

# 嗜热链球菌 CGMCC 1.1864 所产的 一种新型细菌素 ST9

李琳 贾士儒\* 谭之磊 杨洪江 高玉荣 范宝庆 王国良

(工业微生物教育部重点实验室 天津科技大学 天津 300457)

**摘要:** 本文利用琼脂扩散法测定嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*) CGMCC 1.1864 发酵上清液的抑菌效果, 结果表明此菌能够产生抑菌物质, 且在排除有机酸和过氧化氢的影响后上清液不但能抑制革兰氏阳性菌, 对革兰氏阴性菌也有抑制能力。此抑菌物质具有热稳定性, 于 100°C 处理 2 h 及 121°C 处理 20 min 仍保留抑菌活性, 但若将其在 100°C 处理 2 h 的上清液立即置于 -20°C 保存, 其抑菌活性有较大损失。常温下(37°C), 该抑菌物质在 pH 2.0–9.0 范围内有很好的稳定性。发酵上清液经各种蛋白酶及  $\alpha$ -淀粉酶处理后抑菌活性完全消失, 而对过氧化氢酶不敏感, 表明此抑菌物质为多肽, 属于细菌素, 本文初步将其命名为嗜热链球菌素 ST9。由于 ST9 对其产生菌具有吸附作用, 选择 pH 吸附释放法对该嗜热链球菌素进行粗提, 然后经 Sephadex G-25 凝胶层析柱除去杂蛋白, 最后冷冻干燥得纯品。通过 Tricine-SDS-PAGE 分析得到其分子量约为 5.0 kD。

**关键词:** 嗜热链球菌, 细菌素, 纯化, 抑菌活性, 抑菌谱

## Thermophilin ST9, a New Bacteriocin Produced by *Streptococcus thermophilus* CGMCC 1.1864

LI Lin JIA Shi-Ru\* TAN Zhi-Lei YANG Hong-Jiang GAO Yu-Rong  
FAN Bao-Qing WANG Guo-Liang

(Key Laboratory of Industrial Microbiology, Ministry of Education, Tianjin University of Science & Technology,  
Tianjin 300457, China)

**Abstract:** In this study, antimicrobial activity of the culture supernatant of *Streptococcus thermophilus* CGMCC 1.1864 was investigated with the agar diffusion method. The subsequent experiments results indicated the antimicrobial activity of the supernatant were not due to the existence of hydrogen peroxide and organic acid in the solution. The antimicrobial spectrum assays showed that the supernatant could inhibit the growth of both Gram-negative bacteria and Gram-positive bacteria. Heat stability test was also performed with the antimicrobial substance and no activity lost was observed after 2 h incubation at 100°C or 20 min at 121°C. However, its activity was reduced significantly if the boiling samples were transferred to -20°C freezer for storage immediately. It was also tolerable to changes of pH levels, no significant reduction of its

基金项目: 国家 973 计划项目(No. 2007CB714305); 国家 863 计划项目(No. 2006AA10Z347)

\*通讯作者: Tel: 86-22-60601598; ✉: jiashiru@tust.edu.cn

收稿日期: 2009-09-21; 接受日期: 2009-11-19

antimicrobial activity was observed at pH 2.0 through pH 9.0. The treatment of proteases and  $\alpha$ -amylase could completely abolish the antimicrobial activity of the supernatant, while no activity loss was observed when treated with catalase. These results demonstrated that the antimicrobial substance belonged to bacteriocin family and was named as thermophilin ST9 tentatively. Since thermophilin ST9 could specially adsorb to the producing strain, pH-adsorption method was chosen to purify the bacteriocin, and subsequently the SephadexG-25 column chromatography was adopted to eliminate other proteins. Elution solution was further concentrated with freeze-drying method to obtain thermophilin ST9 powder. Purified thermophilin ST9 was subjected to Tricine-SDS-PAGE analysis and its molecular mass was determined to be 5.0 kD.

