

产苯乳酸的乳酸菌分离筛选及菌种鉴定*

李兴峰¹, 江波¹, 潘蓓蓓², 沐万孟¹, 张涛¹

1(江南大学食品科学与安全教育部重点实验室, 江苏无锡, 214036)

2(中国食品科学技术学会, 北京, 100833)

摘要 通过对自然发酵泡菜中乳酸菌的分离, 建立了一种准确、快速的苯乳酸产生菌的筛选方法。在 112 株筛选菌株中, 获得 1 株苯乳酸高产菌株 SK007。研究了苯丙氨酸对苯乳酸合成的影响, 即增加苯丙氨酸的浓度可以提高苯乳酸产量, 苯丙氨酸是苯乳酸合成的前体。高产菌株经 16S rDNA 序列初步鉴定为 *Lactobacillus* sp., GenBank 接受号为 DQ534529。系统发育分析表明它与植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 亲缘关系最近。

关键词 苯乳酸, 乳酸菌, 菌株筛选, 16S rDNA, 苯丙氨酸

苯乳酸(phenyllactic acid, PLA), 也称 3-苯基乳酸或 β -苯乳酸, 即 2-羟基-3-苯基丙酸, 是近年来发现的一种新型天然防腐剂。1998 年, Dieuleveux^[1] 发现白地霉 (*Geotrichum candidum*) 发酵的干酪对单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) 有很强的抑制作用, 通过分离、鉴定, 最终确定苯乳酸是其中的主要抑菌物质。2003 年, Lavermicocco^[2] 研究了苯乳酸对多种引起食品腐败的真菌的作用, 发现其有宽广的抑菌谱, 如抑制黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、黄曲霉 (*Aspergillus flavus*)、娄地青霉 (*Penicillium roqueforti*) 等。与 Nisin(乳链球菌素) 相比, 苯乳酸抑菌谱宽, 能抑制多种食源性致病菌、腐败菌, 特别是能抑制真菌污染; 溶解性好, 易于在食品体系中扩散; 稳定性高, 具有宽广的 pH 范围和热稳定性, 这些优点决定了它在食品工业具有广阔的应用前景^[3~5]。

苯乳酸可由多种微生物产生, 如白地霉^[1]、丙酸菌^[6]和乳酸菌^[5]。由于乳酸菌具有 GRAS(公认为安全)资格, 可广泛用于发酵食品的生产。2000 年, Lavermicocca^[7] 从酸面团中分离到的植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 21B 能产生苯乳酸, 这是关于乳酸菌产生苯乳酸的首次报道。随后, 相继发现乳酸菌的一些属种能够产生苯乳酸, 如 2002 年 Strom^[8] 等从青贮饲料中分离到 1 株 *L. plantarum* MiLAB393; 2003 年, Magnusson^[9] 从青草中分离出苯乳酸产生菌株, 鉴定为棒状乳杆菌 (*L. coryniformis*)。Valerio^[10] 等报道多种乳酸菌能够产生苯乳酸, 但产量较低, 并且菌株个体差异大。因

此, 从不同来源分离筛选能够产生苯乳酸的乳酸菌非常重要。

文中从自然发酵的泡菜中分离、筛选产苯乳酸的乳酸菌, 研究苯乳酸的生物合成并且利用 16S rDNA 序列对高产菌株进行初步鉴定。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 样品采集

泡菜样品购自无锡天润发超市。

1.1.2 培养基

MRS 培养基(g/L): 葡萄糖 20, 酵母膏 5, 蛋白胨 10, 牛肉膏 10, K_2HPO_4 2, 乙酸钠 5, 柠檬酸二铵 2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.58, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.25, 吐温 80 1mL。调 pH 至 6.2~6.4。

保藏培养基(g/L): 葡萄糖 15, 酵母膏 10, $CaCO_3$ 15, 琼脂 15, pH6.2~6.4。

分离培养基(g/L): MRS 培养基中添加质量分数为 3% 的 $CaCO_3$ 、2% 的琼脂。

筛选培养基(g/L): 同 MRS 培养基。

1.1.3 主要试剂

苯乳酸、苯丙氨酸, 购自 Sigma 公司。其他材料为市售, 甲醇为色谱纯, 试剂为分析纯。

1.2 主要设备

Agilent1100 高效液相色谱仪, Agilent Zorbax SB-C18 反相色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μ m)。

1.3 实验方法

1.3.1 从泡菜中产苯乳酸的乳酸菌的方法

取不同泡菜汁液 5 mL 接种于 MRS 液体培养基中, 30℃ 培养 24 h 进行富集。取 0.1 mL 适当稀释度的菌液倒平板, 30℃ 培养 18~24 h。挑取有碳酸钙

