

产细菌素乳酸菌的筛选及其所产细菌素的特性

周配东¹, 潘道东^{1,2,*}, 张玉千¹, 丁海兵¹

(1. 南京师范大学金陵女子学院食品科学与营养系, 江苏 南京 210097;

2. 宁波大学生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211)

摘 要: 利用牛津杯双层平板法从豆腐乳中筛选得到一株广谱的、具有较强抑菌活性的乳酸菌菌株, 经生理生化分析及 16S rDNA 基因序列比对确定该菌株为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)。该菌株发酵液经高温、聚乙二醇辛基苯基醚(TritonX-100)、吐温-80、吐温-20、十二烷基磺酸钠(SDS)、乙二胺四乙酸(EDTA)、尿素处理以及在低 pH 值(pH < 5)条件下均能够保持较好的抑菌活性, 而其发酵产物的抑菌活性受胰蛋白酶和蛋白酶 K 的影响。抑菌谱实验表明, 该菌株的发酵液对部分革兰氏阳性细菌和阴性细菌都有明显的抑制作用, 但对酵母菌和霉菌无抑制作用。

关键词: 乳酸菌; 筛选; 抑菌活性

Screening of Bacteriocin-producing Lactic Acid Bacteria and Its Antibacterial Properties

ZHOU Pei-dong¹, PAN Dao-dong^{1,2,*}, ZHANG Yu-qian¹, DING Hai-bing¹

(1. Department of Food Science and Nutrition, Ginling College, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China;

2. Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: A lactic acid bacterial strain with broad-spectrum and obvious antibacterial activity, named as LPb1 was selected from soybean cheese by agar diffusion method. Based on 16S rDNA sequence alignment and physiological and biochemical analysis, the isolated strain was identified as *Lactobacillus plantarum*. The inhibitory activity of strain LPb1 fermentation supernatant was not affected by high temperature, 1% TritonX-100, Tween-80, Tween-20, SDS, EDTA, or low pH (pH < 5). However, its inhibitory activity revealed an obvious decrease after treatment with protease K and trypsin. Moreover, the fermentation supernatant of LPb1 strain could inhibit both some gram-positive bacteria and partial gram-negative bacteria. In contrast, the fermentation supernatant of LPb1 strain did not reveal inhibitory effect against yeast or mould.

Key words: lactic acid bacteria; screening; inhibitory activity

中图分类号: Q93.331

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)17-0303-05

乳酸菌对腐败微生物和致病微生物的抑制作用, 可能是酸性产物如乙酸、乳酸及其他有机酸、过氧化氢或细菌素的作用。细菌素是由某些细菌在代谢过程中通过核糖体合成机制产生的一类具有生物活性的蛋白质、多肽; 这些物质可以杀灭或抑制与之相同或相似生境的其他微生物^[1]并且产生菌对其细菌素有自身免疫性^[2]。截至目前, 已发现的乳酸菌细菌素有 300 多种, 分别是由乳球菌、片球菌、明串球菌、乳杆菌、肠球菌等属的菌株产生^[3-6]。食品工业中广泛使用的化学防腐剂影响人体健康, 而乳酸菌细菌素具有安全、无毒、性能稳

定等优点, 因此可以作为天然食品防腐剂和饲料添加剂来控制某些腐败菌和病原菌的生长^[7]。近年来新的乳酸菌细菌素不断出现, 我国对于乳酸菌细菌素的研究起步较晚, 除 Nisin^[8-9]外, 对其他乳酸菌细菌素还没有进行很好的基础和开发性研究。

本实验拟从市售的豆腐乳、酸菜、腊肠、甜面酱、酸奶等发酵产物中筛选出能对革兰氏阳性和阴性致病细菌起到广谱抑菌作用的菌株, 并对其发酵产物的抑菌特性进行研究, 为开发天然具有抑菌作用的食物添加剂提供参考。

收稿日期: 2011-03-31

基金项目: 江苏省科技支撑计划项目(BE2009366); 国家农业科技成果转化基金项目(2009GB2C220412);

