



## 消化乳杆菌泡菜分离株W369的鉴定及其益生功能

汤伟, 胡维, 王菁蕊, 王金菊, 王艳萍\*

天津科技大学食品工程与生物技术学院, 食品营养与安全教育部重点实验室, 天津 300457

**摘要:** 【目的】鉴定从中国传统发酵泡菜分离的1株乳酸菌, 并分析其潜在的益生功能。【方法】通过形态观察、生理生化、16S rRNA基因序列分析等方法对分离得到的乳酸菌进行鉴定; 评价该菌株的NaCl耐受能力、抗生素最小抑制浓度, 以及益生功能。【结果】该菌株鉴定为消化乳杆菌(*Lactobacillus alimentarius*) W369, 在10%的NaCl浓度下仍可以存活; 对常用抗生素具有不同程度的敏感性。益生功能分析表明, 培养72 h后W369对亚硝酸钠的降解率为92.92%; 其体外胆固醇脱除率达到31.80%; 发酵液上清具有清除DPPH自由基(DPPH·)、超氧阴离子自由基( $\cdot\text{O}_2^-$ )和螯合亚铁离子( $\text{Fe}^{2+}$ )的作用, 分别达到(88.02±1.48)%、(43.75±3.10)%和(29.99±2.34)%; 完整细胞具有很强的还原能力[(244.52±0.92) μmol/mL半胱氨酸当量]、羟自由基( $\cdot\text{OH}$ )清除能力(77.17±0.58)%和抗脂质氧化的能力(29.67±0.77)%; 发酵上清液和无细胞提取物均具有谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和超氧化物歧化酶(Mn-SOD)活性。【结论】消化乳杆菌W369分离株具有亚硝酸盐降解能力、胆固醇清除能力和抗氧化活性等诸多益生功能, 具有潜在的应用价值。

**关键词:** 消化乳杆菌, 降解亚硝酸盐, 降胆固醇, 抗氧化活性

乳酸菌可赋予食品柔和的酸味和香气, 改善食品的品质和营养, 在食品中广泛应用而被人们所熟识。目前, 乳酸菌形成的食品占食品总量的25%以上, 乳酸菌发酵食品被誉为“21世纪的食品”和“健康食品”<sup>[1]</sup>。近年来, 乳酸菌对于人体及动物的益生作用也得到广泛的关注。如乳酸菌具有很好的调节肠道菌群平衡形成抗菌生物屏障, 产生半乳糖苷酶具有缓解乳糖不适症的作用、抗过敏、降低

胆固醇作用等等<sup>[2-3]</sup>。随着对乳酸菌功能多样性研究的深入及分子生物学在乳酸菌种的应用, 很多乳酸菌的新的益生功能特性被发现并解释, 如抑制致病菌在肠道的定殖及改善肠道菌群<sup>[4]</sup>、缓解肠炎<sup>[5-6]</sup>、调节机体的免疫力<sup>[7-8]</sup>、抗氧化延缓衰老、降低直肠癌的患病几率等生物学功能。

乳酸菌在细菌分类学上划分为23个属, 包括乳杆菌属(*Lactobacillus*)、乳球菌属(*Lactococcus*)、

基金项目: 国家“863计划”(2011AA100904)

\*通信作者。Tel/Fax: +86-22-60192442; E-mail: ypwang@tust.edu.cn

收稿日期: 2015-08-22; 修回日期: 2015-10-06; 网络出版日期: 2015-12-10

肠球菌属(*Enterococcus*)、双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、链球菌属(*Streptococcus*)等。目前应用于工业生产的乳酸菌菌种主要是:乳球菌(*Lactococcus*)、乳杆菌(*Lactobacillus*)、肠膜明串珠菌(*Leuconostoc*)、片球菌(*Pediococcus*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、酒类酒球菌(*Oenococcus oeni*)和嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)<sup>[9]</sup>。1970年,消化乳杆菌首次在鱼和肉制品中分离得到<sup>[10]</sup>,随后其他专家学者也在肉制品中分离得到该菌,特别是在发酵香肠中得到的较多<sup>[11]</sup>。直到1983年该菌种仍未被《Approved Lists of Bacterial Names》收录<sup>[12]</sup>,基于这之前的研究Reuter等<sup>[13]</sup>对消化乳杆菌这一新种进行了重新校正及定义。目前国内外对消化乳杆菌的研究报道甚少,Yu等<sup>[14]</sup>从传统发酵泡菜中分离获得了16株消化乳杆菌;葛平珍等<sup>[15]</sup>从发酵酸肉中分离得到1株高效降胆固醇消化乳杆菌SR10,总降胆固醇率为33.7%;Kotzekidou等<sup>[16]</sup>将消化乳杆菌添加到真空包装的法兰克福香肠中能抑制致病菌*Salmonella enteritidis*并延长产品的货架期;Lemay等<sup>[17]</sup>也在研究中发现,消化乳杆菌BJ33能够提高肉制品质量和安全性,与其他防腐剂配合使用能够控制因微生物引起的腐败并能够延长货架期。本课题组从中国传统发酵蔬菜中分离得到1株同时具有亚硝酸盐降解能力、胆固醇清除能力和抗氧化活性等诸多益生功能的乳酸菌,通过形态观察、生理生化、16S rRNA基因序列分析等方法,鉴定为消化乳杆菌。本文旨在综合发掘乳酸菌的应用潜力,丰富乳酸菌菌种资源,为功能性食品的开发和人类健康提供新的菌株资源和科学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种和培养基:** (1) 消化乳杆菌W369由本课题组筛选,并保存于中国微生物菌种保藏管理委员会(菌种保藏号:CGMCC 7.180)。(2) MRS培养基和MRS-CHOL培养基<sup>[18]</sup>。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** 胆固醇、牛胆盐、Ezup柱式细菌基因组DNA抽提试剂盒、16S rRNA基因的PCR扩增引物购自上海生工生物工程技术有限公司;2-硫代巴比妥酸(Thiobarbituric acid)购自北京索莱宝科技有限公司;焦性没食子酸(Pyrogallic acid)购自天津博迪化工股份有限公司;1,1-二苯基-2-苦基肼自由基(DPPH·)购自上海梯希爱化成工业发展有限公司;总抗氧化能力(T-AOC)测试盒、超氧化物歧化酶(SOD)分型测试盒、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)测试盒购自南京建成科技有限公司。SU-1510扫描式电子显微镜,日本日立公司;BIO-RAD水平电泳装置和凝胶成像系统;Thermo酶标仪;Whitley DG250厌氧工作站;SIGMA 3-18K冷冻离心机;SCIENTZ-II D超声破碎仪。

