

产 β -葡萄糖苷酶鸡乳杆菌的益生功能评价及其在发酵红茶汤中的应用

檀茜倩, 周振彧, 崔方超, 王当丰, 吕欣然, 李学鹏, 励建荣

Probiotic Characterization of β -Glucosidase Producing *Lactobacillus gullinarum* and Its Application in the Fermentation of Black Tea Soup

TAN Xiqian, ZHOU Zhenyu, CUI Fangchao, WANG Dangfeng, L Xinran, LI Xuepeng, and LI Jianrong

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024070296>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

新会陈皮中4株糖苷酶高产菌的分离鉴定、益生特性及发酵效果分析

Isolation and Identification of Four High Glycosidase-producing Strains from Xinhui Chenpi and Their Probiotics Properties and Fermentation Effect Analysis

食品工业科技. 2025, 46(1): 171-180 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024020140>

驼乳制品中抑制 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶活性乳酸菌的筛选及益生特性研究

Screening and Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Inhibiting α -Amylase and α -Glucosidase Activities in Camel Dairy Products

食品工业科技. 2022, 43(19): 191-201 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022020053>

具有益生特性植物乳杆菌的筛选及其发酵特性的研究

Screening of *Lactobacillus plantarum* with Probiotic Properties and Its Fermentation Characteristics

食品工业科技. 2020, 41(17): 109-113, 120 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.17.018>

米糠发酵产物抑制 α -葡萄糖苷酶的工艺优化

Optimization of Inhibition of α -Glucosidase by Rice Bran Fermentation Products

食品工业科技. 2021, 42(4): 128-134 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020040183>

β -葡萄糖苷酶的枯草芽孢杆菌表达、酶学性质分析及其在宝藿苷 I 制备中的应用

Expression of Recombinant β -Glucosidase in *Bacillus subtilis* and Its Enzymatic Characterization and Application in Preparation of Icariside II

食品工业科技. 2022, 43(6): 133-140 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021080167>

黑曲霉发酵牛蒡根的化学成分及对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶抑制作用

Chemical Composition of *Arctium lappa* Roots Fermented by *Aspergillus niger* and Its Inhibition on α -Glucosidase and α -Amylase

食品工业科技. 2022, 43(10): 50-55 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021060161>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

檀茜倩, 周振彧, 崔方超, 等. 产 β -葡萄糖苷酶鸡乳杆菌的益生功能评价及其在发酵红茶汤中的应用 [J]. 食品工业科技, 2025, 46(11): 174–184. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024070296

TAN Xiqian, ZHOU Zhenyu, CUI Fangchao, et al. Probiotic Characterization of β -Glycosidase Producing *Lactobacillus gullinarum* and Its Application in the Fermentation of Black Tea Soup[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(11): 174–184. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024070296

· 生物工程 ·

产 β -葡萄糖苷酶鸡乳杆菌的益生功能评价及其在发酵红茶汤中的应用

檀茜倩, 周振彧, 崔方超, 王当丰, 吕欣然, 李学鹏, 励建荣*
(渤海大学食品科学与工程学院, 辽宁锦州 121013)

摘要: 本研究对健康婴儿粪便和东北酸菜中产 β -葡萄糖苷酶乳酸菌进行了筛选, 随后对酶活力最高的乳酸菌菌株的安全和益生特性以及其在红茶汤发酵中的应用进行了研究。实验结果发现健康婴儿粪便分离的一株乳酸菌 FB20 产 β -葡萄糖苷酶活力最高, 为 0.58 U/mL, 经鉴定为鸡乳杆菌 (*Lactobacillus gullinarum*)。 *L. gullinarum* FB20 具有良好的耐酸特性, 在模拟胃液中存活率可达到 96.21% $\pm$ 1.40%, 8 h 自聚集率为 38.87% $\pm$ 0.14%, 与大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的共聚集率分别为 38.82% $\pm$ 1.10% 和 53.92% $\pm$ 1.96%。可有效清除 DPPH 自由基、ABTS⁺ 自由基、羟自由基, 清除率分别为 55.67% $\pm$ 3.19%、98.47% $\pm$ 0.01% 和 57.65% $\pm$ 3.42%; 具有抑制 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的能力, 抑制率分别为 67.91% $\pm$ 1.24% 和 66.53% $\pm$ 0.34%。 *L. gullinarum* FB20 发酵红茶汤后, 红茶汤对 DPPH 自由基、ABTS⁺ 自由基和羟自由基清除能力显著提高了 12.48%、4.35% 和 10.57% ($P < 0.05$), 总酚含量也显著提高了 1.07 mg/mL ($P < 0.05$)。通过电子鼻测定发现, 经过 *L. gullinarum* FB20 发酵的红茶汤相较对照组有机硫化物显著降低。本研究对产 β -葡萄糖苷酶菌种的挖掘以及相关菌株在改善发酵茶汤中的应用提供了一定的理论依据。

关键词: 鸡乳杆菌, β -葡萄糖苷酶, 益生特性, 发酵, 红茶汤

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2025)11-0174-11

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2024070296

本文网刊:



Probiotic Characterization of β -Glycosidase Producing *Lactobacillus gullinarum* and Its Application in the Fermentation of Black Tea Soup

TAN Xiqian, ZHOU Zhenyu, CUI Fangchao, WANG Dangfeng, LÜ Xinran, LI Xuepeng, LI Jianrong*

(College of Food Science and Engineering, Bohai University, Jinzhou 121013, China)

Abstract: This study aimed to isolate lactic acid bacteria capable of producing β -glucosidase from healthy infant feces and Chinese northeast sauerkraut. Then the strain with the highest β -glucosidase activity was identified for subsequent evaluation of the safety, probiotic characteristics, and potential application in the fermentation of black tea soup. The results indicated one of the β -glucosidase producing lactic acid bacteria FB20, derived from healthy infant feces demonstrated the highest β -glucosidase activity, quantified at 0.58 U/mL, and was classified as *Lactobacillus gullinarum*. *L. gullinarum* FB20 had good acid resistance ability, could survive in the simulated gastric fluid (a survival rate of 96.21% $\pm$ 1.40%), an auto-aggregation rate of 38.87% $\pm$ 0.14% at 8 h, co-aggregation rates of 38.82% $\pm$ 1.10% and 53.92% $\pm$ 1.96% with *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, respectively. It could effectively scavenge DPPH free radicals, ABTS⁺ free radicals, and hydroxyl free radicals, with scavenging rates of 55.67% $\pm$ 3.19%, 98.47% $\pm$ 0.01%, and 57.65% $\pm$ 3.42%, respectively. It could inhibit α -amylase and α -glucosidase, and the inhibition rates were 67.91% $\pm$ 1.24%, and 66.53% $\pm$ 0.34%, separately. After fermenting black tea soup, the eliminating rates of DPPH, ABTS⁺, and hydroxyl radicals in the fermented black tea soup

收稿日期: 2024-07-23

基金项目: 云南科技人才与平台计划项目 (202205AF150060)。

作者简介: 檀茜倩 (1985-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品营养与安全, E-mail: tanxiqian@163.com。

* 通信作者: 励建荣 (1964-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品营养与安全, E-mail: lij6491@163.com。

increased significantly by 12.48%, 4.35%, and 10.57% ($P<0.05$), respectively, and the total phenolic content also increased by 1.07 mg/mL ($P<0.05$). Electronic nose analysis results showed that the black tea soup fermented by *L. gullinarum* FB20 significantly reduced organic sulfides compared to the control group. This study provides a certain theoretical basis for the exploration of β -glucosidase-producing strains and the improvement of their application in fermenting tea soup.

Key words: *Lactobacillus gullinarum*; β -glucosidase; probiotic activity; fermentation; black tea soup

乳酸菌是一类公认安全的益生菌,具有抗氧化、调节免疫等功能,常被用来辅助治疗多种疾病^[1]。乳酸菌在生长过程中会分泌各种酶类,包括 β -葡萄糖苷酶、蛋白酶、胆汁盐水解酶和植酸酶等^[2]。其中 β -葡萄糖苷酶(β -D-葡萄糖苷葡萄糖水解酶)是一种通过水解 1,4- β 和 1,6- α 糖苷键从低聚糖中释放非还原末端葡萄糖残基的酶^[3],根据其底物特异性可分为三大类:芳基葡萄糖苷酶(作用于芳基葡萄糖苷底物)、纤维二糖酶(作用于双糖)和广谱葡萄糖苷酶(底物广泛,也是最常见的一类)^[4]。

β -葡萄糖苷酶存在于动物、植物和微生物中,其中乳酸菌是 β -葡萄糖苷酶的良好来源^[5]。目前产 β -葡萄糖苷酶乳酸菌已经广泛应用于食品发酵中,起到改善食品风味和功能的作用。Lorn 等^[6]利用产 β -葡萄糖苷酶的乳酸菌发酵番茄后,其中具有花香和水果风味的萜类、酮类物质显著提高;Quines-Lagmay 等^[7]利用产 β -葡萄糖苷酶乳酸菌发酵刺梨,不仅改善了果汁风味,还提高了果汁得率和生物活性。利用产 β -葡萄糖苷酶枯草芽孢杆菌发酵可以将大豆中非活性糖苷黄酮类化合物分解为游离异黄酮苷元,进而提高其生物活性^[8]。产 β -葡萄糖苷酶的酵母菌应用于葡萄酒发酵则能提升其中单萜烯(如香叶醇、橙花醇、香茅醇等)芳香族挥发物的含量,以及增加白藜芦醇和花青素的浓度^[9]。目前还有大量产 β -葡萄糖苷酶菌株有待挖掘。

