

## 虾酱源芽孢杆菌的筛选及其益生特性

檀茜倩, 王丹, 程笑笑, 李学鹏, 励建荣\*

(渤海大学食品科学与工程学院/海洋研究院 辽宁锦州 121013)

**摘要** 从市售农家制作传统虾酱中筛选分离 5 株芽孢杆菌,经鉴定后命名为解淀粉芽孢杆菌 Y11、贝莱斯芽孢杆菌 Y12、枯草芽孢杆菌 Y13、沙福芽孢杆菌 Y32 和蜡样芽孢杆菌 BI6Y。5 株菌都可在 10% 的盐质量分数下正常生长,具有不同产蛋白酶和脂肪酶的能力以及抑菌特性。其中,蜡样芽孢杆菌 BI6Y 具有  $\beta$  溶血性,对氯霉素、万古霉素、诺氟沙星不敏感,不适合作为益生菌。其它 4 株芽孢杆菌具有  $\gamma$  溶血性,对氯霉素不敏感,自聚集率在 25%~35% 之间,可耐受酸和胆盐;分泌表面活性素 surfactin;人工胃肠液处理后的存活率多数集中在 50%~70% 之间,枯草芽孢杆菌 Y13 在人工胃液 (pH 2.0) 的存活率最高为 95.3%,沙福芽孢杆菌 Y32 在人工肠液中的存活率最高为 85.1%;其菌体、无细胞提取液、细胞内容物分别具有不同的抗氧化活性,其中无细胞提取液可同时清除 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH) 和羟自由基,清除率在 40%~60% 之间。研究表明:除蜡样芽孢杆菌 BI6Y 外,解淀粉芽孢杆菌 Y11、贝莱斯芽孢杆菌 Y12、枯草芽孢杆菌 Y13、沙福芽孢杆菌 Y32 具有作为益生菌的潜力。研究结果为基于芽孢杆菌的益生菌产品开发提供了一定理论依据。

**关键词** 芽孢杆菌; 益生菌; 益生特性; 抗氧化; 虾酱

**文章编号** 1009-7848(2023)12-0051-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.12.006

益生菌是指达到一定数量时对宿主有益的一类微生物<sup>[1]</sup>。芽孢杆菌(*Bacillus*)是一类圆杆状,可形成芽孢的革兰氏阳性菌,一般对哺乳动物无害,可作为人和动物使用的益生菌<sup>[2]</sup>。芽孢杆菌本身分泌的胞外代谢物种类丰富,并且芽孢的生成使其耐受周围环境压力能力增强,能保证芽孢杆菌顺利经过含有低 pH 值消化液的胃肠道到达小肠而发挥益生作用<sup>[3-4]</sup>。芽孢杆菌常被添加在饲料中用来改善动物健康。鱼类养殖中,芽孢杆菌产生的抗菌物质能够净化水体,降低水中病原菌数目,鱼类食用添加芽孢杆菌的饲料后自身消化酶、抗氧化酶活性增强,免疫和压力相关基因表达得到促进,对病原菌的免疫能力增强<sup>[5]</sup>。芽孢杆菌作为饲料补充剂添加到禽类饲料中,母鸡食用后产蛋效率以及鸡蛋品质也得到显著改善<sup>[6]</sup>。芽孢杆菌还可以用作益生功能性食品的开发<sup>[7]</sup>,食用含有芽孢杆菌的功能性食品可以改善人体健康状态,除了可以杀灭病原微生物、调节肠道菌群外,还具有降低胆固

醇<sup>[8]</sup>,防止高脂肪饮食所产生的代谢性疾病<sup>[9]</sup>等作用。因芽孢杆菌对很多杀菌单元操作具有耐受性,能在加工中极大程度地保持菌株的活性和益生功效,故在应用上具有一定优势。

发酵食品一直是益生菌的主要来源,针对不同发酵食品中分离的芽孢杆菌的益生特性目前已有许多研究,如在泡菜中发现具有抑菌和清除胆固醇作用的地衣芽孢杆菌 PUFSTP35 (*Bacillus licheniformis* PUFSTP35)<sup>[10]</sup>,从米酒中分离出具有潜在益生特性的贝莱斯芽孢杆菌 DU14 (*Bacillus velezensis* DU14)<sup>[11]</sup>,在黄豆酱中发现具有抗氧化性和具有良好发酵性能的枯草芽孢杆菌 P229 (*Bacillus subtilis* P229)<sup>[12]</sup>。虾酱是沿海地区比较常见并广受欢迎的一种发酵食品<sup>[13]</sup>,研究发现虾酱中分离的芽孢杆菌可作为发酵剂改善虾酱品质<sup>[14-16]</sup>,然而,目前对虾酱源芽孢杆菌的益生特性研究较少。本研究筛选农家制作的传统虾酱中的芽孢杆菌,并测定其产酶特性、抑菌特性、产抗菌肽能力。结合抗生素的敏感性、溶血特性、自聚集能力、耐受不同环境和模拟胃肠液的能力和抗氧化能力等指标,对所分离芽孢杆菌的益生特性进行分析评价,为基于芽孢杆菌的益生菌产品开发及提高发酵虾酱品质提供理论参考。

收稿日期: 2022-12-02

基金项目: 辽宁省教育厅项目(LQ2020007);辽宁省食品安全重点实验室开放课题(LNKLFS202118)

第一作者: 檀茜倩,女,博士,讲师

通信作者: 励建荣 E-mail: lij6491@163.com

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

虾酱,辽宁省锦州市不同农贸市场(发酵时间3~6个月)。LB培养基、牛肉膏提取物、蛋白胨酵母提取物、琼脂,北京奥博星生物技术有限责任公司;哥伦比亚血琼脂、羊血,青岛海博生物有限公司;革兰氏染色盒、50×TAE缓冲液、聚乙烯醇,北京索莱宝生物科技有限公司;细菌通用引物、Ezup柱式细菌基因组DNA抽提试剂盒、DNA Maker、琼脂糖、Taq PCR Master Mix,上海生工生物工程股份有限公司;氯霉素、万古霉素、克拉霉素、四环素、环丙沙星、诺氟沙星,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;其它试剂,分析纯,天津光复有限公司。大肠杆菌、金黄色葡萄球菌为本实验室保存;不动杆菌、蜂房哈夫尼菌为本实验室从腐败水产中分离,保存,腐生葡萄球菌、马胃葡萄球菌为本实验从同批虾酱样品中分离,保存。

