

乳链菌肽产生菌的定向筛选 及发酵产物的鉴定*

还连栋 陈秀珠 才 迎** 庄增辉 薛禹谷

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 利用乳链菌肽产生菌中 $nip^+nis'suc^+$ 紧密连锁的原理, 在添加乳链菌肽、蔗糖及溴甲酚紫的选择培养基上, 从牛奶样品中定向筛选乳链菌肽产生菌。对筛选到的 *L. lactis* 1409 菌株发酵产物的分析鉴定结果揭示: 该产物对多种革兰氏阳性菌有强烈抑制作用, 而对革兰氏阴性菌、酵母菌和霉菌无效, 在 pH 值低的条件下对热稳定, 对 α -胰凝乳蛋白酶敏感, 具有生物活性的蛋白质的分子量与乳链菌肽相当, 而 1409 菌株的质粒分布与 *L. lactis* ATCC11454 和 *L. lactis* 7962 不同, 说明筛选到的 *L. lactis* 1409 菌株确是一株新的乳链菌肽产生菌。

关键词 乳酸乳球菌, 乳链菌肽, 定向筛选, 产物鉴定

乳链菌肽(nisin)是某些乳酸乳球菌产生的一种小肽分子, 对许多革兰氏阳性菌(包括梭菌属、利斯特氏菌属和芽孢杆菌属的食物腐败菌和病原菌)有强烈抑制作用, 已被世界许多国家(包括我国)和地区广泛应用于乳制品、植物蛋白食品、罐装食品及肉制品的防腐保鲜, 是越来越受到人们重视的一种高效、无毒的天然食品防腐剂^[1,2]。多年来, 本实验室一直致力于这种天然食品防腐剂的研究与开发。我们以乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*) 7962 为原始菌株, 经多次诱变处理获得一株乳链菌肽高产菌株, 并对其发酵条件、产物的提纯和性质进行了研究^[3~5]。

近些年来, 国外一些实验室的研究工作证实, 编码乳链菌肽前体的结构基因(nip^+)与乳链菌肽抗性基因(nis')和蔗糖发酵基因(suc^+)紧密连锁, 位于一个大约 70kb 的可接合转移的转座子上^[6~9]。据此, 我们设计了一种简便、定向的方法, 在一种选择培养基上可从牛奶样品中直接筛选乳链菌肽产生菌。本文报道用这种新方法筛选, 所得的菌株及其产物的研究。

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 乳酸乳球菌试管斜面、平板分离、液体种子及发酵培养基: 均采用 M17G 培养

* 中国科学院“八五”重点科研项目和微生物资源前期开发国家重点实验室资助课题。

** 辽宁师范大学生物系代培硕士研究生。

本文于 1996 年 2 月 7 日收到。

表1 实验用菌株

Table 1 Strains used in this study

菌 株	表 型	质 粒	来 源
Strain	Phenotype	Plasmid (s) (kb)	Source
乳酸乳球菌1409	Nip ⁺ Nis ^r Suc ⁺	25.5, 14.9	This study
<i>Lactococcus lactis</i> 1409			
乳酸乳球菌ATCC 11454	Nip ⁺ Nis ^r Suc ⁺	NA	This lab.
<i>Lactococcus lactis</i> ATCC 11454			
乳酸乳球菌7962	Nip ⁺ Nis ^r Suc ⁺	NA	This lab.
<i>Lactococcus lactis</i> 7962			
乳酸乳球菌MG 1614	Nip ⁻ Nis ^s Suc ⁻		This lab.
<i>Lactococcus lactis</i> MG 1614			
植物乳杆菌AS 1.557			郭兴华研究员提供
<i>Lactobacillus plantarum</i> AS 1.557			
干酪乳杆菌AS 1.539			郭兴华研究员提供
<i>Lactobacillus casei</i> AS 1.539			
枯草芽孢杆菌DB 104			This lab.
<i>Bacillus subtilis</i> DB104			
短小芽孢杆菌AS 1.940			This lab.
<i>Bacillus pumilus</i> AS 1.940			
嗜热脂肪芽孢杆菌CU21			毛裕民教授提供
<i>Bacillus stearothermophilus</i> CU21			
黄色微球菌NCIB8166			This lab.
<i>Micrococcus flavus</i> NCIB8166			
谷氨酸棒杆菌B9			贾盘兴研究员提供
<i>Corynebacterium glutamicum</i> B9			
肠炎沙门氏菌LT2			王敦全研究员提供
<i>Salmonella enteritidis</i> LT2			
酿酒酵母AS 2.182			张博润副研究员提供
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> AS 2.182			
白地霉AS 2.1080			张博润副研究员提供
<i>Geotrichum candidum</i> AS 2.1080			
大肠杆菌DH5α			This lab.
<i>Escherichia coli</i> DH5α			
大肠杆菌V517		54, 7.3, 5.5, 5.1,	This lab.
<i>Escherichia coli</i> V517		3.1, 2.7, 2.1	

