

分类号:

学 号: 2013406022

密 级:

单位代码: 10759

# 石河子大学

## 硕士学位论文



### 新疆地区干酪中产细菌素乳酸菌的筛选、系统发育 及其抑菌活性研究

学 位 申 请 人

杨尚娇

指 导 教 师

倪永清(教授)

申请学位门类级别

专业硕士

学 科 、 专 业 名 称

农业推广硕士

研 究 方 向

食品加工与安全

所 在 学 院

食品学院

中国·新疆·石河子

2015年5月

分类号：

密 级：

学 号：2013406022

单位代码：10759

# 石河子大学

## 硕士学位论文



### 新疆地区干酪中产细菌素乳酸菌的筛选、系统发育 及其抑菌活性研究

学 位 申 请 人

杨尚娇

---

指 导 教 师

倪永清(教授)

---

申请学位门类级别

专业硕士

---

学 科、专 业 名 称

农业推广硕士

---

研 究 方 向

食品加工与安全

---

所 在 学 院

食 品 学 院

---

中国·新疆·石河子

2015 年 5 月

**Bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated  
from traditional cheeses in XinJiang as potential  
bio-control agents in food:isolation, screening and  
phylogeny**

A Dissertation Submitted to  
**Shihezi University**  
In Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of  
**Master of Agriculture**

By  
**Yang Shang-jiao**  
(Food Processing and Security)

**Dissertation Supervisor:Prof. Ni Yong-qing**

**May,2015**

## 学位论文独创性声明

本人所呈交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：杨尚娇

时间：2015年6月8日

## 学位论文版权授权书

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：杨尚娇

时间：2015年6月8日

导师签名：倪自清

时间：2015年6月8日

## 摘要

**目的:** 乳酸菌作为食品加工过程中应用最为广泛的微生物,在食品工业中拥有非常重要的地位。研究表明,在贮藏食品中使用乳酸菌作为天然防腐剂能大大提高食品的安全性,乳酸菌作为益生菌抑制腐败菌和食源性病原体的生长,不仅对食品贮藏过程中食品原料的营养品质的保证、货架期的延长做出了重要的贡献,而且在抑制腐败菌的同时还可以保留食品感官品质。乳酸菌细菌素被称为“生物食品保鲜剂”,其优势在于无毒、无抗药性、无副作用、无残留,能够取代化学防腐剂和抗生素在食品生产过程中的使用,在食品保鲜领域具有巨大的开发应用价值。因此,筛选得到优质的产细菌素乳酸菌开发应用作为生物保鲜剂,并对细菌素进行分离纯化、深入研究其生物学特性很有研究价值。

**方法:** 本研究采集新疆地区伊犁、昭苏、巩留、新源、可可托海等地的牧民自制干酪为样品,通过传统培养方法采用五种选择培养基,包括 MRS 琼脂培养基、乳酸杆菌选择性培养基、M17 培养基、胆汁七叶灵苷叠氮钠培养基和 Elliker 琼脂培养基分离干酪中可培养乳酸菌并测序研究其系统多样性。采用琼脂扩散法中的牛津杯法从乳酸菌中初步筛选产细菌素的菌株并对其所产细菌素进行生物学特性的研究,为开发乳酸菌及乳酸菌素作为生物保鲜剂奠定一定的理论和实践基础。

**结论:** 1.通过传统分菌方法利用选择性培养基一共分离获得 285 株纯培养物,初步筛选后得到 202 株革兰氏染色阳性并且过氧化氢酶阴性的疑似乳酸菌菌株,基于分离纯培养物的 16S rDNA 部分基因序列进行分析,发现 163 株菌株属于乳酸菌。由系统发育分析可知,163 株乳酸菌分别隶属于 *Enterococcus*、*Lactobacillus*、*Lactococcus*、*Weissella* 和 *Streptococcus* 五个属,其中 *Enterococcus* 属为优势菌群,占到乳酸菌的 62%。

2.初筛得到 75 株菌株对李斯特菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌具有不同程度的抑制作用。排除有机酸干扰和过氧化氢的影响后,试验结果显示,其中仍有 12 株乳酸菌菌株对李斯特菌具有显著的抑制作用;酶处理后发现,12 株乳酸菌发酵上清液的抑菌活性急剧下降甚至消失,其发酵上清液中可能存在细菌素或其他抑菌肽成分,这 12 株乳酸菌可能为产细菌素乳酸菌。

3.挑选其中 2 株对四种指示菌都具有显著抑菌活性的产细菌素的广谱高效乳酸菌菌株 *Enterococcus* sp. KKTHD-13 和 *Lactococcus* sp.ZS5-11,进一步探究其产细菌素的生物学特性,研究结果显示,这两株乳酸菌的发酵上清液在 60℃~100℃ 范围内依然具有抑菌活性,具有较好的热稳定性;乳酸菌发酵上清液在 pH2~9 内都显示出抑菌活性,具有相对比较宽的抑菌 pH 范围;经不同蛋白酶处理后,两株乳酸菌都丧失其抑菌活性,具有较高的安全性,取代化学类食品添加剂应用于食品保鲜是乳酸菌生物保鲜剂的发展趋势。

**关键词:** 乳酸菌;细菌素;系统发育多样性;生物学特性

## Abstract

**Aim:** Lactic acid bacteria were widely used in the food processing as microbe, they have a very important position in the food industry. Studies have shown that lactic acid bacteria as a natural preservative used in the food storage can improve the safety of food. Lactic acid bacteria can inhibit the growth of pathogens as probiotics. They not only made a contribution to the storage of raw materials, guarantee the nutritional quality, extension of shelf life, but also inhibiting microorganism to keep the food quality. Bacteriocin known as the “biological food preservative”, it is non-toxic, no resistance, no side effect, no residue which can replace chemical preservatives and antibiotics in food production, bacteriocin has great application value in the food preservation field. Therefore, screening and purification of high quality producing-bacteriocin lactic acid bacteria as biological preservatives, it has a highly research value.

**Method:** This sample was collected from cheese made by herders in YiLi, ZhaoSu, GongLiu, XinYuan, KeKeTuoHai of XinJiang region. By dependent-culture method, lactic acid bacteria were isolated using five media including MRS, Lactobacillus selective medium, M17, Bile esculin sodium azide medium, Elliker and sequencing the diversity of phylogeny. Using agar diffusion method of Oxford cup to screen the producing-bacteriocin lactic acid bacteria, studying the biological characterization of bacteriocin, studying on lactic acid bacteria and bacteriocin as preservative for some theoretical and practical basis.

**Conclusion:** 1. Isolated the 285 strains by selective media. By preliminary screening, 202 presumptive lactic acid bacteria were gram positive and catalase negative, based on the sequence analysis of 16S rRNA, 163 strains were belonged to lactic acid bacteria which included 5 genus: *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Weissella* and *Streptococcus* was predominant strain in which 62% of total proportion.

2. 75 strains had a different degree to inhibit the *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis*, *E. coli* and *Staphylococcus aureus*. Excluding the effect of organic acid and hydrogen peroxide, the result shows 12 strains still had a clear impact on inhibiting the *Listeria monocytogenes*. After enzyme treatment, the 12 bacteriostatic activity of supernatant fell sharply even disappeared, the fermented supernatant may exist the bacteriocin or other antimicrobial peptide composition, 12 strains could be producing -bacteriocin lactic acid bacteria.

3. Selected the strain *Enterococcus* sp. KKTHD-13 and *Lactococcus* sp. ZS5-11, which had significant antimicrobial activity to four indicator strains. According to the further explore the biological characteristics of its, the study has shown that two supernatant still had activity at 60°C-100°C. They had a better thermal stability; supernatant had a relative wide antibacterial pH range (2-9); By different enzyme treatment, two strains lost the antibacterial activity, they had the high security, it is the trend that replaced the chemical food additives used in the food preservation as the biological preservative.

**Key words:** Lactic acid bacteria, Bacteriocin, Phylogenetic diversity, Biological characteristics

# 目 录

摘要.....	I
Abstract .....	II
目 录.....	III
缩略词表.....	VI
第一章 文献综述.....	VI
1.1 乳酸菌概况.....	1
1.1.1 乳酸菌分类.....	1
1.1.2 乳酸菌的抑菌作用.....	2
1.2 乳酸菌细菌素概况.....	2
1.2.1 乳酸菌细菌素定义.....	2
1.2.2 乳酸菌细菌素分类.....	3
1.2.3 细菌素的抑菌机理.....	5
1.3 生物保护剂的开发利用.....	5
1.3.1 乳酸菌生物保护剂抑制真菌.....	5
1.3.2 细菌素生物保护剂.....	7
1.4.国内外乳酸菌细菌素的研究进展.....	7
1.4.1 国外研究现状.....	7
1.4.2 国内研究现状.....	9
1.5 展望.....	9
1.6 研究内容.....	11
1.7 立题意义.....	11
第二章 新疆地区传统干酪中乳酸菌多样性研究.....	12
2.1 引言.....	12
2.2 实验材料.....	12
2.2.1 样品来源.....	12
2.2.2 药品和试剂.....	12
2.2.3 实验主要仪器.....	13
2.2.4 培养基.....	13
2.3 实验方法.....	14
2.3.1 乳酸菌分离、纯化与保藏.....	14
2.3.2 奶酪乳酸菌的生长特性.....	14
2.3.4 干酪中可培养乳酸菌 16S rRNA 系统发育分析.....	15
2.3.5 乳酸菌生理生化鉴定.....	16
2.4 结果与分析.....	18

2.4.1 新疆干酪中可培养乳酸菌菌落形态.....	18
2.4.2 分离菌株最适生长温度测定.....	19
2.4.3 干酪中可培养乳酸菌多样性分析.....	20
2.4.4 干酪中可培养乳酸菌生理生化分析.....	23
2.5 本章小结.....	24
第三章 干酪中产细菌素乳酸菌的筛选.....	26
3.1 引言.....	26
3.2 实验材料.....	26
3.2.1 乳酸菌菌株来源.....	26
3.2.2 主要试剂.....	26
3.2.3 培养基.....	26
3.3 实验方法.....	26
3.3.1 菌种的活化.....	26
3.3.2 乳酸菌发酵液制备.....	26
3.3.3 指示菌悬液的制备.....	26
3.3.4 具有抑菌活性乳酸菌初步筛选.....	27
3.3.5 产细菌素乳酸菌复筛.....	27
3.4 结果与分析.....	27
3.4.1 产细菌素乳酸菌的初筛结果.....	27
3.4.2 产细菌素乳酸菌菌株复筛结果.....	30
3.5 本章小结.....	32
第四章 乳酸菌 <i>Enterococcus</i> sp. KKTHD-13 和 <i>Lactococcus</i> sp.ZS5-11 产细菌素的生物学特性研究.....	33
4.1 引言.....	33
4.2 实验材料.....	33
4.2.1 菌株来源.....	33
4.2.2 主要试剂和仪器.....	33
4.2.3 培养基.....	33
4.3 实验方法.....	33
4.3.1 产细菌素乳酸菌代表菌株的鉴定.....	33
4.3.2 温度对细菌素抑菌活性的影响.....	34
4.3.3 pH、表面活性剂对细菌素抑菌活性的影响.....	34
4.3.4 酶对细菌素活性的影响.....	34
4.3.5 乳酸菌细菌素活性测定.....	34
4.4 结果与分析.....	35
4.4.1 代表菌株表型特性和系统发育分析.....	35

4.4.2 温度对细菌素抑菌活性的影响.....	36
4.4.3 pH、酶、表面活性剂对细菌素活性的影响.....	38
4.3.5 乳酸菌细菌素活性.....	38
4.5 本章小结.....	39
第五章 结论与展望.....	40
5.1 结论.....	40
5.2 展望.....	40
5.3 本研究的不足和有待进一步研究的问题.....	41
参考文献.....	42
致 谢.....	46
作者简介.....	47

缩略词表

序号	缩写	英文全称	中文全称
1	MRS	de Man, Rogosa and Sharp	人名命名培养基
2	PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
3	MR	methyl red	甲基红
4	EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid	乙二胺四乙酸
5	SDS	sodium dodecylsulfate	十二烷基硫酸钠
6	CTAB	cetyltrimethyl ammonium bromide	溴化十六烷基三甲基铵
7	LB	lysogeny broth	溶菌肉汤
8	DMSO	dimethyl sulphoxide	二甲基亚砷
9	Elliker	Elliker Broth Lactobacilli Broth	肉汤培养基
10	V-P	Voges-Proskauer test	伏普二氏试验
11	OD	optical density	光密度
12	Rep-PCR	repetitive Extragenic Palindromic-PCR	基因组重复序列 PCR 技术
13	rDNA	Ribosome	核糖体 RNA
14	CFU	Colony-Forming Units	菌落形成单位

# 第一章 文献综述

## 1.1 乳酸菌概况

### 1.1.1 乳酸菌分类

乳酸菌的明确定义至今为止依然不够清晰,所以大多数乳酸菌的特征描述经常会出现例外。对于广义乳酸菌的定义是:乳酸菌(Lactic acid bacteria, 简称 LAB)是一类可发酵酸性碳水化合物(主要指葡萄糖)以产生乳酸为主要代谢产物的无芽孢的革兰氏阳性过氧化氢酶阴性菌的通称。属于厌氧或者兼性厌氧微生物,在 pH3.0~4.5 的酸性条件下仍然能够生存。遵循以上定义,就将形成芽孢的乳酸菌排除在乳酸菌之外。乳酸菌的典型特征是不能形成卟啉环(非亚铁血红素),这是产生上述定义的基础。由于不能形成卟啉环,而实验室所用的生长培养基中通常缺乏血色素和相关的化合物,因此,当细胞在这种培养基上生长时缺失真正的细胞色素。在这种情况下,对于绝大多数乳酸菌而言,它们无法通过电子转移来获得生长所需的能量,只能依赖于发酵,也就是底物磷酸化作用<sup>[2]</sup>。也有一部分乳酸菌,偶尔会出现由非亚铁血红素所形成的“假触酶”而引起的触酶活性,因此作为乳酸菌鉴定的第一步,缺失细胞色素这一特征可能比通常所用的触酶试验更可靠。

乳酸菌资源在自然界分布十分广泛,具有很强的适应能力,繁殖快并且可以与其它微生物建立起共生关系。乳酸菌主要由乳杆菌属(*Lactobacillus*),乳球菌(*Lactococcus*),链球菌属(*Streptococcus*),明串珠菌属(*Leuconostoc*),片球菌(*Pediococcus*),肠球菌属(*Enterococcus*),双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)等构成。根据乳酸菌发酵终产物的差异将其划分为两大类:同型发酵乳酸菌和异型乳酸发酵。大多数乳酸菌菌株的生长条件发生变化将导致终产物组成的变化,变化的原因很有可能是丙酮酸代谢途径发生转变,或是以氧或其他有机物作为额外电子受体,以氧作为电子受体在呼吸作用或非呼吸作用代谢模式写均可发生<sup>[2]</sup>。

依据以下特征将乳酸菌划分为不同的属:细胞形态、糖发酵模式最是生长温度、发酵的最终产物、高 NaCl 环境的生长能力、耐酸/碱能力等等。乳酸菌的化学分类方法,例如以脂肪酸的成分作为分析内容或者细胞壁成分作为分析内容来划分。最近的分类学,基于基因序列的分析方法也被应用于乳酸菌的分类,这一方法决定了乳酸菌的真正系统发育关系,基于寡核苷酸探针或是 16S rDNA 测序的方法对近期发现的新属进行鉴定,但其中有一些属,尤其是乳杆菌属和片球菌属,与其它发育系统的分支混在一起,与目前基于形态学的分类关系不太一致。随着科学的发展,乳酸菌的鉴定方法由表型分类法逐渐被分子水平上的鉴定方法所代替。

### 1.1.2 乳酸菌的抑菌作用

乳酸菌代谢产物中含有多种抑制有害菌生长的化合物，其中，乳酸菌细菌素是乳酸菌代谢产物中具有蛋白质敏感性的一种活性肽，它具有抑制食品中有害微生物生长繁殖的功能。目前作为食品保鲜剂添加到食品中的有嗜酸乳杆菌、双歧乳杆菌和粪链球菌，它们在饲料工业中也被广泛应用。

近年来，真菌污染引起的食品腐败备受当前食品生产者的关注。文献中关于生物保护剂的研究越来越多，研究表明乳酸菌和它们的抗菌代谢产物具有作为天然防腐剂的潜力，可以有效抑制食品中有害微生物生物生长。为提高食品的安全性，在食品贮藏过程中将乳酸菌及其代谢产物作为生物保鲜剂添加到食品中。在食品行业中，乳酸菌作为益生菌抑制腐败菌和食源性病原体的生长繁殖，在抑制腐败菌的同时保留了食品的感官品质如颜色、风味、口感和营养价值。乳酸菌抗真菌物质分离的研究表明，抗真菌物质中包括有机酸（主要是乳酸和醋酸）、过氧化氢和其它化合物（细菌素和抗真菌多肽类）等，同时应用于食品的抗真菌乳酸菌也在文献中被报道<sup>[3]</sup>。S. Rouse, D. Harnett 等人研究从麦芽谷物中分离出具有抗真菌活性的乳酸菌并且确定乳酸菌在特定食品模型系统中具有抗真菌的能力，对抗真菌化合物的部分特性表明，乳酸菌具有抗菌性是由于产生了抗菌肽<sup>[4]</sup>。在饲料和食品贮藏和运输过程中，添加乳酸菌可以明显的减少霉菌和酵母菌的生长繁殖，以减少以往贮藏和运输过程中的巨大经济损失<sup>[5]</sup>。在食品加工阶段干燥、冷藏、气调保藏、热处理等都需要添加化学添加剂，然而全球食品行业的发展趋势就是需要减少甚至消除化学类添加剂在食品加工过程中的添加。添加生物保鲜剂可以达到对新鲜食品进行最低限度加工的要求，保留即食食品和功能食品的营养物质的要求也能达到。近年来，生物保鲜剂的研究也有很大进展，使生产高质量、高营养和美味的食物和延长货架期、去除安全隐患更少的依赖于人工添加剂。食品生物保鲜剂是指可以延长保质期、增强安全性或控制微生物菌群的抗菌化合物。研究重点是将益生乳酸菌作为安全的食品添加剂。有报道称生物保鲜剂已经成为越来越受欢迎的原因有几个：（1）天然的添加剂可以一定程度上消减安全隐患；（2）最大程度的保留了食品营养和感官特性；（3）降低成本的同时延长食品保质期；（4）对设备和技术的要求较低；（4）并且通过新来源解决新问题，如食物链中抗生素耐药性的增加，可通过自然手段控制新型病原体。乳酸菌的抗菌性与食物有关，乳酸菌作为生物保鲜剂被广泛研究。乳酸菌菌株生长时能产生有机酸，还会产生其他抗菌化合物，可以抑制病原菌和腐败微生物的生长。

## 1.2 乳酸菌细菌素概况

### 1.2.1 乳酸菌细菌素定义

细菌素是由细菌产生的具有抗生素特性，但不与抗生素相同的一类抑菌物质，抗生素可能会使人类发生过敏反应。具有蛋白质性质的细菌素不同于大部分抗生素，细菌素

只具有较为狭窄的抑菌谱，一般作用于同种或近源微生物。细菌素是由核糖体合成的多肽，可以被人类消化道中的蛋白酶迅速消化分解，然而，细菌素在食品中的抑菌谱较窄而且成本较高，因此必须继续发现新的更有效的细菌素来解决这些问题。由于乳酸菌及其产物在多次培养后，对食品并没有不利影响，所以乳酸菌被作为食品保鲜剂的首选资源。从 1953 年开始将细菌素作为通用术语来表示细菌产生的抗菌肽。