培养基的配制:改良脱脂乳培养基(牛肉膏提取物5.0g、蛋白胨5.0g、酵母提取物2.5g、聚乙烯醇1.0g、琼脂15.0g、脱脂乳10.0g,无菌水1.0L,121℃,灭菌15min);产脂甘油三丁酸酯/橄榄油培养基(牛肉膏提取物5.0g、蛋白胨5.0g、酵母提取物2.5g、聚乙烯醇1.0g、琼脂15.0g、甘油三丁酸酯/橄榄油10.0mL,无菌水1.0L,121℃,灭菌15min)。

### 1.2 设备与仪器

BagMixer400均质器,法国Interscience公司;LRH-250A型生化培养箱,上海一恒科技有限公司;立式压力蒸汽灭菌锅,上海申安医疗器械厂;SW-CJ-2FD超净工作台,苏净集团苏州安泰空气技术有限公司;Thermo Sorvall Legend Micro21R台式微量离心机,美国赛默飞世尔科技公司;MS105DU电子分析天平,瑞士梅特勒-托利多公司;PHS-25CW pH计,上海般特仪器有限公司;PCR仪,德国Eppendorf公司;DYY-8C型电泳仪,北京六一生物技术有限公司;GelDoc XR+全自动凝胶成像系统,美国Bio-Rad公司。

### 1.3 试验方法

1.3.1 芽孢杆菌的筛选和分离 在无菌状态下称取10g样品于含90mL无菌水的无菌袋内,均质

机均质120s后,将样品逐级稀释,各取100μL分别涂布于含不同质量分数NaCl(0%,8%,10%,12%)的LB平板,30℃倒置培养48h。从LB平板上挑取单菌落到LB液体培养基中,在相同条件下过夜培养,根据菌株形态和革兰氏染色对菌株做进一步筛选和分离,将纯化的菌株于-80℃冻存,备用。

1.3.2 菌株的鉴定 用引物27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和1492R(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')作为上、下游引物对细菌的16sDNA基因进行测序并根据测序结果鉴定细菌类型<sup>[17]</sup>。采用细菌DNA提取试剂盒提取分离菌株DNA作为模板,构建50μL扩增体系(1μL DNA模板、25μL预混液、上、下游引物各2μL、20μL dd H<sub>2</sub>O),扩增条件为:95℃、30s;58℃、30s,72℃、90s,35次循环;72℃、5min。采用DNA琼脂糖凝胶电泳对扩增后的PCR产物进行验证,对纯化后PCR样品测序(上海生工),通过NCBI数据库的BLASTn工具进行对比分析,并通过MEGA 7.0软件构建系统发育树。

1.3.3 产酶情况分析 为了研究菌株产胞外蛋白酶和脂肪酶的能力,参考Zhang等<sup>[18]</sup>方法并稍作修改,将1mL对数培养期各菌株菌液于4℃、10000r/min离心10min,获得的无细胞提取液,用0.45μm无菌滤膜过滤。分别吸取150μL加入牛津杯打孔的改良脱脂乳平板和甘油三丁酸酯/橄榄油培养基,用无菌水作阴性对照,置37℃培养箱中培养24h。通过观察水解圈产生,判断菌株是否具有产胞外蛋白酶和脂肪酶能力。

1.3.4 抑菌能力测定 以大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、不动杆菌、腐生葡萄球菌、马胃葡萄球菌、蜂房哈夫尼菌、蜡样芽孢杆菌BI6Y为指示菌,参考Rasiya等<sup>[19]</sup>的方法,利用牛津杯双平板法验证所分离菌株无细胞提取液的抑菌能力。通过扫描电子显微镜(Scanning electron microscopy, SEM)观察具有抑菌能力菌株的无细胞提取液处理后指示菌表面形貌的变化<sup>[20]</sup>。

1.3.5 抗菌肽编码基因检测 根据已报告抗菌肽编码基因设计8对引物<sup>[21]</sup>(见表1),采用PCR方法检测所分离的芽孢杆菌产抗菌肽的能力。

表 1 抗菌肽编码基因检测相关 PCR 引物

Table 1 PCR primers used in the detection of antimicrobial peptide encoding gene

引物名称	引物序列(5'-3')	目的基因	扩增片段长度/bp
CER1F	ATCATAAAGGTGCGAACAAGA	呕吐毒素合成酶 A 基因	188
EMT1R	AAGATCAACCGAATGCAACTG		
EM1F	GACAAGAGAAATTTCTACGAGCAAGTACAAT	呕吐毒素合成酶 B 基因	635
EM1R	GCAGCCTTCCAATTACTCCTTCTGCCACAGT		
BACCF1F	GAAGGACACGGCAGAGAGTC	杆菌霉素 D 基因	875
BACC1R	CGCTGATGACTGTTTCATGCT		
FEND1F	TTTGGCAGCAGGAGAAGTTT	丰原素基因	964
FEND1R	GCTGTCCGTTCTGCTTTTTTC		
ituDF	ATGAACAATCTTGCCTTTTTA	伊枯草素 A 基因	1 203
ituDR	TTATTTTTAAAATCCGCAATT		
sfpF	ATGAAGATTTACGGAATTTA	表面活性素合成酶基因	675
sfpR	TTATAAAAGCTCTTCGTACG		
subF	CAAAGTTCGATGATTTTCGATTTGGATGT	枯草杆菌蛋白酶基因	566
subtilinR	GCAGTTACAAGTTAGTGTGTTGAAGGAA		
subsinF	CGCGCAAGTAGTCGATTTCTAACA	枯草杆菌蛋白酶基因	734
subsinR	CGCGCAAGTAGTCGATTTCTAACA		

