

# 筛选具有抑制引起腹泻致病菌黏附功能的益生菌

薛超辉, 张兰威\*, 张迎春, 单毓娟, 王淑梅, 李洪波

(哈尔滨工业大学食品科学与工程学院, 黑龙江哈尔滨 150090)

**摘要:** 筛选能够抑制引起腹泻致病菌黏附的益生菌, 并且对其适应肠道环境: 耐酸、耐胆盐和黏附性能进行评价。从中国西部地区传统发酵食品以及人类粪便样品中分离的14株益生菌作为筛选菌株。对这14株益生菌进行抑制致病菌黏附的筛选, 最终筛选出7株使致病菌黏附数量降低到 $1.5 \times 10^4$  CFU/mL的益生菌进行耐受肠道环境能力评价。实验结果显示这7株益生菌在pH2的条件下处理90min后存活的益生菌依然能够达到 $10^7$  CFU/mL左右, 在0.3%的胆盐环境中处理2h后菌数降低到原来的百分之一, 单层细胞上黏附的益生菌数J5、G15和F0533能够达到 $10^6$  CFU/mL, 显示出了较强的黏附能力。经过综合分析筛选出F0533、IN4125、G15、J5和M7益生菌, 经16S rDNA基因技术鉴定分别为*Lactobacillus rhamnosus*、*Lactobacillus rhamnosus*、*Lactobacillus paracasei*、*Lactobacillus casei*和*Lactobacillus paracasei*。

**关键词:** 益生菌, 沙门氏菌, 抑制黏附, 耐酸耐胆盐

## Screening the probiotics inhibiting the diarrhea caused by pathogens

XUE Chao-hui, ZHANG Lan-wei\*, ZHANG Ying-chun, SHAN Yu-juan, WANG Shu-mei, LI Hong-bo

(School of Food Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China)

**Abstract:** In this study, fourteen selected *Lactobacillus* isolated from human intestinal and ferment milk were assessed the ability to inhibit the infection of enteropathogens. The *Lactobacillus* strains were screened on the basis of probiotic characteristics (i.e., resistance to low pH and bile salts, adhesion to the human gastrointestinal tract). By an *in vitro* system simulating gastric transit, it indicated that the three probiotic strains had the ability to tolerate gastroenteric environment and the adhesive capacity to HT-29 cells. It was demonstrated that the number of 7 probiotics strains could reach about  $10^7$  CFU/mL after treatment of 90min in pH2 and the number of bacteria strains decreased to one percent of the original after treatment of 0.3% of the bile salt environment 2h. Adhesion of probiotics on number of J5, G15 and F0533 could reach  $10^6$  CFU/mL, which showed strong adhesion ability. Among the selected strains, five selected *Lactobacillus* showed a high probiotic potential and could be used in health-promoting food products. After analyzing the sequence of the 16S rDNA regions of these strains, five potential probiotic F0533, IN4125, G15, J5 and M7 were *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei*.

**Key words:** probiotics; *Salmonella*; inhibition of adhesion; resistance to low pH and bile salts

中图分类号: Q78

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)02-0227-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.02.040

益生菌是指一类活着的微生物, 当人类使用足够的量时就会在肠道中存活, 而且对人体产生有益的影响。1907年梅切尼科夫提出“喝酸乳可以长寿不老学说”, 19世纪30年代田稔博士发现了可以活着到达小肠的养乐多菌, 并对其功效进行了深入的研究后, 显示了乳酸菌并不仅仅只是用来发酵乳品的细菌, 而是有益于肠道菌群平衡、对于人类健康有帮助的菌种, 这种对人类健康有益的细菌被称为益生

菌<sup>[1-2]</sup>。自90年代初以来, 形形色色的“益生菌”类保健品风靡了整个世界。与此同时, “益生菌”的研究也已成为国际上的热门研究课题。何谓益生菌? 益生菌来源于希腊字母“*probios*”为生命的意思, 益生菌的历史可以追溯到人类历史初期, 希腊人和古罗马人已经开始食用奶酪和发酵乳制品, 特别是给孩子和康复期的病人食用<sup>[3]</sup>。