**Keywords:** *Streptococcus thermophilus*, Bacteriocin, Purification, Antimicrobial activity, Antimicrobial spectrum

细菌素是由某些细菌在代谢过程中产生的一类具有抑菌活性的蛋白质或多肽,其抑菌范围不局限于同源菌,也可以杀死或抑制食物中的一些腐败菌和病原菌<sup>[1]</sup>。由于产生菌对其细菌素有自身免疫性,因此产细菌素的菌株在生态环境中具有相当强的竞争力。尽管许多革兰氏阳性菌和阴性菌都能产生细菌素,但乳酸菌所产的细菌素更能引起人们的兴趣,因为乳酸菌在食品中有着广泛的应用,安全性较高,所以其所产细菌素一般也被认为是安全的<sup>[2]</sup>。

乳酸菌素一般是带正电荷的小分子蛋白,大部分对热稳定且具有高等电点和亲水特性,可以与食品在加热处理时一起使用,缩短加热时间,降低加工过程中的能耗,减小营养成分的破坏程度。乳酸菌素普遍呈现不可逆的杀菌方式,在食品中稳定,可在人体内被降解和消化,对健康无害且在低浓度下具有活性。因此,由乳酸菌产生的细菌素可以用于食品防腐,控制食品中的某些腐败菌和病原菌,延长保质期<sup>[3]</sup>。本文对一株嗜热链球菌所产的抑菌物质进行了研究,通过其生物化学特性初步判断此抑菌物质为细菌素,并通过 Tricine-SDS-PAGE 对其分子量进行了测定。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验菌种:**产抑菌物质菌株:嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*) CGMCC 1.1864; 主要指示菌:干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*, 本实验室保藏), 其余指示菌及其来源见表 1。

**1.1.2 培养基:**乳酸菌选用 MRS 培养基<sup>[4]</sup>, 李斯特氏菌采用 LB 培养基<sup>[5]</sup>, 其余指示菌均采用肉汤培养基<sup>[5]</sup>。

**1.1.3 主要药品及仪器:**胃蛋白酶(北京奥博星)、过氧化氢酶(Sigma 公司)、木瓜蛋白酶(Sigma 公司)、蛋白酶 K (Sigma 公司)、 $\alpha$ -淀粉酶(北京奥博星)。自动核酸蛋白分离层析仪(MD99-3 型, 上海沪西分析仪器厂有限公司), 垂直电泳槽(DYCZ-24DN 型, 北京市六一仪器厂), 电泳仪(DYY-8C 型, 北京市六一仪器厂)。其他试剂均为市售分析纯。

### 1.2 方法

**1.2.1 菌种培养条件:**所有菌株使用前在斜面培养基中活化 2 次。嗜热链球菌 37°C 培养 12 h, 以 1% 接种量转接到 150 mL MRS 培养基中, 30°C 静置培养 24 h, 测定抑菌活性。指示菌 37°C 培养 12 h, 10 倍稀释法将菌液稀释至浓度约  $1 \times 10^6$  CFU/mL, 备用<sup>[6]</sup>。

**1.2.2 琼脂扩散法测定抑菌活性:**在无菌平皿中倒入 10 mL 融化的素琼脂(2%), 待其充分冷却凝固后, 放入已灭菌的牛津杯数个, 并按一定次序排列整齐。将 100 mL 固体 MRS 培养基融化后冷却至 50°C, 加入指示菌液 1 mL, 迅速混合均匀, 用无菌移液管吸 15 mL 于放有牛津杯的平皿中, 冷却后取出牛津杯。将待测液 100  $\mu$ L 加入到牛津杯形成的小孔中, 37°C 培养 18 h, 用游标卡尺测定抑菌圈直径。

**1.2.3 嗜热链球菌发酵上清液抑菌活性分析:**(1) 排除有机酸影响:将嗜热链球菌发酵液 5000 r/min 离心, 所得上清液用 5 mol/L NaOH 溶液调至 pH 6.0, 以排除有机酸的影响, 然后用 0.22  $\mu$ m 微滤膜过滤除菌, 琼脂扩散法测定上清液抑菌活性;(2) 排除过氧化氢影响:将发酵上清液于 80°C 水浴 10 min, 以排除 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的干扰, 然后用 0.22  $\mu$ m 微滤膜过滤除菌, 琼脂扩散法测定上清液抑菌活性<sup>[7]</sup>。

