

腌冬瓜中具有抑菌活性乳酸菌的鉴定及其抑菌特性的研究

黎浩田^{1,2}, 吴祖芳^{1,2*}

(1. 宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波 315211; 2. 宁波大学 教育部应用海洋生物技术重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要: 利用双层平板法从浙东传统腌制冬瓜中筛选得到1株具有抑菌活性的乳酸菌, 命名为L34。以大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和蜡状芽孢杆菌为指示菌, 利用牛津杯法测定乳酸菌发酵上清液的抑菌活性, 发现其抑菌活性物质具有热稳定性, 对部分蛋白酶敏感; 抑菌活性随pH值的降低而增强, 表现出对酸的依赖性。结合生理生化实验和16S rDNA序列比对结果, 鉴定L34为植物乳杆菌。

关键词: 腌冬瓜; 乳酸菌; 双层平板法; 16S rDNA; 抑菌特性

中图分类号: TQ920.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2016) 02-0012-06

腌冬瓜又名臭冬瓜, 是浙东地区一种传统的腌制蔬菜, 与臭芋茼蒿和臭苋菜梗并称为“宁波三臭”。其加工原理是利用一定浓度的食盐溶液产生高渗透压抑制不耐盐有害微生物的生长, 并利用附着于蔬菜表面的耐盐有益微生物(如乳酸菌)进行发酵。乳酸菌具有GRAS(公认为安全)资格^[1], 是冬瓜腌制过程中的优势菌^[2], 在冬瓜腌制成熟的过程中发挥了重要的作用, 通过乳酸菌的发酵所产生的有机酸(乳酸、醋酸、甲酸、丙酸、苯乳酸等)赋予食品柔和的酸味, 又能降低体系的pH值, 同时产生过氧化氢、双乙酰及细菌素等抑制食品中常见的腐败菌、同源性微生物和致病性革兰氏阴性菌的生长^[3-5]。

自1900年俄国生物学家梅契尼柯夫发现食用含乳酸杆菌的酸奶与长寿有关以来, 各国科学家对乳酸菌做了大量的研究, 如乳酸菌能调节肠道正常菌群、保持微生态平衡, 降低血清胆固醇, 抑制肠道腐败菌生长, 改善食品风味提高食品保藏性等^[6]。其中乳酸菌对常见的食品腐败菌如金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和沙门氏菌等具有抑制作用, 由此得到了重视。刘玉恩^[7]利用紫外诱变从发酵泡菜中筛选出1株产细菌素的植物乳杆菌, 并验证了其产生的细菌素的广谱抑菌效果。李兴峰等^[8-9]研

究了乳酸菌产生的苯乳酸的抑菌效果, 并从自然发酵泡菜中筛选得到苯乳酸高产菌株, 阐明了苯乳酸通过破坏细菌的细胞壁达到抑菌效果。国外学者如Santiago等^[10]将乳酸菌产生的片球菌素(pediocin)与包装薄膜联合应用于火腿的保存, 能抑制火腿中污染微生物生长的同时又减少了防腐剂的使用。Fooks等^[11]研究发现一种植物乳杆菌与低聚糖混合发酵能抑制大肠杆菌生长。目前, 国外研究主要集中在乳酸菌的抑菌机理和抑菌活性成分的分离鉴定^[12-14]。

腌冬瓜中有丰富的乳酸菌资源, 笔者拟从浙东传统腌冬瓜中筛选出对常见食品腐败菌具有较高抑菌活性的乳酸菌, 并研究其抑菌活性物质的热稳定性、蛋白酶敏感性和pH稳定性, 为发酵蔬菜中功能性乳酸菌的筛选和天然抑菌剂的开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

冬瓜 15 kg, 2014年春季购于宁波市区农贸市场; 食盐(浙江宁波晶泰盐业发展有限公司); Easy Pure Bacteria DNA Kit 试剂盒, 扩增用PCR体系(10×Buffer、MgCl₂、dNTPs、Ex-Taq polymerase); 胃