红茶与绿茶(未发酵)、白茶(微发酵)、乌龙茶(半发酵)不同属全发酵茶,发酵过程中在各种酶的作用下产生其独特的色泽和风味。研究表明, β -葡萄糖苷酶在红茶制作中对提升其质量和风味也起到了积极的作用。在红茶叶上喷洒 β -葡萄糖苷酶可显著增加芳香醇、香叶醇和水杨酸甲酯等糖苷前体挥发性化合物含量^[10]。在红茶汤中加入 β -葡萄糖苷酶能使芳樟醇和香叶醇风味物质的浓度分别提高 10% 和 18.5%^[11],此外 β -葡萄糖苷酶的加入可以增强红茶的“花果”香气,提升红茶甲苯醇和苯乙醇含量,实现红茶汤整体质量的提升^[12]。目前也有一些研究报道了乳酸菌作为发酵剂应用于红茶发酵。Nguyen 等^[13]发现乳酸菌发酵红茶能提升其抗氧化性,发酵后的红茶对 DPPH 自由基清除能力在 71.00%~89.50%,显著高于未发酵组(62.75%)($P<0.05$);Li 等^[14]发现植物乳杆菌 RLL68 发酵红茶汤,能增加有机酸和 γ -氨基丁酸的含量,降低苦味氨基酸含量,提升感官品质。但是产 β -葡萄糖苷酶乳酸菌作为发酵剂会对红茶汤会产生怎样的影响还有待于进一步研究证实。

本研究拟对健康婴儿粪便和东北酸菜中的产 β -葡萄糖苷酶能力的乳酸菌进行筛选分离,随后选择酶活力最高的乳酸菌,对其安全性和益生特性以及在发酵红茶汤中的应用进行研究。为产 β -葡萄糖苷酶益生菌菌种资源的开发以及在发酵红茶汤中的应用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

婴儿粪便 3 月龄男婴;东北酸菜 农家自制;红茶 辽宁锦州农贸市场;MRS(Man Rogosa Sharpe)肉汤培养基、蛋白胨、大豆蛋白胨、胰蛋白胨、琼脂粉、葡萄糖、牛肉粉、酵母提取物 北京奥博星生物技术有限公司;抗生素药敏纸片 杭州滨和微生物试剂有限公司;DPPH(1,1-二苯基-2-三硝基苯肼) 四川省维克奇生物科技有限公司;ABTS(2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐) 上海阿拉丁生化科技股份有限公司;细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒、七叶苷、水系尼龙滤膜 生工生物工程(上海)股份有限公司; α -葡萄糖苷酶(100 U)、对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷(pNPG)、3,5-二硝基水杨酸试剂 上海源叶生物科技有限公司;阿卡波糖、明胶 上海麦克林生化科技有限公司;金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)S1、大肠杆菌(*Escherichia coli*)E1 本实验室保存;蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)BI6Y、蜂房哈夫尼亚菌(*Hafnia alvei*)A1 分离于腐败鱼肉;植物乳杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*)LHZ4 分离于自制酸菜;短双歧杆菌(*Bifidobacterium breve*)FB18 分离于婴儿粪便。

UV-2550 型分光光度计 日本 Shimadzu 公司;DYY-8C 型电泳仪 中国六一仪器厂;全自动生长曲线分析仪 芬兰 Bioscreen 公司;Biofuge Stratos 型冷冻高速离心机 美国 Thermo 公司;LDZX-75KBS 立式高压蒸汽灭菌锅 上海申安医疗器械有限公司;EDU3 电子鼻 德国 AirSense 公司;YT-1101 全自动酶标仪 中国叶拓科技有限公司;0.22 μ m 水系滤膜 中国比克曼生物。

1.2 实验方法

1.2.1 产 β -葡萄糖苷酶乳酸菌分离鉴定与生长性能分析

1.2.1.1 乳酸菌初筛 准确称取 1 g 婴儿粪便或酸菜汁样品与 9 mL 生理盐水(0.85%w/v)涡旋混匀,采用梯度稀释法连续稀释至 10^{-5} 后,吸取适量 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 的稀释样品涂布于含 1% CaCO_3 的固体 MRS

培养基上,在 37 ℃ 厌氧条件下静置培养 24 h 后,选择含有溶钙圈菌落,在相同条件下划线纯化一次,选取纯化后单菌落接入 MRS 液体培养基在上述相同条件下培养后保存。

1.2.1.2 具有产 β -葡萄糖苷酶能力乳酸菌的复筛 为判定菌株是否具备产 β -葡萄糖苷酶能力,参考 Deng 等^[15]的方法,用接种环蘸取所分离菌株活化后菌液在 β -葡萄糖苷酶验证培养基(蛋白胨 10 g、牛肉粉 5 g、葡萄糖 20 g、酵母提取物 4 g、乙酸钠 5 g、磷酸氢二钾(K_2HPO_4) 2 g、七水硫酸镁($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 0.2 g、柠檬酸三铵($C_6H_{17}N_3O_7$) 2 g、一水硫酸锰($MnSO_4 \cdot H_2O$) 0.05 g、吐温 80 1 mL、七叶苷 10 g、柠檬酸铁铵($C_6H_{11}FeNO_7$) 25 g、琼脂粉 20 g 溶于 1000 mL 蒸馏水)上进行划线,37 ℃ 静置培养 48 h,待菌株在培养基上生长出明显单菌落后,菌落周围产生明显黑色晕圈即初步判定其具有产 β -葡萄糖苷酶能力。

1.2.1.3 菌株产 β -葡萄糖苷酶酶活力测定 采用 Liu 等^[16]的方法对菌株产 β -葡萄糖苷酶酶活力进行测定。以对硝基苯基- β -D-吡喃半乳糖苷(pNPG)为底物,根据 pNPG 释放的硝基苯酚(pNP)的量测定菌株所产 β -葡萄糖苷酶活力。首先将菌悬液于 4 ℃ 下 5000×g 离心 10 min 收集无细胞上清液以制备粗酶液,吸取 0.1 mL 粗酶液与 0.2 mL 用柠檬酸-磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L, pH5.0)配制的 pNPG 溶液(0.002 mol/L)混合于 40 ℃ 反应 30 min,最后用 2 mL Na_2CO_3 (0.25 mol/L)溶液终止反应。用多功能酶标仪于 405 nm 下测定吸光度。一个酶活力单位(U)定义为上述实验条件下每分钟释放 1 nmol pNP 的量。确定产 β -葡萄糖苷酶活力最高的菌株进行后续实验。

1.2.1.4 产 β -葡萄糖苷酶乳酸菌的鉴定 对产 β -葡萄糖苷酶乳酸菌进行革兰氏染色。选取革兰氏阳性菌采用细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒提取其 DNA,选择通用引物 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGG CTCAG-3')和 1492R(5'-TACGGTTACCTTGTT ACGACTT-3')进行 PCR 扩增,PCR 产物送至上海生工进行测序。测序结果提交至 GenBank 进行 BLASTN 比较分析,利用 MEGA 11.0 软件构建系统发育树。

1.2.1.5 菌株生长曲线测定 利用全自动生长曲线仪于吸光度 600 nm 下在 48 h 内测定菌株的生长情况。

1.2.2 菌株安全性分析

1.2.2.1 溶血性 采用 Kanpiengjai 等^[17]的方法测定菌株溶血性。用接种环蘸取活化后的菌液在含 5% 羊血哥伦比亚血琼脂上划线,37 ℃ 孵育 3 d,以金黄色葡萄球菌为阳性对照。若菌株所形成菌落为暗绿色或菌落周围出现透明圈则代表其具有溶血性。

1.2.2.2 明胶酶活性 采用 Khan 等^[18]的方法测定菌株明胶酶活性。用接种针蘸取活化后的菌液穿刺

接种于明胶培养基(NaCl 5 g、蛋白胨 10 g、牛肉膏 3 g、明胶 120 g,蒸馏水 1000 mL)中,37 ℃ 孵育 5~7 d,以金黄色葡萄球菌 S1 为阳性对照。孵育结束后,将培养基放入 4 ℃ 冰箱中静置 1 h 后观察明胶液化情况。若穿刺区域出现液化则代表其明胶酶活性阳性。

1.2.2.3 DNase 活性 采用 Nandha 等^[19]的方法测定菌株 DNase 酶活性。用接种环蘸取活化后的菌液在 DNase 验证平板(胰蛋白胨 15 g、大豆蛋白胨 5 g、DNA 2 g、NaCl 5 g、琼脂粉 15 g,溶解于 1000 mL 蒸馏水)上划线,37 ℃ 孵育 48 h 后,滴入 1 mol/L 的盐酸后观察透明圈的生成,以金黄色葡萄球菌为阳性对照。若菌株周围出现明显透明圈则代表其 DNase 酶活性阳性。

1.2.2.4 产生物胺能力 采用 Li 等^[20]的方法并稍作修改,用牛津杯打孔法测定菌株产生物胺能力。将活化后的产 β -葡萄糖苷酶乳酸菌与蜂房哈夫尼亚菌 A1(具有产生物胺能力,作为阳性对照)分别于 4 ℃ 下 8000×g 离心 10 min 收集无细胞上清液。吸取 100 μ L 不同菌株的上清液分别注入生物胺培养基(胰蛋白胨 5 g、酵母提取物 5 g、NaCl 5 g、 $CaCl_2$ 1 g、溴甲酚紫 0.06 g、组氨酸 2 g、酪氨酸 2 g、赖氨酸 2 g、色氨酸 2 g、琼脂粉 15 g,蒸馏水 1000 mL)上牛津杯所预先形成的孔洞内,在 37 ℃ 孵育 48 h 后,观察孔洞周围颜色变化,紫色则代表其产生物胺能力为阳性。

