鼠李糖乳杆菌细菌素 WO-A/2 的表达及其抗菌特性

韩岳峰[1,2]，焦 明[1,2]，马慧君[3]，李松建[1]，金 山[*1,2]

（1. 内蒙古农业大学 兽医学院，内蒙古 呼和浩特 010018；2. 农业农村部动物临床诊疗技术重点实验室，内蒙古 呼和浩特 010018；3. 阿拉善左旗巴彦浩特镇综合保障和技术推广中心，内蒙古 巴彦浩特 750325）

摘要：为建立鼠李糖乳杆菌细菌素替抗、防腐应用平台，探究鼠李糖乳杆菌细菌素的抗菌特性，利用 DNASTAR 软件对鼠李糖乳杆菌细菌素进行全基因序列分析，确定了鼠李糖乳杆菌细菌素的主要调控基因为 *wo-a/2*，利用原核表达的方法表达细菌素 WO-A/2，并对 WO-A/2 的可溶性、诱导表达条件、免疫原性、溶血活性、抑菌特性进行了分析。结果表明，作者成功构建了 pET-32a-*wo-a/2* 质粒，表达了鼠李糖乳杆菌细菌素 WO-A/2，其主要以包涵体的形式存在。当表达 pET-32a-*wo-a/2* 质粒的菌株接种于含 Amp^+的 LB 液体培养基中培养，以终浓度 1.0 mmol/L 的 IPTG 诱导 8 h 后，细菌素 WO-A/2 的表达量最大。通过双层牛津杯血琼脂平板法验证表明，不同浓度的鼠李糖乳杆菌细菌素 WO-A/2 均无溶血活性。采用双荧光染色法，通过激光共聚焦显微镜观察到细菌素 WO-A/2 可促使金黄色葡萄球菌凋亡。该研究为鼠李糖乳杆菌细菌素成为安全可靠的生物替抗剂提供了依据。

关键词：鼠李糖乳杆菌；细菌素；抗菌肽；感受态细胞；原核表达

中图分类号：Q 939.92　　**文章编号：**1673-1689(2024)05-0019-07　　**DOI：**10.12441/spyswjs.20220506002

Expression and Antibacterial Properties of Bacteriocin WO-A/2 from *Lactobacillus rhamnosus*

HAN Yuefeng[1,2]，*JIAO Ming*[1,2]，*MA Huijun*[3]，*LI Songjian*[1]，*JIN Shan*[*1,2]

（1. College of Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China; 2. Key Laboratory of Clinical Diagnosis and Treatment Technology in Animal Disease, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Hohhot 010018, China; 3. Alashan Left Banner Bayanhot Town Comprehensive Support and Technology Extension Center, Bayanhot 750325, China）

Abstract: In order to establish the application platform for antibiotic and antiseptic application of *Lactobacillus rhamnosus* bacteriocin, the author explored its antibacterial properties. The main regulatory gene of *Lactobacillus rhamnosus* was found to be *wo-a/2*, which was determined by DNASTAR as the whole gene sequence analysis software. The *wo-a/2* gene was expressed by prokaryotic expression method and its solubility, induced expression conditions, immunogenicity, hemolytic activity and antibacterial characteristics were analyzed. The results showed that pET-32a-*wo-a/2* plasmid was successfully constructed and expressed *Lactobacillus rhamnosus*

收稿日期：2022-05-06　　**修回日期：**2022-09-23

基金项目：国家重点研发计划项目(2023YFE0100400)；内蒙古自治区直属高校基本科研业务项目(BR22-11-17)。

*** 通信作者：**金 山(1968—)，男，博士，副教授，硕士研究生导师，主要从事乳酸菌分离鉴定与发酵产物研制及开发研究。E-mail：jinshan@imau.edu.cn

bacteriocin WO-A/2, which mainly existed in the form of inclusion body. When pET-32a-*wo-a/2* plasmid was inoculated in LB liquid medium containing Amp^+ and induced with IPTG at a final concentration of 1.0 mmol/L for 8 h, the expression of bacteriocin WO-A/2 reached the maximum. It was verified from the double-layer Oxford cup blood agar plate method that *Lactobacillus rhamnosus* bacteriocin WO-A/2 had no hemolytic characteristics either at different concentrations. Bacteriocin WO-A/2 was found to promote the apoptosis of *Staphylococcus aureus*, as observed by dual fluorescence staining and laser confocal microscopy. This study provides a reference for *Lactobacillus rhamnosus* bacterin to be a safe and reliable antibiotic agent.

