

## 四川泡菜中潜在益生性植物乳杆菌的筛选及安全性评价

史梅莓, 伍亚龙, 杨 恺, 吕鹏军, 汪冬冬, 唐 尧, 王 勇, 张其圣

### Screening and Safety Evaluation of Potential Probiotic *Lactobacillus plantarum* in Sichuan Paocai

SHI Meimei, WU Yalong, YANG Kai, L Pengjun, WANG Dongdong, TANG Yao, WANG Yong, and ZHANG Qisheng

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022010227>

## 您可能感兴趣的其他文章

### Articles you may be interested in

#### 植物乳杆菌KLDS 1.0318产酸、耐酸、耐胆盐能力及其免疫特性研究

Study on the Acid Producing Ability, Acid and Bile Salt Tolerance of *Lactobacillus plantarum* KLDS 1.0318 and Its Immunologic Properties

食品工业科技. 2018, 39(15): 70-76

#### 西藏曲拉和发酵乳中抗氧化和益生特性乳酸菌的筛选及鉴定

Screening and Identification of Lactic Acid Bacteria with Antioxidant and Probiotic Properties from Qula and Fermented Milk in Tibet

食品工业科技. 2019, 40(2): 142-147

#### 副干酪乳杆菌L1的安全性及益生性评价

Safety and Probiotic Evaluation of *Lactobacillus paracasei* L1

食品工业科技. 2019, 40(12): 120-127

#### 东北传统发酵食品中高抗氧化活性植物乳杆菌的筛选及体外耐受性分析

Screening and *in Vitro* Tolerance Analysis of *Lactobacillus plantarum* with High Antioxidant Activity in Traditional Fermented Food of Northeast China

食品工业科技. 2019, 40(18): 59-64

#### 东北地区传统发酵食品中两株植物乳杆菌的安全性评价

Safety Assessment of Two New *Lactobacillus Plantarum* Strains Isolated from Traditional Fermented Food of Northeast China

食品工业科技. 2021, 42(13): 253-261

#### 具有抑制肠道致病菌和黏附Caco-2细胞作用的益生性乳酸菌的筛选及鉴定

Screening and Identification of Probiotic *Lactobacillus* Strains Inhibiting Intestinal Pathogens and Adhering to Caco-2 Cells

食品工业科技. 2019, 40(20): 133-139, 153



关注微信公众号，获得更多资讯信息

史梅莓, 伍亚龙, 杨恺, 等. 四川泡菜中潜在益生性植物乳杆菌的筛选及安全性评价 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(22): 165-172. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022010227

SHI Meimei, WU Yalong, YANG Kai, et al. Screening and Safety Evaluation of Potential Probiotic *Lactobacillus plantarum* in Sichuan Paocai[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(22): 165-172. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022010227

· 生物工程 ·

# 四川泡菜中潜在益生性植物乳杆菌的 筛选及安全性评价

史梅莓<sup>1</sup>, 伍亚龙<sup>2,3,+</sup>, 杨 恺<sup>1</sup>, 吕鹏军<sup>1</sup>, 汪冬冬<sup>3</sup>, 唐 焱<sup>3</sup>, 王 勇<sup>2,3</sup>, 张其圣<sup>1,3,\*</sup>

(1.四川省食品发酵工业研究设计院有限公司, 四川成都 611130;

2.四川益动源生物科技有限公司, 四川眉山 620000;

3.四川东坡中国泡菜产业技术研究院, 四川眉山 620000)

**摘 要:**为筛选具有潜在益生作用和安全性的植物乳杆菌, 以四川泡菜中分离的 114 株植物乳杆菌为出发菌株, 进行耐酸性、耐胆盐能力、耐模拟胃肠液能力、自聚能力、致病菌共聚性、抗生素耐药性和溶血性研究。经过 pH2.0 酸性条件、0.2% 浓度胆盐培养后, 初步筛选出 13 株耐受能力较好的菌株。对 13 株菌进行模拟胃肠液、聚集能力、耐药性和溶血性试验。结果表明, 13 株菌模拟胃肠液耐受存活率均高于 75%, 自聚集能力 23%~52%, 与致病菌单增李斯特菌和大肠埃希氏菌的共聚集能力分别为 10%~29% 和 16%~37%。在药敏和最小抑菌浓度 (MIC) 试验中, 潜力菌株对 10 种常见抗生素的耐药性表现基本一致, 对  $\beta$ -内酰胺类、酰胺醇类抗生素较敏感, 对氨基糖苷类、喹诺酮类、糖肽类、大环内酯类和四环素类抗生素有较强耐受性; 13 株菌均无溶血现象, 说明具有一定的安全性。因此, 筛选得到的 13 株植物乳杆菌均有潜在的益生作用和较高安全性, 研究结果为益生菌的开发提供了菌种资源。

**关键词:**植物乳杆菌, 益生作用, 药敏, 最小抑制浓度, 模拟胃肠液, 耐酸, 耐胆盐

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)22-0165-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022010227



本文网刊:

## Screening and Safety Evaluation of Potential Probiotic *Lactobacillus plantarum* in Sichuan Paocai

SHI Meimei<sup>1</sup>, WU Yalong<sup>2,3,+</sup>, YANG Kai<sup>1</sup>, LÜ Pengjun<sup>1</sup>, WANG Dongdong<sup>3</sup>,  
TANG Yao<sup>3</sup>, WANG Yong<sup>2,3</sup>, ZHANG Qisheng<sup>1,3,\*</sup>

(1.Sichuan Food and Fermentation Industry Research & Design Institute Co., Ltd., Chengdu 611130, China;

2.Sichuan Eden Biology Technology Co., Ltd., Meishan 620000, China;

3.Sichuan Dongpo Chinese Paocai Industrial Technology Research Institute, Meishan 620000, China)

**Abstract:** In order to screen *L. plantarum* with potential probiotic effect and safety, 114 strains of *L. plantarum* isolated from Sichuan Paocai were used as starting strains to conduct acid resistance, bile salt tolerance, resistance to simulated gastrointestinal fluid, auto-aggregation ability, pathogenic bacteria co-aggregation, antibiotic resistance and hemolytic research. After culturing in pH2.0 acidic conditions and 0.2% bile salt concentration, 13 strains with better tolerance were initially screened. The 13 strains were tested with simulated gastroenteric fluid, aggregation capacity, antibiotic resistance and hemolysis. The results showed that 13 strains simulated gastrointestinal fluid tolerance survival rate was higher than 75%, auto-aggregation ability 23%~52%, and the co-aggregation ability of pathogenic bacteria *Listeria monocytogenes* and