1.2.2.5 抗生素敏感性 采用 Saeed 等^[21]的方法使用圆纸片扩散法测定菌株抗生素敏感性。将活化后的菌株接种于(接种量 1%, v/v)冷却至 40 ℃ 含 1.5% 琼脂粉的 MRS 肉汤培养基中,混合均匀后倾倒入平皿中,待培养基凝固后将药敏片镀于培养基表面,37 ℃ 孵育 48 h 后测定所形成透明圈直径。所使用抗生素分别为诺氟沙星(10 μ g)、四环素(30 μ g)、青霉素 G(10 μ g)、红霉素(15 μ g)、克拉霉素(15 μ g)、庆大霉素(10±2.5 μ g)、氯霉素(30 μ g)、链霉素(10 μ g)、克林霉素(10 μ g)、氨苄西林(10 μ g)、卡那霉素(30 μ g)、万古霉素(30 μ g)。

1.2.3 菌株益生特性分析

1.2.3.1 耐酸耐胆盐能力测定 采用 Motey 等^[22]描述的方法测定菌株对酸和胆盐的耐受能力。用 1 mol/L 的 HCl 将 MRS 肉汤的 pH 调至 2.5、3.0、4.0 以模拟低 pH 环境。用添加 0.1%、0.2%、0.3% 牛胆盐的 MRS 肉汤模拟不同浓度胆盐存在的环境。分别将乳酸菌以 2% 接种量(v/v)接种于上述各培养基中,37 ℃ 孵育,于 0 h 和 4 h 两个时间点取样进行菌落计数。存活率计算公式如下所示:

$$\text{存活率}(\%) = \frac{C_1}{C_0} \times 100 \quad \text{式(1)}$$

式中: C_0 和 C_1 分别代表菌株处理前(0 h)和处理后(4 h)的菌落数。

1.2.3.2 模拟胃肠液耐受能力测定 采用 Hacıoglu 等^[23] 描述的方法测定菌株在模拟胃肠液中的耐受能力。用 1 mol/L 的 HCl 将人工胃液 (NaCl 0.85% w/v, 胃蛋白酶 0.5% w/v) 的最终 pH 调整至 2.0。取 1 mL 菌悬液接种于 9 mL 人工胃液中涡旋混匀后, 吸取 1 mL 混合后的人工胃液进行梯度稀释并涂布以测定初始菌落数, 剩余混合后的人工胃液于 37 °C、160 r/min 振荡培养 4 h 后重复上述操作, 吸取 1 mL 人工胃液进行梯度稀释并涂布以确定最终的菌落数量。

将上步的人工胃液在 5000×g 下 4 °C 离心 10 min 后收集菌体沉淀。并用 PBS 洗涤 2 次。最终将菌体重悬于人工肠液 (胰酶 0.1% w/v, 牛胆盐 0.15% w/v, pH7.0)。吸取 1 mL 混合后的人工肠液进行梯度稀释并涂布以测定初始菌落数, 剩余混合后的人工肠液于 37 °C、160 r/min 振荡培养 4 h 后重复上述操作, 吸取 1 mL 人工肠液进行梯度稀释并涂布以确定最终的菌落数量。

1.2.3.3 自聚集能力测定 采用 Shazadi 等^[24] 描述的方法测定菌株自聚集能力。将菌悬液于 8000×g 下 4 °C 离心 10 min 收集菌体沉淀。用 PBS 缓冲液 (pH7.0) 洗涤两次后重悬于 PBS 缓冲液中制备菌悬液, 于 OD_{600 nm} 下调整吸光度至 1.00±0.02。取 5 mL 菌悬液涡旋 10 s 后, 于 37 °C 下静置孵育 8 h。于 4、6、8 h 时吸取 1 mL 菌悬液上层与 1 mL PBS 混合后于 OD_{600 nm} 下测定吸光度。自聚集能力百分比计算公式如下所示:

$$\text{自聚集率}(\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \quad \text{式 (2)}$$

式中: A_0 为 0 h 时的吸光度, A_1 为各取样时间点 (4、6、8 h) 的吸光度。

1.2.3.4 共聚集能力测定 采用 Soemarie 等^[25] 描述的方法测定菌株共聚集能力。选取一株革兰氏阳性菌 (金黄色葡萄球菌 S1) 和一株革兰氏阴性菌 (大肠杆菌 E1) 用于测定乳酸菌共聚集能力。将所用细菌培养液于 8000×g 下 4 °C 离心 10 min, 用 PBS 缓冲液 (pH7.0) 洗涤两次后重悬于 PBS 缓冲液中制备菌悬液, 于 OD_{600 nm} 下调整 OD 值 1.00±0.02。将乳酸菌菌悬液分别与金黄色葡萄球菌 S1 和大肠杆菌的菌悬液以 1:1 的比例混合, 于 37 °C 静置孵育 8 h。于 4、6、8 h 时吸取菌悬液上层于 OD_{600 nm} 下测定吸光度值。共聚集能力百分比计算公式如下所示:

$$\text{共聚集率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1}{A_0}\right) \times 100 \quad \text{式 (3)}$$

式中: A_0 为 0 h 时的吸光度, A_1 为各取样时间点 (4、6、8 h) 的吸光度。

1.2.4 抑菌能力测定 采用 Ramadhanti 等^[26] 描述的牛津杯打孔法测定菌株无细胞上清液的抑菌能力。分别选取金黄色葡萄球菌 S1、大肠杆菌 E1、蜡样芽孢杆菌 BI6Y 和植物乳杆菌作为指示菌。首先

将活化后的菌株菌悬液 5000×g 下 4 °C 离心 10 min 收集无细胞上清液, 并过 0.22 μm 的水系滤膜 (比克曼生物, 中国) 备用, 指示菌以 0.2% 接种量分别接种于含 0.5% 琼脂粉的 LB 或 MRS 培养基中, 混匀后倾注于放置好牛津杯的培养皿内, 待培养基凝固后取出牛津杯, 在牛津杯产生的孔洞内加入 180 μL 待测菌株无细胞上清液, 37 °C 静置孵育 24 h 后观察是否有透明圈出现, 并测量其直径。

1.2.5 菌株无细胞上清液的体外抗氧化能力测定

1.2.5.1 菌株无细胞上清液及细胞破碎提取液的制备 将活化后的菌株菌悬液 8000×g 下 4 °C 离心 10 min 后过 0.22 μm 水系滤膜于无菌管内得到菌株无细胞上清液。离心所得菌体沉淀用 PBS 缓冲溶液洗涤 2~3 次, 并重悬于 PBS 缓冲溶液中, 得到完整细胞菌悬液 ($\text{OD}=1.000\pm0.2$), 并将其置于冰浴中进行超声破碎 (超声功率为 400 W, 超声 2 s, 停止 2.2 s, 超声 10 min), 随后于 4 °C 下 8000×g 离心 10 min 得到的上清液即为细胞破碎液, 用于后续测定乳酸菌体外降糖能力。

1.2.5.2 DPPH 自由基清除能力测定 采用 Kundu-hoglu 等^[27] 描述的方法测定菌株无细胞上清液对 DPPH 自由基 (1,1-二苯基-2-三硝基苯肼) 清除能力。分别吸取 1 mL 乳酸菌无细胞上清液和 1 mL 抗坏血酸溶液 (1 $\mu\text{g/mL}$) 置于 5 mL 离心管内, 随后加入等体积 0.2 mmol/L 的 DPPH-无水乙醇溶液, 涡旋 20 s 后于 37 °C 下避光反应 30 min, 反应完成后, 使用紫外分光光度计于波长 517 nm 处测定吸光度, DPPH 自由基清除百分比计算公式如下所示:

$$\text{DPPH自由基清除率}(\%) = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100 \quad \text{式 (4)}$$

式中: A_s 为 DPPH-无水乙醇溶液与乳酸菌无细胞上清液的吸光度; A_c 为 DPPH-无水乙醇溶液与蒸馏水的吸光度。

1.2.5.3 ABTS⁺自由基清除能力测定 采用 Ragul 等^[28] 描述的方法测定菌株无细胞上清液对 ABTS⁺ 自由基 (2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐) 的清除能力。首先将 7 mmol/L ABTS 与 2.45 mmol/L 过硫酸钾 (1:1 v/v) 混合形成 ABTS 溶液, 在避光条件下室温反应 24 h 以制备 ABTS⁺ 自由基, 反应结束后于波长 734 nm 处调整 ABTS 溶液吸光度至 0.70±0.02 后备用。随后分别吸取 500 μL 乳酸菌无细胞上清液和抗坏血酸溶液 (1 $\mu\text{g/mL}$) 与 1 mL ABTS 溶液混合, 于室温下静置反应 10 min, 使用紫外分光光度计于波长 734 nm 处测定吸光度, ABTS⁺ 自由基清除百分比计算公式如下所示:

$$\text{ABTS}^+\text{自由基清除率}(\%) = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100 \quad \text{式 (5)}$$

