

## 高产 AI-2 信号分子乳酸菌的筛选及生物性能研究

吕欣然<sup>1</sup>, 吕孟敏<sup>1</sup>, 杨冰艳<sup>1</sup>, 顾振辰<sup>1</sup>, 刘雪晴<sup>1</sup>, 励建荣<sup>1,2\*</sup>, 白凤翎<sup>1</sup>, 檀茜倩<sup>1</sup>, 李英美<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>渤海大学食品科学与工程学院 生鲜农产品贮藏加工及安全控制技术国家地方联合工程研究中心

辽宁省食品安全重点实验室 辽宁锦州 121013

<sup>2</sup>大连工业大学 海洋食品精深加工关键技术省部共建协同创新中心 辽宁大连 116034

<sup>3</sup>达莲食品(锦州)有限公司 辽宁锦州 121019)

**摘要** 细菌 AI-2 信号分子具有调节乳酸菌生物膜形成及益生性等多种功能。本文从 16 株来源于传统发酵食品和鲤鱼肠道的乳酸菌中,筛选高产 AI-2 信号分子菌株,并对其生物膜形成、抗氧化活性和产香能力进行分析。结果表明:获得 1 株高产 AI-2 菌株 DBM2-4,其相对荧光强度达 9.69,经生理生化 and 16S rRNA 鉴定为植物乳杆菌。与低产 AI-2 菌株 YF-7 相比,菌株 DBM2-4 经 37 °C 培养 24,48,72 h 后,生物膜形成量分别高出 85.48%,135.54%,63.03%,其完整细胞和无细胞提取物 DPPH 自由基清除能力分别提高了 24.49%和 11.37%,风味物质丁二酮和乙醛产量分别增加了 3.42 mg/L 和 5.86 mg/L,说明 AI-2 信号分子调控植物乳杆菌 DBM2-4 生物膜形成、抗氧化活性和产香能力。产 AI-2 信号分子乳酸菌的筛选为改善乳酸菌发酵剂的益生性、抗氧化性和产香能力提供一定的理论基础。

**关键词** 乳酸菌; AI-2; 生物膜; 抗氧化; 产香; 筛选

**文章编号** 1009-7848(2023)07-0152-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.07.016

群体感应(Quorum sensing, QS)是细菌间进行信息交流的一种机制。细菌通过自身合成来释放信号分子-自诱导物(Autoinducer, AI)以感知环境变化,当信号分子浓度达到一定阈值后,与受体蛋白结合激活信号通路,从而调控细菌生物发光,生物膜形成,毒力基因产生等<sup>[1-2]</sup>。革兰氏阴性菌主要分泌 *N*-乙酰基高丝氨酸内酯(*N*-acyl-homoserine lactone, AHLs)类信号分子,而革兰氏阳性菌主要分泌寡肽类(Autoinducing peptides, AIP)信号分子进行种内交流。自诱导因子 2(Autoinducer-2, AI-2)作为一种菌种间交流信号分子,存在于革兰氏阴性和阳性菌中,包括哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)及植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)等<sup>[3-5]</sup>。感应激酶蛋白 LuxQ 由周质结合蛋白 LuxP 调控后识别信号分子 AI-2, AI-2 信号分子的浓度达到一定

的阈值时, LuxQ 发挥磷酸酶的作用,使 LuxO 去磷酸化而失去活性,进而调控相关基因的表达<sup>[6-8]</sup>。

乳酸菌(Lactic acid bacteria, LAB)是一类能将碳水化合物发酵形成乳酸的革兰氏阳性菌的统称,具有改善肠道菌群结构,调节消化系统,延缓机体衰老等功能<sup>[9-10]</sup>。研究发现,多种乳酸菌的基因组序列中都含有 *luxS* 基因的同系物,且能够分泌 AI-2 信号分子,如嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)、长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)NCC2705 和粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)等。AI-2/LuxS 介导的 QS 系统参与调控乳酸菌的抑菌性、耐酸性、黏附性及在动物消化道中的定植与存活率等益生特性。张腾等<sup>[11]</sup>研究发现,植物乳杆菌(*L. plantarum*)HE-1 中含有 *luxS* 基因, AI-2 信号分子和生物膜的形成量均是在 12 h 开始大量产生,18 h 达到高峰期, AI-2 信号分子的产量与生物膜的形成量呈正相关,说明 AI-2 信号分子参与调控其生物膜形成。杨杰<sup>[12]</sup>研究发现外源添加 AI-2 信号分子对植物乳杆菌(*L. plantarum*)KLDS1.0391 的生长虽无明显影响,但能促进细菌素的形成。姜黎明<sup>[13]</sup>研究发现植物乳杆菌(*L. plantarum*)AY01 和 YM4-3 的 AI-2 群体感应系统能够调控其抑菌、耐酸、耐胆盐的益生特性。

**收稿日期:** 2022-07-05

**基金项目:** 辽宁省博士科研启动基金计划项目(2020-BS-236);辽宁省食品安全重点实验室开放课题(LNKLFS202102)

**第一作者:** 吕欣然,女,博士,副教授

**通信作者:** 励建荣 E-mail: lijr6491@163.com

乳酸菌除具有良好的益生特性外,还具备较强的抗氧化能力和产香特性。然而,关于 AI-2/LuxS 群体感应系统是否可以调控乳酸菌的抗氧化活性和产香特性还有待探究。

本文从传统发酵食品、鲤鱼肠道等天然环境中分离产 AI-2 信号分子的乳酸菌,比较高产与低产 AI-2 信号分子的乳酸菌的生物膜形成、抗氧化活性及产香能力的差异,验证 AI-2 信号分子对它们的调控作用,进而找到 AI-2/LuxS 群体感应与上述三者之间的关系,为开发乳酸菌发酵剂奠定理论基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株、试剂和仪器

