

胡彦新,李清,王英,等. 传统发酵食品中产细菌素乳酸菌的筛选与鉴定[J]. 江苏农业科学,2016,44(1):276-278.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.01.082

传统发酵食品中产细菌素乳酸菌的筛选与鉴定

胡彦新^{1,2}, 李清^{1,2}, 王英², 刘小莉², 董明盛², 周剑忠^{1,2}

(1. 江苏省农业科学院农产品加工研究所, 江苏南京 210014; 2. 南京农业大学食品科技学院, 江苏南京 210095)

摘要:从侗族酸肉、贵州酸汤、苗族酸鱼等传统发酵食品中分离 63 株乳酸菌,通过琼脂扩散牛津杯法从中筛选出 M-M₄-SS₂-6、SR₄-1 这 3 株对指示菌均具有明显抑菌作用的菌株。3 株菌株经排除有机酸和过氧化氢作用、胰蛋白酶和胃蛋白酶发酵处理、70% 硫酸铵沉淀发现,这 3 株菌株经排除有机酸和过氧化氢作用仍具有一定的抑菌活性;用胰蛋白酶和胃蛋白酶处理,菌株活性消失;经硫酸铵沉淀的盐析液抑菌能力明显增大。通过形态学观察、生理生化试验和 16S rRNA 序列分析方法,鉴定这 3 株菌株分别是香肠乳杆菌、乳酪短杆菌、植物乳杆菌。

关键词:发酵食品;乳酸菌;细菌素;硫酸铵沉淀;筛选鉴定

中图分类号: TS201.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)01-0276-03

细菌素是一类在细菌代谢过程中通过核糖体合成机制产生、具有抑菌活性的蛋白质或多肽^[1],一般只对亲缘关系较近的细菌有毒害作用,对自己产生的细菌素具有自身免疫力^[2-3]。乳酸菌是公认的安全微生物和益生菌,在许多食品发酵中广泛应用,历史长达几千年。乳酸菌素是乳酸菌产生的一类蛋白类抑菌物质,可以改善肠道生态,对动物无毒性,易被人体消化道中的蛋白酶降解,不会在体内蓄积而引起不良反应,被认为是一种具有广阔应用前景的天然食品防腐剂和饲料添加剂^[4]。目前,研究最为深入的是乳球菌乳酸亚种所产细菌素 Nisin,现已被 60 多个国家广泛应用于乳制品和罐头制品等的保藏。

近年来,发现的新型细菌素种类繁多,但对其进行深入研究的很少,而投入生产的更是少之又少,对新型细菌素的研究和开发显得尤为重要。为获得结构新颖、抑菌活性更为稳定的细菌素,国内外学者从当地传统的发酵食品中,尤其是发酵

肉制品中进行产细菌素乳酸菌的分离筛选。如 De Carvalho 等从意大利 Salami 香肠中分离到 1 株能抑制李斯特氏菌的乳酸菌^[5]; Noonpakdee 等从泰国传统发酵香肠 Nham 中分离到 1 株产 Nisin 的乳酸乳球菌^[6];而我国学者则多从四川腊肉香肠、宣威火腿、泡菜、传统乳制品等发酵食品中分离得到产细菌素的乳酸菌^[7]。

本试验以侗族发酵酸肉、贵州酸汤和苗族酸鱼等传统发酵食品中分离出的 63 株乳酸菌为材料,采用琼脂扩散牛津杯法对产细菌素乳酸菌进行筛选,利用 16S rRNA 序列分析法进行乳酸菌鉴定,以期从原生态的发酵食品中筛选出有益的乳酸菌,对充分挖掘本地传统发酵食品中的乳酸菌资源具有一定的理论和实践意义,为生鱼保鲜和食品生物防腐提供优质菌种资源。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株 63 株供试乳酸菌分离于苗族酸鱼、侗族酸肉、贵州酸汤等传统发酵食品中;3 种指示菌分别为金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、沙门氏菌(*Salmonella*)、志贺氏菌(*Shigella*),均来源于江苏省农业科学院农产品加工研究所微生物实验室。

1.1.2 培养基与主要试剂 培养基主要有 MRS 培养基、LB

方园艺,2010(7):210-211.

