发酵蔬菜源食品用益生乳酸菌的筛选及降胆固醇能力评价

杜 秋[1]，周 晓[1]，覃业优[2]，胡嘉亮[2]，刘 洋[1]，蒋立文[*1]
（1. 湖南农业大学 食品科学技术学院，湖南 长沙 410128；2. 湖南坛坛香食品科技有限公司，湖南 浏阳 410300）

摘要：为了从发酵蔬菜中筛选出具有降解胆固醇能力的食品用益生乳酸菌，作者以融合魏斯氏菌（*Weissella confusa*）RW 作为对照，采用定向分离法结合 16S rDNA 分析不同来源的发酵蔬菜样品中得到 5 株具有降胆固醇能力的益生乳酸菌。结果表明，5 株菌对 pH 2.0、质量浓度为 3 g/L 的胆盐以及模拟胃肠液均具有耐受性，降胆固醇能力强（54.79%~62.54%）、能够抑制病原菌且黏附于 Caco-2 细胞上，表现出优良的益生特性。此外，5 株菌均无溶血现象，不产生物胺，对多数抗生素敏感，安全性高。通过 16S rDNA 鉴定 5 株菌分别为植物乳植杆菌（*Lactiplantibacillus plantarum*）JCSMC-1、植物乳杆菌（*Lactobacillus plantarum*）SYB 和 JCSMC6-2、副干酪乳酸菌（*Lacticaseibacillus paracasei*）SYD 和 XSMC-1。本研究获得的 1 株植物乳植杆菌、2 株植物乳杆菌、2 株副干酪乳酸菌均具有食品用益生菌的基本特性，为开发食品用益生菌提供了新资源。

关键词：发酵蔬菜；乳酸菌；益生菌；降胆固醇
中图分类号：TS 201.3　**文章编号：**1673-1689（2023）11-0063-11　**DOI：**10.12441/spyswjs.20230423004

Screening and Evaluating with Cholesterol-Lowering Ability of Probiotic Lactic Acid Bacteria for Food from Fermented Vegetable

DU Qiu[1]，*ZHOU Xiao*[1]，*QIN Yeyou*[2]，*HU Jialiang*[2]，*LIU Yang*[1]，*JIANG Liwen*[*1]
（1. College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. Hunan Tantanxiang Food Technology Co., Ltd., Liuyang 410300, China）

Abstract: In order to screen probiotic lactic acid bacteria for food with cholesterol-lowering ability from fermented vegetable. In present study, taking *Weissella confusa*(RW) as a reference, 5 probiotic lactic acid bacteria isolated with cholesterol-lowering ability were obtained from different fermented vegetable samples via directional separation method combined with 16SrDNA identification method. The results showed that the five strains had excellent probiotic characteristics, with exhibiting the tolerance to acid (pH 2.0), bile salt (3 g/L) and simulated gastrointestinal fluids, and superior cholesterol-lowering ability (54.79%~62.54%), and inhibiting pathogen and adhere to Caco-2 cells. The strains showed excellent probiotic characteristics. Further, five isolates were safety with no

收稿日期：2023-04-23　**修回日期：**2023-06-08
基金项目：湖南省重点领域研发计划项目（2020NK2027）。
*通信作者：蒋立文（1968—），男，博士，教授，博士研究生导师，主要从事食品生物技术方面的研究。E-mail：fs_ly@163.com

hemolysis phenomenon, no biogenic amines producing, and showed sensitivity to a variety of antibiotics. Five isolates were identified as *Lactiplantibacillus plantarum* (JCSMC-1), *Lactobacillus plantarum* (SYB and JCSMC6-2), *Lacticaseibacillus paracasei* (SYD and XSMC-1) by 16S rDNA. The isolates of 1 *Lactiplantibacillus plantarum*, 2 *Lactobacillus plantarum*, and 2 *Lacticaseibacillus paracasei* all have the basic characteristics of probiotic lactic acid bacteria for food, providing new resources for the development of probiotic lactic acid bacteria for food.

Keywords: fermented vegetable, lactic acid bacteria, probiotics, cholesterol-lowering

联合国粮农组织（FAO）、世界卫生组织（WHO）、国际益生菌和益生元科学协会（ISAPP）以及国际乳业联盟（IDF）对益生菌给出了定义：益生菌是活的微生物，当摄入足够数量时，对宿主的健康产生益处[1]。因此，益生菌应具备足够数量、活菌状态和有益健康功能这三大特征[2]。2003 年，FAO/WHO 提出了一套评价食品用益生菌的系统方法指南《食品中益生菌评价指南》，制定了益生菌的基本标准[3]；2022 年中国食品科学技术学会（CIFST）发布的《食品用益生菌通则》（以下简称通则），明确规定食品用益生菌活菌数应大于（或等于）1×10^8 CFU/mL 或 1×10^8 CFU/g，并定义了食品用益生菌为可用于食品中的一种或多种益生菌，经发酵、富集、干燥或不干燥、混合或不混合、包装等工序制成的食品原料[4]。通则对食品用益生菌的评价要求进行了系统的阐述，要求应在菌株水平进行鉴定、安全评价和健康作用评价[5]。

乳酸菌（Lactic acid bacterium，简称 LAB）来源广泛，随着对大健康的重视，植物源乳酸菌已引起业内的关注[6]。传统发酵蔬菜是以蔬菜为原料，利用微生物自然发酵的冷加工食品[7]。在我国不同地区有着丰富的传统发酵蔬菜制品[8]。已有研究发现，不同地区的发酵蔬菜的微生物组成群落存在显著差异，但其优势细菌菌群主要为乳酸菌[9]。因此，传统发酵蔬菜为植物源益生乳酸菌筛选提供了强大的资源库[10]。由于植物源乳酸菌分离难度低、容易获得[11]，且植物源乳酸菌与动物源乳酸菌对胃肠液具有类似的抗性[12]，所以对发酵蔬菜源益生乳酸菌的研究已成为该产业的一个热点。目前，国外对发酵蔬菜中益生菌研究较多的是韩国泡菜[13-14]，而我国研究较多的是四川泡菜、东北酸菜[15]，而其他地区的报道相对较少。作者从不同地区自制的传统发酵蔬菜中分离乳酸菌，对传统发酵蔬菜源乳酸菌进行了系统益生性评价及鉴定，并分析了益生特性降胆固醇能力，旨在开发符合食品用益生菌要求的发酵蔬菜源益生乳酸菌。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 样品来源 湖南剁辣椒、湖南芥菜、云南剁辣椒、广西发酵酸笋等共计 17 个样品。

