

泡菜源乳酸菌的分离筛选及其对小鼠氧化应激水平的改善作用

周先容¹, 谭仟¹, 母健菲^{1,2}, 曾松³, 曾艺涛³, 赵欣¹

(1. 重庆第二师范学院, 重庆市功能性食品协同创新中心, 重庆 400067)

(2. 西南大学食品科学学院, 重庆 400715) (3. 重庆市辅仁中学校, 重庆 400066)

摘要: 为筛选具有较好体外抗性以及体内抗氧化效果的乳酸菌, 本研究从重庆农家自然发酵泡菜中分离得到 12 株菌株, 经 16S rDNA 种属分析表明, 其中植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 4 株, 发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*) 7 株, 短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*) 1 株。采用 pH 3.0 人工胃液和 0.3% 胆盐对乳酸菌进行体外抗性筛选, 发现 12 株乳酸菌具有较好的体外抗性, 其中 10 株乳酸菌在 pH 3.0 人工胃液中处理 3 h 后的存活率超过 80%; 2 株乳酸菌在 0.3% 胆盐中的存活率超过 60%。选取体外抗性好且为食品可用菌种的 *Lactobacillus fermentum* CQPC-11 (*L. fermentum* CQPC-11) 为实验菌株, 评价其对活性炭水诱导氧化应激损伤小鼠的改善作用, 结果表明 H-LF CQPC11 组小鼠血清中总超氧化物歧化酶 (T-SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 和过氧化氢酶 (CAT) 的酶活力分别为 67.73 U/mL、2742.35 酶活力单位、136.59 U/mL, 显著高于模型组 ($p < 0.05$), 而丙二醛 (MDA) 的含量为 1.99 nmol/L, 显著低于模型组 ($p < 0.05$)。综上所述, *L. fermentum* CQPC-11 不仅具备良好的耐胃酸和耐胆盐能力, 还能降低氧化应激模型小鼠的氧化应激反应, 可通过后续进一步的实验探讨该菌株抗氧化作用的具体机理, 为新型微生态制剂以及功能性乳酸菌食品的开发提供理论依据和可用菌株。

关键词: 泡菜; 乳酸菌; 分离筛选; 抗氧化

文章编号: 1673-9078(2020)09-17-25

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.9.0248

Isolation and Screening of Lactic Acid Bacteria from Pickle and its Improvement Effect on Oxidative Stress Level in Mice

ZHOU Xian-rong¹, TAN Qian¹, MU Jian-fei^{1,2}, ZENG Song³, ZENG Yi-tao³, ZHAO Xin¹

(1. Chongqing Engineering Laboratory for Functional Food, Chongqing Collaborative Innovation Center for Functional Food, Chongqing 400067, China) (2. Southwest University, College of Food Sciences, Chongqing 400715, China)

(3. Chongqing Furen High School, Chongqing 400066, China)

Abstract: In order to screen lactic acid bacteria with good *in vitro* resistance and antioxidative effect *in vivo*, 12 strains were isolated from natural fermented pickle in Chongqing farmhouse. 16S rDNA species analysis showed that 4 strains are *Lactobacillus plantarum*, 7 strains are *Lactobacillus fermentum*, and 1 strain is *Lactobacillus brevis*. The *in vitro* resistance of lactic acid bacteria were tested using artificial gastric juice (pH 3.0) and 0.3% of bile salt, it was found that all 12 strains of *Lactobacillus* had good resistance *in vitro*. The survival rate of 10 strains of *Lactobacillus* in artificial gastric juice at pH 3.0 for 3 h exceeded 80%; the survival rate of 2 strains of *Lactobacillus* in 0.3% bile salt exceeded

引文格式:

周先容, 谭仟, 母健菲, 等. 泡菜源乳酸菌的分离筛选及其对小鼠氧化应激水平的改善作用[J]. 现代食品科技, 2020, 36(9): 17-25

ZHOU Xian-rong, TAN Qian, MU Jian-fei, et al. Isolation and screening of lactic acid bacteria from pickle and its improvement effect on oxidative stress level in mice [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(9): 17-25

收稿日期: 2020-03-17

基金项目: 重庆市教委科学技术研究项目重点项目 (KJZD-K201901601); 重庆第二师范学院大学生科研项目 (KY20190140); 重庆市普通高中教育教学改革研究重点课题 (2015cqjwz2001); 重庆市教育科学规划办教育科学专项课题 (2016-cx-06)

作者简介: 周先容 (1993-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品化学与营养学

通讯作者: 赵欣 (1981-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品化学与营养学

60%。 *L. fermentum* CQPC-11, which has good resistance *in vitro* and is a usable strain of food, was selected as the experimental strain, and its improvement effect on activated carbon ice water-induced oxidative damage in mice was evaluated. The results showed that the enzyme activities of T-SOD, GSH-Px and CAT in the serum of mice in the H-LF CQPC11 group were 67.73 ± 5.42 U/mL, 2742.35 ± 107.35 enzyme activity units, and 136.59 ± 18.72 U/mL, respectively, which were significantly higher than the model group ($p < 0.05$), and the content of MDA was 1.99 ± 0.14 nmol/L, which was significantly lower than the model group ($p < 0.05$). In summary, *L. fermentum* CQPC-11 not only has good resistance to gastric acid and bile salts, but also reduces oxidative stress response in oxidative stress model mice. The specific mechanism of the anti-oxidant effect of this strain can be explored through subsequent experiments, so as to provide a theoretical basis and available strains for the development of new micro-ecological preparations and functional lactic acid bacteria food.

