

乳酸乳酸球菌 AL2 产生的乳链菌肽的提纯和性质*

陈秀珠 何 松 龙力红 还连栋 薛禹谷

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 用 NaCl 饱和的乳酸乳酸球菌 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) AL2 发酵液经正丙醇提取和 CM-Sephadex C-25 柱层析, 得到聚丙烯酰胺凝胶电泳纯的乳链菌肽组分, 比活力从 24427IU/mg 提高到 39865IU/mg, 活力回收为 41.7%。 α -胰凝乳蛋白酶可使乳链菌肽丧失活性; 在低 pH 条件下, 乳链菌肽对热较稳定; 对许多革兰氏阳性菌有强烈抑制作用, 而对革兰氏阴性菌、酵母菌和霉菌没有作用。

关键词 乳酸乳酸球菌 AL2, 乳链菌肽, 提纯和性质

乳链菌肽 (Nisin) 是由某些乳酸乳酸球菌产生的一种小肽, 分子量只有 3510。由于它对许多革兰氏阳性菌, 尤其是对引起食品腐败的有害微生物, 如梭菌、芽孢杆菌和利斯特氏菌等有强烈抑制作用, 并能被消化道内的酶很快降解成氨基酸, 对人体安全无毒, 已被世界许多国家和地区广泛用作食品防腐剂^[1]。本实验室以乳酸乳酸球菌 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) 7962 为出发菌株, 用理化诱变因子多次诱变处理, 获得一株乳链菌肽高产突变株 AL2^[2], 并对其发酵条件进行了研究^[3]。本文报道乳酸乳酸球菌 AL2 产生的乳链菌肽的制备、纯化和性质。

1 材料和方法

1.1 菌株

实验所用的菌株见表 1。

1.2 培养基

1.2.1 菌种保藏及传代培养基、种子培养基均用 M17 培养基^[4]。

1.2.2 发酵培养基用改良的 M17 培养基^[3]。

1.2.3 乳链菌肽效价测定培养基同文献^[3]。

1.3 试剂

作为对照样品的乳链菌肽是英国 Aplin & Barrett 公司的产品 Nisaplin, CM-Sephadex C-25 是瑞典 pharmacia 公司产品, α -胰凝乳蛋白酶是 Sigma 公司产品, 正丙醇是北京化工厂产品。

1.4 方法

1.4.1 用正丙醇从发酵液中提取乳链菌肽按文献^[5]进行。

* 中国科学院“八五”重点科研项目。

本文于 1995 年 4 月 1 日收到。

表1 实验用菌株

Table 1 Strains used

| 菌株 Strain | 用途 Use | 来源 Source |
|--|---------------------------|-----------------|
| 乳酸乳酸球菌 AL2 <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> AL2 | 乳链菌肽产生菌 Nisin producer | This lab. |
| 乳酸乳酸球菌 ATCC 11454 <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454 | 指示菌 Indicator strain | This lab. |
| 乳酸乳酸球菌 MG 1614 <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MG 1614 | 指示菌 Indicator strain | This lab. |
| 乳酸乳酸球菌 1.9 <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 1.9 | 指示菌 Indicator strain | This lab. |
| 乳酸乳酸球菌 LM 0230 <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LM 0230 | 指示菌 Indicator strain | This lab. |
| 蕈黄八叠球菌 AS 1.880 <i>Sarcina lutea</i> AS 1.880 | 指示菌 Indicator strain | 中国菌保中心 CCGMC |
| 粪链球菌 AS 1.997 <i>Streptococcus faecalis</i> AS 1.997 | 指示菌 Indicator strain | 中国菌保中心 CCGMC |
| 溶壁微球菌 IFO 3333 <i>Micrococcus lysodeikticus</i> IFO 3333 | 指示菌 Indicator strain | 宋幼新研究员提供 |
| 黄色微球菌 NCIB 8166 <i>Micrococcus flavus</i> NCIB 8166 | 指示菌 Indicator strain | This lab. |
| 啤酒片球菌 AS 1.123 <i>Pediococcus cerevisiae</i> AS 1.123 | 指示菌 Indicator strain | 中国菌保中心 CCGMC |
| 枯草芽孢杆菌 ATCC 6633 <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 | 指示菌 Indicator strain | This lab. |
| 枯草芽孢杆菌 BS 5 <i>Bacillus subtilis</i> BS 5 | 指示菌 Indicator strain | 郭兴华研究员提供 |
| 短小芽孢杆菌 AS 1.594 <i>Bacillus pumilus</i> AS 1.594 | 指示菌 Indicator strain | 中国菌保中心 CCGMC |
| 酿酒酵母 JW-23 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> JW-23 | 指示菌 Indicator strain | 张博润副研究员提供 |
| 异常汉逊酵母 AS 2.300 <i>Hansenula anomala</i> AS 2.300 | 指示菌 Indicator strain | 张博润副研究员提供 |
| 产阮假丝酵母 AS 2.1180 <i>Candida utilis</i> AS 2.1180 | 指示菌 Indicator strain | 张博润副研究员提供 |
| 白地霉 AS 2.498 <i>Geotrichum candidum</i> AS 2.498 | 指示菌 Indicator strain | 张博润副研究员提供 |
| 大肠杆菌 JM109 <i>Escherichia coli</i> JM109 | 指示菌 Indicator strain | This lab. |