浙江省重大科技专项(2010C12015); 宁波市科技创新基金项目(2010C92024)

作者简介: 周配东(1985—), 男, 硕士研究生, 研究方向为农产品加工。E-mail: zhoupeidong2009@163.com

* 通信作者: 潘道东(1964—), 男, 教授, 博士, 研究方向为畜产品加工。E-mail: daodongpan@163.com

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要指示菌株与试剂

铜绿假单胞杆菌、大肠杆菌、福氏志贺氏菌、金黄色葡萄球菌 ATCC25923、副伤寒沙门氏菌、肠沙门氏菌、戊糖乳杆菌、瑞士乳杆菌、发酵乳杆菌、乳酸乳球菌、干酪乳杆菌, 由南京师范大学金陵女子学院提供; 鲍氏不动杆菌、恶臭假单胞菌、微小杆菌(筛选得到)、酿酒酵母、黑曲霉、绿色木霉、青霉, 由南京师范大学生命科学学院提供。下文无特别说明提到的指示菌都是金黄色葡萄球菌 ATCC25923。

过氧化氢酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶、蛋白酶 K 美国 Sigma 公司; 其他试剂及基因组提取试剂盒 上海生工生物工程技术服务有限公司; PCR 产物回收试剂盒、*rTaq* 酶 日本 Takara 公司。

1.1.2 培养基

乳酸菌选用 De Man-Rogosa-Sharpe(MRS)培养基^[10]、霉菌选用 YPG 培养基、酵母选用 PDA 培养基, 其他指示细菌选用 LB 培养基^[11]。

1.1.3 仪器与设备

PTC-200TM PCR 仪 美国 MJ Research 公司; MINI SUB CELL GT 电泳槽、Smart SpecTM 3000 分光光度计 美国 Bio-Rad 公司; 恒温培养箱 上海精宏实验设备有限公司; 温控摇床 太仓市博莱特实验仪器厂; 3K30 高速冷冻离心机 德国 Sigma 公司; PP-15-P11 pH 计 德国 Sartorius 公司。

1.2 方法

1.2.1 抑菌乳酸菌的筛选

初筛采用 Agar-spot-test 方法^[12]: 将待分离材料用无菌生理盐水进行梯度稀释, 涂布到 MRS 固体平板上, 37℃恒温箱培养 36h, 挑选长出 50 个左右菌落的平板, 然后上面浇注一层含金黄色葡萄球菌 ATCC25923(终浓度为 10⁶CFU/mL)的 0.7g/100mL 半固体 LB 培养基, 37℃恒温箱培养 24h。挑取产抑菌圈较大的菌落, 并在 MRS 平板上多次划线分离纯化, 挑取单菌落, 接种斜面, 培养 36h, 4℃保藏。

复筛采用牛津杯双层平板法^[13]: 1.5% 的琼脂 10mL 倾倒入无菌平皿中晾干作为下层, 上面均匀放置几个牛津杯(直径 8mm), 浇注一层含金黄色葡萄球菌的半固体 LB 培养基, 晾干, 取出牛津杯, 每孔加入 60 μ L 的无细胞发酵液(制备方法见 1.2.2 节), 超净工作台上放置 2h, 37℃恒温箱培养 16h, 用游标卡尺测量抑菌圈直径(后面得到的抑菌圈直径都是减去牛津杯直径后的结果), 取抑菌直径最大的乳酸菌菌株划线保存, 并命名为菌株 LPb1。

1.2.2 发酵液的制备

将菌株 LPb1 活化后, 以 2% 的接种量接种到 MRS 液体培养基中, 37℃静置培养 18h 后, 14000r/min 离心 20min, 收集的上清液经孔径 0.22 μ m 滤膜过滤除菌, 4℃保存。以下实验的发酵液均采用此操作。

