

德式乳杆菌和德式乳杆菌保加利亚亚种抑菌特性研究及发酵条件优化与保鲜效果评价

秦伟灵, 彭欢, 王洁*

(华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)

摘要: 为获得产抗菌肽且保鲜效果较好的乳酸菌, 该研究从发酵食品中分离具有广谱抑菌活性的乳酸菌, 分析其发酵上清液的主要抗菌物质成分, 从热&酸碱耐受性、细胞壁完整性、细胞膜通透性及葡萄糖利用度等研究乳酸菌发酵上清液的抑菌特性; 并利用单因素分析和响应面实验优化乳酸菌发酵条件, 最后验证发酵上清液对猪肉和鱼肉的保鲜效果。结果表明: 分别从酸豆角、发酵乳中分离得到的德式乳杆菌 (*Lactobacillus delbrueckii*, *L. delbrueckii*) M2 和德式乳杆菌保加利亚亚种 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) M6 具有广谱抑菌作用, 它们的抑菌成分主要为热、酸碱稳定性较好的蛋白质或肽类物质, 其中, M2 抑菌物质强碱耐受性优于 M6。该两株乳酸菌最优发酵条件均为: 接种体积分数 3.00%, 葡萄糖质量分数 2.00%, 大豆蛋白胨质量分数 3.00%, 在此条件下进行验证试验, 测得 M2 和 M6 的抑菌效果比优化前分别提高了 25.47% 和 22.64%。进一步研究发现: M2、M6 发酵上清液通过破坏细菌细胞壁完整性、细胞膜通透性及影响葡萄糖利用而达到抑菌作用。冷鲜肉的保鲜试验证实: M2、M6 发酵上清液能减少冷鲜肉菌落总数, 延长猪肉和鱼肉货架期 2~4 d。研究结果将为广谱新型的生物防腐剂的开发和应用提供理论指导。

关键词: 乳酸菌; 抑菌活性; 保鲜应用; 发酵优化

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.12.1366

Isolation of Lactic Acid Bacteria Producing Antimicrobial Peptides From Fermented Food and their Bacteriostatic Properties and Preservation Application

QIN Weiling, PENG Huan, WANG Jie*

(College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: In order to obtain lactic acid bacteria, which could synthesize antimicrobial peptides and have good preservation effects, this study aimed to isolate lactic acid bacteria with broad-spectrum antibacterial activities from fermented foods, analyze the main antibacterial substances in the fermentation supernatant of lactic acid bacteria, investigate the antibacterial properties of the supernatant, including the tolerance to heat, acid, and alkali, cell wall integrity, membrane permeability and glucose availability, optimize the fermentation conditions using single factor analysis and response surface experiments, and evaluate their preservative effects on pork and fish. The results demonstrated that *Lactobacillus delbrueckii* M2 and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* M6, which were isolated from sour bean and fermented milk, respectively, both exhibited good antibacterial activities with a broad spectrum. Their antimicrobial components are mainly proteins or peptides with good thermal and acid-base stability. Moreover, antimicrobial substances from M2 harbored higher tolerance to alkali than those from M6. The optimal fermentation conditions of the two strains of lactobacillus were as follows: 2.00% glucose and 3.00% soybean peptone and 3.00% inoculation exhibited. Under these conditions, the antibacterial effects of *L. delbrueckii* M2 and *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* M6 were increased by 25.47% and 22.64%, respectively. Moreover, the supernatant of *L. delbrueckii* M2 and *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* M6 could disrupt cell wall integrity and membrane permeability and impact glucose utilisation. Furthermore, the supernatant of *L. delbrueckii* M2 and *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* M6 reduced the total viable counts and prolong the shelf-life during the storage of chilled pork and fish, extend the

收稿日期: 2024-09-13; 修回日期: 2024-11-27; 接受日期: 2024-12-09

基金项目: 广东省科技创新战略专项资金-重点领域研发计划 (2022B0202040002、2020B020226008、2018B020206001); 广州市科技计划项目 (201904010274)

作者简介: 秦伟灵 (1995-), 女, 本科, 助理工程师, 研究方向: 微生物学, E-mail: lynneqin@foxmail.com

通讯作者: 王洁 (1987-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 微生物学, E-mail: jiewang@scau.edu.cn

shelf life of pork and fish for 2–4 days. The findings will provide theoretical guidance for the development and application of new broad-spectrum biological preservatives.

Key words: lactic acid bacteria; antimicrobial activity; preservation application; optimization of fermentation conditions

食源性疾病是全球性的公共卫生问题。2021 年中国大陆食源性疾病暴发事件共 5 493 起, 死亡 117 人, 李红秋等^[1]研究发现微生物导致的发病人数最多, 占 53.05%; 2010–2020 年中国大陆金黄色葡萄球菌及其肠毒素引起的食源性疾病暴发事件共 703 起^[2]; 据报道, 美国每年感染肠出血大肠杆菌 O157:H7 约 7.3 万例^[3], 为了防止食源性致病菌的污染, 抗生素被广泛使用于畜牧业和食品制造中, 但抗生素的过度使用对人类健康造成威胁, 如耐药菌的产生、抗生素通过食物链影响人类健康、污染环境等^[4,5]。因此, 寻找可以替代抗生素的安全且高效的抗菌物质已成为当今国内外研究热点。

乳酸菌 (Lactic Acid Bacteria, LAB) 是一类利用碳水化合物产生乳酸的细菌总称, 其发酵液对病原菌具有较强的杀伤作用, 可显著延长食品货架期。陈全毅等^[6]发现冷鲜鸡肉涂抹上乳酸菌发酵上清液后, 可显著抑制单增李斯特菌的生长, 鸡肉货架期延长 3 天; Kushi 等^[7]将戊糖片球菌的发酵上清液添加到奶酪中, 发现菌落总数显著降低, 奶酪货架期延长了 75%。抗菌肽是乳酸菌抑菌的主要成分之一, 抗菌能力强, 不易产生耐药性, 安全无毒副作用^[8]。乳酸链球菌素 (Nisin) 是一种天然生物活性抗菌肽, 安全性高, 已被 50 多个国家许可作为食品添加剂, 广泛应用于肉制品、罐藏食品、奶制品等食品中, 但 Nisin 抗菌活性主要针对革兰氏阳性菌, 不能抑制革兰氏阴性菌^[9], 因此, 继续挖掘合成广谱抑菌作用的抗菌肽的乳酸菌对开发新型“抗生素替代品”或生物防腐剂有重要意义。

鉴于安全防腐剂的需求性和 Nisin 应用的局限性, 本文拟从发酵食品中分离具有广谱抑菌活性且产抗菌肽的乳酸菌, 分析其抗菌特性, 优化发酵条件, 探究其对肉水产的防腐保鲜效果。研究结果将为广谱新型的安全生物防腐剂的开发和应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

金黄色葡萄球菌 ATCC6538、枯草芽孢杆菌 ATCC6633、洋葱伯克霍尔德氏菌 ATCC25416、日沟维肠杆菌 ATCC33028, 购于北京北纳创联生物技术研究院; 大肠杆菌 ATCC8099、白色葡萄球菌 ATCC8032、铜绿假单胞菌 ATCC15442、白色念珠菌 ATCC10231, 购于中国工业微生物菌种保藏管理中心; 肺炎克雷伯菌 ATCC4352、鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028, 购于美国菌种保藏中心; 圆红酵母 CGMCC2.2424, 购于中国普通微生物菌种保藏管理中心。

1.2 实验材料

MRS 肉汤、营养琼脂、LB 培养基, 购于北京陆桥技术股份有限公司; 氯化钠、技术琼脂粉, 购于广东环凯微生物科技有限公司; 胰蛋白酶、胃蛋白酶, 购于国药集团化学试剂有限公司; 蛋白酶 K, 购于飞净生物科技有限公司; DNA 提取试剂盒, 购于生工生物工程 (上海) 股份有限公司; AKP 试剂盒, 购于南京建成生物工程研究所。

1.3 实验仪器

ME204 电子天平, 梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司; YXQ-70A 立式压力蒸汽灭菌器, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; TGL-18M 台式高速冷冻离心机, 湖南沪康离心机有限公司; ST300 便携式 pH 计, 奥豪斯仪器 (常州) 有限公司; HPX-300BSH-III 恒温恒湿箱, 上海新苗医疗器械制造有限公司; MPE 高通量真空平行浓缩仪, 睿科集团股份有限公司。

1.4 具有广谱抑菌活性的乳酸菌的分离与鉴定

1.4.1 乳酸菌分离

参考 GB4789.35-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验》^[10], 从酸豆角和发酵乳中分离乳酸菌。分别称取 25 g 样品, 置于装有 225 mL 无菌生理盐水的三角瓶中震荡摇匀, 用生理盐水进行 10 倍稀释, 每个稀释度取 1 mL 置于平板内, 倾注含质量分数 1% 碳酸钙的 MRS 培养基摇匀, 于 37 °C 中培养 48~72 h 后取出, 挑取单菌落反复划线分离纯化。

1.4.2 乳酸菌发酵上清液的制备

用接种环取纯化后的乳酸菌于 10 mL MRS 液体培养基中, 37 °C 培养 12 h, 制成乳酸菌种子液。取 5 mL 乳酸菌种子液于 50 mL MRS 液体培养基中, 37 °C 培养 48 h, 7 000 r/min 离心 25 min, 0.22 μ m 滤膜过滤, 滤液 4 °C 下储存备用。

1.4.3 抑菌活性的鉴定

采用牛津杯法测定乳酸菌发酵上清液的抑菌活性, 筛选出对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌抑菌活性较好的菌株作为实验菌株^[11]。然后, 测定良好抗菌活性的发酵上清液对白色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌等革兰氏阳性菌, 铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、鼠伤寒沙门氏菌、洋葱伯克霍尔德氏菌、日沟维肠杆菌等革兰氏阴性菌和白色念珠菌、圆红酵母等真菌的抑菌效果。