腹泻是发展中国家导致儿童死亡的最主要原因, 腹泻除了直接引起健康问题外, 还引起人体营养失调, 生长速度减缓等问题。随着近几年来诊断技术的发展, 人们开始研究引起腹泻的原因, 进而对引起腹泻的机制更深入的了解<sup>[4-5]</sup>。引起婴幼儿腹泻的主要致病菌包括: 大肠埃希氏菌、志贺氏菌、弯曲杆菌、弧菌和沙门氏菌。轮状病毒依然是引起婴儿腹泻的

收稿日期: 2014-05-22

作者简介: 薛超辉(1986-), 男, 博士研究生, 研究方向: 益生菌筛选及功能性研究。

\* 通讯作者: 张兰威(1961-), 男, 教授, 研究方向: 乳制品及益生菌功能。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30871816/C120108)。

主要原因,大约占到总腹泻的20%,然而整个致病菌依然占主要地位,大肠杆菌(11%)、弯曲杆菌(7%)、志贺氏菌(5%)被认为是引起腹泻最常见的致病菌。所以抑制引起腹泻的致病菌将能够有效的抑制腹泻的发生,致病菌引起腹泻的过程包括黏附、生长和侵入等过程,抑制致腹泻致病菌的益生菌的主要筛选指标是抑制致病菌生长和黏附<sup>[6]</sup>。

本文将筛选能够抑制引起腹泻致病菌的益生菌,筛选能够抑制致病菌黏附的益生菌菌株。益生菌进入肠道定植的过程中要经受胃酸低pH环境,益生菌活性将会受到很大损失,在小肠中存在着一定浓度的胆盐,益生菌活性也会遭到损失,因此益生菌的耐酸和耐胆盐能力是其益生功能的重要指标。将筛选出的益生菌进行耐酸、耐胆盐实验以确定益生菌适应肠道环境的性能。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

**供试菌株** 本实验室保存共44株(从传统发酵乳和人体肠道中分离纯化),选取LGG菌株为参照进行筛选,将益生菌分别接种于MRS、M17和TPY液体培养基中,在37℃培养箱中厌氧培养24h,活化3代;致病菌指标菌 沙门氏菌(*Salmonella* ATCC14028),沙门氏菌接种于TSB培养基中活化3代;HT-29细胞按常规传代培养于含10%小牛血清的RPMI-1640、100U/mL链霉素和100U/mL链霉素细胞培养液中,于CO<sub>2</sub>培养箱(5% CO<sub>2</sub>, 95%空气)中37℃培养,每48h换培养液一次,长成单层后传代接种于细胞培养板中,于5% CO<sub>2</sub>, 95%空气,37℃恒温培养,48h后进行黏附性实验。

**ABI2720型PCR仪** 美国ABI公司;SW-CJ-1D型无菌操作台 苏州净化设备有限公司;LDZX-40AI型高压灭菌锅 上海申安医疗器械厂;GL-10LM型离心机 星科离心机有限公司;LRH-250型生化培养箱 上海一恒科技有限公司。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 筛选具有抑制致病菌黏附功能的益生菌** 根据Kamini等提供的方法测定益生菌抑制致病菌黏附的能力<sup>[8]</sup>。将分离出的益生菌菌株在MRS培养基中37℃厌氧培养24h,致病菌在其培养基中37℃培养。HT-29细胞按常规传代培养于含10%小牛血清的RPMI-1640、100U/mL链霉素和100U/mL链霉素细胞培养液中,于CO<sub>2</sub>培养箱(5% CO<sub>2</sub>, 95%空气)中37℃培养,每48h换培养液一次,长成单层后传代接种于细胞培养板中后进行黏附性实验。

将长成单层24孔组织细胞培养板(约1×10<sup>5</sup>CFU/mL)中加入200μL 1×10<sup>8</sup>CFU/mL的益生菌-RPMI-1640混合液和200μL浓度为1×10<sup>7</sup>CFU/mL的致病菌-RPMI-1640混合液,只加入致病菌-RPMI-1640混合液作为对照组,将24孔细胞培养板在5% CO<sub>2</sub>, 95%空气的CO<sub>2</sub>培养箱中37℃培养2h,之后将益生菌菌液移除,用缓冲溶液PBS清洗三次。将致病菌菌液移出之后加入1mL含有Triton X-100(聚乙二醇辛基苯基醚)浓度为0.5%的PBS处理5min。然后用缓冲溶液PBS冲

