

罗伊氏乳杆菌的益生特性及安全性分析

朱振军¹, 黄国宏^{1,2}, 梁晓琳¹, 蔡达¹, 梁爱红³, 李全阳¹

(1. 广西大学轻工与食品工程学院, 广西南宁 530004) (2. 广西职业技术学院, 广西南宁 530226)

(3. 山东省泰安市岱岳区疾控中心, 山东泰安 271000)

摘要: 本研究对一位 128 岁老人源罗伊氏乳杆菌进行了体外益生特性和安全性分析。采用模拟胃肠液对 49 株罗伊氏乳杆菌进行耐受筛选, 得到了 3 株存活率都大于 90.00% 的菌株, 分别是 LT018、LT037、LT046。对上述 3 株罗伊氏乳杆菌进行表面特性、抑菌活性和安全性分析, 结果表明, LT018 具有较好的粘附繁殖能力 (疏水性为 54.65%, 凝集性为 67.20%), 菌株的表面疏水性和凝集性之间存在负相关 ($R = -0.869$); 非酸性抑菌活性物质在酸性条件下才发挥作用, 它们的上清液对大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌、蜡样芽胞杆菌、伤寒沙门氏菌和福氏志贺氏菌均有较明显的抑制作用, 其中对金黄色葡萄球菌的抑制效果最佳, 抑菌圈直径均大于 15.00 mm; 它们都不具有产生物胺有害物质的活性, 除氯霉素外, 对其他 4 种临床常用抗生素 (红霉素、四环素、庆大霉素、万古霉素) 敏感。综合上述结果, 认为这些菌株具有良好的开发潜力。

关键词: 罗伊氏乳杆菌; 益生特性; 抑菌活性; 安全性分析

文章编号: 1673-9078(2016)6-315-320

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.6.048

Analysis of Probiotic Properties and Safety of *Lactobacillus reuteri*

ZHU Zhen-jun¹, HUANG Guo-hong^{1,2}, LIANG Xiao-lin¹, CAI Da¹, LIANG Ai-hong³, LI Quan-yang¹

(1.College of Light Industry and Food Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China)

(2.Guangxi Vocational and Technical College, Nanning 530226, China)

(3.Daiyue District Center for Disease Prevention and Control, Taian 271000, China)

Abstract: The safety and *in vitro* probiotic properties of *Lactobacillus reuteri* isolated from a 128-year-old woman were analyzed in this study. Forty-nine strains of *Lactobacillus reuteri* were screened for their tolerance to simulated gastrointestinal fluid, and three strains with a survival rate of more than 90.00% were obtained: LT018, LT037, and LT046. The analyses of surface characteristics, antimicrobial activity, and safety of these three *Lactobacillus reuteri* strains were investigated, and the results showed that LT018 had relatively good adhesive reproductive capacity (hydrophobicity: 54.65% and auto-aggregation: 67.20%), and the surface hydrophobicity was negatively correlated with agglutination of the strains ($R = -0.869$). The non-acidic antibacterial substances could exert antibacterial action under acidic conditions, and the supernatant of these three strains had obvious inhibitory effects against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhi*, and *Shigella flexneri*. In particular, the strongest inhibitory effect against *Staphylococcus aureus* was observed, with an inhibition zone diameter of more than 15.00 mm. The strains did not produce harmful biogenic amines, and were sensitive to four types of commonly used antibiotics (erythromycin, tetracycline, gentamicin, and vancomycin), but were resistant to chloramphenicol. Based on the above results, these strains are believed to have a good potential for development.

Key words: *Lactobacillus reuteri*; probiotic property; antibiotic activity; safety analysis

随着中国乃至世界其他国家老龄化人口迅速上升, 老年人健康问题越发需要重视。益生菌制成的食物, 可维持老年人肠道微生物系统的平衡, 有利于老年人健康长寿^[1], 乳酸杆菌作为益生菌的重要成员,

收稿日期: 2015-08-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31371762); 乳业生物技术国家重点实验室开放基金项目 (SKLDB2013-07)

