HAL
open science

Physiological characteristics and applications of Lactobacillus pentosus strains in selected dairy products

Su Jin

To cite this version:

Su Jin. Physiological characteristics and applications of Lactobacillus pentosus strains in selected dairy products. Biotechnology. AgroParisTech, 2010. Chinese. NNT : 2010AGPT0079 . pastel-00552270

HAL Id: pastel-00552270

https://pastel.hal.science/pastel-00552270

Submitted on 5 Jan 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ParisTech
INSTITUT DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES
PARIS INSTITUTE OF TECHNOLOGY

AgroParisTech
INSTITUT DES SCIENCES ET INDUSTRIES DU VIVANT ET DE L'ENVIRONNEMENT
PARIS INSTITUTE OF TECHNOLOGY FOR LIFE, FOOD AND ENVIRONMENTAL SCIENCES

Ecole Doctorale ABIES
Agriculture Agriculture Alimentation Food Biologie Biology Environnement Environment Santé Health

Doctorat ParisTech

THÈSE

pour obtenir le grade de docteur délivré par

L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement

(AgroParisTech)

Spécialité : Biotechnologie

présentée et soutenue publiquement par

Su JIN

Le 29 novembre 2010

Physiological properties of two *Lactobacillus pentosus* strains

Directeur de thèse : **Zhang BOLING**
Co-encadrement de la thèse : **Georges CORRIEU**

Jury

M. Georges Corrieu, Directeur de Recherches, INRA	**Président**
Mrs. Kong Jian, ProfessorShandong University	**Rapporteur**
Mrs. Catherine Béal, Professeur, AgroParisTech	**Examinateur**
M. Hou Xialong, Professor, Beijing Forestry University	**Examinateur**
M. Huo Guicheng, Professor, Northeast Agricultural University	**Examinateur**
M. Li Lite, China Agriculture University	**Rapporteur**
M. Sun Aidong, Professor, Beijing Forestry University	**Examinateur**
M. Yue Yonge, Professor, International Centre CAFS	**Examinateur**
M. Zhang Zhixiang, Professor, Beijing Forestry University	**Examinateur**

AgroParisTech
UMR Génie et microbiologie des procédés alimentaires
CBAI, 78850 Thiverval-Grignon

分类号

密级 UDC

学位论文

戊糖乳杆菌的生理功效及应用研究

（中文题名）

Physiological Characteristics and Applications of *Lactobacillus pentosus* Strains in Selected Dairy Products

（英文题名）

金苏

（作者姓名）

指 导 教 师 张柏林 教授

申请学位级别 博 士

学科专业名称 _____

研 究 方 向 食品生物技术

论文提交日期 **2010 年 10 月**

论文答辩日期 **2010 年 11 月**

学位授予日期 _____

答辩委员会主席：

评 阅 人：

北京林业大学

独 创 性 声 明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包括含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包括为获得北京林业大学或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

签名：_____日期：_____

关于论文使用授权的说明

本人完全了解北京林业大学有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留送交论文的复印件，允许论文被查阅和借阅；学校可以公布论文的全部或部分内容，可以采用影印、缩印或其它复制手段保存论文。

(保密的论文在解密后应遵守此规定)

签名：_____导师签名：_____日期：_____

摘要

本文以传统新疆奶酪产品“奶疙瘩”中筛选出的 2 株戊糖乳杆菌（*Lactobacillus pentosus*）Ind1 和 Ind3 为实验菌株，研究了它们在宿主肠胃环境中的耐受能力，肠上皮细胞的黏附能力和可能的粘附机制，调节小鼠肠道菌群作用及持续时间，对胃肠道中的苯酚、对甲酚和吲哚等有害物质的耐受性以及粘附降解作用；考察了两株戊糖乳杆菌产 γ-氨基丁酸（GABA）的能力，优化了其在发酵乳制品中产 γ-氨基丁酸的工艺条件；探讨了两株戊糖乳杆菌作为辅助发酵菌种制作新疆奶酪的工艺技术，旨在为戊糖乳杆菌在发酵乳制品中的应用提供理论和技术指导。主要研究结果如下：

1、菌株的分离和鉴定

基于细胞形态、生理生化特性和 16s rRNA 测试数据，2 株乳杆菌被鉴定为戊糖乳杆菌，即 *Lactobacillus pentosus* Ind1 和 *Lactobacillus pentosus* Ind3。

2、戊糖乳杆菌在宿主胃肠道的耐受性及黏附能力研究

对戊糖乳杆菌体外粘附肠上皮细胞的能力、影响粘附的因素及粘附机理研究表明，当菌株 Ind1 和 Ind3 在 0.50%的牛胆盐溶液、pH 2.5 人工胃液或 pH 6.8 人工肠液环境下处理 4h，2 株戊糖乳杆菌的存活率都在 80%以上，表明两株乳杆菌对消化道逆境环境有较好的抵抗能力，且菌株 Ind1 对肠胃环境的耐受性稍好于 Ind3。

采用 Caco-2 人结肠腺癌细胞体外模型实验证实，2 株戊糖乳杆菌黏附 Caco-2 细胞的能力与菌体浓度和培养时间密切相关，最佳的黏附条件是菌体细胞浓度为 1×10^8 cfu/mL，黏附时间 2h。菌株 Ind3 的黏附指数为 830.5±19.46（按每 100 个细胞计算）；粘附能力非常优越，而菌株 Ind1 的黏附指数为 431.0±28.16，黏附性相对较差。pH、培养温度以及细胞生长阶段是影响乳杆菌黏附的主要因素。对菌株 Ind1 和 Ind3 在黏附过程中的代谢产物以及菌体表面蛋白分析表明，耗尽上清液的乳杆菌经胰蛋白酶或 100°C 处理后黏附能力显著下降，说明细胞或许通过分泌某种热敏感性蛋白来介导黏附作用的。当菌体细胞经 5mol/L 氯化锂处理后，黏附指数没有明显变化，但经胰蛋白酶或蛋白酶 K 处理后黏附能力显著降低，这表明戊糖乳杆菌菌体表面的蛋白成分可能参与了黏附过程，而细胞外表面的 S 层蛋白可能没有参与黏附过程。

3、戊糖乳杆菌抑制结肠突变因子的能力

苯酚、甲苯酚、吲哚等有害物质在体内长期积累会诱发结肠癌的发生。在 MRS

中添加苯酚、对甲酚和吲哚等潜在的诱变物质，研究戊糖乳杆菌 Ind1 和 Ind3 对这些诱变物质的耐受及清除能力表明，浓度大于 150μg/mL 的苯酚、对甲酚和吲哚对菌株生长基本没有影响，且 37°C 厌氧培养 144h 后两株菌的活菌数仍然保持在 10^6cfu/mL。在模拟人体肠道环境下，这表明戊糖乳杆菌对肠道中有害酚类物质有较高的耐受性。

在浓度为 5μg/mL 以及 50μg/mL 的苯酚和对甲酚培养基中，戊糖乳杆菌 Ind1 和 Ind3 分别在 37°C 培养 24h 和 144h 后，培养基中苯酚和对甲酚含量明显减少，其中苯酚浓度在 0.95μg/mL 与 1.93μg/mL 之间，对甲酚浓度在 0.45μg/mL 与 1.14μg/mL 之间，2 株乳杆菌活菌数从 10^9cfu/mL 降至 10^6cfu/mL，诱变因子的吸附量随着细胞培养时间的延长而降低，表明戊糖乳杆菌细胞对突变因子有较好的黏附或降解作用。

4、小鼠肠道菌群的调节能力评价

当给小鼠饲胃含有 5×10^9cfu/ml 的 2 株戊糖乳杆菌的脱脂乳 10d 后，对灌胃小鼠粪便中的乳杆菌，双岐杆菌、肠杆菌、肠球菌和产气荚膜梭菌的数量检测表明，乳杆菌和双歧杆菌的数量明显增加，肠杆菌和产气荚膜梭菌的生长明显受到抑制，但是对肠球菌的抑制不明显。停止喂食 6d 后，对乳杆菌的增殖仍有一定作用。

在饲喂 10d 后，戊糖乳杆菌 Ind3 对小鼠菌群中乳杆菌和双歧杆菌的增殖促进作用显著；对肠杆菌和产气荚膜梭菌的生长的抑制作用也很显著，与商业化的益生菌嗜酸乳杆菌 NCFM 的效果相当。且即使停止饲喂戊糖乳杆菌 6d 后，小鼠肠道中的乳杆菌数量的增加与饲喂前相比仍十分显著。这表明外源服用戊糖乳杆菌 Ind1 和 Ind3 能够调节肠道内有益和有害微生物菌群间的平衡，并能持续对小鼠肠道菌群发挥调节功效，调节效果至少可以维持 7d 左右。

5、戊糖乳杆菌代谢生成 GABA 的能力

对 2 株戊糖乳杆菌代谢谷氨酸（L-Glu）生成 GABA 的条件以及在发酵乳中的应用研究表明，戊糖乳杆菌 Ind1 和 Ind3 在 MRS 培养基 37°C 厌氧培养 48h，GABA 产量分别是 0. 3615g/L 和 0.1575 g/L。

戊糖乳杆菌转化 L-Glu 合成 GABA 的优化条件是发酵温度为 37°C，pH 7.0，葡萄糖（20g/L）为碳源，胰蛋白胨、酵母膏及牛肉膏（均 10g/L）为复合氮源，L-谷氨酸单钠（MSG）添加量 15g/L，$CaCl_2$ 浓度为 0.5mmol/L，接种量 2%（V/V，菌数 10^8 cfu/mL），种子的菌龄 12h。在此条件下，当菌株 In1 厌氧培养至 72h 时，GABA 的产量为 1.0020 g/L，而菌株 Ind3 厌氧培养至 84h，GABA 的产量为 0.3262g/L。将 2 株

戊糖乳杆菌转至 4°C 贮存时，其改良 MRS 培养液中的 GABA 浓度继续上升，最高分别达到 1.4064g/L 和 0.4563g/L。

接种产 GABA 的戊糖乳杆菌菌株到脱脂乳中，37°C 厌氧培养 24h 表明，外源添加 MSG（2 g/L），碳源如葡萄糖，氮源如酵母膏均可促进 GABA 的生成。优化条件后戊糖乳杆菌菌株在发酵乳中的 GABA 产量提高了 3 倍，分别达到 0.2647g/L 和 0.0677g/L。

6、戊糖乳杆菌在新疆干酪制备中的应用

作为辅助发酵剂，将两株戊糖乳杆菌 Ind1 和 Ind3 添加到新疆传统奶酪中表明，通过与其他乳酸菌种联合发酵，添加菌株 Ind-1 和 Ind3 到新疆干酪生产中，可以使干酪的切割时间从 5h 降到 4h，成品的水分活度从 0.659 分别下降到 0.546 和 0.494，干酪的产率也从 5.27%提高到 6.25%。

综上，与商业化益生菌菌株相比，两株戊糖乳杆菌 Ind1 和 Ind3 表现出了较强的消化道逆境环境抵抗能力和肠上皮细胞粘附能力，具有良好的清除体内诱变物质能力，有较好的肠道菌群的调节效果，可以使发酵脱脂奶中的 GABA 的量分别提高 50%和 314%，具有一定的改善新疆干酪特性的作用，可以作为益生菌或膳食补充剂应用于乳品加工中。

关键词：戊糖乳杆菌，黏附，肠道菌群调节，突变因子，益生菌，γ—氨基丁酸（GABA），新疆干酪

PHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS AND APPLICATIONS OF *LACTOBACILLUS PENTOSUS* STRAINS IN SELECTED DAIRY PRODUCTS

Candidate for Ph.D. degree: Jin Su

Specialty in Food Biotechnology

Directed by Professor Zhang Bolin & Professor Geroge CORRIEU

ABSTRACT

Two *Lactobacillus pentosus* strains, named as Ind1 and Ind3, were isolated from a traditional Chinese cheese product called Naigeda collected from Xinjiang region of China. There is little information and less report on the probiotic properties and applications of *Lactobacillus pentosus* strains. Therefore, the objectives of this study were to: (1) assess the abilities of these two strains to tolerate human gastrointestinal environments *in vitro*; (2) evaluate their adhesive ability to intestinal mucosa via Caco-2 cell lines; (3) investigate their effects to bind mutagenic agents like phenol, p-cresol and indole that accumulate in intestinal tract; (4) deal with their modulation of the mice intestinal microflora; (5) analyze the formation of γ-aminobutyric acid(GABA) by two strains; and (6) use them to process cheese and find their way as potential probiotic adjuncts in selected dairy products. The following are main results:

1. Isolation and identification of two strains

First of all, two strains Ind1 and Ind3 isolated from Chinese traditional Xinjiang cheese product called “Naigeda”, were identified as *Lactobacillus pentosus* according to their morphological, physiological-biochemical properties as well as 16s DNA sequence data.

2. Tolerance and adherence studies of two lactobacilli strains

The survival of 2 tested strains were observed in simulating human gastric and intestinal enviroments. The possible factors affecting the adhesion of the 2 strains, including bacterial cell growth stage, pH, and temperature, the association of adhesion with surface protein or S-layer protein was studied using Coca-2 cell ines as model. Strains Ind1 and Ind3, after grown in the gastric juice of pH 2.5, intestinal juice of pH 6.8 and 0.50% concentration of bile salt at 37°C for 4h, had high viable counts. Their viability enumerated was above 90% in acid solution, and 80% in bile solution, respectively. The two *L. pentosus*

strains showed strong resistances to harmful gastrointestinal environments. Individually, the intolerance of Ind1 to gastrointestinal enviroments was slightly better than Ind3.

Bacterial adhesion tests on Caco-2 cells (ATCC 2102-CRL) monolayer were carried out in 24-well tissue culture plates. Strain Ind1 displayed relatively poor adhesiveness compared to Ind3. Its adhered live cells per 100 epithelial cells were only 431.0±28.16, while that of strain Ind3 were 830.5±19.46. The adhesion ability was strain-specific. Strain Ind3 showed similar adhesion performance to that of commercial probiotic strains like *L. acidophilus* NCFM and *L. plantarum* Lp115. The good adhesion ability of the two *L. pentosus* strains occurred when the growth stage of bacterial cells reached 26h with a pH of 4.0 and an incubation temperature of 37°C. Heat inactivation had no significant effect on their adhesion to epithelial cells. The adhesion decreased significantly due to the presences trypsin and proteinase K, but the removal of S-layer protein from cell surface did not cause the loss of their adhesive to epithelial cells.

3. Ability of two strains to reduce pre-carcinogenic substances

Some compounds produced in intestinal tract from fermented proteins, including phenolic and indolic substance, might be harmful as mutagenic and pre-carcinogenic agents, and are responsible for colon cancer development due to long-term accumulation in the colon. The growth and survival abilities of these two *L. pentosus* strains were observed in the presence of phenol, *p*-cresol and indole with concentrations ranging from 5 μg/mL to 150 μg/mL. Resistance to three pre-carcinogens agents was strain-dependent. After the addition of phenol, *p*-cresol and indole to MRS, the two strains grew very well at the concentrations of 5 μg/mL to 50μg/mL, but their growth was influenced at a concentration of 150μg/mL. Compared to the control, their viability was decreased by 1 to 2 log. The phenol and *p*-cresol remainings in MRS media were reduced in the presence of two lactobacilli strains, depending on their live cells. The phenol residual varied between 0.95 and 1.93μg/mL or the *p*-cresol between 0.45 and 1.14μg/mL when the cell counts of two *L. pentosus* strains decreased from 10^9cfu/mL to 10^6cfu/mL. Moreover, it was seen that the content of phenol on the bacterial cell wall of two strains vried between 0.42 and 1.47μg/mL, and that of p-cresol between 0.90 and 1.28μg/mL when the *L. pentosus* strains were grown in MRS media containing three pre-carcinogenic substances at 37°C for 144h. These data indicate that involvement of two *L. pentosus* strains into media is able to remove some pre-carcinogenic substance from intestine.

4. Modulation of gut intestinal microflora by *L. pentosus* strains

The effects of the two *L. pentosus* strains Ind1 and Ind3 on mice intestinal microflora by oral administration of 10^9cfu/ml contained in 0.5ml skim milk were investigated. The live cells of intestinal bacteria, including microorganisms from the genera of *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Enterobacter*, *Enterococcus* as well as *Clostridium perfringens* in the feces of rats were detected via selective media. The feeding of *L. pentosus* Ind1 to mice for 10 days significantly promoted the levels of lactobacilli and bifidobacteria from mice gut, and inhibited the growth of *Enterobacter* and *Clostridium perfringens*. However, no obvious growth inhibition of *Enterococus* was observed after rats were orally administrated with strain Ind1. After stopping the feeding of strain Ind1 for 6 days, a substantial improvement of lactobacilli in mice gut flora still went. Oral administration of Ind3 for 10 days produced quite good effect on the improvement of beneficial bacteria from mice gut, as a commercial probiotic strain *L. acidophilus* NCFM did. Compared to the control, a great growing of lactobacilli and bifidobacteria in mice gut was observed ($P<0.01$) while the levels of entrobacter and *Clostridium perfringens* were significantly inhibited($P<0.01$). Even after stopping the feeding of strain Ind3 for 6 days, the enumerations of lactobacilli cells were significant higher than that before feeding.

5. GABA production by two strains

The *L. pentosus* Ind1 and Ind3 were observed to transfer L-Glu into GABA. The optimal parameters of the two strains to form GABA were incubation of 37ºC in a modified medium with pH 7.0, 20g/L glucose, 10g/L tryotone,10g/L yeast extract,10g/L beef extract, MSG concentration of 15 g/L plus $CaCl_2$ concentration 0.5mmol/L. A 2% (v/v, a quantity of 10^8 cfu/mL) inoculation size was recommended. Under the conditions, the maximum biosynthesis of GABA was 1.002 g/L for strain Ind1 incubated for 72h, and 0.3262g/L for strain Ind3 incubated for 84h. The levles of GABA by the two strains reached 1.4064g/L and 0.4563g/L, respectively stored at 4ºC for 30 days.

The GABA production was 0.065g/L for *L. pentosus* strains Ind1 and 0.003g/L for strain Ind3 when they were grown in skim milk incubated at 37°C for 24 h. Under the same condition, addition of monosodium L-glutamate(MSG) to skim milk promoted GABA by 50% for strain Ind1 and 314% for strain Ind3. It was seen that glucose and yeast extract as carbon and nitrogen sources were beneficial for producing more GABA.

6. Application of two strains as dietary adjuncts in cheese-making

A Chinese traditional cheese produce was manufactured with the two lactobacilli strains as dietary adjuncts with start microorganisms. Addition of the two strains to typical Xinjiang cheese shortened the cutting time of curd from 5h to 4h. The water activity of final cheese product was decreased to 0.546 for strain Ind1 and 0.494 for strain Ind3 from an initial stage of 0.659. The protein yield of final cheese product was increased to 6.25% from 5.27%.

In conclusions, *L. pentosus* strains presented in this study offer some benefits to host. The probiotic properties include good survival in harsh gastrointestinal environments, a nice performance of adhesion to intestinal mucosa, modulation of gut microflora by improving the beneficial bacteria and reducing the harmful microorganisms, and reduction of mutagenic agents existing in intestinal tract. Use of the *L. pentosus* strains promotes the GABA production in milk, a functional compound helpful for decreasing blood pressure, and improves the physical texture of final cheese products. To our knowledge, this is first report that supports *L. pentosus* as a potential probiotic bacterial candidate or dietary supplement to be used in selected dairy or related food products.

Keywords: *Lactobacillus pentosus* strains; probiotics; adherence; intestinal flora; phenol; *p*-cresol; indole; mutagenic substances; γ-aminobutyric acid (GABA); Chinese cheese

目录

摘要 I
ABSTRACT V
目录 IX
1. 前言 1
1.1 益生菌 1
1.1.1 益生菌简介 1
1.1.2 益生菌国内外研究现状 1
1.1.3 益生菌营养功能 2
1.1.4 益生菌的健康功效 3
1.2 益生菌筛选评估标准 6
1.3 本研究目标 7
2. 戊糖乳杆菌菌株的鉴定与生长 9
2.1 材料与方法 9
2.1.1 实验材料 9
2.1.2 实验方法 9
2.2 实验结果 11
2.2.1 分子生物学方法鉴定结果 11
2.2.2 培养及形态特征结果 12
2.2.3 生化特性测试结果 13
2.2.4 pH 耐受性 14
2.2.5 耐盐性测试 14
2.2.6 生长实验 14
2.3 本章小结 15
3. 戊糖乳杆菌对肠道环境的耐受和黏附能力 17
3.1 益生菌的黏附作用研究进展 17
3.1.1 黏附机理研究 17
3.1.2 黏附素的研究 18
3.1.3 黏附受体的研究 20
3.1.4 黏附影响因素的研究 21
3.2 戊糖乳杆菌体外粘附肠上皮细胞能力实验 22
3.2.1 材料与方法 22
3.2.2 结果与分析 26

3.2.3 本章小结 32
4. 戊糖乳杆菌体外黏附影响因素及黏附机制的研究 35
4.1 材料与方法 35
4.1.1 实验材料 35
4.1.2 实验方法 36
4.2 结果与分析 38
4.2.1 菌体生长曲线的测定 38
4.2.2 两种乳杆菌黏附影响因素的研究 39
4.2.3 两种乳杆菌体外黏附机制研究 42
4.3 本章小结 46
5. 戊糖乳杆菌对小鼠肠道菌群的调节作用 49
5.1 肠道菌群结构变化及其作用 49
5.1.1 肠道菌群生理功能 50
5.1.2 肠道微生态的调控 51
5.2 材料及方法 52
5.2.1 实验材料 52
5.2.2 实验方法 53
5.3 结果与分析 56
5.3.1 灌胃乳杆菌对小鼠体重的影响 56
5.3.2 戊糖乳杆菌对小鼠肠道菌群的调节作用 57
5.4 本章小结 66
6. 戊糖乳杆菌抑制突变因子的研究 69
6.1 材料与方法 69
6.1.1 实验材料 69
6.1.2 试验方法 70
6.3 结果与分析 72
6.3.1 不同浓度突变因子对菌株生长的影响 72
6.3.2 同一浓度突变因子对菌株生长的影响 76
6.4 解析与讨论 81
6.4.1 MRS 肉汤培养基中突变因子的变化 81
5.4.2 乳酸菌菌体中突变因子的变化 84
6.5 本章小结 86
7. 戊糖乳杆菌产γ-氨基丁酸及其乳制品的研究 88
7.1 引言 88

7.1.1 γ-氨基丁酸的生理功能及作用机制 88
7.1.2 γ-氨基丁酸的来源 89
7.1.3 微生物中γ-氨基丁酸的代谢 89
7.1.4 GABA 产品的应用现状 91
7.2 材料与方法 92
7.2.1 试验菌株 92
7.2.2 试剂与材料 92
7.2.3 仪器设备 93
7.2.4 GABA 分析检测方法 93
7.2.5 GABA 发酵条件优化 94
7.2.6 生成 GABA 的动力学研究 95
7.2.7 发酵乳制品中 GABA 含量的研究 96
7.3 结果与分析 97
7.3.1 GABA 的分析检测方法的确立 97
7.3.2 戊糖乳杆菌发酵条件的优化 100
7.3.3 戊糖乳杆菌代谢 L-Glu 转化生成 GABA 动力学研究 105
7.3.4 发酵乳制品中菌体代谢 L-Glu 生成 GABA 的研究 110
7.4 讨论 113
7.4.1 改良纸层析法用于 GABA 的分析检测 113
7.4.2 不同因素对戊糖乳杆菌代谢 L-Glu 生成 GABA 产量的影响 113
7.4.3 发酵脱脂乳制品中 GABA 含量的研究 117
7.5 本章小结 118
8. 新疆奶酪制作工艺的研究 119
8.1 引言 119
8.1.1 新疆特色酸凝奶酪 119
8.1.2 新疆特色干酪的生产现状及发展前景 119
8.2 实验方法 119
8.2.1 实验材料和设备 119
8.3 结果与分析 123
8.3.1 三个样品的具体工艺参数 123
8.3.2 奶酪制作过程中 pH 值的测定 123
8.3.3 最终水分活度（AW） 124
8.3.4 产率 125
8.4 本章小结 125

9. 结论与展望 127
参考文献 129
附录 133
个人简介 147
导师简介 149
获得成果目录清单 151
致　　谢 153

1. 前言

1.1 益生菌

1.1.1 益生菌简介

益生菌（Probiotic）起源于希腊文字，其意思是“专管生命（pro-life）”。益生菌概念最早起始于 1965 年，当时 Lilly DM 首先将益生菌描述为对动物肠道菌群平衡有益的促进物质或微生物。1989 年，罗伊•福勒博士（Dr. Roy Fuller） 将其修改为：“益生菌是补充喂养的活微生物，而且可通过改善肠道菌群的平衡，对宿主动物产生良好的健康效应”。尽管此定义当时仅指动物，但仍为大多数医学文章所引用。联合国粮农组织和世界卫生组织（FAO/WHO）定义为：

益生菌：活的微生物，当摄入充足的数量，对宿主产生一种或多种有论证的功能性健康益处。

作出相关的定义还有：IDF （国际乳业联合会）、ISAPP （国际益生菌和益生素科学委员会）、EFFCA（欧洲食品与饲料菌种委员会）等等。但定义都围绕下列几点：强调益生菌“应指摄入的一定数量的活的微生物，这些微生物除了它原有的营养价值之外，更重要的是要有明确的健康功效” 。

1.1.2 益生菌国内外研究现状

俄国科学家 Metchnikoff（1907）首先科学地揭示了乳酸菌及其发酵乳制品的保健与医疗效果，发现以酸奶为食品的巴尔干山区保加利亚居民长寿者颇多，并于 1908 年发表了著名的“长寿的秘诀”（The Prolongation of Life）一书（Fuller R, 1992），开启了乳酸菌研究的先河，但由于各种原因未能引起人们的高度重视。20 世纪 30 年代以来，人们逐渐认识到嗜酸乳杆菌（*Lactobacillus acidophilus*）、双歧杆菌（*Bifidobacterium*）等乳酸菌在肠内存在的可能及其作用，再次掀起了乳酸菌研究的热潮。益生菌从发现至今已近一个世纪，期间各国科学家对各类益生菌进行了深入的研究，并发表了大量科学专著，益生菌的功效已经得到各国科学家和消费者的认同。目前，与益生菌有关的专题学术会议包括国际乳酸菌会议、国际乳酸菌遗传修饰应用会议、国际微生物学会议、国际功能食品会议等。以英国 Gibson 和 Fuller、爱尔兰 Fitzgerald 和芬兰 Salminen 等为代表的欧洲学者，在欧盟第六框架的资助下，集中力量对益生菌的遗传、代谢、应用等方面进行了系统和深入研究，公布了近 20 种益生菌的全基因组序列，利用益生菌的全基因组信息明确了糖、蛋白质等的代谢途径，开发出类似嗜酸乳杆菌 NCFM（*L. acidophilus* NCFM）.鼠李糖乳杆菌（*L. rhamnosus* GG，简称 LGG）这样的商业化菌株和相关产品。

此外，世界各国都注重具有自主知识产权益生菌菌种的开发，已经公认的具有益生性状的菌株有鼠李糖乳杆菌（*L. rhmnosus*）GG、干酪乳杆菌（*L. casei*）Shirota、嗜酸乳杆菌（*L. acidophilus*）NCFM、干酪乳杆菌（*L.casei*）CRLA31、发酵乳杆菌（*L. fermentum*）RC-14、嗜酸乳杆菌（*L. acidophilus*）LA1 和植物乳杆菌（*L. plantarum*）299v 以及动物双歧杆菌（*B. animalis*）Bb-12、长双歧（*B. longum*）BB536 和婴儿双歧（*B. infantis*）1912 等，这些具有益生作用的乳杆菌和双歧杆菌被广泛用于酸奶、干酪、冰淇淋、发酵肉制品、巧克力、果蔬制品、豆制品等产品中。目前，益生菌产品在国外已形成比较成熟的市场，其产品有口服液、粉剂、片剂、胶囊化等多种形式，适合不同人群消费。

近 10 年来，受市场需求的刺激，国内各研究机构纷纷开展益生菌的研究工作，在益生菌种质资源、益生作用以及益生菌在医药和食品领域的应用等方面展开了广泛的研究，已获得大量具有潜在应用价值的益生菌菌株。随着人们对肠道微生物与健康关系的认识和研究的不断深入，以及临床医学、微生物学和食品科学相互渗透，有关这方面的研究也在深入的发展。然而，与国外相比，国内的益生菌基础理论研究与产品开发仍处在发展阶段。

1.1.3 益生菌营养功能

1.1.3.1 促进营养物质的吸收

益生菌在动物消化道内生长繁殖，在动物体内可产生多种消化酶如淀粉酶、蛋白酶和葡萄糖苷酶等，促进了营养物质特别是下消化道营养物质的消化和吸收，这一作用被认为是益生菌促进动物生长最有力的证据。益生菌可参与多种维生素代谢，产生维生素B、生物素、叶酸、烟酸、泛酸等供人体所需。并且在代谢胆酸、其他甾体化合物及其他难生物降解物质的代谢中有重要作用（Clausen MR, et al., 1991）。肠道内定居着各种微生物，主要通过发酵吸收利用糖类在小肠中的主要产物短链脂肪酸，而短链脂肪酸所蕴含的能量占碳水化合物全部能量的40%~50%。在含有益生菌的动物肠道内，蛋白酶和糖酶的含量高于无菌动物，且这些酶同时具有更高的活性。乳酸菌不仅可以产生多种酶类，而且能通过产酸，提高钙、磷、铁的利用率，还能促进维生素D的吸收和利用（Ichikawa H, et al., 1999）。

1.1.3.2 减缓乳糖不耐症

乳糖吸收不良是涉及全世界范围的健康问题，乳糖在人乳及牛乳中的平均含量分别为 7.0%和 4.8%，是人体重要的营养源，并具有重要的生理作用。乳糖只有在乳糖酶的催化下水解成葡萄糖和半乳糖，才能被人体转化吸收。若体内缺少乳糖酶，致使乳糖在大肠中积累，成为肠道微生物的异质性发酵基质，结果引起腹泻、腹胀、腹部疼痛和肠胃气胀等不适症状，这种现象被称为乳糖不忍耐症（Lactose Intolerance）（谢玲，2001; Jiang T, et al.,1996; Lin M Y, et al.,1991）。全球有半数以上人口存在乳糖酶

缺乏，特别是东方人，乳糖吸收不良者所占比例更大，因此乳糖不耐症愈来愈多地受到人们的关注。

益生菌在乳糖存在的情况下可以诱导合成β-半乳糖苷酶（β-Galactosidase），有利于乳糖的分解和利用。饮用嗜酸乳杆菌、双歧杆菌等益生菌发酵的酸奶有助于乳糖消化，可大大降低乳糖不耐症（Daniel J, 2001）。Kim 和 Gilliland（1983）研究了未发酵的嗜酸乳杆菌奶对乳糖不忍耐症的影响，表明服用含有 2×10^8 cfu/mL 嗜酸乳杆菌的未发酵奶，乳糖的利用率明显增加。食用益生菌制剂改善其乳糖不耐症。

1.1.4 益生菌的健康功效

迄今已有数以百计的文章发表以论述益生菌的许多健康功效。大致总结为以下七类：

调节肠道菌群及相应结果：

1) 抑制肠内有害腐败细菌的生长及毒素的产生：乳酸菌和双歧杆菌通过在内酵糖类产生乳酸、醋酸等物质，抑制肠内腐败菌的生长从而减少体内毒素的产生。
2) 整肠作用：改善便秘、腹泻等肠道不适症状。乳杆菌和双歧杆菌生成的酸促进了肠的消化和吸收功能，这些有机酸还能刺激肠道的蠕动，促进排便。它们对治病菌的抑制作用又能预防或及时治愈由于感染产生的细菌性腹泻。
3) 减少外来致病菌产生的感染的危险：乳酸菌和双歧杆菌产生的有机酸和细菌素（一种微生物产生的将对手杀死的杀菌物质）可以保护我们减少因食物引起的外来细菌感染的可能性。其中益生菌治疗轮状病毒引发的腹泻：FAO 和 WHO 举办的“益生菌专家会议（Expert consultation of Probiotics）”根据迄今为止的研究成果，认为益生菌对人类健康的最大功效在于预防和治疗轮状病毒引发的儿童急性腹泻。

益生菌对肠道微生物菌群的调节，机理如下：

1) 通过黏附素与肠黏膜上皮细胞受体黏附，占位定植于肠道中，与病原菌竞争黏附位点，如果这些吸附位点被较多的有益微生物所占据，病原微生物就会被排斥，从而起到对病原菌的定植拮抗作用。
2) 产生有益代谢产物。乳酸菌作为益生菌使用时可产生挥发性脂肪酸和乳酸，芽孢杆菌进入动物肠道也能够产生乙酸、丙酸和丁酸等挥发性脂肪酸，降低肠道 pH 值，从而有效地抑制致病菌的生长；某些益生菌产生一些抑菌物质如过氧化氢、细菌素等，抑制肠道有害菌的繁殖。Gibson 等报道，双歧杆菌能产生一种未知的广谱抗菌物质，具有抑制沙门氏菌、志贺氏菌、霍乱弧菌等病原菌的活性。某些乳酸杆菌、链球菌、芽孢杆菌在代谢过程中可产生一些抗菌物质如乳糖菌素、杆菌肽、伊短菌素等，来抑制病源菌在肠道内的生长繁殖。

3) 营养竞争。乳杆菌进入小鼠肠道中呈优势生长，于肠道中的病原菌及潜在的致病菌竞争营养物质。营养竞争也是决定肠道菌群分布的重要因素。
4) 生物夺氧。在肠道微生态系中，厌氧菌是优势种群。利用非致病的耗氧微生物暂时在肠道定植，使局部环境的氧分子浓度降低，促进厌氧微生物的生长，达到提高定植抗力，恢复生态平衡的目的。这是好氧和兼性厌氧芽胞杆菌的作用机理之一。但在动物体内是否存在“生物夺氧”作用，还有待进一步研究。
5) 调节人体的免疫：益生菌可以通过激活免疫细胞，从而增强人体免疫力防止疾病的发生；同时益生菌又可以通过平衡免疫系统来避免免疫过激引起的如：湿疹、过敏性鼻炎和哮喘等过敏性疾病。

益生菌制剂的免疫调节和免疫刺激特性的研究正受到愈来愈多的关注。乳酸菌的代谢产物、细胞壁成份以及乳酸菌在肠道内的定植作用等都被看作是影响免疫调节的重要因素。近年来许多学者就益生菌的免疫效果进行了研究，Perdigon（1987）等调查了嗜热链球菌和嗜酸乳杆菌发酵奶对老鼠免疫成分的影响，发现老鼠的巨噬细胞和淋巴细胞都被激活（Perdigon G, et al., 1990）。对双歧杆菌的大量研究也表明，双歧杆菌能诱导 TNF-A、IL-2、IL-6、IL-10 和 INF-A 的 mRNA 表达增强，激活巨噬细胞，如 Nk 细胞、T 细胞和淋巴细胞，提高机体的特异性及非特异性免疫功能。有报道，服用含有一定剂量双歧杆菌的酸奶可使体内 T 细胞产量提高 3-4 倍（Robert Havenaar, et al., 1994）。口服乳酸杆菌 GG 可以提高机体对轮状病毒和沙门氏杆菌疫苗的抗体反应性（Fangac, 2000）。短乳杆菌能够提高脊髓灰质炎病毒疫苗的 IgA 水平（Fukushima, 1999）。

益生菌还可以提高亚免疫状况、幼年个体和老年个体的免疫力。研究表明，随着年龄增大免疫系统功能也将逐渐下降，而免疫反应功能的强弱与寿命密切相关（Goodwin, 1995）。益生菌可以提高老年个体 T 细胞诱导的免疫反应、提高 NK 细胞和吞噬细胞功能（Solana, 2000）。研究表明鼠李糖乳杆菌和乳酸乳杆菌联合使用可以提高壮年及老年个体的细胞免疫功能（Sheih, 2001）。益生菌的活菌细胞、死细胞或发酵产物都具有调节免疫的功能，且益生菌的免疫调节不会带来有害的炎症反应（陈有容等, 2001）。

1) 生成维生素，促进营养物质如钙和乳糖的吸收。
2) 抑制和延缓某些癌症的进程：益生菌通过吸附分解某些致癌物质，降低某些癌酶水平来实现。实验评价有丝分裂原诱导的肿瘤发展的水平或时间变化，肿瘤发展指数是很重要的，但这种评价方式不能直接用于人类。细菌酶的活性被认为扮演了将前致癌物到致癌物质的转化的角色，在粪便分析中获得量化。这些酶包括 ß-葡萄糖苷酸酶，硝基还原酶，和氮还原酶。研究设计让老鼠食用肉食，在实验老鼠的结肠癌潜伏期期间增加 NCFM 的补充，20 周的实验期间显示结肠癌的发生

是低水平的(Goldin and Gorbach, 1980)。NCFM 与抗生素一同使用显示老鼠结肠瘤的减少(Goldin and Gorbach, 1984c)。Goldin and Gorbach (1984a) 同样研究了喂食 NCFM 对肉食喂食的老鼠的粪便中自由胺产生的影响。他们发现喂食 NCFM 的老鼠自由胺的水平显著的降低了。在人体实验，Goldin and Gorbach (1984b)发现每天消费含有 NCFM 的牛奶，三种粪便酶的活力减少了 20-40%。相似的结果在其它人体研究中 (Goldin and Gorbach, 1984c) ，还有老鼠实验中 (Goldin et. al., 1980) 被发现。

3) 对常见的成人生活习惯病的预防和改善：益生菌通过吸附胆固醇将其变成不易被肠道吸收的粪烷固醇而降低胆固醇；乳酸菌产生的某些物质如伽玛-氨基丁酸具有降低血压的功效。

血清胆固醇水平的提高是引发冠心病的主要危险因素，许多体外或体内研究也表明益生菌有一定的降胆固醇作用。

人体血液中总胆固醇或低密度脂蛋白的减少被认为有利于降低冠心病的发生。益生菌已经显示能够担当降低血脂的角色，尽管研究数据有不确定性(Taylor and Williams, 1998). 在对嗜酸乳杆菌NCFM的研究(Gilliland et.al.,1985;Gilliland and Walker,1990) 显示它具有能将实验室生长培养基上的胆固醇消除的能力。NCFM被报道具有在胆汁中和缺氧条件下对胆固醇的吸收，环境模拟人体肠道。对嗜酸乳杆菌菌株的评价显示胆固醇吸收同化作用是菌株依赖型的。（Thompson et al. 1982）12位健康者每日食用250 ml含嗜酸乳杆菌的甜牛奶进行为期9周的研究，宽范围的观察这些乳制品对血浆胆固醇的影响。该嗜酸乳杆菌甜牛奶已经被北卡罗来纳乳品研究中心（北卡罗来纳州立大学，Raleigh，NC）注册商标，产品属于低脂牛奶并提供$2\cdot10^6$ CFU/ml 嗜酸乳杆菌NCFM. 产品在3周内被消费。作者介绍了嗜酸乳杆菌甜牛奶，酸奶和酪乳，空白作了对血浆胆固醇水平具有的重要影响。

益生菌对健康人群的作用

由于消费者中的大部分是由健康人群构成的，因此研究益生菌对正常人群的益生作用具有重要的意义。通常认为益生菌对健康人的功效在于降低某些疾病的发病率。如前面提到的，益生菌能够降低结肠癌的发病率。但实际情况因人而异。但 Hatakka 等的实验证实了长期服用含益生菌的非发酵乳制品能够降低肠道感染的几率，尤其对于儿童，效果更为显著

上述的功效其中一些是通过设定的临床试验来观察研究，得出益生菌如何影响人体内的健康环境。这是非常复杂的问题，而鉴别益生菌对人体健康的作用的研究一直不停歇地进行着。任何已有的研究都有一定的局限性，因为人们注意到用一些临床系统作直接研究十分困难。例如，为了研究心脏病或癌症的病变机率，需要对数千至少数百个病人进行长期的观察研究。因此，通常只是侧重于研究显示这些疾病的指标，

如血液胆固醇的高低反应心脏病的发病率，而粪便或尿样中致癌物质的含量则是测定癌症发病率的指标。

虽然任何一个研究都不可能完全描述益生菌的功效，但一项对益生菌菌种研究的评估表明相对多地摄入某类菌对人体健康有益。利用益生菌菌种促进健康有其固有的优势，即这是一种不干扰人体正常殖生菌丛的自然手段。

1.2 益生菌筛选评估标准

众多的候选菌株在被确定为益生菌并用于大规模生产之前，都要经过严格的筛选，并要求符合一定的标准。

（1）活菌数量

益生菌对宿主的益生功效与其在肠道中的活菌数量密切相关，有数据显示乳酸菌数的摄入量每天必须达到 $10^{9\text{-}10}$ 以上才能发挥其生理益生功能。

（2）胃肠道环境耐受性

口服乳酸菌若要到达肠道并在肠道内起作用，需要菌体能够通过低 pH 胃液存活下来，并耐受肠道内的胆盐浓度。有学者研究表明不是所有的乳杆菌都能耐受低 pH 和高浓度胆盐环境，仅有少数嗜酸乳杆菌具有这种能力（Lankputhra, 1995）。以活菌状态到达肠道必须对胃酸及肠道环境具有耐受性，因此耐酸及耐胆盐是筛选益生菌的一个重要指标（JAYA P, et al. 1998）。

（3）粘附能力

益生菌进入肠道后，首先和肠粘膜表面相接触，并与粘膜表面的黏附素受体结合，黏附于肠粘膜表面，这种黏附一方面通过竞争性的占位定植形成生物屏障，以阻止病原菌与肠粘膜受体结合，另一方面也延长了益生菌影响宿主胃肠道免疫系统和微生态区系的时间，这种黏附能力是与其生理作用的效率是相关的。所以对益生菌的黏附性能进行评价和筛选，是益生菌活菌制剂质量优劣的一个重要内容。事实上，益生菌的黏附能力低下时，只能和过路菌一样，无法对肠道产生保护作用，因此将益生菌黏附能力检测纳入其评估体系显得极为重要。Collins 等提出选择益生菌株的标准是，益生菌必须有黏附和定植于宿主肠道的能力，因为益生菌株必须对上皮细胞组织具有黏附性才能长期在肠道中存活并发挥其作用（Collins JK, et al. 1998）。

（4）其他健康效果

1998 年，欧盟乳酸菌工业平台（Lactic Acid Bacteria Industrial Platform，LABIP）会议提出了筛选和评估益生菌的标准，指出益生菌应满足以下条件：即菌株来自于健康人体；具有无致病性、耐酸和耐胆盐、易于黏附和定植、产生抗菌物质、调节免疫功能、代谢活性强（如同化胆固醇、分泌乳糖酶等）以及能耐受各种加工条件等生理和技术特性（Kamao M, et al., 2000）。而对于益生菌是否必须是人源性存在争议，早在 1999 年 Jacobsen 等对 47 株从人体中分离得到的乳酸菌进行了评价，所有菌株经

pH 2.5，0.3%牛胆盐溶液处理，并进行体外黏附 Caco-2 细胞实验，之后将具有良好耐受性，能够黏附肠上皮细胞的菌株给健康的志愿者服用，最终从健康志愿者粪便中检出 5 株乳酸菌，其中 2 株人源性，3 株猪源性。FAO/WHO（2001）也提出应当重新考虑是否将人源性作为益生菌强制性评价标准之一，菌株的功能特性比其来源更加重要。

目前，有关益生菌及其产品开发的最大兴趣是分离和开发新的益生菌菌株。理论上，益生菌菌株的初步筛选评价标准应包括：（1）菌株能顺利通过消化道，尤其是在上消化道极端条件（高胃酸、高胆汁）下具有较高的存活率；（2）具有对上皮细胞表面的黏附能力，能在消化道内定植。

1.3 本研究目标

本研究拟对我国新疆传统干酪食品奶疙瘩中分离得到的 2 株戊糖乳杆菌（Lactobacillus pentose）Ind1 和 Ind3 开展研究，研究它们在宿主肠胃环境中的耐受能力、对体外 Caco-2 模型肠上皮细胞的黏附能力和可能的粘附机制，对小鼠肠道菌群调节作用及持续时间；同时，对两株戊糖乳杆菌对于胃肠道中的有害物质如苯酚、对甲酚和吲哚在不同浓度下的耐受性及这些有害物质的粘附或降解作用进行评价；对戊糖乳杆菌 Ind1 和 Ind3 产 γ 氨基丁酸（GABA）的条件进行了优化，初步探讨了高产 γ 氨基丁酸的发酵乳制品的工艺条件，对菌株 Ind1 和 Ind3 作为辅助发酵菌种制作新疆奶酪的工艺进行了研究，旨在完善戊糖乳杆菌益生菌筛选及评估体系，建立菌株黏附能力评价体系，探讨体内黏附定植机制及生物屏障机制，为戊糖乳杆菌的商业开发提供理论技术依据。

2. 戊糖乳杆菌菌株的鉴定与生长

2.1 材料与方法

2.1.1 实验材料

蛋白胨	MERCK KGaA公司；
MRS琼脂培养基	MERCK KGaA公司；
MRS肉汤培养基	MERCK KGaA公司；
PY基础培养基	MERCK KGaA公司；
吐温80	国药集团；
溴甲酚紫（分析纯）	国药集团；
氯化钠（分析纯）	国药集团；
乙醇（分析纯）	国药集团；
脱脂乳	雀巢公司；
bugbox厌氧培养箱	Ruskinn公司；
MS3 basic旋涡混匀器	德国IKA公司；
pH计	北京赛多维斯天平有限公司；
Bs-300s精密分析天平	北京赛多维斯天平有限公司；
AUTOCLAVE MLS-3750灭菌器	SANYO Electric有限公司；
DKB-600B型电热恒温水箱	上海一恒科技有限公司；
离心机	德国Hettich公司；
戊糖乳杆菌 Ind1，Ind3	北京林业大学生物学院保藏；

2.1.2 实验方法

（1）分子生物学方法鉴定：挑取斜面培养基的菌苔于 10μL 灭菌水中，99℃变性后离心取上清液作为模板，使用 TaKaRa 16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit（Code No.D310），以 Forward /Reverse primer2 为引物，扩增目的片段。取 5 μL 进行琼脂糖凝胶电泳。

（2）培养及形态特征：将活化好的菌种接种于 MRS 固体培养基上，37°C 培养 3 天后观察菌落形状、大小、颜色、是否褶皱等特征；挑取单个菌落，革兰氏染色后，观察细胞形状、排列方式、是否形成荚膜及革兰氏染色情况。

（3）生化特性测试：

过氧化氢酶试验：挑取一环生长于 MRS 斜面的培养物，涂于干净载玻片上，然后在其上加一滴 3%的 H_2O_2，若有气泡产生则为阳性反应，无气泡为阴性反应。

精氨酸水解试验：取活化好的 MRS 液体培养物 1~2 滴，接种于精氨酸水解培养

基内，并在其上加盖无菌的石蜡矿物油，然后置于 37°C 下培养 72 h 后，观察结果。

淀粉水解试验：将菌液接入含可溶性淀粉的 MRS 培养基，取培养液少许放入比色盘内，同时取未接种的培养液作为对照，分别在其中滴加卢哥氏碘液。

碳水化合物发酵产酸试验：参照表 2.1 所列内容，分别将各种碳水化合物按其相应的添加量添加到基础培养基中，调节 pH 值到 6.8，分装试管后依照不同碳水化合物相应的灭菌时间对培养基进行灭菌。取活化好的液体培养物按 1％的接种量，分别接种于含有不同碳水化合物的发酵培养基中，置于 37°C 培养 24~72 h。

表 2.1 发酵试验中的碳水化合物

Table 2.1 Carbohydrates used for fermentation in the present study

碳源	添加量（g/100mL）	灭菌后的 pH 值	灭菌时间（min）
阿拉伯糖	0.5	6.9	12
纤维二糖	1.0	6.9	15
半乳糖	1.0	6.9	15
葡萄糖	1.0	6.9	15
乳糖	1.0	6.9	15
麦芽糖	1.0	6.9	15
甘露醇	1.0	6.9	15
松三糖	0.5	6.9	15
棉子糖	1.0	6.9	15
密二糖	0.5	6.9	15
鼠李糖	1.0	6.9	15
核糖	0.5	6.7	12
山梨醇	1.0	6.9	15
蔗糖	1.0	6.9	15
海藻糖	0.5	6.9	15
木糖	1.0	6.7	12
七叶灵	0.5	6.9	15
甘露糖	1.0	6.9	15

（4）pH 耐受性：将生长于 MRS 液体培养基中的培养物，接种在 pH3、pH9.6 的 MRS 培养基中，然后将培养液在 37°C 下恒温培养 24 h，将培养物振荡均匀后于 560nm 下以空白培养基为参照测定 OD 值，依据 OD 值判断细胞生长状况。

（5）耐盐性测试：挑取生长于 MRS 斜面的新鲜培养物，接入 NaCl 浓度为 6.5％

和 18%的 MRS 液体培养基中，在 37°C 下恒温培养 24 h，将培养物振荡均匀后，于 560nm 下以空白培养基为参照测定 OD 值，依据 OD 值判断细胞生长状况。

（6）生长实验：供试菌种使用前按 2%接种量转接至 MRS 培养基中，37ºC 培养 14 h，使菌株活力得到充分恢复，将已活化好的菌种以 2%接种量转入 MRS 培养基中，37ºC 培养 14 h 后离心（6000 r/min，20 min）收集菌体。将收集到的菌体悬浮于灭菌的 9‰生理盐水中，调节菌数至 10^8 cfu/mL，然后按 2%接种量接种到 MRS 培养基中，按一定时间间隔取样，560 nm 处测定吸光值，同时测其 pH 值。

2.2 实验结果

2.2.1 分子生物学方法鉴定结果

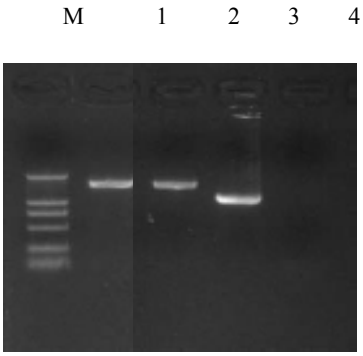
以 Seq Forward、Seq Internal 为引物对上述回收产物进行 DNA 测序。Ind1 和 Ind3 的 16S rRNA 基因序列分析结果：

（1） 菌株 Ind1 的 16S rDNA 基因序列分析结果（CTB689-P SEQ）：见附录图 A1~A7

（2）菌株 Ind3 的 16S rDNA 基因序列分析结果 (CTB689-Ind3 SEQ)：见附录图 B1~B7

（3）根据乳酸菌 Ind1 和 Ind3 的菌体形态，生理生化结果反应及 16S rDNA 鉴定结果，综合判定证实 Ind1 和 Ind3 为戊糖乳杆菌。

（4）菌株 Ind1 和 Ind3 的 Genebank acccession Number 分别是 EU483102 和 EU483099。



M：DNA Marker DL2,000

1：CTB689-Ind-1-PCR产物

2：CTB689-Ind3-PCR产物

图 2.1 Ind1 和 Ind3 的 16S rDNA 基因

Fig. 2.1 PCR product by using -1 and-3 specified primers

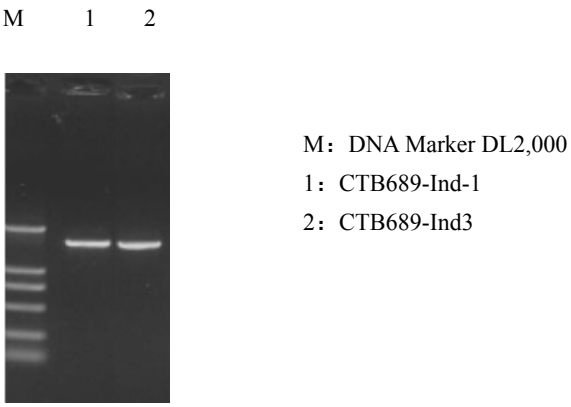


图 2.2 Ind1 和 Ind3 的纯化的 16S rDNA 基因

Fig. 2.2 The purified 16S rDNA gene from Ind1 和 Ind3 strain

2.2.2 培养及形态特征结果

菌株 Ind1 和 Ind3 在 MRS 固体培养基上培养 2 天后，形成乳白色圆形菌落，且表面光滑，边缘整齐，无褶皱，直径约在 1mm 左右。见下图 2.3 和图 2.4：

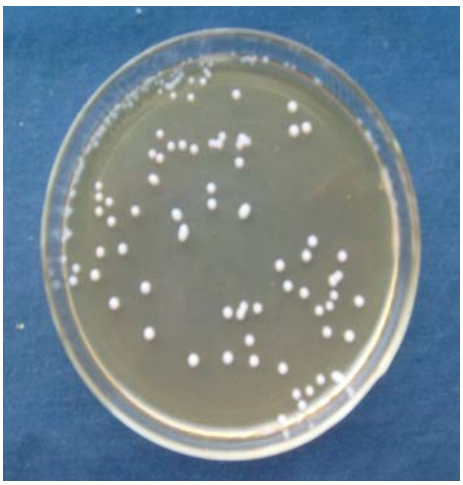


图 2.3　Ind1 的菌落形态照片

Fig. 2.3 photo of Ind1

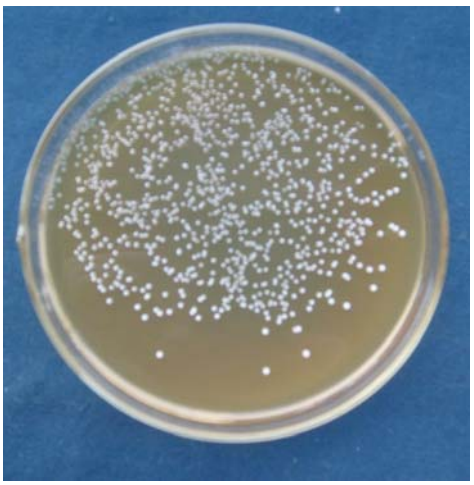


图 2.4 Ind3 的菌落形态照片

Fig. 2.4 photo of Ind3

菌株 Ind1 和 Ind3 在显微镜下观察，细胞为长杆形，以单个或链状存在，革兰氏染色阳性。见图 2.5 和图 2.6：

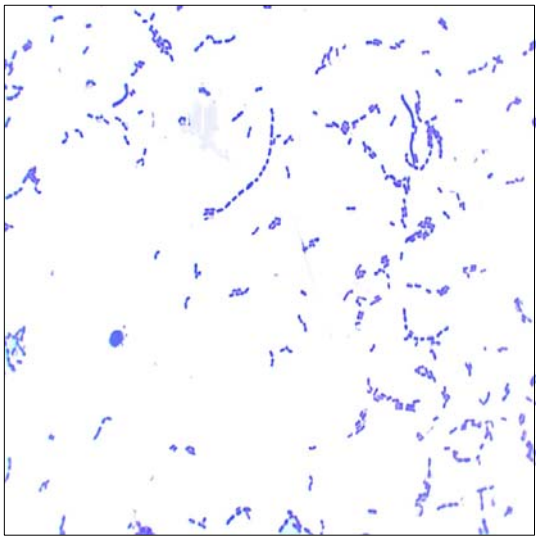


图 2.5 Ind1 的显微照片

Fig. 2.5The microscope photo of Ind1

图 2.6 Ind3 的显微照片

Fig.2.6The microscope photo of Ind3

2.2.3 生化特性测试结果

对菌株 Ind1 和 Ind3 的一些生理生化特性进行了检测，结果如表 2.2 所示：从表 2.2 可知，菌株 Ind1 和 Ind3 均在 10°C 可以生长；6.5%耐盐试验生长，18%耐盐试验不生长，过氧化氢酶阴性，不能水解精氨酸，不水解淀粉；能够代谢半乳糖、葡萄糖、乳糖、麦芽糖、核糖、蔗糖、阿拉伯糖、纤维二糖、松三糖、棉子糖、蜜二糖、山梨醇、七叶灵、木糖、海藻糖和甘露糖产酸。不能代谢鼠李糖产酸，其生理生化特性基本符合《伯杰细菌鉴定手册》第九版所描述的戊糖乳杆菌的特征，由此将这 2 株乳杆菌菌株初步鉴定为戊糖乳杆菌。

表 2.2 乳杆菌的生理生化特性

Table2.2 Physiological and biochemical characteristics of Lactobacillus

特征	Ind1	Ind3
10°C 生长	＋	＋
45°C 生长	＋	－
6.5%耐盐	＋	＋
18%耐盐	－	－
精氨酸水解	－	－
淀粉水解	－	－
过氧化氢酶	－	－
阿拉伯糖	＋	＋
纤维二糖	＋	＋

半乳糖	＋	＋
葡萄糖	＋	＋
乳糖	＋	＋
麦芽糖	＋	＋
甘露醇	＋	＋
松三糖	＋	＋
棉子糖	＋	＋
密二糖	＋	＋
鼠李糖	－	－
核糖	＋	＋
山梨醇	＋	＋
蔗糖	＋	＋
海藻糖	＋	＋
木糖	＋	＋
七叶灵	＋	＋
甘露糖	＋	＋

2.2.4 pH 耐受性

将生长于 MRS 液体培养基中的培养物，接种在 pH3、pH9.6 的 MRS 培养基中，然后将培养液在 37°C 下恒温培养 24 h，将培养物振荡均匀后于 560nm 下以空白培养基为参照测定 OD 值，戊糖乳杆菌生长正常说明戊糖乳杆菌可以在 pH3~pH9.6 之间生长。

2.2.5 耐盐性测试

挑取生长于 MRS 斜面的新鲜培养物，接入 NaCl 浓度为 6.5％和 18％的 MRS 液体培养基中，在 37°C 下恒温培养 24 h，将培养物振荡均匀后，于 560nm 下以空白培养基为参照测定 OD 值，结果说明戊糖乳杆菌可以在 pH3 和 pH9.6 的情况下生长。

2.2.6 生长实验

供试菌种使用前按 2%接种量转接至 MRS 培养基中，37ºC 培养 14 h，使菌株活力得到充分恢复，将已活化好的菌种以 2%接种量转入 MRS 培养基中，37ºC 培养 14 h 后离心（6000 r/min，20 min）收集菌体。将收集到的菌体悬浮于灭菌的 9‰生理盐水中，调菌至 10^8 cfu/mL，然后按 2%接种量接种到 MRS 培养基中，按一定时间间隔取样，560 nm 处测定吸光值，同时测其 pH 值。将活化后的两菌株 Ind1 和 Ind3 接入 MRS 液体培养基中，37°C，培养 24 h，菌体细胞生长曲线和酸度变化如图 2.7 和图 2.8 所示：

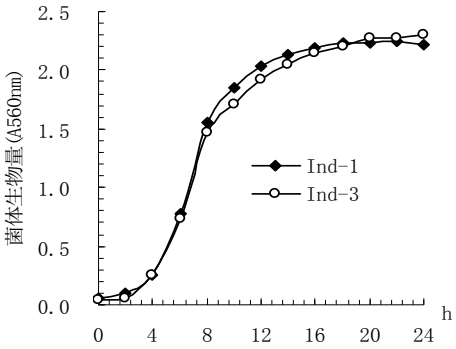


图 2.7　Ind1 和 Ind3 生长曲线

Fig. 2.7 Growth Curve of Ind1 and Ind3

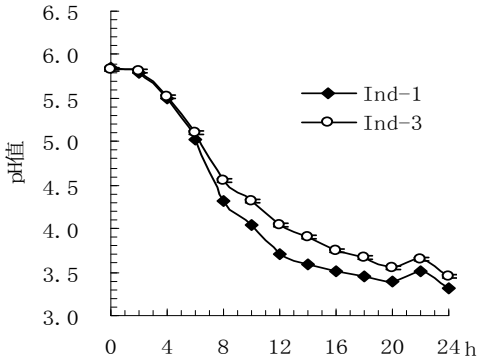


图 2.8 Ind1 和 Ind3 的 pH 变化

Fig. 2.8 pH changed of Ind1and Ind3

由图 2.7 可看出，两菌株 Ind1 和 Ind3 均培养 4 h 后进入对数生长期，在 14 h 左右结束对数生长期，转入稳定期，而此时 pH 值已低于 4。因此，将供试菌种活力得到充分恢复后，两菌株 Ind1 和 Ind3 采用 MRS 液体培养基 37ºC 培养 14 h。

2.3 本章小结

基于 16s rDNA 测序数据以及细胞形态核生理生化特征，菌株 Ind1 和 Ind3 属于戊糖乳杆菌。戊糖乳杆菌 Ind1 和 Ind3 有较高的 pH 耐受性和耐盐能力，在 37°C 厌氧条件下，4 h 后进入对数期，16 h 后进入生长稳定期。

3. 戊糖乳杆菌对肠道环境的耐受和黏附能力

3.1 益生菌的黏附作用研究进展

3.1.1 黏附机理研究

黏附和定植作用是益生菌体现功效的重要特征, 也可以联想由于肠道粘膜可能需要细菌的黏附作用在上皮细胞上，没有这种特性，益生菌可能就无法表达一些重要的生理学功能。不幸的是，因为体外条件与内肠道环境非常不同，黏附性在体外试验研究往往无法代表内肠道的真实情况，况且一些代表性菌株来源都是外来的或非目标人群肠道原有菌株，所以通过喂食外源益生菌做的研究，或者在体外实验中能够体现黏附性特点的益生菌，并且供给更多数量给人体时，都不能像土著微生物长期定植(Alander et al., 1999; Bouhnik, et al., 1992)。另一方面，尽管一些益生菌在体内产生了一定黏附，却没有表现较好的效果或被大量的定植，当摄食外源微生物的行为停止，就会发现排泄物中的外源益生菌的数量会稳定下降到无法检出的水平。研究志愿者肠道活组织结构是非常有价值的。但必须确认益生菌的黏附和定植发生在关键的胃肠道位置。

不过，在组织培养中对肠内壁细胞的黏附能力通常认为是对益生菌菌株该属性的通用评价方式，对嗜酸乳杆菌NCFM 的研究显示在人类胚胎细胞中和持钙细胞上都具有黏附性，当存在钙时的表现会增加黏附性(Greene and Klaenhammer, 1994; Kleeman and Klaenhammer, 1982). 肠道细胞粘液物HT-29，对比无粘液分泌的肠道细胞组织，被认为与肠道内环境更加接近。比较其他的乳杆菌与NCFM，在模拟生理相关的pH值在6-8之间有更高的黏附性。(Greene and Klaenhammer, 1994)。使用电子显微镜扫描，Hood and Zottola (1987) 显示出NCFM有对人体细胞有更好的黏附性。

表3.1：一些益生菌的黏附属性的对比

Table 3.1 Comparisons of adhesive properties from probiotic bacteria

+，黏附体现；-，无黏附；HT29，表型HT29或HT29-MTX细胞

乳杆菌菌种和菌株		黏附分析用的细胞组织			有关黏附的因素	文献
		HITHs0074	Caco-2	HT29		
嗜酸乳杆菌 NCFM	L.acidophilus NCFM	+	+	+	蛋白质	Greene and Klaenhammer，1994
嗜酸乳杆菌 LA	L.acidophilus LA	+	+	+	蛋白质	Chauviere et al，1992；Coconnier

嗜酸乳杆菌 LB	L.acidophilus LB		+	+	分泌蛋白	et al，1992
嗜酸乳杆菌 LA1	L.acidophilus LA1		+	+	分泌蛋白	
卷曲乳杆菌 BG2FO4	L.crispatus BG2FO4	+	+	+	蛋白质和碳水化合物	Greene and Klaenhammer，1994
格氏乳杆菌 ADH	L．gasseri ADH	+	+	+	碳水化合物	
鼠李糖乳杆菌 GG	L．rhamnosus GG		+	+		Mack et al, 1999
植物乳杆菌 299&299V	L.plantarum 299&299V			+	甘露糖黏附物	Adlerberth et al, 1996
德氏乳杆菌 1489	L.delbruechii 1489	+	+			Greene and Klaenhammer,1994

主要数据来源：(Greene and Klaenhammer, 1994)

