

抗食品腐败酵母的乳酸菌的筛选与鉴定

饶瑜, 常伟, 向文良, 车振明

(西华大学生物工程学院, 四川成都 610039)

摘要: 本文筛选了能够抑制食品中典型腐败酵母的乳酸菌, 研究其抑制特性并进行了分子生物学鉴定。从泡菜、榨菜、酸奶、火腿等食品中分离得到乳酸菌 57 株, 通过双层拮抗平板法筛选能够抑制食品中典型腐败酵母(假丝酵母属、毕赤酵母属、酵母属、蔷薇酵母属和解脂耶罗维亚酵母)的乳酸菌 6 株, 其中菌株 AT 6 能够抑制所有 11 株腐败酵母指示菌。96 孔板法测定乳酸菌 AT6 发酵上清液对腐败酵母的抑制率可达 73.04% 以上, 其抑制活性对蛋白酶不敏感, 但随着 pH 值的升高而降低。菌株 AT6 在 MRS 培养基中的生长曲线研究表明 30 °C 静置培养 30 h, 其发酵上清液可达到对白色念珠菌的最大抑菌活性 95.02%。提取菌株 AT6 基因组并扩增 16S rRNA 基因, 将 PCR 片段克隆到 pMD 19-T 载体后进行测序, BLAST 分析和多重比对后确定 AT6 为食窦魏斯氏菌。

关键词: 食品安全; 腐败; 酵母; 抑制率; 食窦魏斯氏菌

文章编号: 1673-9078(2013)8-1943-1947

Screening and Identification of *Lactic Acid Bacteria* with Inhibition Activity against Food-borne Spoilage Yeast

RAO Yu, CHANG Wei, XIANG Wen-liang, CHE Zhen-ming

(School of Bioengineering, Xihua University, Chengdu, 610039, China)

Abstract: Lactic acid bacteria (LAB) with inhibition activity against food-borne spoilage yeast were screened, characterized and identified by molecular biological method. Fifty-seven LAB strains were isolated from different food products such as pickles, pickled mustards, yoghurt and hams. Overlay method showed that six LAB strains represented inhibition activity against food-borne spoilage yeast such as *Candida*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Rhodotorula* and *Yarrowia lipolytica*. Among them, strain AT6 could inhibit the growth of all eleven spoilage yeast indicators. 96 well-plate method showed that the inhibition rate of supernatant AT6 reached above 73.04%. The supernatant AT6 was not sensitive to proteinase but lose the activity at higher pH value. The inhibition activity of AT6 supernatant against *Candida albicans* was maximal after 30 h incubation at 30 °C. The genome of AT6 was extracted and the gene of 16S rRNA was amplified by PCR. The PCR products were cloned into pMD 19-TT-vector and sequenced. The sequence was BLISA and strain AT6 was identified as *Weissella cibaria*.

Key words: food safety; spoilage; yeast; inhibition rate; *Weissella cibaria*

食品腐败通常是由细菌和丝状真菌引起的, 但当食品的特性和加工贮藏条件如低 pH、高盐、高糖等抑制了细菌和丝状真菌的快速生长及竞争力时, 酵母将成为优势菌并引起腐败^[1]。常见的腐败酵母包括酵母属 (*Saccharomyces*), 假丝酵母属 (*Candida*), 毕赤酵母属 (*Pichia*), 接合酵母属 (*Zygosaccharomyces*) 等。酵母腐败的主要特征为, 生长成为肉眼可见的单克隆或形成无光泽、干或黏滑的菌膜并引起变色; 利用食品中的糖代谢产生的二氧化碳使食品包装涨袋、变形; 酵母利用食品成分作为培养基生长, 产生一系列的终产物并改变食物的化学、生理和感官特点^[2]。

收稿日期: 2013-05-11

基金项目: 西华大学重点科研基金项目 (Z1120536)

