

说明书

用于高产细菌素的植物乳杆菌 SWUN5815 及其应用

5 技术领域

本发明属于微生物技术领域，具体地说，涉及一种用于高产细菌素的植物乳杆菌 SWUN5815 及其应用。

背景技术

10 乳酸菌是人和动物肠道内的优势微生物菌群，益生性的乳酸菌在机体内有调节人和动物体微生态平衡，抑制并杀死致病菌，增强机体免疫力的作用。

植物乳杆菌是一种在泡菜、酸奶及动物胃肠道中等发现的能广泛利用植物性碳源、耐受胆盐和低的乳酸杆菌。有些植物乳杆菌能产生类细菌素，对大肠菌群、沙门氏菌、志贺氏菌等肠道致病菌有抑制作用。植物乳杆菌产生的类细菌素由天然氨基酸组成，转录后不修饰，是热稳定的疏水肽，该类细菌素的合成受群体感应系统调节控制。

15

常见的牦牛腹泻肠道病原菌如大肠杆菌、沙门氏菌、空肠弯曲杆菌、奇异变形杆菌等，由于抗生素的不合理使用导致牦牛腹泻问题难以控制。乳酸菌细菌素因其安全、无毒且有较强的抑菌活性，目前为止被普遍认为是抗生素最有效的替代物。而且有高效抗菌活性，能被机体降解，不产生耐药性等优点而受到人们的关注。牦牛源产细菌素乳酸菌不仅对高原环境以及牦牛肠道环境有更强的适应力，抑制牦牛肠道病原菌减轻牦牛腹泻问题，还可以促进牦牛生长发育、调节机体免、促进肠道发育和局部抵抗力，在食品安全方面也具有十分重要的意义。

20

25 现有技术中大部分乳酸菌产细菌素的抑菌谱窄，只能单独抑制革兰氏阳性菌或者革兰氏阴性菌；由于种属特异性，大部分乳酸菌不能适应青藏高原严峻的地理环境，不能适用于牦牛。

发明内容

有鉴于此,本发明针对上述的问题,提供了一种用于高产细菌素的植物乳杆菌 SWUN5815 及其应用。

为了解决上述技术问题,本发明公开了一种用于高产细菌素的植物乳杆菌 SWUN5815,该菌株已于 2016 年 08 月 02 日保藏于保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC),保藏号为 CCTCC NO:M2016419。

进一步地,所述植物乳杆菌的形态学特征具体为:

菌体特征:呈革兰氏染色阳性,细胞杆状,菌体约 0.5-1.0 μ m 宽,1.5-4 μ m 长,成单、成对或者成链,不形成芽孢,两端圆形;

菌落特征:在 MRS 培养基上形成明显的菌落,直径在 0.5-2.0mm 之间,圆形,边缘整齐,乳白色,透明,表面湿润光滑,不产生色素。

进一步地,植物乳杆菌体内耐受特征为:

植物乳杆菌的菌株耐酸性较强,在 pH3.0 的人工胃液下 3h 后存活率为 93.36 \pm 4.06%;在 1.0% 浓度胆盐下可以缓慢生长,生长效率达到无胆盐培养的 15.26 \pm 1.19%。

本发明还公开了一种植物乳杆菌 SWUN5815 在制备植物乳杆菌细菌素中的应用。

进一步地,将上述的植物乳杆菌 SWUN5815 接种于 MRS 培养基中培养,得到植物乳杆菌菌发酵液。

进一步地,制备植物乳杆菌细菌素的方法具体为:

1)把菌株 SWUN5815 保存液接种到 5mL 的 MRS 液体培养基中,震荡混匀,37 $^{\circ}$ C 恒温培养 24h,以 2% 的接种量连续活化三代,取第三代的发酵液以 4000 \times g 离心 10min,取上清,上清液经 0.22 μ m 微膜过滤,-20 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用,制备得到粗植物乳杆菌 MRS 发酵上清液;

2)收集后指数生长期的植物乳杆菌 MRS 发酵上清液 500mL,4 $^{\circ}$ C,12000 \times g 离心 20min 收集上清液,以 0.22 μ m 的滤膜过滤上清液以除去残余的细胞碎片;加入预冷的三氯乙酸/丙酮溶液至三氯乙酸的终浓度为 12.5%,-20 $^{\circ}$ C 静置 8h 使蛋白充分沉淀,4 $^{\circ}$ C,15000 \times g 离心 20min 收集蛋白沉淀,向沉淀中加入 80%的预冷丙酮反复洗涤 3-5 次以除去残留的三氯乙酸,室温放置