细菌素（如大肠杆菌素）最初被定义为具有较窄抑菌谱的蛋白质，可以吸附特定的细胞膜受体。最常见的是小分子的大肠杆菌素具有更广泛的抑菌谱和抑菌模式。科学发展的今天，我们将细菌产生的多肽和蛋白质，称为细菌素。多年来，许多科学家对于细菌素的性质进行了研究，例如 Reeves (1972), Franklin 和 Snow(1975), Hardy (1975), Tagg 等人 (1976), Konisky (1982),Klaenhammer (1988, 1993), Jack 等人(1995), de Vos 等人 (1995), Sahl 等人(1995), Venema 等人(1995, Abee 等人(1995), Nes 等人 (1996), 和 Cleveland (2001)等人。

Nisin 是最早发现并在商业中使用的乳酸菌细菌素(Rogers 1928; De Vuyst and Vandamme 1994), 但是在对乳酸菌研究的 15 年时间里，研究表明，乳酸菌可以在食品中作为生物防腐剂或可以发展为生物防腐剂的克隆载(Klaenhammer 1988)。1953 年以来，Nisin 作为生物保鲜剂被 50 多个国家和地区应用于食品工业中。制备制剂的市场标准是 106IU/g。尽管多种第二类细菌素被证明可以作为合适的生物保鲜剂，但是一直没有得到授予许可证。

在过去的 20 年里，许多具有抑制有害微生物生长性质的细菌素的生物特性和基因特征已经被确定。从 Louis Pasteur 和 Robert Koch 时代开始，人们就有了控制周围环境中有害微生物来减少微生物污染的科学认识。1929 年，Alexander Fleming 发现青霉素开始，打开了在医学中使用抗生素抑制特定特定微生物的大门。虽然抗生素是禁止在食品中使用的，但是利用具有抵抗性的食品添加剂、防腐剂和抗菌素成为了食品保鲜过程中的安全标志。在食品和饮料中添加抗菌素已经成为了食品保存过程中的传统方法。

### 1.2.2 乳酸菌细菌素分类

乳酸菌资源在自然界广泛分布，随着研究的深入，大量的细菌素被发现，因此细菌素的分类也越来越清晰，根据细菌素的蛋白质分子量的大小、热敏感型等等将其划分为不同的种类<sup>[7]</sup>。乳酸菌产生的蛋白质类细菌素抑制剂近年来被分为三个种类，包括羊毛硫抗生素（第一类，如 Nisin）、小分子热稳定肽（第二类，如片球菌素 AcH/PA1）和大分子热不稳定肽（第三类，如乳杆菌素 J）。前两类中大部分细菌素都可以成功的应用于食品工业中抑制微生物，但是只有 Nisin 得到了作为防腐剂应用于食品工业的授权 [11]。

### 1.2.2.1 羊毛硫抗生素

羊毛硫抗生素 (<5kDa), 羊毛硫抗生素是指包含羊毛硫氨基酸、脱氢丙氨酸和脱氢酪氨酸的细菌素。这些细菌素被分为第一类, 进一步根据它们的化学结构和抗菌活动将他们分为 A 型羊毛硫抗生素和 B 型羊毛硫抗生素, 其结构特征为: N 一末端信号肽序列长度为 18~21 个氨基酸, 前导肽链由一个蛋氨酸开始, 并常伴随一个赖氨酸<sup>[8]</sup>, 有活性的细菌素其 N 一末端+1 的位置上通常是赖氨酸或精氨酸<sup>[7]</sup>。A 型羊毛硫抗生素带有正电荷, 通过正电荷在靶细胞膜上形成孔。B 型羊毛硫抗生素是较小的球状肽, 没有电荷, 抗菌活性依赖于特定的酶<sup>[10]</sup>。其中典型的羊毛硫抗菌素的有: nisin (*Lactococcus lactis*, Hurst 1981), lactocin S (*Lactobacillus sake*, Mortvedt and others 1991), epidermin (*Staphylococcus epidermidis*, Allgaier and others 1986), gallidermin (*Staphylococcus gallinarum*, Kellner and others 198), lactacin 481 (*L. lactis* Piard and others 1992), mersacidin (*Bacillus subtilis*, Altena and others 2000)。

### 1.2.2.2 小分子热稳定肽

第二类是小分子热稳定肽(<10 kDa), 不含有羊毛硫氨基酸, 是细菌素最大的类群, 被划分为三组。IIa 型包含共识序列 N 一末端氨基酸序列-Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys; IIb 型活性依赖于两个多肽, 任何一个单独多肽都不具活性<sup>[7]</sup>。Lactacin F 是前者的代表, 后者的代表是 Lactococcin G; IIc 型该类细菌素属于分泌依赖型细菌素, 其前体 N 一端为信号肽序列, 通过 GSP 机制转运, 包括 divergicin A<sup>[9]</sup>。典型第二类细菌素有以下几种:

IIa型: pediocin PA-1/AcH (*Pediococcus acidilactici*, Henderson and others 1992), sakacin A (*L. sake*, Holck and others 1992), sakacin P (*L. sake*, Tichaczek and others 1992), lactococcin, MMFII (*L. lactis*, Ferchichi and others 2001)

IIb型: lactococcin G (*L. lactis*, Nissen-Meyer and others 1992), lactococcin M (*L. lactis*, van Belkum and others 1991), lactacin F (*Lactobacillus johnsonii*, Allison and others 1994), (*L. plantarum*, Jimenez-Diaz and others 1995),

IIc型: acidocin B (*Lactobacillus acidophilus*, Leer and others 1995), carnobacteriocin A (*Carnobacterium piscicola*, Worobo and others 1994), divergicin A (*C. divergens*, Worobo and others 1995)。

### 1.2.2.3 大分子热不稳定肽

第三类细菌素是大分子热不稳定的肽(>30 kDa), 特点是热不稳定的蛋白质, 是较为复杂的细菌素类群, 此类细菌素包括不属于上述任何一种的其它细菌素, 且不需要信号肽或前导肽<sup>[7]</sup>, 是在生化水平上划分出来的一个类群, 抑菌谱较窄。较为典型的几种如下: helveticin J (*Lactobacillus helveticus*, Joerger and Klaenhammer 1986), helveticin V-1829 (*L. helveticus*, Vaughan and others 1992)。

### 1.2.3 细菌素的抑菌机理

#### 1.2.3.1 抑菌机理

抑菌机理 (mode of action) 是指杀菌剂通过影响靶标菌的某些生理生化过程导致了菌体生长受到抑制或是死亡<sup>[9]</sup>。在研究中, 抑菌机理最重要的研究内容是细菌素直接与杀菌剂结合或者相互作用的受体、酶或是其它生物分子的研究, 即细菌素抑菌的作用位点 (target site of action) 的深入研究<sup>[12]</sup>。细胞膜主要是阴离子脂质构成的, 乳酸菌对其的破坏就是在细胞膜上形成孔隙。羊毛硫抗生素可能加剧了对受体细胞的电导率和稳定性的影响, 但是, 第 II 类细菌素明显对于目标受体具有特异性<sup>[13]</sup>。也就是说第 I 类细菌素的抑菌机制是在受体细胞膜上形成孔隙, 造成内外失衡导致受体细胞瓦解; 第 II 类细菌素的抑菌机制是干扰细胞膜的形成。Gravesen 等人在研究 IIa 型细菌素对李斯特氏菌抑制时发现一个特定的识别位点。IIa 型细菌素 pediocin PA-1 和 euocin A 对李斯特氏菌具有抗性, 被分离出来进行深入研究<sup>[14]</sup>。

从常见的突变中研究发现, 所有抗性突变株是一种酶的突变引起的, 甘露糖特异性磷酸依赖性磷酸转移酶, 系统由 54 个转录因子调控。解释是: 对单核细胞增生李斯特氏菌具有抗性的这些细菌素, 和其他革兰氏阳性菌是有关系的, 这一共同的特异性位点没有发生突变<sup>[15]</sup>。Lacticin3147 是由两个部分组成的细菌素, 两部分完全是是具有拮抗活性所必需的, 在革兰氏阳性的靶细胞上用特定离子在膜上形成孔隙。乳酸链球菌素相比其他细菌素往往是一种表面活性阳离子吸附剂, 在吸附到细菌细胞表面时是非常必要的<sup>[16]</sup>。在 Upreti 和 Hinsdill 对细菌素抑菌作用早期的研究中, 细菌素可以吸附敏感和耐药细胞, 从而导致终止合成蛋白质。zajdel 等人 (1985) 发现细菌素 Las 5 对敏感和不敏感的细胞吸附一样好。原生质体的敏感菌株不受 Las 5 的影响, 表明细胞膜受体的细菌需要动力<sup>[17]</sup>。

科学发展的今天, 人们对乳酸菌细菌素的抑菌机理已经取得了显著地成功, 大部分的乳酸菌细菌素是通过在敏感受体菌的细胞膜上形成孔隙, 使胞内的离子流出细胞, 造成细胞内外失衡, 最终引起质子驱动势的耗散<sup>[9]</sup>。然而, 不同种类的乳酸菌细菌素想要达到这一目标的机制都各有差异。

## 1.3 生物保护剂的开发利用

### 1.3.1 乳酸菌生物保护剂抑制真菌

在食品工业中, 使用食品保鲜剂是增强食品安全和延长货架期的一项常用手段。目前研究使用的食品保鲜剂一般分两大类, 一类是化学保鲜剂, 另一类为生物保鲜剂<sup>[18]</sup>。化学保护剂, 已有报道硝酸盐和乳酸盐的抗 *Listeria sp.* 特性, 这些物质对人体是有害的或者会破坏食品的口感品质, 应用起来缺点较多。因此, 将乳酸菌细菌素作为生物保鲜剂是未来食品工业发展的趋势。为了延长食品保质期, 在食品加工阶段需要进一步处理,

干燥、冷藏、气调保藏、热处理等，也有部分需要添加化学添加剂，然而全球食品行业的发展趋势之一就是需要消除化学添加剂和防腐剂的使用<sup>[19]</sup>。食品生物保护剂近年来一直是研究热点。添加生物保护剂可以达到对新鲜食品进行最低限度加工的要求，保留即食食品和功能食品的营养物质的要求也能达到<sup>[20]</sup>。近年来，生物保护剂的研究也有很大进展，使生产高质量、高营养和美味的食物和延长货架期、去除安全隐患更少的依赖于人工添加剂<sup>[21]</sup>。

真菌是引起新鲜蔬菜变质的主要原因，真菌导致新鲜蔬菜和饲料数量损失，质量下降。除了巨大的经济损失，毒素的存在也造成了食品安全隐患。由于蔬菜在土壤中成长和收获，蔬菜中存在大量的腐败微生物。在运输过程中使用适当的保存方法（化学保护剂或生物保护剂）就可以减少蔬菜变质、减少真菌毒素在蔬菜中的残留。抗真菌乳酸菌可以减少真菌引起的变质腐败，从而可以作为生物保护剂应用于蔬菜保质期的延长<sup>[22]</sup>。

有报道称生物保护剂已经成为越来越受欢迎的原因有几个：天然的添加剂来保存食品，减少安全隐患；对食品营养和感官特性的影响较小；它可以降低成本，同时延长食品保质期；它不需要先进的设备和技术，因此不发达国家也可以使用；并且通过新来源解决新问题，如食物链中抗生素耐药性的增加，可通过自然手段控制新型病原体。乳酸菌的抗菌性与食物有关，乳酸菌作为生物保护剂被广泛研究。乳酸菌菌株处理能产生有机酸，还会产生其他抗菌化合物。乳酸菌的生长，发酵糖产酸，降低生长环境的 pH 值，代谢产物可以抑制病原菌和腐败微生物的生长。这些工作主要有 Leistner<sup>[23]</sup>，Brul and Coote<sup>[24]</sup>，Leistner<sup>[25]</sup>，Cleveland et al.<sup>[26]</sup>，Salminen et al.<sup>[27]</sup>，Davidson et al.<sup>[28]</sup>，Tamime<sup>[29]</sup>，Cotter et al.<sup>[30]</sup>，Galvez et al.<sup>[31]</sup> and Riley and Chavan<sup>[32]</sup>等人完成。当前关于抗菌化合物的研究，尤其是细菌素的作用和抑菌机制越来越多，这些抗菌化合物都将会运用在食品加工业中。益生菌乳酸菌的优势在于拥有很好的蛋白水解活性；发酵乳糖和柠檬酸；产生多糖；对冷冻和冷冻干燥具有高抵抗力；在消化道粘膜可以附着和定殖；产生维生素和抗菌化合物<sup>[33, 34, 35, 36]</sup>。益生菌乳酸菌的生物保护剂效果是由于产生了多个活跃的代谢产物和其他抑菌物质。近年来，大量产细菌素乳酸菌被筛选出来，但是乳酸菌作为生物保护剂的应用尚未充分发展<sup>[37, 38]</sup>。

近年来，文献中关于生物保护剂的研究越来越多，研究表明拮抗微生物和它们的抗菌代谢产物具有作为天然防腐剂的潜力，不仅可以控制食品中有害微生物的生长，甚至使其失去活性。这些具有抗菌性的乳酸菌竞争营养物质来产生更多的可抗菌活性代谢产物如有机酸（主要是乳酸和醋酸）、过氧化氢和其它化合物（细菌素和抗真菌多肽类）。在食品行业中，乳酸菌作为益生菌抑制腐败菌和食源性病原体，对食品贮藏过程中食品原料的营养品质的保证、货架期的延长做出的重要贡献，乳酸菌在抑制腐败菌的同时保留了食品感官品质如颜色、风味、口感和营养价值。

### 1.3.2 细菌素生物保护剂

细菌素的优势在于，不仅具有无毒、无抗药性、无副作用、无残留，而且还能够高效的抑制或杀死一些有害微生物，具有酸稳定性及热稳定性，特别是细菌素的蛋白质性质，容易被人体肠道的酶消化分解，因而细菌素成为用作食品添加剂、抑制微生物、调节干酪菌群等的理想帮手，特别受到食品工业者的喜爱。Nisin 是乳酸菌的代谢产物，自 1953 年起，就被批准作为商业化生产的食品添加剂应用于食品工业中，全球已有 50 多个国家和地区将 Nisin 作为食品保鲜剂并广泛使用。Nisin 尤其是对形成芽孢的 G<sup>+</sup>菌具有很好地抑制效果，同时因为 Nisin 的蛋白质性质，能够被人体肠道内的蛋白酶所分解，从而被人体所吸收，不会造成在体内蓄积残留，在干酪中应用时，也不会造成干酪内正常菌群失调，还能够促进干酪内益生菌的生长繁殖。近年来，在科研工作者与生产厂家的共同协助努力下，Nisin 被广泛的应用到肉制品、干酪、酒精饮料、果蔬制品、发酵果蔬饮料、灌装食品等的保存中。

经研究认为将产细菌素的乳酸菌直接添加到食品中比添加细菌素效果更为明显。研究发现，如果产细菌素的菌种作为发酵剂在食品发酵过程中存在，那么将会非常搞笑的抑制不良微生物的生长繁殖及污染<sup>[6]</sup>(李平兰等，1998)。目前国内外均有利用产细菌素乳酸菌提高食品安全性、延长货架期的例子，如将产片球菌素的片球菌应用于土耳其香肠、产细菌素的戊糖乳杆菌 31-1 对香肠的发酵<sup>[39]</sup>(吕燕妮，2004)将嗜酸乳杆菌 Ind-1 等产细菌素的乳酸菌投放在消毒奶制品中，会有效的抑制杂菌，延长奶制品的货架期和保质期<sup>[40]</sup>。

近年来，抗生素的过度使用导致多种致病菌对抗生素产生了较强的抗药性，引起了人们的反思，因此具有无抗药性，易分解吸收的细菌素成为人们的研究重点。生物保护剂的开发和利用将有利于改善食品安全问题，有利于延长新鲜瓜果蔬菜的保质期。新疆全年总日照时间长、昼夜温差大等特点造就了瓜果甜度高质量好的优势，但是鲜食瓜果不耐贮藏，在长途运输过程中造成了巨大的经济损失，生物保护剂的开发既可以延长瓜果的保质期，又无毒性残留保证了瓜果的安全。

## 1.4.国内外乳酸菌细菌素的研究进展

### 1.4.1 国外研究现状

自 1953 年将 Nisin 批准作为食品添加剂以来，50 多个国家和地区将其作为生物保鲜剂应用于食品工业中。制备制剂的市场标准是 10<sup>6</sup>IU/g。Nisin 的发现为现代食品保鲜技术开拓了新的疆土。虽然抗生素是禁止在食品中使用的，但是利用具有抵抗性的食品添加剂、防腐剂和抗菌素成为了食品保鲜过程中的安全标志。在食品中添加抗生素来防止食品腐败变质并且延长其货架期的方法将逐渐被细菌素的开发和应用代替。以后的几十年里，国外学者对乳酸菌细菌素进行了研究，主要是对 Nisin 的研究。1928 年，L. Rogers

等人发现乳酸链球菌的代谢产物具有抑制乳酸杆菌的生长能力<sup>[41-42]</sup>；1933年，Whitehead从乳酸链球菌代谢物中分离出这种具有抑菌特性的物质，并证明了它的蛋白质性质；1947年，Mattick等人发现链球菌血清学N群中的一些菌株的产物中含有蛋白质性质的抑菌物质，并证明该物质具有可抑制许多革兰氏菌的性质，该物质被命名为“Nisin”<sup>[43]</sup>。1951年，HirsehA发现了新的食品防腐剂乳酸乳球菌及其产物，并且进一步研究发现，其可以高效的抑制引起奶酪腐败的产气梭状芽孢杆菌的生长繁殖<sup>[44]</sup>；1952年，Clintock等人的研究发现，将乳酸乳球菌直接接种到酸奶中，乳酸乳球菌在生长代谢过程中产生Nisin可以有效控制酸奶的腐败变质<sup>[45]</sup>；1953年，Nisin作为第一种商业用细菌素在英国面市；1969年，联合国粮农组织(FAO)/世界卫生组织(WHO)联合食品添加剂专家委员会的专家批准Nisin用于食品防腐保鲜领域<sup>[46]</sup>；1971年，Gross等人经过深入研究，公布了Nisin分子全结构<sup>[47]</sup>；1988年，Buchman等将编码Nisin前体的结构基因克隆，并且测定了其DNA序列<sup>[48]</sup>；1991年，Mulders等人在研究中报道，他们发现Nisin有两个天然的变异体Nisin A和Nisin Z<sup>[49]</sup>。

近年来，国外学者对细菌素进行了深入的研究，他们将产细菌素菌株的筛选、细菌素的纯化、细菌素分子结构等方面作为主要研究内容。如Jurgen Verluyten等<sup>[50]</sup>采集发酵香肠，并且从中发现了产细菌素CurvacinA的菌株Lactobacillus curvatusLTH1174；C.A. VanReenen等<sup>[51]</sup>人，研究了来自啤酒中的微生物，发现了植物乳杆菌所产生细菌素Plantaricin423，并且对其位于质粒上细菌素的编码基因进行了分析，并表达出该细菌素的免疫蛋白；Imke Wiedemann等<sup>[52]</sup>(2006)由植物乳杆菌LL441所产生的PlantaricinC与Nisin的作用模式进行了比较研究发现脂质在细菌素的抑菌活性上起着至关重要的作用<sup>[42]</sup>；Heo S等人<sup>[53]</sup>利用阳离子交换色谱法分离纯化乳酸片球菌提取液，得到了一种细菌素，该细菌素是通过破坏受体细胞壁，释放内含物导致菌体自溶，从而抑制有害微生物的生长；Han KS等人<sup>[43]</sup>研究了嗜酸乳杆菌产生的细菌素Acidocinl B，研究发现其抑菌机制是质粒作为质子直线加速器引起了细菌素Acidocinl B及其宿主免疫系统的产生，而且它可以转换成嗜酸乳杆菌ATCC43121的感受态细胞。

