

植物乳杆菌抑菌蛋白的分离鉴定及抑菌特性研究

李小宁¹, 李 军¹, 尹杨燕², 李常挺¹, 马春霞¹, 陶 立¹, 龚 俞³,

钟舒红¹, 白慧丽¹, 彭 昊¹✉, 廖玉英¹✉

(1. 广西壮族自治区兽医研究所, 广西兽医生物技术重点实验室, 南宁 530001; 2. 广西大学动物科学技术学院, 南宁 530004; 3. 贵州省畜禽遗传资源管理站, 贵阳 550001)

摘要:【目的】筛选新型广谱有效的抑菌蛋白, 为全面解析植物乳杆菌抑菌机制和开发新型抗菌制剂奠定基础。【方法】以植物乳杆菌 GX20200417-1 为研究对象, 采用牛津杯法测定其抑菌活性, 以低温离心和超滤法初步分离获得胞外蛋白并测定其抑菌活性, 对胞外蛋白进行不同温度、pH 及蛋白酶处理, 研究抑菌蛋白理化特性, 利用液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)进一步分析鉴定植物乳杆菌代谢产物中的抑菌成分。【结果】植物乳杆菌 GX20200417-1 对沙门氏菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌均具有良好的抑菌作用; 发酵上清液在发酵 24 h 的抑菌能力最强; 胞外蛋白的抑菌能力与发酵上清液相近; 植物乳杆菌抑菌蛋白具有较好的耐热特性, 与对照组相比, 在 20~80 °C 时抑菌活性均无显著变化($P < 0.05$), 在 pH 6.0~8.0 时抑菌活性最佳, 对蛋白酶敏感; 经 LC-MS/MS 鉴定分析, 检测出 5 种可信度较高且与抑菌作用相关的蛋白质, 分别是片球菌素 pediocin PA-1、溶菌素(lysin)、聚酮合酶(polyketide synthase)、辅助蛋白(accessory protein)和 LysM peptidoglycan-binding domain-containing protein, 分子质量分别为 5.348、7.348、8.348、6.348 和 19.662 ku; 蛋白质功能分析结果表明, 片球菌素 pediocin PA-1 与溶菌素主要通过破坏细菌细胞壁与细胞膜, 从而达到抑菌效果。LysM peptidoglycan-binding domain-containing protein 可识别含有 N-乙酰氨基葡萄糖(GlcNAc)残基的肽聚糖, 上调抗菌肽的表达; 辅助蛋白主要参与细菌素的合成, 聚酮合酶主要参与抗生素的合成, 二者通过参与抑菌物质的合成间接发挥抑菌作用。【结论】本研究成功分离并鉴定植物乳杆菌 GX20200417-1 的 5 种抑菌蛋白; 植物乳杆菌 GX20200417-1 可能通过其代谢产物中的多种抑菌蛋白协同发挥抗菌作用。

关键词: 植物乳杆菌; 抑菌蛋白; 超滤法; 液相色谱串联质谱; 抑菌机制

中图分类号: S816.73

文献标识码: A

Doi: 10.16431/j.cnki.1671-7236.2022.08.042

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Isolation, Identification and Antibacterial Property of Antibacterial Proteins from *Lactobacillus plantarum*

LI Xiaoning¹, LI Jun¹, YIN Yangyan², LI Changting¹, MA Chunxia¹, TAO Li¹,
GONG Yu³, ZHONG Shuhong¹, BAI Huili¹, PENG Hao¹✉, LIAO Yuying¹✉

(1. Guangxi Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Guangxi Veterinary Research Institute, Nanning 530001, China; 2. College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, China; 3. Guizhou Livestock and Poultry Genetic Resources Management Station, Guiyang 550001, China)

Abstract: 【Objective】 This study was aimed to screen broader-spectrum and effective antibacterial proteins so as to lay the foundation for analyzing antibacterial mechanism of *Lactobacillus plantarum*

收稿日期: 2022-01-05

基金项目: 广西重点研发计划(AB21238003、AB21220005); 广西基本科研业务费(桂科专项 22-5、21-6、22-6); 国家水禽产业技术体系建设专项(CARS-42); 国家现代农业产业体系广西肉鸡产业创新团队建设专项(nycytxgxcxttd); 南宁市重点研发计划(20202106、20212023); 良庆区重点研发计划(202109); 良庆区重大科技专项(202118); 防城港市重点研发计划(AB21014016); 武鸣区重点研发计划(20210102); 贵州省农业动植物育种项目(黔农育专字[2018]016号)

联系方式: 李小宁, E-mail: 15602160653@163.com. 通信作者彭昊, E-mail: hpeng2006@163.com; 廖玉英, E-mail: 315951610@qq.com

thoroughly and exploring new antibacterial agents. 【Method】 *Lactobacillus plantarum* GX20200417-1 was chosen to be the object of this study. Oxford cup method was selected to determine the antimicrobial activity. Proteins were extracted from *Lactobacillus plantarum* GX20200417-1 by the means of centrifugation at low temperature and ultrafiltration and their antibacterial activities were measured. The extracellular proteins were treated with different temperatures, pH and protease to study the physicochemical properties of antibacterial proteins. Antimicrobial components from *Lactobacillus plantarum* metabolites were further analyzed by LC-MS/MS. 【Result】 *Lactobacillus plantarum* GX20200417-1 had strong antibacterial effect on *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The antimicrobial activity of fermentation was tested at different time which was the strongest at 24 h with the antimicrobial diameter. The proteins extracted from fermentation had the similar antimicrobial activity with the fermentation. *Lactobacillus plantarum* antibacterial protein exhibited a high stability towards the temperatures. Compared with control group, there was no significant change in antibacterial activity at 20-80 °C ($P < 0.05$), the best antibacterial activity at pH 6.0-8.0 and sensitive to protease. By GC-MS/MS analysis, five kinds of proteins were obtained which were not only corrected with bacteriostasis, but also had much more credibility. They were pediocin PA-1, lysin, polyketide synthase, accessory protein and LysM peptidoglycan-binding domain-containing protein and the molecular weight were 5.348, 7.348, 8.348, 6.348 and 19.662 ku respectively. Pediocin PA-1 and lysin achieve bacteriostatic effect mainly by destroying bacterial cell wall and cell membrane. LysM peptidoglycan-binding domain-containing protein could recognize peptidoglycans including N-acetylglucosamine (GlcNAc) residue and upregulate the expression of antibacterial peptides. Accessory protein participated in the synthesis of bacteriocin, polyketide synthase participated in the synthesis of antibiotics, both of which played an indirect bacteriostatic role by participating in the synthesis of antimicrobial substances. 【Conclusion】 In this study, five antimicrobial proteins of *Lactobacillus plantarum* GX20200417-1 were successfully identified, which laid a foundation for protein separation and purification. It speculated that *Lactobacillus plantarum* GX20200417-1 could play an antibacterial role by the coordination of antibacterial proteins in metabolites.

