

醋醅源潜在益生菌的筛选及其对秀丽隐杆线虫寿命延长作用

陈伟哲, 杜李宇, 陈俊杰, 郑琦锴, 廖振林*

(华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)

摘要: 该研究对从传统醋醅中分离的 7 株菌株进行体外益生功能检测, 并研究其对秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*, *C. elegans*) 寿命的影响。7 株菌通过溶血性、抑菌能力、产蛋白酶、自聚集和共聚集、疏水性以及 DPPH 自由基清除能力检测有明显差异, 筛选出两株斯塔贝基斯鲁梅利杆菌 (*Rummeliibacillus stabekisii*, *R. stabekisii*) CY2 与 CY4 具有无溶血性, 产蛋白酶含量高 (11.49 mm 和 13.24 mm), 24 h 自聚集与共聚集能力强, 24 h 细胞表面疏水性突出, DPPH 自由基清除能力较好 (上清液 48.69% 和 59.22%, 菌体 44.00% 和 41.20%), 进一步耐酸性实验得出 CY2 在 pH 值 3.0 时耐酸性显著优于 CY4, 且能够繁殖生长 (4~8 h 时存活率升高 8.82%), 并且 CY2 具有较高的 LPS 降解能力 (46.95%), 秀丽隐杆线虫 (*C. elegans*) 寿命实验表明 CY2 能够显著延长寿命, 单独饲喂相较于 OP50 组, 平均寿命延长 1.37 d, 延长率为 15.91% ($P<0.05$), 最大寿命延长 1.00 d, 与 OP50 混合饲喂, 平均寿命延长 1.47 d, 延长率为 17.10% ($P<0.05$), 最大寿命延长 2.00 d。该研究结果表明斯塔贝基斯鲁梅利杆菌 (*R. stabekisii*) CY2 益生特性明显, 具有较好的开发潜力, 同时也为发掘新型食源潜在益生菌提供参考和依据。

关键词: 醋醅; 潜在益生菌; 筛选; 秀丽隐杆线虫; 寿命

文章编号: 1673-9078(2023)03-102-111

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.3.0374

Screening of Potential Probiotics Derived from Cupei and Their Effect on Prolonging the Lifespan of *Caenorhabditis elegans*

CHEN Weizhe, DU Liyu, CHEN Junjie, ZHENG Qikai, LIAO Zhenlin*

(College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Seven strains of bacteria were isolated from traditional Cupei and tested for *in vitro* probiotic function as well as their effect on the longevity of *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). The strains differed significantly in terms of hemolytic ability, antibacterial activity, protease production, self-aggregation and co-aggregation, hydrophobicity, and DPPH free radical scavenging ability. Two strains of *Rummeliibacillus stabekisii*, CY2 and CY4, were selected based on no hemolysis and high protease content (11.49 mm and 13.24 mm), strong 24-h self-aggregation and co-aggregation ability, outstanding 24-h cell surface hydrophobicity, and good DPPH free radical scavenging ability (supernatant 48.69% and 59.22%, bacterial cell 44.00% and 41.20%). The results of acid resistance experiments showed that CY2 had significantly better acid resistance at pH value 3.0 than did CY4 and was able to multiply and grow; the survival rate increased by 8.82% at 4~8 h. CY2 also showed a high LPS degradation ability (46.95%). The results of the *C. elegans* lifespan experiment showed that CY2 could significantly prolong lifespan. Compared with the OP50 group, the average lifespan was prolonged by 1.37 days, the prolongation rate was 15.91% ($P<0.05$), and the maximum lifespan was extended by 1.00 d. Mixed feeding with OP50 prolonged the average lifespan by 1.47 d, the prolongation rate was 17.10% ($P<0.05$), and the maximum lifespan was prolonged by 2.00 d. These results indicated that *R. stabekisii* CY2 has

引文格式:

陈伟哲,杜李宇,陈俊杰,等.醋醅源潜在益生菌的筛选及其对秀丽隐杆线虫寿命延长作用[J].现代食品科技,2023,39(3):102-111.

CHEN Weizhe, DU Liyu, CHEN Junjie, et al. Screening of potential probiotics derived from Cupei and their effect on prolonging the lifespan of *Caenorhabditis elegans* [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(3): 102-111.

收稿日期: 2022-04-02

基金项目: 广东省重点领域研发计划项目 (2018B020206001; 2020B020226008); 国家自然科学基金项目 (31171673)

作者简介: 陈伟哲(1997-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 微生物工程, E-mail: superchenweizhe@163.com

通讯作者: 廖振林(1968-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 益生菌、菌群与健康, E-mail: larryliao@scau.edu.cn

significant prebiotic properties and good development potential. The results of this study provide a reference and basis for exploring potential probiotics from new food sources.

Key words: Cupei; potential probiotics; screening; *Caenorhabditis elegans*; lifespan

数据显示,目前全球益生菌产值已占到功能性食品市场的65%,且益生菌市场仍以每年15%~20%的速度增长,2017年总产值达到360亿美元,而我国作为人口大国,益生菌市场也极具潜力,2020年即达到850亿元^[1]。虽然益生菌成为当下的研究热点并取得了可喜进展,但其在使用和工业化生产方面仍存在一定的技术壁垒,如由于一些外界条件如地域、饮食差异等差异,使一种益生菌在不同人群中肠道中可发挥的作用大相径庭。

食醋作为调味品外,本身有大量多酚类物质^[2],有助于降血脂和抗氧化,还含有多种生物活性有机酸^[3],如短链脂肪酸、琥珀酸和乳酸,可辅助调节血压、血脂、干预肥胖^[4],还具有缓解酒精性脂肪肝功能^[5]。醋醅作为食醋生产的副产物,微生物种群丰富,有大量微生物生长与演替,细菌群体主要包括醋杆菌属(*Acetobacter*)、乳酸菌属(*Lactobacillus*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*)^[6],研究表明,芽孢杆菌可产生高度活性的蛋白酶,可将蛋白水解成氨基酸,此外,芽孢杆菌对食醋活性成分之一-四甲基吡嗪的生成有一定作用^[7,8]。食醋的保健功能与醋醅发酵过程中微生物代谢产生的多种活性物质有关,为潜在益生菌的存在提供了依据。李敏^[9]利用Illumina高通量测序分析,首次从醋醅中检测到鲁梅利杆菌属(*Rummeliibacillus*),菌株理化检测得出其具有一定耐酸能力,郭宴君^[10]从醋醅中分离出产乙偶姻*Rummeliibacillus*,二者均研究其食用添加性与产风味物质能力,却并未涉及研究鲁梅利杆菌属(*Rummeliibacillus*)所具有的益生功能潜力。

