

酵素中具有抑菌能力乳酸菌的筛选及鉴定

肖仔君^{1*}, 钟瑞敏¹, 陆伟东², 章馥¹, 林丽芳³

(1. 韶关学院英东食品学院, 广东韶关 512005) (2. 韶关学院化学与土木工程学院, 广东韶关 512005)

(3. 韶关市紫背桃源生态科技有限公司, 广东韶关 512000)

摘要: 该研究探讨了从酵素中分离纯化具有抗菌性能的 12 株乳酸菌, 对其进行生理生化实验和 API 鉴定。利用牛津杯法对阪崎大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌和宋内志贺氏菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌进行抑菌特性研究, 并探讨了乳酸菌是否产生生物胺能力和偶氮还原酶。结果表明, 酵素源的 12 株乳酸菌对肠道致病菌均具有不同程度的抑菌活性, 其抑菌圈直径为 14~22 mm, 对大肠杆菌的抑菌效果较好, 其抑菌圈直径为 15~23 mm, 对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径为 14~24 mm, 12 株乳酸菌都不具有产生生物胺和偶氮还原酶的能力。通过生理和 API 生化鉴定确定 XZJ003、XZJ006、XZJ015 均为副干酪乳杆菌, 通过 16S rDNA 和同源性确证 XZJ015 为副干酪乳杆菌, 该研究结果对今后益生菌的深入研究和功能性食品的开发具有一定的作用。

关键词: 酵素; 乳酸菌; 分离鉴定; 抗菌特性

文章编号: 1673-9078(2023)07-60-67

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.7.0157

Screening and Identification of Lactic Acid Bacteria with Antimicrobial Activity in Fruit Ferments

XIAO Zijun^{1*}, ZHONG Ruimin¹, LU Weidong², ZHANG Fu¹, LIN Lifang³

(1. Henry Fok College of Food Science, Shaoguan University, Shaoguan 512005, China)

(2. School of Chemistry and Civil Engineering, Shaoguan University, Shaoguan 512005, China)

(3. Shaoguan Zibei Taoyuan Ecological Technology Co. Ltd., Shaoguan 512000, China)

Abstract: Twelve lactic acid bacteria (LAB) strains with antimicrobial activity were isolated and purified from fruit ferments. These LAB strains were subjected to physicochemical tests and analytical profile index (API) identification, and the Oxford cup assay was used to assess their antimicrobial activities against *Escherichia coli sakazakii*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus*. In addition, they were tested for the ability to produce biogenic amines and azoreductases. All 12 LAB exhibited varying degrees of antimicrobial activity against enteropathogenic bacteria, and the diameters of their zone of inhibition (ZOI) ranged from 14 to 22 mm. The LAB were especially effective against *E. coli* and *S. aureus*, as their ZOI diameters for these bacteria were 15~23 mm and 14~24 mm, respectively. None of the 12 LAB had the ability to produce biogenic amines or azoreductases. Through physiological and API identification, it was determined that XZJ003, XZJ006, and XZJ015 were all *Lactobacillus paracasei*. XZJ015 was also identified as *L. paracasei* through 16S rDNA sequencing and sequence homology analysis. The findings of this study will contribute to future in-depth studies on beneficial bacteria and the development of functional foods.

Key words: ferments; lactic acid bacteria; isolation and identification; antimicrobial activity

引文格式:

肖仔君, 钟瑞敏, 陆伟东, 等. 酵素中具有抑菌能力乳酸菌的筛选及鉴定[J]. 现代食品科技, 2023, 39(7): 60-67.

XIAO Zijun, ZHONG Ruimin, LU Weidong, et al. Screening and identification of lactic acid bacteria with antimicrobial activity in fruit ferments [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(7): 60-67.

