

抑制致病菌益生乳杆菌的胁迫耐受性及免疫活性

于 微, 缪宇思, 李亚楠, 刘 鑫, 侯俊财, 马佳歌*

(东北农业大学食品学院 乳品科学教育部重点实验室 哈尔滨 150030)

摘要 以 16 株乳杆菌为研究对象, 分析其对病原菌金黄色葡萄球菌、鼠伤寒沙门氏菌及大肠杆菌的抑菌能力, 黏附及干预病原菌黏附 Caco-2 细胞的作用, 对酸及胆盐胁迫的抗逆性及对免疫细胞的调节活性。结果表明, 植物乳杆菌 KLDS 1.0328 等乳杆菌的无细胞发酵上清液的抑菌圈直径均在 15 mm 以上。以鼠李糖乳杆菌 LGG 为对照, 体外筛选出 6 株对 Caco-2 细胞体外黏附能力强或与之相当的菌株。基于竞争、排阻及置换试验, 复筛出 4 株抑制病原菌和对 Caco-2 细胞黏附能力较强的乳杆菌, 其中植物乳杆菌 KLDS 1.0328 竞争性抑制鼠伤寒沙门氏菌的抑制率为 $(72.52 \pm 4.94)\%$ 。此外, 证实植物乳杆菌 KLDS 1.0328 对酸及胆盐的耐受性较强, 对免疫细胞活性有较好的调节作用, 具有在食品工业开发、应用的潜力。

关键词 植物乳杆菌; 抑菌能力; 黏附; 耐受性; 免疫调节

文章编号 1009-7848(2023)03-0060-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.03.007

益生菌(Probiotics)是活的微生物, 当施予一定数量时, 通过维持肠道正常微生物, 抑制病原菌黏附于肠道黏膜, 降胆固醇及提高免疫力等, 为宿主的健康提供诸多益处^[1]。乳杆菌属(*Lactobacillus*)为乳酸菌(Lactic acid bacteria, LAB)中最大的属, 乳杆菌是“通常被认为是安全的”(Generally recognized as safe, GRAS)食品级微生物^[2]。目前, 大量科学实验证明乳杆菌具有多种益生功效, 主要包括调节及恢复肠道菌群正常平衡, 增强肠上皮细胞的屏障功能, 抑制病原菌的生长及黏附定植, 调节免疫力, 抗炎, 抗氧化以及抗病毒等, 兼具降低血清胆固醇及预防结肠癌等重要保健功效^[3-5]。

食源性疾病是过去几十年中最重要的健康问题之一, 乳杆菌抑制病原菌的生长特性被认为是衡量其益生特性的关键指标。乳杆菌对胃肠道病原菌的抑制作用受到研究人员关注。摄入乳杆菌后, 会面临胃(低 pH 值、胃液及胃蛋白酶)和肠(胆盐及胰蛋白酶)等环境胁迫, 只有具有酸及胆盐耐受性或排斥能力才能在胃肠道中存活, 从而实现乳杆菌的益生作用^[6]。益生乳杆菌的黏附是其定植的第 1 步, 其黏附于肠上皮细胞或黏液可增强上皮细胞的屏障功能, 是保护宿主机体免受病

原体侵袭及黏附的机制之一^[7]。在体外条件下, 良好的黏附能力与其在宿主中的稳定性及定植能力有重要关系, 对排除病原体及宿主免疫调节产生有益的影响^[8]。

本研究以 16 株乳杆菌菌株为研究对象, 分析其抑制病原菌生长的能力, 初步筛选体外抑菌效果较强的乳杆菌, 研究其黏附及抑制病原菌黏附 Caco-2 细胞的能力。分析其对酸和胆盐的耐受性, 再结合乳杆菌菌株体外调节免疫细胞活性, 获得具有优良抑菌性能及模拟人体胃肠道环境胁迫耐受性的益生乳杆菌。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株及细胞株 受试乳杆菌副干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei*)1.1013、1.1014、1.1016, 瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus*)1.0632、1.0637, 植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)1.0328、1.0332、1.0628, 干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)1.0375、1.0415, 嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)1.0731、1.0732、1.0735, 鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*)1.0914、1.0915, 分离筛选自黑龙江省及内蒙古等地区的传统特色发酵食品, 保藏于东北农业大学乳品科学教育部重点实验室(Key Laboratory of Dairy Science, KLDS); 鼠李糖乳杆菌 GG(ATCC 53103)为参照菌株, 由东北农业大学生命科学学院惠赠; 金黄色葡萄球菌

收稿日期: 2021-03-08

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目(LH2020C027)

第一作者: 于微, 女, 博士, 助理研究员

通信作者: 马佳歌 E-mail: jiage_ma@neau.edu.cn

(*Staphylococcus aureus*)CMCC 26003、鼠伤寒沙门菌 (*Salmonella typhimurium*)ATCC 14028 及大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*)ATCC 25922 为指示菌,保藏于东北农业大学乳品科学教育部重点实验室。结肠癌细胞株为 Caco-2 细胞,中国科学院上海生科院细胞资源中心。

1.1.2 培养基及主要试剂 MRS 肉汤培养基配方:牛肉膏 10 g/L,蛋白胨 10 g/L,酵母浸粉 5 g/L,葡萄糖 20 g/L,柠檬酸铵 2 g/L, K_2HPO_4 2 g/L,乙酸钠 5 g/L,吐温-80 1 g/L, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.25 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.58 g/L,pH 6.4 ± 0.2,121 °C 下高压灭菌 15 min;LB 培养基配方:胰蛋白胨 10 g/L,NaCl 10 g/L,酵母浸粉 5 g/L,将 pH 值调至 7.4,121 °C 下高压灭菌 15 min。

细胞株培养基:采用达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified eagle medium,DMEM)高糖完全培养基,即向高糖 DMEM 培养基内补充 10%热灭活的胎牛血清、1%的双抗(100 U/mL 青霉素及 100 μg/mL 链霉素),经过 0.22 μm 的水系滤膜过滤除菌,4 °C 下冷藏备用。

胃蛋白酶、胰蛋白酶、牛胆盐,美国 Sigma-Aldrich 公司;胎牛血清,美国 HyClone 公司;CCK-8 试剂盒,美国 APE×BIO 生物科技有限公司;胰蛋白酶-EDTA 消化液,美国 Gibco 公司;刀豆蛋白、中性红染色液,北京索莱宝科技有限公司。