乳杆菌在人类钙细胞黏附性的机理

（Factors Involved in Adherence of Lactobacilli to Human Caco-2 Cells）

*JEFFREY D. GREENE AND TODD R. KLAENHAMMER**

北卡罗来那州立大学东南乳食品研究中心，食品科学系，Raleigh，北卡罗来那 27695-7624（发表于 1994 年 12 月 16 日）

黏附是益生菌定植的第一步，使其避免被肠道分泌的流体和肠道的蠕动所清除。目前的研究普遍认为乳杆菌的黏附机理主要有脂磷壁说、黏附蛋白说及表面分子说。

3.1.2 黏附素的研究

黏附素是存在于微生物的菌毛、细胞壁、外膜蛋白、鞭毛、荚膜及小丝状体的一类与微生物的黏附密切相关的特殊物质，可能是蛋白质、多肽、糖蛋白、糖脂和多糖或单糖，是一种具有多种结构和功能的多样化分子，但具体的构型还有待于研究。黏附作用主要是乳酸菌体表面一些特定的分子如黏附素蛋白、PSC（多糖）和 LTA（脂磷壁酸）等识别宿主表面特异的受体的结果。

（1）菌体表面黏附因子——黏附素蛋白

乳酸菌中表面黏附素蛋白能够介导黏附，是参与定植过程的重要物质。郑跃杰等（2000）用胰蛋白酶处理双歧杆菌或其耗尽营养物质的培养上清液，发现菌的黏附力下降，说明蛋白起黏附作用。另外，他们还用革兰氏染色法从激光共距式细胞仪对黏附做试验也证明黏附素为蛋白质。黏附素蛋白分为两种：

S 层蛋白：研究表明,乳酸菌的黏附作用与细胞表层蛋白密切相关。表层蛋白又名 S-层蛋白(surface layer protein,Slp)，能够以非共价键或者离子键（电荷之间的相互作

用）与细胞壁相结合（Weygand M, et al., 1999; Sleytr UB, 1999）,是许多细菌及古生菌细胞壁表面所包被的生物活性大分子,在一些乳酸菌中也发现了 S-层蛋白的存在。S-层蛋白的相对分子质量在 40 000~200 000 间,而在已发现的乳酸菌中,S-层蛋白相对分子质量在 25 000~70 000 间。S-蛋白的功能可能有：维持细胞外形，屏障防卫，分子筛的作用，形成抗体，提供外酶的附着结构，黏附于宿主上皮细胞等等（郭兴华，1997）。S-蛋白以类结晶的方阵完整的覆盖了细菌的细胞表面，对菌体黏附于粘膜和细胞外基质起重要作用。国际上很多研究已经鉴定和特征性地描述了乳杆菌中很多种的 S-蛋白和编码 S-蛋白的基因。“嗜酸组”中的一些乳杆菌，如嗜酸乳杆菌、卷曲乳杆菌都含有 S-蛋白。不同的菌株有不同的黏附特异性。在含有 S 层的细菌中，表层蛋白是该菌的主要蛋白质种类，约占菌体全蛋白的 10-20%左右。在乳酸菌中，表层蛋白的分子量范围约在 40-71 kDa 之间（Garrote GL, et al., 2004; Sleytr UB, et al., 1993）。乳杆菌属于革兰氏阳性兼性厌氧菌，其表面的 S 层都是以非共价键或者离子键与细菌的细胞壁相结合，其表面蛋白的获得多运用尿素、氯化锂等试剂。Takahiro 等人用 2mol/L 盐酸胍提取了卷曲乳杆菌 JCM5810 中的 CbsA 蛋白（collagen-binding S-layer protein A）（Takahiro T, et al. 1995）。Garrote 等人利用 5mol/L LiCl 从高加索奶乳杆菌（*Lactobacillus kefir*）和类高加索乳杆菌（*Lactobacillus parakefir*）中分离得到了分子量为 66-71 kDa 的表层蛋白（Garrote GL, et al. 2004）。采用氯化锂可以去除 90%以上的 S 层蛋白，乳杆菌外表面的 S 层蛋白 Mr 大约为（41~52）$\times 10^3$（Syvie L, et al., 1992）。杜珍辉发现未提取 S-层蛋白的 Lactobacillus acidophilus L050103-12 对 HT-29 细胞的黏附数为 440.33±8.02 个・100 细胞-1，而经 LcLi 抽提后的黏附数为 227.46±65.74 个・100 细胞-1，两者之间差异极显著；未提取 S-层蛋白和已提取 S-层蛋白的保加利亚杆菌 B050102-14 对 HT-29 细胞的黏附数也表现为差异极显著，这表明 S-层蛋白在乳酸菌黏附过程中起重要作用[9]。Schneitz 等在测试分离自禽类的乳酸杆菌对艾维茵肉鸡肠上皮细胞的黏附时发现，乳酸杆菌的细胞壁存在 S-层蛋白时，黏附率较高，而没有的则黏附率较低[10]。Greene 等研究显示，用氯化锂处理嗜酸乳杆菌 BG2F04 和 NCFM/F2，去除 S 层蛋白之后，两株菌的黏附能力未见降低（Greene JD, et al., 1994）；王斌等采用氯化锂去除路氏乳杆菌 JCMl081 的 S 层蛋白之后，对 HT-29 细胞的黏附影响不大（王斌等，2006）。但是也有学者研究嗜酸乳杆菌 M92 时，去除 S 层蛋白后，该菌株的黏附能力显著降低，说明 S 层蛋白参与了黏附（Kos B, et al., 2003）。综上所述，S 层蛋白并不是与所有的乳杆菌黏附都有关，这类蛋白在其功能上存在一定的多样性。

在乳杆菌中发现的与黏附有关的另一类蛋白，与上述蛋白相比对细菌细胞表面附着力不强，它能在黏附细胞和细菌之间形成“桥”，这种蛋白作为黏附因子的基因已进行了结构分析，它十分相似于弯曲杆菌（*Campylobacter*）和巴氏德菌（*Pasteurella*）

的毒素因子。这为开发和了解乳杆菌的益生机制提供了一个很好的线索。

国内外也有相关报道，嗜酸乳杆菌 BG2F04、NCFM/F2 经胰蛋白酶、胃蛋白酶处理后黏附力显著下降，但是加氏乳杆菌 LDH 黏附能力没有显著变化（Greene JD, et al., 1994）；嗜酸乳杆菌 LB 经胰蛋白酶和蛋白酶 K 处理后黏附力未见降低（Chauviere G, et al., 1992）。路氏乳杆菌 JCMl081 的 S 层蛋白之后，胰蛋白酶和蛋白酶 K 处理后，其对细胞的黏附力显著下降，路氏乳杆菌 JCM1081 表面的蛋白成分可能参与了其与 HT-29 细胞的黏附。乳杆菌的黏附过程由多种成分参与，其中乳杆菌表面的蛋白类成分可能参与了乳杆菌的黏附，种属不同的菌株甚至同种不同株的菌株参与黏附的蛋白种类亦存在一定的差异（王斌等，2006）。

（2）菌体表面黏附因子——脂磷壁酸和肽聚糖

乳杆菌是革兰氏阳性菌,其细胞壁中含有丰富的脂磷壁酸（lipoteichoic acid, LTA）和肽聚糖。早期的研究发现，对于大多数革兰阳性菌，其细胞壁中的脂磷壁酸在菌体的黏附过程中起很大的作用。LTA 是公认的许多革兰阳性菌表面黏附因子，它介导 A 群链球菌（*Streptococcus*）与上皮细胞表面纤维连接蛋白、B 群链球菌与上皮细胞、腐生葡萄球菌（*Staphylococcus saprophyticus*）与尿道上皮细胞、表皮葡萄球菌（*Staphylococcus epidermidis*）与纤维蛋白、金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）与黏膜细胞之间的黏附。Dominique 研究表明，纯化的 LTA 可有效地抑制乳杆菌与肠上皮细胞 Caco-2 的黏附，LTA 参与了乳杆菌对肠上皮细胞的黏附，LTA 可能先锚定于细菌表面蛋白分子上,然后通过其脂类部分与宿主细胞表面的纤维连接蛋白结合（Granato D, et al., 1999）。

WPG 是一种 PS 和肽聚糖聚合而成的袋状结构，由于 WPG 保持了细胞壁的完整形态，因此其空间位阻作用可能是 WPG 抑制黏附作用较强的原因之一。邓一平等用 ELISA 阻断法研究了双歧杆菌表面分子完整肽聚糖（WPG）、多糖（PS）对猪胃黏膜糖蛋白的黏附作用，结果显示菌体表面的 WPG 起着介导黏附的作用（邓一平等，2000）。许多乳酸菌都能产生细胞外多糖（EPS），可能参与其黏附过程（DeVuyst L, et al., 1999; Henriksson A, et al., 1996）。孙进等通过用高碘酸处理可能降低 L.plantarum Lp6 的黏附性，说明碳水化合物参与了黏附。在另一方面，高碘酸破坏的也可能是细胞表面存在的糖蛋白的糖基部分，或者参与黏附的是细菌细胞表面的蛋白，而这种蛋白就结合在 EPS 上（孙进等，2006）。

3.1.3 黏附受体的研究

除了细菌具有黏附素外，宿主细胞必须具有相对应的黏附素受体，黏附是细菌的黏附素与宿主细胞相应受体之间的特异性结合过程，宿主细胞是否具有相应的受体及受体的类型，决定着细菌能否在特定的部位黏附及定值。宿主细胞表面黏附素受体的类型和数量决定着细胞能否黏附于宿主细胞表面以及黏附位置和数量。黏附素受体一

般位于宿主细胞的细胞膜上，目前有关黏附素膜受体的研究较少，现已发现肠粘膜上皮细胞及粘液中存在着细菌黏附素的受体，并阐明了一些病原菌黏附素受体的化学组成，这些受体多为糖类或糖蛋白（Cohen PS, et al., 1985）。

郑跃杰等用胰蛋白酶和过碘酸钠处理 Lovo 细胞后，发现其与双歧杆菌的黏附明显降低，过碘酸钠能裂解糖的羟基基团间的 C-C 键，可能破坏黏附素受体。证实双歧杆菌黏附素可能识别肠上皮细胞膜上特异的糖蛋白。用各种糖类进行抑制试验的结果进一步表明，双歧杆菌黏附素的受体可能与 D-甘露糖有关（郑跃杰等，1997）。Fujiwara 等研究发现，从双歧杆菌培养上清液中分离出的蛋白质物质成分能抑制 ETEC 对其糖脂结合受体（GA1）的黏附，同时也能抑制其对肠上皮细胞 HCT-8 的黏附且呈剂量依赖效应（Patti JM, et al., 1994），这说明双歧杆菌黏附素的受体可能是一种糖脂。黏附素的受体的成份可能比较复杂,具体的物质类别尚未辨明。目前对乳杆菌的黏附素受体研究较少，有关黏附素-受体相互作用的具体机制还有待更进一步的深入研究。今后的研究应首先确定黏附素受体所属的物质类别、结构,影响因素，受体与黏附素的结合方式，从而为开发更优秀的益生菌。

3.1.4 黏附影响因素的研究

乳酸菌的黏附过程是细菌表面的黏附素和细胞或者粘液中的特异性受体共同完成的，但实际上，黏附的发生不仅与黏附素和黏附受体的特征相关，也与乳酸菌的生理学以及物理化学性质，如周围环境的 pH 值、离子浓度、菌体生长阶段和温度等关系密切。

通常情况下，在一定浓度范围内，乳酸菌黏附的数量随着菌悬液浓度的升高而升高。黏附具有群体效应，菌体只有达到一定的量时，黏附才能牢固（伦永志等，2002）。黏附受生态环境、食物种类、服用药物、粘液和宿主健康状况的影响在一定浓度范围内，黏附随细菌浓度升高而升高，但当浓度低于 10^6 cfu/mL 后，黏附基本消失。因此，黏附的顺利进行需要在菌浓度大于 10^6 cfu/mL 条件下进行。

陈军等人发现，青春双歧（*Bifidobactericum adolescentis*）0926 菌株在不同的生长阶段具有不同的黏附能力。在对不同生长阶段的比较后发现，随着生长，菌体的黏附能力不断提高，在稳定期达到最高值。生长阶段对 B.ado 0926 黏附有影响。细菌的生长条件能影响细菌脂磷壁酸（LTA）和表面蛋白的合成。随着细菌生长的进程 LTA 的合成增加，到静止期合成的 LTA 量最多（Bond D R, et al., 1999），因此静止期菌黏附作用最强，可能与此有关。

一般认为,只有活菌才具有黏附能力，但 Fourniat 等发现,死乳杆菌也具有与活菌相同的黏附能力（Fourniat J, et al., 1992）；伦永志等观察灭活的青春双歧杆菌 DM8504 菌株对人大肠癌细胞系 CCL-229 的黏附时发现,发现灭活的双歧杆菌与活菌均能黏附于肠上皮细胞周围。灭活的双歧杆菌可能具有与活菌相同的生态效应，并且灭活的该

菌株对肠致病性大肠艾希菌（EPEC）黏附有抑制作用。由于死菌本身具有极高的稳定性和安全性，这就为双歧杆菌及其它菌的实际应用提供了又一条全新途径。但目前这一观点尚未被广泛接受，用于临床的微生态制剂基本都为活菌制剂。

相对于多细胞生物而言，细菌对周围环境的适应性比较强，但是只有在最适生长环境中才能达到最佳生长状态。温度是影响菌体生长的一个重要因素，陈军等人研究证明生理温度下青春型双歧杆菌 0926 具有最佳黏附特性。

Dominique 等发现，从小肠中分离的发酵乳杆菌 La1 在体外酸性环境中能够呈现出对 Caco-2 细胞较高的黏附性，虽然 pH 值并不是影响该菌黏附的唯一因素，也不是影响其黏附的主要因素，但是超出 4~7 范围的环境 pH 值都会影响到该菌对人肠细胞样 Caco-2 细胞系的黏附（Granato D, et al., 1999）。pH 值对双歧杆菌黏附影响的试验发现，随着 pH 值的下降，双歧杆菌的黏附数增多，可能由于酸性 pH 值作用于单层细胞，改变了细胞上受体的某些性质，从而增强了双歧杆菌对 IEC 细胞的黏附（陈军等，2002）。

3.2 戊糖乳杆菌体外粘附肠上皮细胞能力实验

3.2.1 材料与方法

3.2.1.1 实验材料

供试菌株和细胞株：戊糖乳杆菌（*Lactobacillus pentose*）Ind1 和 Ind3 由北京林业大学生物院保存提供，嗜酸乳杆菌（*Lactobacillus acidophilus*）NCFM、植物乳杆菌（*Lactobacillus plantarum*）LP115 由上海丹尼斯克中国（投资）有限公司提供。人结肠腺癌细胞株 Caco-2 细胞，由上海中科院细胞库提供。

试剂：

DMEM/HIGH GLUCOSE		美国Hyclone公司
无菌磷酸缓冲液PBS（pH 7.2）		美国Hyclone公司
非必需氨基酸MEM NEAA		美国GIBCO公司
双抗（+10,000Units/mL Penicillin+10,000Ug/mL Streptomycin)		美国GIBCO公司
0.25%Trypsin-EDTA		美国GIBCO公司
牛胆汁粉Ox-bile		Fluka公司
甘油		美国amresco公司
胎牛血清优级（FBS）		杭州四季青
磷酸氢二钾		国药集团
HCL	分析纯	国药集团

NaOH	分析纯	国药集团
胃蛋白酶	543U/mg	国药集团
胰蛋白酶	11800U/mg	国药集团
MRS-Agar、MRS-Bouillon		德国Merck公司
无水乙醇	分析纯	
脱脂奶粉		新西兰

仪器与设备：

MCO-15A二氧化碳培养箱	日本SANYO公司
MLS-3750高压灭菌锅	日本SANYO公司
超低温冰箱	日本SANYO公司
SW-CJ-IFO 超净工作台	苏州安泰空气技术有限公司
水浴锅	德国Memmert公司
D-55122 磁力搅拌仪	德国SCHOTT公司
DKB-600B 电热恒温水槽	上海一恒科学仪器有限公司
BD恒温培养箱	德国Binder公司
ED自然对流烘箱	德国Binder公司
CKX41 倒置显微镜	日本OLYMPUS公司
BX51光学显微镜	日本OLYMPUS公司
EBA20离心机	德国Hettich公司
EM208E51微波炉	日本SANYO公司
超低温冰箱	日本SANYO公司
数显振荡器	德国IKA公司
BS 300S电子天平	赛多利斯科学仪器北京有限公司
普及型PH计（PB-10）	赛多利斯科学仪器北京有限公司

3.2.1.2 *实验方法*

菌株的活化：将真空冷冻干燥保存的实验菌株 Ind1、Ind3、NCFM 和 LP115 接入 10%脱脂乳中活化一代，37ºC 厌氧培养 24h，然后按 3%接种量转接于 MRS-Bouillon 培养基中活化两代，37ºC 厌氧培养 18h，以便菌株活力得到充分恢复。

乳杆菌菌悬液制备：活化后实验菌株 Ind1、Ind3、NCFM 和 LP115，按照 3%的接种量入 MRS-Bouillon 培养基中，37ºC 培养 18h 后，离心（6000 r/min, 20 min）收集细菌分为两组，其中一组经 65ºC 水浴灭活 30min，经过 MRS-Bouillon 37ºC 厌氧培养至一周无细菌生长，作为灭活组；另一组不处理作为活菌组。无菌磷酸缓冲液 PBS（pH 7.2）离心洗涤，将菌体沉淀悬浮于 DMEM 培养液调菌数约为 1×10^8 cfu/mL（用

于黏附实验）；菌体悬浮于无菌的生理盐水中调整菌浓度为 5×10^9 cfu/mL（用于耐受性实验）。

乳杆菌耐受性实验：（1）耐胆盐实验方法：将 1mL Ind1 和 Ind3 菌悬液菌数约为 5×10^9 cfu/mL，加入 9 mL 的无菌牛胆盐 MRS-Bouillon（浓度分别为 0.00%、0.10%、0.15%、0.20%、0.25%、0.30%、0.35%、0.40%、0.45%、0.50%）中，制得不同浓度牛胆盐的菌悬液（含菌量约为 5×10^8 cfu/mL），置于 37ºC 恒温培养箱中，培养 4h 后，分别取样梯度稀释活菌计数。（2）人工胃液耐受实验：体外模拟乳杆菌通过胃和小肠，以其通过之后存活数量评价该乳杆菌耐受性。将 Ind1 和 Ind3 孵育在制备好的无菌人工胃液（5×10^8 cfu/mL），振荡均匀后，置于 37ºC 恒温培养箱中，在 1h、2h、3h、4h，分别取 1mL 培养液梯度稀释活菌计数。人工胃液的制备：取质量分数为 10%盐酸 16.4mL 加去离子水稀释，使 pH 分别为 1.5、2.0、2.5、3.0、3.5，添加胃蛋白酶（1g/100mL），充分溶解后，用 0.22μm 的微孔过滤除菌待用。胃蛋白酶（543U/mg）。（3）人工肠液耐受实验：将 1mL Ind1、Ind3 菌悬液（5×10^9 cfu/mL），分别接种于 9mL 无菌人工肠液（pH 6.8）中，37ºC 恒温培养 4 h 后，取样稀释，活菌计数。人工肠液制备：称取 KH_2PO_4 6.8g，加去离子水 500mL 溶解，以质量分数为 0.4%的 NaOH 溶液调节 pH 为 6.8，加水至 1000mL，每 100mL 溶液中添加 1g 的胰蛋白酶，充分溶解后，用 0.22 μm 的微孔过滤除菌待用，胰蛋白酶（11800 U/mg）。

Caco-2 上皮细胞培养及细胞模型的建立：

（1）细胞培养液的制备：①细胞培养用液：DMEM/HIGH GLUCOSE（含 4.00mML-谷氨酰胺，4500mg/L 葡萄糖）Hyclone，含青霉素（*penicillin*）10,000Units/mL-链霉素（*streptomycin*）10,000Units/mL，1%非必需氨基酸 MEM NEAA，20%胎牛血清优级（*Fetal bovine serum*, FBS)，以上试剂均 0.1 微米无菌过滤，4ºC 保存。②细胞消化液（胰酶-EDTA 消化液）：0.25% Trypsin-EDTA 0.1 微米无菌过滤（GIBCO），在使用前分装小瓶，-20ºC 保存备用。③消化终止液：DMEM/HIGH GLUCOSE（含 4.00mML-谷氨酰胺，4500mg/L 葡萄糖）含 20%的胎牛血清 FBS，4ºC 保存。④细胞冻存液：DMEM/HIGH GLUCOSE（含 4.00mML-谷氨酰胺，4500mg/L 葡萄糖）含 30%的生物级甘油，4ºC 保存。

（2）肠上皮细胞培养：①Caco-2 细胞置于 $25cm^2$ 的培养瓶中，加入含有 20%胎牛血清、1%非必需氨基酸，双抗（青霉、链霉 100 U/mL）的 DMEM 高糖培养液中，于 37ºC，5% CO_2 培养箱中培养，1~2d 换一次培养液。②传代培养：细胞密度达 80%左右时，进行传代。吸出旧的培养液，用 PBS 缓冲液冲洗 1~2 次，加入 2mL 的胰蛋白酶消化液（使用 $25cm^2$ 培养瓶时），消化液的量以盖住细胞为最好，最佳的消化温度为 37ºC。倒置显微镜下观察细胞，当细胞质回缩，细胞之间不再连成片时，此时细胞消化适度可以终止消化。向培养瓶中加入消化终止液，吹打分散细胞，使分散成

单个细胞。将细胞悬液吸入 10mL 离心管中，1000 r/min，6~8 min 弃上清，加入新鲜培养液，用滴管轻轻吹打使其分散成单个细胞，倒置显微镜下观察细胞量，传代细胞的密度应该不低于 5×10^5 个/mL。将调整好浓度的细胞悬液分装于 $25cm^2$ 培养瓶中，每瓶约 7~8 mL。用酒精棉球擦拭培养瓶，适当旋松瓶盖，置于 37ºC，5%CO_2 培养箱中继续培养，传代细胞 2 小时后开始黏附在瓶壁上，当生长细胞铺展面积占培养瓶底面积 50%以上为++，75%为+++。大约一周传代一次。待细胞生长 15～20d 之后可接种于 24 孔板中用于黏附实验。③细胞冻存与复苏：将处于对数生长期细胞（5×10^7 个/mL）转入含 20%甘油的 DMEM 培养液中，细胞冻存温度程序：4ºC，40 min→ -20ºC，30 ~ 60 min→ -80ºC 冻存；从-80ºC 超低温冰箱中取出冻存管，迅速投入到已经预热的水浴锅中（37ºC），不断的晃动，使其迅速融化。

（3）细胞模型的建立：将细胞接种于 24 孔板中进行培养：用 DMEM 培养液（含 20%胎牛血清、1%非必需氨基酸，双抗青霉-链霉 100U/mL）调整细胞浓度为 5×10^5 个/mL，接种到含有盖玻片的 24 孔板中，每孔 2mL，置于 37ºC，5%的 CO_2 培养箱中培养，一天更换一次培养液。待 Caco-2 细胞在培养板底部形成完整的单层类似上皮样细胞的膜状结构时用于黏附实验。

3.2.1.3 黏附实验

细菌黏附 Caco-2 细胞在 24 孔培养板中进行，待 24 孔板中 Caco-2 细胞密度达到 80%以上，用无菌的不含 Ca^{2+}、Mg^{2+}离子的 PBS（pH 7.2）洗涤 2~3 次，每孔加入 DMEM 培养液悬浮的乳杆菌悬液 2mL，置于 37ºC，5%CO2 培养箱中 2h，用灭菌 PBS 洗涤 2 次除去未黏附的细菌，甲醇固定 20min，取出盖玻片，革兰氏染色，油镜下计算 20 个随机视野下黏附到细胞上的细菌数，黏附指数以 100 个细胞上黏附的细菌数表示，每个标本平行 3 孔。

两种乳杆菌黏附动力学实验方法：

（1）两种乳杆菌黏附 Caco-2 细胞的时间曲线：将戊糖乳杆菌 Ind1 和 Ind3 厌氧培养 18h，离心收集菌体，DMEM 培养液重悬，调整菌浓度为 1×10^8 cfu/mL，加入已经长至单层细胞的 24 孔板中，置于 37ºC，5% CO2 培养箱中，分别培养 1/2h、1h、2h、3h、4h、5h、6h 后，取出盖玻片，油镜下计数细胞黏附细菌个数。

（2）两种乳杆菌黏附 Caco-2 细胞浓度曲线：将戊糖乳杆菌 Ind1 和 Ind3 厌氧培养 26h，离心收集菌体，DMEM 培养液重悬乳杆菌，分别调整菌浓度为 1×10^5 cfu/mL、1×10^6 cfu /mL、1×10^7 cfu /mL、1×10^8 cfu /mL、1×10^9 cfu /mL，加入已经长至单层细胞的 24 孔板中，置于 37ºC，5%CO2 培养箱中 2h 后，革兰氏染色计数每 100 个细胞黏附细菌个数。

四种乳杆菌黏附 Caco-2 细胞对比实验：将戊糖乳杆菌 Ind1 和 Ind3，嗜酸乳杆菌 NCFM，植物乳杆菌 LP115 接种于 MRS 液体培养基中，37ºC 厌氧培养 14h 离心收集

细菌，用 DMEM 培养液重悬细菌，调整菌浓度为 1×10^8 cfu/mL，置于 37ºC，5% CO_2 培养箱中，培养 2h 革兰氏染色，计数细胞黏附细菌个数。每组实验重复 3 次。

3.2.2 结果与分析

3.2.2.1 耐受性研究

（1）人工胃液耐受性：

表 3.2 两种乳杆菌对人工胃液耐受性实验结果（lg cfu/mL）

Table 3.2 Artificial gastric juice tolerance results of two strains

Strain	pH	0 h	2 h	3 h	4 h
Ind1	3.5		8.13±0.11	8.05±0.12	8.00±0.07
	3.0	8.43±0.15	8.00±0.09	7.95±0.05*	7.93±0.07*
	2.5		7.99±0.07	7.88±0.09*	7.71±0.12*
	2.0		7.92±0.11*	7.82±0.08*	7.53±0.14*
	1.5		4.05±0.10**	-	-
Ind3	3.5		8.08±0.08	8.02±0.07	7.93±0.04
	3.0	8.48±0.16	8.00±0.24	7.83±0.15*	7.73±0.14*
	2.5		7.64±0.12*	7.61±0.13*	7.56±0.14*
	2.0		7.41±0.08*	6.84±0.12**	6.58±0.16**
	1.5		-	-	-

注：表中实验数据采用平均值±标准差表示，均为对数值。与处理前 0h 相比,*：P<0.05 表示差异显著，**：P<0.01 表示差异极显著。

Note: Values are expressed as means ± standard deviations of at least three independent experiments. *: P<0.05, **: P<0.01; compared with 0h.

正常成人胃液 pH 值的大小根据饮食结构不同波动很大，通常 pH 值为 3.0 左右；而食品通过胃的时间相对较短一般为 1~2h，胃排空时间为 4~6h（姚泰等．1987）。人

在空腹时胃里的 pH 值为 2 左右，对微生物的杀灭力很强。益生菌必须通过胃到达肠道之后才能发挥其益生功效，耐酸能力是益生菌的筛选重要指标之一。本实验采用体外模拟乳杆菌通过人工胃液，处理后乳杆菌的存活数量来评价该菌株的耐酸能力。将戊糖乳杆菌（*Lactobacillus pentosus*）Ind1 和 Ind3 孵育在人工胃液中（pH 为 1.5，2.0，2.5，3.0，3.5），37ºC 恒温培养 1h、2h、3h、4h 后取样梯度稀释进行活菌计数，结果见表 3.2。

pH 2.0 的人工胃液中培养 4h 后菌株 Ind1 和 Ind3 仍然具有很高的存活率，分别为 85%和 75%。菌株 Ind3 在人工胃液 pH 为 2.0 中培养 3 h，活菌数量与处理前相比显著减少（P<0.01），其活菌数对数值下降到 6.84 Lg cfu mL^{-1}；pH 为 1.5 条件下处理 Ind3，无活菌检出。菌株 Ind1 在 pH 为 1.5 条件下处理 2h，其菌株存活率仅为 49%，且活菌数量与处理前相比差异极显著；菌株 Ind1 在 pH 为 1.5 条件下处理 3h 后几乎无活菌检出。

实验结果表明：pH 1.5 的人工胃液处理后菌株 Ind1、Ind3 均不能存活；pH 2.0 的人工胃液处理，两株菌均可以存活，存活数量随着处理时间的延长而减少，但 4 h 后仍然具有很高的存活率，分别为 85%和 75%；pH 2.5 的人工胃液下，2 株戊糖乳杆菌乳杆菌的存活率均在 90%以上。

（2）人工肠液耐受性：

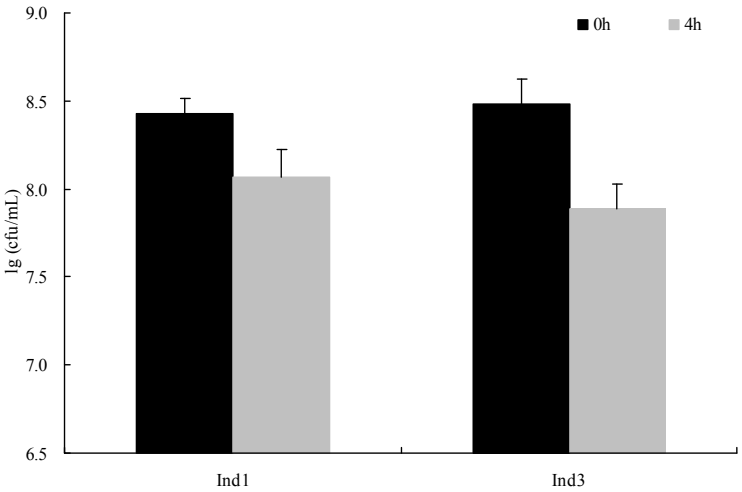


图 3.1 乳杆菌对人工肠液（pH 6.8）耐受性实验结果

乳杆菌采用 MRS-agar 进行平板计数，图中以活菌数对数值表示，与处理前 0h 相比,*：P<0.05 表示差异显著，所有实验均重复 3 次，实验数据采用平均值+标准差表示。

Figure3.1 Lactobacillus survival after suspension in simulated intestinal juice (pH 6.8) for 4 h. Viable cell counts were determined followed by plating onto MRS-agar. *: P<0.05 compared with the control (0 h). Standard deviations of triplicate results are represented by error bars. Each value is the mean of values from three experiments.

乳酸菌到达肠道内必须具有能够抵抗肠道环境的能力，才能在肠道中定植，对宿主起到保健作用，否则很难说其具有益生菌功效。乳酸菌发挥生理功能特性的活菌数临界值为10^6 cfu/mL（Kumann JA, et al., 1988）。本实验通过体外模拟肠道环境研究2株戊糖乳杆菌Ind1和Ind3对人工肠液耐受性。将菌株Ind1和Ind3用pH=6.8的人工肠液在37ºC的恒温培养箱中处理4h，取样稀释活菌计数。

结果见图3.1：在pH 6.8的人工肠液中37ºC处理4h后，菌株Ind3活菌数量与处理前相比显著减少（P<0.05），其活菌数对数值下降到7.90 Lgcfu mL^{-1}；而菌株Ind1无明显差异，菌株Ind1和Ind3经人工肠液处理后存活率均在90%以上。因此，2株戊糖乳杆菌对人工肠液有较好的抵抗能力，其中菌株Ind1对人工肠液的耐受性稍强于菌株Ind3。

（3）胆盐耐受性：

益生菌要黏附定植于肠道中，必须对胆盐有一定的耐受性，并且耐受性越高表明菌株在肠道中的存活能力越强。人体肠道胆盐含量在0.03%~0.3%范围之内（张培业，1997）。本实验研究了戊糖乳杆菌Ind1和Ind3对不同浓度牛胆盐的耐受性。将菌株Ind1和Ind3悬浮于无菌牛胆盐MRS-Bouillon中，浓度为0.00%~0.50%，37º C恒温培养4h后，分别取样梯度稀释进行活菌计数并绘制胆盐耐受曲线。

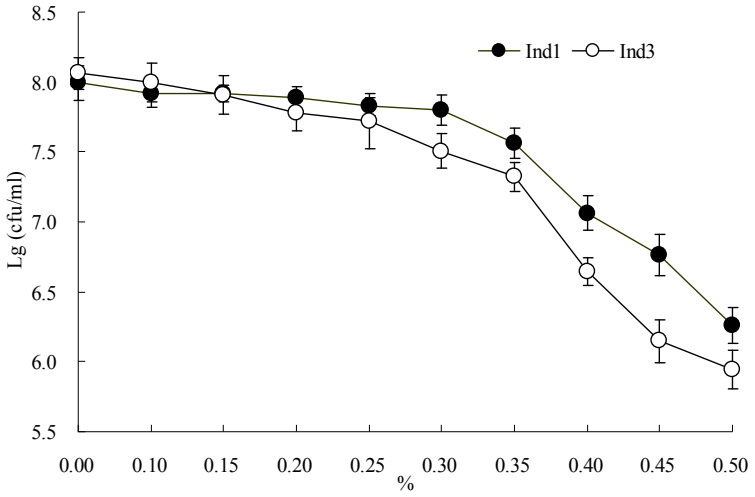


图 3.2 乳杆菌对不同浓度胆盐的耐受性

Figure 3.2 The ability of Lactobacillus pentosus to grow in different concentration bile salts (0.00% ~ 0.50%) for 4h. Ind1 (black circles) and Ind3 (white circles).*: P<0.05 compared with the control (0.00%); **: P<0.01 Vertical lines on the bars represent standard deviations.

图 3.2 显示了 2 株戊糖乳杆菌在不同浓度牛胆盐中的生长状况，可以看出，戊糖乳杆菌株 Ind1 和 Ind3 均具有很强的耐胆盐能力，随着胆盐浓度的升高其菌株存活率下降。菌株 Ind1 耐胆盐能力稍强于 Ind3，但差异不显著。菌株 Ind1 和 Ind3 在胆盐浓

度为 0.30%条件下培养 4h，菌株的活菌数均低于原培养液（0.00%）中活菌数，菌株 Ind3 差异显著（P<0.05）。在浓度为 0.40%胆盐培养基中培养 4h，菌株 Ind1 和 Ind3 存活数量与对照（0.00%）相比显著下降（P<0.01），但其存活率仍然很高，分别为 88%和 82%，活菌对数值下降均小于 2。Ind1 悬浮于 0.50%的胆盐-MRS 液体培养基中 4h 后，活菌数对数值与原培养液活菌数对数值之差仍然小于 2，该菌的存活率仍然达到 80%以上。由此表明，2 株戊糖乳杆菌 Ind1 和 Ind3 均有较强的抗牛胆汁盐能力。

3.2.2.2 黏附动力学研究

Caco-2 单层细胞实验模型显微观察：体外细胞模型人肠上皮细胞系 Caco-2 细胞，已广泛用于评估益生菌黏附特性（Blum, S, et al., 2000）。Caco-2 细胞与人肠上皮细胞在形态学上相似，具有相同的细胞极性和紧密连接。Caco-2 细胞形态：倒置显微镜中观察到单层细胞不对称连接紧密。细胞密度达到 75%以上可用于实验。如图 3.3-3.4：

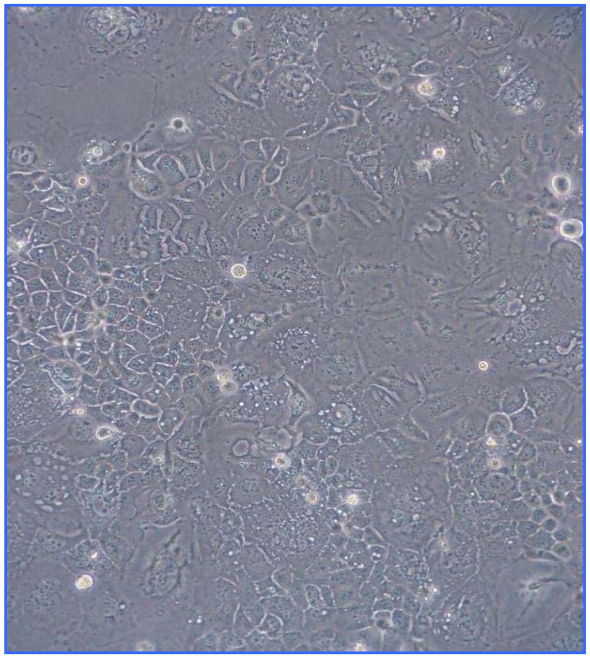


图 3.3 Caco-2 单层细胞显微照片

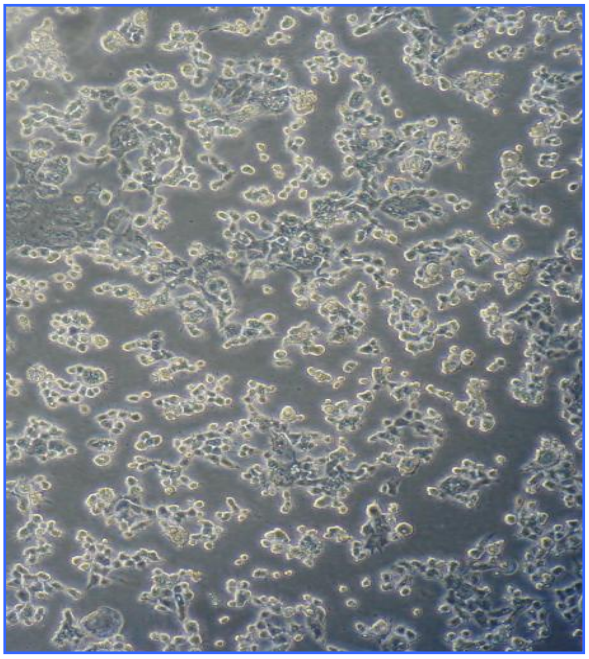


图 3.4 Caco-2 细胞消化显微照片

(放大倍数 2000)

Fig. 3.3-3.4 The microscope photo of Caco-2 cell

戊糖乳杆菌黏附时间曲线：乳杆菌的黏附数量随着与 Caco-2 细胞作用时间的延长而增加，乳杆菌与 Caco-2 细胞共同培养 0~3h 间戊糖乳杆菌 Ind1 和 Ind3 对 Caco-2 细胞的黏附数量迅速增加，3h 之后黏附增加缓慢，以后逐渐趋于稳定，表明戊糖乳杆菌黏附 Caco-2 细胞的能力培养时间密切相关。戊糖乳杆菌 Ind3 对 Caco-2 细胞黏附指数（830±20/100cell, 2h）大于戊糖乳杆菌 Ind1 的黏附指数（431±29/100cell, 2h）。

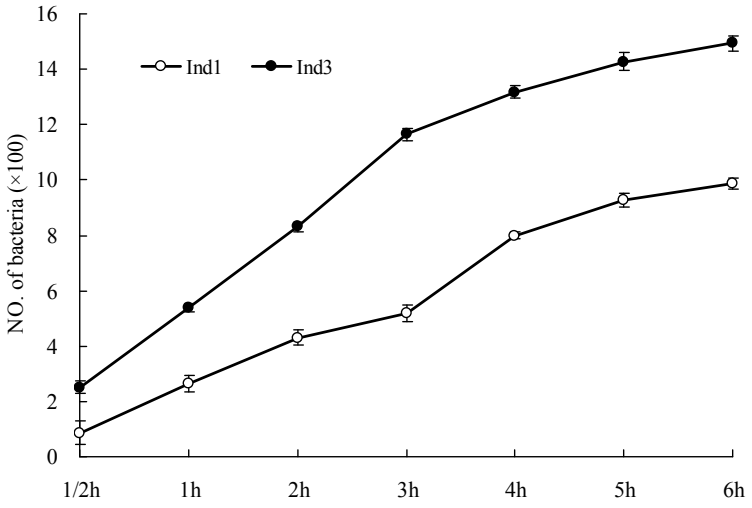


图 3.5 乳杆菌 Ind1 和 Ind3 黏附时间曲线

Fig 3.5 Time curve of Lactobacillus pentosus adhesion

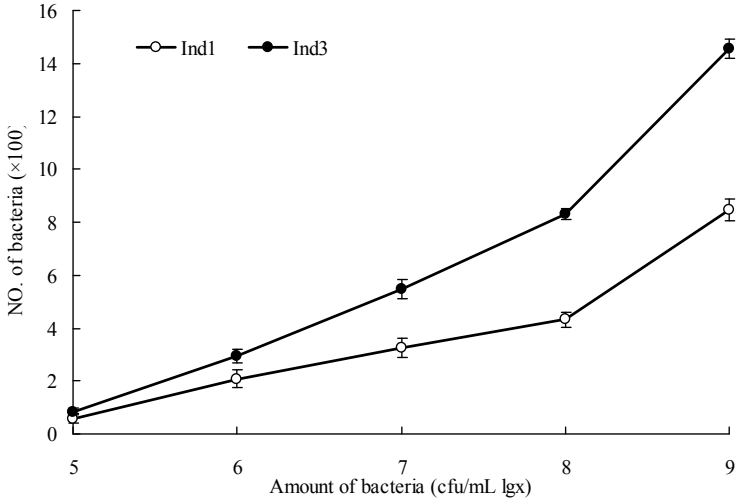


图 3.6 乳杆菌黏附浓度曲线

Fig 3.6 Concentration curve of *Lactobacillus pentosus* adhesion

戊糖乳杆菌黏附菌体浓度曲线：戊糖乳杆菌黏附 Caco-2 细胞的菌体浓度依赖曲线（如图 3.6 所示）,乳杆菌菌体浓度低时(10^5~10^6 cfu/mL)，黏附率较低，当其浓度为 10^6~10^9 cfu/mL 时，黏附率迅速升高。乳杆菌黏附的数量随着菌悬液浓度的升高而升高，菌体只有达到一定的量时，黏附才能牢固。戊糖乳杆菌乳杆菌 Ind1 和 Ind3 黏附指数随菌体浓度升高而增大，但当浓度低于 10^6 个/mL 后，黏附细菌数很少；当浓度为 10^5 cfu/mL 时，菌株 Ind1 和 Ind3 的黏附指数分别为（59±18）/100cell，（84±14）/100cell。因此，黏附的顺利进行需要在乳杆菌浓度大于 10^6 cfu/mL 条件下进行，以下实验采取菌浓度为 10^8 cfu/mL。

戊糖乳杆菌Ind1和Ind3黏附Caco-2细胞的能力与菌体浓度和培养时间密切相关，选择最佳的黏附实验条件：菌体细胞浓度为1×10^8 cfu/mL，黏附时间2h。

3.2.2.3 乳杆菌黏附能力比较

本实验对从传统新疆奶酪筛选出的2株戊糖乳杆菌Ind1和Ind3，进行了黏附性评价。采用人结肠腺癌细胞株Caco-2细胞做为体外模型，与Danisco商业益生菌株嗜酸乳杆菌NCFM、植物乳杆菌LP115进行了黏附对比实验。四种乳杆菌对Caco-2细胞的黏附指数结果见表3.3：

表 3.3 四种乳杆菌对 Caco-2 细胞的体外黏附实验结果

Table 3.3 Adhesion of four strains of probiotic bacteria to Caco-2 cells in vitro

菌株	黏附指数（NO. of adhesion）
L. acidophilus NCFM	873.0±44.86
L. plantarum LP115	934.2±41.35
L. pentosus Ind1	431.0±28.16*#
L. pentosus Ind3	830.5±19.46

注：黏附指数为 100 个细胞上黏附的细菌数，实验数据均采用平均值±标准差表示。与 NCFM 相比，*：P<0.05 表示差异显著，**：P<0.01 表示差异极显著。与 LP115 相比，#：P<0.05 表示差异显著，##：P<0.01 表示差异极显著

Note: Each adhesion assay was conducted in duplicate with cells from three successive passages. Adhesion assays were monitored after 2 h of incubation. The table presents mean numbers ± standard deviation of bacteria adhering per 100 epithelial cells. *: P<0.05, **: P<0.01 compared with NCFM; #: P<0.05, ##: P<0.01 compared with LP115.

由表3.3知，检测的4株乳杆菌中，黏附指数（每100个细胞上黏附的细菌数）有所差异，在400~1000之间。其中植物乳杆菌LP115对Caco-2细胞的黏附性能最好，黏附指数达到934.2±41.35；不同菌株的黏附性有差异，如菌株NCFM和Ind3黏附指数均达到800以上，分别为873.0±44.86，830.5±19.46；菌株Ind1的黏附性较差，黏附指数为431.0±28.16。戊糖乳杆菌Ind3和Ind3的黏附指数，均小于商业益生菌株NCFM、LP115,其中Ind1差异显著（P<0.05）。通过与公认商业益生菌株黏附对比实验，可知戊糖乳杆菌Ind3和Ind3对肠上皮细胞有较好的黏附性。

图3.7反映了四株乳杆菌黏附细胞的情况，每个细胞上均黏附有菌体，且有些乳杆菌间有交连现象。

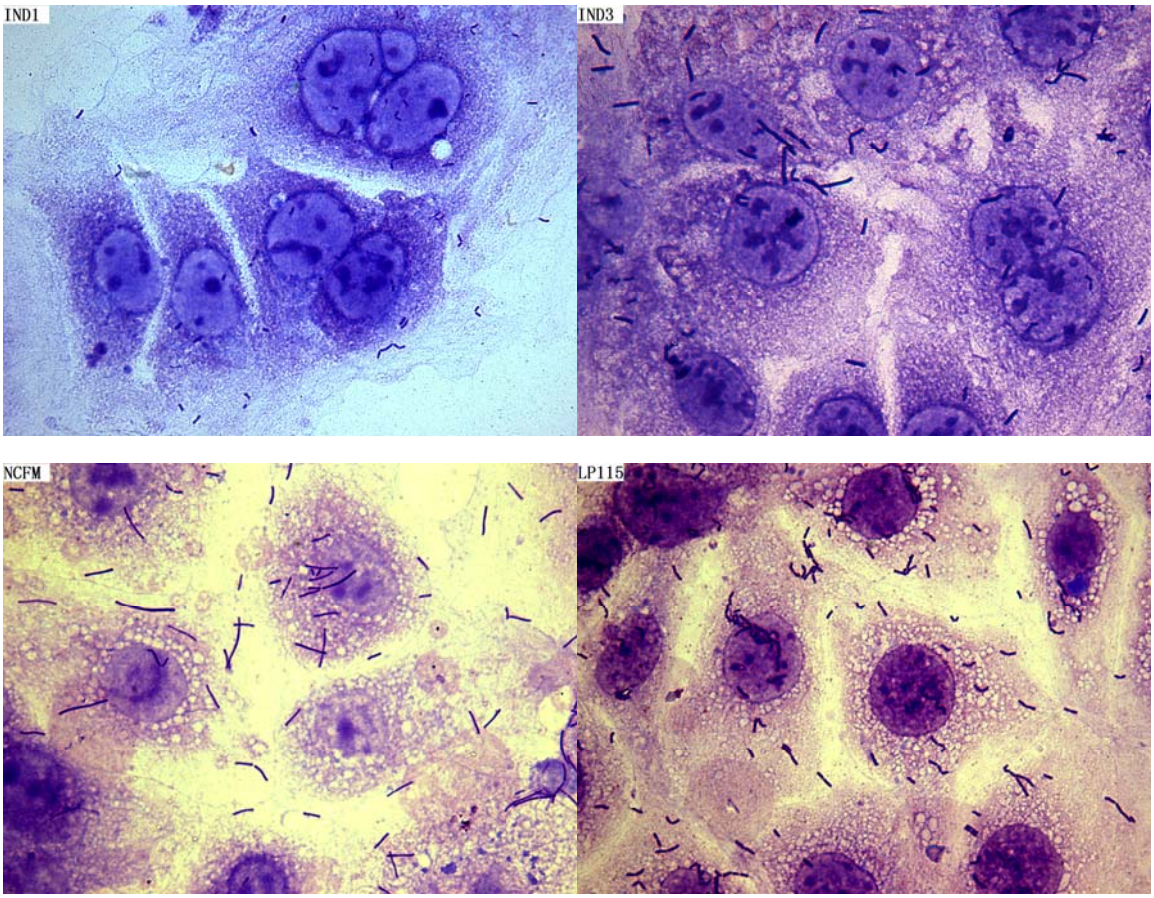


图 3.7 几种乳杆菌黏附于 Caco-2 细胞的革兰氏染色图(放大倍数 2000)

Fig.3.7 Adhesion of different Lactobacillus strains to Caco-2 cell monolayer observed using light microscopy after Gram-staining. (magnification 2000×).

3.2.3 本章小结

（1）体外实验结果显示，戊糖乳杆菌乳杆菌Ind1和Ind3对人工胃液、人工肠液均具有良好的耐受性。人工胃液pH值对其存活率有较大的影响，用pH 1.5的人工胃液处理，菌株Ind1和Ind3均不能存活；pH 2.0条件下两株菌存活率随着处理时间的延长而降低，但4h后仍然具有很高的存活率，分别为85%和75%；pH 2.5的人工胃液对两株乳杆菌几乎没有影响存活率都在90%以上；人工肠液对乳杆菌影响不大，存活率均在90%以上，pH 6.8的人工肠液37ºC处理4h后，菌株Ind3活菌数量显著减少；而菌株Ind1无明显差异。菌株Ind1和Ind3对人工肠胃液都具有较好的耐受性，且菌株Ind1耐受性稍强于菌株Ind3。

（2）戊糖乳杆菌乳杆菌 Ind1 和 Ind3 对不同浓度牛胆盐均有很强的耐受性，菌株 Ind1 的耐受性略强于 Ind3，但差异不显著。在 0.40%胆盐处理 4h，菌株 Ind1 和 Ind3 存活率很高，分别为 88%和 82%，活菌数下降均低于 2 个对数值；在 0.50%胆盐浓度处理 4h，Ind1 存活率仍然达到 80%以上。

（3）以人结肠腺癌细胞 Caco-2 细胞为体外实验模型的黏附动力学实验显示，2 株戊糖乳杆菌黏附 Caco-2 细胞的能力与菌体浓度和培养时间密切相关，随着作用时间的延长乳杆菌细胞的黏附数量增加；乳杆菌菌体浓度低于 10^6 cfu/ml，黏附指数很低，最佳的黏附实验条件是：菌体细胞浓度为 1×10^8 cfu/mL，黏附时间 2h。

（4）与商业益生菌株进行黏附对比实验结果显示，戊糖乳杆菌 Ind3 和 Ind3 的黏附指数均小于商业益生菌株嗜酸乳杆菌 NCFM 和植物乳杆菌 LP115，其中菌株 Ind1 差异显著。实验菌株 LP115、NCFM、Ind3 黏附指数均达到 800 个以上，分别为 934.2±41.35、873.0±44.86、830.5±19.46；菌株 Ind1 的黏附性较差，黏附指数为 431.0±28.16。

4. 戊糖乳杆菌体外黏附影响因素及黏附机制的研究

黏附是衡量乳杆菌发挥生理功能的重要指标，因此，筛选与肠道粘附因子相结合的特异高粘附性乳酸菌菌种，探讨有关其黏附特点和黏附机制已成为研究益生菌的重点之一。本节研究采用人结肠腺癌上皮细胞 Caco-2 细胞为黏附模型，考察 2 株戊糖乳杆菌 Ind1 和 Ind3 的黏附特点，得到影响黏附率的主要因素：生长阶段、pH 值、温度、乳杆菌存活状态；探讨两株乳杆菌的体外黏附机制，包括乳杆菌代谢产物、表面蛋白成分和菌体外表面 S 层蛋白对乳杆菌黏附的影响。

4.1 材料与方法

4.1.1 实验材料

供试菌株和细胞株：（1）戊糖乳杆菌（*Lactobacillus pentose*）Ind1 和 Ind3，由北京林业大学生物院保存提供。（2）嗜酸乳杆菌（*Lactobacillus acidophilus*）NCFM、植物乳杆菌（*Lactobacillus plantarum*）LP115 由上海丹尼斯克中国（投资）有限公司提供。（3）人结肠腺癌细胞株 Caco-2 细胞，由上海中科院细胞库提供。

培养基：乳杆菌培养基 MRS-Bouillon（MERK, Germany），121℃灭菌 20min。细胞培养基 DMEM 为美国 GIBCO 公司产品。

细胞培养用液：DMEM/HIGH GLUCOSE（含 4.00mML-谷氨酰胺，4500mg/L 葡萄糖），青霉素（penicillin）10,000Units/mL-链霉素（streptomycin）10,000 Units/mL，1%非必需氨基酸 MEM NEAA，20%胎牛血清优级（Fetal bovine serum，FBS)，以上试剂均 0.1 微米无菌过滤

主要试剂：

DMEM/HIGH GLUCOSE		美国 Hyclone 公司
非必需氨基酸MEM NEAA		美国GIBCO公司
双抗（+10,000Units/mL Penicillin+10,000Ug/mL Streptomycin)		美国GIBCO公司
胎牛血清优级（FBS）		杭州四季青
0.25%Trypsin-EDTA		美国GIBCO公司
胰蛋白酶	酶活力11800U/mg	国药集团
胃蛋白酶	酶活力453U/mg	国药集团

蛋白酶K	美国amresco公司
氯化锂	国药集团
MRS-Agar、MRS-Bouillon	德国Merck公司

设备：

MCO-15A二氧化碳培养箱	日本SANYO公司
MLS-3750高压灭菌锅	日本SANYO公司
超低温冰箱	日本SANYO公司
SW-CJ-IFO 超净工作台	苏州安泰空气技术有限公司
水浴锅	德国Memmert公司
D-55122 磁力搅拌仪	德国SCHOTT公司
DKB-600B 电热恒温水槽	上海一恒科学仪器有限公司
BD恒温培养箱	德国Binder公司
ED自然对流烘箱	德国Binder公司
ED自然对流烘箱	德国Binder公司
CKX41 倒置显微镜	日本OLYMPUS公司
BX51光学显微镜	日本OLYMPUS公司
EBA20离心机	德国Hettich公司
EM208E51微波炉	日本SANYO公司
超低温冰箱	日本SANYO公司
数显振荡器	德国IKA公司
BS 300S电子天平	赛多利斯科学仪器北京有限公司
普及型PH计（PB-10）	赛多利斯科学仪器北京有限公司

4.1.2 实验方法

乳杆菌生长特性：

（1）实验菌株以 1%的接种量接入 200mL 的 MRS-Bouillon 中，37ºC 恒温厌氧培养 4h、6h、8h、10h、12h、14h、16h、18h、20h、22h、24h、26h 后取出，放入 4ºC 冰箱，倾注平板测定活菌数，并绘制曲线。

（2）实验菌株以 1%的接种量接入 200mL 的 MRS-Bouillon 中 37ºC 恒温厌氧培养 26h，使用 CINAC 发酵监控仪得到戊糖乳杆菌 Ind1 和 Ind3 pH 变化曲线。

两种乳杆菌黏附影响因素实验方法：

（1）生长阶段对乳杆菌黏附肠上皮细胞的影响：将戊糖乳杆菌 Ind1、Ind3 厌氧

培养 8h、18h、26h 后，离心收集菌体，用 DMEM 培养液重悬乳杆菌，调整菌浓度为 1×10^8 cfu/mL，取 2mL 加入已经长成单层细胞的 24 孔板中，置于 37ºC，5%CO2 培养箱中，培养 2h 后革兰氏染色，计数每 100 细胞黏附细菌个数。

（2）pH 值对 Ind1、Ind3 黏附肠上皮细胞的影响：DMEM 重悬 Ind1、IND3 调菌浓度为 1×10^8 cfu/mL，用过滤除菌的 2mol/L HCl 溶液调菌悬液 pH 分别为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 与 Caco-2 细胞共养 2h，计数细胞黏附细菌个数。

（3）温度对菌株 Ind1 和 Ind3 黏附肠上皮细胞的影响：分别在 4ºC、37ºC、45ºC 温度条件下进行黏附实验，乳杆菌浓度为 1×10^8 cfu/mL，黏附 2h 后，计数细胞黏附细菌个数。

（4）乳杆菌 Ind1 和 Ind3 活力对黏附肠上皮细胞的影响：将已经调好菌浓度的灭活组和活菌组 Ind1 和 Ind3（1×10^8 cfu/mL），取 2mL 入 Caco-2 细胞单层细胞 24 孔培养板中，置于 37°C，5%CO2 培养箱中 2h，计数乳杆菌黏附率。

戊糖乳杆菌体外黏附机制：

（1）戊糖乳杆菌乳杆菌 Ind1 和 Ind3 代谢产物对 Caco-2 细胞黏附影响：分别用新鲜制备培养基、耗尽培养基上清重悬乳杆菌，调菌浓度为 1×10^8 cfu/mL，向 Caco-2 单层细胞 24 孔培养板中每孔注入 2ml 菌悬液，37°C，5%CO2 培养箱中 2h，检测受试菌株对细胞的黏附能力。耗尽上清液的制备：将活化好的菌株 Ind1 和 Ind3，按 3% 接种于 MRS-Bouillon 中，37°C 厌氧培养 48h 后，离心收集收集上清液；耗尽上清液经 100°C，10min 处理，重悬乳杆菌进行黏附实验，以未经处理的耗尽上清液为对照组；耗尽上清液分别经 1mg/ml、3mg/ml、5mg/ml 胰蛋白酶处理，重悬乳杆菌后进行黏附实验，以未经处理的耗尽上清液为对照组。

（2）胰蛋白酶处理菌体对黏附的影响：离心（6000r/min, 15min）收集乳杆菌 Ind1 和 Ind3，用 PBS 洗 2 次，分别用 2.5mg/mL 的胰蛋白酶，37°C 处理 60min，用热灭活的胎牛血清终止消化。再次用 PBS 洗 2~3 次，离心收集菌体，用 DMEM 重悬菌体，调菌浓度 1×10^8 cfu/mL，用未处理的菌体作为空白对照组，进行黏附实验。

（3）用蛋白酶 K 处理菌体对黏附的影响：将乳杆菌菌体分别用 2.5mg/mL 的蛋白酶 K，37°C 处理 60min，用热灭活的胎牛血清终止消化。再进行黏附实验方法同上。

（4）S-层蛋白对黏附的影响：离心（6000r/min, 15min）收集乳杆菌 Ind1、Ind3，用 PBS 洗 2 次，分别用 5mol/L 氯化锂和 5mol/L 盐酸胍重悬菌体，4°C 处理 60min，后将菌悬液离心，1200r/min 15min，收集菌体，用 PBS 洗涤 1~2 次，DMEM 重悬乳杆菌，调菌浓度（1×10^8 cfu/mL）进行黏附实验。

4.2 结果与分析

4.2.1 菌体生长曲线的测定

活化后的两菌株 Ind1 和 Ind3 以 1%接种量接入 200mL 的 MRS 液体培养基中，37°C 培养，以活菌数对数值和 pH 值对时间作图得到两株菌的生长曲线和酸度变化曲线，见图 4.1 和图 4.2 所示：

由图 4.1 可看出，菌株 Ind1 和 Ind3 在 MRS 液体培养基中生长旺盛，活菌计数生长曲线显示培养 8h 左右 2 株菌 Ind1 和 Ind3 在进入对数生长期；在 20h 后进入稳定期。因此，将供试菌种活力得到充分恢复后，两菌株 Ind1 和 Ind3 采用 MRS 液体培养基 37°C 培养 18h 后用于实验。由图 4.2 知，乳杆菌 Ind3 的产酸能力较强，24h 时发酵液 pH 在 4.0 左右；菌株 Ind1 的 pH 为 4.6 左右。

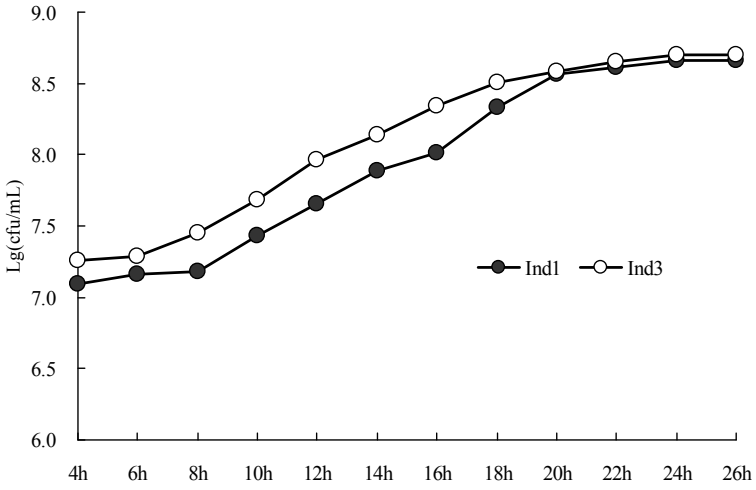


图 4.1 Ind1 和 Ind3 生长曲线

Fig.4.1 Growth Curve of Ind1 and Ind3

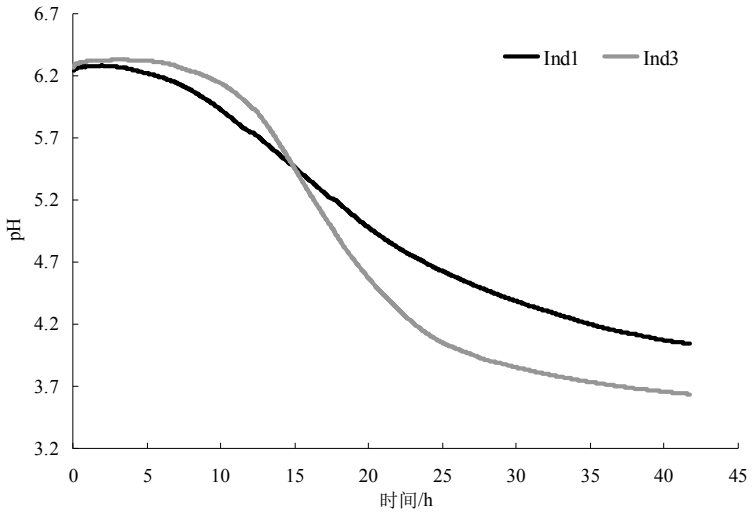


图 4.2 Ind1 和 Ind3 的 pH 变化

Fig.4.2 pH changed of Ind1 and Ind3

4.2.2 两种乳杆菌黏附影响因素的研究

生长阶段对乳杆菌黏附肠上皮细胞的影响：选择延滞期（8h）、对数期(18h)、稳定期（26h）的实验乳杆菌株分别与 Caco-2 细胞 37°C 培养 2h 后革兰氏染色，计数每 100 细胞黏附细菌个数。培养 8h 的乳杆菌与 18h 的相比，黏附数略有增加，26h 的乳杆菌黏附能力显著增加（P<0.01）此时菌株 Ind1、Ind3 的黏附指数分别为：537±27、931±20。菌株的不同生长阶段黏附率见表 4.1 所示。

表 4.1 生长阶段对粘附的影响

Table 4.1 Effect of growth stage on Lactobacillus adhesion

生长阶段	黏附指数（NO. of adhesion）	
t/h	*L. pentosus* Ind1	*L. pentosus* Ind3
8	293.1±23	748±26
18	431±29*	830±20
26	537±27**	931±20**

注：黏附指数为 100 个细胞上黏附的细菌数，实验数据均采用平均值±标准差表示。与生长 8h 的乳杆菌相比，*：P<0.05 表示差异显著，**：P<0.01 表示差异极显著。

Note: The table presents mean numbers ± standard deviation of bacteria adhering per 100 epithelial cells. *: P<0.05, **: P<0.01 compared with 8h.