收稿日期: 2015-01-21.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://journal.lg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 国家自然科学基金(31171735); 宁波市农业择优委托项目(2012C10016)。

第一作者: 黎浩田(1990-), 男, 安徽安庆人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 食品生物技术. E-mail: lhtqmb@163.com

*通信作者: 吴祖芳(1963-), 男, 浙江奉化人, 博士/教授, 主要研究方向: 微生物应用技术. E-mail: wuzufang@nbu.edu.cn

蛋白酶,酶活 $3\,000\sim 3\,500\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$,北京索莱宝科技有限公司;胰蛋白酶,酶活 $\geq 50\,000\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$,国药化学试剂有限公司;木瓜蛋白酶,酶活 $\geq 500\,000\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$,北京索莱宝科技有限公司;菌种分别为金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和蜡状芽孢杆菌,宁波大学食品生物技术实验室保存。

1.2 仪器设备

D-37520 落地高速冷冻离心机,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;SPX-128 智能生化培养箱,宁波江南仪器厂;LDZX-50KBS 立式压力蒸汽灭菌器,上海申安医疗器械厂;PHS-3C 酸度计,上海精科仪器有限公司;IT041-0002 梯度 PCR 仪器,上海依赛科公司;AlphaImager 2200 凝胶成像系统,美国 Alpha 公司;牛津杯内径 $(6.0\pm 0.1)\text{ mm}$,外径 $(8.0\pm 0.1)\text{ mm}$,高 $(10\pm 0.1)\text{ mm}$;SW-CJ-2D 超净台,苏州净化设备有限公司;真空冷冻干燥机,SCIENTZ-18N;金属罩壳数显卡尺(精度 $\pm 0.03\text{ mm}$),浙江永康五金总汇。

1.3 培养基

MRS 培养基:杭州微生物试剂有限公司;LB 培养基:杭州微生物试剂有限公司;PCA 培养基:杭州微生物试剂有限公司

1.4 试验方法

1.4.1 冬瓜的腌制

按照传统浙东冬瓜的熟腌工艺进行,将新鲜冬瓜清洗干净后,称重、去子瓢,然后切成边长 8 cm 左右的方块在沸水中煮七分熟,按照每 12.5 kg 冬瓜加 0.8 kg 食盐的比例加入食盐,加盐同时要将冬瓜除皮以外的5个面都抹上食盐,以面对面、背对背的方式整齐的放入坛子中,放置于阴凉处 20 d 即可。

1.4.2 抑菌活性乳酸菌的筛选

(1)指示菌的确定.以4种常见食品污染菌为指示菌,将其接种于LB液体培养基中,培养 24 h (37°C , $150\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$),活化2代后,将细菌浓度调至 $1\times 10^8\text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$,备用。

(2)初筛和复筛.采用双层平板法初筛:吸取稀释后的熟腌冬瓜卤汁于平板底层,倾注约 20 mL 的MRS培养基,待MRS培养基凝固后,再在上层倒上1层LB培养基,将菌浓度为 $10^8\text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$ 大肠杆菌菌悬液于上层培养基涂布。 37°C 培养 48 h ,观

察抑菌情况。抑菌性质乳酸菌的复筛:利用打孔器将有抑菌圈的培养基打孔后,用接种环挑取1环抑菌区域较大菌株的菌落,于MRS培养基中, 37°C 静置培养 48 h 。将乳酸菌发酵上清液浓缩10倍后,并将MRS液体培养基调节至相同pH值作为空白对照实验,用牛津杯法测定其抑菌活性,选出抑菌活性较强菌株,并用游标卡尺测定其抑菌圈直径。

(3)乳酸菌活化及发酵上清液的制备.将分离所得的乳酸菌接种于MRS液体培养基中,活化2代后取培养液, 4°C 、 $8\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min ,取上清液,然后用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 无菌微膜过滤。再将所得上清液在冷冻干燥机中干燥 48 h ,用上清液十分之一体积的超纯水将其复原,置于 -20°C 冰箱中保存。