Nip⁺. 产乳链菌肽 Nisin producing; Nip⁻. 不产乳链菌肽 Nisin negative; Nis^r. 乳链菌肽抗性 Nisin resistant; Nis^s. 乳链菌肽敏感 Nisin sensitive; Suc⁺. 发酵蔗糖 Sucrose fermenting; Suc⁻. 不能发酵蔗糖 Sucrose negative; NA. 重现性差 Not applicable.

基^[10], 固体培养基则加入 1.5% 琼脂。

1.2.2 选择培养基(筛选乳链菌肽产生菌用): M17 培养基, 以蔗糖(0.5%)作碳源, 同时含有 0.004% 溴甲酚紫和 50IU/ml 乳链菌肽。

1.2.3 乳链菌肽效价测定培养基: 参见文献 [4]。

1.3 试剂

作为对照样品的乳链菌肽是英国 Aplin & Barrett 公司产品 Nisaplin, α -胰凝乳蛋白酶是 Sigma 公司产品, 其余均为国产分析纯或化学纯试剂。

1.4 乳链菌肽产生菌的筛选

将新鲜的牛奶样品以 10% 接种量接种于含 20IU/ml 乳链菌肽的 M17G 液体中, 置 30℃ 增殖培养 24h, 取 30 μ l 增殖培养液涂布于选择培养基上, 30℃ 温箱培养 24h, 挑取使周围培养基变黄的菌落, 再次在选择培养基上划线分离单菌落, 将单菌落接种于斜面培养基上, 保藏待用。

1.5 乳酸乳球菌的鉴定

参见文献[11]。

1.6 乳链菌肽粗制品的制备

按文献 [12] 进行。

1.7 乳链菌肽效价测定

测定方法参见文献 [13]。测定指示菌为黄色微球菌 (*Micrococcus flavus*) NCIB8166, 用 Nisaplin 作为对照样品。

1.8 核酸含量的测定

紫外吸收法^[14]。

1.9 质粒 DNA 的分离及琼脂糖凝胶电泳

按文献 [15] 方法。

1.10 聚丙烯酰胺凝胶电泳

按文献 [16] 方法。

2 结果

2.1 乳链菌肽产生菌的筛选

长期以来, 人们一直认为编码乳链菌肽前体的基因 (nip^+) 位于质粒上。但是, 最近有几个实验室相继报道 nip^+ 位于一个可接合转移的转座子上, 且与乳链菌肽抗性基因 (nis^+) 和蔗糖发酵基因 (suc^+) 紧密连锁, 这已为接合转移实验证实^[17]。据此, 我们设计一个简便、快速、定向筛选乳链菌肽产生菌的方法: 即在蔗糖作碳源和添加适当乳链菌肽的 M17 培养基上, 配以溴甲酚紫作指示剂, 如果一个菌株既对乳链菌肽具有抗性, 又能利用蔗糖, 则能使菌落周围的培养基由紫色转变成黄色, 很容易用肉眼加以识别, 然后检测该菌株是否产生抑菌物质。

从北京市厢黄旗村牛奶场和北京市东郊牛奶场采集的 150 个新鲜牛奶样品中, 共获得 7 株可在选择培养基上生长, 并使培养基由紫变黄的菌株, 将这 7 株菌的发酵液滴加于黄色微球菌 NCIB8166 作指示菌的检测平板上, 均产生清晰的抑菌圈, 选取抑菌圈最

