

一株产细菌素乳酸菌的筛选及细菌素特性研究

黎杰, 韩磊, 殷文政* (内蒙古农业大学食品科学与工程学院, 内蒙古呼和浩特 010018)

摘要 [目的] 研究从酸马奶酒中筛选出的 1 株产细菌素的乳酸菌的细菌素特性。[方法] 从内蒙古地区酸马奶酒中分离到 19 株乳酸菌, 采用牛津杯双层平板扩散法, 排除有机酸、过氧化氢的干扰后, 经蛋白酶敏感性试验, 筛选出 1 株产细菌素的乳酸菌菌株 XMD6。[结果] 通过形态学特征、生理生化试验及 16S rRNA 基因序列分析, 鉴定为坚强肠球菌(*E. durans*)。其所产细菌素在 80 ℃ 对热稳定, 显示抑菌活性 pH 范围为 2~7。抑菌谱试验表明, 该菌能抑制食品中常见的革兰氏阳性、革兰氏阴性的致病菌及腐败菌, 具有较广的抑菌谱。[结论] 研究可为今后开发利用新型细菌素防腐剂提供理论依据。

关键词 乳酸菌; 筛选; 细菌素; 特性

中图分类号 S879.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)22-225-03

Screening of Bacteriocin-producing Lactic Acid Bacteria and the Characteristics of Bacteriocin

LI Jie, HAN Lei, YIN Wen-zheng* (College of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010018)

Abstract [Objective] To study bacteriocin characteristics of lactic acid bacteria isolated from koumiss. [Method] Nineteen strains of lactic acid bacteria were isolated from koumiss in Inner Mongolia region. Through the Oxford cup double agar diffusion method, after eliminating the interference of organic acids and hydrogen peroxide. Screening one strain of bacteriocin producing lactic acid bacteria strain XMD6 by the protease sensitivity test. [Result] The lactic acid bacteria was identified as *E. durans* by morphological, physiological and biochemical method and 16S rRNA gene sequence homology analysis. The bacteriocin of strain XMD6 heat-stable at 80 ℃, and pH in the range of 2–7 have anti-bacterial activity. The inhibitory spectrum test showed that it can inhibit the gram positive and gram negative pathogenic bacteria and spoilage bacteria in food, has a wider antibacterial spectrum. [Conclusion] The study can provide theoretical basis for development and utilization of new type bacteriocin preservative.

Key words Lactic acid bacteria; Screening; Bacteriocin; Characteristics

细菌素(bacteriocin)是某些细菌在代谢过程中通过核糖体合成的一类具有抑菌活性的蛋白质或多肽^[1-2], 能抑制食品中的多数腐败菌和致病菌的生长繁殖^[3]。化学防腐剂的乱用、滥用会在人体内毒素蓄积, 而细菌素可被人体内蛋白酶降解, 无任何残留, 无毒副作用, 也不会产生抗药性, 是公认的天然食品防腐剂^[4-5]。乳酸菌(*lactic acid bacteria*, LAB)是被证明了的食品安全级微生物(GRAS), 其发酵过程中产生有机酸、过氧化氢、细菌素等多种代谢产物。其中乳酸菌细菌素因其安全、无毒且有较强的抑菌活性, 作为食品防腐剂具有广阔的应用前景和市场价值, 已成为国内外开发研究的热点。在食品工业中应用乳酸菌细菌素替代化学防腐剂, 将有利于改善食品安全现状。目前为止, 乳酸链球菌素(Nisin)是唯一允许作为防腐剂在食品生产加工中使用的细菌素, 已在 60 多个国家和地区广泛用于乳制品、肉制品、罐装食品等的防腐保鲜中^[6]。但 Nisin 的抑菌谱较窄, 对 pH 的稳定性较差^[7-8], 因而, Nisin 在食品中应用范围受到一定程度的限制。笔者从酸马奶酒中筛选出 1 株产细菌素的乳酸菌, 并对细菌素的特性进行初步研究, 为今后开发利用新型细菌素防腐剂提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品。采集自内蒙古锡林郭勒地区以传统方法自然发酵的酸马奶酒。