1.3.6 抗生素敏感性测定 采用纸片琼脂扩散法测定所分离菌株对抗生素的敏感性。采用抗生素(氯霉素、万古霉素、克拉霉素、四环素、环丙沙星、诺氟沙星)质量浓度为 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。根据其产透明圈直径的大小将其分成对抗生素不敏感、中度敏感和敏感 3 类。

1.3.7 溶血特性测定 将所分离的菌株在羊血琼脂上划线,菌落周围形成绿色圈的为具有  $\alpha$  溶血性,形成透明圈的为具有  $\beta$  溶血性,不形成透明圈的为具有  $\gamma$  溶血性<sup>[22]</sup>。

1.3.8 自聚集能力测定 为了测定所分离的菌株的自聚集能力,参考 Gupta 等<sup>[23]</sup>的方法并稍作修改,将所分离的菌株在 LB 液体培养基中培养 16~18 h,离心收集的菌体用 PBS 缓冲液洗涤后重新悬浮并调整 OD<sub>600nm</sub> 至 0.5,在 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 8 h,测定 600 nm 处吸光度值。自聚集率按公式(1)计算:

$$\text{自聚集率}(\%) = \frac{(\text{OD}_{\text{初始}} - \text{OD}_{8\text{h}})}{\text{OD}_{\text{初始}}} \times 100 \quad (1)$$

1.3.9 对酸和胆盐的耐受性测定 为了测试菌株对酸和胆盐的耐受性,将过夜培养后的菌株按 5% 接种量分别接种至含不同 pH 值 (3.0, 4.0, 5.0) 和不同质量分数胆盐 (0%, 0.2%, 0.3%, 0.4%) LB 液体培养基的 96 孔板中,在 37  $^{\circ}\text{C}$  下培养 24 h,用全

自动生长曲线分析仪在波长 600 nm 处测定不同条件下菌株的生长情况<sup>[24]</sup>。

1.3.10 对模拟胃肠液的耐受能力测定 为了测定所分离菌株对模拟胃肠液的耐受能力,参考 Shinde 等<sup>[25]</sup>的方法并稍作修改,将过夜培养的待测菌株在 3 000 r/min 离心 10 min,收集菌体,用无菌 PBS 缓冲液 (pH 7.2) 洗涤 2 次除去残余培养基,用 5 mL 生理盐水重悬菌体后取 1.0 mL 菌悬液分别加入 9.0 mL 无菌的模拟人工胃液 (含 1% 胃蛋白酶, pH 2.0) 中,37  $^{\circ}\text{C}$  下培养,分别记录初始和共培养 3 h 后的活菌数。随后收集人工胃液处理后的菌体,同样条件清洗重悬后,取 1.0 mL 菌悬液分别加入 9.0 mL 无菌的模拟人工肠液 (含 0.2% 胰蛋白酶, 1.2% 牛胆盐, pH 8.0) 中,37  $^{\circ}\text{C}$  下培养,分别记录初始和共培养 3 h 后的活菌数。在模拟胃液和模拟肠液阶段的芽孢杆菌存活率按公式(2)计算:

$$\text{存活率}(\%) = \frac{\text{活菌数}_{\text{共培养 3h}}}{\text{活菌数}_{\text{目}_{\text{初始}}}} \times 100 \quad (2)$$

1.3.11 抗氧化能力测定 为了验证所分离菌株的抗氧化能力,分别测试各分离菌株发酵后无细胞提取液、细胞内提取物和菌体对 1,1-二苯基-

2-三硝基苯肼 (DPPH) 与羟自由基的清除能力。DPPH 清除能力的测定<sup>[26]</sup>: 分别取过夜培养的各分离菌株的发酵上清液/细胞内提取物/清洗重悬后的菌液 1 mL 加到 1 mL 0.2 mmol/L DPPH 乙醇溶液中, 室温下避光反应 30 min, 测定在 517 nm 处溶液的吸光度( $A_s$ )。空白对照采用 1 mL PBS 缓冲液 (0.01 mol/L, pH 7.2) 替代, 所测吸光度值为 ( $A_b$ )。DPPH 清除率按公式(3)计算:

$$\text{DPPH 清除率}(\%) = (1 - A_s - A_b) \times 100 \quad (3)$$

羟自由基清除能力的测定<sup>[27]</sup>: 分别取 1 mL PBS (pH 7.4)、0.5 mL 0.25 mmol/L 邻二氮菲溶液、0.5 mL 2.5 mmol/L 硫酸亚铁溶液、0.5 mL 样品 (对照组加入相同体积 PBS 溶液), 混合后加入 0.5 mL 20 mmol/L  $H_2O_2$  在 37°C 下反应 60 min, 在 536 nm 处测定吸光度。羟自由基清除能力按公式(4)计算:

$$\text{羟自由基清除率}(\%) = [(A_s - A_b) / (A_c - A_b)] \times 100 \quad (4)$$

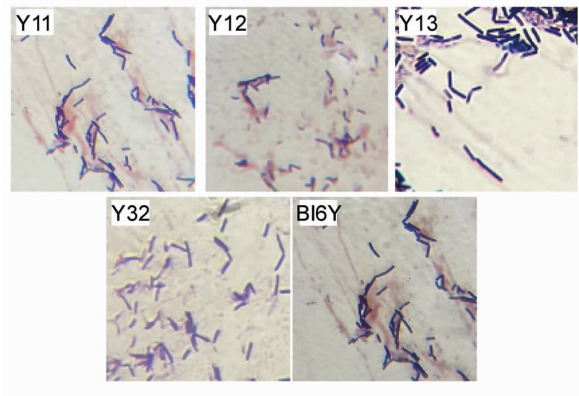


图1 光学显微镜下分离菌株的形态

Fig.1 Morphology of the isolated strains under light microscope

## 2.2 产酶特性分析

芽孢杆菌一直以来被认为是各种酶类的重要来源<sup>[28-29]</sup>, 菌株分泌的蛋白酶和脂肪酶促进了发酵过程中蛋白、脂肪的分解和风味物质的产生, 同时增加了芽孢杆菌在宿主酶促消化中的益生作用, 促进蛋白和脂肪的消化和分解过程, 还可通过破坏宿主与小肠上皮细胞结合的位点对宿主起到一定的保护作用。本试验分离的各芽孢杆菌产酶特