Keywords: *Lactobacillus rhamnosus*, bacteriocin, antibacterial peptide, receptive cell, prokaryotic expression

食源性致病菌是造成食品卫生安全问题、影响人类健康的一类致病性细菌，其中金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、副溶血性弧菌和单增李斯特菌最为常见。食源性致病菌常以食品作为传播媒介引起人们食物中毒，因具有耐药性强、传播速度快、传播途径广、危害性大等特性备受人们关注[1-2]。因此，寻找一种能有效控制食源性致病菌又不会影响食品安全的方法具有重要意义。

细菌素是由细菌在竞争性多菌环境中分泌，能抑制其他细菌生长，具有 20~60 个氨基酸长度的抗菌肽[3]。细菌素不易产生耐药性且安全无害，有望与抗生素结合使用或完全替代抗生素[4-5]，在养殖业、农业、医疗健康和保健方面都显示出广阔的应用前景。目前，已发现多种细菌素，但能够用于商业化的仅有 Nisin 一种。开发新的细菌素并实现商业化生产与实际应用还有很大的发展空间，通过基因工程和蛋白质工程对细菌素进行基因水平的修饰，可进一步增加细菌素的安全性和应用潜力，因此开发新型细菌素将成为新的研究趋势[6]。

鼠李糖乳杆菌（*L. rhamnosus*）多存在于人和动物肠道内，是一种厌氧耐酸、不产芽孢的革兰氏阳性益生菌，不能利用乳酸，可发酵多种单糖，是发酵食品中应用最广泛的益生菌之一，也是潜在健康益处被研究最多的菌株之一[7]。国内外的研究者们已通过大量动物实验和人体临床试验证明 *L. rhamnosus* 不仅具有耐胃酸、耐胆盐、耐多种抗生素等特点，而且能够定植肠道、平衡肠道菌群，通过竞争性抑制减少病原微生物的数量，提高肠道屏障功能；产生抗菌物质，参与调节机体的免疫功能；促进机体排除有害物质；预防龋齿；减少腹泻；抗肿瘤等[8-9]。近年来，对于鼠李糖乳杆菌的研究大多集中于改善肠道菌群以及组织修复功能[10]，而关于其抑菌作用以及细菌素产生方面的研究很少。

wo-a/2 基因是调控鼠李糖乳杆菌产生细菌素的一段基因序列。作者利用大肠杆菌表达系统，实现鼠李糖乳杆菌细菌素基因 *wo-a/2* 的克隆表达，为细菌素替代抗生素和防腐剂起到助推作用，也为实现乳杆菌细菌素的商业化生产提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 鼠李糖乳杆菌 XA2-14：作者所在课题组前期从内蒙古锡林郭勒盟采集的酸马奶中分离鉴定并筛选；金黄色葡萄球菌（ATCC25923）：中科院上海细胞库提供。

1.1.2 主要试剂 *E.coli* DH5α 感受态细胞、*E.coli* BL21（DE3）感受态细胞：上海昂羽生物技术有限公司；pET-32a(+)载体、pMD-19T 载体、T4 DNA 连接酶、rTaq DNA 聚合酶、*Hind* Ⅲ和 *Xho* Ⅰ限制性核酸内切酶：宝生物工程（大连）有限公司；2×Taq PCR Master Mix：苏州宇恒生物科技有限公司；DNA Maker DL-2000、DNA Maker DL-5000、蛋白质 Maker（相对分子质量 10 000~180 000）：碧云天生物科技有限公司；5 mL 镍柱、Binding/Wash Buffer（含变性剂）、Elution Buffer：上海生工（生物）工程公司；细菌基因组 DNA 提取试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒：北京天根生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成 根据 NCBI 上 GenBank 发布的 *wo-a/2* 基因全序列(GenBank:HV942910.1),利用 Oligo7 设计一对特异性引物用于克隆和表达,上游引物 1-F:5′-CAAGCTTGGATGACCAAAGTACGGTC-3′;下游引物 1-R:5′-CCTCGAGAGTTAACTATTAATTAAATC-3′。上下游引物下划线处分别表示 *Hind* Ⅲ和 *Xho* Ⅰ限制性核酸内切酶识别位点,引物由上海生工(生物)工程技术有限公司合成。