洗三次,用1mL的蒸馏水溶解,连续稀释后用BHI培养基进行计数。

**1.2.2 益生菌耐受胃酸能力测定** 参考Mishra等实验方法对益生菌进行耐酸性实验<sup>[9-10]</sup>。益生菌在MRS液体培养基中活化3代,使液体培养基中菌的浓度达到10<sup>9</sup>CFU/mL。取100μL的菌液接种于9.9mL用4mol/L盐酸酸化到pH1.5、2.0和2.5的液体培养基和未酸化的培养基中(作为对照),37℃处理90min,之后将样品稀释不同的梯度,用琼脂平板倾注法在厌氧培养箱中37℃培养48h后计数,对比处理前后数活菌数的变化。

**1.2.3 益生菌耐受肠液胆盐能力测定** 参考Ruiz-Moyano等实验方法对益生菌进行耐胆盐实验<sup>[11-12]</sup>。活化两代后的益生菌菌株1%接种于含胆汁的液体培养基中(0.3%和0.5%牛胆汁),同时1%接种于不含胆汁的培养基中作为对照。37℃条件下处理2h前后分别计活菌数。

**1.2.4 筛选具有黏附能力的益生菌** 参考Kim等实验方法对益生菌进行黏附实验<sup>[13-14]</sup>。益生菌菌株在MRSC培养基中37℃厌氧培养24h,活化三代备用。将益生菌菌液10000r/min离心10min,除去上清液,收集沉淀的菌体,将菌体和RPMI-1640细胞培养基重混合,使其浓度达到10<sup>8</sup>CFU/mL。将长成单层的六孔组织细胞培养板中加入1mL 1×10<sup>8</sup>CFU/mL的益生菌-RPMI-1640混合液,将细胞培养板在5% CO<sub>2</sub>, 95%空气的CO<sub>2</sub>培养箱中37℃培养2h,之后将益生菌移除,用缓冲溶液PBS清洗三次除去未黏附的益生菌,之后加入含有Triton X-100的PBS使细胞溶解。用100μL的蒸馏水溶解,连续稀释后用MRS琼脂培养基在37℃培养箱中培养,培养48h后计算每毫升中活菌的数量。

**1.2.5 运用16S rDNA技术分析鉴定益生菌菌株** 运用16S rDNA技术分析鉴定益生菌菌株的过程如下:

益生菌基因组DNA的提取:取处于对数生长期的益生菌培养液,5000r/min离心10min。使用DNA提取试剂盒(D3350-01 Bacterial DNA Kit, OMEGA, BIO-TEK)提取益生菌的总DNA。

引物的设计:根据不同种属的细菌的16S rDNA序列两端的保守性设计通用引物:引物1(fD1 primer):AGAGTTTGATCCTGGCTCAG,引物2(rP1 primer):ACGGTTACCTTGTACGACTT。引物1共20bp碱基,G+C含量为50.00%。引物2共21bp碱基,G+C含量为42.86%。

PCR反应条件:PCR共50μL反应体系如下:30μL ddH<sub>2</sub>O, 5μL 10×PCR反应缓冲液, 4μL四种dNTP, 4μL MgCl<sub>2</sub>, 1μL上游引物(引物1), 1μL下游引物(引物2), 4μL模板DNA, 1μL *Taq* TMDNA聚合酶。PCR反应步骤:a.94℃热启动变性5min。b.94℃变性30s。c.57℃退火40s。d.72℃延伸90s。e.重复步骤b、c和d达到30次。f.72℃延伸10min,使扩增产物完整。

扩增产物纯度检测:配制1%琼脂糖凝胶,用TAE作为电泳缓冲液,制作10μL反应体系。以DL2000分子量为:200、500、800、1000、1500和2000为分子量标准,80V电压(5V/cm)恒压电泳,观察凝胶条带。

回收16S rDNA目标产物:配制1%琼脂糖凝胶,

用TAE作为电泳缓冲液,制作50 $\mu$ L反应体系。以DL2000分子量为标准,80V电压(5V/cm)恒压电泳。电泳完成后切去DNA片段,用DNA胶回收试剂盒对16S rDNA片段进行回收。

将16S rDNA目标片段转入大肠杆菌及测序:将16S rDNA转入到感受态大肠杆菌体内,37℃培养箱中培养24h后,挑取白色单菌落到50mL三角瓶中扩大培养。从扩大培养的菌液提取16S rDNA片段进行琼脂糖凝胶电泳,选择条带较亮的扩增菌株送至上海生工进行测序。

