布氏乳杆菌 CF10 所产类细菌素 Lactobacillin FC-10 的初步研究

常 峰,梁 波,朱何东,胡 承,蒋 宏,王忠彦*
(四川大学生命科学学院,四川 成都 610064)

摘 要: 采用纸片法初筛和杯碟法复筛自黄水中分离出一株抗生物质产生菌 CF10,经鉴定为布氏乳杆菌。排除酸性末端产物及过氧化氢的干扰后,CF10 菌株发酵液对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌等革兰氏阳性菌、大肠杆菌和绿脓杆菌等革兰氏阴性菌、K 酵母和某些真菌有强烈的抑制作用。经蛋白酶 K 处理,该菌株具有广谱抑菌活性、热稳定性,在酸性条件下稳定且活性高,对蛋白酶敏感度低。

关键词: 布氏乳杆菌; 类细菌素; 抑菌活性; 生物学特性
中图分类号:TS261.1;Q93-3;Q939 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2005)06-0036-04

Study on Lactobacillin FC-10

CHANG Feng, LIANG Bo and ZHU He-dong et al.
(Life Science College of Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610064, China)

Abstract: CF10, a strain producing antibiotic substances, was separated by paper strip method (primary screening) and cylinder plate method (*secondary screening*) from yellow water. It was identified as *Lactobacillus buchneri*. After the exclusion of the interference of acidic end products and hydrogen peroxide, CF10 fermenting solution could inhibit Gram-positive bacteria such as *staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*, Gram-negative bacteria such as *Escherichia* coli and *Pseudomoras pyocyaneu* etc., and *Saccharomyces cerevisiae* K and some fungi. CF10 treated by protease K was in possession of broad-spectrum bacteriostasis activity and thermal stability. Under acid conditions, it remained stable with low susceptibility to protease and high activity. (Tran. by YUE Yang)

Key words: *Lactobacillus buchneri*; lactobacillin; bacteriostasis activity; bionomics

乳酸菌(Lactic acid bacteria LAB)是一类可发酵糖并产生大量乳酸的细菌统称。长期以来,乳酸菌广泛应用于乳制品、蔬菜及肉制品的发酵和防腐中[1]。许多乳酸菌代谢除了产生乳酸、乙酸等有机酸和过氧化氢外,还能产生多种具有抑菌或杀菌生物活性的细菌素,在抑制多种病原微生物和食物腐败菌等方面具有重要意义[2]。细菌素是细菌在代谢过程中由核糖体合成的具有抑菌活性的蛋白质或多肽类物质,其抑菌谱较窄,只对有近缘关系的乳酸菌和非乳酸菌的革兰氏阳性菌有抑制作用,而对革兰氏阴性菌和真菌则无效[3]。类细菌素是用来描述那些不符合或不完全符合细菌素定义的拮抗物质[4],它不仅能抑制革兰氏阳性菌,而且对革兰氏阴性菌和真菌也有抑制作用[5]。这一特性决定了类细菌素具有比细菌素更广泛的应用前景。目前关于乳酸菌产生细菌素的研究已深入到分子水平,而对乳酸菌类细菌素的研究相对较少。关于类细菌素国外已有研究,而在国内相关报道却很少。

黄水是浓香型白酒酿造过程中的副产物,含有丰富的醇、醛、酸、酯等呈香呈味物质和经长期驯化的有益微生物等[6]。笔者从黄水中分离得一株产类细菌素的乳酸菌株,经鉴定为布氏乳杆菌(*Lactobacillus buchneri*),并对其产生的类细菌素 Lactobacillin FC-10 的生物学特性进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

收稿日期:2004-11-19
作者简介:常峰(1979-),男,四川郫县人,硕士研究生,发表论文 1 篇。
* 王忠彦为通讯作者。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.1.1　样品来源

采集自四川某浓香型白酒酿造企业窖池中的黄水。

1.1.2　供试指示菌(见表 6)

1.1.3　培养基

筛选培养基(g/L):MRS 培养基[7]。

指示菌培养基(g/L):蛋白胨 10.0,酵母膏 6.0,葡萄糖 1.0,牛肉膏 1.5,琼脂 20.0,pH7.2~7.5。

发酵培养基(g/L):MRS 液体培养基。抑菌活性检测用培养基,采用双层平板。下层为 2.0 %水琼脂,上层为 10 mL 指示菌培养基中加入 1.0 %指示菌悬液(指示菌斜面于 30 ℃培养 24 h,用 10 mL 生理盐水刮洗斜面,制成菌悬液)。