第一作者: 博士研究生(江波教授为通讯作者)。

* 国家自然科学基金重点项目(20436020)

收稿日期: 2006-08-16, 改回日期: 2006-09-29

溶解圈的单菌落划线纯化并镜检。将获得的乳酸菌接种 MRS 液体培养基, 30℃ 培养 72 h 后, 采用高效液相色谱法检测发酵液中的苯乳酸含量, 得到的高产菌株于 4℃ 保存。

1.3.2 添加苯丙氨酸的生物转化

发酵转化直接在 MRS 培养基中进行。将不同浓度的苯丙氨酸加入 MRS 培养基后调节 pH 为 6.2~6.4, 121℃ 灭菌 20 min。高产菌株活化 2 代后, 以 2% 的接种量接种, 静置培养 72 h。每样 3 个平行。

1.3.3 反相高效液相色谱法测定苯乳酸含量

参考 Valerio 等方法^[10], 适当修改。HPLC 条件: 流动相为 0.05% 的三氟乙酸/甲醇(A)和 0.05% 的三氟乙酸/水(B)的混合液, 梯度洗脱程序为: 0~20 min 由 10% A 线性变化至 100%, 20~23 min 保持 100% A, 23~25 min 由 100% A 线性变化至 10%。流速 1 mL/min, 检测波长 210 nm, 柱温 30℃。

1.3.4 16S rDNA 序列的测定、分析

16S rDNA 测序由宝生物工程(大连)有限公司完成。将测得的 16S rDNA 序列在 NCBI 核酸数据库中进行 BLAST 搜索与其相似性最高的序列, 并提交 GenBank。然后从数据库中获得高相似性的 16S rDNA 序列, 用 ClustalX 软件进行同源性分析, 校准

排齐后构建系统发育树。

2 结果与讨论

2.1 泡菜中产苯乳酸的乳酸菌分离、筛选结果

利用稀释平板法从自然发酵的泡菜样品中共分离出 175 株菌株, 经过镜检得到 112 株乳酸菌。将乳酸菌接种于 MRS 液体培养基发酵, 30℃ 静置培养 72 h 后检测上清液中苯乳酸的含量。结果发现, 42 株菌的发酵液中苯乳酸含量低于 16.6 mg/L; 60 株菌产生的苯乳酸浓度范围在 16.6~63.1 mg/L; 10 株菌产生的苯乳酸含量超过 66.4 mg/L。这表明大部分乳酸菌可以产生苯乳酸, 但苯乳酸的产量取决于菌株个体。菌株筛选结果见表 1。

表 1 产苯乳酸的乳酸菌菌株筛选结果

苯乳酸含量/mg · L ⁻¹	菌株数量/株	所占比例/%
≤16.6	42	37.5
16.6~63.1	60	53.5
≥66.4	10	8.9

乳酸菌菌株 SK007 显示出最高的苯乳酸合成能力, 在 MRS 培养基中 30℃ 培养 72 h, 苯乳酸的产量可达 91 mg/L。菌株 SK007 的发酵上清液的 HPLC 图谱如图 1 所示。

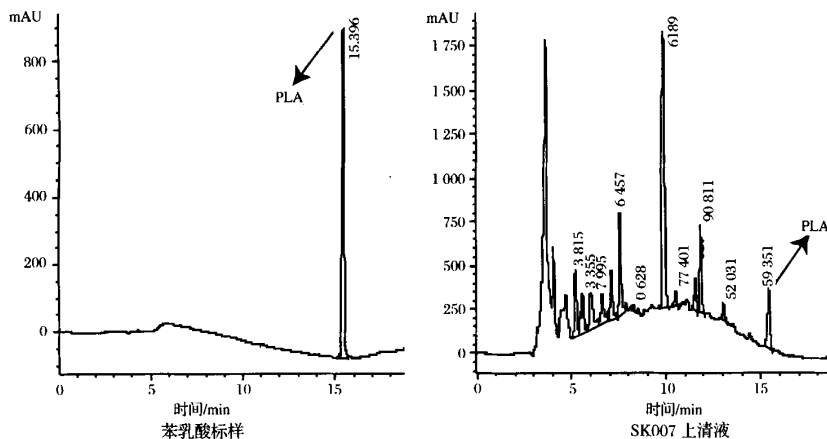


图 1 菌株 SK007 发酵上清液的 HPLC 图谱

Valerio^[10]等对在发酵食品中作为发酵剂或非发酵剂的几乎所有代表乳酸菌进行了研究, 根据在 MRS 培养基中的苯乳酸和羟基苯乳酸的产生情况将乳酸菌分为 3 个类群: (1) 既产生苯乳酸又产生羟基苯乳酸的乳酸菌, 苯乳酸浓度范围为 26.56~76.36 mg/L、羟基苯乳酸的浓度范围为 12.74~52.78 mg/L。 (2) 只产生苯乳酸的乳酸菌, 浓度为 28.22~