1.1.2 对照菌株（RW） 融合魏斯氏菌（*Weissella confusa*）CWY578262：革兰氏阳性，过氧化氢酶阴性，显微镜下呈短杆状或球状，具有益生菌的基本特性，还具有富产胞外多糖的特性[16]。

1.1.3 $CaCO_3$-MRS 琼脂培养基 MRS 琼脂培养基 1 L、$CaCO_3$（质量浓度 25 g/L）、pH 6.5，121 ℃高压蒸汽灭菌 20 min。

1.1.4 MRS-CHOL 肉汤培养基 蔗糖酯 0.1 g，胆固醇 0.1 g，牛胆盐 0.2 g，吐温 80 1 mL，加冰乙酸5 mL，搅拌均匀，超声溶解趁热过 0.45 μm 滤膜到 1 L MRS 肉汤培养基中，pH 6.0~7.0，121 ℃高压蒸汽灭菌 20 min。

1.1.5 氨基酸脱羧酶培养基 MRS 琼脂培养基1 L，组氨酸、酪氨酸、赖氨酸、精氨酸、鸟氨酸等 1 g/L，溴甲酚紫 0.06 g/L，pH 5.5~6.5，121 ℃高压蒸汽灭菌 20 min[17]。

1.1.6 试剂 胆固醇、蔗糖酯、抗生素：源叶生物科技有限公司；邻苯二甲醛、组氨酸、酪氨酸、鸟氨酸、精氨酸、赖氨酸：国药集团化学试剂有限公司；MRS 肉汤培养基、MRS 琼脂培养基、PCA 琼脂培养基：广东环凯微生物科技有限公司；胃蛋白酶（酶活 250 U/mg）、胰酶（酶活 250 U/mg）：南京都莱生物技术有限公司；牛胆盐：上海麦克林生化科技有限公司。

1.2 仪器与设备

DHP120 恒温培养箱：上海实验仪器厂有限公

司;HY45 恒温摇床:深圳汇成科技有限公司;LDZX-50KBS 立式高压灭菌锅:上海申安医疗器械有限公司;CX23 光学显微镜:日本 Olympus 公司;ReadMax 1900 光吸收型全波长酶标仪:上海闪谱生物科技有限公司;TG16-WS 台式高速离心机:湖南湘仪实验室仪器开发有限公司。

1.3 乳酸菌的分离鉴定

1.3.1 乳酸菌的分离及形态学鉴定 取 10 g 样品加入 90 mL 无菌生理盐水中,摇匀后取适宜梯度稀释液 100 μL 均匀涂布于 $CaCO_3$-MRS 琼脂培养基上,37 ℃倒置培养 3 d。选取不同菌落形态且溶钙圈较大的单菌落划线至 MRS 固体培养基上,反复划线纯化,通过革兰氏染色筛选出符合乳酸菌条件的菌株。初筛得到的乳酸菌保存于含体积分数 40%甘油的 MRS 肉汤培养基中,于-20 ℃冷冻保存。

1.3.2 乳酸菌耐酸耐胆盐能力 参考刘璐等的方法加以修改[18],将传代 3 代的实验菌株以体积分数 3%分别接种于 pH 值为 2.0、质量浓度为 3 g/L 牛胆盐的 MRS 肉汤培养基中,立即取样测 600 nm 处的吸光度,剩余混合液于 37 ℃、120 r/min 振荡培养,12 h 时取样,测定 600 nm 处的吸光度 A_1,存活率按(1)式计算。

$$R_1=\frac{A_1}{A_0}\times 100\% \quad (1)$$

式中:R_1 为菌株耐酸/耐胆盐存活率,%;A_1 为 12 h 样品的吸光度;A_0 为 0 h 样品的吸光度。

1.4 乳酸菌的生物特性评价

1.4.1 对条件致病菌的拮抗活性 用琼脂孔扩散法测定待测菌株的抗菌活性,以大肠杆菌(*E.coli*)、金黄色葡萄球菌(*S.aureus*)、枯草芽孢杆菌(*B.subtilis*)为指示菌。指示菌(10^7 CFU/mL)与无菌 PCA 琼脂培养基以 1∶10 充分混匀后倒入放有多个无菌牛津杯的平板中,待加有病原菌的 PCA 琼脂培养基冷却凝固后,用无菌镊子取出牛津杯,即形成若干琼脂孔。分别向琼脂孔里加入 100 μL 待检菌(10^7 CFU/mL)的离心上清液于 9 000 r/min 离心 5 min,37 ℃培养 12 h,游标卡尺测量抑菌圈直径[19]。

1.4.2 乳酸菌对胃/肠模拟液耐受性实验 参考费永涛等的方法制备人工胃/肠液[20]。将活化至 3 代的菌液,用无菌 PBS(pH 7.0)清洗 3 次(8 000 r/min 离心 10 min),用 PBS(pH 7.0)反复吹打菌泥,混匀,制成供试菌悬液(1×10^8 CFU/mL)。移取 1 mL 菌悬液接种于 9 mL 人工胃液中,混匀,立即取样通过平板计数法测定其活菌数 N_0,剩余混合液置于 37 ℃恒温培养箱中培养,3 h 时取样测定其活菌数 N_1。将在模拟胃液中孵育 3 h 后的菌液,取 1 mL 接种于 9 mL 人工肠液中,混匀,立即取样平板计数测定其活菌数 N_0,剩余混合液于 37 ℃培养 3 h 后取样测定其活菌数 N_1,存活率按式(2)计算。

$$R_2=\frac{N_1}{N_0}\times 100\% \quad (2)$$

式中:R_2 为人工胃/肠液存活率,%;N_1 为人工胃液/肠液处理 3 h 后 LAB 的活菌数,CFU/mL;N_0 为人工胃液/肠液处理 0 h 后 LAB 的活菌数,CFU/mL。

1.5 乳酸菌的安全性评价

1.5.1 抗生素耐药性安全性评价 将纯化培养后的乳酸菌菌液浓度调整为 1×10^8 CFU/mL,取 100 μL 菌液涂布于 MRS 固体培养基,待菌液吸收后放置药敏纸片,37 ℃培养 24 h。每组重复 3 次,记录抑菌圈直径,根据表 1 进行药物敏感性判定。