1.4.4 乳酸菌的鉴定

观察乳酸菌菌落、革兰氏染色, 参考《常见细菌系统鉴定手册》^[12]和《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》^[13]中描述的接触酶、糖醇发酵、吡啶、明胶液化等试验进行分析; 提取乳酸菌基因组, 以 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')/1492R (5'-TACGACTTAACCCCAATCGC-3') 为引物扩增 16S rDNA 序列, 然后送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序, NCBI 数据库 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 比对, MEGA7.0 构建系统发育树。

1.5 乳酸菌抑菌物质的初探

1.5.1 有机酸排除

分别用乳酸、乙酸调节 MRS 培养基 pH 值至 5.50, 用 NaOH 调节乳酸菌发酵上清液 pH 值至 5.50, 以未处理样品作为对照, 测定抑菌活性^[14]。

1.5.2 过氧化氢排除

将发酵上清液置于高通量真空平行浓缩仪中, 在 70 °C 下蒸发浓缩 4 倍后, 用无菌水稀释至原来体积, 以未处理样品作为对照, 测定抑菌活性。

1.5.3 蛋白酶处理试验

将发酵上清液的 pH 值调至各酶的最适 pH 值, 分别将蛋白酶 K、胰蛋白酶、胃蛋白酶(质量浓度均为 1 mg/mL) 加入发酵上清液中, 37 °C 孵育 2 h, 沸水浴处理 3 min 使酶失活, 冷却后调节 pH 值至发酵液初始 pH 值, 以未用酶处理发酵液作为对照, 测定抑菌活性^[15]。

1.5.4 热稳定性

将乳酸菌发酵上清液分别在 80、100、121 °C 下处理 15 min, 以未经热处理发酵液作为对照, 测定抑菌活性^[16]。

1.5.5 酸碱敏感性

用 HCl 和 NaOH 调节乳酸菌发酵上清液 pH 值为 3~10 等 8 个不同的梯度, 室温静置 1 h 后调节 pH 值至发酵液初始 pH 值, 以未处理样品作为对照, 测定抑菌活性。

1.6 乳酸菌发酵条件优化

1.6.1 菌株接种体积分数对发酵液抑菌活性的影响

将 1×10^8 CFU/mL 乳酸菌分别按体积分数 1%、2%、3%、4%、5% (V/V) 接入 MRS 培养基中, 37 °C 培养 48 h 后, 离心收集上清液, 滤膜过滤, 测定抑菌活性。

1.6.2 发酵时间对发酵液抑菌活性的影响

把乳酸菌按体积分数 3% (V/V) 接入 MRS 培养基中, 37 ± 1 °C 培养 12、24、36、48、60、72 h 后, 离心收集上清液, 滤膜过滤, 测定抑菌活性。

1.6.3 碳源种类对发酵液抑菌活性的影响

以去除碳源的 MRS 为基础培养基, 分别添加不同碳源(葡萄糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖、甘露醇)用以替代 MRS 中原有的碳源, 其他条件不变, 将乳酸菌按体积分数 3% (V/V) 接种于不同碳源的 MRS 液体培养基中, 于 37 °C 分别培养最优时间后, 离心收集上清液, 滤膜过滤, 测定抑菌活性。

1.6.4 碳源浓度对发酵液抑菌活性的影响

乳酸菌按体积分数 3% (V/V) 接种于含有不同浓度葡萄糖(质量分数分别为: 1%、1.5%、2%、2.5%、3%) 的 MRS 培养基中, 37 °C 分别培养最优时间后, 离心收集上清液, 滤膜过滤, 测定抑菌活性。

1.6.5 氮源种类对发酵液抑菌活性的影响

以去除氮源的 MRS 为基础培养基, 分别添加不同氮源(蛋白胨、大豆蛋白胨、牛肉膏、酵母浸粉、硫酸铵、硝酸钾)用以替代 MRS 中原有的氮源, 其他条件不变, 将乳酸菌按体积分数 3% (V/V) 分别接种于不同氮源的 MRS 液体培养基中, 于 37 °C 分别培养最优时间后, 离心收集上清液, 滤膜过滤, 测定抑菌活性。

1.6.6 氮源浓度对发酵液抑菌活性的影响

乳酸菌按体积分数 3% (V/V) 接种于含有不同浓度大豆蛋白胨(质量分数分别为: 1%、1.5%、2%、2.5%、3%) 的 MRS 培养基中, 37 °C 分别培养最优时间后, 离心收集上清液, 滤膜过滤, 测定抑菌活性。

1.6.7 响应面分析乳酸菌的最佳发酵条件

根据单因素结果, 以对大肠杆菌的抑菌圈直径为响应值, 使用 Design-Expert 8.0 软件中 Box-Behnken 设计进行实验设计, 并基于实验结果建立二次响应面回归模型, 寻求最优的发酵条件。

1.7 乳酸菌对大肠杆菌抑菌机理的初探

1.7.1 碱性磷酸酶 (Alkaline Phosphatase, AKP) 浓度测定

分别将等量的乳酸菌发酵上清液与 1×10^6 CFU/mL 大肠杆菌 LB 培养液混合, 37 °C 恒温摇床振荡培养 8 h, 以加入发酵液培养基的菌悬液为对照组。8 000 r/min 离心 10 min 收集上清液, 0.22 μ m 滤膜过滤, AKP 试剂盒测定 AKP 活性^[17]。

1.7.2 胞外溶液电导率的测定

分别将等量的乳酸菌发酵上清液与 1×10^6 CFU/mL 大肠杆菌 LB 培养液混合, 37 °C 恒温摇床振荡培养, 以加入发酵液培养基的菌悬液为对照组, 0、2、4、8、12 h 定时取样, 8 000 r/min 离心 10 min 收集上清液, 电导率仪测试电导率^[18]。

1.7.3 胞外紫外吸收物质的测定

分别将等量的乳酸菌发酵上清液与 1×10^6 CFU/mL 大肠杆菌 LB 培养液混合, 37 °C 恒温摇床振荡培养, 以加入发酵液培养基的菌悬液为对照组, 0、2、4、8、12 h 定时取样, 8 000 r/min 离心 5 min 收集上清液, 分光光度计在 260、280 nm 波长处测量其光密度^[19]。

1.7.4 葡萄糖利用效率的测定

将葡萄糖配制成质量分数分别为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL 的标准溶液, 采用蒽酮法测定葡萄糖含量, 绘制标准曲线 $Y=3.778X+0.03767$, $R^2=0.9953$ 。在质量分数为 0.5 mg/mL 的葡萄糖溶液中加入大肠杆菌, 调节菌浓度为 1×10^6 CFU/mL, 分别加入等量的乳酸菌发酵上清液, 37 °C 恒温摇床振荡培养。以加入发酵液培养基的菌悬液为空白对照, 0、2、4、8、12 h 定时取样, 8 000 r/min 离心 5 min 收集上清液, 取 1 mL 上清液加入 1 mL 水和 0.5 mL 蒽酮试剂, 再缓慢加入 5 mL 浓硫酸, 混匀后置于沸水浴中加热 10 min, 冷却后测定 620 nm 处的吸光值。根据标准曲线计算可溶性总糖含量^[20]。

1.8 乳酸菌发酵上清液对冷猪肉、鱼肉的防腐保鲜作用

1.8.1 冷鲜肉的前处理

在无菌条件下, 将新鲜猪肉和鱼肉切成质量大小相近的 100 g 肉块, 乳酸菌发酵上清液浸泡样品 30 min 后沥干水分, 放入封口袋中做好标签^[21], 以无菌生理盐水处理肉样作为空白对照, 参照国家标准 GB 2760-2014 中 Nisin 的最大使用量, 以质量分数 0.5 mg/mL Nisin 溶液处理肉样作为阳性对照。将处理好的肉样放入 4 °C 冰箱中冷藏, 每隔 2 天取样测定进行感官评定、pH 值和细菌总数的测定。

1.8.2 感官评定

评价员根据样品的色泽、气味和质地等 3 个方面进行综合评定，最后对综合评价结果分析，感官评分标准见表 1^[22]。

表 1 感官评分标准
Table 1 Sensory scoring criteria

指标		分值（分）			
		8~10（好）	6~7.9（较好）	3~5.9（轻微变质）	0~2.9（变质）
猪肉	色泽	鲜红	鲜红（褐）色	暗红（褐）色	灰白色
	气味	良好	可接受	难接受	不能接受
	质地	有弹性，不粘手	弹性不足，少量汁液	松弛，汁液量较多	粘手，汁液量多
鱼肉	色泽	肉色半透明有光泽	光泽消失	略带褐色	褐色或者绿色
	气味	新鲜鱼特有气味	无明显气味	轻微臭味	臭味明显
	质地	紧实，按压立即复原	紧实，按压后缓慢复原	轻度软烂，压痕不易复原	软烂，表面有粘液

1.8.3 pH 值测定

称取肉样约 10.0 g，用剪刀剪碎后加入 100 mL 无菌水，混匀、充分震荡 30 min，过滤，精密 pH 计测定 pH 值。

1.8.4 细菌总数

按国家标准 GB/T 4789.2-2016^[23]中的平板菌落计数法测定细菌总数。

1.9 数据处理

所有试验平行 3 次，实验结果以平均值±标准差（M±SD）表示，利用 Graph Pad Prism 7 统计软件进行绘图，基于单因素方差分析及 Tukey’s 检验采用 SPSS 23.0 分析软件对数据进行差异显著性分析及相关性分析，以 $P<0.05$ 为样本间有显著差异。