**1.2.4 发酵上清液热稳定性:**(1) 取 1.5 mL 上清液

于 100°C 温浴 2 h, 冷却至室温, 琼脂扩散法测定抑菌活性, 以未温浴的上清液作对照; (2) 将 100°C 水浴 2 h 的上清液迅速置于 -20°C 保存 12 h, 同样方法测抑菌活性, 以未处理过的原上清液作为对照; (3) 取 5 mL 上清液于试管中, 121°C 加热 20 min 后测抑菌活性。

**1.2.5 发酵上清液对 pH 值的稳定性:** 用 2 mol/L NaOH 和 2 mol/L HCl 将发酵上清液 pH 调至 pH 2.0-11.0, 37°C 温浴 2 h, 以相同 pH 的空白 MRS 培养基和 pH 6.0 的发酵上清液作为对照, 测定细菌素抑菌活性变化。

**1.2.6 发酵上清液对酶的敏感性:** 实验中应用了胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、蛋白酶 K、过氧化氢酶及淀粉酶。将 5 种酶溶液分别加入发酵上清液, 使酶的终浓度为 2 mg/mL, 37°C 温浴 2 h, 不加任何酶的上清液作为对照, 残留抑菌活性通过上述方法测定。

**1.2.7 抗菌物质的抑菌谱:** 利用琼脂扩散法测定嗜热链球菌所产抑菌物质的抑菌谱, 所用指示菌及其培养基见表 1。实验重复 3 次。

**1.2.8 嗜热链球菌素 ST9 的产生与菌体的生长关系:** 嗜热链球菌 37°C 培养过夜, 以 1% 接种量转接到 15 瓶含有 150 mL MRS 培养基的三角瓶中, 30°C 静置培养 30 h, 每 2 h 取 10 mL 发酵液, 测其 pH 值、 $OD_{600}$  及其发酵上清液抑菌活性。细菌素抑菌活性用每毫升的任意单位(AU)来表示。一个任意单位 AU 被定义为: 对细菌素溶液进行连续 2 倍稀释, 能够对指示菌产生明显抑菌圈的最大稀释倍数的倒数。

**1.2.9 嗜热链球菌素 ST9 的分离提取:** 将嗜热链球菌以 1% 接种量接于 100 mL MRS 培养基中, 30°C 培养至最佳产细菌素时间。用 5 mol/L NaOH 溶液调发酵液 pH 6.0, 4°C 振荡 2 h 使细菌素充分吸附到菌体上。离心收集菌体, 用 pH 6.0 的  $Na_3PO_4$  溶液 (5 mmol/L) 洗涤菌体 1 次, 再将菌体悬于 pH 2.0 的 NaCl 溶液 (100 mmol/L) 中, 4°C 振荡 5 h 后离心去除菌体, 取上清液<sup>[8]</sup>, 旋转蒸发浓缩 10 倍, 得细菌素粗提液。利用 Sephadex G-25 凝胶柱将粗提液进行凝胶层析, 收集活性峰并进行冷冻干燥得纯品。

**1.2.10 蛋白含量的测定:** 通过考马斯亮蓝染色法测定细菌素提取液中蛋白浓度<sup>[9]</sup>。

**1.2.11 嗜热链球菌素 ST9 的分子量测定:** 采用 Tricine-SDS-PAGE 测定嗜热链球菌素 ST9 分子量<sup>[10]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 嗜热链球菌发酵上清液的抑菌活性及其抑菌谱

实验表明在排除有机酸和过氧化氢的干扰后, 嗜热链球菌发酵上清液仍然具有抑菌活性。利用琼脂扩散法测定上清液对几种常见指示菌的抑菌活性, 结果表明(表 1), 中性发酵上清液显示出较广的抑菌范围, 不但对部分乳酸菌和部分革兰氏阳性菌有抑制力, 而且对革兰氏阴性菌也有活性, 如: 弗氏志贺氏菌、绿脓假单胞杆菌。空白 MRS 培养基对各指示菌均没有抑制效果。

