

## 西藏干酪源植物乳杆菌产细菌素的分离纯化及特性研究

周倩玉, 郦萍, 王利君, 周青青, 顾青\*

(浙江工商大学食品与生物工程学院 浙江省食品微生物技术研究重点实验室 杭州 310018)

**摘要** 从西藏干酪中分离筛选出 1 株能够产生抑菌活性物质的乳酸菌,该菌的发酵上清液在排除有机酸、过氧化氢的影响后仍有显著抑菌活性,然而,用胃蛋白酶、蛋白酶 K 和胰蛋白酶处理后抑菌活性丧失,说明该菌的代谢产物中起抑菌作用的物质具有蛋白质性质,初步确定是一种细菌素。结合形态学观察、生理生化分析及 16S rDNA 鉴定结果,确定该菌为植物乳杆菌,命名为 ZFM804。细菌素经大孔树脂(XAD-16)层析、强阳离子交换层析、RP-HPLC 三步法初步纯化。经 SDS-PAGE 分析该细菌素分子质量约为 15 ku。理化性质分析表明该细菌素具有良好的酸碱稳定性:在 pH 3~11 范围内都具有抑菌活性;良好的热稳定性:100℃处理 30 min 仍有明显抑菌活性,同时可被人体内蛋白酶降解。抑菌谱测定结果表明,ZFM804 植物乳杆菌素对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌都有抑制作用,是一种广谱细菌素。

**关键词** 植物乳杆菌; 细菌素; 分离纯化; 抑菌作用

**文章编号** 1009-7848(2023)08-0024-08 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.08.003

乳酸菌广泛分布于多种环境中,其中肠球菌、链球菌和乳杆菌是最具特征的种类<sup>[1]</sup>。乳酸菌固有的优良发酵特性以及不断被发掘的益生特性而受到人们的关注。对于奶制品,发酵果蔬中的乳酸菌可以改善食物的风味,延长食品的保存期,提高食物的营养价值<sup>[2]</sup>。在人体和动物肠道中的乳酸菌可以改善人体和动物的肠道功能,平衡肠内菌群,提高机体的免疫水平<sup>[3]</sup>。

细菌素是一种核糖体合成的抗菌肽,产生菌对自身分泌的细菌素具有免疫力<sup>[4-5]</sup>。细菌素因高效、无毒、无残留以及无耐药性等特点,而被认为是化学防腐剂和抗生素的有效替代物<sup>[6]</sup>。根据细菌素的分子质量、化学结构、作用方式、抗菌活性或翻译后修饰等方面将其分为 4 大类:羊毛硫细菌素、未修饰的肽、高分子质量肽及环状肽,其中乳酸菌细菌素以羊毛硫细菌素和未被修饰的肽为主<sup>[7]</sup>。目前应用最广、研究最成熟的尼生素就是典型的羊毛硫细菌素类细菌素,由乳酸乳球菌产生。尼生素对多种革兰氏阳性菌有良好的抑制作用,于 1953 年首次在英国上市,随后在 1983 年,尼生素被添加到欧洲食品添加剂列表中,编号为

E234,紧接着在 1988 年,美国食品和药物管理局(FDA)批准将尼生素用于奶酪生产,目前已有超过 50 个国家批准将尼生素作为食品添加剂使用<sup>[8]</sup>。其它已报道的乳酸菌细菌素大多因抑菌谱窄,限制了其在食品工业中的应用。

少数民族生产的传统奶酪是我国传统乳制品的重要组成部分,蕴藏着丰富的微生物资源,乳酸菌在传统乳制品发酵过程中起关键作用<sup>[9-10]</sup>。许多研究表明,奶酪生产中的乳酸菌也会产生细菌素,这些细菌素可以影响复杂的奶酪微生物区系的组成,并有可能抑制腐败菌或病原菌<sup>[7]</sup>。这些传统奶制品中的乳酸菌主要来源是少数民族的本土菌株,其经过不断筛选,许多具有优良性状的菌株得以保留。然而,受民族性、区域性的制约,大多产自自销,流通范围局限,其丰富的乳酸菌及细菌素资源需进一步挖掘。本研究从西藏干酪中筛选可产广谱抑菌活性物质的乳酸菌,分离纯化该菌代谢产物细菌素,研究其生物学特性,旨在丰富我国食品级细菌素资源,为开发安全的新型商业化细菌素提供理论支撑。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料与试剂

乳酸菌菌株(*Lactobacillus*)分离自西藏干酪。指示菌:藤黄微球菌 10209(*M. luteus* 10209)、柠檬色葡萄球菌 LC5(*S. citreus* LC5)、金黄色葡萄