作者简介: 饶瑜 (1982-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 食品生物技术

通讯作者: 车振明 (1960-), 男, 教授, 研究方向: 食品生物技术

控制食品中腐败酵母的传统方法通常为热处理和添加防腐剂。防腐剂的添加能够控制酵母的生长, 但不同酵母对防腐剂的敏感度不一样, 一些酵母属对防腐剂具有较高的耐受性, 如克鲁氏假丝酵母、膜醭毕赤酵母、解脂耶罗维亚酵母和粟酒裂殖酵母菌和一些酿酒酵母菌株。已有研究表明, 在法规规定的防腐剂最大添加量条件下, 这些腐败酵母仍能够生长^[1]。

目前, 利用乳酸菌进行食品的生物保鲜 (biopreservation) 已越来越受到关注^[3-4]。乳酸菌被认为是食品安全级 (generally recognized as safe, GRAS) 微生物, 能够产生具有抑菌活性的代谢产物, 如有机酸、CO₂、乙醇、过氧化氢、丁二酮、细菌素和抗真菌化合物。现已筛选出大量能够抑制细菌和丝状真菌的乳酸菌^[5-6], 并运用于食品保鲜, 但抑制食品中腐败酵母乳酸菌的筛选工作尚少。本研究从数种容

易发生酵母腐败的食品中, 筛选能够广泛抑制各种腐败酵母的乳酸菌, 分析其抑菌特性并进行菌种鉴定。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 实验菌株

SY1: 白色念珠菌(*Candida albicans*) ATCC 90028; SY2: 光滑假丝酵母(*C. glabrata*) ATCC 90030; SY3: 近平滑念珠菌(*C. parapsilosis*) ATCC 22019; SY4: 葡萄牙念珠菌(*C. lusitaniae*) ATCC 42720; SY6: 热带念珠菌(*C. tropicalis*) ATCC 750; SY5: 酿酒酵母(*S. cerevisiae*) ATCC 9763; SY7: 膜醭毕赤酵母(*Pichia membranaefaciens*) CICC32259; SY9: 发酵毕赤酵母(*P. fermentans*); SY8: 德巴利汉逊氏酵母(*Debaryomyces hansenii*) CICC 32269; SY10: 解脂耶罗维亚酵母(*Yarrowia lipolytica*); SY11: 粘红酵母(*Rhodotorula glutinis*)。其中 SY9、SY10 和 SY11 为本实验室从腐败泡菜中分离得到。已有相关报道上述酵母菌种为食品腐败酵母^[1,7,8], 作为本研究指示菌用于抑菌实验。

1.1.2 培养基、试剂及仪器设备

YM 培养基用于腐败酵母培养; MRS 培养基用于乳酸菌的分离和发酵; 乳酸菌鉴定培养基为 MRS 培养基中加入 5 g/L CaCO₃。

蛋白胨、牛肉膏、酵母膏、琼脂, 北京奥博星生物技术有限责任公司; 葡萄糖、吐温 80、乙酸钠、磷酸氢二钾、硫酸镁、硫酸锰、柠檬酸二胺, 成都市科龙化工试剂厂。

酶标仪 Bio-rad Model 680; SGSP-02 电热恒温隔水式培养箱, 黄石市恒丰医疗器械有限公司; SW-CJ-2F 双人双面净化工作台, 苏州净化设备有限公司; LDZX-40AI 立式自动压力蒸汽灭菌锅, 上海三申医疗核子仪器厂; 电子天平, 北京赛多利斯仪器系统有限公司; 高速离心机, Eppendorf; PHS-3C 酸度计, 方舟科技; 游标卡尺, 成都量具刃具总厂。

1.1.3 食品材料

泡菜样品取自家庭自制泡菜, 榨菜、酸奶、火腿购买于超市。

1.2 实验方法

1.2.1 乳酸菌的分离

用 225 mL 生理盐水分别洗涤或重悬 25 g 各食品样品, 取洗脱液或悬液 1 mL 进行 10 倍稀释到 10⁻⁵, 取各稀释度液涂布乳酸菌鉴定培养基, 30 °C 培养 18 h

