

东北传统大酱中产抗菌物质菌株的筛选及安全性研究

任晓蕾, 鲍捷, 郭宝松, 董亮, 纪超凡, 张素芳*

(大连工业大学食品学院 海洋食品加工与安全控制全国重点实验室 国家海洋食品工程技术研究中心
海洋食品精深加工关键技术省部共建协同创新中心 辽宁大连 116034)

摘要 以东北大酱为原料,分离、鉴定产抗菌物质的微生物菌株,分析其抗菌能力。结果显示,共分离得到 44 株具有抑菌活性的菌株,主要为芽孢杆菌属。通过抑菌谱试验发现,贝莱斯芽孢杆菌 R2 可抑制 6 种食源性致病菌生长,具有抑菌广谱性,并可从中扩增出其编码非核糖体脂肽类物质杆菌霉素 D、丰原素、鞭毛蛋白、伊枯草菌素 A、芽孢菌溶素、枯草菌脂肽和蛋白质类 TasA 的相关基因片段。通过对贝莱斯芽孢杆菌 R2 的功能、表型和安全相关特性的研究,发现菌株贝莱斯芽孢杆菌 R2 菌株不溶血,对 10 种抗生素敏感,并具有蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶和果胶酶活性。本研究为酱类低盐发酵微生物资源的高值化利用提供参考。

关键词 东北大酱; 抑菌活性菌株; 芽孢杆菌; 抗菌物质; 安全性

文章编号 1009-7848(2024)07-0100-11 **DOI**: 10.16429/j.1009-7848.2024.07.010

传统的东北大酱是以大豆为原料,利用环境中微生物经发酵形成的一种调味品^[1],因其独特的风味和营养成分而被广泛食用^[2]。大酱是在露天环境下自然发酵而成,发酵过程较复杂,包含多种微生物的共同作用^[3]。

大酱通常在瓷罐中自然发酵,因发酵条件难以控制,故增加了大酱在发酵过程中被杂菌污染的可能性,而实际上大酱产品很少有杂菌污染的报道,一方面是大酱在高盐环境中,抑制了杂菌的生长^[4];另一方面是传统发酵食品可能蕴含天然产抗菌物质的微生物。目前,对发酵大酱中微生物的研究主要集中在产酶菌株、耐盐菌株、增鲜菌株、降生物胺菌株等,如 Yao 等^[5]对 6 种东北大酱的微生物群落和质量特征进行分析,发现芽孢杆菌属、四球菌属和乳酸菌属为优势菌属,其对农家豆瓣酱发酵过程具有促进作用,并对农家豆瓣酱品质 and 安全性具有较大影响。徐鑫等^[6]从传统农家大酱中筛选出耐盐性优良的菌株为屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)和植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)。潘国杨等^[7]从传统发酵豆酱中分离鉴定出增鲜菌株为嗜盐四联球菌(*Tetragenococcus halophilus*)。赵佳迪等^[8]从豆瓣酱样品中筛选降解

生物胺菌株为乳酸片球菌(*Pediococcus acidilactici*)M-28。董丹等^[9]筛选了对豆瓣风味影响较大的产中性蛋白酶、脂肪酶、纤维素酶、淀粉酶菌株。目前,针对大酱中微生物产抗菌物质菌株的筛选鲜有研究报道。此外,传统的大酱生产是在高盐条件下完成的,高盐不利于人体健康,而低盐可能会导致发酵失败。目前,一些研究人员主要通过接种功能性核心微生物菌群,使有益菌株快速繁殖形成后代,抑制有害微生物的增殖和有害代谢物的积累^[10-12]。然而,微生物菌群在发酵体系中难以控制。筛选到具有病原菌拮抗活性和多功能特性的菌株,是解决上述问题的关键。

本研究对东北大酱中产抗菌物质的菌株进行分离、纯化,采用 16S rDNA 菌株进行种属鉴定。通过抑菌谱得到具有很好抑菌活性的菌株,并对其安全性和产酶功能特性进行测试,评价其可否作为低盐发酵大酱的潜在发酵剂,为低盐发酵酱类食品生产提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 材料与培养基

东北农家大酱,来源于辽宁省抚顺市。

蛋白酶筛选培养基(g/L):脱脂奶粉 10.0,葡萄糖 0.5,NaCl 5.0,KH₂PO₄ 0.5,琼脂 20.0,pH 7.5。

淀粉酶筛选培养基(g/L):蛋白胨 10.0,酵母

收稿日期: 2023-07-08

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32072185)

第一作者: 任晓蕾,女,硕士生

通信作者: 张素芳 E-mail: zhangsf@dlpu.edu.cn

粉 5.0,NaCl 5.0,K₂HPO₄ 3.0, 可溶性淀粉 5.0,琼脂 20.0,pH 7.2~7.4。

果胶酶筛选培养基 (g/L): 果胶 5.0,MgSO₄·7H₂O 2.0,K₂HPO₄ 1.0,NH₄Cl 0.4,FeSO₄ 0.01, 琼脂 15.0,pH 7.2~7.4。

纤维素酶筛选培养基(g/L): 羧甲基纤维素钠 2.0,(NH₄)₂SO₄ 2.0,MgSO₄·7H₂O 0.5,KH₂PO₄ 1.0,NaCl 0.5,琼脂 15,pH 7.0。

指示菌如表 1 所示。

表 1 试验所用指示菌

Table 1 Indicator strains of experiments

序号	菌株名称	菌株编号	来源
1	单核细胞增生李斯特氏菌(<i>Listeria monocytogenes</i>)	CICC 21635	中国工业微生物菌种保藏中心
2	大肠埃希氏菌(<i>Escherichia coli</i>)	CICC 23657	
3	金黄色葡萄球菌(<i>Staphylococcus aureus</i>)	CICC 23656	
4	铜绿假单胞菌(<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	CICC 21636	
5	粪肠球菌(<i>Enterococcus faecalis</i>)	CICC 23658	
6	伤寒沙门氏菌(<i>Salmonella typhi</i>)	CICC 10871	
7	福氏志贺氏菌(<i>Shigella flexneri</i>)	CICC 10865	

