

一株高产苯乳酸菌株的安全性评价与发酵工艺优化

侯楠楠, 谢全喜*, 王梅, 王倩, 鹿晓慧, 周红, 谷巍

(山东宝来利来生物工程股份有限公司, 山东省动物微生态制剂重点实验室, 山东泰安 271000)

摘要: 该研究利用传统生物发酵技术生产苯乳酸, 并对高产苯乳酸菌株种属、安全性以及发酵工艺进行研究。通过反相高效液相色谱法筛选得到1株高产苯乳酸菌株 BLCC2-0069, 该菌株发酵24 h后发酵液中苯乳酸的含量为1.26 g/L; 借助菌株形态观察和16S rDNA序列鉴定, 初步确定该菌株为植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*); 该菌株培养4 h进入对数生长期, 10 h进入稳定期, 活菌数可达到 1.78×10^9 cfu/mL。通过对该菌株的小鼠体内安全评价, 初步确定该菌株的体内安全性。同时还对植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) BLCC2-0069的发酵工艺进行研究, 发现在培养基中添加3.00 g/L苯丙酮酸为底物时发酵液中苯乳酸产量最高可达3.96 g/L。综上, 植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) BLCC2-0069对小鼠无毒, 具有较高生物安全性, 直接发酵苯乳酸的产量可达到1.26 g/L, 添加底物发酵苯乳酸产量可达到3.96 g/L。研究结果可为菌株的安全应用提供理论基础。

关键词: 植物乳杆菌; 苯乳酸; 菌株鉴定; 安全性评价

文章编号: 1673-9078(2021)09-67-75

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.9.1213

Safety Evaluation and Fermentation Process Optimization of a High-yield Phenyllactic Acid Strain

HOU Nan-nan, XIE Quan-xi*, WANG Mei, WANG Qian, LU Xiao-hui, ZHOU Hong, GU Wei

(Shandong Baolai-Leelai Bioengineering Co. Ltd., Shandong Key Laboratory of Animal Microecological Preparations, Tai'an 271000, China)

Abstract: In this study, traditional bio-fermentation technology was used to produce phenyllactic acid, and the species, safety and fermentation process of high-yielding phenyllactic acid strains were studied. A high-yielding phenyllactic acid strain BLCC2-0069 was obtained through screening by reversed-phase high performance liquid chromatography. The content of phenyllactic acid in the fermentation broth of this strain was 1.26 g/L after 24 h of fermentation; By observations on the morphology of the strain and identification of 16S rDNA sequence of the strain, the strain was preliminarily determined as *Lactobacillus plantarum*; the strain entered the logarithmic growth phase after 4 hours of culture, and entered the stable phase after 10 hours, with the number of viable bacteria reaching 1.78×10^9 cfu/mL. Through an *in vivo* safety evaluation in mice, this strain was preliminarily determined safe *in vivo*. In the meantime, the fermentation process using *Lactobacillus plantarum* BLCC2-0069 was also studied, and that the yield of phenyllactic acid in the fermentation broth reached the highest (3.96 g/L) when 3.00 g/L of phenylpyruvate was added to the medium as a substrate. In summary, *Lactobacillus plantarum* BLCC2-0069 is non-toxic to mice and has a high level of biological safety. The yield of phenyllactic acid reached 1.26 g/L through direct fermentation, and 3.96 g/L through fermentation with a substrate addition. The results can provide a theoretical basis for the safe application of the strain.

Key words: *Lactobacillus plantarum*; phenyllactic acid; strain identification; safety evaluation

引文格式:

侯楠楠, 谢全喜, 王梅, 等. 一株高产苯乳酸菌株的安全性评价与发酵工艺优化[J]. 现代食品科技, 2021, 37(9): 67-75

HOU Nan-nan, XIE Quan-xi, WANG Mei, et al. Safety evaluation and fermentation process optimization of a high-yield phenyllactic acid strain [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(9): 67-75

收稿日期: 2020-12-28

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2017YFD0501000)

作者简介: 侯楠楠 (1989-), 女, 助理研究员, 研究方向: 动物微生态制剂的研发, E-mail: 891622197@qq.com

通讯作者: 谢全喜 (1984-), 女, 副研究员, 研究方向: 微生态制剂, E-mail:

xiequanxi@126.com

霉菌毒素污染, 防腐防霉剂使用不当导致我国食品、饲料等行业上存在很多问题, 主要反映在食品安全性差、饲料保质期短等方面^[1,2]。

苯乳酸也称3-苯乳酸或 β -苯乳酸, 是一种广泛存在于自然界中的小分子天然有机酸, 其分子式为 $C_9H_{10}O_3$, 相对分子质量为166^[3]。近年来研究发现,

苯乳酸是可以由部分乳酸菌分泌的一种具有广谱抗菌性的新型抑菌剂,能抑制食源性致病菌、腐败菌,尤其能抑制真菌的污染;且溶解性好、易于在食品体系中扩散;具有稳定性高、宽广的 pH 适应性范围和热稳定性^[4-6]。1998 年,Dieuleveux^[7]发现发酵生产的干酪在成熟过程中产生苯乳酸对食源致病菌具有很强的抑制作用;2000 年,Lavremicocca^[8]等进一步确定苯乳酸的广谱抑菌效果。苯乳酸作为天然防腐剂价格高昂,目前合成方法主要有化学合成法和生物合成法。其中化学合成存在许多不利因素,比如技术条件复杂、反应条件严苛、环境污染比较大等;生物合成苯乳酸是一种新方法。研究发现很多菌株都可以产生苯乳酸,如乳杆菌^[4]、白地霉^[8]、芽孢杆菌^[9]、丙酸菌^[10]、戊糖片球菌^[11]等,但各种菌株间的产量差异比较大。微生物可以利用发酵过程中的多酶体系将前体化合物合成苯乳酸,例如牛的瘤胃微生物能够利用苯丙氨酸合成苯乳酸,大量微生物可以利用乳酸脱氢酶在 NADH 作用下利用苯丙酮酸合成苯乳酸^[12,13]。微生物在合成苯乳酸起到防腐效果的同时还能产生其它有机酸成分,是目前普遍认可的一种成本低、效果好、使用安全的方法。乳酸菌作为重要的益生菌,是 GRAS 认证 (Generally Recognized as Safe) 微生物,在食品工业中广泛应用可以改善食品风味,提高食品营养价值和保鲜性能,乳酸菌来源的苯乳酸成为研究的热点^[14,15]。因此筛选高产苯乳酸的乳酸菌,提高苯乳酸产量具有重要意义。

