

三种植物源增殖性底物 对嗜酸乳杆菌发酵及蛋白表达的影响

王秋萍¹, 臧凯丽^{1,*}, 赵林森², 赵培¹, 闫亚丽^{1,*}, 刘爱国^{1,*}, 陈庆森¹

(1.天津商业大学生物技术与食品科学学院,天津市食品生物技术重点实验室,天津 300134;

2.河北一然生物科技有限公司,河北石家庄 050899)

摘要:为探究植物源增殖性底物对嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus* CICC6005)生物量的影响,并在此基础上重点解析发酵菌体蛋白质表达水平上的变化,本研究通过采用正交优化方法,在TJA培养基中添加各种增殖性底物确定其生物量的水平,利用SDS-PAGE凝胶电泳技术对胞内胞外蛋白质进行纯化鉴定。结果显示,三种植物源增殖性底物最优浓度分别为番茄汁5%、土豆汁3%、苹果汁2%,发酵液活菌数达 2.31×10^{10} CFU/mL;由R值分析得出,影响*L.acidophilus* CICC6005菌株生长的各因素的主次顺序为:番茄汁、土豆汁和苹果汁。发酵液中表达全蛋白质的图谱显示,*L.acidophilus* CICC6005菌株在该营养条件下表达蛋白的数量有明显的增加,并根据标准曲线得出各峰的蛋白分子量大小,即胞内蛋白的分子量为59、17 ku;胞外蛋白的分子量为66、35 ku,其表达量分别为2.144、0.744、2.394、4.644 mg/mL。综上,在TJA培养基上,适宜浓度的植物源增殖性底物对*L.acidophilus* CICC6005菌株的增殖以及蛋白质的表达水平起到了一定的促进作用,同时纯化鉴定出该菌表达的两种主要蛋白质,对进一步其益生功能具有科学和实践意义。

关键词:嗜酸乳杆菌 CICC6005, 发酵, 生长促进物质, 胞外蛋白, 胞内蛋白

Fermentation and Influence of Protein Expression of Three Plant-Based Proliferative Substrates for *Lactobacillus acidophilus* CICC6005

WANG Qiu-ping¹, ZANG Kai-li^{1,*}, ZHAO Lin-sen², ZHAO Pei¹, YAN Ya-li^{1,*}, LIU Ai-guo^{1,*}, CHEN Qing-sen¹

(1.Tianjin Key Laboratory of Food Biotechnology, College of Biotechnology and Food Science, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China;

2.Hebei Inatural Biological Technical Company, Shijiazhuang 050899, China)

Abstract: In order to explore the effects of botanical proliferative substrates on the biomass of *Lactobacillus acidophilus* CICC6005, and to analyze the changes of protein expression level in fermented cells, orthogonal optimization was applied to determine the biomass of TJA medium by adding various proliferative substrates in this study. The intracellular and extracellular proteins were purified and identified by SDS-PAGE gel electrophoresis. The results showed that, the optimum concentration of proliferative substrates from three plant sources was 5% tomato juice, 3% potato juice, 2% apple juice, and the number of viable bacteria in fermentation broth was 2.31×10^{10} CFU/mL. The order of factors affecting the growth of *L. acidophilus* CICC6005 strain was tomato juice, potato juice and apple juice. The maps of all proteins expressed in fermentation broth showed that *L. acidophilus* CICC6005 strain had a significant increase in the number of proteins expressed under the nutritional conditions. According to the standard curve, the molecular weight of each peak was 59 and 17 ku, and the molecular weight of extracellular protein was 66 and 35 ku, with the expression quantities of 2.144, 0.744, 2.394 and 4.644 mg/mL, respectively. The maps of expression of all protein in the fermentation broth showed that the number of protein expressed in *L. acidophilus* CICC6005 strain increased obviously under the nutritional conditions. According to the standard curve, the molecular weight of each peak was 59 and 17 ku, and the molecular weight of extracellular protein was 66 and 35 ku, the expression quantities were 2.144, 0.744, 2.394 and 4.644 mg/mL respectively. In conclusion, on the TJA basic medium, the suitable concentration of plant source proliferative substrates played a certain role in promoting the proliferation of *L. acidophilus* CICC6005 strain and protein expression level. At the same time, two major proteins expressed by the strain were purified and identified, which was of scientific and practical significance for further analysis and identification of its probiotic function.

Key words: *Lactobacillus acidophilus* CICC6005; fermentation; growth promoting substance; extracellular protein; intracellular protein

收稿日期:2018-05-07 + 为并列第一作者

作者简介:王秋萍(1991-),女,硕士研究生,研究方向:发酵生物技术,E-mail:1587813026@qq.com。

臧凯丽(1993-),女,硕士研究生,研究方向:发酵生物技术,E-mail:1623249305@qq.com。

* 通讯作者:闫亚丽(1962-),女,硕士,副教授,研究方向:发酵生物技术、微生物学,E-mail:yyali@tjcu.edu.cn。

刘爱国(1964-),男,硕士,教授,研究方向:功能性冷食与人体健康,E-mail:liuaignuo@tjcu.edu.cn。

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2019)07-0144-06

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2019.07.025

引文格式: 王秋萍, 臧凯丽, 赵林森, 等. 三种植物源增殖性底物对嗜酸乳杆菌发酵及蛋白表达的影响[J]. 食品工业科技, 2019, 40(7): 144-149.