94.62 mg/L。 (3) 苯乳酸和羟基苯乳酸均不产生的乳酸菌, 苯乳酸 ≤ 16.6 mg/L、羟基苯乳酸 ≤ 3.64 mg/L。按照此分类方法, 菌株 SK007 应属于第 2 类群, 与该群中产苯乳酸最高的 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ITMY30 的产量 (94.62 mg/L) 相近。

2.2 苯丙氨酸对高产菌株 SK007 合成苯乳酸的影响

在 MRS 培养基中添加不同浓度的苯丙氨酸，30℃ 培养 72 h，测发酵液中苯乳酸含量(图 2 所示)。

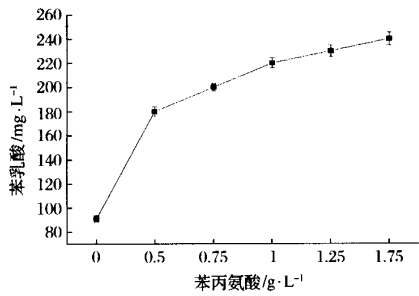


图 2 苯丙氨酸对 SK007 合成苯乳酸的影响

(注:Phe: phenylalanine, 苯丙氨酸;PLA: phenyllactic acid, 苯乳酸)

随着苯丙氨酸浓度的增加,苯乳酸逐渐增加;当苯丙氨酸浓度为 1.75 g/L 时,苯乳酸产量可达 230 mg/L。表明苯丙氨酸是苯乳酸合成的前体物质。这与 Valerio^[10]等人的报道类似,在 SM 培养基中增加苯丙氨酸的浓度可以提高 *L. plantarum* ITM21B 合成苯乳酸的产量。

Kieronczyk^[11]等人研究干酪的风味物质时发现,*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 将苯丙氨酸转化成苯丙酮酸和苯乳酸,进而合成有效的风味化合物——羧酸。据此推测,添加苯丙氨酸后发生了下述反应:苯丙氨酸在转氨酶的催化下发生转氨反应,将氨基转移给 α-酮酸生成苯丙酮酸,苯丙酮酸在羟基酸脱氢酶的作用下进一步生成苯乳酸。添加苯丙氨

酸使反应向苯乳酸方向进行,因此苯乳酸产量增加。乳酸菌 SK007 利用苯丙氨酸的合成苯乳酸可能的代谢途径见图 3:

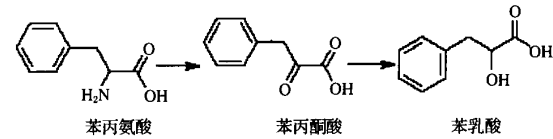


图 3 菌株 SK007 利用苯丙氨酸合成苯乳酸可能的代谢途径

2.3 高产菌株的初步鉴定

2.3.1 菌株形态特征观察

菌株 SK007 菌落培养特征:30℃ 培养 24 h,在 MRS+3% CaCO₃ 固体培养基上形成明显的透明圈,菌落光滑、湿润,乳白色。

2.3.2 16S rDNA 序列测定

测序结果表明,该菌株 16S rDNA 序列共 1 483 bp,将序列到 NCBI 进行 BLAST,同源性结果见表 2。结果发现,它与乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 的 16S rDNA 序列同源性最高,其中最高的已知菌有 *L. plantarum* WCFS1、*L. pentosus*。分析比对结果,菌株 SK007 的 16S rDNA 序列与 *L. plantarum* WCFS1 只有 3 个碱基的差别,因此可以将 SK007 鉴定为乳杆菌的一个种,命名为 *Lactobacillus* sp. SK007。将其 16S rDNA 序列提交 GenBank 得到的接受号为 DQ534529。

表 2 SK007 的 16S rDNA 在 GenBank 中的序列同源性分析

菌种名	GenBank+EMBL+DDBI 接受号	同源性/%
<i>Lactobacillus</i> sp. MR-2	AF516755	99
<i>L. plantarum</i> WCFS1	AL935258	99
<i>L. pentosus</i>	D79211	99
<i>L. plantarum</i> MiLAB14	AY383631	98
<i>L. arizonensis</i>	AJ965483	98

参考 *Lactobacillus* sp. SK007 的 16S rDNA 序列在 GenBank 的比对结果,用 ClustalX 做 *Lactobacillus* sp. SK007 的系统发育树,结果如图 4 所示。

