

一株产细菌素乳酸菌的分离、鉴定及生物学特性研究

Isolation, identification and biological characteristics of a bacteriocin-producing lactic acid bacteria strain isolated from fermented soybean processing wastewater

尹乐斌^{1,2} 张臣飞¹ 孙菁¹ 孔小婷¹ 夏秋良¹

YIN Le-bin^{1,2} ZHANG Chen-fei¹ SUN Jing¹ KONG Xiao-ting¹ XIA Qiu-liang¹

周新星¹ 杜燕¹ 赖晗¹ 赵良忠^{1,2}

ZHOU Xin-xing¹ DU Yan¹ LAI Han¹ ZHAO Liang-zhong^{1,2}

(1. 邵阳学院生物与化学工程系, 湖南 邵阳 422000; 2. 湖南省豆制品加工技术基础研究基地, 湖南 邵阳 422000)

(1. Department of Biological and Chemical Engineering, Shaoyang University, Shaoyang, Hunan 422000, China; 2. Soybean Processing Techniques of the Application and Basic Research Base in Hunan Province, Shaoyang, Hunan 422000, China)

摘要:从豆制品工厂自然发酵的豆清蛋白发酵液中分离得到一株产细菌素的乳酸菌, 编号为 NLB-3。通过排除发酵液中有有机酸、过氧化氢对指示菌的抑菌作用, 及抑菌物质的蛋白酶稳定性试验, 初步确定菌株 NLB-3 的抑菌物质为细菌素。结合菌株 NLB-3 的菌落及菌体形态、生理生化特征及 16S rDNA 测序结果, 初步将其鉴定为乳杆菌属 NLB-3 (*Lactobacillus* sp. NLB-3)。菌株 NLB-3 的生物学特性表明, 该菌株最适生长温度为 35 °C, 菌株在该温度下发酵 16 h 后菌液 pH 低至 3.45, 菌株 NLB-3 有较广的盐耐受范围, 当 NaCl 浓度大于 10% 时, 菌株的生长受到明显抑制。

关键词:豆清蛋白; 发酵液; 细菌素; 乳杆菌属

Abstract: A bacteriocin-producing lactic acid bacteria strain designated as NLB-3 was isolated from natural fermentation broth of a soybean plant. By excluding the disturbances of organic acids and H₂O₂ to antibacterial activity of indicator bacteria, and after the fermentation broth protein stability analysis, the antibacterial substance was determined as bacteriocin. On the basis of the colonies, cells morphology, dissolved calcium circle, physiological and biochemical characteristics, strain NLB-3 was preliminary identified as *Lactobacillus*

sp.. The biological characteristics of strain NLB-3 showed that, its optimum growth temperature was at 35 °C, after 16 hours fermentation, the pH value reached 3.45 and it had a wider range of salt tolerance, but when the NaCl concentration was greater than 10%, and the growth of this strain was significantly inhibited.

Keywords: soy bean serofluid protein; fermented soybean processing wastewater; bacteriocin; *Lactobacillus* sp.

乳酸菌 (*Lactobacillus*) 是一类能够发酵糖类且主要产物为乳酸的革兰氏阳性微生物的总称, 其广泛分布在自然界中的各个角落, 在奶制品、乳制品、发酵食品等均有分布^[1-3]。乳酸菌的代谢产物包括有机酸、乳链菌肽 Nisin (细菌素) 及过氧化氢等化合物, 能抑制食品腐败微生物及病原菌的生长^[4-6], 从而防止腐败, 延长食品的货架期。科研工作者已从不同生境中分离得到了大量的对病原微生物具有抑菌作用的乳酸菌^[7-9], 其抑 (杀) 菌可通过单一的代谢产物如细菌素、有机酸、过氧化氢等, 以及所生产的酶如溶酶体酶和蛋白酶共同起作用^[9]。乳酸菌产生的细菌素是一类具有抑菌活性的多肽、蛋白质或复合物的次级代谢产物, 对亲缘关系较近的微生物具有较强的抑菌活性^[10], 细菌素可作为抗竞争分子、生物膜的信号分子阻碍病原菌入侵微生物群落, 一般只对产细菌素亲缘关系较近的细菌有毒害作用^[11], 是一种具有潜在开发能力的天然食品防腐剂^[12-15]。因此, 分离、筛选高产广谱细菌素乳酸菌仍然是国内外研究的热点, 具有重要的理论和实践意义。

