

泡菜中产 β -葡萄糖苷酶植物乳杆菌的益生和酶学特性

檀茜倩¹, 程笑笑¹, 崔方超¹, 王当丰¹, 吕欣然¹, 俞张富², 沈荣虎², 励建荣^{1*}

(¹ 渤海大学食品科学与工程学院 辽宁锦州 121013

² 杭州萧山农业发展有限公司 杭州 311215)

摘要 乳酸菌因自身特性和分泌多种代谢物而在发酵过程中起重要的作用。从泡菜中筛选出 2 株高产 β -葡萄糖苷酶乳酸菌,经 16S rRNA 基因测序比对后均鉴定为植物乳杆菌(命名为 PC7-C6 和 PC7-C11)。随后对 2 菌株的益生特性以及酶产量较高的 PC7-C11 的酶学特性进行分析。结果显示:2 菌株为 γ -溶血,对氨苄西林、克拉霉素敏感,对四环素、红霉素和克林霉素中度敏感;可在 pH 4 条件下生长;培养 8 h 后自聚集率在 50%~64%范围,与大肠杆菌共聚集率均大于 60%;对乙酸乙酯的疏水率分别为 70.41%,61.19%,对二甲苯和正己烷的疏水率在 30%~40%范围;能够抑制大肠杆菌、蜂房哈夫尼菌、腐生葡萄球菌、粘质沙雷氏菌和马胃葡萄球菌等细菌的生长;PC7-C11 的抗氧化能力优于 PC7-C6,PC7-C11 对 DPPH 自由基清除率和羟自由基清除率分别为 59.33%和 53.49%。植物乳杆菌 PC7-C11 菌株酶活力的最适反应温度 40℃、最适 pH 值 7,乙醇、葡萄糖、二甲基亚砜、SDS、EDTA、Fe²⁺、Mg²⁺、Na⁺、Ca²⁺会不同程度地抑制酶活,K⁺对酶活力有一定的促进作用。

关键词 植物乳杆菌; β -葡萄糖苷酶;益生菌;酶活力;抗氧化;抑菌

文章编号 1009-7848(2024)09-0069-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.09.007

β -葡萄糖苷酶(β -D-Glucosidase, EC3.2.1.21)是一种水解芳香化合物非挥发性糖基化前体的关键酶,在食品工业生产中具有非常重要的作用。 β -葡萄糖苷酶的存在可以丰富发酵食品的香气组成,改善发酵食品的风味^[1-2]。有研究发现,在葡萄酒酿造过程中,包括孢汉逊酵母(*Hanseniaspora uvarum*)、膜醭毕赤酵母(*Pichia membranifaciens*)等多种非酿酒酵母具有不同程度的 β -葡萄糖苷酶分泌能力,可催化水解 C13-降异戊二烯和部分萜烯醇的芳香糖苷,对葡萄酒的增香作用明显,赋予葡萄酒更多花香、甜味、浆果和坚果香等香气特征^[3]。 β -葡萄糖苷酶还可作为添加剂,加入茶饮料中,在水解葡萄苷过程中释放更多的芳香醇、苯乙醇和香叶醇等游离化合物,增加了液态发酵黑茶的草木风味、花香以及甜味^[4]。除了改善和提升发酵饮料的风味, β -葡萄糖苷酶可用于活性物质的生产。例如:利用固定化后的 β -葡萄糖苷酶,提升对木质纤维素的降解能力,以增加生物乙醇的产量^[5]。 β -葡萄糖苷酶参与转糖基化反应制备低聚龙胆糖等一些活性多糖,使反应具有条件温和、安

全、污染小、成本低、易分离等优点^[6]。

植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)是发酵食品中一种常见乳酸菌,目前已证实具有抗氧化、抑菌、改善营养和风味等功能特性^[7]。植物乳杆菌具有分泌 β -葡萄糖苷酶的能力^[8]。Izaguirre 等^[9]发现高产 β -葡萄糖苷酶植物乳杆菌 128/2 可将豆浆中的异黄酮糖苷酶解为异黄酮糖苷元,促进人体对异黄酮的吸收。另一种植物乳杆菌 P8 可将芝麻中的芝麻氨基醇苷(芝麻甾醇三酸糖苷)转化为苷元(芝麻甾醇),增加芝麻的抗氧化功能活性,提高芝麻的生物利用率^[10]。不同来源的植物乳杆菌分泌的 β -葡萄糖苷酶在结构和功能上存在差异。本研究以云南泡菜汁为来源,筛选到 2 株高产 β -葡萄糖苷酶的植物乳杆菌,对菌株益生特性及其所产 β -葡萄糖苷酶的特性进行评价和分析,以期为泡菜源产 β -葡萄糖苷酶的植物乳杆菌资源开发和应用提供一定参考。

1 材料和方法

1.1 主要材料和仪器

本研究所用的主要培养基:MRS 培养基、LB 培养基,北京奥博星生物技术有限公司;初筛培养基:在 MRS 培养基的基础上添加 0.3%七叶苷和

收稿日期:2023-09-12

第一作者:檀茜倩,女,博士,讲师

通信作者:励建荣 E-mail: lij6491@163.com

0.05%柠檬酸铁铵。主要试剂:七叶苷、枸橼酸铁铵、pNP、p-NPG、醋酸钠、冰醋酸,上海源叶生物有限公司;其它试剂(分析纯),天津光复有限公司。指示菌:蜂房哈夫尼菌(*Hafnia alvei*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、腐生葡萄球菌(*Staphylococcus saprophyticus*)、蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*)和马胃葡萄球菌(*Staphylococcus equorum*),本实验室保存。

