

## 发酵蔬菜来源具抑菌活性明串珠菌的筛选及其细菌素基因簇挖掘

刘毕琴, 陈骏飞, 罗义勇, 赵勇, 万幸, 蔡英丽, 唐蓉, 史巧, 李宏

### Screening of *Leuconostoc* Strains with Antibacterial Activity from Fermented Vegetables and Mining of Bacteriocin Gene Cluster

LIU Biqin, CHEN Junfei, LUO Yiyong, ZHAO Yong, WAN Xing, CAI Yingli, TANG Rong, SHI Qiao, and LI Hong

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023070125>

## 您可能感兴趣的其他文章

### Articles you may be interested in

筛选自泡菜的发酵乳杆菌细菌素纯化及抑菌特性分析

Purification and Antibacterial Properties of Bacteriocin Produced by *Lactobacillus fermentum* Isolated from Pickled Vegetables

食品工业科技. 2021, 42(3): 201-207,283 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020030145>

产细菌素乳酸菌的筛选与鉴定

Screening and identification of bacteriocin produced by lactic acid bacteria

食品工业科技. 2017(17): 146-151 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.17.028>

泡菜中抑菌性芽孢杆菌的筛选及其细菌素理化特性

Screening of *Bacillus* with Antimicrobial Activity from Pickles and Physicochemical Characteristics of Bacteriocin

食品工业科技. 2018, 39(14): 110-114,119 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.14.020>

产右旋糖酐肠膜明串珠菌发酵培养基的优化

Optimization of Fermentation Medium for Producing Dextran from *Leuconostoc mesenteroides*

食品工业科技. 2020, 41(3): 146-152 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.03.026>

乳酸菌细菌素的抑菌活性测定及效价表示方法

Methods for the Determination of Bacteriocin Activity and the Expression of Its Titer

食品工业科技. 2018, 39(16): 340-345 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.16.061>

清香酒醅中高产细菌素乳酸菌的筛选及其细菌素特性研究

Isolation of Lactic Acid Bacteria with High-yield Bacteriocin from Fermented Grians of Light-flavor Baijiu and Its Bacteriocin Characteristic

食品工业科技. 2020, 41(16): 102-107 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.16.017>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

刘毕琴, 陈骏飞, 罗义勇, 等. 发酵蔬菜来源具抑菌活性明串珠菌的筛选及其细菌素基因簇挖掘 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(11): 142-150. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023070125

LIU Biqin, CHEN Junfei, LUO Yiyong, et al. Screening of *Leuconostoc* Strains with Antibacterial Activity from Fermented Vegetables and Mining of Bacteriocin Gene Cluster[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(11): 142-150. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023070125

· 生物工程 ·

# 发酵蔬菜来源具抑菌活性明串珠菌的筛选 及其细菌素基因簇挖掘

刘毕琴<sup>1</sup>, 陈骏飞<sup>1</sup>, 罗义勇<sup>2</sup>, 赵勇<sup>1</sup>, 万幸<sup>3</sup>, 蔡英丽<sup>1</sup>, 唐蓉<sup>1</sup>, 史巧<sup>1,\*</sup>, 李宏<sup>4,\*</sup>

(1. 云南省农业科学院农产品加工研究所, 云南昆明 650223;

2. 江西师范大学生命科学院国家淡水鱼加工技术研发专业中心, 江西南昌 330022;

3. 赫尔辛基大学农林学院, 芬兰赫尔辛基 00790;

4. 云南农业大学食品科学技术学院, 云南昆明 650201)

**摘要:** 为提高发酵蔬菜的安全性和保藏性, 来自云南传统发酵蔬菜的 8 株明串珠菌中筛选出 1 株对食源性致病菌和引起泡菜过酸化的细菌抑制效果好的肠膜明串珠菌 AP7。通过排除酸和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 影响及蛋白酶敏感性确定 AP7 的主要抑菌物质, 分析其酸稳定性和热稳定性, 根据 AP7 的全基因组序列挖掘潜在的细菌素基因簇。结果表明: 排除酸及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的影响后, 菌株的发酵上清液仍具有明显抑菌活性, 经蛋白酶处理后, 抑菌效果明显下降, 推测 AP7 发酵上清液浓缩液中的抑菌物质为细菌素; 该细菌素对 pH 变化敏感, 热稳定性高, 分子质量在 6.51~14.4 kDa; 全基因组测序表明, 菌株 AP7 全基因组包含 1 条染色体 (1948310 bp) 和 2 个质粒 (37366 和 20698 bp), GC 含量 37.7%; 存在 1 个以 Enterocin\_X\_chain\_beta 细菌素为核心的基因簇, 其编码产物预测为带正电的亲水性稳定蛋白, 二级结构以  $\alpha$ -螺旋为主, 三级结构主要由两端松散肽链和中间  $\alpha$ -螺旋构成。综上, 产细菌素的肠膜明串珠菌 AP7 具有优良抑菌性能, 有潜力应用于酸性食品的发酵和防腐。

**关键词:** 发酵蔬菜, 肠膜明串珠菌, 全基因组测序, 细菌素

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)11-0142-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023070125



本文网刊:

## Screening of *Leuconostoc* Strains with Antibacterial Activity from Fermented Vegetables and Mining of Bacteriocin Gene Cluster

LIU Biqin<sup>1</sup>, CHEN Junfei<sup>1</sup>, LUO Yiyong<sup>2</sup>, ZHAO Yong<sup>1</sup>, WAN Xing<sup>3</sup>, CAI Yingli<sup>1</sup>,  
TANG Rong<sup>1</sup>, SHI Qiao<sup>1,\*</sup>, LI Hong<sup>4,\*</sup>

(1. Institute of Agro-Product Processing, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650223, China;

2. National R & D Center for Freshwater Fish Processing, College of Life Sciences, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, China;

3. Faculty of Agriculture and Forestry, University of Helsinki, Helsinki 00790, Finland;

4. College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

**Abstract:** In order to improve the safety and preservability of fermented vegetables, strain *Leuconostoc mesenteroides* AP7, with potent inhibitory effects on foodborne pathogens and bacteria causing paocai over-acidification, was selected from 8 *Leuconostoc* strains derived from traditional fermented vegetables in Yunnan, China. The main antimicrobial substance of

收稿日期: 2023-07-17

基金项目: 云南省科技厅重大科技专项 (202002AE320006); 科技人才与平台计划 (202005AD160015)。

作者简介: 刘毕琴 (1989-), 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 食品发酵技术, E-mail: lbq@yaas.org.cn。

\* 通信作者: 史巧 (1983-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 食品加工, E-mail: sq@yaas.org.cn。

李宏 (1974-), 男, 硕士, 研究员, 研究方向: 农产品加工, E-mail: ynveg@163.com。

AP7 was determined by eliminating the effects of organic acid and  $H_2O_2$  and through protease sensitivity. The acid stability and thermal stability were analyzed and potential bacteriocin gene clusters were mined from the whole genome sequence of AP7. The results showed that the culture supernatant still had obvious antibacterial activity after excluding the influence of acid and  $H_2O_2$ , and after protease treatment, the antibacterial effect decreased significantly. It was speculated that the antibacterial substance in the concentrated culture supernatant was bacteriocin. The bacteriocin was sensitive to pH changes, had high thermal stability, and had a molecular weight of 6.51~14.4 kDa. Whole genome sequencing showed that the whole genome of AP7 contained 1 chromosome (1948310 bp) and 2 plasmids (37366 and 20698 bp), with a GC content of 37.7%. There was a gene cluster with Enterocin\_X\_chain\_beta bacteriocin as the core. Its encoded product was predicted to be a positively charged hydrophilic stable protein, the secondary structure was dominated by  $\alpha$ -helix, and the tertiary structure was mainly composed of loose peptide chains at both ends and an  $\alpha$ -helix in the middle. In summary, the bacteriocin-producing *Leuconostoc mesenteroides* AP7 has excellent antibacterial properties and has the potential to be applied to the fermentation and preservation of acidic foods.