1.2.2 PCR 扩增 参照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明,提取鼠李糖乳杆菌 XA2-14 菌株基因组。以提取的鼠李糖乳杆菌 XA2-14 菌株基因组为模板,用上下游引物进行 PCR 扩增,95 ℃预变性 3 min,95 ℃变性 30 s,55 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,运行 30 个循环,4 ℃修复延伸 7 min,扩增得到的 PCR 产物经纯化后克隆到 pMD19-T 载体转入 *E.coli* DH5α 感受态细胞。阳性菌落经 PCR 和双酶切鉴定后,送至上海生工(生物)工程有限公司进行基因测序。

1.2.3 质粒的构建 参照质粒小量提取试剂盒说明,提取上述阳性菌落的质粒,将获得的阳性质粒及 pET-32a(+)分别进行 *Hind* Ⅲ和 *Xho* Ⅰ双酶切,然后利用琼脂糖凝胶回收试剂盒纯化目的基因片段和 pET-32a(+)的酶切产物,再利用 T4 DNA 连接酶连接胶回收产物,将连接体系置于 4 ℃恒温 8 h,再转入 *E.coli* DH5α 感受态细胞,在平皿中挑取疑似阳性单菌落进行 PCR,阳性菌落接种于含 Amp^+ 的 LB 液体培养基中培养 7 h,提取克隆后的质粒进行双酶切鉴定,将鉴定无误的阳性质粒交由上海生工(生物)工程有限公司进行测序鉴定。

1.2.4 细菌素的诱导表达 将测序结果与预期序列相同的质粒转入感受态细胞 *E.coli* BL21(DE3)。挑取单菌落接种于含 Amp^+ 的 LB 液体培养基,并在 37 ℃振荡培养箱中于 180 r/min 培养,当 OD_{600} 达到 0.4~0.6 时,向培养液中加入终浓度 1 mmol/L 的 IPTG,于振荡培养箱中继续诱导 8 h。诱导结束后收集菌体,用 0.1 mol/L PBS 清洗菌体,设置超声破碎仪工作 3 s,暂停 5 s,超声破碎 13 min,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液 100 μL,并用 100 μL 0.1 mol/L PBS 重悬沉淀,在 5×SDS-PAGE 蛋白质上样缓冲液中煮沸 15 min 使蛋白质变性,将 10 μL 样品加入凝胶孔,设置电泳仪电压为 80 V,工作 40 min,随后将电压调至 120 V,工作 30 min;凝胶电泳结束后用考马斯亮蓝染色液室温染色 1~2 h,脱色液脱色 1~2 h,分析蛋白质的可溶性。

1.2.5 细菌素的诱导条件优化 细菌素 WO-A/2 诱导时间的确定:按 1.2.4 中的方法培养菌体,当 OD_{600} 达到 0.4~0.6 时,将培养液分为 5 组,每组 100 mL。第 1 组作为对照组,其余 4 组均向培养物中加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG,于 37 ℃摇床中 180 r/min 诱导,分别在 2、4、6、8、12 h 吸取 1 mL 菌液,经菌体破碎、离心、SDS-PAGE 电泳,确定细菌素 WO-A/2 的最佳诱导时间。

IPTG 诱导浓度的确定:按 1.2.4 中的方法培养菌体,当 OD_{600} 达到 0.4~0.6 时,将培养液分为 6 组,每组 100 mL。第 1 组作为对照组,其余组分别用终浓度为 0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 mmol/L 的 IPTG 诱导。8 h 后收集各组菌液,经菌体破碎、离心、SDS-PAGE 电泳,确定 IPTG 的最佳诱导浓度。

1.2.6 包涵体纯化 诱导后用超声破碎菌体,12 000 r/min 离心 30 min,收集沉淀,用 20 mL 含变性剂的 Binding/Wash Buffer 重悬包涵体沉淀,每个 5 mL 镍柱中分两次加入共计 10 mL 的沉淀重悬液,置于 4 ℃冰箱静置过夜,使包涵体变性溶解,即为 WO-A/2 重组蛋白质样品液。次日,用两倍柱体积的 Elution Buffer 洗脱镍柱上与 His 标签结合的目的蛋白质,重复 2 次,洗脱液即为纯化后的细菌素 WO-A/2。将全部洗脱液进行 SDS-PAGE 电泳,分析包涵体蛋白质的纯化效果。