大的菌株(编号为 1409)作进一步研究。

2.2 菌株的鉴定及遗传特性

2.2.1 菌株的鉴定: 参照《一般细菌常用鉴定方法》对 1409 菌株进行初步鉴定。结果为 18~24h 1409 菌株斜面培养物镜检球菌成对或链, 革兰氏染色阳性。接触酶试验阴性。在 pH 7.0 的液体培养基中培养 18~24 h, pH 值降到 4.0~4.5。发酵液用新华滤纸层析, 展开液用正丁醇:冰醋酸:水 (4:1:2), 显色剂用 0.05% 溴酚蓝酒精溶液, 证明产乳酸。进一步试验证明 1409 菌株可在含 4% 氯化钠的培养基中生长, 水解精氨酸产氨, 发酵乳糖、甘露糖而不发酵棉子糖。依据《伯杰细菌鉴定手册》^[18], 表明 1409 菌株应属乳酸乳球菌, 定名为 *Lactococcus lactis* 1409。

2.2.2 1409 菌株的遗传特性: 为了排除 1409 菌株是实验室中现有乳链菌肽产生菌污染的可能, 根据绝大多数乳酸乳球菌都含有分子量各不相同的质粒的特性, 我们抽提了 1409 菌株的质粒 DNA, 同时以 *L. lactis* ATCC11454 和 *L. lactis* 7962 作为对照。从图 1 可见菌株 1409, 11454 和 7962 都含有质粒, 但它们所含质粒数及分子量均不相同。1409 菌株含有 2 个质粒, 分布于染色体带的前后, 初步估算分子量分别为 14.9kb 和 25.5kb。说明 1409 菌株确是与 11454 和 7962 菌株不同的一株乳酸乳球菌。

2.3 发酵产物的抑菌范围及作用方式

2.3.1 发酵产物的抑菌范围: 根据前述, 已知 1409 菌株发酵液对黄色微球菌 NCIB8166 有抑制作用。为搞清 1409 菌株发酵产物的抑菌范围, 选用革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、酵母菌和霉菌作检测指示菌, 用平板扩散法测定了菌株 1409 产物对这些菌株的抑制作用。结果(表 2)表明, 1409 菌株的发酵产物对多种革兰氏阳性菌有强烈抑制作用, 而对革兰氏阴性菌、酵母菌、霉菌及产乳链菌肽的乳酸乳球菌无效, 其抑菌谱与对照 Nisaplin 相同。

2.3.2 发酵产物的作用方式: 为了解 1409 菌株发酵产物对革兰氏阳性菌的作用方式究竟是杀死细菌、抑制细菌生长还是溶菌, 我们以黄色微球菌 NCIB8166 作指示菌进行了试验, 结果见图 2。在加入 1409 菌株发酵液的 NCIB8166 菌液中, 随着培养时间的延长, 活菌数逐渐减少直至零。而除去菌体的上清液中核酸含量没有明显变化, 显微镜检查也未发现菌体溶解现象, 说明菌株 1409 发酵产物的作用方式既不是溶菌, 也不是抑制细菌生长, 而是杀死细菌。从透明抑菌圈中挑取琼脂块进行液体培养, 结果未见菌体

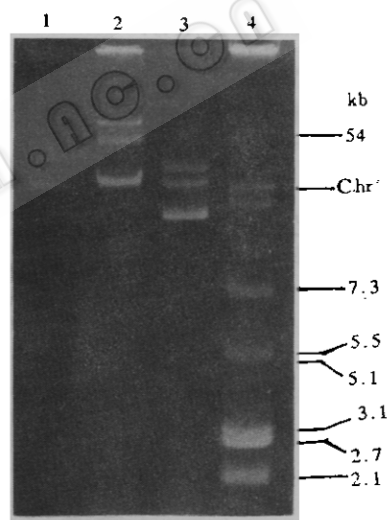


图1 菌株质粒电泳图

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of plasmids isolated from *L. lactis* 1409, *L. lactis* ATCC11454 and *L. lactis* 7962
1. 乳酸乳球菌 ATCC 11454;
2. 乳酸乳球菌 7962;
3. 乳酸乳球菌 1409;
4. 大肠杆菌 V517 质粒分子量标准。
E. coli V517 size standard plasmids.

