

# 抑制辣椒采后疫霉菌的乳酸菌筛选及相关特性分析

孙若兰<sup>1</sup>, 易有金<sup>1\*</sup>, 夏菠<sup>1\*</sup>, 胡楠<sup>1</sup>, 邓后勤<sup>1</sup>, 朱树清<sup>2</sup>, 朱利红<sup>3</sup>, 朱妮娜<sup>4</sup>

(1. 湖南农业大学食品科学技术学院, 湖南长沙 410128) (2. 汝城县繁华食品有限公司, 湖南郴州 424100)  
(3. 汝城县鑫利食品有限公司, 湖南郴州 424100) (4. 张家界洞溪七姊妹辣椒开发有限公司, 湖南张家界 427209)

**摘要:** 辣椒疫霉病对辣椒采后经济效益造成了较大损失, 但目前暂未见关于采后辣椒疫霉病的生物防治研究。该试验从自然发酵蔬菜中分离筛选出一株对辣椒疫霉菌具有抑制效果的乳酸菌 O2, 其对辣椒疫霉菌的菌落生长抑制率为 87.18%, 经 16S rDNA 和生理生化实验鉴定其为植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)。采用固体稀释法分析 O2 发酵上清液的理化特性、对辣椒疫霉菌的最小抑菌浓度 (MIC) 和最小杀菌浓度 (MBC), 采用固体稀释法和牛津杯法分别测定 O2 发酵上清液对辣椒采后致病菌和部分食源性致病菌的抑菌图谱。结果表明, O2 发酵上清液对过氧化氢酶、蛋白酶 K、胰蛋白酶、胃蛋白酶不敏感, 在温度 40~120 °C 和 15 W 紫外灯照射 30~150 min、pH 值 < 5 范围内抑菌物质稳定, 对辣椒疫霉菌的 MIC 和 MBC 分别为 12.8 mg/mL 和 25.6 mg/mL, 对红色炭疽菌、大肠杆菌、沙门氏菌、志贺氏菌和阪崎肠杆菌具有显著抑制效果。综上所述, 植物乳杆菌 O2 具有良好的抑制辣椒疫霉菌效果, 其代谢产物稳定性好, 可作为采后辣椒疫霉病的生物防治菌株进一步开发利用。

**关键词:** 辣椒采后; 辣椒疫霉菌; 乳酸菌; 抑菌

文章编号: 1673-9078(2022)11-63-72

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.11.1433

## Screening of Lactic Acid Bacteria against *Phytophthora capsici* in Postharvest Pepper and Analysis of Related Characteristics

SUN Ruolan<sup>1</sup>, YI Youjin<sup>1\*</sup>, XIA Bo<sup>1\*</sup>, HU Nan<sup>1</sup>, DENG Houqin<sup>1</sup>, ZHU Shuqing<sup>2</sup>, ZHU Lihong<sup>3</sup>, ZHU Nina<sup>4</sup>

(1. College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)  
(2. Rucheng Fanhua Food Co. Ltd., Chenzhou 424100, China) (3. Rucheng Xinli Food Co. Ltd., Chenzhou 424100, China)  
(4. Zhangjiajie Dongxi Qizimei Pepper Development Co. Ltd., Zhangjiajie 427209, China)

**Abstract:** The *Phytophthora capsici* disease has caused great losses to the economic benefits of postharvest pepper, but there has been no study on the biological control of *Phytophthora capsici* disease in postharvest pepper. In this experiment, a strain of lactic acid bacteria O2 with an inhibitory effect on *Phytophthora capsici* was isolated and screened from natural fermented vegetables. Its colony growth inhibition rate against *Phytophthora capsici* was 87.18%. It was identified as *Lactobacillus plantarum* by 16s rDNA sequence Analysis and based on physiological and biochemical experiments. The physicochemical properties, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of the O2 fermentation supernatant against *Phytophthora capsici* were analyzed by the solid dilution method. The antibacterial profiles of the O2 fermentation supernatant against the postharvest pathogenic bacteria and some foodborne pathogens were determined by the solid dilution method and Oxford cup method. The results showed that the supernatant of O2 fermentation was insensitive to catalase, protease K, trypsin and pepsin, and the antibacterial substances remained stable in the temperature range of 40~120 °C, after 15 W UV lamp irradiation for 30~150 min,

引文格式:

孙若兰, 易有金, 夏菠, 等. 抑制辣椒采后疫霉菌的乳酸菌筛选及相关特性分析[J]. 现代食品科技, 2022, 38(11): 63-72

SUN Ruolan, YI Youjin, XIA Bo, et al. Screening of lactic acid bacteria against *Phytophthora capsici* in postharvest pepper and analysis of related characteristics [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(11): 63-72

收稿日期: 2021-12-21

基金项目: 湖南省重点研发计划项目 (2021NK2014); 湖南省研究生创新科研项目 (CX20220683); 湖南农业大学研究生创新科研项目 (2021.63); 长沙市自然科学基金资助项目 (kq2202224); 湖南农业大学第三批重大科研项目 (创新团队培育工程 2019); 湖南农业大学“双一流”学科建设项目 (SYL2019061)

作者简介: 孙若兰 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 营养与食品卫生, E-mail: 2491406790@qq.com

通讯作者: 易有金 (1968-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 微生物资源开发与利用, E-mail: yiyoujin@163.com; 共同通讯作者: 夏菠 (1980-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 微生物源天然产物开发与利用, E-mail: julinumber2@sina.com

and at pH < 5. The MIC and MBC of the O2 fermentation supernatant against *Phytophthora capsici* were 12.8 mg/mL and 25.6 mg/mL, respectively, and exhibited significant inhibitory effects against *Colletotrichum gloeosporioides*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella* and *Enterobacter sakazakii*. In summary, *Lactobacillus plantarum* O2 has a good inhibitory effect against *Phytophthora capsici*, and its metabolites high sound stability, thus, can be further developed and utilized as a strain for biological control of postharvest *Phytophthora capsici* disease.

**Key words:** postharvest pepper; *Phytophthora capsici*; lactic acid bacteria; bacteriostasis

辣椒疫霉菌 (*Phytophthora capsici*) 是引起辣椒采后病害的常见病原菌之一, 最适生长温度为 24~26 °C<sup>[1,2]</sup>。在侵染发病之前, 辣椒疫霉菌具有 2 d 左右的潜伏期, 因此采收时看起来健康的果实在采后贮藏和运输过程中可能会出现腐烂<sup>[3]</sup>。肖晶等<sup>[4]</sup>研究发现, 辣椒常温贮存 5 d 后, 果身可出现疫霉病害症状, 15 d 后平均发病率为 5%, 在辣椒采后病害中排名第六。辣椒疫霉菌寄主广泛, 除侵染辣椒之外, 还能够侵染黄瓜、番茄和南瓜等其他茄果类蔬菜, 因此使果蔬采后经济价值受到了较大的损失<sup>[5]</sup>。目前, 暂未见关于采后辣椒疫霉菌的生物防治研究, 所以开发一种安全、绿色且高效的辣椒采后疫霉病抑制剂变得十分迫切<sup>[6]</sup>。