式中,  $A_s$ 、 $A_c$ 、 $A_b$ ——分别代表样品、空白和对照组的吸光度。

1.3.12 统计分析 每组试验独立重复 3 次, 结果采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 使用 SPSS 22.0 进行数据的统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 芽孢杆菌的筛选和鉴定

从市售农家制作虾酱中分离出多株白色、表面凸起菌株, 经革兰氏染色, 在光学显微镜下观察证实为短杆状革兰氏阳性菌 (图 1)。所分离菌株具有耐盐特性, 在盐质量分数 8%~10% 时菌株可以正常生长。用 NCBI 数据库对菌株进行比对, 并做进化树分析 (见图 2)。结果证实 Y11 为解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*), Y12 为贝莱斯芽孢杆菌 (*B. velezensis*), Y13 为枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*), Y32 为沙福芽孢杆菌 (*B. safensis*), BI6Y 为蜡样芽孢杆菌 (*B. cereus*)。

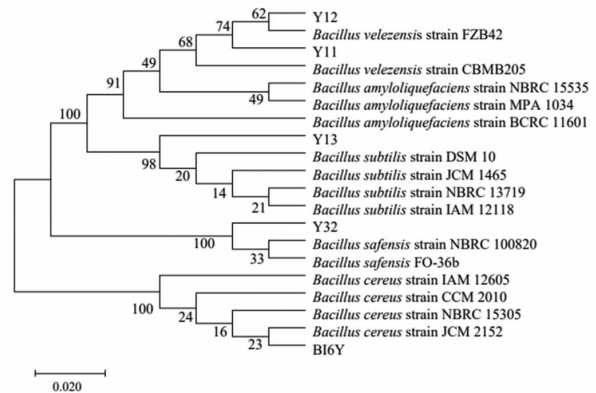


图2 分离菌株与相关芽孢杆菌之间关系的进化树

Fig.2 The phylogenetic tree shows the relationship between the isolates and other *Bacillus* spp.

性如表 2 所示。5 株芽孢杆菌均可在脱脂乳平板和甘油三丁酸酯平板表面产生明显水解圈, 然而, 不同菌株间形成的水解圈的大小不同, 说明其具有产生蛋白酶和脂肪酶的特性, 而产酶能力不同菌株间存在差异, 其中蜡样芽孢杆菌 BI6Y 产蛋白酶和脂肪酶的能力最弱。各菌株均不具备分解橄榄油的能力, 可分解某些短链脂肪酸酯, 不能分解不饱和脂肪酸。

表 2 芽孢杆菌的产酶特性

Table 2 Enzyme producing abilities of the isolates

对不同底物的 水解能力	解淀粉芽孢杆菌 Y11	贝莱斯芽孢杆菌 Y12	枯草芽孢杆菌 Y13	沙福芽孢杆菌 Y32	蜡样芽孢杆菌 BI6Y
脱脂乳平板	+	++	+	+	+
甘油三丁酸酯平板	+	++	+	+	+
橄榄油平板	-	-	-	-	-

注: -; 水解圈直径在 9 mm 以下; +; 水解圈直径在 10~15 mm; ++; 水解圈直径在 15 mm 以上。

2.3 抑菌特性分析

制情况如表 3 所示。

5 株芽孢杆菌的无细胞提取液对指示菌的抑

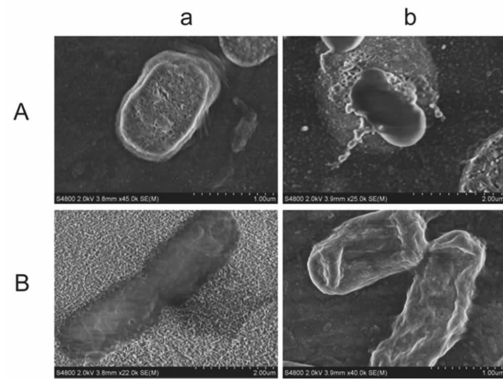
表 3 分离菌株对不同指示菌的抑制情况

Table 3 Antibacterial activities of the isolates against indicator strains

指示菌	抑菌圈直径/mm				
	解淀粉芽孢杆菌 Y11	贝莱斯芽孢杆菌 Y12	枯草芽孢杆菌 Y13	沙福芽孢杆菌 Y32	蜡样芽孢杆菌 BI6Y
大肠杆菌	13.75 ± 0.17	13.26 ± 0.45	-	-	-
金黄色葡萄球菌	30.20 ± 0.38	28.72 ± 0.22	13.17 ± 0.17	16.92 ± 0.40	12.97 ± 0.01
不动杆菌	13.20 ± 1.85	12.28 ± 1.23	13.93 ± 0.07	-	13.82 ± 0.03
腐生葡萄球菌	17.45 ± 0.47	17.53 ± 3.09	16.73 ± 0.02	14.32 ± 0.13	15.75 ± 0.04
马胃葡萄球菌	22.60 ± 0.19	24.35 ± 0.00	15.61 ± 0.12	17.32 ± 0.05	15.14 ± 0.16
蜂房哈夫尼菌	-	-	-	-	-
蜡样芽孢杆菌 BI6Y	-	-	-	-	-