### 1.2 试验菌株的培养及各组样品的制备

**菌株培养:** 将W369按2%接种量(V/V)接种于MRS液体培养基中37℃静置厌氧培养16–18 h,充分活化到最佳状态。乳酸菌发酵液上清、完整细胞悬液和乳酸菌无细胞提取物的制备:在4000 r/min转速下离心15 min,收集上清液,即为发酵液上清;收集菌体细胞沉淀,并用无菌去离子水洗涤2次,再将乳酸菌细胞重新悬浮,调节乳酸菌细胞终浓度为 $1.0 \times 10^{10}$  CFU/mL,得到乳酸菌完整细胞悬液;将制备得到完整细胞悬液超声波破碎,在冰浴中每超声处理5 s、间隔5 s,超声粉碎10 min,并经显微镜下检查没有完整细胞菌体,然后4℃、6000 r/min离心10 min,丢弃沉淀保留上清部分,得到乳酸菌无细胞提取物备用<sup>[19]</sup>。

### 1.3 W369形态和生理生化鉴定

参照《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[20]</sup>对W369进行形态特征和生理生化特性等鉴定。并对其进行扫描电镜观察。

### 1.4 16S rRNA基因的PCR扩增与序列分析

**1.4.1 细菌总DNA提取:** 参照试剂盒操作说明进行。

**1.4.2 16S rRNA基因扩增:**以基因组DNA为模板,利用细菌通用引物<sup>[21]</sup>(正向引物27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';反向引物1492R:5'-GGTTACGTTACGACTT-3')进行PCR扩增。扩增程序:95 °C 4 min;95 °C 30 s,56 °C 30 s,72 °C 90 s,30个循环;72 °C 10 min。PCR产物切胶回收纯化后送华大基因测序。

**1.4.3 序列分析:**将所得的16S rRNA基因序列用BLAST软件与GenBank数据库进行相似性比对,运用MEGA 6.0软件采用Neighbor-Joining方法构建系统发育树。

### 1.5 菌株生长特性的测定

将活化好的菌株按2%的接种量接种于MRS液体培养基中37 °C静置培养,每隔2 h采用比浊法在600 nm处测定细菌细胞生长量和pH值直到稳定期为止,以培养时间为横坐标,对应的吸光度值pH值为纵坐标,绘制生长曲线和产酸特性曲线。

### 1.6 菌株耐盐、耐酸及耐胆盐特性研究

**1.6.1 耐盐试验:**将活化菌液按2%接种量分别接入含有不同浓度NaCl(2%–14%)的MRS液体培养基中,37 °C静置培养24 h测定600 nm下的发酵液OD值,将最高的吸光度值定义为100%。

**1.6.2 耐酸试验:**调整活菌数约为 $2.0 \times 10^8$  CFU/mL分别接种于pH为3.5和3.0的MRS液体培养基中,37 °C静置培养并于第0、1、2、3、4 h梯度稀释平板法测定乳酸菌活菌数,以pH 6.2的MRS液体培养基作为对照。

**1.6.3 耐胆盐试验:**调整活菌数约为 $2.0 \times 10^8$  CFU/mL分别接种于含有不同浓度牛胆盐(0–0.2%)的MRS液体培养基中,37 °C厌氧培养并于第0、2、4、6、8 h梯度稀释平板法测定乳酸菌活菌数,以不含牛胆盐的MRS液体培养基作为对照。

### 1.7 菌株药敏性试验

采用液体稀释法进行乳酸菌抗药性的表性分析<sup>[22–23]</sup>,抗药性表型用最小抑制浓度(the minimum inhibitory concentration, MIC)表示。将菌株过

夜活化之后接种到含有不同浓度抗生素的MRS(pH 6.2–6.4)液体培养基中,使培养基中菌株的终浓度为 $2.0 \times 10^8$  CFU/mL,然后将其置于37 °C厌氧培养,观察菌株的生长情况。最小抑制浓度定义为抗生素能抑制菌株生长的最低浓度。

### 1.8 降解亚硝酸盐实验

根据GB5009.33-2010《食品中亚硝酸盐与硝酸盐测定》中盐酸萘乙二胺法对亚硝酸盐进行测定。

### 1.9 胆固醇含量的测定

采用邻苯二甲醛法测定胆固醇含量,并略作修改<sup>[18,24]</sup>。

胆固醇去除率(%)=(初始胆固醇含量–上清液胆固醇含量)/初始胆固醇含量 $\times 100\%$

### 1.10 抗氧化活性的测定

还原性的测定以及DPPH·清除力测定参照Lin等<sup>[25]</sup>的方法;·OH清除力测定参照Gutteridge等<sup>[26–27]</sup>的方法;·O<sup>2-</sup>清除力测定参照付丽红<sup>[28]</sup>的方法;螯合亚铁离子能力的测定按照Yamauchi和Lin等的方法<sup>[25,29]</sup>进行;抗脂质过氧化能力的测定参照Kullisaar等<sup>[30]</sup>和张江巍等<sup>[31]</sup>所述方法;巯基含量、T-AOC、SOD和GSH-PX活性的测定具体方法参照南京建成试剂盒说明书操作。

