

研究报告

Plantaricin 163 对热杀索丝菌的抗菌活性及其作用机制

杜贺超 李秀秀 陆兆新 别小妹 赵海珍 张充 吕凤霞*

(南京农业大学食品科技学院 江苏 南京 210095)

摘要:【背景】热杀索丝菌(*Brochothrix thermosphacta*)为鲫鱼在 4 °C 贮藏过程中的主要腐败菌, Plantaricin 163 是由植物乳杆菌产生的一种新型广谱细菌素, 能明显延长鲫鱼的贮藏期。【目的】研究 Plantaricin 163 对热杀索丝菌的抗菌活性和作用机制。【方法】通过测定最小抑菌浓度 (Minimum inhibitory concentration) 和杀菌动力学了解 Plantaricin 163 对热杀索丝菌的抗菌效果, 并从电导率的变化、核酸和蛋白的泄露、流式细胞实验、扫描电镜和透射电镜观察等 4 个方面探讨 Plantaricin 163 对热杀索丝菌的作用机制。【结果】Plantaricin 163 对热杀索丝菌的最小抑菌浓度为 32 μg/mL, 优于 Nisin 的作用效果, 作用方式为杀菌模式, 6 h 内能完全杀死热杀索丝菌。Plantaricin 163 能够通过增加热杀索丝菌细胞膜的通透性, 增加胞外电导率, 进而破坏细胞膜完整性, 导致内容物泄漏, 并影响细胞的外部形态和内部结构, 从而导致菌体细胞瓦解死亡。【结论】Plantaricin 163 可以破坏热杀索丝菌的细胞膜和内部结构, 发挥抗菌活性。

关键词: 细菌素, Plantaricin 163, 热杀索丝菌, 抗菌活性, 抗菌机制, 天然保鲜剂

Antibacterial activity and mechanism of action of Plantaricin 163 against *Brochothrix thermosphacta*

DU He-Chao LI Xiu-Xiu LU Zhao-Xin BIE Xiao-Mei ZHAO Hai-Zhen
ZHANG Chong LU Feng-Xia*

(College of Food and Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

Abstract: [Background] *Brochothrix thermosphacta* is the main spoilage bacterium in Crucian Carp (*Carassius auratus*) during storage at 4 °C. Plantaricin 163, a new broad-spectrum bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*, significantly extends the shelf life of crucian carp. [Objective] To investigate the antibacterial activity and mechanism of action of Plantaricin 163 against *B. thermosphacta*. [Methods] The minimum inhibitory concentration and bactericidal kinetics of Plantaricin 163 were determined to measure the antimicrobial effect of Plantaricin 163 on *B. thermosphacta*. Change in conductivity, and nucleic acid and protein leakage were measured, and flow cytometry, scanning electron microscopy, and transmission electron microscopy were performed, to determine the mechanism of action of Plantaricin 163 against *B. thermosphacta*.

Foundation item: Key Technologies Research and Development Program of China (2015BAD16B04)

*Corresponding author: Tel: 86-25-84395963; E-mail: lufengxia@njau.edu.cn

Received: December 13, 2017; Accepted: April 04, 2018; Published online (www.cnki.net): April 13, 2018

基金项目: 国家科技支撑计划(2015BAD16B04)

*通信作者: Tel: 86-25-84395963; E-mail: lufengxia@njau.edu.cn

收稿日期: 2017-12-13; 接受日期: 2018-04-04; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-04-13

[Results] The MIC of Plantaricin 163 against *B. thermosphacta* was found to be 32 $\mu\text{g/mL}$, which was better than that of Nisin, and the mode of action of the bacteriocin was killing of cells instead of growth inhibition. The permeability of the cell membrane was increased and caused a change in extracellular conductivity, thereby destroying the integrity of the cell membrane and resulting in the leakage of cell contents. The external morphology and internal structure of the cells were affected, eventually leading to cell death. **[Conclusion]** Plantaricin 163 can destroy the membrane and internal structure of *B. thermosphacta*.

Keywords: Bacteriocin, Plantaricin 163, *Brochothrix thermosphacta*, Antibacterial activity, Antibacterial mechanism, Preservative

热杀索丝菌(*Brochothrix thermosphacta*)是一种革兰氏阳性兼性厌氧型长杆菌,最适生长温度为20–25 $^{\circ}\text{C}$ 。研究已报道,热杀索丝菌广泛存在于真空包装和气调包装中,是引起牛、羊、猪等肉制品及水产品腐败的主要微生物之一。江芸等^[1]的研究表明热杀索丝菌是真空包装冷却猪肉4 $^{\circ}\text{C}$ 贮藏末期中的优势腐败菌之一。Reid等^[2]研究发现热杀索丝菌是真空包装牛肉中主要的嗜冷菌之一。Silbande等^[3]研究认为热杀索丝菌是金枪鱼冰贮过程中的主要腐败菌。因其兼性厌氧和嗜冷的特点,即便在真空包装和冷藏条件下也能生长繁殖,利用营养产生腐败物质,导致肉品腐败和变质^[4]。不仅造成经济损失,也给人类健康带来危害。因此,开发针对热杀索丝菌的高效防腐剂对于肉制品及水产品的防腐保鲜具有重要意义。目前人们对食品防腐剂的使用要求越来越严格,化学防腐剂因存在安全和残留问题引起社会恐慌,天然生物防腐剂因安全、环保、高效的特点正在逐渐受到研究者的关注^[5-6]。

细菌素是由乳酸菌产生的一类抗菌多肽和蛋白,能有效抑制食源性致病菌和腐败菌^[7]。乳酸菌本身具有无毒、高稳定性和安全性的特性(Generally regarded as safe, GRAS),使得乳酸菌细菌素在食品保鲜上的应用受到了广泛的关注^[8]。关于细菌素作用机制的研究主要集中在I类和IIa类,不同类型的细菌素作用机理不尽相同,总的来说包括细胞膜损伤、阻碍细胞分裂以及影响基因表达和蛋白的产生^[9]。大部分细菌素能通过与其敏感菌细胞膜上特异位点结合,使细胞膜形成孔道,破坏膜结构的完整性从而引起离子、氨基酸和ATP外渗,进而导致细胞死亡。细胞壁前体类脂II(Lipid II)是最常见