1.2.3 菌种鉴定

1.2.3.1 形态学观察

包括细胞形态特征、菌落特征、革兰氏染色、芽孢染色、荚膜染色等^[14]。

1.2.3.2 生理生化水平鉴定

常规生理生化鉴定实验^[14]。

1.2.3.3 16S rDNA 序列分析

根据细菌基因组提取试剂盒的说明提取菌株基因组 DNA, 以基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 16S rDNA 片段, 正向引物为 K1: 5'-A A C T G A A G A G T T T G A T C C T G G C T C-3', 反向引物为 K2: 5'-T A C G G T T A C C T T G T T A C G A C T T-3'。PCR 反应体系: 10 \times 缓冲液 5 μ L, Mg²⁺ 溶液 4 μ L, 正、反向引物各 2.5 μ L, dNTP 4 μ L, *rTaq* 酶 0.5 μ L, DNA 模板 1.5 μ L, 去离子水 30 μ L。PCR 扩增程序为: 94℃预变性 5min; 94℃变性 1min, 58℃退火 45s, 72℃延伸 2min, 进行 29 个循环; 最后 72℃延伸 10min。PCR 产物纯化后委托上海美吉生物医药科技有限公司测序。16S rDNA 序列在 Gene Bank 数据库中进行比对, 并用 Mega3.1、Bioedit 生物学软件建立 Neighbor-Joining 统发育树。

1.2.4 发酵液中抑菌物质生物学特性

1.2.4.1 过氧化氢及酸作用的排除

加入过氧化氢酶的菌株 LPb1 发酵液(酶终质量浓度 1mg/mL), 调 pH7.3, 37℃放置 2h 后, 调 pH4。用过氧化氢酶处理后的发酵液及 pH4 的乳酸、乙酸和盐酸测定抑菌活性, 以未处理的上清发酵液(pH4)作对照。

1.2.4.2 抑菌活性与生长量的关系

将菌株 LPb1 以体积分数 2% 的接种量接到 MRS 液态培养基中, 37℃静置培养 24h, 每 2h 取样 1 次, 测定波长 600nm 处的吸光度及发酵液的抑菌活性, 绘制抑菌活性与生长量关系曲线。

1.2.4.3 细菌素耐酸、碱及去污剂的能力

将菌株 LPb1 上清发酵液 pH 值调至 2~12, 测定抑菌活性; 往上清发酵液中加入 Triton X-100、吐温-80、吐温-20、十二烷基磺酸钠(SDS)、EDTA 至终质量分数为 1%, 37℃放置 2h, 测定抑菌活性。

1.2.4.4 细菌素热稳定性测定

将菌株 LPb1 上清发酵液于 60℃, 分别水浴 30、60min; 80℃, 分别水浴 30、60min; 100℃, 分别水浴 30、60min; 120℃, 20min 处理后, 用未处理的发酵液作对照, 测抑菌活性。

1.2.4.5 蛋白酶敏感性实验

分别取含各消化酶发酵上清液 20mL, 消化酶终质量浓度为 1mg/mL, 利用 1mol/L NaOH 或 1mol/L HCl 调节发酵液至酶反应最适 pH 值(过氧化氢酶 pH7.3、胃蛋白酶 pH2、胰蛋白酶 pH8.1、蛋白酶 K pH7.5), 37℃ 消化 2h, 再将处理后的发酵液调至 pH4, 用未处理的发酵液作对照, 测定抑菌活性。

1.2.5 抑菌谱的测定

按照牛津杯双层平板制作方法^[13], 制作含不同指示菌的指示平板, 上层半固体培养基中的指示菌终浓度为 10⁶CFU/mL, 真菌、酵母菌细胞或孢子 10⁴个/mL, 取菌株 LPb1 发酵上清液 60μL 加入孔内, 于各指示菌最适生长温度条件下培养, 测量抑菌圈直径。