乳酸菌具有维持肠道菌群平衡^[1]、降低胆固醇^[2]、增强免疫力^[3]和抗氧化等作用^[4-6], 备受众多研究者的

收稿日期: 2023-02-16

基金项目: 韶关市科技计划项目 (2018sn080)

作者简介: 肖仔君 (1973-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品发酵、生物催化与生物转化, E-mail: yaoyoux2001@163.com

青睐。为了更好丰富发酵产品, 增加食品的营养价值, 乳酸菌应用的领域越来越广泛, 除了传统的发酵产品外^[7-9], 还用在水果发酵制品中^[10,11], 不仅可以提高水果的营养成分, 还可以解决不宜储藏的问题, 同时延长水果的产业链, 增加经济效益。

水果酵素是利用水果为主要原料, 添加或不添加

辅料,经微生物发酵制得的含有特定生物活性成分的食品。酵素中的酵母菌、乳酸菌和醋酸杆菌等微生物不仅能分解原料中的组织,释放出对人体有益的成分,而且对酵素产品的风味物质的形成起着重要的作用。酵素由于含有丰富的酚类物质、黄酮类物质以及由于发酵菌株的不同产生的不同代谢产物,而使其具有抑菌、减肥、降血压、降血脂、抗氧化等作用,其中抑菌活性和抗氧化的研究较多,这源于不同的酵素发酵原料和工艺不同,其含有的微生物种类特别是乳酸菌的种类不同而具有不同的抑菌效果。前期的研究表明,紫背桃源的水果酵素具有较好的抑菌效果,但机理不明,可能是由于酵素中含有不同的乳酸菌具有较强的拮抗作用可能是机制之一,故本课题从酵素中分离分离得到的12种发酵菌为研究对象,对抗菌性能较好的乳酸菌机型筛选和鉴定。本研究以肠道中常见的致病菌为指示菌,筛选抑菌能力较强的益生菌,并对其是否产生物胺性能、偶氮还原酶能力方面进行研究,确定其安全性,最后选择抗菌性能较好的乳酸菌进行鉴定,为具有优良益生特性的益生菌的开发利用提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料

水果酵素,由韶关市紫背桃源生态科技有限公司提供。

1.1.2 培养基与菌株

MRS培养基、营养肉汤培养基、淀粉培养基、明胶基础培养基、生物胺检测培养基参考文献^[12],以上各试剂均购于广东省环凯生物有限公司。

阪崎大肠杆菌(*Enterobacter sakazakii*)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)、宋氏志贺氏(*Shigella sonnet*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*),实验中心保藏。

1.1.3 实验试剂

过氧化氢(AR),天津市大茂化学试剂厂;API 50 CH试剂盒,上海华微泰达生物科技有限公司;直接蓝71(生物级),广州市齐云生物计数有限公司。

1.1.4 仪器与设备

SW-CJ-2FD超净工作台,上海一恒科学仪器有限公司;MIX-250B-Z电热恒温培养箱,上海博讯实业有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 乳酸菌的分离与纯化

将酵素在含有CaCO₃的MRS琼脂培养基上进行

划线分离,37℃厌氧培养24~48 h。挑取溶钙圈的单个菌落进行纯化。

1.2.2 抑菌实验

将分离所得乳酸菌接种于MRS液体培养基上活化后,以20 mL/L的接种量接种于100 mL MRS液体培养基中,37℃厌氧培养24 h。取10 mL发酵液以1 000 r/min 4℃离心10 min,得无细胞发酵上清液。

将指示菌:阪崎大肠杆菌(*Enterobacter sakazakii*)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)、宋氏志贺氏(*Shigella sonnet*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)活化2次后,以20 mL/L接种量接种到营养肉汤培养基中,在营养肉汤固体培养基上,采用牛津杯法测定乳酸菌发酵液和上清液的抑菌活性,37℃培养24 h,测定抑菌圈直径大小。

1.2.3 乳酸菌产生物胺能力测定

按照参考文献的方法^[12]进行。

1.2.4 乳酸菌产偶氮还原酶能力测定

将已活化的试验菌涂布于含有5 mg/mL直接蓝71的MRS固体培养基上,37℃培养24 h,观察结果是否有水解圈的产生。

1.3 乳酸菌的生理生化以及分子生物学鉴定

1.3.1 形态学特征和生理生化鉴定

参考文献^[13]的方法,将纯化所得的12株菌株进行菌落形态、细胞形态及生理生化试验:革兰氏染色后显微镜下观察细胞形态。生理生化试验包括:接触酶试验、淀粉水解试验、明胶液化试验以及API鉴定(按照说明书进行操作)。

1.3.2 分子生物学鉴定

使用Solarbio的DNA试剂盒提取菌株DNA并用27F和1492R引物对其进行PCR扩增。琼脂糖凝胶电泳法检测PCR产物后,送至上海生工测序。测序结果与NCBI的GenBank数据库进行BLAST同源性序列比对,选取并下载同源性大于99%的乳酸菌,然后使用MEGA 7.0软件中的邻近法构建亲缘关系系统树。