本研究借助高效液相色谱法筛选出高产苯乳酸的菌株,对菌株进行分子鉴定、安全性评价并对产苯乳酸发酵工艺进行研究,为菌株安全应用到实际生产中提供重要参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 乳酸菌

菌株 BLCC2-0069、菌株 BLCC2-0021 和菌株 BLCC2-0410,均由山东宝来利来生物工程股份有限公司生物工程研究院菌种资源保藏中心保存。

1.1.2 培养基

MRS 液体培养基:葡萄糖 20 g、蛋白胨 10 g、牛肉膏 8 g、酵母膏 4 g、硫酸镁 0.5 g、硫酸锰 0.3 g、柠檬酸铵 2 g、乙酸钠 5 g、吐温-80 1 mL,蒸馏水定容至 1000 mL,调 pH 值至 6.0,121 °C 灭菌 30 min 备用。MRS 固体培养基按照 1.5% 加入进口琼脂。

1.1.3 化学试剂

葡萄糖:山东祥瑞药业有限公司;蛋白胨:北京奥博星生物技术有限责任公司;酵母膏、牛肉膏:天津市英博生化试剂有限公司;硫酸镁、硫酸锰:济南汇丰达化工有限公司;柠檬酸铵:上海抚生实业有限公司;乙酸钠:青岛捷世康生物科技有限公司;吐温-80:天津凯通化学试剂有限公司;三氟乙酸和甲醇(均为色谱级):天津市永大化学试剂有限公司;琼脂粉:北京索莱宝科技有限公司;微孔滤膜(直径 13 mm、孔径 0.22 μm):上海安谱有限公司;苯丙氨酸(分析纯,纯度≥99.5%)、苯丙酮酸(分析纯,纯度≥99.5%)、DL-3 苯乳酸(分析纯,纯度≥98%)均购自美国 Sigma 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 高产苯乳酸菌株的筛选

将超低温冰箱(-80 °C)保存的乳酸菌菌株 BLCC2-0069、BLCC2-0021 和 BLCC2-0410 冻干粉分别接种于 MRS 固体斜面培养基上,37 °C 培养 24 h;将培养好的斜面,在无菌条件下用接种环挑取一环接种至 MRS 液体培养基中,37 °C 静置培养 24 h 和 48 h,4000 r/min 离心 10 min,取发酵上清液备用,采用高效液相色谱法检测发酵上清液中苯乳酸含量。

1.2.2 菌株鉴定

1.2.2.1 形态学鉴定

挑取产苯乳酸效果最好的菌株的纯培养物接种于 MRS 固体培养基中,37 °C 培养 48 h,观察菌落形态。

1.2.2.2 分子生物学鉴定

将目的菌株接种于新鲜的 MRS 液体培养基中培养 24 h,采用天根公司的试剂盒提取菌体 DNA,并对其进行 16S rDNA 序列扩增。所用引物为通用引物:1492r: 5'-ggttacctgttacgactt-3, (SEQ ID NO.2); 27f: 5'-agagttgatcctggtcag-3, (SEQ ID NO.3)。

PCR 反应体系(50 μL)为: Mixture 25 μL(含 Taq DNA 聚合酶及 d NTP 等,天根生化科技有限公司),上下游引物各 1 μL,模板 DNA 2 μL,超纯水 21 μL。PCR 扩增程序为 94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 1 min,52 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 2 min,25 个循环,72 °C 延伸 10 min。PCR 产物送北京博尚生物技术有限公司进行序列测定。

1.2.3 菌株安全性试验

1.2.3.1 菌粉制备

植物乳杆菌 BLCC2-0069 中试试验后,发酵液立即离心冻干,制备冻干菌粉,活菌数≥1.0×10¹¹ cfu/g。

1.2.3.2 试验动物

昆明系小白鼠(许可证号 SYXK(鲁)20130002), 体重 20 ± 2 g, 购自山东鲁抗医药股份有限公司。

1.2.3.3 试验设计

参照《食品安全国家标准 28 天经口毒性试验》^[16] 动物饲养法以及《食品安全国家标准急性经口毒性试验》^[17] 限量法进行毒性试验。选择体重 20.00 ± 2.00 g 健康昆明种小鼠 120 只, 雌雄各半。基础日粮预饲一周后随机分为 4 组, 每组 30 只, 雌雄各 15 只, 分笼喂养, 其中一组为对照组, 其余三组为试验组, 分别灌胃 1.0×10^8 cfu/mL、 1.0×10^9 cfu/mL 和 1.0×10^{10} cfu/mL 植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) BLCC2-0069 菌液。

1.2.3.4 给药

动物饲养法给药方式为灌胃, 各组小鼠禁食 16 h 后, 对照组灌胃生理盐水, 其余三个试验组分别灌胃生理盐水稀释好的菌粉, 按照 0.4 mL/20 g 体重的受试样品量进行灌胃给药, 连续灌胃 2 d, 每次灌胃后密切观察 2 h, 2 h 后常规饮食, 连续观察 14 d, 每天定时观察记录。

1.2.3.5 观察指标

(1) 肉眼观察: 详细记录被毛和皮肤、眼睛和粘膜、呼吸、循环、自主神经和中枢神经系统、肢体活动和行为等改变。特别注意是否出现震颤、抽搐、流涎、腹泻、嗜睡和昏迷等症状。记录毒作用体征出现和消失的时间和死亡时间。

