

## 传统腌渍蔬菜中高产 AI-2 信号分子乳酸菌的筛选及其益生特性

吕欣然<sup>1</sup>, 刘雪晴<sup>1</sup>, 顾振辰<sup>1</sup>, 吕孟敏<sup>1</sup>, 励建荣<sup>1\*</sup>, 檀茜倩<sup>1</sup>, 崔方超<sup>1</sup>,  
白凤翎<sup>1</sup>, 俞张富<sup>2</sup>, 沈荣虎<sup>2</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>杭州萧山农业发展有限公司 杭州 311215)

**摘要** LuxS/AI-2 作为种间交流群体感应系统常存在于乳酸菌中,具有调控其生物膜形成、耐酸、耐胆盐等益生特性。采用哈维氏弧菌 BB170 菌株报告法筛选产 AI-2 信号分子乳酸菌,利用 PCR 测序检测 *luxS* 基因的表达,通过耐酸、耐胆盐、抑菌性及细胞黏附性评价高产 AI-2 乳酸菌的益生特性。结果表明:从 200 株乳酸菌中筛选出 10 株产 AI-2 乳酸菌,其中植物乳杆菌 SCT-2 为高产 AI-2 信号菌株。验证菌株 SCT-2 中存在 *luxS* 群体感应调控基因。高产 AI-2 菌株 SCT-2 的耐酸和耐胆盐存活率分别为 14%~92%和 63%~89%,抑菌直径范围 17.50~19.43 mm,黏附细胞数为 102 CFU/细胞。与低产 AI-2 乳酸菌菌株比较,生物膜产量、耐酸、耐胆盐、抑菌率及黏附率分别提高 111.4%,8%,15%,26.7%,197%。结论:*luxS* 基因是 AI-2 信号合成的关键基因,LuxS/AI-2 群体感应提高了乳酸菌的生物膜形成能力、耐酸性、耐胆盐性、抑菌能力及细胞黏附力等益生性,为开发良好益生特性的乳酸菌生物制剂提供了理论参考。

**关键词** 乳酸菌;群体感应;AI-2 信号分子;益生特性

**文章编号** 1009-7848(2024)01-0083-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.01.009

群体感应(Quorum sensing, QS)是指细菌通过监测种群群体密度,进而调节其基因表达的行为,是细菌群体之间通讯和交流的一种机制<sup>[1]</sup>。目前,依据信号分子类型分为 4 类群体感应系统:1)扩散信号因子(Diffusible signaling factor, DSF)群体感应,存在于革兰氏阴性菌中,具有调节细菌毒力因子与生物膜形成等功能<sup>[2]</sup>;2)寡肽(Auto-inducing peptides, AIP)类群体感应,广泛存在于革兰氏阳性细菌中<sup>[3]</sup>;3)酰基高丝氨酸内酯(N-acyl-homoserine lactones, AHLs)类群体感应,介导细菌种间交流;4)呋喃硼酸二酯(Autoinducer-2, AI-2)类群体感应, AI-2/LuxS 群体感应系统及其合成酶蛋白 LuxS,可介导革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌之间的种间和种内信息交流<sup>[4]</sup>。AI-2 是细菌中同型半胱氨酸代谢的副产物<sup>[5]</sup>,其 QS 系统主要参

与调控生物膜形成、生物发光、细胞运动和毒力因子的表达等<sup>[6]</sup>。

植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)是传统发酵食品中一种重要的乳酸菌,广泛应用在食品加工领域。其具有较好的抑菌性和胃肠道耐受能力,大多数植物乳杆菌菌株是公认的益生菌<sup>[7]</sup>。为有效适应生存环境变化,乳酸菌种群间会通过分泌群体感应信号增加个体间的信息交流,通过产生生物膜、细菌素等适应环境的变化<sup>[8]</sup>。嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)通过 AI-2/LuxS 群体感应系统调节其在肠道表面的黏附和定殖能力<sup>[9-10]</sup>。Moslehi-Jenabian 等<sup>[11]</sup>研究发现, AI-2/LuxS 群体感应系统改善了 4 种乳酸杆菌的酸适应性,增强其在胃肠道微生态系统中存活能力。AI-2/LuxS 群体感应系统可调控乳酸菌的酸耐受性和肠道定植能力,然而其调控乳酸菌的其它益生特性的能力尚不清楚。需进一步研究 AI-2/LuxS 群体感应系统与乳酸菌益生特性的关系。

鉴于上述问题,本研究利用哈维氏弧菌 BB170 菌株报告法,从传统腌渍蔬菜中筛选产 AI-2 信号分子乳酸菌,并通过酸耐受性、胆汁耐受性、黏附性、抑菌特性和生物膜形成能力等指

收稿日期:2023-01-05

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: lij6491@163.com

标,评价 AI-2/LuxS 群体感应系统对乳酸菌益生特性的影响,以期为开发具有益生潜力的乳酸菌发酵剂提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株 乳酸菌菌株来源于安徽安庆农家自制萝卜和雪菜,辽宁葫芦岛农家自制酸菜,辽宁阜新、彰武农家自制酸黄瓜和酸菜,辽宁沈阳农家自制酸菜,辽宁锦州农家自制酸菜;鼠李糖乳杆菌 GG(*Lactobacillus rhamnosus* GG, LGG)、哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)BB170,北纳创联生物技术有限公司;金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌、大肠杆菌、嗜水气单胞菌、Hela 细胞,本实验室保藏。