有报道称, 产自革兰氏阳性菌的细菌素对革兰氏阴性菌没有抑菌作用<sup>[11]</sup>, 而本实验结果却与之相反, 类似细菌素也有报道, 如 Bradley 等人报道的植物乳杆菌素<sup>[12]</sup>和 Ahmad Cheikhyoussef 等人报道的 BLIS<sup>[13]</sup>。对革兰氏阴性菌的抑制作用使细菌素在食品安全方面的应用更加广泛。

表 1 无细胞上清液的抑菌谱  
Table 1 Antimicrobial spectrum of the cell-free supernatant

指示菌名称 Indicator species	来源 Origin	培养基 Growth medium	抑制活性 Antimicrobial activity
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC63589	肉汤	+
藤黄八叠球菌 <i>Sarcina flava de Bary</i>	CMCC29001	肉汤	-
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	实验室保藏	肉汤	+
李斯特氏菌 <i>Listeria monocytogens</i>	实验室保藏	LB	++
大肠杆菌 <i>Esherichia coli</i>	CGMCC 1.90	肉汤	+
鼠伤寒沙门氏菌 <i>Salmonella typhimurium</i>	CGMCC 1.1174	肉汤	-
弗氏志贺氏菌 <i>Shiglla flexneri</i>	CGMCC 1.1868	肉汤	++
绿脓假单胞杆菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	实验室保藏	肉汤	++
干酪乳杆菌 <i>Lactobacillus casei</i>	实验室保藏	MRS	++

注: +: 有抑菌活性; -: 无抑菌活性。所用菌株培养温度均为 37°C。

Note: +: Bacteriocin activity; -: No bacteriocin activity. All strains were propagated at 37°C.

## 2.2 发酵上清液对 pH、温度的稳定性及对酶的敏感性(表 2)

实验发现该上清液在 pH 2.0–9.0 之间均保持活性,说明此抑菌物质稳定性较好,适宜的 pH 范围广泛,类似抑菌物质还有 Todorov 等人报道的一种类细菌素物质<sup>[14]</sup>,而 nisin 只在酸性范围内保持良好活性<sup>[15]</sup>。

无菌上清液于 121°C 处理 20 min,冷却至室温测其活性,结果表明仍有活性存在;100°C 处理 2 h,抑菌活性也不减弱,表明此抑菌物质对热稳定,该特性类似于大多数细菌素。其中嗜热链球菌素 A (Somkuti)、嗜热链球菌素 13 (Marciset)以及嗜热链球菌素 T (Aktypis),均具有很好的热稳定性。

但若将 100°C 处理 2 h 的样品立即置于-20°C 保存 12 h,上清液抑菌活性则有较大损失。原因可能是 100°C 到 20°C 的温差较大,这种环境的剧烈改变使得抑菌物质高级结构发生不可逆变化,抑菌活性也随之丧失。

上清液被各种蛋白酶处理后活性完全丧失,证明了此抑菌物质的蛋白本质,而经过氧化氢酶作用后活性无变化,表明此抑菌效果不是由过氧化氢引起的。实验中还用 $\alpha$ -淀粉酶对上清液进行了处理,结果没有抑菌圈出现,即活性丧失。这可能是由于此抑菌物质活性基团中含有糖基或脂类。这与 Mathot AG 等人研究的嗜热链球菌素 580、Ward 等人发现的嗜热链球菌素 A 及 Aktypis 研究的嗜热链球菌素 T 的现象一致,均对 $\alpha$ -淀粉酶敏感<sup>[16]</sup>。

## 2.3 嗜热链球菌的生长曲线及产嗜热链球菌素最佳时间(图 1)

将嗜热链球菌于 30°C 发酵 30 h 后,酸碱度从最初 pH 6.1 降到 pH 4.5,菌体量则在 16 h 时达到最大

值。随着菌体的生长,抑菌物质活性也在不断增加,并在菌体生长的稳定期达最高(700 AU/mL),继续培养并没有使抑菌活性增大,30 h 后,抑菌活性反而下降(数据略)。活性下降的原因可能是菌体生长过程中产生的蛋白酶对 ST9 的降解作用,或是 ST9 吸附到产生菌上,或者反馈调节等作用<sup>[15]</sup>。

