

单宁降解菌株筛选鉴定及益生功能特性分析

段文靖¹ 于 冲¹ 田 缘^{1,2} 张淑梅¹ 宿 婷³

(1. 黑龙江省科学院微生物研究所, 黑龙江 哈尔滨 150010; 2. 东北农业大学食品学院, 黑龙江 哈尔滨 150030;
3. 黑龙江省科学院, 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要: [目的] 从天然样品中筛选具有单宁降解能力的微生物菌株, 并评估其益生特性。[方法] 通过单宁酶活力测定筛选出 3 株植物乳杆菌 (Y1、Y20、Y22) 和一株卡利比克迈耶氏酵母 Y3, 考察菌株生长特性、抗氧化能力、耐胆盐性能、胆固醇降解效率等益生特性, 采用溶血试验和标准药敏试验进行安全性评价。[结果] 酵母 Y3 展现出优秀的抗氧化优势, 其细胞上清液的超氧阴离子自由基清除率为 95.25%, 破壁后胞内提取物的羟自由基清除率为 66.43%, DPPH 自由基清除率也显著高于同组植物乳酸杆菌。该菌株在胆盐环境中最高存活率为 118.50%, 胆固醇降解率为 46.52%, 且未表现溶血活性。耐药性检测显示其对常规细菌抗生素具有固有耐药性。[结论] 卡利比克迈耶氏酵母 Y3 具有优异的抗氧化能力、良好的消化道适应性和较高的使用安全性, 具备开发为功能性益生发酵制剂的潜在应用价值。

关键词: 单宁降解菌; 抗氧化活性; 胆盐耐受; 降胆固醇; 溶血性; 耐药性

Screening and identification of tannin-degrading strains and analysis of their probiotic functional characteristics

DUAN Wenjing¹ YU Chong¹ TIAN Yuan^{1,2} ZHANG Shumei¹ SU Ting³

(1. Institute of Microbiology Heilongjiang Academy of Sciences, Harbin, Heilongjiang 150010, China;
2. College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China;
3. Heilongjiang Academy of Sciences, Harbin, Heilongjiang 150001, China)

Abstract: [Objective] Microbial strains with tannin-degrading capabilities were screened from natural samples, and their probiotic properties were systematically evaluated. [Methods] Three *Lactobacillus plantarum* strains (Y1, Y20, Y22) and *Meyerozyma caribbica* Y3 exhibiting high tanninase activity are selected. Probiotic characteristics including growth characteristics, antioxidant capacity, bile salt tolerance, and cholesterol degradation efficiency are investigated. Safety profiles were determined through hemolytic activity assays and standard antibiotic susceptibility testing. [Results] The experimental data reveal that *M. caribbica* Y3 demonstrates remarkable antioxidant activities, with a superoxide anion scavenging rate of 95.25% in cell supernatants and a hydroxyl radical scavenging rate of 63.43% in extracts after cell wall disruption. Furthermore, its DPPH radical scavenging rate significantly surpasses the co-evaluated *L. plantarum* strains. Within the environment of bile salts, this strain maintains a maximal survival rate of 158.82% and degrades 46.52% of the cholesterol, and it does not exhibit hemolytic activity. The antibiotic susceptibility test indicates that it has inherent resistance to conventional bacterial antibiotics. [Conclusion] These findings suggest that *M. caribbica* Y3 holds promise as a candidate for functional fermented products with probiotic effects due to its exceptional antioxidative capacity, gastrointestinal adaptability, and biosafety.

Keywords: tannin-degrading strains; antioxidant activity; bile salt tolerance; cholesterol-reducing; hemolytic activity; drug resistance

基金项目: 黑龙江省科学院科学研究基金 (编号: KY2023SW02)

通信作者: 于冲 (1979—), 男, 黑龙江省科学院微生物研究所研究员, 硕士。E-mail: 8411287@qq.com

收稿日期: 2025-06-06 改回日期: 2025-11-07

引用格式: 段文靖, 于冲, 田缘, 等. 单宁降解菌株筛选鉴定及益生功能特性分析[J]. 食品与机械, 2026, 42(4): 33-42.

Citation: DUAN Wenjing, YU Chong, TIAN Yuan, et al. Screening and identification of tannin-degrading strains and analysis of their probiotic functional characteristics[J]. Food & Machinery, 2026, 42(4): 33-42.

单宁作为广泛存在于植物界的多酚类次生代谢产物,复杂的芳香环结构赋予其抗氧化、抗菌等特性,但单宁过多时易与蛋白质、金属离子等结合形成抗营养复合物,显著降低食品生物利用率^[1]。在果蔬加工领域,单宁的过度积累不仅会导致果汁浑浊、涩味加剧,其热稳定性还阻碍了加工过程中有效去除^[2]。传统物理化学脱单宁法存在效率低、副产物多等缺陷,而微生物脱单宁条件温和、专一性强,且生成没食子酸等增值产物^[3]。

单宁酶可通过水解酯键和缩酚酸键将单宁酸分解为没食子酸和葡萄糖,这一过程直接关联菌株的碳源利用效率^[4]。在食品工业领域,产单宁酶的菌株被广泛应用,特别是在茶叶加工过程中,单宁酶可以有效降低茶叶中的单宁含量,从而改善茶叶的口感和风味,并提升其生物活性^[5]。研究显示,*Lactobacillus pentosus* 菌(23株)在2.5%单宁培养基中展现降解酚类及抗氧化能力^[6];泰国发酵茶源芽孢杆菌(117株)中有21株产胞外单宁酶且具有益生潜力^[7];贝氏酵母 N₁ 在质量浓度>30 g/L 单宁环境下仍保持高效降解与产香特性,为高单宁水果发酵提供参考^[8]。

益生功能是评估微生物菌株工业适用性的核心指标。乳酸菌和酵母菌作为常见的发酵微生物,具有显著的益生特性。阿热爱·巴合提等^[9]研究表明,乳酸菌(如乳杆菌属和双歧杆菌属)可通过清除自由基、调节脂代谢和耐受消化道逆境等机制发挥健康效应。其中,植物乳植杆菌 CCFM 8661 在临床和动物试验中表现出多种益生功能,包括缓解重金属毒性、抗氧化应激、改善肠黏膜屏障和缓解衰老^[10]。酵母菌通过调节肠道菌群、增强免疫等机制发挥益生功能。非益生类酵母菌(如 *Debaryomyces hansenii* 和 *Pichia kudriavzevii*^[11])具备耐胃酸/胆盐特性及诱导抗炎因子生成能力,其中 *Pichia kudriavzevii* OG23 可显著提升发酵食品抗氧化活性与风味品质。而 *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* 与乳酸菌的协同作用可增强发酵食品的功能特性^[11]。

基于单宁酶介导的单宁微生物降解机制,研究拟筛选果蔬及益生菌饮品源单宁耐受菌株,建立菌株生长曲线、抗氧化活性、生理稳定性(体外降胆固醇效率、胆盐耐受率)及生物安全性(溶血活性、抗生素敏感性)四维评价体系,旨在筛选兼具单宁降解功能与益生特性的高值菌株,为微生物发酵功能性食品产业链的综合效益提升提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