## 2 结果和分析

### 2.1 W369形态和生理生化鉴定

在MRS培养基上菌落呈灰白色,直径约2 mm,圆形,表面凸起,湿润易挑取(图1)。经戊二醛固定,乙醇梯度脱水,冷冻干燥后电镜观察W369形态(图2),细胞呈短杆状,宽0.6–0.8  $\mu\text{m}$ ,长1.5–2.3  $\mu\text{m}$ ,无芽孢,无鞭毛。革兰氏阳性菌;过氧化氢酶试验呈阴性;不凝乳;在低于8 °C或高于42 °C不生长;在MRS液体培养基中最终pH为4.0;在pH 9.2条件下不生长;不运动。

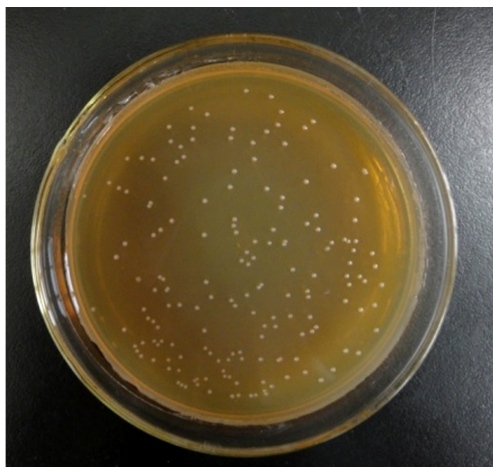


图 1. W369的菌落形态

Figure 1. Colony morphology of *L. alimentarius* W369.

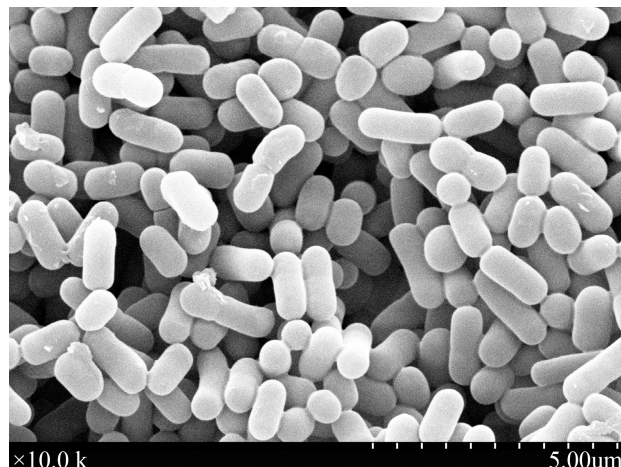


图 2. W369的电子显微镜照片

Figure 2. Morphology of *L. alimentarius* W369 ( $\times 10.0k$ ).

## 2.2 W369基于16S rRNA基因序列系统发育树的构建及菌种鉴定

利用NCBI网站的PSI-BLAST软件, 对W369的16S rRNA进行同源性序列比对, 使用MEGA软件, 采用邻结法(Neighbor-Joining, NJ)构建了系统进化树(图 3), 利用自举分析(Bootstrap, 1000次重复)检验各分支的置信度。如图 3所示, W369与消化乳杆菌的其他菌株处于同一个分支, 与菌株*L. alimentarius* NBRC 106464的

16S rRNA序列(AB626058)同源性为99%, 结合生理生化鉴定进一步确认W369为消化乳杆菌种, 序列登录号为KJ737424。

## 2.3 菌株生长曲线和产酸曲线

W369在液体MRS培养基中的生长曲线和产酸曲线如图 4所示。在培养的前6 h处于生长适应期, 生长代谢缓慢, 产酸较少; 6 h后缓慢进入对数生长期, 菌体呈几何级数递增, 由生长代谢产生的有机酸也在不断地积累, pH下降; 到20 h进

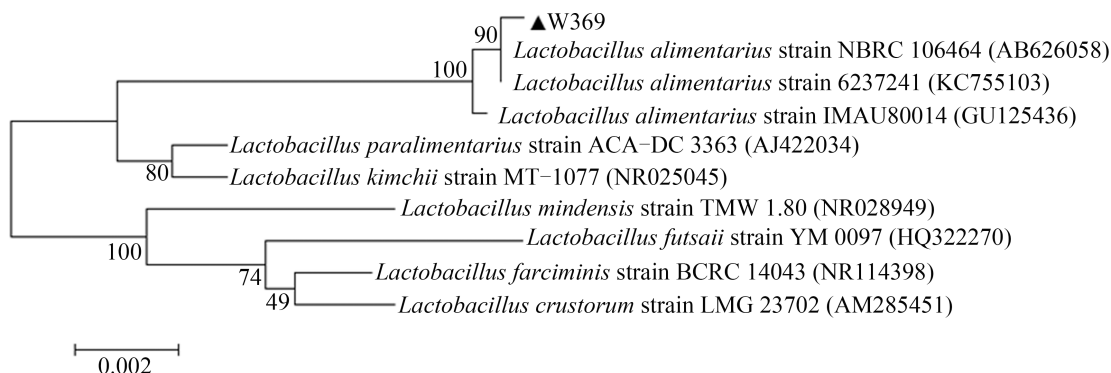


图 3. 基于*Lactobacillus*相关菌种及W369 16S rRNA序列构建系统发育树

Figure 3. Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of strain W369 and related *Lactobacillus* strains. Numbers at the nodes are the Bootstrap confidence values obtained after 1000 replicates. The scale bar corresponds to 0.002 substitution per nucleotide position. The GenBank accession numbers for nucleotide sequence data are shown in the brackets.

