

广谱抑菌性多粘类芽孢杆菌的 筛选及其细菌素理化特性

周 涛, 满文曾, 吴晓营, 万玉莲, 马 宁, 胡 容
(南京师范大学食品科学与工程系, 江苏南京 210097)

摘 要:采用热处理和琼脂扩散法从淤泥中筛选出一株产广谱抗菌活性物质的芽孢杆菌 XW4, 通过形态观察、生理生化实验、16S rDNA 分析等对其进行鉴定, 并对其发酵产物进行抑菌活性探究。结果表明 XW4 在细菌发育分类学上鉴定为多粘类芽孢杆菌, 其发酵产物对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、赖氨酸芽孢杆菌等多种腐败微生物均有抑制作用 XW4。XW4 无细胞上清液对蛋白酶 k 敏感, 对木瓜蛋白酶、胰蛋白酶、胃蛋白酶不敏感; 经 60、80、100 ℃ 处理 30 min 后, 对大肠杆菌拮抗活性基本不变; 在 pH3.0~11.0 范围内保持其抑菌活性。

关键词:广谱抑菌活性, 多粘类芽孢杆菌, 细菌素, 鉴定

Screening of Broad-Spectrum Antibacterial *Paenibacillus polymyxa* and Physicochemical Properties of Its Bacteriocin

ZHOU Tao, MAN Wen-zeng, WU Xiao-ying, WAN Yu-lian, MA Ning, HU Rong

(Department of Food Science and Technology, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: One strain of *Bacillus* named XW4 was isolated from lake mud with a broad spectrum of antimicrobial activity by heat treatment and agar diffusion method. *Bacillus* XW4 was identified by its morphological and cultural characteristics, physiological and biochemical properties and 16S rDNA sequence analysis. And the antibacterial activity of its fermentation products was also determined. The results showed that the strain XW4 was identified as *Paenibacillus polymyxa*, and its secondary metabolites had strong antimicrobial activities against some kinds of spoilage microorganisms, including *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Lysinibacillus fusiformis*. The cell-free supernatants from *Bacillus* was sensitive to proteinase k, while without sensitive to papain, trypsin and pepsin. The antimicrobial activity to *Escherichia coli* was stable after heat treatment with 60, 80, 100 ℃, and it maintained effective within pH3.0~11.0.

Key words: broad antibacterial activity; *Paenibacillus polymyxa*; bacteriocin; identification

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2019)24-0099-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2019.24.017

引文格式:周涛, 满文曾, 吴晓营, 等. 广谱抑菌性多粘类芽孢杆菌的筛选及其细菌素理化特性[J]. 食品工业科技, 2019, 40(24): 99-103, 109.

随着生活水平的提高, 人们对食品品质和食品安全越来越重视。食品添加剂的安全性越来越受人们关注, 因此占主导地位但有一定危害的化学防腐剂的使用量逐渐减少, 而天然防腐剂成为近年来的热点, 其中生物保鲜是常用的化学防腐剂的替代方法。生物防腐剂的有效发展可作为化学防腐剂的替代途径, 生物防腐剂通过微生物的新陈代谢产生抑菌物质起到防腐保鲜的作用^[1]。细菌素已被用于治疗传染病、预防胃肠道疾病、维持人体健康以及作为食品工业中的防腐剂^[2]。目前乳酸菌细菌素研究的较多, 但在商业中成熟应用较少^[3-4]。相比而言, 学者对产生抑菌物质的多粘类芽孢杆菌关注相对较

少, 因为多粘类芽孢杆菌属细菌能够产生多种不同化学结构的抗菌多肽, 所以对产细菌素的多粘类芽孢杆菌的研究显得更有意义^[5]。广谱抑菌性多粘类芽孢杆菌具有广泛的抑菌性, 抑菌成分多为多糖、多肽、蛋白质等。抑菌机理多为作用于目的菌的细胞壁、细胞膜等, 从而达到抑菌的效果。

国内外学者从不同的环境中分离筛选出产细菌素的芽孢杆菌。如 Kavitha 等^[6]在水稻的根际土壤中筛选出一株优良多粘类芽孢杆菌 VLB16, 对稻纹枯病菌的生长具有良好的抑制作用。Balaiah 等^[7]从发酵番茄果实中分离到一株芽孢杆菌 NP75, 对革兰氏阳性细菌有显著的抑菌活性。Yang 等^[8]筛选出一株

收稿日期: 2019-05-13

作者简介: 周涛(1964-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: zhoutao@sina.com。