收稿日期: 2022-08-30

基金项目: 中国工程院院地合作项目(2019-ZJ-JS-02);浙江省重点研发计划项目(2020C04002)

第一作者: 周倩玉,女,硕士生

通信作者: 顾青 E-mail: guqing2002@hotmail.com

球菌 D48 (*S. aureus* D48)、肉葡萄球菌 pCA 44 (*S. carnosus* pCA 44)、单增李斯特氏菌 LM1 (*L. monocytogenes* LM1)、大肠杆菌 (*E. coli* DH5 $\alpha$ )、副溶血球菌 SCF16 (*V. parahaemolyticus* SCF16)、枯草芽孢杆菌 BAS2 (*B. subtilis* BAS2)、甲型副伤寒沙门氏菌 CMCC 50093 (*S. paratyphi*-A CMCC 50093)、肠炎沙门氏菌亚利桑亚那种 CMCC (B) 47001 [*S. enterica* subsp. *arizonae* CMCC (B) 47001]、铜绿假单胞菌 ATCC 47085 (*P. aeruginosa* ATCC 47085) 等均为实验室保藏。

MRS 培养基、GM17 培养基、LB 培养基, 青岛海博生物技术有限公司。

细菌微量生化鉴定试剂盒, 青岛海博生物技术有限公司; 细菌基因组提取试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; HiPrep<sup>TM</sup> SP XL 16/10 层析柱、XAD-16 大孔吸附树脂填料, 北京慧德易科技有限责任公司; 荧光探针 DisC2(5), 杭州启真湖生物科技有限公司。

## 1.2 仪器与设备

3K30 台式高速冷冻离心机, 美国 Sigma 公司; Gel Doc XR 型凝胶成像仪, 美国 Bio-Rad 公司; AKTA Purifier 100 快速蛋白纯化仪, 瑞典 GE Healthcare 公司; Waters 2489 高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司; 蛋白垂直电泳仪, 美国 Bio-Rad 公司; PB-10 pH 计, 德国 Startorius 公司。

## 1.3 方法

### 1.3.1 菌种筛选

1.3.1.1 干酪中乳酸菌的分离 将干酪样品用研钵研细溶于无菌水中, 均质制成样品匀液, 接种 2% 样品至 GM17 和 MRS 液体培养基中, 置于 37 °C 增殖培养 24 h, 划线于 GM17 和含 1.5% CaCO<sub>3</sub> 的 MRS 固体培养基上, 37 °C 培养 48 h, 用灭菌环挑取在 GM17 培养基上长势良好的单菌落、在添加 1.5% CaCO<sub>3</sub> 的 MRS 培养基上出现溶钙圈的单菌落, 分别接种至 GM17、MRS 液体培养基中增殖培养 24 h, 传代培养后 -80 °C 甘油管冻藏。

1.3.1.2 有抑菌活性的乳酸菌的筛选 活化菌种, 挑取单菌落至 10 mL MRS 液体培养基, 37 °C 静置培养 24 h, 将菌液 4 °C, 8 000 r/min, 离心 10 min 后取上清, 采用牛津杯琼脂扩散法筛选出对藤黄微球菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌等指示菌

有显著抑菌活性的菌株。

### 1.3.1.3 产细菌素乳酸菌的复筛

1) 排除有机酸对抑菌作用的干扰 用 0.1 mol/L 乳酸调节 MRS 灭菌未接种液体培养基的 pH 值和发酵上清液原 pH 值相同, 并用 0.1 mol/L 乳酸调节发酵上清液的 pH 值为 5.0, 7.0; 用 0.1 mol/L 乳酸、0.1 mol/L 乙酸调灭菌未接种的 MRS 液体培养基的 pH 值为 5.0。用藤黄微球菌作为指示菌, 用牛津杯琼脂扩散法进行抗菌试验。

2) 排除过氧化氢 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对抑菌作用的干扰 将过氧化氢酶溶解在磷酸缓冲液中配成 2 mg/mL 的工作液, 将其与发酵上清液按 1:1 的体积比混合, 使过氧化氢最终质量浓度为 1 mg/mL, 37 °C 水浴 4 h, 用藤黄微球菌作为指示菌, 用牛津杯琼脂扩散法进行抗菌试验。