Key words: *Lactobacillus plantarum*; antibacterial proteins; ultrafiltration; LC-MS/MS; antibacterial mechanism

植物乳杆菌是一种多功能乳酸菌,作为乳酸菌的代表,在自然界分布广泛,因其具有良好的抗菌性能而成为无抗养殖领域的研究重点,是一类具有开发前景的新型绿色抗菌制剂^[1]。

现有研究表明,植物乳杆菌的抗菌特性主要依赖于其产生的代谢产物,分离到的抑菌物质主要包括有机酸^[2-3]、脂肪酸^[4]、抑菌蛋白或小分子抗菌肽^[5-7]。抑菌蛋白或小分子抗菌肽是植物乳杆菌产生的重要代谢产物,研究证实植物乳杆菌的发酵上清经蛋白酶处理后,其原本的抑菌能力将会大打折扣^[8]。目前针对植物乳杆菌抑菌蛋白的研究主要集中在对其进行分离、鉴定及其抑菌机理的探讨。詹晖等^[9]对小鼠进行沙门氏菌攻毒,发现植物乳杆菌

细菌素对沙门氏菌在增殖过程中的细胞膜有破坏作用。韩金志等^[10]从植物乳杆菌中分离出一种新型细菌素,经抑菌试验证实其对大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、金黄色葡萄等食源性致病菌具有不同程度的抑菌活性。细菌素可破坏病原菌的细胞膜或细胞壁,使其内容物外泄而达到抑菌作用;也可以菌体的核酸为作用靶点,阻碍病原菌的增殖分裂从而发挥抗菌作用。Miao等^[11]研究发现干酪乳杆菌的细菌素 F1 可通过作用于金黄色葡萄球菌的 DNA 和破坏细胞膜两种方式抑制金黄色葡萄球菌的增殖。Khalaf等^[12]从乳酸菌中分离出的细菌素 PLNC8 $\alpha\beta$ 可通过破坏病原菌的生物膜从而发挥抗菌作用。

与其他非蛋白类抑菌物质相比,抑菌蛋白或小

分子抗菌肽抑菌活性强、抑菌谱广且抑菌蛋白编码基因易克隆表达,可为实现工业化生产发挥更大的应用价值,筛选新型广谱而有效的抑菌蛋白或小分子抗菌肽可为开发新型替抗产品提供新思路新选择。目前针对植物乳杆菌的抑菌效果研究多集中在有机酸的协同作用,而对于抗菌肽或抑菌蛋白的协同作用却鲜有报道。本研究通过低温离心和超滤法提取植物乳杆菌代谢产物中的胞外蛋白,采用液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)法进一步分析鉴定抑菌蛋白成分,并对抑菌机制进行解析,以期为全面解析植物乳杆菌的抑菌机制和进一步研发替代抗生素的新一代绿色安全抑菌蛋白制剂提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与培养基 试验用菌种植物乳杆菌 GX20200417-1,分离自广西市售发酵酸菜,由广西壮族自治区兽医研究所细菌室提供;指示菌大肠杆菌 ATCC 25922、金黄色葡萄球菌 ATCC 6583、沙门氏菌 SM022 均由广西壮族自治区兽医研究所收藏保存。MRS 肉汤培养基购自北京陆桥技术股份有限公司。

1.1.2 主要试剂及仪器 RIPA 裂解液(Solarbio 公司);乙腈(ACN)、甲酸(FA)、碳酸氢铵、二硫苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺(IAA)(Sigma-Aldrich 公司);考马斯亮蓝染色剂(碧云天生物技术有限公司)。超净工作台(Thermo Scientific 公司);低温高速离心机(Eppendorf 公司);Western 电泳仪(Bio-Rad 公司);毛细管高效液相色谱仪和电喷雾-组合型离子阱 Orbitrap 质谱仪(Thermo Fisher Scientific 公司)。

1.2 方法

1.2.1 菌种活化及生长性能测定 将 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存的菌种溶解,灼烧接种环至冷却后,蘸取少量菌液,轻轻划线接种于指定的平板培养基, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后,挑取单个菌落,接种于 MRS 液体培养基, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 恒温摇床震荡培养,分别在 0、4、8、12、24、36 和 48 h 吸取发酵液,测定其 $D_{600\text{ nm}}$ 值。

1.2.2 植物乳杆菌发酵上清液的制备 将活化传代后的植物乳杆菌接种于 15 mL MRS 液体培养基, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 恒温摇床震荡培养 24 h 后, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min,取上清经 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 无菌滤膜过滤,并收集滤液。

1.2.3 牛津杯法检测抑菌活性 分别吸取 $200\text{ }\mu\text{L}$ 1×10^8 CFU/mL 的指示菌悬液并均匀涂布于固体培养板上,轻轻放置牛津杯,在杯中加入

$200\text{ }\mu\text{L}$ 发酵液/发酵上清液/胞外蛋白, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 24 h,每种处理做 3 个平行,测定抑菌圈直径。

