

DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.017076

引用格式:罗炜,宋春艳,李彦林,等.抑制呕吐毒素生物合成的乳酸菌的筛选及鉴定[J].食品与发酵工业,2018,44(9):41-47.

LUO Wei, SONG Chun-yan, LI Yan-lin, et al. Screening and identification of lactic acid bacteria inhibiting the biosynthesis of deoxynivalenol[J]. Food and Fermentation Industries, 2018, 44(9): 41-47.

## 抑制呕吐毒素生物合成的乳酸菌的筛选及鉴定

罗炜<sup>1,2</sup>, 宋春艳<sup>2</sup>, 李彦林<sup>2</sup>, 张蔚<sup>2</sup>, 鲁心怡<sup>2</sup>, 曹钰<sup>1,2\*</sup>

1(江南大学,教育部工业生物技术重点实验室,江苏 无锡,214122) 2(江南大学 生物工程学院,江苏 无锡,214122)

**摘要** 以禾谷镰刀菌 ACCC36938 为指示菌,测定不同乳酸菌对其抑制作用,筛选得到抑菌效果较强的 1 株乳酸菌 A14-2。进一步研究不同温度、pH 值和蛋白酶处理对乳酸菌 A14-2 抑菌活性的影响,结果表明 pH 值变化对其影响最大,同时也存在非蛋白类热敏感物质具有一定抑菌作用。为了探究乳酸菌 A14-2 对禾谷镰刀菌呕吐毒素(deoxynivalenol, DON)生物合成的影响,选用麦芽汁作为培养基,将乳酸菌和禾谷镰刀菌混合在麦芽汁培养基中共同培养,分析培养基中 DON 质量浓度变化,结果发现乳酸菌培养物及其上清液均能够在抑制禾谷镰刀菌生长的同时,也显著降低了 DON 的合成量,但乳酸菌细胞对 DON 无吸附作用。最后对乳酸菌 A14-2 进行理化及分子鉴定,显示其为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)。

**关键词** 植物乳杆菌;禾谷镰刀菌;呕吐毒素;抑菌活性

镰刀菌是谷物感染赤霉病的主要病原菌,其在适宜环境下通过侵染麦穗部而导致作物死亡,对农业造成巨大的经济损失<sup>[1]</sup>。此外,镰刀菌还会产生各种真菌毒素,包括玉米赤霉烯酮、伏马毒素,以及多种单端孢霉烯族毒素等<sup>[2]</sup>,其中单端孢霉烯 B 族化合物呕吐毒素(deoxynivalenol, DON)由于其易溶于水,对各类以谷物为主要原料的食品行业影响巨大,尤其是在啤酒中的大量堆积,会对人体安全产生重大威胁<sup>[3]</sup>。

为了保障食品安全性,降低谷物污染程度,可以通过抑制产毒真菌生长来实现<sup>[4]</sup>。目前一般采用化学杀菌剂来达到抑制产毒真菌生长,减少毒素产生的作用,但化学试剂可能对人体和环境产生一定危害<sup>[5]</sup>,利用生物杀菌剂代替化学杀菌剂符合人们安全和环保需求。其中乳酸菌作为生物杀菌剂的典型代表,很早就用于食品防腐杀菌方面,通常乳酸菌都被认为是安全的菌株<sup>[6]</sup>,其产生的代谢产物,包括有机酸<sup>[7-8]</sup>、蛋白类物质<sup>[9-10]</sup>等证明能够抑制产毒真菌特别是镰刀菌生长<sup>[11]</sup>,进而降低谷物中 DON 的产

生。研究显示啤酒生产中 DON 主要由镰刀菌在制麦过程中产生,通过在浸麦开始添加乳酸菌菌液,能够最终降低麦芽中 DON 质量浓度<sup>[12]</sup>,说明利用乳酸菌降低谷物食品中 DON 质量浓度是可行的。

本实验通过筛选能够抑制禾谷镰刀菌生长的乳酸菌,并研究其对禾谷镰刀菌 DON 生物合成的影响,以期利用乳酸菌降低谷物食品镰刀菌污染方面提供有力支持。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料

##### 1.1.1 菌株

禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*) ACCC36938,购自中国农业微生物菌种保藏中心。

##### 1.1.2 培养基

MRS 培养基;PDA 培养基;KMnO<sub>4</sub>-KBr-MRS 培养基<sup>[13]</sup>:在 MRS 培养基中加入质量浓度 2 g/L KMnO<sub>4</sub>和质量浓度 2.5 g/L 的 KBr;绿豆汤培养基<sup>[14]</sup>:质量浓度 30 g/L 绿豆加入蒸馏水中煮沸 3 min,过滤定容即可。