表 1 微生物药物敏感实验执行标准

Table 1 Criteria for microbial drug susceptibility test

抗生素名称	规格/(μg/片)	抑菌圈直径/mm		
		耐药 R	中介 I	敏感 S
四环素	30	≤14	15~18	≥19
氯霉素	30	≤12	13~17	≥18
氨苄西林	10	≤13	14~16	≥17
万古霉素	30	≤14	15~16	≥17
庆大霉素	10	≤12	13~14	≥15
卡那霉素	30	≤13	14~17	≥18
链霉素	10	≤11	12~14	≥15
红霉素	15	≤13	14~22	≥23
克林霉素	20	≤14	15~20	≥21

耐存率按式(3)计算:

$$R_3=\frac{N_1}{N_0}\times 100\% \quad (3)$$

式中:R_3 为乳酸菌耐药率,%;N_1 为耐药和中介菌株总数,CFU;N_2 为实验菌株总数,CFU。

1.5.2 乳酸菌 γ-溶血实验 将供试菌株点接于脱纤维绵羊血琼脂平板上,以金黄色葡萄球菌为对照,37 ℃培养 24 h 后观察菌落是否具有溶血现象。

1.5.3 乳酸菌氨基酸脱羧酶活性实验 将乳酸菌点接在氨基酸脱羧酶培养基上,37 ℃培养 24 h 后观察菌落周围颜色变化,若培养基变成紫色,即氨

基酸脱羧酶活性阳性,则具有潜在产胺威胁;若为黄色,即氨基酸脱羧酶活性阴性,该乳酸菌无潜在产胺威胁。

1.6 乳酸菌的降胆固醇能力评价

参考余萍等[21]的方法稍做修改,将活化 3 代后的乳酸菌调节菌浓度为 1×10^8 CFU/mL,按体积分数 3%接种至 MRS-CHOL 培养基中,37 ℃培养 48 h 后,9 000 r/min 离心 5 min,取上清液,采用邻苯二甲醛比色法测定 550 nm 处的吸光度,胆固醇去除率见公式(4)。

$$R_4=\frac{A_0-A_1}{A_0}\times100\% \quad (4)$$

式中:R_4 为胆固醇去除率,%;A_0 为未接种菌株培养 48 h 后离心上清液的吸光度;A_1 为接种培养 48 h 后离心上清液的吸光度。

1.7 乳酸菌对 Caco-2 细胞黏附能力评价

参考郭志华等的方法,将 Caco-2 细胞密度调整为 1×10^5 CFU/mL,并分装于 24 孔培养板中培养至单层细胞待用[22]。取 2 mL 待测菌液(10^8 CFU/mL)于 9 000 r/min 离心 5 min,用 2 mL DMEM 培养基将菌体重悬并进行菌落计数(M_0),剩余混合液取 200 μL 加入 24 孔板中,于 37 ℃、体积分数 5% CO_2 孵育 1 h 后用 PBS(pH 7.0)清洗细胞表面未黏附的乳酸菌,加入 2 mL 胰酶消化 5 min 后用 2 mL DMEM 培养基重悬并进行活菌计数(M_1)。黏附率按照公式(5)计算。乳酸菌活菌计数参照申文熹等的方法进行菌落计数[23]。

$$R_5=\frac{M_1}{M_0}\times100\% \quad (5)$$

式中:R_5 为乳酸菌黏附率,%;M_1 为黏附的乳酸菌的菌落总数,CFU/mL;M_0 为待测重悬液菌落总数,CFU/mL。

1.8 乳酸菌的分子生物学鉴定

1.8.1 菌株鉴定 将乳酸菌纯化 3 代后委托杭州联川生物有限公司进行 16S rDNA 测序鉴定。

1.8.2 同源性分析 利用 BlAST 网站(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)找到与鉴定菌株同源性最高的菌株并下载序列,使用 MEGA7 软件构建系统发育树。

1.9 数据分析

分析、计算、图表绘制分别采用 DPS 数据处理软件和 OriginPro 2021(64-bit)软件。各实验组重复 3 次,以平均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌的初步筛选结果

传统发酵蔬菜样品经过菌种分离纯化,筛选出革兰氏阳性的 96 株溶钙菌株,初筛判断为乳酸菌。部分菌落形态与镜检结果见图 1。

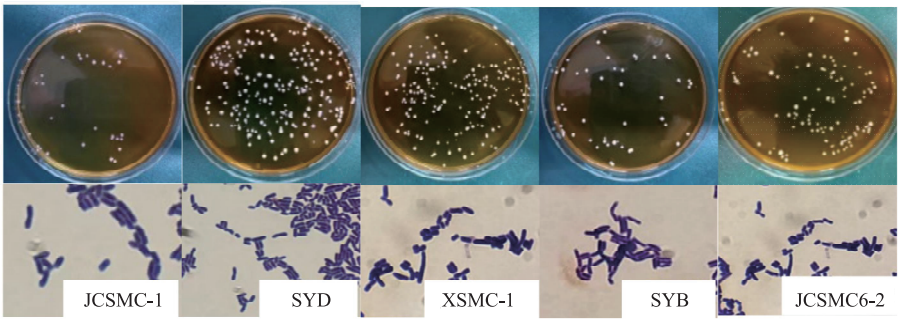
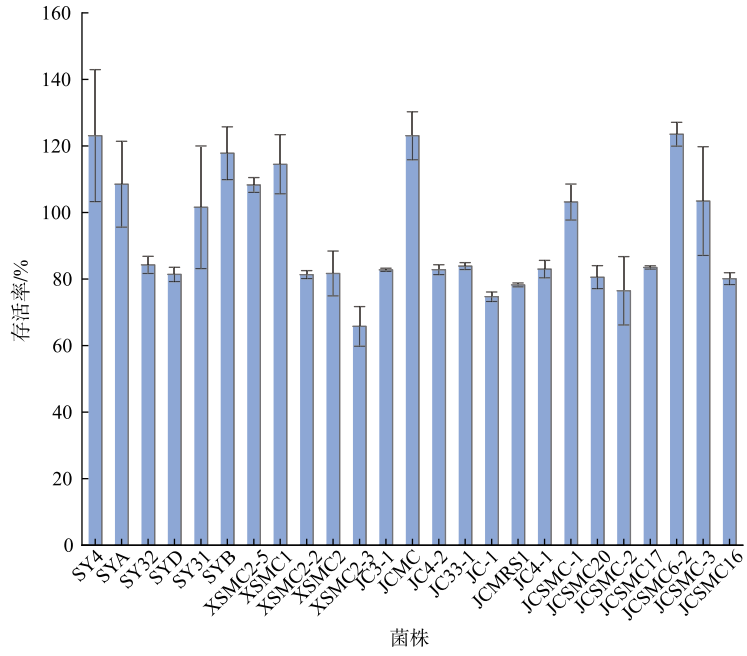