1.2 试剂

培养基,青岛海博生物技术有限公司;Tris、蛋白酶 K、50×TAE 缓冲液、RNase A(10 mg/mL)、TE 缓冲液、Tris 饱和酚溶液,生工生物工程(上海)股份有限公司;Taq 酶,南京诺唯赞生物科技股份有限公司;DL 2000 Marker,宝生物工程(大连)有限公司。

1.3 仪器与设备

光学显微镜,徕卡;DNA 浓度测定仪,Thermo;PCR 仪,美国伯乐公司;水平电泳仪,北京六一生物科技有限公司;凝胶成像仪,以色列 DNR 公司;全自动超高清菌落计数器,法国 Interscience 公司。

1.4 试验方法

1.4.1 细菌分离 细菌分离过程如图 1 所示,取 5 g 大酱样品置于灭菌袋中,加入 45 mL 灭菌水,利用均质机充分拍打混匀。待残留酱汁沉淀 10 min 后,取 1 μL 上清液进行梯度稀释,稀释梯度为 10⁻⁴,10⁻⁵,10⁻⁶。取 200 μL 稀释液于 LB、MRS 和 M17 固体培养基中,涂布后 37 ℃培养 24 h。选取菌落数为 30~300 的平板,挑选单一菌落,划线分离,在培养一定时间后,再次挑选,平板划线纯化,直至得到单一纯种菌落。单菌落于 200 r/min,37 ℃液体培养基,至培养液浑浊,镜检无污染,添加体积分数为 20%的甘油后,冻存于-80 ℃备用。

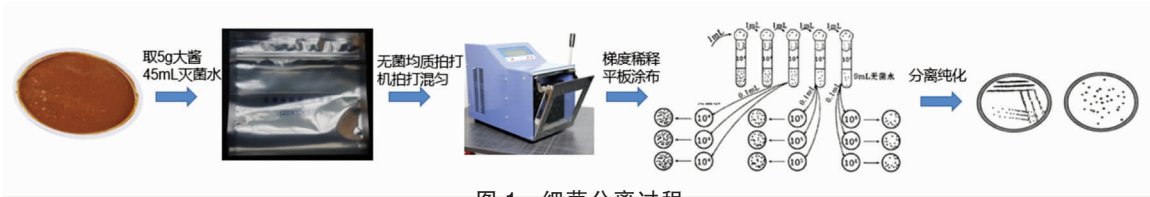


图 1 细菌分离过程

Fig.1 Bacterial isolation process

1.4.2 抑菌活性菌株的筛选 参考文献[13]的方法,采用牛津杯双琼脂扩散法测定分离菌株无细胞上清液的抑菌活性。

1.4.3 形态学鉴定 从菌落大小、形状、边缘、光泽和颜色等方面观察纯化后菌株,并采集图像。取

单菌落于 40×物镜下观察,对菌体的形态进行观察,并采集图像。

1.4.4 分子生物学鉴定 参考文献[14]和[15]试验方法。扩增样品送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,所得测序结果参考文献[16]和

[17]构建系统发育树。

1.4.5 R2 菌株的抑菌活性物质抑菌基因的克隆和鉴定

1.4.5.1 抗菌物质基因 PCR 引物的设计 参考文献[18]~[21],通过 PCR 方法检测抗菌物质的相关合成基因,对杆菌霉素 D(Bacillomycin D)、丰原素(Fengycin)、鞭毛蛋白(Flagellin)、伊枯草菌素 A(Iturin A)、芽孢菌溶素(Bacilysin)、枯草菌脂肽(Surfactin)和蛋白质类 TasA 等抗菌物质的相关合成基因,设计 9 对基因特异性引物序列,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.4.5.2 R2 菌株的抑菌基因的鉴定 PCR 扩增条件:95 ℃预变性 3 min;95 ℃变性 15 s,50 ℃退火 15 s,72 ℃延伸 1 min,共 35 个循环;最后 4 ℃15 min。同 1.4.4 节。将扩增的基因片段进行 1%琼脂糖凝胶电泳,检测扩增得到的基因片段并送测序。

1.4.6 R2 菌株的溶血性 参考文献[21],[22]的试验方法,制备 R2 菌液(约 1×10^8 CFU/mL),在含有 5%脱脂纤维无菌羊血的哥伦比亚平板上划线,于 37 ℃培养 24 h,观察透明圈的情况,做 3 次平行。

1.4.7 R2 菌株的抗生素敏感性 使用纸片扩散法^[22]对 R2 的抗生素敏感性谱进行表征。

1.4.8 R2 菌株的产酶性 粗酶液制备:将接种量为 2%(体积分数)的 R2 接种于 50 mL LB 肉汤中,37 ℃,200 r/min 培养 24 h,离心(8 000 r/min,10 min,4 ℃),收集上清液。

采用牛津杯法^[23]验证分离出的细菌是否生产胞外酶,37 ℃静置 24 h,观察水解圈情况。

1.5 数据分析方法

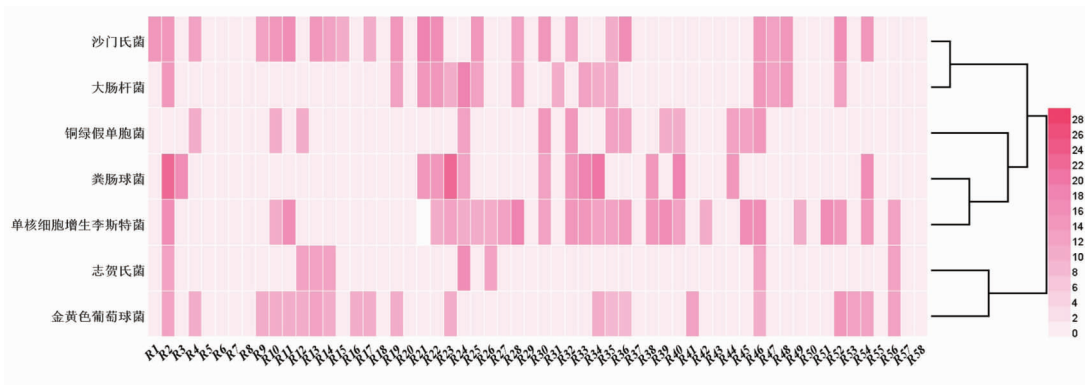
所有试验重复 3 次,结果以“平均值±标准差”表示。使用 SPSS 20.0 软件进行数据分析,使用 Origin 8.5 软件绘制图表。采用独立样本 *t* 检验来确定统计学意义, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 东北大酱微生物抑菌活性的测定