在比较不同生长阶段（8h、18h、26h）的菌体黏附数量后发现，随着乳杆菌的生长，菌体的黏附能力不断提高，在稳定期达到最高值。可能处于不同生长阶段的菌株

表面成分的表达有所不同，使得其具有不同的黏附能力，而到达稳定期时菌体的黏附分子表达最充分，因此此时的黏附性最强。

表 4.2 pH 对黏附的影响

Table 4.2 Effect of pH value on Lactobacillus adhesion

pH value	黏附指数（NO. of adhesion）	
	***L. pentosus* Ind1**	***L. pentosus* Ind3**
8.0	326.6±30.42	539.5±33.50
7.0	431.0±28.16	830.5±19.46
6.0	459.5±24.92*	917.8±36.32**
5.0	534.2±27.22**	933.2±22.16**
4.0	506.0±24.00**	955.5±29.78**

注：黏附指数为 100 个细胞上黏附的细菌数，实验数据均采用平均值±标准差表示。以 pH 8.0 为对照，*：P<0.05 表示差异显著，**：P<0.01 表示差异极显著。

Note: The table presents mean numbers ± standard deviation of bacteria adhering per 100 epithelial cells. *: P<0.05, **: P<0.01 compared with pH 8.0.

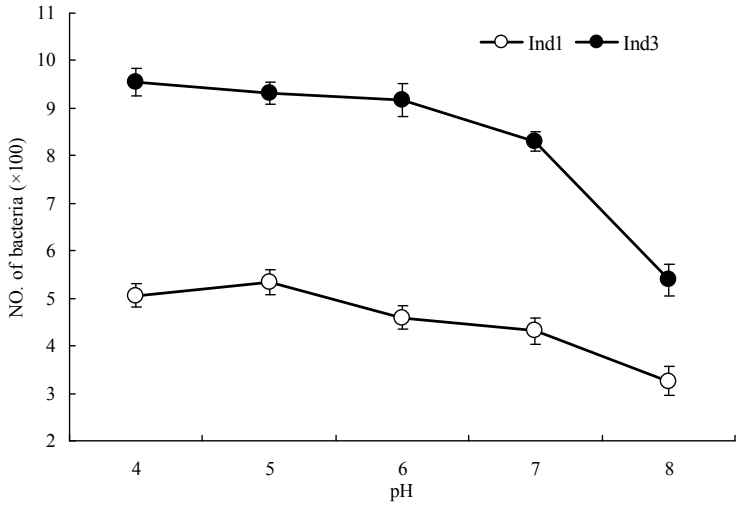


图 4.3 pH 对乳杆菌黏附的影响

Fig. 4.3 Effect of pH value on Lactobacillus pentosus adhesion

pH 值对戊糖乳杆菌 Ind1 和 Ind3 黏附肠上皮细胞的影响：体消化道正常 pH 值范围为 2~8（王素英等, 2004），而进入消化道胃酸作用后活菌数有所降低，由第二章耐受性实验知 pH 3.5 条件下培养 2h 菌株 Ind1 和 Ind3 的存活率均为 95%以上，选择 pH 为 4~8 为实验范围研究 pH 对戊糖乳杆菌黏附肠上皮细胞的影响。由图 4.3，表 4.2 知：随着 pH 值的下降，两株乳杆菌对 Caco-2 细胞的黏附数增多，Ind1、Ind3 黏附指

数分别在 pH 值 5.0、pH4.0 时达到最大：534.2±27.22、955.5±29.78；而 pH 值为 8.0 时它们的黏附指数分别为 326.6±30.42、539.5±33.50。当 pH 7.0 时，两株乳杆菌的黏附指数明显大于 pH 8.0 的黏附指数，差异显著（P<0.05）；pH 4.0 时黏附指数差异极显著(P<0.01)；在 pH 4~7 条件下黏附指数无明显变化。结果表明 pH 值对乳杆菌 Ind1、Ind3 的黏附有着调节作用，是影响因素之一。但是考虑正常人体肠道 pH 偏碱性以及体外细胞培养的条件，选择 pH 值 7.0 作为乳杆菌体外黏附试验条件。

Greene Jeffreyd 等在研究乳杆菌体外黏附中研究指出，在菌株培养上清液中的小分子量热稳定性的非蛋白因子（酸性 pH 环境），能够改变细胞本身，使乳酸杆菌对 Caco-2 细胞黏附性增强（Greene Jeffreyd, et al., 1994）。也有学者对双歧杆菌黏附影响因素研究指出，耗尽上清液可以促进双歧杆菌的黏附，而双歧杆菌耗尽上清 pH 值为 4.0 左右（Bernet MF, et al., 1993）。可能是酸性 pH 作用于细胞，改变了细胞上黏附受体的某些性质，增强了菌株对细胞的黏附性。不能忽视 pH 值对黏附的影响。

温度对戊糖乳杆菌 Ind1 和 Ind3 黏附肠上皮细胞的影响：在生理温度 37°C 下,戊糖乳杆菌 Ind1 和 IndD3 对细胞的黏附数量最多，而在低温和高温下黏附指数都有所降低。在 4°C 下两株乳杆菌的黏附数量显著减少，分别为 261.2±32.36、538.6±29.58；而 45°C 处理对黏附的影响不明显（见表 4.3）。虽然细菌对周围环境的适应性比较强，但是只有在最适生长环境中才能达到最佳生长、生理状态。有报道在生理温度下青春型双歧杆菌 0926 对 IEC 细胞具有最佳黏附特性（陈军等. 2002）。

表 4.3 温度对黏附的影响

Table 4.3 Effect of temperature on Lactobacillus adhesion

温度 (Temperature ℃)	黏附指数（NO. of adhesion）	
	***L. pentosus* Ind1**	***L. pentosus* Ind3**
4	261.2±32.36*	538.6±29.58*
37	431.0±28.16	830.5±19.46
45	304.0±31.24	814.1±23.37

注：黏附指数为 100 个细胞上黏附的细菌数，实验数据均采用平均值±标准差表示。与 37℃实验组相比，*：P<0.05 表示差异显著，**：P<0.01 表示差异极显著。

Note: The table presents mean numbers ± standard deviation of bacteria adhering per 100 epithelial cells. *: P<0.05, **: P<0.01 compared with 37ºC.

表 4.4 乳杆菌生物状态对黏附的影响

Table 4.4 Effect of the living being state on *Lactobacillus* adhesion

生物状态 Living state	黏附指数（NO. of adhesion）	
	***L. pentosus* Ind1**	***L. pentosus* Ind3**
存活状态 (the living)	431.0±28.16	830.5±19.46
热灭活状态 (the heat-killed)	405.0±30.24	839.1±24.59

注：黏附指数为 100 个细胞上黏附的细菌数，实验数据均采用平均值±标准差表示。与活菌组相比，*：P<0.05 表示差异显著，**：P<0.01 表示差异极显著。

Note: The table presents mean numbers ± standard deviation of bacteria adhering per 100 epithelial cells. *: P<0.05, **: P<0.01 compared with the living forms

乳杆菌不同生物状态对 Caco-2 细胞黏附的影响：比较两种不同生物状态（热灭活状态和活菌状态）乳酸杆菌对肠上皮细胞的黏附能力。由表 4.4 知，两种生物状态下实验乳杆菌株 Ind1 和 Ind3 均能够黏附 Caco-2 细胞，且灭活的乳杆菌黏附指数并不低于活菌，无显著性差异（P>0.05）。也许灭活状态下的菌株其表面黏附成分数量没有减少且其结构没有发生变化，使得菌株的黏附能力不变。

有报道，灭活的双歧杆菌可能具有与活菌相同的生态效应（伦永志等，2000）。灭活状态下戊糖乳杆菌 Ind1 和 Ind3 具有与活菌相同的黏附能力，这与国内外报道相符合。相对于活菌而言，死菌本身具有较高的稳定性和安全性，为开发灭活益生菌制剂提供理论依据。

4.2.3 两种乳杆菌体外黏附机制研究

乳杆菌代谢产物对黏附影响：

（1）不同培养液成分对乳杆菌黏附的影响

用新鲜的 MRS–Bouillon 培养液、耗尽培养上清液悬浮细菌，进行黏附 Caco-2 细胞对比实验后。如表 4.5 所示，悬浮于耗尽上清液的乳杆菌 Ind1 和 Ind3 黏附指数远大于悬浮在新鲜培养液中的乳杆菌（P<0.01）；灭活组与活菌组的黏附能力差异不显著。说明耗尽培养上清液中存在与乳杆菌菌黏附有关的黏附因子，可能是菌体生长过程中分泌到培养液中的某种物质，其介导乳杆菌对肠上皮细胞的黏附。

表 4.5 乳杆菌对 Caco-2 细胞的黏附指数

Table 4.5 Adhesion of *Lactobacillus* to human intestinal epithelial Caco-2 cell

不同培养	黏附指数（NO. of adhesion）

液成分 Different culture fluid	存活状态（the living）		热灭活状态 (the heat-killed)	
	Ind1	Ind3	Ind1	Ind3
新鲜培养液 fresh culture fluid	431.0±28.16	830.5±19.46	405.0±30.24	839.1±24.59
耗尽上清液 exhausting supernatant fluid	902.3±30.44**	1237±20.81**	883.4±33.10**	1248±24.79**

注：黏附指数为 100 个细胞上黏附的细菌数，实验数据均采用平均值±标准差表示。与新鲜培养液中实验组相比，*：P<0.05 表示差异显著，**：P<0.01 表示差异极显著。

Note: The table presents mean numbers ± standard deviation of bacteria adhering per 100 epithelial cells. Each value is the mean of values from three or four experiments. *: P<0.05, **: P<0.01 compared with the fresh culture fluid group.

（2）耗尽上清液经热处理后乳杆菌黏附指数的变化

耗尽上清液中某些成分增强了乳杆菌的黏附能力，将耗尽上清液经 100°C，10min 加热处理以后乳杆菌 Ind1、Ind3 的黏附指数显著降低，且差异极显著，分别为 421.1±12.04、780.3±22.08，见表 4.6。存在于耗尽上清液中的某些黏附素对热敏感，其发生了结构上的变化，乳杆菌的黏附率显著下降。

表 4.6 耗尽上清液经热处理后菌体黏附指数的变化

Table 4.6 The effects on adhesion of strain in heat treated culture

不同热处理 Different heat treatment	黏附指数（NO. of adhesion）	
	L. pentosus Ind1	*L.pentosus* Ind3
对照	902.3±30.44	1237±20.81
100℃, 10min	421.1±12.04**	780.3±22.08**

注：黏附指数为 100 个细胞上黏附的细菌数，实验数据均采用平均值±标准差表示。与对照组相比，*：P<0.05 表示差异显著，**：P<0.01 表示差异极显著。

Note: The table presents mean numbers ± standard deviation of bacteria adhering per 100 epithelial cells. Each value is the mean of values from three or four experiments. *: P<0.05, **: P<0.01 compared with the control group.

（3）耗尽上清液经胰蛋白酶对乳杆菌黏附的影响

为了探讨耗尽上清液中黏附因子是否为蛋白，将耗尽上清液经不同浓度的胰蛋白

酶处理后，观察乳杆菌对 Caco-2 细胞黏附指数的变化情况，见表 4.7。结果显示，悬浮于经胰蛋白酶处理的耗尽上清中的菌体，其黏附能力显著降低，并且随着蛋白酶浓度的增大黏附指数逐渐降低。当胰蛋白酶浓度为 1mg/mL 时，乳杆菌的黏附指数于对照组相比显著降低（P<0.05）；当浓度为 3mg/mL 时，黏附指数达到差异极显著水平。

表 4.7 耗尽上清液经胰蛋白酶处理后菌体黏附指数的变化

Table 4.7 The effects on adhesion of strain in Trypsin treated culture

不同处理 Different treatment	浓度（mg/ml）	黏附指数（NO. of adhesion）	
		L. pentosus Ind1	*L. pentosus* Ind3
对照	-	902.3±30.44	1237±20.81
胰蛋白酶	1	735.3±29.76*	1040.7±25.43*
	3	561.0±18.87**	954.5±24.31**
	5	404.5±23.58**	817.2±24.55**

注：黏附指数为 100 个细胞上黏附的细菌数，实验数据均采用平均值±标准差表示。与对照组相比，*：P<0.05 表示差异显著，**：P<0.01 表示差异极显著。

Note: The table presents mean numbers ±standard deviation of bacteria adhering per 100 epithelial cells. Each value is the mean of values from three experiments. *: P<0.05, **: P<0.01 compared with the control group.

本实验结果表明，耗尽培养上清液中存在与乳杆菌菌黏附有关的黏附因子，且耗尽上清液经高温处理后乳杆菌的黏附能力显著降低；经胰蛋白酶处理后能显著抑制乳杆菌株 Ind1 和 Ind3 对 Caco-2 细胞的黏附，说明耗尽上清液中存在黏附素是一种不耐热的蛋白质。但在新鲜的培养液中悬浮的乳杆菌仍然具有较强的黏附能力，说明乳杆菌 Ind1 和 Ind3 菌体本身也存在黏附素。

表 4.8 乳杆菌菌体经蛋白酶处理后菌体黏附指数的变化

Table 4.8 The effects on adhesion of strain in Protease treated culture

不同处理 Different treatment	浓度（mg/ml）	黏附指数（NO. of adhesion）	
		L. pentosus Ind1	*L. pentosus* Ind3
对照	-	431.0±28.16	830.5±19.46
胰蛋白酶	2.5	67.3±20.70**	190.7±19.80**
蛋白酶K	2.5	114.4±26.34**	226.2±23.91**

注：黏附指数为 100 个细胞上黏附的细菌数，实验数据均采用平均值±标准差表示。与对照组相比，*：P<0.05 表示差异显著，**：P<0.01 表示差异极显著。

Note: The table presents mean numbers ± standard deviation of bacteria adhering per 100 epithelial cells. Each value is the mean of values from three experiments. *: P<0.05, **: P<0.01 compared with the control group.

乳杆菌表面蛋白对其黏附 Caco-2 细胞的影响：将乳杆菌 Ind1 和 Ind3 菌体分别用胰蛋白酶（2.5mg/mL）和蛋白酶 K（2.5 mg/mL）37°C 处理 60min，黏附指数变化曲线如图 4.4。菌体经胰蛋白酶和蛋白酶 K 处理后，两株乳杆菌对 Caco-2 细胞的黏附能力显著下降(P<0.01)，经胰蛋白酶处理菌体后黏附指数低于蛋白酶 K 处理组的黏附指数（见表 4.8）。戊糖乳杆菌 Ind1 和 Ind3 菌体表面蛋白成分可能与其黏附能力有关，作为黏附素参与对 Caco-2 细胞的黏附过程。国内外也有相关报道，嗜酸乳杆菌 BG2F04、NCFM/F2 经胰蛋白酶、胃蛋白酶处理后黏附力显著下降，但是加氏乳杆菌 LDH 黏附能力没有显著变化（Greene JD, et al., 1994）；嗜酸乳杆菌 LB 经胰蛋白酶和蛋白酶 K 处理后黏附力未见降低（Chauviere G, et a1., 1992）。乳杆菌表面的蛋白成分可能参与了乳杆菌的黏附，不同的菌株其参与黏附的蛋白种类有一定的差异（王斌等，2006）。

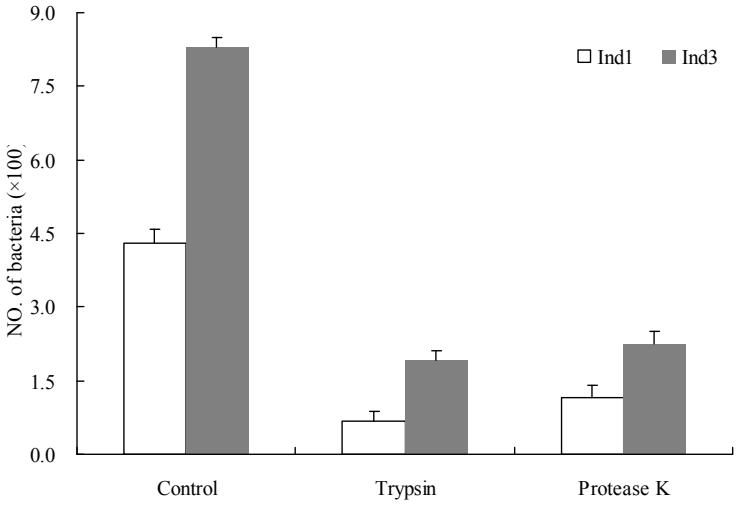


图 4.4 酶处理对乳杆菌黏附 Caco-2 细胞的影响

Fig.4.4 Effect of trypsin or pronase treatment on adhesion of Lactobacillus to Caco-2 cells

乳杆菌 S-层蛋白对其黏附 Caco-2 细胞的影响：有学者发现，在某些乳杆菌的外表面存在有一层呈单分子晶体排列的 S 层蛋白，参与了乳杆菌的黏附（Schneitz C, et al., 1992）。有资料报道，采用氯化锂可以去除 90%以上的 S 层蛋白，乳杆菌外表面的 S 层蛋白 Mr 大约为(41~52)×10^3(Syvie L，et al., 1992)。为了探讨 Lactobacillus pentosus Ind1、IND3 的 S 层蛋白是否存在抑制黏附的作用，本实验将乳杆菌 Ind1 和 Ind3 菌体

分别用 5mol/L 氯化锂 4°C 处理 60min，黏附指数变化见表 4.9。

表 4.9 乳杆菌体经氯化锂处理后菌体黏附指数的变化

Table 4.9 The effects on adhesion of strain in Protease treated culture

不同处理 Different treatment	浓度（mol/L）	黏附指数（NO. of adhesion）	
		L. pentosus Ind1	*L. pentosus* Ind3
对照	-	431.0±28.16	830.5±19.46
氯化锂	5	417.5±28.16	780.7±26.11

注：黏附指数为 100 个细胞上黏附的细菌数，实验数据均采用平均值±标准差表示。与对照组相比，*：P<0.05 表示差异显著，**：P<0.01 表示差异极显著。

Note: The table presents mean numbers ± standard deviation of bacteria adhering per 100 epithelial cells. Each value is the mean of values from three experiments. *: P<0.05, **: P<0.01 compared with the control group.

菌体经去除 S 层蛋白处理之后，两株乳杆菌对 Caco-2 细胞的黏附能力没有明显降低，表明戊糖乳杆菌 Ind1 和 Ind3 菌体外表面的 S 层蛋白可能没有参与黏附过程。本实验结果与 Greene 等研究一致，用氯化锂处理嗜酸乳杆菌 BG2F04 和 NCFM/F2，去除 S 层蛋白之后，两株菌的黏附能力未见降低（Greene JD, et al., 1994,）；王斌等采用氯化锂去除路氏乳杆菌 JCMl081 的 S 层蛋白之后，对 HT-29 细胞的黏附影响不大。（王斌等，2006）。但是也有学者研究嗜酸乳杆菌 M92 时，去除 S 层蛋白后，该菌株的黏附能力显著降低，S 层蛋白参与了黏附（Kos B, et al., 2003）。由此看出，S 层蛋白并非一定参与所有乳杆菌黏附过程。

4.3 本章小结

（1）以 Caco-2 细胞为黏附模型证实，影响戊糖乳杆菌 Ind1 和 Ind3 黏附的主要因素是菌体生长阶段、pH、培养温度及乳杆菌存活状态。

①处于延滞期（8h）、对数期(18h)、稳定期（26h）等不同的生长阶段的乳杆菌细胞的黏附能力存在差异，处于稳定期的乳杆菌其黏附指数最大，生长到 26h 的乳杆菌细胞黏附能力与 8h 的相比差异极显著。

②不同 pH 条件影响戊糖乳杆菌 Ind1 和 Ind3 的黏附能力。随着 pH 降低，两株乳杆菌在 Caco-2 细胞上的的黏附数增多。菌株 Ind1 和 Ind3 的黏附指数分别在 pH 5.0 和 pH 4.0 时达到最大。当 pH 是 7.0 时，两株乳杆菌的黏附指数明显大于 pH 8.0 的黏附指数。

③培养温度为 37°C 时，两株乳杆菌的黏附能力最强，培养温度升高至 45°C 并

不显著影响菌体的黏附指数，但 4°C 低温对菌体细胞的黏附能力有明显抑制作用。

④活菌状态和灭活状态的戊糖乳杆菌菌体都能够黏附 Caco-2 细胞，且灭活菌体和活菌有相同的黏附能力。

（2）戊糖乳杆菌 Ind1 和 Ind3 的黏附能力可能与其代谢产物及表面蛋白成分有关。悬浮于耗尽上清液的戊糖乳杆菌 Ind1 和 Ind3 黏附指数大于新鲜培养液中乳杆菌的黏附指数；耗尽上清液经 100°C，10min 加热处理后乳杆菌黏附能力显著降低；耗尽上清液经胰蛋白酶处理后能显著抑制乳杆菌株 Ind1 和 Ind3 的黏附能力，且随着蛋白酶浓度的增大，乳杆菌黏附指数逐渐降低。这意味着戊糖乳杆菌在生长过程中可能会分泌一种热敏性蛋白质，介导其黏附肠上皮细胞。戊糖乳杆菌 Ind1 和 Ind3 细胞直接经胰蛋白酶和蛋白酶 K 处理后其黏附能力显著下降，这表明戊糖乳杆菌的表面蛋白参与了黏附过程。用氯化锂去除 S 层蛋白后，菌株 Ind1 和 Ind3 对 Caco-2 细胞的黏附能力没有明显降低。这表明戊糖乳杆菌外表面 S 层蛋白没有参与黏附过程。

5. 戊糖乳杆菌对小鼠肠道菌群的调节作用

5.1 肠道菌群结构变化及其作用

我们被微生物包围着， 所有的哺乳动物出生时肠道是无菌的，对细菌都是开放的，自出生之时起很快从母体获得它们独特的细菌.这些细菌丛有很高的活性,有些每20 分钟复制一次.甚至在被娩出的过程中,许多细菌、病毒和其他微生物就开始在人体内繁殖,并常年与人共生。在这个充满微生物的世界中,人们早已适应了环境中及体内这些微生物的存在,将人与微生物分离开来既不可能、也不可取。微生物群落遍布我们的皮肤、肠道和其他腔隙, 大肠里包含了数量最多范围最广的细菌：.嗜酸乳杆菌保护小肠,双岐杆菌保护大肠.保加利亚乳杆菌短暂的存在帮助其他两种细菌顺利地通过人体。这三种主要的细菌存活在人体肠道中,保护人体肠道.整个肠道包括 100-400 种不同的细菌。

人类，和其他动物一样，殖生有大量微生物。它们生活在人体的皮肤，嘴，女性的阴道等和遍及我们的消化道，共约有 10^{14} 个，是人体细胞总和的十倍。人体微生物的总重量为 2 至 3 磅，并且种类繁多，共超过 400 种。而一个人一生肠道平均要处理 65 吨食物和饮料，相当于 12 头大象的重量。

去除这些与我们共生的微生物必将打破机体的平衡,并可能导致慢性腹泻、维生素缺乏、对食物产生不恰当的免疫耐受、或发生机会性感染。 在人肠道中,诸多共生菌株形成了一个庞大而复杂的体系,尽管该体系因个体的不同存在着很大差异,但他们通常都由数百种不同菌株组成,多数菌株是专性厌氧菌(>99%)。厌氧菌在缺氧的环境中可大规模增殖,但专性厌氧菌在婴儿肠道内的氧被兼性厌氧菌消耗殆尽之前是不能任意增殖的,因此,专性厌氧菌的活性在某种程度上受到了兼性厌氧菌的制约。

肠道微生物菌群可分为三大类：

（1）与宿主共生的生理性细菌。为专性厌氧菌，是肠道中的优势菌群，与宿主存在共生关系，宿主为肠道菌群提供生长所须的适宜环境，肠道菌群为宿主提供有益物质。如乳杆菌、双歧杆菌、类杆菌、优杆菌等是膜菌群的主要构成者，具有营养、免疫调节、维持正常的肠道粘膜屏障作用；

（2）与宿主共栖的条件致病菌。以兼性需养菌为主，肠道中非优势菌，如肠杆菌、肠球菌，在肠道微生态平衡时，这些细菌数量很少不会致病，在特定的病理情况下，数量异常增多具有侵袭性，对人体有害；

（3）病原菌。大多为过路菌，长期定植的机会也很少，在肠道微生态平衡时，病原菌的数量很少，不会致病，一旦数量超过一定范围就可引起疾病，如变形杆菌、假单孢菌，伤寒沙门菌等（郭贵海等，2002）。

5.1.1 肠道菌群生理功能

1. 营养作用

（1）物质代谢。

肠道菌群可将未消化的食物残渣发酵转化为能量，糖类发酵是主要的能量来源，主要包括不能消化的糖（纤维素、果胶等）和一些没有消化的寡糖（Cununlngs JH, et al., 1996），还可分解部分的多肽和蛋白质。肠球菌可分解蛋白质；双歧杆菌可产生各种酶，将不溶性蛋白、脂肪和糖转变为可溶性；

（2）合成作用。

肠道中的厌氧菌可以合成多种维生素，肠道菌群可以合成多种维生素，如维生素B1、B2、B6，VC、VK，尼克酸、生物素和叶酸等，其中双歧杆菌能合成维生素 B，大肠杆菌合成维生素 K，链球菌合成维生素 C。但是如果摄入抗生素将杀死肠道细菌，可能导致某种维生素杀我缺乏（Tannock GW, 1995）；还可合成短链脂肪酸，肠道中的细菌发酵可产生短链脂肪酸，如乙酸、丁酸。

2. 生物屏障作用

随着宿主的生长发育，不同种类和数量的微生物定植在肠道中，形成肠道动态微生物态平衡，该平衡可以有效地阻止病原菌的入侵。

（1）厌氧菌和胃肠道黏膜上皮细胞紧密结合，形成一层叫膜菌群的生物膜，肠道正常菌群是宿主的天然生物屏障，对宿主起到了占位性保护作用。通过竞争排斥作用，使入侵的病原菌无法接近肠黏膜上的黏附位点，使之难以定植，从而起到对病原菌的定植拮抗作用。由于厌氧有益菌的属于优势菌，在营养竞争上处于优势，于肠道中的病原菌及潜在的致病菌竞争营养物质，限制了其他细菌的生长繁殖。营养竞争也是决定肠道菌群分布的重要因素。

（2）肠道中的有益菌在代谢过程中产生挥发性脂肪酸和乳酸，降低肠道 pH，从而抑制外籍菌的生长繁殖。产生一些抑菌物质如过氧化氢、细菌素等，抑制肠道有害菌的繁殖（Kamao M, et al., 2000）。

3. 免疫调节作用

（1）正常肠道菌群可刺激和激活宿主免疫系统，促进免疫功能成熟和完善，提高机体的免疫防御机能。在检查无菌动物的免疫系统时发现其淋巴系统、抗体形成系统等均发育不良。但把无菌动物暴露于普通条件下，淋巴细胞的数目迅速增长，血清中免疫球蛋白的浓度上升（Jiang HQ, et al., 2001）。有学者对无菌鸡小肠和回肠部位淋巴结进行了比较，发现比普通鸡的小 4/5，将其暴露在普通条件下饲养两周后，其免疫系统与普通鸡相似（Drasar BS, et al., 1985）。

（2）刺激宿主产生免疫及功能，产生非特异性免疫调节因子、活性抗菌蛋白等多种活性物质，参与调节免疫。如增强抗体的产生，刺激吞噬细胞功能和增加干扰素

的产生等。无菌动物血液中免疫球蛋白的浓度较低，基本测不出分泌型 IgA，无菌的小鼠血液中的 IgG 含量为普通小鼠的 1/10。实验也发现双歧杆菌能激活机体的吞噬活性（劳丈艳等，2002），促进特异性和非特异性抗体的产生。乳酸杆菌促进辅助性 T 细胞的发育，诱导产生多种细胞因子，预防 IgE 介导的过敏反应（Shida K et al., 1998）。

4. 促进结肠上皮细胞的增值和分化

肠道的微生物影响细胞的增值。无菌小鼠与普通的小鼠相比，隐窝上皮细胞的更新率较低，说明在不同小鼠肠道定植的微生物可以促进上皮细胞的增值（Younes H, et al., 2001）。据报道，上皮细胞的分化与肠道中定植的微生物有关，微生物代谢产生短链脂肪酸，促进上皮细胞的分化和繁殖；在体外丁酸能够抑制肿瘤细胞的繁殖，促进细胞分化（Gibson, et al., 1992）。肠道菌群的结构变化

上面所描述的人体肠道菌群并不是一成不变的，随着人的生长过程发生如下的演变：

婴儿期：肠道内有益菌占优势，数目较多。

成年期：开始食用杂食类食物，偏食，新陈代谢不佳，体内酸碱值不平衡，严重感染、服用抗生素等都会造成体内免疫力下降，肠胃内功能失调、使得腐败菌如：大肠菌、魏氏杆菌、葡萄球菌占优势而有益菌数目逐渐减少。

老年期：身体整体机能自然老化，肠道活力也自然衰退；最显著的变化是：老年人肠道中的双栖杆菌大幅降低，产气荚膜梭菌大幅上升。这种肠道就是肠道老化现象。即使健康状况非常好的老人，也很难避免这种肠道菌群的自然老化，只能通过保养尽量延缓老化。

因此，人随着年龄的增长，肠内的有益菌逐渐减少，因而使得百病丛生。只有拥有强大的有益菌队伍，才能清除体内的坏菌，使毒性物质无法滋生，从而增强免疫力，拒绝疾病。所以，减少肠内有害细菌即可达到健康长寿的目的，关键则在肠道内的有益菌比例。

5.1.2 肠道微生态的调控

肠道菌群的种类和数量只是处于相对稳定的状态，当受到饮食。生活习惯、地理环境、年龄及卫生条件等诸多因素的影响时，肠道内微生物种类及数量发生不同程度的变化，病原菌大量繁殖，有益菌数量减少，肠道菌群失调。抗生素调控、营养调控、微生物制剂调控都会使肠道菌群发生变化。

1. 抗生素调控

使用抗生素可以快速的抑制甚至杀死肠道感染细菌但是抗生素在杀死有害菌的同时也杀死了有益菌，在一定程度上也破坏了肠道菌群的平衡，长期服用抗生素，将引起肠道菌群失调；而滥用抗生素，则使具有耐药性的肠内菌异常增殖而取代优势菌的位置，产生耐药性菌株，造成肠道内微生态平衡的失调。

2. 营养调控

通过改变饮食结构促进有益菌的增值，调节胃肠道微生物群落结构。益生元是一种对宿主有益的非消化性食物成分，可选择性的刺激肠道有益菌的生长繁殖，而不被病原菌微生物利用，从而促进宿主的肠道健康，主要有低聚果糖和低聚乳糖等。据报道，许多寡糖进入小肠后，不能被病原菌如大肠杆菌和沙门氏菌利用，只能被有益微生物如乳酶杆菌、双歧杆菌分解利用，产生二氧化碳和挥发性脂肪酸，促进有益菌大量繁殖（刘一尘等，2003）。

本研究采用小鼠模型，研究了戊糖乳杆菌 Ind1 和 Ind3 对小鼠肠道菌群的调节作用及作用时间，并与丹尼斯克提供商业菌株嗜酸乳杆菌 NCFM 和植物乳杆菌 LP115 的肠道菌群调节效果进行对比。旨在验证戊糖乳杆菌 Ind1 和 Ind3 体内黏附肠上皮细胞的能力，为研究益生菌在肠道中的黏附定植效果提供理论依据。

5.2 材料及方法

5.2.1 实验材料

供试菌株及实验动物：戊糖乳杆菌（*Lactobacillus pentosus*）Ind1 和 Ind3 由北京林业大学生物院保存提供，嗜酸乳杆菌（*Lactobacillus acidophilus*）NCFM、植物乳杆菌（*Lactobacillus plantarum*）LP115 由丹尼斯克中国（投资）有限公司提供。清洁级纯种昆明系雄性小鼠 50 只，体重为 18~22g，由上海交通大学医学院动物实验中心提供。

培养基及试剂：

MRS-Agar, MRS-Bouillon	德国Merck公司
乳杆菌选择性培养基LBs	美国GIBCO公司
双歧杆菌选择性培养基TPY	北京陆桥技术有限责任公司
肠道菌计数培养基VRBDA	北京陆桥技术有限责任公司
肠球菌选择性琼脂Pfizer	北京陆桥技术有限责任公司
胰际-亚硫酸盐-环丝氨酸琼脂基础TSC	北京陆桥技术有限责任公司
D-环丝氨酸	国药集团
氯化钠	国药集团
氯化锂	国药集团
硫酸巴仑霉素	国药集团
硫酸新霉素	国药集团
萘啶酮酸	国药集团

仪器与设备：

MCO-15A二氧化碳培养箱	日本SANYO公司
MLS-3750高压灭菌锅	日本SANYO公司
超低温冰箱	日本SANYO公司
SW-CJ-IFO 超净工作台	苏州安泰空气技术有限公司
水浴锅	德国Memmert公司
D-55122 磁力搅拌仪	德国SCHOTT公司
DKB-600B 电热恒温水槽	上海一恒科学仪器有限公司
BD恒温培养箱	德国Binder公司
ED自然对流烘箱	德国Binder公司
CKX41 倒置显微镜	日本OLYMPUS公司
BX51光学显微镜	日本OLYMPUS公司
EBA20离心机	德国Hettich公司
EM208E51微波炉	日本SANYO公司
超低温冰箱	日本SANYO公司
数显振荡器	德国IKA公司
BS 300S电子天平	赛多利斯科学仪器北京有限公司
普及型PH计（PB-10）	赛多利斯科学仪器北京有限公司

5.2.2 实验方法

菌株的活化：将真空冷冻干燥保存的实验菌株 Ind1 和 Ind3 接入 10%脱脂乳中活化第一代，后再接入 MRS 肉汤液体培养基中活化第两代。

灌胃菌悬液制备：Ind1、Ind3 菌悬液制备：按照 1%的接种量入 200mL MRS-bouillon 培养基中，37°C 厌氧培养 18h，离心收集菌体（6000r/min，20min）。无菌生理盐水离心洗涤，将菌体沉淀悬浮于 20%灭菌脱脂乳中，调乳杆菌浓度约为 5×10^{10} cfu/mL。

NCFM、LP115 菌悬液制备：NCFM（150B），LP115（400B）由丹尼斯克中国投资有限公司提供，菌粉含菌量为分别为 1.5×10^{11} cfu/g、4×10^{11} cfu/g。称取嗜酸乳杆菌 NCFM（150B）菌粉 10g，加入 20mL 20%灭菌脱脂乳；称取植物乳杆菌 LP115（400B）菌粉 5g 加入 35mL 的灭菌 20%脱脂乳，稀释一定倍数后，含菌量约为 5×10^{10} cfu/mL

灌胃菌悬液的短期保存及复苏：将 Ind1、Ind3、NCFM、LP115 菌悬液分别振荡均匀，分装于无菌的 EP 管（1.5mL）中，每管分装 1mL，封口膜封口，立即置于-80°C 冷冻保存。次日，将 Ind1，Ind3，NCFM，LP115 灌胃菌液 EP 管各取出一只，快速放入 37°C 的水浴锅中速溶。无菌的生理盐水 10x 倍比稀释成系列，MRS 琼脂培养基

菌落计数，37°C 厌氧培养 24h~48h。每次灌胃前取出冻存的 EP 管，快速置于 37°C 的水浴锅速溶，用 20%的脱脂乳将菌悬液稀释 10 倍，灌胃菌悬液含菌量约为 5×10^9 cfu/mL。

实验动物分组：小鼠购入后随机分笼饲养，自由采食饮水，温度湿度分别控制在 20~25°C 和 45~50%，预饲养 6d 用于实验。每隔一天称重一次，随机平均分成 5 组，每组 10 只小鼠，分别为对照组、灌胃 Ind1 组、Ind3 组、NCFM 组、LP115 组。（在上海交通大学医学院动物实验中心进行）

灌胃方法：每日上午 9 时，分别向实验小鼠无菌灌胃 20%脱脂乳和含有 Ind1、Ind3、LP115、NCFM 的脱脂乳菌悬液（含菌量约为 5×10^9 cfu/mL），每只灌胃 0.5mL，每日一次，连续灌胃 10 天。

粪便的采集及活菌计数：

（1）粪便的采集：分别在灌胃前，灌胃后第 2d、4d、6d、8d、10d，停止灌胃后 2d、4d、6d 无菌采集新鲜粪便样。轻压小鼠直肠部位，逼迫法在超净台中收集新鲜粪便约 1g，装于事先灭菌的 EP 管（2mL）中，每组实验小鼠收集 3 个粪便标本。立即将 EP 管封口，在 3 小时之内检测。

（2）标本的称量和稀释：分别向灭菌的试管中加入 9.9mL 无菌生理盐水待用。用天平称取 0.1g 的粪便于含有 9.9mL 无菌生理盐水的试管中，在振荡器上使之匀浆，制得 1:10 的样品匀液。吸取 1mL 1: 10 样品匀液入 9mL 含无菌生理盐水试管中，样本稀释呈系列 10^{-2}，10^{-3}，10^{-4}，10^{-5}，10^{-6}，10^{-7}，10^{-8}，10^{-9}，根据预实验的结果，选择 2-3 个合适的稀释度。

（3）接种和培养：取合适稀释度标本 1mL，分别接种于培养乳酸杆菌、双歧杆菌、肠杆菌、肠球菌、产气荚膜梭菌的 LBs、TPY、VRBDA、PZ、TSC 选择性培养基上。将 TPY、LBs、TSC 培养基放入厌氧罐中，加入厌氧条后密封，厌氧培养；将 EMB、PZ 培养基直接放入培养箱培养。进行菌落特征、革兰氏染色、镜检等预实验后进行菌落计数。每 100mL TPY 琼脂培养基中加入 4mL NNLT 液，每 250mL TSC 琼脂培养基中加入 0.5g D-环丝氨酸。

溶液制备：①稀释液生理盐水：称取 8.5g NaCl 和 1.0g 蛋白胨溶解到 1000mL 蒸馏水中，121°C 灭菌 15min；②NNLT 溶液：氯化锂 6g；萘啶酮酸 0.3g；硫酸新霉素 0.2g；硫酸巴仑霉素 0.25g，蒸馏水 100mL，溶解后膜过滤除菌，并避光冷藏保存

（4）粪便微生物检测指标：肠杆菌（*enterobacter*），肠球菌（*enterococci*），产气荚膜梭菌（*clostridium perfringens*）乳杆菌（*lactobacillus*），双歧杆菌（*bifidobacterium*），；选择性培养基分别为：大肠杆菌计数培养基 VRBDA，肠球菌选择性琼脂 Pfizer，胰际-亚硫酸盐-环丝氨酸琼脂基础 TSC（4mL/100mL NNLT），乳杆菌选择性培养基 LBs，双歧杆菌选择性培养基 TPY（1g/250mL），表 5.1 所示。

表 5.1 小鼠粪便微生物检测指标

Table 5.1 Mouse intestinal discharge microbial detection indicators

培养基名称	菌名称	培养条件	菌落大小	菌落形态
VRBDA	肠杆菌 enterobacter	25±1°C, 18~24h	<2.5mm	菌落呈红色，伴有红紫色晕圈，革兰氏阴性杆菌
Pfizer	肠球菌 enterococci	37±1°C, 24~48h	1~1.5 mm	菌落呈褐色，伴有明显的有黑色晕圈，革兰氏阴性球菌
TSC	产气荚膜梭菌 clostridium perfringens	37±1°C 厌氧培养 72h	<1.5mm	菌落呈白色，伴有明显的白色晕圈，革兰氏阳性粗大杆菌
MRS	乳杆菌 lactobacillus	37±1°C 厌氧培养, 48h	1.5~2.5mm	菌落呈乳白色，革兰氏阳性杆菌
TPY	双歧杆菌 bifidobacterium	37±1°C 厌氧培养, 72h	<1.5mm	菌落呈粉红色，凸起，革兰氏阳性棒状或叉状杆菌

（5）菌落计数：根据平板上的活菌数和稀释度，按活菌计数公式计算，结果以每克湿粪便样本中菌落数对数值表示（lgcfu/g）。每 mL 粪样中菌落数 cfu/mL=（同一稀释度 3 个平皿上的菌落平均数×稀释倍数）/取样体积。

肠道菌群调节标准：

标准 1：双歧杆菌或乳杆菌增加，产气荚膜梭菌减少或不增加，拟杆菌、肠杆菌或肠球菌增加但增加的幅度小于双歧杆菌或乳杆菌。

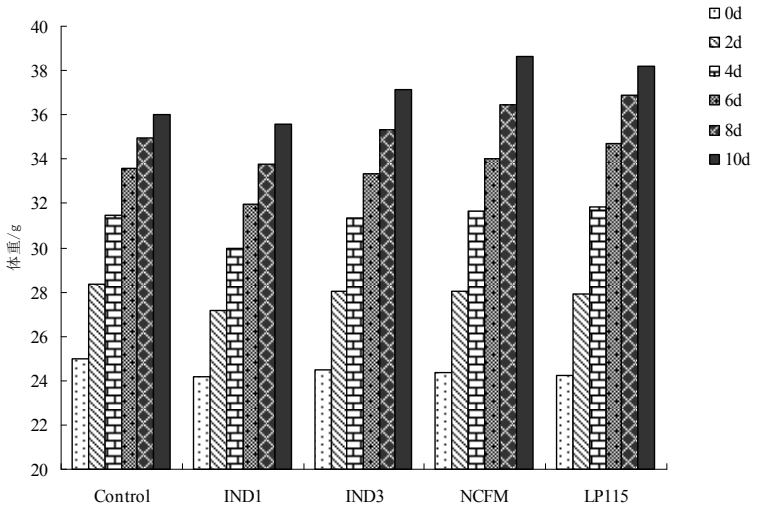
标准 2：双歧杆菌或乳杆菌增加，产气荚膜梭菌减少或不增加，拟杆菌、肠杆菌或肠球菌减少或无明显变化（Kamao M, et al., 2000）。

实验数据统计分析：所有实验均重复 3 次，实验数据采用平均值±标准差表示，采用 SPSS 13.0 统计软件做 t 检验。

5.3 结果与分析

5.3.1 灌胃乳杆菌对小鼠体重的影响

实验小鼠分为对照组（灌胃 20%无菌菌脱脂乳）和乳杆菌实验组（灌胃含菌量约为 5×10^9 cfu/mL 的 Ind1、Ind3、NCFM、LP115 20%脱脂乳菌悬液），连续灌胃期间小鼠体重变化如图 5.1 所示，各乳杆菌实验组和对照组小鼠体重呈增加趋势，灌胃 6d 后，饲喂乳杆菌的小鼠体重增加量均高于对照组。表明：4 株乳杆菌均可以促进小鼠对营养物质的吸收。乳杆菌通过调节肠道菌群平衡，改善肠道环境，提高肠道对营养物质的吸收。有学者研究表明，益生菌利用半乳糖甘酶等，帮助分解上消化道尚未分解吸收的营养物质，有利于宿主进一步吸收利用。某些乳酸菌还能合成维生素、有机酸供动物体吸收，有机酸能加强肠的蠕动，促进常量及微量元素如钙、铁、锌等的吸收（Clausen MR, et al., 1991）。



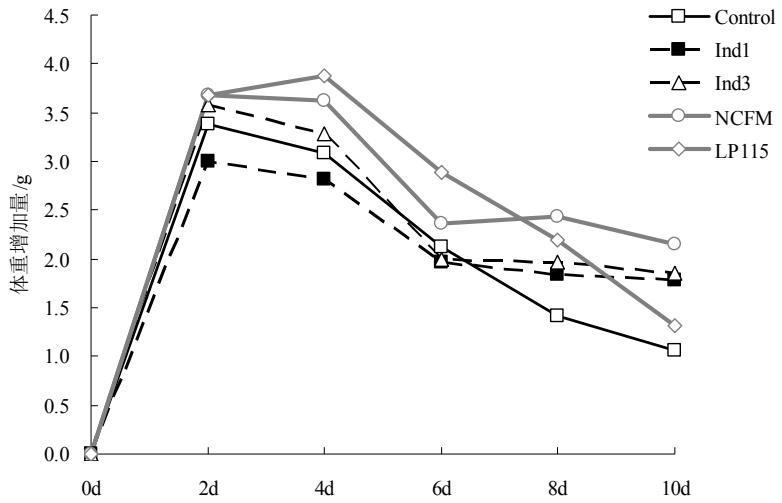


图 5.1 灌胃乳杆菌对小鼠体重的影响

Fig.5.1 Effects of the probiotics on body weight in mice

5.3.2 戊糖乳杆菌对小鼠肠道菌群的调节作用

（1）灌胃 4 株乳杆菌对小鼠肠道乳杆菌的增值作用及其持续时间：

益生菌对宿主的益生功效与其在肠道中的活菌数量密切相关，有数据显示乳酸菌数必须达到 10^6 cfu/mL 以上才能发挥其生理益生功能。戊糖乳杆菌 Ind1 和 Ind3 在 pH 2.5 人工胃液、pH 6.8 人工肠液中培养 4h 存活率均在 90%以上；在浓度为 0.40%胆盐培养基中培养 4h，菌株 Ind1 和 Ind3 存活率分别为 88%和 82%，活菌对数值下降均小于 2。基于菌株通过复杂胃肠环境会有一定量的损失，选择灌胃乳杆菌浓度约为 10^9 cfu/mL，到达小鼠肠道中的活菌数将在 10^6 cfu/mL 以上。实验小鼠分别连续灌胃 5×10^9 cfu/mL 4 株乳杆菌 10d，灌胃前、灌胃期间及停止灌胃后，各实验组小鼠粪便乳杆菌数量变化见表 4-2，图 4-2。灌胃后各实验组乳杆菌数量与灌胃前相比都有所增加。4d 后 Ind1 组小鼠肠道乳杆菌数量小于 Ind3、NCFM 和 LP115 实验组。10d 各益生菌实验组乳杆菌数量与灌胃前相比差异极显著（$P<0.01$），益生菌实验组各取样时间点，小鼠粪便乳杆菌数量均大于对照组，且在灌胃第 10d 与对照组相比差异显著（$P<0.05$）。表明：戊糖乳杆菌 Ind1 和 Ind3、嗜酸乳杆菌 NCFM、植物乳杆菌 LP115 对小鼠肠道乳杆菌均有一定的增值作用，增值效果无明显差异。

停止灌胃后，各实验组小鼠粪便乳杆菌数量有所回落，灌胃停止后益生菌实验组各取样时间点，小鼠粪便乳杆菌数量仍然大于对照组；16d 与 0d 相比，益生菌实验组乳杆菌数呈显著增加（$P<0.05$）。表明：停止灌胃后，4 株乳杆菌对小鼠肠道乳杆菌仍然有一定的调节作用，调节作用可维持一周左右。戊糖乳杆菌 Ind1 和 Ind3 与商业菌株嗜酸乳杆菌 NCFM、植物乳杆菌 LP115 对肠道乳杆菌的调节作用没有明显的差异。

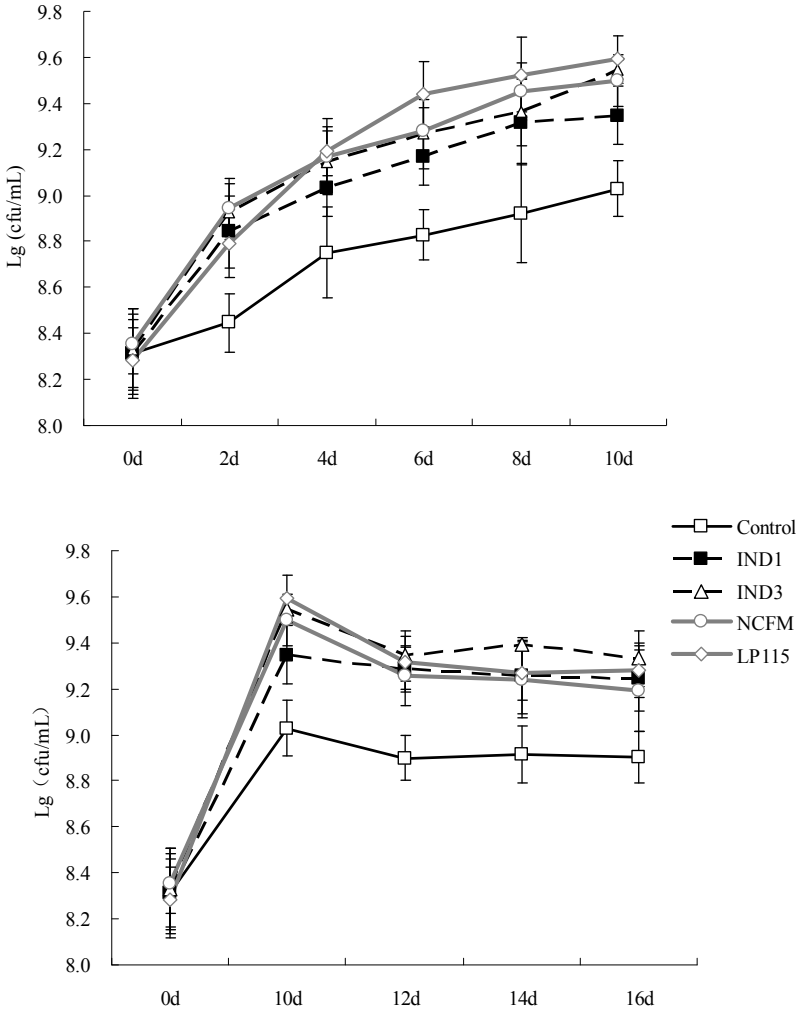


图 5.2 小鼠肠道乳杆菌数量变化趋势

Fig. 5.2 Effects of the probiotics on murine *Lactobacillus* spp.

表 5.2 小鼠肠道中乳杆菌数量变化（$lg10^n$/mL）

Table 5.2 Effects of probiotics on lactobacillus of the mouse intestinal tract

时间	乳杆菌数量（$lg10^n$/mL）				
	对照组	Ind1 组	Ind3 组	NCFM 组	LP115 组
0d	8.31±0.19	8.31±0.15	8.33±0.17	8.35±0.13	8.28±0.14
10d	9.03±0.12*	9.35±0.13**#	9.55±0.04**#	9.50±0.11**#	9.59±0.10**#
12d	8.90±0.10*	9.29±0.10**	9.34±0.11**	9.25±0.13*	9.31±0.11*
14d	8.91±0.13	9.26±0.17*	9.32±0.09*	9.24±0.17*	9.27±0.12*
16d	8.90±0.11	9.25±0.14*	9.33±0.12*	9.19±0.18*	9.28±0.12*

注：表中实验数据采用平均值±标准差表示，均为对数值。与 0d 相比，*：P<0.05 表示差异显著，**：P<0.01 表示差异极显著；与对照组相比，#：P<0.05 表示差异显著，##：P<0.01 表示差异极显著。

Note: Stool samples were collected and detected by plant count prior to administration treatment, on day 2, 4, 6, 8, 10 of treatment, and 12, 14, 16 days after discontinuation of dosage. The table presents mean numbers ± standard deviation of Lactobacillus of the mouse intestinal tract. Each value is the mean of values from three or four experiments. *: P<0.05, **: P<0.01 compared with 0d; #: P<0.05, ##: P<0.01 compared with control group.

表 5.3 鼠肠道中双歧杆菌数量变化（lg10n/mL）

Table 4.3 cts of probiotics on bifidobacteria of the mouse intestinal tract

时间	双歧杆菌数量（$lg10^n$/mL）				
	对照组	**Ind1 组**	**Ind3 组**	**NCFM 组**	**LP115 组**
0d	7.83±0.16	7.87±0.13	7.87±0.14	7.74±0.13	7.94±0.13
10d	8.37±0.11*	8.60±0.15*	8.93±0.18**#	8.97±0.10**#	8.96±0.17*#
12d	8.23±0.13	8.33±0.13*	8.77±0.13**	8.98±0.12**	8.74±0.19**
14d	8.19±0.14	8.17±0.20	8.66±0.16**	8.90±0.12**	8.52±0.13*
16d	8.05±0.15	8.16±0.15	8.32±0.11	8.34±0.12	8.21±0.09

注：表中实验数据采用平均值±标准差表示，均为对数值。与 0d 相比，*：P<0.05 表示差异显著，**：P<0.01 表示差异极显著；与对照组相比，#：P<0.05 表示差异显著，##：P<0.01 表示差异极显著。

Note: The table presents mean numbers ± standard deviation of Lactobacillus of the mouse intestinal tract. Each value is the mean of values from three or four experiments. *: P<0.05, **: P<0.01 compared with 0d; #: P<0.05, ##: P<0.01 compared with control group.

（2）灌胃 4 株乳杆菌对小鼠肠道双歧杆菌的调节作用及其持续时间

灌胃前、灌胃期间及停止灌胃以后，各实验组小鼠粪便双歧杆菌数量变化见表 4-3，实验期间各实验组双歧杆菌数量与 0d（灌胃前）相比都有所增加（图 5.3 与灌

胃前（0d）相比，10d 时对照组、Ind1 组、LP115 组双歧杆菌数量增加显著（P<0.05），Ind3 组、NCFM 组肠道双歧杆菌增加极显著（P<0.01）；Ind3、NCFM 和 LP115 实验组双歧杆菌数量与对照组相比差异显著（P<0.05），Ind1 实验组灌胃期间各取样时间点与对照组相比，小鼠双歧杆菌数量无显著性差异。表明：饲胃含戊糖乳杆菌 Ind3、嗜酸乳杆菌 NCFM 和植物乳杆菌 LP115 的脱脂乳可以促进小鼠肠道中双歧杆菌数量，而戊糖乳杆菌 Ind1 对双歧杆菌没有明显的增值作用。

停止灌胃后，各实验组小鼠粪便双歧杆菌数量与灌胃期间相比有所回落。14d 时 Ind3 和 NCFM 实验组小鼠粪便双歧杆菌数量与 0d 相比仍然差异极显著（P<0.01），LP115 实验组差异显著（P<0.05）；Ind1 组双歧杆菌数量基本回到灌胃前的水平。16d 时各实验组小鼠粪便双歧杆菌数量仍然多于灌胃前，并基本接近灌胃前的水平。停止灌胃以后各益生菌实验组与对照组相比，双歧杆菌数量变化不显著。结果表明：停止灌胃后，戊糖乳杆菌 Ind3 与商业菌株嗜酸乳杆菌 NCFM 和植物乳杆菌 LP115 对肠道双歧杆菌仍然有增值作用，且调节作用可维持 4d 左右。

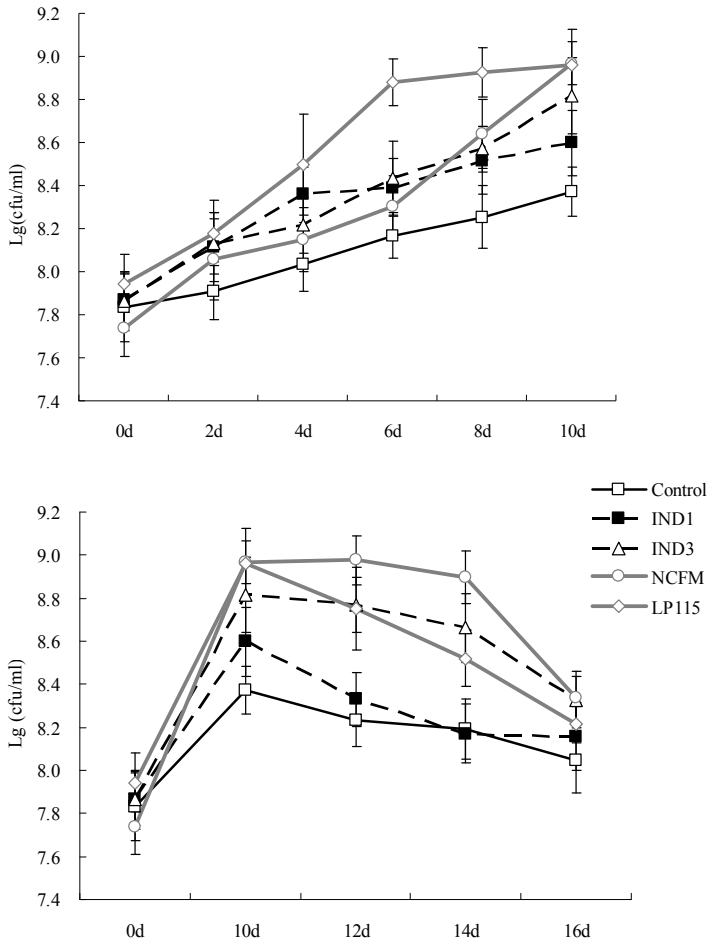


图 5.3 小鼠肠道双歧杆菌数量变化趋势

Fig.5.3 Effects of the probiotics on murine Bifidobacterium spp.