3) 蛋白酶检测确定细菌素类物质 分别称取蛋白酶 K、胃蛋白酶和胰蛋白酶, 配置成 2 mg/mL 的工作液, 分别将发酵上清液的 pH 值调至各酶的最适反应 pH 值, 分别加入各酶使发酵上清液中各蛋白酶终质量浓度为 1 mg/mL, 置于 37 °C 水浴锅中反应 4 h, 再调回初始 pH 值。以发酵上清液原液作为对照, 用藤黄微球菌 10209 作为指示菌, 用牛津杯琼脂扩散法进行抗菌试验。

## 1.3.2 产细菌素乳酸菌菌株的鉴定

1.3.2.1 菌体形态及生理生化试验 在 MRS 固体培养基上划线分离乳酸菌, 肉眼观察菌落形态, 挑取适量的菌体进行革兰氏染色, 在显微镜下观察菌体的形态, 如杆状、球状、有无鞭毛等, 进行常规形态学鉴定; 运用细菌微量生化鉴定试剂盒进行生理生化试验分析<sup>[11]</sup>。

1.3.2.2 菌种的 16S rDNA 鉴定 该细菌的基因组 DNA 提取方法参考文献[12], 以基因组 DNA 为模板进行 16S rDNA 基因的 PCR 扩增, PCR 扩增以 F (5'-ATCATGATTTACATTTGAGTG-3') 和 R (5'-CGACGACCATGAACCCACCTGT-3') 为引物。PCR 产物测序由上海派森诺公司完成。PCR 扩增产物测序结果通过 BLAST 与 NCBI 中的核酸序列数据库进行比对, 以菌株的 16S rDNA 序列为基础, 并利用 MEGA 7.0 中的邻位法构建系统进化树<sup>[13]</sup>。

### 1.3.3 细菌素初步分离纯化及 SDS-PAGE 分析

采用大孔吸附树脂(XAD-16)层析-Hiprep SP XL16/10 强阳离子交换层析-RP-HPLC 3 步法初步纯化细菌素,并对纯化后的细菌素进行 SDS-PAGE 分析。

1.3.4 生化特性分析 用 0.05% 的醋酸溶液调节细菌素样品 pH 值为 3,4,5,6,7,8,9,10,11,进行抑菌试验,研究细菌素在不同 pH 值条件下的稳定性;将细菌素样品分别置于 40,50,60,70,80,90,100 °C 分别处理 10,30 min,以未经热处理的细菌素样品为对照,检测抑菌活性,研究细菌素的热稳定性;将胃蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、蛋白酶 K、溶菌酶、 $\alpha$ -淀粉酶、脂肪酶、核糖核酸酶分别加入细菌素样品,使各酶的终质量浓度为 1 mg/mL,以未用酶处理的细菌素样品作为对照,检测抑菌活性,研究细菌素的酶解稳定性。检测抑菌活性的方法均为牛津杯琼脂扩散法,指示菌均为藤黄微球菌 10209。

1.3.5 细菌素抑菌谱的确定 采用打孔法研究细菌素对不同指示菌的抑菌能力,选取有代表性的革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌各 8 株为指示菌,通过测量对不同指示菌的抑菌圈直径大小,确定该细菌素的抑菌谱。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌种筛选

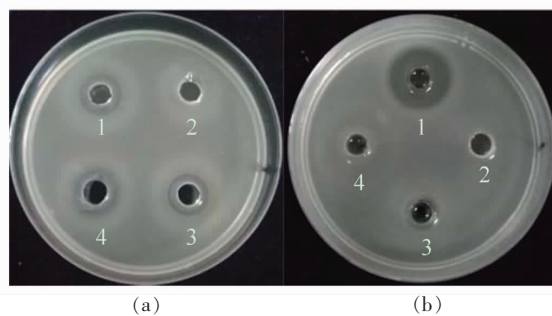
2.1.1 产抑菌活性代谢产物的乳酸菌的筛选 从西藏干酪样品中分离到乳酸菌 10 株,通过抑菌试验发现 6 株菌的发酵上清液对金黄色葡萄球菌 D48、沙门氏菌等致病菌有抗菌活性,其中 4 号菌对革兰氏阳性菌和阴性菌均有较好的抑菌效果,所以后续试验围绕 4 号菌株进行。

#### 2.1.2 产细菌素乳酸菌的复筛

2.1.2.1 排除有机酸对抑菌作用的干扰 取 3 份 4 号菌的发酵上清液,用 pH 计测其 pH 值为 3.74,用 0.1 mol/L 乳酸调节经灭菌处理的 MRS 液体培养基的 pH 值至 3.74,发酵上清液有抑菌效果而 MRS 液体培养基没有抑菌效果;用 0.1 mol/L 乳酸将发酵上清液 pH 值分别调至 5 和 7,与原始发酵上清液产生的抑菌圈大小接近。分别用 0.1 mol/L 乳酸、0.1 mol/L 乙酸将灭过菌未接种的 MRS 液体培养基的 pH 值调至 5,发现两者均未产生抑菌效