1.2.4 不同培养时间植物乳杆菌发酵上清液对大肠杆菌抑菌活性的测定 将活化的植物乳杆菌接种于 15 mL MRS 液体培养基, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 恒温摇床震荡培养,分别在培养 0、4、8、12、24、36 和 48 h 时吸取 $200\text{ }\mu\text{L}$ 发酵液,按照 1.2.2 的方法收集发酵上清液,按照 1.2.3 的方法测定其对于大肠杆菌的抑菌活性。

1.2.5 胞外蛋白的制备 将 1.2.2 收集到的发酵上清液加入到 3 ku 超滤膜的 15 mL 超滤管中, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、6 500 r/min 离心 40 min,收集浓缩液,并将浓缩液稀释于 MRS 培养基中,使其蛋白溶液总量与初始发酵液体积一致。

1.2.6 SDS-PAGE 分离胞外蛋白 取适量胞外蛋白样品,与 Loading Buffer($5\times$)混合,将样品和 Marker 依次加入 12% 分离凝胶的孔中,100 V 运行 10 min。然后 120 V 运行 60 min,剥离胶放入考马斯亮蓝染色液中,室温染色 1 h。加入脱色液,置于 80 r/min 脱色摇床上,每 20 min 更换一次脱色液至完全脱净。完成脱色后,用双蒸水浸泡,参照蛋白质质量标准将所提纯的蛋白从凝胶中分离出来。

1.2.7 抑菌蛋白理化特性研究

1.2.7.1 温度对抑菌蛋白抑菌活性的影响 将抑菌蛋白分别在 20、40、60、80、100 和 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下水浴 30 min,以室温的抑菌蛋白液为对照组,每组 3 个重复,采用牛津杯法测定不同处理后的样品对大肠杆菌抑菌活性的影响。

1.2.7.2 pH 对抑菌蛋白抑菌活性的影响 将抑菌蛋白分别用 Tris-HCl 和 MES-NaOH 缓冲液调节 pH 至 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、11.0 和 12.0,静置 2 h,以未处理的抑菌蛋白液为对照组,每组 3 个重复,采用牛津杯法测定不同处理后的样品对大肠杆菌抑菌活性的影响。

无菌蒸馏水分别用 Tris-HCl 和 MES-NaOH 缓冲液调节 pH 至 2.0、3.0、4.0、10.0、11.0 和 12.0,采用牛津杯法测定不同 pH 缓冲液对大肠杆菌抑菌活性的影响,以排除过酸或过碱条件本身对抑菌效果的影响。

1.2.7.3 蛋白酶对抑菌蛋白抑菌活性的影响 分别用胰蛋白酶与蛋白酶 K 处理抑菌蛋白, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min,以未处理的抑菌蛋白液为对照组,每组 3 个重复,采用牛津杯法测定不同处理后的样品对大肠杆菌抑菌活性的影响。

1.2.8 胰蛋白酶酶解 ①胶粒脱色:将目的条带

切成胶粒,分装进 1.5 mL EP 管中,使用 50% ACN-50% 50 mmol/L NH_4HCO_3 溶液脱色。②胶粒脱水:加入 100% ACN 100 μL ,放置 30 min,待胶粒呈白色团状,弃去 ACN,室温放置干燥。③还原烷基化:加入适量 10 mmol/L DTT 于 56 $^\circ\text{C}$ 水浴中还原 1 h,吸出弃去。而后加入适量 55 mmol/L IAA,暗处室温反应 1 h,吸出弃去,按照①②步骤脱色脱水。④酶切:取 10 μL 5 ng/ μL 酶于 EP 管中,4 $^\circ\text{C}$ 冰箱孵育 40 min,取出后每管补加 5~10 μL 50 mmol/L NH_4HCO_3 溶液,密封于 37 $^\circ\text{C}$ 水浴中酶切 16 h。⑤肽段提取:加提取液(5% TFA-50% ACN-45%水)100 μL /管,37 $^\circ\text{C}$ 水浴 1 h,超声 5 min,离心 5 min,重复 1 次,真空离心干燥。

1.2.9 LC-MS/MS 检测 经胰蛋白酶酶解后的肽段在质谱仪中离子化后,通过检测器分析,可得到各肽段的质荷比(m/z),即一级质谱图;部分肽段再次被破碎和分析,产生二级质谱图,采用质谱检索软件选择 Uniprot 蛋白数据库,对获得的全部质谱数据进行分析。色谱条件:流动相 A:0.1% 甲酸,2% ACN;流动相 B:0.1% 甲酸,80% ACN;流速:600 nL/min;每个组分分析时间:66 min。

1.3 数据统计分析

试验数据采用 SPSS 26.0 软件进行单因素方差分析,采用 LSD 法对抑菌活性进行多重比较,采用 Duncan's 法对理化特性各组数据进行多重比较,结果以平均值 \pm 标准差表示, $P<0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 植物乳杆菌 GX20200417-1 生长曲线

由图 1 可知,植物乳杆菌 GX20200417-1 在 4 h 后 $D_{600\text{ nm}}$ 值迅速上升,进入对数期,24 h 后趋于稳定,进入平台期。

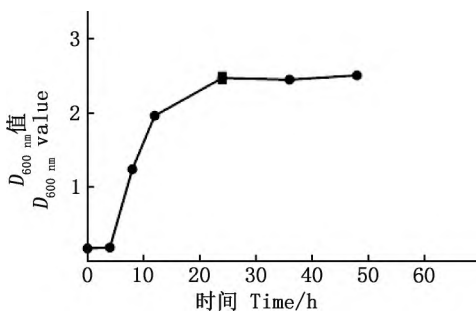


图 1 植物乳杆菌 GX20200417-1 生长曲线

Fig 1 Growth curve of *Lactobacillus plantarum* GX20200417-1

2.2 植物乳杆菌抑菌活性测定

植物乳杆菌 GX20200417-1 对供试指示菌的抑

菌活性见图 2。由图 2 可知,植物乳杆菌 GX20200417-1 对沙门氏菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌均具有较好的抑菌效果,其中对大肠杆菌的抑菌圈直径大于沙门氏菌和金黄色葡萄球菌,抑菌圈直径为 13.33 mm,说明植物乳杆菌 GX20200417-1 对大肠杆菌的抑菌效果优于沙门氏菌和金黄色葡萄球菌。