式中: A_s 为 1 mL 的 ABTS 溶液与 500 μL 乳酸菌无细胞上清液的吸光度; A_c 为 1 mL 的 ABTS

溶液与 500 μL 蒸馏水的吸光度。

1.2.5.4 羟自由基清除能力测定 采用 Xia 等^[29] 描述的水杨酸法测定菌株无细胞上清液对羟自由基的清除能力。首先将 9 mmol/L FeSO_4 和 8.8 mmol/L H_2O_2 (1:1 v/v) 混合以制备羟自由基溶液。随后加入 500 μL 9 mmol/L 水杨酸乙醇溶液后分别加 500 μL 乳酸菌无细胞上清液和抗坏血酸溶液 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下静置孵育 30 min, 使用紫外分光光度计于波长 510 nm 处测定吸光度, 羟自由基清除百分比计算公式如下所示:

$$\text{羟自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_s - A'_s}{A_c}\right) \times 100 \quad \text{式 (6)}$$

式中: A_s 为 1 mL 的羟自由基溶液与 500 μL 水杨酸乙醇溶液和 500 μL 乳酸菌无细胞上清液的吸光度; A'_s 为 1 mL 的羟自由基溶液与 500 μL 乳酸菌无细胞上清液的吸光度; A_c 为 1 mL 的羟自由基溶液与 500 μL 水杨酸乙醇溶液的吸光度。

1.2.6 乳酸菌体外降糖能力测定

1.2.6.1 α -淀粉酶抑制活性 采用 Fan 等^[30] 描述的方法测定菌株无细胞上清液或细胞破碎后的提取液对 α -淀粉酶的抑制能力。分别在试管中加入 500 μL 菌株无细胞上清液或细胞破碎提取液, 再分别依次加入 500 μL PBS (pH7.4) 和 500 μL α -淀粉酶 (0.5 mg/mL), 37 $^{\circ}\text{C}$ 下静置孵育 10 min 后加入 500 μL 1% 可溶性淀粉, 再次于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下静置孵育 10 min。孵育结束后加入 1 mL 3,5-二硝基水杨酸 (DNS) 试剂, 沸水浴 5 min。水浴结束后加入 5 mL 蒸馏水并冷却至室温, 使用紫外分光光度计于波长 540 nm 处测定吸光度, 以阿卡波糖为阳性对照。 α -淀粉酶抑制活性百分比计算公式如下所示:

$$\alpha\text{-淀粉酶抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3}\right) \times 100 \quad \text{式 (7)}$$

式中: A_1 为实验样品 (含样品和 α -淀粉酶) 的吸光度; A_2 为空白样品 (含样品、不含 α -淀粉酶) 的吸光度; A_3 为对照样品 (含 α -淀粉酶、不含样品) 的吸光度。

1.2.6.2 α -葡萄糖苷酶抑制活性 采用 Li 等^[31] 描述的方法测定菌株无细胞上清液或细胞破碎后的提取液对 α -葡萄糖苷酶的抑制能力。分别在试管中加入 25 μL 无细胞上清液或细胞破碎液后, 分别依次加入 50 μL α -葡萄糖苷酶 (0.2 U/mL)、150 μL PBS (pH7.4) 和 75 μL 对硝基苯- α -D-吡喃半乳糖苷 (pNPG) 溶液 (20 mmol/L), 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置孵育 10 min 后加入 0.1 mol/L Na_2CO_3 溶液终止反应, 使用紫外分光光度计于波长 405 nm 处测定吸光度, 以阿卡波糖为阳性对照。 α -葡萄糖苷酶抑制活性百分比计算公式如下所示:

$$\alpha\text{-葡萄糖苷酶抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3}\right) \times 100 \quad \text{式 (8)}$$

式中: A_1 为样品 (含样品和 α -葡萄糖苷酶) 的吸光度; A_2 为空白 (含样品、不含 α -葡萄糖苷酶) 的吸光度; A_3 为对照 (含 α -葡萄糖苷酶、不含样品) 的吸光度。

1.2.7 产 β -葡萄糖苷酶菌株发酵红茶中的应用

1.2.7.1 发酵红茶汤的制备 称取 3 g 干制红茶叶浸泡于 100 mL 纯净水中, 100 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min 后静置 20 min 至茶汤呈棕红色, 室温晾凉至 50 $^{\circ}\text{C}$, 加入 5 g 蔗糖并充分搅拌, 121 $^{\circ}\text{C}$ 湿热灭菌 20 min 晾凉备用。将活化好的菌株菌悬液于 5000 $\times g$ 下 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min 收集菌体沉淀, 用 PBS (pH7.0) 洗涤两次后重悬于 PBS 中并调整 $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ 至 1.0 ± 0.02 。以 2% 的接种量 (v/v) 接种至制备好的红茶汤中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min 发酵 24 h, 5000 $\times g$ 下 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 30 min 收集没有菌体的茶汤用于后续实验分析。

1.2.7.2 发酵红茶汤体外抗氧化能力测定 采用本文 1.2.5 的实验方法对发酵红茶汤的 DPPH 自由基、ABTS⁺ 自由基和羟自由基的清除能力进行测定; 总还原力采用 Chang 等^[32] 描述的方法进行测定, 具体方法为吸取 300 μL 发酵红茶汤至 5 mL 离心管内, 加入 300 μL PBS 缓冲液 (pH7.4) 及 300 μL 铁氰化钾 ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) 溶液后混匀, 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 20 min 后迅速冰浴冷却以终止反应, 向管内加入 300 μL 10% (v/v) 三氯乙酸 ($\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$) 溶液, 混匀, 3500 $\times g$ 下 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min, 吸取离心上清液 500 μL 至全新离心管内并加入 500 μL 蒸馏水和 1 mL 0.1% (w/v) 三氯化铁 (FeCl_3) 溶液, 摇匀静置 10 min。空白组以蒸馏水代替样品进行实验。利用紫外分光光度计于 700 nm 处测定吸光度。还原力按如下公式计算:

$$\text{还原力} = A_1 - A_0 \quad \text{式 (9)}$$

式中: A_0 代表空白组的吸光度; A_1 代表实验组的吸光度。

发酵红茶总酚含量的测定采用 Ning 等^[33] 描述的方法。于 100 μL Folin-Ciocalteu (FC) 试剂中加入 2 mL 发酵红茶汤, 混匀后室温静置反应 15 min 后加入 3 mL 的 2% Na_2CO_3 , 混匀后于避光条件下反应 30 min, 以未发酵的红茶汤为对照, 测定波长 760 nm 的吸光度值, 通过以没食子酸为标准品绘制标准曲线计算红茶汤的总酚含量。

1.2.7.3 发酵红茶汤的电子鼻分析 采用 Zhu 等^[34] 描述的方法使用电子鼻测定发酵红茶汤的气味特征。电子鼻各个传感器所对应的响应特性见表 1。将发酵红茶汤置于 50 mL 离心管内, 用保鲜膜封闭管口且使其中顶空平衡 30 min。在测定阶段, 采样器以 300 mL/min 的速度吸取管内气体并通过传感器, 测定持续时间为 120 s 以确保传感器可达到稳定响应值且为减少实验误差, 环境温度控制为 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.3 数据处理

以上每个数据均独立重复三次, 实验结果以平

均值±标准差表示。数据采用 SPSS(IBM SPSS Statistics 22)进行方差分析和 Tukey 检验。当 $P<0.05$ 时,认为结果具有显著性差异。

表 1 电子鼻传感器性能描述
Table 1 Performance description of electronic nose sensor

阵列检测器序号	传感器名称	性能描述
1	W1C	对芳香成分,苯类敏感
2	W5S	对氮氧化合物敏感
3	W3C	对芳香成分,氨类敏感
4	W6S	对氢化物敏感
5	W5C	对芳香成分,烷烃类敏感
6	W1S	对甲烷等断链烷烃敏感
7	WSW	对无机硫化物敏感
8	W2S	对醇醚醛酮类敏感
9	W2W	对无机硫化物敏感
10	W3S	对长链烷烃类敏感

2 结果与分析

2.1 产 β -葡萄糖苷酶乳酸菌分离

经过初筛和复筛,从发酵酸菜中分离了 6 株产 β -葡萄糖苷酶乳酸菌 LHZ6、B3、js3、js5、js6 和 js7,酶活力分别为 0.28、0.39、0.35、0.38、0.16 和 0.42 U/mL; 婴儿粪便分离一株产 β -葡萄糖苷酶乳酸菌 FB20,酶活为 0.58 U/mL(图 1),酶活力最高,本研究后续实验围绕 FB20 进行分析。

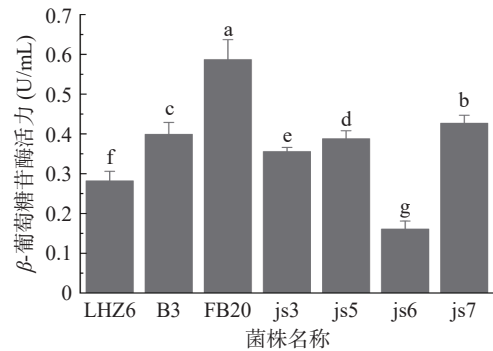


图 1 所分离的乳酸菌产 β -葡萄糖苷酶的酶活力
Fig.1 Enzyme activity of the β -glycosidase producing lactic acid bacteria

注:不同小写字母代表有显著性差异($P<0.05$)。

2.2 FB20 的鉴定和生长性能分析

经观察,FB20 在厌氧条件下生长菌落周围有明显白色絮状分泌物(图 2a),革兰氏染色后判断为革兰氏阳性菌、杆状(图 2b),在含 CaCO_3 的 MRS 琼脂平板上生长时会产生明显溶钙圈说明其产酸(图 2c),在 β -葡萄糖苷酶验证培养基上生长时,菌落周围生成明显晕圈说明其具备产 β -葡萄糖苷酶的能力(图 2d)。对其 16S rDNA 进行测序,经过 BLASTN 序列对比及构建系统发育树分析,鉴定 FB20 为鸡乳杆菌(*Lactobacillus gallinarum*)(图 2e)。已有研究证实鸡乳杆菌是一种潜在益生菌,具有降低患结肠肿瘤的风险的作用^[35]。生长曲线(图 2f)显示