4-5min 使丙酮完全挥发，加入 100 μ L 超纯水溶解蛋白沉淀，制备得到纯化后的植物乳杆菌 MRS 发酵上清液，即为植物乳杆菌细菌素。

进一步地，MRS 培养基成分如下：蛋白胨 10.0g、牛肉膏 10.0g、酵母粉 5g、葡萄糖 20.0g、吐温 801.1g、磷酸氢二钾 2.0g、乙酸钠 3.0g、柠檬酸二胺 2.0g、硫酸镁 0.6g、硫酸锰 0.25g 以及蒸馏水 1000mL。

与现有技术相比，本发明可以获得包括以下技术效果：

1) 本发明植物乳杆菌能够同时抑制革兰氏阳性菌和阴性菌；

2) 本发明植物乳杆菌含有多重细菌素基因，包括 plnA、plnB、plnD、plnEF、plnJ、plnK、plnI、plnL 和 plnN；

10 3) 本发明植物乳杆菌适应青藏高原的严峻环境与牦牛体内的内环境。

当然，实施本发明的任一产品并不一定需要同时达到以上所述的所有技术效果。

附图说明

15 此处所说明的附图用来提供对本发明的进一步理解，构成本发明的一部分，本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明，并不构成对本发明的不当限定。在附图中：

图 1 是本发明不同条件对细菌素活性的影响；其中，1. 植物乳杆菌 MRS 发酵上清液（发酵原液），2. 排除酸后的植物乳杆菌 MRS 发酵上清液，3. 20 相同 PH 的 MRS 肉汤培养基（空白对照），4. 蛋白酶 K 处理；

图 2 是本发明过氧化氢酶处理对细菌素活性的影响；其中，1. 植物乳杆菌 MRS 发酵上清液（发酵原液），2. 过氧化氢酶处理后的植物乳杆菌 MRS 发酵上清液；

图 3 是本发明 SWUN5815 合成相关细菌素基因 PCR 产物电泳图；其中，25 M.DNA 标准 mark1；1.plnA；2.plnB；3.plnD；4.plnEF；5.plnJ；6.plnK；7.plnI；8.plnL；9.plnN。

具体实施方式

以下将配合实施例来详细说明本发明的实施方式,藉此对本发明如何应用技术手段来解决技术问题并达成技术功效的实现过程能充分理解并据以实施。

实施例 1 菌的分离与鉴定

5 一、菌的分离

称取 2 g 新鲜牦牛粪便样品与 20 ml 无菌水中,震荡混匀后以 10 倍系列稀释,分别取不同稀释度在无菌条件下,于平皿中,以 MRS (含 0.5% 碳酸钙)培养基倒平板,37℃ 培养 48h。挑取具有溶钙圈,形状不同的单个菌落进行革兰氏染色,选取革兰氏阳性菌,分别接种于 MRS 液体培养基,37℃
10 培养,将筛选得到的乳酸菌编号后于 MRS 固体培养基上画线纯化保存待用;

利用牛津杯法从 90 株乳酸菌中筛选出 33 株乳酸菌对指示菌株有明显的抑制作用,排除酸的影响后仍有 9 株乳酸菌对指示菌有明显的抑制作用,筛选其中抑制效果最好的抑制乳酸菌命名为 SWUN5815。

二、分子生物学鉴定

15 (一) 形态特征、培养特性和生理生化特性鉴定:

按照“伯杰细菌鉴定手册”(第八版)和“常见细菌系统鉴定手册”(东秀珠,蔡妙英等编著,北京:科学出版社,2001.2)中描述的方法,对菌株 SWUN5815 进行形态特征、培养特性,具体结果如下:

菌体特征:呈革兰氏染色阳性,细胞杆状,菌体约 0.5-1.0 μ m 宽,1.5-4 μ m
20 长,成单、成对或者成链,不形成芽孢,两端圆形。

菌落特征:在 MRS 培养基上形成明显的菌落,直径在 0.5-2.0mm 之间,圆形,边缘整齐,乳白色,透明,表面湿润光滑,不产生色素。

植物乳杆菌的菌株耐酸性较强,在 pH3.0 的人工胃液下 3h 后存活率为 93.36 \pm 4.06%;在 1.0% 浓度胆盐下可以缓慢生长,生长效率达到无胆盐培养的 15.26 \pm 1.19%。
25