后, 在菌落数为 30~300 个的平板上挑取有明显碳酸钙溶解圈的单菌落, 经革兰氏染色鉴定为阳性者被初步认定为乳酸菌。

1.2.2 抗腐败酵母乳酸菌的筛选

采用双层平板拮抗法。将分离得到的乳酸菌分别接种于 2 mL MRS 液体培养基中, 30 °C 静置培养 24 h 后, 用移液枪取培养的乳酸菌菌液 10 μL 点种于 MRS 固体培养基。点种菌液吸干后, 用移液枪取过夜培养的酵母指示菌 2 μL 于 7 mL YM 半固体培养基中(50 °C), 摇匀后, 立即倒入上述 MRS 固体培养基上, 37 °C 培养 18 h 后, 产生明显抑酵母生长透明圈的乳酸菌被初步认为是阳性, 并用游标卡尺测量抑菌圈宽度。将阳性乳酸菌菌株划线 MRS 固体培养基, 4 °C 保存待用。

1.2.3 抗腐败酵母乳酸菌抑制率的测定

96 孔板法测定乳酸菌抑制腐败酵母活性。将初筛阳性乳酸菌接种于 5 mL MRS 液体培养基中, 30 °C 静置培养 36 h, 测定 OD_{595nm} 后 10,000 r/min 离心 10 min, 取上清液并测定 pH 值, 4 °C 保存备用。取无菌的 96 孔细菌培养板, 每孔加入 190 μL 制备好的发酵液, 再加入 10⁶ cfu/mL 的腐败酵母指示菌 10 μL。在 30 °C 条件下置于摇床培养 24 h 后于酶标仪 595 nm 下测定其 OD 值。每个乳酸菌发酵液进行 3 孔平行实验, 结果取其平均值。乳酸菌发酵液的抑菌活性以抑菌率(如公式 1)表示, 其中 OD_{LAB} 表示腐败酵母在乳酸菌发酵液中培养 24 h 后的 OD_{595nm} 值, OD_{control} 表示腐败酵母在 MRS 培养基中培养 24 h 后的 OD_{595nm} 值。同时, 用同样的方法测定用乳酸调 pH 至 4.0 的 MRS 培养基对腐败酵母的抑制率。

$$\text{抑制率}(\%) = 100\% - 100\% \times \frac{\text{OD}_{\text{LAB}}}{\text{OD}_{\text{control}}} \quad (1)$$

1.2.4 抑酵母活性分析

pH 对抑制活性的影响。将乳酸菌接种于 5 mL MRS 液体培养基中, 30 °C 静置培养 36 h, 测定 OD_{595nm} 后 10,000 r/min 离心 10 min, 取上清液用 1 M 乳酸或 1 M NaOH 调 pH 为 4.0、5.0 或 6.0, 并用 96 孔板法测定对腐败酵母的抑制率。

蛋白酶对抑制活性的影响。分别配制 1 mg/mL 的蛋白酶 K、胰蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶, 将各种酶与等体积的发酵上清液混合, 对照为无蛋白酶, 置 37 °C 保温 1 h, 然后 100 °C 处理 10 min 灭活蛋白酶, 并用 96 孔板法测定对腐败酵母的抑制率。

1.2.5 生长动力曲线

取 100 μL 过夜培养的乳酸菌菌液于 300 mL MRS 液体培养基中, 30 °C 培养 48 h。每隔 6 h 取培养液 10

mL, 测定 OD_{595nm} 和 pH, 同时测定发酵上清液对腐败酵母的抑制率。本节抑菌实验以 SY1 白色念珠菌为指示菌。

1.2.6 菌种的分子生物学鉴定

将乳酸菌接种于 5 mL MRS 液体培养基, 培养过夜后提取总基因组, 然后 PCR 扩增 16S rRNA 基因片段。PCR 引物为:

(a) 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

(b) 1490R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'

PCR 条件为 95 °C 预变性 5 min, 35 个扩增循环 (95 °C 变性 1 min, 50 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min), 最后 72 °C 延伸 5 min。将 PCR 产物连接于 pMD 19-T T-vector (Takara) 并进行 DNA 测序 (上海华津生物科技有限公司)。提取的基因组和 PCR 扩增产物用

