

# 产共轭亚油酸 *Lactiplantibacillus plantarum* ZFM804 的筛选及益生特性评价

余梦为<sup>1,2</sup>, 黄滢洁<sup>1</sup>, 章子豪<sup>1</sup>, 杨甜甜<sup>1</sup>, 陈向峰<sup>1</sup>, 董若萌<sup>1</sup>,  
王凤轩<sup>1</sup>, 王若南<sup>1</sup>, 顾青<sup>1</sup>, 郇萍<sup>\*1</sup>

(1. 浙江工商大学 食品与生物工程学院, 浙江 杭州 310018; 2. 长江大学 生命科学学院, 湖北 荆州 434025)

**摘要:** 作者以发酵食品中分离的 8 株乳酸菌为研究对象, 采用紫外分光光度法筛选出产共轭亚油酸 (CLA) 的菌株, 进一步对其体外益生特性进行评价。结果表明, *Pediococcus acidilactici* ZFM801、*Leuconostoc mesenteroides* ZFM803、*Lactiplantibacillus plantarum* ZFM804、*Lactiplantibacillus plantarum* ZFM805、*Lactiplantibacillus plantarum* ZFM806、*Weissella cibaria* ZFM810 具有产 CLA 的能力, 其中 *Lactiplantibacillus plantarum* ZFM804 产 CLA 能力最高 (质量浓度达 21.7 mg/L), 且 CLA 异构体分别为 *c9,t11*-CLA 和 *t10,c12*-CLA。益生特性评价结果表明, *Lactiplantibacillus plantarum* ZFM804 对 3 种致病菌的共凝聚率均高达 25% 以上。耐受性结果表明, *Lactiplantibacillus plantarum* ZFM804 可耐受质量分数 4% 的 NaCl 和质量分数 0.1% 的胆盐; 同时 *Lactiplantibacillus plantarum* ZFM804 在模拟胃肠液环境下同样表现出较高的耐受性, 且 pH 4.5 时存活率高达 60% 以上; 其次 *Lactiplantibacillus plantarum* ZFM804 对藤黄微球菌、金黄色葡萄球菌具有显著的抑制作用。综上, *Lactiplantibacillus plantarum* ZFM804 具有高产 CLA 的潜能和良好的益生特性。

**关键词:** 共轭亚油酸; 乳酸菌; 益生特性; 耐受性

中图分类号: TS 201.3 文章编号: 1673-1689(2024)04-0072-09 DOI: 10.12441/spyswjs.20231201001

## Screening and Evaluating the Probiotic Properties of *Lactiplantibacillus plantarum* ZFM804 Producing Conjugated Linoleic Acid

YU Mengwei<sup>1,2</sup>, HUANG Yingjie<sup>1</sup>, ZHANG Zihao<sup>1</sup>, YANG Tiantian<sup>1</sup>, CHEN Xiangfeng<sup>1</sup>,  
DONG Ruomeng<sup>1</sup>, WANG Fengxuan<sup>1</sup>, WANG Ruonan<sup>1</sup>, GU Qing<sup>1</sup>, LI Ping<sup>\*1</sup>

(1. School of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018, China; 2. College of Life Science, Yangtze University, Jingzhou 434025, China)

**Abstract:** In this study, 8 strains of lactic acid bacteria isolated from fermented foods were used to screen the strains producing conjugated linoleic acid (CLA) by ultraviolet spectrophotometry, and further evaluation of *in vitro* probiotic properties were conducted. The results showed that *Pediococcus acidilactici* ZFM801, *Leuconostoc mesenteroides* ZFM803, *Lactiplantibacillus*

收稿日期: 2023-12-01 修回日期: 2024-03-25

基金项目: 浙江省自然科学基金杰出青年项目(1110KZ0722027)。

\* 通信作者: 郇萍(1981—), 女, 博士, 研究员, 博士研究生导师, 主要从事益生菌资源挖掘及益生菌、益生元、后生元与机体健康研究。

E-mail: ping-biology@outlook.com

*plantarum* ZFM804, *Lactiplantibacillus plantarum* ZFM805, *Lactiplantibacillus plantarum* ZFM806, and *Weissella cibaria* ZFM810, had the ability to produce CLA, among which *Lactiplantibacillus plantarum* ZFM804 exhibited the highest CLA production capacity (mass concentration up to 21.7 mg/L) and consisted of *c*9,*t*11-CLA and *t*10,*c*12-CLA isomers. The results of prebiotic properties revealed that *Lactiplantibacillus plantarum* ZFM804 exhibited a high co-coagulation rate of 25% against three pathogenic bacteria. The tolerability study showed that *Lactiplantibacillus plantarum* ZFM804 could tolerate 4% mass fraction of NaCl and 0.1% mass fraction of bile salt, and *Lactiplantibacillus plantarum* ZFM804 also showed high tolerance under a simulate gastrointestinal fluid environment, with a survival rate over 60% at pH 4.5. Moreover, *Lactiplantibacillus plantarum* ZFM804 demonstrated a significant inhibitory effect on *Micrococcus luteus* and *Staphylococcus aureus*. In summary, *Lactiplantibacillus plantarum* ZFM804 possesses the potential for high CLA production and exhibits excellent prebiotic properties.