1.1.1 菌株 乳酸菌菌株:16 株乳酸菌 DBM2-4、YF-7、YF-10、DF-9、XCT1-7、LJM2-2、LJM1-3、LJ2-2、LJ2-1、LJ3-1、LD1-4、LY2-1、LY1-2-2、L-3、ZHG2-1、ZHG1-4,以上菌株分离自丹东酸面汤(DBM、YF、DF)、葫芦岛酸菜汤(XCT、LJM)、辽宁锦州面团(LJM、LJ)、鲤鱼肠道(LD、LY、L)、辽宁彰武酸黄瓜(ZHG),均由本实验室保藏。

抗氧化阳性对照菌株:鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus* GG, LGG) ATCC53103,北纳创联生物技术有限公司。

报告菌株:哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*) BB170,通过哈维氏弧菌 BB120 定向突变获得,菌株 BB170 对 AI-2 非常敏感,可以检测到极少量的 AI-2,并诱导其生物发光,作为检测 AI-2 信号分子的报告菌株<sup>[14]</sup>。

1.1.2 培养基和试剂 MRS 固体培养基、MRS 肉汤,北京奥博星生物技术有限公司;AB 培养基,山东拓普生物工程有限公司;邻苯三酚、邻苯二胺、亚硫酸氢钠,上海麦克林生化科技有限公司;细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒、PCR 扩增引物、DNA marker-D、Taq PCR Master mix,上海生工生物工程有限公司;DPPH, Sigma-Aldrich。

1.1.3 仪器与设备 Imark 酶标仪,美国 BIO-RAD 公司;UV2550 紫外-可见分光光度计,日本岛津有限公司;HT-ECP3000 高压电泳仪、HT8300/8500 全自动凝胶成像分析系统,北京鸿涛基业科技发展有限公司;Bioscreen C 全自动生

长曲线分析仪,上海谓载商贸发展有限公司;KS50R 台式高速冷冻离心机,盐城市凯特实验仪器有限公司;VOSHIN96-IIL 超声细胞破碎机,无锡沃信仪器制造有限公司;SW-CJ-1D 型超净工作台,苏州博莱尔净化设备。

### 1.2 方 法

1.2.1 产 AI-2 信号分子乳酸菌的筛选 培养至 2 代的乳酸菌按 2.0%接种于 MRS 液体培养基中,37℃培养 18 h 后,于 6 000 r/min 离心 10 min,弃去菌泥,用 0.22 μm 的滤菌器过滤,得到乳酸菌的无细胞上清液。按同样方法收集 30℃振荡培养 16 h 的哈维氏弧菌 BB170 无细胞上清液。

将哈维氏弧菌 BB170 按 2.0%接种于 AB 液体培养基,30℃摇床培养至 OD<sub>595nm</sub> 为 0.8 左右,然后用新鲜的 AB 培养基以 1:1 000 稀释哈维氏弧菌 BB170,充分混匀后备用。参照蔡针华等<sup>[15]</sup>研究方法检测其荧光强度值。

1.2.2 产 AI-2 信号分子乳酸菌菌株鉴定 形态学:对 1.2.1 节筛选的高产 AI-2 信号分子的乳酸菌进行革兰氏染色和形态学观察。

生理生化:对 1.2.1 节筛选的高产 AI-2 信号分子的乳酸菌参考凌代文等<sup>[16]</sup>的方法进行生理生化鉴定。

16S rRNA 序列分析:采用 DNA 快速抽提试剂盒提取乳酸菌 DNA,以通用引物 27F (5'-A GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACGGYTACCTTTGTTACGACTT-3') 进行 PCR 扩增。PCR 扩增条件参照崔天琦等<sup>[17]</sup>方法,利用琼脂糖凝胶电泳观察扩增结果,扩增成功的产物在上海生物工程有限公司测序,测序结果与 NCBI 中已知菌株序列进行比对,寻找同源性较高的菌株,并利用 MEGA5.0 构建系统发育进化树。

1.2.3 乳酸菌生长曲线测定 培养至 2 代的乳酸菌按 2.0%接种于灭活的 MRS 液体培养基中,使用全自动生长曲线仪在 OD<sub>595nm</sub> 下每隔 3 h 测定菌密度,确定各菌株的生长情况。

1.2.4 生物膜形成的测定 生物膜定量分析:向 96 孔板中加入 200 μL MRS 液体培养基,将乳酸菌以 2.0%接种于培养基中,置于 37℃分别培养 24,48,72 h。弃去上层培养液后,用 PBS 清洗 2~3 次去除浮游细胞,晾干后,加 100 μL 结晶紫染色

20 min, 去除染液后用 PBS 缓慢冲洗至无明显紫色。晾干后加入 200  $\mu$ L 3.0%的冰醋酸脱色, 将脱色后的菌液吸入到新的 96 孔板中, 用酶标仪在 OD<sub>595nm</sub> 下测定吸光度值。

生物膜形态观察: 向放置有硅片(使生物膜黏附于硅片上)的 24 孔板中加入 1.0 mL MRS 液体培养基, 乳酸菌以 2.0%接种于培养基中, 置于 37  $^{\circ}$ C 分别培养 24, 48, 72 h。硅片取出用无菌水清洗 2~3 次后, 在 4  $^{\circ}$ C 2.5%戊二醛溶液中固定 12 h, 用无菌水洗去剩余的戊二醛后用 40%, 70%, 90%, 100%乙醇分别脱水 15 min, 干燥, 喷金, 扫描电镜(Scanning electron microscope, SEM)观察。