果。以上试验说明发酵上清液中有非酸物质产生抑菌效果。

2.1.2.2 排除过氧化氢对抑菌作用的干扰 经过过氧化氢酶处理的 4 号乳酸菌的发酵上清液产生的抑菌圈明显比未经处理的发酵上清液产生的抑菌圈直径小,说明除了过氧化氢产生抗菌作用外,发酵上清液中还存在其它产生抗菌作用的物质。



注:a 图中,1. 4 号菌发酵上清液(pH=3.74),2. MRS(pH=3.74),3. 发酵上清液(pH=5.0),4. 发酵上清液(pH=7.0);b 图中,1. 4 号菌发酵上清液(pH=3.74),2. MRS(pH=3.74),3. MRS(乳酸调 pH=5.0),4. MRS(乙酸调 pH=5.0)。

图 1 有机酸排除

Fig.1 Elimination of organic acids

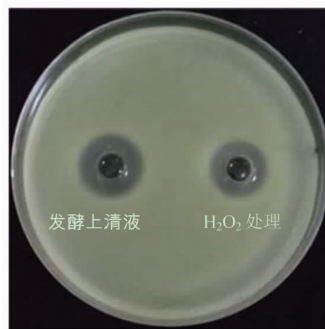


图 2 排除 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对抑菌活性的影响

Fig.2 Exclude the effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on antibacterial activity

2.1.2.3 蛋白酶检测确定细菌素类物质 在 4 号乳酸菌的发酵上清液中加入胃蛋白酶、蛋白酶 K 和胰蛋白酶,使其终质量浓度均为 1 mg/mL,发现经 3 种酶处理过的发酵上清液都没有产生抑菌圈,说明发酵上清液中发挥抑菌作用的是蛋白类物质。

## 2.2 产细菌素乳酸菌菌株的鉴定

2.2.1 常规形态及生理生化鉴定 该菌菌落为圆形凸起的乳白色菌落,边缘整齐、表面光滑;革兰氏染色结果呈阳性,光学显微镜下观察到菌体呈杆状形态,无鞭毛和芽孢,与乳酸杆菌的特征相符合。用细菌微量生化鉴定试剂盒鉴定该菌的生理生化特征,结果如表 1 所示。

2.2.2 菌种的 16S rDNA 鉴定 提取该菌的基因组 DNA 作为模板,使用乳酸菌 16S rDNA 通用引物进行 PCR 扩增,得到长度为 1 383 bp 的碱基序列,将此序列上传至 NCBI 数据库中利用 BLAST 软件进行基因序列比对,应用 MEGA 7.0 中的邻位法构建系统发育树,结果表明该菌株与植物乳杆菌 JY28 同源性达到 100%,综合前述的形态学与生理生化鉴定试验结果,确定该菌为植物乳杆菌,命名为植物乳杆菌 ZFM804 (*Lactobacillus plantarum* ZFM804)。

表 1 4 号菌株的生理生化特征

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of strain No. 4

生理生化鉴定指标	试验结果
过氧化氢酶	-
七叶苷	+
纤维二糖	+
麦芽糖	+
甘露醇	+
水杨苷	+
山梨醇	-
蔗糖	+
棉籽糖	-
葡萄糖	+
乳糖	+
淀粉水解试验	-
明胶液化	-
V-P 试验	-
蛋白胨水	-
硫化氢试验	-

