

产抑菌素菌株 SM-A 的分离和鉴定

刘 稳 马桂荣 孔 健 孟凡伦

(山东大学微生物研究所 济南 250100)

高福鸿

(中国科学院动物研究所 北京 100080)

摘 要 自市售酸乳酪中分离到一株乳球菌 SM-A 菌株。该菌株产生的抑菌素能抑制或杀死芽孢杆菌、葡萄球菌、微球菌、链球菌、棒杆菌和梭菌等革兰氏阳性细菌,但对革兰氏阴性细菌、霉菌和酵母无效。SM-A 菌株多为链球状,也有成对存在。革兰氏染色阳性,抗酸染色阴性,兼性厌氧生长,最适生长温度 32℃,不形成芽孢,无荚膜和鞭毛,不运动;可从多种糖类产酸,但不产气;接触酶、苯丙氨酸脱氨酶和酪氨酸脱羧酶均为阴性,精氨酸双水解酶阳性;不液化明胶,还原石蕊牛奶并胨化,生长温度范围 10~43℃,DNA 中 G+C mol 为 36.4%。经鉴定,SM-A 菌株为乳酸乳球菌乳酸亚种 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*)。

关键词 乳酸乳球菌乳酸亚种,抑菌素

乳酸菌是一类发酵糖产生大量乳酸、分解蛋白质但不产生有毒物质的细菌。长期以来,乳酸菌在食品发酵、贮存等工业生产中广泛应用,它们能产生一些具有抑菌活性的多肽物质,暂命名为抑菌素 (Antimicrobials)^[1,2]。某些乳球菌能产生一种或几种小分子多肽抑菌素^[3],这些抑菌素通常含有不饱和氨基酸和硫环氨基酸,能抑制或杀死多种腐败菌和食物病原菌。目前国际上研究较深入、应用较广的是乳链菌肽 (Nisin)^[4],它是由某些乳酸乳球菌乳酸亚种 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) 产生的一个由基因编码的硫肽抗菌素 (Lantibiotic)^[5],由 34 个氨基酸组成,分子量 3500,含有 3 个不饱和氨基酸和 5 个硫环氨基酸。Nisin 对许多革兰氏阳性细菌如利斯特氏菌、梭菌、葡萄球菌和芽孢杆菌等有强烈的抑制作用,已被许多国家广泛应用于乳制品、罐头、高蛋白食品及乙醇饮料的防腐保鲜,成为越来越受人重视的一种安全、高效的天然食品防腐剂。目前我国及其他发展中国家普遍使用化学防腐剂,这对人体产生或多或少的毒害作用。随着对天然食品防腐剂性质及作用机制的逐步阐明,天然食品防腐剂将很快取代化学防腐剂而用于食品保鲜,乳球菌及其所产生的抑菌素将有实际应用前景。本文报道了一株产抑菌素的乳酸乳球菌乳酸亚种 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) SM-A 菌株的分离和鉴定结果。

1 材料和方法

1.1 样品来源

内蒙包头市售酸乳酪。

1.2 对照菌株

乳酸乳球菌乳酸亚种 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) ATCC11454 标准菌株由美国犹他州立大学 Jeff Broadbent 博士惠赠。

1.3 培养基

1.3.1 分离培养基: CM 培养基, MRS 培养基和 M17 培养基。此三种培养基增加 0.1% 溴甲酚紫或倾注时增加 2% 碳酸钙作为分离培养基。MRS 培养基主要用于乳杆菌分离, M17 培养基主要用于链球菌分离。

1.3.2 鉴定培养基: MRS 培养基、M17 培养基、石蕊牛乳培养、半固体培养基和糖发酵培养基。

1.4 分离培养

样品按常规要求处理后, 倾注分离培养基, 用需氧和厌氧方法培养后, 挑取可疑菌落 (有溶钙圈或溴甲酚紫变色环菌落), 对经过革兰氏染色和显微个体形态观察初步认为是乳球菌者, 将其移植 M17 培养基进行纯培养。

