

蒙古干酪中产细菌素戊糖片球菌的筛选及其 细菌素理化特性研究*

王艳婷, 汪立平, 唐潮, 孙晓红

(上海海洋大学 食品学院, 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海, 201306)

摘要 利用打孔法从蒙古农户自制干酪样品中分离得到1株具有抑菌活性的乳酸菌C-2-1。在排除有机酸、过氧化氢的影响后,通过酶敏感性实验确定此抑菌物质为蛋白质类物质,即细菌素。经16S rDNA序列同源性分析鉴定其为戊糖片球菌。以单核细胞增生李斯特菌ATCC19114为指示菌,当戊糖片球菌C-2-1生长到稳定期22~26 h时,达到最大抑菌活性5 120 AU/mL;细菌素C-2-1对多种革兰氏阳性菌有较强的抑制作用,对供试的革兰氏阴性菌和酵母菌无明显抑制作用;对指示菌单增李斯特菌的作用方式为杀菌;在60~90℃及pH=2.0~9.0条件下抑菌活性稳定;对SDS、吐温-20、吐温-80、尿素、NaCl、EDTA不敏感;对其产生菌细胞表面无吸附性;通过Tricine-SDS-PAGE确定其分子质量在5.8~7.8 kDa。从蒙古干酪中筛选出的戊糖片球菌所产的细菌素C-2-1具有良好的热、酸稳定性,具有作为乳制品生物防腐剂的潜在应用价值。

关键词 抑菌活性;戊糖片球菌;细菌素;乳制品

乳酸菌细菌素是乳酸菌在代谢过程中,通过核糖体合成机制产生的一类具有生物活性的蛋白质、多肽或前体多肽,抑菌对象主要是近源菌株,产生菌对自身分泌的细菌素具有免疫性^[1]。因细菌素能被人类胃肠道分泌的蛋白酶降解,对人体无毒副作用,所以具有作为食品生物防腐剂的潜在应用价值而得到了广泛的研究^[2],有代表性的是乳酸链球菌素Nisin。

自1928年Rogers发现Nisin以来,新型细菌素的发现层出不穷,迄今已有70余种乳酸菌细菌素^[3]。片球菌素稳定的理化性质,对多种食源性致病菌尤其是单核细胞增生李斯特菌的显著抑制效果使其成为继Nisin后又一个研究热点。目前,在片球菌素家族中研究最为深入的Pediocin PA-1已经被用于商业开发^[4]。

片球菌素主要由戊糖片球菌、乳酸片球菌、小片球菌产生,在细菌素分类中属于IIa类细菌素^[5]。戊糖片球菌是公认的安全菌,农业部2013年12月2045号公告《饲料添加剂品种目录(2013)》中规定作为微生态制剂可以直接饲喂动物。戊糖片球菌素具有较广的抑菌谱,尤其对单增李斯特菌具有极强的抑制作用,并具有较好的热稳定性,同时大部分在

pH2~10^[6-8]范围内稳定,相比于Nisin在pH6.0时就有90%以上的活性丧失的特点,在食品防腐保鲜领域中具有更广阔的应用前景。

戊糖片球菌通常分离自蔬菜和肉制品,如已报道的Pediocin A产生菌*P. pentosaceus*分离自黄瓜^[9],*Pediococcus pentosaceus* T1分离自韩国泡菜^[10],Bacteriocin N463的产生菌*P. pentosaceus* N463分离自牛肉丸^[6],Pediocin SM-1产生菌*P. pentosaceus* Mees 1934分离自希腊干制香肠^[11]等。戊糖片球菌在乳制品中的生长较差,极少有相关报道;同时因单增李斯特菌在低温、低pH下能在许多乳制品中生长,而引起乳制品安全问题也频繁发生^[12],因此乳品来源的产片球菌素的戊糖片球菌是目前期望的。本实验从蒙古干酪中筛选到1株对单增李斯特菌具有显著抑制作用的戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*) C-2-1,并对其所产细菌素C-2-1的理化特性进行研究,为戊糖片球菌素C-2-1在乳制品中的应用研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株

戊糖片球菌C-2-1,分离自蒙古农户家中采集的干酪样品。指示菌为单增李斯特菌(*L. monocytogenes* ATCC19114),其他指示菌详见表2(均为实验室保藏)。

第一作者:硕士研究生(汪立平副教授为通讯作者,E-mail:lpwang@sohu.edu.cn)。

*上海市科委工程中心建设项目(11DZ2280300)

