

2 结果与分析

2.1 细菌素粗提液的制备

将瑞士乳杆菌 M14-1 的发酵上清液经 75% 硫酸铵沉淀后透析除盐,抑菌检测细菌素的活性(图 1)。

2.2 阳离子交换层析

阳离子交换结果如图 2A 所示,由于硫酸盐沉淀法粗提出的样品中含有很多杂质(如色素和其他杂蛋白),而紫外检测的波长 280 nm 是蛋白的通用波长,并非是细菌素 M14-1 的最适波长,所以虽然洗脱前期有很明显的吸收峰,但仍不是细菌素 M14-1,而后期没有明显的吸收峰,但可能含有细菌素 M14-1。因此最终通过抑菌检测的方式来收集细菌素 M14-1。将离子交换后的洗脱液每 5 min 收集一次以后以单增生李斯特氏菌 ATCC54003 为指示菌抑菌检测,结果如图 2B 所示,收集有抑菌活性的洗脱液。

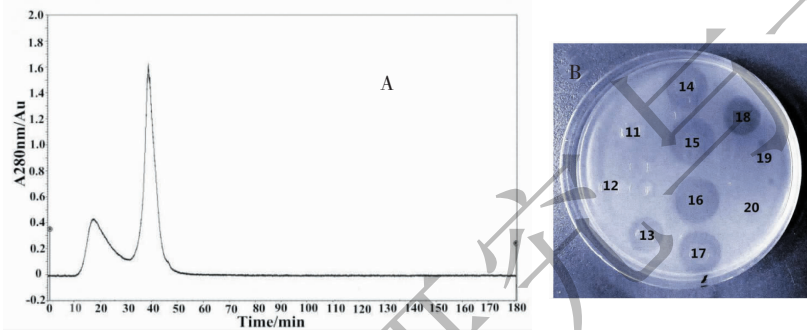


图 2 阳离子交换洗脱程序洗脱液的检测

Fig. 2 Detection of eluent after Cation-exchange chromatography

注:11-20 为相应管号的洗脱液。

Note:11-20 is the eluent for the corresponding tube number.

表 3 C_{18} 固相萃取纯化瑞士乳杆菌素 M14-1

Table 3 The purification of bacteriocin M14-1 with C_{18} -Solid phase extraction

收集液 Collecting liquid	抑菌圈直径 Diameter of inhibition zone (mm)
上样液 Sample preparation	无
淋洗液 Leachate	无
10% 乙腈洗脱液 10% acetonitrile eluent	无
20% 乙腈洗脱液 20% acetonitrile eluent	无
30% 乙腈洗脱液 30% acetonitrile eluent	无
40% 乙腈洗脱液 40% acetonitrile eluent	10.38
50% 乙腈洗脱液 50% acetonitrile eluent	10.54
60% 乙腈洗脱液 60% acetonitrile eluent	11.56
70% 乙腈洗脱液 70% acetonitrile eluent	12.24
80% 乙腈洗脱液 80% acetonitrile eluent	11.56
90% 乙腈洗脱液 90% acetonitrile eluent	8.24
100% 乙腈洗脱液 100% acetonitrile eluent	7.52

注:牛津杯内径 6.0 mm。

Note:The diameter of Oxford cup was 6 mm.

2.3 C_{18} 固相萃取

目标蛋白从 40% 乙腈开始洗脱,70% 乙腈洗脱

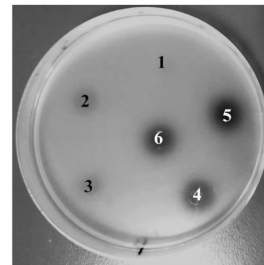


图 1 硫酸盐沉淀结果

Fig. 1 The result of sulfate precipitation

注:1:硫酸盐沉淀上清;2,3:透析换洗液;4,5,6:透析后的粗提液
Note:1:sulfate precipitation supernatant;2,3:dialysis change solution;4,5,6:crude extract after dialysis

