

宋小玲, 高冀婷, 曹菲薇, 等. 产 ACE 抑制肽乳酸菌的筛选、益生特性评定及应用 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(10): 149–157. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080212

SONG Xiaoling, GAO Jiting, CAO Feiwei, et al. Screening, Probiotic Properties Evaluation and Application of ACE-inhibitory Peptide-producing Lactic Acid Bacteria[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(10): 149–157. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080212

· 生物工程 ·

产 ACE 抑制肽乳酸菌的筛选、益生特性 评定及应用

宋小玲, 高冀婷, 曹菲薇, 胡子毅, 任大喜*

(浙江大学动物科学学院, 奶业科学研究所, 浙江杭州 310058)

摘要:目的: 筛选出富产血管紧张素转化酶 (Angiotensin converting enzyme, ACE) 抑制肽的乳酸菌并评定其益生特性。方法: 依据蛋白水解度及 ACE 抑制率对乳酸菌进行初筛, 然后依据模拟胃肠消化后的 ACE 抑制率最终筛出 2 株乳酸菌 ZJUIDS09 和 ZJUIDS11, 进一步评价其耐酸、耐胆盐、抗生素耐药性和抑菌活性等益生特性, 最后评定两菌株对荷斯坦脱脂乳、荷斯坦乳清、水牛脱脂乳和水牛乳清发酵后产物 ACE 抑制率。结果: 筛选出菌株 ZJUIDS09 和 ZJUIDS11, 其发酵乳的蛋白水解度分别为 $5.79\% \pm 0.14\%$ 和 $5.75\% \pm 0.10\%$, ACE 抑制率分别为 $87.39\% \pm 2.44\%$ 和 $90.41\% \pm 0.99\%$, IC_{50} 值分别为 0.31 和 0.25 mg/mL, 经人工胃肠液消化后 ACE 抑制率分别为 $70.13\% \pm 0.15\%$ 和 $76.39\% \pm 2.91\%$ 。菌株 ZJUIDS09 和 ZJUIDS11 都具有良好的耐酸耐胆盐、抗菌和抗生素敏感性, 经 16S rDNA 鉴定分别为罗伊氏乳杆菌 (*Lactobacillus reuteri*) 和瑞士乳杆菌 (*Lactobacillus helveticus*)。通过对比同一蛋白浓度下不同底物 (荷斯坦脱脂乳、荷斯坦乳清、水牛脱脂乳和水牛乳清) 经菌株发酵后的 ACE 抑制率, 确定菌株 ZJUIDS09 和 ZJUIDS11 的最佳发酵底物为荷斯坦脱脂乳。结论: 本研究筛选的罗伊氏乳杆菌 ZJUIDS09 和瑞士乳杆菌 ZJUIDS11 有较强的产 ACE 抑制肽能力, 具有开发降血压功能发酵乳制品的潜力。

关键词: 乳酸菌, 血管紧张素转化酶抑制肽, 胃肠道环境, 益生特性, 发酵底物

中图分类号: Q939.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)10-0149-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080212



本文网刊:

Screening, Probiotic Properties Evaluation and Application of ACE-inhibitory Peptide-producing Lactic Acid Bacteria

SONG Xiaoling, GAO Jiting, CAO Feiwei, HU Ziyi, REN Daxi*

(Institute of Dairy Science, College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: Objectives: To screen lactic acid bacteria (LAB) produced angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides and to evaluate their probiotic properties. Methods: Lactic acid bacteria were inoculated into skimmed milk, the proteolysis degree and ACE inhibition rate of fermented milk were determined by colorimetric assays. Two LAB (ZJUIDS09 and ZJUIDS11) that resulted in the highest proteolysis degree and ACE inhibition rate were selected, and their probiotic properties were evaluated, including acid resistance, bile salt resistance, antibiotic resistance, and antibacterial activity. The fermented milk produced by the two strains was treated with simulated gastrointestinal digestive juices, and their ACE inhibition rates were determined. Finally, the two strains were used as starter cultures in the fermentation of Holstein skim milk, Holstein whey, buffalo skim milk and buffalo whey, and the ACE inhibition rates of the fermented milk were determined. Results: The degrees of proteolysis of fermented milk produced by strain ZJUIDS09 and ZJUIDS11 were $5.79\% \pm 0.14\%$ and $5.75\% \pm 0.10\%$, respectively. Their ACE inhibition rates were $87.39\% \pm 2.44\%$ and $90.41\% \pm 0.99\%$, respectively. And their IC_{50} were 0.31 and 0.25 mg/mL, respectively. Their ACE inhibition rates after digestion with

收稿日期: 2021-08-20

基金项目: 浙江省重点研发计划 (2019C02091); 广西省重点研发计划 (AB1850017)。

作者简介: 宋小玲 (1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 乳酸菌筛选及应用, E-mail: 1021747575@qq.com。

* 通信作者: 任大喜 (1983-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 营养与乳品加工, E-mail: dxren@zju.edu.cn。

simulated gastrointestinal juices were decreased to $70.13\% \pm 0.15\%$ and $76.39\% \pm 2.91\%$, respectively. Strains ZJUIDS09 and ZJUIDS11 were resistant to acid and bile salt, exhibited antibacterial activity and antibiotic sensitivity, and were identified as *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus helveticus* by 16S rDNA. Comparing Holstein skim milk, Holstein whey, Buffalo skim milk and Buffalo whey after strain fermentation, Holstein skim milk was the most suitable substrates for strains ZJUIDS09 and ZJUIDS11 to produce ACE-inhibitory peptides. Conclusion: *Lactobacillus reuteri* ZJUIDS09 and *Lactobacillus helveticus* ZJUIDS11 screened in this study had a strong ability to produce ACE inhibitory peptides and had the potential to develop fermented dairy products with blood pressure-lowering effect.