### 1.2.5 产 AI-2 信号分子乳酸菌抗氧化能力测定

乳酸菌连续活化 3 代后获得的菌悬液在 4  $^{\circ}$ C, 6 000 r/min 离心 15 min 后收集菌体, 收集的菌体用 PBS 缓冲液洗涤 2 次后重悬于缓冲液中, 调节菌液终浓度为 10<sup>8</sup> CFU/mL, 一部分作为完整细胞试验, 另一部分菌悬液置于 0  $^{\circ}$ C 下超声破碎(变幅杆:  $\phi$ 6; 超声开 1 s, 超声关 2 s; 功率 33%; 15 min)后, 于 4  $^{\circ}$ C, 6 000 r/min 离心 15 min, 收集上清为乳酸菌无细胞提取物。

取 1.0 mL 样品(完整细胞或无细胞提取物)加入 1.0 mL 0.2 mmol/L DPPH-无水乙醇溶液, 在室温下避光反应 30 min, 3 500 r/min 离心 10 min, 在波长 517 nm 下测定上清吸光度值。清除率按公式(1)计算, 式中,  $A_i$ ——1.0 mL 样品加 1.0 mL DPPH-无水乙醇;  $A_j$ ——1.0 mL 样品加 1 mL PBS;  $A_c$ ——1.0 mL PBS 加 1.0 mL DPPH-无水乙醇; 以 LGG 为阳性对照<sup>[18]</sup>。

$$\text{DPPH 自由基清除率} = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_c}\right) \times 100\% \quad (1)$$

超氧阴离子自由基清除能力的测定: 取 2.0 mL Tris-HCl 缓冲液(150 mmol/L, pH 8.0)加入 0.6 mL 样品, 在 25  $^{\circ}$ C 下水浴预热, 在加入 0.4 mL 25  $^{\circ}$ C 水浴预热后的邻苯三酚, 25  $^{\circ}$ C 水浴 20 min 后在波长 325 nm 下测定吸光度值。清除率按公式(2)计算, 式中,  $A_{11}$ ——含样品和邻苯三酚;  $A_{10}$ ——含样品, 邻苯三酚以蒸馏水代替;  $A_{01}$ ——只含邻苯三酚,  $A_{00}$ ——不含样品不含邻苯三酚。以 LGG 为阳性对照<sup>[19]</sup>。

$$\text{超氧阴离子清除率} = \frac{A_{11} - A_{10}}{A_{01} - A_{00}} \times 100\% \quad (2)$$

1.2.6 产信号分子 AI-2 乳酸菌产香能力测定 发酵乳的制备和预处理: 培养至 3 代的乳酸菌用 PBS 缓冲液洗涤 2 次后的重悬液(10<sup>8</sup> CFU/mL)按 4.0%接于 12%无菌脱脂乳中, 37  $^{\circ}$ C 培养至乳凝固, 4  $^{\circ}$ C 下放置 24 h 进行后熟。制备好的发酵乳按 1:1 加入 16%三氯乙酸溶液混匀, 8 000 r/min 离心 10 min, 取上清液备用。

丁二酮的测定: 参照俞本杰<sup>[20]</sup>的研究方法, 以不加邻苯二胺的试管为参比液调零, 在波长 335 nm 下测定吸光度值。回归方程  $y = 0.0793x + 0.0507$ ,  $R^2 = 0.9952$  ( $n = 5$ ), 计算出样品中丁二酮的含量。

乙醛的测定: 参照李妍等<sup>[21]</sup>的方法, 发酵乳中乙醛含量采用碘滴定法测定。按公式(3)计算, 式中,  $V_1$ ——空白滴定消耗 I<sub>2</sub> 标准溶液体积(mL);  $V_2$ ——样品滴定消耗 I<sub>2</sub> 标准溶液体积(mL);  $C$ ——1/2I<sub>2</sub> 标准溶液浓度 (mmol/L); 25——乙醛样品称样量(mg); 0.022——乙醛化学反应基本单位(g)。

$$\text{乙醛(g/mL)} = \frac{(V_1 - V_2)C \times 0.022}{25} \quad (3)$$

1.2.7 数据处理与统计分析 试验结果均平行测定 3 次, 结果用“平均值 $\pm$ 标准差”表示, 并采用 IBM SPSS 23 软件以及 OriginPro 9.1 软件对数据进行分析处理。

## 2 结果与分析

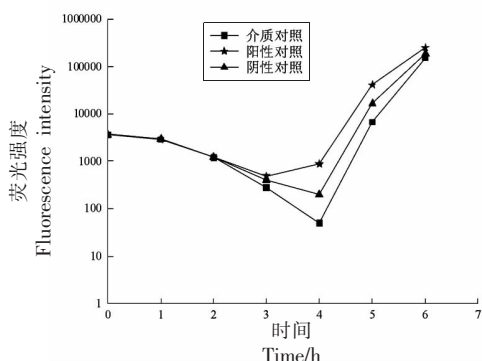
### 2.1 高产 AI-2 信号分子乳酸菌的筛选

如图 1a 所示, 介质对照、阳性对照以及阴性对照的荧光强度值均呈先下降后上升的趋势, 这可能是因为初期哈维氏弧菌 BB170 稀释液中存在一定量的 AI-2 信号分子, 产生一定量的荧光物质, 然而由于菌体密度较低, 荧光会逐渐被猝灭, 导致其荧光值逐渐下降。但经过一段时间的培养, 菌体密度增加到一定程度后, 开始产生 AI-2 信号分子并重新诱导菌株发光, 使其荧光强度快速增加。阴性和介质对照的荧光强度在 4 h 达到最低值, 后又逐渐增强, 而阳性对照在 3 h 达到最低值后逐渐增强, 这可能是由于阴性和介质对照没有