作者简介: 朱振军 (1989-), 男, 硕士, 研究方向为食品营养与健康长寿

通讯作者: 李全阳 (1964-), 男, 博士, 教授, 研究方向为食品营养与健康长寿

它具有许多益生作用, 如调节免疫系统、肠道菌群和降低胆固醇等^[2]。而且, 乳酸细菌普遍认为是安全的 (GRAS), 作为食品发酵剂已有很长使用的历史^[3]。目前, 所研究的乳酸杆菌主要是分离自一些发酵食品以及动物和人的肠道^[4-6], 而且除了中国和田和巴马地区长寿源、欧洲老人源乳酸杆菌有所报道外, 鲜有其他长寿老人源乳酸杆菌分析的报道。研究表明老年人肠道乳酸杆菌种类相对于健康年轻人显著减少^[7], 使得老年人源乳酸杆菌资源更显珍贵。高龄的老人之所以能够长寿, 其体内的益生菌很可能发挥着一定的

辅助作用,因此分析高寿老人肠道益生菌株,将对长寿益生菌资源的探索 and 开发具有重要意义。

罗伊氏乳杆菌作为重要的益生菌之一,在功能性食品和医疗行业日益得到重视。目前,罗伊氏乳杆菌已是国家允许的可用于保健食品的益生菌菌种,同时,也被世界其他国家批准使用,动物食用结果也证明它没有安全性方面的不良反应报导^[3]。目前研究分析的罗伊氏乳杆菌,主要是来源于狗和灵长类、鸡和牛仔、猪以及婴儿和年轻人的肠道和粪便,研究表明不同来源的罗伊氏乳杆菌所具特性不一,同源的不同菌株也各具特性^[8],因此,分析高寿老人源罗伊氏乳杆菌是有必要的。

本文以本研究团队自主分离自一位巴马128岁老人的49株罗伊氏乳杆菌为研究对象。以模拟胃肠液为益生特性筛选指标进行筛选,然后,对所筛菌株的表面特性(疏水性和凝集性)、安全性(抗生素、生物胶)和对有害菌的拮抗能力分析,旨在为开发新的长寿食品益生菌源提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源

49株罗伊氏乳杆菌(分离自一位巴马128岁老人)均由本实验室提供;目标致病菌:大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)CMCC 44102、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)CMCC 26003、蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)CMCC 63303、伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*)CMCC 50222、福氏志贺氏菌(*Shigella flexneri*)CMCC 51572由中国医学细菌保藏管理中心提供。

1.1.2 试剂和仪器

TPY液体及固体培养基, LB肉汤液体培养基, 青岛海博生物技术有限公司;含不同氨基酸(1%的酪氨酸、组氨酸、鸟氨酸、赖氨酸)(sigma公司)的脱酸酶培养基^[9];LSM(90% isosensitest, 招远拓普生物工程有限公司和10%TPY)固体培养基;胃蛋白酶(pepsin 1:10000), Amresco公司;胰蛋白酶(Trypsin 1:250), Amresco公司;牛胆汁(oxgall)Sigma公司;抗生素纸片[四环素(30 μg)、庆大霉素(10 μg)、红霉素(15 μg)、氯霉素(30 μg)、万古霉素(30 μg)], 杭州百思生物技术有限公司。

ZHTY-50F型恒温振荡培养箱,上海知楚仪器有限公司;PYX-DHX.350-B型隔水式电热恒温培养箱,上海市跃进医疗器械一厂;PHS-2C型实验室pH计,

合肥桥斯仪器设备有限公司;Epoch型微量微孔板分光光度计,美国伯腾仪器有限公司;LDZX-50FBS型立式压力蒸汽灭菌器,上海申安医疗器械厂;Universal320R型台式冷冻离心机,德国海蒂诗设备公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株活化及供试菌液的制备

将已纯化并30%甘油、-8℃保存的菌种,划线接种于TPY固体培养基上,37℃下培养24h,活化传代两次,经革兰氏染色镜检确定为纯物质,接种于10mLTPY液态培养基中,37℃下过夜(14~18h)培养后以4000r/min、4℃条件下离心20min,弃上清液,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤两次后,添加适量PBS重悬浮(菌体含量约 10^8 cfu/mL),即为供试菌液。