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(201810319)。

多粘类芽孢杆菌 Jsa-9,其产生的细菌素对食品中的优势腐败菌有良好的抑制作用。Kim 等^[9]从韩国东大麦根际分离出一株多粘类芽孢杆菌 E681,具有促进植物生长和抑制植物病害的能力。目前国内外研究的多粘类芽孢杆菌抑菌谱较窄,且多应用于生物防治,在食品防腐中应用极少。为获得新颖、抑菌活性更为稳定的细菌素,本文拟从不同环境中的湖泥、土壤中分离筛选具有广谱抑菌作用的多粘类芽孢杆菌菌株,进而为生物保鲜新品种的开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

湖泥和根系土壤 取自玄武湖、中山陵景区、南京清凉山、南京国防园、南京师范大学随园校区;金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、赖氨酸芽孢杆菌 (*Lysinibacillus*)、大肠埃希氏杆菌 (*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 均由南京师范大学实验室保藏;LB 肉汤、LB 琼脂培养基、营养琼脂培养基 BR,南京腾春生物试剂有限公司;胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、胰蛋白酶、蛋白酶 K、氯化钠、革兰氏染色试剂盒、蔗糖 AR,南京腾春生物试剂有限公司;DNA 抽提试剂盒、通用引物 上海生工生物工程技术服务有限公司。

CJ-2S 型超净工作台 天津市泰斯特仪器有限公司;生化培养箱 LRH-250A 广东省医疗器械厂;自动高压灭菌锅 HVE-50 南京博惠科学仪器有限公司;ALLEGRA64R 台式高速冷冻离心机 美国 Beckman Coulter 公司;电子分析天平 AU220 日本 ShiMADzu;Phs-3C 精密 pH 计 上海三信仪表厂;DK-8D 电热恒温水槽 上海一恒科学仪器有限公司;TH2-C 恒温摇床 太仓市实验设备厂;2720 thermal cycle PCR 仪 上海巴玖实业有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 芽孢杆菌的分离纯化 取 1 g 分离样品于 9 mL 无菌生理盐水中,混匀后于 80 ℃ 水浴 30 min,杀死营养细胞, $10^{-1} \sim 10^{-7}$ 梯度稀释,取梯度稀释液 100 μ L 涂布于 LB 固体培养基,观察细菌菌落的形态特征,对疑似菌落进行革兰氏染色^[10],挑取产芽孢的革兰氏阳性单菌落于 LB 固体培养基中培养 36 h 后,保存于 4 ℃ 冰箱备用。

将已分离的菌株置于 LB 肉汤液体培养基中 180 r/min、37 ℃ 摇床培养 24 h,发酵液经过 10000 r/min 离心 15 min,弃沉淀,0.22 μ m 的滤膜过滤上清去除菌体,获得拮抗液。利用平板打孔法测定抑菌活性,取大肠杆菌培养液 (1.0×10^8 CFU $\cdot$ mL⁻¹) 均匀涂布于固体培养基表面,于每个孔中加入 100 μ L 拮抗液,培养 24 h,观察抑菌作用,记录抑菌圈直径^[11-12]。

1.2.2 H₂O₂ 作用的排除 H₂O₂ 作用的排除参照张艾青等^[13]方法,利用 H₂O₂ 受热分解的特性,取菌株发酵产物于 80 ℃ 水浴加热 10 min,参照 1.2.1 测定除去 H₂O₂ 的上清液对大肠杆菌的抑菌直径。

1.2.3 蛋白酶的处理 取排除 H₂O₂ 作用的拮抗液,分别加入蛋白酶 k、胰蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶,使酶的终浓度为 2 mg/mL,在酶的最适 pH 下,

37 ℃ 保温 2 h,再将 pH 调回至 6.8 ± 0.2 ,以不加酶液的拮抗液作为对照,参照 1.2.1 测定蛋白酶和非蛋白酶处理后上清液对大肠杆菌的抑菌直径。

1.2.4 菌株鉴定 根据目标菌的形态特征结合革兰氏染色,并依照《微生物学实验教程》^[14]提供的途径进行生理生化实验,参照《伯杰细菌鉴定手册》^[15]做出初步鉴定。之后进行 16S rRNA 序列同源性分析鉴定^[16],把得到的测序结果利用 NCBI 的 Gen Bank 数据库进行 BLAST 分析,按照序列同源性选择不同模式菌株,利用 MEGA6.06 软件构建系统发育树,从而确定菌株 XW4 的种属。

1.2.5 温度和 pH 对细菌素的影响

1.2.5.1 温度对细菌素的影响 菌体培养物以 2% 的接种量接入 50 mL LB 培养基中,37 ℃ 培养 24 h,取上清液分别于 60、80、100、120 ℃ 水浴中处理 30 min,冷却至室温后,参照 1.2.1 测定上清液对指示菌大肠杆菌的抑菌直径^[17]。