蓝莓葡萄(产地云南弥勒)、人参果(产地云南楚雄)、蓝莓(产地云南玉溪)、涩柿(产地广西桂林)、脐橙(产地江西赣南)、猕猴桃(产地陕西周至)、早春枇杷(产地福建云霄)、苹果(产地山东烟台)、沙棘果(产地山西吕梁)、黑

果花楸(产地吉林长白山):市售;

日本益生菌固体饮品(3种):市售;

MRS 肉汤培养基、LB 液体培养基:杭州百思生物技术有限公司;

细菌基因组 DNA 提取试剂盒:天根生化科技有限公司;

绕丹宁:分析纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;

没食子酸丙酯:分析纯,上海麦克林生化科技有限公司;

单宁:色谱纯,上海易恩化学技术有限公司;

硫酸镁七水合物、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾:分析纯,天津市凯通化学试剂有限公司;

氯化铵、硝酸钠、氯化钾:分析纯,天津市天力化学试剂有限公司;

蔗糖:分析纯,西陇科学股份有限公司;

溴酚蓝:色谱纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;

胆固醇、硫代乙醇酸钠:色谱纯,北京索莱宝科技有限公司。

1.2 仪器与设备

超净工作台:C1115C 型,上海智城分析仪器制造有限公司;

高压蒸汽灭菌锅:HVE-50 型,日本 Hirayama 公司;

二氧化碳培养箱:CCL-240B-8-IVF 型,新加坡艺思高科技有限公司;

多功能酶标仪:Tecan Infinite M200 Pro 型,瑞士帝肯公司;

台式冷冻离心机:3K15 型,德国 Sigma 公司;

天平:MA104 型,美国 mettler toledo 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 单宁降解菌的分离 准确称取 4.0 g 样品于含 50 mL 无机盐培养基的三角瓶中,添加 1 mL 无菌单宁酸母液(0.22 μm 滤膜除菌),180 r/min、分别于 30、37 °C 下振荡培养 48 h。取 0.6 mL 菌液进行梯度稀释(10^{-4} ~ 10^{-6}),分别涂布于 LB 和 MRS 平板,静置培养 2~3 d。挑取典型菌落纯化后接种液体培养基扩培,于-80 °C 甘油中冻存。

1.3.2 单宁降解菌的筛选

(1) 初筛:活化菌株经两次传代后,采用水解透明圈法^[12]筛选。向筛选培养基中均匀涂布 100 μL 单宁酸(0.22 μm 滤膜除菌),梯度稀释菌液至 10^{-1} ~ 10^{-2} (用 a、b、c 分别表示原浓度、稀释 10 倍、稀释 100 倍)。牛津杯中分别加入 200 μL 原液及稀释菌液,培养 3~5 d。测定菌落周围变色圈直径(D)与菌落直径(d)的比值,依据是否出现变色圈进行单宁降解潜力菌株初筛。

(2) 复筛:初筛获得的菌株以 2% 接种量接入产酶培养基^[12],分别于对应温度,100 r/min 振荡培养 48 h。离心

收集上清得粗酶液(100倍稀释),参照保玉心等^[13]的方法测定胞外酶活。基于没食子酸与绕丹宁显色反应($\Delta A=520\text{ nm}$),通过 ΔA 计算酶活力(每分钟分解底物产生 $0.1\text{ }\mu\text{mol}$ 没食子酸所需的酶量为1个酶活力)。以标准曲线定量,筛选酶活力前4的菌株用于后续试验。

1.3.3 菌株鉴定

(1) 形态特征观察:分离菌株经菌落形态观察及革兰氏染色镜检,结合理化特性完成初步鉴定。

(2) 16S rRNA 序列分析与系统发育树构建:取 2.0 mL 活化后菌液, $12\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 1 min ,根据试剂盒说明书提取基因组DNA。采用16S rRNA通用引物27F/1492R进行PCR扩增,产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳验证、镜检后送样检测。测序结果经GenBank数据库Blast比对,选取高同源模式菌株序列,通过MEGA11.0构建邻接法系统发育树确定分类地位。

1.3.4 生长曲线绘制 根据马子琳^[12]的方法。

1.3.5 菌株抗氧化活性分析 菌悬液经 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心($8\text{ }000\times g$, 15 min),PBS洗涤两次并重悬至 10^8 CFU/mL 。一部分作为完整细胞,另一部分菌悬液于冰浴下超声破碎(乳酸杆菌^[14]:超声 1 s 间歇 2 s 、功率 600 W 、 15 min ;酵母菌^[15]:超声 2 s 间歇 2 s 、功率 550 W 、 30 min),离心取上清得破碎细胞。采用完整/破碎双体系进行抗氧化分析。

(1) 羟自由基清除能力测定:参照文献^[15],按式(1)计算羟自由基清除率。

$$D_1 = \frac{A_s - A_0}{A - A_0} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

D_1 ——羟自由基清除率,%;

A_s ——样品吸光度;

A ——水代替 H_2O_2 的吸光度;

A_0 ——水代替样品的吸光度。

(2) DPPH 自由基清除能力测定:参照文献^[16]并适当修改。取 0.5 mL 待测菌液与 1 mL 0.05 mmol/L DPPH 无水乙醇溶液混合,室温避光反应 30 min 。 $8\text{ }000\times g$ 离心 10 min ,测定 517 nm 处上清液吸光度。按式(2)计算DPPH自由基清除率。

$$D_2 = \left(1 - \frac{A_s - A_b}{A_c}\right) \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

D_2 ——DPPH自由基清除率,%;

A_s ——样品+DPPH-无水乙醇的吸光度;

A_b ——样品+乙醇的吸光度;

A_c ——水+DPPH-无水乙醇的吸光度。

(3) 超氧阴离子自由基清除能力测定:参照文献^[14]并适当修改。将 0.25 mL 待测菌液加入 1 mL 的Tris-HCl溶液($\text{pH } 8.2$, 0.05 mol/L)中, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 15 min ,加入 1 mL 邻苯三酚溶液(3 mmol/L), $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 6 min ,加入 0.025 mL

HCl(8 mol/L), $10\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 5 min ,测定 325 nm 处上清液吸光度。按式(3)计算超氧阴离子自由基清除率。

$$D_3 = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

D_3 ——超氧阴离子自由基清除率,%;

A_1 ——含样品的吸光度;

A_2 —— 10 mmol/L HCl代替邻苯三酚的吸光度;

A_0 ——水代替样品的吸光度。

(4) 铁离子还原/抗氧化能力法(FRAP法):参照文献^[15]并适当修改。向 0.45 mL 菌液中依次加入等体积的 0.1 g/L 铁氰化钾和PBS溶液($\text{pH } 6.6$, 0.2 mol/L), $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 20 min ,迅速冷却,加入等体积 10 g/L 三氯乙酸, $5\text{ }000\times g$ 离心 10 min ;取 0.9 mL 上清液与等体积 0.1 g/L 三氯化铁混匀,静置 10 min ,测定 700 nm 处吸光度。吸光值越大,还原力越强。

1.3.6 菌株胆盐耐受力分析 参照文献^[17],按式(4)计算菌体存活率。

$$R_1 = \frac{A_1}{A_0} \times 100\%, \quad (4)$$

式中:

R_1 ——菌株耐胆盐存活率,%;

A_1 —— $4\text{ h}/12\text{ h}$ 样品的吸光度;

A_0 —— 0 h 样品的吸光度。

1.3.7 菌株降解胆固醇能力分析 参照文献^[18],按式(5)计算胆固醇去除率。

$$R_2 = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\%, \quad (5)$$

式中:

R_2 ——胆固醇去除率,%;

A_0 ——未接种菌株培养 48 h 后离心上清液的吸光度;

A_1 ——接种培养 48 h 后离心上清液的吸光度。

1.3.8 溶血性试验 菌株于哥伦比亚血琼脂平板三区划线,对应温度培养 24 h 后,观察溶血特性^[19]。

1.3.9 菌株抗生素敏感性分析 取 $100\text{ }\mu\text{L}$ 菌悬液($1\times 10^8\text{ CFU/mL}$)涂布于MH固体培养基,贴敷药敏纸片(见表1),对应温度培养 24 h ^[20]。3次重复测定抑菌圈直径,通过滤纸片扩散法评估菌株药物敏感性。

1.3.10 数据分析 每组试验重复进行3次,结果用“平均值±标准偏差”表示,采用SPSS 25.0软件的Duncan法分析数据显著性,使用Origin 2021软件绘制图表。

2 结果与讨论

2.1 产单宁酶菌株的筛选

2.1.1 分离与纯化 具有单宁酶活性的菌株可在以单宁为唯一碳源的培养基中良好生长,其生长状况可反映单宁酶的产生能力。利用富集培养法,从13个异源样品中分离出39株菌,编号Y1~Y39,经 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 甘油冻藏后用于

表 1 药敏纸片种类、含药量及判断标准

Table 1 Types of antibiotic susceptibility paper, drug content, and determination criteria

药敏纸片 类型	纸片效价	抑菌直径/mm		
		耐药	中度	敏感
头孢噻肟	30 μg	≤14	15~21	≥22
哌拉西林	100 μg	≤17	18~20	≥21
万古霉素	30 μg	≤15	16~20	≥21
红霉素	15 μg	≤13	14~22	≥23
四环素	30 μg	≤14	15~18	≥19
环丙沙星	5 μg	≤15	16~20	≥21
庆大霉素	10 μg	≤12	13~14	≥15
头孢曲松	30 μg	≤13	20~22	≥23
卡那霉素	30 μg	≤13	14~17	≥18
左氧氟沙星	5 μg	≤13	14~16	≥17
头孢他啶	30 μg	≤14	15~17	≥18
链霉素	10 μg	≤11	12~14	≥15
青霉素	10 U	≤19	20~27	≥28
氯霉素	30 μg	≤12	13~17	≥18

后续试验。

2.1.2 初筛结果 单宁酸降解产物没食子酸可致溴酚蓝显色体系由蓝紫变黄,菌落周缘黄色水解圈的形成表征菌株单宁降解能力,需注意培养基中没食子酸氧化产生的黄绿色干扰。由图 1 可知,a 组水解圈直径较 b、c 组差异显著($P<0.05$),故选定原浓度进行单宁降解效能评价。根据水解圈大小筛选出 20 株单宁酸降解菌进行后续测定,其菌落直径和透明圈直径见表 2。

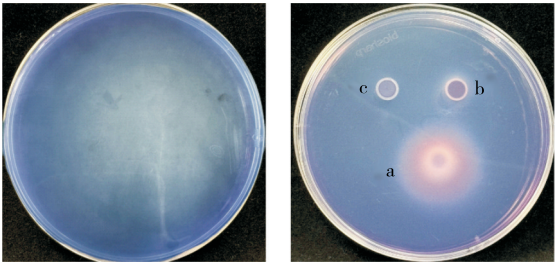


图 1 产单宁酶菌株在筛选培养基上的变色圈
Figure 1 Color circles of tannase producing strains on screening medium

表 2 单宁酸降解菌的变色圈在原浓度下的直径和菌落直径[†]

Table 2 Discoloration circle diameters and colony diameters of tannin-degrading strains at the original concentration

菌种	菌落直径/cm	透明圈直径/cm	D/d	菌种	菌落直径/cm	透明圈直径/cm	D/d
Y1	1.53±0.11	3.27±0.12	2.14±0.25 ^a	Y25	1.50±0.17	2.03±0.15	1.37±0.18 ^{efg}
Y2	2.03±0.06	2.80±0.20	1.38±0.07 ^{efg}	Y26	1.27±0.06	2.00±0.10	1.58±0.15 ^{de}
Y3	1.37±0.15	2.60±0.10	1.91±0.15 ^{ab}	Y27	1.37±0.12	2.17±0.06	1.59±0.17 ^{de}
Y18	1.33±0.06	2.17±0.06	1.63±0.06 ^{cd}	Y28	1.40±0.10	2.27±0.06	1.62±0.13 ^{cd}
Y19	1.30±0.10	2.27±0.12	1.75±0.08 ^{bcd}	Y29	1.40±0.17	2.33±0.06	1.68±0.16 ^{bcd}
Y20	1.23±0.06	2.37±0.06	1.85±0.06 ^{bcd}	Y30	1.13±0.12	1.87±0.12	1.66±0.15 ^{cd}
Y21	1.57±0.12	2.07±0.06	1.32±0.08 ^{fg}	Y31	1.43±0.06	1.97±0.12	1.37±0.12 ^{efg}
Y22	1.30±0.10	2.27±0.23	1.76±0.30 ^{bcd}	Y33	1.77±0.06	2.13±0.15	1.21±0.13 ^g
Y23	1.40±0.00	2.17±0.21	1.55±0.15 ^{def}	Y36	1.10±0.10	1.87±0.06	1.71±0.20 ^{bcd}
Y24	1.23±0.06	2.13±0.12	1.73±0.09 ^{bcd}	Y37	1.17±0.06	1.90±0.10	1.63±0.04 ^{cd}

[†] 同列小写字母不同表示差异显著($P<0.05$)。

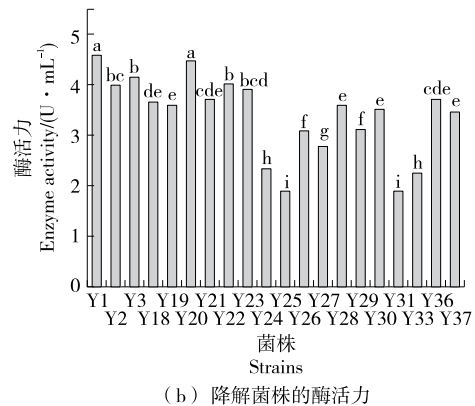
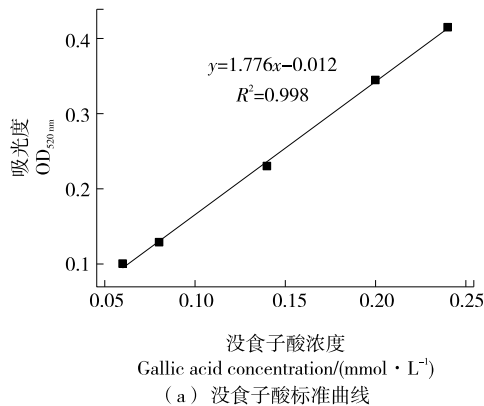
2.1.3 复筛结果 通过初筛试验从候选菌株中筛选出 20 株具有单宁酶生产潜力的菌株,为进一步评估其产酶性能,将各菌株分别接种于含 2% 单宁的发酵培养基中进行培养。由图 2 可知,菌株 Y1、Y3、Y20 和 Y22 均表现出较好的产酶能力,其酶活力分别为 4.59, 4.16, 4.48, 4.24 U/mL。菌株 Y1 展现出最优异的单宁酶生产能力,显著高于其他测试菌株(较 Y31 提高了 30.77%)。综合酶活力表现,确定 Y1、Y3、Y20 和 Y22 4 株菌为后续试验的重要候选菌株。