1.2.7 Western-blot 分析 按照 1.2.4 的方法对 WO-A/2 进行电泳,采用半干转膜仪将凝胶转至 PVDF 膜上,将膜置于质量分数 5%的脱脂乳中封闭 4 h,弃去封闭液,并用 1×TBST 清洗 3~4 次。用鼠抗组氨酸抗体于 4 ℃孵育 12 h。用 1×TBST 清洗 3~4 次,每次 10~15 min,清洗膜上未完全反应的抗体。将 Goat Anti-Mouse IgG/HRP 作为二抗,室温孵育 2 h,清洗,显影。

1.2.8 溶血活性测定 使用双层牛津杯血琼脂平板法对细菌素 WO-A/2 的溶血活性进行定性分析。首先配制含琼脂质量分数 2%的液体培养基,高压锅 121 ℃灭菌 20 min,放置于超净工作台冷却至 50 ℃,添加适量无菌脱纤维羊血,使其终体积分数为 7%,混匀后在牛津杯中放入 90 mm 平皿后倒入血琼脂,室温静置至凝固。将细菌素 WO-A/2 梯度稀释,分别为 LC 组(4 倍最小抑菌浓度)、MC 组(16 倍

最小抑菌浓度)、HC 组(32 倍最小抑菌浓度),随后依次向样品孔中加入 150 μL 上述浓度的细菌素 WO-A/2,设置阴性对照组和阳性对照组,其中阴性对照组为 0.1 mol/L PBS 缓冲液,阳性对照组为含体积分数 1% Triton X-100 的缓冲液。37 ℃下孵育 48 h。每个样品设 3 个生物学重复。

使用 96 孔板法对细菌素 WO-A/2 的溶血活性进行量化分析,以红细胞释放的血红蛋白量反映溶血活性。设置离心机转速 1 000 *g*,时间 10 min,温度降至 4 ℃,羊血离心后收集红细胞,首先用 0.1 mol/L PBS 缓冲液洗涤 3 次,接着重悬于 PBS 缓冲液中至终体积分数为 4%。随后将 30 μL 的红细胞溶液与不同浓度的细菌素 WO-A/2 混合,在 37 ℃恒温箱中孵育 1 h。设置离心机转速 1 000 *g*,时间 5 min,温度降至 4 ℃后离心,将上清液转移至 96 孔板中。使用多功能酶标仪测量 OD_{540}。将红细胞分别悬浮在 0.1 mol/L PBS 缓冲液和含体积分数 1% Triton X-100 的缓冲液中作为空白对照组和阳性对照组,测量重复 3 次。溶血率的计算公式如下:

$$R=[(A_s-A_b)/(A_T-A_b)]\times 100\%,$$

式中:R 为溶血率,%;A_s 为添加细菌素 WO-A/2 组的吸光度;A_b 为 PBS 处理后细胞的吸光度;A_T 为含体积分数 1%Triton X-100 的缓冲液处理后上清液的吸光度。

1.2.9 AO/EB 双荧光染色 使用 AO/EB 双荧光染色测定细菌素 WO-A/2 对金黄色葡萄球菌(ATCC25923)的杀菌活性。首先使用 LB 液体培养基培养金黄色葡萄球菌至 OD_{600} 为 0.6,12 000 r/min 离心 10 min,收集菌体,然后用 0.1 mol/L PBS 洗涤菌体 3 次,PBS 重悬菌体至 OD_{600} 为 0.6。将 200 μL 金黄色葡萄球菌液与 100 μL 细菌素 WO-A/2 混合,随后设置摇床温度为 37 ℃、转速为 150 r/min,培养 1 h。按说明书配制 AO/EB 混合染料,将30 μL AO/EB 与金黄色葡萄球菌液和细菌素 WO-A/2 混合液染色 15 min,使用 PBS 缓冲液冲洗掉多余的染料并重悬。空白对照组使用相同的 PBS 处理,阳性对照组使用 80 μg/mL 的 Nisin 处理。在载玻片上滴加 5 μL 培养液,使用盖玻片封片。在激光共聚焦显微镜下观察菌体荧光状态,橙黄色荧光表示开始凋亡的细菌;绿色荧光表示活性无变化的细菌;红色荧光表示死亡的细菌。