用涂布平板法对大酱样品中分离的微生物进行筛选,共筛选得到 58 个菌落形态差异较大的单菌落,并测定其抑菌活性。以 7 种食源性致病菌(表 1)为指示菌,筛选得到 44 株具有抑菌活性的菌株。其抑菌效果如图 2 所示,其中有 27 株菌株抑制单细胞增生李斯特菌的生长,24 株菌株抑制沙门氏菌的生长,24 株菌株对金黄色葡萄球菌具有一定抑制作用,17 株菌株对大肠杆菌具有一定抑制作用。其中,本研究发现 R2 菌株对大肠杆菌、单核细胞增生李斯特菌、金黄色葡萄球菌、粪肠球菌、沙门氏菌和志贺氏菌均具有一定的抑制作用。其中,R2 对粪肠球菌的抑制作用最为明显,它的抑菌圈直径达到了 23.1 mm。以上结果表明,R2 菌株具有抑菌的广谱性。

Lee 等^[24]从韩国传统发酵豆制品中分离到一株具有抗菌活性的野生型微生物,能抑制多种革兰氏阳性菌的生长;Jeon 等^[25]从韩国豆酱中筛选了具有抗菌活性的芽孢杆菌,能够抑制大肠杆菌和金黄色葡萄球菌等食源性致病菌的生长;本研究筛选的 R2 菌株,食源性致病菌有抑菌活性,因此,R2 有作为低盐发酵东北大酱潜在发酵剂的可能。



注:颜色强度对应抑菌圈直径从大(红色)到小(白色),单位为 mm。

图 2 分离菌株的抑菌谱

Fig.2 Bacterial inhibition profile of isolated strains

2.2 菌株形态学鉴定

以中国东北大酱为原料，检测其对常见食源性致病菌的抑菌活性，共分离到 44 株细菌。这些

菌株平板纯化后获得纯菌落，它们在固体培养基上呈现典型芽孢杆菌形态。图 3 展示部分菌株的平板图和显微镜检查图。

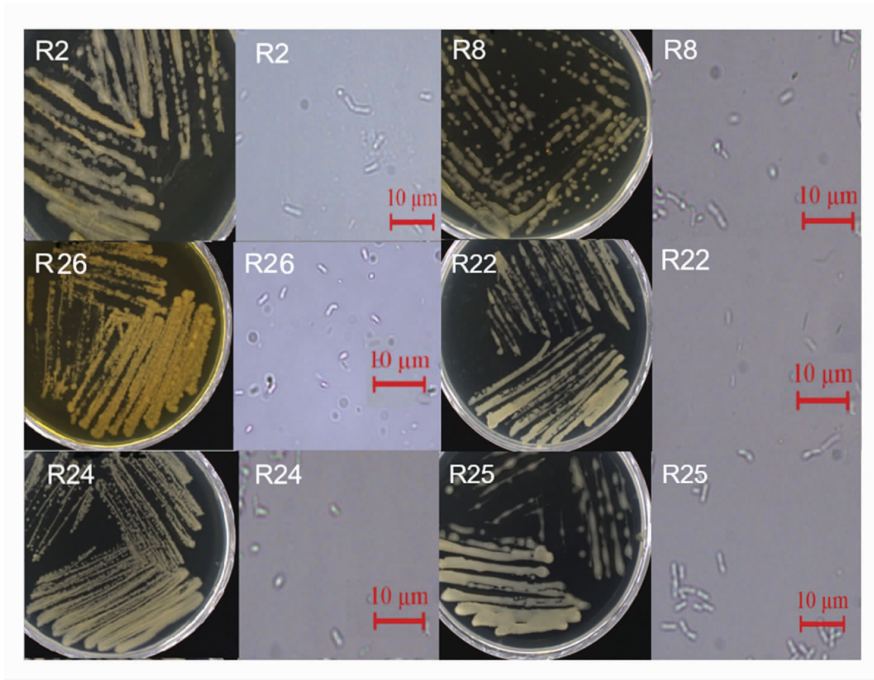


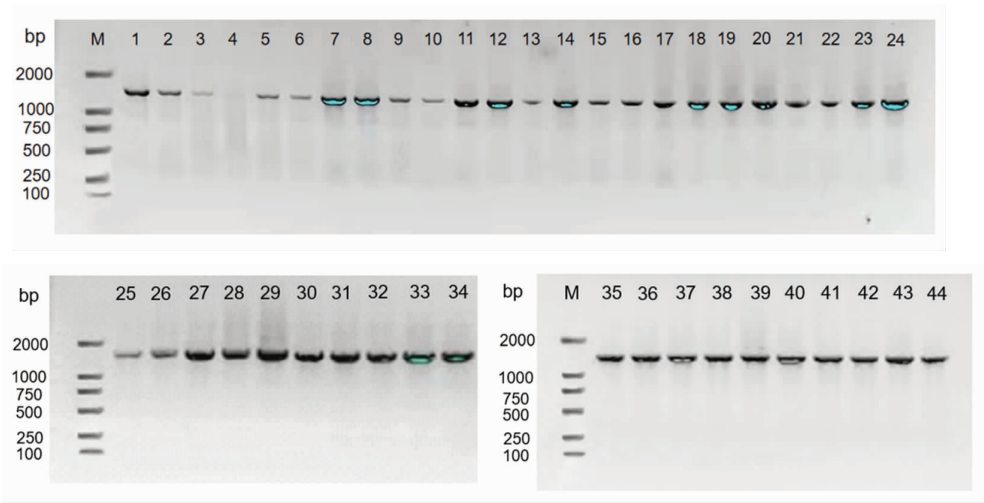
图 3 部分分离菌株形态学及细菌镜检(40×)观察

Fig.3 Morphology and bacterial microscopy (40×) observation of some isolates

2.3 菌株的分子学鉴定

菌株分子学鉴定结果如图 4 所示，所有细菌

均有 1 500 bp 左右的清晰条带。



注：M；DL 2000 DNA Marker；泳道 1~4；R1~R4；泳道 5~13；R9~R17；泳道 14；R19；泳道 15~29；R21~R36；泳道 30~34；R38~R42；泳道 35~39；R44~R49；泳道 40~43；R51~R53；泳道 44；R56。

