

# 重组抗冻肽在乳酸乳球菌中表达及其抗冻活性研究

## Expression of recombinant antifreeze peptide in *Lactococcus lactis* and its antifreeze activity

张莉 黄心阳 马添熠 吴金鸿

ZHANG Li HUANG Xin-yang MA Tian-yi WU Jin-hong

汪少芸 王正武

WANG Shao-yun WANG Zheng-wu

(上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240)

(School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

**摘要:** 为了优化抗冻蛋白 SF-P 的重组表达, 利用乳酸链球菌素 Nisin 对已构建的重组乳酸乳球菌进行表达。通过对诱导时间、诱导 pH、诱导温度和诱导剂 Nisin 浓度等诱导表达条件进行优化, 利用 SDS-PAGE 和 Western blot 确定最佳的表达条件; 通过比较冷冻胁迫前后菌体的生长状况、发酵活力和细胞内钠钾离子含量的变化, 研究重组菌在冷冻胁迫作用下的生理功能特性。结果表明: 优化后的最佳表达条件为 pH 7.0, 诱导剂 Nisin 浓度 15 ng/mL, 温度 25 °C, 诱导时间 6 h; SF-P2 诱导重组菌株可以显著改善乳酸菌由于经受冷冻胁迫导致的对数生长延滞期和稳定生长延滞期的增加, 表现出较强的酸化活力, 并且可以有效降低冷冻胁迫过程对乳酸菌细胞膜通透性的影响, 起到保护细胞生理功能的作用, 表明 SF-P2 诱导重组菌具有显著的抗冷冻胁迫保护作用。

**关键词:** 抗冻肽; 乳酸乳球菌; 重组表达; 抗冻活性; 冷冻胁迫; 生理功能

**Abstract:** In order to optimize the expression of antifreeze protein SF-P, using Nisin as the inducer to induced the expression of recombinant *Lactococcus lactis*. The expression conditions of induction time, induced pH, induced temperature and inducer Nisin concentration were optimized. The optimal expression conditions were determined by SDS-PAGE and Western blot. Furthermore, the physiological characteristics of recombinant bacteria under freezing stress were investigated by comparing the growth status, the acid production of bacteria and the changes of sodium and potassium con-

tents before and after freezing stress. The results showed that the optimal expression conditions were determined: pH of 7.0, Nisin concentration of 15 ng/mL, temperature of 25 °C, and incubation time of 6 h. The recombinant strain SF-P2 could significantly improved the growth of *Lactococcus lactis* in the logarithmic phase and the stable growth lag following freezing, and had a significant improvement in fermentation of *L. lactis* following freezing. It also could effectively reduced the effect of freezing stress on the permeability of cell membrane, which played a role in protecting the physiological function of cells. The results showed that the recombinant strain SF-P2 had significant protective effects against cold stress.

**Keywords:** Antifreeze peptide; *Lactococcus lactis*; Recombinant expression; Antifreeze activity; Freezing stress; Physiological function

抗冻肽(antifreeze peptide, AFP)能结合到冰晶表面并抑制冰晶进一步生长, 且具有冰重结晶抑制(ice recrystallization inhibition, IRI)效应<sup>[1-2]</sup>。近年来 AFP 的资源开发及应用引起了广泛关注, 并发现其在冷冻食品加工与储藏<sup>[3-4]</sup>、细胞保藏<sup>[5]</sup>、抗冻农作物栽培和冷冻手术等领域具有诱人的商业应用前景<sup>[6-7]</sup>。Chuanmei 等<sup>[8]</sup>研究用一种由乳酸菌表达的 type I AFP 处理冷冻肉和冷冻面团, 结果表明它可以降低冷冻肉水分流失, 减少蛋白损失, 提高肉制品多汁性, 提高面团中酵母发酵能力; Kontogiorgos 等<sup>[9-10]</sup>发现, 将 AFP 添加到玉米与小麦淀粉胶中可提高其在冷冻—解冻过程中脱水收缩和硬度的稳定性, 添加到冷冻脱水面筋中可通过抑制冰晶重结晶作用而降低其网络结构破坏程度。

从天然的低温生物中提取抗冻肽的成本高、得率低, 影响了其应用。为了提高抗冻肽的产量并降低其生产成本, 近年来许多研究采用基因工程生物表达的方法进行抗冻肽的制备。例如, Uhlig 等<sup>[11]</sup>在大肠杆菌中异源表达制备了一种

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(编号:31471623, 21276154); 国家重点研发计划项目(编号:2016YFD0400206)

**作者简介:** 张莉, 女, 上海交通大学在读硕士研究生。

**通信作者:** 吴金鸿(1978—), 女, 上海交通大学副研究员, 博士。

E-mail: wujinhong@sjtu.edu.cn

**收稿日期:** 2017-08-15

来源于圆柱拟胞杆菌的 AFP 类似物; Mok 等<sup>[12]</sup> 在大肠杆菌中表达制备了来源于雪蚤的具有高热滞活性的重组 AFP; 吕绘倩等<sup>[13]</sup> 在大肠杆菌中也成功表达了太平洋鳕抗冻基因 AFP4。由于乳酸菌表达的活性肽产物可以分离直接作为食品添加剂应用于食品加工中, 大大节约了生物活性肽的生产制备成本<sup>[14]</sup>。因此, 许多研究<sup>[15-16]</sup> 采用乳酸菌作为活性蛋白或多肽生物表达的宿主。目前主要问题就是优化重组抗冻蛋白在乳酸菌中的表达条件, 使其有效表达, 最终能在生产中应用, 满足各行各业的需求。