[52]梁小玲. 高氧气调包装对鲜切果蔬品质的影响——鲜切梨和土豆的研究[D]. 无锡:江南大学,2008.

[53]王展华,李洁,高琼,等. 洋葱提取液对鲜切马铃薯褐变的影响[J]. 食品研究与开发,2007,28(5):137-140.

[54]陈林林. 柑橘皮精油对鲜切马铃薯褐变及冷却猪肉保鲜的影响[J]. 食品工业科技,2012,33(2):106-109.

[55]李伟锋,何玲,张江利,等. 生姜提取液对鲜切苹果贮藏品质的影响[J]. 北方园艺,2012(3):157-160.

[56]沈金玉,李晓莉,黄家音. 木瓜蛋白酶抑制芦荟褐变的研究[C]. 中国酶工程学术研讨会,2005.

[57]郭冬青,纪付江,程绍杰,等. 无花果蛋白酶的研究进展[J]. 北

[58]吴茂玉,马超,乔旭光,等. 菠萝蛋白酶的研究及应用进展[J]. 食品科技,2008(8):17-20.

[59]龚吉军,李忠海,钟海雁,等. 乙醇处理对萎蒿采后生理生化的影响[J]. 中南林学院学报:自然科学版,2006,26(4):61-64,84.

[60]徐莉,张兵兵,王庆国. 乙醇熏蒸对鲜切菊芋保鲜效果的研究[J]. 食品与发酵工业,2007,33(9):169-173.

[61]孙芝杨,钱建亚. 果疏酶促褐变机理及酶促褐变抑制研究进展[J]. 中国食物与营养,2007(3):22-24.

[62]赵东海,王云,张建平. 果蔬酶促褐变的条件及控制方法研究[J]. 长江蔬菜,2005(7):32-34.

收稿日期:2014-12-08

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号:SCX(14)2297]。

作者简介:胡彦新(1990—),男,河北张家口人,硕士研究生,从事食品微生物研究。E-mail:15996228500@163.com。

通信作者:周剑忠,博士,研究员,从事食品生物技术研究。E-mail:zjzluck@126.com。

培养基、YPD培养基、糖发酵培养基等；胃蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶，均由美国Sigma公司生产；NaOH、HCl，均为分析纯。

1.1.3 主要仪器与设备 JY 502 电子天平、SX-500 型立式电热压力灭菌锅、SW-CJ-2G 型双人单面净化工作台、LRH-150 型生化培养箱、THZ-98 型台式恒温振荡器、SIGMA 3K15 高速冷冻离心机、PB-20 型 pH 计、722S 型可见分光光度计、85-2 型磁力搅拌器、HH-6 型数显恒温水浴锅、电热恒温鼓风干燥箱、游标卡尺等。

1.2 方法

1.2.1 乳酸菌的活化及发酵上清液的制备 将 63 株乳酸菌分别接种于液体 MRS 培养基中，37 ℃ 培养 16~18 h；传代培养 2 次，以 2% 接种量接种于 MRS 液体培养基中，37 ℃ 培养 24 h；发酵液经 10 000 r/min、4 ℃ 低温冷冻离心 10 min，收集上清液，置于 4 ℃ 保存。

1.2.2 指示菌的培养及菌悬液的制备 将金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、志贺氏菌 3 种指示菌传代 1 次，保存于 4 ℃ 冰箱。使用前，将其接种于 LB 液体培养基，传代 2 次，每次均于 37 ℃、120 r/min 培养 16 h。

1.2.3 抑菌活性的测定 采用琼脂扩散牛津杯法^[8-9]测定乳酸菌发酵上清液的抑菌活性。将指示菌发酵液用冷却至 40~50 ℃ 的 LB 半固体培养基稀释至 $10^6 \sim 10^7$ CFU/mL，倒平板；待培养基凝固，用无菌镊子将灭菌的牛津杯从凝固好的培养基中轻轻拔出；乳酸菌发酵上清液用 0.22 μm 滤膜过滤以去除杂菌；在用牛津杯打好的孔中分别注入 150 μL 发酵上清液和盐析液，4 ℃ 冰箱中渗透扩散 5 h，37 ℃ 培养箱中静置培养 24 h，观察并测量抑菌圈大小。设 3 个平行试验，求均值；下同。