2 结果与分析

2.1 广谱抑菌活性的乳酸菌分离及鉴定

表 2 乳酸菌发酵上清液的抗菌谱
Table 2 Antimicrobial spectrum of LAB fermentation supernatant

指示菌	来源	抑菌圈直径/mm		
		M2	M6	
革兰氏阳性菌	金黄色葡萄球菌	ATCC6538	++	++
	白色葡萄球菌	ATCC8032	++	++
	枯草芽孢杆菌	ATCC6633	++	++
革兰氏阴性菌	洋葱伯克霍尔德氏菌	ATCC25416	++	+
	铜绿假单胞菌	ATCC15442	+	+
	肺炎克雷伯菌	ATCC4352	++	+
	大肠杆菌	ATCC8099	+	+
	鼠伤寒沙门氏菌	ATCC14028	++	+
	日沟维肠杆菌	ATCC33028	++	++
	真菌	白色念珠菌	ATCC10231	-
	圆红酵母	CGMCC2.2424	-	-

注：“+”为抑菌圈直径在 21-25mm；“++”为抑菌圈直径在 26-30mm；“-”为无抑菌圈。

表 3 乳酸菌生理生化特征

Table 3 Physiological and biochemical characteristics of LAB

生化项目	结果	
	M2	M6
接触酶	-	-
纤维二糖	+	+
甘露醇	+	+
山梨醇	-	-
棉子糖	-	+
乳糖	+	+
七叶苷	+	+
麦芽糖	+	-
水杨苷	+	+
蔗糖	+	-
菊糖	+	+
吲哚试验	-	-
明胶液化	-	-

注：“+”表示阳性，“-”表示阴性。

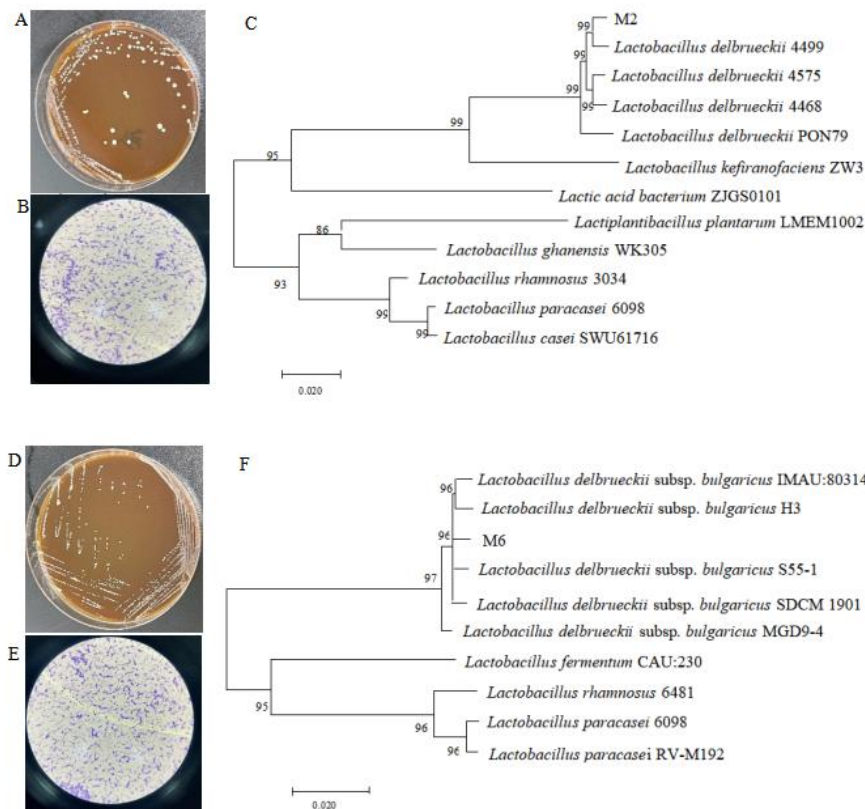


图 1 乳酸菌菌落 (A、D)、镜检 (B、E) 及 16S rDNA 进化树 (C、F) 分析

Fig.1 The images of bacteria colonies (A, D), and microscopic observation (B, E) and phylogenetic analysis (C, F) of 16S rDNA

以大肠杆菌和金黄色葡萄球菌为指示菌，从酸豆角和发酵乳中分离得到具有显著抑菌效果的乳酸菌 M2、M6 ($P<0.05$)，其中 M2 发酵上清液对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌圈直径分别为 14.68、15.51 mm，M6 发酵上清液对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌圈直径分别为 16.53、15.81 mm。M2、M6 发酵上清液对铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、洋葱伯克霍尔德氏菌、日沟维肠杆菌、金黄色葡萄球菌、白色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌等革兰氏阴性菌 (G^-) 和阳性菌 (G^+) 均具有良好的抑菌效果，但对白色念珠菌、圆红

酵母等真菌无抑菌作用（表 2）。进一步研究发现：M2 菌落呈圆形微黄色、表面光滑有光泽、中间凸起、菌落边缘整齐（图 1A），短杆状革兰氏阳性菌、无鞭毛和芽孢（图 1B）；可以发酵纤维二糖、甘露醇、七叶苷、乳糖、麦芽糖、水杨苷、蔗糖、菊糖等，但是不能发酵棉子糖、山梨醇，不产生吡嗪，不液化明胶，接触酶试验阴性（表 3）；16S rDNA 序列与德式乳杆菌同源性达 99.93%（图 1C）。M6 菌落呈圆形白色、湿润、边缘整齐（图 1D），短杆状革兰氏阳性菌、无鞭毛和芽孢（图 1E）；可以发酵纤维二糖、甘露醇、七叶苷、棉子糖、乳糖、水杨苷、蔗糖、菊糖，但是不能发酵山梨醇、蔗糖、麦芽糖，不产生吡嗪，不液化明胶，接触酶试验阴性（表 3）；16S rDNA 序列与德式乳杆菌保加利亚亚种同源性达 100.00%（图 1F）。陈华等^[24]研究发现的德氏乳杆菌保加利亚亚种发酵产物对多种 G⁺、G⁻病原菌均具有较强抑菌活性，黄晓英等^[25]研究发现德式乳杆菌 HS023 发酵液对多种 G⁺、G⁻病原菌均抑菌活性，对真菌无抑菌作用。同样地，酸豆角来源的德式乳杆菌 M2、发酵乳来源的德式乳杆菌保加利亚亚种 M6 对多种革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌均具有较强的抑菌作用，对真菌无抑菌作用。

2.2 M2、M6 发酵上清液抑菌特性

以金黄色葡萄球菌和大肠杆菌为指示菌，通过乙酸或乳酸调节 MRS 培养基 pH 值至 5.50 后的培养液无抑菌活性，M2、M6 发酵上清液 pH 值调至 5.50 后抑菌活性虽有小幅度下降，但仍具有较好的抑菌活性，其抑菌圈直径均大于 12 mm（表 4），说明 M2、M6 发酵上清液中有有机酸有一定抑菌作用，但非主要抑菌物质。陆春波等^[26]通过 GC-MS 代谢组学方法分析乳酸菌发酵上清液发现其主要抑菌物质为有机酸；王嘉悦等^[27]从延吉南瓜中分离得到肠膜明串珠菌 WJY-6，研究发现其发酵液中的抑菌活性物质并非有机酸；高欣等^[28]研究发现从水产动物及其生境中分离出来的屎肠球菌的有机酸有一定的抑菌作用，但不是该乳酸菌抑菌的主要物质。因此说明乳酸菌分泌的有机酸如乙酸、乳酸等具有抑菌作用，但其是否起主导作用因菌而异。

表 4 乳酸菌发酵上清液排酸试验

Table 4 Effect of NaOH and organic acids on the antibacterial activities of fermentation supernatant from M2 and M6

样品	抑菌圈直径/mm	
	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌
pH 5.50 的 M2 发酵上清液	12.76±0.15 ^b	12.18±0.22 ^b
M2 发酵上清液	14.51±0.29 ^a	15.51±0.31 ^a
pH 5.50 的 M6 发酵上清液	13.43±0.36 ^b	13.31±0.33 ^b
M6 发酵上清液	16.69±0.18 ^a	15.71±0.25 ^a
乙酸调节的 MRS 培养基（pH5.50）	-	-
乳酸调节的 MRS 培养基（pH5.50）	-	-

注：“-”为无抑菌圈，不同小写字母表示有显著性差异。

通过 70 ℃下蒸发去除过氧化氢后发现：处理后的两株乳酸菌发酵上清液的抑菌活性与对照组相比无显著性差异（ $P>0.05$ ）（表 5），说明过氧化氢不是这两株乳酸菌发酵液的抑菌物质，这与德式乳杆菌 HS023 发酵液中的过氧化氢有显著抑菌作用的结论不同^[25]。不同乳酸菌产过氧化氢能力不同，乳酸菌 M2、M6 产生过氧化氢的量可能不足以达到抑菌剂量，导致去除过氧化氢前后抑菌作用变化不明显。

表 5 乳酸菌发酵上清液排除过氧化氢试验

Table 5 Effect of H₂O₂ elimination on the antibacterial activities of fermentation supernatant from M2 and M6

乳酸菌	样品类型	抑菌圈直径（mm）	
		金黄色葡萄球菌	大肠杆菌
M2	未处理上清液	14.28±0.29 ^a	15.32±0.21 ^a
	70 ℃处理后上清液	13.97±0.35 ^a	15.19±0.28 ^a
M6	未处理上清液	16.09±0.15 ^a	15.91±0.14 ^a
	70 ℃处理后上清液	15.81±0.32 ^a	15.63±0.13 ^a