Key words: lactic acid bacteria; angiotensin converting enzyme inhibitory peptide; gastrointestinal environment; probiotic properties; fermentation substrate

高血压是引起心脑血管疾病和中风的重要危险因素之一^[1]。近年来,高血压人群在全球范围内持续增加^[2]。中国高血压调查发现,2018 年我国成人的高血压患病人数达 2.45 亿,且患者越来越年轻化^[3-4]。血管紧张素转化酶(Angiotensin converting enzyme, ACE)在血压调节方面起着重要作用,可以将血管紧张素 I(Ang I)转化为具有收缩血管功能的血管紧张素 II,还可以将具有血管舒张作用的缓激肽水解成失活片段^[5]。血管紧张素转化酶抑制剂是治疗高血压最常用的药物之一^[6-7],尽管药物疗法是最广泛用于治疗高血压的方法,但长期使用具有继发性副作用。发酵乳被推荐作为高血压的非药物疗法,主要因为它基本无副作用。发酵乳的降压效果^[8-9]主要归因于乳蛋白中的 ACE 抑制肽(ACEI 肽),这些肽可以在特定乳酸菌发酵或胃肠消化过程中被释放出来,通过抑制 ACE 活性来引起血管扩张反应,从而降低血压。

关于 ACEI 肽研究最多的是乳酸杆菌菌株^[10-11],例如 *Lb. helveticus*、*Lb. casei*、*Lb. paracasei*、*Lb. fermentum*、*Lb. plantarum*、*Lb. rhamnosus* 等,其中以瑞士乳杆菌(*Lb. helveticus*)最多。研究最多的 ACEI 肽^[12]是在瑞士乳杆菌发酵乳中发现的 VPP 和 IPP,在几种大鼠模型和人体研究中都显示出降血压效果。目前市面上的降血压发酵乳^[13-14]基本都是国外的,芬兰和日本研发的降血压发酵乳对高血压的治疗有显著效果,知名度较高。虽然市面上存在具有降血压作用的商业发酵乳,但品种稀缺,且大多数基于瑞士乳杆菌。

研究表明乳酸菌的细胞壁蛋白酶负责生产 ACEI 肽,细胞壁蛋白酶可以将乳蛋白分解成寡肽并将其用作营养来源,乳酸菌的细胞壁蛋白酶活性、蛋白水解系统和菌株活性是生产降压肽的基础。酶的特异性决定了释放肽的序列,每个菌株的酶有特异性^[15],具有富产 ACEI 肽潜力的乳酸菌是开发降血压发酵乳的前提。因此,筛选具有富产 ACEI 肽的新型乳酸菌并开发含有新型乳酸菌的功能性乳制品,对促进人体健康和满足人们对功能性食品的消费需求意义重大。本研究拟在实验室乳酸菌库中,筛选出具有自主知识产权的富产 ACE 抑制肽的乳酸菌,为后续动物试验、临床研究、降压发酵乳及乳制品的开发提供菌株和科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

实验菌株:本实验室筛选的菌株来自内蒙及川藏地区酸奶汤、鲜奶、奶疙瘩、手工酸奶及浙江新生儿粪便等分离到的遗传稳定性优良的 30 多株菌;指示菌株:大肠杆菌 O157:H7(*Escherichia coli* O157:H7) ATCC 25922、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*) ATCC 13311 美国典型培养物保藏中心;单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*) CMCC 54007、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) CMCC 26003 中国医学细菌保藏管理中心;胆盐、MRS 肉汤培养基、琼脂培养基 北京陆桥技术股份有限公司;脱脂乳粉 新西兰恒天然有限公司;水牛乳 广西水牛研究所牧场;FAPGG 底物、ACE(来自兔肺,酶活 0.1 UN)、胃蛋白酶(1:3000)和胰蛋白酶(1:250) Sigma 公司;BCA 蛋白试剂盒 上海源叶生物科技有限公司;HEPES(4-羟乙基哌嗪乙磺酸) 阿拉丁(上海)有限公司;抗生素药敏试纸 杭州微生物试剂有限公司;其他试剂 均为国产分析纯。

SpectraMax M5 多功能酶标仪 上海道尚生物科技有限公司;3-30K 低温高速离心机 德国 Christ 公司;FE20 实验室 pH 计 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;TGL-16M 高速台式冷冻离心机 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;ES-315 高压灭菌锅 日本 TOMY 公司;BD-305E 变温冷冻冻藏箱 浙江星星冷链集成股份有限公司;SW-CJ-IF 超净工作台 苏州安泰空气技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 发酵乳制备 取出实验室乳酸菌库中保藏的菌株,在 MRS 固体培养基上活化三代,取单菌落接于 MRS 液体培养基中 37 °C 培养 20 h 后取出,用 PBS 将菌株浓度调至 10^8 CFU/mL,按照 3%(v/v)的接种量接种到灭菌脱脂乳(11%,w/v)中,37 °C 培养 48 h 后取出,-20 °C 冰箱放置,待进一步分析。

1.2.2 蛋白水解度测定 蛋白水解度的测定参考罗艳华等^[16]的方法。以丝氨酸为标准溶液,采用 OPA 法测定样品在 340 nm 处的吸光值,通过公式计算蛋白水解度(DH)。称取 0.01 g 丝氨酸于 100 mL 容量

瓶中定容,使其浓度为 1 mmol/L,再加超纯水稀释至 0、0.2、0.4、0.6、0.7、0.8、0.9 mmol/L,配制成丝氨酸标准溶液,向 96 孔板中加入 20 μ L 丝氨酸标准溶液和 150 μ L OPA 溶液混合,静置 2 min 后读取 340 nm 的吸光值(标准曲线方程为 $y=0.5746x+0.0178$, $R^2=0.9935$)。将发酵乳稀释 20 倍后,取 20 μ L 样品与 150 μ L OPA 溶液混合,静置 2 min 后读取 340 nm 的吸光值,计算公式如下:

$$W_{\text{serineNH}_2} = C \times \frac{V \times N}{X \times P} \quad \text{式 (1)}$$

$$h = \frac{(W_{\text{serineNH}_2} - \beta)}{\alpha} \quad \text{式 (2)}$$

$$\text{DH}(\%) = \frac{h}{h_{\text{tot}}} \times 100 \quad \text{式 (3)}$$

式中: W_{serineNH_2} 表示每克蛋白质含丝氨酸的量, mmol/g; C 表示样品 OD 值相对应于标曲中丝氨酸的浓度, mol/L; V 表示样品体积, L; N 表示稀释倍数; X 表示样品质量, g; h 表示每克蛋白因水解被断裂的肽键数, mmol/g; h_{tot} 表示每克蛋白所含的肽键毫摩尔数, mmol/g; 乳蛋白的 α 值为 1.0, β 值为 0.4。

1.2.3 ACE 抑制率测定 发酵乳清的制备: 将发酵乳 pH 调至 4.6, 8000 $\times$ g 离心 10 min 取上清液, 再将上清液 pH 调至 8.3, 8000 $\times$ g 离心 10 min 取上清液得发酵乳清。

HEPES 缓冲液: pH8.3, 80 mmol/L HEPES 缓冲液(含 30 mmol/L 的 NaCl); FAPGG 溶液: 取 FAPGG 粉末加入到 HEPES 缓冲液中, 配制成 1.0 mmol/L 的 FAPGG 溶液; ACE 溶液: 取 ACE 固体加入到 HEPES 缓冲液中, 配制成 0.1 U/mL 的 ACE 溶液。