本研究利用多种体外益生检测评价候选菌株,选取最优性能菌株结合秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*, *C. elegans*)寿命实验,将醋醅分离菌株通过体外和体内联合筛选新型潜在益生菌。本论文将研究斯塔贝基斯鲁梅利杆菌(*Rummeliibacillus stabekisii*, *R. stabekisii*)的益生功能,以期对来源于醋醅的芽孢杆菌开辟新的应用场景。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

醋醅样品购自上海佳民酿造食品有限公司酿造一厂(前身为上海酿造一厂);秀丽隐杆线虫N2野生型(*C. elegans* Bristol N2)、大肠杆菌OP50(*Escherichia*

coli OP50, *E. coli* OP50),均由华南农业大学食品学院王洁副研究员实验组惠赠。

1.2 试剂配制

0.2%乙醇发酵固体培养基:葡萄糖10g、酵母粉10g、磷酸二氢钾0.5g、硫酸镁0.5g、去离子水1000mL,灭菌后冷却至60℃以下,加入 $\varphi=0.2\%$ 无水乙醇;胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)培养基:购自广东环凯微生物科技有限公司;TSA培养基:TSB培养基液体培养基中加入 $m=2\%$ 琼脂粉;LB液体培养基:酵母粉5g、胰蛋白胨10g、氯化钠10g、去离子水1000mL;硫酸镁缓冲液:硫酸镁24.648g、去离子水100mL,高压灭菌锅灭菌20min,待冷却后,4℃保存备用;磷酸钾缓冲液:磷酸氢二钾10.448g、磷酸二氢钾2.042g、去离子水1000mL,高压灭菌锅灭菌20min,待冷却后,4℃保存备用;M9缓冲液:磷酸氢二钠6g、磷酸二氢钾3g、氯化钠5g、硫酸镁缓冲液1mL,去离子水定容1000mL;胆固醇溶液:称量胆固醇粉末50mg,加入10mL无水乙醇溶解后过滤膜除菌,4℃保存备用。NGM(Nematode Growth Medium)培养基:胰蛋白胨2.5g、氯化钠3g、磷酸钾缓冲液25mL、硫酸镁缓冲液1mL、氯化钙缓冲液1mL、水1000mL、2%琼脂粉,高压灭菌后,每200mL加胆固醇溶液200 μ L。

1.3 主要仪器设备

生化培养箱SPX-250B3,广州市叁科仪器有限公司;恒温培养摇床bluepard THZ-300C,上海一恒科学仪器有限公司;多功能酶标仪EnSpire,PerkinElmer;连续变倍体视显微镜XSP-3C,上海中恒仪器。

1.4 试验方法

1.4.1 醋醅源菌株分离

称取1mg醋醅溶解于9mL无菌生理盐水中,涡旋振荡混匀,取1mL稀释依次稀释为 10^{-2} ~ 10^{-7} ,各取100 μ L进行涂布于0.2%乙醇发酵固体培养基中,平行3次,30℃恒温培养箱培养24~48h。从平板上挑取生长良好的单菌落接种分别单独在0.2%乙醇发酵固体培养基上平板划线,30℃恒温培养箱培养48h,得到醋醅源初筛菌株。以同样方法进行二次初筛。

1.4.2 菌株分子生物学鉴定

取划线平板菌落,用接种环划取置于含有 1 mL 无菌水于 1.5 mL 离心管中,采用 SDS 提取法,提取细菌 DNA,具体方法如下,在含菌无菌水离心管中用枪头吹打均匀,置于 10 000 r/min 离心 5 min,弃去上清,往菌体中加入 10 μ L 的 $m=1\%$ SDS 溶液,振荡 8 min, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 30 min,随后加入 490 μ L 无菌水,摇匀后作为 PCR 扩增模板备用。采用细菌 16S rDNA 通用引物正向 27F (5-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3)和反向 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTAYGACTT-3') 引物由上海生工合成,进行 PCR 扩增,将 PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测后送擎科生物公司测序,测序结果于 NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 比对鉴定。

1.4.3 菌株溶血活性检测

将活化后的目的菌活,用接种环挑取单菌落接种于哥伦比亚血琼脂平板上,在封口膜密封条件下 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h,观察菌落在血平板上有无透明圈^[11]。

1.4.4 菌株抑制病原菌能力检测

采用牛津杯法^[12]来测定菌株对大肠杆菌 (*E. coli*) 等 7 株常见致病菌的抑制能力。将无菌牛津杯平行放置于冷却的薄层 TSA 培养基上,将活化后致病菌,吸取 100 μ L 倾注于 20 mL TSA 培养基中倒入薄层板,冷却后,在牛津杯中加入 100 μ L 菌株发酵上清液,于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中扩散 2 h 后,缓慢将平板置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中,培养 24 h,观察并测量抑菌圈直径。

1.4.5 菌株产蛋白酶检测

参考文献^[13]的方法,将 20 g 脱脂乳粉加入到 100 mL 水混匀 ($115\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 min),称取 $m=1.5\%$ 琼脂加入到 100 mL 水中混匀 ($121\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 min),分别进行高压蒸汽灭菌,灭菌完后二者混合配置成 10% 脱脂牛奶琼脂培养基。吸取 1 μ L 点接于培养基中,每株菌 3 个平行,将培养基置于 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱培养 24 h。测量单菌落的直径 (Dc) 和水解圈直径 (Dh),根据 Dh/Dc 比较菌株产蛋白酶活性。

1.4.6 自聚集和共聚集试验

自聚集实验参考文献^[14]: $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 000 r/min 下离心 15 min 并用无菌 0.2 mol/L PBS 缓冲液清洗 2 次,重悬,将 OD₆₀₀ 调节至 0.7 左右,于 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置 24 h,分别在 0、2、4、6、8、12、24 h 吸取 100 μ L 上层菌液,在酶标仪中测量各菌株 600 nm 下的吸光值,将吸光值带入以下公式计算得出自聚集百分率:

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

式中:

S——自聚集百分率, %;

A_1 ——0、2、4、6、8、12、24 h 上层菌液吸光值;

A_0 ——0 h 的菌液吸光值。

共聚集实验参考文献^[15]: 以大肠杆菌 (*E. coli*) 对菌株的共聚集能力进行评价。将等体积的待测菌株和致病菌菌悬液混合,涡旋振荡 10 s,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下孵育 0、2、4、6、8、12、24 h 后,轻取 100 μ L 上层悬液,在酶标仪中测量 600 nm 处的吸光值 ($A_{混}$)。

$$C = \frac{\frac{A_2 + A_3}{2} - A_{混}}{A_2 + \frac{A_3}{2}} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

C——共聚集百分率, %;

A_2 ——受试菌菌悬液单独处理的吸光值;