注：相同小写字母表示无显著性差异。

蛋白酶处理结果显示：M2 发酵上清液经胰蛋白酶和蛋白酶 K 处理后丧失抑菌活性，胃蛋白酶处理后抑菌活性显著性下降；M6 经蛋白酶 K 处理后丧失抑菌活性，胰蛋白酶和胃蛋白酶处理后抑菌活性显著性下降（表 6）。

蛋白酶 K 作用于脂族氨基酸和芳香族氨基酸的羧基端肽键^[29], 胰蛋白酶作用于多肽链中精氨酸和赖氨酸残基的羧基侧^[30], 胃蛋白酶作用的主要部位是芳香族氨基酸或亮氨酸所组成的肽键^[31], 从而使相关肽类或蛋白质类物质失活。这些酶处理后抑菌活性消失或显著下降说明: M2、M6 上清液中抑菌物质主要是蛋白质或肽类物质, 且 M2、M6 可能富含脂族氨基酸和芳香族氨基酸, M2 中精氨酸、赖氨酸残基可能多于 M6。

表 6 乳酸菌发酵上清液对酶敏感试验

Table 6 Effect of proteases on the antibacterial activities of fermentation supernatant from M2 and M6			
乳酸菌	样品类型	抑菌圈直径/mm	
		金黄色葡萄球菌	大肠杆菌
M2	对照组	14.75±0.12 ^a	15.61±0.11 ^a
	胃蛋白酶处理上清液	12.11±0.32 ^b	11.46±0.14 ^b
	胰蛋白酶处理上清液	-	-
	蛋白酶 K 处理上清液	-	-
M6	对照组	16.61±0.27 ^a	15.88±0.14 ^a
	胃蛋白酶处理上清液	15.33±0.19 ^b	14.77±0.38 ^b
	胰蛋白酶处理上清液	11.76±0.15 ^b	12.13±0.48 ^b
	蛋白酶 K 处理上清液	-	-

注: “-” 为无抑菌圈, 不同小写字母表示有显著性差异。

2.3 乳酸菌发酵上清液的理化特性分析

黄晓英等^[25]研究发现德式乳杆菌 HS023 代谢产物具有良好的热稳定性。热稳定性实验显示: 与对照组相比, 80、100、121 °C 处理后 M2 发酵上清液对大肠杆菌的抑菌圈直径减少 19.37%~29.12%, 对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径减少 24.04%~29.60%, M6 发酵上清液对大肠杆菌的抑菌圈直径减少 10.62%~30.04%, 对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径减少 27.54%~37.70% (图 2), 但在高温作用下, 两者仍保持较好抑菌活性, 说明 M2、M6 的抑菌物质具有较好的热稳定性, 且 M6 抑菌物质对 121 °C 的热稳定性略优于 M2。食品中的杀菌一般采用 65~80 °C 的巴氏灭菌和 120 °C 以上的超高温瞬时灭菌, 而两株乳酸菌发酵上清液在这两个温度下处理后仍有抑菌活性, 具有较好的应用潜力。M2、M6 的发酵液对大肠杆菌的抑菌效果改变程度显著低于金黄色葡萄球菌, 后续实验选择大肠杆菌作为验证抑菌效果的指示菌。

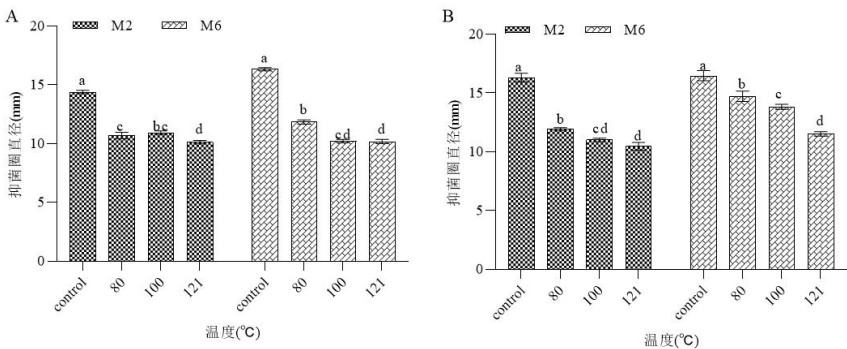


图 2 乳酸菌发酵上清液对金黄色葡萄球菌 (A) 和大肠杆菌 (B) 抗菌活性的热稳定性试验

Fig.2 Effect of high temperature on the antibacterial activities of fermentation supernatant from M2 and M6 against *S. aureus* (A) and *E. coli* (B)

注: 不同小写字母表示有显著性差异。

酸碱稳定性实验发现: 德式乳杆菌 M2 发酵上清液在酸性条件下 (pH 值 3~5) 抑菌活性较好, pH 值为 6 时, 抑菌活性开始显著下降 ($P<0.05$), 但是在 pH 值为 10 时仍具有较好的抑菌活性, 抑菌圈直径为 10.32 mm (图 3), 说明 M2 抑菌物质的酸碱稳定性较好, 适用于 pH 值 3.0~10.0 的环境; M6 发酵上清液在酸性条件下 (pH 值 3~5) 抑菌活性较好, 在 pH 值 5.0~10.0 范围内随着 pH 值的增加抑菌活性降低, 直至完全失去抑菌活性 (图 3), 说明

M6 抑菌物质适用于 pH 3.0~9.0 的环境, 两株乳酸菌酸碱稳定性比较发现, M2 抑菌物质强碱耐受性优于 M6。

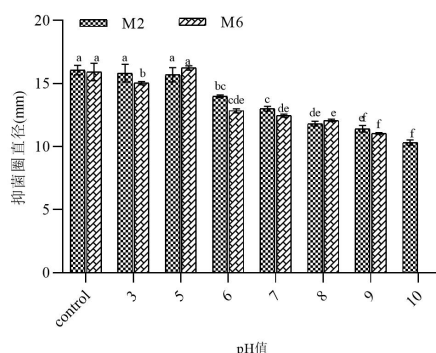


图3 乳酸菌发酵上清液的酸碱稳定性

Fig.3 Effect of various pH values on the antibacterial activities of fermentation supernatant from M2 and M6 against *E. coli*

注: 不同小写字母表示有显著性差异。

2.4 乳酸菌发酵条件优化

单因素实验表明: M2、M6 的抑菌活性随着接种体积分数增加而增强, 接种体积分数为 3% 时达到峰值, 其抑菌圈直径分别为 17.11、18.50 mm (图 4A)。随着发酵时间延长抑菌活性先增强后减弱, M2 在发酵 60 h 时抑菌活性最强, 抑菌圈直径为 18.55 mm, M6 在发酵 48 h 时抑菌活性最强, 抑菌圈直径为 18.50 mm (图 4B)。

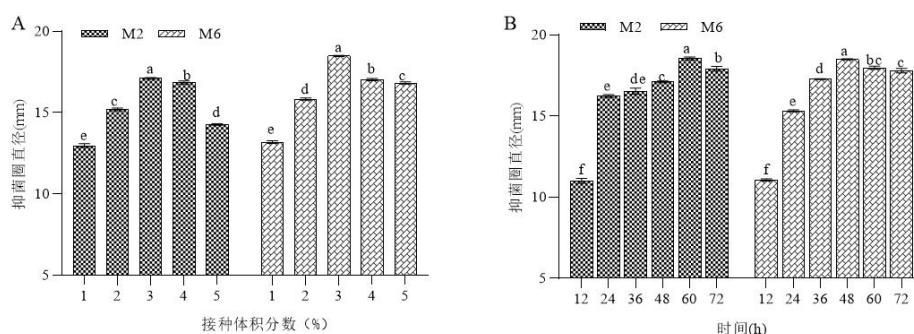


图4 接种体积分数(A)和发酵时间(B)对抑菌活性的影响

Fig.4 Effect of inoculum volume (A) and fermentation time (B) on antibacterial activities against *E. coli*

注: 不同小写字母表示有显著性差异。

碳氮源是细菌生长所必需的营养成份, 不同的碳氮源对菌体的生长代谢有重大影响, 且碳氮源能够间接的影响抗菌物质的产量。碳源替代实验发现: M2 以葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、甘露醇为碳源时抑菌圈直径无显著差异 ($P>0.05$), 其中葡萄糖为碳源时抑菌圈平均直径最大 (17.20 mm); 与葡萄糖相比, 乳糖、半乳糖的添加组抑菌活性分别下降 21.50%、22.67% ($P<0.05$) (图 5A); 在质量分数 1%~3% 的葡萄糖范围内, 随着质量分数的增加抑菌活性先增强后基本不变, 质量分数 2% 时 M2 发酵液具有最大抑菌圈 (17.11 mm) (图 5B)。M6 以葡萄糖为碳源时抑菌圈平均直径最大 (18.36 mm) (图 5C), 与葡萄糖相比, 麦芽糖、乳糖、蔗糖、甘露醇和半乳糖的添加组抑菌活性分别显著下降 100.00%、15.80%、100.00%、5.10%、20.50% ($P<0.05$); 在质量分数 1%~3% 的葡萄糖范围内, 随着质量分数增加到 1.5% 时达到最大抑菌圈 (18.50 mm), 更高浓度下抑菌活性与 1.5% 时无显著差异 (图 5D)。

氮源替代实验发现: M2 以大豆蛋白胨和蛋白胨为氮源时抑菌圈直径无显著差异 ($P>0.05$), 其中以大豆蛋白胨为氮源时抑菌圈平均直径最大 (17.11 mm), 与大豆蛋白胨相比, 牛肉膏、酵母浸粉、硫酸铵和硝酸钾的添加组抑菌活性分别下降 9.12%、15.60%、37.23% 和 27.93% ($P<0.05$) (图 5E); 在质量分数 1%~5% 的大豆蛋白胨范围内, 随着质量分数的增加抑菌活性先增强后减弱, 质量分数 3% 时 M2 发酵液具有最大抑菌圈 (18.38 mm) (图 5F)。M6 以大豆蛋白胨和牛肉膏为氮源时抑菌圈直径无显著差异 ($P>0.05$), 其中以牛肉膏为氮源时抑菌圈平均

