

酸马奶酒中一株粪肠球菌抑菌物质的粗提及特性研究

贺银凤, 王锂韞, 李少英, 吴敬, 田建军
(内蒙古农业大学食品科学与工程学院, 呼和浩特 010018)

摘要: 该文研究了分离自内蒙古锡林郭勒盟地区酸马奶酒样中一株粪肠球菌(H₁₋₁₋₂)的最佳培养条件和菌株的抑菌特性, 从菌株的培养液中粗提了抑菌物质, 并对抑菌物质的理化特性进行了初步鉴定。研究结果表明, 粪肠球菌 H₁₋₁₋₂ 最适生长温度 37℃, 发酵 4 h 后 pH 值开始下降, 7 h 后菌株进入对数生长期, 抑菌物质的产生是在发酵 8 h 以后, 12 h 达到高峰; 发酵液经超滤、凝胶柱分离、薄层层析、紫外吸收图谱的测定, 抑菌活性物质是分子量大于 50 ku 的蛋白类物质; 粗提物在 pH 1.0~ 10.0 范围内均有抑菌活性, 在 pH 4.0 时可耐受 60℃ 加热 30 min, 耐受一些表面活性剂, 但对蛋白酶、过氧化氢酶敏感。

关键词: 酸马奶酒; 粪肠球菌; 抑菌物质; 粗提; 特性

中图分类号: S377 **文献标识码:** B **文章编号:** 1002-6819(2007)1-0264-04

贺银凤, 王锂韞, 李少英, 等. 酸马奶酒中一株粪肠球菌抑菌物质的粗提及特性研究[J]. 农业工程学报, 2007, 23(1): 264- 267.

He Yinfeng, Wang Liyun, Li Shaoying, et al. Extraction and characteristics of antibacterial factor from *Enterococcus faecalis* in koumiss [J]. Transactions of the CSAE, 2007, 23(1): 264- 267. (in Chinese with English abstract)

0 引言

酸马奶酒(Koumiss)是一种古老的乳酸、酒精发酵乳饮料, 不仅营养价值高, 风味醇香, 且具有活血、化瘀等生理功能。一百多年前, 前苏联就创建了专用酸马奶酒治疗各种疾病的医院。在 20 世纪 80 年代我国内蒙古锡盟蒙医研究所, 成功地提出了酸马奶酒疗法, 经过多年实践, 发现酸马奶酒能够降血压、血脂, 促进新陈代谢, 增强肝脾功能, 提高人体免疫力, 对肺结核、高血压等病症也有较好的治疗效果^[1-3], 但只有临床表观效果的研究。为了探讨酸马奶酒的医疗价值形成机理, 进一步开发酸马奶酒系列食疗、医疗制品, 我们对酸马奶酒中的微生物进行分离鉴定及抗菌特性进行了初步研究。研究中发现已分离鉴定的 21 株乳酸球菌中, 粪肠球菌就占有 12 株, 是酸马奶酒中优势乳酸球菌, 经初步研究发现其中有 6 株菌具有程度不同的抑菌特性^[4-6]。

粪肠球菌常常被认为是人类肠道以及尿道感染的病原菌, 实际上仅有 20% 的菌株会引起肠道及尿道疾病, 而这些疾病通常是腹腔和盆腔中多种微生物共同作用的结果。关系到人类健康和食品安全的肠球菌决定于它的分离源。粪肠球菌常被用作某些食品的发酵剂, 如欧洲南部的一些奶酪用粪肠球菌参与发酵过程。而且, 粪肠球菌常作为益生菌来治疗人和动物的一些肠道疾病。

本文着重对来自于酸马奶酒中一株抑菌性较强的粪肠球菌 H₁₋₁₋₂ 进行深入研究, 以探讨其抑菌物质的特性, 为酸马奶酒的医疗作用提供一定的理论依据; 为进一步挖掘酸马奶酒这一宝贵的资源, 促进酸马奶酒食疗、医疗产品的产业化进程, 推动民

族乳制品的发展奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验菌种

粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) H₁₋₁₋₂, 分离自内蒙古锡盟地区酸马奶酒。

1.1.2 标准菌株

单核细胞增生利斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*) C53002, 简称利斯特氏菌; 枯草芽孢菌 (*Bacillus subtilis*) IFO 3335, 标准菌株由内蒙古农业大学乳制品研究培训中心微生物研究室提供。