2.2 鉴定结果

2.2.1 形态特征结果 由图 3 可知,菌株 Y1、Y20、Y22 菌

落呈乳白色至淡黄色,表面光滑湿润有光泽,边缘整齐或波状;显微观察显示其为短直杆状,单生或链状排列,革兰氏染色呈典型蓝紫色阳性特征。菌株 Y3 呈现乳白色圆形菌落,细胞形态具多态性(梭形/不规则),表面光滑整齐无褶皱,其细胞壁结构与染色特性同样符合革兰氏阳性菌标准。

2.2.2 序列分析与系统发育树构建结果 由图 4 和表 3 可知,对菌株 16S rDNA 序列进行分析,并构建系统发育树,经 BLAST 比对,菌株 Y1、Y20、Y22 与植物乳杆菌相似度达 100%,确定其为植物乳杆菌,命名为 *Lactiplantibacillus plantarum*;菌株 Y3 与卡利比克迈耶氏酵母的 ITS 序列同



小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$)

图2 不同菌株的单宁酶酶活力结果

Figure 2 Tannase activity of strains

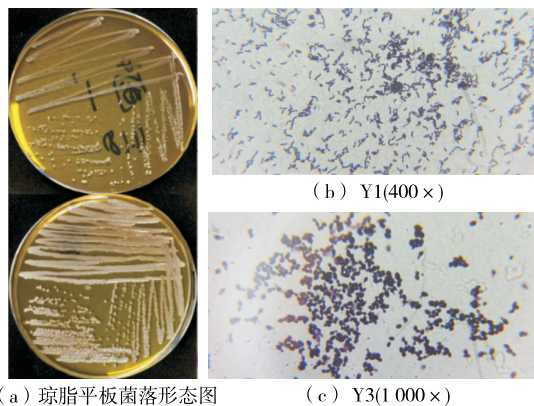


图3 单宁降解菌株菌落和细胞显微形态

Figure 3 Colony and microscopic morphology of tannin-degrading strains

源性达100%,确定为 *Meyerozyma caribbica*。

2.3 生长曲线

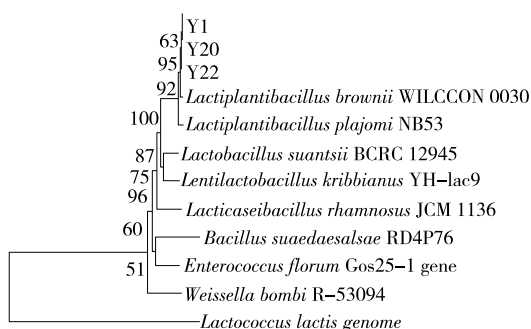
为进一步评估菌株的工业应用潜力,结合其生长特性分析发现,单宁酶活力与菌株的增殖效率呈现协同效应。由图5可知,乳杆菌属菌株(Y1、Y20、Y22)在液态培

表3 筛选得到的菌株结果

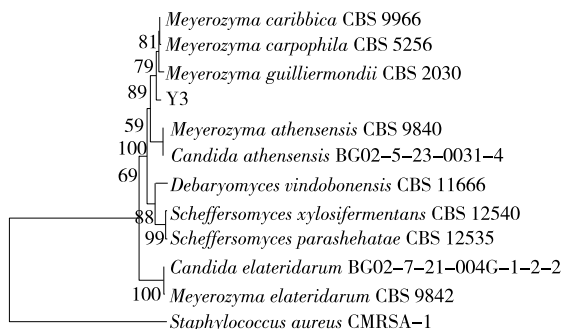
Table 3 Strains obtained after screening

菌株	属	种
Y1	乳植杆菌属 (<i>Lactiplanti-</i> <i>bacillus</i>)	植物乳植杆菌 (<i>Lactiplan-</i> <i>tibacillus plantarum</i>)
Y3	季也蒙迈耶氏酵母属 (<i>Meyerozyma</i>)	卡利比克迈耶氏酵母 (<i>Meyerozyma caribbica</i>)
Y20	乳植杆菌属 (<i>Lactiplanti-</i> <i>bacillus</i>)	植物乳植杆菌 (<i>Lactiplan-</i> <i>tibacillus plantarum</i>)
Y22	乳植杆菌属 (<i>Lactiplanti-</i> <i>bacillus</i>)	植物乳植杆菌 (<i>Lactiplan-</i> <i>tibacillus plantarum</i>)

养体系中表现出更优的环境适应性:接种后5 h进入指数增殖期,18~22 h达到最大生物量($OD_{600\text{ nm}}$ 分别为1.36, 1.36, 1.34),其快速增殖可能与高效的单宁酶系统加速碳源代谢有关。相比之下,酵母菌Y3的单宁酶活力略低(4.16 U/mL),但其在20 h即进入衰退期($OD_{600\text{ nm}}=0.85$),表示其代谢模式可能更依赖胞内储存物质而非持续底物利用^[21]。表明乳杆菌属菌株凭借高酶活力与快速增殖的协同优势,更适合高密度发酵工艺;而Y3的阶段性高效



(a) 基于16S rRNA的植物乳杆菌系统发育树



(b) 基于ITS序列的卡利比克迈耶氏酵母菌系统发育树

图4 菌株Y1、Y3、Y20、Y22的系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree of Y1, Y3, Y20 and Y22 strains