(2) 小鼠体重: 于试验开始时、7 d 和 14 d 分别对每组雌雄小鼠进行称重, 比较其体重情况。

(3) 病理学检查: 14 d 时对各组小鼠全部进行尸检, 观察脏器官病变, 对观察有变化的脏器官需进行组织病理学检查。

1.2.4 植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) BLCC2-0069 发酵工艺研究

1.2.4.1 发酵时间对植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) BLCC2-0069 发酵 pH 值和活菌数的影响

将培养好的植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) BLCC2-0069 种子液按照 2.00% 接种量接种到 MRS 液体培养基中静置培养, 每隔 2 h 取样测定发酵液的 pH 值和活菌数。

1.2.4.2 发酵底物对植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) BLCC2-0069 发酵液苯乳酸含量的影响

将培养好的植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) BLCC2-0069 种子液按照 2.00% 接种量接种到 MRS 液体培养基中静置培养, 接种 3 组, 每组 3 个重复。试验 1 组: MRS 液体培养基中额外添加 3.00 g/L 苯丙氨酸; 试验 2 组: MRS 液体培养基中额外添加 3.00 g/L

苯丙酮酸; 第 3 组为对照组, 不额外添加任何添加剂, 37 °C 培养箱静置培养 24 h, 取发酵液 4000 r/min 离心 10 min, 弃菌体, 取发酵上清液采用高效液相色谱法检测被试菌株发酵液中苯乳酸含量。

1.2.4.3 苯丙酮酸添加量对植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) BLCC2-0069 发酵液苯乳酸含量的影响

将培养好的植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) BLCC2-0069 种子液按照 2.00% 接种量接种到 MRS 液体培养基中静置培养, 共接种 4 组, 每组 3 个重复。试验 1 组、2 组、3 组和 4 组分别在 MRS 液体培养基中额外添加 0 g/L、1.00 g/L、3.00 g/L 和 5.00 g/L 苯丙酮酸, 均放入 37 °C 培养箱静置培养 24 h 和 48 h, 取发酵液 4000 r/min 离心 10 min, 弃菌体, 取发酵上清液检测被试菌株发酵液中苯乳酸含量。

1.3 测定指标及方法

1.3.1 植物乳杆菌活菌数的测定

准确吸取乳酸菌发酵液 1 mL, 用生理盐水 10 倍梯度稀释, 取适当稀释度的样品至 MRS 平皿培养基上, 37 °C 培养 48 h, 根据菌落数计算样品中乳酸菌活菌数, 结果用 cfu/mL 表示。

1.3.2 苯乳酸含量的测定

标准溶液的配制: 分别准确称取 DL-3 苯乳酸标准品 0.2058 g (实含苯乳酸 0.2048 g) 用超纯水溶解后定容至 100 mL, 配制成 2.048 g/L 的苯乳酸标准溶液。然后从中分别吸取 0.62 mL、1.25 mL、2.50 mL 和 5.00 mL 用超纯水定容至 10.0 mL, 各组质量浓度如表 1。

表 1 苯乳酸溶液浓度梯度组成

Table 1 The concentration gradient composition of phenyllactic acid solution

瓶号	苯乳酸浓度/(g/L)	峰面积
1	2.05	98249129
2	1.02	55668761
3	0.51	31032314
4	0.26	16190460
5	0.13	8715644

浓度由低至高进样测定, 以峰面积和浓度作图, 得到苯乳酸标准曲线回归方程, 为: $Y = 0.00000002151X - 0.1092 (R^2 = 0.9955)$

待测样品苯乳酸的提取: 发酵液经 10000 r/min, 离心 5 min 和 0.22 μ m 滤膜过滤后, 采用岛津 LC-20A 高效液相色谱, 岛津 SPD-20A 紫外检测器进行分析。

HPLC 法测定苯乳酸含量: 色谱条件为色谱柱: InertSustain AQ-C18 (5 μ m 4.6 \times 250 mm) (W), 柱温箱: 30 °C, 进样量: 20 μ L, 流速: 1.0 mL/min。流动相 A:

0.05%三氟乙酸水溶液,流动相 B: 0.05%三氟乙酸甲醇溶液;梯度洗脱条件: 0~15 min 流动相 B 的比例由 40%升至 80%, 15~16 min 流动相 B 的比例保持 80%, 16~18 min 流动相 B 的比例由 80%降至 40%, 洗脱完成后, 波长 210 nm 检测。

1.4 数据分析

试验数据采用 Excel 2007 进行初步处理后, 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析, 采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 程序进行方差分析, LSD 法进行组间多重比较, 结果以“平均值±标准差”表示, $p < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与讨论

2.1 苯乳酸标准曲线的绘制

由苯乳酸标准品的 HPLC 色谱图 (图 1, 苯乳酸标准品浓度 2.05 g/L), 可以看出, 在 9.5 min 左右出现苯乳酸色谱峰, 且稳定性良好、分离效果好、峰型理想、灵敏度高。

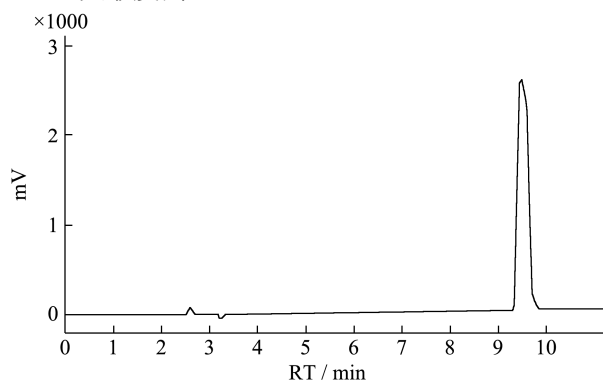


图 1 苯乳酸标准品的 HPLC 色谱图

Fig.1 HPLC chromatogram of phenyllactic acid standard

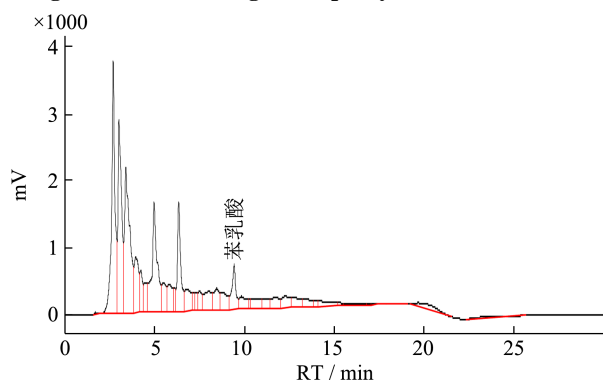


图 2 发酵上清液液的 HPLC 色谱图

Fig.2 HPLC chromatogram of fermentation supernatant

由图 2 发酵上清液的 HPLC 色谱图可以看出, 乳酸菌发酵上清液苯乳酸色谱峰, 分离效果好, 峰型理想。

2.2 高产苯乳酸菌株的筛选

表 2 不同菌株发酵液对苯乳酸含量的影响 (g/L)