ACE 抑制率的测定方法参考罗鹏^[17]和 Memarpoor 等^[18]并略作修改。以 FAPGG 底物法测定发酵乳清的 ACE 抑制率。取 40 μ L 样品和 50 μ L 的 FAPGG 混合均匀, 最后加入 10 μ L 的 ACE 溶液, 利用酶标仪测定 OD_{340} 数值的前后变化来代表 ACE 酶活性。空白对照采用 HEPES 缓冲液(40 μ L), 其余测定同上。抑制率可用公式表示:

$$\text{ACE抑制率}(\%) = \frac{\Delta B - \Delta A}{\Delta B} \times 100 \quad \text{式 (4)}$$

式中: ΔA 为空白对照组在 0~40 min 内吸光值的变化; ΔB 为实验组(ACE 抑制剂)在 0~40 min 时吸光值的变化。

IC₅₀ 测定: 将发酵乳清冻干, 取冻干粉加水复配成 30 mg/mL 溶液, 参照罗鹏^[17]测定溶液中多肽含量, 将样品溶液 8000 g 离心 10 min 保留上清液, 使用 10 kDa 超滤管对上清液进行超滤, 取超滤液借助 BCA 试剂盒测定其多肽含量(酶标仪法), 将样本溶液稀释至 6 个多肽浓度梯度 0.001、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/mL, 测定各浓度梯度下的 ACE 抑制率, 利用 Graph Pad Prism 8 软件计算样品的 IC₅₀ 值(IC₅₀ 定义为 ACE 抑制率达 50% 时所需的多肽浓

度)。

1.2.4 模拟胃肠消化 人工胃液和肠液参考 Lisson 等^[19]进行配制。取发酵乳 5 mL, 将发酵乳与人工胃液按 2:1(v/v)混合, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴振荡器中消化 2 h, 沸水浴加热 10 min 以终止反应, 取样测定其 ACE 抑制率; 胃蛋白酶消化后的样品按 1:1(v/v)的量与人工肠液混合, 在恒温水浴振荡器中消化 2 h, 沸水浴加热 10 min 以终止反应, 取样测定其 ACE 抑制率。

1.2.5 菌株 16S rRNA 鉴定 将筛选到的菌株送至生工生物工程(上海)有限公司进行测序, 将所得到的序列于 NCBI 数据库中通过 BLAST 进行同源性比较确定菌属。使用 MEGA 7.0 软件进行菌株系统发育树的构建。

1.2.6 益生特性评价

1.2.6.1 乳酸菌酸耐受性能测定 参考郑志瑶等^[20]的方法, 将乳酸菌(浓度约 10^8 CFU/mL)以 10%(v/v)接种量接于 pH 为 3.0 的 MRS 液体培养基中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养, 分别在 0、3 h 取菌液, 进行活菌计数, 计算酸耐受性:

$$\text{酸耐受率}(\%) = \frac{A_3}{A_0} \times 100 \quad \text{式 (5)}$$

式中: A_0 、 A_3 分别为待测菌株 0 和 3 h 的活菌数, CFU/mL。

1.2.6.2 乳酸菌胆盐耐受性能测定 参考郑志瑶等^[20]的方法, 将乳酸菌(浓度约 10^8 CFU/mL)以 10%(v/v)的接种量接于含 0.3% 牛胆盐(v/v)的 MRS 液体培养基中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养, 分别在 0、3 h 取菌液, 进行活菌计数, 计算胆盐耐受性:

$$\text{胆盐耐受率}(\%) = \frac{T_3}{T_0} \times 100 \quad \text{式 (6)}$$

式中: T_3 、 T_0 分别为待测菌株 0 和 3 h 的活菌数, CFU/mL。

1.2.6.3 乳酸菌的抑菌活性 参考梁竞一等^[21]的方法, 采用牛津杯法和琼脂扩散法测量菌株 ZJUIDS09 和 ZJUIDS11 代谢产物的抑菌活性。将已活化好的 4 种指示菌株(大肠杆菌、沙门氏菌、金黄葡萄球菌和单核细胞增生李斯特菌)的菌悬液浓度调至 10^8 CFU/mL, 按 1%(v/v)的量接种到 LB 琼脂培养基(50 $^{\circ}\text{C}$)中, 混合均匀后倒培养皿中(15 mL/皿), 冷凝后拔掉事先放置的无菌牛津杯, 将菌株 ZJUIDS09 和 ZJUIDS11 的代谢上清样品加入杯孔中(200 μ L/孔), 以未接乳酸菌的 MRS 肉汤作为空白对照, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养, 24 h 后测量抑菌圈直径。

1.2.6.4 乳酸菌的抗生素敏感性 参考梁竞一等^[21]的方法, 采用纸片扩散法^[22]测量菌株 ZJUIDS09 和 ZJUIDS11 的抗生素敏感性。分别取 100 μ L 菌株 ZJUIDS09 和 ZJUIDS11 的菌悬液(约 10^8 CFU/mL)于 MRS 固体培养基上, 涂布均匀, 然后放置抗生素

试纸,在 37 ℃ 下培养,24 h 后测量抑菌圈直径。

1.2.7 乳酸菌对不同发酵底物效果比较 将荷斯坦脱脂乳粉按 11% 浓度加水复配,调整 pH 至 4.6,8000×g 离心 10 min 保留上清液,调上清液 pH 至 7.0 得荷斯坦牛乳清;水牛乳由广西水牛所提供,将水牛乳 5000×g 离心 10 min 脱脂,然后调整 pH4.6,8000 ×g 离心 10 min 保留上清液,调上清液 pH 至 7.0 得水牛乳清。使用 BCA 试剂盒分别测定荷斯坦脱脂乳、荷斯坦乳清、水牛脱脂乳、水牛乳清的蛋白浓度。用超纯水将 4 种底物的蛋白浓度调整为同一浓度,将菌株 ZJUIDS09 和 ZJUIDS11 按 3%(v/v)的量接种到这 4 种底物中,37 ℃ 发酵 48 h,取样测定 ACE 抑制率。

1.3 数据处理

所有试验均重复 3 次。采用 Graph Pad Prism 8.0 软件进行非线性拟合得到回归曲线图;采用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析及显著性分析(one-way ANOVA 和 two-way ANOVA),使用 Tukey 进行多重比较,试验结果表示为平均值±标准偏差, $P<0.05$ 的差异被认为具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 产 ACE 抑制肽乳酸菌的初筛