A_3 ——致病菌菌悬液单独处理的吸光值;

$A_{混}$ ——菌悬液混合后检测的吸光值。

1.4.7 疏水性试验

利用微生物黏附碳氢化合物法 (BATH) 测定菌株的表面疏水性^[16]。将待测菌株培养至 24 h, 3 000 r/min 下离心 15 min,收集菌体沉淀,无菌 0.2 mol/L PBS 缓冲液洗涤两次,重悬,将菌悬液的 OD₆₀₀ 调节至 0.7,取 3 mL 菌液 (以 0.2 mol/L PBS 缓冲液为对照组) 分别与 1 mL 氯仿、1 mL 二甲苯和 1 mL 乙酸乙酯混合振荡并室温静置 24 h,待分层后分别在 0、2、4、6、8、12、24 h 吸取 100 μ L 水相,在在酶标仪中测量各菌株 600 nm 的吸光值,将吸光值带入以下公式计算得出表面疏水率:

$$H = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\% \quad (3)$$

式中:

H——表面疏水率, %;

A_0 ——菌液未与有机溶解混合的初始吸光值;

A_1 ——菌液与有机相混合静置分层后水相部分的吸光值。

1.4.8 菌株 DPPH 清除能力测定

参考文献^[17]的方法,取 1 mL 上清或 OD₆₀₀=1.0 的菌悬液,置于 10 mL 离心管中,加入 3 mL 现配的 0.2 mmol/L 的 DPPH 乙醇溶液,混合摇匀后,在室温下置于暗处静置 30 min,4 000 r/min 离心 10 min,取上清,于 517 nm 处测定吸光值。空白组以等体积无水乙醇代替 DPPH 乙醇溶液,对照组以等体积去离子水代替菌液。公式为:

$$E = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0} \right) \times 100\% \quad (4)$$

式中:

E——DPPH 清除率, %;

A_1 —实验组: 样品与 DPPH 乙醇溶液的吸光值;

A_2 —空白组: 无水乙醇与样品的吸光值;

A_0 —对照组: 去离子水与 DPPH 乙醇溶液的吸光值。

1.4.9 菌株耐酸能力测定

参考文献^[18]的方法, 将活化好的菌液 40% 接种量, 4 000 r/min, 10 min 离心后弃上清, 接入 pH 值 3.0 的 TSB 液体培养基中, 30 °C 静置培养, 以普通 TSB 培养基为对照, 接种后分别在 0 h、4 h、8 h 采用十倍梯度稀释法用无菌生理盐水稀释合适梯度在 TSA 平板点 10 μ L, 于 30 °C 培养 0 h、4 h、8 h 后进行活菌计数将活菌数带入以下公式计算得出耐酸存活率。

$$L = \frac{\log N_1}{\log N_0} \times 100\% \quad (5)$$

式中:

L —存活率, %;

N_1 —实验组培养下的活菌数;

N_0 —普通 TSB 培养基培养后的 0 h 活菌数。

1.4.10 菌株降解脂多糖 (LPS) 能力

菌株活化后 (30 °C 条件下培养至浑浊), 分别取 5 mL 培养液然后 4 000 r/min 离心 10 min。分别取上清液, 空白培养基各 1 mL 加入 80 EU 的 LPS 中, 在 30 °C 条件下分别反应 0 h、4 h, 分别取 0 h 反应后溶液的原液、4 h 反应后溶液以及稀释 10 倍、100 倍、1 000 倍稀释液各取 0.1 mL, 加到除热原微孔板内, 每一浓度加 3 孔, 再分别加入 0.1 mL 鲎试剂, 中速振摇 10 s 混匀后, 将微孔板放入已预热好的内毒素自动分析仪 ELx808 中进行检测。

1.4.11 *E. coli* OP50 的培养

从 -80 °C 冰箱里取出 *E. coli* OP50 冻存管于冰上融化后, 吸取 100 μ L 加入装有 5 mL LB 液体培养基中, 于转速为 180 r/min, 温度为 37 °C 的恒温摇床培养过夜直至 $A_{600\text{nm}}=0.5$ 。

1.4.12 秀丽隐杆线虫 (*C. elegans*) 同期化方法

为保证实验的统一性, 线虫均须经过同期化处理。裂解生长至 L4 时期的线虫此时的线虫。裂解方法^[19]: 吸取 1 mL M9 缓冲液至上述平板中洗下线虫至 1.5 mL 离心管中, 待线虫沉到底部后吸走上清液, 反复冲洗 3 次后, 取 1 mL 次氯酸钠配置的裂解液至每个离心管中, 适量震荡后, 离心弃去上清液, 再用 1 mL 的 M9 缓冲液冲洗线虫, 离心弃去上清, 重复三遍, 最后一遍用 200 μ L M9 缓冲液重悬线虫后转移至新鲜的涂布有 *E. coli* OP50 的 NGM 培养基, 20 °C 培养箱培养 3~4 d 后即可得到 L4 期线虫。

1.4.13 秀丽隐杆线虫 (*C. elegans*) 寿命试验

将 OD_{600} 值为 0.5 的 OP50、CY2 和 50% OP50+50%

CY2 (m/V) 混合液等量加在 NGM 琼脂平板上, NGM 琼脂平板上只涂 *E. coli* OP50 作为对照组。将同期化处理生长至 L4 时期的秀丽隐杆线虫 (*C. elegans*) 挑选至以上处理的 NGM 固体平板上, 每个培养皿分别有 20~30 条线虫, 每个处理组有 4 板, 总共 100 条线虫, 在 20 °C 恒温培养箱中培养。每天同一时间记录线虫死亡数目, 统计存活率, 并进行换板培养直到线虫全部死亡。

1.5 数据分析

采用 SPSS 23.0 软件对实验结果进行单因素方差分析显著性差异; 采用 GraphPad Prism 8 软件统计分析与制作图表; 采用 GraphPad Prism 8 中 Kaolan-Meier 法绘制秀丽隐杆线虫 (*C. elegans*) 生存曲线。

2 结果与讨论

2.1 醋醅源菌株分离结果

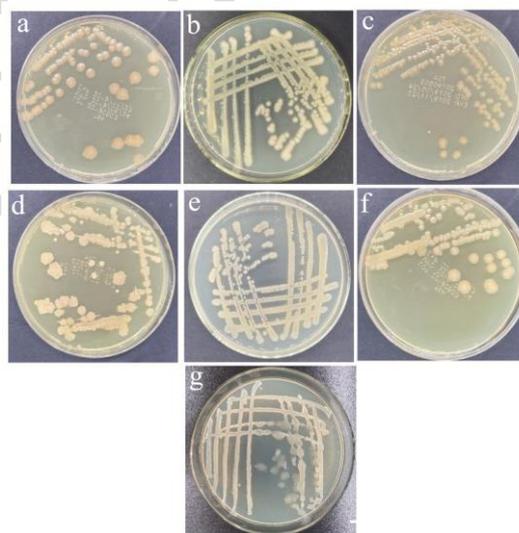


图 1 6 株斯塔贝基斯鲁梅利杆菌 (*R. stabekisii*) TSA 平板菌落形态 (a~f) 和 1 株贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*, *B. velezensis*) TSB 平板菌落形态 (g)

