

干酪乳杆菌发酵荔枝汁在模拟胃肠道中耐受能力及其抑菌性的研究

关小莺^{1,2}, 温靖¹, 肖更生¹, 徐玉娟¹, 吴继军¹, 余元善¹, 邹波¹

(1. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 农业部功能食品重点实验室, 广东省农产品加工重点实验室, 广东广州 510610) (2. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510462)

摘要: 以干酪乳杆菌发酵荔枝汁为研究对象, 在人工胃液、人工肠液环境下对干酪乳杆菌的存活性能进行研究; 同时, 采用琼脂扩散法, 研究其对六种常见食源性致病菌(肠炎沙门氏菌、宋氏志贺氏菌、大肠埃希氏菌 O157:H7、单增李斯特氏菌、金黄色葡萄球菌和阪崎肠杆菌)的抑菌性, 以及探究酸和酶等因素对发酵液抑菌性的影响。结果表明: 在模拟胃肠消化中, 干酪乳杆菌在 pH 1.5、pH 2.0、pH 3.0 和 pH 4.0 的人工胃液中培养 4 h 后, 活菌数分别达到了 260 CFU/mL、 8.63×10^7 CFU/mL、 9.57×10^7 CFU/mL 和 1.15×10^8 CFU/mL; 在人工肠液中消化 12 h 后, 活菌数均在 10^7 CFU/mL 以上。在抑菌试验中, 经去酸、去过氧化氢和酶解等不同处理的发酵液对肠炎沙门氏菌等五种常见食源性致病菌具有明显的抑制效果, 而对阪崎肠杆菌均未表现出抑制作用, 其中胞外多糖、 H_2O_2 和蛋白肽类物质对五种常见的致病菌是主要的抑菌物质。研究结果为干酪乳杆菌发酵荔枝汁能否在胃肠道中发挥有益作用提供体外实验的理论依据以及在当地食品工业的开发应用提供科学依据。

关键词: 干酪乳杆菌; 发酵荔枝汁; 模拟胃肠环境; 耐受性; 抑菌性

文章编号: 1673-9078(2019)04-96-102

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.4.014

Antimicrobial Activity of the Litchi Juice Fermented by *Lactobacillus casei* and the Strain's Tolerance in Simulated Gastrointestinal Tract

GUAN Xiao-ying^{1,2}, WEN Jing¹, XIAO Geng-sheng¹, XU Yu-juan¹, WU Ji-jun¹, YU Yuan-shan¹, ZOU Bo¹

(1. Sericultural & Agri-Food Research Institute Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Functional Foods, Ministry of Agriculture, Guangdong Key Laboratory of Agricultural Products Processing, Guangzhou 510610, China) (2. College of Food Science of South China Agricultural University, Guangzhou 510462, China)

Abstract: The survival of *Lactobacillus casei* in its fermented lychee juice was investigated in an artificial gastric juice and artificial intestinal juice model. At the same time, the antimicrobial activities of the fermented juice against six common foodborne pathogens (*Salmonella*, *Shigella sonnei*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Enterobacter sakazakii*) were examined using the agar diffusion method, considering the effects of acids and enzymes. The results showed that in the simulated gastrointestinal digestion model, the viable counts of *Lactobacillus casei* were 260, 8.63×10^7 , 9.57×10^7 and 1.15×10^8 CFU/mL, respectively, after a 4-h incubation in an artificial gastric juice at pH 1.5, 2.0, 3.0 or 4.0, while above 10^7 CFU/mL after a 12-h digestion in the artificial intestinal juice. In terms of antimicrobial activity, the fermentation broths subjected to different treatments such as deacidification, hydrogen peroxide removal and enzymatic hydrolysis exhibited significant inhibitory effects on five common foodborne pathogenic bacteria including *Salmonella enteritidis*, except for *Enterobacter sakazakii*. Exopolysaccharide, H_2O_2 and protein peptides were the main antimicrobial substances against five common pathogenic bacteria. These results will lay a theoretical foundation for *in vitro* experiments on whether *Lactobacillus casei* fermented lychee juice could offer beneficial effects in the gastrointestinal tract and provides a scientific basis for local food industrial development and application.

