

分离自泡菜中的 1 株高产胞外多糖植物乳杆菌的益生特性

檀茜倩¹, 麻冰玉¹, 程笑笑¹, 崔方超¹, 王当丰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 对泡菜中产胞外多糖的乳酸菌进行筛选,对一株胞外多糖产量最高的菌株 PC715 进行鉴定,并分析了其生长、耐酸和耐胆盐能力、自聚集性、共聚集性、疏水性、安全性、抗菌活性和体外抗氧化能力等益生特性。结果表明,此菌株为植物乳杆菌,胞外多糖 EPS715 产量约为 870 mg/L。紫外-可见光谱表明 EPS715 中不存在蛋白质或核酸。植物乳杆菌 PC715 在 28 ℃ 和 37 ℃ 均能良好生长,在酸性条件下(pH 2.5, 3.0 和 4.0)存活率分别为 75.54%, 91.77% 和 93.69%,在胆盐(1, 2, 3 mg/mL)中存活率高于 40%,自聚集率约为 27.64%,对大肠杆菌的共聚集率约为 16%,对不同有机溶剂的疏水能力在 0.88%~16.97% 之间。植物乳杆菌 PC715 对四环素、氟苯青霉素、红霉素、氯霉素和克林霉素敏感,无溶血性;可在一定程度上抑制大肠杆菌、蜡样芽孢杆菌、腐生葡萄球菌、蜂房哈夫尼亚菌、金黄色葡萄球菌和不动杆菌的生长;PC715 无细胞上清液对 DPPH、羟自由基和 ABTS⁺ 自由基的清除能力分别为 (62.90±0.87)%, (93.39±2.20)% 和 (60.19±1.07)%。本研究表明,所分离产胞外多糖植物乳杆菌 PC715 具有一定益生潜力,为其在发酵中的应用提供一定的理论依据。

关键词 胞外多糖; 植物乳杆菌; 抑菌; 抗氧化; 益生特性

文章编号 1009-7848(2024)11-0022-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.11.003

多糖包括植物多糖(如枸杞多糖^[1]、洋葱多糖^[2])、动物多糖(海参多糖^[3]、鲍鱼多糖^[4])和微生物多糖。其中,微生物多糖(Exopolysaccharides, EPS)是某些微生物分泌在细胞外的高分子聚合物,包括同质多糖和异质多糖^[5]。产 EPS 的微生物种类很多,细菌、真菌等均能分泌 EPS,如四川发酵泡菜中分离的芽孢杆菌 S-1 (*Bacillus* S-1),来源于中国发酵食品甜糯米中的酿酒酵母 Y3 (*Saccharomyces cerevisiae* Y3),中国东北酸菜中分离的干酪乳杆菌 NA-2 (*Lactobacillus casei* NA-2),来源于西藏传统发酵牦牛酸奶的植物乳杆菌 MC5 (*L. plantarum* MC5),巴基斯坦传统发酵食品 Dahi 中分离的嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*),湖北香肠中分离出沙克乳酸杆菌 L3 (*Lactobacillus sakei* L3)等^[6-10],而不同来源以及不同菌株所分泌的 EPS 在结构和功能上有所差异。EPS 可作为食品的增稠剂或稳定剂^[11],具有抑菌、抗氧化、抗生物被膜、抗肿瘤、免疫调节等功能^[12-16],

并具有天然、无毒、安全等优势。

植物乳杆菌是一种常见益生菌^[17],其本身及产生的代谢物具有抑菌,延长食品货架期,改善食品品质等作用。例如其代谢产生的有机酸(乳酸、乙酸、苯乳酸等)可以抑制真菌生长^[18],产生的细菌素可抑制单增李斯特氏菌等食源性致病菌的生长,从而起到延长食品保质期的作用^[19]。其分泌的 EPS 通过增强 EPS-蛋白质相互作用对抗外界剪切力,可以增加发酵牛奶黏度,改善牛奶流变性能^[20]。EPS 的存在还可以降低脱脂发酵香肠的硬度,改善香肠的食用口感^[21]。植物乳杆菌可从多种发酵食品中分离,其中泡菜(Pickled vegetables)是一个主要来源。泡菜一般是以蔬菜(萝卜、白菜等)为原料,通过自然发酵或接种发酵的方式制成的一种中国传统发酵食品^[22-23]。泡菜中的微生物赋予泡菜独特的香气和风味^[24],而加入产 EPS 的植物乳杆菌可以提升泡菜品质。研究发现产 EPS 植物乳杆菌作为直投式发酵剂可使菊芋泡菜汁液更细腻,色泽更诱人,酸味适宜,气味更清新^[25]。

本研究对传统发酵食品——泡菜中产胞外多糖的植物乳杆菌进行筛选,评估该菌株的安全性、益生特性、抑菌能力和体外抗氧化能力,以期产 EPS 植物乳杆菌作为发酵剂在发酵食品中的应用

收稿日期: 2023-11-24

基金项目: 云南省科技人才与平台计划项目(202205AF150060)

第一作者: 檀茜倩,女,博士,讲师

通信作者: 励建荣 E-mail: lijr6491@163.com

提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

MRS肉汤,海博生物技术有限公司;琼脂粉,北京奥博星生物技术有限责任公司;碳酸钙,上海麦克林生化科技有限公司;细菌DNA提取试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司,牛胆盐(BR)、胃蛋白酶(≥ 250 U/mg),北京索莱宝科技有限公司;苯酚、蔗糖、三氯乙酸、刚果红,均为分析纯级,上海阿拉丁公司;氯化钠,福晨(天津)化学试剂有限公司;碳酸钙(分析纯级),上海麦克林生化科技股份有限公司。

