

魏朝治, 袁纪莹, 陈蕾蕾, 等. 恶味乳杆菌 B₂ 的益生特性及安全性评价[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(5): 162–165.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.05.040

恶味乳杆菌 B₂ 的益生特性及安全性评价

魏朝治^{1,2}, 袁纪莹¹, 陈蕾蕾¹, 陈相艳¹, 刘孝永¹, 辛 雪¹

(1. 山东省农业科学院农产品研究所/山东省农产品精深加工技术重点实验室/农业部新食品资源加工重点实验室, 山东济南 250100;

2. 山东农业大学食品科学与工程学院, 山东泰安 271018)

摘要: 研究具有生物转化银杏花粉黄酮苷活性的恶味乳杆菌 B₂ 的益生特性和安全性。结果表明, 该菌具有较好的 β -葡萄糖苷酶活性和体外脱除胆固醇能力, 对酸和人工模拟胃液的耐受性较好, 而对胆盐和人工模拟肠液的耐受性一般; 同时该菌对 10 种常见抗生素不具有耐药性, 并且不携带耐药基因, 不具备硝酸盐还原酶、氨基脱羧酶活性, 不产生吲哚等有害代谢产物, 因此该菌安全性较高。

关键词: 恶味乳杆菌 B₂; β -葡萄糖苷酶; 益生特性; 安全性; 耐药性

中图分类号: TS201.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)05-0162-04

乳酸菌(lactic acid bacteria, 简称 LAB)是一类能利用可发酵碳水化合物产生大量乳酸的细菌通称。这类细菌在自然界分布极为广泛, 具有丰富的物种多样性, 是公认的安全性菌株(generally recognized as safe, 简称 GRAS)。乳酸菌不仅可应用于食品发酵行业, 同时也能调节机体胃肠道正常菌群、保持微生态平衡等, 与机体的生命活动息息相关^[1]。但近年来研究发现, 一些乳酸菌具有抗生素抗性, 甚至有些菌株出现了多重耐药性^[2]。

恶味乳杆菌 B₂ 是从手工泡菜中筛选到的 1 株能够生物转化银杏花粉黄酮苷的优良菌株, 其培养条件简单, 易存活, 产酸能力适中, 口感较好, 可用于活菌型功能性银杏花粉产品的研制。但目前文献报道缺乏关于恶味乳杆菌益生特性和安全性方面的研究。因此, 本试验以自主分离的 1 株恶味乳杆菌 B₂ 为研究对象, 以 β -葡萄糖苷酶活性、降解胆固醇能力以及耐酸、耐胆盐、耐模拟肠胃液能力和耐药性、有害代谢产物分析等为手段, 开展其益生特性和安全性评价, 旨在为进一步开发恶味乳杆菌资源提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 菌株来源 试验用菌株为恶味乳杆菌 B₂, 是由笔者所在实验室自手工泡菜中分离得到的 1 株能够转化银杏花粉黄酮苷的优良菌株。

1.1.2 培养基与试剂 乳酸细菌(MRS)培养基^[3]用于菌株

活化、培养, MRS-胆固醇(MRS-CHOL)培养基^[4]用于体外降解胆固醇试验, 药敏纸片购自杭州微生物试剂有限公司, 对硝基苯酚(*p*-NP)、对硝基苯基 β -D-葡萄糖苷(*p*-NPG)、磷酸氢二钠、柠檬酸等均为分析纯。

1.1.3 仪器与设备 CR22G III 高速冷冻离心机, 日本日立公司生产; SHP-150 生化培养箱, 上海精宏实验设备有限公司生产; Mettler AE240 电子分析天平, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司生产; UV-160 型紫外可见分光光度计, 日本岛津公司生产。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株活化与培养 将菌株划线接种于 MRS 固体培养基上, 37 ℃ 培养 24 h, 挑单菌落活化传代 2 次, 经革兰氏染色观察为纯菌后, 接种于 5 mL MRS 液态培养基中, 37 ℃ 静置培养 16 h。