##### 1.1.3 试剂和仪器

DON 试剂盒购自青岛普瑞邦生物公司;API50CHL 试剂盒购自梅里埃公司;DNA 提取试剂盒购自上海生工公司;蛋白酶购自江苏锐阳公司;其他试剂购自国药集团。

酶标仪 Enspire2300,珀金埃尔默有限公司;BME

第一作者:硕士研究生(曹钰副教授为通讯作者, E-mail: tsaoy5@jiangnan.edu.cn)。

基金项目:啤酒用新酶创制与低碳制造关键技术研究,国家高技术发展(863)计划(2013AA102109);高等学校学科创新引智计划(111 计划)资助项目(111-2-06);江苏高等优势学科建设工程资助项目(PAPD);江苏省现代工业发酵协同创新中心资助项目;江苏高校品牌专业建设工程资助项目(TAPP)

收稿日期:2018-02-12,改回日期:2018-04-08

显微镜,上海徕卡公司。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 乳酸菌筛选

将土壤、酸菜等发酵食品样品加入到灭菌的 MRS 液体培养基中于 30 ℃ 下振荡培养 12 h,取其中 100  $\mu$ L 液体稀释涂布到含  $\text{KMnO}_4$ -KBr-MRS 培养基上,在 30 ℃ 培养箱中培养 48 h,选择透明圈较大的单菌落挑起接种到新的 MRS 平板上纯化 2 次,然后进行革兰氏染色和过氧化氢酶实验,将革兰氏染色阳性,过氧化氢酶试验阴性且能在  $\text{KMnO}_4$ -KBr-MRS 平板上产生较大透明圈的菌株初步认定为乳酸菌,甘油管保藏。

### 1.2.2 乳酸菌对禾谷镰刀菌抑制作用

#### 1.2.2.1 禾谷镰刀菌孢子制备

将禾谷镰刀菌接种到 PDA 培养基上,25 ℃ 下培养 3 d,然后取部分菌丝接种到绿豆汤培养基中,在 200 r/min,25 ℃ 摇床中振荡培养 3~5 d 至产生大量孢子,血球板计数,用无菌水稀释至  $10^5$  个孢子/mL 浓度,备用。

#### 1.2.2.2 抑菌实验

将筛选得到的乳酸菌菌株接种到 MRS 液体培养基中,在 30 ℃ 下静置培养 24 h,用生理盐水将其稀释至浓度为  $1 \times 10^9$  CFU/mL,然后取 20  $\mu$ L 乳酸菌菌液点接在 MRS 平板中心,将其在 30 ℃ 下静置培养 2 d,覆盖上 50 ℃ 左右每毫升含  $10^4$  个禾谷镰刀菌孢子的 PDA 培养基,凝固后在 30 ℃ 下培养 3 d,测量抑菌直径,以不加乳酸菌的相同浓度的禾谷镰刀菌孢子培养物做对照。

### 1.2.3 乳酸菌培养物中抑菌物质特性分析

#### 1.2.3.1 乳酸菌上清液的制备

将活化乳酸菌按 5% 接入 MRS 培养基中,30 ℃ 培养 2 d,10 000 r/min 离心 10 min,上清液用 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤,备用。

#### 1.2.3.2 热处理对乳酸菌上清液抑菌活性影响

将乳酸菌上清液分别在 60、80、100 ℃ 下处理 10 min,然后按 1:9 加入到 50 ℃ 左右的 PDA 培养基中,混匀倒平板,待其凝固后在平板中心滴加 20  $\mu$ L 禾谷镰刀菌孢子液,30 ℃ 培养 3 d,测定禾谷镰刀菌生长直径,以无菌水代替上清液做对照,计算各上清液的抑菌率。

$$\text{抑菌率}/\% =$$

$$\frac{\text{对照组镰刀菌生长直径} - \text{实验组镰刀菌生长直径}}{\text{对照组镰刀菌生长直径}} \times 100$$

### 1.2.3.3 酶处理对乳酸菌上清液抑菌活性影响

调节乳酸菌上清液的 pH 值到酸性蛋白酶、中性蛋白酶的胃蛋白酶、胰蛋白酶、过氧化氢酶的最适 pH 值,按 1 mg/mL 加入相应酶到乳酸菌上清液中,分别在其最适温度下水浴 2 h,处理结束调回原 pH 值,然后按 1:9 加入到 50 ℃ 左右的 PDA 培养基中,混匀倒平板,待其凝固后在平板中心滴加 20  $\mu$ L 禾谷镰刀菌孢子液,30 ℃ 培养 3 d,观察禾谷镰刀菌生长直径,以无菌水代替上清液做对照,计算各上清液的抑菌率(同 1.2.3.2)。