豆清蛋白发酵液, 俗称酸浆、黄浆水, 是豆制品生产过程中的废水经过自然发酵而成, 是一种传统的天然豆腐凝固

基金项目: 豆制品加工技术湖南省应用基础研究基地项目 (编号: 2013TP4068); 湖南省大学生研究性学习和创新性实验计划项目 (编号: 湘教通 [2014] 248 号); 湖南省研究生科研创新项目 (编号: CX2015B604); 邵阳学院研究生创新性试验项目 (编号: CX2014SY005)

作者简介: 尹乐斌, 男, 邵阳学院讲师, 博士。

通讯作者: 赵良忠 (1962-), 男, 邵阳学院教授, 硕士。

E-mail: sys169@163.com

收稿日期: 2015-11-01

剂^[16-17]。豆清发酵液点浆豆腐不仅质地细腻、持水性好,而且乳酸菌发酵产生的有机酸及蛋白酶等物质还增加了豆腐独特风味,并保持了良好的组织状态,深受广大消费者欢迎。目前,有关豆清蛋白发酵液的研究主要集中在其再利用及产酸发酵条件优化^[18-21],有关利用豆清蛋白发酵产乳酸菌细菌素相关研究还未见报道。本研究拟从传统的豆制品企业的豆清发酵液中分离筛选产细菌素的乳酸菌,并对其初步鉴定及相关生物学特性研究,旨为其进一步开发利用提供试验依据,对充分挖掘豆清蛋白自然发酵液中的乳酸菌资源具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 样品来源

豆腐点浆所用豆清自然发酵液(pH 3.45)采集于湖南省恭兵食品有限公司豆制品生产车间,4℃保存备用。

1.1.2 指示菌

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)保存于邵阳学院生物与化学工程系果蔬清洁加工实验室。

1.1.3 培养基、试剂

MRS培养基:酵母膏 5 g,牛肉膏 5 g, MgSO₄ 0.6 g,葡萄糖 15 g,胰蛋白胨 5 g,无水醋酸钠 4 g,柠檬酸三铵 1.5 g,吐温-80 0.15 g, MnSO₄ 0.2 g,琼脂 10 g, ddH₂O 定容至 1 000 mL, pH 调至 6.0;

发酵培养基:MRS 液体培养基(不含琼脂);

指示菌培养基为 LB 培养基;

过氧化氢酶(2 000 U/mg)、胰蛋白酶(1 000 U/mg)、胃蛋白酶(100 U/mg)、蛋白酶 K(50 U/mg):成都格雷西化学技术有限公司;

乙酸、乳酸等其他生化试剂为常用分析纯。

1.1.4 主要仪器设备

数码显微镜:BA301 型,麦克奥迪实业有限公司;

电热恒温培养箱:HPX-9272 MBE 型,上海博迅实业有限公司;

全温摇床:IS-RDD3 型,美国精骐有限公司;

pH 计:EL20 型,梅特勒-托利多国际贸易上海有限公司;

高速冷冻离心机:VELOCITY18R 型,驭铭实业有限公司;

细菌过滤器:Durapore™ 0.22 μm 型,美国 Millipore 公司;

冰箱:BCD-579WE 型,青岛海尔有限公司。

1.2 方法

1.2.1 产细菌素乳酸菌的分离、筛选 对采集保存的豆清蛋白自然发酵液(pH 3.45)经滤纸过滤悬浮大颗粒物后,用灭菌 ddH₂O 稀释到适当梯度,取 1 mL 稀释液涂布在含 1% CaCO₃的 MRS 平板上,待平板吸收稀释液后,于 37℃倒置平板培养 2~3 d,观察培养基颜色、菌落形态及溶钙圈变化。