1.5 产抑菌素菌株的筛选

采用菌落覆盖法^[7]和牛津杯定量扩散法^[12]。

1.6 鉴定方法

主要根据文献[8]、[9]介绍的有关方法进行。

1.6.1 形态特征观察: 待鉴定菌株于 CM 液体培养基中 32℃ 培养 12~36h, 光学显微镜下观察个体形态并测量菌体大小; 于 CM 平板上 32℃ 培养 48h, 观察菌落形态并测量菌落大小。

1.6.2 生长温度测定: 用 722 型分光光度计在 610nm 处测定待鉴定菌株在不同温度下 (4、10、15、30、37、40、43、45 和 50℃) 的生长量。于 10℃ 和 45℃ 临界温度下, 连续转接三次, 确证是否生长。

1.6.3 耐酸碱度试验: 用 722 型分光光度计在 610nm 处测定待鉴定菌株在不同 pH 条件下 (pH3.2、4.6、5.2、6.5、7.2、8.6、9.2 和 9.6) 的生长量, 对于临界 pH 连续转接三次, 确证是否生长。

1.6.4 耐盐能力测定: 待鉴定菌株分别接种于含 2%、4% 和 6.5% NaCl 的 CM 液体培养基中, 32℃ 培养 7d, 并连续转接三次, 观察结果。

1.6.5 需氧性测定: 参照文献[10]方法进行。

1.6.6 运动性测定: 采用半固体穿刺培养法 (兼测需氧性) 和悬滴镜检法。

1.6.7 糖类发酵试验: 参照周德庆^[11]、范秀容^[12]等人的方法, 在装有杜氏小管的溴甲酚紫蛋白胨水试管中分别加入终浓度为 1% 的各种糖、醇和糖苷, 32℃ 培养 2、3、6d 观察结果。

1.6.8 酸、醇分析: 取待鉴定菌株的葡萄糖发酵液, 用 Shimadzu GC-7AG 气相色谱仪检查其主要代谢产物, 发酵液衍生物制备方法见文献[13]。色谱条件: 色谱柱, 3mm×2m 不锈钢柱, 填充 80~100 目 GDX-401; 氮气流速 20ml/min, 氢气流速 40ml/min, 空气流速 400ml/min; 灵敏度 1000, 检测器 FID; 柱温起始 60℃, 进样 2min 后以 20℃/min 程序升温至 120℃, 继续恒温 4min; 汽化室与检测室温度 150℃。

1.6.9 DNA 中 G+C mol%测定: DNA 提取方法见文献[14],用 Shimadzu UV-240 紫外分光光度计,以大肠杆菌 K12 作参照菌,用 T_m 值法测定。

1.6.10 抑菌谱测定: 采用牛津杯定量扩散法,液体培养各指示菌,与熔化后冷至 50℃ 左右的各培养基(加 0.1%吐温 20)混匀后倾注平板,待冷凝后安置牛津杯,杯中注入 200 μ l 样品液(样品液制备方法见文献[6]),置各适宜温度下培养 24~48h,观察结果。

2 结果

2.1 个体形态

由包头市售酸乳酪中分离到一株抑菌活性很强的乳球菌菌株 SM-A,该菌株多为链状,也有呈对存在,菌体圆形或卵圆形,直径 0.75~1.25 μ m,革兰氏染色阳性,抗酸染色阴性,无荚膜和鞭毛,不形成芽孢。

2.2 培养特征

SM-A 菌株于 CM 平板上 32℃ 培养 24h,菌落呈圆形,凸起,较光滑,乳白或灰白色,湿润,不透明,无水溶性色素,直径 0.7~1.4mm。液体培养不形成菌膜,血平板上生长呈 γ 溶血。