直径最大(18.50 mm),与牛肉膏相比,蛋白胨(16.40 mm)、酵母浸粉(15.38 mm)、硫酸铵(14.47 mm)和硝酸钾(12.58 mm)的添加组抑菌活性分别下降 11.35%、6.50%、21.78%和 32.00% ($P<0.05$) (图 5G)。考虑今后发酵实验的便利和成本,选取大豆蛋白胨作为氮源。在质量分数 1%~5%的大豆蛋白胨范围内,随着质量分数的增加抑菌活性先增强后减弱,质量分数 3%时 M6 发酵液具有最大抑菌圈(19.02 mm) (图 5H)。

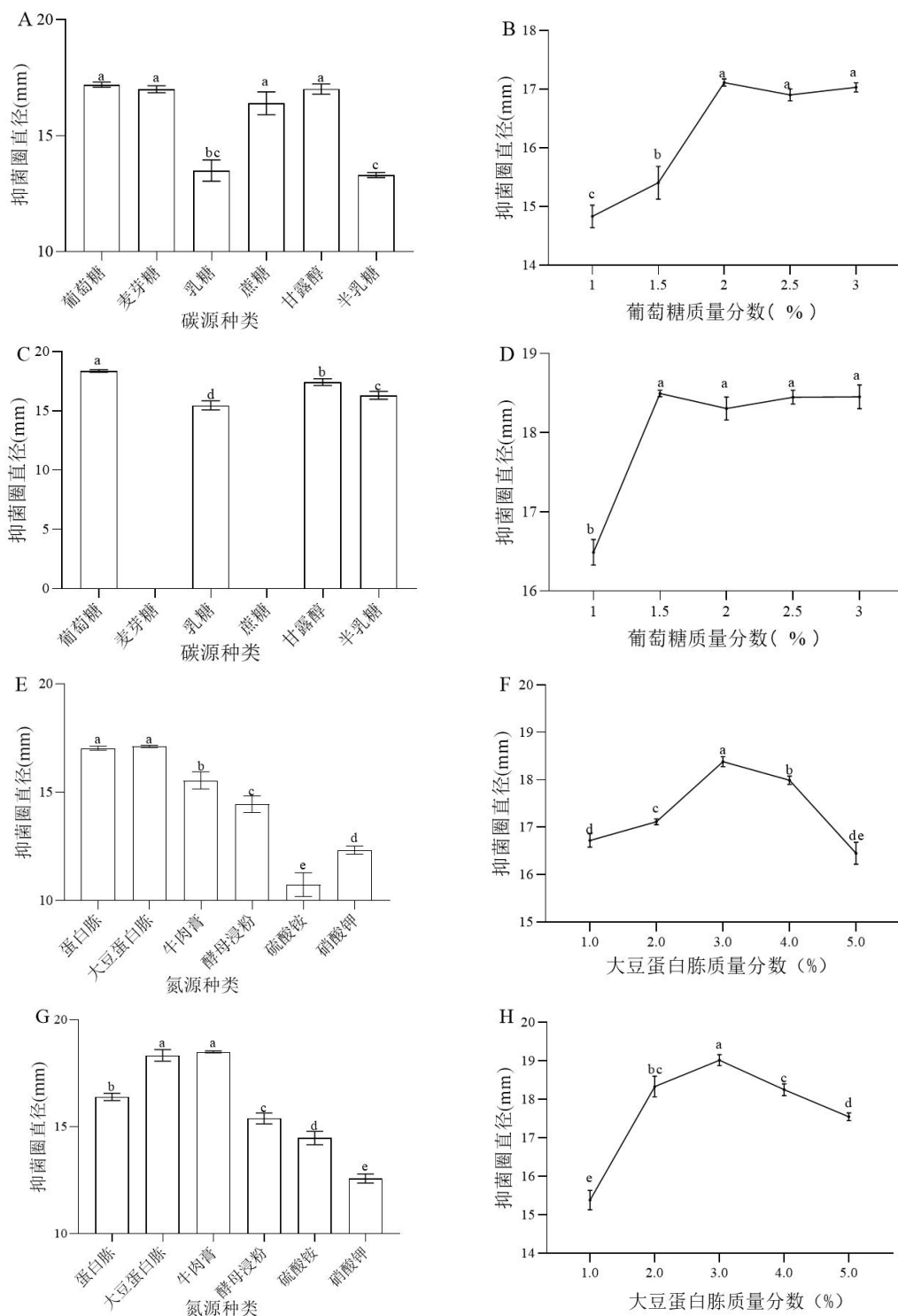


图5 碳源种类(A、C)及质量分数(B、D)和氮源种类(E、G)及质量分数(F、H)对M2(A-B、E-F)、M6(C-D、G-H)抑菌活性的影响

Fig.5 Effect of the type (A,C,E,G) and mass fraction (B,D,F,H) of carbon (A-D) and nitrogen (E-H) sources on antibacterial activities of M2(A-B,E-F) and M6(C-D,G-H) against *E. coli*

注: 不同小写字母表示有显著性差异。

在单因素实验基础上，以接种体积分数、葡萄糖质量分数、大豆蛋白胨质量分数为独立变量，抑菌圈直径为响应值，采用三因素三水平的响应面分析试验对 M2、M6 发酵条件进行优化。利用 Design-Expert 8.0.6 软件进行试验设计、数据处理及模型建立。

表 7 德氏乳杆菌 M2 响应面试验设计方案及结果

Table 7 Response surface test design and results of M2

编号	单因素/%			抑菌圈直径/mm
	A: 接种体积分数	B:: 葡萄糖质量分数	C: 大豆蛋白胨质量分数	
1	0 (3.00)	0 (2.00)	0 (3.00)	18.93
2	1 (4.00)	1 (2.50)	0 (3.00)	16.88
3	1 (4.00)	0 (2.00)	1 (4.00)	17.24
4	0 (3.00)	-1 (1.50)	-1 (2.00)	16.04
5	1 (4.00)	-1 (1.50)	0 (3.00)	16.11
6	1 (4.00)	0 (2.00)	-1 (2.00)	17.28
7	0 (3.00)	0 (2.00)	0 (3.00)	18.79
8	0 (3.00)	1 (2.50)	1 (4.00)	17.33
9	0 (3.00)	1 (2.50)	0 (3.00)	15.99
10	0 (3.00)	1 (2.50)	-1 (2.00)	17.11
11	0 (3.00)	0 (2.00)	0 (3.00)	17.89
12	-1 (2.00)	1 (2.50)	0 (3.00)	15.66
13	0 (3.00)	0 (2.00)	0 (3.00)	19.21
14	0 (3.00)	0 (2.00)	0 (3.00)	19.07
15	0 (3.00)	-1 (1.50)	1 (4.00)	16.09
16	-1 (2.00)	0 (2.00)	-1 (2.00)	16.11
17	-1 (2.00)	0 (2.00)	1 (4.00)	16.09

表 8 德氏乳杆菌 M2 回归模型方差分析

Table 8 Analysis of variance for regression models of M2

参数	自由度	平方和	均方	F 值	P 值	显著性
模型	22.27	9	2.47	12.37	0.001 6	**
A-接种体积分数	1.67	1	1.67	8.37	0.023 2	*
B-葡萄糖质量分数	1.45	1	1.45	7.27	0.030 8	*
C-大豆蛋白胨质量分数	0.006	1	0.006	0.028	0.872 9	
AB	0.048	1	0.048	0.24	0.637 9	
AC	0.000 1	1	0.000 1	0.000 4	0.982 8	
BC	0.007	1	0.007	0.036	0.854 7	
A ²	7.01	1	7.01	35.04	0.000 6	***
B ²	7.42	1	7.42	37.10	0.000 5	***
C ²	2.75	1	2.75	13.73	0.007 6	**
残差	1.40	7	0.20			
失拟项	0.32	3	0.11	0.39	0.767 6	
纯误差	1.08	4	0.27			
总和	23.67	16				
R ² =0.940 8		R ² _{Adj} =0.864 8				