1.1.2 培养基及试剂 MRS 液体培养基、LB 液体培养基、琼脂粉,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;细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒、Taq PCR Master mix、DNA marker,生工生物工程(上海)股份有限公司;高糖 DMEM 培养基、胰蛋白酶-EDTA 消化液、青霉素-链霉素双抗, Gibco(美国)公司。

### 1.2 主要设备与仪器

DL-CJ-2N 超净工作台,北京市东联哈尔仪器制造有限公司;Bioscreen C 全自动生长曲线分析仪,上海谓载商贸发展有限公司;CO<sub>2</sub> 培养箱,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;GI54DS 高压灭菌锅,至微仪器有限公司;IKA Vortex GENIUS 3 振荡器,德国 IKA 公司;Motic AE2000 倒置显微镜,北京荣兴光恒科技有限公司;DYY-8C 电泳仪,北京市六一仪器厂;QuantityOne 凝胶成像系统、I-mark 酶标仪,美国 Bio-Rad 公司;ABI StepOnePlus-PCR 仪,德国 Eppendorf 公司。

### 1.3 方法

1.3.1 高产 AI-2 乳酸菌的筛选 将活化后的乳酸菌以 2%接种于 MRS 培养基,置 37℃培养 16 h, 8 000 r/min 离心 10 min,将上清液用 0.22 μm 滤膜过滤,得到乳酸菌无细胞上清液。

按照燕彩玲等<sup>[12]</sup>、曹素芳等<sup>[13]</sup>、张腾等<sup>[14]</sup>的方法,采用哈维氏弧菌生物发光法测定乳酸菌产 AI-2 活性。信号分子 AI-2 的浓度用相对荧光强

度表示。 $A_e$  为待测相对荧光强度; $A_i$  为待测样品的荧光强度值; $A_j$  为介质对照的荧光强度值。计算公式如下:

$$A_e = A_i/A_j \quad (1)$$

1.3.2 *luxS* 基因生物学鉴定 取 1 mL 过夜培养的乳酸菌菌悬液,参照 DNA 快速抽提试剂盒说明书提取乳酸菌 DNA。参照张腾<sup>[15]</sup>的方法设计 *luxS* 引物与 PCR 反应体系和扩增条件。PCR 产物采用 1%琼脂糖凝胶电泳 20 min,凝胶成像系统观察扩增结果,送至上海生物工程有限公司测序。

1.3.3 生长曲线的测定 向 96 孔板中加入 200 μL MRS 液体培养基,将乳酸菌以 2%接种于培养基中,使用全自动生长曲线仪于 37℃每 2 h 测定其 OD<sub>600nm</sub> 值。

1.3.4 耐酸能力的测定 将活化后的二代乳酸菌以 2%的接种量接种于 pH 值分别为 1.5, 2.5, 3.5, 4.5 的 MRS 培养基中,37℃培养 24 h 后移入 96 孔板中,测定其 OD<sub>Ai</sub>,以未作处理培养的乳酸菌 OD<sub>Aj</sub> 作对照<sup>[16]</sup>。存活率计算公式:

$$\text{存活率} = \text{OD}_{Ai}/\text{OD}_{Aj} \times 100\% \quad (2)$$

1.3.5 耐胆盐能力的测定 将活化后的二代乳酸菌以 2%的接种量接种于体积分数分别为 1%, 2%, 3%, 4%的含胆盐的 MRS 培养基中<sup>[17]</sup>,测定方式同 1.3.4 节。

1.3.6 抑菌能力的测定 利用双层琼脂扩散法测定筛选出的乳酸菌的抑菌能力<sup>[18]</sup>。以大肠杆菌、嗜水气单胞菌、金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌为指示病原菌。在平板中加入 10 mL 素琼脂作为底层培养基,待其凝固后,将牛津杯放在其表面,然后将含有 10<sup>6</sup> CFU/mL 指示菌的 LB 半固体培养基倒入平板内作为上层培养基,待其凝固后,将牛津杯取出,分别在孔内加入 180 μL 乳酸菌液,37℃培养 12 h,测量抑菌圈直径。

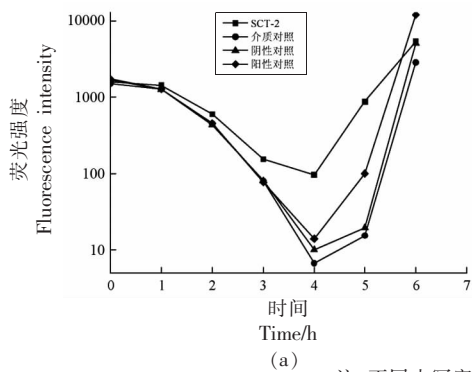
1.3.7 生物膜形成能力的测定 向 96 孔板中加入 200 μL MRS 液体培养基,将乳酸菌以 2%接种于培养基中,置于 37℃分别培养 24, 36 h 和 48 h。弃上层培养液后,用 PBS 清洗 2~3 次去除浮游细胞,晾干后,加 100 μL 结晶紫染色 15 min,去除染液后用 PBS 缓慢冲洗至无色。晾干后加入 200 μL 33%冰醋酸脱色,摇匀。用多功能酶标仪在