研究发现解淀粉芽孢杆菌 Y11 和贝莱斯芽孢杆菌 Y12 对所选择的指示菌的抑菌效果较好, 优于其它 3 株分离菌株, 对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、不动杆菌、腐生葡萄球菌和马胃葡萄球菌均有不同的抑制作用, 对金黄色葡萄球菌的抑制作用最高, 形成直径 30 mm 左右的抑菌圈。其中腐生葡萄球菌和马胃葡萄球菌与解淀粉芽孢杆菌 Y11、贝莱斯芽孢杆菌 Y12 为农家制作的不同虾酱中分离, 推测含有解淀粉芽孢杆菌 Y11 和贝莱斯芽孢杆菌 Y12 中的样品因两株菌的抑菌特性而抑制腐生葡萄球菌和马胃葡萄球菌的生长。所分离的几株菌对水产品腐败菌蜂房哈夫尼菌及蜡样芽孢杆菌 BI6Y 无抑制作用, 说明芽孢杆菌对细菌的抑菌效果存在差异性。

为了明确抑菌物质的抑菌机理, 以解淀粉芽孢杆菌 Y11 对腐生葡萄球菌(革兰氏阳性菌)和不动杆菌(革兰氏阴性菌)的作用为例, 测定解淀粉芽孢杆菌 Y11 无细胞提取液对细菌表面形态的影响, 扫描电镜结果见图 3。



注: a. 未处理形态; b. 处理后形态。

图 3 解淀粉芽孢杆菌 Y11 无细胞提取液处理后的腐生葡萄球菌(A)和不动杆菌(B)细胞形态扫描电镜图  
Fig.3 The morphology of *Staphylococcus saprophyticus* (A) and *Acinetobacter*. sp (B) after cell free supernatant of *B. amyloliquefaciens* Y11 treatment observed by SEM

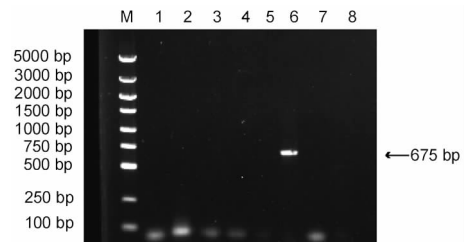
扫描电镜结果表明, 正常状态下腐生葡萄球菌和不动杆菌细胞表面圆滑、完整、比较规则, 采用解淀粉芽孢杆菌 Y11 的无细胞提取液处理后,

细胞的完整和圆滑性受到破坏,形状变得不规则,出现不同程度的凹陷和缺口。有研究表明细胞结构的破坏会造成细胞内物质泄漏,最终导致细菌死亡<sup>[30]</sup>。

通过已报道<sup>[21]</sup>的芽孢杆菌抗菌肽基因设计引物对所分离的菌株是否产生抗菌肽和抗菌肽类型进行检测,结果发现解淀粉芽孢杆菌 Y11、贝莱斯芽孢杆菌 Y12、枯草芽孢杆菌 Y13、沙福芽孢杆菌 Y32 这 4 株菌在 675 bp 附近(表面活性素 surfactin 合成酶基因)出现目的条带(图 4 以解淀粉芽孢杆菌 Y11 为例,展示,PCR 检测结果),证实其有表达 surfactin 的可能性。Surfactin 是包括 7 个氨基酸的寡肽环亲水基团和脂肪酸链疏水基团的两亲性脂肽,低活性的 surfactin 具有降低界面张力的作用,可以阻止细菌在附着物上的早期黏附,抑制生物被膜的形,也可作为油-水界面的乳化剂发挥一定的功效<sup>[31-33]</sup>。蜡样芽孢杆菌 BI6Y 不具有表 1 列出的抗菌肽编码基因。

## 2.4 抗生素敏感性分析

评价了所分离芽孢杆菌对 6 种抗生素的敏感性(见表 4)。所有菌株对氯霉素均不敏感;解淀粉芽孢杆菌 Y11、贝莱斯芽孢杆菌 Y12、枯草芽孢杆菌 Y13、沙福芽孢杆菌 Y32 对克拉霉素、四环素和环丙沙星普遍敏感,对万古霉素和诺氟沙星中度



注:M. DNA marker;泳道 1~8. 分别代表不同的引物从左到右依次为 CER1F 和 EMT1F、EM1F 和 ME1R5、BACCF1F 和 BACC1R、FEND1F 和 FEND1R、ituDF 和 ituDR、sfpF 和 sfpR、subF 和 subtilinR、subsinF 和 sunsinR。

图 4 解淀粉芽孢杆菌 Y11 抗菌肽基因检测结果  
Fig.4 Detection result of the antibacterial peptide encoding gene of *B. amyloliquefaciens* Y11

敏感;蜡样芽孢杆菌 BI6Y 对万古霉素和诺氟沙星不敏感。研究发现芽孢杆菌基因组内部存在一些属于耐药基因组的固有抗性基因,包括地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)在内的一些芽孢杆菌中就存在潜在编码一种新型的氯霉素乙酰转移酶的氯霉素抗性基因 *cat*,然而,这种抗性基因不会发生水平转移,因此不会对人类和动物的健康造成潜在的风险<sup>[34]</sup>。本试验分离的蜡样芽孢杆菌 BI6Y 造成抗性基因水平转移的可能性较高,不适合作为益生菌使用。

表 4 分离菌株的抗生素敏感性

Table 4 Antibiotic susceptibilities of the isolates

菌株类型	氯霉素	万古霉素	克拉霉素	四环素	环丙沙星	诺氟沙星
解淀粉芽孢杆菌 Y11	R	MS	S	S	S	MS
贝莱斯芽孢杆菌 Y12	R	MS	S	S	S	MS
枯草芽孢杆菌 Y13	R	MS	S	S	S	S
沙福芽孢杆菌 Y32	R	MS	S	S	S	MS
蜡样芽孢杆菌 BI6Y	R	R	S	MS	MS	R

