乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 原核表达及其理化特性

焦　明[1,2]，　罗玉霞[3]，　陈亚男[1,2]，　舒　伦[4]，　吉林台[1,2]，　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. 阿拉善左旗农牧区生态管理综合行政执法局，内蒙古 巴彦浩特 750325；4. 内蒙古农业大学 动物科学学院，内蒙古 呼和浩特 010018）

摘要：为实现原核表达产出细菌素并检测其理化特性，作者将乳酸片球菌 R-4 细菌素 *pedA* 基因进行扩增回收，与 pMD19-T 载体连接后转入 *E.coli* DH5α 感受态细胞进行克隆。提取克隆后的 *pedA* 基因与表达载体 pET-32a(+)连接，形成重组质粒 pET-32a-*pedA* 并转入 *E.coli* BL21(DE3)感受态细胞，经异丙基硫代半乳糖苷诱导，乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 在大肠杆菌细胞进行表达。表达蛋白质经 Ni-NTA 柱纯化后，以金黄色葡萄球菌为指示菌检测其理化特性。结果表明，在 *E.coli* BL21(DE3)细胞中成功表达相对分子质量为 26 000 的乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 并完成纯化。纯化后的乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 在 40~121 ℃作用 20 min、在 pH 2~12、紫外线照射 0~10 h、过氧化氢酶作用 2 h 后，其抑菌范围分别为 14.7~15.6 mm、14.0~16.5 mm、15.1~15.8 mm 和 14.9 mm，而分别经胃蛋白酶和胰蛋白酶作用 2 h 均失去抑菌作用。这表明乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 对高温、强酸强碱、紫外线和过氧化氢酶均具有较好的稳定性，而胃蛋白酶和胰蛋白酶会使其失活。

关键词：乳酸片球菌 R-4；细菌素 PA-1；pedA 基因；原核表达；抑菌范围

中图分类号：TS 201.2　　**文章编号**：1673-1689(2023)11-0098-08　　DOI：10.12441/spyswjs.20211014002

Prokaryotic Expression and Physicochemical Properties of Bacteriocin PA-1 from *Pediococcus acidilactici* R-4

JIAO Ming[1,2]，　*LUO Yuxia*[3]，　*CHEN Ya'nan*[1,2]，　*SHU Lun*[4]，　*JI Lintai*[1,2]，　*JIN Shan*[*1,2]

(1. College of Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agriculture 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. Administration of Ecological Management in Agricultural and Pastoral Areas of Alxa Left Banner, Bayanhott 750325, China; 4. College of Animal Science, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

Abstract: In order to produce bacteriocin in large quantity through prokaryotic expression and investigate its physicochemical properties, this study amplified and recycled the *Pediococcus acidilactici* R-4 bacteriocin *pedA* gene. The gene was subsequently ligated into the pMD19-T vector and transferred into *E. coli* DH5α receptor cells for cloning. The cloned *pedA* gene was extracted and

收稿日期：2021-10-14　　**修回日期**：2021-12-01

基金项目：内蒙古农业大学高层次人才引进科研启动项目(NDYB2017—7)。

* **通信作者**：金　山(1968—)，男，博士，副教授，硕士研究生导师，主要从事兽医微生物学与免疫学研究。E-mail：jinshan@imau.edu.cn

connected to the expression vector pET-32a(+) to form a recombinant plasmid pET-32a-*pedA*, which was then transferred into *E. coli* BL21(DE3) receptor cells. Following induction with isopropyl-*β*-D-thiogalactoside (IPTG), *Pediococcus acidilactici* R-4 bacteriocin PA-1 was expressed within *E. coli* BL21 (DE3) cells. The expressed protein was purified by a Ni-NTA column and its physicochemical properties were determined using *Staphylococcus aureus* as an indicator. The results demonstrated successful expression and purification of the 26 000 of *Pediococcus acidilactici* R-4 bacteriocin PA-1 in *E. coli* BL21 (DE3) cells. The purified *Pediococcus acidilactici* R-4 bacteriocin PA-1 exhibited antibacterial activity within the ranges of 14.7~15.6 mm, 14.0~16.5 mm, 15.1~15.8 mm, and 14.9 mm, respectively, under the treatment of 40~121 ℃ for 20 min, pH 2 to 12, 0~10 h ultraviolet irradiation, and 2 h catalase. However, the antibacterial activity was lost after treatment with pepsin and trypsin for 2 hours. This indicates that *Pediococcus acidilactici* R-4 bacteriocin PA-1 has good stability to high temperature, strong acid and alkali, UV radiation, and catalase. However, it could be deactivated by pepsin and trypsin.