2 结果与分析

2.1 产细菌素乳酸菌的筛选

利用牛津杯双层平板法从发酵的豆腐乳中筛选得到一株对金黄色葡萄球菌 ATCC25923 抑菌活性较好的乳酸菌, 命名为 LPb1。

2.2 细菌素产生菌的鉴定

2.2.1 形态学观察

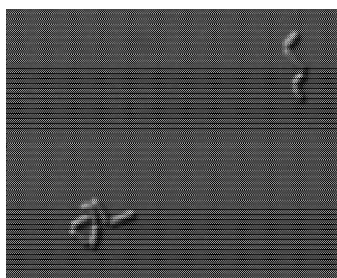


图1 电子显微镜下的 LPb1 菌体形态(× 630)

Fig.1 Mycelial morphology of strain LPb1 (× 630)

菌株 LPb1 在 MRS 固体平板上培养 24h 呈乳白色、圆形、表面光滑、湿润、边缘整齐、隆起菌落。电子显微镜下观察, 菌株菌体圆短直杆状、成对(图 1)。液体培养浑浊度大, 革兰氏染色阳性, 无芽孢, 荚膜和鞭毛。

2.2.2 生理生化水平鉴定

表1 LPb1 常规生理生化实验鉴定结果

Table 1 Physiological and biochemical identification of strain LPb1

实验名称	结果	实验名称	结果
过氧化氢酶	—	淀粉水解	—
从葡萄糖产酸	+	H ₂ S 的产生	—
石蕊牛奶产酸	+	V P 实验	—
石蕊牛奶胨化	—	明胶液化实验	—
石蕊牛奶还原	+	从葡萄糖酸盐产酸	—
硝酸盐还原	—	15℃ 生长	+
45℃ 生长	—		

注: +, 呈阳性; —, 呈阴性。下同。

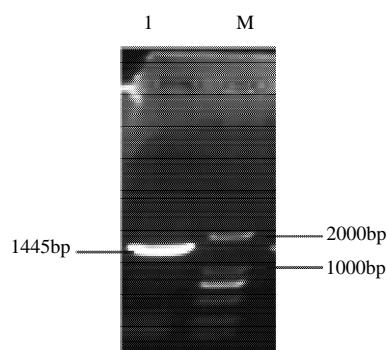
表2 LPb1 碳水化合物发酵实验结果

Table 2 Carbohydrate fermentation capability of strain LPb1

底物	结果	底物	结果
淀粉	—	纤维二糖	+
葡萄糖	+	麦芽糖	+
乳糖	+	海藻糖	+
蔗糖	+	阿拉伯糖	—
核糖	+	鼠李糖	—
木糖	—	甘露醇	+
蜜二糖	+	山梨醇	+
岩藻糖	—	甘油	—

根据以上生理生化实验鉴定及糖发酵实验结果, 参照《伯杰细菌鉴定手册》^[15]和《乳酸细菌分类鉴定及实验法》^[16], 初步确定乳酸菌 LPb1 为植物乳杆菌。

2.2.3 16S rDNA 序列分析



M:DL2000bp; 1:纯化后 16S rDNA。

图2 菌株 LPb1 16S rDNA 纯化后的电泳图谱

Fig.2 Electrophoresis pattern of purified 16S rDNA of strain LPb1

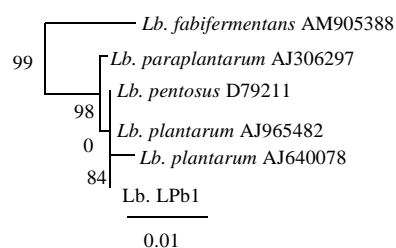


图3 基于菌株 LPb1 16S rDNA 序列构建的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequence of strain LPb1

以 LPb1 基因组 DNA 为模板进行 PCR, 产物纯化后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 可见约 1500bp 的 PCR 产物条带清晰(图 2)。菌株 16S rDNA 序列测定共测得 1445bp, 通过 Blast 比对, 菌株 LPb1 与 *Lactobacillus plantarum* AJ965482 有 99.6% 的同源性。结合 2.2.2 节的生理生化实验结果, 可以鉴定菌株 LPb1 为植物乳杆菌。