Key words: pickles; lactic acid bacteria; isolation and screening; antioxidant

泡菜被公认为具有益生功能的健康发酵食品^[1], 目前泡菜中乳酸菌的研究主要包括其与泡菜风味及品质形成机理的关系、其在泡菜发酵过程中的动态变化以及优良泡菜发酵菌剂的开发^[2-4]等方面, 也有研究对泡菜中的乳酸菌进行分离鉴定, 但多数是对分离出来的乳酸菌进行发酵性能、发酵风味方面的鉴定^[5-8]。作为一种富含乳酸菌的发酵食品, 从泡菜中分离筛选出在人体内可能产生益生作用的乳酸菌不仅可以丰富优良乳酸菌种资源, 同时也可提升泡菜营养价值的提升、开发具有益生作用的新型泡菜发酵剂等提供理论依据与原料来源。

人体肠道中的益生菌对机体有着重要的生理作用, 如改善胃肠道功能、提高机体免疫力、降低胆固醇、防癌抗癌与延缓机体衰老等^[9-12]。能在人体胃液、胆盐中存活下来是益生菌在体内发生益生作用的前提, 所以在筛选益生性菌株的过程中, 胃液耐受性和胆盐耐受性是两个重要的评价指标^[13]。反复冰水和活性炭刺激会导致肠道蠕动减慢, 而且附着在肠粘膜表面的活性炭可吸收肠道中的大量水分, 减少肠液的分泌和加速肠道粘膜的断裂损伤, 最终诱发剧烈的肠道氧化应激反应^[14,15]。研究发现口服乳酸菌制剂可以刺激肠道蠕动, 增加肠液的分泌, 从而起到改善肠道氧化应激反应的作用^[16]。

该研究以重庆农家自然发酵泡菜为原料, 采用传统方法对乳酸菌进行分离纯化, 然后采用 16S rDNA 和系统发育树分析纯化菌株的种属关系, 并采用 pH 3.0 人工胃液和 0.3%胆盐实验评价乳酸菌的体外抗性。根据体外抗性结果选出一株体外抗性好且为食品可用菌种的乳酸菌 (*L. fermentum* CQPC-11), 采用活性炭冰水灌胃诱导小鼠肠道氧化应激模型, 然后评价该菌株对氧化应激小鼠血清氧化应激指标的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

实验样品: 12 株乳酸菌分离自重庆市南岸区农家自然发酵泡菜, 保藏于重庆市功能性食品协同创新中心。

MRS 肉汤, 美国 BD 公司; Agar Powder, 北京索莱宝科技有限公司。猪胆盐, 山东西亚化学工业有限公司; 胃蛋白酶 (1:3000), 北京索莱宝生物科技有限公司; 硫代乙醇酸钠, 山东西亚化学工业有限公司; 盐酸 (分析纯), 成都市科龙化工试剂厂; 通用细菌基因组 DNA 提取试剂盒、Proteinase K、琼脂糖、50×TAE 缓冲溶液、2×Taq PCR Master Mix、2000 bp DNA Ladder, 天根生化 (北京) 科技有限公司; Gold View 核酸染色剂 (EB 替代品), 武汉百浩天生物科技有限公司代理; PCR 扩增上游引物 1495R、下游引物 27F, 由上海生工生物工程公司合成; 活性炭, 郑州竹林活性炭开发有限公司; 超氧化物歧化酶 (T-SOD) 试剂盒、丙二醛 (MDA) 试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 试剂盒、过氧化氢酶 (CAT) 试剂盒, 南京建成生物研究所。

1.2 仪器与设备

BI-150A 恒温培养箱, 施都凯仪器设备 (上海) 有限公司; SW-CJ-2FD 超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; LDZM-80KCS-II 高压蒸汽灭菌锅, 上海申安医疗器械厂; ICEN-24R 台式高速冷冻离心机, 杭州奥盛仪器有限公司; BK6000 生物显微镜, 重庆奥特光学仪器有限公司; OLYMPUS-X43 正置生物显微镜, 日本奥林巴斯公司; ULTS1651 医用低温冰箱, 赛默飞世尔 (苏州) 仪器有限公司; UPH-II-20T 纯水/超纯水制造系统, 四川优普超纯水科技有限公司; Tanon-2500 PCR 凝胶成像仪, 上海 Tanon 科技有限公司; PHS-3E pH 计, 雷磁-上海仪电科学仪器股份有限公司; ES 500 电子天平, 天津市得安特传感技术有限公司; JY600C 电泳仪, 北京君意东方电泳设备有限公司; HHW21.600AII 数显恒温水浴锅, 天津市泰斯特仪器有限公司; VARIOSKAN LUX 多功能酶标

仪,赛默飞世尔科技(苏州)有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 乳酸菌的分离纯化及初步鉴定

将泡菜汁样品以5%的接种量接种于无菌MRS肉汤中,37℃静置富集培养18~24 h。取上述富集菌悬液1 mL,进行10倍梯度稀释至 10^{-6} ,然后选择 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} ,3个梯度的菌液100 μ L进行平板涂布,37℃培养24~48 h,观察并记录菌落形态。挑取平板上不同形态的菌落进行划线分离,经37℃培养48 h后,再次挑取平板上不同形态的单菌落进行划线分离,如此重复2至3次,直至得到形态一致的纯的单菌落。然后通过革兰氏染色筛选出疑似乳酸菌,并将其用20%的甘油保存于-80℃备用。

1.3.2 乳酸菌的16S rDNA分析

将纯化的疑似目标菌株接种于MRS肉汤中,37℃培养18~24 h后,采用细菌基因组DNA提取试剂盒进行DNA提取。提取完的DNA进行PCR扩增,其中上游引物27F(5'-AGA GTT TGA TCC TGGCTC AG-3') 1 μ L、下游引物1495 R(5'-CTA CGG CTA CCTTGT TAC GA-3') 1 μ L, 2 $\times$ Taq plus Buffer 12.5 μ L、模板DNA 1 μ L,用无菌dd H₂O将体系补足至25 μ L。并以无菌超纯水替代模板DNA作为阴性对照。扩增条件为:94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min,共29个循环,最后72℃延伸5 min。然后取5 μ L扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,琼脂糖浓度为1.5%,电泳条件为110 V,45 min。将检测成功的PCR产物送往北京擎科生物技术有限公司进行测序,测序成功的序列使用NCBI中的BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)程序进行比对分析。

1.3.3 人工胃液耐受性测定

人工胃液的配制^[17]:人工胃液由0.2% NaCl和0.35%胃蛋白酶组成,按照对应的质量体积比分别称取实验所需NaCl和胃蛋白酶进行配制,用1 mol/L的HCl将配制好的人工胃液pH调整为3.0,再用0.22 μ m的滤膜过滤除菌备用。