1.2　方法

1.2.1　初筛方法

将样品用无菌水梯度稀释,滴加 0.1~0.2 mL 涂布于筛选培养基平板,30 ℃倒置培养 72 h,挑取其上单菌落接种于加有 1 mL 发酵培养基的 1.5 mL 离心管 (Ep 管,Eppendorf tube)中,密封,30 ℃静置培养 72 h。用直径 5 mm 的三层滤纸片蘸取其离心上清液,贴于带菌平板表面,37 ℃培养 16~18 h,挑取滤纸片周围具有明显抑菌圈及发酵产物具有广谱抗性的菌株进行复筛[8]。

1.2.2　复筛及发酵方法

将纯化后的初筛菌种接入装有 150 mL 发酵培养基的 150 mL 三角瓶中活化 72 h,按 1.0 %的接种量接入装有 250 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中,30 ℃静置培养 48 h。将发酵液以 15000 r/min 离心 30 s,以杯碟法测定初筛菌株发酵上清液抑菌活性。

1.2.3　乳酸旋光性的测定

采用化学法[9]。

1.2.4　G+C 摩尔百分含量测定

采用 Tm 法[10]。

1.2.5　pH 值的测定

pHS-2C 型酸度计。

2　结果与分析

2.1　产类细菌素乳酸菌的分离与鉴定

采用梯度稀释涂布平板法和厌氧分离技术,从黄水中采集样品,通过纸片法初筛分离纯化得到 18 株具有抑菌活性的菌株,再通过牛津杯双层平板法筛得一株编号为 CF10 的具有广谱抑菌作用的菌株,不仅对 G^+菌和 G^-菌有较强的抑制作用,而且对部分真菌也有程度各异的抑制作用(结果见图 1,图 2)。该菌菌体细胞呈短杆状,两端稍圆,大小为(1.0~2.0)μm×(0.4~0.5)μm,单个或成短链。革兰氏染色呈阳性,无芽孢,不运动。单菌落呈圆形,较光滑,乳白色,不透明,边缘齐整,无缺刻,直径 0.2~0.8 mm。葡萄糖氧化发酵类型为专性异型发酵,发酵葡萄糖产酸产气,从阿拉伯糖、果糖、乳糖、半乳糖、麦芽糖、蔗糖、松三糖、蜜二糖、棉籽糖、核糖、木糖、七叶灵发酵产酸,不发酵纤维二糖、鼠李糖、海藻糖、甘露糖、甘露醇、山梨醇。15 ℃生长,45 ℃不生长,乳酸旋光性为 DL,DNA 中 G+C 摩尔百分含量为 45.2 %。进一步的生理生化试验结果见表 1。

表 1　目的菌株的生理生化特征

反应	特征	反应	特征	反应	特征
细胞色素氧化酶	-	硝酸盐还原	-	明胶水解	-
过氧化氢酶	-	产生 H_2S	-	联苯胺反应	-
需氧性	兼性厌氧	石蕊牛奶	紫→红	M. R. 试验	+
淀粉水解	-	酪素水解	-	V. P. 试验	+

根据 CF10 菌株的形态特征及生理生化特征,参照《伯杰细菌鉴定手册》(第 8 版)和乳酸菌分类鉴定及实验方法,将该菌鉴定为布氏乳杆菌(*Lactobacillus buchneri*)。

