

doi:10.12301/spxb202100309

文章编号:2095-6002(2022)04-0064-10

引用格式:孙庆申,王钰涵,韩德权,等.酸菜中具有抑菌活性乳酸菌的分离鉴定及其产细菌素特性[J].食品科学技术学报,2022,40(4):64-73.



SUN Qingshen, WANG Yuhuan, HAN Dequan, et al. Isolation and identification of lactic acid bacteria with antibacterial activity in pickles and their bacteriocin production characteristics[J]. Journal of Food Science and Technology, 2022, 40(4):64-73.

## 酸菜中具有抑菌活性乳酸菌的分离鉴定及其产细菌素特性

孙庆申<sup>1,2</sup>, 王钰涵<sup>1,2</sup>, 韩德权<sup>1,2</sup>, 张炎<sup>1,2</sup>, 韩晓云<sup>1,3,\*</sup>

(1. 黑龙江大学 农业微生物技术教育部工程研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150500;

2. 黑龙江大学 生命科学学院 黑龙江省普通高等学校微生物重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150080;

3. 黑龙江大学 生命科学学院 黑龙江省普通高等学校分子生物学重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150080)

**摘要:** 目前已有研究陆续从不同的乳酸菌中分离到细菌素,但是这些细菌素存在着抑菌谱窄的问题,寻找广谱抗菌性能的新一代细菌素具有重要的理论价值和应用前景。以市售保质期较长的8种不同品牌的酸菜为材料,将青霉菌作为指示菌,通过抑菌实验筛选出一株能产生抑菌物质的菌株L3,经过生理生化鉴定、16S rDNA测序分析确定该菌株为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*),故命名为植物乳杆菌L<sub>3</sub>,NCBI序列号为MT781360。该菌株在MRS培养基中于37℃培养18~24h时产细菌素L3的抑菌活性最强。将该培养上清液采用乙酸乙酯萃取,葡聚糖凝胶柱Sephadex G-50过滤分离纯化,再经Trinice-SDS-PAGE电泳结果显示,细菌素L3的分子质量约为4~5kDa。细菌素L3对蛋白酶敏感,但其活性不受过氧化氢酶的影响,初步结果显示细菌素L3为蛋白质类物质。细菌素L3在60~100℃处理20min或121℃处理15min仍具有较高的抑菌活性,pH值2~10范围内有良好的稳定性;对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌以及部分真菌具有抑菌活性。植物乳杆菌L<sub>3</sub>分泌的细菌素L3除了具备现有细菌素的稳定性和对革兰氏阳性细菌的杀菌能力以外,还能对革兰氏阴性细菌和真菌起到抑菌效果,这对于易被真菌污染导致腐败的果蔬类产品及乳制品的保藏具有重要意义,希望研究可为具有广谱抗菌性能的天然防腐剂的生产提供新的菌种。

**关键词:** 腌菜;植物乳杆菌;细菌素;分离;抑菌活性

**中图分类号:** TS201.3

**文献标志码:** A

东北酸菜是白菜经腌制而成的传统食品。酸菜腌制过程中的微生物发酵不仅赋予酸菜独特的色、香、味,而且低pH值在一定程度上抑制了有害菌的生长<sup>[1]</sup>。但是随着贮藏期的延长,由于杂菌大量繁殖引起的酸菜腐败现象时有发生。不同的酸菜贮藏性能不同,可能与酸菜中特有微生物及其抑制腐败

菌作用有关。因此,从酸菜中分离具有防腐作用的微生物,并明确其发挥抗菌作用的成分具有重要的意义。

植物乳杆菌作为发酵蔬菜中的主要种属,在发酵过程中会产生不同的抗菌物质,如有机酸、抗菌肽(包括细菌素)等<sup>[2]</sup>。细菌素是一类由核糖体合成

收稿日期:2021-06-21

基金项目:黑龙江省自然科学基金联合引导项目(LH2021C075)。

第一作者:孙庆申,男,教授,博士,主要从事食品活性物质挖掘方面的研究。

\*通信作者:韩晓云,女,副教授,博士,主要从事食品活性物质挖掘方面的研究。

的低分子量抗菌肽,具有一定的抑菌作用<sup>[3-4]</sup>。这一特性使它们成为发酵食品的有效防腐剂。乳酸菌作为一类革兰氏阳性菌,常被用作食品发酵剂和益生菌制剂<sup>[5-6]</sup>。Islam等<sup>[7]</sup>分离得到乳酸菌具有广谱抑菌性,对食源性腐败菌、致病菌具有较好抑菌能力。高兆建等<sup>[8]</sup>从泡菜中分离到的发酵乳杆菌具有良好的耐酸碱性,作为酸性食物防腐剂具有良好的发展前景。齐世华等<sup>[9]</sup>通过筛选高产苯乳酸的菌株得到植物乳杆菌 Lp45,其抑制霉菌生长的能力较强,作为生物保鲜剂具有良好的应用前景。

随着人们食品安全意识的提高,挖掘具有广谱抑菌性能的细菌素受到了越来越多的关注<sup>[10]</sup>。尽管针对植物乳杆菌细菌素分泌的研究已有很多报道,这些菌株的来源不同,同时大多数细菌素的抑菌谱较窄。本研究从市售的保藏期较长的腌菜中筛选出了一株具有高效抗菌活性的菌株,经生理生化及分子生物学鉴定该菌株为植物乳杆菌,并对其所产的细菌素的性质进行了研究。本实验所筛选出的植物乳杆菌 L<sub>3</sub> 产细菌素 L3 除了具备目前研究的细菌素的特性以外,对革兰氏阴性菌如大肠杆菌,以及真菌等都具有较好的抑菌活性,这些特性对于防止食品的微生物败坏具有重要的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 指示菌与试剂

指示菌:凝结芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、单核增生李斯特菌、铜绿假单胞菌、大肠杆菌、白色念珠菌、毕赤酵母、青霉菌均来自黑龙江大学微生物重点实验室保存菌种。

蛋白胨、酵母浸粉、牛肉膏,北京奥博星生物技术有限责任公司;胃蛋白酶、胰蛋白酶、蛋白酶 K、过氧化氢酶、琼脂粉、葡萄糖、硫酸锰、吐温 80、硫酸镁、磷酸钠、氯化钠,天津市科密欧化学试剂有限公司;Sephadex G-50,北京博奥拓达科技有限公司。MRS 肉汤培养基, Solarbio 试剂公司。

PDA 固体培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,加蒸馏水至 1 000 mL,121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min,用于真菌指示菌的培养(不加琼脂的为 PDA 液体培养基)。