1.1.2 指示菌。肠沙门氏菌亚种、荧光假单胞菌、枯草芽孢

杆菌、蜡样芽孢杆菌, 购于中国普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC); 大肠杆菌购于美国典型菌种保藏中心(ATCC); 金黄色葡萄球菌、嗜热链球菌, 购于中国工业微生物菌种保藏管理中心(CICC); 单核细胞增生李斯特氏菌, 购于中国医学微生物菌种保藏管理中心(CMCC); 酿酒酵母、热带假丝酵母、黑曲霉, 均由内蒙古农业大学微生物实验室保藏。

1.1.3 培养基。脱脂乳培养基、生理生化试验培养基参照文献[3, 9]配制。MRS 培养基、NA 培养基、NB 培养基、YPD 培养基、PDA 培养基, 购于北京路桥技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 乳酸菌的分离、纯化与保存。采用平板划线法, 对酸马奶酒样品中乳酸菌进行分离和纯化, 选取纯菌株进行革兰氏染色镜检及过氧化氢酶试验, 并将菌株于 4 ℃ 保存备用。

1.2.2 发酵上清液的制备。乳酸菌连续传代培养 3 代, 发酵液在 4 ℃, 8 000 r/min 离心 20 min, 上清液用 0.45 μm 滤菌器过滤除去菌体, 收集发酵上清液。

1.2.3 抑菌试验。采用牛津杯双层平板扩散法^[10]。具体方法为: 在灭菌的平皿中注入约 10 ml 2% 的琼脂培养基, 使均匀铺满平皿底部作为下层, 冷却后在表面等间距放置灭菌的牛津杯, 待 NA 培养基冷却到 50 ℃ 左右时, 取 200 μl 指示菌悬液加入到 20 ml 培养基中, 混匀后倒入下层有琼脂的平皿中, 待上层培养基冷却后再将牛津杯取出, 制成带孔的含菌平板。将 180 μl 乳酸菌发酵上清液注入到小孔内, 室温下扩散 4 h, 在 37 ℃ 恒温培养 12 h, 取出后用游标卡尺测定抑菌圈直径。抑菌试验均重复 3 次。

1.2.4 产抑菌物质乳酸菌的初筛。以沙门氏菌为指示菌, 测定乳酸菌发酵上清液的抑菌活性。选取产生明显抑菌圈的菌株进行复筛。

基金项目 内蒙古自然科学基金项目(2014MS0359)。
作者简介 黎杰(1988-), 男, 重庆人, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学。* 通讯作者, 教授, 硕士, 从事微生物与食品安全研究。
收稿日期 2015-06-03

1.2.5 产细菌素乳酸菌的复筛。有机酸的排除:将发酵上清液调 pH 至 5.0,以用乙酸、乳酸调相同 pH 的 MRS 液体培养基为对照组,对沙门氏菌抑菌试验。

过氧化氢的排除:发酵上清液 pH 调至 7.0,按浓度为 10 mg/ml 加入过氧化氢酶,37 ℃水浴 2 h,再调回 pH 至 5.0,以未加过氧化氢酶处理 pH 5.0 的发酵上清液作对照,进行抑菌试验。

酶敏感性试验:将发酵上清液分别调到各蛋白酶的最适 pH 2.0、7.6、7.6、6.0 和 6.5,按终浓度 1 mg/ml 对应加入胃蛋白酶、胰蛋白酶、蛋白酶 K、木瓜蛋白酶和溶菌酶,在 37 ℃水浴锅中温育 2 h,再调回对照 pH 5.0。以未用蛋白酶处理的 pH 5.0 发酵上清液作对照组,进行抑菌试验。