1.2 主要仪器与设备

UV-2550紫外-分光光度计,优尼科仪器有限公司;LRH150生化培养箱,上海一恒科技有限公司;PCR仪,德国Eppendorf公司;电泳仪,北京六一生物技术有限公司;PE Victor X3酶标仪,美国Bio-Rad公司;PHS-25型pH计,上海雷磁仪器厂;超净工作台,苏净集团苏州安泰空气技术有限公司;BHS-2型电热数显恒温水浴锅,群安实验仪器(JOANLAB)有限公司;LDZX-30L型立式压力蒸汽灭菌锅,上海申安医疗器械厂;Multifuge X1R高速冷冻离心机,美国ThermoFisher Scientific公司。

1.3 试验方法

1.3.1 菌株的初筛 样品称重10 g,溶解于90 mL的0.85%无菌生理盐水中,振荡混匀,得到 10^{-1} 的菌悬液。取1 mL此菌悬液,梯度稀释。取0.1 mL适宜浓度(10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6})的稀释液涂布在含有1%碳酸钙的MRS琼脂培养基中,37℃培养24~48 h。挑取有溶钙圈出现并且表面黏稠或者周围有扩散现象的菌株连续平板划线后置于37℃培养24 h,并观察菌落形态。

1.3.2 产胞外多糖菌株的复筛 EPS提取方法参照Yang等^[20]的方法并稍作修改。将上述分离的菌株活化两代后,按体积分数2%接种于含50 g/L蔗糖的MRS肉汤培养基,37℃培养48 h。随后将发酵液在100℃水浴15 min,冷却至室温,离心20 min(4℃、8 000 r/min)以除去菌体。向上清液中加入30%三氯乙酸(TCA)至终质量浓度为40 g/L,充

分搅拌均匀后4℃静置过夜,在4℃、12 000 r/min离心40 min以去除蛋白。向上清液中加入3倍体积预冷的95%乙醇,充分混匀后4℃静置过夜,离心得到EPS沉淀。收集的沉淀用少量65℃温水溶解,装入截留分子质量为8 000~14 000 u的透析袋中,每8 h换一次水,换6次水后定容至原体积得到粗多糖溶液。采用苯酚-硫酸法并利用葡萄糖标准曲线: $y=0.0076x+0.0274$ ($R^2=0.9926$),横坐标为葡萄糖含量($\mu\text{g/mL}$),纵坐标为溶液在波长490 nm处的吸光度,确定高产EPS的乳酸菌菌株。

1.3.3 菌株16S rDNA鉴定 严格按照DNA快速抽提试剂盒的说明提取菌株PC715的基因组DNA,并进行PCR扩增。经琼脂糖凝胶电泳分离后的扩增产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序,根据测序结果利用Mega 11软件构建系统进化树。

1.3.4 植物乳杆菌PC715 EPS的紫外-可见光光谱(UV-VIS)分析 利用紫外-可见分光光度计对提取的多糖进行纯度鉴定。称取1 mg溶于10 mL水中配制为质量浓度为0.1 mg/mL的溶液,在波长200~700 nm进行紫外光谱扫描。

1.3.5 植物乳杆菌PC715的生长曲线 将活化的植物乳杆菌PC715按接种量2%接种至初始pH值为6.5的MRS肉汤中,分别在4,28,37℃培养24 h,培养过程中每2 h测1次波长600 nm处的光密度。

1.3.6 植物乳杆菌PC715对酸和胆盐的耐受性 参考Soliemani等^[27]的方法并稍作修改。为了研究菌株对酸的耐受性,将活化至对数末期的植物乳杆菌PC 715按接种量2%接种至不同pH值(pH值为2.5,3.0,4.0)的MRS肉汤中(通过HCl调节),在37℃下培养3 h来评估耐酸性。使用pH值为6.5的MRS肉汤作为对照。在MRS琼脂培养基上使用平板计数法在特定时间间隔(0,3 h)测定该菌株的生存能力。菌株的耐酸性表示为1 mL培养基中的菌落形成单位(CFU/mL)。此外,根据计算结果测定菌株的存活率。

菌株对胆盐耐受性的评估参考Lin等^[28]的方法。将活化至对数末期的菌株以2%的接种量接种至10 mL分别含有0.01,0.02,0.03 g牛胆盐的液体MRS中,37℃培养4 h,分别在第0,1,4 h取发

酵液稀释至合适梯度后接种至 MRS 琼脂培养基,用平板计数法测定 37 °C 培养 24 h 后的活菌数,以此判断所筛选菌株的胆盐耐受能力。未经胆盐处理的 MRS 液体培养基作为对照。菌株存活率计算公式如下:

$$\text{菌株存活率}(\%) = N_t / N_0 \times 100 \quad (1)$$

式中: N_t 为菌株孵育后活菌数; N_0 为菌株初始活菌数。

1.3.7 抗生素敏感性 采用药敏纸片琼脂扩散法进行药敏试验,将过夜培养的植物乳杆菌 PC715 (10^8 CFU/mL) 按 0.2% 接种量接种至 MRS 固体培养基中,待平板凝固后,用无菌镊子将抗生素纸片(直径 6 mm) 在无菌条件下均匀放置在平板上。37 °C 培养 24 h 后测量抑菌圈直径^[29]。所用药敏纸片分别为四环素(30 μg/片)、卡那霉素(30 μg/片)、氨苄西林(10 μg/片)、庆大霉素[(10 ± 2.5) μg/片]、红霉素(15 μg/片)、氯霉素(30 μg/片)、克林霉素(20 μg/片)、万古霉素(30 μg/片)。

1.3.8 溶血特性 将在 MRS 肉汤中培养至对数末期的植物乳杆菌 PC715,在含有 5% 羊血的哥伦比亚血琼脂上划线,并于 37 °C 培养 48 h^[30]。细菌菌落周围出现透明溶血区为溶血性(β -溶血),菌落周围出现绿色区域为 α -溶血,而菌落周围没有任何区域为非溶血性(γ -溶血)。