所采用的主要设备有:DL-CJ-2N 超级洁净工作台,北京市东联哈尔仪器制造有限公司;UV-2550 紫外可见分光光度仪,岛津仪器(苏州)有限公司;MS105DU 电子分析天平,瑞士梅特勒-托利多公司;Thermo Sorvall Legend Micro21R 台式微量离心机,美国赛默飞世尔科技公司;LRH-250A 型生化培养箱,上海一恒科技有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株的分离纯化 首先对样品中产 β -葡萄糖苷酶乳酸菌进行初筛:称取 10 g 样品于 90 mL 生理盐水,均质混匀,吸取 1 mL 梯度稀释,取 100 μ L 各梯度稀释液于初筛培养基涂布,37 $^{\circ}$ C 培养 24~48 h,选取具有颜色变化的菌株进行下一步研究。对初筛后的菌株进行复筛,参考冯程程等^[1]的方法稍作修改,具体步骤为:将过夜培养的发酵菌液于 4 $^{\circ}$ C 6 000 r/min 离心 10 min,去上清,生理盐水洗涤 2 次后,加入 1 mL 生理盐水混匀作为粗酶液;取 100 μ L 粗酶液加入 1.8 mL 乙酸-乙酸钠缓冲液(pH=5)于 37 $^{\circ}$ C 水浴 5 min,加入 100 μ L 20 mmol/L p-NPG,反应 30 min 后加入 1 mL 1 mol/L Na_2CO_3 溶液终止反应;使用 100 μ L 缓冲液替代粗酶液制备空白组,离心除去菌体,于 OD_{400nm} 测定吸光值。酶单位(U)定义为在上述条件下,每分钟催化生成 1 μ mol 对硝基苯酚所需的酶量即为 1 个酶活力单位。酶活力的计算如公式(1)所示:

$$U = (C \times V) / (t \times 0.1) \times N \quad (1)$$

式中: U 为酶活力单位, U/mL; C 为对硝基苯酚(p-NP)的浓度, mmol/L; V 为反应体系的体积, mL; N 为原酶液稀释倍数; t 为反应时间, min; 0.1 为所取上清液或细胞液的体积。选取酶活力较高的菌株对其进行鉴定。

1.2.2 菌株形态观察及鉴定 取分离纯化菌株于 MRS 培养基划线培养,采用革兰氏染色法在光学显微镜观察其形态。使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取菌株 DNA,以此 DNA 为模板,27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 作为引物进行 PCR 扩增,扩增条件为:95 $^{\circ}$ C、30 s;58 $^{\circ}$ C、30 s;72 $^{\circ}$ C、90 s,35 次循环;72 $^{\circ}$ C、5 min。扩增产物纯化后进行测序(上海生工),测序结果通过与 NCBI 数据库的 BLASTN 工具进行对比分析,并使用 MEGA 7.0 软件构建系统发育树。

1.2.3 菌株益生特性

1.2.3.1 溶血性分析 将所分离菌株于含 5% 羊血的哥伦比亚血琼脂平板划线,37 $^{\circ}$ C 培养 48 h,观察菌株在平板上的溶血情况^[12]。

1.2.3.2 抗生素敏感性分析 采用纸片扩散法评估菌株的抗生素敏感性。选择 12 种抗生素:青霉素(10 μ g)、四环素(30 μ g)、氨苄西林(10 μ g)、诺氟沙星(10 μ g)、卡那霉素(30 μ g)、克拉霉素(15 μ g)、庆大霉素(10 μ g)、链霉素(10 μ g)、红霉素(15 μ g)、氯霉素(30 μ g)、克林霉素(2 μ g)、万古霉素(30 μ g)。

1.2.3.3 菌株对酸耐受性分析 菌株对酸耐受性分析根据 Xu 等^[13]的方法并稍加修改。将活化菌株按 2% 接种量分别接种至含不同 pH 值(pH 2、pH 3、pH 4、pH 5)的 MRS 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养 24 h,分别在每 2 h 于 OD_{600nm} 处测定吸光值。

1.2.3.4 自聚集和共聚集特性分析 对菌株自聚集和共聚集能力的分析^[14]:菌株于 6 000 r/min 离心 10 min 收集沉淀;用 PBS(pH 7.2)清洗 2 次并重悬,涡旋 10 s,调整 OD_{600nm} 为 0.5,记为 OD₁;将待测菌株菌悬液于 37 $^{\circ}$ C 培养,每隔 2 h 取上清液于 OD_{600nm} 测定吸光值,记为 OD₂。自动聚集计算公式如下(2)所示:

$$\text{自动聚集率}(\%) = [(OD_1 - OD_2) / OD_1] \times 100 \quad (2)$$

式中:OD₁ 为待测菌株菌悬液在 0 h 的吸光值;OD₂ 为待测菌株菌悬液培养后的吸光值。

以大肠杆菌作为指示菌对所分离菌株与致病菌的共聚集能力进行分析:同上方法制备待测菌株菌悬液,记为 OD₁;大肠杆菌菌悬液,记为 OD₂;待测菌株菌悬液与大肠杆菌菌悬液各取 2 mL,混

合涡旋 10 s, 记为 OD_3 。每隔 2 h 取上清液于 OD_{600nm} 测定吸光值, 共聚集率计算公式如(3)所示:

$$\text{共聚集率}(\%) = [1 - OD_3 / (OD_1 + OD_2) / 2] \times 100 \quad (3)$$

式中: OD_1 、 OD_2 分别为待测菌株和大肠杆菌悬液在 0 h 的吸光值; OD_3 为待测菌株和大肠杆菌悬液混合处理后的吸光值。

1.2.3.5 表面疏水性分析 菌株表面疏水性测定依据 Klayraung 等^[15]的方法, 并适当修改。取过夜培养菌液, 于 6 000 r/min 离心 10 min, 收集沉淀, 使用 50 mmol/L K_2HPO_4 (pH 6.5) 清洗 2 次, 并重悬使其 OD_{560nm} 在 0.8~1.0 制成待测菌株菌悬液, 记为 OD_1 。取 1 mL 二甲苯、正己烷、乙酸乙酯 3 种有机溶剂分别与 3 mL 的待测菌株菌悬液混合, 并将混合物涡旋 120 s。37 °C 培养 3 h 以分离两相, 于 OD_{560nm} 测量水相的吸光值, 记为 OD_2 。疏水性计算的公式如公式(4)所示:

$$\text{表面疏水性}(\%) = (1 - OD_2 / OD_1) \times 100 \quad (4)$$

式中: OD_1 为待测菌株菌悬液初始吸光值; OD_2 为水相吸光值。

1.2.4 菌株的抑菌能力测定 采用牛津杯法测定菌株的抑菌能力。过夜培养菌液经离心、过滤膜后获得上清液, 指示菌蜂房哈夫尼菌、大肠杆菌、粘质沙雷氏菌、金黄色葡萄球菌、腐生葡萄球菌、蜡样芽胞杆菌和马胃葡萄球菌分别稀释至合适浓度; 取牛津杯置于带有琼脂培养基的平板上, 将已接种指示菌的培养基倒入平板, 待培养基凝固, 取出牛津杯, 取 150 μ L 待测菌液于相应牛津杯孔洞中, 并以加入水的牛津杯设为对照组, 于 37 °C 培养 24 h, 培养结束后观察其抑菌圈大小。