Key words: *Lactobacillus casei*; Fermented litchi juice; simulated gastrointestinal digestion environments; tolerance; antimicrobial activity

收稿日期: 2018-07-15

基金项目: 广东省科技计划项目 (2017A030303038); 广东省科技计划项目 (2017B020207005)

作者简介: 关小莺 (1992-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工与安全

通讯作者: 温靖 (1978-), 女, 研究员, 研究方向: 果蔬深加工

荔枝属于无患子科荔枝属常绿植物,作为常见热带亚热带水果之一,主要在我国西南和南部地区生长。荔枝果肉鲜甜柔嫩、美味多汁,营养丰富、色味俱佳,为国内外消费者所喜爱,故被称之“果中皇后”。

现代研究证实,荔枝含有丰富的活性物质,如多酚、黄酮、多糖等物质,具有抑菌、抗氧化、促进益生菌生长等活性^[1-4]。乳酸菌是一类以糖为主要原料进行发酵的革兰氏染色阳性细菌的总称,具有抗菌消炎、抗氧化、增强免疫、抗肿瘤、抗衰老和降血脂等多种功效^[5-7]。乳酸菌能代谢产生有机酸、双乙酰、过氧化氢、细菌素及类细菌素等物质,能够有效地抑制病原菌和腐败菌^[8],维持动物肠道微生态平衡且安全性高^[9]。乳酸菌被人或动物食用后,只有在大量活菌顺利黏附于肠组织中,才可对宿主起到益生效果^[10]。因此,能否顺利通过胃肠环境并定殖于肠道是益生菌的重要筛选标准之一。目前对于干酪乳杆菌发酵荔枝汁在胃肠消化研究中尚属空白,以及其在肠道内能否起到抑菌作用的研究尚不够广泛和深入,对其中抑菌活性物质成分尚不明确。

本实验通过以干酪乳杆菌发酵的荔枝汁为研究对象,通过模拟人体胃肠道环境,探究干酪乳杆菌在人工胃肠液中的存活能力;并采用琼脂扩散法,研究其对常见食源性致病菌的抑制作用,以及探究酸和酶等因素对发酵液抑菌性的影响,为干酪乳杆菌发酵荔枝汁能否在胃肠道环境中发挥健康促进作用提供理论参考。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 原料

荔枝品种:妃子笑,购于广东省广州市。

1.1.2 培养基

MRS 固(液)体培养基、营养肉汤固(液)培养基、脑心浸萃液体培养基:购于广东环凯生物科技有限公司。

1.1.3 菌种

1.1.3.1 供试菌

干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*) CICC 6117:由广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所提供。

1.1.3.2 指示菌

肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*)ATCC14028、宋氏志贺氏菌(*Shigella sonnei*)ATCC25931、大肠埃希氏菌 O157:H7 (*E. coli* O157:H7) ATCC35150、单增李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*) ATCC19115、金

黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) ATCC25923 和阪崎肠杆菌 (*Enterobacter sakazakii*) CMCC45401:由广东省微生物菌种保藏中心提供。

1.1.4 主要试剂与器材

试剂:胃蛋白酶(酶活力 3850 U/mg)、胰蛋白酶(酶活力 4~6 U/mg)、胆汁盐,美国 Sigma 公司;乳酸、氢氧化钠、盐酸、PBS 缓冲剂,广州化学试剂厂;碳酸氢钠,天津渤化永利化工股份有限公司。

器材:打孔器(内径 7.0±0.1 mm,外径 7.8±0.1 mm),惠州市宏业仪器有限公司;培养皿,常德比克曼生物科技有限公司;0.22 μm Millipore 默克密理博无菌针头式过滤器,上海摩速科学器材有限公司;注射器,江西洪达医疗器械集团有限公司。

1.1.5 主要仪器与设备

pH 计, PB-10 德国 Sartorius; 恒温摇床培养箱、立式蒸汽灭菌锅,上海博讯实业有限公司;高速冷冻离心机,美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 发酵荔枝汁的制备

将荔枝鲜果的皮和核去掉,打浆后经过两层纱布过滤,将过滤后的荔枝汁放于-20℃中保存备用。

1.2.1.1 菌体培养

(1) 菌种活化:从-80℃中取甘油菌种(干酪乳杆菌),取 500 μL 甘油菌液接种于 50 mL MRS 肉汤,30℃静置培养 18 h 后,挑新鲜菌液划线接种于 MRS 琼脂培养基,37℃培养 24 h 后,挑取单菌落在 MRS 琼脂培养基上继续划线分离纯化,于 37℃条件下培养 24 h。

(2) MRS 肉汤培养:挑取(1)中活化的单菌落接种于 50 mL MRS 肉汤中,30℃静止培养 18 h,备用。

1.2.1.2 荔枝汁的乳酸菌发酵培养

荔枝汁解冻后,向无菌果汁瓶中加入 100 mL 荔枝汁,利用碳酸氢钠调 pH 至 6.5,经巴氏杀菌(将原料加热至 70℃左右,并保持此温度 30 min 以后急速冷却到室温)后按 $1.0 \times 10^{6.5}$ (CFU/mL) 接种量接入杀菌后的荔枝汁中,置于 30℃静置发酵 24 h,即可得到干酪乳杆菌发酵荔枝汁。

