

产抑菌物质乳酸菌的筛选及其抑菌特性研究

杜贺超¹, 蒋加进¹, 王楠楠¹, 李静², 冯美琴¹, 姚宏亮^{1*}

(1. 金陵科技学院动物科学与食品工程学院, 南京 210038; 2. 金陵科技学院理学院, 南京 211169)

摘要: **目的** 筛选具有抑菌活性的乳酸菌(lactic acid bacteria, LAB), 为其在食品保鲜中的应用奠定基础。**方法** 以 De Man Rogosa Sharpe (MRS)和 M17 为培养基, 对韩国传统泡菜中乳酸菌进行分离鉴定, 通过琼脂孔扩散法筛选具有广谱抑菌活性的乳酸菌, 并分析它的耐酸、耐胆盐能力, 及对温度、pH、发酵时间的敏感性。**结果** 以大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、肠炎沙门氏菌、枯草芽孢杆菌为指示菌进行抑菌活性筛选, 获得一株抑菌效果最佳的植物乳杆菌 PC4-5。植物乳杆菌 PC4-5 在酸性条件(pH=2)处理 2 h 后存活率达到 43.79%, 0.5%胆盐处理 2 h 后存活率达到 21.02%, 说明植物乳杆菌 PC4-5 具有较好的耐酸、耐胆盐能力。经排酸排过氧化氢实验后, 发酵上清依然保留抑菌活性, 蛋白酶处理后抑菌活性丧失, 表明该抑菌物质为细菌素。该细菌素在 pH 为 2~6 的范围有抑菌能力, 且有较好的热稳定性。**结论** 植物乳杆菌 PC4-5 适用于酸性食品的防腐保存, 在食品保鲜中的应用有较大的潜力。

关键词: 乳酸菌; 抑菌活性; 耐酸耐胆盐; 细菌素; 食品保鲜

Screening of lactic acid bacteria with producing bacteriostatic substances and study on its antibacterial characteristics

DU He-Chao¹, JIANG Jia-Jin¹, WANG Nan-Nan¹, LI Jing², FENG Mei-Qin¹, YAO Hong-Liang^{1*}

(1. College of Animal Science and Food Engineering, Jingling Institute of Technology, Nanjing 210038, China; 2. College of Science, Jingling Institute of Technology, Nanjing 211169, China)

ABSTRACT: Objective To screen lactic acid bacteria (LAB) with antibacterial activity and lay a foundation for its application in food preservation. **Methods** The LAB in the traditional Korean kimchi were isolated and identified using De Man Rogosa Sharpe (MRS) and M17 as the culture medium, the LAB with broad-spectrum antibacterial activity were screened by agar well diffusion method, and their acid and bile salt resistance as well as sensitivity to temperature, pH and fermentation time were analyzed. **Results** The antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* PC4-5 with the best antibacterial effect was screened by using *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* and *Bacillus subtilis* as indicator bacteria. The viability of *Lactobacillus plantarum* PC4-5 reached 43.79% after 2 h treatment in acidic condition (pH=2) and 21.02% after 2 h treatment with 0.5% bile salt, indicating that *Lactobacillus plantarum* PC4-5 had good acid and bile salt tolerance, after the experiment of acid and hydrogen peroxide removal, the antibacterial activity of the fermentation supernatant was still retained, and the antibacterial activity was lost after protease treatment, indicating that the antibacterial substance was bacteriocin. The

基金项目: 金陵科技学院高层次人才科研启动项目(205/040521200113)、金陵科技学院校级“创客”虚拟班建设项目(2021010、2017ck009)

Fund: Supported by the Research Foundation for Talented Scholars of Jinling Institute of Technology (205/040521200113), and the Innovator Virtual Class Project of Jinling Institute of Technology (2021010, 2017ck009)

*通信作者: 姚宏亮, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品安全控制、功能性食物资源开发与应用。E-mail: dlyaohongliang@jlit.edu.cn

*Corresponding author: YAO Hong-Liang, Ph.D, Associate Professor, Jinling Institute of Technology, No.130, Xiaozhuang Central Village, Qixia District, Nanjing 210038, China. E-mail: dlyaohongliang@jlit.edu.cn

bacteriocin had antibacterial ability in the pH range of 2-6 and good thermal stability. **Conclusion** *Lactobacillus plantarum* PC4-5 is suitable for preservation of acidic food and has great potential in food preservation.