的结合位点,其次还有细胞膜相关的甘露磷酸转移酶系统(Man-PTS)^[10-12]。有的细菌素如Nisin与Lipid II特异性结合,不仅细胞膜形成孔道,低浓度时还能抑制细胞壁的合成,从而发挥双重作用机制^[13]。此外,还能通过干扰DNA、RNA和蛋白质的代谢来杀死敏感菌^[14]。目前,关于细菌素作用机制的研究主要集中在对 G^+ 致病菌的研究,对热杀索丝菌作用机制的研究鲜有报道。

本实验室前期通过Illumina MiSeq高通量测序和聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)的方法^[15],发现热杀索丝菌是鲫鱼在4 $^{\circ}\text{C}$ 真空贮藏过程中的主要腐败菌,并筛选到一种高效生物保鲜剂Plantaricin 163,能够明显延长鲫鱼的贮藏期。Plantaricin 163是一种由植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)产生的分子量为3553.2 Da的新型广谱细菌素,MALDI-TOF-MS/MS分析显示Plantaricin 163由32个氨基酸组成:VFHAYSARGNYGNC PANWPS CRNNYKSAGGK。同时,它有极强的热稳定性,对蛋白酶敏感,对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌都有很好的抑制效果,有作为天然生物保鲜剂的巨大应用潜力^[16]。本文为阐明Plantaricin 163作为鲫鱼防腐保鲜剂的机理,研究Plantaricin 163对热杀索丝菌抗菌活性和作用机理。以期Plantaricin 163天然保鲜剂的开发利用和复配剂的筛选提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

热杀索丝菌分离自腐败的鲫鱼;植物乳杆菌163

GCMGC (No. 8224)分离自贵州泡菜, 以上菌株均保藏于南京农业大学食品科技学院酶工程实验室。

1.1.2 培养基、主要试剂和仪器

MRS 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 牛肉膏 10.0, 酵母粉 5.0, K_2HPO_4 2.0, 柠檬酸二铵 2.0, 乙酸钠 5.0, 葡萄糖 20.0, $MgSO_4 \cdot H_2O$ 0.58, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.25, 吐温-80 1.0 mL, 蒸馏水 1 000 mL, 调节 pH 至 6.2–6.4, 7×10^4 Pa 灭菌 20 min。STAA 培养基, 青岛高科技园海博生物技术有限公司。碘化丙啶 (Propidium iodide, PI)、戊二醛, Sigma 公司。高速冷冻离心机, Eppendorf 公司; 紫外分光光度计, SHIMADZU 公司; pH 计, Thermo 公司; DDS-电导率仪, 上海精密科学仪器有限责任公司; 流式细胞分析仪, Beckman 公司; 扫描电子显微镜, CARL ZEISS 公司; 离子溅射仪, 深圳市速普仪器有限公司; 透射电子显微镜, 电子株式会社。

1.2 方法

1.2.1 Plantaricin 163 的制备

取保藏的 *L. plantarum* 163 接种于 100 mL MRS 培养基, 37 °C 静置培养, 转接 2 次复壮后, 按照 1% (体积比)接种于 1 000 mL 新鲜 MRS 培养基, 37 °C 静置培养 24 h, 4 °C、10 000 r/min 离心 15 min 得发酵上清液。按照 Hu 等^[16]的方法, 用硫酸铵沉淀、凝胶层析和 HPLC 等方法分离纯化 Plantaricin 163。真空冷冻干燥后备用。

1.2.2 最小抑菌浓度的测定

最小抑菌浓度的测定参考美国临床实验室标准化协会(Clinical and laboratory standards institute, CLSI)指南^[17]。将冻干的 Plantaricin 163 配置成浓度为 1 024 μ g/mL 的储备液, 无菌条件下用无菌水二倍梯度稀释, 按稀释度从高到低加入 96 孔板的第 1–11 列, 每孔加 100 μ L, 第 12 列加入等量的无菌水作为空白对照。收集生长至对数期的热杀索丝菌, 配制成浓度约为 10^6 CFU/mL 的菌悬液, 每孔加入 100 μ L 菌悬液。混匀后将 96 孔板置于 25 °C 培养箱中静置培养 24 h, 用酶标仪测定 OD_{600} 值。以未见指示菌生长(即 OD_{600} 不增高)的最低浓

度为 Plantaricin 163 对热杀索丝菌的最小抑菌浓度 (Minimum inhibitory concentration, MIC)^[18]。每组实验重复 5 次。

1.2.3 杀菌动力学测定

参考 Han 等^[19]报道的方法略作修改, 热杀索丝菌按 1% (体积比)接种于 100 mL STAA 培养基中, 25 °C、180 r/min 振荡培养至对数期, 调整 OD_{600} 为 0.4, 每瓶培养基中添加终浓度为 $1 \times MIC$ 和 $2 \times MIC$ 的 Plantaricin 163 继续培养, 分别在 0、30、60、120、240、360、480 min 各取 1 mL 菌液, 以平板计数法测其活菌数(CFU)。以添加等量无菌水的菌液作为对照。实验重复 3 次, 结果取平均值。

1.2.4 Plantaricin 163 对热杀索丝菌电导率的影响

通过测定电导率的变化来分析 Plantaricin 163 对热杀索丝菌细胞膜通透性的影响。将热杀索丝菌 37 °C、180 r/min 振荡培养至对数期, 0.02 mol/L PBS 清洗 2 次, 并用 PBS 调整 OD_{600} 为 0.4, 每瓶培养基中添加 Plantaricin 163 至终浓度为 $1 \times MIC$ 和 $2 \times MIC$, 分别于 0、0.5、1.0、1.5、2.0、3.0 h 取出定量培养液, 4 °C、5 000 r/min 离心 5 min, 用电导仪测定上清液的电导率值。以空白的 STAA 培养基调零为参比, 以添加蒸馏水的实验组为空白对照。实验取 5 次平均值。