1.2 仪器与设备

UV-2600 紫外-可见分光亮度计,日本岛津公司;SpectraMax reg iD3 多功能酶标仪,美谷分子仪器(上海)有限公司;LDZX-50KBS 立式压力蒸汽灭菌锅,上海申安医疗器械厂;SW-CJ-1D 超净工作台,苏州净化设备有限公司;DHP-9082 型电热恒温培养箱,上海一恒科技有限公司;HF90 二氧化碳培养箱,上海力新仪器有限公司;H1750R 台式高速冷冻离心机,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司。

1.3 方法

1.3.1 菌种的活化 将保藏于-80 °C 下甘油冻存管中的受试乳杆菌菌株取出,以体积分数 2%的接种量接种于 MRS 液体培养基中,37 °C 下培养 24 h,并连续活化 3 次以恢复菌种活力。以接菌环挑取少量菌液,在 MRS 琼脂平板上 3 区平板划线,

于 37 °C 下培养。

1.3.2 乳杆菌对病原菌的抑菌能力测定 采用 Gong 等^[9]所述牛津杯琼脂扩散法测定 16 株供试乳杆菌的抑菌能力。分别将 16 株乳杆菌培养液于 4 °C 下 5 000×g 离心 10 min,取上清液。无细胞发酵上清液(Cell-free supernatant,CFS)分为两部分:一部分为原发酵上清液,以 0.22 μm 的水系滤膜过滤;另一部分用 2 mol/L NaOH 将上清液的 pH 值调至 6.5,用 0.22 μm 滤膜过滤。在无菌平板上倾倒 10 mL 已灭菌的 2%琼脂,待凝固后把内径为 6 mm 的牛津杯轻放在已凝固的平皿上。将接种指示菌的培养基倾倒入带有牛津杯的琼脂平板上晾干。将牛津杯取出,向每个孔中加入 100 μL 乳杆菌发酵上清液,置 37 °C 下恒温培养 24 h,用游标卡尺测定抑菌圈的直径(mm)。

1.3.3 乳杆菌对 Caco-2 细胞的黏附能力测定

Caco-2 细胞株被用作肠上皮细胞模型,参考 Tuo 等^[10]的方法进行细胞活化和培养。采用倾注平板法对乳杆菌计数。乳杆菌菌株黏附率计算公式:

$$\text{黏附率}(\%) = \frac{N_1}{N_0} \times 100 \quad (1)$$

式中: N_0 和 N_1 ——分别为每孔中加入和黏附的乳杆菌总数【lg(CFU/mL)】。

1.3.4 乳杆菌干预病原菌对 Caco-2 细胞的黏附能力测定 分别通过竞争、排阻及置换试验,分析受试乳杆菌干预 3 株病原菌对 Caco-2 细胞的黏附能力,参考 Zhang 等^[11]的方法。乳杆菌菌株干预病原菌对 Caco-2 细胞的黏附,抑制率计算公式:

$$\text{黏附抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{N_i}{N_j}\right) \times 100 \quad (2)$$

式中: N_i 和 N_j ——分别为对照组和试验组中病原菌的黏附总数【lg(CFU/mL)】。

1.3.5 乳杆菌对酸及胆盐环境胁迫的耐受性测定

将受试乳杆菌按体积分数 2%的接种量,接种于以 2 mol/L HCl 调整至 pH 值至 3.0 或 2.0 的 MRS 液体培养基内;或接种于添加有 0.3%或 0.5%牛胆盐的 MRS 液体培养基内。混匀后立即置于 37 °C,分别厌氧孵育 1.5 h 及 3 h,并以原 MRS 培养基为对照。通过倾注平板法在 37 °C 厌氧下培养 48 h,菌落计数(CFU/mL)。乳杆菌存活率的计算公式:

$$\text{存活率}(\%) = \frac{N_n}{N_m} \times 100 \quad (3)$$

式中: N_m 和 N_n ——分别为培养后及培养起始时样品的乳杆菌总数【lg(CFU/mL)】。

1.3.6 乳杆菌对免疫细胞活性的影响

1.3.6.1 脾淋巴细胞增殖活性测定 小鼠脾脏淋巴细胞的制备参照 Amrouche 等^[12]的方法,按表 1 所示设置不同加样组。加样并充分混匀后,在含有 5%CO₂、RH 90%的厌氧培养箱内 37℃ 孵育 48 h。以 CCK-8 法分析脾淋巴细胞的增殖活性^[13],测定

OD_{450 nm} 值。脾淋巴细胞的转化值及增殖指数的计算公式:

$$\text{脾淋巴细胞的转化值} = A_1 - A_2 \quad (4)$$

$$\text{脾淋巴细胞的增殖指数(PI)} = \frac{A_1 - A_3}{A_4} \quad (5)$$

式中: A_1 ——试验组 OD_{450 nm}; A_2 ——代表阴性对照组 OD_{450 nm}; A_3 ——乳杆菌对照组 OD_{450 nm}。

表 1 脾淋巴细胞增殖试验的加样方式

Table 1 Methods of adding samples for the splenic lymphocyte proliferation test

分组	加样方式
空白调零组	200 μL 细胞培养液
阴性对照组	20 μL 细胞培养液及 180 μL 1×10 ⁶ 个/mL 淋巴细胞悬液
阳性对照组	20 μL 5 μg/mL 刀豆蛋白 A(ConA)及 180 μL 1×10 ⁶ 个/mL 淋巴细胞悬液
乳杆菌对照组	20 μL 终含量分别为 10 ⁶ , 10 ⁷ 或 10 ⁸ CFU/mL 的乳杆菌悬液及 180 μL 细胞培养液
试验组	20 μL 终含量分别为 10 ⁶ , 10 ⁷ 或 10 ⁸ CFU/mL 的乳杆菌悬液及 180 μL 1×10 ⁶ 个/mL 淋巴细胞悬液