收稿日期:2015-05-05,改回日期:2015-07-01

1.1.2 试剂及培养基

过氧化氢酶、胃蛋白酶、蛋白酶 K, Sigma; 胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、 α -淀粉酶, 国药; 细菌 DNA 提取试剂盒, 通用引物 27F (5'-AGAGTTT-GATCCTGGCTCAG-3'), 1492R (5'-GGTTACCTTGT-TACGACTT-3'), Tricine-SDS-PAGE 试剂。MRS 培养基, LB 培养基, TSB-YE 培养基。

1.2 实验方法

1.2.1 产细菌素乳酸菌的筛选

从蒙古农户采集的干酪样品中分离得到 40 株疑似乳酸菌的菌株, 将其活化后接种到 MRS 培养基中, 30 ℃ 静置培养 24 h, 8 000 r/min 4 ℃ 离心 15 min, 取其上清液用无菌 0.22 μ m 滤膜过滤, 得到无细胞发酵上清液。用无菌 NaOH (2 mol/L) 调 pH 6.5 以排除有机酸的影响。再加入过氧化氢酶使酶终浓度为 1 000 AU/mL 以排除 H_2O_2 的影响。之后制备以 *L. monocytogenes* ATCC 19114 为指示菌的菌悬液, 采用打孔法 (1.0% 琼脂) 做抑菌实验, 参照 Tagg^[13] 的方法进行改良。

将经过上述处理后仍有抑菌活性的无细胞发酵上清液分别加入胰蛋白酶、胃蛋白酶、蛋白酶 K、木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、 α -淀粉酶、过氧化氢酶 (酶的终质量浓度为 1 mg/mL), 在酶的最适 pH 值下, 37 ℃ 水浴 2 h, 再调回 pH 6.5, 采用打孔法 (100 μ L/孔) 做抑菌实验, 对照为未处理的 pH 6.5 的无细胞发酵上清液。

1.2.2 乳酸菌的鉴定

根据乳酸菌菌落形态进行初步鉴定, 再进一步利用 16S rDNA 进行遗传性鉴定, 参考文献^[14]。将测序结果利用 BLAST 软件对比以及在 EZBioCloud 网站上找同源性近的模式菌株序列利用 MAGE5.0 构建系统发育树。

1.2.3 细菌素产量与乳酸菌生长的关系

培养基中接入 2 次传代后培养 12 h 的 C-2-1 的种子液, 接种量为体积分数 2%, 30 ℃ 静置培养 36 h, 每 2 h 取 1 次样, 测 pH, OD_{600} 和抑菌活性。抑菌活性 (AU/mL) 是通过 2 倍稀释法和打孔法结合测定, 2 倍稀释法即将发酵液 (pH 6.5) 用 50 mmol/L pH 6.5 的无菌磷酸钠缓冲溶液进行梯度稀释, 直至稀释到对指示菌无抑菌作用时为止。AU 为有明显抑菌圈出现时的最高稀释倍数的倒数^[15]。

1.2.4 抑菌谱

按照 1.2.1 的方法制备无细胞发酵上清液, 调 pH 6.5, 加入过氧化氢酶使酶终浓度为 1 000 AU/mL,

利用打孔法 (100 μ L/孔) 确定抑菌谱, 指示菌菌株见表 2。

1.2.5 细菌素对指示菌的作用方式

在接入体积分数为 1% 的 *L. monocytogenes* ATCC19114 的 100 mL TSB-YE 培养基中, 分别于 3 h ($OD_{600} = 0.021$) 和 7 h ($OD_{600} = 0.469$) 加入 20 mL 无细胞发酵上清液 (pH 6.5)。以接入同样量 *L. monocytogenes* ATCC19114, 但没有加入无细胞发酵上清液的 TSB-YE 培养基为空白对照, 每小时取 1 次样测 OD_{600} 值。

1.2.6 温度、pH 和化学试剂对细菌素的影响

1.2.6.1 温度对细菌素的影响

将筛选出的 C-2-1 无细胞发酵上清液 (pH 6.5) 分别置于 60 ~ 100 ℃ 水浴中 30 min 和 60 min, 以及 121 ℃ 下 15 min、20 min 和 30 min 后立即冷却。再加入过氧化氢酶使酶的终浓度为 1 000 AU/mL, 37 ℃ 水浴 1 h 后测试其抑菌活性, 以未加热处理的发酵上清液 (pH 6.5) 作对照。实验重复 3 次。