然而, 有研究<sup>[17]</sup> 表明, 在冷冻过程中, 由于受到低温冻结胁迫作用, 会引起乳酸菌细胞中的细胞膜通透性改变、磷脂膜由液晶态转变成凝胶态、膜脂肪酸组成改变、膜的流动性或完整性改变、调节生理活动的关键蛋白质或酶变性失活等, 导致菌体细胞大量死亡。因此, 为了减少冷冻胁迫的损伤, 最有效的措施是添加适当的保护剂。例如, Carvalho 等<sup>[18]</sup> 将海藻糖在乳酸菌细胞内表达和积累, 使其存活率几乎达到 100%。本研究拟采用菌株胞内表达的抗冻肽作为细胞保护剂来提高重组菌的抗冻能力。

本研究主要利用课题组前期构建的乳酸乳球菌工程菌株表达重组抗冻蛋白 SF-P, 该蛋白具有重复序列结构, 具有 162 氨基酸残基<sup>[19]</sup>。通过对诱导时间、诱导 pH、诱导温度和诱导剂 Nisin 浓度等表达条件进行优化, 确定最佳的重组蛋白表达条件。在此基础上, 通过比较冷冻胁迫前后重组菌生长状况、发酵活力和细胞内金属离子的变化, 进一步从生理功能特性方面探讨重组抗冻肽对提高乳酸乳球菌抗冷胁迫性的作用, 为抗冻肽在乳酸菌冻干制剂中的开发应用提供新的技术指导 and 理论参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

食品级乳酸乳球菌表达菌株 NZ3900 (含融合质粒 pNZ8149-SF-P): 实验室保存;

M17 肉汤: 青岛高科园海博生物技术有限公司;

Nisin、预染蛋白 Marker Page Ruler Prestained Protein Ladder: 美国 Thermo 公司;

PBS 磷酸盐缓冲液(干粉): 北京中杉金桥生物技术有限公司;

增强型 BCA 蛋白浓度测定试剂盒: 上海碧云天生物技术有限公司;

兔抗 6×His 多克隆抗体、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体: 上海生工生物技术有限公司;

其他试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

恒温培养摇床: THZ-100 型, 上海一恒科技有限公司;

手提式压力蒸气灭菌器: DSX-280B 型, 上海申安医疗器械厂;

离心机: J6-MI 型, 美国贝克曼库尔特有限公司;

pH 计: FE20 型, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;

超声波细胞破碎仪: JY92-IIID 型, 上海比朗仪器制造有

限公司;

冷冻干燥机: FD-1A-50 型, 上海比朗仪器制造有限公司;

电泳仪: EPS300 型, 上海天能科技有限公司;

转移电泳槽: VE186 型, 上海天能科技有限公司;

微生物生长曲线自动分析仪: FP-1100-C 型, 芬兰 Bioscreen 公司;

火焰原子吸收光谱仪: AA800 型, 美国 PE 公司。

### 1.3 方 法

1.3.1 重组菌株的诱导表达条件优化 在重组乳酸乳球菌表达抗冻蛋白 SF-P 的基础上, 对诱导时间(3, 6, 9, 12, 15 h)、pH(3.4, 5, 6, 7)、温度(20, 25, 30, 35, 37 °C)和诱导剂 Nisin 浓度(15, 25, 50, 75, 100 ng/mL)分别进行筛选, 并利用 Western blot 检测重组菌 SF-P 和空载菌 NZ3900 表达水平的差异, 以确定较好的表达条件。

具体试验优化步骤: 将 SF-P 重组菌株接种于含有 0.5% 葡萄糖的 M17 液体培养基内, 接种量为 1 mL/100 mL, 30 °C 静置培养过夜, 然后按 1 mL/100 mL 的接种量接种于新鲜的含 0.5% 葡萄糖的 M17 液体培养基内, 优化诱导温度下静置培养 2~3 h 至对数生长初期(OD 值为 0.4~0.5), 用冰乙酸调节至优化 pH, 并加入优化终浓度的诱导剂 Nisin, 在优化诱导温度下继续静置培养至优化诱导时间。诱导表达后在 6 000 r/min、4 °C 条件下离心 10 min, 收集菌体, 用 pH 7.4, 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 2 次, 并在 pH 8.0 的裂解缓冲液(由 2 mol/L 尿素, 50 mmol/L Tris, 300 mmol/L 氯化钠, 1 mmol/L DL-二硫苏糖醇(DTT), 0.01% 溶菌酶和 0.2% TritonX-100 组成)中用超声波细胞破壁仪破壁(功率 400 W, 超声 3 s, 间隔 3 s, 超声 80 次), 然后在 12 000 r/min、4 °C 条件下离心 10 min, 收集上清液。利用增强型 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定上清液中的蛋白浓度, 利用 Western-Blot 鉴定目标蛋白的表达<sup>[20]</sup>。