1.1.3 培养基

BLB(Briggs Liver Broth) 和 LB(Lactic Broth) 液体增菌培养基, TPY(Trypticase phytone Yeast) 液体培养基、营养琼脂培养基, TSYE(Tryptone Soy Broth+ 0.5% Yeast Extract) 培养基, 参照文献[7]所介绍材料和方法制备。

1.1.4 仪器设备

HM-12P 型 pH 计(上海雷磁仪器厂); BBL 150 型厌氧罐(日本产); LXJ-H1B 型离心机(上海安亭公司); CL-25 型蠕动泵及中空纤维超滤器(北京旭邦公司); 自动核酸蛋白分离层析系统, 包括 YC-1 型层析柜和 HD-2 型核酸蛋白检测仪、HL-1S 型恒流泵、BSG-100 自动部分收集器(上海枫立仪器厂); UV-2000 分光光度计(日本日立公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 指示菌的培养及菌悬液的制备

整个试验期间, 将利斯特氏菌和枯草芽孢菌分别接种于 TSYE 半固体培养基斜面、营养琼脂斜面, 每两周继代一次, 并保存于 4℃ 冰箱。使用前分别接种于上述的两种液体培养基中, 置 37℃ 培养箱中, 增殖 2 次, 每次培养 18~ 24 h, 使液体培养基中含菌量至 10⁶cfu/mL, 备用。

收稿日期: 2005-04-12 修订日期: 2006-12-29

项目来源: 国家自然科学基金资助项目(29966003)

作者简介: 贺银凤(1960-), 女, 内蒙古包头人, 教授, 主要从事乳品科学技术教学研究工作。呼和浩特 内蒙古农业大学食品科学与工程学院教育部乳品生物科学重点实验室, 010018

1.2.2 供试菌株 H₁₋₁₋₂ 的培养及代谢产物的收集

将粪肠球菌 H₁₋₁₋₂ 接种于 TPY 液体培养基中于 37℃ 培养 18 h, 取出于 2700 × g 离心 10 min, 将上清液与菌体分离。上清液用 1.0 mol/L NaOH 调至 pH 6.0 后, 用 0.45 μm 微孔过滤膜过滤后测定抑菌活性。

1.2.3 抑菌活性的测定

用杯碟法测定, 牛津杯直径均为 8 mm。试验方法参照文献 [8]。

1.2.4 抑菌物质产生的动力学研究

H₁₋₁₋₂ 菌株的种子液以 1% 的接种量接种于 90 管 5 mL TPY 液体培养基中, 每 30 管分别于 30、37、42℃ 恒温箱中培养, 每隔 1 h 在 600 nm 处测其光密度值 (OD), 以及 pH 值, 同时用 1 mol/L NaOH 中和上清液至 pH 6.0, 测其抑菌活性。指示菌为单核细胞增生利斯特氏菌。

1.2.5 抑菌物质的提取及鉴定

1) 发酵液的超滤

培养 18 h 的菌株 H₁₋₁₋₂ 发酵液于 4℃, 12000 × g, 30 min 离心后, 取上清液, 首先经过截留分子量为 50000 (50 ku) 的超滤柱超滤, 得浓缩液 (分子量 $M > 50$ ku) 及超滤液 (分子量 $M < 50$ ku), 然后超滤液再经截留分子量为 30 ku 超滤柱超滤, 再得浓缩液 (30 ku < $M < 50$ ku) 及超滤液 ($M < 30$ ku)。将菌株 H₁₋₁₋₂ 的所有超滤液、浓缩液经真空冷冻 (-54℃) 干燥, 加去离子水, 分别配成质量体积 1:1 溶液 (g:mL), 备用。取部分溶液调 pH 值 6.0 后测定抑菌活性。

2) 浓缩液的凝胶柱分离

分子量 $M > 50$ ku 的备用 1:1 溶液调 pH 值至 6.0, 取 1 mL, 过 Sephadex-G 100 凝胶柱, 加 100 mL 重蒸水洗脱, 洗脱液流速为 1.4 mL/min, 5 min 收集一管, 共 100 管。以 HD-2 型核酸蛋白检测仪在 280 nm 处测定各管收集液的吸光度值, 绘制洗脱曲线。同时测定各管收集液的抑菌活性, 将有活性的收集液经真空冷冻干燥制得抑菌物质粗品, 备用。