1.2.6.2 pH 对细菌素的影响

将 C-2-1 无细胞发酵上清液用 2 mol/L HCl 和 2 mol/L NaOH 调节 pH 2.0 ~ 12.0, 37 ℃ 温育 2 h 后, 再将 pH 调回到 6.5 后同上处理。

1.2.6.3 化学试剂对细菌素的影响

在 C-2-1 无细胞发酵上清液 (pH 6.5) 中分别加入质量分数为 1% 的十二烷基硫酸钠 (SDS)、尿素、体积分数 1% 的吐温-20、吐温-80, 质量分数为 2% ~ 8% 的 NaCl 以及终浓度分别为 0.1、2.0 和 5.0 mmol/L 的乙二胺四乙酸 (EDTA), 37 ℃ 温育 5 h, 用 NaOH 调 pH 6.5 后同上处理。

1.2.7 细菌素对产生菌细胞表面的吸附性研究

根据 YANG 等人^[16] 的方法进行细菌素对产生菌细胞的吸附实验。取培养 24 h 后的发酵液, 在 70 ℃ 中水浴 30 min 杀死细胞, 用 NaOH 调 pH 值为 6.5 后, 室温下搅拌 30 min 使细菌素吸附到细胞表面。8 000 r/min 4 ℃ 下离心 30 min 收集沉淀 (保留上清液), 重悬于 5 mmol/L 100 mL (pH = 6.5) 磷酸钠缓冲溶液, 离心后悬浮于 40 mL 100 mmol/L NaCl 溶液中调节 pH = 2.0 (5% 的磷酸), 4 ℃ 磁力搅拌 12 h 后 10 000 r/min 4 ℃ 离心 30 min 收集上清液用 0.22 μ m 的微孔滤膜过滤后于 $M_w = 1\ 000$ 的透析袋中透析 48 h, 收集溶液用 1.2.3 的方法测定抑菌活性。

1.2.8 细菌素分子质量测定

将 200 mL 无细胞发酵上清液经 70% 饱和度硫

酸铵处理,用磁力搅拌器在 4 ℃ 冰浴条件下缓慢搅拌约 4 h 后,10 000 r/min,4 ℃ 离心 30 min 收集沉淀以及漂浮在上面的蛋白。用原体积 1/10 的 25 mmol/L 的磷酸缓冲溶液 (pH 6.5) 溶解,用 $M_w = 1\ 000$ 的透析袋在 4 ℃ 下透析 48 h 后收集溶液保存于 -20 ℃ 备用。

蛋白质电泳采用 Tricine-SDS-PAGE^[17],利用中科瑞泰的超低分子质量 Marker(3.3 ~ 22 kDa 共 5 条带),在北京君意东方的垂直电泳槽中进行电泳。电泳结束后,将胶切成两半,将带有 Marker 的一半胶进行银染,另一半用灭菌的去离子水漂洗干净后,小心地铺上接有 *L. monocytogenes* ATCC19114 的 TSB-YE 固体培养基(1.0% 琼脂),37℃ 培养 12 h,与染色的一半胶作对比,确定细菌素的分子质量。

2 结果与讨论

2.1 产细菌素乳酸菌的筛选

从蒙古农户采集的干酪样品中分离得到的 40 株菌,在排除有机酸和过氧化氢的影响后仍有 1 株菌对 *L. monocytogenes* ATCC19114 表现出极强的抑制作用,将其命名为 C-2-1,说明乳酸菌 C-2-1 产生的抑菌物质除了有机酸和过氧化氢外还有其他物质。

如表 1 所示,菌株 C-2-1 的发酵上清液用胰蛋白酶、蛋白酶 K、木瓜蛋白酶、中性蛋白酶处理后抑菌活性完全消失,而用过氧化氢酶处理剩余 98.6% 的活性,说明发酵上清液中存在的抑菌物质为蛋白质类,即细菌素。此外,用 α -淀粉酶处理后的发酵液抑菌活性消失,说明细菌素分子的活性结构中可能含有碳水化合物成分,这与用胃蛋白酶处理后发酵上清液仍剩余 86.1% 的抑菌活性的结果说明了此细菌素的抑菌活性依赖于糖基化修饰,与 Pediocin L5-6^[7]、Pediocin SA-1^[18] 具有相似的结果。