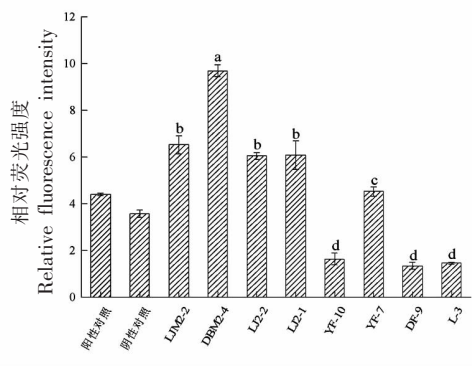
外源添加信号分子 AI-2, 只有稀释液中的哈维氏弧菌 BB170 菌体密度增加到一定值后, 产生的信号分子 AI-2 重新诱导发光。本结果与廉雪花<sup>[22]</sup>的研究结果相似, 其介质对照和阴性对照在 4 h 达到最低点, 阳性对照在 3 h 时达到最低点, 相对荧光强度计算时间点为 4 h。

图 1b 展示了 8 株乳酸菌的相对荧光强度, 由

图可知, 菌株 YF-10、DF-9、L-3 的相对荧光强度均低于阴性对照, 说明其不产生 AI-2 信号分子。其余 5 株乳酸菌的相对荧光强度均高于阴性对照, 具有产 AI-2 信号分子的能力, 其中菌株 DBM2-4 的相对荧光强度值最高 ( $P < 0.05$ ), 因此, 选取高产 AI-2 信号分子菌株 DBM2-4 进行后续特性研究。



(a) 各样品的荧光强度



(b) 乳酸菌的相对荧光强度

注: 不同小写字母表示具有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

图 1 高产 AI-2 信号分子乳酸菌的筛选

Fig.1 Screening of high-yield AI-2 signal molecule LAB

## 2.2 乳酸菌菌株鉴定

由图 2 可知, 菌株 DBM2-4 菌落呈圆形、光滑、乳白色、不透明, 可以产生溶钙圈, 且革兰氏染色呈紫色的杆菌, 同时结合表 1 的生理生化鉴定结果, 该菌株被初步确定为乳酸杆菌。

图 3a 是菌株 DBM2-4 的 16S rRNA 电泳图, 可以看出片段在 1 500 bp 左右, 表明该片段扩增成功。构建的发育树的结果见图 3b, 从图中可以看出菌株 DBM2-4 与 *Lactiplantibacillus plantarum* G2-5-6 最为相似, 相似度达到 99%, 因此可以确定菌株 DBM2-4 为植物乳杆菌 (*Lactiplantibacillus plantarum*)。

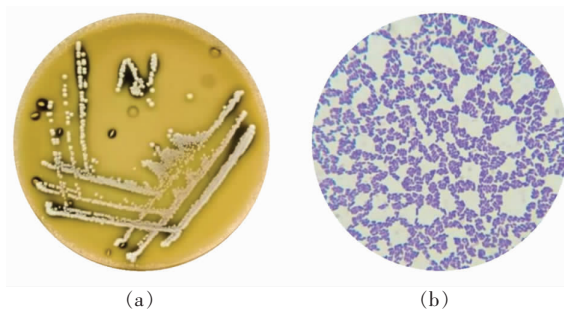


图 2 菌株 DBM2-4 菌落形态 (a) 及革兰氏染色 (b) (1 000×)  
Fig.2 The colony morphology (a) and Gram stain (b) of strain DBM2-4 (1 000×)

表 1 乳酸菌 DBM2-4 的生理生化鉴定结果

Table 1 Physiological and biochemical identification results of strain DBM2-4

项目	结果	项目	结果	项目	结果	项目	结果
纤维二糖	+	葡萄糖	+	蔗糖	+	乳糖	+
阿拉伯糖	+	麦芽糖	+	甘露糖	+	鼠李糖	-
葡萄糖酸盐	-	棉籽糖	+	甘露醇	-	蜜二糖肉汤	+
果糖	+	松三糖肉汤	-	山梨醇	-	半乳糖	-
木糖	+	七叶灵	+				

注: “+”表示阳性; “-”表示阴性。

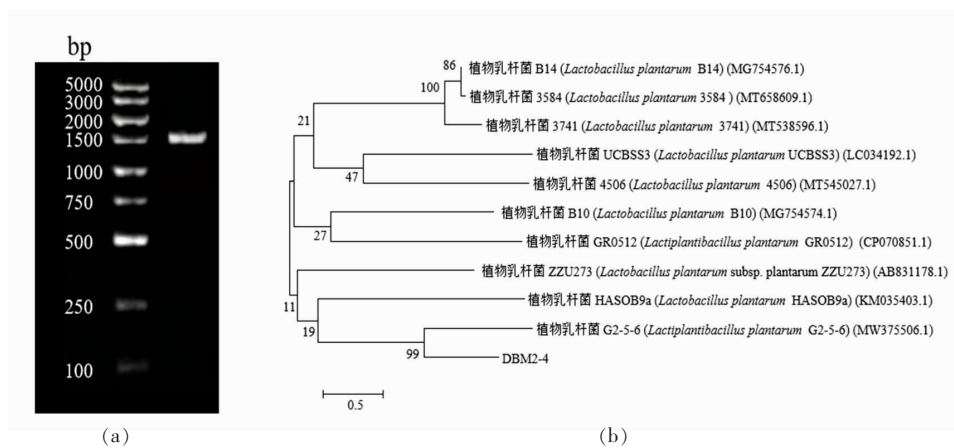


图 3 菌株 DBM2-4 16S rRNA 基因扩增电泳图(a)和系统发育树(b)