KEY WORDS: lactic acid bacteria; antibacterial activity; acid resistance and bile salt resistance; bacteriocin; food preservation

0 引言

乳酸菌是一类公认安全(generally recognized as safe, GRAS)和对人类健康有益的食品级微生物^[1-2]。发酵过程能够产生有机酸、过氧化氢、细菌素等抑菌物质,是一种独特的天然生物防腐剂^[3]。

在技术日益更新的现代社会,人们对食品的生产要求越来越严格,传统的化学防腐剂被许多消费者所排斥,开发具有广谱、高效的天然生物型食品防腐剂逐渐成为关注的热点^[4]。细菌素是细菌在代谢过程中通过核糖体途径产生的一类对产生菌有自身免疫作用的抗菌蛋白或多肽。乳酸菌细菌素具有抑菌活性好、安全性高且来源丰富等优点,用于食品工业中,可以有效减少化学防腐剂的使用量^[5]。研究表明,乳酸菌及其细菌素对多种食源性致病菌和腐败菌都有很好的抑制效果,因此能在面包、奶制品、肉制品、水产品等多种食品中发挥保鲜作用^[6-9]。

目前,分离到的细菌素有很多,但是商业化生产的细菌素只有乳酸链球菌素(nisin)和片球菌素(pediocin PA-1)^[10]。已报道的乳酸菌细菌素大多抑菌谱窄,对革兰氏阴性菌抑菌效果较差,限制了其在食品工业中的应用。因此,本研究拟筛选可产广谱抑菌活性物质的乳酸菌,并分析其益生特性和细菌素抑菌特性,为其在生物防腐剂上的开发应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

样品:用无菌镊子采集3份韩国农家自制泡菜,放入无菌均质袋中,用保鲜盒带回实验室。

大肠杆菌 ATCC25922、枯草芽孢杆菌 AS1.1846、金黄色葡萄球菌 ATCC25923、肠炎沙门氏菌 CICC21527 4种指示菌由金陵科技学院动物科学与食品工程学院食品安全控制实验室保存。

De Man Rogosa Sharpe (MRS)肉汤培养基、M17 培养、Luria-Bertani (LB)肉汤培养基、细菌琼脂粉(北京陆桥技术股份有限公司);革兰氏染色试剂盒(杭州百思生物技术有限公司);细菌基因组提取试剂盒(美国 Omega 公司);2×Taq Master Mix (Dye Plus)(南京诺唯赞生物科技有限公司);DNA 分子量标准 Marker(广州东盛生物科技有限公司);16S rRNA 基因扩增通用引物(苏州金唯智公司)。

1.2 仪器与设备

BXM-30R 立式压力蒸汽灭菌锅(上海博讯实业有限公司医疗设备厂);BHC-1300IIA/B3 生物安全柜(苏州净化设备有限公司);TC-96/G PCR 扩增仪(杭州博日有限公司);GI-1 凝胶成像系统(通宝达成科技北京有限公司);SPX-1508SH-II 恒温培养箱(上海新苗医疗器械制造有限公司);VHB-400 光学显微镜(上海维翰光电科技有限公司);PHS-3C 精密 pH 计(上海精密科学仪器有限公司);BlueStar A 紫外可见分光光度计(北京莱伯泰科仪器股份有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 乳酸菌的分离纯化

用无菌镊子取 25 g 泡菜样品,加入到含 225 mL 生理盐水的锥形瓶中,混匀振荡 30 min,使菌体均匀分散在培养液中。取 1 mL 混合液进行 10 倍梯度的倍比稀释,从 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 稀释梯度里各取 200 μ L 混合液涂布于 MRS 和 M17 平板上,37 $^{\circ}$ C 培养 48 h。取单菌落接种至 10 mL 的 MRS 和 M17 液体培养基试管中扩大培养,并用 25% 的甘油保存于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱^[11]。

1.3.2 产广谱抑菌物质乳酸菌的筛选

指示菌平板的制备:指示菌活化后接种于 LB 肉汤培养基中,振荡(180 r/min)培养 6~8 h 作为指示菌菌液。配制 100 mL 的 LB 固体培养液,待冷却至 50 $^{\circ}$ C 左右时,取指示菌菌液 1 mL 加入其中,然后倾倒入平板备用。

无细胞上清液的制备:挑取单个乳酸菌菌落接种于 10 mL MRS 液体培养基中,在 37 $^{\circ}$ C 条件下培养 36 h,8000 r/min 离心 5 min 得无细胞上清液。

采用琼脂孔扩散法筛选具有抑菌活性的乳酸菌^[12]。初筛以革兰氏阴性菌(大肠杆菌)和革兰氏阳性菌(金黄色葡萄球菌)为指标菌。在指示菌平板背面画 2 cm×2 cm 的方格,方格中间用 5 mm 的打孔器打孔,将 50 μ L 无细胞上清液加入到孔中,置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中过夜培养。用游标卡尺测量抑菌圈直径,选择抑菌圈直径大于 7 mm 的乳酸菌进行复筛。复筛以革兰氏阴性菌(大肠杆菌、沙门氏菌)和革兰氏阳性菌(金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌)为指标菌。实验重复 3 次。