液的抑菌圈最大(表 3)。可先用 10% ~ 40% 的乙腈洗脱除去杂质,然后用 50% 乙腈洗脱得到细菌素。

2.4 高效液相色谱纯度检测

经 C_{18} 固相萃取后的瑞士乳杆菌素 M14-1 冷冻干燥后复溶于超纯水中。在 280 nm 的波长下高效液相色谱检测分离纯度。在 4.07 min 时出现一个吸收峰(如图 3 所示)。

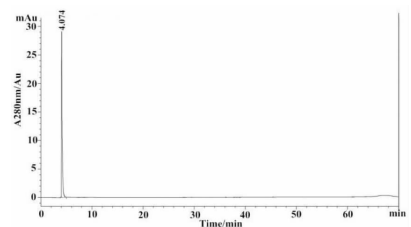


图 3 HPLC 检测瑞士乳杆菌素 M14-1 纯度

Fig. 3 Detection of the purity of bacteriocin M14-1 using HPLC

2.5 酶敏感性

将上清发酵液 pH 调至 6.0 时仍然具有抑菌作用(如图 4),由此可见该抑菌物质不是酸类物质。发酵液经过蛋白酶 K、胰蛋白酶、胃蛋白酶处理后发

现抑菌圈消失,而经过过氧化氢酶处理后抑菌圈直径变化不大,可知细菌素对蛋白酶 K、胰蛋白酶、胃蛋白酶敏感。

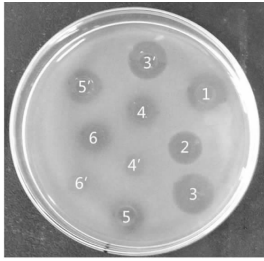


图4 瑞士乳杆菌素 M14-1 酶稳定性

Fig. 4 The sensitivity of bacteriocin *L. helveticus* M14-1 to enzymes

注:1:原发酵液(pH3.84);2:pH 6.0;3:过氧化氢酶处理;4:蛋白酶 K 处理;5:胰蛋白酶处理;6:胃蛋白酶处理;X':pH6.0;X:pH3.84。

Note:1:primary fermentation;2:pH6.0;3:treated with catalase;4:treated with proteinase K;5:treated with trypsin;6:treated with trypsin;X':pH6.0;X:pH3.84.

2.6 热稳定性

瑞士乳杆菌 M14-1 的上清发酵液经过不同温度的处理后仍具有很好的抑菌活性(如表4),即使在 90 ℃ 的条件下处理 90 min 仍然可以保持活性。然而在 121 ℃ 的条件下处理 15 min 后,抑菌圈直径变小,抑菌圈仅牛津杯大小,这主要是由于高温使蛋白质失活导致抑菌效果降低。

表4 瑞士乳杆菌 M14-1 所产细菌素的热稳定性

Table 4 The stability of the bacteriocin of strain *L. helveticus* M14-1 to temperature

热处理方式 Heat treatment methods	抑菌直径 Diameter of inhibition zone (mm)
原发酵液(pH6.0) Primary fermentation (pH6.0)	15.34 ± 0.24
60 ℃ 处理 30 min	15.28 ± 0.42
60 ℃ 处理 60 min	13.90 ± 0.28
60 ℃ 处理 90 min	13.52 ± 0.12
90 ℃ 处理 30 min	13.34 ± 0.30
90 ℃ 处理 60 min	13.40 ± 0.14
90 ℃ 处理 90 min	13.16 ± 0.12
121 ℃ 处理 15 min	6.00 ± 0.20

注:牛津杯内径 6.0 mm。

Note:The diameter of Oxford cup was 6 mm.

