

可缓解食物过敏的热灭活乳酸菌的筛选及其全基因组分析

郑 淼, 何梦丽, 方如雪, 满朝新, 张 宇, 杨鑫焱, 赵倩玉, 姜毓君*

(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 食物过敏(FA)是指人体免疫系统对特定食物产生的异常反应,会导致消化道、呼吸道、皮肤和心血管系统等多个系统的不适。本文通过透明质酸酶抑制试验和 RBL-2H3 细胞试验,从 20 株乳酸菌中筛选出抗过敏活性较强的热灭活副干酪乳杆菌 JY56。随后,通过全基因组测序和体外安全性试验,评价副干酪乳杆菌 Y56 菌株的安全性。最后,构建卵清蛋白(OVA)诱导的 FA 小鼠模型,明确 HK-副干酪乳杆菌 JY56 对 FA 小鼠临床症状的缓解效果。结果表明, HK-副干酪乳杆菌 JY56 具有较高的 β -氨基己糖苷酶(β -HEX)抑制率,其干预后细胞因子 IL-4、IL-5、IL-13、TNF- α 的含量显著降低。全基因组测序分析发现副干酪乳杆菌 JY56 不具有毒性和传递接收抗生素耐药基因的能力。抗生素敏感性试验、溶血试验、有害代谢产物评价等安全性评价试验表明副干酪乳杆菌 JY56 对常用抗生素具有敏感性,不产生溶血作用和有害代谢产物。上述说明副干酪乳杆菌 JY56 具有安全性,其灭活菌体可用于后续研究。OVA 刺激后会导致小鼠的体质量和直肠温度降低,过敏评分提高,而 HK-副干酪乳杆菌 JY56 干预后可以明显缓解小鼠过敏症状。本研究结果为 HK-副干酪乳杆菌 JY56 用于缓解食物过敏及相关疾病提供理论依据。

关键词 热灭活; 乳酸菌; 食物过敏; 副干酪乳杆菌; 全基因组; 安全性

文章编号 1009-7848(2024)09-0141-14 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.09.014

食物过敏(Food Allergy, FA)是指机体摄入特定食物后产生的免疫系统反应,通常由各种食物来源中发现的蛋白质抗原引起^[1-2]。FA 会引起多种临床症状,包括口腔或耳朵瘙痒、鼻炎、哮喘、呕吐、腹泻、呼吸困难等,严重者甚至导致休克、死亡^[3]。近年来,全球 FA 发生率显著增加。据世界过敏组织(World Allergy Organization, WAO)白皮书报告,全球大约有 2.5 亿人患有 FA^[4]。中国疾控中心最新研究显示,我国自我报告和医院诊断的 FA 综合患病率为 8%,其中自我报告的 FA 患病率为 12%,而医院诊断的 FA 患病率为 5%。此外,2009—2018 年我国 FA 患病率为 8%,高于 1999—2008 年(5%),呈上升趋势^[5]。以上调查数据说明 FA 在不同国家、不同年龄阶段的人群中普遍发生,且患病率逐年升高,已成为一个全球性公共健康问题。FA 是一种复杂的免疫性疾病,目前没有完全治愈的方法,最主要、有效的预防手段仍是避免接触和摄入被确定为过敏原的食物^[6]。由于膳食的复杂性,仅对患者进行饮食管理,不能完全避免

FA 的发生,仍需通过其它手段对 FA 进行治疗。目前针对 FA 的治疗方法主要包括过敏原特异性免疫疗法和非特异性免疫疗法两类。过敏原特异性免疫疗法指反复给患者摄入不同剂量、浓度的食物过敏原(剂量由小到大,浓度由低到高),使患者不发生过敏反应或减轻过敏反应,包括口服免疫疗法(OIT)、舌下免疫疗法(SLIT)和皮下免疫疗法(EPIT)^[7]。虽然过敏原特异性免疫疗法在脱敏方面有显著的功效,但是有可能引起过敏反应及胃肠道症状等全身性副作用^[8]。非特异性免疫疗法包括抗过敏药物、单克隆抗体、天然生物活性物质和益生菌等。抗过敏药物主要包括抗组胺药物、肾上腺素和糖皮质激素等,其作用效果虽迅速,但可能会产生耐药性和药物副作用^[9]。单克隆抗体主要包括单克隆抗 IgE 抗体和抗 IL-5 单克隆抗体等,虽成功用于 FA 的治疗中,但需有资质的医疗机构才可以实施^[9]。继续寻找天然抗过敏物质,如海藻或非藻类来源的多糖、中药和药用植物等,是预防或治疗各种免疫疾病的重要来源物质^[10]。

益生菌因具有诸多健康功效而被广泛应用于食品加工、医疗、农业,甚至水产养殖业生产^[11]。然而,益生菌易受加工、储存及胃肠道环境的影响,在一定程度上限制了其应用^[12]。此外,使用活的益

收稿日期: 2023-09-02

基金项目: 黑龙江省自然科学基金联合引导项目(LH2023C033)

第一作者: 郑淼,女,硕士

通信作者: 姜毓君 E-mail: yujun_jiang@163.com

生菌还可能存在以下风险:易位引起的全身感染,特别是易感患者和儿科人群;获得抗生素抗性基因;干扰新生儿的肠道定植^[10]。为了避免这些风险,近年来研究者将研究目标转向微生物细胞提取物或灭活微生物,尤其是热灭活益生菌。目前,日本、美国、俄罗斯、德国等国家的研究者在灭活益生菌的基础研究与应用方面有较深入的研究,其中研究较多的种属包括灭活乳杆菌属、灭活双歧杆菌属、灭活枯草杆菌和部分灭活链球菌类。我国益生菌研究起步较晚,目前其功能性研究多局限于活菌,关于灭活益生菌和其制品方面的研究较少^[13]。目前灭活益生菌已被证明具有潜在的抗过敏功能,其可能通过调节 Th1/Th2 平衡,增加 Treg 和 Th17 细胞的比例,调节 DC 的抗原呈递能力,抑制肥大细胞的激活,增强肠道屏障,调节肠

道菌群及其代谢物等机制,改善过敏机体的免疫应答,进而缓解 FA。

本研究通过体外透明质酸酶抑制试验和 RBL-2H3 细胞试验,从实验室保藏的 20 株乳酸菌中筛选出抗过敏活性较强的 HK-副干酪乳杆菌 JY56。通过全基因组测序和安全性试验评价副干酪乳杆菌 JY56 的安全性。通过 OVA 诱导的过敏小鼠动物模型,验证 HK-副干酪乳杆菌 JY56 对过敏小鼠临床症状的缓解作用,旨在为热灭活乳酸菌在抗过敏及相关疾病的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验菌株、细胞与动物

试验菌株:本试验所用菌株选取自实验室自主分离和保藏的菌株。试验菌株具体信息见表 1。

表 1 试验菌株
Table 1 The strains of the experiment

试验菌株	编号	来源
格氏乳杆菌	JM1	健康婴儿粪便
罗伊氏乳杆菌	J1	西藏地区传统发酵乳制品
副干酪乳杆菌	JY062、JY56、TD060、TD089、TD091、TD099	西藏地区传统发酵乳制品
植物乳杆菌	63-16、63-15、63-17、64-14、43-11、100-4	西藏地区传统发酵乳制品
鼠李糖乳杆菌	20-1、20-3、20-37、19-1、19-36、JL-1	健康婴儿粪便
	LGG	本实验室保藏
大肠杆菌	ATCC25922	本实验室保藏
金黄色葡萄球菌	ATCC25923	本实验室保藏

试验细胞:大鼠嗜碱性细胞白血病细胞 RBL-2H3,购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

实验动物:5 周龄雌性 BALB/c 小鼠,购自北京维通利华有限公司。

1.2 主要材料与试剂

MRS 肉汤培养基、哥伦比亚血琼脂基础、胰蛋白胍水培养基、硝酸盐培养基,青岛海博生物技术有限公司;PBS 缓冲液、透明质酸酶、透明质酸钠、对二甲氨基苯甲醛、乙酰丙酮、青链霉素混合液(双抗)、胰酶、CCK-8 试剂盒、无菌脱纤维绵羊血,北京索莱宝科技有限公司;DMEM 高糖培养液、胎牛血清,赛默飞世尔科技有限公司;抗 DNP-IgE 单抗、卵清蛋白(OVA),美国 Sigma;精氨酸双水解酶实验培养基、赖氨酸脱羧酶实验培

养基、鸟氨酸脱羧酶实验培养基,山东拓普生物工程有限公司;DNP-BSA,美国 Biosearch Technologies 公司;4-硝基苯-N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷,阿拉丁试剂(上海)有限公司;抗生素药敏纸片,杭州微生物试剂有限公司;小鼠饲料,沈阳茂华生物科技有限公司;小鼠白介素(IL)酶联免疫试剂盒,上海酶联生物科技有限公司。