很多的研究者通过各种方法来分离纯化乳酸菌产生的细菌素(比如有机溶剂法、其他吸附法、菌体吸附法、盐析法、泡沫分离法、膜分离法、免疫亲和层析和免疫磁珠分离等方法)。如Cheseman和Berridge<sup>[44]</sup>从发酵液中提取细菌素，他们利用的是正丙醇和氯化钠的组合物；Yang等人<sup>[45]</sup>研究报道说，他们提取细菌素利用了pH依赖的菌体吸附法，而且发现当pH等于6.5时，细菌素对产生菌细胞出现了最大的吸附；Cheigh C I等<sup>[46]</sup>人研究报道，采用了离子交换层析来进一步纯化细菌素Nisin Z，纯化倍数最终为31倍，收率为90%；Daoudi L等<sup>[47]</sup>对离心处理除过菌体的发酵液利用分子截流量为1000道尔顿的中空纤维膜进行了超滤，最终浓缩率达到5，收率为74.2%，纯化程度1.3；而提取细菌素粗制品通过饱和硫酸铵盐析的方法收率达到60%，纯化程度2.0；Hirsh<sup>[48]</sup>利用的是与众不同的方法——泡沫技术回收法，最终容器中收集到的泡沫细菌素含量高

达 90%的。随着提纯工艺的新技术发展越来越快,如 SuarezAM 等<sup>[49]</sup>采用免疫亲和层析法分离纯化细菌素,这种方法可以一步提纯细菌素; Guenolee 等<sup>[61]</sup>则是采用免疫磁珠分离法纯化细菌素。

#### 1.4.2 国内研究现状

国内对乳酸菌细菌素的研究晚于国外,国外关于乳酸菌细菌素的报道文献资料非常多。而国内对细菌素起步较晚,研究也较少,近年来国内主要筛选产细菌素乳酸菌菌株、纯化细菌素及研究其理化性质等工作,对 Nisin 的研究最为深入<sup>[50]</sup>。

##### 1.4.2.1 植物性来源的乳酸菌细菌素

张艾青等<sup>[51]</sup> (2007)研究中发现,从醪糟样品中得到一株植物乳杆菌 P158,它产生的细菌素对大肠杆菌、铜绿假单胞杆菌、藤黄微球菌等均有明显的抑制作用;韩雪等<sup>[52]</sup> (2006)从东北发酵酸菜样品中筛选到一株乳酸片球菌,并且利用改变 pH 的方法分离纯化了这株乳酸片球菌产生的细菌素,该细菌素对植物乳杆菌、绿脓杆菌、单胞增生李斯特氏菌、沙门氏菌等均有抑制作用,耐盐并具有较好的热稳定性;王蔚森等<sup>[53]</sup> (2006)从自制青贮饲料样品中获得两株产细菌素的乳酸菌菌株 X1、C15,分别提取其细菌素,并用 SDS-PAGE 进行初步鉴定,发现明显的电泳条带;刘双凤等<sup>[54]</sup> (2007)从自然发酵辣椒样品中分离获得三株具有抑菌活性的乳酸菌菌株,研究者对其抑菌成分进行了深入的研究,发现发挥抑菌作用的物质是蛋白质性质的细菌素。

##### 1.4.2.2 动物性来源的乳酸菌细菌素

杨颖等<sup>[55]</sup> (2006)从健康成年人的口腔中获得了一株植物乳杆菌 HO-69,这株菌所产生的细菌素可以有效的抑制变形链球菌、大肠杆菌等菌的生长繁殖,提取细菌素后对其进行深入研究,经推测其分子量小于 10KDa;周雨霞等<sup>[56]</sup> (2006)采用平板挖井法,从内蒙古传统干酪中得到一株具有抑菌活性的乳酸乳球菌 CB20-2,进一步研究其抑菌物质为细菌素,此细菌素对乳酸菌和非乳酸菌属的革兰氏阳性菌显示出很好的抑菌活性,但对革兰氏阴性菌没有表现出抑制作用;吕燕妮等<sup>[57]</sup> (2005)从云南宣威火腿样品中获得一株产广谱细菌素的戊糖乳杆菌菌株,该细菌素具有较好的热、酸稳定性以及蛋白质敏感性;曾志刚等<sup>[58]</sup> (2002)研究人员从香肠样品中分离获得一株产细菌素的乳酸片球菌,乳酸菌发酵液经硫酸铵沉淀,CM-Sephadex50 阳离子交换柱层析后得到了细菌素样品,通过 SDS-PAGE 发现条带明显,分子量大约 20.83Ku,该细菌素具有较好的酸、热稳定性,并且对许多革兰氏阳性菌都有较强的抑制作用,而对革兰氏阴性菌、酵母菌和霉菌没有表现出抑制作用<sup>[59]</sup>。

## 1.5 展望

尽管过去的许多年里,我们对乳酸菌细菌素的研究已经取得了进步,但是以后还存在一些问题需要我们去解决,(1)我们需要进一步去探究细菌素分子机理、结构与功能

的关系以及细菌素的活性；(2) 第一类细菌素羊毛硫抗生素的生物合成功能、酶反应体系依然不清楚；还需要我们继续深入研究。(3) 细菌素生产者的自身免疫机制依然存在很多疑问。如果想要高效的利用细菌素作为食品保鲜剂，这些问题是至关重要的。基因工程的方法将有助于探究细菌素的活性、溶解度和稳定性等问题。细菌素的基因工程或化学修饰，可以改善他们的活性，使其更好地生长。例如 Rollema 等人通过赖氨酸替换 Asn-27 和 His-31 改善了 nisin Z 的溶解度和稳定性。Johnsen 等人在室温下用赖氨酸取代 Met-31 提高了 pediocin PA-1 在 4℃ 的稳定性。诸如此类的例子，解决细菌素应用的问题，然而，得到了监管部门的批准还是非常困难的。

很多分离出来的细菌素生物学特性已经被研究清楚，但是被证明能用于食品工业的细菌素却非常少。被全世界的 50 多个国家和地区广泛使用，主要在奶酪制品、蔬菜罐头、各种巴氏杀菌的乳制品、液体蛋制品以及沙拉酱。发酵食品中包括 pediocin PA-1，pediocin PA-1 是可以用作食品保鲜剂以增加食品货架期、抑制有害微生物的生长，特别是在肉制品中抑制李斯特氏菌的生长。可以预期的是，乳酸链球菌素和其他细菌素将会继续被开发成为食品保鲜剂。

科学发展的今天，乳酸菌在食品工业中的应用越来越广泛，很多国内外研究者将开发利用乳酸菌作为研究热点。研究成果表明，乳酸菌之所以具有抑菌活性，是因为其代谢产物中含有过氧化氢、双乙酰、有机酸及细菌素等<sup>[1]</sup>，这些物质具有有效的抑菌效果。在这些抗菌代谢产物中，细菌素凭借自身的蛋白质敏感性质，在食品工业保鲜领域具有很高的安全性和应用潜力。腐败菌和致病菌导致食品或饲料腐败变质是非常常见的。而且，腐败菌的生长繁殖也给食品和饲料带来了安全隐患。如李斯特氏菌、大肠杆菌等有害菌不仅对食品产生污染，而且危害人体健康，所以急需新的更环保更有效的方法来代替化学添加剂的使用。乳酸菌代谢产物中的抗菌化合物可以有效的抑制有害菌的生长，特别是将细菌素开发为食品保鲜剂已经成为未来食品保鲜领域的发展趋势。

我国新疆地区地广人稀、多个民族聚居，由于少数民族使用传统方法制作发酵干酪来延长乳品的保质期使其干酪中有丰富的乳酸菌资源。这些干酪资源为我们开发乳酸菌资源提供了丰富的来源。本研究广泛采集新疆各地区牧民自制的传统干酪，分离干酪中的乳酸菌并测序研究其系统多样性。从获得的乳酸菌中筛选、纯化出产细菌素菌株，以为开发优质生物保鲜剂和实际生应用奠定一定的理论和实践基础。细菌素作为食品保鲜剂应用于食品加工过程中具有诸多优点，(1) 细菌素无抗药性、易被人体肠道酶分解吸收的特点，可以保证安全使用避免产生不必要的残留；(2) 细菌素可以有效抑制冷加工的食品中的有害微生物的生长，因此食品可以避免热处理二保持较好的感官和营养品质。因此开发利用细菌素是未来食品保险领域的趋势，要做好细菌素的基础研究，相信细菌素作为天然安全的生物型食品保鲜剂，将对人类健康有着重大的意义和价值。

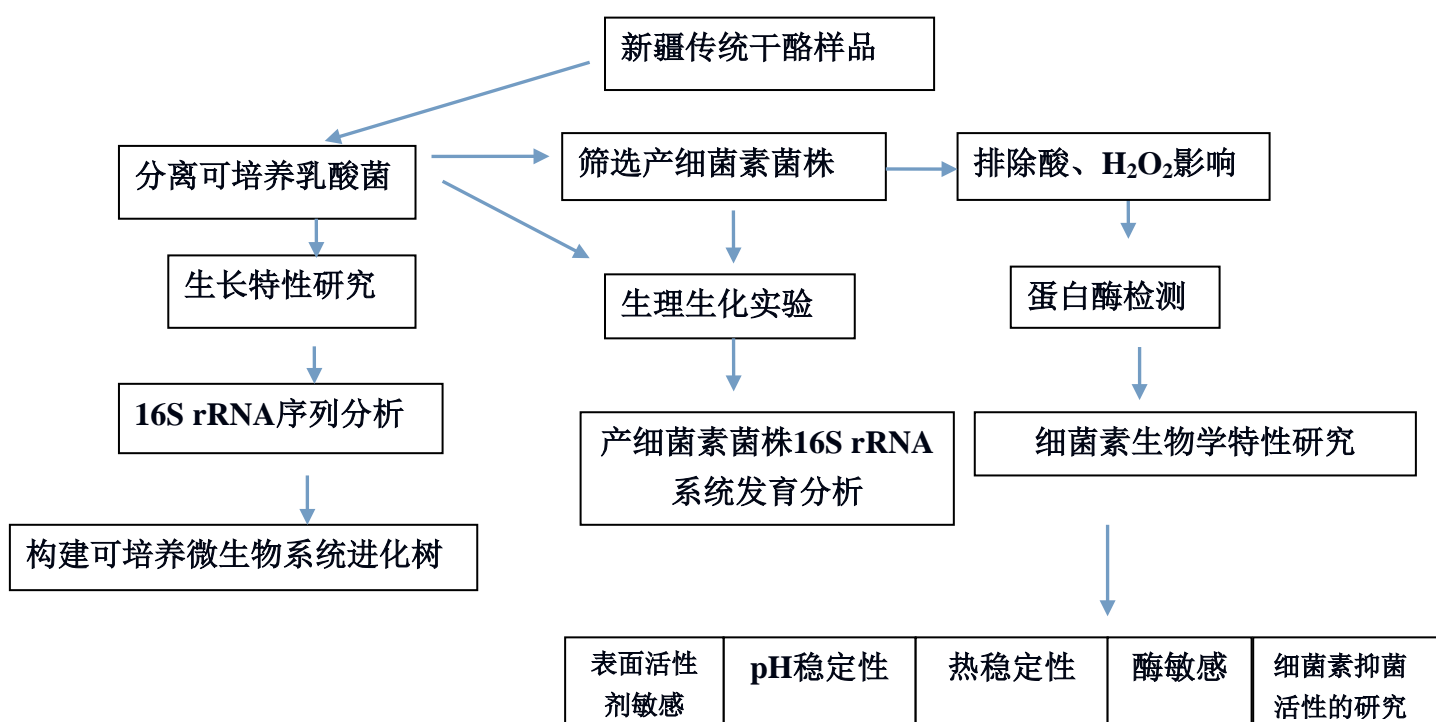
## 1.6 研究内容

- 1.采用传统培养法分离来自新疆地区的传统干酪样品中的菌株，通过初步筛选，得到革兰氏染色阳性过氧化氢酶阴性的疑似乳酸菌菌株，基于乳酸菌的 16S rDNA 部分基因序列，进行分析乳酸菌多样性。
2. 对分离出的乳酸菌进行生理生化特性研究（菌落形态、颜色、大小、湿润程度、V-P 试验、耐盐试验、糖发酵试验等）。
- 3.从乳酸菌中初筛对四种指示菌都具有不同程度的抑制作用的菌株。排除有机酸干扰和过氧化氢的影响后，酶处理后确定可能为产细菌素的乳酸菌菌株。
- 4.挑选对四种指示菌都具有显著抑菌活性乳酸菌菌株，进一步探究其产细菌素的生物学特性。

## 1.7 立题意义

本实验从新疆多地采取牧民自制传统发酵干酪样品分离产细菌素的优质乳酸菌，筛选出具有高效抑菌活性的菌株，并对其产细菌素的特性及影响细菌素活性的因素进行了深入研究，以期开发安全的食品生物保鲜乳酸菌及其生产应用奠定理论基础。食品级微生物乳酸菌及其代谢产物以其安全、高效、无毒等优点，成为开发生物保护剂的热点。从而筛选出高产细菌素的优质乳酸菌及其代谢产物作为生物保护剂，并对其细菌素进行分离纯化和深入的研究是很有必要的，因此本课题的研究无疑具有实际的生产实践指导意义，同时具有较高的理论水平。

## 1.8 研究路线



## 第二章 新疆地区传统干酪中乳酸菌多样性研究

### 2.1 引言

乳酸菌资源在自然界广泛存在，不仅在蔬菜、肉类中存在，而且在乳制品中也十分丰富，特别是新疆牧民自制的传统干酪中。本章节广泛采取新疆各地传统干酪样品，通过选择性培养基分离可培养乳酸菌，基于表性特征和分子生物学手段，经过 16S rDNA 基因测序后构建系统发育树，分析传统干酪中可培养乳酸菌遗传多样性，为后期研究产细菌素乳酸菌菌株的筛选提供理论依据。

### 2.2 实验材料

#### 2.2.1 样品来源

从新疆伊宁、巩留、可可托海、昭苏、那拉提、新源等地随机采取牧民自制干酪样品。将干酪封于无菌密封袋中，样品贴上标签标明采样地点后置于车载冰箱内 - 4℃ 保存。运回实验室并将样品编号，于 4℃ 下保存备用。以上所有步骤都在无菌条件下进行。

#### 2.2.2 药品和试剂

##### 2.2.2.1 革兰氏染色溶液和试剂

###### ①结晶紫液

A 液: 结晶紫 2.0g                      95%乙醇 20ml

B 液: 草氨酸 0.5g                      蒸馏水 80ml

将 A, B 两液相混合，静置 48h 后使用，染色液应放到棕色瓶中保存。

###### ②卢哥尔(Lugol)氏碘液

碘片 1g                                      碘化钾 2.0g

蒸馏水 300ml

先用少量蒸馏水溶解碘化钾，再投入碘片，直至碘片全部溶解后，加入蒸馏水定容至 300ml，放置棕色瓶可保存数月。

###### ③2.5%番红乙醇溶液

番红 2.5g                                      95%乙醇 100ml

复染剂需保存在棕色瓶中。用复染剂与蒸馏水按 1:4 比例混合就是革兰氏染色所需的 0.5%番红水溶液。

##### 2.2.2.2 其余药品和试剂如下表:

表 2.1 药品和试剂

Table 2.1 Reagents and leechdom

名称	级别	生产商
酵母提取物	AR	OXOID 公司
酶酪解蛋白	AR	OXOID 公司
琼脂粉	AR	鹏程生物技术有限公司
氯化钠	AR	天津市福晨化学试剂厂

葡萄糖	AR	上海生工生物工程有限公司
蛋白胨	AR	Solarbio 公司
柠檬酸钠	AR	天津市巴斯夫化学试剂厂
磷酸二氢钠	AR	天津市巴斯夫化学试剂厂
磷酸氢二钠	AR	天津市巴斯夫化学试剂厂
氯化钙	AR	天津市巴斯夫化学试剂厂
硫酸镁	AR	天津市福晨化学试剂厂
冰醋酸	AR	天津市致远化学试剂厂
Taq DNA 聚合酶	AR	TAKARA 公司
dNTPs	AR	TAKARA 公司
碘	AR	天津市巴斯夫化学试剂厂
碘化钾	AR	天津市巴斯夫化学试剂厂

### 2.2.3 实验主要仪器

表 2.2 实验用仪器设备

Table 2.2 Equipments and apparatus

序号	仪器名称	型号	生产厂家
1	高速冷冻离心机	5810R	德国 eppendorf 仪器公司
2	万分之一天平	BS224 S	美国 Mettler Toledo 公司
3	超声波清洗器	KQ250B	山东昆山超声仪器有限公司
4	冷藏冷冻箱	BCD-265F	荣事达集团
5	全自动高压灭菌锅	LAC-5040S	韩国 LabTech 公司
6	标准型 pH 计	PHS-3C	上海精密科学仪器有限公司
7	精密磁力搅拌器	85-2	金坛市恒丰仪器厂
8	PCR 扩增仪	TC-512	英国 Techne 公司
9	水平电泳仪	PowerPac Universal	美国 BioRad 公司
10	凝胶成像系统	Gel DOC XR	美国 BioRad 公司
11	光学显微镜	CX21	Olympus 公司
12	紫外分光光度计	UVmini-1240	日本岛津公司
13	超净工作台	SW-CJ	苏州安泰空气技术有限公司
14	恒温水浴锅	HH-42	常州国华仪器有限公司
15	控温摇床	SHZ-B	上海博远医疗器械厂
16	智能生化培养箱	SPX	宁波市江南仪器厂
17	旋涡振荡器	LAB DANCER S25	IKA 公司
18	组织捣碎机	JJ-2	江苏省金坛市荣华仪器有限公司

### 2.2.4 培养基

本研究所用的选择培养基有：改良 MRS 培养基、Elliker 琼脂培养基、M17 培养基、胆汁七叶灵苷叠氮钠培养基和乳酸杆菌选择性培养基。

表 2.3 改良 MRS 培养基成分  
Table 2.3 composition of MRS medium

成分	含量(g/l)	成分	含量(g/l)
蛋白胨	5.0	柠檬酸二胺	2.0
乳酪蛋白水解物	5.0	磷酸氢二钾	2.0
酵母提取物	5.0	硫酸镁	0.58
吐温-80	0.001	琼脂	15.0
牛肉膏	10.0	葡萄糖	20.0
乙酸钠	5.0	硫酸锰	0.25

表 2.4 Elliker 培养基成分  
Table 2.4 composition of Elliker medium

成分	含量(g/l)
乳糖	5.0
葡萄糖	5.0
磷酸氢二胺	4.0
酵母提取物	5.0
蔗糖	5.0
抗坏血酸	0.5
乙酸钠	1.5
明胶	2.5
胰蛋白胨	20.0
琼脂	15.0
氯化钠	4.0

## 2.3 实验方法

### 2.3.1 乳酸菌分离、纯化与保藏

1g 干酪→放入含 100ml 无菌水的三角瓶中→37℃摇床上震荡 40min→菌悬液。

吸取 1ml 菌悬液至 9ml 无菌水得  $10^{-1}$ ，依次做 3 个梯度，取  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$  梯度菌悬液 100ul 至培养皿用涂布棒分别均匀涂布于五种选择性培养基上，37℃厌氧、有氧条件下培养 24h（每个梯度做两个平行）。待其长出菌落后，观察菌落表型特征进行菌株分离，挑取单菌落并对其进行至少连续三次划线纯化分离，直至得到纯的分离培养物。将得到的纯的分离物接种于 MRS 液体培养基中进行富集培养 24h 后，用 20% 甘油置于 -80℃ 条件下保藏。

### 2.3.2 奶酪乳酸菌的生长特性

#### 2.3.2.1 菌落表型

观察菌落大小、颜色、凹凸、边缘形状、干湿状态、表面光滑程度、透明程度等并编号记录。

#### 2.3.2.2 革兰氏染色及镜检<sup>[60]</sup>

将已分离出的乳酸菌可培养物进行革兰氏染色并镜检

1. 在无菌操作台上，载玻片固定，用接种环挑取少量细菌在玻片上涂布均匀，在火焰上加热固定。
2. 结晶紫初染 1min，蒸馏水冲洗，去掉浮色，吸水纸吸取多余溶液。
3. 用碘—碘化钾溶液媒染 1min，吸水纸吸去多余溶液。
4. 95%乙醇或丙酮脱色 30s，蒸馏水洗，吸水纸吸干。
5. 用番红复染 30s，蒸馏水洗，吸水纸吸干。
6. 镜检，详细记录结果。