LB 固体培养基:酵母浸粉 5 g,蛋白胨 10 g,氯化钠 10 g,琼脂 20 g,加蒸馏水至 1 000 mL,121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min,用于细菌指示菌的培养(不加琼

脂的为 LB 液体培养基)。

### 1.2 仪器与设备

YPD 固体培养基:葡萄糖 20 g,酵母粉 10 g,蛋白胨 20 g,琼脂 20 g,加蒸馏水至 1 000 mL,121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min,用于酵母菌和霉菌的分离与培养(不加琼脂的为 YPD 液体培养基)。

LRH-250 型生化培养箱,上海一恒科技有限公司;LDZM-75 型立式压力蒸汽灭菌器,上海申安医疗器械厂;752 型紫外可见分光光度计,上海光谱仪器有限公司;SW-CJ-2FD 型双人单面净化工作台,苏州净化设备有限公司;XS-212 型生物显微镜,南京江南光电股份有限公司;H1650 型高速离心机,长沙湘仪仪器制造公司;HZQ-C 型空气浴振荡器,哈尔滨东联电子技术开发有限公司;DKS-24 型水浴锅,上海经济区沈荡中新电器厂。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 乳酸菌的分离及拮抗菌初筛

购买市售保质期为 9 个月的各品牌腌制蔬菜,包括亲民北大荒有机酸菜、翠花酸菜、朱老六东北酸菜、迟红棵酸菜、秒厨酸菜丝、农夫大田酸菜、农夫酸菜和正宗大田酸菜产品,在过保质期 1 个月时将每个品牌包装袋内的蔬菜和汁液分别取出,经组织捣碎机捣碎后取 1 mL 样品加到 9 mL 的无菌生理盐水中,充分振荡后进行稀释,取稀释度为  $1 \times 10^{-7}$  和  $1 \times 10^{-8}$  倍的样品 200  $\mu$ L,在含有  $\text{CaCO}_3$  的 MRS 培养基上进行涂布,37 °C 培养 24 ~ 48 h;选择有溶钙圈的白色单菌落通过三区划线进行分离纯化,再挑取单一菌落接种至 MRS 斜面,4 °C 保存备用。将挑选出来的 19 个菌株在 37 °C 兼性厌氧环境下进行培养,观察乳酸菌生长情况。

再利用从酸菜汁中分离出的青霉菌,采用菌饼法进行拮抗实验,对 19 个菌株的抑菌活性进行初筛<sup>[11]</sup>。将对数生长期的乳酸菌悬液以 7 140 g 离心 15 min,取上清液加入至 PDA 培养基,在 PDA 培养基未凝固时,接入分离出的青霉菌,将此含有青霉菌和乳酸菌上清液的 PDA 培养基倒入平板内,28 °C 培养 24 ~ 48 h,观察乳酸菌上清液对青霉菌抑菌圈直径的大小。以无菌生理盐水制成的未加入乳酸菌上清液、仅接种青霉菌的 PDA 培养基为对照。实验重复三次。

#### 1.3.2 一株优势乳酸菌的筛选及菌种鉴定

将 1.3.1 节中筛选出的一株抑菌效果最好的乳酸菌命名为 L<sub>3</sub>。

### 1.3.2.1 乳酸菌 L<sub>3</sub> 生长及抑菌动力学曲线

将乳酸菌 L<sub>3</sub> 以体积分数为 2% 的接种量接入 MRS 液体培养基中, 37 °C 静置培养 24 h。每隔 2 h 测定发酵液的 pH 值以及 OD<sub>600</sub> 值, 以未接菌的 MRS 液体培养基做对照。通过培养时间(*t*)与培养液 OD 值绘制乳酸菌 L<sub>3</sub> 的生长曲线。

在乳酸菌 L<sub>3</sub> 培养 24 h 过程中, 每隔 2 h 取培养液 5 mL, 经 7 140 g 离心 15 min 后, 取上清液。以枯草芽孢杆菌为指示菌, 采用牛津杯法测定上清液对指示菌的抑菌效果, 以培养时间(*t*)为横坐标, 抑菌圈直径(mm)为纵坐标, 绘制抑菌动力学曲线。

### 1.3.2.2 乳酸菌 L<sub>3</sub> 的菌种鉴定

1) 菌体的生理生化特征。根据《伯杰细菌鉴定手册》和《常见细菌系统鉴定手册》方法, 采用革兰氏染色, 吡啶实验, 过氧化氢实验以及碳水化合物利用实验等对乳酸菌 L<sub>3</sub> 进行菌株鉴定<sup>[12]</sup>。

2) 16S rDNA 分子生物学鉴定。采用 Ezup 柱式细菌基因组提取试剂盒对所分离的乳酸菌 L<sub>3</sub> 进行 DNA 提取, 利用细菌通用引物(F: AGTTTGATCMTGGCTCAG; R: GGTTACCTTGTTACGACTT)进行 PCR 扩增, 并将扩增产物委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。利用 blast 软件将所得菌株 L<sub>3</sub> 的 16S rDNA 基因序列与 NCBI 数据库中已知序列进行比对, 进行同源性分析, 然后提交到 NCBI Genbank 数据库进行登记。

### 1.3.3 细菌素 L3 的抗菌活性测定

#### 1.3.3.1 细菌素 L3 的抑菌性能干扰因素排除实验

根据文献[13]报道的方法对抑菌物质的抑菌性能干扰因素, 如酸、蛋白酶等, 进行排除分析。

无细胞上清液(cell-free supernatant, CFS)的制备。将分离出的乳酸菌 L<sub>3</sub> 以体积分数 2% 的接种量接种于 100 mL 的 MRS 液体培养基中, 37 °C 120 r/min 摇床培养 18 h, 7 140 g 离心 10 min 取上清液, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤得到 CFS, 4 °C 保存备用。

指示菌的制备: 将金黄色葡萄球菌和酵母菌按体积分数 2% 的接种量分别接种于 LB 和 YPD 液体培养基中, 37 °C 150 r/min 摇床培养过夜, 1 776 g 离心 10 min 后收集菌体, 稀释至  $1 \times 10^{-7}$  倍, 分别涂布于 LB 和 YPD 固体培养基, 再用牛津杯打孔, 备用。

1) 排除酸实验。将 CFS 冷冻干燥, 用 1 mL 无菌蒸馏水复溶, 再用 5 mol/L NaOH 溶液调节 pH 值

6.5 ~ 7.0<sup>[14]</sup>。采用琼脂扩散法, 向含有指示菌的 YPD 和 LB 固体培养基牛津杯孔内加入调节 pH 前后的 CFS 100 μL, 4 °C 静置 1 h, 于 37 °C 培养 24 h 比较两者的抑菌圈大小。