注:R. 不敏感;MS. 中度敏感;S. 敏感。

## 2.5 益生特性分析

对所分离的几株芽孢杆菌的溶血性、自聚集率、酸和胆盐的耐受性、在人工胃肠液的存活率分析结果见表 5。其中溶血特性是评价菌株是否满足益生菌标准的一项非常重要的安全参数指标,研究发现,除了蜡样芽孢杆菌 BI6Y 在羊血琼脂上显示出  $\beta$  溶血外,其余分离的芽孢杆菌为  $\gamma$  溶血,说明除蜡样芽孢杆菌 BI6Y 外其它菌株均相对安

全。

自动聚集能力的大小反应菌株与小肠上皮细胞结合的能力,可帮助益生菌在肠道中定植<sup>[25]</sup>。本研究发现贝莱斯的芽孢杆菌 Y12、枯草芽孢杆菌 Y13 和沙福芽孢杆菌 Y32 的自动聚集能力较好,在 30%以上,解淀粉芽孢杆菌 Y11 的自聚集程度稍弱为 25%,蜡样芽孢杆菌 BI6Y 的自聚集力最弱,而整体稍微低于已报道的芽孢杆菌自聚集度,

可能与菌株间的差异和来源有关。

酸和胆盐的耐受性也是选择和评价菌株是否可作为潜在益生菌的重要评价指标,有耐受性说明其可能在胃部和十二指肠的消化道液中生存。通过测定不同条件下菌株的生长情况,发现各菌株对酸和胆盐都有一定的耐受性,而其生长随 pH 值的降低和胆盐浓度的升高受到不同程度的抑制。

测定各芽孢杆菌在人工胃肠液中存活率,结果发现,枯草芽孢杆菌 Y13 在人工胃液中的存活率最高为 95.3%,对极端的 pH 值有较强的耐受性,其次为贝莱斯芽孢杆菌 Y12、解淀粉芽孢杆菌

Y11、沙福芽孢杆菌 Y32,存活率分别为 72.6%, 69.5% 和 58.3%; 而随后 3 h 人工肠液暴露处理后,沙福芽孢杆菌 Y32 的存活率最高为 85.1%,其次为枯草芽孢杆菌 Y13、解淀粉芽孢杆菌 Y11、贝莱斯芽孢杆菌 Y12,存活率分别为 65.9%, 60.1% 和 50.8%; 证实菌株对人工胃肠液具有一定耐受性。蜡样芽孢杆菌 BI6Y 对人工胃肠液的存活率相对其它菌株较低,在 40% 左右。其为从虾酱中分离的一种条件性致病菌,对胃肠液较低的存活率在一定程度上降低了食用其污染虾酱后致病的风险性。

表 5 分离菌株的益生特性

Table 5 Probiotic characteristics of the isolates

益生特性	解淀粉芽孢杆菌	贝莱斯芽孢杆菌	枯草芽孢杆菌	沙福芽孢杆菌	蜡样芽孢杆菌
	Y11	Y12	Y13	Y32	BI6Y
溶血性	$\gamma$ 溶血	$\gamma$ 溶血	$\gamma$ 溶血	$\gamma$ 溶血	$\beta$ 溶血
自聚集率/%	25.0	32.9	33.3	33.6	12.5
酸耐受性	+	+	+	+	+
胆盐耐受性	+	+	+	+	+
人工胃液存活率/%	69.5	72.6	95.3	58.3	46.4
人工肠液存活率/%	60.1	50.8	65.9	85.1	39.8

注:+,耐受。

本试验分别测定了各株芽孢杆菌的无细胞提取液、细胞内容物和菌体对 DPPH 和羟自由基的清除能力,各菌株的清除能力存在差异,这与自由基的类型有关(见表 6)。5 株芽孢杆菌的无细胞提取液与细胞内容物对 DPPH 均有较高的清除作用,其菌体不具有 DPPH 清除能力。5 株芽孢杆菌

的菌体对羟自由基的清除率在 20%~30%,可能与对羟自由基的吸附有关<sup>[35]</sup>。无细胞提取液对羟自由基的清除率高于其菌体,而细胞内容物不具有羟自由基清除能力,其抗羟自由基物质主要分泌到胞外。

表 6 芽孢杆菌对 DPPH 和羟自由基清除能力

Table 6 DPPH and hydroxyl radical scavenging abilities of the *Bacillus.spp*

菌株	DPPH 清除率/%			羟自由基清除率/%		
	无细胞提取液	细胞内容物	菌体	无细胞提取液	细胞内容物	菌体
解淀粉芽孢杆菌 Y11	56.96 ± 0.23 <sup>a</sup>	26.02 ± 3.78 <sup>b</sup>	-	50.37 ± 2.39 <sup>b</sup>	-	36.12 ± 2.79 <sup>a</sup>
贝莱斯芽孢杆菌 Y12	30.86 ± 0.81 <sup>c</sup>	39.40 ± 4.21 <sup>a</sup>	-	54.15 ± 1.13 <sup>b</sup>	-	34.14 ± 2.49 <sup>a</sup>
枯草芽孢杆菌 Y13	40.34 ± 2.99 <sup>b</sup>	35.58 ± 2.01 <sup>a</sup>	-	54.98 ± 2.16 <sup>b</sup>	-	18.42 ± 2.62 <sup>c</sup>
沙福芽孢杆菌 Y32	42.54 ± 1.16 <sup>b</sup>	29.70 ± 1.05 <sup>b</sup>	-	61.45 ± 1.69 <sup>a</sup>	-	24.09 ± 1.82 <sup>b</sup>
蜡样芽孢杆菌 BI6Y	38.43 ± 3.38 <sup>b</sup>	33.82 ± 0.71 <sup>a</sup>	-	42.43 ± 0.79 <sup>c</sup>	-	32.86 ± 2.69 <sup>a</sup>