注:“-”表示阴性,“+”表示阳性。

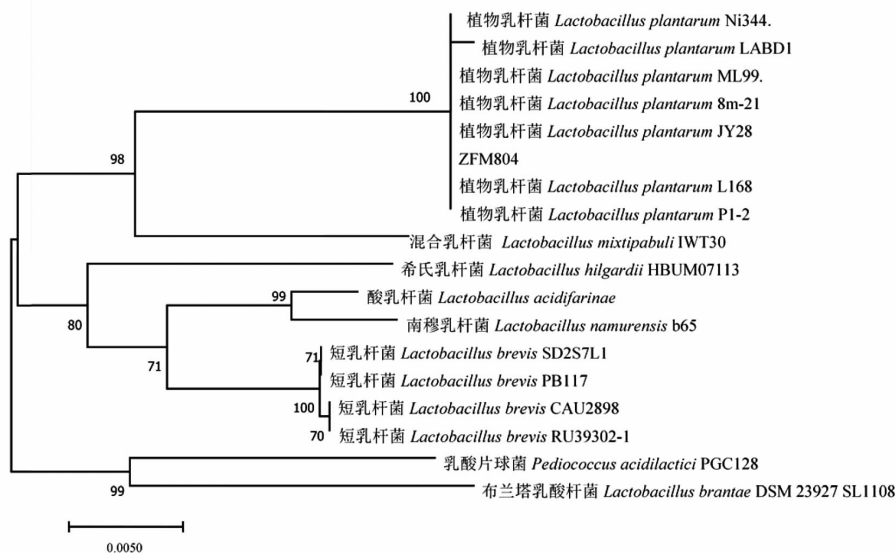


图 3 4 号菌株的 16S rDNA 基因序列系统发育树

Fig.3 16S rDNA gene sequence phylogenetic tree of strain No. 4

## 2.3 细菌素初步分离纯化及 SDS-PAGE 分析

2.3.1 细菌素初步分离纯化 对植物乳杆菌 ZFM804 的发酵上清液经过大孔吸附树脂层析、强阳离子交换层析、RP-HPLC 3 步法初步纯化后,得到如图 4 所示的洗脱峰且有抑菌效果,说明细菌素样品基本得到纯化。

2.3.2 SDS-PAGE 估算细菌素分子质量 将经过

HPLC 纯化后的 ZFM804 植物乳杆菌素进行 SDS-PAGE,经考马斯亮蓝染色后在凝胶成像仪上拍照得到条带见图 5,判断分子质量大小约为 15 ku。

## 2.4 生化特性分析

细菌素在在 pH 3~11 的范围内都具有抑菌活性,在 pH 值为 3~7 时,抑菌活性较对照组无明显差异,pH 值高于 7 时,抑菌活性虽下降明显,但

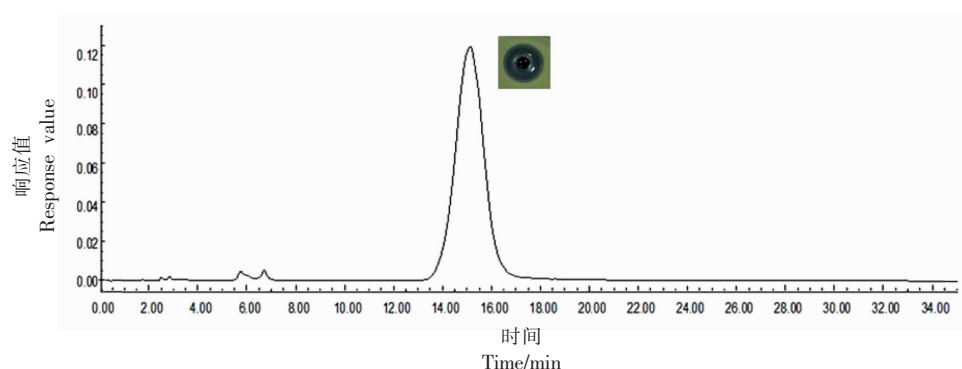


图4 RP-HPLC 纯化色谱图

Fig.4 Purification chromatogram of RP-HPLC

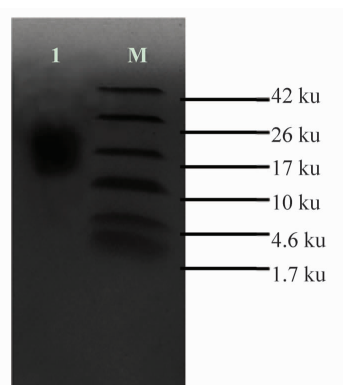


图5 ZFM804 植物乳杆菌素的 SDS-PAGE 图谱

Fig.5 The SDS-PAGE map of bacteriocin of *Lactobacillus plantae* ZFM804

仍有抑菌活性,说明 ZFM804 植物乳杆菌素的酸碱耐受性较好。当 100 °C 处理 30 min 时,仍有明显的抑菌活性,说明 ZFM804 植物乳杆菌素的温度耐受性较好。ZFM804 植物乳杆菌素对蛋白酶 K、胃蛋白酶、胰蛋白酶、脂肪酶、溶菌酶比较敏感,处理 30 min 后,抑菌活性几乎完全丧失,而木瓜蛋白酶、核糖核酸酶、 $\alpha$ -淀粉酶在处理 30 min 以后,仍有很好的抑菌活性,可见其对这 3 种酶不敏感。

