

猴头菇益生菌发酵对小鼠酒精性胃溃疡的保护作用

薛红洋¹, 张智^{1*}, 包瑞敏², 蒋士龙³, 解庆刚³, 巩燕妮⁴

(1. 东北林业大学林学院, 黑龙江哈尔滨 150038) (2. 石家庄君乐宝乳业有限公司, 河北石家庄 050221)

(3. 黑龙江飞鹤乳业有限公司, 黑龙江哈尔滨 150100)

(4. 北大荒完达山乳业股份有限公司, 黑龙江哈尔滨 150001)

摘要: 该实验采用保加利亚乳杆菌、嗜热链球菌、醋酸菌 3 种菌种发酵猴头菇, 通过比较发酵液的 DPPH 自由基清除率, 确定猴头菇发酵的最优条件。用猴头菇益生菌发酵液对酒精性胃溃疡模型的小鼠进行灌胃, 测定胃溃疡小鼠胃组织中超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA)、过氧化氢酶 (CAT) 和血清中炎症因子白介素-6 (IL-6)、白介素-10 (IL-10)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 含量。结果表明, 最佳发酵条件为起始 pH 值 6.5、菌种复配比 (保加利亚乳杆菌:嗜热链球菌:醋酸菌) 1:1:1、接种量 8.8%、发酵温度 37.5 °C、发酵时间 27 h, 发酵液菌落数为 8.72×10^9 CFU/mL、发酵液的 DPPH 自由基清除率可达 79.59%。与模型组相比, 高剂量组小鼠胃组织的 SOD 和 CAT 水平分别升高了 71.38% 和 99.89%、MDA 含量降低了 47.45%; 小鼠血清中的炎症因子 TNF- α 和 IL-6 含量分别降低了 32.66% 和 34.95%、IL-10 含量升高了 100.46%, 表明猴头菇益生菌发酵液对小鼠的急性酒精性胃溃疡有保护作用。该研究为猴头菇的应用提供了理论支持, 为猴头菇新产品的开拓和益生菌的开发提供理论基础。

关键词: 猴头菇; 益生菌; 胃溃疡; 炎症因子

文章编号: 1673-9078(2023)02-135-144

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.2.0319

Protective Effects of *Hericium hericium* Fermented with Probiotic Strains on Alcoholic Gastric Ulcer

XUE Hongyang¹, ZHANG Zhi^{1*}, BAO Ruimin², JIANG Shilong³, XIE Qinggang³, GONG Yanni⁴

(1.School of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150038, China) (2.Shijiazhuang Junlebao Dairy Co. Ltd.,

Shijiazhuang 050221, China) (3.Heilongjiang Feihe Dairy Co. Ltd., Harbin 150100, China)

(4.BeidahuangWandashan Dairy Co. Ltd., Harbin 150001, China)

Abstract: In this experiment, three strains of *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* and *Acetic acid bacteria* were used to ferment *Hericium erinaceus*. The DPPH free radical scavenging rates of the fermentation broth samples were compared to determine the optimal conditions for fermenting *Hericium hericium*. Mice with alcoholic gastric ulcer were subjected to intragastric administration with hericium or dosica probiotic fermentation broth. The contents of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), catalase (CAT) in gastric tissues and contents of interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10), tumor necrosis factor - α (TNF- α) in the serum of the mice with alcoholic gastric ulcer were measured. The results showed that the optimal fermentation conditions were as follows: initial pH 6.5; bacteria compound ratio 1:1:1 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*: *Streptococcus thermophilus*: *Acetobacter*); inoculation amount 8.8%; fermentation temperature 37.5 °C; fermentation time 27 h. The colony number of the fermentation broth was 8.72×10^9 CFU/mL and the DPPH free radical scavenging rate of fermentation broth was 79.59%. Compared with the model group, the SOD and CAT levels increased by 71.38% and 99.89% whilst the MDA content decreased by 47.45% in gastric tissues of mice in high-dose group. The contents of TNF- α and IL-6 in the serum of mice decreased by

引文格式:

薛红洋,张智,包瑞敏,等.猴头菇益生菌发酵对小鼠酒精性胃溃疡的保护作用[J].现代食品科技,2023,39(2):135-144

XUE Hongyang, ZHANG Zhi, BAO Ruimin, et al. Protective effects of hericium hericium fermented with probiotic strains on alcoholic gastric ulcer [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(2): 135-144

收稿日期: 2022-03-22

基金项目: 黑龙江省“揭榜挂帅”科技攻关项目 (2021ZXJ03B01-1)

作者简介: 薛红洋 (1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品安全与检测, E-mail: 1430202165@qq.com

通讯作者: 张智 (1964-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品发酵、植物生物转化、功能食品, E-mail: idzhangzhi@nefu.edu.cn

32.66% and 34.95%, respectively, and the content of IL-10 increased by 100.46%. The results showed that the probiotics fermentation broth of *hericium* had a protective effect on acute alcoholic gastric ulcer in mice. This study provides a theoretical support for the application of *Hericium hericium*, and a theoretical basis for the development of new products of *Hericium hericium* and probiotics.

Key words: *Hericium erinaceus*; probiotics; gastric ulcer; inflammatory cytokines

猴头菇 (*Hericium erinaceus*) 是一种药食两用菌类^[1], 又名猴头菌、狮鬃菇、刺猬菌等, 是一种低脂高蛋白且营养物质丰富的资源^[2]。含有萜类^[3]、黄酮类、多酚类^[4]、糖类^[5]、蛋白质、多肽等生物活性物质^[6], 具有保护胃黏膜、抗氧化、抗炎防溃疡、降血糖、提高身体免疫力^[7,8]、抗肿瘤^[9]等作用。基于很多科研工作者对猴头菇生物活性的研究, 发现通过促进胃黏膜组织中有生长因子的分泌和表达的通路已成为当下有效降低胃溃疡发病率的一种重要方式。

益生菌是一种能够促进肠道微生物菌群保持平衡, 对食用者有利的菌种^[10], 在摄食保持足量时会对食用者产生有益影响^[11]。益生菌具有免疫调节功能, 可以产生抗菌化合物和有机酸, 并与宿主微生物群相互作用, 改善酶的形成和肠道屏障的完整性^[12]。近年来果蔬加工技术不断发展, 益生菌发酵果蔬技术的研究也日渐丰富^[13]。在西欧等国家, 果蔬发酵受到人们的普遍欢迎和深入研究^[14]。果蔬发酵过程中产生的糖被乳酸菌转化成乳酸, 用乳酸菌来发酵果蔬不仅可以改善味道延长保存期, 还可以提高营养价值增加保健效果^[15]。

