

产广谱细菌素芽孢菌筛选与鉴定

满文曾, 胡容, 封嗣中, 严铭玺, 张雷春雨, 杨焕, 周涛* (南京师范大学食品科学与工程系, 江苏南京 210097)

摘要 为筛选出可产抑菌肽的芽孢菌, 采用稀释涂布、平板划线的方法从土壤、泡菜、湖泥等 10 种样品中分离纯化菌种, 利用抑菌圈法筛选出有 4 株抑菌性的芽孢菌, 对抑菌效果最好的菌株 J11 通过菌落形态、革兰氏染色、芽孢染色、生理生化试验以及 16SrDNA 测序鉴定, 表明其为多粘类芽孢杆菌, 并进一步测定 J11 的抑菌谱, 结果表明其对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、溶酪巨型球菌、戊糖片球菌、瑞士乳酸杆菌、乳酸链球菌均具有一定的抑菌性。尤其对溶酪巨型球菌的抑菌圈直径达 30.13 mm, 抑菌作用非常明显。J11 具有良好的抑菌性, 具有广谱抑菌效果, 对常见的致病菌和腐败菌都有一定的抑菌性, 在食品保藏中具有一定的应用价值。

关键词 筛选; 细菌素; 芽孢菌; 抑菌性

中图分类号 TS202.3 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2020)01-0173-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.01.052



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Screening and Identification of *Bacillus* Strain Producing Bacteriocin

MAN Wen-zeng, HU Rong, FENG Si-zhong et al (Department of Food Science and Engineering, Nanjing Normal University, Nanjing, Jiangsu 210097)

Abstract In order to screen *Bacillus* strain producing bacteriocin, four *Bacillus* strains were isolated and purified from soil, pickles, lake mud and other samples by dilution coating and plate marking. Antibacterial bacteria were screened by the method of bacteriostasis circle. The bacterial strains were identified by colony morphology, gram staining, spore staining, physiological and biochemical experiments and 16SrDNA sequencing. Finally, the bacteriostasis circle was used to determine the bacteriostasis circle size of the strains against various indicator bacteria and the bacteriostasis spectrum was obtained. The best bacteriostasis strain J11 was identified as *Bacillus polymyxa*. J11 was tested for *Enterobacter*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Caseinolyticus megacoccus*, *Pentosacoccus*, *Lactobacillus Switzerland* and *Streptococcus lactis*. The bacteria had certain bacteriostasis. The diameter of bacteriostasis circle for *Megacoccus casei* was 30.13 mm, which was extremely sensitive to bacteriostasis. J11 had good bacteriostasis and broad-spectrum bacteriostasis effect, which had certain bacteriostasis to common pathogenic bacteria and spoilage bacteria, and had certain application value in food preservation.

Key words Screen; Bacteriocin; *Bacillus*; Antibacterial activities

微生物引起的食品腐败是改变食品物理化学性质、降低或失去食品营养价值和商品价值的过程, 缩短了食品的货架期, 同时也造成大量食品的浪费^[1]。寻找有效的食品防腐保鲜方法一直是人们研究的热点问题, 使用防腐剂、灭菌处理以及采用一些特殊的包装方法可以抑制食品微生物繁殖, 减慢食品变质的速度, 其中使用化学防腐剂是目前最广泛的食品防腐方法, 如使用苯甲酸钠盐、山梨酸钾盐等。但越来越多的研究表明化学防腐剂有一定的危害作用, 朱沁玲等^[2]研究苯甲酸钠多次给药对雌性大鼠肝脏、肾脏及卵巢毒性, 发现苯甲酸钠多次给药对大鼠肝脏、肾脏的功能均有损害, 浓度越高, 毒性越大。化学防腐剂越来越不能满足人们对食品安全的高要求, 人们也正在竭力寻找一些安全高效的天然防腐剂, 如一些天然植物的提取物、中草药提取物^[3-4], 但天然植物抑菌物质存在提取率低的问题。细菌素作为一种生物性的天然防腐剂受到了广泛的关注, 细菌素是细菌在代谢过程中产生的一类具有抑菌作用的多肽类物质, 在人体内可被代谢分解, 安全性很高。微生物种类繁多, 是开发细菌素的丰富资源^[5], 其中芽孢菌环境适应性强且分布广泛, 是产细菌素的潜力菌种^[6-7]。笔者利用稀释涂布和平板划线的方法