图 1 乳酸菌菌落形态及革兰氏染色结果

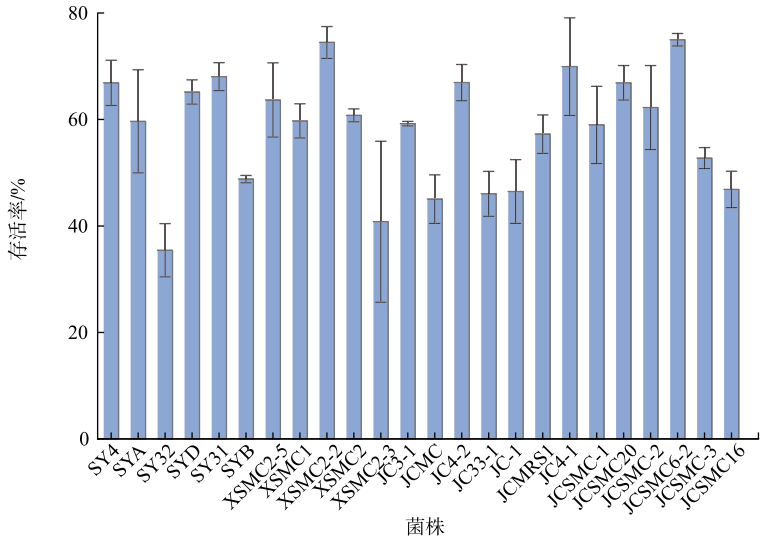
Fig. 1 Colonial morphology and gram staining results of LAB

2.2 乳酸菌对酸和胆盐耐受特性

益生菌需要到达肠道才能发挥其益生功能。益生菌从口腔到人体肠道的过程中需要耐受胃中的低 pH 环境[23],以适应小肠中胆盐胁迫[24]等不良环境[25]。因此,具有耐受人体胃肠道环境的抗逆能力已经成为评价益生菌的一项重要指标[26]。作者将初筛获得的菌株依次在 pH 2.0 和质量浓度 3 g/L 牛胆盐的 MRS 液体培养基中处理 12 h 进行筛选。如图 2(a)所示,96 株乳酸菌经 pH 2.0 培养 12 h 后得到25 株乳酸菌且存活率在 65%以上,其中有 10 株菌活菌数较之前有所增加,表明耐酸能力强。25 株耐酸乳酸菌经质量浓度 3 g/L 牛胆盐处理 12 h 后,有 24 株乳酸菌能存活,存活率在 35%以上,见图2(b)。表明这 24 株菌对酸和胆盐具有良好的耐受性。



（a）25株乳酸菌的耐酸性(pH 2)



（b）25株乳酸菌对3 g/L胆盐耐受性

图 2　乳酸菌的耐酸性及胆盐耐受性实验结果

Fig. 2　Acid tolerance and bile salt tolerance tests results of LAB

2.3　生物特性评价

2.3.1　*抑菌实验*　乳酸菌可以抑制病原菌的生长繁殖,有助于胃肠道环境健康[27]。24 株乳酸菌对病原菌抑菌能力的检测结果见表 2。37 ℃培养 12 h 后，有 22 株菌株对金黄色葡萄球菌有显著抑菌效果,平均抑菌直径为(30.60±0.46) mm;所有菌株对枯草芽孢杆菌都有抑菌效果，平均抑菌直径为(19.87±0.30) mm。表明大多数乳酸菌对所选择的革兰氏阳性病原菌具有显著抑菌效果。多数菌株对大肠杆菌也具有抑菌效果，平均抑菌直径为（12.20±0.35）mm，表明实验菌株对大肠杆菌抑菌能力一般。值得注意的是,菌株 SY4、SY32、JC3-1、JCMC、JC4-1 对大肠杆菌没有抑菌效果，菌株 JCSMC-3、JCSMC16 对金黄色葡萄球菌没有抑菌效果;而其余 17 株菌株对 3 株病原菌均有抑菌效果,表明其抑菌谱较广且抑菌能力更强。

表 2　乳酸菌对病原菌的抑菌直径

Table 2　Inhibition zone diameter of LAB against pathogenic bacteria　　单位：mm

菌株	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌
SY4	—	26.03±0.65	17.20±0.38
SYA	12.63±0.23	31.54±0.77	16.20±0.32
SY32	—	35.13±0.32	22.30±0.01
SYD	12.17±0.29	28.70±0.05	25.00±0.61
SY31	11.47±0.45	28.17±0.84	22.00±0.01
SYB	12.00±0.50	34.69±0.61	23.00±0.78
XSMC2-5	11.12±0.08	31.83±0.52	16.69±0.25
XSMC1	11.00±0.73	30.00±0.10	25.65±0.05
XSMC2-2	11.83±0.29	32.00±0.20	23.00±0.28
XSMC2	12.07±0.68	30.31±0.56	18.23±0.01
XSMC2-3	14.33±0.08	33.17±0.62	19.31±0.17
JC3-1	—	30.00±0.01	16.30±0.03
JCMC	—	35.33±0.29	19.54±0.89
JC4-2	13.00±0.12	30.00±0.01	22.10±0.61
JC33-1	12.00±0.51	33.30±0.61	20.50±0.53
JC-1	12.00±0.01	24.00±0.58	19.85±0.02
JCMRS1	10.78±0.73	26.00±0.89	12.30±0.05
JC4-1	—	32.00±0.20	21.30±0.31
JCSMC-2	13.33±0.08	30.00±0.02	19.86±0.01
JCSMC-3	11.54±0.50	—	16.49±0.36
JCSMC16	11.67±0.28	—	17.21±0.96
JCSMC-1	14.32±0.08	29.17±0.69	26.50±0.28
JCSMC20	13.67±0.25	28.96±0.95	15.32±0.36
JCSMC6-2	10.85±0.74	32.90±0.53	21.05±0.01