注：“***”表示极显著 (P<0.001)， “**”表示高度显著 (P<0.01)， “*”表示显著 (P<0.05)。

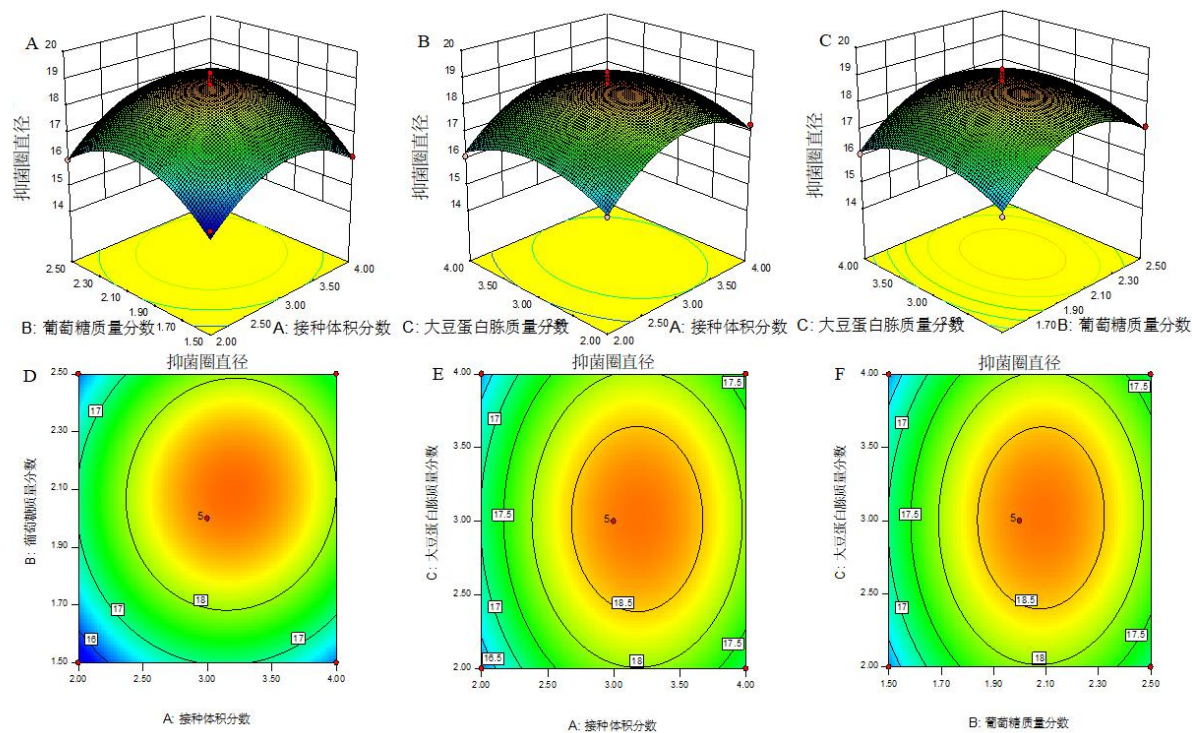


图 6 德式乳杆菌 M2 发酵条件响应面图 (A-C) 和等高线图 (D-F)

Fig.6 Response surface diagram (A-C) and contour diagram (D-F) fermentation conditions of M2

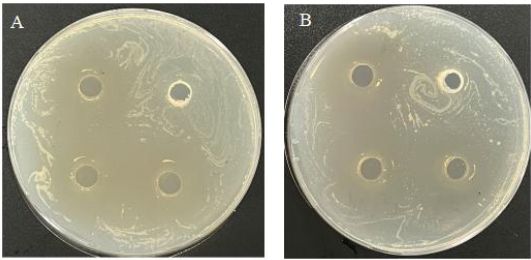


图 7 德式乳杆菌 M2 (A) 和德式乳杆菌保加利亚种 M6 (B) 验证试验结果

Fig.7 Results of M2(A) and M6(B) verification test

基于 M2 响应面试验设计方案及结果 (表 7)，以最大抑菌圈直径 (Y) 为因变量，以接种体积分数、葡萄糖质量分数和大豆蛋白胨质量分数三个因素为自变量，多重回归拟合所得 M2 发酵条件的二阶多项式方程为 $Y=18.78+0.46A+0.43B+0.026C+0.11AB-0.005AC+0.042BC-1.29A^2-1.33B^2-0.81C^2$ 。对回归模型进行方差分析， R^2 值为 0.940 8，说明此回归方程的拟合程度良好；失拟项 P 值 $0.7676>0.05$ ，能较好的反映响应面的变化 (表 8)。该模型预测 M2 发酵最佳条件为接种体积分数 3.18%，葡萄糖质量分数 2.00%，大豆蛋白胨质量分数 3.00%，最佳发酵条件下模型的预测抑菌圈直径为 18.81 mm。

对回归模型进行显著性检验可知，接种体积分数 (A)、葡萄糖质量分数 (B) 表现为显著 ($P<0.05$)， A^2 、 B^2 表现为极显著 ($P<0.001$)， C^2 表现为高度显著 ($P<0.01$) (表 8)。F 值可判断各因素的显著性，F 值越大，显著性越高，各因素对抑菌圈直径影响程度为 $A>B>C$ (表 8)。由三维空间响应面图和等高线图可知：接种体积分数、葡萄糖质量分数、大豆蛋白胨质量分数这三个因素交互作用并不显著 ($P>0.05$) (图 6)。

同样地，德式乳杆菌保加利亚种 M6 通过 Design-Expert 8.0.6 进行多重回归。以最大抑菌圈直径 (Y) 为因变量，以接种体积分数、葡萄糖质量分数和大豆蛋白胨质量分数三个因素为自变量，拟合所得二阶多项式方程： $Y=19.37+0.45A+0.72B+0.044C+0.072AB+0.052AC-0.015BC-1.78A^2-0.74B^2-0.65C^2$ ($R^2=0.9822$ ，失拟项 P 值 >0.05)。该模型预测 M6 发酵过程中三个重要独立变量的最佳条件如下：接种体积分数 3.14%，葡萄糖质量分数 1.75%，大豆蛋白胨质量分数 3.03%，最佳发酵条件下模型的预测抑菌圈直径为 19.58 mm。

为检验响应面法所得的试验结果的可靠性，综合考虑实验可行性和便利性，最终选择发酵条件为接种体积分

数 3.00%, 葡萄糖质量分数 2.00%, 大豆蛋白胨质量分数 3.00%, 在此条件下进行验证试验, 结果测得德式乳杆菌 M2 抑菌圈直径为 19.46 mm (图 7A), 抑菌效果比优化前提高了 25.47%; 德式乳杆菌保加利亚亚种 M6 抑菌圈直径为 19.39 mm (图 7B), 抑菌效果比优化前提高了 22.64%。

2.5 抗菌肽抑菌机理的初探

2.5.1 发酵上清液对大肠杆菌细胞壁及细胞膜的影响

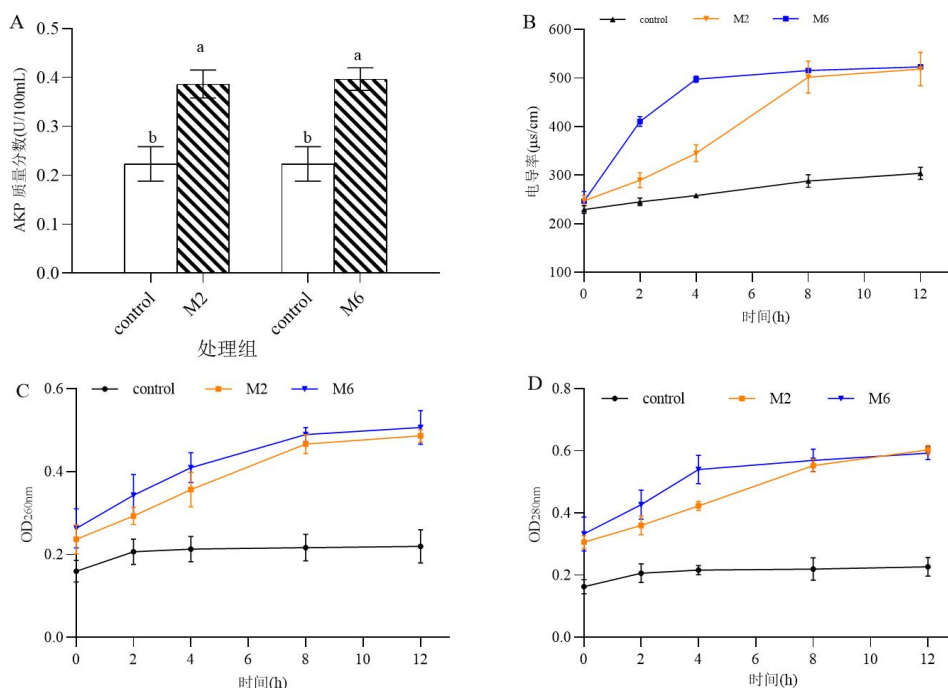


图 8 乳酸菌发酵上清液对大肠杆菌胞外 AKP 质量分数 (A)、电导率变化 (B)、OD_{260nm} (C) 和 OD_{280nm} (D) 处的影响

Fig.8 Effects of LAB fermentation supernatant on extracellular AKP mass fraction (A), conductivity change (B), OD₂₆₀ value(C) and OD₂₈₀ value(D) in *E.coli*

注: 不同小写字母表示有显著性差异。

AKP 是存在于细菌细胞壁和细胞膜之间的酶, 当细菌细胞壁遭到破坏时, AKP 会泄露于细胞壁外。与对照组相比, 大肠杆菌经 M2、M6 发酵上清液处理后胞外 AKP 质量分数增加了 77.27%、81.81% ($P<0.05$) (图 8A), 说明 M2、M6 发酵上清液处理破坏细胞壁完整性。细胞壁可以帮助细胞抵抗外界物理、化学及生物等多种因素的影响, 是保护细胞的重要屏障^[32], 因此破坏大肠杆菌细胞壁完整性是 M2、M6 发酵上清液抑菌作用的主要机制之一, 类似地, Peng 等^[17]研究发现鼠李糖乳杆菌发酵液可通过破坏细菌细胞壁而达到抑菌效果。

正常情况下, 细胞内外的离子处于平衡状态, 当细胞膜遭到破坏后, 细胞膜通透性受到影响, 导致细胞内离子外泄, 使细胞外溶液电导率增大。研究发现: 对照组的电导率随时间变化基本保持稳定, 大肠杆菌经 M2、M6 发酵上清液处理后电导率均随时间增加而逐渐增大, M2 组处理 8 h 后基本达到平衡, M6 组处理 4 h 后基本达到平衡 (图 8B), 与对照组相比, M2、M6 处理 8 h 后电导率分别增强了 73.99%、78.85% (图 8B)。除此之外, 细胞膜被破坏后会导致大分子物质如核酸、蛋白质等外泄。OD₂₆₀、OD₂₈₀ 吸光值显示: 对照组核酸类、蛋白类物质的含量始终保持在平稳状态, M2、M6 处理组随时间增加核酸类、蛋白类物质的含量增加, 8 h 后基本上保持不变; 与对照组相比, M2、M6 处理组 OD₂₆₀ 值分别增加 109.10%、122.73%, OD₂₈₀ 值分别增加 150.00%、159.09% (图 8C~D)。这些结果表明: M2、M6 发酵上清液破坏了细胞膜的通透性。细胞膜是高度选择性的屏障, 能将细胞质与外界隔开, 同时对细胞有物质交换、能量转换及信号传递等作用, 活性物质发挥作用的基础是与病原菌细胞膜间相互作用^[33]。因此, 细胞膜通透性的改变、内容物外泄也是 M2、M6 发酵上清液抑菌的主要机制之一, 类似地, 赖崇熙等^[19]从海鱼肠道分离出的乳酸菌细菌素通过破坏细菌细胞膜、细胞内的蛋白质、核酸、带电离子外泄而导致细菌死亡。