1.4.3 乳酸菌的鉴定

(1)乳酸菌生理生化实验.乳酸菌鉴定主要通过硫化氢实验、葡糖糖产酸产气实验、接触酶实验、淀粉水解实验、甲基红实验、VP实验、吲哚实验、明胶水解实验和革兰氏染色实验来进行鉴定^[15]。

(2)乳酸菌DNA的提取纯化.参照EasyPure Bacteria DNA Kit试剂盒的步骤提取乳酸菌DNA。

(3)PCR扩增.扩增引物采用通用引物,正向引物为27f:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';反向引物为1492r:5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3';宝生物工程(大连)有限公司合成。PCR扩增片段约为 $1\,500\text{ bp}$ 。PCR扩增所用的反应体系为: $10\times\text{PCR buffer } 2.5\text{ }\mu\text{L}$ 、 $25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 $\text{MgCl}_2\text{ } 2.5\text{ }\mu\text{L}$ 、 $2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的dNTP $2\text{ }\mu\text{L}$ 、 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的上下游引物 $1\text{ }\mu\text{L}$ 、模板DNA $0.5\text{ }\mu\text{L}$ 、 $5\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 的Takara Ex Taq酶 $0.2\text{ }\mu\text{L}$,用 ddH_2O 补足 $25\text{ }\mu\text{L}$ 体系。PCR反应的循环条件为: 94°C 预变性 5 min 、30个循环(94°C 变性 1 min 、 55°C 退火 1 min 、 72°C 延伸 1.5 min) 72°C 末端延伸 5 min 。

1.4.4 乳酸菌抑菌活性的确定

(1)蛋白酶的敏感性.在发酵上清液中加入胃蛋白酶,使最终质量浓度为1%。用NaOH($0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和HCl($0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)将乳酸菌发酵上清液pH值调至7.0,在发酵上清液中分别加入胰蛋白酶和木瓜蛋白酶,最终质量浓度为1%。在 37°C 保温 1 h ,然后测定其抑菌活性。

(2)热稳定性实验.将乳酸菌发酵上清液在 100°C 的水中水浴 30 min 后,用牛津杯法测定其抑菌

活性.

(3)pH 对抑菌活性影响. 用 NaOH($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)和 HCl($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)将乳酸菌发酵上清液 pH 值分调节为 2、3、4、5、6, 分别测定其抑菌活性, 并用相同 pH 值的乳酸做对照实验.

2 结果与分析

2.1 有抑菌活性乳酸菌的筛选

以大肠杆菌为指示菌, 利用双层平板拮抗法(图 1)共筛选得到具有抑菌活性的菌株 28 株, 分别命名为 Lc1~26, L22, L34. 将初筛得到的乳酸菌发酵上清液浓缩 10 倍, 以大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、蜡状芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌为指示菌, 利用牛津杯法测定其抑菌效果. 结果表明: 有 10 株试验菌对至少 1 株指示菌有抑制效果, 分别为 L22、Lc5、Lc26、Lc18、Lc24、L34、Lc3、Lc10、Lc14、

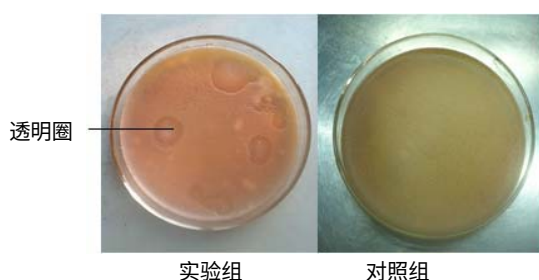


图 1 双层平板法筛选菌株

Lc20(表 1). 从表 1 可以看出, 各试验菌对指示菌表现出不同的抑菌效果, 同一试验菌对 4 株不同的指示菌的效果也不相同, 如 Lc20 对金黄色葡萄球菌、蜡状芽孢杆菌和大肠杆菌有抑制效果, 但是对枯草芽孢杆菌没有抑制效果. 综合 4 株指示菌的抑制效果来看, L34 的效果最好, 对 4 株菌的抑菌直径均达到 15 mm 以上, 因此选定 L34 作为此次筛选的目的菌株.