注："—"表示无抑菌圈。

2.3.2　*模拟胃肠液耐受特性评价*　乳酸菌在胃肠消化过程中，除了受低酸和胆盐的影响，各种消化酶也会影响乳酸菌最终到达肠道的活菌数[28-29]。作者以 RW 为参考，测定 24 株乳酸菌在模拟胃/肠液中的存活情况。由表 3 可知，24 株菌株在模拟胃液中处理 3 h 均能存活，但其存活能力存在差异。菌株 SY4、JC33-1、XSMC1、JC-1 在模拟胃液中存活率较高，均大于 100%。菌株 SY32、JC4-1、SY31、JCMC、SYA、JCSMC-2、XSMC2-2、SYD、JCSMC16 在模拟胃液中的存活率(55.83%~87.64%)高于 RW 的存活率(48.80%)。其余 11 株的存活率低于融合魏斯菌，其中 XSMC2-3 的存活率最低(3.08%)，但活菌数仍高于 10^6 CFU/mL。

24 株实验菌株经模拟肠液处理 3 h 后，除菌株 SY31 和 JCSMC-2 对模拟肠液无耐受能力，其余菌株对模拟肠液均表现出不同程度的耐受能力，见表 3。其中菌株 XSMC2-3 耐受能力较弱，活菌数仅有 7.55×10^5 CFU/mL，表明菌株 XSMC2-3 受到模拟肠液的影响较大。

2.4　安全性评价

通过对实验菌株的生物特性评价，选择抑菌谱较广、抑菌能力较强且对胃肠道环境耐受能力强的 18 株乳酸菌进行安全性评价。18 株菌株对 9 种抗生素的耐药性检测结果见表 4。18 株乳酸菌对四环素、氯霉素、氨苄西林、红霉素具有敏感性；对万古霉素、庆大霉素、卡那霉素、链霉素具有耐药性。据报道，多数乳酸菌对糖肽类(万古霉素)和氨基糖苷类(庆大霉素、卡那霉素和链霉素)的抗生素具有天然耐受能力[30-31]。克林霉素主要是通过抑制细菌蛋白质合成从而达到抑菌效果[32]，因此35%的供试菌

表 3 乳酸菌在人工胃肠液中的活菌数及存活率

Table 3 Viable count and survival rates of LAB in artificial gastrointestinal fluids

菌株	模拟胃液			模拟肠液		
	0 h 活菌数/(CFU/mL)	3 h 活菌数/(CFU/mL)	存活率/%	0 h 活菌数/(CFU/mL)	3 h 活菌数/(CFU/mL)	存活率/%
RW	8.30×10^{8}	4.05×10^{8}	48.80	5.05×10^{7}	1.70×10^{7}	33.66
SY4	3.40×10^{8}	59.0×10^{7}	173.53	3.65×10^{7}	1.70×10^{7}	46.58
SYA	3.97×10^{8}	3.04×10^{8}	76.57	2.92×10^{7}	1.26×10^{7}	43.15
SY32	4.45×10^{8}	3.90×10^{8}	87.64	1.71×10^{7}	1.42×10^{7}	83.04
SYD	3.40×10^{8}	2.00×10^{8}	58.82	1.76×10^{7}	1.92×10^{7}	109.09
SY31	4.06×10^{8}	3.32×10^{8}	81.77	—	—	—
SYB	5.00×10^{8}	1.27×10^{8}	25.40	1.72×10^{7}	3.05×10^{7}	177.33
XSMC2-5	4.74×10^{8}	8.12×10^{7}	17.13	2.01×10^{7}	7.44×10^{6}	37.01
XSMC-1	5.00×10^{8}	9.10×10^{8}	182.00	1.06×10^{7}	1.01×10^{7}	95.28
XSMC2-2	2.23×10^{8}	1.54×10^{8}	69.06	1.29×10^{7}	3.15×10^{6}	24.42
XSMC2	4.85×10^{8}	3.58×10^{7}	7.38	6.05×10^{6}	3.27×10^{6}	54.05
XSMC2-3	2.34×10^{8}	7.20×10^{6}	3.08	2.56×10^{6}	7.55×10^{5}	29.49
JC3-1	3.91×10^{8}	1.67×10^{8}	42.71	6.85×10^{6}	4.24×10^{6}	61.90
JCMC	1.79×10^{8}	1.43×10^{8}	79.89	1.36×10^{7}	6.75×10^{6}	49.63
JC4-2	4.40×10^{8}	6.13×10^{7}	13.93	9.70×10^{6}	7.70×10^{6}	79.38
JC33-1	2.27×10^{8}	3.47×10^{8}	152.86	1.87×10^{7}	4.32×10^{6}	23.10
JC-1	2.74×10^{8}	2.98×10^{8}	108.76	2.24×10^{7}	2.92×10^{6}	13.04
JCMRS1	1.89×10^{8}	7.00×10^{7}	37.04	4.25×10^{6}	8.55×10^{6}	201.18
JC4-1	2.63×10^{8}	2.24×10^{8}	85.17	2.31×10^{7}	6.74×10^{6}	52.25
JCSMC-2	5.12×10^{8}	3.78×10^{8}	73.83	—	—	—
JCSMC-3	2.69×10^{8}	9.60×10^{7}	35.69	9.20×10^{6}	6.72×10^{6}	73.04
JCSMC16	2.83×10^{8}	1.58×10^{8}	55.83	1.63×10^{7}	7.56×10^{6}	46.38
JCSMC-1	2.55×10^{8}	9.80×10^{7}	38.43	1.05×10^{7}	5.07×10^{6}	48.29
JCSMC20	2.27×10^{8}	1.10×10^{8}	48.46	2.06×10^{7}	3.04×10^{6}	14.76
JCSMC6-2	3.39×10^{8}	1.07×10^{8}	31.56	1.01×10^{7}	5.30×10^{6}	52.48

注:—表示未检出乳酸菌活菌数。

株的蛋白质合成不受克林霉素抑制,表现出耐药性。18 株供试菌株均无溶血现象且在氨基酸脱羧酶培养基上呈阴性,表明这 18 株试验菌株均为安全菌株。

2.5 益生乳酸菌降解胆固醇能力评价

由图 3 可知,18 株乳酸菌培养 48 h 后胆固醇的去除率均大于 40%。对照菌株 RW 培养 48 h 后胆固醇去除率达到 54.56%。除 JC4-1、JCSMC16、JC33-1、JCSMC-3、XSMC2-2 外其余 13 株菌株的胆固醇去除率则高于 RW 的胆固醇去除率,其中菌株 SYD 的胆固醇去除率高达 62.54%。