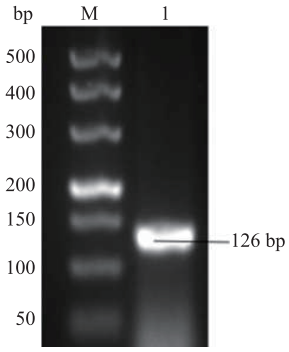
2 结果与分析

2.1 鼠李糖乳杆菌细菌素 WO-A/2 的原核表达结果

以鼠李糖乳杆菌基因组为模板,以 1-F、1-R 为引物,经 PCR 扩增获得了约 126 bp 的细菌素 DNA 片段,共编码 42 个氨基酸,大小与预期相同(见图 1)。将该片段与 pET-32a(+)载体连接后转化至 *E.coli* DH5α 感受态细胞中,经 PCR 扩增得到约 126 bp 的条带(见图 2)。提取 pET-32a-*wo-a/2* 质粒做双酶切验证(见图 3),对酶切产物测序,测得的序列与预期基因序列比对结果一致。

2.2 鼠李糖乳杆菌细菌素 WO-A/2 诱导条件的优化结果

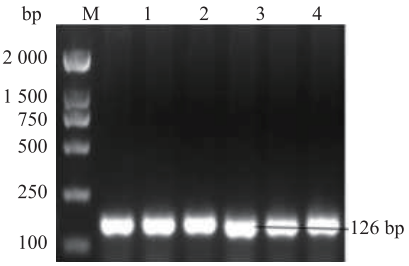
如图 4~7 所示,包涵体是该细菌素的主要表达形式,蛋白质相对分子质量约为 26 000。用终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG 诱导 8 h,细菌素 WO-A/2 的表达量最大。SDS-PAGE 电泳结果表明(见图 7),WO-A/2 包涵体经变性后可与镍柱充分结合,纯化后得到了相对分子质量为 26 000 的蛋白质。



M. DNA maker DL-5000;1. *wo-a/2* 基因。

图 1 鼠李糖乳杆菌基因 *wo-a/2* 的 PCR 扩增结果

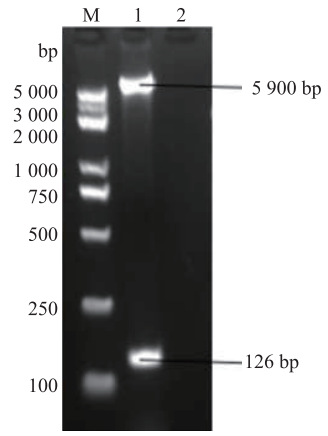
Fig. 1 PCR amplification results of *L. rhamnosus wo-a/2* gene



M. DNA maker DL-2000;1~4. 克隆后菌落的 PCR 产物。

图 2 克隆后菌落的 PCR 鉴定结果

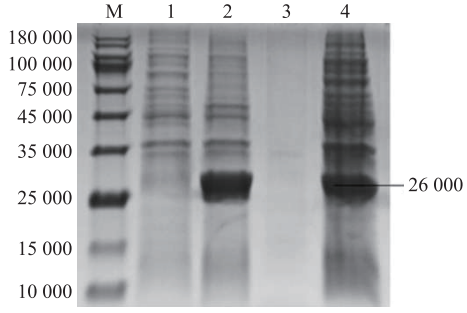
Fig. 2 Identification of clonal vector bacteria by PCR electrophoresis



M. DNA maker DL-5000;1. 阳性质粒的双酶切处理组;2. 阴性对照组。

图 3 阳性质粒的双酶切鉴定结果

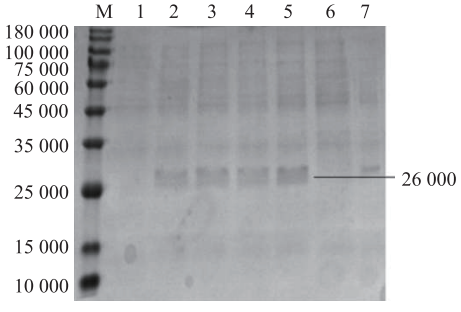
Fig. 3 Identification of positive plasmids by double enzyme digestion