2) 蛋白酶敏感实验。用 50 mmol/L (pH = 7.0) 的 PBS 缓冲液把适量的蛋白酶 K、胰蛋白酶以及胃蛋白酶溶解, 分别加入经处理的 CFS, 各蛋白酶终质量浓度均为 1 mg/mL<sup>[15]</sup>, 分别调整为各酶的最适 pH 值(蛋白酶 K pH 值 8.0、胰蛋白酶 pH 值 7.8 ~ 8.5、胃蛋白酶 pH 值 1.5 ~ 2.0, 37 °C 水浴 2 h 后调回 pH 值 6.5 ~ 7.0。对照组为未经各种酶处理的 CFS。采用琼脂扩散法, 37 °C 培养 24 h 测量抑菌圈直径。

3) 排除过氧化氢实验。根据文献[16]的方法进行调整后, 用 50 mmol/L (pH = 7.0) 的 PBS 缓冲液把 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 酶溶解, 加入 CFS 中, 使 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 酶终质量浓度均为 10 mg/mL, 以未加 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的 CFS 作为对照组, 37 °C 水浴 2 h 后, 取 100 μL 处理后的 CFS 加入牛津杯孔中, 4 °C 静置 1 h, 于 37 °C 培养 24 h 测量抑菌圈直径。

### 1.3.3.2 细菌素 L3 的提取及纯化

参考文献[16]的方法提取 CFS 中的细菌素, 取 100 mL 的 CFS 于烧杯中, 加入 1.5 倍体积的乙酸乙酯进行萃取, 4 °C 静置过夜, 收集有机相, 45 °C 旋转蒸发, 得到 CFS 中的细菌素。对乳酸菌 L<sub>3</sub> 胞内的细菌素, 采取细胞破碎的方法提取, 具体过程如下: 采用细胞破碎仪将培养至对数生长期的乳酸菌 L<sub>3</sub> 进行超声破碎 5 min, 于 75 °C 水浴中加热 15 min, 灭活蛋白水解酶, 7 140 g 离心 10 min, 用 5 mmol/L PBS 缓冲液 (pH 值 7.1 ~ 7.4) 洗细胞沉淀物, 重悬于灭菌蒸馏水; 再次离心后重悬于 100 mmol/L NaCl 至 pH = 2.0, 4 °C 放置 2 h, 不断搅拌, 使细菌素从破碎的细胞最大限度地释放出来, 悬浮液再次离心, 取上清液, 在上清液中加入 1.5 倍体积的乙酸乙酯进行萃取, 4 °C 静止过夜, 倒出有机相, 45 °C 旋转蒸发, 得到乳酸菌胞内细菌素粗提物, 将其与发酵上清液中提取的细菌素分别用甲醇复溶, 混合后备用。

采用 Sephadex G-50 层析柱将提取的细菌素 L3 进行过滤层析, 流动相使用 100% 纯水, 每 6 mL 馏分收集 1 管, 流速为 0.2 mL/min, 然后再利用自动分步收集器收集样品。收集各洗脱峰进行抑菌活性检测, 将有抑菌活性的收集液合并, 冻干并进一步分析。

### 1.3.3.3 细菌素 L3 的抑菌谱检测

采用琼脂扩散法测定细菌素 L3 的抑菌活性。无菌条件下将 LB、PDA 和 YPD 固体培养基倒入灭菌后的平皿中,待冷却至适当温度,加入各指示菌(凝结芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、单核增生李斯特菌、铜绿假单胞菌、大肠杆菌、白色念珠菌、毕赤酵母、青霉菌)混匀后(指示菌稀释度为  $1 \times 10^{-7}$  倍),插入牛津杯,待冷却后取出。在孔中加入 100  $\mu$ L 的细菌素 L3 水溶液,置于 37  $^{\circ}$ C 培养 24 h,测量抑菌圈直径  $d$ 。以空白培养基为对照组,每组 3 个平行。

### 1.3.3.4 细菌素 L3 分子量的测定

经系列纯化后的活性组分通过 Tricine-SDS-PAGE 电泳测定细菌素 L3 分子量。采用相同条件进行两次电泳,电泳结束后,一份用于染色,另一份经充分洗涤脱去十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)后,覆盖 LB 培养基做抑菌活性验证实验。根据抑菌条带位置判断细菌素 L3 的分子量大小。

### 1.3.3.5 细菌素 L3 的稳定性测定

本部分实验以枯草芽孢杆菌作为指示菌,经 LB 液体培养基培养 24 h 后,1 776 g 离心 10 min 后收集菌体,涂布于 LB 固体培养基平皿中,再通过琼脂扩散法分别测定经过下述处理的细菌素 L3 的抑菌活性,以未处理的细菌素 L3 作为对照。

1) 热稳定性。将细菌素 L3 加热至 60、80、100  $^{\circ}$ C 处理 20 min 或 121  $^{\circ}$ C 处理 15 min,测定其对枯草芽孢杆菌的抑菌圈直径。

2) 酸碱稳定性。根据参考文献[17]方法略做修改,配置 pH = 1.5、2.5、3.5、4.5 的人工模拟胃液、pH = 7 的人工模拟肠液以及 pH > 7 的碱性溶液处理细菌素 L3,测定细菌素 L3 的酸碱稳定性。

3) 蛋白酶的敏感性。根据参考文献[18]的方法略做修改,用胃蛋白酶、胰蛋白酶和蛋白酶 K 分别处理细菌素 L3,将各酶(终浓度为 1 mg/mL)加入细菌素 L3 中,37  $^{\circ}$ C 水浴 2 h,测定细菌素 L3 对不同的蛋白酶的敏感性。

4) 对其他物质的敏感性。参考文献[19-20]的方法,向细菌素 L3 样品中加入质量分数为 1% 吐温-80、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA),30  $^{\circ}$ C 处理 4 h,通过牛津杯法测定细菌素 L3 对上述物质的敏感性。

### 1.3.3.6 细菌素 L3 对金黄色葡萄球菌的生长抑制作用

将初步提纯的细菌素 L3 与金黄色葡萄球菌以 1:1 (体积比)的接种量进行接种,观察未接种的金黄色葡萄球菌和接入细菌素 L3 的金黄色葡萄球菌在 600 nm 下的 OD 值变化。

## 1.4 数据分析

使用 Excel 软件计算平均值和标准误差值。利用 Origin 软件对实验结果进行统计分析,显著性水平为  $P < 0.05$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 乳酸菌的分离及拮抗菌初筛结果

