

# 具有高效 ACE 抑制活性乳酸菌的筛选及其益生特性研究

程龙<sup>1</sup>, 龚福明<sup>1,2</sup>, 李晓然<sup>1</sup>, 向新<sup>1</sup>, 罗义勇<sup>1</sup>, 柳陈坚<sup>1</sup>

(1. 昆明理工大学生命科学与技术学院, 云南昆明 650500) (2. 德宏职业学院基础医学部, 云南芒市 678400)

**摘要:** 本研究运用紫外分光光度法初筛, 再以 HPLC 法进行复筛, 从 31 株源自云南传统发酵食品的乳酸菌中筛选具有高效 ACE 抑制活性菌株, 同时研究其益生特性及脱脂乳发酵过程中 ACE 抑制率的动态变化。综合各项研究结果, 最终筛选出 ACE 抑制率较高、抑菌谱广、耐酸耐胆盐性强, 且对抗生素敏感的 *Lactobacillus plantarum* YM-4-3 作为研究菌株。益生特性研究表明, 该菌株对 *Escherichia coli* O 157: H 7 和 *Listeria monocytogenes* 的抑菌圈直径可分别达 41.30 mm 和 42.00 mm, 甚至在高胆盐 (0.3%) 及强酸 (pH 2.5) 处理后仍保持较高活菌数 (大于  $10^5$  cfu 数量级)。脱脂乳发酵过程中 ACE 抑制活性的动态监测表明, 37 °C 发酵 48 h 是 *Lb. plantarum* YM-4-3 菌株发酵产生 ACE 抑制肽的最适培养条件, 该发酵条件下获得的发酵乳的 ACE 抑制率可高达 81.23%, 菌体生物量、游离氨基酸及多肽含量也均达到最大值。本研究成果将为新型具有高效 ACE 抑制活性发酵乳制品的研发提供理论依据及菌株保证。

**关键词:** 乳酸菌; 血管紧张素转化酶; ACE 抑制活性; 益生特性

文章编号: 1673-9078(2015)11-127-134

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.11.021

## Screening and Potential Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria with High Angiotensin-I Converting Enzyme-inhibition Activity

CHENG Long<sup>1</sup>, GONG Fu-ming<sup>1,2</sup>, LI Xiao-ran<sup>1</sup>, XIANG Xin<sup>1</sup>, LUO Yi-yong<sup>1</sup>, LIU Chen-jian<sup>1</sup>

(1. Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

(2. Basic Medical Department, Dehong Vocation College, Mangshi 678400, China)

**Abstract:** A lactic acid bacterium with high angiotensin-I converting enzyme (ACE)-inhibitory activity was screened from 31 isolates obtained from traditional fermented foods in Yunnan. The isolates were preliminarily screened by ultraviolet (UV) spectrophotometry, followed by high-performance liquid chromatography (HPLC). Potential probiotic properties and dynamic changes in ACE inhibitory activity during skim milk fermentation were evaluated. *Lactobacillus plantarum* YM-4-3 strain was selected owing to its high ACE inhibitory activity, broad antibacterial spectrum, sensitivity to antibiotics, and strong tolerance to acid and bile. The inhibition zone diameters of *Lactobacillus plantarum* YM-4-3 against *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* were 41.30 and 42.00 mm, respectively. After treatment with strong acid (pH 2.5) and high concentration of bile salt (0.3%), the viable cell count was still above  $10^5$  CFU/mL. The dynamic monitoring of ACE inhibitory activity of *Lactobacillus plantarum* YM-4-3 during the fermentation of skim milk indicated that the optimum condition for *Lactobacillus plantarum* YM-4-3 to produce ACE inhibitory peptide was 37 °C for 48 h. Under this condition, the ACE inhibition rate of fermented milk reached 81.23%, and the maximum biomass of the strain and the highest content of free amino acid and polypeptides in fermented milk were achieved. This study can provide a theoretical basis and a candidate bacterium for the study and development of a novel, functional fermented milk beverage, with high ACE inhibitory activity.

**Key words:** lactic acid bacteria; angiotensin converting enzyme; angiotensin I converting enzyme-inhibitory activity; probiotic properties

收稿日期: 2014-12-26

基金项目: 益生菌的生理保健机能及应用 (14078326)

作者简介: 程龙 (1988-), 男, 硕士研究生, 研究方向为应用食品微生物; 龚福明, 并列第一作者

通信作者: 柳陈坚 (1968-), 博士, 教授, 研究方向为应用微生物、食品营养与安全

高血压是一种以动脉收缩压或舒张压升高为主要表征的综合征, 常伴随高血脂症、动脉粥样硬化、脑卒中、冠心病及心力衰竭等疾病, 是心脑血管疾病的主要成因, 严重时可导致意识障碍、肢体瘫痪甚至猝死<sup>[1]</sup>。因此, 有效控制血压是防治该类疾病的关键。人体内存在肾素-血管紧张素 (Renin-angiotensin

system, RAS) 和激肽释放酶-激肽 (Kallikrein-kinin system, KKS) 两大血压调节系统, 血管紧张素转换酶 (Angiotensin converting enzyme, EC 3. 4. 15. 1, ACE) 是两大调控系统的关键限速酶, 它能促进缓激肽水解及血管紧张素 II (Ang II) 生成而发挥升压作用。因而 ACE 抑制剂 (ACEI) 可以作为降压药被应用于临床治疗<sup>[2]</sup>, 然而大量研究表明, 虽然化学合成 ACEI 制剂的降压效果显著, 然而其治标不治本, 长期使用会有明显的毒副作用<sup>[3]</sup>, 因此发掘降压效果显著且安全无毒的 ACEI 新药即成为该领域的研究重点与热点。