1.3 设备与仪器

Multifuge X1 X1R 高速冷冻离心机,Thermo Fisher Scientific;HF90CO2 细胞培养箱,上海力申科学仪器有限公司;BCN1360 型生物洁净工作台,北京东联哈尔仪器制造有限公司;HH-W-600 电热恒温水浴锅,上海精密仪器仪表有限公司;INFINITE M200 PRO 多功能酶标仪,美国 Molecular

Devices 公司。

1.4 热灭活益生菌的制备

将冻存在 -80°C 冰箱的保藏菌株以5%的接种量接种于无菌MRS液体培养基中, 37°C 培养18 h。将活化的菌液 4°C , 6 000 r/min 离心5 min, 收集菌体,并用PBS洗涤3次,重悬成菌悬液,调整菌浓度为 5×10^9 CFU/mL。将菌悬液放至 85°C 水浴锅中加热30 min,进行热灭活处理后,置于 -20°C 冰箱保存备用。同时将灭活后的菌悬液涂布于MRS固体培养基上, 37°C 培养48 h,无菌落生成。

1.5 具有抗过敏功能的热灭活益生菌的体外筛选

1.5.1 透明质酸酶抑制试验 根据雷文平等^[14]的方法稍作修改后测定,向A、C试管中加入0.5 mL 400~1 000 U/mL的透明质酸酶溶液,B、D试管中加入pH=5.6的醋酸缓冲液,同时向A、B、C、D试管中分别加入0.1 mL 2.5 mmol/L的氯化钙溶液, 37°C 处理20 min。取热灭活的益生菌菌悬液0.5 mL于A、B试管,蒸馏水0.5 mL于C、D试管, 37°C 处理20 min。向A、C试管中加入0.5 mL 0.4 mg/mL的透明质酸钠溶液,B、D试管中加入pH=5.6的醋酸缓冲液, 37°C 处理40 min,室温静置10 min。同时向4支试管中分别加入0.5 mL乙酰丙酮溶液和0.1 mL 0.4 mol/mL的氢氧化钠溶液,振荡混匀,沸水浴15 min后,立即冰浴10 min,冷却至室温。向4支试管中分别缓慢加入1 mL Ehrlich试剂,振荡混匀,室温静置显色30 min,在530 nm波长下测定各试管吸光度,以鼠李糖乳杆菌LGG作为对照菌株。根据式(1)计算样品透明质酸酶抑制率。

$$\text{透明质酸酶抑制率}(\%) = \frac{(C-D)-(A-B)}{C-D} \times 100 \quad (1)$$

式中:A为试验组吸光度(透明质酸酶溶液+试样+透明质酸钠溶液);B为试样空白组吸光度(醋酸缓冲液+试样+醋酸缓冲液);C为对照组吸光度(透明质酸酶溶液+蒸馏水+透明质酸钠溶液);D为空白组吸光度(醋酸缓冲液+蒸馏水+醋酸缓冲液)。

1.5.2 细胞活性的测定 取处于对数生长期的RBL-2H3细胞,制成细胞悬液,接种到96孔板中,每孔加入100 μL 细胞悬液,细胞数调整至 $1\times$

10^5 cells/孔,放入 37°C 培养箱中,预培养24 h。向培养板加入不同浓度的灭活菌悬液,将培养板在培养箱中孵育24 h。每孔加入10 μL CCK-8溶液, 37°C 培养箱中孵育2 h,测定其在450 nm波长处的吸光度。分别设置空白组(不加细胞)、对照组(只加细胞不加菌液)、不同浓度的菌液处理组。根据式(2)计算细胞活力,确定不同菌浓度(10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} CFU/mL)对RBL-2H3细胞活力的影响,并选取适宜的菌浓度进行干预。

$$\text{细胞活力}(\%) = \frac{[A_{(\text{加药})} - A_{(\text{空白})}]}{[A_{(0\text{加药})} - A_{(\text{空白})}]} \times 100 \quad (2)$$

式中: $A_{(\text{加药})}$ 为试验孔吸光度(加入菌液和细胞); $A_{(\text{空白})}$ 为空白孔吸光度(只加菌液不加细胞); $A_{(0\text{加药})}$ 为对照孔吸光度(只加细胞不加菌液)。

1.5.3 细胞脱颗粒 β -HEX释放的测定 根据Lei等^[15]的方法稍作修改后测定,取处于对数生长期的RBL-2H3细胞,制成细胞悬液,接种于24孔板中,每孔加入1 mL细胞悬液,细胞数调整至 1×10^5 cells/孔,置于培养箱中孵育24 h。加入终质量浓度为0.5 $\mu\text{g/mL}$ 的抗DNP-IgE单抗,置于培养箱中培养12 h,弃去培养板中的上清,用无菌的PBS溶液洗涤2次,分别设置正常组、致敏组和样品组,样品组加入浓度为 10^9 CFU/mL的不同菌株样品,其余组用等体积的DMEM培养基代替,孵育1 h。然后除正常组外每组加入终质量浓度为0.25 $\mu\text{g/mL}$ 的DNP-BSA放入培养箱中激发1 h,正常组加入等量PBS缓冲液代替,冰浴10 min以终止对细胞的激发。收集各组细胞培养上清液于EP管中,然后向每孔加入100 μL 细胞裂解液裂解板底细胞,处理5 min。吸取各组收集的细胞上清液和细胞裂解液各50 μL 至新的96孔培养板中,每孔加入50 μL 显色液,放在培养箱中孵育90 min,然后每孔加入200 μL 终止液终止反应,用酶标仪测定其在405 nm波长处的吸光度,根据式(3)和(4)计算样品的脱颗粒效率和脱颗粒抑制率。

$$\text{脱颗粒效率}(\%) = \frac{\text{OD}_{\text{上清}}}{(\text{D}_{\text{上清}} + \text{OD}_{\text{细胞裂解液}})} \times 100 \quad (3)$$

$$\text{脱颗粒抑制率}(\%) = \frac{(\text{致敏孔脱颗粒效率} - \text{样品孔脱颗粒效率})}{(\text{致敏孔脱颗粒效率} - \text{正常孔脱颗粒效率})} \times 100 \quad (4)$$

1.5.4 细胞因子的测定 用 DNP-BSA 激发细胞后,分别取各组细胞上清液,按照 ELISA 试剂盒说明书测定 IL-4、IL-5、IL-13、TNF- α 的释放量。

1.6 副干酪乳杆菌 Y56 全基因组分析

1.6.1 副干酪乳杆菌 JY56 基因文库构建 将副干酪乳杆菌 JY56 在 MRS 液体培养基中,37 °C 条件下,传代培养 24 h,传 2 代培养至对数期后,8 000 r/min 的条件下,离心 5 min,取菌泥,用 PBS 洗涤 2 次。提取副干酪乳杆菌 JY56 的基因组 DNA,利用 Qubit 检测 DNA 总量,通过琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性,基因组 DNA 样品经质检合格后用于构建文库和上机测序。采用全基因组鸟枪法策略,同时利用第 2 代测序技术和第 3 代单分子测序技术,基于 Illumina NovaSeq 测序平台和 Pacbio Sequel 测序平台进行测序。

1.6.2 测序评估及基因组分分析 测序数据评估:使用 FastQC 对二代测序数据的质量进行控制,评估测序数据的碱基质量分布及平均质量分布,过滤掉下机数据中低质量的 reads,获取高质量的测序数据^[16]。

基因组序列拼装:使用 Unicycler、HiFiasm、Flye 等软件对 Pacbio 获得的下机数据进行拼装,获得 Contig 序列。使用 Pilon 软件利用二代的高质量数据对三代 Contig 结果进行校正,最后拼接得到完整的序列^[17]。

基因预测:采用 tRNAscan-SE、GeneMarkS、Barrnap、RepeatModeler 等软件对蛋白编码基因、非编码 RNA、重复序列、原噬菌体、基因岛等基因组成分进行预测分析。

1.6.3 基因功能注释 采用 Diamond 软件进行蛋白编码基因的序列比对,将得到的蛋白编码基因分别与 GO、COG、KEGG 功能数据库进行 BLAST 比对,设置序列比对的临界值,进行相关基因功能注释^[18]。

1.6.4 毒力基因及抗生素抗性分析 采用 BLAST 软件,将基因编码的蛋白质序列与毒力因子相关基因数据库以及抗生素抗性数据库当中的氨基酸序列进行比对,预测基因组中存在的毒力因子相关基因和抗生素抗性相关的基因,并设定 BLAST 比对参数,筛选统计序列比对结果^[19-20]。

