

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

Isolation, identification and growth characteristics of a strain of lactic acid bacteria with efficient antimicrobial activity

徐云凤 张 欣 褚泽军

XU Yun-feng ZHANG Xin CHU Ze-jun

张 萌 张 敏 陈俊亮

ZHANG Meng ZHANG Min CHEN Jun-liang

(河南科技大学食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471023)

(College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology,
Luoyang, Henan 471023, China)

摘要:从内蒙古地区家庭自制的酸菜中分离筛选了一株具有高效抑菌活性的乳酸菌,并对其生长特性进行了测定。经菌落形态观察、生理生化鉴定及 16S rDNA 序列分析,该菌株被鉴定为植物乳杆菌。该菌株对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌均有良好的抑菌效果,抑菌圈直径分别为 15.5, 14.5 mm。生长曲线测定结果表明,菌株生长约 8 h 时, $OD_{600\text{ nm}}$ 值开始迅速增大,进入对数生长期;8~24 h 时, pH 值下降速度较快,为产酸的主要时期。综上,从酸菜中分离筛选出的乳酸菌具有高效抑菌作用,在发酵食品的生产 and 食品防腐保藏等领域具有潜在的应用价值。

关键词:发酵食品;乳酸菌;抑菌;16S rDNA;生长曲线

Abstract: A strain of lactic acid bacteria with high antibacterial activity was isolated from home-made sauerkraut in Inner Mongolia, and its growth characteristics were determined. The strain was identified as *Lactobacillus plantarum* by colony morphology observation, physiological and biochemical identification and 16S rDNA sequence analysis. This strain had good antibacterial effects on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* with the diameters of inhibition zone of 15.5 and 14.5 mm, respectively. The results of growth curve showed that the $OD_{600\text{ nm}}$ value began to increase rapidly when the strain grew to about 8 h, and

entered the logarithmic growth phase; the pH value decreased rapidly from 8 to 24 h, which was the main period of acid production. In conclusion, the lactic acid bacteria isolated from the pickled Chinese cabbage have high antibacterial effect and have potential application value in the production of fermented food and food preservation.

Keywords: fermented food; lactic acid bacteria; antibacterial; 16S rDNA; growth curve

乳酸菌在自然界中分布广泛,在各种传统发酵食品,尤其是酸菜中,常成为优势菌群^[1]。乳酸菌在发酵过程中能够产生乳酸、醋酸、甲酸等有机酸,降低环境体系的 pH 值,从而抑制多种食品腐败菌和致病菌的生长;此外,乳酸菌的其他代谢产物,如细菌素也具有抑菌作用^[2]。鉴于乳酸菌的广谱抑菌特性以及多种抑菌机理,其已成为开发微生物源天然防腐剂的潜在菌种^[3]。目前,关于分离自发酵乳制品^[4]、肉制品^[5]和发酵蔬菜^[6]等食品材料中乳酸菌多样性的研究日益增多,但筛选出性能优良的菌株仍是一项重要的工作。研究拟从内蒙古地区家庭自制的酸菜中分离筛选乳酸菌,进行初步鉴定及生长特性研究,并探讨其对多种常见病原微生物的抑菌作用,从而筛选出具有高效抑菌作用的菌株,为其进一步在发酵食品的生产 and 食品防腐保藏剂的开发等领域的应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 主要材料与试剂

酸菜样品:家庭自制酸菜,取回后置于 4 °C 冰箱备

基金项目:国家自然科学基金青年项目(编号:31601450);河南科技大学博士科研启动基金项目(编号:13480067);河南科技大学大学生研究训练计划(编号:2019170)

作者简介:徐云凤,女,河南科技大学讲师,博士。

通信作者:陈俊亮(1982—),男,河南科技大学副教授,博士。

E-mail: junliangchen@126.com

收稿日期:2020-08-30

用,内蒙古包头市;

金黄色葡萄球菌 ATCC 25923、大肠杆菌 ATCC 25922;河南科技大学食品与生物工程学院微生物实验室保存;

MRS 琼脂、MRS 肉汤、胰蛋白胨大豆琼脂(TSA)培养基:北京陆桥技术股份有限公司;

甘油、碳酸钙:分析纯,天津德恩化学试剂有限公司;

酸度计校正液:天津市科密欧化学试剂有限公司;