1.2.2 发酵荔枝汁中干酪乳杆菌的耐受能力的测定方法

1.2.2.1 人工胃肠消化液的制备

模拟人工胃肠消化试验参考 Zhuang Guo 和 Megda Silva Fernandes 等^[11,12]方法,稍作改进。

(1) 磷酸盐缓冲液(PBS)的制备:称取 8 g NaCl,

0.2 g KH_2PO_4 和 1.15 g Na_2HPO_4 , 用蒸馏水定容至 1 L。将 PBS 的 pH 用 0.1 mol/L HCl 分别调节至 1.5、2.0、3.0、4.0、7.5, 121 °C 高压灭菌 15 min, 备用。

(2) 人工胃液: 在 pH 为 1.5、2.0、3.0、4.0 的无菌 PBS 中, 分别加入 10.0 g/L 胃蛋白酶, 充分溶解后, 用无菌的 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 除菌后即可得到人工胃液, 备用。

(3) 人工肠液: 在 pH 为 7.5 的无菌 PBS 缓冲液中, 加入 10.0 g/L 胰蛋白酶和 3.0 g/L 胆汁盐, 充分溶解后, 用无菌的 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 除菌后即可得到人工肠液, 备用。

1.2.2.2 发酵荔枝汁对人工胃液和肠液耐受能力的测定

分别将干酪乳杆菌发酵荔枝汁按 10% 体积量 (V/V) 接入到上述不同 pH 的人工胃液中 (即取 1 mL 菌液, 加入到 9 mL 人工胃液), 于 37 °C、100 r/min 恒温摇床中^[13]消化 4 h, 每隔 1 h 取样, 采用平板菌落计数法测定活菌数, 每个处理重复 3 次。然后, 从上述已消化 2 h 的 pH 3.0 人工含菌胃液中取 1 mL, 加入到 9 mL 人工肠液中, 在 37 °C、100 r/min 恒温摇床中继续培养。在第 0、1、2、3、4、8、12 h 时间点按时取样, 用平板菌落计数法测定活菌数, 每个处理重复 3 次。

1.2.3 抑菌实验

1.2.3.1 指示菌悬液的制备

将单增李斯特氏菌接种于脑心浸萃液体培养基中, 其余指示菌 (肠炎沙门氏菌、宋氏志贺氏菌、大肠埃希氏菌 O157:H7、金黄色葡萄球菌和阪崎肠杆菌) 分别接种于营养肉汤培养基, 在 37 °C 培养箱中培养 12 h, 再分别用生理盐水将指示菌悬液的活菌数调节为 10^7 CFU/mL, 待用。

1.2.3.2 抑菌活性的测定

采用琼脂扩散法^[14], 稍作修改。分别取上述调节至 10^7 CFU/mL 的指示菌悬液 20 μL , 加入到无菌空培养皿中, 接着倒入 20 mL 约 45 °C 的营养琼脂培养基, 充分混匀, 待其完全凝固后, 采用无菌打孔器打孔, 再向孔中分别加入 50 μL 1.2.3.3 不同处理的发酵荔枝汁, 在 37 °C 培养箱培养 12 h, 测量并记录抑菌圈直径, 每个处理重复 3 次。

1.2.3.3 不同处理的发酵荔枝汁

参考王成涛、李莉媛等^[8,15]人方法, 对发酵荔枝汁进行以下不同处理。

(1) A 液为发酵荔枝汁上清液: 在条件为 4 °C、10000 r/min 的低温离心机中, 将发酵荔枝汁离心 10 min 收集的上清液。

(2) B 液为无菌上清液: 将上述 (A 液) 通过 0.22 μm 微孔滤膜进行过滤除菌即可得到无菌上清液。

(3) C 液为 MRS 肉汤活化的干酪乳杆菌菌液: 将干酪乳杆菌接种于无菌的 MRS 肉汤中, 于 30 °C 培养 24 h 得到的菌液。

(4) D 液为去除有机酸的无菌上清液 (碱处理): 用 6 mol/L NaOH 溶液将 B 液调节至 pH 5.0, 以 pH 5.0 的乳酸溶液作为对照组, 测定其抑菌性的变化。

(5) E 液为去除过氧化氢的无菌上清液 (热处理): 将 B 液于 80 °C 水浴 10 min 以排除 H_2O_2 , 测定其抑菌性的变化。

(6) F 液为去除有机酸和过氧化氢的无菌上清液: 用 6 mol/L NaOH 溶液将 B 液调节至 pH 5.0, 并于 80 °C 水浴 10 min 以排除 H_2O_2 , 测定其抑菌性的变化。

(7) G 液为 α -淀粉酶处理的无菌上清液 (酶处理): 用 α -淀粉酶在其最适 pH 6.5 条件下, 以酶浓度为 1 mg/mL 对 B 液进行酶处理, 于最适温度下处理 2 h (60 °C 水浴), 处理后用乳酸将上清液 pH 调至原始 pH 4.5。以不加酶的空白为对照, 测定其抑菌性的变化。