OD<sub>595nm</sub> 处测定其吸光度值<sup>[19]</sup>。

**1.3.8 HelA 细胞黏附能力的测定** 乳酸菌菌悬液的制备<sup>[20]</sup>:将活化后的 2 株产 AI-2 的乳酸菌和鼠李糖乳杆菌 LGG(作为阳性对照)接种于 MRS 液体培养基培养过夜,调整细菌浓度,使其在波长 600 nm 处的吸光度为 1 4000 r/min 离心 10 min,收集菌体,用无菌 PBS 洗涤 3 次。最后用不含血清的 DMEM 高糖培养基重悬。

**黏附性测定**<sup>[21-22]</sup>:在六孔板中预先放入 20 mm×20 mm 的载玻片,将培养好的 HelA 细胞调整至  $2 \times 10^4$  cell/mL,接种到六孔板中使其贴壁生长,至细胞长成单层后用无菌 PBS 洗涤 2 次,每孔加入 1 mL DMEM 和 1 mL 预先制备好的乳酸菌菌悬液继续培养 1 h。六孔板用 PBS 洗 3 次,除去未黏附的乳酸菌,加入甲醛固定 20 min,对载玻片进行革兰氏染色,光学显微镜下随机取 20 个视野,观察并计算乳酸菌黏附数。

**1.3.9 数据处理** 试验均重复测定 3 次,数据采用“平均数±标准差”表示。利用 SPSS 23 软件对数据进行统计学分析,Origin 9.0 软件绘图。



注:不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

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

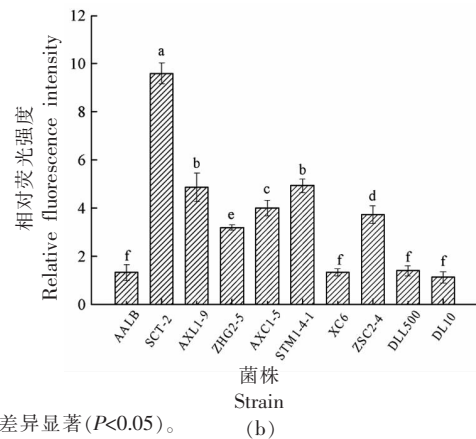
## 2.2 luxS 基因生物学鉴定结果

图 2a 为两株产 AI-2 乳酸菌 *luxS* 基因扩增后的电泳结果。目标条带约为 477 bp,与 NCBI 中植物乳杆菌 *luxS* 基因大小相同,说明两株乳酸菌都含有 *luxS* 基因。将其序列在 NCBI 上进行 BLAST 比对,选取部分同源性较高的不同菌株,用 Neighbor-joining 法构建系统发育树,结果见图 2b。高产 AI-2 信号分子的 SCT-2 与植物乳杆菌

## 2 结果与分析

### 2.1 高产 AI-2 信号分子乳酸菌的筛选结果

用哈维氏弧菌 BB170 生物发光法从 200 多株乳酸菌中筛选到 10 株可产生 AI-2 信号分子的乳酸菌。图 1a 为乳酸菌菌株 AI-2 的产生情况。在 0 h, AI-2 是种间交流信号分子,刚加入的乳酸菌上清液中的信号分子未被指示菌识别,所检测到的荧光强度是哈维氏弧菌所产生。0~4 h 内,各组荧光强度逐渐下降,表明各组产生的信号分子未达到使指示菌发光的浓度,荧光强度在 4 h 最低,之后逐渐升高,说明 4 h 是报告菌株诱导发光的阈值时间,因此,以 4 h 测定的荧光强度来计算最为准确。本结果与蔡针华<sup>[23]</sup>的研究结果相近,各组发光强度均在 4 h 达到最低点,相对荧光强度计算时间以孵育 4 h 为基准点。图 1b 为 10 株乳酸菌的相对荧光强度。源自于酸菜的植物乳杆菌 SCT-2 信号分子 AI-2 产量远高于其它乳酸菌,植物乳杆菌 DL10 产量最低,且 SCT-2 产量为 DL10 的 8.7 倍。选择以上两株植物乳杆菌做后续试验并比较。



NMD-17 的 *luxS* 基因有 100% 的同源性。低产信号分子的 DL10 与植物乳杆菌 KLDS1.0391 在同分支且同源率达 99%。

### 2.3 乳酸菌的生长曲线

图 3 显示 AI-2 产量不同的两株乳酸菌 24 h 生长曲线。2 株乳酸菌的生长周期相似。2 h 时开始进入对数生长期,10 h 时达到对数生长末期,而后进入稳定期,菌密度在对数末期达到最大值,菌