2.2 乳酸菌的鉴定

2.2.1 生理生化实验

复筛后的菌株活化后进行了基本的生理生化实验, L34 为革兰氏阳性, 过氧化氢酶阴性, 葡萄糖发酵产酸不产气, 不能水解淀粉. 菌落形状呈圆形, 乳白色不透明, 中央微微凸起, 光滑有光泽, 结果见表 2.

2.2.2 16S rDNA 序列分子生物学鉴定

将测得的菌株 L34 的 16S rDNA 序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比较, 发现与 GU125508 相似度达到 99%, 综合上述实验可以认为 L34 是植物乳杆菌(图 2).

2.3 乳酸菌抑菌活性的确定

2.3.1 乳酸菌发酵上清液的抑菌活性

利用牛津杯法测定 L34 对 4 株指示菌的抑菌活性, 产生明显抑菌透明圈, 作为空白对照的 MRS

表 1 乳酸菌发酵上清液抑菌活性

试验菌	金黄色葡萄球菌	蜡状芽孢杆菌	枯草芽孢杆菌	大肠杆菌
L22	++	+++	+++	+++
Lc5	++	++	+	+
Lc26	+++	+++	++	+++
Lc18	++	+++	+++	++
Lc24	+++	++	+++	+++
L34	+++	+++	+++	+++
Lc3	++	+	-	+
Lc10	+	++	+	-
Lc14	-	+	+	+
Lc20	++	++	-	+

注: 无抑菌活性(-); 轻抑菌活性: 抑菌圈直径小于 10 mm(+); 中抑菌活性: 抑菌圈直径 10~15 mm(++); 高抑菌活性: 抑菌圈直径>15 mm(+++).

表 2 菌株生理生化实验

项目	糖发酵	革兰氏染色	淀粉水解	接触酶	甲基红	VP	硫化氢	吲哚	明胶水解
L34	±	+	-	-	+	+	-	-	-

注: “+”表示反应呈阳性, “-”表示反应呈阴性, ±表示产酸不产气.

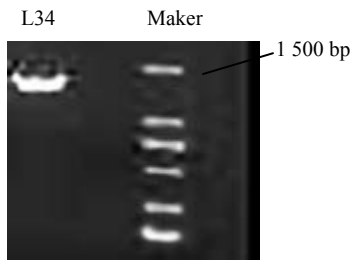


图 2 L34 菌株的 16S rDNA 片段扩增图

培养液未出现抑菌圈(图 3). 通过游标卡尺测定抑菌圈直径, 数据经 SPSS 软件处理, 发现 L34 对各指示菌有较强抑制作用, 且差异性显著($P<0.05$). 其中, L34 对蜡状芽孢杆菌抑制效果最强, 抑菌圈大小达到 (19.75 ± 0.12) mm, 对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和枯草芽孢杆菌抑菌圈大小分别为 (18.65 ± 0.18) mm、 (18.75 ± 0.14) mm 和 (16.60 ± 0.17) mm.



(1)蜡状芽孢杆菌 (2)金黄色葡萄球菌



(3)大肠杆菌 (4)枯草芽孢杆菌 (5)对照实验

图 3 L34 菌株发酵上清液对各指示菌的抑菌效果

2.3.2 乳酸菌 L34 抑菌性质热稳定性研究

将 L34 的发酵上清液置于 100 °C 的沸水浴 30 min 后, 测试其抑菌活性, 并以未加热的发酵上清液

做对照, 测量抑菌圈大小, 结果见表 3.