使用同样条件培养空载菌株 NZ3900 作为对照组。

1.3.2 重组菌冷冻胁迫作用下生理功能特性分析 选择 SF-P1 未诱导重组菌(SF-P 重组菌不添加诱导剂 Nisin)、SF-P2 诱导重组菌和 NZ3900 空载菌为研究对象, 在冷冻胁迫处理前后进行生理功能特性研究。在最佳表达条件下培养待测菌株至稳定生长初期, 在 6 000 r/min、4 °C 条件下离心 10 min, 收集菌体细胞。0.02 mol/L PBS 洗 2 遍, 与培养基等量的 PSB 重悬菌体细胞, 制备菌悬液, 并用 PSB 调节至相同的 OD<sub>600 nm</sub> 值。分别取 10 mL 菌悬液进行冷冻胁迫前的活性测定。将其余样品菌悬液置于 -20 °C 冷冻 24 h 后取出, 37 °C 解冻 10 min, 然后进行冷冻胁迫后的活性测定。冷冻胁迫作用下的生理功能特性分析包括生长率、产酸活性、细胞内 K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup> 浓度变化。

(1) 冷冻胁迫前后生长曲线的测定: 分别取上述制备的 SF-P1、SF-P2 和 NZ3900 菌悬液 0.5 mL 与灭过菌的 M17 培养基按 1:100 的浓度制备最终样品, 之后往 100 孔板中分别添加 300 μL 的最终样品, 每个样品做 5 个平行对照。采用微生物生长曲线自动分析仪测定样品的生长曲线。检测

温度 37 ℃, 波长 600 nm, 静置检测, 周期为 24 h, 平均每 30 min 检测一次。

(2) 酸化活力的测定: 采用 pH 计直接测定乳酸菌的酸化活力。分别取上述制备的 SF-P1、SF-P2 和 NZ3900 菌悬液 1 mL, 接种于 10% 的脱脂乳培养基中, 接种量为 10%, 置于 37 ℃ 静置培养。分别连续测定培养基的 pH 值, 直至 pH 5.5 时停止测定, 记录培养时间<sup>[21]</sup>。

(3) 细胞内 K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup> 浓度变化的测定: 用火焰原子吸收光谱仪测定冷冻胁迫前后乳酸菌细胞内 K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup> 含量。分别取上述制备的 SF-P1、SF-P2 和 NZ3900 菌悬液 2 mL, 加入 2 mL 硝酸, 1 mL 双氧水, 在石墨消解器上 120 ℃ 处理 90~120 min, 容量瓶定容至 50 mL 待测。火焰原子吸收光谱法测定 K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup> 的仪器条件见表 1。

表 1 火焰原子吸收光谱法测定 K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup> 的仪器条件

Table 1 Flame atomic absorption spectrometry conditions for determination of potassium and sodium

离子	波长/ nm	狭缝/ nm	灯电流/ mA	燃烧器 高度/mm	燃气流量/ (L·min <sup>-1</sup> )
K <sup>+</sup>	766.5	0.7	8	7.0	2.0
Na <sup>+</sup>	589.0	0.2	8	7.0	2.0

## 2 结果与分析

### 2.1 重组 SF-P 抗冻肽的乳酸乳球菌诱导表达条件的优化

2.1.1 诱导时间对重组菌中目的蛋白表达量的影响 在 pH 7、Nisin 浓度 25 ng/mL、25 ℃ 下鉴定不同诱导时间对 SF-P 抗冻蛋白表达的影响。由图 1 可知, 随着诱导时间的延长, 目的蛋白 SF-P 的表达量呈现先上升后降低的趋势, 在诱导时间分别为 3, 6, 9 h 时目的蛋白 SF-P 的表达量较高, 且诱导 6 h 获得最高的表达量。相同条件下空载菌 NZ3900 未见表达。因此, 最优的诱导培养时间为 6 h, 此时目的蛋白的表达量较高。

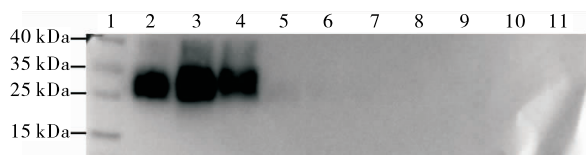


图 1 不同诱导时间菌株表达目的蛋白的 Western blot 分析  
Figure 1 Western blot analysis of target proteins expressed by strains at different induction times

2.1.2 培养 pH 值对重组菌株诱导表达目的蛋白的影响 在 Nisin 浓度 25 ng/mL 与 25 ℃ 下培养 6 h 鉴定不同诱导 pH 对 SF-P 抗冻蛋白表达的影响。由图 2 可知, 随着诱导 pH 的升高, 目的蛋白 SF-P 的表达量呈现逐渐上升的趋势, 在诱导 pH 为 6 和 7 时 SF-P 的表达量较高, 且诱导 pH 7 时获得最高的表达量。相同条件下空载菌 NZ3900 未见表达。因此, 最优的诱导培养 pH 为 7, 此时目的蛋白的表达量较高。