## 2.4 嗜热链球菌素的提取纯化

### 2.4.1 pH 吸附释放法:

已有文献报道利用 pH 吸附释放法来提取细菌素,最初 Yang 等人用此法提取 nisin<sup>[8]</sup>和其他 3 种细菌素,但并不是所有细菌素都对其产生菌有吸附作用,Todorov 所研究的 8 种细菌素对产生菌均无吸附作用<sup>[15]</sup>。本实验测出此嗜热链球菌素类似于 nisin 对产生菌有吸附作用,因此,可以采用 pH 吸附释放法提取 ST9。由于 pH 值对吸附作用有着很大影响,当 pH 值在 6.0 左右时吸附作用最强,而在 2.0 左右时细菌素很容易能吸附,所以实验中将发酵后溶液调至不同 pH 值,选择最佳吸附 pH (图 2)和最优解吸附 pH (表 3)。结果表明,嗜热链球菌素 ST9 对产生菌的吸附作用在 pH 5.5 时最好,而在 pH 为 1.8 时,解吸附效果最好。

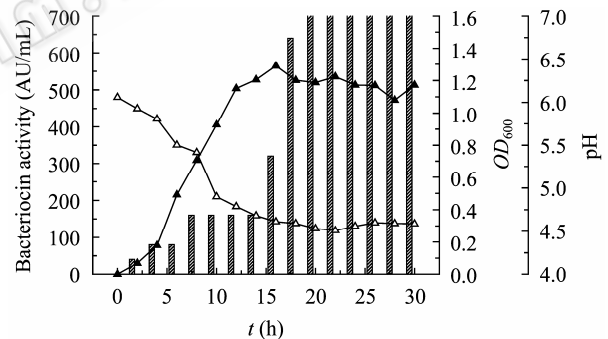


图 1 嗜热链球菌所产抑菌物质的活性(▨)与菌体生长(▲)及 pH(△)之间的关系曲线

Fig. 1 Growth (▲) and bacteriocin activity (▨) of *Streptococcus thermophilus* at uncontrolled pH(△) at 30°C

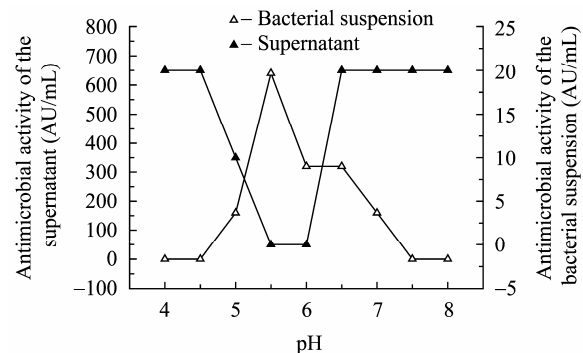


图 2 pH 对 ST9 与嗜热链球菌吸附作用的影响

Fig. 2 Effect of pH on the adsorption of ST9 onto producer cells

表 2 不同处理方式对上清液中抑菌物质的活性影响

Table 2 Factors affecting the antimicrobial activity of the supernatant	
处理方式 Treatment	抑菌活性 Antimicrobial activity
pH 2.0–9.0	+
100°C, 2 h; 121°C, 20 min	+
100°C, 2 h → -20°C, 12h	+
胃蛋白酶 Pepsin	-
蛋白酶 K Proteinase K	-
木瓜蛋白酶 Papain	-
过氧化氢酶 Catalase	+
$\alpha$ -淀粉酶 $\alpha$ -amylase	-

**2.4.2 凝胶层析法纯化粗提液:**将 pH 吸附释放法所得粗提液过 Sephadex G-25 凝胶层析柱。上样量 1.0 mL, 流速 0.3 mL/min, 5 min 收集一管, 经琼脂扩散法测定各管抑菌活性。结果表明, 110–120 min 所收集的液体有抑菌活性。混合有抑菌活性的收集液进行第 2 次上柱, 上样量 1.0 mL, 流速 1.0 mL/min, 结果见图 3。经测定, 在第 3 个峰处所收集的物质有抑菌活性, 即为细菌素峰。