胃溃疡是一种良性病变, 有多种病因, 是最常见的消化系统疾病之一。胃黏膜自我防御因子与引起黏膜损伤的攻击因子之间的平衡被打破, 导致了胃黏膜的病变, 是胃溃疡发病的主要机制^[16]。当攻击因子的破坏程度超过防御因子的保护、修复程度, 会造成胃黏膜的病变。临床上胃溃疡的常见病因有过度饮酒、幽门螺杆菌感染、过度使用非甾体类抗炎药、饮食习惯不规律、应激和精神心理因素等。随着人们生活方式的改变和压力的增加, 对酒精的需求日渐显著^[17], 饮酒是引发胃溃疡疾病的重要因素, 长期、大量饮酒可直接引起急慢性胃炎、胃溃疡甚至胃癌^[18]。

现有的对乙醇刺激引起的胃溃疡具有保护作用的药物大多是通过抗氧化作用^[19]、抗炎作用^[20]加强胃黏膜的保护屏障来实现的, 并且大多数药物都具有副作用^[21]。猴头菇经发酵后黄酮^[22]、多酚含量大大提高其抗氧化^[23]抗炎^[24]能力增强。本研究以保加利亚乳杆菌、嗜热链球菌、醋酸菌为发酵菌种, 选取菌种复配比、发酵温度、发酵时间及接种量四个因素, 以发酵液 DPPH 自由基清除率为响应值, 进行响应面分析, 对猴头菇的发酵工艺进行优化, 旨在确定益生菌发酵猴头菇的最佳工艺条件并探究其对胃溃疡的保护作用。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

干猴头, 哈尔滨比优特超市购买; 保加利亚乳杆菌 (*Lactobacillus bulgaricus*)、嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*)、醋酸菌 (*Acetobacter*), 东北林业大学林学院食品微生物实验室提供。

蛋白胨、琼脂粉、葡萄糖、牛肉膏、磷酸氢二钾、酵母浸粉、丙三醇、吐温-80、乙酸钠、抗坏血酸、硫酸锰、柠檬酸氢二铵、硫酸镁等, 上海源叶生物科技有限公司; 均为国产分析纯; 超氧化物歧化酶试剂盒、过氧化氢酶试剂盒、丙二醛试剂盒、肿瘤坏死因子- α 试剂盒、白介素-6 试剂盒、白介素-10 试剂盒, 南京建成生物工程研究所。

1.2 仪器与设备

FB2009 分析天平, 上海迈仪仪器有限公司; 722s 型紫外分光光度计, 上海第三分析仪器厂; RT-6000 型酶标仪, 深圳雷杜生命科学有限公司; SJ-3F 型 pH 计, 上海圣科仪器设备有限公司; XY-500 粉碎机, 鹤壁市鑫远仪器设备有限公司; TGL-16G 台式离心机, 上海安亭科学仪器厂; SW-CJ-IFD 超净工作台, 北京思博晟达科技有限公司; DGS-280C 手提式压力蒸气灭菌器, 绍兴杰明仪器制造厂; 303-2B 型电热恒温培养箱, 浙江尚城科技有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 猴头菇发酵液的制备

原料处理: 挑选无发霉变质的猴头菇, 烘干至恒重, 粉碎过 100 目筛。将猴头菇粉与水按 1:15 (m/V) 的比例进行混匀。121 °C 灭菌 20 min 后保存备用。

活化: 在-20 °C 保存的保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌斜面平板上挑取单菌落分别接种至已灭菌的 MRS 和 M17 培养基中, 40 °C 条件下培养 20~22 h, 传代 2 次得到活化菌种备用^[25,26]。在-20 °C 保存的醋酸菌斜面平板上挑取单菌落接种于已灭菌的醋酸菌培养基中, 33 °C 条件下培养 16~18 h, 传代 2 次得到活化菌种备用^[27]。

菌悬液的制备: 将上述菌种的液体培养基摇匀,

取 4 mL 于无菌离心管中,以 6 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,用 0.85% 的无菌生理盐水进行清洗,再次离心后,用无菌生理盐水调节各菌悬液浓度^[28],使保加利亚乳杆菌、嗜热链球菌和醋酸菌菌悬液浓度为 1×10^5 CFU/mL,即得到本次试验的发酵菌株。

1.3.2 猴头菇发酵液单因素及响应面优化试验

1.3.2.1 菌种复配比对发酵液 DPPH 自由基清除率和菌落数的影响

将灭菌备用的猴头菇样品调节 pH 值至 6.5,按照总体积的 6% 接种保加利亚乳杆菌、嗜热链球菌和醋酸菌混合发酵剂(体积比分别为 (3:3:1、2:2:1、3:3:2、1:1:1、2:2:3、1:1:2)),接种后在 37 ℃ 培养箱中静态放置 24 h,得到猴头菇发酵液。

1.3.2.2 接种量对发酵液 DPPH 自由基清除率和菌落数的影响

将灭菌备用的猴头菇样品调节 pH 值至 6.5,按照总体积的 2%、4%、6%、8%、10% 接种保加利亚乳杆菌、嗜热链球菌和醋酸菌混合发酵剂(体积比 1:1:1),接种后在 37 ℃ 培养箱中静态放置 24 h,得到猴头菇发酵液。

1.3.2.3 发酵温度对发酵液 DPPH 自由基清除率和菌落数的影响

将灭菌备用的猴头菇样品调节 pH 值至 6.5,按照总体积的 8% 接种保加利亚乳杆菌、嗜热链球菌和醋酸菌混合发酵剂(体积比 1:1:1),接种后在 31、34、37、40、43 ℃ 培养箱中静态放置 24 h,得到猴头菇发酵液。

1.3.2.4 发酵时间对发酵液 DPPH 自由基清除率和菌落数的影响

将灭菌备用的猴头菇样品调节 pH 值至 6.5,按照

总体积的 8% 接种保加利亚乳杆菌、嗜热链球菌和醋酸菌混合发酵剂(体积比 1:1:1),接种后在 37 ℃ 培养箱中静态放置 12、18、24、30、36 h,得到猴头菇发酵液。