(二) 16S rDNA 试验

将冷冻保存的供试菌株接种于 MRS 液体培养基中,30℃ 恒温培养 24h,经 MRS 传代培养 2~3 代后,取 2mL 对数生长末期的菌体培养物置于无菌 EP 管内离心,经 8000 \times g 离心 3min(4℃)后收集菌体,弃上清,采用乳酸菌

专用 CTAB 冻融法提取菌株的基因组 DNA。采用通用引物，正向引物是 27f(对应于 *Escherichia coli* 8-27 位碱基) : 5' -AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (核苷酸序列如 SEQ ID NO.28 所示); 反向引物是: 5' -CTACGGCTACCTTGTACGA-3' (核苷酸序列如 SEQ ID NO.29 所示), 以菌体 DNA 为扩增模板 PCR 扩增 16S rRNA 基因区域, 扩增产物经纯化后进行 16S rRNA 基因序列测定, 测得的序列如 SEQ ID No.1 所示, 然后通过基因序列比对。根据 Gen-Bank 序列同源性比较, 菌株 SWUN5815 与 *Lactobacillus plantarum* WCFS1(GenBank 登录号 NC_004567.2) 同源性为 99%; 所得菌株显示出了与植物乳杆菌最高的分子系统学上的亲缘关系, 初步判定该菌为植物乳杆菌;

基于以上特征, 将菌株 SWUN5815 命名为植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) SWUN5815。该菌株已于 2016 年 08 月 02 日保藏于保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC), 保藏号为 CCTCC NO:M2016419。

实施例 2 菌体的抑菌活性

1. 制备植物乳杆菌 MRS 发酵上清液:

把冻存管中的保藏液接种到 5mL 的 MRS 液体培养基中, 震荡混匀, 37℃ 恒温培养 24h, 以 2% 的接种量连续活化三代, 取第三代的发酵液以 4000 × g 离心 10min, 取上清, 上清液经 0.22 μm 微膜过滤, -20℃ 冰箱保存备用, 制备得到植物乳杆菌 MRS 发酵上清液。

2. 酸抑制作用的排除

植物乳杆菌 MRS 发酵上清液对指示菌的抑制效果, 可能是乳酸菌分泌的酸性产物如乙酸、乳酸等作用。为移除酸性物质的干扰, 将植物乳杆菌 MRS 发酵上清液 pH 从 4.0 均调至 6.0, 制备得到排除酸后的植物乳杆菌 MRS 发酵上清液, 并且用相同 pH 的 MRS 肉汤培养基作为空白对照。

实验结果见图 1, 植物乳杆菌 MRS 上清液对指示菌有抑制作用, 排除了酸的影响后, 抑菌圈减小。说明酸对指示菌有一定的抑制作用, 但排除酸后仍有抑菌物质存在。

3. 过氧化氢作用的排除

将过氧化氢酶溶解于双蒸水中配成母液, 加入到经酸排除的植物乳杆菌

MRS 发酵上清液中使过氧化氢酶的最终浓度达到 1 mg/mL，37℃水浴 2h 后取出，检测过氧化氢酶处理后植物乳杆菌 MRS 发酵上清液的抑菌活性。

利用过氧化氢酶可以降解过氧化氢的特性来排除过氧化氢的干扰。如图 2 所示，经过过氧化氢酶处理的植物乳杆菌 MRS 发酵上清液与植物乳杆菌 MRS 发酵上清液（发酵原液）相比其抑菌活性没有降低，所以认为抑菌活性成分不是过氧化氢。

4.蛋白酶的敏感性

从图 1 可知，发酵上清液经蛋白酶 K 处理后，其抑菌活性完全丧失。说明此抑菌物质对胃蛋白酶、蛋白酶 K 和胰蛋白酶敏感性较高。初步确定发酵上清液中有蛋白质类抑菌活性物质。

实施例 3 抑菌谱测定

表 1 SWUN5815 所产细菌素抑菌谱

| 指示菌 | 抑菌圈 |
|-------------------|-----|
| 大肠杆菌 ATCC25922 | ++ |
| 沙门氏菌 ATCC14028 | ++ |
| 金黄色葡萄球菌 ATCC25923 | ++ |
| 大肠杆菌 SWUN4569 | +++ |
| 大肠杆菌 SWUN4580 | ++ |
| 大肠杆菌 SWUN4088 | ++ |
| 金黄色葡萄球菌 swun4514 | + |
| 金黄色葡萄球菌 SWUN4513 | + |
| 鼠伤寒沙门氏菌 SWUN3733 | ++ |
| 都柏林沙门氏菌 SWUN3736 | +++ |
| 肠炎沙门氏菌 SWUN3731 | ++ |