从土壤、泡菜、湖泥等样品中分离纯化菌株, 采用抑菌圈法筛选出具有广谱抑菌效果的产细菌素芽孢菌^[8-10], 并鉴定菌株种属, 测量其抑菌谱, 以期筛选到具有广谱抑菌效果的新菌株, 扩大产细菌素菌种的同时促进天然防腐剂细菌素的开发和利用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品。土壤分别来自江苏南京、江苏连云港、湖北恩施、贵州遵义、安徽六安农耕地; 南京市玄武湖湖泥; 南京上海路市售泡白菜、泡萝卜。

1.1.2 培养基。LB 固体培养基、LB 液体培养基、NA 固体培养基; PDA 马铃薯葡萄糖琼脂培养基、高氏一号培养基^[11]。

1.1.3 指示菌。微生物菌种均由食品系微生物实验室提供。以革兰氏阴性菌代表菌大肠杆菌、革兰氏阳性菌代表菌金黄色葡萄球菌作为抑菌性鉴定指示菌, 其余作为抑菌谱测定的指示菌。

1.1.4 主要仪器与设备。CJ-2S 超净工作台(天津市泰斯特仪器有限公司); HVE-50 高压灭菌锅(南京博惠科学仪器有限公司); HPX-9082 ME 数显恒温培养箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂); TH2-C 恒温摇床(太仓市实验设备厂); TH4-200 倒置荧光显微镜(南京奥力科学仪器有限公司); AU200 电子分析天平(日本 Shimadzu); PHS-3C 精密 pH 计(上海三信仪表厂); DK-8D 电热恒温水浴锅(上海一

基金项目 江苏省农业科技自主创新资金项目[CX(16)1057]; 南京师范大学国家级大学生创新项目(201810319030Z)。

作者简介 满文曾(1993—), 男, 山东菏泽人, 硕士研究生, 研究方向: 产抑菌肽芽孢菌筛选。胡容(1996—), 女, 贵州习水人, 从事食品安全研究。满文曾与胡容为共同第一作者。* 通信作者, 副教授, 博士, 从事食品生物技术研究。

收稿日期 2019-06-14; **修回日期** 2019-07-05

恒科学仪器有限公司);GL-ZZM 高速冷冻离心机(赛特湘怡离心机仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 菌种分离与筛选。取 1 g 样品放入 10 mL 无菌水中充分混匀,80 °C 加热 30 min 杀死营养细胞,制成 1:10 的样品匀液。然后用无菌水按 10 倍梯度稀释 5 个梯度浓度,分别为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} ,每个梯度浓度吸取 0.1 mL 于 LB 固体培养基均匀涂布后置于 37 °C 的培养箱中培养 24 h。初步根据菌落形态判断不同的菌株,分别挑取不同的菌株进行划线纯化,划线 3~4 次得到纯种的菌株。

1.2.2 抑菌试验。细菌的抑菌性测定采用抑菌圈法,以抑菌圈直径判断其抑菌性的大小。

挑取纯种菌株接种到 5 mL 的 LB 液体培养基中,置于 37 °C 摇床培养 18 h 后作为种子液,将种子液按 2% 的接种量接种到 50 mL 液体培养基中 37 °C 摇床培养 18~22 h,取适量发酵液置于 4 °C、10 000 r/min 的离心机中离心 15 min 去除细菌细胞,得到细菌的发酵上清液,取 0.1 mL 大肠杆菌、金黄色葡萄球菌均匀涂布在 NA 固体培养基作为指示菌,用打孔器在每个培养基上打出 3 个孔,然后注入适量的发酵上清液,不宜溢出。置于 37 °C 培养箱培养 6~8 h 后观察有无抑菌圈并测量抑菌圈直径^[12-13](抑菌圈直径包括打孔器直径,打孔器直径为 8 mm)。