对实验室保藏的 30 多株菌进行脱脂乳发酵实验,测定菌株的水解度在 2.74%~7.54% 之间,筛选出了 13 株水解能力最强的菌株($P<0.05$)用于后期研究,如图 1 所示。初筛得到的 13 种菌株,其蛋白水解度均在 5% 以上,其中菌株 ZJUIDS22 和 ZJUIDS13 的蛋白水解能力最强($P<0.05$),水解度分别达 7.54% 和 7.51%。

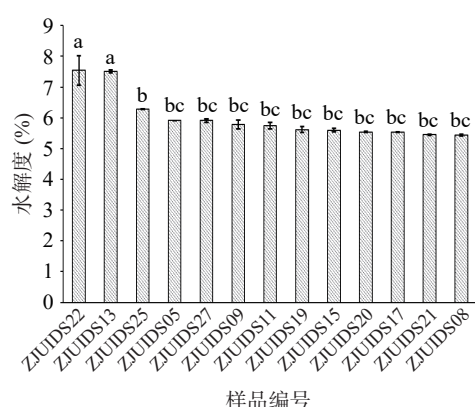


图 1 菌株发酵乳的蛋白水解度

Fig.1 Protein hydrolysis degree of fermented milk by different strains

注:不同小写字母表示差异显著, $P<0.05$;图 2、表 1 同。

2.2 产 ACE 抑制肽乳酸菌的复筛

对上述筛选到的 13 株水解能力较强的菌株进行发酵实验,测定 ACE 抑制率,所得结果见图 2。结果显示,抑制效果最好的是菌株 ZJUIDS11,其 ACE 抑制率达 90.41%。13 株乳酸菌中,有 6 株乳酸菌发

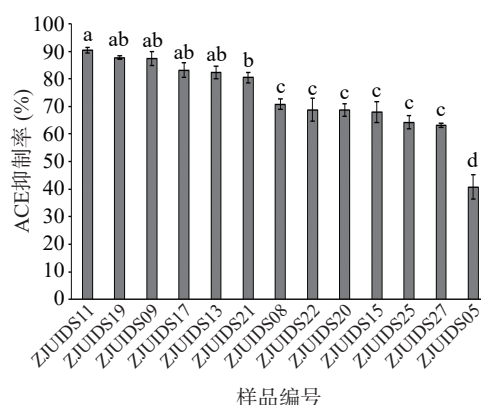


图 2 不同菌株发酵乳的 ACE 抑制率

Fig.2 ACE inhibition rate of fermented milk by different strains

酵乳的 ACE 抑制率显著高于其它株($P<0.05$),其 ACE 抑制率均在 80% 以上,筛选该 6 株菌用于后续的研究。

2.3 乳酸菌发酵乳在模拟胃肠液中 ACE 抑制率的变化

6 株菌的发酵乳经人工胃液和肠液消化后的 ACE 抑制率见图 3。6 种菌株发酵乳经胃蛋白酶和胰蛋白酶的水解作用后,ACE 抑制率全部下降,显著低于消化前($P<0.05$)。ZJUIDS09 发酵乳经胃液和肠液作用后,ACE 抑制率无显著性变化($P>0.05$);ZJUIDS11 发酵乳经胃液和肠液消化后 ACE 抑制率先降低后升高($P<0.05$);经人工肠液后,ZJUIDS09 和 ZJUIDS11 发酵乳的 ACE 抑制率分别达到了 70.13%±0.15% 和 76.39%±2.91%,显著高于其它 4 株菌($P<0.05$)。因此,经筛选得 ZJUIDS09 和 ZJUIDS11 为富产 ACE 抑制肽的最佳潜力菌株。

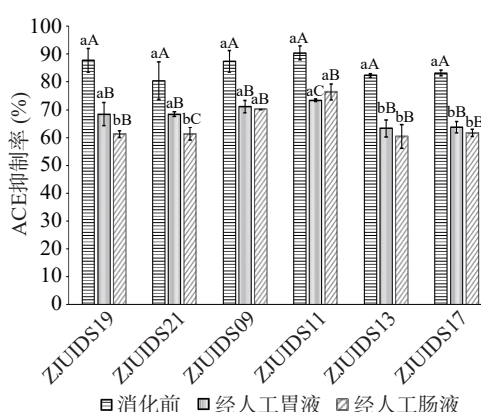


图 3 人工胃液和肠液对发酵乳 ACE 抑制率的影响

Fig.3 Effect of artificial gastric juice and intestinal juice on the ACE inhibition rate of fermented milk

注:不同大写字母表示同一消化阶段不同样品间差异显著, $P<0.05$;不同小写字母表示同一消化阶段不同样品间差异显著, $P<0.05$ 。

2.4 菌株的鉴定和系统发育树构建

经筛选后发现,菌株 ZJUIDS09 发酵乳的 ACE 抑制率为 87.39%±2.44%,菌株 ZJUIDS11 发酵乳的

ACE 抑制率为 $90.41\% \pm 0.99\%$, 两者都能耐受模拟消化环境。送样测定两株菌的 16S rDNA 序列, 将获测序结果进行 BLAST 序列比对。综合 16S rDNA 和系统发育树的结果可知(图 4), 菌株 ZJUIDS09 为罗伊氏乳杆菌(*Limosilactobacillus reuteri*), 菌株 ZJUIDS11 为瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus* strain)。

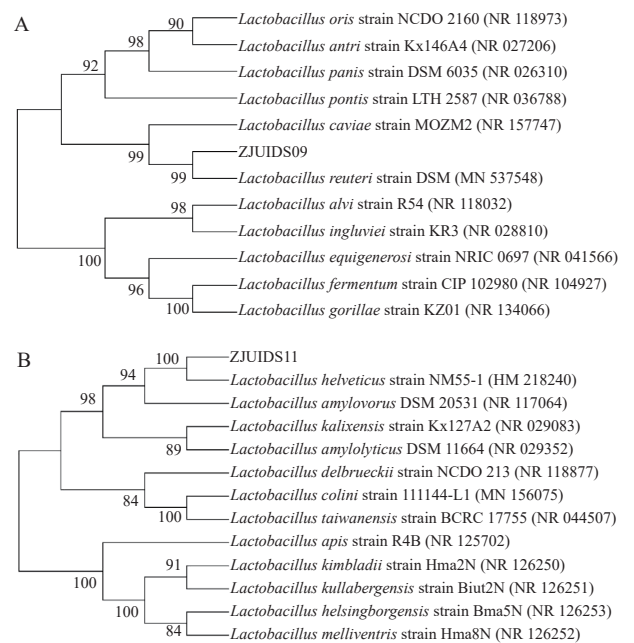


图 4 两株乳酸菌的系统发育树
Fig.4 Phylogenetic tree of two lactic acid bacteria
注: A: 罗伊氏乳杆菌 ZJUIDS09; B: 瑞士乳杆菌 ZJUIDS11。