Table 2 Effects of different strains of fermentation broth on the content of phenyllactic acid (g/L)

时间/h	BLCC2-0021	BLCC2-0069	BLCC2-0410
24	0.84±0.01 ^a	1.26±0.01 ^c	1.11±0.01 ^b
48	0.91±0.01 ^a	1.43±0.02 ^c	1.31±0.01 ^b

注: 不同小写字母表示结果差异显著 ($p < 0.05$), 相同字母或无字母表示结果差异不显著 ($p > 0.05$), 下表同。

由表 2 可知, 24 h 时菌株 BLCC2-0069 发酵液中苯乳酸含量最高, 为 1.26 g/L, 显著高于其余各菌株 ($p < 0.05$); 48 h 时菌株 BLCC2-0069 发酵液中苯乳酸含量为 1.43 g/L, 分别高于菌株 BLCC2-0021 和 BLCC2-0410 的 58.21% 和 8.79%, 差异显著 ($p < 0.05$)。综合分析 24 h 和 48 h 发酵液中苯乳酸含量结果, 后续试验优选产苯乳酸最高的菌株 BLCC2-0069 为研究对象。

Lavermicocca^[8]从酸面团中分离到的 *L. plantarum* 2I B, 产生的苯乳酸量为 56.00 mg/L, 这是关于乳酸菌产生苯乳酸的首次报道; 随后研究人员陆续发现不同种属的乳酸菌也能够产生苯乳酸, 常规实验室条件下筛选得到的乳酸菌其苯乳酸产量多在 1.0 g/L 以下。例如李士龙^[18]通过抑菌试验结合反相高效液相色谱法, 筛选到一株乳酸菌苯乳酸产量为 246 mg/L。李明华^[19]通过溶钙圈法和琼脂柱抑菌实验法筛选到一株植物乳杆菌苯乳酸产量为 89.30 mg/L。本实验通过对公司优选菌株的筛选, 得到 1 株高产苯乳酸菌株 BLCC2-0069, 24 h 时该菌株发酵液中苯乳酸含量为 1.26 g/L, 高于国内外有益益生菌产苯乳酸报道。

2.3 菌株 BLCC2-0069 鉴定

2.3.1 形态学鉴定



图 3 乳酸菌 BLCC2-0069 菌落形态图

Fig.3 Colonial morphology of BLCC2-0069

菌株 BLCC2-0069 在 37 °C 培养 48 h 后, 培养基上的菌落形态为白色、凸起、光滑、湿润、易挑取 (如图 3 所示), 在显微镜下观察菌体形态为杆状, 单独、成对或短链排列 (如图 4 所示), 从菌落形态

和菌体形态上初步判断为一种乳杆菌。



图4 乳酸菌 BLCC2-0069 革兰氏染色图

Fig.4 Gram stain of BLCC2-0069

2.3.2 分子生物学鉴定

菌株 BLCC2-0069 的 16S rDNA PCR 产物电泳结果显示, 在分子量大小为 1500 bp 左右得到一条特异性好的条带, 与预期结果一致, 并进行测序, 将测序序列与 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 网站上已登录的部分菌株的 16S rDNA 基因序列进行比对, 将 BLCC2-0069 的 16S rDNA 序列与不同乳杆菌模式菌株 16S rDNA 序列一起构建系统发育树, 结果如图 5 所示, 该菌株与已报道的 *Lactobacillus plantarum* MT464064.1 和 MG983980.1 相似度最高, 鉴定 BLCC2-0069 菌株属于植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)。同时也进一步佐证了表型特征、生理生化特性仍可以作为乳酸菌分类的重要指标之一, 依据生化特征来划分仍具有一定可行性。

将 BLCC2-0069 送至中国典型培养物保藏中心进

行保藏 (地址为武汉市武汉大学), 保藏编号为 CCTCC NO: M 2020388。

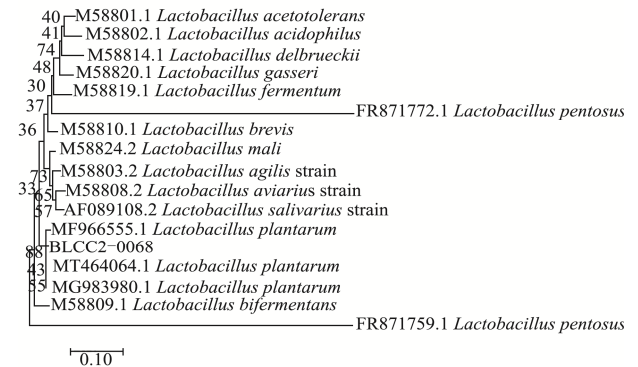


图5 BLCC2-0069 系统发育树

Fig.5 Phylogenetic tree of BLCC2-0069

2.4 植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)

BLCC2-0069 安全性试验

2.4.1 植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) BLCC2-0069 菌粉对各组小鼠 (雌性和雄性) 的生长和死亡情况的影响

由表 3 可知, 在 14 d 观察期内, 雌/雄性小鼠体态观察正常, 四肢活动正常, 对体重无显著性影响, 各组均没有出现死亡情况。解剖仔细观察肝脏、肾脏和脾脏, 均无肉眼可见病变。