1.2.4 有机酸抑菌作用排除试验 将培养好的发酵液，用 1 mol/L 氢氧化钠溶液调 pH 值为 6.0，以金黄色葡萄球菌为指示菌进行抑菌试验。

1.2.5 过氧化氢抑菌作用排除试验 用 1 mol/L NaOH 和 1 mol/L HCl 将发酵上清液调至过氧化氢的最适作用 pH 值 7.0；将发酵上清液用 1 mol/L 过氧化氢酶于 37 ℃ 水浴 1 h，将 pH 值调回对照 pH 值，以未经酶处理的发酵上清液作为对照，进行抑菌试验。

1.2.6 蛋白酶敏感试验 将胰蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、糜蛋白酶分别加入试验菌株的发酵上清液中，使其终浓度为 1 mg/mL；调节 pH 值至各酶的最适作用范围，37 ℃ 水浴 2 h；取出，再将 pH 值调回至 6.0，进行抑菌试验。

1.2.7 细菌素的硫酸铵分级沉淀 在等量发酵上清液中分别加入固体硫酸铵，使其饱和度分别为 40%、50%、60%、70%、80%，振荡过夜；10 000 r/min、4 ℃ 离心 10 min，收集沉淀，用 pH 值为 6.0 的磷酸缓冲液溶解；离心，超滤浓缩，进行抑菌试验，指示菌为金黄色葡萄球菌和沙门氏菌。

1.2.8 产细菌素乳酸菌的鉴定 MRS 琼脂平板上观察菌落形态，革兰氏染色观察菌体形态；各生理生化指标测定参照《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》《微生物学实验》及《伯杰细菌鉴定手册》^[10-11]进行，主要包括过氧化氢酶试验、甲基红试验、乙酰甲基甲醇 (VP) 试验、石蕊牛奶试验、淀粉水解试验、葡萄糖产酸试验和糖发酵试验等^[12-13]；16S rRNA 遗传学鉴定方法参照文献^[14]进行。

2 结果与分析

2.1 产细菌素乳酸菌的筛选

通过琼脂扩散牛津杯法确定 63 株乳酸菌中有 24 株菌株的发酵上清液对 3 种指示菌有抑制作用，其中有 7 株菌株对 3 种指示菌均具有抑菌作用。由表 1 可见，筛选出的 7 株菌株对金黄色葡萄球菌的抑菌效果相对最好；对 3 种指示菌抑菌效果较好的菌株有 M-M₄、SS₂-6、SR₄-1。

表 1 各乳酸菌发酵上清液抑菌效果

菌株编号	对不同指示菌的抑菌圈直径 (mm)		
	金黄色葡萄球菌	沙门氏菌	志贺氏菌
M-M ₄	16.31 ± 0.22	13.44 ± 0.27	12.56 ± 0.43
SS ₂ -6	15.78 ± 0.43	12.63 ± 0.29	12.01 ± 0.26
SR ₁ -8	10.23 ± 0.12	9.87 ± 0.66	10.01 ± 0.32
SR ₄ -1	13.29 ± 0.31	11.86 ± 0.18	10.21 ± 0.47
SR ₁ -7	10.96 ± 0.28	8.61 ± 0.06	10.40 ± 0.40
CM ₂	11.40 ± 0.33	7.97 ± 0.18	9.97 ± 0.31
D ₂	11.45 ± 0.10	10.49 ± 0.33	9.98 ± 0.77

注：表内数据为 3 次试验的“平均值 ± 标准误差”。表 2、表 3 同。

2.2 有机酸、过氧化氢作用的排除

由表 2 可见，排除有机酸、过氧化氢作用，菌株 M-M₄、SS₂-6、SR₄-1 仍有一定的抑菌作用，说明这 3 株乳酸菌对指示菌的抑制作用不单纯是由有机酸、过氧化氢引起的，可能由于其在代谢过程会产生其他抑菌物质。