乳酸菌 (Lactic Acid Bacteria, LAB) 是一类常见于发酵食品、人类胃肠道中的益生菌, 能通过发酵多种碳源产生具有抑菌能力的有机酸和细菌素, 具有抗氧化、改善肠道环境、抗菌保鲜的功效<sup>[7-9]</sup>。因具有公认的安全状态 (GRAS), 乳酸菌被认为是抑制食品真菌生长及霉菌毒素产生的天然防腐剂, 成为了许多传统化学杀菌剂的替代品<sup>[10-12]</sup>。近年来, 使用乳酸菌及其代谢产物对果蔬采后抑菌及保鲜的研究逐渐深入, 已被证实具有抑制真菌效果的乳酸菌主要有植物乳杆菌、乳酸链球菌、鼠李糖乳杆菌等<sup>[13]</sup>。Xiang 等<sup>[14]</sup>研究发现, 保加利亚乳杆菌 F17 和乳酸明串珠菌 H52 对霉菌和大肠菌群具有明显的抑制作用, 具有草莓采后保鲜效果。Melo 等<sup>[15]</sup>研究发现乳酸菌发酵液对樱桃番茄采后致病镰刀菌、黑曲霉菌和匍匐根霉菌具有抑制效果, 然而, 关于乳酸菌及其代谢产物对辣椒采后疫霉病的生物防治研究尚未见报道。

鉴于此, 本研究旨在从发酵蔬菜中分离筛选出一株对辣椒疫霉菌具有明显抑菌效果的乳酸菌, 并对该乳酸菌进行菌种鉴定、对其产酸能力进行测定。研究发酵上清液对辣椒疫霉菌的抑制效果以及理化性质, 为抑制辣椒疫霉菌生长和防控辣椒采后疫霉病提供乳酸菌菌种资源及数据参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

#### 1.1.1 试验材料

蔬菜原材料 (辣椒、豇豆、白萝卜、黄瓜、卷心菜、甘薯) 购于湖南省衡阳市。

#### 1.1.2 试验菌株

辣椒疫霉菌 (*Phytophthora capsici*) 由湖南农业大学植物保护学院赠予。辣椒根霉菌 (*Rhizopus* spp.)、辣椒红色炭疽菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*)、辣椒黑色炭疽菌 (*Colletotrichum nigrum*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、沙门氏菌 (*Salmonella*)、志贺氏菌 (*Shigella*)、阪崎肠杆菌 (*Enterobacter sakazakii*)、单核细胞增生李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*) 由湖南农业大学食品科技学院微生物实验室提供。

#### 1.1.3 培养基与试剂

MRS 肉汤、营养肉汤 (NB)、马铃薯葡萄糖培养基 (PDB) 广东环凯微生物科技有限公司; 脑心浸液肉汤 (BHI) 杭州百思生物技术有限公司; 以上培养基加入 18 g 琼脂粉即配制为相对应的固体培养基。

碳酸钙、氯化钠、明胶、体积分数 30% 过氧化氢 (分析纯) 国药集团化学试剂有限公司; 过氧化氢酶、蛋白酶 K、胰蛋白酶、胃蛋白酶福州飞净生物科技有限公司; Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒、SanPrep 柱式 DNA 回收试剂盒、DNA Ladder Mix maker、dNTP 生工生物工程 (上海) 有限公司; 氨苄青霉素钠上海瑞永生物科技有限公司; 多菌灵江苏达捷生物科技有限公司。

## 1.2 仪器与设备

净化工作台, 上海新苗医疗器械制造有限公司; 7200 分光光度计, 上海尤尼柯仪器有限公司; LRH-250 智能生化培养箱, 上海飞跃实验仪器有限公司; HR/T16M 台式高速冷冻离心机, 湖南赫西仪器装备有限公司; HR/T16M 台式高速冷冻离心机, 湖南赫西仪器装备有限公司; FD-1-50 真空冷冻干燥机, 北京博医康实验仪器有限公司。

## 1.3 试验方法

### 1.3.1 自然发酵蔬菜制作

将辣椒、豇豆、白萝卜、黄瓜、卷心菜、甘薯洗

净切分晾晒至表面无水分后入坛,加入5% (*m/m*) 食用盐,冷开水浸没蔬菜,密封坛盖,室温静置发酵14 d;或加入8% (*m/m*) 食用盐至上述晾干蔬菜表面,进行盐渍处理,室温静置发酵14 d。

### 1.3.2 乳酸菌初步分离

采用稀释涂布平板法,取10 g采集样品至50 mL 无菌0.85% (*m/V*) NaCl,旋涡混匀,依次进行 $10^{-1}$ ~ $10^{-4}$ 浓度梯度的稀释。各梯度取100  $\mu$ L涂布在含2% CaCO<sub>3</sub> (*m/V*) 的MRS固体培养基,37  $^{\circ}$ C培养48 h~72 h。挑取具有明显溶钙圈的菌落,多次划线纯化直至菌落形态单一、镜检无杂菌,将革兰氏染色阳性、过氧化氢酶阴性的乳酸菌株,4  $^{\circ}$ C斜面保藏备用。

### 1.3.3 乳酸菌发酵上清液制备

取保藏菌株,经MRS肉汤活化两次后,以3%添加量添加菌株至MRS肉汤,37  $^{\circ}$ C静置培养72 h,8 000 r/min离心10 min,上清液经0.22  $\mu$ m滤膜过滤除菌,4  $^{\circ}$ C保存。

### 1.3.4 乳酸菌筛选

采用固体稀释法,待PDA培养基冷却至55  $^{\circ}$ C左右,以发酵上清液为试验组、无菌水为对照,按照1:9 (*V:V*) 的比例(发酵上清液为1, PDA培养基为9)将发酵上清液与培养基混合均匀,每皿注入约20 mL混合液。培养基冷却凝固后,在中央加入一块4 mm辣椒疫霉菌菌饼,28  $^{\circ}$ C正置培养7 d,采用十字交叉法测量菌落生成直径,并代入公式计算菌落生长抑制率,记录抑菌效果最佳的菌株,-80  $^{\circ}$ C甘油冻存管保藏菌株备用。

$$B = \frac{d_0 - d_1}{d_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

$B$ ——菌落生长抑制率, %;

$d_0$ ——对照组菌落直径, mm;

$d_1$ ——试验组菌落直径, mm。

### 1.3.5 菌株鉴定

参考《伯杰细菌鉴定手册》<sup>[16]</sup>对筛选菌株进行生化试验,使用Ezup柱式细菌基因组DNA抽提试剂盒进行菌株基因组DNA提取;选用细菌通用引物27F: 5'-AGT TTG ATC MTG GCT CAG-3', 1492R: 5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'进行PCR扩增;PCR产物经1wt%琼脂糖凝胶电泳纯化后,交由生物工程(上海)股份有限公司进行16S rDNA序列比对鉴定。

### 1.3.6 乳酸菌生长曲线、产酸能力

于超净台挑取一环菌落接入30 mL MRS肉汤,静置培养18 h作为种子培养液,以5%的接种量转移至

新鲜MRS肉汤,37  $^{\circ}$ C静置培养,在0、2、4、6、8、10、16、22、28、34、40、46、52、58 h取样,测定pH值及其在600 nm处吸光度值,绘制变化曲线。