(8) H 液胰蛋白酶处理的无菌上清液 (酶处理): 用胰蛋白酶在其最适 pH 7.5 条件下, 以酶浓度为 1 mg/mL 对 B 液进行酶处理, 于最适温度下处理 2 h (37 °C 水浴), 处理后用乳酸将上清液 pH 调至原始 pH 4.5。以不加酶的空白为对照, 测定其抑菌性的变化。

1.3 数据统计与分析

试验数据以“Mean \pm SD”表示, 采用 Origin8.5 软件进行作图, 通过 SPSS 20.0 统计软件, 进行多组间比较和组间两两比较, 分别运用单因素方差分析 (one way-ANOVA) 以及 LSD (方差齐) / Tamhane's (方差不齐)。显著性水平为 $p < 0.05$, 用不同小写字母表示; 显著性水平为 $p > 0.05$, 用相同小写字母表示。

2 结果与分析

2.1 发酵荔枝汁中干酪乳杆菌的耐受能力

2.1.1 人工胃液消化过程

由图 1 可以看出, 干酪乳杆菌在 pH 2.0、3.0 和 4.0 人工胃液分别消化 4 h 过程中, 其耐受性趋势一致, 活菌数呈先下降后回升的趋势, 可以保持较高的活菌数, 活菌数均在 10^7 CFU/mL 以上。在 pH 1.5 胃液中, 消化 2 h 后, 干酪乳杆菌的活菌数为 2.71×10^4

CFU/mL, 消化 4 h 后, 干酪乳杆菌的活菌数较 0 h 处显著下降, 活菌数为 230 CFU/mL。

胃作为人体消化道的重要组成部分, 胃液具有强酸性, 一般胃液 pH 在 1.5~4 范围内变化^[16,17], 胃的排空时间一般为 3~5 h。酸性条件能够激活胃液中的胃蛋白酶, 从而杀死进入胃里面的细菌^[18]。因此, 乳酸菌必须要同时具有耐酸性和胃蛋白酶的耐受性, 才能以活菌状态进入肠道并发挥益生功能^[19,20]。本实验中干酪乳杆菌可以通过自身的应激反应来抵抗外界所造成的危害, 能够在低 pH 环境中保持较好的活性。

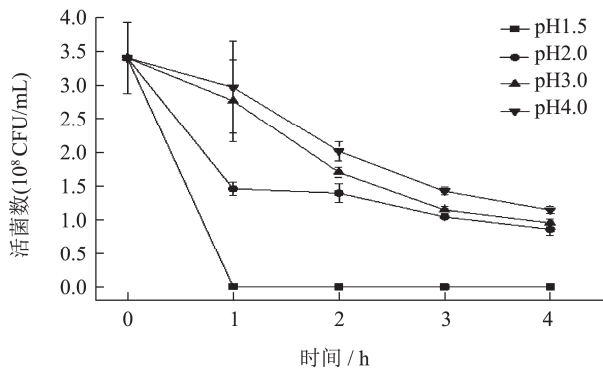


图 1 干酪乳杆菌在不同 pH 人工胃液中消化过程的活菌数

Fig.1 The viable counts of *Lactobacillus casei* in different pH artificial gastric juice digestion process

2.1.2 人工肠液消化过程

益生乳酸菌在机体肠道内必须保持 10^6 CFU/mL 以上^[21~23]的活菌数才可以发挥其益生效果, 由图 2 可以看出, 在人工肠液中消化 4 h 后, 干酪乳杆菌的活菌数为 2.33×10^7 CFU/mL; 消化 12 h 后, 其活菌数也在 10^7 CFU/mL 以上。人体小肠中胆汁盐质量浓度以

0.3~3 g/L 波动, 人体小肠液 pH 值在 7.5 左右, 含有大量的水分和各种酶、胆汁盐等物质, 对肠道菌群有一定的阻力, 因此对胰蛋白酶、胆汁盐的耐受性是筛选益生乳酸菌的重要标准之一^[24]。固体或液体食物在小肠一般 6~8 h 左右消化完毕^[25], 本实验将消化了 2 h 的 pH 3.0 人工含菌胃液继续加入到人工肠液中进行消化, 消化 12 h 观察其存活情况, 结果如图 2 所示。人工肠液对发酵荔枝汁中的干酪乳杆菌有一定的杀菌作用。随着消化时间延长, 干酪乳杆菌的存活率下降速度由快到慢, 原因可能是胰蛋白酶和胆盐促使细菌细胞膜溶解而导致菌体内溶物外泄^[26], 从而使细胞死亡。