1.2.5 菌株的抗氧化能力分析 菌株 DPPH 自由基清除能力测定参考 Rajoka 等^[16]方法。将 100 μ L 发酵上清液与 100 μ L 0.2 mmol/L DPPH 乙醇溶液混合, 采用 1 mL 的 PBS 缓冲液 (0.01 mol/L, pH 7.2) 替代发酵上清液设为对照组, 室温下避光培养 30 min。于 OD_{517nm} 处测定吸光值, DPPH 自由基清除能力计算公式如(5)所示:

$$\text{DPPH 自由基清除能力}(\%) = [1 - (OD_1 / OD_2)] \times 100 \quad (5)$$

式中: OD_1 为样品的吸光值; OD_2 为对照组的吸光值。

羟自由基清除能力测定参考 Javed 等^[17]方法,

稍作修改。分别取 2 mL PBS (pH 7.4)、1 mL 0.25 mmol/mL 邻二氮菲溶液、1 mL 0.75 mmol/L 的 $FeSO_4$ 溶液、1 mL 的发酵上清液混合, 后加入 1 mL H_2O_2 (12%) 在 37 °C 下反应 60 min。加入相同体积 PBS 溶液替换发酵上清液制备对照, 同时, 加入水代替发酵上清和反应混合物中所有其它成分制备空白组。于 OD_{536nm} 处测定吸光值。羟自由基清除能力计算公式如(6)所示:

$$\text{羟自由基清除能力}(\%) = [(OD_1 - OD_0) / (OD_2 - OD_0)] \times 100 \quad (6)$$

式中: OD_1 为样品的吸光值; OD_0 为对照组的吸光值; OD_2 为空白组的吸光值。

1.2.6 菌株产 β -葡萄糖苷酶活性分析

1.2.6.1 温度对酶活力的影响 酶反应最适温度的确定。将粗酶液与反应底物分别置于 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 °C 不同温度下反应 30 min, 测定 β -葡萄糖苷酶活力, 以最适温度下的酶活性为 100%, 计算相对酶活。

酶热稳定性分析。将粗酶液于 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 °C 不同温度下恒温孵育 6 h, 每间隔 1 h 测定一次酶活力, 以相同温度条件下未经恒温孵育酶溶液的酶活力为 100%, 计算相对酶活。

1.2.6.2 pH 值对酶活力的影响 酶反应最适 pH 值的确定。将粗酶液置于 pH 值为 3, 4, 5, 6, 7, 8 的不同 pH 缓冲液中进行反应确定 pH 值对酶活力的影响, 所用缓冲溶液为乙酸-乙酸钠缓冲溶液 (pH 3~5)、柠檬酸-磷酸氢二钾缓冲溶液 (pH 6~8), 于最适温度下反应 30 min, 测定 β -葡萄糖苷酶活力, 以最适 pH 值下的酶活性为 100%, 计算相对酶活。

酶活力的 pH 稳定性分析。将粗酶液在不同 pH 值 (pH 3~8) 缓冲液中 4 °C 孵育 12 h, 于最适温度下反应 30 min, 测定 β -葡萄糖苷酶活力, 以相同 pH 条件下未经孵育酶溶液的酶活力为 100%, 计算相对酶活。

1.2.6.3 乙醇对酶活力的影响 在反应体系中加入终体积比为 2%, 4%, 6%, 8%, 10%, 12% 的无水乙醇, 于最适温度和最适 pH 值下反应 30 min, 测定 β -葡萄糖苷酶活力, 以未添加乙醇酶溶液的酶活力为 100%, 计算相对酶活。

1.2.6.4 葡萄糖对酶活力的影响 在反应体系中加入不同浓度(0~2 500 mmol/L)葡萄糖,于最适温度和 pH 值下反应 30 min,测定 β -葡萄糖苷酶活力,以未添加葡萄糖酶溶液的酶活力为 100%,计算相对酶活。

1.2.6.5 金属离子和其它试剂对酶活力的影响 在反应体系中加入终浓度为 5 mmol/L 的 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Mg^{2+} 、 Na^{2+} 、EDTA、SDS 和 5%(体积分数)二甲亚砜,于最适温度和 pH 值下反应 30 min,测定 β -葡萄糖苷酶活力,以未添加金属离子或化学试剂的酶溶液酶活力为 100%,计算相对酶活。