1.3.2.5 起始 pH 值对发酵液 DPPH 自由基清除率和菌落数的影响

将灭菌备用的猴头菇样品调节 pH 值至 3.5、4.5、5.5、6.5、7.5,按照总体积的 8% 接种保加利亚乳杆菌、嗜热链球菌和醋酸菌混合发酵剂(体积比 1:1:1),接种后在 37 ℃ 培养箱中静态放置 24 h,得到猴头菇发酵液。

1.3.2.6 猴头菇发酵响应面优化试验

在单因素试验结果的基础上,选取菌种复配比(A)、接种量(B)、发酵温度(C)、发酵时间(D)四个因素,以发酵液 DPPH 自由基清除率(Y)为指标。采用 Box-Behnken 进行四因素三水平试验对猴头菇发酵工艺进行优化。

1.3.3 猴头菇发酵液对小鼠胃溃疡的影响

1.3.3.1 猴头菇发酵液的制备

将猴头菇粉与水按 1:15 (m/V) 的比例混匀,调节 pH 值至 6.5。灭菌后,冷却至室温,按照菌种复配比(保加利亚乳杆菌:嗜热链球菌:醋酸菌) 1:1:1 接入 8.8% 的菌种,在 37.5 ℃ 的恒温培养箱中培养 27 h 后,得到猴头菇益生菌发酵液。将发酵液无菌过滤后,得到试验所需的猴头菇益生菌发酵液。

1.3.3.2 动物分组与给药及胃溃疡模型的建立

SPF 级小鼠 50 只,适应性喂养一周后,随机分为正常组、模型组、奥美拉唑组、高剂量组、低剂量组,每组 10 只,分笼饲养。除高剂量组和低剂量组灌胃猴头菇发酵液外,其余组正常喂饲料。根据表 1 给药方案每天灌胃 1 次,连续一个月。

表 1 动物分组及给药方案

Table 1 Grouping of animals and administration plan

组别	药物浓度	给药体积/(mL/kg, 以体质量计)
正常组(C)	--	--
模型组(M)	0.85%生理盐水	10
奥美拉唑组(Y)	3.6 mg/mL	10
高剂量组(H)	猴头菇益生菌发酵液	10
低剂量组(L)	稀释 1 倍的猴头菇益生菌发酵液	10

造模前 24 h,小鼠禁食不禁水,最后一次给药 1 h 后,除正常组小鼠外,其余小鼠均给予无水乙醇灌胃(10 mL/kg),1 h 后取眼球血脱颈椎处死,用手术剪将小鼠腹腔小心剪开并取出胃。用注射器向胃内注入 1% 甲醛溶液 1 mL,并将整个胃放置于装有 1% 甲醛溶液的烧杯中固定 20 min,取出后用手术刀剪沿胃大弯一侧剪开,使用 0.85% 生理盐水反复冲洗内容物至干

净,然后用滤纸吸干表面的水分,一部分展平,用于观察溃疡,另一部分置于 -80 ℃ 条件下保存备用^[29]。

1.3.3.3 溃疡指数与溃疡抑制率

观察胃溃疡情况,溃疡的最大长度及宽度用游标卡尺进行测量,取最大的长宽径为损伤指标评分(长度和宽度均以最大径计;出血点每个 1 分)。溃疡评分标准见表 2。

表2 溃疡指数评分标准

Table 2 Ulcer index scoring criteria

损伤情况	1分	2分	3分	4分	5分
出血带长度/mm	0~1	1~2	2~3	3~5	>5
出血带宽度/mm	0~1	1~2	>2		

$$A = \frac{B-C}{B} \times 100\%$$

式中:

A——溃疡抑制率, %;

B——模型组溃疡指数;

C——给药组溃疡指数。

1.3.3.4 ELISA 法检测胃组织中 MDA、SOD、CTA 水平

取胃组织 1.5 g, 按胃组织质量:生理盐水=1:9 制备组织匀浆, 在 3 500 r/min 条件下离心 15 min, 取上清液; 按试剂盒说明书上的方法进行操作并计算各含量。

1.3.3.5 ELISA 法检测血清中 IL-6、IL-10、TNF- α 相关因子含量

眼球取血后, 将血液静置 1 h 后 3 000 r/min 离心 20 min, 分离血清; 按试剂盒说明书上的方法进行操作并计算各含量。

1.3.4 数据分析

每个实验重复 3 次, 取平均值。采用 SPSS 17.0 进行单因素方差分析与显著性差异分析, 运用 Origin 9.0 软件进行作图, Design-Expert 8.0.6 进行 Box-Behnken 试验设计。