### 1.3.7 发酵上清液理化性质

#### 1.3.7.1 过氧化氢酶敏感性

在菌株O2的发酵上清液中加入过氧化氢酶,使其终浓度为5 mg/mL,37  $^{\circ}$ C水浴24 h后,80  $^{\circ}$ C水浴处理5 min对酶灭活,恢复室温后0.22  $\mu$ m滤膜过滤除菌,按照“1.3.4”进行抑菌检测,以不做任何处理为对照。

#### 1.3.7.2 蛋白酶敏感性

使用6 mol/L HCl和10 mol/L NaOH将发酵上清液pH值分别调至蛋白酶K、胰蛋白酶、胃蛋白酶最适pH值,以1 mg/mL的浓度分别添加三种蛋白酶至上清液,37  $^{\circ}$ C水浴2 h后,调节pH值至上清液原浓度,以不做任何处理为对照,按照“1.3.4”进行抑菌检测。

#### 1.3.7.3 热稳定性测定

发酵上清液分别于40、60、80、100、120  $^{\circ}$ C条件下加热30 min,以不做任何处理的室温为对照,按照“1.3.4”进行抑菌检测。

#### 1.3.7.4 紫外线照射敏感性

取发酵上清液置于15 W紫外灯25 cm处,分别照射30、60、90、120、150 min,以未处理发酵上清液作为对照,按照“1.3.4”进行抑菌检测。

#### 1.3.7.5 酸碱稳定性

使用6 mol/L HCl和10 mol/L NaOH于室温下将发酵上清液pH值分别调至2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12,用无菌水定容发酵上清液至同等体积作为对照(pH值3.60),0.22  $\mu$ m滤膜过滤除菌后按照“1.3.4”进行抑菌检测;

### 1.3.8 发酵上清液冻干制备

菌株O2以3%添加量添加至MRS肉汤,37  $^{\circ}$ C静置培养72 h,8 000 r/min离心10 min,上清液经0.22  $\mu$ m滤膜过滤除菌后取10 mL分装于50 mL离心管,-80  $^{\circ}$ C预冷12 h,冷冻干燥48 h后得到褐色蜂窝状冻干,置于-80  $^{\circ}$ C保藏备用。

### 1.3.9 发酵上清液对辣椒疫霉菌最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)

称取适量发酵上清液冻干粉溶解于PDB培养基中,采用二倍稀释法分别配制成256.0、128.0、64.0、32.0、16.0、8.0、4.0、2.0、1.0 mg/mL九个浓度梯度,以无菌水为对照,使用0.22  $\mu$ m滤膜过膜除菌,4  $^{\circ}$ C保存备用。按照“1.3.4”方法进行处理,使发酵上清液终浓度分别为25.6、12.8、6.4、3.2、1.6、0.8、0.4、0.2、0.1、0 mg/mL,以无疫霉菌生长的最低发酵上清

液浓度为最小抑菌浓度。在最小抑菌浓度试验的基础上,继续培养7d,以在14d内无辣椒疫霉菌生长的最低发酵上清液浓度为最小杀菌浓度。

### 1.3.10 发酵上清液抑菌谱

#### 1.3.10.1 发酵上清液对辣椒采后致病菌的抑菌作用

辣椒采后致病菌抑菌试验以乳酸菌发酵上清液为试验组、无菌MRS肉汤为对照、5 μg/mL多菌灵为阳性对照,无菌水为空白对照,按“1.3.4”进行抑菌检测。

#### 1.3.10.2 发酵上清液对常见食源性致病菌的抑菌作用

食源性致病菌抑菌试验采用牛津杯法<sup>[17]</sup>,每平皿倾注20 mL培养基(金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、沙门氏菌使用NA培养基;志贺氏菌、阪崎肠杆菌、单核细胞增生李斯特氏菌使用BHI培养基),调整致病菌浓度至每毫升 $1 \times 10^8$ 个,每平皿涂布100 μL菌悬液,静置5 min后,将无菌牛津杯置于固体培养基表面,添加100 μL发酵液至牛津杯,同时以无菌MRS肉汤作为对照,以100 μg/mL氨苄青霉素钠作为阳性对照,4℃静置4 h后,37℃静置16 h,测量抑菌圈直径,每个处理重复三次。

## 1.4 数据处理与统计分析

采用Excel 2010与SPSS 20统计软件进行试验数据处理与分析,使用OriginPro 2021进行图片绘制,显著性分析采用Tukey test法, $p < 0.05$ 为差异显著。

## 2 结果与讨论

### 2.1 乳酸菌筛选

本试验从不同自制发酵蔬菜中初步筛选出生长良好的乳酸菌8株,分别命名为C1、E2、G1、G2、M1、O1、O2、P1。采用固体稀释法,从8株菌株中筛选一株对辣椒疫霉菌具有抑菌活性乳酸菌,结果见图1。

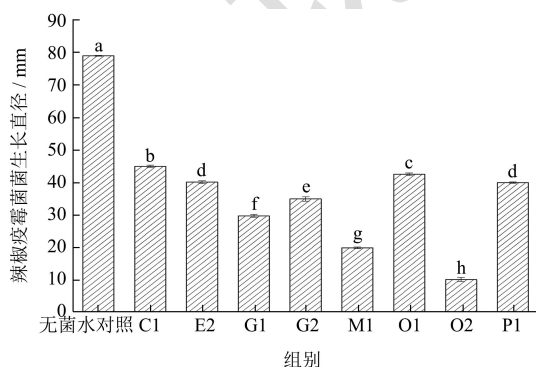


图1 不同乳酸菌对辣椒疫霉菌的菌落生长抑制率

Fig.1 The colony growth inhibition rate of different lactic acid bacteria against *Phytophthora capsici*

注:不同小写字母表示各组间差异显著( $p < 0.05$ ),下同。

PDA培养基28℃培养7d后,加有无菌水的对照组辣椒疫霉菌菌落生长直径为(79.01±0.13)mm,加有菌株C1、E2、G1、G2、M1、O1、O2、P1发酵上清液的试验组辣椒疫霉菌菌落生长直径分别为44.94、40.06、29.71、34.92、19.86、42.48、10.13、39.92 mm。其中,加有菌株O2发酵上清液的试验组对辣椒疫霉菌的抑制效果最佳,与C1、E2、G1、G2、M1、O1、O2、P1试验组、无菌水对照组相比,差异显著( $p < 0.05$ ),对疫霉菌的生长抑制率为87.18%,因此选取菌株O2进行下一步试验。

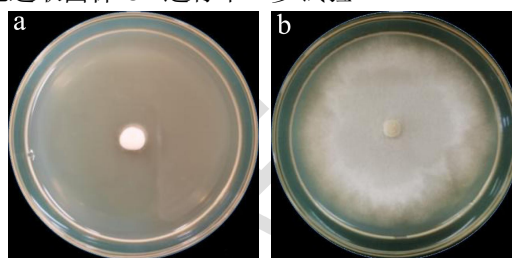


图2 菌株O2发酵液在PDA培养基对辣椒疫霉菌的抑制效果

Fig.2 Inhibitory effect of strain O2 fermentation broth on *Phytophthora capsici* in PDA