**Keywords:** conjugated linoleic acid, lactic acid bacteria, probiotic property, tolerance

共轭亚油酸(conjugated linoleic acid,CLA)是由必需脂肪酸亚油酸(linoleic acid,LA)衍生而成的含有共轭双键的多种位置异构体和几何异构体的总称。根据其双键在碳链上的不同位置,至少有 28 种异构体<sup>[1]</sup>,其中 *c*9,*t*11-CLA 和 *t*10,*c*12-CLA 是发挥益生功能的主要异构体,能够提高人体免疫能力<sup>[2]</sup>、抗动脉粥样硬化、加快脂肪氧化分解<sup>[3]</sup>、调节肠道菌群、调节肠道炎症<sup>[4]</sup>等。然而人和哺乳动物均无法自身合成,只能通过反刍动物的肉制品和奶产品,以及红花籽等<sup>[5]</sup>获取,但其含量较低难以满足摄入需求。目前市面上普遍用的化学合成的 CLA 中含有 *t,t* 异构体,对人体具有毒副作用。有研究报道,微生物合成的 CLA 异构体单一、条件易控制、产量高,同时微生物合成的 CLA 可避免化学合成过程所带来的副作用,具有良好的安全性,已经被认为是一种替代天然或化学合成 CLA 的最佳选择<sup>[6]</sup>。

乳酸菌作为人体肠道中一类重要的益生菌,可定植于肠道上皮细胞,具有改善肠道菌群、调节肠道屏障功能<sup>[7]</sup>、参与机体免疫调节、提高人体抵抗力等特性<sup>[8]</sup>,还能够预防和治疗糖尿病<sup>[9]</sup>、肥胖症<sup>[10]</sup>、癌症及病原微生物感染性疾病<sup>[11]</sup>。研究表明很多乳酸菌具有产 CLA 的能力,结合乳酸菌的益生特性,从乳酸菌中筛选高产 CLA 的菌株有望获得优质且安全的菌源性 CLA。

作者以发酵食品中分离的 8 株乳酸菌为研究对象,从中筛选出转化 CLA 能力强的乳酸菌,同时评价菌株的体外益生特性,以期为高产 CLA 的微生物制剂制备及相关发酵产品的研发提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

乳酸菌:来自浙江工商大学食品微生物技术研究重点实验室菌种资源库中的干酪、泡菜源乳酸菌共 8 株,分别为 *Pediococcus acidilactici* ZFM801(全文简称 ZFM801)、*Leuconostoc mesenteroides* ZFM802(全文简称 ZFM802)、*Leuconostoc mesenteroides* ZFM803(全文简称 ZFM803)、*Lactiplantibacillus plantarum* ZFM804(全文简称 ZFM804)、*Lactiplantibacillus plantarum* ZFM805(全文简称 ZFM805)、*Lactiplantibacillus plantarum* ZFM806(全文简称 ZFM806)、*Weissella cibaria* ZFM810(全文简称 ZFM810)、*Limosilactobacillus fermentum* ZFM819(全文简称 ZFM819);MRS 培养基:上海化学试剂公司;草酸铵结晶紫染液、碘液:上海源叶生物科技有限公司;氢氧化钠、磷酸盐缓冲液:上海生工生物公司;共轭亚油酸标准品(色谱纯)、亚油酸标准品(色谱纯):加拿大 Toronto Research Chemicals 公司。

### 1.2 乳酸菌的培养

将乳酸菌甘油保藏液从-80℃冰箱取出划线,并于 37℃恒温培养箱中培养 48 h。取单菌落于 MRS 液体培养基中 37℃培养 12 h 进行第一次活化,以接种体积分数 1%将菌株接种到含 10 mL MRS 液体培养基的试管中,37℃培养 12 h,取活化二代的菌液,4℃保存备用。

### 1.3 CLA 标准曲线绘制

取 2.5 mL 的 CLA 溶液(5 mg CLA 标准品溶解

于 5 mL 正己烷)置于 25 mL 容量瓶中,并用正己烷定容。分别取 0.25、0.50、0.75、1.00、1.25、1.50、1.75、2.00、2.25、2.50 mL 于 10 mL 的比色管中并用正己烷定容至刻度线,样品质量浓度分别为 2.5、5.0、7.5、10.0、12.5、15.0、17.5、20.0、22.5、25.0 mg/L,以正己烷为参比,在波长 233 nm 处测定吸光度,并绘制共轭亚油酸标准曲线。

#### 1.4 CLA 产量测定

将乳酸菌以体积分数 1% 接种到 10 mL MRS 液体培养基中,在培养基中加入 200  $\mu$ L 的 LA 乳化液,使培养基基质中 LA 质量浓度达到 0.4 g/L,置于 37  $^{\circ}$ C 培养 24 h。分别设置无乳酸菌发酵组 (MRS+LA)、无底物发酵组 (MRS+乳酸菌)、正常组 (MRS+LA+乳酸菌),均放置在相同环境培养相同时间,以排除底物亚油酸、培养基成分在正己烷萃取液中对紫外吸收的影响。

将培养后的发酵液在 4  $^{\circ}$ C 下以 6 000 r/min 离心 10 min,取上清液;用 5 倍体积正己烷萃取 30 min,静置 1 h 后收集上层正己烷层并加入 10 g 无水硫酸钠,涡旋振荡 5 min 进行干燥,于 4 000 r/min 离心 10 min;将上层正己烷层转移至 50 mL 棕色容量瓶中,用正己烷定容。以正己烷为参比,用紫外分光光度计在波长 233 nm 处测定样品吸光度<sup>[12]</sup>。

#### 1.5 CLA 构型测定

对产 CLA 的乳酸菌进行初步鉴定后,挑选出高产 CLA 的菌株进行再次培养。将培养后的发酵液于 4  $^{\circ}$ C 下以 6 000 r/min 离心 10 min,取上清液;用 5 倍体积正己烷萃取发酵液 30 min,静置 1 h 后收集上层正己烷层;在正己烷萃取液中加入 10 g 无水硫酸钠,涡旋振荡 5 min 进行干燥,于 4 000 r/min 离心 10 min;取上层正己烷层于 30  $^{\circ}$ C 下旋转蒸发浓缩至 1~2 mL,收集脂肪酸浓缩提取液于带盖高温试管中,加入 2 mL 含盐酸的甲醇溶液,于 90  $^{\circ}$ C 水浴条件下酯化 2.5 h;冷却至室温后,在酯化后的溶液中加入 2 mL 蒸馏水,分别用 2 mL 正己烷浸提 3 次,合并正己烷层转移至 10 mL 棕色容量瓶中,用正己烷定容;加入 0.5 g 无水硫酸钠,涡旋振荡 1 min,静置 0.5 h,取上清液待测。