Keywords: *Pediococcus acidilactici* R-4, bacteriocin PA-1, *pedA* gene, prokaryotic expression, bacteriostasis range

据世界卫生组织报告，随着涉及食品病原菌和腐败菌的食品安全事故频发，每年约有 10 亿人食物中毒，约 42 万人因食物中毒死亡，因此人们越来越关注食品安全问题。其中金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和单增李斯特杆菌为主要致病菌。利用乳酸菌产生的抑菌物质，尤其是通过细菌素来抑制食品病原菌和腐败菌越来越得到人们的认同[1-2]。细菌素是一种无抗药性、无残留的天然蛋白质[3]，能够防止食品腐败变质，延长食品保质期[4]，作为食品添加剂替代品有一定潜力[5]。

细菌素是细菌代谢过程中通过核糖体合成的一类抑菌肽[6]，具有抗细菌、真菌等作用[7]，主要分为四大类：Ⅰ类细菌素为含有修饰氨基酸的多肽[8]；Ⅱ类细菌素为不含修饰氨基酸的多肽；Ⅲ类细菌素为大相对分子质量蛋白质[9]，此类细菌素在核糖体生成后不经修饰，相对分子质量大于 10 000[10]；Ⅳ类细菌素为复合型大分子复合物，由于其带正电荷且具有疏水性，故可以和粗提物中其他大分子物质聚合形成复合物[11]。

片球菌素属于Ⅱa 类细菌素，主要由乳酸片球菌、戊糖片球菌、小片球菌产生[12]。片球菌素 PA-1 的操纵子由 *pedA*、*pedB*、*pedC*、*pedD* 组成，*pedA* 为其结构基因。片球菌素具有耐热性，对许多革兰氏阳性菌有抑制作用，对部分革兰氏阴性菌也有抑制作用，显示了较宽的抑菌普。另外片球菌素具有高等电点和亲水特性，乳酸片球菌素的抑菌活性与分子结构也有一定关系。乳酸片球菌素的分子结构中 *α*-螺旋含量上升，*β*-折叠、转角含量降低的时候，乳酸片球菌素的活性也降低[13]。但是天然的细菌素产量有限，纯化困难，目前主要通过发酵法[14]和化学合成法[15]大量获取，但二者的成本都相对较高，产量较低，并且化学合成的细菌素活性不稳定。近年来随着基因工程技术的发展，原核表达技术日趋成熟，因此通过原核表达来获取大量细菌素也是比较好的选择[16-17]。此外，从各个乳酸菌菌株中发掘潜在的细菌素（如鼠李糖乳杆菌）[18]，以及用纳米技术提高细菌素稳定性和作用力也是未来的趋势[19-20]。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

乳酸片球菌 R-4 和金黄色葡萄球菌：内蒙古农业大学微生物实验室保存；*E.coli* DH5*α* 感受态细胞、pMD19-T 载体、pET-32a（+）载体、T4 DNA 连接酶、rTaq DNA 聚合酶、dNTP、*Sac* Ⅰ和 *Hin*d Ⅲ限制性核酸内切酶：宝生物工程（大连）有限公司；*E.coli* BL21(DE3)感受态细胞：北京全式金生物技术有限公司；核酸染料：北京泰克生物技术有限公司；标准相对分子质量核酸 DNA Marker DL-2000、DNA Marker DL-5000、蛋白质相对分子质量标准（180 000）：碧云天生物科技有限公司；氨苄青霉素、

异丙基硫代半乳糖苷：美国西格玛奥德里奇公司；细菌基因组提取试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒、Tris、SDS、Alycine、考马斯亮蓝 R-250：天根生化科技(北京)有限公司；LB 培养基、MRS 肉汤培养基：青岛高科园海博生物技术有限公司；透析袋 MD55、过氧化氢酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶、脱脂奶粉、TBST、PVDF 膜、BCA 蛋白质浓度测定试剂盒：北京索莱宝科技有限公司；小鼠抗 His-tag 单克隆抗体、山羊抗小鼠 IgG-HRP：北京博奥赛生物技术有限公司；Super ECL PLUS：苏州宇恒生物科技有限公司；Binding/Wash Buffer、Elution Buffer、Ni-NTA Sefinose(TM) Resin：生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 仪器与设备

恒温水浴锅：日本 SANYO 公司；恒温生化培养箱：美国热电公司；核酸电泳仪、SDS-PAGE 电泳仪、半干转膜仪：伯乐生命医学产品(上海)有限公司；高速离心机、冷冻离心机：赛默飞世尔科技(中国)有限公司；电子天平：美国颇尔公司；多功能酶标仪、PCR 仪：基因有限公司；脱色摇床：海门市其林贝尔仪器制造有限公司；核酸凝胶成像仪：上海复日科技仪器有限公司；恒温振荡培养箱：美国热电公司。

