

产共轭亚油酸乳酸菌的筛选及体外特性评价

莫嘉玲¹, 肖沐岩^{2*}, 熊涛^{1*}

(¹食品科学与技术国家重点实验室 南昌 330047)

(²南昌大学国际食品创新研究院 南昌 330047)

摘要 从 117 株泡菜和婴儿粪便源中筛选高产共轭亚油酸(CLA)的乳酸菌,对其进行功能性和安全性评价。采用紫外分光光度法初筛得到 27 株 CLA 转化率大于 8%的菌株,通过 GC-Q-TOFMS 验证其 CLA 异构体组成,最终获得 8 株 CLA 转化率在 10%以上,同时发酵液中 c9,t11-CLA、t10,c12-CLA 异构体质量浓度高于 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 乳酸菌。对这 8 株菌进行自凝集、疏水性、黏附性能、胃肠道耐受能力、抑菌活性、安全性等体外特性评价。结果表明,植物乳杆菌 NCU001044、NCU006007 整体表现优异,自凝集率皆大于 60%,具有中度疏水能力,且黏附率分别为 8.81%、9.10%。两株菌在 pH 2.5 酸性条件下存活率分别为 95.68%、84.63%,在质量分数为 0.3%的胆盐中存活率均高于 65%。安全性方面,两株菌对青霉素、苄卡西林、四环素、红霉素中性敏感或敏感,无溶血活性。本研究筛选到具有高效生物转化有益 CLA 异构体能力的植物乳杆菌 2 株,这 2 株菌具有良好的胃肠道定植能力,以及酸、胆盐耐受力,对致病菌表现出较高的抑制作用,可进一步投入发酵产品及功能性微生态制剂的开发。

关键词 乳酸菌; 共轭亚油酸; 体外特性

文章编号 1009-7848(2023)03-0051-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.03.006

共轭亚油酸(Conjugated linoleic acid, CLA)是含有顺式和反式共轭双键的十八碳二烯酸的总称,根据其双键在碳链上的不同位置,至少有 28 种异构体^[1],而 cis9,trans11-共轭亚油酸(c9,t11-CLA),trans10,cis12-共轭亚油酸(t10,c12-CLA)两种异构体被报道具有包括抗动脉粥样硬化、抗癌,提高免疫力等在内的多种的生理功能^[2-4]。乳酸菌广泛存在于泡菜、奶制品及人和动物的肠道中,产生的亚油酸异构酶可高效转化 LA 获得 CLA^[5],与瘤胃细菌相比其培养条件易于控制,且发酵产生的 CLA 异构体和天然食品中的组成相似。

目前,乳酸菌作为一类极其重要的肠道益生菌,其安全性、益生作用和应用价值备受人们的关注。乳酸菌可以通过代谢产生功能性物质,增强营

养吸收来调节肠道微生物平衡,从而起到一定的益生作用。对于筛选体外生物转化 CLA 乳酸菌来说,评价其益生特性十分必要,可以获得优质且安全的乳酸菌。

本研究以高产 c9,t11-CLA,t10,c12-CLA 等含有多种生理功能的异构体为指标,从南昌大学食品科学与技术国家重点实验室菌种资源库中筛选转化共轭亚油酸能力强的乳酸菌,同时对所筛选的菌株进行体外益生特性评价,以期为高产共轭亚油酸的微生物制剂制备及相关发酵产品的开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

乳酸菌,源自南昌大学食品科学与技术国家重点实验室菌种资源库中的泡菜、婴儿源乳酸菌共 117 株。LA 标准品、CLA 标准品, sigma 公司;其它试剂为色谱纯、分析纯级。

1.2 设备与仪器

MLS-3751L-PC 高压蒸汽灭菌锅,松下健康医疗器械株式会社;CJ-1680 超净工作台,苏州市净化设备有限公司;DNP-9272 型生化培养箱,上海精宏实验设备有限公司;7250 高分辨气-质谱

收稿日期: 2022-03-16

基金项目: 广东省重点领域研发计划项目(2022B0202050001);江西省蔬菜产业技术体系岗位专家项目(JXARS-06);“十四五”广东省农业科技创新十大主攻方向“揭榜挂帅”项目(2022SDZG04);云南省发酵蔬菜重点实验室科技人才与平台计划项目(202205AG070001)

第一作者: 莫嘉玲,女,硕士生

通信作者: 熊涛 E-mail: xiongtao0907@163.com
肖沐岩 E-mail: myxiao@neu.edu

联用仪,安捷伦科技有限公司;Varioskan™ LUX 酶标仪,赛默飞世尔科技有限公司。

1.3 研究方法

1.3.1 产 CLA 乳酸菌的筛选

1.3.1.1 紫外分光光度法初筛 将乳酸菌在 LA 质量浓度为 0.5 mg/mL 的 MRS 培养基中培养 48 h,在发酵液中加入正己烷,超声提取脂肪酸^[6]。静置后弃下层水相,采用蒸馏水水洗,取上层有机相定容待检。以未发酵的 MRS 作参比,测定脂肪酸萃取液吸光度。根据绘制的标准曲线计算发酵液中 CLA 浓度,初步筛选具有生物转化 CLA 能力的乳酸菌。