1.2.6 产细菌素乳酸菌的鉴定。形态学特征:观察记录乳酸菌的菌落特征及细胞形态。生理生化试验:生理生化试验参照文献[11-13]的方法进行。16S rRNA 基因序列分析:用细菌基因组 DNA 提取试剂盒对乳酸菌的基因组 DNA 进行提取,以其为模板进行 PCR 扩增 16S rRNA 基因序列。PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶检测,并送上海生工进行测序。将所测 16S rRNA 基因序列在提交到 NCBI,用 BLAST 工具进行序列的同源性分析,并通过 MEGA5.2 软件构建系统发育树。

1.2.7 细菌素的热稳定性。将发酵上清液 pH 调至 5.0,分别在 40、60、80、100、121 ℃条件下加热处理 30 min,以未加热的发酵液作对照,做抑菌试验。

表 2 乳酸菌 XMD6 的复筛结果 mm

样品处理	抑菌圈直径	样品处理	抑菌圈直径
发酵上清原液	19.31 ± 0.27	胃蛋白酶处理的发酵上清液(pH 5.0)	9.87 ± 0.32
发酵上清液(pH 5.0)	14.52 ± 0.17	胰蛋白酶处理的发酵上清液(pH 5.0)	-
乙酸(pH 5.0)	-	木瓜蛋白酶处理的发酵上清液(pH 5.0)	-
乳酸(pH 5.0)	-	蛋白酶 K 处理的发酵上清液(pH 5.0)	-
过氧化氢酶处理的发酵上清液(pH 5.0)	14.19 ± 0.41	溶菌酶处理的发酵上清液(pH 5.0)	14.29 ± 0.16

注:表中数值为 3 次试验的平均值 ± 标准误差;“-”,无抑菌圈;牛津杯直径 8 mm。

由表 2 可知,pH 5.0 时,乙酸、乳酸对沙门氏菌均无抑制作用,发酵上清液的抑菌圈减小,仍有较强抑菌作用,表明有机酸有一定的抑制作用,但不是主要抑菌物质。过氧化氢酶处理的发酵上清液抑菌圈直径基本没变化,可排除过氧化氢的作用。发酵上清液经胃蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶和蛋白酶 K 处理后,其抑菌活性部分或完全丧失,说明发酵上清液中的主要抑菌物质是蛋白类物质,可初步确认为细菌素。

2.4 产细菌素乳酸菌的鉴定

2.4.1 形态学特征。菌株 XMD6 的菌落呈圆形、乳白色、大小 0.5~2.0 mm、边缘整齐、表面光滑、质地均匀、有光泽、凸起、不透明。细胞形态为革兰氏阳性球菌,呈圆形或椭圆,单个或成簇排列。

2.4.2 生理生化试验。乳酸菌 XMD6 的生理生化试验结果见表 3。由表 3 可知,菌株 XMD6 能发酵葡萄糖不产气,10 ℃和 45 ℃生长,在 pH 9.6 和 6.5% NaCl 也能生长,0.1% 美兰还原,不能发酵阿拉伯糖、山梨醇、棉子糖、蜜二糖、鼠李糖

1.2.8 细菌素对 pH 的稳定性。用 2 mol/L 的 HCl 和 2 mol/L 的 NaOH 将发酵上清液的 pH 分别调至 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 和 11.0。分别测定不同 pH 下细菌素对指示菌的抑菌活性。

1.2.9 抑菌谱的测定。发酵上清液 pH 调至 5.0,分别对沙门氏菌、荧光假单胞菌、枯草芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、嗜热链球菌、单核细胞增生李斯特氏菌、酿酒酵母、热带假丝酵母和黑曲霉做抑菌试验,确定细菌素的抑菌谱。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌的分离 从酸马奶酒中分离得到 19 株菌株,均革兰氏染色呈阳性、过氧化氢酶试验呈阴性,可初步判定为乳酸菌。