**Key words:** fermented vegetable; *Leuconostoc mesenteroides*; whole genome sequencing; bacteriocin

新鲜蔬菜经不同微生物发酵,形成风味独特、营养价值高、保质期长的发酵蔬菜,发酵蔬菜中的菌群决定了产品的风味特征,营养功能和安全性,同时也影响成品的保藏性<sup>[1]</sup>。蔬菜发酵过程中的优势乳酸菌包括魏斯氏菌属(*Weissella*)、明串珠菌属(*Leuconostoc*)和乳杆菌属(*Lactiplantibacillus*)<sup>[2]</sup>。同型发酵的乳杆菌耐酸能力强,在泡菜储存过程中会继续发酵,产生乳酸,导致泡菜的后酸化<sup>[3-4]</sup>;此外,发酵蔬菜在生产、加工及贮藏过程中易受到微生物的污染,导致软化、变色、变味和腐败变质,通常采用高盐腌渍和添加防腐剂延长发酵蔬菜保质期,但高盐和防腐剂不利于人体健康<sup>[5]</sup>。

乳酸菌合成的细菌素是一种抗菌肽,是其自身的次生代谢产物。通常细菌素的分子量低,翻译修饰后,易被蛋白水解,对人体无害。因此,开发具有生物拮抗性能的天然发酵菌种以保持泡菜品质显得尤为重要。明串珠菌具有广谱抑菌性,能防止发酵蔬菜过酸,抑制食源性致病菌延长其保藏期,常被用作泡菜发酵剂<sup>[6-7]</sup>。CHANG等<sup>[6]</sup>用植物乳植杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*)诱导柠檬明串珠球菌(*Leuconostoc citreum*)GJ7产生细菌素,诱导后的GJ7对植物乳植杆菌(*L. plantarum*)有较好的抑制效果;用诱导后的GJ7发酵韩国泡菜,7℃下发酵27d,发酵前期,自然发酵泡菜的总酸比GJ7发酵泡菜增加的慢,但最终自然发酵泡菜的总酸1.0%(pH3.98)超过了GJ7发酵泡菜0.86%(pH4.18)。BAJPAI等<sup>[8]</sup>从韩国泡菜里分离的肠膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*)无细胞上清液对食源性致病菌有显著的抑制作用,最低抑菌浓度为250~2000  $\mu\text{g/mL}$ 。

明串珠菌存在蔬菜早期发酵阶段,在蔬菜发酵过程中产生 $CO_2$ 、乙醇和甘露醇作为代谢产物,产酸速率慢,赋予发酵蔬菜微酸、清爽和愉快的味道,感官品质较好<sup>[9]</sup>。而过酸发酵蔬菜中含有大量*L. plantarum*和清酒广布乳杆菌(*Latilactobacillus sakei*)<sup>[10-11]</sup>。目前,乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)对引起发酵蔬菜过酸的*L. plantarum*和清酒广布乳杆菌(*L. sakei*)抑制的研究较多<sup>[10,12-13]</sup>。有关明串珠菌对引起泡菜

过酸菌抑菌特性的研究较少。目前,对产细菌素乳酸菌筛选的研究多集中于乳杆菌属<sup>[14-16]</sup>,本研究从分离自云南传统发酵蔬菜样品的8株明串珠菌中,筛选一株抑菌效果好且产细菌素的明串珠菌,并对其进行抑菌特性的研究和细菌素基因簇的挖掘,以期工业开发蔬菜专用发酵剂提供备选菌株。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与仪器

明串珠菌 分离自云南不同地区自制发酵蔬菜,AP7、LPC-1、JD3-3、FYF-1、FYF-3、STJ-2、G26、L-1均保存于云南省农业科学院发酵食品微生物菌种库(表1);大肠杆菌(*Escherichia coli* ATCC 25922)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* ATCC25923)、MRS肉汤培养基、MRS固体培养基、NB肉汤培养基、BHI液体培养基、LB液体培养基、LB固体培养基 青岛高科技工业园海博生物技术有限公司;*L. sakei*、*L. plantarum* 分离自云南传统发酵过酸泡菜样品,保存于云南省农业科学院发酵食品微生物菌种库;氯化钠、氢氧化钠、盐酸 天津市风船化学试剂科技有限公司;过氧化氢酶(酶活力 $\geq 3000 \text{ U/mg}$ ) 上海生工生物工程股份有限公司;蛋白酶K(酶活力40  $\text{U/mg}$ )、胰蛋白酶(250  $\text{U/mg}$ )、胃蛋白酶(1:10000,酶活力 $\geq 250 \text{ U/mg}$ ) 分析纯,北京索莱宝科技有限公司;草酸标准品、柠檬酸标准品、酒石酸标准品、苹果酸标准品、琥珀酸标准品、乳酸标准品、乙酸标准品 色谱纯,北京索莱宝科技有限公司。

Universal 320R 高速冷冻离心机 德国 Hettich 公司;SW-CJ-2FD 超净台 苏州安泰空气技术有限公司;HWS-24 型电热恒温水浴锅 上海一恒科学仪器有限公司;YXQ-75SL 高压灭菌锅 上海博迅实业有限公司医疗设备厂;S210 pH 计 梅特勒托利多科技(中国)有限公司;JA1003 电子天平 上海舜宇恒平科学仪器有限公司;WPL-125BE 电热恒温培养箱 天津市泰斯特仪器有限公司;JY-SCZ2+垂直电泳系统 北京君意东方电泳设备有限公司。

表1 实验菌株  
Table 1 Test strains

菌株编号	相似菌株	种名	16S相似度(%)	NCBI
AP7	<i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>jonggajibkimchii</i> strain 1980	肠膜明串珠菌亚种	100	MT597785.1
LPC-1	<i>Ln. mesenteroides</i> strain 4622	肠膜明串珠菌	100	MT545113.1
JD3-3	<i>Ln. mesenteroides</i> strain ATCC 8293	肠膜明串珠菌	100	ON937320.1
FYF-1	<i>Ln. lactis</i> strain 4574	乳明串珠菌	99.72	MT545082.1
FYF-3	<i>Ln. lactis</i> strain Le2-1	乳明串珠菌	99.65	EU794734.1
STJ-2	<i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>jonggajibkimchii</i> strain DRC1506	肠膜明串珠菌亚种	99.93	NR_157602.1
G26	<i>Ln. citreum</i> strain 4367	柠檬明串珠菌	100	MT544904.1
L-1	<i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> strain JCM 9700	肠膜明串珠菌亚种	100	NR_113254

## 1.2 实验方法

1.2.1 高效抑菌活性明串珠菌初筛 利用 agar-spot-on law<sup>[17]</sup> 方法筛选有抑菌效果的明串珠球菌。将实验菌株经活化 2 代,以 3% 的接种量接入 MRS 肉汤培养基中,37 °C 静置培养 15 h。将培养物振荡混匀,取 10 μL 滴加在 MRS 固体培养皿上,置于 37 °C,培养 24 h。将含有浓度为 10<sup>8</sup> CFU/mL 的指示菌的固体培养基倒在长有乳酸菌单菌落的 MRS 培养基上,37 °C 培养 20 h,观察结果。

1.2.2 明串珠菌发酵上清液的制备 将筛选获得的高抑菌活性菌株活化 2 代,以 3% 的接种量加入 MRS 肉汤培养基中,37 °C 过夜培养后,7000 r/min、4 °C 离心 10 min,取无细胞发酵上清液,进行冷冻干燥得到固体粉末,用 0.85% 的生理盐水溶解固体粉末,配制浓度为 0.25 g/mL 的 AP7 发酵上清浓缩液。