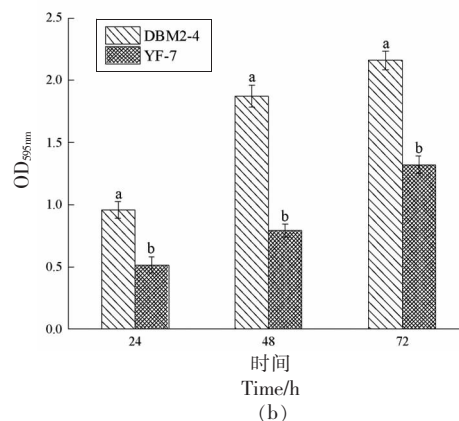
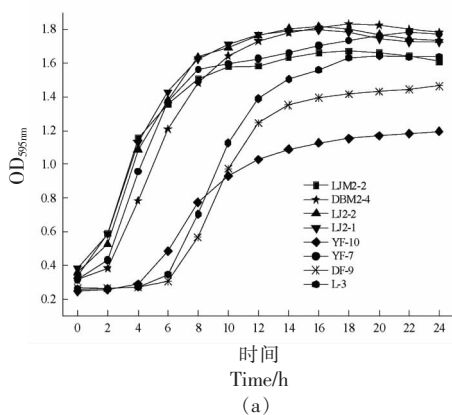
Fig.3 The 16S rRNA gene amplification electrophoresis diagram (a) and phylogenetic tree (b) of strain DBM2-4

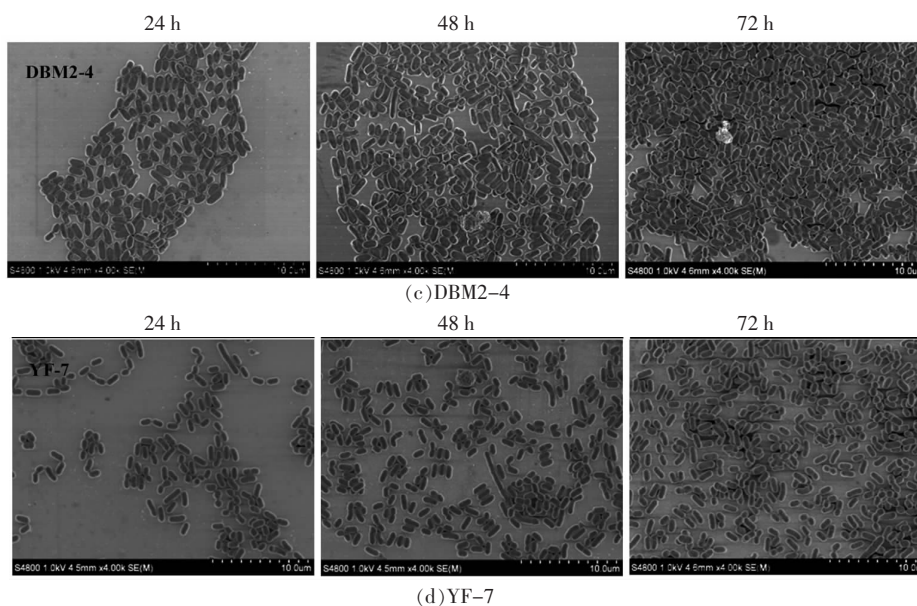
### 2.3 乳酸菌生长曲线及生物膜的测定

8 株乳酸菌的生长曲线如图 4a 所示, 菌株 LJM2-2、DBM2-4、LJ2-2、LJ2-1、YF-7 的生长曲线变化趋势一致, 在 3 h 时进入对数生长期, 在 9 h 左右进入对数末期后进入稳定期。同时, 结合 5 株乳酸菌的相对荧光强度值, 选取菌株 YF-7 作为低产 AI-2 乳酸菌, 比较其与高产 AI-2 菌株 DBM2-4 在生物膜形成、抗氧化活性和产香能力的差异。

在自然环境中, 细菌生物膜不仅能抵抗外界环境的胁迫, 而且能够增强机体免疫防御的功能<sup>[23]</sup>。研究发现, AI-2/LuxS 能够调控乳酸菌生物膜的形成, 提高其环境适应能力<sup>[24]</sup>。图 4b 显示了产 AI-2 能力不同的乳酸菌、在不同时间产生生物膜的能力, 由图可知, 高产和低产 AI-2 乳酸菌的生物膜形成量均随培养时间的延长而逐渐增加。其

中, 高产 AI-2 菌株 DBM2-4 在 24, 48, 72 h 3 个时间段的生物膜形成量比菌株 YF-7 分别高出 85.48%, 135.54%, 63.03%, 且在 48 h 时生物膜形成能力差异最显著 ( $P < 0.05$ )。图 4c 和图 4d 分别是菌株 DBM2-4 和 YF-7 生物膜在 24, 48, 72 h 3 个时间段的扫描电镜图, 由图可知, 随着时间的延长菌株 DBM2-4 形成的生物膜变得更加致密, 厚度也逐渐增加。与 DBM2-4 相比 YF-7 形成的生物膜比较分散, 这会导致细菌形成的生物膜不牢固。这与吴荣<sup>[25]</sup>研究的结果相似, 外源添加 60  $\mu\text{mol/L}$  AI-2 信号分子菌体与未添加 AI-2 信号分子相比表面更加平整, 菌膜更加光滑, 分布更加密集, 并且对生物膜的形成也有一定的促进作用。因此, 说明群体感应 AI-2 信号分子正向调控乳酸菌生物膜的形成。





注:不同小写字母表示具有显著性差异( $P<0.05$ )。

图 4 乳酸菌的生长曲线(a)、生物膜形成量(b)和形态结果(c:DBM2-4;d:YF-7)