1.3 研究方法

1.3.1 克隆载体 pMD19-T-*pedA* 构建 根据 NCBI 上 GenBank 公布的 *pedA* 基因序列(Accession number M83924)设计带有保护性碱基和酶切位点的引物 P.P-F：5′-AACCCCGAGCTCGCAAAAAAATTGAAAAATTAACT-3′和引物 P.P-R：5′-CCCGGGAAGCTTGACTAGCATTTATGATTACCTTG-3′。引物带有的酶切位点分别是 *Sac* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ。提取乳酸片球菌 R-4 的 DNA，通过聚合酶链式反应(polymerase chain reaction，PCR)对 *pedA* 基因片段进行扩增。PCR 反应体系如下：3.0 μL 乳酸片球菌 R-4 DNA，2.5 μL 10×Taq 缓冲液，2.0 μL dNTP 混合液，2.0 μL Mg^{2+}，0.5 μL rTaq 酶，1.0 μL 引物 P.P-F(质量浓度 10 mg/mL)，1.0 μL 引物 P.P-R(质量浓度 10 mg/mL)；13.0 μL ddH_2O，总体系 25.0 μL。反应条件为：95 ℃预变性 3 min；95 ℃变性 30 s、60 ℃退火 30 s、72 ℃延伸 30 s，共 30 个循环；72 ℃修复延伸 5 min。反应完成后，取扩增 *pedA* 基因片段 5 μL 进行琼脂糖凝胶电泳检测，对目的片段 *pedA* 基因进行胶回收后与 pMD19-T 载体连接，构建克隆载体 pMD19-T-*pedA* 并转入 *E.coli* DH5α 感受态细胞，选取阳性克隆接种于含氨苄青霉素(终质量浓度 100 μg/mL)的 LB 液体培养基过夜培养，提取质粒后双酶切鉴定。

1.3.2 表达载体 pET-32a-pedA 构建 提取重组质粒 pMD19-T-*pedA* 后与表达载体 pET-32a(+)同时用限制性核酸内切酶 *Sac* Ⅰ、*Hind* Ⅲ进行酶切，用 T4 DNA 连接酶对回收的 *pedA* 片段和 pET-32a(+)酶切产物进行连接，连接体系如下：4.0 μL 回收的 *pedA* 片段，2.0 μL pET-32a(+)载体酶切回收产物，1.0 μL 10×DNA 连接缓冲液，1.0 μL T4 DNA 连接酶(3 U/μL)，2.0 μL ddH_2O，总体系为 10.0 μL。连接体系于 4 ℃过夜，次日将连接产物转入 *E.coli* BL21(DE3)感受态细胞。挑取 *E.coli* BL21(DE3)单菌落接种于含氨苄青霉素(终质量浓度 100 μg/mL)的 LB 液体培养基过夜培养，提取重组质粒 pET-32a-*pedA* 进行双酶切鉴定。

1.3.3 重组菌的诱导表达 将含有阳性质粒 pET-32a-*pedA* 的重组菌接种于 100 mL 的 LB 液体培养基中，37 ℃、180 r/min 培养至 OD_{600} 为 0.4~0.6，加入 100 μL 异丙基硫代半乳糖苷(240 mg/mL)，25 ℃过夜诱导。诱导完成的菌液于 7 000 r/min 离心 15 min 后弃上清液，用生理盐水重悬菌体，重复 2 次。通过超声波细胞破碎仪破碎菌体，于 12 000 r/min 离心 15 min，分离上清液和沉淀，上清液用 0.22 μm 的滤膜过滤，上清液变性后进行检测。

1.3.4 成功表达的乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 纯化 将 2 mL Ni-NTA 琼脂糖纯化树脂装入 Ni-NTA 预装柱，结合/洗脱缓冲液平衡柱子。取 5 mL 结合/洗脱缓冲液与上清液混匀，装入已添加填料的柱子，蛋白质与填料于 4 ℃过夜结合。2 倍柱体积的结合/洗脱缓冲液清洗柱子，用洗脱缓冲液洗脱带有 His-tag 的乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1。纯化后的乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 用 SDS-PAGE 检测纯化情况并采用 BCA 法检测蛋白质质量浓度。

1.3.5 乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 的 Western blot 方法鉴定 以小鼠抗 His-tag 单克隆抗体为一抗，工作浓度 1:6 000，山羊抗小鼠 Ig G-HRP 为二抗，工作浓度 1:5 000。纯化的乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 经 SDS-PAGE 检测后切下相应位置的 PAGE 胶，进行转膜。37 ℃封闭 4 h，用 TBST 洗涤，一抗 4 ℃孵育 16 h 后 TBST 洗涤，二抗孵育 2 h，

TBST 洗膜后进行显影。

1.3.6　乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 的活性鉴定

通过双层平板法鉴定乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 的蛋白质活性，并以洗脱缓冲液各组分作为对照。