2.5.2 发酵上清液对大肠杆菌的葡萄糖利用的影响

与对照组逐渐下降相比, M2、M6 处理组在培养 4 h 内可溶性总糖含量随着时间延长而升高, 这可能是早期细胞膜破坏后胞内可溶性多糖外泄而引起的; 随后可溶性总糖含量逐渐下降, 但下降幅度变缓(图 9), 与对照组相比, M2、M6 组 12 h 的可溶性总糖质量浓度分别减少了 75.76%、87.88%(图 9)。这些结果说明 M2、M6 发酵上清液降低大肠杆菌对葡萄糖的利用度, 王文婧等^[20]研究的植物乳杆菌发酵液降低沙门氏菌的糖利用能力而抑菌, 说明减缓葡萄糖利用度也是 M2、M6 发酵上清液抑菌的主要机制之一。

综上所述 M2、M6 发酵上清液通过破坏细菌细胞壁完整性、细胞膜通透性及影响葡萄糖利用而达到抑菌作用, 且 M6 对大肠杆菌抑菌能力略优于 M2。

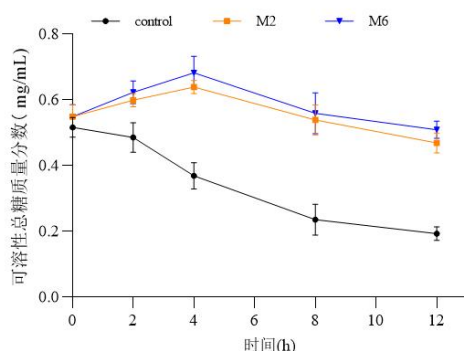


图 9 乳酸菌发酵液对大肠杆菌葡萄糖利用的影响

Fig.9 Effects of LAB fermentation supernatant on glucose utilisation in *E.coli*

2.6 冷鲜肉保鲜测定结果

在猪肉储藏期间, 对照组和实验组感官分值均显著下降, 前 3 d 处理组和对照组评分 >6 分, 随着储藏时间延长, 对照组感官评分迅速下降, 在第 5 天, 对照组评分为 3.93 分, 不可食用, Nisin、M2、M6 处理组分别为 6.23、7.20、7.80 分; 第 7 天时, 对照组为 1.77 分, Nisin、M2、M6 处理组分别为 4.37、5.53、5.50 分, M2、M6 处理组比对照组货架期延长 3 d(图 10A)。同样地, 随着鱼肉储藏时间延长, 对照组感官评分迅速下降, 在第 5 天, 对照组评分为 4.27 分, 不可食用, Nisin、M2、M6 处理组分别为 6.07、7.33、7.67 分; 第 7 天时, 对照组为 1.10 分, Nisin、M2、M6 处理组分别为 4.23、5.80、6.40 分, M2、M6 处理组比对照组货架期分别延长了 3、4 d(图 10B)。

根据细菌总数划分为: 一级鲜肉 $\leq 6 \lg \text{CFU/g}$, 二级鲜肉在 $6 \sim 8 \lg \text{CFU/g}$, 变质肉 $> 8 \lg \text{CFU/g}$ ^[21]。在整个储藏过程中, 随着储藏时间的延长, 各处理组猪肉的菌落总数呈上升趋势。在第 3 天时, 空白对照组的菌落总数达到 $6.40 \lg \text{CFU/g}$, 为二级鲜肉, Nisin、M2、M6 处理组菌落总数分别为 4.82、4.75、4.05 $\lg \text{CFU/g}$, 为一级鲜肉等级; 第 5 天, Nisin 处理组 $> 6 \lg \text{CFU/g}$, M2 处理组的菌落总数接近 $6 \lg \text{CFU/g}$, M6 处理组的菌落总数为 5.29 $\lg \text{CFU/g}$; 第 9 天时, 对照组与 Nisin 处理组菌落总数 $> 8 \lg \text{CFU/g}$, M2、M6 处理组的菌落总数分别为 7.74、7.88 $\lg \text{CFU/g}$ (图 10C), 说明 M2、M6 发酵液能显著延缓猪肉中细菌的生长繁殖。同样地, M2、M6 发酵上清液能显著抑制鱼肉中菌落繁殖, 对照组鱼肉在第 7 天的菌落总数超过 $8 \lg \text{CFU/g}$, Nisin 组的菌落总数在第 9 天超过 $8 \lg \text{CFU/g}$, 而 M2、M6 处理组鱼肉中的菌落总数在第 9 天分别为 6.83、6.20 $\lg \text{CFU/g}$ (图 10D), 说明 M2、M6 发酵液能显著延缓鱼肉中细菌的生长繁殖。

猪肉在储藏过程中, 由于细菌及内源酶的相互作用, 使肉样蛋白质被降解, 所形成的生物胺会影响肉样中的 pH 值。依据《食品 pH 值的测定》中的规定, pH 值在 5.0~6.2 范围内属于新鲜肉, 6.2~6.6 范围内为次鲜肉, $\text{pH} \geq 6.7$ 则为腐败肉。由于 Nisin、乳酸菌发酵液呈酸性, 导致 Nisin、M2、M6 处理组初始 pH 值略低于对照组。在猪肉储藏过程中, 各组猪肉 pH 值随时间延长呈上升趋势, 对照组、Nisin 组、M2、M6 处理组第 7 天的 pH 值分别为 6.63、6.52、6.14、6.08, 第 9 天的 pH 值分别为 7.06、6.83、6.46、6.30(图 10E), 说明 M2、M6 发酵液能显著延缓猪肉 pH 值的上升趋势。

在鱼肉储藏过程中, 第 3 天对照组、Nisin、M2、M6 处理组 pH 值呈下降趋势, 可能是由于在鱼的僵死期,

厌氧糖酵解过程中丙酮酸的形成,从而形成和累积了大量乳酸,导致 pH 值下降,而后期 pH 值上升是因为细菌和内源酶的影响,导致生物胺、氨等强碱性物质的积累^[34]。整个储藏过程中,发酵液处理组的鱼肉 pH 值变化范围比空白对照组和 Nisin 处理组略小,说明乳酸菌发酵液处理组在维持鱼肉 pH 值方面有一定作用。第 7 天,对照组、Nisin、M2、M6 处理组的 pH 值分别为 7.14、6.86、6.80、6.72;第 9 天, Nisin、M2、M6 处理组的 pH 值分别为 7.16、7.00、6.98 (图 10F),说明 M2、M6 发酵液能显著延缓鱼肉 pH 值的上升趋势。

综上所述, M2、M6 发酵上清液能显著延缓猪肉、鱼肉中细菌的繁殖,降低菌落总数,延缓 pH 值上升趋势,延长货架期,具有较好保鲜效果,为肉类防腐剂开发和应用提供理论指导。类似地,有研究发现青海牧民酸奶中乳酸菌产抑菌物质能有效减少冷却猪肉 TVB-N 的产生,减缓 pH 的升高,抑制细菌总数的增加,改善冷却肉的感官质量^[35]; Meng 等^[36]将抗菌肽 Mytichitin-A 能有效抑制猪肉贮藏过程中细菌生长、有利于猪肉品质的维持;高永悦等^[37]发现戊糖片球菌 YF-8 淬灭酶粗提物处理感染温和气单胞菌的三文鱼,能有效地抑制菌落总数,延长货架期。