1.2.3 酸抑制作用的排除 参考王娜等<sup>[18]</sup> 的方法,将 AP7 发酵上清浓缩液用盐酸调节 pH 至 5.0,用盐酸、乳酸、乙酸调节 MRS 肉汤培养基 pH 至 5.0 作为对照组。采用牛津杯琼脂扩散法,分别向培养皿底部倾倒 15 mL 水琼脂,冷却凝固后,放上牛津杯,向培养皿中分别倒入 10 mL 混有 10<sup>8</sup> CFU/mL 指示菌 (*E. coli* ATCC25922、*S. aureus* ATCC25923、*L. sakei* 和 *L. plantarum*) 的固体培养基,冷却凝固后取出牛津杯,向孔内加入 150 μL AP7 发酵上清浓缩液。于 37 °C 培养 20 h,测量抑菌圈直径,所有实验均重复 3 次。

1.2.4 酶敏感性实验 将 AP7 发酵上清浓缩液分别用 NaOH 溶液和 HCl 溶液调节至酶的最佳 pH,胃蛋白酶 pH2.0,胰蛋白酶、蛋白酶 K pH7.4,过氧化氢酶 pH7.0,分别添加至 AP7 发酵上清浓缩液使其工作浓度为 1 mg/mL。37 °C 处理 2 h,沸水浴 5 min 终止反应,调节 pH 至上清浓缩液初始 pH3.85,以未处理的发酵上清浓缩液作为对照,按照 1.2.3 的方法进行测定。

1.2.5 酸稳定性 用 NaOH 或盐酸溶液将 AP7 发酵上清浓缩液调节到 pH2.0、3.0、5.0、6.0、7.0,对照组为未进行 pH 调节的原始浓缩液,按照 1.2.3 的方法进行测定。

1.2.6 热稳定性 取 AP7 发酵上清浓缩液 5 mL,分别于 60、80、100 °C 下处理 20 min,以未处理的 AP7 发酵上清浓缩液作为对照,按照 1.2.3 的方法进行测定。

1.2.7 细菌素的 Tricine-SDS-PAGE 分子量测定与原位抑菌活性检测 将 1.2.2 中配制的 AP7 上清浓缩液通过 Tricine-SDS-PAGE 电泳测定细菌素分子量。电泳完成将凝胶切成 2 份,一份用于考马斯亮蓝染色,另外一份参考张晓妍等<sup>[16]</sup> 的方法用于凝胶原位检测,将凝胶置于灭菌后平皿中,加入用灭菌后的超纯水配制的 1% Triton-x 于摇床摇动 20 min,弃去试剂并用无菌水漂洗 2 次,加入 0.1 mol/L pH7.2 的磷酸缓冲液再摇动 30 min,弃去缓冲液,加入 20 mL 含 10<sup>8</sup> CFU/mL 指示菌 (*E. coli* ATCC25922) 的 LB 培养基,待凝固后,37 °C 过夜培养,观察抑菌条带。

1.2.8 菌株 AP7 全基因组测序及细菌素基因簇挖掘 采用 PacBio Illumina HiSeq 测序平台对菌株 AP7 进行全基因组测序,使用 Hifiasm 软件进行组装,通过 Circlator v1.5.5 软件进行环化和调整起始位点,采用 Pilon v1.22 软件利用二代数据进一步进行纠错,得到准确度高的基因组。所得全基因组序列对比 GO (Gene Ontology)、KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)、NR (Non-Redundant Protein Database) 等数据库进行功能注释。使用在线软件 BAGEL4 (<http://bagel4.molgenrug.nl/index.php>) 对 AP7 全基因组中潜在的编码细菌素的基因簇进行挖掘。

1.2.9 细菌素结构预测 利用 ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>) 对细菌素的理化性质进行分析; 用 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 对跨膜结构域进行预测; 用 SOPMA ([http://npsabibil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_gor4.html](http://npsabibil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html)) 对二级结构进行分析; 用在线软件 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 分析三级结构。

## 1.3 数据处理

实验数据采用 SPSS Statistics 26 软件进行统计

分析,以平均值±标准差表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 高效抑菌活性乳酸菌筛选

如表 2 所示,8 株明串珠菌对不同的指示菌抑制效果不同,其中 AP7、LPC-1 对 *E. coli* ATCC25922、*S. aureus* ATCC25923、*L. sakei* 和 *L. plantarum* 均有抑制效果。8 株菌对 *E. coli* ATCC25922 均有显著抑制效果,AP7 效果最好。对 *S. aureus* ATCC25923,AP7、LPC-1 和 JD3-3 效果较好,其次是 FYF-3 和 STJ-2,G26、FYF-1 及 L-1 无抑菌效果。对导致泡菜后熟 *L. sakei* 和 *L. plantarum*<sup>[12]</sup>,AP7、LPC-1 均有较好的抑菌效果。AP7 所产抑菌物质具有较为宽广的抑菌谱,对食源性致病菌和导致泡菜后熟菌均存在明显的抑制作用,进一步分析 AP7 的主要抑菌物质。

表 2 8 株明串珠菌的抑菌能力

Table 2 Antimicrobial effects of 8 *Leuconostoc* strains

菌株	指示菌			
	<i>E. coli</i> ATCC25922	<i>S. aureus</i> ATCC25923	<i>L. sakei</i>	<i>L. plantarum</i>
AP7	++++	+++	++	++
LPC-1	+++	+++	+	++
JD3-3	+++	+++	+	-
FYF-1	+++	-	+	+
FYF-3	+++	++	-	-
STJ-2	+++	++	-	-
G26	+++	-	++	+
L-1	+++	-	++	-

注:“-”表示无抑菌作用或抑菌作用不明显,表3、表5同;抑菌直径: +< 15 mm; ++15~25 mm; +++25~35 mm; ++++>35 mm。

### 2.2 肠膜明串珠菌抑菌谱分析

2.2.1 酸作用的排除 由表 3 可知,当 pH 为 5.0 时,发酵上清浓缩液对 4 种指示菌均有明显的抑菌效果,但用乳酸、乙酸、盐酸分别调节 MRS 肉汤 pH 为 5.0 时,对 4 种指示菌均无抑菌效果,这说明上清浓缩液里对 4 种指示菌的抑菌作用不是酸作用的结果,而是其他物质。

表 3 发酵上清浓缩液排酸实验

Table 3 Acid elimination test of culture supernatant concentrate

不同处理方式	抑菌圈直径(mm)			
	<i>E. coli</i> ATCC25922	<i>S. aureus</i> ATCC25923	<i>L. sakei</i>	<i>L. plantarum</i>
pH5.0				
上清浓缩液	14.16±0.41	13.07±0.91	11.67±0.44	11.18±1.26
乳酸	-	-	-	-
乙酸	-	-	-	-
盐酸	-	-	-	-

注:牛津杯直径为 10 mm,实验所测抑菌圈直径包含牛津杯直径,表4~表6同。

2.2.2 酶敏感性 表 4、图 1 显示,AP7 发酵上清浓缩液加入过氧化氢酶处理后,AP7 对 *E. coli* ATCC 25922、*S. aureus* ATCC25923、*L. sakei* 和 *L. plantarum* 的抑菌圈直径略有下降,但变化不显著( $P>0.05$ ),说明 AP7 发酵上清液浓缩液中的过氧化氢不是主要的