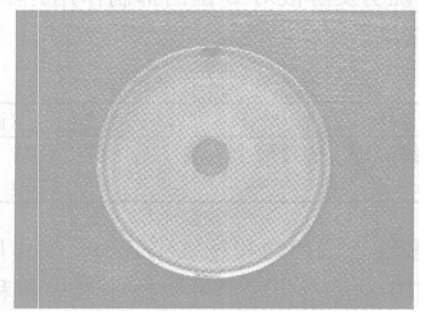


图 1　CF10 发酵液对大肠杆菌的抑制结果

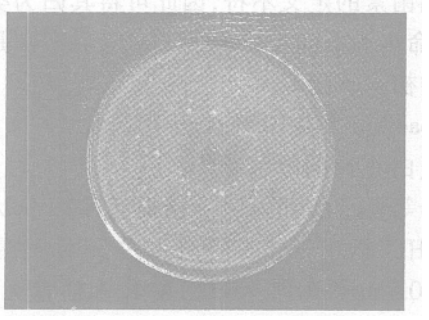


图 2　CF10 发酵液对米曲霉的抑制结果

2.2　布氏乳杆菌 CF10 产抑菌活性物质的确定

2.2.1　酸性末端产物干扰的排除

布氏乳杆菌 CF10 发酵液对指示菌的抑制作用,可能是代谢合成的乳酸菌素,也可能是酸性末端产物如乳酸、乙酸或其他有机酸作用的结果。为了排除酸性末端产物的干扰,将培养 24 h 的发酵液离心,取上清液进行抑菌试验(以金黄色葡萄球菌和绿脓杆菌为指示菌),分别以乳酸、乙酸调等量的发酵培养基至 pH3.5 作为对

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

照。结果如表 2 所示,pH3.5 的乳酸、乙酸均不能抑制指示菌的生长,而初始 pH 值的发酵上清液(pH 值>3.5)具有较强的抑制作用,说明在排除酸性末端产物的干扰后,发酵液中存在着抑菌活性物质。

表 2 酸性末端产物干扰的排除

样 品	金葡平板的透明圈直径(mm)	绿脓平板的透明圈直径(mm)
初始 pH 的发酵上清液	16.44	19.38
以乳酸调 pH3.5 的筛选培养基	-	-
以乙酸调 pH3.5 的筛选培养基	-	-

注:"-"表示无抑制作用。

2.2.2 过氧化氢干扰的排除

乳酸菌代谢过程中产生的过氧化氢也可能抑制细菌的生长,尤其是抑制 G^-菌的生长,因此必须排除过氧化氢的干扰。用过氧化氢酶处理培养 24 h 后的发酵上清液,以大肠杆菌为指示菌进行抑菌试验,以未经过氧化氢酶处理的发酵上清液为对照(两者 pH 值一致)。结果表明(见表 3),经过氧化氢酶处理的发酵液的抑菌作用变化甚微,说明发酵液对 G^-菌的抑制作用并不是过氧化氢作用的结果。

表3 过氧化氢干扰的排除

样 品	透明圈直径 (mm)
经过氧化氢酶处理后的发酵上清液	18.06
对 照	18.50

在排除酸性末端产物和过氧化氢的干扰作用后,布氏乳杆菌 CF10 发酵上清液仍可明显抑制 G^+菌和 G^-菌,证明了发酵上清液中抑菌活性物质的存在。由于这一性质与一般细菌素的定义不符,因此可将其归为类细菌素的范畴,暂命名为 Lactobacillin FC-10,以下则是对其生物学性质的初步研究。

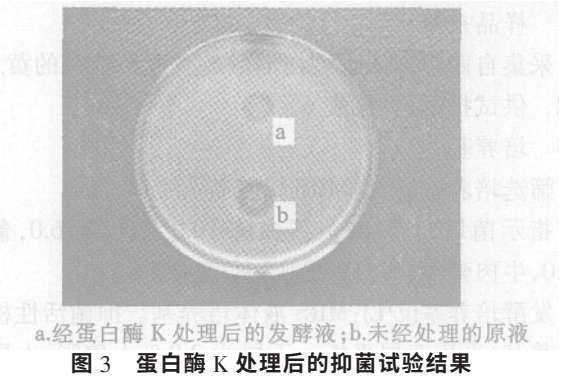
2.3 Lactobacillin FC-10 的生物学特性

2.3.1 对蛋白酶 K 的敏感性

取 2 份等量(1 mL)的 CF10 粗提液,用 1mol/L NaOH 和 1mol/L HCl 调节其 pH 值至蛋白酶 K 的最适作用 pH7.6,按 0.5 mg/mL 加入蛋白酶 K 和适量无菌水,在 37 ℃下培养 1 h。再将 pH 值调回到 CF10 发酵液的初始 pH 值,并以未经处理的原液作对照,进行抑菌试验(以绿脓杆菌为指示菌),结果如图 3 所示。Lactobacillin FC-10 经蛋白酶 K 处理后,透明圈直径略有减小,但仍具有很明显的抑菌作用。暗示该活性物质为非蛋白组分或者起抑菌作用的不是单一的物质,关于其详细性质有待进一步研究。