1.3.9 自聚集和共聚集能力

1.3.9.1 自聚集能力^[31] 通过 4 °C、 $10\ 000 \times g$ 离心 10 min 获得培养至稳定期的植物乳杆菌 PC715 菌株。沉积物在等体积无菌 PBS(pH=7.0) 中重悬,并在无菌 PBS 中洗涤 3 次,最终调整至 10^9 CFU/mL ($OD_{600nm} \approx 1.000$)。将 4 mL 乳酸菌悬浮液涡旋 10 s,在 37 °C 静置培养 0, 1, 5, 8 h。以 MRS 肉汤作为对照。在不改变微生物悬浮液的情况下,在第 0, 1, 5, 8 h 利用酶标仪测定最上层悬浮液约 0.1 mL 的 OD_{600nm} 值。

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

式中: A_t 为培养 t h 后的吸光度; A_0 是时间为 0 h 时的吸光度。

1.3.9.2 共聚集能力^[28] 将乳酸菌和大肠杆菌在各自最适温度下培养 16 h,然后在 4 °C、 $10\ 000 \times g$ 离心 10 min,去除上清液,将菌体在无菌 PBS(pH 7.0) 中洗涤 3 次,最终调整 OD_{600nm} 分别为 0.25 和

0.60。将等体积(5 mL)的乳酸菌和大肠杆菌细菌悬液涡旋 10 s 混合均匀。在 37 °C 培养 0, 5 h 后测量悬液最上层在 600 nm 处的吸光度(A_{mix})。

$$\text{共聚集率}(\%) = [(A_1 + A_2) / 2 - A_{mix}] / (A_1 + A_2) / 2 \times 100 \quad (3)$$

式中: A_1 为乳酸菌培养 0 h 的吸光度, A_2 为大肠杆菌在培养 0 h 的吸光度; A_{mix} 为 2 株菌混合培养 5 h 后的吸光度。

1.3.10 细胞表面疏水性 将菌株在 MRS 肉汤中 37 °C 培养 18 h, 4 °C、 $10\ 000 \times g$ 离心 10 min,去除上清液,将菌体在无菌 PBS(pH=7.0) 中洗涤 2 次,最终调整至 10^8 CFU/mL ($OD_{600nm}=1.0, A_0$)。然后将 0.3 mL 正己烷、二甲苯按体积比 1:4 的比例分别加入到 1.2 mL 的细菌悬浮液中。在涡旋混合 3 min 后在室温下静置培养 30 min 待相分离,小心吸取下层水相转移至酶标板中,测 OD_{600nm} 值^[32]。

$$\text{细胞表面疏水性}(\%) = (1 - A_1 / A_0) \times 100 \quad (4)$$

式中: A_0 为二甲苯处理之前细菌悬浮液的 OD_{600nm} ; A_1 为二甲苯处理之后水相的 OD_{600nm} 。

1.3.11 植物乳杆菌 PC715 的抗菌效果 采用双层平板法进行该试验,即下层为素琼脂,上层为形成无数孔洞的 LB 半固体培养基(含指示菌)。将指示菌(金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、腐生葡萄球菌、马胃葡萄球菌、蜂房哈夫尼亚菌、蜡样芽胞杆菌)分别接种于 LB 肉汤培养基中,37 °C、160 r/min 过夜培养。将植物乳杆菌 PC715 按接种量 2% 接种于 10 mL 无菌 MRS 肉汤中,37 °C、200 r/min 培养 12 h 后于 8 000 r/min 离心 10 min。将上述指示菌以 0.5% 接种量加入到 LB 半固体培养基(0.8% 琼脂)中并充分混匀。向孔中添加 100 μL 植物乳杆菌 PC715 的离心上清液。以无菌 LB 肉汤的孔为阴性对照,37 °C 培养 24 h 后观察并测量抑菌圈直径。

1.3.12 植物乳杆菌 PC715 的体外抗氧化能力 将活化 2 代后的菌种按体积分数 2% 接种至 MRS 肉汤中并在 37 °C 下培养过夜,无细胞上清液是通过该菌液在 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min 得到的。取菌体沉淀,用磷酸盐缓冲溶液(PBS, pH=7.2)洗涤 2~3 次并重悬于 PBS 中,得到完整细胞菌悬液 ($OD=1.000 \pm 0.2$),将此菌悬液超声冰浴破碎(超声功率为 300 W,超声 2 s,停止 2.4 s,超声 10 min),

随后在 4 ℃、8 000 r/min 离心 10 min 得到细胞破碎提取物。

1.3.12.1 DPPH 自由基清除能力的测定 等体积的样品和 DPPH-无水乙醇(0.2 mmol/L)混匀后在室温下避光 0.5 h,8 000 r/min 离心 10 min 后测定上清液在波长 517 nm 处的吸光度,计算 DPPH 自由基清除率,每组重复 3 次。

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = (1 - A_{\text{对照}}/A_{\text{样品}}) \times 100 \quad (5)$$

式中: $A_{\text{样品}}$ 为 2 mL 的 DPPH-无水乙醇溶液+2 mL 样品的吸光度; $A_{\text{对照}}$ 为蒸馏水代替样品的吸光度。

1.3.12.2 羟自由基清除能力 参照 Hu 等^[6]的方法并稍作修改。分别取 1 mL PBS (pH=7.4)、0.5 mL 0.25 mmol/L 的邻二氮菲溶液、0.5 mL 2.5 mmol/L 的硫酸亚铁溶液、0.5 mL 的样品混合(对照组加入相同体积 PBS 溶液)。最后加入 0.5 mL 20 mmol/L H_2O_2 在 37 ℃下静置反应 60 min 后,利用紫外分光光度计在波长 536 nm 处测定吸光度。羟自由基清除能力按以下公式计算:

$$\text{羟自由基清除率}(\%) = [(A_3 - A_5)/(A_4 - A_5)] \times 100 \quad (6)$$

式中: A_3 、 A_4 、 A_5 分别为样品、对照和空白组的吸光度。

1.3.12.3 ABTS⁺自由基清除能力 参考 Kang 等^[33]的方法并稍作修改。简言之,通过将 7 mmol/L ABTS 与 2.45 mmol/L 过硫酸钾按体积比 1:1 混合,将混合物在室温下黑暗放置 24 h 来制备自由基阳离子,并调节该 ABTS⁺溶液在波长 734 nm 处的吸光度为 0.700 ± 0.02 。接下来,将 500 μL 所选菌株样品和 1 000 μL ABTS⁺溶液混合并在室温下避光培养 10 min。在波长 734 nm 处测量混合物的吸光度。每个样品测定一式 3 份,清除率计算如下:

$$\text{ABTS}^+ \text{ 自由基清除率}(\%) = (1 - A_6/A_7) \times 100 \quad (7)$$

式中: A_6 为样品的吸光度; A_7 为对照品在波长 734 nm 处的吸光度。

1.3.13 数据分析 3 次独立重复试验的结果表示为平均值 \pm 标准差。SPSS 26 软件用于单因素方差分析, $P < 0.05$ 用于确定统计学显著差异。