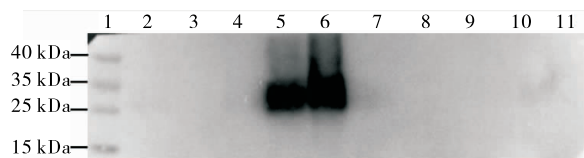


图 2 不同 pH 诱导菌株表达目的蛋白的 Western blot 分析  
Figure 2 Western blot analysis of target proteins expressed by strains at different induction pH

2.1.3 培养温度对重组菌株诱导表达目的蛋白的影响 在 Nisin 浓度 25 ng/mL、pH 7 条件下培养 6 h 鉴定不同诱导温度对 SF-P 抗冻蛋白表达的影响。由图 3 可知, 随着诱导温度的升高, 目的蛋白 SF-P 的表达量呈现逐渐降低的趋势, 在诱导温度分别为 20, 25, 30 ℃ 时 SF-P 的表达量较高, 且在 25 ℃ 时获得最高的表达量。有研究<sup>[22]</sup>表明, 乳酸菌的一些特殊蛋白如冷休克蛋白、氧化还原蛋白、抗冻蛋白等在较低温度时的表达量更高, 与本研究的结果相吻合。但温度如果偏低, 如达到 20 ℃, 又会一定程度对微生物代谢产生不利影响, 从而减弱蛋白质的表达量。相同条件下空载菌 NZ3900 未见表达。因此, 最优的诱导培养温度为 25 ℃, 此时目标蛋白的表达量较高。

2.1.4 诱导剂 Nisin 浓度对重组菌株诱导表达目的蛋白的影响 在 pH 7、25 ℃ 下诱导培养 6 h 鉴定不同 Nisin 浓度对 SF-P 抗冻蛋白表达的影响。由图 4 可知, 在诱导剂 Nisin 浓度分别为 15, 25 ng/mL 时 SF-P 的表达量较高, 其他诱导剂浓度下均未见目的蛋白明显表达, 可能与添加的诱导剂

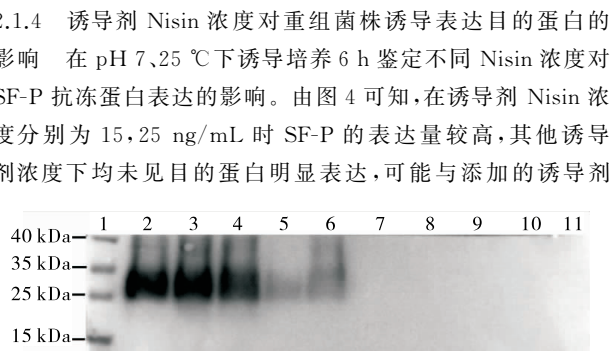


图 3 不同温度诱导菌株表达目的蛋白的 Western blot 分析  
Figure 3 Western blot analysis of target proteins expressed by strains at different induction temperature

2.1.5 诱导剂 Nisin 浓度对重组菌株诱导表达目的蛋白的影响 在 pH 7、25 ℃ 下诱导培养 6 h 鉴定不同 Nisin 浓度对 SF-P 抗冻蛋白表达的影响。由图 4 可知, 在诱导剂 Nisin 浓度分别为 15, 25 ng/mL 时 SF-P 的表达量较高, 其他诱导剂浓度下均未见目的蛋白明显表达, 可能与添加的诱导剂

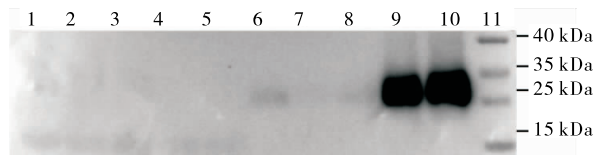


图 4 不同诱导剂浓度诱导菌株表达目的蛋白的 Western blot 分析  
Figure 4 Western blot analysis of target proteins expressed by strains under different inducers concentrations

2.1.6 诱导剂 Nisin 浓度对重组菌株诱导表达目的蛋白的影响 在 pH 7、25 ℃ 下诱导培养 6 h 鉴定不同 Nisin 浓度对 SF-P 抗冻蛋白表达的影响。由图 4 可知, 在诱导剂 Nisin 浓度分别为 15, 25 ng/mL 时 SF-P 的表达量较高, 其他诱导剂浓度下均未见目的蛋白明显表达, 可能与添加的诱导剂

Nisin 具有一定的抑菌作用有关,在 Nisin 太高浓度下对菌的生理活性有一定抑制作用,从而影响目的蛋白的表达<sup>[23]</sup>。由于目的蛋白 SF-P 在 15 ng/mL 时比在 25 ng/mL 的表达量略高,因此,确定诱导剂的最优浓度为 15 ng/mL。相同条件下空载菌 NZ3900 未见表达。

