

吕蕾, 杨晓萍, 王阿利, 等. 酱油渣中具有抑菌活性的乳酸菌的筛选及其抑菌特性 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(18): 137-144. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021120290

LÜ Lei, YANG Xiaoping, WANG Ali, et al. Screening of Lactic Acid Bacteria with Antibacterial Activity in Soy Sauce Residue and Its Antibacterial Properties[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(18): 137-144. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021120290

· 生物工程 ·

酱油渣中具有抑菌活性的乳酸菌的筛选 及其抑菌特性

吕蕾^{1,2,3,4,5}, 杨晓萍^{1,2,3,4,5}, 王阿利^{1,2,3,4,5}, 钟先锋^{1,2,3,4,5}, 黄桂东^{1,2,3,4,5,*}, 赵嘉乐^{1,2,3,4,5}

(1. 佛山科学技术学院食品科学与工程学院, 广东佛山 528231;

2. 广东省传统发酵食品工程技术研究中心, 广东佛山 528231;

3. 广东省食品流通安全控制工程技术研究中心, 广东佛山 528231;

4. 佛山市酿造工程技术研究中心, 广东佛山 528231;

5. 佛山市农业生物制造工程技术研究中心, 广东佛山 528231)

摘要: 本研究以实验室前期从酱油渣中分离的 16 株乳酸菌 ZW1~ZW16 为出发菌株, 拟筛选对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌抑制效果较强的菌株, 并对菌株产生的抑菌物质、生长特性及其影响因素进行分析。结果显示, 乳酸菌 ZW2、ZW9、ZW14 对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌均有较高的抑菌活性, 其中 ZW9 抑菌效果最好, 排除有机酸和 H₂O₂ 影响后, 胰蛋白酶、胃蛋白酶、蛋白酶 K、 α -蛋白酶、碱性蛋白酶、中性蛋白酶处理后抑菌活性均显著性降低 ($P < 0.05$), 初步推断抑菌物质是一种具有蛋白质属性的细菌素。抑菌动力学曲线显示, 菌株培养至 20 h 抑菌活性趋于稳定。抑菌稳定性显示, 抑菌物质在 40~100 °C 具有较好的热稳定性, 在紫外线照射、表面活性剂处理下均保持较高的抑菌活性; 在 pH2.0~6.0 抑菌活性无明显变化, pH10.0 抑菌能力完全丧失。酱油渣中筛选的 3 株乳酸菌具有抑菌功能且产生的抑菌物质稳定, 对开发成新型生物抑菌剂具有重要参考价值。

关键词: 酱油渣, 乳酸菌, 抑菌活性, 细菌素, 稳定性

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)18-0137-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021120290



本文网刊:

Screening of Lactic Acid Bacteria with Antibacterial Activity in Soy Sauce Residue and Its Antibacterial Properties

LÜ Lei^{1,2,3,4,5}, YANG Xiaoping^{1,2,3,4,5}, WANG Ali^{1,2,3,4,5}, ZHONG Xianfeng^{1,2,3,4,5}, HUANG Guidong^{1,2,3,4,5,*}, ZHAO Jiale^{1,2,3,4,5}

(1. College of Food Science and Engineering, Foshan University, Foshan 528231, China;

2. Guangdong Traditional Fermented Food Engineering Technology Research Center, Foshan 528231, China;

3. Guangdong Food Safety Control Engineering Technology Research Center, Foshan 528231, China;

4. Foshan Brewing Engineering Technology Research Center, Foshan 528231, China;

5. Foshan Agricultural Biomanufacturing Engineering Technology Research Center, Foshan 528231, China)

Abstract: In this study, a total of 16 LAB strains, isolated from soy sauce residue in the early stage of our research group, were evaluated for their antibacterial activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. In addition, the bacteriostatic substances and growth characteristics of these strains were investigated. The results showed that LAB strains

收稿日期: 2021-12-27

基金项目: 国家自然科学基金 (32072198, 32101926); 广东省自然科学基金 (2020A1515011444, 2019A1515110036, 2019A1515110973); 广东省教育厅创新团队 (2021KCXTD034); 广东省教育厅重点领域专项 (2020ZDZX1029, 2020ZDZX1046); 广东省研究生教育创新计划资助项目 (2019JGXM100); 佛山市科技奖培育入库项目 (2020001003715); 禅城区省以上科学技术奖培育项目 (禅经发 [2021]136)。

作者简介: 吕蕾 (1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工与安全, E-mail: LvL1178@163.com。

* 通信作者: 黄桂东 (1978-), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 食品营养与加工, E-mail: guidongh78@126.com。

ZW2, ZW9 and ZW14 exhibited high antibacterial activity against *E. coli* and *S. aureus*, of which ZW9 had the best antibacterial effect. After eliminating the interference factors such as the organic acids and hydrogen peroxides, three strains still maintained antimicrobial activity. However, the inhibitory activity decreased by the treatment with trypsin, pepsin, proteinase K, α -amylase, alkaline protease and neutral protease ($P < 0.05$). Therefore, these strains might produce antimicrobial substances of proteinaceous character, i.e., bacteriocins. The three LAB strains showed maximum antibacterial activity and were fairly stable after 20 h of incubation by bacteriostatic profile analysis. The antibacterial substances exhibited a good thermal stability in 40~100 °C and kept their high antibacterial activity under ultraviolet irradiation and surfactant treatment. There was no significant decrease in antibacterial activity at pH2.0~6.0, and the antibacterial ability was completely lost at pH10.0. The three LAB strains from soy sauce residue exhibited good antibacterial activity and their antibacterial substances had good stability, which had important reference value for the development of new biological antimicrobial agents.