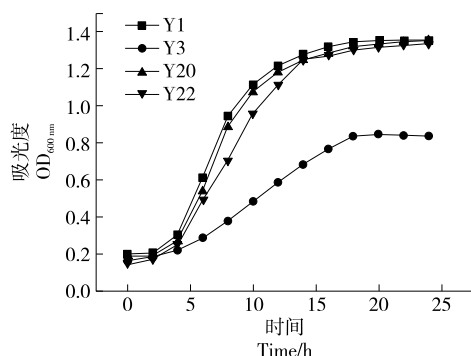


图5 菌株的生长曲线

Figure 5 Growth curves of strains

代谢特性,或可适配于短周期发酵体系(如果酒酿造),通过阶段性单宁降解提升产品质量。

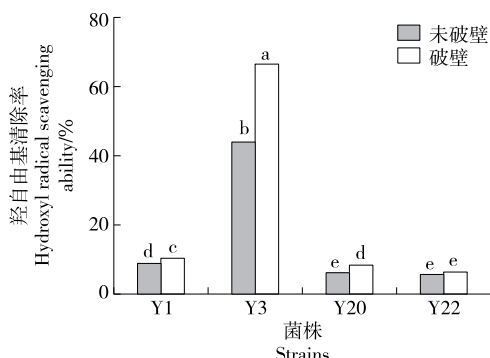
2.4 抗氧化活性分析

微生物细胞壁的完整性可能限制其内部抗氧化成分的释放或与外界的接触,因此破壁处理是研究胞内代谢产物及其抗氧化机制的有效手段,有助于揭示细菌或酵母菌在氧化胁迫下的生理反应。由图6可知,乳杆菌属菌株Y1、Y20、Y22虽表现出较高的单宁酶活力,但其抗氧化作用呈现典型的“胞外主导型”。破壁后菌株的羟自由基清除率增幅极低,Y1、Y20、Y22分别增加了1.43%,

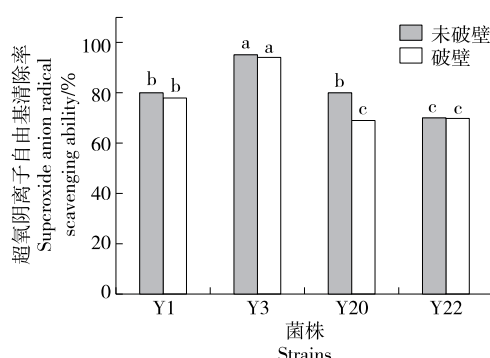
2.28%,0.68%,表明其抗氧化作用主要依赖于胞外代谢物(如有机酸/多糖)的持续分泌。此现象与单宁酶介导的代谢机制一致,高酶活力加速单宁水解生成游离酚酸(如没食子酸),同时菌株通过胞外代谢维持还原性物质的稳定积累^[22],然而乳杆菌胞内抗氧化物质(如超氧化物歧化酶、谷胱甘肽)贡献有限,致使羟自由基清除率增幅不足2.5%,表明其代谢网络侧重胞外抗氧化防御^[23]。

酵母菌Y3呈现独特的“胞内外协同型”抗氧化机制,其单宁酶活力为4.16 U/mL,虽略低于乳杆菌属菌株,但在羟自由基清除能力上优势显著:破壁后清除率从43.92%提升至66.43%,增幅达22.51%。这一差异可能源于破壁后胞内超氧化物歧化酶、谷胱甘肽等抗氧化成分的高效释放,显著提升了活性氧清除效率^[24]。在超氧阴离子自由基清除能力方面,Y20破壁后清除率从80.01%降至68.84%,降幅达13.9%,而Y3未破壁细胞上清液清除率达95.25%,破壁后仍保持94.04%,稳定性显著优于乳杆菌属菌株。研究表明,Y3分泌的胞外抗氧化成分(如低相对分子质量抗氧化肽或硫氧还蛋白)具有强效稳定性^[25],而乳杆菌胞外代谢物可能因破壁导致的理化环境改变而部分失活^[26]。

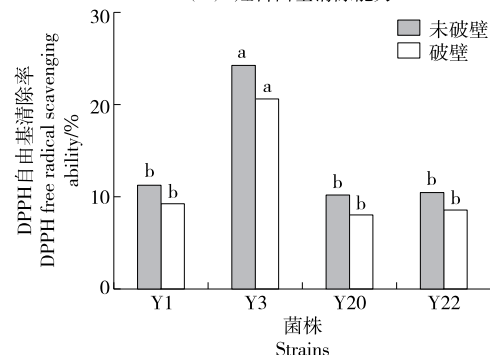
DPPH自由基清除试验显示,Y3未破壁时清除率为24.25%,分别为Y1、Y20、Y22的2.2、2.4、2.3倍;破壁后Y3



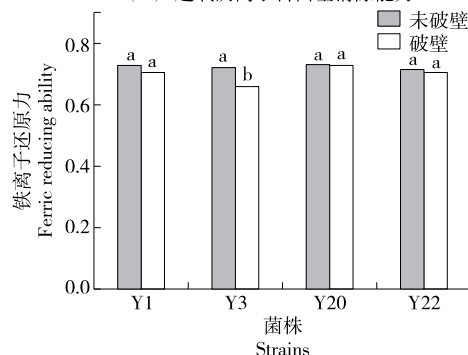
(a) 羟自由基清除能力



(b) 超氧阴离子自由基清除能力



(c) DPPH自由基清除能力



(d) 铁离子还原力

小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$)

图6 菌株破壁前后的抗氧化能力

Figure 6 Antioxidant capacities of strains before and after wall disruption

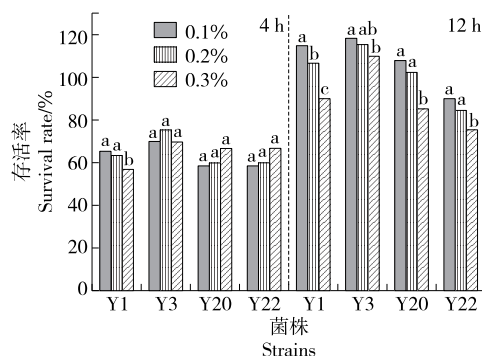
的DPPH自由基清除率降至20.59%,仍高于乳杆菌(如Y20破壁后下降20.9%~7.98%)的。表明乳杆菌抗氧化主要依靠胞外代谢物,而Y3具备胞内成分快速释放和胞外成分持久防御的双重特性^[25]。铁离子还原能力测试中,乳杆菌属菌株Y1、Y20、Y22的完整细胞上清液对铁离子的还原能力(Y20最高吸光度为0.730 7)在破壁后仅下降0.19%,而Y3破壁后吸光度从0.722 4降至0.660 6,降低了8.55%,这一现象反映了酵母胞内还原性辅酶系统(如NADH/NADPH)可能在细胞破裂后存在失活现象。这种显著差异揭示了不同微生物在应对氧化应激时进化出的独特防御策略,酵母作为真核微生物依赖区室化保护还原物质,而乳杆菌作为原核生物可能通过结构修饰和组成型防御来维持氧化还原稳态乳杆菌则持续分泌至胞外。

酵母通过其独特的抗氧化防御机制展现出显著优于乳杆菌的抗氧化效能,这一优势主要源于其细胞内外的协同抗氧化体系。在胞内,酵母富含谷胱甘肽、超氧化物歧化酶和过氧化氢酶等关键抗氧化成分,这些物质能高效清除自由基并阻断氧化链式反应;而在胞外,酵母细胞壁中的 β -葡聚糖和甘露糖蛋白等成分构成了稳定的物理屏障,不仅能直接捕获环境中的活性氧,还能通过信号传导激活细胞内的抗氧化通路。