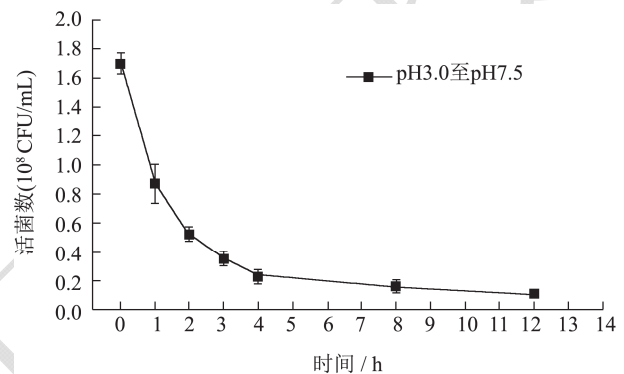


图 2 干酪乳杆菌在人工肠液中消化不同时间的活菌数

Fig.2 The viable counts of *Lactobacillus casei* in artificial intestinal juice digestion at different times

2.2 抑菌作用

2.2.1 干酪乳杆菌发酵荔枝汁中产抑菌物质的抑菌谱

表 1 荔枝发酵汁对常见致病菌的抑菌作用

Table 1 Antibacterial effect of litchi fermented juice on common pathogenic bacteria

指示菌处理条件	抑菌圈直径/cm					
	肠炎沙门氏菌	宋氏志贺氏菌	大肠杆菌 O157:H7	单增李斯特氏菌	金黄色葡萄球菌	阪崎肠杆菌
A 液	3.53±0.20 ^a	3.57±0.10 ^a	2.17±0.18 ^a	3.78±0.25	2.83±0.10 ^a	-
B 液	3.02±0.08 ^b	3.32±0.40 ^a	2.10±0.13 ^a	3.43±0.23	2.23±0.08 ^b	-
C 液	1.52±0.08 ^c	1.13±0.08 ^b	1.15±0.05 ^b	-	0.97±0.08 ^c	-

注: 数据以“Mean±SD”表示, 孔径为 0.70 cm: “-”表示未观察到明显抑菌圈, 供试菌为干酪乳杆菌; 显著性水平为 $p < 0.05$, 用不同小写字母表示; 显著性水平为 $p > 0.05$, 用相同小写字母表示。下表同。

从表 1 和图 3 可以看出, 发酵荔枝汁 A 液和 B 液对肠炎沙门氏菌、宋氏志贺氏菌、大肠杆菌 O157:H7、单增李斯特氏菌、金黄色葡萄球菌均有不同程度的抑菌效果, 对阪崎肠杆菌均无杀菌效果, A 液和 B 液对单增李斯特氏菌、宋氏志贺氏菌和肠炎沙门氏菌的抑菌作用较强。B 液比 A 液抑菌效果较弱, CICC6117 干酪乳杆菌 MRS 肉汤发酵液对肠炎沙门氏菌、宋氏志贺氏菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌抑菌效果较弱,

说明干酪乳杆菌对致病菌发挥的抑菌作用较小。

干酪乳杆菌发酵荔枝汁和无菌上清液对这五种致病细菌(肠炎沙门氏菌、宋氏志贺氏菌、大肠埃希氏菌 O157:H7、单增李斯特氏菌和金黄色葡萄球菌)均具有一定的抑菌活性, 且抑菌圈之间存在显著性差异 ($p < 0.05$)。

各组发酵液的抑菌圈均比 MRS 肉汤活化的干酪乳杆菌菌液的抑菌圈大, 差异显著 ($p < 0.05$), 这可能

是由于发酵液中的干酪乳杆菌对指示菌无拮抗作用，所以抑菌圈均比其他处理的抑菌圈小，说明发酵液和无菌上清液的代谢产物的抑菌活性基本相同，表明抑菌活性物质存在于代谢产物和荔枝本身营养成分中。

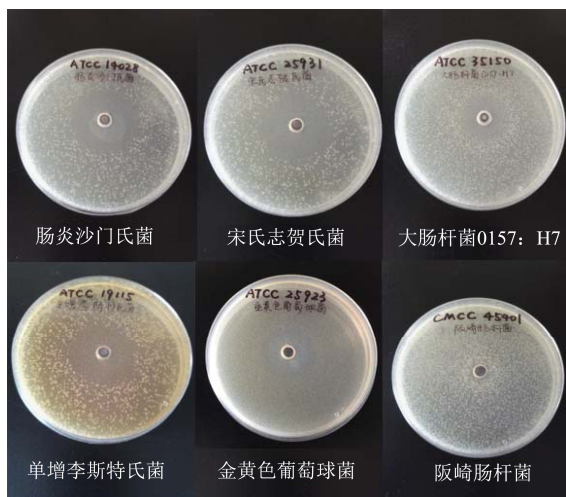


图3 乳酸菌发酵荔枝汁对指示菌的抑菌效果

Fig.3 Antibacterial effect of lactic acid bacteria fermentation juice on indicator bacteria