1.2.5 Plantaricin 163 对热杀索丝菌上清液 OD_{260} 、 OD_{280} 的影响

通过测定细胞上清在波长 260 nm 和 280 nm 吸光度的变化, 初步分析 Plantaricin 163 对热杀索丝菌细胞膜完整性的影响。具体方法如下, 将培养至对数期的热杀索丝菌调整 OD_{600} 为 0.4, 加入 Plantaricin 163 至终浓度为 $1 \times MIC$ 和 $2 \times MIC$, 在 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h 时取定量培养液, 4 °C、5 000 r/min 离心 5 min 后用紫外分光光度计测上清液的 OD_{260} 和 OD_{280} , 以 STAA 培养基调零为参比, 以添加蒸馏水的实验组为空白对照。实验取 5 次平均值。

1.2.6 流式细胞实验

经 $1 \times MIC$ Plantaricin 163 处理 0、10、30、

60 min 的细菌样品, 5 000 r/min 离心 5 min, 用 0.02 mol/L PBS 清洗 2 次, PBS 重悬后添加浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的碘化丙啶(Propidium iodide, PI)荧光染料, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min, 0.02 mol/L PBS 清洗 2 次洗去未结合的 PI 染料, 通过流式细胞仪在 675 nm 的发射波长条件下检测被荧光染料结合的菌体细胞数^[20]。

1.2.7 扫描电镜和透射电镜

分别采用扫描电镜(Scanning electron microscope, SEM)和透射电镜(Transmission electron microscope, TEM)观察敏感菌细胞外部形态变化和内部结构变化。将 1 \times MIC 的 Plantaricin 163 处理 30 min 和 60 min 的细菌样品, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、5 000 r/min 离心 5 min, 用 0.02 mol/L PBS 清洗 2 次, 菌体沉淀用 2.5% 的戊二醛固定 8 h 以上, 磷酸缓冲液清洗 3 次, 每次 10 min, 一式两份分别用于 SEM 和 TEM 的处理。SEM 样品处理: 50%、70%、80%、90% 的乙醇梯度脱水各 15 min; 100% 乙醇脱水 3 次, 每次 30 min; 叔丁醇置换 3 次, 每次 30 min; 冷冻干燥仪干燥样品, 双面胶带将样品黏在样品台上, 观察面向上, 用离子溅射仪给样品镀 10 nm 金膜, 用扫描电子显微镜观察并采集图像。TEM: 1%–2% 的锇酸固定 2–3 h, 磷酸缓冲液清洗 3 次, 每次 10 min; 用 50%、70%、80%、90% 的丙酮梯度脱水各 15 min, 100% 丙酮脱水 3 次, 每次 30 min; 梯度浸渍后将样品放入盛有纯包埋剂的包埋板中, 置于 37、45、60 $^{\circ}\text{C}$ 条件下聚合各 48 h; 切成 70–90 nm 的超薄切片, 染色清洗后, 用透射电子显微镜观察并采集图像。以 0.02 mol/L PBS 处理的样品作为对照。

1.3 数据处理与分析

应用 SPSS 21.0 软件对实验数据进行处理分析, 结果用平均数 \pm 标准差表示。

2 结果与分析

2.1 MIC 测定结果

30 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 24 h 后, 酶标仪测定菌液

OD_{600} 。Plantaricin 163 稀释到浓度为 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, OD_{600} 值不再增加, 细菌不再生长, 说明 Plantaricin 163 对热杀索丝菌的 MIC 为 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。同样的方法测得 Nisin 对热杀索丝菌的 MIC 为 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 可见 Plantaricin 163 的抑制效果比 Nisin 好。说明 Plantaricin 163 对热杀索丝菌有很强的抗菌活性, 在食品防腐保鲜方面显示出很好的应用前景。

2.2 杀菌动力学测定

了解一种抗菌物质的杀菌规律, 对于实际生产应用有很好的指导作用。加入 Plantaricin 163 后 30 min 开始(图 1), 处理组的活菌数明显下降, 1 h 时, 1 \times MIC 和 2 \times MIC 处理组菌活总数和对照组已分别相差 2 个和 3 个数量级, 说明 Plantaricin 163 对热杀所丝菌的作用方式是杀菌模式。随着处理时间延长, 处理组的菌落总数持续减少, 处理 4 h 时, 2 \times MIC 处理组菌落总数的 lg 值已下降到 2 以下, 6 h 后处理组已检测不到活菌, 说明 Plantaricin 163 对热杀所丝菌有很强的杀菌效果, 能够完全杀死菌体, 且这种杀伤作用存在时间依赖性, 也是一个持续发挥作用的过程。同时, 2 \times MIC 处理组 6 h 内的活菌数都低于 1 \times MIC 处理组, 可见 2 \times MIC 处理的杀菌效果明显优于 1 \times MIC

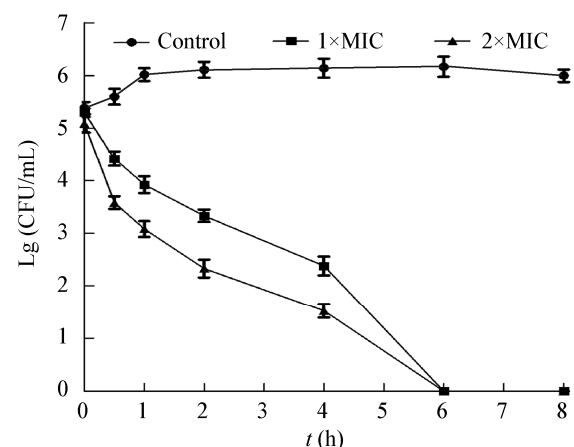


图 1 Plantaricin 163 对热杀索丝菌的杀菌动力曲线
Figure 1 Time kill kinetics of Plantaricin 163 against *B. thermosphacta*

处理,说明 Plantaricin 163 对热杀索丝菌的杀伤作用存在浓度依赖性,可为具体生产实践中处理浓度和时间的应用提供参考依据。这与 Zhu 等^[21]和 Wen 等^[22]报道的植物乳杆菌素的作用规律相同。为了进一步了解 Plantaricin 163 对热杀索丝菌的作用机制,从细胞膜通透性和完整性,以及细胞外部形态和内部结构的改变等方面研究细胞的变化。