（3）灌胃 4 株乳杆菌对小鼠肠道肠杆菌的调节作用及其持续时间

灌胃含有 4 株乳杆菌（5×10^9cfu/ml）的脱脂乳，小鼠粪便肠杆菌数量变化如表 4-4。实验期间对照组小鼠粪便肠杆菌数量无显著性变化；各益生菌实验组，灌胃期间肠杆菌数量呈下降趋势（如图 4-4）。与灌胃前（0d）相比，灌胃第 10d Ind3、Ind1、NCFM 和 LP115 实验组肠杆菌数量显著减少（P<0.05）；与对照组小鼠粪便肠杆菌数相比，Ind3、NCFM 实验组差异极显著（P<0.01）；Ind1、LP115 实验组差异显著（P<0.05）。表明：灌胃戊糖乳杆菌 Ind3 和 Ind1、嗜酸乳杆菌 NCFM、植物乳杆菌 LP115 可抑制小鼠肠道肠杆菌的繁殖，菌株 Ind3、NCFM 对肠杆菌抑制作用略好于 Ind1 和 LP115。

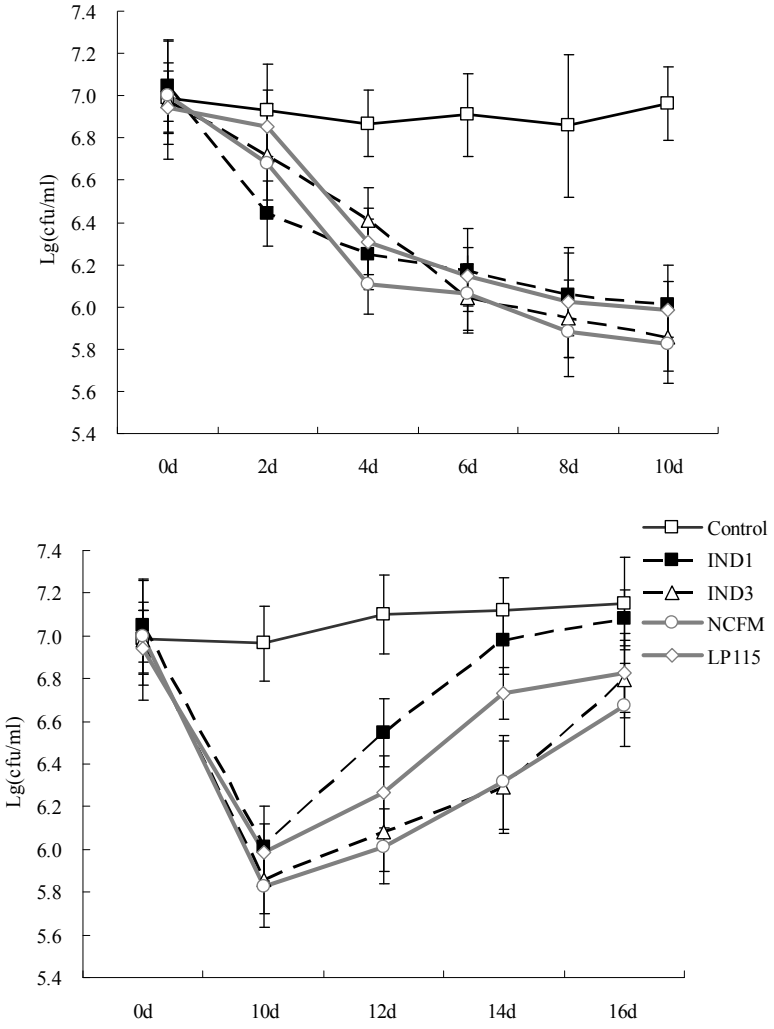


图 5.4 小鼠肠道肠杆菌数量变化趋势

Fig.5.4 Effects of the probiotics on murine Enterobacilli

由图 5.4 知，停止灌胃后各实验组小鼠粪便肠杆菌数量呈现增加趋势。第 16d，

Ind1、Ind3、NCFM、LP115 实验组小鼠粪便肠杆菌数量仍然低于灌胃前的水平；各益生菌实验组肠杆菌数量低于对照组，但无显著差异。14d 时 Ind1 实验组小鼠肠杆菌数量回升到灌胃前水平。表明：停止灌胃以后，戊糖乳杆菌 Ind3 和 Ind1、嗜酸乳杆菌 NCFM、植物乳杆菌 LP115 仍然可调节肠道中肠杆菌的数量，调节作用可维持 6d 左右。

表 5.4 中肠杆菌数量变化（lg10n/mL）

Table 5.4 cts of probiotics on entericbacilli of the mouse intestinal tract

时间	肠杆菌数量（$lg10^n$/mL）				
	对照组	Ind1 组	Ind3 组	NCFM 组	LP115 组
0d	6.99±0.17	7.05±0.19	6.98±0.13	7.00±0.13	6.94±0.10
10d	6.96±0.17	6.01±0.19*#	5.85±0.16*##	5.82±0.19*##	5.99±0.13*#
12d	7.10±0.18	6.55±0.16	6.08±0.19*#	6.01±0.18*##	6.27±0.17##
14d	7.12±0.15	6.98±0.16	6.29±0.22	6.32±0.22##	6.73±0.12
16d	7.15±0.22	7.08±0.13	6.80±0.18	6.68±0.19	6.83±0.19

注: 表中实验数据采用平均值±标准差表示，均为对数值。与 0d 相比，*：P<0.05 表示差异显著，**：P<0.01 表示差异极显著；与对照组相比，#：P<0.05 表示差异显著，##：P<0.01 表示差异极显著。

Note: The table presents mean numbers ± standard deviation of Lactobacillus of the mouse intestinal tract. Each value is the mean of values from three or four experiments. *: P<0.05, **: P<0.01 compared with 0d; #: P<0.05, ##: P<0.01 compared with control group

表 5.5 球菌数量变化（lg10n/mL）

Table 5.5 cts of probiotics on enterococcus of the mouse intestinal tract

时间	肠球菌数量（$lg10^n$/mL）				
	对照组	Ind1 组	Ind3 组	NCFM 组	LP115 组
0d	8.98±0.17	9.02±0.19	9.05±0.13	8.99±0.13	8.93±0.10
10d	9.29±0.14	8.87±0.24	8.80±0.19#	8.68±0.16##	8.66±0.24#
1	9.27±0.	9.02±0.	8.93±0.30	8.87±0.21	8.88±0.1

2d	17	18		#	8
1	9.34±0.	9.18±0.	9.16±0.15	9.06±0.17	9.13±0.2
4d	19	17			0
1	9.34±0.	9.22±0.	9.18±0.17	9.16±0.20	9.21±0.1
6d	29	13			2

注: 表中实验数据采用平均值±标准差表示，均为对数值。与 0d 相比，*：P<0.05 表示差异显著，**：P<0.01 表示差异极显著；与对照组相比，#：P<0.05 表示差异显著，##：P<0.01 表示差异极显著。

Note: The table presents mean numbers ± standard deviation of Lactobacillus of the mouse intestinal tract. Each value is the mean of values from three or four experiments. *: P<0.05, **: P<0.01 compared with 0d; #: P<0.05, ##: P<0.01 compared with control group

（4）灌胃 4 株乳杆菌对小鼠肠道肠球菌的调节作用及其持续时间

灌胃前、灌胃期间各实验组小鼠粪便肠球菌数量变化（见图 5.5）。与灌胃前（0d）相比，对照组小鼠粪便中肠球菌数量呈上升趋势，差异不显著（P>0.05）；灌胃后各益生菌实验组小鼠肠道肠球菌数量有所减少，但无显著性差异（P>0.05）。灌胃第 10d 益生菌实验组与对照组相比，NCFM 实验组：差异极显著（P<0.01）；Ind3、LP115 实验组：差异显著（P<0.05）；Ind1 实验组：差异不显著（P>0.05）。表明：灌胃戊糖乳杆菌 Ind1 和 Ind3、嗜酸乳杆菌 NCFM、植物乳杆菌 LP115 对小鼠肠道肠球菌的繁殖有不同程度的抑制作用。

由图 5.5 灌胃后，各实验组肠球菌数变化呈增加趋势。第 12d，Ind1、Ind3、NCFM、LP115 实验组小鼠粪便肠球菌数均恢复到灌胃前水平。但是直到第 16 天，益生菌实验组各取样时间点小鼠粪便肠球菌数量仍然低于对照组，差异不显著（P>0.05）。根据肠道菌群调节标准，停止灌胃后，戊糖乳杆菌 Ind1 和 Ind3，嗜酸乳杆菌 NCFM、植物乳杆菌 LP115 仍然可以抑制小鼠肠道肠球菌繁殖，但是其作用仅能维持 2d 左右，需要不断的摄入才可继续维持其抑制作用。

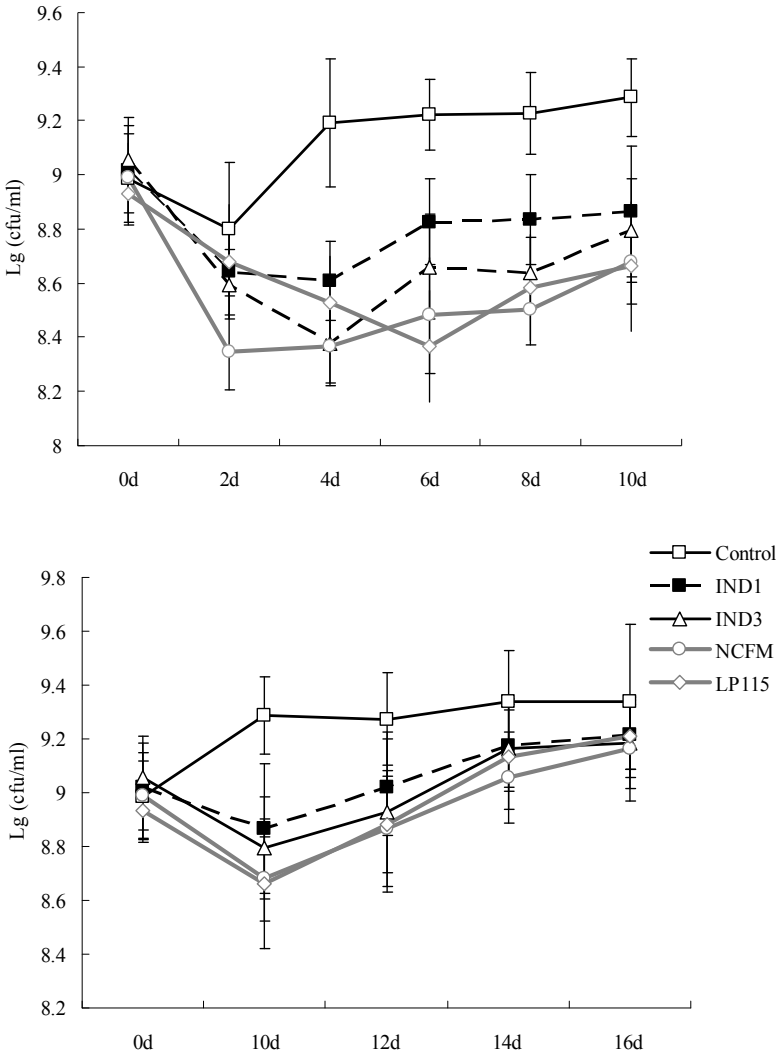


图 5.5 小鼠肠道肠球菌数量变化趋势

Fig. 5.5 Effects of the probiotics on murine Enterococcus

（5）灌胃 4 株乳杆菌对小鼠肠道产气荚膜梭菌的调节作用及其持续时间

灌胃前、灌胃期间及停止灌胃以后，各实验组小鼠粪便产气荚膜梭菌数量变化（见图 5.6。对照组小鼠粪便中产气荚膜梭菌数量与灌胃前（0d）相比，呈增加趋势无显著性差异（P>0.05）；灌胃后各益生菌实验组产气荚膜梭菌数量均呈下降趋势，灌胃第 10 天与灌胃前（0d）相比，Ind1、Ind3、NCFM、LP115 实验组：产气荚膜梭菌数量差异极显著（P<0.01）。灌胃第 10d，益生菌实验组产气荚膜梭菌数均低于对照组（P<0.01）。表明：灌胃戊糖乳杆菌 Ind1 和 Ind3、嗜酸乳杆菌 NCFM、植物乳杆菌 LP115 有效可以抑制小鼠肠道产气荚膜梭菌的增殖。

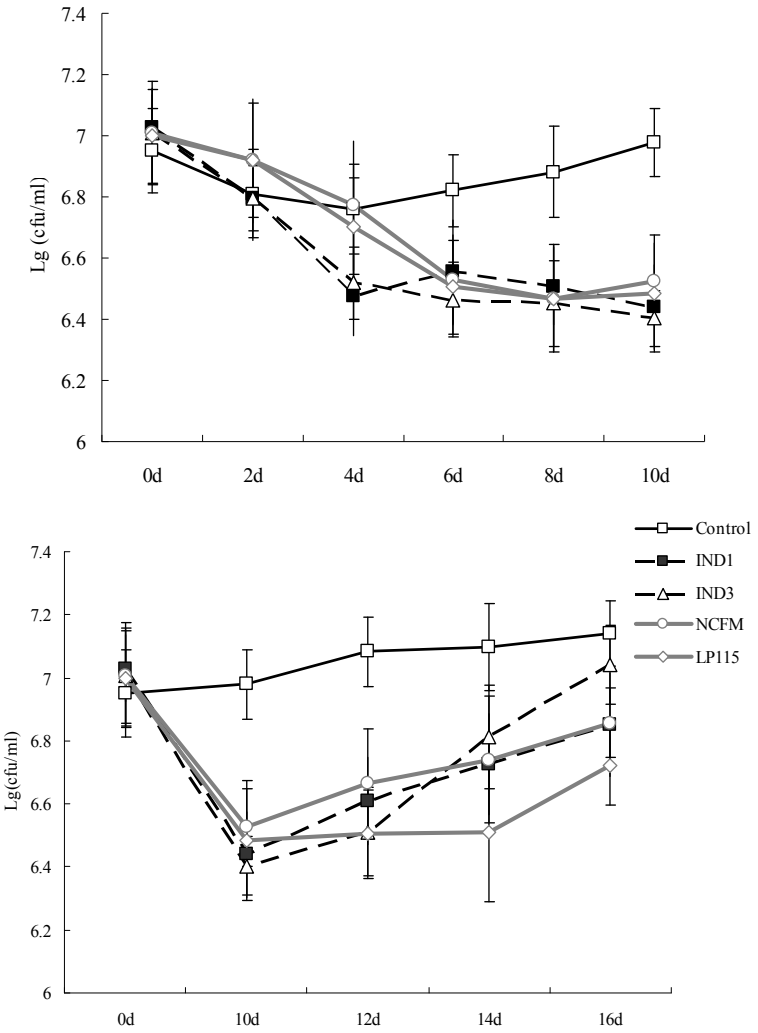


图 5.6 小鼠肠道产气荚膜梭菌数量变化

Fig. 5.6 Effects of the probiotics on murine Clostridium perfringens

停止灌胃后，各益生菌实验组小鼠粪便产气荚膜梭菌数量有所回升，Ind1、Ind3、NCFM、LP115 实验组各取样时间点小鼠粪便产气荚膜梭菌数量仍然低于对照组。14d，Ind1、LP115 实验组产气荚膜梭菌数与对照组相比，仍然差异显著（P<0.05）。第 16d 益生菌实验组小鼠肠道产气荚膜梭菌数量基本接近灌胃前的水平。停止灌胃后，戊糖乳杆菌 Ind1 和 Ind3、嗜酸乳杆菌 NCFM、植物乳杆菌 LP115 对小鼠肠道产气荚膜梭菌的抑制作用可维持 4d 左右。

表 5.6 中产气荚膜梭菌数量变化（lg10n/mL）

Table 5.6 the probiotics on murine Clostridium perfringens

时间	产气荚膜梭菌数量（$lg10^n$/mL）				
	对照组	**Ind1 组**	**Ind3 组**	**NCFM 组**	**LP115 组**
0	6.95±0.	7.03±0.1	7.01±0.17	7.01±0.15	7.00±0.1

d	14	1			5
1	6.98±0.	6.44±0.1	6.40±0.10	6.53±0.12	6.49±0.1
0d	11	4**##	**##	**##	9**##
1	7.08±0.	6.61±0.1	6.51±0.14	6.66±0.18	6.51±0.1
2d	11	4#	*##	#	4#
1	7.10±0.	6.73±0.1	6.81±0.16	6.74±0.20	6.53±0.2
4d	14	6#			2#
1	7.14±0.	6.85±0.1	7.04±0.13	6.86±0.11	6.72±0.1
6d	10	6			3

注: 表中实验数据采用平均值±标准差表示，均为对数值。与 0d 相比，*：P<0.05 表示差异显著，**：P<0.01 表示差异极显著；与对照组相比，#：P<0.05 表示差异显著，##：P<0.01 表示差异极显著。

Note: The table presents mean numbers ± standard deviation of Lactobacillus of the mouse intestinal tract. Each value is the mean of values from three or four experiments. *: P<0.05, **: P<0.01 compared with 0d; #: P<0.05, ##: P<0.01 compared with control group

益生菌进入宿主肠道后可以通过黏附素与肠黏膜上皮细胞受体黏附，占位定植于肠道中，与病原菌竞争黏附位点，如果这些吸附位点被较多的有益微生物所占据，病原微生物就会被排斥，从而起到对病原菌的定植拮抗作用；肠道中的有益菌代谢产物如乳酸、醋酸降低肠道 pH，产生抑菌物质如过氧化氢、细菌素等，抑制肠道有害菌的繁殖；高剂量益生菌进入宿主肠道中呈优势生长，于肠道中的病原菌及潜在的致病菌竞争营养物质，从而抑制有害菌的生长。

给小鼠饲喂高剂量（5×10^9 cfu/mL）的戊糖乳杆菌 Ind1 和 Ind3、商业菌株嗜酸乳杆菌 NCFM 及植物乳杆菌 LP115 能够有效增加有益菌数量（乳杆菌和双歧杆菌），抑制有害菌（肠杆菌、肠球菌和产气荚膜梭菌）的生长繁殖。肠道菌群调节标准知，戊糖乳杆菌 Ind1 和 Ind3 能够起到调节宿主肠道菌群平衡的作用。

5.4 本章小结

（1）灌胃戊糖乳杆 Ind1 活细胞 10d 后，小鼠肠道中乳杆菌及双歧杆菌数量显著增加，肠杆菌和产气荚膜梭菌的繁殖受到显著抑制，但肠球菌的抑制作用不明显。灌胃戊糖乳杆菌株 Ind3 和商业嗜酸乳杆菌株 NCFM 活细胞 10d 后，小鼠肠道乳杆菌和双歧杆菌数量显著增加；肠杆菌数量显著减少，能够显著抑制产气荚膜梭菌，肠球菌数量有所减少但变化不明显。灌胃商业性益生菌植物乳杆菌株 LP115 活细胞 10d 后，小鼠粪便乳杆菌和双歧杆菌数量增加显著，肠杆菌数量显著减少，但对肠球菌和产气荚膜梭菌的抑制作用不明显。灌胃停止 6d 以后，饲喂四株乳杆菌的小鼠肠道中的肠杆菌、肠球菌、产气荚膜梭菌数量均小于对照组，且对乳杆菌仍然具有显著增值作用。

这表明，与商业化益生菌嗜酸乳杆菌 NCFM 和植物乳杆菌 LP115 一样，灌胃戊糖乳杆菌 Ind1 和 Ind3 能够对正常小鼠肠道菌群产生不同程度的调节作用，其益生功效可维持一周左右，需要不断地摄入该菌株才能够维持其调节肠道微生态菌群平衡的益生功能。

（2）尽管灌胃益生菌或脱脂乳的小鼠体重呈增加趋势，但在灌胃 6d 后，益生菌组小鼠的体重增加量高于对照组。这表明，与商业化益生菌嗜酸乳杆菌 NCFM 和植物乳杆菌 LP115 一样，灌胃戊糖乳杆菌 Ind1 和 Ind3 可以促进肠道营养物质的吸收，改善小鼠的健康。

6. 戊糖乳杆菌抑制突变因子的研究

人的消化道内存在着大约 30 个属 500 多种微生物, 菌群密度在每克 10^{10} 与 10^{11} 个之间，可以分为专性厌氧菌、兼性厌氧菌和需氧菌 3 部分,属于专性厌氧菌的有拟杆菌 (*bacteroides*) 、梭状芽孢杆菌 (*clostridia*) 等 , 兼性厌氧菌有葡萄球菌 (*staphycococci*)、肠道球菌(*enterococci*)、大肠杆菌(*E coli*)等。厌氧菌的数量远远大于需氧菌的数量,并且革兰氏阳性菌占主要部分,大部分为乳酸菌(乳酸杆菌、链球菌、消化链球菌等) 和双歧杆菌,另一部分为革兰氏阴性菌(Calrane G T , 1994)。肠道微生物能够降解体内蛋白质（主要是酪氨酸，苯丙氨酸，色氨酸组氨酸等）产生很多对人体有害的物质，如氨、苯酚、甲苯酚、吲哚、N-二甲基亚硝胺、糖苷配体、次级胆汁酸、雌性激素等。这些废弃物对人体有着多方面的毒害，亚硝胺、吲哚、3-甲基吲哚，苯酚和甲苯酚，雌性激素等有毒代谢废弃物能够提高机体自由基数量，加速组织、细胞病变和老化过程，而且这些有害物质是肿瘤诱变剂，如果人体内长期含有这些物质将导致结肠癌的发生。

本章考察两株戊糖乳杆菌对肠道有害物质如苯酚、对甲酚和吲哚的耐受及清除能力，以便为益生菌的体外筛选和健康效果评价提供依据。两项实验如下

1) 耐受试验：通过向 MRS 培养基添加苯酚、对甲酚和吲哚等突变因子，研究这些突变因子对戊糖乳杆菌 Ind1 和 Ind3 菌株生长的影响。
2) 对突变因子有黏附或降解效果：通过高效液相色谱分析戊糖乳杆菌菌体细胞黏附、降解突变因子的功效性，研究其对突变因子的效果。

6.1 材料与方法

6.1.1 实验材料

苯酚（色谱纯）	sigma公司；
对甲酚（色谱纯）	sigma公司；
吲哚（色谱纯）	sigma公司；
蛋白胨	MERCK KGaA公司；
MRS琼脂培养基	MERCK KGaA公司；
MRS肉汤培养基	MERCK KGaA公司；
NaCl	国药集团；
乙醇（分析纯）	国药集团；
甲醇（色谱纯、0.2um 过滤）	MERCK KGaA 公司；

乙腈（色谱纯、0.2um 过滤） MERCK KGaA 公司；

bugbox厌氧培养箱 Ruskinn公司；
MS3 basic旋涡混匀器 德国IKA公司；
pH计 北京赛多维斯天平有限公司；
Bs-300s精密分析天平 北京赛多维斯天平有限公司；
AUTOCLAVE MLS-3750灭菌器 SANYO Electric有限公司；
DKB-600B型电热恒温水箱 上海一恒科技有限公司；
离心机 德国Hettich公司；
戊糖乳杆菌Ind1，Ind3 北京林业大学生物学院保藏；
高效液相色谱 agilent1100 系列， agilent 公司；
ZORBAX Eclipse XDB-C18 色谱柱（4.6×250mm 5-micron） agilent 公司；

6.1.2 试验方法

6.1.2.1 突变因子对戊糖乳杆菌生长的影响

溶液配制：分别准确称取 1g±0.003g 苯酚、对甲酚、吲哚，其中苯酚、对甲酚加入 200mL 水溶解，吲哚加入 200mL 乙醇溶解，分别得到 5mg/mL 的苯酚、对甲酚、吲哚母液，121°C、15min 灭菌备用。

突变因子培养基配制：在 MRS 肉汤培养基中分别加入苯酚、对甲酚、吲哚配制成含浓度为 0、5、50、150μg/mL 的 MRS 肉汤培养基。

菌种活化：戊糖乳杆菌 Ind1、Ind3 在 MRS 肉汤培养基中 37°C 厌氧培养 24 h，离心（6,000g、20min），10mL 无菌 PBS(pH6.4)洗涤 3 次，重新悬浮菌体，使用分光光度计调整菌体浓度为 109cfu/mL。按接种量 3%接入含突变因子的灭菌 MRS 肉汤培养基中，37°C 厌氧培养 144 h。

活菌菌数测定：每 24 h 用 MRS 琼脂培养基（含琼脂 1.5%）平板计数法测定菌数，无菌 0.85% NaCl 溶液 10 倍稀释平板倾注，3 个平行，37°C 厌氧培养 48 h，选择菌数在 30-300 之间的平板计数。

6.2.2.2 戊糖乳杆菌降解和吸附突变因子的研究

（1）溶液配制：分别准确称取 1g±0.003g 苯酚、对甲酚、吲哚，其中苯酚、对甲酚加入 200mL 水溶解，吲哚加入 200mL 乙醇溶解，分别得到 5μg/mL 的苯酚、对甲酚、吲哚母液，121°C、15min 灭菌备用。在 MRS 肉汤培养基中分别加入苯酚、对甲酚、吲哚配制成含浓度为 0、5、50、150μg/mL 的 MRS 肉汤培养基。

（2）菌种活化：戊糖乳杆菌 Ind1 和 Ind3 在 MRS 肉汤培养基中 37°C 厌氧培养 24 h，离心（6,000g、20min），10mL 无菌 PBS(pH6.4)洗涤 3 次，重新悬浮菌体，使

用分光光度计调整菌体浓度为 10^9cfu/mL。按接种量 3%接入含突变因子的灭菌 MRS 肉汤培养基中，37°C 厌氧培养 144 h。

（3）菌体与培养基分离：将培养基 4°C 离心（6,000g、20min）收集菌体细胞，PBS 洗涤三次。

（4）菌体细胞破碎：收集菌体细胞，0.2%溶菌酶破（37°C，60min）碎细胞。

（5）苯酚、对甲酚的 HPLC 条件建立：根据流动相与固定相的极性确定高效液相色谱的定性和定量条件，因苯酚检测波长超过乙腈的紫外切点，因此选择乙腈与水做为流动相，根据柱效和柱压确定流速。确定条件如下：

苯酚 HPLC 检测条件： 进样量：20ul，流速：0.5mL/min，流动相：乙腈：水=50：50；温度：室温（25°C）；波长：220nm；保留时间：7.939s

对甲酚 HPLC 检测条件：进样量：30ul，流速：0.6mL/min，流动相：乙腈：水=50：50；温度：室温（25°C）；波长：220nm；保留时间：7.924s

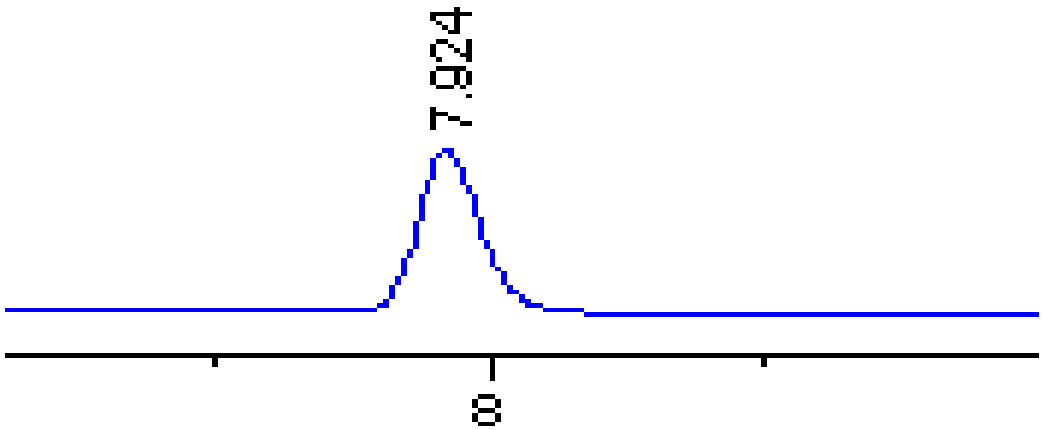


图 6.1 对甲酚 HPLC 图

Fig. 6.1the p-cresol photo of HPLC

苯酚和对甲酚标准曲线的制作：准确称取苯酚和对甲酚标准品加入双蒸水配制成 10，20，30，40，50μg/mL 的标准溶液，于 220 nm 处测得吸收峰值，以峰面积建立苯酚和对甲酚检测标准曲线，得到苯酚曲线方程 y＝1342.1x 与对甲酚曲线方程 y＝1228.9x。

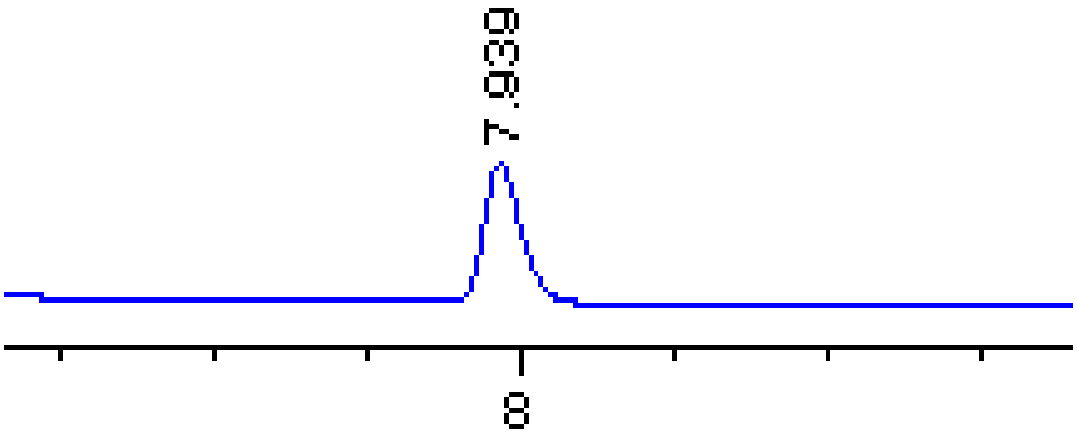


图 6.2 苯酚 HPLC 图

Fig. 6.2the phenolicl photo of HPLC

6.3 结果与分析

6.3.1 不同浓度突变因子对菌株生长的影响

戊糖乳杆菌 Ind1、Ind3 在 MRS 修饰培养基中 37°C 厌氧培养 144 h，每 24 h 计数，得到 0-144 h 生长曲线，通过曲线可以鉴别挥发性酚类物质苯酚、对甲酚、吲哚对菌株的影响。

6.3.1.1 吲哚对菌株的影响

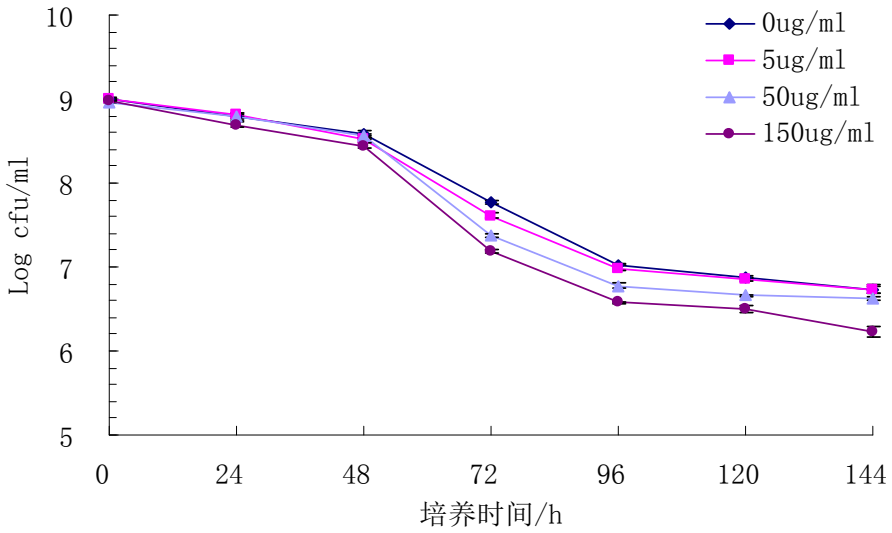


图 6.3 吲哚对戊糖乳杆菌 Ind1 的影响

Fig. 6.3 the indole impact of L. pentosus Ind1

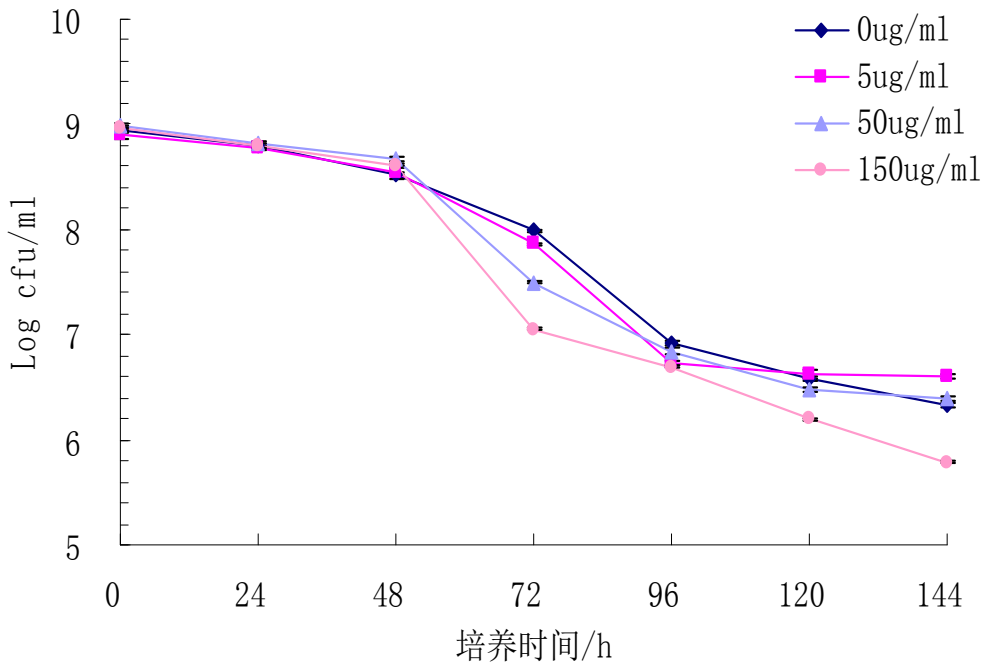


图 6.4 吲哚对戊糖乳杆菌 Ind3 的影响

Fig. 6.4 the indole impact of *L. pentosus* Ind3

图 6.3、6.4 为戊糖乳杆菌 Ind1、Ind3 在 MRS 修饰培养基中不同吲哚浓度、37°C 的厌氧培养条件在下的生长曲线。

图 6.3 为吲哚对 Ind1 的影响，由图可知 MRS 修饰培养基中吲哚浓度为 5μg/mL、50μg/mL 的两条曲线和空白样浓度为 0μg/mL 的曲线差别很小，浓度为 50μg/mL 的曲线在 72-120 h 时活菌菌数稍低于浓度为 0μg/mL 的空白曲线活菌菌数，而 144 h 时又与浓度为 0μg/mL、5μg/mL 的活菌菌数接近；浓度为 150μg/mL 的曲线在 72-144 h 之间低于空白样 0μg/mL 曲线，说明吲哚加入量的多少对 Ind1 的生长有一定的影响。

图 6.4 为吲哚对戊糖乳杆菌 Ind3 的影响，由图可知吲哚浓度为 5μg/mL、50μg/mL 的两条曲线和空白样浓度为 0μg/mL 的曲线没有显著差别，说明戊糖乳杆菌 Ind3 生长不受浓度为 50μg/mL 吲哚的影响；浓度为 150μg/mL 的曲线在 120-144 h 之间低于空白样 0μg/mL 曲线，说明吲哚加入量大小对戊糖乳杆菌 Ind3 的生长有影响。

6.3.1.2 对甲酚对菌株的影响

图 6.5、6.6 为戊糖乳杆菌 Ind1、Ind3 在 MRS 修饰培养基中 37°C 厌氧培养条件下不同对甲酚浓度的生长曲线。由图可知对甲酚浓度为 150μg/mL 的曲线与其他曲线有明显差别。

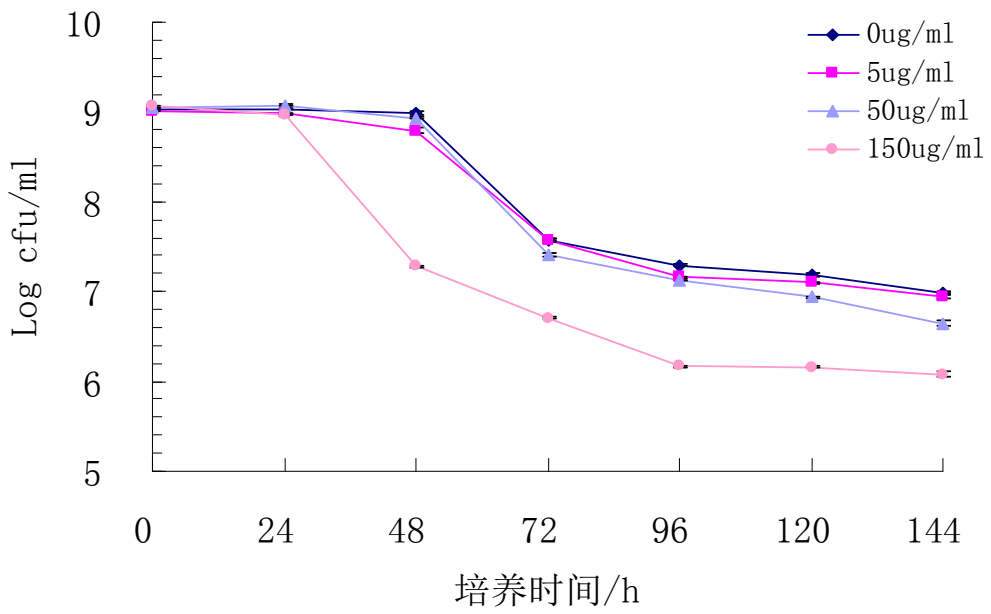


图 6.5 对甲酚对戊糖乳杆菌 Ind1 的影响

Fig. 6.5 the p-cresol impact of *L. pentosus* Ind1

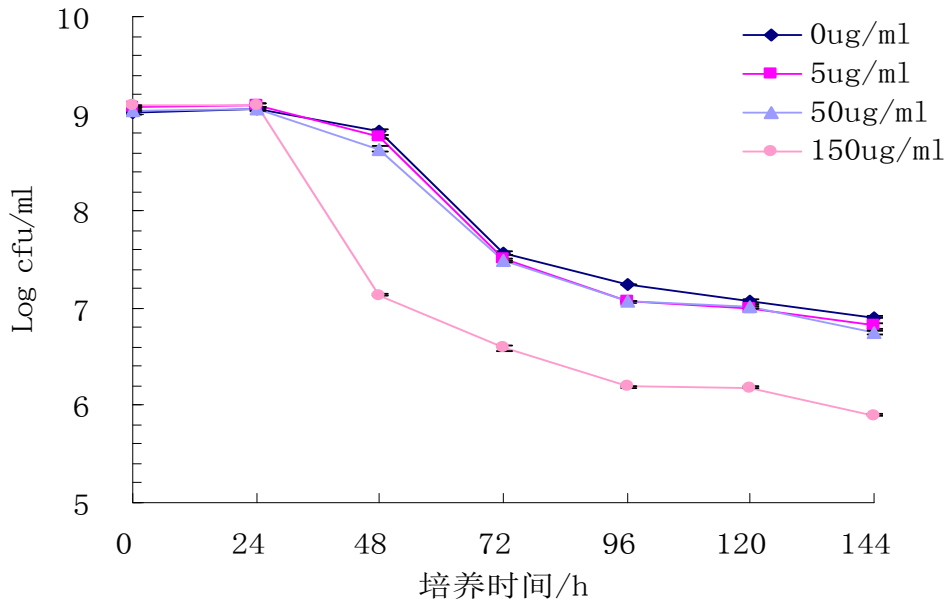


图 6.6 对甲酚对戊糖乳杆菌 Ind3 的影响

Fig. 6.6 the indole impact of *L. pentosus* Ind3t

图 6.5 为对甲酚对戊糖乳杆菌 Ind1 的影响，由图可知修饰培养基中对甲酚浓度为 5μg/mL、50μg/mL 的两条曲线和空白样浓度为 0μg/mL 的曲线没有明显差别，只有浓

度为 50μg/mL 的曲线在 96-144 h 时菌数稍微低于空白样；浓度为 150μg/mL 的曲线在 24-144 h 之间菌数低于空白样，说明当对甲酚加入量为 150μg/mL 时对戊糖乳杆菌 Ind1 的生长有影响。

图 6.6 为对甲酚对戊糖乳杆菌 Ind3 的影响，由图可知修饰培养基中对甲酚浓度为 5μg/mL、50μg/mL 的两条曲线和空白样浓度为 0μg/mL 的曲线没有差别，说明对甲酚浓度为 50μg/mL 是戊糖乳杆菌 Ind3 生长不受影响；浓度为 150μg/mL 的曲线在 24-144 h 之间菌数低于空白样，说明当对甲酚加入量为 150ug/mL 时对戊糖乳杆菌 Ind3 的生长有较大影响。从图 3.3、3.4 可知虽然高浓度的对甲酚对戊糖乳杆菌 Ind1、Ind3 的生长有影响，但是其 144 h 菌种数量维持在较高的 10^6cfu/mL 左右。

6.3.1.3 苯酚对菌株的影响

图 6.7、6.8 为戊糖乳杆菌 Ind1、Ind3 菌株在 MRS 修饰培养基中 37°C 的厌氧培养条件下不同苯酚浓度下的生长曲线。

图 6.7 为苯酚对戊糖乳杆菌 Ind1 的影响，由图可知修饰培养基中不同苯酚浓度曲线在 24-120 h 之间菌数有一定的变化，其中苯酚浓度较高的菌数偏低，但是 120-144 h 菌数又接近，所以在最终并没有影响。

图 6.8 为苯酚对戊糖乳杆菌 Ind3 的影响，由图可知修饰培养基中苯酚浓度为 5μg/mL 曲线和空白样浓度为 0μg/mL 的曲线没有显著差别，而浓度为 50、150μg/mL 曲线在 24-144 h 之间菌数偏低于空白样，说明苯酚加入量大于 50μg/mL 时对戊糖乳杆菌 Ind3 的生长有明显影响。144 h 时菌数维持在 10^5-10^6cfu/mL。

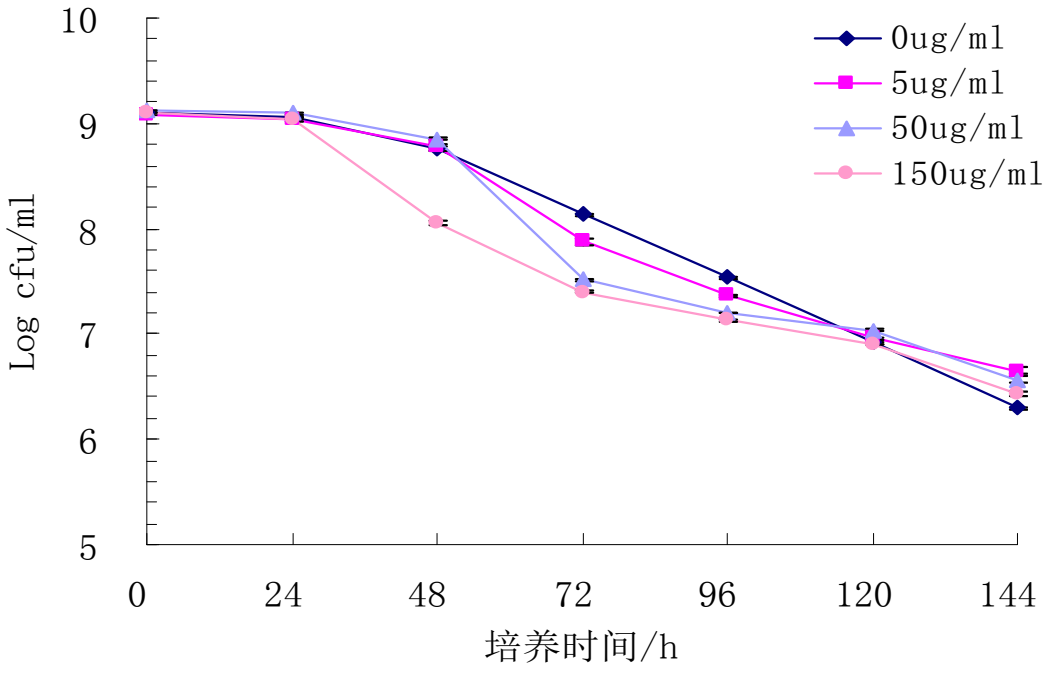


图 6.7 苯酚对戊糖乳杆菌 Ind1 的影响

Fig. 6.7 the phenol impact of *L. pentosus* Ind1

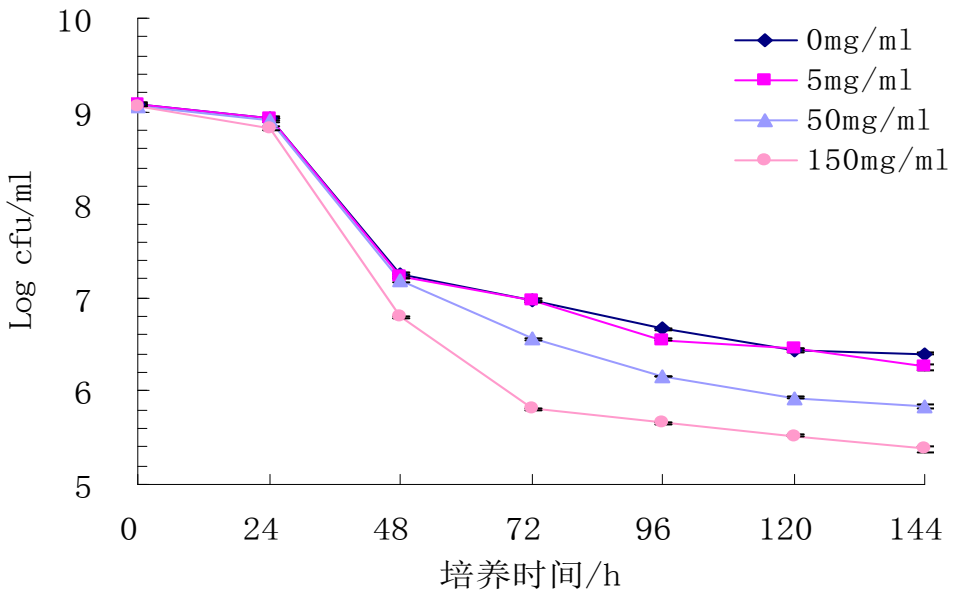


图 6.8 苯酚对戊糖乳杆菌 Ind3 的影响

Fig. 6.8 the phenol impact of *L. pentosus* Ind3

6.3.2 同一浓度突变因子对菌株生长的影响

6.3.2.1 对 Ind1 的影响

图 6.9-6.11 为戊糖乳杆菌 Ind1 在含有相同浓度的苯酚、对甲苯、吲哚 MRS 修饰培养基中 37°C 的厌氧培养 144 h 的生长曲线图。

图 6.9 为戊糖乳杆菌 Ind1 在 MRS 培养基中 37°C 的厌氧培养 144 h 的生长曲线图，MRS 培养基为修饰培养基，含苯酚、对甲苯、吲哚的量为 5μg/mL。图 6.10 为戊糖乳杆菌 Ind1 在 MRS 培养基中 37°C 的厌氧培养 144 h 的生长曲线图，MRS 培养基为修饰培养基，含苯酚、对甲苯、吲哚的量为 50μg/mL。图 6.11 为戊糖乳杆菌 Ind1 在 MRS 培养基中 37°C 的厌氧培养 144 h 的生长曲线图，MRS 培养基为修饰培养基，含苯酚、对甲苯、吲哚的量为 150μg/mL。

由图 6.9-6.11 可知，戊糖乳杆菌 Ind1 在 MRS 修饰培养基中 37°C 的厌氧培养 0-144 h 的过程中，添加相同量的不同突变因子对戊糖乳杆菌 Ind1 的生长有一定的影响，但是戊糖乳杆菌 Ind1 的生长还受到突变因子添加量大小的影响。突变因子的添加量在 5μg/mL 时戊糖乳杆菌 Ind1 在苯酚、对甲苯、吲哚中的生长没有明显区别，144 h 时 MRS 修饰培养基中戊糖乳杆菌 Ind1 的活菌数量大约在 10^7cfu/mL 左右，其中吲哚影

响戊糖乳杆菌 Ind1 生长较苯酚、对甲苯小。突变因子的添加量在 50μg/mL 时戊糖乳杆菌 Ind1 在苯酚、对甲苯中的生长没有明显区别，0-144 h MRS 修饰培养基中戊糖乳杆菌 Ind1 的活菌数量大致相同，而戊糖乳杆菌 Ind1 在吲哚中生长 24-120 h 时活菌数低于苯酚、对甲苯的活菌数。突变因子的添加量在 150μg/mL 时戊糖乳杆菌 Ind1 在苯酚、对甲苯、吲哚中的生长受到影响，戊糖乳杆菌 Ind1 在 MRS 修饰培养基中 37°C

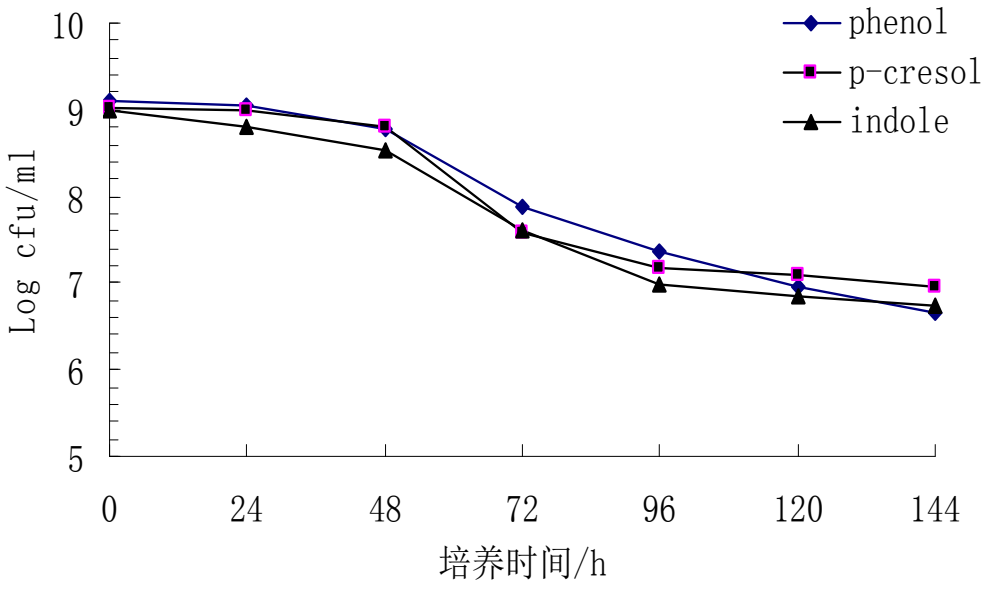


图 6.9 修饰培养基中含 5μg/mL 的突变因子培养 144 h 对 Ind1 的影响

Fig. 6.9 the impact of Ind1 cultured 144 h in medium containing of 5μg/mL phenol, p-cresol, indole

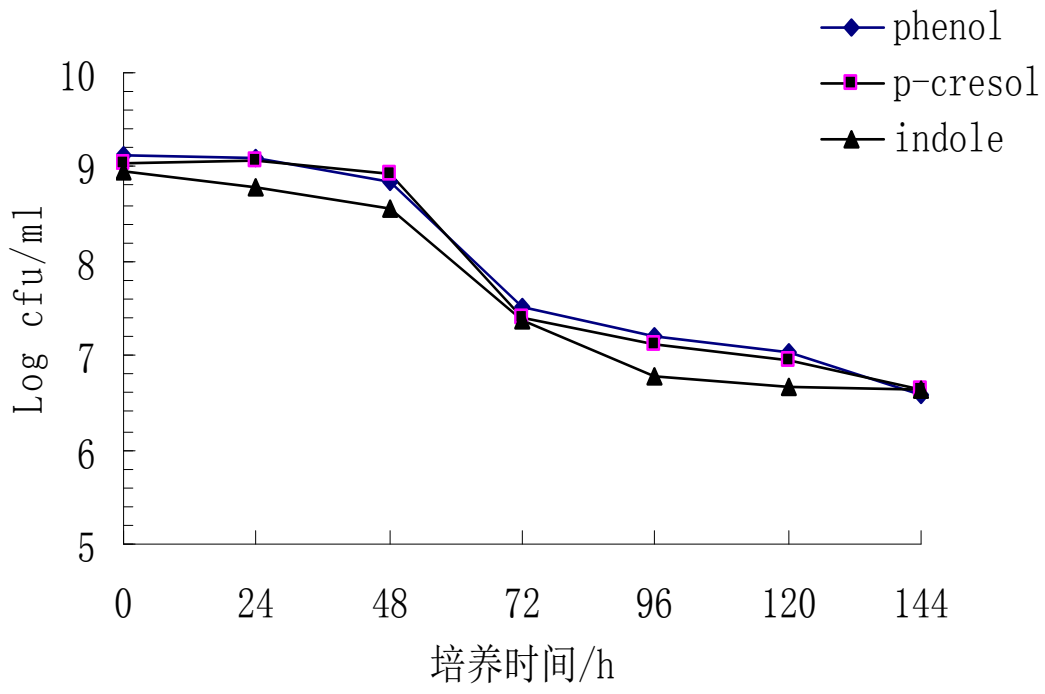


图 6.10 修饰培养基中含 50μg/mL 的突变因子培养 144 h 对 Ind1 的影响

Fig. 6.10 the impact of Ind1 cultured 144 h in medium containing of 50μg/mL phenol, p-cresol, indole

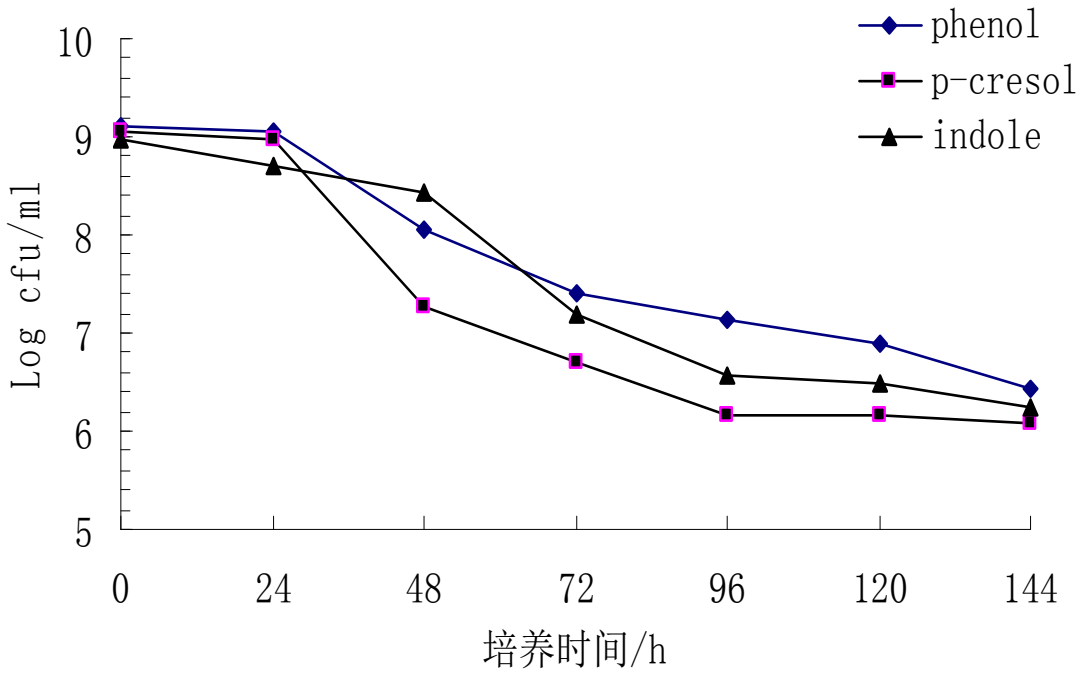


图 6.11 修饰培养基中含 150μg/mL 的突变因子培养 144 h 对 Ind1 的影响

Fig. 6.11 the impact of Ind1 cultured 144 h in medium containing of 150μg/mL phenol, p-cresol, indole

厌氧培养 0-144 h 的活菌数量有较大差别，对甲苯和吲哚对戊糖乳杆菌 Ind1 的生长影响比苯酚的要大，戊糖乳杆菌 Ind1 在浓度为 150μg/mL 的对甲苯的 MRS 修饰培养基中生长时活菌数量低于苯酚和吲哚。

图 6.9-6.11 说明了戊糖乳杆菌 Ind1 在含有相同浓度的苯酚、对甲苯、吲哚 MRS 修饰培养基中 37°C 的厌氧培养 0-144 h 之间的生长情况，由图可知当突变因子的剂量低，一般浓度在 5μg/mL-50μg/mL 之间时，戊糖乳杆菌 Ind1 的生长受突变因子的影响较小，而当突变因子浓度在 50μg/mL 以上时戊糖乳杆菌 Ind1 的生长受到影响。其中，吲哚和对甲苯对菌株的影响较大。

6.3.2.2 对 Ind3 的影响

图 6.12-6.14 为戊糖乳杆菌 Ind3 在含有相同浓度的苯酚、对甲苯、吲哚 MRS 修饰培养基中 37°C 的厌氧培养 144 h 的生长曲线图。

图 6.12 为戊糖乳杆菌 Ind3 在 MRS 培养基中 37°C 的厌氧培养 144 h 的生长曲线图，MRS 培养基为修饰培养基，含苯酚、对甲苯、吲哚的量为 5μg/mL。图 6.13 为戊糖乳杆菌 Ind3 在 MRS 培养基中 37°C 的厌氧培养 144 h 的生长曲线图，MRS 培养基为修饰培养基，含苯酚、对甲苯、吲哚的量为 50μg/mL。图 6.14 为戊糖乳杆菌 Ind3 在 MRS 培养基中 37°C 的厌氧培养 144 h 的生长曲线图，MRS 培养基为修饰培养基，含苯酚、对甲苯、吲哚的量为 150μg/mL。

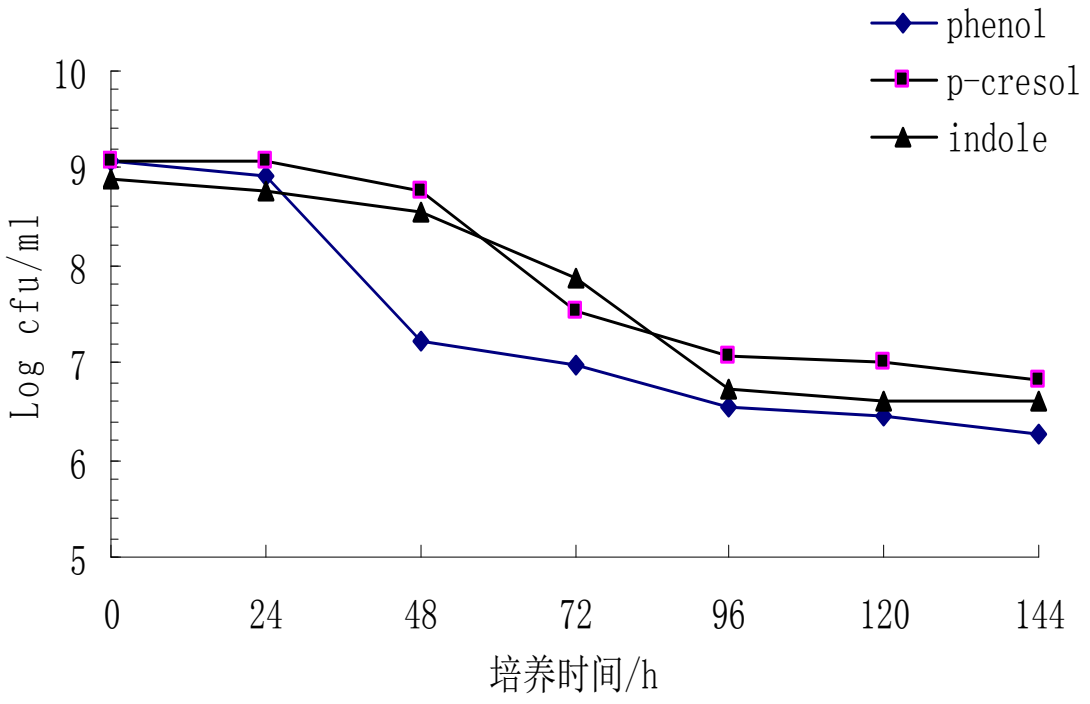


图 6.12 修饰培养基中含 5μg/mL 的突变因子培养 144 h 对 Ind3 的影响

Fig. 6.12 the impact of Ind3 cultured 144h in medium containing of 5μg/mL phenol, p-cresol, indole

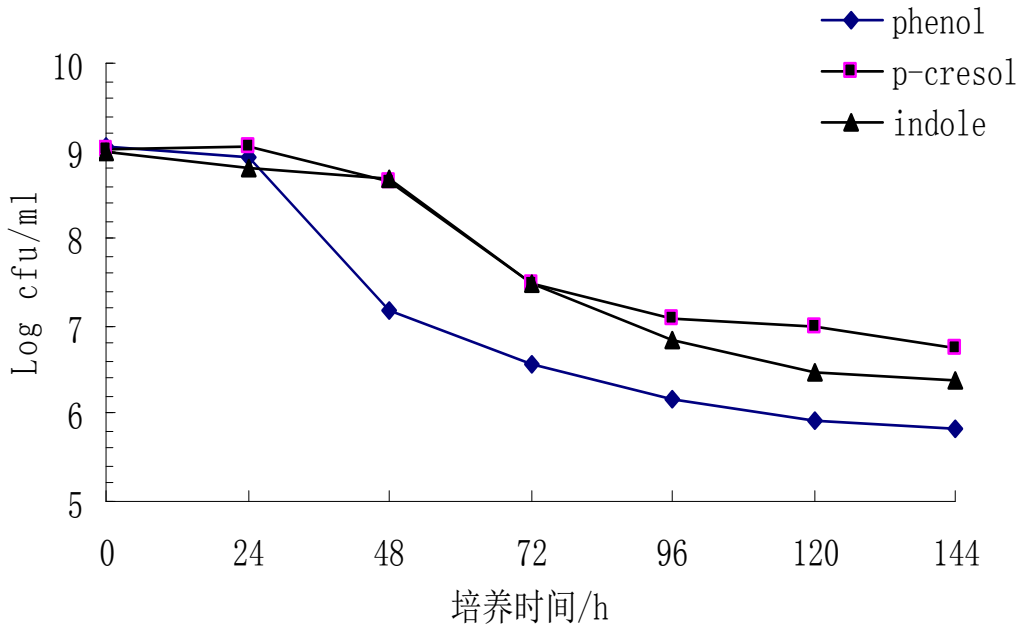


图 6.13 修饰培养基中含 50μg/mL 的突变因子培养 144 h 对 Ind3 的影响

Fig. 6.13 the impact of Ind3 cultured 144 h in medium containing of 50μg/mL phenol, p-cresol, indole

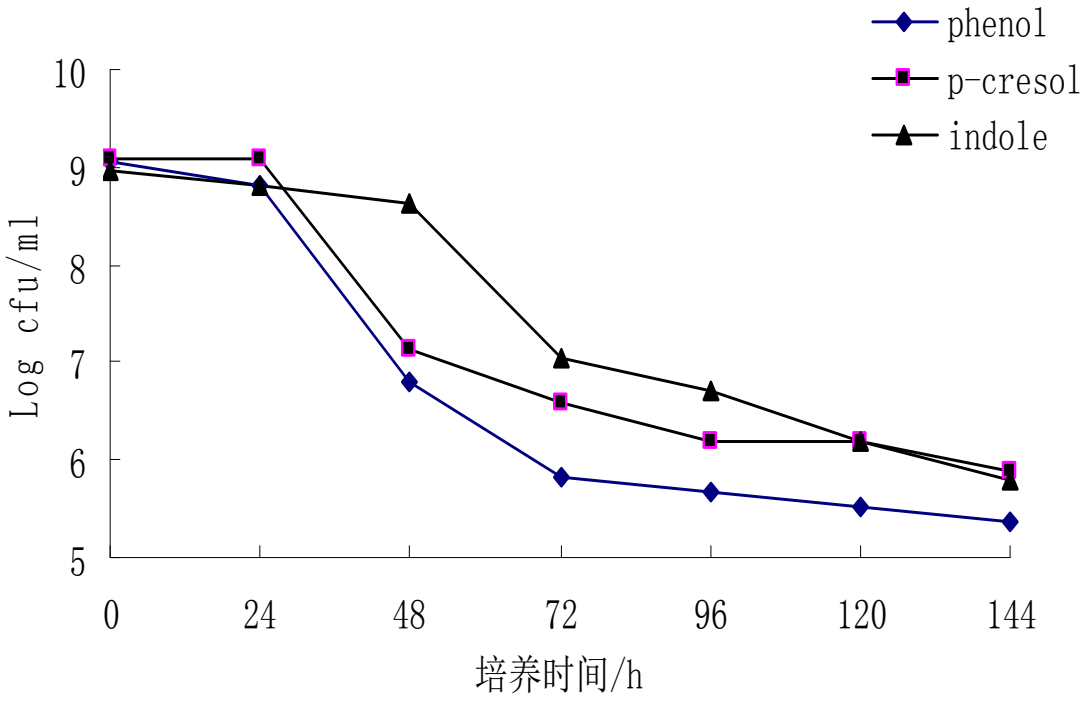


图 6.14 修饰培养基中含 150μg/mL 的突变因子培养 144 h 对 Ind3 的影响

Fig. 6.14 the impact of Ind3 in medium containing of 150μg/mL phenol, p-cresol, indole

由图 6.12-6.14 可知，在 MRS 修饰培养基中戊糖乳杆菌 Ind3 在 37°C 厌氧培养条件下培养 0-144 h 的过程中，添加相同量的不同突变因子对戊糖乳杆菌 Ind3 的生长有

显著的影响，其中戊糖乳杆菌 Ind3 的生长受到苯酚的影响最大，说明戊糖乳杆菌 Ind3 在含有苯酚、尤其是苯酚含量较高的时候生长会受到限制，这也和突变因子添加量大小成正比。突变因子的添加量在 5μg/mL 时戊糖乳杆菌 Ind3 在苯酚、对甲苯、吲哚中的生长没有区别，144 h 时 MRS 修饰培养基中戊糖乳杆菌 Ind3 的活菌数量大约在 10^7cfu/mL 左右，其中苯酚影响戊糖乳杆菌 Ind3 生长较苯酚、对甲苯大。突变因子的添加量在 50μg/mL 时戊糖乳杆菌 Ind3 在吲哚、对甲苯中的生长没有明显区别，0-144 h MRS 修饰培养基中戊糖乳杆菌 Ind3 的活菌数量大约相同，而戊糖乳杆菌 Ind1 在苯酚中生长 24-144 h 时活菌数低于苯酚、对甲苯的活菌数。突变因子的添加量在 150μg/mL 时戊糖乳杆菌 Ind3 在苯酚、对甲苯、吲哚中的生长受到影响，戊糖乳杆菌 Ind3 在 MRS 修饰培养基中 37°C 厌氧培养 0-144 h 的活菌数量有较大差别，对甲苯和吲哚对戊糖乳杆菌 Ind3 的生长影响比苯酚的要小，戊糖乳杆菌 Ind3 在浓度为 150μg/mL 的苯酚的 MRS 修饰培养基中生长时活菌数量低于对甲苯和吲哚。

图 6.12-6.14 说明了戊糖乳杆菌 Ind3 在含有相同浓度的苯酚、对甲苯、吲哚 MRS 修饰培养基中 37°C 的厌氧培养 0-144 h 之间的生长情况，由图可知在突变因子的剂量低时，一般浓度在 5μg/mL-150μg/mL 之间时，戊糖乳杆菌 Ind3 的生长受到一定的影响，但是突变因子的影响较小，最终活菌数维持在 10^6cfu/mL 左右。

6.4 解析与讨论

（1）通过模拟人体肠道环境中酚类物质的浓度水平对戊糖乳杆菌 Ind1 和 Ind3 生长的影响表明，在 37°C 厌氧条件下培养 144 h 后，尽管不同浓度的酚类、对甲苯和吲哚成分会影响其生长，但 2 株的活菌数量仍然能够维持在 10^6cfu/mL，说明 2 株戊糖乳杆菌对肠道中的有害突变物质有较高的耐受性。

（2）在 5μg/mL-50μg/mL 的低剂量突变因子存在下，戊糖乳杆菌 Ind1 生长受影响较小，而当浓度大于 50μg/mL 则菌株 Ind1 的生长受影响较大。其中，吲哚和对甲苯对菌株生长的影响较大。戊糖乳杆菌 Ind3 在 5μg/mL-150μg/mL 浓度的苯酚、对甲苯、和吲哚存在下，其生长尽管受到一定的影响，但与菌株 Ind1 相比则生长受到的影响较小，最终活菌数仍能维持在 10^6cfu/mL。显然，戊糖乳杆菌对肠道内突变物的抗性差异是与菌株密切关联的。

6.4.1 MRS 肉汤培养基中突变因子的变化

将乳酸菌在含有浓度为 5、50μg/mL 苯酚、对甲酚的 MRS 肉汤培养基中 37°C 培养 24 h、144 h，然后对 MRS 培养基进行处理，HPLC 检测，结果如表 6.1。从表中可以看出乳酸菌在含 5μg/mL 苯酚、对甲酚的 MRS 肉汤培养基中 37°C 培养 24 h 和 144 h 时，MRS 肉汤培养基中苯酚、对甲酚的含量减少，说明乳酸菌有降低突变因子的功效。其中，24 h 时，戊糖乳杆菌 Ind1、Ind3 和植物乳杆菌 Lp115 的培养基中

的苯酚浓度减少量在 1.20μg/mL 与 1.93μg/mL 之间；144 h 时，戊糖乳杆菌 Ind1、Ind3 和植物乳杆菌 Lp115 的培养基中的苯酚浓度减少量在 0.95μg/mL 与 1.22μg/mL 之间。从 24 h 与 144 h 的检测结果可以看出突变因子的吸附量随着乳酸菌培养时间的增长而降低。这可能是因为随着培养时间的增加，MRS 培养基中的乳酸菌菌数下降造成的，乳酸菌的菌数大致从 10^9cfu/mL 降至 10^6cfu/mL，可以判定乳酸菌对突变因子有吸附作用。而对甲酚的 MRS 培养基中 24 h 培养的减少量在 0.45μg/mL 与 1.02μg/mL 之间，144 h 培养的减少量在 0.87μg/mL 与 1.14μg/mL 之间。这说明除上述作用外，乳酸菌还具有对突变因子的降解作用。

表 6.1 含苯酚、对甲苯 5μg/mL 的 MRS 培养基在培养 24、144 h 后培养基中苯酚的含量

Table 6.1 phenol and p-cresol concentration of 5μg/mL after 24 h、144 h cultivation of lactobacillus strains in MRS broth

浓度	培养基中的含量（μg/mL）	培养时间(h)	Ind1	Ind3	Lp115
			培养后含量(μg/mL)		
苯酚	5	24	3.07	3.80	3.54
		144	4.05	3.78	3.81
	50	24	35.61	36.74	38.78
		144	46.08	48.47	47.02
对甲苯	5	24	4.55	4.22	3.98
		144	4.13	3.92	3.86
	50	24	41.47	40.23	40.86
		144	40.77	40.66	39.27