### 1.2.3.4 pH 值处理对乳酸菌上清液抑菌活性影响

采用牛津杯法,将乳酸菌上清液浓缩 10 倍,分别调 pH 值至 5.0、6.0,取 200  $\mu$ L 禾谷镰刀菌孢子液涂布到 PDA 平板上,放置牛津杯,加入 200  $\mu$ L 不同 pH 值的浓缩上清液,以原上清液做对照,30 ℃ 下培养 2 d,记录抑菌直径。

### 1.2.4 乳酸菌在麦芽汁培养基中生长情况

#### 1.2.4.1 麦芽汁培养基制备

按图 1 糖化工艺曲线配制麦芽汁培养基,麦芽粉碎度为 2,料水比为 1:4,初始按 1800 U/g 大麦加入中性蛋白酶,糖化结束后煮沸 1 h,滤纸过滤,稀释成 8% 糖浓度,加入质量浓度 10 g/L 柠檬酸氢二铵,115 ℃ 下灭菌 20 min。

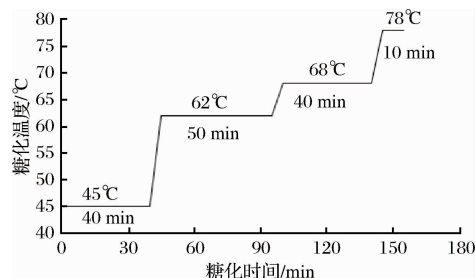


图 1 麦芽汁制备的糖化工艺曲线

Fig. 1 Profile of mashing process for wort preparation

#### 1.2.4.2 乳酸菌在麦芽汁培养基中生理特性研究

将活化乳酸菌菌株按 10% 接种量接入麦芽汁培养基中,在 30 ℃ 下静置培养,每隔 3 h 取样测 600 nm 下吸光值,以空白培养基做对照,同时测定样品总酸,绘制生长曲线和产酸曲线,每组 3 个平行。

### 1.2.5 乳酸菌对禾谷镰刀菌生长及 DON 生物合成的影响

将活化乳酸菌接种到麦芽汁培养基中,在 30 ℃ 下培养 18 h,然后各取 1、5、10、20 mL 乳酸菌菌液离心菌体细胞,与 4 mL 浓度为  $1 \times 10^5$  个孢子/mL 的禾

谷镰刀菌菌液混合倒入灭菌培养皿中,再加入 50 ℃ 左右的麦芽汁琼脂培养基,混合凝固后在 25 ℃ 下培养 5 d,以不加乳酸菌菌体的平板做对照,观察平板禾谷镰刀菌生长情况。

取平板培养物放入离心管中,捣碎并加入 5 mL 蒸馏水,按 1 g 培养物加入到 5 mL 蒸馏水,在摇床中振荡混匀 3 h,按 DON 试剂盒测定滤液的毒素质量浓度。

#### 1.2.6 乳酸菌上清液对禾谷镰刀菌生长及 DON 生物合成的影响

将活化乳酸菌接入到麦芽汁培养基中,30 ℃ 下培养 18 h,离心后得到上清液,将其在旋转蒸发仪中浓缩 16 倍,过滤除菌,再分别稀释至原浓度的 8 倍、4 倍、2 倍、1 倍浓度,取 1 mL 各浓度上清液与 4 mL 浓度为  $1 \times 10^5$  个孢子/mL 的禾谷镰刀菌菌液混合加入到无菌平板中,再加入 50 ℃ 左右的麦芽汁琼脂培养基,混合凝固后在 25 ℃ 下培养 5 d,以不加乳酸菌菌体的平板做对照,观察平板禾谷镰刀菌生长情况。

取平板培养物放入离心管中,捣碎并加入 5 mL 蒸馏水,按 1 g 培养物加入到 5 mL 蒸馏水,在摇床中振荡混匀 3 h,按 DON 试剂盒测定滤液的毒素质量浓度。

#### 1.2.7 乳酸菌细胞对 DON 吸附作用分析

采用改良的 FRANCO 方法<sup>[15]</sup>,将活化乳酸菌接入到麦芽汁培养基中,在 30 ℃ 下培养 18 h,各取 4 mL 菌液,一份煮沸使细胞失活,另一份做对照,离心后用 PBS 缓冲液清洗菌体 2 次,再用无菌水清洗菌体 2 次,加入配制的 DON 标准液(1 500 μg/L),漩涡振荡后在 30 ℃ 培养箱中培养 4 h,离心测定上清液中毒素质量浓度。