表 3 BLCC2-0069 菌粉对小鼠生长和死亡情况的影响

Table 3 Effect of BLCC2-0069 on the growth and death of mice in each group

项目	对照组	1.0×10 ⁸ cfu/mL 组	1.0×10 ⁹ cfu/mL 组	1.0×10 ¹⁰ cfu/mL 组
初始平均体重/g	20.22±1.81 ^a	20.58±2.24 ^a	20.73±2.42 ^a	20.45±2.04 ^a
雌性				
7 d 平均末重/g	24.15±2.23 ^{ab}	25.95±2.36 ^a	25.48±2.16 ^a	25.32±2.41 ^a
14 d 平均末重/g	25.00±2.72 ^{ab}	26.58±2.14 ^a	26.89±2.34 ^a	26.23±2.75 ^a
雄性				
初始平均体重/g	21.91±2.31 ^a	21.74±1.87 ^a	22.05±1.67 ^a	21.86±1.94 ^a
7 d 平均末重/g	27.5±2.83 ^{ab}	28.9±2.83 ^a	28.13±2.78 ^a	28.2±2.62 ^a
14 d 平均末重/g	31±3.32 ^a	31.5±2.53 ^a	31.1±2.57 ^a	31.05±2.51 ^a
行为、动作	反应敏捷、 被毛平整顺滑	反应敏捷、 被毛平整顺滑	反应敏捷、 被毛平整顺滑	反应敏捷、 被毛平整顺滑
体态观察	正常	正常	正常	正常
死亡记录	0	0	0	0

表 4 BLCC2-0069 菌粉对各组小鼠器官指数的影响

Table 4 Effect of BLCC2-0069 on organ index of mice in each group

项目	对照组	1.0×10 ⁸ cfu/mL 组	1.0×10 ⁹ cfu/mL 组	1.0×10 ¹⁰ cfu/mL 组
脾脏指数	0.52±0.01 ^b	0.53±0.03 ^b	0.56±0.02 ^{ab}	0.55±0.03 ^{ab}
肝体比	5.17±0.31 ^a	5.42±0.19 ^a	5.49±0.28 ^a	5.40±0.40 ^a

2.4.2 植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) BLCC2-0069 菌粉对各组小鼠的器官指数的影响

由表 4 可知, 植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) BLCC2-0069 菌粉对各试验组小白鼠的脾脏指数和肝体比没有显著性影响。益生菌在世界范围

内广泛应用,其消费量不断增加,但有关益生菌的负面性报道却很少见到,这与益生菌的安全性评价密不可分。国际上对乳酸菌的安全性评价主要是毒理学、机体评级以及代谢产物评价等。其中动物试验是确定乳酸菌安全性的一项重要手段。本试验中采用 1.0×10^8 cfu/mL、 1.0×10^9 cfu/mL 和 1.0×10^{10} cfu/mL 植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) BLCC2-0069 菌粉按照 0.4 mL/20 g 体重的受试样品量进行灌胃给样,连续给药 14 d 观察试验小鼠的皮肤、毛发、中毒、死亡情况等,均无异常,说明所试菌株对小鼠各器官均无影响,同时适量摄入该菌株也未对小鼠的采食量产生影响;肾脏、肝脏是机体重要的排毒器官^[20],通过剖检试验结果可以证明所试菌株对小鼠毒性不显著,进一步确定植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) BLCC2-0069 安全性。王梦娇^[21]采用乳酸菌 1.0×10^8 、 1.0×10^7 、 1.0×10^6 cfu/g 体重给小鼠灌胃,连续灌胃 30 d,每天记录小鼠的一般行为表现、中毒现象以及死亡情况,30 d 后剖检试验组小鼠无异常,菌株安全;张晓妹等^[22]筛选得到一株长双歧杆菌采用灌胃试验和急性经口毒性试验,以 1.0×10^8 、 1.0×10^9 、 1.0×10^{10} cfu/鼠的菌株剂量饲喂小鼠 28 d,未发现不良现象,其血液、肝脏、肾脏未发现该菌株。

2.5 植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)

BLCC2-0069 发酵工艺研究

2.5.1 发酵时间对植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) BLCC2-0069 发酵 pH 值和活菌数的影响

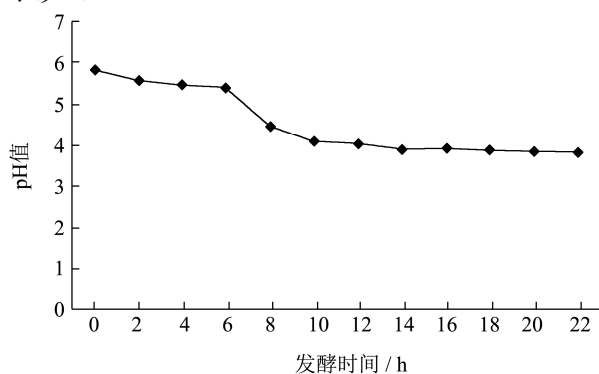


图6 BLCC2-0069 液体发酵不同时间点取样 pH 值测定结果
Fig.6 BLCC2-0069 pH value of liquid fermentation at different times

植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) BLCC2-0069 于 MRS 液体培养基中 37 °C 培养,初始 pH 值为 5.86, 0~4 h 时比较稳定维持在 5.6 左右,随后开始下降, pH 值的降低,是由于菌株发酵产生大量

乳酸等有机酸导致。从活菌数的统计结果中可以看出其在 0~4 h 处于延滞期, 6~10 h 处于对数生长期。这与 6 h 开始 pH 值出现显著降低现象相应,菌株大量繁殖,产生大量有机酸, pH 值相应降低。10 h 后进入稳定期,活菌数最高为 1.78×10^9 cfu/mL。这一结果与徐珑倩研究的植物乳杆菌 P158 的研究结果相似,菌株在 4~6 h 左右开始进入对数生长期^[23]。