表 2 排有机酸和过氧化氢后 3 株菌株对金黄色葡萄球菌的抑制效果

样品类型	不同菌株的抑菌圈直径 (mm)		
	M-M ₄	SS ₂ -6	SR ₄ -1
pH 值 6.0 的发酵液	10.85 ± 0.22	9.32 ± 0.51	9.10 ± 0.31
原发酵上清液	16.31 ± 0.22	15.78 ± 0.43	11.29 ± 0.31
过氧化氢酶处理后的发酵液	11.05 ± 0.42	9.89 ± 0.76	7.56 ± 0.48

2.3 蛋白酶检测抑菌物质的蛋白质性质

排除有机酸和过氧化氢对指示菌的抑制作用后，为进一步确定抑菌物质是否具有蛋白质性质，本试验用胰蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、糜蛋白酶对发酵液进行处理，用其发酵液进行抑菌试验，检测抑菌能力是否降低。结果表明，细菌素对胰蛋白酶、胃蛋白酶特别敏感，其菌株发酵上清液的抑菌效果基本消失；对木瓜蛋白酶、糜蛋白酶则较为稳定，抑菌圈直径没有明显变化。结果说明这 2 株菌株产生的抑菌物质主要为蛋白质。

2.4 硫酸铵沉淀和最佳沉淀浓度的确定

试验结果表明，随着硫酸铵浓度的增加，3 株菌株的盐析液对金黄色葡萄球菌和沙门氏菌都有抑制能力（表 3）且逐渐增大，用 70%、80% 硫酸铵沉淀的盐析液对其指示菌的抑菌能力相差无几。因此，确定硫酸铵沉淀的最佳浓度为 70%。

2.5 产细菌素乳酸菌的鉴定

2.5.1 形态学观察 将 M-M₄、SS₂-6、SR₄-1 这 3 株菌株接种于 MRS 固体培养基中，37 ℃ 培养 24 h 发现，3 株菌株均为革兰氏阳性菌，均无芽孢和荚膜；M-M₄ 为乳白色、凸起、

表3 3株菌株盐析液(pH值为6.0)的抑菌试验结果

菌株编号	不同硫酸铵浓度的抑菌圈直径				
	30%	40%	60%	70%	80%
M-M ₄	11.21 ± 0.34	14.42 ± 0.12	20.78 ± 0.54	24.70 ± 0.37	24.68 ± 0.82
SS ₂ -6	0	12.32 ± 0.33	17.43 ± 0.65	20.24 ± 0.52	20.28 ± 0.22
SR ₄ -1	0	13.34 ± 0.26	18.05 ± 0.54	21.22 ± 0.32	21.08 ± 0.15

边缘整齐、半透明的光滑型菌落,直径(2.0 ± 0.14)mm;SS₂-6为微白色、凸起、边缘整齐、半透明的光滑型菌落,直径(2.0 ± 0.14)mm;SR₄-1为乳白色菌落,呈凹透镜状突起,光滑、圆形、半透明、直径(1.7 ± 0.32)mm,菌体呈直杆状,成对或链状排列。

2.5.2 菌株的生理生化特性 由表4可见,菌株M-M₄、SS₂-6、SR₄-1都能使石蕊牛奶变为粉红色、凝固,但不能使

其变清澈,表明这3种菌株都能在石蕊牛奶中产酸,并且产酸的能力很强,但不产生蛋白酶;3种菌株过氧化氢酶全部为阴性,乙酰甲基甲醇、甲基红试验全部为阳性,都不能水解淀粉;除SR₄-1不能使乳糖培养液变为黄色,呈阴性外,其余全部呈阳性。结合形态学特征和生理生化特性,初步确定M-M₄为香肠乳杆菌,SS₂-6为乳酪短杆菌,SR₄-1为植物乳杆菌。