收稿日期: 2022-01-25 +并列第一作者

基金项目: 泡菜产业科技服务平台建设 (2021ZHFP0132); 泡菜现代加工连续工艺标准化控制研究与应用 (2020YFN0047)。

作者简介: 史梅莓 (1996-), 女, 硕士, 助理工程师, 研究方向: 益生菌, E-mail: 15881657280@163.com。

伍亚龙 (1990-), 男, 本科, 高级工程师, 研究方向: 传统发酵食品微生物应用研究及益生菌功能食品, E-mail: probioticff@163.com。

\* 通信作者: 张其圣 (1983-), 男, 博士, 正高级工程师, 研究方向: 泡菜微生物, E-mail: bigbeastone@163.com。

*Escherichia coli* were 10%~29% and 16%~37%. The results of drug sensitivity and minimum inhibitory concentration (MIC) tests showed that the potential strains showed similar resistance to 10 common antibiotics in drug susceptibility and minimum inhibitory concentration (MIC) experiments. They were sensitive to  $\beta$ -lactam and amido alcohol antibiotics, and had strong resistance to aminoglycosides, quinolones, glycopeptides, macrolides and tetracycline antibiotics. There was no hemolysis phenomenon, indicating high safety. Therefore, the 13 strains of *L. plantarum* obtained from the primary screening had potential probiotics and high safety, and the research results would provide strain resources for the development of probiotics.

**Key words:** *Lactobacillus plantarum*; probiotic effect; drug sensitivity; minimum inhibitory concentration; simulate gastrointestinal fluid; acid resistance; bile salt tolerance

国际益生菌和益生元科学协会将益生菌定义为一类活的微生物,当摄入足够量时,可以为宿主带来健康益处。据统计,2019年全球益生菌市场价值约400亿欧元,近几年我国益生菌市场平均年增速约15%,预计2022年我国益生菌市场规模接近900亿元,拥有巨大的市场空间<sup>[1]</sup>。目前,研究表明益生菌具有多种益生作用,尤其是在调节胃肠道菌群、机体免疫力方面有了相对充实的理论基础与临床研究,其健康作用已被消费者普遍认可<sup>[2]</sup>。在未来,筛选并评价更多优良功能菌株,开发差异化菌种以及特异性产品成为益生菌发展趋势之一。

植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)作为人体肠道内的优势菌之一,大量研究表明具有调节肠道微生物菌群平衡、改善人体免疫力、拮抗致病菌感染、抗氧化性等多种功效<sup>[3-4]</sup>,在食品、医疗保健、饲料等领域被广泛应用,国内外学者对其益生功能和临床研究越来越深入。植物乳杆菌来源广泛,研究人员从天然原料奶、传统奶制品、泡菜、地方特色发酵饮料等<sup>[5-6]</sup>食品中分离筛选出具有某种功能特性的菌株。四川泡菜是我国典型的传统发酵食品,以多代循环发酵工艺制作的典型四川泡菜,其新制泡菜会逐步演变为一个稳定的含有大量乳酸菌、酵母菌等微生物菌群结构单一和氨基酸、有机酸等底物稳定的生态系统<sup>[7]</sup>,其中主导四川泡菜发酵的微生物主要是乳酸菌(93.89%),如植物乳杆菌、耐酸乳杆菌、短乳杆菌等<sup>[8]</sup>。研究表明分离自四川泡菜中的乳酸菌具有高产 $\gamma$ -氨基丁酸、良好的免疫活性、润肠通便功能等特性,如朱珺等<sup>[9]</sup>研究发现分离自四川农家泡菜的植物乳杆菌581具有良好胃肠道环境耐受能力,具有润肠通便功能和良好的发酵特性;彭灯水等<sup>[10]</sup>从四川泡菜中分离出一株植物乳杆菌LC-13,发现其具有较强的抗逆能力以及较好的益生菌潜力。因此,四川泡菜发酵后期以植物乳杆菌为主导的耐酸性优势菌<sup>[11]</sup>,非常值得挖掘。目前,多数研究主要是对四川泡菜中用于泡菜发酵功能菌的筛选<sup>[12]</sup>,而针对四川泡菜中可能存在的具有益生潜质的植物乳杆菌及其功能特性研究还远远不足。本研究对分离自传统四川泡菜的114株植物乳杆菌进行耐酸、耐胆盐初筛,通过对其筛选菌模拟胃肠液耐受能力、自聚性和共聚性、体外安全性等指标进行益生作用和安全性评价,以期为后续挖

掘优良功能性菌株以及益生菌产品的开发提供理论基础和数据支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

114株植物乳杆菌 为实验室保藏菌种,分离自四川多代泡菜(编号PC开头代表泡菜);鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus* GG, LGG) 四川省食品发酵工业研究设计院有限公司实验室保藏;单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes* CICC21633)、大肠埃希氏菌(*Escherichia coli* CICC10305)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* CICC23926) 购自中国工业微生物菌种保藏中心;MRS肉汤培养基 广东环凯微生物科技有限公司;氯化钠、盐酸、氢氧化钠 成都市科隆化学品有限公司;胰蛋白酶(1:250)、胃蛋白酶(1:3000)、哥伦比亚血琼脂平板 生工生物工程(上海)股份有限公司;抗菌药物药敏纸片(10种) 杭州微生物试剂有限公司;牛胆盐(胆酸含量 $\geq 60\%$ )、四环素、氨苄青霉素钠等 上海源叶生物科技有限公司。

ESJ200-4A 电子天平 沈阳龙腾电子有限公司;XH-B 旋涡混合器 江苏天翎仪器有限公司;LDZF-75L-II 立式压力蒸汽灭菌器 上海申安医疗器械厂;BSP-150 生化培养箱、GZX-9140MBE 电热鼓风干燥箱 上海博讯实业有限公司医疗设备厂;SW-CJ-1FD 洁净工作台 苏州安泰空气技术有限公司;DZKW-4 电子恒温水浴锅 北京中兴伟业仪器有限公司;FC 型酶标仪 赛默飞世尔(上海)仪器有限公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 耐酸能力的测定 将活化2次后的114株植物乳杆菌分别以10%的接种量接种于pH2.0 MRS液体培养基中,37℃静置培养,分别在培养2和4h取发酵液稀释至合适梯度后接种至MRS固体培养基,37℃培养24h后活菌计数,对照组为酸处理0h的活菌数,计算植物乳杆菌的存活率。存活率计算公式如下:

$$\text{存活率}(\%) = \frac{\text{酸处理2 h(或4 h)活菌数(CFU/mL)}}{\text{酸处理0 h的活菌数(CFU/mL)}} \times 100$$