3) 浓缩液的薄层层析

选用 TLC PLATES 20 cm × 20 cm cellulose 板, 取 50 μL 菌株 H₁₋₁₋₂ 的超滤分子量 50 ku 以上的备用 1:1 溶液及具有抑菌活性的第一洗脱峰的洗脱液点样后, 于展开剂为甲醇:吡啶:水:浓缩盐酸 (160:20:35:3) (v/v) 的层析缸中平衡 10 min, 之后浸于展开剂中, 其深度约为 0.5 cm, 待展层剂上升到距离玻璃板的另一端 4/5 左右时即可停止展层。取出玻璃板, 迅速吹干, 喷雾显色, 观察层析斑点个数并计算各斑点的相对展开比率 R_f 值 ($R_f = \text{斑点移动距离} / \text{溶剂前沿移动距离}$)。

4) 紫外吸收图谱

将粗制品 0.5 mg 溶于 5 mL 去离子水中, 取溶液 3 mL, 用 UV-2000 分光光度计在 200~700 nm 范围内扫描, 将其紫外吸收图谱与标准蛋白紫外吸收图谱对照^[9]。

1.2.6 粗品的理化特性研究

1) pH 值敏感性及其不同 pH 值条件热稳定性

将干燥的粗品加去离子水配成 1:1 溶液, 用 1.0 mol/L HCl 及 1.0 mol/L NaOH 调节 pH 值 (从 1 到 12), 测其抑菌活性。同时, 分别取不同 pH 值的 1:1 溶液, 于 60、70、80、100、和

121℃ 分别加热 5、10、15、20 和 30 min 后, 测其抑菌活性。

2) 表面活性剂对粗提物抑菌活性的影响

将表面活性剂 SDS (十二烷基苯磺酸钠), N-Lauryl sarcosine (十二烷基肌氨酸), Tween20, Tween80, Triton x-100 (辛基苯氧基聚乙氧乙醇), Urea (脲, 尿素) 以 1% 添加量加入干燥粗品的 1:1 溶液 (pH 6.0) 中, 37℃ 放置 5 h, 然后测其抑菌活性。

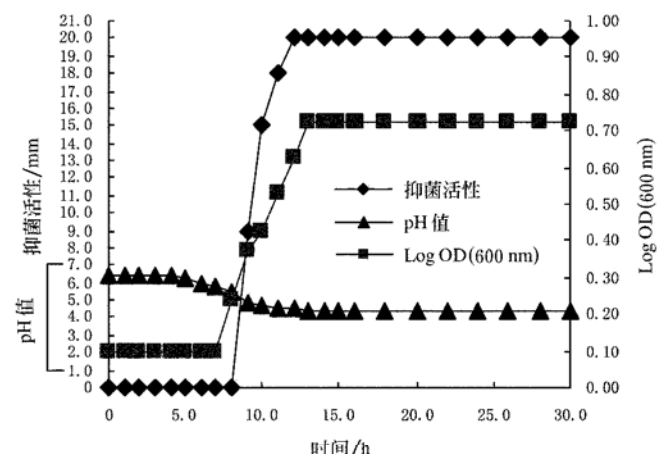
3) 酶对粗提物抑菌活性的影响

将 a-Chymotrypsin (α-胰凝乳蛋白酶, 350 u/mL; sigma), Trypsin (胰蛋白酶, 14 u/mL; sigma), a-Amylase (α-淀粉酶, 0.6 u/mL sigma), Catalase (过氧化氢酶, 2600 u/mL; merck), 用 1.0 mol/L NaOH 调节 pH 值至 7.0, Pepsin (胃蛋白酶, 91 u/mL; sigma), 用 1.0 mol/L HCl 调 pH 值至 2.0, 经 0.45 μm 微孔过滤膜过滤, 取粗品的 1:1 溶液 (pH 6.0) 100 μL, 分别加上述各种酶类 1 mg/mL 处理 2 h 后, 测抑菌活性。

2 结果与分析

2.1 酸马奶酒中粪肠球菌的生物学特性

以菌株 H₁₋₁₋₂ 为研究对象, 探讨其生物学特性及抑菌物质产生的动力学变化。研究结果发现: H₁₋₁₋₂ 菌株最适生长温度是 37℃, 在 42℃ 和 30℃ 条件下生长均受到影响, pH 值下降缓慢, OD 值上升缓慢, 抑菌活性减小, 只有在 37℃ 条件下培养, 菌株生长旺盛, 产抑菌物质活性高; H₁₋₁₋₂ 菌株在 37℃ 下培养 4 h 后, pH 值开始下降, 到 13 h 达最低值 4.41; OD 值在 7 h 之内变化不大, 菌株生长十分缓慢, 7 h 以后几乎呈直线上升, 菌株进入对数生长期, 13 h 后不再改变; 抑菌物质的产生是在发酵 8 h 以后, 12 h 达到高峰 (见图 1)。