2 结果与分析

2.1 产胞外多糖菌株的筛选

从泡菜样品中分离出多株产 EPS 植物乳杆菌,采用苯酚硫酸法对粗提取的 EPS 浓度测定后,选择胞外多糖产量最高(870 mg/L)的 1 株菌 PC715 进行后续研究。该菌株在含有 1% CaCO_3 的 MRS 琼脂培养基上呈乳白色、圆形、菌落凸起、周围有透明溶钙圈、湿润黏稠且挑取时有拉丝(图 1a 和 1b)。光学显微镜下显示蓝紫色,具有革兰氏阳性菌的典型特征,呈杆状,并排或分散排列。

2.2 菌株鉴定

根据 16S rDNA 测序结果绘制菌株 PC715 系统发育树,同源性达 99% 以上的菌株被用于对比,结果如图 2 所示。将菌株 PC715 命名为植物乳杆菌 PC715。

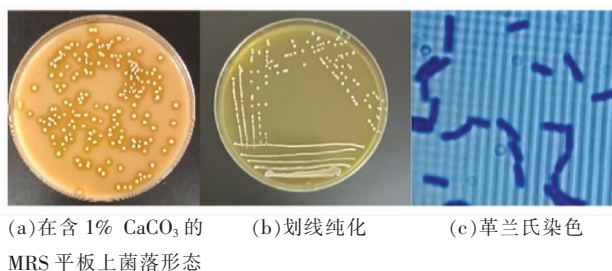


图 1 菌株 PC715 的形态

Fig.1 The morphology of the PC715



图 2 菌株 PC715 基于 16S rDNA 序列构建的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of the strain PC715 based on 16S rDNA sequence

2.3 EPS715 的紫外-可见光光谱分析

EPS715 的紫外-可见光光谱由图 3 所示,在

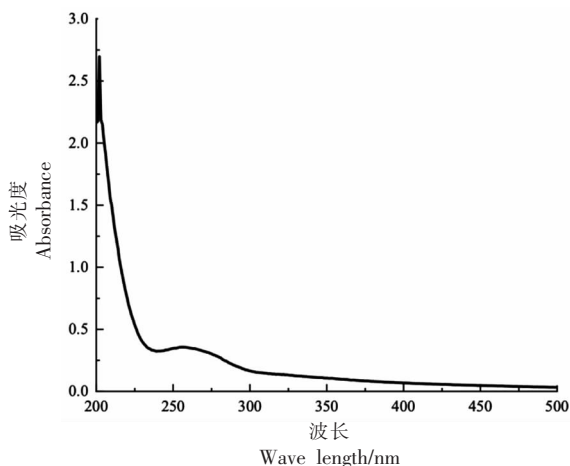


图3 EPS715的紫外-可见光光谱分析

Fig.3 UV-Vis spectrum of EPS715

波长 260 nm 和 280 nm 处无明显吸收峰,表明经分离纯化后的组分中不含有蛋白质和核酸。

2.4 菌株的生长特性

图4显示植物乳杆菌PC715在28℃和37℃均能生长,而该菌株在4℃的 OD_{600nm} 与接种时基本无变化,说明该菌株在4℃基本不生长。此外,植物乳杆菌PC715在接种第2~12h的 OD_{600nm} 迅速增加,进入对数生长期并且在37℃培养条件下的生长速度明显高于28℃。

2.5 植物乳杆菌PC715耐酸和耐胆盐能力

人类胃液的pH值可在1.5~4.5之间波动^[34],食物在胃中通过的时间是0~4h。因此益生菌需要具有一定的抵抗胃酸的能力。表1显示在pH值为3.0和4.0时,植物乳杆菌PC715的存活率均高于90%;在pH=2.5的环境下培养3h后,植物乳杆菌PC715的存活率为75.54%,活菌数仍能达到 3.83×10^7 CFU/mL,说明过酸环境会在一定程度上抑制PC715生长,但其对酸有一定的耐受性。

对胆汁耐受性是益生菌小肠中生存、生长、繁殖的基本条件之一^[35]。如表2所示,胆盐质量浓度1 mg/mL下,植物乳杆菌PC715在4h后存活率为65.46%,活菌数维持在 10^7 CFU/mL以上;当胆盐质量浓度为2 mg/mL时,存活率仍然>60%;当胆盐质量浓度为3 mg/mL时,存活率为41.27%。上述结果表明,植物乳杆菌PC715具有较好的耐胆盐能力。

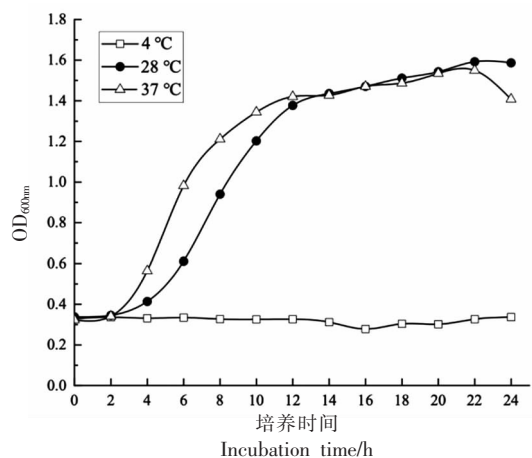


图4 植物乳杆菌PC715在MRS肉汤中的生长曲线

Fig.4 Growth curve of *L. plantarum* PC715 in MRS broth

表1 植物乳杆菌PC715在不同pH值下的存活率

Table 1 Survival rate of *L. plantarum* PC715 at different pH value

pH 值	0 h 活菌数/ (CFU/mL)	3 h 活菌数/ (CFU/mL)	存活率/%
2.5	5.07×10^7	3.83×10^7	75.54 ^a
3.0	8.10×10^7	7.43×10^7	91.77 ^b
4.0	5.07×10^7	4.75×10^7	93.69 ^a