1.2.3 细菌素检验。取发酵上清液测量其 pH,将酸性发酵上清液调至碱性以排除有机酸的影响,做抑菌试验观察其抑菌圈大小变化。然后进行酶解试验,先取适量发酵上清液测量其 pH,按 1 mg/mL 的比例分别加入蛋白酶 K、木瓜蛋白酶、胰蛋白酶、胃蛋白酶,调节 pH 到相应酶的最适 pH(分别为 7.4、6.7、4 和 2.0)后 37 °C 水浴反应 1 h,调回原液的 pH 后做抑菌试验,观察其抑菌圈大小变化^[14]。

1.2.4 菌种鉴定。对菌株进行革兰氏染色和芽孢染色^[15],观察其颜色反应。将初步确定为芽孢菌的菌株送往菌种鉴定机构——生工生物工程(上海)股份有限公司进行 16SrDNA 测序鉴定其具体的菌属。

1.2.5 抑菌谱测定。将各种指示菌培养至对数期作为抑菌试验的指示菌,取 J11 的发酵上清液进行抑菌试验,测定其对各种指示菌的抑菌圈大小,得到 J11 的抑菌谱。

2 结果与分析

2.1 产细菌素菌株的筛选结果 通过细菌的分离纯化,从 10 种样品中分离筛选出 48 株纯种菌株,对该 48 株纯种菌株进行抑菌试验,获得 16 株具有一定抑菌性的菌株,表 1 为该 16 株菌株对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径。其中 J11、W1、Plb3、PC12 这 4 株菌抑菌性较好,抑菌圈直径在 15 mm 以上。

2.2 抑菌物质细菌素鉴定结果 为排除有机酸对微生物的抑菌作用,对抑菌性较好的 J11、W1、Plb3、PC12 进行排除有机酸试验,测得其发酵上清液的 pH 都大于 7,呈碱性,可以有效排除有机酸的影响。对其发酵上清液进行酶解试验,酶解试验结果如表 2 所示,J11 被胰蛋白酶、胃蛋白酶酶解,

W1、PC12 能被蛋白酶 K 酶解,Plb3 能被胰蛋白酶酶解。由此可确定 J11、W1、Plb3、PC12 的抑菌物质是肽类物质细菌素。

表 1 16 株菌株对指示菌的抑菌圈大小

Table 1 Inhibitory circle size against indicators of 16 strains mm

菌株编号 Strain code	抑菌圈直径 Inhibitory circle size	
	金色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>
J11	15.36±0.12	18.40±0.11
W1	16.44±0.23	15.00±0.02
F5	13.00±0.26	14.62±0.12
H1	14.00±0.16	15.04±0.68
H5	12.22±0.02	12.20±0.78
Plb1	8.24±0.40	13.64±0.58
Plb2	8.24±0.40	9.34±0.66
Plb3	15.66±0.04	15.50±0.12
PC12	15.06±0.02	16.42±0.02
PC23	8.24±0.42	10.64±0.76
PC24	10.56±0.28	8.24±0.46
Ft2	15.50±0.20	13.30±0.52
T2	8.24±0.58	12.44±0.34
T9	9.04±0.32	8.24±0.30
R1	8.24±0.90	10.76±0.28
R2	8.24±0.38	11.90±0.36