Key words: soy sauce residue; lactic acid bacteria; antibacterial activity; bacteriocin; stability

乳酸菌是普遍公认安全(generally recognized as safe, GRAS)的微生物,不仅能赋予食品特殊风味,且部分乳酸菌能分泌细菌素等抑菌物质^[1]。乳酸菌所产细菌素是低分子量蛋白质或多肽^[2-3],能抑制食品腐败,延长货架期,且无毒、无抗药性、无副作用、可被分解消化^[4]。目前乳酸菌源细菌素作为新型生物抑菌剂在食品安全方面成为了化学防腐剂的的良好替代品,逐渐成为食品科学研究的热点。

发酵食品是产细菌素乳酸菌的重要来源。Gutiérrez-Cortés 等^[5]从巴西新鲜手工奶酪中分离出多株乳酸菌,其能产生抑制单核细胞增生李斯特氏菌的细菌素;刘树昕等^[6]从新疆传统酸奶中得到一株抑菌效果良好的植物乳杆菌,并鉴定出菌株主要抑菌物质是 IIb 类细菌素;舒梨等^[7]从浓香型窖泥中分离出抑菌活性较高的副干酪乳杆菌,其抑菌物质是具有蛋白质特性的细菌素。但当前细菌素商业化产品较少,且抑菌特性不稳定。乳酸链球菌的 Nisin 是目前唯一被美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)官方批准认可的食品防腐剂,因此亟需开发稳定、安全、具有高效抑菌活性的细菌素,作为新型生物抑菌剂延长食品保质期。

酱油渣是酱油发酵结束后残留的固形物质^[8],作为工业副产物产量巨大,其所含微生物和营养物质丰富,主要微生物为乳酸菌、酵母等^[9],具备再次加工利用的潜力。目前,国内外学者对酱油渣中筛选有益菌株的相关研究关注较少。现有研究表明,酱油渣的综合利用基本集中在副产物饲料生产和化工能源方面,如何实现酱油渣中产细菌素的有益微生物筛选和利用的问题仍值得深入探讨。本课题组前期以酱油渣为材料,分离鉴定得到多株乳酸菌,且具有耐受模拟胃肠环境能力、疏水能力及抗氧化能力等特性^[8,10-11]。为进一步开发现有乳酸菌的有益生物活性,本研究以酱油渣中分离得到的 16 株乳酸菌为出发菌株,拟筛选出具有高效抑菌活性的乳酸菌,并通过有机酸、过氧化氢排除试验,酶敏感试验初步分析乳酸菌上清液的抑菌物质和其抑菌特性,为乳酸菌回填以提升酱油耐储藏品质提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

16 株乳酸菌 实验室前期从酱油渣中筛选获得,其中 ZW2 为已鉴定称为 HT31 的副干酪乳杆菌副干酪亚种、ZW9 为已鉴定称为 HT4 的乳酸乳球菌霍氏亚种、ZW14 为已鉴定称为 HT155 的副干酪乳杆菌坚韧亚种^[8,10-11];金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) 南京茂捷微生物科技有限公司;大肠杆菌(*Escherichia coli* ATCC 25922)

上海鲁傲科技有限公司;MRS 肉汤、酵母提取物、胰化蛋白胨、琼脂粉 广东环凯微生物科技有限公司;胰蛋白酶(2500 U/mg)、蛋白酶 K(20 U/mg)、胃蛋白酶(2500 U/mg)、 α -蛋白酶(400 U/mg)、碱性蛋白酶(200 U/mg)、中性蛋白酶(4 U/mg) 生工生物工程股份有限公司;氯化钠、吐温-80、Triton X-100、SDS、尿素 天津市大茂化学试剂厂。

ME104 电子分析天平 梅特勒-托利多精密仪器公司;SW-CJ-1FD 超净工作台 苏州安泰空气技术有限公司;LRH-150 恒温培养箱 上海一恒科学仪器有限公司;GR60DA 全自动灭菌锅 致微(厦门)仪器;SY-1220 水浴锅 美国精骐有限公司;Epoch2 微孔板分光光度计酶标仪 美国伯腾仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 指示菌悬液制备 参考马国涵等^[12]的方法,将大肠杆菌、金黄色葡萄球菌分别接种于 LB 液体培养基中,经 3 代活化后,于 4 °C 保存备用。

1.2.2 乳酸菌上清液制备 参照马国涵等^[12]和杜宏等^[13]的方法,16 株乳酸菌甘油菌各取 200 μ L(2%, v/v)接种于 MRS 肉汤中,活化 3 代后,4 °C、6000 r/min 离心 15 min,0.22 μ m 滤膜过滤,得乳酸菌上清液,4 °C 保存备用。

1.2.3 具有抑菌活性乳酸菌的筛选 参照黄奕雯等^[14]的方法,以大肠杆菌、金黄色葡萄球菌为指示菌,采用牛津杯双层平板法,每个孔中加 200 μ L 乳酸菌上清液,检测 16 株酱油渣源乳酸菌上清液中是否有抑菌物质。经室温扩散 4 h,培养箱 37 °C 培养

24 h, 测定抑菌圈直径大小, 判断乳酸菌上清液抑菌活性, 选取对两种指示菌均有抑菌活力的乳酸菌上清液进行后续抑菌物质分析。

1.2.4 乳酸菌抑菌物质分析 乳酸菌在代谢过程中产生的抑菌物质主要是有机酸、 H_2O_2 和细菌素等, 尤其细菌素是蛋白类物质, 易被人体蛋白酶降解完全, 安全无毒, 是极具潜力和应用前景的生物抑菌剂。为进一步明确 1.2.3 筛选获得的对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌有抑菌活性的酱油渣源乳酸菌上清液中的抑菌物质, 采用 NaOH 中和法, 排除发酵产物中有机酸影响, 用过氧化氢酶处理排除过氧化氢影响, 通过酶敏感试验进一步验证抑菌物质是否是细菌素。

1.2.4.1 有机酸排除试验 参考黄奕雯等^[14]的方法, 用 2 mol/L NaOH 调节乳酸菌上清液的 pH 至 6.0, 用 1 mol/L 的乳酸、盐酸、乙酸分别调节 MRS 肉汤至 pH6.0 和未处理乳酸菌上清液(pH4.2)作为对照, 如 1.2.3 所示, 进行抑菌试验。