1.3.3 乳酸菌的种属鉴定

将抑菌活性较好的目的菌株进行分区划线培养,观察单菌落形态,并挑取单菌落进行革兰氏染色,观察细菌形态,然后进行分子生物学鉴定。

采用 16S rRNA 基因扩增通用引物(27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')进行 PCR 扩增。反应体系: 2×Taq Master Mix 加 12.5 μL, 引物各 1.0 μL, DNA 模板 1.0 μL, ddH₂O 加 9.5 μL, 总共 25.0 μL。以无菌水代替 DNA 模板作为空白对照。95 °C 变性 10 min; 95 °C 15 s, 58 °C 15 s, 72 °C 1 min 20 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 5 min。将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 用紫外凝胶成像系统观察电泳条带。PCR 产物切胶回收后, 送去苏州金唯智生物科技有限公司进行测序。

将目标菌株的 16S rDNA 序列与美国国家生物技术信息中心(National Center of Biotechnology Information, NCBI)数据库中经鉴定细菌的 16S rDNA 序列进行比对, 确定目标菌株的种属特性。根据序列同源性, 选取乳杆菌不同种的菌株的 16S rRNA 基因序列, 采用 Mega 7.0 软件构建系统发育树, 以确定目标菌株的进化关系。

1.3.4 菌株生长曲线及其抑菌性能

活化后的目标菌株以 2% 的接种量转接到 500 mL 的 MRS 培养液, 37 °C 静置培养 52 h, 分别在 0、4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、52 h 取 5 mL 发酵液, 测定其 OD₆₀₀、pH 和抑菌活性(以金黄色葡萄球菌为指示菌), 实验重复 3 次^[13]。

1.3.5 乳酸菌的益生特性

(1) 乳酸菌耐酸能力的测定

活化后的目标菌株, 37 °C 静止培养 36 h 后, 8000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液, 菌体用无菌生理盐水清洗 3 次, 加入 pH=2.0 和 pH=3.0 的盐酸溶液, 涡旋菌体, 分别静置 1 h 和 2 h 后, 将稀释液涂布于 MRS 固体培养基, 37 °C 培养 24 h。按照公式(1)计算菌株的存活率。实验重复 3 次^[14]。

$$\text{乳酸菌耐酸存活率} = \lg N_2 / \lg N_1 \times 100\% \quad (1)$$

式中: N₁ 为没有酸处理的活菌数(CFU/mL); N₂ 为经酸处理后的活菌数(CFU/mL)。

(2) 乳酸菌耐胆盐能力的测定

清洗后的菌体分别加入 0.3% 和 0.5% 的胆盐水溶液, 涡旋菌体, 静置 1 h 和 2 h 后, 将稀释液涂布于 MRS 固体培养基, 37 °C 培养 24 h, 然后按照公式(2)计算菌株的存活率。实验重复 3 次。

乳酸菌耐胆盐存活率计算公式:

$$\text{乳酸菌耐胆盐存活率} = \lg N_2 / \lg N_1 \times 100\% \quad (2)$$

式中: N₁ 为胆盐处理前的活菌数(CFU/mL); N₂ 为胆盐处理后 2 h 的活菌数(CFU/mL)。

1.3.6 有机酸、过氧化氢抑菌作用的排除

乳酸菌在发酵过程中不仅会产生细菌素, 还会产生乳酸、乙酸等有机酸和过氧化氢^[15], 为了排除这些物质的抑菌作用, 进行如下实验。将发酵上清的 pH 调到 5.0 后按照 1.3.2 的方法测定其抑菌活性, 同时用 pH=5.0 的乙酸、乳酸和原始发酵上清作对照。在 900 μL pH 为 5.0 的发酵上清中加入 100 μL 过氧化氢酶(终浓度为 50 U/mL), 测定

其抑菌圈直径, 同时用未加过氧化氢酶的 pH 为 5.0 的发酵上清和原始发酵上清作对照。

1.3.7 蛋白酶水解实验

为了评估乳酸菌抑菌物质的蛋白酶敏感性, 分别用胰蛋白酶[pH=7.5, 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)]、蛋白酶 K (pH=7.5, 50 mmol/L Tris-HCl)和胃蛋白酶(pH=2.0, 0.1 mol/L HCl)在其最适 pH 下处理 PC4-5 发酵上清, 所有酶的最终质量浓度均为 1.0 mg/mL^[16]。在 37 °C 孵育 30 min 后, 在 100 °C 加热 5 min 终止反应, 使酶失活。随后将样品调整到原始 pH, 并测定其抗菌活性。以未经处理的原始发酵上清为对照。

1.3.8 pH 对发酵上清抑菌性能的影响

用 1 mol/L 的盐酸和 1 mol/L 的氢氧化钠, 将上清 pH 分别调至 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0, 原始发酵液为对照, 用 1.3.2 的实验方法测定其抑菌活性, 实验重复 3 次。

1.3.9 温度对发酵上清抑菌性能的影响

发酵上清液分别于 65、85、100 °C 水浴 20 min, 及 121 °C 灭菌 20 min, 以常温不经过高温处理的发酵上清液为对照组, 测定其抑菌活性, 实验重复 3 次。

1.3.10 数据处理

采用 Excel 软件对实验数据进行分析, 实验重复 3 次, 结果用平均数±标准偏差(mean±SD)表示。采用 GraphPad 7.0 绘图。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌的筛选和鉴定