2.3 发酵液中抑菌物质生物学特性

2.3.1 酸及过氧化氢作用的排除

用 pH4 的乙酸、乳酸、盐酸及用过氧化氢酶作用后的发酵液做抑菌实验,以同样 pH 值条件下的未处理的发酵上清液做对照,结果见表 3。3 种酸性物质没有出现抑菌圈,过氧化氢酶作用后的发酵液抑菌圈直径没有明显降低,可见起抑菌作用的物质不是酸或者过氧化氢。

表 3 菌株 LPb1 发酵液和酸的抑菌作用

Table 3 Inhibitory activity of the fermentation supernatant of strain LPb1 and acids against *Staphylococcus aureus* ATCC25923

样品	pH4 的 发酵液	pH4 的 乳酸	pH4 的 醋酸	pH4 的 盐酸	pH4 过氧 化氢酶解液
抑菌圈直径/mm	12.25	—	—	—	11.56

注:—,无抑制作用。

2.3.2 抑菌活性与生长量的关系

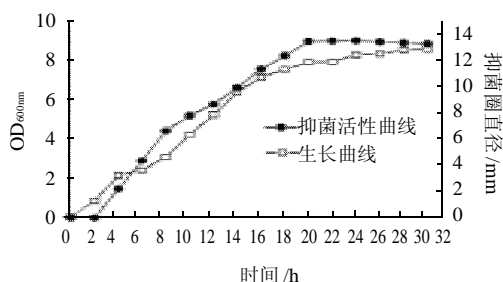


图 4 菌株 LPb1 的抑菌活性与生长量的关系

Fig.4 Relationship between anti-*Staphylococcus aureus* ATCC25923 activity and growth of strain LPb1

如图 4 所示,菌株 LPb1 能够很快进入对数生长期,这与菌自身的生长特性和接种量大小有关,到 20h 后进入稳定期,OD_{600nm} 值开始稳定。从抑菌活性曲线看,细菌素在 2h 后开始产生,其后产量继续增加,到进入稳定期时发酵液的抑菌活性最强,抑菌圈直径达到 13.57mm,进入稳定期后,细菌素产量基本维持稳定。菌株 LPb1 抑菌活性曲线与生长曲线变化趋势总体上基本一致。

2.3.3 细菌素耐酸、碱性及去污剂研究

表 4 酸碱及去污剂对 LPb1 发酵液抑菌活性的影响

Table 4 Effects of acid treatment, alkali treatment and detergents on anti-*Staphylococcus aureus* ATCC25923 activity of the fermentation supernatant of strain LPb1

pH	抑菌圈直径/mm	去污剂	抑菌圈直径/mm
2.0	17.08	TritonX-100	9.53
3.0	15.73	吐温-20	10.32
4.0	12.34	吐温-80	12.08
5.0	4.11	SDS	12.20
6.0~12.0	—	EDTA	12.15
3.83(原液)	13.10	尿素	12.26

由表 4 可知,菌株 LPb1 产生的细菌素只在较酸的环境中才有活性(pH < 5),且随酸性的增强显示更高的活性。如果将维持碱性环境(pH2~12)2h 的菌液调回酸

性(pH < 5),作抑菌活性分析,证实菌液再次出现抑菌活性,说明菌株 LPb1 产生的细菌素有很好的耐酸、碱能力,但发挥抑菌作用必须在酸性环境中。表 4 列出的去污剂中只有 TritonX-100 对细菌素活性有较大影响。

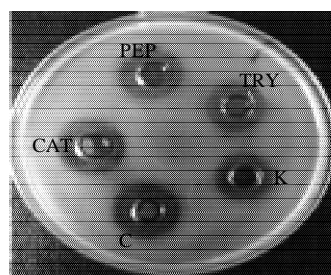
2.3.4 细菌素热稳定性和蛋白酶敏感性

实验中,在不同的温度和时间条件下菌株 LPb1 的发酵液的抑菌活性没有大的改变(表 5)。菌株产生的抑菌活性物质对于胰蛋白酶和蛋白酶 K 有敏感性,抑菌活性受到影响,但受过氧化氢酶和胃蛋白酶的影响较小(表 5、图 5),说明这种抑菌物质是细菌素蛋白类物质。