乳酸菌是国际公认的食品安全级微生物, 被广泛应用于食品工业和医疗保健业。研究表明, 源于发酵食品的短肽, 尤其是来自乳酸菌为主要发酵菌种的传统发酵食品的短肽, 其 ACEI 活性更强, 相关报道表明源自传统发酵食品的 *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lb. casei*, *Lb. acidophilus*, *Lb. helveticus* 及 *Bifidobacterium longum* 等乳酸菌均能产生诸如降压肽、 $\gamma$ -氨基丁酸等具有 ACEI 的生理活性物质<sup>[4-6]</sup>。云南地处西南多民族地区, 特殊地理环境及多民族的人文优势, 孕育出独具特色的乳扇、乳饼及发酵豆豉等传统发酵食品资源, 然而研究起步晚, 技术落后, 重视程度不够等原因, 使这些发酵食品资源未能物尽其用。

本研究运用紫外分光光度法初筛, HPLC 法复筛的体系, 从云南传统发酵食品中分离筛选具有高效 ACEI 活性的乳酸菌。以探究云南传统发酵食品中具有 ACEI 活性乳酸菌的分布, 从而为其深度开发奠定理论基础, 本研究成果也将为新型且具有 ACEI 活性发酵乳的研发提供理论依据和菌株保证。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验菌株

本研究所用 31 株乳酸菌均源自云南传统发酵食品 (详见表 1); 除菌株 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 外, 其余病原菌 *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella pullorum*, *Listeria monocytogenes* 及 *Enterococcus faecium* 等均从腐败食品中分离鉴定并保存于本研究室。

### 1.2 试验用培养基

(1) MRS 肉汤培养基 (Oxoid): 蛋白胨 10.0 g, 牛肉浸取物 10.0 g, 酵母粉 4.0 g, 葡萄糖 20.0 g, 结晶乙酸钠 5.0 g, 柠檬酸三胺 2.0 g, 吐温-80 1.0 mL,

磷酸氢二钾 2.0 g, 七水硫酸镁 0.2 g, 七水硫酸锰 0.05 g, 加蒸馏水定容至 1 L, 121 °C 高压灭菌 15 min。(2) BHI 培养基 (Oxoid, 加 0.75% 琼脂后即为 BHI 软琼脂培养基): 牛脑 200.0 g, 牛心浸出液 250.0 g, 蛋白胨 10.0 g, 葡萄糖 2.0 g, NaCl 5.0 g, 琼脂 20.0 g, 蒸馏水 1000 mL, 调节 pH 6.8~7.2, 121 °C 高压灭菌 15 min。(3) LB 培养基: 蛋白胨 10.0 g, 酵母粉 5.0 g, 氯化钠 5.0 g, 葡萄糖 1.0 g, 加蒸馏水定容至 1 L, 121 °C, 15 min 灭菌备用, 添加 0.75% 琼脂后即为 LB 软琼脂;(4) 11% 脱脂乳培养基: 11 g 脱脂乳溶于 100 mL 蒸馏水, 105 °C 高压灭菌 20 min。

### 1.3 试验用试剂及溶液

#### 1.3.1 主要试剂

马尿酸-组氨酸-亮氨酸水合物 (简称 HHL, Sigma); 血管紧张素转换酶 (来源于兔肺, 酶活 $\geq 2.0$  units/mg protein, Sigma), 1 mg ACE 溶于 1 mL 0.01 M 的磷酸钾缓冲液 (pH 7.0 且含 0.5 M NaCl); 猪胆盐 (胆酸含量 $> 65.0\%$ ); 马尿酸 (Sigma); 乙腈 (色谱纯); 三氟乙酸 (简称 TFA, 色谱纯) 及四硼酸钠等; 以上试剂除特别说明外均为分析纯。

#### 1.3.2 主要溶液

(1) 硼酸盐缓冲液 (pH 8.3): 0.6184 g 硼酸, 2.925 g 的 NaCl, 蒸馏水定容至 100 mL 即为 A 液, 0.9535 g 硼酸钠蒸馏水定容至 100 mL 即为 B 液, A 液 60.0 mL 与 40.0 mL B 液混合即可;(2) 5.0 mmol/L HHL: 0.2148 g HHL 溶于 100 mL 硼酸盐缓冲液 (pH 8.3) 即可;(3) 邻苯二甲醛溶液 (OPA): 将 80 mg 邻苯二甲醛溶于 2 mL 甲醇, 然后与 50 mL 四硼酸钠溶液 (100 mmol/L), 200  $\mu$ L  $\beta$ -巯基乙醇及 5 mL SDS 溶液 (m/m, 20%) 混合, 混匀后定容至 200 mL, 现用现配;(4) 流动相 A: 含 0.1% 三氟乙酸的乙腈溶液, 流动相 B: 0.1% 的三氟乙酸溶液。

### 1.4 试验用主要仪器

高效液相色谱仪 (Agilent 1100); 便携式 pH 计 (AS ONE pH BOY-KS723, Japan); 高速冷冻离心机 (德国 Sigma 3-18K), 紫外分光光度计 (英国 GENOVA), 恒温水浴槽 (KTS-2346, 日本 AS ONE)。

### 1.5 高产 ACE 抑制肽乳酸菌的分离筛选

#### 1.5.1 高产 ACE 抑制肽乳酸菌的初筛

##### 1.5.1.1 ACE 抑制肽粗提液制备

将保存于 -80 °C 的乳酸菌菌株各吸取 10  $\mu$ L 接种至 5 mL MRS 肉汤培养基复壮 (37 °C, 静置 24 h),

当菌体浓度达到  $10^6$  CFU/mL 时,按 2% 比例将活化菌株接种至 20 mL 脱脂乳培养基,  $37\text{ }^\circ\text{C}$  静置培养 48 h, 选取凝乳效果好且 pH 值低于 4.5 的发酵乳离心吸取上清(3000 r/min,  $4\text{ }^\circ\text{C}$ , 20 min), 随后使用 1 mol/L NaOH 调节发酵乳上清 pH 至 8.3, 再次离心获得的发酵乳上清(3000 r/min,  $4\text{ }^\circ\text{C}$ , 20 min) 即为 ACE 抑制肽粗提液。