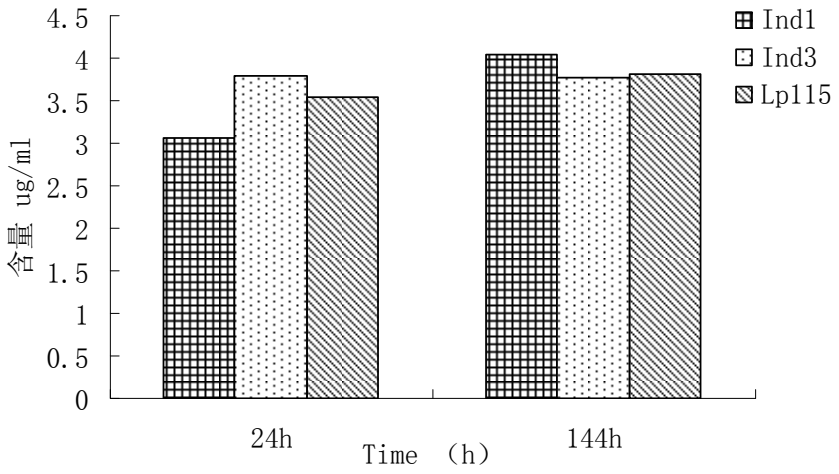


图 6.15 含苯酚 5μg/mL 的 MRS 培养基在培养 24、144 h 后培养基中苯酚的含量

Fig. 5.13 phenol concentration of 5μg/mL after 24 h、144 h cultivation of lactobacillus strains in MRS broth

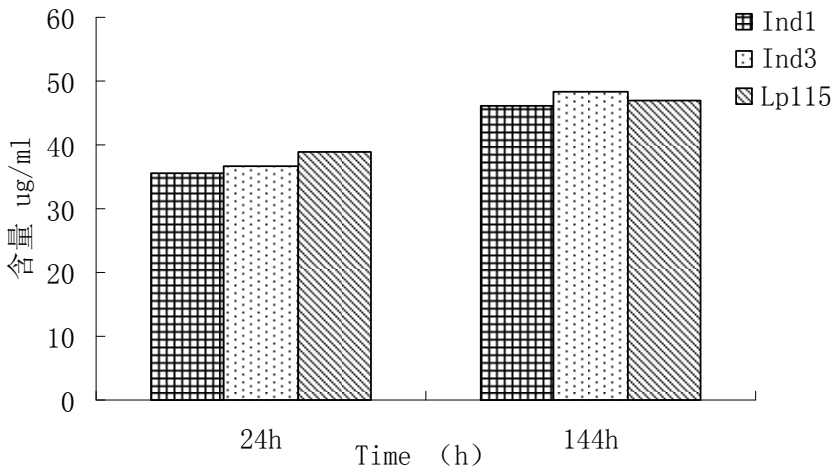


图 6.16 含苯酚 50μg/mL 的 MRS 培养基在培养 24、144 h 后培养基中苯酚的含量

Fig. 5.14 phenol concentration of 50μg/mL after 24 h、144 h cultivation of lactobacillus strains in MRS broth

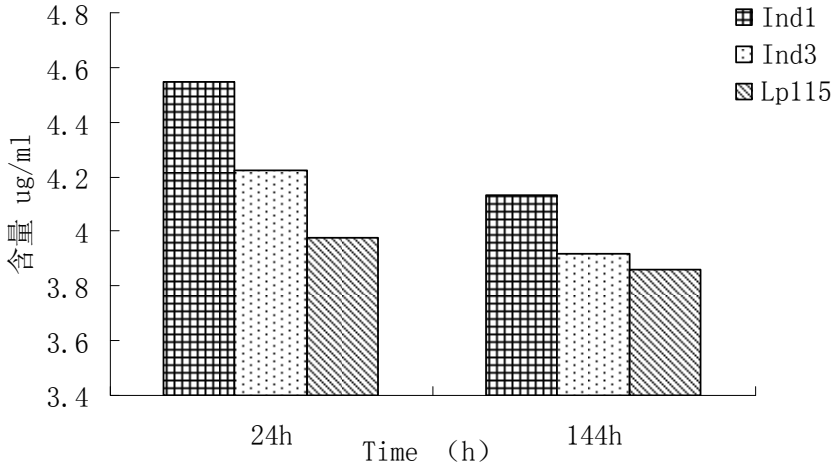


图 6.17 含对甲苯 5μg/mL 的 MRS 培养基在培养 24、144 h 后培养基中对甲苯的含量

Fig. 6.17 p-cresol concentration of 5μg/mL after 24 h、144 h cultivation of Lactobacillus strains in MRS broth

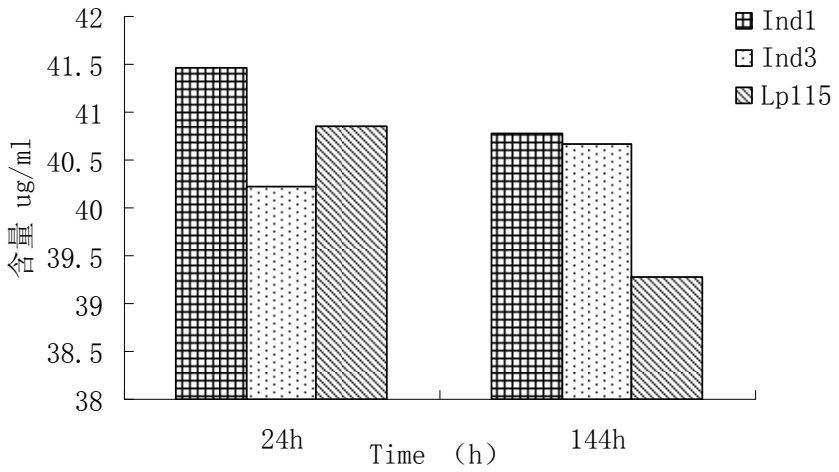


图 6.18 含对甲苯 50μg/mL 的 MRS 培养基在培养 24、144 h 后培养基中对甲苯的含量

Fig. 6.18 p-cresol concentration of 50μg/mL after 24 h、144 h cultivation of Lactobacillus strains in MRS broth

5.4.2 乳酸菌菌体中突变因子的变化

将乳酸菌在含有浓度为 5、50μg/mL 苯酚、对甲酚的 MRS 肉汤培养基中 37°C 培养 24 h、144 h，然后对乳酸菌菌体进行处理，HPLC 检测，结果如表 6.2。由表 6.2 可以看出乳酸菌在含 5μg/mL 苯酚、对甲酚的 MRS 肉汤培养基中 37°C 培养 24 h 和 144 h 时戊糖乳杆菌 Ind1、Ind3、植物乳杆菌 Lp115 的菌体细胞中苯酚、对甲酚的含量，说明乳酸菌菌体细胞有黏附突变因子的能力，这可能时由于乳酸菌菌体表层黏附蛋白造成的。其中，24 h 时，戊糖乳杆菌 Ind1、Ind3 和植物乳杆菌 Lp115 的菌体细胞中的苯酚含量在 0.94 μ g/mL 与 1.47 μ g/mL 之间；144 h 时，戊糖乳杆菌 Ind1、Ind3 和植物乳杆菌 Lp115 的菌体细胞中的苯酚含量在 0.42 μ g/mL 与 0.79 μ g/mL 之间。从 24 h 与 144 h 的检测结果可以看出突变因子的黏附量随着乳酸菌培养时间的增长而降低。这因为随着培养时间的增加，MRS 培养基中的乳酸菌菌数下降、乳酸菌活性降低致使黏附蛋白功能下降造成的。而对甲酚的 MRS 培养基中 24 h 培养的减少量在 1.01 μ g/mL 与 1.28 μ g/mL 之间，144 h 培养的减少量在 0.90 μ g/mL 与 1.17 μ g/mL 之间，同样说明了当乳酸菌培养时间过长，活性降低时，其黏附功效就随之降低。

表 6.2 含苯酚、对甲苯 5μg/mL、50μg/mL 的 MRS 培养基在培养 24、144 h 后菌体中苯酚、对甲苯的含量

Table 6.2 Ability of LAB to bInd/absorb phenol and p-cresol after 24 h、144 h cultivation in MRS broth

浓度	培养基中含量(μg/mL)	培养时间(h)	Ind1	Ind3	Lp115
			培养后浓度(μg/mL)		
苯酚	5	24	0.94	1.24	1.47

		144	0.57	0.79	0.42
	50	24	1.04	1.33	2.63
		144	0.54	0.57	0.35
对甲苯	5	24	1.19	1.01	1.28
		144	0.90	1.13	1.17
	50	24	1.29	1.78	3.05
		144	1.00	1.25	1.88

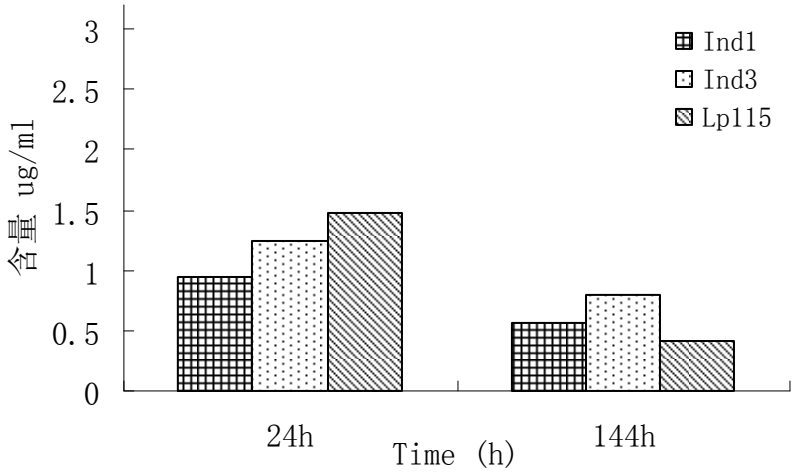


图 6.19 含苯酚 5μg/mL 的 MRS 培养基在培养 24、144 h 后菌体中苯酚的含量

Fig. 6.19 Ability of LAB to bInd/absorb phenol concentration of 5μg/mL after 24 h、144 h cultivation in MRS broth

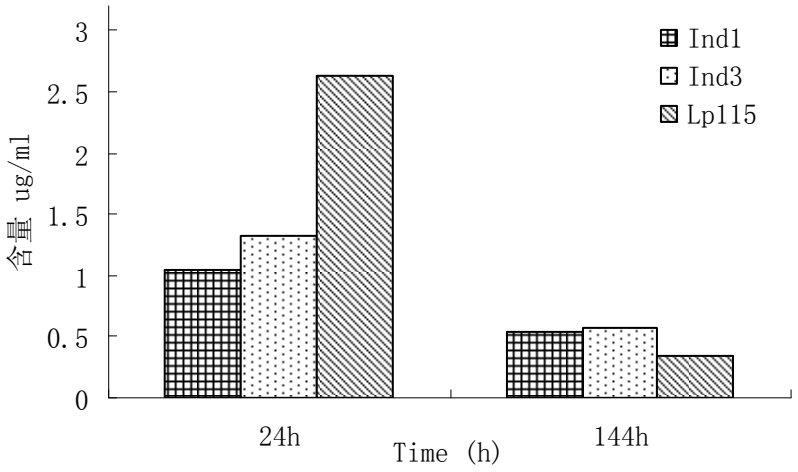


图 6.20 含苯酚 50μg/mL 的 MRS 培养基在培养 24、144 h 后菌体中苯酚的含量

Fig. 6.20 Ability of LAB to bInd/absorb phenol concentration of 50μg/mL after 24 h、144 h cultivation in MRS broth

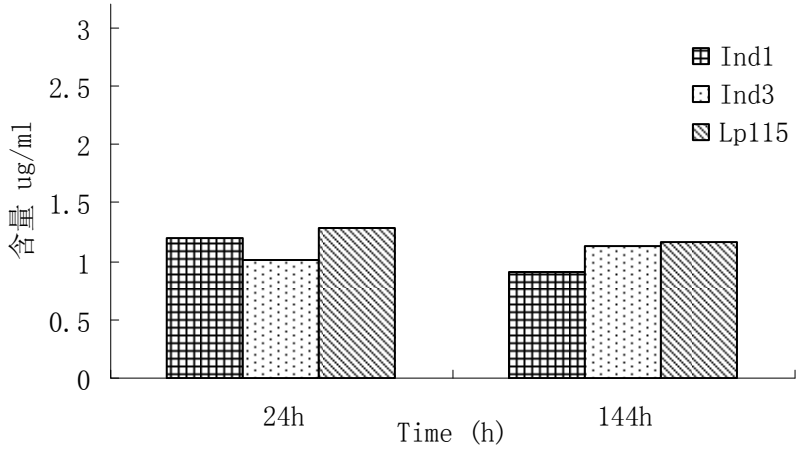


图 6.21 含对甲苯 5μg/mL 的 MRS 培养基在培养 24、144 h 后菌体中对甲苯的含量

Fig. 6.21 Ability of LAB to bInd/absorb p-cresol concentration of 5μg/mL after 24 h、144 h cultivation in MRS broth

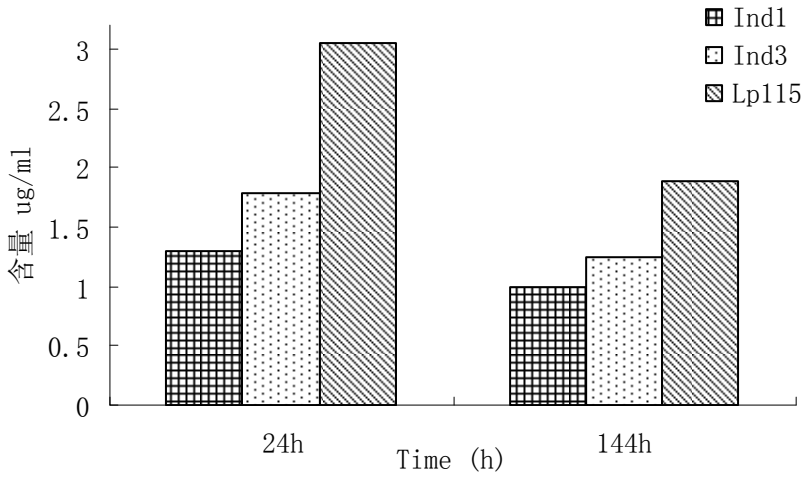


图 6.22 含对甲苯 50μg/mL 的 MRS 培养基在培养 24、144 h 后菌体中对甲苯的含量

Fig. 6.22 Ability of LAB to bInd/absorb p-cresol concentration of 50μg/mL after 24 h、144 h cultivation in MRS broth

6.5 本章小结

肠道的有害微生物在代谢某些氨基酸过程中产生苯酚、对甲酚、吲哚等酚类物质，如果这些物质长期存在于人体肠道内，将会引起肠道疾病最终导致结肠癌。而益生菌

能够产生抑制病原菌的代谢产物,其中肠道内双歧杆菌、乳酸杆菌等有益菌可产生一些酸性代谢产物（如乙酸、乳酸、短链脂肪酸）能够降低局部 pH ,可抑制大肠杆菌及梭菌类的生长,抑菌率高达 80%以上；还有双歧杆菌和某些乳杆菌产生胞外糖苷酶,可降解肠粘膜上皮细胞的复杂多糖,由于这些糖是致病菌和细菌毒素的潜在受体,通过酶的作用,可以阻止毒素对上皮细胞的粘附和侵入而益生菌能够促进肠内微生物菌群的生态平衡,具有改善肠道菌群结构、促进肠道中有益菌的增殖、抑制有害菌的生长、消除突变因子有着重要意义。

通过高效液相色谱对 MRS 培养基和乳酸菌菌体细胞黏附、降解突变因子的功效性进行了分析，结果表明将乳酸菌在含有浓度为 5、50μg/mL 苯酚、对甲酚的 MRS 肉汤培养基中 37°C 培养 24 h、144 h 后，对 MRS 培养基进行处理、检测，发现戊糖乳杆菌 Ind1、Ind3 和植物乳杆菌 Lp115 的培养基中的苯酚浓度减少量在 0.95μg/mL 与 1.93μg/mL 之间，对甲酚的减少量在 0.45μg/mL 与 1.14μg/mL 之间，而乳酸菌的菌数从 10^9cfu/mL 降至 10^6cfu/mL 左右，突变因子的吸附量随着乳酸菌培养时间的增长而降低，这可能是因为 MRS 培养基中的乳酸菌菌数下降造成的，可以判定乳酸菌对突变因子有黏附或降解作用；戊糖乳杆菌 Ind1、Ind3 和植物乳杆菌 Lp115 的菌体细胞中的苯酚含量在 0.42μg/mL 与 1.47μg/mL 之间，对甲酚的含量在 0.90μg/mL 与 1.28μg/mL 之间，检测结果可以看出突变因子的黏附量随着乳酸菌培养时间的增长而降低，因为随着培养时间的增加，MRS 培养基中的乳酸菌菌数下降、乳酸菌活性降低致使黏附蛋白功能下降造成的。而同样说明了当乳酸菌培养时间过长，活性降低时，其黏附功效就随之降低。

7. 戊糖乳杆菌产γ-氨基丁酸及其乳制品的研究

7.1 引言

γ-氨基丁酸（γ-Aminobutyric acide GABA）又称氨酪酸，是一种非蛋白质天然氨基酸，它是中枢神经系统中最重要的抑制性神经递质，具有降低血压，改善脑机能、抗惊厥、预防和治疗癫痫、活化肾肝、促进精子受精等功能。人体本身对 GABA 有一自我调节的系统，当缺乏时会产生焦躁、不安、疲劳、忧郁、失眠等症状。在人脑中，虽然 GABA 可由脑部的谷氨酸在脱羧酶的作用下转化而成，但是年龄的增长和精神压力加大使 GABA 的积累异常困难，而通过日常饮食补充可有效的改善这种状况。

7.1.1 γ-氨基丁酸的生理功能及作用机制

GABA 是大脑神经递质的主要抑制物，在大脑中由谷氨酸或谷氨酰胺合成。既然 GABA 是一种神经递质抑制剂，GABA 的补充产生健康效应是针对大脑的。这些健康效应包括降血压、抗狂躁抑郁、防止癫痫发作、防止月经前焦虑障碍、防止焦虑、防止失眠。GABA 也被认为对关节炎和背部疾病具有镇痛疗效。在体外 GABA 和其类似物可以横跨肠壁细胞转运到体内，因此似乎看来 GABA 和其类似物都可以产生健康疗效。来源于饮食的 GABA 用作上述功能使用的问题是 GABA 不能直接通过血脑屏障，因此食源性的 GABA 不能到达大脑。相关化合物例如 γ-羟基丁酸可以通过血脑屏障，但是它的使用是不安全的。目前与 GABA 相关的药物应用涉及到 GABA 同型物的使用，这类 GABA 同型物可以作为治疗癫痫的 GABA 转运抑制物。

食源性的 GABA 的另一个健康益处是抗高血压，这已经在 20 世纪 50 年代第一次被提出。另一方面，GABA 由大脑介导的抗高血压效应被为渗透性差的血脑屏障所阻碍，这已经表明抗高血压效应仅限于在 GABA 对于中枢神经控制。然而，尽管缺少血脑屏障的转运，来自于发酵产品中的 GABA 已经表明对轻度高血压患者具有降低血压的疗效。基于 39 名轻度高血压患者的单盲法临床研究，Inoue 和其他学者[5]指出在发酵乳产品中的 GABA 的摄入可以致使血压减低。采用大鼠模型，Yamakoshi 和其他学者认为 GABA 不会致使中枢神经控制，而是致使周围神经，例如肾交感神经活动的减低，尿液中 Na^+排血的增加。来源于交感神经纤维去甲肾上腺素释放的抑制也表明了机制。

人体使用 GABA 是因为被认为可以提高人生长激素的分泌。虽然在激素产生的内分泌器官中 GABA 具有调控作用。因为生长激素分泌将需要每天几克 GABA 的剂量，所以在此方面饮食中 GABA 的效应是不确定的。

7.1.2 γ-氨基丁酸的来源

一些可供食用的植物如：经过处理的茶叶、桑叶、发芽糙米、鲜蕨、果仁等含有丰富的γ-氨基丁酸。然而，在植物材料中，即使是含量较高的发芽糙米，其含量也处于较低水平。并且植物材料的分离提取比较困难，因此寻找一种快速高产并较易分离提取得到 GABA 的方法迫在眉睫。

许多生物（从哺乳动物到微生物）都能合成 GABA。所选择的乳酸杆菌菌株也被指出有产生 GABA 的能力。Siragusa 和其他学者研究了从意大利干酪中分离的乳酸菌，报告指出分离的菌株有 14%可以产生 GABA。在这些干酪中 GABA 的终浓度差异很大，最高浓度可达到 400 mg kg^{-1}。发酵 Yakult 产品已经通过了人体抗高血压的临床实验，此产品产生的 GABA 是由 *L. casei* Shirota 和 *Lactococcus lactis* YIT 2027 发酵而来的。在此研究中发酵产品中的 GABA 的含量为 10-12 mg $100ml^{-1}$。Chang 教授从泡菜中分离的 *L. buchneri* 具有产生 GABA 的 能力，在谷氨酸钠中的转化率为 94%。

7.1.3 微生物中γ-氨基丁酸的代谢

（1）化学合成γ-氨基丁酸及其局限性

化学合成方法由邻苯二甲酰亚氨钾和γ-氯丁氰在强烈条件下反应，其产物与浓硫酸作用后获得或者由吡咯烷酮经氢氧化钙、碳酸氢铵水解开环制得。化学法反应速度快、产率高，但是由于反应条件苛刻，天然原料昂贵以及安全性差的问题很难广泛应。

表 7.1 在特定培养基中，部分经实验证明能合成 GABA 的乳酸菌

Table 7.1 Lactobacillus that can synthe ize GABA in the special medium by the part experimenting

乳杆菌（*Lactobacillus*）	乳球菌（*Lactococcus*）
Lactobacillus plantarum M-10	*Lactococcus lactis* YIT2027
Lactobacillus acidophilus	*Lactococcus lactis* SYFS1.009
Lactobacillus brevis hjxj-01	*Lactococcus lactis* SYFC02
Lactobacillus brevis IFO-12005	*Lactococcus lactis*01-7
Lactobacillus casei（Shirota）	*Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* 712
Lactobacillus paracasei NFRI 7415	链球菌 *Streptococcus thermophilus* 9Y
Lactobacillus delbruekii	

（3）乳酸菌合成γ-氨基丁酸的方式和机制

①乳酸菌的深层发酵培养

将乳酸菌置于某些特定培养基中（如 MRS 或 TYG），直接添加前体物质 L-谷氨酸深层发酵培养后，获得高产量的 GABA 后提取分离，可作为含 GABA 的辅料，添加入其它食品中。

江南大学的许建军等人在国内首次成功筛选出高产 GABA 的乳酸菌株 *Lactococcus lactis* SYFS1.009，可以使发酵液中GABA含量提高到200mg/100mL以上。浙江工业大学的徐冬云等人从泡菜中分离得到一株较高产 GABA 的乳酸菌，在添加 0.1%谷氨酸的 TYG 液体培养基，30℃厌氧培养 24h，其产量达到 0.463g/L，并对此菌株初步的鉴定为嗜酸乳杆菌（*Lactobacillus acidophilus*）；浙江大学的夏江等人从鲜奶中分离得到 1 株高产 GABA 的乳酸菌株 hjxj-01，经初步鉴定为短乳杆菌（*Lactobacillus brevis*），在含 5%的 L-谷氨酸钠的 GYP 培养基中，此乳酸菌产 GABA 最大积累浓度为 7 g/L。在此基础上，又先后使用了紫外线和 γ 射线对出发菌株进行了诱变处理。诱变后得到 1 株突变菌株 hjxj-08119，经连续传代 12 次，遗传性状稳定；日本大阪生物环境科学研究所的森下日出旗博士筛选得到高产 GABA 的乳酸菌(*Lactobacillus plantarum*M-10)，该乳酸菌在米糠成分的存在下能增强产 GABA 的能力。该产品的特点是 GABA 含量高，其含量是 Gabaron 茶和富含 GABA 的米胚芽的 10 倍多。并且水溶性非常高，风味良好，所含 GABA 有很好的稳定性。在加热条件下，较宽的 pH(pH 3~10)范围内都很稳定。因此可以在许多食品、饮料中添加。

此外，某些唾液链球菌（*Streptococcus thermophilus*）和干酪乳杆菌（*Lactobacillus casei*）在特定培养基中也有高产的能力。

②乳酸菌合成γ-氨基丁酸的机制

乳酸菌在发酵的过程中利用糖发酵为乳酸，造成低的 pH 环境。而这样的环境不利于乳酸菌维持自身的活力。因此，必须启用某种耐酸机制。而 GAD 的活性在低 pH 下（<5.5）得到激发，催化脱羧反应。Takesh H 等认为在此过程中，L-谷氨酸被携带者（GltA）由细胞外运输至膜内，在胞内 GAD 的催化下消耗一个 H^+生成 GABA 并释放 CO_2。细胞内的谷氨酸脱羧消耗氢质子，这种一对一的转化使细胞膜两侧两极化，造成细胞膜两边的 pH 压差和质子势差，而这种质子运动作用力促使化合物运输，脱羧过程用于合成 ATP（由 F_1F_0ATPase 催化），CO_2 向外自由扩散则使循环不可逆的有意进行下去。乳酸菌富集 GABA 的能力可能与乳酸菌的耐酸能力有关。

③乳酸菌合成γ-氨基丁酸的关键酶

GAD 是生物技术富集生产 GABA 的关键酶。细菌、植物、昆虫和哺乳动物不同来源的 GAD 结构差异很大，而结构上的差异与它们化学反应共性和生理功效的关系正是目前争论的焦点之一。

不同来源的 GAD 的结构不尽相同，GAD 的活性也有很大差别，这可能与其自身的酶学特性有关，决定了乳酸菌的耐酸能力及富集 GABA 的能力。

除菌株因素外，还有一些因素影响 GAD 的活性：

A. pH 值

GAD 在酸性环境中(pH 3.6~5.4)具有较高的活力，pH 6.0 以上没有酶活力，这与

GAD 酶的诱导产生机制是紧密相关的。许建军等人发酵实验表明，*Lc. lactis* 在受控制的中性培养基中生长时,既没有γ-氨基丁酸的产生也不能检测到 GAD 活力。

B.化学物质对酶活的影响

磷酸吡哆醛（PLP）是谷氨酸脱羧酶的辅助因子，PLP、VB_6 及 Ca^{2+}在一定浓度时都能促进酶活，在添加含量小于 100μmol/L 时，作用大小为 PLP＞VB_6＞Ca^{2+}。反应体系中添加的乙酸浓度在 0.05mol/L 以下时，也能提高酶活，但随着乙酸浓度的不断增加，酶活力下降。巯基乙醇、二硫苏糖醇、半胱氨酸和对氯高汞苯甲酸等一些化合物抑制 GAD 活性。

④ γ-氨基丁酸在乳制品中的强化途径

乳酸菌发酵剂本质上是发酵乳，它将葡萄糖发酵为乳酸，为凝块地形成和质地及风味的发展提供了最好的环境。并由于乳酸菌的厌氧发酵增加了酸性，很可能具有抵抗酸的机制，以在低 pH 环境下保持生命活力。而低 pH 环境正好有利于乳酸菌 GAD 的活性，消耗了氢离子而减少了酸性，因而富集成具有 GABA 活性的功能性乳制品。

7.1.4 GABA 产品的应用现状

伴随着人们过多的注重自身的健康，在全球范围内，GABA 被用作膳食补充剂来销售。在食品工业中，在亚洲很有 GABA 的产品大多被销售。在日本，GABA 已经被批注为 FOSHU status。

在日本，富含 GABA 食品的开发始于 1986 年，日本开发成功的富含 GABA 的 Gabaron Tea 茶，这种富含 GABA 的茶已在市场上作为降血压功能食品销售。1994 年，日本农林水产省中国农业试验场开发成功 GABA-RG 和米糠，之后日本又相继开发出富含 GABA 的发芽糙米和乳酸菌、酵母发酵的高 GABA 浓度的健康食品素材等。近年来，富含 GABA 食品的研究与开发，成为国外研究的热点，包括植物(米胚、米糠、绿茶、南瓜、豆制品、西红柿、小球藻等)、微生物(乳酸菌、酵母)等由来的 GABA 的食品。 Yakult 销售含有 GABA 的酸奶，它可以抗高血压。在日本的 Glico 销售和含有 GABA 的巧克力，倡导产品可以使人体放松。(Toshio Sakurai, Siew-Lii Bong, Bettina Hornung; personal communication)

在韩国，市面上含 GABA 的产品似乎没有一个是由乳酸菌发酵得来的。Haitai 销售 GABA 巧克力，他的宣传是学生在准备考试的时候可以帮助改善注意力。GABA 的强化米的市场已经被开阔，他的宣传是降血压和降血脂。在韩国，GABA 被认定为氨基酸，他可以被用作食品和头颈部护肤品而没有同健康联系起来。如果被韩国 FDA 批准，GABA 被当作强化健康物是有可能的。

在我国传统的药材和茶品中都有 GABA 检出，如桑茶和 Gabaron Tea 和等都有一定含量的 GABA，与日本等发达国家相比，我国在 GABA 类食品的研究开发上要落后许多，有报道的富集 GABA 的金白龙茶和水稻新品种等产品尚处于研究阶段，还

没有上市销售，并且这两种产品中 GABA 的含量不高，应用范围和功能性都一定的局限。

本节拟采用利用高效液相色谱、改良纸层析方法和比色法，建立 γ-氨基丁酸（GABA）通用检测和定量分析程序，以便在样品处理中快速确定 γ-氨基丁酸的含量；通过变化碳源、氮源以及碳氮比来优化突变菌株的培养基条件；依据 L-谷氨酸（L-Glu）添加量、培养时间、培养温度、初始 pH、金属离子、种子菌龄、接种量等因素，确定乳酸菌合成 GABA 的最佳条件，确定乳酸菌最佳培养条件和方法，为其发酵功能性乳制品的生产提供理论和技术依据；分离纯化戊糖乳杆菌细胞中转化 L-Glu 到 GABA 的关键性酶——谷氨酸脱羧酶，建立其提取分离技术，并对该酶的最适反应温度、最适反应 pH 值、酶的热稳定性、底物添加和金属离子对酶活的影响等酶学性质和影响因素进行研究，以确定戊糖乳杆菌代谢 L-谷氨酸转化为γ-氨基丁酸的生物机制；以乳作为介质，接种高产 GABA 的乳酸菌菌株，控制发酵条件，制备强化 GABA 的乳制品，旨在为研制和开发高 GABA 含量的相关功能性食品提供一定的理论基础和科学依据。

7.2 材料与方法

7.2.1 试验菌株

（1）*Lactobacillus pentosus* Ind1——工业微生物资源平台号 1511C006000000044（以下简称 P）；

（2）*Lactobacillus pentosus* Ind3——工业微生物资源平台号 1511C006000000025（以下简称 Ind3）。

7.2.2 试剂与材料

将冷冻干燥的供试菌种，转接于 5 mL 的 12%脱脂乳（可添加 1%的葡萄糖和 0.5%的酵母浸膏）中，37ºC 厌氧培养 24 h，然后按 2%接种量转接于 MRS 液体培养基中，37ºC 厌氧培养 18 h，以便菌株活力得到充分恢复。

菌株 Ind1 和 Ind3 采用 MRS 液体培养基 37ºC 培养 14 h，每次试验之前，各菌株均在 MRS 液体培养基上转接两次，以便菌株活力完全恢复。

（1）L-谷氨酸钠（MSG）（太太乐），γ-氨基丁酸（γ-Aminobutyric acide 色谱纯，99%，购于 Sigma 公司）。

（2）甲醇、四氢呋喃为国产色谱纯试剂；邻苯二甲醛（OPA，购于上海生工，>97%）；

（3）苯酚、安替福民、乙醇、硫酸铵等其他试剂均为国产分析纯；

（4）标准分子量蛋白（分子量 14,400～97,400 Da），牛血清蛋白（BSA）；

（5）透析袋。

7.2.3 仪器设备

SPX-150B 型生化培养箱，医用型洁净工作台，手提压力灭菌锅，pH 计，紫外可见分光光度计（普析通用，T6 新世纪），分析天平，光学显微镜，水浴锅，GL-20G-Ⅱ冷冻离心机，JY98-Ⅲ超声波细胞破碎仪，电泳仪 DYY-4C，电泳槽 DYY-Ⅲ，电泳胶片成像仪 DBT-08，液相色谱分析检测仪（大连依立特），DGF2053 台式电热鼓风干燥箱及其它辅助设备。

7.2.4 GABA 分析检测方法

（1）GABA 液相色谱的定性和定量分析

①色谱柱：ODS C18 柱(250mm×4. 6mm,5μm)；

②流动相：0.1mol/L 磷酸二氢钾缓冲液(pH = 6. 0):四氢呋喃:甲醇=52:2:46，流动相均经 0. 22μm 滤膜过滤，超声脱气 30 min 后使用；

③检测条件：紫外 338nm；

④检测温度：室温(19~23°C)；

⑤衍生剂配制及衍生反应：将 27 mg OPA ，40uL 2- MCE（β-巯基乙醇）溶于 5mL 甲醇中。再加入 0.1 mol/ L 硼酸缓冲液(pH9. 5) 5 mL 制得衍生液，密封后于 4℃避光保存。每次过夜后添加 10～15μL 2- MCE，可使用 7~ 10 d；

⑥发酵液样品的预处理：将发酵液先冷冻离心 10 min（8000 r/min）以除去大分子杂质，取上层清液稀释数倍。

⑦取 50μL 样品加入 50μL 衍生试剂混匀 90s 后进样 20μL。

（2）GABA 改良纸层析法的定量分析

① GABA 的吸收波长扫描：吸取 10μL 样品，点样线距滤纸 2.0cm，样品间距 2.0cm。将点样后的滤纸在展开剂(正丁醇:冰乙酸:水＝4:2:1，含 0.4g/L 茚三酮)中展开，风干显色后（90℃，10min）将与标准品位置一致的斑点剪下，用洗脱液（V75%乙醇:V0.1%硫酸铜溶液＝38:2）洗脱 25 分钟后在 510nm 测定其吸光度值。

② GABA 标准曲线的制作：准确称取 GABA 标准品 200 mg 放入 10 mL 的容量瓶中，加入蒸馏水至刻度，从中分别吸取 0.5，1.0，1.5，2.0，2.5 mL 溶液放入 25 mL 的容量瓶中，加入 10g/L 的 L-Glu 溶液至刻度，配制成 0.4，0.8，1.2，1.6，2.0 g/L 的标准溶液，于 510 nm 处测得吸收值。以空白洗脱液做参比，建立 GABA 检测标准曲线。

③ GABA 含量的测定：

A 发酵液离心（6,000 r/min，10min）取上清液，点样 10μL；

B 发酵乳离心（12,000 r/min，20min）取上清液，点样 10μL。

（3）GABA 比色法的定量分析

①GABA 标准曲线的制作：准确称取 GABA 标准品 100 mg 放入 10 mL 的容量瓶中，加入蒸馏水至刻度，从中分别吸取 0.5，1.0，1.5，2.0，2.5 mL 溶液放入 25 mL 的容量瓶中，加入 10g/L L-Glu 溶液的至刻度，配制成 0.4，0.8，1.2，1.6，2.0 g/L 的标准溶液，取 0.6mL 标准溶液加入 0.4mL 硼酸缓冲溶液（pH9）中止反应，再加入 0.8mL6％苯酚溶液和 1.5mL 次氯酸钠溶液（含有效氯 5.23%），沸水浴 10 min 后迅速冰浴 20min，在 630nm 测吸光度值，建立 GABA 检测标准曲线。

②酶反应液中 GABA 含量的测定

取 0.6mL 酶反应液加入 0.4mL 硼酸缓冲溶液（pH9）中止反应，再加入 0.8mL6％苯酚溶液和 1.6mL 次氯酸钠溶液（含有效氯 5.23%），沸水浴 10 min 后迅速冰浴 20min，在 630nm 测吸光度值。

7.2.5 GABA 发酵条件优化

（1）培养温度对菌体生物量及 GABA 产量的影响

在 15mm×150 mm 的试管中，装入 5 mL 含 MSG(10g/L) 的 MRS 液体培养基，按 2%（v/v）接种量接种菌龄为 14h 的戊糖乳杆菌菌株 P 和 Ind3（活菌数调整至 10^8 cfu/mL）。调整培养温度至 23°C～43°C 之间，分别在不同温度下，在 pH 值 6.5 的培养液中厌氧培养 48h 后，按 2.4.1 测定 GABA 的产量和菌体生物量，确定最佳培养温度。

（2）初始 pH 值对菌体生物量及 GABA 产量的影响

在 15mm×150 mm 的试管中，装入 5 mL 含 MSG(10g/L) 的 MRS 液体培养基，按 2%（v/v，活菌数调整至 10^8 cfu/mL）接种量接种菌龄为 14h 的戊糖乳杆菌菌株 P 和 Ind3。用 2 M/L 的 HCl 和 NaOH 调整发酵液的初始 pH 值为 5、6、6.5、7、7.5、8、9。37°C 厌氧培养 48h 后，按 2.4.1 测定 GABA 的产量和菌体生物量，确定最佳初始 pH 值。

（3）变换不同的碳源对菌体的生物量及 GABA 产量的影响

将含 MSG(10g/L) 的 MRS 培养基中的葡萄糖用等量的乳糖、蔗糖、果糖替换，制备成不同碳源的改良 MRS 培养基，将活化培养菌龄为 14h 的戊糖乳杆菌菌株 P 和 Ind3 按 2%（v/v，活菌数调整至 10^8 cfu/mL）接种量接种于 MRS 改良培养基中，初始 pH 值为 7，37°C 厌氧培养 48h，按 2.4.1 测定 GABA 的产量和菌体生物量，确定最佳碳源。

（4）变换不同的氮源对菌体的生物量及 GABA 产量的影响

将含 MSG(10g/L) 的 MRS 培养基中的氮源用酵母膏、牛肉膏、蛋白胨、鱼蛋白胨、胰蛋白胨替换，制备成不同单一氮源的改良 MRS 培养基，将活化培养菌龄为 14h 的菌株 P 和 Ind3 按 2%（v/v，活菌数调整至 10^8 cfu/mL）接种量接种于 MRS 改良培养基中，初始 pH 值为 7，37°C 厌氧培养 48 h，按 2.4.1 测定 GABA 的产量和菌体生

物量，确定最佳氮源。

（5）变换不同的复合碳源对菌体的生物量及 GABA 产量的影响

将含 MSG(10g/L) 的 MRS 培养基中的氮源变换为酵母膏 10g/L，牛肉膏 10g/L，蛋白胨、胰蛋白胨、鱼蛋白胨分别添加 5g/L 和 10g/L，制备成不同复合氮源的改良 MRS 培养基，将活化培养的菌龄为 14h 的菌株 P 和 Ind3 按 2%（v/v，活菌数调整至 10^8 cfu/mL）接种量接种于 MRS 改良培养基中，初始 pH 值为 7，37°C 厌氧培养 48 h，按 2.4.1 测定 GABA 的产量和菌体生物量，确定最佳复合氮源。

（6）变换不同的碳氮比对菌体的生物量及 GABA 产量的影响

将含 MSG(10g/L) 的 MRS 培养基中的碳源和总氮源的比例按 5:30、10:30、20:30、30: 30、40:30（g/L：g/L）制备成不同碳氮比的改良 MRS 培养基，将活化培养的菌龄为 14h 的菌株 P 和 Ind3（活菌数调整至 10^8 cfu/mL）按 2%（v/v，活菌数调整至 10^8 cfu/mL）接种量接种于 MRS 改良培养基中，初始 pH 值为 7，37°C 厌氧培养 48 h，按 2.4.1 测定其 GABA 的产量和菌体生物量。考察培养基中不同碳氮含量对发酵液 GABA 产量的影响，获得培养基碳氮比优化参数。

7.2.6 生成 GABA 的动力学研究

（1）不同底物的添加量对对菌体的生物量及生成 GABA 的影响

将活化培养的菌龄为 14h 的菌株 P 和 Ind3 按 2%（v/v，活菌数调整至 10^8 cfu/mL）接种量接种于 MRS 改良培养基中，反应体系中加入不同浓度的 MSG（5，10，15，20，25，30，40g/L），初始 pH 值为 7，37°C 厌氧培养 48 h 后，按 2.4.1 测定其产 GABA 的量，同时测定两种菌的菌体生物量。

（2）PLP 和 Ca^{2+}对菌体的生物量及 GABA 产量的影响

将活化培养的菌龄为 14h 的菌株 P 和 Ind3 按 2%（v/v，活菌数调整至 10^8 cfu/mL）接种量接种于含 MSG（15g/L）MRS 改良培养基中，反应体系中分别加入 PLP(0.1mmol/L)和不同浓度的 Ca^{2+}(0.1，0.25，0.5，1.0，1.5，2.0mmol/L)，以不添加 PLP 和 Ca^{2+}的培养基作对照，37°C 厌氧培养 48h 后，按 2.4.1 测定 GABA 的产量和菌体生物量。

（3）不同菌龄的种子培养液对菌体的生物量及 GABA 产量的影响

将活化培养的不同菌龄（8，10，12，14，16，18h）的 P 和 Ind3 两菌株分别按 2%（v/v，活菌数调整至 10^8 cfu/mL）接种在含 MSG（15g/L）MRS 改良培养基中，初始 pH 值为 7，37°C 厌氧培养 48h 后，按 2.4.1 测定 GABA 的产量和菌体生物量。

（4）菌体的浓度对菌体的生物量及生成 GABA 的影响

将活化培养的菌龄为 12h 的 P 和 Ind3 两菌株分别按 1%，2%，4%，6%，8%，10%，12%，14%（v/v，活菌数调整至 10^8 cfu/mL）接种在 MRS 改良培养基中接种菌株，初始 pH 值为 7，37°C 厌氧培养 48h 后，按 2.4.1 测定 GABA 的产量和菌体生

物量。

（5）发酵过程中菌体代谢 L-Glu 生成 GABA 最佳时间得确立

将活化培养菌龄为 12h 的两菌株 P 和 Ind3 种子发酵液按 2%（v/v，活菌数调整至 10^8 cfu/mL）接种量接种于改良培养基中，初始 pH 值为 7，37°C 厌氧培养 108 h，每隔 12 h 取样，测定 GABA 的产量，确定 GABA 的最佳生成时间。

（6）储藏过程中 GABA 产量的变化

将活化培养的菌龄为12h的两菌株P和Ind3按2%（v/v，活菌数调整至10^8 cfu/mL）接种量接种于 MRS 改良培养基中，初始 pH 值为 7，菌株 P 37°C 厌氧培养 72 h，菌株 Ind3 37°C 厌氧培养 84 h 后置于低温保藏（4°C），第 0、1、2、3、4、5、6、7、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30d 取样，测定发酵液中 GABA 的变化量。

（7）发酵液 GABA 的液相色谱检测[59,60,67-71]

将活化培养的菌龄为12h的两菌株P和Ind3按2%（v/v，活菌数调整至10^8 cfu/mL）接种量接种于改良培养基中，初始 pH 值为 7，菌株 P37°C 厌氧培养 72 h，菌株 Ind3 37°C 厌氧培养 84 h 后，发酵液离心（8000 r/min，10 min）检测。

7.2.7 发酵乳制品中 GABA 含量的研究

（1）脱脂乳制备及发酵。

① 12 g 脱脂奶粉溶于蒸馏水中，定容到 100 mL。

②按 2%（v/v）接种量接种两菌株 P 和 Ind3 于脱脂乳中（P 发酵脱脂乳添加 1%葡萄糖），37°C 发酵 24 h。与接种戊糖乳杆菌的乳培养基（样品）一样，在同一条件下对空白（不添加 MSG）作灭菌处理，并与添加 MSG 的样品同时培养，培养到预定时间后，同时取出检测其中的 GABA 含量。

（2）乳中添加不同的碳源对菌体生长及代谢 L-Glu 生成 GABA 产量的影响。

活化后的两菌株 P 和 Ind3 分别接入已灭菌的脱脂牛乳培养基中，接种量 2%（v/v），脱脂牛乳中 MSG 加入量为 0.2 g/L。实验组分别加入 1%的葡萄糖、乳糖及蔗糖，菌株 Ind3 以不添加糖的脱脂牛乳为对照组，菌株 P 以添加 1%葡萄糖的脱脂牛乳作为对照，37°C 厌氧培养 24h，采用平板稀释培养计数法，在 MRS 琼脂平板上培养 48 h，测定菌体生物量及其 GABA 生成量。

（3）乳中添加不同的氮源对菌体生长及代谢 L-Glu 生成 GABA 产量的影响。

活化后的两菌株 P 和 Ind3 分别接入已灭菌的脱脂牛乳培养基中，接种量 2%（v/v），脱脂牛乳中 MSG 加入量为 2 g/L。实验组分别加入 1%的酵母膏、牛肉膏、蛋白胨，以不添加任何氮源的脱脂牛乳为对照组，37°C，培养 24 h，采用平板稀释培养计数法，在 MRS 琼脂平板上培养 48 h，测定菌体生物量及其产 GABA 含量。

（4） 发酵乳制品在储藏期间 GABA 含量的变化

① 发酵乳制品的制备：MSG 含量为 2 g/L，添加 1%葡萄糖和 1%的酵母膏充分混匀。2%（v/v）接种菌株 P 和 Ind3 于该培养基中，每 10 mL 发酵液分装到大试管中。37°C 厌氧培养 24 h。

② 发酵乳制品储藏条件：将发酵好的样品放在 4°C 冰箱中保存。每 0 d、1 d、3 d、6 d、11d、16d、21 d 取样，按 2.4.1 方法进行检测。以确定 GABA 在牛乳制品中的变化。

7.3 结果与分析

7.3.1 GABA 的分析检测方法的确立

7.3.1.1 标准品液相色谱的测定

（1）GABA 标准品液相色谱的定性分析

液相色谱条件及标准品的前处理同 2.4.1，GABA 的保留时间为 16.27min，见图 7.1：

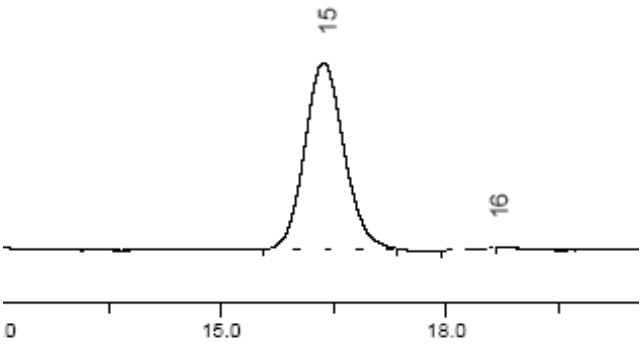


图 7.1 GABA 的高效液相图谱

Fig. 7.1. HPLC chromatogram of GABA

（2）GABA 标准品液相色谱的定量分析

GABA 标准曲线的制作：准确称取 GABA 标准品 200mg 放入 100 mL 的容量瓶中，加入双蒸水至刻度，从中分别吸取 0.5，1.0，1.5，2.0，2.5 mL 溶液放入 25 mL 的容量瓶中，加入双蒸水至刻度，配制成 0.04，0.08，0.12，0.16，0.2 g/L 的标准溶液，于 338 nm 处测得吸收峰值。以峰面积建立 GABA 检测标准曲线。

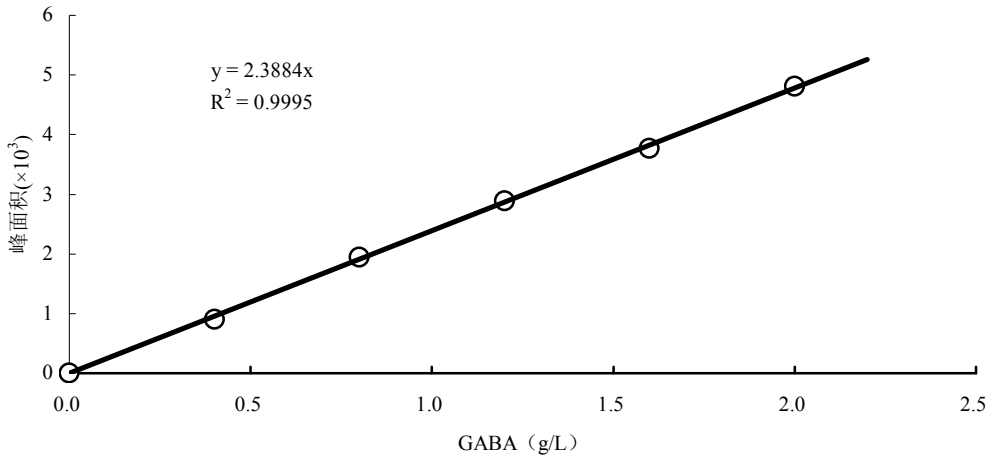


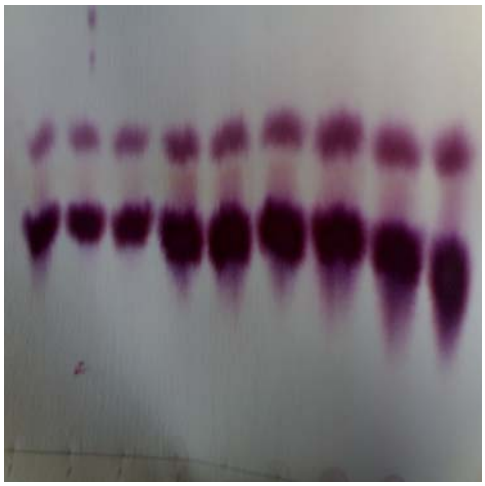
图 7.2 液相色谱测 GABA 的标准曲线

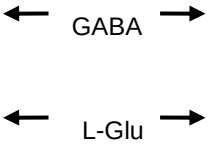
Fig. 7.2. Standard curve of GABA by HPLC

由图 7.2 可知，本文所采用的高效液相色谱法在 GABA 0～2g/L 的范围内成良好的线性关系，线性方程为 y＝2388.4x。

7.3.1.2 标准品改良纸层析法的测定

（1）纸层析法可以很好的将氨基酸层析分离，即使是成分复杂的发酵液，也可以很好的将多种氨基酸分离，将分离后的 GABA 斑点剪下，用洗脱液洗脱后在 510nm 测其吸光度值，根据标准曲线可换算 GABA 的产量。GABA 和 L-Glu 标准品和发酵液的纸层析照片见图 7.3 和图 7.4。





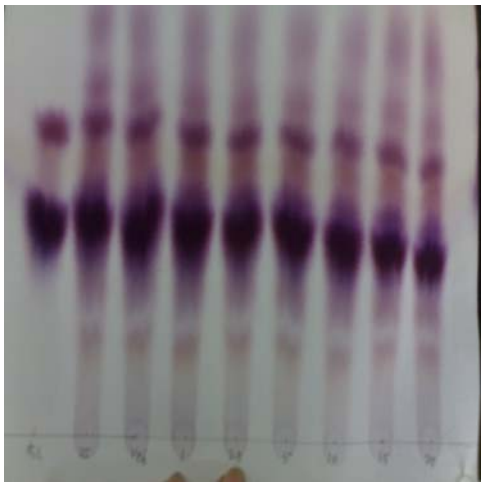


图 7.3 GABA 和 L-Glu 的纸层析

Fig. 7.3 GABA and L-Glu by paper chromatogram

图 7.4 发酵液中的 GABA 和 L-Glu

Fig.7.4 GABA and L-Glu in fermented liquor by paper chromatography

（2）做标准溶液，所测的曲线见图 7.5：

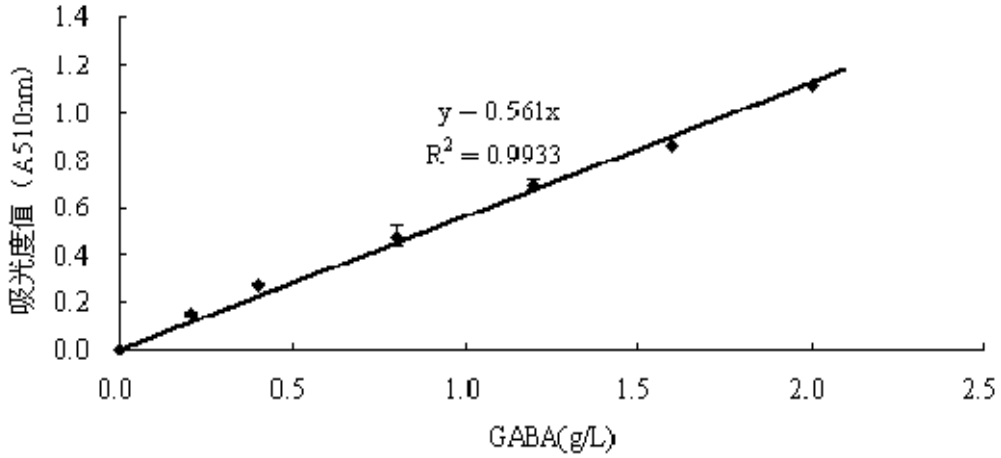


图 7.5 改良纸层析法测 GABA 标准曲线

Fig.7.5. Standard curve of GABA by Paper chromatography

由图 7.5 可知，本文所采用的改良纸层析法在 GABA 0～2g/L 的范围内成良好的线性关系，线性方程为 y＝0.561x。

7.3.1.3 标准品 Berthelot 比色法的测定

按 2.4.1 方法做标准曲线，所测的曲线见图 7.6：

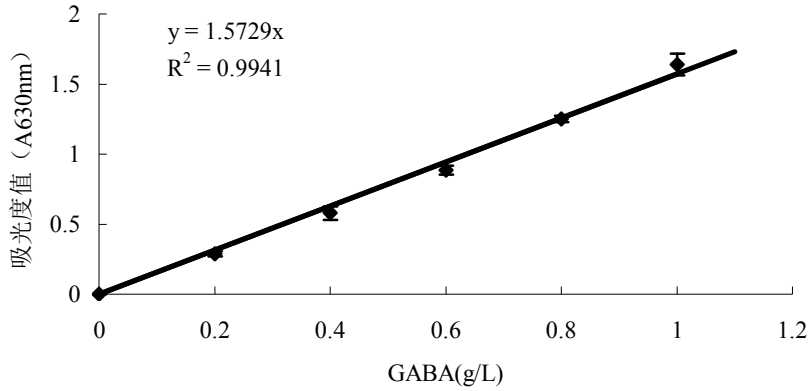


图 7.6 Berthelot 比色法测 GABA 标准曲线

Fig. 7.6 Standard curve of GABA by Berthelot Spectrophotometry

由图 7.6 可知，本文所采用的改良纸层析法在 GABA 0～1g/L 的范围内成良好的线性关系，线性方程为 y＝1.5729x。

7.3.2 戊糖乳杆菌发酵条件的优化

7.3.2.1 培养温度的影响

温度是最重要的影响微生物生长和生存的环境因素之一。温度可以以两种相反的方法影响活的微生物体。当温度升高时，细胞内的化学和酶促反应都以较快的速度进行，微生物生长也会变得越来越快。但是超过一特定的温度，蛋白质、核酸及细胞组分会受到不可逆转的损坏。所以本文调整培养温度至 23°C～43°C 之间，分别在不同温度下，在初始 pH 值 6.5 的培养液中培养 48h 后，按 2.4.1 测定 GABA 的产量，确定最佳培养温度。发酵温度对菌体生物量和 GABA 生物量的影响如图 7.7 和图 7.8 所示。

由图 7.7 和图 7.8 可以看出，当培养温度从 24°C 升高到 37°C 时，菌株 Ind1 和 Ind3 发酵液中 GABA 产量逐渐增大。到 37°C 时，GABA 产量均达到最高，分别为 0.4599g/L 和 0.1818g/L，当温度继续升高时，两菌株 Ind1 和 Ind3 代谢 L-Glu 生成 GABA 开始受到抑制，发酵液 GABA 产量逐渐下降。并且，两菌株的菌体生物量也都在 37°C 达到最高。此实验结果表明，较高或较低的温度均不利于戊糖乳杆菌的生长及生成 GABA，37°C 为 Ind1 和 Ind3 发酵生成 GABA 的最适温度。

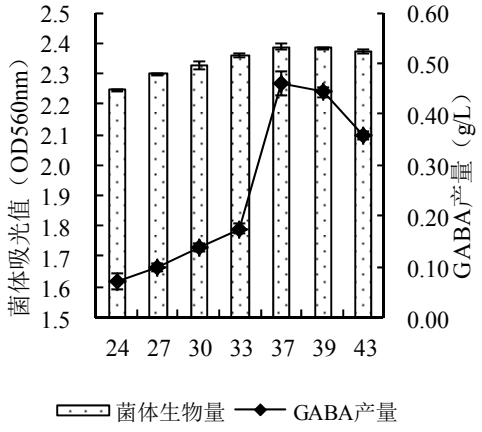


图 7.7 不同温度对 Ind1 菌体生物量及 GABA 产量的影响

Fig. 7.7 Effect of temperature on Ind1 biomiss and producing GABA

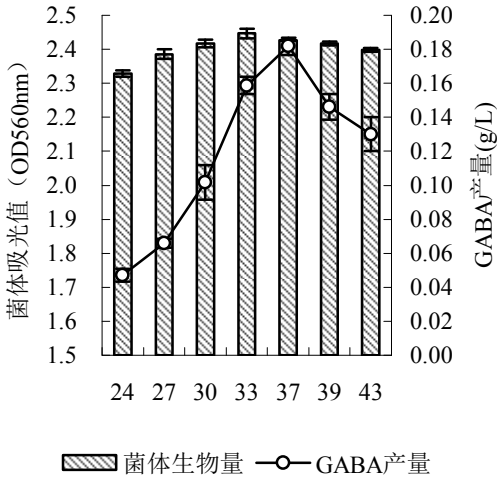


图 7.8 不同温度对 Ind3 菌体生物量及 GABA 产量的影响

Fig. 7.8 Effect of temperature on Ind3 biomiss and producing GABA

7.3.2.2 初始 pH 值的影响

每种微生物都有一定的 pH 范围可以生长，但都有一最适 pH 值。本文调整发酵液的初始 pH 值为 5、6、6.5、7、7.5、8、9，37°C 厌氧培养 48h 后，按 7.2.4 测定 GABA 的产量及菌体生物量，确定最佳初始 pH 值。结果如图 7.9 和图 7.10：

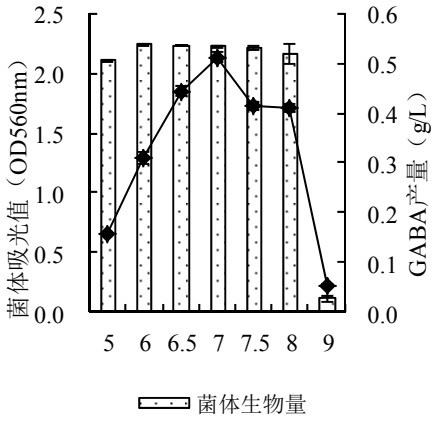


图7.9 初始pH值对Ind1菌体生物量及GABA产量的影响

Fig. 7.9 Effect of initial pH on P biomiss and producing GABA

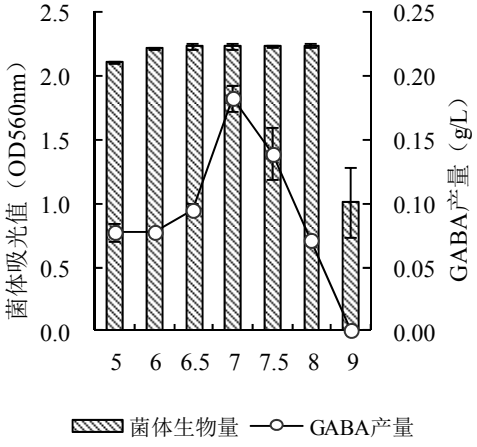


图7.10 初始pH值对Ind3菌体生物量及GABA产量的影响

Fig. 7.10 Effect of initial pH Ind3 biomiss and producing GABA

由图 7.9 可以看出，培养基初始 pH 为 6.5～8 时，菌株 P 的菌体生物量和 GABA 产量都处在较高水平，其中 pH 7.0 时，菌体生物量和 GABA 浓度最高，而初始 pH 为 9 时，菌体几乎不能生长。

由图 7.10 可以看出，培养基初始 pH 为 6.5～7.5 时，菌株 Ind3 的菌体生物量和 GABA 产量都处在较高水平，尤其是 pH 7.0 时，菌体生物量和 GABA 浓度最高。因此，以后研究选择 pH7.0 作为培养基的初始 pH 值。

7.3.2.3 不同碳源的影响

经选育出的高产 GABA 的菌株菌株 P 和 Ind3，需要适宜的营养条件和发酵条件才能更好发挥其高产性能。虽然不同的单糖和二糖可以支持其细胞增殖，但这些碳水化合物对细胞增长的促进效果存在很大差异，研究戊糖乳杆菌与碳源之间的相互关系对于其工业化生产、菌株培养和保存都有重要意义。为此下面对培养基组分进行优化，将 MRS 培养基中的葡萄糖用等量的乳糖、蔗糖和果糖替换，制备成不同碳源的改良 MRS 培养基，初始 pH 值为 7，37°C 厌氧培养 48 h，以确定最佳碳源。试验结果如下：

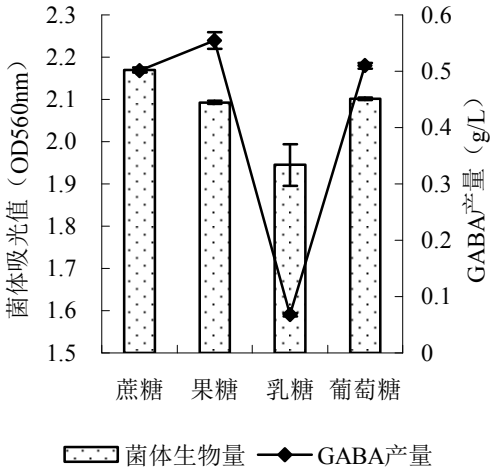


图 7.11 不同碳源对 Ind1 菌体生物量及 GABA 产量的影响

Fig. 7.11 Effect of carbon source on on Ind1 biomiss and producing GABA

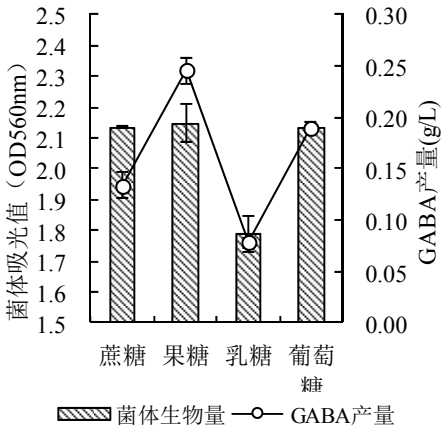


图 7.12 不同碳源对 Ind3 菌体生物量及 GABA 产量的影响

Fig. 7.12 Effect of carbon source on on Ind3 biomiss and producing GABA

由图 7.11 和图 7.12 可以看出菌株 Ind1 和 Ind3 均能利用蔗糖、乳糖、葡萄糖和果糖生长代谢并转化 L-Glu 生成 GABA。从菌体生成 GABA 产量来看，菌株 Ind1 和 Ind3 虽能利用乳糖生长，但 GABA 的产量很低；以果糖为碳源时，发酵液具有较高 GABA 产量，达到 0.5544g/L 和 0.2460g/L。而果糖的价格较贵，提高大规模工业生产的成本，因此选用产量较高的葡萄糖作为培养基的碳源。

7.3.2.4 不同氮源的影响

氮源是组成菌体核酸和蛋白质的重要元素，对微生物的生长发育有着重要作用，不同的氮源含营养成分不同，对菌体的生长和 GABA 的产量有不同的影响。以加入 MSG(10g/L)的液体培养基为基础，其中的氮源用酵母膏、牛肉膏、蛋白胨、鱼蛋白胨、胰蛋白胨替换，制备成不同单一氮源的改良 MRS 培养基，按 2.4.1 测定 GABA 的产量，确定最佳氮源。

由图 7.13 和图 7.14 可以看出，菌株 Ind1 以酵母浸膏为单一氮源时，发酵液最高菌体生物量和具有最高 GABA 产量，达到 0.5544 g/L；而菌株 Ind3 则是以鱼蛋白胨为氮源时，发酵液具有较高 GABA 产量，达到 0.2477g/L，从发酵液中的菌体生物量来看，发酵液具有较高的菌体生物量。