色谱条件如下:色谱柱 DB-WAX(60 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.5  $\mu$ m);进样口温度 240  $^{\circ}$ C,进样量 1  $\mu$ L,分流比 20:1,恒流模式,柱流量 1 mL/min;柱子初始温度 60  $^{\circ}$ C,以 5  $^{\circ}$ C/min 升到 240  $^{\circ}$ C,保持 20 min。

质谱条件如下:离子源为 EI,离子源温度 230  $^{\circ}$ C,四级杆温度 150  $^{\circ}$ C,扫描范围: $m/z$  33~500<sup>[13-14]</sup>。

#### 1.6 高产 CLA 乳酸菌的耐受性测定

将活化后的菌株以接种体积分数 1% 接种至 10 mL MRS 液体培养基,于 37  $^{\circ}$ C 培养 18 h,8 000 r/min 离心 10 min,弃去发酵上清液,离心菌体用 PBS 缓冲液制成菌悬液,10 000 r/min 离心 10 min,弃去上清液。重复洗涤菌体 3 次后,用等体积 PBS 缓冲溶液制成菌悬液,备用。

**1.6.1 渗透压耐受性测定** 按照接种体积分数 1%,将菌悬液接种至 NaCl 质量分数分别为 4%、6%、8% 的 MRS 培养基中振荡混匀,置于 37  $^{\circ}$ C 培养 24 h。分别取 1 mL 上述培养液用无菌水适当稀释,取 100  $\mu$ L 稀释液涂布后于 37  $^{\circ}$ C 培养。当有成熟菌落出现后开始计数,实验重复 3 次,以未加 NaCl 的 MRS 培养基作为对照组。

**1.6.2 耐酸能力测定** 按照接种体积分数 1%,将菌悬液接种至 pH 为 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 的 MRS 培养基中振荡混匀,置于 37  $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养,分别在 2 h 和 4 h 取 1 mL 上述培养液用无菌水进行适当梯度稀释,取 100  $\mu$ L 稀释液在 MRS 固体培养基平板上涂布后于 37  $^{\circ}$ C 培养。当有成熟菌落出现后开始计数,实验重复 3 次,以未调 pH 的 MRS 培养基作为对照组。

**1.6.3 耐胆盐能力测定** 按照接种体积分数 1%,将菌悬液接种至胆盐质量分数分别为 0.1%、0.2%、0.3% 的 MRS 培养基中振荡混匀,置于 37  $^{\circ}$ C 恒温培养箱培养 5 h,分别在 2 h 和 4 h 取 1 mL 上述培养液用无菌水进行适当梯度稀释,取 100  $\mu$ L 稀释液涂布后于 37  $^{\circ}$ C 培养。当有成熟菌落出现后开始计数,实验重复 3 次,以未加胆盐的 MRS 培养基作为对照组。

**1.6.4 模拟胃肠液耐受性测定** 按照接种体积分数 1%,将菌悬液接种至模拟人工胃液 (pH 设置为 1.5、3.0、4.5) 和人工肠液 (pH 设置为 8) 中,摇匀置于 37  $^{\circ}$ C 培养 4 h,取 1 mL 上述模拟液用无菌水进行适当梯度稀释,取 100  $\mu$ L 稀释液在 MRS 固体培养基平板上涂布后于 37  $^{\circ}$ C 培养。当成熟菌落出现后开始计数,实验重复 3 次,以 MRS 培养基作为对照组<sup>[14]</sup>。

#### 1.7 自凝集能力的测定

分别取 5 mL 菌液置于 6 支试管中,取静置 1、

2、3、4、5 h 后上层菌液,测量其波长 600 nm 处的吸光度<sup>[15]</sup>。

$$X=(A_0-A_t)/A_0\times 100\% \quad (1)$$

式中: $X$  为自凝集率,%; $A_0$  为静置前上层溶液的吸光度; $A_t$  为静置后某个时间点上层溶液的吸光度。

### 1.8 共凝聚能力的测定

将活化后的指示菌(藤黄微球菌、肠炎沙门氏菌、金黄色葡萄球菌)液体于 8 000 r/min 离心 10 min 后,收集离心管底部菌体用 PBS 缓冲液洗涤 2 次后调整菌液浓度,使  $A_{600}$  为 0.5,备用。分别取 3 mL 乳酸菌菌悬液和指示菌菌悬液等体积混合为实验组,再取 6 mL 乳酸菌菌悬液和 6 mL 指示菌菌悬液作为对照组,分别使用相同试管,涡旋振荡 30 min 后置于 37 ℃ 的相同环境。静置培养 2 h 后取 3 mL 上层菌悬液分别测定其吸光度<sup>[16]</sup>。

$$X=[(A_0+A_p)/2-A_m]/[(A_0+A_m)/2]\times 100\% \quad (2)$$

式中: $X$  为共凝聚率,%; $A_0$  为静置后乳酸菌菌悬液的吸光度; $A_p$  为静置后指示菌菌悬液的吸光度; $A_m$  为静置后混合菌悬液的吸光度。

### 1.9 抑菌能力测定

采用琼脂扩散法测定高产 CLA 乳酸菌的抑菌活性。分别以大肠杆菌、藤黄微球菌、肠炎沙门氏菌和金黄色葡萄球菌为指示菌,将指示菌以接种体积分数 1% 接种到 LB 半固体培养基中,采用牛津杯双层平板法,每个孔中加 200  $\mu$ L 乳酸菌上清液,经室温扩散 4 h 后置于 37 ℃ 培养箱培养 8~12 h,测定抑菌圈直径,判断乳酸菌上清液的抑菌活性。