### 2.5 嗜热链球菌素得率

由表 4 可以看出, 经过凝胶层析后细菌素的得率稍低, 但纯化倍数较高。粗提液经旋转蒸发后, 细菌素的得率为 64.0%, 纯化倍数为 4.2, 经凝胶层析后, 得率为 48.0%, 纯化倍数达到 23.1。这也说明了 pH 吸附释放法和凝胶层析法适合于细菌素的纯化。

### 2.6 嗜热链球菌素 ST9 分子量的测定

将分离纯化的嗜热链球菌素 ST9 样品经过 Tricine-SDS-PAGE 分析, 所得电泳图谱见图 4。图谱显示经 Sephadex G-25 凝胶层析后的样品呈单一条带, 分子量约 5.0 kD。

pH	解吸附后效价(AU/mL) Activity unit after desorption of ST9 onto producer cells		
	空白对照 Control	菌悬液 Bacterial suspension	上清液 Supernatant
1.5	0	0	40
1.8	0	0	80
2.0	0	0	20
2.3	0	40	0
2.5	0	160	0

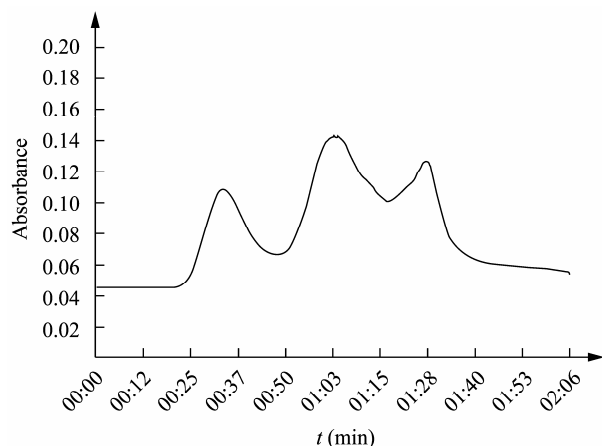


图 3 粗提液重过 Sephadex G-25 凝胶柱层析图  
Fig. 3 Crude extraction treated by the Sephadex G-25 column chromatography secondly

表 4 嗜热链球菌素 ST9 的纯化  
Table 4 Purification table for ST9

样品 Samples	发酵上清液 Supernatant	粗提液 Crude extraction	纯化液 Pure extraction
效价 Activity unit (AU/mL)	20	640	960
蛋白浓度 Protein concentration (mg/mL)	0.0898	0.678	0.187
体积 Volume (mL)	100	2	1
比活力 Specific activity (AU/mg)	222.7	944.0	5133.7
总活力 Total activity (AU)	1999.8	1280.1	960.0
得率 Yield (%)	100	64.0	48.0
纯化倍数 Purification fold	1	4.2	23.1

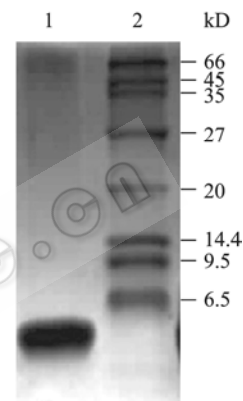


图 4 Tricine-SDS-PAGE 电泳分析图谱  
Fig. 4 Tricine-SDS-PAGE of thermophilin ST9

注: 1: 嗜热链球菌素 ST9; 2: 低分子量 Marker.

Note: 1: Thermophilin ST9; 2: Low-range molecular marker.

## 3 结论

实验中最显著的发现是嗜热链球菌所产抑菌物质对革兰氏阴性菌的抑制性。一般来说, 来自乳酸菌的细菌素只对革兰氏阳性菌有抑菌效果, 本文的结果与 Klaenhammer 的研究不一致<sup>[17]</sup>。

此抑菌物质对蛋白酶敏感, 可初步判断为细菌素; 其对热稳定, 能在较大 pH 范围内保持抑菌活性, 且为小分子量蛋白(< 10 kD), 由这些生化特性判断此嗜热链球菌素属于第二类细菌素; 而对淀粉酶的敏感性推断其活性结构中含有糖基或脂类, 此特征类似于第四类细菌素。因此, 还需从其结构和基因水平进一步研究此物质, 以探明其属于哪类细菌素, 并合理解释其热稳定性以及对革兰氏阴性菌的抑制作用。