#### 1.2.8 乳酸菌鉴定

##### 1.2.8.1 乳酸菌生理生化试验

按照梅里埃碳水化合物鉴定试剂条(API50CHL)的说明书进行测试,记录相关结果。

##### 1.2.8.2 乳酸菌分子生物学鉴定

将菌株进行纯培养,使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取乳酸菌 DNA,然后利用细菌通用引物进行序列扩增,PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳分析纯化后,送去无锡天霖生物公司测序。将测得序列在 NCBI 网站上进行 Blast 比对,选取同源性较高的模式菌株序列,构建发育进化树<sup>[16]</sup>。

#### 1.2.9 数据处理

每组试验做 3 个平行,结果以平均值  $\bar{x} \pm s$  表示,

运用 SPSS 20.0 软件,采用单因素方差分析法进行显著性分析,以  $p < 0.05$  表示差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 乳酸菌筛选

从土壤、酸菜等发酵食品样品中分离得到革兰氏染色阳性、过氧化氢酶试验阴性,且在  $\text{KMnO}_4$ -KBr-MRS 培养基中透明圈大于 10 mm 的菌株 58 株,初步认定为乳酸菌,编号并甘油管冷冻保藏。

### 2.2 乳酸菌抑菌实验

大部分乳酸菌对禾谷镰刀菌都表现出一定的抑制效果,表 1 陈列了抑菌直径大于 40 mm 的乳酸菌菌株编号,可以看出,A14-2 菌株抑制效果最强。

表 1 乳酸菌对禾谷镰刀菌的抑制作用

Table 1 Inhibitory effect of lactic acid bacteria A14-2 on *Fusarium graminearum*

菌株编号	抑菌直径/mm	菌株编号	抑菌直径/mm
A14-2	65.23 ± 1.22	16-1	54.46 ± 2.32
14-3	61.34 ± 3.13	30	50.16 ± 3.11
3-2	58.18 ± 2.18	M13	46.52 ± 1.22
13	57.63 ± 2.23	HB101	46.45 ± 2.55

### 2.3 乳酸菌培养物的抑菌特性分析

#### 2.3.1 热处理对乳酸菌上清液抑制活性影响

不同温度处理上清液,其对抑菌活性影响如图 2 所示,60 ℃ 水浴处理 10 min 其抑菌活性相对空白对照组无显著差异,而 80 ℃ 甚至 100 ℃ 处理上清液,其抑菌活性相对空白对照组下降显著,降幅达到 26%,说明上清液中存在某种热不稳定性抑菌物质,可能是蛋白类物质。

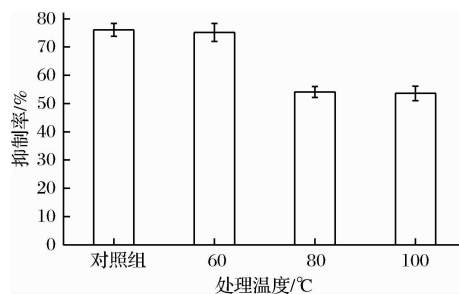


图 2 不同处理温度对乳酸菌上清液抑菌活性影响

Fig. 2 Effect of heat treatments on the antimicrobial activity of cell-free solution

#### 2.3.2 酶处理对乳酸菌上清液抑菌活性影响

上清液经过蛋白酶、过氧化氢酶处理后,对禾谷镰刀菌抑制效果的影响结果如图 3 所示,乳酸菌上清液经酸性蛋白酶和中性蛋白酶处理,其抑菌率相对空

白对照几乎没有发生变化,而经胃蛋白酶、胰蛋白酶处理,其对镰刀菌抑制率从 74.8% 分别下降到 69.1% 和 70.5%,变化显著( $p < 0.05$ ),说明上清液中存在某些蛋白类物质对镰刀菌生长具有一定的抑制作用。用过氧化氢酶处理上清液,其抑菌活性变化不明显,所以可以排除过氧化氢的抑菌作用。

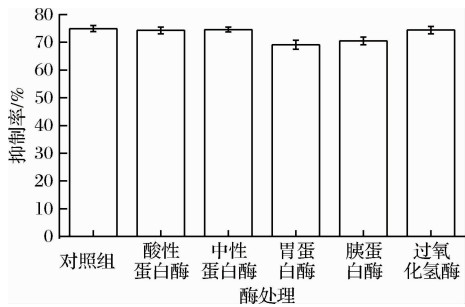


图3 不同蛋白酶处理对乳酸菌上清液抑菌活性影响  
Fig.3 Effect of protease enzyme treatments on the antimicrobial activity of cell-free solution