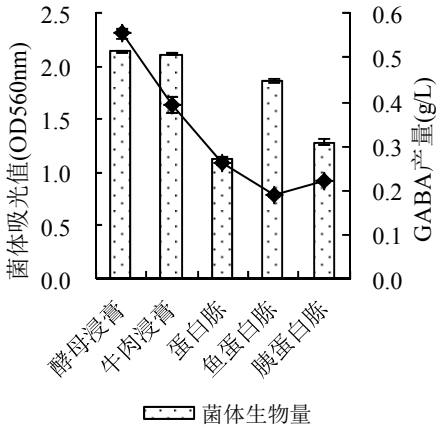


图 7.13 不同氮源对 Ind1 菌体生物量及 GABA 产量的影响

Fig. 7.13 Effect of nitrogen source on Ind1 biomiss and producing GABA

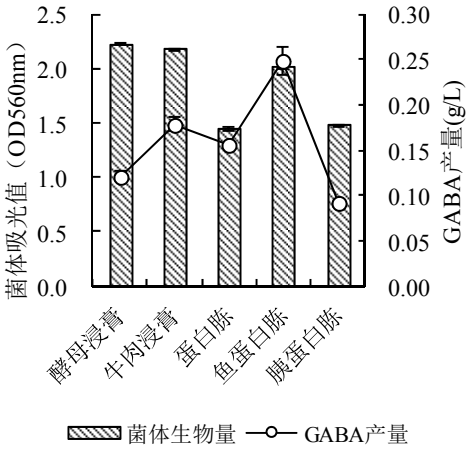


图 7.14 不同氮源对 Ind3 菌体生物量及 GABA 产量的影响

Fig.7.14 Effect of nitrogen source on Ind3 biomiss and producing GABA

7.3.2.5 不同复合碳源的影响

由 7.3.2.3 可知，以酵母浸膏和牛肉膏为单一碳源时，两菌株的菌体生长情况较好，GABA 的产量也相对较高，但是单一碳源的成分比较单一，因此考虑将几种产量较高的单一碳源组合成复合碳源。由将含 MSG(10g/L) 的 MRS 培养基中的氮源变换为酵母膏 10g/L,牛肉膏 10g/L；蛋白胨，胰蛋白胨，鱼蛋白胨分别添加 5g/L 和 10g/L，制备成不同复合氮源的改良 MRS 培养基，按 7.2.4 测定 GABA 的产量，确定最佳复合氮源配比。

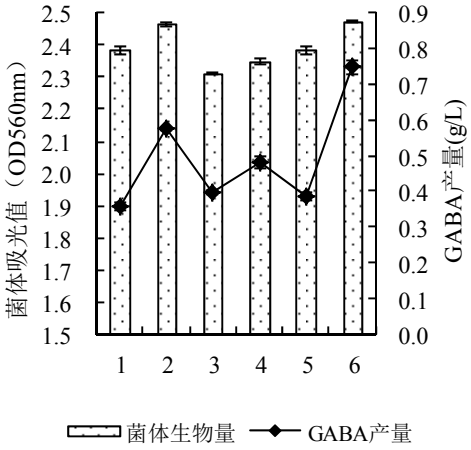


图 7.15 不同复合氮源 Ind1 菌体生物量及 GABA 产量的影响

Fig. 7.15 Effect of multiplex nitrogen source on Ind1 biomiss and producing GABA

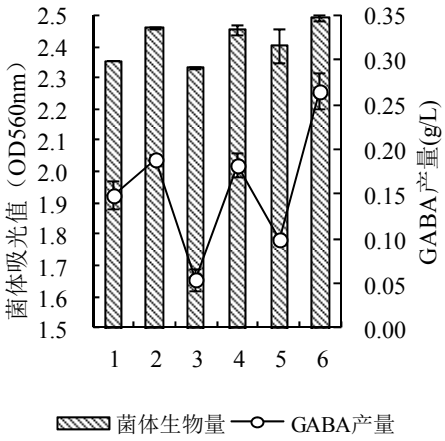


图 7.16 不同复合氮源对 Ind3 菌体生物量及 GABA 产量的影响

Fig. 7.16 Effect of multiplex nitrogen source on Ind3 biomiss and producing GABA

说明：1.鱼蛋白胨:酵母浸膏:牛肉膏＝5: 10 :10
2.鱼蛋白胨:酵母浸膏:牛肉膏＝10:10 :10
3.蛋白胨:酵母浸膏:牛肉膏＝5:10 :10
4.蛋白胨:酵母浸膏:牛肉膏＝10:10 :10
5.胰蛋白胨:酵母浸膏:牛肉膏＝5:10 :10
6.胰蛋白胨:酵母浸膏:牛肉膏＝10:10 :10

1.鱼蛋白胨:酵母浸膏:牛肉膏＝5:10 :10
2.鱼蛋白胨:酵母浸膏:牛肉膏＝10:10 :10
3.蛋白胨:酵母浸膏:牛肉膏＝5:10 :10
4.蛋白胨:酵母浸膏:牛肉膏＝10:10 :10
5.胰蛋白胨:酵母浸膏:牛肉膏＝5:10 :10
6.胰蛋白胨:酵母浸膏:牛肉膏＝10:10 :10

由图 7.15 和 7.16 可知几种复合氮源都能使菌株 Ind1 和 Ind3 较好的生长。但添加 10g 各种蛋白质培养基的菌体生物量和 GABA 产量都优于只添加 5g 各种蛋白质培养基，并且复合氮源为 10g 胰蛋白胨、10g 酵母浸膏、10g 牛肉膏的条件下，菌株 Ind1 和 Ind3 的菌体生物量和 GABA 产量达到最高，且 GABA 产量（分别为 0.7487g/L 和 0.2656g/L）高于等质量单一氮源的产量，说明复合碳源的营养更加全面，更利于 GABA 的产生。

7.3.2.6 不同碳氮比的影响

将含 MSG(10g/L) 的 MRS 培养基中的碳源和总氮源的比例按 5:30、10:30、20:30、30: 30、40:30 制备成不同碳氮比的改良 MRS 培养基，考察培养基中不同碳氮比对发酵液 GABA 产量的影响，获得培养基碳氮比优化参数，结果如下图所示。

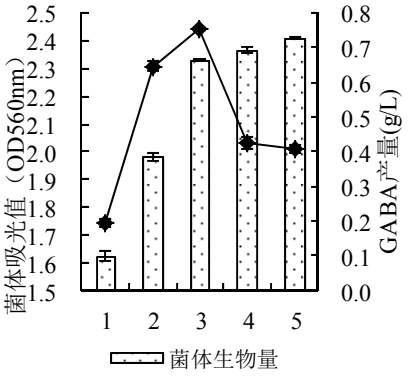


图 7.17 不同碳氮比对 Ind1 菌体生物量及 GABA 产量的影响

Fig. 7.17 Effect of C/N on Ind1 biomiss and producing GABA

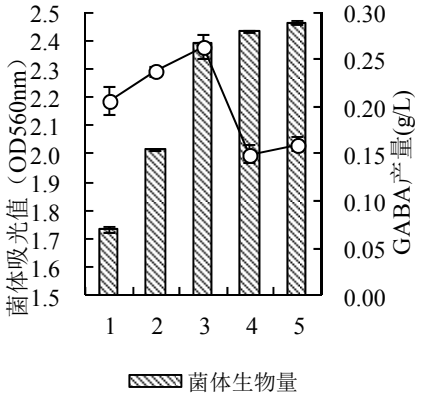


图 7.18 不同碳氮比对 Ind3 菌体生物量及 GABA 产量的影响

Fig.7.18 Effect of C/N on Ind3 biomiss and producing GABA

说明

1.葡萄糖:胰蛋白胨:酵母浸膏:牛肉膏＝5:10:10 :10
2.葡萄糖:胰蛋白胨:酵母浸膏:牛肉膏＝10:10:10 :10
3.葡萄糖:胰蛋白胨:酵母浸膏:牛肉膏＝20:10:10 :10
4.葡萄糖:胰蛋白胨:酵母浸膏:牛肉膏＝30:10:10 :10
5 葡萄糖:胰蛋白胨:酵母浸膏:牛肉膏＝40:10:10 :10

1. 葡萄糖:胰蛋白胨:酵母浸膏:牛肉膏＝5:10:10 :10
2. 葡萄糖:胰蛋白胨:酵母浸膏:牛肉膏＝10:10:10 :10
3. 葡萄糖:胰蛋白胨:酵母浸膏:牛肉膏＝20:10:10 :10
4. 葡萄糖:胰蛋白胨:酵母浸膏:牛肉膏＝30:10:10 :10
5. 葡萄糖:胰蛋白胨:酵母浸膏:牛肉膏＝40:10:10 :10

由图 7.17 和图 7.18 可知，随着葡萄糖的增多，菌株 Ind1 和 Ind3 两菌株的菌体生物量均随之增长，但 GABA 的产量先是随葡萄糖增多而增多，到葡萄糖和总氮源

比例为 20:30 时两菌株的 GABA 的产量达到最高，分别为 0.754087g/L 和 0.2638g/L 随后，随葡萄糖的继续增多，GABA 的产量呈下降趋势。当葡萄糖的含量增加到 30g/L 时，菌体的生长没有受到抑制，但 GABA 的产量分别下降了 44％和 43％。

7.3.3 戊糖乳杆菌代谢 L-Glu 转化生成 GABA 动力学研究

7.3.3.1 底物的添加量的影响

由于 GABA 是由谷氨酸脱羧酶催化 L-谷氨酸产生的，因此添加 L-谷氨酸的量直接影响了 GABA 的产量，而添加过多的前体物质有可能对菌体的生长产生抑制，由于 L-谷氨酸在中性和酸性的水溶液中呈离子状态，所以本试验中添加 L-谷氨酸的单钠盐（MSG），在不同 MSG 添加量时，菌体生长和 GABA 的产量的结果如下：

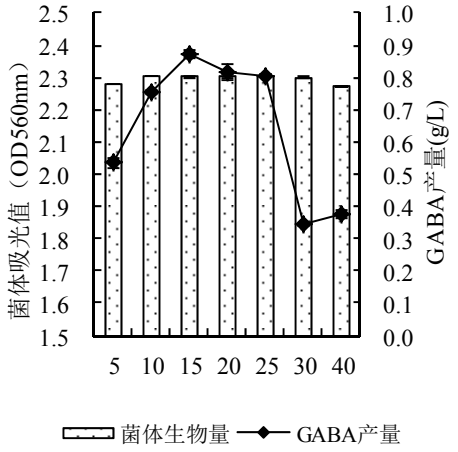


图 7.19 MSG 浓度对 Ind1 菌体生物量及 GABA 产量的影响

Fig.7.19 Effect of MSG concentration on Ind1 biomiss and producing GABA

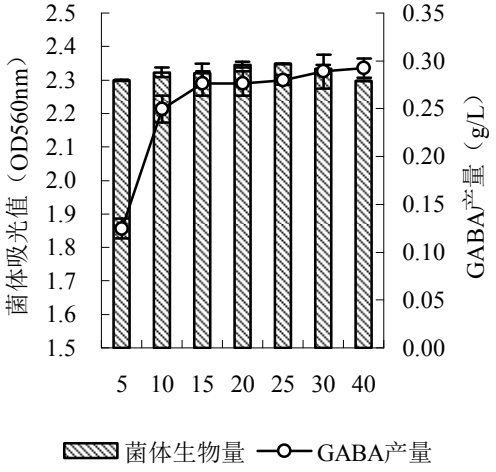


图 7.20 MSG 浓度对 Ind3 菌体生物量及 GABA 产量的影响

Fig. 7.20 Effect of MSG concentration on Ind3 biomiss and producing GABA

由图 7.19 可见，菌株 Ind1 随着反应液中 MSG 浓度增加，GABA 产量随之增加，MSG 浓度达到 15 g /L，GABA 产量达到最大 0.8716g/L，此后，继续增加 MSG 浓度，GABA 产生受到抑制。当 MSG 浓度达到 30 g /L，GABA 产量下降了 61％。同时，菌株 Ind1 的生物量在 MSG 的浓度为 40 g /L 之前没有明显的变化趋势，可见催化 MSG 转化生成 GABA，菌株 Ind1 的 MSG 最适底物浓度为 15g/L。

由图 7.20 可见，随着反应液中 MSG 浓度增加，菌株 Ind3 的菌体生物量在 MSG 的浓度为 30g /L 之前没有明显的变化趋势，而当 MSG 的浓度大于 30 g /L 时菌体的生长开始受到抑制，说明 Ind3 对 MSG 由很好的耐受性。而随着反应液中 MSG 浓度增加，GABA 产量随之增加，但 MSG 浓度从 15 g /L 增至 40 g /L 时，GABA 产量增长缓慢，只增长了 1.1％，综合考虑确定 MSG 浓度为 15g /L。

7.3.3.2 PLP 和钙离子的影响

5’-磷酸吡哆醛(PLP)是反应体系中谷氨酸脱羧酶的辅酶，而 Ca^{2+}可增加细胞的通透性，有利于物质的转运。添加 PLP(0.1mmol/L)或不同浓度的 Ca^{2+}(0.1，0.25，0.5，1.0，1.5，2.0mmol/L)可对 GABA 的生成产生不同的影响，其结果如下：

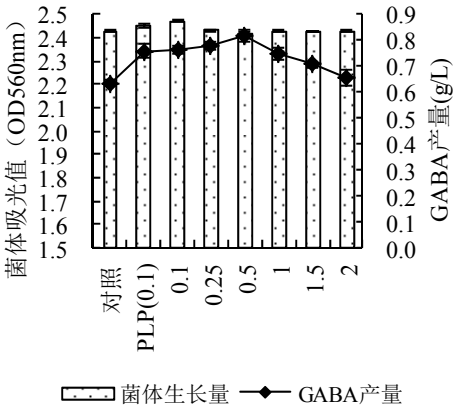


图 7.21 PLP 和 Ca^{2+}对 Ind1 菌体生物量及 GABA 产量的影响

Fig. 7.21 Effect of PLP and Ca^{2+}concentration on Ind1 biomiss and producing GABA

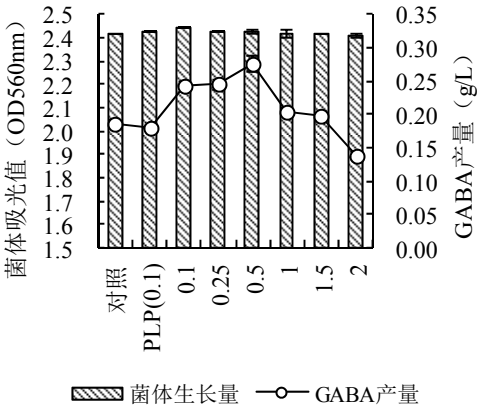


图 7.22 PLP 和 Ca^{2+}对 Ind3 菌体生物量及 GABA 产量的影响

Fig. 7.22 Effect of PLP and Ca^{2+}concentration on Ind3 biomiss and producing GABA

由图 7.21 和图 7.22 可知，PLP 添加对两菌株 GABA 的产量没明显的影响，可能是酵母浸膏中维生素的含量丰富，已含有 VB_6 关(VB_6 包括磷酸吡哆醛、磷酸吡哆醇、磷酸吡哆胺)。添加 PLP 和 Ca^{2+}两菌株的菌体生物量均没有明显的影响。而随着 Ca^{2+}浓度的增加，菌株 Ind1 和 Ind3 的发酵液中 GABA 的产量随之增加，而当 Ca^{2+}浓度达到 0.5mmol/L，GABA 的产量最高达到 0.8146g/L 和 0.2762g/L。当 Ca^{2+}浓度继续增加，对 GABA 的产生有抑制作用。由此，在培养基中添加 Ca^{2+}使其浓度为 0.5mmol/L。

7.3.3.3 种子培养液的菌龄的影响

菌体在不同的生长阶段机体机能不尽相同，接种于发酵培养基后相应酶的表达水平有所差别。考察了不同生理阶段的种子培养液接种于发酵培养基培养后菌体生物量和 GABA 的产量如下图所示：

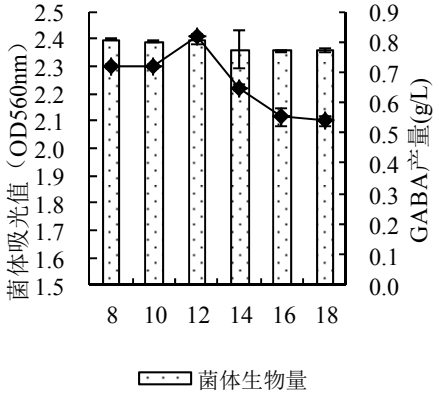


图 7.23 不同菌龄的种子对 Ind1 菌体生物量及 GABA 产量的影响

Fig. 7.23 Effect of different age germ on Ind1 biomiss and producing GABA

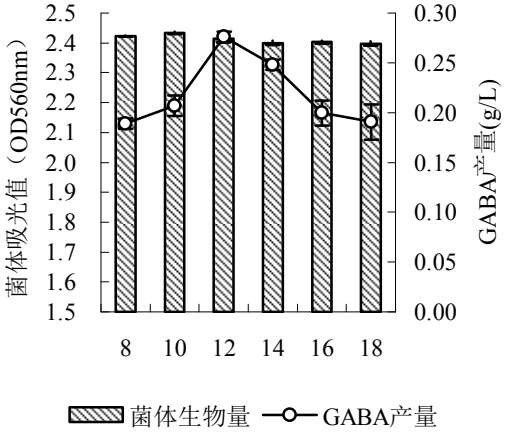


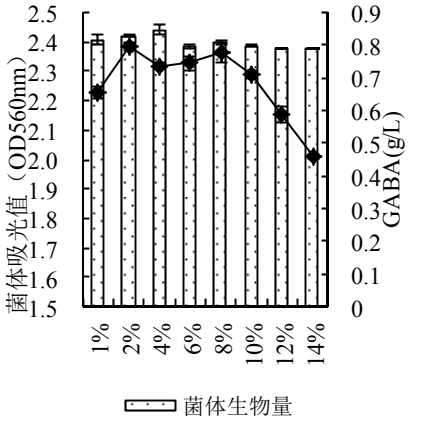
图 7.24 不同菌龄的种子对 Ind3 菌体生物量及 GABA 产量的影响

Fig. 7.24 Effect of different age germ on Ind3 biomiss and producing GABA

由图 7.23 和图 7.24 可知，不同菌龄的种子对两菌株发酵液的菌体生长量没有明显影响，只是随菌龄增长，发酵液的菌体生长量呈略微下降趋势。但对 GABA 的产量有很大影响。刚开始，随菌龄增长，菌株 Ind1 和 Ind3 的 GABA 产量随之增加，当种子菌龄为 12h 时，产量最高达到 0.8181g/L 和 0.2762g/L，随后随菌龄增长，产量开始下降。因此选用菌龄为 12h 菌体作为种子。

7.3.3.4 接种量的影响

传代菌种接入种子瓶后，要经过延滞期、对数生长期和衰亡期。种子浓度过低的种子转发酵,往往会出现前期生长缓慢，整个发酵周期延长，产物开始形成时间推迟等现象；而种子浓度过高则会引起菌体过早自溶，导致产物生成能力下降。在考察了不同种子培养液接种量接种于发酵培养基培养后菌体生物量和 GABA 的产量如下所示：



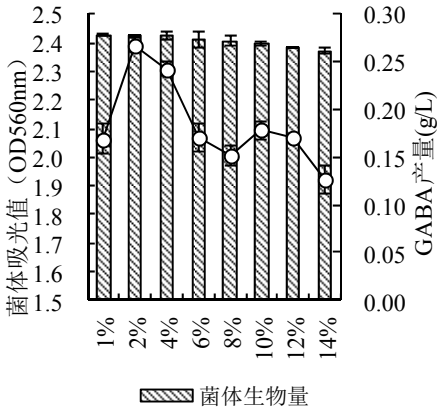


图 7.25 接种量对 Ind1 菌体生物量及 GABA 产量的影响

Fig. 7.25 Effect of the cell concentration on Ind1 biomiss and producing GABA

图 7.26 接种量对 Ind3 菌体生物量及 GABA 产量的影响

Fig. 7.26 Effect of the cell concentration on Ind3 biomiss and producing GABA

由图 7.25 和图 7.26 可见，刚开始增加菌体的接种量时，GABA 产量随接种量提高而增加，当接种量为 2%（v/v）时，GABA 产量达到最高，继续提高接种量，GABA 产量反而下降。可见菌株 Ind1 和 Ind3 代谢 MSG 转化生成 GABA，最适种子接种量的浓度均为 2%（v/v, 活菌数调整至 10^8 cfu/mL）。

7.3.3.5 发酵过程中最佳时间的确立

将活化培养的菌株 Ind1 和 Ind3 按 2%（v/v，活菌数调整至 10^8 cfu/mL）接种量接种于 MRS 改良培养基中，初始 pH 值为 7，37°C 培养 108 h，每 12h 取样，测定 GABA 的生物量，确定 GABA 的最佳生成时间。

图 7.27 可以看出，菌株 Ind1 在 0～108h 的发酵过程中，发酵液中 GABA 的生物量随着发酵时间的增加而增长，24h 时的产量仅有 0.0219 g/L ,以后急剧增长，72 h 时发酵液中 GABA 浓度达到较高值，为 1.007g/L。此后，发酵液中 GABA 浓度趋于稳定。

从图 7.27 可以看出，菌株 Ind3 在 0～108h 的发酵过程中，发酵液中 GABA 的生物量随着发酵时间的增加而增长，84 h 发酵液中 GABA 浓度达到较高，为 0.3226g/L，此后，GABA 浓度随发酵时间的延长趋于稳定，增幅很小。

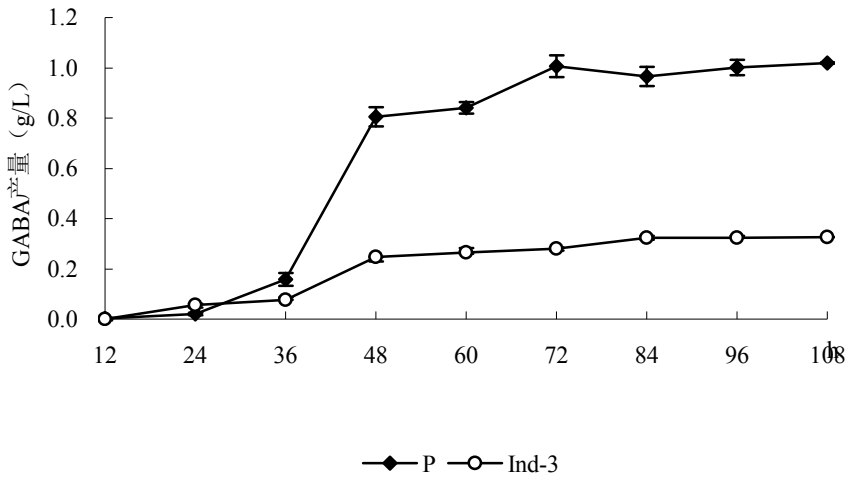


图 7.27 Ind1 和 Ind3 发酵过程中生成 GABA 量的时间进程变化曲线

Fig. 7.27 Time course of Ind1 and Ind3 producing GABA

因此，两菌株 Ind1 和 Ind3 的代谢 L-Glu 生成 GABA 的最佳时间分别为发酵后的 72h 和 84h 时，并且 GABA 的生成量分别达到 1.007g/L 和 0.3226g/L。

7.3.3.6 贮存期发酵液中的 GABA 的变化

由于 GABA 的产生可能与乳酸菌的耐酸机制有关，而在以上优化条件下培养的发酵液中酸度达到 pH4 以下，因此乳酸菌为了自身的存活，会继续生成 GABA。因此，对不同贮存时间的发酵液检测，GABA 的浓度变化如图所示：

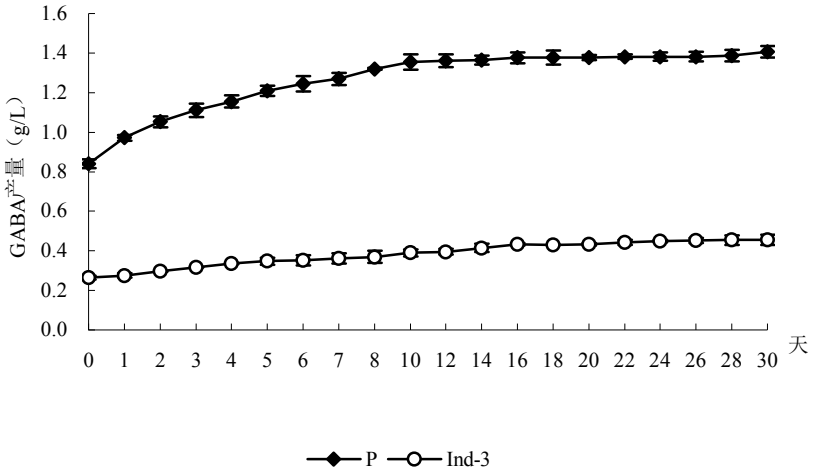


图 7.28 Ind1 和 Ind3 贮存过程中生成 GABA 量的时间进程变化曲线

Fig.7.28 Deposited time course of Ind1 and Ind3 producing GABA

由图 7.28 可知，菌株 Ind1 和 Ind3 在贮存期 GABA 的浓度继续上升，尤其是前 10 天上升较快，分别达到 1.3547 g/L 和 0.3904 g/L，之后趋于缓慢。在 30 天贮存期结束时，产量分别达到 1.4064 g/L 和 0.4563 g/L。

7.3.3.7 优化发酵条件后发酵液中的 GABA 的液相色谱检测

菌体的优化培养条件：将菌株 Ind1 和 Ind3（活菌数调整至 10^8 cfu/mL）按 2%（v/v）接种量接种于 MRS 改良培养基中，且 L-Glu 的浓度为 15g/L，初始 pH 值为 7，37°C 培养 72 h（Ind3 为 84h）后，发酵液离心稀释数倍后，液谱检测结果如图 7.29 和图 7.30。

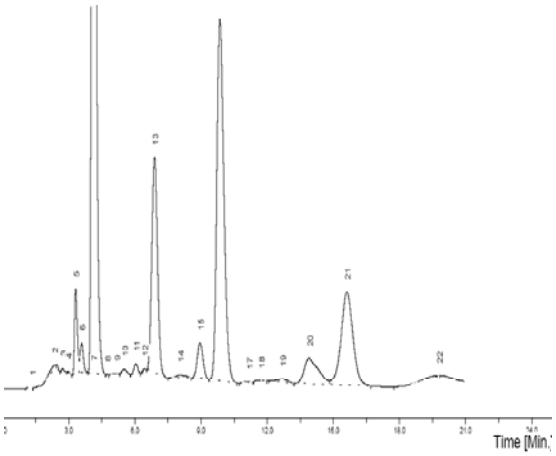


图 7.29 Ind1 在优化培养基中代谢 L-Glu 生成 GABA 的液相色谱检测结果

Fig. 7.29 HPLC chromatogram of fatty acid composition of fermented optimized culture medium by Ind1

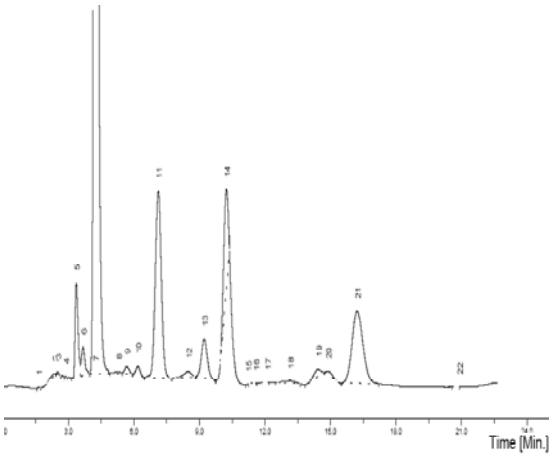


图 7.30 Ind3 在优化培养基中代谢 L-Glu 生成 GABA 的液相色谱检测结果

Fig. 7.30 HPLC chromatogram of fatty acid composition of fermented optimized culture medium by Ind3

从图 7.29 和图 7.30 中的液谱分析图中可以看到，保留时间为 4.12 min 的物质为 L-谷氨酸，保留时间为 15.61 min 的物质为 GABA。

7.3.4 发酵乳制品中菌体代谢 L-Glu 生成 GABA 的研究

7.3.4.1 添加 MSG 的影响

脱脂乳中游离 L-Glu 的含量比较低，在其中添加 L-Glu 后可促进谷氨酸脱羧酶的产生，及 GABA 的转化。在脱脂牛乳中添加 0.2%的 MSG，GABA 产量变化如图：

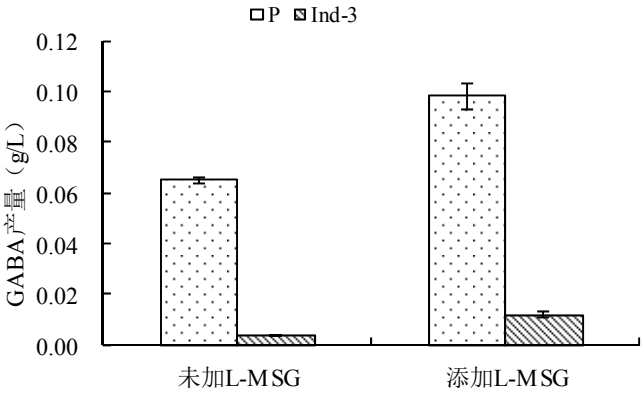


图 7.31 MSG 诱导对 Ind1 和 Ind3 发酵脱脂牛乳 GABA 生成的影响

Fig. 7.31 Effect of MSG inducer onInd1 和 Ind3 producing GABA in fermented skim milk

试验结果表明，发酵脱脂牛乳中加入 MSG 对 GABA 的生成影响较大。未添加 MSG 的发酵脱脂牛乳的 GABA 产量较低。添加 MSG 后菌株 Ind1 和 Ind3 两菌株发酵脱脂牛乳中 GABA 的含量提高了 50%和 314%。

7.3.4.2 乳中添加不同的碳源的影响

诱导活化后的菌株 Ind1 和 Ind3 分别接入已灭菌的脱脂牛乳培养基中，接种量 2%（v/v），脱脂牛乳中 MSG 加入量为 0.2 g/L。实验组分别加入 1%的葡萄糖、乳糖及蔗糖，菌株 Ind1 由于不能使脱脂乳在 24h 内成凝乳状态，因此无空白对照。菌株 Ind3 以不添加糖的脱脂牛乳为对照组，37°C，培养 24 h。采用平板稀释培养计数法，在 MRS 琼脂平板上培养 48 h，测定菌体生物量及其产 GABA 含量。实验结果如图 7.32 和图 7.33 所示：

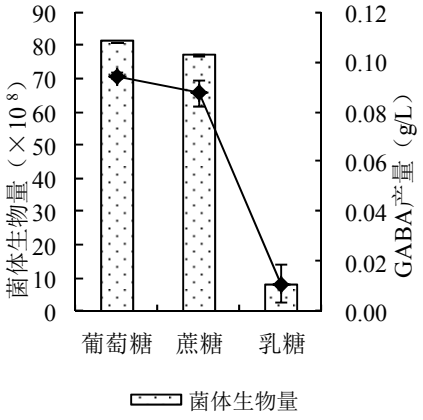


图 7.32 不同碳源对 Ind1 发酵脱脂牛乳活菌数和 GABA 产量的影响

Fig. 7.32 Effect of some sweeteners on Ind1 biomass and producing GABA in fermented skim-milk.

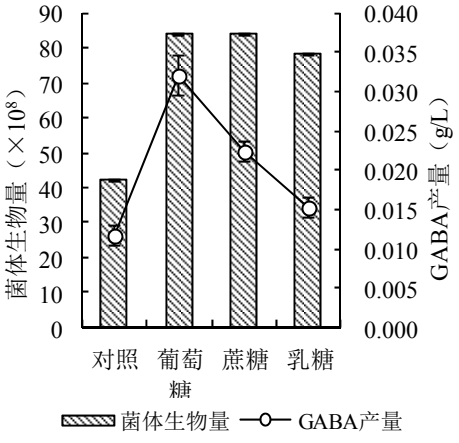


图 7.33 不同碳源对 Ind3 发酵脱脂牛乳活菌数和 GABAGABA 产量的影响

Fig. 7.33 Effect of some sweeteners on Ind3 biomass and producing GABA in fermented skim-milk.

由试验结果图 7.32 和图 7.33 可以看出，几种糖对菌株 Ind1 和 Ind3 生长和 GABA 生物量的影响顺序为葡萄糖>蔗糖>乳糖。和乳糖、蔗糖相比，脱脂牛乳中加入葡萄糖可促进两株菌的生长，并提高 GABA 的生成量。

7.3.4.3 乳中添加不同的氮源的影响

诱导活化后的 Ind1 和 Ind3 分别接入已灭菌的脱脂牛乳培养基中，接种量 2%（v/v），脱脂牛乳中 MSG 加入量为 2 g/L。实验组分别加入 1%的酵母浸膏、蛋白胨及牛肉膏，以不添加任何氮源的脱脂牛乳为对照组，37°C，培养 24 h，测定菌体生物

量及其产 GABA 含量。 计算脱脂牛乳培养基发酵后的生物量（cfu/mL），实验结果如图 7.34 和图 7.35 所示：

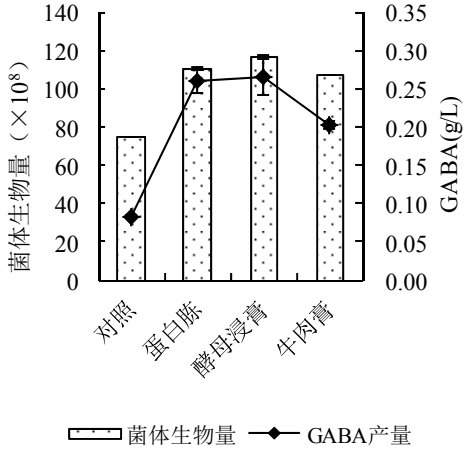


图 7.34 不同氮源对 Ind1 发酵脱脂牛乳活菌数和 GABA 产量的影响

Fig. 7.34 Effect of nitrogen source on Ind1 biomass and producing GABA in fermented skim-milk

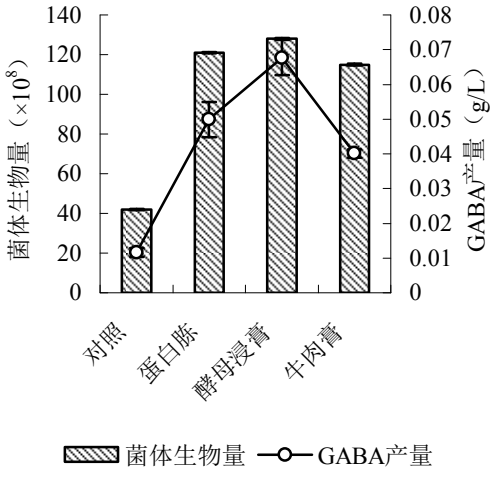


图 7.35 不同氮源对 Ind3 发脱脂牛乳酵活菌数和 GABAGABA 产量的影响

Fig. 7.35 Effect of nitrogen source on Ind3 biomass and producing GABA in fermented skim-milk

由试验结果图 7.34 和图 7.35 可以看出，几种氮源对菌株 Ind1 和 Ind3 菌体生长和 GABA 生物量的影响顺序为酵母膏>蛋白胨>牛肉膏。尤其脱脂牛乳中加入酵母浸膏后可促进 Ind1 和 Ind3 的生长，并将提高 GABA 生物量提高了 135%和 145%，这可能与酵母浸膏中含丰富的维生素有关，而其中的 PLP 是 GAD 辅酶，促进酶反应发生。

7.3.4.4 发酵乳制品在贮存期间 GABA 含量的变化

Ind1 和 Ind3 两菌株在发酵脱脂乳的过程中产生了 GABA，我们还需要考察 GABA 在贮存过程中的变化，结果如图所示：

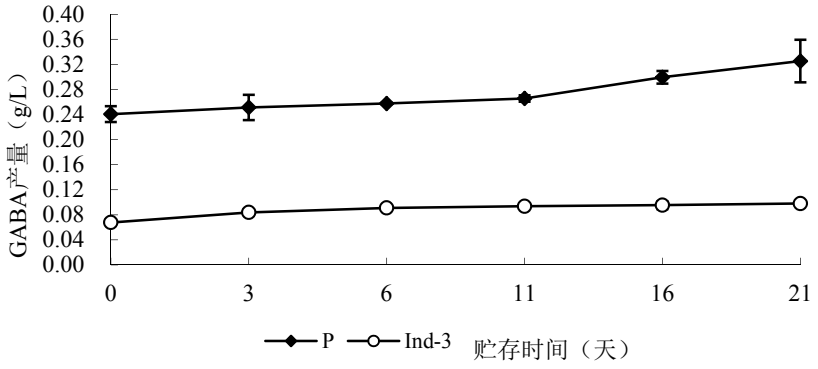


图 7.36 发酵乳制品在贮存期间 GABA 含量的变化

Fig. 7.36 Ultraviolet absorb of GABA of fermented skim-milk during storage of 21 days

从图 7.36 中可以看出，在 0～21d 之间，菌株 Ind1 和 Ind3 生成的 GABA 含量呈缓慢增加的趋势，21d 时 GABA 含量上升到到初始含量的 135%和 145%，达到 0.3253g/L 和 0.0980g/L。发酵的牛乳制品中的 GABA 含量在其货架期（冷藏条件下）21d 内缓慢上升。因此作为一种功能性乳制品，不用担心产品中 GABA 含量降低而失去保健的功效。

7.4 讨论

7.4.1 改良纸层析法用于 GABA 的分析检测

本方法是建立在纸色谱对物质的高效分离以及 GABA 与茚三酮定量反应的基础上，有机溶剂萃取后，利用分光光度计进行定量测定 GABA 的方法。尤其是将一定量的茚三酮加入展开剂中，确保定量更加准确。氨基酸展开后将滤纸风干，显色时控制显色温度和显色时间，也是对传统纸层析法的改进，提高定量的准确性和可重复性。

7.4.2 不同因素对戊糖乳杆菌代谢 L-Glu 生成 GABA 产量的影响

7.4.2.1 发酵温度

温度对发酵的影响主要表现在发酵前期影响菌体的生长和在发酵中后期 GABA 的产生，适合的发酵温度既有利于菌体的生长，也有利于菌体转化 L-Glu 生成 GABA。Nomura M 等人发现六种商业发酵剂在 30°C 培养时，有产生 GABA 的能力。刘清等优化一株有产生 GABA 能力的乳酸乳球菌的发酵条件时，发现其最佳的生成 GABA 的温度在 33°C。崔晓俊等通过对乳酸菌 SK005 发酵产 GABA 的条设计的一系列优化实验，得到乳酸乳球菌 SK005 发酵产 GABA 的优化发酵条件为发酵温度 30°C。南昌大学的江英英从传统发酵食品泡菜中分离出的一株高产 GABA 的乳杆菌 L139，在 34°C 时菌体的生物量和 GABA 的生物量都达到了最高值，37°C 产量下降了近 50%，

高于 40°C 则不能生成 GABA，说明较高或较低的温度都不利于细胞的生长和 GABA 的生成[80]。温度对于 GABA 的生成存在种或菌株之间的差异性，显然影响菌体生长和代谢活性的温度条件是会发生变化的。

从我们目前的试验结果来看，当培养温度从 19°C 升高到 37°C 时，两菌株 Ind1 和 Ind3 发酵液中 GABA 产量逐渐增大。到 37°C 时，GABA 产量均达到最高，当温度继续升高时，两菌株 Ind1 和 Ind3 代谢 L-Glu 生成 GABA 开始受到抑制，发酵液 GABA 产量逐渐下降。较高或较低的温度均不利于戊糖乳杆菌 L-Glu 生成 GABA，37°C 为菌株 Ind1 和 Ind3 发酵生成 GABA 的最适温度。

7.4.2.2 *初始* pH 值

GABA 的产生主要是依赖 L-Glu 的脱羧酶转化系统，由于谷氨酸脱羧酶在碱性条件下没有活性，最适 pH 在 4.0～5.5 左右，在而乳酸菌发酵过程中，发酵液的 pH 值由起始逐渐降低，GAD 的活性逐渐增大，而随 pH 值继续下降，GAD 的活性会受到抑制。不同的菌种产生的谷氨酸脱羧酶对于 pH 值的耐受性不同，也就使得不同菌种发酵液的初始 pH 值存在很大差异性。江英英对 L139 的研究发现，培养基初始 pH 值在 5.0 之间最有利于菌体的生长和 GABA 的生成。刘清、姚惠源等研究一株乳酸乳球菌 SYFC02，发现此菌株的培养基最佳初始 pH 值为 7.0，培养基初始 pH 太高和太低都不利于菌体的生长和 GABA 的生成。我们的试验研究发现，对于菌株 Ind1 和 Ind3 培养基初始 pH 为 6.5～7.5 时，GABA 生物量都处在较高水平，其中初始 pH 为 7 时，发酵液中 GABA 浓度最高。

7.4.2.3 *碳源的变化*

碳源是构成菌体合成的碳架及能量的来源，不同氨基酸产生菌，一般都能很好的利用葡萄糖，对其它糖如蔗糖、果糖、乳糖的利用能力各不相同。在其他一些研究[81]中也发现，乳酸菌代谢生成 GABA 的产量受到碳源种类的影响，一般果糖可以促进 GABA 的生成，可溶性淀粉抑制 GABA 的生成。刘清等人对乳酸乳球菌 *L.lactisl* SYFC02 进行研究，能利用葡萄糖、乳糖、果糖进行生长代谢并生成 GABA，不能代谢可溶性淀粉。从生成的 GABA 产量来看，以乳糖、果糖为碳源时，发酵液具有较高 GABA 产量。考虑到培养基的经济成本，选用乳糖作为培养基的碳源。我们的研究发现菌株 Ind1 和 Ind3 均能利用蔗糖、葡萄糖、乳糖、果糖代谢 L-Glu 生成 GABA。菌株 Ind1 以果糖为碳源时，发酵液具有较高 GABA 产量，而以乳糖为碳源时，菌体生物量较低，GABA 的产量只有果糖为碳源时的 12%。而菌株 Ind3 与 Ind1 相似，以果糖为碳源时，发酵液具有较高 GABA 产量，而以乳糖为碳源时，菌体生物量和 GABA 的产量均较低。这与上述研究结果不符，可能是由于菌体的差异造成的利用碳源的种类不同。而从 48h 后发酵液中的菌体生物量来看，菌株 Ind1 和 Ind3 均以葡萄糖和果糖为碳源时，发酵液具有较高的菌体生物量，表明戊糖乳杆菌能够较好的利用葡萄糖

和果糖。由此可以看出，菌体利用不同种类的碳源供菌体生长和 GABA 的生成，在不同的菌株之间存在差异性。

7.4.2.4 氮源的变化

氮源也是菌体生成GABA产量的影响因素之一，培养液中采用不同的氮源GABA的产量会不同，氮源分为无机氮和有机氮，一般菌体利用无机氮比较迅速,利用有机氮源比较缓慢，但乳酸菌生长对营养要求通常比较苛刻，单一的无机氮源不能满足菌体生长的需求。刘清等人对乳酸乳球菌 *L.lactisl* SYFC02 进行研究，发现培养基中添加单一无机氮源硫酸铵和硝酸钠时，菌体几乎不能生长，可以利用有机氮源蛋白胨、牛肉膏、酵母膏、胰蛋白胨生长并产生 GABA。并且蛋白胨、酵母膏作为复合氮源组合能达到最高的 GABA 产量。我们的研究发现菌株 Ind1 和 Ind3 均能利用几种有机氮源生成 GABA。其中菌株 Ind1 以酵母浸膏，菌株 Ind3 以鱼蛋白胨为单一氮源时，发酵液具有最高 GABA 产量，菌体生物量也较高；在以酵母膏和牛肉膏为碳源的培养基中添加部分其它氮源组成复合培养基，结果发现，在 10g 胰蛋白胨、10g 酵母浸膏、10g 牛肉膏的条件下，Ind1 和 Ind3 的菌体生物量和 GABA 产量达到最高，且 GABA 产量高于等质量单一氮源的产量，说明复合碳源的营养更加全面，更利于 GABA 的产生。

7.4.2.5 碳氮比的变化

培养基中适合的碳源、氮源的比例，能够使菌体进行充分的发酵和代谢生成 GABA，并且产量达到最高值。江英英对乳杆菌 L139 进行研究结果为葡萄糖和混合氮源的初始浓度均为 3%时，GABA 产量最高，在此碳氮源初始浓度下，有利于菌体按比例吸收营养物质和 GABA 的生成。刘清等人对乳酸乳球菌 *L.lactisl* SYFC02 进行研究，发现碳源增加到一定比例（20g/L）后，再增加反而对 GABA 生成起抑制作用，原因可能是营养物质过于丰富对酶的作用产生了不良的影响。与其相似，本文研究结果表明，添加 2%的葡萄糖和 3%的复合氮源 GABA 的产量最高，菌体生物量较高，而继续增加葡萄糖的比例，则会抑制 GABA 的产生。不同的菌株，利用和耐受不同碳氮源的种类和比例也不尽相同。

7.4.2.6 MSG 添加量

GABA 是乳酸菌将 L-Glu 脱羧形成的产物，因此底物 L-谷氨酸（或 MSG）的浓度是决定 GABA 形成的最主要因素之一。江英英对乳杆菌 L139 进行研究时，改变变底物浓度（1%～5%），观察其摩尔转化率，结果发现，当底物浓度为 2%时，其摩尔转化率已与 1%的转化率接近，说明在优化后的培养基中，菌体在充分生长后，对 MSG 的消耗速率也有所提高，适量增加底物浓度，可使 GABA 的产量有所提高，所以，在优化后的培养基中，选择 2%为底物的起始浓度。而我们的研究发现 Ind1 随着反应液中 MSG 浓度增加，GABA 产量随之增加，MSG 浓度达到 15g/L，GABA 产量

达到最大 0.8716g/L，此后，继续增加 MSG 浓度，GABA 产量反而下降。同时，随 MSG 的浓度增加，菌体的生物量呈少量增加趋势，在 MSG 的浓度大于 25 g/L 时，菌体的生长开始受到抑制；菌株 Ind3 随着反应液中 MSG 浓度增加，GABA 产量随之增加，MSG 浓度达到 25 g/L，GABA 产量增幅趋于平缓，而菌体生物量变化趋势同菌株 Ind1，前期随 MSG 的浓度增加，菌体的生物量呈少量增加趋势在 MSG 的浓度大于 30 g/L 时，菌体的生长开始受到抑制。显然，不同的菌株对于 MSG 的耐受性存在着差异性。

7.4.2.7 种子菌龄和菌体浓度

传代菌种接入种子瓶后，要经过延滞期、对数生长期和衰亡期。种龄太短或种子浓度过低的种子转发酵,往往会出现前期生长缓慢，整个发酵周期延长，产物开始形成时间推迟等现象；而种龄过长或种子浓度过高则会引起菌体过早自溶，导致产物生成能力下降。通常，种龄以菌体处于极为旺盛的对数生长中后期较为合适，这样可保持高的细胞活力 。

江英英发现乳杆菌 L139 在培养 3~4h 后进入对数生长期，18h 左右结束对数生长，转入稳定期，因此选择接种种龄为 16h。而我们的研究表明，Ind1 和 Ind3 在培养 4h 后进入对数生长期，14h 左右结束对数生长，转入稳定期，在种子菌龄为 12h 时转接的菌体生物量和 GABA 产量均最高。菌株 Ind1 和 Ind3 代谢 MSG 转化生成 GABA，最适种子接种量的浓度均为 2%（v/v，活菌数调整到 10^8cfu/mL）。

7.4.2.8 PLP 和钙离子

5’-磷酸吡哆醛(PLP)是反应体系中谷氨酸脱羧酶的辅酶，是谷氨酸脱羧酶的辅酶，很容易与酶蛋白发生解离，使谷氨酸脱接酶失去活力。TSUCHIYA 考察在曲霉催化谷氨酸脱羧时，加入 PLP 后，谷氨酸脱羧酶活力提高近 40 倍。黄俊考察了在反应液中加入不同浓度的 PLP 对游离短乳杆菌细胞合成 GABA 反应的影响，试验结果表明，随着 PLP 的浓度增大，反应的初速度以及产率略有增加，但不十分显著，说明此菌株的谷氨酸脱羧酶不易于 PLP 发生解离，在菌体内主要以全酶存在。而我们的研究发现，在培养基中添加 PLP（0.5mmol/L)，对 GABA 的产量影响不明显，这也可能与有机氮源酵母浸膏维生素 VB_6 含量丰富有关。显然，PLP 对不同的微生物的促 GABA 生产能力是不同的。

而 Ca^{2+}可增加细胞的通透性，有利于物质的转运。也有报道认为谷氨酸脱羧酶是钙依赖性的，受 Ca^{2+}/CaM 所激活，因此加入一定浓度的 Ca^{2+}可以大大提高产物 GABA 的产量。而我们的研究发现，而添加 Ca^{2+}可促进 GABA 产生，但添加 Ca^{2+}也不是越多产量越高，当培养基中添加 Ca^{2+}浓度超过 0.5mmol/L，GABA 的产量反而受到抑制。

7.4.2.9 发酵时间及贮存时间

Takesh H 等认为乳酸菌富集 GABA 的能力可能与乳酸菌的耐酸能力有关，所以乳酸菌发酵产生 GABA 应该在对数生长期以后，pH 下降至较低水平时。刘清等对乳酸乳球菌 *L.lactisl* SYFC02 研究发现 12h 时，GABA 的产量很低，从 12h 至 48hGABA 的产量增长很快，72h 后 GABA 的产量增加幅度缓慢。而江英英[78]对乳杆菌 L139 的研究发现，在 0～6h 时是菌体生长的延滞期，基本不产 GABA，此时 pH 缓慢下降，细胞生长开始进入对数生长期，约 44h 达到最高点，当 pH 降至第一个低谷时，GABA 开始合成；44～80h 菌体进入稳定期，在此阶段，降至第二个低谷，GABA 合成速度明显加快，大量被合成，约 80h 时积累量达到最高，80~100h 为菌体衰退期，这时，菌体细胞开始自溶,直到发酵结束。本文所研究的菌株 Ind1 和 Ind3 在 12h 时产量很低，12～72h 时 GABA 产量合成速度明显加快，72～120h GABA 产量继续上升，但增长缓慢。

而菌株 Ind1 和 Ind3 在发酵 72h 后在 4℃的储存期，GAD 活性依然存在，前十天 GABA 的产量继续上升。二十天后，GABA 的产量几乎不再增加。

7.4.2.10 MRS 培养基中戊糖乳杆菌生成 GABA 的液相色谱检测

高效液相色谱法检出线很低，在紫外检测条件下还可以达到 pmol/L。而发酵液中的 L-Glu 和 GABA 达到 mol/L，如果直接检测，峰型容易失真，导致结果不准确。并且 OPA 与 β－巯基乙醇需要在碱性条件下才能与氨基酸迅速反应，而发酵液的 pH 值低于 4，这样势必须加大衍生试剂的用量才能保证氨基酸发生完全衍生反应，无疑浪费试剂。所以，本研究将发酵液按一定比例（10 倍）稀释，既可减少衍生试剂的用量，又使峰面积在标准曲线的线性范围内。

由于 OPA 与氨基酸形成的衍生物稳定性较差，故恰当、准确地控制反应时间，不仅对方法的灵敏度，而且对定量的精确性都有很大影响。为此本研究考察了不同反应时间对各种氨基酸衍生物响应值的影响，结果表明，OPA 与多数氨基酸的反应在 60s 内已进行完全，个别氨基酸在 90s 内反应完全。故将反应时间统一控制在 90s。

本研究还发现，温度对各种氨基酸的保留时间影响很大，当温度由 16℃上升至 21℃时，GABA 的保留时间由 18.46min 提前到了 15.27min，所以在检测过程中要保持温度恒定。

7.4.3 发酵脱脂乳制品中 GABA 含量的研究

在乳酸菌脱脂乳发酵过程中，脱脂乳的成分及菌体的生长趋势都会影响着 GABA 的产生,不同的因素影响着发酵奶中 GABA 的产量，如：发酵菌种及菌体细胞数量的不同，发酵的 pH 值、MSG 诱导等这些因素的共同作用影响 GABA 生成水平。

在干酪成熟过程中，牛奶中的酪蛋白逐渐降解成肽和氨基酸，某些乳酸菌中含有谷氨酸脱羧酶，可将降解生成的谷氨酸催化为 GABA 和 CO_2，干酪中的孔眼和缝隙

就是由于 CO_2 的产生形成的。Nomura M 等人的研究中发现 7 种商业乳酸菌发酵剂中有 3 种在脱脂乳培养中产生能 GABA，并能在干酪成熟过程中产生了 GABA，产量可高达 383mg/Kg。添加具有 GAD 活性的乳酸菌并控制发酵成熟过程，是乳制品产生 GABA 的两个关键条件。

7.4.3.1 添加 MSG

很多研究表明，适量添加外源 MSG 对 GABA 的生成有诱导作用。张晖等[84]在利用米胚 GAD 制备 GABA 过程中，发现米胚和 MSG 用量越大，GABA 产生越多，当两者比例合适时，Glu 的转化率可以达到 100%，这时所有的 Glu 全部转化为 GABA。本试验在发酵脱脂乳培养中加入 MSG 对发酵牛乳 GABA 的生成有诱导作用，GABA 产量明显提高。

7.4.3.2 添加碳源和氮源

脱脂牛乳中所含糖类主要为乳糖，而菌株 Ind1 由于利用乳糖较为困难，不能使发酵脱脂乳在 37℃下 24h 内呈凝乳状态，所以没有不添加碳源的空白对照。

在脱脂乳中，添加几种糖对菌株 Ind1 和 Ind3 生长和 GABA 生物量的影响顺序为：葡萄糖>蔗糖>乳糖。几种氮源的影响顺序为：酵母浸膏>蛋白胨>牛肉膏。这于前面发酵液深层发酵生产时添加不同碳源和氮源对 GABA 影响变化基本一致。葡萄糖和酵母膏可促进菌株 Ind1 和 Ind3 和生成 GABA。

7.5 本章小结

（1）利用改良纸层析方法建立 γ-氨基丁酸（GABA）定性和定量分析程序条件是：展开剂配方为：正丁醇:冰乙酸:水＝4:2:1（含 0.4g/L 茚三酮）；30℃展开 3.5h，风干后 90℃烘干 10min，将对应斑点剪下用洗脱液(V75%乙醇：V0.1%硫酸铜＝38：2）3mL 洗脱 25 分钟后在 510nm 测定其吸光度值。

（2）通过变化碳源、氮源以及碳氮比来优化突变菌株的培养基条件；依据谷氨酸（L-Glu）添加量、培养时间、培养温度、pH、金属离子培养时间等因素，确定戊糖乳杆菌合成 GABA 的最佳条件及液谱检测 GABA，

（3）以乳作为介质，接种高产 GABA 的戊糖乳杆菌菌株，控制发酵条件，如 L-Glu 的诱导、碳源和氮源影响及贮藏期间 GABA 稳定的研究，制备强化 GABA 的乳制品。结果表明：① 发酵培养中加入 MSG 对发酵牛乳 GABA 的生成有诱导作用。② 在脱脂乳中，添加几种糖对菌株 Ind1 和 Ind3 生长和 GABA 生成量的影响顺序为：葡萄糖>蔗糖>乳糖。几种氮源的影响顺序为：酵母浸膏>蛋白胨>牛肉膏。③ 贮藏期间，在 0～21d 之间，两菌株 Ind1 和 Ind3 生成的 GABA 含量呈缓慢增加的趋势，21d 时 GABA 含量上升到到初始含量的 135%和 145%，达到 0.3253g/L 和 0.0980g/L。

8. 新疆奶酪制作工艺的研究

8.1 引言

8.1.1 新疆特色酸凝奶酪

新疆是少数民族聚集的地区,新疆少数民族素有食用奶酪的传统习惯,他们利用富余的牛奶制作成奶酪,即俗称的“奶疙瘩”。奶疙瘩曾是我国西北草原哈萨克族人民的主食之一,深受少数民族群众的喜爱。奶疙瘩是以牛奶为原料,每生产 1 kg 干酪需要消耗约 10 kg 鲜奶,相当于将原料奶中的蛋白质和脂肪浓缩了 10 倍。同时牛奶经乳酸菌发酵,乳酸菌分解了乳糖产生乳酸,部分乳糖转移到乳清中,避免了某些人因体内缺乏糖酶饮用牛乳导致的腹泻等乳糖不适症。经过发酵,也可避免蛋白质过敏反应。同时牛乳中的部分蛋白质在乳酸菌的作用下分解成多肽、氨基酸等营养物质,很容易被人体消化吸收,因此可以说,奶疙瘩是营养价值极高的食品。

8.1.2 新疆特色干酪的生产现状及发展前景

新疆民族传统奶酪的生产大多采用家庭式手工生产,没有固定的菌种,多采用自然发酵,品质差异很大。目前新疆有少量小规模的传统干酪生产企业,但没有形成规模及稳定的消费市场,且相关的理论研究资料非常少,产品层次不齐,质量无法统一。同时对传统奶酪进行的理论研究非常少,系统性的研究几乎没有,且也没有与之配套的生产设备。一些生产奶疙瘩的企业也只是用较原始的方法生产。随着人民生活水平的提高,对蛋白质特别是优质蛋白质的需求不断增加,随着我国经济的进一步发展以及在乳品消费多元化的影响下, 我国干酪产业必将有广阔的发展前景,而新疆特色干酪应该抓住这个千载难逢的契机实现跨越式发展。

8.2 实验方法

8.2.1 实验材料和设备

8.2.1.1 菌种

Yo-mix 187（丹尼斯克中国投资有限公司提供）

Ind1、Ind3 (河北农业大学食品微生物实验室提供)

8.2.1.2 实验材料及设备

新鲜优质牛奶、CINAC 酸度自动跟踪仪、不锈钢数显电热水浴锅、高温烘箱、水分活度仪、自制不锈钢奶酪槽、自制不锈钢切刀。

8.2.1.3 实验方法

原料乳的选择—原料乳杀菌—添加乳酸菌发酵剂—恒温发酵—添加 $CaCl_2$ 和凝乳

酶—切割凝乳块—吊袋排乳清—入模成型—烘干—包装—成品

8.2.1.4 原料乳的选择

选取新鲜、优质且无其它杂质的牛奶

8.2.1.5 原料乳杀菌

采用巴氏杀菌的方法：75℃保持 15s，既保证能够杀死原料乳中大多数的细菌和病原微生物又能够得蛋白适度变性，便于凝乳。

8.2.1.6 添加发酵剂

杀菌后迅速冷却降温至 42℃，添加 Yo-mix 187、Yo-mix 187&Ind-1、Yo-mix 187&Ind3 三种发酵剂。

8.2.1.7 恒温发酵并添加 $CaCl_2$ 和凝乳酶

42℃恒温发酵，发酵期间酸度仪自动测定酸度变化，当 pH 值降至 6.4～6.5 时添加凝乳酶，并添加 0.02%的 $CaCl_2$。

图 8.1 发酵

Fig 8.1.Femetation

8.2.1.8 切割、排乳清

当 pH 值降至 4.8～5.2 时切割凝块，切割凝块为边长 2～3cm 的正方体。

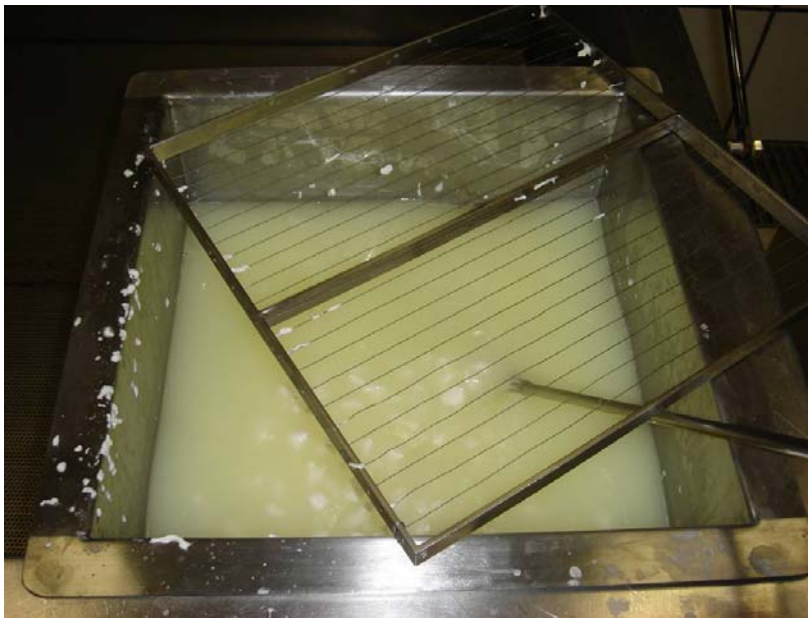


图 8.2 切割

Fig. 8.2 Cutting

图 8.3 搅拌排乳清

Fig.8.3 Whey off in Xinjiang cheese-maiking

8.2.1.9 过滤排乳清

将凝块与乳清一并倒入两层纱布中，滤掉乳清。

图 8.4 过滤排乳清

Fig.8.4 Wheying off and Filtering

8.2.1.10 入模成型

排乳清后的凝乳块分次装入干酪模具中压制成型。具中压制成型。

8.2.1.11 烘干

在 50℃烘箱中烘 3～4 天。

图 8.5 新疆奶酪成品

Fig.8.5 Finished Product of Xinjiang Cheese

8.3 结果与分析

8.3.1 三个样品的具体工艺参数

表 8.1 样品工艺参数

Table 8.1 Processing Parameter of Models

菌种	接种量	凝乳酶 (Marzyme 150)	切割时的 pH	悬吊时间(h)	烘干时间（天）
Yo-mix187	5 DCU	1/8（2080 IMCU）/100L	5.11	15	3
Yo-mix187 Ind-1	5 DCU 2%	1/8（2080 IMCU）/100L	4.91	15	3
Yo-mix187 Ind3	5 DCU 2%	1/8（2080 IMCU）/100L	5.18	15	3

注：Ind-1 和 Ind3 以 2%的接种量接种于 12%的脱脂牛奶中，37℃培养至凝乳，活化 2 代，即可作为发酵剂。

8.3.2 奶酪制作过程中 pH 值的测定

由表 2 和图 7 中可以看出，只添加 Yo-mix187 作为发酵剂时的切割时间为 5h，而添加 Ind-1、Ind3 与 Yo-mix187 联合发酵后的切割时间仅为 4h，缩短了 1h，由此表明，菌株 Ind-1 和 Ind3 的添加可缩短奶酪的切割时间。

表 8.2 奶酪制作过程中不同时间凝乳块的 pH 值

Table 8.2 The pH of Curds in Different Time during the Cheese Making

样品 / 时间(h)	A	B	C
0	6.57	6.54	6.58
0.5	6.50①	6.49①	6.50①
1	6.45	6.44	6.43
1.5	6.33	6.29	6.30
2	6.26	6.24	6.23
2.5	6.19	6.10	6.16
3	6.10	5.84	5.96
3.5	5.72	5.51	5.61

4	5.50	4.91②	5.18②
4.5	5.36		
5	5.11②		

注： A：Yo-mix 187 单株发酵； B：Ind-1&Yo-mix 187 联合发酵； C：Ind3&Yo-mix 187 联合发酵； ①：添加凝乳酶时间； ②：切割凝乳块时间；

原料乳初始 pH 值为 6.88；灭菌后温度降至 42℃时的 pH 值为 6.5 左右。

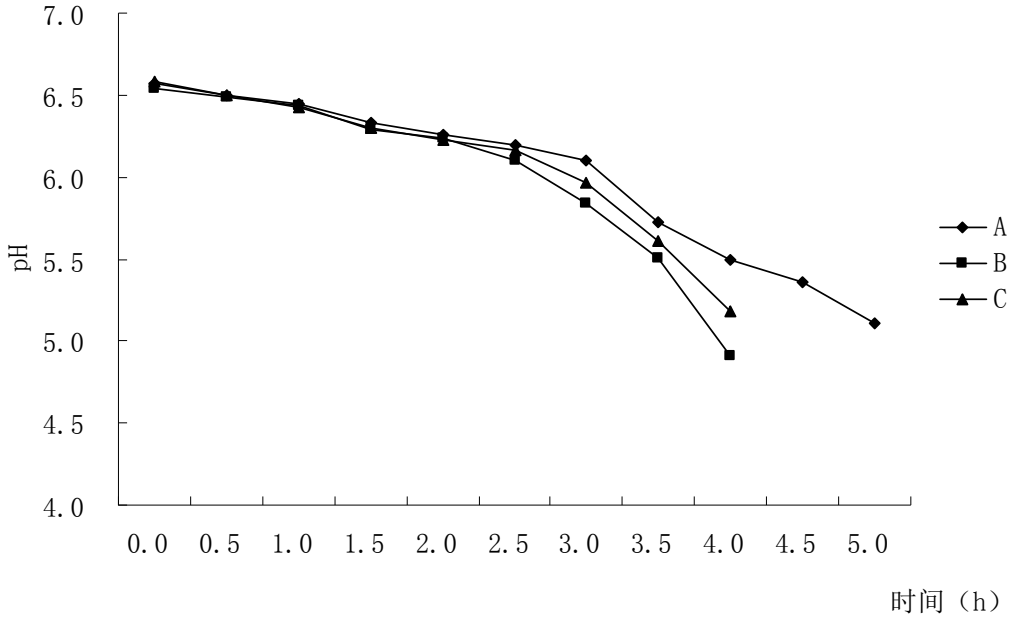


图 8.6 不同时间凝乳块的 pH 值

Fig.8.6 The pH of Curds During in Different Time During the Cheese Making

8.3.3 最终水分活度（AW）

表 8.3 三种干酪的最终水分活度（AW）

Table 8.3 The Final Water Activity of Three Kinds Fermentation Cheese

发酵剂	Yo-mix187	Yo-mix187&Ind-1	Yo-mix187&Ind3
水分活度（AW）	0.659	0.546	0.494

由表 8.3 可以看出，只添加 Yo-mix187 作为发酵剂的干酪样品最终水分活度为 0.659，而分别添加 Ind-1、Ind3 与 Yo-mix187 联合发酵后的干酪样品最终的水分活度均降低了，分别为 0.546 和 0.494，由此表明菌株 Ind-1 和 Ind3 对降低干酪成品的水分活度有一定的作用。

8.3.4 产率

表 8.4 三种发酵干酪产率

Table 8.4 The Yield of Three Kinds Fermentation Cheese

发酵剂	原料乳质量（kg）	成品质量（kg）	产率（%）
Yo-mix187	12.008	0.633	5.27
Yo-mix187&Ind-1	12.002	0.682	5.68
Yo-mix187&Ind3	12.011	0.751	6.25

由表 8.4 中可以看出，添加 Ind-1、Ind3 与 Yo-mix187 联合发酵后产率均有所提高，尤以添加 Ind3 后效果明显，产率比只添加 Yo-mix187 作为发酵剂时提高了近 1%。

8.4 本章小结

新疆奶酪作为营养价值极高的食品，添加戊糖乳杆菌 Ind1 和 Ind3 之后工艺参数如切割时间，成品的水分活度和产率都有不同程度的提高。本研究确定了新疆干酪制作的工艺流程，其关键参数如下：原料乳杀菌条件为 75°C、15s，发酵温度为 42°C 恒温，当 pH 值降至 6.4～6.5 时添加凝乳酶，并添加 0.02%的 $CaCl_2$，凝乳块切割 pH 值 4.8~5.2，吊袋排乳清 15h，入模成型，烘干温度为 50°C，3d，真空包装即可得成品。添加菌株 Ind1 或 Ind3 与 Yo-mix187 联合发酵后，缩短了切割时间，降低了产品最终的水分活度，提高了产率。今后本项研究重点在：

①进一步改善产品的质构和口感；

②还要进一步充分利用 Ind1 和 Ind3 其对人体的有益的生理作用，提供进一步的临床试验依据；

③进一步推广奶酪在广大消费者的接受程度，以更好的发挥 这一美味加营养又具独特健康功效的食品的效用，造福民众。

9. 结论与展望

本论文从传统新疆奶酪筛选出的 2 株戊糖乳杆菌（*Lactobacillus pentosus*）Ind1 和 Ind3 为实验菌株，对其生理功效及应用做了初步探讨，主要研究结论如下：

9.1：基于细胞形态、生理生化特性和 16s rRNA 测试数据，2 株乳杆菌被鉴定为戊糖乳杆菌，即 *Lactobacillus pentosus* Ind1 和 *Lactobacillus pentosus* Ind3。

9.2：两株戊糖乳杆菌 Ind1 和 Ind3 对消化道逆境环境有较好的抵抗能力，存活率都在 80%以上。与商业化益生菌一样具有较好黏附肠上皮细胞的能力，戊糖乳杆菌的粘附能力与菌体浓度、培养时间、pH、培养温度以及细胞生长阶段密切相关，菌体表面蛋白成分可能参与了黏附过程，但是菌体外表面的 S 层蛋白可能没有参与黏附过程，粘附能力存在菌株差异性，菌株 Ind3 展示了更好的黏附能力。

9.3：两株戊糖乳杆菌能持续对小鼠肠道菌群发挥调节功效，调节效果可以维持 7d 左右，不断地摄入戊糖乳杆菌能够维持其调节肠道微生态菌群平衡的益生功能。

9.4：戊糖乳杆菌具有耐受及清除苯酚、甲苯酚、吲哚等突变因子的能力，这种清除作用是通过细胞的吸附来完成的，吸附量随着细胞培养时间的延长而降低。

9.5：两株戊糖乳杆菌能够通过发酵代谢方式产γ－氨基丁酸（GABA），优化发酵工艺可以使戊糖乳杆菌 Ind1 和 Ind3 在发酵乳中的 GABA 产量提高 3 倍，分别达到 0.2647g/L 和 0.0677g/L。将戊糖乳杆菌 Ind1 和 Ind3 与其他发酵菌种联合制备新疆传统干酪，可以缩短干酪凝块切割时间，使干酪产率从 5.27%提高到 6.25%。

9.6：综上，目前获得两株戊糖乳杆菌表现出了较好的在胃酸和胆盐环境下的耐受性，具有较好的粘附和定植能力，能够调节胃肠道中有益和有害菌群的平衡，能够降低肠道环境中突变因子的含量，可以用乳作为载体产生较高的 GABA 等潜在功能成分，并在一定程度上改善干酪的物性特点，可以作为潜在的益生菌或功能性配料应用到乳品加工或相关食品加工中。

9.7：进一步的工作展望：

（1）目前实验表明，热灭活菌体粘附性并未有太大差异，但由于死菌本身具有极高的稳定性和安全性，这就为益生菌的实际应用提供了又一条新的途径。鉴于这一观点尚未被普遍接受，且作为益生菌使用的产品也多为活菌，因此需要进一步的体外及临床试验证实灭火菌的生理功效。

（2）宿主肠道菌群调节的评价指标和方法很多，比如肠道中短链脂肪酸（特别是丁酸）含量的增加，人体内致癌物质前体的改变等等，均可以作为下一步的研究内容，以进一步完善戊糖乳杆菌作为潜在益生菌菌株的理论依据。

（3）本研究对戊糖乳杆菌 Ind1 和 Ind3 抗诱变因子的耐受性以及降解、吸附诱变因子的功能性进行了体外实验，但由于体内降解机理非常复杂，且是否对结肠癌有作用，

需要更多的临床试验来证实。

参考文献

[1] 布坎南 R E,吉本斯 N E.伯杰氏细菌鉴定手册(第八版)[M].1998.