琼脂糖凝胶电泳分析检测。16S rDNA 测序结果进行 BLAST 分析, 用 Mega 4.0 软件 Neighbor-joining 法计算构建系统发育树图。

2 结果与讨论

2.1 乳酸菌的分离和对酵母生长的抑制

从泡菜、榨菜、酸奶和火腿中分离得到乳酸菌共 57 株, 编号为 AT1-AT57, 革兰氏染色为阳性。其中 AT1-AT15 来源于泡菜, AT16-AT28 来源于榨菜, AT29-AT48 来源于酸奶, AT49-AT57 来源于火腿。采用双层平板拮抗法测定菌株 AT1-AT57 对各酵母指示菌的抑制作用, 结果如表 1 所示。

表 1 不同菌株对各酵母指示菌的抑制活性

Table 1 Inhibitory activity of lactic acid bacteria against different indicators

菌株	抑制活性 1										
	SY1	SY2	SY3	SY4	SY5	SY6	SY7	SY8	SY9	SY10	SY11
AT6	+++	++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	+
AT14	+	±	+	++	+	+	-	±	-	-	-
AT19	+	+	-	-	-	-	-	+	++	++	±
AT31	-	-	-	±	-	-	+	+	+	+	±
AT38	+	-	++	+	++	-	±	+	++	++	+
AT55	+	+	-	+	+	-	++	-	++	++	-

注: 1. 抑菌活性用抑菌圈的宽度 (mm) 表示, +++ , >5 mm; ++, 3-5 mm; +, 1-3 mm; ±, <1 mm; -, no inhibition.

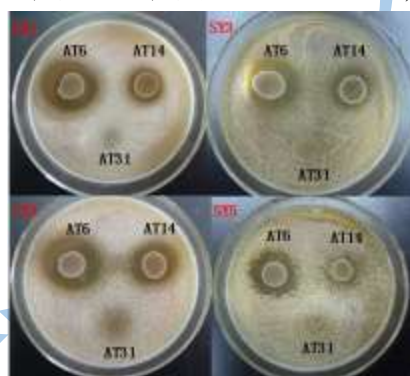


图 1 菌株 AT6、AT14 和 AT31 对指示菌 SY1、SY3、SY4 和 SY5 生长的抑制

Fig.1 Inhibition of strains AT6, AT14 and AT31 against the indicator SY1, SY3, SY4 and SY5

6 株菌株表现出对不同酵母生长的拮抗作用, 其中 AT6 能够抑制所有酵母指示菌, 对 SY1、SY3、SY4 和 SY5 的抑菌圈宽度均大于 5 mm。AT14 能抑制所有念珠菌并微弱抑制 SY8 发酵毕赤酵母。AT31 对 SY7-11 菌有抑制活性, 微弱抑制 SY4 葡萄牙念珠菌, 但对其余念珠菌均无抑制。如图 1 所示为菌株 AT6、AT14 和 AT31 对酵母指示菌 SY1、SY3、SY4 和 SY5

的生长抑制。其余菌株 AT19、AT38 和 AT55 对酵母指示菌的抑制范围均有所差异。

2.2 菌株 AT6 对酵母指示菌的抑制率

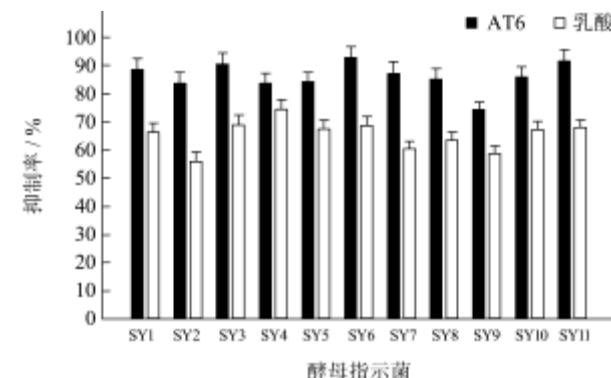


图 2 菌株 AT6 对腐败酵母的抑制率

Fig.2 Inhibition rates of strain AT6 against spoilage yeast indicators

对抑制腐败酵母谱最广的菌株 AT6 进行进一步研究。菌株 AT6 接种于 5 mL MRS 液体培养基于 30°C 静置培养 36 h 后, OD_{595nm} 值达到 1.76, pH 值为 4.1。用 96 孔法测定 AT6 发酵液对酵母指示菌的抑制率,