表 2 菌株发酵上清液酶解结果

Table 2 Enzymatic hydrolysis of fermentation supernatant of strain

酶类 Enzyme	菌液 Bacterial fluid	J11	W1	PC12	Plb3
蛋白酶 K Proteinase K	DC	+	+	+	-
蛋白酶 K Proteinase K	KC	+	+	+	-
木瓜蛋白酶 Papaya protein	DC	-	-	-	-
木瓜蛋白酶 Papaya protein	KC	-	-	-	-
胰蛋白酶 Trypsin	DC	-	-	-	+
胰蛋白酶 Trypsin	KC	-	-	-	+
胃蛋白酶 Pepsin	DC	+	-	-	-
胃蛋白酶 Pepsin	KC	+	-	-	-

注: + 为酶解; - 为不能酶解; DC 为大肠杆菌; KC 为枯草芽孢杆菌

Note: + is enzymatic hydrolysis; - is not enzymatic hydrolysis; DC is *Escherichia coli*; KC is *Bacillus subtilis*

2.3 菌种鉴定结果 对抑菌最好的 J11 菌株进行菌种鉴定,革兰氏染色呈阳性,芽孢染色可以看到绿色芽孢以及细菌形态呈杆状,可以初步确认其为芽孢杆菌,PCR 扩增 J11 的 16SrDNA 基因序列为 1 494 bp,将 J11 的 16SrDNA 基因序列碱基序列进行 Blastn 和数据库中 16SrDNA 序列进行核苷酸同源性比较,发现其与 *Paenibacillus polymyxa* IAM 13419 16SrDNA 和 *Paenibacillus polymyxa* HBUAS57026 16SrDNA 的序列相似率为 99%。取上述序列和 *Paenibacillus thiaminolyticus*、*Paenibacillus kobensis*、*Bacillus cytotoxicus*、*Bacillus subtilis*、*Paenibacillus dauci*、*Paenibacillus massiliensis*、*Paenibacillus lautus*、*Paenibacillus hemerocallicola* 模式菌株的 16SrDNA 进行系统发育分析,构建了 J11 的系统发育进化树,结果如图 1 所示,确认 J11 为多粘类芽孢杆菌^[16-18]。

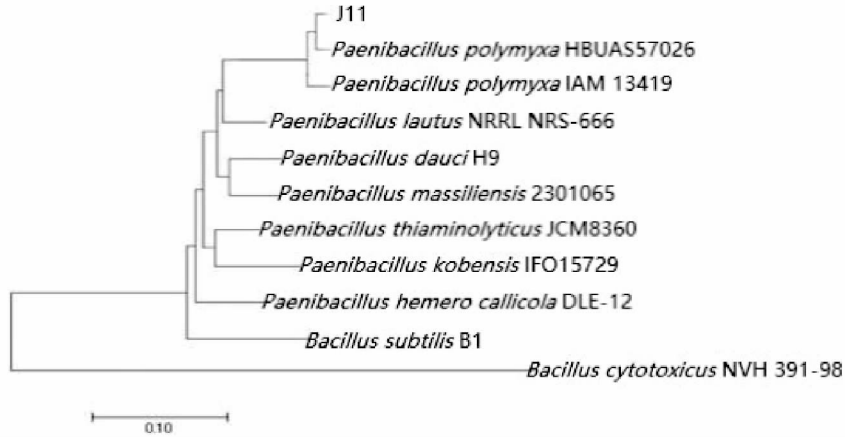


图 1 J11 系统进化发育树

Fig. 1 J11 phylogenetic tree

2.4 抑菌谱测定结果 选择 16 种指示菌进行抑菌试验, 得到 J11 的发酵上清液对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、溶酪巨型球菌、戊糖片球菌、瑞士乳酸杆菌、乳酸链球菌都有抑菌效果, 抑菌圈直径如表 3 所示, 其中对溶酪巨型球菌的抑菌性最敏感, 抑菌圈直径达 30.13 mm。J11 抑菌效果见图 2。