1.2.5.2 pH 对细菌素的影响 菌体培养物以 2% 的接种量接入 50 mL LB 培养基中,37 ℃ 培养 24 h,获得拮抗液,用 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 调节无细胞发酵上清液 pH,使其 pH 分别为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0,37 ℃ 保温 2 h 后,再调回至初始 pH 6.8 ± 0.2 ,参照 1.2.1 测定上清液对大肠杆菌的抑菌直径^[17]。

相对抑菌率(%) = [(对照组扩展直径 - 处理组扩展直径) / 对照组扩展直径] $\times$ 100

1.2.6 细菌素抑菌谱 以主要的食源性致病菌大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 和克氏原螯虾优势腐败菌赖氨酸芽孢杆菌 (*Lysinibacillus*) 做为指示菌,活化后稀释到 1.0×10^8 CFU $\cdot$ mL⁻¹,涂布接种于营养琼脂培养基表面,参照 1.2.1 测定上清液对各指示菌的抑菌直径^[17]。

1.3 数据处理

实验中每组数据均进行 3 次重复,数据用 Excel 2007 软件处理。

2 结果与分析

2.1 多粘类芽孢杆菌菌株的筛选

利用高温水浴杀死营养细胞体的方法,从样品中共分离出 103 株产芽孢细菌,通过革兰氏染色和芽孢染色后,发现其中 87 株菌同时具有革兰氏阳性、产芽孢、杆状细胞的特点,初步确定这 87 株菌属于芽孢杆菌属细菌。

2.2 抑菌物质产生菌株的筛选

利用琼脂扩散法,以大肠杆菌为指示菌,对从湖泥中分离的 87 株芽孢杆菌属细菌进行抑菌活性检测,选取一株抑菌效果最好的菌株将其命名为 XW4,结果如图 1 所示。由图 1 可见,XW4 对大肠杆菌有抑制作用,能形成抑菌圈,图 1 中该细菌素抑菌圈平均直径为 (17.86 ± 0.33) mm,打孔直径为 6 mm;选用 XW4 菌株作为进一步试验的测试菌。

2.3 排除 H₂O₂ 的抑菌作用

细菌生长代谢过程所产有机酸、H₂O₂ 以及菌体



图1 菌株对指示菌的抑菌作用

Fig.1 The antimicrobial effect of the selected strain

细胞常常也具有抑菌作用,初步筛选的 XW4 需进一步确定其抑菌活性是否为细菌素所致。由于拮抗液的制作过程包含过滤除菌环节,故排除菌体细胞的影响;此外,在发酵前后上清液的 pH 无显著变化为 6.8 ± 0.2 ,排除酸的干扰;加热法分解 H_2O_2 ,结果如图 2 所示。由图可知上清液排除 H_2O_2 后仍然具有显著抑菌作用,抑菌圈直径平均为 (16.88 ± 0.71) mm,和处理前相比抑菌性变化不大,初步判断 H_2O_2 不是 XW4 的抑菌物质。



图2 H_2O_2 排除后的抑菌作用

Fig.2 The antimicrobial effect of *Bacillus* XW4 after eliminating H_2O_2

2.4 对蛋白酶的敏感性

为确定 XW4 的抑菌物质是否为蛋白或肽类,分别用木瓜蛋白酶、胰蛋白酶、蛋白酶 k、胃蛋白酶对上清液进行处理,抑菌结果见图 3。图 3 表明,拮抗液中加入不同蛋白酶后,加蛋白酶 k 与对照相比抑菌圈直径显著减小,抑菌活性降低;而木瓜蛋白酶和胰蛋白酶、胃蛋白酶对上清液抑菌活性的影响较小,抑菌圈相对抑菌率为 6.82%、5.89%、11.00%,与对照组相比差异不显著;蛋白酶 k 对其抑菌活性的影响较大,其相对抑菌率为 50.5%。从酶处理的结果来看,说明 XW4 所产抑菌物质为蛋白类的细菌素物质。由于细菌素的氨基酸组成特征不同,造成细菌素对蛋白酶的敏感型不同。

2.5 菌株鉴定

2.5.1 菌株 XW4 菌体形态学观察 由图 4 可观察到菌落成圆形,直径大小 0.9~1.7 mm,白色菌落,半透明,表面光滑湿润,革兰氏染色呈阳性,放大倍数为 100 时显微镜观察下细胞形状为长杆状。