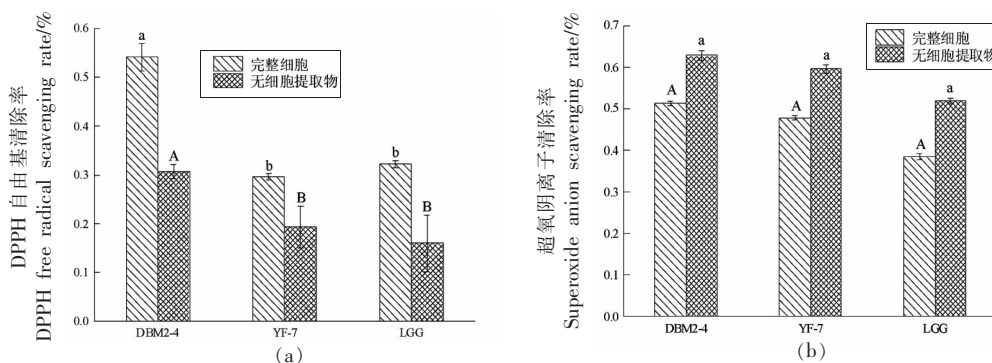
Fig.4 Growth curve (a), biofilm formation (b) and morphological results (c:DBM2-4; d:YF-7) of LAB

### 2.4 乳酸菌抗氧化能力

DPPH 是一个稳定的自由基,常被用来评价菌株的抗氧化能力。图 5a 是以 DPPH 为指标比较产 AI-2 能力不同乳酸菌的抗氧化能力,结果表明,3 株乳酸菌的 DPPH 自由基清除率均是完整细胞的高于无细胞提取物的,这可能是因为乳酸菌的胞外活性物质如表面蛋白、胞外多糖等具有清除 DPPH 自由基作用的结果<sup>[26]</sup>。与低产 AI-2 的菌株 YF-7 相比,高产菌株 DBM2-4 完整细胞和无细胞提取物的 DPPH 自由基清除能力提高了 24.49%和 11.37%,且 DBM2-4 的 DPPH 自由基的清除率高于 LGG 阳性对照,而 YF-7 略低于 LGG

阳性对照。说明 AI-2 信号分子可以调节乳酸菌表面蛋白、胞外多糖等活性物质,进而起到清除 DPPH 自由基的作用。

此外,许多自由基是以超氧阴离子( $O_2^-$ )为前体物质通过一系列的氧化反应得到的,超氧阴离子能够损害细胞进而引发一系列的氧化反应<sup>[27]</sup>。图 5b 以超氧阴离子为指标比较产 AI-2 不同的乳酸菌的抗氧化能力,结果表明,3 株乳酸菌的超氧阴离子清除率均是无细胞提取物的高于完整细胞的,这是因为大部分的抗氧化酶如超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)存在于细胞内<sup>[28]</sup>。而菌株 DBM2-4 与 YF-7 的超氧阴离子的



注:不同小写及大写字母分别表示组间具有显著性差异( $P<0.05$ )。

图 5 乳酸菌清除 DPPH 自由基(a)和超氧阴离子能力(b)

Fig.5 The scavenging ability of DPPH free radicals (a) and superoxide anions (b) by LAB

清除率没有显著性差异。说明 AI-2 信号分子对乳酸菌胞内的 SOD、GSH-Px 等抗氧化酶没有显著的调节作用,使得超氧阴离子的清除率差异不显著。

乳酸菌的 DPPH 自由基清除作用主要依靠其胞外的多糖和蛋白等物质,而清除超氧阴离子的能力取决于胞内 SOD、GSH-Px 等抗氧化酶,研究结果表明, AI-2 信号分子可以调节乳酸菌胞外表面蛋白、多糖等活性物质,对乳酸菌胞内的 SOD、GSH-Px 等抗氧化酶没有显著的调节作用,该研究结果与 AI-2/LuxS 群体感应系统调控乳酸菌胞外代谢产物相一致<sup>[11-12]</sup>。

### 2.5 丁二酮及乙醛含量测定

优良的乳酸菌发酵剂需要具有抗氧化特性还应具有较好的产香特性,丁二酮和乙醛作为特征性风味物质,能够改善发酵乳的风味及提升产品品质<sup>[29-30]</sup>。从表 2 可得出菌株 DBM2-4 的丁二酮和乙醛的产量均高于菌株 YF-7,产量分别高出 3.88 mg/L 和 5.86 mg/L。因此,说明 AI-2 信号分子能够增加乳酸菌产生丁二酮和乙醛特征性风味物质的能力。本结果与李妍等<sup>[21]</sup>研究的乳酸菌菌株的丁二酮和乙醛含量测定结果相似,其中丁二酮含量在 7.19~39.21 mg/L,乙醛含量在 9.65~20.03 mg/L。

表 2 乳酸菌中丁二酮和乙醛含量

Table 2 The content of diacetyl and acetaldehyde in lactic acid bacteria

菌株	DBM2-4	YF-7
丁二酮/mg·L <sup>-1</sup>	14.89 ± 0.12 <sup>a</sup>	11.01 ± 0.15 <sup>b</sup>
乙醛/mg·L <sup>-1</sup>	20.53 ± 0.01 <sup>a</sup>	14.67 ± 0.01 <sup>b</sup>

注:不同肩标小写字母表示具有显著性差异( $P < 0.05$ )。

### 3 结论

本文从丹东酸汤面中获得 1 株高产 AI-2 信号分子的植物乳杆菌 DBM2-4。与低产 AI-2 菌株 YF-7 相比,植物乳杆菌 DBM2-4 培养 48 h 后,生物膜形成量增加了 135.54%;其完整细胞和无细胞提取物 DPPH 自由基清除能力分别提高了 24.49% 和 11.37%,香味物质丁二酮和乙醛产量分别增加了 3.42 mg/L 和 5.86 mg/L。上述结果表明 AI-2/LuxS 群体感应系统介导乳酸菌生物膜形成、抗氧化活性及产香能力。本研究为开发具有高生

