

酢辣椒中益生乳酸菌的筛选及其功能特性

夏海燕, 周思多, 张明喆, 方 晗, 黄 艺, 董明盛*
(南京农业大学食品科技学院, 江苏 南京 210095)

摘 要: 为从酢辣椒筛选出具有益生特性的菌株, 开发辣椒益生菌产品, 本实验从地方特色发酵食品酢辣椒中分离得到16株乳酸菌, 以产酸速度、耐人工胃液能力为指标进行初筛, 通过生化实验和16S rDNA序列分析方法鉴定; 并通过研究菌株对工艺逆境的耐受能力, 表面疏水性和自聚合能力以及抑菌活性、抗氧化能力、降解亚硝酸盐能力和安全特性来评价乳酸菌的益生特性。结果表明: 发酵乳杆菌17-1、发酵乳杆菌18-2和短乳杆菌L3-5能耐受0.4%苯酚、溶酶菌和热处理; 具有较高的表面疏水性和自聚合能力; 能产生具有广谱抑菌效果的细菌素来抑制病原菌的生长; 菌株L3-5和17-1具有较高的抗氧化能力; 3株菌都具有胆盐水解酶活性和产 γ -氨基丁酸能力, 并且都属于安全性菌株。综上所述, 传统酢辣椒是分离益生乳酸菌新的天然来源, 从中分离得到的发酵乳杆菌17-1、发酵乳杆菌18-2和短乳杆菌L3-5可以作为潜在的益生性菌株。

关键词: 酢辣椒; 益生菌; 分离; 功能特性; 抗氧化

Screening and Functional Characteristics of Probiotics from Zuolajiao, a Traditional Fermented Hot Pepper Product

XIA Haiyan, ZHOU Siduo, ZHANG Mingzhe, FANG Han, HUANG Yi, DONG Mingsheng*
(College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The present study was designed to screen 16 strains of lactic acid bacteria isolated from Zuolajiao for their probiotic potential for the development of functional foods. The acid production rates and resistance to artificial gastric juice of these isolates were comparatively evaluated. They were identified by biochemical tests and 16S rDNA sequence analysis. In addition, their probiotic properties were evaluated with respect to stress tolerance, surface hydrophobicity, auto-aggregation ability, antibacterial activity, antioxidant capacity, nitrite degradation ability and safety. Three potential probiotic strains, namely *Lactobacillus fermentum* 17-1 and 18-2 and *Lactobacillus brevis* L3-5 were found to be tolerant to 0.4% phenol, lysozyme and heat treatment and have high surface hydrophobicity and auto-aggregation ability. They could produce broad-spectrum bacteriocins against pathogenic bacteria. L3-5 and 17-1 had stronger antioxidant potential. All strains exhibited bile salt hydrolase activity and γ -aminobutyric acid producing ability and were safe. In conclusion, Zhajiao is a new natural source of probiotics, and *L. fermentum* 17-1 and 18-2 and *L. brevis* L3-5 can be used as potential probiotic strains.

Keywords: Zuolajiao; probiotic; isolation; functional properties; antioxidant activity

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180315-199

中图分类号: TS214.9

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2019)06-0093-07

引文格式:

夏海燕, 周思多, 张明喆, 等. 酢辣椒中益生乳酸菌的筛选及其功能特性[J]. 食品科学, 2019, 40(6): 93-99. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180315-199. <http://www.spkx.net.cn>

XIA Haiyan, ZHOU Siduo, ZHANG Mingzhe, et al. Screening and functional characteristics of probiotics from Zuolajiao, a traditional fermented hot pepper product[J]. Food Science, 2019, 40(6): 93-99. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180315-199. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2018-03-15

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31371807)

第一作者简介: 夏海燕(1993—)(ORCID: 0000-0003-2386-9000), 女, 硕士, 研究方向为食品微生物。

E-mail: 2015108017@njau.edu.cn

*通信作者简介: 董明盛(1961—)(ORCID: 0000-0002-4988-8915), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品微生物与生物技术。

E-mail: dongms@njau.edu.cn

酢辣椒是四川、湖北、湖南和贵州等地区的传统发酵食品,多为农家自制,其口味独特,在当地广受人们的喜爱。制作酢辣椒的原料及方法各有不同,但大多数是由辣椒粉、米粉或是玉米粉,加水拌和入坛自然发酵而成^[1]。研究表明,自然发酵的酢辣椒中存在大量乳酸菌^[2],不同地区酢辣椒产品中乳酸菌群组成各异^[3-4],包括植物乳杆菌、肠膜明串珠菌、乳链球菌、醋酸杆菌、发酵乳杆菌等。乳酸菌在代谢过程中产生乳酸、醋酸、醇、醛、酮等物质,对酢辣椒风味、营养、质地等起重要作用^[2]。同时,乳酸菌还可以黏附于肠上皮细胞,调节胃肠道微生物菌群,减少胃肠道感染和炎症性肠病以及调节免疫系统^[5-7]。

目前对酢辣椒中乳酸菌资源的研究主要集中在菌种的筛选以及发酵工艺的优化^[2,8],对于其中可能具有益生属性的乳酸菌研究较少。从其他发酵食品中分离得到的植物乳杆菌、发酵乳杆菌和醋酸杆菌等显示出良好的益生属性,表现为产酸能力强、胃肠环境适应能力强、能有效提高动物的生长性能和免疫功能^[9]。作为益生菌,发挥益生特性的前提是进入人体肠道并在其中定植,所以在筛选益生菌时需要注意考察乳酸菌对酸性环境、肠道环境的耐受能力。同时益生菌的肠道黏附能力,抑制病原菌能力和抗氧化能力等其他功能性特性也尤为重要^[10]。