2.1.1 产抑菌物质乳酸菌的筛选结果

从泡菜样品中分离得到 27 株乳酸菌, 经过初筛和复筛后得到 5 株抑菌活性较高的菌株(表 1)。这 5 株乳酸菌对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌都有一定的抑菌作用, 表明他们所产生的抑菌物质具有较广谱的抑菌活性, 并且对革兰氏阳性菌(枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌)的抑菌效果优于革兰氏阴性菌(大肠杆菌、肠炎沙门氏菌)。其中菌株 PC4-5 具有最高的抑菌活性, 因此, 选择菌株 PC4-5 为目标菌株, 进行后续实验。

表 1 不同菌株对指示菌的抑菌圈直径(n=3)

Table 1 Inhibitory zone diameters of different strains against indicator bacteria (n=3)

菌株编号	抑菌圈直径/mm			
	枯草芽孢杆菌	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌	肠炎沙门氏菌
PC4-5	12.5±0.24	11.3±0.23	10.5±0.41	9.5±0.36
PC4-4	12.1±0.23	11.1±0.47	10.5±0.24	9.1±0.47
PC3-2	11.2±0.34	1.05±0.41	9.1±0.24	8.2±0.41
PC5-3	11.1±0.22	10.2±0.62	9.1±0.47	8.5±0.24
PC4-9	10.3±0.41	10.1±0.32	10.2±0.28	8.1±0.41

2.1.2 目的菌株的鉴定

(1) 菌落形态和镜检结果

菌株 PC4-5 的菌落形态呈乳白色、圆形凸起、不透明、表面光滑(图 1A)。从革兰氏染色镜检图来看, PC4-5 是革兰氏阳性菌, 呈短杆状, 可以初步判断菌株 PC4-5 为乳杆菌(图 1B)。

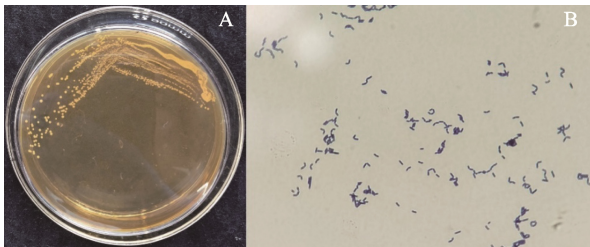


图 1 菌株 PC4-5 的菌落形态特征(A)和革兰氏染色镜检图 1000× (B)

Fig.1 Colony morphological (A) and Gram-staining microscopy 1000× (B) of strain PC4-5

(2) PCR 鉴定结果

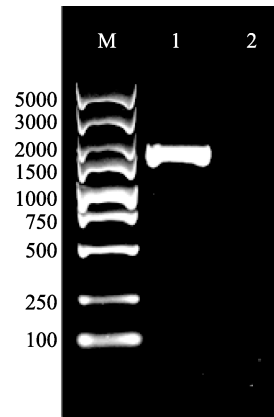
菌株 PC4-5 的 PCR 条带清晰, 大小接近 1500 bp, 且空白对照无条带(图 2)。测序结果在 NCBI 数据库进行 BLAST 核酸序列比对, 发现菌株 PC4-5 与植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum* 3334) 的相似性为 100%, 初步判定 PC4-5 为植物乳杆菌。

(3) 系统发育树分析

选择乳杆菌属 (*Lactobacillus* spp.) 中的代表菌为参考

菌, 构建菌株 PC4-5 的系统发育树(图 3), 以了解 PC4-5 的进化关系。根据构建的系统发育树, PC4-5 与植物乳杆菌 (*L. plantarum*) 在同一分支, 同时与戊糖乳杆菌 (*Lactobacillus pentosus*) 亲缘关系最近, 其次为干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*) 和副干酪乳杆菌 (*Lactobacillus paracasei*)。

结合形态学观察、分子生物学鉴定及细菌系统发育分类学的分析, 确定该菌株为植物乳杆菌, 命名为植物乳杆菌 PC4-5 (*L. plantarum* GZ1-27)。



注: M 为 Marker (DL5000); 1 号泳道为菌株 PC4-5 的扩增条带; 2 号泳道为空白对照。

图 2 菌株 PC4-5 的 16S rRNA 基因 PCR 扩增产物电泳图
Fig.2 16S rRNA gene PCR amplification product electrophoresis of strain PC4-5