1.7 副干酪乳杆菌 JY56 安全性试验

1.7.1 抗生素敏感性试验 采用琼脂平板药敏纸片扩散法测定副干酪乳杆菌 JY56 对常见抗生素的敏感性,每个药敏纸片测定 3 个平行,观察并测量记录抑菌圈的直径,菌株药敏结果判断参照 CLSI 的最新版标准^[21]。

1.7.2 溶血试验 将副干酪乳杆菌 JY56 用无菌接种环接种至哥伦比亚血琼脂培养基中,选取金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 作为对照菌株。若菌落周围观察到绿色半透明溶血圈,为 α -溶血;若菌落周围观察到透明圈为 β -溶血;若菌落周围未观察到溶血现象,为 γ -溶血即不溶血^[22]。

1.7.3 吲哚试验 将副干酪乳杆菌 JY56 接种到蛋白胨水培养基中,放置于培养箱中 37 °C 培养 72 h,培养结束后滴加 5~10 滴吲哚试剂,选取大肠杆菌 ATCC 25922 作为对照菌株。观察结果,若滴加吲哚试剂后形成红色环为阳性,否则为阴性^[23]。

1.7.4 硝酸盐还原酶活性测定试验 将副干酪乳杆菌 JY56 以 3% 的接种量接种到硝酸盐培养基中,放置于培养箱中 37 °C 培养 5 d,分别滴加 10 滴 5% 的 KI 溶液和 10 滴 5% 的淀粉溶液,摇匀观察结果,选取大肠杆菌 ATCC 25922 作为对照菌株。滴加试剂后,培养基溶液变为蓝色为阳性,不变色为阴性^[22]。

1.7.5 氨基酸脱羧试验 将副干酪乳杆菌 JY56 以 3% 的接种量分别接种到精氨酸双水解酶试验培养基、赖氨酸脱羧酶试验培养基和鸟氨酸脱羧酶试验培养基中,放置于培养箱中 37 °C 培养 72 h,摇匀观察结果,选取大肠杆菌 ATCC 25922 作为对照菌株。培养后培养基颜色呈紫色的为阳性,培养基颜色呈黄色的为阴性^[23]。

1.8 热灭活副干酪乳杆菌 JY56 缓解卵清蛋白诱导的小鼠过敏

1.8.1 实验动物的分组及模型的建立 动物实验在 Li 等^[24]的研究基础上设计和修改。实验动物选用 48 只雌性 BALB/c 小鼠(5 周龄),以 (22 \pm 2)°C 的温度和 (55 \pm 5)% 的湿度喂养,12 h 昼夜交替,小鼠自由采食和饮水。适应喂养 1 周后,将小鼠随机分成 5 组($n=8$ 只/组):正常组(NC)、OVA 致敏组(OVA)、低剂量组(LLP,1 \times 10⁷ CFU/d HK-副干酪

乳杆菌 JY56 溶于 0.2 mL PBS 溶液)、中剂量组 (MLP, 1×10^8 CFU/d HK-副干酪乳杆菌 JY56 溶于 0.2 mL PBS)、高剂量组 (HLP, 1×10^9 CFU/d HK-副干酪乳杆菌 JY56 溶于 0.2 mL PBS)。正常组小鼠在第 0 天和第 14 天腹腔注射 0.2 mL PBS, 其余各组小鼠分别在第 0 天和第 14 天腹腔注射 50 μ g OVA 和 2 mg 氢氧化铝佐剂 (溶于 0.2 mL PBS 中)。除正常组外, 各组小鼠分别在第 28, 31, 34, 37, 40, 43 天口服灌胃 50 mg OVA 进行激发, 共 6 次。NC 和 OVA 每天灌胃 0.2 mL PBS, 其余各组小鼠每天灌胃 0.2 mL 不同剂量的灭活菌悬液。

1.8.2 小鼠体质量测定及过敏症状评价 在第 0, 14, 28, 31, 34, 37, 40, 43 天测定各组小鼠体质量并记录, 共测定 8 次。最后一次刺激时, 用肛温温度计测量并记录刺激前后小鼠的直肠温度, 计算各组小鼠在刺激前后体温的变化, 每组选取 3 只进行测定。灌胃 1 h 内观察各组小鼠过敏症状, 进行评分。共分为 5 级: 0 分=无症状; 1 分=抓耳朵、鼻子; 2 分=眼睛、耳朵肿, 呼吸急促, 不活跃; 3 分=嘴巴、尾巴出现疹子, 哮喘, 呼吸困难; 4 分=灌胃后不动, 肌肉收缩, 抽筋; 5 分=死亡, 休克^[25]。

1.9 数据统计与分析

使用 SPSS 27.0 软件对试验数据进行单因素方差分析, 使用 Origin 软件和 GraphPad Prism 8.02 等软件进行绘图。试验结果以平均值 \pm 标准差 (Mean \pm SD) 表示。P<0.05 代表结果差异显著。

2 结果与分析

2.1 具有抗过敏功能的热灭活益生菌的体外筛选结果

2.1.1 透明质酸酶抑制试验结果 透明质酸酶抑制试验是体外快速筛选抗过敏药物的有效方法, 透明质酸酶抑制率越大抗过敏活性越强^[26]。20 株菌的透明质酸酶抑制率如图 1 所示, 所有菌株的透明质酸酶抑制率在 (11.68 \pm 1.35)%~(45.69 \pm 1.28)% 之间, 其中阳性菌株 HK-鼠李糖乳杆菌 LGG 抑制率最高, HK-加氏乳杆菌 JM1、HK-罗伊氏乳杆菌 J1、HK-副干酪乳杆菌 JY56、HK-鼠李糖乳杆菌 19-1、HK-鼠李糖乳杆菌 JL-1 和 HK-植物乳杆菌 3-17 的抑制率与 HK-鼠李糖乳杆菌

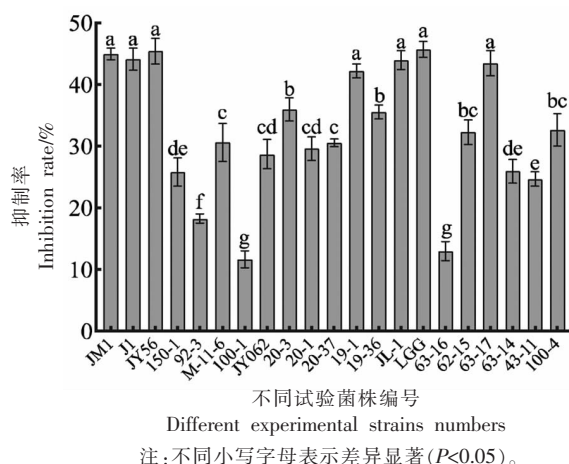


图1 透明质酸酶抑制活性

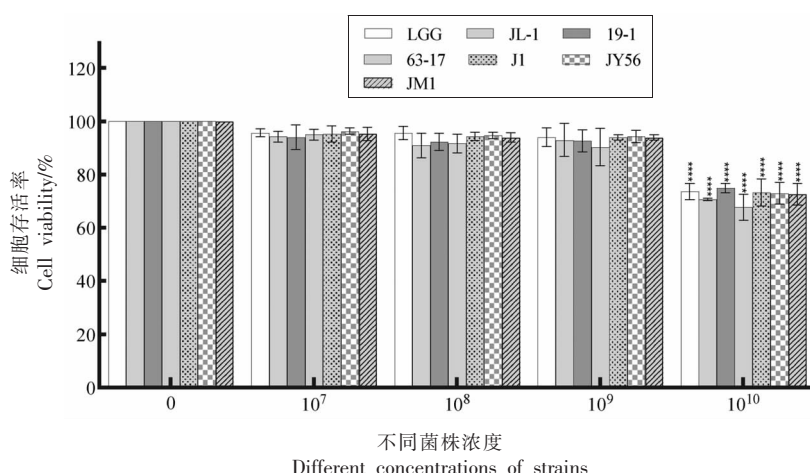
Fig.1 Hyaluronidase inhibitory activity

LGG 无显著性差异 ($P<0.05$), 根据透明质酸酶抑制率大小初步筛选以上 6 株菌进行下一步试验。

2.1.2 RBL-2H3 细胞活性测定结果 采用 CCK-8 法检测初步筛选的菌株不同菌浓度对 RBL-2H3 细胞存活率的影响, 以明确后续试验最佳浓度。结果如图 2 所示, 采用 10^7 , 10^8 CFU/mL 和 10^9 CFU/mL 3 个菌浓度对 RBL-2H3 细胞进行刺激时, 其存活率均高于 90%, 活性无显著变化 ($P<0.0001$)。当菌浓度为 10^{10} CFU/mL 时, RBL-2H3 细胞活性显著降低 ($P<0.0001$)。故选取 10^9 CFU/mL 的菌浓度进行后续试验。