3 结论

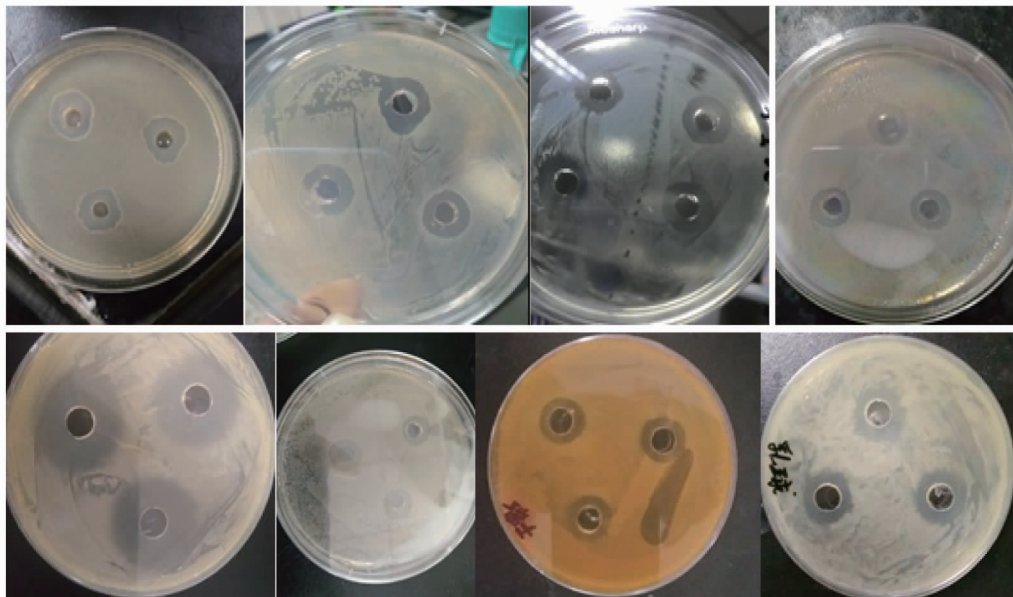
从淤泥中筛选出一株具有广谱抑菌效果的新菌株 J11, 通过对 J11 的发酵上清液进行排除有机酸和酶解试验, 确定其抑菌物质为细菌素。对其进行革兰氏染色和芽孢染色以及 16SrDNA 测序, 鉴定其为多粘芽孢杆菌。并测得其对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、溶酪巨型球菌、戊糖片球菌、瑞士乳酸杆菌、乳酸链球菌都有抑菌

效果, 具有广谱的抑菌性, 且抑菌性良好, 可抑制食品常见的腐败菌和致病菌, 在食品防腐保鲜中有一定的使用价值。

表 3 J11 抑菌谱

Table 3 J11 bacteriostasis spectrum

序号 No.	菌株名称 Strain name	抑菌圈直径 Inhibitory circle diameter/mm
1	大肠杆菌	18.20±0.22
2	金黄色葡萄球菌	15.40±0.12
3	枯草芽孢杆菌	14.44±0.12
4	蜡样芽孢杆菌	14.36±0.22
5	溶酪巨型球菌	30.13±0.30
6	戊糖片球菌	14.20±0.30
7	瑞士乳酸杆菌	16.86±0.48
8	乳酸链球菌	18.72±0.48



注: 从左往右依次为大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、溶酪巨型球菌、戊糖片球菌、瑞士乳酸杆菌、乳酸链球菌

Note: From left to right, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Megacoccal candida*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus helveticus*, *Streptococcus lacticus*

图 2 J11 抑菌效果

Fig. 2 J11 bacteriostatic effect

别为 11.70%、32.00% 和 75.86%。在试验浓度范围内,总黄酮和 V_c 的还原力均随浓度的增大而增大(图 8),线性关系较好,其中 2 mg/mL 的总黄酮与 0.67 mg/mL 的 V_c 几乎均等,可见其总黄酮体外抗氧化活性较好。