注:a为菌株O2发酵液试验组,b为无菌水对照组。

### 2.2 菌株鉴定

#### 2.2.1 形态学鉴定

如图3a, O2在2% CaCO<sub>3</sub> (m/V) MRS固体培养基呈乳白色菌落,周边具有典型溶钙圈,菌落呈圆形、边缘整齐、表面光滑且湿润、中央隆起、不透明;在光学显微镜下观察,菌体革兰氏染色呈阳性、长约6~10 μm,无芽孢、无荚膜、无鞭毛(图3b)。

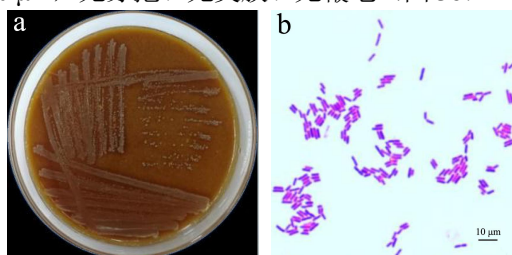


图3 菌株O2在2% CaCO<sub>3</sub> MRS培养基菌落形态(a)与菌体形态(×1 000) (b)

Fig.3 O2 Colony morphology (a) and cell morphology (×1 000) (b) in 2% CaCO<sub>3</sub> MRS

#### 2.2.2 生理生化特征鉴定

由表1可知,菌株O2碳水化合物反应皆为阳性,触酶试验、葡萄糖产气试验、硝酸盐还原试验、VP试验、H<sub>2</sub>S试验、明胶液化试验、吲哚试验皆为阴性,在pH值4.5、pH值6.5、4%~8% NaCl、10℃、15℃环境下正常生长,45℃生长停滞。根据《伯杰细菌鉴定手册》(第八版)中乳杆菌科描述,菌株O2生理生

化试验的结果与乳杆菌属植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 描述相符合。

表 1 菌株 O2 生理生化试验结果

Table 1 O2 results of physiological and biochemical tests

项目	结果	项目	结果
触酶试验	-	硝酸盐还原试验	-
七叶苷	+	VP 试验	-
纤维二糖	+	H <sub>2</sub> S 试验	-
麦芽糖	+	明胶液化试验	-
甘露醇	+	吲哚试验	-
水杨苷	+	pH 值 4.5	+
山梨醇	+	pH 值 6.5	+
蔗糖	+	4wt% NaCl	+
棉子糖	+	6wt% NaCl	+
菊糖	+	8wt% NaCl	+
乳糖	+	10 °C	+
1%马尿酸钠	+	15 °C	+
葡萄糖产气试验	-	45 °C	-

注：试验结果阳性用“+”表示，阴性用“-”表示。

### 2.2.3 16S rDNA 序列比对鉴定

如图 4, 菌株 O2 的 PCR 扩增产物经 1wt%琼脂糖凝胶电泳纯化后, 在 1 500 bp 处出现特异清晰的单一条带。经生工生物工程(上海)股份有限公司测序分析获得 16S rDNA 基因序列, 将 O2 菌株 16S rDNA 基因序列上传至 BLAST, 使用 GenBank 搜索源性高的相似菌株 16S rDNA 序列进行相似性分析, 在 MEGA X 软件中使用 Neighbor-Joining (N-J) 法构建系统发育树。结果表明, O2 菌株与植物乳杆菌同源性为 98%, 鉴定 O2 菌株为植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum* (GenBank 登陆号为 OL616071)。

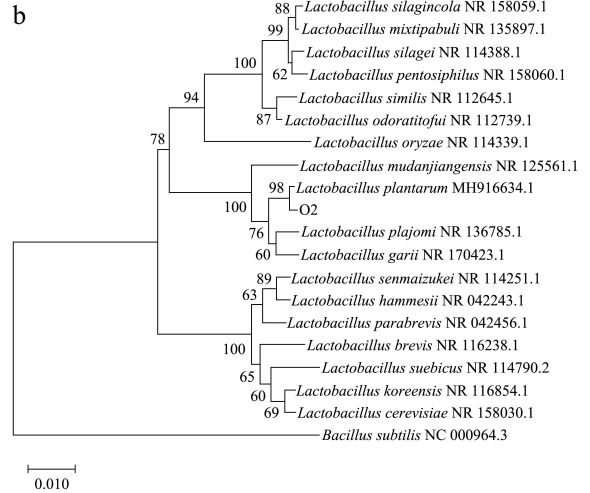
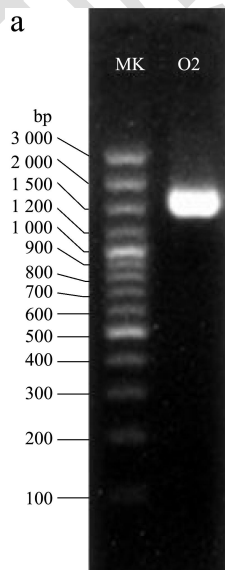


图 4 菌株 O2 PCR 产物电泳图(a)与系统发育树(b)

Fig.4 O2 Electrophoretic map of PCR products (a) and phylogenetic tree (b)

### 2.3 植物乳杆菌 O2 生长曲线及产酸能力

如图 5, 植物乳杆菌 O2 在 0~58 h 培养时间内的生长曲线主要表现为 3 个阶段: 0~2 h 为菌株 O2 的生长延滞期, 此时期细菌数目增加不明显, OD<sub>600</sub> 值从 0.437 上升至 0.456; 2~28 h 为生长对数期, 菌体代谢旺盛, 菌体数量呈几何级数增加, OD<sub>600</sub> 值从 0.456 上升至 8.716 (发酵液原液稀释 OD<sub>600</sub> 值至 0.5~0.6 左右后再乘以稀释倍数); 28~58 h 为生长稳定期, 随着培养时间的延长细菌增长速度逐渐趋向于零, OD<sub>600</sub> 值从 8.716 降低至 7.833。植物乳杆菌 O2 在 0~58 h 培养时间内的产酸能力与其生长曲线的变化相吻合, 在 0~2 h 内, 发酵液 pH 值出现缓慢降低, 从 5.18 降至 5.10; 在 2~28 h 内, 随着细菌进入生长对数期, 菌体内酶系活跃, 迅速产酸, 发酵液 pH 值从 5.10 迅速下降至 3.64; 在 28~58 h 内, 发酵液 pH 值逐渐趋于稳定维持在 3.60。