2.1.3 β -HEX 释放测定结果 当肥大细胞或嗜碱性粒细胞受到过敏原刺激时, 会发生脱颗粒反应, 颗粒中的 β -HEX 随之释放出来^[27]。因此可通过测量细胞培养基中 β -HEX 的活性来评估 RBL-2H3 细胞的脱颗粒效率。根据试验所得的 OD 值计算出 β -HEX 的抑制率, 结果如图 3 所示, 所有待测菌株均可抑制 β -HEX 的释放, 其中 HK-副干酪乳杆菌 JY56 和 HK-罗伊氏乳杆菌 J1 具有较强的 β -HEX 抑制活性, 其抑制率分别为 (41.36 \pm 0.88)% 和 (37.61 \pm 1.15)%, 且 HK-副干酪乳杆菌 JY56 与对照菌株 HK-鼠李糖乳杆菌 LGG 的抑制率无显著性差异 ($P<0.05$)。

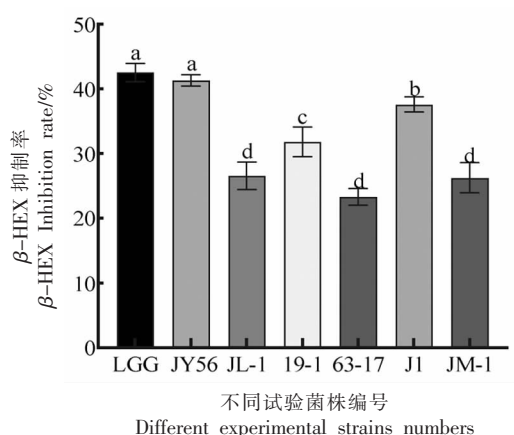
2.1.4 细胞因子测定结果 当肥大细胞或嗜碱性粒细胞活化脱颗粒后, 会释放 IL-4、IL-5、IL-13 和 TNF- α 等细胞因子, 引起过敏反应^[28]。本研究使用 ELISA 试剂盒测定细胞分泌的 IL-4、IL-5、IL-



注:显著性差异均与空白对照组相比,*: $P < 0.05$;**: $P < 0.01$;***: $P < 0.001$;****: $P < 0.0001$ 。

图2 不同浓度菌株对 RBL-2H3 细胞活性的影响

Fig.2 Effects of strains with different concentrations on the activity of RBL-2H3 cells



注:不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

图3 不同菌株对 RBL-2H3 细胞活化脱颗粒 β -HEX 的影响

Fig.3 Effect of different strains on the activation of degranulated β -HEX in RBL-2H3 cells

13 和 $\text{TNF-}\alpha$ 含量,结果如图 4 所示。由图 4a 可知不同菌株刺激后 IL-4 的含量与模型组相比均显著降低,其中对照菌株 HK-鼠李糖乳杆菌 LGG 和 HK-副干酪乳杆菌 JY56 作用效果最为显著,分别降低了 $(31.44 \pm 2.88) \text{ pg/mL}$ 和 $(32.02 \pm 1.21) \text{ pg/mL}$,且与正常组无显著性差异 ($P < 0.05$)。由图 4b 可知,与模型组相比,待测菌株刺激后均显著降低了 IL-5 的含量,其中 HK-罗伊氏乳杆菌 J1 和 HK-副干酪乳杆菌 JY56 作用效果最为显著,分别降低了 $(25.49 \pm 2.65) \text{ pg/mL}$ 和 $(28.59 \pm 1.69) \text{ pg/mL}$,HK-

副干酪乳杆菌 JY56 作用效果与对照菌株 HK-鼠李糖乳杆菌 LGG 和正常组无显著性差异 ($P < 0.05$)。由图 4c 可知,不同菌株刺激后 IL-13 的含量与模型组相比均显著降低,其中 HK-副干酪乳杆菌 JY56 和 HK-鼠李糖乳杆菌 JL-1 作用效果最为显著,分别降低了 $(47.39 \pm 0.68) \text{ pg/mL}$ 和 $(46.79 \pm 2.68) \text{ pg/mL}$,且与对照菌株 HK-鼠李糖乳杆菌 LGG 和正常组相比无显著性差异 ($P < 0.05$)。由图 4d 可知与模型组相比,所有菌株刺激后均显著降低了 RBL-2H3 细胞中 $\text{TNF-}\alpha$ 的含量,其中 HK-副干酪乳杆菌 JY56 和 HK-鼠李糖乳杆菌 19-1 作用效果最为显著,分别降低了 $(151.30 \pm 2.74) \text{ pg/mL}$ 和 $(152.09 \pm 3.42) \text{ pg/mL}$,与正常组相比无显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.2 副干酪乳杆菌 JY56 基因组特征分析结果

2.2.1 副干酪乳杆菌 JY56 基因组构成信息 将过滤获得的高质量 reads 数据进行拼接,对拼接得到的完整序列进行评价,经过对比得知副干酪乳杆菌 JY56 基因组由 1 个环状染色体(chr)和 4 个环状质粒(plasmid1-4)组成(图 5),共编码 2 863 个基因。染色体序列总长度为 2 704 929 bp,基因序列中 GC 含量百分比为 46.70%,编码 2 701 个基因,包含 15 个 rRNA 操纵子基因(5 个 5s rRNA、5 个 16s rRNA、5 个 23s rRNA),59 个 tRNA 基因,23 个基因岛,7 个原噬菌体。质粒 1 序列总长度为 44 721 bp,基因序列中 GC 含量百分比

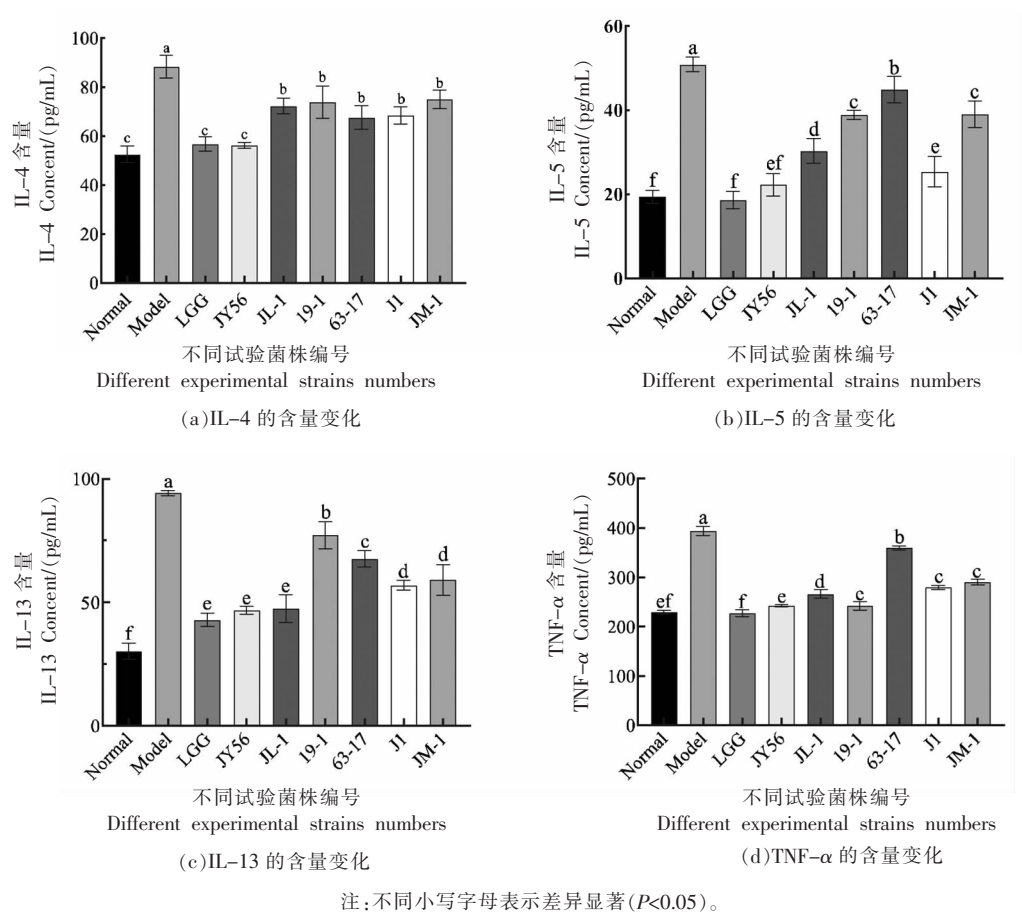
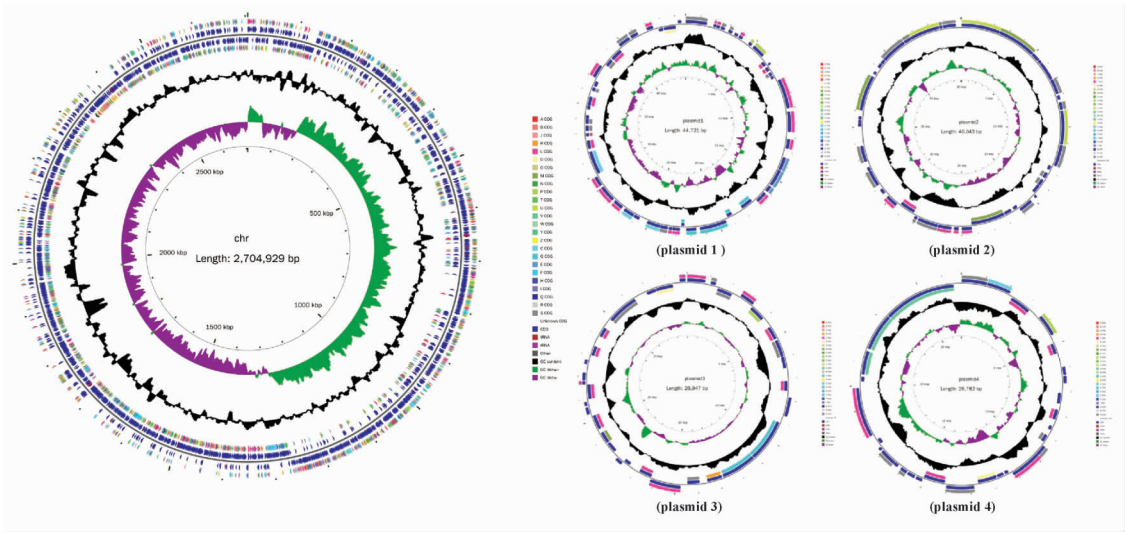