注: $P < 0.05$ 。

### 3 结论

本研究对传统虾酱中的芽孢杆菌进行筛选、分离,5 株芽孢杆菌中,除蜡样芽孢杆菌 BI6Y 外,

解淀粉芽孢杆菌 Y11、贝莱斯芽孢杆菌 Y12、枯草芽孢杆菌 Y13、沙福芽孢杆菌 Y32 均安全可控,可不同程度地抑制包括大肠杆菌和金黄色葡萄球菌

在内的多种革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌。扫描电镜结果表明其抑菌物质使细胞表面形态发生变化,虽有分泌 surfactin 的可能性,但其抑菌能力是否是 surfactin 作用的结果还有待探究。解淀粉芽孢杆菌 Y11、贝莱斯芽孢杆菌 Y12、枯草芽孢杆菌 Y13 和沙福芽孢杆菌 Y32 的自聚集率在 30% 左右,有在肠道定植的倾向;对酸和胆盐有一定的耐受性,能够耐受消化道等不利环境;体外试验证实这 4 株芽孢杆菌兼具较高的抗氧化活性,无细胞提取液对 DPPH 和羟自由基的清除能力在 40%~60%。综上所述,解淀粉芽孢杆菌 Y11、贝莱斯芽孢杆菌 Y12、枯草芽孢杆菌 Y13、沙福芽孢杆菌 Y32 可作为潜在的益生菌。

### 参 考 文 献

- [1] PLAZA-DIAZ J, RUIZ-OJEDA F J, GIL-CAMPOS M, et al. Mechanisms of action of probiotics[J]. *Advances in Nutrition*, 2019, 10(suppl\_1): S49-S66.
- [2] LIU C H, CHIU C S, HO P L, et al. Improvement in the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by a protease - producing probiotic, *Bacillus subtilis* E20, from natto[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 107(3): 1031-1041.
- [3] LEE N K, KIM W S, PAIK H D. *Bacillus* strains as human probiotics: characterization, safety, microbiome, and probiotic carrier[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2019, 28(5): 1297-1305.
- [4] MINGMONGKOLCHAI S, PANBANGRED W. *Bacillus* probiotics: an alternative to antibiotics for livestock production[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2018, 124(6): 1334-1346.
- [5] KUEBUTORNYE F K A, ABARIKE E D, LU Y. A review on the application of *Bacillus* as probiotics in aquaculture [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 87: 820-828.
- [6] MAZANKO M S, GORLOV I F, PRAZDNOVA E V, et al. *Bacillus* probiotic supplementations improve laying performance, egg quality, hatching of laying hens, and sperm quality of roosters [J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2018, 10(2): 367-373.
- [7] ALMADA-ÉRIX C N, ALMADA C N, PEDROSA G T S, et al. Quantifying the impact of eight unit operations on the survival of eight *Bacillus* strains with claimed probiotic properties[J]. *Food Research International*, 2021, 142: 110191.
- [8] MAJEED M, MAJEED S, NAGABHUSHANAM K, et al. Evaluation of the *in vitro* cholesterol - lowering activity of the probiotic strain *Bacillus coagulans* MTCC 5856[J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2019, 54(1): 212-220.
- [9] KIM B, KWON J, KIM M S, et al. Protective effects of *Bacillus* probiotics against high-fat diet-induced metabolic disorders in mice[J]. *PLoS ONE*, 2018, 13(12): e0210120.
- [10] RAGUL K, SYIEM I, SUNDAR K, et al. Characterization of probiotic potential of *Bacillus* species isolated from a traditional brine pickle[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2017, 54 (13): 4473-4483.
- [11] BORAH T, GOGOI B, KHATANIAR A, et al. Probiotic characterization of indigenous *Bacillus velezensis* strain DU14 isolated from Apong, a traditionally fermented rice beer of Assam[J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2019, 18: 101008.
- [12] JEON H L, YANG S J, SON S H, et al. Evaluation of probiotic *Bacillus subtilis* P229 isolated from *cheonggukjang* and its application in soybean fermentation [J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2018, 97: 94-99.
- [13] NAKAMURA A, KONDO A, TAKAHASHI H, et al. Microbiological safety and microbiota of Kapi, Thai traditional fermented shrimp paste, from different sources[J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2021, 154: 112763.
- [14] PONGSETKUL J, BENJAKUL S, SUMPAPOL P, et al. *Bacillus subtilis* K - C3 isolated from Thai salted shrimp paste (*Kapi*): Its extracellular enzymes and use as a starter culture in *Kapi* production[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2018, 42(6): e12649.
- [15] PRIHANTO A A, NURDIANI R, JATMIKO Y D, et al. Physicochemical and sensory properties of terasi (an Indonesian fermented shrimp paste) produced using *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. *Microbiological Research*, 2021, 242: 126619.
- [16] LV X, LI Y, CUI T, et al. Bacterial community succession and volatile compound changes during