物活性产 AI-2 信号分子的乳酸菌发酵剂提供一定的理论基础。

### 参 考 文 献

- [1] WU S B, LIU J H, LIU C J, et al. Quorum sensing for population-level control of bacteria and potential therapeutic applications[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2020, 77(7): 1319-1343.
- [2] ZHU P, LI M Y. Recent progresses on AI-2 bacterial quorum sensing inhibitors[J]. Current Medicinal Chemistry, 2012, 19(2): 174-186.
- [3] WATERS C M, BASSLER B L. Quorum sensing: Cell-to-cell communication in bacteria[J]. Annual Review of Cell Developmental Biology, 2005, 21: 319-346.
- [4] 刘琳, 谭小娟, 贾爱群. 细菌群体感应与细菌生物被膜形成之间的关系[J]. 微生物学报, 2012, 52(3): 271-278.  
LIU L, TAN X J, JIA A Q. The relationship between bacterial quorum sensing and bacterial biofilm formation[J]. Acta Microbiology, 2012, 52(3): 271-278.
- [5] 马荣华. 金黄色葡萄球菌 AI-2/SaaR 调控生物被膜形成的分子机制[D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2016.  
MA R H. Molecular mechanism of biofilm formation modulated by AI-2/SaaR *Staphylococcus aureus* [D]. Hefei: University of Science and Technology of China, 2016.
- [6] 白灏, 韩先干, 刘蕾, 等. 影响禽致病性大肠杆菌信号分子 AI-2 产生的因素分析[J]. 中国农业科学, 2013, 46(15): 3220-3226.  
BAI H, HAN X G, LIU L, et al. Analysis of factors affecting the activity of AI-2 of avian pathogenic *Escherichia coli* [J]. China Agricultural Sciences, 2013, 46(15): 3220-3226.
- [7] FEDERLE M J, BASSLER B L. Interspecies communication in bacteria[J]. The Journal of Clinical Investigation, 2003, 112(9): 1291-1299.
- [8] PEREIRA C S, THOMPSON J A, XAVIER K B. AI-2-mediated signalling in bacteria[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2013, 37(2): 156-181.
- [9] MOSLEHI J S, VOGENSEN F K, Jespersen L. The quorum sensing *luxS* gene is induced in *Lactobacil-*

- lus acidophilus* NCFM in response to *Listeria monocytogenes*. [J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 149(3): 269-273.
- [10] 姜黎明, 康子腾, 柳陈坚, 等. AI-2/LuxS 群体感应系统介导乳酸杆菌益生特性研究进展[J]. 生命科学, 2014, 26(4): 414-418.  
JIANG L M, KANG Z T, LIU C J, et al. The research advances of AI-2/LuxS quorum sensing system mediating *Lactobacillus probiotic* properties [J]. Life Sciences, 2014, 26(4): 414-418.
- [11] 张腾, 田建军, 李梓媛, 等. 植物乳杆菌 HE-1 由 AI-2/LuxS 介导的群体感应与生物膜形成关系的研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(5): 130-132, 136.  
ZHANG T, TIAN J J, LI Z Y, et al. Research of the relationship between AI-2/LuxS quorum sensing system and biofilm formation in *Lactobacillus plantarum* HE-1[J]. Food Industry Technology, 2014, 35(5): 130-132, 136.
- [12] 杨杰. AI-2 的体外合成及其对植物乳杆菌细菌素合成的影响[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2015.  
YANG J. Synthesis of AI-2 *in vitro* and effect of AI-2 on bacteriocin synthesis of *Lactobacillus plantarum*[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2015.
- [13] 姜黎明. AI-2/LuxS 群体感应系统介导植物乳杆菌益生特性的初步研究[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2014.  
JIANG L M. The preliminary research of AI-2/LuxS quorum sensing system mediating *Lactobacillus plantarum* properties [D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology, 2014.
- [14] 李博, 顾悦, 燕彩玲, 等. 高产信号分子 AI-2 乳酸菌的筛选及鉴定[J]. 食品工业科技, 2016, 37(2): 185-188.  
LI B, GU Y, YAN C L, et al. Screening and identification of AI-2 high-producing lactic acid bacteria[J]. Food Industry Technology, 2016, 37(2): 185-188.
- [15] 蔡针华, 程娜, 贾震虎, 等. 群体感应信号分子 AI-2 高产乳酸菌株筛选及特性研究[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(1): 66-71.  
CAI Z H, CHENG N, JIA Z H, et al. Screening and characterization research of quorum sensing signaling molecule AI-2 high-yield *Lactobacillus* strains [J]. Food and Fermentation Industry, 2018, 44(1): 66-71.
- [16] 凌代文, 东秀珠. 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: 130-133.  
LING D W, DONG X Z. Classification and identification of lactic acid bacteria and experimental methods[M]. Beijing: China Light Industry Press, 1999: 130-133.
- [17] 崔天琦, 吕欣然, 孙梦桐, 等. 降解嗜水气单胞菌群体感应 AHLs 信号分子的乳酸菌筛选及淬灭作用[J]. 中国食品学报, 2020, 20(9): 19-29.  
CUI T Q, LÜ X R, SUN M T, et al. Screening and quorum quenching of lactic acid bacteria with degrading aeromonas hydrophila quorum sensing AHLs activity[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(9): 19-29.
- [18] 刘珊春. 传统发酵酸乳中抗氧化乳酸菌的筛选与功能评价[D]. 重庆: 西南大学, 2017.  
LIU S C. Screening and functional evaluating of anti-oxidative lactic acid bacteria in traditional fermented milk [D]. Chongqing: Southwest University, 2017.
- [19] 高原. 海洋乳酸菌抗氧化活性研究[D]. 大连: 大连工业大学, 2016.  
GAO Y. Antioxidant activity of marine lactic acid bacteria [D]. Dalian: Dalian Polytechnic University, 2016.
- [20] 俞本杰. 发酵乳中增香乳酸菌的筛选及其产香机制研究[D]. 上海: 上海应用技术大学, 2020.  
YU B J. Screening of high flavor-producing lactic acid bacteria and their mechanism for flavor production [D]. Shanghai: Shanghai University of Applied Sciences, 2020.
- [21] 李妍, 邢慧敏, 邵亚东, 等. 发酵乳中丁二酮和乙醛含量检测方法探讨[J]. 食品与发酵工业, 2008(3): 157-159.  
LI Y, XING H M, SHAO Y D, et al. An alternative method for determination of diacetyl and acetaldehyde in fermented milk[J]. Food and Fermentation Industry, 2008(3): 157-159.
- [22] 廉雪花. 酸马奶酒中乳酸菌产 AI-2 信号分子的研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2014.  
LIAN X H. Study of AI-2 signal molecule in lactic acid bacteria from Koumiss [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2014.
- [23] BRINK H G, NICOL W. The influence of shear on the metabolite yield of *Lactobacillus rhamnosus* biofilms[J]. New Biotechnology, 2014, 31(5): 460-467.