1.2.4.2 过氧化氢排除试验 参照黄奕雯等^[14]的方法, 用 0.05 mol/L (pH7.0) 的磷酸盐缓冲液溶解适量的 H_2O_2 酶, 加入经排酸后的乳酸菌上清液(pH6.0) 中, 使 H_2O_2 酶终浓度为 1 mg/mL。37 °C 水浴 2 h, 以未处理乳酸菌上清液(pH4.2)和加酶空白培养基作为对照组, 如 1.2.3 所示, 进行抑菌试验。

1.2.4.3 酶敏感验证实验 参照刘树昕等^[6]的方法, 分别用 0.05 mol/L (pH7.0) 的磷酸盐缓冲液溶解适量的胰蛋白酶、蛋白酶 K、胃蛋白酶、 α -淀粉酶、碱性蛋白酶、中性蛋白酶, 分别加入排除酸和 H_2O_2 后的乳酸菌上清液中, 使各蛋白酶终浓度均为 1 mg/mL, 分别将 pH 调整为酶最适 pH (依次为 8.5、2.0、6.5、9.8、7.5), 37 °C 水浴 2 h。以未经各种酶处理的上清液 (pH4.2) 和加酶 MRS 肉汤为对照组, 如 1.2.3 所示, 进行抑菌试验。

1.2.5 抑菌动力学曲线 参照王萌萌等^[15]的方法稍作修改, 将 1.2.4 筛选出具有抑制效果的菌株按 2% (v/v) 的接种量加入到 100 mL MRS 肉汤中, 37 °C 恒温培养, 每隔 2 h 测 OD_{600} 值, pH 值及乳酸菌上清液对大肠杆菌指示菌的抑菌圈直径, 绘制抑菌动力学曲线。

1.2.6 影响乳酸菌上清液抑菌活性的因素

1.2.6.1 温度对乳酸菌上清液抑菌活性影响 参照曹海鹏等^[16]方法, 将乳酸菌上清液分装 5 mL 至试管中, 分别置于 40、60、80、100 °C 的水浴锅以及 121 °C 高压锅中处理 30 min, 室温冷却, 以大肠杆菌为指示菌, 参照 1.2.3 进行抑菌试验。

1.2.6.2 pH 对乳酸菌上清液抑菌活性影响 参考高欣等^[17]方法, 将每管 5 mL 乳酸菌上清液分别用 2 mol/L 的 HCl 和 2 mol/L 的 NaOH 溶液调节 pH 为 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0, 以大肠杆菌为指示菌, 参照 1.2.3 进行抑菌试验。

1.2.6.3 紫外线对乳酸菌上清液抑菌活性影响 参考郝艳芳等^[18]方法, 将每管 5 mL 乳酸菌上清液在距离 40 W 紫外灯 20 cm 处分别照射 15、30、60、90、120 min, 以大肠杆菌为指示菌, 参照 1.2.3 进行抑菌试验。

1.2.6.4 表面活性剂对乳酸菌上清液抑菌活性影响 参考舒梨等^[7]的方法, 将表面活性剂吐温-80、Triton X-100、SDS 和尿素分别加入装有 5 mL 乳酸菌上清液的试管中, 在 37 °C 水浴锅温育 2 h 后, 以大肠杆菌为指示菌, 参照 1.2.3 进行抑菌试验。

1.3 数据处理

本研究所有实验均重复 3 次及以上, 数据采用平均值 \pm 标准偏差形式, 应用 Origin 2019 软件进行绘图, 并采用 SPSS 25.0 软件进行单因素方差分析, 以最小显著差异法(LSD)进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 酱油渣源具有抑菌活性的乳酸菌的筛选

前期从酱油渣中筛选分离得到的 16 株乳酸菌, 编号依次为 ZW1~ZW16, 以大肠杆菌和金黄色葡萄球菌为指示菌, 根据抑菌圈大小进行抑菌活性初步筛选。由表 1 可知, 大肠杆菌抑菌实验中, 12 株菌对大肠杆菌有抑菌作用, 其中 ZW9 抑菌效果最好, 抑菌圈直径为 15.63 ± 0.04 mm, 抑菌圈最小乳酸菌是 ZW7, 直径为 9.31 ± 0.03 mm; 金黄色葡萄球菌抑菌实验中, 4 株乳酸菌上清液对金黄色葡萄球菌有抑菌作用, 且 ZW9 抑菌效果最好; 而 ZW6、ZW10、ZW11 对两种指示菌均无抑菌效果。整体而言, 16 株乳酸菌对两种指示菌有不同的抑制作用, 且乳酸菌上清液

表 1 不同乳酸菌上清液对指示菌的抑制作用(mm)

Table 1 Inhibitory effect of different lactic acid bacteria supernatant on indicator bacteria (mm)

菌株编号	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	菌株编号	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	菌株编号	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌
ZW1	9.68 \pm 0.04 ^c	-	ZW7	9.31 \pm 0.03 ⁱ	-	ZW13	9.62 \pm 0.03 ^{ef}	-
ZW2	12.57 \pm 0.05 ^c	11.46 \pm 0.04 ^b	ZW8	9.55 \pm 0.04 ^{ib}	-	ZW14	12.69 \pm 0.06 ^b	9.67 \pm 0.03 ^c
ZW3	9.51 \pm 0.03 ^e	-	ZW9	15.63 \pm 0.04 ^a	12.76 \pm 0.05 ^a	ZW15	-	9.66 \pm 0.03 ^d
ZW4	12.53 \pm 0.03 ^c	-	ZW10	-	-	ZW16	11.79 \pm 0.05 ^d	-
ZW5	9.38 \pm 0.04 ^b	-	ZW11	-	-			
ZW6	-	-	ZW12	9.49 \pm 0.03 ^g	-			

注: 表内数据为抑菌圈直径(mm), 牛津杯外径 7.8 mm; “-”表示无抑菌作用, 抑菌圈直径 \leq 7.8 mm; 不同小写字母代表菌株间抑菌活性差异显著 ($P<0.05$)。