综上所述,酢辣椒是益生菌的天然来源,但是对于酢辣椒中具有益生特性的乳酸菌在体内发挥益生作用的研究较少。本实验以农贸市场采集的酢辣椒为研究对象,分离得到16株乳酸菌,以产酸能力和模拟胃液耐受能力为指标进行初筛,得到4株具有潜在益生功能的乳酸菌,通过研究菌株对工艺逆境的耐受能力、菌株的疏水性和自聚合能力、菌株发酵液的抗菌和抗氧化能力等,最终得到3株具有益生特性的菌株。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

酢辣椒采自贵州剑河县农贸市场,在4℃转移至实验室备用。

MRS培养基 上海盛思生化科技有限公司; API 50 CHL培养基 法国生物梅里埃公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

手提式压力蒸汽灭菌器 上海三申医疗器械有限公司; LRH系列生化培养箱 上海一恒科技有限公司; AIPHAPHOT-2 YS2光学显微镜 日本Nikon公司; PB-10 pH仪 德国Sartorius公司; Mastercycle聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)仪 德国Eppendorf公司; Tanon 1600凝胶成像系统 上海天能公司。

1.3 方法

1.3.1 酢辣椒中益生乳酸菌的分离

取酢辣椒样品25 g装入225 mL无菌生理盐水中,摇匀后梯度稀释涂布于MRS固体培养基上,37℃培养48 h,选取平板上具有较大溶钙圈的菌落,进行分离纯化。通过革兰氏染色和过氧化氢接触酶实验筛选出符合乳酸菌菌株。

1.3.2 益生乳酸菌的筛选

1.3.2.1 产酸性能测定

将二次活化的菌株接种2%到MRS液体培养基中。37℃厌氧培养24 h,每隔2 h测量菌液的pH值和总酸。总酸的测定参照GB/T 12456—2008《食品中总酸的测定》^[11]。

1.3.2.2 人工消化液耐受性实验

人工模拟胃液配制^[12]:胃蛋白酶(比活力3 000 U/mg)溶于0.5 g/100 mL NaCl溶液中,用1 mol/L HCl溶液调节pH 2.0,终质量浓度为0.27 mg/mL;人工模拟肠液配制:胰蛋白酶溶于0.5 g/100 mL NaCl溶液,添加0.3%胆盐并用0.1 mol/L NaOH溶液调节pH 8.0,终质量浓度为0.4 mg/mL,上述所有溶液过0.22 μm滤膜除菌。

实验方法:菌株在连续传代培养至稳定期后取1 mL加入9 mL的模拟胃液或肠液中,混合均匀后37℃培养3 h。倾注平板法测定菌株经胃液和肠液处理前后的活菌数,根据式(1)计算存活率:

$$\text{菌株存活率}/\% = \frac{\text{培养3 h后活菌数}}{\text{培养0 h后活菌数}} \times 100 \quad (1)$$

1.3.3 菌株鉴定

1.3.3.1 生理生化鉴定

初步分析菌种生理特征,结合糖醇发酵实验试剂条(API试剂条)进行生理生化鉴定实验。

1.3.3.2 分子生物学鉴定

采用六烷基三甲基溴化铵(hexadecyl trimethyl ammonium bromide, CTAB)-溶菌酶法提取菌株DNA。16S rDNA扩增采用通用引物,27F和1492R。PCR条件为:94℃预变性4 min,94℃变性1 min,58℃退火1 min,72℃延伸2 min,此步骤共进行29个循环。72℃延伸10 min,4℃保存。PCR产物经0.8%琼脂糖凝胶电泳检测后送去生工生物工程(上海)公司测序。将所得序列与NCBI的GenBank数据库中已知序列进行比对,并用Clustal X软件和MEGA(version 6.06)软件进行相似性分析,从GenBank菌株中选择亲缘关系较远的菌株构建系统发育树,从而分析菌株间的亲缘关系。

1.3.4 筛选菌株对工艺逆境的耐受特性

1.3.4.1 热的耐受力

将菌株在60℃水浴条件下处理5 min,对比处理前后活菌数,按式(2)计算存活率:

$$\text{菌株存活率}/\% = \frac{\text{热处理后的活菌数}}{\text{热处理前的活菌数}} \times 100 \quad (2)$$

1.3.4.2 溶菌酶的耐受能力

将活化好的菌株细胞用含有100 mg/L溶菌酶的MRS液体培养基重悬,对比培养0、30、90 min的活菌数。

1.3.4.3 0.4%苯酚的耐受能力

将活化好的菌株接种到0.4%苯酚的MRS液体培养基中37℃培养24 h。将0 h和24 h的系列稀释液进行活菌计数。

1.3.5 筛选菌株的表面疏水性和自聚合能力

1.3.5.1 表面疏水性

按照Ding Wurong等^[13]方法将乳酸菌细胞悬浮液分别与正十六烷、氯仿和乙酸乙酯混合,静置分层,在600 nm波长处记录水相的吸光度。根据式(3)计算细胞表面疏水性:

$$\text{疏水性}/\% = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100 \quad (3)$$

式中: A_0 和 A_t 分别为试剂萃取前、后水相在600 nm波长处的吸光度。

1.3.5.2 自聚合能力

参照Shekh等^[14]的方法测定自聚合能力。观察乳酸菌细胞悬浮液在37℃放置0、2、4、24 h,在600 nm波长处检测吸光度。根据式(4)计算自聚合能力:

$$\text{自聚合能力}/\% = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100 \quad (4)$$

式中: A_t 为 t 时刻的吸光度; A_0 为 t 为0时的吸光度。

1.3.6 筛选菌株的抗菌活性测定

采用牛津杯法测定菌株对3种病原菌(大肠杆菌K12、铜绿假单胞菌PAO1、金黄色葡萄球菌ATCC6538)的抑制作用。上清液做3种方式处理,分别为用1 mol/L NaOH溶液将pH值调至6.0,用过氧化氢酶处理和胰蛋白酶处理,然后过滤灭菌。加入准备好的病原菌平板上的牛津杯中,将平板于4℃放置4 h,直到上清液扩散到琼脂中,在37℃条件下培养24 h,测定抑菌圈直径(mm)。