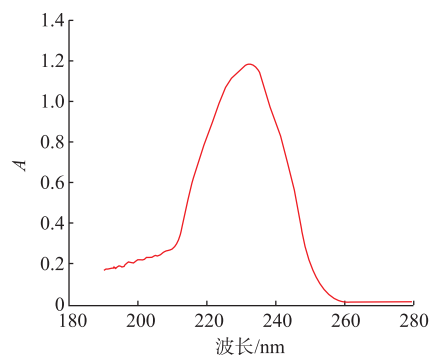
### 1.10 数据统计分析

每组实验重复 3 次,结果采用平均值 $\pm$ 标准差表示。运用 SPSS 23.0 软件进行单因素方差分析,以  $P<0.05$  为显著性检验标准。运用 Design-Expert 8.0.5 软件进行响应面分析,并使用 Origin 进行图形绘制。

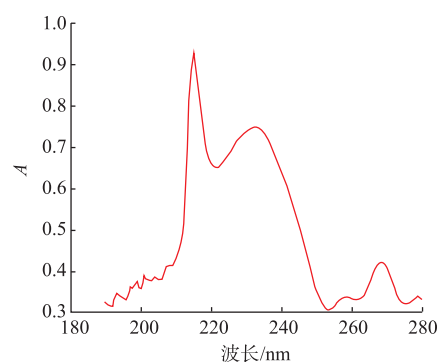
## 2 结果与分析

### 2.1 CLA 及 LA 标品出峰时间的确定

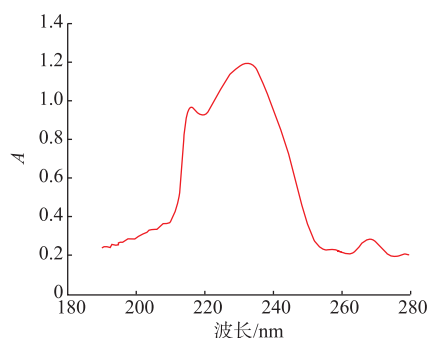
共轭双键在紫外光谱下存在特殊吸收峰,以此来判断检测样品中是否有 CLA 的存在。如图 1 所示,CLA 和 LA 的紫外吸收峰分别在 233 nm 和 214 nm 左右。将 LA 和 CLA 混合标准品进行检测,LA 和 CLA 的最大吸收峰依旧在 214 nm 和 233 nm 附近,说明 LA 和 CLA 的最大紫外吸收峰没有相互干扰。



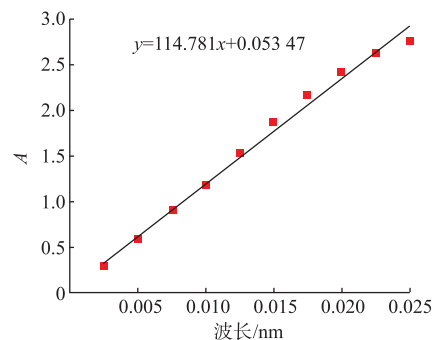
(a) CLA 标准品的紫外吸收光谱曲线



(b) LA 标准品的紫外吸收光谱曲线



(c) CLA 与 LA 混合标准品的紫外吸收光谱曲线



(d) CLA 质量浓度与吸光度标准曲线

图 1 CLA 及 LA 的紫外吸收峰及 CLA 标准曲线

Fig. 1 UV absorption peaks and CLA standard curves of CLA and LA

### 2.2 CLA 标准曲线分析

样品中 CLA 质量浓度和紫外吸光度成正比,分



别测定 2.5、5.0、7.5、10.0、12.5、15.0、17.5、20.0、22.5、25.0 g/L 下 CLA 标准品的紫外吸光度,如图 1(d)所示,得到标准曲线方程为  $y=114.781x+0.05347$ ,  $R^2=0.99294$ ,可以看出吸光度与 CLA 的质量浓度呈线性关系,即可以通过此标准曲线来计算样品中 CLA 的质量浓度。

### 2.3 高产 CLA 乳酸菌的筛选

将初筛得到的 8 株乳酸菌进行产 CLA 的复筛,共得到 6 株产 CLA 的乳酸菌,结果如表 1 所示。其中 ZFM804 和 ZFM806 具有较高的产 CLA 能力,ZFM804 的 CLA 产量最高,为 21.7 mg/L。这与文献报道的某些植物乳杆菌具备产 CLA 能力的结果一致<sup>[17]</sup>。因此,选用 ZFM804 进行后续益生特性研究。

### 2.4 CLA 构型分析

采用气相色谱法对 ZFM804 所产 CLA 的构型进行测定,结果见图 2(a),*t*10,*c*12-CLA、*c*9,*t*11-CLA 标准品的出峰时间分别为 41.56 min、42.87 min。同时在 ZFM804 的发酵液中检测到 41.55 min 和

表 1 筛选产 CLA 的乳酸菌

Table 1 Screening lactic acid bacteria producing CLA

菌株名称	吸光度	CLA 质量浓度 / (mg/L)
ZFM801	1.538	12.9
ZFM802	—	—
ZFM803	1.203	10.0
ZFM804	2.541	21.7
ZFM805	1.386	11.6
ZFM806	2.037	17.3
ZFM810	1.261	10.5
ZFM819	—	—

42.86 min 处有两个峰,见图 2 (b)。可判断出 ZFM804 所产 CLA 含有 *c*9,*t*11-CLA、*t*10,*c*12-CLA 两种异构体。并且,Qi 等对 CLA 进行探究发现,CLA 的构型主要为 *c*9,*t*11-CLA、*t*10,*c*12-CLA<sup>[18]</sup>。另外,CLA 的质谱结果表明,*t*10,*c*12-CLA 与 *c*9,*t*11-CLA 两种异构体并无显著差异,见图 2(c)和 2(d)。