2.7 酸碱稳定性

将瑞士乳杆菌 M14-1 的上清发酵液调到 pH2 ~ 10 后,发现其抑菌圈并没有大幅变化(如表5),说明所产的细菌素具有良好的酸碱稳定性。

表5 瑞士乳杆菌 M14-1 所产细菌素酸碱稳定性

Table 5 The pH stability of the bacteriocin of strain *L. helveticus* M14-1

pH	抑菌直径 Diameter of inhibition zone (mm)
原发酵液(pH3.86) Primary fermentation (pH3.86)	14.38 ± 0.24
2	15.20 ± 0.14
4	14.34 ± 0.16
6	14.42 ± 0.34
8	14.10 ± 0.18
10	13.78 ± 0.14

注:牛津杯内径 6.0 mm。

Note:The diameter of Oxford cup was 6 mm.

2.8 抑菌谱

抑菌谱结果如表6所示,瑞士乳杆菌 M14-1 所产细菌素虽然对单核细胞增生李斯特氏菌有良好的抑菌效果,但对其他的常见的致病菌如大肠杆菌有弱阳性,沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、志贺氏菌并没有抑菌效果。

2.9 细菌素产量与细菌生长关系

将瑞士乳杆菌 M14-1 连续发酵 24 h,其间每隔 2 h 测定一次发酵液的 OD 值、pH 值与其效价,结果如图5所示。瑞士乳杆菌从 16 h 开始进入稳定期。发酵上清液的 pH 值随着菌株的生长不断下降,当菌株进入稳定期后,发酵上清液 pH 值不再发生变化。细菌素随着植物乳杆菌的生长而产生,在 12 h 后达到最大效价 2560 AU/mL。但此时的 OD 值与 pH 值还在变化,到 16 h 时稳定,pH 值为 3.94,OD 值为 2.709。

3 讨论与结论

目前国内对瑞士乳杆菌所产细菌素研究较少,田宇对瑞士乳杆菌素 HF08 的产生菌的发酵条件进行研究,并进一步研究其抑菌机理^[17],赵娜也对瑞士乳杆菌 AJT 进行同样的研究^[18]。本文仅对瑞士乳杆菌 M14-1 所产细菌素进行了初步的理化性质研究。在此基础上可以进行细菌素的分子量鉴定及氨基酸序列分析,根据部分或者全部氨基酸序列进行对比分析,从而初步确定细菌素的类型。

该细菌素对蛋白酶 K、胰蛋白酶、胃蛋白酶均敏感并有良好的酸碱稳定性,抑制单增李斯特氏菌的生长,这些生物学特性与目前已知的 II a 细菌素相似,而瑞士乳杆菌素 M14-1 是否为 II a 类细菌素还

表 6 瑞士乳杆菌 M14-1 细菌素的抑菌谱

Table 6 Antimicrobial spectrum of bacteriocin produced by strain *L. helveticus* M14-1

指示菌 Indicator bacteria	来源 ^a Origin	培养基及培养温度 Culture medium and temperature (°C)	抑制效果 ^b Inhibitory effect
单核细胞增生李斯特氏菌 <i>Listeria monocytogenes</i>	CMCC54003	Lis, 37	+++
单核细胞增生李斯特氏菌 <i>Monocyte Listeria monocytogenes</i>	CMCC54003	Lis, 37	+++
鼠伤寒沙门氏菌 <i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14028	BPY, 37	-
伤寒沙门氏菌 <i>Salmonella typhosa</i>	CMCC50071	BPY, 37	-
都柏林沙门氏菌 <i>Salmonella dublin</i>	CMCC50761	BPY, 37	-
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC29213	LB, 37	-
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	CMCC26001	LB, 37	-
大肠埃希氏菌 <i>Escherichia coli</i>	CMCC44110	LB, 37	+
志贺氏菌 <i>Shigella dysenteriae</i>	ATCC29243	GN	-
福氏志贺氏菌 <i>Shigella flexneri</i>	ATCC51572	GN, 37	-

注: a: ATCC, American type culture collection; CMCC, National center for medicinal culture collection; . b: 抑菌圈直径 (mm): + + +, 15 ~ 21 mm; + +, 9 ~ 14 mm; +, 6 ~ 8 mm; -, 无抑菌圈。

a: ATCC, American type culture collection; CMCC, China nation center for medical culture collections. b: inhibition zone (mm); + + +, 15-21 mm; + + 9-14 mm, +, 1-8 mm; -, no inhibition.