## 2 结果与分析

### 2.1 抑制致病菌黏附的益生菌的筛选

抑制致病菌黏附是益生菌抑制腹泻发生的关键环节,将肠道致病菌从肠道上皮细胞黏附位点脱落,不仅能够有效预防腹泻的发生,还能够降低腹泻复发的概率。致病菌黏附上皮细胞的结合位点是其致病的首要条件,因为只有这样才能不被肠道的食物和流体冲走并进行后续的大量生长和定植,最终引起腹泻。如果益生菌能够大幅降低致病菌的黏附效果,则能够有效地抑制腹泻的发生<sup>[15-17]</sup>。将筛选出的14株益生菌进行抑制致病菌黏附实验,在长成单层细胞培养板中同时加入益生菌和致病菌菌体,两种菌竞争性黏附到细胞,通过对比加入益生菌后致病菌的黏附性能的降低幅度来筛选抑制效果好的益生菌菌株。益生菌抑制致病菌黏附的实验结果如图1所示。

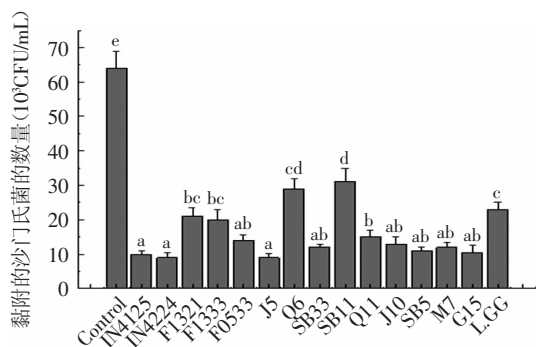


图1 筛选出的益生菌进行抑制沙门氏菌黏附实验结果  
( $\bar{x} \pm SD$ ,  $n=3$ )

Fig.1 Results of screened probiotics inhibition of Salmonella adhesion ( $\bar{x} \pm SD$ ,  $n=3$ )

注:不同的字母表示差异显著 ( $p < 0.05$ ),图2同。

从图1可以看出抑制沙门氏菌黏附能力比LGG强的菌株有:G15、M7、SB5、J10、Q11、SB33、J5、F0533、F1333、F1321、IN4224和IN4125。其中G15、J5、SB33、F0533、IN4224、IN4125和M7的抑制效果最为显著,和对照组 $6.5 \times 10^4$ CFU/mL相比降低到 $1.0 \times 10^4$ CFU/mL,降低了85%左右。将筛选出的7株能够共同抑制沙门氏菌黏附的益生菌进行耐酸耐胆盐适应肠道环境的性能评价。

### 2.2 益生菌耐酸实验

益生菌要进入人体定植肠道就必须经过胃酸的低酸环境,人体胃环境影响益生菌存活的主要是酸水解作用,当pH2.5时胃酸的杀菌作用就很明显。因

此,益生菌必须能够耐受胃酸的恶劣环境存活,才能够到达肠道定植下来,发挥益生功能。由于胃酸最低pH可能达到1.5,在一定的范围内变化,所以选取不同pH测定益生菌的耐酸能力<sup>[18-20]</sup>。从表1可以看出益生菌在pH1.5的条件下处理90min后存活的益生菌为 $10^5 \sim 10^6$ CFU/mL左右,其中J5、IN4125、M7和F0533存活的菌数能达到 $10^6$ CFU/mL, M7的菌数则能达到将近 $10^7$ CFU/mL,和对照组正常菌数 $10^6$ CFU/mL相比,菌数降低了3个数量级。

表1 益生菌耐酸实验结果( $\bar{x} \pm SD$ ,  $n=3$ )

Table 1 Effect of gastric juice on viability of strains ( $\bar{x} \pm SD$ ,  $n=3$ )

| 菌株编号   | 活菌株数量(lg CFU/mL)  |                   |                  |
|--------|-------------------|-------------------|------------------|
|        | pH1.5             | pH2.0             | pH2.5            |
| IN4224 | 5.33 $\pm$ 0.34a  | 7.27 $\pm$ 0.20bc | 7.86 $\pm$ 0.07a |
| J5     | 6.08 $\pm$ 0.21ab | 7.77 $\pm$ 0.04d  | 8.39 $\pm$ 0.09b |
| SB33   | 5.51 $\pm$ 0.45a  | 6.86 $\pm$ 0.23a  | 8.43 $\pm$ 0.07b |
| G15    | 5.45 $\pm$ 0.54a  | 6.81 $\pm$ 0.08a  | 8.46 $\pm$ 0.03b |
| IN4125 | 6.21 $\pm$ 0.48ab | 6.91 $\pm$ 0.09ab | 8.46 $\pm$ 0.10b |
| M7     | 6.72 $\pm$ 0.39b  | 7.60 $\pm$ 0.07cd | 8.39 $\pm$ 0.08b |
| F0533  | 6.28 $\pm$ 0.27b  | 7.00 $\pm$ 0.13ab | 8.40 $\pm$ 0.19b |

