

干酪乳杆菌 S-层蛋白对金黄色葡萄球菌的抑制作用

戴露婷, 陈瑞, 饶胜其*, 郭小庆, 秦怡, 陆思进

(扬州大学食品科学与工程学院, 江苏扬州 225127)

摘要: 以干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei* ATCC 334)为研究对象,不同初始 pH 培养条件下菌株的生长情况分析表明 *L. casei* ATCC 334 具有良好的耐酸胁迫能力,透射电子显微镜观察表明其存在表层结构。应用 5mol/L LiCl 提取菌株 S-层并进行 SDS-PAGE 和 MALDI-TOF-MS 分析,发现该乳杆菌 S-层含有两种 S-层蛋白,分子量分别为 49kDa 和 40kDa。抑菌试验显示 *L. casei* ATCC 334 S-层蛋白(60 μ g/mL)对金黄色葡萄球菌具有一定抑制作用,当与 Nisin(150IU/mL)共同作用时比 S-层蛋白和 Nisin 单独作用时分别提高 3.9 倍和 1.5 倍,表现出显著的协同抑菌作用。

关键词: 干酪乳杆菌; S-层蛋白; 金黄色葡萄球菌; 抑制作用

中图分类号: TS 972.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 2095-8730(2018)02-0061-04

食源性病原金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)属于革兰氏阳性球菌,能引起许多严重感染,诸如引起肺炎、伪膜性肠炎、心包炎等,甚至败血症、脓毒症等全身感染。^[1]易被 *S. aureus* 污染的食品主要有奶、肉、蛋、鱼及其制品,在我国它是引起食物中毒的主要病原菌。^[2]随着中国乳制品的发展,乳制品质量安全问题获得人们广泛关注。^[3]生乳极易受乳牛乳腺炎、环境、器具、操作人员等所带的 *S. aureus* 污染,引起食源性疾病。^[4]为了减少 *S. aureus* 污染的风险,牛奶及其乳制品加工中会添加化学防腐剂或者抗生素。然而,在食品加工过程中使用化学防腐剂会损害食品原有品质以及对人体健康造成伤害。^[5]使用安全无毒的天然抗菌物质来代替合成添加剂对食品的安全保鲜非常重要,微生物来源的抗菌肽或抗菌蛋白是其中一种安全无毒的杀菌剂。^[6]

S-层蛋白是细菌表层的一种蛋白成分,具有自组装功能,在超滤膜和分子筛、脂质体、多功能 S-层纳米器件、超晶格金属纳米粒子等应用方面有所报道。^[7]由于 S-层蛋白的基因多样性,不同

来源的 S-层晶格结构和生物学特性千差万别,相关研究主要集中在古菌属。^[8]有关乳杆菌 S-层蛋白的研究起步较晚,且主要集中在其黏附及免疫调节功能方面。^[9]近年来有研究显示少数乳杆菌 S-层蛋白能够裂解革兰氏阳性病原菌细胞壁,报道目前仅限于嗜酸乳杆菌、瑞士乳杆菌和卷曲乳杆菌,^[10-12]其中卷曲乳杆菌 S-层蛋白与乳酸链球菌素(Nisin)对多种致病菌均具有极显著的协同杀菌作用。^[12]

本文以已商业化应用的干酪乳杆菌 *L. casei* ATCC 334 为研究材料,研究其 S-层蛋白对金黄色葡萄球菌的抑制作用以及协同 Nisin 的抑菌作用,为开发新型绿色安全的抗菌剂以及拓展乳杆菌 S-层蛋白的应用提供信息参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

Lactobacillus casei ATCC 334: 扬州大学食品科学与工程学院发酵实验室提供; *Staphylococcus aureus* CICC 22936: 购置于中国工业微生物菌种

收稿日期: 2018-02-20 * 通讯作者

基金项目: 江苏省大学生创新创业训练计划项目(201611117044Z)