本研究采用溶钙圈法从不同品牌的酸菜中,挑选出呈白色或者微黄色、不透明或半透明、圆润光滑、边沿整齐的 19 个杆状或短杆状乳酸菌菌落(见表 1)。

表 1 19 株乳酸菌菌落形态

Tab. 1 Morphology of 19 *Lactobacillus* colonies

菌株编号	$d$ (菌株)/mm	颜色	形状	质地	光泽	显微形态
L <sub>1</sub>	1.5	白色	圆形整齐	圆润光滑	有	杆状
L <sub>2</sub>	1.0	白色	圆形整齐	圆润光滑	有	杆状
L <sub>3</sub>	1.5	白色	圆形整齐	圆润光滑	有	杆状
L <sub>4</sub>	1.5	白色	圆形整齐	圆润光滑	有	杆状
L <sub>5</sub>	2.0	白色	圆形整齐	圆润光滑	有	短杆状
L <sub>6</sub>	1.5	白色	圆形整齐	圆润光滑	有	杆状
L <sub>7</sub>	1.0	白色	圆形整齐	圆润光滑	有	杆状
L <sub>8</sub>	1.0	白色	圆形整齐	圆润光滑	有	杆状
L <sub>9</sub>	1.5	白色	圆形整齐	圆润光滑	有	杆状
L <sub>10</sub>	1.0	白色	圆形整齐	圆润光滑	有	短杆状
L <sub>11</sub>	1.5	白色	圆形整齐	圆润光滑	有	杆状
L <sub>12</sub>	1.5	白色	圆形整齐	圆润光滑	有	杆状
L <sub>13</sub>	2.0	白色	圆形整齐	圆润光滑	有	杆状
L <sub>14</sub>	1.0	白色	圆形整齐	圆润光滑	有	短杆状
L <sub>15</sub>	1.5	白色	圆形整齐	圆润光滑	有	杆状
L <sub>16</sub>	2.0	白色	圆形整齐	圆润光滑	有	杆状
L <sub>17</sub>	1.5	白色	圆形整齐	圆润光滑	有	杆状
L <sub>18</sub>	1.0	白色	圆形整齐	圆润光滑	有	杆状
L <sub>19</sub>	1.0	白色	圆形整齐	圆润光滑	有	杆状

因为在果蔬贮藏和保鲜过程中,霉菌污染是导致果蔬品质变坏甚至腐败的最主要的有害菌,且霉菌具有传播速度快等特点,所以,本实验以酸菜中分离出的青霉菌作为指示菌,以所得到的 19 株乳酸菌的抑菌活性强弱作为筛选条件,获得 5 株对青霉菌

有拮抗作用的乳酸菌,通过菌饼直径比较发现编号为L<sub>3</sub>的菌株抑菌能力最强(见表2),因此选择乳酸菌L<sub>3</sub>进行后续实验。

表2 19株乳酸菌对青霉菌的抑菌性能

Tab.2 Antibacterial characteristics of 19 lactic acid strain on *Penicillium*

乳酸菌编号	d(抑菌圈)/mm	抑菌率/%	抑菌效果
L <sub>1</sub>	63	28.57	-
L <sub>2</sub>	70	19.48	-
L <sub>3</sub>	40	58.44	++
L <sub>4</sub>	74	14.28	-
L <sub>5</sub>	80	6.49	-
L <sub>6</sub>	57	36.36	+
L <sub>7</sub>	59	33.77	+
L <sub>8</sub>	66	24.67	-
L <sub>9</sub>	73	15.58	-
L <sub>10</sub>	79	7.79	-
L <sub>11</sub>	64	27.27	-
L <sub>12</sub>	55	38.96	+
L <sub>13</sub>	68	22.08	-
L <sub>14</sub>	82	3.90	-
L <sub>15</sub>	72	16.88	-
L <sub>16</sub>	63	15.58	-
L <sub>17</sub>	76	11.69	-
L <sub>18</sub>	57	36.36	+
L <sub>19</sub>	80	6.49	-

- ,无抑菌作用; + ,抑菌率为30%~50%; ++ ,抑菌率在50%以上。

## 2.2 乳酸菌L<sub>3</sub>的生理生化特性及菌种鉴定结果

### 2.2.1 乳酸菌L<sub>3</sub>的生长动力学、产酸特性及抑菌曲线

本实验测定了培养液的OD<sub>600</sub>值,以此判定乳酸菌L<sub>3</sub>的生长曲线,结果见图1,在MRS液体培养基中,乳酸菌L<sub>3</sub>培养约2h开始进入对数生长期,并于18h之后进入了稳定期。该菌株的产酸能力强,在培养2h时pH值下降到5.5左右,到8h时,pH下降到4.0以下。以枯草芽孢杆菌作为指示菌进行抑菌活性测定,从培养4h开始,菌株L<sub>3</sub>的发酵液开始具有抑菌活性,在进入生长稳定期后抑菌活性基本稳定,在24h达到最高水平,所以将24h作为产细菌素L3的最佳发酵时间。

### 2.2.2 乳酸菌L<sub>3</sub>的生理生化特征

利用溶钙圈实验证明了乳酸菌L<sub>3</sub>具有分解Ca-

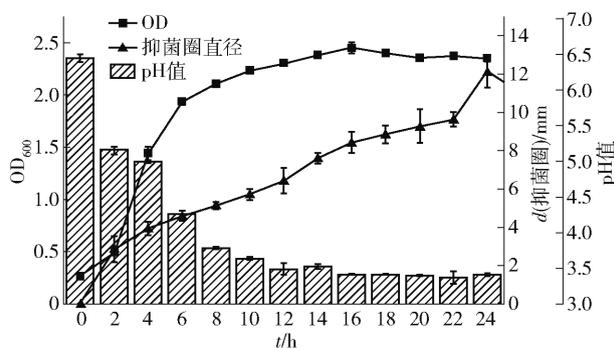


图1 优势乳酸菌L<sub>3</sub>生长曲线及抑菌动力学曲线

Fig.1 Growth curve and antibacterial dynamics curve of dominant lactic acid bacteria L<sub>3</sub>

CO<sub>3</sub>的能力。经过革兰氏染色,吲哚试验,过氧化氢试验以及测试碳水化合物中经发酵后均呈阳性,初步判定菌株L<sub>3</sub>属于乳杆菌属(见表3)。

表3 乳酸菌L<sub>3</sub>生理生化鉴定结果

Tab.3 Physiological and biochemical identification results of lactic acid bacteria L<sub>3</sub>