1.2.2 模拟胃肠液耐受筛选试验

取1mL供试菌液于9mLPBS稀释液中,梯度稀释后取稀释液100μL涂布TPY琼脂培养基,37℃培养24h计数;另取1mL添加到模拟胃液后37℃下培养3h,取1mL模拟胃液培养物稀释涂布培养计数,同时取1mL模拟胃液培养物添加到模拟肠液后37℃继续培养24h,取1mL模拟肠液培养物稀释涂布培养计数。模拟胃液的组成为:含1500U/mL的胃蛋白酶、125mMNaCl、7mMKCl、45mMNaHCO₃、pH2.5的TPY液态培养基;模拟肠液的组成为:含75U/mL的胰蛋白酶、45mMNaCl、0.3%的牛胆汁、pH8的TPY液态培养基。

其存活率计算公式:

$$\text{存活率} = \frac{\text{Log cfu}N_1(N_2)}{\text{Log cfu}N_0} \times 100$$

式中: N_0 -0h活菌数; N_1 -经模拟胃液消化3h后的活菌数; N_2 -经模拟肠液消化24h后的活菌数。

1.2.3 表面特性分析

1.2.3.1 表面疏水性

筛选菌株在37℃下过夜培养,4℃下以4000r/min离心15min富集菌体,用磷酸尿镁缓冲液洗涤两次后使之重悬浮,调节其吸光度在波长600nm时达到0.8。取1mL二甲苯添加到细胞悬浮液(3mL)中,在室温条件下预培育10min后涡旋2min使其充分混合,然后在室温下继续培育20min使其两相完全分离。小心吸出下层水相,测定其在波长600nm时的吸光度。

菌体表面疏水性计算公式:

$$H\% = \left(1 - \frac{A_1}{A_0}\right) \times 100$$

式中: A_0 -与二甲苯混合前菌液 OD 值; A_1 -与二甲苯混匀后菌液 OD 值。

1.2.3.2 凝集性

如 1.2.3.1 进行菌体富集, 用 PBS 洗涤两次后使之重悬浮, 调节其吸光度在波长 600 nm 时达到 0.8。取 5 mL 悬浮液在 37 °C 下静置培养 2 h 后, 取 200 μ L 上悬浮液 (不摇液体), 测定其在波长 600 nm 时的吸光度。

菌体凝集性计算公式:

$$A\% = (1 - \frac{A_t}{A_i}) \times 100$$

式中: A_i -0 h 悬浮液 OD 值; A_t -2 h 上悬浮液 OD 值。

1.2.4 抑菌活性分析

将目标致病菌接种于 LB 肉汤液体培养基后在 37 °C 下过夜培养, 取 100 μ L 致病菌至 30 mL LB 肉汤琼脂培养基 (45~50 °C) 内, 用力混匀再倾倒至培养皿中, 用无菌橡胶塞在每个琼脂培养基上做 6 mm 的圆洞。将筛得菌株过夜培养后离心, 取上清液测量其 pH 值后一半上清液 pH 值调为 6.5, 另一半不调, 取同批次未接种的培养液用乳酸调其 pH 值与原上清液一致和未调 pH 培养液作对照, 然后均通过无菌过滤膜 (0.22 mm) 除菌。将上述四种液体分别以 80 μ L 的量加入圆洞内。先在 4 °C 度冰箱预培育 2 h, 再转移到 37 °C 下培育 48 h 后测量抑菌圈直径 mm, 比较分析四种液体抑菌效果。

1.2.5 安全性分析

1.2.5.1 生物胺检测

将菌株过夜培养后, 取 2 μ L 菌液接种于含不同氨基酸的脱酸酶培养基上, 以 0.006% 溴甲酚紫为指示剂, 在需氧和 37 °C 条件下培育 4 d, 观察菌体周围培养基颜色。以大肠埃希氏菌为阳性对照。

1.2.5.2 药敏试验

将菌株过夜培养后, 取 100 μ L 菌液涂布于 25 mL LSM 琼脂培养基上, 再将各种抗生素纸片覆盖于每个 LSM 固体培养基上。先在 4 °C 度冰箱预培育 2 h, 再转移到 37 °C 下培育 48 h 后测量抑菌直径 mm。参照临床和实验室标准协会 (CLSI) 条款判断敏感, 适度敏感和耐受^[10]。