1.2.2 耐胆盐能力的测定 将活化后的114株植物乳杆菌分别以10%的接种量接种于含0.2 g/100 mL



牛胆盐的 MRS 培养液中, 37 °C 静置培养, 分别在培养 1 和 3 h 取发酵液稀释至合适梯度后接种至 MRS 固体培养基, 37 °C 培养 24 h 后活菌计数, 以未经胆盐处理的 MRS 培养基菌落数为对照。

1.2.3 耐模拟胃肠液能力的测定 参考丁诗瑶等<sup>[13]</sup>的方法, 模拟胃液的配制: 用 NaOH 溶液将 1 mol/L HCl 溶液 pH 调至 2.0, 加入胃蛋白酶使其终浓度为 1 g/100 mL, 0.22 μm 微孔滤膜除菌。模拟肠液的配制: 用 NaOH 溶液将磷酸二氢钾溶液 pH 调至 6.8, 加入胰蛋白酶使其终浓度为 1 g/100 mL, 磷酸二氢钾溶液终浓度为 0.68 g/100 mL, 0.22 μm 微孔滤膜除菌。

分别取 13 株菌的菌液 0.5 mL 加至 4.5 mL 模拟胃液或肠液中, 在 37 °C 静置培养 0 和 3 h 取发酵液稀释至合适梯度后接种至 MRS 固体培养基, 37 °C 培养 24 h 后活菌计数, 计算植物乳杆菌的存活率, 以鼠李糖乳杆菌 GG 为阳性对照。存活率计算公式如下:

$$\text{存活率}(\%) = \frac{3\text{h时活菌数}(\text{CFU}/\text{mL})}{0\text{h时活菌数}(\text{CFU}/\text{mL})} \times 100$$

1.2.4 自聚集能力和共聚性的测定 参考 Behrooz 等<sup>[14]</sup>的方法。将活化后的 13 株菌 6000 r/min 离心 10 min, 用 pH7.4 的磷酸盐缓冲液 PBS 清洗 2 次, 重新悬浮于 PBS 中, 调整细菌悬液浓度约为 10<sup>8</sup> CFU/mL, 取菌悬液测定 A<sub>620 nm</sub>, 记为 A<sub>0</sub>。菌悬液 37 °C 静置培养 5 h 后取上清液, 测定 A<sub>620 nm</sub>, 记为 A<sub>1</sub>。自聚集能力计算公式如下:

$$\text{自聚集能力}(\%) = \left(1 - \frac{A_1}{A_0}\right) \times 100$$

共聚性的测定: 以大肠杆菌 CICC10305、单增李斯特菌 CICC21633 对植物乳杆菌的共聚集能力进行评价。将植物乳杆菌与致病菌菌悬液等体积混合均匀, 37 °C 静置培养 5 h 后取上清液, 测定 A<sub>620 nm</sub>。共聚性计算公式如下:

$$\text{共聚性}(\%) = \frac{\frac{A_2 + A_3}{2} - A_{混}}{\frac{A_2 + A_3}{2}} \times 100$$

式中: A<sub>2</sub>、A<sub>3</sub> 分别为植物乳杆菌、致病菌在 0 h 时的吸光值; A<sub>混</sub> 为植物乳杆菌与致病菌混合液处理 5 h 的吸光值。

### 1.2.5 体外安全性评价

1.2.5.1 药物敏感性 采用纸片扩散法(K-B 法), 将活化后的 13 株菌经适当的梯度稀释(菌液浓度约为 1×10<sup>8</sup> CFU/mL), 均匀地涂布于 MRS 平板上, 用无菌镊子将药敏纸片均匀放置其上, 37 °C 培养 24 h 后, 记录各药敏纸片的抑菌圈直径大小。用标准敏感菌株金黄色葡萄球菌 CICC23926 作为质控菌, 参照美国临床实验室标准化协会<sup>[15]</sup>对抗菌药物敏感性的最小抑菌圈直径大小来判定菌株的药敏性。

1.2.5.2 菌株最小抑制浓度(MIC)的测定 采用宏量肉汤稀释法测定各菌株 MIC。取菌液加入 10 种抗生素溶液中(最终细菌浓度约为 5×10<sup>5</sup> CFU/mL), 以不加抗生素的 MRS 液体培养基试管作为对照, 混匀后测量各试管 A<sub>620 nm</sub> 值。37 °C 培养 24 h 后, 肉眼观察有无可见菌生长, 并测定 A<sub>620 nm</sub> 值。结果根据欧洲食品安全局(EFSA)的指南<sup>[16]</sup>、欧洲抗菌素敏感性试验委员会(EUCAST)<sup>[17]</sup>、美国临床实验室标准化协会(CLSI)颁布的标准中临界值或耐药折点进行判断<sup>[15]</sup>。

1.2.5.3 溶血性试验 参考高慢慢等<sup>[18]</sup>的方法, 将活化后的 13 株菌株划线接种于哥伦比亚血琼脂培养基上, 37 °C 培养 24 h, 观察是否出现溶血现象。以金黄色葡萄球菌 CICC23926 作为阳性对照菌株。

### 1.3 数据处理

所有试验均重复三次, 数据结果用平均值±标准差表示。采用 Excel 2019、Origin 2018 软件进行数据统计分析和绘制结果图, SPSS Statistics 22 软件进行方差分析(ANOVA)和 LED 检验, 以 P<0.05 判断为具有显著差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 耐酸能力

大部分人胃液 pH 在 1.5~3.0, 益生菌要在人体肠道内存活并增殖, 必须具备一定的耐酸能力。本试验初期以 pH2.0 的酸性环境下培养 2 和 4 h 作为筛选植物乳杆菌的条件, 从 114 株菌中筛选得到 13 株具有一定耐酸能力的菌株(图 1)。13 株菌培养 2 h 后存活率均高于 50%, PC05、PC06、PC08、PC09、PC94、PC97 菌株在培养 4 h 后其存活率仍能达到 80% 以上。其中 PC08 菌株在培养 4 h 后存活率由 54.57% 增加至 82.09%(P<0.05), 这与聂紫玉等<sup>[19]</sup>研究发现 49 株植物源乳酸菌在 pH2.5 MRS 培养基中培养 4 h 后, 其中的 12 株菌活菌数较 0 h 时增加的结果相似。赵山山等<sup>[20]</sup>从贵州家庭自制泡菜中分离出 11 株植物乳杆菌, 经过 pH2.0 的酸溶液处理 2 h