从表 3 数据可见, L34 发酵上清液经加热后的抑菌效果与未加热的原液抑菌效果相比没有显著差异性, 因此可认为乳酸菌 L34 的抑菌活性物质具有热稳定性. Pringsulaka 等^[16]发现从泰国发酵鱼类和肉类分离的乳酸菌在 121 °C 下保温 2 h 后, 仍具有较高的抑菌活性. 郭颖等^[17]也发现 1 株分离自内蒙古传统发酵乳制品中的植物乳杆菌在 100 °C 处理 120 min 后仍具有良好的抑菌活性. 由此可见, 乳酸菌发酵上清液的抑菌活性物质具有一定的热稳定性, 该性质有助于乳酸菌发酵产物在食品加工中的应用.

2.3.3 蛋白酶对乳酸菌 L34 抑菌活性稳定性的影响

在 L34 的发酵浓缩上清液加入胃蛋白酶、木瓜蛋白酶和胰蛋白酶(使蛋白酶最终质量浓度为 1%), 在 37 °C 保温 1 h, 测定其抑菌活性, 结果见表 4. 从表 4 数据可见, 经过胃蛋白酶处理后, L34 的发酵浓缩上清液的抑菌圈大小与未经处理的发酵浓缩上清液相比, 抑菌效果并未发生显著的变化, 可知乳酸菌 L34 的抑菌活性物质对胃蛋白酶并不敏感. 经过木瓜蛋白酶的作用后, L34 发酵上清液除对金黄色葡萄球菌的抑制效果没有显著性改变外, 对另外 3 株指示菌的抑菌效果均有所减弱, 抑菌圈大小差异显著. 将 L34 的发酵上清液中加入胰蛋白酶, 抑菌圈大小均较未处理的原发酵液减小, 差异显著, L34 发酵上清液抑菌圈大小平均值减小 2.6%. 据文献[18]报道, 乳酸菌产生的细菌素分类中有一种热稳定性好的小分子肽类物质. Todorov 等^[19]发现 1 株植物乳杆菌产生具有热稳定性的细菌素 ST28MS 和 ST26MS 经蛋白酶处理后, 能降低其抑

表 3 L34 发酵上清液经加热后抑菌结果(平均值) mm

乳酸菌		金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	蜡状芽孢杆菌	大肠杆菌
L34	热处理	18.34±0.24 ^a	16.58±0.11 ^a	19.44±0.21 ^a	18.55±0.2 ^a
	对照	18.65±0.18 ^a	16.60±0.17 ^a	19.75±0.12 ^a	18.75±0.14 ^a

注: 角标小写字母表示发酵上清液经处理后与对照组对同一指示菌的抑菌效果差异性($P<0.05$), 下同.

表 4 L34 发酵上清液经蛋白酶处理后抑菌结果(平均值) mm

乳酸菌		金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	蜡状芽孢杆菌	大肠杆菌
L34	胃蛋白酶	18.44±0.16 ^a	16.69±0.23 ^a	19.65±0.13 ^a	18.76±0.13 ^a
	木瓜蛋白酶	18.44±0.16 ^a	16.19±0.23 ^b	19.25±0.13 ^b	18.16±0.13 ^b
	胰蛋白酶	18.22±0.13 ^b	16.12±0.13 ^b	19.22±0.17 ^b	18.30±0.09 ^b

表5 L34 发酵上清液经调 pH 后的抑菌结果(平均值)

乳酸菌(pH)	调节 pH	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	蜡状芽孢杆菌	大肠杆菌
L34(4.75)	2	20.87±0.23 ^a	18.33±0.10 ^a	22.47±0.11 ^a	22.02±0.06
	3	20.40±0.15 ^b	18.26±0.11 ^a	22.23±0.21 ^a	21.86±0.12 ^a
	4	18.12±0.07 ^d	17.69±0.11 ^b	20.54±0.06 ^b	20.23±0.06 ^b
	5	18.14±0.12 ^d	微弱	微弱	16.97±0.15 ^d
	6	-	-	-	-
对照		18.65±0.18 ^c	16.60±0.17 ^b	19.75±0.12 ^c	18.75±0.14 ^c