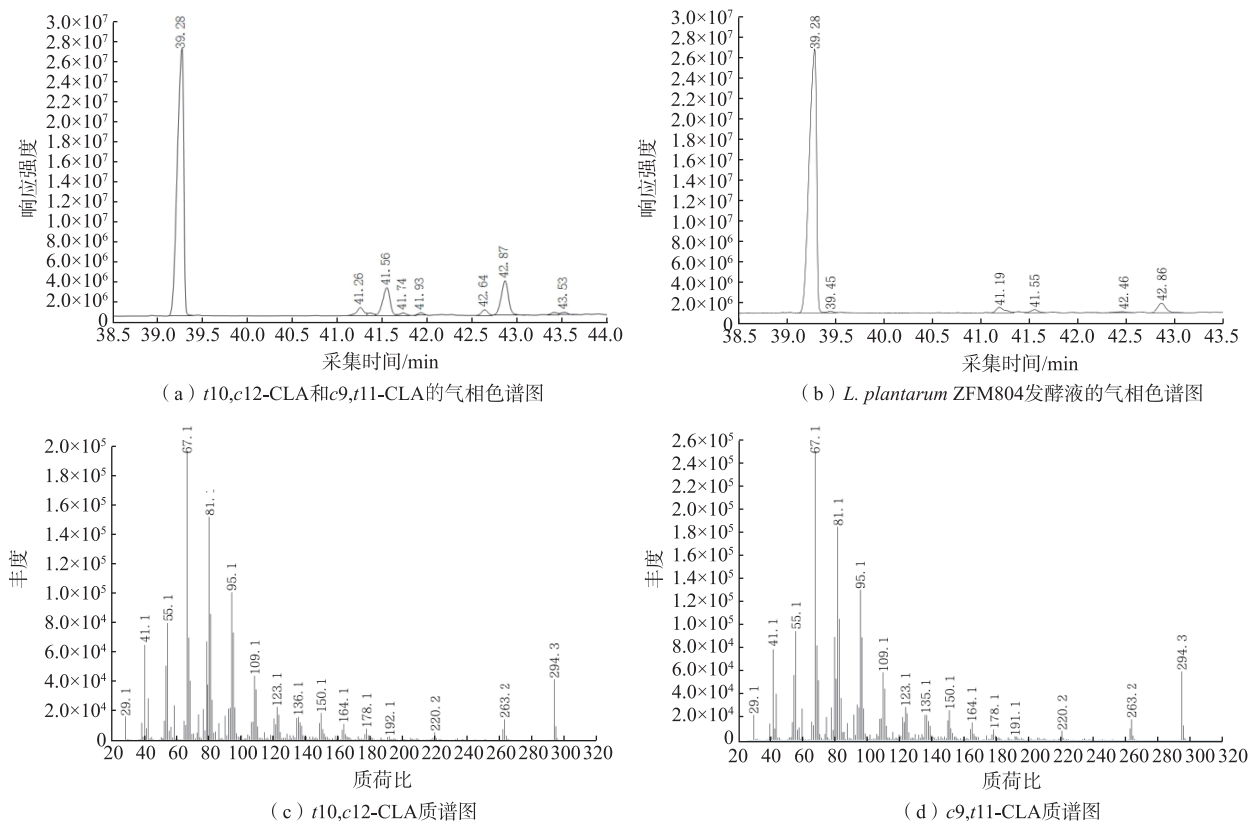


图 2 *L. plantarum* ZFM804 发酵液气相色谱及 CLA 质谱分析

Fig. 2 *L. plantarum* ZFM804 fermentation liquid GC and CLA standard mass spectrometry analysis

## 2.5 高产 CLA 乳酸菌的耐受性

**2.5.1 菌株耐渗透压性能分析** 微生物能否在胃肠道中存活,渗透压耐受性是关键评价指标之一<sup>[19]</sup>。乳酸菌在进入人体胃部时,会与大量的食物混合在一起,而食物中含有一定盐分,乳酸菌细胞要存活下去就必须克服这种高渗透压环境。同样在食品发酵生产中,很多情况都需要抵抗高盐生长环境,因此能够耐受高渗透压的乳酸菌才具有开发利用的价值。

如图 3(a)可知,ZFM804 菌株存活率随 NaCl 质量分数的增加显著降低( $P<0.05$ )。当 NaCl 质量分数为 4%时,菌株存活率最高为 92.46%。有研究指出,乳酸菌能够适应平稳的渗透压变化,但渗透压的突然增大或减小都抑制微生物的生长,甚至导致死亡<sup>[20]</sup>。于晨等对 *Lactobacillus plantarum* 的益生特性进行探究发现,*Lactobacillus plantarum* 随着 NaCl 质量分数的增大而降低,其中在 NaCl 质量分数为 6%时,其存活率最大<sup>[21]</sup>,与本研究结果相似。

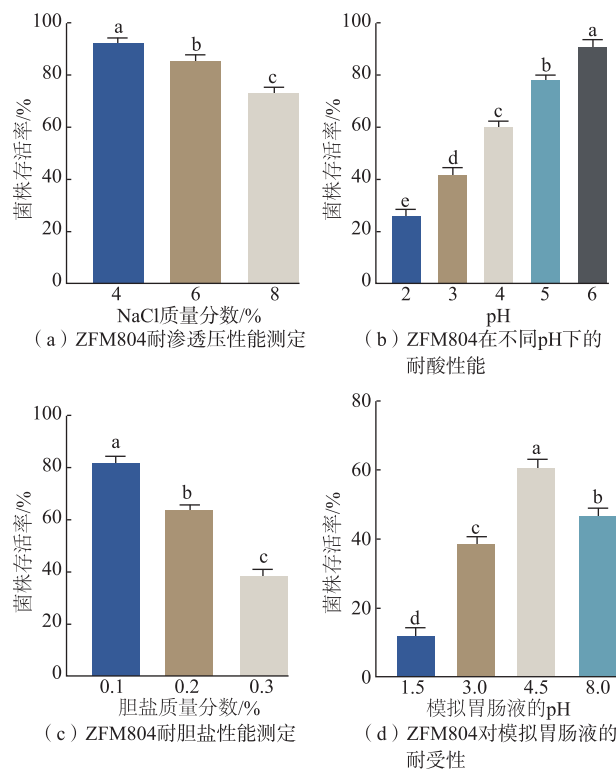
**2.5.2 菌株耐酸性能分析** 乳酸菌发酵过程中的主要代谢产物为乳酸<sup>[22]</sup>,可降低周围生长环境的 pH,是保证本身生长的基本条件,同时乳酸菌的耐酸性也是检验其益生潜力的重要标准之一。