1.3.7 筛选菌株的抗氧化能力测定

将二次活化的菌株发酵上清液作为实验样品溶液,根据Xiao Yu等^[15]描述的方法分析菌株的体外抗氧化能力。

1.3.7.1 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)自由基清除能力测定

取样品溶液2 mL与2 mL 0.2 mmol/L DPPH溶液混合,避光反应30 min,在517 nm波长处读取样品溶液和DPPH溶液的吸光度。

$$\text{DPPH自由基清除率}/\% = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}}}{A_{\text{对照}}} \times 100 \quad (5)$$

式中: $A_{\text{对照}}$ 为DPPH溶液的吸光度; $A_{\text{样品}}$ 为样品溶液存在下的吸光度。

1.3.7.2 清除2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS)阳离子自由基能力的测定

将1 mL样品溶液与4 mL ABTS的乙醇溶液混合,室温反应6 min后测定734 nm波长处的吸光度。

$$\text{ABTS阳离子自由基清除率}/\% = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}}}{A_{\text{对照}}} \times 100 \quad (6)$$

式中: $A_{\text{对照}}$ 为没有样品溶液的吸光度; $A_{\text{样品}}$ 为样品溶液存在下的吸光度。

1.3.7.3 亚铁离子还原力(ferric reducing ability of plasma, FRAP)测定

将1 mL样品与5 mL FRAP试剂混合,37℃反应20 min,在593 nm波长处读取吸光度。配制100~1 600 μmol/L FeSO₄标准溶液,以FeSO₄代替样品。标准曲线方程为: $y=1.6008x-0.0105$ ($R=0.9996$),根据标准曲线计算样品的FeSO₄当量浓度。FRAP越强,抗氧化能力越强。

1.3.8 筛选菌株的胆盐水解酶(bile salt hydrolase, BSH)活性和产γ-氨基丁酸(γ-aminobutyric acid, GABA)能力测定

1.3.8.1 BSH活性测定

在含有0.37 g/L CaCl₂和5 g/L牛黄胆酸钠的培养基中用接种环蘸取菌液划线,37℃培养3 d,观察菌落周围是否形成一圈沉淀环。

1.3.8.2 乳酸菌产GABA能力测定

将菌株以2%接种于含1%谷氨酸钠的MRS培养基中,采用高效液相色谱法测定GABA的产量^[16]。

1.3.9 安全评估

1.3.9.1 药敏实验

利用纸片法进行药敏实验^[17],药敏纸片种抗生素含量分别为红霉素15 μg,链霉素10 μg,卡那霉素30 μg,壮观霉素100 μg,四环素30 μg,环丙沙星5 μg,万古霉素30 μg,氯霉素和氨苄西林10 μg。

1.3.9.2 溶血活性实验

根据Foulquié Moreno^[18]和Pieniz^[10]等在血琼脂平板上测试溶血活性。将菌株划线至血琼脂平板,37℃厌氧培养48 h,选择金黄色葡萄球菌作为阳性对照。

1.3.9.3 DNA酶活性测定

如Foulquié Moreno等^[18]所述评估DNA酶活性。使用含甲苯胺蓝的DNA酶琼脂培养基接种菌株进行实验。将二次活化的菌株接种与平板上,37℃厌氧培养48 h。

1.4 数据分析

各实验组重复3次,数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示,使用SPSS 16.0统计软件进行统计分析,采用One-Way ANOVA进行组间比较分析,图表绘制采用Origin 2018软件。

2 结果与分析

2.1 酢辣椒中筛选菌株的产酸能力

对酢辣椒样品进行菌种分离,筛选出革兰氏阳性、过氧化氢接触酶阴性的16株乳酸菌纯菌株。根据产酸速度,筛选出6株产酸速度快的乳酸菌(图1),编号为7-2、6-1、L3-4、L3-5、18-2和17-1。

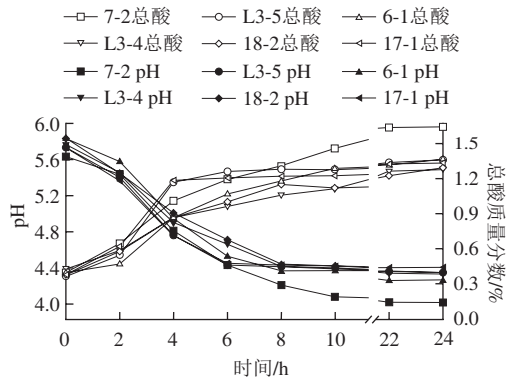


图1 6株菌在MRS液体培养基的pH值和总酸变化

Fig. 1 Changes in pH and total titratable acidity of six strains in MRS broth

如图1所示,在MRS中生长24 h后,6株乳酸菌的pH值稳定在4.0~4.4,总酸的范围为1.28%~1.71%。pH值在发酵前10 h内迅速下降,随着菌株生长到稳定期而缓慢下降。所有菌株培养14 h都可进入稳定生长期,其中L3-5和17-1产酸最快,在培养4 h后即进入对数生长期。研究表明,总酸和pH值的变化率与乳酸菌的生长性能密切相关^[19],甚至影响了它们的发酵特性^[20],且当pH值低于5.5时,由乳酸菌产生的代谢产物抑菌效果更好^[21]。