图 4 不同菌株对 RBL-2H3 细胞分泌细胞因子的影响

Fig.4 Effects of different strains on the secretion of cytokines by RBL-2H3 cells



注:从内到外,第1圈代表刻度;第2圈代表 GC Skew;第3圈代表 GC 含量;第4圈和第7圈代表每一个 CDS 所属的 COG;第5圈和第6圈代表 CDS、tRNA 及 rRNA 在基因组上的位置。

图 5 副干酪乳杆菌 JY56 基因组圈图

Fig.5 The genome cycle graph of *L. paracasei* JY56

为 42.46%, 编码 57 个基因。质粒 2 序列总长度为 40 042 bp, 基因序列中 GC 含量百分比为 44.41%, 编码 42 个基因。质粒 3 序列总长度为 28 947 bp, 基因序列中 GC 含量百分比为 42.22%, 编码 33 个基因。质粒 4 序列总长度为 26 782 bp, 基因序列中 GC 含量百分比为 41.30%。

2.2.2 基因功能注释 GO 功能注释是建立一套特定的词汇集合来描述生物学功能, 以此对基因

功能注释统一化。其将基因的功能分为三部分, 分别为基因的分子功能(Molecular function)、细胞组分(Cellular component)、参与的生物学过程(Biological process)。注释结果如图 6 所示, 利用 GO 数据库对副干酪乳杆菌 JY56 染色体基因组进行注释, 共注释到 1 865 个相关基因。其主要在生物学过程、分子功能、细胞氮化合物代谢过程、细胞过程、离子结合等基因上获得注释。

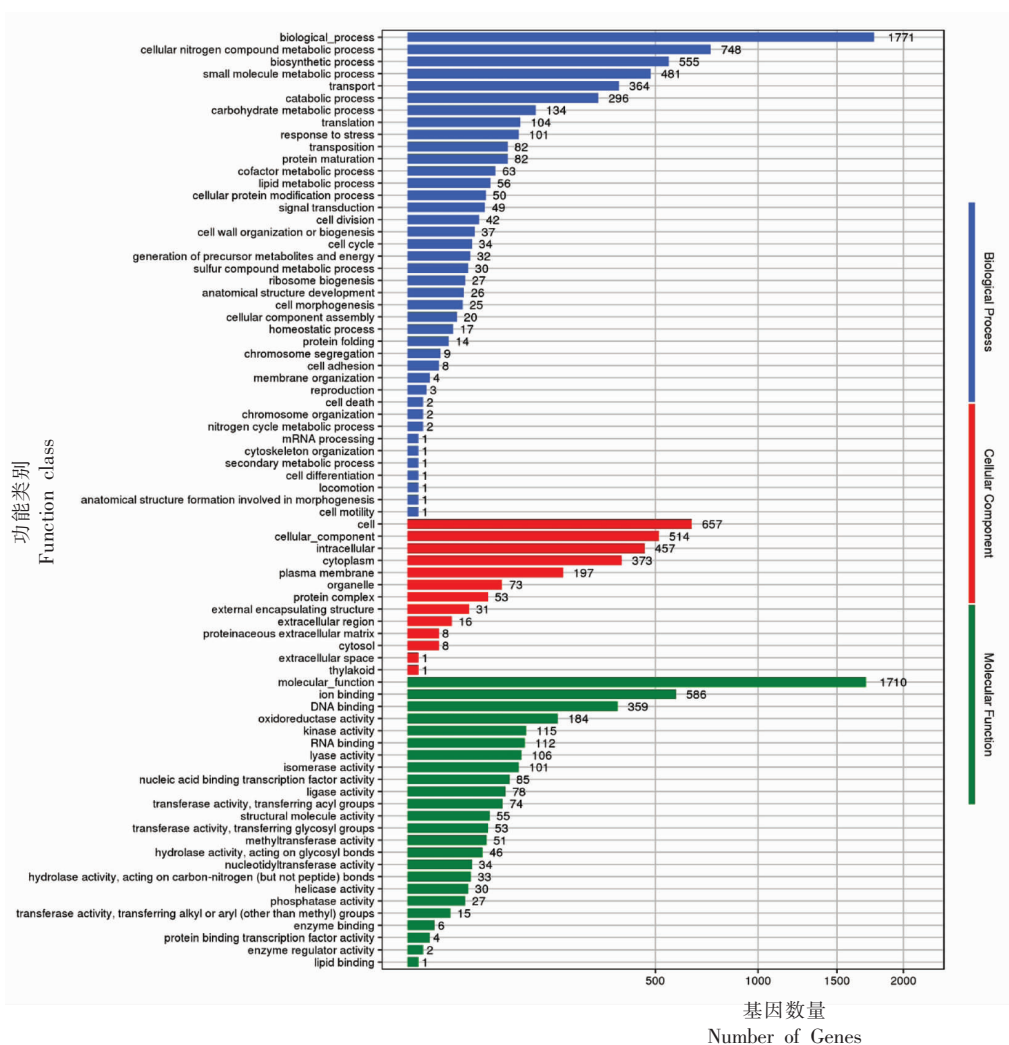


图 6 副干酪乳杆菌 JY56 GO 功能注释图

Fig.6 GO function annotation results of *L. paracasei* JY56

COG 数据库是利用已知蛋白比对未知序列, 将其注释到某一 COG 分类中, 用以推测该序列的生物学功能。注释结果如图 7 所示, 在副干酪乳杆菌 JY56 染色体基因组中, 有 2 226 个基因能够归类至 COG 功能分类数据库中。在功能已注释的基

因中, 参与 DNA 复制、重组和修复的基因最多有 259 个(9.59%), 其次参与碳水化合物运输和代谢的基因为 184 个(6.81%), 参与氨基酸运输和代谢的基因有 174 个(6.44%)。另外, 有 475 个蛋白编码基因在 COG 数据库中未得到注释。