入稳定期，菌体数量趋于稳定，产酸平稳，pH基本维持在4.2以下，最低可达4.06。

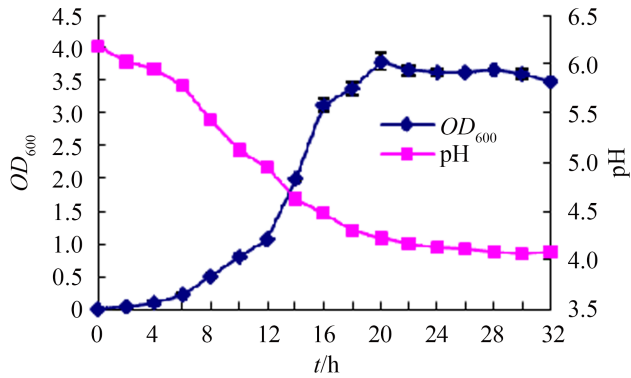


图 4. W369的生长曲线和产酸特性

Figure 4. Growth curve and ability of producing acid of strain W369.

## 2.4 菌株耐受特性

**2.4.1 耐盐试验:** W369对NaCl具有较高的耐受性，在盐浓度小于10%时菌株都能够生长，但是随着盐浓度的升高，菌体生长逐渐受到抑制，当盐浓度达到10%以上时几乎不能生长(图 5)。

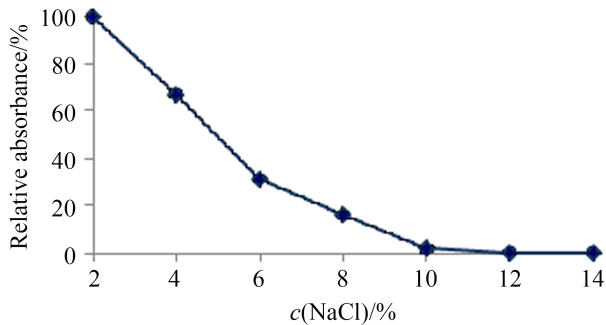


图 5. W369在不同NaCl浓度下的存活特性

Figure 5. Effect of NaCl on viability of strain W369.

**2.4.2 耐胃酸试验:** W369在pH为3.0和3.5的条件下存活率都比较高，均维持在 $10^8$  CFU/mL(图 6)。

**2.4.3 耐胆盐试验:** 结果表明W369在胆盐浓度0.05%–0.20%均能够存活至少8 h，且菌活力都能保持在 $10^4$  CFU/mL以上(图 7)。

## 2.5 菌株耐药性

通过液体稀释法我们测定了菌株对8种抗生素

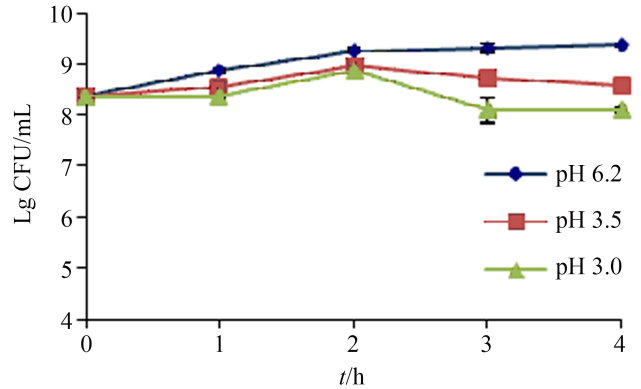


图 6. W369在不同pH值下的存活特性

Figure 6. Survival of W369 under different pH condition and time.

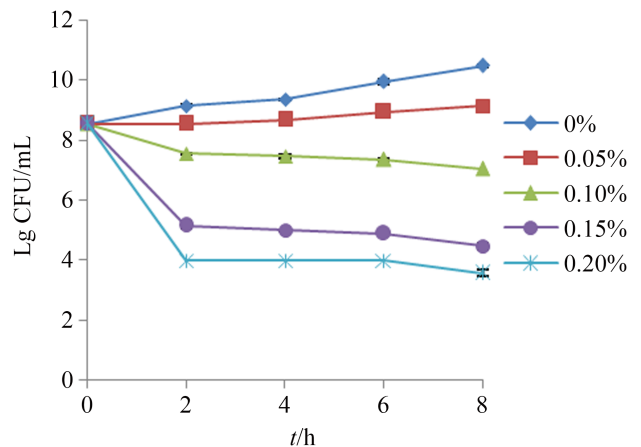


图 7. W369在不同胆盐浓度下的存活特性

Figure 7. Survival of W369 under different bile salt concentration and time.

的MIC值(表 1)，从而对个体乳酸菌的耐药水平进行了评估。对于不同抗生素，菌株的敏感性差异较大。W369表现出了多重耐药性，即每株菌至少对两种抗生素耐药，W369对氯霉素、卡那霉素、氨苄青霉素、红霉素及链霉素均表现出不同程度的耐药。此外，我们还检测到了高水平的耐药性，如W369的卡那霉素MIC值超过了2048  $\mu$ g/mL。

## 2.6 菌株对亚硝酸盐和胆固醇降解的能力

对W369以2%接种量接入含0.25 mg/mL  $\text{NaNO}_2$ 的MRS液体培养基，37  $^{\circ}\text{C}$ 培养，用盐酸萘乙二胺法测 $\text{NaNO}_2$ 含量。根据初始加入的 $\text{NaNO}_2$

表1. W369对8种抗生索的最小抑制浓度

Table 1. Minimum inhibitory concentrations (MICs) of the different antibiotics assayed against W369

Antibiotic	MICs/(μg/mL)	R/S
Chloramphenicol	16	R
Kanamycin	>2048	R
Ampicillin	2	R
Erythromycin	2	R
Penicillin sodium	0.125	S
Rifampicin	0.125	S
Cefotaxime sodium	4	S
Streptomycin	32	R

R and S represent “resistant” and “sensitive”, respectively.