2.3 Plantaricin 163 对热杀索丝菌膜通透性的影响

上清电导率的变化能反映出细胞膜通透性的改变。在整个培养时期内,对照组的热杀索丝菌胞外电导率基本保持不变,而各处理组随着时间的延长而增大(图 2)。处理 2 h 后 1×MIC 处理组电导率保持在 16.0 ms/cm 左右,而 2×MIC 处理组电导率保持在 17.0 ms/cm 左右。说明 Plantaricin 163 处理后的热杀索丝菌膜透通性增加,导致离子外流,上清液中电导率增加。细胞膜是细菌抵抗杀菌物质发挥作用的重要屏障,细菌素发挥作用的重要步骤是破坏细胞膜的完整性。可见 Plantaricin 163 和大部分细菌素发挥作用的机制相似,首先通过与细菌膜上的特异位点结合,形成微小孔洞,引起跨膜电势

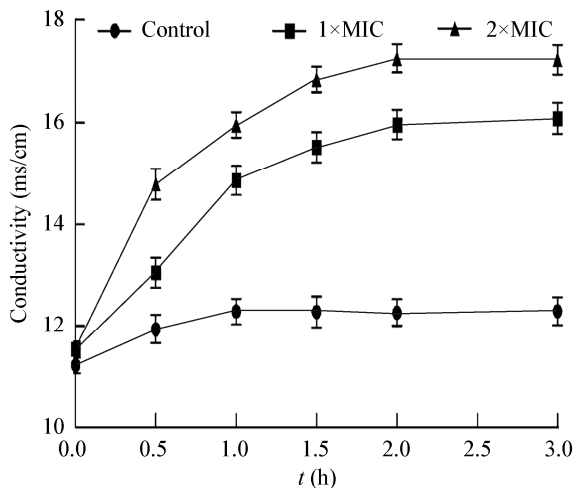


图 2 Plantaricin 163 对热杀索丝菌电导率的影响
Figure 2 Effects of Plantaricin 163 on the electrical conductivity of *B. thermosphacta*

消失,导致离子和 ATP 等泄露,因而引起胞外电导率增加^[23]。具体与细胞膜的结合位点有待进一步的研究。

2.4 Plantaricin 163 对热杀索丝菌膜完整性的影响

为了了解热杀索丝菌细胞膜对核酸和蛋白等大分子物质的通透性,用紫外分光光度计测定处理前后上清液中 OD_{260} 和 OD_{280} 。加入 Plantaricin 163 处理后,上清液的 OD_{260} 、 OD_{280} 值不断增加, OD_{260} 在 2.5 h 后稳定(图 3A), OD_{280} 在 2 h 后稳定(图 3B)。

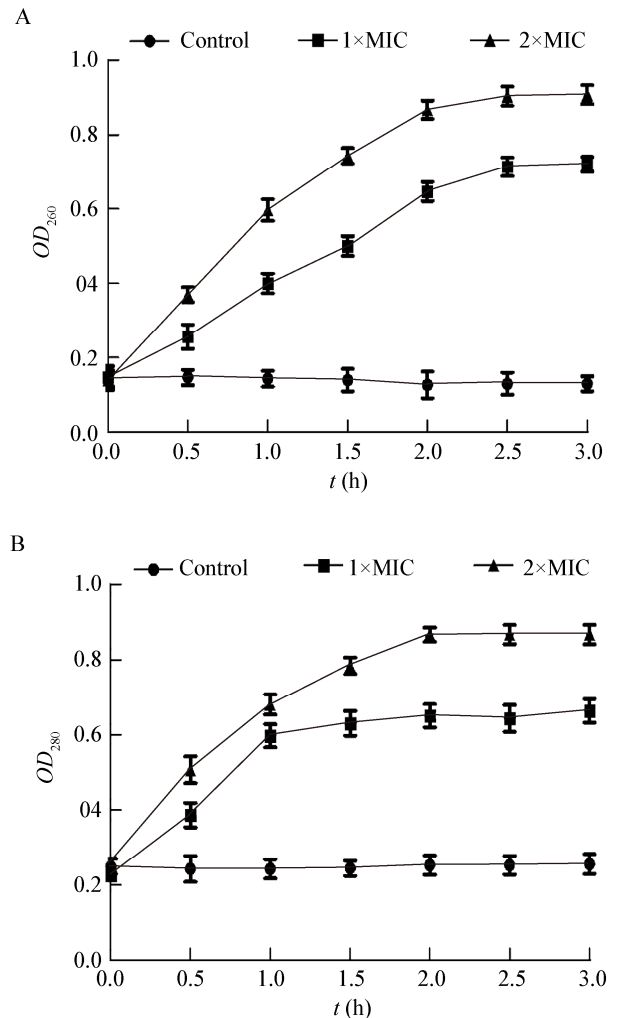


图 3 Plantaricin 163 对热杀索丝菌上清液 OD_{260} 和 OD_{280} 的影响
Figure 3 Effects of Plantaricin 163 on the UV absorption of the *B. thermosphacta* supernatant at 260 nm and 280 nm

最终 $1\times\text{MIC}$ 处理组 OD_{260} 和 OD_{280} 值分别达到 0.72 和 0.66, $2\times\text{MIC}$ 处理组 OD_{260} 和 OD_{280} 值分别达到 0.91 和 0.87。说明 Plantaricin 163 不仅能增加热杀索丝菌细胞膜的通透性, 还能进一步破坏膜的完整性, 使细胞内的核酸和蛋白等大分子物质外泄, 从而使上清液中 OD_{260} 和 OD_{280} 上升^[24]。核酸、蛋白质和离子在维持细胞正常生长、代谢和形成细胞结构等方面发挥重要作用, 外泄后代谢受阻, 也会加速热杀索丝菌的死亡。

PI 是一种可与 DNA 结合的核酸染料, 它不能进入具有完整细胞膜的活细胞, 当细胞膜的完整性被破坏后, 可进入细胞内与 DNA 结合, 在 488 nm

的激发波长下能检测到荧光, 因此可以根据荧光强度的强弱反应细胞膜的受损伤程度^[25]。未处理的热杀索丝菌中被荧光染料结合的细胞仅占 5.7% (图 4A), 可能是一些自然死亡的菌体。与 Plantaricin 163 作用 10、30、60 min 后, 被荧光染料结合的细胞比例分别达到 39.5%、62.4% 和 93.8%。图 4E 更直观地看出热杀索丝菌的荧光强度随着处理时间的延长不断增加。以上结果进一步说明了 Plantaricin 163 处理会破坏细胞膜的完整性, 且随着时间的延长, 与 PI 结合的细胞不断增多, 细胞膜破坏程度增加。细胞完整性的破坏是热杀索丝菌死亡的一个重要原因。