2.5.2 生理生化特征 菌株 XW4 的生理生化测定结果见表 1。由表 1 可知,菌株 XW4 能还原硝酸盐、水解淀粉等。根据鉴定结果查表,并结合革兰氏染色观察结果,可初步确定 XW4 菌株属于多粘类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*)。

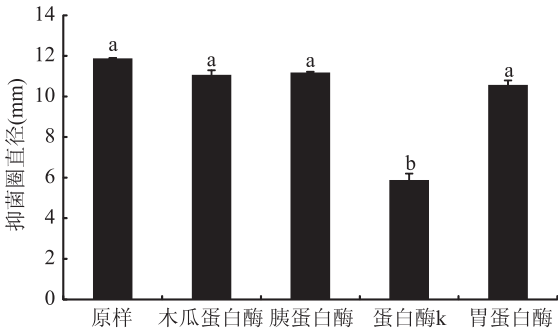


图3 蛋白水解酶对芽孢杆菌 XW4 细菌素活性的影响

Fig.3 The effect of proteolytic enzyme

on the activity of bacteriocin from *Bacillus* XW4

注:图中不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

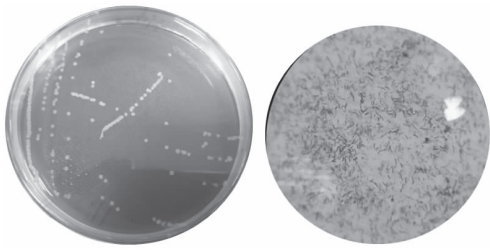


图4 菌株 XW4 的形态特征

Fig.4 The morphological characteristic of train XW4

表1 芽孢杆菌 XW4 的生理生化特征

Table 1 Biochemical characteristic of *Bacillus* XW4

测试项目	结果	测试项目	结果
耐盐性		蔗糖	+
2%	+	柠檬酸钠利用	-
5%	-	琥珀酸钠利用	-
10%	-	H ₂ S 产生	-
糖发酵		厌氧生长	+
D-葡萄糖	+	接触酶	+
L-阿拉伯糖	+	氧化酶	-
D-木糖	+	硝酸还原反应	+
甘露醇	+	水解酪蛋白	+
甘油	+	水解淀粉	+
乳糖	+	V-P 反应	+

注:“+”表示为阳性;“-”表示为阴性。

2.5.3 细菌 16S rDNA 基因序列分析和系统发育树构建 测试菌株 XW4 经过扩增电泳后得到大约 1498 bp 的序列。将测序的结果输入到 Genebank 中,使用 Blast 功能对目的序列与 Genebank 库中的已有数据序列进行同源性比对^[18]。Clustal X 1.8 对齐之后使用 MEGA 5.0 计算序列相似性,构建系统发育树,发育树结果见图 5。软件进行序列分析后,菌株 XW4 与同源性搜索后关系最近的前 2 株来自多粘类芽孢杆菌的亲缘性最高,与菌株 *Paenibacillus polymyxa* KRO58350.1 处于同一个小分支,亲缘关系最接近。结合菌落形态学特征和生理生化鉴定的结果,菌株 XW4 被鉴定为多粘类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*)。