的量计算亚硝酸盐的降解率。经测定W369培养72 h以后的最终亚硝酸盐含量为0.0177 mg/mL, 降解率为92.92%。采用邻苯二甲醛法, 在胆固醇含量为300 mg/L的条件下测得W369胆固醇的降解率为31.80%。

## 2.7 菌株的抗氧化能力

**2.7.1 W369的还原能力:** 样品的还原活性与抗氧化性之间存在着一定的相关性。采用铁氰化钾法测定了菌株不同组分的还原活性(表 2)。W369完整细胞悬液的还原活性最高, 高达(244.52±0.92) μmol/L半胱氨酸当量, 要高于同等条件下其他已报道的乳酸菌株, 但在发酵液上清中并未检测到还原力。

## 2.7.2 W369对DPPH·和·OH的清除能力:

DPPH·是一种人工合成的具有单个电子的以氮为中心的具有良好稳定性能的有机自由基, 当在环境中遇到具有还原性的自由基清除剂时, 自由基清除剂便与DPPH·自由基的单电子发生配对, 溶液的褪色程度与DPPH·接受的电子数呈现出一定的定量关系。目前DPPH·的清除已经成为一种广泛使用的筛选和评价抗氧化剂抗氧化能力的方法。本研究测定了W369各组分对DPPH·的清除情况(表 2), W369发酵液上清清除DPPH·的能力最强, 达到(88.02±1.48)%, 其次是完整细胞悬液为(74.03±2.77)%, 无细胞提取物的清除能力相对弱些为(35.56±3.89)%。

芬顿反应是一种将H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液与Fe<sup>2+</sup>溶液混合后产生强氧化产物的现象, 其机制是在反应体系中生成了具有强氧化性的·OH (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Fe<sup>2+</sup>→·OH+H<sub>2</sub>O+Fe<sup>3+</sup>)。由表 2所示W369的完整细胞对·OH的清除能力要高于无细胞提取物, 清除率分别为(77.17±17)%和(46.44±2.48)%, 在发酵液上清中并未检测出对·OH有清除作用。

## 2.7.3 W369对·O<sup>2-</sup>的清除能力和对Fe<sup>2+</sup>的螯合能力:

·O<sup>2-</sup>虽然不会直接诱导生物机体内的脂类氧化, 但它能在金属离子催化下发生芬顿反应产生具有高活性的·OH, 故研究乳酸菌各组分对·O<sup>2-</sup>的清除能力可以反应其抗氧化能力。由实验结果可知, W369对·O<sup>2-</sup>均有不同程度的清除能力, 清除

表2. W369不同组分的抗氧化能力

Table 2. Antioxidant capacity of different lactic acid bacteria isolates

Subjects	Fermented supernatant	Intact cell	Cell-free extract
Reducing activity/(μmol/mL cysteine equivalent)	–	244.52±0.92	65.50±3.13
Scavenging of DPPH·/%	88.02±1.48	74.03±2.77	36.56±3.89
Scavenging of ·OH/%	–	77.17±0.58	46.44±2.48
Scavenging of ·O <sub>2</sub> <sup>-</sup> /%	43.75±3.10	42.98±1.27	0.92±1.53
Fe <sup>2+</sup> chelating ability/%	29.99±2.34	6.83±0.21	4.73±2.56
Lipid peroxidation inhibition capacity/%	3.98±0.55	29.67±0.77	2.56±0.47

能力依次为发酵液上清>完整细胞>无细胞提取物。

过渡金属离子如 $\text{Fe}^{2+}$ 可通过芬顿反应促进脂类的氧化反应,因此测定金属离子螯合能力的大小也是评价氧化剂抗氧化性能常用的方法。螯合能力越强被评价的抗氧化剂潜在的抗氧化性就愈强。W369各组分对 $\text{Fe}^{2+}$ 的螯合能力与 $\cdot\text{O}^{2-}$ 的清除能力的趋势相同,都是发酵液上清>完整细胞>无细胞提取物。

**2.7.4 抗脂质过氧化能力:**脂质体是一个利用磷脂双分子层膜所形成的自组装体系,向其中加入抗坏血酸与 $\text{Fe}^{2+}$ 可以诱导脂质发生过氧化,常被用于评价化合物和制剂的抗氧化能力<sup>[32]</sup>。我们测定了W369各组分对脂质体模型中脂质过氧化的抑制作用,表2对抗脂质过氧化率分别是发酵液上清(3.98±0.55)%、完整细胞(29.67±0.77)%和无细胞提取物(2.56±0.47)%。

**2.7.5 W369非蛋白巯基含量、T-AOC、总SOD和CuZn-SOD以及GSH-P<sub>x</sub>活性的测定:**巯基(-SH)可螯合羟基清除单线态氧,正常情况下巯基

处于还原态,与自由基发生反应后可形成二硫键(-S-S-),其中与羟基反应最活跃,反应式为: $2\text{-SH}+2\cdot\text{OH}\rightarrow\text{-S-S-}+2\text{H}_2\text{O}$ ,所以说菌体内的巯基含量越高,其清除自由基的能力就越强。W369菌体匀浆具有较高含量的非蛋白巯基,这可能是其具有较高 $\cdot\text{OH}$ 清除能力的主要原因之一。W369的发酵上清液和细胞匀浆均表现一定的SOD活性,表明W369的SOD在胞内和胞外均有分布。进一步对胞内的SOD进行分型检测,发现CuZn-SOD活性极低,进而可以推断W369的SOD属于Mn-SOD。由表3可知,W369细胞匀浆和发酵上清液均表现一定的GSH-P<sub>x</sub>活性,发酵上清液GSH-P<sub>x</sub>活性要高于细胞匀浆GSH-P<sub>x</sub>活性,表明代谢产物中GSH-P<sub>x</sub>的含量要多于胞内。此外,GSH-P<sub>x</sub>也具有一定的清除 $\cdot\text{O}^{2-}$ 的能力<sup>[33]</sup>。在机体中某种单一自由基的清除不仅仅是一种抗氧化物质在起作用,而是多种物质的共同作用所致,因此不能就此确定某种自由基含量的减少仅是由于某一种活性物质发挥的作用,只能说明这种物质对自由基有一定的清除作用。