表2 1409菌株发酵产物的抑菌谱试验

Table 2 Inhibitory spectra of the products from *L. lactis* 1409

试验菌株 Indicator strain	抑菌圈直径 (mm)* Diameter of inhibition zone	
	1409菌株发酵产物 The products from <i>L. lactis</i> 1409	
	Nisaplin	
<i>Bacillus subtilis</i> DB104	+	+
<i>Bacillus pumilus</i> AS 1.940	+	++
<i>Bacillus stearothermophilus</i> CU21	+++	+++
<i>Micrococcus flavus</i> NCIB8166	+++	+++
<i>Corynebacterium glutamicum</i> B9	+	+
<i>Lactobacillus plantarum</i> AS 1.557	++	+++
<i>Lactobacillus casei</i> AS 1.539	+	++
<i>Lactococcus lactis</i> MG1614	++	+++
<i>Lactococcus lactis</i> ATCC 11454	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> 7962	-	-
<i>Escherichia coli</i> DH5α	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i> LT2	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> AS 2.182	-	-
<i>Geotrichum candidum</i> AS 2.1080	-	-

* 抑菌圈直径 Diameter of inhibition zone (mm): +, 10.0~15.0; ++, 15.1~20.0; +++, >20.0; -, 没有抑制作用 No inhibition.

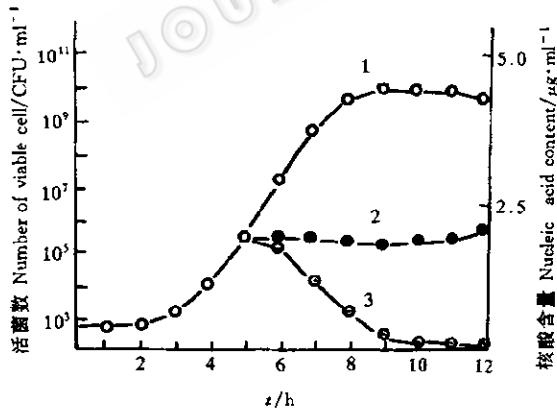


图2 1409菌株发酵产物对 *M. flavus* NCIB 8166生长的影响

Fig.2 Effect of the fermentation product from *L. lactis* 1409 on growth of *M. flavus* NCIB 8166

1. 对照 Control; 2. 核酸含量 Nucleic acid content; 3. 加入 1409 菌株发酵产物后的活菌数 Number of viable cell after addition of the fermentation product from *L. lactis* 1409.

生长,进一步证实了 1409 菌株发酵产物的作用方式是杀死细菌的结论。

2.4 发酵产物的理化性质

2.4.1 在不同 pH 中的热稳定性: 将 1409 菌株发酵液分别调 pH 至 2, 4, 6, 8, 10, 12, 按图 3 条件作用后测定其活性。结果表明, 在低 pH 条件下, 其发酵液对热较为稳定, 可经 115℃ 或 121℃ 加热 30 min 仍不丧失活性, 但在高 pH 条件下即失活。即使将样品重新恢复至 pH2.0, 也不具有抑菌活性, 说明活性的丧失是不可逆的。该结果与 Liu 等人的报道一致^[19]。

2.4.2 对α-胰凝乳蛋白酶的敏

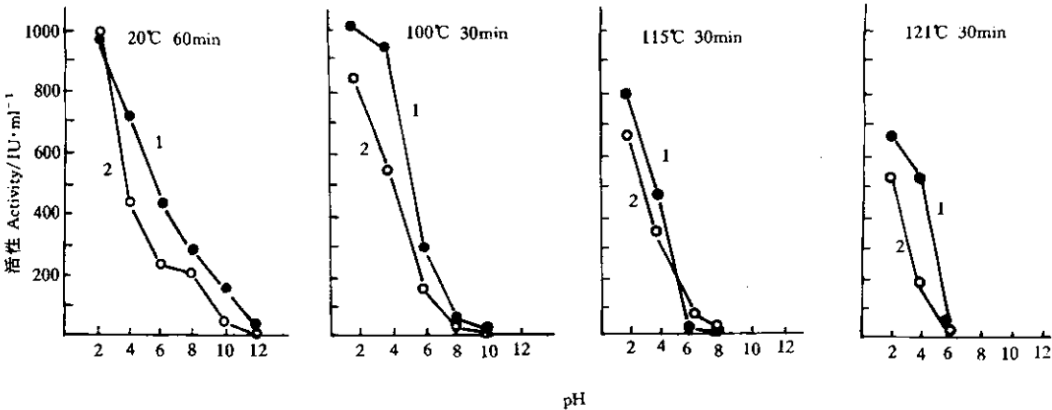


图3 1409菌株发酵产物在不同pH条件下的热稳定性

Fig.3 Stability of the fermentation product from *L. lactis* 1409 at various conditions of pH