2.5 潜力菌株发酵乳的 ACE 抑制 IC₅₀ 值测定

ZJUIDS09 和 ZJUIDS11 发酵乳的 ACE 抑制率与其多肽浓度之间存在明显的量效关系, 多肽浓度与 ACE 抑制率之间的关系如图 5A ($R^2=0.951$)和图 5B ($R^2=0.928$)所示。根据 Graph Pad Prism 8.0 软件进行非线性拟合得到 ZJUIDS09 和 ZJUIDS11 发酵乳 ACE 抑制 IC₅₀ 值分别为 0.31、0.25 mg/mL(注: IC₅₀ 定义为 ACE 抑制率达 50% 时所需的多肽浓度)。

2.6 两株乳酸菌的益生特性

2.6.1 两株乳酸菌的酸耐受率和胆盐耐受率 本试验中, 菌株 ZJUIDS09 和 ZJUIDS11 的酸耐受率和胆盐耐受率如表 1 所示。胃液的 pH 一般在 2~3 左右, 具有酸耐受性的乳酸菌才能进入胃肠道中发挥作用, 试验结果显示两株菌的酸耐受率分别为 62.50% 和 152.00%, ZJUIDS11 的酸耐受率是 ZJUIDS09 的 2 倍以上。人体小肠内的胆盐含量约为 0.30%, 具有胆盐抗性的乳酸菌才能在小肠中维持活力并发挥益生菌作用, 试验结果显示两株菌的胆盐耐受率分别为 0.26% 和 0.004%, 表明 ZJUIDS09 可以耐受小肠的胆盐环境, ZJUIDS11 几乎没有胆盐抗性。

2.6.2 两株乳酸菌对 4 种常见致病菌的抗菌活性 在本试验中, 采用 4 种肠道致病菌作为指示菌, 分别检测菌株 ZJUIDS09 和 ZJUIDS11 上清液的抑菌活

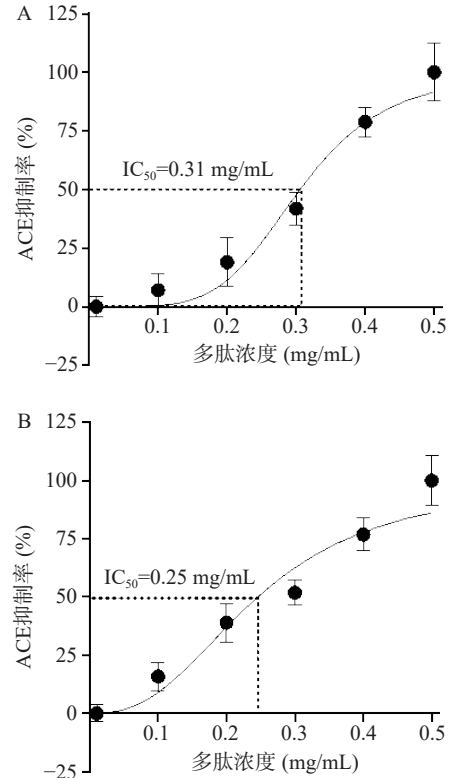


图 5 发酵乳的多肽浓度与 ACE 抑制率间的关系
Fig.5 Relationship between the peptide concentration of fermented milk and ACE inhibitory rate
注: A: 罗伊氏乳杆菌 ZJUIDS09; B: 瑞士乳杆菌 ZJUIDS11。

表 1 乳酸菌的酸、胆盐耐受率

Table 1 Acid and bile salt tolerance rate of lactic acid bacteria		
编号	酸耐受率(%)	胆盐耐受率(%)
ZJUIDS09	62.50±2.13 ^b	0.26±0.04 ^a
ZJUIDS11	152.00±3.98 ^a	0.004±0.00 ^b

性, 数据结果见表 2。菌株 ZJUIDS09 和 ZJUIDS11 对 4 种致病菌均有一定的抑制作用, 菌株 ZJUIDS09 对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌有显著的抑制效果 ($P<0.05$), 抑菌圈达 15.25 mm, 菌株 ZJUIDS11 对金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特菌和大肠杆菌有显著的抑制效果($P<0.05$), 其中对单核细胞增生李斯特菌的抑制效果最好, 抑菌圈达 15.01 mm。因此, 菌株 ZJUIDS09 和 ZJUIDS11 生长过程中产生的代谢物质具有一定的抗菌活性, 对人体肠道健康具有促进作用。

2.6.3 两株乳酸菌的抗生素敏感性 根据 CLSI 的药敏试验标准, 分别对菌株 ZJUIDS09 和 ZJUIDS11 的常见抗生素敏感性进行判断, 结果见表 3。菌株 ZJUIDS09 对 4 种抗生素(氯霉素、红霉素、克拉霉素、林可霉素)呈现敏感状态, 其中对氯霉素最敏感, 抑菌圈达 35.15 mm, 对青霉素中度敏感。菌株 ZJUIDS11 对 2 种抗生素(红霉素、四环素)呈现敏感状态, 其中对红霉素最敏感, 抑菌圈达 20.51 mm, 对氯霉素、克拉霉素和氨苄青霉素中度敏感。试验结

表 2 乳酸菌的抑菌活性
Table 2 Antibacterial activity of lactic acid bacteria

分类	指示菌株	抑菌圈直径(mm)		
		ZJUIDS09	ZJUIDS11	阳性对照(林可霉素)
G+	金黄色葡萄球菌CMCC 26003	15.25±0.75*	14.75±0.25*	11.23±2.03
	单核细胞增生李斯特菌CMCC 54007	14.25±2.25	15.01±1.00*	11.67±0.62
G-	大肠杆菌O157:H7 ATCC 25922	13.50±0.50*	11.11±0.10*	8.52±0.05
	鼠伤寒沙门氏菌ATCC 13311	8.55±0.01	8.53±0.10	8.5±0.05

注: *表示与阳性对照相比, 差异显著($P<0.05$)。

表 3 两株乳酸菌的抗生素敏感性
Table 3 Antibiotic sensitivity of two lactic acid bacteria

药品名称	抑菌圈直径(mm)	
	ZJUIDS09	ZJUIDS11
青霉素	17.55±0.45 ^R	13.56±1.26 ^R
氯霉素	35.15±0.95 ^S	14.50±1.47 ^I
红霉素	27.90±1.20 ^S	20.51±2.48 ^S
克拉霉素	26.65±0.55 ^S	17.91±2.01 ^I
四环素	17.20±0.90 ^I	19.51±0.50 ^S
氨苄青霉素	0 ^R	13.14±0.03 ^I
林可霉素	23.15±0.05 ^S	0 ^R