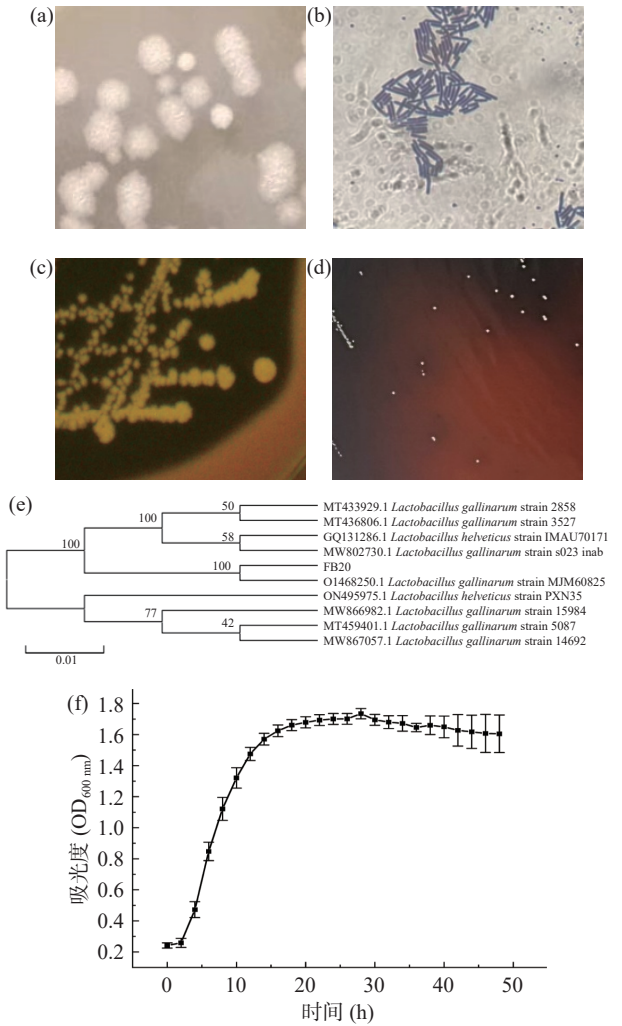


图 2 鸡乳杆菌 FB20 的鉴定和生长特性分析

Fig.2 Identification and growth characteristic of *L. gallinarum* FB20

注:(a)鸡乳杆菌 FB20 在厌氧条件下培养的菌落形态图;(b)鸡乳杆菌 FB20 革兰氏染色后于光学显微镜下 1000×观察图;(c)鸡乳杆菌 FB20 在 CaCO_3 平板上的生长情况;(d)鸡乳杆菌 FB20 产 β -葡萄糖苷酶能力;(e)鸡乳杆菌 FB20 系统发育树图;(f)鸡乳杆菌 FB20 生长曲线。

鸡乳杆菌的生长在 4 h 时进入对数期,在 18 h 进入稳定期,在 30 h 之后进入衰亡期。

2.3 鸡乳杆菌 FB20 安全性分析

安全性是益生菌开发的前提,如表 2 所示,鸡乳杆菌 FB20 未表现出 α 溶血或 β 溶血,不具有溶血性。此外,鸡乳杆菌 FB20 产明胶酶、DNase 和生物胺的能力均呈阴性,表明其具有作为发酵剂应用于发

表 2 鸡乳杆菌 FB20 产有害代谢物能力

Table 2 Ability of *L. gallinarum* FB20 to produce harmful metabolites

安全指标	测定结果
溶血性	—
明胶酶	—
DNase 活性	—
产生物胺能力	—

注: +代表阳性, —代表阴性。

酵食品的潜力。

鸡乳杆菌 FB20 对抗生素的敏感性如表 3 所示, 研究发现其对四环素、青霉素 G、红霉素、克拉霉素、氯霉素、克林霉素、氨苄西林和万古霉素表现出了高敏感性, 对链霉素中等敏感, 而对诺氟沙星、庆大霉素和卡那霉素低敏感。根据现有报道诺氟沙星与卡那霉素的抑菌靶点分别是参与 DNA 复制的酶和参与细胞壁生物合成的青霉素结合蛋白^[36], 且二者的抑菌效果也与微生物是否携带抗性基因有关^[37]。因此推测鸡乳杆菌 FB20 对诺氟沙星和卡那霉素的低敏感性可能与其细胞结构或某些抗性基因的存在有关。

表 3 鸡乳杆菌 FB20 抗生素药敏性
Table 3 Antibiotic susceptibility of *L. gallinarum* FB20

抗生素类型	抑制直径(mm)	敏感程度
诺氟沙星	0.00±0.00	R
四环素	31.16±3.42	S
青霉素G	48.60±1.66	S
红霉素	36.38±0.45	S
克拉霉素	43.39±2.37	S
庆大霉素	9.66±0.19	R
氯霉素	30.55±2.32	S
链霉素	16.97±0.07	IR
克林霉素	26.26±0.25	S
氨苄西林	44.50±2.69	S
卡那霉素	0.00±0.00	R
万古霉素	30.65±1.49	S

注: 抗生素药敏性的抑制程度分为R(低敏感性, 抑制直径≤14 mm)、IR(中等敏感性, 抑制直径15~19 mm)、S(高敏感性, 直径>20 mm)。

2.4 鸡乳杆菌 FB20 益生特性分析

2.4.1 鸡乳杆菌 FB20 耐酸耐胆盐能力分析 耐酸、耐胆盐特性是益生菌发挥益生作用的前提。鸡乳杆菌 FB20 在 pH2.5、pH3、pH4 以及含 0.1%、0.2%、0.3% 浓度的胆盐存在条件下的存活率见表 4。研究发现在不同酸性条件下, 处理 4 h 后, 鸡乳杆菌 FB20 存活率均高于 100%, 略呈现上升趋势, 不同条件下存活率没有显著性差异, 说明其在酸性条件下能够很好地存活。一些报道表明乳酸菌在酸性条件下

表 4 鸡乳杆菌 FB20 耐酸耐胆盐及模拟胃肠液存活率

Table 4 Acid and bile salt tolerant and survival rate in simulated gastrointestinal fluid of *L. gallinarum* FB20

益生指标	条件	0 h(lg CFU/mL)	4 h(lg CFU/mL)	存活率(%)
耐酸	pH2.5	6.07±5.21	6.15±5.14	120.81±12.44 ^a
	pH3	6.31±5.32	6.34±5.60	105.50±10.51 ^a
	pH4	6.43±4.33	6.44±5.11	103.10±4.92 ^a
	0.1%	4.87±3.57	4.81±3.40	88.39±1.15 ^a
耐胆盐	0.2%	4.74±3.33	4.59±2.91	70.97±1.93 ^b
	0.3%	4.60±2.91	4.51±3.33	82.64±7.07 ^a
模拟胃肠液	胃液	7.94±0.01	7.64±0.01	96.21±1.40 ^a
	肠液	5.58±0.01	2.13±0.04	38.27±2.79 ^b

注: 不同小写字母代表各实验组内有显著性差异($P<0.05$)。

会产生自我防护机制, 分泌质子转运 ATP 酶, 有助于其稳定细胞内外 pH, 以适应低 pH 的外部环境^[38]。

鸡乳杆菌 FB20 在含 0.1%、0.2%、0.3% 浓度胆盐下的存活率分别为 88.39%±1.15%、70.97%±1.93% 和 82.64%±7.07%。研究发现乳酸菌 Zhang 等^[39]的生长会受到胆盐的影响。而乳酸菌生长时所分泌的可水解胆盐的酶或产生应激反应蛋白会在一定程度上起到对胆盐的耐受作用^[40]。

2.4.2 鸡乳杆菌 FB20 模拟胃肠液耐受性分析 菌株对模拟胃肠液的耐受性在一定程度上反映其在体内的存活情况(表 4)。鸡乳杆菌 FB20 在模拟胃液中表现出较高的存活率, 为 96.21%±1.40%, 而在模拟肠液中存活率较低, 为 38.27%±2.79%。研究表明, 菌株对模拟胃肠液的耐受性与其是否产胞外多糖有关^[41], 鸡乳杆菌 FB20 菌落周围有白色絮状分泌物(图 2a), 推测其可能通过产生胞外多糖增加了对环境的耐受性。

2.4.3 鸡乳杆菌 FB20 自聚集、共聚集能力分析 鸡乳杆菌 FB20 自聚集、共聚集能力如表 5 所示, 其自聚集能力随时间增加显著增高($P<0.05$); 鸡乳杆菌 FB20 与金黄色葡萄球菌 S1 和大肠杆菌 E1 的共聚集能力也随时间的增加显著增强($P<0.05$), 在与两株不同的菌株共孵育 4 h 时, 其与大肠杆菌 E1 的共聚集能力显著高于金黄色葡萄球菌 S1($P<0.05$), 而在 6 h 和 8 h 时, 其对金黄色葡萄球菌 S1 的共聚集能力更强。乳酸菌与病原菌的共聚集会在一定程度上阻碍病原体定殖^[42]。同时菌株之间聚集能力的强弱也与细胞表面相关蛋白有关, 因此不同类型乳酸菌其聚集能力也不尽相同^[43]。

表 5 鸡乳杆菌 FB20 自聚集、共聚集率
Table 5 Auto-aggregation and co-aggregation rates of *L. gallinarum* FB20