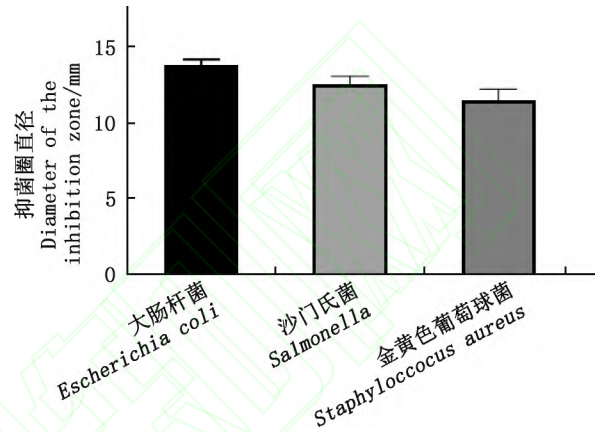


图 2 植物乳杆菌 GX20200417-1 体外抑菌活性测定

Fig 2 Determination of antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* GX20200417-1 in vitro

2.3 植物乳杆菌发酵上清液对大肠杆菌的抑制活性测定

由图 3 可知,发酵液及发酵上清液的抑菌曲线基本相似且一致;在 0~4 h 内没有抑菌能力,4 h 后抑菌能力逐渐增强,并在 24 h 时达到最大,此时发酵液及发酵上清液产生的抑菌圈直径分别为 13.33 和 12.21 mm,随着培养时间的延长,抑菌能力并无显著变化。MRS 培养基产生的抑菌圈直径为 0 mm,对比图 1 与图 3 可发现,在 4~24 h 范围内,抑菌圈直径与 $D_{600\text{ nm}}$ 值增长趋势一致,且在 24 时达到稳定。

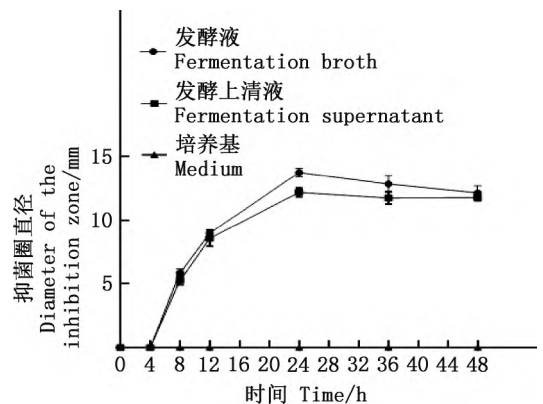


图 3 植物乳杆菌 GX20200417-1 发酵液及发酵上清液抑菌曲线

Fig 3 Inhibitory curves of *Lactobacillus plantarum* GX20200417-1 fermentation broth and fermentation supernatant

2.4 胞外蛋白的制备及抑菌活性测定

将提取的胞外蛋白按比例稀释于等体积发酵液的 MRS 培养基中,以保证单位体积的胞外蛋白全部来自于等体积下的菌液或等体积的发酵上清液。由图 4 可知,稀释后的胞外蛋白与等体积的发酵液(1×10^8 CFU/mL)及发酵上清液可产生相近直径的抑菌圈,说明植物乳杆菌 GX20200417-1 胞外蛋白对于大肠杆菌亦具有较好的抑菌活性,进一步说明植物乳杆菌代谢产物中的抑菌物质主要为抑菌蛋白成分,通过 SDS-PAGE 对提取的胞外蛋白进行分离,分离到胞外蛋白分子质量在 5~150 ku 之间(图 5)。

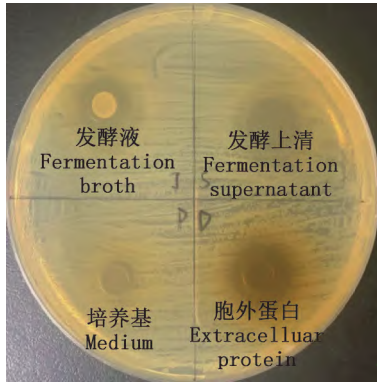
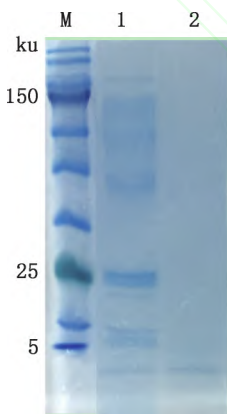


图 4 植物乳杆菌 GX20200417-1 发酵液/发酵上清/胞外蛋白/培养基对大肠杆菌的抑菌效果

Fig 4 Inhibitory effect of *Lactobacillus plantarum* GX20200417-1 fermentation broth, fermentation supernatant, extracellular protein and medium on *Escherichia coli*