2.3.3 pH 值处理对乳酸菌上清液抑菌活性影响

结果如表 2 所示,可以看出,将上清液 pH 值调至 5.0、6.0,其对禾谷镰刀菌抑制效果消失,说明浓缩乳酸菌上清液的抑菌活性受 pH 值变化影响较大,可能是有机酸类物质。

表 2 pH 值处理对乳酸菌上清液抑菌活性影响  
Table 2 Effect of pH treatments on the antimicrobial activity of cell-free supernatant

上清液的 pH 值	抑菌直径/mm
3.9 (对照)	28.11 ± 1.1
5.0	0
6.0	0

2.4 麦芽汁培养基中乳酸菌生长及产酸

将活化乳酸菌按 10% 接种量接入麦芽汁培养基中,30 ℃ 下培养 18 h,测定其 600 nm 下吸光度、pH 值及总酸,以空白培养基做对照,结果见图 4。

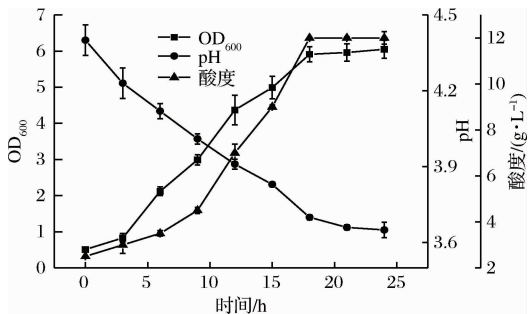


图4 乳酸菌 A14-2 在麦芽汁培养基中生长特性  
Fig.4 Growth characteristics of *Lactobacillus* strain A14-2 in wort-based substrate

从结果可以看出,0 ~ 18 h 发酵液 pH 值逐步降低,OD<sub>600</sub> 值和总酸呈直线上升状态,在 18 h 之后,乳酸菌发酵液 OD 值增加变得缓慢,酸度不再增加,pH 几乎不再变化,说明 18 h 时乳酸菌生长达到了稳定期。

2.5 乳酸菌抑制禾谷镰刀菌生长及 DON 的生物合成

将乳酸菌混合禾谷镰刀菌,在麦芽汁培养基中培养 5 d 后,可以观察到添加乳酸菌的麦芽汁平板中禾谷镰刀菌生长都被完全抑制,测定各平板培养物中呕吐毒素质量浓度,结果如图 5 所示,可以看出,只添加 1 mL 乳酸菌菌体,DON 抑制率就超过了 90%,说明乳酸菌在培养基中不仅能够抑制禾谷镰刀菌生长,也显著降低了其 DON 的产生。

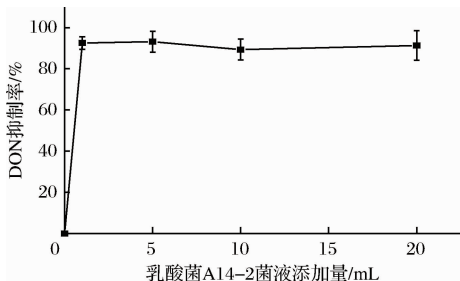
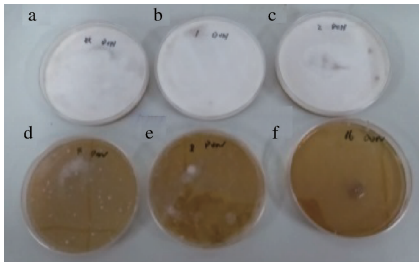


图5 不同添加量下乳酸菌 A14-2 对 DON 生物合成的抑制作用  
Fig.5 Inhibition of DON production by different amount of lactic acid bacteria