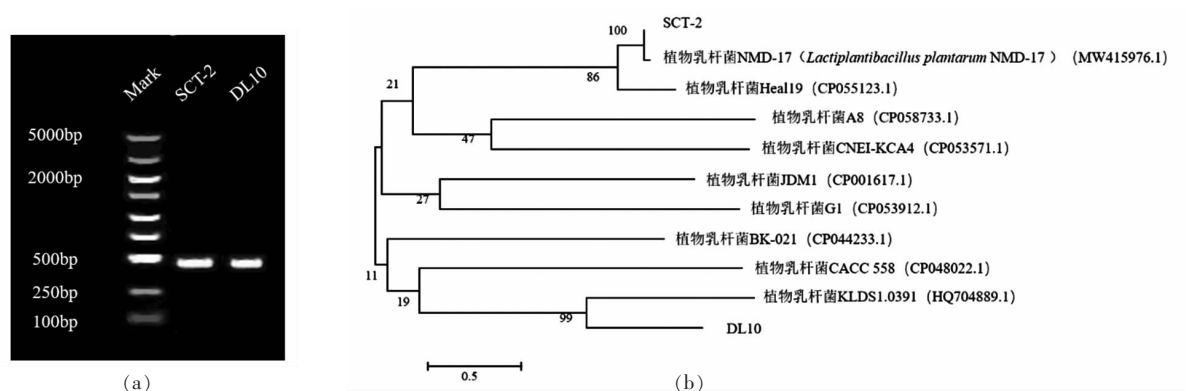
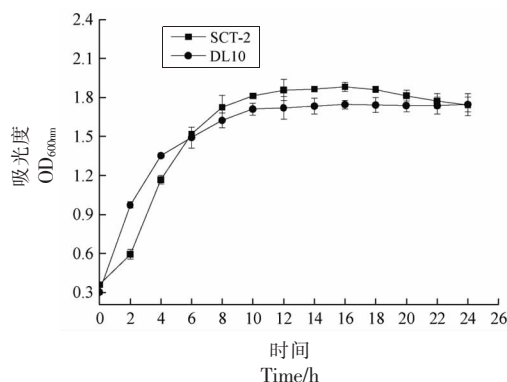
图2 *luxS* 基因扩增后电泳结果及系统发育树Fig.2 Electrophoresis results after *luxS* gene amplification and phylogenetic tree

图3 2株乳酸菌的生长曲线

Fig.3 Growth curves of two strains lactic acid bacteria

株 SCT-2 在 18 h 进入生长衰退期, 而 DL10 菌体密度相对稳定。排除生长特性的干扰即可做后续试验。

## 2.4 耐酸、耐胆盐能力

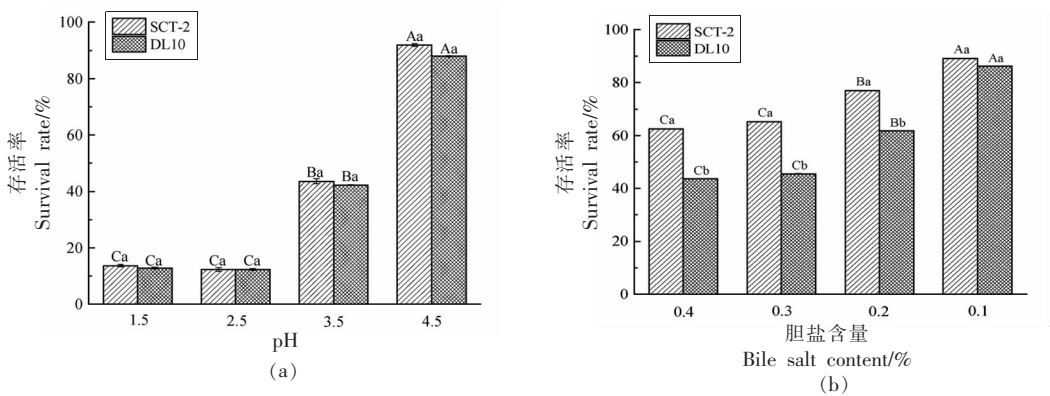
益生菌对酸和胆盐的抗性是选择新益生菌候选物的基本特性, 这种特性与菌株在胃肠道中的存活密切相关<sup>[24]</sup>。通常, 只有很少细菌可以在 pH 2.0 下存活, 一部分在 pH 3.0 下存活, 在 pH 4.0 几乎所有菌株仅可维持其初始种群的 80%<sup>[25]</sup>。图 4a 显示两株乳酸菌在不同 pH 下的存活率。两株乳酸菌在 pH 1.5 和 2.5 时, 存活率仅为 12.7% 和 13.6%。当 pH 4.5 时, 均表现出 80% 以上的存活率, 其中高产 AI-2 菌株 SCT-2 存活率高出低产 AI-2 菌株 DL10 的 8% 左右。Rogers 等<sup>[26]</sup>研究了酸胁迫条件下, 嗜酸乳杆菌 NCFM 与鼠李糖杆菌 GG 的 AI-2 活性变化规律, 发现随着 pH 的降低, AI-