### 2.2 重组乳酸乳球菌冷冻胁迫前后生长曲线分析

冷冻胁迫处理后菌体细胞的生长速率是评价细胞冷冻胁迫抗性的一个指标。选取乳酸菌冷冻效果较明显的对数生长期和稳定生长期前期(10 h)作为研究对象,对待测菌株重培养过程中细胞的生长情况进行了测定。由图 5 可知,冷冻胁迫处理前的 SF-P2 重组菌株与 NZ3900 空载菌株的生长情况无显著差异,均在相同时间到达对数生长期和稳定生长期,只有 SF-P1 未诱导重组菌表现出较低的终浓度。经过 24 h 的冷冻胁迫处理后,与处理前相比,各菌体生长速率均表现出了一定的差异。具体来讲,经过 -20 °C 冷冻胁迫 24 h 后的 SF-P1 未诱导重组菌株、SF-P2 诱导重组菌和 NZ3900 空载菌株,其对数生长延滞期分别增加了 0.5,1.5,2.5 h,并且比较冷冻胁迫前后菌株的稳定生长期,发现 SF-P 重组菌株无稳定生长延滞期,而 NZ3900 空载菌株的稳定生长延滞期增加了 3 h,并且在对数生长后期其生长速率出现明显波动和减缓。上述结果表明,与未诱导重组菌和空载菌株相比,SF-P2 诱导重组菌株可以显著改善乳酸菌由于经受冷冻胁迫导致的对数生长延滞期和稳定生长延滞期的增加。这对提高冷冻胁迫后菌体细胞的活力,特别是改善工业生产中因起始菌株的低温保藏造成的生产效率下降具有重要意义。

### 2.3 重组乳酸乳球菌冷冻胁迫前后酸化活力分析

酸化活力即乳酸菌发酵乳糖产酸的能力<sup>[24]</sup>。将待测菌株接种于脱脂乳培养基中,置于适当温度下进行培养。样品培养基 pH 值下降至 5.5 所需时间越长,则表示菌的酸化活力越弱<sup>[25-27]</sup>。检测冷冻胁迫前后乳酸菌的酸化活力,通过冷冻后及冷冻前的时间差值及 pH 下降趋势,即可看出不同待测菌株的抗冷冻能力。

3 种待测菌株的酸化活力测定结果见图 6。由图 6 可知,冷冻胁迫处理前 SF-P2 诱导重组菌和 NZ3900 空载菌株的酸化活力无显著差异,pH 值降至 5.5 的时间分别为 18,22 h, SF-P1 未诱导重组菌株表现出最强的酸化活力,在 12 h 即达到 pH 5.5,与重组菌添加的诱导剂 Nisin 具有一定抑菌作用有关。经冷冻胁迫 24 h 后,3 种待测菌株均表现出不同程度的酸化活力减弱现象,SF-P1 未诱导重组菌和 SF-P2 诱导重组菌的酸化活力减弱程度较低,NZ3900 空载菌的酸化活力减弱现象最明显,在发酵初期表现出酸化活力延滞。冷冻胁迫后 SF-P1 未诱导重组菌、SF-P2 诱导重组菌和 NZ3900 空载菌的培养基 pH 值降至 5.5 的时间分别为 15.5,19.0,25.0 h,与冷冻胁迫处理前相比酸化时间分别增加了 3.5,1.0,3.0 h。表明 SF-P2 诱导重组菌可以显著改善乳酸菌经冷冻胁迫处理后的发酵活力,具有一定的抗冷冻胁迫保护作用。

### 2.4 冷冻胁迫前后重组乳酸乳球菌细胞内 K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup> 浓度的变化

本试验用火焰原子吸收光谱法测定冷冻胁迫前后乳酸菌细胞内 K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup> 的浓度变化,测定结果见图 7。由图 7 可知,冷冻胁迫前后 3 种待测菌株胞内的 K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup> 浓度均发生

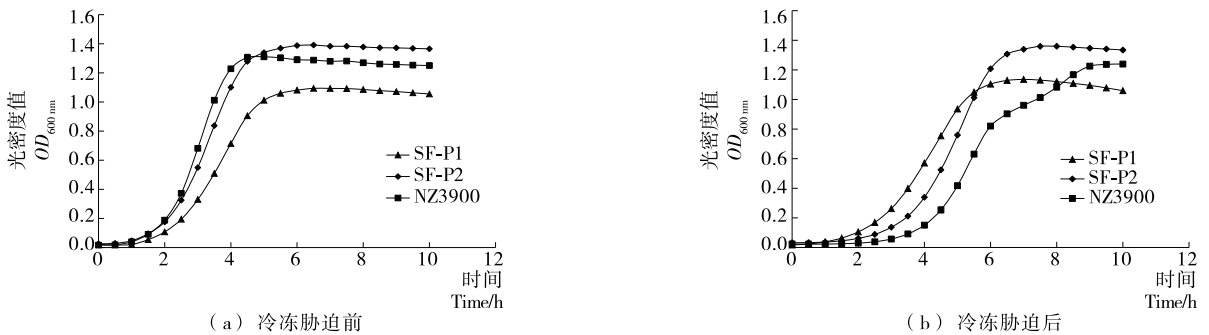


图 5 冷冻胁迫前后菌株的生长曲线  
Figure 5 Growth curve of strains before and after freezing stress