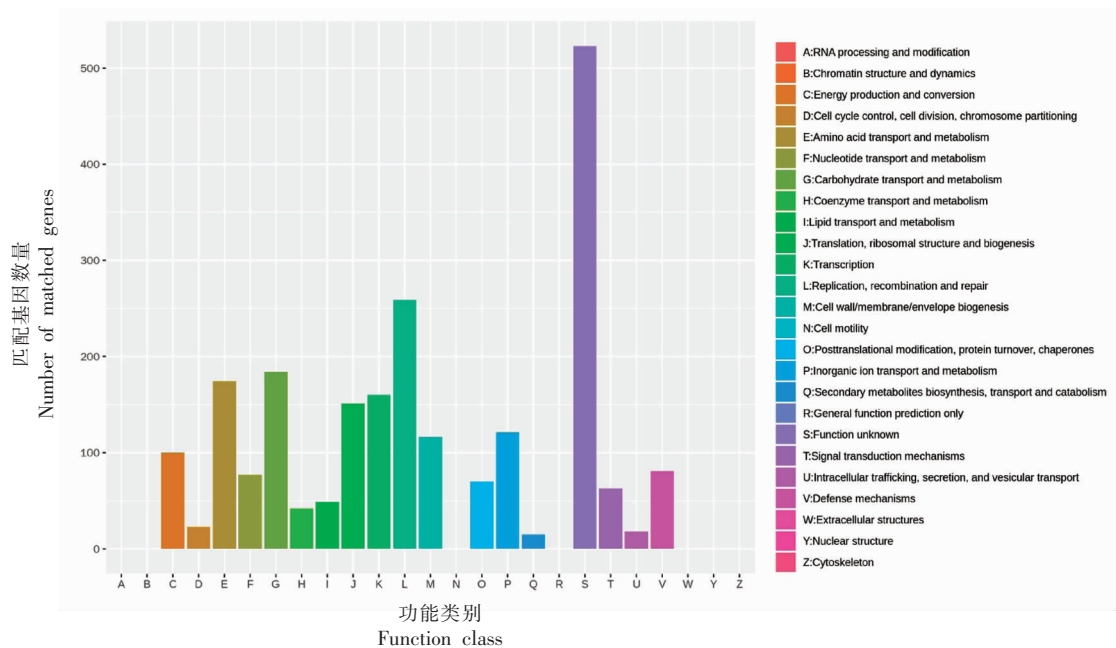


图 7 副干酪乳杆菌 JY56 COG 功能注释图

Fig.7 COG function annotation results of *L. paracasei* JY56

KEGG 注释是将分子网络的相关信息进行跨物种注释以及代谢通路注释,获得物种内分子间相互作用和反应的网络,以系统分析基因组信息。注释结果如图 8 所示,在副干酪乳杆菌 JY56 染色体基因组中,有 1 295 个基因能够归类至 KEGG 数据库中。在功能已注释的基因中,参与遗传信息处理的基因多达 443 个,参与信号和细胞过程的基因为 339 个,参与碳水化合物代谢和膜运输的基因分别为 233 个和 144 个。

2.2.3 毒力因子及抗生素抗性 将副干酪乳杆菌 JY56 的基因编码蛋白序列与致病菌的毒力因子综合性数据库(VFDB)的氨基酸序列进行比对,设定氨基酸序列的一致性不低于 60%,比对率高于 70%,比对结果如表 2 所示。共预测到 11 个毒力因子,预测到的毒力因子与单细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、图拉弗朗西斯菌(*Francisella tularensis* subsp)、艰难梭菌(*Clostridium difficile*)等多种致病菌同源。预测到的毒力因子与黏附相关的基因有 4 个、与提高生存能力相关的基因有 3 个、与免疫调节相关的基因有 3 个。

将副干酪乳杆菌 JY56 的基因编码蛋白序列与抗生素抗性数据库(CARD)的氨基酸序列进行

比对,设定氨基酸序列的一致性不低于 45%,比对率高于 70%,比对结果如表 3 所示。预测结果显示菌株存在 8 个抗性基因,其中包括 3 个环丙沙星相关耐药基因、3 个达托霉素相关耐药基因、1 个林可霉素相关耐药基因、1 个利福平相关耐药基因,共 4 类。

2.3 副干酪乳杆菌 JY56 安全性评价结果

2.3.1 抗生素敏感性 副干酪乳杆菌 JY56 的抗生素敏感性结果如表 4 所示。结果表明副干酪乳杆菌 JY56 对青霉素类、头孢类、大环内酯类、利福平、氯霉素、环丙沙星、四环素类、克林霉素等 20 种抗生素具有敏感性,对氨基糖苷类抗生素庆大霉素和喹诺酮类抗生素诺氟沙星中度敏感,对氨基糖苷类抗生素新霉素、卡那霉素、丁胺卡那和糖肽类抗生素万古霉素 4 种抗生素具有耐药性。

2.3.2 溶血试验结果 副干酪乳杆菌 JY56 的溶血性试验结果如图 9 所示,副干酪乳杆菌 JY56 培养基中未出现绿色半透明溶血圈以及透明圈,未观察到溶血现象。而对照菌株金黄色葡萄球菌 TCC 25923 划线琼脂周围出现了透明圈,判定为 β -溶血。表明副干酪乳杆菌 JY56 不会产生溶血素。

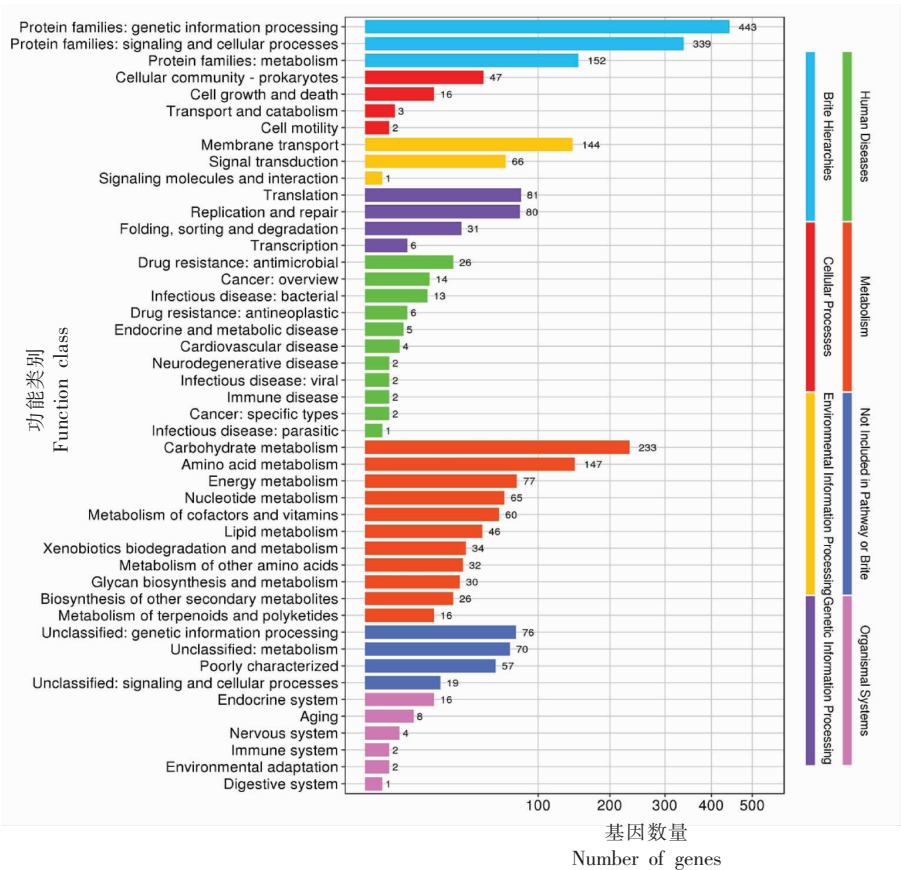


图 8 副干酪乳杆菌 JY56 KEGG 功能注释图

Fig.8 KEGG function annotation results of *L. paracasei* JY56

表 2 潜在毒力因子数量和功能

Table 2 Number and function of potential virulence factors			
菌株	数量	基因	功能
单细胞增生李斯特菌	4	<i>lap</i>	黏附
		<i>clpC</i>	应激生存
		<i>clpE</i>	应激生存
		<i>clpP</i>	应激生存
粪肠球菌	2	<i>efaA</i>	黏附
		<i>cpsA</i>	免疫调节
图拉弗朗西斯菌	1	<i>tufA</i>	黏附
艰难梭菌	1	<i>groEL</i>	黏附
化脓链球菌	1	<i>hasC</i>	免疫调节
肺炎克雷伯氏菌	1	<i>gndA</i>	免疫调节

表 3 潜在抗生素抗性基因

Table 3 Potential antibiotic resistance gene		
ARO 分类	抗性基因	相应的抗生素
氟喹诺酮类	<i>parC, parE, gyrA</i>	环丙沙星
环脂肽类	<i>rpoB, rpoC, pgsA</i>	达托霉素
林可酰胺类	<i>lasA</i>	林可霉素
利福霉素类	<i>ropB</i>	利福平

表 4 副干酪乳杆菌 JY56 的抗生素敏感性

Table 4 Antibiotic susceptibility of *L. paracasei* JY56

抗生素类别	名称	敏感性	抗生素类别	名称	敏感性
青霉素类	青霉素	S	氨基糖苷类	新霉素	R
	苯唑西林	S		卡那霉素	R
	氯苄西林	S		庆大霉素	I
	羧苄西林	S		丁胺卡那	R
	哌拉西林	S	氯霉素类	氯霉素	S
头孢类	头孢氨苄	S	喹诺酮类	诺氟沙星	I
	头孢唑啉	S		氧氟沙星	S
	头孢拉定	S		环丙沙星	S
	头孢他啶	S	四环素类	四环素	S
	头孢哌酮	S		多西环素	S
大环内酯类	红霉素	S		米诺环素	S
	麦迪霉素	S	糖肽类	万古霉素	R
利福霉素类	利福平	S		克林霉素	S