### 2.3.2.3 菌株最适生长温度测定

将菌株按 1%的接种量接入装有液体 MRS 培养基的试管中，分别置于 4℃、10℃、24℃、35℃、37℃、45℃六个温度下培养，培养 24 h 后测 OD<sub>600</sub> 值。

以上实验均参照《伯杰细菌鉴定手册》（第九版）进行<sup>[61]</sup>。

### 2.3.4 干酪中可培养乳酸菌 16S rRNA 系统发育分析

#### 2.3.4.1 尿素法提取 DNA

1. 1ml 菌悬液离心 5000r/min，3min。
2. 离心后的菌体用 0.5ml 的 pH7.4 的磷酸缓冲液洗脱三次，再用 0.5ml 的无菌水洗脱一次，转速同上。
3. 洗脱后的细胞用 0.5ml 的 6M 尿素和 0.1ml 的 10%SDS 培养 20min，37℃。
4. 沸水浴 20min。
5. 25℃，8000r/min 离心 10min。
6. 弃上清后，加入 0.1ml 的 0.2N NaOH，37℃培养 10min。
7. 25℃，3000r/min 离心 3min，取上清液。
8. 上清液中加入 2.5 倍体积的无水乙醇，-20℃，2h。
9. 取出后，4℃，10000r/min 离心 15min，弃上清液，用 70%乙醇洗脱。
10. 洗脱后在超净工作台上吹干 20min，加 0.1ml TE 在-20℃保存。

#### 2.3.4.2 菌株 16S rDNA 的扩增

(1) 扩增引物

27F: 5-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3;

1492R: 5-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3

(2) PCR 反应体系 (25 μL):

预混液 Master Mix	12.5 ul
27F	1 ul
1492R	1 ul

DNA 模板	2 ul
ddH <sub>2</sub> O	补足
total	25 ul

### (3) PCR 反应条件

94℃	5min	} 35 cycles
94℃	1min	
55℃	1min	
72℃	90s	
72℃	7 min	

PCR 反应在 Bio-Rad iCycler Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) 上进行。

#### 2.3.4.3 PCR 扩增产物的检测

(1) 制作 1.5% 的琼脂糖凝胶，将用万分天平准确称量好的琼脂糖置于三角瓶中，然后在三角瓶中加入一定体积的 1×TBE 缓冲液，带塞子放入微波炉中溶化琼脂糖；

(2) 将制胶台调平，把电泳槽固定在制胶台上，然后插入梳子；

(3) 凝胶冷却至 60℃ 时，加入 Goldview 染料，慢慢晃动摇匀使其充分混匀后，缓慢地倒入到电泳槽内，并检查是否有气泡；

(4) 待凝胶凝固后，从梳子的一边缓慢拔掉梳子，将凝胶转移到电泳槽中；

(5) 向电泳槽内缓慢加入 0.5×TBE 电泳缓冲液，没过凝胶 0.5 mm 左右，使电泳缓冲液混合均匀；

(6) 用移液枪吸取 3 μL PCR 扩增产物加到点样孔内；

(7) 在 100V 电压开始进行电泳，待溴酚蓝迁移到 50%~60% 时停止电泳，将凝胶置于 BIORAD 凝胶成像仪中观察试验结果。

#### 2.3.4.4 测序及其数据处理

经琼脂糖凝胶电泳检测过的 PCR 扩增产物，送交上海美吉生物科技有限公司进行测序。将测序结果提交到 GenBank 数据库，通过 BLAST 工具搜索同源性较高的序列，并采用 CLUSTAL X 1.81 和 MEGA 5.0 软件对其进行比对分析并建立系统发育树。

#### 2.3.5 乳酸菌生理生化鉴定

参照《乳酸菌分类鉴定及实验方法》、《常见细菌系统鉴定手册》及《伯杰细菌鉴定手册》(第九版) 的检测方法<sup>[62,63,64]</sup>进行生理生化特性的研究 (M.R 试验、V-P 试验、精氨酸产氨试验、耐盐试验、糖发酵试验等)。

##### 2.3.5.1 甲基红(M.R)试验

培养液：蛋白胨 5g，葡萄糖 5g，磷酸氢二钾 5g，水 1000ml，pH7.0~7.2，每管分装 5mL，121℃ 灭菌 30min。

试剂：甲基红 0.1g，95%乙醇 300mL，蒸馏水 200mL。

接种：接种试验菌于以上培养液中，置适温下培养 2 天。

观察结果：在培养液中加入一滴甲基红试剂，红色为甲基红试验阳性反应，黄色为阴性反应。

#### 2.3.5.2 乙酰甲基甲醇 V-P 试验

培养液：与甲基红试验相同。蛋白胨 5g，葡萄糖 5g，磷酸氢二钾 5g，水 1000mL，pH7.0~7.2，每管分装 5mL，121℃灭菌 30min。

试剂：肌酸：0.3%或原粉，NaOH：40%

接种：与甲基红试验相同。接种试验菌于以上培养液中，置适温下培养 2 天。

观察结果：取培养液和 40%NaOH 等量混合再加入少许肌酸，培养 10min 后之后，若出现红色，即为阳性反应，有时候需要放置更长时间才出现红色反应。

#### 2.3.5.3 精氨酸产氨试验

培养基

PY 基础培养基

蛋白胨	0.5g	胰酶解酪阮(Trypticase)	0.5g
酵母提取物	1.0g	盐溶液	4.0 mL
蒸馏水	100mL		

盐溶液成分：无水 CaCl<sub>2</sub> 0.2g，MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.48g，K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0g，KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0g，NaHCO<sub>3</sub>10.0g，NaCl 2.0g。

将 CaCl<sub>2</sub> 和 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 混合溶解于 300mL 蒸馏水中，再加 500mL 水，一边搅拌一边缓慢加入其他盐类。继续搅拌直到全部溶解，加 200mL 蒸馏水，混合后贮备于 4℃。

在 PY 基础培养液中加入配制好的精氨酸液。精氨酸液的成分及制备如下：

L-精氨酸	1.5g
半胱氨酸(1g/10ml H <sub>2</sub> O)	0.05mL
蒸馏水	10mL

调 PH 至 7.0，灭菌后加 3 滴至 3mL 培养基中。

奈氏 (Nessler)试剂

将 20g KI 溶于 50mL 蒸馏水，并在此溶液中加入 HgI<sub>2</sub> 小颗粒，至溶液达饱和为止(约 32g)，然后再加 460mL 水和 134g KOH。将上清液贮存于暗色瓶中备用。

接种和培养

接种待检测菌于含精氨酸的培养基中，并同时将菌种接种于不含精氨酸的培养基作为对照。置适温培养 1~3d。

结果检测：取培养完成的培养液少许置于比色盘内，加数滴奈氏试剂，如果待测菌产氨，则出现橙黄或黄褐色沉淀。当含精氨酸培养基中的培养液与试剂的反应明显强于对照液的反应才能认为是阳性反应。由于有些菌产氨是利用培养基中的蛋白胨，二者不可混淆。

#### 2.3.5.4 过氧化氢酶试验(触酶试验)

挑取一环固体培养基上的待测菌落，置于已灭菌的载玻片上，滴加一滴 3%的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 水溶液，若半分钟内有气泡产生则为阳性反应。(3%的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 水溶液要现用现配，不宜长期保存待用)

#### 2.3.5.5 硝酸盐还原试验

肉汁胨、KNO<sub>3</sub> 培养基，分装 121℃ 灭菌 15 min。新鲜培养物接种于培养基中，20℃ 培养 1、3、7 d。2 个重复，2 个空白对照。取两支无菌空试管，倒入培养液，再各加一滴格林斯(Griess)试剂 A 液和 B 液，同时做对照实验。若培养液变为橙色、棕色、粉红、玫瑰红等表示培养物中有亚硝酸盐，为阳性；若无红色，可滴加加 1-2 滴二苯胺试剂，蓝色表示无硝酸盐还原作用；若无蓝色则也为阳性反应。

#### 2.3.5.6 耐盐性试验

方法：在液体培养基中分别加入 2%、4%、8%、10%、12% 浓度的氯化钠溶液，适温下培养一周后，420nm 条件下测 OD 值，同时设置空白试验。

#### 2.3.5.7 碳源利用实验

检验细菌能否利用某些含碳化合物为唯一碳源。碳源利用基础培养基成分为：硫酸铵 2.0g、硫酸镁 0.2g、磷酸二氢钠 0.5g、氯化钙 0.1g、磷酸氢二钾 0.5g、纯水 1000ml。(蔗糖、果糖、木糖、麦芽糖、甘露糖、半乳糖、鼠李糖、棉子糖、海藻糖、山梨糖、阿拉伯糖、纤维素二糖和淀粉共 13 种糖类，甘露醇和山梨醇 2 种醇类。)各种碳源的添加浓度为 0.2%，其他条件固定，以菌悬液接种，10℃ 培养 2-3d 后，摇匀后测定菌悬液在 600nm 下的吸光度，同时设置空白对照。

## 2.4 结果与分析

### 2.4.1 新疆干酪中可培养乳酸菌菌落形态

选择培养基中挑取纯化后的菌株依据菌落形态、大小、颜色、湿润度、细胞形态、革兰氏染色与液体培养特征观察初步判断从干酪中共分离获得 285 株可培养物，对菌株进行革兰氏染色和接触酶实验筛选，其中 70.9% 为革兰氏阳性菌，29.1% 为阴性菌。筛选革兰氏阳性接触酶阴性的疑似乳酸菌 202 株。以下是部分菌株特征分析如表 2.5 所示。

表 2.5 部分菌株特征分析

Table 2.5 Characteristics of strains isolated from Cold-Water Fishes

菌株	菌落特征	菌株	菌落特征
ZS1-2	淡黄 湿润 易挑 2-3 mm	KKTHB-6	乳白 稍透明 凸起 湿润 <1 mm
ZS2-8	凸起 圆形菌落 1 mm	KKTHB-7	白色 圆形 边缘齐整 <1 mm
ZS2-4	白色 凸起 易挑 1-1.5mm	KKTHD-13	白色 易挑 边缘齐整 0.5-1 mm
NLTB3-4	白色 凸起 湿润 1.5-2 mm	ZF1-13	白色(发黄) 湿润 <1 mm
NLTE4-4	乳白色 凸起 湿润 0.5-2 mm	ZS4-1	白色 透明 0.5-1 mm
KKTHA-14	白色 凸起 易挑 湿润 0.5-1mm	KKTHB-10	乳白色 凸起 1-2 mm
ZS1-6	白色 凸起 边缘整齐 湿润 <1 mm	ZS1-1	白色 微小 <0.5 mm

ZS1-4	乳白偏黄 凸起 边缘齐整 <1 mm	ZS3-1	白色 凸起 湿润 1-2 mm
ZS6-12	白色 湿润 0.5-1 mm	ZS6-8	砖红 突起 边缘齐整 0.5-1 mm
ZS5-14	白色 凸起 湿润 0.5-1 mm	ZS2-7	玉米黄 突起 湿润 0.5-2 mm
ZS1-7	乳白色 凸起 边缘齐整 1 mm	NLTD2-2	乳白 湿润 1-2 mm
ZS1-8	白色 湿润 1-2 mm	ZS8-11	乳白 突起 湿润 0.5-1 mm
XYG3-3	乳白色 凸起 边缘齐整 0.5-1mm	GLM3-1	灰白色 圆形 湿润 1-2 mm
ZS8-10	乳白色 湿润 <1 mm	ZF1-12	灰白色 湿润 凸起 0.5-1 mm
KKTHD-14	乳白色 凸起 边缘齐整 0.5-1 mm	KKTHB-11	白色 凸起 1 mm
XYF1-1	乳白 凸起 湿润 0.5-1 mm	GLL4-1	白色 凸起 湿润 1-2 mm
KKTHA-2	白色 (发黄) 凸起 1-2 mm	ZS5-11	乳白 凸起 0.5-1 mm
KKTHB-12	白色 凸起 湿润 1-2 mm	ZS5-12	白色 凸起 湿润 0.5-1 mm
ZS4-15	乳白色 凸起 湿润 1-2 mm	ZS7-4	白色 凸起 湿润 0.5-1mm
KKTHA-9	乳白 凸起 湿润 1-2 mm	GLK1-2	白色 湿润 1 mm
KKTHA-13	淡黄 凸起 湿润 <1 mm	ZS6-5	白色 凸起 湿润 0.5mm
KKTHC-1	乳白色 凸起 边缘齐整 0.5-1 mm	KKTHB-1	灰白色 圆形 湿润 1-2 mm
KKTHA-6	乳白色 湿润 <1 mm	KKTHC-22	乳白色 湿润 <1 mm
NLTE-22	玉米黄 突起 湿润 0.5-2 mm	NLTE-23	乳白色 凸起 边缘齐整 0.5-1 mm
NLTE-24	灰白色 圆形 湿润 1-2 mm	KKTHC-6	白色 凸起 湿润 0.5mm
ZS7-1	白色 边缘齐整 湿润 0.5-1 mm	NLTB3-4	白色 突起 0.5-1 mm

#### 2.4.2 分离菌株最适生长温度测定

乳酸菌资源在自然界中广泛存在，来源不同、种类不同的乳酸菌就会拥有不同的生长特性，生长温度范围和最适生长温度都会有程度不等的差异。生长环境的温度决定着生物的生化反应过程能否顺利进行，较低的温度有利于微生物细胞的保存。干酪中分离得到的可培养乳酸菌中最高生长温度不高于 45℃，最适生长温度为 24~37℃，最低生长温度不低于 10℃。(表 2.6)。

表 2.6 菌株革兰氏染色结果与最适生长温度

Table 2.6 Gram staining and optimum temperature of strains

菌株	革兰氏染色	最适生长温度(°C)	菌株	革兰氏染色	最适生长温度(°C)
ZS1-2	G+	33	KKTHB-6	G+	35
ZS2-8	G+	35	KKTHB-7	G+	35
ZS2-4	G+	33	KKTHD-13	G+	35
NLTB3-4	G+	37	ZF1-13	G+	37
NLTE4-4	G+	37	ZS4-1	G+	37
KKTHA-14	G+	35	KKTHB-10	G+	36
ZS1-6	G+	33	ZS1-1	G+	37
ZS1-4	G+	35	ZS3-1	G+	37
ZS6-12	G+	35	ZS6-8	G+	37

ZS5-14	G+	35	ZS2-7	G+	37
ZS7-1	G+	35	NLTB3-4	G+	36
ZS1-7	G+	37	NLTD2-2	G+	37
ZS1-8	G+	35	ZS8-11	G+	37
XYG3-3	G+	37	GLM3-1	G+	35
ZS8-10	G+	37	ZF1-12	G+	35
KKTHD-14	G+	37	KKTHB-11	G+	37
XYF1-1	G+	35	GLL4-1	G+	37
KKTHA-2	G+	37	ZS5-11	G+	37
KKTHB-12	G+	35	ZS5-12	G+	37
ZS4-15	G+	35	ZS7-4	G+	37
KKTHA-9	G+	35	GLK1-2	G+	36
KKTHA-13	G+	35	ZS6-5	G+	35
KKTHC-1	G+	35	KKTHB-1	G+	35
KKTHA-6	G+	35	KKTHC-22	G+	35
NLTE-22	G+	35	NLTE-23	G+	35
NLTE-24	G+	37	KKTHC-6	G+	35

#### 2.4.3 干酪中可培养乳酸菌多样性分析

对从新疆地区采集到的干酪样品中分离得到的疑似乳酸菌菌株进行 16S rRNA 的 PCR 反应及扩增产物琼脂糖凝胶电泳检测，将 PCR 反应扩增产物约为 1.5 kb 的特征性条带的 PCR 产物进行测序，测序结果的 16S rRNA 序列在 NCBI 中使用 BLAST 工具与 GenBank 数据库中的序列比对，根据比对的相似性鉴定对应菌种的属。163 株干酪可培养乳酸菌分属于 *Enterococcus*、*Lactobacillus*、*Weissella*、*Streptococcus*、*Lactococcus* 五个属，以下为部分菌株系统发育相似性分析（表 2.7）。

表 2.7 乳酸菌菌株系统发育相似性分析  
Table 2.7 Similarity analysis of phylogenetic of LAB strain

Strain	temp °C	Closest relative species	Similarity	Sample source
ZS1-2	10-35-45	<i>Enterococcus rivorum</i> (KC337244)	98	Yili Zhaosu
ZS2-8	10-35-45	<i>Enterococcus rivorum</i> (KC337248)	100	Yili Zhaosu
ZS2-4	10-35-45	<i>Enterococcus faecium</i> (JN415145 )	100	Yili Zhaosu
NLTB3-10	10-37-45	<i>Enterococcus durans</i> (EU794738)	100	Yili Nalati
NLTE4-4	10-37-45	<i>Enterococcus thailandicus</i> (HQ603855)	99	Yili Nalati
KKTHA-14	10-35-45	<i>Enterococcus faecalis</i> (JF903802)	99	Aletai Keketuohai
ZS1-6	10-35-45	<i>Enterococcus durans</i> (JF690868)	99	Yili Zhaosu
ZS1-4	10-35-45	<i>Enterococcus hirae</i> (JX179264.1)	99	Yili Zhaosu
ZS6-12	10-35-45	<i>Enterococcus sp.</i> (KC347588)	100	Yili Zhaosu
ZS5-14	10-35-45	<i>Enterococcus hermanniensis</i> (GQ337028)	99	Yili Zhaosu
ZS7-1	10-35-45	<i>Enterococcus hermanniensis</i> (GQ337028)	99	Yili Zhaosu
ZS1-7	10-37-45	<i>Enterococcus faecalis</i> (JQ889271)	100	Yili Zhaosu
ZS1-8	10-35-45	<i>Enterococcus faecalis</i> (JQ889271)	100	Yili Zhaosu
XYG3-3	10-37-45	<i>Enterococcus faecalis</i> (JQ800439)	100	Yili Xinyuan