1.3.6.2 腹腔巨噬细胞能量代谢水平及吞噬中性红能力测定 小鼠腹腔巨噬细胞的制备参照 Lim 等^[14]的方法。小鼠腹腔巨噬细胞悬液以 100 μL/孔接种至无菌 96 孔细胞培养板内,在含有 5%CO₂、RH 90%的厌氧培养箱内 37℃ 孵育 4 h,待贴壁后弃上清液。参照 1.3.6.1 节的加样方式,向每孔中添加 20 μL CCK-8 溶液后培养 4 h,测定 OD_{450 nm} 值。以 100 μL/孔添加 0.1% 中性红染色液,继续培养 3 h 后弃中性红染色液,以无菌 PBS 缓冲液将细胞洗涤 3 次,每孔分别添加 200 μL 细胞裂解液,充分混匀后培养 2 h,测定 OD_{540 nm} 值。

1.3.7 数据处理 试验均重复 3 次,结果以平均值±标准偏差表示。采用 SPSS 26.0 中的单因素方差分析及 Tukey 检验法对数据进行多重比较, $P < 0.05$,数据间差异显著。采用 Origin 8.5 软件绘图。

2 结果与分析

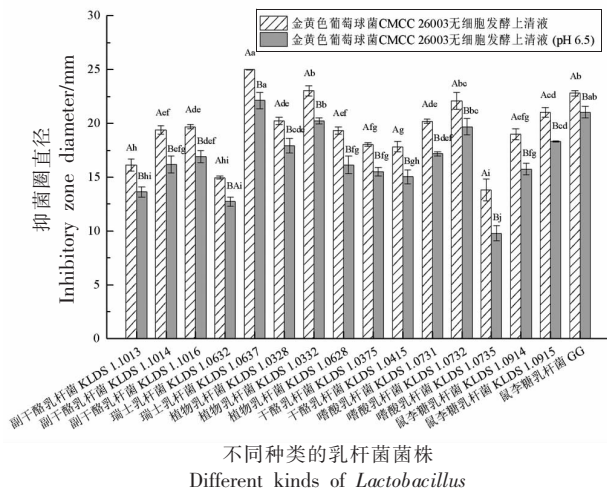
2.1 乳杆菌抑菌活性

分别采用 16 株乳杆菌的原无细胞发酵上清液及 pH 值调至 6.5 的上清液进行抑菌试验,结果如图 1 和 2 所示。瑞士乳杆菌 KLDS 1.0637 的无细胞发酵上清液(CFS)对金黄色葡萄球菌 CMCC 26003 的抑菌圈直径为(25.01 ± 0.04)mm,显著高

于标准菌株鼠李糖乳杆菌 GG,当各乳杆菌 CFS 的 pH 值调至 6.5 后,同一乳杆菌的抑菌能力均显著降低($P < 0.05$)。13 株乳杆菌排酸后的 CFS 对金葡菌的抑菌圈均大于 15 mm。植物乳杆菌 KLDS 1.0328 的 CFS 对鼠伤寒沙门氏菌 ATCC 14028 的抑菌效果显著强于标准菌株($P < 0.05$)。仅有 10 株乳杆菌 CFS(pH 6.5)对大肠杆菌 ATCC 25922 的抑菌圈直径在 15 mm 以上。Halimi 等^[15]发现,发酵乳杆菌的低 pH 值培养上清液对金葡菌及铜绿假单胞菌均有较强的抑菌能力。经综合分析,共筛选出 10 株乳杆菌,具有较强的拮抗 3 株病原菌的能力。

2.2 乳杆菌对 Caco-2 细胞的黏附能力

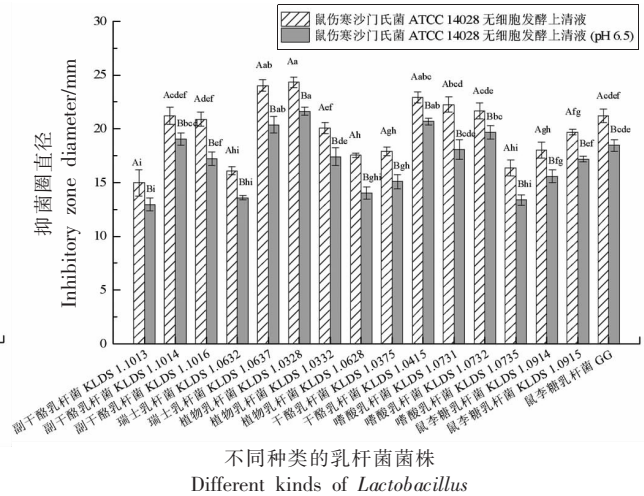
如图 4 所示,11 株乳杆菌在 Caco-2 细胞上的黏附率在(2.41 ± 0.42)%~(12.75 ± 0.25)%之间,这有赖于菌株及种属的不同^[16]。植物乳杆菌 KLDS 1.0332、KLDS 1.0328 及瑞士乳杆菌 KLDS 1.0637 对 Caco-2 细胞的黏附能力显著高于鼠李糖乳杆菌 GG ($P < 0.05$)。本研究采用平板菌落计数,分析活菌的黏附能力。另有一些研究采用荧光标记法,可反映死菌的黏附,这可能是造成结果差异的原因。共筛选出 6 株对 Caco-2 细胞具有较好黏附性的乳杆菌。Sophatha 等^[17]的研究表明,乳杆



注：不同小写字母代表不同菌株的抑菌效果间存在显著性差异，不同大写字母代表不同无细胞发酵上清液样品的抑菌效果间存在显著性差异($P<0.05$)。

图 1 不同种类的乳杆菌菌株对金黄色葡萄球菌 CMCC 26003 的抑菌效果分析

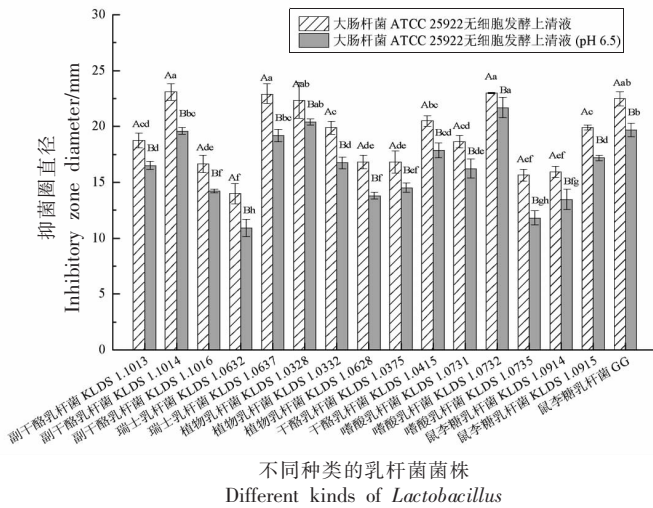
Fig.1 Analysis of antimicrobial effect of different kinds of *Lactobacillus* on *S. aureus* CMCC 26003