对大肠杆菌的抑制效果更明显。其中,菌株 ZW2、ZW9、ZW14 同时对两种指示菌的抑菌效果较好,可进一步研究菌株产生的抑菌物质及其影响因素。

2.2 酱油渣源乳酸菌抑菌物质分析

2.2.1 酸排除结果 排酸试验结果如表 2 所示。结果显示,采用 NaOH 中和后的 pH6.0 乳酸菌上清液对两种指示菌具有明显的抑制作用,与未经处理乳酸菌上清液(pH4.2)抑菌活性相比差异不显著($P>0.05$),说明排除酸作用后对两种指示菌抑菌圈仍明显;而 1 mol/L 的乳酸、乙酸、盐酸调节 pH 至 6.0 的 MRS 肉汤对两种指示菌无抑菌作用。由此推测,有机酸不是乳酸菌上清液抑菌作用的主要物质,还可能在其他抑菌物质,这与马迎涛^[19]进行的副干酪乳杆菌的排酸试验结果一致。

2.2.2 过氧化氢排除结果 H_2O_2 排除试验结果见表 3,经 H_2O_2 酶处理的乳酸菌上清液与未经处理的乳酸菌上清液相比,均具有抑菌活性。经 H_2O_2 酶处理的乳酸菌上清液其抑菌活性仅降低了 5.59%~9.90%,

说明 H_2O_2 不是主要抑菌作用因素,该结果与涂小丽等^[20]的研究:用 H_2O_2 酶处理后的乳酸菌上清液对两种指示菌仍有较强抑制作用一致,提示乳酸菌上清液可能存在其他抑菌物质。

2.2.3 酶敏感性结果 酶敏感试验结果如表 4 所示。经 6 种蛋白酶(胰蛋白酶、胃蛋白酶、 α -蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶、蛋白酶 K)处理的乳酸菌上清液对两种指示菌的抑制效果有不同程度变化。胰蛋白酶处理的乳酸菌上清液与未经酶处理的乳酸菌上清液相比,对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌活性显著降低($P<0.05$);胃蛋白酶处理的乳酸菌上清液与未经处理的乳酸菌上清液相比,对大肠杆菌的抑菌活性显著降低($P<0.05$),而对金黄色葡萄球菌无抑菌作用; α -蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶、蛋白酶 K 处理的乳酸菌上清液对两种指示菌无抑制作用。上述结果表明,3 株乳酸菌上清液的抑菌物质对蛋白酶敏感,能被其分解,初步推断是一种具有蛋白质类特性的细菌素,乳酸菌上清液中该物质具备良好的抑菌效果,与 Zhang 等^[21]研究具备抑菌作用的细

表 2 有机酸对乳酸菌上清液抑菌活性的影响(mm)

Table 2 Effect of organic acids on antibacterial activity of lactic acid bacteria supernatant (mm)

菌株编号	大肠杆菌					金黄色葡萄球菌				
	乳酸菌上清液 (pH4.2)	乳酸菌上清液 (pH6.0)	乳酸	乙酸	盐酸	乳酸菌上清液 (pH4.2)	乳酸菌上清液 (pH6.0)	乳酸	乙酸	盐酸
ZW2	12.58±0.04 ^c	12.54±0.05 ^b	-	-	-	11.49±0.06 ^b	11.39±0.04 ^b	-	-	-
ZW9	15.64±0.05 ^a	15.57±0.04 ^a	-	-	-	12.73±0.04 ^a	12.64±0.08 ^a	-	-	-
ZW14	12.69±0.03 ^b	12.57±0.04 ^b	-	-	-	9.69±0.04 ^c	9.62±0.04 ^c	-	-	-

注:不同小写字母代表菌株间抑菌活性差异显著($P<0.05$);乳酸菌上清液(pH6.0)与未经处理的乳酸菌上清液(pH4.2)之间差异不显著($P>0.05$)。

表 3 过氧化氢酶处理对乳酸菌上清液抑菌活性的影响(mm)

Table 3 Effect of catalase treatment on antibacterial activity of lactic acid bacteria supernatant (mm)

菌株编号	大肠杆菌			金黄色葡萄球菌		
	乳酸菌上清液 (pH4.2)	H_2O_2 酶处理的乳酸菌上清液	活性下降率 (%)	乳酸菌上清液 (pH4.2)	H_2O_2 酶处理的乳酸菌上清液	活性下降率 (%)
ZW2	12.58±0.04 ^c	11.49±0.06 ^{b*}	8.67±0.58	11.49±0.06 ^b	10.60±0.07 ^{b*}	7.75±0.27
ZW9	15.64±0.05 ^a	14.76±0.04 ^{a*}	5.59±0.5	12.73±0.04 ^a	11.47±0.05 ^{a*}	9.90±0.12
ZW14	12.69±0.03 ^b	11.52±0.04 ^{b*}	9.27±0.51	9.69±0.04 ^c	8.99±0.05 ^{c*}	7.19±0.87

注:不同小写字母代表菌株间抑菌活性差异显著($P<0.05$);*代表 H_2O_2 酶处理与未经处理的乳酸菌上清液(pH4.2)之间差异显著($P<0.05$)。

表 4 不同酶处理对乳酸菌上清液抑菌活性的影响(mm)

Table 4 Effect of different enzyme treatments on antibacterial activity of lactic acid bacteria supernatant (mm)

菌株编号	大肠杆菌			金黄色葡萄球菌		
	ZW2	ZW9	ZW14	ZW2	ZW9	ZW14
乳酸菌上清液(pH4.2)	12.58±0.04 ^{Ac}	15.64±0.05 ^{Aa}	12.69±0.03 ^{Ab}	11.49±0.06 ^{Ab}	12.73±0.04 ^{Aa}	9.69±0.04 ^{Ac}
胰蛋白酶	10.11±0.06 ^{Bc}	11.46±0.07 ^{Bb}	12.24±0.05 ^{Ba}	9.37±0.08 ^{Bb}	9.87±0.06 ^{Ba}	8.99±0.05 ^{Bc}
胃蛋白酶	9.56±0.07 ^{Cb}	9.93±0.05 ^{Ca}	8.72±0.03 ^{Cc}	-	-	-
α -蛋白酶	-	-	-	-	-	-
中性蛋白酶	-	-	-	-	-	-
碱性蛋白酶	-	-	-	-	-	-
蛋白酶K	-	-	-	-	-	-