2 结果与讨论

2.1 发酵单因素试验

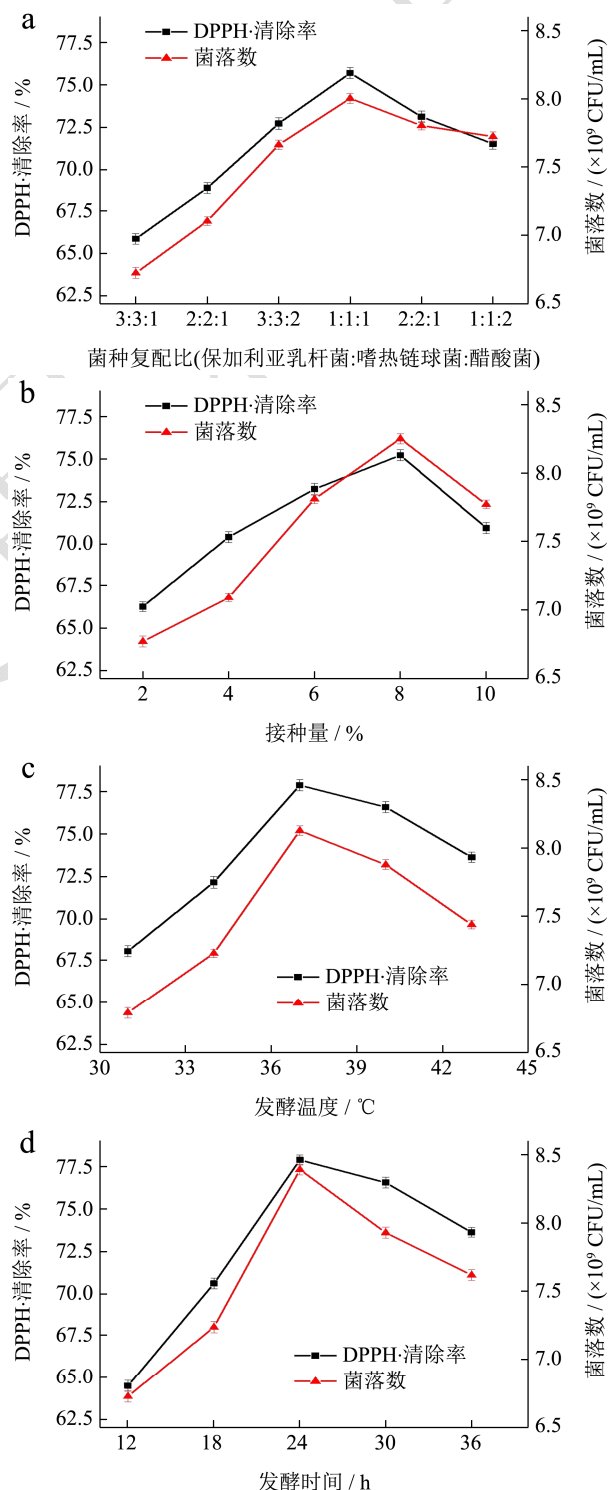
2.1.1 各因素对发酵液 DPPH 自由基清除率和菌落数的影响

由图 1a 可知, 随着醋酸菌所占比例的增大, DPPH·清除率呈现先升后降的趋势, 当醋酸菌所占比例为 1/3 时, DPPH·清除率达到最大值为 75.73%, 菌落数也达到最大值 8.03×10^9 CFU/mL。分析产生这种显著性变化的原因因为醋酸菌前期菌体繁殖速度快, 一段时间后当所占比例过大时, 会影响其他乳酸菌的繁殖, 乳酸菌在所占比例低时, 水解出的多酚、黄酮等抗氧化物质较少, 抗氧化活性较低^[29]。所以, 选取最佳的菌种复配比为保加利亚乳杆菌:嗜热链球菌:醋酸菌=1:1:1。

由图 1b 可知, 接种量的多少会影响乳酸菌发酵初期的繁殖速度, 当接种量小于 8% 时, 接种量过低, 乳酸菌生长的延滞期变长; 当接种量等于 8% 时, DPPH·清除率达到最大值为 75.19%, 菌落数也达到最

大值 8.25×10^9 CFU/mL。当接种量大于 8% 时接种量过高时, 乳酸菌延滞期缩短并很快到达对数生长期, 多酚、黄酮等活性物质在此阶段也会被利用, 不利于后期发酵的持续性进行, 也使抗氧化能力减小^[30]。所以, 选取最佳的接种量为 8%。

由图 1c 可知, 当发酵温度为 37 °C 时, 发酵液的 DPPH·清除率达到最大值为 77.89%, 菌落数也达到最大值 8.13×10^9 CFU/mL。因此, 确定 37 °C 为发酵猴头菇的最佳温度。



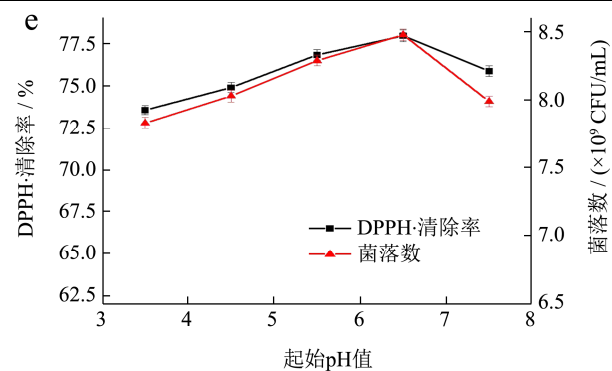


图 1 不同因素对 DPPH·清除率和菌落数的影响

Fig.1 Effects of different factors on DPPH· clearance rate and colony count

由图 1d 可知，发酵时间的延长，发酵液的 DPPH·清除率呈现先升后降的趋势。这可能是由于发酵过程中的大分子酚类物质被逐渐转化为小分子游离酚类物质，DPPH·能够与小分子酚类物质给出的 H⁺ 生成稳定产物^[31,32]。第 24 h 时，发酵液 DPPH·清除率达到最大值为 77.87%，菌落数也达到最大值 8.39×10⁹ CFU/mL。第 24 h 之后发酵液的 DPPH·清除率开始下降，其原因可能是发酵液中的小分子游离酚类等抗氧化物质被乳酸菌进一步分解，使发酵液的抗氧化活性下降^[33]。因此，适宜的发酵时间为 24 h。

由图 1e 可知，起始 pH 值对 DPPH·清除率的影响

不大，可能是因为醋酸菌生长 pH 值为 3.5~6.5、保加利亚乳杆菌生长 pH 值为 4.5~7.0、嗜热链球菌生长 pH 值为 4~6.8，三个菌种在偏酸环境下都可以生长，所以发酵液中菌落总数变化不明显，营养物质含量差异不大，对 DPPH·清除率影响不是特别显著。在 pH 值为 6.5 时发酵液 DPPH·清除率达到最大值为 77.97%，菌落数也达到最大值 8.48×10⁹ CFU/mL。所以，选择最佳的起始 pH 值为 6.5。

2.1.2 响应面优化试验结果与分析

2.1.2.1 响应面试验方案及优化结果

以单因素试验结果为依据，确定菌种复合比(A)、接种量(B)、发酵温度(C)、发酵时间(D)为响应面的因素，以发酵液 DPPH·清除率(Y)为响应值，采用 Box-Behnken 中心组合设计对猴头菇发酵工艺进行优化。响应面因素与水平见表 3，结果见表 4。

表 3 响应面分析因素与水平

Table 3 Variables and levels of response surface analysi				
水平	因素			
	(A) 菌种复配比	(B) 接种量/%	(C) 发酵温度/℃	(D) 发酵时间/h
-1	3:3:2	6	34	18
0	1:1:1	8	37	24
1	2:2:3	10	40	30