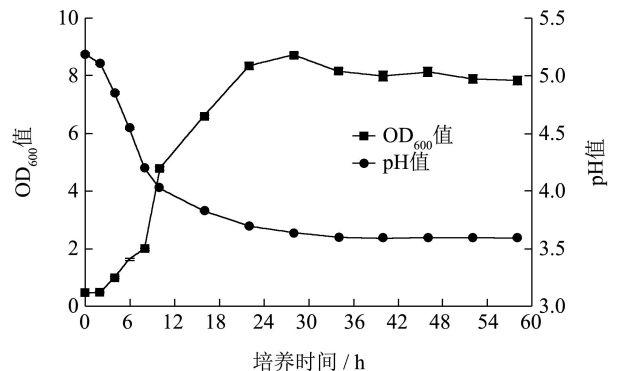


图 5 植物乳杆菌 O2 在 MRS 肉汤中的生长曲线和产酸曲线

Fig.5 *Lactobacillus plantarum* O2 growth curve and acid production curve in MRS



## 2.4 发酵上清液理化性质

### 2.4.1 发酵上清液过氧化氢酶、蛋白酶敏感性

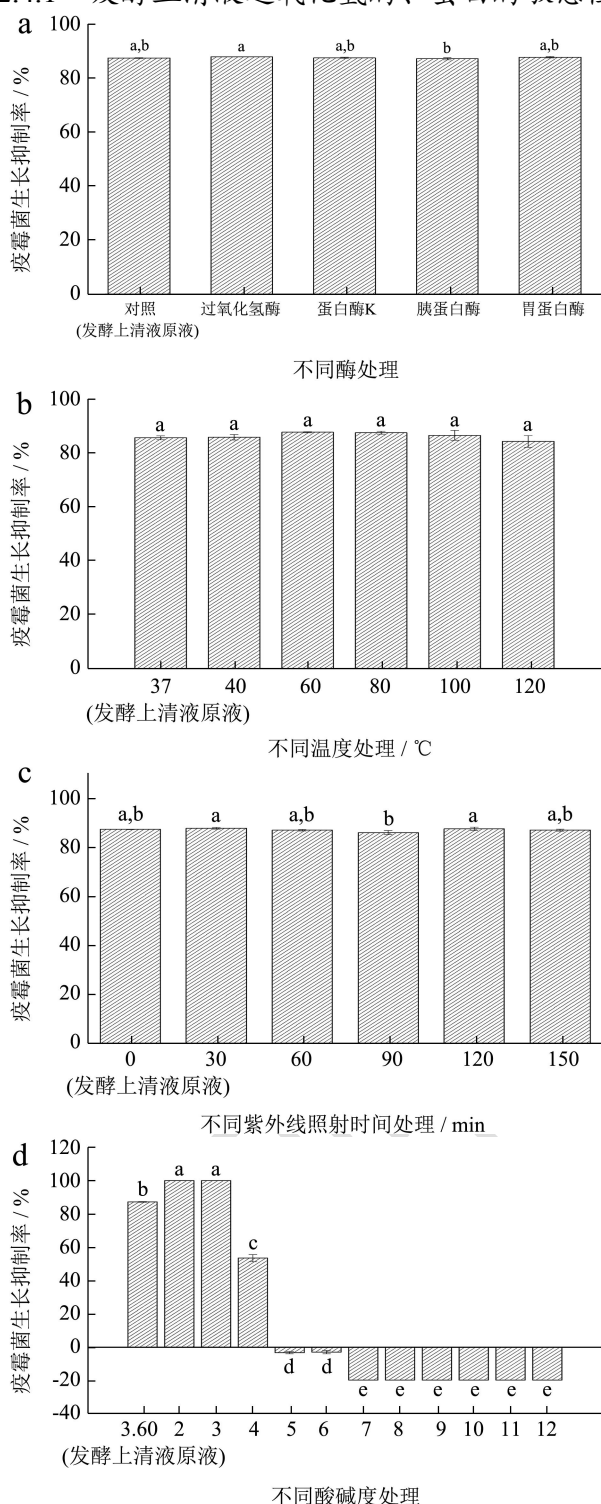


图6 不同方式处理植物乳杆菌 O2 发酵上清液对辣椒疫霉菌生长抑制率的影响

Fig.6 Effect of different treatment of *Lactobacillus plantarum* O2 fermentation supernatant on growth inhibition rate of *Phytophthora capsici*

注：不同小写字母表示各组间呈显著性差异 ( $p < 0.05$ )，下同。

乳酸菌可产生过氧化氢、黏蛋白以及细菌素等代谢产物，通过破坏细胞膜、羟基自由基等方法抑制致病菌生长繁殖<sup>[18,19]</sup>。如图 6a 所示，经过氧化氢酶、蛋白酶 K、胰蛋白酶和胃蛋白酶处理的 O2 发酵上清液的菌落生长抑制率与未经处理的原液相比，菌落生长抑制率无显著差异 ( $p > 0.05$ )。说明 O2 发酵上清液对过氧化氢酶、蛋白酶 K、胰蛋白酶和胃蛋白酶不敏感，这与黄晓英等<sup>[20]</sup>的结果相同。

### 2.4.2 发酵上清液热稳定性测定

抑菌剂的适用范围主要受温度的影响，Digaitiene 等<sup>[21]</sup>研究发现，清酒乳杆菌 KTU05-6 具有良好的热稳定性，即使在 100 °C 下处理 60 min 其抑菌物质也能保持稳定。本试验分别在 40、60、80、100、120 °C 条件下处理上清液 30 min，如图 6b 所示，在 40~120 °C 的温度范围内，O2 发酵上清液对疫霉菌生长抑制率与发酵上清液原液的差异不显著 ( $p > 0.05$ )，证明发酵上清液的主要抑菌物质具有良好的热稳定性。

### 2.4.3 发酵上清液紫外线照射敏感性

紫外线敏感试验同热稳定性试验相似，其测定结果对抑菌物质的应用范围有所影响。Banerjee 等<sup>[22]</sup>研究发现，紫外线照射对短乳杆菌 FPTLB3 的抑菌成分无影响。如图 6c 所示，O2 发酵上清经 15 W 紫外灯照射 30、60、90、120 及 150 min 处理后，对疫霉菌生长抑制率分别为 87.87%、87.06%、86.11%、87.63% 和 87.09%，与发酵上清液原液的差异不显著 ( $p > 0.05$ )，证明 O2 发酵上清液的主要抑菌物质在 15 W 紫外线下不敏感，这与 Banerjee 的结果一致。

### 2.4.4 发酵上清液酸碱稳定性测定

大多数有机酸在酸性条件具有最高抑菌活性，通过测定发酵上清液对酸碱的耐受程度，可进一步鉴别抑菌物质最高抑菌活性的范围，对抑菌物质纯化鉴定也有着重大意义<sup>[23]</sup>。如图 6d 所示，在 O2 发酵上清液 pH 值为 2~3 时，发酵上清液对疫霉菌生长抑制率为 100%，与对照组的抑制率相比有显著差异 ( $p < 0.05$ )。随着 O2 发酵上清液 pH 值的升高，菌生长抑制率逐渐降低，当 pH 值为 5 时，发酵上清液已无法抑制疫霉菌的生长，且当 pH 值 > 6 时，碱性环境下的某些物质促进了疫霉菌的生长。说明 O2 发酵上清液对辣椒疫霉菌的主要抑菌物质在 pH 值 < 5 时有较好的稳定性。