同时测定用乳酸调 pH 至 4.1 的 MRS 液体培养基对酵母指示菌的抑制率, 结果如图 2 所示。可以看出, 96 孔法的测定结果与双层平板拮抗法保持一致, 但在抑菌活性大小上有一定差异。例如, 双层平板拮抗法测定 AT6 对 SY11 粘红酵母的抑制活性最低, 而 96 孔法测定表明 AT6 发酵液对 SY11 具有较高的抑制率。该差异可能是由于检测方式的不同引起腐败酵母的敏感度不同, 不同的基质会影响菌株 AT6 活性成分的抗酵母能力, 类似的结果在其他文献也有所报道。

由图 2 可以看出, 低 pH 下有机酸乳酸对各腐败酵母的生长有所抑制, 这与已有报道相符^[9]。菌株 AT6 发酵液的抑制率高于乳酸对照, 表明菌株 AT6 的代谢产物中除乳酸外, 还有其他活性成分。

2.3 pH 和蛋白酶对 AT6 发酵上清液抑制活性的影响

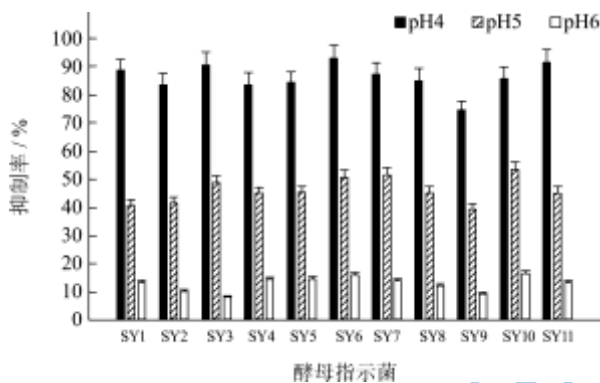


图 3 pH 对菌株 AT6 发酵上清液抑制酵母活性的影响

Fig.3 Influence of the pH on the inhibition activity of AT6 supernatants against spoilage yeast

菌株 AT6 发酵上清液抑制腐败酵母的抑制率受 pH 影响较大 (如图 3)。当发酵上清液 pH 值为 4 时, 除对 SY9 发酵毕赤酵母抑制率为 74.03% 外, 对其他腐败酵母的抑制率都高于 80%; 当发酵上清液 pH 调为 5 时, 抑制率大幅下降到 40~55% 之间; 当发酵上清液 pH 为 6 时, 对所有腐败酵母的抑制率都低于 20%。该结果表明菌株 AT6 抑制腐败酵母的活性具有 pH 依赖性。乳酸菌能够产生具有抑菌活性的有机酸等代谢产物, 抑菌机理通常认为是在酸性 pH 条件下, 以未解离的形式作用于目标细胞膜, 破坏细胞膜电化学质子梯度从而导致细胞死亡^[10]。有机酸的抑菌活性具有 pH 依赖性, 未解离有机酸的抑菌活性高于解离的有机酸。AT6 发酵上清液的抑菌性质与有机酸的抑菌性质一致。另外, 蛋白酶 K、胰蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶处理 AT6 发酵上清液后, 对其抑制活性无显著影响 (结果未显示), 表明活性成分非蛋白质类化