1.4 数据分析

所有实验重复3次,数据分析采用Graphpad进行统计分析。

2 结果与讨论

2.1 乳酸菌分离纯化

从酵素样品中共分离得到20株菌株,通过革兰氏

染色、接触酶实验初步确定疑似乳酸菌共 12 株。如图 1 所示, 菌株菌落形态大多为白色或乳白色, 边缘整齐, 直径在 0.5~2 mm 之间, 革兰氏阳性菌, 无芽孢, 多为短杆状, 单生, 长度为 2~5 μm 。

2.2 抑菌性能的测定

2.2.1 乳酸菌对肠道致病菌抗菌能力测定结果

鼠伤寒沙门氏菌是引起急性胃肠炎的主要病原菌之一, 作为筛选乳酸菌具有重要作用。宋内志贺氏菌, 是人细菌性痢疾的病原菌, 人体对宋内志贺氏菌有较高的易感性, 特别是幼儿, 可能会引发急性中毒性菌痢, 死亡率较高。阪崎氏肠杆菌(*Enterobacter sakazaki*) 是奶粉一种致命肠杆菌。由其引发的婴儿、早产儿脑膜炎、败血症及坏死性结肠炎散发和暴发的病例已在全球相继出现。

从酵素种分离纯化后的乳酸菌菌株按照顺序进行编号, 以肠道中常见的致病菌阪崎大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、宋内志贺氏菌作为指示菌进行抑菌性能的测定。由表 1 可以看出, 受试的 12 株菌株对阪崎大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌以及宋内志贺氏菌具有较强的抑菌效果。受试的菌株发酵液的抑菌效果大于上清液的抑菌效果, 但上清液的抑菌效果仍有较强的抑菌效果, 大多数抑菌圈直径在 15 mm 以上。12 株菌对阪崎大肠杆菌抑菌效果较好的前六位菌分别为 XZJ007

>XZJ001>XZJ015>XZJ003>XZJ006>XZJ005, 它们的抑菌圈直径分别为 22.02、19.23、19.03、19.02、18.95、18.45 mm, 其他六株菌的抑菌圈直径均超过 15 mm, 这说明这些菌株对阪崎大肠杆菌的抑菌效果。对鼠伤寒沙门氏菌的抑菌效果较好的六株菌分别为 XZJ001 > XZJ010 > XZJ007 > XZJ018 > XZJ011 > XZJ009, 抑菌圈直径分别为 22.12、21.13、20.16、19.12、18.24、17.22 mm, 其他菌株对鼠伤寒沙门氏菌的抑菌圈直径超过 14 mm。对宋内志贺氏菌的抑菌效果较好的前六株菌分别 XZJ011 > XZJ003 > XZJ005 > XZJ010 > XZJ007 > XZJ001, 它们的抑菌圈分别为 16.10、16.08、15.11、15.09、14.12 mm, 其他 6 株菌对宋内志贺氏菌的抑菌圈直径均大于 12 mm。从这一数据可以得出, 同一株对不同的指示菌抑菌效果不同, 受试的 12 株均对鼠伤寒沙门氏菌的抑菌效果优于阪崎大肠杆菌和宋内志贺氏菌, 整体表现对宋内志贺氏菌的抑菌效果较差, 与对其他指示菌抑菌相比, 其最大抑菌圈直径小 (~17 mm vs 22 mm)。这和袁先玲^[14]研究不同乳酸菌对不同指示菌的抑制的结果相符, 且研究乳酸菌对沙门氏菌的抑制效果较好, 抑菌圈直径几乎都在 16~18 mm; 从这一数据可以得出: 与张会生研究结果相一致, 同一菌株对不同指示菌的抑制效果不同^[15]; 与段超^[16]研究植物乳杆菌对鼠伤寒沙门氏菌以及阪崎大肠杆菌具有不同抑菌效果。

表 1 不同乳酸菌对肠道致病菌的抑制作用 (mm)

Table 1 Inhibitory effect of different lactic acid bacteria on intestinal pathogenic bacteria (mm)