2.6 益生乳酸菌对 Caco-2 黏附能力的评价

13 株降胆固醇益生乳酸菌对 Caco-2 细胞的黏附率见图 4。有 9 株乳酸菌对 Caco-2 细胞的黏附率高于对照菌株 RW 的黏附率(62.10%),其中菌株 SYB 的黏附率高达 81.74%;余下菌株的黏附率均低于 RW 的黏附率(62.10%),但均在 45%以上。黏附性强的乳酸菌更容易在肠道中定植[33-35],从而发挥益生作用。故选择黏附率前 5 名的菌株进行鉴定。

表 4　乳酸菌对不同抗生素的耐药性

Table 4　Resistance of LAB to different antibiotics

菌株	四环素	氯霉素	氨苄西林	万古霉素	庆大霉素	卡那霉素	链霉素	红霉素	克林霉素
XSMC2-2	S	S	S	R	R	R	R	S	S
SYD	S	S	S	R	R	R	R	S	S
JCSMC-1	S	S	S	R	R	R	R	S	S
JCSMC6-2	S	S	S	R	R	R	R	S	S
JCMRS1	S	S	S	R	R	R	R	S	I
SY32	S	S	S	R	R	R	R	S	I
JC4-2	S	S	S	R	R	R	R	S	R
JCMC	S	S	S	R	R	R	R	S	I
SYA	S	S	S	R	R	R	R	S	I
SYB	S	S	S	R	R	R	R	S	S
SY4	S	S	S	R	R	R	R	S	S
JC-1	S	S	S	R	R	R	R	S	S
JCSMC-3	S	S	S	R	R	R	R	S	R
JC3-1	S	S	S	R	R	R	R	S	S
XSMC-1	S	S	S	R	R	R	R	S	S
JC33-1	S	S	S	R	R	R	R	S	S
JC4-1	S	S	S	R	R	R	R	S	S
JCSMC16	S	S	S	R	R	R	R	S	S
RW	S	S	S	R	R	R	R	S	S
耐药率/%	0	0	0	100	100	100	100	100	35

注：“S”表示敏感；“I”表示中介；“R”表示耐药。

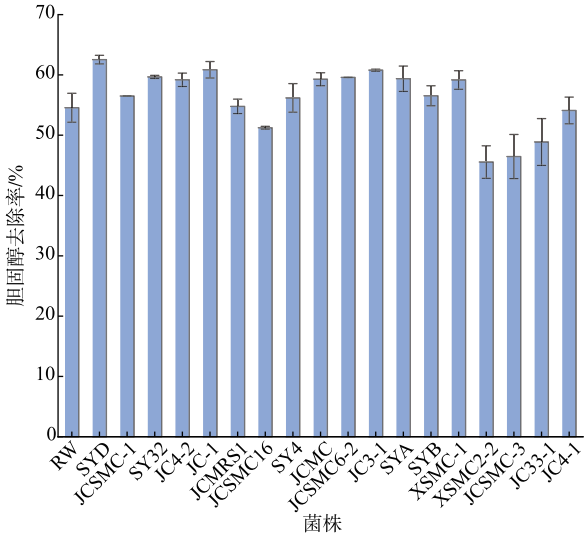


图 3　乳酸菌的胆固醇降解率

Fig. 3　Rate of cholesterol removal by LAB

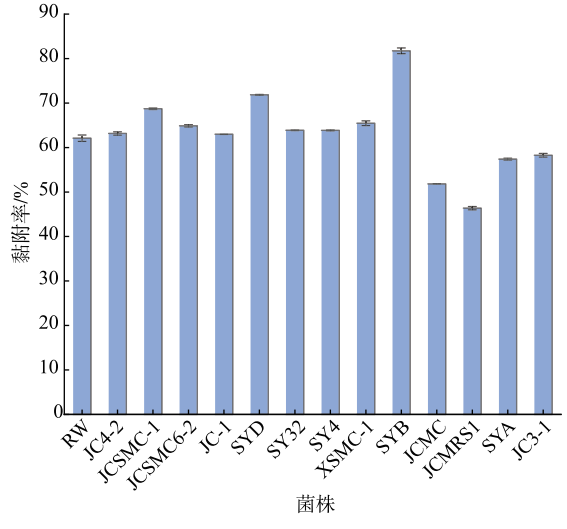


图 4　乳酸菌对 Caco-2 细胞的黏附作用

Fig. 4　Adhesion of LAB to Caco-2 cells

2.7　乳酸菌 16SrDNA 分子鉴定结果

通过构建的系统发育树获得同源菌株信息见表 5。可知菌株 JCSMC-1 与植物乳植杆菌（*Lactiplantibacillus plantarum*），菌株 SYB、JCSMC6-2 与植物乳杆菌（*Lactobacillus plantarum*），菌株 SYD、XSMC-1 与副干酪乳酸菌（*Lacticaseibacillus paracasei*）的亲缘关系分别最近，且序列相似性均高达 100%。

表 5 乳酸菌鉴定结果

Table 5 Identification of LAB

菌株	登录号	相似菌种	同源性/%
JCSMC-1	CP055123.1	*Lactiplantibacillus plantarum*	100
SYD	CP039707.1	*Lacticaseibacillus paracasei*	100
SYB	AP019815.1	*Lactobacillus plantarum*	100
XSMC-1	CP039707.1	*Lacticaseibacillus paracasei*	100
JCSMC6-2	AP019815.1	*Lactobacillus plantarum*	100

3 结 语

本研究筛选得到的 5 株发酵蔬菜源益生乳酸菌 JCSMC-1、SYB、JCSMC6-2、SYD、XSMC-1 具有较好的胆固醇去除能力(45.55%~62.54%)。同时,对酸、胆盐和模拟胃/肠液耐受性强,对 Caco-2 细胞黏附性也强;另外,对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌具有一定的抑菌效果,且在绵羊血培养基均没有溶血现象,经氨基酸脱羧酶培养基检测表明没有产生物胺的潜在威胁;5 株菌株对所选用的 6 种抗生素表现出敏感性,3 种(1 种糖肽类、2 种氨基糖苷类)抗生素表现出耐药性,这可能是乳酸菌对糖肽类和氨基糖苷类抗生素具有天然耐受能力;经 16S rDNA 鉴定,菌株 JCSMC-1 为植物乳植杆菌,SYB、JCSMC6-2 为植物乳杆菌,SYD、XSMC-1 为副干酪乳酸菌。综上所述,5 株菌株可作为潜在的食品用益生菌,进一步用于功能性乳制品的开发。