注: 培养温度 37℃

图 1 H₁₋₁₋₂ 菌株生长特性

Fig. 1 Growth properties of bacteria H₁₋₁₋₂

2.2 抑菌活性物质的提取

2.2.1 发酵液的超滤结果

由表 1 可知, 菌株 H₁₋₁₋₂ 上清液超滤后, 分子量范围在 $M > 50$ ku 浓缩液抑菌活性最强, 因此选取 $M > 50$ ku 的浓缩液提取抑菌物质。

表1 H₁₋₁₋₂发酵液超滤后的抑菌活性

Table 1 Antibacterial ability of culture medium of bacteria H₁₋₁₋₂ after super filtration

超滤后上清液 分子量范围	抑菌圈直径/mm	
	利斯特氏菌	枯草芽胞杆菌
(M > 50 ku)	35	31
(30 ku < M < 50 ku)	—	—
(M < 30 ku)	—	—

注:—无抑菌作用;指示菌悬液浓度为 10⁶ cfu/mL;
药敏片直径:98 mm。

2.2.2 浓缩液的凝胶柱分离结果

将分子量 M > 50 ku 的备用 1:1 溶液,上柱洗脱,收集洗脱液并绘制洗脱曲线,测定各接收管洗脱液抑菌活性,结果见图 2。

由图 2 可看出,分子量 M > 50 ku 的备用 1:1 浓缩溶液经 Sephadex-G100 凝胶柱分离后的洗脱曲线呈现四个洗脱峰,测定四个洗脱峰的洗脱液中的抑菌活性,只有第一洗脱峰(第 19 至 26 管)具有抑菌活性。收集第一洗脱峰洗脱液,经真空冷冻干燥得菌株 H₁₋₁₋₂ 产生的抑菌物质粗制品。

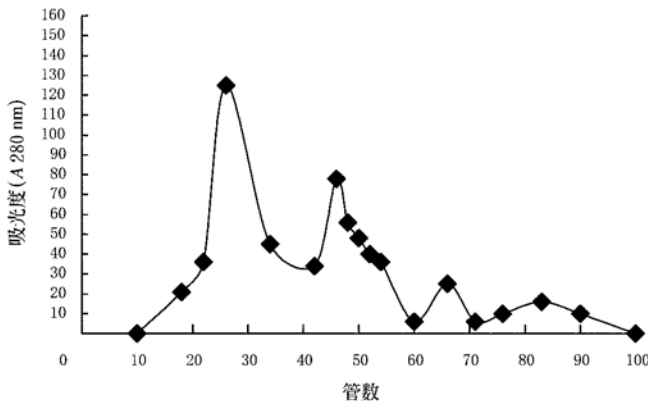


图 2 H₁₋₁₋₂ 浓缩液洗脱曲线

Fig. 2 Column chromatography curve of condensed culture medium of bacteria H₁₋₁₋₂

2.2.3 浓缩液的薄层层析结果

经 TLC 板层析后,结果见图 3。菌株 H₁₋₁₋₂ 的浓缩液在板上呈现四个斑点,这与凝胶柱分离结果(四个洗脱峰)一致,说明菌株 H₁₋₁₋₂ M > 50 ku 的备用 1:1 溶液存在着四个组分,组分 1 的分子量大于组分 2、3、4,已知溶剂前沿移动距离为 12.4 cm,组分 1、2、3、4 的移动距离分别为 1.7、3.2、5.3、6.4 cm,所以组分 1、2、3、4 的 R_f 值分别为 0.137、0.258、0.427、0.516。

菌株 H₁₋₁₋₂ 第一洗脱峰的洗脱液再次层析,层析斑点只有一个,其 R_f 值为 0.138,此结果与菌株 H₁₋₁₋₂ M > 50 ku 浓缩液层析结果中的组分 1 与凝胶柱分离的菌株 H₁₋₁₋₂ M > 50 ku 浓缩液所得第一洗脱峰的洗脱液中所含物质是同一物质。