2 活性显著增加, 说明酸胁迫下, 乳酸菌会产生更多 AI-2 来应对。这与本试验结果大致相似, 说明 *luxS* 基因产生的 AI-2 信号分子在抗酸胁迫中发挥了关键作用。

胆汁盐是阻碍细菌存活的另一个屏障, 也是胃肠道细菌细胞应激的主要因素<sup>[27]</sup>。虽然体外条件与体内情况不同, 但是体外耐受能力测定可以反映菌株对胆盐的抗逆性。图 4b 显示两株乳酸菌在不同胆盐含量下的存活率。两株产 AI-2 的乳酸菌随胆盐浓度的升高, 存活率显著下降。在胆盐含量为 0.1% 时, 两株乳酸菌均表现出良好的存活率。当胆盐含量为 0.3% 和 0.4% 时, 高产 AI-2 的 SCT-2 存活率为 65.2%, 高出 DL10 存活率 20%。总体看来, SCT-2 对胆盐的抗性显著高于 DL10, 说明产 AI-2 能力好的菌株, 其耐胆盐能力也更好。这与 Jiang 等<sup>[28]</sup>的研究结果相似, 植物乳杆菌 YM-4-3 在生长对数期时, 可耐受 0.4% 胆汁, 而稳定生长期只能耐受 0.2% 胆汁, 且 *luxS* 基因的表达也随植物乳杆菌 YM-4-3 的生长而减少, 表明 AI-2/LuxS 群体感应系统参与调控乳酸菌对胆盐的耐受性。

## 2.5 抑菌能力

表 1 列出两株乳酸菌对单增李斯特菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和嗜水气单胞菌抑菌的能力, 结果表明, 产 AI-2 的乳酸菌对革兰氏阴性菌和阳性菌均有不同程度的抑制能力 ( $P < 0.05$ )。低产 AI-2 的菌株 DL10 对单增李斯特菌和嗜水气单胞菌的抑菌直径为  $(15.93 \pm 0.26)$  mm 和  $(15.80 \pm 0.13)$  mm, 在 4 种指示菌中抑制率明显低于高产



注:不同大写字母表示组间差异显著( $P<0.05$ ),不同小写字母表示组内差异显著( $P<0.05$ )。

图 4 两株乳酸菌体外对酸和胆盐的耐受性分析

Fig.4 Tolerance analysis of acid and bile salt tolerance of two strains lactic acid bacteria *in vitro*

表 1 2 株乳酸菌的抑菌能力

Table 1 Bacteriostatic ability of two strains of lactic acid bacteria

菌株	抑菌直径/ mm			
	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌	单增李斯特菌	嗜水气单胞菌
SCT-2	18.96 ± 0.61 <sup>c</sup>	19.28 ± 0.47 <sup>b</sup>	17.50 ± 0.14 <sup>d</sup>	19.43 ± 0.44 <sup>a</sup>
DL10	18.59 ± 0.33 <sup>b</sup>	19.43 ± 0.77 <sup>a</sup>	15.93 ± 0.26 <sup>c</sup>	15.80 ± 0.13 <sup>d</sup>

注:不同上标小写字母表示显著性差异( $P<0.05$ )。

AI-2 的 SCT-2。SCT-2 对单增李斯特菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和嗜水气单胞菌的抑菌直径为 17.50~19.43 mm,表明高产 AI-2 信号分子的植物乳杆菌 SCT-2 具有较强的抑菌作用。