2.2 产抑菌物质乳酸菌的初筛 通过抑菌试验,有 4 株乳酸菌的发酵上清液对沙门氏菌有明显抑制作用,结果见表 1。

表 1 产抑菌物质乳酸菌初筛结果 mm

菌株编号	抑菌圈直径	菌株编号	抑菌圈直径
XMA6	16.03 ± 0.41	XMC10	19.29 ± 0.33
XMC6	17.47 ± 0.28	XMD6	19.12 ± 0.17

注:表中数值为 3 次试验的平均值 ± 标准误差;牛津杯直径 8 mm。

2.3 产细菌素乳酸菌的复筛 对 4 株产抑菌物质乳酸菌进行复筛,通过排除有机酸、过氧化氢的干扰及酶敏感性试验,筛选出 1 株产细菌素的乳酸菌,复筛结果如表 2 所示。

表 3 乳酸菌 XMD6 生理生化试验结果

试验项目	试验结果	试验项目	试验结果
过氧化氢酶试验	-	果糖	+
葡萄糖产气	-	半乳糖	+
硝酸盐还原	-	麦芽糖	+
明胶液化试验	-	乳糖	+
运动性试验	-	蔗糖	-
石蕊牛乳凝固	+	甘露糖	+
H ₂ S 试验	-	阿拉伯糖	-
吡啉试验	-	海藻糖	+
0.1% 美兰还原试验	+	蜜二糖	-
10 ℃生长	+	纤维二糖	+
15 ℃生长	+	松三糖	-
45 ℃生长	+	棉子糖	-
4% NaCl 生长	+	鼠李糖	-
6.5% NaCl 生长	+	甘露醇	-
pH 4.5 生长	+	山梨醇	-
pH 9.6 生长	+	七叶苷	D
葡萄糖	+		

注:“+”,90% 以上菌株为阳性;“-”,90% 以上菌株为阴性;“d”,11%~89% 菌株为阳性。

和蔗糖。根据《伯杰氏系统细菌学手册》^[11]和《常见细菌系统鉴定手册》^[13]可初步鉴定为坚强肠球菌(*Enterococcus durans*)。

2.4.3 16S rRNA 基因序列分析。PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳检测结果(图 1)。由图 1 可知,PCR 扩增产物得到一条清晰的条带,大小约 1 500 bp。

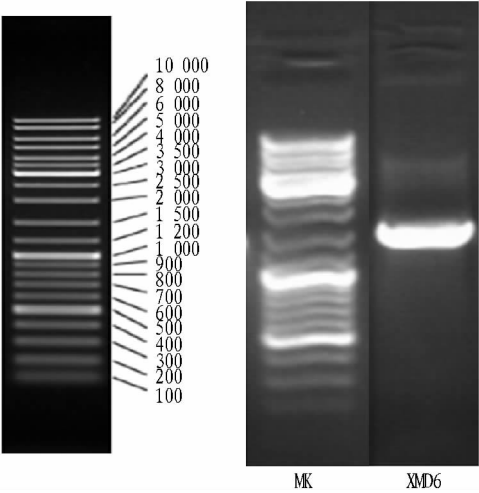


图 1 菌株 XMD6 的 PCR 扩增产物电泳

将菌株 XMD6 测得的 16S rRNA 基因序列与 GenBank 中已知菌株的基因序列进行同源性比较,并构建系统发育树(图 2)。由图 2 可知,菌株 XMD6 与标准菌株 *Enterococcus durans* strain DSM 20633 的同源性最高,达到 100%。结合生理生化试验及 16S rRNA 基因序列分析,该菌为坚强肠球菌(*Enterococcus durans*),命名为 *E. durans* XMD6。