HBI 乳酸菌生化鉴定条:青岛海博生物技术有限公司;

Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒、引物、Taq Plus DNA 聚合酶、SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒:生工生物工程(上海)有限公司;

细菌滤膜:0.22 μm 孔径,上海密粒膜分离技术有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

电子天平:JY1002 型,上海上天精密仪器有限公司;

紫外—可见分光光度计:WFJ7200 型,尤尼柯(上海)仪器有限公司;

恒温培养箱:PYL-45 型,天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司;

洁净工作台:SW-CJ-IF 型,常州普天仪器制造有限公司;

冷冻离心机:HC-2518R 型,安徽中科中佳科学仪器有限公司;

高压蒸汽灭菌锅:BFGJ-23 型,青岛化工仪器设备有限公司;

普通光学显微镜:BA210 型,麦克奥迪实业集团有限公司;

PCR 仪:Veriti 96 孔型,美国应用生物系统公司(ABI);

电泳仪:DYY-6C 型,北京六一仪器厂;

酸度计:PHS-25 型,杭州雷磁分析仪器厂。

1.2 试验方法

1.2.1 乳酸菌的分离纯化 取适量的酸菜样品于无菌生理盐水中,震荡摇匀后,进行 $10^{-3} \sim 10^{-1}$ 的梯度稀释,各吸取 0.1 mL 至 MRS 平板(含 1% 碳酸钙)上^[7],用涂布棒涂布均匀,37 °C 恒温培养 24 h。培养结束后,用肉眼观察菌落形态,挑取疑似乳酸菌的单菌落转接至新的 MRS 平板上,37 °C 恒温培养 24 h,重复操作 3~4 次,直至同一平板上长出的细菌菌落形态一致,且无杂菌生长。将纯化后的菌株保存于 20% 甘油—MRS 液体培养基中,冻存备用。

1.2.2 菌株生理生化特征测定 对菌株进行革兰氏染色和显微观察,参照《伯杰氏细菌鉴定手册》和 GB 4789.35—2016,结合乳酸菌生化鉴定试剂盒操作说明,进行碳水化合物(七叶苷、纤维二糖、麦芽糖、甘露醇、水杨苷、山梨醇、蔗糖、棉子糖、菊糖和乳糖)反应测定^[8]。

1.2.3 基于 16S rDNA 的菌株鉴定

(1) 基因组 DNA 的提取:参照 DNA 抽提试剂盒说明书。

(2) PCR 扩增:以菌株的基因组 DNA 为模板,采用通用引物对 16S rDNA 进行 PCR 扩增。引物序列为 27F:5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3',1492R:5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'。反应条件为 95 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s;57 °C 复性 30 s;72 °C 延伸 90 s,30 次循环;72 °C 延伸 8 min。

(3) 琼脂糖凝胶电泳:使用浓度为 1.5% 的琼脂糖凝胶,以 $1 \times$ TAE 为电泳缓冲液,将 PCR 扩增产物进行电泳检测,电泳条件为 150 V,100 mA,20 min。

(4) 测序结果分析:菌种测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。16S rDNA 序列在 NCBI 数据库上进行序列比对分析,利用 MEGA 6.0 软件按邻近算法(Neighbor-Joining),自展值(bootstrap)为 1 000,构建系统发育树,进行系统发育分析^[9]。

1.2.4 抑菌试验

(1) 指示菌平板的制备:用接种环分别挑取金黄色葡萄球菌和大肠杆菌在 TSA 培养基上进行活化,37 °C 培养 24 h,挑取部分单个菌落于无菌生理盐水中,测定吸光度值,调节 $OD_{600\text{ nm}}$ 值至 0.5,加入无菌生理盐水稀释 100 倍(含菌量约为 10^6 CFU/mL),吸取 100 μL 于 TSA 培养基上涂布均匀后,放置牛津杯。

(2) 乳酸菌代谢产物的制备:将保存的菌种接种至 MRS 琼脂平板上进行活化,挑取单菌落于 MRS 肉汤培养基中,37 °C 静置培养 48 h。8 000 r/min 离心 10 min,收集上清液,经 0.22 μm 孔径细菌过滤器过滤制成无菌滤液,所得无菌滤液即为乳酸菌代谢产物^[10]。