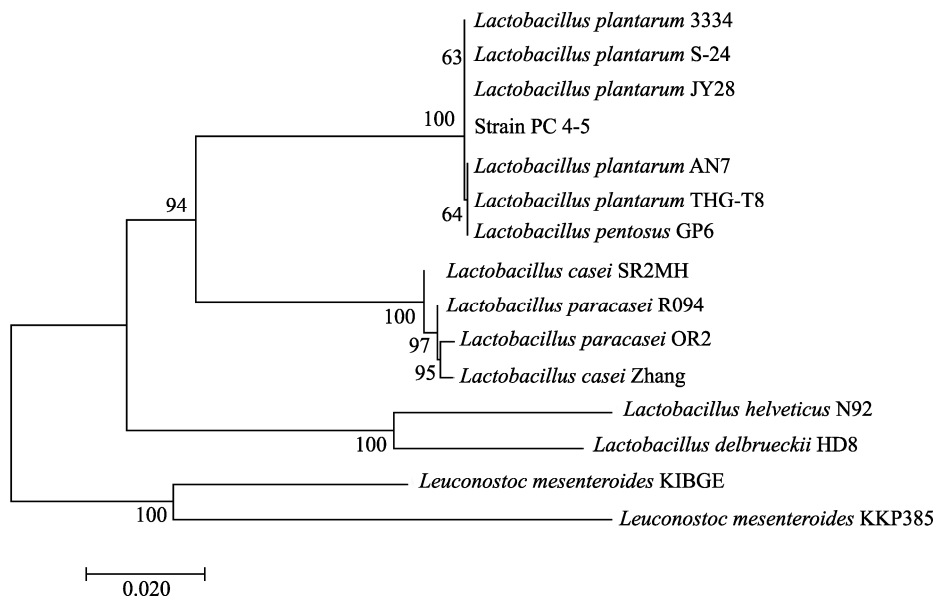


图 3 菌株 PC4-5 的系统发育树
Fig.3 Phylogenetic tree of strain PC4-5

2.2 植物乳杆菌 PC4-5 的生物学特性

2.2.1 PC4-5 生长曲线及其抑菌特性

植物乳杆菌 PC4-5 的生长曲线、pH 变化曲线和抑菌性能的变化曲线如图 4 所示。从 OD₆₀₀ 值可以看出, 植物乳杆菌 PC4-5 从 4 h 开始迅速生长, 进入对数生长期, 8 h 后 OD₆₀₀ 达到 2.1, 20 h 后趋于平稳生长。

PC4-5 在 37 °C 培养 4 h 后, 随着乳酸菌的生长, pH 开始显著下降, 8 h 时达到 4.2, 到 20 h 后趋于平稳, 发酵液的最最终 pH 维持在 3.7 左右。在接种培养 0~12 h, pH 是呈急剧下降的趋势, 这是由于发酵过程中产生了大量的有机酸, 从而导致了发酵液的 pH 急剧下降。

发酵上清液在 0~4 h 前没有抑菌活性, 4~8 h 抑菌活性显著增加($P < 0.05$), 在 24 h 内, 抑菌活性随着菌株的繁殖而逐渐增强。28 h 时有所下降, 但 36 h 时又到达最高值 11.32 mm, 之后抑菌活性有所下降。20 h 后发酵液的 pH 到达稳定, 而抑菌圈的直径依然在增加, 这也说明除了酸以外, PC4-5 还能产生其他的抑菌活性物质。

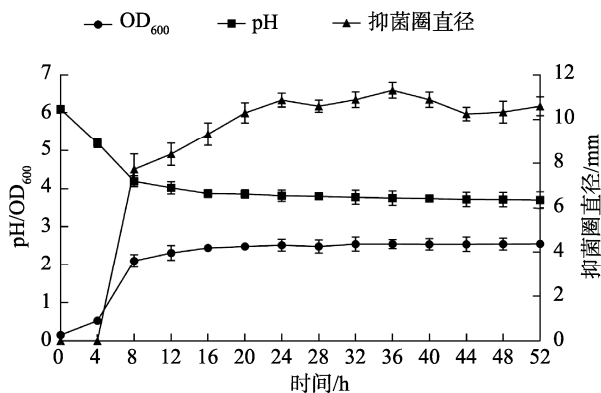


图 4 植物乳杆菌 PC4-5 的生长曲线及对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径($n=3$)

Fig.4 Growth curve and antibacterial activity curve of *L. plantarum* PC4-5 against *Staphylococcus aureus* ($n=3$)

2.2.2 PC4-5 的耐酸和耐胆盐能力

人体胃液的 pH 约为 2.0~3.0, 为保证乳酸菌在体内发挥益生作用, 需要有一定的耐酸性, 这样才能在胃的酸性环境下存活。由表 2 可知, 经过 pH 为 2.0 的酸条件处理 2 h 后, PC4-5 的存活率依然达到 43.79%, 说明植物乳杆菌 PC4-5 具有一定的耐酸能力。

食物进入人体经过胃液的消化后会进入肠道, 处在一个胆盐含量高的环境中。乳酸菌只有具备对胆盐的耐受能力, 才能存活并且发挥益生作用^[17]。人体胃肠中的胆盐浓度不超过 0.5%, 由表 2 可知, 经过 0.5%胆盐溶液处理 2 h 后, PC4-5 的存活率达到 21.02%, 说明植物乳杆菌 PC4-5 具有一定的耐胆盐能力, 能够适应胃肠道的环境。