2.5 胆盐耐受能力

耐胆盐菌株具有抑制肠道致病菌的关键能力^[27],通过牛胆盐胁迫试验可筛选出具备潜在抑菌功能的菌株。由图7可知,经4 h 0.2%浓度胆盐胁迫后,Y3菌株存活率达75.37%,显著高于其他3株菌的最高值(66.78%)。此外,Y3菌株在0.2%胆盐浓度下表现存活率峰值与Y20、Y22菌株在4 h呈现“低抑高促”现象,本质是其进化出的适应性策略激活菌株的应激保护机制,这一异常响应可能与低浓度胆盐激活菌株膜转运系统、高浓度下诱导应激蛋白表达的毒力调控机制相关^[28]。从浓度梯度响应来看,随着胆盐浓度升高至0.3%,各菌株在12 h的存活率总体呈下降趋势。Y3菌株的衰减幅度最小,存活率仅下降

7.2%,显著低于Y1和Y22菌株。在时间维度上,所有菌株在0.3%胆盐浓度下12 h的存活率均高于4 h,其中Y3菌株的存活率增幅最为显著,从69.73%提升至110.0%,增加了57.7%。12 h后不同浓度梯度下菌株耐受性层级高度一致($Y3 > Y1 > Y20 > Y22$),特别是在0.2%胆盐浓度下,Y3是唯一存活率 $>100\%$ 的菌株。其卓越的时间增益系数(在0.3%胆盐浓度下,12 h与4 h的比值为1.58)以及浓度稳定性(12 h存活率仅下降7.2%)表明,Y3可能通过胞内储能物质积累或细胞膜成分重构(如增加饱和脂肪酸比例),降低胆盐对细胞结构的损伤。因此,菌株在应对胆盐胁迫过程中会激活抗氧化防御机制,提高抗氧化能力^[29],这一结果印证了Y3较突出的抗氧化能力。



小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$)

图7 菌株耐胆盐能力

Figure 7 Bile salt tolerance of strains

2.6 降胆固醇能力

发酵微生物降胆固醇能力关系到其益生效果的发挥,是筛选和应用发酵微生物时需要重点关注的特性之一。一些发酵微生物在降胆固醇过程中,可能会改善肠道微生物群落的组成和功能,增强肠道屏障功能,减少有害物质的产生和吸收,进一步维护人体健康^[30]。由图8可知,4株受试菌株均表现出优异的胆固醇降解能力。其

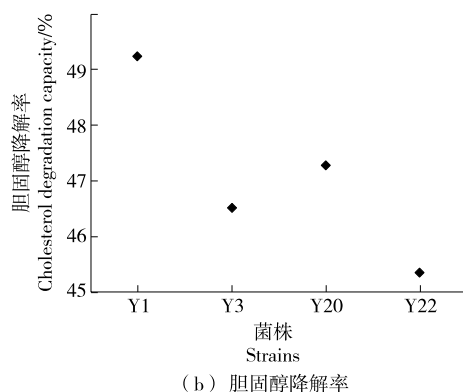
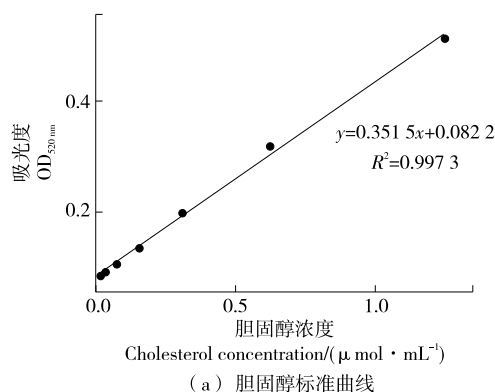


图8 菌株降解胆固醇能力

Figure 8 Cholesterol-degrading capacity of strains

中,Y1菌株在标准培养基中培养48 h后,胆固醇去除率达49.24%,展现了其高效的自主降解性能。这一效率接近于植物乳杆菌NF4^[31]依赖益生元协同的去除率(55.8%),也高于在模拟肠道条件下胆固醇同化率为44.4%的双歧杆菌BPL1^[32]。其余3株菌株(Y3、Y20、Y22)的去除率均>45%且波动范围小,表明该菌株能通过自身代谢稳定发挥降胆固醇作用。菌株的降胆固醇能力与其耐胆盐能力的关系存在菌种差异,表现为:植物乳杆菌(Y1、Y20、Y22)的耐胆盐能力与降胆固醇能力呈强正相关,即耐胆盐性越强(如Y1),降解胆固醇效率越高;而酵母菌(Y3)的耐胆盐能力最强(在0.3%胆盐中长期存活率表现优异),但降胆固醇能力(46.52%)却弱于部分植物乳杆菌(如Y1和Y20),与文献[33]报道的假丝酵母DZ018的结果近似。这一差异表明,胆盐水解酶活性、细胞膜吸附能力以及代谢调控等,可能在微生物降解胆固醇过程中具有决定性作用^[34-35]。

2.7 溶血性试验

由图9可知,经血琼脂培养基培养后,4株菌(Y1、Y3、Y20、Y22)菌落周围既无透明圈也无绿色圈,未产生溶血作用,为 γ -溶血。结果表明,3株乳酸菌与1株酵母菌菌株均无强致病性^[36]。

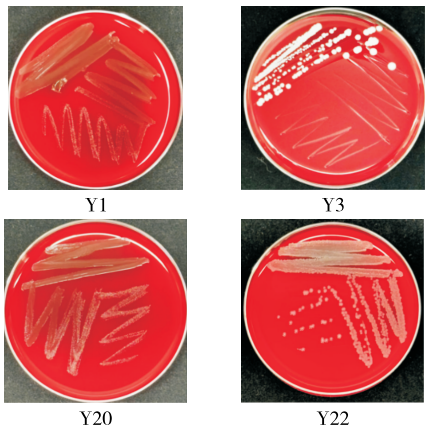


图9 溶血试验结果

Figure 9 Results of hemolytic test

2.8 药敏试验

由表4可知,Y1、Y20、Y22 3株乳杆菌均对哌拉西林、红霉素和青霉素呈敏感或中度敏感。值得注意的是,同种细菌或真菌的不同菌株对同一种抗菌药物的敏感程度存在差异^[37],因此Y1对万古霉素和氯霉素表现出耐药性,而Y20、Y22为中度敏感;Y1对头孢噻肟表现为中度敏感,而Y20、Y22为耐药。从作用机制来看,哌拉西林(β -内酰胺类抗生素)可以通过干扰细菌细胞壁的合成发挥杀菌作用;红霉素是大环内酯类抗生素,通过与细菌核糖体50S亚基结合抑制蛋白质合成,进而产生抑菌或杀菌作用;青霉素^[38]则通过与转肽酶结合,阻止细胞壁的主要

成分肽聚糖的交联,导致细菌细胞壁结构完整性受损,而引起细菌吸水膨胀并最终裂解死亡。基于上述机制,部分乳酸菌株的生长受到抑制,表现为菌落形成减少和生长速度减缓。因此,3株细菌对这类抗生素较为敏感。酵母菌株Y3对所有抗生素均呈现出耐药性,与冯东华等^[37]对于酵母菌耐药性测试结果一致。Stirke等^[39]研究表明,酵母菌因具有较厚的细胞壁,可在一定程度上阻碍抗生素进入内部,此外,酵母菌可能通过调节细胞膜的通透性降低抗生素对自身的毒性。

表4 根据抑菌圈直径对菌株的抗生素耐药性分析[†]