### 2.5 抑菌谱

用打孔法对 ZFM804 植物乳杆菌素的抑菌谱进行研究,结果如表 2 所示,通过细菌素的抑菌试验可知,该细菌素不仅能够抑制藤黄微球菌、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特菌等革兰氏阳性菌,而且对不同种的沙门氏菌、铜绿假单胞菌等革兰氏阴性菌也有显著抑制效果,是一种广谱抗菌素。

## 3 讨论

乳酸菌自古以来就与发酵食品紧密联系,这与乳酸菌对食品的营养、感官和货架期的有益影响息息相关<sup>[14]</sup>。国内外学者从发酵食品中筛选出了多种具有益生特性的乳酸菌,例如从哈萨克族传统奶酪中分离到的降解亚硝酸盐的干酪乳杆菌<sup>[15]</sup>,从东北辣酱中分离能够清除胆固醇的植物乳杆菌 H6<sup>[16]</sup>,从希腊干香肠中分离到的抑制单增李斯特菌的弯曲乳杆菌<sup>[17]</sup>等。乳酸菌所产的细菌素,具有作为天然食品防腐剂和治疗性抗生素的潜力,因而获得了国内外的持续关注<sup>[18]</sup>。

迄今为止已有大量关于细菌素分离纯化的研究,溶剂沉淀法、硫酸铵沉淀法、凝胶过滤法、膜分离法等是常用的分离纯化方法<sup>[19-20]</sup>。值得注意的是,高质量细菌素商业化生产的主要障碍是成本高昂,因此简化细菌素纯化步骤,对于节约成本,促进细菌素在食品工业中的应用是很有必要的。本实验室建立了简便的三步法分离纯化 ZFM804 植物乳杆菌素:1) 利用 XAD-16 大孔树脂分离植物乳杆菌 ZFM804 发酵上清液,得到有抑菌活性的浓缩发酵液;2) 由于细菌素一般是带正电荷的多肽,选用强阳离子柱去除杂蛋白;3) 通过反相色谱得到基本纯化的细菌素。通过 SDS-PAGE 检测,确定该细菌素分子质量约为 15 ku。

本文中研究了在不同的 pH 值、温度和蛋白酶的处理下对细菌素抑菌活性的影响。发现 ZFM804 植物乳杆菌素有较好的酸碱耐受性以及热稳定性。在酸性条件下,pH 值改变,抑菌活性基

表 2 ZFM804 植物乳杆菌素的抑菌谱

Table 2 Antibacterial spectrum of bacteriocin of *Lactobacillus plantarum* ZFM804

G <sup>+</sup> /G <sup>-</sup>	菌种名称	抑菌程度
G <sup>+</sup>	藤黄微球菌 10209	+++
	金黄色葡萄球菌 D48	+++
	肉葡萄球菌 pet 20( <i>S. carnosus</i> pet 20)	++
	蝇葡萄球菌( <i>S. muscae</i> )	++
	肉葡萄球菌 pCA 44	++
	瓦氏葡萄球菌( <i>S. warneri</i> )	++
	模仿葡萄球菌( <i>S. simulans</i> )	+
	单核细胞增生李斯特菌 LM1( <i>L. monocytogenes</i> LM1)	++
	G <sup>-</sup>	大肠杆菌
枯草芽孢杆菌 BAS2		++
甲型副伤寒沙门氏菌 CMCC 50093		+++
乙型副伤寒沙门氏菌 CMCC50094( <i>S. paratyphi</i> -B CMCC 50094)		+++
肠炎沙门氏菌亚利桑亚那种 CMCC(B) 47001		+++
猪霍乱沙门氏菌 ATCC 13312( <i>S. choleraesuis</i> ATCC 13312)		/
鼠伤寒沙门氏菌 CMCC 50015( <i>S. typhimurium</i> CMCC 50015)		++
铜绿假单胞菌 ATCC 47085		+++

注:+++。抑菌圈直径在 13~16 mm 范围; ++。抑菌圈直径在 11~13 mm 范围; +。抑菌圈直径在 9~11 mm 范围;-。无抑菌效果。

本没有变化,在碱性条件下,pH 值增大,仍保留有抑菌活性,这表明该细菌素在酸性条件发挥最佳的抑菌作用。一般认为细菌素的分子质量越小在高温下越稳定,比如分子质量在 6~17 ku 的细菌素一般可经 100 ℃处理 30 min 而不失活<sup>[21]</sup>,这与本研究的结果相符,ZFM804 植物乳杆菌素在 100 ℃处理 30 min 时,仍有明显的抑菌活性。通过对 ZFM804 植物乳杆菌素抑菌谱的测定,发现其能够抑制常见革兰氏阳性菌和某些革兰氏阴性菌,例如食源性致病菌金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特菌、沙门氏菌等。能够在食品中应用的细菌素应具有来源安全、广谱抑菌、热稳定等特点,这一结果说明该细菌素有在食品工业中广泛应用的潜能。