目前, 有关益生菌的发酵生产以及功能评价一直是生物发酵领域的研究主题, 使用较多的是乳杆菌属和双歧杆菌属。日本、欧洲、澳大利亚、美国等国的益生菌制品在功能性食品市场份额上占有很大的比重。现如今益生菌产品开发的新方向还包括: 减肥降脂食品、孕婴食品、宇航食品、运动食品、减压食品、过敏人群食品、减少损害食品^[1]等。研究表明, 益生菌能改善宿主微生态平衡、发挥有益作用并产生确切的健康疗效, 对宿主健康具有非常重要的作用, 因此在生物工程、工农业、食品安全等领域^[2]均有广泛应用, 也是研究的热点。嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) 是目前乳酸菌家族中研究与开发比较广泛的益生菌之一, 是人体肠道中重要的微生物, 被视为第三代乳酸发酵剂菌种^[3]。报道指出, *L.acidophilus* 具有平衡肠道微生物区系、调节肠道功能紊乱、增强机体肠粘膜屏障、调节肠道内免疫系统、抗癌抗肿瘤的作用^[4-5]。*L.acidophilus* CICC6005 属于革兰氏 G⁺, 无芽孢杆菌科的乳杆菌属, 以短链、单个、成对等形式存在于人及一些动物肠道中, 其最适生长温度为 35~38 ℃, 最适 pH 为 5.5~6.2^[6], 具有耐酸、耐胆汁酸盐的特性, 能通过胃进入肠道, 代谢乳糖产生乳酸、细菌素等^[7]物质; 因 *L.acidophilus* CICC6005 的主要代谢产物是有机酸, 可降低环境中的氧化还原电位和 pH, 抑制酸性细菌和需氧细菌生长, 这是该菌发挥益生作用的主要原因^[8]。因此, 对其进行更深的研究是非常必要的。

已有研究表明, 益生菌分泌的一些代谢产物具有免疫调节作用, 能够促进肠道稳态, 在保健食品的开发研究中具有显著的开发潜力^[9]。Schlee 等^[10]研究发现, *L.acidophilus* PZ 1138、发酵乳杆菌 PZ 1162, 干酪乳杆菌干酪亚种 LMGP.17806 混合益生菌分泌的胞外蛋白可以通过激活 NF- κ B 和 MAPK 信号通路诱导上皮细胞抗菌肽 β BD-2 的分泌。Bernaro 等^[11]研究发现, 植物乳杆菌分泌的肽类物质可以诱导人类肠道树突细胞产生白细胞介素-10 (interleukin, IL-10), IL-10 对炎症、自身免疫疾病的预防和肠道稳态的维持有很重要的作用。

目前本实验室对 *L.acidophilus* CICC6005 也进行了一定的研究, 贾彦等^[12-13]研究了不同质量浓度的杜仲水提液添加到 MRS 培养基中, 旨在探究不同质量浓度的杜仲水提液对 *L.acidophilus* CICC6005 菌株增殖情况及对发酵过程中胞外和胞内蛋白含量变化的影响, 并对其蛋白组分进行分析。结果显示添加适宜质量浓度的杜仲水提液对 *L.acidophilus* CICC6005 菌株的增殖起到了一定的促进作用, 并对其发酵产物组成产生了一定的影响。在此研究基础上为更好地探究和利用 *L.actobacillus* CICC6005 的生物学功能, 解析该菌表现生物学功能的活性成分, 本研究进一步从基础培养基 (TJA) 出发, 通过添加不同的增殖

性底物, 筛选并优化促进 *L.actobacillus* CICC6005 菌株增殖的组合促进剂; 同时重点分析鉴定该组合促进剂对发酵 *L.actobacillus* CICC6005 的胞内和胞外蛋白质的作用, 探讨对该菌表达蛋白质的影响, 对阐述该菌的益生功能具有科学意义。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

番茄、苹果、土豆 天津市水木天成店物美超市, 体型饱满, 无病虫害; 嗜酸乳杆菌 CICC6005 (*L.acidophilus* CICC6005) 本实验室保藏菌种; MRS 肉汤培养基、TJA 培养基 购自北京奥博星生物技术有限公司; 十二烷基硫酸钠 (SDS) 上海威奥科技有限公司; TEMED 碧云天生物技术有限公司; 葡聚糖凝胶 Sephadex G-100 北京索莱宝科技有限公司; 30% 丙烯酰胺 Solarbio 公司; 1.0 mol/L Tris-HCl Solarbio 公司; 过硫酸铵 天津市风船化学试剂科技有限公司; 考马斯亮蓝 R-250 Sigma 公司; 细菌总蛋白抽提试剂盒 上海生工生物工程股份有限公司; BCA 蛋白定量试剂盒 北京康为世纪生物科技有限公司。