注:不同大写字母代表不同蛋白酶处理与未经处理的乳酸菌上清液(pH4.2)之间的差异显著($P<0.05$);不同小写字母代表菌株间抑菌活性差异显著($P<0.05$)。

菌素对蛋白酶敏感的结果一致。

2.3 抑菌动力学曲线

经抑菌活性乳酸菌的筛选和抑菌物质分析发现,菌株 ZW2、ZW9、ZW14 发酵上清液对大肠杆菌抑制作用较好,以大肠杆菌为指示菌,进一步研究菌株的抑菌动力学曲线,结果如图 1 所示。菌株的生长曲线显示:菌株生长呈典型的“S”型,在迟缓期 4 h 内,3 株菌增长缓慢,OD₆₀₀ 值变化不明显;培养 4 h 后进入生长对数期,随着发酵时间的延长,菌液浓度呈指数增长,细胞代谢活跃;培养 20 h 后达到生长稳定期,3 株乳酸菌 OD₆₀₀ 均稳定在 1.5 左右。菌株的 pH 变化曲线显示:乳酸菌从接种至培养 4 h 时,pH 有小幅下降;培养 4~20 h 时,pH 迅速下降;培养 20~28 h 时,pH 趋于 3.5 左右,说明 3 株菌有一定产酸能力。以大肠杆菌为指示菌株,乳酸菌上清液的抑菌活性显示:进入生长对数期后菌株开始呈现抑菌活性,随培养时间的延长,抑菌圈直径不断增大,20 h 后

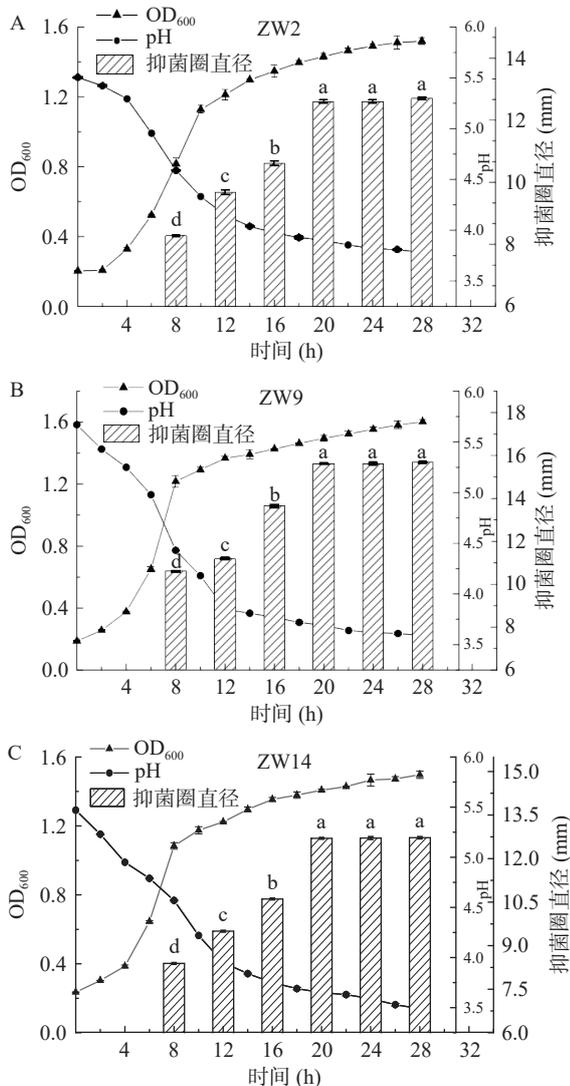


图 1 ZW2、ZW9、ZW14 菌株的抑菌动力学曲线

Fig.1 Antimicrobial kinetics curves of ZW2, ZW9, ZW14

注:不同字母代表不同培养时间对抑菌圈直径的影响差异显著(P<0.05)。

抑菌圈直径趋于稳定。上述结果表明,抑菌物质产生于生长对数期,随菌液浓度增加,pH 不断降低,细菌素的抑菌活性不断增强;在稳定期时,培养基中碳源和氮源的耗尽使细菌生长受到抑制,代谢物产量、pH 与抑菌活性趋于稳定,这与涂小丽等^[20]和张建飞等^[22]报道的乳酸菌抑菌动力学曲线总体变化结果一致。综上所述,选取培养时间 20 h 为最佳观察抑菌圈直径时间。

2.4 乳酸菌上清液抑菌效果影响因素研究

2.4.1 温度稳定性 温度是影响蛋白质的空间结构及生物功能的主要因素之一,随温度升高蛋白质空间结构遭到破坏,相应的生物功能也发生变化。在食品工业中,巴氏杀菌温度为 65~80 °C,微生物(含芽孢)灭菌温度为 121 °C,为探究乳酸菌上清液的抑菌物质对温度的耐受性情况,选择 40~121 °C 区间进行观察,如图 2 所示。结果显示,经 40、60、80、100 °C 处理后,菌株 ZW2、ZW9 的抑菌圈直径基本无变化(P>0.05),经 121 °C 处理后抑菌活性降低(P<0.05);ZW14 上清液经 60、80、100、121 °C 处理后,抑菌圈直径显著减小(P<0.05)。3 株乳酸菌经热处理的上清液与未经热处理的上清液相比,抑菌活性均出现一定程度的下降,这是由于高温引起部分蛋白或多肽失活,但菌株上清液的抑菌活性仍保持在 90% 以上。结果表明,3 株乳酸菌上清液细菌素具有极好的热稳定性,与 Qiao 等^[23]从传统发酵马奶筛选到壳状乳杆菌细菌素经加热处理后仍保持较好抑菌活性的结果一致。耐高温的细菌素在食品工业高温灭菌生产过程中具有较大优势。细菌素是乳酸菌产生的具有抑菌活性的主要物质,Ishibashi 等^[24]和 Han 等^[25]研究显示乳酸菌产生多是 Class II b 类双肽细菌素,且 Class II 类细菌素耐热性强,推测本研究乳酸菌所产可能为 Class II b 类细菌素。