注: S代表敏感; I代表中介; R代表耐药。

果表明两株菌均对红霉素表现出较高的敏感性, 对 4 种常见抗生素(氯霉素、红霉素、克拉霉素、四环素)均无耐药性(注: 对抗生素敏感与中度敏感被认为不具备耐药性), 菌株安全性较好。

2.7 两株乳酸菌对不同底物的发酵后 ACE 抑制效果比较

将水牛脱脂乳、水牛乳清、荷斯坦脱脂乳、荷斯坦乳清这 4 种底物调整为同一蛋白浓度, 加入乳酸菌 ZJUIDS09 和 ZJUIDS11 进行发酵, 测定发酵上清液的 ACE 抑制率。如图 6, 不同菌株发酵水牛脱脂乳和水牛乳清, ACE 抑制率分别在 77.25%~89.92% 和 34.22%~37.38% 之间; 不同菌株发酵荷斯坦脱脂乳和荷斯坦乳清, ACE 抑制率分别在 86.46%~88.48%

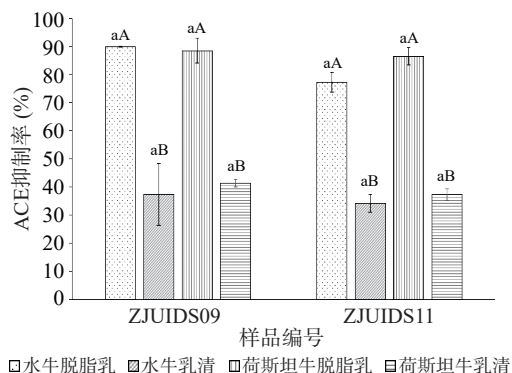


图 6 四种发酵底物的 ACE 抑制率

Fig.6 ACE inhibitory rate of four different fermentation substrates

注: 不同大写字母表示同一菌株不同发酵底物间差异显著; 不同小写字母表示同一发酵底物不同菌株间差异显著, $P<0.05$ 。

和 37.29%~41.32% 之间; 无论是荷斯坦脱脂乳还是水牛脱脂乳, 发酵后的 ACE 抑制率都显著高于乳清 ($P<0.05$); 对比荷斯坦脱脂乳和水牛脱脂乳发酵后的 ACE 抑制率, 发现二者并无显著性差异 ($P>0.05$); 使用不同菌株发酵同一底物, 发现其 ACE 抑制率无显著性差异 ($P>0.05$)。

3 讨论

具有产 ACE 抑制肽功能的乳酸菌研究^[23] 受到越来越多的关注, 不同菌株的蛋白水解能力存在较大差异^[24], 菌株发酵乳的蛋白水解度越高, 则代表该菌株的蛋白酶解系统越丰富, 可以将乳蛋白降解生成大量的多肽, 产肽效果较好的菌株更具备生产 ACEI 肽的潜力。本试验对实验室保藏的 30 多株菌进行脱脂乳发酵实验, 以水解度作为初筛指标选出 13 株水解蛋白能力最强的菌株 ($P<0.05$), 水解度均在 5% 以上。

乳酸菌^[25] 酶解乳蛋白释放出 ACEI 肽, 这些短肽可以与 ACE 活性中心结合, 从而阻碍血管紧张素 II 的生成以及促进缓激肽的降解, 达到降血压的功效。Li 等^[26] 从 41 株干酪乳杆菌中, 筛选出 2 株产 ACE 抑制肽效果最佳的菌株, 抑制率最高达 73.50%; Chen 等^[27] 从 59 株瑞士乳杆菌中, 筛选出 3 株产 ACE 抑制肽的菌株, 抑制率最高达 81.71%; Pihlanto 等^[28] 筛选出 25 种具有 ACE 抑制率的乳酸菌发酵乳, ACE 抑制率在 5%~74% 之间, IC_{50} 在 0.42~0.52 mg/mL 之间; Tsai 等^[29] 使用乳酸菌(嗜热链球菌和保加利亚乳杆菌)和蛋白酶发酵脱脂乳, 测定发酵上清的 IC_{50} 值为 0.27 mg/mL; Leclerc 等和 Fuglsang 等^[30-31] 使用瑞士乳杆菌发酵脱脂乳, 测定发酵乳清的 IC_{50} 为 0.16~1.1 mg/mL。本研究从 13 株水解蛋白能力较强的菌株中筛选出 6 株产 ACEI 肽效果较好的菌株, 其中罗伊氏乳杆菌 ZJUIDS09 和瑞士乳杆菌 ZJUIDS11 发酵乳的 ACE 抑制率分别达 87.39% 和 90.41%, IC_{50} 值分别为 0.31 和 0.25 mg/mL, 与上述菌株相比 ACE 抑制率更强。这可能是因为本试验筛选出的菌株, 具有较丰富的蛋白酶系统, 其细胞壁蛋白酶、肽链内切酶及氨基肽酶, 可以高效地酶解牛乳蛋白, 产生的活性肽可以有效且稳定地与 ACE 活性中心结合, 从而抑制 ACE 的活性。

乳酸菌发酵乳释放的生物活性肽应能抵抗胃肠道蛋白酶的消化才能发挥作用^[32-33]。一些肽序列在发

酵后是无活性的,但是经过胃肠蛋白酶消化后会被激活,一些发酵产生的活性肽在经过胃肠蛋白酶消化后会被水解成小的灭活片段,因此模拟胃肠消化后的 ACE 抑制率是发酵乳在人体内发挥作用的重要指标。本试验从 6 株产 ACEI 肽效果较好的乳酸菌中,通过模拟胃肠消化筛选出 2 种抗消化的菌株发酵乳,分别是 ZJUIDS09 和 ZJUIDS11。这两种菌株发酵乳在经过胃肠液消化后,ACE 抑制率均有所下降,ZJUIDS09 菌株发酵乳下降至 70.13%,ZJUIDS11 菌株发酵乳下降至 76.39%。Chen 等^[34]使用植物乳杆菌 L69(*Lactobacillus plantarum* L69)发酵山羊奶,通过体外胃肠液消化后发现,消化前的 ACE 抑制率可达 79.11%,经胃消化后降至 70.22%,最后在肠道环境中维持 59.89%,发酵乳经过胃肠消化后 ACE 抑制率会降低。这与本试验结果较一致,原因可能是乳酸菌生产的 ACE 抑制肽经胃肠蛋白酶消化后释放出了一些小的失活片段。相比其他学者的试验结果,本试验筛选的这两种菌株发酵乳在经过胃肠液消化后的 ACE 抑制率仍较为稳定。因此,ZJUIDS09 和 ZJUIDS11 为富产 ACE 抑制肽的潜力菌株。