1.2.2 β -葡萄糖苷酶活性的测定^[5] 粗酶液的制备: 将发酵液在 8 000 r/min 条件下离心 20 min, 沉淀用 pH 值为 6.0 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液洗涤 2 遍, 离心去上清, 沉淀溶于相同缓冲液中, 在 0 ℃ 条件下超声间歇粉碎 15 min 后, 10 000 r/min, 4 ℃ 离心 20 min, 上清液为粗酶液。对硝基苯酚标准曲线的绘制: 精准称取 0.139 mg 对硝基苯酚纯品, 溶解于 1 mL 甲醇溶液中, 用 pH 值为 6.0 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液定容到 100 mL, 再稀释为 5.0、12.5、25.5、37.5、50.0、75.0 μ mol/L 等浓度梯度溶液; 取 100 μ L 稀释后的 pNP 溶液, 加入 100 μ L 1 mol/L 的 Na₂CO₃ 溶液, 测定其在 405 nm 处的吸光度, 绘制对硝基苯酚标准曲线。 β -葡萄糖苷酶活性的测定: 将 20 μ L 25 mmol/L 的 *p*-NPG 加入到 80 μ L 的粗酶液中, 在室温下进行反应, 30 min 后加入 100 μ L 浓度为 1 mol/L 的 Na₂CO₃ 溶液终止反应, 测定其在 405 nm 处的吸光度。根据对硝基苯酚标准曲线回归方程计算生成的对硝基苯酚浓度。一个 β -葡萄糖苷酶活性单位(*U*)定义为在一定的反应条件下, 每分钟分解对硝基苯基 β -D-葡萄糖苷底物生成 1 μ mol 对硝基苯酚(*p*-NP)所需要的 β -葡萄糖苷酶量。计算公式如下:

收稿日期: 2017-12-11

基金项目: 山东省农业科学院创新工程(编号: CXGC2017B06); 山东省泰山学者工程项目; 山东省农业科学院青年英才培养计划; 山东省自然科学基金三院联合基金(编号: ZR2014YL020、ZR2016YL022)。

作者简介: 魏朝治(1992—), 男, 山东济宁人, 硕士研究生, 主要从事食品微生物研究。E-mail: weizwcz0220@163.com。

通信作者: 辛 雪, 助理研究员, 主要从事农产品加工研究。E-mail: jasmine811201@126.com。

$$U = \frac{\text{pNP 浓度} \times \text{反应总体积}}{\text{反应时间} \times \text{酶液体积}} \times \text{稀释倍数}。$$

1.2.3 体外降解胆固醇能力试验 恶味乳杆菌 B₂ 体外降解胆固醇能力的测定参照文献[4]进行。胆固醇工作液的配制:量取一定量的胆固醇配制胆固醇贮存液,并进一步稀释,使胆固醇工作液的终浓度分别为 50、100、150、200、250、300、350 μg/mL。标准曲线的制作:取胆固醇工作液和铁铵显色剂各 2.5 mL 振荡摇匀后,冷却至室温,以冰乙酸加显色剂为空白对照,于 560 nm 处测定吸光度,以 $D_{560 \text{ nm}}$ 为纵坐标,胆固醇含量为横坐标绘制标准曲线。胆固醇含量的测定采用硫酸铁铵法。在 MRS-胆固醇(MRS-CHOL)液体培养基中接入 1% (体积比) 的乳酸菌,37 ℃ 培养 24 h,离心(8 000 r/min、4 ℃、10 min),获取上清液;用 5 mL 去离子水洗涤菌体沉淀(2 次),离心(8 000 r/min、4 ℃、10 min),获得沉淀洗涤液;分别取上清液和沉淀洗涤液 0.3 mL 于离心管中,加入 3.7 mL 冰乙酸充分混匀,13 000 r/min 离心 5 min;取上清液 2.5 mL 于试管中,沿管壁缓缓加入 2.5 mL 铁铵显色液,室温静置 20 min,然后充分振荡摇匀,测定 $D_{560 \text{ nm}}$ 。以未接种乳酸菌的 MRS-CHOL 培养基代替发酵液为空白。胆固醇的降解率按以下公式计算:

$$\text{胆固醇的降解率} = \frac{D_{\text{空白}} - D_{\text{样品}}}{D_{\text{空白}}} \times 100\%。$$