1.3.1.2 GC-Q-TOFMS 分析 氮气吹干萃取的脂肪酸,采用重氮甲烷法^[7]衍生,用真空冷冻旋干仪去除溶剂与水分,加入色谱级正己烷定容,待检。采用外标法测定菌株所产 CLA 的组分及含量。

脂肪酸甲酯采用高分辨气-质谱联用仪检测。气相柱 DB-WAX,程序升温条件:初始温度 40 °C 保持 2 min,以 55 °C/min 升至 171 °C,保持 25 min,最后以 10 °C/min 升至 215 °C,保持 15 min。采用液体分流进样,进样量为 1 μL,分流比为 20:1,氦气作为载气,进样器温度和检测器温度均为 240 °C。离子源温度 220 °C,强度 70 eV。

1.3.2 乳酸菌的表面疏水性能测定 乳酸菌活化培养后,离心收集菌体,用 PBS 洗涤,调 OD_{600nm}=0.40±0.05。取 2 mL 菌液和 2 mL 二甲苯混合,震荡后静置 1 h,取下层水相,测定其在波长 600 nm 处的吸光度。表面疏水性计算公式:

$$\text{疏水作用力}(\%) = [(A_0 - A) / A_0] \times 100 \quad (1)$$

式中: A_0 和 A ——分别为菌液与二甲苯混匀前、后测得的吸光度。

1.3.3 乳酸菌自凝聚能力测定 将乳酸菌活化培养后,离心收集菌体,用 PBS 洗涤。将菌体用 PBS (pH=7)重悬至浓度约为 10⁸ CFU/mL,于 37 °C 静置孵育,在 0,2,4,6,8,10,24 h,分别取 0.1 mL 上清,测定波长 600 nm 处的吸光值。菌体表面自凝聚能力计算公式:

$$\text{自聚集性}(\%) = (1 - A_t / A_0) \times 100 \quad (2)$$

式中: A_0 ——0 h 的吸光度; A_t ——菌悬液静置后的吸光度。

1.3.4 乳酸菌模拟人体肠道上皮细胞黏附性能

采用胰酶-EDTA 消化孵育至单层的 CaCo-2 细胞,用 DMEM 完全营养液调整细胞浓度为 1.0×10⁵ 个/mL,均匀装于 6 孔组织培养板中,于 37 °C 孵育至单层细胞。弃各孔的营养液,用无菌 PBS 洗板 2 遍,采用血球计数板计算其中 1 孔的细胞浓度。其它 5 孔加入 1 mL DMEM 原液和 1 mL 菌悬液(1×10⁸ CFU/mL),吹打混合,于 37 °C 孵育 2 h 后弃各孔的混合液,用无菌 PBS 缓冲液洗涤 5 次,除去未黏附的乳酸菌。加入胰酶消化液和无菌 PBS 梯度稀释,计算黏附的细菌数。黏附率计算公式:

$$\text{黏附率}(\%) = \text{黏附细菌数} / \text{总细菌数} \times 100 \quad (3)$$

1.3.5 酸耐受能力测定 用 HCl 将液体 PBS 的 pH 值调至 2.0,2.5,3.0,7.4,121 °C 灭菌 15 min,待用。菌株离心后去上清,用无菌生理盐水洗涤,使用不同 pH 值的 PBS 重悬至活菌数为 10⁸ CFU/mL,置 37 °C 孵育 3 h,分别取 0,3 h 的样品稀释,涂布,计数。

存活率(%) = 处理后活菌数(CFU/mL) / 初始活菌数(CFU/mL) × 100 (4)

1.3.6 胆盐耐受能力测定 用 NaOH 将液体 PBS 的 pH 值调至 8.0,在其中加入猪胆盐,使胆盐的质量浓度分别为 1,3,5 g/L,121 °C 灭菌 15 min,待用。将菌株离心,去上清,无菌生理盐水洗涤。使用上述不同胆盐浓度的 PBS 重悬至活菌数为 10⁸ CFU/mL,于 37 °C 孵育 4 h,分别取 0,4 h 的样品稀释,涂布,计数,按公式(4)计算存活率。

1.3.7 抑菌能力测定 采用琼脂扩散法^[8]测定菌株发酵上清液对蜡样芽孢杆菌 JXCDC-JJ0398、金黄色葡萄球菌 CMCC 2603、大肠杆菌 CMCC 44350、沙门氏菌 ATCC 13311 等 7 种致病菌的抑菌谱。将长至对数期的致病菌作为指示菌,离心去上清,用无菌水重悬后加入 LB 培养基,制得浓度为 10⁷ CFU/mL 的含菌平板。采用打孔器打孔,每孔加入 200 μL 已培养 24 h 的乳酸菌上清液,于 37 °C 静置培养 12 h,测定抑菌圈直径。

1.3.8 抗生素敏感性研究 采用 K-B (药敏纸片琼脂扩散法)做药敏试验,将菌株离心去上清,采用无菌 PBS 稀释至浓度为 1.0×10⁹ CFU/mL。取菌悬液 0.1 mL,均匀涂布于 MRS 固体培养基表面,待干燥后,用镊子将药敏纸片平贴在涂好细菌的琼脂表面。所用药敏纸片分别为阿莫西林、庆大霉

素、环丙沙、青霉素、氨苄西林、卡那霉素、四环、链霉素、红霉素。于 37 °C 培养 48 h, 测量抑菌圈直径。参照制片法药敏试验抑菌环直径判断标准判定试验结果。