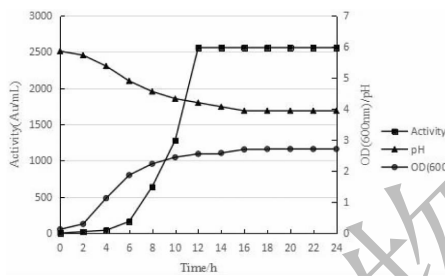


图 5 瑞士乳杆菌 M14-1 所产细菌素与菌株生长关系

Fig. 5 Production of the bacteriocin during the growth of *L. helveticus* M14-1

需进一步的测其 N 端氨基酸序列, 看其是否具有 II a 类细菌素的保守序列-YGNGV-。

瑞士乳杆菌素 M14-1 抑菌范围窄, 对大肠埃希氏菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、志贺氏菌无抑菌效果, 只对单核细胞增生李斯特氏菌有较强的抑菌作用。细菌素的最佳收获时间是发酵后 12 h。经硫酸盐沉淀、阳离子交换、C₁₈ 固相萃取三个纯化步骤后可得较纯的细菌素。

参考文献

- Devuyt L, Leroy F. Bacteriocin from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications [J]. *Mol Microbiol Biotech*, 2007, 13: 194-199.
- Stoyanova L, Ustyugova E, Netrusov A. Antibacterial metabolites of lactic acid bacteria: their diversity and properties [J]. *Appl Biochem Microbiol*, 2012, 48: 229-243.
- Yu N (于娜), Chen ZJ (陈忠军). Screening of lactic acid bacteria for bacteriostatic activity and characteristics of antibacterial compounds [J]. *Food Sci Tech* (食品科技), 2011, 36(5): 13-17.
- Coelho MC, Silva CCG, Ribeiro SC, et al. Control of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese using protective lactic acid bacteria [J]. *Int J Food Microbiol*, 2014, 191(17): 53-59.
- Eva R, Arques JL, Manuel N, et al. Combined effect of high-pressure treatments and bacteriocin-producing lactic acid bacteria on inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in raw-milk cheese [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71: 3399-3404.
- Carr FJ, Chill D, Maida N. The lactic acid bacteria: a literature survey [J]. *Crit Rev Microbiol*, 2002, 28: 281-370.
- Ren DY (任大勇), Li C (李昌), Qin YQ (秦艳青), et al. Development review on healthy function and potential mechanism of lactic acid bacteria [J]. *Chin J Vet Med* (中国兽药杂志), 2011, 2: 47-50.
- Cotter PD, Hill C, Ross RP. Bacteriocins: developing innate immunity for food [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2005, 3: 777-788.
- Farber JM, Peterkin PI. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen [J]. *Microbiol Rev*, 1991, 55: 476-511.
- Jin XY (靳晓燕). The study of distribution and internalin Genes profiles of *Listeria monocytogenes* among food samples [D]. Baoding: Hebei Agriculture University (河北农业大学), 2008.
- Liu H (刘慧). Experimental techniques of modern food mi-

