

环境因素对 PInA 诱导类植物乳杆菌产生 细菌素效果的影响

张香美^{1,2} 李平兰^{2*}

- (1. 河北经贸大学 生物科学与工程学院 河北 石家庄 050061)
(2. 中国农业大学 食品科学与营养工程学院 北京 100083)

摘要: 【目的】研究人工合成的 PInA (Plantaricin A) 诱导类植物乳杆菌 L-XM1 细菌素合成的功能及环境条件对其诱导效果的影响。【方法】制备类植物乳杆菌 L-XM1 Bac⁻ 培养物, 用人工合成的 PInA 对其进行诱导, 确定 PInA 在类植物乳杆菌 L-XM1 细菌素合成中的作用, 并通过比较不同温度、pH 以及 NaCl 浓度、乙醇浓度条件下 PInA 的诱导活性, 研究环境条件对 PInA 诱导效果的影响。【结果】在不同温度及 pH 条件下, 自诱导肽 PInA 的诱导活性有很大的差异, 较高的培养温度及 pH 有利于其诱导活性的发挥。不同浓度的 NaCl 对 PInA 的诱导活性影响不大。乙醇可以减弱 PInA 的诱导活性, 高浓度的乙醇完全抑制 PInA 的诱导活性。6% 乙醇对细菌素合成的抑制可以被 700 $\mu\text{g/L}$ 的 PInA 消除, 含有 8% 乙醇的培养基中, 恢复细菌素的合成需要浓度高达 1 000 $\mu\text{g/L}$ 的 PInA。【结论】环境条件可以影响 PInA 的诱导活性, 乙醇对细菌素合成的抑制可以通过增大 PInA 的浓度消除。

关键词: 细菌素, 类植物乳杆菌, 诱导肽, 群体感应

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31071591)

*通讯作者: Tel: 86-10-62737664; Fax: 86-10-62738678; ✉ lipinglan@cau.edu.cn

收稿日期: 2012-11-26; 接受日期: 2013-02-22

Effects of PlnA on bacteriocin production in *Lactobacillus paraplantarum*: influence of environmental factors

ZHANG Xiang-Mei^{1,2} LI Ping-Lan^{2*}

- (1. College of Biological Science and Engineering, Hebei University of Economics and Business, Shijiazhuang, Hebei 050061, China)
(2. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: [Objective] Function of PlnA in bacteriocin production of *Lactobacillus paraplantarum* L-XM1 and the influences of environmental conditions on its inducing effect were studied. **[Methods]** The function of PlnA was determined by adding synthesis PlnA to Bac⁻ cultures of *L. paraplantarum* L-XM1. Induction activity of PlnA was detected at different temperature, pH, NaCl and ethanol concentrations for investigating the effects of environmental conditions on PlnA. **[Results]** Variabilities for induction activity of PlnA were detected for different temperature and pH value, higher incubation temperature or relatively higher pH is helpful for its induction activity. No significant differences in PlnA induction activity were found among different concentrations of NaCl. The presence of ethanol was found to reduce the induction activity of PlnA, and at higher concentration of ethanol, its activity is inhibited. The inhibitory of bacteriocin production by 6% ethanol could be attenuated by simultaneously addition of high concentration of PlnA (700 µg/L), while restoring bacteriocin production in medium containing 8% ethanol need up to 1 000 µg/L PlnA. **[Conclusion]** The induction effects of PlnA could be affected by environmental factors, the inhibition effects of bacteriocin synthesis by ethanol could be eliminated by increasing PlnA concentrations.