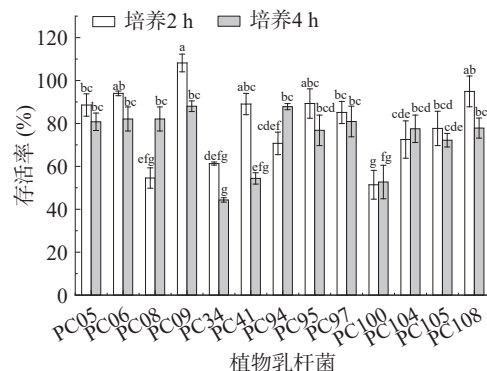


图 1 植物乳杆菌在 pH2.0 酸性条件下培养 2、4 h 的存活率

Fig.1 Survival rate of *L. plantarum* under pH2.0 acidic conditions for 2 and 4 h

注: 对于同测定指标, 字母不同表示差异显著 (P<0.05); 图 2~图 3 同。

后存活率均能达到 87% 以上。Giri 等<sup>[21]</sup>从当地传统的大米发酵饮料中筛选出植物乳杆菌 L7, 在 pH2.0 的条件下培养 4 h 其存活率可达 89.87%。表明培养 4 h 后, 6 株植物乳杆菌存活率达到 80% 以上, 这与其他研究报道具有较强的耐酸性的结果相似。

### 2.2 耐胆盐能力

胆盐可通过破坏菌体细胞膜和表面特性, 影响胞内基质蛋白稳定性、损伤 DNA 等, 正常生理情况下, 人小肠中胆盐浓度约为 0.03%~0.3%, 设定胆盐浓度为 0.2 g/100 mL, 评价植物乳杆菌的耐受能力。由表 1 可知, 培养 1 h 时, 整体活菌数量均下降, 其中 PC06、PC08、PC09 菌株耐胆盐短时能力偏强, 其余菌株耐受能力较低。在培养 3 h 后, 共 8 株菌具有长时耐受性, 其中 PC05、PC06、PC100、PC104 菌株活菌数能维持在 6 lg CFU/mL 以上, 而其余 5 株菌无活菌检出。表明 13 株菌中共有 8 株菌具有较强的耐胆盐能力(PC05、PC06、PC94、PC97、PC100、PC104、PC105、PC108)。结果与一些报道相似, 如周海柱等<sup>[22]</sup>从长春民间自制泡菜中筛选出 4 株植物乳杆菌, 其中两株菌在含 0.2% 牛胆盐的培养基中培养 3 h 后其活菌数能维持在 10<sup>8</sup> CFU/mL, 而其余 2 株活菌数在 10<sup>5</sup>~10<sup>6</sup> CFU/mL 范围内。不同菌株对胆盐的耐受能力不同, 这与其自身有关, 有的菌株可以通过调控热激蛋白调控系统的基因应对胆盐胁迫导致的蛋白质过量、错误折叠等的不利影响、通过氨基酸代谢提高细胞膜稳定性等适应和对抗胆盐胁迫的机制和系统<sup>[23]</sup>。

表 1 植物乳杆菌对 0.2 g/100 mL 牛胆盐溶液耐受能力  
Table 1 Tolerance of *L. plantarum* to 0.2 g/100 mL bovine bile salt solution

菌株编号	活菌数(lg CFU/mL)		
	对照组	1 h	3 h
PC05	8.23±0.04 <sup>a</sup>	7.51±0.04 <sup>b</sup>	7.50±0.01 <sup>b</sup>
PC06	8.34±0.03 <sup>a</sup>	8.33±0.11 <sup>a</sup>	7.65±0.07 <sup>b</sup>
PC08	7.68±0.05 <sup>a</sup>	7.48±0.02 <sup>b</sup>	ND
PC09	7.75±0.02 <sup>a</sup>	7.22±0.19 <sup>b</sup>	ND
PC34	7.73±0.02 <sup>a</sup>	5.03±0.11 <sup>b</sup>	ND
PC41	8.17±0.04 <sup>a</sup>	5.03±0.07 <sup>b</sup>	ND
PC94	8.31±0.03 <sup>a</sup>	5.54±0.34 <sup>b</sup>	5.54±0.09 <sup>b</sup>
PC95	7.06±0.03 <sup>a</sup>	4.70±0.28 <sup>b</sup>	ND
PC97	8.31±0.08 <sup>a</sup>	6.54±0.08 <sup>b</sup>	5.69±0.13 <sup>c</sup>
PC100	8.23±0.09 <sup>a</sup>	7.39±0.02 <sup>b</sup>	7.21±0.02 <sup>c</sup>
PC104	8.29±0.05 <sup>a</sup>	6.19±0.01 <sup>b</sup>	6.00±0.13 <sup>b</sup>
PC105	8.32±0.01 <sup>a</sup>	6.00±0.12 <sup>b</sup>	5.85±0.01 <sup>b</sup>
PC108	7.97±0.04 <sup>a</sup>	4.76±0.37 <sup>b</sup>	5.00±0.03 <sup>b</sup>

注: “ND”表示未生长; 表中同一行字母不同表示差异显著(P<0.05)。

### 2.3 耐模拟胃肠液能力

人体消化道中的胃蛋白酶和胰蛋白酶可以分解蛋白质, 也会对微生物的生长具有一定的抑制作用。植物乳杆菌在人工模拟胃液和肠液的环境下其存活率如图 2 所示, 在模拟胃液中, 3 h 内菌株存活率均

高于 75%, 其中 4 株菌存活率达到 100% 以上, 表现出很强的耐受胃液能力。在模拟肠液中, 共有 9 株菌存活率高于 100%。郑越等<sup>[24]</sup>同样研究表明, 6 株不同来源的植物乳杆菌培养 3 h 时, 在模拟胃液中的存活率均高于 97%, 4 株菌在肠液中存活率能达到 100% 以上。说明 13 株菌对胃肠液均有一定的耐受能力, 具有发挥益生功能的潜力。