注：不同小写字母代表不同菌株的抑菌效果间存在显著性差异，不同大写字母代表不同无细胞发酵上清液样品的抑菌效果间存在显著性差异($P<0.05$)。

图 2 不同种类的乳杆菌菌株对鼠伤寒沙门氏菌 ATCC 14028 的抑菌效果分析

Fig. 2 Analysis of antimicrobial effect of different kinds of *Lactobacillus* on *S. Typhimurium* ATCC 14028

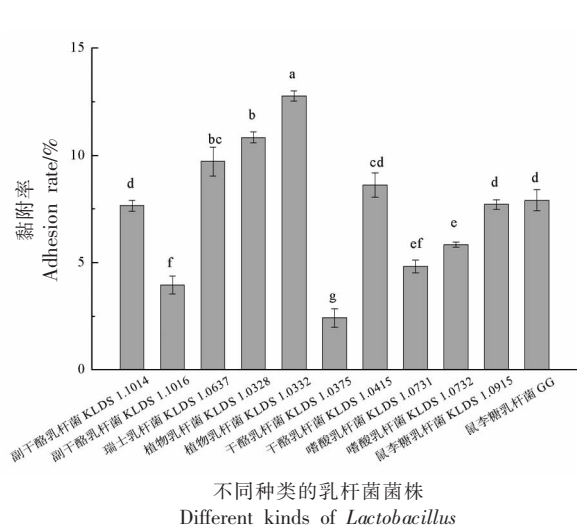


注：不同小写字母代表不同菌株的抑菌效果间存在显著性差异，不同大写字母代表不同无细胞发酵上清液样品的抑菌效果间存在显著性差异($P<0.05$)。

图 3 不同种类的乳杆菌菌株对肠杆菌 ATCC 25922 的抑菌效果分析

Fig.3 Analysis of antimicrobial effect of different kinds of *Lactobacillus* on *E. coli* ATCC 25922

菌在体外黏附 Caco-2 细胞的效果与抑制病原菌黏附细胞存在一定相关性，推测本研究中具有良好 Caco-2 细胞黏附性能的供试乳杆菌，能更好地



注：不同小写字母代表乳杆菌菌株的黏附率之间差异显著($P<0.05$)。

图 4 乳杆菌对 Caco-2 细胞黏附能力

Fig.4 The adhesion ability of *Lactobacillus* strains to Caco-2 cells

黏附于肠上皮细胞，通过代谢作用产生有机酸及细菌素等，以遏制或消灭病原菌。

2.3 乳杆菌干预病原菌对 Caco-2 细胞的黏附能力

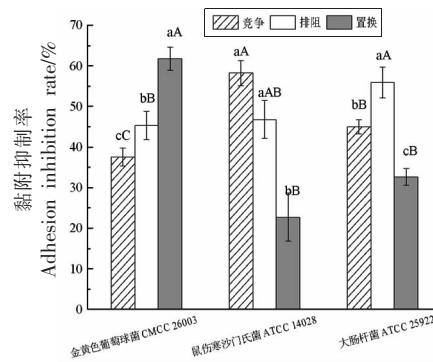
从竞争、排阻及置换作用分析前期筛选出 6 株乳杆菌及标准菌株 LGG 抵御 3 株病原菌对 Caco-2 细胞黏附的效果,探究乳杆菌干预病原菌定植于宿主胃肠道的益生机制。

如图 5~11 所示,不同的乳杆菌干预 3 株病原菌对 Caco-2 黏附的作用存在较大差异,抑制率在 $(17.14 \pm 2.20)\%$ ~ $(78.41 \pm 1.17)\%$ 范围。植物乳杆菌 KLDS 1.0332 对金黄色葡萄球菌 CMCC 26003 的竞争性抑制效果好,抑制率达 $(75.27 \pm 2.61)\%$ 。植物乳杆菌 KLDS 1.0328 竞争性抑制、KLDS 1.0332 排阻性抑制鼠伤寒沙门氏菌 ATCC 14028 对 Caco-2 细胞黏附的效果最好。Iglesias 等^[18]指出当单核细胞增生李斯特菌与鼠李糖乳杆菌 GG 共同接种在食物基质中时,由于益生菌分泌抑菌代谢物且与胃肠道病原体竞争相同受体,导致病原菌对胃肠道的侵袭性较低。经综合分析,植物乳杆菌 KLDS 1.0328、KLDS 1.0332 以及干酪乳杆菌 KLDS 1.0415 对本试验中 3 株病原菌的黏附有显著的抑制效果。

2.4 乳杆菌对胃肠道胁迫环境的耐受性

2.4.1 乳杆菌对酸的耐受性 一般地,由于受到食物种类、饮食结构及个体差异等因素的影响,胃

液的 pH 值在 1~4 范围内波动^[19]。本研究分析 3 株乳杆菌在 pH 2.0 及 pH 3.0 酸性环境下处理 1.5 h 或 3 h 后的存活率。由表 2 可知,乳杆菌在不同酸性环境下的存活率有差异,对于同一酸性 pH 值下的乳杆菌,其存活率均随孵育时间的增加而有所降低。植物乳杆菌 KLDS 1.0328 和 LGG 在酸胁迫下具有较好的耐受性。



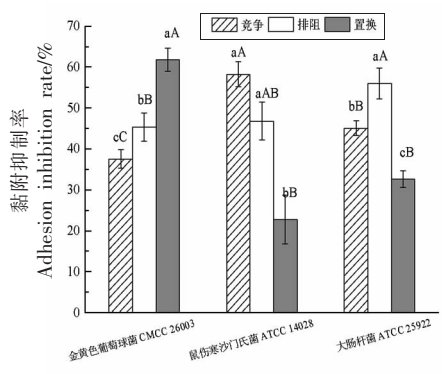
不同种类的致病菌

Different kinds of pathogenic strains

注:不同小写字母代表不同抑制作用方式之间差异显著,不同大写字母代表不同病原菌之间差异显著 ($P < 0.05$)。

图 6 瑞士乳杆菌 KLDS 1.0637 干预病原菌对 Caco-2 细胞的黏附抑制作用

Fig.6 *L. helveticus* KLDS 1.0637 inhibited adhesion of pathogenic bacteria to Caco-2 cells