图 4 分离菌株 16S rDNA PCR 产物电泳图

Fig.4 Electrophoresis of 16S rDNA PCR products of isolated strains

利用 BLAST 分析菌株的测序结果如表 2 所示,44 株菌均属于芽孢杆菌属。其中,分离到 16 株贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*),占总数的 36.36%,是东北大酱中分离到最多的菌种;其次是解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)有 13 株,占总数的 29.54%;枯草芽孢杆菌(*Bacillus sp.*)有 9 株,占总数的 20.45%;暹罗芽孢杆菌(*Bacillus siamensis*)有 3 株,占总数的 6.82%;最后是短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)、沙福芽孢杆菌(*Bacillus*

safensis)、漳州芽胞杆菌(*Bacillus zhangzhouensis*)各有 1 株。

芽孢杆菌是大酱中的优势发酵细菌,是从酱曲的制作到大酱发酵成熟过程中都参与的主要细菌,对大酱的品质起着至关重要的作用^[26]。研究表明,芽孢杆菌产生至少 20 种不同类型的抗菌物,其中主要是脂肽和蛋白质类化合物。因此,从大酱中筛选的产抗菌物质的菌株主要为芽孢杆菌。

表 2 分离菌株 16S rDNA 序列结果
Table 2 16S rDNA sequence results of isolated strains

菌株编号	鉴定结果	同源性/%	Genbank
R1	贝莱斯芽孢杆菌(<i>Bacillus velezensis</i>)	99	MT271915.1
R2	贝莱斯芽孢杆菌(<i>Bacillus velezensis</i>)	99	MK367782.1
R3	枯草芽孢杆菌(<i>Bacillus subtilis</i>)	99	KU159190.1
R8	解淀粉芽孢杆菌(<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>)	98	MT611666.1
R9	贝莱斯芽孢杆菌(<i>Bacillus velezensis</i>)	100	KY887762.1
R10	解淀粉芽孢杆菌(<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>)	94	KF803274.1
R11	解淀粉芽孢杆菌(<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>)	99	AB813716.1
R12	枯草芽孢杆菌(<i>Bacillus subtilis</i>)	98	MN726441.1
R13	解淀粉芽孢杆菌(<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>)	99	AB813716.1
R14	贝莱斯芽孢杆菌(<i>Bacillus velezensis</i>)	99	KY887762.1
R15	解淀粉芽孢杆菌(<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>)	98	MT950335.1
R16	枯草芽孢杆菌(<i>Bacillus subtilis</i>)	99	MT950335.1
R17	贝莱斯芽孢杆菌(<i>Bacillus velezensis</i>)	99	MT103089.1
R19	暹罗芽孢杆菌(<i>Bacillus siamensis</i>)	99	MN371812.1
R21	解淀粉芽孢杆菌(<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>)	98	MK521053.1
R22	暹罗芽孢杆菌(<i>Bacillus siamensis</i>)	97	MN371812.1
R23	枯草芽孢杆菌(<i>Bacillus subtilis</i>)	99	KU230011.1
R24	短小芽孢杆菌(<i>Bacillus pumilus</i>)	97	KM265461.1
R25	漳州芽孢杆菌(<i>Bacillus zhangzhouensis</i>)	98	MG937684.1
R26	枯草芽孢杆菌(<i>Bacillus subtilis</i>)	98	KU904297.1
R27	解淀粉芽孢杆菌(<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>)	99	AB813716.1
R28	解淀粉芽孢杆菌(<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>)	99	JN661699.1
R30	<i>Bacillus safensis</i>	98	KX023225.1
R31	枯草芽孢杆菌(<i>Bacillus subtilis</i>)	98	KU230011.1
R32	暹罗芽孢杆菌(<i>Bacillus siamensis</i>)	98	KX129844.1
R33	贝莱斯芽孢杆菌(<i>Bacillus velezensis</i>)	99	MT611650.1
R34	贝莱斯芽孢杆菌(<i>Bacillus velezensis</i>)	98	MW314755.1
R35	解淀粉芽孢杆菌(<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>)	98	JX475120.1
R36	枯草芽孢杆菌(<i>Bacillus subtilis</i>)	99	CP053102.1
R38	漳州芽孢杆菌(<i>Bacillus zhangzhouensis</i>)	99	MG937684.1
R39	解淀粉芽孢杆菌(<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>)	99	AB813716.1
R40	贝莱斯芽孢杆菌(<i>Bacillus velezensis</i>)	99	MW363359.1
R41	贝莱斯芽孢杆菌(<i>Bacillus velezensis</i>)	97	MT626060.1
R42	解淀粉芽孢杆菌(<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>)	99	GU568203.1

(续表 2)

菌株编号	鉴定结果	同源性/%	Genbank
R44	贝莱斯芽孢杆菌 (<i>Bacillus velezensis</i>)	99	MW363359.1
R45	贝莱斯芽孢杆菌 (<i>Bacillus velezensis</i>)	99	MK367782.1
R46	贝莱斯芽孢杆菌 (<i>Bacillus velezensis</i>)	100	MK130897.1
R47	贝莱斯芽孢杆菌 (<i>Bacillus velezensis</i>)	97	MN100588.1
R48	贝莱斯芽孢杆菌 (<i>Bacillus velezensis</i>)	99	MT081105.1
R49	枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)	98	EU883786.1
R51	解淀粉芽孢杆菌 (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>)	98	AB813716.1
R52	贝莱斯芽孢杆菌 (<i>Bacillus velezensis</i>)	100	MG996871.1
R53	解淀粉芽孢杆菌 (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>)	98	MN176421.1
R54	贝莱斯芽孢杆菌 (<i>Bacillus velezensis</i>)	98	MK367782.1
R56	枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)	99	MN704472.1