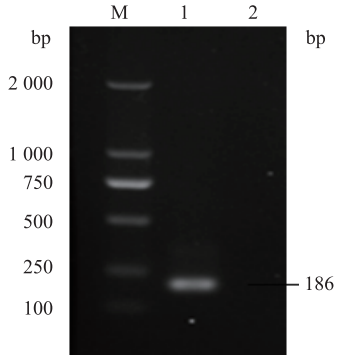
1.3.7　乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 理化特性

以 1×10^6 CFU/mL 的金黄色葡萄球菌悬液为指示菌，将纯化的乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 的 pH 调至 2、4、6、8、10、12，检测不同 pH 下的乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 对金黄色葡萄球菌抑菌效果。乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 在 40、60、80、100、121 ℃处理 20 min，检测不同温度下乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 对金黄色葡萄球菌抑菌效果。乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 用过氧化氢酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶（终质量浓度均为 20 mg/mL）于 37 ℃处理 2 h，之后于 80 ℃水浴 30 min 将酶灭活，检测不同酶处理对乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 抑菌效果的影响。乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 经紫外线照射 0、2、4、6、8、10 h 来检测其对紫外线的敏感性。

2　结果与分析

2.1　乳酸片球菌 R-4 细菌素 *pedA* 基因的克隆和表达载体构建

如图 1 所示，将提取的乳酸片球菌 R-4 基因作为模板，用特异性引物 P.P-F 和 P.P-R 扩增出序列长度为 186 bp 的目的基因，与预期条带大小相符。

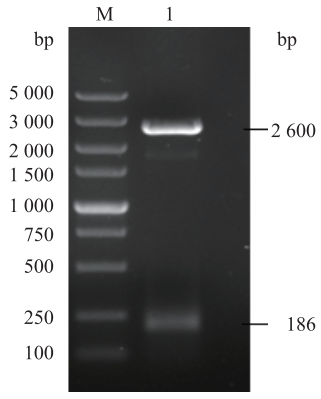


M：DNA Marker DL-2000；1：*pedA* 基因 PCR 产物；2：阴性对照。

图 1　*pedA* 基因片段 PCR 扩增结果

Fig. 1　PCR amplification of *pedA* gene fragment

目的条带纯化后与克隆载体 pMD19-T 过夜连接，将重组质粒 pMD19-T-*pedA* 用限制性核酸内切酶 *Sac* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切，结果见图 2。在 2 600 bp 和 186 bp 处获得 2 条条带，与克隆载体和乳酸片球菌 R-4 细菌素 *pedA* 基因大小相符，表明 *pedA* 基因与载体 pMD19-T 成功连接并转入到 *E.coli* DH5α 感受态细胞。

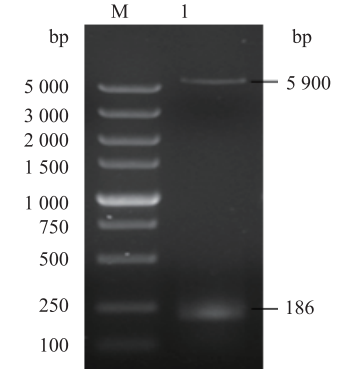


M：DNA Marker DL-5000；1：重组质粒 pMD19-T-*pedA* 酶切产物。

图 2　重组 pMD19-T-*pedA* 质粒的酶切鉴定

Fig. 2　Identification of recombinant plasmid pMD19-T-*pedA* by restriction enzyme digestion

回收纯化 *pedA* 基因与 pET-32a(+)进行连接后，将重组质粒 pET-32a-*pedA* 经限制性核酸内切酶 *Sac* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切，结果见图 3。在 5 900 bp 和 186 bp 处获得 2 条条带，与表达载体 pET-32a(+)和 *pedA* 基因大小相符，表明目的基因 *pedA* 与表达载体 pET-32a(+)连接成功。



M：DNA Marker DL-5000；1：重组质粒 pET-32a-*pedA* 酶切产物。

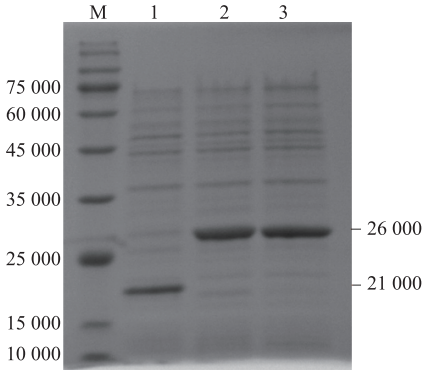
图 3　重组质粒 pET-32a-*pedA* 的酶切鉴定

Fig. 3　Identification of recombinant plasmid pET-32a-*pedA* by restriction enzyme digestion