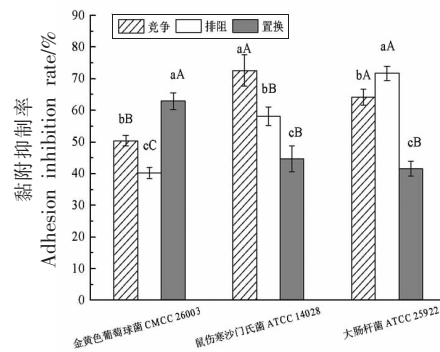
不同种类的致病菌

Different kinds of pathogenic strains

注:不同小写字母代表不同抑制作用方式之间差异显著,不同大写字母代表不同病原菌之间差异显著 ($P < 0.05$)。

图 5 副干酪乳杆菌 KLDS 1.1014 干预病原菌对 Caco-2 细胞的黏附抑制作用

Fig.5 *L. paracasei* KLDS 1.1014 inhibited adhesion of pathogenic bacteria to Caco-2 cells



不同种类的致病菌

Different kinds of pathogenic strains

注:不同小写字母代表不同抑制作用方式之间差异显著,不同大写字母代表不同病原菌之间差异显著 ($P < 0.05$)。

图 7 植物乳杆菌 KLDS 1.0328 干预病原菌对 Caco-2 细胞的黏附抑制作用

Fig.7 *L. plantarum* KLDS 1.0328 inhibited adhesion of pathogenic bacteria to Caco-2 cells

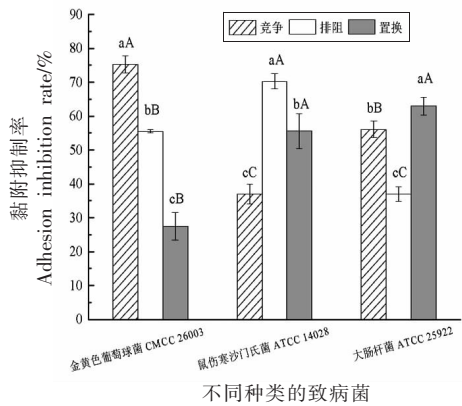


图 8 植物乳杆菌 KLDS 1.0332 干预病原菌对 Caco-2 细胞的黏附抑制作用
注:不同小写字母代表不同抑制作用方式之间差异显著,不同大写字母代表不同病原菌之间差异显著(P<0.05)。

图 8 *L. plantarum* KLDS 1.0332 inhibited adhesion of pathogenic bacteria to Caco-2 cells

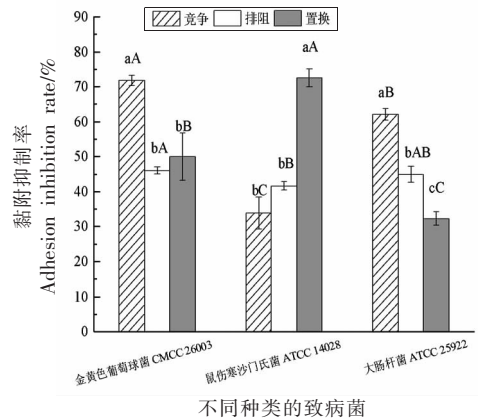


图 9 植物乳杆菌 KLDS 1.0415 干预病原菌对 Caco-2 细胞的黏附抑制作用
注:不同小写字母代表不同抑制作用方式之间差异显著,不同大写字母代表不同病原菌之间差异显著(P<0.05)。

图 9 *L. plantarum* KLDS 1.0415 inhibited adhesion of pathogenic bacteria to Caco-2 cells

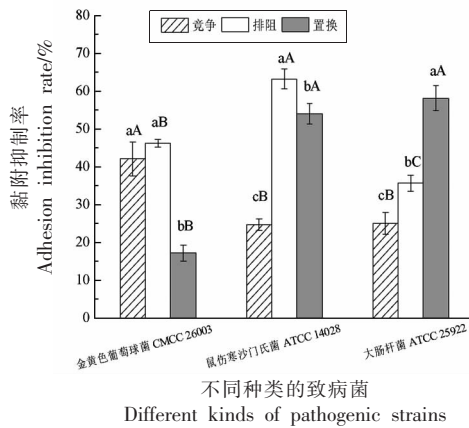


图 10 植物乳杆菌 KLDS 1.0915 干预病原菌对 Caco-2 细胞的黏附抑制作用
注:不同小写字母代表不同抑制作用方式之间差异显著,不同大写字母代表不同病原菌之间差异显著(P<0.05)。

图 10 *L. plantarum* KLDS 1.0915 inhibited adhesion of pathogenic bacteria to Caco-2 cells

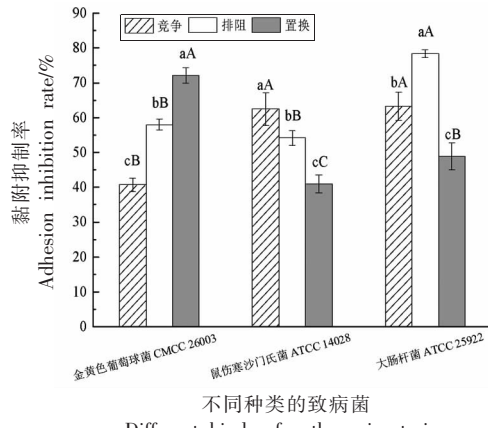


图 11 鼠李糖乳杆菌 GG 干预病原菌对 Caco-2 细胞的黏附抑制作用
注:不同小写字母代表不同抑制作用方式之间差异显著,不同大写字母代表不同病原菌之间差异显著(P<0.05)。

图 11 *L. rhamnosus* GG inhibited adhesion of pathogenic bacteria to Caco-2 cells

表 2 乳杆菌在不同酸性 pH 值条件下的存活率 (%)

Table 2 The survival rate (%) of *Lactobacillus* strains under different acidic pH values