参考文献:

[1] 段云峰,蔡峰,律娜,等. 益生菌促进胃肠道健康的机制及应用[J]. 微生物学报,2022,62(3):836-847.
DUAN Y F,CAI F,LYU N,et al. The mechanism and application of probiotics in promoting gastrointestinal health[J]. **Acta Microbiologica Sinica**,2022,62(3):836-847. (in Chinese)

[2] HILL C,GUARNER F,REID G,et al. The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic[J]. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**,2014,11(8):506-514.

[3] 吴蜀豫,冉陆. FAO/WHO《食品益生菌评价指南》[J]. 中国食品卫生杂志,2003,15(4):377-379.
WU S Y,RAN L. FAO/WHO guidelines for the evaluation of food probiotics[J]. **Chinese Journal of Food Hygiene**,2003,15(4):377-379. (in Chinese)

[4] 食品用益生菌通则:T/GDWJ 009—2022[S].

[5] 张国华,田慧颖,何国庆. 益生菌安全性与功能性评价方法研究进展[J]. 山西农业科学,2022,50(11):1505-1510.
ZHANG G H,TIAN H Y,HE G Q. Research progress on evaluation methods of probiotic safety and function[J]. **Journal of Shanxi Agricultural Sciences**,2022,50(11):1505-1510. (in Chinese)

[6] 关倩倩,熊涛,谢明勇. 植物基食品乳酸菌发酵技术研究进展[J]. 食品与生物技术学报,2022,41(7):1-11.
GUAN Q Q,XIONG T,XIE M Y. Research progress in lactic acid bacteria fermentation technology of plant-based foods[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2022,41(7):1-11. (in Chinese)

[7] 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. (in Chinese)

[8] 叶陵,李勇,王蓉蓉,等. 我国传统发酵蔬菜中乳酸菌多样性的研究进展[J]. 食品科学,2018,39(15):296-301.
YE L,LI Y,WANG R R,et al. Progress in research on the diversity of lactic acid bacteria in traditional Chinese fermented vegetables[J]. **Food Science**,2018,39(15):296-301. (in Chinese)

[9] 韩俊燕,赵国忠,赵建新,等. 发酵辣椒细菌多样性的 16S rDNA 测序分析[J]. 中国食品学报,2018,18(5):246-251.
HAN J Y,ZHAO G Z,ZHAO J X,et al. 16S rDNA sequencing analysis of bacterial diversity of fermented pepper[J]. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**,2018,18(5):246-251. (in Chinese)

[10] MERUVU H,HARSA S T. Lactic acid bacteria:isolation-characterization approaches and industrial applications[J]. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**,2022,63(26):1-2.

[11] 汤回花,李宏,陶慧玲,等. 潜在益生乳酸菌分离和鉴定研究进展[J]. 中国酿造,2021,40(11):21-25.
TANG H H,LI H,TAO H L,et al. Research progress in isolation and identification of potential probiotic lactic acid bacteria[J].

China Brewing, 2021, 40(11): 21-25. (in Chinese)

[12] AHMAD MIR S, RAJA J, MASOODI F A. Fermented vegetables, a rich repository of beneficial probiotics-a review [J]. **Fermentation Technology**, 2018, 7(1): 1-6.

[13] JUNG M Y, LEE C S, SEO M J, et al. Characterization of a potential probiotic bacterium *Lactococcus raffinolactis* WiKim0068 isolated from fermented vegetable using genomic and *in vitro* analyses[J]. **BMC Microbiology**, 2020, 20(1): 136.

[14] SUN H Y, KIM K P, BAE C H, et al. Evaluation of *Weissella cibaria* JW15 probiotic derived from fermented Korean vegetable product supplementation in diet on performance characteristics in adult beagle dog[J]. **Animals: An Open Access Journal from MDPI**, 2019, 9(8): 581.

[15] 康建依, 洪洁, 高逸, 等. 山西地方自然发酵蔬菜发酵过程中细菌多样性分析[J]. 食品科学, 2019, 40(10): 106-111.
KANG J Y, HONG J, GAO Y, et al. Analysis of bacterial diversity during fermentation of naturally fermented vegetables in Shanxi[J]. **Food Science**, 2019, 40(10): 106-111. (in Chinese)

[16] 刘佳琪, 张和平. 融合魏斯氏菌的基因组学及其安全性研究进展[J]. 科学通报, 2021, 66(23): 2920-2929.
LIU J Q, ZHANG H P. Advances in genomics and safety studies of *Weissella confusa*[J]. **Chinese Science Bulletin**, 2021, 66(23): 2920-2929. (in Chinese)

[17] 张黎明, 章祎, 赵云松, 等. 腌鱼中产生物胺菌株的筛选、鉴定及其特性研究[J]. 中国食品学报, 2021, 21(7): 291-299.
ZHANG L M, ZHANG Y, ZHAO Y S, et al. Screening, identification and characteristics of biogenic amines producing strains in salted fish[J]. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**, 2021, 21(7): 291-299. (in Chinese)

[18] 刘璐, 吴江丽, 杨金桃, 等. 发酵鱼酱酸产 GABA 乳酸菌的分离筛选及发酵特性[J]. 食品科学, 2021, 42(18): 73-79.
LIU L, WU J L, YANG J T, et al. Isolation and fermentation characteristics of γ-aminobutyric acid-producing lactic acid bacteria from Yujiangsuan, a traditional Miao ethnic fermented condiment[J]. **Food Science**, 2021, 42(18): 73-79. (in Chinese)

[19] 韩之皓, 郭帅, 黄天, 等. 复合益生菌在乳酸菌饮料中的发酵特性和功能性质研究[J]. 中国食品学报, 2020, 20(11): 129-138.
HAN Z H, GUO S, HUANG T, et al. Studies on fermentation characteristics and functional properties of compound probiotics in lactic acid bacteria beverage[J]. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**, 2020, 20(11): 129-138. (in Chinese)