如图 3(b)所示,ZFM804 的存活率随 pH 的升高显著升高( $P<0.05$ )。pH 为 2 时,乳酸菌 4 h 存活率达到 20%以上;pH 为 3 时,4 h 存活率达 40%以上。

**2.5.3 菌株耐胆盐性能分析** 胆盐是由人及动物体内肝脏细胞分泌的胆汁酸类物质与甘氨酸或牛磺酸结合形成的钠钾盐,经胆汁分泌到小肠,促进食物消化吸收。乳酸菌进入小肠后,会受到高浓度胆盐的胁迫,因此研究益生菌的耐胆盐能力具有重要意义<sup>[23-24]</sup>。

如图 3(c)所示,ZFM804 的存活率随胆盐质量分数的增加而显著降低( $P<0.05$ ),在胆盐质量分数为 0.1%的条件下处理 4 h,其存活率最高,为 82.33%;当胆盐质量分数为 0.2%和 0.3%时,ZFM804 在胆盐处理 4 h 条件下的存活率均显著降低,分别为 64.21%和 39.37%。杨旭洲等对 5 株乳酸菌的胆盐耐受性进行了研究,发现随着胆盐质量分数的增加,乳酸菌的存活率均受到不同程度抑制,且胆盐质量分数为 0.1%和 0.2%时,其存活率为 45.22%和 33.35%。该研究中 ZFM804 在胆盐质量分数为 0.3%时仍有 39%的存活率,说明 ZFM804 具有较强的耐胆盐能力<sup>[25]</sup>。

**2.5.4 菌株对模拟胃肠液的耐受性能分析** 一般人的胃液 pH 为 1.5~4.5,肠液 pH 为 7~8,且其 pH 因摄入食物不同而波动。乳酸菌经过胃消化后还必须经过小肠的消化转运才能到达目的地定植,并且增殖到一定数量才能有效发挥其益生功能。因此进一步对 ZFM804 在模拟胃肠液环境中的耐受性进行研究。由图 3(d)可知,在 pH 为 1.5 的模拟胃液中,ZFM804 的存活率低于 20%,而 pH 为 3.0~4.5 时,表现出较高的存活率,其存活率最高达 61%,表明 ZFM804 在模拟胃液中具有较好的存活率。在 pH 为 8 的模拟肠液中,仍具有较高的存活率,为 47%。综上所述,ZFM804 在模拟胃肠液中具有较好的存活率,具有发挥其益生特性的潜力。



图中不同字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

图3 *L. plantarum* ZFM804 的耐受性测定

Fig. 3 Tolerability assay of *L. plantarum* ZFM804

## 2.6 乳酸菌的自凝集能力

菌株的自凝集是指同一种菌株之间相互凝集形成多细胞簇现象。菌体的黏附能力与其表面凝集能力也呈正相关关系。

由表 2 可知,ZFM804 的自凝集能力与时间呈线性关系。且不同处理时间下菌株自凝集能力之间存在显著差异( $P<0.05$ )。其中,在 5 h 时,自凝集率

最高为(36.78±0.91)%。Saini 等探究食品来源的乳杆菌的益生潜力时发现,乳杆菌的自凝集能力随时间增加而增高<sup>[26]</sup>,与该研究结论一致。因此,ZFM804 因其良好的自凝集能力,可以更好地发挥益生性能<sup>[27]</sup>。

表 2 ZFM804 在不同时间下的自凝集率

Table 2 Self-aggregation rate of ZFM804 at different time periods

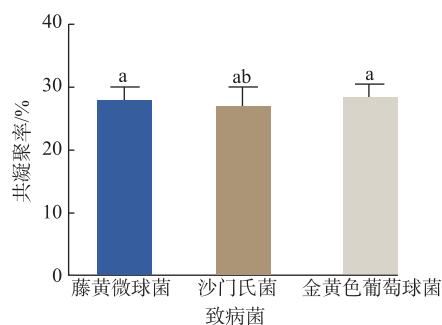
时间/h	自凝集率/%
1	9.81±1.21 <sup>c</sup>
2	15.44±0.72 <sup>d</sup>
3	23.36±0.64 <sup>c</sup>
4	30.53±1.31 <sup>b</sup>
5	36.78±0.91 <sup>a</sup>

注:表中不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

## 2.7 乳酸菌与致病菌共凝聚能力测定结果

共凝聚是具有特定遗传性状的细菌之间通过特殊分子黏附起来的过程,乳酸菌的凝集现象对致病菌在肠道中的黏附和定植起到阻碍作用,而菌株对致病菌的凝集可以使致病菌更易从肠道中排出。

由图 4 可知,ZFM804 对藤黄微球菌、肠炎沙门氏菌以及金黄色葡萄球菌等致病菌均具有较高的共凝聚能力,且对各致病菌的共凝聚能力之间存在差异,其中对金黄色葡萄球菌显示出较强的共凝聚能力,共凝聚率为 28.51%。综上,ZFM804 对致病菌均具有较强的共凝聚能力。



图中不同字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

图 4 *L. plantarum* ZFM804 与致病菌共凝聚能力

Fig. 4 Co-coagulation ability of *L. plantarum* ZFM804 with pathogenic bacteria

## 参考文献:

- [1] 杨波. 乳酸菌生物转化共轭亚油酸的研究[D]. 无锡:江南大学,2014.
- [2] MUHLENBECK J A, OLSON J M, HUGHES A B, et al. Conjugated linoleic acid isomers *trans*-10, *Cis*-12 and *Cis*-9, *trans*-11 prevent collagen-induced arthritis in a direct comparison[J]. *Lipids*, 2018, 53(7): 689-698.