菌株	阪崎大肠杆菌		鼠伤寒沙门氏菌		宋内志贺氏菌	
	发酵液	上清液	发酵液	上清液	发酵液	上清液
XZJ001	19.23±0.02	15.03±0.06	22.12±0.03	20.25±0.04	14.12±0.06	13.10±0.02
XZJ003	19.02±0.12	16.02±0.02	16.25±0.11	15.19±0.23	16.10±0.02	14.07±0.03
XZJ005	18.45±0.03	17.13±0.05	17.10±0.22	18.25±0.06	16.08±0.03	15.12±0.04
XZJ006	18.95±0.12	14.08±0.03	16.08±0.13	16.21±0.03	13.12±0.12	9.08±0.03
XZJ007	22.02±0.02	17.05±0.06	20.16±0.08	19.14±0.07	15.09±0.01	11.21±0.12
XZJ009	18.02±0.01	20.05±0.12	17.22±0.12	16.42±0.12	14.08±0.02	12.12±0.01
XZJ010	16.96±0.05	16.02±0.03	21.13±0.15	19.95±0.15	15.11±0.02	14.21±0.03
XZJ011	15.42±0.03	15.21±0.13	18.24±0.22	17.13±0.06	17.12±0.03	14.06±0.02
XZJ012	15.38±0.02	12.15±0.02	17.21±0.02	14.09±0.10	12.07±0.02	9.08±0.11
XZJ014	17.21±0.14	16.08±0.02	14.08±0.15	17.16±0.06	14.08±0.06	11.24±0.02
XZJ015	19.03±0.01	18.02±0.03	16.32±0.21	16.09±0.10	13.12±0.03	13.15±0.03
XZJ018	15.02±0.03	13.15±0.05	19.12±0.26	19.12±0.12	12.21±0.12	12.11±0.05

2.2.2 乳酸菌对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌抑菌能力的测定

乳酸菌进入肠道后黏附机体肠道后, 可以通过分泌有机酸、多糖类、抗菌肽类等物质来抑制微生物。从酵素中分离纯化后的乳酸菌利用肠道中常见大肠杆

菌和金黄色葡萄球菌作为指示菌研究酵素源乳酸菌的抑菌性能。从表 2 可以看出, 受试 12 株乳酸菌的发酵上清液和发酵液对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均具有较强的抑菌能力, 发酵液的抑菌效果几乎好于上清液的抑菌效果, 这可能说明除了上清液中分泌有抑菌物

质外，这些乳酸菌可能对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌起拮抗作用。乳酸菌对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径在 18~24 mm 范围内，且不同菌株对同一种指示菌、同一株菌株对不同指示菌的抑菌效果不一样，没有显著的差异，这和刘晶等^[17]研究乳酸菌对不同指示菌的抑制的结果相符，且对大肠杆菌的抑菌效果较好。

表 2 不同乳酸菌对大肠菌群、金黄色葡萄球菌的抑制作用

Table 2 Inhibitory effect of different lactic acid bacteria on *Escherichia coli* or *Staphylococcus aureus* (mm)

菌株	大肠杆菌		金黄色葡萄球菌	
	发酵液	上清液	发酵液	上清液
XZJ001	18.12±0.02	18.08±0.05	24.08±0.02	20.20±0.03
XZJ003	23.15±0.12	23.07±0.04	19.21±0.03	22.12±0.04
XZJ005	18.12±0.05	20.08±0.12	18.12±0.03	19.14±0.05
XZJ006	22.12±0.12	22.10±0.11	20.09±0.04	20.02±0.02
XZJ007	22.03±0.08	21.03±0.12	19.07±0.03	19.03±0.04
XZJ009	20.07±0.10	20.21±0.02	20.05±0.02	20.12±0.05
XZJ010	22.02±0.03	21.07±0.03	20.12±0.04	19.09±0.03
XZJ011	15.11±0.12	14.01±0.07	17.12±0.03	16.14±0.08
XZJ012	18.08±0.03	19.12±0.08	17.21±0.06	16.89±0.05
XZJ014	20.04±0.05	20.12±0.02	19.15±0.02	19.01±0.02
XZJ015	19.08±0.12	19.09±0.02	18.12±0.04	17.93±0.05
XZJ018	21.23±0.11	20.05±0.03	18.14±0.04	17.92±0.03