注:同列中不同小写字母表示差异显著 ( $p < 0.05$ );表2同。

益生菌在pH2.0的条件下处理90min后存活的益生菌数量能达到 $10^6$ CFU/mL以上,其中J5和M7存活的菌数能达到将近 $10^8$ CFU/mL,益生菌菌数降低了2个数量级左右。益生菌在pH2.5的条件下处理90min后存活的益生菌数量达到 $10^8$ CFU/mL左右,菌数降低了1个数量级左右。说明筛选出的益生菌在胃酸极端的pH环境下至少能有1%的菌株生存,进入人体肠道定植,从而发挥其益生功能。

### 2.3 益生菌耐胆盐实验

益生菌只有耐受肠道的胆盐环境,才能在肠道内定植。从表2可以看出在0.3%的胆盐环境下存活的益生菌菌数达到 $10^7$ CFU/mL,和对照组对比降低了1~2个数量级,数据表明筛选出的益生菌具有较强的耐受胆盐能力,其中J5、G15、IN4125、M7和F0533的耐受能力较强,能达到 $10^7$ CFU/mL以上。而这些益生菌在0.5%的胆盐环境下存活数为 $10^6$ CFU/mL左右,降低了2~3个数量级。

表2 不同浓度胆盐对菌株繁殖能力的影响( $\bar{x} \pm SD$ ,  $n=3$ )

Table 2 Effect of different concentrations of bile salt on growth of strains ( $\bar{x} \pm SD$ ,  $n=3$ )

| 菌株编号   | 活菌株数量(lg CFU/mL)  |                   |                  |
|--------|-------------------|-------------------|------------------|
|        | Control           | 0.3%              | 0.5%             |
| IN4224 | 8.62 $\pm$ 0.03a  | 6.10 $\pm$ 0.20a  | 5.64 $\pm$ 0.11a |
| J5     | 8.92 $\pm$ 0.05b  | 7.24 $\pm$ 0.14b  | 6.45 $\pm$ 0.09b |
| SB33   | 8.52 $\pm$ 0.05a  | 6.78 $\pm$ 0.20ab | 5.33 $\pm$ 0.12a |
| G15    | 9.07 $\pm$ 0.05c  | 7.48 $\pm$ 0.12c  | 6.46 $\pm$ 0.03b |
| IN4125 | 8.82 $\pm$ 0.04ab | 7.43 $\pm$ 0.11b  | 6.46 $\pm$ 0.10b |
| M7     | 8.67 $\pm$ 0.03a  | 7.53 $\pm$ 0.17c  | 5.79 $\pm$ 0.08a |
| F0533  | 8.88 $\pm$ 0.02ab | 7.33 $\pm$ 0.13b  | 6.40 $\pm$ 0.19b |

## 2.4 筛选黏附能力强的益生菌

经过胃酸和肠道胆盐极端环境条件下存活的益生菌,如果要发挥益生功能需黏附到肠道上皮细胞上,因为只有这样才能避免被肠道流体和食物冲洗掉,才能完成在肠道的定植,因此黏附性能是衡量益生菌特性非常关键的指标<sup>[21]</sup>。益生菌的粘附能力如图2所示。

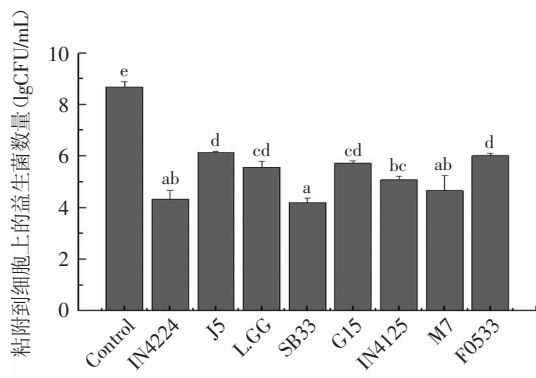


图2 筛选出的益生菌黏附实验结果( $\bar{x} \pm SD, n=3$ )