2.3.2 热稳定性

取等量的 CF10 粗提液分别于 60 ℃,80 ℃,100 ℃和 120 ℃下保温 20 min,以未经处理的 CF10 发酵液为对照,做抑菌试验(以金黄色葡萄球菌和绿脓杆菌为指示菌)。结果如表 4 所示,随着温度的升高,CF10 发酵液对指示菌的抑菌活性有少许下降,但两者的透明圈仍然很明显,这充分证明 Lactobacillin FC-10 具有相当好的热稳定性。



a.经蛋白酶 K 处理后的发酵液;b.未经处理的原液

图 3 蛋白酶 K 处理后的抑菌试验结果

表 4 Lactobacillin FC-10 的热稳定性

样 品	金葡平板的透明圈直径(mm)	绿脓平板的透明圈直径(mm)
60 ℃处理后的发酵液	16.80	22.54
80 ℃处理后的发酵液	16.12	20.60
100 ℃处理后的发酵液	15.64	19.74
120 ℃处理后的发酵液	14.42	18.58
对 照	16.36	18.90

2.3.3 不同 pH 值对抑菌活性的影响

取等量的 CF10 粗提液用 1 moL/L HCl 和 1 moL/L NaOH 调至不同 pH 值,以未经处理的原液为对照,进行抑菌试验 (以绿脓杆菌为指示菌)。结果如表 5 所示,Lactobacillin FC-10 活性随着 pH 值的升高而降低,当 pH 值为 6.0 时,活性完全丧失。说明 Lactobacillin FC-10 在酸性条件下稳定,且具有较高活性。

表 5 不同 pH 值对抑菌活性的影响

pH 值	透明圈直径(mm)
3.0	18.42
3.5	18.24
4.0	17.78
4.5	15.30
5.0	11.62
5.5	8.64
6.0	—
6.5	—
对 照	17.86

2.3.4 Lactobacillin FC-10 的抑菌谱

选取 G^+菌、G^-菌、K 酵母以及真菌作为供试指示菌,检测 Lactobacillin FC-10 对各指示菌的抑菌活性,以确定其抑菌谱。结果如表 6 所示,Lactobacillin FC-10 不仅对亲缘关系相近的乳杆菌有抑菌活性,而且对非乳酸菌的 G^+菌也有较强的抑制作用,更重要的是,它对 G^-菌有

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 6　Lactobacillin FC-10 的抑菌谱

中文菌名	拉丁文菌名	抑菌圈直径 (mm)
金黄色葡萄球菌 A301	*Staphylococcus aureus A301*	16.20
金黄色葡萄球菌 A309	*Staphylococcus aureus A309*	16.74
枯草芽孢杆菌	*Bacillus subtilis*	22.26
表皮葡萄球菌	*Staphylococcus epidermidis*	16.96
鸟链球菌	*Stretococcus avium*	20.38
粪链球菌	*Streptococcus faecalis*	19.04
大肠杆菌	*Escherichia coli*	18.32
绿脓杆菌	*Pseudomonas pyocyanea*	18.60
瑞士乳杆菌	*Lactobacillus helveticus*	18.56
K 酵母	*Saccharomyces cerevisiae K*	8.86
玉米纹枯菌	*Rhizoctonia solani*	21.48
新月弯孢霉	*Curvularia lunata*	19.72
米曲霉	*Aspergillus oryzae*	18.92
蓝色犁头霉	*Absidia coerulea*	11.56
黄曲霉	*Aspergillus flavus*	-
白色链霉菌	*Streptomyces albus*	-
常见青霉	*Penicillium frequentans*	-
白色念珠菌	*Candida albicane*	-

注：表中所列菌种来源为本实验室保藏。

十分明显的抑制作用，甚至能够抑制 K 酵母和部分真菌，但对白色念珠菌和某些霉菌则无抑制作用。

3　讨论

黄水作为酿酒副产物，富含多种有益微生物，长期以来，对黄水的综合利用程度一直都处于较低水平，甚至不加处理直接排放，造成环境污染。笔者从“变废为宝”的角度出发，有针对性地对黄水中的乳酸菌进行理性筛选，得到了一株具有广谱抑菌活性的乳酸菌株，经鉴定为布氏乳杆菌，命名为 CF10。在排除了酸性末端产物及过氧化氢的干扰后，其发酵产物 Lactobacillin FC-10 具有耐高温，在酸性条件下稳定且活性高，对蛋白酶 K 敏感性很低，且对 G^-菌、酵母菌和真菌有明显的抑制作用等特性，与一般乳酸菌细菌素定义不符，因此归为类细菌素。