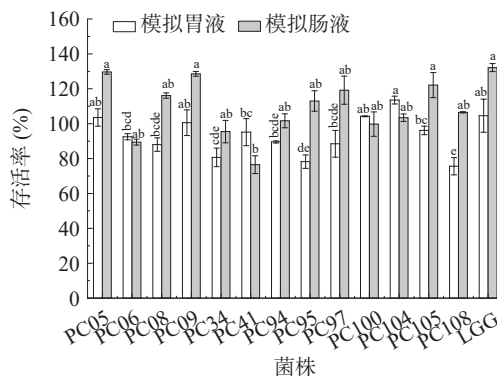


图 2 植物乳杆菌对模拟胃肠液的耐受能力  
Fig.2 Tolerance of *L. plantarum* to simulated gastrointestinal fluid

### 2.4 自聚集能力和共聚性

益生菌要在宿主体内发挥作用必须在肠黏膜上皮细胞中发生黏附并进一步定植, 有研究表明自聚性和共聚性较强的菌株, 其与肠道上皮的黏附能力也较强<sup>[25]</sup>。由图 3 可知, 13 株植物乳杆菌自聚集能力在 23%~52%。其中, PC97、PC108 菌株的自聚集能力达 39.92% 和 51.09%, 不同植物乳杆菌之间自聚集能力存在差异性, 这与一些研究结果相似, 李清等<sup>[26]</sup>研究分离自新疆酸马奶、酸驼奶等的 10 株植物乳杆菌, 其中自聚能力最强可达 63.39%, 5 株菌的自聚集能力在 20%~30% 之间。有研究表明, 培养时间即超过某一培养时间后菌株的自动聚集能力不会发生显著性变化, 菌体表面成分如碳水化合物、蛋白质与菌株的自动聚集能力也有一定的相关性<sup>[27]</sup>。

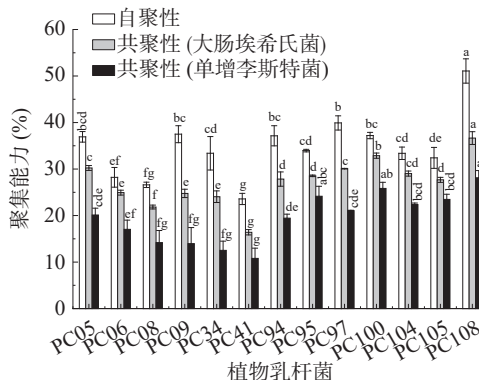


图 3 植物乳杆菌的聚集能力  
Fig.3 Aggregation ability of *L. plantarum*

由图 3 可知, 植物乳杆菌分别与致病菌大肠埃希氏菌、单增李斯特菌的共聚集能力存在差异, 分别在 16%~37%、10%~29% 之间。与单增李斯特菌相比,

13 株植物乳杆菌对大肠埃希氏菌显示出更高的共聚集能力。其中,PC108 菌株与大肠埃希氏菌的共聚集值最高(36.66%)。有研究表明共聚集可能是干扰致病菌黏附上皮细胞的重要因素,在共聚集过程中,乳酸菌可以控制致病菌周围的微环境,形成防止致病菌定植的屏障、增加分泌抑制物如细菌素浓度等<sup>[28]</sup>。

### 2.5 体外安全性评价

2.5.1 抗生素药敏性 具有抗生素抗性基因的益生菌被食用后可能向人体内其他细菌或致病菌转移其抗性基因,从而导致对人体健康的潜在风险,因此植物乳杆菌对抗生素的敏感性是体外安全性评价最重要的指标之一<sup>[29]</sup>。植物乳杆菌对 10 种抗生素的敏感性如表 2 所示,13 株菌均对链霉素、万古霉素以及诺氟沙星耐药;对四环素、氨苄西林、阿莫西林、红霉素、氯霉素均为敏感;对青霉素(6/13, 46.15%)敏感,(6/13, 46.15%)中度敏感,其中 PC108 对青霉素耐药;对庆大霉素(11/13, 84.61%)耐药,PC41 对庆大霉素中度敏感,PC108 对庆大霉素耐药。研究结

果与许女等<sup>[30]</sup> 研究中分离自传统发酵食品的 97 株乳酸菌对链霉素、万古霉素、庆大霉素耐药性较强的结果相似。据报道,乳酸菌对氨基糖苷类抗生素(链霉素、庆大霉素)耐药原因之一是产生的氨基糖苷类钝化酶使此抗生素灭活<sup>[31]</sup>。综合上述结果,13 株菌对多种抗生素具有敏感性。

2.5.2 菌株最小抑制浓度(MIC) 采用宏量肉汤稀释法进行体外药敏试验结果如表 3 所示,13 株植物乳杆菌对红霉素、氯霉素和青霉素表现出不同程度的耐药性,对 3 种抗生素的耐药率分别为红霉素(12/13, 92.31%)、氯霉素(5/13, 38.46%)、青霉素(4/13, 30.77%)。13 株菌对氨苄西林、阿莫西林全部敏感,对链霉素、庆大霉素、四环素、万古霉素和诺氟沙星全部耐药。所测菌株对抗生素耐药率从高到低为链霉素=庆大霉素=四环素=万古霉素=诺氟沙星>红霉素>氯霉素>青霉素>氨苄西林=阿莫西林。13 株菌耐药性结果与很多研究报道大致相同,如李嫒等<sup>[32]</sup> 分离了 8 株不同来源的植物乳杆菌,对  $\beta$ -内

表 2 13 株植物乳杆菌的抑菌圈直径(mm)及判定结果

Table 2 Diameter of inhibition zone (mm) and judgment results of 13 strains of *L. plantarum*

菌株编号	抗生素									
	氨苄西林	阿莫西林	红霉素	链霉素	庆大霉素	四环素	青霉素钠	氯霉素	万古霉素	诺氟沙星
PC05	33.3/S	41.4/S	26.4/S	-/R	10.5/R	20/S	27/I	31.8/S	-/R	7.8/R
PC06	36.6/S	40.2/S	23.8/S	-/R	10.3/R	18.5/S	23.5/I	29.8/S	-/R	-/R
PC08	32.8/S	41.2/S	30.6/S	-/R	8.9/R	24/S	30.5/S	33.5/S	-/R	-/R
PC09	32.7/S	34.1/S	28.9/S	-/R	9.6/R	22/S	27.5/I	32.5/S	-/R	-/R
PC34	30.7/S	36.6/S	30.3/S	-/R	-/R	24.5/S	30/S	33.5/S	-/R	-/R
PC41	39.9/S	43/S	28.3/S	-/R	12.5/I	23/S	35.5/S	31.5/S	-/R	-/R
PC94	28.8/S	31/S	25.5/S	-/R	8/R	19/S	26/I	29.8/S	-/R	-/R
PC95	40.5/S	43.8/S	28.3/S	-/R	8.8/R	25/S	43.8/S	32.3/S	-/R	11/R
PC97	31.2/S	31/S	27.8/S	-/R	9.6/R	18.8/S	28.3/S	30.5/S	-/R	7.5/R
PC100	35.8/S	39.4/S	25/S	-/R	9.1/R	18.5/S	33/S	29.5/S	-/R	-/R
PC104	33.4/S	39.8/S	25.8/S	-/R	8.5/R	22/S	22/I	30.5/S	-/R	-/R
PC105	31.7/S	32.6/S	27.4/S	-/R	9.3/R	20.3/S	20.3/I	29/S	-/R	-/R
PC108	36.5/S	42.2/S	30.6/S	-/R	16.9/S	16.8/S	16.8/R	34.5/S	-/R	-/R