#### 4 结论

本研究分离筛选到一株西藏干酪源乳酸菌,结合形态学观察、生理生化分析及 16S rDNA 鉴定结果,确定该菌为植物乳杆菌,命名为 ZFM804。在植物乳杆菌 ZFM804 的发酵上清液中发现有抑菌活性物质,并且排酸,排过氧化氢后其抑菌活性

仍存在,用胃蛋白酶、蛋白酶 K 和胰蛋白酶处理后抑菌活性丧失,初步判断该物质具有蛋白质性质,是一种细菌素。大孔树脂(XAD-16)层析、强阳离子交换层析、RP-HPLC 三步法初步纯化得到该细菌素后,对其进行理化分析及抑菌谱测定,发现该细菌素为有良好酸碱稳定性和热稳定性的光谱抑菌素,SDS-PAGE 分析分子质量约为 15 ku。

对于 ZFM804 植物乳杆菌素还需进一步研究,未来将进一步纯化该细菌素,测定其氨基酸序列,结合结构特征探究其作用机制。

#### 参 考 文 献

- [1] CARR F J, CHILL D, MAIDA N. The lactic acid bacteria: A literature survey[J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2002, 28(4): 281-370.
- [2] 周志江. 生物防腐剂及其在食品防腐中的应用[J]. *保鲜与加工*, 2015, 15(1): 1-8.  
ZHOU Z J. Biological preservatives and their application for food preservation[J]. *Storage and Process*, 2015, 15(1): 1-8.
- [3] ZAREIE M, JOHNSON-HENRY K, JURY J, et al.

- Probiotics prevent bacterial translocation and improve intestinal barrier function in rats following chronic psychological stress[J]. *Gut*, 2006, 55(11): 1553–1560.
- [4] 管世敏, 龚钢明. 细菌素及其在食品防腐保藏中应用的研究进展[J]. *中国酿造*, 2008(19): 1–5.  
GUAN S M, GONG G M. Advances of bacteriocin and its application in food preservation[J]. *China Brewing*, 2008(19): 1–5.
- [5] KLAENHAMMER T R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 1993, 12(1/2/3): 39–85.
- [6] ZOU J, JIANG H, CHENG H, et al. Strategies for screening, purification and characterization of bacteriocins[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 11: 781–789.
- [7] COTTER P D, HILL C, ROSS R P. Bacteriocins: Developing innate immunity for food[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(10): 777–788.
- [8] JUTURU V, WU J C. Microbial production of bacteriocins: Latest research development and applications[J]. *Biotechnology Advances*, 2018, 36(8): 2187–2200.
- [9] 呼斯楞, 刘红新, 于洁, 等. 内蒙古呼伦贝尔地区传统发酵乳中乳酸菌的多样性分析[J]. *微生物学通报*, 2016, 43(5): 984–990.  
HU S L, LIU H X, YU J, et al. Diversity of lactic acid bacteria associated with traditional fermented milk from Hulun Buir in Inner Mongolia[J]. *Microbiology China*, 2016, 43(5): 984–990.
- [10] 刘绒梅, 田圆圆, 耿琦, 等. 四川稻城传统干酪中乳酸菌的分离鉴定及功能研究[J]. *中国测试*, 2017, 43(12): 58–62.  
LIU R M, TIAN Y Y, GENG Q, et al. Isolation, identification and functional properties of lactic acid bacteria derived from traditional cheese in Daocheng, Sichuan[J]. *China Measurement & Testing Technology*, 2017, 43(12): 58–62.
- [11] 刘珊春, 赵欣, 骞宇, 等. 西藏羊八井地区牦牛酸乳中乳酸菌菌种鉴定[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(10): 208–212, 216.  
LIU S C, ZHAO X, QIAN Y, et al. Identification of *Lactobacillus* isolated from fermented yak milk in Tibetan Yangbajing area[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2016, 37(10): 208–212, 216.
- [12] 单成俊, 胡彦新, 夏秀东, 等. 面包乳杆菌(*Lactobacillus panis*)C-M2 细菌素的分离纯化及特性分析[J]. *食品科学*, 2017, 38(20): 20–26.  
SHAN C J, HU Y X, XIA X D, et al. Purification and characterization of the bacteriocin produced by *Lactobacillus panis* C-M2[J]. *Food Science*, 2017, 38(20): 20–26.
- [13] 李兴峰, 江波, 潘蓓蕾, 等. 产苯乳酸的乳酸菌分离筛选及菌种鉴定[J]. *食品与发酵工业*, 2007, 33(2): 1–4.  
LI X F, JIANG B, PAN B L, et al. Screening and identification of phenyllactic acid-producing lactic acid bacteria[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2007, 33(2): 1–4.
- [14] DE VUYST L, LEROY F. Bacteriocins from lactic acid bacteria: Production, purification, and food applications[J]. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2007, 13(4): 194–199.
- [15] 陈欢, 王斌, 史学伟, 等. 新疆哈萨克族传统奶酪中潜在益生乳酸菌的筛选[J]. *中国调味品*, 2019, 44(12): 50–54.  
CHEN H, WANG B, SHI X W, et al. Screening of potential probiotic lactic acid bacteria in Xinjiang Kazak traditional cheese[J]. *China Condiment*, 2019, 44(12): 50–54.
- [16] 任大勇, 曲天铭, 杨柳, 等. 东北传统发酵食品中降胆固醇乳酸菌的筛选及其降解机制[J]. *食品科学*, 2019, 40(22): 199–206.  
REN D Y, QU T M, YANG L, et al. Screening of lactic acid bacterial isolates from traditional fermented foods in Northeast China for cholesterol-lowering property and mechanism of action analysis[J]. *Food Science*, 2019, 40(22): 199–206.
- [17] PAPANOLIS E, TZANETAKIS N, LITOPOULOU-TZANETAKI E, et al. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties[J]. *Meat Science*, 2003, 65(2): 859–867.
- [18] CLEVELAND J, MONTVILLE T J, NES I F, et al. Bacteriocins: Safe, natural antimicrobials for food preservation[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2001, 71(1): 1–20.
- [19] 吉玉强, 吴兆亮, 郭雅楠, 等. 微生物发酵生产乳链菌肽的分离技术研究进展[J]. *食品科学*, 2007, 28(2): 369–372.  
JI Y Q, WU Z L, GUO Y N, et al. Review on nisin separation technology from fermentation broth