Keywords: Bacteriocin, *Lactobacillus paraplantarum*, Inducing peptide, Quorum sensing

调控 II 类细菌素合成的群体感应系统 (Quorum sensing, QS) 由自诱导肽、组氨酸蛋白激酶以及感应调节蛋白组成, 因此被称为三组分系统^[1]。自诱导肽是调控 II 类细菌素合成的群体感应系统的信号分子。自诱导肽与组氨酸蛋白激酶的结合是启动细菌素合成的重要步骤。

细菌素的合成有很强的条件依赖性, 受到温度、pH、离子强度等的影响。另一方面, 对许多菌株来说, 细菌素基因的表达受到群体感应机制的调控。环境条件可能通过影响群体感应调控系

统来影响细菌素的合成^[2-4]。Nilsen 等认为^[5]环境因子可能会通过影响自诱导肽与组氨酸蛋白激酶的结合或者影响磷酸化水平来影响 QS 调控。pH、NaCl 以及乙醇影响 EntF 诱导 *Enterococcus faecium* CTC492 细菌素合成的活性^[5]。Hauge 等^[6]则认为溶剂种类以及溶质浓度等因素会影响自诱导肽的空间结构, 进而影响其诱导活性。

类植物乳杆菌 (*Lactobacillus paraplantarum*) L-XM1 是中国农业大学食品科学与营养工程学院应用微生物实验室从那不勒斯风味萨拉米香

肠中分离到的一株 IIb 类细菌素产生菌, 前期的研究表明, 该菌细菌素的合成具有菌体密度依赖效应, 在接种量低于 10^5 CFU/mL 时该菌失去细菌素合成能力; PCR 扩增及测序结果表明, 该菌存在群体感应调控系统编码基因 *plnABCD* 以及细菌素编码基因 *plnEF* 和 *plnJK*, 并初步认定该菌细菌素的合成受到群体感应机制调控^[7]。本研究根据 *L. paraplantarum* L-XM1 的自诱导肽基因(*plnA*)编码序列, 人工合成 PlnA 肽, 系统地研究了温度、pH 值等环境因素对诱导肽 PlnA 作用效果的影响, 为进一步解析环境条件如何通过影响群体感应组分进而影响细菌素合成奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

26 个氨基酸残基小肽 PlnA (KSSAYSLQMGATAIKQVKKLFKKWG) 由上海强耀生物科技有限公司合成, 纯度(HPLC)>95%。

1.2 菌种及培养基

L. paraplantarum L-XM1、*L. plantarum* B12 均由中国农业大学应用微生物学实验室分离并保存。

MRS 固、液体培养基配方参照文献[8]。

1.3 合成肽 PlnA 功能的确定

将过夜培养的 *L. paraplantarum* L-XM1 以 10^4 CFU/mL 接种量接种到新鲜的 MRS 培养基中, 获得不产细菌素的细胞表型(Bac⁻)。添加合成肽 PlnA 至终浓度为 50 μ g/L (A 组), 同时以不添加 PlnA 组作为对照(B 组), 37 °C 培养 14 h。将上述培养物 4 °C、 $10\ 000\times g$ 离心 10 min, 收集发酵上清液, 用 2.5 mol/L NaOH 调节 pH 6.0–6.5, 以 *L. plantarum* B12 为指示菌, 参照文献[9]用杯碟法测定细菌素活性。同时检测 50 μ g/L PlnA (C 组) 的抑菌活性以及 PlnA (终浓度 50 μ g/L)+B 组发酵

上清液(D 组)的抑菌活性作为对照。并用 20、50、100、300、500、700 以及 1 000 μ g/L PlnA 进行抑菌实验。

1.4 合成肽 PlnA 诱导活性的测定

基于上述实验结果, 确定诱导活性测定方法如下: 制备 *L. paraplantarum* L-XM1 Bac⁻培养物, 添加诱导物 PlnA, 37 °C 继续培养至设定菌密度, 4 °C、 $10\ 000\times g$ 离心 10 min, 收集发酵上清液, 用 60%饱和度硫酸铵过夜沉淀, 4 °C、 $10\ 000\times g$ 离心 10 min 收集沉淀, 溶于 0.02 mol/L 的 Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ (pH 7.0) 缓冲溶液中, 用 500 Da 超滤膜超滤除盐, 制备细菌素粗提物。调整粗提物浓度为 10 mL/100 mL 发酵液, 以 *L. plantarum* B12 为指示菌, 用杯碟法测定细菌素活性, 计算诱导活性。诱导活性定义: 诱导 Bac⁻表型培养物产生 1 个细菌素活力单位的诱导物浓度为 1 个诱导活力单位(IU)。