在超净工作台中吸取5 mL培养好的含菌培养基于10 mL无菌离心管中,经3000 r/min离心10 min,弃去上层培养基并收集菌体,加入等体积(5 mL)无菌生理盐水混匀制成菌悬液,然后取1 mL菌悬液与9 mL pH 3.0的人工胃液混匀,此时取1 mL上述混合液作为人工胃液处理0 h的样品,剩余9 mL混合液置于恒温水浴摇床(37℃,150 r/min)中培养3 h。0 h和3 h的样品分别经10倍梯度稀释,选择合适梯度采用

平板涂布的方法测定活菌数,在MRS固体培养基上37℃培养48 h^[17-19],按公式(1)计算存活率(%)。

$$\text{存活率}/\% = \frac{3 \text{ h活菌数}/(\text{CFU}/\text{mL})}{0 \text{ h活菌数}/(\text{CFU}/\text{mL})} \times 100\% \quad (1)$$

1.3.4 胆盐胁迫性实验

在MRS-THIO培养基(含0.2%巯基乙酸钠的MRS肉汤)中添加猪胆盐使其浓度为0.3%,121℃灭菌15 min。将活化好的菌种以2%(V/V)的接种量分别接入不含胆盐(0.0%)的MRS-THIO培养基和含0.3%胆盐的MRS-THIO培养基中,以空白培养基(未接菌的MRS-THIO培养基)为对照,37℃培养24 h后,分别测定上述不同浓度培养基的OD_{600nm}值^[17-20],按公式(2)计算菌株对胆盐的耐受力:

$$\text{胆盐耐受力}/\% = \frac{C-A}{B-A} \times 100\% \quad (2)$$

其中:A:空白培养基OD_{600nm}值;B:含0.0%胆盐培养基OD_{600nm}值;C:含0.3%胆盐培养基OD_{600nm}值。

1.3.5 实验动物分组与处理

50只小鼠适应性喂养一周后,随机分为5组,每组10只,分别为正常组、模型组、*L. fermentum* CQPC-11低剂量组(L-LFCQPC11组)、*L. fermentum* CQPC-11高剂量组(H-LFCQPC11组)和保加利亚乳杆菌对照组(LB组),整个实验周期为9 d。整个实验期间,正常组和模型组每天灌胃生理盐水;*L. fermentum* CQPC-11低、高剂量组每天灌胃*L. fermentum* CQPC-11菌悬液,其中低剂量组的乳酸菌灌胃浓度为 1.5×10^8 CFU/mL,高剂量组为 5.0×10^9 CFU/mL;保加利亚乳杆菌对照组每天灌胃 5.0×10^9 CFU/mL的保加利亚乳杆菌菌悬液;从第7 d至第9 d,除正常组小鼠外,其余所有小鼠每天需要另外灌胃0.2 mL 10%的活性炭冰水进行肠道氧化应激模型诱导。第9 d灌胃完成之后,所有小鼠禁食不禁水24 h,通过脱脊椎的方法处死小鼠,然后通过下腔静脉收集全血,全血于4℃冰箱静置2 h左右,于3000 r/min,4℃条件下冷冻离心10 min,然后收集上层血清放于-80℃冰箱保存备用。

1.3.6 小鼠血清中T-SOD、MDA、GSH-PX和CAT含量测定

根据南京建成生物研究所试剂盒说明书分别测定小鼠血清中T-SOD、MDA、GSH-PX和CAT的含量。

1.3.7 数据处理与分析

采用spss 17.0中的one-way ANOVA对数据进行显著性分析($p < 0.05$),最终结果表示为平均值 $\pm$ 标准偏差。文中所用图是由origin 8.6.0软件制作所得。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌菌体形态结构

如图 1 所示，经平板划线分离，菌株在平板上形成单菌落，且各单菌落形态几乎完全一致。菌落颜色多为白色或乳白色，形状为圆形，边缘整齐，表面湿润光滑，符合乳酸菌菌落形态特征。因为乳酸菌为革兰氏阳性菌，通过革兰氏染色会呈现蓝紫色，所以对分纯的菌株进行革兰氏染色镜检，从而筛选疑似乳酸菌。疑似乳酸菌菌株细胞形态如图 2 所示，细胞形态有长杆、短杆，且无芽孢存在、形态均匀单一，说明菌株纯化较好，无杂菌污染。

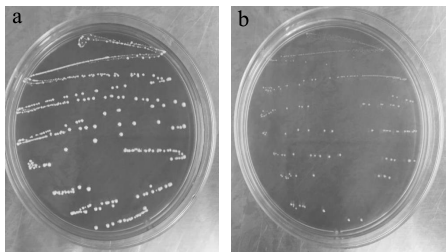


图 1 菌株菌落形态

Fig.1 Colony morphology of strains

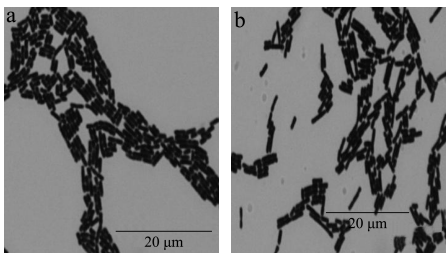


图 2 菌株革兰氏染色结果

Fig.2 Gram staining results of strains

2.2 菌株 16S rDNA 序列分析

从泡菜样品中共分离纯化出 12 株疑似乳酸菌，编号分别为 CQPC-1、CQPC-2、CQPC-3、CQPC-8、CQPC-11、CQPC-12、CQPC-19、CQPC-21、CQPC-28、CQPC-29、CQPC-30、CQPC-32。以提取的 12 株乳酸菌 DNA 为模板，经 PCR 扩增后直接采用琼脂凝胶电泳进行检测，检测结果见图 3。由图可知，条带清晰无拖尾现象，且位于 1000~2000 bp 之间，符合乳酸菌的预期扩增片段长度。