2.6 温度和 pH 对细菌素的影响

2.6.1 温度对细菌素的影响 经过不同温度处理后

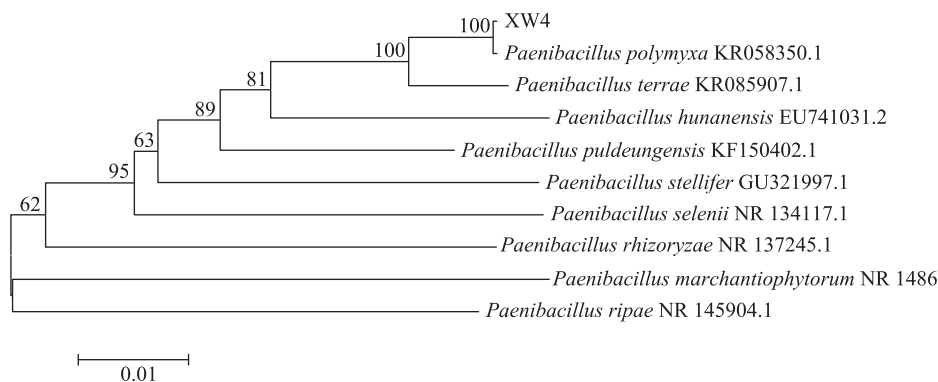


图5 菌株 XW4 的 16S rDNA 序列系统发育树

Fig.5 The developmental phylogenetic tree of XW4 based on 16S rDNA

结果如图 6 所示。由图 6 可知,菌株 XW4 的拈抗液经 60、80 和 100 ℃ 处理 30 min 后,对大肠杆菌的抑菌活性基本无影响,抑菌圈直径保持在 (16 ± 0.30) mm 范围内;经 120 ℃ 处理 30 min 后仍具有一定的抑菌性,表明 XW4 所产细菌素有显著的热稳定性。研究发现地衣芽孢杆菌产生的杆菌素 490 是一种新型的食品抗菌剂,在热处理和贮藏过程中表现出良好的稳定性,在高温下也具有杀菌活性^[19]。苏云金芽孢杆菌 HD868 所产细菌素在 90 ℃ 时相对耐热,但煮沸 30 min 后未检测到菌素活性^[20]。地衣芽孢杆菌 MKU3 所产细菌素在 100 ℃ 维持 10 min 时稳定,在 121 ℃ 时 15 min 失去活性^[21]。苏云金杆菌 SF361 产生的细菌素,其活性在 50 ℃ 维持 30 min 时稳定,在 80 ℃ 以上时,维持 10 min,其活性降低到无法检测到的水平^[22]。解淀粉芽孢杆菌 J4 产生的细菌素在 80 ℃、20 min 稳定,在 100 ℃、15 min 失活^[23]。枯草芽孢杆菌 sly-3 产生的细菌素在 100 ℃ 的温度下保存 60 min 不会失去任何活性^[24]。综上所述与已报道的菌株相比 XW4 产生的抑菌物质热稳定性突出,有良好的应用前景。

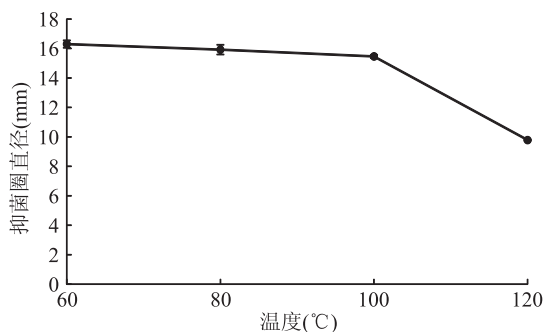


图6 温度处理对多粘类芽孢杆菌 XW4 抑菌效果的影响

Fig.6 Effect of temperature on the activity of bacteriocin from *Paenibacillus polymyxa* XW4

2.6.2 pH 对细菌素的影响 不同 pH 条件下菌株 XW4 的拈抗液对大肠杆菌的抑菌活性变化情况如图 7 所示,由图 7 可知,XW4 所产细菌素在相对较宽的 pH 范围 (pH3.0~11.0) 内抑菌活性稳定,pH9.0~11.0 的碱性环境中抑菌活性相对其他报道耐受性较强。处于 pH7.0 的中性条件下抑菌活性最强,低于或高于此值的偏酸或偏碱环境时,抑菌活性会不同程度递

减。pH3.0 的偏酸环境时,抑菌活力减少到 77.04%, pH11.0 的偏碱环境中,抑菌活力减少到 79.75%。偏碱环境下的抑菌效果强于偏酸环境下的抑菌效果。而相关研究多有报道偏碱环境下的抑菌效果弱于偏酸环境下的抑菌效果。苏云金芽孢杆菌菌株 BUPM103 中提取的一种新的细菌素 F103 在 pH3.0~10.0 范围内活性均稳定^[25]。克劳氏芽孢杆菌 GM17 产生的细菌素在 pH3.0~9.0 范围内活性均稳定^[26]。枯草芽孢杆菌 H27 产生的细菌素在 pH3.0~9.0 范围内活性均稳定,在 pH10 及以上时无活性^[27]。多粘类芽孢杆菌 JB05-01-1 产生的抗菌物质,活性在 2~9 的 pH 范围内均稳定^[28]。因此,该细菌素的这一特性不但有利于其在弱酸性、中性,而且在碱性食品中都可作为防腐剂的使用。

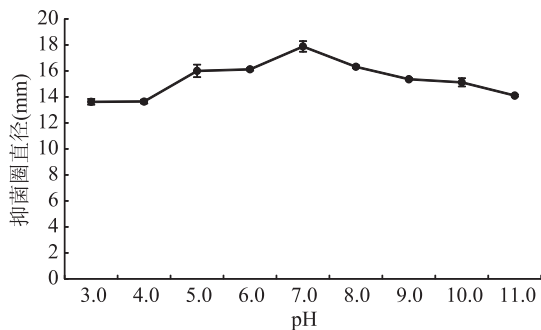


图7 pH 对多粘类芽孢杆菌 XW4 抑菌效果的影响

Fig.7 Effect of pH on the activity of bacteriocin from *Paenibacillus polymyxa* XW4