1.2.4 耐酸、耐胆盐和耐模拟胃肠液试验 参照高盛等的方法^[6-7]测定恶味乳杆菌 B₂ 的耐酸、耐胆盐、耐模拟胃肠液能力。耐酸试验:将发酵液在 8 000 r/min 条件下离心 20 min,沉淀用 0.85% 生理盐水洗涤 2 遍,离心去上清,沉淀重悬于等体积生理盐水中,制成菌悬液。分别将上述菌悬液接种于 pH 值为 1.5、2.5、3.5、4.5 的 MRS 液体培养基中,37 ℃ 条件下培养 0、2、4、6 h,培养后取一定量梯度稀释涂布于 MRS 平板,37 ℃ 静置培养 48 h 后活菌计数,每个稀释度作 3 个平行。耐胆盐试验:将发酵液在 8 000 r/min 条件下离心 20 min,沉淀用 0.85% 生理盐水洗涤 2 遍,离心去上清,沉淀重悬于等体积生理盐水中,制成菌悬液。分别将上述菌悬液接种于含不同浓度牛胆盐的 MRS 液体培养基(牛胆盐质量分数分别为 0%、0.1%、0.2%、0.3%)中,37 ℃ 条件下培养 0、2、4、6 h,培养后取一定量梯度稀释涂布于 MRS 平板,37 ℃ 条件下静置培养 48 h 后活菌计数,每个稀释度作 3 个平行。耐模拟胃肠液试验:将胃蛋白酶过滤除菌,加入到灭菌的 0.5% NaCl 溶液中,胃蛋白酶终浓度为 3 g/L,分别调节溶液 pH 值至 1.5、2.5、3.5,即为供试的人工胃液;将胰蛋白酶和牛胆盐过滤除菌,加入到灭菌的 0.5% NaCl 溶液中,胰蛋白酶和牛胆盐终浓度均为 1 g/L,调节溶液 pH 值至 8.0,即为人工肠液;将发酵液在 8 000 r/min 条件下离心 20 min,弃上清,沉淀重悬于 MRS 液体培养基中,加入等体积的人工胃液或人工肠液,37 ℃ 条件下培养 0、2、4、6 h,培养后取一定量梯度稀释涂布于 MRS 平板上,37 ℃ 静置培养 48 h 后活菌计数,每个稀释度作 3 个平行。

1.2.5 耐药性评价 药敏试验:采用药敏纸片琼脂扩散法进行药敏试验^[8]。将 100 μL 待测菌液均匀涂布于 MRS 固体平板上,待菌液被完全吸收后放置药敏纸片。供试药敏纸片:购自杭州微生物试剂有限公司,纸片上附有抗生素分别为青霉

素、万古霉素、庆大霉素、红霉素、四环素、氯霉素、链霉素、阿莫西林、诺氟沙星、卡那霉素。质粒提取试验:取 5 mL 待测菌液,使用 OMEGA 公司质粒提取试剂盒提取质粒;取提取好的质粒液体 5 μL 加入 1 μL 6 × Loading buffer,点样于琼脂糖凝胶进行电泳,电泳液为 1 × TAE 溶液,电压为 100 V,运行 30 min,电泳结束后,置于 254 nm 紫外灯下观察。