2.2 菌株胃肠道耐受能力

表1 菌株在模拟胃、肠液中菌株的存活率

Table 1 Survival rates of isolates in simulated gastrointestinal fluids

菌株编号	人工胃液 (lg (CFU/mL))		存活率/%	人工肠液 (lg (CFU/mL))		存活率/%
	0 h	3 h		0 h	3 h	
7-2	8.52±0.04	2.02±0.03	23.71±0.24 ^a	8.58±0.09	5.85±0.04	68.10±0.07 ^e
L3-5	8.49±0.01	3.31±0.01	38.99±0.07 ^c	8.63±0.04	6.31±0.02	73.12±0.11 ^d
6-1	8.60±0.01	2.31±0.01	26.86±0.08 ^b	8.56±0.06	4.20±0.03	49.07±0.01 ^b
L3-4	7.70±0.08	3.19±0.16	41.42±1.64 ^d	8.59±0.05	3.6±0.01	41.96±0.32 ^c
18-2	7.82±0.01	4.61±0.02	58.95±0.18 ^e	7.91±0.11	5.74±0.05	72.57±0.76 ^d
17-1	8.48±0.01	4.56±0.03	53.77±0.29 ^d	8.34±0.07	6.34±0.01	76.02±0.52 ^e

注: 同列小写字母不同表示差异显著 ($P<0.05$), 下同。

从表1可知,6株乳酸菌在pH 2.0的胃液环境下培养3 h后活菌数均有一定程度的下降。其中菌株18-2的存活率最高,达到58.95% ($P<0.05$),其次是17-1 (53.77%)、L3-4 (41.42%)和L3-5 (38.99%)。菌株7-2和6-1的存活率相对较低,分别为23.71%和26.86%,说明其耐受胃液的能力较差。在模拟肠液消化3 h后菌株17-1 (76.02%)存活率最高,其次是L3-5 (73.12%)、18-2 (72.57%)和7-2 (68.10%)。乳酸菌在进入人胃肠道内,只有不被胃肠道环境抑制和消化^[22],在肠道中的定植^[23]才能发挥其益生作用。综上结果将菌株7-2、17-1、18-2和L3-5选定为潜在益生乳酸菌进行下一步研究。

2.3 4株潜在益生乳酸菌菌株的鉴定

API细菌鉴定系统试剂条,检验株菌对49种碳源的利用能力,将对照作为阴性实验,底物被利用的反应结果均为阳性,结果见表2,菌株7-2、L3-5、18-2和

17-1分别可以利用24、8、14种和13种底物。将反应结果输入乳酸菌和相关细菌鉴定软件中,依据梅里埃数据库比对,将7-2鉴定为植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*); L3-5鉴定为短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*); 17-1和18-2鉴定为发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*)。

表2 API 50 CHL试剂条反应结果

Table 2 Results of API 50 CHL strip reaction					测试指标	7-2	L3-5	18-2	17-1
测试指标	7-2	L3-5	18-2	17-1	对照	—	—	—	—
甘油	—	—	—	—	七叶灵	+	—	+	—
赤藓醇	—	—	—	—	柳醇	+	—	+	—
D-阿拉伯糖	—	—	—	—	纤维二糖	+	—	+	—
L-阿拉伯糖	+	—	—	+	麦芽糖	+	+	+	+
核糖	+	+	—	+	乳糖	+	+	—	+
D-木糖	—	—	—	—	蜜二糖	+	+	—	+
L-木糖	—	—	—	—	蔗糖	+	+	+	+
阿东糖醇	—	—	—	—	海藻糖	+	—	—	+
β -甲基-D-木糖苷	—	—	—	—	菊糖	—	—	—	—
半乳糖	+	+	+	+	松三糖	+	—	—	—
葡萄糖	+	+	+	+	棉子糖	+	—	—	+
果糖	+	+	+	+	淀粉	—	—	—	—
甘露糖	+	—	+	+	糖原	—	—	—	—
山梨糖	—	—	—	—	木糖醇	—	—	—	—
鼠李糖	—	—	—	—	挠牛儿糖	+	—	+	—
卫矛醇	—	—	—	—	D-松二糖	+	—	—	—
肌醇	—	—	—	—	D-来苏糖	—	—	—	—
甘露醇	+	—	—	—	D-塔塔糖	—	—	—	—
山梨醇	—	—	—	—	D-岩糖	—	—	—	—
苦杏仁苷	+	—	+	—	L-岩糖	—	—	—	—
熊果苷	+	—	+	—	D-阿拉伯糖醇	—	—	—	—
α -甲基-D-甘露糖苷	+	—	—	—	L-阿拉伯糖醇	—	—	—	—
α -甲基-D-葡萄糖苷	—	—	—	—	葡萄糖酸盐	+	—	+	+
N-乙酰-葡萄糖胺	+	—	+	—	2-酮基-葡萄糖酸盐	—	—	—	—
					5-酮基-葡萄糖酸盐	—	—	—	—

注: +, 阳性反应; —, 阴性反应。

将菌株的16S rDNA的PCR产物测序后,进行同源性分析,构建系统发育树,在GenBank数据库的同源性高的序列用作参考序列。菌株7-2与植物乳杆菌属模式菌株KC887524.1达到99%的同源性; L3-5与数据库中短乳杆菌HM058973.1同源性达到99%; 18-2和17-1则分别与发酵乳杆菌GU138568.1和AY929282.1达到100%和99%的同源性。结合形态学及糖发酵实验结果,确定分离菌株7-2为植物乳杆菌, L3-5为短乳杆菌, 18-2和17-1为发酵乳杆菌。