2.7 细菌素抑菌谱

通过平板打孔法检测菌株 XW4 抑菌谱,结果见图 8。结果表明,该拈抗液抑菌谱较广,分别对 G-菌 (如大肠杆菌) 和 G+ 菌 (如金黄色葡萄球菌) 均有良好抑菌作用,抑菌圈的直径均为 (17 ± 0.86) mm;对克氏原螯虾优势腐败菌赖氨酸芽孢杆菌有显著的抑制作用,抑菌圈直径为 (18 ± 0.47) mm;对食品中常见腐败菌枯草芽孢杆菌抑菌效果良好,抑菌圈直径为 (17 ± 0.37) mm。表明菌株 XW4 所产细菌素具有广谱抑菌性,对克氏原螯虾优势腐败菌赖氨酸芽孢杆菌有显著的抑制作用。多粘类芽孢杆菌 XW4 所产细菌素对食品中的常见优势腐败菌有显著抑制的作用,表明其在生物保鲜方面的应用有良好的前景。

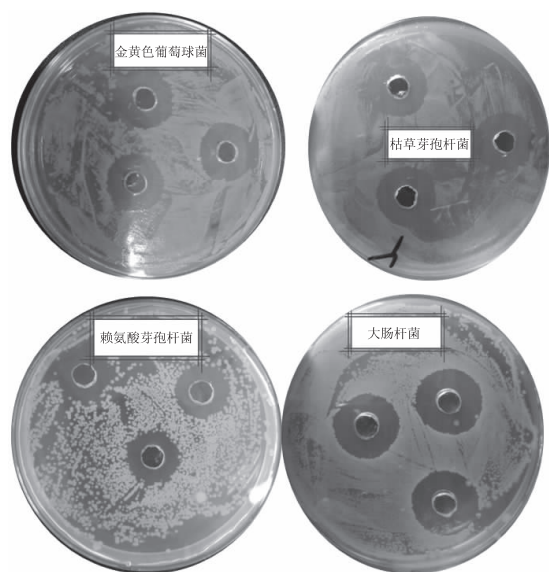


图8 多粘类芽孢杆菌 XW4 所产细菌素的抑菌谱

Fig.8 Inhibition spectrum of bacteriocin produced by *Paenibacillus polymyxa* XW4

3 结论

本研究从湖泥中分离得到 1 株不仅对食物中的腐败菌及致病菌具有显著抑菌作用,而且对水产中克氏原螯虾优势腐败菌具有良好抑菌作用的芽孢杆菌菌株 XW4,经生理生化试验和 16S rDNA 鉴定为多粘类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*)。抑菌物质具有显著的热稳定性,100 ℃ 处理 30 min 后活性仍为原来的 79.63%,120 ℃ 处理 30 min 后抑菌活性为原来的 31.82%。抑菌活性在 pH3.0~11.0 范围内稳定,XW4 的抑菌物质在碱性环境中稳定性与已报道的相比更好,在碱性环境中活性减弱幅度较小且抑菌效果显著,利用这一特性可作为碱性食品保鲜剂。经蛋白酶 k 处理后抑菌活性显著降低,初步可以推测抑菌活性物质为蛋白质类的细菌素。该抑菌物质抑菌谱较广,包括大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌,且抑菌效果显著。因此,本实验室从克氏原螯虾分离出的优势腐败菌,其细菌素有显著的抑菌效果,为生物保鲜行业的广泛应用奠定了基础。本研究将会进一步分析菌株 XW4 的抑菌物质结构、安全性和抑菌机理,为其商业化应用奠定基础。

参考文献

[1] 张莹.食品防腐中生物防腐剂的应用探究[J].食品安全导刊,2018(6):112-113.
[2] Sahoo T K, Jena P K, Prajapati B, et al. *In vivo* assessment of immunogenicity and toxicity of the bacteriocin TSU4 in BALB/c mice [J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2017, 9 (3): 345-354.
[3] Lv X, Du J, Jie Y, et al. Purification and antibacterial mechanism of fish-borne bacteriocin and its application in shrimp (*Penaeus vannamei*) for inhibiting *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2017, 33 (8): 156.
[4] Gupta A, Tiwari S, Ann K. Probiotic potential of bacteriocin-