挑取溶钙圈大,培养基变黄的菌落,按照上述的方法反复划线纯化 3~5 次,用灭菌的牙签挑取单菌落接种于 MRS 液体培养基静置发酵 24 h,发酵液于 4℃下 10 000 r/min 离心 10~15 min,用牛津杯法^[22]检测上清液对指示菌的抑菌活性,将有抑菌活性的菌株编号并保藏备用。

1.2.2 产细菌素乳酸菌的确认

(1) 有机酸抑菌作用的排除:对上述分离保藏的菌株活化后,按 2%接种量接种于 MRS 液体培养基,在 37℃下静置发酵 24 h,发酵液于 4℃下 10 000 r/min 离心 10~15 min,收集上清液并分别调 pH 至 6.0,以 pH 6.0 乳酸及乙酸的 MRS 培养基为对照,检测其对指示菌的抑菌活性,测定抑菌圈直径。重复 3 次,求平均值。

(2) H₂O₂ 抑菌作用的排除:将菌株发酵上清液 pH 调至 7.0,按体积比 1:1 的比例加入 0.5 mg/mL H₂O₂ 酶液,37℃恒温处理 120 min,测定其对指示菌的抑菌活性,选用未经 H₂O₂ 酶处理的上清液为对照。

(3) 抑菌物质的酶稳定性:发酵液中抑菌物质对胰蛋白酶、胃蛋白酶及蛋白酶 K 的稳定性参照张小美等^[23]的方法,稍加改进,将菌株发酵上清液加入等体积的 2 mg/mL 的蛋白酶母液并调节 pH(胰蛋白酶 pH 5.5、胃蛋白酶 pH 2.5 及蛋白酶 K pH 7.5),37℃恒温处理 120 min 后,统一调 pH 至 7.0,测定其对指示菌的抑菌活性。

1.2.3 产细菌素乳酸菌的鉴定 观察平板上生长的单菌落形态、颜色、质地,菌落表面是否干燥、平滑或褶皱等特征试验参照文献^[24]⁷⁹⁷⁻⁸⁰⁸;菌体经过革兰氏染色后在光学显微镜下观察革兰氏染色结果,并测量大小、菌体形态、有无芽孢及排列方式等特征试验参照文献^[25]²⁶⁷⁻²⁷⁰;菌株的生理生化特性相关试验参照文献^[26]⁸⁻¹³。将菌株提取的 DNA 提交给上海美吉生物医药科技有限公司进行 16S rDNA 测序,并在 NCBI 在线数据库进行比对分析,综合以上试验结果,对产细菌素乳酸菌进行初步鉴定。

1.2.4 产细菌素乳酸菌的生物学特性

(1) 生长曲线的测定:对 1.2.1 分离保藏的菌株经过活化后,按上述接种量接种于 MRS 发酵培养基中,于 37℃培养箱静置发酵 24 h,期间每隔 2 h 取样,测定发酵液 OD_{600 nm} 值,绘制菌株的生长曲线。

(2) 最适生长温度的测定:对 1.2.1 分离保藏的菌株经过活化后,按上述接种量接种于 MRS 发酵培养基中,分别置于 15,25,35,45,55℃培养箱中静置发酵 24 h 后,取样前摇匀,分别测定不同温度下 24 h 发酵液 OD_{600 nm} 值,确定菌株的最适生长温度。

(3) 发酵 pH 变化动态:对 1.2.1 分离保藏的菌株经过活化后,按上述接种量接种于 MRS 发酵培养基中,于上述最适生长温度下静置发酵 24 h,期间每隔 2 h 取样,分别测定发酵液 pH 值,绘制菌株的发酵 pH 变化曲线。

(4) 对盐的耐受性:对 1.2.1 分离保藏的菌株经过活化后,按上述接种量接种于 MRS 发酵培养基中(添加 4.0%,6.0%,8.0%,10.0%,12.0%氯化钠),于上述最适生长温度下静置发酵 24 h 后,摇匀并取样,分别测定不同盐浓度的发