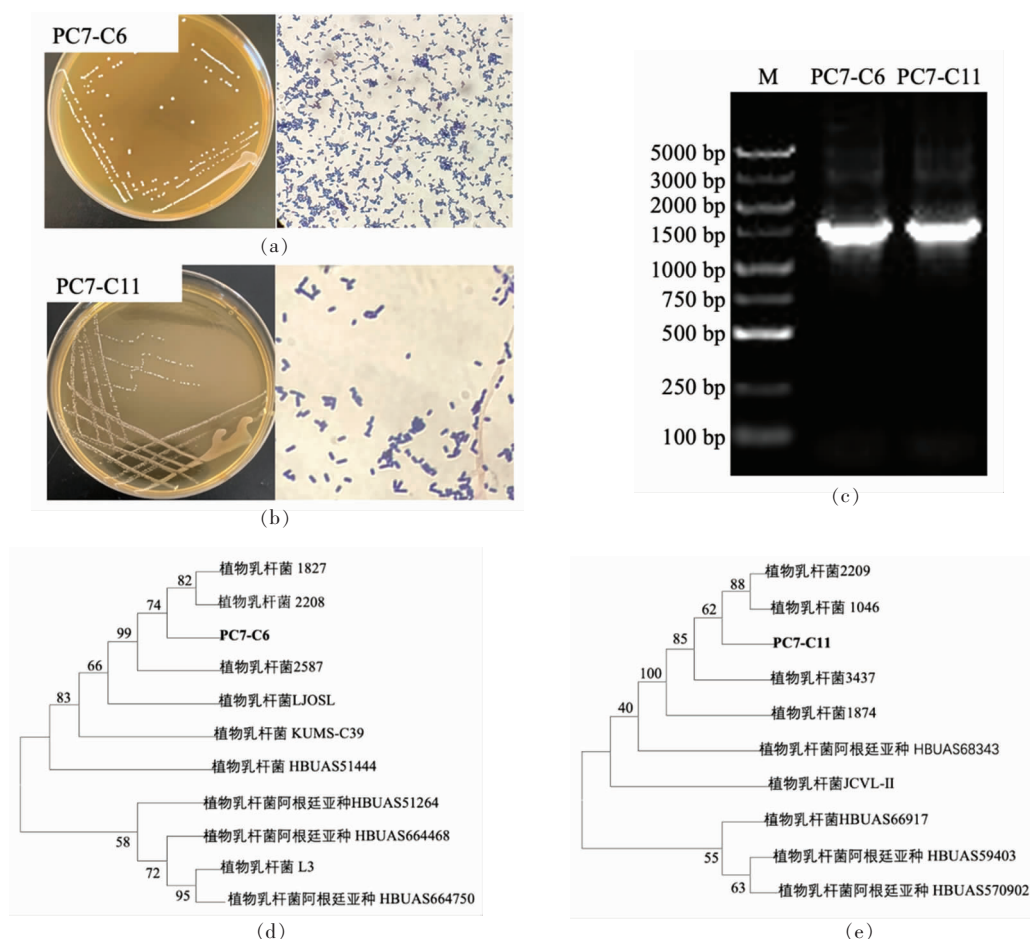
1.2.7 数据处理 所有试验组均独立重复 3 次,

试验结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 origin 8 作图,SPSS 22.0 进行统计分析。

2 结果

2.1 菌株筛选、形态学观察及鉴定

筛选出 2 株高产 β -葡萄糖苷酶菌株 PC7-C6 和 PC7-C11(图 1a~1b)。经形态学观察见 PC7-C6 乳白色,边缘整齐;PC7-C11 菌落小,边缘不太整齐,表面光滑湿润;革兰氏阳性,杆状;16S rDNA 基因检测均在 1 500 bp 处出现条带(图 1c);系统发育树结果(图 1d~1e)显示 2 菌株与植物乳杆菌亲缘性关系最近。



注:a、b 为 PC7-C6 和 PC7-C11 菌株形态学和革兰氏染色图;c 为分离菌株 16S rDNA PCR 产物电泳图;d、e 为 PC7-C6 和 PC7-C11 菌株系统发育树。

图 1 分离菌株形态学、革兰氏染色和 16S rDNA PCR 产物及比对结果

Fig.1 Strain morphology, gram staining images, and DNA gel electrophoresis 16S rDNA PCR products

2.2 菌株溶血和抗生素敏感性分析

溶血性是菌株安全性评价的重要指标之一,

结果显示分离 2 菌株为 γ -溶血^[18]。由于菌株的抗生素耐药基因有可能随菌株发生水平转移,因此

需要对菌株的抗生素敏感性进行分析^[19-20]。结果如表 1 所示,2 菌株均对氨苄西林、克拉霉素表现为敏感,对四环素、红霉素和克林霉素表现为中度敏感,对诺氟沙星、卡那霉素、庆大霉素、链霉素和万古霉素表现为不敏感,此外 PC7-C6 对青霉素和氯霉素敏感;PC7-C11 对青霉素表现为中度敏感。

2.3 菌株酸耐受性分析

细菌对低 pH 值的耐受性是在其胃肠道内生存的关键。2 菌株耐酸性如图 2 所示,菌株在 pH 2 和 pH 3 的培养基中几乎不生长,在 pH 4 时菌株可以生长;与对照相比,菌株在 pH 5 条件下可以很好地生长,表现出随 pH 值增大菌株活力增强。

2.4 菌株自聚集和共聚集特性

细菌的聚集能力与其对肠道的黏附、定殖和保护相关;乳酸菌与致病微生物的共聚集能抑制病原微生物的定殖,进而影响其毒力的发挥^[21-22]。分离菌株自聚集率与大肠杆菌的共聚集率如图 3 所示。2 菌株的聚集能力随着培养时间的延长而提高,自聚集率在 14%~64%之间,与大肠杆菌共聚集率在 42%~67%之间,且聚集率均在 8 h 后达到最高,均在 50%以上,最高自聚集率和共聚集率 PC7-C6 为 (51.68 ± 4.440)%、(63.87 ± 1.640)%, PC7-C11 为 (65.21 ± 0.340)%、(66.44 ± 1.257)%。有研究显示从奶酪中分离的短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)、干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)、植物乳杆菌(*L. plantarum*)和嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)等 7 株乳酸菌的自聚集率在

表 1 分离菌株的溶血和抗生素敏感性

Table 1 Hemolysis and antibiotic sensitivity of isolated strains

溶血性/抗生素	菌株	
	PC7-C6	PC7-C11
溶血性	γ	γ
青霉素	++	+
四环素	+	+
氨苄西林	++	++
诺氟沙星	-	-
卡那霉素	-	-
克拉霉素	++	++
庆大霉素	-	-
链霉素	-	-
红霉素	+	+
氯霉素	++	+
克林霉素	+	+
万古霉素	-	-

注:抗生素敏感性由培养皿上菌株抑制区域的直径(*d*)决定。
+:5≤*d*<15 mm; ++:15≤*d*≤30 mm; +++:*d*>30 mm;-:不敏感。

8%~20%之间,与大肠杆菌的共聚集率在 10%~40%之间^[23],低于本研究所分离植物乳杆菌。

2.5 菌株表面疏水性

细菌疏水性主要通过细菌与碳氢化合物的亲和能力评价^[24]。具有较高疏水性值菌株有助于细胞黏附,易于在黏膜表面定植^[25]。菌株疏水率如表 2 所示,2 菌株均对乙酸乙酯疏水性较高,分别为 (70.41±3.93)%、(61.19±0.994)%,这可能与植物乳杆菌对酸性有机溶剂的黏附性大于碱性溶剂有