- [J]. Food Science, 2007, 28(2): 369-372.
- [20] JAMALUDDIN N, STUCKEY D C, ARIFF A B, et al. Novel approaches to purifying bacteriocin: A review[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2018, 58(14): 2453-2465.
- [21] ZAMFIR M, CALLEWAERT R, CORNEA P C, et al. Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801 [J]. Journal of Applied Microbiology, 1999, 87(6): 923-931.

### Studies on Separation and Purification of a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum* from Tibetan Cheese and Its Characteristic

Zhou Qianyu, Li Ping, Wang Lijun, Zhou Qingqing, Gu Qing\*

(College of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Key Laboratory for Food Microbial Technology of Zhejiang Province, Hangzhou 310018)

**Abstract** A strain of lactic acid bacteria which produce antibacterial active substances was isolated and sifted from Tibetan cheese. After eliminating the interference of organic acids and hydrogen peroxide, the fermentation supernatant of the bacteria still had obvious antibacterial activity. After the fermentation supernatant was treated with pepsin, proteinase K and trypsin, its antibacterial activity was lost, indicating that the antibacterial substance in the metabolite of the bacteria had protein properties, and it was preliminarily determined to be a bacteriocin. It was identified as *Lactobacillus plantarum* by morphological observation, physiological and biochemical analysis and homology analysis of 16S rDNA gene sequence, named *Lactobacillus plantarum* ZFM804. The bacteriocin was preliminarily purified by macroporous resin (XAD-16) chromatography, strong cation exchange chromatography and RP-HPLC three-step method. The molecular mass of the bacteriocin was determined 15 ku approximately by SDS-PAGE. The analysis of physical and chemical properties showed that the bacteriocin had good acid-base stability; had bacteriostatic activity in the range of pH 3~11; good thermal stability; 100 °C treatment for 30 min still had obvious bacteriostatic activity, and could be degraded by proteases in human body. The results of the antibacterial spectrum assay showed that the bacteriocin had inhibitory effects on both gram-positive and gram-negative bacteria, and was a broad-spectrum bacteriocin.

**Keywords** *Lactobacillus plantarum*; bacteriocin; separation and purification; antibacterial effect