1.3.9 溶血试验 分别将乳酸菌通过划线方法在血平板固体培养基上划线, 37 °C 培养 48 h, 以金黄色葡萄球菌为阳性对照, 观察是否出现溶血现象。

2 试验结果

2.1 产共轭亚油酸菌株的筛选

2.1.1 紫外分光光度法初筛 据报道, 植物乳杆菌、罗伊氏乳杆菌、短乳杆菌^[9-10]等能够生物转化 CLA, 从资源库中选取植物乳杆菌、发酵乳杆菌、戊糖片球菌、鼠李糖乳杆菌等在内的 117 株菌, 采用紫外分光光度法测定, 根据建立的标准曲线计算 CLA 浓度, 结果见图 1。乳酸菌生物转化 CLA 的能力没有明显的种属规律性, 其中植物乳杆菌 NCU001158、植物乳杆菌 NCU001021、发酵乳杆菌 NCU003066、鼠李糖乳杆菌 NCUH061020、鼠李糖乳杆菌 NCUH081008 等 27 株乳酸菌 CLA 产量大于 40 μg/mL, 转化率大于 8%, 进一步验证了这 27 株菌产 CLA 能力。采用 GC-Q-TOFMS 方法分析其异构体组成和含量。

2.1.2 菌株生物转化 CLA 异构体组分分析 CLA 结构包括多种几何异构体和位置异构体, 目前 c9, t11-CLA, t10, c12-CLA 是被广泛报道具有生理活性的两种异构体^[11-12], 包括降低血浆胆固醇, 抑制癌变, 减少机体脂肪含量等功能。与其它异构体相

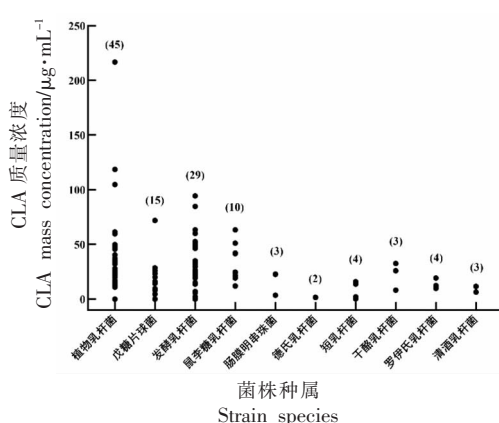


图 1 117 株乳酸菌发酵液中的 CLA 浓度

Fig.1 Concentration of CLA in fermentation broth of 117 lactic acid bacteria

比, 这两种异构体在食品生物技术和营养领域得到关注。杨波等^[1]报道亚油酸转化率超过 10% 即可认定为高产菌株。为筛选能高转化有益 CLA 异构体的菌株, 采用 7250 高分辨气-质谱联用仪分析初筛的 27 乳酸菌发酵液中的 CLA 异构体, 结果见表 1。最终筛选到鼠李糖乳杆菌 NCUH061008, 发酵乳杆菌 NCU003012, NCU001036, NCU003069, 植物乳杆菌 NCU001013, NCU001044, NCU001046, NCU006007, 8 株菌的 CLA 转化率在 10% 以上, 同时发酵液中 c9, t11-CLA, t10, c12-CLA 异构体质量浓度高于 20 μg/mL。相比 Ribeiro 等^[13]筛选的植物乳杆菌产有益异构体质量浓度在 12~18 μg/mL 范围, 本研究所得菌株生物转化 CLA 能力较强。

表 1 乳酸菌发酵后培养基中 CLA 的异构体组成

Table 1 Composition of CLA isomers in the culture medium after lactic acid bacteria fermentation

菌株	436 μg/mL LA				转化率/%
	c9, t11-CLA/ μg·mL ⁻¹	t10, c12-CLA/ μg·mL ⁻¹	c9, c11-CLA/ μg·mL ⁻¹	t9, t11-CLA/ μg·mL ⁻¹	
鼠李糖乳杆菌					
NCUA00105	4.08 ± 0.42	2.45 ± 0.36	39.15 ± 2.44	4.06 ± 0.22	11.41
NCUH061016	3.79 ± 0.06	4.98 ± 0.01	35.49 ± 5.92	2.97 ± 0.49	10.83
NCUH061008	15.18 ± 1.98	19.05 ± 0.06	4.94 ± 0.33	5.03 ± 1.66	10.14
NCUH003017	6.87 ± 1.06	7.12 ± 0.47	14.81 ± 2.31	10.13 ± 0.93	8.93
NCUA00102	2.89 ± 0.33	2.71 ± 0.43	8.82 ± 0.43	2.77 ± 0.37	3.94
NCUH061013	4.97 ± 0.40	5.11 ± 1.00	2.01 ± 0.01	3.09 ± 1.28	3.48
NCUH061020	2.69 ± 0.03	3.93 ± 0.39	2.53 ± 0.37	3.31 ± 0.92	2.86

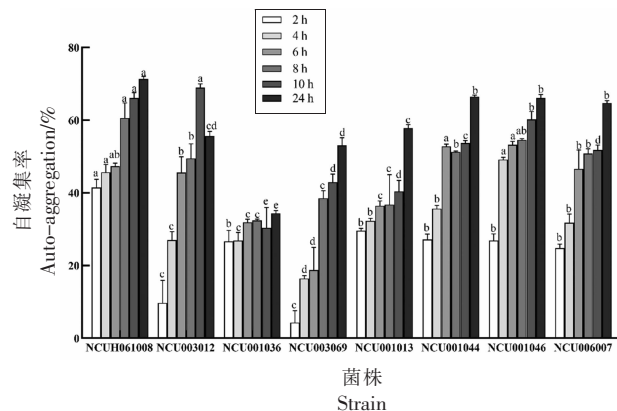
(续表 1)