表 5 高温及蛋白酶对 LPb1 发酵液抑菌活性的影响

Table 5 Effects of high temperature and proteases on anti-*Staphylococcus aureus* ATCC25923 activity of the fermentation supernatant of strain LPb1

热处理条件	抑菌圈直径/mm	酶处理	抑菌圈直径/mm
未加热处理	13.21	未加酶处理	12.34
60℃ 30min	13.17	过氧化氢酶	12.25
80℃ 30min	12.79	胃蛋白酶	11.12
100℃ 30min	13.73	胰蛋白酶	9.79
60℃ 60min	13.85	蛋白酶 K	9.87
80℃ 60min	13.37		
100℃ 60min	12.47		
120℃ 20min	11.69		



PEP.胃蛋白酶; TRY.胰蛋白酶; CAT.过氧化氢酶; K.蛋白酶 K; C.对照。

图 5 菌株 LPb1 发酵上清液对蛋白酶的敏感性

Fig.5 Sensitivity of the fermentation supernatant of strain LPb1 to proteases

2.4 抑菌谱分析

表 6 菌株 LPb1 无细胞上清液抑菌谱

Table 6 Antimicrobial spectrum of the cell-free fermentation supernatant of strain LPb1

指示菌	抑菌效果	指示菌	抑菌效果
铜绿假单胞杆菌	+++	戊糖乳杆菌	—
大肠杆菌	++	瑞士乳杆菌	++
福氏志贺氏菌	++	发酵乳杆菌	—
金黄色葡萄球菌	+++	乳酸乳球菌	++
副伤寒沙门氏菌	+++	干酪乳杆菌	—
肠沙门氏菌	+++	酿酒酵母	—
鲍氏不动杆菌	—	黑曲霉	—
恶臭假单胞菌	+++	绿色木霉	—
微小杆菌	+	青霉	—

注:—,无抑菌活性;+,抑菌圈直径 0~5 mm; ++,抑菌圈直径 5~10 mm; +++,抑菌圈直径 > 10 mm。

由表6可见,菌株LPb1的发酵液对表6列出的大部分革兰氏阴性菌和阳性菌有明显的抑制作用,但对于酵母和霉菌等真菌没有抑制效果。

3 结 论

乳酸菌细菌素是一类重要的蛋白类抑菌物质,它是由公认为安全的食品级微生物乳酸菌产生的,它可抑制食品中的某些腐败菌和病原菌,因此乳酸菌素及其产生菌可以作为食品的防腐剂,以提高食品安全。乳酸菌产生的细菌素一般只抑制亲缘关系较近的微生物,所以乳酸菌一般不能抑制革兰氏阴性细菌,如已经被广泛应用于食品防腐行业的乳酸链球菌素(Nisin)。据报道一些乳酸菌产生的细菌素可以抑制部分革兰氏阴性细菌,如沙门氏菌和大肠杆菌^[17-19]。本实验从发酵的豆腐乳中分离得到一株产抑菌物质的乳杆菌,通过排除酸、过氧化氢的干扰和蛋白酶处理实验,确定了该菌株产生的抑菌物质是一种细菌素。生理生化实验结果及16S rDNA序列同源性数据分析初步鉴定该菌为植物乳杆菌,并命名为植物乳杆菌LPb1。菌株LPb1不但对革兰氏阳性细菌有抑制作用,而且对于一些革兰氏阴性细菌也有抑制作用,但对于酵母和霉菌等真菌没有抑制作用,植物乳杆菌产生的细菌素PlataricinMG^[18]、Plantaricin35d^[20]等也有类似的研究结果。