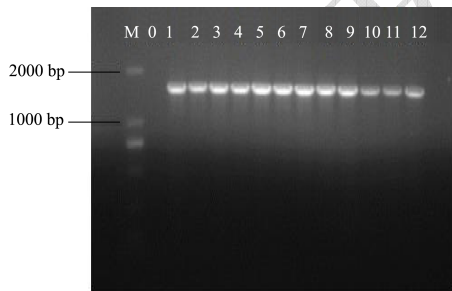


图 3 优良乳酸菌 PCR 扩增产物 16S rDNA 琼脂糖凝胶电泳图

Fig.3 Agarose gel electrophoresis of 16S rDNA-PCR products from excellent strains of lactobacillus

注：M-2000 bp DNA Ladder；0-阴性对照组；1-CQPC-1；2-CQPC-2；3-CQPC-3；4-CQPC-8；5-CQPC-11；6-CQPC-12；7-CQPC-19；8-CQPC-21；9-CQPC-28；10-CQPC-29；11-CQPC-30；12-CQPC-32 的菌株。

如表 1 所示，经 BLAST 程序比对分析表明，12 株乳酸菌中植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 4 株，发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*) 7 株，短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*) 1 株，且它们与 Gene Bank 数据库中已知乳酸菌的同源性均达 99% 及以上。

表 1 12 株优良乳酸菌鉴定结果

Table 1 Identification result of the selected 12 strains

菌株编号	拉丁菌名	中文名	同源性/%	Gene Bank 登录号
CQPC-1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	植物乳杆菌	99	NC_004567.2
CQPC-2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	植物乳杆菌	99	NC_004567.2
CQPC-3	<i>Lactobacillus plantarum</i>	植物乳杆菌	99	NC_004567.2
CQPC-8	<i>Lactobacillus fermentum</i>	发酵乳杆菌	99	NC_010610.1
CQPC-11	<i>Lactobacillus fermentum</i>	发酵乳杆菌	99	NC_010610.1
CQPC-12	<i>Lactobacillus brevis</i>	短乳杆菌	99	NC_008497.1
CQPC-19	<i>Lactobacillus fermentum</i>	发酵乳杆菌	99	NC_010610.1
CQPC-21	<i>Lactobacillus fermentum</i>	发酵乳杆菌	99	NC_004567.2
CQPC-28	<i>Lactobacillus plantarum</i>	植物乳杆菌	99	NC_004567.2
CQPC-29	<i>Lactobacillus fermentum</i>	发酵乳杆菌	99	NC_010610.1
CQPC-30	<i>Lactobacillus fermentum</i>	发酵乳杆菌	99	NC_010610.1
CQPC-32	<i>Lactobacillus fermentum</i>	发酵乳杆菌	99	NC_010610.1

2.3 乳酸菌系统发育结果分析

从 GeneBank 数据库中调取参考菌株序列, 采用 Clustalx 1.83 软件进行序列匹配比对, 通过 MEGA 5.0 软件对具有益生性特性的 12 株乳酸杆菌构建菌株的系统发育树^[21], 由图 4 可知, 12 株实验菌株全部归为乳酸杆菌属。其中 CQPC-1、CQPC-2、CQPC-3 和 CQPC-28 以自举支持率 99% 归为植物乳杆菌; CQPC-8、CQPC-11、CQPC-19、CQPC-21、CQPC-29 CQPC-31 和 CQPC-32 以 99% 的自举支持率与发酵乳杆菌归在一起; CQPC-12 以 100% 的自举支持率与短乳杆菌聚在一起, 表明二者同源关系近。由此可知, 系统发育树分析结果与 16S rDNA 分析结果相符合。

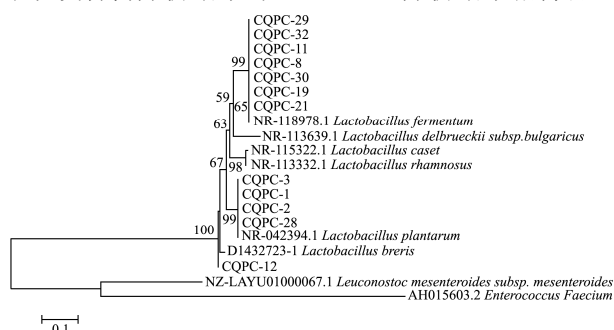


图 4 乳酸菌的系统发育树

Fig.4 Phylogenetic trees of lactic acid

表 2 乳酸菌耐受 pH 3.0 人工胃液实验结果

Table 2 Resistance of lactic acid bacteria to artificial gastric juice

菌株编号	0 h 菌落数/(cfu/mL)	3 h 菌落数/(cfu/mL)	存活率/%
CQPC-1	5.75×10^7	5.20×10^7	90.43±8.26
CQPC-2	5.85×10^7	5.30×10^7	107.69±8.75
CQPC-3	6.30×10^7	5.80×10^7	92.06±6.91
CQPC-8	1.12×10^8	7.65×10^7	68.61±2.20
CQPC-11	7.25×10^7	6.10×10^7	84.14±6.06
CQPC-12	1.22×10^8	1.01×10^8	82.79±10.61
CQPC-19	1.26×10^8	1.07×10^7	84.19±7.39
CQPC-21	7.3×10^7	5.0×10^7	68.49±11.02
CQPC-28	7.75×10^7	7.50×10^7	96.77±2.83
CQPC-29	4.25×10^7	1.32×10^7	91.76±7.92
CQPC-30	2.55×10^7	1.56×10^7	104.12±3.49
CQPC-32	2.15×10^7	2.66×10^7	110.02±3.53

2.5 乳酸菌在 0.3%胆盐胁迫下的抗性

人体中胆盐浓度处于 0.03%~0.3%之间^[26], 评价益生性乳酸菌的一个重要特性是对小肠中的胆汁有一定的耐受能力^[27]。本研究采用 0.3% 的胆盐浓度测试乳酸菌在胆盐培养基中的生长效率, 从而筛选出具有益生潜质的菌株。李利等^[13]研究从酸奶中分离的两株乳