2.3 乳酸菌产生物胺能力测定结果

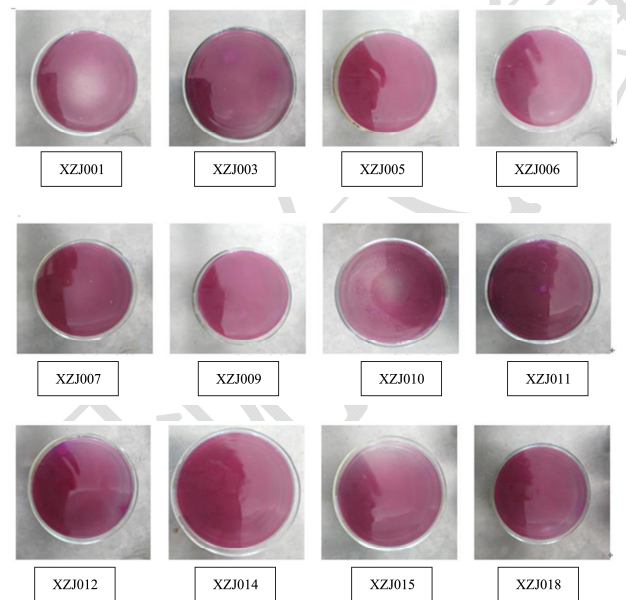


图 1 XZJ001~XZJ018 号试验菌产组胺能力检测结果

Fig.1 Detection results of histamine producing capacity of XZJ001~XZJ018

乳酸菌是否产生生物胺是评价其安全性指标之一，在发酵食品中，乳酸菌能利用氨基酸进行脱羧反应生成生物胺。适量生物胺对人体具有特定生理活性，

从表2可以看出，XZJ003、XZJ006、XZJ007、XZJ010 这 4 株菌对大肠杆菌的抑菌圈直径较大，抑菌圈直径分别为 23.15、22.12、22.03、22.02 mm；菌株 XZJ001、XZJ006、XZJ009、XZJ010 这 4 株菌对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径较大，抑菌圈直径分别为 24.08、20.09、20.05、20.12 mm，对金黄色葡萄球菌的抑菌作用最强。

过量摄入生物胺会损害人体健康。生物胺是影响发酵产品安全的一个主要风险因素。如何有效检测与评价乳酸菌产生物胺的能力是开发利用乳酸菌时所必须要考虑的一个问题。



图 2 XZJ001~XZJ018 号试验菌产酪胺能力检测结果

Fig.2 Test results of tyramine producing capacity of XZJ001~XZJ018

乳酸菌利用组氨酸代谢产生的组胺呈碱性，使培

培养基 pH 值增大, 使得含溴甲酚紫的培养基呈黄色, 由此显示该乳酸菌产生生物胺。由图 1 可知, 12 株乳酸菌在组胺的检测培养基培养后, 培养基成紫色, 检测结果为阴性, 受试 12 株均不能将组氨酸转化为组胺, 不具有生物胺产生能力。图 2 可以得出, 受试 12 株乳酸菌在酪胺检测培养基上, 实验前后培养基的颜色未发生变化, 表明试验菌未利用酪氨酸产生酪胺。这与林杨等研究阿克苏地区传统酸乳中 4 株乳酸菌产生物胺的结果相同, 结果阴性。也与刘玉晗等研究产生物胺的能力结果相同, 这说明并非所有的乳酸菌利用相应氨基酸产生生物胺的能力, 这可能源于这些乳酸菌自身缺乏相应的脱羧酶^[18]。