注:不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

表2 植物乳杆菌PC715在不同胆盐质量浓度下的存活

Table 2 Survival rate of *L. plantarum* PC715 under different bile salt mass concentrations

牛胆盐质量浓度/(mg/mL)	0 h 活菌数/ (CFU/mL)	4 h 活菌数/ (CFU/mL)	4 h 存活率/%
1	1.94×10^7	1.27×10^7	65.46 ^a
2	5.97×10^6	3.87×10^6	64.82 ^b
3	6.13×10^5	2.53×10^5	41.27 ^c

注:不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

2.6 植物乳杆菌PC715药物敏感性

根据聂紫玉等^[29]的方法确定了该菌株对8种不同抗生素的敏感性,结果发现植物乳杆菌PC715对四环素、氨苄西林、红霉素、氯霉素、克林霉素均敏感,对卡那霉素和庆大霉素具有耐药性(表3)。这与莫嘉玲等^[36]报道的乳酸菌相似。卡那霉素、庆大霉素都属于氨基糖苷类抗生素,二者能够抑制蛋白质合成,而革兰氏阳性菌细胞壁厚,使

表 3 植物乳杆菌 PC715 的药物敏感性

Table 3 Antibiotic susceptibility of *L. plantarum* PC715

抗生素	植物乳杆菌 PC715
四环素 (30 $\mu\text{g}/\text{片}$)	敏感(S)
卡那霉素 (30 $\mu\text{g}/\text{片}$)	耐药(R)
氯苄西林 (10 $\mu\text{g}/\text{片}$)	敏感(S)
庆大霉素 [(10 \pm 2.5) $\mu\text{g}/\text{片}$]	耐药(R)
红霉素 (15 $\mu\text{g}/\text{片}$)	敏感(S)
氯霉素 (30 $\mu\text{g}/\text{片}$)	敏感(S)
克林霉素 (20 $\mu\text{g}/\text{片}$)	敏感(S)
万古霉素 (30 $\mu\text{g}/\text{片}$)	n.r.

注: R (Resistance) 代表耐药; S (Sensitive) 代表敏感; n.r. 代表不具有耐药性; 药敏片直径为 6 mm。

得这 2 种抗生素不能进入细胞壁干扰细胞膜合成, 因此表现为菌株对这两种抗生素具有耐药性^[37]。

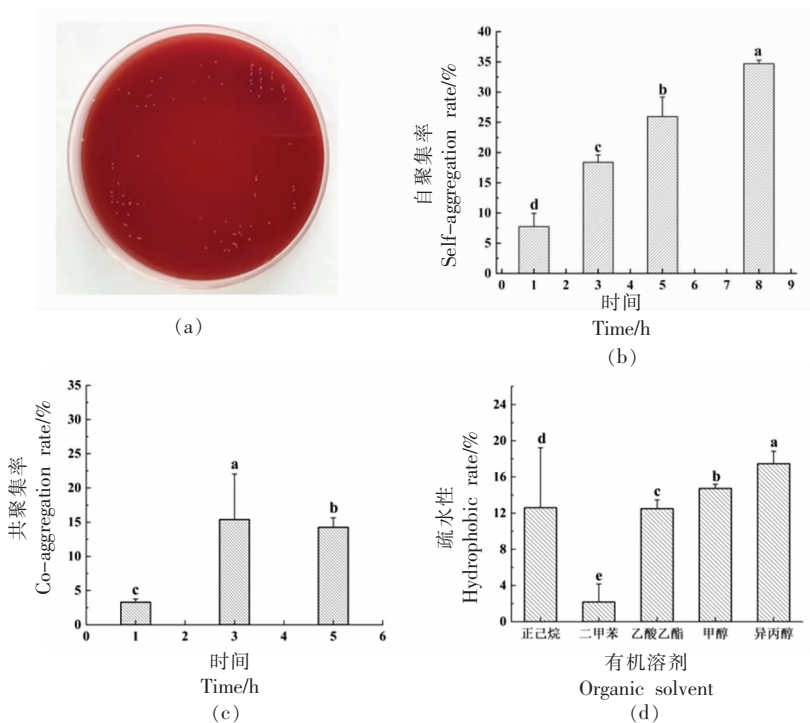
2.7 植物乳杆菌 PC715 溶血性

溶血性检测是益生菌体外安全性评价的必要环节。溶血性主要表现为 3 类: 菌落周围有绿色或棕色溶血圈被认为是 α -溶血; 在菌落周围呈现浅

色、浅黄色或透明圈为 β -溶血, 与红细胞的完全溶解有关, 对人致病力强; 菌落周围无变化被认为是 γ -溶血 (不溶血)^[38]。试验结果如图 5a 所示, PC715 的菌落周围没有出现透明溶血圈或草绿色环, 即 γ -溶血, 由此说明该菌株无溶血性, 结果与一些研究所报道的其它未检测出溶血现象一致^[36]。