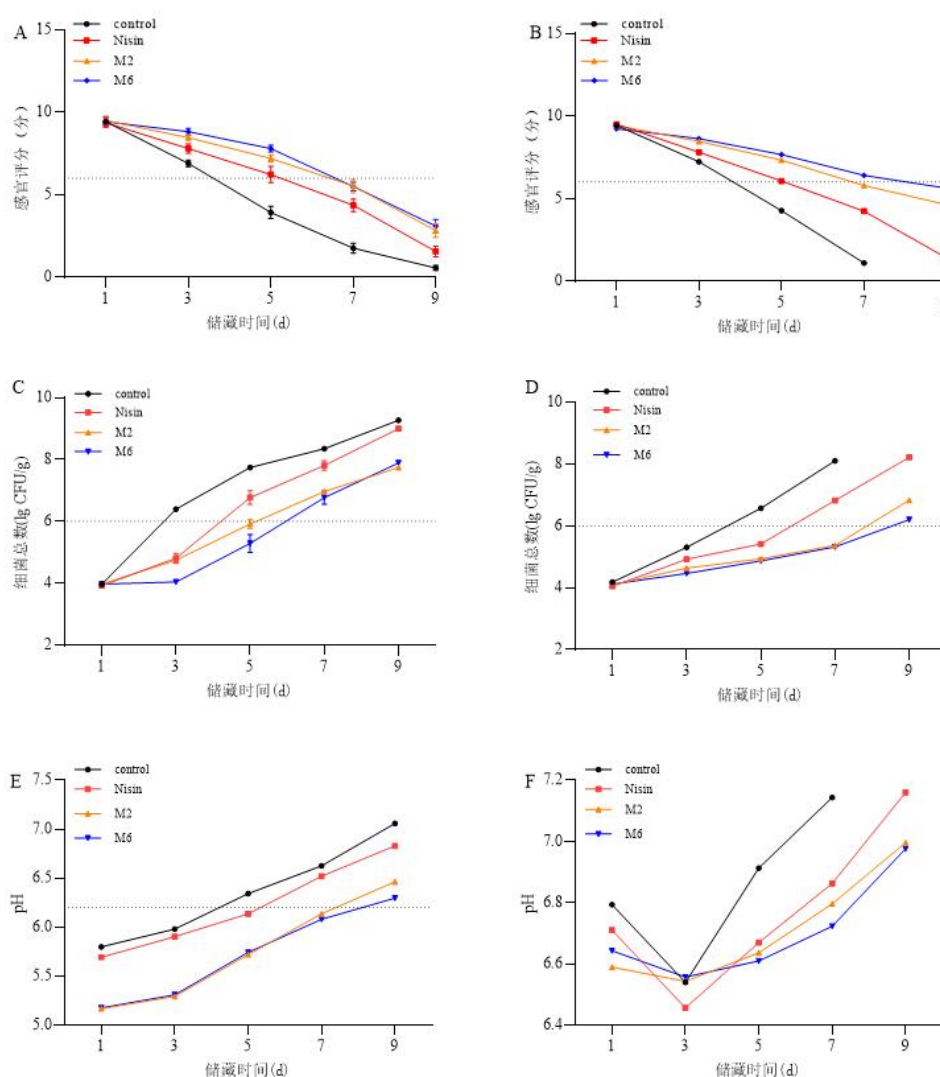


图 10 不同处理组对猪肉 (A、C、E) 和鱼肉 (B、D、F) 的感官评分 (A-B)、菌落总数 (C-D) 及 pH 值 (E-F) 的影响

Fig.10 Effects of different treatment groups on the sensory score(A-B), total number of colonies (C-D) and pH(E-F) of pork (A,C,E) and fish (B,D,F)

3 结论

本研究分别从酸豆角、发酵乳中分离得到的德氏乳杆菌 M2、德氏乳杆菌保加利亚亚种 M6 能有效抑制多种

革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的生长,它们的主要抑菌物质均为热、酸碱稳定性较好的蛋白或抗菌肽类物质。M2、M6 抑菌最佳发酵条件均为:接种体积分数 3.00%,葡萄糖质量分数 2.00%,大豆蛋白胨质量分数 3.00%。M2、M6 发酵液通过破坏大肠杆菌细胞壁完整性、细胞膜通透性且干扰葡萄糖利用而达到抑菌作用,对猪肉、鱼肉具有较好的保鲜效果。该文丰富了产抗菌肽的乳酸菌资源库,为广谱新型的生物防腐剂的开发和应用提供理论指导。然而,M2、M6 的抑菌物质结构、安全性等还有待于深入研究。

参考文献

- [1] 李红秋,贾华云,赵帅,等.2021 年中国大陆食源性疾病暴发监测资料分析[J].中国食品卫生杂志,2022,34(4):816-821.
- [2] 刘婷婷,崔春霞,宋壮志,等.2010-2020 年中国大陆金黄色葡萄球菌及其肠毒素引起的食源性疾病暴发事件归因分析[J].中国食品卫生杂志,2022,34(5):1029-1034.
- [3] MEAD S P, SLUTSKERR L, DIETZ A, et al. Food-related illness and death in the united states emerge [J]. International Journal of Infectious Diseases, 1999, 5: 607-625.
- [4] MOSTFA A, AL-ASKAR A A, ALMAARY K S, et al. Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases [J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2018, 25(2): 361-366.
- [5] DAVUES J, DAVIES D. Origins and evolution of antibiotic resistance [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2010, 74(3): 417.
- [6] 陈全毅,唐慧芳,刘颖,等.海洋源抑菌活性乳酸菌的筛选及对冷鲜鸡肉货架期评价[J].食品与发酵工业,2020,46(20):164-170.
- [7] KUSH K P, SHIV K S, SURYA K V, et al. Bioutilization of paneer whey waste for production of paneer making powder containing pediocin PA-1 as a biopreservative to enhance shelf life of paneer [J]. LWT-Food Science and Technology, 2019, 113: 108243.
- [8] [8] 杨晨远,于子川,秦迪,等.抗菌肽的结构分析、抗菌机制及改造应用的研究进展[J].微生物学报,2024,64(7):2242-2259.
- [9] 李仲玄,程强,姚蒙蒙,等.乳酸链球菌素(Nisin)的特性及应用[J].饲料工业,2020,41(24):8-11.
- [10] 国家食品药品监督管理总局,国家卫生和计划生育委员会.GB4789.35-2016,食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验[S].北京:中国标准出版社,2016.
- [11] MUHAMMAD Z, RAMZAN R, ABDELAZEZ A, et al. Assessment of the antimicrobial potentiality and functionality of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from the conventional inner mongolian fermented cheese against foodborne pathogens [J]. Pathogens, 2019, 8(2): 71.
- [12] 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.
- [13] 凌代文,东秀珠.乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M].北京:中国轻工业出版社,1999.
- [14] 杜贺超,蒋加进,王楠楠等.产抑菌物质乳酸菌的筛选及其抑菌特性研究[J].食品安全质量检测学报,2021,21(12):8543-8550.
- [15] HYEUN C G, IRORITA F J I, MAY D C, et al. Antimicrobial peptides (bacteriocins) produced by *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus* strains with activity against clinical and food-borne pathogens [J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2025, 17(3): 1171.
- [16] 王娜,李慧,戴伶俐,等.产抗菌肽乳酸菌的筛选与鉴定[J].中国食品学报,2020,20(12):248-255.
- [17] PENG H, ZHOU G, YANG X M, et al. Transcriptomic analysis revealed antimicrobial mechanisms of *Lactobacillus rhamnosus* SCB0119 against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(23): 15159.
- [18] 代博仁,申光辉,刘海娜,等.大蒜有机硫化物对解淀粉芽孢杆菌的抑菌作用及机理[J].华南农业大学学报,2020,41(4):95-103.
- [19] [19] 赖崇熙,刘唤明,贾瑞博,等.产细菌素海洋乳酸菌的筛选及细菌素抑菌机制[J].广东海洋大学学报,2024,44(3):1-8.
- [20] 王文婧,殷文政,冀昌龙.产抑菌活性物质菌株的筛选及其抑菌机理的研究[J].现代食品科技,2016,32(12):151-157.
- [21] 张漫敏,*Lactobacillus plantarum* C010 产细菌素的分离纯化、抑菌特性及保鲜应用初探[D].南昌:江西农业大学,2022.
- [22] 石林玥. Mytichitin-CB 抗菌肽在冷鲜猪肉防腐保鲜中的作用研究[D].天津:天津科技大学,2019.
- [23] 国家食品药品监督管理总局,国家卫生和计划生育委员会.GB4789.2-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定[S].北京:中国标准出版社,2016.
- [24] 陈华,彭浩,胡方兴,等.德氏乳杆菌保加利亚亚种发酵产物对常见病原菌的抑制作用[J].国际检验医学杂志,2020,41(23):2898-2903,2907.
- [25] 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.

- [26] 陆春波,毛银,李国辉,等.植物乳杆菌 DY6 主要抑菌代谢物的分析和鉴定[J].微生物学通报,2019,46(9):2258-2271.
- [27] 王嘉悦,潘果,钟忻桐,等.肠膜明串珠菌细菌素抗金黄色葡萄球菌的生物学特性分析[J].微生物学通报,2024,51(9):3562-3571.
- [28] 高欣,刘颖,刘凡湘,等.水产源产细菌素乳酸菌的分离、筛选及鉴定[J].中国饲料,2020,21:29-34.
- [29] SHI Y H, HUANG J H, ZENG G M, et al. Exploiting extracellular polymeric substances (EPS) controlling strategies for performance enhancement of biological wastewater treatments: An overview [J]. Chemosphere, 2017, 180: 396-411.
- [30] OLSEN J V, SHAO-EN O, MATTHIAS M. Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues [J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2004, 3(6): 608-614.
- [31] 孙贺.四种食源性多酚与胃蛋白酶、胰蛋白酶相互作用的研究[D].河南:河南科技大学,2019.
- [32] HASIM S, COLEMAN J J. Targeting the fungal cell wall: Current therapies and implications for development of alternative antifungal agents [J]. Future Medicinal Chemistry, 2019, 11(8): 869-883.
- [33] COLCERIU M, ALDEA P L, RACHISAN A, et al. Vesicoureteral reflux and innate immune system: physiology, physiopathology, and clinical aspects [J]. Journal of Clinical Medicine, 2023, 12(6): 2380.
- [34] OLADIPUPO O O, SOOTTAWA B, KITIVA V. Comparative study on nitrogen and argon- based modified atmosphere packaging on microbiological, chemical, and sensory attributes as well as on microbial diversity of Asian sea bass [J]. Food Packaging and Shelf Life, 2019, 22: 100404.
- [35] 杜琨.青海牧民酸奶中乳酸菌产抑菌物质对冷却猪肉保鲜效果研究[J].东北农业科学, 2018,43(1):41-44.
- [36] MENG D M, SUN S N, SHI L Y, et al. Application of antimicrobial peptide mytichitin-CB in pork preservation during cold storage [J]. Food Control, 2021, 125(1): 108041.
- [37] 高永悦,吕欣然,杜宏,等.降解温和气单胞菌 AHLs 乳酸菌的筛选及在三文鱼保鲜中的应用[J].食品科学,2022,43(14):136-142.