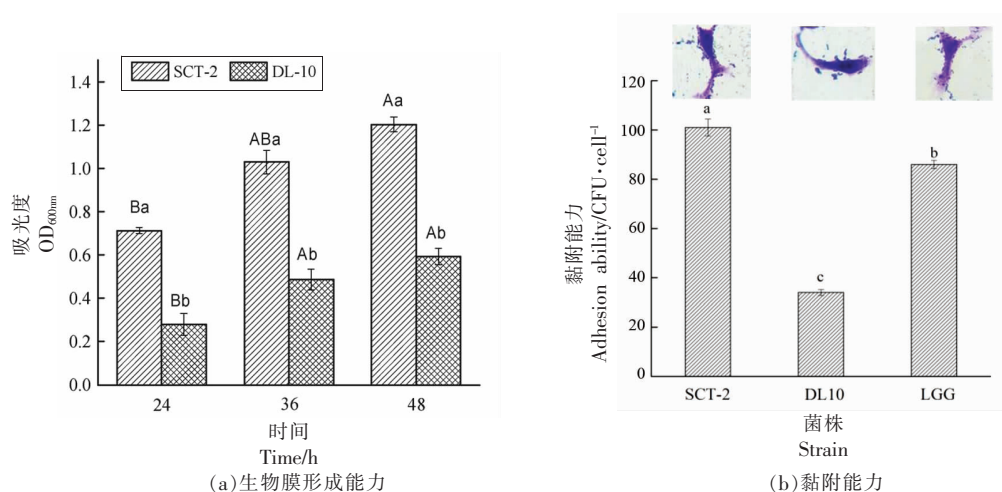
### 2.6 生物膜形成能力

生物膜是一种复杂的微生物基质。细胞和胞外多糖、蛋白质等其它有机成分附着在生物或非生物表面可形成生物膜<sup>[29]</sup>。细菌形成的成熟生物膜可以抵抗紫外线、pH 值、渗透压等外界不利因素,并降低对常规抗菌药物的敏感性。图 5a 显示两株乳酸菌在不同时间生物膜的形成能力。随着时间的延长,生物膜产量逐渐增多,且高产 AI-2 的菌株 SCT-2 在 3 个时期生物膜的形成显著高于低产 AI-2 的菌株 DL10 ( $P<0.05$ ),生物膜产量平均提高 111.4%。高产 AI-2 的 SCT-2 生物被膜形成能力更强,而低产 AI-2 的 DL10 的生物被膜形成能力较弱。E 等<sup>[30]</sup>研究显示,植物乳杆菌 LIP-1 的 AI-2 信号分子上调可促进生物膜的形成。与本研究结果相似,说明 AI-2/LuxS 群体感应系统正

向调控乳酸菌生物膜的形成。

### 2.7 Hela 细胞黏附能力测定

乳酸菌的黏附能力是发挥益生作用的首要条件<sup>[31]</sup>。苏帅等<sup>[32]</sup>以人结肠癌 HT-29 细胞为黏附模型,以黏附能力较强的鼠李糖乳杆菌 LGG 为阳性对照菌株,对乳酸菌的体外黏附能力进行评估,结果表明鼠李糖乳杆菌和长双歧杆菌单独或联合使用在 HT-29 细胞上都表现出良好的黏附性。图 5b 为 3 株乳酸菌对 Hela 细胞黏附的结果,在光镜下观察 Hela 细胞无明显变化,且所筛选的产 AI-2 乳酸菌不同程度地黏附在 Hela 细胞周围。其中高产 AI-2 乳酸菌 SCT-2 黏附数量最多,达到 102 CFU/细胞,与阳性对照相比,黏附率提高 17.4%,且达到 DL10 黏附数量的 3 倍,黏附能力最强。低产 AI-2 乳酸菌 DL10 黏附数量最少,黏附能力最差。Jia 等<sup>[33]</sup>研究表明 *luxS* 缺失的乳酸杆菌对 Ca-co-2 细胞的黏附能力降低,且 *luxS* 与乳酸杆菌对胃肠环境的高耐受性相关。这与本结果相似。推测 AI-2 产生量与乳酸菌黏附能力呈正相关。



注:不同大写字母表示组间差异显著( $P<0.05$ ),不同小写字母表示组内差异显著( $P<0.05$ )。

图5 两株乳酸菌在不同时间的生物膜形成能力和细胞黏附能力

Fig.5 Biofilm forming ability and cells adhesion ability of two strains lactic acid bacteria at different times

### 3 结论

乳酸菌具有抑菌、抗癌、改善肠道菌群等益生功能,是食品工业中的重要菌种。作为细菌种间交流的特殊信号分子 AI-2,具有调控细菌生物膜形成、相关基因的表达等生理功能。本研究筛选获得 1 株高产 AI-2 的植物乳杆菌 SCT-2 和低产 AI-2 的植物乳杆菌 DL10。通过验证确定两株植物乳杆菌中均存在调控 AI-2 合成的 *luxS* 基因。与低产 AI-2 乳酸菌比较,高产 AI-2 植物乳杆菌 SCT-2 的生物膜产量、耐酸性、耐胆盐、抑菌率与细胞黏附性等特性均有提高。综上所述,AI-2/LuxS 群体感应系统具有调控乳酸菌的生物膜形成能力、耐胆盐性、抑菌能力及细胞黏附性等益生特性。

### 参 考 文 献

- [1] MENG F Y, ZHANG F, CHEN Q D, et al. Virtual screening and in vitro experimental verification of LuxS inhibitors from natural products for *Lactobacillus reuteri*[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2022, 147: 112521.
- [2] DENG Y Y, WU J, TAO F, et al. Listening to a new language: DSF-based quorum sensing in gram-negative bacteria[J]. Chemical Reviews, 2011, 111 (1): 160-173.
- [3] 董汝月, 于晓倩, 曾名湧, 等. 细菌群体感应对细菌生物膜形成与调控的研究进展[J]. 生物加工过程, 2019, 17(3): 271-277.
- [4] DONG R Y, YU X Q, ZENG M Y, et al. Effects of quorum sensing on biofilm formation and regulation of bacteria a review[J]. Chinese Journal of Bio-process Engineering, 2019, 17(3): 271-277.
- [5] CHEN X, SCHAUDER S, POTIER N, et al. Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron[J]. Nature, 2002, 415 (6871): 545-549.
- [6] DE KEERSMAECKER S C, SONCK K, VANDERLEYDEN J. Let LuxS speak up in AI-2 signaling[J]. Trends in Microbiology, 2006, 14(3): 114-119.
- [7] RIZZELLO C G, FILANNINO P, DI CAGNO R, et al. Quorum-sensing regulation of constitutive plantaricin by *Lactobacillus plantarum* strains under a model system for vegetables and fruits[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80 (2): 777-787.
- [8] PALACHUM W, CHISTI Y, CHOORIT W. In vitro assessment of probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* WU-P19 isolated from a traditional fermented herb[J]. Annals of Microbiology, 2018, 68 (2): 79-91.
- [9] 贾芳芳, 孙思睿, 孟祥晨. *luxS* 基因介导乳酸菌益生特性研究进展[J]. 中国酿造, 2017, 36(12): 5-9.
- [10] JIA F F, SUN S R, MENG X C. Research progress on probiotic characteristics of lactic acid bacteria mediated by *luxS* gene[J]. China Brewing, 2017, 36 (12): 5-9.