表3. W369非蛋白巯基含量、T-AOC、SOD以及GSH-P<sub>x</sub>活性

Table 3. Mercapto,T-AOC,SOD,GSH-P<sub>x</sub> activity of W369

Subjects	Samples	Content
Nonprotein mercapto (-SH)	cell homogenate	140.53 μmol/g prot
T-AOC	cell homogenate	0.38 U/mg prot
T-SOD	cell homogenate	6.07 U/mg prot
	fermented supernatant	14.95 U/mg prot
CuZn-SOD	cell homogenate	0.02 U/mg prot
GSH-P <sub>x</sub>	cell homogenate fermented supernatant	4.52 U/mg prot 33.06 U/mg prot

### 3 讨论

目前乳酸菌菌株多用于乳制品及益生菌剂的开发,日本和欧美用于酸奶及益生菌剂的乳酸菌种主要是一些来自人体的乳酸菌种和双歧杆菌,如:嗜酸乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、罗氏乳杆菌、

植物乳酸杆菌、干酪乳杆菌、詹氏乳酸杆菌、短双歧杆菌、长双歧杆菌、两歧双歧杆菌等等<sup>[34-36]</sup>。我国自主开发的菌种很少,市售的益生菌相关产品中的菌株几乎被国外菌株所垄断,在肉制品中应用特别具有亚硝酸盐分解能力和胆固醇降解能力的乳酸菌更少,因此我们将焦点集中

在对特定菌株的各方面功能进行全面研究, 试图筛选多功能单菌株, 以丰富我国可利用乳酸菌菌种资源。

消化乳杆菌W369生长繁殖迅速, 培养6 h开始进入对数生长期, 迅速产酸最终达到pH 4.0, 可以很好的满足泡菜发酵剂生长和产酸迅速的基本条件。W369对NaCl耐受性较高, 10%的条件下仍有存活, 这无论是用来发酵泡菜还是作为肉制品的发酵剂都能够满足其在不低于浓度为5%以上的盐水中仍然可以正常存活的对食用盐的耐受性要求<sup>[37]</sup>。W369能够适应pH 3.0的胃酸和0.2%的胆盐环境, 因此W369应该可以顺利通过胃酸环境到达肠道, 从而保证菌株对肠道的调节作用。除此之外, 泡菜发酵过程中亚硝酸盐会出现一个峰值, 影响了泡菜的食用安全性和发展前景。而在生产发酵肉制品时为了取得理想的发色效果, 添加适量的亚硝酸盐作为发色剂。但随着人们对健康的重视程度越来越高, 对发酵食品中因添加亚硝酸盐所带来的危害性也给予了更多的关注, 开发具有降解亚硝酸盐能力的功能性菌株, 有效降低亚硝酸盐的最终残留变得越来越重要。杜晓华等<sup>[38]</sup>从四川传统泡菜中分离出的植物乳杆菌N2对NaNO<sub>2</sub>的降解率达90.81%, 应用于发酵泡菜中降解亚硝酸盐的效果较自然发酵泡菜显著。另外, 由血液中胆固醇含量偏高引起的动脉粥样硬化、冠心病、脑中风等疾病也已严重威胁着人类健康, 深入研究降低人体血清中胆固醇的方法和开发低胆固醇食品也成为当今功能食品研究的一个发展趋势。本实验室前期从Kefir粒中筛选得到的1株植物乳杆菌MA2, 其胆固醇的移除率达到(55.61±3.19)%, 体内动物试验也展示出良好的降胆固醇效果<sup>[2]</sup>。虽然目前对于乳酸菌的功能研究和菌株的开发日益增多, 但多数却集中在同一菌株的单一功能, 对于新多功能单菌株的开发利用较少。本研究中的消化乳杆菌W369对亚硝酸盐的

降解率为92.92%, 还同时具有胆固醇降解能力(31.80%)和抗氧化能力, 对发酵泡菜和肉制品的研究具有重要的健康效应和现实意义。另外研究还发现W369对多种病原菌具有抑制作用, 从而预测其能够有效延长货架期、控制有害微生物的生长, 抑制其产生毒素, 从而提高肉制品的安全性。

对W369的抗氧化特性的研究结果我们发现, 同一株乳酸菌的发酵上清液、完整细胞悬液和胞内提取物的抗氧化能力存在较大差异, 表明其抗氧化的活性物质存在的部位和含量都有所不同。在乳酸菌中, 抗氧化物质主要是由抗氧化酶、锰离子、巯基化合物等组成<sup>[39]</sup>。本实验检测了W369中SOD和GSH-Px两种起抗氧化作用的酶, 对于是否还有其他类活性物质起作用以及各自在抗氧化过程中起何种作用有待进一步研究。另外, 细胞内有对氧敏感的“巯基/二硫化物”氧化还原系统, 非蛋白巯基主要指谷胱甘肽一类的化合物。这些物质中起到抗氧化作用的主要因素就是巯基清除·OH的能力。我们在细胞匀浆中检测到较高的非蛋白巯基化合物, 这可能也是W369具有抗氧化作用的因素之一。由此可见, W369的抗氧化机制是多种抗氧化物质的综合作用。

消化乳杆菌的研究相对起步较晚, 但是越来越多的研究表明该菌种具有许多的优良特性。本研究简单的概述了这一菌种的发展历程, 以及对本实验室筛选得到的1株消化乳杆菌W369进行了综合的评价, 该菌展现出诸多良好的性能, 具有潜在的生产应用价值。本试验结果将为消化乳杆菌应用于生产实践及功能食品的开发提供理论基础和指导意义, 同时也为新多功能单菌株的开发利用提供了良好的微生物资源。

## 参考文献

- [1] 陈功. "一碟小菜"的效益延伸-乳酸菌与泡菜产业. 中外食品, 2013, (1): 19-23.