菌株	pH 2.0		pH 3.0	
	1.5 h	3 h	1.5 h	3 h
植物乳杆菌 KLDS 1.0328	80.86 ± 1.48 ^{aA}	55.86 ± 0.31 ^{bB}	91.98 ± 0.42 ^{aA}	74.54 ± 0.52 ^{bA}
植物乳杆菌 KLDS 1.0332	68.91 ± 0.66 ^{Ab}	51.90 ± 0.83 ^{bC}	84.08 ± 0.87 ^{Ab}	63.58 ± 0.65 ^{bB}
干酪乳杆菌 KLDS 1.0415	69.31 ± 1.60 ^{Ab}	33.39 ± 1.04 ^{bI}	75.50 ± 1.23 ^{Ac}	61.03 ± 1.37 ^{bC}
鼠李糖乳杆菌 GG	83.55 ± 1.46 ^{aA}	59.93 ± 1.58 ^{bA}	93.32 ± 0.46 ^{aA}	76.54 ± 0.82 ^{bA}

注:不同小写字母代表同一 pH 值及处理时间下不同乳杆菌存活率间的差异显著;不同大写字母代表同一乳杆菌在同一 pH 值、不同处理时间条件下存活率间差异显著(P<0.05)。

2.4.2 乳杆菌对胆盐的耐受性 胆盐被认为是一种表面活性剂,造成细菌细胞膜损伤,从而导致菌体发生裂解乃至死亡^[20]。Mathara 等^[21]采用 0.3%的胆盐浓度对益生菌株进行筛选,当菌株存活率高于 50%时具有良好的胆盐胁迫抗性。本研究

中乳杆菌在 0.5%胆盐胁迫 3 h 后存活率为 50%~70%,其中植物乳杆菌 KLDS 1.0328 存活率达 (69.54 ± 1.05)%。经综合分析,筛选出植物乳杆菌 KLDS 1.0328 进行后续研究。

表 3 不同含量胆盐下乳杆菌的存活率(%)

Table 3 Survival rate (%) of *Lactobacillus* strains in the different concent of bile salts

菌株	胆盐 0.3%		胆盐 0.5%	
	1.5 h	3 h	1.5 h	3 h
植物乳杆菌 KLDS 1.0328	91.26 ± 0.89 ^{Aa}	83.72 ± 0.84 ^{Ba}	82.61 ± 0.49 ^{Ab}	69.54 ± 1.05 ^{Ba}
植物乳杆菌 KLDS 1.0332	84.28 ± 1.04 ^{Ab}	71.16 ± 0.77 ^{Bb}	78.67 ± 0.53 ^{Ac}	63.81 ± 0.43 ^{Bb}
干酪乳杆菌 KLDS 1.0415	90.17 ± 0.91 ^{Aa}	71.20 ± 0.64 ^{Bb}	79.08 ± 0.77 ^{Ac}	57.93 ± 1.45 ^{Bc}
鼠李糖乳杆菌 GG	90.60 ± 0.55 ^{Aa}	84.75 ± 0.49 ^{Ba}	85.16 ± 1.11 ^{Aa}	63.86 ± 1.29 ^{Bb}

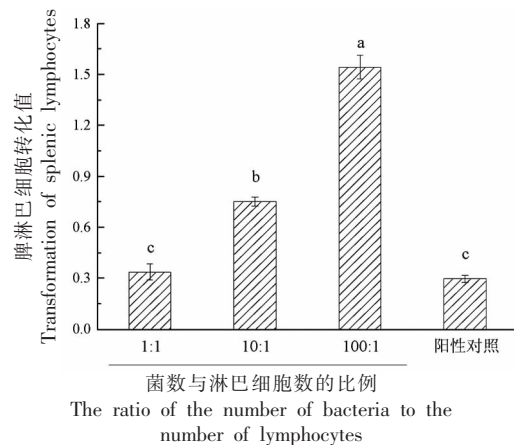
注:不同小写字母代表同一胆盐浓度及处理时间下不同乳杆菌存活率间的差异显著;不同大写字母代表同一乳杆菌在同一胆盐浓度、不同处理时间条件下存活率间的差异显著($P<0.05$)。

2.5 植物乳杆菌 KLDS 1.0328 对免疫细胞活性的影响

2.5.1 植物乳杆菌 KLDS 1.0328 对脾淋巴细胞转化值及增殖指数的影响 脾淋巴细胞转化值可作为评价小鼠脾淋巴细胞免疫功能的重要指标^[22]。如图 12 所示,脾淋巴细胞的转化值随植物乳杆菌 KLDS 1.0328 浓度的升高而显著升高 ($P<0.05$),具有剂量依赖关系,当菌数与淋巴细胞数之比为 100:1 时,脾淋巴细胞的转化值显著大于比例 10:1 和 1:1 试验组以及 ConA 阳性对照组($P<0.05$),能够很好地调节脾淋巴细胞活性。

当脾淋巴细胞增殖指数(PI)大于 1 时乳杆菌促进淋巴细胞增殖。由图 13 可知,植物乳杆菌 KLDS 1.0328 浓度与促进小鼠脾淋巴细胞的增殖作用呈剂量依赖关系。当乳杆菌与脾淋巴细胞间比例达 100:1 时,对应的 PI 值大于 1,且显著大于阳性对照($P<0.05$)。李雪等^[23]在研究植物乳杆菌对小鼠脾淋巴细胞增殖能力时发现,只有当乳杆菌含量为 10^7 CFU/mL 时可促进脾淋巴细胞的转化。本研究表明植物乳杆菌 KLDS 1.0328 具有提高小鼠脾淋巴细胞增殖的作用,可潜在地促进该细胞的免疫应答。

2.5.2 植物乳杆菌 KLDS 1.0328 对腹腔巨噬细胞能量代谢水平及吞噬中性红能力的影响 不同剂量植物乳杆菌 KLDS 1.0328 对小鼠腹腔巨噬细胞能量代谢的影响见图 14。当活菌数和巨噬细胞间