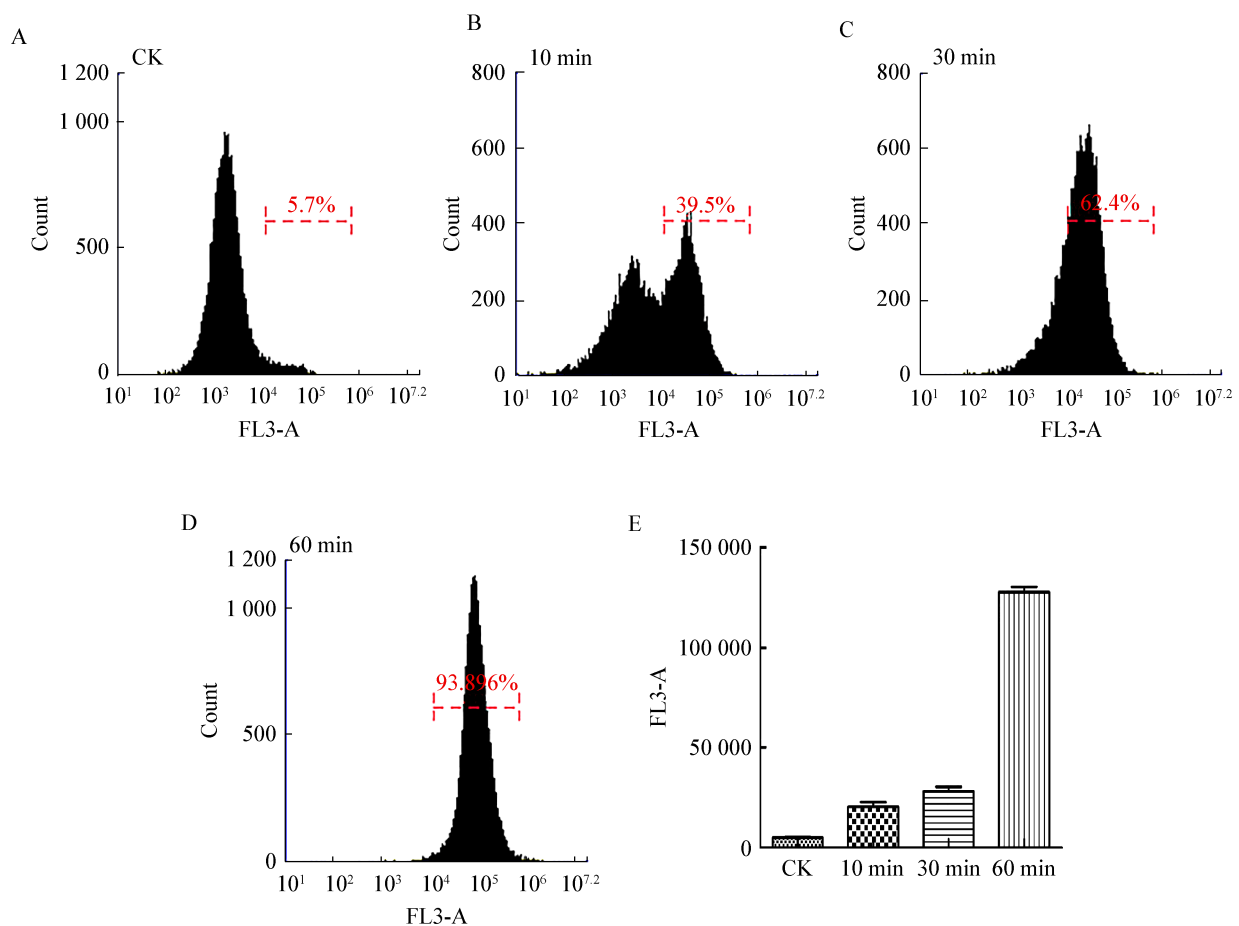


图 4 Plantaricin 163 对热杀索丝菌损伤的流式细胞分析

Figure 4 Flow cytometry of cell damage of *B. thermosphacta* caused by Plantaricin 163

2.5 Plantaricin 163 对热杀索丝菌细胞形态和内部结构的影响

为了更加直观地观察 Plantaricin 163 对热杀索丝菌的作用方式,用 SEM 和 TEM 观察受试菌的外部形态和内部结构。未经处理的热杀索丝菌菌体呈长杆状,表面光滑,有光泽并伴有明显的二分裂现象(图 5A)。1×MIC 细菌素作用 30 min 时,能观察到菌体表面凹陷、有褶皱(图 5B)。作用 1 h 时,视野内的菌体褶皱变多,细胞塌陷,表面粗糙(图 5C)。TEM 图显示未经 Plantaricin 163 处理的热杀索丝菌菌体结构完整,内部原生质结构致密,能观察到完整的细胞膜和二分裂的隔膜(图 5D)。细菌素作用 30 min 时,细胞壁膜界限模糊,破损形成孔洞,内部结构疏松分布不均匀,形成空泡样(图 5E)。作用时间延长到 1 h 时,细胞破损进一步加重,膜结构脱落,大量内部物质外泄使细胞形成空泡化(图 5F)。以上结果表明,Plantaricin 163 处理对热杀索丝菌的外部形态和内部结构均造成明显改变,随着作用浓度的增加,这种破坏程度不断加重。可见,外部形态和内部结构的改变是热杀索丝菌死亡的另一重要原因。