随着对乳酸菌细菌素研究的不断深入，与 Lactobacillin FC-10 性质类似的抑菌物质也有相关报道。Talarico 等对一株乳酸杆菌进行研究，发现该菌产生一种非细菌素的广谱抑菌物质，该物质对 G^+菌及 G^-菌、酵母菌、真菌都具有明显的抑制作用。Coconnier 等发现一类热稳定、对蛋白酶敏感性低、低分子量、对 G^+菌及 G^-菌都具有抑制作用的抑菌活性物质，且在酸性条件下活性更高，同样与一般细菌素定义不符。Dicks 也从乳酸杆菌中分离得一种广谱的微生物化合物，对 G^+菌、G^-菌以及真菌都有抑菌活性，也不为蛋白酶所分解，它被认为是类抗生素物质。从目前的报道看，类细菌素物质性质各异，结构组成复杂。关于细菌素的定义，存在多种说法，对于类细菌素的归属也缺乏统一的标准。细菌素与类细菌素以及类抗生素物质之间的关系和彼此涵盖的具体内容尚没有很明确的界定。因此，众多文献中对于上述名词的使用上存在一定的紊乱，这些都有待于对乳酸菌抑菌活性物质研究的不断深入[11]。

参考文献：

[1] Perlak F J, Dwaton R W, Armstrong TA. Insect Resistant Cotton Plants[J]. Bio/technol, 1990,(8): 939-943.

[2] Li X B, Mao H Z, Bai Y Y. Transgenic Plants of Rutabaga Tolerant to Pest Insects[J]. Plant Cell Rep,1995,(15): 97-101.

[3] 徐进,冉陆,罗雪云.乳酸菌细菌素的生物合成与应用[J].卫生研究,2002,(3): 211-213.

[4] Virginia S O, Aida A P, Maria E N-Characterization of a Bacteriocin-like Substance Produced by a Vaginal Lactobacillus Salivarius Strain[J].Appl Environ Microbiol,1999,(65): 5631-5635.

[5] Mcgoarty J.Probiotic Use of Lactobacilli in the Human Female Urogenital Tract [J].FEMS Immunol Med Microbiol, 1993,(6):251-264.

[6] 罗惠波,张宿义,卢中明.浓香型白酒黄水的应用探索[J].酿酒,2004,31(2): 71-72.

[7] 凌代文,东秀珠.乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M].北京:中国轻工业出版社,1999. 85-86.

[8] 田宇,洪芳,王忠彦,等.类细菌素产生菌 HF08 的选育及其发酵条件的研究[J]. 食品与发酵工业,2004,30(3): 56-60.

[9] 杨杰彬,等.乳酸菌-生物学基础及应用[M].北京:中国轻工业出版社, 1996. 41-42.

[10] 林万明,李银太,郭兆彪.细菌分子遗传学分类鉴定法[M].上海:上海科学技术出版社,1990. 85-92.

[11] 荆谷,孔健,李德冠,等.乳酸乳球菌 L9 产类细菌素 lactococcinGJ-9 的初步研究[J]. 食品与发酵工业,2003,29(9):17-21.

部分省区酿协负责人座谈会在京举行

本刊讯：2005 年 5 月 18 日晚，利用“中国酒类产品质量等级认证检查员培训班”的间隙时间，中国酿酒工业协会召开了与会部分省区酿协负责人座谈会，会议由王琦秘书长主持。王延才理事长在会上讲话，他指出，酒协的同志参加培训，是对酒类产品质量认证工作的重视，国家推出产品质量认证，在大食品范畴下，酒类是一个分支，关系到国计民生问题。目前，大食品未动，酒是第一个出台的规范，要认真学习。这一批检查员与 9000 序列和 14000 序列不同，是一个新的序列，酒类产品认证中心的分支机构全部设在各省区酿酒协会。经过两年多的时间，完成了认证机构的建设，优势在本机构的认证具有国家权威性，并且与其他国家相互通用。大家要通过学习，开好局，走好第一步，走出层次，要对过得硬的企业先行开展工作。与会者对检查员培训学习及相关工作进行了热烈讨论，对王理事长“开好局，走好第一步”表示赞同，并提议通过不同方式加强宣传，为企业和广大消费者做实实在在的工作，为净化市场做出贡献。（小雨）

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net