1.4.2 CM-Sephadex C-25 柱层析: 使用 $1 \times 15\text{cm}$ 层析柱, 按文献[6]处理 CM-Sephadex C-25 树脂后装柱。参照文献[7]用 0.05mol/L HAc-NaAc (pH3.6) 起始缓冲液平衡。加样后用上述缓冲液洗脱未吸附的蛋白质, 然后用 KCl 梯度洗脱, 分步收集器的速度为 $1\text{ml}/2\text{min}$, 分别测定收集各管的乳链菌肽活性, 测定活性峰各管在 280nm 处的光吸收值。

1.4.3 测定方法: 乳链菌肽活性测定按文献[8]; 蛋白质测定用紫外测定法^[9], 使用 Beckman DU-7 紫外分光光度计; 聚丙烯酰胺凝胶电泳按文献[10]; SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电泳胶的制备与电泳参见文献[11], 样品处理按文献[12]进行; 抑菌谱测定按文献[13]进行。

2 结果和讨论

2.1 乳链菌肽的提纯

2.1.1 乳链菌肽的制备: 按文献[5]程序, 用正丙醇从 NaCl 饱和的发酵液中提取 2 次, 再用丙酮沉淀得到乳链菌肽粗制品, 结果见表 2。

表 2 乳链菌肽的制备

Table 2 Preparation of nisin from the fermentation liquor

| 发 酵 液 Fermentation liquor | | | 乳链菌肽粗制品 Crude product of nisin | | | | |
|---|------------------------------|---------------------------------------|---|---|--|---------------------------|------|
| 活性 Activity $/\text{IU} \cdot \text{ml}^{-1}$ | 体积 Volume $/\text{ml}$ | 总活性 Total activity $/\text{IU}$ | 活性 Activity $/\text{IU} \cdot \text{mg}^{-1}$ | 沉淀湿重 Wet weight of the precipitate $/\text{g}$ | 总活性 Total activity $/\text{IU}$ | 收率 Recovery $/(\%)$ | |
| No.1 | 4273 | 900 | 3.85×10^6 | 2661 | 0.6 | 1.6×10^6 | 41.5 |
| No.2 | 3298 | 2025 | 6.68×10^6 | 2064 | 2.07 | 4.27×10^6 | 63.9 |
| No.3 | 2942 | 15500 | 4.56×10^7 | 2386 | 12.1 | 2.89×10^7 | 63.3 |

2.1.2 CM-Sephadex C-25 柱层析: 称取一定量的乳链菌肽粗制品, 溶于 0.05mol/L HAc-NaAc (pH3.6) 缓冲液, 并用该缓冲液透析 24h, 离心后上柱。测定各管的乳链菌肽活性, 其活性峰在第 25~31 管(图 1)。将 25~31 管样品合并, 测定蛋白质含量及乳链菌肽活性。从表 3 结果可见, 经 CM-Sephadex C-25 柱层析, 样品的比活由 $24427\text{IU}/\text{mg}$ 提高到 $39865\text{IU}/\text{mg}$, 纯度提高 1.63 倍。用聚丙烯酰胺凝胶电泳检测上柱前后样