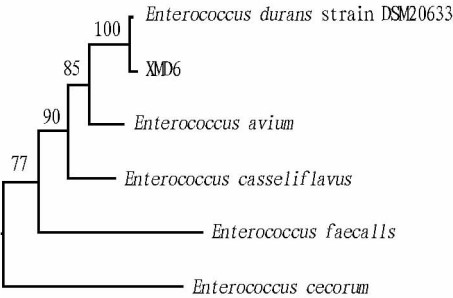


图 2 菌株 XMD6 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树

2.5 细菌素的热稳定性 发酵上清液经不同温度处理后的抑菌结果见表 4。由表 4 可知,*E. durans* XMD6 产的细菌素在经 80 ℃处理 30 min 后,抑菌圈大小基本不变,121 ℃处理 30 min,仍有抑菌活性,可以判定该细菌素具有良好的热稳定性。

表 4 不同温度对细菌素抑菌活性的影响 mm

处理条件	抑菌圈直径	处理条件	抑菌圈直径
未加热处理	14.51 ± 0.23	80 ℃	13.95 ± 0.36
40 ℃	14.63 ± 0.21	100 ℃	12.84 ± 0.47
60 ℃	14.29 ± 0.11	121 ℃	11.68 ± 0.38

注:表中数值为 3 次试验的平均值 ± 标准误差;牛津杯直径 8 mm。

2.6 细菌素的 pH 稳定性 不同 pH 对发酵上清液抑菌活性的影响结果如图 3 所示。由图 3 可以看出,*E. durans*

XMD6 产的细菌素在 pH 2 ~ 7 的范围内有抑菌活性,其抑菌活性随 pH 的升高而逐渐降低,pH 在 8 ~ 11 范围内无抑菌活性,说明 *E. durans* XMD6 产的细菌素酸性条件下有较好的稳定性。

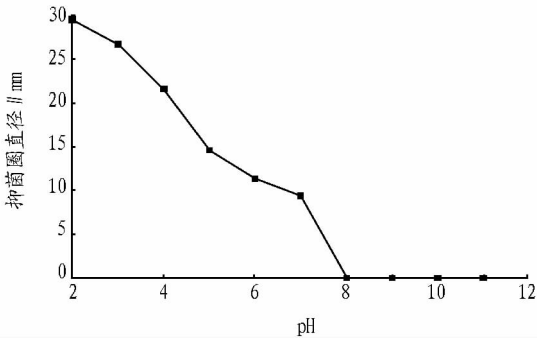


图 3 pH 对细菌素抑菌活性的影响

2.7 抑菌谱的测定 发酵上清液对 11 株指示菌的抑菌结果如表 5 所示。由表 5 可知,*E. durans* XMD6 产的细菌素能抑制金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌等革兰氏阳性细菌以及沙门氏菌、大肠杆菌革兰氏等革兰氏阴性细菌,具有广谱抑菌作用。

表 5 细菌素的抑菌谱

指示菌	抑菌圈直径	指示菌	抑菌圈直径
肠沙门氏菌亚种	++	嗜热链球菌	++
荧光假单胞菌	++	单核细胞增生李斯	+++
大肠杆菌	++	特氏菌	
金黄色葡萄球菌	++	酿酒酵母	-
枯草芽孢杆	+++	热带假丝酵母	-
蜡状芽孢杆菌	+++	黑曲霉	-

注:“+++”,直径 > 15 mm;“++”,11 mm < 直径 < 15 mm;“+”,8 mm < 直径 < 11 mm;“-”,无抑菌圈。

3 结论

该研究从酸马奶酒中分离出 19 株乳酸菌,排除有机酸、过氧化氢的干扰后,经蛋白酶敏感性试验,筛选出 1 株产细菌素的乳酸菌菌株 XMD6。结合形态学特征、生理生化反应及 16S rRNA 基因序列分析,将其鉴定为 *Enterococcus durans*,并命名为 *E. durans* XMD6。