### 1.5.1.2 ACE 抑制肽体外抑制活性测定

参照郭宇星等方法<sup>[6]</sup>, 用紫外分光光度法测定 ACE 降压肽的体外 ACEI 活性, 具体步骤如下: 将 80  $\mu\text{L}$  ACE 抑制肽粗提液与 200  $\mu\text{L}$  的 HHL 溶液混合,  $37\text{ }^\circ\text{C}$  水浴 3 min 后添加 20  $\mu\text{L}$  ACE 溶液, 混匀后  $37\text{ }^\circ\text{C}$  孵育 30 min 后添加 250  $\mu\text{L}$  1.0 mol/L HCl 终止反应。用 1.7 mL 乙酸乙酯萃取后, 吸取 1.0 mL 上层萃取液,  $120\text{ }^\circ\text{C}$  烘干后, 使用 ddH<sub>2</sub>O 定容至 1.0 mL 充分混匀并测定其 OD<sub>228</sub> 值。使用相同同法处理酶对照组(底物 HHL 和 ACE 混合液)及空白对照组, 用后述公式计算 ACE 抑制率:

$$\text{ACE抑制率(\%)} = \frac{B - A}{B - C} \times 100\%$$

其中 A 为样品 OD 值, B 为酶液对照组的 OD 值, C 为空白对照组的 OD 值。

### 1.5.1.3 发酵乳中游离氨基酸或肽含量测定<sup>[7]</sup>

(1) L-酪氨酸和胰酪标准曲线: 将 5 mg/mL 的 L-酪氨酸和胰酪标准液依次稀释至 0.01 mg/mL、0.5 mg/mL、1 mg/mL、2 mg/mL、3 mg/mL、4 mg/mL、5 mg/mL, 然后分别吸取 100  $\mu\text{L}$  标准液与 2 mL OPA 混匀测定其 OD<sub>340</sub> 值。每个浓度做三个平行, 以 L-酪氨酸或胰酪浓度为横坐标, OD<sub>340</sub> 为纵坐标绘制标准曲线, 计算被测样品的游离氨基酸和肽含量, 由此表明被测乳酸菌菌株的蛋白水解能力。

(2) 发酵乳中游离氨基酸及肽含量测定: 分别将 1 mL 凝乳效果好且 pH 低于 4.5 的发酵乳样品与 2 mL 三氯乙酸(0.75 mol/L)混匀, 离心后(8000 r/min,  $4\text{ }^\circ\text{C}$ , 5 min) 吸取 100  $\mu\text{L}$  上清与 2 mL OPA 混匀, 检测其 OD<sub>340</sub> 值; 同法处理 ddH<sub>2</sub>O 作为空白对照。

## 1.5.2 具有高效 ACEI 活性乳酸菌的复筛

参照 Wu 等方法实施具有 ACEI 活性乳酸菌复筛<sup>[8]</sup>, ACE 分解底物 HHL 后会产生马尿酸, 采用 HPLC 分析检测反应液中马尿酸浓度即可分析 ACE 活力及发酵乳的 ACEI 活性。

### 1.5.2.1 马尿酸标准曲线

分别配制浓度为 0.10、0.20、0.30、0.40 及 0.50 mmol/L 的马尿酸标准液, 以马尿酸标准液浓度为横坐标, 峰面积值为纵坐标, 绘制标准曲线。HPLC 分析

条件为 Agilent ZORBAX. Eclipse XDB-C18 型反相色谱柱(4.6 $\times$ 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ , Agilent, USA), 洗脱程序为 20% 流动相 A 和 80% 流动相 B, 流速 1.0 mL/min, 柱温  $30\text{ }^\circ\text{C}$ , 检测波长 228 nm, 进样量为 20  $\mu\text{L}$ 。

### 1.5.2.2 发酵样品乳 ACEI 活性的 HPLC 分析

将初筛获得的 15 株乳酸菌(表 2) 进行脱脂乳发酵, 发酵后按 1.5.1.1 的方法制备 ACE 抑制肽粗提液。将 20  $\mu\text{L}$  各发酵乳样品的粗提液, 加入 40  $\mu\text{L}$  HHL 后  $37\text{ }^\circ\text{C}$  孵育 2 min, 孵育后添加 40  $\mu\text{L}$  ACE 溶液, 混匀后  $37\text{ }^\circ\text{C}$  孵育 30 min, 最后  $85\text{ }^\circ\text{C}$  水浴 10 min 终止反应, 吸取 20  $\mu\text{L}$  反应液用于 HPLC 分析。同时以 ACE 和底物 HHL 的混合液为酶对照组(即 C<sub>c</sub> 组), HHL 溶液为底物对照组(即 C<sub>b</sub> 组), 用公式(1) 计算 ACE 抑制率:

$$\text{ACE抑制率(\%)} = \frac{C_c - C_s}{C_c - C_b} \times 100\% \quad (1)$$

其中 C<sub>c</sub> 为酶对照组马尿酸浓度, C<sub>s</sub> 为实验组马尿酸浓度, C<sub>b</sub> 为底物对照组马尿酸浓度。

## 1.6 具有高效 ACEI 活性乳酸菌的益生特性探讨

### 1.6.1 高产 ACE 抑制肽乳酸菌的抑菌试验

采用 spot-on-lawn 法检测高效 ACEI 活性乳酸菌的抑菌特性<sup>[9]</sup>。基层平板: 将 10  $\mu\text{L}$  ( $10^8$  CFU/mL) 复筛得到的乳酸菌培养上清液滴加至 MRS 琼脂培养基中央, 置于  $4\text{ }^\circ\text{C}$  感作 2 h 后  $35\text{ }^\circ\text{C}$  培养 48 h, 形成直径约为 5 mm 的菌斑即为基层平板。上层平板: 使用灭菌生理盐水将已复壮的病原指示菌悬液稀释至  $10^8$  CFU/mL, 将 10  $\mu\text{L}$  指示菌悬液分别与 10 mL 灭菌并冷却至  $40\text{ }^\circ\text{C}$  的 BHI 及 LB 软琼脂培养基混合(除 *S. aureus* 与 BHI 软琼脂混合外, 其余均与 LB 软琼脂混合), 混匀后迅速倾倒在基层平板即为上层平板, 待冷却凝固后  $35\text{ }^\circ\text{C}$  培养 24 h, 测量抑菌圈直径, 每个待检菌株做 3 个平行。