时间(h)	自聚集能力(%)	共聚集能力(%)	
	鸡乳杆菌FB20	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌
4	27.61±0.09 ^c	11.14±0.47 ^{Bc}	14.78±0.18 ^{Ac}
6	29.88±0.32 ^b	47.14±0.93 ^{Ab}	16.59±0.26 ^{Bb}
8	38.87±0.14 ^a	53.92±1.96 ^{Aa}	38.82±1.10 ^{Ba}

注: 不同大写字母代表组间有显著性差异, 不同小写字母代表组内有显著性差异($P<0.05$)。

2.5 鸡乳杆菌 FB20 抑菌能力分析

如图 3 所示, 鸡乳杆菌 FB20 对大肠杆菌 E1、金黄色葡萄球菌 S1 及蜡样芽孢杆菌 BI6Y 分别产生直径为 16.27±0.40、11.53±1.23 和 12.94±0.52 mm 的抑菌圈, 对大肠杆菌抑制效果最优。鸡乳杆菌 FB20 的抑菌能力发挥可能与有机酸类物质有关^[44]。鸡乳杆菌 FB20 对植物乳杆菌没有抑制作用。

2.6 鸡乳杆菌 FB20 无细胞上清液的体外抗氧化能力

乳酸菌及其代谢物可作为抗氧化剂以应对多种氧化应激引发的相关疾病, 例如心血管疾病、癌症、

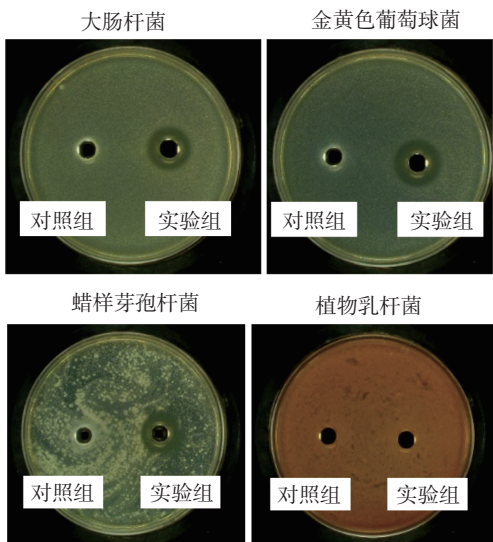


图 3 鸡乳杆菌 FB20 抑菌能力
Fig.3 Antibacterial ability of *L. gallinarum* FB20

肥胖等^[45-46]。实验结果发现鸡乳杆菌 FB20 无细胞上清液具有良好的抗氧化性(图 4),对 ABTS⁺自由基的清除能力最高为 98.47%±0.01%;对 DPPH 自由基和羟自由基的清除能力分别为 55.67%±3.19% 和 57.65%±3.42%。Xia 等^[29]从马粪中分离了 4 株魏斯氏菌测定其无细胞上清液 DPPH 自由基清除能力分别在 9.93%~35.78% 之间,对羟自由基的清除率在 12%~15% 之间;林瑛兰等^[47]从酸粥中分离了一株植物乳杆菌 Y3,其无细胞上清液对羟自由基的清除能力为 51.26%。Lepecka 等^[48]从发酵肉制品中分离了 23 株乳酸菌,其无细胞上清液对 DPPH 自由基的清除率在 0.00%±0.00%~36.05%±1.08% 之间,对 ABTS⁺自由基清除率在 5.72%±2.54%~33.33%±5.05% 之间。最终确定戊糖片球菌 KL14 对两种自由基清除能力最强,分别为 36.05%±1.08% 和 33.33%±5.05%。由此可见乳酸菌抗氧化能力可能与菌株来源和类型有关。

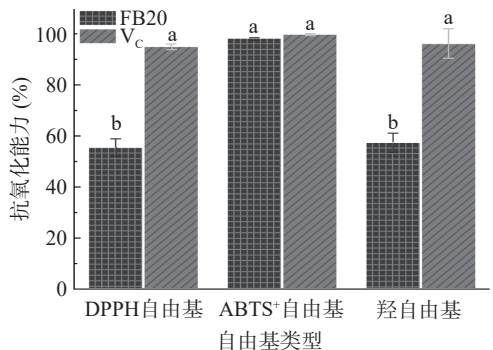


图 4 鸡乳杆菌 FB20 对 DPPH 自由基、ABTS⁺自由基、羟自由基清除能力

Fig.4 Scavenging ability of *L. gallinarum* FB20 on DPPH radicals, ABTS⁺ radicals, and hydroxyl radicals
注: 同一指标不同小写字母代表有显著性差异($P<0.05$)。

2.7 鸡乳杆菌 FB20 的降糖能力

降糖能力是益生菌开发的一项重要指标。淀粉

等在胃肠道消化过程中经 α -淀粉酶裂解 1,4- α -糖苷键转化为双糖或寡糖,又通过 α -葡萄糖苷酶的作用水解为单糖后经小肠吸收^[49-50],血糖升高会加速自由基的产生,进而导致内源性抗氧化水平降低,从而诱发其他慢性疾病^[51],抑制 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶活性可以作为控制血糖增高以及减少其他疾病发生的一个方法。研究结果发现鸡乳杆菌 FB20 的无细胞上清液及细胞破碎提取液均具有 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶抑制能力(表 6),且无细胞上清液优于细胞破碎提取液,抑制率分别为 67.91%±1.24% 和 66.53%±0.34%。曹英等^[52]从骆驼乳中分离出 34 株乳酸菌并对其无细胞上清液的 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶抑制效果进行测定,发现有 6 株乳酸菌表现出较好的体外降糖能力,对 α -葡萄糖苷酶的抑制率在 11%~16% 之间,对 α -淀粉酶的抑制率在 50% 以上。Shir-khan 等^[53]从天然发酵乳中分离了一株德氏乳杆菌,其无细胞上清液和细胞破碎液对 α -淀粉酶的抑制率分别为 50% 和 25%。与本研究结果类似,这可能与无细胞上清液中含有的菌株代谢物例如胞外多糖有关^[54]。

表 6 鸡乳杆菌 FB20 降糖能力 Table 6 Hypoglycemic ability of <i>L. gallinarum</i> FB20		
指标	类型	抑制率(%)
α -淀粉酶抑制活性	无细胞上清液	67.91±1.24 ^b
	细胞破碎液	20.76±4.05 ^c
	阿卡波糖	77.41±0.76 ^a
α -葡萄糖苷酶抑制活性	无细胞上清液	66.53±0.34 ^b
	细胞破碎液	48.17±14.06 ^c
	阿卡波糖	97.63±0.00 ^a

注: 同一指标不同小写字母代表有显著性差异($P<0.05$)。

2.8 鸡乳杆菌 FB20 发酵对红茶汤抗氧化能力的影响

红茶因本身含有酚类物质而具备一定的抗氧化能力^[55]。这些酚类物质主要是一些儿茶素、绿原酸等,其在绿茶含量最高,乌龙茶次之,红茶最低^[56]。本研究发现经鸡乳杆菌 FB20 发酵后的红茶汤抗氧化能力显著提高($P<0.05$)(图 5),对 DPPH、ABTS⁺、羟自由基的清除能力分别从 43.52%、69.37%、81.38% 提高至 56.00%、73.72%、91.95%,分别显著提升了 12.48%、4.35%、10.57%。还原力没有显著变化,但总酚含量由 7.53 mg/mL 显著提升至 8.60 mg/mL ($P<0.05$)。

已有研究表明乳酸菌发酵可以提高产品的抗氧化能力^[57],这可能与发酵后提升了活性产物的释放有关。发酵会增加总酚含量,菌株所产生的酶可以促进儿茶素、黄酮类化合物的生物转化,增强抗氧化性^[58]。也有研究表明在植物基食品发酵过程中,产 β -葡萄糖苷酶的乳酸菌通过将糖苷转换成其糖苷元来提升食品的抗氧化能力^[59]。鸡乳杆菌 FB20 发酵可以在一定程度弥补红茶因制作工艺过程中抗氧化能力的损耗。

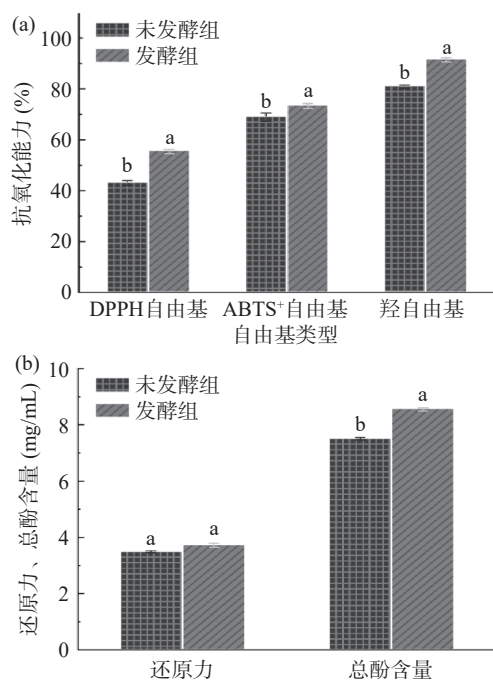


图5 鸡乳杆菌 FB20 发酵红茶体外抗氧化能力

Fig.5 *In vitro* antioxidant capacity of fermented black tea soup by *L. gallinarum* FB20

注: (a) 自由基清除能力; (b) 总酚含量与还原力; 同一指标不同小写字母代表有显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.9 鸡乳杆菌 FB20 发酵后红茶汤的电子鼻结果分析