测序结果与 NCBI 比对结果使用本地软件 Mega 11.0,运用 N-J 法建立系统发育树,结果如图 5 所示,R2 与贝莱斯芽孢杆菌 (*B. velezensis*) NRRL B-41580 KY694464 聚为一支,表明菌株 R2 为贝莱斯芽孢杆菌;菌株 R8 与解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 在同一分支,表明两者遗传距离较近,菌株 R8 为解淀粉芽孢杆菌;菌株 R24 与短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) 1.19 在一个分支上,与分子鉴定结果一致,表明菌株 R24 为短小芽孢杆菌;菌株 R18 与苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) Y4 为一支,表明菌株 R18 为苏云金杆菌;菌株 R22 与沙福芽孢杆菌 (*Bacillus siamensis*) AMB-y1 为一支,表明菌株 R22 为沙福芽孢杆菌;菌株 R25 与漳州芽孢杆菌 (*Bacillus zhangzhouensis*) SML-M151 聚为一支,表明菌株 R25 为漳州芽孢杆菌。

2.4 贝莱斯芽孢杆菌 R2 抑菌基因的鉴定结果

为了进一步探究贝莱斯芽孢杆菌 R2 所产抑菌活性物质的种类,对贝莱斯芽孢杆菌 R2 基因组中可能有关抗菌活性物质的合成基因进行鉴定。结果如图 6 所示,以贝莱斯芽孢杆菌 R2 基因组 DNA 为模板,可特异性扩增出 7 个产物,即非核糖体脂肽类物质杆菌霉素 D、丰原素、鞭毛蛋白、伊枯草菌素 A、芽孢菌溶素、枯草菌脂肽的编码基因 *bmyD*、*fenA*、*hag*、*ituA*、*bacA*、*Srf*,其扩增产物大小分别为 1 200,1 400,1 000,650,500,350 bp;蛋白质类 TasA 的编码基因 *tasA* 扩增出的条带大小为 800 bp,均与文献中报道相一致^[19-21]。所有 PCR 产物送测序后均证明扩增正确。研究显示,贝

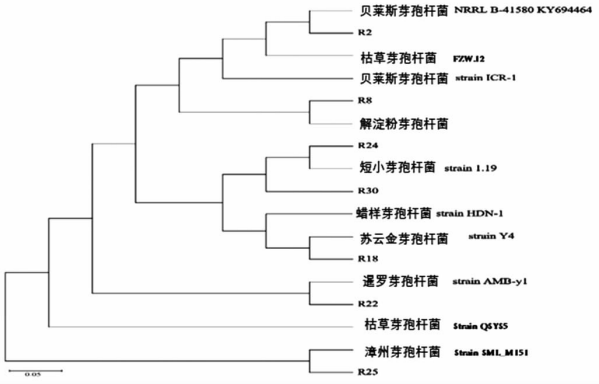
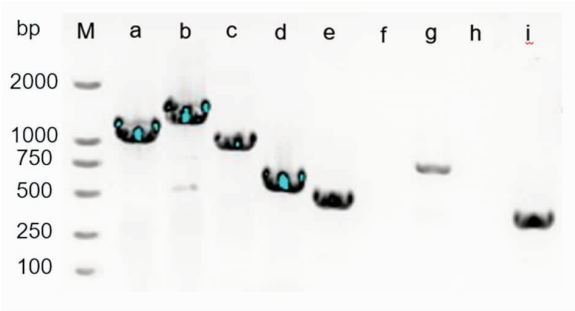


图 5 分离菌株 16S rDNA 序列系统发育树

Fig.5 Phylogenetic tree of 16S rDNA sequences of isolated strain isolates



注:M:DL 2000 DNA Marker;泳道 a:*bmyD*;泳道 b:*fenA*;泳道 c:*hag*;泳道 d:*ituA*;泳道 e:*bacA*;泳道 f:*mrsA*;泳道 g:*tasA*;泳道 h:*spaA*;泳道 i:*Srf*。

图 6 抗菌物质的编码或调控基因 PCR 扩增电泳图

Fig.6 PCR amplification electrophoresis of genes encoding or regulating antibacterial substances

莱斯芽孢杆菌通过合成次级代谢产物来抑制病原菌,其中主要包括细菌素类物质、抑菌蛋白类^[27]、

脂肽类物质^[28]和聚酮类化合物等^[29]。有研究发现贝莱斯芽孢杆菌全基因有 10 个基因簇参与了聚酮酸、脂肽和细菌素的非核糖体合成^[30],与本研究结果一致。此外,抑菌活性物质的编码或调控基因的 PCR 扩增结果表明,本研究所分离的贝莱斯芽孢杆菌 R2 至少可以产生 7 种抗菌物质。贝莱斯芽孢杆菌 R2 产生这些抗菌物质,在低盐发酵大酱中可以抑制一些致病菌和腐败菌的生长。

2.5 贝莱斯芽孢杆菌 R2 溶血性评价结果

由于部分芽孢杆菌可能携带毒素、溶血活性

和细胞毒性活性^[31],本研究对分离的菌株进行安全性评价。排除溶血活性是安全性评价的首选试验^[32],溶血性试验结果如图 7 所示,对照菌株金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 显示出 β -溶血,对照菌株大肠杆菌 Nissle 1917 显示 α -溶血。而本试验菌株贝莱斯芽孢杆菌 R2 在 37 ℃的含 5%羊血的哥伦比亚平板上培养时,未显示溶血(γ -溶血)。因此,贝莱斯芽孢杆菌 R2 没有潜在溶血风险,被认为是安全的,可以添加到发酵食品中。