注：抑菌圈直径（ mm ）： +++， 19 ~ 24； ++， 15 ~ 18； +， 10 ~ 15； -， 无抑菌效果。

选取常见的牦牛源致腹泻肠道病原菌肠炎沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、都柏林沙门氏菌、产志贺大肠杆菌、作为指示菌，用无细胞发酵上清液进行牛津杯抑菌实验。

SWUN5815 细菌素抑菌谱结果见表 1。从表中可以看到，SWUN5815 所产细菌素具有广谱抑菌活性，其病原指示菌均分离与牦牛。除对本研究所用

指示菌具有较好的抑制作用外,对牦牛制品中一些常见的病原微生物也具有
良好的抑制作用。

所述发酵乳杆菌体内耐受特征为:

发酵乳杆菌的菌株耐酸性较强,在 pH3.0 的人工胃液下 3h 后存活率为
5 93.36 ± 4.06%;在 1.0%浓度胆盐下可以缓慢生长,生长效率达到无胆盐培养
的 15.26 ± 1.19%;

(1) 益生菌耐受 pH3.0 人工胃液的筛选。

人工胃液的配制:将氯化钠(0.2g/100mL)和胃蛋白酶(0.35g/100mL)溶
解后用 1mol/L 的盐酸调整 pH 值为 3.0 后,在无菌操作台中用真空泵抽滤除
10 菌后备用。

益生菌对人工胃液耐受性的测定:取 5mL 已经活化好的菌株培养液,
在无菌操作台中倒入已灭菌 10mL 离心管中,经 3000r/min 离心 10min 收集
菌体,加入 5mL 灭菌生理盐水混匀制成菌悬液,取 1mL 菌悬液与 9mL pH3.0
的人工胃液混合,摇匀,置于恒温振荡器中培养(37℃, 300r/min),并分别
15 在 0h 和 3h 取样,用 MRS 琼脂培养基倾注 37℃培养 48h。用平板计数法测
定活菌数,计算其存活率(%):存活率(%)=3h 的活菌数/0h 的活菌数 × 100%。

(2) 益生菌耐受胆盐的测定。

选择在 pH3.0 人工胃液中存活率在 10%以上的菌种做不同胆盐浓度下的
生长测试。将活化好的菌种 5mL 按 2%的接种量(100μL)用移液枪分别接种
20 于含 0.0%牛胆盐(即空白)、0.3%牛胆盐、0.5%牛胆盐、1.0%牛胆盐(W/V)
的 MRS-THIO 培养基(MRS 培养基中加 0.2%的巯基乙酸钠)。在恒温振荡器
中 37℃培养 24h 后,以空白培养基为对照(未接种的 MRS-THIO 培养基),
分别测定上述不同浓度培养基的 OD_{600nm} 值,计算菌株对胆盐的耐受力。胆
盐耐受力=含胆盐的培养基的 OD_{600nm} 值/空白培养基的 OD_{600nm} 值 × 100%。

表 2 植物乳杆菌 SWUN5815 耐酸耐胆盐结果

| 菌株编号 | pH3.0 人工胃 | 不同胆盐浓度下的生长率(%) | | |
|----------|------------|----------------|------------|------------|
| | 液存活率(%) | 0.3% | 0.5% | 1.00% |
| SWUN5815 | 93.36±4.06 | 50.81±1.32 | 30.47±0.63 | 15.26±1.19 |

由表 2 可知，菌株 SWUN5815 在 pH3.0 的环境下存活率很高，对酸有较强的耐受性。通过胃后存活的菌体将与小肠中的胆盐接触，本实验把乳酸菌对胆盐的抵抗能力用于作为潜在益生菌的一个选择标准。耐酸性较好的 SWUN5815 菌株耐受不同浓度胆盐的结果是对 0.3% 的胆盐有一定的耐受力，当胆盐浓度升高至 0.5% 及 1.0% 时，SWUN5815 对胆盐耐受力下降。

实施例 4 生产植物乳杆菌细菌素的方法

把冻存管中的保藏液接种到 5mL 的 MRS 液体培养基中，震荡混匀，37℃ 恒温培养 24h，以 2% 的接种量连续活化三代，取第三代的发酵液以 4000 × g 离心 10min，取上清，上清液经 0.22 μ m 微膜过滤，-20℃ 冰箱保存备用，制备得到粗植物乳杆菌 MRS 发酵上清液。