抑菌物质,还有其他物质对指示菌起到抑制作用。用蛋白酶 K、胰蛋白酶和胃蛋白酶处理 AP7 的上清浓缩液后,观察到菌株上清液对 *E. coli* ATCC25922、*S. aureus* ATCC25923、*L. sakei* 和 *L. plantarum* 产生的抗菌活性极显著或显著降低( $P<0.01$  或  $P<0.05$ ),表明 AP7 产生的细菌素对蛋白酶敏感,由此推测 AP7 上清液浓缩液中包含蛋白质或者肽类物质。

表 4 不同酶处理对发酵上清浓缩液的抑菌活性影响

Table 4 Effects of different enzyme treatment on the antibacterial activity of culture supernatant concentrate

酶处理	抑菌圈直径(mm)			
	<i>E. coli</i> ATCC25922	<i>S. aureus</i> ATCC25923	<i>L. sakei</i>	<i>L. plantarum</i>
未处理浓缩液	22.93±0.83	22.04±0.61	17.37±0.27	17.30±0.35
过氧化氢酶	21.66±0.61	20.87±0.76	16.93±0.48	17.02±0.16
蛋白酶K	17.73±0.73**	16.69±0.33**	14.03±0.54**	14.92±0.65**
胰蛋白酶	17.29±0.74**	16.78±0.44**	15.22±0.31**	14.20±0.05**
胃蛋白酶	20.73±0.51*	15.63±0.89**	15.37±0.66**	15.10±0.55**

注:同列“\*”表示相对于未处理浓缩液,抑菌圈有显著性差异( $P<0.05$ ),“\*\*”表示差异极显著( $P<0.01$ );表5~表6同。

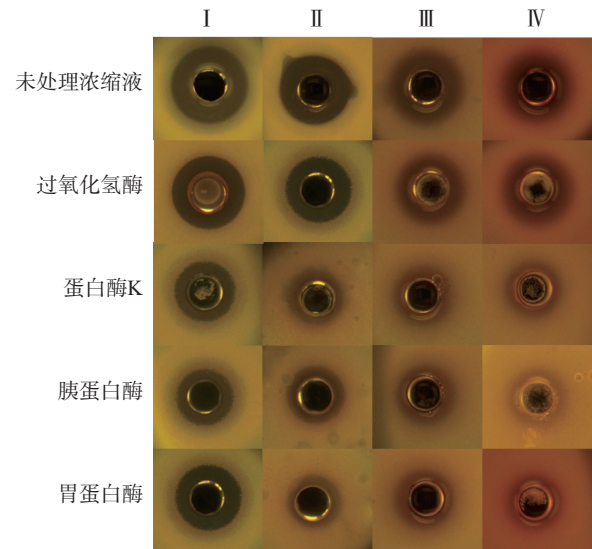


图 1 不同酶处理对发酵上清浓缩液的抑菌效果影响

Fig.1 Effects of different enzyme treatment on the antibacterial effect of culture supernatant concentrate

注: I 指示菌为 *E. coli* ATCC25922; II 指示菌为 *S. aureus* ATCC25923; III 指示菌为 *L. sakei*; IV 指示菌为 *L. plantarum*; 图 2~图 3 同。

2.2.3 酸稳定性 由表 5、图 2 可知,对照组为 AP7 的原始未处理发酵浓缩液, pH 为 3.85。pH 为 2.0 和 3.0 时,AP7 对 4 种指示菌的抑菌活性都显著或极显著提高( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ),这可能是细菌素与酸协同作用的结果<sup>[19]</sup>。pH5.0 与原始发酵浓缩液 (pH3.85)相比,抑菌活性显著或极显著降低( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ),pH 大于 6.0 以后抑菌活性消失,说明该菌株所产的细菌素在酸性条件下活性较强。

2.2.4 热稳定性 经不同温度处理后,发酵上清浓缩液抑菌效果如表 6、图 3 所示。AP7 发酵上清浓缩

表5 不同pH对发酵上清浓缩液的抑菌活性影响

Table 5 Effects of different pH conditions on the antibacterial activity of culture supernatant concentrate

pH	抑菌圈直径(mm)			
	<i>E. coli</i> ATCC25922	<i>S. aureus</i> ATCC25923	<i>L. sakei</i>	<i>L. plantarum</i>
3.85(未处理浓缩液)	22.93±0.83	22.04±0.61	17.37±0.27	17.30±0.35
2.0	25.02±0.41*	27.19±0.81**	22.06±0.10**	20.02±0.53**
3.0	23.96±0.73*	24.25±0.33*	21.38±0.54**	18.22±0.18**
5.0	14.16±0.41**	13.07±0.91*	11.67±0.44**	11.18±1.26**
6.0	-	-	-	-
7.0	-	-	-	-

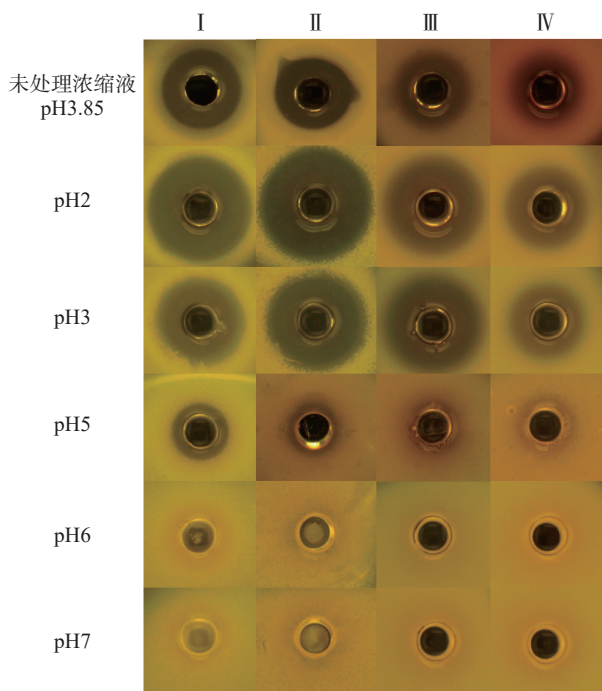


图2 不同pH对发酵上清浓缩液的抑菌效果影响

Fig.2 Effects of different pH conditions on the antibacterial effect of culture supernatant concentrate

液经 60 和 80 °C 高温处理 20 min 后,对 4 种指示菌的抑菌活性无明显影响,抑菌圈直径与未处理浓缩液相比无显著差异( $P>0.05$ ); 100 °C 高温处理 20 min,对 *E. coli* ATCC25922 的抑菌能力显著下降( $P<0.05$ ),但对 *S. aureus* ATCC25923、*L. sakei* 和 *L. plantarum* 抑制活性几乎无影响,菌株 AP7 所产抗菌活性物质能在较宽的温度范围保持较强的抗菌活性,说明 AP7 所产生的细菌素具有良好的热稳定性。

表6 高温处理对发酵上清浓缩液抑菌活性的影响

Table 6 Effects of high temperature treatment on the antibacterial activity of culture supernatant concentrate

温度(°C)	抑菌圈直径(mm)			
	<i>E. coli</i> ATCC25922	<i>S. aureus</i> ATCC25923	<i>L. sakei</i>	<i>L. plantarum</i>
室温(未处理浓缩液)	22.93±0.83	22.04±0.61	17.37±0.27	17.30±0.35
60	22.75±0.25	21.83±0.74	17.84±0.14	17.22±0.59
80	22.35±0.84	21.83±0.47	16.77±0.56	17.10±0.47
100	20.33±0.26*	21.13±0.76	17.32±0.36	16.58±0.87