MuLiskan MK3 Thermo 酶标仪 Thermo 公司; 3-18KS 高速冷冻离心机 Sigma 公司; TD5Z 低速离心机 Aida 公司; DYCZ-24DN 迷你双垂直电泳槽 北京六一仪器厂; 24DN 制胶器 北京六一仪器厂; DYY-2C 电泳仪 北京六一仪器厂; T6 新世纪紫外分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司; OHG-9073BS-III 电热恒温鼓风干燥箱 上海新苗医疗器械制造有限公司; SPX-250BS-II 生化培养箱 上海新苗医疗器械制造有限公司; XW-80A 微型漩涡混合仪 上海沪西分析仪器有限公司; HYG-III 迴转式恒温摇瓶柜 上海欣蕊自动化设备有限公司; CXG-1 电脑恒温层析柜 上海沪西分析仪器有限公司; BT-100 恒流泵 上海沪西分析仪器有限公司; 1H1D-5 电脑紫外检测仪 上海沪西分析仪器有限公司; BS-100A 自动部分收集器 上海沪西分析仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 番茄汁、苹果汁、土豆汁的制备 番茄汁的制备: 将新鲜番茄切碎 (勿捣碎), 置于 4 ℃ 冰箱中 8~12 h 至到有上清液析出, 纱布过滤即得; 苹果汁、土豆汁的制备: 将新鲜苹果、土豆洗净, 切成边长为 0.5 cm 左右的小丁, 各称取 150 g, 加水煮沸 15 min, 定容至 500 mL, 过滤取上清。将以上汁液 (作为植物源增殖性底物) 分装, 121 ℃, 灭菌 15 min, 4 ℃ 冰箱保存备用。

1.2.2 *L.acidophilus* CICC6005 种子液的配制 以 TJA 培养基作为基础培养基, 将冻存的 *L.acidophilus* CICC6005 菌种于固体斜面培养基上活化 24~36 h, 再转接于 MRS 活化 24 h, 以此作为种子液。

1.2.3 单因素实验设计 前期通过预实验确定了 *L.acidophilus* CICC6005 菌株在 TJA 培养基上的生长情况,在此基础上,将番茄汁、苹果汁、土豆汁分别稀释成 0%、2%、4%、6%、8% 的浓度,分别取 2 mL 逐个加入 48 mL TJA 液体培养基中,调节 pH 为 6.2,为 5 组实验组,另取 2 mL 蒸馏水添加到 48 mL TJA 液体培养基中作为对照组,以上 5 组分别做 3 个平行实验,121 °C 灭菌 15 min,实验组和对照组均按 2% 接种量接入 *L.acidophilus* CICC6005 菌株,在 37 °C 下培养 24 h 后,得到的菌悬液用平板计数法测定活菌数^[14]。

1.2.4 正交试验设计 在单因素实验的基础上,对番茄汁、土豆汁、苹果汁进行 3 因素 3 水平正交试验^[15-16]见表 1。在 600 nm^[17]下测定悬菌液的 OD 值(OD 值与活菌数在同一介质溶液中呈线性相关,为避免计算存在的误差,正交试验结果以 OD_{600 nm} 下测定的吸光度为指标),得出影响条件的主次顺序及各因素对反应的影响程度,选取最优组合。

表 1 正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels table of orthogonal experiment

因素	A 番茄汁浓度 (%)	B 土豆汁浓度 (%)	C 苹果汁浓度 (%)
水平	2	1	2
	5	3	4
	8	5	6

1.2.5 *L.acidophilus* CICC6005 菌体胞外蛋白和胞内蛋白的提取 胞内蛋白的提取:将以上最优组合发酵液于 4 °C 离心,10000 r/min,10 min,分离上清液和菌体。收集移出的上清液,并于 4 °C 条件下保存。沉淀的菌体用 2 mL 预冷的 0.01 mol/mL 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)振荡洗涤,10000 r/min 离心 10 min,除去上清液,沉淀即为胞内蛋白,将其存放于 -20 °C 条件下保存^[18-19]。

胞外蛋白的提取:采用 TCA-丙酮沉淀法浓缩胞外蛋白。上清液与 TCA 以体积比 4:1 混合,4 °C 条件下处理 60 min,4 °C 条件下 14000 r/min 离心 20 min,弃去上清液。用预冷丙酮溶液反复洗去蛋白沉淀中的 TCA,4 °C 条件下 14000 r/min 离心 5 min 弃上清液,待丙酮完全挥发,用 0.01 mol/L PBS 溶解沉淀,与 -20 °C 条件下存放^[20-21]。蛋白质浓度的测定采用 BCA 法,具体操作按照试剂盒说明书。