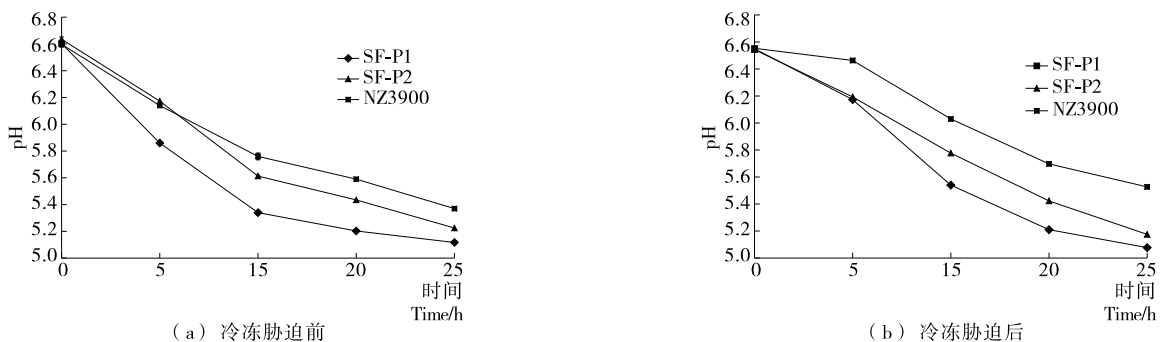
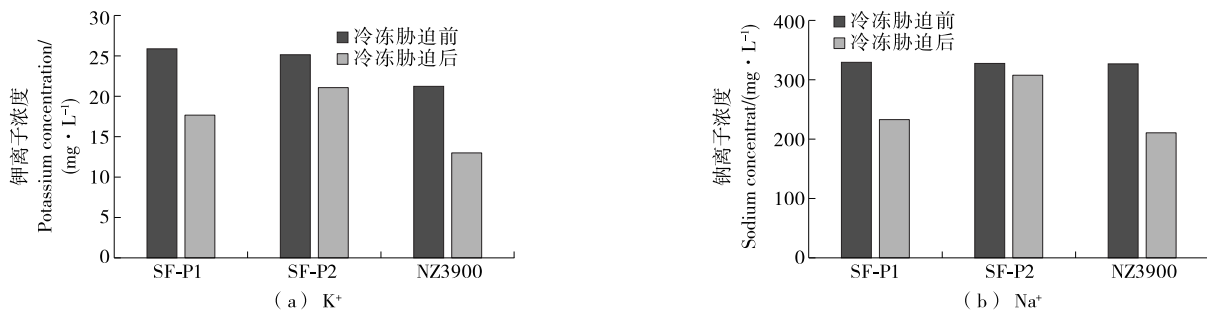


图 6 冷冻胁迫前后菌株的酸化活力  
Figure 6 Acid production of strains before and after freezing

图 7 冷冻胁迫前后细胞内 K<sup>+</sup> 和 Na<sup>+</sup> 浓度的变化Figure 7 Changes of intracellular K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> concentrations before and after freezing stress

一定变化,说明冷冻胁迫后细菌细胞膜的渗透性出现损伤,使细胞内外离子发生转移,细胞内部的离子浓度发生改变<sup>[28-29]</sup>。冷冻后,SF-P1 未诱导重组菌和 NZ3900 空载菌胞内的 K<sup>+</sup> 浓度分别降低了 46.41%,41.43%,Na<sup>+</sup> 浓度分别降低了 63.43%,55.05%,而 SF-P2 重组菌胞内的 K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup> 浓度分别降低了 19.32%,6.47%,说明 SF-P2 重组菌细胞膜的渗透性损伤程度要低于其他 2 种菌株。说明抗冻蛋白 SF-P 在胞内的表达可以有效降低冷冻胁迫过程对乳酸菌细胞膜通透性的影响,起到保护细胞生理功能的作用。

### 3 结论

在冷冻胁迫过程中,乳酸菌的细胞膜通透性会发生改变,磷脂膜由液晶态转变成凝胶态,膜脂肪酸的组成、膜的流动性和完整性等也会发生变化,导致菌体细胞大量死亡。本研究通过对诱导时间、诱导 pH、诱导温度和诱导剂 Nisin 浓度等表达条件进行优化,使重组菌株高效表达目的抗冻蛋白 SF-P,并通过比较冷冻胁迫前后菌体的生长状况、发酵活力和细胞内 K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup> 浓度的变化,对重组菌的生理功能特性进行研究。研究结果表明,在 pH 7.0,诱导剂 Nisin 浓度 15 ng/mL,温度 25 °C,诱导 6 h 的条件下目的蛋白的表达量最高。此外,SF-P2 诱导重组菌株可以显著改善乳酸菌由于经受冷冻胁迫导致的对数生长延滞期和稳定生长延滞期的增加,表现出较强的酸化活力,并且可以有效降低冷冻胁迫对乳酸菌细胞膜通透性的影响。抗冻蛋白在乳酸菌胞内的表达可以有效降低冷冻胁迫对乳酸菌生理功能作用的损伤程度,因此可为乳酸菌冻干粉开发应用提供一种新的工艺手段,并为抗冻肽在食品加工中应用提供新的技术方法。

### 参考文献

[1] HASSAS-ROUDSARI M, GOFF H D. Ice structuring proteins from plants: mechanism of action and food application[J]. Food Research International, 2012, 46(1): 425-436.

[2] 赵金红,胡锐,刘冰,等.几种冷冻新技术对食品冻结过程中冰晶形成的影响[J].食品与机械,2012,28(6):241-245.