作者简介: 戴露婷(1996-),女,江苏南京人,扬州大学食品科学与工程学院本科生,从事食品安全研究;

饶胜其(1981-),男,湖北鄂州人,扬州大学食品科学与工程学院副教授,博士,从事食品生物技术与食品安全研究。

保藏管理中心; Nisin: 浙江新银象生物工程有限公司; 氯化锂: 生工生物工程(上海)有限公司; MRS培养基: 广东环凯微生物科技有限公司。

LB液体培养基的配制: 胰蛋白胨 $10\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、酵母提取物 $5\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、氯化钠 $10\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、蒸馏水 1L, 121°C 湿热灭菌 15min。

1.2 主要仪器与设备

SX-500型高压蒸汽灭菌锅: 日本 TOMMY 公司; UV-7504C 紫外可见分光光度计: 上海欣茂仪器有限公司; Tecnai-12 透射电镜: 荷兰 Philips 公司; 5800 超高分辨飞行时间生物质谱仪: 美国 AB SCIEX 公司。

1.3 方法

1.3.1 菌株活化

取 -20°C 甘油管保存的干酪乳杆菌按 2% (v/v) 的接种量接种于 MRS 液体培养基中, 37°C 恒温培养 20h 后, 再按 2% (v/v) 的接种量活化于 MRS 液体培养基中, 37°C 恒温培养 20h, 备用。

取 -20°C 甘油管保存的金黄色葡萄球菌按 2% (v/v) 的接种量接种于 LB 液体培养基中, 37°C 恒温摇床培养 16h, 再按 2% (v/v) 的接种量活化于 LB 液体培养基中, 37°C 恒温摇床培养 16h, 如此提高菌株活力, 备用。

1.3.2 干酪乳杆菌的生长情况分析

参考胡斌^[13]等人的研究方法, 将活化好的干酪乳杆菌培养液按 2% (v/v) 的接种量分别接种至不同 pH 值 (pH 5.5、pH 5.0、pH 4.0、pH 3.5) 的 MRS 液体培养基中, 37°C 恒温培养 24h, 每 2h 测一次 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 值。

1.3.3 干酪乳杆菌 S-层蛋白的提取

S-层蛋白提取方法参考 Johnson-Henry^[14]等人的研究并稍作修改。干酪乳杆菌培养液离心 ($5000\text{r}/\text{min}$, 15min), 收集菌体; 0.01M PBS (pH 7.4) 清洗并再次离心收集菌体, 湿菌体用 $5\text{mol}/\text{L}$ LiCl 溶液重悬混匀, 37°C 温育 30min, 离心 ($8000\text{r}/\text{min}$, 15min), 弃上清, $4\text{mol}/\text{L}$ 盐酸胍溶液重悬混匀, 于 37°C 恒温培养箱中处理 1h, 离心 ($8000\text{r}/\text{min}$, 15min), 收集上清。将上清移入 14kDa 分子截留量的透析袋中, 4°C 去离子水中透析 48h 后, 离心 ($12000\text{r}/\text{min}$, 15min) 取上清, 即为干酪乳杆菌 S-层粗蛋白。^[15] 置于 -20°C 冰箱保存备用。

1.3.4 蛋白相对分子量的测定

将 LiCl 提取物采用 12% 分离胶的 SDS-PAGE 进行电泳分析。将电泳胶上的条带进行割胶后, 采用 $0.01\text{mol}/\text{L}$ PBS (pH 7.4) 洗净, 经胰蛋白酶酶解后通过 MAIDI-TOF-MS 质谱鉴定, 应用 MASCOT 软件搜索 NCBI 数据库。