Fig.1 The colony morphology of 6 strains of *R. stabekisii* on TSA plate (a~f), and the colony morphology of 1 strain of *B. velezensis* on TSA plate (g)

注: a: CY1; b: CY2; c: CY3; d: CY4; e: CY5; f: CY6; g: CY+。

本实验从醋醅中分离得到 7 株菌, 通过分子生物学鉴定得出分别得到 6 株斯塔贝基斯鲁梅利杆菌 (*R. stabekisii*), 编号分别为 CY1、CY2、CY3、CY4、CY5、CY6, 菌落如图 1a~1f 所示, 从平板可看出形态差异, CY1 与 CY4 菌落边缘不平整, CY2 菌落周围有透明圈, CY3 菌落较小, CY6 菌落圆整。二次分

离出 1 株贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*, *B. velezensis*), 编号为 CY+, 菌落如图 1g 所示。斯塔贝基斯鲁梅利杆菌 (*R. stabekisii*) 分类地位属于厚壁菌门, 动球菌科, 鲁梅利芽孢杆菌属, 最初被包括在芽孢杆菌属中。2009 年, 分离出的 *Rummeliibacillus* 通过系统发育分析, 将其重新分类为 *Rummeliibacillus* 新属, 斯塔贝基斯鲁梅利杆菌 (*R. stabekisii*) 也被认为是 *Rummeliibacillus* 属的模式种^[20,21]。据可查文献报道, 对斯塔贝基斯鲁梅利杆菌 (*R. stabekisii*) 的研究较少, 大多只是分离得到, 如在多粮浓香型酒厂^[22]、苧麻脱胶菌种^[23]、印度梅加拉亚邦卡西山洞穴土壤^[24] 中发现了斯塔贝基斯鲁梅利杆菌 (*R. stabekisii*) 的存在, 张琪等^[25] 在传统曲霉型豆豉中筛选得到了一株产酒精的斯塔贝基斯鲁梅利杆菌 (*R. stabekisii*)。

2.2 菌株溶血活性检测结果

菌株的溶血性有无关系其是否具有病原微生物毒性, 是益生菌体外筛菌的重要指标, 也是选择潜在益生菌菌株安全性的先决条件^[26]。通过哥伦比亚血琼脂平板试验得出溶血性如图 2 所示, 相比于对照组 CY1~CY6 (b7~b8) 菌落周围均无明显溶血圈, 而 CY+ (c9) 周围具有明显溶血圈, 且属于有毒理性 γ 溶血^[27]。

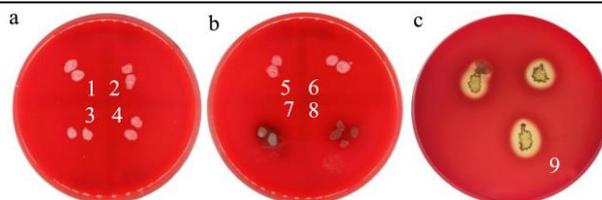


图 2 不同菌株哥伦比亚血琼脂平板菌落图

Fig.2 Colony diagram of different strains on Columbia blood agar plate

注: a1~a4: CY1~CY4; b5~b6: CY5~CY6; b7~b8: 阳性对照; c9: CY+。

2.3 菌株抑制病原菌能力检测

研究表明^[28] 菌株抑制病原菌的能力是评价益生菌的重要标志之一。通过抑菌试验获得抑菌谱如表 1 所示, 从表中可以得出 CY1~CY6 对大部分致病菌并无抑菌效果, 而 CY+ 对福氏志贺氏菌 (*Shigella flexneri*, *S. flexneri*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*, *P. aeruginosa*) 具有抑制能力。任津莹等^[29] 筛选出一株贝莱斯芽孢杆菌 (*B. velezensis*), 其对革兰氏阳性致病菌有较好的抑制作用。CY+ 本身具有溶血性, 但其对福氏志贺氏菌 (*S. flexneri*)、肠炎沙门氏菌 (*S. enteritidis*) 具有抑制能力, 其代谢产物具有较好的开发前景, 但不适合作为宿主益生菌进行研究。

表 1 菌株抑菌谱

Table 1 Bacteriostatic spectrum of strains

致病菌	CY1	CY2	CY3	CY4	CY5	CY6	CY+
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	-
副溶血弧菌 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	-	-	-	-	-	-
单增李斯特菌 <i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	-	-	-	-	-
福氏志贺氏菌 <i>Shigella flexneri</i>	-	-	-	-	-	-	+
乙型溶血性链球菌 <i>Beta-hemolytic streptococcus</i>	-	-	-	-	-	-	-
铜绿假单胞菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	+
肠炎沙门氏菌 <i>Salmonella enteritidis</i>	-	-	-	-	-	-	-

注: “-”表示无抑菌圈, “+”表示有抑菌圈。

2.4 菌株产蛋白酶检测

通过接种脱脂乳粉平板, 7 株菌株的溶蛋白圈直径如表 2 所示, 图 3 显示了 7 株菌株直径大小比对结果, 依次为 CY4>CY2>CY5>CY6>CY7>CY3>CY1, 其中 CY4、CY2、CY5 和 CY2 的溶蛋白圈均大于 10 mm, 分别为 13.24 mm、11.49 mm、11.17 mm 和 10.99 mm。蛋白酶为一类具复杂功能结构并具有催化蛋白质水解功能, 在生物体中可通过水解产生的胞内胞外酶参与动植物细胞及微生物的新陈代谢和调控^[30]。

表 2 菌株产蛋白酶能力测定结果

Table 2 Bacteriostatic spectrum of strains

菌株	蛋白水解圈直径/mm
CY1	7.57±0.14 ^a
CY2	11.49±0.17 ^b
CY3	9.54±0.20 ^c
CY4	13.24±0.17 ^d
CY5	11.17±0.07 ^b
CY6	10.99±0.40 ^b
CY+	9.88±0.17 ^c