2.4 筛选菌株对工艺逆境的耐受特性

表3 乳酸菌对热处理、溶菌酶的耐受力

菌株编号	热处理 (lg (CFU/mL))		存活率/%	溶菌酶 (lg (CFU/mL))		
	0 min	5 min		0 min	30 min	90 min
7-2	9.52±0.05	7.00±0.04	73.53±0.81 ^a	9.42±0.05	9.47±0.02	9.56±0.02
L3-5	9.57±0.02	8.42±0.02	87.98±0.03 ^d	9.34±0.05	9.39±0.04	9.59±0.01
18-2	9.20±0.05	8.67±0.03	94.24±0.29 ^e	9.32±0.02	9.18±0.03	9.40±0.07
17-1	9.62±0.01	7.93±0.04	82.43±0.33 ^c	9.60±0.09	10.08±0.00	9.50±0.03

表3表明, 4株菌经过热处理都有较高的存活率。其中菌株18-2具有较好的热耐受力, 其存活率达到94.24% ($P<0.05$), 其次是菌株L3-5和17-1, 存活率分别为87.98%和82.43%。乳酸菌对热的耐受力对于益生菌在食品 and 食品工业中的应用具有积极的作用。

溶菌酶实验中, 处理前后活菌数都没有明显下降(表3), 说明筛选菌株均对100 mg/mL质量浓度的溶菌酶具有很好的耐受力。

表4 乳酸菌对0.4%苯酚的耐受力
Table 4 Tolerance of strains to 0.4% phenol

菌株编号	活菌数 (lg (CFU/mL))		
	0 h	24 h	变化值
7-2	8.03±0.03	8.40±0.07	0.37±0.01 ^b
L3-5	7.95±0.04	8.47±0.03	0.52±0.07 ^{cd}
18-2	7.95±0.01	8.87±0.03	0.92±0.04 ^e
17-1	7.87±0.02	8.09±0.02	0.22±0.04 ^a

从表4可以看出, 菌株经0.4%苯酚溶液处理前后活菌数没有减少。苯酚是肠中芳香族氨基酸代谢的常见副产物, 菌株对苯酚的抗性表明肠道条件下存活的能力^[24]。结果表明筛选菌株可以抵抗肠道中苯酚的抑菌作用。

2.5 筛选菌株的疏水性和自聚合能力

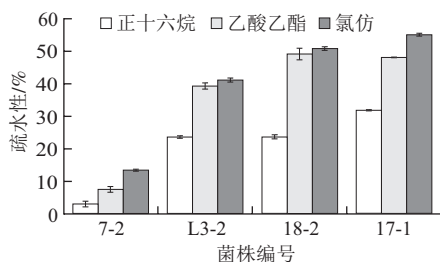


图2 菌株表面疏水性
Fig. 2 Cell surface hydrophobicity of strains

如图2所示, 所有菌株对氯仿和乙酸乙酯显示出更高的表面疏水性, 在Shekh等^[14]的研究中, 溶剂类型的亲和力与本研究相同, 不同乳酸菌对氯仿的疏水性最高, 而对正十六烷最低。菌株的肠道黏附能力是益生菌的重要特性。细菌表面疏水性和自聚合能力作为乳酸菌的表面特性, 被用于间接评估益生菌的黏附能力^[25-26]。菌株17-1、18-2和L3-5疏水性较高, 表明其对肠道的黏附性可能较强。

由图3可见, 所有菌株具有较高的自聚合能力。接种2、4 h和24 h其自聚合能力范围分别为6.8%~19.7%, 7.2%~28.1%和48.4%~70.7%。其中发酵乳杆菌18-2 (70.50%) 和发酵乳杆菌17-1 (70.67%) 表现出更高的自集合能力。已有研究表明, 菌株的自聚合能力对形成生物膜有重要影响, 这有助于肠道定植以保护胃肠道中的菌株^[14]。

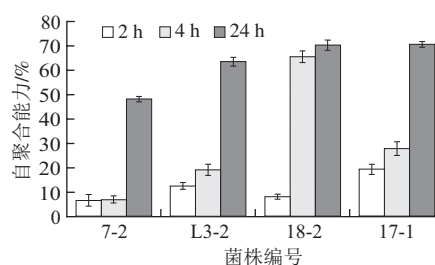
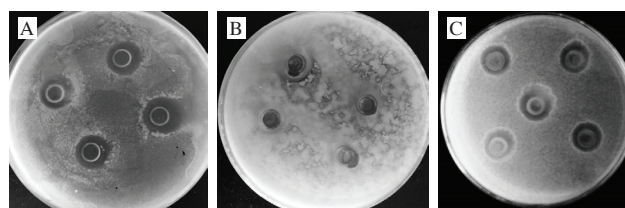


图3 分离菌株的自聚合能力
Fig. 3 Auto-aggregation of selected strains

2.6 筛选菌株的抑菌作用



A.大肠杆菌K12; B.铜绿假单胞菌PAO1; C.金黄色葡萄球菌ATCC6538。

图4 4株乳酸菌对3种指示菌的抑制作用

Fig. 4 Inhibitory activities of four strains against three indicator strains

如图4所示, 4株乳酸菌发酵上清液均能抑制大肠杆菌K12和金黄色葡萄球菌ATCC6538, 不能抑制铜绿假单胞菌PAO1, 这与Tulumoglu等^[27]报道的结果一致。

表5 菌株的抑菌能力
Table 5 Antimicrobial activity of isolates

指示菌	样品处理	抑菌圈直径/mm			
		7-2	L3-5	18-2	17-1
大肠杆菌 K-12	发酵上清原液	14.15±0.087 (++)	15.15±0.087 (++)	14.72±0.087 (++)	14.69±0.05 (++)
	中和处理	14.12±0.077 (++)	15.12±0.077 (++)	14.62±0.033 (++)	14.63±0.036 (++)
	过氧化氢处理	10.08±0.02 (+)	11.08±0.02 (+)	13.32±0.01 (++)	12.23±0.018 (++)
	胰蛋白酶处理	—	—	9.03±0.013 (+)	—
金黄色葡萄球菌 ATCC6538	发酵上清原液	11.05±0.063 (+)	12.05±0.063 (++)	12.31±0.033 (++)	11.08±0.02 (+)
	中和处理	11.03±0.032 (+)	12.03±0.032 (++)	12.25±0.034 (++)	11.02±0.033 (+)
	过氧化氢处理	9.23±0.034 (+)	10.23±0.034 (+)	11.04±0.045 (+)	10.65±0.025 (+)
	胰蛋白酶处理	—	—	—	—