2.4 乳酸菌对人工胃液的耐受性

当进食时, 人胃部的 pH 通常维持在 3.0 左右^[22], 食物在胃中停留时间较短, 一般 1~3 h^[23]。所以本实验选择 pH 3.0 的人工胃液来测试乳酸菌对其耐受力, 从而筛选出具有较好耐受性的菌株。如表 2 所示, 12 株乳酸菌均可在 pH 3.0 人工胃液中生长, 但不同菌株的存活率之间存在差异。除了编号为 CQPC-8 和 CQPC-21 两株菌的存活率低于 80% 之外, 其余菌株的存活率均超过 80%。Sanae Kaewnopparat 等^[24]研究 *Lactobacillus fermentum* SK5 在 pH 3.0 人工胃液中的存活率, 结果表明, 在 pH 3.0 人工胃液中处理 2 h 后, 该菌的存活率几乎不发生改变, 但是处理 3 h 后, 该菌的存活率下降至 96.57%。Heejae Lee 等^[25]研究从韩国泡菜中分离的 12 株乳酸菌在 pH 3.0 人工胃液中处理 1 h 后的存活率, 其中 6 株乳酸菌的存活率处于 68%~91% 之间, 剩余 6 株乳酸菌的存活率均在 100% 及以上。与以上研究类似, 本研究中 *Lactobacillus plantarum* CQPC-2、*Lactobacillus fermentum*-30 和 *Lactobacillus fermentum*-32 的存活率也均超过 100%, 分别为 107.69%、104.12% 和 110.02%。如此说明泡菜中分离的乳酸菌具有较好的抗酸能力, 具有潜在适应胃肠道环境并发挥其益生作用的能力。

酸菌的耐酸耐胆盐能力, 结果表明, 在 0.03% 胆盐浓度下培养 16 h 后, *L.rhamnosus* SN6 和 *L.plantarum* SN1 的存活率分别为 69.48%、57.70%; 而在 0.06% 胆盐浓度下的存活率分别为 29.56%、48.22%。王素英等^[28]研究 4 株产多糖乳酸菌的耐酸耐胆盐能力, 在 0.3% 胆盐浓度的生长环境中, 仅菌株 F2②和 F404②的存活率达到了 10% 以上。彭灯水等^[29]对干酪乳杆菌 LC-13

和乳酸乳杆菌 LL-12 进行了胆盐耐受性试验, 结果发现培养液中胆酸盐为 0.50% 时, 菌株 LC-13 可以生长, 而菌株 LL-12 基本无法生长。由图 5 可知, 12 株乳酸菌在 0.3% 的胆盐培养基中均超过 10%, 但是不同菌株的生长效率仍存在不同。编号为 CQPC-11、CQPC-12 的乳酸菌在 0.3% 胆盐中的生长效率显著高于其他菌株, 分别为 65.45%、68.18%。其中 CQPC-11 为发酵乳杆菌, 属于食品可用菌种, 可进一步通过动物实验评价其益生作用。

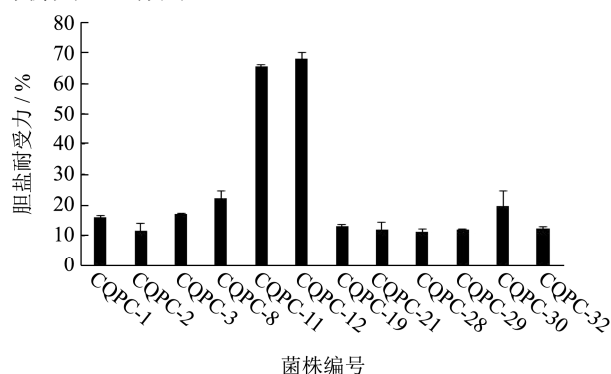


图 5 乳酸菌在胆盐中的生长效率

Fig.5 Growth efficiency of lactic acid bacteria in bile

2.6 小鼠血清中 T-SOD、MDA、GSH-Px 和 CAT 水平

总超氧化物歧化酶(T-SOD)和过氧化氢酶(CAT)是机体内重要的抗氧化酶, 当它们的含量升高时, 就会有更多的活性氧被分解, 从而在机体氧化与抗氧化平衡中发挥重要的调节作用。当机体受到损伤时, 会因为氧化应激反应产生大量自由基, 从而导致机体内 T-SOD 和 CAT 消耗过度而降低^[30,31]。丙二醛(MDA)是脂质过氧化的重要产物之一, 测定 MDA 含量常可反映机体内脂质过氧化的程度, 也是反映组织细胞受自由基攻击受损严重程度的重要指标^[32]。谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)是机体内广泛存在的一种重要的过氧化物分解酶。硒是 GSH-Px 酶系的组成成分, 它能催化 GSH 变为 GSSG, 使有毒的过氧化物还原成无毒的羟基化合物, 同时促进 H_2O_2 的分解, 从而保护细胞膜的结构及功能不受过氧化物的干扰及损害^[33]。

如图 6 所示, 接受活性炭冰水灌胃后, 模型组小鼠血清中的 T-SOD、GSH-Px 和 CAT 含量分别为 50.08 U/mL、1793.01 酶活力单位、44.62 U/mL, 而 MDA 含量为 3.97 nmol/mL, 以上指标均与正常组正常组之间存在显著差异 ($p < 0.05$), 如此说明氧化应激损伤模型诱导成功。与模型组相比, L-LFCQPC-11 组、H-LFCQPC-11 组和 LB 组小鼠血清中的 T-SOD、

GSH-Px 和 CAT 水平均有所提高, MDA 水平均有不同程度的降低, 其中 H-LFCQPC-11 组小鼠血清中的 T-SOD、GSH-Px 和 CAT 含量分别增加为 55.46 U/mL、2326.08 酶活力单位、100.43 U/mL, 而 MDA 含量降低为 2.63 nmol/mL, 与模型组之间存在显著差异 ($p < 0.05$), 且与正常组小鼠血清中的氧化应激水平接近。