注: 同列右肩不同的小写字母表示具有显著差异 ($P<0.05$)。

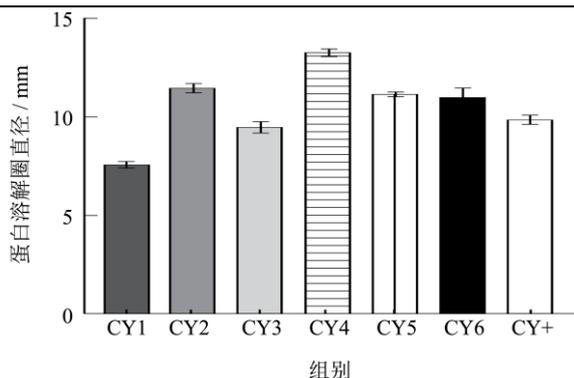


图3 菌株溶蛋白圈直径

Fig.3 The diameter of the proteolytic circle of the strain

2.5 自聚集和共聚集实验

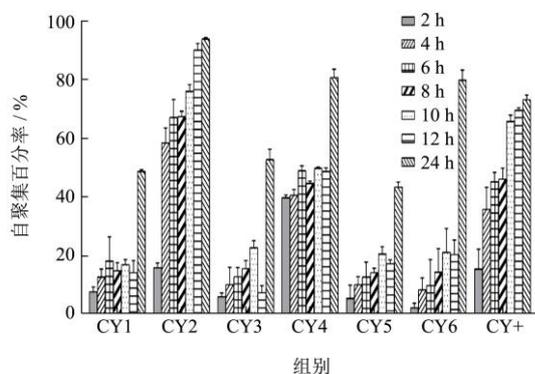


图4 菌株 24 h 自聚集情况

Fig.4 24 h self-aggregation of strains

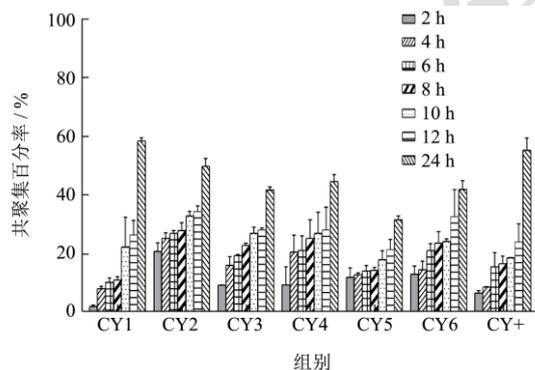


图5 菌株 24 h 与大肠杆菌共聚集情况

Fig.5 Co-aggregation of strains with *Escherichia coli* at 24 h

待测菌株的自聚集和与致病菌 (*E. coli*) 共聚集能力如图 4、5 所示,可以看出这 7 株菌之间的聚集能力存在差异。由图 4 可以得出,7 株菌的自聚集能力从大到小依次为: CY2、CY4、CY+、CY6、CY3、CY1、CY5,其中最为突出的 CY2 在 4 h 的自聚集能力具有 58.49%,随着时间的延长不断升高,24 h 达到所有菌株中最高的 93.88%,CY4 也具有较优的自聚集能力,2 h 就有接近 40.00% (39.79%) 的聚集能力,但是在 2~12 h 区间内随时间增加变化不大。与致病菌的共聚集能力可以间接反应菌株保护肠道免受致病菌侵

染的能力^[1,31]。由图 5 可以看出,在 2~12 h 之内与大肠杆菌 (*E. coli*) 共聚集能力最强的为 CY2,2 h 的共聚集能力就可达到 20.84%,且随时间不断升高,至 24 h 达到 49.92%。以上结果说明 7 株菌中 CY2 和 CY4 是具有明显粘附优势的菌株。

2.6 疏水性实验

微生物黏附碳氢化合物法 (BATH) 测定 7 株菌株的表明疏水性结果如图 6~8 所示。7 株菌株在氯仿试剂中细胞表面疏水性随时间增加而增强,在 24 h 内从高到低依次为 CY3>CY+>CY4>CY2>CY1>CY6>CY5,其中 CY3、CY+、CY4 和 CY2 四株菌在氯仿中的疏水性均可超过 70.00%。在二甲苯试剂中表面疏水性最强的是 CY2,从 2 h 开始疏水性均在 85.00% 以上,并且没有减弱现象,CY+ 也有较好的疏水性,但仍明显弱于 CY2,其余 5 株菌在二甲苯中的表面疏水活性较差。在乙酸乙酯有机试剂中,相比于其余 6 株菌,CY2 仍然表现出极强的细胞表面疏水活性,从 4 h 开始不断增强,8 h 后疏水性均在 80.00% 以上。由疏水性结果可以得出 CY2 在 7 株菌中具有最高的细胞表面疏水活性,为 7 株菌中最具肠道粘附性潜力的菌株。

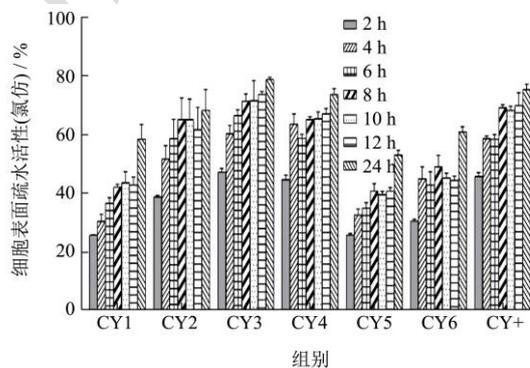


图6 细胞表面疏水活性 (氯仿)

Fig.6 Cell surface hydrophobic activity (chloroform)

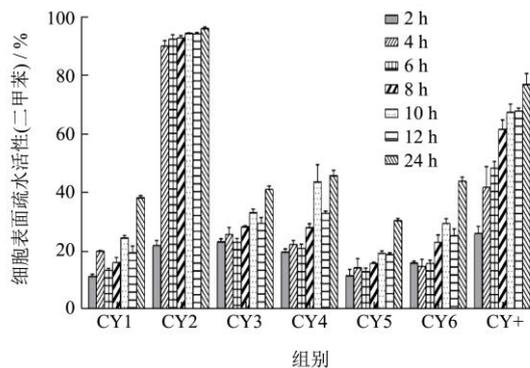


图7 细胞表面疏水活性 (二甲苯)

Fig.7 Cell surface hydrophobic activity (xylene)

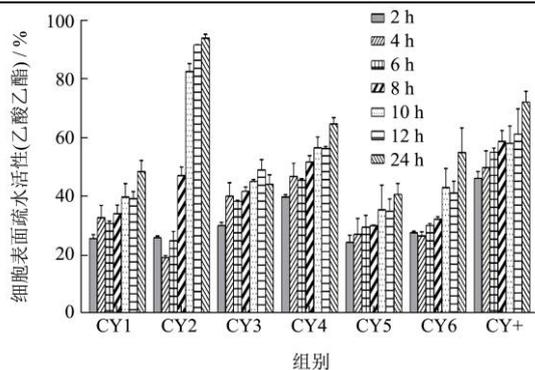


图 8 细胞表面疏水活性 (乙酸乙酯)