1.2.6 有害代谢产物试验 吡啶试验:将菌液以 2% (体积比) 接种量接种于蛋白胨水培养基中,37 ℃ 培养 48 h,滴加吡啶试剂,观测颜色变化情况,以不接菌液的蛋白胨水培养基为空白对照,试验作 3 次平行。硝酸盐还原酶试验:将菌液以 2% (体积比) 接种量接种于硝酸盐培养基中,37 ℃ 条件下培养 48 h,滴加碘化钾溶液和淀粉溶液,观察颜色变化情况,以不接菌液的硝酸盐培养基为空白对照,试验作 3 次平行。氨基脱羧酶活性检测:将菌株划线于添加前体氨基酸(L-鸟氨酸、L-精氨酸、L-赖氨酸)的脱羧酶筛选平板上,以未添加前体氨基酸的脱羧酶筛选平板为对照,37 ℃ 条件下培养 48 h 后,观察培养基颜色变化情况,试验作 3 次平行。

2 结果与分析

2.1 恶味乳杆菌 B₂ 的 β-葡萄糖苷酶活性

β-葡萄糖苷酶又称 β-D-葡萄糖苷葡萄糖水解酶,能够水解结合于末端非还原性的 β-D-葡萄糖苷键,释放 β-D-葡萄糖和相应的配基。研究显示,β-葡萄糖苷酶在生物转化黄酮苷中有重要应用,同时,很多生物转化黄酮苷优良菌株具有分泌 β-葡萄糖苷酶能力^[9-11]。恶味乳杆菌 B₂ 能够高效转化银杏花粉黄酮苷,因此检测其 β-葡萄糖苷酶活性,可为转化机制研究提供参考。

2.1.1 对硝基苯酚标准曲线 以 p-NP 浓度为横坐标, $D_{405 \text{ nm}}$ 为纵坐标,取 3 次测量的平均值绘制标准曲线,结果见图 1,标准曲线回归方程为 $y = 0.0109x + 0.0024$, $r^2 = 0.999$ 。

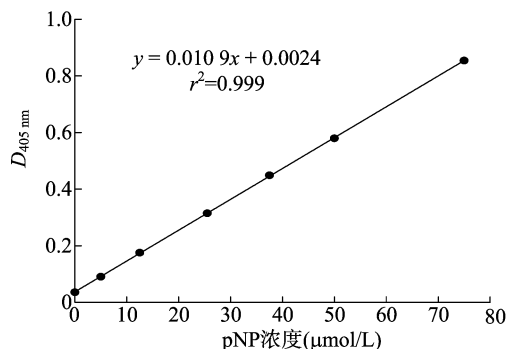


图1 对硝基苯酚标准曲线

2.1.2 β-葡萄糖苷酶活性 恶味乳杆菌 B₂ 粗酶液经 3 次平行试验后,测得的 $D_{405 \text{ nm}}$ 值为 0.283 ± 0.0027 。将数据代入 p-NP 标准曲线回归方程计算得到,生成的对硝基苯酚浓度为 $(25.74 \pm 0.01) \mu\text{mol/L}$ 。通过计算得到恶味乳杆菌 B₂ 的 β-葡萄糖苷酶活性为 16.09 U。

2.2 恶味乳杆菌 B₂ 的耐酸、耐胆盐和耐模拟胃肠液能力

2.2.1 耐酸能力 人体胃液中胃酸的 pH 值一般在 1.5 ~ 3.5 之间^[7]。从图 2 可以看出,恶味乳杆菌 B₂ 在 pH 值为 3.5 时表现出良好的酸耐受性,6 h 内活菌数无明显变化;在 pH 值为 2.5 时,每隔 2 h,活菌数下降 2 个数量级,6 h 后活菌数

下降了 6 个数量级;当 pH 值为 1.5 时,2 h 后活菌数下降了 6 个数量级,4 h 后已无活菌检出。说明该菌对酸的耐受性较好,在酸性环境下仍可存活较长时间并保持生长。