1. Nisaplin; 2. 1409菌株发酵产物 The fermentation product from *L. lactis* 1409.

感性：1409 菌株发酵液分别加入 α -胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶和链霉蛋白酶液，置 37℃ 保温 1h。从图 4 结果可见，1409 菌株发酵产物对 α -胰凝乳蛋白酶敏感，而胰蛋白酶、链

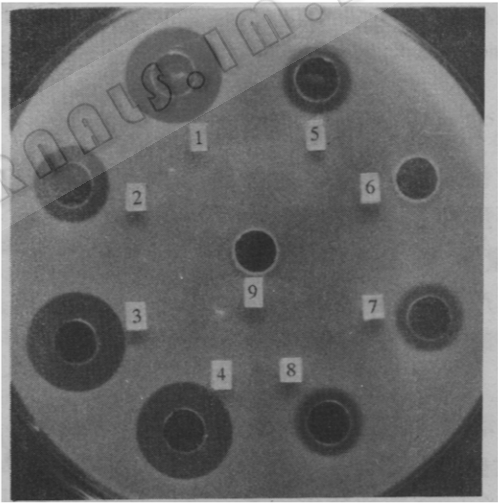


图4 1409菌株发酵产物对 α -胰凝乳蛋白酶的敏感性

Fig.4 The fermentation product from *L. lactis* 1409 inactivated by α -chymotrypsin

1. 30 μ l Nisaplin溶液+30 μ l磷酸缓冲液 30 μ l Nisaplin solution+30 μ l phosphate buffer;
2. 30 μ l Nisaplin溶液+30 μ l α -胰凝乳蛋白酶 30 μ l Nisaplin solution+30 μ l α -chymotrypsin;
3. 30 μ l Nisaplin溶液+30 μ l链霉蛋白酶 30 μ l Nisaplin solution+30 μ l pronase;
4. 30 μ l Nisaplin溶液+30 μ l胰蛋白酶 30 μ l Nisaplin solution +30 μ l trypsin;
5. 30 μ l 1409菌株发酵液+30 μ l磷酸缓冲液 30 μ l fermentation broth from *L. lactis* 1409+30 μ l phosphate buffer;
6. 30 μ l 1409菌株发酵液+30 μ l α -胰凝乳蛋白酶 30 μ l fermentation broth from *L. lactis* 1409+30 μ l α -chymotrypsin;
7. 30 μ l 1409菌株发酵液+30 μ l 链霉蛋白酶 30 μ l fermentation broth from *L. lactis* 1409+30 μ l pronase;
8. 30 μ l 1409菌株发酵液+30 μ l 胰蛋白酶 30 μ l fermentation broth from *L. lactis* 1409+30 μ l trypsin;
9. 60 μ l 磷酸缓冲液 60 μ l phosphate buffer.

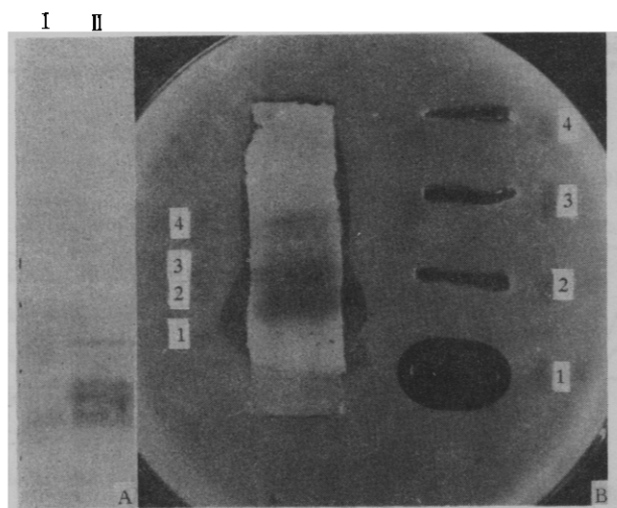


图5 1409菌株发酵产物的粗提物的聚丙烯酰胺凝胶电泳及不同分子量蛋白质的活性检测

Fig.5 Polyacrylamide gel electrophoretic pattern of the crude extraction from *L. lactis* 1409 and antibacterial activity of various molecular weight proteins