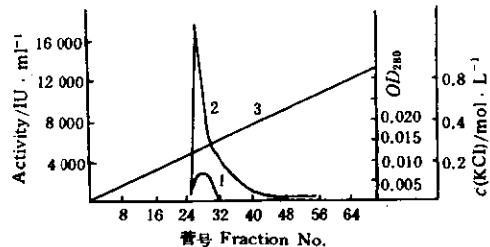


图 1 CM-Sephadex C-25 柱层析

Fig.1 Elution pattern of nisin from
CM-Sephadex C-25

1. 蛋白质 Protein ($\text{OD}_{280}, 0.5\text{cm}$);
2. 活性 Activity; 3. KCl 浓度 KCl conc.

品,发现上柱后样品仅呈现一条带(见图2)。

表3 CM-Sephadex C-25 纯化结果

Table 3 Purification of nisin from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* AL2

| 步骤 Step | 总活性 Total activity /IU | 总蛋白质 Total protein /mg | 比活 Specific activity /IU·mg ⁻¹ | 收率 Activity recovery / (%) | 纯化倍数 Fold of purification |
|------------------------|------------------------------|------------------------------|---|----------------------------------|------------------------------|
| 乳链菌肽样品 Nisin sample | 160000 | 6.55 | 24427 | 100 | 1 |
| CM-Sephadex C-25 | 66735 | 1.67 | 39865 | 41.7 | 1.63 |

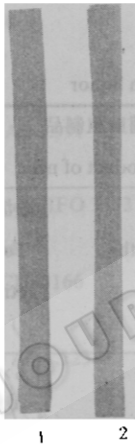


图2 聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig.2 Polyacrylamide gel electrophoretic pattern

1. Crude product of nisin; 2. Purified nisin through CM-Sephadex C-25. 100 μ g nisin each.

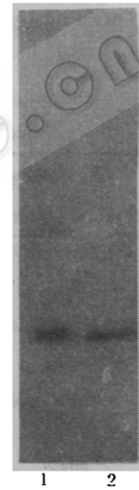


图3 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig.3 SDS-Polyacrylamide gel electrophoretic pattern

1. Nisaplin; 2. Nisin from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* AL2. 5 μ g nisin each.

2.2 乳链菌肽的性质

2.2.1 分子量测定:用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定乳酸乳酸球菌 AL2 产生的乳链菌肽的分子量,同时用英国 Aplin & Barrett 公司的 Nisaplin 作为分子量对照。电泳结果(图3)显示,由乳酸乳酸球菌 AL2 产生的乳链菌肽分子量与 Nisaplin 的相同,约为 3500。

2.2.2 对 α -胰凝乳蛋白酶的敏感性:Jarvis 等人报道 α -胰凝乳蛋白酶可专一性作用于乳链菌肽分子的 31~32 位氨基酸残基之间的肽键,使乳链菌肽分子丧失活性^[14]。在乳酸乳酸球菌 AL2 发酵液中加入不同浓度的 α -胰凝乳蛋白酶,置 37 $^{\circ}$ C 保温 1h,检测保温后的发酵液的活性,从图4结果可见其抑菌圈直径随 α -胰凝乳蛋白酶浓度的增加而逐渐