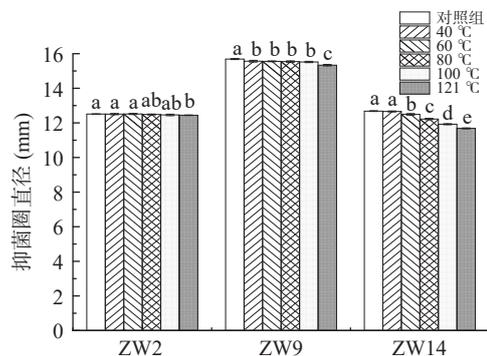


图 2 温度对乳酸菌细菌素的影响

Fig.2 Effect of temperature on lactic acid bacteriocin

注:不同字母代表不同温度对乳酸菌细菌素活性的影响差异显著(P<0.05)。

2.4.2 pH 耐受性 乳酸菌上清液对 pH 敏感性结果如图 3 所示。结果表明,3 株乳酸菌的抑菌物质对 pH2.0~6.0 环境具有较强耐受性,而在中性、碱性环境(pH8.0~10.0)条件下,抑菌活性降低甚至丧失。

Zacharof 等^[26] 研究也发现酸性条件有助于乳酸菌细菌素更有效地吸附到致病菌上,从而能发挥更好的杀菌效果。pH 增高会导致分子内静电相互作用而引起细菌素结构改变,从而导致抑菌活性下降甚至彻底丧失^[27]。3 株乳酸菌细菌素的酸性耐受性强,有利于作为生物抑菌剂应用在酸性食品保鲜中。

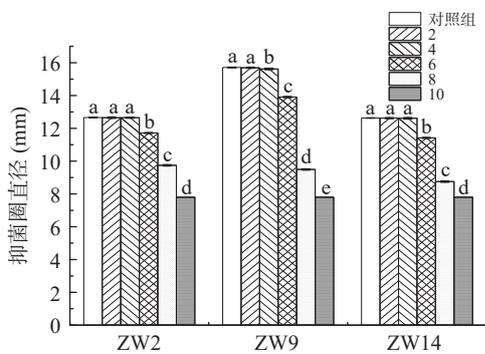


图 3 pH 对乳酸菌细菌素的影响

Fig.3 Effect of pH on bacteriocin of lactic acid bacteria

注: 不同字母代表不同 pH 对乳酸菌细菌素活性的影响差异显著($P<0.05$)。

2.4.3 紫外线敏感性 蛋白质的氢键经过紫外辐照后会被破坏,甚至会使某些蛋白质丧失基础功能,最终导致蛋白性质改变,乳酸菌上清液对紫外线敏感性如图 4 所示。由图 4 数据变化规律可知,3 株乳酸菌细菌素在不同时间紫外线辐射下均表现出抑菌活性,而对紫外线耐受性不尽相同。随着紫外线照射时间增加,紫外线辐射 60 min 后 3 株乳酸菌上清液抑菌效果与未经处理的上清液相比,呈显著性下降($P<0.05$),但紫外线辐射 120 min,乳酸菌上清液抑菌活性仍保留近 80%。由此可见,3 株乳酸菌细菌素对紫外线敏感性较弱。本研究结果与冉军舰等^[28] 研究嗜酸乳杆菌在紫外照射超过 1 h 其抑菌活性才有显著性降低的报道相似。ZW2、ZW9、ZW14 乳酸菌细菌素作为生物抑菌剂对紫外线有很好的耐受性,适用于食品工业中需紫外线杀菌消毒的食品。

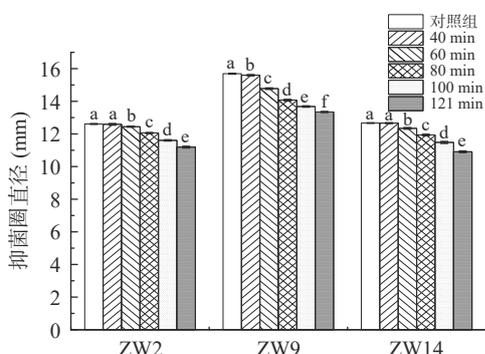


图 4 紫外线对乳酸菌细菌素的影响

Fig.4 Effects of ultraviolet on lactic acid bacteriocin

注: 不同字母代表不同紫外线对乳酸菌细菌素活性的影响差异显著($P<0.05$)。

2.4.4 表面活性剂敏感性 乳酸菌上清液经不同表

面活性剂处理后的抑菌活性变化如图 5 所示,3 株乳酸菌上清液均具有一定抑菌活性,并且细菌素对不同表面活性剂敏感性不同。乳酸菌上清液经吐温-80、Triton X-100、SDS 处理后对大肠杆菌抑菌圈直径均大于未经处理的上清液,3 种表面活性剂显著提高乳酸菌上清液的抑菌能力($P<0.05$),推测它们改变了蛋白质空间结构,使细菌素溶解度增大,稳定性提高,从而增强了抑菌效果^[29],这与李志如等^[30] 研究表面活性剂的试验结果一致。而经尿素处理的乳酸菌上清液与未经处理的上清液相比,抑菌活性呈显著性下降($P<0.05$),推测尿素对抑菌物质有一定拮抗作用,能破坏氢键,导致蛋白质分子结构松弛,使蛋白质变性失活^[31],但抑菌活性仍保留 80%~90%。