2.2.2 碱处理和热处理对常见致病菌的抑制作用

由表 2 可知，pH 5.0 的乳酸对致病菌没有明显的抑菌作用，pH 调至 5.0 的无菌上清液（D 液）对这五种致病菌均呈现抑菌现象，但对这五种致病菌的抑菌作用比 A 液均显著变弱；而对于 E 液，只有宋氏志贺氏菌、大肠杆菌和单增李斯特氏菌的抑菌圈显著性变小，肠炎沙门氏菌和金黄色葡萄球菌分别无显著性差异 ($p>0.05$)。同时去除乳酸和过氧化氢后的 F 液，其抑菌圈均小于单一去除过氧化氢（D 液和 E 液）的抑菌圈。乳酸菌在代谢过程中产生的乳酸等有机酸、过氧化氢和蛋白肽类物质能够强烈抑制微生物生长^[27]。本实验利用 H_2O_2 对热的不稳定性，采用热处理方法来去除 H_2O_2 ，处理后的抑菌圈显著变小 ($p<0.05$)，说明过氧化氢物质对宋氏志贺氏菌、大肠杆菌和单增李斯特氏菌三种致病菌起到抑菌效果，Pridmore 等^[28]也报道了约氏乳酸杆菌产生的 H_2O_2 能够抑制鼠伤寒沙门氏菌的活性，产生的抗菌素也能有效地抑制或杀死致病菌^[15,16]。

表 2 酸碱处理和热处理对常见致病菌的抑菌作用

Table 2 Antimicrobial effects of acid and alkali treatment and heat treatment on common pathogenic bacteria

指示菌处理 条件	抑菌圈直径/cm				
	肠炎沙门氏菌	宋氏志贺氏菌	大肠杆菌 O157:H7	单增李斯特氏菌	金黄色葡萄球菌
B 液	3.02±0.08 ^a	3.32±0.40 ^a	2.10±0.13 ^a	3.43±0.23 ^a	2.23±0.08 ^a
D 液	2.65±0.05 ^b	2.73±0.24 ^b	1.50±0.38 ^{bc}	3.02±0.31 ^b	2.10±0.05 ^b
乳酸	-	-	-	-	-
E 液	2.90±0.13 ^a	2.70±0.40 ^b	1.60±0.23 ^b	3.03±0.60 ^b	2.17±0.08 ^a
F 液	2.45±0.05 ^c	2.43±0.13 ^c	1.17±0.06 ^c	2.35±0.20 ^c	1.95±0.05 ^c

表 3 酶处理对常见致病菌抑菌作用

Table 3 Enzyme treatment against common pathogens

指示菌处理 条件	抑菌圈直径/cm				
	肠炎沙门氏菌	宋氏志贺氏菌	大肠杆菌 O157:H7	单增李斯特氏菌	金黄色葡萄球菌
B 液	3.02±0.08 ^a	3.32±0.40 ^a	2.10±0.13 ^a	3.43±0.23 ^a	2.23±0.08 ^a
G 液	3.03±0.06 ^a	2.57±0.08 ^b	1.61±0.40 ^b	3.00±0.46 ^b	2.28±0.03 ^a
I 液	2.63±0.08 ^b	2.63±0.03 ^b	1.12±0.08 ^c	2.83±0.38 ^{bc}	1.92±0.08 ^b

2.2.3 酶处理对常见致病菌的抑制作用

由表 3 可知， α -淀粉酶处理后，只有宋氏志贺氏菌、大肠杆菌和单增李斯特氏菌的抑菌圈显著性变小，其余两种无显著性差异 ($p>0.05$)。胰蛋白酶处理后，抑菌作用均显著性削弱 ($p<0.05$)。

由 F 液可知，其具有较大的抑菌圈，而对照组无明显抑菌圈，表明乳酸可能不是这五种致病菌的有效抑菌成分。经 α -淀粉酶和胰蛋白酶处理后的发酵上清液的抑菌圈大小变化较为明显 ($p<0.05$)，说明干酪乳杆菌荔枝发酵液产生的胞外多糖对宋氏志贺氏菌、大

肠杆菌和单增李斯特氏菌起到抑菌作用，发酵液中的某些蛋白肽物质能够抑制这五种致病菌。综合上述抑菌现象，可知发酵荔枝汁上清液中的 H_2O_2 、多糖和肽类物质均有抑制致病菌（肠炎沙门氏菌、宋氏志贺氏菌、大肠埃希氏菌 O157:H7、单增李斯特氏菌和金黄色葡萄球菌）的作用，推测发酵荔枝中起抑菌作用的是上述抑菌物质的综合作用。在 Rea 等^[29]人研究中也证实，乳酸菌菌株的抗菌特性主要与细胞外代谢物的分泌有关，如乳酸、乙酸、琥珀酸和细菌素等物质。Palaniyandi S A 等^[30]研究发现乳酸菌和发酵温度对大