表 4 响应面分析试验结果

Table 4 Response surface analysis test results

试验号	(A) 菌种复配比	(B) 接种量/%	(C) 发酵温度/℃	(D) 发酵时间/h	DPPH·清除率/%
1	-1	-1	0	0	63.79
2	1	-1	0	0	67.34
3	-1	1	0	0	69.52
4	1	1	0	0	70.04
5	0	0	-1	-1	61.88
6	0	0	1	-1	70.11
7	0	0	-1	1	70.07
8	0	0	1	1	70.98
9	-1	0	0	-1	66.53
10	1	0	0	-1	66.34
11	-1	0	0	1	70.05
12	1	0	0	1	74.53
13	0	-1	-1	0	63.79
14	0	1	-1	0	66.43
15	0	-1	1	0	64.61
16	0	1	1	0	74.53
17	-1	0	-1	0	62.79
18	1	0	-1	0	64.52
19	-1	0	1	0	66.43

续表 4

试验号	(A) 菌种复配比	(B) 接种量/%	(C) 发酵温度/℃	(D) 发酵时间/h	DPPH·清除率/%
20	1	0	1	0	69.07
21	0	-1	0	-1	68.25
22	0	1	0	-1	70.03
23	0	-1	0	1	70.09
24	0	1	0	1	77.35
25	0	0	0	0	79.23
26	0	0	0	0	79.17
27	0	0	0	0	77.35
28	0	0	0	0	78.98
29	0	0	0	0	76.44

表 5 响应面试验方差分析

Table 5 The variance analysis of response surface test

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	Prob>F	显著性
模型	746.14	14	53.30	63.84	<0.000 1	**
A-菌种复配比	13.48	1	13.48	16.15	0.001 3	**
B-接种量	75.45	1	75.45	90.38	<0.000 1	**
C-发酵温度	57.25	1	57.25	68.57	<0.000 1	**
D-发酵时间	74.70	1	74.70	89.48	<0.000 1	**
AB	2.30	1	2.30	2.75	0.119 5	
AC	0.21	1	0.21	0.25	0.626 2	
AD	5.38	1	5.38	6.45	0.023 6	*
BC	13.25	1	13.25	15.87	0.001 4	**
BD	7.45	1	7.45	8.93	0.009 8	**
CD	13.25	1	13.25	15.87	0.001 4	**
A ²	236.73	1	236.73	283.57	<0.000 1	**
B ²	113.74	1	113.74	136.24	<0.000 1	**
C ²	296.85	1	296.85	355.58	<0.000 1	**
D ²	54.03	1	54.03	64.72	<0.000 1	**
残差	11.69	14	0.83			
失拟项	5.26	10	0.53	0.33	0.930 6	
净误差	6.42	4	1.61			
总和	757.83	28				

注: **代表差异极显著 $P<0.05$; *代表差异显著 $0.05<P<0.05$ 。

2.1.2.2 模拟方程的建立及显著性分析

运用 Desing-Expect 8.0.6 软件对表 3 中的结果进行多元回归拟合得到 DPPH·清除率和四个因素之间的关系为:

$$Y=78.23+1.06A+2.51B+2.19C+2.49D-0.76AB+0.23AC+1.16AD+1.82BC+1.37BD+1.83CD-6.04A^2-4.19B^2-6.76C^2-2.88D^2$$

对回归方程进行方差分析,结果如表 5 所示。

表 5 为模型方程回归方程方差分析结果,该回归模型的回归效果极显著 ($P<0.05$),线性关系较好

($R^2=0.9846$)。失拟项 $P=0.9306>0.05$ 不显著,说明未知因素对试验结果的干扰较小,该试验模型充分拟合试验数据,可以用于确定益生菌发酵猴头菇的最佳工艺。由 F 值可判断各因素对响应值得影响,结果显示:四个因素对响应值的影响大小顺序为 $B>D>C>A$,即接种量>发酵时间>发酵温度>菌种复配比。A、B、C、D、AD、BC、BD、CD、A²、B²、C²、D²、的 P 值均 <0.05 ,其中 AD 对发酵液中 DPPH 清除率影响显著 ($P<0.05$),A、B、C、D、BC、BD、CD、A²、B²、C²、D²对发酵液中 DPPH·清除率影响极显著

($P<0.05$)。由表 5 还可以看出 $P_{ac}>P_{ab}>P_{ad}>P_{bd}>P_{bc}=P_{cd}$, 比较 P 值可知菌种复配比与发酵温度的交互作用对发酵液 DPPH·清除率干扰最小, 而接种量与发酵温度和发酵时间与发酵温度的交互作用对发酵液 DPPH·清除率干扰最大。

2.1.3 最佳发酵工艺的验证

利用 Desing-Expect 8.0.6 软件进行分析, 得到猴头菇发酵最佳工艺条件为: 菌种复配比 1:1:1.07、发酵温度 37.45 °C、发酵时间 27.01 h、接种量 8.81%, 在此条件下 DPPH·清除率的预测值为 79.59%。考虑到试验的实际情况, 对各参数作出调整, 即起始 pH 值 6.5、发酵时间 27 h、发酵温度 37.5 °C、菌种复配比 1:1:1、接种量 8.8%。为了验证响应面实验的准确性, 按上述最佳工艺条件进行 3 次重复试验。结果显示, 3 次重复试验的平均值为 79.48%, 与预测值相近, 说明该模型具有可靠性。

2.2 发酵液对胃溃疡小鼠的影响

2.2.1 小鼠试验期的状态

正常组小鼠整个实验过程中精神状态良好, 活泼好动, 喜欢攀爬; 给予酒精灌胃的各组小鼠状态不佳, 相继出现了行动缓慢、精神不振、蜷缩不动、嗜睡等症状。与模型组小鼠相比, 高、低剂量组及药物组灌胃的小鼠上述症状较轻, 高、低剂量组的小鼠精神状态无明显差异。