M. 蛋白质 marker;1. 破碎后的菌体上清液;2. 破碎后的菌体沉淀;3. 未破碎的上清液;4. 未破碎的沉淀。

图 4 细菌素 WO-A/2 的可溶性分析结果

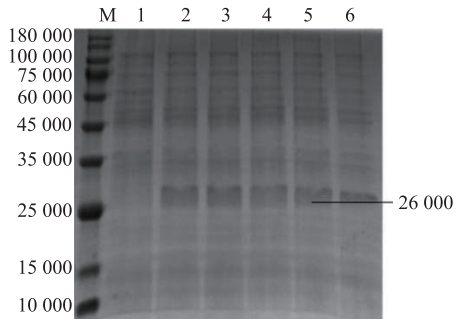
Fig. 4 Solubility analysis results of bacteriocin WO-A/2



M. 蛋白质 marker;1. 阴性对照组;2~5. 2、4、6、8 h 处理组;6. 8 h 阴性对照组;7. 12 h 处理组。

图 5 细菌素 WO-A/2 的诱导时间优化结果

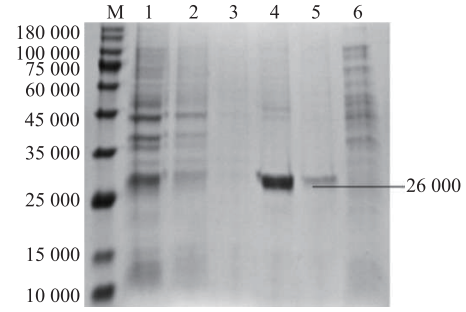
Fig. 5 Optimized results of induction time of bacteriocin WO-A/2



M. 蛋白质 marker;1. 阴性对照组;2~6. 0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 mmol/L 处理组。

图 6 IPTG 诱导浓度的优化结果

Fig. 6 Optimized results of IPTG-induced concentrations



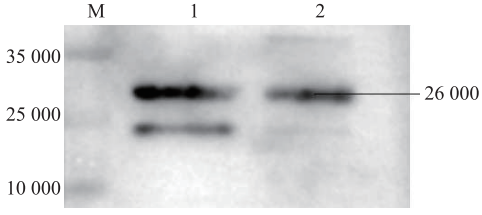
M. 蛋白质 marker;1~3. 洗脱 1、2、3 次后的细菌素 WO-A/2 洗脱液;4. 细菌素 WO-A/2 收集液;5. 细菌素 WO-A/2 第 2 次收集液;6. 阴性对照组。

图 7 细菌素 WO-A/2 的纯化结果

Fig. 7 Purification results of bacteriocin WO-A/2

2.3 WO-A/2 的免疫印迹反应检测结果

免疫印迹结果见图 8,在相对分子质量 26 000 处存在特异性条带。



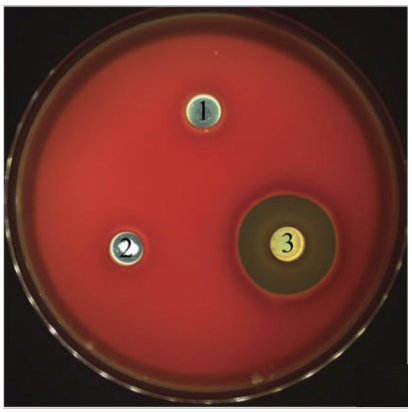
M. 蛋白质 marker;1. 未纯化的重组蛋白质;2. 纯化后的重组蛋白质。

图 8 细菌素 WO-A/2 的 Western-blot 鉴定结果

Fig. 8 Western-blot results of identification of bacteriocin WO-A/2

2.4 鼠李糖乳杆菌细菌素 WO-A/2 的溶血活性结果

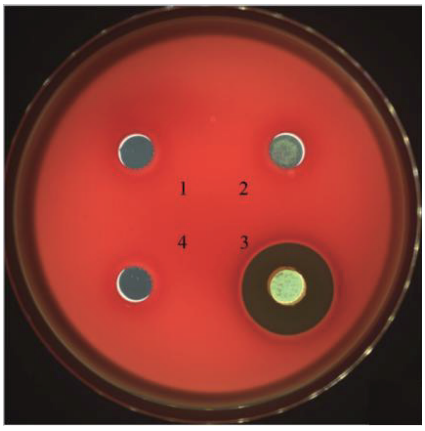
从图 9 可知,细菌素 WO-A/2 无明显溶血现象。从图 10 可知,不同浓度组的细菌素均不存在溶血活性。