Table 4 Antibiotic susceptibility analysis for strains based on the diameters of the inhibition zones

抗生素	Y1	Y3	Y20	Y22
头孢噻肟	++	+++	+++	+++
哌拉西林	+	+++	+	+
万古霉素	+++	+++	++	++
红霉素	++	+++	++	++
四环素	+++	+++	+++	+++
环丙沙星	+++	+++	+++	+++
庆大霉素	+++	+++	+++	+++
头孢曲松	+++	+++	+++	+++
卡那霉素	+++	+++	+++	+++
左氧氟沙星	+++	+++	+++	+++
头孢他啶	+++	+++	+++	+++
链霉素	+++	+++	+++	+++
青霉素	+	+++	++	++
氯霉素	+++	+++	++	++

[†] +表示敏感,++表示中度敏感,+++表示耐药。

3 结论

从多源样本出发,基于特定培养基筛选出单宁降解菌,成功分离得到3株植物乳杆菌(Y1、Y20、Y22)与一株卡利比克迈耶氏酵母Y3,并深入探究其潜在益生功能。结果表明,酵母菌株Y3具有抗氧化酶系、细胞壁结构及代谢产物等方面的天然优势。抗氧化评估表明,其细胞上清液对超氧阴离子自由基的清除效果显著,破壁细胞对羟自由基与DPPH自由基的清除能力也优于乳酸杆菌,且在各组试验中,两类样本(胞外上清液与胞内提取物)的清除率均显著高于最低值组20%。该菌株对胆盐耐受力较强、存活率较高(118.50%),且在抗生素敏感性测试中呈现固有耐受特性。尽管其胆固醇降解效率(46.52%)略低于其他测试菌株,但优异的抗氧化性能与胆盐耐受性使其在食品发酵领域更具应用潜力。在发酵特性方面,Y3能够有效利用葡萄糖、蔗糖和麦芽糖等碳源,并可与酿酒酵母协同作用,在果酒发酵过程中促进苹果酸降

解,显著提升发酵液的可滴定酸含量和抗氧化物质水平。安全性评估显示该菌株无溶血活性,符合食品级微生物的基本要求。但目前研究仅限实验室,缺乏中试及产业化数据,益生机制解析不足。未来需优化培养体系,结合多组学技术探究益生机制,评估菌株在动物模型及人体中的安全性和有效性。

参考文献

- [1] ZENG X Q, JIANG W B, DU Z J, et al. Encapsulation of tannins and tannin-rich plant extracts by complex coacervation to improve their physicochemical properties and biological activities: a review[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2023, 63(18): 3 005-3 018.
- [2] ZHANG L L, GUAN Q H, JIANG J C, et al. Tannin complexation with metal ions and its implication on human health, environment and industry: an overview[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 253: 127485.
- [3] AHMED A I, ABOU-TALEB K A A, ABD-ELHALIM B T. Characterization and application of tannase and gallic acid produced by co-fungi of *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride* utilizing agro-residues substrates[J]. *Scientific Reports*, 2023, 13(1): 16755.
- [4] BORAH A, SELVARAJ S, MURTY V R. Production of gallic acid from *Swietenia macrophylla* using tannase from *Bacillus gottheilii* M2S2 in semi-solid state fermentation[J]. *Waste and Biomass Valorization*, 2023, 14(8): 2 569-2 587.
- [5] LIANG S, WANG F, CHEN J X, et al. Optimization of a tannase-assisted process for obtaining teas rich in theaflavins from *Camellia sinensis* leaves[J]. *Food Chemistry: X*, 2022, 13: 100203.
- [6] CHAIKAEW S, BAIPONG S, SONE T, et al. Diversity of lactic acid bacteria from Miang, a traditional fermented tea leaf in northern Thailand and their tannin-tolerant ability in tea extract [J]. *Journal of Microbiology*, 2017, 55(9): 720-729.
- [7] UNBAN K, KOCHASEE P, SHETTY K, et al. Tannin-tolerant and extracellular tannase producing *Bacillus* isolated from traditional fermented tea leaves and their probiotic functional properties[J]. *Foods*, 2020, 9(4): 490.
- [8] 谭川川, 何劲, 魏雨萌, 等. 一株耐单宁酵母菌的筛选、鉴定及发酵特性[J]. *食品与发酵工业*, 2023, 49(15): 47-53.
TAN C C, HE J, WEI Y M, et al. Screening and identification of a tannin-tolerant yeast strain and its fermentation characteristics [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2023, 49(15): 47-53.
- [9] 阿热爱·巴合提, 谭春明, 李平兰. 益生菌的分类及其多领域应用研究现状[J]. *生物加工过程*, 2022, 20(1): 88-94.
AREAI B, TAN C M, LI P L. Classification and applications of probiotics[J]. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2022, 20(1): 88-94.
- [10] 高浩, 陈志豪, 陆致成, 等. 植物乳植杆菌 CCFM8661 和动物双歧杆菌乳亚种 XLTG11 复合益生菌对免疫系统的增强作用[J]. *中国乳品工业*, 2024, 52(11): 13-19.
- GAO H, CHEN Z H, LU Z C, et al. *Lactiplantibacillus plantarum* CCFM8661 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* XLTG11 combined probiotics enhance immune system function[J]. *China Dairy Industry*, 2024, 52(11): 13-19.
- [11] STANISZEWSKI A, KORDOWSKA-WIATER M. Probiotic and potentially probiotic yeasts-characteristics and food application[J]. *Foods*, 2021, 10(6): 1 306.
- [12] 马子琳. 产单宁酶乳酸菌在豆类酸面团馒头中的应用研究[D]. 无锡: 江南大学, 2021: 13-14.
MA Z L. Study on the application of tannase-producing LAB in legumes sourdough steamed bread[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2021: 13-14.
- [13] 保玉心, 邱树毅, 李秧针, 等. 一种胞外单宁酶的活力检测方法[J]. *精细化工*, 2008, 25(6): 621-624.
BAO Y X, QIU S Y, LI Y Z, et al. A method for detecting activity of extracellular tannase[J]. *Fine Chemicals*, 2008, 25 (6): 621-624.
- [14] 张艳芳, 吕欣然, 武文玉, 等. 水产品肠道中富硒乳酸菌的筛选及其体外生物活性[J]. *食品研究与开发*, 2024, 45(18): 106-113.
ZHANG Y F, LÜ X R, WU W Y, et al. Screening of selenium-rich lactic acid bacteria from intestinal tract of aquatic products and evaluation of its bioactivities *in vitro*[J]. *Food Research and Development*, 2024, 45(18): 106-113.
- [15] ZHANG H, XU J H, CHEN Q, et al. Physiological, morphological and antioxidant responses of *Pediococcus pentosaceus* R1 and *Lactobacillus fermentum* R6 isolated from Harbin dry sausages to oxidative stress[J]. *Foods*, 2021, 10(6): 1 203.
- [16] 许凤, 陈金玲, 张梦雪, 等. 一株发酵条斑紫菜植物乳杆菌的筛选、发酵特性及其发酵多糖抗氧化活性[J]. *江苏海洋大学学报*, 2025, 34(1): 16-23.
XU F, CHEN J L, ZHANG M X, et al. Screening and fermentation characteristics of a strain of fermented *Porphyra yezoensis* lactobacillus and the antioxidant activity of its fermented polysaccharides[J]. *Journal of Jiangsu Ocean University*, 2025, 34(1): 16-23.
- [17] 徐冬美, 刘永乐, 李向红, 等. 红曲鲑鱼中原生乳酸菌菌株筛选及发酵工艺优化[J]. *食品与机械*, 2023, 39(8): 175-185.
XU D M, LIU Y L, LI X H, et al. Screening of autochthonous lactic acid bacteria and optimization of fermentation process in low-salt *Zhayu* of red rice[J]. *Food & Machinery*, 2023, 39(8): 175-185.
- [18] 余萍, 矫艳平, 张春宇, 等. 具有降胆固醇功能的罗伊氏乳杆菌的筛选及其益生作用[J]. *现代食品科技*, 2021, 37(11): 106-113.
YU P, JIAO Y P, ZHANG C Y, et al. Screening for cholesterol-lowering *Lactobacillus reuteri* strains and analyzing their probiotic effectiveness[J]. *Modern Food Science and*