目前,已发现的乳酸菌细菌素有 300 多种,其产生菌株集中在乳球菌属、片球菌属、乳杆菌属、肠球菌属等^[14-16]。肠球菌属中以屎肠球菌研究最多^[17],坚强肠球菌产细菌素还未见报道。*E. durans* XMD6 产的细菌素对蛋白酶敏感,有良好的热稳定性,80 ℃处理 30 min 抑菌活性基本不变,可用于巴氏杀菌食品的生产加工中,具有广阔的应用前景。此外,*E. durans* XMD6 产的细菌素在 pH 2 ~ 7 的范围内显示抑菌活性,抑菌活性随 pH 增大而降低,这可能是由于高酸性条件可促进细菌素的抑菌活性或细菌素和酸共同的作用,有待继续研究,因此,可将其用于酸性食品的防腐保鲜中。一般情况下,细菌素只能抑制同种或亲缘关系很近的细菌,而该试验筛选的 *E. durans* XMD6 产的细菌素,对食品中常见的革

务,引领农户以自己的劳力、技术等生产要素入股,与农产品加工企业形成紧密的利益共享体,进行农业生产和经营。鼓励有条件的农户自己创建农产品加工企业,延长农业生产的产业链条,采用一定的方式,实现在生产、加工、流通各个环节降低成本增加收益,使农户也能够得到供应链条各个环节的平均利润,这样就能给农户很大的生产积极性,他们能够主动融入到农业产业链条当中,农户和企业之间就会形成信息通畅的一个供求平台,更好地为整个农业产业化发展提供更大的发展机遇。这样,农户就可以避免原来那种盲目生产的状况,按照市场需求进行生产,按照工业要求来安排农业生产,企业也可以实现高附加值的农产品加工,降低舍近求远成本的浪费,企业利润水平提高,农户收入水平也增加,达到共赢的目的。在大中原经济区发展的形势下,农产品加工贸易在这种发展模式指导下,可以得到更大的发展,从而带动全省农业生产结构的调整和转变。

5.2 大力发展农村金融,支持农产品加工业发展,壮大企业规模 根据河南农村金融的现状,在继续鼓励支持农信社、邮政储蓄、农业银行对农村产业化发展支持的同时,积极发展村镇银行、农村商业银行的设立,为农村经济主体特别是农产品加工企业的发展提供更多的金融服务创造条件。采取措施对农信社在原有授信额度的基础上,进一步提高涉农贷款额度,鼓励邮政储蓄信贷部更多面对农业产业化企业发放贷款,为他们提供更多的金融信息咨询服务等。发展正规金融同时,也要鼓励企业自身采取各种融资方式充分利用民间资本来发展壮大,比如,在农产品收购季节通过与农户签订延期付款合约的付款方式,通过民间借贷等方式提高农产品加工业企业原料收购规模,扩大生产。

5.3 加快高新技术的开发与引进,提高管理水平,建立现代企业制度 农产品加工业的发展对高新技术的需求越来越强,针对河南省农产品加工企业技术与管理现状,在农产品加工科技水平提高方面,要采取措施鼓励该类企业联合农业科研单位和农业技术推广相关部门,对新技术、新设备和新

产品的开发共同合作,共享利益,减少农产品高新技术开发和引进,防止开发和利用脱节。对于经营管理,积极鼓励农产品加工企业改变传统的经营模式,建立现代科学的企业管理制度,提高生产经营效益,这样可以扩大经营规模,提高规模收益,达到企业可持续发展的目的。当然,对于企业本身,也要鼓励他们提高自主创新能力,政府采取措施扶持他们积极学习和引进国内外先进加工生产技术,结合自身开展需要开发出自主知识产权的品牌产品。

5.4 完善技术管理人才培养引进机制 政府部门采取各种措施支持农业科技培训,加强人才培养,提高农民的科技水平,把农业、农村经济发展真正转移到依靠科技进步和提高劳动者素质的轨道上来。打破家族式管理模式,大力引进加工技术人才;提高农产品加工企业职工工资待遇,改善企业人才的生活和工作环境。