注: 直径<9 mm, 无抑菌活性, 记为“—”; 9 mm≤直径<12 mm, 有抑菌活性, 记为“+”; 直径≥12mm, 抑菌活性强, 记为“++”。

由表5可知, 菌株18-2、L3-5和17-1的抑菌能力更强, 中和法排除有机酸和过氧化氢酶的作用、排除过氧化氢对指示菌的抑菌作用后, 用胰蛋白酶对4个菌株发酵液进行处理, 结果抑菌效果有明显降低, 确定了抑菌物质中含有具备蛋白质性质的细菌素^[28]。乳酸菌发酵上清液对病原体的抑制能力具有潜在应用价值, 乳酸菌可以通过抑制病原菌生长来保持肠胃道平衡, 进而改善人类健康^[14]。

2.7 筛选菌株的抗氧化活性

通过3种不同的方法评估抗氧化活性, 结果如表6所示, 所有菌株都表现出一定的ABTS阳离子自由基清除

能力，但是清除能力相差较大（ $P<0.05$ ）。其中L3-5、7-2和17-1具有较高的ABTS阳离子自由基清除能力（分别为65.95%、56.91%和61.13%）。而这4株菌清除DPPH自由基清除能力差异不是很明显。FRAP法是通过测量样品中的还原剂将三吡啶基三嗪（tripyridyltriazine, TPTZ）- Fe^{3+} 还原成TPTZ- Fe^{2+} 的能力来衡量样品的抗氧化能力，结果表明菌株L3-5、7-2和17-1表现出较高抗氧化活性（565.55、571.61 $\mu\text{mol/L}$ 和547.22 $\mu\text{mol/L}$ ）。先前的报道证明乳酸菌的完整细胞在体内具有抗氧化活性^[29]。不同方法测定的抗氧化能力不同，可能是不同乳酸菌起抗氧化作用的活性物质的不同，综合比较，发酵乳杆菌17-1、植物乳杆菌7-2和短乳杆菌L3-5发酵上清液具有较好的抗氧化能力，其在肠道内生长期间能通过发挥抗氧化活性来减少食物和饲料中的氧化损伤^[19]。

表6 菌株的抗氧化能力
Table 6 Antioxidant activity of isolates

菌株编号	ABTS阳离子自由基清除率/%	DPPH自由基清除率/%	FRAP/ ($\mu\text{mol/L}$)
7-2	56.91 \pm 2.04 ^c	73.67 \pm 1.27 ^{bc}	571.61 \pm 2.22 ^f
L3-5	65.95 \pm 0.68 ^c	73.22 \pm 0.13 ^b	565.55 \pm 1.32 ^c
18-2	23.34 \pm 1.95 ^a	74.50 \pm 0.07 ^c	314.05 \pm 3.77 ^b
17-1	61.13 \pm 1.50 ^d	73.18 \pm 0.39 ^b	547.22 \pm 0.76 ^d

2.8 筛选菌株的BSH活性和产GABA能力

表7 菌株的产GABA能力和BSH活性
Table 7 GABA production and BSH activity of isolates

菌株编号	GABA产量/(mg/L)	BSH活性
7-2	142.67 \pm 2.42 ^c	+
L3-5	101.37 \pm 2.21 ^a	+
18-2	130.20 \pm 2.34 ^b	+
17-1	101.57 \pm 3.40 ^a	+

注：+，有活性。

表7列出了分离细菌的BSH活性，4株菌菌落周围都有沉淀环，说明具有BSH活性，具有水解牛磺脱氧胆酸钠盐的能力。BSH可催化酰胺键的水解释放游离氨基酸和游离胆汁酸^[30]，这是胃肠道中非常重要的转化。BSH活性对降低血清胆固醇也很重要^[31]。此外，所有菌株都有产GABA的能力，其中菌株7-2的GABA产量较高，可达到142.67 mg/L。从传统发酵食品中筛选食品级具有GABA生产能力的菌株，继而将此菌株接种到合适的食品基质中，生产功能性食品，一方面能够发挥GABA的保健功效，另一方面，乳酸菌的益生功能也可以得到很好的体现^[32]。

2.9 筛选菌株的安全性评估

从酸辣酱中分离出的可用作益生菌的菌株应对其对人类健康的潜在不利影响进行测试。抗生素抗性，溶血活性和DNA酶活性是分析菌株在发酵剂培养中安全使用的重要特征。

表8 菌株对不同抗生素的耐药性
Table 8 Resistance of LAB strains to different antibiotics

抗生素	菌株编号			
	7-2	L3-5	18-2	17-1
红霉素	+	+	+	+
链霉素	+	+	+	+
卡那霉素	-	-	+	+
壮观霉素	+	-	-	+
四环素	-	-	-	-
氯霉素	-	-	-	-
万古霉素	+	+	+	+
氨苄青霉素	-	-	-	-
环丙沙星	+	+	+	+

注：+，敏感；-，耐药。

如表8所示，4株菌对红霉素、链霉素、环丙沙星和万古霉素敏感性强，对四环素、氯霉素和氨苄青霉素均为中等敏感性和弱敏感性。18-2和17-1对卡那霉素敏感。而对壮观霉素敏感的为菌株7-2和17-1。