菌活性。熊涛等^[20]发现植物乳杆菌 NCU116 抑菌活性物质含有对蛋白酶敏感的小分子肽类物质。综上可知, 乳酸菌 L34 的抑菌活性物质可能含有对部分蛋白酶敏感的小分子肽类。

2.3.4 pH 对乳酸菌 L34 抑菌活性稳定性的影响

乳酸菌 L34 发酵上清液经 NaOH 和 HCl 调 pH 至 2、3、4、5、6 后分别进行抑菌试验, 并与未经处理的发酵原液进行对比, 结果见表 5。从表 5 数据可见, pH 值为 2 时, 抑菌效果比原液的抑菌效果显著增强, 随着 pH 的增大, 抑菌圈大小逐渐减小; pH 值为 6 时, 发酵上清液对各指示菌没有抑制效果。同时为排除有机酸的影响, 用 NaOH 和 HCl 将乳酸溶液 pH 值分别调制为 2、3、4、5、6 的进行抑菌实验, 结果并未出现抑菌圈, 证明乳酸不是其主要的抑菌活性物质。由此可以总结出, 乳酸和 pH 并不是影响乳酸菌抑菌活性的主要因素, 但是随着 pH 的降低, 乳酸菌上清液的抑菌活性增大, 所以乳酸菌发酵上清液的抑菌性呈现对酸依赖, 酸度越小抑菌活性越强。国内赵智兴^[21]发现的分离自酸马奶酒中的乳酸菌抑菌为热稳定性且是酸依赖性物质。该性质有助于乳酸菌 L34 在酸性食品中发挥其抑菌活性。

3 结论

从浙东熟腌冬瓜中筛选出 1 株具有较高抑菌活性的植物乳杆菌, 命名为 L34。其发酵上清液对金黄色葡萄球菌、蜡状芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌和大肠杆菌有较强的抑菌活性, 其中对蜡状芽孢杆菌的抑制效果最强, 抑菌圈大小达到了(19.75±0.12) mm, 对枯草芽孢杆菌的抑制效果最弱, 但也能达到(16.6±0.17) mm。乳酸菌 L34 发酵上清液经 100℃处理 30 min 后, 抑菌圈大小并没有明显的变化, 显示了良好的热稳定性。L34 发酵上清液抑菌

活性物质对胃蛋白酶不敏感, 但经过木瓜蛋白酶和胰蛋白酶处理会降低其抑菌能力, 所以 L34 发酵液可能含有对这两类蛋白酶敏感的肽类物质; 乳酸和 pH 并不是影响其抑菌活性的主要因素, 但随着 pH 的降低其抑菌活性增强, 所以其抑菌活性表现出对酸的依赖性, 酸度越大, 抑菌活性越强。本实验利用双层平板拮抗法从浙东传统熟腌冬瓜中筛选出 1 株具有抑菌活性的乳酸菌, 探究了其抑菌活性的影响因素, 证明了浙东传统腌冬瓜具有抑制常见食品污染微生物功能乳酸菌的存在, 并为天然抑菌剂的开发提供了理论参考。

参考文献:

- [1] SAVADOGO A, OUATTARA C A T, BASSOLE I H N, et al. Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from Burkina Faso fermented milk[J]. Pakistan Journal of Nutrition, 2004, 3(3):174-179.
- [2] 沈锡权, 赵永威, 吴祖芳, 等. 冬瓜生腌过程中种群变化及其品质相关性[J]. 食品与生物技术学报, 2012, 31(4):111-115.
- [3] DEVUYST L, LEROY F. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications [J]. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2007, 13(4):194-199.
- [4] USAMI M, MIYOSHI M, KANBARA Y, et al. Effects of perioperative synbiotic treatment on infectious complications, intestinal integrity, and fecal flora and organic acids in hepatic surgery with or without cirrhosis[J]. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition, 2011, 35(3): 317-328.
- [5] RODRIGUEZ J M, MARTINEZ M I, HORN N, et al. Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria[J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 80(2):101-116.
- [6] 陈杰, 徐冲, 孙翠焕, 等. 乳酸菌在食品工业中的应用现状及发展前景[J]. 微生物学杂志, 2012, 32(3):91-94.