表 1 C-2-1 的酶敏感实验

Table 1 Enzyme sensitive experiment of C-2-1

酶	最适 pH	剩余活性/%
胰蛋白酶	5.4	—
胃蛋白酶	2.0	86.1 ± 0.44
蛋白酶 K	7.5	—
木瓜蛋白酶	7.0	—
中性蛋白酶	7.0	—
α -淀粉酶	7.0	—
过氧化氢酶	7.3	98.6 ± 0.25

注:“—”表示无抑菌活性。

2.2 乳酸菌的鉴定

C-2-1 菌落形态为圆形菌落,乳白色,光滑,凸起,边

缘整齐,不透明,在显微镜的观察为革兰氏阳性,球菌。

以菌株 C-2-1 基因组 DNA 为模板,采用 16S rDNA 引物进行 PCR 扩增,得到约 1 500 bp 的特异性扩增产物。将测序结果在 NCBI 网站中应用 BLAST 软件在基因库中进行同源性搜索,结果显示与戊糖片球菌 (*Pediococcus pentosaceus*) 相似度最高为 99%。将 C-2-1 的 16S rDNA 序列在 EZBioCloud 网站中对比找到相似度较高的模式菌株,用 MAGE5.0 软件采用邻接法构建进化树 (neighbor-joining method) 如图 1 所示,戊糖乳杆菌 *Lactobacillus pentosus* JCM 1558(T) 为外群菌株。结合菌落形态特征以及 16S rDNA 序列分析结果,菌株 C-2-1 被鉴定为戊糖片球菌 (*Pediococcus pentosaceus*)。

将序列提交到 Gene Bank 数据库获得登录号为: KP996486。

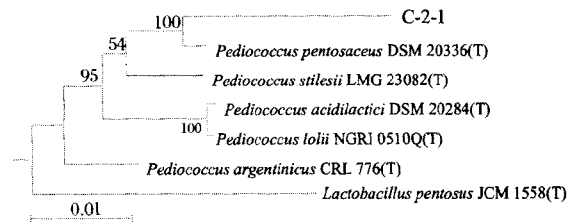


图 1 菌株 C-2-1 的 16SrDNA 序列系统发育树

Fig. 1 The phylogenetic tree of strain C-2-1 based on 16S rDNA sequence

2.3 细菌素产量与乳酸菌生长的关系

连续 36 h 测定戊糖片球菌 C-2-1 的 pH 值、 OD_{600} 值和无细胞发酵上清液 (pH6.5) 的抑菌活性,结果如图 2 所示。

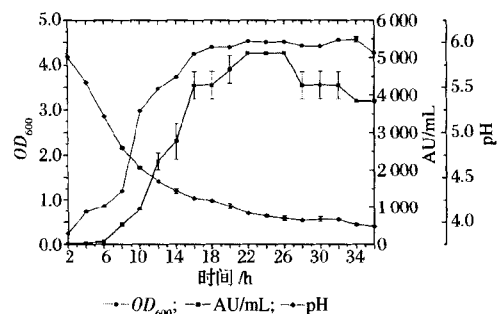


图 2 戊糖片球菌素 C-2-1 产量与戊糖片球菌 C-2-1 生长的关系

Fig. 2 The relationship between production of pentosaceus pediocin C-2-1 and the growth of *P. pentosaceus* C-2-1

从图 2 中可以看出,细菌素的产生伴随菌株生长的全过程,这个趋势可以判断细菌素为戊糖片球菌 C-2-1 的初级代谢产物,Zacharof 等^[19]也得到相同结

论。在细菌生长稳定期 22 ~ 26 h 之内 ($\text{pH} \approx 4.07$), 戊糖片球菌素 C-2-1 产量达到最大值, 最大抑菌活性为 5 120 AU/mL。在最后的发酵阶段, 细菌素的抑菌活性随着生长而不断地减少, 可能是由于被自身产生的蛋白酶降解而导致活性下降。