2.8 植物乳杆菌 PC715 自聚集、共聚集、细胞表面疏水性

乳酸菌的自聚集、共聚集和表面疏水性都是菌株在肠道的黏附能力评定的指标。由图 5b、5c 可以看出, 随着时间的延长, 植物乳杆菌 PC715 的自聚集率和共聚集率都增加。在孵育 8 h 后自聚集率为 (34.72 \pm 0.59)%, 植物乳杆菌 PC715 与大肠杆菌的共聚集能力在 3.30%~15.38% 范围, 共孵育 3 h 时的共聚集能力最高为 (15.38 \pm 6.65)%。植物乳杆菌 PC715 对二甲苯的表面疏水性最低 (2.17 \pm 2.00)%, 对异丙醇的表面疏水性最高 (17.46 \pm 1.38)%, 对其它有机溶剂的表面疏水性均在 12%~15%。



注: 不同小写字母表示显著性差异 ($P < 0.05$)。

图 5 植物乳杆菌 PC715 的溶血性 (a)、自聚集率 (b)、共聚集率 (c) 和疏水性 (d)

Fig.5 Hemolytic activity (a), self-agglutination capacity (b), co-agglutination capacity (c) and hydrophobicity (d) of *L. plantarum* PC715

2.9 植物乳杆菌 PC715 的体外抗菌活性

抗菌能力对于食品生产及保藏具有重要意义,乳酸菌能分泌多种具有抗菌作用的代谢产物(肽类、有机酸、酶、过氧化氢等)^[39],因此可作为潜在天然防腐剂。通过牛津杯法测定植物乳杆菌 PC715 对 6 种指示菌的抗菌活性,结果显示,植物乳杆菌 PC715 对大肠杆菌、蜡样芽胞杆菌、腐生葡萄球菌、蜂房哈夫尼亚菌、金黄色葡萄球菌、不动杆菌均具有不同程度的抑制效果(表 4)。其中,PC715 对腐生葡萄球菌的抑制率最高,抑菌圈约为 16 mm。Yang 等^[40]指出,从四川泡菜中分离出的植物乳杆菌 LR-14 对金黄色葡萄球菌既能造成细胞损伤,又能有效抑制和清除生物被膜的形成。从埃及当地羊奶和奶酪中分离的植物乳杆菌对金黄色葡萄球菌也有类似的抑制效果^[41]。

2.10 PC715 的体外抗氧化能力分析

氧化是食品腐败变质的重要原因,因此本研究通过测定 DPPH 自由基清除能力、羟自由基清除能力和 ABTS 阳离子自由基清除能力对 PC715

表 4 植物乳杆菌 PC715 的抗菌活性

指示菌(致病菌)	植物乳杆菌 PC715 抑菌效果
大肠杆菌	+
蜡样芽胞杆菌	++
腐生葡萄球菌	+++
蜂房哈夫尼亚菌	++
金黄色葡萄球菌	++
不动杆菌	++

注:+. 抑菌圈直径 1~5 mm,++. 抑菌圈直径 5~12 mm,+++。抑菌圈直径>12 mm。

的体外抗氧化活性进行分析(表 5)。总体而言,PC715 具有良好的体外抗氧化能力,并且菌株无细胞上清液的抗氧化能力均高于细胞破碎提取物,这可能与菌株生长过程中分泌的具有还原性的有机酸有关^[42]。其无细胞上清液的羟自由基清除能力高达(93.39±2.20)%,除此之外,DPPH 自由基清除能力和 ABTS 阳离子自由基清除能力都超过 60%,分别为(62.9±0.87)%和(60.19±1.09)%。

表 5 植物乳杆菌 PC715 的体外抗氧化能力

Table 5 *In vitro* antioxidant capacity of *L. plantarum* PC715

PC715	DPPH 自由基清除能力/%	羟自由基清除能力/%	ABTS 自由基清除能力/%
无细胞上清液	62.90 ± 0.87 ^b	93.39 ± 2.20 ^b	60.19 ± 1.07 ^b
细胞破碎提取物	10.96 ± 9.00 ^c	53.57 ± 1.35 ^c	21.19 ± 3.45 ^c
抗坏血酸(100 μg/mL)	93.98 ± 0.55 ^a	>100.00 ^a	73.39 ± 1.19 ^a

注:不同小写字母表示显著性差异($P < 0.05$)。

3 结论

本研究从泡菜中筛选分离 1 株高产胞外多糖的乳酸菌,鉴定并命名为植物乳杆菌 715。其发酵液中胞外多糖产量约为 870 mg/L,在 28 °C 和 37 °C 均能生长,具有良好的耐酸耐胆盐能力,对四环素、氨苄西林、红霉素、氯霉素、克林霉素表现敏感,无溶血性。PC715 具有一定的自聚集、共聚集和疏水性,可不同程度抑制大肠杆菌、蜡样芽胞杆菌、腐生葡萄球菌、蜂房哈夫尼亚菌、金黄色葡萄球菌和不动杆菌。其无细胞上清液对 DPPH、羟自由基和 ABTS+ 自由基的清除能力分别为(62.90±0.87)%,(93.39±2.20)%和(60.19±1.07)%。本研究为植物乳杆菌在发酵和益生方面的应用提供了一定理论依据。下一步可以对植物乳杆菌 715 所产

EPS715 的结构和功能特性进行深入研究和解析。

参 考 文 献

- [1] ZHANG X X, NI Z J, ZHANG F, et al. Physicochemical and antioxidant properties of *Lycium barbarum* seed dreg polysaccharides prepared by continuous extraction[J]. Food Chemistry: X, 2022, 14: 100282.
- [2] ZHOU S Y, HUANG G L, HUANG H L. Extraction, derivatization and antioxidant activities of onion polysaccharide[J]. Food Chemistry, 2022, 388: 133000.
- [3] WANG J J, SHI S, LI F F, et al. Physicochemical properties and antioxidant activity of polysaccharides