## 2.8 高产 CLA 乳酸菌的抑菌能力

乳酸菌的自身代谢产物复杂多样,且很多代谢物质具有很好的抑菌性能,因此其抑制病原菌生长的效果常作为益生菌益生特性的评价指标。

选取 4 株常见指示菌,进一步测定 ZFM804 对不同致病菌的抑制效果(见表 3)。结果表明,ZFM804 对不同的致病菌均有一定的抑制作用,其中藤黄微球菌、金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径较大,均达到 20 mm 以上,这可能是因为 ZFM804 产生的酶类、有机酸和细菌素等代谢产物可抑制病原菌的生长,从而起到抑菌作用<sup>[28-29]</sup>。

表 3 ZFM804 的抑菌效果

Table 3 Antibacterial effect of ZFM804

菌名	抑菌圈直径/mm
大肠杆菌	19.20±0.21
肠炎沙门氏菌	16.61±0.15
藤黄微球菌	23.47±0.20
金黄色葡萄球菌	20.54±0.45

## 3 结 语

作者以发酵食品中分离的 8 株乳酸菌为研究对象,从中筛选出转化共轭亚油酸能力强的乳酸菌,并对所筛选的菌株进行体外益生特性评价。结果表明,ZFM801、ZFM803、ZFM804、ZFM805、ZFM806、ZFM810 这 6 株乳酸菌均具有产 CLA 的能力,其中 ZFM804 转化 CLA 能力最高,其产量高达 21.7 mg/L。经气相色谱鉴定出 ZFM804 产生的 CLA 异构体主要为 *c*9, *t*11-CLA、*t*10, *c*12-CLA。另外,高产 CLA 菌株 ZFM804 具有良好的自凝集和共凝聚能力,表明其可以有效地黏附在肠道及致病菌上。此外,ZFM804 还具有良好的耐渗透压、耐酸、耐胆盐及胃肠道耐受性,并对藤黄微球菌、金黄色葡萄球菌具有良好的抑菌能力。因此,作者筛选出的 ZFM804 可作为一种潜在的高产 CLA 的益生菌,为其在食品中的进一步应用提供了理论依据。

- [ 3 ] DEN HARTIGH L J. Conjugated linoleic acid effects on cancer, obesity, and atherosclerosis: a review of pre-clinical and human trials with current perspectives[J]. **Nutrients**, 2019, 11(2): 370.
- [ 4 ] PENG M F, TABASHUM Z, PATEL P, et al. Prevention of enteric bacterial infections and modulation of gut microbiota with conjugated linoleic acids producing *Lactobacillus* in mice[J]. **Gut Microbes**, 2020, 11(3): 433-452.
- [ 5 ] GHOLAMI Z, KHOSRAVI-DARANI K. An overview of conjugated linoleic acid: microbial production and application[J]. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, 2014, 14(9): 734-746.
- [ 6 ] 袁高峰, 孙海燕, 李铎. 植物种子共轭亚麻酸含量分析[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2011, 37(3): 326-331.  
YUAN G F, SUN H Y, LI D. Analysis of conjugated linolenic acid from plant seeds[J]. **Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences)**, 2011, 37(3): 326-331. (in Chinese)
- [ 7 ] ZHANG X F, GUAN X X, TANG Y J, et al. Clinical effects and gut microbiota changes of using probiotics, prebiotics or synbiotics in inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis[J]. **European Journal of Nutrition**, 2021, 60(5): 2877.
- [ 8 ] ZOUMPOPOULOU G, POT B, TSAKALIDOU E, et al. Dairy probiotics: beyond the role of promoting gut and immune health[J]. **International Dairy Journal**, 2017, 67: 46-60.
- [ 9 ] 刘瑞芳, 赵华, 史红娟, 等. 益生菌与 2 型糖尿病心血管疾病的研究进展[J]. 医学信息, 2019, 32(18): 29-31.  
LIU R F, ZHAO H, SHI H J, et al. Advances in research on probiotics and cardiovascular diseases in type 2 diabetes[J]. **Medical Information**, 2019, 32(18): 29-31. (in Chinese)
- [ 10 ] LY N P, LITONJUA A, GOLD D R, et al. Gut microbiota, probiotics, and vitamin D: interrelated exposures influencing allergy, asthma, and obesity?[J]. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 2011, 127(5): 1087-1094.
- [ 11 ] WANG Y, ZHANG C, LIU F, et al. Ecological succession and functional characteristics of lactic acid bacteria in traditional fermented foods[J]. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2023, 63(22): 5841-5855.
- [ 12 ] 时旭, 刘瑛, 史海粟, 等. 定向进化植物乳杆菌和痤疮丙酸杆菌高产共轭亚油酸[J]. 食品科学, 2021, 42(12): 99-106.  
SHI X, LIU Y, SHI H S, et al. Directed evolution of *Lactobacillus plantarum* and *Propionibacterium acnes* for increased production of conjugated linoleic acid[J]. **Food Science**, 2021, 42(12): 99-106. (in Chinese)
- [ 13 ] 赵微, 张峰, 张和平, 等. 植物乳杆菌 p-8 转化亚油酸为共轭亚油酸的分析[J]. 食品科学, 2021, 42(10): 94-103.  
ZHAO W, ZHANG F, ZHANG H P, et al. Conversion of linoleic acid to conjugated linoleic acid by *Lactobacillus plantarum* p-8[J]. **Food Science**, 2021, 42(10): 94-103. (in Chinese)
- [ 14 ] MOUSSAID S, EL ALAOU M A, OUNINE K, et al. *In-vitro* evaluation of the probiotic potential and the fermentation profile of *Pediococcus* and *Enterococcus* strains isolated from Moroccan camel milk[J]. **Archives of Microbiology**, 2023, 205(4): 144.
- [ 15 ] REUBEN R C, ROY P C, SARKAR S L, et al. Isolation, characterization, and assessment of lactic acid bacteria toward their selection as poultry probiotics[J]. **BMC Microbiology**, 2019, 19(1): 253.
- [ 16 ] ARMAS F, CAMPERIO C, MARIANELLI C. *In vitro* assessment of the probiotic potential of *Lactococcus lactis* LMG 7930 against ruminant mastitis-causing pathogens[J]. **PLOS One**, 2017, 12(1): e0169543.
- [ 17 ] PALACHUM W, CHOORIT W, CHISTI Y. Accumulation of conjugated linoleic acid in *Lactobacillus plantarum* WU-P19 is enhanced by induction with linoleic acid and chitosan treatment[J]. **Annals of Microbiology**, 2018, 68(10): 611-624.
- [ 18 ] QI X L, WANG J, YUE H Y, et al. *Trans*10, *cis*12-conjugated linoleic acid exhibits a stronger antioxidant capacity than *cis*9, *trans*11-conjugated linoleic acid in primary cultures of laying hen hepatocytes[J]. **Poultry Science**, 2018, 97(12): 4415-4424.
- [ 19 ] 朱建宁, 曹磊, 文鹏程, 等. 牦牛曲拉源乳酸菌的耐受性与抑菌性能比较[J]. 食品工业科技, 2020, 41(7): 115-120.  
ZHU J N, CAO L, WEN P C, et al. Comparison of tolerance and antibacterial activity of lactic acid bacteria from yak qula[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2020, 41(7): 115-120. (in Chinese)
- [ 20 ] 王娟, 赵湘涛. 两株乳酸菌的耐受特性分析与研究[J]. 中国酿造, 2013, 32(11): 87-90.  
WANG X, ZHAO X T. Analysis and study on the tolerance property of two lactic acid bacteria[J]. **China Brewing**, 2013, 32(11): 87-90. (in Chinese)