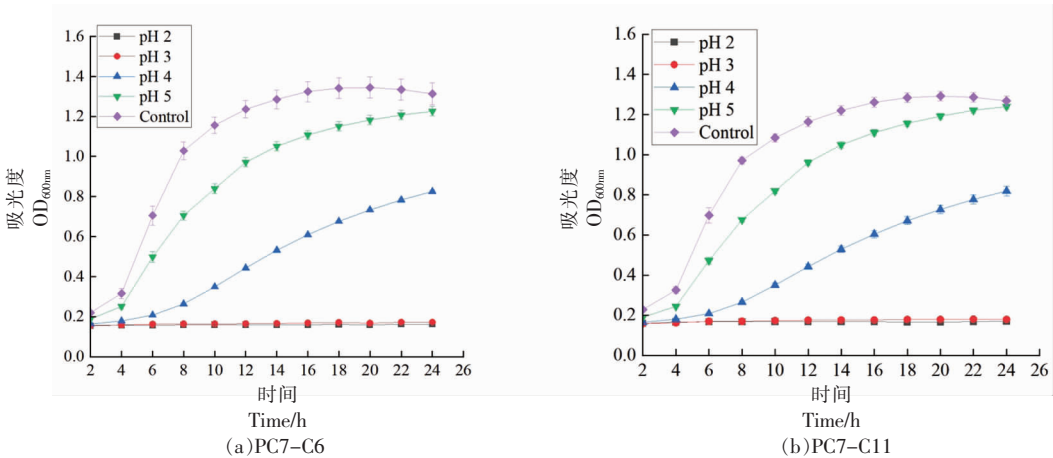
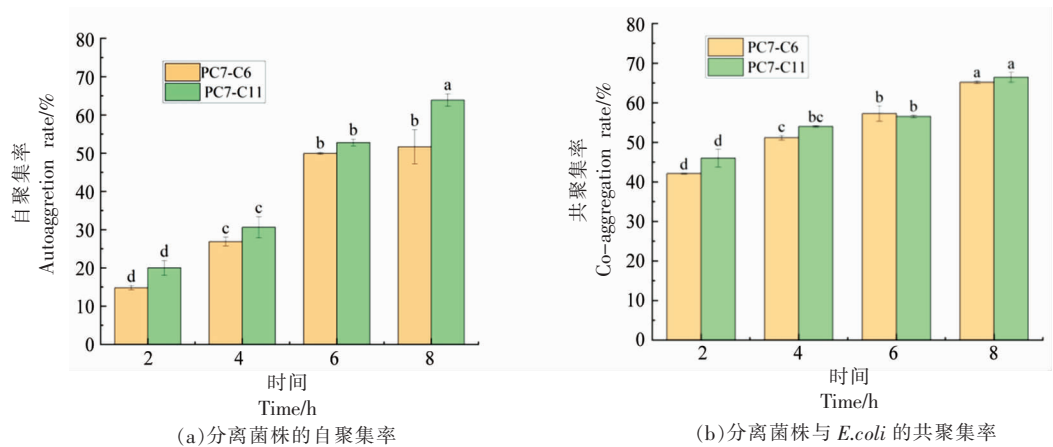


图 2 分离菌株的耐酸性

Fig.2 Acid resistance of isolated strains



注:不同字母表示各组间存在显著性差异($P<0.05$)。

图3 分离菌株的聚集率

Fig.3 The aggregation rate of the isolates

表2 分离菌株的疏水率

Table 2 The hydrophobic rate of the isolates

菌株	疏水率/%		
	二甲苯	正己烷	乙酸乙酯
PC7-C6	33.17 ± 0.862 ^d	45.85 ± 5.136 ^c	70.41 ± 3.93 ^a
PC7-C11	40.87 ± 1.367 ^{cd}	35.22 ± 0.378 ^{de}	61.19 ± 0.994 ^b

注:不同字母表示各组间存在显著性差异($P<0.05$)。

关^[26-27];PC7-C6对二甲苯的疏水作用大于正己烷,PC7-C6相反。

2.6 菌株抑菌和抗氧化能力分析

乳酸菌在生长的过程中可能分泌乙酸、细菌素类等抑菌活性物质^[28],这些物质对抑制肠道中致病微生物的增殖以及维持肠道健康起到非常重要的作用^[29]。研究发现2菌株均对大肠杆菌、蜂房哈夫尼菌、马胃葡萄球菌、粘质沙雷氏菌和腐生葡萄球菌均有一定程度的抑制作用(表3),其中对马胃葡萄球菌抑制能力最强,对大肠杆菌的抑菌能力最弱,且PC7-C11对腐生葡萄球菌的抑制能力优于PC7-C6;分离菌株对金黄色葡萄球菌和蜡样芽孢杆菌均无抑制作用。

抗氧化能力也可作为评价菌株是否具有益生功能的一个重要指标^[30]。DPPH和羟自由基是常见自由基,会造成细胞损伤^[31]。由表3可知,分离菌株对DPPH自由基的清除率分别为(59.33±0.221)%、(57.54±0.542)%,羟自由基清除率分别为(53.49±0.025)%、(40.45±4.262)%;菌株的抗氧化能力可能与其产生的胞外多糖^[32-33]、阿魏酸^[34]等

表3 分离菌株抑菌活性和抗氧化能力

Table 3 The antibacterial activity and antioxidant activities of the isolates

指示菌	抑菌圈直径/mm	
	PC7-C6	PC7-C11
大肠杆菌	8.92 ± 0.070 ^d	9.05 ± 0.105 ^d
蜂房哈夫尼菌	15.99 ± 1.000 ^{bc}	15.03 ± 0.320 ^c
腐生葡萄球菌	15.91 ± 0.940 ^{bc}	17.95 ± 0.812 ^{ab}
粘质沙雷氏菌	18.07 ± 0.826 ^{ab}	18.12 ± 1.227 ^{ab}
马胃葡萄球菌	19.01 ± 0.768 ^b	19.24 ± 0.728 ^a
金黄色葡萄球菌	—	—
蜡样芽孢杆菌	—	—
DPPH清除率/%	59.33 ± 0.221	57.54 ± 0.542
羟自由基清除率/%	53.49 ± 0.025	40.45 ± 4.262

注:—:不具有抑菌能力;不同字母表示各组间存在显著性差异($P<0.05$)。

活性化合物有关。

2.7 菌株产β-葡萄糖苷酶活性分析

选择酶活力最高的PC7-C11对其产β-葡萄糖苷酶活性进行分析,研究温度、pH值、乙醇、金属离子和化学试剂等因素对β-葡萄糖苷酶活

力的影响。

温度对菌株酶活力影响如图 4a~4b 所示,最适酶活温度为 40 ℃时,55 ℃时酶活性丧失;在不同温度下,随着温度处理时间的延长,菌株酶活力整体呈下降趋势,在 20 ℃处理 6 h 后相对酶活力可达 70%以上,在 40 ℃处理 6 h 后相对酶活不到 10%。