由图 4 可以看出, *Lactobacillus* sp. SK007 与 *L. plantarum* MiLAB14 的亲缘关系最近。由 NCBI 的 BLAST 可知, *Lactobacillus* sp. SK007 与 *L. plantarum* MiLAB14 的同源性只有 98%,而与 *L. plantarum* WCFS1、*L. pentosus* 却有 99% 的同源性,这是由于 BLAST 时取的是序列的全长,而 ClustalX 做系统发育树时系统会截去某些长序列两端的一些短片断,使最终参与排序比对的片断长度相

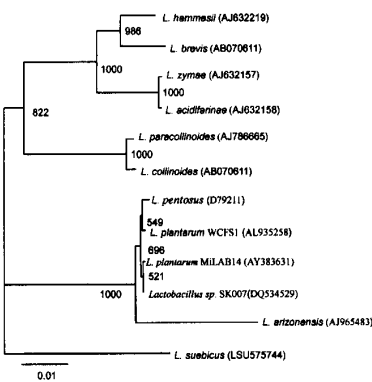


图 4 *Lactobacillus* sp. SK007 16S rDNA 序列的系统发育树

同。把 16S rDNA 作为鉴定依据的是其中的可变区,因此截去序列两端保守区的一些小片段不会影响结果,所以利用 ClustalX 做的系统发育树较为可信。此外,结果表明,用 16S rDNA 序列鉴定乳酸菌时较适用于属以上的分类单位,但对属以下的分类单位,如种和亚种就显得分辨率不足。

3 结 论

(1)建立了一种准确、快速的苯乳酸产生菌的筛选方法。从传统发酵泡菜中分离、筛选得一高产菌株,苯乳酸的产量与目前报道的乳酸菌中的最高产量接近。

(2)添加苯丙氨酸可以提高苯乳酸的产量,苯丙氨酸是苯乳酸合成的前体物质。

(3)高产菌株经 16S rDNA 序列鉴定为乳杆菌,命名为 *Lactobacillus* sp. SK007,提交 GenBank 得到的接受号为 DQ534529。

参 考 文 献

- Dieuleveux V, Van Der Pyl D, Chataud J, et al. Purification and characterization of anti-*Listeria* compounds produced by *Geotrichum candidum* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(2): 800~803
- Lavermicocca P, Valerio F, Visconti A. Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(1): 634~640
- Dieuleveux V, Lemariner S, Gueguen M. Antimicrobial spectrum and target site of D-3-phenyllactic acid [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 1998, 40(3): 177~183
- Dieuleveux V, Gueguen M. Antimicrobial effects of D-3-phenyllactic acid on *Listeria monocytogenes* in TSB-YE medium, milk, and cheese [J]. *Journal of Food Protection*, 1998, 61(10): 1281~1285
- Schnurer J, Magnusson J. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2005, 16(1~3): 70~78
- Thierry A, Maillard M B. Production of cheese flavour compounds derived from amino acid catabolism by *Propionibacterium freudenreichii* [J]. *Lait*, 2002, 82(1): 17~32
- Lavermicocca P, Valerio F, Evidente A, et al. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(9): 4084~4090
- Strom K, Sjogren J, Broberg A, et al. *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(9): 4322~4327
- Magnusson J, Strom K, Roos S, et al. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 219(1): 129~135
- Valerio F, Lavermicocca P, Pascale M, et al. Production of phenyllactic acid by lactic acid bacteria: an approach to the selection of strains contributing to food quality and preservation [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 233(2): 289~295
- Kieronczyk A, Skeie S, Langsrud T, et al. Cooperation between *Lactococcus lactis* and nonstarter lactobacilli in the formation of cheese aroma from amino acids [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(2): 734~739

Screening and Identification of Phenyllactic Acid-producing Lactic Acid Bacteria

Li Xingfeng¹, Jiang Bo¹, Pan Beilei², Mu Wanmeng¹, Zhang Tao¹

1(The Key Lab of Food Science and Safety, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

2(Chinese Institute of Food Science and Technology, Beijing 100833, China)

ABSTRACT Screening methods for phenyllactic acid (PLA)-producing lactic acid bacteria was developed. One strain, SK007, which was isolated from Chinese traditional pickles, showed the highest PLA-producing ability among 112 strains. Furthermore, information gathered by supplying the strain SK007 with phenylalanine (Phe) indicated that PLA yield is improved using increased concentrations of Phe and Phe is the precursors of PLA. The screened strain was identified as *Lactobacillus* sp. by 16S rDNA sequence. The 16S rDNA sequence of *Lactobacillus* sp. SK007 has been deposited in GenBank under accession number DQ534529. Phylogenetic analysis showed that it closely related with *Lactobacillus plantarum*.

Key words phenyllactic acid, lactic acid bacteria, screening, 16S rDNA, phenylalanine