生理生化实验	革兰氏染色	接触酶反应	吲哚试验	利用乳糖	利用葡萄糖	利用麦芽糖	淀粉水解
特性	+	-	+	+	+	+	-

+ ,能利用该物质和实验阳性;- ,不能利用和实验阴性。

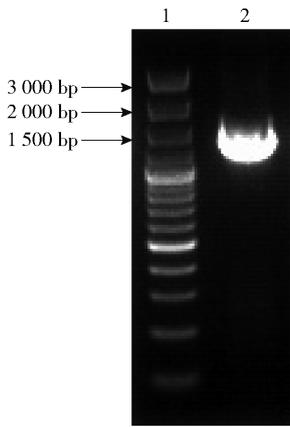
### 2.2.3 乳酸菌L<sub>3</sub>的16S rDNA分子生物学鉴定结果

本实验按照细菌基因组提取试剂盒操作说明提取了菌株L<sub>3</sub>的总DNA,并进行葡聚糖凝胶电泳检测,然后将提取的基因组作为模板进行PCR扩增,获得的目的片段大小在1500bp左右(见图2)。对菌株L<sub>3</sub>的16S rDNA序列在NCBI数据库上进行Blast分析,结果显示,这株菌与植物乳杆菌同源性在99%以上,故将该菌株确定为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*),并命名为植物乳杆菌L<sub>3</sub>,将该序列提交NCBI Genbank数据库,获得菌株序列号为MT781360。

## 2.3 细菌素L3的抗菌活性分析

### 2.3.1 细菌素L3粗提物的抑菌性能干扰因素排除实验结果

有研究表明乳酸菌的代谢产物中具有多种抑菌物质,包括有机酸、过氧化氢等<sup>[21]</sup>。为了证明抑菌物质的蛋白质性质,对1.3.3.1节中的无菌上清液进行了蛋白水解酶处理、排酸和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>酶实验;然后以枯草芽孢杆菌为指示菌,发现加入了蛋白酶K和胰蛋白酶后抑菌活性明显降低,而加入了过氧化氢



泳道1为Marker;泳道2为乳酸菌L<sub>3</sub>

图2 乳酸菌L<sub>3</sub> PCR扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图

Fig.2 Agarose gel electrophoresis image of PCR amplification product of lactic acid bacteria L<sub>3</sub>

酶后抑菌活性没有明显变化,说明除了过氧化氢酶以外,该抑菌物质对其他酶都敏感,证明了抑菌物质是蛋白质类物质(见表4)。这一结果与 Seval 等<sup>[15]</sup>分离出的细菌素 KT11,以及徐志娇等<sup>[22]</sup>从植物乳杆菌 L<sub>10</sub>中发现的代谢物抑菌活性相似,所有这些细菌素对 pH 值有一定的依赖性,对温度和过氧化氢酶不敏感,经过蛋白酶处理后其抑菌活性降低,与本研究结果一致,进一步说明了其蛋白质性质。

表4 细菌素 L3 对酶的敏感性

Tab.4 Susceptibility of bacteriocin L3 to different enzymes

酶的种类	敏感性
蛋白酶 K	+
胰蛋白酶	+
胃蛋白酶	+
过氧化氢酶	-

+,对酶类敏感;- ,对酶类不敏感。

表5 细菌素 L3 的抑菌谱

Tab.5 Antibacterial spectrum of bacteriocin L3

微生物类型	指示菌名称	培养基	t(培养)/°C	d(抑菌圈)/mm
革兰氏阳性菌	凝结芽孢杆菌( <i>Bacillus coagulans</i> )	MRS	37	-
	蜡样芽孢杆菌( <i>Bacillus cereus</i> )	NA	37	17.0 ± 0.1
	枯草芽孢杆菌( <i>Bacillus subtilis</i> )	LB	37	7.0 ± 0.3
	金黄色葡萄球菌( <i>Staphylococcus aureus</i> )	LB	37	10.0 ± 0.1
	单核增生李斯特菌( <i>Listeria monocytogenes</i> )	LB	37	18.0 ± 0.6
革兰氏阴性菌	乳酸杆菌( <i>Lactobacillus fermentum</i> )	MRS	37	-
	铜绿假单胞菌( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> )	NA	37	12.0 ± 0.4
	大肠杆菌( <i>Escherichia coli</i> )	NA	37	4.0 ± 0.8
	肺炎克雷伯氏菌( <i>Klebsiella pneumoniae</i> )	LB	37	10.0 ± 0.8
真菌	白色念珠菌( <i>Candida albicans</i> )	YPD	30	9.0 ± 0.5
	毕赤酵母( <i>Pichia spartinae</i> )	YPD	30	8.0 ± 0.7
	青霉菌( <i>Penicillium spp.</i> )	PDA	30	10.0 ± 0.2

-代表没有抑菌性。

### 2.3.2 细菌素 L3 粗提物的初步纯化结果

初步纯化细菌素 L3 采用分子筛凝胶过滤层析,层析结果见图3,洗脱 2 h 34 min 左右出现第一个峰,全程仅有一个峰,将该峰进行收集后做抑菌实验,发现存在抑菌性。

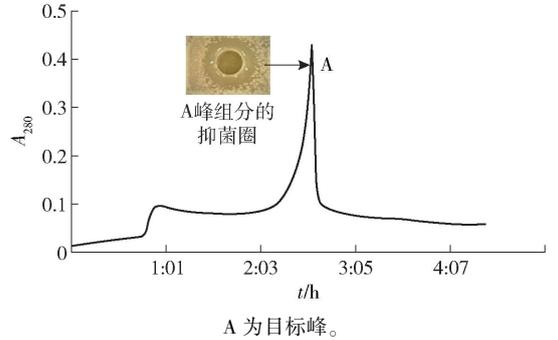


图3 Sephadex G-50 分离的粗细菌素 L3 层析图谱

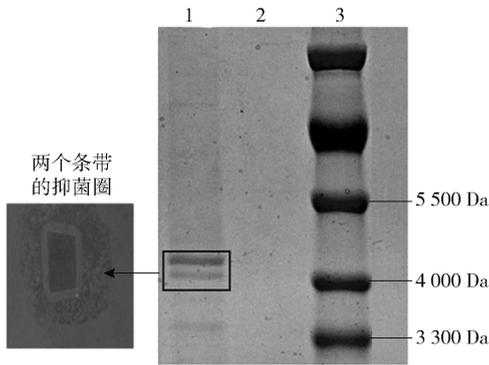
Fig.3 Chromatogram of crude bacteriocin L3 isolated by Sephadex G-50