1. 0.1 mol/L PBS 缓冲液;2. 透析复性后重组蛋白质缓冲液;3. 含体积分数 1%Triton X-100 的 PBS 缓冲液。

图 9　血平板溶血活性结果

Fig. 9　Results of hemolytic activity of blood agar plate



1. HC 组;2. MC 组;3. 阳性对照组;4. LC 组。

图 10　不同浓度组细菌素 WO-A/2 的溶血活性结果

Fig. 10　Results of hemolytic activity of bacteriocin WO-A/2 in different concentration groups

2.5　鼠李糖杆菌细菌素 WO-A/2 的溶血活性量化分析结果

为更精确地验证细菌素 WO-A/2 的溶血活性,进一步对溶血活性进行定量分析,结果见图 11。细菌素 WO-A/2 的溶血率随着细菌素 WO-A/2 浓度的增加而增加，但最高浓度组的溶血率也不超过 0.67%。

2.6　AO/EB 双荧光染色结果

由图 12 可知，当细菌素 WO-A/2 与金黄色葡萄球菌共同培养 1 h 后,大部分细菌呈橙黄色荧光,说明细菌开始凋亡,有少数细菌呈绿色荧光,说明此时 WO-A/2 对少量细菌活力无影响。阴性对照组大部分细菌呈绿色荧光，说明细菌活力无明显变化;阳性对照组细菌呈橙黄色荧光,说明大部分细菌开始凋亡。当细菌素 WO-A/2 与金黄色葡萄球菌共同培养 5 h 后,大部分细菌呈现红色荧光,少量细菌呈现橙黄色荧光，说明大部分细菌已经死亡,少量细菌正在凋亡。与处理 1 h 相比,阴性对照组的活力无明显变化;阳性对照组中大多数细菌呈红色荧光,少数细菌呈橙黄色荧光。当细菌素 WO-A/2 与金黄色葡萄球菌共同培养 9 h 后，大部分细菌呈红色荧光,少量细菌呈橙黄色荧光;阳性对照组全部呈红色荧光。与阴性对照组相比，细菌素 WO-A/2 对金黄色葡萄球菌有明显的抑制作用;与阳性对照组相比,尽管阳性对照组杀菌活性高于细菌素 WO-A/2，但该实验研究的细菌素 WO-A/2 同样对金黄色葡萄球菌具有良好的抑制作用。

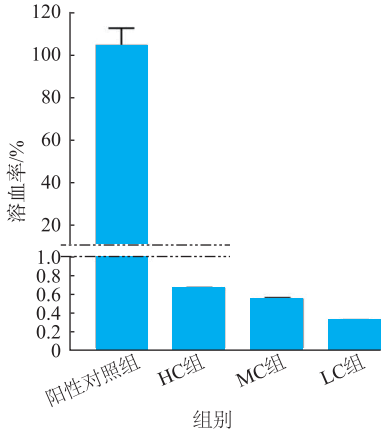


图 11　不同浓度组细菌素 WO-A/2 的溶血活性量化结果

Fig. 11　Quantification results of hemolytic activity of bacteriocin WO-A/2 in different concentration groups

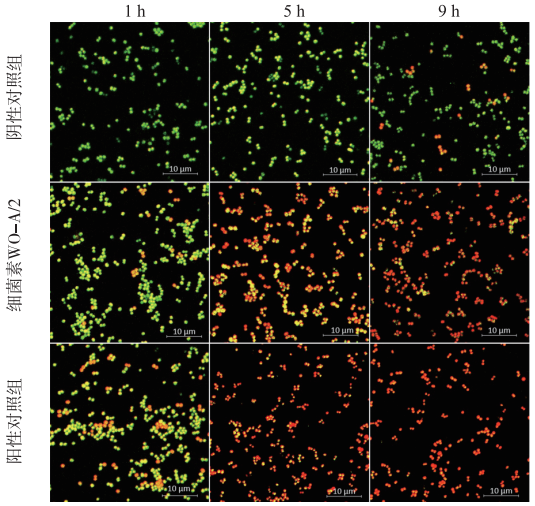


图 12　AO/EB 双荧光染色结果

Fig. 12　AO/EB dual fluorescence staining results

3 结 语

细菌素通常由基因直接编码,和传统抗生素相比更加易于工程改造。通过基因工程改造,可有效减少产生耐药性的因素、提高安全性、增加产量,这也是细菌素有可能替代抗生素的重要原因。作者将 *L. rhamnosus* XA2-14 菌株中产细菌素的 *wo-a/2* 基因克隆到 pET-32a(+)质粒中,并在 *E. coli* BL21(DE3)中过表达,随后用 IPTG 对重组菌进行诱导表达,成功表达出细菌素 WO-A/2。