- [7] 刘玉恩. 泡菜中产细菌素植物乳杆菌的筛选及其所产细菌素生物学特性的研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2009.
- [8] 李兴峰, 江波, 潘蓓蕾, 等. 乳酸菌产生的新型抗菌物质——苯乳酸的抑菌性质及作用机理研究[J]. 乳业科学与技术, 2011, 34(2):94-98.
- [9] 李兴峰, 江波, 潘蓓蕾, 等. 产苯乳酸的乳酸菌分离筛选及菌种鉴定[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(2):1-4.
- [10] SANTIAGO S P, SOARES N F F, NÓBREGA J E, et al. Antimicrobial efficiency of film incorporated with pediocin (ALTA2351) on preservation of sliced ham[J]. Food Control, 2009, 20(1):85-89.
- [11] FOOKS L J, GIBSON G R. Mixed culture fermentation studies on the effects of synbiotics on the human intestinal pathogens *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli*[J]. Anaerobe, 2003, 9(5):231-242.
- [12] KAWAHARA T, IIDA A, TOYAMA Y, et al. Characterization of the bacteriocinogenic lactic acid bacteria *Lactobacillus curvatus* strain Y108 isolated from Nozawana-Zuke pickles[J]. Food Science and Technology Sesearch, 2010, 16(3):253-262.
- [13] BAUER R, DICKS L M T. Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics[J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 101(2):201-216.
- [14] ROUSE S, CANCHAYA C, VAN SINDEREN D. *Lactobacillus hordei* sp. nov., a bacteriocinogenic strain isolated from malted barley[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008, 58(9): 2013-2017.
- [15] 东秀珠, 凌代文. 乳酸菌细菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1996:86-101.
- [16] PRINGSULAKA O, THONGNGAM N, SUWANNASAI N, et al. Partial characterisation of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Thai fermented meat and fish products[J]. Food Control, 2012, 23(2):547-551.
- [17] 郭颖, 杨相宜, 单艺, 等. 一株植物乳杆菌的鉴定及其抑菌特性研究[J]. 中国乳品工业, 2013, 41(8):12-16.
- [18] 樊星, 张昊, 郭慧媛, 等. 乳酸菌抑菌功能的研究进展[J]. 中国乳业, 2012 (9):52-54.
- [19] TODOROV S D, DICKS L M T. *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2005, 36(2):318-326.
- [20] 熊涛, 宋苏华, 黄涛, 等. 植物乳杆菌 NCU116 抑菌性能的研究[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(6):97-101.
- [21] 赵智兴. 乳酸菌发酵上清液对肠道致病菌抑菌特性的研究[D]. 中国农业科学院, 2006.

Screening of Lactic Acid Bacteria with Antibacterial Activity from Pickled Wax Gourd and their Antibacterial Properties

LI Hao-tian^{1,2}, WU Zu-fang^{1,2*}

(1.School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2.Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: One lactic acid bacteria with antibacterial activity was obtained from pickled wax gourd in Eastern Zhejiang by using the double-plate method, and named as L34. The antibacterial activity of lactic acid fermentation supernatant was measured by of oxford cup method, with the *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* as indicator bacteria. The results showed that antibacterial substances are thermally-stable, sensitive to some kinds of the proteases. The antibacterial activity increased with the decrease in pH. It showed a dependence of the acids. The strain was identified as *Lactobacillus* by 16S rDNA molecular identification method.

Key words: pickled wax gourd; *Lactobacillus*; double-plate method; 16S rDNA; antibacterial properties

(责任编辑 章践立)