2.4 抑菌谱

通过 30 株指示菌进行戊糖片球菌素 C-2-1 抑菌

表 2 戊糖片球菌素 C-2-1 的抑菌谱

Table 2 Antimicrobial spectrum of *Pentoseaceus pediocin* C-2-1

指示菌	抑菌活力	指示菌	抑菌活力
干酪乳杆菌 9	++	马其顿链球菌 11	-
巴黎链球菌 15-1	+	乳酸乳球菌 LDN2	-
肠膜明串珠菌 A	++	植物乳杆菌 8	-
希氏乳杆菌 B3	++	鼠李糖乳杆菌 SN2	-
乳酸肠球菌 B8	++	发酵乳杆菌 5-2	-
粪肠球菌 YY-2	++	金黄色葡萄球菌	-
棒状乳杆菌 XTT2-2	++	蜡样芽孢杆菌 F1-5-10	-
单核细胞增生李斯特菌 Lis	++	醋酸杆菌	-
单核细胞增生李斯特菌	+++	气单胞菌 1 号	-
Lis 1 ATCC19114		假单胞菌 2 号	-
单核细胞增生李斯特菌	+++	沙门氏菌 Y1	-
Lis 2 ATCC19117		柠檬酸杆菌 L3	-
单核细胞增生李斯特菌	++	大肠埃希氏菌	-
Lis 3 ATCC13932		大肠埃希氏菌 B121	-
单核细胞增生李斯特菌	++	毕赤酵母	-
Lis 4 ATCC19116		法尔皮有孢汉逊酵母 2182	-
枯草芽孢杆菌 K-6-9	++	酿酒酵母 20005	-

注: -, 表示没有抑菌性; +, 表示抑菌圈直径 < 15 mm; ++, 抑菌圈直径 15 ~ 20 mm; +++ 抑菌圈直径 > 20 mm。

2.5 细菌素对指示菌的作用方式

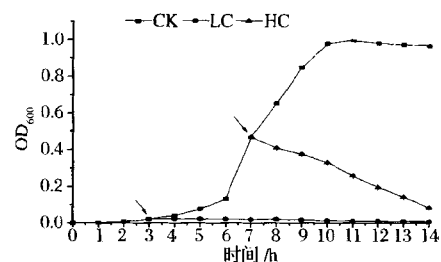
在指示菌 *L. monocytogenes* ATCC19114 的对数生长期 ($\text{OD}_{600} = 0.469$) 加入有活性的戊糖片球菌素 C-2-1, 指示菌的 OD_{600} 随之骤减, 指示菌在加入细菌素的 1 h 内活菌数从 2.05×10^9 到 1.10×10^4 下降了 5 个数量级 (数据未显示), 可能是由于细菌素破坏了指示菌细胞膜的完整性, 形成孔洞导致细胞内容物溢出, 说明细菌素的作用方式为杀菌^[20], 在低浓度 ($\text{OD}_{600} = 0.021$) 加入时也具有相似的结果。同时, 从图 3 中也可以看出戊糖片球菌素 C-2-1 对 *L. monocytogenes* ATCC19114 的抑菌性至少可以维持 10 h, 与 Svetoslav D. Todorov, Daniel Abrams 等人具有相似的结果^[21,8]。

2.6 温度、pH 和化学试剂对细菌素的影响

2.6.1 温度对细菌素的影响

由表 3 可以看出, 60 ~ 90 °C 水浴处理 60 min 后对戊糖片球菌素 C-2-1 抑菌活性几乎没有影响, 当温度达到 100 ~ 121 °C, 处理时间超过 30 min 时, 细菌素的抑菌活性骤减, 但在 121 °C 处理时间不超过

谱的测定, 其中革兰氏阳性菌 20 株、革兰氏阴性菌 7 株、酵母菌 3 株。由表 2 可以看出戊糖片球菌素 C-2-1 除了对亲源性较近的乳酸菌以及枯草芽孢杆菌具有较好的抑制作用外, 同时对致病菌单增李斯特菌具有极强的抑制作用, 但对大肠杆菌、沙门氏菌等革兰氏阴性菌和酵母菌没有抑制作用。



CK - 对照组; LC - 低浓度加入; HC - 高浓度加入

图 3 戊糖片球菌素 C-2-1 对单核细胞增生李斯特菌的作用方式

Fig. 3 Mode of *Pentoseaceus pediocin* C-2-1 action against *L. monocytogenes*

15 min 时还可保留 50% 以上的抑菌活性。

2.6.2 pH 对细菌素的影响

戊糖片球菌素 C-2-1 在 pH 2.0 ~ 9.0, 37 °C 温浴 2 h 仍然保持相对稳定的抑菌活性, 当 pH 超过 10.0 时抑菌活性迅速下降, 在 pH 12.0 时还可以检测到部分剩余活性。说明细菌素 C-2-1 在强碱性环境下比较敏感, 在酸性、中性及弱碱性的条件下抑菌活性比