注: R: 耐药; I: 中度敏感; S: 敏感;“-”无药敏圈;质控菌株对实验抗生素的抑菌圈直径均在允许范围内。

表 3 13 株植物乳杆菌对 10 种抗生素的 MIC 检测结果

Table 3 Minimum inhibitory concentrations of 13 *L. plantarum* strains when exposed to ten antibiotics

菌株编号	MIC范围( $\mu$ g/mL)									
	氨苄西林	阿莫西林	红霉素	链霉素	庆大霉素	四环素	青霉素钠	氯霉素	万古霉素	诺氟沙星
PC05	<2/S	<2/S	4-2/R	>512/R	256-128/R	128-64/R	4-2/S	8-4/S	>512/R	>512/R
PC06	<2/S	<2/S	8-4/R	512-256/R	128-64/R	128-64/R	32-16/R	16-8/R	>512/R	>512/R
PC08	<2/S	<2/S	4-2/R	512-256/R	128-64/R	128-64/R	16-8/R	8-4/S	>512/R	>512/R
PC09	<2/S	<2/S	4-2/R	512-256/R	128-64/R	128-64/R	16-8/R	8-4/S	>512/R	>512/R
PC34	<2/S	<2/S	4-2/R	512-256/R	256-128/R	64-32/R	32-16/R	8-4/S	>512/R	>512/R
PC41	<2/S	<2/S	<2/S	256-128/R	64-32/R	64-32/R	<2/S	8-4/S	>512/R	>512/R
PC94	<2/S	<2/S	4-2/R	>512/R	>512/R	256-128/R	8-4/S	16-8/R	>512/R	>512/R
PC95	<2/S	<2/S	4-2/R	512-256/R	64-32/R	128-64/R	<2/S	8-4/S	>512/R	>512/R
PC97	<2/S	<2/S	8-4/R	512-256/R	256-128/R	256-128/R	4-2/S	16-8/R	>512/R	>512/R
PC100	<2/S	<2/S	8-4/R	512-256/R	32-16/R	256-128/R	<2/S	16-8/R	>512/R	>512/R
PC104	<2/S	<2/S	8-4/R	>512/R	256-128/R	128-64/R	4-2/S	16-8/R	>512/R	>512/R
PC105	<2/S	<2/S	8-4/R	>512/R	256-128/R	128-64/R	4-2/S	8-4/S	>512/R	>512/R
PC108	<2/S	<2/S	8-4/R	256-128/R	128-64/R	128-64/R	8-4/S	8-4/S	>512/R	>512/R

注: R: 耐药; S: 敏感; MIC评判标准为分别参照EFSA(庆大霉素16  $\mu$ g/mL、链霉素64  $\mu$ g/mL、万古霉素8  $\mu$ g/mL、青霉素8  $\mu$ g/mL、阿莫西林2  $\mu$ g/mL、诺氟沙星4  $\mu$ g/mL)、EUCAST(红霉素2  $\mu$ g/mL、四环素32  $\mu$ g/mL、氨苄西林2  $\mu$ g/mL、氯霉素8  $\mu$ g/mL)。



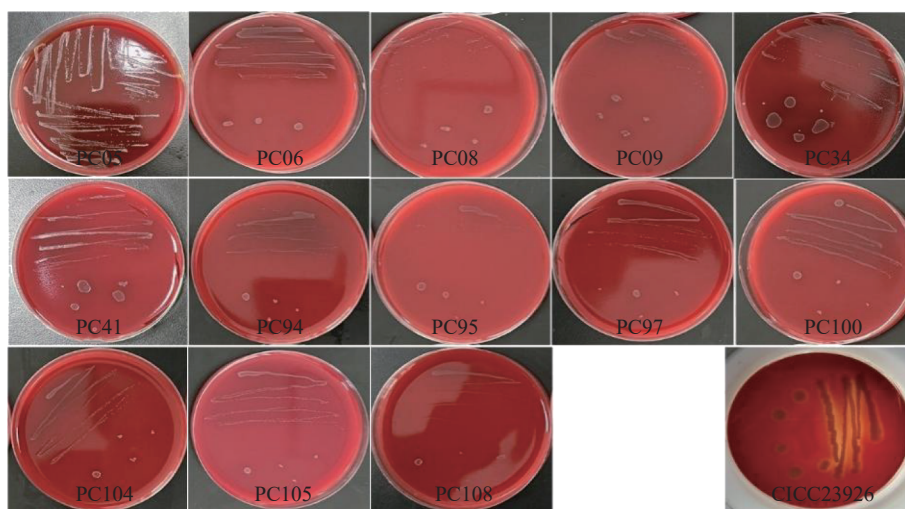


图4 溶血试验结果

Fig.4 Results of hemolysis test

酰胺类、大环内脂类、四环素类、氯霉素类抗生素敏感,对氨基糖苷类、糖肽类和喹诺酮类等抗生素有抗性。本实验中13株菌对四环素表现为耐药,这与Li等<sup>[33]</sup>研究四川泡菜中部分乳酸菌对四环素表现出较强的耐药性结果基本一致。综合上述结果,13株菌对链霉素、万古霉素、诺氟沙星耐药,对氨苄西林、阿莫西林敏感,K-B法和宏量肉汤稀释法(MIC)两种方法结果具有一致性,而对其他抗生素的敏感性两种方法结果存在一定差异。

**2.5.3 溶血性** WHO/FAO在《食品中益生菌评估指南》中建议,溶血性检测是益生菌体外安全性评价中不可缺少的环节。具有溶血性的细菌在补体的作用下,抗原(红细胞)和抗体(溶血素)进行溶解反应,将抗体溶解,进而引发破坏红细胞,造成集体严重的溶血反应,进而导致败血症等疾病<sup>[34]</sup>。