醇液 $OD_{600\text{ nm}}$ 值,确定菌株对盐的耐受浓度。

2 结果与分析

2.1 产细菌素乳酸菌的筛选

经过平板反复划线分离,从豆清发酵液中筛选出 6 株具有明显溶钙圈的乳酸菌菌株,利用牛津杯法检测上清液对指示菌的抑菌活性和产细菌素的鉴定,得到一株对所有指示菌都有较好抑菌效果的菌株,编号为 NLB-3,作为进一步研究的目标菌。

2.2 菌株 NLB-3 发酵液中抑菌物质的确定

除细菌素外,乳酸菌的其他发酵产物如有机酸、过氧化氢等会对抑菌作用产生干扰。由表 1 可知:pH 6.0 的乳酸和乙酸对指示菌均无抑菌作用,而 pH 6.0 的发酵液的抑菌圈大小与原发酵液差异不明显,说明在排除有机酸抑菌作用后,发酵液中还存在其他抑菌物质; H_2O_2 酶处理菌株 NLB-3 发酵液后,其抑菌大小比原发酵液抑菌圈大小略有减少,但差异不明显,表明发酵液中除 H_2O_2 外还存在其他抑菌物质;发酵液经 Millipore 细菌过滤器除去菌株 NLB-3 细胞后,发现其不含细胞的发酵液的抑菌圈大小与对照相比没有差别,说明菌株 NLB-3 对这 3 种指示菌均无抑菌作用;菌株 NLB-3 发酵液分别经过蛋白酶 K、胰蛋白酶及胃蛋白酶处理后,抑菌活性消失,表明发酵液中该抑菌物质对蛋白酶 K、胰蛋白酶、胃蛋白酶均非常敏感,可初步确定该抑菌物质具有蛋白质特性,是一种细菌素。

表 1 菌株 NLB-3 发酵液中抑菌物质的确定[†]

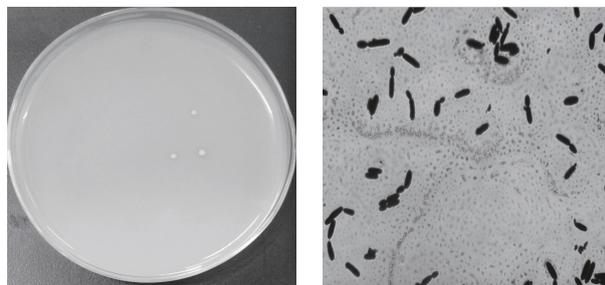
Table 1 Antibacterial substance determination from strain NLB-3's fermentation broth ($n=3$)

样品	抑菌圈直径/mm		
	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌	枯草芽孢杆菌
pH 6.0 的发酵液	19.5±0.28	17.3±0.38	14.6±0.27
pH 6.0 乳酸	—	—	—
pH 6.0 乙酸	—	—	—
发酵液 H_2O_2 酶处理	18.2±0.31	14.8±0.24	13.3±0.52
发酵液细菌过滤器处理	20.8±0.25	18.1±0.46	15.5±0.33
发酵液胰蛋白酶处理	—	—	—
发酵液胃蛋白酶处理	—	—	—
发酵液蛋白酶 K 处理	—	—	—
发酵上清液原液	21.3±0.36	18.4±0.43	15.6±0.26

† “—”表示无抑菌作用。

2.3 菌株的鉴定

2.3.1 菌落及菌体形态特征 菌株 NLB-3 在 MRS 培养基上 37 °C 培养 24 h,呈乳白色,不透明的小菌落,圆形,微微隆起,乳白色,表面光滑,有光泽,菌落边缘整齐,有较大的溶钙圈,无色素,兼性厌氧生长。菌体革兰氏阳性,形态多样,呈杆状或双链杆状、无芽孢、无鞭毛、无荚膜,不运动,不形成内生芽孢,约(0.6~0.9) μm ×(1.4~6.0) μm (见图 1)。菌株 NLB-3 的菌落及菌体形态符合文献[26]⁶⁻¹⁶中有关乳酸菌典型菌落特征的描述。



(a) 菌株 NLB-3 菌落形态

(b) 菌株 NLB-3 菌体形态



(c) 菌株 NLB-3 溶钙圈

图 1 菌落、菌体形态及菌株溶钙圈

Figure 1 The colonies, cells morphology and its dissolved calcium circle of strain NLB-3