由图 4c 可知,菌株最适酶活 pH 值为 5;在

pH 3.0~5.0 范围内,酶活力随 pH 值增大而升高;pH>5 时,酶活力逐渐下降,说明该 β -葡萄糖苷酶在酸性条件下具有较强的催化能力。经过对不同 pH 值下酶活随时间延长的稳定性分析发现(图 4d),经 12 h 处理后,在 pH=3 时酶基本失活;在 pH 3.0~7.0 范围内,酶活稳定性随 pH 值增大而升高;pH=7 时酶稳定性最高,说明 β -葡萄糖苷酶在中性条件下比较稳定;在 pH=8 时酶活力有所

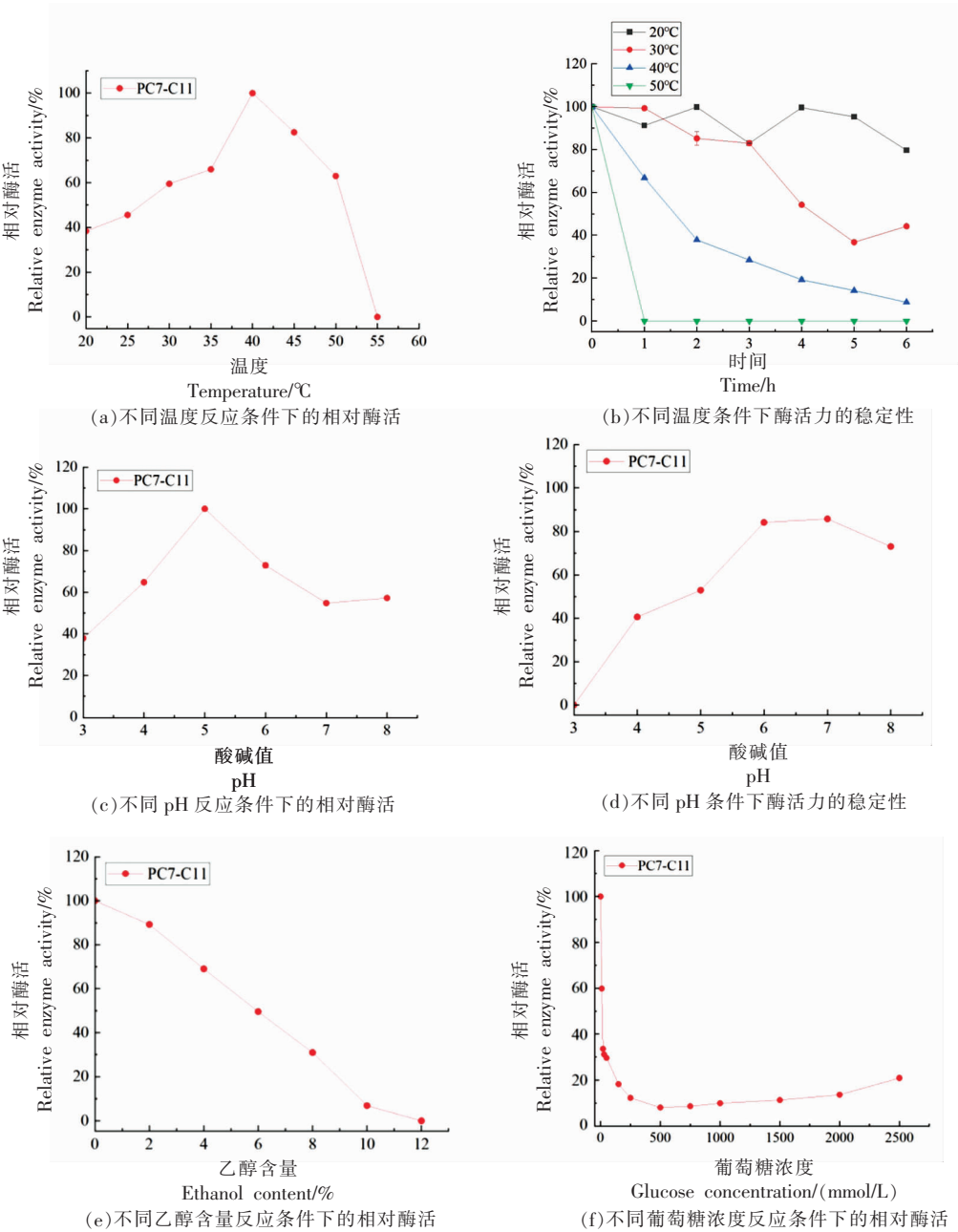


图 4 植物乳杆菌 PC7-C11 的酶学特性
Fig.4 Enzymatic properties of *L.plantarum* PC7-C11

下降,可能是因为碱性条件下会对酶的蛋白质结构有所破坏。来自藻酸盐降解的海洋细菌的微泡菌(*Microbulbifer sp*)的 β -葡萄糖苷酶的最适反应条件为 40 ℃、pH 4.5^[35];嗜热真菌印度热毛霉菌(*Thermomucor indicae-seudaticae*)的 β -葡萄糖苷酶的最适反应条件为 70 ℃、pH 3.5~4.5^[36]。与本研究分离植物乳杆菌的最适温度和 pH 值不同,说明 β -葡萄糖苷酶的稳定性与菌株来源和类型有关。

由图 4e 可知,酶活力随着乙醇浓度增加逐渐降低,当乙醇体积分数为 12%时,酶失活。由图 4f 可知,在葡萄糖浓度为 0~500 mmol/L 范围内时,随着葡萄糖浓度增加,酶活力减少,在 500~2 500 mmol/L 范围内,随着葡萄糖浓度增加,酶活力略有上升。

通过研究金属离子和化学试剂对菌株酶活的影响(表 4),发现在 SDS 和 EDTA 的作用下, β -葡萄糖苷酶失去活性; K^+ 可能在一定程度上促进酶活性的提高,可能是因为 K^+ 能够与酶中的保守氨基酸残基结合,形成稳定的化学键进而提高酶活性^[37]。 Fe^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Na^{2+} 二甲基亚砷对酶活力均有不同程度抑制作用。其中 Fe^{2+} 存在下酶活性损失较大,可能与 Fe^{2+} 和反应体系螯合或者与酶发生反应,破坏了酶的二级或三级结构,进而抑制了部分酶活性有关^[38]。

表 4 不同金属离子和化学试剂对植物乳杆菌

PC7-C11 产 β -葡萄糖苷酶酶活力的影响

Table 4 Effects of different metal ions and chemical reagents on the β -glucosidase enzyme activity of *L. palantarum* PC7-C11