2.2　乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 的诱导表达和分离纯化

将 pET-32a(+)转入 *E.coil* BL21(DE3)感受态细胞作为空载体，与含重组质粒 pET-32a-*pedA* 的 *E.coil* BL21(DE3)细胞形成对照，用 IPTG 诱导培养，SDS-PAGE 电泳结果见图 4。pET-32a-*pedA* 表

达相对分子质量 26 000 的蛋白质条带,而 pET-32a(+)表达的蛋白质相对分子质量为 21 000,表明乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 成功表达。

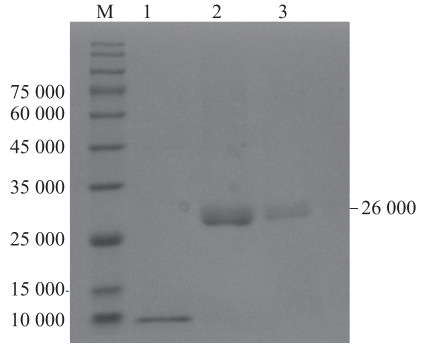


M: 蛋白质 Marker;1: 空载体;2~3: 重组蛋白质 pET-32a-*pedA*。

图 4 乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 的 SDS-PAGE 电泳结果

Fig. 4 SDS-PAGE electrophoresis results of *Pediococcus acidilactici* R-4 bacteriocin PA-1

带有 His-tag 的乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 经 Ni-NTA 柱纯化后的 SDS-PAGE 结果见图 5。在相对分子质量 26 000 处出现单一条带,表明乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 纯化效果良好。通过 BCA 法测得第一次洗脱的蛋白质质量浓度为 0.245 mg/mL。



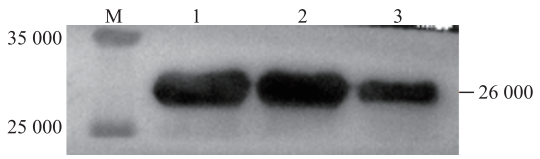
M: 蛋白质 Marker;1:流穿液;2:第一次洗脱;3:第二次洗脱。

图 5 纯化后的乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 的 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 5 SDS-PAGE electrophoresis of purified *Pediococcus acidilactici* R-4 bacteriocin PA-1

乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 的 Western blot 结果见图 6。在相对分子质量 26 000 处显影并出现单一条带,表明所纯化出来的蛋白质为带 His-tag 的乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1。

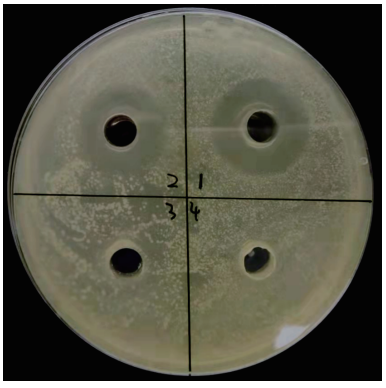
将乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 以及洗脱缓冲液各组分进行抑菌试验,结果见图 7。纯化后含洗脱缓冲液的乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 和 250 mmol/L 咪唑同样具有抑菌效果。将纯化后含洗脱缓冲液的乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 和洗脱缓冲液各组分梯度透析后进行抑菌试验,结果见图 8。透析后的咪唑失去抑菌效果,而乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 通过透析除去咪唑等洗脱缓冲液成分后仍具有抑菌效果,表明乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 具有蛋白质活性。



M:蛋白质 Marker;1~3:纯化蛋白质显影。

图 6 纯化后乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 的 Western blot 鉴定

Fig. 6 Identification of purified *Pediococcus acidilactici* R-4 bacteriocin PA-1 by western blot



1:含洗脱缓冲液的乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1;2:250 mmol/L 咪唑;3:500 mmol/L NaCl;4:$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$。

图 7 纯化后乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 及各组分的抑菌作用

Fig. 7 Antibacterial activity of purified *Pediococcus acidilactici* R-4 bacteriocin PA-1 and its components

2.3 乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 理化特性分析

2.3.1 温度对乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 抑菌效果的影响 如图 9 所示,未处理的乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径为 15.4 mm。乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 在 40~100 ℃处理 20 min 后仍显示出良好的抑菌作用,菌抑圈直径在 14.7~15.6 mm;121 ℃处理 20 min 后抑菌圈直径仍有 14.1 mm,表明乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 具有耐热性。



1：NaCl 透析 2：$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 透析；3：咪唑透析；4：透析后的乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1。

图 8　乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 和各组分透析后的抑菌作用

Fig. 8　Antibacterial activity of *Pediococcus acidilactici* R-4 bacteriocin PA -1 and its components after dialysis