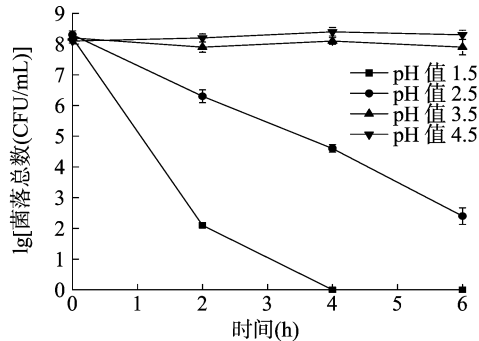


图2 恶味乳杆菌 B₂ 的耐酸能力

2.2.2 耐胆盐能力 小肠中胆盐浓度一般为 0.1% ~ 0.3% 肠内容物^[12]。从图 3 可以看出,恶味乳杆菌 B₂ 在胆盐浓度为 0.1% 时表现出较好的耐受性,6 h 内活菌数与不加胆盐相比无明显差异;在胆盐浓度为 0.2% 时,2 h 后活菌数下降了 3 个数量级,6 h 后无活菌检出;在胆盐浓度为 0.3% 时,2 h 后无活菌数检出。说明恶味乳杆菌 B₂ 的胆盐耐受性一般,当胆盐浓度达到 0.3% 时,该菌无法存活。

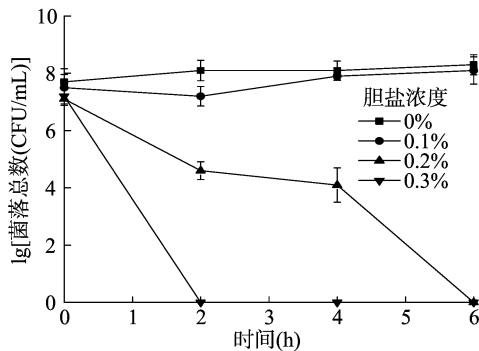


图3 恶味乳杆菌 B₂ 的耐胆盐能力

2.2.3 耐模拟胃液能力 胃液中含有胃蛋白酶和胃酸,所以胃液是一个富含蛋白酶并且低 pH 值的环境。人体摄入食物后,胃液的 pH 值会随着胃酸的分泌和消耗在 1.5 ~ 3.5 之间波动。肠液里不仅富含胰蛋白酶和胆盐,而且还是一个微碱环境。胃液肠液中存在的酶、胆盐以及酸碱环境对乳酸菌生长都有抑制作用。从图 4 可以看出,在 pH 值为 3.5 的人工模拟胃液中,活菌数在 6 h 内没有明显变化,都保持在同一数量级。在 pH 值为 2.5 的人工模拟胃液中,6 h 后活菌数下降了 5 个数量级。在 pH 值为 1.5 的人工模拟胃液中,4 h 后已无活菌检出。而在 pH 值为 8.0 的人工模拟肠液中,活菌数呈现明显下降趋势,6 h 后活菌数下降了 6 个数量级。可见,恶味乳杆菌 B₂ 对人工模拟胃液具有较好的耐受性,但对人工模拟肠液的耐受性一般。

2.3 恶味乳杆菌 B₂ 的降胆固醇能力

2.3.1 胆固醇标准曲线 以胆固醇浓度为横坐标,对应吸光度(D_{560 nm})为纵坐标,取 3 次测量的平均值绘制标准曲线,结果见图 5,标准曲线回归方程为 $y = 0.000\ 9x - 0.002\ 8$, $r^2 = 0.994$ 。