2.2.4 紫外吸收图谱

取粗制品配成的溶液 3 mL 在 UV-2000 分光光度计 200~

700 nm 范围内进行扫描,菌株 H₁₋₁₋₂ 产生的抑菌活性物质在 287.0 nm 处出现一个吸收峰。这与查得的标准蛋白紫外谱图结果相似,从而可进一步证实菌株 H₁₋₁₋₂ 产生的抑菌活性物质是蛋白类物质。

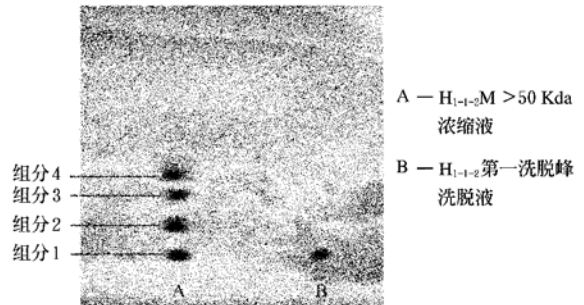


图 3 浓缩液的薄层层析结果

Fig. 3 Result of thin layer chromatography of condensed culture medium of bacteria H₁₋₁₋₂

2.3 粗品的理化特性研究结果

2.3.1 pH 敏感性及其不同 pH 值条件热稳定性结果

菌株 H₁₋₁₋₂ 抑菌物质粗品的 1:1 溶液,调不同 pH 值,测其抑菌活性;再置于不同温度下加热不同时间后测抑菌活性,结果见表 2。菌株 H₁₋₁₋₂ 在 pH 值 1.0~ 10.0 范围内均有活性,pH 4.0、6.0 时抑菌活性较强,抑菌圈直径分别达到 32 mm 和 36 mm。在 pH 值 4.0 时活性物质较耐热,60℃ 加热 30 min 仍有活性,但活性降低;在其他 pH 范围内对热不稳定,70℃ 以上加热就失去活性。

表 2 粗品不同 pH 值条件的热稳定性(抑菌圈直径/mm)

Table 2 Heat stability of antibacterial factor under different pH values (antibacterial diameter/mm)

加热温度 与时间 /℃ · min ⁻¹	pH 值										
	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0	11~12
4/0	25	30	29	32	25	36	30	30	25	16	-
60/5	17	22	25	28	10	20	-	-	-	-	-
60/10	9	17	20	22	-	13	-	-	-	-	-
60/15	-	-	10	17	-	-	-	-	-	-	-
60/20	-	-	-	13	-	-	-	-	-	-	-
60/30	-	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-
70~121 /5~30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注:—无抑菌作用;指示菌悬液浓度为 10⁶ cfu/mL;

药敏片直径:98 mm。

2.3.2 表面活性剂对粗品抑菌活性的影响结果

菌株 H₁₋₁₋₂ 抑菌物质粗品的 1:1 溶液(pH 6.0),加入 1% 表面活性剂,结果见表 3。发现,H₁₋₁₋₂ 粗品中存在 1% SDS, N-Lauryl Sarcosine 和 TritonX-100 时,对利斯特氏菌和枯草芽胞菌无抑制作用。而 Tween20, Tween80 对 H₁₋₁₋₂ 的抑制活性无影响。1% Urea 使得 H₁₋₁₋₂ 丧失抑制 *Bacillus subtilis* 的活性而保持抑制 *Listeria monocytogenes* 活性。

表3 表面活性剂对粗品抑菌活性的影响

Table 3 Effect of surfactants on antibacterial ability of the factor

表面活性剂	H ₁₋₁₋₂ 粗品抑制 <i>Listeria monocytogenes</i> 活性	H ₁₋₁₋₂ 粗品抑制 <i>Bacillus subtilis</i> 活性
SDS	-	-
N-Lauryl Sarcosine	-	-
Tween20	+	+
Tween80	+	+
Tritonx-100	-	-
urea	+	-

注: + : 有抑菌作用; - : 无抑菌作用; 指示菌菌体浓度为 10⁶ cfu/mL; 约敏片直径: 8 mm。

2.3.3 酶对粗品抑菌活性的影响结果

粗品的 1 : 1 溶液经酶处理后, 结果见表 4。粗品经 a-chymotrypsin, Trypsin, a-Amylase, Pepsin, Catalase, 处理后, 几乎完全丧失对利斯特氏菌和枯草芽孢菌的抑制作用。