ZS8-10	10-37-45	<i>Enterococcus sp.</i> (KM873128)	99	Yili Zhaosu
KKTHD-14	10-37-45	<i>Enterococcus sp.</i> (KP117095)	100	Aletai Keketuohai
XYF1-1	10-35-45	<i>Enterococcus faecalis</i> (JQ800426)	99	Yili Xinyuan
KKTHA-2	10-37-45	<i>Enterococcus sp.</i> (KP120825)	100	Aletai Keketuohai
KKTHB-12	10-35-45	<i>Enterococcus sp.</i> (KP120825)	100	Aletai Keketuohai
ZS4-15	10-35-45	<i>Enterococcus durans</i> (JF896435)	99	Yili Zhaosu
KKTHA-9	10-35-45	<i>Enterococcus hermanniensis</i> (AY396048)	100	Aletai Keketuohai
KKTHA-13	10-35-45	<i>Enterococcus hermanniensis</i> (NR 042897)	100	Aletai Keketuohai
KKTHC-1	10-35-45	<i>Lactobacillus plantarum</i> (AM279764)	100	Aletai Keketuohai
KKTHA-6	10-35-45	<i>Lactobacillus curvatus</i> (HM218173)	99	Aletai Keketuohai
NLTE-22	10-35-45	<i>Lactobacillus curvatus</i> (HM218173)	100	Yili Nalati
NLTE-24	10-37-45	<i>Lactobacillus curvatus</i> (GU13861)	100	Yili Nalati
KKTHB-6	10-35-45	<i>Enterococcus hermanniensis</i> (AY396048)	100	Aletai Keketuohai
KKTHB-7	10-35-45	<i>Enterococcus faecalis</i> (AB362601)	100	Aletai Keketuohai
KKTHD-13	10-35-45	<i>Enterococcus faecium</i> (JN415145.1 )	100	Aletai Keketuohai
ZF1-13	10-37-45	<i>Enterococcus rivorum</i> (KC337248)	100	Yili Zhaosu
ZS4-1	10-37-45	<i>Enterococcus faecium</i> (HQ259241)	100	Yili Zhaosu
KKTHB-10	10-36-45	<i>Enterococcus faecalis</i> (AB712374)	100	Aletai Keketuohai
ZS1-1	10-37-45	<i>Enterococcus hermanniensis</i> (GQ337028)	100	Yili Zhaosu
ZS3-1	10-37-45	<i>Enterococcus faecium</i> (JN415145.1 )	99	Yili Zhaosu
ZS6-8	10-37-45	<i>Lactobacillus sakei</i> (AB362606)	99	Yili Zhaosu
ZS2-7	10-37-45	<i>Lactococcus raffinolactis</i> (JN226416)	100	Yili Zhaosu
NLTB3-4	10-36-45	<i>Weissella sp.</i> (KF760540)	100	Yili Nalati
NLTD2-2	10-37-45	<i>Weissella koreensis</i> (HQ896200)	100	Yili Nalati
ZS8-11	10-37-45	<i>Streptococcus parauberis</i> (EU081009)	99	Yili Zhaosu
GLM3-1	10-35-45	<i>Streptococcus parauberis</i> (AY942570)	99	Yili Gongliu
ZF1-12	10-35-45	<i>Enterococcus sp.</i> (KP120825)	99	Yili Zhaosu
GLL4-1	10-37-45	<i>Enterococcus sp.</i> (KP120825)	100	Yili Gongliu
ZS5-11	10-37-45	<i>Lactococcus garvieae</i> (KM409680)	100	Yili Zhaosu
ZS5-12	10-37-45	<i>Lactococcus garvieae</i> (JN089369)	100	Yili Zhaosu
ZS7-4	10-37-45	<i>Lactococcus garvieae</i> (AY699289)	99	Yili Zhaosu
GLK1-2	10-36-45	<i>Lactococcus raffinolactis</i> (JN226416)	99	Yili Gongliu
ZS6-5	10-35-45	<i>Lactococcus garvieae</i> (KM209202)	100	Yili Zhaosu
KKTHB-1	10-35-45	<i>Lactobacillus plantarum</i> (AM279763)	100	Aletai Keketuohai
KKTHC-22	10-35-45	<i>Lactobacillus sakei strain TW3-2</i> (KJ026628)	100	Aletai Keketuohai



0.02

图 2.1 基于 16S rRNA 序列的菌株系统发育树

Fig. 2.1 Phylogenetic tree of strains based on partial 16S rRNA sequences

#### 2.4.4 干酪中可培养乳酸菌生理生化分析

根据《常见细菌系统鉴定手册》所进行的生理生化试验(表 2.8), 结果表明所有乳酸菌菌株接触酶反应都是阴性; 大部分菌株的 V-P 实验呈阳性, 部分 *Streptococcus* ZS8-11、GLM3-1 及 *Weissella* 的 NLTB3-4、NLTD2-2 V-P 实验呈阴性; 值得注意的是在系统进化发育树中同属一类的 *Enterococcus* 中, ZS2-8、ZS2-4、NLTB3-4、NLTE4-4、KKTHA-14、ZS6-12、ZS5-14、ZS7-1、ZS1-7、ZS1-8、ZS1-6 及 M.R 实验反应呈阴性, 同时发现 *Lactococcus* 的 ZS5-11 不同于 ZS5-12 菌株 M.R 实验呈阴性; *Enterococcus* 的硝酸盐还原实验 *Enterococcus* 显阳性只有菌株 ZS1-6、ZS6-12、ZS5-14、ZS1-7、XYG3-3、ZS1-8、KKTHD1-1、ZS2-7、NLTD2-2、GLM3-1、KKTHC-2, *Lactococcus* 也只有菌株 ZS7-4 显阳性; *Lactococcus* 菌株反应都是阴性, *Enterococcus* 在此生理生化实验中差别较大, 68%的菌株显示阴性; 对乳酸菌的碳源利用实验结果表明, *Enterococcus* 的 GLL4-1 对乳糖的利用不明显, 而 ZF1-12 和 KKTHB-11 对 14 种碳源都能利用, 同属于 *Weissella* 的菌株 NLTB3-4、NLTD2-2 在别的碳源利用与上述的生理生化实验结果一致, 但是在碳源利用中对木糖和甘露醇的结果有所不同, 同时可见 *Streptococcus* 的 ZS8-11 可以利用海藻糖, GLM3-1 可以利用鼠李糖、甘露醇、纤维二糖, *Lactococcus* 的碳源利用实验结果差异较大, ZS7-4、GLK1-2 不能很好的利用蔗糖, ZS6-5 对麦芽糖是阴性, 只有 ZS5-11 不能利用甘露糖, 只有 2 株 *Lactococcus* 能利用海藻糖, 几乎所有的 *Lactococcus* 都能利用乳糖和果糖,; 大多数的乳酸菌属于微好盐细菌, 在 6~8%的浓度下都可生长, 同属于 *Weissella* 的菌株 NLTB3-4、NLTD2-2 在 8%盐浓度下可生长, 高于 10%停止生长, *Lactococcus* ZS5-11、ZS5-12、ZS7-4 耐盐性较差, 高于 4%的盐浓度下生长缓慢, 且会停止生长。对 51 株从干酪分离的乳酸菌生理生化差异进行研究, 可为进一步深入研究乳酸菌奠定基础。

表 2.8 菌株常见生理生化特征

Table 2.8 Physiological characteristics of bacteria strains

No.	Arginine produce ammonia	Nitrate reduction	Catalase	M.R	V-P	Sucrose	Fructose	Maltose	Xylose	Mannose	Galactose	Rhamnose	Raffinose	Arabinose	Trehalose	Mannitol	Sorbitol	Cellobiose	lactose	Range NaCl %
ZS1-2	1	0	0	1	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0-8
ZS2-8	0	0	0	0	1	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	0-8
ZS2-4	1	0	0	0	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0-8
NLTB3-4	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	/	+	-	0-8
NLTE4-4	0	0	0	0	1	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	0-8
KKTHA-14	0	0	0	0	1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	0-8
ZS1-6	0	1	0	0	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	0-6
ZS1-4	0	0	0	1	1	+	+	+	+	/	+	-	+	+	+	-	+	-	+	0-6

ZS6-12	1	1	0	0	1	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	0-6
ZS5-14	0	1	0	0	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0-6
ZS7-1	0	0	0	0	1	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	0-6
ZS1-7	0	1	0	0	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0-6
ZS1-8	0	1	0	0	1	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	0-6
XYG3-3	1	1	0	1	1	+	/	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	0-6
ZS8-10	0	0	0	1	1	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	0-6
KKTHD-14	0	1	0	1	1	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	0-6
XYF1-1	0	1	0	1	1	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	0-6
KKTHA-2	1	0	0	1	1	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	0-6
KKTHB-12	0	0	0	1	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	0-8
ZS4-15	1	0	0	1	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	0-8
KKTHA-9	1	0	0	1	1	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	0-8
KKTHA-13	1	0	0	1	1	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	0-8
KKTHC-1	0	0	0	1	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0-6
KKTHA-6	1	0	0	0	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0-8
NLTE-22	0	0	0	1	1	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	0-8
NLTE-24	0	0	0	1	1	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0-8
KKTHB-6	0	0	0	1	1	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	0-8
KKTHB-7	0	0	0	1	1	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	/	-	+	0-8
KKTHD-13	0	0	0	1	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0-8
ZF1-13	1	0	0	1	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0-8
ZS4-1	1	0	0	1	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0-8
KKTHB-10	0	0	0	1	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0-6
ZS1-1	0	0	0	1	1	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	0-8
ZS3-1	1	0	0	1	1	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	0-8
ZS6-8	0	0	0	0	1	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	0-8
ZS2-7	1	1	0	1	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0-8
NLTB3-4	0	0	0	0	1	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0-8
NLTD2-2	0	1	0	0	0	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0-8
ZS8-11	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	0-6
GLM3-1	0	1	0	0	0	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	0-8
ZF1-12	1	0	0	0	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0-10
KKTHB-1111	0	0	0	1	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0-10
GLL4-1	0	0	0	1	1	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	0-10
ZS5-11	0	0	0	0	1	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	0-4
ZS5-12	0	0	0	1	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	0-4
ZS7-4	0	1	0	0	1	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	0-4
GLK1-2	1	0	0	0	1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0-8
ZS6-5	0	0	0	1	1	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	0-6
KKTHB-1	0	0	0	0	1	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	0-6
KKTHC-22	0	1	0	0	1	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0-8
NLTE-23	0	0	0	0	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0-8

注：“-”实验结果为阴性，“+”实验结果为阳性

## 2.5 本章小结

本章节利用五种选择性培养基分离来自新疆地区多地采集的牧民自制的传统干酪样品中的乳酸菌，共分离得到革兰氏阳性、过氧化氢酶阴性的疑似乳酸菌 202 株。表型水

平上，通过菌株菌落形态观察，大多数菌株的菌落形态呈现白色或乳白色，大多数大小为 1mm，镜检之后发现细胞形态多数为球状，少数呈杆状。

分子水平上，基于疑似乳酸菌菌株 16S rDNA 部分基因进行系统发育分析。干酪中分离得到可培养乳酸菌菌株共有 163 株干酪可培养乳酸菌分属于 *Enterococcus*、*Lactobacillus*、*Weissella*、*Streptococcus*、*Lactococcus* 五个属，其中肠球菌属(*Enterococcus*) 是传统干酪乳酸菌中的优势菌群，包含菌株 101 株。

本实验采用传统培养的方法，使用肠球菌选择性的培养基分离传统干酪乳酸菌，但是没有分离出肠球菌菌株，可能是由于培养基和干酪中温度、水分含量等因素差异造成的。本研究发现传统干酪中的乳酸菌有丰富的多样性，详细的研究不同地区传统干酪中的乳酸菌的属种及个体差异对于开发和利用乳酸菌资源有很重要的意义。

## 第三章 干酪中产细菌素乳酸菌的筛选

### 3.1 引言

乳酸菌细菌素作为生物保鲜剂在食品、饲料的保鲜领域中被广泛应用。细菌素优势在于无毒、无抗药性、无副作用、无残留，必将逐步取代化学防腐剂和抗生素在食品生产过程中的使用，在食品保鲜领域具有巨大的开发应用价值<sup>[6]</sup>。因此筛选出广谱高产细菌素的优质乳酸菌具有重要的意义。至今为止，对细菌素的检测方法有很多报道，一般可以分为液体检测法和固体检测法。液体检测法虽然能快速得出结果，但操作繁琐，已很少被用到。固体检测法以其操作简便被广泛应用，也称为琼脂扩散法（Agar Diffusion Assay）。固体检测方法虽被广泛应用，但是本身具有诸多局限性，如指示菌种类，培养时间，扩散时间等。本实验为严格控制这些因素，每皿加入定量培养基，保证同一厚度，选用同一指示菌，每组实验三次重复，确保结果稳定。本章节利用琼脂扩散法中的牛津杯法对分离干酪样品的乳酸菌菌株进行初步筛选，以期从中筛选出具有较强抑菌活性的产细菌素乳酸菌菌株。

### 3.2 实验材料

#### 3.2.1 乳酸菌菌株来源

本章节所使用实验乳酸菌为上章节从新疆干酪中分离出的，具体编号与分离来源见表。

#### 3.2.2 主要试剂

指示菌：大肠杆菌（*Escherichia coli*）、枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）、李斯特氏菌（*Listeria monocytogenes*），试验室保存。金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）CICC21600 购买于中国工业微生物菌种保藏管理中心。

#### 3.2.3 培养基

①LB 培养基②改良 MRS 培养基

### 3.3 实验方法

#### 3.3.1 菌种的活化

将-80℃保存的菌种转放至4℃冰箱解冻1d，在无菌操作台上按2%的接种量接种至10ml MRS 液体培养基试管中，37℃，培养24h。取出，在无菌工作台上，用接种环沾取菌液在固体培养基上划线，37℃，培养24h。

#### 3.3.2 乳酸菌发酵液制备

将乳酸菌菌株以1%的接种量接种到装有MRS液体培养基的无菌离心管中，密封，30℃静置培养24h，离心（10000r/min，10min，4℃）获得上清液，并用0.22μm微孔滤膜过滤得到无细胞发酵上清液，4℃条件下保存备用。

#### 3.3.3 指示菌菌悬液的制备

分别挑取已活化的四种指示菌接种于5ml LB液体培养基，37℃培养24h，测其浓度，用无菌生理盐水稀释成 $10^7$ cfu/mL菌悬液，于4℃保存备用。

### 3.3.4 具有抑菌活性乳酸菌初步筛选

采用牛津杯法筛选具有抑菌活性的乳酸菌。

将 20ml 的 LB 培养基倒入直径为 7cm 的培养皿中，水平放置，静置至凝固，将指示菌悬液 100 $\mu$ L 均匀涂布在 lb 固体培养基上，固定一小时。在每个平皿中等距离放置牛津杯 4 个，其中三个牛津杯中加入 200 $\mu$ l 乳酸菌上清液，其余一个作为对照加入等量的灭菌 MRS 液体培养基，标注菌株号，于 37 $^{\circ}$ C 培养 16h，观察抑菌圈。如果若在牛津杯周围出现透明抑菌圈，则表明该乳酸菌对指示菌具有抑制作用，并用游标卡尺测量抑菌圈直径，每个菌株做三个平行实验。挑选出抑菌圈较大的菌株进行下一步试验。

### 3.3.5 产细菌素乳酸菌复筛

乳酸菌对指示菌的抑制作用，可能由于乳酸菌其他代谢产物酸干扰作用，过氧化氢的抑制作用或者是乳酸菌细菌素的作用。为了检测和排除酸的干扰和过氧化氢作用，进一步研究抑菌物质，进行以下实验。

#### 3.3.5.1 酸抑制作用的排除<sup>[65,66]</sup>

挑取初筛具有较好抑菌活性的乳酸菌菌株，接种于 5mLMRS 液体，37 $^{\circ}$ C 静置培养 24h，10000r/min 离心 10min 后，用 1mol/L NaOH 心发酵上清液 pH 值调至 6.0，未处理的乳酸菌发酵上清液作为对照，牛津杯法分别检测两者的抑菌活性。

#### 3.3.5.2 过氧化氢作用的排除

将发酵上清液 pH 值调至 7.0，过氧化氢酶溶解到发酵上清液中，使其终浓度为 5mg/mL，在 37 $^{\circ}$ C 水浴中水浴 2h 后取出，再将 pH 值调回 6.0，未处理的乳酸菌发酵上清液和加酶的空白培养基作为对照，牛津杯法分别检测两者的抑菌活性。

#### 3.3.5.3 蛋白酶解检测

用胰蛋白酶、胃蛋白酶对筛选出的乳酸菌菌株上清液进行酶分解实验，先用 1mol/LNaOH 和 1mol/LHCl 分别调发酵上清液到胰蛋白酶最适作用 pH8.0、胃蛋白酶的最适作用 pH8.0，分别在发酵上清液中加入胰蛋白酶、木瓜蛋白酶，使其终浓度为 1mg/mL，37 $^{\circ}$ C 水浴 2h 后，80 $^{\circ}$ C 水浴 10min 灭酶处理，再将 pH 值调回 6.0，未处理的乳酸菌发酵上清液和加酶的空白培养基作为对照，牛津杯法分别检测两者的抑菌活性。

## 3.4 结果与分析

### 3.4.1 产细菌素乳酸菌的初筛结果

以四种致病菌和腐败菌作为指示菌，从分离纯化得到的 163 株乳酸菌中筛选出 75 株在不同程度上抑制腐败菌的生长的菌株见表 3.1。

表 3.1 对指示菌的抑菌特性

Table 3.1 Antibacterial properties for indicator bacteria

菌株名称	菌株来源	分离培养基	指示菌			
			枯草芽 孢杆菌	大肠 杆菌	李斯特 氏菌	金黄葡 萄球菌
ZS1-2	<i>Yili Zhaosu</i>	Elliker	++	—	+	++
ZS2-8	<i>Yili Zhaosu</i>	Elliker	+	++	—	++
ZS2-4	<i>Yili Zhaosu</i>	Elliker	++	++	—	+
NLTB3-4	<i>Yili Nalati</i>	Elliker	++	—	—	+
NLTE4-4	<i>Yili Nalati</i>	M17	++	+++	++	+
KKTHA-14	<i>Aletai Keketuohai</i>	MRS	++	++	—	+
ZS1-6	<i>Yili Zhaosu</i>	M17	++	—	+	++
ZS1-4	<i>Yili Zhaosu</i>	Elliker	+	+	—	+++
ZS6-12	<i>Yili Zhaosu</i>	MRS	+	++	—	+
ZS5-14	<i>Yili Zhaosu</i>	Elliker	++	—	+	++
ZS7-1	<i>Yili Zhaosu</i>	M17	+++	—	—	+
ZS1-7	<i>Yili Zhaosu</i>	M17	+	—	—	+
ZS1-8	<i>Yili Zhaosu</i>	MRS	++	++	—	+
XYG3-3	<i>Yili Xinyuan</i>	Elliker	++	—	+	++
ZS8-10	<i>Yili Zhaosu</i>	M17	+	++	+	—
KKTHD-14	<i>Aletai Keketuohai</i>	MRS	++	++	—	+
XYF1-1	<i>Yili Xinyuan</i>	Elliker	+	—	—	+
KKTHA-2	<i>Aletai Keketuohai</i>	M17	++	—	+	++
KKTHB-12	<i>Aletai Keketuohai</i>	胆汁七叶灵昔叠氮钠	+	++	—	+++
ZS4-15	<i>Yili Zhaosu</i>	Elliker	++	—	—	+
KKTHA-9	<i>Aletai Keketuohai</i>	胆汁七叶灵昔叠氮钠	+++	++	++	+
KKTHA-13	<i>Aletai Keketuohai</i>	MRS	++	+++	+	+++
KKTHC-1	<i>Aletai Keketuohai</i>	胆汁七叶灵昔叠氮钠	+++	++	+++	++
KKTHA-6	<i>Aletai Keketuohai</i>	胆汁七叶灵昔叠氮钠	++	—	+	++
NLTE-22	<i>Yili Nalati</i>	M17	+	++	+++	+++
NLTE-24	<i>Yili Nalati</i>	M17	++	++	—	+
KKTHB-6	<i>Aletai Keketuohai</i>	Elliker	++	—	+	++
KKTHB-7	<i>Aletai Keketuohai</i>	Elliker	++	++	—	+
KKTHD-13	<i>Aletai Keketuohai</i>	MRS	+++	+	+	+++
ZF1-13	<i>Yili Zhaosu</i>	MRS	+	++	++	++
ZS4-1	<i>Yili Zhaosu</i>	M17	+	++	—	+++
KKTHB-10	<i>Aletai Keketuohai</i>	胆汁七叶灵昔叠氮钠	++	++	—	+
ZS1-1	<i>Yili Zhaosu</i>	Elliker	++	++	—	+
ZS3-1	<i>Yili Zhaosu</i>	M17	++	—	+	++
ZS6-8	<i>Yili Zhaosu</i>	M17	+	—	—	+
ZS2-7	<i>Yili Zhaosu</i>	Elliker	+	++	—	+++