- obtained from sea cucumber gonads via ultrasound-assisted enzymatic techniques[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2022, 160: 113307.
- [4] SHI L F, HAO G X, CHEN J, et al. Structural characterization and immunostimulatory activity of a water-soluble polysaccharide from abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) muscle[J]. *Food Science and Human Wellness*, 2023, 12(2): 495-502.
- [5] AFREEN A, AHMED Z, KHALID N, et al. Optimization and cholesterol-lowering activity of exopolysaccharide from *Lactiplantibacillus paraplantarum* NCCP 962 [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2023, 107(4): 1189-1204.
- [6] 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.
- [7] LIU L, XU J J, NA R Y, et al. Purification, characterization and partial biological activities of exopolysaccharide produced by *Saccharomyces cerevisiae* Y3 [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 206: 777-787.
- [8] XU X Q, PENG Q, ZHANG Y W, et al. Antibacterial potential of a novel *Lactobacillus casei* strain isolated from Chinese northeast sauerkraut and the antibiofilm activity of its exopolysaccharides[J]. *Food & Function*, 2020, 11(5): 4697-4706.
- [9] ZHAO X F, LIANG Q. EPS-producing *Lactobacillus plantarum* MC5 as a compound starter improves rheology, texture, and antioxidant activity of yogurt during storage[J]. *Foods*, 2022, 11(11): 1660.
- [10] TAJ R, MASUD T, SOHAIL A, et al. *In vitro* screening of EPS-producing *Streptococcus thermophilus* strains for their probiotic potential from Dahi[J]. *Food Science & Nutrition*, 2022, 10(7): 2347-2359.
- [11] WANG B B, SONG Q Z, ZHAO F K, et al. Isolation and characterization of dextran produced by *Lactobacillus sakei* L3 from Hubei sausage[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2019, 223: 115111.
- [12] KARACA B, HALISCELIK O, GURSOY M, et al. Analysis of chemical structure and antibiofilm properties of exopolysaccharides from *Lactiplantibacillus plantarum* EIR/IF-1 postbiotics [J]. *Microorganisms*, 2022, 10(11): 2000.
- [13] SELIM S, ALMUHAYAWI M S, ALHARBI M T, et al. *In vitro* assessment of anti-*Staphylococci*, antitumor, immunological and structural characterization of acidic bioactive exopolysaccharides from marine *Bacillus cereus* isolated from Saudi Arabia [J]. *Metabolites*, 2022, 12(2): 132.
- [14] ZHAO X T, PENG F, LIU Z G, et al. Lactic acid bacteria with anti-hyperuricemia ability: Screening *in vitro* and evaluating in mice[J]. *Food Bioscience*, 2023, 52: 102411.
- [15] TSENG K C, HUANG H T, HUANG S N, et al. *Lactobacillus plantarum* isolated from kefir enhances immune responses and survival of white shrimp (*Penaeus vannamei*) challenged with *Vibrio alginolyticus* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2023, 135: 108661.
- [16] AL-SAAFAN B A, AL-BAKRI A G, ABDELRAZIG S, et al. Investigating the effect of the probiotic *Lactobacillus plantarum* and the prebiotic fructooligosaccharides on *Pseudomonas aeruginosa* metabolome, virulence factors and biofilm formation as potential quorum sensing inhibitors [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2023, 177: 106057.
- [17] BU Y S, LIU Y S, LIU Y X, et al. Screening and probiotic potential evaluation of bacteriocin-producing *Lactiplantibacillus plantarum in vitro*[J]. *Foods*, 2022, 11(11): 1575.
- [18] ZHAO S S, HAO X M, YANG F Y, et al. Antifungal activity of *Lactobacillus plantarum* ZZUA493 and its application to extend the shelf life of Chinese steamed buns[J]. *Foods*, 2022, 11(2): 195.
- [19] ZHAO D Y, WANG Q, LU F X, et al. A novel class IIb bacteriocin-plantaricin EmF effectively inhibits *Listeria monocytogenes* and extends the shelf life of beef in combination with chitosan[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(7): 2187-2196.
- [20] BACHTARZI N, SPECIALE I, KHARROUB K, et al. Selection of exopolysaccharide-producing *Lactobacillus Plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) isolated from Algerian fermented foods for the manufacture of skim-milk fermented products[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(8): 1101.
- [21] HILBIG J, GISDER J, PRECHTL R M, et al. Influence of exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria on the spreadability of fat-reduced raw fer-