较稳定。

2.6.3 化学试剂对细菌素的影响

不同的化学试剂处理对戊糖片球菌素 C-2-1 的抑菌活性没有多大影响。终浓度为质量分数为 1% SDS, 尿素, 体积分数 1% 吐温-20, 吐温-80 和质量分数为 2%~8% NaCl 以及终浓度分别为 0.1, 2.0 和 5.0 mmol/L 的 EDTA, 37℃ 温育 5 h 后都没有降低细菌素 C-2-1 的抑菌活性, 同时用 5.0 mmol/L 的 EDTA 处理后细菌素的抑菌活性为 10 240 AU/mL (数据未显示), 说明加入一定量的 EDTA 与戊糖片球菌素 C-2-1 具有协同抑菌的效果。

表 3 不同条件处理后戊糖片球菌素 C-2-1 的残留活性
Table 3 The residual activity of pentosaceus pediocin C-2-1 after treatment of different conditions

处理	条件	残留活性
温度	60~90℃ (30min, 60min)	++
	100℃ (30min, 60min)	+
	121℃ (15min, 20min, 30min)	+++
pH 值	2.0~9.0 (2h)	++
	10~12.0 (2h)	+
化学试剂	SDS (1%)	++
	吐温-20 (1%)	++
	吐温-80 (1%)	++
	尿素 (1%)	++
	NaCl (2%~8%)	++
	EDTA (1.0, 2.0, 5.0 mmol/L)	++++

注: “+” 0~50% 活性 “++” 50%~100% 活性 “+++” >100% 活性。

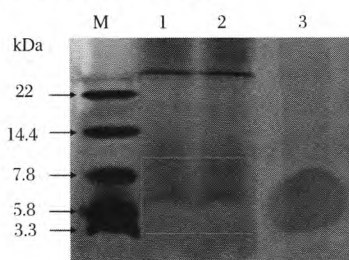
2.7 细菌素对产生菌细胞表面的吸附性研究

用 100 mmol/L pH 2.0 的 NaCl 溶解沉淀后, 离心得到的上清液没有检测到抑菌活性, 而最原始的上清液检测到了戊糖片球菌素 C-2-1 全部的抑菌活性 (5 120 AU/mL), 说明戊糖片球菌素没有吸附到产生菌的细胞表面。与已经报道的 bacPPK34^[8]、Pediocin ST18^[22]、Pediocin 05-10^[23] 等具有相似的结果。

2.8 细菌素分子质量测定

将经过 70% 硫酸铵沉淀的粗纯化细菌素样品经过 Tricine-SDS-PAGE 分析, 结果如图 4 所示。在银染后的电泳胶中可以看出有 2 条蛋白条带, 通过在 *L. monocytogenes* ATCC19114 的 TSB-YE 固体培养基得到的抑菌条带位置与这 2 条蛋白条带进行对比, 可知戊糖片球菌素 C-2-1 的分子质量在 5.8~7.8 kDa。已报道的片球菌素 Pediocin PA-1、bacteriocin ST44AM、Pediocin SA-1、pediocin SM-1 等在 2.7~6.5 kDa 之间^[11,18,21,24], 说明戊糖片球菌素 C-2-1 在已经

报道的片球菌素的范围之内。



M-蛋白质分子质量标准; 1 和 2 - 经过银染的两条平行样品条带; 3 - 在 *L. monocytogenes* ATCC19114 平板上的抑菌活性条带

图 4 Tricine-SDS-PAGE 分析及电泳后抑菌活性的测定

Fig. 4 Tricine-SDS-PAGE analysis and detection of antibacterial activity after Tricine-SDS-PAGE

3 结论

研究人员从蒙古农户采集的干酪样品利用打孔法筛选得到 1 株对单增李斯特菌具有明显抑菌作用的戊糖片球菌 C-2-1, 排除有机酸和过氧化氢的影响后, 其发酵上清液对单增李斯特菌仍有很强的抑菌作用, 经过胰蛋白酶、蛋白酶 K、木瓜蛋白酶、中性蛋白酶的处理后抑菌活性消失, 说明抑菌物质为蛋白质类, 确定其为戊糖片球菌素 C-2-1。