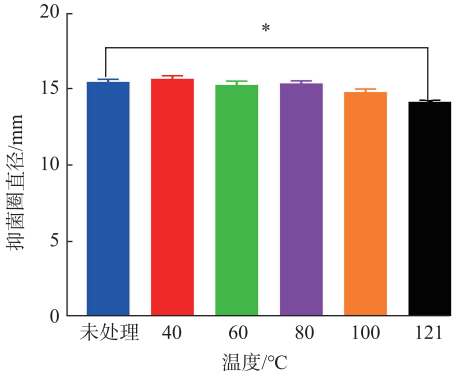


图 9　温度对乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 抑菌效果的影响

Fig. 9　Effect of temperatures on the antibacterial effect of *Pediococcus acidilactici* R-4 bacteriocin PA-1

2.3.2　pH 对乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 抑菌效果的影响　如图 10 所示，pH 8 对乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 对金黄色葡萄球菌抑菌圈直径为 15.3 mm，在 pH 2 时乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 抑菌效果最好，抑菌圈直径达到 16.5 mm。在 pH 4~6 时抑菌圈直径虽然逐步下降，但仍具有较高的抑菌效果，抑菌圈直径分别为 16.0 mm 和 15.7 mm，比 pH 8 的乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 抑菌作用略强。pH 10 和 pH 12 比 pH 8 时乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 抑菌效果明显降低，抑菌圈直径分别为 14.6 mm 和 14.0 mm。这表明乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 具有较好的耐酸性，对碱性环境较为敏感。

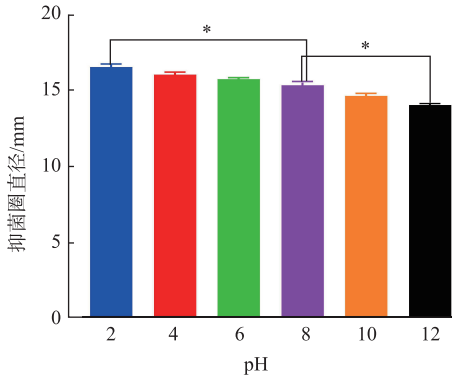


图 10　pH 对乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 抑菌效果的影响

Fig. 10　Effect of pH environments on the antibacterial effect of *Pediococcus acidilactici* R-4 bacteriocin PA-1

2.3.3　酶种类对乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 抑菌效果的影响　如图 11 所示，未处理的乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 对金黄色葡萄球菌抑菌圈直径为 15.3 mm，经胰蛋白酶和胃蛋白酶处理的乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 失去抑菌作用，经过氧化氢酶处理的乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 仍然显示出较好的抑菌效果，抑菌圈直径为 14.9 mm，表明胃蛋白酶和胰蛋白酶可能分解乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1，而过氧化氢酶对其没有影响。

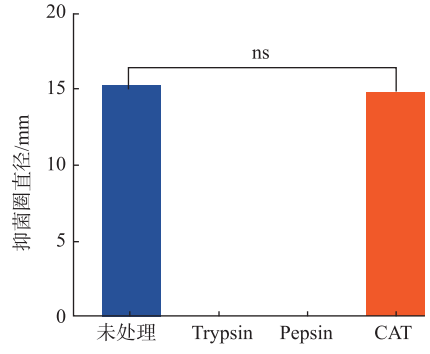


图 11　酶种类对乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 抑菌效果的影响

Fig. 11　Effect of enzymes on the antibacterial effect of *Pediococcus acidilactici* R-4 bacteriocin PA-1

2.3.4　紫外线照射时间对乳酸片球菌 R-4细菌素 PA-1 抑菌效果的影响　如图 12 所示，未照射紫外线的乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 对金黄色葡萄球菌抑菌圈直径为 15.4 mm，经 2~10 h 紫外线照射后仍具有较好的抑菌效果，抑菌圈直径为 15.1~15.8 mm，表明紫外线照射对其抑菌效果几乎没有影响，乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 对紫外线不敏感。

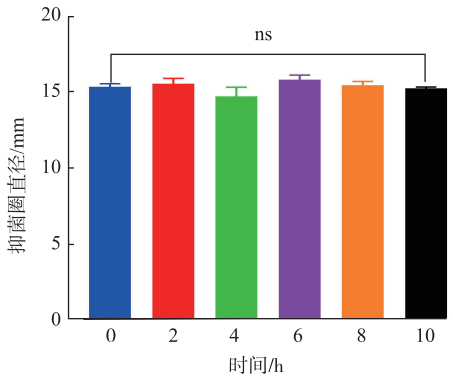


图 12　紫外线照射时间对乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 抑菌效果的影响

Fig. 12　Effect of different UV irradiation times on the antibacterial effect of *Pediococcus acidilactici* R-4 bacteriocin PA-1