2.3.2 菌株 NLB-3 的生理生化特性 结合文献[24]⁸⁰¹⁻⁸⁰²、[25]²⁶⁹⁻²⁷⁰和[26]⁸⁻¹³对菌株 NLB-3 进行生理生化试验,结果见表 2。

表 2 菌株 NLB-3 的生理生化特性[†]

Table 2 The biochemical and physiological characteristics of strain NLB-3

项目	结果	项目	结果
接触酶	—	乳糖	+
明胶	—	麦芽糖	+
吲哚	—	蔗糖	+
甲基红	+	水杨苷	—
H_2S	—	甘露醇	—

† “+”阳性;“—”阴性。

2.3.3 菌株 NLB-3 的分子鉴定 菌株 NLB-3 的 16S rDNA 测序结果为 1 314 bp,通过 NCBI 在线的 Blast 比对分析,与菌株 NLB-3 同源性达 99% 的菌株分别为:*Lactobacillus hamsteri* strain IMAU70022 (Genebank 登录号 GQ131138)、*Lactobacillus* sp. HG209 (Genebank 登录号 JN983820)、*Lactobacillus amylolyticus* strain TUST016 (Genebank 登录号 KC456630),均为乳杆菌属(*Lactobacillus*)。结合菌株 NLB-3 的菌落及菌体形态、生理生化特征及 16S rDNA 测序结果,初步将该产细菌素微生物鉴定为乳杆菌属,并命名为乳杆菌属 NLB-3 (*Lactobacillus* sp. NLB-3)。

2.4 菌株 NLB-3 生物学特性研究

2.4.1 菌株 NLB-3 生长曲线 菌株 NLB-3 的生长曲线见图 2。由图 2 可知,菌株 NLB-3 的延滞期为 4 h,该时期活菌数量基本无变化;随后进入对数生长期,活菌数呈对数增加;16 h 后进入稳定期,该时期也是活菌数最高时期;20 h 后则

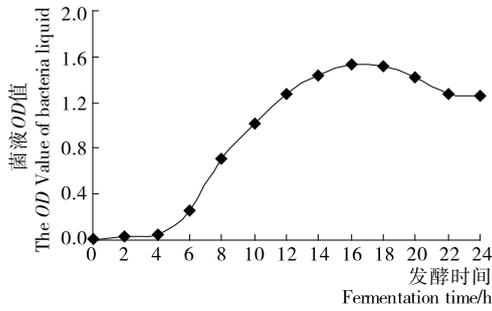


图2 菌株 NLB-3 的生长曲线

Figure 2 The growth curve of strain NLB-3

为衰亡期,活菌数呈下降趋势。

2.4.2 菌株 NLB-3 最适生长温度 温度是影响微生物生长繁殖最重要的因素之一,因此菌株 NLB-3 最适生长温度的确定,可为更好地利用该菌株提供依据。由图 3 可知,菌株 NLB-3 最适生长温度效应呈“钟型”曲线变化,其最适生长温度为 35℃。低于 35℃,菌液 OD 值随温度的增加而增加;当高于 35℃ 菌液 OD 值随温度的增加而降低。

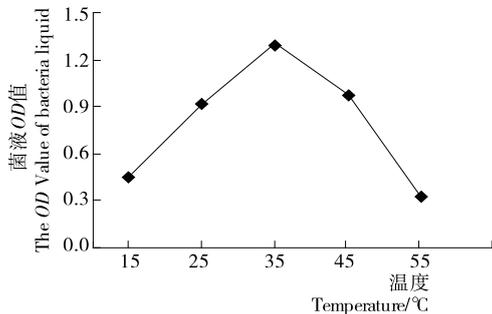


图3 菌株 NLB-3 的最适生长温度

Figure 3 The optimal growth temperature of strain NLB-3

2.4.3 菌株 NLB-3 发酵 pH 菌株 NLB-3 在最适温度下静置发酵 pH 变化曲线见图 4。由于延滞期的原因,菌株在培养前 4 h 的 pH 几乎无变化(图 4);6 h 后随着菌株进入对数生长期,菌液 pH 曲线急剧下降;菌株发酵 16 h 后菌液 pH 低至 3.45。