菌株		436 $\mu\text{g/mL}$ LA				转化率/%
		c9,t11-CLA/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	t10,c12-CLA/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	c9,c11-CLA/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	t9,t11-CLA/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	
发酵乳杆菌	NCU003012	57.56 \pm 7.09	38.14 \pm 1.27	0.30 \pm 0.03	20.19 \pm 0.01	26.65
	NCU003042	5.49 \pm 0.45	3.53 \pm 0.16	49.94 \pm 3.06	36.25 \pm 2.08	21.84
	NCU003069	24.84 \pm 2.88	23.44 \pm 2.94	5.35 \pm 0.67	15.6 \pm 0.39	15.88
	NCU001036	22.08 \pm 1.87	11.59 \pm 0.99	3.62 \pm 0.22	13.74 \pm 0.05	11.7
	NCU003048	7.31 \pm 2.35	3.81 \pm 0.44	1.64 \pm 0.01	34.11 \pm 4.90	10.75
	NCU003066	8.28 \pm 3.56	8.35 \pm 2.56	3.37 \pm 0.25	7.5 \pm 1.43	6.31
	NCU003041	7.75 \pm 0.58	5.35 \pm 0.01	3.55 \pm 0.06	0.91 \pm 0.00	4.03
	NCU003022	2.84 \pm 0.79	3.19 \pm 1.66	1.63 \pm 0.20	3.38 \pm 0.12	2.53
植物乳杆菌	NCU006007	101.44 \pm 5.99	95.59 \pm 9.74	2.25 \pm 0.02	29.20 \pm 1.34	52.40
	NCU001044	54.41 \pm 1.74	5.86 \pm 0.93	24.62 \pm 4.03	48.13 \pm 2.47	30.51
	NCU001013	17.51 \pm 1.08	5.58 \pm 0.32	80.27 \pm 10.11	16.3 \pm 1.84	27.44
	NCU001046	40.17 \pm 3.02	15.27 \pm 1.03	1.84 \pm 0.25	33.92 \pm 1.09	20.92
	NCU001048	12.50 \pm 1.24	5.32 \pm 0.03	12.88 \pm 1.46	11.37 \pm 0.82	9.65
	NCU001158	2.70 \pm 0.14	4.69 \pm 0.04	2.58 \pm 0.20	14.05 \pm 3.55	5.51
	NCU001038	6.87 \pm 0.23	5.92 \pm 0.46	3.06 \pm 0.18	6.25 \pm 0.29	5.07
	NCU001039	4.20 \pm 0.66	5.30 \pm 1.30	3.26 \pm 0.42	6.75 \pm 0.74	4.47
	NCU001027	4.17 \pm 0.13	2.53 \pm 0.35	8.63 \pm 0.18	4.13 \pm 1.01	4.46
	NCU001021	2.78 \pm 0.88	3.62 \pm 0.19	1.79 \pm 0.23	4.44 \pm 0.57	2.90
NCU001032	2.09 \pm 0.41	0.80 \pm 0.01	2.47 \pm 0.19	1.93 \pm 0.03	1.67	
戊糖片球菌	NCU006004	6.93 \pm 0.75	4.35 \pm 0.31	2.62 \pm 0.94	7.22 \pm 0.35	4.84

2.2 自凝集能力、疏水性能及对 Caco-2 细胞的黏附能力

2.2.1 自凝集能力 乳酸菌的自凝集能力、疏水能力和对 Caco-2 细胞的黏附能力呈正相关,可作为菌体在肠道黏附能力的评定指标,往往具有较高自凝集的菌株可以在一定程度上消除肠道蠕虫带来的影响,有利于其在肠道中定植^[14]。由图 2 可见,随着静置时间的延长,8 株乳酸菌的自凝集率逐渐增加,在前 8 h 迅速聚集后,在 24 h 达到最大值。其中,鼠李糖乳杆菌 NCUH061008 的自凝集率最高,达 75%,具有较强的自凝集能力。除发酵乳杆菌 NCU001036,其它 7 株菌在 24 h 时的自凝集率均大于 50%,达到 Han 等^[15]划定的高等自凝集能力。

2.2.2 疏水性能 细菌表面疏水性作为乳酸的表面特性,被用于间接评估益生菌的黏附能力^[16]。较好的疏水性有助于菌体对宿主胃肠道上皮细胞的黏附定植。由图 3 可知,疏水性存在一定的菌株特