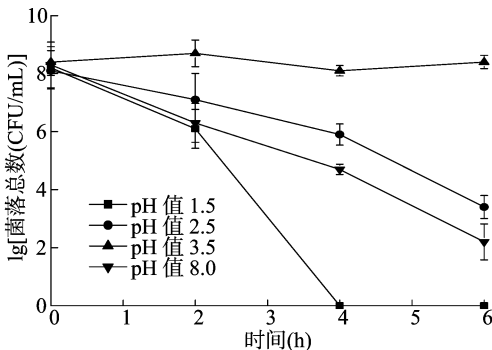


图4 恶味乳杆菌 B₂ 的耐模拟胃肠液能力

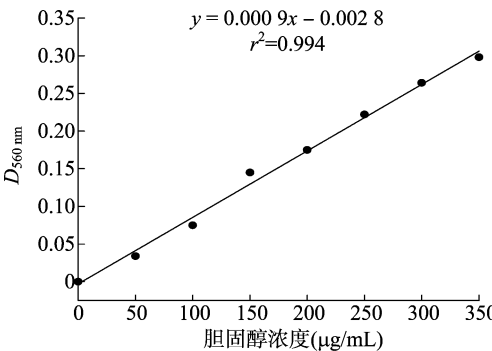


图5 胆固醇标准曲线

2.3.2 体外降胆固醇能力 根据胆固醇标准曲线,计算恶味乳杆菌 B₂ 在 MRS - CHOL 培养基中培养 24 h 后上清液以及沉淀洗涤液中的胆固醇含量。从表 1 可以看出,恶味乳杆菌 B₂ 培养 24 h 后对胆固醇的脱除率达到 40.24%,具有较好的体外降胆固醇能力。但沉淀洗涤液中胆固醇含量较低,表明大量的胆固醇可能被乳酸菌转运至菌株体内,说明该菌株对胆固醇的清除能力主要依靠的是菌体吸收作用^[13-14]。

表 1 恶味乳杆菌 B₂ 在 MRS - CHOL 中对胆固醇的脱除作用

溶液	胆固醇含量 (μg/mL)	胆固醇脱除率 (%)
上清液	61.33 ± 4.9	40.24
沉淀洗涤液	9.33 ± 4.9	

2.4 恶味乳杆菌 B₂ 的耐药性

恶味乳杆菌 B₂ 的耐药性评价结果见表 2。10 种抗生素对恶味乳杆菌 B₂ 的的抑菌圈直径均 ≥ 15 mm,抑菌效果比较明显,因此认为恶味乳杆菌 B₂ 不具有耐药性。此外,质粒提取试验结果显示,恶味乳杆菌 B₂ 不含有质粒,因此该菌株不携带耐药基因。

2.5 恶味乳杆菌 B₂ 的有害代谢产物

色氨酸是人体必需氨基酸,如果菌株分解色氨酸生成吡啶,会引起人体代谢的紊乱。硝酸盐还原酶可将硝酸盐还原成亚硝酸盐,人体摄入过多亚硝酸盐易引起中毒,同时在胃酸的条件下,亚硝酸盐易与胺类物质反应生成强致癌物亚硝胺。氨基脱羧酶可以将氨基酸转化为生物胺,若菌株含有氨基脱羧酶,则可以将 L - 鸟氨酸、L - 精氨酸、L - 赖氨酸分别转化为腐胺、精胺、亚精胺、尸胺。过量的生物胺会使人出现恶心、腹痛等食物中毒症状^[8,15]。由表 3 可知,恶味乳杆菌 B₂ 不产生吡啶,无硝酸盐还原酶活性,因此不能还原硝酸盐生成亚硝酸盐。同时,恶味乳杆菌 B₂ 无氨基脱羧酶活性,不能以

表 2 恶味乳杆菌 B₂ 的耐药性评价结果

抗生素	抑菌圈直径 (mm)	敏感度
红霉素	18.0	H
青霉素	17.9	H
四环素	18.2	H
氯霉素	23.9	H
万古霉素	15.0	H
阿莫西林	22.6	H
卡那霉素	19.2	H
链霉素	19.5	H
庆大霉素	21.9	H
诺氟沙星	24.4	H