1.2.6 数据分析

采用 SPSS v.19.0 数据软件和 Excel 进行数据分析和作图。所有实验数据均为三次重复试验的平均值 \pm 标准差。

2 结果与分析

2.1 模拟胃肠液耐受筛选

耐受模拟胃肠液是益生菌筛选的重要指标, 通过该指标, 能够判断筛选对象在胃肠道内是否具有良好的存活能力。因此, 本研究对 49 株罗伊氏乳杆菌进行了模拟胃肠液耐受筛选, 得到了具有良好地生存能力的菌株 LT018、LT037 和 LT046, 结果见表 1。由表 1 可知, LT018 和 LT046 的存活率都超过了 100.00%, LT037 的存活数量也仅有微量的 0.4-log 循环值下降。Yu, Z.H. 等^[11]所得最优耐受模拟胃液的菌株存活数量却下降了 3.47-log 循环值, 其条件也只是在 pH 3、3 mg mL⁻¹ 胃蛋白酶条件下消化 3 h, 较本研究报道结果偏低, 由此可说明本研究所得菌株对胃液的抗逆能力更强。研究表明人的生理胆汁浓度一般在 0.3%~0.5% 之间, 益生菌要发挥健康作用, 在肠道内存活量需要达到 10⁶ cfu/day 以上^[12], 相比较本研究所得菌株, 在 pH 8、0.3% 牛胆汁和胰蛋白酶 (75 U/mL) 共同作用 24 h, 其存活率仍有 90.00%, 则可认为这些菌株在肠道内具有良好地生存能力和发挥益生作用的潜质, 因此, 选择 LT018、LT037 和 LT046 三株菌进一步试验。

表 1 罗伊氏乳杆菌在模拟胃液和肠液中的活细胞计数 (Log₁₀ cfu/mL) 和存活率 (%)

Table 1 Viable cell counts (Log₁₀ cfu/mL) and survival rate (%) of *L. reuteri* strains in simulated gastric juice and intestinal juice

菌号	原培养液	模拟胃液		模拟肠液	
	计数 /(Lg cfu/mL)	计数 /(Log ₁₀ cfu/mL)	存活率/%	计数 /(Lg cfu/mL)	存活率 /%
LT001	9.05 \pm 0.04	7.03 \pm 0.07	77.65	5.20 \pm 0.02	57.47
LT002	9.02 \pm 0.04	5.46 \pm 0.15	60.55	6.11 \pm 0.07	67.76
LT003	8.44 \pm 0.04	7.97 \pm 0.03	94.39	4.56 \pm 0.07	54.03
LT004	8.15 \pm 0.13	6.96 \pm 0.07	85.40	n.d	0.00
LT005	8.12 \pm 0.02	5.46 \pm 0.15	67.21	n.d	0.00
LT006	8.70 \pm 0.09	8.23 \pm 0.03	94.60	4.95 \pm 0.04	56.86
LT007	8.46 \pm 0.03	8.11 \pm 0.04	95.94	7.36 \pm 0.10	87.03