M,蛋白质分子质量标准;1,胞外蛋白;2,培养基
M,Protein Marker;1,Extracellular protein;2,Medium

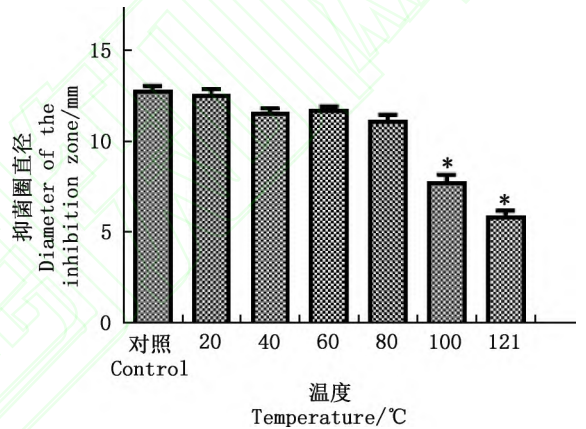
图 5 胞外蛋白 SDS-PAGE

Fig 5 SDS-PAGE of extracellular protein

2.5 抑菌蛋白理化特性

与对照组相比,胞外蛋白经 20、40、60 和 80 °C 水浴处理后,抑菌活性均无显著变化($P > 0.05$),但

其在 100 和 121 °C 处理后,抑菌活性明显下降,与对照组及其他温度处理组差异显著($P < 0.05$)(图 6)。不同 pH 缓冲液处理抑菌蛋白后,抑菌蛋白在 pH 为 6.0~8.0 的环境下,抑菌活性较好,与对照组相比,在过酸或过碱条件下抑菌活性均受到抑制($P < 0.05$)(图 7)。为验证 pH 缓冲液本身是否对大肠杆菌产生抑菌影响,在 pH 分别为 2.0~4.0 和 10.0~12.0 的条件下对大肠杆菌做抑菌处理,结果显示,pH 为 2.0~4.0 和 10.0~12.0 的无菌缓冲液均未对大肠杆菌产生抑菌影响(图 8)。与对照组相比,用蛋白酶 K 及胰蛋白酶处理抑菌蛋白后,抑菌蛋白抑菌活性显著下降($P < 0.05$)(图 9)。



与对照组相比,* ,差异显著($P < 0.05$);无* ,差异不显著($P > 0.05$)。下同

Compared with control group,* , Significant difference ($P < 0.05$);No* ,No significant difference ($P > 0.05$). The same as below

图 6 温度对抑菌蛋白抑菌活性的影响

Fig 6 Effect of temperature on antibacterial activity of antibacterial protein

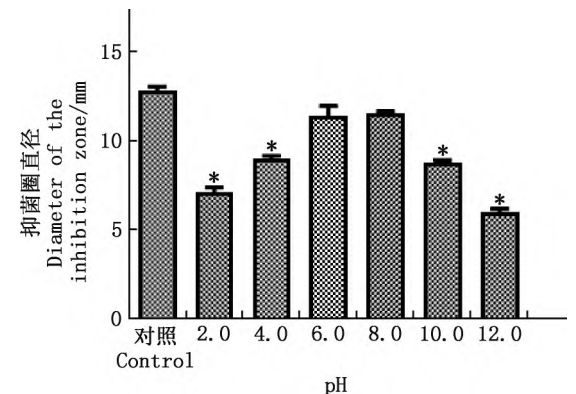


图 7 pH 对抑菌蛋白抑菌活性的影响

Fig 7 Effect of pH on antibacterial activity of antibacterial protein

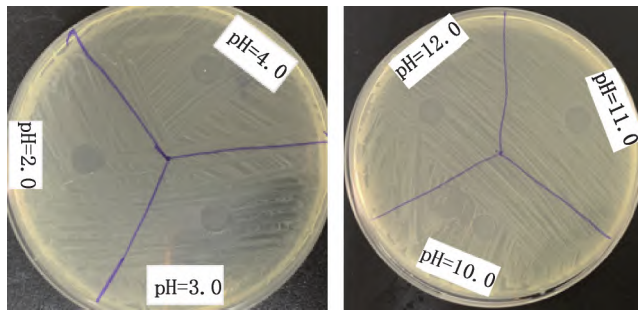


图 8 不同 pH 缓冲液对大肠杆菌抑菌活性的影响

Fig 8 Antibacterial activity of different pH buffer on *Escherichia coli*

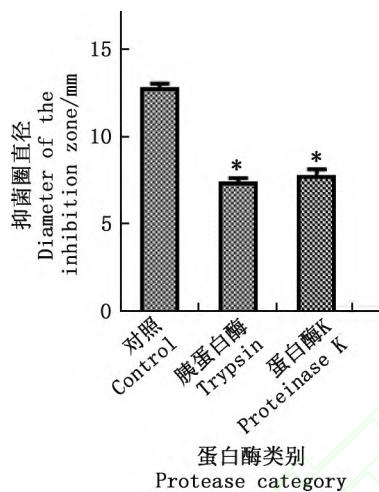


图 9 抑菌蛋白对蛋白酶的敏感性

Fig 9 Sensitivity of antibacterial protein to protease

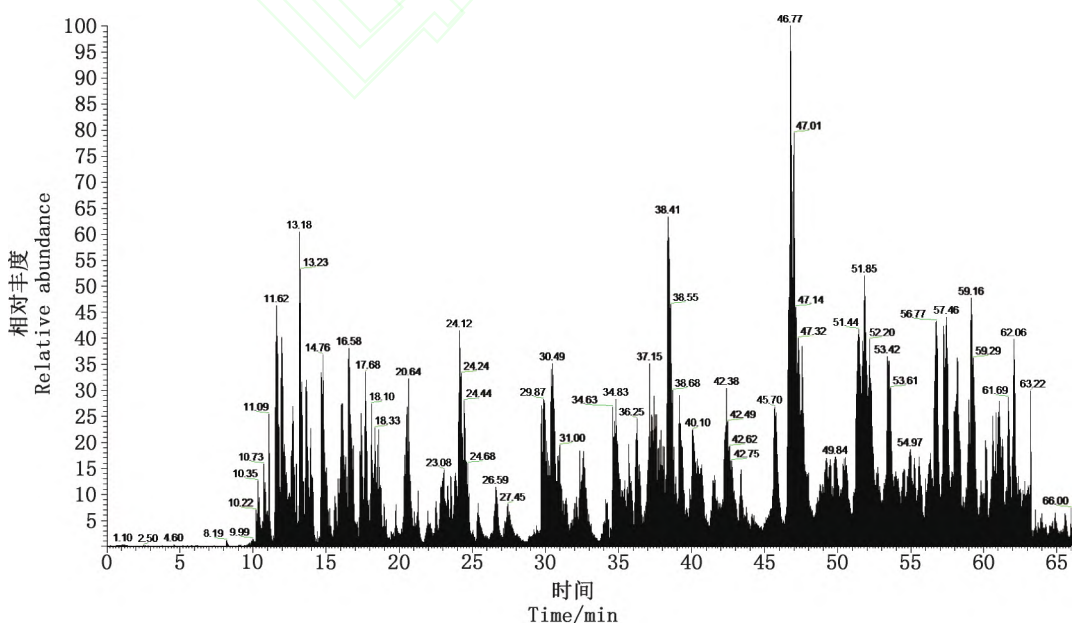


图 10 植物乳杆菌 GX20200417-1 胞外蛋白总离子图谱

Fig 10 Total ion map of extracellular protein of *Lactobacillus plantarum* GX20200417-1