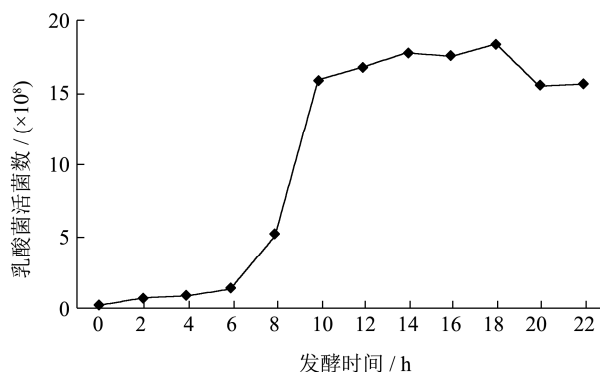


图7 BLCC2-0069 液体发酵不同时间点取样活菌数测定结果
Fig.7 BLCC2-0069 number of viable bacteria at different time points in liquid fermentation

2.5.2 发酵底物对植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) BLCC2-0069 发酵液苯乳酸含量的影响

单纯依靠菌株自身产苯乳酸,能力有限,学者们通过诱变菌株、改良培养基或是添加底物的方法来提高苯乳酸的产量。刘晨等^[24]利用质量浓度 3 g/L 的亚硝基胍诱变 40 min,紫外照射 90 s 时获得 1 株苯乳酸产量最高的变异株 UN-30,苯乳酸产量可达 712 mg/L;黄国昌^[25]通过对培养基进行优化,苯丙氨酸 8.3 g/L、牛肉浸粉 1.8 g/L,优化后苯乳酸产量提高至 1.67 g/L;李士龙^[18]通过添加苯丙氨酸的方法,筛选得到一株植物乳杆菌苯乳酸产量高达 2.13 g/L。但李兴峰等^[26]研究发现:在乳酸菌利用苯丙氨酸合成苯乳酸的过程中,转氨反应是限速步骤,成为苯乳酸产生的瓶颈,可以采用苯丙酮酸代替苯丙氨酸作为底物合成苯乳酸,在本研究中也发现,培养基中添加苯丙酮酸时苯乳酸的产量要高于添加苯丙氨酸。本试验中分别测定植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) BLCC2-0069 以苯丙氨酸和苯丙酮酸为底物发酵 24 h 发酵液的 pH 值、乳酸菌活菌数、乳酸含量和苯乳酸含量,结果见表 5。苯丙氨酸/苯丙酮酸是两种芳香族氨基酸或代谢产物,在机体内具有重要生理功能,研究表明适量添加至日粮中对小鼠的学习能力、记忆水平、运动能力和淋巴细胞增殖具有较高改善效果^[26]。但本研究中发现两种底物对乳酸菌的生长有一定影响,这可能与二者的代谢产物苯乳酸有关,乳酸菌在利用苯丙酮酸/苯丙氨酸

产生大量苯乳酸, 苯乳酸可能会对乳酸菌产生一定抑制作用; 也可能与两种底物自身延缓了乳酸菌的生长速度有关。但对发酵液的 pH 值以及菌株的产酸效果影响不大。以苯丙酮酸为底物时发酵液中苯乳酸含量最高为 3.97 g/L, 显著高于对照组和苯丙氨酸组 ($p < 0.05$)。以苯丙氨酸为底物时发酵液中苯乳酸含量次之为 2.10 g/L, 显著高于对照组 66.72% ($p < 0.05$)。选择苯丙酮酸作为底物发酵产苯乳酸的效果要优于苯丙氨酸。这一结论与李兴峰^[27]的研究发现相一致。究其原因可能是植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) BLCC2-0069 合成苯乳酸的过程中, 底物苯丙酮酸可在脱氢酶的作用下直接转换成苯乳酸。而苯丙氨酸无法直接合成苯乳酸, 它需要先经过转氨反应将苯丙氨酸转化成苯丙酮酸, 再经过还原反应将苯丙酮酸转化成苯乳酸。

表 5 不同底物对 BLCC2-0069 发酵液苯乳酸含量的影响

Table 5 The influence of different substrates on the phenyllactic acid content of BLCC2-0069 fermentation broth

24 h	对照组	+苯丙氨酸组	+苯丙酮酸组
pH 值	3.75±0.04 ^a	3.85±0.13 ^a	3.86±0.13 ^a
乳酸菌活菌数/(10 ⁹ cfu/mL)	3.05±0.55 ^a	1.65±0.25 ^b	1.55±0.25 ^b
乳酸含量/(g/L)	17.33±1.52 ^a	11.32±2.34 ^b	16.35±2.52 ^a
苯乳酸含量/(g/L)	1.26±0.01 ^a	2.10±0.01 ^b	3.97±0.05 ^c

2.5.3 苯丙酮酸添加量对植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) BLCC2-0069 发酵液苯乳酸含量的影响

表 6 苯丙酮酸添加量对 BLCC2-0069 发酵液苯乳酸含量的影响 (g/L)

Table 6 The effect of the amount of phenylpyruvate added on the content of phenyllactic acid in the fermentation broth of BLCC2-0069 (g/L)

时间/h	苯丙酮酸添加量/(g/L)			
	0	1.00	3.00	5.00
24	1.26±0.07 ^a	2.59±0.03 ^b	3.66±0.06 ^c	2.55±0.08 ^b
48	1.45±0.04 ^a	2.82±0.06 ^c	4.23±0.06 ^d	2.65±0.04 ^b

为了实现最大苯乳酸获得率, 本研究还进一步对苯丙酮酸的添加量进行分析, 苯丙酮酸不同添加量对苯乳酸含量的影响结果如表 6 所示。发酵 24 h 和 48 h 时, 苯乳酸含量随苯丙酮酸添加量的增加呈现先升高后降低的趋势, 其中以苯丙酮酸添加 3.00 g/L 时苯乳酸含量最高, 分别达到 3.66 g/L 和 4.23 g/L, 显著高于其余各添加组 ($p < 0.05$); 24 h 和 48 h 时添加 3.00 g/L 苯丙酮酸为底物发酵苯乳酸含量分别是未添加时的 2.90 倍和 2.91 倍, 差异显著 ($p < 0.05$)。究其原因可