### 1.6.2 高效 ACEI 活性乳酸菌的耐酸及耐胆盐特性

使用 MRS 液体培养基将具有较强抑菌活性且高产 ACEI 活性肽的乳酸菌复壮, 置于  $37\text{ }^\circ\text{C}$  培养 24 h 后, 吸取 1 mL 菌液于 1.5 mL 灭菌离心管中, 每个样品取 3 管, 其中 2 管分别用 pH 2.5 和 pH 4.5 的磷酸缓冲液处理 2 h, 第三管用等量生理盐水处理作对照。每个样品做 3 个平行, 待酸处理后适当稀释涂布于 MRS 平板, 置于  $37\text{ }^\circ\text{C}$  培养 24 h 后计算残存活菌数, 每个计数平板的菌落数以 20~200 为宜。同法, 分别使用

0.03%及0.3%猪胆盐处理2 h,用生理盐水作空白对照,检测其耐胆盐特性。

### 1.6.3 具有高效ACEI活性乳酸菌的药敏试验

用药敏纸片琼脂扩散法(K-B法)检测乳酸菌的药物敏感性,在配制琼脂平板时先用2%琼脂铺底(厚度小于2 mm),然后将500  $\mu$ L菌液( $10^8$  CFU/mL)与500 mL灭菌并冷却至50  $^{\circ}$ C的MRS琼脂培养基混合,混匀后将10 mL乳酸菌悬液倾倒入铺底的培养皿。冷却后粘贴标准药敏纸片,两个纸片间距不小于24 mm,距平板内缘距离需大于15 mm,贴好后置于37  $^{\circ}$ C培养24~48 h,观察抑菌效果。同时以标准敏感菌*S. aureus* ATCC 25923作对照,试验菌株的药物敏感性参照WHO提供的NCCLS最新版标准判定<sup>[10]</sup>。

### 1.7 *Lb. plantarum* YM-4-3菌株发酵过程中

#### ACEI活性的动态监测

将具有高效ACEI活性的*Lb. plantarum* YM-4-3菌株进行脱脂乳发酵,在确定最适发酵温度后,分别监测0 h、6、12、18、24、30、36、42、48、60及72 h发酵样品乳的pH、菌体生物量、游离氨基酸(包括短肽含量)及整个发酵过程中ACEI活性的动态变化,每个监测时间点做3个平行。在检测样品pH值时,发酵上清制备条件为4  $^{\circ}$ C,3000 r/min,10 min;检测OD值时样品需用4.5 mL冰EDTA处理(浓度0.2%,pH 12),混匀后检测其OD<sub>600</sub>值;参照1.5方法分析游离氨基酸、短肽含量及ACEI活性。

### 1.8 数据处理与分析

本研究所得实验数据均采用RSD值计算统计软件进行计算处理,所得平均值和标准偏差均由两个以上样品的测量结果经计算得到;在ACEI活性实时监测过程中,所有数据都经Microsoft Excel软件及SigmaPlot 12.0软件处理得到。

## 2 结果与讨论

### 2.1 具有高效ACE抑制活性乳酸菌的分离筛选

#### 2.1.1 产ACE抑制肽乳酸菌的初筛

通过紫外分光光度法分析,发现源自云南传统发酵食品的31株乳酸菌,除4株不具备ACEI活性外,其余27株均具有ACE抑制活性(占87.1%,表1)。表1结果显示,ACE抑制率大于40%的菌株共有15株,其中9株为*Lb. plantarum*,5株为*Pediococcus pentosaceu*,1株为*Weissella confusa*;有7株菌株的ACE抑制率更是大于70%,尤以菌株KY-6-2L的ACE抑制率最高,可高达81.23%。当前研究表明,通过产ACE降压肽等活性物质而发挥调节血压,降低心脑血管疾病发生的乳酸菌多以*Lb. hevelticus*为主<sup>[11]</sup>,其次是*Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*,*Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris*,*Lb. casei*及*Lb. plantarum*等乳酸菌<sup>[12]</sup>。与文献报道相比,本研究的初筛结果更具多样性,除文献报道种属外,还发现*Ped. acidilactici*,*Ped. Pentosaceu*,*W. confusa*及*Lb. fermentum*等种属的乳酸菌也具有ACEI活性,说明云南传统发酵食品可作为筛选具有ACEI活性乳酸菌的菌种库。

表1 发酵乳中游离氨基酸及多肽含量与ACE抑制率的相关性

Table 1 Relation between ACE inhibition rate and the content of free amino acids and peptides in fermented milk

菌株	ACE抑制率/%	种属	游离AA/(mg/mL)	肽含量/(mg/mL)	来源
ZTLM-3-4	-	<i>Lb. plantarum</i>	1.10 $\pm$ 0.06	1.96 $\pm$ 0.06	昭通豆豉
YML-4-5	-	<i>Lb. plantarum</i>	1.06 $\pm$ 0.04	1.92 $\pm$ 0.11	易门豆豉
YM-4-3	78.80 $\pm$ 1.53	<i>Lb. plantarum</i>	4.69 $\pm$ 0.17	4.80 $\pm$ 0.16	易门豆豉
YM6LM-2-6	15.40 $\pm$ 0.93	<i>Lb. plantarum</i>	1.33 $\pm$ 0.10	0.91 $\pm$ 0.03	易门豆豉
YML-4-3	76.20 $\pm$ 0.85	<i>Lb. plantarum</i>	5.61 $\pm$ 0.40	5.87 $\pm$ 0.14	易门豆豉
QBLB-3-1	-	<i>Lb. plantarum</i>	5.33 $\pm$ 0.35	5.54 $\pm$ 0.15	丘北豆豉
QBL(17)-3-1	16.50 $\pm$ 1.18	<i>Lb. plantarum</i>	1.90 $\pm$ 0.15	1.57 $\pm$ 0.10	丘北豆豉
QBTL-3-1	41.40 $\pm$ 1.08	<i>Lb. plantarum</i>	2.81 $\pm$ 0.20	2.62 $\pm$ 0.10	丘北豆豉
QBLB-3-1	73.17 $\pm$ 0.90	<i>Lb. plantarum</i>	5.91 $\pm$ 0.21	6.21 $\pm$ 0.04	丘北豆豉
S10	61.27 $\pm$ 0.31	<i>Lb. plantarum</i>	1.40 $\pm$ 0.11	0.99 $\pm$ 0.10	元阳豆豉
AY01	73.73 $\pm$ 0.91	<i>Lb. plantarum</i>	5.04 $\pm$ 0.20	5.20 $\pm$ 0.18	石林乳饼上清液
JSB-7	22.43 $\pm$ 1.53	<i>Lb. plantarum</i>	2.23 $\pm$ 0.06	1.96 $\pm$ 0.08	建水豆豉