戊糖片球菌素 C-2-1 具有较好的热稳定性, 在 121℃ 处理 15 min 后仍有 50% 以上的抑菌活性, 此外在 pH 2.0~9.0 范围内有较强的抑菌活性。Nisin 作为食品防腐剂只在低 pH 条件时表现较高的溶解度和稳定性, 据 Tramer 报道, Nisin 在 pH 2.0 时稳定性很强, 但在 pH 6.0 时失去 90% 的活性, 同时路遥^[25]等人的一项研究显示, 利用改变 Nisin 的分子结构而使其对温度及 pH 值的稳定性有显著提高, 但是双突变体 M21K/S29K NisinZ 对指示菌的抑菌活性却有所下降。戊糖片球菌素 C-2-1 不同于 Nisin, 在酸性、中性以及弱碱性条件下均具有较好的稳定性。同时戊糖片球菌素 C-2-1 经过 1% SDS、尿素、吐温-20、吐温-80、2%~8% NaCl 以及 0.1 mmol/L、2.0 mmol/L、5.0 mmol/L EDTA 处理后, 仍能保持较好的抑菌活性, 并且 5.0 mmol/L EDTA 处理与戊糖片球菌素 C-2-1 表现出了协同抑菌作用, 在实际应用中有助于拓宽戊糖片球菌素 C-2-1 的抑菌谱。

本研究从乳制品来源的材料中筛选出产片球菌素的戊糖片球菌 C-2-1, 拓展了戊糖片球菌的来源领域, 并对其所产的戊糖片球菌素的理化特性进行研

究,为该细菌素在乳制品防腐保鲜中的应用提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] Lucy H, Deegan, Paul D, et al. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension [J]. International Dairy Journal, 2006, 16(9): 1 058 - 1 071.
- [2] 于雷雷,王超,施波,等. 戊糖乳杆菌素 pentocin LPEM818 的初步纯化及特性研究 [J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(2): 17 - 23.
- [3] 刘书亮,敖灵,周佳,等. 戊糖乳杆菌素 C50-6 的纯化及特性研究 [J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(5): 36 - 40.
- [4] 刘晨,齐凡,陈颖怡,等. 片球菌素在食品防腐保鲜中的应用研究进展 [J]. 保鲜与加工, 2012, 12(4): 1 - 6.
- [5] 赵爱珍,徐兴然. IIa 类乳酸菌细菌素的分类 [J]. 食品科学, 2013, 34(17): 356 - 360.
- [6] 张红星,刘丽,谢远红,等. 产细菌素的戊糖片球菌的筛选及其细菌素的理化性质研究 [J]. 现代食品科技, 2011, 27(2): 135 - 143.
- [7] 张红星,刘丽,谢英,等. 风干肠中戊糖片球菌所产细菌素 L5-6 的理化特性研究 [J]. 中国食品学报, 2011, 11(1): 75 - 79.
- [8] Abrams D, Barbosa J, Albano H, et al. Characterization of bacPPK34 a bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* strain K34 isolated from "Alheira" [J]. Food Control, 2011, 22(6): 940 - 946.
- [9] Costilow R N, Coughlin F M, Robach D L, et al. A study of the acid-forming bacteria from cucumber fermentations in Michigan. Food Research, 1956, 21(1): 27 - 33.
- [10] Seongho J, Joohyung L, Uisub J, et al. Identification of an anti-listerial domain from *Pediococcus pentosaceus* T1 derived from Kimchi, a traditional fermented vegetable [J]. Food Control, 2014, 43: 42 - 48.
- [11] Anastasiadou S, Papagianni M, Filiouis G, et al. Growth and metabolism of a meat isolated strain of *Pediococcus pentosaceus* in submerged fermentation purification, characterization and properties of the produced pediocin SM-1 [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2008, 43(6): 448 - 454.
- [12] 都立辉,施荣华,张虹,等. 肠球菌素的分离提取及其在牛乳杀菌中的应用 [J]. 食品科学, 2014, 35(1): 1 - 4.
- [13] Tagg J R, Mcgiver A R. Assay System for Bacteriocins [J]. Applied Microbiology, 1971, 21(5): 943.
- [14] 侯亚文. 产 Class IIa 类抗菌肽乳酸菌的筛选及其抗菌特性研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2013.
- [15] Messaoudi S, Kergourlay G, Dalgalarondo M, et al. Purification and characterization of a new bacteriocin active against campylobacter produced by *Lactobacillus salivarius* SMXD51 [J]. Food Microbiology, 2012, 32(1): 129 - 134.
- [16] YANG R, Johnson M C, Ray B. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1992, 58(10): 3 355 - 3 359.
- [17] Schagger H, Von J G. Tricine-sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of protein in the range from 1 to 100 kDa [J]. Analytical Biochemistry, 1987, 166(2): 368 - 379.
- [18] Anastasiadou S, Papagianni M, Filiouis G, et al. Pediocin SA-1, an antimicrobial peptide from *Pediococcus acidilactici* NRRL B5627: Production conditions, purification and characterization [J]. Bioresource Technology, 2008(13), 99: 5 384 - 5 390.
- [19] Zacharof M P, Lovitt R W. Bacteriocins produced by lactic acid bacteria [J]. APCBEE Procedia, 2012, 2: 50 - 56.
- [20] 刘晨,安超,李飞,等. 片球菌素的纯化及稳定性研究 [J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(6): 33 - 37.
- [21] Todorov S D, Dicks L M T. Bacteriocin production by *Pediococcus pentosaceus* isolated from marula [J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 132(2-3): 117 - 126.
- [22] Todorov S D, Dicks L M T. Pediocin ST18, an anti-listerial bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* ST18 isolated from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria [J]. Process Biochemistry, 2005, 40(1): 365 - 370.
- [23] HUANG Ying, LUO Yunbo, ZHAI Zhengyuan, et al. Characterization and application of an anti-Listeria bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* 05 - 10 isolated from Sichuan pickle, a traditionally fermented vegetable product from China [J]. Food Control, 2009, 20(11): 1 030 - 1 035.
- [24] 张健. 乳酸片球菌细菌素的发酵与纯化研究 [D]. 天津: 天津大学, 2012.
- [25] 路遥,蒋立科,陈美玲,等. 通过定点突变提高乳链菌肽对热及 pH 的稳定性 [J]. 微生物学报, 2010, 50(11): 1 481 - 1 487.