2.3 乳酸菌产偶氮还原酶能力测定结果

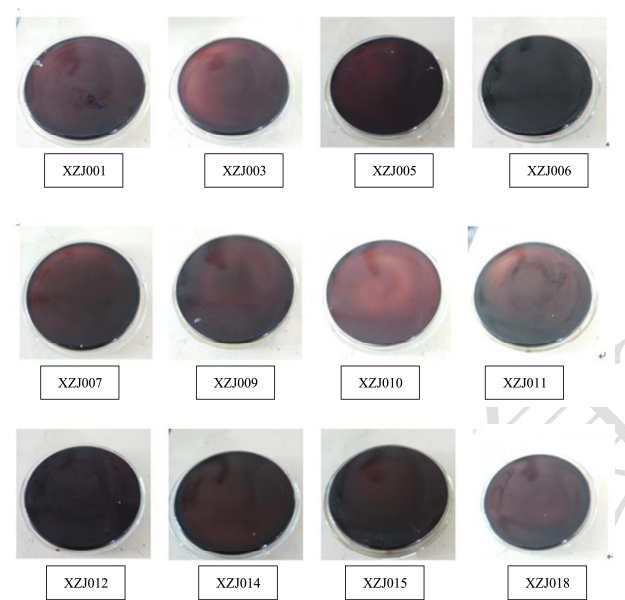


图 3 XZJ001~XZJ018 号试验菌产偶氮还原酶能力检测结果

Fig.3 Test results of azo reductase producing capacity of XZJ001~XZJ018

益生菌可以抑制肠道中某些酶的活性, 如 β -葡萄糖乙酰氧化酶、 β -葡萄糖醛酸酶、尿素酶、硝基还

原酶、偶氮还原酶等, 这些酶可能参与了肠道致癌物的形成。肠道内的偶氮还原酶等能将前致癌物转化为致癌物。因此, 看乳酸菌是否能产生偶氮还原酶是评价乳酸菌的安全性指标之一。图 3 是受试 12 株试验菌产偶氮还原酶能力测定结果。可以看出显示所有培养基均呈紫色, 未出现水解圈, 所有检测结果呈阴性, 说明所有的试验菌没有产偶氮还原酶能力, 有害代谢物质见表 3。

表 3 XZJ01~XZJ18 产有害代谢物检测结果分析

Table 3 Analysis of detection results of harmful metabolites produced by XZJ01~XZJ18

菌株编号	组胺	酪胺	偶氮还原酶
XZJ01	-	-	-
XZJ03	-	-	-
XZJ05	-	-	-
XZJ06	-	-	-
XZJ07	-	-	-
XZJ09	-	-	-
XZJ10	-	-	-
XZJ11	-	-	-
XZJ12	-	-	-
XZJ14	-	-	-
XZJ15	-	-	-
XZJ18	-	-	-

注: 阳性结果表示“+”, 阴性结果表示“-”。

2.4 乳酸菌 API 鉴定及 16S rDNA 鉴定

2.4.1 乳酸菌 API 鉴定

API 50 CH (REF50300) 是用于乳酸杆菌和相关菌的鉴定, 选取菌株 XZJ003、XZJ006、XZJ015 用 API 鉴定系统进行鉴定, 其鉴定糖类结果见表 4。

从鉴定的结果来看, XZJ003、XZJ015、XZJ006 均为副干酪乳杆菌, 其副干酪乳杆菌的相似性分别为 99.4%、99.9%、99.4%。

表 4 酵素中微生物的 API 鉴定结果

Table 4 API 50 CH fermentation patterns of lactic acid bacteria strains isolated from sugarcane sheaths

序号	项目	菌株 XZJ003	菌株 XZJ015	菌株 XZJ006
1	temoin	-	-	-
2	glycerol	-	-	-
3	erythritol	-	-	-
4	d-arabinose	-	-	-
5	l-arabinose	+	+	+
6	d-ribose	-	-	-
7	d-xylose	-	-	-
8	d-adonitol	-	-	+

续表 4

序号	项目	菌株 XZJ003	菌株 XZJ015	菌株 XZJ006
9	Methyl-d-xylopyranoside	-	-	-
10	d-galactose	+	+	+
11	d-glucose	+	+	+
12	d-fructose	+	+	+
13	d-mannose	+	+	+
14	l-sorbose	-	-	-
15	dulcitol	-	-	-
16	inositol	-	-	-
17	d-mannitol	+	+	+
18	d-sorbitol	+	+	+
19	Methyl-d-mannopyranoside	-	-	+
20	Methyl-d-glucopyranoside	-	-	-
21	N-acetylglucosamine	-	-	-
22	amygdaline	+	+	+
23	arbutine	+	+	+
24	Esculine citrate de fer	+	+	+
25	salicine	+	+	+
26	d-celiobiose	+	+	+
27	salicine	+	+	+
28	D-celibiose	+	+	+
29	d-maltose	+	+	+
30	d-lactose	+	+	+
31	d-melibiose	+	+	+
32	d-saccharose	+	+	+
33	d-trehalose	+	+	+
34	inuline	-	-	-
35	d-melezitose	-	-	-
36	d-rafinose	-	-	-
37	amidon	-	-	-
38	glycogene	-	-	-
39	xylitol	-	+	+
40	gentiobiose	+	+	+
41	d-turanose	-	-	-
42	d-lyxose	+	+	+
43	d-tagatose	-	-	-
44	d-fucose	-	-	-
45	l-fucose	-	-	-
46	d-arabitol	-	-	-
47	l-arabitol	+	+	+
48	GNT	-	-	-
49	Potassium 2-cetogluconate	-	-	-
50	Potassium 5-cetogluconate	-	-	-
51	T 值	0.69	0.69	0.93
52	相似性	99.4%	99.9%	99.4%