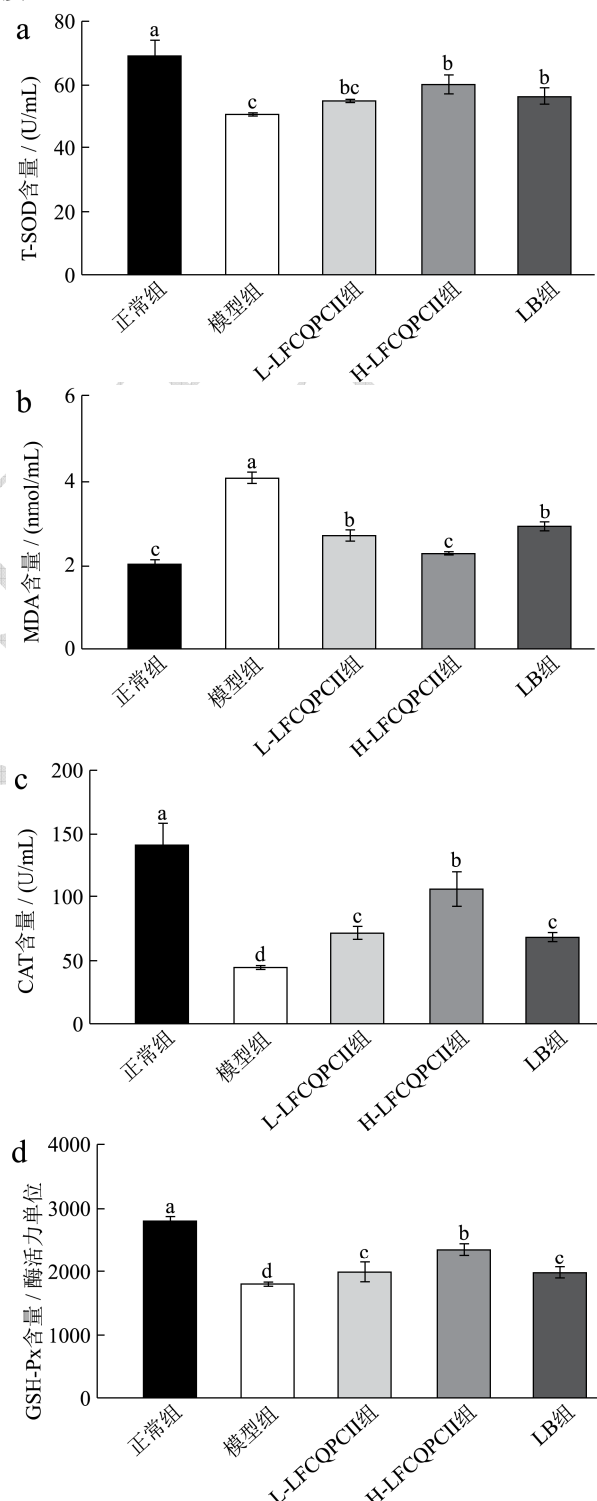


图 6 小鼠血清中 T-SOD、MDA、GSH-Px 和 CAT 水平

Fig.6 T-SOD, MDA, GSH-Px, and CAT levels in serum of mice

注: 图中不同组别之间字母不同表示两者差异显著($p<0.05$)。

目前国内外主要通过测定动物体内各种抗氧化酶(T-SOD、GSH-Px 和 CAT 等)的变化情况以及 MDA 的含量来评价乳酸菌的抗氧化水平。Kullisaar 等^[34]研究表明饮用 *L. fermentum* ME-3 发酵的山羊奶可明显提高人体血浆中 T-SOD 水平, 还能降低 MDA 水平。陈明等^[35]研究发现分离自青藏高原牦牛酸奶中的植物乳杆菌 XM5 能显著提高大鼠血清中的 GSH-Px、T-SOD 活力和 T-AOC 含量, 同时可显著降低 MDA 含量($p<0.05$)。王英^[36]通过评价 *Lactobacillus paracasei* M9-1 和 *Lactobacillus fermentum* LP4 对小鼠氧化损伤的修复作用, 结果表明两株乳酸菌可以不同程度的降低氧化损伤小鼠体内 MDA 含量, 提高 T-SOD 和 GSH-Px 酶活力。通过与其它结果比较可以看出, *L. fermentum* CQPC-11 可较好地改善小鼠机体内的氧化应激反应, 并进一步降低自由基对小鼠组织器官的氧化损伤。其中 *L. fermentum* CQPC-11 降低小鼠血清中氧化应激水平的机制可能与该菌株自身抗氧化能力以及其代谢产物的抗氧化作用相关^[37], 但其具体机理有待进一步研究确定。

3 结论

从自然发酵泡菜中共分离纯化得到 12 株乳酸杆菌, 经 16S rDNA 种属分析表明, 植物乳杆菌 4 株, 发酵乳杆菌 7 株, 另外还分离纯化出短乳杆菌 1 株。pH 3.0 人工胃液和 0.3% 的胆盐数据表明 *L. fermentum* CQPC-11 和短乳杆菌 CQPC12 具有良好的体外抗性, 其中 *L. fermentum* CQPC-11 属于可食用菌种, 可对其开展一系列后续益生性实验。活性炭冰水诱导的小鼠氧化应激实验结果表明, *L. fermentum* CQPC-11 可通过增加小鼠血清中 T-SOD、GSH-Px、CAT 等抗氧化酶水平和降低 MDA 含量, 进而降低小鼠的氧化应激损伤, 但后续还需深入研究该乳酸菌抗氧化效果的机制。此外, 本研究中其余 11 株乳酸菌同样具有较好的体外抗性, 可进一步研究其发酵性能、有益代谢产物、降胆固醇和预防胃肠道疾病等方面的作用, 如此为构建当地优良乳酸菌菌种资源库、研发乳酸菌生态制剂或者乳酸菌食品等提供理论依据。