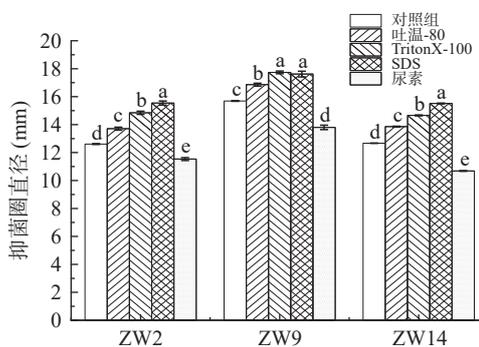


图 5 表面活性剂对乳酸菌细菌素的影响

Fig.5 Effects of surfactant on lactic acid bacteriocin

注: 不同字母代表不同表面活性剂对乳酸菌细菌素活性的影响差异显著($P<0.05$)。

3 结论

本论文以实验室前期从酱油渣中分离的 16 株乳酸菌作为出发菌株,以大肠杆菌、金黄色葡萄球菌为指示菌,筛选得到了具有高效抑菌活性的乳酸菌 ZW2、ZW9、ZW14。经有机酸排除、 H_2O_2 排除、酶敏感试验分析,有机酸和 H_2O_2 不是菌株主要抑菌物质,可能存在具有蛋白质属性的抑菌活性物质。菌株的抑菌动力学曲线和抑菌活性稳定性结果显示,3 株乳酸菌在培养 20 h 后抑菌活性趋于稳定;菌株中的抑菌物质在 40~100 °C 具有良好的热稳定性;菌株在 pH2.0~6.0 中抑菌效果较强,对酸具有较好的耐受性;菌株中的抑菌物质对紫外线不敏感;表面活性剂吐温-80、Triton X-100、SDS 对菌株抑菌活性有促进作用,而尿素对抑菌活性有一定抑制作用。综上所述,通过酱油渣筛选获得的 ZW2、ZW9、ZW14 乳酸菌细菌素,在高温处理的食品保鲜、酸性食品保鲜、紫外灭菌食品保鲜等生物防腐方面具有应用潜力,为后续研究 3 株乳酸菌细菌素类型、抑菌作用机理及安全性奠定了基础,也为酱油渣源乳酸菌资源开发应用提供了科学依据。

参考文献

[1] PARKHILL J, WREN B W, MUNGALL K, et al. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals

- hypervariable sequences[J]. *Nature*, 2000, 403(6770): 665–668.
- [2] GAO Z, DALIRI E B, WANG J, et al. Inhibitory effect of lactic acid bacteria on foodborne pathogens: A review[J]. *Journal of Food Protection*, 2019, 82(3): 441–453.
- [3] PERALES A J, RUBIÑO S, MARTÍNEZ B M, et al. LAB bacteriocins controlling the food isolated (drug-resistant) *Staphylococci*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1–13.
- [4] LANGA S, ARQUÉS J L, MEDINA M, et al. Coproduction of colicin V and lactic acid bacteria bacteriocins in *Lactococci* and *Enterococci* strains of biotechnological interest[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2017, 122(5): 1–9.
- [5] GUTIÉRREZ-CORTÉS C, SUAREZ H, BUITRAGO G, et al. Characterization of bacteriocins produced by strains of *Pediococcus pentosaceus* isolated from Minas cheese[J]. *Annals of Microbiology*, 2018, 68(6): 383–398.
- [6] 刘树昕, 吴爱娟, 甄妮, 等. 广谱抑菌乳酸菌的筛选及其细菌素相关基因分析[J]. *食品科学*, 2020, 41(6): 101–107. [LIU S X, WU A J, YEN N, et al. Screening of broad-spectrum bacteriostatic lactic acid bacteria and analysis of bacteriocin-related genes[J]. *Food Science*, 2020, 41(6): 101–107.]
- [7] 舒梨, 何义国, 赵兴秀, 等. 浓香型窖泥中高产细菌素乳酸菌的鉴定及特性[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(4): 119–124. [SHU L, HE Y G, ZHAO X X, et al. Identification and characterization of bacteriocin-producing lactic acid bacteria in Luzhou-flavor pit mud[J]. *Food Industry Technology*, 2019, 40(4): 119–124.]
- [8] 唐素婷, 区锡敏, 黄桂东, 等. 酱油渣中副干酪乳杆菌的分离鉴定及抗氧化特性研究[J]. *食品与机械*, 2019, 35(10): 11–17. [TANG S T, OU X M, HUANG G D, et al. Isolation, identification and antioxidant properties of *Lactobacillus paracasei* from soy sauce residue[J]. *Food and Machinery*, 2019, 35(10): 11–17.]
- [9] O'TOOLE D K. The role of microorganisms in soy sauce production[J]. *Advances in Applied Microbiology*, 2019, 108: 45–113.
- [10] 黄桂东, 唐素婷, 程云辉, 等. 酱油渣中乳酸乳球菌分离鉴定及对模拟胃肠环境的耐受性[J]. *食品与机械*, 2019, 35(8): 15–19. [HUANG G D, TANG S T, CHENG Y H, et al. Isolation and identification of *Lactococcus lactis* from soy sauce residue and its tolerance to simulated gastrointestinal environment[J]. *Food and Machinery*, 2019, 35(8): 15–19.]
- [11] 唐素婷, 区锡敏, 孙张乐, 等. 酱油渣中乳酸菌的分离鉴定及其生长特性研究[J]. *食品研究与开发*, 2019, 40(20): 195–200. [TANG S T, OU X M, SUN Z L, et al. Isolation and identification of lactic acid bacteria from soy sauce residue and its growth characteristics[J]. *Food Research & Development*, 2019, 40(20): 195–200.]
- [12] 马国涵, 马欢欢, 吕欣然, 等. 大菱鲆肠道中广谱拮抗活性乳酸菌的筛选及其细菌素鉴定[J]. *食品科学*, 2019, 40(6): 159–165. [MA G H, MA H H, LV X R, et al. Screening of broad-spectrum antagonistic active lactic acid bacteria and identification of bacteriocin in *Scophthalmus maximus*[J]. *Food Science*, 2019, 40(6): 159–165.]
- [13] 杜宏, 吕欣然, 崔晓玲, 等. 融合魏斯氏菌对单增李斯特菌生物膜形成的影响[J]. *食品研究与开发*, 2021, 42(13): 180–187. [DU H, LÜ X R, CUI X L, et al. Effect of *Weissella fusarium* on biofilm formation of *Listeria monocytogenes*[J]. *Food Research and Development*, 2021, 42(13): 180–187.]
- [14] 黄奕雯, 刘悦欣, 陶政, 等. 鸡源乳酸菌细菌素的分离筛选及鉴定[J]. *中国兽医杂志*, 2017, 53(9): 23–27. [HUANG Y W, LIU Y X, TAO Z, et al. Isolation, screening and identification of bacteriocin from chicken lactic acid bacteria[J]. *Chinese Veterinary Journal*, 2017, 53(9): 23–27.]
- [15] 王萌萌, 史璇, 李智琪, 等. 清香酒醅中高产细菌素乳酸菌的筛选及其细菌素特性研究[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(16): 102–107. [WANG M M, SHI Y, LI Z Q, et al. Screening and characterization of bacteriocin-producing lactic acid bacteria in fermented grains[J]. *Food Industry Science and Technology*, 2020, 41(16): 102–107.]
- [16] 曹海鹏, 徐兴娜, 文小飞. 一株强抑菌活性植物乳杆菌的分离及益生性能研究[J]. *中国酿造*, 2021, 40(6): 141–146. [CAO H P, XU X N, WEN X F. Isolation and probiotic performance of a strain of *Lactobacillus Plantarum* with strong antibacterial activity[J]. *Chinese Brewing*, 2021, 40(6): 141–146.]
- [17] 高欣, 刘颖, 刘凡湘, 等. 水产源产细菌素乳酸菌的分离、筛选及鉴定[J]. *中国饲料*, 2020(21): 29–34. [GAO X, LIU Y, LIU F X, et al. Isolation, screening and identification of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from aquatic products[J]. *Chinese Feed*, 2020(21): 29–34.]
- [18] 郝艳芳. 植物乳杆菌素的鉴定及其对食品中单增李斯特菌的抑制作用研究[D]. 北京: 北京农学院, 2014. [HAO Y F. Identification of *Lactobacillus plantarum* and its inhibitory effect on *Listeria monocytogenes* in food[D]. Beijing: Beijing Agricultural College, 2014.]
- [19] 马迎涛. 微生物制剂副干酪乳杆菌素分离及理化特性研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2016. [MA Y T. Isolation and physicochemical characteristics of probiotics *Lactobacillus paracasei*[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2016.]
- [20] 涂小丽, 赖水明, 王俊, 等. 产细菌素的乳酸杆菌的分离和筛选[A]. 中国畜牧兽医学会动物微生物学分会. 中国畜牧兽医学会动物微生物学分会第五届第十三次全国学术研讨会论文集[C]//中国畜牧兽医学会动物微生物学分会: 中国畜牧兽医学会, 2018: 1. [TU X L, LAI S M, WANG J, et al. Isolation and screening of bacteriocin-producing lactobacilli[A]. Animal Microecology Branch of Chinese Society of Animal Husbandry and Veterinary Medicine. Proceedings of the 13th National Symposium of the 5th Animal Microecology Branch of Chinese Society of Animal Husbandry and Veterinary Medicine[C]// Animal Microecology Branch of Chinese Animal Husbandry and Veterinary Medical Association: Chinese Animal Husbandry and Veterinary Medical Association, 2018: 1.]
- [21] ZHANG J M, YANG Y Y, YANG H, et al. Purification and partial characterization of bacteriocin Lac-B23, a novel bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* J23, isolated from Chinese traditional fermented milk[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2165.
- [22] 张建飞. 筛选自牛、羊肠道的乳酸菌 N8603 细菌素纯化及抑菌特性分析[J]. *饲料研究*, 2021, 44(11): 65–69. [ZHANG J F. Purification of bacteriocin from lactic acid bacteria N8603 screened