Fig.2 Results of screened probiotics adhesion assay ( $\bar{x} \pm SD, n=3$ )

从图2中可以看出益生菌和上皮细胞混合2h后,对照组益生菌浓度为 $10^6$ CFU/mL,而黏附到上皮细胞上的益生菌数量是 $10^4 \sim 10^6$ CFU/mL左右,其中J5、G15和F0533的黏附能力比LGG的黏附能力强,黏附到细胞上的菌数超过 $10^6$ CFU/mL,黏附率为0.1%,具备较强的黏附能力。

## 2.5 通过16SrDNA鉴定益生菌菌株

最终筛选出J5、M7、IN4125、F0533和G15进行机理研究实验,提取其总DNA并用16S rDNA引物进行PCR,得到菌株的16S rDNA,送至上海生工进行测序。将测序结果在NCBI网站上进行比对,鉴定益生菌所属的菌属。经过鉴定J5、M7、IN4125、F0533和G15分别为:*Lactobacillus rhamnosus*、*Lactobacillus casei*、*Lactobacillus rhamnosus*、*Lactobacillus paracasei*和*Lactobacillus paracasei*。

## 3 结论

从14株潜在的益生菌菌株筛选出能够抑制致病菌黏附的益生菌,并且对筛选出来的7株益生菌耐受肠道环境进行评价,即进行耐受肠道环境及其黏附性筛选。首先对7株菌株耐酸能力评价,实验结果显示4株益生菌在pH2的条件下存活的益生菌能够达到在 $10^7$ CFU/mL以上。耐胆盐能力结果显示,在0.3%的胆盐环境下5株益生菌活菌数在能够达到在 $10^7$ CFU/mL以上。用单层HT-29细胞模拟肠道环境进行益生菌黏附实验,实验结果显示有3株益生菌能够将0.1%的益生菌黏附到上皮细胞上。运用16S rDNA基因技术鉴定五株乳酸菌F0533、IN4125、G15、J5和M7分别为*Lactobacillus rhamnosus*、*Lactobacillus rhamnosus*、*Lactobacillus paracasei*、*Lactobacillus casei*和*Lactobacillus paracasei*。

## 参考文献

[1] Hempel S, Newberry S J, Maher A R, et al. Probiotics for the

Prevention and Treatment of Antibiotic-Associated Diarrhea: A Systematic Review and Meta-Analysis[J]. JAMA, 2012, 307(18): 1959-1969.

[2] O'Reilly C E, Jaron P, Ochieng B, et al. Risk Factors for Death among Children Less Than 5 Years Old Hospitalized with Diarrhea in Rural Western Kenya, 2005-2007: A Cohort Study [J]. PLoS Medicine, 2012, 9(7): e1001256.

[3] Liu L, Li Q, Lee R A, et al. Trends in Causes of Death among Children under 5 in Bangladesh, 1993-2004: An Exercise Applying a Standardized Computer Algorithm to Assign Causes of Death Using Verbal Autopsy Data[J]. Popul Health Metr, 2011, 9(1): 43-55.

[4] Scallan E, Mahon B E, Hoekstra R M, et al. Estimates of Illnesses, Hospitalizations and Deaths Caused by Major Bacterial Enteric Pathogens in Young Children in the United States[J]. The Pediatric Infectious Disease Journal, 2013, 32(3): 217-221.

[5] Walker C L F, Rudan I, Liu L, et al. Global Burden of Childhood Pneumonia and Diarrhoea[J]. The Lancet, 2013, 381(9875): 1405-1416.

[6] BARR W, SMITH A. Acute Diarrhea[J]. American Family Physician, 2014, 89(3): 538-552.

[7] Trejo F M, Minnaard J, Perez P F, et al. Inhibition of Clostridium difficile Growth and Adhesion to Enterocytes by Bifidobacterium Supernatants[J]. Anaerobe, 2006, 12(4): 186-193.

[8] Ramiah K, van Reenen C A, Dicks L M. Surface-Bound Proteins of *Lactobacillus plantarum* 423 That Contribute to Adhesion of Caco-2 Cells and Their Role in Competitive Exclusion and Displacement of Clostridium sporogenes and Enterococcus faecalis[J]. Research in Microbiology, 2008, 159(6): 470-475.