转下页

接上页

KY-6-3L	49.70±0.53	<i>Lb. plantarum</i>	3.28±0.13	3.16±0.19	开远豆豉
KY-6-2L	81.23±0.81	<i>Lb. plantarum</i>	4.06±0.09	4.07±0.11	开远豆豉
KY-1-2L	75.47±1.19	<i>Lb. plantarum</i>	4.73±0.18	4.84±0.15	开远豆豉
SP-8-7L	51.93±0.99	<i>Lb. plantarum</i>	4.06±0.23	4.07±0.21	石屏豆豉
HH-4-1L	43.67±0.81	<i>Lb. plantarum</i>	4.57±0.28	4.66±0.21	红河豆豉
HH-4-7L	66.17±0.95	<i>Lb. plantarum</i>	3.89±0.21	3.88±0.15	红河豆豉
YY-1-3L	73.27±1.07	<i>Ped. pentosaceus</i>	3.96±0.23	3.96±0.14	元阳豆豉
YY-1-5L	-	<i>Ped. pentosaceus</i>	1.97±0.09	1.66±0.05	元阳豆豉
YY-1-7L	66.77±0.57	<i>Ped. pentosaceus</i>	4.07±0.18	4.08±0.13	元阳豆豉
GJ-2-2L	17.33±0.68	<i>Ped. pentosaceus</i>	2.19±0.07	1.91±0.10	个旧豆豉
GJ-4-2L	54.63±1.38	<i>Ped. pentosaceus</i>	4.75±0.16	4.87±0.17	个旧豆豉
GJ-4-10L	16.87±0.60	<i>Ped. pentosaceus</i>	3.35±0.09	3.26±0.17	个旧豆豉
GJ-5-1L	58.20±0.66	<i>Ped. pentosaceus</i>	2.54±0.05	2.31±0.12	个旧豆豉
GJ-5-4L	34.17±0.93	<i>Ped. pentosaceus</i>	2.08±0.09	1.78±0.11	个旧豆豉
GJ-5-6L	64.30±1.15	<i>Ped. pentosaceus</i>	4.80±0.11	4.93±0.13	个旧豆豉
JSL-9-2	47.03±0.68	<i>Ped. acidilactici</i>	3.62±0.13	3.87±0.18	建水豆豉
JSL-9-3	27.33±0.91	<i>Lb. fermentum</i>	3.38±0.11	3.28±0.19	建水豆豉
JS4	58.40±0.36	<i>W. confuse</i>	4.64±0.13	4.74±0.17	建水豆豉
JSL-9-1	17.77±0.38	<i>Lb. fermentum</i>	3.04±0.09	2.88±0.14	建水豆豉

注：“-”为ACEI活性不明显或没有抑制活性。

### 2.1.2 发酵乳中游离氨基酸和短肽含量检测

发酵乳中游离氨基酸及短肽含量分析计算的线性回归方程分别为  $y=0.39x-0.20$  ( $R=0.995$ ) 和  $y=0.36x-0.05$  ( $R=0.995$ ), 检测结果见表 1。表 1 结果显示, 15 株 ACE 抑制率较高的乳酸菌所发酵脱脂乳中游离氨基酸和短肽含量也相对较高, 但 ACE 抑制率与二者产量之间未呈现显著的正相关关系, 如 *Lb. plantarum* QBLB-3-1 菌株在初筛时, 检测其 ACEI 活性为零, 然而其发酵液的游离氨基酸和短肽含量却很高, 由此推测可能与该菌株代谢酶类型的差异相关, 具体原因还有待进一步研究验证。

### 2.1.3 具有高效 ACEI 活性乳酸菌复筛

为能快速且精确地筛选具有高效 ACEI 活性的乳酸菌菌株, 采用 HPLC 分析法进行复筛, 以标品马尿酸浓度对其峰面积作线性回归分析, 得线性回归方程  $y=14695x+427.5$  ( $R=0.996$ ); 复筛时选择 15 株 ACE 抑制率大于 40% 的乳酸菌菌株作研究对象, 具体结果见表 2。研究结果表明, YM-4-3, KY-6-2L, AY01, YML-4-3 及 KY-1-2L 等五株菌株的 ACE 抑制率大于 75%, 其中采用 YM-4-3 菌株所得的发酵乳的 ACE 抑制率可高达 80.83%, 与市售酸奶平均 64% 的抑制率相比, 本研究所得乳酸菌菌株的 ACE 抑制率较高<sup>[13]</sup>; 而不同种属间 ACE 抑制率比较结果则表明, 植物乳杆菌具有较强的 ACEI 活性, 而 *Lb. fermentum* 和 *Ped.*

*pentosaceus* 相对较弱。除个别菌株外, 初筛结果与复筛结果基本吻合, 由此可见初筛体系的可靠性, 该初筛方法可有效应用于大规模 ACEI 活性菌株的初筛。