## 2.5 发酵上清液对辣椒疫霉菌最小抑菌浓度

(MIC) 及最小杀菌浓度 (MBC) 测定

取冷冻干燥后发酵上清进行称重，经测定每 10 mL 发酵上清液冻干后质量为 494.6 mg，冻干转化

率为 49.46 mg/mL。取适量发酵上清液冻干溶解于 PDB 中, 采用二倍稀释法进行 MIC 和 MBC 测定, 结果如表 2 和图 7 所示, 从质量浓度为 0.8 mg/mL 开始, O2 发酵上清液对疫霉菌的生长出现显著抑制作用 ( $p < 0.05$ ), 菌落生长抑制率达到 7.87%。随着 PDA 培养基中植物乳杆菌 O2 发酵上清液含量的上升, 疫霉菌的菌落生成直径逐渐减小, 其对疫霉菌的生长抑制率逐渐上升。当 O2 发酵上清液质量浓度达到 12.8 mg/mL 后, 菌落生长抑制率达到 100%, 7 d 内未见菌丝生长, 故确定 12.8 mg/mL 为菌株 O2 发酵上清液对辣椒疫霉菌的 MIC。由表 2 可知, 28 °C 培养 14 d 时, 质量浓度为 12.8 mg/mL 的 O2 发酵上清液对疫霉菌的生长抑制率为 91.30%, 具有较好的抑菌效果, 但要使疫霉菌生长抑制率达到 100%, 需进一步提高 O2 发酵上清液质量浓度至 25.6 mg/mL, 故 25.6 mg/mL 为菌株 O2 发酵上清液对辣椒疫霉菌的 MBC。

MIC 和 MBC 分别表示最小抑制病原微生物繁殖或杀灭病原微生物生存的药物浓度, 用于定量表示抑菌剂的抑菌或杀菌性能<sup>[24]</sup>。胡诚<sup>[25]</sup>采用液体二倍稀释法对轮枝镰孢菌孢子进行 MIC 测定, 研究表明当乳酸菌上清液含量在 8 mg/mL 及以上时可抑制轮枝镰孢菌

菌丝生长, 使液体培养基保持清澈透明。致病菌和乳酸菌的种类是影响 MIC 的重要因素, 此外, 不同的试验方法对 MIC 的结果也具有显著差异。因此可通过进一步纯化 O2 上清液的抑菌物质, 以达到低剂量且高效的抑菌效果。

表 2 植物乳杆菌 O2 发酵上清液对辣椒疫霉菌的最小杀菌浓度 (MIC) 和最小杀菌浓度 (MBC)

Table 2 The MIC and MBC of *Lactobacillus plantarum* O2 fermentation to *Phytophthora capsici*

冻干粉质量浓度 (mg/mL)	菌落生长抑制率/%	
	MIC	MBC
0(无菌水对照组)	0 <sup>a</sup>	0 <sup>c</sup>
0.1	0.51±1.21 <sup>f</sup>	0 <sup>c</sup>
0.2	0.44±2.16 <sup>f</sup>	0 <sup>c</sup>
0.4	1.30±1.78 <sup>f</sup>	0 <sup>c</sup>
0.8	7.87±1.46 <sup>e</sup>	0 <sup>c</sup>
1.6	10.56±1.31 <sup>d</sup>	0 <sup>c</sup>
3.2	17.58±1.49 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>
6.4	27.83±3.57 <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>
12.8	100.00 <sup>a</sup>	91.30±5.85 <sup>b</sup>
25.6	100.00 <sup>a</sup>	100.00 <sup>a</sup>

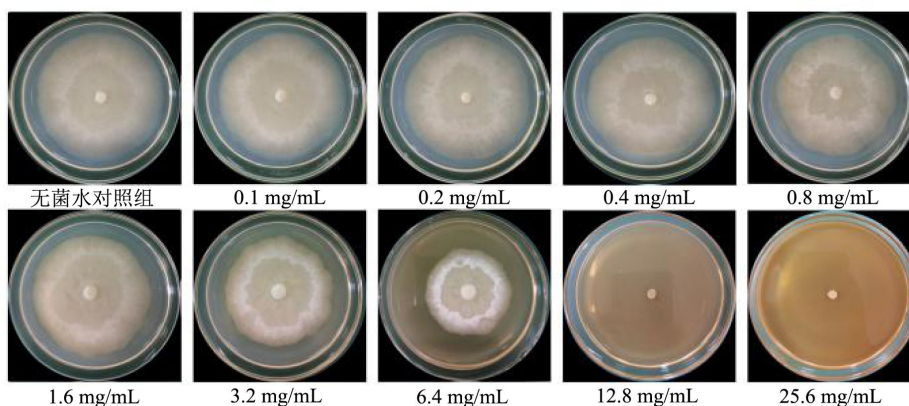


图 7 植物乳杆菌 O2 发酵上清液对辣椒疫霉菌的 MIC

Fig.7 The MIC of *Lactobacillus plantarum* O2 fermentation to *Phytophthora capsici*

表 3 植物乳杆菌 O2 发酵上清液对辣椒采后致病菌抑菌谱

Table 3 The antibacterial spectrum of *Lactobacillus plantarum* O2 fermentation supernatant on postharvest capsicum pathogens

辣椒采后致病菌	菌落生长直径/mm				生长抑制率/%		
	无菌水对照组	MRS 肉汤对照组	(5 μg/mL 多菌灵) 阳性对照组	发酵上清液试验组	MRS 肉汤对照组	(5 μg/mL 多菌灵) 阳性对照组	发酵上清液试验组
辣椒疫霉菌	79.01±0.15 <sup>a</sup>	65.46±0.97 <sup>b</sup>	63.08±2.14 <sup>b</sup>	10.13±0.64 <sup>c</sup>	17.14±1.23 <sup>b</sup>	20.15±2.71 <sup>b</sup>	87.18±0.81 <sup>a</sup>
辣椒红色炭疽菌	56.03±1.57 <sup>a</sup>	54.47±1.74 <sup>a</sup>	37.22±0.79 <sup>b</sup>	38.42±1.22 <sup>b</sup>	2.78±3.10 <sup>b</sup>	33.57±1.41 <sup>a</sup>	31.43±2.18 <sup>a</sup>
辣椒黑色炭疽菌	90±0.00 <sup>a</sup>	90±0.00 <sup>a</sup>	56.44±0.95 <sup>b</sup>	90±0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>b</sup>	37.29±1.05 <sup>a</sup>	0.00 <sup>b</sup>
辣椒根霉菌	90±0.00	90±0.00	90±0.00	90±0.00	0.00	0.00	0.00