- crobiology(现代食品微生物学实验技术)[M]. Beijing: China Light Industry Press, 2006.
- 12 Marugg JD, Gonzalez CF, Kunka BS, *et al.* Cloning, expression, and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1 and bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1. 0 [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58: 2360-2367.
 - 13 Arakawa K, Kawai Y, Ito Y, *et al.* HPLC purification and re-evaluation of chemical identity of two circular bacteriocins, gassericin A and reutericin [J]. *Let Appl Microbiol*, 2010, 50: 406-411.
 - 14 Jean-Marc B, Yves C. Purification of antilisterial bacteriocins [J]. *Methods Mol Biol*, 2004, 268: 225-233.
 - 15 Lu J(陆健). Protein purification technology and its application(蛋白质纯化技术及应用)[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005.
 - 16 Lyu HX(吕好新), Wang WD(王巍东), Tan ZF(谈重芳), *et al.* Screening and identification of a broad spectrum Bacteriocin-producing lactic acid bacteria strain, *Leuconostoc mesenteroide* [J]. *China Dairy Ind* (中国乳品工业), 2013, 10: 8-10.
 - 17 Tian Y(田宇), Hong F(洪芳), Hu C(胡承), *et al.* Selection of an bacteriocin-like substance producing strain and study on its fermentation conditons [J]. *Food Ferment Ind* (食品与发酵工业), 2004, 30(3): 56-60.
 - 18 Zhao N(赵娜), Liu X(刘鑫), Zhou LJ(周利娟), *et al.* Optimization of fermentation conditions for bacteriocin production by *Lactobacillus helveticus* AJT [J]. *Food Res Dev* (食品研究与开发), 2016, 37: 170-175.

(上接第 1436 页)

- 7 National Chinese Medicine Authority "Chinese materia medica" Editorial Board(国家中医药管理局《中华本草》编委会). Chinese materia medica(中华本草)[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2002: 7178-7185.
- 8 Cao Y(曹岩), Liu SY(刘树英), Wang SY(汪思远), *et al.* Extraction of saponins from *H. ventricosa* Stearn [J]. *Heilongjiang Agr Sci* (黑龙江农业科学), 2014: 107-110.
- 9 Yu M(于淼). Study on extraction and antibacterial activity of active components from roots of *H. ventricosa* stearn and [D]. Jilin: Jilin Agricultural University(吉林农业大学), 2015.
- 10 Zhao HR(赵惠茹), Ren Z(任早), Liu CY(刘春叶). Purification technology optimization for saponins from *Ziziphi Spinosae* Semen with macroporous adsorption resin by Box-Behnken design-response surface methodology [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2015, 38: 831-834.
- 11 Qu ZY(曲中原), Zhang YQ(张逸乔), Zou X(邹翔), *et al.* Purification of total saponins from *Ornithogalum caudatum* and its antioxidant activity [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2016, 28: 404-408.

(上接第 1460 页)

- 15 Han YQ(韩亚琼), Gu XJ(谷晓娟), Shen BC(沈报春), *et al.* Preparation, characterization and application of ginsenoside Rg1-bonded silica gel stationary phase (I) [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2014, 26: 268-272.
- 16 Li XY(李心怡), Gu XJ(谷晓娟), Shen BC(沈报春), *et al.* A new stationary phase for HPLC [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2015, 27: 78-784.
- 17 Yin Y(尹艳), Guan HY(关红雨), Zhang XN(张夏楠). Review on enzymes and genes related to the biosynthesis of steroidal saponins [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2016, 28: 1332-1336.
- 18 Kimata K, Iwaguchi K, Onishi S, *et al.* Chromatographic characterization of silica C₁₈ packing materials. Correlation between a preparation method and retention behavior of stationary phase [J]. *J Chromatogr Sci*, 1989, 27: 721-728.
- 19 Layne J. Characterization and comparison of the chromatographic performance of conventional, polar-embedded, and polar-endcapped reversed-phase liquid chromatography stationary phases [J]. *J Chromatogr A*, 2002, 957: 149-164.
- 20 Li WJ(李文婧), Zhao LJ(赵丽娟), Wei CHL(魏缠玲), *et al.* Preparation and evaluation of chromatographic properties of sulfobetaine zwitterionic hydrophilic interaction chromatography stationary phase [J]. *Chin J Chromatogr* (色谱), 2017, 35: 382-387.