- [9] BUCK B L, AZCARATEPERIL M A, KLAENHAMMER T R. Role of autoinducer-2 on the adhesion ability of *Lactobacillus acidophilus*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 107(1): 269-279.
- [10] LEBEER S, CLAES I, VERHOEVEN T, et al. Impact of *luxS* and suppressor mutations on the gastrointestinal transit of *Lactobacillus rhamnosus* GG[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(15): 4711-4718.
- [11] MOSLEHI-JENABIAN S, GORI K, JESPERSEN L, et al. AI-2 signalling is induced by acidic shock in probiotic strains of *Lactobacillus spp.*[J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 135(3): 295-302.
- [12] 燕彩玲, 李博, 顾悦, 等. 信号分子 AI-2 的检测方法研究进展[J]. 微生物学通报, 2016, 43(6): 1333-1338.
- YAN C L, LI B, GU Y, et al. Methods for the determination of autoinducer-2—a review[J]. Microbiology China, 2016, 43(6): 1333-1338.
- [13] 曹素芳, 吴迪, 孔兰芳, 等. 奶牛隐性乳房炎致病性大肠杆菌 AI-2 信号分子检测[J]. 中国兽医杂志, 2018, 54(8): 9-12.
- CAO S F, WU D, KONG L F, et al. Detection AI-2 of pathogenic *Escherichia coli* isolated from bovine subclinical mastitis [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2018, 54(8): 9-12.
- [14] 张腾, 贺银凤. 坚强肠球菌 SQ-3-2 基于 *LuxS* 群体感应系统信号分子 AI-2 的检测及方法优化[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(2): 168-173.
- ZHANG T, HE Y F. Detection of the *Lux S*-mediated quorum-sensing system signal autoinducer-2 of *Enterococcus durans* SQ -3 -2 and optimize the methods[J]. Food and Fermentation Industries, 2013, 39(2): 168-173.
- [15] 张腾. 植物乳杆菌 HE-1 在共培养中产抑菌物质与 *LuxS/AI-2* 群体感应现象关系的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2014.
- ZHANG T. Study on relationship between production of antibacterial substances and *LuxS/AI-2* mediated quorum sensing system in *lactobacillus plantarum* He-1 co-culture with LABs[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2014.
- [16] 王帅静, 李啸, 刘玲彦, 等. 西藏牦牛粪和乳源中益生菌的筛选与鉴定[J]. 中国酿造, 2021, 40(7): 43-48.
- WANG S J, LI X, LIU L Y, et al. Screening and identification of probiotics from yak dung and milk in Tibet[J]. China Brewing, 2021, 40(7): 43-48.
- [17] 赵芳, 李艳琴, 李彬春. 模拟人体胃肠道环境筛选益生乳杆菌[J]. 微生物学通报, 2016, 43(6): 1396-1403.
- ZHAO F, LI Y Q, LI B C. Screening of probiotic *Lactobacillus* in simulated gastrointestinal environment[J]. Microbiology China, 2016, 43(6): 1396-1403.
- [18] 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.
- [19] 孙梦桐, 吕欣然, 崔天琦, 等. 鱼类肠道中抑制哈维氏弧菌群体感应及生物膜形成的乳酸菌的筛选和鉴定[J]. 中国食品学报, 2020, 20(8): 255-263.
- SUN M T, LÜ X R, CUI T Q, et al. Screening and identification of lactic acid bacteria with inhibitory activity of quorum sensing and biofilm of *Vibrio harveyi* from fish intestine[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(8): 255-263.
- [20] 张汝京, 胡亚凡, 海丹, 等. 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[J]. 食品工业科技, 2019, 40(20): 133-139.
- ZHANG R J, HU Y F, HAI D, et al. Screening and identification of probiotic *Lactobacillus* strains inhibiting intestinal pathogens and adhering to Caco-2 cells[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(20): 133-139.
- [21] SCILLATO M, SPITALE A, MONGELLI G, et al. Antimicrobial properties of *Lactobacillus* cell-free supernatants against multidrug-resistant urogenital pathogens [J]. Microbiology Open, 2021, 10(2): e1173.
- [22] 胡鹏钰. 母婴来源乳酸菌的筛选及对发酵乳品质影响的研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2021.
- HU P Y. Screening of lactic acid bacteria from breast milk and baby infant and the effect of fermented milk quality[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2021.