[20] 费永涛, 黄一鹤, 黄力, 等. 利用体外模型研究解淀粉乳杆菌 L6 发酵豆乳对肠道菌群的影响[J]. 食品科学, 2023, 44(18): 157-164.
FEI Y T, HUANG Y H, HUANG L, et al. Effects of soybmilk fermented by *Lactobacillus amylolyticus* L6 on intestinal microorganisms *in vitro*[J]. **Food Science**, 2023, 44(18): 157-164. (in Chinese)

[21] 余萍, 矫艳平, 张春宇, 等. 具有降胆固醇功能的罗伊氏乳杆菌的筛选及其益生作用[J]. 现代食品科技, 2021, 37(11): 106-113.
YU P, JIAO Y P, ZHANG C Y, et al. Screening for cholesterol-lowering *Lactobacillus reuteri* strains and analyzing their probiotic effectiveness[J]. **Modern Food Science and Technology**, 2021, 37(11): 106-113. (in Chinese)

[22] 郭志华, 王聪, 陈红玲. 红茶菌中降解亚硝酸盐乳酸菌的筛选、鉴定及其功能特性[J]. 中国食品学报, 2021, 21(8): 309-316.
GUO Z H, WANG C, CHEN H L. Studies on screening, identification and functional properties of nitrite degrading lactic acid bacteria in kombucha[J]. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**, 2021, 21(8): 309-316. (in Chinese)

[23] 申文熹, 陈功, 唐垚, 等. 不同盐质量分数泡白菜发酵过程中乳酸菌群落结构的变化[J]. 食品科学, 2017, 38(10): 104-110.
SHEN W X, CHEN G, TANG Y, et al. Community dynamics of lactic acid bacteria during the fermentation process of Chinese Paocai with different salt concentrations[J]. **Food Science**, 2017, 38(10): 104-110. (in Chinese)

[24] KIMOTO H, NOMURA M, KOBAYASHI M, et al. Identification and probiotic characteristics of *Lactococcus strains* from plant materials[J]. **Japan Agricultural Research Quarterly**, 2004, 38(2): 111-117.

[25] 王帅, 贺羽, 贺斌. 自然发酵泡菜中高体外抗氧化活性乳酸菌的筛选及其对模拟胃肠道环境的耐受性[J]. 食品工业科技, 2019, 40(22): 93-97.
WANG S, HE Y, HE B. Screening of high antioxidant activity lactic acid bacteria in traditional fermented pickles and its tolerance to simulated gastrointestinal environments[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2019, 40(22): 93-97. (in Chinese)

[26] 蒙月月, 陆婧婧, 占萌, 等. 植物乳杆菌 KLDS 1.0318 产酸、耐酸、耐胆盐能力及其免疫特性研究[J]. 食品工业科技, 2018, 39(15): 70-76.
MENG Y Y, LU J J, ZHAN M, et al. Study on the acid producing ability, acid and bile salt tolerance of *Lactobacillus plantarum*

KLDS 1.0318 and its immunologic properties[J]. **Science and Technology of Food Industry**,2018,39(15):70-76.(in Chinese)

[27] CHOI A R,PATRA J K,KIM W J,et al. Antagonistic activities and probiotic potential of lactic acid bacteria derived from a plant-based fermented food[J]. **Frontiers in Microbiology**,2018,9:1963.

[28] LAPARRA J M,SANZ Y. Comparison of *in vitro* models to study bacterial adhesion to the intestinal epithelium[J]. **Letters in Applied Microbiology**,2009,49(6):695-701.

[29] 麻菊美,赵伟睿,胡升,等. 高效降解嘌呤核苷乳酸菌的筛选及特性研究[J]. 食品与生物技术学报,2019,38(4):8-14.
MA J M,ZHAO W R,HU S,et al. Isolation of a lactic acid bacterium with high ability of purine nucleoside-decomposing and evaluation of its probiotic properties[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2019,38(4):8-14.(in Chinese)

[30] 杨博,柏吉,靳亚梅,等. 新疆地区驴乳源优良乳酸菌发酵剂的筛选及菌株益生特性[J]. 食品科学,2022,43(2):224-232.
YANG B,BAI J,JIN Y M,et al. Screening of lactic acid bacteria from donkey milk in Xinjiang for use as starter culture and their probiotic characteristics[J]. **Food Science**,2022,43(2):224-232.(in Chinese)

[31] 顾晨荣,俞漪,张娜娜,等. 荧光定量 PCR 方法检测杀菌型乳酸菌产品中的耐药基因[J]. 食品安全质量检测学报,2020,11(17):5927-5932.
GU C R,YU Y,ZHANG N N,et al. Detection of drug resistance genes in sterilization lactobacillus products by fluorescence quantitative PCR[J]. **Journal of Food Safety & Quality**,2020,11(17):5927-5932.(in Chinese)

[32] 宁亚维,赵忠情,孙颖,等. 抗龋齿口腔益生乳酸菌的筛选[J]. 食品科学,2023,44(10):195-204.
NING Y W,ZHAO Z Q,SUN Y,et al. Screening of oral probiotic lactic acid bacteria against dental caries[J]. **Food Science**,2023,44(10):195-204.(in Chinese)

[33] 吕秀莉,岳莹雪,平丽筠,等. 益生菌黏附机制及其拮抗肠道致病菌研究进展[J]. 食品科学,2023,44(9):313-320.
LYU X L,YUE Y X,PING L J,et al. Research progress on the adhesion mechanism and antagonistic effects against intestinal pathogens of probiotics[J]. **Food Science**,2023,44(9):313-320.(in Chinese)

[34] 覃志成,周笑犁,吴承木,等. 番茄发酵液中乳酸杆菌的分离鉴定及对模拟胃肠液耐受性研究[J]. 食品与生物技术学报,2023,42(8):54-61.
QIN Z C, ZHOU X L, WU C M,et al. lsolation and ldentification of *Lactobacillus* in tomato fermentation broth and investigation of its tolerance to simulated gastrointestinal environment[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2023,42(8):54-61.(in Chinese)

[35] 张艾青. 苹果酵素复合型羊乳的制备及抗氧化活性研究[J].食品与生物技术学报,2021,40(6):106-111.
ZHANG A Q. Preparation of apple-ferment-fortified goat milk and its antioxidant activity investigation[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2021,40(6):106-111.(in Chinese)