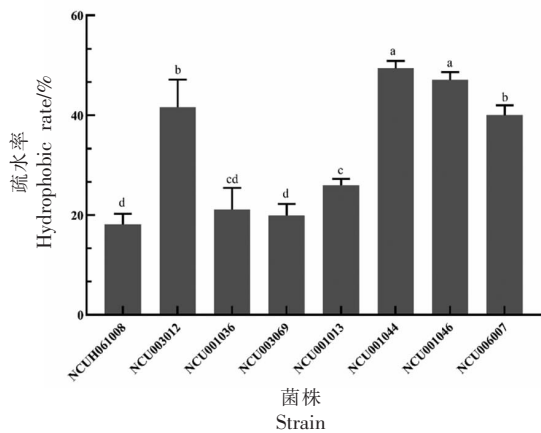


注:不同字母(a-d)表示各菌株间自凝集能力存在显著性差异($P < 0.05$)。

图 2 8 株乳酸菌自凝集能力

Fig.2 Self-agglutination capacity of lactic acid bacteria

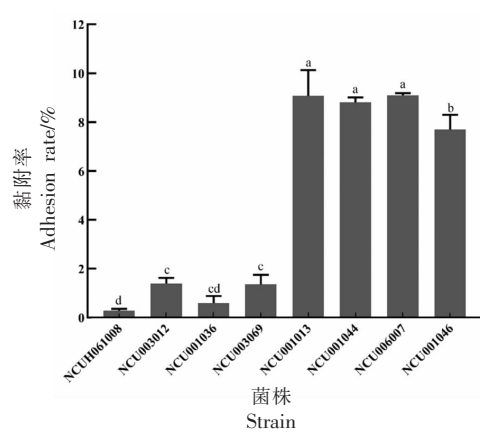
异性,发酵乳杆菌 NCU003012、植物乳杆菌 NCU001044、NCU001046、NCU006007 对二甲苯的疏水性都处于中等水平^[17];而其它 4 株菌对二甲苯的疏水性处于较低水平。



注:不同字母(a-d)表示各组间存在显著性差异($P < 0.05$)。

图 3 乳酸菌菌株的疏水性

Fig.3 The hydrophobicity of lactic acid bacteria



注:不同字母(a-d)表示各组间存在显著性差异($P < 0.05$)。

图 4 乳酸菌菌株对 Caco-2 细胞的黏附率

Fig.4 Adhesion rate of lactic acid bacteria to Caco-2 cells

2.2.3 黏附能力 黏附能力作为评定新型益生菌的指标,是菌株在肠道中定植,进而发挥其益生作用的必要条件,也是菌株调节肠道菌群平衡的关键影响因素^[18]。采用结肠癌细胞系 Caco-2 作为体外细胞模型,探究 8 株乳酸菌的黏附能力,根据活菌计数结果得到黏附率,如图 3 所示。这 8 株菌对于 Caco-2 细胞的黏附能力具有明显的菌株差异性($P < 0.05$)。植物乳杆菌 NCU001013、NCU001044、NCU001046、NCU006007 的黏附率分别为 9.08%、8.81%、7.70%、9.10%,与其它 4 株菌相比,黏附率存在明显差异性。结合前文所述,植物乳杆菌 NCU001044、NCU001046、NCU006007 表现优异,推测它们具有较好的胃肠道定植能力。

2.3 菌株酸和胆盐耐受结果

2.3.1 酸耐受结果 益生菌只有顺利通过消化道后才能在宿主体内发挥益生作用。良好的酸耐受性作为益生菌的重要特性,反映菌株在胃酸(低 pH 值)的极端条件下的存活情况。由表 2 可见,当 pH3 时,除发酵乳杆菌 NCU003069 外,对其它菌株无显著影响;当 pH2.5 时,发酵乳杆菌 NCU003012、NCU001036 和植物乳杆菌 NCU001044、NCU006007 的存活率都在 80%以上;当 pH 值降至 2 时,菌株酸耐受明显下降,8 株菌的活菌数均至少下降 2 个数量级,然而,发酵乳杆菌 NCU001036、植物乳杆菌 NCU001044、NCU006007 的活菌数高于 10^5 CFU/mL,表现出较好的酸耐受性。

表 2 乳酸菌在不同 pH 值下孵育 3 h 后的存活率

Table 2 Survival rate of lactic acid bacteria incubated at different pH values for 3 h

菌株	pH 3.0	pH 2.5	pH 2.0
NCUH061008	97.08 ± 5.05 ^a	0.00 ± 0.00 ^d	0.00 ± 0.00 ^c
NCU003012	93.33 ± 11.55 ^a	90.00 ± 10.00 ^{ab}	0.00 ± 0.00 ^c
NCU001036	96.32 ± 2.73 ^a	80.24 ± 9.48 ^b	0.13 ± 0.03 ^b
NCU003069	0.36 ± 0.12 ^c	0.10 ± 0.04 ^d	0.00 ± 0.00 ^c
NCU001013	71.18 ± 3.62 ^b	53.08 ± 2.03 ^c	0.00 ± 0.00 ^c
NCU001044	94.57 ± 6.49 ^a	95.68 ± 1.50 ^{ab}	0.21 ± 0.02 ^a
NCU001046	100.00 ± 0.00 ^a	48.58 ± 6.56 ^c	0.01 ± 0.01 ^c
NCU006007	98.23 ± 1.36 ^a	84.63 ± 6.85 ^b	0.21 ± 0.04 ^a

注:不同字母(a-c)表示各菌株间酸耐受力存在显著性差异($P < 0.05$)。

2.3.2 胆盐耐受结果 菌株通过胃液后在小肠的前部遇到一定浓度的胆盐作用,只有在高浓度胆

盐含量中保持活力并能够繁殖的菌株才能抵抗肠道消化作用而存活。肠道内胆汁的质量分数一般

在 0.1%~0.3%^[19],选择 3 个不同胆盐质量分数。表 3 为 8 株乳酸菌胆盐耐受结果,随着胆盐浓度的上升,乳酸菌的存活率受到显著影响,这与郑志瑶等^[20]的研究结果相似。其中,鼠李糖乳杆菌 NCUH061008 和发酵乳杆菌 NCU003012 对胆盐十分敏感;植物乳杆菌 NCU001013、NCU001044、