由于此抑菌物质能够吸附到产生菌上, 并且这

种吸附作用只在一定 pH 范围内起作用, 当 pH 5.5 时吸附效果最好, 而当 pH 1.8 时能够完全解吸附。所以, 本文利用 pH 吸附释放法对其进行了粗提(片球菌素、明串珠菌素及 nisin 均可用此方法纯化<sup>[18]</sup>), 再将粗提液经 Sephadex G-25 凝胶层析柱纯化后得到具有活性的单一条带。纯化后活性为 960 AU/mL, 得率达 48.0%, 纯化倍数为 23.1。经 Tricine-SDS-PAGE 分析得到其分子量约为 5.0 kD。

嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*) CGMCC 1.1864 来自酸奶, 为益生菌, 可用于奶制品发酵, 而此菌所产嗜热链球菌素 ST9 能够在较广 pH 范围内保持活性, 抑制其他杂菌生长, 这就使得此菌作为发酵剂更有优势。所以, 进一步研究是很有必要的, 如测定食物成分以及处理方法对细菌素结构、溶解性和活性的影响, 此细菌素在发酵环境中对产品口感的影响以及发酵过程中细菌素产生情况等, 通过这些研究有望拓宽嗜热链球菌及其细菌素在食品中的应用范围。

## 参 考 文 献

- [1] 田晓乐, 孟庆繁, 周杰, 等. 微生物防腐剂——细菌素的研究与应用. 食品工业科技, 2004, **25**(1): 120–123.
- [2] Deegan LH, Cotter PD, Hill C, *et al.* Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal*, 2006, **16**(9): 1058–1071.
- [3] 赵玲艳, 邓放明, 杨细平, 等. 生物防腐剂——乳酸菌素. 中国食物与营养, 2005(2): 27–29.
- [4] 张刚. 乳酸细菌——基础、技术和应用. 北京: 化学工业出版社, 2007: 421.
- [5] 杜连祥, 路福平. 微生物学实验技术. 北京: 中国轻工业出版社, 2006: 349–350.
- [6] Wiegand I, Hilpert K, Hancock R. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature protocols*, 2008, **3**(2): 163–175.
- [7] 张艾青, 刘书亮, 敖灵. 产广谱细菌素乳酸菌的筛选和鉴定. 微生物学通报, 2007, **34**(4): 753–756.
- [8] Yang R, Johnson MC, Ray B. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, **58**(10): 3355–3359.
- [9] 李建斌, 余瑞元, 袁明秀, 等. 生物化学实验原理和方法. 北京: 北京大学出版社, 1990: 174–176.
- [10] Schagger. Tricine-SDS-PAGE. *Naturalprotocols*, 2006, **1**(1): 16–23.
- [11] Klaenhammer TR. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Review*, 1993, **12**(1/3): 39–85.
- [12] Lash BW, Mysliwiec TH, Gourama H. Detection and partial characterization of a broad-range bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014). *Food Microbiology*, 2005, **22**(2/3): 199–204.
- [13] Cheikhoussef A, Pogori N, Chen H, *et al.* Antimicrobial activity and partial characterization of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by *Bifidobacterium infantis* BCRC 14602. *Food Control*, 2009, **20**(6): 553–559.
- [14] Todorov SD, Dicks LMT. Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria Comparison of the bacteriocins. *Process Biochemistry*, 2006, **41**(1): 11–19.
- [15] 江芸, 高峰, 周光宏. 温度、pH 值对 nisin 抑菌活性的影响. 食品科技, 2002(8): 32–34.
- [16] Mathot AG, Beliard E, Thuault D. *Streptococcus thermophilus* 580 produces a bacteriocin potentially suitable for inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in hard cheese. *American Dairy Science Association*, 2003, **86**(10): 3068–3074.
- [17] Pascual LM, Daniele MB, Giordano W, *et al.* Purification and partial characterization of novel bacteriocin L23 produced by *Lactobacillus fermentum* L23. *Curr Microbiol*, 2008, **56**(4): 397–402.
- [18] 曾志刚, 陈英, 余柏松. 细菌素产生菌的筛选及其细菌素的分离纯化. 中国抗生素杂志, 2003, **28**(5): 257–259.