- fermentation of shrimp paste from Chinese Jinzhou region [J]. *LWT -Food Science and Technology*, 2019, 122: 108998.
- [17] LEITE A M O, MIGUEL M A L, PEIXOTO R S, et al. Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains [J]. *Journal of Dairy Science*, 2015, 98(6): 3622-3632.
- [18] ZHANG D, PALMER J, TEH K H, et al. Identification and selection of heat-stable protease and lipase-producing psychrotrophic bacteria from fresh and chilled raw milk during up to five days storage [J]. *LWT -Food Science and Technology*, 2020, 134: 110165.
- [19] RASIYA K T, SEBASTIAN D. Iturin and surfactin from the endophyte *Bacillus amyloliquefaciens* strain RKEA3 exhibits antagonism against *Staphylococcus aureus* [J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2021, 36: 102125.
- [20] NOOR S, SHAH Z, JAVED A, et al. A fungal based synthesis method for copper nanoparticles with the determination of anticancer, antidiabetic and antibacterial activities [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2020, 174: 105966.
- [21] KAEWKLOM S, LUMBERT S, KRAIKUL W, et al. Control of *Listeria monocytogenes* on sliced bologna sausage using a novel bacteriocin, amysin, produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from Thai shrimp paste(Kapi)[J]. *Food Control*, 2013, 32(2): 552-557.
- [22] NWAGU T N, UGWUODO C J, ONWOSI C O, et al. Evaluation of the probiotic attributes of *Bacillus* strains isolated from traditional fermented African locust bean seeds (*Parkia biglobosa*), 'daddawa' [J]. *Annals of Microbiology*, 2020, 70(1): 1-15.
- [23] GUPTA S, MOHANTY U, MAJUMDAR R K. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from traditional fermented fish product *Shidal* of India with reference to their probiotic potential [J]. *LWT -Food Science and Technology*, 2021, 146: 111641.
- [24] XU Y H, ZHOU T, TANG H Q, et al. Probiotic potential and amylolytic properties of lactic acid bacteria isolated from Chinese fermented cereal foods [J]. *Food Control*, 2020, 111: 107057.
- [25] SHINDE T, VEMURI R, SHASTRI M D, et al. Probiotic *Bacillus coagulans* MTCC 5856 spores exhibit excellent in-vitro functional efficacy in simulated gastric survival, mucosal adhesion and immunomodulation [J]. *Journal of Functional Foods*, 2019, 52: 100-108.
- [26] GIRI S S, RYU E C, SUKUMARAN V, et al. Antioxidant, antibacterial, and anti-adhesive activities of biosurfactants isolated from *Bacillus* strains [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2019, 132: 66-72.
- [27] HU X Y, PANG X, WANG P G, et al. Isolation and characterization of an antioxidant exopolysaccharide produced by *Bacillus* sp. S-1 from Sichuan Pickles [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2019, 204: 9-16.
- [28] PANT G, PRAKASH A, PAVANI J V P, et al. Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis* [J]. *Journal of Taibah University for Science*, 2015, 9(1): 50-55.
- [29] HADJIDJ R, BADIS A, MECHRI S, et al. Purification, biochemical, and molecular characterization of novel protease from *Bacillus licheniformis* strain K7A [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 114: 1033-1048.
- [30] PENG S D, SONG J J, ZENG W Y, et al. A broad-spectrum novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* SHY 21-2 from yak yogurt: Purification, antimicrobial characteristics and antibacterial mechanism [J]. *LWT -Food Science and Technology*, 2021, 142: 110955.
- [31] HOFFMANN M, MÜCK D, GROSSMANN L, et al. Surfactin from *Bacillus subtilis* displays promising characteristics as O/W-emulsifier for food formulations [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2021, 203: 111749.
- [32] ISA M H M, SHAMSUDIN N H, AL-SHORGANI N K N, et al. Evaluation of antibacterial potential of biosurfactant produced by surfactin-producing *Bacillus* isolated from selected Malaysian fermented foods [J]. *Food Biotechnology*, 2020, 34(1): 1-24.
- [33] ABDELLI F, JARDAK M, ELLOUMI J, et al. Antibacterial, anti-adherent and cytotoxic activities of surfactin (s) from a lipolytic strain *Bacillus safensis* F4 [J]. *Biodegradation*, 2019, 30(4): 287-300.
- [34] AGERSØ Y, BJERRE K, BROCKMANN E, et al. Putative antibiotic resistance genes present in extant *Bacillus licheniformis* and *Bacillus paralicheniformis* strains are probably intrinsic and part of the ancient

resistome[J]. PLoS ONE, 2019, 14(1): e0210363.  
[35] KADAIKUNNAN S, REJINIEMON T S, KHALED J M, et al. *In-vitro* antibacterial, antifungal, antioxi-

dant and functional properties of *Bacillus amyloliquefaciens* [J]. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 2015, 14(1): 1-11.

### Screening and Probiotic Characteristics of Shrimp Paste Originated *Bacillus* spp.

Tan Xiqian, Wang Dan, Cheng Xiaoxiao, Li Xuepeng, Li Jianrong\*

(College of Food Science and Technology/Institute of Marine Science and Technology, Bohai University, Jinzhou 121013, Liaoning)

**Abstract** Five *Bacillus* strains were isolated from the traditional homemade shrimp paste, and were identified as *Bacillus amyloliquefaciens* Y11, *Bacillus velezensis* Y12, *Bacillus subtilis* Y13, *Bacillus safensis* Y32, and *Bacillus cereus* BI6Y. All five strains could grow normally at 10% NaCl concentration, had different protease and lipase and antibacterial substances production capacities. Among them, *Bacillus cereus* BI6Y has  $\beta$ -hemolysis and is insensitive to chloramphenicol, vancomycin and norfloxacin, hence is not suitable for a probiotic. The other four *Bacillus* strains are  $\gamma$ -hemolytic, insensitive to chloramphenicol, with a self-aggregation rate between 25% and 35%, and tolerant to acid and bile salts; they were found to secrete surfactin and could survive after treatment with artificial gastrointestinal fluid, the strain that had the highest survival rate in artificial gastric juice (pH 2.0) was found to be *B. subtilis* Y13 (95.3%), and in artificial intestinal juice it was *B. safensis* Y32 (85.1%). The bacterial cell, cell-free supernatant, and cellular contents had different antioxidant activities, and the cell-free supernatant could scavenge 1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine (DPPH) and hydroxyl radicals simultaneously, the scavenging rate is between 40% and 60%. The results of the study showed that in addition to *B. cereus* BI6Y, *B. amyloliquefaciens* Y11, *B. velezensis* Y12, *B. subtilis* Y13, *B. safensis* Y32 have certain safety and probiotic properties, hence could be used as potential probiotics, which would provide a theoretical basis for the development of *Bacillus* spp.-based probiotic products.

**Keywords** *Bacillus*; probiotics; probiotic characteristics; antioxidant; shrimp paste