[9] Mishra V, Prasad D. Application of in Vitro Methods for Selection of Lactobacillus Casei Strains as Potential Probiotics[J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 103(1): 109-115.

[10] Bao Y, Zhang Y, Zhang Y, et al. Screening of Potential Probiotic Properties of Lactobacillus fermentum Isolated from Traditional Dairy Products[J]. Food Control, 2010, 21(5): 695-701.

[11] Liu Z, Jiang Z, Zhou K, et al. Screening of Bifidobacteria with Acquired Tolerance to Human Gastrointestinal Tract[J]. Anaerobe, 2007, 13(5): 215-219.

[12] Ruiz-Moyano S, Martín A, Benito M J, et al. Screening of Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria for Potential Probiotic Use in Iberian Dry Fermented Sausages[J]. Meat Science, 2008, 80(3): 715-721.

[13] Kim P I, Jung M Y, Chang Y-H, et al. Probiotic Properties of Lactobacillus and Bifidobacterium Strains Isolated from Porcine Gastrointestinal Tract[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 74(5): 1103-1111.

[14] Maragkoudakis P A, Zoumpopoulou G, Miaris C, et al. Probiotic Potential of Lactobacillus Strains Isolated from Dairy Products[J]. International Dairy Journal, 2006, 16(3): 189-199.

[15] Sonnenburg J L, Chen C T, Gordon J I. Genomic and

(下转第242页)

离纯化荚果蕨总三萜的理想大孔吸附树脂是AB-8。通过考察不同因素对纯化效果的影响,初步确定最佳吸附条件:上样浓度1.96mg/mL,上样流速1.5mL/min,样液pH6,最大上样量达5BV;最佳洗脱条件:60%乙醇,2.0mL/min洗脱速度,4BV洗脱体积。其回收率为86.27%,纯度从28.61%提高到82.32%,精制倍数达2.88,说明AB-8大孔吸附树脂对荚果蕨总三萜具有较好的纯化精制效果,选择性好,吸附解析率高,操作简单易行且无毒害作用。

与其他三萜类物质的分离纯化研究<sup>[22-23]</sup>相较而言,本文所用的乙醇浓度低、用量少、节约成本,其纯度和回收率也有一定的提高,因此该方法在分离纯化药材中三萜类物质方面具有一定推广价值,可为工业生产中荚果蕨总三萜的分离纯化及单体的鉴定等方面提供可靠的理论和参考依据。