转下页

接上页

LT008	8.42±0.20	9.31±0.01	110.57	7.56±0.07	89.79
LT009	8.40±0.04	6.60±0.03	78.57	4.69±0.09	55.87
LT010	8.16±0.06	8.57±0.04	104.94	6.36±0.05	77.87
LT011	8.26±0.06	7.41±0.02	89.71	6.49±0.05	78.61
LT012	8.76±0.06	6.72±0.13	76.67	n.d	0.00
LT013	8.78±0.05	8.85±0.04	100.84	6.83±0.04	77.75
LT014	8.86±0.02	8.39±0.04	94.73	5.93±0.06	66.99
LT015	8.47±0.01	7.48±0.06	88.24	7.00±0.13	82.61
LT016	8.51±0.12	8.51±0.03	100.04	7.42±0.02	87.26
LT017	8.53±0.06	8.59±0.08	100.66	7.53±0.04	88.28
LT018	8.75±0.13	8.83±0.04	100.99	8.09±0.03	92.49
LT019	8.62±0.04	8.61±0.04	99.96	7.60±0.02	88.24
LT020	8.45±0.11	8.40±0.06	99.45	4.75±0.09	56.24
LT021	8.73±0.05	9.06±0.04	103.82	5.88±0.22	67.39
LT022	8.70±0.04	8.88±0.05	101.99	7.12±0.03	81.81
LT023	8.64±0.02	9.25±0.05	106.98	4.91±0.11	56.85
LT024	8.31±0.05	6.91±0.01	83.16	n.d	0.00
LT025	8.55±0.01	8.92±0.07	104.33	5.72±0.06	66.97
LT026	8.59±0.06	8.38±0.14	97.59	6.67±0.08	77.64
LT027	8.78±0.05	8.51±0.04	96.92	7.37±0.02	83.97
LT028	8.19±0.10	8.13±0.08	99.27	5.01±0.05	61.17
LT029	8.94±0.06	7.89±0.11	88.29	6.03±0.10	67.49
LT030	8.39±0.06	7.34±0.06	87.45	5.51±0.04	65.69
LT031	8.05±0.05	6.64±0.07	82.41	n.d	0.00
LT032	8.74±0.10	8.81±0.03	100.80	7.60±0.04	86.92
LT033	8.16±0.15	n.d	0.00	n.d	0.00
LT034	8.91±0.03	8.84±0.01	99.21	7.46±0.07	83.73
LT035	8.18±0.10	n.d	0.00	n.d	0.00
LT036	8.82±0.01	8.87±0.02	100.60	6.07±0.19	68.88
LT037	8.61±0.02	8.28±0.07	96.21	7.81±0.06	90.71
LT038	8.19±0.04	8.07±0.02	98.53	6.41±0.10	78.30
LT039	8.05±0.02	8.09±0.06	100.46	5.98±0.03	74.30
LT040	8.74±0.07	n.d	0.00	n.d	0.00
LT041	8.27±0.09	7.06±0.03	85.36	5.82±0.07	70.44
LT042	9.09±0.01	8.87±0.06	97.62	6.41±0.10	70.52
LT043	8.15±0.09	n.d	0.00	n.d	0.00
LT044	8.83±0.08	8.82±0.04	99.85	7.62±0.03	86.23
LT045	8.80±0.04	8.75±0.07	99.39	7.18±0.09	81.59
LT046	8.85±0.04	8.93±0.05	100.90	8.05±0.04	91.03
LT047	8.90±0.09	8.08±0.04	90.75	n.d	0.00
LT048	8.18±0.07	6.51±0.07	79.55	n.d	0.00
LT049	8.22±0.30	6.24±0.07	75.95	4.10±0.17	49.88

注: n.d表示未检测到。

2.2 表面特性分析

3株罗伊氏乳杆菌的表面疏水性、凝集性及两者相关性试验结果如表2所示。

表2 3株罗伊氏乳杆菌的疏水性、凝集性及两者相关性

Table 2 Auto-aggregation and hydrophobicity of three *L. reuteri* strains and their correlation

菌号	表面疏水性/%	凝集性/%	表凝相关性/R
LT018	54.65±0.85 ^b	67.20±1.88 ^b	
LT037	56.61±0.33 ^b	23.74±0.94 ^c	-0.869
LT046	61.36±1.11 ^c	5.72±0.06 ^d	

注：同列不同小写字母显示差异显著 ($p < 0.05$)。

菌体表面特性影响着菌体的粘附和繁殖。本次研究通过测定3株优势罗伊氏乳杆菌的表面疏水性和凝集特性对菌株的表面特性进行评价。由表2可知，菌

表3 3株罗伊氏乳杆菌对各种致病菌的抑菌活性

Table 3 Antimicrobial activity of three *L. reuteri* strains against various pathogens

目标致病菌	处理方式	菌号	LT018	LT037	LT046
		pH	4.04	4.16	4.12
大肠埃希氏菌	上清液		12.67±0.60 ^{a*}	10.40±0.18 ^{a**}	9.20±0.72 ^{a***}
	pH 6.5 上清液		-	-	-
	等 pH 培养液		5.47±0.32	5.17±0.83	5.32±0.47
	培养液		-	-	-
金黄色葡萄球菌	上清液		18.57±1.00 ^{b*}	15.36±0.53 ^{c**}	16.77±0.51 ^{b***}
	pH 6.5 上清液		-	-	-
	等 pH 培养液		2.13±0.15	1.92±0.15	2.01±0.52
	培养液		-	-	-
蜡样芽胞杆菌	上清液		10.63±0.50 ^{c*}	14.17±0.34 ^{d**}	12.71±0.43 ^{c***}
	pH 6.5 上清液		-	-	-
	等 pH 培养液		5.37±0.31	4.49±0.52	5.04±0.17
	培养液		-	-	-
伤寒沙门氏菌	上清液		10.50±0.69 ^{c*}	11.43±0.37 ^{ab*}	14.59±0.33 ^{d**}
	pH 6.5 上清液		-	-	-
	等 pH 培养液		6.63±0.38	5.77±0.37	6.31±0.61
	培养液		-	-	-
福氏志贺氏菌	上清液		12.93±0.25 ^{d*}	12.37±0.50 ^{b*}	6.93±0.25 ^{e**}
	pH 6.5 上清液		-	-	-
	等 pH 培养液		3.80±0.17	2.97±0.63	3.59±0.37
	培养液		-	-	-