表 2 ACE 抑制率的复筛结果

**Table 2 ACE inhibition rate of secondary screening**

菌株	种属	初筛 ACE 抑制率/%	复筛 ACE 抑制率/%
YM-4-3	<i>Lb. plantarum</i>	78.80±1.53	80.83±0.93
KY-6-2L	<i>Lb. plantarum</i>	81.23±0.81	78.90±0.66
AY01	<i>Lb. plantarum</i>	73.73±0.91	78.17±1.00
YML-4-3	<i>Lb. plantarum</i>	76.20±0.85	76.23±0.81
KY-1-2L	<i>Lb. plantarum</i>	75.47±1.19	75.50±0.70
YY-1-3L	<i>Ped. pentosaceus</i>	73.27±1.07	66.77±0.96
YY-1-7L	<i>Ped. pentosaceus</i>	66.77±0.57	66.80±0.87
QBLB-3-1	<i>Lb. plantarum</i>	73.17±0.90	65.43±0.76
GJ-5-1L	<i>Ped. pentosaceus</i>	58.20±0.66	58.23±0.51
SP-8-7L	<i>Lb. plantarum</i>	51.93±0.99	51.93±0.45
GJ-4-2L	<i>Ped. pentosaceus</i>	54.63±1.38	49.77±0.85
JS4	<i>W. confusa</i>	58.40±0.36	41.50±0.36
KY-6-3L	<i>Lb. plantarum</i>	49.70±0.53	40.13±0.61
GJ-5-6L	<i>Ped. pentosaceus</i>	64.30±1.15	36.80±0.70
GBLT-3-1	<i>Lb. plantarum</i>	41.40±1.08	30.87±0.65

## 2.2 高效 ACEI 活性乳酸菌的益生特性

### 2.2.1 高效 ACEI 活性乳酸菌的抑菌试验

乳酸菌是国际公认的食品安全级微生物,而被广泛应用于食品工业和医疗保健业<sup>[14]</sup>,又因其具备改善宿主微生态平衡,同时还能分泌产生细菌素、过氧化氢及有机酸等抑菌物质,而被称为益生菌<sup>[15]</sup>。本研究对 5 株具有高效 ACEI 活性的乳酸菌菌株进行抑菌试

验,抑菌结果表明该 5 株乳酸菌均具有极强的抑菌活性,对 *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* O 157: H7, *S. pullorum*, *L. monocytogene*, *E. faecium* 等 5 株食源性病原菌均呈现较强的抑制作用,其中 YM-4-3 和 AY01 两菌株的抑菌效果尤为突出(表 3)。

表 3 五株高效 ACEI 活性乳酸菌的抑菌试验 (mm)

Table 3 Bacteriostatic test result of five lactic acid bacterial strains with higher ACE inhibitory activity

试验用乳酸菌	对不同病原菌的抑菌圈直径 D/mm				
	<i>S. aureus</i> ATCC	<i>E. coli</i> O 157: H 7	<i>S. pullorum</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. faecium</i>
YM-4-3	37.47±0.35	41.30±0.17	31.57±0.21	42.07±0.36	21.10±0.20
YML-4-3	36.30±0.26	43.33±0.21	29.33±0.21	40.50±0.30	19.07±0.15
AY01	39.63±0.15	38.30±0.20	38.02±0.20	41.60±0.30	22.57±0.21
KY-6-2L	27.53±0.32	39.50±0.20	38.63±0.15	36.07±0.25	18.07±0.15
KY-1-2L	36.27±0.20	41.27±0.42	28.07±0.15	35.03±0.32	16.53±0.15

### 2.2.2 高效 ACEI 活性乳酸菌的耐酸及耐胆盐特性 *Escherichia coli* O 157:H 7

乳酸菌作为益生菌被广泛应用于食品工业及医疗保健业,其在人体胃肠道内定植力的高低直接影响保健品功效。本研究在体外对 5 株具有高效 ACEI 活性的乳酸菌菌株实施模拟胃肠道条件的耐酸及耐胆盐试验,以初步探究这 5 株菌株的胃肠道定植力。试验结果表明,该 5 株菌株均能耐受 0.03%胆盐及 pH 4.5 的酸性条件(表 4),在 0.3%胆盐及 pH 2.5 的酸性条件

处理后,大部分菌株的生长受到强烈抑制。相对而言,只有 YM-4-3 和 AY01 两株菌株在高浓度胆盐和强酸条件处理后,仍有大量活菌生存,其中菌株 AY01 的活菌数更是可分别高达 10<sup>7</sup> cfu 和 10<sup>5</sup> cfu 数量级。因此,可以初步断定 YM-4-3 和 AY01 两株植物乳杆菌具有较强的耐酸及耐胆盐特性,由此可推测这两株菌株具有较强的胃肠道定植力,然而该初步结论源于菌株的体外试验,最终结论还有待于后续的动物及人体体内试验进行验证。

表 4 五株高 ACEI 活性乳酸菌的耐酸及耐胆盐试验 (单位: log CFU/mL)

Table 4 Acid and bile tolerance properties of five lactic acid bacterial strains with higher ACE inhibitory activity

菌株	活菌数				
	对照组活菌数	0.03%胆盐	0.3%胆盐	pH 4.5	pH 2.5
YM-4-3	11.21±0.26	7.55±0.01	4.07±0.08	6.70±0.18	0.84±0.03
YML-4-3	9.62±0.19	4.78±0.06	0.48±0.01	1.40±0.11	0.29±0.02
AY01	11.75±0.11	7.61±0.02	6.02±0.07	3.60±0.48	1.28±0.02
KY-6-2L	9.95±0.12	3.58±0.06	0.63±0.11	5.72±0.18	0.73±0.02
KY-1-2L	9.62±0.19	4.92±0.08	1.02±0.04	8.73±0.09	0.71±0.02

### 2.2.3 高效 ACEI 活性乳酸菌的药敏试验

药物敏感实验是评价益生菌的一个重要指标,因为益生菌一旦具备耐药性,往往就会携带可转移的耐药基因,被人食用后就容易将耐药基因转移给致病菌而产生高耐药性菌株。本研究所选 5 株具有高效 ACEI 活性乳酸菌的药敏试验结果见表 5,研究结果表明,该 5 株菌株除对青霉素、糖肽类的万古霉素、喹诺酮类的环丙沙星、氧氟沙星及诺氟沙星表现出一定耐药性外,对其余强力抗生素均不具有耐药性,因此该 5 株菌株可以被安全而广泛的应用于食品与医药工业。