2.3 生长温度

SM-A 菌株生长温度范围 10~43℃,最适生长温度 32℃。

2.4 需氧性和运动性

SM-A 菌株属于兼性厌氧菌,按 Cappuccino 的方法,在整个琼脂试管中基本呈均匀生长;半固体穿刺培养和悬滴镜检结果表明该菌株无运动性。

2.5 生理生化反应和耐盐能力

有氧情况下测定了 SM-A 菌株的部分生理生化特性和耐盐能力,以乳酸乳球菌乳酸亚种 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) ATCC11454 标准株作参照。结果表明,SM-A 菌株在 10℃ 时能生长,45℃ 不生长;在含 4.0%NaCl 肉汤中或在 pH9.2 时能生长,而在 6.5%NaCl 肉汤中或在 pH9.6 时不生长;不能耐受 60℃ 30min;可耐受 40%胆汁;能在 0.3%美蓝牛奶中生长;还原石蕊牛奶并胨化;不产吲哚或硫化氢;不能利用柠檬酸盐或马尿酸盐;联苯胺阴性;触酶阴性;精氨酸双水解酶阳性;酪氨酸脱羧酶和苯丙氨酸脱氨酶阴性。糖类发酵产酸不产气;不能液化明胶,也不能水解淀粉;可以分解七叶苷和水杨素。从葡萄糖、果糖、甘露糖、核糖、阿拉伯糖、乳糖、蔗糖及麦芽糖产酸;极弱发酵木糖、半乳糖、海藻糖和纤维二糖;不发酵岩藻糖、棉子糖、鼠李糖或菊糖,也不发酵甘油、山梨糖、山梨醇、甘露醇或肌醇。DNA 的 G+C mol 为 36.4%。SM-A 菌株的这些生理生化特性基本与乳酸乳球菌乳酸亚种 ATCC11454 标准株相吻合,所不同的是,ATCC11454 菌株不发酵阿拉伯糖,但能发酵棉子糖和山梨糖,其 DNA 中 G+C mol 为 38.3%。

2.6 开始生长的 pH 范围

SM-A 菌株在初始 pH4.6~9.2 条件下均可生长,最适生长 pH 为 6.8。

2.7 发酵葡萄糖产酸分析

气相色谱分析结果表明,SM-A 菌株发酵葡萄糖主要产乳酸(占总酸 95%以上),不产乙醇或甲醇,甲酸、乙酸未测出。因此认为 SM-A 菌株发酵产酸为同型乳酸发酵。

2.8 抑菌谱

经用牛津杯定量扩散法测定, SM-A 菌株所产抑菌素对多种革兰氏阳性菌如枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、白色葡萄球菌 (*Staphylococcus albus*)、粪链球菌 (*Streptococcus faecalis*)、浅黄微球菌 (*Micrococcus flavus*)、单核细胞增生利斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*)、粒状棒杆菌 (*Corynebacterium granulosum*)、干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*) 和丁酸梭菌 (*Clostridium butyrium*) 有很强的抑制或杀灭作用, 而对革兰氏阴性细菌、霉菌和酵母无效。

3 讨论

SM-A 菌株按其菌体排列成链状, 无运动性; 革兰氏染色阳性; 接触酶阴性; 联苯胺阴性; 兼性厌氧; 糖发酵产酸不产气; 液体培养基中生长不形成菌膜; 营同型发酵产乳酸; 细胞在一个平面上分裂等特征, 可归为乳球菌属。该菌株 10℃ 时能生长, 45℃ 不生长; 在 4.0% NaCl 肉汤中或在 pH9.2 时能生长, 而在 6.5% NaCl 肉汤中或在 pH9.6 时不生长; 在 0.3% 美蓝牛奶中能生长; 精氨酸双水解酶阳性; 血平板上生长呈 γ 溶血; 不能耐受 60℃, 30min; 可耐受 40% 胆汁。该菌株的主要生理生化特性与乳酸乳球菌乳酸亚种 ATCC11454 基本一致。由此, 结合该菌株生物学特性和 DNA 的 G+C 克分子含量, 依据《伯杰氏系统细菌学鉴定手册》, 将其鉴定为乳酸乳球菌乳酸亚种 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*)。乳酸乳球菌乳酸亚种 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) 是以前文献报道的乳链球菌 (*Streptococcus lactis*) 的同种异名^[15]。