2.4.4 菌株 NLB-3 对盐的耐受性 由图 5 可知,菌株 NLB-3 有较广的盐耐受范围。当培养基中 NaCl 浓度低于 8% 时,其对菌株 NLB-3 生长的影响不明显,而当培养基中 NaCl 浓度大于 8% 时,菌株 NLB-3 生长受到一定程度的抑制,NaCl 浓度越高,菌株 NLB-3 生长受到的抑制越明显。

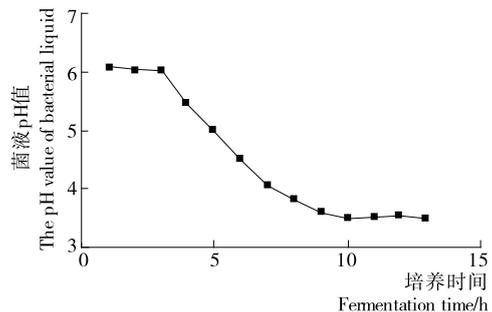


图4 菌株 NLB-3 发酵产酸

Figure 4 pH variation curve of strain NLB-3

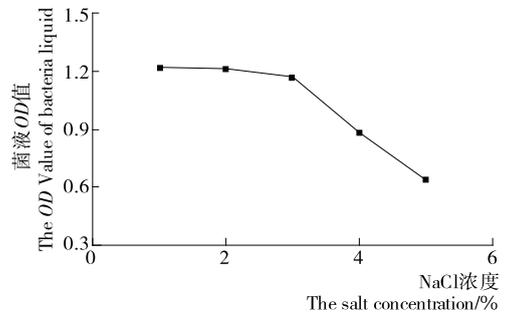


图5 菌株 NLB-3 对盐的耐受性

Figure 5 Salt stress tolerance of strain NLB-3

3 结论

本研究从传统豆制品企业的豆清自然发酵液中分离筛选产细菌素的乳酸菌,扩大了产细菌素乳酸菌的来源。通过排除发酵液中有有机酸、过氧化氢对指示菌的抑菌作用及抑菌物质的蛋白酶稳定性试验,初步确定菌株 NLB-3 的抑菌物质为细菌素。结合菌株 NLB-3 的菌落及菌体形态、生理生化特征及 16S rDNA 测序结果,初步将其鉴定为乳杆菌属 (*Lactobacillus* sp.)。菌株 NLB-3 的生物学特性表明,该菌株最适生长温度为 35℃,菌株在该温度下发酵 16 h 后菌液 pH 低至 3.45,菌株 NLB-3 有较广的盐耐受范围,当 NaCl 浓度大于 10% 时,菌株的生长受到明显抑制。本试验对菌株的生长曲线、最适生长温度及初始盐浓度等生物学特性的研究可为其进一步发酵开发提供理论依据,并对充分挖掘豆清蛋白发酵液的乳酸菌资源及豆制品企业废水的再利用研究均具有重要意义,下一步拟对该菌的发酵条件进行优化,为提高细菌素的深入研究提供依据。