2.2.2 小鼠胃组织溃疡图

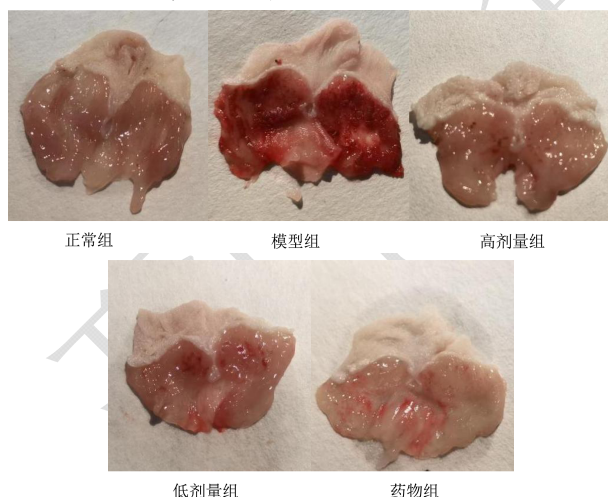


图 2 小鼠胃组织溃疡图

Fig.2 Gastric tissue ulcer in mice

如图 2 所示, 正常组的小鼠胃黏膜呈淡粉色, 有光泽, 表面滑嫩, 黏膜皱壁完整。模型组的大鼠胃黏膜呈红色充血状态, 黏膜表面大面积损伤出血, 高中低剂量组以及药物组的小鼠胃黏膜损伤情况较模型组均有大程度的减轻, 其中高剂量组的胃黏膜成淡红色,

仅有少量点状出血, 优于及其他剂量组, 药物组小鼠胃黏膜呈淡粉色, 有少量条状出血。

2.2.3 溃疡指数与溃疡抑制率

由图 3 可以看出, 与正常组相比, 胃溃疡模型组出血情况严重, 溃疡指数显著增加, 模型建立成功。经益生菌猴头菇发酵液低、高剂量和药物干预后, 均显著减少了小鼠的溃疡指数, 经计算胃溃疡抑制率分别为 50.90%、68.1%和 71.37%。

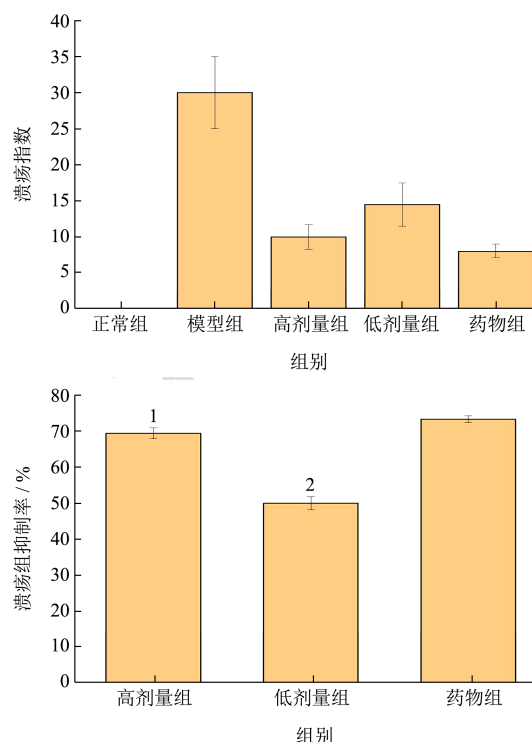


图 3 溃疡指数与溃疡抑制率

Fig.3 Ulcer index and ulcer inhibition rate

注: 与药物组比较, 1. ($P<0.05$), 2. ($P<0.01$).

2.2.4 小鼠胃溃疡的胃组织匀浆中 MDA、SOD、CTA 的含量

由图 4 可以看出, 与正常对照组比较, 模型组胃组织中抗氧化因子 CAT 水平降低了 68.61% ($P<0.05$); 与模型组比较, 药物组、高剂量组、低剂量组 CAT 水平分别升高了 79.96%、99.89%、47.94%, 有显著意义 ($P<0.05$); 与奥美拉唑组比较, 高、低剂量组差异有显著意义 ($P<0.05$)。与正常对照组比较, 模型组胃组织中 MDA 水平显著升高了 419.61% ($P<0.05$); 与模型组比较, 药物组、高剂量组、低剂量组 MDA 水平分别降低了 51.39%、47.45%、12.19%, 有显著意义 ($P<0.05$); 与奥美拉唑组比较, 低剂量组差异有显著意义 ($P<0.05$), 高剂量组有统计学意义 ($P<0.05$)。与正常对照组比较, 模型组胃组织中 SOD 水平降低了 19.08% ($P<0.05$); 与模型组比较, 药物组、高剂量组、低剂量组 SOD 水平分别升高了 78.62%、

71.38%、57.79%，有显著意义 ($P<0.05$)；与奥美拉唑组比较，低剂量组有统计学意义 ($P<0.05$)，高剂量组无统计学意义 ($P<0.05$)。

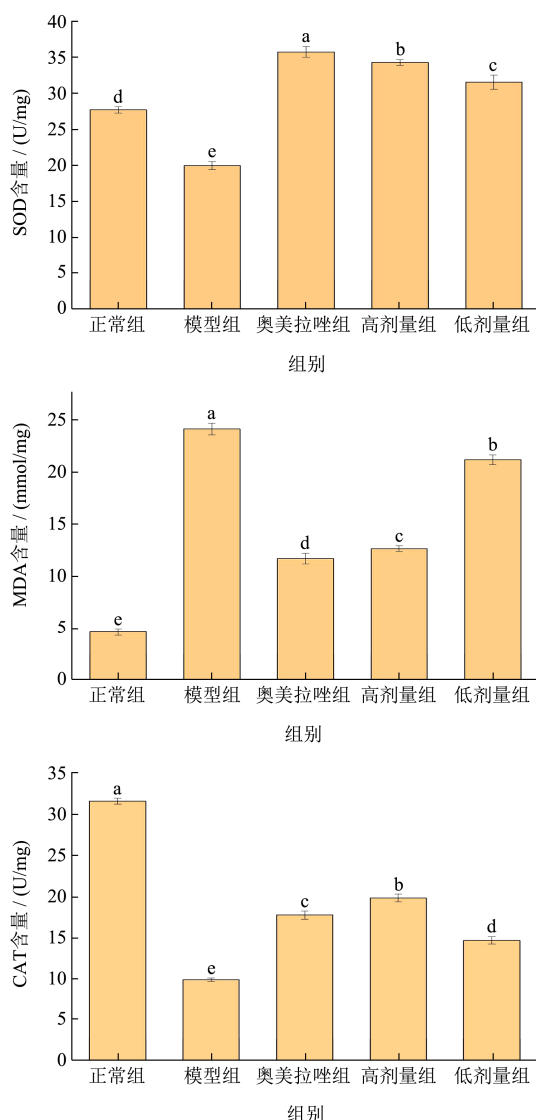


图4 猴头菇益生菌发酵液对胃溃疡小鼠胃组织中 SOD、MDA、CAT 水平的影响

Fig.4 Effects of Probiotic fermentation broth of *Hericiumhericium* on SOD, MDA and CAT levels in gastric tissue of mice with gastric ulcer