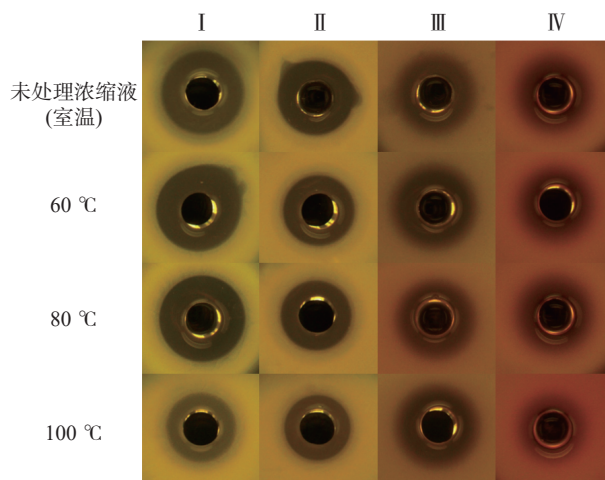


图3 高温处理对发酵上清浓缩液抑菌效果的影响

Fig.3 Effects of high temperature treatment on the antibacterial effect of culture supernatant concentrate

### 2.3 细菌素的分子量与原位抑菌活性

如图4所示,通过 Tricine-SDS-PAGE 电泳显示清晰良好的条带,分子质量范围在 6.51~14.4 kDa 内,凝胶原位活性检测和电泳条带相对应位置处出现明显的指示菌抑菌带,表明得到的条带为小分子肽类细菌素,可初步确定 AP7 产生的抑菌物质为细菌素。

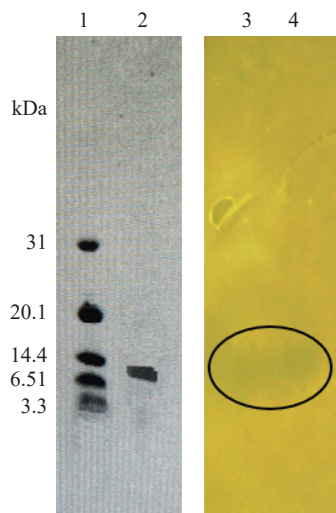


图4 细菌素的 Tricine-SDS-PAGE 电泳图

Fig.4 Tricine-SDS-PAGE electrophoresis of bacteriocin  
注: 1: Marker; 2: 经过染色的样品谱带; 3~4: 凝胶原位检测样品条带。

### 2.4 肠膜明串珠菌 AP7 全基因组分析

分析 *Ln. mesenteroides* AP7 全基因组测序 (NCBI 登录号: JAVJJA000000000) 结果发现,菌株 AP7 全基因组(0 gaps)由 1 个染色体(1948310 bp)和 2 条质粒(37366 和 20698 bp)组成,GC 含量 37.7%; 预测得到 1979 个编码基因,总长度达 1778910 bp,平均长度 898 bp; 非编码区 rRNA 和 tRNA 的数量分别为 12 和 71。

使用 GO、KEGG、NR 等数据库对菌株 AP7 基因组进行注释(图5)。其中,GO 数据库注释的基因

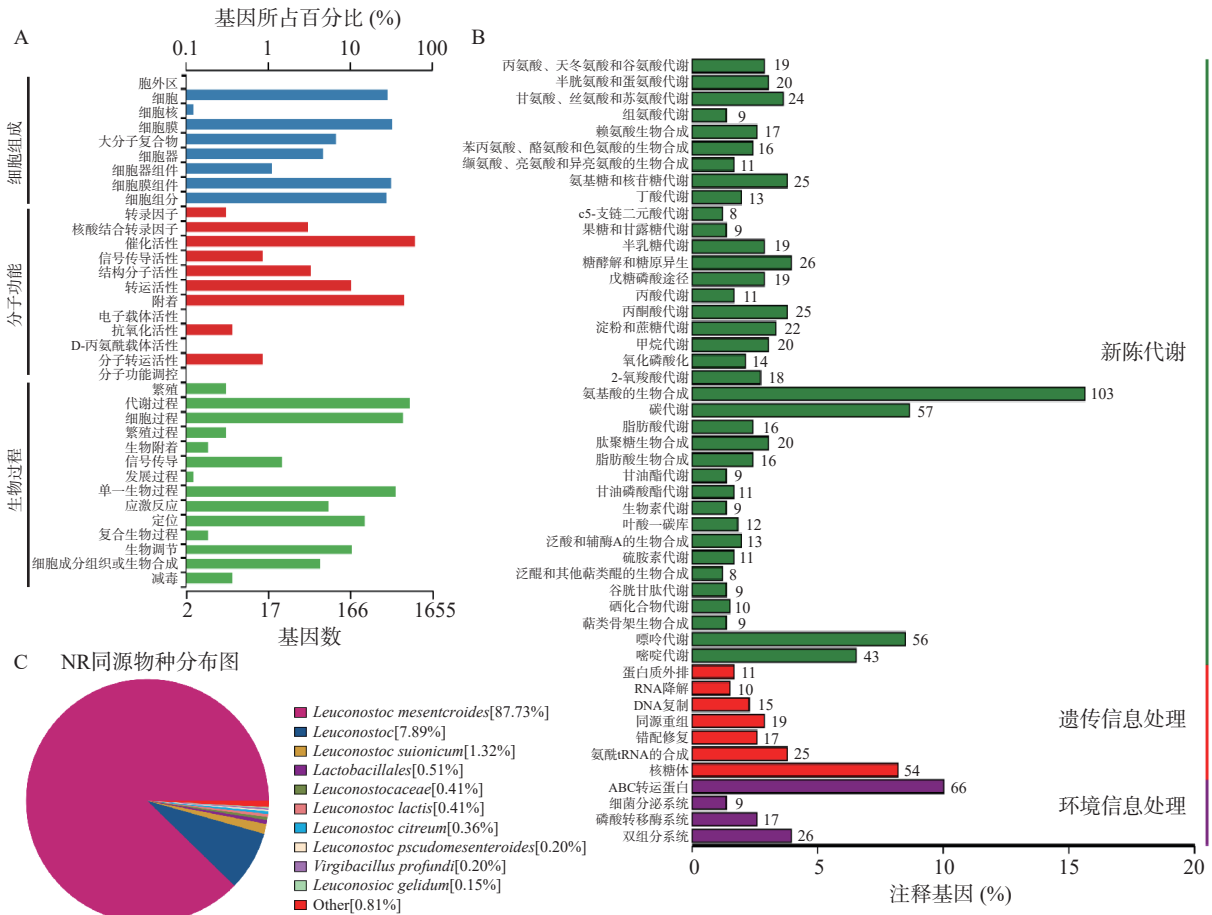


图 5 肠膜明串珠菌 AP7 基因注释图

Fig.5 Gene annotation map of *Ln. mesenteroides* AP7

注: A: GO 功能分类; B: KEGG 功能分类; C: NR 注释图。

有 1655 个, 占总注释基因的 83.6%, 主要分为细胞组成、分子功能和生物过程 3 大类, 和转运相关的基因有 166 个; KEGG 数据库注释的基因有 1129 个, 占总注释基因的 57.0%, 分为 3 大部分, 新陈代谢 (Metabolism, 757 个基因)、遗传信息处理 (Genetic information processing, 151 个基因)、环境信息处理 (Environmental information processing, 118 个基因), 与 ABC 转运蛋白相关的基因 66 个。NR 数据库注释的基因有 1965 个, 占总注释基因的 99.3%, 含有 9 个与细菌素相关编码基因, 大部分与 II 类细菌素相关 (见表 7), AP7 中存在已经报道的有关细菌素的生