注:S:敏感;M:中度敏感;R:抗性。

2.3.3 吲哚试验结果 副干酪乳杆菌 JY56 的吲哚试验结果如图 10a 所示,向培养好的菌液中滴吲哚试剂后,副干酪乳杆菌 JY56 培养基中未出现红色环,试验结果呈阴性。而对照菌株大肠杆菌 ATCC 25922 培养基中滴加吲哚试剂后形成红色环,试验结果呈阳性。表明副干酪乳杆菌 Y56 不会产生吲哚类物质。

2.3.4 硝酸盐还原酶活性 菌株产生硝酸盐还原酶,会将硝酸盐培养基中的硝酸盐还原为亚硝酸盐,滴加 KI 溶液会置换出单质碘,再滴加淀粉溶液会产生蓝色。副干酪乳杆菌 JY56 的硝酸盐还原酶活性试验结果如图 10b 所示,滴加 KI 溶液和淀粉溶液后,副干酪乳杆菌 JY56 的培养基溶液不变色,为阴性反应。而对照菌株大肠杆菌 ATCC 25922 滴加 KI 溶液和淀粉溶液后培养基溶液变为蓝色,试验结果为阳性反应。表明副干酪乳杆菌 JY56 代谢产物中没有硝酸还原酶或硝酸还原酶无活性。

2.3.5 氨基酸脱羧试验结果 副干酪乳杆菌 JY56 氨基酸脱羧试验结果如图 11 所示,72 h 培养结束后,副干酪乳杆菌 JY56 的鸟氨酸、精氨酸和赖氨酸培养基颜色均呈黄色,试验结果为阴性。而对照菌株大肠杆菌 ATCC 25922 培养结束后,鸟氨酸、精氨酸和赖氨酸培养基颜色均呈紫色,试验结果为阳性。表明副干酪乳杆菌 JY56 不产生精胺、尸

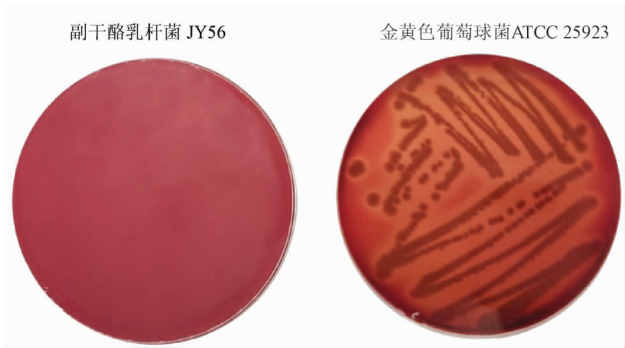


图 9 溶血试验结果

Fig.9 Hemolytic test results

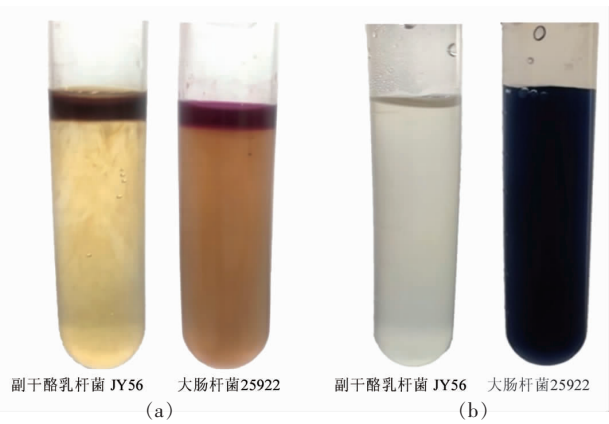


图 10 吲哚(a)及硝酸盐还原酶活性检测(b)试验结果图

Fig.10 Indole (a) and nitrate reductase activity detection (b) test results

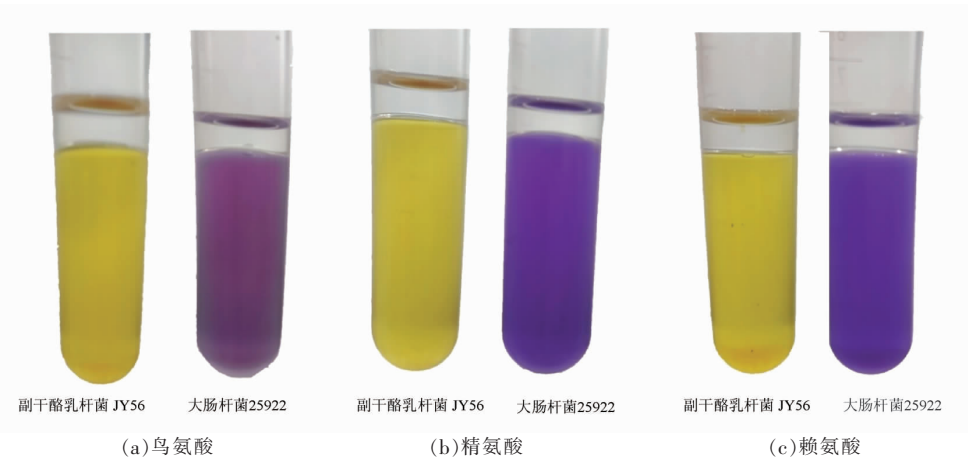


图 11 氨基酸脱羧试验结果

Fig.11 Amino acid decarboxylation test results

胺和腐胺等生物胺。

2.4 HK-副干酪乳杆菌 JY56 对卵清蛋白诱导的小鼠过敏的缓解作用

以 OVA 为致敏原构建 BALB/c 小鼠致敏模型,目前已被广泛应用于 FA 研究领域^[10]。为了探究 HK-副干酪乳杆菌 JY56 是否对 FA 小鼠有缓解作用,分别在第 0,14 天向小鼠腹腔注射 OVA 和佐剂混合液,从第 28 天起每隔两天口服灌胃 OVA 进行激发,共进行 6 次,并记录小鼠的体质量、直肠温度、过敏症状,探究不同剂量 HK-副干酪乳杆菌 JY56 对 OVA 诱导 FA 小鼠缓解作用的效果差异,结果表 5 所示。

表 5 为 OVA 诱导后各组小鼠体质量变化,最后一次激发后,HK-副干酪乳杆菌 JY56 干预组小鼠体质量均高于模型组,其中 OVA 组小鼠体质量较 NC 组和 HLP 组均具有显著性差异 ($P<0.05$)。表 5 为 OVA 诱导后各组小鼠直肠温度变化,用肛温测定器测量 OVA 激发 1h 后各组小鼠的体温,OVA 组小鼠体温下降最为显著,下降 (0.92 ± 0.04)℃,灌胃 HK-副干酪乳杆菌 JY56 后各组小鼠体温均显著高于模型组,且呈现剂量趋势,其中 MLP 组、HLP 组体温变化均趋于正常组,无显著性差异($P<0.05$)。表 5 为 OVA 诱导后各组小鼠过敏症状评分,NC 组无明显的过敏反应,OVA 组小鼠在灌胃激发后表现出挠鼻、抽搐、哮喘等过敏症状,而在灌胃 HK-副干酪乳杆菌 JY56 后过敏症状有所缓解,且呈现剂量趋势。

表 5 HK-副干酪乳杆菌 JY56 缓解小鼠过敏症状

Table 5 Alleviating effect of HK-*L. paracasei* JY56 on allergy symptoms mice

	体质量增量/g	直肠温度/℃	过敏评分
NC	3.82 ± 0.06^a	0.00 ± 0.08^a	0.00 ± 0.00^e
OVA	1.67 ± 0.33^c	-0.89 ± 0.03^c	3.13 ± 0.57^a
LLP	1.91 ± 0.17^b	-0.33 ± 0.12^b	2.63 ± 0.46^a
MLP	2.29 ± 0.54^b	-0.03 ± 0.09^a	2.13 ± 0.57^b
HLP	3.02 ± 0.19^a	0.00 ± 0.08^a	1.63 ± 0.46^c

注:表中同一列数据后的不同字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$);结果以平均值±标准差表示。

3 结论

本研究选用实验室保存的 20 株乳酸菌进行体外透明质酸酶抑制试验和构建 RBL-2H3 细胞模型筛选。出抗过敏活性较强的菌株副干酪乳杆菌 JY56 并评价其安全性,利用体内实验分析 HK-副干酪乳杆菌 JY56 对 OVA 诱导的 FA 小鼠的临床症状缓解作用机效果。透明质酸酶抑制试验和 RBL-2H3 细胞试验结果表明,副干酪乳杆菌 JY56 具有较高的透明质酸酶抑制率和 β -HEX 抑制活性,且其干预后可以显著降低细胞中 IL-4、IL-5、IL-13、TNF- α 的释放量($P<0.05$),综合表现为最佳的抗过敏活性。全基因组学测序分析和体外安全性评价试验表明副干酪乳杆菌 JY56 在基因层面上不具备毒性和传递接收抗生素耐药基因的能力,且只对少部分抗生素具有抗性,不产生溶血作用和有害代谢产物,是一株安全的益生菌菌