肠杆菌、沙门氏菌等细菌的生存能力有抑制作用,并验证乳酸有明显的抑菌效果。

本实验结果显示,干酪乳杆菌荔枝发酵液和经不同处理的发酵液均能够有效地形成边缘清晰的抑菌圈(见图1),说明发酵荔枝汁液及不同处理的发酵液均有抑菌作用,并且不同处理的发酵液抑菌效果存在差异性。

3 结论

本实验以干酪乳杆菌发酵的荔枝汁为研究对象,采用琼脂扩散法,研究其对六种常见食源性致病菌(肠炎沙门氏菌、大肠埃希氏菌 O157:H7、单增李斯特氏菌、金黄色葡萄球菌、宋氏志贺氏菌和阪崎肠杆菌)的抑菌作用,并探究温度、酸和酶等因素对发酵液抑菌作用的影响;同时,本实验结合人工胃肠液对发酵液中干酪乳杆菌的活菌数进行了研究,以期研究干酪乳杆菌在体外的功能特性。实验结果显示,去酸、去过氧化氢、酶解等不同处理的发酵液对肠炎沙门氏菌、大肠埃希氏菌 O157:H7、单增李斯特氏菌、宋氏志贺氏菌和金黄色葡萄球菌五种常见食源性致病菌具有明显的抑菌作用,而对阪崎肠杆菌均未表现出抑菌效果。干酪乳杆菌在 pH 1.5、pH 2.0、pH 3.0 和 pH 4.0 的人工胃液中消化 4 h 后,活菌数分别达到了 260 CFU/mL、 8.63×10^7 CFU/mL、 9.57×10^7 CFU/mL 和 1.15×10^8 CFU/mL,在 pH 2.0 以上的人工胃液中具有较强的生存能力,说明以荔枝汁为载体发酵的干酪乳杆菌具有较强的耐酸性;在人工肠液中消化 12 h 后,活菌数均达到了 10^7 CFU/mL 以上,这说明干酪乳杆菌对胰蛋白酶和胆汁盐有较好的耐受力。因此,荔枝乳酸菌发酵饮料在体外实验中呈现出抑菌效果以及在人工肠胃液中具有较强的耐受能力,为干酪乳杆菌荔枝发酵汁能否在胃肠道环境中发挥健康促进作用提供理论参考,为荔枝乳酸菌发酵饮料在食品和保健品工业中的应用前景提供一定的理论依据。

参考文献

[1] Das A K, Rajkumar V, Nanda P K, et al. Antioxidant efficacy of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) pericarp extract in sheep meat nuggets [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2016, 5(2): 16-26

[2] Huang F, Zhang R, Dong L, et al. Antioxidant and antiproliferative activities of polysaccharide fractions from litchi pulp [J]. *Food Funct*, 2015, 6(8): 2598-2606

[3] Rong S, Hu X, Zhao S, et al. Procyanidins extracted from the litchi pericarp ameliorate atherosclerosis in ApoE knockout mice: Their effects on nitric oxide bioavailability and

oxidative stress [J]. *Food Funct*, 2017, 8(11): 4210-4216

[4] Emanuele S, Lauricella M, Calvaruso G, et al. *Litchi chinensis* as a functional food and a source of antitumor compounds: An overview and a description of biochemical pathways [J]. *Nutrients*, 2017, 9(9)

[5] Li S, Li X, Shpigelman A, et al. Direct and indirect measurements of enhanced phenolic bioavailability from litchi pericarp procyanidins by *Lactobacillus casei*-01 [J]. *Food Funct*, 2017, 8(8): 2760-2770

[6] Ebel B, Lemetais G, Beney L, et al. Impact of probiotics on risk factors for cardiovascular diseases. A review [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2014, 54(2): 175-189

[7] Naito E, Yoshida Y, Makino K, et al. Beneficial effect of oral administration of *Lactobacillus casei* strain *Shirota* on insulin resistance in diet-induced obesity mice [J]. *J Appl Microbiol*, 2011, 110(3): 650-657

[8] 王成涛,曹雁平,孙宝国,等.产类细菌素乳酸菌的筛选及其生物学特性研究[J].*中国酿造*,2008,23:50-53

WANG Cheng-tao, CAO Yan-ping, SUN Bao-guo, et al. Screening and biological characteristics of bacteriocin-producing lactic acid bacteria [J]. *China Brewing*, 2008, 23: 50-53

[9] Tuohy K M, Probert H M, Smejkal C W, et al. Using probiotics and prebiotics to improve gut health [J]. *Drug Discov Today*, 2003, 8(15): 692-700

[10] Mattila-Sandholm T, Mättö J, Saarela M. Lactic acid bacteria with health claims-interactions and interference with gastrointestinal flora [J]. *International Dairy Journal*, 1999, 9(1): 25-35

[11] Zhuang G, Wang Jicheng, Yan Liya, et al. *In vitro* comparison of probiotic properties of *Lactobacillus casei* Zhang, a potential new probiotic, with selected probiotic strains [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2009,42(10): 1640-1646