续表

NLTB3-4	<i>Yili Nalati</i>	MRS	++	-	+	++
NLTD2-2	<i>Yili Nalati</i>	Elliker	++	+++	+++	++
ZS8-11	<i>Yili Zhaosu</i>	M17	+++	+	++	+++
GLM3-1	<i>Yili Gongliu</i>	MRS	+	++	-	++
ZF1-12	<i>Yili Zhaosu</i>	MRS	+++	-	-	+
KKTHB-11	<i>Aletai Keketuohai</i>	胆汁七叶灵昔叠氮钠	++	++	-	+
GLL4-1	<i>Yili Gongliu</i>	Elliker	++	-	+	++
ZS5-11	<i>Yili Zhaosu</i>	胆汁七叶灵昔叠氮钠	++	+++	+	+++
ZS5-12	<i>Yili Zhaosu</i>	Elliker	+	+	-	+
ZS7-4	<i>Yili Zhaosu</i>	M17	++	++	-	+
GLK1-2	<i>Yili Gongliu</i>	M17	++	-	+	++
ZS6-5	<i>Yili Zhaosu</i>	Elliker	+	++	-	+++
KKTHB-1	<i>Aletai Keketuohai</i>	MRS	+	+	-	+
KKTHC-22	<i>Aletai Keketuohai</i>	Elliker	++	++	++	+
NLTE-23	<i>Yili Nalati</i>	M17	++	+++	++	++
ZS1-3	<i>Yili Zhaosu</i>	Elliker	+	++	-	+++
ZS1-5	<i>Yili Zhaosu</i>	M17	+	+	-	+
ZS1-9	<i>Yili Zhaosu</i>	MRS	++	++	-	+
ZS2-5	<i>Yili Zhaosu</i>	Elliker	++	-	+	++
ZS2-10	<i>Yili Zhaosu</i>	MRS	+	++	-	++
ZS3-2	<i>Yili Zhaosu</i>	M17	++	-	-	+
ZS8-14	<i>Yili Zhaosu</i>	Elliker	++	++	-	+
ZS8-16	<i>Yili Zhaosu</i>	Elliker	+	+	-	+
NLTB2-5	<i>Yili Nalati</i>	MRS	+	++	+	-
NLTE4-1	<i>Yili Nalati</i>	M17	++	-	+	++
KKTHC-6	<i>Aletai Keketuohai</i>	MRS	++	-	-	+
ZS3-6	<i>Yili Zhaosu</i>	Elliker	++	++	-	+
ZS4-1	<i>Yili Zhaosu</i>	M17	+	++	+	-
ZS4-6	<i>Yili Zhaosu</i>	Elliker	++	++	-	+
ZS4-14	<i>Yili Zhaosu</i>	MRS	++	-	+	++
ZS5-1	<i>Yili Zhaosu</i>	MRS	+	++	-	+++
ZS5-4	<i>Yili Zhaosu</i>	MRS	+	++	+	-
ZS5-5	<i>Yili Zhaosu</i>	胆汁七叶灵昔叠氮钠	++	++	-	+
ZS5-10	<i>Yili Zhaosu</i>	M17	+	++	-	+++
ZS6-7	<i>Yili Zhaosu</i>	M17	+++	-	-	+
ZS6-10	<i>Yili Zhaosu</i>	M17	++	-	-	+
ZS8-6	<i>Yili Zhaosu</i>	MRS	++	++	-	+
ZS8-7	<i>Yili Zhaosu</i>	MRS	+	++	+	-
ZS8-13	<i>Yili Zhaosu</i>	Elliker	++	++	-	+

注：抑菌效果以抑菌圈的直径表示：-，≤8 mm (没有抑菌效果)；+，8~10 mm；++，10~15 mm；+++，15~20mm；++++，>20mm；牛津杯直径为8 mm

在具有抑菌活性的75株乳酸菌中，有12株菌对四种指示菌均具有抑制作用，所产生的抑菌圈在8mm~20mm范围内（牛津杯直径为7mm），抑菌圈直径如表3.2，同一乳酸菌对不同的指示菌的抑制效果有差异。

表3.2 产抑菌活性物质乳酸菌的初筛结果(抑菌圈直径单位：mm)

Table3.2 Preliminary screening results of bacteriostatic active material-producing lactic acid bacteria

菌株编号	指示菌			
	大肠杆菌	金黄葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	李斯特氏菌
NLT4-4	17.32	16.35	10.89	9.48
KKTHA-9	14.36	11.12	13.67	13.35
KKTHA-13	11.75	11.45	17.86	9.6
ZF1-13	12.45	17.01	15.08	10.09
KKTHD-13	16.18	12.35	20.15	14.35
NLTD2-2	16.25	12.88	13.15	8.16
GLM3-1	16.32	14.35	14.89	9.48
ZS5-11	13.46	11.56	12.35	12.98
KKTHC-1	14.37	11.12	13.67	13.35
KKTHC-22	11.76	11.35	17.66	9.6
NLTE-22	13.45	15.01	14.08	12.75
NLTE-23	12.22	14.66	15.40	11.20

注：表内数据为抑菌圈直径(mm). 数值为三次试验的平均值.

### 3.4.2 产细菌素乳酸菌菌株复筛结果

乳酸菌的代谢产物较多，而代谢产物中的酸、过氧化氢等对指示菌也具有一定的抑制作用，因此不能直接确定这12株菌抑制指示菌的物质就是细菌素，需要进一步探究确定。将发酵上清液的pH调至6，排除酸作用的干扰实验结果显示12株菌所产生的抑菌圈都还存在，只是直径都有不同程度的缩小。具体抑菌直径见表3.3，由表3.3说明乳酸菌代谢产物中的酸在一定条件下确实抑制了腐败菌的生长。在排除酸的作用的干扰后，乳酸菌发酵上清液的抑菌活性并未消失，证明其抑菌活性并非全由酸的产生而引起的（图3.1）。

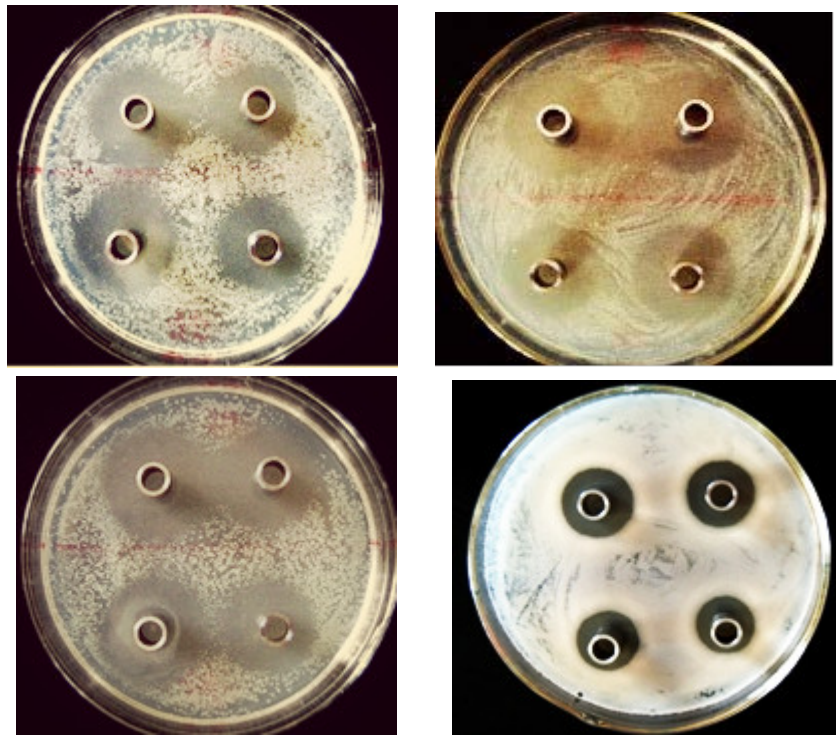


图 3.1 初筛抑菌图

Fig 3.1 Antibacterial picture of preliminary screening

同时将发酵上清液用过氧化氢酶处理后，抑菌圈直径虽略有下降但依然存在（表 3.3），实验结果表明除了乳酸菌代谢产生的过氧化氢，还有其他物质具有重要的抑制作用。

表3.3 排除酸及过氧化氢作用的抑菌试验结果

Table3.3 Bacteriostatic results of precluding acidoid's and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> effect

菌株号	大肠杆菌		金黄葡萄球菌		枯草芽孢杆菌		李斯特氏菌	
	酸干扰 排除	过氧化 氢排除	酸干扰 排除	过氧化 氢排除	酸干扰 排除	过氧化 氢排除	酸干扰 排除	过氧化 氢排除
NLT4-4	11.30	8.90	15.48	10.10	10.45	9.12	8.78	8.16
KKTHA-9	11.44	11.32	9.46	9.38	10.66	10.57	11.40	10.76
KKTHA-13	9.87	9.87	10.10	—	12.67	11.89	—	—
ZF1-13	11.75	10.35	15.05	10.07	13.46	11.55	9.35	8.70
KKTHD-13	11.45	10.55	12.15	11.10	18.20	17.15	13.15	11.20
NLTD2-2	—	—	9.35	—	11.65	11.10	—	—
GLM3-1	11.77	11.25	12.35	9.34	11.30	11.25	—	—
ZS5-11	13.71	13.45	10.33	10.05	17.22	16.63	12.88	11.35
KKTHC-1	—	—	9.40	—	12.08	12.66	11.75	11.10
KKTHC-22	11.70	11.25	10.45	9.25	11.3	11.25	—	—
NLTE-22	13.40	13.35	13.55	12.5	12.85	—	11.15	10.65
NLTE-23	12.14	11.56	11.22	10.35	12.35	13.66	—	10.80

注：表内数据为抑菌圈直径，“—”代表实验结果为阴性。数值为三次试验的平均值。

因为乳酸菌细菌素具有蛋白性质，为了确定抑菌物质是否具有蛋白性质，本章节用胃蛋白酶和胰蛋白酶进行酶解实验来确定乳酸菌产物中对指示菌有抑制作用的物质是否为具有蛋白性质的细菌素。从表3.4中实验结果可知，这12株菌的抑菌活性经过酶解后都有明显的变化，说明乳酸菌发酵上清液都对蛋白酶很敏感，证明抑菌物质是具有蛋白性质的物质。

表3.4 酶对细菌素活性的影响

Table 3.4 Effect of enzyme on the antibacterial activity of bacteriocin

菌株号	胰蛋白酶处理	胃蛋白酶处理
NLT4-4	—	—
KKTHA-9	+	—
KKTHA-13	—	—
ZF1-13	+	—
KKTHD-13	—	—
NLTD2-2	—	—
GLL4-1	—	—
GLM3-1	—	—
KKTHC-1	—	—
KKTHC-22	—	—
NLTE-22	—	—
NLTE-23	—	—

注：“-”代表实验结果为阴性，“+”代表实验结果为阳性

### 3.5 本章小结

本章选取 3 株革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*) 和 1 株革兰氏阴性菌大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 作为指示菌，用琼脂扩散法中的牛津杯法筛选对革兰氏阳性和革兰氏阴性菌都具有抑制作用的乳酸菌，这些抑菌谱较宽的菌在将来作为食品、饲料生物保护剂有很大的应用前景。

本章用新疆伊犁县、昭苏县、巩留县、新源县、那拉提以及可可托海干酪样品中筛选出的 202 株乳酸菌，筛选出来 75 株对指示菌具有不同程度抑制作用的菌株，其中 12 株菌对四种指示菌都具有抑制作用。对这 12 株菌的发酵上清液进行排除酸干扰和过氧化氢的作用后，依然具有抑菌性质。进一步检测发酵上清液中抑菌性质物质的蛋白质性质，这 12 株乳酸菌发酵上清液中存在蛋白质成分物质，这与 G. Rajaram 等人报道的乳酸菌产生具有抑菌活性的蛋白或多肽的结论相一致。根据有关文献报道及试验研究可初步鉴定，分离自新疆干酪的 12 株乳酸菌可能为产细菌素的菌株。国内外文献报道将排除酸干扰和过氧化氢的作用作为初步确定为细菌素的标准，更加确定的证明需要后续更为详细的深入研究。筛选高产细菌素的优质乳酸菌对于开发生物保鲜剂代替化学保鲜剂具有深远意义，奠定坚实理论基础。

## 第四章 乳酸菌 *Enterococcus* sp. KKTHD-13 和 *Lactococcus* sp.ZS5-11 产细菌素的生物学特性研究

### 4.1 引言

本章节选取第三章节筛选出具有较高抑菌活性的产细菌素的肠球菌 *Enterococcus* sp. KKTHD-13 和乳球菌 *Lactococcus* sp.ZS5-11 为研究对象, 实验进一步研究了这两株乳酸菌菌株的生长特性及其表型特征, 同时对它们产生细菌素的生长曲线、以及温度、pH、酶及表面活性剂对其产细菌素活性的影响也进行了分析, 以期进一步了解产细菌素乳酸菌的生长特性, 为开发安全的食品生物保鲜剂及其生产应用提供依据奠定深厚的理论基础。

### 4.2 实验材料

#### 4.2.1 菌株来源

第三章节中分离筛选的产细菌素的肠球菌 *Enterococcus* sp. KKTHD-13 和乳球菌 *Lactococcus* sp.ZS5-11。

#### 4.2.2 主要试剂和仪器

表 4.1 药品与试剂

Table 4.1 Reagents and leechdoms

名称	级别	生产商
SDS	AR	天津市福晨化学试剂厂
Tween 80	AR	天津市福晨化学试剂厂
Tween 20	AR	天津市福晨化学试剂厂
TritonX-100	AR	天津市巴斯夫化学试剂厂
尿素 (Urea)	AR	天津市福晨化学试剂厂
蛋白酶 K	AR	TAKARA 公司
胰蛋白酶	AR	TAKARA 公司
胃蛋白酶	AR	TAKARA 公司

#### 4.2.3 培养基

①LB 培养基②改良 MRS 培养基 (配方同上一章)

### 4.3 实验方法

#### 4.3.1 产细菌素乳酸菌代表菌株的鉴定

菌株的细胞形态、菌落形态、革兰氏染色、生理生化试验参照文献<sup>[67, 68]</sup>进行。尿素法提取菌株DNA, 用引物27F和1492R扩增这两株产细菌素乳酸菌16S rDNA。PCR 扩增得到的产物通过1.5% (w/v)琼脂糖凝胶电泳进行检测。PCR 扩增产物经凝胶电泳检测后, 送交上海美吉生物科技有限公司进行测序分析。将这两株菌的测序结果提交到GenBank数据库, 通过BLAST工具搜索同源性较高的序列, 并使用CLUSTAL X 1.81和MEGA 5.0软件对其进行比对分析并建立系统发育树。

#### 4.3.2 温度对细菌素抑菌活性的影响

把细菌素发酵上清液分别在不同温度下处理不同的时间，进行比较其抑菌活性。在冰浴、30℃、37℃、45℃、60℃、80℃、100℃水浴锅中分别放置培养 30min、60min、90min 和 120min，以及 121℃ 20min 处理，以未经处理的细菌素发酵上清液做对照，测定抑菌活性。

#### 4.3.3 pH、表面活性剂对细菌素抑菌活性的影响

为了检测 pH 对细菌素抑菌活性的影响，将这两株产细菌素乳酸菌上清液用 1N 的 HCl 或者 NaOH 调节 pH 值 2~10，pH6.0 为对照，室温培养 2h，再以 1M 的 HCL 和 1M 的 NaOH 将 pH 调至 6.0，牛津杯法检测其抑菌性，每个处理做三个平行，取平均值判断细菌素的 pH 敏感性。

选择 SDS，Tween 80，Tween 20，尿素(urea)和 Triton X-100 五种表面活性剂，以 1% (v/v) 的用量添加到这两株乳酸菌发酵上清液中，置于 37℃ 处理 5 h。以 1% (w/v) 表面活性剂添加到空白培养基作为对照，所有表面活性剂使用前配制成 10% (w/v) 的水溶液，并使用 0.22μm 微孔滤膜进行过滤。牛津杯法检测抑菌活性，每个处理做三个平行，取平均值判断细菌素对表面活性剂的敏感性。

#### 4.3.4 酶对细菌素活性的影响

为进一步检测菌株的发酵上清液对于蛋白酶的敏感性，选取蛋白酶 K、木瓜蛋白酶、胰蛋白酶和胃蛋白酶分别处理乳酸菌发酵上清液。先将这两株乳酸菌菌株的发酵上清液的 pH 调节至各种酶反应的最适 pH，再向其发酵液中添加各种酶，置于 37℃ 培养 2 h，再置于沸水浴中处理 5min，进行灭酶处理，再以 1M 的 HCL 和 1M 的 NaOH 将 pH 调至 6.0。其中，蛋白酶 K 和木瓜蛋白酶使用 10 mmol/l 的磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 进行溶解，添加终浓度为 0.1 mg/ml；胰蛋白酶用 1 M 的 Tris-HCl (pH 8.0) 预先溶解，添加终浓度 1mg/ml；胃蛋白酶则用 1 M HCl (pH 2.0) 溶解，添加 0.1 mg/ml。以添加了未经酶处理的缓冲液的乳酸菌发酵上清液和添加了各种酶处理后的空白培养基作为对照组。每个处理做三个平行试验，取平均值检测菌株的发酵上清液对于蛋白酶的敏感性。

#### 4.3.5 乳酸菌细菌素活性测定

将这两株产细菌素菌株以 2% 的接种量于 100mlMRS 培养基中于 37℃ 培养箱中培养 24h 后，用过滤灭菌的磷酸盐缓冲液 (20mM, pH6.0, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 对 pH 6.0 的发酵上清液连续稀释，直到稀释至其无抑菌效果的最高稀释倍数。选取李斯特菌作为指示菌，采用牛津杯法检测其抑菌活性 (AU/mL)。

$$AU/mL=1000D/V$$

注：D—稀释倍数；V—添加体积

## 4.4 结果与分析

### 4.4.1 代表菌株表型特性和系统发育分析

KKTHD-13 菌株的形态学试验结果显示(图 4.1): 该菌株  $G^+$ , 细胞呈球状, 成对或短链状排列, 无鞭毛、无芽孢、无荚膜。菌落直径约 1 mm、乳白色、圆形、凸起、边缘整齐、表面光滑。

ZS5-11 菌株的形态学试验结果显示(图 4.2): 该菌株  $G^+$ , 细胞呈球状, 无鞭毛、无芽孢、无荚膜。菌落直径约 0.8 mm、乳白色、圆形、凸起、边缘整齐、表面光滑, 湿润易挑起。

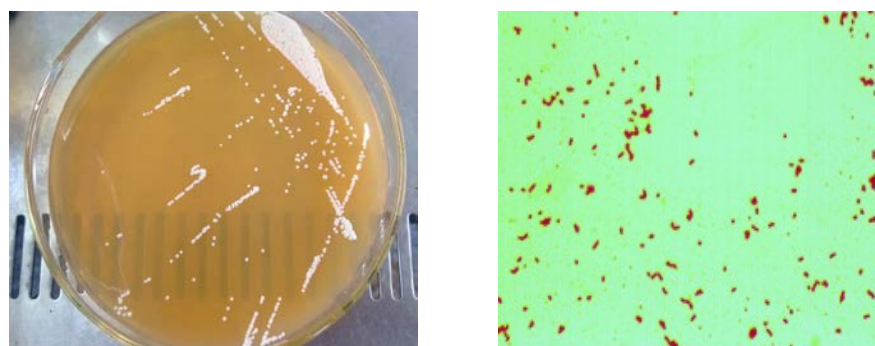


图 4.1 菌株 KKTHD-13 菌落与细胞形态

Fig.4.1 Colony characteristic and cell morphology of strain KKTHD-13

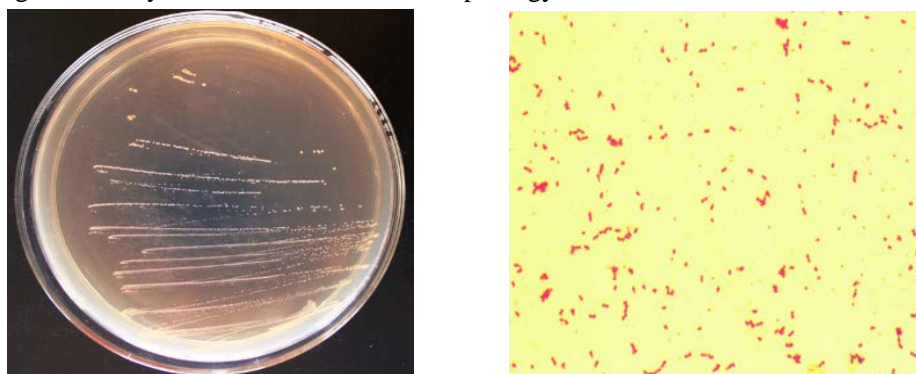


图 4.2 菌株 ZS5-11 菌落与细胞形态

Fig.4.2 Colony characteristic and cell morphology of strain ZS5-11

对菌株 KKTHD-13 的 16S rRNA 基因序列同源性分析并构建系统发育树 (图 4.3) 可知, 菌株 KKTHD-13 隶属于肠球菌属 (*Enterococcus*), 与已知种 *Enterococcus faecium* 系统发育关系最近, 序列同源性达到 99%, 同时与肠球菌其它几个种的亲缘关系也较近, 其中与 *Enterococcus mundtii* 的 16S rRNA 基因序列同源性达到 98%, 与 *Enterococcus avium*、*Enterococcus gilvus*、*Enterococcus durans*、*Enterococcus casseliflavus* 等的同源性也在 95% 以上, 因此参考微生物种鉴定的通用标准<sup>[69]</sup>, 在种水平上还不能明确确定 KKTHD-13 的系统发育地位, 只能初步将其确定为 *Enterococcus* sp.。