1.5 环境条件对合成肽 PlnA 诱导效应的影响

将过夜培养的 *L. paraplantarum* L-XM1 以 10^4 CFU/mL 的接种量分别接种到以下培养基中: (1) 初始 pH 值分别为 4、5、6、7、8、9、10 的 MRS 培养基中; (2) 含 0、2%、4%、6%、8%、10%乙醇的 MRS 培养基中; (3) 含有 0、2%、4%、6%、8% NaCl 的 MRS 培养基中。37 °C 培养至 $OD_{600}\approx 0.6$ 。或将过夜培养的 *L. paraplantarum* L-XM1 以 10^4 CFU/mL 的接种量接种到新鲜 MRS 培养基中, 分别置于 28 °C、30 °C、37 °C、42 °C 培养至 $OD_{600}\approx 0.6$ 。将合成肽 PlnA (终浓度 20 μ g/L) 添加到上述培养物中, 每个处理设 3 个重复, 继续培养至 $OD_{600}\approx 1.5$, 收集发酵上清液, 按 1.4 方法制备细菌素粗提物并测定诱导活性, 比较环境条件对 PlnA 诱导活性的影响。

1.6 提高合成肽 PlnA 的浓度减弱乙醇对细菌素合成的影响

将过夜培养的 *L. paraplantarum* L-XM1 以

10^4 CFU/mL 的接种量接种到含有 6% 和 8% 乙醇的新鲜 MRS 液体培养基中, 分别置于 37 °C 培养至 $OD_{600} \approx 0.6$ 。将合成肽 PlnA 添加到上述培养物中, 使得 PlnA 终浓度分别为 20、500、700、1 000 $\mu\text{g/L}$, 以不含有乙醇的培养物作为对照, 继续培养至 $OD_{600} \approx 1.5$, 按 1.4 方法制备细菌素粗提物并测定细菌素活性。

2 结果与讨论

2.1 合成肽 PlnA 诱导功能的确定

本文根据对 *L. paraplantarum* L-XM1 自诱导肽基因的测序结果, 人工合成自诱导肽 PlnA, 添加到 Bac⁻表型的 *L. paraplantarum* L-XM1 培养物中, 确定其功能。细菌素活性检测结果(图 1)显示: 添加合成肽 PlnA 进行诱导的实验组(A), 抑菌效果显著。对照 B 组未检测到抑菌活性。而对照 C 组(50 $\mu\text{g/L}$ PlnA 100 μL)、对照 D 组(终浓度为 50 $\mu\text{g/L}$ PlnA+B 组发酵上清液)都未检测到抑菌

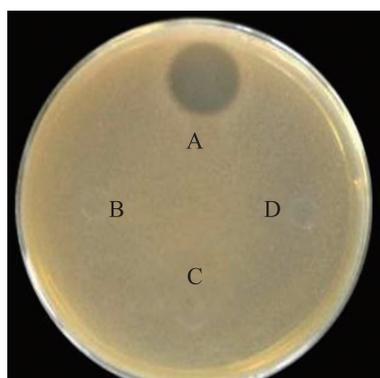


图 1 不同处理组的抑菌活性

Fig. 1 Antibacterial activity of different treatment groups

注: A: 经 50 $\mu\text{g/L}$ PlnA 诱导的类植物乳杆菌 L-XM1 Bac⁻表型培养物; B: 未经诱导的类植物乳杆菌 L-XM1 Bac⁻表型培养物; C: 50 $\mu\text{g/L}$ PlnA; D: B 组无细胞发酵上清液+50 $\mu\text{g/L}$ PlnA (终浓度)。

Note: A: The Bac⁻ culture of *L. paraplantarum* L-XM1 after being induced by 50 $\mu\text{g/L}$ PlnA; B: The Bac⁻ culture of *L. paraplantarum* L-XM1 without being induced; C: 50 $\mu\text{g/L}$ PlnA; D: The cell-free supernatant of treatment B+50 $\mu\text{g/L}$ PlnA (final concentration).