SM-A 菌株所产抑菌素对许多革兰氏阳性细菌, 包括葡萄球菌、梭菌、利斯特氏菌和芽孢杆菌等腐败菌和食物病原菌有强烈的抑制作用, 是一种具有潜在应用前景的抑菌剂。

致谢 本所任红卫和山东医科大学朱文森曾参加部分工作, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Amechi O, Thomas J M. *Appl Env Microbiol*, 1991, 57(12): 3423~3425.
- [2] Elaine E V, Looney R. *J Appl Bacteriol*, 1994, 76(1): 118~123.
- [3] Klaenhammer T R. *Biochemie*, 1988, 70(2): 337~349.
- [4] Hurst A. *Adv Appl Microbiol*, 1981, 27(1): 85~92.
- [5] Kleiakauf H, Dohren H V. *Annu Rev Microbiol*, 1987, 41: 259~289.
- [6] Fleming H P, Etchells J L, Hofte H et al. *Appl Microbiol*, 1975, 30(4): 1040~1042.
- [7] Tramer J, Fowler G G. *J Sci Food Agric*, 1964, 15(3): 522~528.
- [8] 中国科学院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法. 北京: 科学出版社, 1978. 98~193.
- [9] Mundt J O. Lactic Acid Streptococci. In: Sneath P H A ed. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 2. Baltimore: The Williams & Wilkins Co, 1986. 1066~1068.
- [10] Cappuccino J G, Sherman R F. *Fundamental Experiments in Bacteria*. In: Gerald E W ed. *Microbiology*. New York: Addison & Wesley Publishing Co, 1983. 111~113.
- [11] 周德庆. 微生物实验手册. 上海: 上海科技出版社, 1983. 136~164.
- [12] 范秀容 沈萍. 微生物学实验方法. 北京: 高等教育出版社, 1980. 58~76.

- [13] 胡家元. 食品与发酵工业, 1992, 6: 19~22.
[14] Allen L N, Hanson R S. *J Bacteriol*, 1985, 161 (3): 955~962.
[15] Schleifer K H, Krans J, Dvorak C *et al. Syst Appl Microbiol*, 1985, 6: 183~195.

THE ISOLATION AND IDENTIFICATION OF ANTIMICROBIAL-PRODUCING STRAIN SM-A

Liu Wen Ma Guirong Kong Jian Meng Fanlun

(Institute of Microbiology, Shandong University, Jinan 250100)

Gao Fuhong

(Institute of Zoology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract One strain of *Lactococcus*, SM-A, was isolated from a commercial yoghurt. It can produce an antimicrobial with activity upon various Gram-positive bacteria including *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Clostridium* and *Corynebacterium*. But it has no activity on Gram-negative bacteria, fungi or yeasts. The strain is Gram-positive, acid-fast negative, nonsporing, facultative anaerobic and without flagellum and capsula. The ovoid cells of the strain are elongated in the direction of the chain, 0.75~1.25 μ m in diameter and mostly in chains or pairs. The optimum temperature for growth is 32 $^{\circ}$ C. Many kinds of carbohydrates can be utilized for acid production, but no gas is produced. Gelatin can not be liquefied. Catalase, phenylalanine deaminase and tyrosine decarboxylase are all negative. Arginine dihydrolase is positive. Litmus milk is reduced and peptonized. Growth is found in the range of 10 $^{\circ}$ C to 43 $^{\circ}$ C. G+C content in DNA is 36.4 mol% (Tm). Therefore, according to the references, strain SM-A is identified as *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

Key words *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, Antimicrobial