Fig.8 Cell surface hydrophobic activity (ethyl acetate)

2.7 DPPH 自由基清除能力测定结果

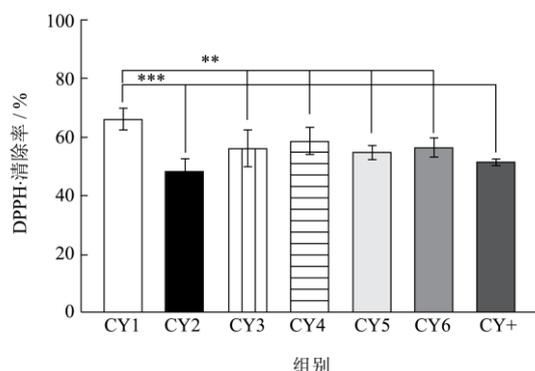


图 9 菌株上清液 DPPH 自由基清除能力

Fig.9 DPPH free radical scavenging ability of strain supernatant

注: *表示处理间存在显著性差异 (**: $P < 0.01$, $n=2$; ***: $P < 0.0003$, $n=2$).

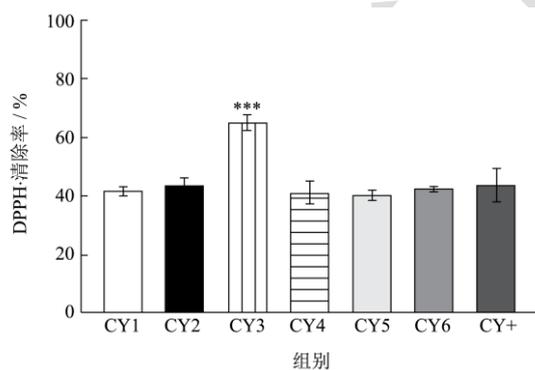


图 10 菌株菌体 DPPH 自由基清除能力

Fig.10 DPPH free radical scavenging ability of strains

注: *表示处理间存在显著性差异 (***: $P < 0.0003$, $n=2$).

7 株菌菌液和菌体 DPPH 自由基清除率测定结果如图 9、10 所示。从图 9 可以看出, 这 7 株菌的 DPPH 自由基清除率均在 45% 以上, 其中 CY1 上清液的 DPPH 自由基清除率最高 (66.45%), 其次为 CY4 (59.22%) 最低的为 CY2 (48.69%)。对菌体的 DPPH 自由基清除率检测结果得出 (图 10), CY3 相比于其

余 6 株菌具有较高的 DPPH 自由基清除率, 达到了 65.36%, CY2 也表现出较好的清除率, 为 44.00%, 其余株均在 40.00% 以上。

2.8 菌株耐酸能力测定结果

耐酸性是菌株能否在动物体肠道中存活和定植的评价指标之一, 人体胃肠道环境的 pH 值在 3.0 上下浮动^[32]。由图 11 可以看出, CY2 (a) 在 pH 值 3.0 中, 0 h 存活率相较于原始降低了 19.44%, 4 h 时存活率为 70.08%, 随着时间的延长, 4~8 h 存活率升高了 8.82%, 已接近于 0 h, 存在上升趋势。CY4 (b) 在 pH 值 3.0 中存活率呈不断下降的趋势, 0 h 存活率为 77.90%, 至 8 h 时已经降至 28.23%, 存在下降趋势。以上结果说明 CY2 在 pH 值 3.0 酸性条件下具有耐受性甚至能够繁殖生长, 所以选定 CY2 用于后续实验。

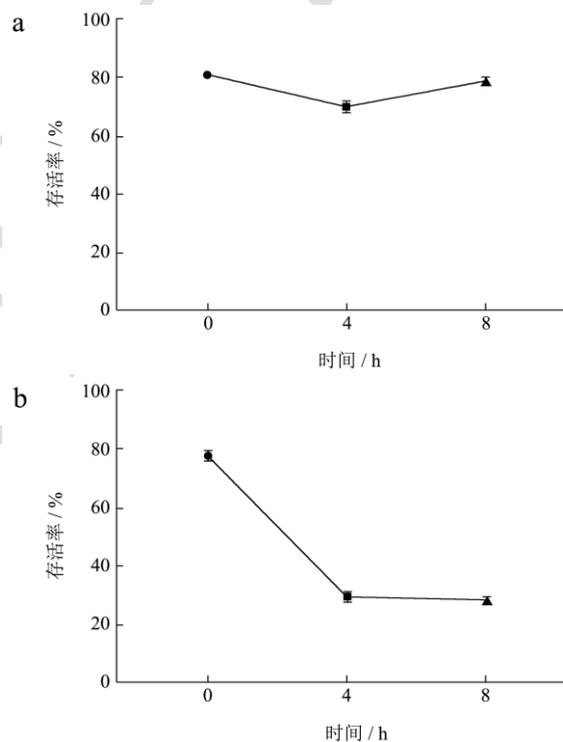


图 11 菌株在 pH 值 3.0 条件下的存活率

Fig.11 Strain presence pH value 3.0 conditional survival rate

注: a 为 CY2 在 pH 值 3.0 条件下的存活情况; b 为 CY4 在 pH 值 3.0 条件下存活情况。

2.9 CY2 降解脂多糖 (LPS) 能力

肠道菌群中存在的各种革兰氏阴性菌是循环系统中 LPS 的已知来源^[33]。在非感染条件下, 少量的 LPS 会从肠道转运到循环系统中, 从而引起肥胖和低度轻微炎症^[34]。通过检测菌株降解 LPS 能力, 可以作为评估其是否具有作为益生菌潜力的指标之一。本实验通过鲎试剂标准品结合动态浊度法检测 CY2 降解 LPS

的能力,由图 12 可知,CY2 具有显著降解 LPS 的能力 ($P<0.01$),在 4 h 内能够降解 LPS 标准品中的 46.95%。在杜李宇等^[35]的研究中表明 LPS 是革兰氏阴性细菌细胞壁的主要成分,通过 TLRs 等途径参与炎症和高脂饮食诱导型代谢综合征的触发。