活性。因此, 抑菌活性不是来自 PlnA 本身, 也与 PlnA 以及对对照 B 组的协同抗菌效果无关。以上结果提示 PlnA 可以诱导 *L. paraplantarum* L-XM1 合成细菌素。*L. paraplantarum* L-XM1 的 *plnA* 基因 (Accession number JQ974918) 编码区与 *L. plantarum* C11 的 *plnA* 编码序列同源性为 100%, 而 *L. plantarum* C11 的 *plnA* 编码肽 PlnA (Plantaricin A) 已经证实具有信号分子功能^[10], 可以调控 *L. plantarum* C11 细菌素的合成, PlnA 对 *L. paraplantarum* L-XM1 细菌素的合成具有诱导调控功能尚属首次报道。

本文以 *L. plantarum* B12 作为指示菌, 用 20、50、100、300、500、700 及 1 000 $\mu\text{g/L}$ PlnA 进行抑菌实验, 均未观察到抑菌圈出现, 因此, 本文所涉及到的细菌素活性与 PlnA 自身的抑菌活性无关。前人的研究认为^[10-11], PlnA 是一个抗菌活性较弱、抗菌谱较窄的抗菌肽。Anderssen 等^[10]的研究表明, PlnA 对某些指示菌如 *L. plantarum* 965 等表现出抑菌活性, 而本文的研究结果显示, PlnA 对 *L. plantarum* B12 无抑制作用, 所以, PlnA 的抑菌活性能否呈现可能与指示菌的选择有关。

2.2 温度对合成肽 PlnA 诱导活性的影响

在不同温度条件下, 自诱导肽 PlnA 的诱导活性有很大的差异(图 2)。在 28 °C 培养条件下, PlnA 未呈现诱导活性; 在 30 °C-42 °C, 随着培养温度的升高, PlnA 的诱导活性增强; 42 °C 培养时, 诱导活性可以达到 852.18 IU/ μg 。可见, PlnA 的诱导活性随着温度的升高而增强。自诱导肽与受体之间的相互作用涉及静电相互作用^[12-13]。随着温度的升高, 静电相互作用增强, 提高了信号的传递效率, 因而 PlnA 的诱导活性也随之增强。

2.3 pH 对合成肽 PlnA 诱导活性的影响

pH 对合成肽 PlnA 诱导效应的影响见图 3。在 *L. paraplantarum* L-XM1 可以生长的 pH 范围内(pH 4-10), 自诱导肽 PlnA 的诱导活性有很大

的差异。在 $\text{pH}<5$ 时, PlnA 不能诱导 *L. paraplantarum* L-XM1 Bac⁻表型培养物产生细菌素。在 $5\leq\text{pH}\leq 10$ 的环境条件下, PlnA 均呈现诱导活性。在 $\text{pH} 5$ 时, PlnA 的诱导活性较弱。在 $\text{pH} 7$ 条件下, PlnA 诱导活性较高, 为 $785.97 \text{ IU}/\mu\text{g}$ 。在 $\text{pH} 10$ 时, PlnA 诱导活性最高, 达到 $874.70 \text{ IU}/\mu\text{g}$ 。Diep 等认为 pH 影响自诱导肽与组氨酸蛋白激酶的亲和力^[14]。也有研究认为, pH 等条件影响自诱导肽与受体之间的静电相互作用^[12-13]。 pH 如何影响 PlnA 及其受体的解离状态, 如何影响其与受体之间的相互作用, 进而影响 PlnA 的活性还有待于进一步研究。