(3) 乳酸菌代谢产物抑菌试验:使用牛津杯法测定抑菌圈大小。向牛津杯(8 mm $\times$ 6 mm $\times$ 10 mm)中加入 200 μL 除菌的乳酸菌上清液,37 °C 培养 24 h,测量抑菌圈直径,结果用平均值 $\pm$ 标准差表示^[11]。指示菌分别为金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 和大肠杆菌 ATCC 25922。

1.2.5 生长曲线和产酸能力测定 将菌株活化后,接种至 MRS 肉汤培养基中培养 48 h,将其 $OD_{600\text{ nm}}$ 值调至 0.5,取 50 μL 加入到 500 mL 无菌新鲜的 MRS 培养基中,37 °C 静置培养,0~24 h 内每间隔 2 h 取样,24~48 h 内每间隔 4 h 取样,测定其在 600 nm 处吸光度值,同时,用 pH 计测定培养基的 pH 值^[12]。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌的筛选、鉴定

由图 1 可知,疑似菌株在 MRS 固体培养基上培养 24 h 后,其菌落形态为圆形、乳白色、有光泽、中间凸起、表面光滑、边缘整齐且有溶钙圈,具有明显的乳酸菌形态学特点^[13];该菌株为革兰氏阳性杆菌,无芽孢和鞭毛。生

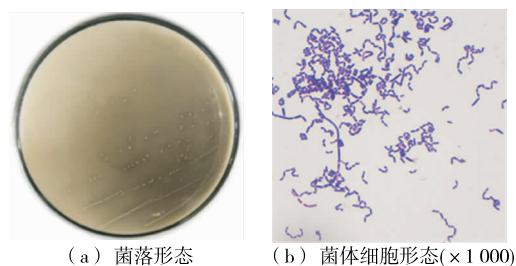


图 1 乳酸菌的菌落和菌体细胞的形态学特征

Figure 1 Morphological characteristics of the colonies and cells of LAB

化鉴定结果表明,其对所测试的 10 种碳水化合物的反应均为阳性。

由图 2 可知,琼脂糖凝胶电泳图上观察到大小约为 1 500 bp 的特异性条带,经测序得到菌株的 16S rDNA 序列长度刚好为 1 500 bp。通过 BLAST 序列同源性比对,与之相似度达 100% 的菌株为植物乳杆菌;取相似度达 100% 的序列和其他乳杆菌的序列共 11 个 16S rDNA 序列,利用 MEGA 6.0 构建系统发育树(见图 3)。由图 3 可知,该乳酸菌与植物乳杆菌处于同一个分支,同源性最高,结合细菌的菌落形态和生理生化特征,该菌株被鉴定为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)。

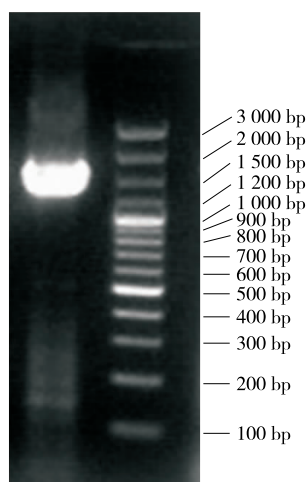


图 2 菌株的 16S rDNA 电泳图

Figure 2 Electrophoresis of 16S rDNA of the strain

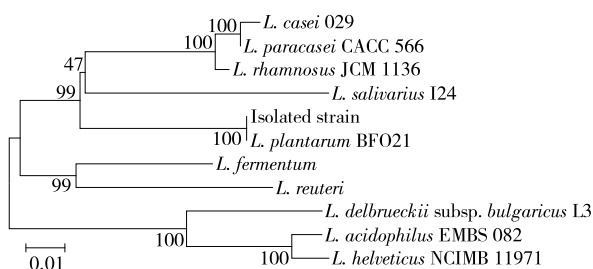


图 3 基于 16S rDNA 序列的系统进化树

Figure 3 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences

2.2 抑菌试验

由图 4 可知,乳酸菌代谢产物上清液对两种指示菌均有良好的抑菌效果,对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌圈平均直径分别为 (15.5 ± 0.3) , (14.5 ± 0.2) mm。一般而言,乳酸菌代谢产物如细菌素,大多仅仅抑制亲缘关系相近的菌种或多数革兰氏阳性细菌^[14]。而试验分离的菌株,不仅对革兰氏阳性菌(金黄色葡萄球菌)有较好的抑菌效果,而且对革兰氏阴性菌(大肠杆菌)同样表现出较强的抑制作用,可能是由于乳酸菌在生长代谢过程中产生了有机酸、过氧化氢或细菌素等物质,通过协同作用有效地抑制了指示菌的生长。