对照组蛋白为 1.2.3 对照组培养后所得悬菌液提取的粗蛋白。

1.2.6 *L.acidophilus* CICC6005 胞内和胞外蛋白的纯化 采用凝胶过滤层析法将 Sephadex G-100 凝胶柱(1.6 cm × 50 cm)用 0.05 mol/L 的 PBS 缓冲液(pH7.4)平衡好溶胀好后,取胞外或胞内蛋白 2 mL 进行上样,然后用缓冲液以 1 mL/min 的流速进行洗脱,用紫外检测仪在波长 280 nm 处检测,并用核酸、蛋白检测系统收集信号,收集各峰组分;用 PEG 10000 包埋浓缩^[22-23]。

1.2.7 SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定蛋白质的分子量大小 聚丙烯酰胺凝胶电泳是根据不同的蛋白质具有不同的电荷,能产生不同的迁移率,从而将蛋白质分

离成若干条谱带。SDS 能将分子间和分子内的氢键和疏水键断裂,以一定的比例与蛋白质分子结合成复合物,使蛋白质不再受电荷的影响,只与分子大小有关,当分子量在 15~200 ku 之间时,蛋白质的迁移率和分子量的对数呈线性关系^[24]。凝胶电泳迁移率是根据 SDS-PAGE 凝胶电泳结果图,以蛋白质 Marker 中各蛋白迁移率 X 作为横坐标,以标准蛋白质分子量的对数为纵坐标作图,根据标准曲线得出各峰的蛋白分子量大小。将培养好的 *L.acidophilus* CICC6005 的胞内胞外蛋白粗提液及两组胞内蛋白、胞外蛋白组进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分析,判断胞外胞内蛋白组分子量大小。

1.3 数据统计与分析

所有数据均做平行试验,采用 SPSS 16.0 统计软件对结果进行分析,各组数据结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果与分析

2.1 不同浓度增殖性底物对 *L.acidophilus* CICC6005 活菌数的影响

本研究以 TJA 为基础培养基考察 *L.acidophilus* CICC6005 的生长状况,经平板计数,*L.acidophilus* CICC6005 活菌数可达 5.38×10^9 CFU/mL。随后考察不同增殖性底物对 *L.acidophilus* CICC6005 生长的影响。

在增殖培养基中,添加的增殖性底物中含有丰富的营养成分^[25],会对菌株生长产生一定的影响,不同增殖性底物对 *L.acidophilus* CICC6005 生长的影响如图 1 所示。由图 1 可知,随着增殖性底物浓度的增大,活菌数均呈现先升高后降低的趋势。当番茄汁浓度为 4%~6% 时,活菌数较高,对 *L.acidophilus* CICC6005 的生长促进作用较大;当番茄汁浓度为 8% 时,对菌的生长产生了明显的抑制作用,这是由于番茄汁添加量的增大,其含有的糖类物质浓度相应增加,导致 *L.acidophilus* CICC6005 生存环境中的渗透压升高,从而抑制了菌的增殖^[26]。在苹果汁浓度为 4% 时,活菌数达到最高,对 *L.acidophilus* CICC6005 的生长促进作用达到最大。当苹果汁浓度过大(8%)时,对菌的生长产生抑制作用,苹果汁中含有多糖、维生素以及有机酸类物质^[27],随着苹果汁浓度的增大,使培养基中多糖、维生素含量偏高,增大培养基的渗透压,抑制了 *L.acidophilus* CICC6005 的生长。当土豆汁浓度为 2%~4% 时,对菌的生长促进作用也较大。土豆中富含淀粉、氨基酸、维生素以及无机盐,可为 *L.acidophilus* CICC6005 提供生长所需的碳源、氮源、以及生长因子^[28]。土豆汁浓度过高时,同样使活菌数下降,对 *L.acidophilus* CICC6005 的生长不利。综上,选择的较优番茄汁浓度为 5%,苹果汁浓度为 4%,土豆汁浓度为 3%。

2.2 正交试验结果

按照正交试验表 1 设计,考察三种植物源增殖性底物的组合对 *L.acidophilus* CICC6005 在 TJA 培养基共培养所表现的对菌体增殖能力的影响,结果见表 2 所示。

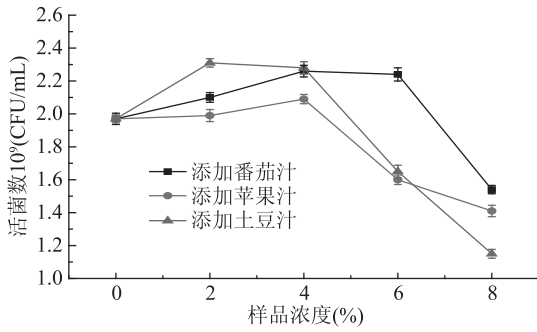


图1 不同浓度增殖性底物对 *L.acidophilus* CICC6005 活菌数的影响

Fig.1 Effect of different concentration of growth promoting substance on the growth of *L.acidophilus* CICC6005