表 2 植物乳杆菌 PC4-5 的耐酸性和耐胆盐能力($n=3$)
Table 2 Acid and bile salt tolerance of *L. plantarum* PC4-5 ($n=3$)

处理	存活率/%	
	1 h	2 h
酸处理(pH=3.0)	64.33±0.79	53.93±1.08
酸处理(pH=2.0)	52.49±1.13	43.79±0.34
0.3%胆盐处理	45.73±0.58	32.67±0.63
0.5%胆盐处理	33.92±0.26	21.02±0.34

2.3 植物乳杆菌 PC4-5 发酵上清的抑菌特性

2.3.1 PC4-5 发酵上清中抑菌物质的判定

由表 3 可知, 当乙酸和乳酸调至 pH=5.0 时, 对 4 种指示菌都没有抑菌活性, 而 pH=5.0 的发酵上清仍然保留部分抑菌活性。说明发酵上清中除了有机酸外还含有其他抑菌物质。进一步用过氧化氢酶处理后, 发酵上清依然保留 90%以上的抑菌活性, 说明过氧化氢在发酵液中所占的比例也很低。

表 3 有机酸和过氧化氢干扰排除实验结果($n=3$)

Table 3 Experimental result on interference exclusion of organic acid and hydrogen peroxide ($n=3$)

处理	抑菌圈直径/mm			
	枯草芽孢杆菌	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌	肠炎沙门氏菌
发酵上清	11.07±0.62	10.50±0.41	10.17±0.24	9.33±0.24
发酵上清(pH=5.0)	10.42±0.53	9.23±0.62	8.95±0.47	8.00±0.41
乙酸(pH=5.0)	/	/	/	/
乳酸(pH=5.0)	/	/	/	/
发酵上清(pH=5.0, 过氧化氢酶处理)	10.03±0.36	8.89±0.54	8.35±0.64	7.43±0.52

注: /表示没有抑菌圈, 下同。

PC4-5 发酵上清经胰蛋白酶、胃蛋白酶和蛋白酶 K 处理后, 抑菌活性都所有下降(表 4)。尤其是蛋白酶 K 处理后, 对 4 种指示菌的抑菌活性完全消失。结果表明 PC4-5 所产生的抑菌物质具有蛋白性质, 能够被蛋白酶降解。结合排酸排过氧化氢实验, 初步判定该抑菌物质是细菌素。

2.3.2 pH 对 PC4-5 发酵上清抑菌性能的影响

对照组为 PC4-5 的原始发酵液, pH 为 3.7。由表 5 可知, pH 为 2.0 和 3.0 时, PC4-5 对 4 种指示菌的抑菌活性都有所提高。pH 大于原始发酵液后, 抑菌活性逐渐下降, pH

大于 7.0 以后抑菌活性消失。说明植物乳杆菌 PC4-5 产生的抑菌物质在酸性条件下表现出较好的抑菌活性。

2.3.3 温度对 PC4-5 发酵上清抑菌性能的影响

随着处理温度的升高, 该细菌素抑菌活性逐渐降低。说明 PC4-5 细菌素的抑菌效果一定程度上受温度的影响, 而且处理的温度越高, 抑菌效果受的影响就越大。但 100 °C 处理 20 min 后, 细菌素对 4 种指示菌仍保留 85% 以上的抑菌活性, 121 °C 处理 20 min 后也保留 80% 左右的抑菌活性。表明植物乳杆菌 PC4-5 发酵上清有很好的热稳定性。

表 4 蛋白酶水解实验结果($n=3$)
Table 4 Results of protease hydrolysis experiment ($n=3$)

处理	抑菌圈直径/mm			
	枯草芽孢杆菌	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌	肠炎沙门氏菌
对照	11.07±0.62	10.50±0.41	10.17±0.24	9.33±0.24
胰蛋白酶	7.22±0.42	7.56±0.68	/	/
胃蛋白酶	8.59±0.33	8.41±0.87	8.07±0.41	7.13±0.35
蛋白酶 K	/	/	/	/

表 5 不同 pH 下 PC4-5 细菌素的抑菌效果($n=3$)
Table 5 Bacteriostatic effects of PC4-5 bacteriocin at different pH ($n=3$)

pH	抑菌圈直径/mm			
	枯草芽孢杆菌	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌	肠炎沙门氏菌
对照	11.07±0.62	10.50±0.41	10.17±0.24	9.33±0.24
2.0	16.00±0.82	12.83±0.85	12.17±0.62	10.83±0.62
3.0	14.17±0.85	11.00±0.41	10.67±0.24	9.83±0.24
4.0	11.67±0.62	10.00±0.41	9.83±0.24	9.00±0.41
5.0	10.42±0.53	9.23±0.62	8.95±0.47	8.00±0.41
6.0	9.05±0.33	8.89±0.57	7.75±0.34	7.43±0.35
7.0	/	/	/	/

表 6 不同温度下 PC4-5 细菌素的抑菌效果($n=3$)
Table 6 Antibacterial effects of PC4-5 bacteriocin at different temperatures ($n=3$)