缩小,直到消失。说明 α -胰凝乳蛋白酶的确可使乳酸乳酸球菌 AL2 产生的乳链菌肽专一性失活。

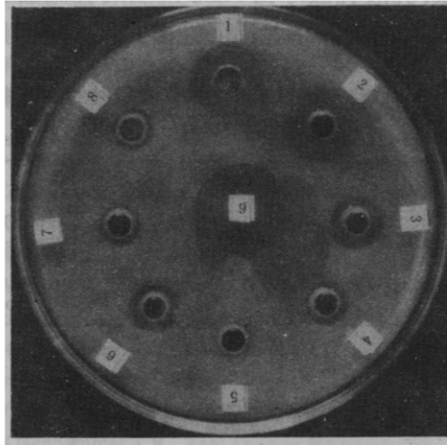


图 4 α -胰凝乳蛋白酶的敏感性试验

Fig.4 Nisin inactivated by α -chymotrypsin

1. 30 μ l of buffer 1 (Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 pH7.0) +50 μ l of fermentation liquor; 2. 30 μ l of buffer 2 (KH_2PO_4 - NaOH pH6.6)+50 μ l of fermentation liquor; 3. 30 μ l of 0.3mg/ml α -chymotrypsin in buffer 1+50 μ l of fermentation liquor; 4. 30 μ l of 0.7mg/ml α -chymotrypsin in buffer 1+50 μ l of fermentation liquor; 5. 30 μ l of 1mg/ml α -chymotrypsin in buffer 1+50 μ l of fermentation liquor; 6. 30 μ l of 0.3mg/ml α -chymotrypsin in buffer 2+50 μ l of fermentation liquor; 7. 30 μ l of 0.7mg/ml α -chymotrypsin in buffer 2+50 μ l of fermentation liquor; 8. 30 μ l of 1mg/ml α -chymotrypsin in buffer 2+50 μ l of fermentation liquor; 9. 30 μ l of 0.02mol/L HCl+50 μ l of fermentation liquor.

2.2.3 在不同 pH 中的热稳定性: 将乳酸乳酸球菌 AL2 产生的乳链菌肽溶于不同 pH 溶液中,置不同温度保温后测其活性。表 4 结果表明,在低 pH 条件下,乳链菌肽对热较为稳定,可经 115 $^{\circ}\text{C}$ 或 121 $^{\circ}\text{C}$ 加热 30 分钟仍不丧失其活性。

表 4 在不同 pH 条件下的热稳定性

Table 4 Nisin stability at various condition of pH

| 温 度 $t / ^{\circ}\text{C}$ | 时 间 t / h | 抑菌圈直径 Diameter of inhibition zones / cm | | |
|-------------------------------|----------------|--|------|------|
| | | pH2 | pH3 | pH4 |
| 4 | 50.0 | 1.80 | 1.71 | 1.69 |
| 20 | 50.0 | 1.78 | 1.71 | 1.65 |
| 70 | 3.0 | 1.69 | 1.70 | 1.63 |
| 100 | 0.5 | 1.67 | 1.65 | 1.62 |
| 115 | 0.5 | 1.50 | 1.39 | 1.50 |
| 121 | 0.5 | 1.40 | 1.33 | 1.51 |

2.2.4 抑菌谱的测定:用表 5 所列的酵母菌、大肠杆菌和一些革兰氏阳性菌作为检测指示菌,试验乳酸乳酸球菌 AL2 产生的乳链菌肽的抑菌谱,同时用 Nisaplin 作为对照。结果表明,与文献[1]报道一致,乳酸乳酸球菌 AL2 产生的乳链菌肽对许多革兰氏阳性菌有较强的抑制作用,而对酵母菌、霉菌和革兰氏阴性菌以及乳链菌肽产生菌没有作用。

表 5 乳酸乳酸球菌 AL2 产生的乳链菌肽的抑菌谱试验

Table 5 Inhibitory spectra of nisin from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* AL2