1.3.5 干酪乳杆菌 S-层结构观察

乳杆菌菌悬液经 $8000\text{r}/\text{min}$ 冷冻离心 10min 收集菌体, $0.01\text{mol}/\text{L}$ 无菌 PBS 洗涤两次。对照组将菌体重悬于 PBS; 处理组将菌体经 $5\text{mol}/\text{L}$ LiCl 处理后重悬于 PBS, 对 LiCl 处理前后的干酪乳杆菌进行观察。菌体重悬于 PBS 后, 将对照组和处理组样品分别滴至专用铜网上, 自然晾干 10min 后, 2% 磷钨酸染色 2min, 滤纸吸除多余染液, 用灯烘干。将样品装入样品台, 放入样品室进行透射电子显微镜 (TEM) 观察。

1.3.6 S-层蛋白对金黄色葡萄球菌的抑制作用

参照 Pradoacosta^[16]等人的研究, 取活化好的金黄色葡萄球菌菌悬液混匀加入 LB 液体培养基中, 接种量 2% (v/v), 设置四个组别。对实验组 1 加入干酪乳杆菌 S-层蛋白 (终浓度 $60\mu\text{g}/\text{mL}$), 实验组 2 加入乳酸链球菌素 (终浓度 $150\text{IU}/\text{mL}$), 实验组 3 同时加入乳酸链球菌素和干酪乳杆菌 S-层蛋白, 对照组只接种金黄色葡萄球菌液, 37°C 摇床振荡培养 10h, 每 2h 测一次 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 值。绘制各条件下金黄色葡萄球菌的生长曲线图。同一培养时间, 实验组的吸光度值记为 A_T , 对照组的吸光度值记为 A_C , 按照如下公式计算金黄色葡萄球菌的生长抑制率。

$$\text{生长抑制率} = \frac{A_C - A_T}{A_C} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 干酪乳杆菌的生长情况及耐酸性

将活化好的干酪乳杆菌培养液接种至不同 pH 值的 MRS 液体培养基中, 37°C 恒温培养 24h, 每 2h 测一次 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 值, 绘制不同初始 pH 培养条件下干酪乳杆菌的生长曲线图。结果见下文图 1 所示, 随着培养初始 pH 值的下降, 干酪乳杆菌的生长速度逐步减缓, 在 pH 3.5 条件下仍然保持生长势头, 说明干酪乳杆菌具有较强的酸适应能力, 能够在较低 pH 条件下存活。进一步的透射电镜观察表明干酪乳杆菌 ATCC 334 存在 S-层结构

(图 2a) 通过 LiCl 处理菌株后,其 S - 层被成功脱除(图 2b),说明 S - 层与菌株是通过共价键相连。有研究显示,乳杆菌的耐酸性与其存在 S - 层结构有一定的关系。^[15]

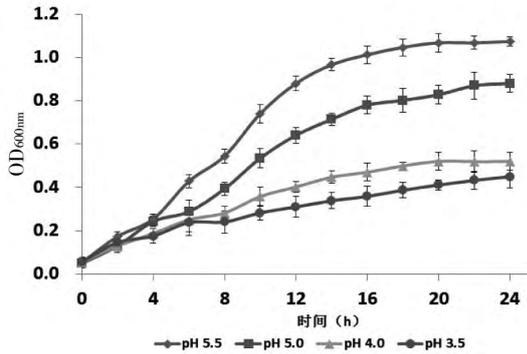


图 1 不同 pH 下干酪乳杆菌的生长曲线

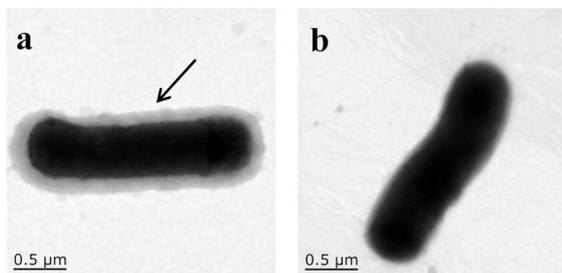


图 2 干酪乳杆菌 S - 层结构 TEM 电镜图

a: 未处理的干酪乳杆菌; b: LiCl 处理的干酪乳杆菌; 箭头: 表层结构

2.2 干酪乳杆菌 S - 层蛋白的提取及鉴定

由图 3 所示,干酪乳杆菌 ATCC 334 S - 层提取物含有分子量约 92 kDa 和 47 kDa 的两条蛋白条带。将泳道 1 中条带 a 和条带 b 分别进行割胶回收后,胶内酶解,采用 MALDI - TOF - MS 进行蛋白鉴定。