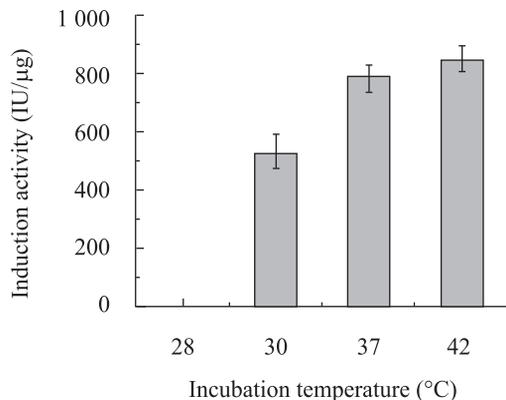


图2 培养温度对 PlnA 的诱导活性的影响

Fig. 2 Effect of temperature on the induction activity of PlnA

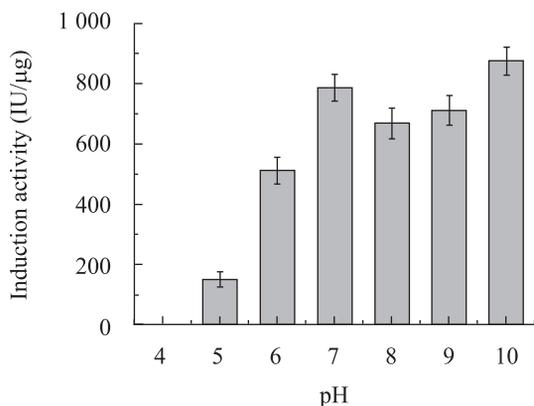


图3 pH 对 PlnA 诱导活性的影响

Fig. 3 Effect of pH on the induction activity of PlnA

2.4 NaCl 对合成肽 PlnA 诱导活性的影响

NaCl 对合成肽 PlnA 诱导效应的影响见图 4。对于 *L. paraplantarum* L-XM1, 在其可以生长的 NaCl 浓度范围内, NaCl 不会抑制 PlnA 的诱导活性 ($P>0.05$), 低浓度的 NaCl 反而会对其诱导活性有促进作用, 如 2% (W/W) 的 NaCl 则可提高 PlnA 的诱导活性 ($P<0.05$)。

本文的研究结果显示, 高达 8% 的 NaCl 对 *L. paraplantarum* L-XM1 细菌素合成并未造成显著影响, 这与前人的研究报道不一致。对于 *Carnobacterium piscicola* A9b, 添加细菌素 Carnobacteriocin B2 作为诱导肽诱导其自身合成作用可以被 NaCl 所抑制^[15]。Nilsen 等的研究表明, 肠球菌较为耐盐, 但是 *E. faecium* CTC 492 产 Enterocins A 和 B 也可被 NaCl 抑制^[5]。

2.5 乙醇对合成肽 PlnA 诱导活性的影响

乙醇对合成肽 PlnA 诱导效应的影响见图 5。与对照相比, 添加乙醇可以影响 PlnA 的诱导活性, 2% 以及 4% 乙醇显著抑制 PlnA 的诱导活性 ($P<0.01$), 6% 乙醇则完全抑制了 PlnA 的诱导活性。

高浓度的乙醇可能会影响诱导肽 PlnA 的空间结构, Hauge 等^[6]也认为在不同种类的溶剂中, 自诱导肽的空间结构会有差异。高浓度的乙醇对

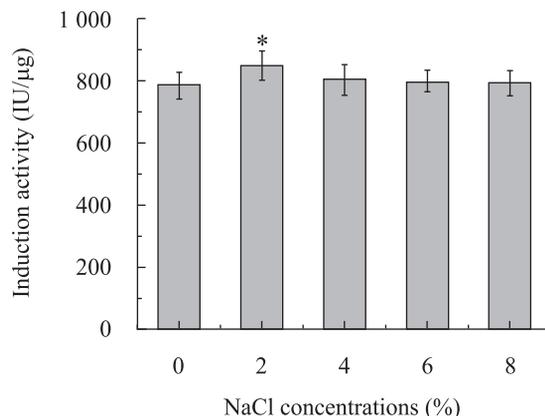


图4 不同浓度的 NaCl 对 PlnA 诱导活性的影响

Fig. 4 Effects of different concentrations of NaCl on the induction activity of PlnA