表2 正交试验设计及结果

Table 2 Design and results of orthogonal experiment

试验号	因素			OD 值
	A	B	C	
1	2	1	2	0.542
2	2	3	4	0.556
3	2	5	6	0.525
4	5	3	2	0.694
5	5	5	4	0.538
6	5	1	6	0.519
7	8	5	2	0.663
8	8	1	4	0.558
9	8	3	6	0.519
K ₁	1.623	1.619	1.899	
K ₂	1.751	1.769	1.653	
K ₃	1.740	1.726	1.652	
k ₁	0.541	0.539	0.633	
k ₂	0.584	0.589	0.551	
k ₃	0.580	0.575	0.551	
R	0.043	0.050	0.082	

由 K 值分析比较可得出,较优试验组合为 A₂B₂C₁,即番茄汁浓度 5%、土豆汁浓度 3%、苹果汁浓度 2%,此时测得 OD 值为 0.694, *L. acidophilus* CICC6005 活菌数达 2.31 × 10¹⁰ CFU/mL。由 R 值分析比较可得, R_c > R_b > R_a,即:影响 *L. acidophilus* CICC6005 生长浓度各因素的主次顺序为:C(番茄汁浓度)、B(土豆汁浓度)、A(苹果汁浓度)。

2.3 *L.acidophilus* CICC6005 胞内和胞外蛋白分析鉴定结果

2.3.1 *L.acidophilus* CICC6005 发酵液胞内和胞外全蛋白分析 按方法 1.2.5 所述,分离提取发酵液和菌体的全蛋白,均按照 BCA 试剂盒法测定发酵液和菌体的蛋白质含量。采用 SDS-PAGE 进行分析,结果见图 2 所示。

由图 2 可看出,*L.acidophilus* CICC6005 胞外全蛋白对应的泳带中包含 6 条主条带,分别位于 80、75、63、48、40、30 ku 附近,未纯化的胞内全蛋白与对照组相比,泳带明显增多,说明植物源增殖性底物对 *L.acidophilus* CICC6005 菌体蛋白表达具有一定的促

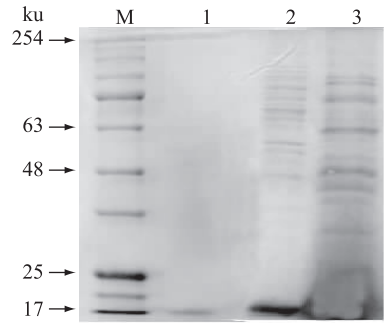


图2 *L.acidophilus* CICC6005 胞内胞外全蛋白 SDS-PAGE 电泳结果

Fig.2 The result of SDS-PAGE electrophoresis of intracellular and extracellular protein of *L.acidophilus* CICC6005

注:M;Marker;1:对照组;

2:未纯化的胞内全蛋白;3:未纯化的胞外全蛋白。

进作用。未纯化的胞外全蛋白与对照组相比,泳带也明显增多的原因,这可能是由于菌体产蛋白酶含量降低有关。

2.3.2 *L.acidophilus* CICC6005 菌体胞外胞内蛋白的纯化 依据 1.2.6 所建立的方法对含有植物源增殖性底物发酵生产的发酵液和菌体的蛋白进行纯化,凝胶过滤层析是根据蛋白质分子大小不同而达到分离效果的,凝胶过滤填料中含有大量微孔,只容许缓冲液及小分子量蛋白质通过,而大分子蛋白质及一些蛋白复合物则被阻挡在外^[29]。

采用最优试验组合 A₃B₂C₃ 的粗提蛋白进行纯化,所得层析图谱如图 3、图 4 所示。由于菌体胞内和胞外蛋白含量的不同,所以在对蛋白进行层析时胞内蛋白和胞外蛋白层析图谱上均出现两个明显的洗脱峰,将其命名为 a、b、c、d 四个峰,用 BCA 法和通过标准曲线测定 a、b、c、d 四个峰的蛋白质质量浓度,依次为 2.144、0.744、2.394、4.644 mg/mL。对各峰分别进行收集,对收集的各峰组分进行透析、浓缩备用。