表 7 肠膜明串珠菌 AP7 潜在的细菌素相关基因

Table 7 Potential bacteriocin related genes of *Ln. mesenteroides* AP7

基因编号	基因功能描述	基因位置
GE000050	细菌素	57750~57920
GE000064	细菌素分泌辅助蛋白	70094~71443
GE000066	II b类细菌素两肽之一-Lactobin A	73839~74015
GE000067	II b类细菌素两肽之一-Lactobin A	74046~74207
GE000069	II b类细菌素两肽之一-Lactobin A	74666~74803
GE000070	II b类细菌素两肽之一-Lactobin A	74818~74997
GE000071	II b类细菌素两肽之一-Lactobin A	75159~75335
GE001723	肠球菌素A免疫蛋白	1765524~1765910
GE001819	细菌素免疫蛋白	1862806~1863093

物合成基因, 且一致性比对结果中, 除与肠球菌素 A 的部分合成基因 *entA* 的一致性为 98.44% 外, 其余均为 100%, 一致性很高。上述结果表明, AP7 存在细菌素生物合成基因, 其代谢产物中很有可能存在对应的抗菌物质。

### 2.5 肠膜明串珠菌 AP7 的潜在细菌素基因簇

通过 BAGEL4 数据库挖掘菌株合成细菌素的种类及相关基因的位置。结果显示 *Ln. mesenteroides* AP7 染色体有 1 个热点区域 (表 8), 以 Enterocin\_X\_chain\_beta 细菌素为核心的基因簇 (图 6)。Enterocin\_X\_chain\_beta 基因簇共有 19 个 ORF (Open reading frame), 核心肽为 Enterocin\_X\_chain\_beta, 氨基酸序列为 MEKLSEQELAKVSGGFLLPIVGP-IIAGGATYVAKDAWNHLDQIRSGWRKAGNSKW, 序列与来源于 *Ln. mesenteroides* str. KFRI-Mg 的 bacteriocin 序列 (AHF 18265.1) 有 100% 匹配度。在编码细菌素基因的下游, 存在 2 种编码 ABC 转运蛋白的基因, ABC 转运蛋白是细菌素合成的核心蛋白<sup>[20]</sup>。

表 8 *Ln. mesenteroides* AP7 细菌素合成基因分析

Table 8 Bacteriocin synthesis gene analysis of *Ln. mesenteroides* AP7

AOI	Start	End	Class
Conting00001.0.AOI 01	47756	67906	97.2; Enterocin_X_chain_beta

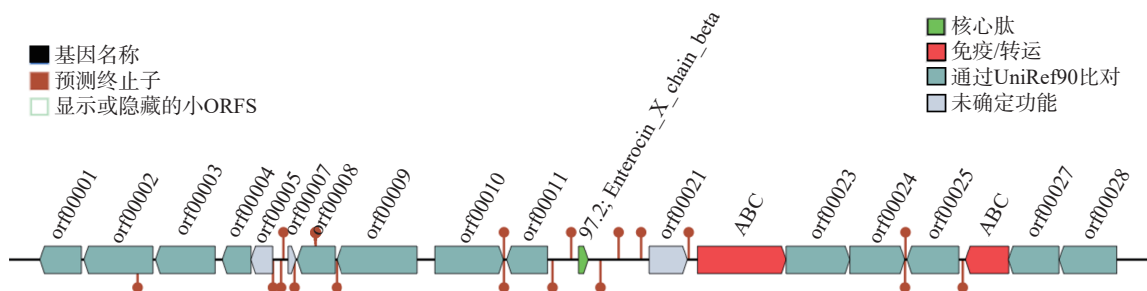


图6 AP7的Enterocin\_X\_chain\_beta基因簇  
Fig.6 Enterocin\_X\_chain\_beta gene cluster of AP7

### 2.6 Enterocin\_X\_chain\_beta 的结构预测

通过 ExPASy 分析 AP7 所产 Enterocin\_X\_chain\_beta 的一级结构,此抗菌肽有 56 个氨基酸组成,分子式为  $C_{277}H_{434}N_{76}O_{77}S_1$ , 分子质量为 6093.02 Da, 理论等电点(PI)为 9.30, 带负电残基数(Asp+Glu)为 5, 带正电荷残基数(Arg+Lys)为 7, 脂肪系数 88.93, 亲水系数-0.243, 不稳定系数为 34.58, 小于 40, 归为稳定蛋白, 良好的稳定性有助于抗菌肽的加工和保存<sup>[21]</sup>。由图 7 可知, Enterocin\_X\_chain\_beta 跨膜螺旋中氨基酸残基数为 21.94209, 存在 1 个预测跨膜区, 肽链一端在膜内, 一端在膜外, N 端在细胞膜内的可能性为 0.89344。

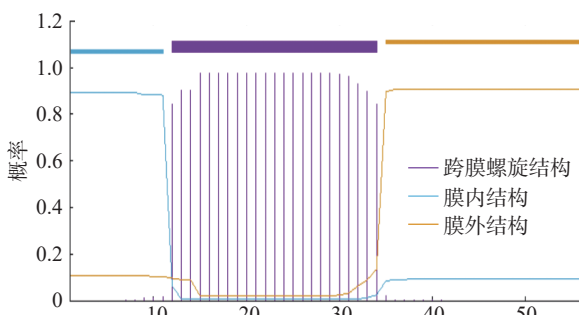


图7 Enterocin\_X\_chain\_beta 跨膜螺旋预测分析  
Fig.7 Prediction of transmembrane helices of Enterocin\_X\_chain\_beta

如图 8 所示, Enterocin\_X\_chain\_beta 二级结构以  $\alpha$ -螺旋为主,  $\alpha$ -螺旋、延伸链、 $\beta$ -转角、无规则卷曲分别由 29 个、7 个、6 个、14 个氨基酸参与形成。  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -转角比例之和为 62.5%。二级结构中  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -转角比例越高蛋白质稳定性越好, 说明

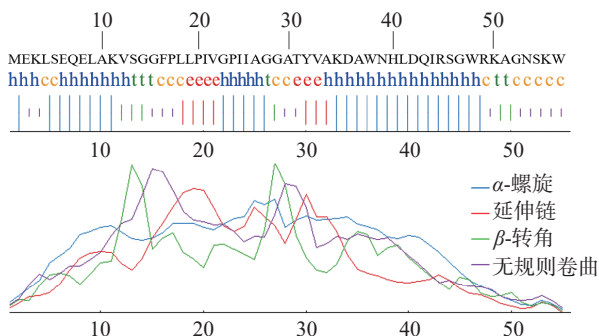


图8 Enterocin\_X\_chain\_beta 的二级结构  
Fig.8 Secondary structure of Enterocin\_X\_chain\_beta

Enterocin\_X\_chain\_beta 具有较好的稳定性。通过 SWISS-MODEL 预测 Enterocin\_X\_chain\_beta 三级结构,以 A0A5M8XC73.1.A 为模板建模,两者序列相似度达 100%, 主要由两端松散肽链和中间  $\alpha$ -螺旋构成。

### 3 讨论

发酵蔬菜具有较长的保存期, 乳酸菌菌种对蔬菜发酵过程和产品保藏性具有重要影响, 但发酵蔬菜来源的肠膜明串珠产细菌素的报道不多。本研究从云南传统发酵蔬菜中筛选出一株具有高抑菌活性的肠膜明串珠菌 AP7, 对食源性病原菌(*E. coli* ATCC 25922 和 *S. aureus* ATCC25923)和引起泡菜过酸菌(*L. sakei* 和 *L. plantarum*)都具有较好的抑菌效果, 具有广谱抑菌特性。在排除有机酸、 $H_2O_2$  的干扰和经蛋白酶处理后, 初步确定 AP7 发酵上清液中的抑菌物质为蛋白质或者肽类物质。TODOROV 等<sup>[22]</sup> 筛选得到一株 *Ln. mesenteroides*, 对枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、几种乳酸杆菌、乳酸乳球菌乳脂亚种(*Lactis subsp. cremoris*)、李斯特菌(*Listeria innocua*)、单核增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)、戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*)、*S. aureus* 和嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)的生长均有抑制作用, 证实其抑制作用是由细菌素引起的, 用硫酸铵沉淀法回收得到一种单肽细菌素 mesentericin ST99。ERKAYA 等<sup>[23]</sup> 从香肠中筛选出 *Ln. mesenteroides* 对肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、痢疾杆菌(*Shigella dysenteriae*)和 *E. coli* O157:H7 有明显的抑制作用, 利用特异性 PCR 检测到菌株携带产细菌素 mecentericin 的基因。