参考文献

- [1] 刘素纯, 胡茂丰, 李宗军. 自然发酵肉制品中乳酸菌的分离及特性研究[J]. 食品与机械, 2006, 22(2): 62-65.
- [2] 刘书亮, 敖灵, 李燮昕, 等. 传统腌腊肉制品中乳酸菌的筛选与鉴定[J]. 食品与机械, 2007, 23(5): 14-16.
- [3] 巨晓英, 韩焯, 周志江. 自然发酵泡菜中乳酸菌的分离鉴定[J]. 食品与机械, 2008, 24(5): 29-31.
- [4] De Souza Barbosa M, Todorov S D, Ivanova I, et al. Improving safety of salami by application of bacteriocins produced by an autochthonous *Lactobacillus curvatus* isolate[J]. Food Microbiol, 2015, 46: 254-262.
- [5] Barbosa M S, Todorov S D, Jurkiewicz C H, et al. Bacteriocin production by *Lactobacillus curvatus* MBSa2 entrapped in calcium alginate during ripening of salami for control of *Listeria monocytogenes*[J]. Food Control, 2015, 47: 147-153.
- [6] Ghanbari M, Jami M, Kneifel W, et al. Antimicrobial activity and partial characterization of bacteriocins produced by lactobacilli isolated from *Sturgeon* fish[J]. Food Control, 2013, 32(2): 379-385.
- [7] Hwanhlem N, Jaffrès E, Dousset X, et al. Application of a nisin Z-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KT2W2L isolated from brackish water for biopreservation in cooked, peeled and ionized tropical shrimps during storage at 8℃ under modified atmosphere packaging[J]. Eur. Food. Res. Technol., 2015, 240(6): 1 259-1 269.

表 4 加和指数法评价重金属混合体系的联合毒性

Table 4 Toxicity evaluation of heavy metals mixture based on the additive index method

混合体系	S 值	AI 值	评价
$Pb^{2+} + Cd^{2+}$	0.148	5.757	协同作用
$Cd^{2+} + Hg^{2+}$	2.564	-1.564	拮抗作用
$Pb^{2+} + Hg^{2+}$	1.903	-0.903	拮抗作用
$Pb^{2+} + Cd^{2+} + Hg^{2+}$	3.746	-2.746	拮抗作用

3 结论

本试验以明亮发光杆菌为受试生物,分别通过等毒性单位法与加和指数法研究了食品中 Pb^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 3 种重金属的二元、三元混合体系的联合毒性,两种方法所得结果一致,即 $Pb^{2+} + Cd^{2+}$ 的联合毒性作用方式为协同作用; $Cd^{2+} + Hg^{2+}$ 、 $Pb^{2+} + Hg^{2+}$ 、 $Pb^{2+} + Cd^{2+} + Hg^{2+}$ 联合毒性作用方式均为拮抗作用,说明使用该方法评价有毒物质的联合毒性是准确的。

参考文献

- [1] 杨肖娥,余剑东,倪吾钟,等. 农业环境质量与农产品安全[J]. 中国农业科技导报, 2002, 4(4): 3-10.
- [2] Kelly C J, Tumsaroj N, Lajoie C A. Assessing wastewater metal toxicity with bacterial bioluminescence in bench-scale wastewater treatment system[J]. Water Research, 2004, 38(2): 423-431.
- [3] 吴淑杭,凌云,赵瑜,等. 生物发光法在农产品安全性检测中的应用前景[J]. 农业环境科学学报, 2006, 25(增刊): 421-424.
- [4] 李林茂,赖泽锋,李苏宁,等. 利用斑马鱼胚胎初步评价单壁碳

纳米管的生物毒性[J]. 广西医科大学学报, 2013, 30(3): 332-336.

- [5] 季静,肖斌,李杨,等. 两种不同剂型毒死蜱对四种环境生物毒性评价[J]. 农业环境科学学报, 2010, 29(9): 1 681-1 686.
- [6] 穆希岩. 苯醚甲环唑对斑马鱼毒性及作用机制研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2015: 30-32.
- [7] 周斯芸. 利用鱼类等水生生物进行毒性评价研究[D]. 大连: 大连理工大学, 2014: 28-38.
- [8] Prakash J, Mimalakhandan N, Sun B, et al. Toxicity of binary mixtures of organic chemicals to microorganisms[J]. Water Research, 1996, 30(6): 1 459-1 463.
- [9] 李真,苗晶晶,潘鲁青. 6 种重金属的发光菌毒性效应及其海洋生物物种敏感度分析[J]. 海洋环境科学, 2015, 34(2): 176-183.
- [10] 卢俊荣. 生物毒性检测技术在农产品检测中的应用研究[J]. 莆田学院学报, 2011, 18(2): 74-77.
- [11] 吴淑杭,周德平,徐亚同,等. 重金属汞、镉和铬对明亮发光杆菌的生物毒性[J]. 农业环境科学学报, 2011, 30(12): 2 446-2 450.
- [12] 张亚辉,刘征涛,刘树深. 混合物联合毒性的评价方法[C]//中国毒理学会环境与生态毒理专业委员会成立大会论文集. 北京: 中国毒理学会, 中国环境科学研究院, 2008: 481-486.
- [13] Fulladosa E, Murat J C, Martinez M, et al. Effect of pH on arsenate and arsenide toxicity to luminescent bacteria (*Vibrio fischeri*) [J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2004, 46(2): 176-183.
- [14] 熊蔚蔚,吴淑杭,徐亚同,等. 等毒性配比法研究镉、铬和铅对淡水发光细菌的联合毒性[J]. 生态环境, 2007, 16(4): 1 085-1 087.
- [15] 王银秋,张迎梅,赵东芹. 重金属镉、铅、锌对鲫鱼和泥鳅的毒性[J]. 甘肃科学学报, 2003, 15(1): 35-38.