以金黄色葡萄球菌 CICC23926 为对照菌株,检测试验中13株植物乳杆菌溶血性(图4)。金黄色葡萄球菌菌落周围出现透明溶血圈,即为溶血,对人体的致病力强。13株植物乳杆菌菌落周围均没有出现溶血圈,即不溶血,由此说明试验菌种无溶血性,结果与一些研究所报道的其他植物乳杆菌未检测出溶血现象一致<sup>[35]</sup>。

### 3 结论

本研究从分离自四川泡菜的114株植物乳杆菌中筛选出13株耐酸和耐胆盐能力菌株,并对其潜在的益生作用和安全性进行了初步研究。结果表明,13株植物乳杆菌显示出良好的人工胃肠道耐受能力和自聚能力,与大肠埃希氏菌的共聚集能力高于单增李斯特菌,均无溶血性;在抗生素药敏性试验中,对链霉素、万古霉素以及诺氟沙星耐药,对四环素、氨苄西林、阿莫西林、红霉素、氯霉素均为敏感,对青霉素和庆大霉素表现出不同程度的敏感;在测定菌株最小抑制浓度 MIC 中,所测菌株对抗生素耐药率从高到低为链霉素=庆大霉素=四环素=万古霉素=诺氟沙

星>红霉素>氯霉素>青霉素>氨苄西林=阿莫西林。综上所述,13株植物乳杆菌在以不同指标评价时各有侧重,可作为潜在的益生菌菌株应用于食品、动物饲料等领域,同时也说明四川泡菜这一天然益生菌资源宝库非常值得挖掘。在下一步工作中,根据不同需求对表现好的菌株进行全基因组测序,挖掘重要性状相关的功能基因,对其功能性进行进一步探究,以期获得优良功能性菌株以及益生菌产品的开发奠定理论基础。

### 参考文献

- [1] 曾亮亮. 健合集团联合多机构启动“益生菌守护行动”[EB/OL]. (2021-10-18)http://www.jjckb.cn/2021-10/18/c\_1310253129.htm. [ZENG L L. H & H Group and multiple institutions launch the "Probiotics Protection Action"[EB/OL]. (2021-10-18)http://www.jjckb.cn/2021-10/18/c\_1310253129.htm.]
- [2] 张彦位, 路江浩, 郝梦洁, 等. 益生菌对生态系统的改善作用及其应用研究进展[J]. 食品工业科技, 2021, 42(4): 369-379. [ZHANG Y W, LU J H, YAN M J, et al. Research on probiotics to improve micro-ecosystem and its application[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(4): 369-379.]
- [3] LA FATA G, WEBER P, MOHAJERI M H. Probiotics and the gut immune system: Indirect regulation[J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2018, 10(1): 369-379.
- [4] RINALDI E, CONSONNI A, GUIDESI E, et al. Gut microbiota and probiotics: Novel immune system modulators in myasthenia gravis?[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2018, 1413(1): 49-58.
- [5] REUBEN R C, ROY P C, SARKAR S L, et al. Characterization and evaluation of lactic acid bacteria from indigenous raw milk for potential probiotic properties[J]. Journal of Dairy Science, 2020, 103(2): 1-15.
- [6] HANDA S, SHARMA N. In vitro study of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* F22 isolated from chhang-A traditional fermented beverage of Himachal Pradesh, India[J]. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 2016, 14(1): 91-97.
- [7] 陈功. 中国泡菜加工技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社,