注：-：无抑菌圈产生；同列不同小写字母显示差异显著 ($p < 0.05$)；同行不同星号个数显示差异显著 ($p < 0.05$)。

由表3可知，上清液的抑菌圈直径均大于6.00 mm，说明菌株LT018、LT037和LT046对5种致病菌都有抑制作用。差异显著性分析表明，3株菌株对金黄色葡萄球菌抑制效果最佳（抑菌圈直径>15.00 mm），其中，LT018最强（18.57 mm），开发潜力较

株LT018、LT037和LT046的表面疏水能力均在50.00%以上，其中，LT018的凝集性也大于50.00%，表明该菌株具有良好的粘附和繁殖能力；菌株之间的表面疏水性和凝集性均存在着显著差异 ($p < 0.05$)，可说明菌株个体差异显著并影响其在肠道内最终的粘附和繁殖；就本研究菌种菌株而言，表面疏水性和凝集性之间是负相关的 ($R = -0.869$)，这与Ren D等^[5]研究结果相反，原因是影响细菌表面疏水性与凝集性的因素有很多，比如细菌表面非极性基团的多少，表面蛋白、脂磷壁酸、菌毛、荚膜等结构，而这些因素因菌种菌株的不同而存在差异。

2.3 抑菌活性分析

上清液、pH 6.5 上清液、等 pH 培养液和培养液处理的抑菌实验结果如表3所示。

大。本研究发现中和后上清液的抑菌圈直径为0.00 mm，而等 pH 培养液有抑菌圈但都小于其上清液的，由此我们可以推知，上清液里存在非酸性抑菌活性物质，但该物质需在酸性环境下才发挥作用，相比较其他研究发现非酸性活性物质是在中性条件下发挥作用

而言^[5, 13], 本研究所得菌株更适合应用于调节人的肠道微生物。

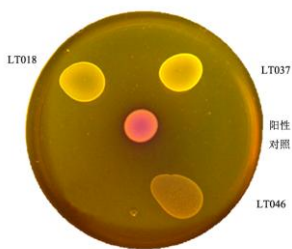


图1 定性检测3株罗伊氏乳杆菌的脱羧酶活性类型

Fig.1 Detection of decarboxylase activity in three *L. reuteri* strains as determined by the qualitative plate method

表4 3株罗伊氏乳杆菌的抗生素耐药性

Table 4 Antibiotic resistance of three *L. reuteri* strains

菌号	红霉素	氯霉素	四环素	庆大霉素	万古霉素
LT018	25.17±0.47 S	0.00 R	20.63±0.42 S	20.27±0.38 S	20.03±0.42 S
LT037	24.37±0.50 S	0.00 R	22.93±0.85 S	15.90±0.69 S	28.90±1.20 S
LT046	24.90±0.35 S	0.00 R	22.37±0.83 S	16.37±0.50 S	24.77±0.49 S

注: R: 耐受; I: 适度耐受; S: 敏感。

由表4可知,除了氯霉素以外,菌株LT018、LT037和LT046对红霉素、四环素、庆大霉素、万古霉素均敏感。先前研究获得的乳酸杆菌绝大多数是对万古霉素耐受^[4-5],虽然普遍认为这种耐受通常是自身内在染色体编码的、不具有转移性,但对人体仍存在一定潜在危害。而本研究所得的菌株并不耐受,因而其更具有安全使用价值。众多野生型乳酸杆菌均具有一种或多种抗生素耐受现象,本研究所得菌株亦是如此(对氯霉素耐受),其耐受的原因有待探索。