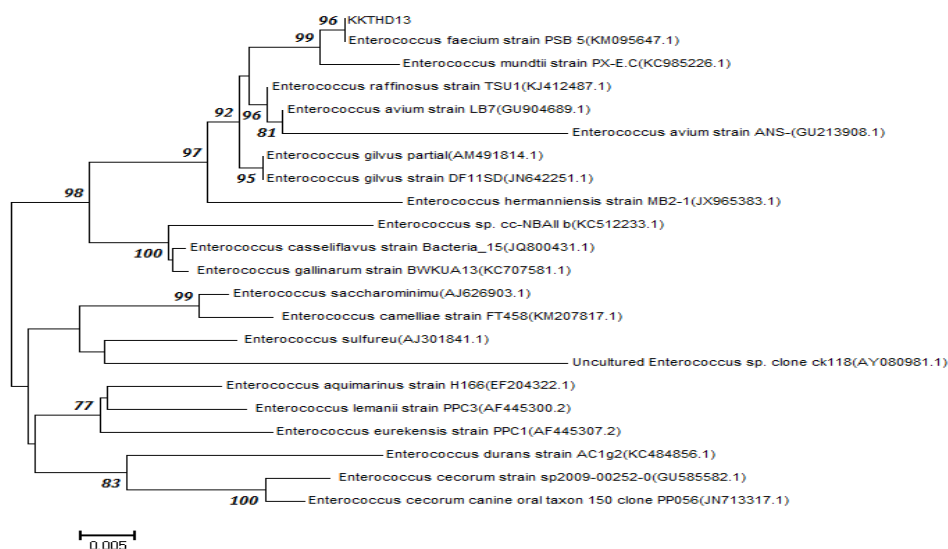


图 4.3 基于部分 16S rRNA 基因序列构建 KKTHD-13 的系统发育树

Fig. 4.3 Neighbour-joining tree showing the phylogenetic relationships among the strain KKTHD-13 16S rRNA gene partial sequences

对菌株 ZS5-11 的 16S rRNA 基因序列同源性分析并构建系统发育树(图 4.4)可知, 菌株 ZS5-11 隶属于乳球菌属 (*Lactococcus*), 与已知种 *Lactococcus garvieae* 系统发育关系最近, 序列同源性达到 100%, 同时与肠球菌其它几个种的亲缘关系也较近, 其中与 *Lactococcus lactis* 的 16S rRNA 基因序列同源性达到 99%, 与 *Lactococcus lactis* strain MNC33、*Lactococcus sp.*UNK2 等的同源性也在 95% 以上, 因此参考微生物种鉴定的通用标准<sup>[69]</sup>, 在种水平上还不能明确确定 ZS5-11 的系统发育地位, 只能初步将其确定为 *Lactococcus sp.*。

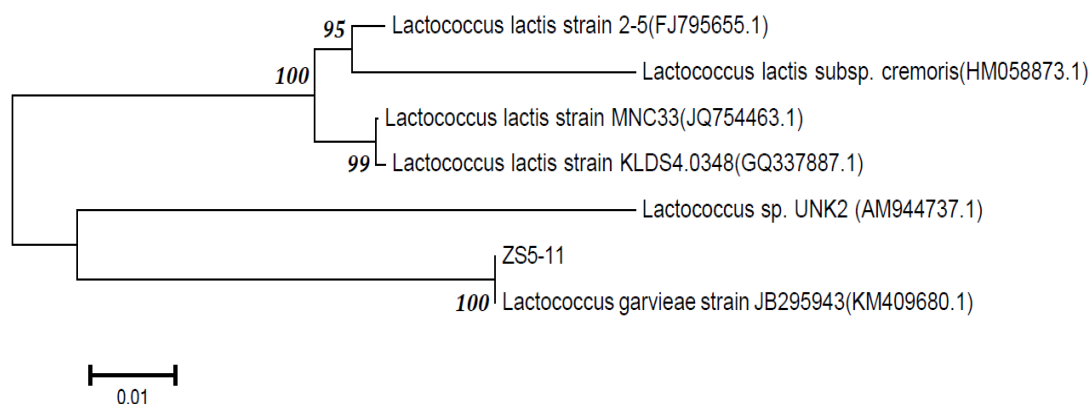


图 4.4 基于部分 16S rRNA 基因序列构建 ZS5-11 的系统发育树

Fig. 4.3 Neighbour-joining tree showing the phylogenetic relationships among the strain ZS5-11 16S rRNA gene partial sequences

#### 4.4.2 温度对细菌素抑菌活性的影响

如图 4.5 研究结果显示, 菌株 *Enterococcus sp.* KKTHD-13 和 *Lactococcus sp.* ZS5-11 的发酵上清液在热处理后仍然具有抑菌活性, 在 0~100℃ 处理 60 min 的范围内, 抑菌

活性基本不下降，但 100℃处理 120min 之后，发酵上清液的抑菌活性逐渐下降；用高压锅在 121℃处理 20min 后，发酵上清液抑菌活性几乎消失。因此菌株 *Enterococcus* sp. KKTTHD-13 和 *Lactococcus* sp.ZS5-11 产生的细菌素具有很强的热稳定性。实验结果与有关乳杆菌素<sup>[70]</sup>的研究报道的结果十分类似，显示了肠球菌素 *Enterococcus* sp. KKTTHD-13 和乳球菌 *Lactococcus* sp.ZS5-11 在食品加工中作为生物保鲜剂具有很好的应用发展前景。

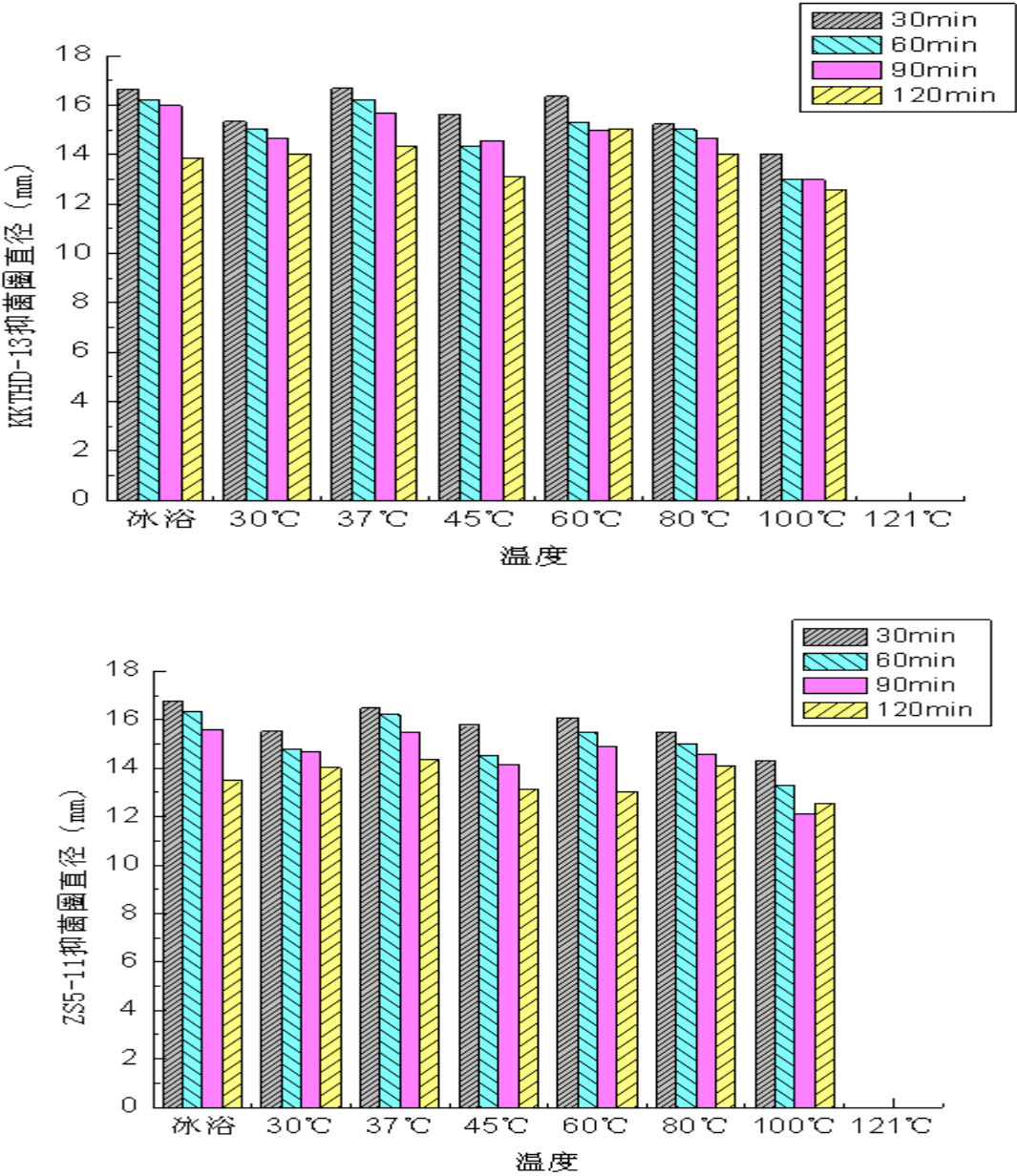


图4.5温度对细菌素活性的影响

Fig.4.4 Effect of temperature on the antibacterial activity of bacteriocin KKTTHD-13 and ZS5-11

#### 4.4.3 pH、酶、表面活性剂对细菌素活性的影响

菌株 *Enterococcus sp.* KKTHD-13 和 *Lactococcus sp.*ZS5-11 初始 MRS 培养液 pH 值为 6.3，接种培养 24 小时后，发酵液 pH 值下降为 4.5 左右，将发酵上清液调整到不同的 pH 值，其抑菌活性如表 4.1。实验结果显示，在 pH 4.0~6.0 的条件下，菌株抑菌物质的抑菌圈直径最大，显示出比较强的抑菌活性；在 pH 3.0 时，抑菌活性反而下降；在 pH 2.0 时，抑菌活性甚至全部消失了。实验结果彻底排除了在 pH 4.0~5.0 时，抑菌活性最大是因为酸的原因。此外，细菌素 KKTHD-13 和 ZS5-11 的抑菌活性在 pH3.0~9.0 的范围内都很稳定，预期在食品保鲜领域中应用时，在中性、弱碱性，特别是酸性环境中均具有较好的应用潜能。

如表 4.1，酶及表面活性剂试验结果表明，经四种蛋白酶处理后的发酵上清液几乎完全丧失抑菌活性，说明菌株的发酵上清液中的抑菌物质对蛋白酶比较敏感。菌株 *Enterococcus sp.* KKTHD-13 和 *Lactococcus sp.*ZS5-11 产生的细菌素在 1%(w/v)的 SDS、EDTA、Triton X-100、Tween80 存在下抑菌活性仍然保持稳定，在尿素 (Urea) 处理后抑菌活性消失。本研究试验结果与植物乳杆菌素 C19<sup>[71]</sup>、片球菌素 ST18<sup>[72]</sup> 的研究结果基本一致。

表4.1 pH、酶、表面活性剂对KKTHD-13和ZS5-11细菌素活性的影响

Table 4.1 Effect of pH and enzyme and chemistry reagent on the antibacterial activity of bacteriocin KKTHD-13 and ZS5-11

pH处理	KKTHD-13 抑菌活性	ZS5-11 抑菌活性	酶、表面活性剂处理		KKTHD-13 抑菌活性	ZS5-11 抑菌活性
2.0	—	—	过氧化氢酶	5mg/ml	++	++
3.0	+	+	胃蛋白酶	1mg/ml	—	—
4.0	+++	++	胰蛋白酶	1mg/ml	—	—
5.0	+++	+++	蛋白酶K	1mg/ml	—	+
6.0	+++	+++	木瓜蛋白酶	1mg/ml	—	—
7.0	++	++	EDTA	1%(w/v)	+++	++
8.0	++	++	Triton X-100	1%(w/v)	++	+++
9.0	+	+	NaCl	1%(w/v)	++	+
10.0	—	—	Urea	1%(w/v)	—	—
11.0	—	—	Tween80	1%(w/v)	++	++
12.0	—	—	SDS	1%(w/v)	+++	++++

注：抑菌效果以抑菌圈的直径表示：—，≤8 mm (没有抑菌效果)；+，8~10 mm；++，10~15 mm；+++，15~20mm；++++，>20mm；牛津杯直径为 8 mm

#### 4.3.5 乳酸菌细菌素活性

乳酸菌菌株 KKTHD-13 和 ZS5-11 接种于 MRS 液体培养基中于 37℃ 培养 24 h，采用牛津杯法测定其发酵上清液中细菌素的抑菌活性。由表 4.2 试验结果可见，菌株 KKTHD-13 细菌素活性达到 1500AU/mL，菌株 ZS5-11 其抑菌活性在 1250 AU/ mL。对

照组没有检测到抑菌活性。通过比较发现菌株 KKTTHD-13 和 ZS5-11 发酵上清液对李斯特菌的抑菌活性较高。

表 4.2 乳酸菌细菌素抑菌活性的测定 (AU/mL)  
Table 4.2 Antimicrobial activity assay of bacteriocins

菌株名称	培养条件	细菌素活性 (Bacteriocin activity, AU/mL)
KKTTHD-13	MRS broth, 37°C, 24h	1500
ZS5-11	MRS broth, 37°C, 24h	1250
对照	MRS broth, 37°C, 24h	0

#### 4.5 本章小结

细菌素是由微生物代谢产生的具有有杀菌或抑菌作用的多肽类物质，对同种近缘菌株呈现活性抑制谱。目前已发现的肠球菌素主要抑制革兰氏阳性菌，如肠球菌素 *mundticin* KS<sup>[73]</sup>，只有少数肠球菌素还能抑制大肠杆菌、沙门氏菌和假单胞菌等革兰氏阴性菌<sup>[74]</sup>，已发现的肠球菌素能抑制真菌和病毒很少。最近，岳喜庆等<sup>[75]</sup>的尿肠球菌 BC-3 所产细菌素能有效抑制米曲霉，发现的 *Enteriocin* ST5Ha<sup>[76]</sup>能抑制病毒的生长。本实验从干酪中分离出的肠球菌素 KKTTHD-13 不仅对常见的革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌、李斯特氏菌等有明显的抑制作用，而且还对革兰氏阴性菌大肠杆菌也有抑制作用。在后续的实验，我们将会进一步测定细菌素 KKTTHD-13 对更多的腐败菌以及一些真菌、病毒的抗性，全面揭示其抑菌谱，对其开发广泛应用于食品的生物保鲜剂具有实际的意义。

pH 值过高或过低都会对细菌素的蛋白结构有一定的影响，从而降低或丧失细菌素的抑菌活性，想要达到最好的抑菌活性，就要特别注意添加细菌素的的 pH 值环境<sup>[77]</sup>。目前已经发现的肠球菌素其抑菌活性都具有较为良好的 pH 稳定性，如肠球菌素 *Enteriocin* P21<sup>[77]</sup>、*Enteriocin* ST15<sup>[78]</sup>的抑菌活性 pH 范围是 2.0~12.0。而本实验肠球菌素 KKTTHD-13 的 pH 稳定范围 (3.0~9.0)，在食品生物保鲜过程中很稳定。肠球菌素 KKTTHD-13 具有较好的热稳定性，在 100°C 处理 60 min 后仍然具有抑菌活性，121°C 处理 20min 后抑菌活性消失，与 *Enterococcus mundtii* 所产肠球菌素 ST15<sup>[78]</sup>相仿。

目前，在国内外报道中乳球菌产生具有抑菌活性的细菌素也很多，本实验中筛选出的乳球菌 ZS5-11 也具有较好的抑菌活性。近年来，文献中关于生物保护剂的研究越来越多，研究表明微生物和它们的抗菌代谢产物具有作为天然防腐剂的潜力，不仅可以抑制食品中腐败微生物的生长，甚至可以使其失去活性。在贮藏食品中使用乳酸菌细菌素作为天然防腐剂大大提高了食品的安全性。在食品行业中，乳酸菌作为益生菌抑制腐败菌和食源性病原体，对食品贮藏过程中食品原料的营养品质的保证、货架期的延长做出的重要贡献，乳酸菌在抑制腐败菌的同时保留了食品感官品质如颜色、风味、口感和营养价值。本实验得到的优质产细菌素乳酸菌 KKTTHD-13 和 ZS5-11 将为后续开发生物保鲜剂提供强有力的理论依据。

## 第五章 结论与展望

### 5.1 结论

本研究是以新疆地区伊犁、昭苏、新源、巩留、可可托海等地的牧民自制干酪为样品，通过传统培养方法采用五种选择培养基，包括 MRS 琼脂培养基、Elliker 琼脂培养基、M17 培养基、胆汁七叶灵昔叠氮钠培养基和乳酸杆菌选择性培养基分离干酪中可培养乳酸菌，并进一步对干酪中分离出的乳酸菌的多样性进行分析，为干酪中乳酸菌资源的开发和利用奠定基础。采用琼脂扩散法中的牛津杯法从分离自干酪的乳酸菌中筛选产细菌素乳酸菌菌株，并对其中产细菌素的优质乳酸菌菌株进行生物学相关特性的研究，为开发乳酸菌生物保鲜剂奠定基础。本研究主要结论如下：

通过选择性培养基的传统分菌方法共分离得到 285 株纯培养物，通过初步筛选，得到 202 株革兰氏染色阳性并且过氧化氢酶阴性的疑似乳酸菌菌株，基于分离纯培养物的 16S rDNA 部分基因序列进行分析，发现 163 株菌株属于乳酸菌。由系统发育分析可知，163 株乳酸菌分别隶属于 *Enterococcus*、*Lactobacillus*、*Lactococcus*、*Weissella* 和 *Streptococcus* 五个属，其中 *Enterococcus* 属为优势菌群，占到乳酸菌的 62%。

采用牛津杯法，对分离自新疆地区干酪的 163 株乳酸菌进行抑菌活性的初步筛选，发现有 75 株菌株对李斯特菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌具有不同程度的抑制作用；对 75 株乳酸菌发酵上清液进行复筛试验，排除有机酸的影响后，试验结果显示，其中仍有 12 株乳酸菌菌株对李斯特菌具有显著的抑制作用。进一步分析发酵上清液中抑菌物质是否具有蛋白质性质，酶处理后发现，12 株乳酸菌发酵上清液的抑菌活性急剧下降甚至消失，其发酵上清液中可能存在细菌素或其他抑菌肽成分，这 12 株乳酸菌可能为产细菌素乳酸菌。

挑选其中 2 株对四种指示菌都具有显著抑菌活性的产细菌素的广谱高效乳酸菌菌株 KKT HD-13 和 ZS5-11，利用牛津杯法进一步探究其产细菌素的生物学特性，研究结果显示，这两株乳酸菌的发酵上清液在 60℃~100℃ 范围内依然具有抑菌活性，具有较好的热稳定性；乳酸菌发酵上清液在 pH 2~9 内都显示出抑菌活性，具有相对比较宽的抑菌 pH 范围；经不同蛋白酶处理后，两株乳酸菌都丧失其抑菌活性，具有较高的安全性，取代化学类食品添加剂应用于食品保鲜是乳酸菌生物保鲜剂的发展趋势。