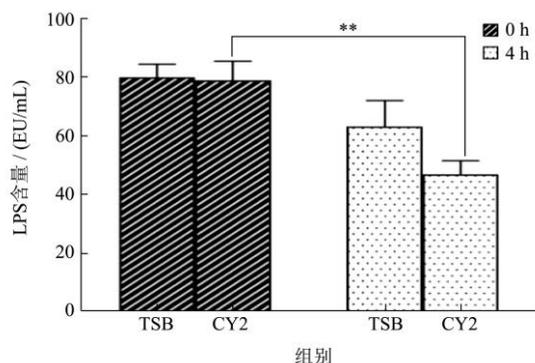


图 12 CY2 降解 LPS 能力

Fig.12 LPS degradation ability of CY2

注: **表示处理间存在显著性差异 ($P<0.01$, $n=2$)。

2.10 CY2 对线虫 (*C. elegans*) 寿命的影响

利用多种体外益生检测评价候选菌株,选取最优秀菌株 CY2 结合秀丽隐杆线虫 (*C. elegans*) 寿命实验,研究其在模式生物中益生效果,本实验设计以 OP50 饲喂线虫作为对照组, CY2 单独饲喂线虫以及 50% OP+50% CY2 两组实验组,以此来检测 CY2 对线虫寿命的影响。寿命曲线如图 13 所示,寿命具体数据如表 3 所示,与 OP 组相比,CY2 组和 50% OP+50% CY2 组平均寿命均得到显著延长 ($P<0.05$),分别延长了 15.91%和 17.10%,这两组的最大寿命也由 OP 组的 16.00 d 分别延长至 17.00 d 和 18.00 d,两组内线虫寿命无显著性差异,50% OP+50% CY2 组较 CY2

组只延长了 1.03%。有研究表明^[36],鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*) 具有延长秀丽隐杆线虫 (*C. elegans*) 寿命功能。以上结果说明 CY2 能够有效延长秀丽隐杆线虫 (*C. elegans*) 的寿命。菌株 CY2 通过体外和体内联合筛选为新型潜在益生菌,拓宽了益生菌研究种类和其应用范围。Tan 等^[37]的研究是第一个报道斯塔贝基斯鲁梅利杆菌 (*R. stabekisii*) 是一种潜在的动物益生菌的研究,他们发现到其作为膳食补充剂饲喂尼罗罗非鱼,生长性能、饲料效率以及蛋白酶、纤维素酶和木聚糖酶等内源性消化能力得到提高,抗氧化能力增强,血清溶菌酶活性等抗致病菌能力增强,同时白细胞介素-1 β 、肿瘤坏死因子- α 、转化生长因子- β 和热休克蛋白 70 表达均显著升高,改善了自身免疫力,肠道中潜在益生菌如芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 和乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*) 的丰度显著增加,潜在致病菌如链球菌属 (*Streptococcus*) 和葡萄球菌属 (*Staphylococcus*) 的丰度降低。斯塔贝基斯鲁梅利杆菌 (*R. stabekisii*) 作为潜在益生菌在动物体的应用还需要更深入研究。

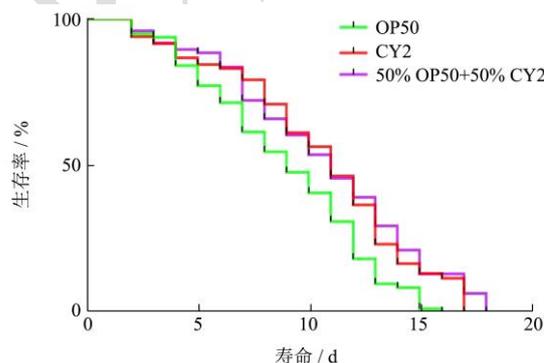


图 13 CY2 饲喂后秀丽隐杆线虫 (*C. elegans*) 寿命曲线

Fig.13 *C. elegans* lifespan curve after CY2 feeding

表 3 不同组别秀丽隐杆线虫 (*C. elegans*) 寿命具体数据

Table 3 Specific data on lifespan of different groups of *C. elegans*

组别	平均寿命/d	最大寿命/d	相比于 OP 组平均寿命延长率/%	相比于 CY2 组平均寿命延长率/%
OP	8.56 ^a	16.00	-	-
CY2	9.93 ^b	17.00	15.91	-
50% OP+50% CY2	10.03 ^b	18.00	17.10	1.03

注: 同列右肩不同的小写字母表示具有显著差异 ($P<0.05$); OP 为 OP50 饲喂线虫; CY2 为 CY2 饲喂线虫; OP+CY2 为 50% OP50 和 50% CY2 同时饲喂线虫。

3 结论

本研究从醋醅中筛选潜在益生菌,首先对从分离的 7 株菌株中进行体外益生实验,每株菌益生特性差异明显,菌株 CY1 上清液的 DPPH 清除率最高,高达 66.45%; CY3 相比于其余 6 株菌具有较高的菌体 DPPH 自由基清除率,达到了 65.36%; CY4 产蛋白酶

能力最强 (13.24 mm); CY5 与 CY6 产蛋白酶能力较强,但 CY6 疏水性及聚集性明显优于 CY5; CY+对福氏志贺氏菌 (*S. flexneri*)、铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*) 具有抑制能力,其代谢产物具有研究前景。实验结果表明 CY2 为体外益生效果优良并具有延长秀丽隐杆线虫 (*C. elegans*) 寿命的潜在益生菌,其具有无溶血性、产蛋白酶含量高、自聚集和共聚集

能力强,疏水性能突出、酸性(pH值3)时能够正常生长,良好抗氧化能力,显著降解LPS性能,并且CY2具有显著延长线虫寿命的功能,其单独饲喂相比对照组平均寿命延长1.37 d,延长率为15.91%,最大寿命延长1.00 d;与OP50复合饲喂时平均寿命延长1.47 d,延长率为17.10%,最大寿命延长2.00 d。表明本研究的CY2分离自食源性醋醅,其具有的益生菌开发潜力,具有更广阔的研究范围和前景,并有助于为发掘新型食源潜在益生菌提供参考和依据。