2.6 抑菌蛋白的抑菌特性研究

为进一步研究抑菌蛋白的成分,用液相色谱串联质谱分析仪进行分析,得到胞外蛋白总离子图谱(图 10),质谱采集的数据,经过软件 MaxQuant (1.6.2.10)数据库检索,共检测出 5 种可信度较高且与抑菌作用相关的蛋白质,依次为片球菌素 pediocin PA-1、辅助蛋白、溶菌素、聚酮合酶和 LysM peptidoglycan-binding domain-containing protein(表 1)。Uniport 蛋白数据库功能预测显示:pediocin PA-1 为广谱性的细菌素,溶菌素具有溶菌酶活性,二者主要通过破坏细菌细胞壁与细胞膜,从而达到抑菌效果。辅助蛋白主要参与细菌素的合成过程,聚酮合酶参与抗生素的合成。LysM peptidoglycan-binding domain-containing protein 在蛋白鉴定结果显示可信度最高,但在检索数据库中未显示相关功能。

表 1 植物乳杆菌 GX20200417-1 抑菌蛋白分析

Table 1 Analysis of antibacterial protein of *Lactobacillus plantarum* GX20200417-1

蛋白 Proteins	蛋白 ID Protein ID	肽段 Peptide	分子质量 Molecular weight/ku	序列长度 Sequence length/bp
片球菌素 Pediocin PA-1	A0A6P1PE88	1	5.348	51
辅助蛋白 Accessory protein	Q93FV5	9	6.348	174
溶菌素 Lysin	A0A0R2GA25	4	7.348	434
聚酮合酶 Polyketide synthase	A0A7G5YP34	1	8.348	1745
LysM peptidoglycan-binding domain-containing protein	A0A7G5N5E7	10	19.662	187

3 讨论

植物乳杆菌的主要益生特性之一是其广谱的抑菌性,抑菌特性主要依赖于其产生的复杂代谢产物,包括有机酸、脂肪酸、抑菌蛋白或小分子抗菌肽等。国内外学者对抑菌蛋白的分离纯化做了相关研究,分离纯化方法主要有层析法、蒸发浓缩法、有机溶剂法、超滤法等^[13]。本研究采用低温离心和超滤法分离植物乳杆菌代谢产物中的抑菌蛋白,并通过抑菌活性测定发现抑菌蛋白对大肠杆菌具有良好的抑菌效果,徐栋等^[14]从植物乳杆菌中分离出的细菌素 LZ222,以及翟佳琳等^[15]分离出的抑菌蛋白对大肠杆菌同样具有抑菌活性,与之不同的是 Todorov 等^[16]分离出的细菌素 ST26MS 和 ST28MS 对大肠杆菌并无抑菌效果。本研究通过温度、pH、酶处理等方法研究植物乳杆菌产生的抑菌蛋白的理化特性,发现抑菌蛋白具有较好的热稳定性,经 121 °C 处理后抑菌活性并未完全丧失;抑菌蛋白经不同 pH 缓冲液处理后均能保持抑菌活性,且在 pH 为 6.0~8.0 时抑菌活性较强,本研究利用极酸极碱的无菌缓冲液对大肠杆菌做抑菌处理,证明缓冲液并未对大肠杆菌产生抑菌影响,这与在酸性条件下抑菌蛋白依然保持较高抑菌活性的结果相违背^[17],与在碱性环境下抑菌活性减弱或丧失的结果保持一致^[18-19],说明过酸过碱环境可能使抑菌蛋白的构象发生改变,对其活性产生影响。抑菌蛋白经胰蛋白酶、蛋白酶 K 处理后抑菌活性明显减弱,可能是抑菌蛋白发生部分降解,这一结果与徐志娇等^[20]分离出的抑菌蛋白及 Seval 等^[21]分离出的 KT11 的抑菌活性相似。

为进一步研究植物乳杆菌产生的抑菌蛋白的抑菌特性,通过 LC-MS/MS 分析鉴定出 5 种可信度较

高且与抑菌作用相关的蛋白质,依次是片球菌素 pediocin PA-1、辅助蛋白、溶菌素、聚酮合酶和 LysM peptidoglycan-binding domain-containing protein。

pediocin PA-1 是由 51 个氨基酸组成的细菌素,属于植物乳杆菌产生的 Class II a 型细菌素,其杀菌机制主要是在细胞膜上形成孔洞,使细胞内离子外泄,引起质子驱动势的耗散,最终引发病原菌死亡^[22]。Alvarez 等^[23]证实细菌素以病原体的细胞膜为攻击靶点,形成孔洞,导致内容物外泄,从而对大肠杆菌发挥抑菌作用。赵瑞香等^[24]发现细菌素作用大肠杆菌后细胞膜通透性增大,胞内 K⁺ 和 ATP 大量外泄,细胞物质及能量代谢失衡,最终引发大肠杆菌死亡。已证实化学合成的 pediocin PA-1 可替代天然细菌素完成其抗菌功能。辅助蛋白是由 174 个氨基酸形成的小分子蛋白,主要功能是参与细菌素的生物合成,辅助蛋白具有高度的同源性,推测其具有辅助细菌素转运的功能。