3 讨论与结论

细菌素作为天然生物防腐剂,在肉制品和水产品保鲜中已得到了广泛使用。在水产品中乳酸菌细菌素被应用于冷冻烟熏蛙鱼、鲈鱼、罗非鱼等的贮藏保鲜中抑制单增李氏特菌和假单胞菌等的生长,显著延长了贮藏期^[26]。Plantaricin 163 是从植物乳杆菌中分离纯化得到的一种广谱细菌素,它对热杀索丝菌的作用效果优于目前国内唯一获得批准用于食品加工中的细菌素类防腐剂 Nisin,显示出很好的应用前景。Plantaricin 163 处理热杀索丝菌 6 h 后检测不到活菌数,说明 Plantaricin 163 对热杀索丝菌的作用方式为杀菌模式,且这种杀伤作用存在时间依赖性。这与大部分植物乳杆菌素的作用方式相同。目前,除了 Plantaricin LC74^[27]仅能够抑制细菌生长外,已知植物乳杆菌素的作用方式一般为杀菌和溶菌。

菌体的细胞膜是抵御外来侵害的首道防线,负责选择性渗透和能量驱动等重要生理功能,细胞膜通透性发生改变会影响细胞的正常生理功能。细菌素发挥抗菌作用的机制虽然不同,但作用目标通常

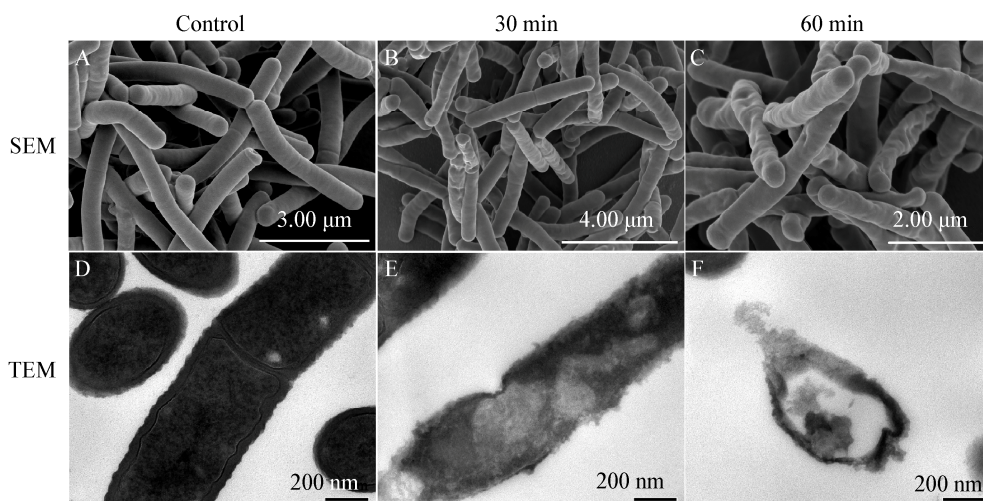


图 5 扫描电子显微镜和透射电子显微镜观察热杀索丝菌形态和内部结构

Figure 5 Morphology and internal structure of *B. thermosphacta* observed by scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM)

是细胞膜,通过破坏细胞膜的通透性,造成膜结构和功能完整性的损失。因此,本研究首先通过测定 Plantaricin 163 作用过程中上清电导率的变化,来判断细胞膜通透性的变化,结果显示处理后的热杀索丝菌细胞膜通透性不断增加。说明 Plantaricin 163 对热杀索丝菌的作用也是先从细胞膜开始的。已有研究表明,Plantaricin L-1 可以导致单增李斯特菌细胞膜通透性发生改变,使敏感细胞的胞内离子、乳酸脱氢酶、紫外吸收物质和 ATP 发生不同程度地泄漏,破坏了细胞膜 ΔpH 和部分 $\Delta\psi$,最终导致细胞的死亡^[28]。Bifidocin A 通过增加大肠杆菌细胞膜通透性,破坏膜质子动力,形成细胞膜孔洞,改变膜完整性,从而使菌体细胞解体^[29]。

通过 OD_{260} 、 OD_{280} 的测定以及流式细胞试验的分析,表明细胞膜的完整性也受到破坏,核酸和大分子物质外泄,荧光染料进入胞内和 DNA 结合,这很可能是由于细胞膜上形成孔洞而导致的,这一结果进一步通过 SEM 和 TEM 得到了直接观察。细菌素如 Piscicocin CS526^[30]、Lacticin 3147^[31] 等作用细胞膜后形成的是只能通过小分子的选择性孔洞,而 Plantaricin 163 抑菌机制所不同的是处理后细胞膜塌陷并有孔洞出现,细胞壁也受到不同程度的损伤,细胞壁完整性的破坏是细胞膜损伤进一步扩大的结果,形成无选择性的孔洞,可使小分子物质(K^+ 和无机磷离子)和大分子物质(核酸、蛋白等)同时泄漏。还有的细菌素可以不破坏细胞膜直接作用于细胞壁,使其功能受到干扰。例如 Lactococcin 972,它并不把细胞膜作为破坏对象,而是通过干扰隔膜的形成来抑制细胞的生长,也会和 Lipid II 形成复合物来抑制肽聚糖的合成,从而导致细胞壁不能合成^[32]。

此外,SEM 和 TEM 结果表明,经 Plantaricin 163 处理后,热杀索丝菌不仅膜结构和外部形态受到影响,内部结构也发生了改变。内部结构疏松分布不均匀,形成空泡样,膜结构扭曲甚至脱落,大量内部物质外泄,细胞形态发生明显改变。在一些细菌素中也发现类似的现象。Rybal'chenko 等^[33]

通过 SEM 研究表明,嗜酸乳杆菌产生的细菌素作用于弗氏志贺菌会引起敏感细胞的形态的变化破坏其结构。Lactocin XN8-A 对金黄色葡萄球菌的 SEM 和 TEM 结果显示,与细菌素作用后菌体细胞凹陷,细胞壁受到损伤,内部结构松散^[34]。但是 Peptide 7 显示出不同的作用现象,其虽然增加大肠杆菌细胞膜的通透性但只造成细胞膜的部分损伤,细胞的结构仍存在,仅在细胞表面形成孔洞^[35]。这说明细菌素发挥作用的机制十分复杂,不同的细菌素作用方式也有差别。Vijayakumar 等^[36]研究发现混合不同作用机制的细菌素可以获得强效天然抗菌混合物,以更好地解决熟肉制品容易被污染的问题。因此,明确 Plantaricin 163 的抗菌机制对于筛选与其复配的保鲜剂也有重要意义。