胆盐和酸耐受性试验旨在测试乳酸菌是否能够通过模拟人体胃酸和肠道环境,从而提高存活的定植概率。本次试验筛选的两种乳酸菌的酸耐受率均在 60% 以上,与嗜酸乳杆菌相当^[35],具有良好的耐酸性。大部分乳酸菌在胆盐中的存活率都处于 0.2%~0.4% 之间^[36-38],本试验中的罗伊氏乳杆菌 ZJUIDS09 的胆盐存活率为 0.26%,比瑞士乳杆菌 ZJUIDS11 更有可能在肠道中存活甚至定植。此外,抗菌特性表明这两株菌的代谢产物能在一定程度上抵御肠道有害菌的侵害,罗伊氏乳杆菌 ZJUIDS09 对金黄色葡萄球菌有较好的抑制效果,瑞士乳杆菌 ZJUIDS11 对单增李斯特菌有较好的抑制效果。抗生素敏感性结果表明菌株的安全性较好,罗伊氏乳杆菌 ZJUIDS09 对氯霉素较敏感,瑞士乳杆菌 ZJUIDS11 对红霉素较敏感。

不同来源(牛、水牛)牛乳的理化特性存在显著差异,不同类型的乳蛋白(乳清蛋白、酪蛋白、脱脂乳)生产的生物活性肽在结构和功能上也有着显著区别^[39]。本试验将荷斯坦脱脂乳、荷斯坦乳清、水牛脱脂乳和水牛乳清调整为同一蛋白浓度,经过菌株发酵后对比 ACE 抑制率,发现以脱脂乳作为发酵底物时的 ACE 抑制率比乳清高一倍($P<0.05$),这表明乳酸菌酶解酪蛋白时生产的 ACE 肽在效果上比乳清蛋白强。试验发现荷斯坦脱脂乳和水牛脱脂乳发酵后的 ACE 抑制率无显著性差异($P>0.05$),原因可能是牛乳蛋白的序列具有很大的同源性。因此,考虑到经济成本,荷斯坦脱脂乳更适合作为菌株的发酵底物。其中的降压肽的分离及功效评定仍需进一步研究确定。

4 结论

本研究通过比较蛋白水解度、ACE 抑制率、模

拟胃肠消化后的 ACE 抑制率,筛选到 2 株富产抗消化 ACE 抑制肽的乳酸菌,分别是罗伊氏乳杆菌 ZJUIDS09 和瑞士乳杆菌 ZJUIDS11,ACE 抑制率分别为 $87.39\%\pm 2.44\%$ 和 $90.41\%\pm 0.99\%$, IC_{50} 值分别为 0.31 和 0.25 mg/mL。在益生特性方面,两株菌对酸和胆盐都有良好的耐受性,且不具备耐药性,对人体健康不存在潜在威胁。经过底物筛选比较得,这两株菌的最佳发酵底物为荷斯坦脱脂乳。研究结果表明罗伊氏乳杆菌 ZJUIDS09 和瑞士乳杆菌 ZJUIDS11 发酵乳产 ACE 抑制肽的能力较好,具有开发降压发酵乳制品的潜力。

参考文献

- [1] LIU J, BU X, WEI L, et al. Global burden of cardiovascular diseases attributable to hypertension in young adults from 1990 to 2019[J]. *Journal of Hypertension*, 2021, 39(12): 2488-2496.
- [2] ZHOU B, PEREL P, MENSAH G A, et al. Global epidemiology, health burden and effective interventions for elevated blood pressure and hypertension[J]. *Nature Reviews Cardiology*, 2021, 18(11): 785-802.
- [3] ZHOU B, DANAEI G, STEVENS G A, et al. Long-term and recent trends in hypertension awareness, treatment, and control in 12 high-income countries: An analysis of 123 nationally representative surveys[J]. *The Lancet*, 2019, 394(10199): 639-651.
- [4] 胡盛寿. 中国心血管健康与疾病报告 2020 概要[J]. *中国循环杂志*, 2021, 36(6): 521-545. [HU S S. China cardiovascular health and disease report 2020 summary[J]. *Chinese Journal of Circulation*, 2021, 36(6): 521-545.]
- [5] ADAMS C, SAWH F, JOHNSON J M, et al. Characterization of casein-derived peptide bioactivity: Differential effects on angiotensin-converting enzyme inhibition and cytokine and nitric oxide production[J]. *Journal of Dairy Science*, 2020, 103(7): 5805-5815.
- [6] MAJUMDER K, WU J. Molecular targets of antihypertensive peptides: Understanding the mechanisms of action based on the pathophysiology of hypertension[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 16(1): 256-283.
- [7] BARRIENTOS L M, MENDOZA A, TORRES M J, et al. Invited review: Fermented milk as antihypertensive functional food[J]. *Journal of Dairy Science*, 2016, 99(6): 4099-4110.
- [8] OBAROAKPO J U, LIU L, ZHANG S, et al. Alpha-glucosidase and ACE dual inhibitory protein hydrolysates and peptide fractions of sprouted quinoa yoghurt beverages inoculated with *Lactobacillus casei*[J]. *Food Chemistry*, 2019, 299: 124985.
- [9] OKAMOTO K, KAWAMURA S, TAGAWA M, et al. Production of an antihypertensive peptide from milk by the brown rot fungus *Neolentinus lepideus*[J]. *European Food Research and Technology*, 2020, 246(9): 1773-1782.
- [10] FUJIMUTA Y, SHIMURA M, NAGAI H, et al. Evaluation of angiotensin-converting enzyme-inhibitory activity in abalone viscera fermented by *Lactobacillus casei* 001[J]. *Journal of Functional Foods*, 2021, 82: 104474.
- [11] SOLANKI D, HATI S. Considering the potential of *Lactoba-*