NCU006007 表现出来良好的胆盐耐受力,在 0.5% 的胆盐下,菌株活菌数仍高于 10⁷ CFU/mL。结合前文所述胃液耐受能力,植物乳杆菌 NCU001044、NCU006007 在模拟胃肠道消化液中仍保持较高的活性,满足了在肠道存活的基本要求。

表 3 乳酸菌在不同胆盐浓度下孵育 4 h 后的存活率

Table 3 Survival rate of lactic acid bacteria incubated at different bile salt concentrations for 4 h

菌株	胆盐质量分数		
	0.1%	0.3%	0.5%
NCUH061008	0.00 ± 0.00 ^e	0.00 ± 0.00 ^e	0.00 ± 0.00 ^d
NCU003012	0.00 ± 0.00 ^e	0.00 ± 0.00 ^e	0.00 ± 0.00 ^d
NCU001036	13.89 ± 5.85 ^c	6.58 ± 1.42 ^d	1.28 ± 0.48 ^d
NCU003069	11.00 ± 1.73 ^{cd}	0.00 ± 0.00 ^e	0.00 ± 0.00 ^d
NCU001013	63.33 ± 3.34 ^b	43.88 ± 1.8 ^c	21.11 ± 1.47 ^a
NCU001044	77.33 ± 4.16 ^a	66.14 ± 1.44 ^b	15.66 ± 3.16 ^b
NCU001046	5.72 ± 0.66 ^{bc}	5.44 ± 0.87 ^d	0.81 ± 0.24 ^d
NCU006007	73.51 ± 4.97 ^a	73.51 ± 4.97 ^a	12.82 ± 2.81 ^c

注:不同字母(a-e)表示各菌株间胆盐耐受力存在显著性差异($P < 0.05$)。

2.4 抑菌试验结果

益生菌的一项重要益生特性就是对致病菌的拮抗作用^[21]。本试验选取蜡样芽孢杆菌在内的 3 种革兰氏阳性菌,以及大肠杆菌在内的 4 种革兰氏阴性菌作为指示菌,根据其抑菌圈直径判断乳酸菌的抑菌活性。以未发酵的 MRS 培养基为阴性

对照,总体来看,8 株乳酸菌对 7 种致病菌均有一定的抑制作用,可能是乳酸菌代谢过程中产生有机酸或者蛋白类物质,能够抑制有害菌的生长,从而起到减少致病菌所产毒素的积累。其中植物乳杆菌 NCU006007 的抑菌效果显著,7 种致病菌的抑菌圈直径都大于 12 mm。

表 4 乳酸菌对 7 种常见致病菌的抑菌活性

Table 4 Antibacterial activity of lactic acid bacteria against seven common pathogenic bacteria

菌株	抑菌圈直径/mm						
	G+指示菌			G-指示菌			
	蜡样芽孢杆菌	单增李斯特菌	金黄色葡萄球菌	沙门氏菌	坂崎肠杆菌	铜绿假单胞菌	大肠杆菌
MRS	6.13 ± 0.10	6.04 ± 0.09	6.18 ± 0.03	6.86 ± 0.12	6.09 ± 0.06	6.05 ± 0.26	6.00 ± 0.00
NCU001044	13.00 ± 0.28	8.50 ± 0.36	12.52 ± 0.18	11.73 ± 0.41	11.92 ± 0.23	12.05 ± 0.86	11.05 ± 0.45
NCU001046	12.12 ± 0.80	7.32 ± 0.10	12.61 ± 0.01	12.47 ± 0.43	12.67 ± 0.06	11.58 ± 0.51	13.25 ± 0.30
NCU006007	12.77 ± 0.20	12.37 ± 0.43	12.52 ± 0.25	11.68 ± 0.60	12.32 ± 0.34	12.03 ± 0.58	12.5 ± 0.73
NCU001013	11.59 ± 0.29	8.32 ± 0.17	12.35 ± 0.26	10.72 ± 0.52	12.23 ± 0.12	10.13 ± 0.92	12.04 ± 0.10
NCU003012	9.59 ± 0.20	7.42 ± 0.38	12.92 ± 0.38	10.96 ± 0.74	11.39 ± 0.66	11.85 ± 0.40	11.70 ± 0.36
NCU003069	9.91 ± 0.37	6.62 ± 0.20	12.24 ± 0.10	10.04 ± 0.32	11.33 ± 0.24	11.16 ± 0.13	11.34 ± 0.20
NCU001036	12.40 ± 0.09	6.38 ± 0.17	11.36 ± 0.27	10.85 ± 0.13	11.32 ± 0.19	9.36 ± 0.19	11.82 ± 0.05
NCUH061008	10.83 ± 1.13	6.16 ± 0.08	10.01 ± 0.20	10.54 ± 0.27	10.91 ± 0.46	10.06 ± 0.44	9.13 ± 0.60

2.5 安全性评价结果

2.5.1 溶血活性评估 溶血是指在溶血毒素及其它理化因素的作用下,红细胞破裂,血红蛋白溢出^[22]。菌株代谢产物有无溶血活性被认为是菌株安全性评价的重要指标^[23]。8 株乳酸菌的溶血试验结果见表 5。以金黄色葡萄球菌为阳性对照,8 株乳酸菌的周围均未出现明显溶血圈,无溶血活性,说明可以安全用于今后的生产应用中。