5.5 实施名牌战略,提高农产品加工企业的综合竞争力 发挥地方资源优势 and 农业重要特色产品,提升农产品加工业的综合竞争力的重要手段就是发展农产品加工品牌,实施“品牌战略”发展。根据河南省现阶段农产品加工业发展的实际状况,首先,政府要采取措施鼓励加工企业转变思想,大力宣传新产品,创建农产品加工品牌意识;其次,鼓励企业提高加工农产品的质量水平,形成规模生产,创立农产品加工品牌基地;同时,扩大商标总量,加强培育能力,构建农产品加工重要品牌的载体。还要鼓励全省有实力的农产品加工企业发展国际市场,不断提高农产品加工附加值和商品的国内外竞争力。

参考文献

- [1] 国家发改委. 中原经济区规划(2012~2020年)[R]. 2012.
- [2] 李民,陈清祥. 农产品加工业发展趋势与对策探析[J]. 中国农学通报, 2011, 27(23): 91-95.
- [3] 杨永坤,赵华. 浅议农产品加工业的发展思路与对策[J]. 科技创新导报, 2011(1): 125.
- [4] 刘惠卿,秦义民. 2014年上半年河南省农产品加工业运行报告[J]. 河南农业, 2014(19): 13.
- [5] riocins for preservation of dairy products[J]. International Dairy Journal, 2008, 18(4): 329-343.
- [9] 凌代文,东秀珠. 乳酸菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京:中国轻工业出版社, 1999.
- [10] TRAMER J, FOWLER G G. Estimation of nisin in foods[J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 1964, 15(8): 522-528.
- [11] BUCHANAN R E. 伯杰氏系统细菌学手册[M]. 北京: 中国科学出版社, 1984.
- [12] 内村泰,冈田早苗. 乳酸菌实验手册[M]. 日本: 朝仓书店, 1992.
- [13] 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.
- [14] RODRIGUEZ J M, CINTAS L M, CASAUS P, et al. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* strains from dry fermented sausages[J]. Journal of Applied Bacteriology, 1995, 78(2): 109-115.
- [15] CHANG J Y, LEE H J, CHANG H C. Identification of the agent from *Lactobacillus plantarum* KFRI464 that enhances bacteriocin production by *Leuconostoc citreum* GJ7[J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, 103(6): 2504-2515.
- [16] 周配东,潘道东,张玉千,等. 产细菌素乳酸菌的筛选及其所产细菌素的特性[J]. 食品科学, 2011(17): 303-307.
- [17] 饶瑜,常伟,唐洁,等. 产细菌素屎肠球菌 E6 的特性分析及发酵条件优化[J]. 食品工业科技, 2013, 34(7): 199-201.
- [1] CLEVELAND J, MONTVILLE T J, NES I F, et al. Bacteriocins: Safe, natural antimicrobials for food preservation[J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 71(1): 1-20.
- [2] DELVES-BROUGHTON J. Nisin and its uses as a food preservative[J]. Food Technology, 1990, 44(11): 100-117.
- [3] DE VUYST L, LEROY F. Bacteriocins from lactic acid bacteria: Production, purification, and food applications[J]. Journal of Molecular Microbiology & Biotechnology, 2007, 13(4): 194-199.
- [4] 杨洁彬,郭兴华,张箴. 乳酸菌——生物学基础及应用[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1996.
- [5] 金世琳. 乳酸菌的科学与技术[J]. 中国乳品工业, 1998, 26(2): 14-20.
- [6] 田文利,吴琼,吕红线,等. 乳酸链球菌素(Nisin)的研究进展[J]. 食品工业, 2000(3): 28-30.
- [7] LIU W, JIN H. Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*[J]. Applied & Environmental Microbiology, 1990, 56(8): 2551-2558.
- [8] SOBRINO-LÓPEZ A, MARTÍN-BELLOSO O. Use of nisin and other bacte-