2.4.2 XZJ015 菌株的 16S rDNA 鉴定结果

为了进一步验证试验的种属,选取试验 XZJ015 进行分子鉴定,菌株扩增的 16S rDNA 序列在 GenBank 中进行 BLAST 同源性比对,结果发现 XZJ015 与副干酪乳杆菌同源性达 99% 以上,将测得 XZJ015 的序列构建系统发育树如图 4 所示。可以看出分离纯化得到的菌株和副干酪乳杆菌聚类在同一分支上,具有高度同源性。综合上述结果 XZJ015 鉴定为副干酪乳杆菌。

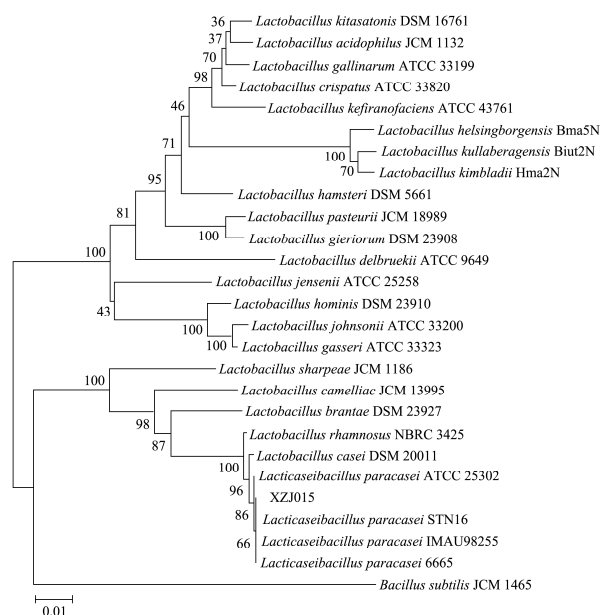


图 4 基于 16S rDNA 序列的系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences

3 结论

本文从酵素中分离出来 60 株乳酸菌,通过抑菌活性的研究,得到 12 株抑菌活性较好的乳酸菌菌株。通过菌体形态和生理生化鉴定以及 API 鉴定确定 XZJ003、XZJ006、XZJ010、XZJ015 确定为副干酪乳杆菌,选取 XZJ015 进行 16s rDNA 分子鉴定证实为副干酪乳杆菌。

受试的 12 株菌株对阪崎大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌以及宋内志贺氏菌具有较强的抑菌效果。受试的菌株发酵液的抑菌效果大于上清液的抑菌效果,但上清液的抑菌效果仍有较强的抑菌效果,12 株受试菌株发酵液对阪崎大肠杆菌的抑菌圈直径在 15~23 mm 内,与大多数抑菌圈直径在 15 mm 以上。12 株受试菌株的发酵液和上清液对鼠伤寒沙门氏菌具有较好抑菌效果,发酵液对鼠伤寒沙门氏菌的抑菌圈直径为 14~22 mm,上清液对鼠伤寒沙门氏菌的抑菌圈直径 14~20 mm。12 株受试菌株发酵液和上清液对宋内志贺氏菌的具有抑菌效果,较好的前六株菌分别 XZJ011 > XZJ003 > XZJ005 > XZJ010 > XZJ007 > XZJ001, 它