- [ 2 ] Wang YP, Xu N, Xi AD, Ahmed Z, Zhang B, Bai XJ. Effects of *Lactobacillus plantarum* MA2 isolated from Tibet kefir on lipid metabolism and intestinal microflora of rats fed on high-cholesterol diet. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 84(2): 341–347.
- [ 3 ] Liu CJ, Liu Q, Jiang B. Acid and bile tolerance and cholesterol reduction ability of *Lactobacillus paraplantarum*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 49(9): 1176–1179. (in Chinese)  
刘长建, 刘秋, 姜波. 类植物乳杆菌的耐酸、耐胆盐及降胆固醇特性. *微生物学报*, 2009, 49(9): 1176–1179.
- [ 4 ] Wang YP, Wang JR, Dai WL. Use of GFP to trace the colonization of *Lactococcus lactis* WH-C1 in the gastrointestinal tract of mice. *Journal of Microbiological Methods*, 2001, 86(3): 390–392.
- [ 5 ] Hedin C, Whelan K, Lindsay JO. Evidence for the use of probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease: a review of clinical trials. *Proceedings of the Nutrition Society*, 2007, 66(3): 307–315.
- [ 6 ] Jonkers D, Stockbrügger R. Review article: probiotics in gastrointestinal and liver diseases. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 2007, 26(Suppl 2): 133–148.
- [ 7 ] Barbieri N, Villena J, Herrera M, Salva S, Alvarez S. Nasally administered *Lactobacillus rhamnosus* accelerate the recovery of humoral immunity in B lymphocyte-deficient malnourished mice 1–3. *The Journal of Nutrition*, 2013, 143(2): 227–235.
- [ 8 ] Qin CB, Xu L, Yang YL, He SX, Dai YY, Zhao HY, Zhou ZG. Comparison of fecundity and offspring immunity in zebrafish fed *Lactobacillus rhamnosus* CICC 6141 and *Lactobacillus casei* BL23. *Reproduction*, 2013, 147(1): 53–64.
- [ 9 ] Zhang WY, Meng H, Zhang HP. Progress on the genomics of lactic acid bacteria—a review. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48(9): 1270–1275. (in Chinese)  
张文羿, 孟和, 张和平. 乳酸菌基因组学研究进展. *微生物学报*, 2008, 48(9): 1270–1275.
- [10] Reuter G. Laktobazillen und eng verwandte mikroorganismen in fleisch und fleischerwaren. 2. Die charakterisierung der isolierten laktobazillenstämme. *Fleischwirtschaft*, 1970, 50: 954–962.
- [11] Kagermeier A. Toxonomie und Vorkommen von Milchsäurebakterien in Fleischprodukten. Universität München, Thesis, 1981.
- [12] Skerman VBD, McGowan V, Sneath PHA. Approved lists of bacterial names. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1980, 30(1): 225–420.
- [13] Reuter G. *Lactobacillus alimentarius* sp. nov., nom. rev. and *Lactobacillus jarciminis* sp. nov., nom. rev. *Systematic and Applied Microbiology*, 1983, 4(2): 277–279.
- [14] Yu J, Gao W, Qing MJ, Sun ZH, Wang WH, Liu WJ, Pan L, Sun T, Wang HM, Bai N, Zhang HP. Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from traditional pickles in Sichuan, China. *Journal of General and Applied Microbiology*, 2012, 58(3): 163–172.
- [15] Ge PZ, Liu Y, Wang D, Ding M, Zhou CQ. Physiological characteristics of *Lactobacillus alimentarius* SR 10 in fermented sour meat and its cholesterol-lowering effect. *Food and Fermentation Industries*, 2013, 39(10): 52–56. (in Chinese)  
葛平珍, 刘洋, 王丹, 丁苗, 周才琼. 发酵酸肉中消化乳杆菌 SR10的理化特性及其降胆固醇作用. *食品与发酵工业*, 2013, 39(10): 52–56.
- [16] Kotzekidou P, Bloukas JG. Microbial and sensory changes in vacuum-packed frankfurter-type sausage by *Lactobacillus alimentarius* and fate of inoculated *Salmonella enteritidis*. *Food Microbiology*, 1998, 15(1): 101–111.
- [17] Lemay MJ, Rodrigue N, Gariépy C, Saucier L. Adaptation of *Lactobacillus alimentarius* to environmental stresses. *International Journal of Food Microbiology*, 2000, 55(1/3): 249–253.
- [18] Zhang B, Xu N, Xi AD, Wang YP. Screening and identification of cholesterol-reducing KF5 strain. *Journal of Tianjin University of Science & Technology*, 2009, 24(2): 17–20. (in Chinese)  
张玢, 许女, 习傲登, 王艳萍. 一株降胆固醇作用乳酸菌 KF5的分离与鉴定. *天津科技大学学报*, 2009, 24(2): 17–20.
- [19] Lin MY, Chang FJ. Antioxidative effect of intestinal bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356. *Digestive Diseases and Sciences*, 2000, 45(8): 1617–1622.
- [20] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [21] Stackebrandt E, Goodfellow M. *Nucleic Acids Techniques in Bacterial Systematics*. Chichester: John Wiley & Sons, 1991, 115–147.
- [22] Teuber M, Perreten V. Role of milk and meat products as vehicles for antibiotic-resistant bacteria. *Acta Veterinaria Scandinavica Supplementum*, 2000, 93: 75–87.
- [23] Threlfall EJ, Ward LR, Frost JA, Willshaw JA. The emergence