温度/°C	抑菌圈直径/mm			
	枯草芽孢杆菌	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌	肠炎沙门氏菌
对照	11.07±0.62	10.50±0.41	10.17±0.24	9.33±0.24
65	10.65±0.41	9.83±0.23	9.83±0.23	9.07±0.10
85	10.17±0.24	9.50±0.41	9.17±0.24	8.83±0.24
100	9.87±0.47	8.93±0.17	8.73±0.21	8.67±0.47
121	8.83±0.24	8.33±0.24	8.17±0.24	7.67±0.47

3 结论与讨论

大量研究表明植物乳杆菌具有很好的抑菌活性。徐云凤等^[13]发现植物乳杆菌 LD-1 对单增李斯特氏菌、大肠杆菌和沙门氏菌均有抑菌活性。DANILOVA 等^[18]研究发现植物乳杆菌发酵上清对铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌都有较强的抑制作用。本研究筛选出的植物乳杆菌 PC4-5 对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌都有很好的抑制作用, 具有一定的广谱性。乳酸菌是公认安全的益生菌, 植物乳杆菌 PC4-5 具有很好的耐酸和耐胆盐的能力, 能够耐受胃肠道的消化, 为其抵达肠道定植发挥以上作用奠定了基础^[19]。PC4-5 抑菌物质在偏酸性条件下才具有抑菌活性, 而且随着 pH 的降低, 抑菌活性增强, 这与华鹤良等^[20]的研究结果相似, 说明 PC4-5 可用于酸性食品的保存。同时, PC4-5 抑菌物质具有很好的耐热性, 结果与 PUMRIW 等^[21]对植物乳杆菌研究相似, 适用于需要高温加工的食品中, 拓宽了其应用范围。此外, PC4-5 抑菌物质具有蛋白酶敏感性, 使其进入人体能被各种蛋白酶分解, 不会对身体产生危害。乳酸菌产生的抑菌物质包括有机酸、过氧化氢、细菌素等。根据排酸、排过氧化氢、蛋白酶实验, PC4-5 发酵上清除了酸和过氧化氢, 还有其他抑菌物质, 并且具有蛋白特性, 因此本研究中的抑菌物质初步判定为细菌素。

综上所述, 本研究筛选出具有广谱抑菌活性的植物乳杆菌 PC4-5, 不仅有良好的益生特性, 它产生的细菌素性质稳定, 在食品防腐和病原菌的控制方面具有很大的应用潜力。之后的研究将集中在 PC4-5 细菌素的结构鉴定和抑菌机制研究, 为其广泛应用奠定基础。