3 结　语

pET-32a(+)作为优秀的表达载体,其 *Lac* 基因仅在经 IPTG 诱导后才会进行表达，有利于表达的进行。pET-32a(+)在 N 端含有 His-tag,有利于表达后利用 His-tag 经 Ni-NTA 柱进行蛋白质纯化。作者在大肠杆菌表达系统中成功表达相对分子质量 26 000 的乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1，并用 Ni-NTA 柱纯化出乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1,经 Western blot 鉴定为乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1,为后续试验提供了较高纯度的乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1。

李亚玲报道分离纯化后的乳酸片球菌细菌素在 121 ℃处理 20 min 后抑菌圈直径为 10.26 mm[21],本研究所表达纯化的乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 经 121 ℃处理 20 min 后抑菌圈直径为14.1 mm,有明显提高,可能是因为乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 质量浓度更高。乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 经 40~100 ℃处理 20 min 后表现出较好的抑菌效果并基本保持稳定,抑菌圈直径为 15.6~14.7 mm ,表明具有较好的耐高温特性,与李亚玲的结论相似。食品制作过程中常用的巴斯德高温灭菌为 60~80 ℃,因此乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 作为食品添加剂与食品一同高温灭菌后仍能保持抑菌活性。研究发现，乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 在 pH 2 时抑菌效果最好,pH 4~6 则相对稳定，碱性环境中抑菌效果开始下降。这与高兆建等报道发酵乳杆菌细菌素在 pH 2~6 有较好的稳定性,在 pH>6 时抑菌作用开始降低基本一致[22]。相比于已经商业化的乳酸链球菌素,乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 在酸性食品中有较好抑菌效果。乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 经紫外照射不会影响其抑菌活性,含有乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 的食品适当存放在紫外线照射环境中,可能起到双重杀菌作用。乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 经蛋白酶处理后失去抑菌活性，与陆洲等报道分离得到的植物乳杆菌细菌素在 5 mg/mL 的胃蛋白酶和胰蛋白酶处理 2 h 后完全失去抑菌作用的结果一致[23]。因此在食用含乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 的食品后,乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 在胃部被消化失活，不会进入肠道而影响肠道菌群。基于以上性质，乳酸片球菌 R-4 细菌素 PA-1 在抑制食品病原菌以及食品保存方面都具有较为广阔的应用前景。

参考文献:

[1] HAVELAAR A H,BRUL S,DE JONG A,et al. Future challenges to microbial food safety[J]. **International Journal of Food Microbiology**,2010,139(1):S79-S94.

[2] GUERRA M M,DE ALMEIDA A M,WILLINGHAM A L. An overview of food safety and bacterial foodborne zoonoses in food production animals in the Caribbean region[J]. **Tropical Animal Health and Production**,2016,48(6):1095-1108.

[3] SKARIYACHAN S,GOVINDARAJAN S. Biopreservation potential of antimicrobial protein producing *Pediococcus* spp towards selected food samples in comparison with chemical preservatives[J]. **International Journal of Food Microbiology**,2019,291:189-196.

[4] 姚沛琳,王剑,张新剑,等. 对大肠杆菌生物膜具有高抑制能力的乳酸菌的筛选[J]. 食品与发酵工业,2019,45(6):59-64.
YAO P L,WANG J,ZHANG X J,et al. Screening of lactic acid bacteria with strong inhibitory effects on *Escherichia coli* biofilm formation[J]. **Food and Fermentation Industries**,2019,45(6):59-64. (in Chinese)

[5] 黄晓英,李启明,吴华星,等. 传统发酵食品中具有抑菌活性乳酸菌筛选及其代谢产物稳定性分析[J]. 现代食品科技,2021,37(11):68-78.
HUANG X Y,LI Q M,WU H X,et al. Screening of traditional fermented food products for lactic acid bacteria with antibacterial