参考文献

- [1] Behera S S, Ray R C, Zdolec N. *Lactobacillus plantarum* with functional properties: An approach to increase safety and shelf-life of fermented foods [J]. BioMed Research International, 2018, 2018: 1-18
- [2] SHEN Qing, WANG Meng-ting, TIAN Jin-hu, et al. Effects of Chinese pickled and dried mustard on nutritional quality, sensory quality, and shelf life of steamed pork belly [J]. Food Science & Nutrition. 2018, 6(4): 747-756
- [3] 周相玲. 自然发酵泡卷心菜风味物质的研究[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2005, 26(2): 72-74
ZHOU Xiang-ling. Study on the flavoring compounds of spontaneously fermented cabbage sauerkraut [J]. Journal of Henan University of Technology (Natural Science), 2005, 26(2): 72-74
- [4] 孙洁. 乳酸菌发酵剂菌株的自溶特性及机理研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2010
SUN Jie. Studies of autolysis properties and mechanism of lactic acid bacteria starters [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Science, 2010
- [5] 敖晓琳, 张小平, 史令, 等. 四川泡菜中两株优良乳酸菌的鉴定及不同发酵条件对其发酵泡菜品质的影响[J]. 食品科学, 2011, 32(11): 152-156
AO Xiao-ling, ZHANG Xiao-ping, SHI Ling, et al. Identification of two lactic acid bacterial strains isolated from Sichuan pickles and effect of fermentation conditions on the quality of pickles co-fermented by them [J]. Food Science, 2011, 32(11): 152-156
- [6] Kim M K, Lee M A, Lee K G. Determination of compositional quality and volatile flavor characteristics of radish-based Kimchi suitable for Chinese consumers and its correlation to consumer acceptability [J]. Food Science and Biotechnology, 2018, 27(5): 1265-1273
- [7] 李欣, 武俊瑞, 田甜, 等. 大庆自然发酵酸菜中乳酸菌的分离鉴定及耐酸菌株初步筛选[J]. 食品科学, 2014, 35(1): 150-154
LI Xin, WU Jun-rui, TIAN Tian, et al. Isolation, identification and preliminary screening of acid-tolerant lactic acid bacteria from naturally fermented pickle juices from Daqing [J]. Food Science, 2014, 35(1): 150-154
- [8] 徐鑫, 王茜茜, 王晓蕊, 等. 传统农家大酱中耐盐性乳酸菌的分离与鉴定[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(11): 33-40
XU Xin, WANG Qian-qian, WANG Xiao-rui, et al. Isolation and identification of salt-resistant lactic acid bacteria in farmers' soybean paste [J]. Food and Fermentation Industries, 2014, 40(11): 33-40
- [9] Davis E C, WANG Mei, Donovan S M. The role of early life nutrition in the establishment of gastrointestinal microbial composition and function [J]. Gut Microbes, 2017, 8(2): 143-171
- [10] LI Jing-jie, ZHANG Wen, WANG Chuan, et al. *Lactococcus*

- lactis*, expressing food-grade β -galactosidase alleviates lactose intolerance symptoms in post-weaning Balb/c mice [J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2012, 96(6): 1499-1506
- [11] Keita N, Makoto S, Takao M. Adhesion properties of lactic acid bacteria on intestinal mucin [J]. *Microorganisms*, 2016, 4(3): 34
- [12] Diego Currò, Ianiro G, Pecere S, et al. Probiotics, fibre and herbal medicinal products for functional and inflammatory bowel disorders [J]. *British Journal of Pharmacology*, 2017, 174(11): 1426-1429
- [13] 李利,孔丽,张宁,等.耐酸耐胆盐乳酸菌的鉴定及筛选[J].食品科学,2015,36(21):123-128
LI Li, KONG Li, ZHANG Ning, et al. Identification and selection of lactic acid bacteria resistant to acid and bile salt [J]. *Food Science*, 2015, 36(21): 123-128
- [14] 易若琨,蹇宇,王强,等.植物乳杆菌 YS-1 对活性炭诱导小鼠便秘的预防作用[J].食品科学,2017,17:238-243
YI Ruo-kun, QIAN Yu, WANG Qiang, et al. Preventive Effect of *Lactobacillus plantarum* YS-1 on activated carbon-induced constipation in mice [J]. *Food Science*, 2017, 17: 238-243
- [15] 李红妮,付成保,闫玲玲,等.疏肝调气配穴针刺治疗卒中后慢传输型便秘疗效及对氧化应激指标、胃肠激素水平的影响[J].现代中西医结合杂志,2018,27(19):2120-2123
LI Hong-ni, FU Cheng-bao, YAN Ling-ling, et al. Effect of acupuncture at shugan, qi-tiao-point on post-stroke slow transit constipation and its effect on oxidative stress index and gastrointestinal hormone level [J]. *Modern Journal of Integrated Chinese Traditional and Western Medicine*, 2018, 27(19): 2120-2123
- [16] 李维,孙开济,孙玉丽,等.乳酸菌缓解肠道氧化应激研究进展[J].动物营养学报,2016,28(1):27-32
LI Wei, SUN Kai-ji, SUN Yu-li, et al. Research progress of lactic acid bacteria in intestinal oxidative stress [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2016, 28(1): 27-32
- [17] 赵欣,蹇宇.牦牛酸乳分离发酵乳杆菌发酵豆浆的胃溃疡预防效果研究[J].食品科学,2014,35(17):236-240
ZHAO Xin, QIAN Yu. Gastric ulcer-preventive activity of *Lactobacillus fermentum* Zhao isolated from yak yogurt [J]. *Food Science*, 2014, 35(17): 236-240
- [18] Owusu-Kwarteng J, Tano-Debrah K, Akabanda F, et al. Technological properties and probiotic potential of *Lactobacillus fermentum* strains isolated from West African fermented millet dough [J]. *Bmc Microbiology*, 2015, 15(1): 261
- [19] Liong M T, Shah N P. Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains [J]. *Journal of Dairy Science*, 2005, 88(1): 55-66
- [20] 张和平,孟和毕力格,王俊国,等.分离自内蒙古传统发酵酸马奶中 *L.casei* Zhang 潜在益生特性的研究[J].中国乳品工业,2006,34(4):4-10
ZHANG He-ping, MENGHE Bi-lige, WANG Jun-guo, et al. Assessment of potential probiotic properties of *L.casei* Zhang strain isolated from traditionally home-made Koumiss in Inner Mongolia of China [J]. *China Dairy Industry*, 2006, 34(4): 4-10
- [21] 呼斯楞,刘红新,于洁,等.内蒙古呼伦贝尔地区传统发酵乳中乳酸菌的多样性分析[J].微生物学通报,2016,43(5):984-990
HU Si-leng, LIU Hong-xin, YU Jie, et al. Diversity of lactic acid bacteria associated with traditional fermented milk from Hulun Buir in Inner Mongolia [J]. *Microbiology China*, 2016, 43(5): 984-990
- [22] Pereira D I A, Gibson G R. Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and *Bifidobacteria* isolated from the human gut [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(9): 4689-4693
- [23] Rémond Didier, Shahar D R, Doreen G, et al. Understanding the gastrointestinal tract of the elderly to develop dietary solutions that prevent malnutrition [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(16): 13858-13898
- [24] Kaewnopparat S, Dangmanee N, Kaewnopparat N, et al. *In vitro* probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* SK5 isolated from vagina of a healthy woman [J]. *Anaerobe*, 2013, 22: 6-13
- [25] Lee H, Yoon H, Ji Y, et al. Functional properties of *Lactobacillus* strains isolated from kimchi [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 145(1): 155-161
- [26] 杨颖,田丰伟,陈卫,等.两株乳杆菌益生特性的体外研究[J].中国乳品工业,2006,34(6):16-19
YANG Yin, TIAN Feng-wei, CHEN Wei, et al. *In vitro* study of two *Lactobacillus* strains as potential probiotics [J]. *China Dairy Industry*, 2006, 34(6): 16-19
- [27] Tigu F, Assefa F, Mehari T, et al. Probiotic property of lactic acid bacteria from traditional fermented condiments: Datta and Awaze [J]. *International Food Research Journal*, 2016, 23(2): 770-776
- [28] 冯美琴,赵小茜,魏旭丹,等.产多糖乳酸菌耐酸耐胆盐性能研究[J].金陵科技学院学报,2016,32(3):84-87