2.6 乳酸菌上清液抑制禾谷镰刀菌生长及 DON 的生物合成

各培养基禾谷镰刀菌生长情况如图 6 所示。



a-空白对照;b-添加 1 倍浓缩上清液;c-添加 2 倍浓缩上清液;  
d-添加 4 倍浓缩上清液;e-添加 8 倍浓缩上清液;f-添加 16 倍浓缩上清液

图6 乳酸菌上清液对禾谷镰刀菌生长抑制作用

Fig.6 Inhibitory effect of lactic acid bacteria supernatant on *Fusarium* growth

从图 6 可以看出,相对空白对照(图 6-a),1 倍(图 6-b)、2 倍(图 6-c)浓度乳酸菌上清液对禾谷镰



刀菌生长未显示出明显的抑制效果,4 倍(图 6-d)、8 倍(图 6-e)、16 倍(图 6-f)浓度乳酸菌上清液则非常显著抑制了禾谷镰刀菌生长,不同浓度乳酸菌上清液对 DON 产生抑制率测定结果如图 7 所示,DON 抑制率随着乳酸菌上清液浓度的增加变化显著,虽然图 7 中低浓度的乳酸菌上清液对生长的抑制作用不明显,但对 DON 生物合成的抑制也已经达到 15%~21%,并且上清液浓度越高,其对禾谷镰刀菌 DON 的生物合成的抑制作用越强,最大可达到 91%。

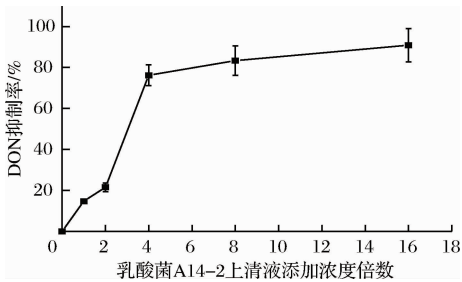


图 7 不同浓度乳酸菌上清液对 DON 生物合成的抑制作用

Fig. 7 Inhibition of DON production by different concentrations of *Lactobacillus* supernatant

2.7 乳酸菌菌体细胞对 DON 吸附作用

从 2.5 和 2.6 结果可知,禾谷镰刀菌与 1 mL 乳酸菌细胞共同培养不仅生长受到显著抑制,其 DON 生物合成量也被抑制了 90%,但与对应的乳酸菌上清液共同培养时,生长受抑制作用非常不明显,其 DON 生物合成量也仅仅被抑制了 15%,2 者之间存在差异是否由于乳酸菌细胞本身吸附毒素的作用而导致的,为此进一步进行了菌体细胞对 DON 吸附作用分析,细胞分别进行非灭活和热灭活处理后加入到 DON 溶液中,处理后测定上清液中 DON 质量浓度,结果如表 3 所示,从结果可以看出,无论灭活与否,乳酸菌 A14-2 细胞本身并不能够通过吸附作用降低溶液中 DON 质量浓度。

表 3 乳酸菌对 DON 吸附作用测定结果

Table 3 The determination results of LAB bind of DON

实验组	上清中 DON 质量浓度/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )
标准 DON 溶液	1 500
加入活的乳酸菌菌体处理	1 487
加入灭活的乳酸菌菌体处理	1 476

2.8 乳酸菌 A14-2 菌株的鉴定

2.8.1 乳酸菌生理生化鉴定

梅里埃 API50CHL 试剂盒测定结果如表 4 所示,

根据鉴定结果分析可以初步确定 A14-2 菌株为植物乳杆菌。

表 4 乳酸菌 A14-2 菌株的 API50CHL 生理生化反应结果

Table 4 Physiological and biochemical reaction of A14-2 strain by API50CHL

序号	反应底物	A14-2	序号	反应底物	A14-2
0	空白	-	25	七叶灵	+
1	甘油	-	26	水杨苷	+
2	赤藓醇	-	27	D-纤维二糖	+
3	D-阿拉伯糖	-	28	D-麦芽糖	+
4	L-阿拉伯糖	+	29	D-乳糖	+
5	D-核糖	+	30	D-蜜二糖	+
6	D-木糖	-	31	D-蔗糖	+
7	L-木糖	-	32	D-海藻糖	+
8	阿东醇	-	33	菊粉	-
9	$\beta$ -甲基-D-木糖苷	-	34	D-松三糖	+
10	半乳糖	+	35	D-棉籽糖	+
11	葡萄糖	+	36	淀粉	-
12	果糖	+	37	糖原	-
13	甘露糖	+	38	木糖醇	-
14	山梨糖	-	39	D-龙胆二糖	+
15	鼠李糖	-	40	D-松二糖	+
16	卫矛醇	-	41	D-来苏糖	-
17	肌醇	-	42	D-塔格糖	-
18	甘露醇	+	43	D-岩藻糖	-
19	山梨醇	+	44	L-岩藻糖	-
20	$\alpha$ -甲基-D-甘露糖苷	+	45	D-阿拉伯醇	+
21	$\alpha$ -甲基-D-葡萄糖苷	-	46	L-阿拉伯醇	-
22	N-乙酰葡萄糖胺	+	47	葡萄糖酸盐	+
23	苦杏仁苷	+	48	2-酮基-葡萄糖酸盐	-
24	熊果苷	+	49	5-酮基-葡萄糖酸盐	-