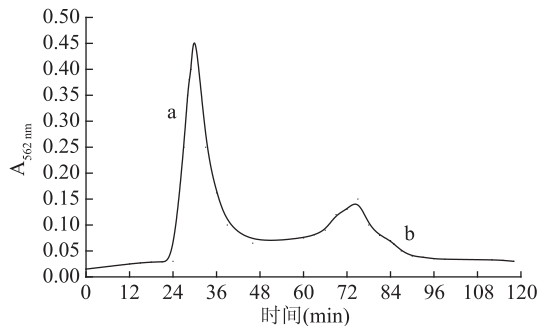


图3 *L.acidophilus* CICC6005 胞内蛋白层析图谱

Fig.3 Intracellular protein chromatography of *L.acidophilus* CICC6005

注:图中 a、b 分别指凝胶层析 Sephadex G-100 分离获得的菌体内的两个主要蛋白质峰。

2.3.3 SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定各峰组分蛋白质的分子量大小 对最优试验组合 A₃B₂C₃ 培养 *L.acidophilus* CICC6005 的胞内胞外蛋白粗提液及两组胞内蛋白(a、b)、胞外蛋白组进行(c、d) SDS-PAGE 凝胶电泳分析,判断胞外胞内蛋白组分分子量

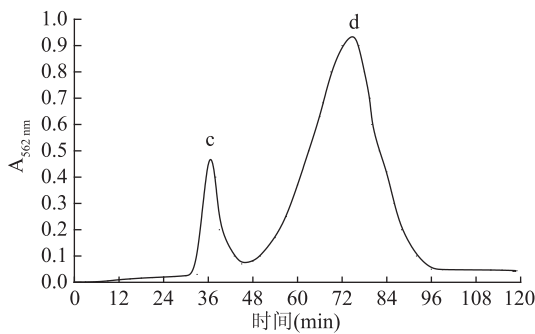
图4 *L.acidophilus* CICC6005 胞外蛋白层析图谱

Fig.4 Extracellular protein chromatography of *L.acidophilus* CICC6005

注:图中 c、d 分别指凝胶层析 Sephadex G-100 分离获得的发酵液中的两个主要蛋白质峰。

大小,结果如图 5。由图 5 可知,胞内蛋白 a 峰的泳带集中在 48~90 ku 附近,b 峰在 18 ku 附近处有一条清晰的电泳条带;胞外蛋白 c 峰在分子量 18、35、48、64 ku 附近有较清晰的条带,d 峰在 37、48 ku 附近有清晰泳带。相比未纯化的胞内胞外全蛋白,当 TJA 营养培养基中加入植物源增殖性底物时,*L.acidophilus* CICC6005 各组分蛋白条带较清晰,差异明显,说明经 Sephadex G-100 凝胶层析后也实现了较好的分离。

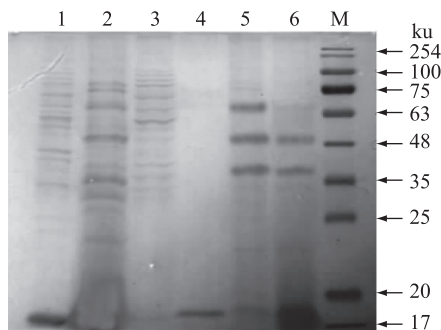
图5 *L.acidophilus* CICC6005 胞外胞内蛋白 SDS-PAGE 电泳结果

Fig.5 The results of SDS-PAGE electrophoresis of extracellular and intracellular protein of *L.acidophilus* CICC6005

注:M:Marker;1:未纯化的胞内全蛋白;2:未纯化的胞外全蛋白;3:经 Sephadex G-100 层析 a 峰;4:经 Sephadex G-100 层析 b 峰;5:经 Sephadex G-100 层析 c 峰;6:经 Sephadex G-100 层析 d 峰。

2.3.4 凝胶电泳迁移率标准曲线 标准曲线如图 6,得到回归方程为 $y = -1.3029x + 2.3431$ ($R^2 = 0.977$) 根据标准曲线得出各峰的蛋白分子量大小,即胞内蛋白的分子量为 a 峰 59 ku、b 峰 17 ku;胞外蛋白的分子量为 c 峰 66 ku、d 峰 35 ku。

3 讨论

益生菌是一类通过改善宿主肠道微生物菌群的平衡而发挥作用的活性微生物,其能够调节胃肠道失调,在抗癌抗肿瘤、预防肥胖、抗过敏、提高免疫功能等有良好的功效^[30]。番茄、土豆、苹果是我们日常生活所涉及的食材,对人体肠道微生物的菌群消长有着较为密切关系。