- [24] NOVAK E A, SHAO H J, DAEP C A, et al. Autoinducer-2 and QseC control biofilm formation and *in vivo* virulence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*[J]. *Infection and Immunity*, 2010, 78(7): 2919-2926.
- [25] 吴荣. 信号分子 AI-2 对乳酸菌生物膜形成的影响[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2018.  
WU R. Effect of signal molecule AI-2 on biofilm formation of lactic acid bacteria[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2018.
- [26] MARIADHAS V A, DA H K, PYOUNG I K et al. *In vitro* antifungal, probiotic and antioxidant properties of novel *Lactobacillus plantarum* K46 isolated from fermented sesame leaf[J]. *Annals of Microbiology*, 2014, 64(3): 1333-1346.
- [27] 何书美. 酸奶中乳酸菌清除超氧阴离子能力的研究[J]. *食品科技*, 2011, 36(4): 15-17, 21.  
HE S M. The ability of lactic acid bacteria scavenging superoxide anion in yogurt[J]. *Food Technology*, 2011, 36(4): 15-17, 21.
- [28] 孙爱, 朱惠莲. 超氧化物歧化酶抗氧化损伤与动脉粥样硬化关系研究进展[J]. *国际内科学杂志*, 2008(5): 303-306, 309.  
SUN A, ZHU H L. Review on anti-oxidative damage of superoxide dismutase and its anti-atherosclerosis[J]. *International Journal of Internal Medicine*, 2008(5): 303-306, 309.
- [29] PASSERINI D, LAROUTE V, CODDEVILLE M, et al. New insights into *Lactococcus lactis* diacetyl- and acetoin-producing strains isolated from diverse origins[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 160(3): 329-336.
- [30] 梁明明, 曹菲薇, 杨欢东, 等. 传统藏式牦牛酸奶中优良乳酸菌筛选与产香性能分析[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(16): 108-113.  
LIANG M M, CAO F W, YANG H D, et al. Separation of excellent lactic acid bacteria from traditional Tibetan yogurt and its fermentation performance analysis[J]. *Food Industry Technology*, 2020, 41(16): 108-113.

### Studies on Screening of Lactic Acid Bacteria with High Production of AI-2 and Its Biological Properties

Lü Xinran<sup>1</sup>, Lü Mengmin<sup>1</sup>, Yang Bingyan<sup>1</sup>, Gu Zhenchen<sup>1</sup>, Liu Xueqing<sup>1</sup>, Li Jianrong<sup>1,2\*</sup>,  
Bai Fengling<sup>1</sup>, Tan Xiqian<sup>1</sup>, Li Yingmei<sup>3</sup>

<sup>1</sup>College of Food Science and Technology, Bohai University, National & Local Joint Engineering Research Center of Storage, Processing and Safety Control Technology for Fresh Agricultural and Aquatic Products, Food Safety Key Lab of Liaoning Province, Jinzhou 121013, Liaoning

<sup>2</sup>Collaborative Innovation Center of Seafood Deep Processing, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning

<sup>3</sup>Dalian Food Jinzhou Co., Ltd., Jinzhou 121019, Liaoning)

**Abstract** AI-2 signal molecule could regulate the biofilm formation and probiotic property of lactic acid bacteria (LAB). In this study, the strain with high production AI-2 were screened from 16 strain lactic acid bacteria derived from traditional fermented food and carp intestines. The ability of biofilm formation, antioxidant and aroma-producing of high production AI-2 LAB were analyzed. The results showed that the relative fluorescence intensity of the high production AI-2 strain DBM2-4 was 9.69. The strain DBM2-4 was identified as *Lactiplantibacillus plantarum* by physiological and biochemical and 16S rRNA sequencing analysis. Compared with the low production AI-2 strain YF-7, strain DBM2-4 was cultured at 37 °C for 24, 48 h, and 72 h, the production of biofilm formation increased by 85.48%, 135.54%, 63.03%, respectively. Meanwhile, the free radical scavenging capacity of DPPH for complete cell and cell-free extracts of strain CY1-2 increased by 24.49% and 11.37%. The production of diacetyl and acetaldehyde increased by 3.42 mg/L and 5.86 mg/L, respectively. These results indicated that AI-2 signal molecule regulated the biofilm formation, antioxidant activity and aroma-producing activity of *Lactiplantibacillus plantarum* DBM2-4, The screening of LAB with high production of AI-2 would provide a theoretical basis for improving the probiotic, antioxidant and aroma-producing activity of LAB starters.

**Keywords** lactic acid bacteria; AI-2; biofilm; antioxidation; aroma-producing; screening