- FENG Mei-qing, ZHAO Xiao-qian, WEI Xu-dan, et al. Acid and bile salt resistant ability of exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria [J]. Journal of Jingling Institute of Technology, 2016, 32(3): 84-87
- [29] 彭灯水,颜正财,汤春梅,等.泡菜优良发酵乳酸菌耐受特性研究[J].食品与发酵科技,2010,46(4):50-52
- PENG Deng-shui, YAN Zheng-cai, TANG Chun-mei, et al. Studies on tolerance property of lactic acid bacteria [J]. Food and Fermentation Technology, 2010, 46(4): 50-52
- [30] FAN Jing, FENG Hai-bo, YU Yu, et al. Antioxidant activities of the polysaccharides of *Chuanminshen violaceum* [J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 157: 629-636
- [31] 韩雪.复合抗氧化剂对动物氧化应激与自由基代谢的影响[D].上海:上海交通大学, 2010
- HAN Xue. Effects of compound antioxidants on oxidative stress and free radical metabolism in animals [D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2010
- [32] Tsikas D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: analytical and biological challenges [J]. Analytical Biochemistry, 2017, 524: 13-30
- [33] Leonel C, Gelaleti G B, Jardim B V, et al. Expression of glutathione, glutathione peroxidase and glutathione S-transferase pi in canine mammary tumors [J]. BMC Veterinary Research, 2014, 10(1): 49
- [34] Kullisaar T, Songisepp E, Mikelsaar M, et al. Antioxidative probiotic fermented goats' milk decreases oxidative stress-mediated atherogenicity in human subjects [J]. British Journal of Nutrition, 2003, 90(2): 449
- [35] 陈明,柯文灿,张娟,等.青藏高原牦牛酸奶中具有抗氧化活性乳酸菌的体内外益生特性[J].食品科学,2017,38(23):178-183
- CHEN Ming, KE Wen-can, ZHANG Juan, et al. Probiotic properties *in vitro* and *in vivo* of antioxidative lactic acid bacteria from yak yogurt in Tibetan Plateau [J]. Food Science, 2017, 38(23): 178-183
- [36] 王英.抗氧化益生乳酸菌的筛选、抗氧化作用机制及应用研究[D].南京:南京师范大学,2016
- WANG Ying. Screening of antioxidant probiotic lactic acid bacteria, antioxidant mechanism and application research [D]. Nanjing: Nanjing Normal University, 2016
- [37] 胡晓丽.乳酸菌抗氧化性及其对小鼠结肠氧化还原状态调节的研究[D].无锡:江南大学,2009
- HU Xiao-li. Study on antioxidant of *Lactobacillus* and its adjusting on antioxidant redox state in colon [D]. Wuxi: Southern Yangtze University, 2009
-
- (上接第 116 页)
- [24] 李丽霞.不同品种猕猴桃皮、肉、籽酚类组分分析及抗氧化活性的研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2018
- LI Li-xia. Analysis of phenolic components and antioxidant activity of different varieties of kiwifruit peel, meat and seeds [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2018
- [25] 禄璐,米佳,罗青,等.枸杞总黄酮提取工艺优化及其体外抗氧化活性分析[J].食品工业科技,2019,40(24):165-171
- LU Lu, MI Jia, LUO Qing, et al. Optimization of extraction process of total flavonoids from wolfberry and analysis of its antioxidant activity *in vitro* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(24): 165-171
- [26] 李洋,马文平,倪志婧.宁夏枸杞体外抗氧化机理研究[J].食品科学,2014,35(1):79-84
- LI Yang, MA Wen-ping, NI Zhi-jing. Study on the anti-oxidation mechanism of Ningxia wolfberry *in vitro* [J]. Food Science, 2014, 35(1): 79-84
- [27] WANG Yue, QIAN Jing, CAO Jin-ping, et al. Antioxidant capacity, anticancer ability and flavonoids composition of 35 citrus (*Citrus reticulata* Blanco) Varieties [J]. Molecules, 2017, 22(7): 1-12
- [28] 蒋萍,黄业传,王艳蓉,等.不同处理对苹果抗氧化活性的影响[J].食品研究与开发,2018,39(4):47-52
- JIANG Ping, HUANG Ye-chuan, WANG Yan-rong, et al. The effect of different treatments on the antioxidant activity of apples [J]. Food Research and Development, 2018, 39(4): 47-52