2.5.2 耐药性评价 目前,抗生素滥用问题日益严重,耐药性问题是乳酸菌在应用安全方面的重要问题^[24]。由表 5 结果可知,抗生素对乳酸菌产生的影响各异,8 株乳酸菌对于青霉素、苄卡西林、四环素、红霉素都表现中性敏感或敏感,都对庆大霉素耐药。这和张灼阳等^[25]报道的相似,大部分乳酸菌对于庆大霉素、链霉素和卡那霉素的耐药性是先天固有的,一般不会传递给致病菌。

表 5 乳酸菌的抗生素敏感性和溶血活性

Table 5 Antibiotic susceptibility and hemolytic activity of lactic acid bacteria

菌株	阿莫西林	庆大霉素	环丙沙星	青霉素	苄卡西林	卡那霉素	四环素	链霉素	红霉素	溶血活性
NCU001044	R	R	R	S	I	R	I	R	I	γ
NCU001046	S	R	R	S	R	R	I	R	I	γ
NCU006007	R	R	R	S	S	R	I	R	I	γ
NCU001013	S	R	R	S	S	R	I	R	S	γ
NCU003012	S	R	R	S	S	R	S	R	I	γ
NCU003069	S	R	R	S	S	R	S	R	I	γ
NCU001036	S	R	R	S	S	R	S	R	S	γ
NCUH061008	S	R	I	S	S	I	S	I	S	γ

注:S. 敏感;I. 中度敏感;R. 耐受;γ. 不溶血。

3 结论

从 117 株分离自传统发酵泡菜及婴儿肠道的乳酸菌中筛选到 8 株具有良好生物转化共轭亚油酸异构体能力的乳酸菌,对其黏附能力、耐酸耐胆盐性能、抑菌能力和安全性进行评价。8 株乳酸菌产有益共轭亚油酸异构体的质量浓度均高于 20 μg/mL,CLA 转化率大于 10%,均无溶血活性,对青霉素、苄卡西林、四环素、红霉素表现中性敏感或敏感。植物乳杆菌 NCU001044、NCU001046、NCU006007 具有良好的自凝集、疏水性及黏附性能;NCU001044、NCU006007 在模拟胃肠道消化液中仍保持较高的活性,具备在体内发挥其益生功能的潜力。此外,这 2 株菌对革兰氏阳性菌和阴性菌都表现出较好的抑菌特性。这些结果表明植物乳杆菌 NCU001044、NCU006007 不仅能生物转化有益 CLA 异构体,还具有良好的体外特性,为开展产 CLA 乳酸菌应用,服务于人类健康提供参考。

参 考 文 献

- [1] 杨波. 乳酸菌生物转化共轭亚油酸的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2014.
YANG B. Study of conjugated linoleic acid bioconversion in lactic acid bacteria[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2014.
- [2] 刘佩, 沈生荣, 阮晖, 等. 共轭亚油酸的生理学功能及健康意义[J]. 中国粮油学报, 2009, 24(6): 161-165.
LIU P, SHENG SH, RUAN H, et al. Physiological function and health significance of conjugated linoleic acid [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2009, 24(6): 161-165.
- [3] BENJAMIN S, SPENER F. Conjugated linoleic acids as functional food: an insight into their health benefits[J]. Nutrition & Metabolism, 2009, 6(1): 36-36.
- [4] PARIZA M W, PARK Y, COOK M E. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid[J]. Progr Lipid Res, 2001, 40(4): 283-298.