Lysin 是由 434 个氨基酸形成的蛋白质,具有溶菌酶活性,通过水解细菌细胞壁的肽聚糖发挥其抗菌作用,杀菌活性高且耐药性强,被认为是替抗产品的潜在候选蛋白, Li 等^[25]发现高度嵌和的 lysin 对金黄色葡萄球菌在体内外均发挥抑菌活性。Chen 等^[26]报道了一种独特的 lysin 嵌合蛋白,该嵌合蛋白对多药耐药鲍曼不动杆菌的抑菌活性提高十万倍左右。有关植物乳杆菌 lysin 的研究罕见报道,从植物乳杆菌 GX20200417-1 鉴定出的 lysin 可作为分离纯化的重要方向。

聚酮合酶广泛存在于植物、细菌和真菌中,是一类与次级代谢有着密切关系的酶类,催化合成结构多样的聚酮化合物,具有良好的抗菌作用^[27]。根据 Uniport 蛋白数据库分析,植物乳杆菌代谢产物中

的聚酮合酶能催化抗生素的生物合成,其对植物乳杆菌的抑菌效果发挥间接作用。

LysM peptidoglycan-binding domain-containing protein 是由 187 个氨基酸形成的小分子蛋白,质谱结果经 Uniprot 数据库比对,蛋白可信度最高。LysM 结构域存在于许多细菌的肽聚糖水解酶中,主要作用机制是识别含有 N-乙酰氨基葡萄糖 (GlcNAc) 残基的肽聚糖,已有研究者在植物乳杆菌中鉴定出一种与免疫相关的葡聚糖水解酶即 N-乙酰氨基葡萄糖苷酶 (Acm2)^[28],葡聚糖水解酶 C 端含有 3 个重复的 LysM 结构域^[29],研究证明 LysM 结构域通过与肽聚糖的结合识别病原菌,并通过某些未知的途径调控抗菌肽的表达,从而起到有效的抑菌作用^[30]。

以上仅是分析鉴定出 5 种可信度较高的抑菌蛋白,并未对抑菌蛋白进一步分离得到单一物质,若对单一物质进行抑菌机理的深入研究,可为替抗产品的开发提供全新思路。

4 结 论

植物乳杆菌 GX20200417-1 抑菌谱广,能有效抑制多种病原菌的增殖。本研究采用超滤法获得其抑菌蛋白混合物,抑菌活性强,具有较好的耐热、耐酸碱性,在 pH 6.0~8.0 时抑菌活性最佳,对蛋白酶敏感。利用 LC-MS/MS 分析鉴定出 5 种可信度较高且与抑菌作用相关的蛋白质,蛋白功能分析显示,这些抑菌蛋白可通过破坏细菌细胞膜及细胞壁直接或间接发挥抑菌作用。本研究对抑菌蛋白的分离及抑菌机制的解析可为新型抗菌制剂的开发提供参考。

参考文献 (References):

- [1] 王利杰,余晓斌,方银兵.可抑制致病菌的益生菌筛选及抑菌物质的初步确定[J].生物技术通报,2017,33(11):123-129.
WANG L J, YU X B, FANG Y B. Screening of probiotics for inhibiting pathogens and preliminary determination of antimicrobial substances[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2017, 33 (11): 123-129. (in Chinese)
- [2] LI X, NING Y, LIU D, et al. Metabolic mechanism of phenyllactic acid naturally occurring in Chinese pickles[J]. *Food Chemistry*, 2015, 186: 265-270.
- [3] 王志新,韩烁培,王雨,等.植物乳杆菌的筛选、鉴定及其抑菌物质研究[J].食品工业科技,2019,40(9):133-139.
WANG Z X, HAN S P, WANG Y, et al. Screening and identification of *Lactobacillus plantarum* and studies on its antibacterial substances[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(9): 133-139. (in Chinese)
- [4] 陆春波,毛银,李国辉,等.植物乳杆菌 DY6 主要抑菌代谢物的分析和鉴定[J].微生物学通报,2019,46(9):2258-2271.
LU C B, MAO Y, LI G H, et al. Analysis and identification of main antibacterial metabolites secreted by *Lactobacillus plantarum* DY6[J]. *Microbiology China*, 2019, 46 (9): 2258-2271. (in Chinese)
- [5] MILIONI C, MARTNEZ B, DEGL'INNOCENTI S, et al. A novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LpU4 as a valuable candidate for biopreservation in artisanal raw milk cheese[J]. *Dairy Science & Technology*, 2015, 95(4): 479-494.
- [6] PEI J J, JIANG L, DAI H P, et al. Application of nisin—The well-known lactic acid bacteria bacteriocin—against spoilage bacteria in tangerine wine[J]. *Czech Journal of Food Sciences*, 2016, 34(6): 488-494.
- [7] HU Y X, LIU X L, SHAN C J, et al. Novel bacteriocin produced by *Lactobacillus alimentarius* FM-MM4 from a traditional Chinese fermented meat Nanx Wudl; Purification, identification and antimicrobial characteristics[J]. *Food Control*, 2017, 77: 290-297.
- [8] 曹海鹏,徐兴娜,文小飞.一株强抑菌活性植物乳杆菌的分离及益生性能研究[J].中国酿造,2021,40(6):141-146.
CAO H P, XU X N, WEN X F. Isolation and probiotic property of a *Lactobacillus plantarum* strain with strong antimicrobial activity[J]. *China Brewing*, 2021, 40(6): 141-146. (in Chinese)
- [9] 詹晖,田林林,钟常城,等.植物乳杆菌 WLPL01 艾草发酵液干预鼠伤寒沙门氏菌感染小鼠的作用[J].南昌大学学报,2019,43(4):351-358.
ZHAN H, TIAN L L, ZHONG C C, et al. Effects of *Artemisia argyi* fermentation liquid by *Lactobacillus*