抗生素是一种生理活性物质，其抗菌活性主要表现在3种现象：抗菌、杀菌和溶解^[8]。对细菌的杀菌作用表现在对细菌细胞壁的强氧化作用以及核酸和细胞内蛋白质的破坏。本研究中选择抗生素，环丙沙星是抑制细菌DNA的合成和复制，万古霉素和氨苄青霉素属于抑制细胞壁合成的抗生素类群，而红霉素、链霉素、卡那霉素、壮观霉素、四环素和氯霉素是影响细菌DNA中的蛋白质合成细菌细胞。兼性和专性异型发酵乳杆菌（*L. plantarum*和*L. brevis*）对万古霉素具有固有耐药性，这与本实验结果一致。益生菌的使用要避免耐药基因的传播，分离菌株需要进一步的研究来进行耐药性检测。如果抗性基因不能进行转移，益生菌品种即可以引进市场^[33]。

金黄色葡萄球菌周围的琼脂出现绿色圈，而实验菌株周围的琼脂未出现绿色圈，也未出现透明圈。具有透明溶血性圈的那些分离株是 β -溶血性或完全溶血性的，绿色圈是 α -溶血性或部分溶血性，只有非溶血性的乳酸菌可作为潜在的益生菌^[34]，本实验中筛选菌株都不是溶血细菌。

4株筛选菌株的DNA酶活性结果显示，菌株均不是DNA酶生产者，所以筛选菌株用于食品发酵是安全的^[12]。

3 结论

本研究从酸辣酱中分离得到产酸速度快的6株乳酸菌，再通过菌株的胃肠道耐受能力筛选出4株乳酸菌，通过生化实验和16S rDNA序列分析方法鉴定，确定其中1株为植物乳杆菌（*L. plantarum*），2株为发酵乳杆菌（*L. fermentum*），1株为短乳杆菌（*L. brevis*）。

通过菌株的益生特性研究及安全性评估，获得3株具有潜在价值的乳酸菌，即发酵乳杆菌17-1、短乳杆菌

菌L3-5和发酵乳杆菌18-2, 其对热处理、0.4%苯酚及溶酶菌有较好的耐受能力, 有较高的表面疏水性和自聚合能力, 都有BSH活性和产GABA能力。菌株发酵上清液具有较强的抑菌能力和抗氧化能力。

研究表明, 传统酢辣椒是分离益生乳酸菌新的天然来源, 该研究从中分离的3株乳酸菌具有多种益生特性, 可作为潜在的益生菌进行进一步研究。

参考文献:

- [1] 栗晖. 土家的辣椒美食[J]. 四川烹饪, 2011: 56-57.
- [2] 邵伟, 张亚雄, 黎姝华. 酢辣椒中微生物的分离及其作用初探[J]. 食品科学, 2001, 22(2): 20-22. DOI:10.3321/j.issn:1002-6630.2001.02.005.
- [3] 梁单, 杨富民, 潘玲, 等. 庆阳地区自然发酵辣椒酱优势菌种筛选及鉴定[J]. 甘肃农业大学报, 2014(6): 162-167. DOI:10.3969/j.issn.1003-4315.2014.06.030.
- [4] 刘毅, 袁月华. 桃源地方风味酢辣椒菌群分析及混菌发酵制作酢辣椒实验研究[J]. 中国调味品, 2015, 40(2): 37-39. DOI:10.3969/j.issn.1000-9973.2015.02.010.
- [5] 许珂, 魏萍. 益生菌作用机制的研究进展[J]. 中国微生物学杂志, 2009, 21(1): 90-92.
- [6] FULLER R, GIBSON G R. Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics[J]. Scandinavian Journal of Gastroenterology, 1997, 32: 28-31. DOI:10.1080/00365521.1997.11720714.
- [7] TODOROV S, BOTES M, GUIGAS C, et al. Boza, a natural source of probiotic lactic acid bacteria[J]. Journal of Applied Microbiology, 2008, 104(2): 465-477. DOI:10.1111/j.1365-2672.2007.03558.x.
- [8] 崔小利, 王薇, 阚建全. 酢辣椒纯种发酵的菌株优选[J]. 食品科学, 2014, 35(21): 149-153. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201421029.
- [9] 黄坚, 童京京, 岳华, 等. 牦牛发酵酸奶中耐久肠球菌的筛选鉴定和益生特性[J]. 食品科学, 2017, 38(12): 43-49. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201712007.
- [10] PIENIZ S, ANDREAZZA R, ANGHINONI T, et al. Probiotic potential, antimicrobial and antioxidant activities of *Enterococcus durans*, strain LAB18s[J]. Food Control, 2014, 37(1): 251-256. DOI:10.1016/j.foodcont.2013.09.055.
- [11] 卫生部. 食品中总酸的测定: GB/T 12456—2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008: 3-6.
- [12] RANADHEERA C S, EVANS C A, ADAMS M C, et al. *In vitro*, analysis of gastrointestinal tolerance and intestinal cell adhesion of probiotics in goat's milk ice cream and yogurt[J]. Food Research International, 2012, 49(2): 619-625. DOI:10.1016/j.foodres.2012.09.007.
- [13] DING W R, SHI C, CHEN M, et al. Screening for lactic acid bacteria in traditional fermented Tibetan yak milk and evaluating their probiotic and cholesterol-lowering potentials in rats fed a high-cholesterol diet[J]. Journal of Functional Foods, 2017, 32: 324-332. DOI:10.1016/j.jff.2017.03.021.
- [14] SHEKH S L, DAVE J M, VYAS B R M. Characterization of *Lactobacillus plantarum* strains for functionality, safety and γ -amino butyric acid production[J]. LWT-Food Science and Technology, 2016, 74: 234-241. DOI:10.1016/j.lwt.2016.07.052.
- [15] XIAO Y, XING G L, RUI X, et al. Enhancement of the antioxidant capacity of chickpeas by solid state fermentation with *Cordyceps militaris* SN-18[J]. Journal of Functional Foods, 2014, 10: 210-222. DOI:10.1016/j.jff.2014.06.008.
- [16] KO C Y, LIN H T V, GUO J T. Gamma-aminobutyric acid production in black soybean milk by *Lactobacillus brevis* FPA 3709 and the antidepressant effect of the fermented product on a forced swimming rat model[J]. Process Biochemistry, 2013, 48(4): 559-568. DOI:10.1016/j.procbio.2013.02.021.
- [17] SAINI K, TOMAR S K. *In vitro*, evaluation of probiotic potential of *Lactobacillus*, cultures of human origin capable of selenium bioaccumulation[J]. LWT-Food Science and Technology, 2017, 84: 497-504. DOI:10.1016/j.lwt.2017.05.034.
- [18] FOULQUIÉ MORENO M R, CALLEWAERT R, DEVREESE B, et al. Isolation and biochemical characterisation of enterococci produced by enterococci from different sources[J]. Journal of Applied Microbiology, 2003, 94(2): 214-229. DOI:10.1046/j.1365-2672.2003.01823.x.
- [19] ZHANG S T, SHI Y, ZHANG S L, et al. Whole soybean as probiotic lactic acid bacteria carrier food in solid-state fermentation[J]. Food Control, 2014, 41(2): 1-6. DOI:10.1016/j.foodcont.2013.12.026.
- [20] GHOSH D, CHATTORAJ D K, CHATTOPADHYAY P. Studies on changes in microstructure and proteolysis in cow and soy milk curd during fermentation using lactic cultures for improving protein bioavailability[J]. Journal of Food Science and Technology, 2013, 50(5): 979-985. DOI:10.1007/s13197-011-0421-1.
- [21] GAO Y R, LI D P, LIU X Y. Effects of *Lactobacillus sakei*, C2 and sakacin C2 individually or in combination on the growth of *Listeria monocytogenes*, chemical and odor changes of vacuum-packed sliced cooked ham[J]. Food Control, 2015, 47: 27-31. DOI:10.1016/j.foodcont.2014.06.031.
- [22] 乔健敏, 席晓霞, 霍冬雪, 等. 内蒙古锡林郭勒牧区自然放养家畜肠道中乳酸菌的分离鉴定与潜在益生特性的筛选[J]. 中国奶牛, 2014(17): 6-13. DOI:10.3969/j.issn.1004-4264.2014.17.002.
- [23] TODOROV S D, LEBLANC J G, FRANCO B D G M. Evaluation of the probiotic potential and effect of encapsulation on survival for *Lactobacillus plantarum*, ST16Pa isolated from papaya[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2012, 28(3): 973-984. DOI:10.1007/s11274-011-0895-z.
- [24] VIZOSO PINTO M G, FRANZ C M, SCHILLINGER U, et al. *Lactobacillus* spp. with *in vitro* probiotic properties from human faeces and traditional fermented products[J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 109(3): 205. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.029.
- [25] COLLADO M C, GUEIMONDE M, HERNÁNDEZ M, et al. Adhesion of selected Bifidobacterium strains to human intestinal mucus and the role of adhesion in enteropathogen exclusion[J]. Journal of Food Protection, 2005, 68(12): 2672-2678. DOI:10.4315/0362-028X-68.12.2672.
- [26] ABUSHELAIBI A, ALMAHDIN S, EL-TARABILY K, et al. Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from camel milk[J]. LWT-Food Science and Technology, 2017, 79: 316-325. DOI:10.1016/j.lwt.2017.01.041.
- [27] TULUMUGLU S, YUKSEKDAG Z N, BEYATLI Y, et al. Probiotic properties of lactobacilli species isolated from children's feces[J]. Anaerobe, 2013, 24: 36-42. DOI:10.1016/j.anaerobe.2013.09.006.
- [28] GUPTA R, SRIVASTAVA S. Antifungal effect of antimicrobial peptides (AMPs LR14) derived from *Lactobacillus plantarum* strain LR/14 and their applications in prevention of grain spoilage[J]. Food Microbiology, 2014, 42(12): 1-7. DOI:10.1016/j.fm.2014.02.005.
- [29] MEIRA S M, HELFER V E, VELHO R V, et al. Probiotic potential of *Lactobacillus* spp. isolated from Brazilian regional ovine cheese[J]. Journal of Dairy Research, 2012, 79(1): 119. DOI:10.1017/S0022029911000884.
- [30] PERES C M, ALVES M, HERNANDEZ-MENDOZA A, et al. Novel isolates of lactobacilli from fermented Portuguese olive as potential probiotics[J]. LWT-Food Science and Technology, 2014, 59(1): 234-246. DOI:10.1016/j.lwt.2014.03.003.
- [31] JONES M L, TOMARODUCHESNEAU C, MARTONI C J, et al. Cholesterol lowering with bile salt hydrolase-active probiotic bacteria, mechanism of action, clinical evidence, and future direction for heart health applications[J]. Expert Opinion on Biological Therapy, 2013, 13(5): 631-642. DOI:10.1517/14712598.2013.758706.
- [32] LI W, WEI M M, WU J J, et al. Novel fermented chickpea milk with enhanced level of γ -aminobutyric acid and neuroprotective effect on PC12 cells[J]. Peer J, 2016, 4(4): e2292. DOI:10.7717/peerj.2292.
- [33] RAJKOVI J, JOKOVI N. Probiotic properties and safety assessment of lactic acid bacteria isolated from kajmak[J]. Biologica Nyssana, 2015, 6(2): 81-89.
- [34] 刘璐, 迪娜热尔·迪力达西, 吴禹澈, 等. 新疆发酵乳品中乳酸菌的分离鉴定及其耐药性[J]. 中国微生物学杂志, 2017, 29(7): 745-749. DOI:10.13381/j.cnki.cjm.201707001.