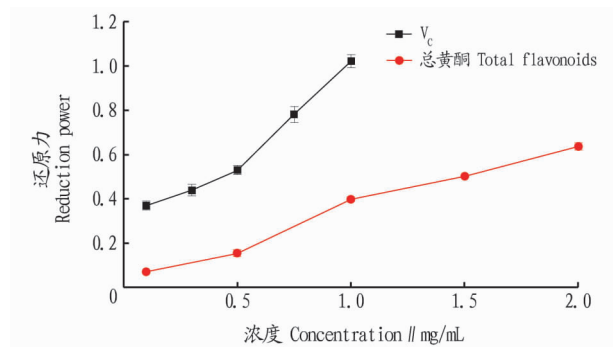


图 8 总黄酮的还原力

Fig. 8 Reduction power of total flavonoids

3 结论

该试验采用响应面法优化多穗石柯总黄酮的提取工艺条件,然后在最佳提取条件下对其进行含量测定,并研究其体外抗氧化活性。结果表明,多穗石柯总黄酮提取的最优条件为:超声功率 328.8 W、超声频率 35 kHz、乙醇浓度 60%、料液比 1:41.2、提取温度 63.2 °C、提取时间 37.8 min,总黄酮提取率为 19.18%;其黄酮对 $\cdot OH$ 、 $O_2^{\cdot -}$ 、DPPH \cdot 均能够起到清除作用,当总黄酮浓度为 2 mg/mL 时,对它们的最大清除率分别为 11.70%、32.00% 和 75.86%。浓度为 2 mg/mL 的总黄酮与 0.67 mg/mL V_c 的吸光度几乎均等,可见其总黄酮体外抗氧化活性较好。通过响应面法优化,采用超声波提

取提取法多穗石柯中的黄酮类化合物,所用时间短,要求温度低,提取率好,方法简单易行,具有明显的优势。

参考文献

- [1] 雷鸣. 多穗石柯水提物对人正常肝细胞 L-02 增殖作用的研究[D]. 遵义:遵义医学院,2018.
- [2] 申东,赖飞,姚文化,等. 多穗石柯茶[J]. 贵州茶叶,2001(2):28-29.
- [3] 王国晖,肖晓清,胡应祥. 多穗石柯人工繁育及丰产栽培技术[J]. 湖南林业科学,2012,39(5):126-128,131.
- [4] 陆武弟,杨仕婷,赵志文,等. 多穗石柯叶提取物的急性毒性实验研究[J]. 右江医学,2017,45(5):535-538.
- [5] 丰金玉,秦昱,段继春,等. 超声波辅助提取多穗石柯根皮苷研究[J]. 中国农学通报,2015,31(10):251-255.
- [6] 盛云杰,赵天文,方大宽,等. 响应面法优化白花蛇舌草中总黄酮的提取工艺[J]. 时珍国医国药,2018,29(6):1284-1286.
- [7] 许静雅,苏小军,李清明,等. 响应面法优化淮山中总黄酮提取工艺的研究[J]. 中国酿造,2016,35(5):115-118.
- [8] 李云龙,李红梅,胡俊君,等. 响应面法优化苦荞酒糟黄酮提取工艺的研究[J]. 中国酿造,2013,32(7):38-42.
- [9] 邓梦琴,何夏怡,何慕怡,等. 响应面法优化菠萝蜜果皮黄酮提取工艺[J]. 食品工业科技,2016,37(5):222-227.
- [10] 赵娟娟. 分心木黄酮超声-微波协同提取及抗氧化性研究[J]. 食品研究与开发,2018,39(18):70-76.
- [11] 井文华,骆立双,刘永芳,等. 超声提取红花总黄酮工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 时珍国医国药,2018,29(7):1540-1543.
- [12] 史艳财,邹蓉,韦记青,等. 黄花倒水莲总黄酮提取工艺研究[J]. 北方园艺,2014(12):134-137.
- [13] 焦文静,林洁荣,叶健军,等. 响应面分析法优化紫象草花青素提取工艺[J]. 黑龙江畜牧兽医(科技版),2015(19):11-15.
- [14] 蔡碧琼. 稻壳黄酮类化合物的提取、精制及抗氧化活性研究[D]. 福州:福建师范大学,2008:58-60.
- [15] 朱会霞. 覆盆子黄酮抗氧化活性研究[J]. 现代食品科技,2012,28(10):1302-1305.
- [16] 吴玉兰. 金樱子总黄酮对氧化损伤 HUVEC 保护作用的研究[D]. 衡阳:南华大学,2012:15.
- [17] 高行恩,王洪新. 不同提取方法对山药多糖含量及其体外抗氧化活性的影响[J]. 食品与发酵工业,2015,41(7):256-262.
- [18] 能研究[J]. 工业微生物,2017,47(5):31-35.
- [19] 胡敏,郝林,贾丽艳. 枯草芽孢杆菌产细菌素发酵条件的优化[J]. 食品科学,2014,35(9):198-202.
- [20] AN J Y, ZHU W J, LIU Y, et al. Purification and characterization of a novel bacteriocin CAMT2 produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from marine fish *Epinephelus areolatus* [J]. Food control, 2015, 51: 278-282.
- [21] 陈雪,侯红漫,陈莉,等. 产细菌素芽孢杆菌的筛选及发酵条件的研究[J]. 中国酿造,2008(9):26-30.
- [22] 林文凭. *Bacillus subtilis* ZJU15 产生的抗菌肽研究[D]. 杭州:浙江大学,2010.
- [23] 严涛,朱建国,姜甜,等. 一株凝结芽孢杆菌的分离筛选及产孢条件优化[J]. 微生物学通报,2018,45(2):238-249.
- [24] 罗宝龙,魏军林,黄丽丽,等. 一猪源产细菌素芽孢杆菌的筛选及抑菌特性[J]. 微生物学通报,2018,45(6):1342-1349.
- [25] 钟小廷. 产细菌素蜡样芽孢杆菌的筛选、鉴定及其培养基优化[D]. 成都:西华大学,2014:15-16.
- [26] CAROLISSEN-MACKAY V, ARENDSE G, HASTINGS J W. Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: Problems and pointers[J]. International journal of food microbiology, 1997, 34(1):1-16.
- [27] CHEN C Z, COOPER S L. Interactions between dendrimer biocides and bacterial membranes [J]. Biomaterials, 2002, 23(16):3359-3368.