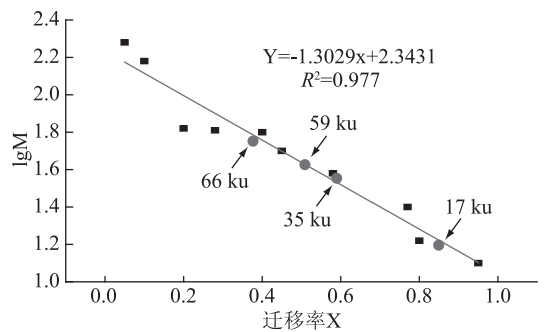


图6 凝胶电泳迁移率标准曲线

Fig.6 Standard curve of gel electrophoresis mobility

李辉等^[31]研究了黄瓜、番茄、胡萝卜天然提取汁对嗜酸乳杆菌 HS112 菌种生长的影响。由单因素实验结果得出,黄瓜汁的 5%、番茄汁的 6%、胡萝卜汁为 8% 为 HS112 菌种的最佳刺激体积分数。刘奕玮等^[32]研究了蓝莓汁及其提取物对嗜酸乳杆菌 NCFM 体外生长的影响,蓝莓多糖添加量为 100 mg/L 时能较好的促进菌株 NCFM 的生长,37 °C 培养 24 h,细胞活菌数可达到 8.32×10^8 CFU/mL。王烈喜等^[33]研究了番茄汁对嗜酸乳杆菌发酵乳的影响,结果表明:番茄汁可以刺激嗜酸乳杆菌的生长,在冷藏的过程中,所有添加番茄汁的发酵乳中嗜酸乳杆菌的活菌数显著高于纯样品。

基于该研究方面的早期报道,本实验探究植物源增殖性底物对 *L.acidophilus* CICC6005 菌体的发酵增殖作用也获得了类似的研究结果。本研究以 *L.acidophilus* CICC6005 为研究对象,基于人类日常摄入多种果蔬食材的习惯和特点,以 TJA 作为基础培养基,通过添加适量的番茄汁、土豆汁、苹果汁发酵培养 *L.acidophilus* CICC6005,对该菌生物量影响是明显的,在这样的发酵培养基组成的条件下,*L.acidophilus* CICC6005 菌体浓度达到 2.31×10^{10} CFU/mL 的水平。本文重点研究并解析发酵菌体蛋白质表达水平的变化,为阐述和揭示该菌的生物学功能奠定基础;研究结果显示,三种增殖性底物添加的浓度番茄汁 5%、土豆汁 3%、苹果汁 2% 的组合比例的条件,对 *L.acidophilus* CICC6005 的胞外蛋白与胞内蛋白的表达水平产生明显影响,电泳图谱的鉴定显示,蛋白质的电泳条带增多;同时也较明显地增强了胞内蛋白的表达量。经进一步鉴定胞外两种主要的蛋白组分分子质量为 66、35 ku,胞内两种主要蛋白组分分子质量为 59、17 ku。研究结果提示,三种植物源增殖性底物番茄汁、土豆汁、苹果汁作用于 *L.acidophilus* CICC6005,不仅对该菌具有较好的增殖作用,也对该菌体蛋白质的表达量水平具有明显的促进作用。然而,在该研究条件下 *L.acidophilus* CICC6005 表达的蛋白结构及其表现的生物学功能尚需进一步研究鉴定,将对阐述该发酵条件下 *L.acidophilus* CICC6005 菌体及发酵液的生物学功能奠定基础。

4 结论

本文通过研究不同浓度的植物源增殖性底物对 *L.acidophilus* CICC6005 生长量的影响,通过正交试验

确定最优组合为:番茄汁5%、土豆汁3%、苹果汁2%,发酵液的菌浓为 2.31×10^{10} CFU/mL。利用 SDS-PAGE 的电泳技术鉴定菌体和发酵液中表达全蛋白质的图谱显示,*L.acidophilus* CICC6005 在该营养条件下表达蛋白的数量有明显的增加,经分离纯化胞外及胞内蛋白均得到两个不同的峰,胞内蛋白的分子量为 59、17 ku;胞外蛋白的分子量为 66、35 ku;其蛋白质质量浓度依次为 2.144、0.744、2.394、4.644 mg/mL。研究对深入阐述益生菌表达的蛋白组分以及其发挥的功效具有一定科学价值。