| 试验菌株 Indicator strain | 抑菌圈直径 / cm Diameter of inhibition zones | |
|---|---|----------|
| | Nisin from <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> AL2 | Nisaplin |
| <i>Bacillus pumilus</i> AS 1.594 | 1.80 | 1.80 |
| <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 | 1.25 | 1.25 |
| <i>Bacillus subtilis</i> BS5 | 1.30 | 1.24 |
| <i>Pediococcus cerevisiae</i> AS1.123 | 1.50 | 1.70 |
| <i>Micrococcus flavus</i> NCIB 8166 | 2.60 | 2.60 |
| <i>Micrococcus lysodeikticus</i> IFO 3333 | 1.90 | 1.65 |
| <i>Streptococcus faecalis</i> AS 1.997 | 1.25 | 1.25 |
| <i>Sarcina lutea</i> AS 1.880 | 1.20 | 1.20 |
| <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LM0230 | 1.50 | 1.55 |
| <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 1.9 | 1.50 | 1.50 |
| <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MG 1614 | 1.80 | 1.70 |
| <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454 | - | - |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> JW-23 | - | - |
| <i>Hansenula anomala</i> AS 2.300 | - | - |
| <i>Candida utilis</i> AS 2.1180 | - | - |
| <i>Geotrichum candidum</i> AS 2.498 | - | - |
| <i>Escherichia coli</i> JM109 | - | - |

"-" No inhibition.

本文报道的这些性质是乳链菌肽的典型特征^[15],连同前文^[2]报道乳酸乳酸球菌 AL2 染色体 DNA 与来自于乳酸乳酸球菌 ATCC11454 编码乳链菌肽前体的结构基因 DNA 片段杂交的事实,充分说明乳酸乳酸球菌 AL2 确是乳链菌肽产生菌,其发酵产物确为乳链菌肽。

致谢 孙万儒研究员和山东大学 1992 年毕业生贾宗剑同学参加部分研究工作;郭兴华研究员、宋幼新研究员、张博润副研究员为本工作提供部分试验菌株,特此一并感谢。

参 考 文 献

- [1] Dolves B J. *Food Technol*, 1990, **44**(11): 100~117.
- [2] 还连栋, 陶 勇, 何 松, 等. 微生物学报, 1995, **35**(5): 364~367.
- [3] 陈秀珠, 何 松, 龙力红, 等. 微生物学通报, 1995, **22**(4): 215~218.
- [4] Betty E T, Sanding W E. *Appl Microbiol*, 1975, **29**(6): 807~813.
- [5] Cheeseman G C, Berridge N J. *Biochem J*, 1957, **65**(3): 603~608.
- [6] 张树政, 仲 如. 微生物学通报, 1974, **1**(2): 30~36.
- [7] Wilimowska P, Olichwier Z, Malicka B M *et al*. *Acta Microbiologica Polonica*, 1976, **25**(1): 71~77.
- [8] Tramer J, Fowler G G. *J Sci Food Agric*, 1964, **15**(8): 522~528.
- [9] 北京大学生物系生物化学教研室. 生物化学实验指导, 北京: 人民教育出版社, 1980. 94.
- [10] Reisfeid R A, Lewis V J, Williams D E *et al*. *Nature*, 1962, **195**(4838): 281~283.
- [11] Hoefer Scientific Instruments Company. *Catolog*, 1988~1989, 134~136.
- [12] Schagger H, Jagow C V. *Anal Biochem*, 1987, **166**(2): 368~379.
- [13] Ogden K, Tubb R S. *J Inst Brew*, 1985, **91**: 390~392.
- [14] Jarvis B, Mahoney R R. *J Dairy Sci*, 1969, **52**: 1448~1450.
- [15] Harris L J, Fleming H P, Klaenhammer T R. *Appl Environ Microbiol*, 1992, **58**(5): 1477~1483.

STUDIES ON PURIFICATION AND SOME PROPERTIES OF NISIN FROM *LACTOCOCCUS LACTIS* SUBSP. *LACTIS* AL2

Chen Xiuzhu He Song Long Lihong Huan Liandong Xue Yugu

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract Nisin from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* AL2 was extracted with n-propanol from NaCl-saturated culture and purified by ion-exchange chromatography on CM-Sephadex C-25. Nisin was purified 1.63 fold with a yield of 41.7%. The molecular weight of nisin was determined by SDS-PAGE to be about 3500. Nisin activity was stable at low pH and sensitive to digestion by α -chymotrypsin. Nisin is capable of inhibiting a broad range of gram-positive bacteria. In contrast, the gram-negative bacteria, yeasts, molds and Nip⁺ *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC11454 were not inhibited.

Key words *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* AL2, Nisin, Purification and properties