- [23] 蔡针华. 群体感应信号分子 AI-2 高产乳酸菌株筛选及特性研究[D]. 太原: 山西师范大学, 2018.
- CAI Z H. Screening and characterization research of quorum sensing signaling molecule AI-2 high-yield *Lactobacillus* strains[D]. Taiyuan: Shanxi Normal University, 2018.
- [24] WON S M, CHEN S, PARK K W, et al. Isolation of lactic acid bacteria from kimchi and screening of *Lactobacillus sakei* ADM14 with anti-adipogenic effect and potential probiotic properties[J]. LWT- Food Science and Technology, 2020, 126: 109296.
- [25] NEZHAD S J E, DOVOM M R E, NAJAFI M B H, et al. Technological characteristics of *Lactobacillus* spp. isolated from Iranian raw milk Motal cheese [J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 133: 110070.
- [26] ROGERS P D, LIU T T, BARKER K S, et al. Gene expression profiling of the response of *Streptococcus pneumoniae* to penicillin[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2007, 59(4): 616-626.
- [27] BEGLEY M, GAHAN C G M, HILL C. The interaction between bacteria and bile[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2005, 29(4): 625-651.
- [28] JIANG L M, LUO Y Y, CAO X B, et al. LuxS quorum sensing system mediating *Lactobacillus plantarum* probiotic characteristics[J]. Archives of Microbiology, 2021, 203(7): 1-8.
- [29] AZAMI S, AREFIAN E, KASHEF N. Postbiotics of *Lactobacillus casei* target virulence and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* by modulating quorum sensing[J]. Archives of Microbiology, 2022, 204(2): 1-19.
- [30] E J J, MA R Z, CHEN Z C, et al. Improving the freeze-drying survival rate of *Lactobacillus plantarum* LIP-1 by increasing biofilm formation based on adjusting the composition of buffer salts in medium[J]. Food Chemistry, 2021, 338: 128134.
- [31] YU Y X, ZONG M L, LAO L F, et al. Adhesion properties of cell surface proteins in *Lactobacillus* strains in the GIT environment[J]. Food & Function, 2022, 13(6): 3098-3109.
- [32] 苏帅, 孙会, 于航宇, 等. 鼠李糖乳杆菌的生物学功能[J]. 动物营养学报, 2019, 31(1): 97-101.
- SU S, SUN H, YU H Y, et al. Biological function of *Lactobacillus rhamnosus* [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2019, 31(1): 97-101.
- [33] JIA F F, ZHENG H Q, SUN S R, et al. Role of luxS in stress tolerance and adhesion ability in *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0391 [J]. Biomed Research International, 2018, 2018(3): 1-10.

### Screening of Lactic Acid Bacteria in Chinese Traditional Pickled Vegetables with High Production of AI-2 Signal Molecule and Its Probiotic Properties

Lü Xinran<sup>1</sup>, Liu Xueqing<sup>1</sup>, Gu Zhenchen<sup>1</sup>, Lü Mengmin<sup>1</sup>, Li Jianrong<sup>1\*</sup>, Tan Xiqian<sup>1</sup>, Cui Fangchao<sup>1</sup>, Bai Fengling<sup>1</sup>, Yu Zhanfu<sup>2</sup>, Shen Ronghu<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>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, College of Food Science and Engineering of Bohai University, Jinzhou 121013, Liaoning)

<sup>2</sup>Hangzhou Xiaoshan Agriculture Development Co., Ltd., Hangzhou 311215)

**Abstract** LuxS/AI-2, as an interspecific communication quorum sensing (QS) system, is commonly found in lactic acid bacteria (LAB), which can regulate the probiotic properties of LAB, including biofilm formation, acid tolerance, bile salt tolerance, cells adhesion. In this study, LAB with production of AI-2 signal molecule was screened using strain *Vibrio harveyi* BB170 reporting method. The expression of luxS gene was detected by PCR sequencing. Moreover, the probiotic properties of high-yield AI-2 LAB were evaluated by acid resistance, bile salt resistance, antibacterial and cells adhesion. The results showed that ten strains of LAB producing AI-2 were screened from two hundred strains LAB. Among them, *Lactobacillus plantarum* SCT-2 had strong ability to produce AI-2 signal molecule. The luxS gene was further verified exist in strain SCT-2. The survival rates of acid and bile salt resistant in strain SCT-2 were 14%-92% and 63%-89%, respectively. The antibacterial diameter of strain SCT-2 ranged from 17.50 mm to 19.43 mm. The number of adhe-



sion cells of strain SCT-2 was 102 CFU/cell. Compared to LAB with low production AI-2, the biofilm formation, acid tolerance, bile salt tolerance, inhibitory rate and cell adhesion of strain SCT-2 increased by 111.4%, 8%, 15%, 26.7% and 197%, respectively. These results indicated that *luxS* gene was the key gene of AI-2 signal synthesis. LuxS/AI-2 quorum sensing system improves the biofilm forming ability, acid tolerance, bile salt tolerance antibacterial ability and cells adhesion of LAB. It will provide a theoretical basis for the development of LAB biological agent with good probiotic properties.

**Keywords** *Lactobacillus plantarum*; quorum sensing; AI-2 signal molecule; probiotic properties