参考文献

- [1] 郑柳青.鼠李糖乳杆菌 LR-ZB1107-01 的益生特性及其高密度培养的研究[D].广州:华南理工大学,2020.
- [2] 张锦华,李涛,路欣,等.老陈醋类黑精的多酚含量与其抗氧化活性相关性[J].食品与发酵工业,2016,42(7):141-146,152.
- [3] 纪凤娣,魏巍,陶汇源,等.传统食醋中有机酸与人体健康[J].中国酿造,2021,40(3):11-16.
- [4] Kondo Tomoo, KishiMikiya, Fushimi Takashi, et al. Vinegar intake reduces body weight, body fat mass, and serum triglyceride levels in obese Japanese subjects [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2009, 73(8): 1837-1843.
- [5] 王晨,高煦丹,唐宁,等.醋酸菌的全新保健功能-对摄入酒精时免疫系统紊乱的影响[J].中国酿造,2022,41(1):19-24.
- [6] NIE Zhiqiang, ZHENG Yu, DU Hongfu, et al. Dynamics and diversity of microbial community succession in traditional fermentation of Shanxi aged vinegar [J]. Food Microbiol, 2015, 47: 62-68.
- [7] 聂志强,汪越男,郑宇,等.传统食醋酿造过程中微生物群落的多样性及功能研究进展[J].中国酿造,2012,31(7):1-6.
- [8] XIAO Zijun, HOU Xiaoyuan, LYU Xin, et al. Accelerated green process of tetramethylpyrazine production from glucose and diammonium phosphate [J]. Biotechnology for Biofuels, 2014, 7(1): 106.
- [9] 李敏.夏冬两季食醋微生物群落演替特征及其特征微生物研究[D].太原:太原理工大学,2019.
- [10] 郭宴君.利用木质纤维素产乙偶姻菌株 TYF-LIM-RU47 的筛选与代谢特性探究[D].太原:山西农业大学,2020.
- [11] 赵圣明,赵岩岩,马汉军,等.发酵酸菜来源乳酸菌的益生特性及其在发酵乳中的应用[J].食品科学,2019,40(6):187-194.
- [12] 钟罗华,邓舜洲,张文波,等.6 株猪源芽孢杆菌的分离鉴定及其益生性研究[J].中国畜牧兽医,2017,44(2):521-529.
- [13] 王佰涛,权淑静,杨文玲,等.1 株蜡样芽孢杆菌的分离鉴定及其生物学功能研究[J].饲料研究,2021,44(14):88-92.
- [14] Angmo Kunzes, Kumari Anila, Savitri, et al. Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh [J]. LWT - Food Science and Technology, 2016, 66: 428-435.
- [15] 丁诗瑶,雷文平,刘成国,等.不同来源植物乳杆菌的益生特性研究[J].中国乳品工业,2021,49(1):20-24.
- [16] 任竹玲.罗非鱼舒伯特气单胞菌疾病及其益生菌防治研究[D].海口:海南大学,2020.
- [17] Duan Guoliang, Yu Xiaobin. Isolation, purification, characterization, and antioxidant activity of low-molecular-weight polysaccharides from *Sparassis latifolia* [J]. International Journal of Biological Macromolecules. 2019, 137: 1112-1120.
- [18] Zhang Q, Wang J, Sun Q, et al. Characterization and antioxidant activity of released exopolysaccharide from potential probiotic *Leuconostoc mesenteroides* LM187 [J]. Journal Microbiol Biotechnol, 2021, 31(8): 1144-1153.
- [19] 李有全,关贵全,彭欲率,等.秀丽隐杆线虫的培养与保存研究[J].中国兽医科学,2011,41(10):1001-1004.
- [20] Vaishampayan Parag, Miyashita Mika, Ohnishi Akihiro, et al. Description of *Rummeliibacillus stabekisii* gen. nov., sp. nov. and reclassification of *Bacillus pycnus* Nakamura et al. 2002 as *Rummeliibacillus pycnus* comb. Nov [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009, 59(5): 1094-1099.
- [21] Da Mota FaioFaria, Vollú Renata Estebanez, Jurelevicius Diogo, et al. Whole-genome sequence of *Rummeliibacillus stabekisii* strain PP9 isolated from Antarctic soil [J]. Genome Announc, 2016, 4(3): e00416-16.
- [22] 周瑞平,陈云宗,唐代云.多粮浓香型白酒厂内细菌多样性及分布的研究[J].食品科学,2010,31(13):209-213.
- [23] 王茜,陈洪高,刘露,等.苕麻脱胶菌群 RAMCD407 中优势菌的分离、鉴定及脱胶能力分析[J].微生物学通报,2016,43(12):2561-2567.
- [24] Devender Mudgil, Sushmitha Baskar, Ramanathan Baskar, et al. Biomineralization potential of *Bacillus subtilis*, *Rummeliibacillus stabekisii* and *Staphylococcus epidermidis* strains *in vitro* isolated from speleothems, Khasi Hill caves, Meghalaya, India [J]. Geomicrobiology Journal, 2018, 35(8): 675-694.
- [25] 张琪,张菊,廖焰焰,等.豆豉中的一株产酒精细菌分离筛选鉴定及其碳源氮源的优化[J].基因组学与应用生物学,2019, 38(10):4530-4535.
- [26] FAO/WHO. Working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food London, Ontario, Canada [Z]. Agriculture Organization and World Health Organization Joint report, 2002.

- [27] 徐晓群,王欢,吕火焯.金黄色葡萄球菌溶血素的研究进展[J].中国微生态学杂志,2017,29(6):720-724,730.
- [28] 钟舒红,彭红艳,李军,等.不同方法测定益生菌体外抑菌活性的比较研究[J].黑龙江畜牧兽医,2022,6:115-119,138-140.
- [29] 任津莹,陈鹏.一株贝莱斯芽孢杆菌的分离鉴定及其生物学特性研究[J].饲料研究,2022,45(2):79-82.
- [30] 李雪,蔡丹,沈月,等.微生物来源蛋白酶的研究进展[J].食品科技,2019,44(1):32-36.
- [31] 许雄鹏.屎肠球菌 WEFA23 拮抗单核增生李斯特菌黏附定植的作用研究[D].南昌:南昌大学,2018.
- [32] Vinderola C G, Reinheimer J A. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative "in vitro" study of probiotic characteristics and biological barrier resistance [J]. Food Research International, 2003, 36(9): 895-904.
- [33] West Christina E, Renz Harald, Jenmalm Maria C, et al. The gut microbiota and inflammatory noncommunicable diseases: associations and potentials for gut microbiota therapies [J]. Journal of Allergy & Clinical Immunology, 2015, 135(1): 3-13.
- [34] DU Liyu, LEI Xi, WANG Jie, et al. Lipopolysaccharides derived from gram-negative bacterial pool of human gut microbiota promote inflammation and obesity development [J]. International Reviews of Immunology, 2022, 41(1): 45-56.
- [35] 杜李宇,李倩滢,陈伟哲,等.肠道菌群促炎与动脉粥样硬化关系研究进展[J].食品科学,2022,43(3):325-332.
- [36] 张俊桃,孙志宏,赵艳梅,等. *Lactobacillus rhamnosus* Probio-M9 影响秀丽隐杆线虫寿命机制的研究[C]//第十六届益生菌与健康国际研讨会摘要集.中国江苏苏州:中国食品科学技术学会,2021:121-122.
- [37] Herng Yih Tan, Sai-Wei Chen, Shao-Yang Hu. Improvements in the growth performance, immunity, disease resistance, and gut microbiota by the probiotic *Rummeliibacillus stabekisii* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Fish and Shellfish Immunology, 2019, 92: 265-275.