注：同一指标不同组间差异 ($P<0.05$)。下图同。

结果表明，益生菌猴头菇发酵液灌胃后提高了 CAT 和 SOD 水平，增强了机体清除自由基的能力，使脂质过氧化的程度降低，减少胃黏膜攻击因子 MDA 的生成，与周臻^[34]等研究结果一致。

2.2.5 小鼠血清中 IL-6、IL-10、TNF- α 含量的影响

结果如图 5 所示，与正常对照组比较，模型组血清中 IL-6 含量升高了 148.58% ($P<0.05$)；与模型组比较，药物组、高剂量组、低剂量组 IL-6 含量分别降低了 23.68%、34.95%、15.19%，有显著意义 ($P<0.05$)；

与奥美拉唑组比较，高剂量组差异有显著意义 ($P<0.05$)，低剂量组有统计学意义 ($P<0.05$)。与正常对照组比较，模型组血清中 TNF- α 含量升高了 77.42% ($P<0.05$)；与模型组比较，药物组、高剂量组、低剂量组 TNF- α 含量分别降低了 28.54%、32.66%、17.50%，有显著意义 ($P<0.05$)；与奥美拉唑组比较，高剂量组差异有显著意义 ($P<0.05$)，低剂量组有统计学意义 ($P<0.05$)。与正常对照组比较，模型组血清中 IL-10 含量降低了 41.51% ($P<0.05$)；与模型组比较，药物组、高剂量组、低剂量组 IL-6 含量分别升高了 89.76%、100.46%、75.92%，有显著意义 ($P<0.05$)；与奥美拉唑组比较，高剂量组有统计学意义 ($P<0.05$)，低剂量组无统计学意义 ($P<0.05$)。

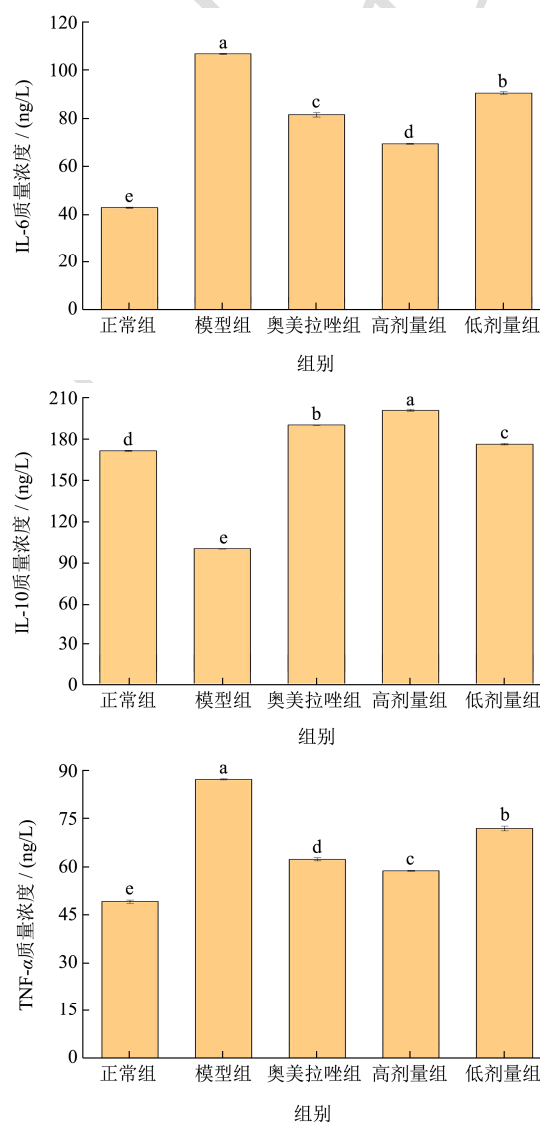


图5 猴头菇益生菌发酵液对胃溃疡小鼠血清中 IL-6、IL-10、TNF- α 含量的影响

Fig.5 Effects of Probiotic fermentation broth of *Hericiumhericium* on serum LEVELS of IL-6, IL-10 and TNF- α in mice with gastric ulcer

结果表明, 益生菌猴头菇发酵液灌胃后通过提高血清中 IL-10 含量从而降低 TNF- α 、IL-6 等炎症因子的表达来产生抗炎作用, 与李有连等^[35]研究结果一致。

3 结论

本研究以猴头菇为原料, 通过单因素及响应面优化试验, 确定了猴头菇发酵的最优工艺条件: 起始 pH 值 6.5、菌种复配比(保加利亚乳杆菌:嗜热链球菌:醋酸菌)为 1:1:1, 发酵温度 37.5 °C, 发酵时间 27 h, 接种量为 8.8%。最终获得菌落数为 8.72×10^9 CFU/mL; 猴头菇发酵液 DPPH 自由基清除率可达到 79.59%。并采用乙醇建立酒精性胃溃疡模型来评价猴头菇益生菌发酵液对急性酒精性胃溃疡病症的影响, 发现猴头菇益生菌发酵液可有效减轻小鼠乙醇所致胃溃疡症状, 能显著提高胃溃疡小鼠胃组织中 SOD、CAT 水平, 降低血清中 MDA 及炎症因子 IL-6、TNF- α 水平, 抑制炎症因子 IL-6、TNF- α 的释放; 对急性酒精性胃溃疡起到保护作用。有研究者证明猴头菇多糖对小鼠胃溃疡模型有显著的保护和修复作用、益生菌可以使酒精性胃溃疡小鼠血清抗氧化能力增强。因此, 猴头菇益生菌发酵液中多糖、益生菌和发酵液的抗炎抗氧化性谁的作用大, 三者有无协同作用, 还需进一步研究。本研究为发酵猴头菇提供了菌种复配的理论依据, 提高了猴头菇产品的利用价值, 为发挥猴头菇的商业价值助力。