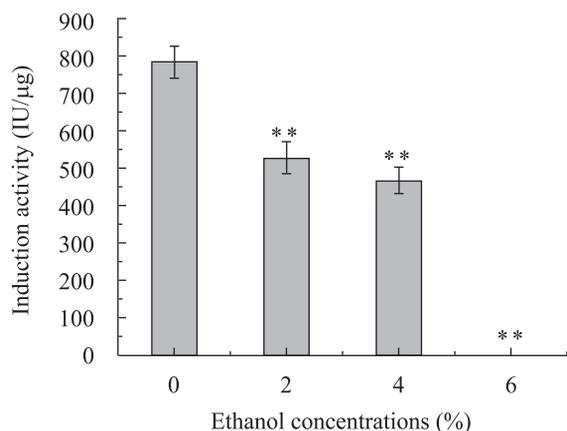


图5 不同浓度的乙醇对 PlnA 诱导活性的影响

Fig. 5 Effects of different concentrations of ethanol on the induction activity of PlnA

PlnA 诱导活性的负面影响可能是通过影响 PlnA 的空间结构, 进而影响诱导肽 PlnA 与其受体组氨酸蛋白激酶的特异性结合所致, 这与易华西 (2010) 的观点一致^[16]。

鉴于 6%乙醇浓度并不影响细菌的生长速度, 但是 PlnA 的诱导活性完全被抑制, 所以本实验选取乙醇这一个因素进行后续的研究。

2.6 提高合成肽 PlnA 的浓度减弱乙醇对细菌素合成的影响

提高合成肽 PlnA 的浓度可以弥补乙醇对细菌素合成的抑制, 结果见图 6。乙醇对细菌素合成的影响可以通过提高 PlnA 浓度来消除。而且乙醇浓度越高, 恢复细菌素合成所需要的 PlnA 的浓度就越大, 700 μg/L PlnA 即可在含 6%乙醇的培养基中启动细菌素合成, 但在含有 8%乙醇的培养基中, 恢复细菌素合成所需要的 PlnA 浓度要高达 1 000 μg/L, 而这个浓度的 PlnA 对照组已经达到诱导饱和。

不利的环境条件, 如乙醇对细菌素合成的影响可通过增加合成肽 PlnA 的添加量来弥补, 这与 Nilsen 等^[5]的研究相类似。乙醇会造成 PlnA 的变性。变性 PlnA 可与 PlnA 竞争结合组氨酸蛋白激酶受体位点, 因此需要更高浓度的 PlnA, 才能

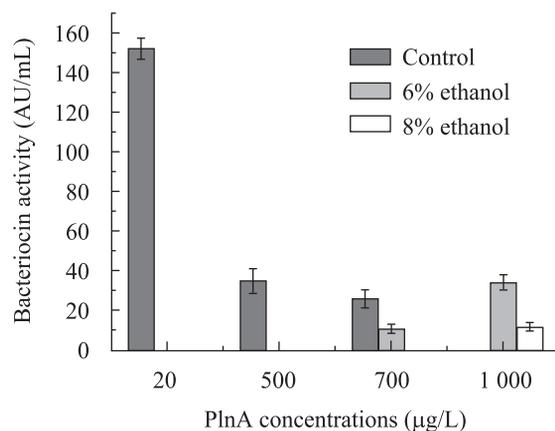


图6 提高合成肽 PlnA 的浓度减弱乙醇对细菌素合成的影响

Fig. 6 Attenuation of the effect of ethanol upon bacteriocin production by increasing PlnA concentration

在这一竞争过程中占据优势, 才能消除变性 PlnA 对群体感应调控的干扰, 启动细菌素合成。

3 结论

本文以类植物乳杆菌 L-XM1 Bac⁻培养物为检测对象, 研究了 PlnA 诱导细菌素合成的功能及环境条件对其诱导效果的影响, 结果发现 PlnA 具有诱导肽的功能, 可以诱导类植物乳杆菌 L-XM1 细菌素的合成, 其诱导作用受到温度、pH、乙醇等的影响, 但对 NaCl 浓度不敏感。在较高的乙醇浓度下, 可以通过增大诱导肽 PlnA 的浓度, 恢复细菌素的合成。