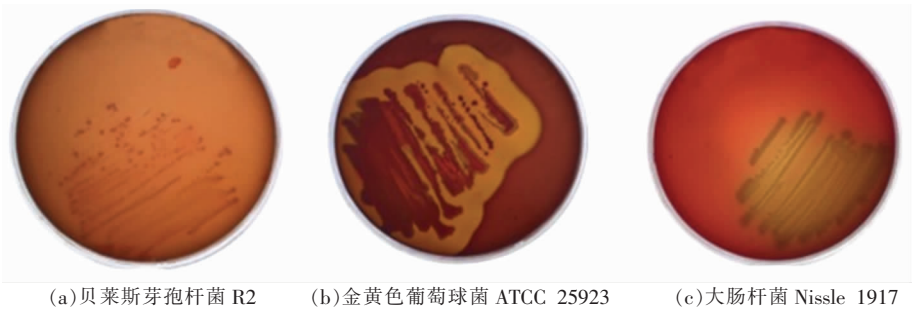


图 7 贝莱斯芽孢杆菌 R2 溶血性照片
Fig.7 Hemolysis picture of *Bacillus velezensis* R2

2.6 贝莱斯芽孢杆菌 R2 抗生素性结果

食品菌株的安全性评价还需测试菌株是否具有抗生素耐药^[33]。试验结果如表 3 所示。贝莱斯芽孢杆菌 R2 对 10 种抗生素头孢唑林、红霉素、庆大霉素、四环素、阿米卡星、氨苄西林、链霉素、万古霉素、米诺环素和青霉素 G 均敏感,与从韩国发酵大豆食品中分离出的贝莱斯芽孢杆菌对氯霉素、克林霉素、红霉素、庆大霉素、卡那霉素、四环素和万古霉素敏感研究一致^[34]。因此,贝莱斯芽孢杆菌 R2 在食品发酵应用中无抗生素抗性风险。

2.7 贝莱斯芽孢杆菌 R2 产酶特性结果

结果从图 8 可以看出,贝莱斯芽孢杆菌 R2 能够产生蛋白酶、淀粉酶、果胶酶和纤维素酶水解圈。有研究认为在发酵初期的大酱中,酶系的形成是豆瓣酱风味物质形成的前提,芽孢杆菌是大酱发酵过程中的优势菌群之一,对大酱的风味品质起关键作用^[35]。研究发现大酱中多种芽孢杆菌具有产生淀粉酶与蛋白酶能力,如枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、沙福芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌等^[36]。李思怡^[37]从东北大酱中筛选的贝莱斯芽孢杆菌

表 3 贝莱斯芽孢杆菌 R2 抗生素敏感性
Table 3 Antibiotic susceptibility of *Bacillus velezensis* R2

抗生素	抑制圈直径/mm	敏感度等级
头孢唑林	36.0 ± 1.50 ^a	S
红霉素	26.7 ± 1.36 ^{bc}	S
庆大霉素	23.1 ± 1.36 ^{de}	S
四环素	24.5 ± 0.76 ^{cd}	S
阿米卡星	21.4 ± 1.42 ^e	S
链霉素	14.5 ± 1.04 ^g	I
万古霉素	18.7 ± 2.71 ^f	I
米诺环素	28.1 ± 2.39 ^b	S
头孢氨苄	35.0 ± 0.38 ^{ac}	S
青霉素 G	23.5 ± 1.35 ^d	S

注:不同的上标字母表示具有统计学差异($P<0.05$);数值表示为“平均值±标准差”(n=3);S 为敏感,I 为中度敏感,R 为耐药。

DPUL-J1 具有较高的蛋白酶和淀粉酶活性。本研究筛选的贝莱斯芽孢杆菌 R2 不仅具有抗菌活性,而且具有产生蛋白酶、淀粉酶、果胶酶和纤维素酶的能力。

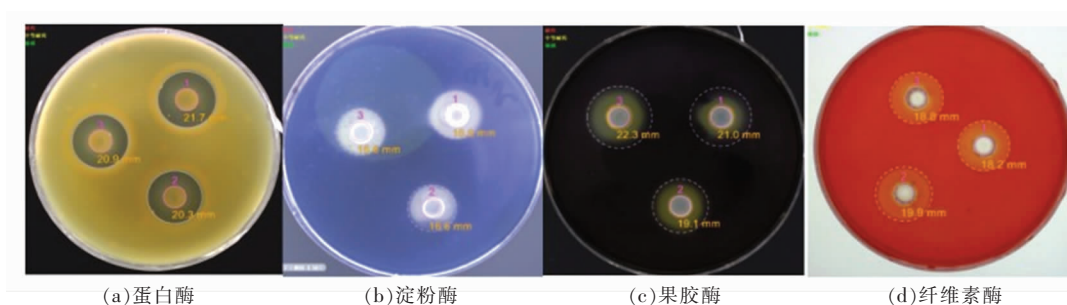


图8 贝莱斯芽孢杆菌 R2 的产酶图片

Fig.8 Pictures of enzyme production of *B. velezensis* R2

3 结论

本研究从东北大酱中共分离到 44 株具有抑菌活性的细菌,经鉴定主要为芽孢杆菌属。其中,贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)有 16 株,解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)有 13 株,枯草芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)有 9 株,暹罗芽孢杆菌(*Bacillus siamensis*)有 3 株,短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)、沙福芽孢杆菌(*Bacillus safensis*)、漳州芽孢杆菌(*Bacillus zhangzhouensis*)各有 1 株。根据 44 株菌株的抑菌谱,发现贝莱斯芽孢杆菌 R2 抑制 6 种食源性致病菌生长。通过对贝莱斯芽孢杆菌 R2 抑菌基因 PCR 扩增结果推测其可能产非核糖体脂肽类抗菌物质杆菌霉素 D、丰原素、鞭毛蛋白、伊枯草菌素 A、芽孢菌溶素、枯草菌脂肽和蛋白类抗菌物质 TasA。此外,研究还发现贝莱斯芽孢杆菌 R2 具有良好的安全性,以及蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶和果胶酶活性。因此,筛选得到贝莱斯芽孢杆菌 R2 是发酵生产均匀、高质量低盐大酱的潜在发酵剂。

本研究通过分离、鉴定东北大酱中产抗菌物质类的菌株,并对其可能产生抗菌物质和安全性进行初探,为酱类发酵微生物资源的挖掘提供参考。这些微生物的挖掘,可为今后开发低盐酱类发酵剂奠定菌株基础。同时,为促进大酱中微生物资源利用,缩短酱类生产周期,提高发酵食品安全性和产品质量,推动东北地区大酱产业发展起到积极作用。

参 考 文 献

[1] LI Z, RUI J, LI X, et al. Bacterial community

succession and metabolite changes during doubanjiang-meju fermentation, a Chinese traditional fermented broad bean (*Vicia faba* L.) paste[J]. Food Chemistry, 2017, 218(1): 534–542.