- Technology, 2021, 37(11): 106-113.
- [19] 王睿敏, 郑冬艳, 但霞, 等. 具有潜在降压功能益生乳酸菌的筛选及其特性的研究[J]. 食品科技, 2025, 50(1): 1-8.
- WANG R M, ZHENG D Y, DAN X, et al. Screening and characterization of probiotic lactic acid bacteria with potential antihypertensive function[J]. Food Science and Technology, 2025, 50(1): 1-8.
- [20] 陈靖, 周佳豪, 毛琪琪, 等. 产胞外多糖乳酸菌的筛选及鉴定[J]. 食品与机械, 2023, 39(4): 26-31, 169.
- CHEN J, ZHOU J H, MAO Q Q, et al. Screening and identification of extracellular polysaccharide-producing lactic acid bacteria[J]. Food & Machinery, 2023, 39(4): 26-31, 169.
- [21] CHEN Y, LI F R, NIELSEN J. Genome-scale modeling of yeast metabolism: retrospectives and perspectives[J]. FEMS Yeast Research, 2022, 22(1): foac003.
- [22] TANG Z H, SHI L Y, LIANG S, et al. Recent advances of tannase: production, characterization, purification, and application in the tea industry[J]. Foods, 2024, 14(1): 79.
- [23] KHAN N, SINGH A K, SANEJA A. Preparation, characterization, and antioxidant activity of *L*-ascorbic acid/HP- β -cyclodextrin inclusion complex-incorporated electrospun nanofibers[J]. Foods, 2023, 12(7): 1 363.
- [24] KANPIENGJAI A, KODCHASEE P, UNBAN K, et al. Three new yeast species from flowers of *Camellia sinensis* var. *assamica* collected in Northern Thailand and their tannin tolerance characterization[J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 14: 1043430.
- [25] WU C Y, ZHANG H X, YANG N N, et al. Antioxidant dipeptides enhance osmotic stress tolerance by regulating the yeast cell wall and membrane[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(8): 4 339-4 347.
- [26] OLIVEIRA G S, FREIRE H P S, ROMANO C C, et al. Bioprotective potential of lactic acid bacteria and their metabolites against enterotoxigenic *Escherichia coli*[J]. Microbiology, 2022, 168(7): 001216.
- [27] LI W, CHEN H, TANG J G. Interplay between bile acids and intestinal microbiota: regulatory mechanisms and therapeutic potential for infections[J]. Pathogens, 2024, 13(8): 702.
- [28] MATEUS C, MAIA C J, DOMINGUES F, et al. Evaluation of bile salts on the survival and modulation of virulence of *Aliarcobacter butzleri*[J]. Antibiotics, 2023, 12(9): 1 387.
- [29] 王祎然, 韦明明, 张涵, 等. 酸汤中乳酸菌的鉴定及其耐酸、耐胆盐和抗氧化活性[J]. 食品工业科技, 2020, 41(16): 121-126, 139.
- WANG Y R, WEI M M, ZHANG H, et al. Identification, acid and bile salt tolerance, and antioxidant ability of lactic acid bacteria isolated from sour soup[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(16): 121-126, 139.
- [30] 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.
- [31] SUI Y, LIU J T, LIU Y X, et al. *In vitro* probiotic characterization of *Lactobacillus* strains from fermented tangerine vinegar and their cholesterol degradation activity[J]. Food Bioscience, 2021, 39: 100843.
- [32] FERNÁNDEZ-CALDERÓN M C, SÁNCHEZ-MORO M D H, RINCÓN E O. *In vitro* cholesterol assimilation by *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BPL1) probiotic bacteria under intestinal conditions[J]. Endocrine, Metabolic & Immune Disorders Drug Targets, 2022, 22(4): 433-439.
- [33] 黄姚, 么乃全, 袁伟涛, 等. 鹿源藿香假丝酵母菌 DZ018 的分离鉴定及其体外益生特性研究[J]. 中国畜牧兽医, 2025, 52(1): 389-399.
- HUANG Y, MO N Q, YUAN W T, et al. Isolation and identification of *Candida rugosa* DZ018 from deer and its probiotic properties *in vitro*[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 52(1): 389-399.
- [34] LEW L C, CHOI S B, KHOO B Y, et al. *Lactobacillus plantarum* DR7 reduces cholesterol *via* phosphorylation of AMPK that down-regulated the mRNA expression of HMG-CoA reductase[J]. Korean Journal for Food Science of Animal Resources, 2018, 38(2): 350-361.
- [35] LIU Y, ZHENG S J, CUI J L, et al. Effect of bile salt hydrolase-active *Lactobacillus plantarum* Y15 on high cholesterol diet induced hypercholesterolemic mice[J]. CyTA - Journal of Food, 2021, 19(1): 408-417.
- [36] 瞿桂花, 朱秋劲, 万婧. 抑制火腿中黑曲霉生长及其合成赭曲霉毒素 A 菌株的筛选、鉴定及生长特性[J]. 食品工业科技, 2024, 45(22): 107-115.
- QU G H, ZHU Q J, WAN J. Screening, identification and growth characterization of strains inhibiting the growth and synthesis of ochratoxin A by *Aspergillus niger* in hams[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(22): 107-115.
- [37] 冯东华, 郑钟立, 林勇平, 等. 益生菌对 16 种抗生素的耐药性分析[J]. 中国微生态学杂志, 2021, 33(10): 1 176-1 180.
- FENG D H, ZHENG Z L, LIN Y P, et al. The drug resistance of probiotics to 16 antibiotics[J]. Chinese Journal of Microecology, 2021, 33(10): 1 176-1 180.
- [38] SIRICHOAT A, FLÓREZ A B, VÁZQUEZ L, et al. Antibiotic susceptibility profiles of lactic acid bacteria from the human vagina and genetic basis of acquired resistances[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(7): 2 594.
- [39] STIRKE A, CELIESIUTE-GERMANIENE R, ZIMKUS A, et al. The link between yeast cell wall porosity and plasma membrane permeability after PEF treatment[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 14731.