### 2.3.3 细菌素 L3 的抑菌谱

采用牛津杯法测定细菌素 L3 对不同的革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和真菌等的抗菌活性,结果见表5,除凝结芽孢杆菌和乳酸杆菌外,细菌素 L3 对所有的指示菌都有抑菌活性,对革兰氏阳性菌的抑制活力显著高于革兰氏阴性菌。细菌素 L3 对革兰氏阳性菌中的蜡样芽孢杆菌、单核增生李斯特菌的抑菌活性高于对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌的抑菌活性。对革兰氏阴性菌的抑制作用稍弱,对于铜绿假单胞菌和肺炎克雷伯氏菌的抑菌活性强于大肠杆菌的抑菌活性。除此之外,细菌素 L3 对于真菌中的白色念珠菌、毕氏酵母及青霉菌也显示了良好的抑制生长的能力。这些结果显示,细菌素 L3 具有广谱抑菌活性。

### 2.3.4 细菌素 L3 分子质量的大小

将细菌素 L3 经过乙酸乙酯萃取后旋转蒸发浓缩、Sephadex G-50 凝胶分子筛层析及 HPLC 纯化处理后,对收集的抑菌活性组分进行 Tricine-SDS-PAGE 检测(见图 4),细菌素 L3 泳道显示清晰的非常靠近的两个条带,这两个条带均存在抑菌活性,该抑菌物质的分子质量大小介于 4~5 kDa。研究显示,不同来源的细菌素分子质量范围变化较大,如 Xin 等<sup>[23]</sup>从芽孢杆菌中分离出得细菌素大小为 5.8 kDa,Seval 等<sup>[15]</sup>分离出的细菌素 KT11 分子质量大小在 3.5 kDa;也有一些研究发现的细菌素分子质量较小,例如韩金志等<sup>[24]</sup>分离出的细菌素 FZU122 的分子质量大小为 1.05 kDa,Wayah 等<sup>[25]</sup>分离的细菌素 SPW11 为 1.2 kDa。本研究通过抑菌实验显示,植物乳杆菌 L<sub>3</sub>分泌的细菌素 L3 与已报道的细菌素不是同一种物质。



泳道 1 为细菌素 L3 浓缩液;泳道 2 为 MRS 培养基对照;泳道 3 为 Marker。

图 4 细菌素 L3 的 Tricine-SDS-PAGE 电泳图及抑菌圈

Fig. 4 Tricine-SDS-PAGE electrophoresis analysis of bacteriocin L3 and antibacterial circle

### 2.3.5 细菌素 L3 的稳定性结果

酸碱稳定性结果表明,纯化后得到的细菌素 L3 在 pH 值 2~10 的范围内抑菌活性保持稳定,且在 pH=3 时抑菌活性最高(见图 5),这与 Seval 等<sup>[15]</sup>分离出的细菌素 KT11 性质相似。将细菌素 L3 分别置于 60、80、100 °C 水浴 20 min,或 120 °C 下处理 15 min 后,仍保持抑菌活性(表 6)。

季红等<sup>[26]</sup>从乳杆菌 ST-III 发酵上清液分离到细菌素类物质,但其在 pH=7 时几乎丧失活性。细菌素 L3 相比于此抑菌素的酸碱稳定性更好,这与 Zhou<sup>[27]</sup>,Messaoudi<sup>[28]</sup>,Castro<sup>[29]</sup>等报道的细菌素性质相似。有些细菌在低温下是稳定的,但在 100 °C 或 121 °C 下失去了大部分抑菌活性,例如肠球菌素

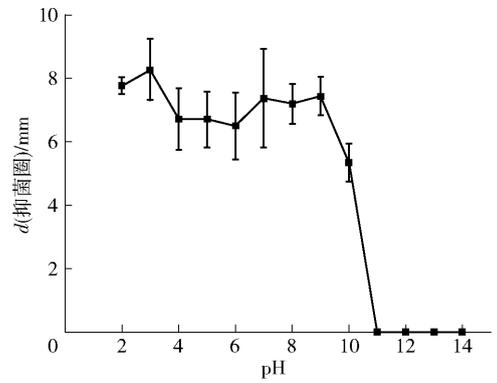


图 5 pH 值对细菌素 L3 抑菌效果的影响

Fig. 5 Effect of pH value on antimicrobial effects of bacteriocin L3

表 6 温度对细菌素 L3 抑菌活性的影响

Tab. 6 Effect of temperature on antibacterial activities of bacteriocin L3

t/°C	d(抑菌圈)/mm
60	8.06 ± 1.02
80	6.93 ± 0.80
100	7.13 ± 0.46
120	3.13 ± 1.22

F4-9<sup>[30]</sup>。因此基于细菌素的蛋白质性质和热稳定性,细菌素 L3 可以归类于热稳定细菌素,在食品工业中有潜在的应用价值。

### 2.3.6 细菌素 L3 对金黄色葡萄球菌的抑制作用结果

金黄色葡萄球菌作为常见的食源性致病微生物,广泛存在于环境中。因此本文研究了细菌素 L3 对金黄色葡萄球菌生长的抑制作用(见图 6),金黄色葡萄球菌在未添加细菌素 L3 的培养基上培养 2 h 时开始进入对数生长期,到 10 h 后开始缓慢增长,24 h 吸光度值到达 1.999。添加细菌素 L3 的金黄