3 结论

本研究通过模拟胃肠液筛选,获得了LT018、LT037和LT046三株高生存能力的菌株(>90.00%)。这些菌株,经表面特性分析发现,LT018具有较好的粘附繁殖能力(54.65%, 67.20%),并发现表面疏水性和凝集性之间存在负相关(-0.869);抑菌特性分析揭示了,非酸性抑菌活性物质在酸性条件下才发挥作用,它们的上清液对金黄色葡萄球菌具有较强的抑制作用(>15.00 mm);安全性分析表明,均不具有产生物胺有害物质的活性,除了氯霉素外,对红霉素、四环素、庆大霉素、万古霉素均敏感。综合这些结果,认为本团队分离所得的3株罗伊氏乳杆菌作为食品微生物具有良好的开发潜力。

参考文献

[1] Claesson M J, Jeffery I B, Conde S, et al. Gut microbiota

2.4 安全性分析

2.4.1 生物胺检测

研究发现部分乳酸杆菌具有产生物胺的脱羧酶活性,这将会给消费者的健康带来潜在危害^[14]。为了消除顾虑,本研究采用氨基酸脱羧酶培养基定性评价了3株罗伊氏乳杆菌产生物胺的脱羧酶活性,如图1所示,均无脱羧酶活性,结果说明菌株LT018、LT037和LT046具有开发为发酵剂的潜质。

2.4.2 药敏试验

通过纸片扩散法评价了3株罗伊氏乳杆菌对临床最常用5种抗生素的敏感性,结果如表4所示。

composition correlates with diet and health in the elderly [J]. Nature, 2012, 488(7410): 178-184

[2] Masood M I, Qadir M I, Shirazi J H, et al. Beneficial effects of lactic acid bacteria on human beings.[J]. Critical Reviews in Microbiology, 2011, 37(1): 91-98

[3] Carr F J, Chill D, Maida N. The lactic acid bacteria: a literature survey [J]. Critical Reviews in Microbiology. 2002, 28(4): 281-370

[4] 石磊,李艳莉,梁暖意,等.广州市售酸奶中乳酸菌的耐药性评估[J].现代食品科技,2014,30(10):245-250

SHI Lei, LI Yan-li, LIANG Nuan-yi, et al. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria in yogurt from Guangzhou [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(10): 245-250

[5] Ren D, Li C, Qin Y, et al. In vitro evaluation of the probiotic and functional potential of *Lactobacillus* strains isolated from fermented food and human intestine [J]. Anaerobe. 2014, 30: 1-10

[6] 陈大卫,郭飞翔,顾瑞霞,等.具有降胆固醇能力的人源乳酸菌筛选[J].现代食品科技,2014,30(3):114-120

CHEN Da-wei, GUO Fei-xiang, GU Rui-xia, et al. Screening of cholesterol-reducing lactic acid bacteria from human origin [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(3): 114-120

[7] O'Toole P W, Claesson M J. Gut microbiota: Changes throughout the lifespan from infancy to elderly [J].

- International Dairy Journal, 2010, 20(4): 281-291
- [8] Oh P L, Benson A K, Peterson D A, et al. Diversification of the gut symbiont *Lactobacillus reuteri* as a result of host-driven evolution [J]. ISME Journal. 2010, 4(3): 377-387
- [9] Bover-Cid S, Holzapfel W H. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria [J]. International Journal of Food Microbiology, 1999, 53(1): 33-41
- [10] M100-S19, Performance standard for antimicrobial disk susceptibility tests [S]
- [11] Yu Z, Zhang X, Li S, et al. Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Chinese sauerkraut [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2013, 29(3): 489-498
- [12] Dunne C, O'Mahony L, Murphy L, et al. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings [J]. American Journal of Clinical Nutrition, 2001, 73(2 Suppl): 386S-392S
- [13] Jena P K, Trivedi D, Thakore K, et al. Isolation and characterization of probiotic properties of *Lactobacilli* isolated from rat fecal microbiota [J]. Microbiology and Immunology, 2013, 57(6): 407-416
- [14] Rubio R, Jofré A, Martín B, et al. Characterization of lactic acid bacteria isolated from infant faeces as potential probiotic starter cultures for fermented sausages [J]. Food Microbiology, 2014, 38: 303-311