[2] LI Z H, DONG L P, HUANG Q L, et al. Bacterial communities and volatile compounds in Doubanjiang, a Chinese traditional red pepper paste[J]. Journal of Applied Microbiology, 2016, 120(6): 1585–1594.

[3] HAO Y, SUN B. Analysis of bacterial diversity and biogenic amines content during fermentation of farmhouse sauce from Northeast China[J]. Food Control, 2020, 108: 106861.

[4] KIM M, KIM Y S. Detection of foodborne pathogens and analysis of aflatoxin levels in home-made doenjang samples[J]. Preventive Nutrition and Food Science, 2012, 17(2): 172.

[5] YAO D, MA L X, WU M N, et al. Effect of microbial communities on the quality characteristics of northeast soybean paste: Correlation between microorganisms and metabolites[J]. LWT—Food Science and Technology, 2022: 113648.

[6] 徐鑫, 王茜茜, 王晓蕊, 等. 传统农家大酱中耐盐性乳酸菌的分离与鉴定[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(11): 33–40.

XU X, WANG X X, WANG X R, et al. Isolation and identification of salt-tolerant lactic acid bacteria from traditional farmhouse jams[J]. Food and Fermentation Industries, 2014, 40(11): 33–40.

[7] 潘国杨, 安飞宇, 曹恺欣, 等. 传统发酵豆酱中嗜盐四联球菌的分离鉴定及增鲜菌株筛选[J]. 食品科学, 2022, 43(14): 111–117.

PAN G Y, AN F Y, CAO K X, et al. Isolation, identification and screening of *Tetragenococcus*

- halophilus* strains from traditional fermented soybean paste[J]. Food Science, 2022, 43(14): 111-117.
- [8] 赵佳迪, 单万祥, 钮成拓, 等. 豆瓣酱生物胺降解菌株的筛选、鉴定及其降解特性研究[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(9): 64-72.
- ZHAO J D, SHAN W X, NIU C T, et al. Screening, identification and biogenic amines-degrading bacteria from Doubanjiang[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(9): 64-72.
- [9] 董丹, 关统伟, 车振明, 等. 发酵初期豆瓣酱中微生物多样性分析及产酶菌株的筛选[J]. 食品工业, 2015, 36(7): 175-178.
- DONG D, GUAN T W, CHE Z M, et al. Microbial diversity and screening of enzyme producing strains in two months period of fermented bean sauce[J]. Journal of Food Industry, 2015, 36(7): 175-178.
- [10] SINGRACHA P, NIAMSIRI N, VISESSANGUAN W, et al. Application of lactic acid bacteria and yeasts as starter cultures for reduced-salt soy sauce (moromi) fermentation[J]. LWT-Food Science and Technology, 2017, 78: 181-188.
- [11] XIE C Z, ZENG H Y, QIN L K. Physicochemical, taste, and functional changes during the enhanced fermentation of low-salt Sufu paste, a Chinese fermented soybean food[J]. International Journal of Food Properties, 2018, 21(1): 2714-2729.
- [12] DEVANTHI P V P, LINFORTH R, EL KADRI H, et al. Water-in-oil-in-water double emulsion for the delivery of starter cultures in reduced-salt moromi fermentation of soy sauce[J]. Food Chemistry, 2018, 257(15): 243-251.
- [13] RAGUL K, SYIEM I, SUNDAR K, et al. Characterization of probiotic potential of *Bacillus* species isolated from a traditional brine pickle[J]. Journal of Food Science and Technology, 2017, 54(13): 4473-4483.
- [14] 徐文欢, 吴若茜, 李采婵, 等. 传统虾酱中酵母菌分离鉴定及碳源利用特性[J]. 中国食品学报, 2021, 21(4): 303-309.
- XU W H, WU R H, LI C C, et al. Separation and identification of yeast from traditional shrimp paste and their carbon utilization characteristics [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(4): 303-309.
- [15] WANG J X, ZHANG S F, TAN H D, et al. PCR-based strategy for the construction of multi-site-saturation mutagenic expression library [J]. Journal of Microbiological Methods, 2007, 71(3): 225-230.
- [16] 董乃慧, 薛思宇, 董亮, 等. 氨基甲酸乙酯降解菌株的分离鉴定及其在白酒中的应用[J]. 中国食品学报, 2023, 23(7): 410-422.
- DONG N H, XUE S Y, DONG L, et al. Isolation and characterization of ethyl carbamate-degrading strains and their application in white wine[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2023, 23(7): 410-422.
- [17] 鲍捷, 任晓蕾, 郭宝松, 等. 传统农家酱产蛋白酶菌株的分离及其在豆浆的应用[J]. 农业工程学报, 2023, 39(11): 266-273.
- BAO J, REN X L, GUO B S, et al. Isolation of protease-producing strains from traditional agaric sauce and their application to soymilk[J]. Journal of Agricultural Engineering, 2023, 39(11): 266-273.
- [18] 郭艳云. 五粮液酒醅中芽孢杆菌的分离鉴定及其产生的抑菌物质[D]. 天津: 天津大学, 2016.
- GUO Y Y. Isolation and identification of *Bacillus sphaericus* from Wuliangye wine spirits and its production of bacteriostatic substances[D]. Tianjin: Tianjin University, 2016.
- [19] ZHAO X, ZHOU Z J, HAN Y, et al. Isolation and identification of antifungal peptides from *Bacillus* BH072, a novel bacterium isolated from honey [J]. Microbiological Research, 2013, 168(9): 598-606.
- [20] MORA I, CABREFIGA J, MONTESINOS E. Antimicrobial peptide genes in *Bacillus* strains from plant environments[J]. Int Microbiol, 2011, 14(4): 213-223.
- [21] DELEU M, PAQUOT M, NYLANDER T. Effect of fengycin, a lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*, on model biomembranes[J]. Biophysical Journal, 2008, 94(7): 2667-2679.
- [22] 张素芳, 熊可欣, 贾宜松, 等. 麦角硫因高产菌株及其筛选方法和应用: CN202210982607.9[P]. 2022-11-11.
- ZHANG S F, XIONG K X, JIA Y S, et al. Ergothioneine high yielding strain and its screening method and application: CN202210982607.9 [P]. 2022-11-11.
- [23] MIDHUN S J, NEETHU S, VYSAKH A, et al. Antibacterial activity and probiotic characterization of autochthonous *Paenibacillus polymyxa* isolated from