[2] 蔡武城,李碧羽,李玉民.生物化学实验技术教程[M].上海:复旦大学出版社,1983,1-8.

[3] 陈思种,李祯祯,陈芳.人体肠道益生菌的作用及其应用[J].江苏调味副食品, 2007, (2):23-25.

[4] 戴红,张宗才,张新申.氨基酸分析的检测方法评述[J].皮革科学与工程 2004,14(3):39-43.

[5] 丁永胜,牟世芬.氨基酸的分析方法及其应用进展[J].色谱 2004,22(3):210-215.

[6] 杜连祥,赵征,王敏等.乳酸菌及其发酵制品生产技术[M].天津科学技术出版社,1999,91~95.

[7] 段宇珩,谈重芳,王雁萍等.乳酸菌鉴定方法在食品工业中的应用及研究进展[J].食品工业科技,2007,2:242-244.

[8] 胡会萍.益生菌及其在功能食品中的应用[J].食品研究与开发,2007,28(2):173-175.

[9] 加永泽培.高血压病的诊疗进展.西藏医药杂志,2001,22(1):26-28.

[10] 金伟华,王晓蕙,陈华,等.人体益生菌药物临床应用新进展[J].中国新药杂志, 2007, 16(4): 263-268.

[11] 李慧,范志涛,邵建新等.氨基酸的应用及鉴别方法[J].中国卫生检验杂志 2003,13(3):351~353.

[12] 李明华,张大伟,楚杰,等.益生菌的作用及其在食品中的应用[J].食品与药品,2006,(08A):72-74.

[13] 李明华,张大伟,郝永任,等.益生菌的营养保健功能及其在食品中的应用[J].中国食物与营养,2006,(11):45-47.

[14] 李咏梅.益生菌辅助治疗重症急性胰腺炎的临床研究[J].内蒙古医学杂志,2007,39(1):10-11.

[15] 林富美.乳酸菌与免疫调节作用[J].食品工业(台湾),2004,36(3):16-26.

[16] 刘立闯,胡志和,贾嘉.利用海洋生物蛋白制备 ACE 抑制肽的研究进展[J].食品科学,2007,28(10):585-589.

[17] 刘艳,明双喜,王沂蒙,等.关注益生菌[J].中国家禽,2007,29(3):43-48.

[18] 刘中辉,彭俊生.益生菌临床应用新进展[J].肠外与肠内营养,20O7,14(5):313-316.

[19] 牟德海,李建生,林展江等.邻苯二甲醛柱前衍生反相高效液相色谱法测定人和小鼠血浆中的游离氨基酸[J].分析测试学报 1998,17(4):18-21.

[20] 盛国庆,张晋蓉,颜梅.高效液相测定氨基酸类神经递质的方法探讨[J].徐州医学院学报 2000, 20(1):34-36.

[21] 潘道东.酸乳中抗高血压肽的分离及其特性研究[J].食品科学,2005,26(1): 205-210.

[22] 秦楠.益生菌及其在食品中应用进展[J].中国酿造,2006,(7):1-3.

[23] 杨洁彬,凌代文,郭兴华等主编,乳酸菌-生物学基础及应用,北京,中国轻工业出版社.

[24] 徐贵成,刘宗莲主编.高血压病[M].北京.科学技术文献出版社.2002.

[25] 于泓,牟世芬.氨基酸分析方法的研究进展[J].分析化学评述与进展 2005,33(3):398-341.

[26] 俞晓辉,姚文,朱伟云.食物过敏及益生菌的预防和治疗作用[J].肠外与肠内营养, 2007, 14(5): 305-308.

[27] 王爱宇.益生菌的研究进展及在儿科的临床应用[J].安徽医药, 2007, 11(2):169-170.

[28] 王锦,沈霖霖,曹银祥等.高效液相色谱荧光检测法快速测定脊髓和脑内氨基酸[J].2005,20 (5): 424-426.

[29] 汪家政, 范明.蛋白质技术手册.北京科学出版社[M].2001.

[30] 吴松刚.微生物工程[M].科学出版社 2004.

[31] 吴建平,潘文彪.乳蛋白生物活性肽的研究概述[J].中国乳品工业, 1999, 27(1):12-15.

[32] Adriana nowak, zdzislawa libudzisz.Ability of intestinal lactic bacteria to bInd or/and metabolise phenol and p-cresol[J].annals of microbiology, 2007,57(3)329-335

[33] Adriana nowak, zdzislawa libudzisz.Influence of phenol, p-cresol and indole on growth and survival of intestinal lactic acid bacteria [J].Anaerobe, 12(2006)80-84.

[34] Alvarez O M I, Oberhelman R A. Probiotic agent s and infectious disease: a modem perspective on a traditional thempy [J]. Clin Infect Dis ,2001,32 (11) :1567-1576

[35] Bone E, Tam A, Hill M.The Production of Urinary Phenols by Gut Bacteria and Their Role in the Causation of Large Bowel Cancer. Am J Clin Nutr, 1976; 29: 1448-1454.

[36] Calrane G T, G R Gibson. Metabolic activities of the normal colonic flora.In Human Health: The Contribution of Microorganisms, S W Gibson (Ed), Springer Verlag, London, 1994, 17-52.

[37] Cross, M.L., Stevenson, L.M., Gill. Anti-allergy properties of fermented foods: an important immunoregulatory mechanism of latic acid bacteria [J] Immunophammcol,2001,1:891-901.

[38] Devnd A, Hancock R. Cationic peptides: distribution and mechanism of resistance [J].Curr Pharmacol Design, 2002, 8: 703-714.

[39] Erickson. K. L and Hubbard. N. E. Probiotics immunomodulation in healh and isease [J]. J.Nutr. 2000.130:403-409.

[40] Fang, H.Elina, T., Heikki,A.,et a1.Modulation of humoral immune respone throngh probiotic intake[J].FEMS Immuno.Med.Mierobio1.2000.29:47-52.

[41] Fooks,L.J.and Gibson. Probiotics as modulators of the gut fiora[J]. Br.J.Nutr,2002,88:39-49.

[42] FITZGERALD R J,MEISEL H.Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin- I-convertingenzyme [J].BrJNutr,2000,84(Suppl1):33-37.

[43] Isolauri,E.,Arvola T,Sutas Y,et a1. Probiotics in the management of atopie eczema fJJ.Clin Exp Allergy,2000,30:1604-1610.

[44] LeBlanc, J. G., Matar, C. and Valdez, J. C.Immun0modu1ating effects of peptidie fractions issued from milk fermented with Lactobacillus helvetieus[J].J.Dairy Sci., 2002.85:2733-2742.

[45] Matsuzaki,T. and Chin. Modulating immune responses with probiotic bacteria[J]. Immunol, 2000, 78:67-73.

[46] Mit suoka T. The human gastrointestinal tract. In: The Lactic Acid Bacteria in Health & Disease, B. J. B. Wood (Ed.) , Elsevier Aplied Science , London ,1992 ,69-114.
[47] Macfalrane G T, G R Gibson. Metabolic activities of the normal colonic flora. In: Human Health: The Contribution of Microorganisms, S W Gibson(Ed), Springer Verlag, London, 1994, 17-52.
[48] MaenoM, YamamotoN, TakanoT. Identification of anantihy pertensive peptide from case in hydrolysate produced by aproteinase from *Lactobacillus helveticus*CP790 [J]. J.Dairy Sci., 1996, 73: 1316-1321.
[49] Naidu, A. S. Bidlack, W.R.and Clemens, R. A. Probiotics spectra of lactic acid bacteria [J]. Critical Reviews in Food Sci. and Nutr, 1999, 38:55.
[50] Naoyuki Y, Atsuko A, Toshiali T. Antihypertensive effect of the peptides derived from case by an extracellular proteinase from *LactoBacillus helveticus*CP790[J]. J.Dairy Sci., 1994, 77:917-922.
[51] Nakamura Y, Yamamoto N,Sakai K,etal. Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensinI-convertingenzyme [J]. J. Dairy Sci., 1995, 78:1253-1257.
[52] NAKAMURA H. Effect of antihypertensive drugs on plasma lipid[J]. Amer J. Cardiol, 1987, 60: 24E-28E.
[53] Ondettim A, Cushman, D W. Enzymes of the rennin-angiotensin system and their inhibitors [J]. Ann Rev B iochem, 1982, 5:283-308.
[54] Peng S, Tid O. *Lactobacillus paracasei* LAFTI L26 in mice[J]. International Journal of Food Microbiology, 2007,115:115-118.
[55] Perdigon, G., Maldonado G.C.,Valdez, J. C. Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system[J]. J. Eur.J.Clin.Nutr..2002.56:21-26.
[56] PahorM, Psaty B M. Diabetes Care, 2000, 23 (7): 917-921.
[57] Paturi,G.,Phillips,M.,Jones, and Rowley HL, Martin KF, Marsden CA. Determination of *in vivo* amino neurotransmitters by high performance liquid chromatography with 0-phthalaldehyde-sulphite derivatisation[J]. Journal neurology Scencei Methaels 1995, 57-93.
[58] Richard J, Fitzgerald R J, Murray B A. The emerging role of dairy proteins and bioactive peptides in nutrition and health [J]. Nutr, 2004, 134:980S-988S.
[59] Rowland I R. Metabolic interactions in the gut. In: Probiotics. The Scientific Basis, R. Fuller (Ed.), Chapman & Hall, London, 1992, 29-54.
[60] Reid, G. Sanders, M.E.Gaskins, H. R.et a1.New scientific paradigms for probiotics and prebiotics [J]. Clin.Gastroentero J.,2003, 37: 105-118.
[61] Smolders I, Sarre S. Michotte Y, et al.The analysis of excitatory, inhibitory and other aminoacids in rat brain microdialysates using miccobore liquid chrunatography [J]. Journal Neurology Science Metheals 1995, 57-47.
[62] Smith S, Sharp T. In vivo measurement of extracellular GABA in rat nucleus accmnberns: improved methodology [J]. British Journal Pharmacol., 1992, 107-210.
[63] Schmidt, E.G. Urinary phenols. IV. The simultaneous determination of phenol and *p*-cresol in urine[J]. Biol. Chem., 1999.15, 179-211.

[64] Tsuchiya N, Nishimura K.Method for producing γ-aminobutyric acid.[J]. 2004, 12, 159-161.
[65] Tannock G W. Afresh look at t he intestinal microflora. In Probiotics: A Critical Review, Horiozon Scientific Press. Wymondham , 1999 , 5-14.
[66] Toshiaki Takano. Milk derived peptides and hypertensin reduction [J].Dairy, 1998: 375-381.
[67] Tiina Jauh A, Makinen. Information About the Evolus fermented milk [P].Valio LTD.2003 223-241.
[68] Tamm, A.,.Urinary volatile phenols in patients with intestinal obstruction. Scand. J. Gastroenterol., 1971, 5-7.
[69] Yamamoto N, Maeno M, TakanoT. Purification and characterization of anantihy pertensive peptide from a yoghurt-like product fermented by *Lactobacillus helveticus*CPN4 [J]. J.Dairy Sci., 1999, 82: 1388-1393.

附录

CTB689-P
Sequencher(tm) "Untitled Project"

```
CTB689-P_seqforward    #1   ACGCTGGCGG CGTGCCTAAT ACATGCAAGT CGAACGAACT CTGGTATTGA TTGGTGCTTG
                       #1   ACGCTGGCGG CGTGCCTAAT ACATGCAAGT CGAACGAACT CTGGTATTGA TTGGTGCTTG

CTB689-P_seqforward    #61  CATCATGATT TACATTTGAG TGAGTGGCGA ACTGGTGAGT AACACGTGGG AAACCTGCCC
                       #61  CATCATGATT TACATTTGAG TGAGTGGCGA ACTGGTGAGT AACACGTGGG AAACCTGCCC

CTB689-P_seqforward    #121 AGAAGCGGGG GATAACACCT GGAAACAGAT GCTAATACCG CATAACAACT TGGACCGCAT
                       #121 AGAAGCGGGG GATAACACCT GGAAACAGAT GCTAATACCG CATAACAACT TGGACCGCAT

CTB689-P_seqforward    #181 GGTCCGAGTT TGAAAGATGG CTTCGGCTAT CACTTTTGGA TGGTCCCGCG GCGTATTAGC
                       #181 GGTCCGAGTT TGAAAGATGG CTTCGGCTAT CACTTTTGGA TGGTCCCGCG GCGTATTAGC

CTB689-P_seqforward    #241 TAGATGGTGG GGTAACGGCT CACCATGGCA ATGATACGTA GCCGACCTGA GAGGGTAATC
                       #241 TAGATGGTGG GGTAACGGCT CACCATGGCA ATGATACGTA GCCGACCTGA GAGGGTAATC

CTB689-P_seqforward    #301 GGCCACATTG GGACTGAGAC ACGGCCCAAA CTCCTACGGG AGGCAGCAGT AGGGAATCTT
                       #301 GGCCACATTG GGACTGAGAC ACGGCCCAAA CTCCTACGGG AGGCAGCAGT AGGGAATCTT

CTB689-P_seqforward    #361 CCACAATGGA CGAAAGTCTG ATGGAGCAAC GCCGCGTGAG TGAAGAAGGG TTTCGGCTCG
                       #361 CCACAATGGA CGAAAGTCTG ATGGAGCAAC GCCGCGTGAG TGAAGAAGGG TTTCGGCTCG
```

2007年12月26日 Page 1 of 4

图 A1 P 的 16S rRNA 基因序列分析

Fig. A1 P The sequence of 16SrRNA gene from P

CTB689-P
Sequencher(tm) "Untitled Project"

```
CTB689-P_seqforward     #421  TAAAACTCTG TTGTTAAAGA AGAACATATC TGAGAGTAAC TGTTCAGGTA TTGACGGTAT
                        ----------------------------------------------------------------------
                        #421  TAAAACTCTG TTGTTAAAGA AGAACATATC TGAGAGTAAC TGTTCAGGTA TTGACGGTAT

CTB689-P_seqforward     #481  TTAACCAGAA AGCCACGGCT AACTACGTGC CAGCAGCCGC GGTAATACGT AGGTGGCAAG
                        ----------------------------------------------------------------------
                        #481  TTAACCAGAA AGCCACGGCT AACTACGTGC CAGCAGCCGC GGTAATACGT AGGTGGCAAG

CTB689-P_seqforward     #541  CGTTGTCCGG ATTTATTGGG CGTAAAGCGA GCGCAGGCGG TTTTTTAAGT CTGATGTGAA
CTB689-P_seqinternal    >#1>                            GCGA GCGCAGGCGG TTTTTTAAGT CTGATGTGAA
                        ----------------------------------------------------------------------
                        #541  CGTTGTCCGG ATTTATTGGG CGTAAAGCGA GCGCAGGCGG TTTTTTAAGT CTGATGTGAA

CTB689-P_seqforward     #601  AGCCTTCGGC TCAAC
CTB689-P_seqinternal     #35  AGCCTTCGGC TCAACCGAAG AAGTGCATCG GAAACTGGGA AACTTGAGTG CAGAAGAGGA
                        ----------------------------------------------------------------------
                        #601  AGCCTTCGGC TCAACCGAAG AAGTGCATCG GAAACTGGGA AACTTGAGTG CAGAAGAGGA

CTB689-P_seqinternal     #95  CAGTGGAACT CCATGTGTAG CGGTGAAATG CGTAGATATA TGGAAGAACA CCAGTGGCGA
                        ----------------------------------------------------------------------
                        #661  CAGTGGAACT CCATGTGTAG CGGTGAAATG CGTAGATATA TGGAAGAACA CCAGTGGCGA

CTB689-P_seqinternal    #155  AGGCGGCTGT CTGGTCTGTA ACTGACGCTG AGGCTCGAAA GTATGGGTAG CAAACAGGAT
                        ----------------------------------------------------------------------
                        #721  AGGCGGCTGT CTGGTCTGTA ACTGACGCTG AGGCTCGAAA GTATGGGTAG CAAACAGGAT
```

2007年12月26日 Page 2 of 4

图 A2 P 的 16S rRNA 基因序列分析

Fig. A2 The sequence of 16SrRNA gene from P

CTB689-P
Sequencher(tm) "Untitled Project"

```
CTB689-P_seqinternal   #215   TAGATACCCT GGTAGTCCAT ACCGTAAACG ATGAATGCTA AGTGTTGGAG GGTTTCCGCC
                       ----------------------------------------------------------------------
                       #781   TAGATACCCT GGTAGTCCAT ACCGTAAACG ATGAATGCTA AGTGTTGGAG GGTTTCCGCC

CTB689-P_seqinternal   #275   CTTCAGTGCT GCAGCTAACG CATTAAGCAT TCCGCCTGGG GAGTACGGCC GCAAGGCTGA
CTB689-P_seqreverse    >#1>                           GCAT TCCGCCTGGG GAGTACGGCC GCAAGGCTGA
                       ----------------------------------------------------------------------
                       #841   CTTCAGTGCT GCAGCTAACG CATTAAGCAT TCCGCCTGGG GAGTACGGCC GCAAGGCTGA

CTB689-P_seqinternal   #335   AACTCAAAGG AATTGACGGG GGCCCGCACA AGCGGTGGAG CATGTGGTTT AATTCGAAGC
CTB689-P_seqreverse     #35   AACTCAAAGG AATTGACGGG GGCCCGCACA AGCGGTGGAG CATGTGGTTT AATTCGAAGC
                       ----------------------------------------------------------------------
                       #901   AACTCAAAGG AATTGACGGG GGCCCGCACA AGCGGTGGAG CATGTGGTTT AATTCGAAGC

CTB689-P_seqinternal   #395   TACGCGAAGA ACCTTACCAG GTCTTGACAT ACTATGCAAA TCTAAGAGAT TAGACGTTCC
CTB689-P_seqreverse     #95   TACGCGAAGA ACCTTACCAG GTCTTGACAT ACTATGCAAA TCTAAGAGAT TAGACGTTCC
                       ----------------------------------------------------------------------
                       #961   TACGCGAAGA ACCTTACCAG GTCTTGACAT ACTATGCAAA TCTAAGAGAT TAGACGTTCC

CTB689-P_seqinternal   #455   CTTCGGGGAC ATGGATACAG GTGGTGCATG GTTGTCGTCA GCTCGTGTCG TGAGATGTTG
CTB689-P_seqreverse    #155   CTTCGGGGAC ATGGATACAG GTGGTGCATG GTTGTCGTCA GCTCGTGTCG TGAGATGTTG
                       ----------------------------------------------------------------------
                      #1021   CTTCGGGGAC ATGGATACAG GTGGTGCATG GTTGTCGTCA GCTCGTGTCG TGAGATGTTG

CTB689-P_seqinternal   #515   GGTTAAGTCC CGCAACGAGC GCAACCCTTA TTATCAGTTG CCAGCATTAA GTTGGGCACT
CTB689-P_seqreverse    #215   GGTTAAGTCC CGCAACGAGC GCAACCCTTA TTATCAGTTG CCAGCATTAA GTTGGGCACT
                       ----------------------------------------------------------------------
                      #1081   GGTTAAGTCC CGCAACGAGC GCAACCCTTA TTATCAGTTG CCAGCATTAA GTTGGGCACT
```

2007年12月26日 Page 3 of 4

图 A3 P 的 16S rRNA 基因序列分析

Fig. A3 The sequence of 16SrRNA gene from P

CTB689-P
Sequencher(tm) "Untitled Project"

```
CTB689-P_seqinternal   #575   CTGGTGAGAC TGCCGGTGAC AAACCGGAGG AAGG
CTB689-P_seqreverse    #275   CTGGTGAGAC TGCCGGTGAC AAACCGGAGG AAGGTGGGGA TGACGTCAAA TCATCATGCC
                      ----------------------------------------------------------------------------
                      #1141   CTGGTGAGAC TGCCGGTGAC AAACCGGAGG AAGGTGGGGA TGACGTCAAA TCATCATGCC

CTB689-P_seqreverse    #335   CCTTATGACC TGGGCTACAC ACGTGCTACA ATGGATGGTA CAACGAGTTG CGAACTCGCG
                      ----------------------------------------------------------------------------
                      #1201   CCTTATGACC TGGGCTACAC ACGTGCTACA ATGGATGGTA CAACGAGTTG CGAACTCGCG

CTB689-P_seqreverse    #395   AGAGTAAGCT AATCTCTTAA AGCCATTCTC AGTTCGGATT GTAGGCTGCA ACTCGCCTAC
                      ----------------------------------------------------------------------------
                      #1261   AGAGTAAGCT AATCTCTTAA AGCCATTCTC AGTTCGGATT GTAGGCTGCA ACTCGCCTAC

CTB689-P_seqreverse    #455   ATGAAGTCGG AATCGCTAGT AATCGCGGAT CAGCATGCCG CGGTGAATAC GTTCCCGGGC
                      ----------------------------------------------------------------------------
                      #1321   ATGAAGTCGG AATCGCTAGT AATCGCGGAT CAGCATGCCG CGGTGAATAC GTTCCCGGGC

CTB689-P_seqreverse    #515   CTTGTACACA CCGCCCGTCA CACCATGAGA GTTTGTAACA CCCAAAGTCG GTGGGGTAAC
                      ----------------------------------------------------------------------------
                      #1381   CTTGTACACA CCGCCCGTCA CACCATGAGA GTTTGTAACA CCCAAAGTCG GTGGGGTAAC

CTB689-P_seqreverse    #575   CTTTTAGGAA CCAGCCGCCT AAGGTGGGAC AGATGATTAG GGG
                      ----------------------------------------------------------
                      #1441   CTTTTAGGAA CCAGCCGCCT AAGGTGGGAC AGATGATTAG GGG
```

2007年12月26日 Page 4 of 4

图 A4 P 的 16S rRNA 基因序列分析 4

Fig. A4 The sequence of 16SrRNA gene from P

图 A5 P 的 16S rRNA 基因序列图谱

Fig. A5 The 16S rRNA gene sequences of P

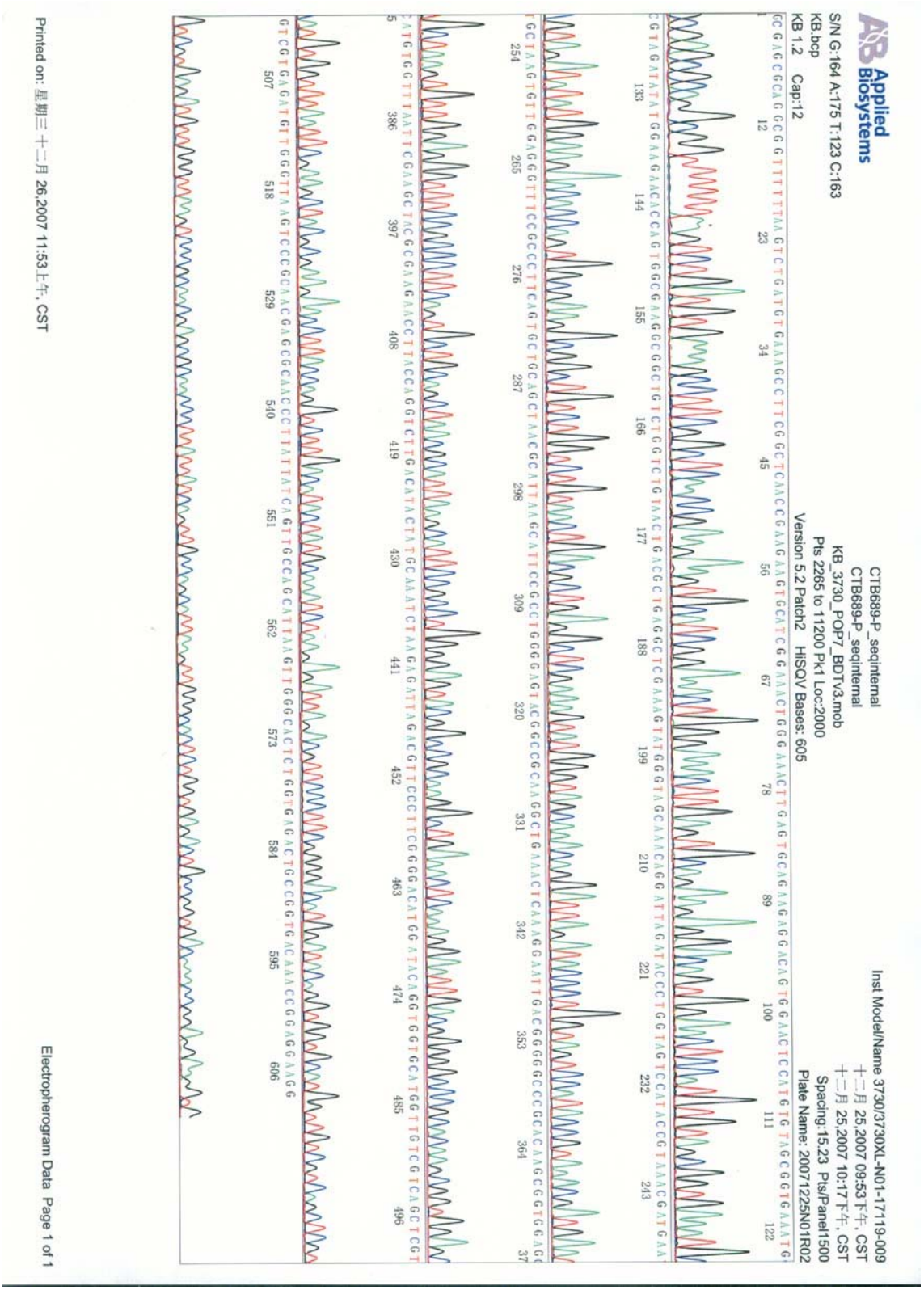


图 A6 P 的 16S rRNA 基因序列图谱 2

Fig. A6 The 16S rRNA gene sequences of P

图 A7 P 的 16S rRNA 基因序列图谱

Fig. A7 The 16S rRNA gene sequences of P

CTB689-Ind
Sequencher(tm) "Untitled Project"

```
CTB689-Ind_seqforward    #1   ACGCTGGCGG CGTGCCTAAT ACATGCAAGT CGAACGAACT CTGGTATTGA TTGGTGCTTG

                         #1   ACGCTGGCGG CGTGCCTAAT ACATGCAAGT CGAACGAACT CTGGTATTGA TTGGTGCTTG

CTB689-Ind_seqforward    #61  CATCATGATT TACATTTGAG TGAGTGGCGA ACTGGTGAGT AACACGTGGG AAACCTGCCC

                         #61  CATCATGATT TACATTTGAG TGAGTGGCGA ACTGGTGAGT AACACGTGGG AAACCTGCCC

CTB689-Ind_seqforward    #121 AGAAGCGGGG GATAACACCT GGAAACAGAT GCTAATACCG CATAACAACT TGGACCGCAT

                         #121 AGAAGCGGGG GATAACACCT GGAAACAGAT GCTAATACCG CATAACAACT TGGACCGCAT

CTB689-Ind_seqforward    #181 GGTCCGAGTT TGAAAGATGG CTTCGGCTAT CACTTTTGGA TGGTCCCGCG GCGTATTAGC

                         #181 GGTCCGAGTT TGAAAGATGG CTTCGGCTAT CACTTTTGGA TGGTCCCGCG GCGTATTAGC

CTB689-Ind_seqforward    #241 TAGATGGTGA GGTAACGGCT CACCATGGCA ATGATACGTA GCCGACCTGA GAGGGTAATC

                         #241 TAGATGGTGA GGTAACGGCT CACCATGGCA ATGATACGTA GCCGACCTGA GAGGGTAATC

CTB689-Ind_seqforward    #301 GGCCACATTG GGACTGAGAC ACGGCCCAAA CTCCTACGGG AGGCAGCAGT AGGGAATCTT

                         #301 GGCCACATTG GGACTGAGAC ACGGCCCAAA CTCCTACGGG AGGCAGCAGT AGGGAATCTT

CTB689-Ind_seqforward    #361 CCACAATGGA CGAAAGTCTG ATGGAGCAAC GCCGCGTGAG TGAAGAAGGG TTTCGGCTCG

                         #361 CCACAATGGA CGAAAGTCTG ATGGAGCAAC GCCGCGTGAG TGAAGAAGGG TTTCGGCTCG
```

2007年12月26日 Page 1 of 4

图 B1 Ind3 的 16S rRNA 基因序列分析 1

Fig. B1 The sequence of 16SrRNA gene from Ind3

CTB689-Ind
Sequencher(tm) "Untitled Project"

```
CTB689-Ind_seqforward   #421  TAAAACTCTG TTGTTAAAGA AGAACATATC TGAGAGTAAC TGTTCAGGTA TTGACGGTAT
                              ..........................................................
                        #421  TAAAACTCTG TTGTTAAAGA AGAACATATC TGAGAGTAAC TGTTCAGGTA TTGACGGTAT

CTB689-Ind_seqforward   #481  TTAACCAGAA AGCCACGGCT AACTACGTGC CAGCAGCCGC GGTAATACGT AGGTGGCAAG
                              ..........................................................
                        #481  TTAACCAGAA AGCCACGGCT AACTACGTGC CAGCAGCCGC GGTAATACGT AGGTGGCAAG

CTB689-Ind_seqforward   #541  CGTTGTCCGG ATTTATTGGG CGTAAAGCGA GCGCAGGCGG TTTTTTAAGT CTGATGTGAA
CTB689-Ind_seqinternal  >#1>                            GCGA GCGCAGGCGG TTTTTTAAGT CTGATGTGAA
                              ..........................................................
                        #541  CGTTGTCCGG ATTTATTGGG CGTAAAGCGA GCGCAGGCGG TTTTTTAAGT CTGATGTGAA

CTB689-Ind_seqforward   #601  AGCCTTCGGC TCAACCGAAG
CTB689-Ind_seqinternal   #35  AGCCTTCGGC TCAACCGAAG AAGTGCATCG GAAACTGGGA AACTTGAGTG CAGAAGAGGA
                              ..........................................................
                        #601  AGCCTTCGGC TCAACCGAAG AAGTGCATCG GAAACTGGGA AACTTGAGTG CAGAAGAGGA

CTB689-Ind_seqinternal   #95  CAGTGGAACT CCATGTGTAG CGGTGAAATG CGTAGATATA TGGAAGAACA CCAGTGGCGA
                              ..........................................................
                        #661  CAGTGGAACT CCATGTGTAG CGGTGAAATG CGTAGATATA TGGAAGAACA CCAGTGGCGA

CTB689-Ind_seqinternal  #155  AGGCGGCTGT CTGGTCTGTA ACTGACGCTG AGGCTCGAAA GTATGGGTAG CAAACAGGAT
                              ..........................................................
                        #721  AGGCGGCTGT CTGGTCTGTA ACTGACGCTG AGGCTCGAAA GTATGGGTAG CAAACAGGAT
```

2007年12月26日 Page 2 of 4

图 B2 Ind3 的 16S rRNA 基因序列分析 2

Fig. B2 The sequence of 16SrRNA gene from Ind3

```
                    CTB689-Ind
          Sequencer(tm)  "Untitled Project"

CTB689-Ind_seqinternal  #215   TAGATACCCT GGTAGTCCAT ACCGTAAACG ATGAATGCTA AGTGTTGGAG GGTTTCCGCC

                        #781   TAGATACCCT GGTAGTCCAT ACCGTAAACG ATGAATGCTA AGTGTTGGAG GGTTTCCGCC

CTB689-Ind_seqinternal  #275   CTTCAGTGCT GCAGCTAACG CATTAAGCAT TCCGCCTGGG GAGTACGGCC GCAAGGCTGA
CTB689-Ind_seqreverse   >#1>                          ATTAAGCAT TCCGCCTGGG GAGTACGGCC GCAAGGCTGA

                        #841   CTTCAGTGCT GCAGCTAACG CATTAAGCAT TCCGCCTGGG GAGTACGGCC GCAAGGCTGA

CTB689-Ind_seqinternal  #335   AACTCAAAGG AATTGACGGG GGCCCGCACA AGCGGTGGAG CATGTGGTTT AATTCGAAGC
CTB689-Ind_seqreverse    #40   AACTCAAAGG AATTGACGGG GGCCCGCACA AGCGGTGGAG CATGTGGTTT AATTCGAAGC

                        #901   AACTCAAAGG AATTGACGGG GGCCCGCACA AGCGGTGGAG CATGTGGTTT AATTCGAAGC

CTB689-Ind_seqinternal  #395   TACGCGAAGA ACCTTACCAG GTCTTGACAT ACTATGCAAA TCTAAGAGAT TAGACGTTCC
CTB689-Ind_seqreverse   #100   TACGCGAAGA ACCTTACCAG GTCTTGACAT ACTATGCAAA TCTAAGAGAT TAGACGTTCC

                        #961   TACGCGAAGA ACCTTACCAG GTCTTGACAT ACTATGCAAA TCTAAGAGAT TAGACGTTCC

CTB689-Ind_seqinternal  #455   CTTCGGGGAC ATGGATACAG GTGGTGCATG GTTGTCGTCA GCTCGTGTCG TGAGATGTTG
CTB689-Ind_seqreverse   #160   CTTCGGGGAC ATGGATACAG GTGGTGCATG GTTGTCGTCA GCTCGTGTCG TGAGATGTTG

                       #1021   CTTCGGGGAC ATGGATACAG GTGGTGCATG GTTGTCGTCA GCTCGTGTCG TGAGATGTTG

CTB689-Ind_seqinternal  #515   GGTTAAGTCC CGCAACGAGC GCAACCCTTA TTATCAGTTG CCAGCATTAA GTTGGGCACT
CTB689-Ind_seqreverse   #220   GGTTAAGTCC CGCAACGAGC GCAACCCTTA TTATCAGTTG CCAGCATTAA GTTGGGCACT

                       #1081   GGTTAAGTCC CGCAACGAGC GCAACCCTTA TTATCAGTTG CCAGCATTAA GTTGGGCACT

2007年12月26日          Page 3 of 4
```

图 B3　Ind3 的 16S rRNA 基因序列分析 3

Fig. B3 The sequence of 16SrRNA gene from Ind3

CTB689-Ind
Sequencher(tm) "Untitled Project"

```
CTB689-Ind_seqinternal  #575   CTGGTGAGAC TGCCGGTGAC AAACCGGAGG AAGGTGGGGA TG
CTB689-Ind_seqreverse   #280   CTGGTGAGAC TGCCGGTGAC AAACCGGAGG AAGGTGGGGA TGACGTCAAA TCATCATGCC

                        #1141  CTGGTGAGAC TGCCGGTGAC AAACCGGAGG AAGGTGGGGA TGACGTCAAA TCATCATGCC

CTB689-Ind_seqreverse   #340   CCTTATGACC TGGGCTACAC ACGTGCTACA ATGGATGGTA CAACGAGTTG CGAACTCGCG

                        #1201  CCTTATGACC TGGGCTACAC ACGTGCTACA ATGGATGGTA CAACGAGTTG CGAACTCGCG

CTB689-Ind_seqreverse   #400   AGAGTAAGCT AATCTCTTAA AGCCATTCTC AGTTCGGATT GTAGGCTGCA ACTCGCCTAC

                        #1261  AGAGTAAGCT AATCTCTTAA AGCCATTCTC AGTTCGGATT GTAGGCTGCA ACTCGCCTAC

CTB689-Ind_seqreverse   #460   ATGAAGTCGG AATCGCTAGT AATCGCGGAT CAGCATGCCG CGGTGAATAC GTTCCCGGGC

                        #1321  ATGAAGTCGG AATCGCTAGT AATCGCGGAT CAGCATGCCG CGGTGAATAC GTTCCCGGGC

CTB689-Ind_seqreverse   #520   CTTGTACACA CCGCCCGTCA CACCATGAGA GTTTGTAACA CCCAAAGTCG GTGGGGTAAC

                        #1381  CTTGTACACA CCGCCCGTCA CACCATGAGA GTTTGTAACA CCCAAAGTCG GTGGGGTAAC

CTB689-Ind_seqreverse   #580   CTTTTAGGAA CCAGCCGCCT AAGGTGGGAC AGATGATTAG GG

                        #1441  CTTTTAGGAA CCAGCCGCCT AAGGTGGGAC AGATGATTAG GG
```

2007年12月26日 Page 4 of 4

图 B4 Ind3 的 16S rRNA 基因序列分析 4

Fig. B4 The sequence of 16SrRNA gene from Ind3

图 B5 Ind3 的 16S rRNA 基因序列图谱

Fig. B5 The 16S rRNA gene sequences of Ind3

图 B6 Ind3 的 16S rRNA 基因序列图谱

Fig. B6 The 16S rRNA gene sequences of Ind3

图 B7　Ind3 的 16S rRNA 基因序列图谱

Fig. B7 The 16S rRNA gene sequences of Ind3

个人简介

金苏，女，1969 年 4 月 21 日出生于上海。1993 年 7 月毕业于华东理工大学生物工程系生物化工专业硕士。

1997 年起就职于罗地亚中国有限公司上海技术应用中心，任乳品技术服务经理，负责罗地亚食品配料（菌种和亲水胶体）在北亚区的技术服务。2004 年加入丹尼斯克中国有限公司，任菌种的产品经理和菌种实验室经理，负责菌种产品在中国的产品支持,市场推广和技术服务。现任丹尼斯克中国有限公司大中华区乳品和保健食品工业总监，负责丹尼斯克生物活性产品在大中华区的市场战略推广和销售支持。

同时兼任中国食品科学技术学会乳酸菌分会常务理事， 上海食品学会乳酸菌专业委员会秘书长。着力于乳酸菌的推广与消费者的教育，多次在国内外的乳酸菌专业会议上发言并参与多本乳酸菌相关书籍的编写。

导师简介

张柏林，男，1992 至 1997 年间在波兰罗兹技术大学食品化学和生物工程学院（**Faculty of Food Chemistry & Biotechnology, Technical University of Lodz, Poland**）发酵工程与工业微生物专业攻读博士学位，主要从事乳酸菌及酵母菌的生理代谢、生化特征、分子生物学及其在食品工业（特别是乳品和肉制品）的应用研究。现为北京林业大学生物学院食品科学系教授，博士生导师。担任《中国乳品工业》、《中国乳品》、《乳品科学与技术》等杂志编委会委员。

近几年来，主持国家级科研项目 5 项（国家 863 计划“高活性乳酸菌发酵剂制造关键技术”； 国家 863 计划“益生菌定向筛选与功能开发关键技术”； 国家科技基础条件平台“微生物菌种资源”项目“益生菌微生物资源标准化整理整合”； “十一五”国家科技支撑计划“奶业发展重大关键技术研究与示范”项目“新型乳制品研制及其产业化开发”； “十一五”国家科技支撑计划“奶业发展重大关键技术研究与示范”项目“乳品质量安全控制关键技术研究与开发”）。参与编写“食品生物技术导论”、“农业微生物学”等面向 21 世纪教材的编写工作。自 1996 年以来，在国际和国内相关杂志上发表学术论文 60 余篇，会议论文 8 篇；主持编写了《农产品加工中的生物技术》、《现代乳品工业手册》、《食品企业 HACCP 实施指南》等学术著作，申报专利 5 项；完成科研课题验收 3 项，完成鉴定课题 4 项，获河北省保定市科技进步二等奖 1 项。指导毕业硕士研究生 9 人，指导毕业博士研究生 1 人，现在读硕士研究生 15 人，博士研究生 4 人。

获得成果目录清单

A：已发表论文

1. 2010 年 2 月（中华疾病控制）发表”评估丹尼斯克乳双岐杆菌 BI07 及嗜酸乳杆菌 NCFM 对人体肠道消化系统微生态环境改善功效的研究
2. 2009 年 12 期《中国食品工业科技》 乳酸菌抗诱变致癌物质的研究
3. 2009 中国食品工业 菌种在食品工业中的应用及发展趋势
4. 酸奶---益生菌的最佳食物载体
   食品工业 (2003 年 1 月)
   并收入”国际酸奶技术研讨会论文集
   本文同时被收入 “中国食品和营养学最有价值的文章集”
5. 钙的强化
   中国食品工业 (May 2001)
6. NCFM 的回顾
   国际食品加工商情 (中国) (2001 年 3 月)
7. 益生菌在乳品和膳食补充物的应用
   食品科学与技术 (April 2001)
8. 亲水性胶体在乳品中的应用
   2000 年 6 月北京 “国际乳品大会论文集”
9. 新型冰激凌稳定系统
   2000 年 6 月北京 “国际乳品大会论文集”
10. 亲水性胶体在乳品工业中的应用
    国际食品加工商情 (中国(2000 年 6 月)
11. 新型冰激凌稳定系统
    国际食品加工商情 (中国) (2000 年 4 月)
12. 亲水性胶体在发酵乳品中的应用
    中国食品工业 (1999 年 10 月)

B：参编著作

[1] 李永敬，金苏《益生菌与健康生活》[M].北京：中国轻工业出版社，2008.

[2] 食品添加剂手册　第十二章“营养强化剂”

[3] 乳品工业手册”，第七章“益生菌”作者之一

[4] 中文版 “酸奶科学与技术” 编委之一,第六章: 发酵菌种. 2003 年 5 月出版.（原著: A.Y. Tamime & R.K. Robinson, Published by Woodhead Publishing Ltd.1999)

C：会议发言摘要

2009 年　　第四届国际乳酸菌与健康研讨会

2008 年　　IUFOST 第 14 届世界食品科技大会

高含量 GABA 菌株的筛选

2008 年　　中国乳品工业协会年会

功能基因组学在乳品菌种上的应用

2007 年 ILSI（international life Science Institute）

国际生命学会中国年会大会发言

2006 年广州　　益生菌与健康会议；

益生菌为食品带来健康新飞跃

2005 年上海　　益生菌与益生元年会

2005 年　　第一届国际乳酸菌与健康研讨会

2005 年天津　　营养强化剂年会

E：已鉴定的成果

2008 年获中国食品科学技术学会产品创新奖三等奖

致　谢

Ackownlegement

本论文是在中方导师北京林业大学生物工程系张柏林教授和法方导师 **Professor Georges CORRIEU (AgroParisTech)**的亲切关怀和悉心指导下完成的，整个实验从始至终都凝结着导师的心血。二位导师严谨的治学态度，开阔的科研思路，实事求是的科学态度，开拓创新的进取精神，辛勤耕耘的奉献精神和诲人不倦的育人精神，将使学生毕生受益。在此真诚的感谢恩师多年来对学生的淳淳教导和无微不至的关怀。

在整个博士论文的过程中得到了丹尼斯克中国有限公司总裁李永敬博士至始至终的支持和关心使得本研究得以顺利完成。Dr. Patrick BOYAVAL, Dr. Arthur Ouwehand and Dr. Sampo Lahtinen has a great support and provided lots of valuable advise for the theisis work, here with my sincere Thanks to them.

实验过程中，北京林业大学的张国亮，冀朵朵和宋伟同学做了大量的工作，同时丹尼斯克上海中心的王德纯，朱春梅，沈微等同事也给予了很多的帮助和支持，他们的帮助使得本实验工作得以圆满完成，当然也离不开研发中心周建均总监的大力协助，在此一并表示衷心的感谢！在论文的修改过程中，得到了展海宁同学大力的帮助，在此也表示感谢！

再次感谢各位老师、同学、丹尼斯克公司的同事为我顺利完成本论文工作提供的支持和帮助！

同时，谨向理解、支持和关心我的家人和朋友致以最诚挚的谢意！

STUDY ON THE PHYSIOLOGICAL EFFECTS OF TWO LACTOBACILLUS PENTOSUS STRAINS

Candidate for Ph.D. degree :

Jin Su

Specialty: Food Biotechnology

Directed by:

Professor Dr. Zhang BOLIN (Beijing Forest University)

Professor Georges CORRIEU (AgroParisTech)

Date: 29th November, 2010

Place: Beijing Forestry University

ABSTRACT

Two *Lactobacillus pentosus* strains, Ind1 and Ind3, were isolated from a traditional Chinese cheese product called Naigeda, collected from Xinjiang region of China. Since there is little information regarding the probiotic properties of *L. pentosus* strains, this study was designed to provide more supporting data for *L. pentosus* as a potential probiotic strain application.

The physiological properties of the two *L. pentosus* strains, Ind1 and Ind3, such as the *in vitro* test on the intolerance under the gastro-intestinal environment, the ability of adherence on the intestinal epithelium were studied. Their intolerance as well as inhibition and degradation ability under presence of pre-carcinogenic substances existing in human gut such as phenol, p-cresol and indole at different concentrations were also determined. The effects of the two *L. pentosus* strains on modulation of the mice intestinal micro flora, by oral administration of 10^9cfu/ml of strains in 0.5ml of skim milk, were investigated: the amounts of Lactobacillus spp., Bifidobacterium spp., Enterobacilli, Enterococcus and *Clostridium perfringens* in the feces of mice during and after the feeding of probiotic strains were counted. Furthermore, the technological properties of the two *L. pentosus* strains on their GABA producing ability were studied: the medium and process parameters optimization was carried out in order to try to obtain the highest GABA content in the fermented dairy products.

Results showed that the two L. *pentosus* strains had high survival rates (higher than 90% in acid and 80% in bile solution). The adhesive ability is strain independent: Ind3 adherence was comparable with those of two commercial probiotic strains (NCFM and Lp115). Ind1 and Ind3 showed good resistance mutagenic substances phenol, p-cresol, indole at concentration below 150 μg/mL). Ind1 and Ind3 also showed certain effect on promoting the increase of Lactobacillus and Bifidobacteria counts, and inhibiting the growth of Enterobacilli and Clostridium in mice gut. These results displayed positive properties that the two *L. pentosus* strains can be good candidates to be used as probiotic strains potentially used in dietary supplement application or Chinese-style dairy products.

Key words : *Lactobacillus pentosus*; γ-Aminobutyric acid (GABA); Adherence; Intestinal flora; Phenol; *P*-cresol; Indole; Mutagenic substance.

INTRODUCTION

Two *Lactobacillus* strains were isolated from Chinese traditional Xinjiang cheese, namely *Lactobacillus pentosus* Ind1, Ind3. As there is little information and less report regarding the probiotic properties of *Lactobacillus pentosus* strains, This study was designed to assess these two strains regarding their ability of tolerance in a simulated intestinal environment: To assess the tolerance of these two strain to human gastrointestinal environment *in vitro*, these two strains were tested in solutions simulating human gastric and intestinal conditions. To test their adhesive ability to intestinal mucosa, Caco-2 cell model was used to evaluate the possible factors affecting their adhesion, including bacterial cell growth stage, pH, and temperature. Association of adhesion with surface protein or S-layer protein was also studied.

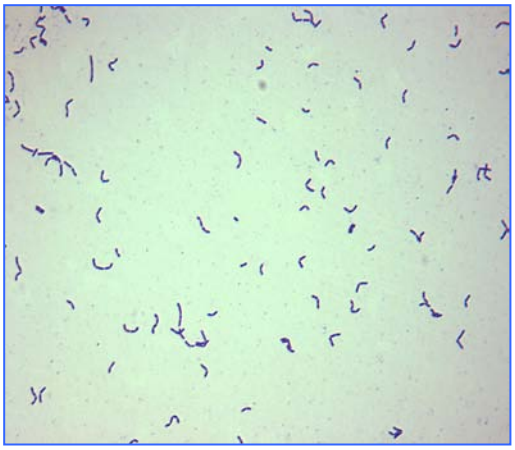
Phenol, p-cresol, indole, were selected at three concentrations to evaluate the growth and survival ability of these two *Lactobacillus pentosus* strains.

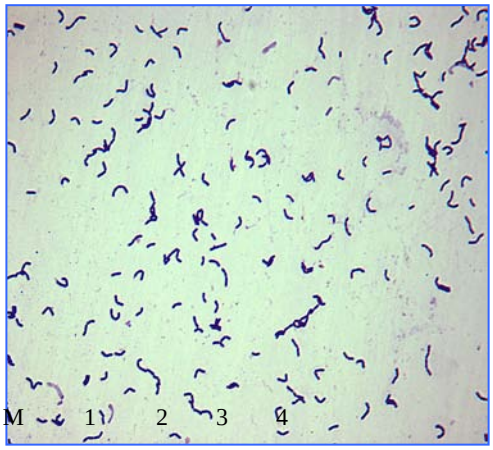
The effects of the two *Lactobacillus pentosus* strains, Ind1 and Ind3, on modulation of the mice intestinal micro flora, by oral administration of 10^9cfu/ml of strains in 0.5ml of skim milk, were also investigated by analyze of the amounts of Lactobacillus spp., Bifidobacterium spp., Enterobacilli, Enterococcus and *Clostridium perfringens* in the feces of mice.

Part I. Isolation and Identification of *Lactobacillus pentosus* strains.

Two strains *of L. pentosus*, Ind1 and Ind3, isolated from Chinese traditional Xinjiang cheese product called “Naigeda”, based on their morphological, physiological-biochemical properties (Fig. 1.1 and 1.2) as well as 16s DNA sequence data (Fig. 1.3 and 1.4), were identified as *Lactobacillus pentosus.* Right now they are collected in China Industrial Cultural Collection (CICC, Beijing, China).

Fig. 1.1 and 1.2 : Microscopy photography of Indl and Ind3





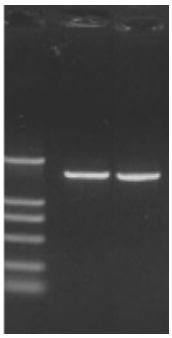
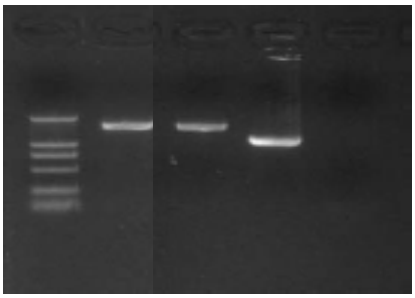


Fig. 1.3 The purified 16S rDNA gene from Ind1 and Ind3 strain



M：DNA Marker DL2,000

1：CTB689-Ind-1

2：CTB689-Ind-3

Fig. 1.4 PCR product by using -1 and -3 specified primers

Part II. Vitro test of tolerance/adherence study and potential mechanism

Since the viability and activity of probiotics are needed at the lower digestive tract, these organisms should withstand the adverse conditions encountered in the host's upper gastrointestinal tract (GIT) (Kotsou M G et al., 2008; Tannock G W, 1999). However, many probiotic bacteria lack the ability to survive the harsh acidity and bile concentration commonly encountered in the GIT (Annuk H et al., 2003; Frece J et al., 2005; Mack D R et al., 1999; Lahtinen S et al.,2009; Greene J D et al., 1994). All bile, depending upon its concentration, can inhibit the growth of bacteria. Bile acids inhibit many Gram-positive probiotic organisms such as Bifidobacterium and Lactobacillus genera; therefore, the ability to adhere to intestinal mucosa is considered as an important selection criterion for lactic acid bacteria (LAB) used as probiotics (Ouwenhand et al., 2002; Schneitz C et al., 1993).

The ability of the 2 *L. pentosus* strains to resist artificial gastrointestinal stresses, and their adhesive properties to the intestinal epithelium was evaluated (Table 2.1; Figures 2.1 and 2.2); the possible factor influencing the adherence of two *L. pentosus* strains was also investigated.

2.1 Resistance on acid, gastric juice and bile solution

Strain	pH	0 h	2 h	3 h	4 h
Ind1	3.5		8.13±0.11	8.05±0.12	8.00±0.07
	3.0		8.00±0.09	7.95±0.05*	7.93±0.07*
	2.5	8.43±0.15	7.99±0.07	7.88±0.09*	7.71±0.12*
	2.0		7.92±0.11*	7.82±0.08*	7.53±0.14*
	1.5		4.05±0.10**	-	-
Ind3	3.5		8.08±0.08	8.02±0.07	7.93±0.04
	3.0		8.00±0.24	7.83±0.15*	7.73±0.14*
	2.5	8.48±0.16	7.64±0.12*	7.61±0.13*	7.56±0.14*
	2.0		7.41±0.08*	6.84±0.12**	6.58±0.16**
	1.5		-	-	-

Table 2.1 Survival of Ind1 and Ind3 after a stay (2, 3 or 4 hours) in different pH solutions.

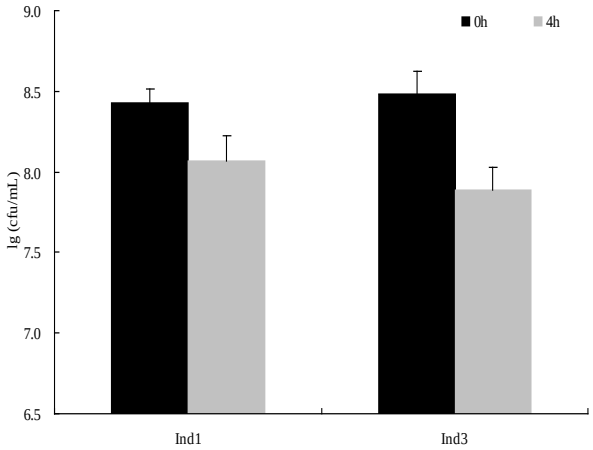


Fig. 2.1: Intolerance on simulated intestinal juice

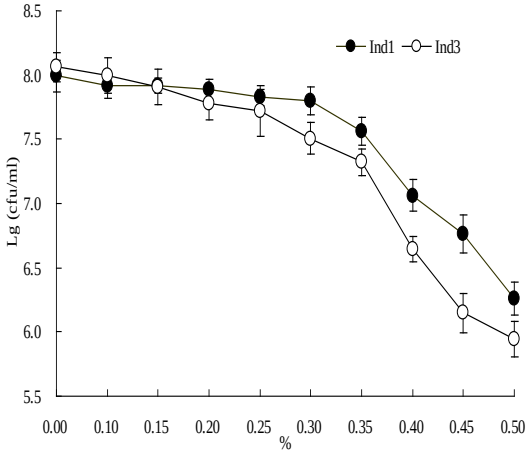


Fig. 2.2: Intolerance on bile

The viable counts of two *Lactobacillus pentosus* strains, Ind1 and Ind3, were enumerated after grown in the gastric juice of pH 2.5, intestinal juice of pH 6.8 and 0.50% concentration of bile salt at 37°C for 4h.

Vitro test results showed that *Lactobacillus pentosus* strains Ind1 and Ind3 has high survival rate (>90% in acid solution and >80% in bile solution respectively), which means they had strong resistances to harmful gastrointestinal environments. Individually, the intolerance of Ind1 was slightly better than Ind3**.**

2.2 Adhesion assays on Caco-2 cells

Bacterial adhesion tests on Caco-2 cells (ATCC 2102-CRL) monolayer were carried out in 24-well tissue culture plates (Collado M C et al., 2005; Marteau P et al., 1997). (Fig. 2.3)

Four lactobacillus strains (Ind1, Ind3 and two commercial strains *Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Lactobacillus plantarum* Lp115, obtained from Danisco A/S) adhering to the epithelial cells were observed under inverted microscopy as dark purple rods. Twenty microscopic fields were randomly counted to assess the number of bacteria attached to Caco-2 cells. The average number of bacteria (± standard deviation) adhering per 100 cells were calculated from these data and defined as the adhesion index (a measure of adhesiveness of a strain). The adhesive index of all four probiotic strains is summarized (Table 2.2).

Table 2.2. Adhesion of four probiotic strains to Caco-2 cells

Bacteria	No. of adhesion
Lactobacillus acidophilus NCFM	873±44
Lactobacillus plantarum Lp115	934±41
Lactobacillus pentosus Ind1	545±31*#
Lactobacillus pentosus Ind3	790±29

Each adhesion assay was conducted in duplicate with cells from three successive passages. Adhesion assays were monitored after 2h of incubation. The table presents mean numbers ± standard deviation of bacteria adhering per 100 epithelial cells. *: P<0.05, **: P<0.01 compared with NCFM; #: P<0.05, ##: P<0.01 compared with Lp115.