### 5.2 展望

本课题依托新疆地区传统干酪资源中丰富的乳酸菌，表型特征与 16S rRNA 序列测定结合研究发现干酪中乳酸菌分别隶属于 *Enterococcus*、*Lactobacillus*、*Lactococcus*、*Weissella* 和 *Streptococcus* 五个属，其中 *Enterococcus* 属为优势菌群，占到乳酸菌的 62%，干酪中的乳酸菌具有丰富的多样性。从纯培养分离的乳酸菌中筛选得到 2 株高产细菌素的优质乳酸菌菌株，对其深入分析，细菌素作为一类具有广阔开发应用价值的天然食品保鲜剂，加大对细菌素的基础和应用研究力度，将对人类健康有着实际意义。因此，在后期研究中，可以对乳酸菌所产细菌素进行纯化的工作，并将产细菌素的菌株直接作为

接种剂或将纯化的细菌素应用于食品保鲜，观察分析其作为工业应用的潜力。也可通过分子学技术从菌株的序列筛选产细菌素基因来研究此细菌素的合成、作用模式，以便从分子方面尽快、安全的大规模应用于食品保鲜工业中。

### 5.3 本研究的不足和有待进一步研究的问题

本文采用的是传统分菌的方法与分离菌株 16S rDNA 部分基因序列结合的方法来分析干酪中乳酸菌的多样性，仅对干酪中分离出的可培养乳酸菌多样性的分析较为准确，但对于干酪中不可培养乳酸菌部分则无法进行分析，具有一定的局限性，并不能全面精准的分析干酪中乳酸菌的多样性的信息。本研究后续进一步结合分子生物学的手段，通过构建克隆文库或高通量测序的方法深入分析干酪微生物及其乳酸菌的多样性，进一步加深对干酪微生物群落组成及其乳酸菌多样性的理解，为新疆地区干酪乳酸菌资源的开发和利用奠定基础。

还需要进一步开展有关细菌素的纯化及其与细菌素有关的基因的克隆与表达的工作，以获得较高产量和纯度的细菌素；进一步研究细菌素的分子结构和其抑菌机理，为安全并广泛的使用新型细菌素的开发及细菌素在食品保鲜领域的应用提供理论支持。

## 参考文献

- [1]DEEGAN L H, COTTER P D, HILLA C, et al. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension[J]. *International Dairy Journal*, 2006, 16(9): 1058-1071.
- [2]郭本恒. 益生菌. 化学工业出版社. 2003:2-10.
- [3]Sarah Crowley, Jennifer Mahony and Douwe van Sinderen. Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. *Trends in Food Science & Technology* 33 (2013) 93e109.
- [4]S. Rouse, D.Harnett, A.Vaughan and D.van Sinderen.Lactic acid bacteria with potential to eliminate fungal spoilage in foods. *Journal of Applied Microbiology* 104 (2008) 915–923.
- [5]Jesper Magnusson,Katrin Strom , Stefan Roos, Jorgen Sjogren, Johan Schnurer.Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria.*FEMS Microbiology Letters* 219 (2003) 129-135.
- [6]李平兰, 张麓, 江汉湖.乳酸菌细菌素研究进展.微生物学通报, 1998, 25(5): 295-298.
- [7]袁玮.《贵州省苗族腌酸汤中产乳酸菌素菌的筛选与初步研究》华中农业大学硕士学位论文, 2010
- [8]张艾青, 刘书亮,《产广谱细菌素植物乳杆菌的初步研究及其在泡菜中的应用》四川农业大学, 硕士学位论文, 2007.
- [9]韩诚武.副干酪乳杆菌素抑菌活性及抑菌机理的研究.黑龙江大学硕士学位论文.2008:10-15.
- [10]J.A.Rei. A.T.Paula . S.N.Casarotti. A.L.B.Penna.Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications.*Food Eng Rev* (2012) 4:124–140.
- [11]S. J. Sathe, N. N. Nawani, P. K. Dhakephalkar and B.P. Kapadnis.Antifungal lactic acid bacteria with potential to prolong shelf-life of fresh vegetables.*Journal of Applied Microbiology* 103 (2007) 2622–2628.
- [12]Leistner L (1995) In: Gould GW (ed) *New methods of food preservation*. Blackie Academic, London.
- [13] Brul S, Coote P (1999) Preservative agents in foods mode of action and microbial resistance mechanisms.*Int J Food Microbiol*50:1-17.
- [14]Leistner L (2000) Basic aspects of food preservation by hurdle technology.*Int J Food Microbiol* 55:181-186.
- [15]Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML (2001) Bacteriocins:safe, natural antimicrobials for food preservation.*Int J Food Microbiol* 71:1-20.
- [16]Salminen S, Von Wright A, Ouwehand A (2004) *Lactic acidbacteria: microbiological and functional aspects*.Marcel Dekker, New York.
- [17]Davidson PM, Sofos JN, Branen AL (2005) *Antimicrobials in food*.CRC Press, Boca Raton.
- [18]Tamime AY (2005) *Probiotic dairy products*.Blackwell, Oxford.
- [19]Cotter PD, Hill C, Ross RP (2005) Bacteriocins: developing innate immunity for food.*Nat Rev Microbiol* 3:777-788.
- [20]Ga´lvez A, Abriouel H, Lo´pez RL, Omar NB (2007) Bacteriocinbased strategies for food biopreservation.*Int J Food Microbiol*120:5-70.
- [21]Riley MA, Chavan MA (2007) *Bacteriocins: ecology and evolution*.Springer, New York.
- [22]Annou S, Maqueta M, Mart´ınez-Bueno M, Valdivia E (2007)Biopreservation, an ecological approach to improve the safety and shelf-life of foods.*Appl Microbiol* 1:475-486.
- [23]LeBlanc JG, Lain˜o JE, Jua´rez VM, Vannini V, Van Sinderen D, Taranto MP, Font VG, Savoy GG, Sesma F (2011) B-Group vitamin production by lactic acid bacteria—current knowledge and potential applications.*J Appl Microbiol* 111:1297-1309.
- [24]Leistner L, Gorris LGM (1995) Food preservation by hurdle technology.*Food Sci Technol* 6:41-46.
- [25]Oliveira RBP, Oliveira AL, Gl´oria MBA (2008) Screening of lactic acid bacteria from vacuum packaged beef for antimicrobial activity.*Braz J Microbiol* 39:368–374.
- [26]De Vuyst L, Leroy F (2007) Bacteriocins from lactic acid bacteria:production, purification, and food applications.*J Mol Microbiol Biotechnol* 13:194-199.

- [27]Sobrinho-Lopez A, Marti'n-Belloso O (2008) Review: use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. *Int Dairy J* 18:329-343.
- [28]吕燕妮.戊糖乳杆菌31-1菌株产细菌素研究. 硕士学位论文. 北京: 中国农业大学, 2004.
- [29]崔建超.乳酸菌产生的细菌素的生物学特性及其在乳品中的应用. [硕士学位论文]. 河北: 河北农业大学, 2002.
- [30]ROGERSL A. The inhibiting effect of Streptococcus on Lactobacillus burglarious[J]. *Journal of Bacteriology*, 1928, 16: 321-325.
- [31]ROGERSL A. WHITTER E O. Limiting factors in the lactic fermentation[J]. *Journal of Bacteriology*, 1928, 16: 211-229.
- [32]Jack R W, Tagg J R, Ray B. B. Bacteriocins of Gram-positiVe bacteria[J]. *MiCrobiol Rev*, 1995, 1(59): 171—200.
- [33]HIRSCH A, GRINSTED E, CHA PMANHR, eta1. A note On the inbition of an anaerobic spore former in Swiss-type cheese by a NiSin producing Streptococcus[J]. *Journal of Diary Research*, 1951, 18: 198-204.
- [34]Hurst. A. NiSin. Adv[J]. *Appl. Microbiol*, 1981, 27: 85-123.
- [35]Li u, W. , &N. Hansen, Some chemical and physical properties of Nis in, a small protcin antibiotic produced by Lactococcus lactis[J]. *Appl. Environ Microbiol*, 1990, 56:2551-2558.
- [36]Gross E, Morell JL. The Strueture of Nisin[J]. *J. Am. Chem. Soc. ,*1971, 93: 4634-4639.
- [37]Buchman, A. R. ,Berg, P. Comparison of intrun-dependent and intton-independent gene expression[J]. *M01. Cell Biol. ,* 1988, 8(10): 4395-4405.
- [38]MuldersJ. W. M, BoerrigterI. J, Rollema H. S, eta1. Identiflection and charaeterzation of the lantiblotic nisinZ, a natrual nisin variant[J]. *Eur. J. Biochem*, 1991, 201: 581-584.
- [39]Jurgen Verluyten, Winy Messens, and Luc De Vuyst. Sodium Chloride Reduces production of CurvacinA, a Bacteriocin produced by, Originating from Fermented Sausage[J]. *Appl. Envir. Microbial*, 2004, 70: 2271-2278.
- [40]C. A. Van Reenen, W. H. Van Zyl, eta1. Expression of the Immunity Protein of Plantaricin 423, Produced by lactobacillus plantarum 423, and Analysis of the Plasmid Enceding the Bacteriocin[J]. *Appl. Envir. Microbiol*, 2006, 72: 7644-7651.
- [41]Imlke Wiedemann, TimB6ttiger, eta1. Lipid II—Based Antimicrobial Activity of the Lantibiotic PlantaricinC[J]. *Appl. Envir. Microbiol*, 2006, 72: 2809—2814.
- [42]方芳.《产细菌素乳酸菌的筛选、细菌素的纯化及其特性研究》, 内蒙古农业大学, 硕士学位论文, 2008.
- [43]Heo S, Lee SK, Lee CH, eta1. Morphological changes induced in *Listeria monocytogenes*V7 by a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. [J]. *J. Microbiol Biotechnol*, 2007, 17(4): 663-667.
- [44]Han KS, Kim Y, Kim SH, Oh S. Characterization and purification of acidocinIB, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* GPIB. [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2007, 17(5): 774-783.
- [45]CHEESEMAN G C, BERRIDGE N J. An improved method of preparing nisin[J]. *Biochemistry Journal*, 1957, 65: 603-608.
- [46]YANG R, JOHNSON M C, RAY B. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria[J]. *Applied and Environment Microbiology*, 1992, 58: 3335-3359.
- [47]CHEIGH C I, KOOK M C, KIM S B, eta1. Simple one-step purification of nisin Z from uncfarified culture broth of *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* A164 using expanded bed ion exchange chromatography[J]. *Biotechnology Letters*, 2004, 26: 1341-1345.
- [48]DAOUDI L, TURCOTTE C, LACROIX C, eta1. Production and characterization of anti-nisin Z monoclonal antibodies: suitability for distinguishing active from inactive forms through a competitive enzyme immunoassay[J]. *Applid Microbio Biotechnol*, 2001, 56: 114-119 .
- [49]HIRSCH A. The assay of the antibiotic nisin[J]. *Gen Microbiol*, 1954, 4: 70-74.

- [50]SUAREZ A M, AZCONA J I, RODRIGUEZ J M, et al. One-step purification of nisin A by immunoaffinity chromatography[J]. Applied and Environment Microbiology, 1997, 63:1990-4992.
- [51]GUENOLEE P, CARL T, LYNDAL L, et al. Rapid purification of nisin Z using specific monoclonal antibody-coated magnetic beads[J]. International Dairy Journal, 2000, 10: 627-633.
- [52]张艾青, 刘书亮, 敖灵. 产广谱细菌素乳酸菌的筛选和鉴定[J]. 微生物学通报, 2007, 34(4):753-756.
- [53]韩雪, 周志江. 乳酸片球菌细菌素的活性及特性的研究[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(4):19-21.
- [54]王蔚森, 潘玲, 周杰等. 青贮饲料中乳酸菌的体外抑菌试验及其细菌素的提取[J]. 饲料博览, 2006, 4:1-3.
- [55]刘双凤, 赵玲艳. 高效抑菌作用乳酸菌的选育[J]. 食品研究与开发, 2007, 128(8):33-37.
- [56]杨颖, 陈卫, 田丰伟等. 产抑菌物质乳杆菌的筛选及性质的研究[J]. 工业微生物, 2006, 36(3):13-17.
- [57]周雨霞, 雷霞, 张颖等. 传统干酪中一产细菌素乳酸乳球菌的筛选[J]. 乳业科学与技术, 2006, 2:59-61.
- [58]吕燕妮. 戊糖乳杆菌31-1菌株产细菌素研究[D]. 北京:中国农业大学硕士学位论文, 2004. 6:11-19.
- [59]曾志刚, 陈英, 余柏松. 细菌素产生菌的筛选及其细菌素的分离纯化[J]. 中国抗生素杂志, 2002, 28(5):257-259.
- [60]Jean-Ren. k, Seamus Condon, Roberta Lod, 2000:Improving the quality of European hard-cheeses by controlling of interactions between lactic acid bacteria and propionibacteria, Food Research International (33) 281-287.
- [61]凌代文, 东秀珠. 乳酸细菌分类鉴定及试验方法 [M]. 北京:中国轻工业出版社, 1999: 115 -128.
- [62]R.E.布克南, N.E.吉姆斯.伯杰细菌鉴定手册 (第九版) [M].北京科学出版社 594-607.
- [63]东秀珠、蔡妙英《常见细菌系统鉴定手册》[M].北京科学出版社, 2001:289-294.
- [64]董彩文, 毛多斌, 白燕红, 等. 产广谱细菌素口乳杆菌菌株的筛选和鉴定[J].食品工业科技 2009, 30( 5) :129-133.
- [65]李悦, 孙玉梅, 杨红, 等. 产细菌素乳酸菌的筛选及其发酵特性 [J].大连工业大学学报, 2008, 27( 1) :19-21.
- [66]ROSSELL M R,AMANN R. The species concept for prokaryotes[J]. FEMS Microbiol Rev, 2001, 25(1): 39-67.
- [67]Bauer R, Dicks LMT. Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics. Int J Food Microbiol, 2005, 101(2):201-216.
- [68]Montville TJ, Winkowski K, Ludescher RD, et al. Models and mechanisms for bacteriocin action and application. Int Dairy Journal, 1995, 5(8):797-814.
- [69]LEE N K, PAIK H D. Partial characterization of lacticin NK24, a newly identified bacteriocin of *Lactococcus lactis* NK24 isolated from Jeot-gal[J]. Food Microbiol. 2001,18(1): 17-24.
- [70]ATRIH A, REKHIF N, MOIR A.J G, et al. Mode of action, purification and amino acid sequence of plantaricin C19, an anti-Listeria bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* C19[J]. Int J Food Microbiol. 2001, 68(1-2):93-104.
- [71]TODOROV S D, DICKS L M T. Pediocin ST18, an anti-listerial bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* ST18 isolated from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria[J]. Process Biochem. 2005, 40(1):365-370.
- [72]KAWAMOTO S, SHIMA J, SATO R, et al. Biochemical and genetic characterization of mundticin KS, an antilisterial peptide produced by *Enterococcus mundtii* NFRI7393[J]. Appl Environ Microbiol. 2002,68(8):3830-3840.

- [73]刘国荣, 畅晓渊, 吴寒宇, 等. 屎肠球菌 M-2 产细菌素的纯化与特性分析[J]. 农业生物技术学报, 2009, 17(5): 925-930.
- [74]岳喜庆, 郭晨, 闵钟慢, 等. 产 II a 类细菌素乳酸菌的筛选、鉴定与生物学特性的研究[J]. 中国酿造, 2010(3): 56-59.
- [75]SVETOSLAV D T, MONICA W, ELISABETTA T, et al. Characterisation of an antiviral pediocin-like bacteriocin produced by *Enterococcus faecium*[J]. Food Microbiology. 2010,27(7):869-879.
- [76]周佳, 刘书亮, 胡欣洁, 等. 产宽谱pH 细菌素乳酸菌的筛选鉴定、毒力检测及细菌素特性研究[J]. 食品科学, 2009, 30(7): 215-219.
- [77]HERRANZ C, CASAUS P, MUKHOPADHYAY S, et al. *Enterococcus faecium* P21: a strain occurring naturally in dry-fermented sausages producing the class 2 bacteriocins enterocin A and enterocin B[J]. Food Microbiology, 2001, 18(2): 115-131.
- [78]DE KWAADSTENIET M, TODOROV S D, KNOETZE H, et al. Characterization of a 3944 Da bacteriocin, produced by *Enterococcus mundtii* ST15, with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria[J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 105(3): 433-444.

## 致谢

本论文是在导师倪永清教授的指导和严格要求下完成的，感谢导师在这两年对我学业上、生活上的指导和帮助。老师在学术研究领域有着自己独特的见解，在我完成课题实验期间，提供了很多具有创新的学术意见。倪老师有着渊博的学识，随时为我解决在实验中碰到的难题。在研究生两年的时间，老师那种忘我工作的敬业精神是我学习的榜样，对事业的不懈追求及追求完美的精神时刻鞭策着我，在课题结束之际，谨向老师表示我崇高的敬意和衷心的感谢。祝愿老师及家人健康快乐，永远幸福！

研究生两年的学习，吴超老师在工作及生活上给予我很多帮助，在此向老师表示我诚挚的谢意。同时感谢在实验期间，许程剑、李宝坤、姬华老师给予我的帮助，祝愿他们身体健康，合家欢乐！

同时非常感谢实验室课题组的成员倪亚雯、赵有婷、刘敏瑞等同学在实验中给予我的帮助，在此对他们深表谢意，祝他们前程似锦！

两年短暂的研究生学习，与同窗深厚的友谊是我一辈子宝贵的财富。在此，由衷得感谢所有支持帮助我的同学和朋友。

最后，谨以此论文献给我的父母。是父母的理解、支持、默默无闻的付出及无微不至的照顾，才使我能够全身心地投入到研究学习中，顺利完成学业。


## 作者简介

杨尚娇，女，生于 1989 年 8 月，籍贯新疆。2013 年 6 月获得新疆农业大学食品科学与药学学院食品科学与工程工学学士学位。同年 9 月起在石河子大学食品学院就读于食品加工与安全专业。在校期间，主要参与的研究项目:国家自然科学基金地区基金项目（31360001）。

在校期间发表的文章:

- 1 杨尚娇, 倪亚雯, 倪永清. 新疆传统干酪中 1 株产细菌素乳酸菌的筛选及其生物学特性. [J]. 中国酿造, 2015, 1.

## 石河子大学硕士研究生学位论文 导师评阅表

研究生姓名	杨尚娇	学制	两年
专业	食品加工与安全	研究方向	食品安全与检测技术
<p>学术评语:</p> <p>该生努力学习相关学科的理论和专业知 识，注重理论与实践相结合，具备扎实的基础理论知识和专业知识。研究了新疆地区伊犁、昭苏、巩留、新源、可可托海等地的牧民自制干酪为样品，通过传统培养方法采用五种选择培养基，包括 MRS 琼脂培养基、乳酸杆菌选择性培养基、M17 培养基、胆汁七叶灵苷叠氮钠培养基和 Elliker 琼脂培养基分离干酪中可培养乳酸菌并测序研究其系统多样性。采用琼脂扩散法中的牛津杯法从乳酸菌中初步筛选产细菌素的菌株并对其所产细菌素进行生物学特性的研究。最终分离出 285 株菌中 163 株菌株属于乳酸菌；12 株乳酸菌可能为产细菌素乳酸菌。</p> <p>杨尚娇在攻读硕士期间，学习刻苦上进，善于思考，做事认真踏实，善于团队合作。已完成了申请硕士学位所要求的全部课程，进一步深化了专业方面的理论学习，具备了较为完善的知识结构和理论水平。同时参与了国家自然基金项目的研究，掌握了科学研究的基本技术方法和手段，表现出较强的学习能力和科研能力。论文写作条理基本清晰、文字流畅，符合科技论文写作规范，完成了预期的研究目标，论文达到硕士学位论文的要求。</p> <div style="text-align: right; margin-top: 20px;">           指导教师签字:             2015 年 6 月 8 日         </div>			