- Anabas testudineus* (Bloch, 1792) [J]. Microbial pathogenesis, 2017, 113: 403–411.
- [24] LEE M H, LEE J, NAM Y D, et al. Characterization of antimicrobial lipopeptides produced by *Bacillus* sp. LM7 isolated from chungkookjang, a Korean traditional fermented soybean food [J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 221(16): 12–18.
- [25] JEON H H, JUNG J Y, CHUN B H, et al. Screening and characterization of potential *Bacillus* starter cultures for fermenting low-salt soybean paste (doenjang) [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2016, 26(4): 666–674.
- [26] CHETTRI R, TAMANG J P. *Bacillus* species isolated from tungrymbai and bekaang, naturally fermented soybean foods of India [J]. International Journal of Food Microbiology, 2015, 197(16): 72–76.
- [27] KHALID A, YE M, WEI C, et al. Production of β -glucanase and protease from *Bacillus velezensis* strain isolated from the manure of piglets [J]. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2021, 51(5): 497–510.
- [28] JUMPATHONG W, INTRA B, EUANORASETR J, et al. Biosurfactant-producing *Bacillus velezensis* PW192 as an anti-fungal biocontrol agent against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum musae* [J]. Microorganisms, 2022, 10(5): 1017.
- [29] 张德锋, 高艳侠, 王亚军, 等. 贝莱斯芽孢杆菌的分类、拮抗功能及其应用研究进展 [J]. 微生物学通报, 2020, 47(11): 3634–3649.
- ZHANG D F, GAO Y X, WANG Y J, et al. Advances in taxonomy, antagonistic function and application of *Bacillus velezensis* [J]. Microbiology China, 2020, 47(11): 3634–3649.
- [30] LIU G Q, KONG Y Y, FAN Y J, et al. Whole-genome sequencing of *Bacillus velezensis* LS69, a strain with a broad inhibitory spectrum against pathogenic bacteria [J]. Journal of Biotechnology, 2017, 249(10): 20–24.
- [31] DENG F R, CHEN Y S, SUN T Y, et al. Antimicrobial resistance, virulence characteristics and genotypes of *Bacillus* spp. from probiotic products of diverse origins [J]. Food Research International, 2021, 139: 109949.
- [32] JUNG J H, LEE M Y, CHANG H C. Evaluation of the probiotic potential of *Bacillus polyfermenticus* CJ6 isolated from Meju, a Korean soybean fermentation starter [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012, 22(11): 1510–1517.
- [33] LEE S, LEE J, JIN Y I, et al. Probiotic characteristics of *Bacillus* strains isolated from Korean traditional soy sauce [J]. LWT—Food Science and Technology, 2017, 79: 518–524.
- [34] HEO G, KONG H, KIM N, et al. Antibiotic susceptibility of *Bacillus velezensis* [J]. FEMS Microbiology Letters, 2022, 369(1): fnac017.
- [35] LIU Y T, YUAN Y, DUAN S Q, et al. Preparation and characterization of chitosan films with three kinds of molecular weight for food packaging [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 155: 249–259.
- [36] 谢全喜, 侯楠楠, 鹿晓慧, 等. 芽孢杆菌的产酶特性及其对抗生素的耐受性 [J]. 中国酿造, 2021, 40(5): 91–96.
- XIE Q X, HOU N N, LU X H, et al. Enzyme-producing characteristic and antibiotic tolerance of *Bacillus* [J]. China Brewing, 2021, 40(5): 91–96.
- [37] 李思怡. 东北传统大酱中安全生产菌种的筛选及生产性能评价 [D]. 大连: 大连工业大学, 2021.
- LI S Y. Screening of safe starter culture strains and evaluation of production performance of traditional soybean paste in Northeast China [D]. Dalian: Dalian Polytechnic University, 2021.

Screening and Safety Study of Antimicrobial Substance Producing Strains in Traditional Soybean Paste in Northeast China

Ren Xiaolei, Bao Jie, Guo Baosong, Dong Liang, Ji Chaofan, Zhang Sufang*

(State Key Laboratory of Marine Food Processing & Safety Control, National Engineering Research Center of Seafood,
Collaborative Innovation Center of Seafood Deep Processing, School of Food Science and Technology,
Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning)

Abstract The objective of this study was to isolate and identify microorganisms capable of producing antimicrobial compounds from Northeast China soybean paste and to analyse their antimicrobial capacity. The results showed that a total of 44 strains with antibacterial activity were isolated, mainly *Bacillus* spp. Of these, *Bacillus velezensis* R2 was identified as capable of inhibiting the growth of six foodborne pathogenic bacteria, with a broad spectrum of bacterial inhibition. Additionally, non-ribosomal lipopeptides encoding bacillomycin D, fengycin, flagellin, iturin A, bacilysin, surfactin, and the protein class TasA were amplified from *B. velezensis* R2. The functional, phenotypic and safety-related characterization of *B. velezensis* R2 revealed that it was non-hemolytic, sensitive to 10 antibiotics, and possessed protease, amylase, cellulase, and pectinase activities. This study aims to provide a reference for the high-value utilization of low-salt fermentation microbial resources of sauces.

Keywords northeast soybean paste; antibacterial microorganism; *Bacillus*; antibacterial substance; safety