收集后指数生长期的菌液 500mL，4℃，12000 × g 离心 20min 收集上清液，以 0.22 μ m 的滤膜过滤上清液以除去残余的细胞碎片；加入预冷的三氯乙酸/丙酮溶液至三氯乙酸的终浓度为 12.5% (该三氯乙酸浓度能够使大部分蛋白得到较好的沉淀效果)，-20℃ 静置 8h 使蛋白充分沉淀，4℃，15000 × g 离心 20min 收集蛋白沉淀，向沉淀中加入 80% 的预冷丙酮反复洗涤 3-5 次以除去残留的三氯乙酸，室温放置 4-5min 使丙酮完全挥发，加入 100 μ L 超纯水溶解蛋白沉淀，制备得到纯化后的植物乳杆菌 MRS 发酵上清液，即为植物乳杆菌细菌素。

其中，MRS 培养基成分如下：蛋白胨 10.0g、牛肉膏 10.0g、酵母粉 5g、葡萄糖 20.0g、吐温 801.1g、磷酸氢二钾 2.0g、乙酸钠 3.0g、柠檬酸二胺 2.0g、硫酸镁 0.6g、硫酸锰 0.25g 以及蒸馏水 1000mL。

实施例 5 PCR 扩增已知植物乳杆菌素基因

表 3 PCR 扩增已知植物乳杆菌素基因

| 目的基因 | 引物序列 | 退火温度 | 片段长度 |
|------|-------------------------|------|------|
| plnA | F:GTACAGTACTAATGGGAG | 53 | 450 |
| | R:CTTACGCCAATCTATACG | | |
| plnB | F:TTCAGAGCAAGCCTAAATGAC | 51.5 | 165 |
| | R:GCCACTGTAACACCATGAC | | |
| PlnC | F:AGCAGATGAAATTCGGCAG | 49.5 | 108 |

| | | | |
|--------------------|--------------------------------|------|-----|
| | R:ATAATCCAACGGTGCAATCC | | |
| plnD | F:TGAGGACAAACAGACTGGAC | 53 | 414 |
| | R:GCATCGGAAAAATTGCGGATAC | | |
| plnEF | F:GGCATAGTTAAAATTCCCCC | 53.2 | 428 |
| | R:CAGGTTGCCGCAAAAAAAG | | |
| plnI | F:CTCGACGGTGAAATTAGGTGTAAG | 52.5 | 450 |
| | R:CGTTTATCCTATCCTCTAAGCATTGG | | |
| plnJ | F:TAACGACGGATTGCTCTG | 51 | 475 |
| | R:AATCAAGGAATTATCACATTAGTC | | |
| plnK | F:CTGTAAGCATTGCTAACCAATC | 52.9 | 246 |
| | R:ACTGCTGACGCTGAAAAG | | |
| plnG | F:TGCGGTTATCAGTATGTCAAAG | 52.8 | 453 |
| | R:CCTCGAAACAATTTCCCCC | | |
| plnN | F:GGTCTGCGTATAAGCATCGC | 51.9 | 146 |
| | R:CCTAAACCATGCCATGCAC | | |
| Plantaricin | F:GGTCTGCGTATAAGCATCGC | 60 | 207 |
| NC8structural gene | R:AAATTGAACATATGGGTGCTTTAAATTC | | |
| | C | | |
| Plantaricin S | F:GCCTTACCAGCGTAATGCCC | 60 | 320 |
| structural gene | R:CTGGTGATGCAATCGTTAGTTT | | |
| Plantaricin W | F:TCACACGAAATATTCCA | 55 | 165 |
| structural gene | R:GGCAAGCGTAAGAAATAAATGAG | | |

为了确定所选择的菌株是否携带用于生产已知的植物乳杆菌素的基因，使用 PCR 分析使用对单个植物乳杆菌素基因特异的引物。

通过设计并合成 11 对细菌素合成及调控相关基因的特异性引物，以 SWUN5815 菌体基因组 DNA 为模版进行 PCR 扩增，琼脂糖凝胶电泳结果如图 3 所示，其中以 plnA-F/R、plnB-F/R、plnD-F/R、plnEF-F/R、plnJ-F/R、plnK-F/R、plnN-F/R、plnNC8-F/R、为引物的 PCR 产物大小与预期片段长度相同。

上述说明示出并描述了发明的若干优选实施例，但如前所述，应当理解

发明并非局限于本文所披露的形式，不应看作是对其他实施例的排除，而可用于各种其他组合、修改和环境，并能够在本文所述发明构想范围内，通过上述教导或相关领域的技术或知识进行改动。而本领域人员所进行的改动和变化不脱离发明的精神和范围，则都应在发明所附权利要求的保护范围内。