AP7 所产生的细菌素在酸性条件下能保持较好的抗菌能力, 随 pH 的升高, 抑菌能力减弱至消失, AP7 更适合在酸或弱酸条件下使用, 与 LÜ 等<sup>[24]</sup> 报道的细菌素在 pH2.5~5.5 间较稳定结果一致; 高兆建等<sup>[25]</sup> 研究发酵乳杆菌所产的细菌素 BLF52 在 pH7.0 以下的酸性范围抑菌效果更好, 可能是因为弱酸体系有助于蛋白吸附在靶细胞上, 高 pH 会改变乳酸菌素的蛋白结构<sup>[18]</sup>。AP7 菌株产生的细菌素在 60、80 和 100 °C 条件下处理 20 min, 显示出良好的热稳定性, 明串珠菌株产生抗李斯特菌/乳酸菌的 II 类细菌

素<sup>[26]</sup>, II 类细菌素分子量小于 10 kDa, 热稳定好<sup>[27]</sup>。王冬梅等<sup>[28]</sup>从和田地区酸奶中筛选出了 *Ln. mesenteroides* A3, 产生的细菌素具有广谱抑菌活性, 对热稳定, 在酸性条件下表现出很好的抑菌活性; LEE 等<sup>[11]</sup>从泡菜中分离到对 *L. sakei* 有抑制作用的明串珠菌, 进一步研究发现, 抗菌活性物质对蛋白酶敏感, 证实为细菌素, 该细菌素 121 °C 处理 15 min 后抑菌效果极稳定, 在 pH4~7 范围内具有活性。Tricine-SDS-PAGE 电泳条带相应位置出现指示菌抑菌圈, 初步确定 AP7 产生的抑菌物质为细菌素(蛋白类物质)。

QI 等<sup>[29]</sup>对副干酪乳杆菌 (*Lactobacillus paracasei*) WX322 进行了全基因组测序, 得到 1 条染色体和 8 个质粒, 通过 BAGEL4 挖掘编码细菌素的基因序列, 鉴定出 3 个细菌素簇和 7 种细菌素。郭行<sup>[30]</sup>将鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus Rhamnosus*) 全基因组的 2835 个蛋白编码基因应用到 BAGEL4 和 antiSMASH 数据库中进行相似性鉴定, 发现了 5 个细菌素生物合成基因簇, 虽无前导肽, 但具有转运蛋白和免疫蛋白。本研究对 *Ln. mesenteroides* AP7 进行了全基因组测序, 由 1 条染色体和 2 个质粒构成, 基因组全长 1948310 bp, GC 含量 37.7%, 基因组序列完整性高, 将基因组数据与 GO、KEGG 和 NR 等数据库进行功能注释, 从分子生物学的角度探究了该菌株的生物学特性及基因组功能特性, 重点研究了编码细菌素的基因。通过 GO 和 KEGG 注释分析, 分别发现 166 个、66 个 ABC 转运蛋白基因, ABC 转运蛋白可将细菌素释放到细胞外<sup>[31]</sup>。在 NR 数据库中注释到 9 个与细菌素合成相关的基因, 其中 5 个基因编码 II b 类细菌素 Lactobin A, 与温度稳定性实验结果一致。通过 BAGEL4 挖掘编码细菌素的基因序列, 鉴定出 1 个细菌素生物合成基因簇, 为 Enterocin\_X\_chain\_beta 基因簇, 核心肽段为 Enterocin\_X\_chain\_beta, 在线分析 Enterocin\_X\_chain\_beta 的理化性质, 该肽分子质量为 6093.02 Da, 带正电荷, 呈亲水性, 结构稳定的蛋白, 亲水性与二级结构中存在大量的  $\alpha$ -螺旋有关<sup>[31]</sup>; 存在 1 个跨膜螺旋结构, 符合细菌素跨过细胞膜分泌蛋白的特点; 二级结构由  $\alpha$ -螺旋、延伸链、 $\beta$ -转角和无规则卷曲构成, 具备抗菌肽二级结构特点<sup>[32]</sup>; 三级结构预测显示主要由两端松散肽链和中间  $\alpha$ -螺旋构成,  $\alpha$ -螺旋可能是膜渗透和抗菌活性必需的, 并且只有当  $\alpha$ -螺旋抗菌肽序列超过一定长度, 才足以跨越整个细胞膜, 形成通道杀死细菌<sup>[21]</sup>。

#### 4 结论

本研究考察了蔬菜来源明串珠菌的抑菌性能, 以期得到能提高发酵蔬菜品质的菌种。对筛选出肠膜 AP7 的抑菌机制进行初步研究, 证实其产 II 类细菌素。AP7 全基因组中具有多个参与细菌素合成和分泌的关键基因, 从基因角度证实了 AP7 具备合成分泌细菌素的能力。基因组分析结合表型实验研究,

*Ln. mesenteroides* AP7 存在多种细菌素, 抑菌能力强。本研究为了解发酵蔬菜中 *Ln. mesenteroides* 抑菌特性提供了新的视角, 接下来的研究中, 将克隆表达与细菌素合成分泌相关的基因, 分离纯化细菌素, 进一步研究 AP7 产生的细菌素的抑菌机制; 此外, 接种该菌对发酵蔬菜菌群演替和产品品质、安全性保藏性影响有待研究。

© The Author(s) 2024. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

#### 参考文献

- [1] 史巧, 刘毕琴, 汤回花, 等. 发酵蔬菜菌种应用及菌群调控研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(5): 273–281. [SHI Q, LIU B Q, TANG H H, et al. Research progress on the application of starter strains and the regulation of microflora in vegetable fermentation[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(5): 273–281.]
- [2] 陈功, 张其圣, 李恒, 等. 中国泡菜发酵态相对稳定性的研究及应用[J]. 食品与发酵科技, 2020, 56(1): 54–63, 72. [CHEN G, ZHANG Q S, LI H, et al. Research and application of the stable fermentation stage of Chinese Paocai[J]. Food and Fermentation Science & Technology, 2020, 56(1): 54–63, 72.]
- [3] KIM D W, KIM B M, LEE H J, et al. Effects of different salt treatments on the fermentation metabolites and bacterial profiles of kimchi[J]. Journal of Food Science, 2017, 82(5): 1124–1131.
- [4] 陈功, 唐焱, 张其圣, 等. 泡菜浅发酵与冷加工的研究及应用[J]. 食品与发酵科技, 2022, 58(2): 1–8. [CHEN G, TANG Y, ZHANG Q S, et al. Research and application of shallow fermentation and cold processing of Paocai[J]. Food and Fermentation Science & Technology, 2022, 58(2): 1–8.]
- [5] 李院, 魏新元, 王静, 等. 抑制青霉菌乳酸菌的分离、鉴定及抑菌物质分析[J]. 食品科学, 2015, 36(21): 150–155. [LI Y, WEI X Y, WANG J, et al. Isolation and identification of lactic acid bacteria inhibiting *Penicillium* and analysis of their antimicrobial components[J]. Food Science, 2015, 36(21): 150–155.]
- [6] CHANG J Y, CHANG H C. Improvements in the quality and shelf life of kimchi by fermentation with the induced bacteriocin-producing strain, *Leuconostoc citreum* GJ7 as a starter[J]. Journal of Food Science, 2010, 75(2): M103–M110.
- [7] CHANG J Y, CHANG H C. Growth inhibition of foodborne pathogens by kimchi prepared with bacteriocin-producing starter culture[J]. Journal of Food Science, 2011, 76(1): M72–M78.
- [8] BAJPAI V K, RATHER I A, MAJUMDER R, et al. Characterization and antibacterial mode of action of lactic acid bacterium *Leuconostoc mesenteroides* HJ69 from kimchi[J]. Journal of Food Biochemistry, 2017, 41(1): e12290.
- [9] MOON S H, KIM C R, CHANG H C. Heterofermentative lactic acid bacteria as a starter culture to control kimchi fermentation[J]. LWT-Food Science and Technology, 2018, 88: 181–188.
- [10] CHOI H J, KIM Y J, LEE N R, et al. Selection of lactic acid bacteria with antibacterial activity for extension of kimchi shelf-life[J]. Journal of the Korean Society of Food Science Nutrition, 2014, 43(2): 328–332.
- [11] LEE K H, LEE J H. Characterization of the bacteriocin produced by a *Leuconostoc mesenteroides* strain inhibiting the growth