合物。

2.4 菌种 AT6 的生长曲线

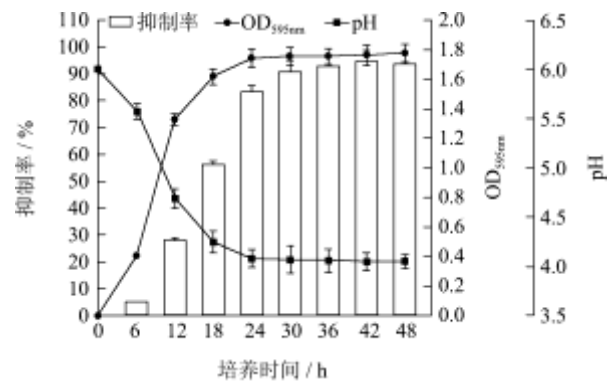


图 4 菌株 AT6 的生长曲线及抑制率

Fig.4 Inhibition rate against spoilage yeast during the grow of AT6 in MRS

如图 4 所示为菌种 AT6 在 MRS 液体培养基中, 于 30 °C 静置培养 48 h 的生长曲线及对腐败酵母抑制率的动态变化。培养 6 h 时, 菌种 AT6 已进入对数生长期, 并在此时其发酵上清液已表现出对 SY1 白色念珠菌较低的抑制活性。培养 24 h 后进入稳定期, 对 SY1 的抑制率达到 83.75%, 培养 30 h 后, 抑制率最大可达 95.02%。48 h 后菌液 OD_{595nm} 为 1.78, pH 值 4.1, 对 SY1 的抑制率为 93.69%。

2.5 AT6 的分子生物学鉴定

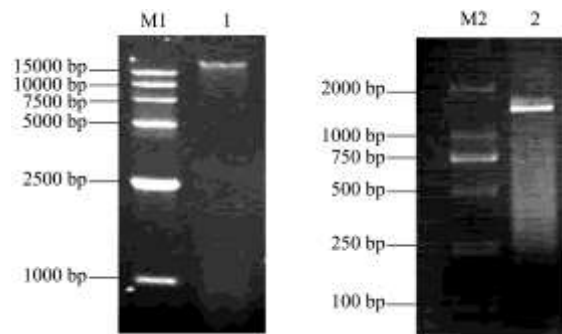


图 5 菌株 AT6 基因组与 16S rDNA 的琼脂糖凝胶电泳

Fig.5 Agarose gel electrophoresis of genome and 16S rDNA fragment of AT6

注: M1、M2 分别为 Marker D15000 和 DL2000; 1, 菌株 AT6 基因组; 2, 16SrDNA 片段。

菌株 AT6 的基因组和 16S rDNA 扩增片段如图 5 所示。16S rDNA 克隆于 pMD 19-T 载体后测序结果经 BLAST 分析和多重比对后, 构建系统发育树见图 6。菌株 AT6 与食窦魏斯氏菌 (*Weissella cibaria*) 16S rRNA 基因序列相似性为 99%, 当 16S rRNA 序列同源性 $\geq 98\%$ 时可以认为是一个种^[11], 因此确定 AT6 为食窦魏斯氏菌。目前关于食窦魏斯氏菌能够抑制真菌的报

道较少。Valerio 等^[12]从小麦粉中筛选得到 1 株能够抑制丝状真菌的食窦魏斯氏菌, Ndagano 等^[13]从食品中筛选到了能够抑制腐败真菌的食窦魏斯氏菌 FMF4B16, 但该菌也只能抑制曲霉属和青霉属, 不能抑制白色念珠菌的生长。食窦魏斯氏菌 AT6 能够抑制假丝酵母属、毕赤酵母属、酵母菌属和蔷薇酵母属 (Rhodotorula) 的腐败酵母, 目前尚无能广泛抑制腐败酵母的食窦魏斯氏菌报道。