表4 酶对粗品抑菌活性的影响

Table 4 Effect of enzymes on antibacterial ability of the factor

酶	H ₁₋₁₋₂ 粗品抑制 <i>Listeria monocytogenes</i> 活性	H ₁₋₁₋₂ 粗品抑制 <i>Bacillus subtilis</i> 活性
a-Chymotrypsin	-	-
Trypsin	-	-
a-Amylase	+	-
Catalase	-	-
Pepsin	-	-

注: + : 有抑菌作用; - : 无抑菌作用; 指示菌菌体浓度为 10⁶ cfu/mL; 约敏片直径: 8 mm。

3 结论

1) 菌株 H₁₋₁₋₂(*Enterococcus faecium*) 最适生长温度为

37℃, 发酵 4 h 后 pH 开始下降, 7 h 后菌株进入对数生长期; 发酵 8 h 后抑菌活性迅速增强, 12 h 后达到高峰。

2) 菌株 H₁₋₁₋₂的发酵上清液经超滤、过分离柱、层析等分离提纯, 得到的抑菌活性物质粗品, 分子量大于 50 ku, 且属于蛋白类物质。

3) 菌株 H₁₋₁₋₂抑菌活性物质粗品在 pH 值 1.0~ 10.0 范围内具有抑菌活性; 在 pH 4.0 时 60℃ 加热 30 min 仍具有一定活性, 但在其它 pH 值范围内对热敏感, 70℃ 以上加热完全失去抑菌活性。

4) 菌株 H₁₋₁₋₂的抑菌活性物质粗品对一些表面活性剂有耐受性, 经 Tween20、Tween80、Urea 处理后, 仍具有抑菌活性; 对蛋白酶、过氧化氢酶敏感。

[参考文献]

- [1] 扎木苏. 酸马奶降脂及抗凝作用 50 例临床观察[J]. 民族医药, 1994, 5(2): 87- 88.
- [2] 哈 达. 酸马奶治疗肺结核 56 例临床观察[J]. 中国民族医药杂志, 1999, 36(4): 13- 14.
- [3] Szakaky S. Role of fermented milk products in protection of health [J]. Tejgazdasg, 1999, 59(2): 15- 18.
- [4] 贺银凤, 李少英, 母智深, 等. 酸马奶酒中微生物的分离鉴定及抗菌特性的研究[J]. 农业工程学报, 2002, 18(2): 91- 95.
- [5] 孙 健, 贺银凤, 田建军. 酸马奶酒中有机酸的抑菌作用[J]. 内蒙古农业大学学报, 2003, 24(1) 56- 59.
- [6] 李丽杰, 贺银凤. 内蒙古地区酸马奶酒中酒香酵母菌抗生物物质特性的研究[J]. 中国食品与畜产科学, 2004, 11(1): 9- 13.
- [7] 陈天寿. 微生物培养基的制造与应用[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995: 50- 167.
- [8] 吴 琼. 乳链菌肽效价测定方法的研究[J]. 食品科学, 1999, (6): 56- 59.
- [9] 姚新生, 陈英杰. 有机化合物波谱分析[M]. 北京: 人民教育出版社, 1986: 74- 145.

Extraction and characteristics of antibacterial factor from *Enterococcus faecalis* in koumiss

He Yinfeng, Wang Liyun, Li Shaoying, Wu Jing, Tian Jianjun

(Department of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agriculture University, Huhhot 010018, China)

Abstract: The best culture conditions and antibacterial ability of one strain of *Enterococcus faecalis* (H₁₋₁₋₂), which was isolated from koumiss collected from farms in Inner Mongolia-Xilinguole region, were studied. The antibacterial factor from the culture medium of the bacteria were also extracted and identified. The results indicate that the best temperature is 37℃ for culturing *Enterococcus faecalis*, the pH value begin to decrease in 4 h of incubation, the bacteria entered the phase of log growth in 7 h, the antibacterial factor is found in medium in 8 h and reaches the highest level in 12 h. After analysis with super-filtration, gel column chromatography, thin layer chromatography, Legend of UV absorb, the factor is a more than 50 ku protein-like substance. The factor can maintain its antibacterial ability in the range of pH 1.0 to pH 10.0, it is durable to heat in pH 4.0, 60℃ for 30 min and some surfactants, but it is damaged easily by protease and catalase.

Key words: koumiss; *Enterococcus faecalis*; antibacterial factor; extraction; characteristics