(下转第 24 页)

Possibility and influence conditions of Maillard reaction in the integrated ethanol-methane fermentation process

WANG Ke^{1,2}, ZHANG Jian-hua^{1,2}, MAO Zhong-gui^{1,2}

1 (Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

2 (School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

ABSTRACT This paper aimed to study the possibility and influence conditions of Maillard reaction between ammonia contained in the anaerobic digestion effluent and reducing sugar during the cooking and sterilization process in the integrated ethanol-methane fermentation process. Results showed that pH played an important role in affecting the Maillard reaction, and the reaction degree increased with rise of pH. Because ratio that undissociated ammonia accounting of total ammonia also increased with rise of pH, this indicated that Maillard reaction occurred between undissociated ammonia and reducing sugar. Under the condition of the integrated process, Maillard reaction hardly occurred because cooking take place under pH 6.0 and corn based medium possessed some buffer capacity, and therefore could not reduce concentration of total sugar and ethanol production in the ethanol fermentation.

Key words ethanol fermentation; anaerobic digestion; ammonia; reducing sugar; Maillard reaction

(上接第 19 页)

Screening of bacteriocin-producing *Pediococcus pentosaceus* from Mongolia cheese and study on physicochemical characteristics of bacteriocin

WANG Yan-ting, WANG Li-ping, TANG Chao, XUN Xiao-hong

(College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai Engineering

Research Center of Aquatic-Product Processing & Preservation, Shanghai 201306, China)

ABSTRACT Lactic acid bacterium strain C-2-1 isolated from Mongolia cheese, which can produced antimicrobial substance, was screened by punch hole method. After eliminating the effect of organic acids and hydrogen peroxide, the antimicrobial substance was found to be sensitive to proteolytic enzyme, which was proved to be bacteriocin. This strain C-2-1 was identified as *Pediococcus pentosaceus* by using 16S rDNA gene sequence homology analysis. The highest bacteriocin production (5120 AU/ml) was noted at stationary phase after 22 ~ 26 h of growth in MRS broth at 30℃ against *L. monocytogenes* ATCC 19114. Bacteriocin C-2-1 could significantly inhibit a part of the gram positive bacteria, but was inactive against gram negative bacteria and Yeast. The mode of activity against *L. monocytogenes* was bactericidal. No change in activity was recorded after treatment at temperature ranged from 60℃ to 90℃, and after treatment at pH values between 2.0 and 9.0. Besides, the bacteriocin was resistant to treatments with SDS, Tween-20, Tween-80, urea, and NaCl, and did not adhere to the surface of the producer cells and the molecular weight was between 5.8 kDa and 7.8 kDa, as determined by Tricine-SDS-PAGE. Bacteriocin C-2-1, sourced from Mongolia cheese, was heat stable and active at wide pH, which indicated that it would have potential application of biopreservatives for dairy product.

Key words antimicrobial activity; *Pediococcus pentosaceus*; bacteriocin; dairy product