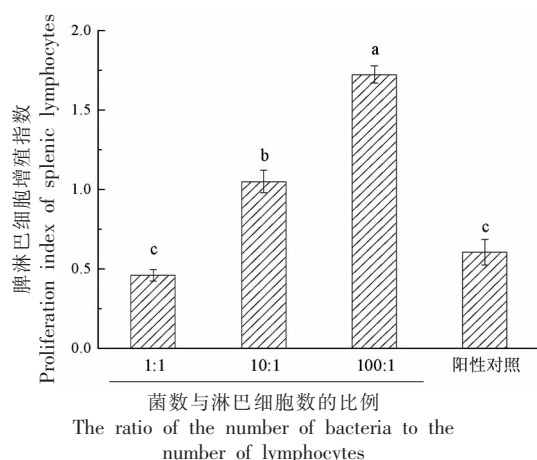
注:不同小写字母代表不同样品间差异显著($P<0.05$)。

图 12 植物乳杆菌 KLDS 1.0328 对小鼠脾淋巴细胞转化值的影响

Fig.12 Effect of *L. plantum* KLDS 1.0328 on the transformation of splenic lymphocytes of mice

比例达 10:1 及 100:1 时,巨噬细胞能量代谢水平都显著强于阴性对照组($P<0.05$),且 100:1 剂量组对小鼠腹腔巨噬细胞能量代谢水平的提高最为明显。

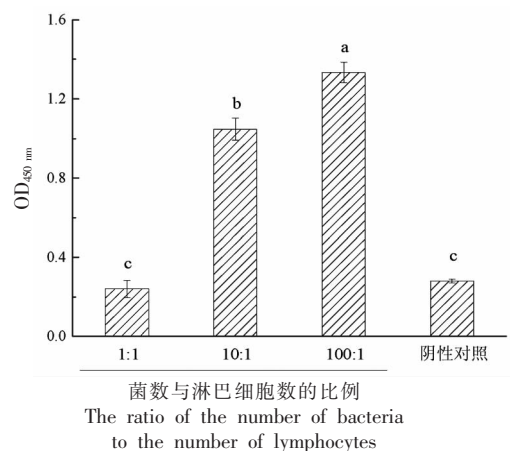
通过分析腹腔巨噬细胞吞噬中性红的能力,研究植物乳杆菌 KLDS 1.0328 对腹腔巨噬细胞吞噬的影响。OD_{540 nm} 值越大,巨噬细胞的吞噬能力越高。从图 15 可发现,随着植物乳杆菌 KLDS 1.0328 与巨噬细胞间比例的提高,对中性红的吞噬能力提高。Lim 等^[24]报道乳杆菌促进抗体的产



注:不同小写字母代表不同样品之间差异显著($P<0.05$)。

图 13 植物乳杆菌 KLDS 1.0328 对小鼠脾淋巴细胞增殖指数的影响

Fig.13 Effect of *L. plantarum* KLDS 1.0328 on the proliferation index of splenic lymphocytes of mice



注:不同小写字母表示不同样品之间差异显著($P<0.05$)。

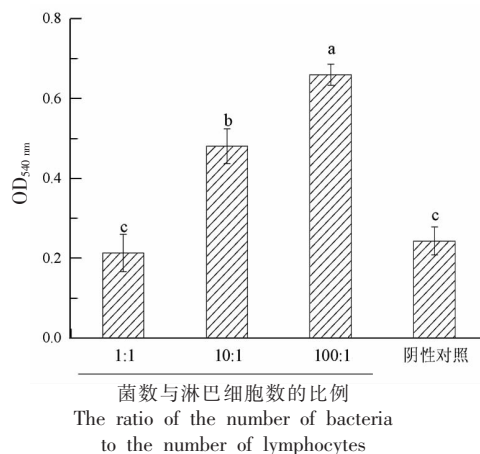
图 14 植物乳杆菌 KLDS 1.0328 对腹腔巨噬细胞能量代谢水平的影响

Fig.14 Effect of *L. plantarum* KLDS 1.0328 on the energy metabolism of abdominal macrophages of mice

生,激活巨噬细胞,与刺激免疫应答直接相关。本研究表明植物乳杆菌 KLDS 1.0328 在一定剂量下提高巨噬细胞对中性红的吞噬功能,具有参与机体非特异性免疫的能力。

3 结论

对 16 株乳杆菌的体外益生特性进行评估,结果植物乳杆菌 KLDS 1.0328 的无细胞发酵上清液



注:不同小写字母表示不同样品之间差异显著($P<0.05$)。

图 15 植物乳杆菌 KLDS 1.0328 对腹腔巨噬细胞吞噬中性红能力的影响

Fig.15 Effect of *L. plantarum* KLDS 1.0328 on the phagocytosis of neutral red in abdominal macrophages of mice

对抗抗病原菌的效果良好,具有较强的体外黏附 Caco-2 细胞能力,可分别通过竞争、排阻及置换 3 种方式抑制 3 株病原菌对 Caco-2 细胞黏附,体外模拟胃肠道环境胁迫下的耐受性显著高于其它试验乳杆菌($P<0.05$),对免疫细胞活性表现出良好的调节功效,且呈剂量依赖效应。这说明植物乳杆菌 KLDS 1.0328 为具有益生功效的菌株,可进一步开发及研究。

参 考 文 献

- [1] CHENG D, SONG J, XIE M, et al. The bidirectional relationship between host physiology and microbiota and health benefits of probiotics: A review [J]. Trends in Food Science & Technology, 2019, 91: 426-435.
- [2] CHEN S, CHEN L, CHEN L, et al. Potential probiotic characterization of *Lactobacillus reuteri* from traditional Chinese highland barley wine and application for room-temperature-storage drinkable yogurt [J]. Journal of Dairy Science, 2017, 101(7): 5780-5788.
- [3] MA J G, WANG W, SUN C B, et al. Effects of environmental stresses on the physiological characteristics, adhesion ability and pathogen adhesion in-