参考文献

- [1] Morita N, Matsushita H, Minami A, et al. Effect of the methanol extract of the Lion's Mane mushroom, *Hericiumerinaceus*, on bone metabolism in ovariectomized rats [J]. Clinical and Experimental Obstetrics and Gynecology, 2020, 47(1): 47-52
- [2] 黄越.猴头菇抗氧化活性成分的分离纯化及结构鉴定研究[D].广州:华南理工大学,2018
- [3] Chen B S, Han J J, Bao L, et al. Identification and alpha-glucosidase inhibitory activity of meroterpenoids from *Hericiumerinaceus* [J]. Planta Medica: Natural Products and Medicinal Plant Research, 2020, 86(8): 571-578
- [4] Mihai V, Cristin S L, Anca S N, et al. Optimization of ultrasonic extraction to obtain Erinacine A and polyphenols with antioxidant activity from the fungal biomass of *Hericiumerinaceus* [J]. Foods, 2020, 9(12): 1889
- [5] Tu J Q, Liu H P, Wen Y H, et al. A novel polysaccharide from *Hericiumerinaceus*: Preparation, structural characteristics, thermal stabilities, and antioxidant activities *in vitro* [J]. Journal of Food Biochemistry, 2021, 45(9)
- [6] Taniya S, Papassara S, Piroonporn S, et al. Peptides obtained from edible mushrooms: *Hericiumerinaceus* offers the ability to scavenge free radicals and induce apoptosis in lung cancer cells in humans [J]. Food Function, 2020, 11(6)
- [7] 张微思,何容,李建英,等.猴头菇的营养药用价值及产品研究现状[J].食品与发酵科技,2018,54(1):104-108
- [8] 张鹏,图力古尔,包海鹰.猴头菌属真菌化学成分及药理活性研究概述[J].菌物研究,2011,9(1):54-62
- [9] Ye Y Y, Zhao H Q, Ren C H, et al. Value added immunoregulatory polysaccharides of *Hericiumerinaceus* and their effect on the gut microbiota [J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 262: 117668
- [10] Farah A, Ghalia K, Subi S, et al. Modulation of stem cell progeny by probiotics during regeneration of gastric mucosal erosions [J]. Biology, 2021, 10(7): 596
- [11] 程音.乳酸菌在食品中的应用[J].安阳工学院学报,2019,18(4): 41-43
- [12] Sanders M E, Merenstein D J, Reid G, et al. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic [J]. Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology, 2019, 16(10): 605-616
- [13] 韦金娜,朱宝生,龙琳.乳酸菌发酵植物基饮料的研究进展[J].饮料工业,2019,22(5):68-72
- [14] Marcel W, Aaron Walsh, Fiona C, Joshua M, et al. Distinct actions of the fermented beverage kefir on host behaviour, immunity and microbiome gut-brain modules in the mouse [J]. Microbiome, 2020, 8(3):67
- [15] Gabriela R, Ana L R, Juan A O, et al. Effect of probiotic cultures on the angiotensin converting enzyme inhibitory activity of whey-based fermented beverages [J]. Journal of Food Science and Technology, 2020,57(10): 3731-3738
- [16] Zhou Y, Chen X, Yi R, et al. Immunomodulatory effect of tremella polysaccharides against cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice [J]. Molecules, 2018, 23(2): 239-251
- [17] 严心怡.硫酸铝镁对大鼠胃溃疡模型治疗作用的研究[D].苏州:苏州大学,2020
- [18] 车思桦.大建中汤及其拆方对胃溃疡模型大鼠影响的实验研究[D].哈尔滨:黑龙江中医药大学,2020
- [19] Laprasert C, Kunanusorn P, Panthong A, et al. Gastric ulcer healing activity against acidified ethanol-induced gastric ulcer and gastroprotective mechanisms of *Zingiber simaoense* rhizome ethanol extract in rats [J]. Pharmacognosy Magazine, 2020, 16(16)

- [20] Asmaa A N, Eman Y, Amal E, et al. Management of *Citrus sinensis* peels for protection and treatment against gastric ulcer induced by ethanol in rats [J]. Biomarkers: Biochemical Indicators of Exposure, Response, and Susceptibility to Chemicals, 2020, 25(4): 349-359
- [21] 刘煜洪.广藿香醇胃液代谢物 β -广藿香烯抗胃溃疡及溃疡性结肠炎的研究[D].广州:广州中医药大学,2018
- [22] 王雪儒.猴菇南瓜保健酒发酵条件优化及其抗氧化成分分析[D].南宁:广西大学,2020
- [23] 黄和升,王海平,陶书中,等.猴头菇料酒的发酵工艺优化及抗氧化活性研究[J].食品科技,2021,46(7):260-264
- [24] 罗青,杨玉珍,王国霞.灵芝与猴头菇发酵液的抑菌性测定[J].现代牧业,2017,1(3):34-36
- [25] 田辉,梁宏彰,霍贵成.嗜热链球菌的特性与应用研究进展[J].生物技术通报,2015,31(9):38-48
- [26] 黄艳娜,游春苹,刘振民.保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌相互作用的研究进展[J].乳业科学与技术,2016,39(6):25-28
- [27] 武斌,李丽,赵良启.醋酸菌培养条件的优化及醋酸分批发酵[J].食品与药品,2007,1:11-14
- [28] Kantachote D, Ratanaburee A, Hayisama-Ae, et al. The use of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* DW12 for producing a novel functional beverage from mature coconut water [J]. Journal of Functional Foods, 2017, 32: 401-408
- [29] 姚芳,张伟,徐海祥,等.响应面法优化银杏果酶菌协同发酵工艺[J].食品工业科技,2021,42(4):77-85
- [30] 周小莉,王淼.乳酸菌在燕麦基质中生长特性的研究[J].食品与发酵工业,2011,37(9):64-69
- [31] Chu S C, Chen C. Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha [J]. Food Chemistry, 2006, 98(3): 502-507
- [32] Shahidi F, Alasalvar C, Liyana-Pathirana C M. Antioxidant phyto-chemicals in hazelnut kernel (*Corylus avellana* L.) and hazelnut by products [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(4): 1212-1220
- [33] 王珊珊,孙晓琦,马玉洁,等.响应面法优化黄浆水发酵液制备工艺及其抗氧化活性研究[J].食品研究与开发,2020,41(4):45-51
- [34] 周臻,李嘉俊.龙须藤多甲氧基总黄酮对大鼠酒精性胃溃疡的预防作用及机制[J].中药材,2020,43(6):1478-1481
- [35] 李有连,张秉丽,霍成英,等.吴茱萸碱对酒精性胃溃疡大鼠胃黏膜上皮细胞的保护作用[J].中南医学科学杂志,2022, 50(2):184-189