胃肠道定植力强、相对不耐药的益生菌 *Lb. plantarum* YM-4-3 菌株,该菌株符合益生菌要求,可用于后续新型功能性发酵乳研发。

## 2.3 *Lb. plantarum* YM-4-3 菌株发酵过程中 ACEI 活性的动态监测

在新型功能性保健食品研发过程中,实现规模化发酵或自动化生产是新型功能性保健食品研发之重点,而功能性菌株在发酵过程中生物活性物质的变化规律更是研发投产之关键。为给新型功能性保健乳制品研发奠定理论基础,本研究对 *Lb. plantarum* YM-4-3

综合上述益生菌特性的研究结果,本研究筛选出一株 ACEI 活性高、对常见食源性病原菌抑制能力强、

菌株的发酵温度及其发酵过程中 ACE 抑制率的变化情况进行动态监测, 结果见图 1 与图 2。图 1 结果显示, *Lb. plantarum* YM-4-3 菌株发酵产生 ACEI 的最适发酵温度为 37 °C, 在该温度发酵 48 h 后, 其 ACE 抑制率可高达 80.53%。该菌株 72 h 发酵过程中的菌体生物量、pH 值、游离氨基酸及短肽含量变化对发酵乳制品 ACE 抑制率影响的结果表明, 该菌株在培养 6 h 后进入对数生长期, 当培养时间为 48 h 时, 菌体生物量达最大值 ( $1.05 \times 10^{12}$  CFU/mL), 此时发酵乳制品的 pH 值为 4.1, ACE 抑制率可高达 81.23%。虽然, 酸性条件能抑制病原菌生长, 延长发酵乳的货架期, 但继续发酵, 会使发酵乳的 pH 值进一步下降, 当发酵 72 h 后, 发酵乳 pH 值降至 3.7, 大量乳清水开始析

出, 菌体生物量及 ACE 抑制率也开始下降 (ACE 抑制率仅为 61.80%), 该现象与相关文献报道相符<sup>[16]</sup>。因此, 新型发酵乳发酵制备的最适时长为 48 h。此外, 探讨发酵乳 72 h 发酵过程中游离氨基酸及多肽含量与 ACE 抑制率变化趋势发现, 在前 48 h 发酵时间内, 二者含量均迅速增加, 当发酵乳发酵 48 h 时, 它们的含量最高 (游离氨基酸含量 5.01 mg/mL, 多肽含量 5.10 mg/mL), 此时 ACE 抑制率也达最高 (81.23±0.09%), 并与游离氨基酸及多肽含量变化呈正相关。由此表明此时的发酵乳不但 ACEI 活性高, 而且其营养价值也最高, 综合考虑新型发酵乳的营养价值及益生特性, 应选择 37 °C 发酵 48 h 作为 *Lb. plantarum* YM-4-3 菌株发酵新型发酵乳的最佳发酵条件。

表 5 五株高 ACEI 活性乳酸菌的药物敏感试验

Table 5 Drug sensitivity test of five lactic acid bacterial strains with higher ACE inhibitory activity

菌株	抗生素									
	P	AM	CFP	AMX	PIP	AM	CTX	CZ	AZI	ASP
YM-4-3	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
YML-4-3	R	S	S	S	S	S	S	MS	S	S
AY01	R	S	S	S	S	S	MS	S	S	S
KY-6-2L	MS	MS	MS	S	S	S	S	S	S	S
KY-1-2L	R	MS	S	S	S	S	S	S	S	S

菌株	抗生素									
	N	SXT	VA	CIP	OFL	NOR	CM	RA	FT	PB
YM-4-3	S	S	R	R	R	R	MS	S	R	R
YML-4-3	S	S	R	R	R	R	S	MS	R	R
AY01	S	S	R	R	R	R	S	S	R	R
KY-6-2L	S	S	R	R	R	R	S	S	R	R
KY-1-2L	S	S	R	R	R	R	MS	MS	MS	R

注: R-耐药, MS-中度敏感, S-敏感。

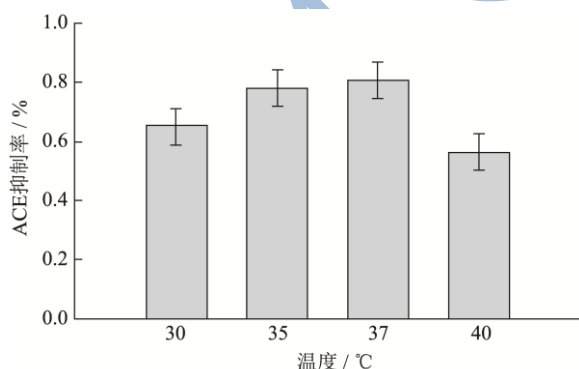


图 1 温度对 *Lb. plantarum* YM-4-3 发酵乳的 ACEI 活性影响  
Fig.1 Effects of temperature on ACE inhibitory activity of *Lb. plantarum* YM-4-3-fermented milk

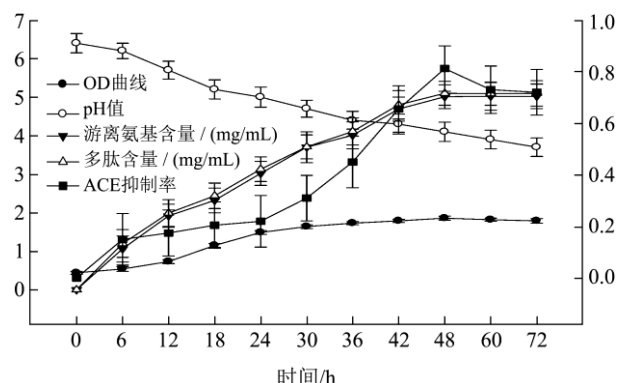


图 2 *Lb. plantarum* YM-4-3 发酵过程中 ACEI 活性的动态监测  
Fig. 2 Dynamic monitoring of ACE inhibitory activity of *Lb. plantarum* YM-4-3 during fermentation