注:“-”代表阴性;“+”代表阳性。

2.8.2 乳酸菌分子生物学实验

将乳酸菌菌株 A14-2 的 PCR 产物测序并进行同源性比对,构建系统发育进化树结果如图 8 所示,A14-2 和植物乳杆菌 NBRC 15891 亲缘性更近,结合 API50CHL 碳水化合物利用情况,可以确定 A14-2 为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)。

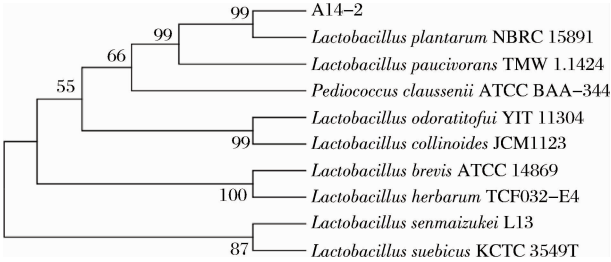


图 8 乳酸菌 A14-2 的 16SrDNA 序列系统发育树

Fig. 8 Polygenetic tree of A14-2 strain based on the complete 16S rDNA sequence

### 3 讨论

本研究从发酵食品中分离得到 1 株对禾谷镰刀菌具有高拮抗活性的乳酸菌株 A14-2,经生理生化及分子鉴定为植物乳杆菌,对该菌抑菌有效成分分析结果显示,其对热较敏感,对 pH 值变化异常敏感,但对蛋白酶处理不敏感,说明其抑菌成分主要为有机酸,也包含一些非蛋白类热敏感物质。通过将不同浓度乳酸菌菌体及发酵上清液与禾谷镰刀菌共培养,发现乳酸菌及其上清液能够降低禾谷镰刀菌 DON 的生物合成,目前很多研究显示乳酸菌菌体可以通过吸附作用降低溶液中 DON 质量浓度<sup>[17-18]</sup>,但乳杆菌 A14-2 并不具备这种作用,其主要作用是通过形成具有抑菌作用的代谢产物以及竞争营养物质和形成不利于禾谷镰刀菌生长的环境影响镰刀菌生长和抑制 DON 的生物合成,但对于已经存在的毒素,并不能通过细胞吸附将其去除。

禾谷镰刀菌是谷物污染的主要病原菌,本实验结果为利用乳酸菌降低谷物食品中呕吐毒素含量提供了理论依据,在之后的研究中,可以进一步将这株植物乳杆菌应用于酿造行业如麦芽制造过程中,从而探究其实际应用的可行性。

### 参 考 文 献

- [1] URREA C A, HORSLEY R D, STEFFENSON B J, et al. Heritability of *Fusarium* head blight resistance and deoxynivalenol accumulation from barley accession Clho4196[J]. *Crop Science*, 2002, 42:1 404 - 1 408.
- [2] 杰彭, 吴晓鹏, 黄惠琴, 等. 镰刀菌毒素研究进展[J]. *中国农业通报*, 2009, 25(2):25 - 27.
- [3] 许伟, 耿芳芳, 范梦雪, 等. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇毒性的研究进展[J]. *生物学杂志*, 2016, 33(1):78 - 85.
- [4] BLAGOJEV N, SKRINJAR M, VESKOVIC M, et al. Control of mould growth and mycotoxin production by lactic acid bacteria metabolites[J]. *Romanian Biotechnological Letters*, 2012, 17:7 219 - 7 226.
- [5] TRIAS R, BANERAS, MONTESINOS E, et al. Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi[J]. *International microbiology*, 2008, 11(4):231 - 236.
- [6] VARSHA K K, PRIYA S, DEVENDRA L, et al. Control of spoilage fungi by protective lactic acid bacteria displaying probiotic properties[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2014, 172(7):3 402 - 3 413.
- [7] LAVERMICOCCA P, FRANCESCA V, ANTONIO E, et al. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(9):4 084 - 4 090.
- [8] PEYTER L C, AXEL C, LYNCH K M, et al. Inhibition of *Fusarium culmorum* by carboxylic acids released from lactic acid bacteria in a barley malt substrate[J]. *Food Control*, 2016, 69:227 - 236.
- [9] MGNUSSEN J, STROM K, SJOGREN J, et al. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 29(1):129 - 135.
- [10] GEREZ C L, TRRES M J, FONT V G, et al. Control of spoilage fungi by lactic acid bacteria[J]. *Biological Control*, 2013, 64(3):231 - 237.
- [11] CIZEIKIENE D, JUODEIKIENE G, PASKEVICIUS A, et al. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread[J]. *Food Control*, 2013, 31(2):539 - 545.
- [12] OLIVERIRA P, BROSNAN B, JACOB F, et al. Lactic acid bacteria bioprotection applied to the malting process. Part II: Substrate impact and mycotoxin reduction[J]. *Food Control*, 2015, 51:444 - 452.
- [13] 蒋雪薇, 盛灿梅, 周倩, 等. 琼脂块法快速平板初筛米根霉 *L*-乳酸高产菌[J]. *食品与机械*, 2010, 26(3):8 - 10.
- [14] 胡晓丹. 禾谷镰刀菌拮抗菌的筛选鉴定及拮抗特性研究[D]. 南京:南京农业大学, 2014.
- [15] FRANCO T S, GARCIA S, HIROOKA E Y, et al. Lactic acid bacteria in the inhibition of *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol detoxification[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2011, 111(3):739 - 748.
- [16] 刘珊春, 赵欣, 李键, 等. 高抗氧化乳酸菌的筛选鉴定[J]. *食品与发酵工业*, 2017, 43(8):59 - 66.
- [17] NIDERKORN V, BOUDRA H, MORGAVI D P. Binding of *Fusarium* mycotoxins by fermentative bacteria *in vitro* [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2006, 101(4):849 - 856.
- [18] ZOU Zhong-yi, HE Zhi-fei, LI Hong-jun, et al. In vitro removal of deoxynivalenol and T-2 toxin by lactic acid bacteria[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2012, 21(6):1 677 - 1 683.