[3] 张莉,王晨笑,陈姗姗,等.丝胶抗冻肽在马铃薯冷冻馒头中的应用研究[J].食品工业科技,2017,38(11):49-54.

[4] 李向红,刘忠祥,邓海洋,等.鲑鱼酶解产物在冷冻鱼糜中的抗冻性能研究[J].食品与机械,2015,31(3):125-130.

[5] 权国波,吴国权,吕春荣,等.抗冻蛋白对山羊精子冷冻保护效果的分析[J].中国畜牧杂志,2017,53(3):53-57.

[6] DOXEY A C, YAISH M W, GRIFFITH M, et al. Ordered surface carbons distinguish antifreeze proteins and their ice-binding regions[J]. Nature Biotechnology, 2006, 24(7): 852-855.

[7] 张晖,丁香丽.抗冻蛋白在食品中应用研究进展及安全性分析[J].食品与生物技术学报,2012,31(5):455-461.

[8] YE H C M, KAO B Y, PENG Hsuan-jung. Production of a recombinant type 1 antifreeze protein analogue by *L. lactis* and its applications on frozen meat and frozen dough[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2009, 57(14): 6 216-6 223.

[9] LI Ling-ling, YANGSOO K, HUANG Wei-ning, et al. Effects of ice structuring proteins on freeze-thaw stability of corn and wheat starch gels[J]. Cereal Chemistry, 2010, 87(5): 497-503.

[10] AND V K, GOFF H D, KASAPIS S. Effect of Aging and Ice Structuring Proteins on the Morphology of Frozen Hydrated Gluten Networks[J]. Biomacromolecules, 2007, 8(4): 1 293-1 299.

[11] UHLIG C, KABISCH J, PALM G J, et al. Heterologous expression, refolding and functional characterization of two antifreeze proteins from *Fragilariaopsis cylindrus* (*Bacillariophyceae*)[J]. Cryobiology, 2011, 63(3): 220-228.

[12] MOK Y F, LIN F H, GRAHAM L A, et al. Structural basis for the superior activity of the large isoform of snow flea antifreeze protein[J]. Biochemistry, 2010, 49(11): 2 593-2 603.

[13] 吕绘倩,蒋洁兰,姜志强,等.太平洋鲑抗冻基因 AFP4 的原核表达及多克隆抗体的制备[J].大连海洋大学学报,2017,32(2):127-133.

[14] 苏松坤,晏励民,刘芳.乳酸菌食品级表达系统的研究进展[J].食品与生物技术学报,2012,31(12):1 233-1 238.

[15] 崔月倩,王菁蕊,王艳萍.乳酸菌基因表达载体及其应用研究进展[J].食品科学,2015,36(9):224-229.

[16] 谭嘉圣.人源及杂合抗冻肽在乳酸乳球菌中重组分泌表达[D].广州:南方医科大学,2015:217-230.

[17] 朱东升.乳酸菌冻干保活关键技术研究[D].杭州:浙江大学,2010:52-69.

[18] CARVALHO A L, CARDOSO F S, BOHN A, et al. Engineering trehalose synthesis in *Lactococcus lactis* for improved stress tolerance[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(12): 4 189-4 199.

[19] PENTELUTE B L, GATES Z P, TERESHKO V, et al. X-ray structure of snow flea antifreeze protein determined by racemic crystallization of synthetic protein enantiomers[J]. Journal of the American Chemical Society, 2008, 130: 9 695-9 701.

(下转第 144 页)



别为 24.55%, 10.55%, 说明压榨法制得的澳洲坚果油风味浓郁, 与笔者<sup>[4,6]</sup>前期研究发现压榨的澳洲坚果油带有一种很浓郁的澳洲坚果特有的香气, 水剂法制得澳洲坚果油则比较淡是相吻合的。

### 3 结论

(1) 制油工艺对澳洲坚果油的脂肪酸组成、甘油三酯组成和生育酚含量的影响不显著, 澳洲坚果油中脂肪酸主要为油酸、棕榈-烯酸、棕榈酸, 占 86% 以上; 甘油三酯共检出 18 种, 其中 OOO、POS、POO 占 53% 以上; 生育三烯酚含量均为 25.00 mg/kg; 水剂法制得的澳洲坚果油中甾醇含量较高, 为 1 439.79 mg/kg, 压榨法制得的澳洲坚果油中矿物质含量较高。

(2) 压榨法制得的澳洲坚果油中, 挥发性风味物质成分较多, 共分离出 41 种, 主要包括烯类、醛类、酚类、醇类、酯类、烃类和酮类共 7 类, 其中相对含量较高的烯类化合物和醇类化合物, 占总挥发性成分的 82.1%, 是构成压榨澳洲坚果油的主要风味物质。

(3) 本研究对澳洲坚果油的营养品质和风味成分进行了全面的分析, 但对其中的功效成分和生理活性没有深度挖掘, 后续将采用现代分离和分析技术对澳洲坚果油中功效成分进行分析, 同时采用体外和体内试验对其生理活性进行综合评价。

### 参考文献

[1] 刁卓越, 杨薇, 李建欢, 等. 澳洲坚果热风干燥特性研究[J]. 食品与机械, 2010, 26(6): 44-46.