能与参与苯乳酸合成酶的数量有关, 培养基中脱氢酶有限, 随着苯丙酮酸添加量的增加, 参与反应的酶达到饱和, 再增加苯丙酮酸添加量不再继续反应。而随着苯丙酮酸添加量的增加, 可能会对菌株的生长产生一定影响, 导致苯乳酸的产量出现下降的情况。对比发酵 24 h 和 48 h 苯乳酸的产量可以发现, 菌株在前期开始大量产生, 随着发酵时间的延长苯乳酸合成总量会有一定积累, 但速度明显下降, 这与该菌株的生长曲线也是相呼应的。与邓林^[28]苯丙酮酸浓度 10 g/L 摇瓶转速为 100 r/min 条件下 24 h 时获得最大苯乳酸含量为 3.86 g/L 的研究结果相似, 虽然在相同发酵时间产量略有差异, 但在底物添加量上成本明显减少, 存在的差异可能是受到菌株自身产苯乳酸能力的影响; 同时该研究结果显著高于黄国昌^[25]在发酵培养基中添加 8.3 g/L 苯丙氨酸的方法; 说明添加苯丙酮酸具有显著提高植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) BLCC2-0069 发酵液中苯乳酸含量的效果, 且以 3.00 g/L 添加时效果最佳。

3 结论

3.1 筛选得到一株高产苯乳酸的菌株 BLCC2-0069, 24 h 发酵苯乳酸产量为 1.26 g/L, 48 h 发酵苯乳酸产量为 1.43 g/L 高于国内外有关益生菌产苯乳酸报道; 通过菌株形态学观察和分子生物学鉴定, 确定其为植物乳杆菌。

3.2 植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) BLCC2-0069 的小鼠体内安全性评价, 结果发现未对试验小鼠造成形态、行为和动作异常, 未见小鼠死亡, 对肝脏、肾脏和脾脏等均无肉眼可见病变, 初步确定该菌株的体内安全性。

3.3 植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) BLCC2-0069 以苯丙酮酸为底物发酵产苯乳酸的效果要优于以苯丙氨酸为底物, 且以 3.00 g/L 苯丙酮酸添加时 24 h 发酵苯乳酸产量为 3.66 g/L, 48 h 发酵苯乳酸产量为 4.23 g/L 效果最佳。

参考文献

- [1] 朱风华, 朱连勤. 2019 年山东省饲料原料及配合饲料主要霉菌毒素污染状况调查[J]. 中国畜牧杂志, 2020, 11: 189-194
ZHU Feng-hua, ZHU Lian-qin. Investigation on the main mycotoxin contamination of feed ingredients and compound feed in Shandong province in 2019 [J]. Chinese Journal of Animal Science, 2020, 11: 189-194
- [2] 刘亚男, 岳燕霞. 食品防腐剂应用研究[J]. 现代食品, 2018, 19: 78-80

- LIU Ya-nan, YUE Yan-xia. Application of food preservatives [J]. Modern Food, 2018, 19: 78-80
- [3] Alistair L Wilkins, Yinrong Lu, Peter C Molan. Extractable organic substances from New Zealand unifloral manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys [J]. Journal of Apicultural Research, 2015, 32(1): 3-9
- [4] 李兴峰,江波,潘蓓蕾,等.乳酸菌产生的新型抗菌物质-苯乳酸的抑菌性质及作用机理研究[J].乳业科学与技术,2011, 34(2):94-98
- LI Xing-feng, JIANG Bo, PAN Bei-lei, et al. Inhibitory properties and target site of phenyllactic acid as a novel antimicrobial compound produced by lactic acid bacteria [J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2011, 34(2): 94-98
- [5] 宁亚维,付浴男,何建卓,等.苯乳酸和醋酸联用对大肠杆菌的抑菌机理[J/OL].食品科学,2021,42(3):77-84
- NING Ya-wei, FU Yu-nan, HE Jian-zhuo, et al. The antibacterial mechanism of phenyllactic acid and acetic acid on *Escherichia coli* [J/OL]. Food Science, 2021, 42(3): 77-84
- [6] 黄云坡,孙晶,梅红霞,等.苯乳酸对单增李斯特菌的细胞膜完整性和通透性的影响[J].食品工业科技,2019,40(5):130-135,143
- HUANG Yun-po, SUN Jing, MEI Hong-xia, et al. The effect of phenyllactic acid on the cell membrane integrity and permeability of *Listeria Monocytogenes* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(5): 130-135, 143
- [7] Dieuleveux V, Pyl D V D, Chataud J, et al. Purification and characterization of anti-listeria compounds produced by *Geotrichum candidum* [J]. Applied & Environmental Microbiology, 1998, 64(2): 800
- [8] Lavermicocca P, Valerio F, Evidente A, et al. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(9): 4084-4090
- [9] 王海宽,高雪芹,张淑丽,等.底物对凝结芽孢杆菌TQ33产苯乳酸的影响[J].天津科技大学学报,2014,29(6):11-15
- WANG Hai-kuan, GAO Xue-qing, ZHANG Shu-li, et al. Effect of substrates on the production of phenyllactic acid of *Bacillus coagulans* TQ33 [J]. Journal of Tianjin University of Science & Technology, 2014, 29(6): 11-15
- [10] Anne Thierry. Production of cheese flavour compounds derived from amino acid catabolism by *Propionibacterium freudenreichii* [J]. Dairy Science & Technology, 2002, 82(1): 17-32
- [11] Shuhuai Yu, Lanjun Zhu, Chen Zhou, et al. Enzymatic production of d-3-phenyllactic acid by *Pediococcus pentosaceus* d-lactate dehydrogenase with NADH regeneration by *Ogataea parapolymorpha* formate dehydrogenase [J]. Biotechnology Letters, 2014, 36(3): 627-631
- [12] 邓廷山,武国干,孙宇.苯乳酸生物合成的研究进展[J].中国生物工程杂志,2020,40(9):62-68
- DENG Ting-shan, WU Guo-gan, SUN Yu. Advances in biosynthesis of phenyllactic acid [J]. China Biotechnology, 2020, 40(9): 62-68
- [13] 邓林.四川冬菜中苯乳酸高产菌株的分离与鉴定[J].中国酿造,2014,33(4):97-100
- DENG Lin. Isolation and identification of phenyl-lactic acid high-yield strains in Sichuan preserved vegetable [J]. China Brewing, 2014, 33(4): 97-100
- [14] 杨小院,李渐鹏,史国萃,等.植物乳杆菌发酵生产苯乳酸的条件优化研究[J].食品科技,2018,43(9):19-23
- YANG Xiao-yuan, LI Jian-peng, SHI Guo-cui, et al. Optimization of *Lactobacillus plantarum* fermentation conditions in producing phenyllactic acid [J]. Food Science and Technology, 2018, 43(9): 19-23
- [15] 马镫,徐匆,张长勇,等.一株荔枝生物保鲜乳酸菌的筛选及鉴定[J].现代食品科技,2014,30(5):111-117
- MA Ke, XU Cong, ZHANG Chang-yong, et al. Screening and identification of a lactic acid bacteria strain with lychee fresh-keeping function [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(5): 111-117
- [16] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会.GB 15193.3-2014 食品安全国家标准 急性经口毒性试验[S]. National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. GB 15193.3-2014 National Food Safety Standard Acute Oral Toxicity Test [S].
- [17] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会.GB 15193.22-2014 食品安全国家标准 28 天经口毒性试验[S]. National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. GB 15193.22-2014 National Food Safety Standard 28-Day Oral Toxicity Test [S].
- [18] 李士龙.传统发酵食品中高产苯乳酸菌株的筛选及发酵工艺条件优化[D].大庆:黑龙江八一农垦大学,2012
- LI Shi-long. Screening of phenyllactic acid bacteria in traditional fermented food and optimization process for mentation conditions [D]. Daqing: Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2012
- [19] 李明华,孟秀梅,徐咏梅.苯乳酸高产乳酸菌的分离鉴定及其生长特性的研究[J].中国食品添加剂,2017,10:85-90
- LI Ming-hua, MENG Xiu-mei, XU Yong-mei. Isolation,