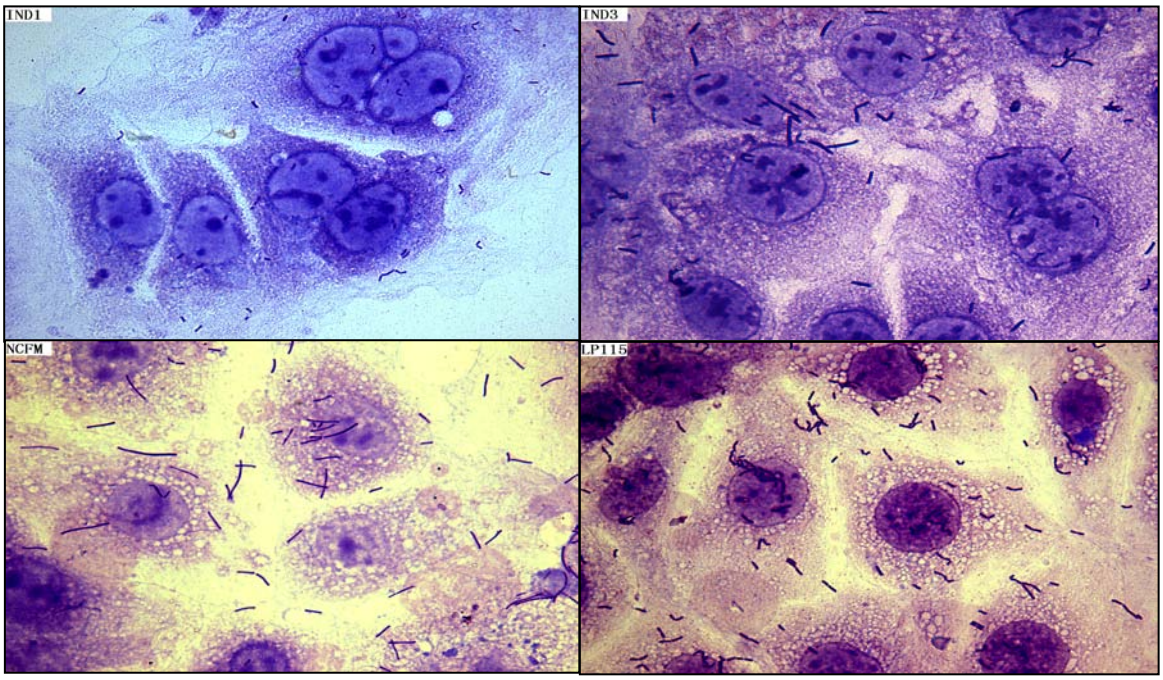


Fig. 2.3 Adhesion of four probiotic strains to Caco-2 cell monolayer observed using light microscopy after Gram-staining. (magnification 2000×).

Result shows that comparing with two commercial probiotic strains NCFM and Lp115, Ind3 is comparable but Ind1 had a relatively poor adhesiveness, and its live cells adhered per 100 epithelial cells were only 431.0 ± 28.16, while Ind3 were 830.5 ± 19.46.

2.3 Potential factors influencing the adherence ability

Caco-2 was used as the model and the potential factors influencing the ability of adherence such as growing phase of bacteria, pH, temperature and cell count were studied (Deepika G et al., 2009; Blum S et al., 1999; Dunne C L et al., 1999).

Impact of strains at different growth phase on the ability of adherence was evaluated under following steps:

1) Anaerobic incubated the two strains at 37°C for 8 h, 18h and 26h respectively,

2) Centrifuge and standardize the cell count to 1×10^8 cfu/ml.

3) Added 2ml of each suspension into the 24-well tissue culture plate, and then incubated in the CO_2 incubator at 37°C for 2 hours.

4) Counting the adherence cells and calculating (Table 2.3.1)

Impact of pH, ranging from 4 to 8, on the adherence was showed in Table 2.3.2. Impact of temperature on the adherence (Table 2.3.3) was tested at 4°C, 37°C and 45°C respectively. Cell counts were standardized at 1×10^8 cfu/ml, after 2 hours adherence, checking the adherence cell count.

Impact of the cell activity was established comparing the adherence between the viable and the non-viable bacteria (Table 2.3.4).

Table 2.3.1 Effect of growth stage on Lactobacillus adhesion

Growth stage	**No. of adhesion**	
t/h	***L. pentosus* Ind1**	***L. pentosus* Ind3**
8	293.1±23	748±26
18	431±29*	830±20
26	537±27**	931±20**

Note: The table presents mean numbers ± standard deviation of bacteria adhering per 100 epithelial cells. *: P<0.05, **: P<0.01 compared with 8h

Table 2.3.2 Effect of pH value on Lactobacillus adhesion

pH	No. of adhesion	
	***L. pentosus* Ind1**	***L. pentosus* Ind3**
8.0	326.6±30.42	539.5±33.50
7.0	431.0±28.16	830.5±19.46
6.0	459.5±24.92*	917.8±36.32**
5.0	534.2±27.22**	933.2±22.16**
4.0	506.0±24.00**	955.5±29.78**

Table 2.3.3 Effect of temperature on Lactobacillus adhesion

Temperature (℃)	No. of adhesion	
	***L. pentosus* Ind1**	***L. pentosus* Ind3**
4	261.2±32.36*	538.6±29.58*
37	431.0±28.16	830.5±19.46
45	304.0±31.24	814.1±23.37

Note: The table presents mean numbers ± standard deviation of bacteria adhering per 100 epithelial cells. *: P<0.05, **: P<0.01 compared with 37ºC.

Table 2.3.4 Effect of the living being state on Lactobacillus adhesion

Living state	No. of adhesion	
	***L. pentosus* Ind1**	***L. pentosus* Ind3**
Live culture	431.0±28.16	830.5±19.46
the heat-killed	405.0±30.24	839.1±24.59

Note: The table presents mean numbers ± standard deviation of bacteria adhering per 100 epithelial cells. *: P<0.05, **: P<0.01 compared with the living forms

The results showed that the adhesion ability of 2 *L. pentosus* strains depended greatly on their cell counts and incubation time. *In vitro*, a cell concentration of 1×10^8cfu/mL for 2h-incubation was proved to improve significantly the adhesion. Moreover, pH, temperature and the growth phase also have an impact on the adhesive effect. A heat treatment (at 100°C for 20min) was supposed to kill the live culture,which assuming to cause lower adhesive index. However, the adhesive ability was almost the same as live culture for both Ind1 and Ind3. (431.0 cells versus. 405; and 830.5 versus. 839.1).

2.4 Potential mechanism of adhesiveness

The potential mechanism on adhesiveness of these two *L. pentosus* strains was investigated on functionality of metabolites, surface protein, and s-layer protein components:

Surface protein was removed by treatment of trypsin (11800U/mg) and proteinase K on the bacteria, and comparing the influence on the adherence with untreated bacteria (Kos B et al., 2003; Steer T et al., 2000).

The S-layer proteins was extracted to compare the difference of adherence ability: Ind1 and Ind3 has been centrifuged at 6000rpm/min for 15min, washing twice by PBS, re-suspending the bacteria cell by adding 5mol/L lithium chloride at 4°C for 60min and then centrifuge at 1200rpm/min for 15min to get the bacteria cell (Lortal S et al., 1992; Ohashi Y et al., 2009). Standardize cell count into 1×10^8 cfu/mL and do the adherence test to compare the difference (Table 2.4).

Table 2.4. The effects of different treatment on adhesion

Different treatment	**mg/mL**	**No. of adhesion**		**Decrease on adhesion (%)**	
		***L. pentosus* Ind1**	***L. pentosus* Ind3**	***L. pentosus* Ind1**	***L. pentosus* Ind3**
Control	-	431.0±28.16	830.5±19.46		
Trypsin	2.5	67.3±20.70**	190.7±19.80**	84.5	77.1
Proteinase K	2.5	114.4±26.34**	226.2±23.91**	73.5	72.7
Lithium chloride	5	417.5±28.16	780.7±26.11	4	5.9

Note: The table presents mean numbers ± standard deviation of bacteria adhering per 100 epithelial cells. Each value is the mean of values from three experiments. *: P<0.05, **: P<0.01 compared with the control group.

As shown in Table 2.4, the adhesion ability of *L. pentosus* Ind1 and Ind3 decreased dramatically after treated by trypsin and proteinase K (P<0.01). The adhesion index of two strains was decreased by over 70%. It implies that the surface protein of the two strains could be related to adhesion ability.

It seems that there was no significant difference (P>0.05) after treatment of lithium chloride: the decrease of adhesion was less than 10%, which implied that after removing S-layer protein from the cell, the adhesive ability had no big change. The conclusion was that S-layer protein could be or not involved in the adhesion of these two lactobacillus bacteria depending on the strain.

Part III. Inhibition of mutagenic/ pre-carcinogenic agents by *Lactobacillus pentosus* strains

Some intestinal bacteria can produce many genotoxic, mutagenic and carcinogenic substances. The major products of the bacterial aromatic amino acids fermented phenolic and indolic compounds, which are responsible for colon cancer development, are accumulated in the colon (Nowak A et al., 2006; Fooks L J and Gibson G R, 2002).

The effect of phenol, p-cresol and indole (5, 50 and 150 μg/mL doses) on growth and survival of selected LAB was studied. The ability of two *Lactobacillus pentosus* strains, Ind1 and Ind3, on reducing the amount of phenol, p-cresol and indole potentially existing in the intestinal tract was also evaluated.

3.1 Tolerance on different concentrations of precarcinogenic substances.

The impact of phenol, p-cresol and indole (5, 50 and 150 μg/mL doses respectively) on the growth and survival of probiotic strains *L. Pentosus* Ind1 and Ind3 was studied and result showed in Figures 3.1.1 to 3.1.6.

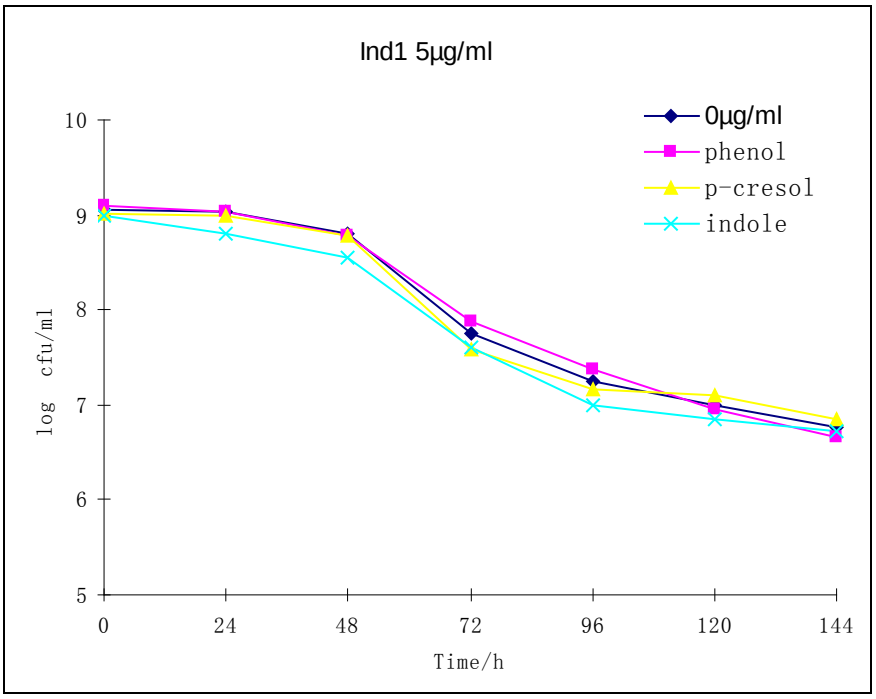


Fig. 3.1.1 Tolerance of strain Ind1 to different precarcinogenic substances at concentration of 5μg/mL.

The results showed that even if there is no presence of any precarcinogenic substances, there was still 2 logs of decrease after 100hours, therefore there is no more impact on the survival of Ind1 after incubated together with all the substances (phenol, p-cresol and indole) at low concentration.

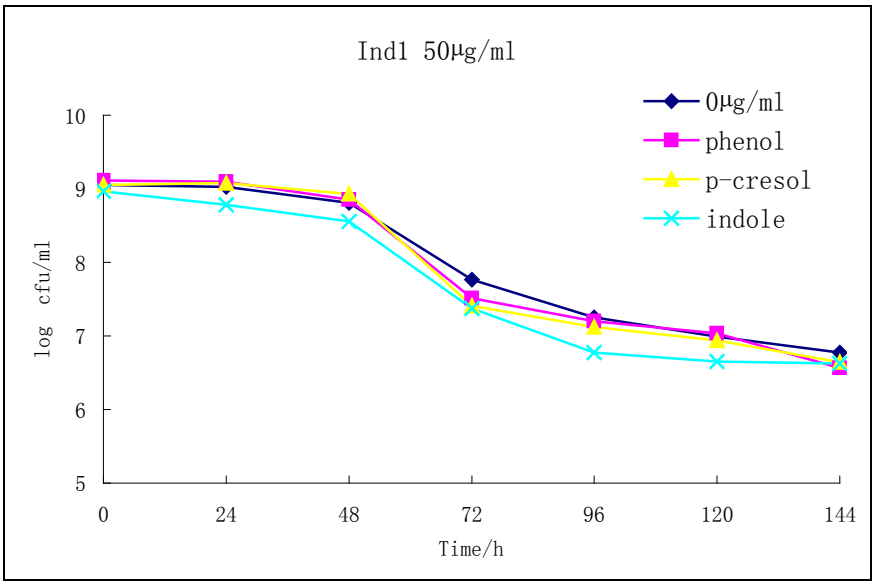


Fig. 3.1.2. Tolerance of strain Ind1 to different precarcinogenic substances at concentration of 50 μg/mL. There was still no significant effect on the cell count of Indl at the concentration of 50 μg/mL.

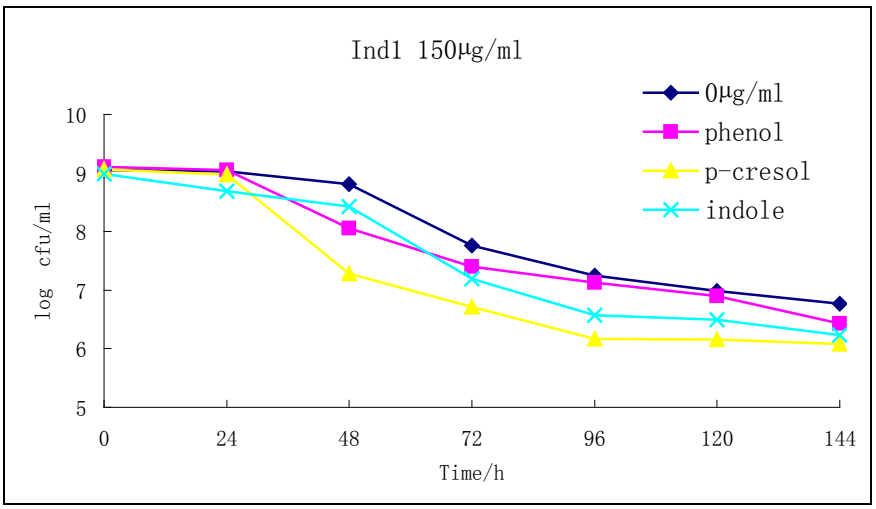


Fig. 3.1.3 Tolerance of strain Ind1 to different precarcinogenic substances at concentration of 150μg/mL.

At concentration of 150μg/ml, there was obviously impact on the cell count especially for p-cresol and Indole. Comparing to the control (no presence of any precarcinogenic substance), there are almost 1.5 log lower after adding p-cresol and more than 0.5 log lower in cell count when co-incubate with indole after 100 hours.

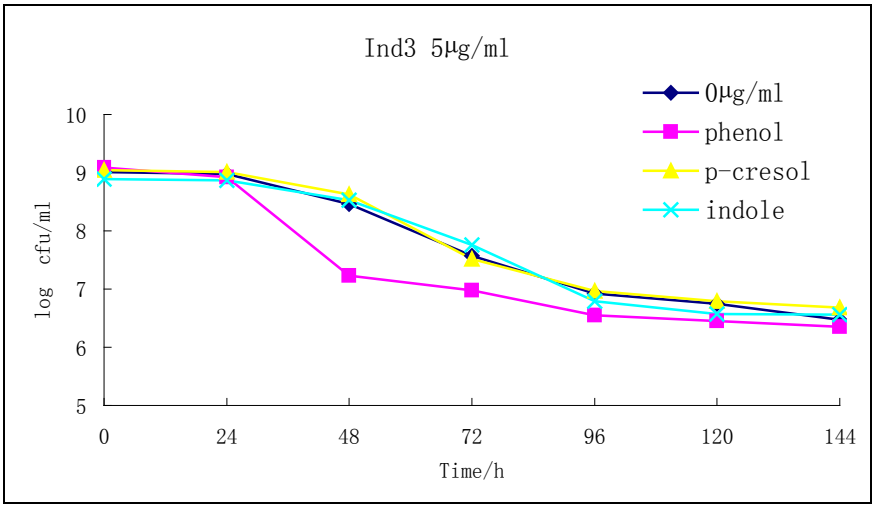


Fig. 3.1.4 Tolerance of strain Ind3 to different precarcinogenic substances at concentration of 5μg/mL.

Results showed that there was no impact for all the substances (phenol, p-cresol and indole) at low concentration (5 μg/mL) comparing to the control (no any precarcinogenic substances)

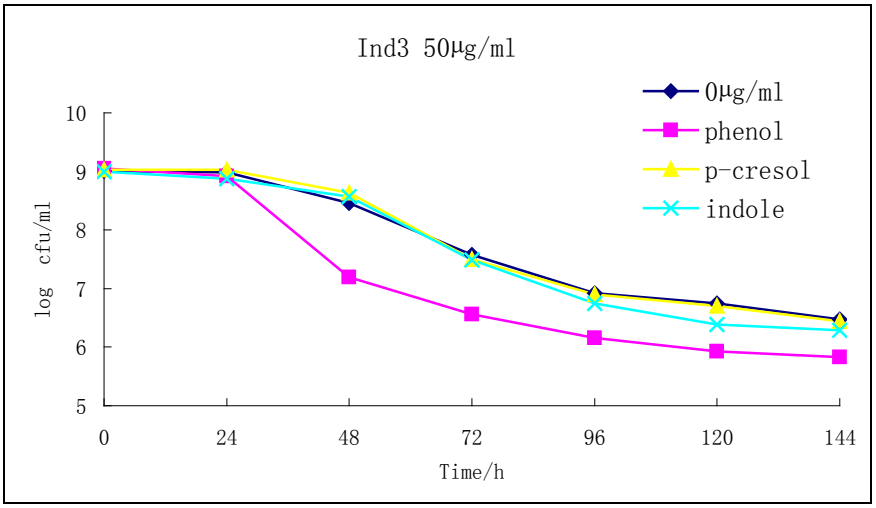


Fig. 3.1.5 Tolerance of strain Ind3 to different precarcinogenic substances at concentration of 50μg/mL

Fig. 3.1.5 showed that at concentration of 50 μg/mL, only phenol had some impact on the growth and survival of strains, there was 1 log lower in cell count comparing to control after incubated for 120 hours together with phenol. But there is no difference of cell count between control and adding p-cresol and indole after co-incubated for 144 hours.

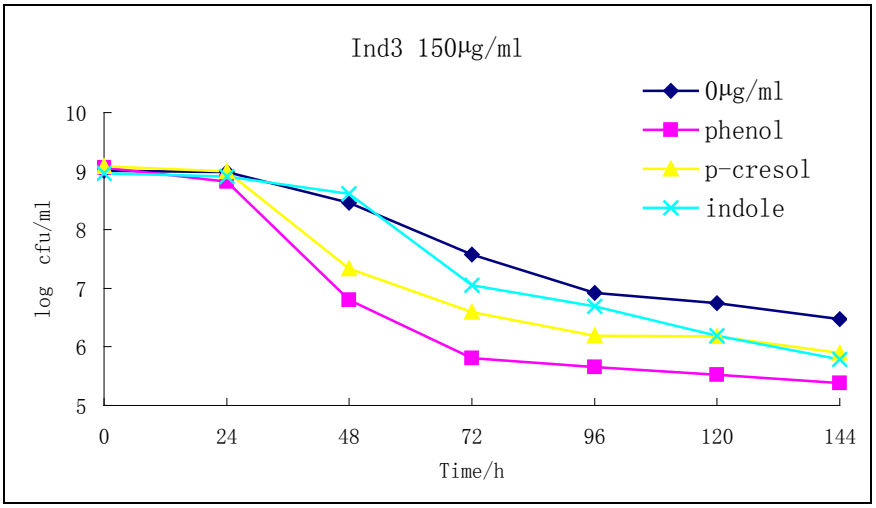


Fig. 3.1.6 Tolerance of strain Ind3 to different precarcinogenic substances at concentration of 150μg/mL

Fig. 3.1.6 showed that at concentration of 150 μg/mL, the growth and survival of strains was impacted by all the substance: p-cresol, indole especially phenol. There are 0.5 log lower of cell count after 144 hours by adding indole and p-cresol in cell count comparing to the control; and there are more than 1 log lower of co-incubated with phenol for 144 hours comparing to the control.

Conclusion:

At concentration of 5 μg/mL, there is no impact on the two *L. Pentosus* strains, Ind1 and Ind3, by presence of either phenol, p-cresol or indole, while they were influenced by 150 μg/mL of above three substances (1 to 2 log decrease comparing to the control). Specifically, there was an obvious impact on Ind3 at 50 μg/mL of phenol presence but no impact on Indl.

3.2 Ability of absorbing and reduction of precarcinogenic substances by *L. pentosus* strains

Normally there are 50 to 100 mg/d volatile phenols in human's urine, mainly phenol (9.8 mg/d) and p-cresol (51.8 mg/d) (Tamm A and Villako K, 1971; Bone E et al., 1976; Bieniek G, 1996). Recent research found that lactic acid bacteria had a degradation effect on those mutagenic substances such as phenol, p-cresol and indole and indirectly help the decrease of adhesion: less than 10% of decrease and the effect of inhibition on colon cancer (Nowak A and Libudzisz Z, 2006). Phenol, p-cresol and indole were added at concentration of 5 and 50 respectively, into MRS medium to evaluate the absorbing and degradation ability of the probiotic strains *L. Pentosus*, Ind1

and Ind3, and of another commercial probiotic strain: *Lactobacillus plantarum* Lp115 (Table 3.2.1).

Table 3.2.1. Phenol and p-cresol concentration after 24h and 144h of cultivation of *L.pentosus* strains Ind1 and Ind3, and *L. plantarum* Lp115 in MRS broth.

Compounds	Initial concentration in the medium (μg/ml)	Incubation time (h)	Ind1	Ind3	Lp115
			Concentration residue in MRS medium after incubation(μg/mL)		
Phenol	5	24	3.07	3.80	3.54
		144	4.05	3.78	3.81
	50	24	35.61	36.74	38.78
		144	46.08	48.47	47.02
p-cresol	5	24	4.55	4.22	3.98
		144	4.13	3.92	3.86
	50	24	41.47	40.23	40.86
		144	40.77	40.66	39.27

Table 3.2.2. Ability of *L. pentosus* strains to bind/absorb phenol and p-cresol after 24h and 144h of cultivation in MRS broth

Compounds	Initial concentration in the medium (μg/ml)	Incubation time (h)	Ind1	Ind3	LP115
			absorbed inside strain after incubation (μg/mL)		
Phenol	5	24	0.94	1.24	1.47
		144	0.57	0.79	0.42
	50	24	1.04	1.33	2.63
		144	0.54	0.57	0.35
p-cresol	5	24	1.19	1.01	1.28
		144	0.90	1.13	1.17
	50	24	1.29	1.78	3.05
		144	1.00	1.25	1.88

Conclusions:

1) The decrease of phenol remaining in MRS medium is between 0.95 and 1.93 μg/mL, and the decrease of p-cresol in MRS medium is between 0.45~1.14 μg/mL; while the cell count of two *L. pentosus* strains has changed from 10^9cfu/mL to 10^6cfu/mL, which means the *L. pentosus* strains

has effect on absorb and degradation on the precarcinogenic substance.

2) Showed from Table3.2.2, the content of phenol inside the bacterial cell was between 0.42 and 1.47 μg/mL, the content of p-cresol was among 0.90 and1.28 μg/mL, which shows that the two *L. pentosus* strains has certain effect on absorbing precarcinogenic substances.

Part IV. Ability of modulation on gut intestinal flora for animal model

The effects of the two *L. pentosus* strains Ind1 and Ind3 on modulation of the mice intestinal micro flora, by oral administration of 10^9cfu/ml strains in 0.5ml of skim milk, were investigated analyzing the amounts of Lactobacillus spp., Bifidobacterium spp., Enterobacilli, Enterococcus and *Clostridium perfringens* in the feces of mice (Guglielmetti S et al., 2008; Hooper L V and Gerdon J I, 2000).

50 mices (male, from Kunming, body weight between 18 and 22g) were randomly divided into 5 groups. The temperature and relative humidity of the mice feeding room were controlled at 20~25 °C and 45~50% respectively. Feeding started after 6 days and weight were taken every other day. 5 groups of mice were orally administrated by 20% sterilized skim milk (control group) and with 20% sterilized skim milk containing 5×10^9cfu/ml Ind1, Ind3, Lp115, NCFM, respectively. This was done for 10 consecutive days, once a day (Fig. 4.1).

Fresh feces were collected before taking probiotics and after feeding for d2, d4, d6, d8 and d10，stopping feed for d2, d4 and d6. EP tube was seal immediately after taking feces and testing within 3 hours. Change of cell count on Lactobacillus and Bifidobacterium spp, in the mouse intestinal tract during feeding and after stop feeding was numerated. The results are shown Table 4.1 and Figures 4.2 and 4.3 for Lactobacillus, Table 4.2, and Figures 4.4 and 4.5 for Bifidobacterium spp. Meanwhile, change of cell count on murine Enterobacilli, Enterococcus and *C. perfringens* in the mice gut during feeding and after stopping the feeding was also investigated to evaluate the ability of these probiotic strains on modulating mice gut micro flora (Table 4.3, Figures 4.6, 4.7 and 4.8).

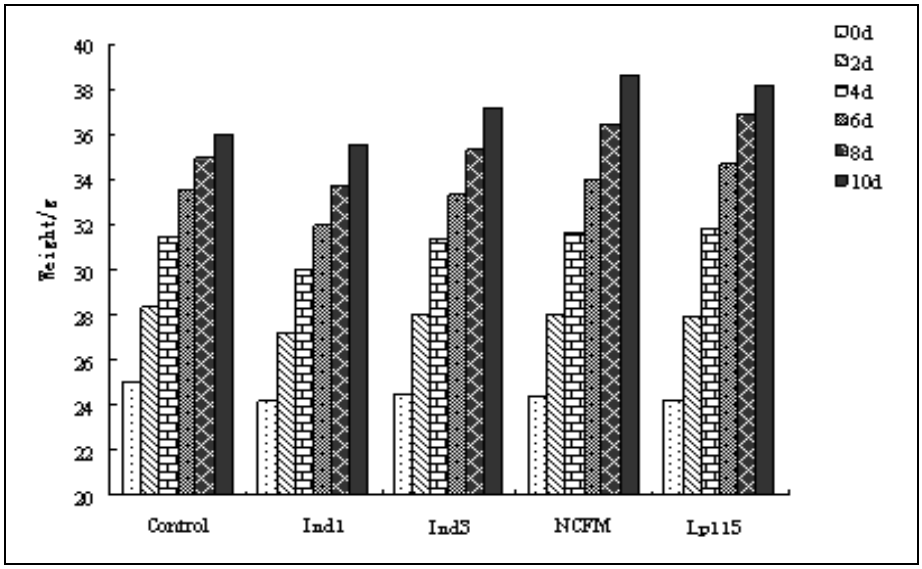


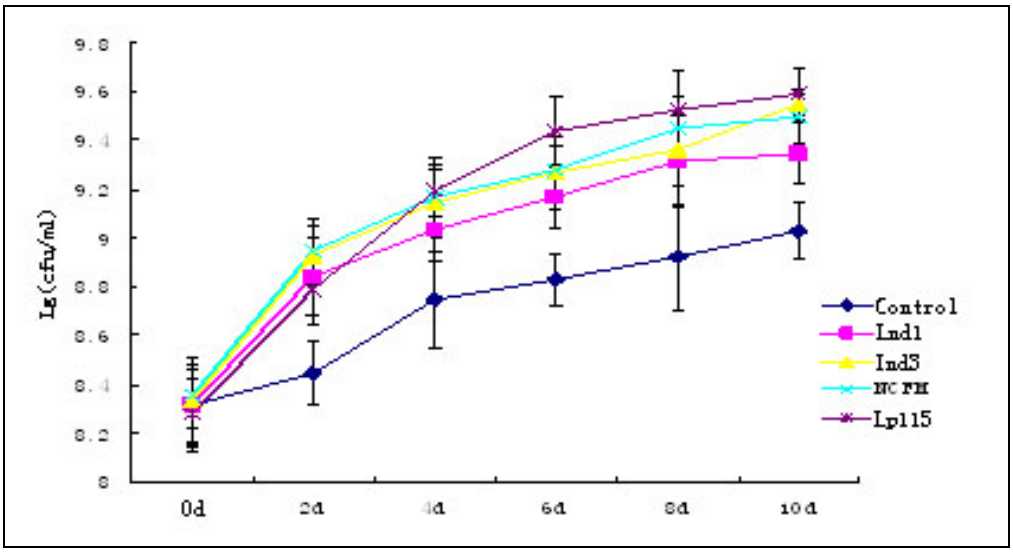
Fig. 4.1. Weight change of mice during and after feeding probiotics.

Table 4.1. Effects of probiotics on Lactobacillus of the mouse intestinal tract. All data are expressed at $\log_{10}$ cfu/mL with the average standard deviation.

days	Lactobacilli（$\lg 10^n$/mL）				
	control	**Ind1**	**Ind3**	**NCFM**	**Lp115**
0d	8.31±0.19	8.31±0.15	8.33±0.17	8.35±0.13	8.28±0.14
10d	9.03±0.12*	9.35±0.13**#	9.55±0.04**#	9.50±0.11**#	9.59±0.10**#
12d	8.90±0.10*	9.29±0.10**	9.34±0.11**	9.25±0.13*	9.31±0.11*
14d	8.91±0.13	9.26±0.17*	9.32±0.09*	9.24±0.17*	9.27±0.12*
16d	8.90±0.11	9.25±0.14*	9.33±0.12*	9.19±0.18*	9.28±0.12*

Note: Stool samples were collected and detected by plant count prior to administration treatment, on day 2, 4, 6, 8, 10 of treatment, and 12, 14, 16 days after discontinuation of dosage. The table presents mean numbers ± standard deviation of Lactobacillus of the mouse intestinal tract. Each value is the mean of values from three or four experiments. *: P<0.05, **: P<0.01 compared with 0d; #: P<0.05, ##: P<0.01 compared with control .

Fig. 4.2. Change of Lactobacillus in the mice gut during feeding period



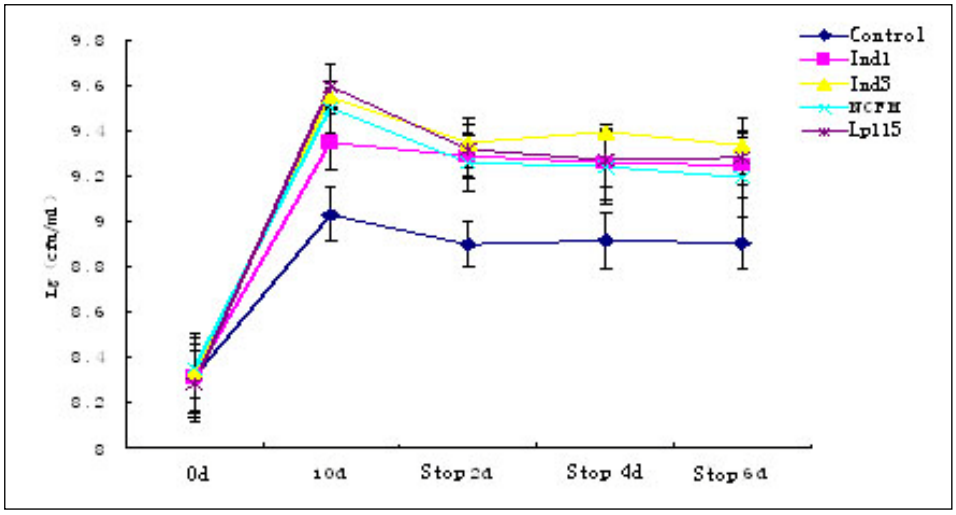


Fig. 4.3. Change of Lactobacillus in mice gut after stop feeding

Table 4.2. Effects of the probiotics on murine Bifidobacterium spp. ($lg10^n$/mL)

	Control	**Ind1 Group**	**Ind3 Group**	**NCFM Group**	**Lp115 Group**
Before feeding	7.83+0.16	7.87+0.13	7.87+0.14	7.74+0.13	7.94+0.13
10th day after feeding	8.37+0.11*	8.60+0.15*	8.93+0.18**#	8.97+0.10**#	8.96+0.17*#
2nd day after stop feeding	8.23+0.13	8.33+0.13*	8.77+0.13**	8.98+0.12**	8.74+0.19**
4th day after stop feeding	8.19+0.14	8.17+0.20	8.66+0.16**	8.90+0.12**	8.52+0.13*
6th day after stop feeding	8.05+0.15	8.16+0.15	8.32+0.11	8.34+0.12	8.21+0.09

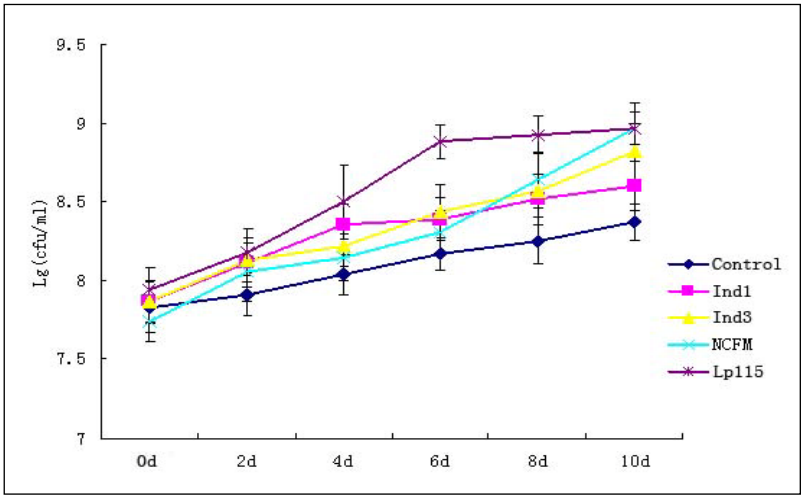


Fig. 4.4. Change of Bifidobacteria in the mice gut during feeding period

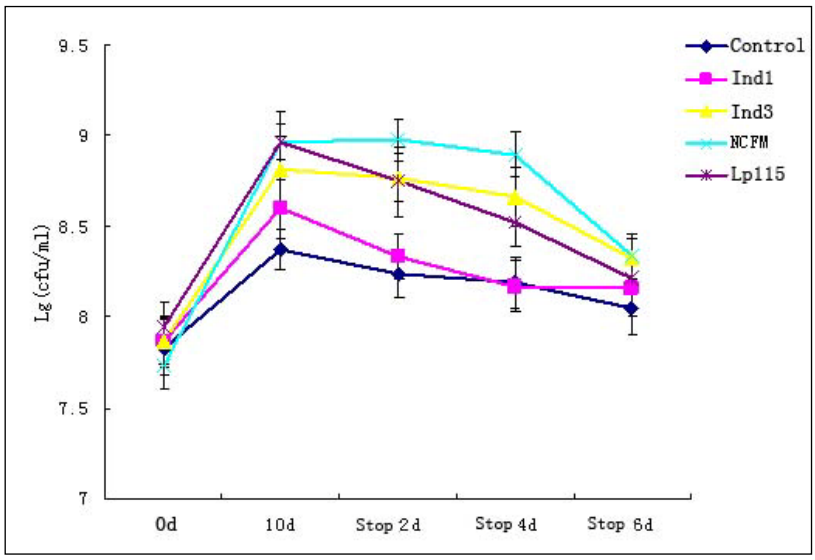


Fig. 4.5. Change of Bifidobacteria in mice gut after stop feeding

For four probiotic strains feeding at 5×10^{9}cfu/ml, the results showed that comparing the number of Lactobacillus before feeding, after 10 days of feeding and 2, 4 and 6 days after stopping the feeding, there were always an increasing number of Bifidobacteria for the four groups than before. The increasing numbers of Bifidobacteria of mice feeding by Ind1 and Lp115 were significantly different（$P<0.05$）at the 10th day of feeding comparing to before feeding.

There were extremely significant difference（$P<0.01$）for groups feeding by Ind3 and NCFM. There were also significant difference（$P<0.05$）for number of Bifidobacteria at the 10th day of experimental group comparing to the control group. However, the group feeding by Ind1 had not significant difference comparing to the control，meaning that only Ind3, NCFM and Lp115 had certain effect on promoting the increase of Bifidobacteria number in mice gut.

After stopping the feeding, the numbers of Bifidobacteria at each group decreased comparing to that of feeding period. The group feeding by NCFM after stopping the feeding for 6 days, and the group feeding by Ind3 and Lp115 after 4 days, the number of Bifidobacteria were significantly increased ($P<0.05$) as compared to the number before feeding. However, after stop feeding, the differences between each experimental group and the control group were not significant in terms of the Bifidobacteria count in mice gut. This means that after feeding for one week, within the 4 probiotic strains, only NCFM still kept certain effect on the modulation. Consequently, in order to maintain the modulation effect, probiotics needs to be taking constantly.

Table 4.3. Effects of the probiotics on murine Enterobacilli（$lg10^n$/mL）

	Control	Ind1 Group	Ind3 Group	NCFM Group	Lp115 Group
Before feeding	6.99±0.17	7.05±0.19	6.98±0.13	7.00±0.13	6.94±0.10
10th day after feeding	6.96±0.17	6.01±0.19*#	5.85±0.16*##	5.82±0.19*##	5.99±0.13*#
2nd day after stop feeding	7.10±0.18	6.55±0.16	6.08±0.19*#	6.01±0.18*##	6.27±0.17##
4th day after stop feeding	7.12±0.15	6.98±0.16	6.29±0.22	6.32±0.22##	6.73±0.12
6th day after stop feeding	7.15±0.22	7.08±0.13	6.80±0.18	6.68±0.19	6.83±0.19

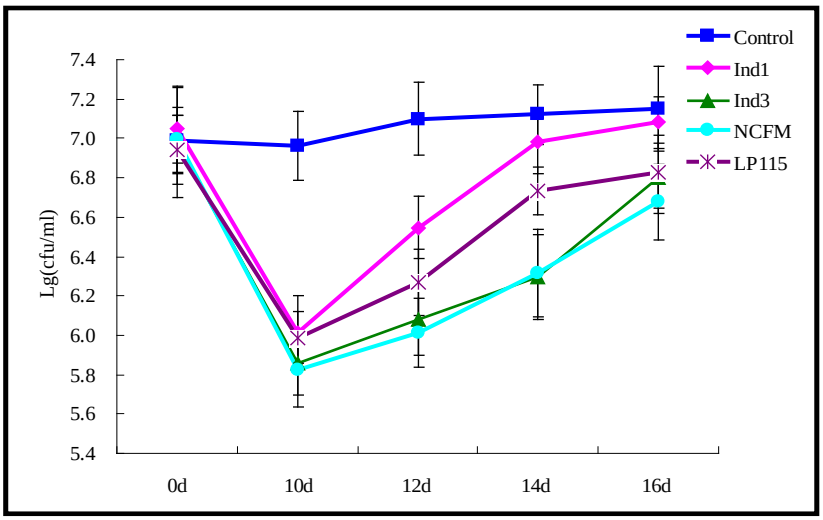


Fig. 4.6. Change of Enterobacilli in the mice gut during and after feeding period

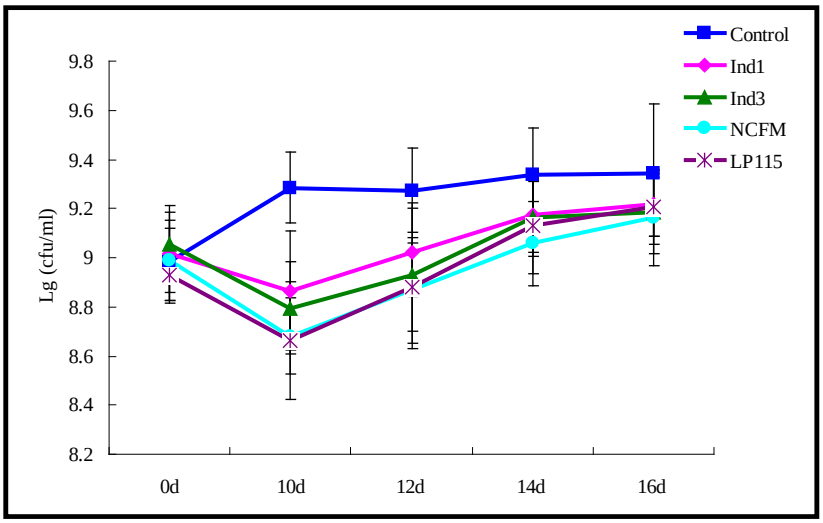


Fig.. 4.7. Change of Enterococcus in the mice gut during and after stop feeding

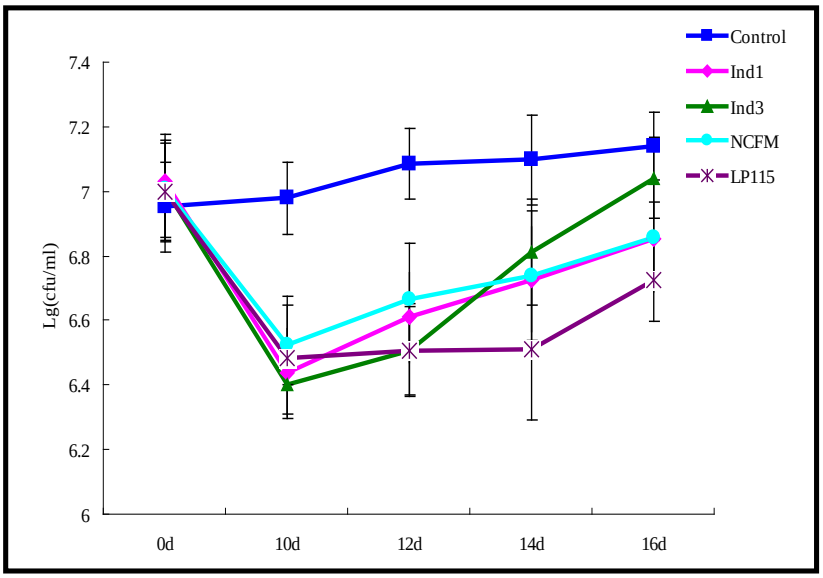


Fig. 4.8. Change of *Clostridium perfringens* in the mice gut during feeding and after stop feeding.

The results showed that before feeding, during feeding and after stopping feeding, the control group has no significant difference on the number of Enterobacteria ($p>0.05$) in mice gut. However, at the 10th day after feeding, there was significant decrease ($p<0.05$) on the number of Enterobacilli for every experimental group comparing to that of before feeding, and there was extremely significant difference on the decrease ($p<0.01$) of Enterobacilli for groups feeding with Ind3 and NCFM comparing to the control. There was also a significant difference on the decrease ($P<0.05$) of Enterobacilli for groups feeding with Ind1 and Lp115 comparing to the control. This implied that feeding with Ind1, Ind3, NCFM and Lp115 had certain inhibition on the growth of Enterobacilli in mice gut.

After stopping the feeding, the numbers of Enterobacilli at each group increased comparing to that of feeding period. The group feeding by NCFM, Ind3 and Lp115 after stopping the feeding for 6 days, were less than that of before feeding but no significant difference ($P>0.05$), the increases were all less than the control group but also no significant difference($P>0.05$). Specifically for group feeding with Inl1, after stopping the feeding for 4 days, the number of Enterobacilli had rised back to that of before feeding. This means that after feeding for one week, Ind3, NCFM and Lp115 still keep certain effect on the modulation，but in order to inhibit the growth of Enterobacilli, probiotics need to be taking continuously.

There is no significant difference ($p>0.05$) for the number of *Clostridium perfringens* before and during feeding for the control group. For the experimental group, the number of *C. perfringens* decreased extremely significantly ($P<0.01$) at the 10th day after feeding with Ind1 and NCFM, and

the Ind3 group showed significant difference (P<0.05) comparing to before feeding.

After stopping the feeding, the number of *C. perfringens* for each group had certain amount of recover, and almost reached the level before feeding, however, the group feeding with Ind1 at the 6th day after feeding had significant difference (P<0.05) comparing to the control. But no significant difference for group of Ind3, NCFM and Lp115 (P>0.05) was observed.

Part V. Evaluation on GABA producing ability and optimization on process parameters

γ-amino butyric acid (GABA) is a very important inhibitory neurotransmitter in the animal central nervous system. Fermentation by using lactic acid bacteria (LAB) is a nature and safe way to obtain high content of GABA (Possemers S et al., 2004; Lebeer S et al., 2007). Here the GABA producing ability of the two *L. pentosus* strains Ind1 and Ind3 was studied, and a try to optimize the processing parameters was done.

Optical density measurement of GABA is:

1. Set a 2.0cm distance between spotting line and edge of filter paper.
2. Take 10ml sample and drop sample on spotting line. Keep 2.0cm distance between spots.
3. Put the sample paper in developer for 3.5 hrs at 30C. The contents of developing agent are n-butanol, acetic acid glacial and water. The ratio is 4:2:1, in which contains 0.4ml/L ninhydrin.
4. After development, the sample filter paper is dried at 90C for 10 min.
5. Run a reference sample by same conditions meanwhile.
6. Compare sample paper and reference paper, and shear the point that is at same position as reference paper.
7. Put the sample point in eluent for 25min. The eluent contains 75% ethanol (v/v) and 0.1% CuSO4 solution (v/v). The ratio is 38:2.
8. Measure optical density of sample eluent at 510nm by spectrometer.

GABA content was calculated using the standard curve.

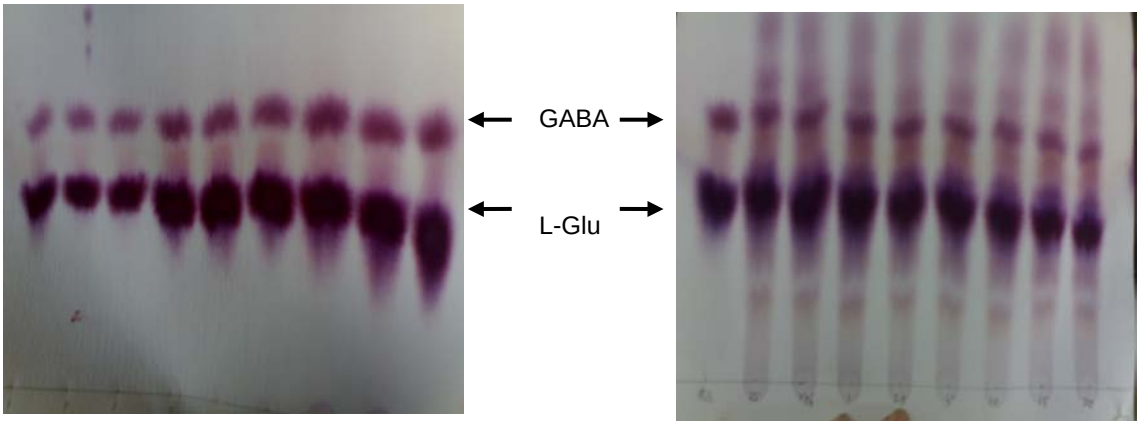


Fig.5.1 Chromatography of pure GABA and L-Glu Fig. 5.2 Chromatography of GABA and L-Glu in fermentation broth

The GABA production of *L. pentosus* strains Ind1 and Ind3 was 0.065g/L and 0.003g/L incubated in skim milk at 37°C for 24 hours, respectively. Under the same condition, the GABA production was 50% and 314% higher with a supplementation with monosodium L-glutamate (MSG). By using different carbon and nitrogen sources, the results showed that glucose and yeast extract were the best supplemental nutrients added in skim milk for strains Ind1 and Ind3. It was also seen that yeast extract had a higher influence on the GABA yield than glucose.

The optimal conditions for *L. pentosus* Ind1 and Ind3 to transfer L-Glu into GABA were: incubated at 37ºC in a medium at pH 7.0; MRS medium modified with 20g/L glucose, 10g/L tryptone, 10g/L yeast extract, 10g/L beef extract, MSG concentration of 15 g/L, and $CaCl_2$ concentration 0.5mmol/L at a recommended inoculation rate of 2% (v/v, 10^8 cfu/mL). Under these conditions, the maximum amount of GABA produced by Ind1 strain after incubation for 72h was 1.002g/L, and 0.326g/L of GABA was produced by Ind3 after incubation for 84h. The GABA concentration increased to 1.406g/L and 0.456g/L after storage at 4ºC for 30 days, respectively.

Glutamate decarboxvlase (GAD), as one of important enzyme able to convert L-Glu to GABA, was extracted from the cells o*f L. pentosus* strains grown in MRS incubated at 37ºC for 16h. Its purification and its properties were characterized. The molecular weight of GAD isolated from the two *L. pentosus* was 43 kd. The GAD showed the maximum activity in transformation of L-Glu to GABA when it was incubated at 37ºC for 1h and maintained in a given pH of 4.8. It was proved that the enzyme was sensitive to heat and never tolerated temperature higher than 60ºC.

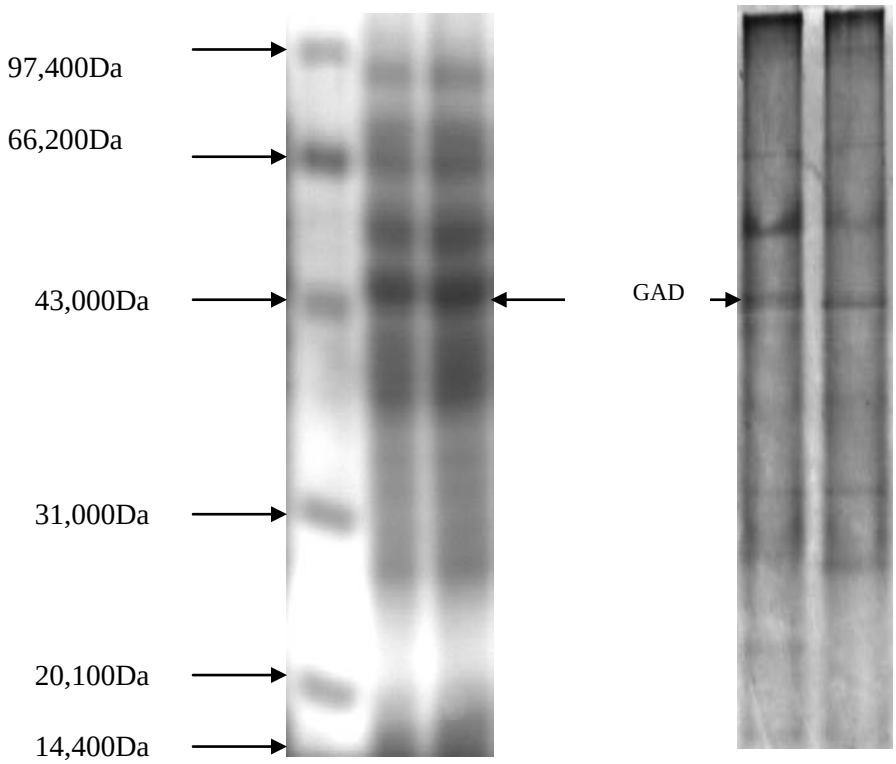


Fig. 5.3. SDS-PAGE of L-Glu isomerase fraction PAGE of L-Glu isomerase fraction

Among metal ions used in the study, Ca^{2+} showed the greatest promoting effects on enzyme activity: the activity of GAD in Ind1 and Ind3 can be increased by 126% and 223%, respectively after adding 1 mmol/L Ca^{2+}, followed by Cu^{2+}, Mn^{2+} and Mg^{2+}.

Meanwhile, after optimization of incubation condition, GABA production by Ind1 and Ind3 in fermented milk drinks was also set up. In the fermented milk, the content of GABA produced by Ind1 and Ind3 can reach 0.325g/L and 0.098g/L

Fermentation on skim milk (incubation at 37°C for 24h) with the two *L. pentosus* strains by adding MSG (2g/L), 1% glucose and 1% yeast extract, allowed to obtain GABA content at 0.264g/L and 0.067g/L, respectively. During storage period (21days), the GABA content had slightly increased, about 35% and 45% for Indl and Ind3, respectively. Milk is a good carrier for GABA production.

Conclusions

Two Lactobacillus strains were isolated from Chinese traditional Xinjiang cheese, namely *Lactobacillus pentosus* Ind1 and Ind3. This study was designed to assess their potential probiotic properties such as: (i) their tolerance to gastric juice, intestinal juice, bile salt, and some pre-carcinogens substances present in the human gut; (ii) their adhesive characteristics; (iii) their ability of modulate the mice gut microflora.

The adhesion ability was strain-specific, and *L. pentosus* Ind3 showed similar adhesion performance to that of two commercial probiotic strains: *L. acidophilus* NCFM and *L. plantarum* Lp115. The good adhesion ability of the two *L. pentosus* strains occurred when the growth stage of bacterial cells reached 26h with a pH of 4.0 and an incubation temperature of 37°C. Heat inactivation had no significant effect on their adhesion to epithelial cells. The adhesion of *L. pentosus* Ind1 and Ind3 decreased significantly due to the presence of enzymes like trypsin and proteinase K, but removal of S-layer proteins from cell surface did not cause the loss of their adhesive to epithelial cells. These two strains of *L. pentosus* might be selected as dietary or probiotic adjunct for potential uses in Chinese-style dairy products.

Bacterial resistance to three carcinogens (phenol, p-cresol and indole) was diverse and depended on the bacterial strain, the compound and its concentration. However, all strains presented ability to multiply and growth in the presence of three carcinogens. Specifically, for the two strains, the concentration at 150 μg/mL for all three carcinogens (phenol, p-cresol and indole) had impact on the survival and growth only except for Ind1 in presence of phenol. However, Ind3 presented more sensitivity to phenol even at 50 μg/mL, Ind1 showed great resistance for phenol. For concentration of 5 and 50 μg/mL, all three carcinogens had almost an impact on the growth and survival of Ind1 and Ind3.

Owing to diverse impact of phenol, p-cresol and indole on growth and survival of intestinal lactobacilli, it is necessary to take their resistance into consideration during selection of strains to producing probiotic specimens. The results achieved will enable to develop further research connected with the ability of intestinal LAB to bind or metabolize the above-mentioned carcinogens.

The modulation of gut microflora of the two *L. pentosus* was as following.

1. For *L. pentosus* strain Ind1: at the 10th day after feeding, this strain significantly promoted the increase of Lactobacillus and Bifidobacteria in mice gut, and significantly inhibited the growth of Enterobacillus and *Clostridium perfringens*, but with no obvious effect on Enterococus. After stopping the feeding for 6 days, Ind1 still had some effect on the increase of Lactobacillus.

2. For strain Ind3, a quite similar effect as a commercial strain (*Lactobacillus acidophilus* NCFM) was observed: at the 10th day of feeding, there was extremely significant difference for improving the growth of Lactobacillus and Bifidobacteria in mice gut ($P<0.01$) and for the inhibition of Entrobacillus and *C. perfringens* ($P<0.01$). Even after stopping feeding for 6 days, the increase of Lactobacillus was still significant comparing to before feeding.

The GABA production of *L. pentosus* strains Ind1 and Ind3 incubated in skim milk at 37°C for 24 hours was 0.065 g/l and 0.003 g/l, respectively. Under the same condition, the GABA production was 50% and 314% higher by adding monosodium L-glutamate (MSG). Glucose and yeast extract were the best nutrients to be added as carbon and nitrogen sources for getting high GABA content. GABA content in fermented milk showed a stable increase during the cold storage period after fermentation.

In summary, *Lactobacillus pentosus* Ind1 and Ind3 the tested strains would be promising as potential candidates as a probiotic in food and dietary supplement applications.

Bibliography

Annuk H, Shchepetova J, Kullisaar T, Songisepp E, Zilmer M, Mikelsaar M. (2003). Characterization of Intestinal Lactobacilli as Putative Probiotic Candidates. *Journal of applied microbiology,* 94(3), 403-412.

Bieniek G. (1996). Simultaneous Determination of Phenol, Cresol, Xylenol Isomers and Napthols in Urine by Capillary Gas Chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 28(682), 167-172*.

Blum S, Reniero R, Schiffrin E J, Crittenden R, Mattila-Sandholm T, Ouwehand A C, Salminen S, Wright A, Saarela M, Saxelin M, Collins K, Morelli L. (1999). Adhesion Studies

for Probiotics: Need for Validation and Refinement. *Trends in Food Science Technology, 10*(12), 405-410.

Bone E, Tam A, Hill M. (1976). The Production of Urinary Phenols by Gut Bacteria and Their Role in the Causation of Large Bowel Cancer. *The American journal of clinical nutrition,* 29, 1448-1454.

Collado M C, Gueimonde M, Hernandez M, Sanz Y, Salminen S. (2005). Adhesion of Selected Bifidobacterium Strains to Human Intestinal Mucus and the Role of Adhesion in Enteropathogen Exclusion. *Journal of Food Protection, 68*(12), 2672-2678.

Deepika G, Green R J, Frazier R A, Charalampopoulos D. (2009). Effect of Growth Time on the Surface and Adhesion Properties of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Journal of Applied Microbiology, 107*(4), 1230-1240.

Dunne C L, Murphy S, Flynn L, O'Mahony S, O'Halloran. (1999). Probiotics: From Myth to Reality. Demonstration of Functionality in Animal Models of Disease and in Human Clinical Trials. *Antonie van Leeuwenhoek* 76, 279-292.

Fooks L J, Gibson G R. (2002). Probiotics as Modulators of the Gut Flora. *The British journal of nutrition,* 88, 39-49

Frece J, Kos B, Svetec I K, Zgaga Z, Mrsa V, Suskovic J. (2005). Importance of S-layer Proteins in Probiotic Activity of *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology, 98*(2), 285-292.

Greene J D, Klaenhammer T R. (1994). Factors Involved in Adherence of Lactobacilli to Human Caco-2 Cells. *Applied and Environmental Microbiology, 60*(12), 4487-4494.

Guglielmetti S, Tamagnini I, Mora D, Minuzzo M, Scarafoni A, Arioli S, Hellman J, Karp M, Parini C. (2008). Implication of an Outer Surface Lipoprotein in Adhesion of *Bifidobacterium bifidum* to Caco-2 Cells. *Applied and Environmental Microbiology, 74*(15), 4695-4702.

Hooper L V, Gerdon J I. (2000). Commensal Host-bacterial Relationships in the Gut. *Science,* 292(5519), 1115-1118.

Kos B, Suskovic J, Vukovic S, Simpraga M, Frece J, Matosic S. (2003). Adhesion and Aggregation Ability of Probiotic Strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied*

Microbiology, 94(6), 981-987.

Kotsou M G, Mitsou E K, Oikonomou I G, Kyriacou A A. (2008). In Vitro Assessment of Probiotic Properties of Lactobacillus Strains from Infant Gut Microflora. *Food Biotechnology, 22*(1-2), 1-17.

Lahtinen S, Ouwehand A. (2009). Mechanisms of Probiotics. *Handbook of Probiotics and Prebiotics*, 377-378.

Lebeer S, Verhoeven T L A, Velez M P, Vanderleyden J, De Keersmaecker S C J. (2007). Impact of Environmental and Genetic Factors on Biofilm Formation by the Probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Applied and Environmental Microbiology, 73*(21), 6768-6775.

Lortal S, Van Heijenoort J, Gruber K, Sleytr U B. (1992). S-layer of *Lactobacillus helveticus* ATCC 12046: Isolation, Chemical Characterization and Re-formation after Extraction with Lithium Chloride. *Journal of General Microbiology, 138*(3), 611-618.

Marteau P, Minekus M, Havenaar R, Veld J. (1997). Survival of Lactic Acid Bacteria in a Dynamic Model of the Stomach and Small Intestine: Validation and the effects of bile. *Journal of Dairy Science, 80*(6), 1031-1037.

Mack D R. Michail S, Wei S, McDougall L, Hollingsworth M A. (1999). Probiotics Inhibit Enteropathogenic *E. coli* Adherence in Vitro by inducing Intestinal Mucin Gene Expression. *American Journal of Physiology,* 276, 941-950.

Nowak A, Libudzisz Z. (2006), Influence of Phenol, P-cresol and Indole on Growth and Survival of Intestinal Lactic Acid Bacteria. *Anaerobe,* 12, 80-84.

Ohashi Y, Ushida K. (2009). Health-beneficial Effects of Probiotics: Its Mode of Action. *Animal Science Journal, 80*(4), 361-371.

Ouwehand A C, Salminen S, Isolauri E. (2002). Probiotics: An Overview of Beneficial Effects. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology, 82*(1-4), 279-289.

Possemers S, Verthe K, Uyttendaele S, Verstraete W. (2004). PCR-DGGE-based Quantification of Stability of the Microbial Community in a Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem. *Fems Microbiology Ecology*, 49(3), 495-507.

Schneitz C, Nuotio L, Lounatma K. (1993). Adhesion of *Lactobacillus acidophilus* to Avian

Intestinal Epithelial-Cells Mediated by The Crystalline Bacterial-Cell Surface-Layer (S-Layer). *Journal of Applied Bacteriology, 74*(3), 290-294.

Steer T, Carpenter H, Tuohy K, Gibson G R. (2000). Perspectives on the Role of the Human Gut Microbiota and Its Modulation by Pro- and Prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, 13, 229-254.

Tannock G W. (1999). A Fresh Look at the Intestinal Microflora. In : Probiotics : A Critical Review, Horizon Scientific Press, Wymondham, 5-14.

Tamm A, Villako K. (1971). Urinary Volatile Phenols in Patients with Intestinal Obstruction. *Scandinavian Journal of Gastroenterology. 5-6.*

RESUME

Deux souches de *Lactobacillus pentosus*, Ind1 et Ind3, ont été isolées à partir de « Naigeda », un fromage traditionnel Chinois produit dans la région du Xinjiang. Les propriétés probiotiques de *L. pentosus* étant peu connues, la présente étude a été conduite afin de déterminer si ces 2 souches, Ind1 et Ind3, sont susceptibles d'être utilisées comme probiotiques.

Certaines propriétés physiologiques des 2 souches de *L. pentosus*, Ind1 et Ind3, telles que leur tolérance à l'environnement gastro-intestinal et leur aptitude à adhérer à l'épithélium intestinal ont été déterminées lors d'essais *in vitro*. Leurs propriétés de dégradation de 3 substances carcinogènes (phénol, p-crésol et indole ; concentrations comprises entre 50 et 150 µg/mL) ainsi que leur inhibition éventuelle par ces mêmes substances ont été étudiées. Les effets des 2 souches de *L. pentosus* sur la microflore intestinale de souris, après administration orale de 10^9cfu/mL dans 0.5 mL de lait écrémé, ont été analysés. A cet effet, les populations de lactobacilles, bifidobactéries, entérobacilles, entérocoques et *Clostridium perfringens*, contenues dans les fèces des souris, avant, pendant et après leur alimentation en probiotiques, ont été considérées. Enfin, les capacités des 2 souches de *L. pentosus* à produire de l'acide γ-amino butyrique (GABA) ont été étudiées, et les conditions de milieu et de culture assurant la meilleure production ont été définies.

Les résultats montrent que les 2 souches de *L. pentosus*, Ind1 et Ind3, présentent des taux de survie élevés : plus de 90 % en milieu acide et de 80% dans une solution de bile. Les aptitudes à l'adhérence à l'épithélium intestinal sont souches dépendantes, avec pour la souche Ind3, un potentiel similaire à celui de souches probiotiques connues (NCFM et Lp115). Les souches Ind1 et Ind3 démontrent également une bonne résistance aux substances carcinogènes (phénol, p-crésol, indole à 150 µg/mL). Enfin, ces 2 souches permettent un accroissement des concentrations de lactobacilles et de bifidobactéries dans le tractus intestinal des souris, tout en inhibant la croissance des entérobacilles et de *C. perfringens*.

Ces résultats démontrent les aptitudes potentielles des deux souches de *L. pentosus* étudiées pour une utilisation comme souches probiotiques au sein de régimes diététiques ou pour l'élaboration de produits laitiers fermentés.

Mots clefs : *Lactobacillus pentosus*; acide γ-amino butyrique ; adhérence ; microflore intestinale ; substance carcinogène.