2.3 生长曲线和产酸特性

由图 5 可知,菌株的生长曲线呈典型的“S”型,可以观察到明显的延滞期、对数生长期和稳定期。其延滞期约为 8 h,该时期细菌数量基本无变化;随后进入对数期,此时期生长迅速,分裂旺盛,细菌数呈对数增长;18 h 后,菌体生长进入稳定期。当菌株从接种至培养 8 h 时,pH 值变化很小;当培养 8~24 h 时,pH 值下降速度较快,说明此期间细胞代谢活跃,生长速度加快,细胞繁殖能力强,为产酸的主要时期;从培养第 24 h 开始 pH 值变化趋缓,最低 pH 值为 3.57。

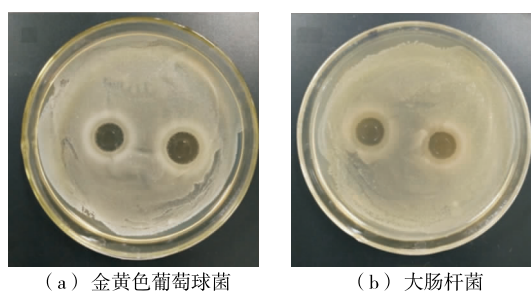


图 4 乳酸菌无细胞培养液对指示菌的抑制效果

Figure 4 Inhibitory effects of the cell-free metabolites supernatant of LAB against indicator bacteria

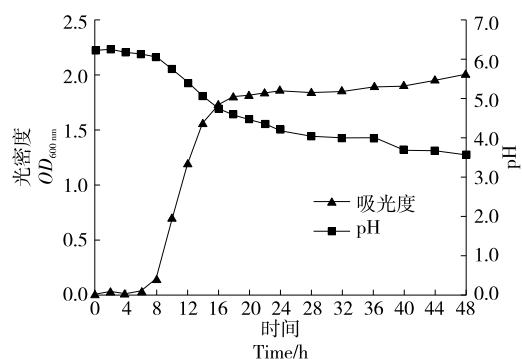


图 5 菌株的生长曲线与产酸曲线

Figure 5 Curves of growth and acid producing of the strain

(下转第 21 页)

- [9] 张端莉, 桂余, 方国珊. 大麦在发芽过程中营养物质的变化及其营养评价[J]. 食品科学, 2014, 35(1): 229-233.
- [10] 朱丽丽, 赵长新, 苏红旭. 大麦和麦芽中酚类物质与抗氧化力关系的研究[J]. 食品科技, 2013, 38(8): 154-158.
- [11] MERGEN F, JOHANSEN T. Effect of ionizing radiation on seed germination and seedling growth of *Pinus Rigida* (mill)[J]. Radiation Botany, 1964, 4(4): 417-427.
- [12] 张凤英, 包海柱, 刘志萍. 钴⁶⁰γ射线对大麦种子的辐射效应[J]. 大麦与谷类科学, 2010, 4(4): 13-15.
- [13] 闵锐. 低剂量/低剂量率电离辐射生物效应[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2014, 32(6): 1-9.
- [14] LI L, STORY M, LEGERSKI R J. Cellular responses to ionizing radiation damage[J]. International Journal of Radiation Oncology Biology Physics, 2001, 49(4): 1 157-1 162.
- [15] ARENA C, MICCO V, MAIO A. Growth alteration and leaf biochemical responses in *Phaseolus vulgaris* exposed to different doses of ionising radiation [J]. Plant Biology, 2014, 1(6): 194-202.
- [16] SUZUKI K, KODAMA S, WATANABE M. Extremely low-dose ionizing radiation causes activation of mitogen-activated protein kinase pathway and enhances proliferation of normal human diploid cells[J]. Cancer Research, 2001, 61(14): 5 396-5 401.
- [17] MOCCO V, DURANTE M, PIGNALSA D. Effects of sparsely and densely ionizing radiation on plants[J]. Radiation and Environmental Biophysics, 2011, 50(1): 1-19.
- [18] SUN Yi, HU Da-wei, LI Liang, et al. Influence mechanism of low-dose ionizing radiation on *Escherichia coli* DH5α population based on plasma theory and system dynamics simulation [J]. Journal of Environmental Radioactivity, 2016, 15(1): 185-192.
- [19] MANDA K, KAVANAGH J, BUTTLER D, et al. Low dose effects of ionizing radiation on normal tissue stem cells[J]. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 2014, 76(1): 6-14.
- [20] 姚文龙, 平雪良, 胡大华. 高压脉冲电场同轴处理室的仿真优化[J]. 食品与机械, 2015, 31(3): 82-86.
- [21] BRADLFORD M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1): 248-254.
- [22] MARIE A, ESNAULT F, LEGUE C. Ionizing radiation: Advances in plant response[J]. Environmental and Experimental Botany, 2010, 68(3): 231-237.
- [23] ERNEST C. HAMMOND J, KEVIN B, et al. Germination, growth rates, and electron microscope analysis of tomato seeds flown on the LDEF[J]. Radiation Measurements, 1996, 26(6): 851-861.
- [24] KOVACS K. Effect of gamma and UV-B/C radiation on plant cells[J]. Micron, 2002, 33(2): 199-210.
- [25] MORRIS P. Integrative plant anatomy [J]. New Phytologist, 2001, 152(2): 178-187.