参考文献

- 任大勇, 曲天铭, 杨柳, 等. 东北传统发酵食品中降胆固醇乳酸菌的筛选及其降解机制[J]. 食品科学, 2019, 40(22): 199–206.
REN DY, QU TM, YANG L, et al. Screening of lactic acid bacterial isolates from traditional foods in northesast of China for cholesterol-lowering property and mechanism of action analysis [J]. Food Sci, 2019, 40(22): 199–206.
- 曾令州, 周青青, 顾青, 等. 益生乳酸菌筛选及其对草石蚕汁发酵特性的影响[J]. 中国食品学报, 2021, 21(5): 212–220.
ZENG LZ, ZHOU QQ, GU Q, et al. Screening of probiotics lactic acid bacteria and its effect on fermentation characteristics of stachy sieboldii juice [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2021, 21(5): 212–220.
- 孔祥丽, 吴昕雨, 许晓曦. 植物乳杆菌代谢产物抑菌机制与应用研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(8): 3131–3140.
KONG XL, WU XY, XU XX. Research progress on metabolites and bacteriostasis mechanism of *Lactobacillus plantarum* [J]. J Food Saf Qual, 2021, 12(8): 3131–3140.
- 董欣旂, 赵英侠. 食品防腐剂在食品中应用现状分析[J]. 中国食品添加剂, 2020, 31(11): 139–143.
DONG XY, ZHAO YX. Analysis on the application status of food preservatives in food [J]. Chin Food Addit, 2020, 31(11): 139–143.
- 杨慧轩, 罗欣, 梁荣蓉, 等. 乳酸菌作为生物抑菌剂在肉与肉制品中的应用研究进展[J/OL]. 食品科学: 1-18. [2021-10-15]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20210224.1806.002.html>
YANG HX, LUO X, LIANG RR, et al. A review of applying lactic acid bacteria as biological antibacterial agent on meat and meat products [J]. Food Sci: 1-18. [2021-10-15]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20210224.1806.002.html>
- 赵天宇, 郭一柯, 刘霁逸, 等. 一株产广谱细菌素乳酸菌的筛选与鉴定[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(23): 163–168.
ZHAO TY, GUO YK, LIU JY, et al. Screening and identification of a broad-spectrum bacteriocin-producing lactic acid bacteria [J]. Food Res Dev, 2018, 39(23): 163–168.
- DU H, LI X, LU Z, et al. Effect of plantaricin 163 in combination with thymol and surfactin on crucian carp (*Carassius auratus*) [J]. J Food Prot, 2019, 82(8): 1283–1291.
- ANANOU S, RIVERA S, MADRID MI, et al. Application of enterocin as-48 as biopreservative in eggs and egg fractions: Synergism through lysozyme [J]. LWT-Food Sci Technol, 2018, 89(12): 409–417.
- WAYAH SB, PHILIP K. Characterization, yield optimization, scale up and biopreservative potential of fermencin sa715, a novel bacteriocin from *Lactobacillus fermentum* ga715 of goat milk origin [J]. Microb Cell Fact, 2018, 17(125): 1–18.
- COTTER PD, ROSS RP, HILL C. Bacteriocins-a viable alternative to antibiotics? [J]. Nat Rev Microbiol, 2013, 11(2): 95–105.
- 冯金晓, 李明珠, 李翠萍, 等. 传统泡菜中两株耐酸性乳酸菌的分离与鉴定[J]. 食品与机械, 2021, 37(5): 22–26.
FENG JX, LI MZ, LI CP, et al. Isolation and identification of two acid-tolerant lactic acid bacteria from traditional pickle [J]. Food Mach, 2021, 37(5): 22–26.
- ADEOSHUN FG, RUPPITSCH W, ALLERBERGER F, et al. Prevalence and antimicrobial properties of lactic acid bacteria in nigerian women during the menstrual cycle [J]. Pol J Microbiol, 2019, 68(2): 203–209.
- 徐云凤, 张欣, 褚泽军, 等. 一株具有高效抑菌活性乳酸菌的分离鉴定及生长特性研究[J]. 食品与机械, 2021, 37(3): 12–14, 21.
XU YF, ZHANG X, CHU ZJ, et al. Isolation, identification and growth characteristics of a strain of lactic acid bacteria with high antibacterial activity [J]. Food Mach, 2021, 37(3): 12–14, 21.
- 郑志瑶, 王伟军, 陈波, 等. 降胆固醇乳酸菌的筛选、鉴定与益生特性评价[J]. 中国食品学报, 2020, 20(12): 239–247.
ZHENG ZY, WANG WJ, CHEN B, et al. Screening, identification and prebiotic evaluation of cholesterol lowering lactic acid bacteria [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2020, 20(12): 239–247.
- 武昌俊, 戴陈伟, 蔡标, 等. 一株安徽传统酸奶中产抑菌物质的乳酸菌的筛选与鉴定[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(17): 5779–5785.
WU CJ, DAI CW, CAI B, et al. Screening and identification of a bacteriostatic-producing lactic acid bacteria from traditional fermented milk in Anhui [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(17): 5779–5785.
- DU H, YANG J, LU X, et al. Purification, characterization, and mode of action of plantaricin gz1-27, a novel bacteriocin against *Bacillus cereus* [J]. J Agric Food Chem, 2018, 66(18): 4716–4724.
- 冯美琴, 栾晓旭, 孙健. 3 株发酵香肠源乳酸菌体外功能特性的比较[J]. 食品科学, 2020, 41(24): 39–45.

- FENG MQ, LUAN XX, SUN J. Comparison study on the vitro functional characteristics of three strains of lactic acid bacteria isolated from fermented sausage [J]. *Food Sci*, 2020, 41(24): 39–45.
- [18] DANILOVA TA, ADZHIEVA AA, DANILINA GA, *et al.* Antimicrobial activity of supernatant of *Lactobacillus plantarum* against pathogenic microorganisms [J]. *Bull Exp Biol Med*, 2019, 167(6): 751–754.
- [19] JUNLI W, JUNCHANG F, SHASHA L, *et al.* The probiotic properties of different preparations using *Lactococcus lactis* z-2 on intestinal tract, blood and hepatopancreas in *Cyprinus carpio* [J]. *Aquaculture*, 2021, 543: 736911.
- [20] 华鹤良, 房东升, 郭睿, 等. 乳源乳酸菌抗菌肽的活性及特性研究[J]. *食品工业*, 2014, 35(7): 84–86.
- HUA HL, FANG DS, GUO R, *et al.* Activity and characteristics of antimicrobial peptides derived from milk-source lactic acid bacteria [J]. *Food Ind*, 2014, 35(7): 84–86.
- [21] PUMRIW S, LUANG-IN V, SAMAPPITO W. Screening of probiotic lactic acid bacteria isolated from fermented pak-sian for use as a starter

culture [J]. *Curr Microbiol*, 2021, 78(37): 2695–2707.

(责任编辑: 张晓寒 于梦娇)

作者简介



杜贺超, 博士, 讲师, 主要研究方向为食品微生物、食品安全控制。
E-mail: hechaodu@jit.edu.cn



姚宏亮, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品安全控制、功能性食物资源开发与应用。
E-mail: dlyaohongliang@jit.edu.cn