本研究结果对于认识环境条件对自诱导肽诱导效果的影响以及作用机制有重要的参考价值, 对揭示环境条件如何通过影响群体感应组分进而影响细菌素合成, 以及全面解析细菌素合成的群体感应调控机制, 具有重要的理论意义。

运用细菌素产生菌作为食品发酵剂, 有助于保障食品安全和传统发酵食品的标准化生产。但是食品的处理技术以及食品生产的环境因素会对细菌素的合成造成一定的影响, 了解食品发酵相关的环境因子对细菌素合成诱导调控系统的

影响,有利于更好地将菌株用于生产。

参考文献

- [1] Drider D, Fimland G, Héchard Y, et al. The continuing story of class IIa bacteriocins[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2006, 70(2): 564–582.
- [2] Gobbetti M, De Angelis M, Di Cagno R, et al. Cell-cell communication in food related bacteria[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 120(1/2): 34–45.
- [3] Maldonado A, Jiménez-Díaz R, Ruiz-Barba JL. Induction of plantaricin production in *Lactobacillus plantarum* NC8 after coculture with specific Gram-positive bacteria is mediated by an autoinduction mechanism[J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(5): 1556–1564.
- [4] Verluyten J, Messens W, De Vuyst L. Sodium chloride reduces production of curvacin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* strain LTH 1174, originating from fermented sausage[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(4): 2271–2278.
- [5] Nilsen T, Nes IF, Holo H. An exported inducer peptide regulates bacteriocin production in *Enterococcus faecium* CTC492[J]. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(7): 1848–1854.
- [6] Hauge HH, Mantzilas D, Moll GN, et al. Plantaricin A is an amphiphilic α -helical bacteriocin-like pheromone which exerts antimicrobial and pheromone activities through different mechanisms[J]. *Biochemistry*, 1998, 37(46): 16026–16032.
- [7] 张香美. 类植物乳杆菌 L-XM1 细菌素合成的群体感应调控机制研究[D]. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2012.
- [8] De-Man JC, Rogosa M, Sharpe E. A medium for the cultivation of Lactobacilli[J]. *Journal of Applied Bacteriology*, 1960, 23: 130–135.
- [9] Mayr-Harting A, Hedges AJ, Berkeley RCW. *Methods in Microbiology*[M]. New York: Academic Press. 1972: 315–342.
- [10] Anderssen EL, Diep DB, Nes IF, et al. Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: Two new two-peptide bacteriocins, plantaricins EF and JK, and the induction factor plantaricin A[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(6): 2269–2272.
- [11] Diep DB, Straume D, Kjos M, et al. An overview of the mosaic bacteriocin *pln* loci from *Lactobacillus plantarum*[J]. *Peptides*, 2009, 30(8): 1562–1574.
- [12] Eijsink VGH, Axelsson L, Diep DB, et al. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication[J]. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 2002, 81(1/4): 639–654.
- [13] Kleerebezem M, Quadri LE. Peptide pheromone-dependent regulation of antimicrobial peptide production in Gram-positive bacteria: A case of multicellular behavior[J]. *Peptides*, 2001, 22(10): 1579–1596.
- [14] Diep DB, Mathiesen G, Eijsink VGH, et al. Use of lactobacilli and their pheromone-based regulatory mechanism in gene expression and drug delivery[J]. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2009, 10(1): 62–73.
- [15] Aymerich T, Artigas MG, Garriga M, et al. Effect of sausage ingredients and additives on the production of enterocin A and B by *Enterococcus faecium* CTC492. Optimization of *in vitro* production and anti-listerial effect in dry fermented sausages[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2000, 88(4): 686–694.
- [16] 易华西. 分泌广谱抗菌肽乳酸菌的筛选及高效表达的调控研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学博士学位论文, 2010.