参考文献

- [1] Elloise du Toit, Carlos Gómez-Gallego, Seppo Salminen. Probiotics during the perinatal period: Impact on the health of mothers and infants [M]. Prebiotics and Probiotics in Human Milk, 2017: 429-459.
- [2] 陈硕,余艳,包显颖,等.益生菌的作用机制及其应用[J].畜牧与兽医,2017,49(4):116-121.
- [3] 施昕琦,杨畅.益生菌临床应用的研究进展[J].实用药物与临床,2017(3):349-352.
- [4] Lee S J, Bose S, Seo J G, et al. The effects of co-administration of probiotics with herbal medicine on obesity, metabolic endotoxemia and dysbiosis: A randomized double-blind controlled clinical trial [J]. Clinical Nutrition, 2014, 33(6): 973-981.
- [5] 王莹.嗜酸乳杆菌细菌素纯化及在牛乳保鲜中的应用[D].新乡:河南科技学院,2016.
- [6] 刘振民,唐晓峰,任彬彬.嗜酸乳杆菌的生理特性及应用[J].中国乳业,2003(5):28-30.
- [7] 胡斌.植物乳杆菌胆盐耐受评价及内在影响因素分析[D].无锡:江南大学,2015.
- [8] 韩俊华.嗜酸乳杆菌的益生特性及其在乳品中的应用[D].保定:河北农业大学,2003.
- [9] Nagpal R, Kumar A, Kumar M, et al. Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: A review [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2012, 334(1): 1-15.
- [10] Schlee M, Wehkamp J, Altenhoefer A, et al. Induction of human beta-defensin 2 by the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is mediated through flagellin [J]. Infection and Immunity, 2007, 75(5): 2399-2407.
- [11] Bernaro D, Sanchez B, Alhassih O, et al. Microbiota-host crosstalk biomarkers: Regulatory response of human intestinal dendritic cells exposed to lactobacillus extracellular encrypted peptide [J]. PLoS ONE, 2012, 7(5): e36262.
- [12] 贾彦,李毛毛,陈蕊,等.杜仲水提液对嗜酸乳杆菌生长及发酵产物的影响[J].食品科学,2016(23):147-153.
- [13] 王泳,贾彦,任效东,等.嗜酸乳杆菌胞外蛋白调控 MAPK 和 PI3K-AKT 信号途径关键蛋白活化水平[J].食品科学,2017,38(3):155-163.
- [14] Shi Tongling, Lu Ye, Liang Jinzhong. Optimization of high-density growth medium of *Lactobacillus acidophilus* strain HUC-La-0812 [J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2009, 139(6): 271-274.
- [15] Yu Guoqin, Shao Yuying, Liu Junbiao, et al. Influences of preparation process on the orientation and properties of PZT piezoelectric thick film generation materials [J]. Advanced Materials Research, 2014, 924: 29-35.
- [16] Lai Xiaojuan, Gong Mina, Wang Lei, et al. Preparation and application of blocked & crosslinked waterborne polyurethane microemulsion as paper strengthening agent [J]. Advanced Materials Research, 2014(989): 644-647.
- [17] 王泳,贾彦,任效东,等.嗜酸乳杆菌胞外蛋白调控 MAPK 和 PI3K-AKT 信号途径关键蛋白活化水平[J].食品科学,2017,38(3):155-163.
- [18] 汪家政,范明.蛋白质技术手册[M].北京:科学出版社,2004:23-36.
- [19] 杨旭,朱静静,潘道东,等.嗜酸乳杆菌肽聚糖的六种提取方法比较研究[J].食品工业科技,2016,37(15):66-70.
- [20] 徐宁,赵丽云,洪钦辉,等.几株米曲霉成曲胞外蛋白鉴定及发酵结果分析[J].中国食品学报,2012,12(11):178-182.
- [21] 王斐斐.基于凝胶电泳的 *Lysobacter* sp.SNNU513 胞外抗菌蛋白分离分析和质谱鉴定[D].西安:陕西师范大学,2013:18-20.
- [22] 胡晓倩,陈来同,陈雅蕙等.凝胶过滤分离蛋白质实验条件的研究[J].中国生化药物杂志,2007,28(6):409-411.
- [23] 贾彦,任效东,江岩,等.嗜酸乳杆菌胞外蛋白的分离纯化及抑制 HT-29 细胞增殖作用的研究[J].现代食品科技,2016,32(11):56-62.
- [24] 陈庆森,吴子健,庞广昌.实用生物化学实验指导[M].杭州:浙江大学出版社,2013:67-68.
- [25] 吴庆光,刘四军,侯如艳.水果干果食法便典[M].广州:广东科技出版社,2008:73-98.
- [26] 牛生洋,赵瑞香,孙俊良.西红柿益生菌酸乳的研制[J].食品工业科技,2008(4):119-120.
- [27] Martina Persic, Maja Mikulic-petkovsek, Ana Statnar, et al. Chemical composition of apple fruit, juice and pomace and the correlation between phenolic content, enzymatic activity and browning [J]. LWT - Food Science and Technology, 2017, 82: 23-31.
- [28] Sato Hiroaki, Koizumi Ryosuke, Nakazawa Yozo, et al. Data on the weights specific gravities and chemical compositions of potato (*Solanum tuberosum*) tubers for food processing from different areas of Hokkaido, Japan [J]. Data in Brief, 2017, 11: 601-605.
- [29] 孙浩思,王莉娜,林智平.高效凝胶过滤色谱法分离测定啤酒中浑浊活性蛋白质的研究应用[J].啤酒科技,2014(12):22-30.
- [30] Araya N, Morelli L, Reid G, et al. Guidelines for the evaluation of probiotics in food [J]. AIP Conference Proceedings, 2002, 1678(1): 5-39.
- [31] 李辉,吴荣荣,魏淑珍.几种蔬菜汁对嗜酸乳杆菌 HS112 菌种生长的影响[J].湖北农业科学,2012,51(22):5139-5141.
- [32] 刘奕炜,周方,郝建新,等.蓝莓汁及其提取物对嗜酸乳杆菌 NCFM 体外生长的影响[J].中国乳品工业,2013,41(2):13-16.
- [33] 王烈喜,翟培,冯翀.番茄汁对嗜酸乳杆菌发酵乳的影响[J].中国乳品工业,2016,44(9):24-27.