[2] 赵静, 唐君海, 王文林, 等. 澳洲坚果营养成分分析[J]. 农业研究与应用, 2013(3): 24-25.

[3] 蔡达, 刘灵芝, 刘丽, 等. 不同工艺制备核桃油品质比较及相关性分析[J]. 中国油脂, 2014, 39(3): 80-84.

[4] 许良, 叶丽君, 邱瑞霞, 等. 亚临界丁烷萃取澳洲坚果油工艺及品质研究[J]. 中国粮油学报, 2015, 30(6): 79-83.

[5] 杜丽清, 帅希祥, 涂行浩, 等. 水剂法提取澳洲坚果油的化学成

分及其抗氧化活性研究[J]. 食品与机械, 2016, 32(10): 140-144.

[6] 朱冰清. 澳洲坚果油提取及其纳米乳口服液的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2013.

[7] International Olive Council. Determination of the composition and content of sterols by capillary-column gas chromatography [S]. Madrid: [s.n.], 2013: 1-16.

[8] American Oil Chemists' Society. Official Methods and Recommended Practices of the AOCS[M]. Illinois: [s.n.], 2009: 8-89.

[9] 柴杰, 金青哲, 薛雅琳, 等. 制油工艺对葵花籽油品质的影响[J]. 中国油脂, 2016, 41(4): 56-61.

[10] 杨金娥, 黄庆德, 周琦, 等. 冷榨和热榨亚麻籽油挥发性成分比较[J]. 中国油料作物学报, 2013, 35(3): 321-325.

[11] 张东生, 薛雅琳, 金青哲, 等. 精炼过程对油茶籽油品质影响的研究[J]. 中国油脂, 2014, 39(9): 18-22.

[12] 胡珺, 魏芳, 董绪燕, 等. 食用油甘油三酯质谱分析方法的研究进展[J]. 分析测试学报, 2012, 31(6): 749-756.

[13] 朱桃花, 范璐, 钱向明, 等. HPLC 分析植物油脂甘油三酯结构组成的研究现状[J]. 中国油脂, 2011, 36(5): 59-63.

[14] KAIJSERA A, DUTTA P, SAVAGE G. Oxidative stability and lipid composition of macadamia nuts grown in New Zealand [J]. Food Chemistry, 2000, 71(1): 67-70.

[15] WALL M M. Functional lipid characteristics, oxidative stability, and antioxidant activity of macadamia nut (*Macadamia integrifolia*) cultivars[J]. Food Chemistry, 2010, 121(4): 1 103-1 108.

[16] STEOHENSON R A, TROCHOULIAS T. Macadamia, In handbook of Environmental Physiology of Fruit Crops. Volume II; Subtropical and Tropical Crops[M]. B th. Boca Raton: CRC Press, 1994: 147-163.

[17] 张谦益, 包李林, 熊巍林, 等. 浓香菜籽油挥发性风味成分的鉴定[J]. 粮食与油脂, 2017, 30(3): 78-80.

[18] 杨湄, 刘昌盛, 周琦, 等. 加工工艺对菜籽油主要挥发性风味成分的影响[J]. 中国油料作物学报, 2010, 32(4): 551-557.

(上接第 127 页)

[20] 陈帅印. 幽门螺杆菌基因在乳球菌中食品级表达及免疫反应性 [D]. 郑州: 郑州大学, 2010: 45-52.

[21] CAVANAGH D, FITZGERALD G F, MCAULIFFE O. From field to fermentation: the origins of *Lactococcus lactis* and its domestication to the dairy environment[J]. Food Microbiology, 2015, 47: 45-61.

[22] 周方方, 吴正钧, 艾连中, 等. 蛋白组学技术在乳酸菌环境胁迫应激研究中的应用[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(8): 101-106.

[23] 贺松, 龚芳红, 张德纯, 等. 乳酸链球菌素对乳酸菌抑菌作用的研究[J]. 食品科学, 2009, 30(23): 352-355.

[24] 蔡鲁峰, 杜莎, 谭雅, 等. 乳酸菌肉品发酵剂的发酵特性研究 [J]. 食品工业科技, 2015, 36(17): 150-156.

[25] 杨俊俊. 西藏牦牛奶渣中微生物的分离鉴定及优良乳酸菌的筛选[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2014: 62-70.

[26] HANSEN G, JOHANSEN C L, MARTEN G, et al. Influence of extracellular pH on growth, viability, cell size, acidification activity, and intracellular pH of *Lactococcus lactis*, in batch fermentations [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2016, 100(13): 1-12.

[27] BISCHOF J C, WOLKERS W F, TSVETKOVA N M, et al. Lipid and protein changes due to freezing in Dunning AT-1 cells [J]. Cryobiology, 2002, 45(1): 22-32.

[28] 吴文茹, 汪政煜, 范梦茹, 等. 乳酸菌的抗冷冻性及冻干保护 [J]. 食品工业, 2017, 38(5): 246-249.

[29] 王学良, 韩雪, 王海娟, 等. 乳酸菌在各种胁迫下的应激反应研究进展[J]. 食品工业科技, 2015, 36(6): 365-369.