- plantarum* WLPL01 on infection of *Salmonella* Typhimurium in mice[J]. *Journal of Nanchang University*, 2019, 43(4): 351-358. (in Chinese)
- [10] 韩金志, 姚思羽, 沈 昊, 等. 植物乳杆菌 FZU122 产细菌素的分离鉴定及其抑菌活性[J]. *福州大学学报*, 2021, 49(1): 128-134.
- HAN J Z, YAO S Y, SHEN H, et al. Purification, molecular characterization of a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* FZU122 and its antibacterial activity[J]. *Journal of Fuzhou University*, 2021, 49(1): 128-134. (in Chinese)
- [11] MIAO J, ZHOU J, LIU G, et al. Membrane disruption and DNA binding of *Staphylococcus aureus* cell induced by a novel anti-microbial peptide produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* FX-6 [J]. *Food Control*, 2016, 59: 609-613.
- [12] KHALAF H, NAKKA S S, SANDEN C, et al. Antibacterial effects of *Lactobacillus* and bacteriocin PLNC8 alphabeta on the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* [J]. *BMC Microbiology*, 2016, 16(1): 188-198.
- [13] 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. (in Chinese)
- [14] 徐 栋, 王晓琪, 王月姣, 等. 植物乳杆菌 LZ222 细菌素的分离纯化及其特性[J]. *中国食品学报*, 2018, 18(12): 158-162.
- XU D, WANG X Q, WANG Y J, et al. Characterization and purification of a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LZ222[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2018, 18(12): 158-162. (in Chinese)
- [15] 翟佳琳, 赵景娜, 王丹丹, 等. 具有抑菌活性植物乳杆菌的筛选及抑菌物质特性的研究[J/OL]. *食品与发酵工业*, 2022, 网络首发.
- ZHAI J L, ZHAO J N, WANG D D, et al. Screening of *Lactiplantibacillus plantarum* with bacteriostatic activity and study on properties of bacteriostatic substances[J/OL]. *Food and Fermentation Industries*, 2022, Epub ahead of print. (in Chinese)
- [16] TODOROV S, DICKS L. *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2005, 36(2): 318-326.
- [17] 姜 晶, 敖日格乐, 王纯洁, 等. 酸马奶提取植物乳杆菌 DSM20174 细菌素的理化特性研究[J]. *中国畜牧兽医*, 2016, 43(2): 444-449.
- JIANG J, AO R G L, WANG C J, et al. Study on physicochemical properties of *Lactobacillus plantarum* DSM20174 bacteriocin from koumiss[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2016, 43(2): 444-449. (in Chinese)
- [18] HELLAL A, AMROUCHE L, FERHAT Z, et al. Characterization of bacteriocin from *Lactococcus* isolated from traditional Algerian dairy products[J]. *Annals of Microbiology*, 2012, 62(1): 177-185.
- [19] DEY B C, RAI N, DAS S, et al. Partial purification, characterization and mode of action of bacteriocins produced by three strains of *Pediococcus* sp [J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2019, 56(11): 2594-2604.
- [20] 徐志娇, 韩晓江, 宋子涵, 等. 一株植物乳杆菌对脂环酸芽孢杆菌的抑菌活性[J]. *西北农林科技大学学报*, 2019, 47(6): 124-131.
- XU Z J, HAN X J, SONG Z H, et al. Antibacterial activity of a *Lactobacillus plantarum* strain against *Alicyclobacillus acidoterrestris*[J]. *Journal of Northwest A&F University*, 2019, 47(6): 124-131. (in Chinese)
- [21] SEVAL A H, BUKET K. Antimicrobial activity of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* KT11 against some pathogens and antibiotic resistant bacteria[J]. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 2018, 38(5): 1064-1079.
- [22] SHI X Z, FENG X W, SUN J J, et al. Involvement of a LysM and putative peptidoglycan-binding domain-containing protein in the antibacterial immune response of kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus* [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2016, 54: 489-498.
- [23] ALVAREZ P, MONTALB N M, MU D, et al. Bacteriocins of lactic acid bacteria: Extending the family[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(7): 2939-2951.
- [24] 赵瑞香, 段改丽, 杨天佑, 等. 嗜酸乳杆菌细菌素 Lactobacillin XH2 抑制大肠杆菌作用机理的探讨[J].

- 食品科学,2015,36(3):75-79.
- ZHAO R X, DUAN G L, YANG T Y, et al. Antibacterial mechanism of Lactobacillin XH2 from *Lactobacillus acidophilus* on *Escherichia coli* [J]. *Food Science*,2015,36(3):75-79. (in Chinese)
- [25] LI X H, WANG S J, NYARUABA R, et al. A highly active chimeric lysin with a calcium-enhanced bactericidal activity against *Staphylococcus aureus* *in vitro* and *in vivo* [J]. *Antibiotics (Basel)*, 2021, 10(4):461.
- [26] CHEN X, LIU M, ZHANG P F, et al. Membrane-permeable antibacterial enzyme against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. *ACS Infectious Diseases*,2021,7(8):2192-2204.
- [27] SATOSHI Y, JAY D K, LEONARD K. Insights into polyketide biosynthesis gained from repurposing antibiotic-producing polyketide synthases to produce fuels and chemicals[J]. *The Journal of Antibiotics*, 2016,69(7):494-499.
- [28] THOMAS R, ELVIS B, PASCAL C, et al. Identification of key peptidoglycan hydrolases for morphogenesis, autolysis, and peptidoglycan composition of *Lactobacillus plantarum* WCFS1[J]. *Microbial Cell Factories*, 2012,11:137.
- [29] GANESH R R, VISWESWARAN M, KEES L, et al. Exploiting the peptidoglycan-binding motif, LysM, for medical and industrial applications[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*,2014,98:4331-4345.
- [30] SHI X Z, ZHOU J, LAN J F, et al. A Lysin motif (LysM)-containing protein functions in antibacterial responses of red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2013,40(3-4):311-319.

(责任编辑 董晓云)