[12] Da S F M, Sanches L F, Rodrigues D, et al. Evaluation of the isoflavone and total phenolic contents of kefir-fermented soymilk storage and after the *in vitro* digestive system simulation [J]. *Food Chem.*, 2017, 229: 373-380

[13] 熊涛,宋苏华,黄锦卿,等.植物乳杆菌 NCU116 在模拟人体消化环境中的耐受力[J].*食品科学*,2011,11:114-117

XIONG Tao, SONG Su-hua, HUANG Jin-qing, et al. Tolerance of *Lactobacillus plantarum* NCU116 in simulating human digestive environment [J]. *Food Science*, 2011, 11: 114-117

[14] 吴燕利.干酪乳杆菌产抑菌物质的发酵条件优化及其制剂的功能评价[D].合肥:安徽农业大学,2014

- WU Yan-li. Optimization of fermentation conditions for the production of antibacterial substances from *Lactobacillus casei* and functional evaluation of its preparation [D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2014
- [15] 李莉媛. 19 株饲用益生菌体外性能评价及优良菌株的筛选 [D]. 郑州: 河南工业大学, 2012
- LI Li-yuan. *In vitro* performance evaluation of 19 probiotics for feeding and screening of excellent strains [D]. Zhengzhou: Henan University of Technology, 2012
- [16] Mills S, Ross R P, Hill C. Bacteriocins and bacteriophage; a narrow-minded approach to food and gut microbiology [J]. FEMS Microbiol Rev, 2017, 41(Supp_1): S129-S153
- [17] Eijsink V G, Axelsson L, Diep D B, et al. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2002, 81(1-4): 639-654
- [18] 刘芸, 曹宜, 刘波, 等. 植物蛋白发酵乳酸菌对模拟胃肠道环境的耐受性研究 [J]. 福建农业学报, 2013, 7: 709-713
- LIU Yun, CAO Yi, LIU Bo, et al. Tolerance of lactic acid bacteria in plant protein fermentation to simulate gastrointestinal environment [J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2013, 7: 709-713
- [19] Gardiner G E, Casey P G, Casey G, et al. Relative ability of orally administered *Lactobacillus murinus* to predominate and persist in the porcine gastrointestinal tract [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(4): 1895-1906
- [20] Bampalia-Davis I M, Geornaras I, Kendall P A, et al. Differences in survival among 13 *Listeria monocytogenes* strains in a dynamic model of the stomach and small intestine [J]. Appl Environ Microbiol, 2008, 74(17): 5563-5567
- [21] Saarela M, Mogensen G, Fonden R, et al. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties [J]. J Biotechnol, 2000, 84(3): 197-215
- [22] Charteris W P, Kelly P M, Morelli L, et al. Effect of conjugated bile salts on antibiotic susceptibility of bile salt-tolerant *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* isolates [J]. J Food Prot, 2000, 63(10): 1369-1376
- [23] 焦苗苗, 李宏梁, 曾桥, 等. 纳豆芽孢杆菌优良菌株的筛选及人工消化液耐受性研究 [J]. 中国调味品, 2017, 3: 1-5
- JIAO Miao-miao, LI Hong-liang, ZENG Qiao, et al. Screening of excellent strains of *Bacillus natto* and tolerance of artificial digestive juice [J]. Chinese Condiment, 2017, 3: 1-5
- [24] Huang Y, Adams M C. *In vitro* assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria [J]. Int J Food Microbiol, 2004, 91(3): 253-260
- [25] Inman S R, Stowe N T, Cressman M D, et al. Lovastatin preserves renal function in experimental diabetes [J]. Am J Med Sci, 1999, 317(4): 215-221
- [26] Ruiz L, Margolles A, Sanchez B. Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* [J]. Front Microbiol, 2013, 4: 396
- [27] Barefoot S F, Nettles C G. Antibiosis revisited: Bacteriocins produced by dairy starter cultures [J]. Journal of Dairy Science, 1993, 76(8): 2366-2379
- [28] Pridmore R D, Pittet A C, Praplan F, et al. Hydrogen peroxide production by *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 and its role in anti-Salmonella activity [J]. FEMS Microbiol Lett, 2008, 283(2): 210-215
- [29] Rea M C, Alemayehu D, Ross R P, et al. Gut solutions to a gut problem: Bacteriocins, probiotics and bacteriophage for control of *Clostridium difficile* infection [J]. Journal of Medical Microbiology, 2013, 62(Pt 9): 1369-1378
- [30] Palaniyandi S A, Damodharan K, Suh J W, et al. *In vitro* characterization of *Lactobacillus plantarum* strains with inhibitory activity on enteropathogens for use as potential animal probiotics [J]. Indian Journal of Microbiology, 2017, 57(2): 201-210