from the intestinal tract of bovine and Sheep and analysis of antibacterial characteristics[J]. *Feed Research*, 2021, 44(11): 65-69.]

[23] QIAO Z, CHEN J X, ZHOU Q G, et al. Purification, characterization, and mode of action of a novel bacteriocin BM173 from *Lactobacillus crustorum* MN047 and its effect on biofilm formation of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*[J]. *Journal of Dairy Science*, 2020, 104(2): 1474-1483.

[24] ISHIBASHI N, ZENDO T, KOGA S, et al. Molecular characterization of the genes involved in the secretion and immunity of lactococcin Q, a two-peptide bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* QU 4[J]. *Microbiology (Reading, England)*, 2015, 161(11): 2069-2078.

[25] HAN J, PING L, QING G. Heterologous expression and purification of plantaricin NC8, a two-peptide bacteriocin against *Salmonella* spp. from *Lactobacillus plantarum* ZJ316[J]. *Protein Expression and Purification*, 2016, 127: 28-34.

[26] ZACHAROF M P, LOVITT R W. Bacteriocins produced by lactic acid bacteria a review article[J]. *APCBEE Procedia*, 2012, 2: 50-56.

[27] JACK R W, TAGG J R, RAY B. Bacteriocins of gram-posi-

tive bacteria[J]. *Microbiological Reviews*, 1995, 59(2): 1-30.

[28] 冉军舰, 焦凌霞, 梁新红, 等. 嗜酸乳杆菌产细菌素的提取及其生物特性研究[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(13): 112-118.

[RAN J J, JIAO L X, LIANG X H, et al. Extraction of bacteriocin from *Lactobacillus acidophilus* and its biological characteristics[J]. *Food Industry Science and Technology*, 2017, 38(13): 112-118.]

[29] ANSARI A, ZOHRA R R, TARAR O M, et al. Screening, purification and characterization of thermostable, protease resistant Bacteriocin active against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)[J]. *BMC Microbiology*, 2018, 18(1): 192.

[30] 李志如, 韩建春, 刘容旭, 等. 戊糖乳杆菌 LS1 细菌素的分离纯化及性质鉴定[J]. *食品科学*, 2020, 41(20): 112-118. [LI Z R, HAN J C, LIU R X, et al. Isolation, purification and characterization of LS1 bacteriocin from *Lactobacillus pentosus*[J]. *Food Science*, 2020, 41(20): 112-118.]

[31] 韩旭东, 张玉苍, 李瑞松, 等. 芽孢杆菌 ZYCHH-01 发酵条件优化及其抑菌物质的研究[J]. *中国酿造*, 2020, 39(2): 38-43.

[HAN X D, ZHANG Y C, LI R S, et al. Study on optimization of fermentation conditions and antibacterial substances of *Bacillus* ZY-CHH-01[J]. *Chinese Brewing*, 2020, 39(2): 38-43.]