producing *Enterococcus hirae* strain LD3 isolated from dosa batter [J]. *Annals of Microbiology*, 2015, 65 (4): 2333-2342.
[5] 田宇曦, 闵勇, 杨自文, 等. 多粘类芽孢杆菌研究进展 [J]. *湖北农业科学*, 2017, 56 (18): 3401-3404.
[6] Kavitha S, Senthilkumar S, Gnanamanickam S, et al. Isolation and partial characterization of antifungal protein from *Bacillus polymyxa* strain VLB16 [J]. *Process Biochemistry*, 2005, 40 (10): 3236-3243.
[7] Balaiah A, Adaikkalam V, Maureen K, et al. Co-production of two new peptide antibiotics by a bacterial isolate *Paenibacillus alvei* NP75 [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 379 (2): 179-185.
[8] Yang D, Zhaoxin L, Hua B, et al. Isolation and characterization of peptide antibiotics LI-F04 and polymyxin B6 produced by *Paenibacillus polymyxa* strain JSa-9 [J]. *Peptides*, 2011, 32 (9): 1917-1923.
[9] Kim J F, Jeong H, Park S Y, et al. Genome sequence of the polymyxin-producing plant-probiotic rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* E681 [J]. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192 (22): 6103-6104.
[10] 李顺鹏. 微生物学实验指导 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 33-35.
[11] 贡汉生, 孟祥晨. 1 株产细菌素乳杆菌的鉴定及其所产抑菌物质的特性 [J]. *山东大学学报: 理学版*, 2008 (7): 33-39.
[12] Nietolozano J C, Reguerauseros J I, Pelaezmartinez M D C, et al. Effect of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* against *Listeria monocytogenes* and *Clostridium perfringens* on Spanish raw meat [J]. *Meat Science*, 2006, 72 (1): 57-61.
[13] 张艾青, 刘书亮, 教灵. 产广谱细菌素乳酸菌的筛选和鉴定 [J]. *微生物学通报*, 2007 (4): 753-756.
[14] 杨革. 微生物学实验教程 [M]. 北京: 科学出版社, 2010: 73-76.
[15] 布坎南. 伯杰细菌鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 1984: 732-741.
[16] 石举然, 别小妹, 吕凤霞, 等. 广谱抗菌芽孢杆菌的筛选及其抗酵母物质的纯化和鉴定 [J]. *食品科学*, 2017, 38 (6): 6-12.
[17] 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 (14): 110-114.
[18] 胡志恒. 多粘类芽孢杆菌 KF-1 抗真菌物质的纯化及其编码基因簇分析 [D]. 济南: 济南大学, 2016.
[19] Martirani L, Varcamonti M, Naclerio G, et al. Purification and partial characterization of bacillocin 490, a novel bacteriocin produced by a thermophilic strain of *Bacillus licheniformis* [J]. *Microbial Cell Factories*, 2002, 1 (1): 1.
[20] Paik H, Bae S, Park S, et al. Identification and partial characterization of tochicin, a bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *tochigiensis* [J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 1997, 19 (4): 294-298.
[21] Kayalvizhi N, Gunasekaran P, E B B. Purification and characterization of a novel broad-spectrum bacteriocin from

(下转第 109 页)

polysaccharide and its immunomodulatory and antitumor activity *in vitro* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2014, 67: 323-329.

[4] 国家标准化委员会, 国家质量监督检验检疫总局. GB/T 31121-2014 果蔬汁类及其饮料[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.

[5] 牛俊乐, 黄斌, 潘彩娟, 等. 百香果汁发酵乳饮料加工工艺研究[J]. 农产品加工, 2018(10): 25-28.

[6] 陈晓维, 徐玉娟, 余元善, 等. 龙眼枸杞糙米(发芽)复合饮料发酵期间品质变化规律研究[J]. 热带作物学报, 2018, 39(11): 2265-2271.

[7] 庞泽肿, 梁燕清. 龙眼乳酸菌发酵饮料工艺的优化[J]. 贵州农业科学, 2018, 46(11): 125-129.

[8] 王超, 林小晖, 杜冰. 乳酸菌发酵型饮料的研究现状与前景[J]. 饮料工业, 2018, 21(1): 68-70.

[9] 骆雨雨, 黄韶媛, 郭洁儿, 等. 乳酸菌与酵母混合发酵制备抗氧化肽发酵乳饮料的研究[J]. 饮料工业, 2018, 21(4): 55-60.

[10] 谢建桦, 张雷, 贾有青, 等. 桑葚发酵饮料的研制与开发[J]. 粮食与食品工业, 2018, 25(3): 24-27.

[11] 乔博鑫, 邢紫娟, 郭红莲. 乳酸菌发酵枸杞过程中理化指标及风味物质的变化[J]. 食品工业科技, 2019, 9: 6-12.