金属离子和化学试剂	相对酶活/%
Fe^{2+}	43.94 ± 0.836^f
二甲基亚砷	75.21 ± 0.331^d
K^+	106.16 ± 0.420^a
Mg^{2+}	92.72 ± 1.212^c
Ca^{2+}	98.52 ± 0.641^b
Na^{2+}	86.24 ± 0.507^e
SDS	—
EDTA	—

注:不同字母表示各组间存在显著性差异($P<0.05$)。

3 结论

从泡菜中分离得到两株高产 β -葡萄糖苷酶的植物乳杆菌 PC7-C6 和 PC7-C11 2。2 菌株均为 γ -溶血,对青霉素、四环素、氨苄西林、克拉霉素、红霉素、氯霉素和克林霉素敏感;可在 pH 4 和 pH 5 的环境中很好地生长,具有一定耐酸能力;在培养 8 h 后自聚集率大于 50%,共聚集率大于 60%,对乙酸乙酯的疏水率分别为 $(70.41 \pm 3.93)\%$ 、 $(61.19 \pm 0.994)\%$,对二甲苯和正己烷的疏水率在 30%~40%之间,2 菌株均对马胃葡萄球菌的抑菌效果最好,PC7-C6 抑菌强度其次为粘质沙雷氏菌、蜂房哈夫尼菌、腐生葡萄球菌和大肠杆菌,PC7-C11 抑菌强度其次为粘质沙雷氏菌、腐生葡萄球菌、蜂房哈夫尼菌和大肠杆菌;对 DPPH 自由基清除率分别为 $(59.33 \pm 0.221)\%$ 、 $(57.54 \pm 0.542)\%$,对羟自由基清除分别为 $(53.49 \pm 0.025)\%$ 、 $(40.4 \pm 4.626)\%$ 。选取酶活力最高的 PC7-C11 进行酶学特性研究,发现该菌株产 β -葡萄糖苷酶在温度 40、20 ℃时酶活力最高和稳定性较好,最适反应 pH 值为 5,在 pH 7 时稳定性最好;乙醇、葡萄糖、化学试剂二甲基亚砷、SDS、EDTA、 Fe^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 等离子均会不同程度抑制其酶活力, K^+ 则会对酶活力起到促进作用。综上所述,本研究分离的植物乳杆菌具有一定的安全特性和益生潜力,所产 β -葡萄糖苷酶活性和稳定性较好,具有一定应用价值。

参 考 文 献

- [1] HAN X Y, QIN Q X, LI C Y, et al. Application of non-*Saccharomyces* yeasts with high β -glucosidase activity to enhance terpene-related floral flavor in craft beer[J]. Food Chemistry, 2023, 404 (Part B 15): 134726.
- [2] FAN T T, JING S Y, ZHANG H Y, et al. Localization, purification, and characterization of a novel β -glucosidase from *Hanseniaspora uvarum* Yun 268 [J]. Journal of Food Science, 2022, 87(3): 886-894.
- [3] HU K, QIN Y, TAO Y S, et al. Potential of glycosidase from non-*Saccharomyces* isolates for enhancement of wine aroma[J]. Journal of Food Science, 2016, 81(4): M935-M943.

- [4] LIANG S, WANG F, GRANATO D, et al. Effect of β -glucosidase on the aroma of liquid-fermented black tea juice as an ingredient for tea-based beverages[J]. Food Chemistry, 2023, 402(15): 134201.
- [5] SHOHREH A, ELAHEH M, KAVEH K, et al. Enhancing the ethanol production by exploiting a novel metagenomic-derived bifunctional xylanase/ β -glucosidase enzyme with improved β -glucosidase activity by a nanocellulose carrier[J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 13: 1056364.
- [6] XIA W, SHENG L L, MU W M, et al. Enzymatic preparation of gentiooligosaccharides by a thermophilic and thermostable β -glucosidase at a high substrate concentration[J]. Foods, 2022, 11(3): 357.
- [7] YILMAZ B, BANGAR S P, ECHEGARAY N, et al. The impacts of *Lactiplantibacillus plantarum* on the functional properties of fermented foods: A review of current knowledge[J]. Microorganisms, 2022, 10(4): 826.
- [8] SESTELO A B F, POZA M, VILLA T G. β -Glucosidase activity in a *Lactobacillus plantarum* wine strain[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2004, 20: 633-637.
- [9] IZAGUIRRE J K, BARAÑANO L, CASTAÑÓN S, et al. Optimization of the bioactivation of isoflavones in soymilk by lactic acid bacteria[J]. Processes, 2021, 9(6): 963.
- [10] BAE J J, YEON S J, PARK W J, et al. Production of sesaminol and antioxidative activity of fermented sesame with *Lactobacillus plantarum* P8, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Streptococcus thermophilus* S10[J]. Food Science and Biotechnology, 2016, 25: 199-204.
- [11] 冯程程, 蔡子哲, 陈琼, 等. 产 β -葡萄糖苷酶乳酸菌益生特性研究[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(15): 85-90.
- FENG C C, CAI Z Z, CHEN Q, et al. Probiotic properties of β -glucosidase producing lactic acid bacteria[J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(15): 85-90.
- [12] AYIVI R D, GYAWALI R, KRASTANOV A, et al. Lactic acid bacteria: Food safety and human health applications[J]. Dairy, 2020, 1(3): 202-232.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] KLAYRAUNG S, VIERNSTEIN H, SIRITHUNYALUG J, et al. Probiotic properties of *Lactobacilli* isolated from Thai traditional food[J]. Scientia Pharmaceutica, 2008, 76(3): 485-504.
- [16] RAJOKA M S R, MEHWISH H M, SIDDIQ M, et al. Identification, characterization, and probiotic potential of *Lactobacillus rhamnosus* isolated from human milk [J]. LWT-Food Science and Technology, 2017, 84: 271-280.
- [17] JAVED G, ARSHAD N, MUNIR A, et al. Signature probiotic and pharmacological attributes of lactic acid bacteria isolated from human breast milk[J]. International Dairy Journal, 2022, 127: 105297.
- [18] PINEIRO M, STANTON C. Probiotic bacteria: legislative framework-requirements to evidence basis[J]. The Journal of Nutrition, 2007, 137(3): 8505-8535.
- [19] PINTO M G V, FRANZ C M, SCHILLINGER U, et al. *Lactobacillus* spp. with *in vitro* probiotic properties from human faeces and traditional fermented products[J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 109(3): 205-214.
- [20] 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]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 473.
- [21] YASMIN I, SAEED M, KHAN W A, et al. *In vitro* probiotic potential and safety evaluation (hemolytic, cytotoxic activity) of *Bifidobacterium* strains isolated from raw camel milk[J]. Microorganisms, 2020, 8(3): 354.
- [22] ABUSHELAIBI A, AL-MAHADIN S, EL-TARABILI K, et al. Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from camel milk [J]. LWT-Food Science and Technology, 2017, 79: 316-325.
- [23] BARZEGAR H, ALIZADEH BEHBAHANI B, FALAH F. Safety, probiotic properties, antimicrobial activity, and technological performance of *Lactobacillus* strains isolated from Iranian raw milk