注:抑菌圈直径≥15 mm,表示高度敏感(H);抑菌圈直径为10~14 mm,表示中度敏感(I);抑菌圈直径<10 mm,表示低度敏感(L)。

表 3 恶味乳杆菌 B₂ 的有害代谢产物评价结果

代谢产物	吡啶生成	硝酸盐 还原酶	氨基脱羧酶		
			L-鸟氨酸	L-精氨酸	L-赖氨酸
评价结果	-	-	-	-	-

注:“-”阴性;“+”阳性。

L-鸟氨酸、L-精氨酸、L-赖氨酸为底物产生腐胺、精胺和亚精胺、尸胺等有害生物胺。

3 讨论与结论

结果显示,恶味乳杆菌 B₂ 的β-葡萄糖苷酶活性较高,因此可降解银杏花粉黄酮苷中的β-葡萄糖苷键,释放出主要黄酮苷元山奈酚。β-葡萄糖苷酶的活性测定为恶味乳杆菌 B₂ 生物转化银杏花粉黄酮苷的机制研究提供依据。益生特性研究表明,恶味乳杆菌 B₂ 具有良好的体外脱除胆固醇能力,对酸和人工模拟胃液的耐受性较好,而对胆盐和人工模拟肠液的耐受性一般,说明恶味乳杆菌 B₂ 可能具有良好的通过胃的能力,但在小肠中的存活性一般。总体来说,恶味乳酸菌 B₂ 拥有一定的消化道通过能力,可在消化道存活并行使生理功能。安全性研究结果显示,该菌对 10 种常见抗生素不具有耐药性,并且不携带耐药基因,同时不具备硝酸盐还原酶活性和氨基脱羧酶,不生成亚硝酸盐、亚硝胺、腐胺、精胺和

亚精胺、尸胺等有害成分,不分解色氨酸生成吡啶,安全性较高。

参考文献:

[1]杨 埔,孔文涛,孙芝兰,等. 食源性乳酸菌安全性的评价[J]. 食品科学,2014,35(19):169-173.

[2]孟祥晨,杜 鹏,李艾黎,等. 乳酸菌与乳品发酵剂[M]. 北京:科学出版社,2009.

[3]徐珑倩,胡凯弟,张艾青,等. 植物乳杆菌 P158 产细菌素培养基及培养条件的优化[J]. 食品科学,2017,38(22):109-116.

[4]中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中胆固醇的测定:GB 5009.128—2016[S]. 北京:中国标准出版社,2016.

[5]金艳妮. 重组高温β-葡萄糖苷酶的酶学性质及协同作用研究[D]. 长春:吉林大学,2013.

[6]高 盛,乔 宇,张宇微,等. 人母乳源乳酸菌的筛选、鉴定及益生活性的初步研究[J]. 食品工业科技,2017,38(10):205-210.

[7]Huang Y, Adams M C. *In vitro* assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria[J]. International Journal of Food Microbiology,2004,91(3):253-260.

[8]顾旭峰,艾连中,宋 馨,等. 两株干酪乳杆菌的安全性评价[J]. 食品与发酵科技,2015,51(2):63-65.

[9]王锐丽,孙 伟,薛业敏. 嗜热菌β-葡萄糖苷酶 A 基因的克隆表达及转化大豆异黄酮糖苷[J]. 中国酿造,2016,35(3):114-119.

[10]赖剑峰,杨荣玲,刘学铭. 黄酮类化合物的生物转化研究进展[J]. 广东农业科学,2013(4):95-98.

[11]张 琴,李艳宾,李 华. 产β-葡萄糖苷酶甘草内生菌的筛选及对甘草黄酮转化的研究[J]. 食品科学,2013,34(1):194-198.

[12]甘 敏. 双歧杆菌胞外多糖益生功能及机理的初步探究[D]. 南昌:南昌大学,2015.

[13]李雪萍,李建宏,李敏权,等. 浆水中降胆固醇乳酸菌的筛选及其功能特性[J]. 微生物学报,2015,55(8):1001-1009.

[14]Dambekodi P C, Gilliland S E. Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of *Bifidobacterium longum*[J]. Journal of Dairy Science,1998,81(7):1818-1824.

[15]Hammerman C, Bin - Nun A, Kaplan M. Safety of probiotics: comparison of two popular strains[J]. British Medical Journal, 2006,333(7576):1006-1008.