[12] 蔺志颖, 张博文, 李佳. 响应面法优化椰浆蛋白发酵饮料发酵工艺[J]. 中国酿造, 2019, 38(5): 210-214.

[13] 张春岭, 刘慧, 刘杰超, 等. 响应面试验优化红枣乳酸发酵饮料工艺[J]. 中国食物与营养, 2019, 25(1): 39-42, 57.

[14] 伍静, 苏春萍, 王显超, 等. 乳酸菌和双歧杆菌制剂对小鼠肠道菌群失调模型的调节作用[J]. 科学技术与工程, 2013, (16): 4497-4500.

[15] 郭羽, 薛慧清, 高丽, 等. 酵母菌发酵黄芪的抑菌作用初探[J]. 山西中医学院学报, 2014, 15(2): 8-10.

[16] 张志焱, 刘红莲, 刘海涛, 等. 乳酸菌发酵上清液对肉仔鸡生产性能和免疫功能的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2013, 49

(15): 78-82.

[17] 杭柏林, 胡建和, 刘丽艳, 等. 乳酸菌株植物乳杆菌和粪链球菌对肉鸡免疫性能的影响[J]. 广东农业科学, 2008, 11: 80-83.

[18] 刘红芝. 酿酒酵母甘露聚糖的制备、结构鉴定及免疫活性研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2009.

[19] Surh Y J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals [J]. Nature Reviews Cancer, 2003, 3(10): 768-780.

[20] 吕全军. 蔬菜、水果的抗癌机制[J]. 国外医学卫生学分册, 2000, 27(1): 15-17.

[21] 卢明, 蔡云清, 赵岩, 等. 果蔬发酵液对小鼠移植肉瘤 S180 抑制作用的研究[J]. 营养学报, 2006, 28(5): 450-451.

[22] Amaretti A, Nunzio M D, Pompei A, et al. Antioxidant properties of potentially probiotic bacteria: *In vitro* and *in vivo* activities [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(2): 809-817.

[23] 洪松虎, 吴祖芳. 乳酸菌抗氧化作用研究进展[J]. 宁波大学学报: 理工版, 2010, 23(2): 17-22.

[24] Kogan G, Stasko A, Bauerov K, et al. Antioxidant properties of yeast (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucan studied by electron paramagnetic resonance spectroscopy and its activity in the adjuvant arthritis [J]. Carbohydrate Polymers, 2005, 61(1): 18-28.

[25] Tomaro D C, Jones M L, Shah D, et al. Cholesterol assimilation by *Lactobacillus* probiotic bacteria: An *in vitro* investigation [J]. Bio Med Research International, 2014, 2014: 380316.

[26] Lourens H A, Viljoen B. Growth and survival of a probiotic yeast in dairy products [J]. Food Research International, 2001, 34(9): 791-796.

[27] 褚巧芳, 张德纯, 孙珊. 双歧杆菌发酵果蔬汁对小鼠抗疲劳作用的实验研究[J]. 中国微生态学杂志, 2009, 21(2): 106-108.

(上接第 103 页)

Bacillus licheniformis MKU3 [J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2010, 15(2): 365-370.

[22] Wang G, Manns D C, Guron G K, et al. Large-scale purification, characterization, and spore outgrowth inhibitory effect of thurincin H, a bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* SF361 [J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2014, 6(2): 105-113.

[23] Lim J, Jeong H, Kim S, et al. Characterization of the bacteriocin J4 produced by *Bacillus amyloliquefaciens* J4 isolated from Korean traditional fermented soybean paste [J]. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, 2011, 54(3): 468-474.

[24] Li J, Li H, Zhang Y, et al. Characterization of a bacteriocin-like substance produced from a novel isolated strain of *Bacillus subtilis* SLYY-3 [J]. Journal of Ocean University of China, 2014, 13(6): 995-999.

[25] Kamoun F, Fguira I B, Hassen N B B, et al. Purification and characterization of a new *Bacillus thuringiensis* bacteriocin active against *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2011, 165(1): 300-314.

[26] Mouloud G, Daoud H, Bassem J, et al. New bacteriocin from *Bacillus clausii* strain GM17: Purification, characterization, and biological activity [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2013, 171(8): 2186-2200.

[27] Kindoli S, Lee H A, Heo K, et al. Properties of a bacteriocin from *Bacillus subtilis* H27 isolated from Cheonggukjang [J]. Food Science and Biotechnology, 2012, 21(6): 1745-1751.

[28] Naghmouchi K, Paterson L, Forster B, et al. *Paenibacillus polymyxa* JB05-01-1 and its perspectives for food conservation and medical applications [J]. Archives of Microbiology, 2011, 193(3): 169-177.