- [5] OGAWA J, MATSUMURA K, KISHINO S, et al. Conjugated linoleic acid accumulation via 10-hydroxy-12-octadecaenoic acid during microaerobic transformation of linoleic acid by *Lactobacillus acidophilus*[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2001, 67(3):1246-1252.
- [6] COAKLEY M, ROSS R P, NORDGREN M, et al. Conjugated linoleic acid biosynthesis by human-derived *Bifidobacterium* species[J]. J Appl Microbiol, 2003, 94(1): 138-145.
- [7] VOLKOV A, LIAVONCHANKA A, KAMNEVA O, et al. Myosin cross-reactive antigen of *Streptococcus pyogenes* M49 encodes a fatty acid double bond hydratase that plays a role in oleic acid detoxification and bacterial virulence[J]. J Biol Chem, 2010, 285(14): 10353-10361.
- [8] HECHARD Y D, HERBOMEZ M, CENATIEMPO Y, et al. Antagonism of lactic acid bacteria from goats' milk against pathogenic strains assessed by the 'sandwich method'[J]. Letters in Applied Microbiology, 1990, 11(4): 185-188.
- [9] ROSSON R A, GRUND A D, DENG M D, et al. Linoleate isomerase: US 6743609 B1[P]. 2004-06-01.
- [10] PANDIT A, ANAND S, KALSCHUR K, et al. Production of conjugated linoleic acid by lactic acid bacteria in milk without any additional substrate[J]. Int J Dairy Technol, 2012, 65(4): 603-608.
- [11] DILZER A, PARK Y. Implication of conjugated linoleic acid (CLA) in human health[J]. Critical Reviews in Food Science & Nutrition, 2012, 52(6): 488-513.
- [12] Lau D S Y, Archer M C. The 10t,12c isomer of conjugated linoleic acid inhibits fatty acid synthase expression and enzyme activity in human breast, colon, and prostate cancer cells[J]. Nutrition and Cancer, 2009, 62(1): 116-121.
- [13] RIBEIRO S C, STANTON C, YANG B, et al. Conjugated linoleic acid production and probiotic assessment of *Lactobacillus plantarum* isolated from Pico cheese[J]. LWT, 2018, 90: 403-411.
- [14] STEFAN B, MÖSCH H U. Choosing the right lifestyle: adhesion and development in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2012, 36(1): 25-58.
- [15] HAN Q, KONG B, CHEN Q, et al. *In vitro* comparison of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Harbin dry sausages and selected probiotics[J]. Journal of Functional Foods, 2017, 32: 391-400.
- [16] ABUSHELAIBI A, AL-MAHADIN 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.
- [17] HERNÁNDEZ-ALCÁNTARA A M, WACHER C, LLAMAS M G, et al. Probiotic properties and stress response of thermotolerant lactic acid bacteria isolated from cooked meat products[J]. LWT, 2018, 91: 249-257.
- [18] STANISZEWSKI A, KORDOWSKA-WIATER M. Probiotic and potentially probiotic yeasts-characteristics and food application[J]. Foods, 2021, 10(6): 1306.
- [19] 胡爱华, 敖晓琳, 陈岑, 等. 乳酸菌耐酸耐胆盐机制的研究进展[J]. 食品工业科技, 2015, 36(8): 380-383, 389.
- [20] HU A H, AO X L, CHEN C, et al. Research progress on mechanism of lactic acid bacteria acid and bile salt resistance[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(8): 380-383, 389.
- [20] 郑志瑶, 王伟军, 陈波, 等. 降胆固醇乳酸菌的筛选, 鉴定与益生特性评价[J]. 中国食品学报, 2020, 20(12): 239-247.
- [20] ZHENG Z Y, WANG W J, CHENG B, et al. Screening and identification of cholesterol-lowering lactic acid bacteria and evaluation of their probiotic characteristics[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(12): 239-247.
- [21] 刘勇. 植物乳杆菌益生特性及产共轭亚油酸能力研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2010.
- [21] LIU Y. The study on probiotic properties and CLA production ability of *Lactobacillus plantarum*[D]. Huhehot: Inner Mongolia Agricultural University, 2010.
- [22] 刘蔓莉. β 溶血性链球菌所致的心内膜炎[J]. 心血管病学进展, 1993(3): 192.
- [22] LIU M L. Endocarditis induced by β Hemolytic streptococcus[J]. Progress in Cardiology, 1993(3): 192.
- [23] 郑柳青. 鼠李糖乳杆菌 LR-ZB1107-01 的益生特性及其高密度培养的研究[D]. 广州: 华南理工大学,

- 2021.
- ZHENG L Q. Study on properties of *Lactobacillus rhamnosus* LR-ZB1107-01 and its high density culture[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2021.
- [24] SANDERS M E, AKKERMANS L, HALLER D, et al. Safety assessment of probiotics for human use [J]. Gut Microbes, 2010, 1(3): 164-185.
- [25] 张灼阳, 刘畅, 郭晓奎. 乳酸菌耐药性的研究进展[J]. 中国微生态学杂志, 2007, 19(5): 478-480.
- ZHANG Z Y, LIU C, GUO X K. Research progress of drug resistance in lactic acid bacteria[J]. Chinese Journal of Microecology, 2007, 19(5): 478-480.

Screening and Evaluation of *in Vitro* Characterization of Lactic Acid Bacteria Strains with High Conjugated Linoleic Acid Production

Mo Jialing¹, Xiao Muyan^{2*}, Xiong Tao^{1*}

¹State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang 330047

²International Food Innovation Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330047)

Abstract This study aims to isolate lactic acid bacteria with high-yield conjugated linoleic acid from Chinese paocai and baby feces, and then conduct functional and safety evaluations. 27 strains with CLA conversion rate greater than 8% were initially screened by ultraviolet spectrophotometry, identifying and classifying its CLA isomer composition by GC-Q-TOFMS. 8 lactic acid bacteria strains with more than 10% conversion rate of CLA and the mass concentrations of c9, t11-CLA, t10, c12-CLA isomers in the fermentation broth were higher than 20 µg/mL were obtained. The 8 strains were further evaluated characteristics such as self-aggregation, hydrophobicity, adhesion performance, gastrointestinal tolerance, antibacterial activity, and safety. The results showed that *Lactobacillus plantarum* NCU001044 and NCU006007 performed well overall, with self-agglutination rate of more than 60%, moderate hydrophobicity, and the adhesion rates were 8.81% and 9.10%, respectively. Their survival rates were 95.68% and 84.63% at pH 2.5 acidic conditions, and survival rates were higher than 65% in 0.3% bile salts. In terms of safety, the two strains are neutrally sensitive or sensitive to penicillin, benzamicin, tetracycline, and erythromycin and had no hemolytic activity. In this study, two *Lactobacillus plantarum* stains were screened with high biotransformation ability of beneficial CLA isomers and great probiotics potential. They have good ability to colonize the gastrointestinal tract, as well as acid and bile salt tolerance, besides show high inhibitory effect on pathogenic bacteria, which could be further used in the development of fermentation products and functional probiotics.

Keywords lactic acid bacteria; conjugated linoleic acid; *in vitro* properties