- cillus rhamnosus* for producing angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides in fermented camel milk (Indian breed)[J]. *Food Bioscience*, 2018, 23: 16–22.
- [12] NAKAMURA Y, YAMAMOTO N, SAKAI K, et al. Anti-hypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme[J]. *Journal of Dairy Science*, 1995, 78(6): 1253–1257.
- [13] UPADRASTA A, MADEMPUDI R S. Probiotics and blood pressure: Current insights[J]. *Integrated Blood Pressure Control*, 2016, 9: 33–42.
- [14] PADGHAN P V, MANN B, SHARMA R, et al. Production of angiotensin-I-converting-enzyme inhibitory peptides in fermented milks (Lassi) fermented by *Lactobacillus acidophilus* with consideration of incubation period and simmering treatment[J]. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 2017, 23(1): 69–79.
- [15] FLAMBARD B, JOHANSEN E. Developing a functional dairy product: From research on *Lactobacillus helveticus* to industrial application of Cardi 04 in novel antihypertensive drinking yoghurts[J]. *Functional Dairy Products*, 2007: 506–520.
- [16] 罗艳华, 王全杰, 陈沛海, 等. 蛋白水解物水解度测定方法的研究[J]. *皮革与化工*, 2017, 34(2): 26–31. [LUO Y H, WANG Q J, CHEN P H, et al. Research on the determination method of hydrolysis degree of protein hydrolysate[J]. *Leather & Chemical Industry*, 2017, 34(2): 26–31.]
- [17] 罗鹏. 葵花籽 ACE 抑制肽的分离纯化、结构分析与稳态化研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2018. [LUO P. Isolation, purification, structure analysis and homeostasis of sunflower seed ACE inhibitor peptide[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2018.]
- [18] MEMARPOOR Y M, ASODEH A, CHAMANI J. Structure and ace-inhibitory activity of peptides derived from hen egg white lysozyme[J]. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 2012, 18(4): 353–360.
- [19] LISSON M, LOCHNIT G, ERHARDT G. Genetic variants of bovine β - and κ -casein result in different immunoglobulin E-binding epitopes after *in vitro* gastrointestinal digestion[J]. *Journal of Dairy Science*, 2013, 96(9): 5532–5543.
- [20] 郑志瑶, 王伟军, 陈波, 等. 降胆固醇乳酸菌的筛选、鉴定与益生特性评价[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(12): 239–247. [ZHENG Z Y, WANG W J, CHEN B, et al. Screening, identification and probiotic properties evaluation of cholesterol-lowering lactic acid bacteria[J]. *Chinese Journal of Food Science*, 2020, 20(12): 239–247.]
- [21] 梁竞一, 胡子毅, 王伟军, 等. 抗幽门螺旋杆菌乳酸菌的筛选与益生特性评价[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(20): 140–148. [LIANG J Y, HUO Z Y, WANG W J, et al. Screening of lactic acid bacteria against *Helicobacter pylori* and evaluation of probiotic properties[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(20): 140–148.]
- [22] ANANDHARAJ M, SIVASANKARI B. Isolation of potential probiotic *Lactobacillus oris* HMI68 from mother's milk with cholesterol-reducing property[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2014, 118(2): 153–159.
- [23] FITZGERALD R J, MURRAY B A. Bioactive peptides and lactic fermentations[J]. *International Journal of Dairy Technology*, 2006, 59(2): 118–125.
- [24] AYYASH M, LIU S Q, AL M A, et al. *In vitro* investigation of health-promoting benefits of fermented camel sausage by novel probiotic *Lactobacillus plantarum*: A comparative study with beef sausages[J]. *Food Science & Technology*, 2019, 99: 346–354.
- [25] 王宇, 田丰伟, 陈卫, 等. 乳酸菌发酵乳血管紧张素转化酶抑制活力的比较研究[J]. *食品与发酵工业*, 2008(2): 29–33. [WANG Y, TIAN F W, CHEN W, et al. Comparative study on the inhibitory activity of angiotensin converting enzyme in fermented milk of lactic acid bacteria[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2008(2): 29–33.]
- [26] LI C, KWOK L Y, MI Z, et al. Characterization of the angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of fermented milks produced with *Lactobacillus casei*[J]. *Journal of Dairy Science*, 2017, 100(12): 9495–9507.
- [27] CHEN Y, LI C, XUE J, et al. Characterization of angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of fermented milk produced by *Lactobacillus helveticus*[J]. *Journal of Dairy Science*, 2015, 98(8): 5113–5124.
- [28] PIHLANTO A, VIRTANEN T, KORHONEN H. Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity and anti-hypertensive effect of fermented milk[J]. *International Dairy Journal*, 2010, 20(1): 3–10.
- [29] TSAI J S, CHEN T J, PAN B S, et al. Antihypertensive effect of bioactive peptides produced by protease-facilitated lactic acid fermentation of milk[J]. *Food Chemistry*, 2008, 106(2): 552–558.
- [30] LECLERC P L, GAUTHIER S F, HELARD H, et al. Anti-hypertensive activity of casein-enriched milk fermented by *Lactobacillus helveticus*[J]. *International Dairy Journal*, 2002, 12(12): 995–1004.
- [31] FUGLSANG A, NILSSON D, NYBORG N. Cardiovascular effects of fermented milk containing angiotensin-converting enzyme inhibitors evaluated in permanently catheterized, spontaneously hypertensive rats[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(7): 3566–3569.
- [32] LI S N, TANG S H, HE Q, et al. *In vitro* antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of fermented milk with different culture combinations[J]. *Journal of Dairy Science*, 2020, 103(2): 1120–1130.
- [33] HAO L, GAO X, ZHOU T, et al. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory and antioxidant activity of umami peptides after *in vitro* gastrointestinal digestion[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(31): 8232–8241.
- [34] CHEN L, ZHANG Q, JI Z, et al. Production and fermentation characteristics of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides of goat milk fermented by a novel wild *Lactobacillus Plantarum* 69[J]. *Food Science and Technology*, 2018, 91: 532–540.
- [35] RYAN K A, JAYARAMAN T, DALY P, et al. Isolation of *Lactobacilli* with probiotic properties from the human stomach[J].

[Letters in Applied Microbiology](#), 2008, 47(4): 269–274.

[36] GROSU S S, ZAMFIR M. Probiotic potential of some lactic acid bacteria isolated from romanian fermented vegetables[J]. [Annals of the Romanian Society for Cell Biology](#), 2012, 17(1): 234–239.

[37] HARBOE M, OETTINGER T, WIKER H G, et al. Evidence for occurrence of the ESAT-6 protein in mycobacterium tuberculosis and virulent mycobacterium bovis and for its absence in mycobacterium bovis BCG[J]. [Infection and Immunity](#), 1996, 64(1): 16–22.

[38] 许文杰. 酸菜和鸡肠道来源乳杆菌的益生特性研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2012. [XU W J. Study on the probiotic properties of sauerkraut and chicken gut-derived *Lactobacillus*[D]. Changchun: Jilin University, 2012.]

[39] RAI A K, SANJUKTA S, JEYARAM K. Production of angiotensin I converting enzyme inhibitory (ACE-I) peptides during milk fermentation and their role in reducing hypertension[J]. [Critical Reviews in Food Science and Nutrition](#), 2017, 57(13): 2789–2800.