注: 不同小写字母表示同行指标数据后呈显著性差异 ( $p < 0.05$ ), 下同。

## 2.6 抑菌谱测定

### 2.6.1 辣椒采后致病菌抑菌试验

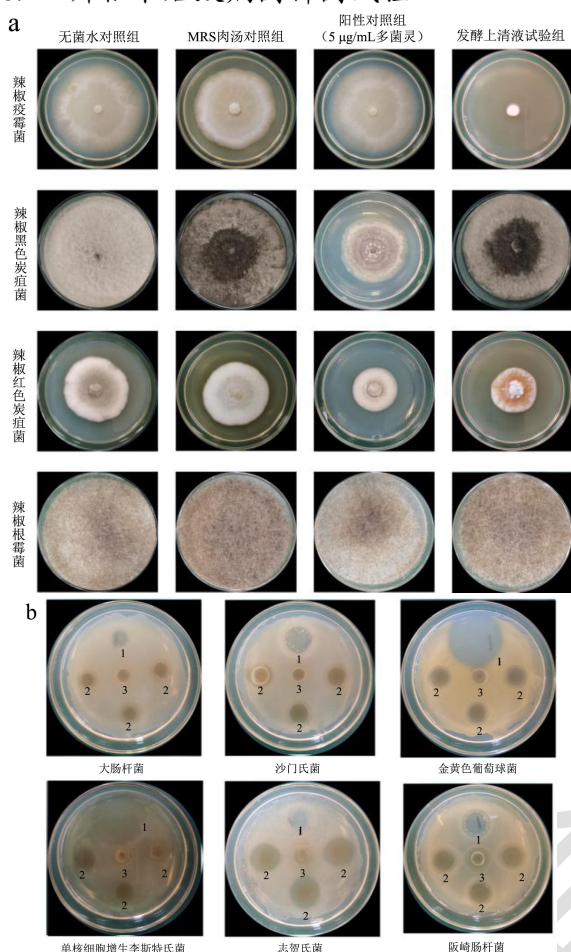


图8 植物乳杆菌 O2 发酵上清液抑菌谱

Fig.8 The antibacterial spectrum of *Lactobacillus plantarum* O2 fermentation supernatant

注: a 为植物乳杆菌 O2 发酵上清液对辣椒采后致病菌抑菌结果, 其中无菌水为空白对照组, MRS 肉汤为对照组, 5 µg/mL 多菌灵为阳性对照组, 植物乳杆菌 O2 发酵上清液为试验组; b 为植物乳杆菌 O2 发酵上清液对食源性致病菌抑菌结果, 其中 1 为阳性对照组 (100 µg/mL 氨苄青霉素钠), 2 为植物乳杆菌 O2 发酵上清液试验组, 3 为 MRS 肉汤对照组。

表4 植物乳杆菌 O2 发酵上清液对常见食源性致病菌抑菌谱

Table 4 The antibacterial spectrum of *Lactobacillus plantarum* O2 fermentation supernatant on common foodborne pathogens

食源性致病菌	抑菌圈直径/mm		
	MRS 肉汤对照组	阳性对照组(100 µg/mL 氨苄青霉素钠)	发酵上清液试验组
大肠杆菌	7.47±0.65 <sup>c</sup>	11.31±1.79 <sup>a</sup>	11.06±1.33 <sup>a</sup>
沙门氏菌	6.29±0.89 <sup>c</sup>	7.82±0.46 <sup>b</sup>	10.06±0.58 <sup>a</sup>
金黄色葡萄球菌	0.00 <sup>c</sup>	35.54±1.92 <sup>a</sup>	13.56±0.84 <sup>b</sup>
单核细胞增生李斯特氏菌	0.00 <sup>c</sup>	35.35±0.47 <sup>a</sup>	14.38±0.82 <sup>b</sup>
志贺氏菌	0.00 <sup>c</sup>	11.95±0.77 <sup>b</sup>	18.40±0.54 <sup>a</sup>
阪崎肠杆菌	0.00 <sup>b</sup>	13.98±0.83 <sup>a</sup>	13.20±0.23 <sup>a</sup>

辣椒疫霉菌、辣椒红色炭疽菌、辣椒黑色炭疽菌以及根霉菌是辣椒采后常见的致病菌<sup>[26,27]</sup>, 本试验用以上四种辣椒采后致病菌为指示菌进行抑菌试验, 结果由表 3 可知, O2 发酵上清液对 4 种指示菌的菌落生长抑制率分别为 87.18%、31.43%、0.00%和 0.00%。其中, O2 发酵上清液对疫霉菌的生长抑制率最佳, 优于阳性对照组, 差异显著 ( $p < 0.05$ )。其次, O2 发酵上清液对红色炭疽菌的生长抑制率可达到阳性对照组抑菌效果, 差异不显著 ( $p > 0.05$ )。O2 发酵上清液对于辣椒黑色炭疽菌和根霉菌无抑制效果, 且根霉菌抑菌试验中四组试验结果差异不显著 ( $p > 0.05$ )。Cortes-Zavaleta 等<sup>[28]</sup>研究发现, 植物乳杆菌 NRRL B-4496 发酵上清液对红色炭疽菌的生长抑制率较低, 25 °C 培养 4 d 后仅为 8.63%, 远低于嗜酸乳杆菌 (41.57%) 对红色炭疽菌的抑制效果。与上述研究结果比较, 本试验中 O2 发酵上清液对红色炭疽菌展现出明显的抑菌效果。

### 2.6.2 常见食源性致病菌抑菌试验

大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特氏菌、和志贺氏菌是果蔬、乳制品及肉制品中的主要致病菌, 可导致人体产生发热、呕吐以及腹泻等症状<sup>[29,30]</sup>。阪崎肠杆菌常见于婴幼儿配方奶粉及乳制品中, 婴幼儿误食阪崎肠杆菌污染的乳制品后会引发婴儿脑膜炎、脓血症等病症<sup>[31]</sup>。本试验用以上六种食源性致病菌为指示菌进行抑菌试验, 由表 4 可知, O2 发酵上清液对 6 种指示菌的抑菌直径分别为 11.06、10.06、13.56、14.38、18.40、13.20 mm。与对照组相比, 试验组对六种食源性致病菌的抑菌试验结果均具有显著差异 ( $p < 0.05$ )。与阳性对照组相比较, 在沙门氏菌和志贺氏菌抑菌试验中, 试验组抑菌效果优于阳性对照组, 差异显著 ( $p < 0.05$ ); 在大肠杆菌和阪崎肠杆菌抑菌试验中, 试验组抑菌效果与阳性对照组差异不显著 ( $p > 0.05$ ), 证明 O2 发酵上清液的抑菌物质对大肠杆菌、沙门氏菌、志贺氏菌和阪崎肠杆菌这四种食源性致病菌具有良好的抑制效果。



Monika 等<sup>[32]</sup>对传统泡菜中分离到的 15 株乳酸菌进行食源性致病菌抑菌试验, 研究结果显示植物乳杆菌 PKL-21 比粪肠球菌和肠系膜明串珠菌有更好的抑菌特性, 对大肠杆菌、志贺杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径分别为 13.1、12.86、8.3 mm。与上述研究结果相比较, O2 发酵上清液对大肠杆菌的抑菌效果稍差一些, 但对志贺杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌效果更好, 且抑菌谱更广。

### 3 结论

从自制发酵蔬菜中初步筛选出 8 株乳酸菌, 通过固体稀释法筛选出一株对辣椒疫霉菌具有明显抑菌效果的乳酸菌 O2, 其发酵上清液对辣椒疫霉菌抑制率为 87.18%, 经 16S rDNA 和生理生化实验鉴定其为植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)。植物乳杆菌对 O2 过氧化氢酶、蛋白酶 K、胰蛋白酶、胃蛋白酶不敏感, 在温度 40~120 °C、15 W 紫外灯照射 30~150 min 和 pH 值 <5 范围内抑菌物质稳定, 对辣椒疫霉的 MIC 和 MBC 分别为 12.8 mg/mL 和 25.6 mg/mL。此外, O2 发酵上清液对红色炭疽菌、大肠杆菌、沙门氏菌、志贺氏菌和阪崎肠杆菌具有显著抑制效果, 后续可通过纯化鉴定深入研究该乳酸菌的抑菌成分及抑菌机理, 进一步探究其对辣椒采后保鲜的效果, 为开发辣椒采后防腐保鲜剂建立一定的基础。