(上接第 14 页)

3 结论

从内蒙古地区家庭自制的酸菜中分离得到了一株乳酸菌,经生理生化鉴定和 16S rDNA 序列同源性分析,该菌株被鉴定为植物乳杆菌;抑菌试验表明,该菌株的代谢产物对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌均有良好的抑制效果;菌株在适宜条件下培养 8 h 后进入对数生长期和产酸的主要时期。试验仅探讨了分离菌株的抑菌效果,关于抑菌物质成分与其生物学性质的相关研究,以及具体的作用机理有待进一步阐释。

参考文献

- [1] 刘巧, 罗强, 张明, 等. 利用 16S rDNA 分析不同地区传统发酵泡菜的细菌多样性[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(22): 91-97.
- [2] 宝冠媛. 酸马奶中产抑菌活性物质乳酸菌的筛选、鉴定及抑菌物质特性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2015: 1-4.
- [3] GAO Zhen-hong, DALIRI B E, WANG Jun, et al. Inhibitory effect of lactic acid bacteria on foodborne pathogens: A review[J]. Journal of Food Protection, 2019, 82(3): 441-453.
- [4] 张和平. 自然发酵乳制品中乳酸菌的生物多样性[J]. 生命科学, 2015, 27(7): 837-846.
- [5] 云月英, 许铭, 王文龙, 等. 自然发酵肉制品中乳酸菌的筛选[J]. 肉类研究, 2017, 31(6): 19-23.
- [6] 高兆建, 黄亮浩, 丁飞鸿, 等. 源自泡菜的植物乳杆菌产新型广谱抑菌细菌素的特性分析[J/OL]. 食品科学. (2020-04-27) [2020-12-30]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20200427.1437.006.html>.
- [7] 尹乐斌, 张臣飞, 孙菁, 等. 一株产细菌素乳酸菌的分离、鉴定及生物学特性研究[J]. 食品与机械, 2016, 32(3): 12-15, 64.
- [8] 马长路, 焦梦丽, 罗红霞, 等. 传统东北酸菜中乳杆菌的分离鉴定及其降胆固醇特性研究[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(21): 209-213.
- [9] 孙杰, 姜杰, 冯彬斌, 等. 一株产细菌素乳酸菌的筛选及其细菌素特性研究[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(9): 48-52.
- [10] 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): 5 779-5 785.
- [11] 刘绒梅, 田圆圆, 耿琦, 等. 四川稻城传统干酪中乳酸菌的分离鉴定及功能研究[J]. 中国测试, 2017, 43(12): 58-62.
- [12] 吴燕, 伏二伟, 桑学财, 等. 传统浆水中乳酸菌的筛选及抑菌性能分析[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(22): 42-48.
- [13] 王小娜, 宋达峰, 顾青. 产细菌素乳酸菌的鉴定及其特性研究[J]. 中国食品学报, 2011, 11(3): 181-186.
- [14] 刘晓蓉, 范瑞, 朱美娟. 产类细菌素乳酸菌筛选及类细菌素的特性[J]. 中国乳品工业, 2009, 37(6): 8-12.