activity and stability analysis of their metabolites[J]. **Modern Food Science and Technology**,2021,37(11):68-78. (in Chinese)
[6] AYMERICH T,RODRÍGUEZ M,GARRIGA M,et al. Assessment of the bioprotective potential of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* on vacuum-packed cold-smoked salmon stored at 8 ℃[J]. **Food Microbiology**,2019,83:64-70.
[7] 李传娟,双全,栗永乐,等. 传统酸菜中具有抗真菌特性乳酸菌素的研究[J]. 食品工业,2012,33(12):128-131.
LI C J,SHUANG Q,LI Y L,et al. Research antifungal activity on bacteriocin produced by lactic acid bacteria from traditional sour cabbage[J]. **The Food Industry**,2012,33(12):128-131. (in Chinese)
[8] KUMARIYA R,GARSA A K,RAJPUT Y S,et al. Bacteriocins:classification,synthesis,mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria[J]. **Microbial Pathogenesis**,2019,128:171-177.
[9] ZOU J,JIANG H,CHENG H,et al. Strategies for screening,purification and characterization of bacteriocins[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**,2018,117:781-789.
[10] STRATEVA T,DIMOV S G,ATANASOVA D,et al. Molecular genetic study of potentially bacteriocinogenic clinical and dairy *Enterococcus* spp. isolates from *Bulgaria*[J]. **Annals of Microbiology**,2016,66(1):381-387.
[11] ENNAHAR S,SASHIHARA T,SONOMOTO K,et al. Class IIa bacteriocins:biosynthesis,structure and activity[J]. **FEMS Microbiology Reviews**,2000,24(1):85-106.
[12] 王艳婷,汪立平,唐潮,等. 蒙古干酪中产细菌素戊糖片球菌的筛选及其细菌素理化特性研究[J]. 食品与发酵工业,2015,41(10):14-19.
WANG Y T,WANG L P,TANG C,et al. Screening of bacteriocin-producing *Pediococcus pentosaceus* from Mongolia cheese and study on physicochemical characteristics of bacteriocin[J]. **Food and Fermentation Industries**,2015,41(10):14-19. (in Chinese)
[13] 李丽,韩烨,周志江. 乳酸片球菌素二级结构与抑菌活性的关系[J]. 食品工业科技,2011,32(6):172-174.
LI L,HAN Y,ZHOU Z J. Relation between pediocin secondary structure and antibacterial activity[J]. **Science and Technology of Food Industry**,2011,32(6):172-174. (in Chinese)
[14] 吕燕妮. 广谱抗菌肽:片球菌素 pediocin PA-1[J]. 食品科技,2011,36(9):41-44.
LV Y N. Pediocin PA-1,a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria[J]. **Food Science and Technology**,2011,36(9):41-44. (in Chinese)
[15] 陈信全,都立辉,鞠兴荣,等. 乳酸片球菌素 PA-1 在大肠杆菌中的表达与纯化[J]. 食品科学,2016,37(3):97-102.
CHEN X Q,DU L H,JU X R,et al. Expression and purifi cation of pediocin PA-1 in *Escherichia coli*[J]. **Food Science**,2016,37(3):97-102. (in Chinese)
[16] 余占桥,杨芳,张日俊. 细菌素异源表达的研究进展[J]. 中国畜牧兽医,2010,37(2):51-55.
YU Z Q,YANG F,ZHANG R J. Advances on heterologous expression of bacteriocins[J]. **China Animal Husbandry & Veterinary Medicine**,2010,37(2):51-55. (in Chinese)
[17] 刘国荣,孙勇,李平兰. Ⅱa 类乳酸菌细菌素的异源表达研究进展[J]. 食品科学,2012,33(5):323-327.
LIU G R,SUN Y,LI P L. Research advances in heterologous expression of class Ⅱ a bacteriocins from lactic acid bacteria[J]. **Food Science**,2012,33(5):323-327. (in Chinese)
[18] 郭行. 鼠李糖乳杆菌 LS-8 中新型细菌素的挖掘及抑菌机制的研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2020.
[19] SIDHU P K,NEHRA K. Bacteriocin-capped silver nanoparticles for enhanced antimicrobial efficacy against food pathogens[J]. **IET Nanobiotechnology**,2020,14(3):245-252.
[20] BAGDE P,VIGNESHWARAN N. Improving the stability of bacteriocin extracted from *Enterococcus faecium* by immobilization onto cellulose nanocrystals[J]. **Carbohydrate Polymers**,2019,209:172-180.
[21] 李亚玲. 乳酸片球菌细菌素的分离纯化及理化性质研究[D]. 天津:天津大学,2007.
[22] 高兆建,张艳秋,宋玉林,等. 筛选自泡菜的发酵乳杆菌细菌素纯化及抑菌特性分析[J]. 食品工业科技,2021,42(3):201-207,283.
GAO Z J,ZHANG Y Q,SONG Y L,et al. Purification and antibacterial properties of bacteriocin produced by lactobacilus fermentum isolated from pickled vegetables[J]. **Science and Technology of Food Industry**,2021,42(3):201-207,283. (in Chinese)
[23] 陆洲,戴意强,Hafiz Abdul RASHEED,等. 植物乳杆菌 D1501 发酵黄浆水的抑菌活性及其中细菌素的分离与鉴定[J]. 食品科学,2020,41(24):117-124.
LU Z,DAI Y Q,RASHEED H,et al. Antimicrobial activity of soy whey fermented by *Lactobacillus plantarum* D1501 and purification and identification of bacteriocin from it[J]. **Food Science**,2020,41(24):117-124. (in Chinese)