- hibition of *Lactobacillus plantarum* KLDS 1.0328[J]. Process Biochemistry, 2020, 92: 426–436.
- [4] GÓMEZ N, RAMIRO J, QUECAN B, et al. Use of potential probiotic lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *Escherichia coli* O157: H7 biofilms formation[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 863.
- [5] ZHAO J, TIAN F, YAN S, et al. *Lactobacillus plantarum* CCFM10 alleviating oxidative stress and restoring the gut microbiota in d-galactose-induced aging mice[J]. Food & Function, 2018, 9(2): 917–924.
- [6] MA J G, XU C, YU H L, et al. Electro-encapsulation of probiotics in gum Arabic-pullulan blend nanofibres using electrospinning technology[J]. Food Hydrocolloids, 2021, 111: 106381.
- [7] HOJJATIA M, BEHABAHANIA B A, FALAHB F. Aggregation, adherence, anti-adhesion and antagonistic activity properties relating to surface charge of probiotic *Lactobacillus brevis* gp104 against *Staphylococcus aureus*[J]. Microbial Pathogenesis, 2020, 147: 104420.
- [8] GARCÍA -RUIZ A, LLANO D, ESTEBAN - FERNÁNDEZ A, et al. Assessment of probiotic properties in lactic acid bacteria isolated from wine [J]. Food Microbiology, 2014, 44: 220–225.
- [9] GONG H, MENG X, WANG H. Plantaricin MG active against Gram-negative bacteria produced by *Lactobacillus plantarum* KLDS 1.0391 isolated from 'Jiaoke', a traditional fermented cream from China [J]. Food Control, 2010, 21(1): 89–96.
- [10] TUO Y, YU H, AI L, et al. Aggregation and adhesion properties of 22 *Lactobacillus* strains[J]. Journal of Dairy Science, 2013, 96(7): 4252–4257.
- [11] ZHANG W, WANG H, LIU J, et al. Adhesive ability means inhibition activities for *Lactobacillus* against pathogens and S-layer protein plays an important role in adhesion[J]. Anaerobe, 2013, 22: 97–103.
- [12] AMROUCHE T, BOUTIN Y, PRIOULT G, et al. Effects of bifidobacterial cytoplasm, cell wall and exopolysaccharide on mouse lymphocyte proliferation and cytokine production[J]. International Dairy Journal, 2006, 16(1): 70–80.
- [13] GALDEANO C M, LEBLANC A, VINDEROLA G, et al. Proposed model: Mechanisms of immunomodulation induced by probiotic bacteria[J]. Clinical and Vaccine Immunology, 2007, 14(5): 485–492.
- [14] LIM S M, KIM D H. *Bifidobacterium adolescentis* IM38 ameliorates high-fat diet-induced colitis in mice by inhibiting NF- κ B activation and lipopolysaccharide production by gut microbiota [J]. Nutrition Research, 2017, 41: 86–96.
- [15] HALIMI S, MIRSALEHIAN A. Assessment and comparison of probiotic potential of four *Lactobacillus* species isolated from feces samples of Iranian infants[J]. Microbiology and Immunology, 2016, 60(2): 73–81.
- [16] GARCÍA -CAYUELA T, KORANY A M, BUSTOS I, et al. Adhesion abilities of dairy *Lactobacillus plantarum* strains showing an aggregation phenotype [J]. Food Research International, 2014, 57: 44–50.
- [17] SOPHATHA B, PIWAT S, TEANPAISAN R. Adhesion, anti-adhesion and aggregation properties relating to surface charges of selected *Lactobacillus* strains: study in Caco-2 and H357 cells[J]. Archives of Microbiology, 2020, 202(6): 1349–1357.
- [18] IGLESIAS M, VIÑAS I, COLÁS-MEDÀ P, et al. Adhesion and invasion of *Listeria monocytogenes* and interaction with *Lactobacillus rhamnosus* GG after habituation on fresh-cut pear[J]. Journal of Functional Foods, 2017, 34: 453–460.
- [19] TULINI F, WINKELSTRÖTER L, de MARTINIS E. Identification and evaluation of the probiotic potential of *Lactobacillus paraplantarum* FT259, a bacteriocinogenic strain isolated from Brazilian semi-hard artisanal cheese[J]. Anaerobe, 2013, 22: 57–63.
- [20] TARANTO M, MURGA M, LORCA G, et al. Bile salts and cholesterol induce changes in the lipid cell membrane of *Lactobacillus reuteri*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2003, 95(1): 86–91.
- [21] MATHARA J, SCHILLINGER U, KUTIMAET P, al. Functional properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Maasai traditional fermented milk products in Kenya [J]. Current Microbiology, 2008, 56(4): 315–321.
- [22] 万峰, 孙思睿, 侯雨佳, 等. 婴儿源动物双歧杆菌消化道胁迫抗性及其体外对免疫细胞活性影响的比较 [J]. 食品科学, 2019, 40(22): 118–125.
- WAN F, SUN S R, HOU Y J, et al. Comparison of resistance of *Bifidobacterium animalis* strains iso-

- lated from infants to simulated gastrointestinal stress and effect of selected strain on activities of immune cells *in vitro*[J]. Food Science, 2019, 40(22): 118–125.
- [23] 李雪. *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0391 和 KLDS1.0706 益生潜能的体外评价[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2015.
- LI X. Probiotic potential *in vitro* of *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0391 and KLDS1.0706[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2015.
- [24] LIM S, JEONG J, JANG S, et al. A mixture of the probiotic strains *Bifidobacterium longum* CH57 and *Lactobacillus brevis* CH23 ameliorates colitis in mice by inhibiting macrophage activation and restoring the Th17/Treg balance[J]. Journal of Functional Foods, 2016, 27: 295–309.

Simulated Gastrointestinal Stress Tolerance and Immunomodulatory Activity of Probiotic *Lactobacillus* with the Ability to Inhibit Pathogenic Bacteria

Yu Wei, Miao Yusi, Li Yanan, Liu Xin, Hou Juncai, Ma Jiage*

(College of Food Science, Northeast Agricultural University, Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education, Harbin 150030)

Abstract In this study, 16 strains of *Lactobacillus* were analyzed for their antibacterial ability against pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*, adhesion and intervention of pathogenic bacteria to Caco-2 cells, resistance to acid and bile salt stress and regulatory activity to immune cells. The results showed that the diameter of inhibition zone corresponding to the cell-free supernatant of *L. plantarum* KLDS 1.0328 was more than 15 mm. Using *Lactobacillus rhamnosus* LGG as control, six *Lactobacillus* strains with stronger or equivalent adhesion ability to Caco-2 cells *in vitro* were screened. Four strains with strong inhibitory ability to Caco-2 cells were further screened based on the competition, exclusion and displacement tests. The inhibition rates of *L. plantarum* KLDS 1.0328 for competition of *S. typhimurium* was $(72.52 \pm 4.94)\%$. Additionally, it is confirmed that *L. plantarum* KLDS 1.0328 has strong tolerance to acids and bile salts, has a good regulatory effect on immune cell activity, and has the potential for further development and application in food industry.

Keywords *Lactobacillus plantarum*; antimicrobial activity; adhesion; tolerance; immunomodulation