## Screening and identification of lactic acid bacteria inhibiting the biosynthesis of deoxynivalenol

LUO Wei<sup>1,2</sup>, SONG Chun-yan<sup>2</sup>, LI Yan-lin<sup>2</sup>, ZHANG Wei<sup>2</sup>, LU Xin-yi<sup>2</sup>, CAO Yu<sup>1,2\*</sup>

1(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

2(School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**ABSTRACT** The aim of this study was to screen lactic acid bacteria (LAB) inhibiting *Fusarium graminearum* AC-CC36938 and a strain LAB A14-2 with strong antifungal effect was obtained. The effects of different temperature, pH value and protease treatment on the antifungal activity of LAB A14-2 were further studied. The results showed that the pH value had the greatest effect on the antibacterial activity of LAB A14-2, and non-protein heat-sensitive substances also had some antifungal activity. In order to investigate the effect of LAB A14-2 on the biosynthesis of deoxynivalenol (DON), LAB A14-2 and *Fusarium graminearum* were co-cultured on wort medium and DON content changes were analyzed. The results showed that LAB culture and supernatant were able to inhibit the growth of *Fusarium graminearum* and significantly reduce the amount of DON synthesis, but LAB cell can't bind DON. Finally, physiological and biochemical characteristics and molecular identification of LAB A14-2 showed that it was *Lactobacillus plantarum*.

**Key words** *Lactobacillus plantarum*; *Fusarium graminearum*; deoxynivalenol; antifungal activity

(上接第 40 页)

## Enhancing the thermostability and activity of nattokinase by site-directed mutagenesis

ZHAO Han, ZHOU Li, ZHOU Zhe-min\*

(School of Biotechnology and the Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**ABSTRACT** Nattokinase (NK, EC3.4.21.62) is a bacterial serine protease derived from the traditional Japanese food natto with strong fibrinolytic activity. However, the thermal stability of NK is too low to ensure high enzyme activity in the production process, and thus limits its production and application. Proteins deamidation process converts asparagine (Asn) and glutamine (Gln) residues into negatively charged aspartate (Asp) and glutamic acid (Glu), which may change the local structure of protein and affect the enzyme activity, pH optimum, and stability. Therefore, simulating this process can efficiently modify the target enzyme. In order to improve the activity and stability of NK, Asn and Gln located on the surface were mutated to Asp and Glu, respectively. The mutant Q59E with increased activity (about 1.54 times of the wild type) and mutant N218D with increased thermal stability were obtained. The thermal stability of the double mutant Q59E-N218D was further improved, and its half-life ( $t_{1/2}$ , 33 min) was 2.75 times of that of the wild type NK ( $t_{1/2}$ , 12 min). It provides a method for enzyme engineering and a new enzyme material for the industrial application of NK.

**Key words** nattokinase; thermostability; enzyme activity; site-directed mutagenesis; protein engineering