株。通过建立OVA诱导的FA小鼠模型研究了HK-副干酪乳杆菌JY56对FA小鼠常规指标(体质量降低、直肠温度降低及过敏评分增加)的改善作用。结果表明, HK-副干酪乳杆菌JY56具有抗过敏作用, 本研究为热灭活副干酪乳杆菌JY56应用于缓解食物过敏及相关疾病提供了理论依据。

参 考 文 献

- [1] ANVARI S, MILLER J, YEH C Y, et al. IgE-mediated food allergy[J]. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 2019, 57(2): 244-260.
- [2] WANG K, PRAMOD S N, PAVASE T R, et al. An overview on marine anti-allergic active substances for alleviating food-induced allergy[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2020, 60(15): 2549-2563.
- [3] ANDORF S, BORRES M P, BLOCK W, et al. Association of clinical reactivity with sensitization to allergen components in multifood-allergic children[J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology-in Practice*, 2017, 5(5): 1325-1334.
- [4] PAWANKAR R, CANONICA G, HOLGATE S. World Allergy Organization (WAO) white book on allergy, Update [J]. Wisconsin: World Allergy Organization, 2011, 24(3): 156-157.
- [5] LUO J Z, ZHANG Q Y, GU Y J, et al. Meta-analysis: Prevalence of food allergy and food allergens-China, 2000-2021[J]. *China Cdc Weekly*, 2022, 4(34): 766-770.
- [6] SAMPATH V, ABRAMS E M, ADLOU B, et al. Food allergy across the globe[J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2021, 148(6): 1347-1364.
- [7] DE MARTINIS M, SIRUFO M M, SUPPA M, et al. New perspectives in food allergy[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(4): 1474.
- [8] CARDONA V, ANSOTEGUI I J, EBISAWA M, et al. World allergy organization anaphylaxis guidance 2020[J]. *World Allergy Organization Journal*, 2020, 13(10): 100472.
- [9] SIRUFO M M, GINALDI L, DE MARTINIS M. Successful treatment with omalizumab in a child with asthma and urticaria: A clinical case report[J]. *Frontiers in Pediatrics*, 2019, 7: 213.
- [10] PRATAP K, TAKI A C, JOHNSTON E B, et al. A comprehensive review on natural bioactive compounds and probiotics as potential therapeutics in food allergy treatment[J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 996.
- [11] BERMUDEZ-BRITO M, PLAZA-DIAZ J, MUNOZ-QUEZADA S, et al. Probiotic mechanisms of action[J]. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 2012, 61(2): 160-174.
- [12] MA L X, TU H J, CHEN T T. Postbiotics in human health: A narrative review[J]. *Nutrients*, 2023, 15(2): 291.
- [13] 朱秀敏, 曹萌. 灭活益生菌的研究进展[J]. *中国微生物生态学杂志*, 2010, 22(2): 175-178.
- ZHU X M, CAO M. A review of progress in researches on inactivated probiotics[J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2010, 22(2): 175-178.
- [14] 雷文平, 周辉, 陈绮, 等. 具有透明质酸酶抑制活性益生菌的体外筛选及鉴定[J]. *食品科学*, 2021, 42(2): 151-157.
- LEI W P, ZHOU H, CHEN Q, et al. Screening and identification of probiotics with hyaluronidase inhibitory activity *in vitro*[J]. *Food Science*, 2021, 42(2): 151-157.
- [15] LEI W P, LIU C G, PAN L N, et al. Screening of probiotic *Lactobacilli* with potential anti-allergic activity based on hyaluronidase inhibition and degranulation of RBL-2H3 cells *in vitro*[J]. *Lwt-Food Science and Technology*, 2021, 140: 110707.
- [16] PATEL R K, JAIN M. NGS QC Toolkit: A toolkit for quality control of next generation sequencing data [J]. *Plos One*, 2012, 7(2): e10639.
- [17] WALKER B J, ABEEL T, SHEA T, et al. Pilon: An integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement[J]. *Plos One*, 2014, 9(11): 112963.
- [18] BUCHFINK B, REUTER K, DROST H G. Sensitive protein alignments at tree-of-life scale using DIAMOND[J]. *Nature Methods*, 2021, 18(4): 366-368.
- [19] CHEN L H, ZHENG D D, LIU B, et al. VFDB 2016: hierarchical and refined dataset for big data analysis-10 years on[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(1): 694-697.
- [20] MCARTHUR A G, WAGLECHNER N, NIZAM F, et al. The comprehensive antibiotic resistance database[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2013, 57(7): 3348-3357.

- [21] MORRIS C P, BERGMAN Y, TEKLE T, et al. Cefiderocol antimicrobial susceptibility testing against multidrug-resistant gram-negative *Bacilli*: a comparison to disk diffusion to broth microdilution[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2021, 59(1): 01649–20.
- [22] 王梦姣, 李少英, 李淑芬, 等. 马奶及其制品中肠球菌属乳酸菌的安全性评价[J]. *食品科学*, 2014(17): 204–208.
WANG M J, LI S Y, LI S F, et al. Safety assessment of *Enterococcus* isolated from Mare's milk and its products[J]. *Food Science*, 2014(17): 204–208.
- [23] OMER A K, MOHAMMED R R, AMEEN P S M, et al. Presence of biogenic amines in food and their public health implications: A review[J]. *Journal of Food Protection*, 2021, 84(9): 1539–1548.
- [24] LI N, YU Y, CHEN X H, et al. *Bifidobacterium breve* M-16V alters the gut microbiota to alleviate OVA-induced food allergy through IL-33/ST2 signal pathway[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2020, 235(12): 9464–9473.
- [25] WANG Y J, ZHANG P, ZHANG J Y, et al. Bis-demethoxycurcumin attenuates OVA-induced food allergy by inhibiting the MAPK and NF- κ B signaling pathways[J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2022, 23(6): 401.
- [26] WU L, LIU X M, JIAN X L, et al. Delayed allergic hypersensitivity to hyaluronidase during the treatment of granulomatous hyaluronic acid reactions[J]. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 2018, 17(6): 991–995.
- [27] HADA M, NISHI K, ISHIDA M, et al. Inhibitory effect of aqueous extract of *Cuminum cyminum* L. seed on degranulation of RBL-2H3 cells and passive cutaneous anaphylaxis reaction in mice[J]. *Cytotechnology*, 2019, 71(2): 599–609.
- [28] NIU L Y, WEI J H, LI X W, et al. Inhibitory activity of narirutin on RBL-2H3 cells degranulation[J]. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 2021, 43(1): 68–76.

Screening of Heat-killed Lactic Acid Bacteria with Food Allergy Alleviating Effects and Its Whole Genome Sequencing Analysis

Zheng Miao, He Mengli, Fang Ruxue, Man Chaoxin, Zhang Yu, Yang Xinyan, Zhao Qianyu, Jiang Yujun*

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

Abstract Food allergy (FA) is an abnormal response of the human immune system to a specific food that causes discomfort in several systems, including the digestive, respiratory, skin and cardiovascular systems. In this study, heat-killed *Lactobacillus paracasei* JY56 (HK-*L. paracasei* JY56) with strong anti-allergic activity was screened from 20 strains of lactic acid bacteria by hyaluronidase inhibition assay and RBL-2H3 cell assay. Subsequently, the safety of *L. paracasei* JY56 was evaluated by whole genome sequencing and *in vitro* safety assays. Finally, an ovalbumin (OVA)-induced FA mouse model was constructed to further clarify the effect of HK-*L. paracasei* JY56 on the alleviation of clinical symptoms in FA mice. The results showed that HK-*L. paracasei* JY56 had high β -aminohexosidase (β -HEX) inhibition rate, and the levels of cytokines IL-4, IL-5, IL-13 and TNF- α were significantly reduced after its intervention. Whole genome sequencing analysis revealed that *L. paracasei* JY56 does not possess the ability to virulently and transmitly receive antibiotic resistance genes. The safety evaluation experiments such as antibiotic susceptibility test, hemolysis test and harmful metabolite evaluation revealed that *L. paracasei* JY56 was susceptible to commonly used antibiotics and did not produce hemolysis or harmful metabolites. OVA stimulation resulted in decreased body weight and rectal temperature and increased allergy score in mice, while HK-*L. paracasei* JY56 intervention significantly alleviated allergy symptoms in mice. In conclusion, this study provides a theoretical basis for the use of HK-*L. paracasei* JY56 for the alleviation of food allergy and related diseases.

Keywords heat-killed; lactic acid bacteria; food allergy; *Lactobacillus paracasei* JY56; whole genome; safety