### 参考文献

- [1] 张灿. 辣椒疫霉和大豆疫霉中几丁质合酶基因的功能研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2017
- [2] 高伦江, 曾小峰, 贺肖寒, 等. 辣椒采后贮藏生理及保鲜技术研究进展 [J]. 南方农业, 2019, 13(1): 96-100
- [3] Granke L L, Quesada O L, Lamour K, et al. Advances in research on *Phytophthora capsici* on vegetable crops in the United States [J]. Plant Disease, 2012, 96(11): 1588-1600
- [4] 肖晶, 陈维信, 刘爱媛, 等. 辣椒采后病害发生情况 [J]. 中国蔬菜, 2008, 6: 13-16
- [5] 武华国. 辣椒疫病病原的特征特性、病害循环及其防治措施 [J]. 湖南农业科学, 2000, 5: 36-38
- [6] 叶旻硕, 马艳, 黄有军. 生防芽孢杆菌防控辣椒疫病研究进展 [J]. 中国农学通报, 2020, 36(15): 123-129
- [7] Minj J, Chandra P, Paul C, et al. Bio-functional properties of probiotic *Lactobacillus*: current applications and research perspectives [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2021, 61: 13, 2207-2224
- [8] 程璐, 缪铭, 张涛, 等. 食品生物防腐剂-抗真菌乳酸菌研究进展 [J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(9): 129-133
- [9] Tamang J P, Shin D H, Jung S J, et al. Functional properties of microorganisms in fermented foods [J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 578
- [10] 徐畅, 于基成, 刘秋. 微生物源食品保鲜剂的研究进展 [J]. 包装工程, 2021, 42(13): 9-20
- [11] Pasquale R, Pia A M, Daniela F, et al. *Lactobacillus plantarum* with broad antifungal activity: A promising approach to increase safety and shelf-life of cereal-based products [J]. International Journal of Food Microbiology, 2017, 247: 48-54
- [12] Sadiq F A, Yan B, Tian F, et al. Lactic acid bacteria as antifungal and anti-mycotoxigenic agents: a comprehensive review [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2019, 18(1): 1403-1436
- [13] Saravanakumar K, Sathiyaseelan A, Mariadoss A V A, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG and biochemical agents enrich the shelf life of fresh-cut bell pepper (*Capsicum annum* L. var. *grossum* (L.) Sendt) [J]. Foods, 2020, 9(9): 1252
- [14] Fang X, Li Y T, Guo W, et al. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* F17 and *Leuconostoc lactis* H52 supernatants delay the decay of strawberry fruits: a microbiome perspective [J]. Food & Function, 2019, 10(12): 7767-7781
- [15] Melo J, Álvarez A, Ramirez C, et al. Antagonistic activity of lactic acid bacteria against phytopathogenic fungi isolated from cherry tomato (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) [J]. Current Microbiology, 2021, 78(4): 1399-1408
- [16] 布坎南 RE, 吉本斯 NE. 伯杰细菌鉴定手册 (8 版) [M]. 北京: 科学出版社, 1995
- [17] Angmo K, Kumari A, Savitril, et al. Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh [J]. LWT - Food Science and Technology, 2016, 66: 428-435
- [18] Wei T, Bao J, Yang H, et al. *Musa basjoo* regulates the gut microbiota in mice by rebalancing the abundance of probiotic and pathogen [J]. Microbial Pathogenesis, 2019, 131: 205-211
- [19] Ananou S, Rivera S, Isabel Madrid M, et al. Application of enterocin AS-48 as biopreservative in eggs and egg fractions: Synergism through lysozyme [J]. LWT - Food Science and Technology, 2017, 89: 409-417
- [20] 黄晓英, 李启明, 吴华星, 等. 传统发酵食品中具有抑菌活性乳酸菌筛选及其代谢产物稳定性分析 [J]. 现代食品科技, 2021, 37(11): 68-78
- [21] Digaitiene A, Hansen Å S, Juodeikiene G, et al. Lactic acid bacteria isolated from rye sourdoughs produce

- bacteriocin-like inhibitory substances active against *Bacillus subtilis* and fungi [J]. J Appl Microbiol, 2012, 112(4): 732-742
- [22] Banerjee S P, Dora K C, Chowdhury S, et al. Detection, partial purification and characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus brevis* FPTLB3 isolated from freshwater fish [J]. Journal of Food Science and Technology-Mysore, 2013, 50(1): 17-25
- [23] Gu X B, Z Z, Yu H Q, et al. Optimization of medium constituents for a novel lipopeptide production by *Bacillus subtilis* MO-01 by a response surface method [J]. Process Biochemistry, 2005, 40: 3196-3201
- [24] 侯温甫, 欧阳何一, 吴忌, 等. 曲酸对冷鲜鸭肉中优势腐败菌的抑制作用及其抑菌机理[J]. 食品科学, 2019, 40(1): 278-285
- [25] 胡诚. 抑制轮枝镰孢菌乳酸菌的筛选及其抑菌特性研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2020
- [26] Synowiec A, Gniewosz M, Krasniewska K, et al. Effect of meadowsweet flower extract-pullulan coatings on *Rhizopus* rot development and postharvest quality of cold-stored red peppers [J]. Molecules, 2014, 19(9): 12925-12939
- [27] De Franca G S, Carvalho R R D C, Neves R P, et al. Post-harvest control anthracnose in pepper by yeast *Rhodotorula glutinis* [J]. Bioscience Journal, 2015, 31(2): 451-459
- [28] Cortes Zavaleta O, Lopez Malo A, Hernandez Mendoza A, et al. Antifungal activity of lactobacilli and its relationship with 3-phenyllactic acid production [J]. International Journal of Food Microbiology, 2014, 173: 30-35
- [29] Yu W Z, Hai X W, Guang C J, et al. Application of aptamer - based biosensor for rapid detection of pathogenic *Escherichia coli* [J]. Sensors, 2018, 18(8): 2518-2520
- [30] Barry E, Cassels F, Riddle M, et al. Vaccines against *Shigella* and enterotoxigenic *Escherichia coli*: A summary of the 2018 VASE conference [J]. Vaccine, 2019, 37(34): 4768-4774
- [31] Fei P, Jiang Y, Gong S, et al. Occurrence, genotyping, and antibiotic susceptibility of *Cronobacter* spp in drinking water and food samples from Northeast China [J]. J Food Prot, 2018, 81(3): 456-460
- [32] Monika, Savitri, Kumar V, et al. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from traditional pickles of Himachal Pradesh, India [J]. Journal of Food Science and Technology - Mysore, 2017, 54(7): 1945-1952