(上接第 15 页)

- [8] Saraiva M A F, Nes I F, Baracat-Pereira M C, et al. Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* PD6. 9[J]. Journal of Microbiology and Antimicrobials, 2014, 6(5): 79-87.
- [9] Pasteris S E, Pingitore E V, Ale C E, et al. Characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* CRL 1584 isolated from a *Lithobates catesbeianus* hatchery[J]. World J. Microbiol Biotechnol, 2014, 30(3): 1 053-1 062.
- [10] 吴清平,黄静敏,张菊梅,等. 细菌素的合成与作用机制[J]. 微生物学通报, 2010, 37(10): 1 519-1 524.
- [11] Desriac F, Defer D, Bourgougnon N, et al. Bacteriocin as weapons in the marine animal-associated bacteria warfare: inventory and potential applications as an aquaculture probiotic [J]. Mar Drugs, 2010, 8(4): 1 153-1 177.
- [12] 陈兵,田波,原韬,等. 酸菜发酵液中抑菌物质的提取与鉴定[J]. 食品与机械, 2011, 27(5): 123-125.
- [13] 孔保华,迟玉杰. Nisin 在大豆制品保鲜中的应用[J]. 食品与机械, 1997(2): 28-29.
- [14] 贺家亮,秦翠丽,康怀彬,等. 乳酸链球菌素在食品工业中的应用[J]. 食品与机械, 2004, 20(4): 61-63.
- [15] 丛建民. Nisin 在草莓保鲜中的应用研究[J]. 食品与机械, 2008, 24(2): 131-133.

- [16] 王凤翼,季瑛. 乳酸菌发酵豆乳最佳条件探讨[J]. 食品与机械, 1995(4): 14-15.
- [17] 于章龙,刘楚怡,李永歌,等. 酸浆豆腐中菌种抗高温损伤保护剂的研究[J]. 食品科技, 2010(7): 5-8.
- [18] 熊卫东,卫军. 利用豆渣、黄浆水发酵生产曲酸的研究[J]. 食品研究与开发, 2004, 25(4): 52-57.
- [19] 陈则华,李理. 利用大豆黄浆水的发酵研究[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(3): 42-46.
- [20] 刘平,李晓峰,谭新敏. 利用大豆黄浆水发酵生产维生素 B₁₂ 的工艺探索[J]. 陕西科技大学学报: 自然科学版, 2004, 21(4): 83-85.
- [21] 于海峰,徐国华,卢松,等. 酸浆中嗜酸乳杆菌在豆腐废水发酵中的条件研究[J]. 发酵科技通讯, 2011, 40(1): 21-23.
- [22] 刘冬梅,李理,杨晓泉,等. 用牛津杯法测定益生菌的抑菌活力[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(3): 110-111.
- [23] 张小美,楼秀玉,顾青. 1 株产细菌素乳酸菌的鉴定和细菌素的分离纯化[J]. 中国食品学报, 2013, 13(12): 181-187.
- [24] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组,译. 北京: 科学出版社, 1984.
- [25] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [26] 凌代文,东秀珠. 乳酸菌的分类鉴定及实验基础[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.