I. Nisaplin; II. 1409菌株发酵产物的粗提物 The crude extraction from *L. lactis* 1409.

霉菌蛋白酶对 1409 菌株发酵液的活性没有影响。

2.4.3 分子量测定: 为测定 1409 菌株发酵产物的分子量, 按 Cheeseman 和 Berridge 报道制备乳链菌肽的方法, 用正丙醇从 NaCl 饱和的 1409 菌株发酵液中提取 2 次, 再用丙酮沉淀得到 1409 菌株发酵产物的粗制品, 用聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 1409 菌株发酵产物的粗制品, 以 Nisaplin 作为对照。电泳结果(图 5A)显示, 1409 菌株发酵产物的粗制品至少有 6 条蛋白带, 分子量最小的一条蛋白带与 Nisaplin 分子量(3500)相同。为确定 1409 菌株发酵产物粗制品中具有生物活性的蛋白带, 将 4 条主要蛋白带置于 NCIB8166 菌株作指示菌的平皿上, 结果(图 5B)表明, 只

有分子量与 Nisaplin 相同的最小蛋白带具有抑菌活性。

综合 1409 菌株发酵产物的抑菌谱及作用方式、不同 pH 条件下的热稳定性、对 α -胰凝乳蛋白酶的敏感性和它的分子量, 充分说明 1409 菌株的发酵产物就是乳链菌肽, 1409 菌株确是乳链菌肽的产生菌^[19~22]。

2.5 1409 菌株发酵动力学特征

按文献[4]中改良的发酵培养基和发酵条件, 研究了 1409 菌株的生长曲线及乳链菌肽的产生曲线。从图 6 中可以看出, 1409 菌株进入对数末期时, 乳链菌肽的活性达到最高峰(1036IU/ml), 此后, 随着培养物进入稳定期, 活性略有下降。1409 菌株的发酵动力学特征与文献[4]报道的乳链菌肽高产菌株 *L. lactis* AL2 极其相似。

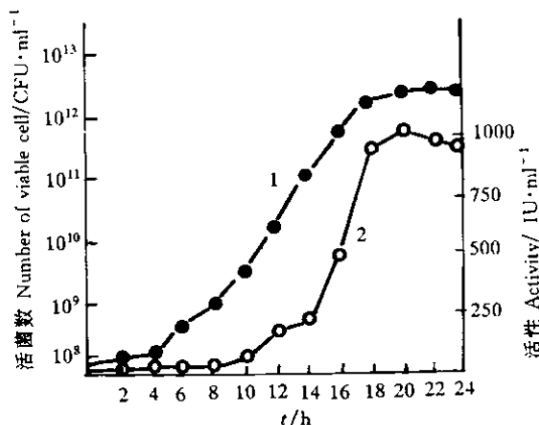


图6 1409菌株的生长与乳链菌肽的产生

Fig.6 The growth curve of *L. lactis* 1409 strain and nisin yield

1. 活菌数 Number of viable cell;
2. 活性 Activity.

3 讨论

本试验利用乳链菌肽产生菌中 $nip^+ nis^+ suc^+$ 紧密连锁的原理, 在添加乳链菌肽、蔗糖及溴甲酚紫的选择培养基上成功地从牛奶样品中筛选到乳链菌肽产生菌, 使乳链菌肽产生菌的筛选工作由某种程度上的随机性和盲目性变为直接和定向筛选, 大大简化了筛选程序。试验结果也再次证明了 $nip^+ nis^+ suc^+$ 这三个基因确实是紧密连锁的。

在测定 1409 菌株发酵产物抑菌谱时, 一定要排除有机酸及过氧化氢的干扰。实验过程中, 发现上述两种物质, 特别是过氧化氢对革兰氏阴性菌有一定的抑制作用, 会给实验结果造成假象。

根据文献报道, 存在两种天然变异体乳链菌肽分子, 即 *nisin A* 和 *nisin Z*。它们的分子结构仅有一个氨基酸的差异, 两者除溶解度和琼脂平板上的扩散能力略有不同外, 其他特性基本一致^[23~25]。1409 菌株产生的乳链菌肽分子是 *nisin A* 还是 *nisin Z*, 有待碱基序列分析或氨基酸序列分析加以确定。