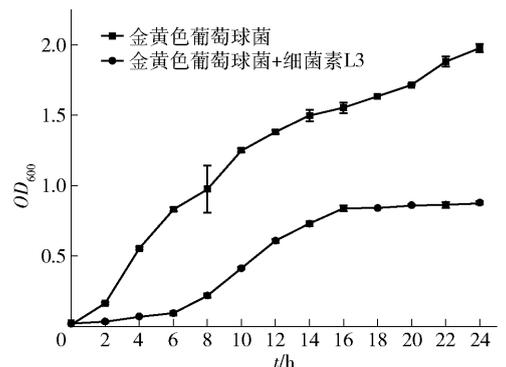


图 6 细菌素 L3 对金黄色葡萄球菌的抑菌作用

Fig. 6 Antibacterial effect of bacteriocin L3 on *Staphylococcus aureus*

色葡萄球菌对数生长期明显延迟,表现出生长抑制,16 h后 OD 值约为 0.868,进入稳定期不再增长。说明细菌素 L3 能很明显地抑制金黄色葡萄球菌生长。

### 3 结 论

本研究在众多品牌腌制蔬菜中分离出 19 株乳酸菌,进行抗菌活性的研究,最终得到一株具有较好抑菌活性的乳酸菌。通过菌体形态、生理生化实验及 16S rDNA 基因序列比对分析,确定该菌株为植物乳杆菌,命名为植物乳杆菌 L<sub>3</sub>。利用 Sephadex G-50 柱层析从该菌株发酵上清液中分离得到抑菌物质,其分子量大小同文献报道的其他植物乳杆菌来源的细菌素不同,初步判定细菌素 L3 是一种新型的细菌素。抑菌实验显示细菌素 L3 对大肠杆菌、蜡样芽孢杆菌以及金黄色葡萄球菌等多种食源性腐败菌均具有抑菌活性。多种蛋白酶处理后发现细菌素 L3 活性完全消失,表明细菌素 L3 是蛋白类物质。稳定性研究表明细菌素 L3 在较高的温度、酸性、中性和偏碱性环境下依旧保持较高的活性,抗逆性强。细菌素 L3 特性与大多文献报道的细菌素存在一定差异。因此,本研究从酸菜中分离得到的植物乳杆菌 L<sub>3</sub> 所产的细菌素 L3 能为一种新型细菌素,在食品防腐方面具备明显的优势,有潜力进一步开发为天然食品防腐剂。但是该细菌素的产量还较低,下一步工作将通过优化发酵条件以及通过群体感应诱导等方法提高该细菌素的产量,并将进一步应用于发酵乳中。

#### 参考文献:

- [1] YANG Y H, PEI J N. Isolation and characterization of an enterococcus strain from Chinese sauerkraut with potential for lead removal [J]. *European Food Research and Technology*, 2020, 246(10): 2055–2064.
- [2] 李书鸿, 柳陈坚, 任贝贝, 等. 不同植物乳杆菌发酵液抑菌活性及其主要有机酸组成比较 [J]. *食品科学*, 2019, 40(5): 8–16.  
LI S H, LIU C J, REN B B, et al. Comparison of antibacterial activity and major organic acids in fermentation broths of different *Lactobacillus plantarum* strains [J]. *Food Science*, 2019, 40(5): 8–16.
- [3] AKHAVAN S, ASSADPOUR E, KATOUIAN I, et al. Lipid nano scale cargos for the protection and delivery of food bioactive ingredients and nutraceuticals [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2018, 74:132–146.
- [4] LU Y Y, AIZHAN R, YAN H, et al. Characterization, modes of action, and application of a novel broad-spectrum bacteriocin BM1300 produced by *Lactobacillus crustorum* MN047 [J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2020, 51(4): 2033–2048.
- [5] SUN C Q, O'CONNOR C J, ROBERTON A M. Antibacterial actions of fatty acids and monoglycerides against *Helicobacter pylori* [J]. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2003, 36(1): 9–17.
- [6] GEBRU Y A, SBHATU D B. Isolation and characterization of probiotic LAB from kimchi and spontaneously fermented teff (*Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter) batter; their effects on phenolic content of teff during fermentation [J]. *BioMed Research International*, 2020, 2020: 4014969.
- [7] ISLAM R, HOSSAIN M N, ALAM M K, et al. Antibacterial activity of lactic acid bacteria and extraction of bacteriocin protein [J]. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 2020, 11(2):49–59.
- [8] 高兆建, 黄亮浩, 丁飞鸿, 等. 源自泡菜的植物乳杆菌产新型广谱抑菌细菌素的特性分析 [J]. *食品科学*, 2021, 42(10):171–177.  
GAO Z J, HUANG L H, DING F H, et al. Characteristics of a new broad spectrum bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* from pickles [J]. *Food Science*. 2021, 42(10):171–177.
- [9] 齐世华, 张栋, 范如意, 等. 抑制霉菌植物乳杆菌的筛选及功能研究 [J]. *食品科技*, 2020, 45(3): 1–7.  
QI S H, ZHANG D, FAN R Y, et al. Screening and functional study of *Lactobacillus plantarum* for inhibition of mildew [J]. *Food Science and Technology*, 2020, 45(3): 1–7.
- [10] 马长路, 焦梦丽, 罗红霞, 等. 传统东北酸菜中乳杆菌的分离鉴定及其降胆固醇特性研究 [J]. *食品研究与开发*, 2019, 40(21): 209–213.  
MA C L, JIAO M L, LUO H X, et al. Isolation and identification of lactic acid bacteria from traditional north-east pickled vegetables and their cholesterol-lowering properties [J]. *Food Research and Development*, 2019, 40(21): 209–213.
- [11] 萨初拉, 陶金山, 苏少锋, 等. 微生物拮抗检测方法的优化及其在秸秆发酵用菌株的应用 [J]. *畜牧与饲料科学*, 2020, 41(5): 19–26.  
SA C L, TAO J S, SU S F, et al. Optimization of microbial antagonism detection method and its application in microbes served as silage additives [J]. *Animal Hus-*