表4 菌株的生理生化测试结果

菌株名称	石蕊牛奶试验			过氧化氢试验	乙酰甲基甲醇	甲基红试验	淀粉水解试验	糖发酵试验		
	变红	凝固	清澈					葡萄糖	麦芽糖	乳糖
M-M ₄	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+
SS ₂ -6	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+
SR ₄ -1	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-

注:“+”表示试验结果呈阳性,“-”表示试验结果呈阴性。

2.5.3 16S rRNA 序列分析及鉴定结果 分别以3种菌株的总DNA为模板,用16S通用引物扩增出目的条带,将PCR产物纯化后送生工生物工程(上海)股份有限公司测序,获得序列提交NCBI数据库进行比对发现,M-M₄与香肠乳杆菌的相似度最高,SS₂-6与乳酪短杆菌的相似度最高,SR₄-1与植物乳杆菌的相似度最高,相似度都达99%,因此鉴定M-M₄为香肠乳杆菌,SS₂-6为乳酪短杆菌,SR₄-1为植物乳杆菌(表5)。

表5 乳酸菌16rRNA序列鉴定结果

菌株编号	鉴定结果	亲缘性最近的菌株	相似度(%)
M-M ₄	香肠乳杆菌	<i>Lactobacillus farciminus</i>	99
SS ₂ -6	乳酪短杆菌	<i>Brevibacterium casei</i>	99
SR ₄ -1	植物乳杆菌	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99

3 结论

筛选到M-M₄、SS₂-6、SR₄-1这3种菌株对金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、志贺氏菌有较好的抑制作用,经排有机酸、蛋白酶处理、硫酸铵沉淀等试验表明,这3种菌株均可产蛋白质类抑菌物质——细菌素。根据形态学观察、生理生化试验和16S rRNA序列分析,鉴定M-M₄、SS₂-6、SR₄-1这3种菌株分别为香肠乳杆菌、乳酪短杆菌、植物乳杆菌。

参考文献:

[1] Koumoutsis A, Chen X H, Henne A, et al. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42[J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(4): 1084-1096.

[2] Tagg J R, Dajani A S, Wannamaker L W. Bacteriocins of gram-positive bacteria[J]. *Bacteriol Rev*, 1976, 40(3): 722-756.

[3] Klaenhammer T R. Bacteriocins of lactic acid bacteria[J]. *Biochimie*, 1988, 70(3): 337-349.

[4] 朱小乔, 刘通讯. 极具潜力的天然防腐剂——Nisin[J]. *食品与发酵工业*, 2001, 27(4): 66-69.

[5] de Carvalho A A, de Paula R A, Mantovani H C, et al. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a lactic acid bacterium isolated from Italian salami[J]. *Food Microbiology*, 2006, 23(3): 213-219.

[6] Noonpakdee W, Santivarangkna C, Jumriangrit P, et al. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC 20 strain from nham, a traditional Thai fermented sausage[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 81(2): 137-145.

[7] 周志江, 韩 焯, 韩 雪, 等. 从酸白菜中分离出一株产细菌素的乳酸片球菌[J]. *食品科学*, 2006, 27(4): 89-92.

[8] O'Connor E B, O'Riordan B, Morgan S M, et al. A lacticin 3147 enriched food ingredient reduces *Streptococcus mutans* isolated from the human oral cavity in saliva[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2006, 100(6): 1251-1260.

[9] 岳喜庆, 郭 晨, 闵钟慢, 等. 产IIa类细菌素乳酸菌的筛选、鉴定与生物学特性的研究[J]. *中国酿造*, 2010(3): 56-59.

[10] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8版. 北京: 科学出版社, 1984: 797-820.

[11] 凌代文, 凌代文, 东秀珠. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999: 45-47.

[12] 沈 萍, 范秀荣, 李广斌, 等. 微生物学实验[M]. 北京: 人民教育出版社, 1980: 214-222.

[13] 赵 斌, 何绍江. 微生物学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 251-255.

[14] 王 英, 周剑忠, 黄开红, 等. 泡菜中一株植物乳杆菌的分离筛选及鉴定[J]. *江苏农业学报*, 2010, 26(1): 219-221.