- cheeses[J]. Food Science & Nutrition, 2021, 9(8): 4094–4107.
- [24] EL-SAYED A I M, EL-BORAI A M, AKL S H, et al. Identification of *Lactobacillus* strains from human mother milk and cottage cheese revealed potential probiotic properties with enzymatic activity [J]. Scientific Reports, 2022, 12(1): 22522.
- [25] SHEKH S L, DAVE J M, VYAS B R M. Characterization of *Lactobacillus plantarum* strains for functionality, safety and γ -amino butyric acid production [J]. LWT-Food Science and Technology, 2016, 74: 234–241.
- [26] IBARRECHE M P, CASTELLANO P, VIGNOLO G. Evaluation of anti-*Listeria* meat borne *Lactobacillus* for biofilm formation on selected abiotic surfaces[J]. Meat Science, 2014, 96(1): 295–303.
- [27] BAJAJ B K, RAZDAN K, CLAES I J, et al. Probiotic attributes of the newly isolated lactic acid bacteria from infants'gut[J]. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, 2015, 5 (2): 109–115.
- [28] UICOSE I I I. Production of anti-microbial substances by probiotics[J]. Asia Pacific J Clin Nutr, 1996, 5: 20–24.
- [29] NGAMSOMCHAT A, KAEWKOD T, KONKIT M, et al. Characterisation of *Lactobacillus plantarum* of dairy-product origin for probiotic chèvre cheese production[J]. Foods, 2022, 11(7): 934.
- [30] QI Y N, HUANG L, ZENG Y, et al. *Pediococcus pentosaceus*: screening and application as probiotics in food processing [J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 762467.
- [31] XIA Y, QIN S K, SHEN Y Q. Probiotic potential of *Weissella* strains isolated from horse feces[J]. Microbial Pathogenesis, 2019, 132: 117–123.
- [32] LI S Y, ZHAO Y J, ZHANG L, et al. Antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditional Chinese fermented foods [J]. Food Chemistry, 2012, 135(3): 1914–1919.
- [33] BERECKA M P, WAŚKO A, SZWAJGIER D, et al. Bifidogenic and antioxidant activity of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus rhamnosus* E/N cultivated on different carbon sources[J]. Pol J Microbiol, 2013, 62: 181–189.
- [34] BHATHENA J, KULAMARVA A, MARTONI C, et al. Preparation and *in vitro* analysis of microencapsulated live *Lactobacillus fermentum* 11976 for augmentation of feruloyl esterase in the gastrointestinal tract [J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2008, 50(1): 1–9.
- [35] JIANG Z D, LONG L F, LIANG M F, et al. Characterization of a glucose-stimulated β -glucosidase from *Microbulbifer* sp. ALW1[J]. Microbiological Research, 2021, 251: 126840.
- [36] MARTINS E S, GOMES E, DA SILVA R, et al. Production of cellulases by *Thermomucor indiciae-seudaticae*: characterization of a thermophilic β -glucosidase[J]. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 2019, 49(8): 830–836.
- [37] 余茜, 张国丽, 敖晓琳. 金属离子对微生物蛋白酶活性的影响及机理[J]. 中国食品学报, 2019, 19(4): 287–294.
- YU X, ZHANG G L, AO X L, et al. Effect and mechanism of metal ions on the activity of microbial protease[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(4): 287–294.
- [38] PYEON H M, LEE Y S, CHOI Y L. Cloning, purification, and characterization of GH3 β -glucosidase, MtBgl85, from *Microbulbifer thermotolerans* DAU221[J]. Peer J, 2019, 7: e7106.

Probiotic and Enzymatic Characteristics of β -glucosidase Producing *Lactobacillus plantarum* Isolated from Pickled Vegetables

Tan Xiqian¹, Cheng Xiaoxiao¹, Cui Fangchao¹, Wang Dangfeng¹, Lü Xinran¹,
Yu Zhangfu², Shen Ronghu², Li Jianrong^{1*}

(¹College of Food Science and Engineering, Bohai University, Jinzhou 121013, Liaoning

²Hangzhou Xiaoshan Agriculture Development Co., Ltd., Hangzhou 311215)

Abstract Lactic acid bacteria play an essential role in fermentation due to their characteristics and secretion of various

metabolites. In this study, two lactic acid bacteria with high β -glucosidase activities were screened from kimchi and identified as *Lactobacillus plantarum* PC7-C6 and PC7-C11). The probiotic characteristics of the two strains and the enzymatic characteristics of PC7-C11 which has higher enzyme production ability, were analyzed. The results showed that the two strains were γ -hemolysis, sensitive to ampicillin and clarithromycin, moderately sensitive to tetracycline, erythromycin, and clindamycin, and could grow at pH 4. The auto-aggregation rate of the two isolates ranged from 50% to 64%, and the co-aggregation rates with *Escherichia coli* were more than 60% after co-incubating for 8 hours. The hydrophobicity of the isolates towards ethyl acetate was 70.41% and 61.19%, and the hydrophobicity of the isolates towards xylene and n-hexane was between 30% and 40%. The two isolates could inhibit the growth *Escherichia coli*, *Hafnia alvei*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Serratia marcescens*, and *Staphylococcus equorum*. The antioxidant capacity of PC7-C11 was superior to that of PC7-C6, with a 59.33% scavenging rate of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and 53.49% scavenging rate of hydroxyl radicals respectively. The enzymatic characteristics of PC7-C11 showed that the optimal reaction temperature and pH for enzyme activity were 40 °C and pH 7. Ethanol, glucose, dimethyl sulfoxide, SDS, EDTA, Fe^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , and Ca^{2+} inhibited enzyme activity to varying degrees, while K^+ has a certain promoting effect on enzyme activity.

Keywords *Lactobacillus plantarum*; β -glucosidase; probiotics; enzyme activity; anti-oxidant activity; anti-bacteria activity