菌株LPb1在37℃培养,20h后进入稳定期,此时发酵产生的细菌素也达到高峰期,随后产量有所降低,整体上看细菌素的产生滞后于菌体的生长,这也说明了菌株产生的细菌素是一种次级代谢产物。所产生的细菌素对于胰蛋白酶和蛋白酶K敏感,具有很好的高温耐受力,120℃、20min仍然保留大部分活性,且具有很强的耐酸、碱和去污剂的能力。但是,这种细菌素必须在酸性环境中才能发挥抑菌作用,这一点与LactococcinGJ29^[21]和植物乳杆菌P158^[22]产生的细菌素相似。本研究室后续将对菌株LPb1产生细菌素的发酵条件,细菌素的分离纯化、以及鉴定做进一步研究。

参考文献:

- [1] DEEGAN L H, COTTER P D, HILL C, et al. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension[J]. International Dairy Journal, 2006, 16 (9): 1058-1071.
- [2] KONISKY J. Colicins and other bacteriocins with established modes of action[J]. Annu Rev Microbiol, 1982, 36: 125-144.
- [3] NOONPAKDEE W, SANTIVARANGKNA C, JUMRIANGRIT P, et al. Isolation of a nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC20 strain from nham, a traditional Thai fermented sausage[J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 81: 137-145.
- [4] CHAGN J Y, LEE H J, CHAGN 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: 2504-2515.
- [5] OSUNTOK A A, GBENLE G O, OLUKOYA D K. Evidence for chromosomal determination of fungicidal activity in strains of *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus fermentum* isolated from fermented foods[J]. Folia Microbiologica, 2003, 48: 56-58.
- [6] GÁLVEZ A, VALDIVIA E, ABRIQUEL H. Isolation and characterisation of enterocin EJ97, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* EJ97[J]. Archives of Microbiology, 1998, 171: 59-65.
- [7] 刘翀, 杨洋. 安全的天然食品防腐剂细菌素[J]. 食品科学, 2004, 25 (7): 521-255.
- [8] 朱小乔, 刘通讯. 极具潜力的天然防腐剂: Nisin[J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(4): 66-69.
- [9] 都立辉, 刘芳, 霍贵成. Nisin产生菌株的筛选及其鉴定[J]. 食品工业科技, 2007(6): 107-109.
- [10] DEMAN J C, ROG ASA M, SHARPE M E. A medium for the cultivation of *Lactobacilli* [J]. Journal of Applied Bacteriology, 1960, 23(1): 130-135.
- [11] 沈萍, 范秀荣, 李广斌, 等. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999: 214-222.
- [12] SCHILLINGER U, LUCKE F. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat[J]. Appl Environ Microbiol, 1989, 55: 1901-1906.
- [13] TRAMER J, FOWLER G G. Estimation of nisin in foods[J]. J Sci Food Agric, 1964, 15: 522-528.
- [14] 赵斌, 何绍江. 微生物学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 251-255.
- [15] 布坎南 R.E, 吉本斯 N.E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8版. 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组, 译. 北京: 科学出版社, 1984: 797-820.
- [16] 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: 45-47.
- [17] TODOROV S D, DICKS L M. *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2005, 36: 318-326.
- [18] GONG H S, MENG X C, WANG H. Plantaricin MG active against Gram-negative bacteria produced by *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0391 isolated from "JiaoKe", a traditional fermented cream from China[J]. Food Control, 2010, 21: 89-96.
- [19] 牟光庆, 李霞, 李慧, 等. 广谱乳酸菌素的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(11): 469-472.
- [20] MESSI P, BONDI M, SABIA C, et al. Detection and preliminary characterization of a bacteriocin (plantaricin 35d) produced by a *Lactobacillus plantarum* strain [J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 64: 193-198.
- [21] 荆谷, 孔健, 李德冠, 等. 乳酸乳球菌 L9 所产类细菌素 Lactococcin GJ29 的初步研究[J]. 食品与发酵工业, 2002, 29(9): 17-21.
- [22] 刘书亮, 张艾青, 曲刚, 等. 植物乳杆菌 P158 的生长曲线及其细菌素的特性[J]. 核农学报, 2009, 23(6): 1021-1025.