综上所述,一旦 *Lb. plantarum* YM-4-3 用于新型功能性发酵乳生产,将会产生极大的开发应用价值,因为与传统发酵酸奶相比,该新型产品将具备更高的 ACEI 活性和营养价值,同时也坚信随着研究的深入和继续,云南传统发酵食品资源将得到更有效开发及利用。

### 3 结论

3.1 本研究所采用以紫外分光光度法初筛,再以 HPLC 法复筛的筛选体系确实可行,能高效的从云南传统发酵食品中筛选出高 ACEI 活性的乳酸菌,因此该体系可用于云南传统发酵食品中高 ACEI 活性乳酸菌的分离与筛选。

3.2 本研究从云南传统发酵食品中成功分离得到一株高效 ACE 抑制活性的菌株 *Lb. plantarum* YM-4-3,其 ACE 抑制率高达 81.23%,而其益生特性的研究结果则表明,该菌株完全符合益生菌特质的要求,因此该菌株可用于后续新型功能性发酵乳的研发。

3.3 本研究对具有高效 ACEI 活性的 *Lb. plantarum* YM-4-3 菌株的最适发酵温度以及发酵过程中菌体生物量、pH 值、游离氨基酸及多肽含量对 ACE 抑制率的影响进行实时监测表明,发酵温度为 37 °C,发酵时间为 48 h 是 *Lb. plantarum* YM-4-3 菌株发酵产生 ACE 抑制肽等活性物质的最佳培养条件,此时发酵乳中菌体生物量、游离氨基酸与多肽含量及 ACE 抑制率均达到最高值(图 2)。

### 参考文献

- [1] Sakharov IY, Danilov SM, Sukhova NV. Isolation of human liver angiotensin-converting enzyme by chromatofocusing [J]. Analytical Biochemistry, 1987, 166(1): 14-17
- [2] 周贺霞,马良,张宇昊.食品中降血压肽的研究现状及应用[J].食品与发酵科技,2012,48(1):11-15  
ZHOU He-xia, MA Liang, ZHANG Yu-hao. The research and application of antihypertensive peptide derived from food [J]. Food and Fermentation Technology, 2012, 48(1): 11-15
- [3] Atkinson A, Robertson J. Captopril in the treatment of clinical hypertension and cardiac failure [J]. The Lancet, 1979, 314(8147): 836-839
- [4] Ramchandran L, Shah NP. Influence of addition of Raftiline HP® on the growth, proteolytic, ACE-and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities of selected lactic acid bacteria and Bifidobacterium [J]. LWT-Food Science And Technology, 2010, 43(1): 146-152
- [5] Chen Y, Liu W, Xue J. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of Lactobacillus helveticus strains from traditional fermented dairy foods and antihypertensive effect of fermented milk of strain H9 [J]. Journal of Dairy Science, 2014, 97(11): 6680-6692
- [6] 葛松涛,周立平,丁兴.一株产 GABA 的植物乳酸菌的筛选及鉴定[J].现代食品科技,2009,25(8):940-943  
GE Song-tao, ZHOU Li-ping, DING Xing. Screening and identification of a lactic acid bacterium for  $\gamma$ -aminobutyric acid production [J]. Modern Food Science and Technology, 2009, 25(8): 940-943
- [7] 郭宇星,陈庆森,赵林森.瑞士乳杆菌发酵法制备乳清蛋白源性 ACE 抑制肽的研究[J].食品科学, 2006, 27(6): 151-154  
GUO Yu-xing, CHEN Qing-sen, ZHAO Lin-sen. ACE inhibitory peptides of whey protein fermentation with lactobacillus helveticus [J]. Food Science, 2006, 27(6): 151-154
- [8] 张龙翔,张庭芳,李令媛.生物化学实验方法和技术[M].北京:高等教育出版社,1997  
ZHANG Long-xiang, ZHANG Ting-fang, LI Lin-yuan. Experiment methods and techniques in biochemistry [M]. Beijing: People's Education Press, 1997
- [9] Wu J, Ding X. Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides [J]. Food Research International, 2002, 35(4): 367-375
- [10] Schillinger U, Lücke FK. Antibacterial activity of lactobacillus sake isolated from meat [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1989, 55(8): 1901-1906
- [11] 陈志辉,俞月琴.抗菌药物临床应用新论[M].上海:同济大学出版社,1994  
CHEN Zhi-hui, YU Yue-qin. New theory on clinical use of antibiotics [M]. Shanghai: Tongji University Press, 1994
- [12] Pihlanto A, Virtanen T, Korhonen H. Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity and antihypertensive effect of fermented milk [J]. International Dairy Journal, 2010, 20(1): 3-10
- [13] Elsebaei F, Zhu Y. Fast gradient high performance liquid chromatography method with UV detection for simultaneous determination of seven angiotensin converting enzyme inhibitors together with hydrochlorothiazide in pharmaceutical dosage forms and



- spiked human plasma and urine [J]. *Talanta*, 2011, 85(1): 123-129
- [14] 崔磊,张少辉.国内 6 种市售酸奶中的 ACE 抑制肽研究[J].*中国乳品工业*,2012,40(6):30-32  
CUI Lei, ZhANG Shao-hui. Research on ACE-inhibitory peptide in six domestic commercial yoghurt [J]. *China Dairy Industry*, 2012, 40(6): 30-32
- [15] Wassenaar TM, Klein G. Safety aspects and implications of regulation of probiotic bacteria in food and food supplements [J]. *Journal of Food Protection*®, 2008, 71(8): 1734-1741
- [16] 任大勇,李昌,秦艳青.乳酸菌益生功能及作用机制研究进展[J].*中国兽药杂志*,2011,45(2):47-50  
REN Da-yong, LI Chan, QIN Yan-qing. Development review on healthy function and potential mechanisms of lactic acid bacteria [J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2011, 45(2): 47-50
- [17] 吴琼英,马海乐.ACEI 发酵乳对原发性高血压大鼠的降压效果[J].*中国乳品工业*,2007,34(12):31-33  
WU Qiong-ying, MA Hai-le. Antihypertensive effects of fermented milk in spontaneously hypertensive rats [J]. *China Dairy Industry*, 2007, 34(12): 31-33