- identification and growth characteristics of lactic acid bacteria with high phenyllactic acid production [J]. China Food Additives, 2017, 10: 85-90
- [20] 孙洁宇,高鹏飞,张和平,等.益生菌 *Lactobacillus casei* Zhang 冻干粉对小鼠急性毒性的研究[J].中国农业科技导报,2009, 11(5):77-82
SUN Jie-yu, GAO Peng-fei, ZHANG He-ping, et al. Studies on acute toxicity of *Lactobacillus casei* Zhang freeze-dried powder in mice [J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2009, 11(5): 77-82
- [21] 王梦姣.内蒙古牧区马奶及其制品中肠球菌属乳酸菌安全性评价[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2014
WANG Meng-jiao. Safety evaluation of lactic acid bacteria isolated from mares milk and its products in pastoral areas of inner mongolia [D]. Huhehot: Inner Mongolia Agricultural University, 2014
- [22] 张晓妹,葛绍阳,桑跃,等.长双歧杆菌 BB68S 体内及体外安全性评价[J].中国奶牛,2019,11:43-46
ZHANG Xiao-mei, GE Shao-yang, SANG Yue, et al. Safety evaluation of *Bifidobacterium longum* BB68S *in vivo* and *in vitro* [J]. China Dairy Cattle, 2019, 11: 43-46
- [23] 徐珑倩,胡凯弟,张艾青,等.植物乳杆菌 P158 产细菌素培养基及培养条件的优化[J].食品科学,2017,38(22):109-116
XU Long-qian, HU Kai-di, ZHANG Ai-qing, et al. Optimization of medium and culture conditions for bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* P158 [J]. Food Science, 2017, 38(22): 109-116
- [24] 刘晨,张丽萍.亚硝基胍-紫外复合诱变筛选高产苯乳酸菌株[J].中国食品学报,2015,15(9):41-46
LIU Chen, ZHANG Li-ping. Breeding of a high phenyllactic acid strain by composite mutation with UV and NTG [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2015, 15(9): 41-46
- [25] 黄国昌,金丹凤,邱小忠,等.植物乳杆菌 BLPC002 产苯乳酸发酵培养基的优化[J].中国酿造,2020,39(7):95-100
HUANG Guo-chang, JIN Dan-feng, QIU Xiao-zhong, et al. Optimization of fermentation medium for phenyllactic acid production by *Lactobacillus plantarum* BLPC002 [J]. China Brewing, 2020, 39(7): 95-100
- [26] 廖正睿.苯丙酮酸对动物生长、行为和免疫功能的影响[D].广州:华南农业大学,2018
LIAO Zheng-rui. Effect of Phenylpyruvate on animal growth, behavior and immune function [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2018
- [27] 李兴峰.乳杆菌生物合成苯乳酸的研究[D].无锡:江南大学,2008
LI Xing-feng. Production of phenyllactic acid (PLA) by *Lactobacilli* [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2008
- [28] 邓林,刘延岭.一株植物乳杆菌产苯乳酸特性的研究[J].食品研究与开发,2015,36(20):161-164
DENG Lin, LIU Yan-ling. Study on the characteristics of phenyllactic acid produced by a *Lactobacillus plantarum* [J]. Food Research and Development, 2015, 36(20): 161-164

(上接第 233 页)

- [22] 吴也,刘中正,宋见喜,等.响应面法优化微波萃取血红铆钉菇多糖及抗氧化活性研究[J].吉林化工学院学报,2021,38(1):4-12
WU Ye, LIU Zhong-zheng, SONG Jian-xi, et al. Optimization of the microwave extraction condition and antioxidant activity of polysaccharides from *Chroogomphidius viscidus* using response surface analysis [J]. Journal of Jilin Institute of Chemical Technology, 2021, 38(1): 4-12
- [23] 吴疆,班立桐.应用双水相萃取技术提取双孢蘑菇多糖的研究[J].食品研究与开发,2011,32(7):4-7
WU Jiang, BAN Li-tong. Application research of extract *Agaricus bisporus* polysaccharides by aqueous two-phase extraction [J]. Food Research and Development, 2011, 32(7): 4-7