红茶以其独特的香气而闻名, 是最受欢迎的非

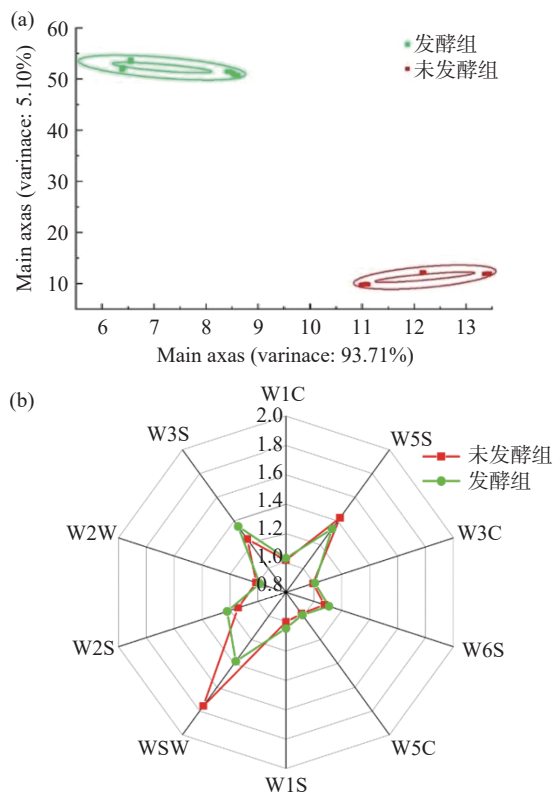


图6 鸡乳杆菌 FB20 发酵对红茶汤风味影响的电子鼻分析

Fig.6 Effect of *L. gallinarum* FB20 fermentation on the flavor of black tea soup by electronic nose analysis

注: (a) 发酵红茶汤 PCA; (b) 鸡乳杆菌 FB20 发酵红茶汤雷达图。

酒精饮料之一^[60]。Liu 等^[61]采用气相色谱-质谱联用技术(GC-MS)鉴定了红茶有 157 种挥发性化合物。这些化合物大致可分为 11 类, 主要包括醇类、酯类、酮类、醛类、萜烯类和硫化物。如图 6a 所示, 经鸡乳杆菌发酵后的红茶与未发酵的红茶气味具有显著性差异, 且与未发酵组相比, 发酵组的红茶汤无机硫化物有所下降, 无机硫化物是一种刺激性的挥发成分, 降低其浓度可以提高产品感官属性。Wu 等^[62]研究发现电子鼻的 W3C、W6S、W5C、W2S 和 W3S 传感器所形容的气味特征与红茶风味有关, 如图 6b 所示, 本研究 W3C、W6S、W5C、W2S 和 W3S 传感器所检测的挥发性物质均高于未发酵组, 说明鸡乳杆菌 FB20 发酵可以在一定程度上提高红茶汤的风味。

3 结论

本研究从泡菜汁和健康婴儿粪便中共分离了 7 株产 β -葡萄糖苷酶的乳酸菌, 通过测定酶活力确定了一株从健康婴儿粪便中分离的高产 β -葡萄糖苷酶的乳酸菌, 通过 16S rDNA 和 BLASTN 序列对比鉴定为一株鸡乳杆菌(*L. gallinarum*)。对其安全、益生特性进行了分析。该菌株溶血性、明胶酶活性、DNase 活性均为阴性, 对酸性环境具有较强耐受性, 在 pH2.5 时, 存活率为 $120.81\% \pm 12.44\%$, 并且具有较高的抗氧化和降糖功能, 其中对 ABTS⁺自由基的清除率为 $98.47\% \pm 0.01\%$, 与 V_C 对 ABTS⁺自由基的清除率无显著性差异。无细胞上清液和细胞破碎液均表现出良好的 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶抑制效果, 是一株潜在的益生菌。利用该菌株发酵红茶汤后, 能够在一定程度上改善和强化发酵红茶汤的风味和抗氧化性, 也为其在发酵红茶汤中的应用提供了一定的理论依据。后续研究可以针对鸡乳杆菌 FB20 发酵后红茶汤的代谢物以及风味变化进行关联分析, 并进一步通过体外发酵以及动物模型实验探索发酵对红茶汤营养功能的影响, 解析鸡乳杆菌 FB20 发酵改善红茶汤品质的机制。

© The Author(s) 2025. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] KANG C H, KIM J S, PARK H M, et al. Antioxidant activity and short-chain fatty acid production of lactic acid bacteria isolated from Korean individuals and fermented foods[J]. *Biotech*, 2021, 11 (5): 1-8.
- [2] MASKE B L, de MELO P G V, da S VALE A, et al. A review on enzyme-producing *Lactobacilli* associated with the human digestive process: From metabolism to application[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2021, 149(3): 109836-109854.
- [3] KETUDAT CAIRNS J R, ESEN A. β -Glucosidases[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2010, 67(20): 3389-3405.
- [4] GODSE R, BAWANE H, TRIPATHI J, et al. Unconventional β -glucosidases: A promising biocatalyst for industrial biotechnolo-

- gy[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2021, 193(9): 2993–3016.
- [5] MICHELMAYR H, KNEIFEL W. β -Glucosidase activities of lactic acid bacteria: Mechanisms, impact on fermented food and human health[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2014, 352(1): 1–10.
- [6] LORN D, NGUYEN T-K-C, HO P-H, et al. Screening of lactic acid bacteria for their potential use as aromatic starters in fermented vegetables[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2021, 350(5): 109242–109252.
- [7] QUINES-LAGMAY V C, JEONG B-G, KERR W L, et al. Antioxidative properties of eastern prickly pear (*Opuntia humifusa*) fermented with lactic acid bacteria and cell wall-hydrolyzing enzymes[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2020, 122(1): 109029–109048.
- [8] LI C, XU T, LIU X W, et al. The expression of β -glucosidase during natto fermentation increased the active isoflavone content[J]. *Food Bioscience*, 2021, 43(7): 101286–101292.
- [9] ZHANG P, ZHANG R, SIRISENA S, et al. Beta-glucosidase activity of wine yeasts and its impacts on wine volatiles and phenolics: A mini-review[J]. *Food Microbiology*, 2021, 100(6): 103859–103872.
- [10] SUPRIYADI S, NARESWARI A R, FITRIANI A, et al. Enhancement of black tea aroma by adding the β -glucosidase enzyme during fermentation on black tea processing[J]. *International Journal of Food Science*, 2021, 2021(8): 1–9.
- [11] ÇELİK A, DİNÇER A, AYDEMİR T. Characterization of β -glucosidase immobilized on chitosan-multiwalled carbon nanotubes (MWCNTS) and their application on tea extracts for aroma enhancement[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 89(5): 406–414.
- [12] LIANG S, WANG F, GRANATO D, et al. Effect of β -glucosidase on the aroma of liquid-fermented black tea juice as an ingredient for tea-based beverages[J]. *Food Chemistry*, 2023, 402(9): 134201–134210.
- [13] NGUYEN N K, DONG N T N, NGUYEN H T, et al. Lactic acid bacteria: Promising supplements for enhancing the biological activities of kombucha[J]. *SpringerPlus*, 2015, 4(1): 1–6.
- [14] LI R, LUO W, LIU Y, et al. The investigation on the characteristic metabolites of *Lactobacillus plantarum* RLL68 during fermentation of beverage from by-products of black tea manufacture[J]. *Current Research in Food Science*, 2022, 5(7): 1320–1329.
- [15] DENG P, MENG C, WU Y, et al. An unusual GH1 β -glucosidase from marine sediment with β -galactosidase and transglycosidation activities for superior galacto-oligosaccharide synthesis[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(11): 4927–4943.
- [16] LIU X, LI Y, YU Z, et al. Screening and characterisation of β -glucosidase production strains from *Rosa roxburghii* Tratt[J]. *International Journal of Food Engineering*, 2021, 17(1): 1–9.
- [17] KANPIENGJAI A, NUNTIKAEW P, WONGSANITTA-YARAK J, et al. Isolation of efficient xylooligosaccharides-fermenting probiotic lactic acid bacteria from ethnic pickled bamboo shoot products[J]. *Biology*, 2022, 11(5): 638–654.
- [18] KHAN A N, YASMIN H, GHAZANFAR S, et al. Antagonistic, anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-diabetic probiotic potential of *Lactobacillus agilis* isolated from the rhizosphere of the medicinal plants[J]. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2021, 28(11): 6069–6076.
- [19] NANDHA M C, SHUKLA R M. Exploration of probiotic attributes in lactic acid bacteria isolated from fermented *Theobroma cacao* L. fruit using *in vitro* techniques[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14(9): 1274636–1274656.
- [20] LI Y, ZHAO N, LI Y, et al. Dynamics and diversity of microbial community in salmon slices during refrigerated storage and identification of biogenic amine-producing bacteria[J]. *Food Bioscience*, 2023, 52(1): 102441–102450.
- [21] SAEED A, YASMIN A, BAIG M, et al. Isolation and Characterization of *Lactobacillus crispatus*, *Lactococcus lactis*, and *Carnobacterium divergens* as potential probiotic bacteria from fermented black and green olives (*Olea europaea*): An exploratory study[J]. *BioMed Research International*, 2023, 2023(4): 1–14.
- [22] MOTÉY G A, OWUSU-KWARTENG J, OBIRI-DANSO K, et al. *In vitro* properties of potential probiotic lactic acid bacteria originating from Ghanaian indigenous fermented milk products[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2021, 37(3): 52–65.
- [23] HACIOĞLU S, KUNDUHOGLU B. Probiotic characteristics of *Lactobacillus brevis* KT38-3 isolated from an artisanal Tulum cheese[J]. *Food Sci Anim Resour*, 2021, 41(6): 967–982.
- [24] SHAZADI K, ARSHAD N. Evaluation of inhibitory and probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from vaginal microflora[J]. *Folia Microbiologica*, 2022, 67(3): 427–445.
- [25] SOEMARIE Y B, MILANDA T, BARLIANA M I, et al. Isolation, characterization, and identification candidate of probiotic bacteria isolated from Wadi Papuyu (*Anabas testudineus* Bloch.) a fermented fish product from Central Kalimantan, Indonesia[J]. *International Journal of Food Science*, 2022, 2022(5): 1–9.
- [26] RAMADHANTI N, MELIA S R I, HELLYWARD J, et al. Characteristics of lactic acid bacteria isolated from palm sugar from west Sumatra, Indonesia and their potential as a probiotic[J]. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 2021, 22(5): 2610–2616.
- [27] KUNDUHOGLU B, HACIOĞLU S. Probiotic potential and gluten hydrolysis activity of *Lactobacillus brevis* KT16-2[J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2020, 13(3): 720–733.
- [28] RAGUL K, KANDASAMY S, DEVI P B, et al. Evaluation of functional properties of potential probiotic isolates from fermented brine pickle[J]. *Food Chemistry*, 2020, 311(12): 126057–126065.
- [29] XIA Y, QIN S, SHEN Y. Probiotic potential of *Weissella* strains isolated from horse feces[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2019, 132(4): 117–123.
- [30] FAN S, XUE T, BAI B, et al. Probiotic properties including the antioxidant and hypoglycemic ability of lactic acid bacteria from fermented grains of Chinese Baijiu[J]. *Foods*, 2022, 11(21): 3476–3482.
- [31] LI L, SU Y, FENG Y, et al. A comparison study on digestion, anti-inflammatory and functional properties of polysaccharides from four *Auricularia* species[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 154(3): 1074–1081.
- [32] CHANG H M, FOO H L, LOH T C, et al. Comparative studies of inhibitory and antioxidant activities, and organic acids compositions of postbiotics produced by probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* strains isolated from Malaysian foods[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2021, 7(1): 602280–602294.
- [33] NING X, LUO Z, CHEN Z, et al. Fortification of set yogurt with passion fruit juice: Effects on fermentation kinetics, physicochemical properties, and functionality[J]. *Journal of Dairy Science*, 2021, 104(4): 4084–4093.