(上接第 175 页)

参考文献

- [1] 何国庆,贾英民,丁立孝. 食品微生物学[M]. 3版. 北京:中国农业大学出版社,2016.
- [2] 朱沁玲,余蓓,蒲玟静,等. 食品防腐剂苯甲酸钠多次给药对雌性大鼠肝脏、肾脏及卵巢毒性的研究[J]. 广东医学,2018,39(3):355-358.
- [3] 丁捷枫,王强胜,李建芬. 天然植物源食品防腐剂的研究进展[J]. 武汉轻工大学学报,2015,34(1):26-31.
- [4] 王晔,张辉华,胡民强. 中草药及其提取物在食品防腐中的应用研究进展[J]. 佛山科学技术学院学报(自然科学版),2015,33(1):5-9.
- [5] 孙兆竹,申秋华,白文杰. 乳酸链球菌肽的特性及其在食品工业中的应用[J]. 安徽农业科学,2013,41(13):5949-5951.
- [6] MATARAGAS M, MELAXOPOULOUS J, DROSINOS E H A. Characterization of two bacteriocins produced by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442, isolated from dry fermented sausages [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2002, 18(9):847-856.
- [7] KEMPERMAN R, KUIPERS A, KARSENS H, et al. Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and clocistin 574 [J]. Appl Environ Microb, 2003, 69(3):1589-1597.
- [8] 张红梅,符丹丹,赵君峰,等. 泡菜中抑菌性芽孢杆菌的筛选及其细菌素理化特性[J]. 食品工业科技,2018,39(14):110-114,119.
- [9] 冯劲,周少璐,顾振东,等. 产细菌素的细菌筛选鉴定及其产物抑菌性