参 考 文 献

- [1] Delves-Broughton J. *Food Technol*, 1990, **44**(11): 100~117.
- [2] 中华人民共和国卫生部. 中国食品添加剂, 1994: 36.
- [3] 还连栋, 陶勇, 何松, 等. 微生物学报, 1995, **35**(5): 364~367.
- [4] 陈秀珠, 何松, 龙力红, 等. 微生物学通报, 1995, **22**(4): 215~218.
- [5] 陈秀珠, 何松, 龙力红, 等. 微生物学报, 1996, **36**(4): 269~275.
- [6] Donkersloot J A, Thompson J. *J Bacteriol*, 1990, **172**(7): 4122~4126.
- [7] Horn N, Swindell S, Dodd H *et al.* *Mol Gen Genet*, 1991, **228**(1~2): 129~135.
- [8] Gireesh T, Davidson B E, Hillier A J. *Appl Environ Microbiol*, 1992, **58**(5): 1670~1676.
- [9] Rauch P J G, de Vos W M. *J Bacteriol*, 1992, **174**(4): 1280~1287.
- [10] Dodd H M, Horn N, Hao Z *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1992, **8**(11): 3683~3693.
- [11] 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.
- [12] Cheeseman G C, Berridge N J. *Biochem J*, 1957, **65**(3): 603~608.
- [13] Tramer J, Fowler G G. *J Sci Food Agric*, 1964, **15**(8): 522~528.
- [14] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛, 等. 生化实验方法和技术. 北京: 高等教育出版社, 1984.
- [15] Anderson D G, McKay L L. *Appl Environ Microbiol*, 1983, **46**(3): 549~552.
- [16] Reisfeld R A, Lewis V J, Williams D E *et al.* *Nature*, 1962, **195**(4838): 281~283.
- [17] 还连栋, 陈秀珠. 微生物学通报, 1993, **20**(5): 301~307.
- [18] Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A *et al.* *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 9th ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1994. 528~529.
- [19] Liu W, Hansen J N. *Appl Environ Microbiol*, 1990, **56**(8): 2551~2558.
- [20] Jarvis B, Mahoney R R. *J Dairy Sci*, 1969, **52**: 1448~1450.
- [21] Harris L J, Fleming H P, Klaenhammer T R. *Appl Environ Microbiol*, 1992, **58**(5): 1477~1483.
- [22] Rodriguez J M, Cintas L M, Casaus P *et al.* *J Appl Bacteriol*, 1995, **78**(2): 109~115.
- [23] Mulders J W M, Boerrigter I J, Rollema H S *et al.* *Eur J Biochem*, 1991, **201**(3): 581~584.
- [24] de Vos W M, Mulders J W M, Siezen R J *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**(1): 213~218.
- [25] Rauch P J G, Beerthuyzen M M, de Vos W M. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60**(6): 1798~1804.

DIRECTIONAL SCREENING OF NISIN-PRODUCING *LACTOCOCCUS LACTIS* AND IDENTIFICATION OF ITS PRODUCT

Huan Liandong Chen Xiuzhu Cai Ying
Zhuang Zenghui Xue Yugu

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract According to which the genetic loci for nisin-producing ability (Nip⁺), nisin resistance (Nis^r) and sucrose-fermenting ability (Suc⁺) are linked closely, nisin-producing *Lactococcus lactis* strains were directionally screened from fresh milk on a selective medium (M17) supplemented with nisin, sucrose and bromocresol purple. Analysis of the fermentation product from *L. lactis* 1409 revealed that it showed antimicrobial activity against a range of Gram positive bacteria, did not inhibit Gram negative bacteria, yeasts and fungi. Antimicrobial activity was stable at low pH and sensitive to digestion by α -chymotrypsin. The molecular weight of protein band having antimicrobial activity is identical with Nisaplin, while plasmid profiles of *L. lactis* 1409 are different from *L. lactis* ATCC 11454 and *L. lactis* 7962. These results indicated that *L. lactis* 1409 was a new nisin-producing strain.

Key words *Lactococcus lactis*, Nisin, Directional screening, Identification