- [21] 于晨,杨露,管峰,等. 抑制副溶血性弧菌的乳酸菌筛选鉴定及其生物学特性研究[J]. 食品与机械,2023,39(6):12-18.  
YU C, YANG L, GUAN F, et al. Screening, identification and biological characteristics of lactic acid bacteria inhibiting *Vibrio parahaemolyticus*[J]. **Food & Machinery**, 2023, 39(6):12-18. (in Chinese)
- [22] 赵崔雨,吴子健,李树森,等. 益生菌发酵乳辅助调节机体健康的研究进展[J]. 食品与机械,2023,39(6):210-218.  
ZHAO C Y, WU Z J, LI S S, et al. Research advances on the functions of probiotic fermented milk in regulating body health[J]. **Food & Machinery**, 2023, 39(6):210-218. (in Chinese)
- [23] 赵小茜,魏旭丹,陈戴玲,等. 乳酸菌耐酸耐胆盐机制研究进展[J]. 乳业科学与技术,2017,40(3):33-36.  
ZHAO X Q, WEI X D, CHEN D L, et al. A review on the mechanism of acid and bile salt resistance of lactic acid bacteria[J]. **Journal of Dairy Science and Technology**, 2017, 40(3):33-36. (in Chinese)
- [24] 冯秀娟,左芳雷,陈丽丽,等. 乳酸菌耐酸耐胆盐分析与胆盐水解酶研究[J]. 中国食品学报,2013,13(11):139-147.  
FENG X J, ZUO F L, CHEN L L, et al. Analysis of acid and bile salt tolerance and study on bile salt hydrolase in lactic acid bacteria[J]. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**, 2013, 13(11):139-147. (in Chinese)
- [25] 杨旭洲,陈佩瑶,张富新. 抗氧化乳酸菌的筛选及其益生特性评价[J]. 食品与发酵工业,2023,49(10):17-23.  
YANG X Z, CHEN P Y, ZHANG F X. Screening of antioxidant lactic acid bacteria and evaluation of their probiotic properties[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2023, 49(10):17-23. (in Chinese)
- [26] SAINI K, TOMAR S K. *In vitro* evaluation of probiotic potential of *Lactobacillus* cultures of human origin capable of selenium bioaccumulation[J]. **LWT-Food Science and Technology**, 2017, 84:497-504.
- [27] 龚虹,王海霞,马征途,等. 乳酸菌黏附力与生物膜、疏水性和自凝集特性的研究[J]. 中国微生态学杂志,2016,28(9):1026-1028.  
GONG H, WANG H X, MA Z T, et al. Biofilm hydrophobicity and auto-agglutination properties of five *Lactobacillus* strains[J]. **Chinese Journal of Microecology**, 2016, 28(9):1026-1028. (in Chinese)
- [28] KORPELA K, SALONEN A, VEPSÄLÄNEN O, et al. Probiotic supplementation restores normal microbiota composition and function in antibiotic-treated and in caesarean-born infants[J]. **Microbiome**, 2018, 6(1):182.
- [29] PRABHURAJESHWAR C, CHANDRAKANTH R K. Probiotic potential of *Lactobacilli* with antagonistic activity against pathogenic strains: an *in vitro* validation for the production of inhibitory substances[J]. **Biomedical Journal**, 2017, 40(5):270-283.