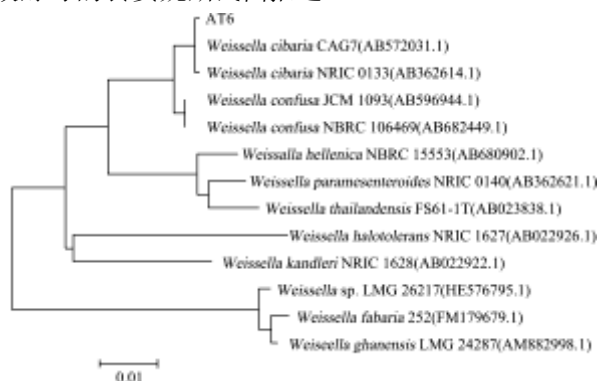


图 6 基于 16S rRNA 基因序列构建的 AT6 与相关代表菌株的系统进化树

Fig.6 Phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequences of strain AT6 and the representative isolates by the neighbor-joining method

3 结论

本研究从食品中分离得到 57 株乳酸菌, 其中 6 株表现出对不同腐败酵母生长的抑制, 其中乳酸菌 AT6 能够抑制所有腐败酵母指示菌的生长并具有较高活性, 对腐败酵母指示菌的抑菌率可达到 73.04% 以上。分子生物学鉴定 AT6 为食窦魏斯氏菌, 在 MRS 培养基中 30 °C 静置培养 30 h 即可达到最大抑菌活性。进一步研究将分析食窦魏斯氏菌 AT6 发酵液中的活性抑酵母成分, 优化发酵条件等, 最终将食窦魏斯氏菌 AT6 在控制食品腐败酵母方面有所应用。

参考文献

[1] Fleet GH. Chapter 5-Yeast Spoilage of Foods and Beverages, in The Yeasts (Fifth Edition). 2011, Elsevier: London, 53-63
 [2] Stratford M. Food and beverage spoilage yeasts, in Yeasts in Food and Beverages, Querol A and Fleet GH, Editors. 2006, Springer-Verlag: Berlin, 335-380
 [3] Reis JA, Paula AT, Casarotti SN, et al. *Lactic Acid Bacteria* Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications

[J]. Food Engineering Reviews, 2012, 4(2): 124-140

- [4] Dalié DKD, Deschamps AM, Richard-Forget F. *Lactic acid bacteria* - Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review [J]. Food Control, 2010, 21(4): 370-380
- [5] Rouse S, Hamett D, Vaughan A, et al. *Lactic acid bacteria* with potential to eliminate fungal spoilage in foods [J]. Journal of Applied Microbiology, 2008, 104(3): 915-923
- [6] Schnürer J, Magnusson J. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives [J]. Trends in Food Science and Technology, 2005, 16(1-3): 70-78
- [7] Saei-Dehkordi SS, Fallah AA, Saei-Dehkordi SS, et al. Chemical Composition and Antioxidative Activity of Echinophora platyloba DC. Essential Oil, and Its Interaction with Natural Antimicrobials against Food-Borne Pathogens and Spoilage Organisms [J]. Journal of Food Science, 2012, 77(11): M631-M637
- [8] Makino H, Fujimoto J, Watanabe K. Development and evaluation of a real-time quantitative PCR assay for detection and enumeration of yeasts of public health interest in dairy products [J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 140(1): 76-83
- [9] Lind H, Jonsson H, Schnürer J. Antifungal effect of dairy propionibacteria-contribution of organic acids [J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 98(2): 157-165
- [10] Brul S, Coote P. Preservative agents in foods: Mode of action and microbial resistance mechanisms [J]. International Journal of Food Microbiology, 1999, 50(1-2): 1-17
- [11] Stackebrandt E, Goebel BM. Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1994, 44(4): 846-849
- [12] Valerio F, Favilla M, De Bellis P, et al. Antifungal activity of strains of lactic acid bacteria isolated from a semolina ecosystem against Penicillium roqueforti, Aspergillus niger and Endomyces fibuliger contaminating bakery products [J]. Systematic and Applied Microbiology, 2009, 32(6): 438-448
- [13] Ndagano D, Lamoureux T, Dortu C, et al. Antifungal Activity of 2 Lactic Acid Bacteria of the Weissella Genus Isolated from Food [J]. Journal of Food Science, 2011, 76(6): 305-311