总之,本实验从细胞膜通透性、细胞壁完整性以及菌体细胞形态和内部结构方面,阐释了 Plantaricin 163 对热杀索丝菌的作用机理。发现 Plantaricin 163 能够与热杀索丝菌细胞膜相结合,增加膜通透性,形成孔洞,导致离子等外泄,进而破坏细胞膜完整性,导致核酸、蛋白质等大分子物质泄露,代谢受阻。同时,菌体结构受损,形态发生改变,内部结构受到影响,最终导致细胞死亡。由此可见,Plantaricin 163 对热杀索丝菌的作用机制与 Class II 类细菌素相似^[37],这与 Lactocin XN8-A 作用的大肠杆菌和 Enterocin CRL35 作用的单增李斯特菌显示的结果一致^[34,38]。关于 Plantaricin 163 进入热杀索丝菌后如何干扰细菌基因表达和蛋白产生,对菌体多种代谢过程产生影响,有待进一步研究。

REFERENCES

- [1] Jiang Y, Gao F, Xu XL, et al. Microfloral change of vacuum-packaged pork during chilled storage[J]. Food Science, 2011, 32(4): 241-245 (in Chinese)
江芸,高峰,徐幸莲,等.真空包装冷却猪肉冷藏过程中菌相变化[J].食品科学,2011,32(4):241-245
- [2] Reid R, Fanning S, Whyte P, et al. The microbiology of beef carcasses and primals during chilling and commercial storage[J]. Food Microbiology, 2017, 61: 50-57
- [3] Silbande A, Adenet S, Smith-Ravin J, et al. Quality assessment of

- ice-stored tropical yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) and influence of vacuum and modified atmosphere packaging[J]. Food Microbiology, 2016, 60: 62-72
- [4] Ai YW, Wang HX, Xiong DP. Mechanism research of *Brochothrix thermosphacta* in protein degradation of chilled pork[J]. Food Science and Technology, 2015, 40(5): 166-170 (in Chinese)
艾有伟, 王宏勋, 熊丹萍. 热杀索丝菌降解猪肉蛋白机制研究[J]. 食品科技, 2015, 40(5): 166-170
- [5] Motarjemi Y, Moy G, Todd E. Encyclopedia of Food Safety[M]. Amsterdam: Elsevier, 2014: 474-476
- [6] Kapetanidou AE, Skandamis PN. Applications of active packaging for increasing microbial stability in foods: natural volatile antimicrobial compounds[J]. Current Opinion in Food Science, 2016, 12: 1-12
- [7] Arena MP, Silvain A, Normanno G, et al. Use of *Lactobacillus plantarum* strains as a bio-control strategy against food-borne pathogenic microorganisms[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 464
- [8] Ahmad V, Khan MS, Jamal QMS, et al. Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2017, 49(1): 1-11
- [9] Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocins—a viable alternative to antibiotics?[J]. Nature Review Microbiology, 2013, 11(2): 95-105
- [10] Bierbaum G, Sahl HG. Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering[J]. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2009, 10(1): 2-18
- [11] Oppedijk SF, Martin NI, Breukink E. Hit'em where it hurts: The growing and structurally diverse family of peptides that target lipid-II[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes, 2016, 1858(5): 947-957
- [12] Diep DB, Skaugen M, Salehian Z, et al. Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(7): 2384-2389
- [13] Wiedemann I, Breukink E, van Kraaij C, et al. Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(3): 1772-1779
- [14] Thompson RE, Collin F, Maxwell A, et al. Synthesis of full length and truncated microcin B17 analogues as DNA gyrase poisons[J]. Organic & Biomolecular Chemistry, 2014, 12(10): 1570-1578
- [15] Li XX, Zeng WW, Lu ZX, et al. PCR-DGGE analysis of microbial community composition and preservation of crucian carp during storage[J]. Food Science, 2017, 38(5): 274-280 (in Chinese)
李秀秀, 曾维伟, 陆兆新, 等. 鲫鱼贮藏过程中微生物菌相 PCR-DGGE 分析及其防腐保鲜[J]. 食品科学, 2017, 38(5): 274-280
- [16] Hu MZ, Zhao HZ, Zhang C, et al. Purification and characterization of plantaricin 163, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* 163 isolated from traditional Chinese fermented vegetables[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(47): 11676-11682
- [17] Clinical and Laboratory Standards Institute. M07-A9: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standards[Z]. 9th Edition. CLSI: Wayne, PA, 2012
- [18] Lü X, Yi LH, Dang J, et al. Purification of novel bacteriocin produced by *Lactobacillus coryniformis* MXJ 32 for inhibiting bacterial foodborne pathogens including antibiotic-resistant microorganisms[J]. Food Control, 2014, 46: 264-271
- [19] Han JZ, Zhao SM, Ma Z, et al. The antibacterial activity and modes of LI-F type antimicrobial peptides against *Bacillus cereus in vitro*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2017, 123(3): 602-614
- [20] Sunny-Roberts EO, Knorr D. Evaluation of the response of *Lactobacillus rhamnosus* VTT E-97800 to sucrose-induced osmotic stress[J]. Food Microbiology, 2008, 25(1): 183-189
- [21] Zhu X, Zhao YZ, Sun YL, et al. Purification and characterisation of plantaricin ZJ008, a novel bacteriocin against *Staphylococcus* spp. from *Lactobacillus plantarum* ZJ008[J]. Food Chemistry, 2014, 165: 216-223
- [22] Wen LS, Philip K, Ajam N. Purification, characterization and mode of action of plantaricin K25 produced by *Lactobacillus plantarum*[J]. Food Control, 2016, 60: 430-439
- [23] Ren LY, Yang YY, Zhang JM, et al. Advance on antibacterial mechanism of lactic acid bacteria antimicrobial peptides[J]. China Food Additives, 2015(1): 143-149 (in Chinese)
任璐雅, 杨艳艳, 章检明, 等. 乳酸菌抗菌肽(细菌素)抗菌机理的研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2015(1): 143-149
- [24] Qian SQ. Study on regulation of efficient biosynthesis and control of *Aspergillus ochraceus* growth by Bacillomycin D[D]. Nanjing: Doctoral Dissertation of Nanjing Agricultural University, 2015: 92-98 (in Chinese)
钱时权. Bacillomycin D 的高效合成调控及赭曲霉污染控制研究[D]. 南京: 南京农业大学博士学位论文, 2015: 92-98
- [25] Gut IM, Blanke SR, van der Donk WA. Mechanism of inhibition of *Bacillus anthracis* spore outgrowth by the lantibiotic nisin[J]. ACS Chemical Biology, 2011, 6(7): 744-752
- [26] Lü XR, Bai FX, Li JR. Research progress in the application of biological preservation with lactic acid bacteria in aquatic products[J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(2): 340-345 (in Chinese)
吕欣然, 白凤翎, 励建荣. 乳酸菌生物保鲜在水产品中的应用研究进展[J]. 食品工业科技, 2014, 35(2): 340-345
- [27] Rekhif N, Atrih A, Lefebvre G. Characterization and partial purification of plantaricin LC74, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LC74[J]. Biotechnology Letters, 1994, 16(8): 771-776
- [28] Zhou W, Liu GR, Li PL, et al. Mode of action of plantaricin L-1, an antilisteria bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2007, 47(2): 260-264 (in Chinese)
周伟, 刘国荣, 李平兰, 等. 植物乳杆菌素 L-1 对单核细胞增生李斯特氏菌作用机理的研究[J]. 微生物学报, 2007, 47(2): 260-264
- [29] Liu GR, Song ZQ, Yang XL, et al. Antibacterial mechanism of bifidocin A, a novel broad-spectrum bacteriocin produced by *Bifidobacterium animalis* BB04[J]. Food Control, 2016, 62: 309-316
- [30] Suzuki M, Yamamoto T, Kawai Y, et al. Mode of action of piscicocin CS526 produced by *Carnobacterium piscicola* CS526[J]. Journal of Applied Microbiology, 2005, 98: 1146-1151
- [31] McAuliffe O, Ryan MP, Ross RP, et al. Lacticin 3147, a