- of *Lactobacillus sakei*[J]. *Microbiology Biotechnology Letters*, 2011, 39(4): 390–396.
- [ 12 ] JANG J Y, LEE M E, LEE H W, et al. Extending the shelf life of kimchi with *Lactococcus lactis* strain as a starter culture[J]. *Food Science Biotechnology Bioengineering*, 2015, 24(3): 1049–1053.
- [ 13 ] KIM M J, LEE H W, LEE M E, et al. Mixed starter of *Lactococcus lactis* and *Leuconostoc citreum* for extending kimchi shelf-life[J]. *Journal of Microbiology*, 2019, 57(6): 479–484.
- [ 14 ] ES-SBATA I, ELOIRDI S, LAKHLIFI T, et al. Biopreservation of yogurt against fungal spoilage using cell-free supernatant of *Lactiplantibacillus pentosus* 22B and characterization of its antifungal compounds[J]. *Food Biotechnology*, 2021, 35(4): 327–348.
- [ 15 ] 吕懿超, 李香澳, 王凯博, 等. 乳酸菌作为生物保护菌的抑菌机理及其在食品中应用的研究进展[J]. *食品科学*, 2021(19): 281–290. [ LÜ Y C, LI X A, WANG K B, et al. Antimicrobial mechanism of lactic acid bacteria as biopreservative organisms and their application in food industry: A review[J]. *Food Science*, 2021(19): 281–290. ]
- [ 16 ] 张晓妍, 沙沈菲, 郭丽丹, 等. 一株后生元菌株的抑菌特性研究及其细菌素基因簇的挖掘[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(17): 1–10. [ ZHANG X Y, SHA S F, GUO L D, et al. Antimicrobial properties of a postbiotic strain and gene cluster mining of its bacteriocin[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(17): 1–10. ]
- [ 17 ] OMAR N B, ABRIOUEL H, LUCAS R, et al. Isolation of bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* strains from ben saalga, a traditional fermented gruel from Burkina Faso[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2006, 112(1): 44–50.
- [ 18 ] 王娜, 李慧, 戴伶俐, 等. 产细菌素乳酸菌的筛选与鉴定[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(12): 248–255. [ WANG N, LI H, DAI L L, et al. Screening and identification of bacteriocin-producing lactic acid bacteria[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2020, 20(12): 248–255. ]
- [ 19 ] PASTERIS S E, VERA PINGITORE E, ALE C E, et al. Characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CRL 1584 isolated from a *Lithobates catesbeianus* hatchery[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2014, 30: 1053–1062.
- [ 20 ] JONATHAN I, TIETZ, CHRISTOPHER J, et al. A new genome-mining tool redefines the lasso peptide biosynthetic landscape[J]. *Nature Chemical Biology*, 2017, 13: 470–478.
- [ 21 ] 张婧, 吴影, 古绍彬, 等. 凝结芽孢杆菌 CGMCC 9951 新型抗菌肽的挖掘、表达及活性测定[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(17): 71–78. [ ZHANG J, WU Y, GU S B, et al. Genome mining, expression and activity determination of a novel antimicrobial peptide from *Bacillus coagulans* CGMCC 9951[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2022, 48(17): 71–78. ]
- [ 22 ] TODOROV S D, DICKS L M T. Characterization of mesentericin ST99, a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* ST99 isolated from boza[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2004, 31(7): 323–329.
- [ 23 ] ERKAYA E, GENÇ B, AKBULUT S, et al. Bacteriocin producing bacteria isolated from turkish traditional sausage samples[J]. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 2020, 14(2): 1567–1576.
- [ 24 ] LÜ X, MA H, SUN M, et al. A novel bacteriocin DY4-2 produced by *Lactobacillus plantarum* from cutlassfish and its application as bio-preservative for the control of pseudomonas fluorescens in fresh turbot (*Scophthalmus maximus*) fillets[J]. *Food Control*, 2018; 22–31.
- [ 25 ] 高兆建, 张艳秋, 宋玉林, 等. 筛选自泡菜的发酵乳杆菌细菌素纯化及抑菌特性分析[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(3): 201–207. [ GAO Z J, ZHANG Y Q, SONG Y L, et al. Purification and antibacterial properties of bacteriocin produced by *Lactobacillus fermentum* isolated from pickled vegetables[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(3): 201–207. ]
- [ 26 ] PAPATHANASOPOULOS M A, KRIER F, REVOL-JUNELLES A M, et al. Multiple bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* TA33a and other *Leuconostoc/Weissella* strains[J]. *Current Microbiology*, 1997, 35(6): 331–335.
- [ 27 ] KLAENHAMMER T R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 1993, 12(1–3): 39–85.
- [ 28 ] 王东梅, 刘飞, 马翠云, 等. 和田地区酸奶中产细菌素乳酸菌的筛选及细菌素特性的研究[J]. *食品科技*, 2012, 37(7): 26–29. [ WANG D M, LIU F, MA C Y, et al. Screening of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from Hetian yoghurt and characterization of the bacteriocin[J]. *Food Science and Technology*, 2012, 37(7): 26–29. ]
- [ 29 ] QI T, WANG S, DENG L, et al. Controlling pepper soft rot by *Lactobacillus paracasei* WX322 and identification of multiple bacteriocins by complete genome sequencing[J]. *Food Control*, 2021, 121(1): 107629.
- [ 30 ] 郭行. 鼠李糖乳杆菌 LS-8 中新型细菌素的挖掘及抑菌机制的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2020. [ GUO X. Mining novel bacteriocins from *Lactobacillus rhamnosus* LS-8 and study of their antibacterial mechanism[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2020. ]
- [ 31 ] 汪立平, 贾爽, 张晓妍, 等. 泡菜源植物乳杆菌 HY41 产细菌素性质及其基因簇挖掘[J]. *东北农业大学学报*, 2022, 53(6): 76–87. [ WANG L P, JIA S, ZHANG X Y, et al. Characteristics of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* HY41 from pickles and its gene cluster mining[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2022, 53(6): 76–87. ]
- [ 32 ] 马佳歌, 于微, 李佳君, 等. 干酪乳杆菌细菌素的抗菌机制分析[J]. *食品科学*, 2018, 39(10): 193–198. [ MA J G, YU W, LI J J, et al. Antibacterial mechanism of bacteriocin from *Lactobacillus casei*[J]. *Food Science*, 2018, 39(10): 193–198. ]