们的抑菌圈分别为 16.10、16.08、15.11、15.09、14.12 mm,其他 6 株菌对宋内志贺氏菌的抑菌圈直径均大于 12 mm。受试 12 株乳酸菌的发酵上清液和发酵液对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均具有较强的抑菌能力,发酵液的抑菌效果几乎好于上清液的抑菌效果,这可能说明除了上清液中分泌有抑菌物质外,这些乳酸菌可能对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌起拮抗作用。乳酸菌对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径在 18~24 mm 范围内,且不同菌株对同一种指示菌、同一株菌株对不同指示菌的抑菌效果不一样,没有显著的差异。检测乳酸菌代谢产物毒性包括是否产偶氮还原酶和生物胺是评价乳酸菌安全性指标之一,从酵素源中分离较好抑菌性能的 12 株乳酸菌均未产生组胺、酪胺和偶氮还原酶,具有安全性。

综上所述,分离出来的乳酸菌在具有较强抑菌特性和安全性,为乳酸菌开发为优质益生性发酵剂都具有较大意义。

参考文献

- [1] Yang Z A, Xu M A, Li Q A, et al. The beneficial effects of polysaccharide obtained from persimmon (*Diospyros kaki* L.) on the proliferation of *Lactobacillus* and gut microbiota [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 182: 1874-1882.
- [2] Koppinger M P, Lopez-Pier M A, Skaria R, et al. *Lactobacillus reuteri* attenuates cardiac injury without lowering cholesterol in low-density lipoprotein receptor-deficient mice fed standard chow [J]. American Journal of Physiology, 2020, 319(1 Pt. 2): 32-41.
- [3] Vos P D, Mujagic Z, Haan B D, et al. *Lactobacillus plantarum* strains can enhance human mucosal and systemic immunity and prevent NSAID induced reduction in T regulatory cells [J]. Frontiers in Immunology, 2017, 8: 1-18.
- [4] Aarti C, Khusro A, Varghese R, et al. *In vitro* studies on probiotic and antioxidant properties of *Lactobacillus brevis* strain LAP2 isolated from Hentak, a fermented fish product of North-East India [J]. LWT - Food Science and Technology, 2017, 86: 438-446.
- [5] Ge Q, Ge P, Jiang D, et al. A novel and simple cell-based electrochemical biosensor for evaluating the antioxidant capacity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Chinese dry-cured ham [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2018, 99: 555-563.
- [6] Sanni A. Binding capacities and antioxidant activities of *Lactobacillus plantarum* and *Pichia kudriavzevii* against

- cadmium and lead toxicities [J]. *Biological Trace Element Research*, 2021, 199(2): 779-791.
- [7] 陈倩,李永杰,扈莹莹,等.传统发酵食品中微生物多样性与风味形成之间关系及机制的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2021,42(9):412-419.
- [8] 马冰涛,范恩帝,李泽霞,等.老白干香型白酒制曲过程中微生物多样性及其与风味成分的关系[J]. *食品与发酵工业*, 2020,46(16):7-16.
- [9] 张海燕,康三江,袁晶,等.苹果酵素自然发酵工艺优化及品质分析[J]. *中国酿造*,2020,39(10):145-151.
- [10] 谢东东,张楠,孙英淇.不同种类水果酵素发酵特性及抗氧化特性的比较[J]. *河南工业大学学报(自然科学版)*,2022, 43(1):35-41.
- [11] 李悦,张云娟,赵叶,等.复合水果酵素发酵过程中理化特性及抗氧化活性分析[J]. *食品工业*,2022,43(12):138-142.
- [12] 李佳宇.共轭亚油酸产生菌的益生性及安全性研究[D].呼和浩特:内蒙古工业大学,2016.
- [13] 凌代文.乳酸菌分类鉴定及实验方法[M].北京:中国轻工业出版社,1999.
- [14] 袁先铃,周莺茹,郑连强,等.酸菜中乳酸菌生长曲线、产酸性能及抑菌性能探究[J]. *食品研究与开发*,2022,43(14):199-203.
- [15] 张会生,熊涛.三株乳酸菌的鉴定及益生性能[J]. *南昌大学学报(理科版)*,2019,43(4):336-341.
- [16] 段超.泡菜中植物乳杆菌的筛选及其功能性初步研究[D].南昌:南昌大学,2015.
- [17] 刘晶,王建昌,孙文菊,等.芬兰传统发酵乳制品 viili 中乳酸菌的分离鉴定及其抑菌性的研究[J]. *食品工业科技*,2015, 36(5):181-184,193.
- [18] 刘玉晗,卢士玲,陆静,等.乳酸菌中生物胺氧化酶菌株的筛选[J]. *现代食品科技*,2016,32(4):106-113.