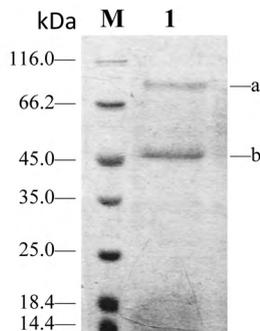


图 3 干酪乳杆菌 LiCl 提取物的 SDS - PAGE 分析

通过 MASCOT 数据库搜索比对质谱分析结果(见表 1),条带 b 鉴定为 *L. casei* ATCC 334 表面抗原,而条带 a 蛋白在 SDS - PAGE 上的分子量

与质谱鉴定结果差别较大,推断该蛋白可能发生糖基化修饰,^[17]导致蛋白分子量发生变化,有待进一步的实验确证。

表 1 蛋白质质谱鉴定结果

条带	NCBI 检索号	理论相对分子量(Da)	分值	蛋白名称
a	gi 116493849	49 435	344	细胞壁相关水解酶 (<i>L. casei</i> ATCC 334)
b	gi 116493594	40 834	227	表面抗原 (<i>L. casei</i> ATCC 334)

2.3 干酪乳杆菌 S - 层蛋白对 *S. aureus* 的抑制作用

如图 4 可见,10 h 后,金黄色葡萄球菌菌体密度增加,在干酪乳杆菌 S - 层蛋白和 Nisin 分别单独作用下,对金黄色葡萄球菌的抑制率分别为 21.83% 和 58.37%;而当 S - 层蛋白与 Nisin 共同作用下,对金黄色葡萄球菌的抑制率达 85.30%,相比单独作用分别提高 3.9 倍和 1.5 倍,结果表明 S - 层蛋白与 Nisin 金黄色葡萄球菌具有协同抑制作用。

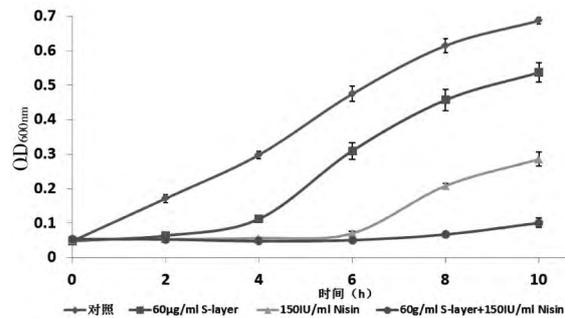


图 4 干酪乳杆菌 S - 层蛋白对金黄色葡萄球菌生长的影响

3 结论

L. casei ATCC 334 存在 S - 层结构及 S - 层蛋白,S - 层蛋白对金黄色葡萄球菌具有抑制作用,且与 Nisin 具有显著的协同效应。

参考文献:

[1] 徐振波,刘晓晨,李琳,等.金黄色葡萄球菌肠毒素在食源性微生物中的研究进展[J].现代食品科技,2013(9):2317-2324.

[2] 索玉娟,于宏伟,凌巍,等.食品中金黄色葡萄球菌污染状况研究[J].中国食品学报,2008,8(3):88-93.