### 参考文献

- [1] 李晓,杨利民,王少江. 不同采收时期荚果蕨营养叶中总黄酮含量测定[J]. 林业科技,2011,36(3):29-31.
- [2] 朱立新. 中国野菜开发与利用[M]. 北京:金盾出版社,2000:90-98.
- [3] Nakata T, Yamada T, Taji S, *et al.* Structure determination of inonotusoxides A and B and *in vivo* anti-tumor promoting activity of inotodiol from the sclerotia of *Inonotus obliquus* [J]. Bioorganic Medicinal Chemistry, 2007, 15(1):257-264.
- [4] Li J, Guo WJ, Yang QY. Effects of ursolic acid and oleanolic acid on human colon carcinoma cell line HCT15[J]. World J Gastroenterol, 2002, 8(3):493-495.
- [5] Singh B, Sahu P M, Lohiya R K, *et al.* An-ti-inflammatory activity of alkanoids and triter-penoids from *trichodesma amplexicaule roth*[J]. Phytomedicine, 2006, 13(3):152-156.
- [6] Angeh J E, Huang X, Sattler I, *et al.* Antimicrobial and anti-inflammatory activity of four known and one new triterpenoid from *com-bretum imberbe* (combretaceae)[J]. Ethnopharmacol, 2007, 15(1):257-264.
- [7] 杨庆新,黄建安,刘仲华,等. 枇杷叶中三萜酸的研究进展[J]. 食品工业科技,2008,29(3):282-285.
- [8] Zhang GW, Hu MM. Optimized ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Prunella vulgaris* L. and evaluation of antioxidant activities *in vitro*[J]. Innovative Food Sci Emerging Technol, 2011, 12(1):18-25.
- [9] Li J, Chen ZB, Di DL. Preparative separation and purification of rebaudioside A from *Stevia rebaudiana* Bertoni crude extracts by mixed bed of macroporous adsorption resins[J]. Food Chemistry, 2012, 132(1):268-276.
- [10] 李颖畅,李冰心,吕艳芳,等. AB-8型大孔树脂纯化蓝莓叶多酚的工艺研究[J]. 食品工业科技,2012,33(20):258-261.
- [11] Li C, Wang NX, Zhang Y, *et al.* Using AB-8 macroporous adsorption resin for separation and purification of total flavonoids from *Stenoloma chusana* (L.) Ching[J]. Food Sci, 2011, 32(16):31-35.
- [12] 杨晓艳,彭飞,陆洋,等. 响应面法优化荚果蕨总三萜超声提取工艺[J]. 食品工业科技,2014,35(15):200-209.
- [13] 李斌,李元魁,孟宪军,等. 响应曲面法优化北五味子总三萜的提取工艺[J]. 食品科学,2010,31(16):106-108.
- [14] Chen Yi, Xie Mingyong, Gong Xiaofeng. Microwave-assisted extraction used for the isolation of total triterpenoid saponins from *Ganoderma atrum*[J]. Journal of Food Engineering, 2007, 81(1):162-170.
- [15] 宋倩,赵声兰,刘芳,等. 大孔吸附树脂分离纯化核桃壳总黄酮[J]. 食品与发酵工业,2012,38(12):180-183.
- [16] 赵芳春,赵兵,黄云祥. 大孔吸附树脂纯化芦笋皂苷工艺研究[J]. 食品工业科技,2012,33(18):248-252.
- [17] 许怀德,陈佳,包蓉,等. 大孔吸附树脂分离纯化洋葱皮黄酮的研究[J]. 食品科学,2011,32(12):133-137.
- [18] 张智,于震,王振宇,等. 落叶松树皮多酚纯化工艺研究[J]. 食品工业科技,2014,35(5):187-191.
- [19] 王清亭,王晓东,赵兵. 大孔树脂分离纯化文冠果种仁总皂苷[J]. 食品工业科技,2013,34(10):219-223.
- [20] 许亮,师俊玲,陈志娜,等. 大孔树脂分离纯化宁夏枸杞总黄酮的研究[J]. 离子交换与吸附,2011,27(3):202-211.
- [21] 李洋,曹珊珊,张媛,等. 大孔树脂分离纯化褚果总黄酮优化工艺研究[J]. 离子交换与吸附,2013,29(4):323-333.
- [22] 尹忠平,上官新晨,张月红,等. 大孔树脂吸附纯化青钱柳叶三萜化合物[J]. 食品科学,2011,32(6):61-65.
- [23] 冯素香,苗明三,苗晋鑫,等. AB-8大孔吸附树脂同时分离纯化毛冬青总黄酮、总皂苷工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(3):5-7.
- [19] Ou J, DeLany J P, Zhang M, *et al.* Association between Low Colonic Short-Chain Fatty Acids and High Bile Acids in High Colon Cancer Risk Populations[J]. Nutrition and Cancer, 2012, 64(1):34-40.
- [20] Zhou Z, Topping D L, Morell M K, *et al.* Changes in Starch Physical Characteristics Following Digestion of Foods in the Human Small Intestine[J]. British Journal of Nutrition, 2010, 104(4):573-580.
- [21] Richardson A J, McKain N, Wallace R J. Ammonia Production by Human Faecal Bacteria, and the Enumeration, Isolation and Characterization of Bacteria Capable of Growth on Peptides and Amino Acids[J]. BMC Microbiology, 2013, 13(1):6-13.

(上接第230页)

Metabolic Studies of the Impact of Probiotics on a Model Gut Symbiont and Host[J]. PLoS Biology, 2006, 4(12):e413.

[16] Parkes G C, Brostoff J, Whelan K, *et al.* Gastrointestinal Microbiota in Irritable Bowel Syndrome: Their Role in Its Pathogenesis and Treatment[J]. The American Journal of Gastroenterology, 2008, 103(6):1557-1567.

[17] Remus D M, Kleerebezem M, Bron P A. An Intimate Tête-Tête—How Probiotic Lactobacilli Communicate with the Host[J]. European Journal of Pharmacology, 2011, 668:S33-S42.

[18] Goldenberg J Z, Ma S S, Saxton J D, *et al.* Probiotics for the prevention of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults and children[J]. Status and Date: New, published in, 2013, 5.