- mented sausages (*Teewurst*)[J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 93: 422–431.
- [22] XIAO M Y, PENG Z, HARDIE W J, et al. Exploring the typical flavours formation by combined with metatranscriptomics and metabolomics during Chinese Sichuan paocai fermentation[J]. *LWT—Food Science and Technology*, 2022, 153: 112474.
- [23] 刘宗敏, 周红丽, 谭兴和. 泡菜中乳酸菌的研究进展[J]. *中国酿造*, 2016, 35(10): 18–21.
- LIU Z M, ZHOU H L, TAN X H. Research progress of lactic acid bacteria in pickled vegetable [J]. *China Brewing*, 2016, 35(10): 18–21.
- [24] YANG Y L, FAN Y, LI T, et al. Microbial composition and correlation between microbiota and quality-related physiochemical characteristics in chongqing radish paocai[J]. *Food Chemistry*, 2022, 369: 130897.
- [25] 崔树茂, 郭钦, 刘崇万, 等. 高产胞外多糖的植物乳杆菌直接发酵菊芋泡菜的研究[J]. *食品与发酵工业*, 2011, 37(9): 114–118.
- CUI S M, GUO Q, LIU C W, et al. Study on *Jerusalem artichoke* pickle fermented directly by *Lactobacillus plantarum* producing higher extracellular polysaccharide[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2011, 37(9): 114–118.
- [26] YANG Y F, FENG F, ZHOU Q Q, et al. Isolation, purification and characterization of exopolysaccharide produced by *Leuconostoc pseudomesenteroides* YF32 from soybean paste[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 114: 529–535.
- [27] SOLIEMANI O, SALIMI F, REZAEI A. Characterization of exopolysaccharide produced by probiotic *Enterococcus durans* DU1 and evaluation of its anti-biofilm activity[J]. *Archives of Microbiology*, 2022, 204(7): 419.
- [28] LIN X N, XIA Y J, YANG Y J, et al. Probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum* AR113 and its molecular mechanism of antioxidant[J]. *LWT—Food Science and Technology*, 2020, 126: 109278.
- [29] 聂紫玉, 吴艳阳, 王增光, 等. 植物源益生乳酸菌的筛选及其特性[J]. *食品科学*, 2022, 43(18): 143–151.
- NIE Z Y, WU Y Y, WANG Z G, et al. Screening and characterization of plant-derived probiotic lactic acid bacteria[J]. *Food Science*, 2022, 43(18): 143–151.
- [30] ZHANG Y, LIANG S, ZHAO M D, et al. Screening and identification of *Lactobacillus curvatus* Z12 from rumen fluid of an adult female Sika deer as a potential probiotic for feed additives[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2021, 8: 753527.
- [31] KIM H, KIM J S, KIM Y G, et al. Antioxidant and probiotic properties of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* of human origins [J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2020, 25(3): 421–430.
- [32] ADESULU-DAHUNSI A T, JEYARAM K, SANNA A I. Probiotic and technological properties of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria isolated from cereal-based Nigerian fermented food products[J]. *Food Control*, 2018, 92: 225–231.
- [33] KANG C H, KIM J S, PARK H M, et al. Antioxidant activity and short-chain fatty acid production of lactic acid bacteria isolated from Korean individuals and fermented foods[J]. *3 Biotech*, 2021, 11(5): 217.
- [34] KAMARINOU C S, PAPADOPOULOU O S, DOULGERAKI A I, et al. Mapping the key technological and functional characteristics of indigenous lactic acid bacteria isolated from Greek traditional dairy products[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(2): 246.
- [35] OSTADZADEH M, HABIBI NAJAFI M B, EHSANI M R. Lactic acid bacteria isolated from traditional Iranian butter with probiotic and cholesterol-lowering properties: *In vitro* and *in situ* activity[J]. *Food Science & Nutrition*, 2023, 11(1): 350–363.
- [36] 莫嘉玲, 肖沐岩, 熊涛. 产共轭亚油酸乳酸菌的筛选及体外特性评价[J]. *中国食品学报*, 2023, 23(3): 51–59.
- MO J L, XIAO M Y, XIONG T. Screening and evaluation of *in vitro* characterization of lactic acid bacteria strains with high conjugated linoleic acid production[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2023, 23(3): 51–59.
- [37] 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.
- [38] SAVARDI M, FERRARI A, SIGNORONI A. Automatic hemolysis identification on aligned dual-lighting images of cultured blood agar plates[J]. *Comput-*

- er Methods and Programs in Biomedicine, 2018, 156: 13–24.
- [39] 励建荣, 檀茜倩, 王丹, 等. 基于益生菌及其代谢物的食源性致病微生物控制技术研究进展[J]. 食品科学技术学报, 2022, 40(3): 1–12.
- LI J R, TAN X Q, WANG D, et al. Recent approaches in probiotics and their metabolites research to control foodborne pathogens[J]. Journal of Food Science and Technology, 2022, 40(3): 1–12.
- [40] YANG S H, LIU L, WANG J W, et al. Antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and genome features of *Lactiplantibacillus plantarum* LR-14 from Sichuan pickles[J]. Archives of Microbiology, 2022, 204(10): 637.
- [41] KHALIL N, KHEADR E, EL-ZINEY M, et al. *Lactobacillus plantarum* protective cultures to improve safety and quality of wheyless Domiati-like cheese[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2022, 46(4): e16416.
- [42] YANG T S, YANG J S, TANG K, et al. Antioxidative properties analysis of gastrointestinal lactic acid bacteria in Hainan black goat and its effect on the aerobic stability of total mixed ration[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 974925.

Probiotic Characteristics of *Lactobacillus plantarum* with High Yield of Exopolysaccharides (EPS) Isolated from Pickled Vegetables

Tan Xiqian¹, Ma Bingyu¹, Cheng Xiaoxiao¹, Cui Fangchao¹, Wang Dangfeng¹,
Yu Zhangfu², Shen Ronghu², Li Jianrong^{*}

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

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

Abstract In the study, lactic acid bacteria which could produce exopolysaccharides (EPS) were screened from pickled vegetables, the yield of the EPS was determined, and the strain PC715 which have the highest EPS producing ability was identified, at the mean time, the probiotic characteristics of PC715 were also evaluated, including its growth status, acid and bile salt tolerance, self-aggregation, co-aggregation, hydrophobicity, safety, antibacterial activity, and *in vitro* antioxidant capacities. The results showed that based on the 16S rDNA sequence, the strain with the highest EPS production yield (PC715) was identified as *Lactobacillus plantarum*. The yield of EPS715 was about 870 mg/L detected by the phenol-sulfuric method. The ultraviolet-visible spectrum indicated no proteins or nucleic acids were in EPS715. *L. plantarum* PC715 could grow well at both 28 °C and 37 °C, its survival rates at acid conditions (pH=2.5, 3.0, and 4.0) were 75.54%, 91.77%, and 93.69%, respectively, and its survival rates in bile salts (1, 2, and 3 mg/mL) were higher than 40%. The self-aggregation rate of the stain was about 27.64%, the co-aggregation towards *Escherichia coli* was at about 16%, and the hydrophobic ability were between 0.88%–16.97% towards different organic solvents. *L. plantarum* PC715 were sensitive to tetracycline, ampicillin, erythromycin, chloramphenicol, and clindamycin, had no hemolytic activity, and had inhibitory effects on *E. coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus saprophyte*, *Hafnia alvei*, *Staphylococcus aureus*, and *Acinetobacter* sp. The scavenging capacity of DPPH, hydroxyl, and ABTS⁺ radicals of *L. plantarum* PC715 cell-free supernatant were (62.90±0.87)%, (93.39±2.20)%, and (60.19±1.07)%, respectively. This study showed that exopolysaccharides producing-*L. plantarum* PC715 might had probiotic potential and could be used as the starter culture in the fermentation industry.

Keywords exopolysaccharides; *Lactobacillus plantarum*; antibacterial; antioxidant; probiotic characteristics