- [34] ZHU D, REN X, WEI L, et al. Collaborative analysis on difference of apple fruits flavour using electronic nose and electronic tongue[J]. *Scientia Horticulturae*, 2020, 260(10): 108879.
- [35] SUGIMURA N, LI Q, CHU E S H, et al. *Lactobacillus gallinarum* modulates the gut microbiota and produces anti-cancer metabolites to protect against colorectal tumourigenesis[J]. *Gut microbiota*, 2022, 71(10): 2011–2021.
- [36] HANCOCK R E W. The complexities of antibiotic action[J]. *Molecular Systems Biology*, 2007, 3(1): 142–144.
- [37] SHAW K J, MILLER N, LIU X, et al. Comparison of the changes in global gene expression of *Escherichia coli* induced by four bactericidal agents[J]. *Microbial Physiology*, 2003, 5(2): 105–122.
- [38] Mbye M, Baig M A, Abuqamar S F, et al. Updates on understanding of probiotic lactic acid bacteria responses to environmental stresses and highlights on proteomic analyses[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2020, 19(3): 1110–1124.
- [39] ZHANG J, LIU M, XU J, et al. First insight into the probiotic properties of ten *Streptococcus thermophilus* strains based on *in vitro* conditions[J]. *Current Microbiology*, 2019, 77(3): 343–352.
- [40] AYYASH M M, ABDALLA A K, ALKALBANI N S, et al. Invited review: Characterization of new probiotics from dairy and nondairy products—Insights into acid tolerance, bile metabolism and tolerance, and adhesion capability[J]. *Journal of Dairy Science*, 2021, 104(8): 8363–8379.
- [41] VAMANU E. Effect of gastric and small intestinal digestion on lactic acid bacteria activity in a GIS1 simulator[J]. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2017, 24(7): 1453–1457.
- [42] NIKOLIC M, JOVICIC B, KOJIC M, et al. Surface properties of *Lactobacillus* and *Leuconostoc* isolates from homemade cheeses showing auto-aggregation ability[J]. *European Food Research and Technology*, 2010, 231(6): 925–931.
- [43] GUAN C, CHEN X, JIANG X, et al. *In vitro* studies of adhesion properties of six lactic acid bacteria isolated from the longevous population of China[J]. *RSC Advances*, 2020, 10(41): 24234–24240.
- [44] PUNIA BANGAR S, SURI S, TRIF M, et al. Organic acids production from lactic acid bacteria: A preservation approach[J]. *Food Bioscience*, 2022, 46(2): 101615–31.
- [45] CHEN W, XIE C, HE Q, et al. Improvement in color expression and antioxidant activity of strawberry juice fermented with lactic acid bacteria: A phenolic-based research[J]. *Food Chemistry: X*, 2023, 17(12): 100535.
- [46] NALIYADHARA N, KUMAR A, KUMAR GANGWAR S, et al. Interplay of dietary antioxidants and gut microbiome in human health: What has been learnt thus far?[J]. *Journal of Functional Foods*, 2023, 100(12): 105365–105376.
- [47] 林瑛兰, 张悦, 李阔, 等. 传统酸粥中乳酸菌的分离筛选及其体外抗氧化能力分析[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(20): 126–134.
- [48] LIN Yinglan, ZHANG Yue, LI Kuo, et al. Screening lactic acid bacteria in traditional sour porridge and analysis of their antioxidant activity[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2023, 44(20): 126–134.
- [49] LEPECKA A, SZYMAŃSKI P, OKOŃ A, et al. Antioxidant activity of environmental lactic acid bacteria strains isolated from organic raw fermented meat products[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2023, 12(2): 174–181.
- [50] LORDAN S, SMYTH T J, SOLER-VILA A, et al. The α -amylase and α -glucosidase inhibitory effects of Irish seaweed extracts[J]. *Food Chemistry*, 2013, 141(3): 2170–2176.
- [51] HEDRINGTON M S, DAVIS S N. Considerations when using alpha-glucosidase inhibitors in the treatment of type 2 diabetes[J]. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 2019, 20(18): 2229–2235.
- [52] AJIBOYE B O, OJO O A, OKESOLA M A, et al. *In vitro* antioxidant activities and inhibitory effects of phenolic extract of *Senecio bialfræ* (Oliv and Hiern) against key enzymes linked with type II diabetes mellitus and Alzheimer's disease[J]. *Food Science & Nutrition*, 2018, 6(7): 1803–1810.
- [53] 曹英, 侯敏, 易光平, 等. 驼乳制品中抑制 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶活性乳酸菌的筛选及益生特性研究[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(19): 191–201.
- [54] CAO Ying, HOU Min, YI Guangping, et al. Screening and probiotic properties of lactic acid bacteria inhibiting α -amylase and α -glucosidase activities in camel dairy products[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(19): 191–201.
- [55] SHIRKHAN F, MIRDAMADI S, MIRZAEI M, et al. The α -amylase and α -glucosidase inhibitory effects and antioxidant properties of native *Lactobacilli* strains isolated from traditional fermented dairy products[J]. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2024, 60(2): 331–346.
- [56] AL-NABULSI A A, JARADAT Z W, AL QUDSI F R, et al. Characterization and bioactive properties of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* isolated from Labaneh[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2022, 167(8): 113817–113827.
- [57] CARDOSO R R, NETO R O, DOS SANTOS D'ALMEIDA C T, et al. Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile, which impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities[J]. *Food Research International*, 2020, 128(11): 108782–108792.
- [58] VU D C, ALVAREZ S. Phenolic, carotenoid and saccharide compositions of Vietnamese *Camellia sinensis* teas and herbal teas[J]. *Molecules*, 2021, 26(21): 6496–6510.
- [59] CHOURASIA R, KUMARI R, SINGH S P, et al. Characterization of native lactic acid bacteria from traditionally fermented Chhurpi of Sikkim Himalayan region for the production of Chhurpi cheese with enhanced antioxidant effect[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2022, 154(11): 112801–112810.
- [60] JAKUBCZYK K, KAŁDUŃSKA J, KOCHMAN J, et al. Chemical profile and antioxidant activity of the kombucha beverage derived from white, green, black and red tea[J]. *Antioxidants*, 2020, 9(5): 1–15.
- [61] LIU L, ZHANG C, ZHANG H, et al. Biotransformation of polyphenols in apple pomace fermented by β -glucosidase-producing *Lactobacillus rhamnosus* L08[J]. *Foods*, 2021, 10(6): 1–12.
- [62] WANG Z, HAN B, JING W, et al. Effects of different steeping temperatures on the leaching of aroma components in black tea by SPME-GC-MS coupled with chemometric method[J]. *Journal of AOAC International*, 2019, 102(6): 1834–1844.
- [63] LIU H, XU Y, WEN J, et al. A comparative study of aromatic characterization of Yingde black tea infusions in different steeping temperatures[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2021, 143(1): 110860–110875.
- [64] WU R, REN G, YIN L, et al. Characterization of Congou black tea by an electronic nose with grey wolf optimization (GWO) and chemometrics[J]. *Analytical Letters*, 2022, 56(13): 2123–2136.