- 2011: 21–23. [ CHEN G. Chinese Paocai processing technology[M]. Beijing: China Light Industry Press, 2011: 21–23. ]
- [ 8 ] 李恒, 陈功, 伍亚龙, 等. 高通量测序方法研究传统四川泡菜母水中微生物群落的动态变化[J]. *食品科学*, 2018, 39(24): 131–138. [ LI H, CHEN G, WU Y L, et al. Analysis of microbial community dynamics of traditional Sichuan Paocai brine by high-throughput sequencing[J]. *Food Science*, 2018, 39(24): 131–138. ]
- [ 9 ] 朱璐, 钱永清, 孙盛, 等. 一株具有益生特性的植物乳杆菌及其在发酵果蔬汁中的应用[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(20): 197–201. [ ZHU J, QIAN Y Q, SUN S, et al. A probiotic *Lactobacillus plantarum* for vegetable and fruit juice fermentation[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2019, 45(20): 197–201. ]
- [ 10 ] 彭灯水, 颜正财, 汤春梅, 等. 泡菜优良发酵乳酸菌耐受特性研究[J]. *食品与发酵科技*, 2010, 46(4): 50–52. [ PENG S D, YAN Z C, TANG C M, et al. Studies on tolerance property of lactic acid bacteria[J]. *Food & Fermentation Tech*, 2010, 46(4): 50–52. ]
- [ 11 ] 张其圣, 陈功, 中文焘, 等. 中国泡菜乳酸菌群落结构动态变化研究进展[J]. *食品与发酵科技*, 2016, 52(6): 1–8. [ ZHANG Q S, CHEN G, SHEN W X, et al. Review of the diversity and dynamics of lactic acid bacteria in Chinese Paocai[J]. *Food & Fermentation Tech*, 2016, 52(6): 1–8. ]
- [ 12 ] 李静, 王瑶, 邓毛程. 泡菜中优良乳酸菌筛选及特性的研究[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(6): 229–232. [ LI J, WANG Y, DENG M C. Screening and characterization of an excellent *Lactobacillus* isolated from pickle[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2016, 37(6): 229–232. ]
- [ 13 ] 丁诗瑶, 雷文平, 刘成国, 等. 不同来源植物乳杆菌的益生特性研究[J]. *中国乳品工业*, 2021, 49(1): 20–24. [ DING S Y, LEI W P, LIU C G, et al. Probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from different habitats[J]. *China Dairy Industry*, 2021, 49(1): 20–24. ]
- [ 14 ] BEHROOZ A B, MOHAMMAD N, FERESHTEH F. Inhibition of *Escherichia coli* adhesion to human intestinal Caco-2 cells by probiotic candidate *Lactobacillus plantarum* strain L15[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2019: 136.
- [ 15 ] WEINSTEIN M P, JR THOMAS J KIRN, II J S L, et al. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. M100, 30th Ed[M]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2020.
- [ 16 ] European Food Safety Authority (EFSA). Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance[J]. *EFSA Journal*, 2012, 10(6): 2740.
- [ 17 ] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)[EB/OL]. <https://eucast.org/>.
- [ 18 ] 高煜煜, 焦新雅, 张志胜, 等. 侗族传统发酵酸肉中乳酸菌的筛选、发酵特性及安全性分析[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(12): 94–99. [ GAO M M, JIAO X Y, ZHANG Z S, et al. Screening, fermentation characteristics and safety analysis of lactic acid bacteria in Dong traditional fermented sour meat[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(12): 94–99. ]
- [ 19 ] 聂紫玉, 吴艳阳, 王增光, 等. 植物源益生乳酸菌的筛选及其特性[J]. *食品科学*: 1–14[2022-09-02]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20211221.1221.012.html>. [ NIEZY, WUYU, WANG Z G, et al. Screening and characterization of plant-derived probiotic lactic acid bacteria[J]. *Food Science*: 1–14[2022-09-02]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20211221.1221.012.html> ]
- [ 20 ] 赵山山, 杨园园, 周玉岩, 等. 贵州泡菜中乳酸菌的分离鉴定及其在泡菜发酵中的应用[J]. *中国酿造*, 2020, 39(12): 113–119. [ ZHAO S S, YANG Y Y, ZHOU Y Y, et al. Isolation and identification of lactic acid bacteria from Guizhou pickles and its application in pickle fermentation[J]. *China Brewing*, 2020, 39(12): 113–119. ]
- [ 21 ] GIRI S S, SEN S S, SAHA S, et al. Use of a potential probiotic, *Lactobacillus plantarum* L7, for the preparation of a rice-based fermented beverage[J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 473.
- [ 22 ] 周海柱, 高云航, 郭玮, 等. 高效降胆固醇植物乳杆菌的筛选及其益生潜能初探[J]. *中国农业大学学报*, 2018, 23(2): 36–42. [ ZHOU H Z, GAO Y H, GUO W, et al. Screening and evaluation of cholesterol-lowering *Lactobacillus plantarum* strains[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2018, 23(2): 36–42. ]
- [ 23 ] 胡敏, 黄涛, 彭珍, 等. 胆盐对植物乳杆菌 NCU116 应激基因和关键生理指标的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(9): 1–8. [ HU M, HUANG T, PENG Z, et al. Influences of bile salts on stress genes and key physiological indexes of *Lactobacillus plantarum* NCU116[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2019, 45(9): 1–8. ]
- [ 24 ] 郑越, 段涛, 宋丹, 等. 六株植物乳杆菌的益生特性研究[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(10): 119–125. [ ZHENG Y, DUAN T, SONG D, et al. Probiotic properties of six *Lactobacillus plantarum* strains[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2022, 48(10): 119–125. ]
- [ 25 ] 张明辉, 王光强, 夏永军, 等. 植物乳杆菌粘附性与其表面特征关系的探究[J]. *工业微生物*, 2017, 47(1): 37–42. [ ZHANG M H, WANG G Q, XIA Y J, et al. Relationships between adhesion abilities and surface properties of *Lactobacillus plantarum*[J]. *Industrial Microbiology*, 2017, 47(1): 37–42. ]
- [ 26 ] 李清, 刘小莉, 王英, 等. 植物乳杆菌表面性质及对 Caco-2 细胞的黏附[J]. *食品科学*, 2015, 36(9): 97–101. [ LI Q, LIU X L, WANG Y, et al. Surface properties and adhesion to Caco-2 cells of *Lactobacillus plantarum* strains[J]. *Food Science*, 2015, 36(9): 97–101. ]
- [ 27 ] 赵维俊. 益生菌表面疏水性与自动聚集能力的研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2012. [ ZHAO W J. Study on surface hydrophobicity and auto-aggregation ability of probiotic[D]. Xi'an: Shaanxi University of Science & Technology, 2012. ]
- [ 28 ] KAEWNOPPARAT S, DANGMANEE N, KAEWNOPPARAT N, et al. *In vitro* probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* SK5 isolated from vagina of a healthy woman[J]. *Anaerobe*, 2013, 22: 6–13.
- [ 29 ] 刘勇, 张勇, 张和平. 世界益生菌安全性评价方法[J]. *中国食品学报*, 2011, 11(6): 141–151. [ LIU Y, ZHANG Y, ZHANG H P. Evaluating methods of probiotic's safety in the world[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2011, 11(6): 141–151. ]
- [ 30 ] 许女, 李雅茹, 王超宇, 等. 传统发酵食品中乳酸菌的抗生素耐药性评估及耐药基因分析[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(7): 160–171. [ XU N, LI Y R, WANG C Y, et al. Antimicrobial resis-



tance evaluation and resistant gene profiles of lactic acid bacteria isolated from traditional fermented foods[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(7): 160-171. ]

[ 31 ] 林凯. 有机白萝卜表皮附生乳酸菌抗生素耐药性评估与耐药基因分析 [D]. 成都: 西华大学, 2016. [ LIN K. Antibiotic resistance evaluation and resistant gene profile of epibiotic lactic acid bacteria on the surface of organic white radish[D]. Chengdu: Xihua University, 2016. ]

[ 32 ] 李禴, 贾丹, 刘军龙, 等. 新分离植物乳杆菌的药敏性和抑菌性试验[J]. 中国兽医科学, 2019, 49(7): 879-886. [ LI H, JIA D, LIU J L, et al. Antibiotic susceptibility and antimicrobial test of newly isolated *Lactobacillus plantarum in vitro*[J]. Chinese Veterinary Science, 2019, 49(7): 879-886. ]

[ 33 ] LI M, TANG Y, GUO L, et al. Antibiotic resistance characterization of bacteria isolated from traditional Chinese Paocai[J]. *Current Microbiology*, 2021, 78(11): 3853-3862.

[ 34 ] 张丹青. 潜在应用乳酸菌安全性的初步评价 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2016. [ ZHANG D Q. Preliminary safety assesment of lactic acid bacteria strains for potential use in industrial[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2016. ]

[ 35 ] 郝露露, 雷文平, 刘成国, 等. 具有益生特性植物乳杆菌的筛选及其发酵特性的研究[J]. 食品工业科技, 2020, 41(17): 109-113. [ HAO L L, LEI W P, LIU C G, et al. Screening of *Lactobacillus plantarum* with probiotic properties and its fermentation characteristics[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(17): 109-113. ]