[3] 于海涛,张甦.乳与乳制品质量安全问题探析[J].黑

- 龙江八一农垦大学学报 2011 23(4): 53-56.
- [4] 刘秀梅. 食源性疾病监控技术的研究[J]. 中国食品卫生杂志 2004 16(1): 3-9.
- [5] 田会丽,袁筠,廖超,等. 石河子地区乳源性金黄色葡萄球菌毒力及耐药性的研究[J]. 现代食品科技, 2017(9): 265-270.
- [6] 马文山,廖富蘋,范雪云,等. 细菌抗菌肽的研究进展及其应用[J]. 生物技术通报 2008(3): 39-43.
- [7] Fagan R P, Fairweather N F. Biogenesis and functions of bacterial S-layers[J]. Nature Reviews Microbiology 2014 12(3): 211-222.
- [8] Zhu C, Guo G, Ma Q, et al. Diversity in S-layers[J]. Progress in Biophysics & Molecular Biology 2016, 123(2): 1-15.
- [9] Hynonen U, Palva A. Lactobacillus surface layer proteins: structure, function and applications[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2013 97(12): 5225-5243.
- [10] Valence F, Lortal S. Zymogram and Preliminary Characterization of Lactobacillus helveticus Autolysins[J]. Applied & Environmental Microbiology, 1995 61(9): 3391-3399.
- [11] Acosta M P, Palomino M M, Allievi M C, et al. Murein hydrolase activity in the surface layer of Lactobacillus acidophilus ATCC 4356[J]. Applied & Environmental Microbiology 2008 74(24): 7824-7827.
- [12] Sun Z, Li P, Liu F, et al. Synergistic antibacterial mechanism of the Lactobacillus crispatus surface layer protein and nisin on Staphylococcus saprophyticus[J]. Scientific Reports, 2017 7(1): 265.
- [13] 胡斌,田丰伟,赵建新,等. 嗜酸乳杆菌 NCFM 表层蛋白的提取及其与菌体酸和胆盐耐受及粘附性能的关系[J]. 食品工业科技 2014 35(5): 118-121.
- [14] Johnson-Henry K C, Hagen K E, Gordonpour M, et al. Surface-layer protein extracts from Lactobacillus helveticus inhibit enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7 adhesion to epithelial cells[J]. Cellular Microbiology 2007 9(2): 356-367.
- [15] Boot H J, Kolen C P A M, Van Noort J M, et al. S-Layer protein of Lactobacillus acidophilus ATCC 4356: purification, expression in Escherichia coli, and nucleotide sequence of the corresponding gene[J]. Journal of Bacteriology, 1993 175(19): 6089-6096.
- [16] Pradoacosta M, Ruzal S M, Allievi M C, et al. Synergistic Effects of the Lactobacillus acidophilus Surface Layer and Nisin on Bacterial Growth[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2010 76(3): 974-977.
- [17] 李军,杜鑫, Hosseini Moghaddam S H,等. 蛋白质糖基化修饰研究进展[J]. 科技通报 2009 25(6): 773-778.

Inhibitory effect of *Lactobacillus casei* S-layer protein on *Staphylococcus aureus*

DAI Luting, CHEN Rui, RAO Shengqi*, GUO Xiaoqing, QIN Yi, LU Sijin

(School of Food Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu, 225127 China)

Abstract: The growth condition under different initial pH showed that the *Lactobacillus casei* ATCC 334 had a good acid resistance ability, and the existence of its surface structure was observed with transmission electron microscopy. The S-layer was extracted with 5mol/L of LiCl and analysed using SDS-PAGE and MALDI-TOF-MS. It was found that the S-layer of *L. casei* contained two kinds of S-layer proteins with molecular weight of 49kDa and 40kDa, respectively. The antibacterial test showed that *L. casei* ATCC 334 S-layer protein (60μg/mL) could inhibit *Staphylococcus aureus*, and the inhibitory effect when combined with Nisin (150IU/mL) was enhanced by 3.9 times and 1.5 times, respectively, as compared to the individual inhibitory effect of S-layer protein and Nisin, which indicated a significant synergistic inhibitory effect.

Key words: *Lactobacillus casei*; S-layer protein; *Staphylococcus aureus*; inhibitory effect

(责任编辑: 赵勇)