细菌素的纯化是深入研究其特性的基础,传统的纯化方法大多比较烦琐,一般是 3 步或 4 步纯化。作者采用 His 标签,构建大肠杆菌表达系统,通过优化诱导条件,并对诱导表达后的细菌素采用 Ni-NTA 亲和层析柱、梯度透析复性的纯化方法,简化了纯化流程。

溶血活性是评价抗菌肽生物安全性的重要指标。溶血活性结果表明,细菌素 WO-A/2 的溶血率最高为 0.67%,有望成为食品防腐和抗菌药物的替代品。通过与商品化的 Nisin 比较,证实了细菌素 WO-A/2 对金黄色葡萄球菌同样具有一定的杀灭作用,但效果没有 Nisin 好,这可能与细菌素纯度不同有关,在后续实验中可将细菌素通过离子交换色谱与高效液相色谱进行纯化。综上,鼠李糖乳杆菌细菌素 WO-A/2 对食源性致病菌具有杀灭作用且安全性好,有望作为天然的抗菌剂用于保障食品安全。

参考文献:

[1] RITTER A C,TONDO E C,SIQUEIRA F M,et al. Genome analysis reveals insights into high-resistance and virulence of *Salmonella enteritidis* involved in foodborne outbreaks[J]. **International Journal of Food Microbiology**,2019,306:108269.

[2] ZHENG X Y,GUO J L,RAO H S,et al. Antibacterial and antibiofilm activity of coenzyme Q0 against *Vibrio parahaemolyticus* [J]. **Food Control**,2020,109:106955.

[3] 闫虹. 新型异源表达细菌素 BM1029 的抑菌作用及其机制研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2020.

[4] BEHRENS H M,SIX A,WALKER D,et al. The therapeutic potential of bacteriocins as protein antibiotics[J]. **Emerging Topics in Life Sciences**,2017,1(1):65-74.

[5] COLLINS F W J,O'CONNOR P M,O'SULLIVAN O,et al. Bacteriocin gene-trait matching across the complete *Lactobacillus* pan-genome[J]. **Scientific Reports**,2017,7(1):3481.

[6] 田露,吴咪,猴敬轩,等. 细菌素的研究与应用进展[J]. 生物技术通报,2021,37(4):224-233.
TIAN L,WU M,GOU J X,et al. Research and application progress of bacteriocin[J]. **Biotechnology Bulletin**,2021,37(4):224-233. (in Chinese)

[7] 唐昱婷,汤加勇,赵华. 鼠李糖乳杆菌对肠道屏障功能的影响机制研究进展[J]. 四川农业大学学报,2021,39(4):427-432.
TANG Y T,TANG J Y,ZHAO H. Research progress on the effect of *Lactobacillus rhamnosus* on intestinal barrier function and the potential mechanism[J]. **Journal of Sichuan Agricultural University**,2021,39(4):427-432. (in Chinese)

[8] 卢艳清,冉军舰,赵瑞香,等. 鼠李糖乳杆菌产细菌素条件优化及抑菌活性研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2019,47(4):119-128.
LU Y Q,RAN J J,ZHAO R X,et al. Optimal conditions and bacteriostatic activity of *Lactobacillus rhamnosus* [J]. **Journal of Northwest A & F University(Natural Science Edition)**,2019,47(4):119-128. (in Chinese)

[9] 赵乙桢,沈雷,孙亚链,等. 鼠李糖乳杆菌 ZJ225 细菌素的分离纯化及其特性研究[J]. 中国食品学报,2015,15(7):54-60.
ZHAO Y Z,SHEN L,SUN Y L,et al. Separation and purification of a bacteriocin produced by *Lactobacillus rhamnosus* ZJ225 and characteristic study[J]. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**,2015,15(7):54-60. (in Chinese)

[10] 刘静华,李静,周国琼,等. 鼠李糖乳杆菌 GG 防治消化系统疾病的研究进展[J]. 国际消化病杂志,2021,41(2):100-103.
LIU J H,LI J,ZHOU G Q,et al. Research progress in control and treatment of digestive system diseases by *Lactobacillus rhamnosus* GG[J]. **International Journal of Digestive Diseases**,2021,41(2):100-103. (in Chinese)

(责任编辑:史润东东)