- bandry and Feed Science, 2020, 41(5): 19–26.
- [12] 凌代文. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.
- LING D W. Classification, identification and experimental methods of lactic acid bacteria [J]. Beijing: China Light Industry Press, 1999.
- [13] XU C, FU Y Y, LIU F, et al. Purification and antimicrobial mechanism of a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus rhamnosus* L. 0320 [J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 137:110338.
- [14] 吴爱娟, 甄妮, 黄苓, 等. 广谱抑菌乳酸菌的筛选及其细菌素相关基因分析 [J]. 食品科学, 2020, 41(6): 110–116.
- WU A J, ZHEN N, HUANG L, et al. Screening of a strain of LAB with broad-spectrum antimicrobial activity and the analysis of its bacteriocin related genes [J]. Food Science, 2020, 41(6):110–116.
- [15] SEVAL A H, BUKET K. Antimicrobial activity of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* KT11 against some pathogens and antibiotic-resistant bacteria [J]. Korean Journal for Food Science of Animal Resources, 2018, 38(5): 1064–1079.
- [16] LU Y, YAN H, LI X, et al. Physicochemical properties and mode of action of a novel bacteriocin BM1122 with broad antibacterial spectrum produced by *Lactobacillus crustorum* MN047 [J]. Journal of Food Science, 2020, 85(5): 1523–1535.
- [17] 许亦峰, 罗晓蕾, 施碧红. 不同提取剂对粗细菌素提取效果的影响 [J]. 微生物学杂志, 2013, 33(1): 35–38.
- XU Y F, LUO X L, SHI B H. Extraction effect of different extractant on crude bacteriocin [J]. Journal of Microbiology, 2013, 33(1): 35–38.
- [18] SORNSENEE P, SINGKHAMANAN K, SANGKHA-THAT S, et al. Probiotic properties of *Lactobacillus* species isolated from fermented palm sap in Thailand [J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2021, 13(4): 957–969.
- [19] KUMAR S T, KUMAR J P, NIDHI N, et al. *In vitro* evaluation of probiotic properties of lactic acid bacteria from the gut of *Labeo rohita* and *Catla catla* [J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2015, 7(2): 126–136.
- [20] 赵永慧, 杨杰, 朱卿正, 等. 一株植物乳杆菌 MMB-03 的筛选鉴定及抑菌特性研究 [J]. 安徽农业科学, 2020, 48(17): 189–192.
- ZHAO Y H, YANG J, ZHU Q Z, et al. Screening identification and bacteriostasis characteristics of *Lactobacillus plantarum* MMB-03 [J]. Journal of Anhui Agricultural Science, 2020, 48(17): 189–192.
- [21] 陆春波, 毛银, 李国辉, 等. 植物乳杆菌 DY6 主要抑菌代谢物的分析和鉴定 [J]. 微生物学通报, 2019, 46(9): 2258–2271.
- LU C B, MAO Y, LI G H, et al. Analysis and identification of main antibacterial metabolites secreted by *Lactobacillus plantarum* DY6 [J]. Microbiology China, 2019, 46(9): 2258–2271.
- [22] 徐志娇, 韩晓江, 宋子涵, 等. 一株植物乳杆菌对脂环酸芽孢杆菌的抑菌活性 [J]. 西北农林科技大学学报, 2019, 47(6): 124–131.
- XU Z J, HAN X J, SONG Z H, et al. Antibacterial activity of a *Lactobacillus plantarum* strain against *Bacillus lipocalis* [J]. Journal of Northwest A&F University, 2019, 47(6): 124–131.
- [23] XIN B Y, XU H T, LIU H L, et al. Identification and characterization of a novel circular bacteriocin, bacicyclicin XIN-1, from *Bacillus* sp. Xin1 [J]. Food Control, 2020, 121:107696.
- [24] 韩金志, 姚思羽, 沈昊, 等. 植物乳杆菌 FZU122 产细菌素的分离鉴定及其抑菌活性 [J]. 福州大学学报(自然科学版), 2021, 49(1): 1–7.
- HAN J Z, YAO S Y, SHEN H, et al. Isolation and identification of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* FZU122 and its antibacterial activity [J]. Journal of Fuzhou University (Nation Science Edition), 2021, 49(1): 1–7.
- [25] WAYAH S B, PHILIP K. Purification, characterization, mode of action and enhanced production of salivariacin mmayel, a novel bacteriocin from *Lactobacillus salivarius* SPW1 of human gut origin [J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2018, 35:39–47.
- [26] 季红, 吴正钧, 韩璠, 等. 植物乳杆菌 ST-III 细菌素类抑菌活性的研究 [J]. 食品研究与开发, 2013, 34(7): 6–12.
- JI H, WU Z J, HAN J, et al. Study on bacteriocin production of *Lactobacillus plantarum* ST-III [J]. Food Research and Development, 2013, 34(7): 6–12.
- [27] ZHOU Q, ZHANG S Z, ZHAO Z N, et al. Dynamic changes of bacterial communities and nitrite character during northeastern Chinese sauerkraut fermentation [J]. Food Science and Biotechnology, 2018, 27(1): 79–85.
- [28] MESSAOUDI S, MANAI M, KERGOURLAY G, et al. *Lactobacillus salivarius*: Bacteriocin and probiotic activity

- [J]. *Food Microbiology*, 2013, 36(2): 296–304.
- [29] CASTRO M P, PALAVECINO N Z, HERMAN C, et al. Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production [J]. *Meat Science*, 2011, 87(4): 321–329.
- [30] ABDELFATTAH M M, NAOKI I, TAKESHI Z, et al. Enterocin F4–9, a novel O-linked glycosylated bacteriocin [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(14): 4819–4826.

## Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria with Antibacterial Activity in Pickles and Their Bacteriocin Production Characteristics

SUN Qingshen<sup>1,2</sup>, WANG Yuhan<sup>1,2</sup>, HAN Dequan<sup>1,2</sup>, ZHANG Yan<sup>1,2</sup>, HAN Xiaoyun<sup>1,3,\*</sup>  
(1. *Engineering Research Center of Agricultural Microbiology Technology, Ministry of Education, Heilongjiang University, Harbin 150500, China;*  
2. *Key Laboratory of Microbiology, College of Heilongjiang Province, School of Life Sciences, Heilongjiang University, Harbin 150080, China;*  
3. *Key Laboratory of Molecular Biology, College of Heilongjiang Province, School of Life Sciences, Heilongjiang University, Harbin 150080, China*)

**Abstract:** Bacteriocins from different lactic acid bacteria have been successively isolated currently, however, these bacteriocins often suffer from the problem of a narrow antibacterial spectrum. Exploring new bacteriocins with broad-spectrum antibacterial properties has important theoretical value and application prospects. Commercially available pickled vegetables (sauerkraut) of 8 different brands with a long shelf life were selected as materials and bacteriostasis tests were done using *Penicillium* as indicator bacteria, the strain L<sub>3</sub> which could produce bacteriostatic substances was screened out. The strain was identified as *Lactobacillus plantarum* and named *Lactobacillus plantarum* L3 after physiological and biochemical identification and 16S rDNA sequencing analysis, and the NCBI serial number was assigned MT781360. The bacteriocin L3 showed the strongest bacteriostatic activity when the strain L<sub>3</sub> was cultured in MRS medium at 37 °C for 18–24 h. The cell-free supernatant was extracted with ethyl acetate and purified by Sephadex G–50 gel filtration on a dextran gel column, and then subjected to Tricine-SDS–PAGE electrophoresis. The results showed that the molecular weight of the bacteriocin L<sub>3</sub> was around 4–5 kDa. The bacteriocin L3 was sensitive to proteases, but its activity was not affected by catalase, indicating that the bacteriocin L3 was proteinaceous substance. The bacteriocin L3 still kept high antibacterial activity after subjected to 60–100 °C treatment for 20 min or 121 °C treatment for 15 min and was stable over the range of pH 2–10. In addition, the bacteriocin L3 had good antibacterial activity against Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria and some fungi. In summary, the bacteriocin L<sub>3</sub> produced by *Lactobacillus plantarum* L3 not only had good stability comparable to existing bacteriocins and the ability to kill Gram-positive bacteria, but also exerted an antibacterial effect on Gram-negative bacteria and some fungi. It is of great significance for the preservation of fruits, vegetables and dairy products, all of which are easily contaminated by fungi and spoilage. Therefore, this study was expected to provide new strain for the production of natural preservatives with broad-spectrum antibacterial properties.

**Keywords:** pickled vegetable; *Lactobacillus plantarum*; bacteriocin; isolation; antibacterial activity

(责任编辑:李 宁)