- and spread of antibiotic resistance in food-borne bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 2000, 62(1/2): 1–5.
- [24] Wang YW, Liu H, Li PL, Wang YX, Xiong LX. Isolation and identification of lactic acid bacteria producing bile salt hydrolase and study on mechanism of reducing cholesterol. *Food Science*, 2006, 27(10): 215–218. (in Chinese)  
王玉文, 刘慧, 李平兰, 王延祥, 熊利霞. 产胆盐水解酶乳酸菌的分离、鉴定及降解胆固醇机理的初步研究. *食品科学*, 2006, 27(10): 215–218.
- [25] Lin MY, Yen CL. Antioxidative ability of lactic acid bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, 47(4): 1460–1466.
- [26] Gutteridge JMC. Ferrous-salt-promoted damage to deoxyribose and benzoate. The increased effectiveness of hydroxyl-radical scavengers in the presence of EDTA. *The Biochemical Journal*, 1987, 243(3): 709–714.
- [27] Jin M, Cai YX, Li JR, Zhao H. 1, 10-Phenanthroline-Fe<sup>2+</sup> oxidative assay of hydroxyl radical produced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup>. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 1996, 23(6): 553–555. (in Chinese)  
金鸣, 蔡亚欣, 李金荣, 赵辉. 邻二氮菲-Fe<sup>2+</sup>氧化法检测 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup>产生的羟自由基. *生物化学与生物物理进展*, 1996, 23(6): 553–555.
- [28] 付丽红. 羊肚菌深层发酵培养及抗氧化活性研究. 天津: 天津科技大学博士学位论文, 2013.
- [29] Yamauchi R, Goto Y, Kato K, Ueno Y. Prooxidant effect of dihydroxyacetone and reducing sugars on the autoxidation of methyl linoleate in emulsions. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1984, 48(4): 843–848.
- [30] Kullisaar T, Songisepp E, Mikelsaar M, Zilmer K, Vihalemm T, Zilmer M. Antioxidative probiotic fermented goats' milk decreases oxidative stress-mediated atherogenicity in human subjects. *British Journal of Nutrition*, 2003, 90(2): 449–456.
- [31] Zhang JW, Cao YS, Lin HX, Chen Y. Antioxidative activities of lactic acid bacteria and the test method. *China Dairy Industry*, 2005, 33(9): 53–56. (in Chinese)  
张江巍, 曹郁生, 李海星, 陈燕. 乳酸菌抗氧化活性及检测方法. *中国乳品工业*, 2005, 33(9): 53–56.
- [32] Fukuzawa K, Chida H, Tokumura A, Tsukatani H. Antioxidative effect of  $\alpha$ -tocopherol incorporation into lecithin liposomes on ascorbic acid-Fe<sup>2+</sup>-induced lipid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1981, 206(1): 173–180.
- [33] Liu Y, Guo YX, Pan DD. Comparative antioxidant activity of four species of lactic acid bacteria *in vitro*. *Food Science*, 2012, 33(11): 25–29. (in Chinese)  
刘洋, 郭宇星, 潘道东. 4种乳酸菌体外抗氧化能力的比较研究. *食品科学*, 2012, 33(11): 25–29.
- [34] 黄珊珊. 植物乳杆菌发酵剂的制备及抗氧化活性研究. 天津: 天津科技大学硕士学位论文, 2011.
- [35] Sanders ME. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 1998, 8(5/6): 341–347.
- [36] 张达荣. 微生态学在医学领域中的应用. *中国微生态学杂志*, 2002, 14(1): 3–4.
- [37] 李先保, 李兴民, 南庆贤, 杨洁彬. 乳酸菌发酵剂在肉制品中的应用. *肉类研究*, 1997, (1): 19–22, 25.
- [38] Du XH, Liu SL, Pu B, Chen G, Yan ZC. Screening, identification and application of nitrite-degenerating lactic acid bacteria from Sichuan pickles. *Food and Fermentation Industries*, 2013, 39(4): 48–52. (in Chinese)  
杜晓华, 刘书亮, 蒲彪, 陈功, 颜正财. 四川泡菜中降解亚硝酸盐乳酸菌的筛选鉴定及其应用. *食品与发酵工业*, 2013, 39(4): 48–52.
- [39] 杨郁荻, 白明. 乳酸菌抗氧化机理的初步探讨. *中国乳业*, 2011, (115): 68–73.

# Identification of a new probiotic *Lactobacillus alimentarius* W369 from Chinese traditional pickles

Wei Tang, Wei Hu, Jingrui Wang, Jinju Wang, Yanping Wang\*

Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Ministry of Education, Food Engineering and Biotechnology Institute, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

**Abstract:** [Objective] A new lactic acid bacterium was isolated from Chinese traditional pickles and its potential probiotic properties were analyzed. [Methods] The strain was identified by morphological observation, physiological and biochemical tests and 16S rRNA gene comparison. Its probiotic properties were evaluated, including resistance to NaCl, the minimum inhibitory concentration of antibiotics, nitrite degradation ability and cholesterol removal ability. [Results] This strain was identified as *Lactobacillus alimentarius* W369 (No. CGMCC 7.180). *L. alimentarius* W369 could survive under the concentration of 10% NaCl and it was sensitive to some common antibiotics. By studying its probiotic properties, we found that its nitrite degradation rate reached 92.92% after 72 h and the cholesterol removal rate reached 31.80%. The fermented supernatant showed strong abilities of DPPH· and the superoxide anion radical scavenging capacity, as well as Fe<sup>2+</sup> chelating ability. The clearance rate were (88.02±1.48)%, (43.75±3.10)% and (29.99±2.34)% respectively. Strain W369 also exhibited strong reducing capacity, hydroxyl radical scavenging action and lipid peroxidation inhibition capacity. Both the fermented supernatant and cell-free extracts exhibited glutathione peroxidase (GSH-Px) and superoxide dismutase (Mn-SOD) activities. [Conclusion] *L. alimentarius* W369 possessed many probiotic properties including nitrite degradation ability, cholesterol removal ability and antioxidant activity. It has many potential application values.

**Keywords:** *Lactobacillus alimentarius* W369, nitrite degradation, cholesterol removal, antioxidant activity

(本文责编: 李磊)

Supported by a Grant from the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (2011AA100904)

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-22-60192442; E-mail: ypwang@tust.edu.cn

Received: 22 August 2015; Revised: 6 October 2015; Published online: 10 December 2015