- broad-spectrum bacteriocin which selectively dissipates the membrane potential[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64: 439-445
- [32] Martínez B, Böttiger T, Schneider T, et al. Specific interaction of the unmodified bacteriocin lactococcin 972 with the cell wall precursor lipid II[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(15): 4666-4670
- [33] Rybal'chenko OV, Bondarenko VM, Verbitskaia NB. Ultrastructural changes in *Shigella flexneri* cells during interaction with bacteriocinogenic *Lactobacillus acidophilus*[J]. Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii, I Immunobiologii, 2006(4): 50-53
- [34] Yi LH, Dang J, Zhang LH, et al. Purification, characterization and bactericidal mechanism of a broad spectrum bacteriocin with antimicrobial activity against multidrug-resistant strains produced by *Lactobacillus coryniformis* XN8[J]. Food Control, 2016, 67: 53-62
- [35] Li LR, Shi YH, Le GW. Antibacterial activity and mechanisms of a new peptide derived from cell-penetrating peptide[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2013, 53(9): 950-956 (in Chinese)
李莉蓉, 施用晖, 乐国伟. 来自穿膜肽的新肽的抗菌活性及抑菌机制[J]. 微生物学报, 2013, 53(9): 950-956
- [36] Vijayakumar PP, Muriana PM. Inhibition of *Listeria monocytogenes* on Ready-to-Eat meats using bacteriocin mixtures based on Mode-of-Action[J]. Foods, 2017, 6(3): E22
- [37] Ingolf FN, Dag AB, Dzung BD, et al. Chapter 16-Class II Non-lantibiotic bacteriocins[A]//Handbook of Biologically Active Peptides (Second Edition)[M]. Pittsburgh: Academic Press, 2013: 85-92
- [38] Minahk CJ, Farias ME, Sesma F, et al. Effect of Enterocin CRL35 on *Listeria monocytogenes* cell membrane[J]. FEMS Microbiology Letters, 2000, 192(1): 79-83

~~~~~  
(上接 p.2428)

### 征 稿 简 则

3.5 参考文献：参考文献按文内引用的先后顺序排序编码，未公开发表的资料请勿引用。我刊参考文献需要注明著者(文献作者不超过3人时全部列出，多于3人时列出前3人，后加“等”或“et al.”，作者姓前、名后，名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外刊名必须写完整，不用缩写，不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例：

- [1] Marcella C, Claudia E, Pier GR, et al. Oxidation of cystine to cysteic acid in proteins by peroxyacids as monitored by immobilized pH gradients[J]. Electrophoresis, 1991, 12(5): 376-377
- [2] Wang BJ, Liu SJ. Perspectives on the cultivability of environmental microorganisms[J]. Microbiology China, 2013, 40(1): 6-17 (in Chinese)  
王保军, 刘双江. 环境微生物培养新技术的研究进展[J]. 微生物学通报, 2013, 40(1): 6-17
- [3] Shen T, Wang JY. Biochemistry[M]. Beijing: Higher Education Press, 1990: 87 (in Chinese)  
沈同, 王镜岩. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990: 87
- [4] Liu X. Diversity and temporal-spatial variability of sediment bacterial communities in Jiaozhou Bay[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2010 (in Chinese)  
刘欣. 胶州湾沉积物细菌多样性及菌群时空分布规律[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 2010

### 4 特别说明

4.1 关于测序类论文：凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文，请先通过国际基因库 EMBL (欧洲)或 GenBank (美国)或 DDBJ (日本)，申请得到国际基因库登录号 (Accession No.)后再投来。

4.2 关于版权：(1) 本刊只接受未公开发表的文章，请勿一稿两投。(2) 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章，所有形式的(即各种文字、各种介质的)版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议，敬请事先声明。(3) 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工，但如涉及内容的大量改动，将请作者过目同意。(4) 文责自负。作者必须保证论文的真实性，因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果，由作者自负。

4.3 审稿程序及提前发表：(1) 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件，一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因，作者登录我刊系统也可查看。稿件经过初审、终审通过后，作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充，然后以投稿时的用户名和密码登录我刊系统上传修改稿，编辑部复审通过后将发出稿件录用通知单，稿件按照投稿先后排队发表。(2) 本刊对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准，对稿件采取择优先登的原则。

### 5 发表费及稿费

论文一经录用，将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

### 6 联系方式

地址：北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; 网址: http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn