

矫艳平, 余萍, 赵迪, 等. 植物乳杆菌 HCS03-001 安全性评价及其益生特性分析 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(5): 165-171. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021060278

JIAO Yanping, YU Ping, ZHAO Di, et al. Safety Evaluation and Probiotic Characteristics Analysis of *Lactobacillus plantarum* HCS03-001[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(5): 165-171. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021060278

· 生物工程 ·

植物乳杆菌 HCS03-001 安全性评价及其益生特性分析

矫艳平, 余萍, 赵迪, 张春宇, 宋佳, 汤纯, 曹蓝
(江西仁仁健康产业有限公司, 江西樟树 331200)

摘要: 为了对植物乳杆菌 HCS03-001(CGMCC No.16258) 进行安全性评价以及益生特性的研究, 通过溶血实验、耐药实验及急性经口毒性实验评价其安全性, 通过对酸环境及胆盐环境的耐受性实验、抑菌功能特性实验及通便功效试验评价该菌株的益生特性。结果表明, 植物乳杆菌 HCS03-001 在哥伦比亚血琼脂培养基上无透明圈形成, 即无溶血性; 植物乳杆菌 HCS03-001 对青霉素 (PEN)、氨苄西林 (AM)、亚胺培南 (IP)、美罗培南 (MP)、利奈唑胺 (LZ)、达托霉素 (DPC) 敏感, 对红霉素 (EM) 中敏, 对万古霉素 (VA) 耐药; 小鼠经口急性毒理无毒, 确定该菌株为食用安全菌。该菌株在 pH3.0 和 pH2.0 环境中培养 3 h 存活率分别为 94.29% 和 92.33%, 在 1.5 g/L 胆盐浓度下培养 3 h, 存活率仍能达到 88.82%; 该菌对肠道致病菌及口腔致病菌 (牙龈卟啉单胞菌和变异链球菌) 均有抑制作用; 对盐酸洛哌丁胺的便秘模型有较好的促排便效果。植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) HCS03-001 具有良好的安全性及益生特性。

关键词: 植物乳杆菌, 溶血性, 耐药性, 急性经口毒性实验, 益生特性, 安全性评价

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)05-0165-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021060278



本文网刊:

Safety Evaluation and Probiotic Characteristics Analysis of *Lactobacillus plantarum* HCS03-001

JIAO Yanping, YU Ping, ZHAO Di, ZHANG Chunyu, SONG Jia, TANG Chun, CAO Lan
(Jiangxi Renren Health Industry Co., Ltd., Zhangshu 331200, China)

Abstract: In order to evaluate the safety and probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* HCS03-001(CGMCC No.16258), the safety of *Lactobacillus plantarum* HCS03-001 was evaluated by hemolysis test, drug resistance test and acute transoral toxicity test. The probiotic properties of the strain were evaluated by acid and bile salt tolerance test, bacteriostatic functional properties test and laxative efficacy test. The results showed that *Lactobacillus plantarum* HCS03-001 did not form transparent circle on the Colombian blood finger culture medium, that was, there was no hemolysis. *Lactobacillus plantarum* HCS03-001 was sensitive to penicillin (PEN), ampicillin (AM), imipenem (IP), meropenem (MP), linezolid (LZ), and datoramycin (DPC), and neutral to erythromycin (EM) and resistant to vancomycin (VA). The acute oral toxicology of mice was non-toxic, and the strain was confirmed to be safe to eat. The survival rate of the strain was 94.29% and 92.33% at pH3.0 and pH2.0 for 3 h, respectively. The survival rate could still reach 88.82% at 1.5 g/L bile salt for 3 h. It had inhibitory effect on intestinal and oral pathogens (*Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus mutans*). It had a good effect on promoting defecation in constipation model of loperamide hydrochloride. *Lactobacillus plantarum* HCS03-001 has good safety and probiotics.

Key words: *Lactobacillus plantarum*; hemolytic; drug resistance; acute transoral toxicity test; probiotic characteristics; safety evaluation

收稿日期: 2021-07-02

作者简介: 矫艳平 (1989-), 女, 硕士, 工程师, 研究方向: 益生菌制剂研究, E-mail: jiaoyanping12@163.com。

近年来,人们越来越意识到肠道微生态对人体健康的重要性,益生菌作为定植于肠道内并对人体健康有益的活性微生物,被广泛应用于各种发酵食品、功能性食品、药品及膳食补充剂等。益生乳酸菌即发酵糖类产生乳酸的益生菌,在食品应用中未发现过严重的不良反应,普遍认为乳酸菌的应用是安全的^[1]。然而,陆续有研究表示从败血症、心内膜炎、急性胰腺炎和尿路感染患者体内分离出了乳酸菌,还有关于摄入乳酸菌引起局部或全身感染的报道,使乳酸菌的安全性进入人们关注的视野,并将其作为乳酸菌应用的前提条件^[2-3]。

植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)是一类存在于人体肠道内并发挥益生作用的革兰氏阳性益生菌群^[4]。大量研究表明,植物乳杆菌具有调节免疫功能^[5-6]、调节血糖、血脂和血压平衡^[7-11]、抑制胃肠道致病菌感染^[12-15]、调节肠道功能^[16-18]、调节神经功能^[19-20]等作用,其作为乳酸菌的一种,其安全性被高度认可,并应用于多种食品、饲料、医疗保健等领域^[21]。植物乳杆菌发挥益生作用的基础是其能够耐受胃酸环境和十二指肠的高胆盐环境,摄入后能够以活菌状态到达小肠和大肠,继而发挥益生功能^[22]。

分离自哺乳婴儿肠道及母乳中的人源性益生菌株更能够在人体肠道内存活^[23]。本研究对从婴儿粪便样品中筛选出的植物乳杆菌 HCS03-001 的安全性进行了评价,并测定其对酸和胆盐的耐受能力,为其进一步应用提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

植物乳杆菌 HCS03-001 分离自顺产健康 8 月龄女婴粪便样品,保存于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为 CGMCC No.16258;清洁级昆明种(KM)小鼠(18~22 g) 沈阳艾克赛斯生物科技有限公司(许可证号:NO.SCXK(辽)2020—0001);块状鼠料 辽宁长生生物技术有限公司;哥伦比亚血琼脂平板 无锡赛维商务有限公司;盐酸洛哌丁胺 西安杨森制药有限公司;肺炎链球菌 ATCC49619 上海复祥生物科技有限公司;英诺克李斯特氏菌 CICC 10417、金黄色葡萄球菌 CICC 10473 中国工业微生物菌种保藏管理中心;梅里埃 E-Test 药敏试条 北京兰伯瑞生物技术有限责任公司;胆盐(HPLC 级 SIGMA) 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028、福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572、单增李斯特菌 ATCC19115 上海鲁微科技有限公司;牙龈卟啉单胞菌 ATCC 33277 中国普通微生物菌种保藏管理中心;白色念珠菌 ATCC10231 青岛高科技工业园海博生物技术有限公司;大肠埃希氏菌 ATCC25922、金黄色葡萄球菌 ATCC12598、变异链球菌 GIM1.530 广东省微生物菌种保藏中心;盐酸洛哌丁胺胶囊(含盐酸洛哌丁胺 2 mg/粒) 西安杨森制药有限公司;植物

乳杆菌 HCS03-001 培养基:酵母蛋白胨 10 g/L,酵母浸出物 5 g/L,葡萄糖 20 g/L,柠檬酸 5 g/L,乙酸钠 5 g/L,磷酸二氢钾 2 g/L,硫酸镁 0.5 g/L,硫酸锰 0.08 g/L,吐温 80 0.6 g/L,余量为纯化水,pH6.60,115 ℃ 灭菌 30 min。

SW-CJ-2D 双人单面净化工作台 苏州净化设备有限公司;DHP-500BS 电热恒温培养箱 北京市永光明医疗仪器厂;LDZX-50KBS 立式压力蒸汽灭菌器 上海申安医疗器械厂;XSP-10CA 生物显微镜 上海佑科仪器仪表有限公司;DZKW-S-8 电热恒温水浴锅 北京市永光明医疗仪器有限公司;TGL-16M 低温高速离心机 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;FiveEasy Plus 型 pH 计 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;MHY-28473 麦氏浊度计 北京美华科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种活化 将植物乳杆菌 HCS03-001 菌种冻存管置 37 ℃ 水浴锅中使其迅速溶化,取 100 μL 菌液加入 10 mL 植物乳杆菌 HCS03-001 液体培养基中,37 ℃ 培养 16 h 后扩大培养至 100 mL,放 4 ℃ 备用。

1.2.2 溶血试验 将已活化好的 HCS03-001 菌株菌悬液接种点样于哥伦比亚血琼脂平皿中,在同一平皿中接种点样阴性对照菌英诺克李斯特氏菌 CICC 10417 和阳性对照菌金黄色葡萄球菌 CICC 10473,37 ℃ 培养 48 h,观察平皿中菌落周围有无溶血圈出现并拍照记录。

1.2.3 耐药性试验 采用 E 试验法对植物乳杆菌 HCS03-001 进行耐药性评价。挑取纯化后的植物乳杆菌 HCS03-001 菌落接种至 MRS 培养基,并于 35 ℃ 培养至浊度达到 0.5 麦氏单位以上,用生理盐水调节菌液浓度至 0.5 麦氏单位。用无菌棉沾取菌悬液涂布于 90 mm 的 MRS 琼脂平板表面,反复涂布 3 次,每次旋转平板 60°,室温下静置 5 min,用无菌镊子夹取 E-test 试条紧贴于 MRS 琼脂培养基表面,15 min 后将平板置 5% 二氧化碳环境孵育 24~48 h 后读取抑菌圈边缘与 E-test 药敏条相交处的 MIC 值。以肺炎链球菌 ATCC49619 为质控菌株,药物敏感性结果依据 CLSI M45-A3(2015)标准执行,判定标准见表 1。

1.2.4 急性经口毒性试验 按照 GB15193.3-2014 限量法评价植物乳杆菌 HCS03-001 对小鼠的经口急性毒性。将 20 只实验小鼠分为雌性组和雄性组。实验环境设置为温度 22±1.5 ℃,湿度 50%±10%,工作照度 160~280 Lux,噪音<60 dB,给予鼠粮和纯净水,适应环境 3 d 后进行实验。实验前小鼠禁食不禁水 6 h。将植物乳杆菌 HCS03-001 菌粉(1×10¹¹ CFU/g,菌粉基质为麦芽糊精)按照 15 g/kg 的剂量,20 mL/kg 的灌胃体积,灌胃小鼠一次,灌胃后观察 14 d,记录中毒症状及死亡情况。

表 1 乳杆菌属药敏试验判定标准($\mu\text{g/mL}$)
Table 1 Criteria for antimicrobial susceptibility test of *Lactobacillus* ($\mu\text{g/mL}$)

抗菌药物	S	I	R
青霉素(PEN)	≤ 8	-	-
氨苄西林(AM)	≤ 8	-	-
亚胺培南(IP)	≤ 0.5	1	≥ 2
美罗培南(MP)	≤ 1	2	≥ 4
万古霉素(VA)	≤ 2	4-8	≥ 16
红霉素(EM)	≤ 0.5	1-4	≥ 8
利奈唑胺(LZ)	≤ 4	-	-
达托霉素(DPC)	≤ 4	-	-

注:表中“-”代表无判定标准;S表示敏感;I表示中度敏感;R表示耐药。

1.2.5 耐酸性试验 用 1 mol/L 盐酸将 MRS 培养基 pH 调成 2.0 和 3.0, 115 °C 高压蒸汽灭菌 30 min, 冷却备用。将活化后的植物乳杆菌 HCS03-001 菌液以 10%(V/V) 的接种量分别接种于 pH3.0、pH2.0 的 MRS 培养基中。37 °C 恒温静置培养, 于 0、1、2、3 h 用灭菌的生理盐水进行 10 倍系列稀释, 分别取适宜稀释度的菌液 1000 μL 移入无菌空平皿中, 将冷却至 48 °C 的 MRS 琼脂培养基倾注入平皿约 15 mL, 转动平皿使其混合均匀。每个稀释度 3 次重复, 37 °C 静置培养 48 h 后计数。耐酸试验存活率计算公式(1)如下:

$$\text{受试菌株耐酸存活率}(\%) = \frac{N_1}{N_0} \times 100 \quad \text{式(1)}$$

式中: N_1 为 1、2、3 h 测得的活菌数, lg CFU/mL; N_0 为 0 h 测得的活菌数, lg CFU/mL。

1.2.6 耐胆盐试验 在 MRS 培养基中加入牛胆盐, 配制胆盐质量浓度分别为 0.3、0.5、1.0、1.5 g/L 的 MRS 培养基, 115 °C 高压蒸汽灭菌 30 min, 冷却备用。将活化后的植物乳杆菌 HCS03-001 菌液按照 10%(V/V) 的接种量分别接种于上述培养基中, 37 °C 恒温静置培养, 于 0、1、2、3 h 用灭菌的生理盐水进行系列 10 倍稀释, 分别取适宜稀释度的菌液 1000 μL 移入无菌空平皿中, 将冷却至 48 °C 的 MRS 琼脂培养基倾注入平皿约 15 mL, 转动平皿使其混合均匀。每个稀释度 3 次重复, 37 °C 静置培养 48 h 后计数。耐胆盐试验菌株存活率计算方法见公式(2)。

$$\text{受试菌株耐胆盐存活率}(\%) = \frac{N_1}{N_0} \times 100 \quad \text{式(2)}$$

式中: N_1 为 1、2、3 h 测得的活菌数, lg CFU/mL; N_0 为 0 h 测得的活菌数, lg CFU/mL。

1.2.7 抑菌功能特性试验 试验以大肠杆菌 ATCC 25922、金黄色葡萄球菌 ATCC12598、鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028、志贺氏菌 CMCC(B)51572、单增李斯特菌 ATCC19115、白色念珠菌 ATCC10231、牙龈卟啉单胞菌 ATCC33277、变异链球菌 GIM 1.530 为指示菌, 采用牛津杯法^[24]测定 HCS03-001 代谢产物的抑菌性。

1.2.7.1 植物乳杆菌 HCS03-001 发酵液浓缩 取一菌株冻存管在 37 °C 水浴锅中使其迅速溶化, 用微量移液器取 10 μL 菌液加入 4.5 mL 生理盐水中, 逐级稀释至 10^{-6} , 取稀释液 50 μL 涂布平板, 37 °C 培养 24~48 h, 挑取单菌落于 5 mL 培养基中 37 °C 培养 20 h, 5% 接种量扩大培养至 100 mL 培养基中, 37 °C 培养 17 h 后, 10000 r/min 离心 10 min, 取上清, 加热 100 °C 浓缩至 5 倍, 放 4 °C 备用。

1.2.7.2 抑菌圈直径测量 分别将指示菌加入到对应的液体培养基中进行活化并稀释菌液浓度为 10^5 CFU/mL, 取菌悬液 100 μL 均匀涂布于培养基上。用镊子将无菌牛津杯竖于涂布有致病菌液的平皿中, 牛津杯中加入 200 μL 活化后的植物乳杆菌 HCS03-001 浓缩上清液。将平皿置于 37 °C 的恒温培养箱中, 24 h 后观察拍照, 并用游标卡尺计量抑菌圈直径。

对应培养基: 大肠杆菌 ATCC25922、金黄色葡萄球菌 ATCC12598: LB 培养基; 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028、志贺氏菌 CMCC(B)51572: 营养琼脂培养基; 单增李斯特菌 ATCC19115: TSA-YE 培养基; 白色念珠菌 ATCC10231: SB 培养基; 牙龈卟啉单胞菌 ATCC33277: TSA+5% 脱纤维羊血; 变异链球菌 GIM1.530: BHI 培养基。

1.2.8 小鼠通便功效试验

1.2.8.1 试剂和动物准备 试验选用清洁级昆明种(KM)小鼠 40 只, 18~22 g, 雄性。试验环境为清洁级动物实验室, 温度 22 ± 1.5 °C, 湿度 $50\% \pm 10\%$, 工作照度 160~280 lx, 噪音 < 60 dB。

盐酸洛哌丁胺混悬液的配制: 取盐酸洛哌丁胺胶囊 10 粒或 20 粒, 去除囊壳, 将药粉加蒸馏水定容至 100 mL 配制成 0.02% 或 0.04% 的浓度。

墨汁配制方法: 将阿拉伯胶 5 g 与 40 mL 蒸馏水混合煮沸至澄清透明, 再与 2.50 g 活性炭粉混合均匀煮沸 3 次, 冷却, 蒸馏水定容至 50 mL, 置于 4 °C 冰箱保存备用。

1.2.8.2 小肠运动试验 经口灌胃给予造模药物盐酸洛哌丁胺, 建立小鼠小肠便秘模型, 计算一定时间内小肠的墨汁推进率, 来判断小肠蠕动功能。以植物乳杆菌 HCS03-001 菌粉(1×10^{11} CFU/g)为受试物, 根据人体推荐量的 10 倍量将试验设置 2 个剂量组(受试物 1.5 g/kg 及 3.0 g/kg)、一个空白对照组和一个模型对照组。将植物乳杆菌 HCS03-001 菌粉溶于蒸馏水中, 每天灌胃一次, 灌胃体积为 10 mL/kg, 模型对照组和空白对照组灌胃同体积蒸馏水, 共给予 21 天后, 剂量组和模型对照组给予 0.02% 的盐酸洛哌丁胺混悬液(盐酸洛哌丁胺 5 mg/kg BW)造便秘模型, 造模 0.5 h 后, 各组小鼠均灌胃 10 mL/kg 墨汁, 计时 20 min 后处死小鼠, 解剖, 测量小肠全长及自胃部下端幽门处到墨水运动前沿的距离, 小肠推进率按公式(3)计算。

$$\text{小肠推进率(\%)} = \frac{\text{墨汁移动距离}}{\text{小肠全长}} \times 100 \quad \text{式(3)}$$

1.2.8.3 排便粒数、排便时间试验 经口灌胃给予造模药物盐酸洛哌丁胺,建立小鼠便秘模型,考察实验动物6 h内排黑便粒数与首次排黑便时间,来反映模型排便情况。以植物乳杆菌 HCS03-001 菌粉(1×10^{11} CFU/g)为受试物,试验设置2个剂量组(受试物 1.5 g/kg 及 3.0 g/kg)、一个模型对照组和一个空白对照组,将植物乳杆菌 HCS03-001 菌粉溶于蒸馏水中,每天灌胃一次,灌胃体积为 10 mL/kg,模型对照组和空白对照组灌胃同体积蒸馏水,共给予 8 d 后,剂量组和模型对照组给予 0.04% 的盐酸洛哌丁胺混悬液(盐酸洛哌丁胺 10 mg/kg BW)造便秘模型,造模 0.5 h 后,各组小鼠均灌胃 10 mL/kg 墨汁,开始记录首粒排黑便时间和 6 h 内排黑便粒数。

1.3 数据处理

每个试验重复 3 次平行测定,数据采用 SPSS 19.0 软件和 Excel 软件进行数据分析,当 $P < 0.05$ 时,差异被认为是有意义的,结果表示为平均值±标准差。

2 结果与分析

2.1 溶血性评价结果

测定乳酸菌溶血现象是评价乳酸菌安全性的一项重要指标。溶血试验结果如图 1 所示,将已活化好的 HCS03-001 菌株菌悬液、阴性对照菌英诺克李斯特氏菌 CICC 10417 和阳性对照菌金黄色葡萄球菌 CICC 10473 接种点样于哥伦比亚血琼脂平皿中,37 °C 培养 48 h 后,阳性对照菌金黄色葡萄球菌

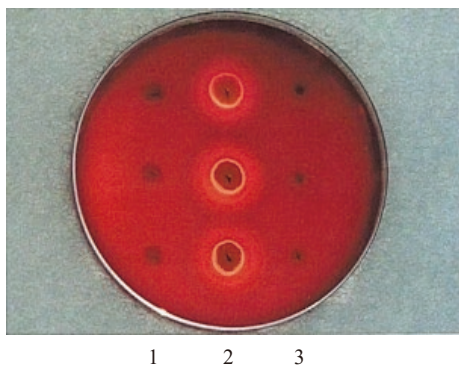


图 1 植物乳杆菌 HCS03-001 的溶血试验结果

Fig.1 Hemolysis test results of *Lactobacillus plantarum* HCS03-001

注: 1.阴性对照菌: 英诺克李斯特氏菌 CICC 10417; 2.阳性对照菌: 金黄色葡萄球菌 CICC 10473; 3.样品: 植物乳杆菌 HCS03-001。

CICC 10473 出现明显的透明圈,表现为溶血。植物乳杆菌 HCS03-001 与阴性对照菌英诺克李斯特氏菌 CICC 10417 结果一致,均无透明圈,即不溶血。说明植物乳杆菌 HCS03-001 在溶血性方面是安全的。

2.2 耐药性评价试验结果

益生菌中是否含有抗生素抗性基因,抗性基因是否会在肠道正常菌群与致病菌之间发生转移,已成为评价菌株安全性的一个重要方面^[25]。植物乳杆菌 HCS03-001 耐药性实验结果见表 2 所示。植物乳杆菌 HCS03-001 对青霉素(PEN)、氨苄西林(AM)、亚胺培南(IP)、美罗培南(MP)、利奈唑胺(LZ)、达托霉素(DPC)敏感,对红霉素(EM)中敏,对万古霉素(VA)耐药。目前针对益生菌的耐药性质有认为其携带耐药基因并可能转移至宿主体内,还有观点认为这种耐受通常是自身内在染色体编码的,不具转移性^[26]。众多关于乳酸菌研究均对一种或多种抗生素有耐受现象,其耐受原因及是否能够转移有待进一步研究。

表 2 植物乳杆菌 HCS03-001 的 MIC 值及药敏性
Table 2 MIC value and drug sensitivity of *Lactobacillus plantarum* HCS03-001

抗菌药物	MIC值(μg/mL)	药敏性
青霉素	2	敏感
氨苄西林	0.38	敏感
亚胺培南	0.047	敏感
美罗培南	0.047	敏感
万古霉素	>256	耐药
红霉素	1.0	中敏
利奈唑胺	2	敏感
达托霉素	0.125	敏感

2.3 急性经口毒性试验结果

植物乳杆菌 HCS03-001 急性经口毒性试验结果如表 3 所示。雌雄小鼠精神状况良好,观察期内体重保持增长,无中毒或死亡情况发生;解剖后未见心肝脾肺肾等内脏器官异常。根据《食品安全国家标准急性经口毒性试验》GB15193.3-2014,植物乳杆菌 HCS03-001 的经口急性毒性耐受剂量大于 15 g/kg,其 $LD_{50} > 15$ g/kg。

2.4 菌株 HCS03-001 的耐酸试验结果

益生菌进入人体后主要在肠道内发挥有益作用,因此必须具有较强的耐受胃酸能力,才能以较高的存活性通过胃环境。人体在空腹时胃液 pH 为 2.0 以下,进食后 pH 能达到 3.0 左右^[27]。因此试验

表 3 植物乳杆菌 HCS03-001 小鼠急性经口毒性试验结果

Table 3 Acute oral toxicity test of *Lactobacillus plantarum* HCS03-001

动物性别	动物数(只)	体重(g)			死亡数(只)	中毒症状	解剖学异常	死亡率(%)
		0 d	7 d	14 d				
♀	10	18.5±0.3	28.6±1.8	35.1±3.0	0	无异常表现	未见明显异常	0
♂	10	18.8±0.4	30.9±2.2	39.2±3.4	0	无异常表现	未见明显异常	0

选定 pH3.0 和 pH2.0 进行检验菌株 HCS03-001 的耐酸能力, 试验结果见表 4。由表 4 可知, 菌株 HCS03-001 在 pH2.0 和 pH3.0、37 °C 条件下培养 3 h, 虽活菌数对数值较 0 h 时显著下降($P<0.05$), 但存活率仍达 92.33% 和 94.29%。说明该菌株对酸环境具有一定的耐受能力, 其耐酸能力可能与菌株的双组分信号调节及酸环境下细胞膜组成变化、蛋白质和 DNA 的损伤修复等耐酸机制有关^[28]。

表 4 菌株 HCS03-001 的耐酸试验结果(n=3)
Table 4 Result of acid resistance tests of strain HCS03-001(n=3)

时间(h)	处理方式及存活率			
	pH2.0 (lg CFU/mL)	存活率(%)	pH3.0 (lg CFU/mL)	存活率(%)
0	8.87±0.02	—	9.11±0.03	—
1	8.73±0.03	98.42	9.03±0.03	99.12
2	8.56±0.04	96.50	8.97±0.01	98.46
3	8.19±0.02*	92.33	8.59±0.04*	94.29

注: *表示差异显著($P<0.05$), 与 0 h 组比较。表 5 同。

2.5 菌株 HCS03-001 的耐胆盐试验结果

益生菌能够在肠道内保持存活性, 较强的胆汁的耐受能力是先决条件。菌株 HCS03-001 经 0.3、0.5、1.0、1.5 g/L 牛胆盐处理后的存活率见表 5。随着牛胆盐含量的增加和处理时间的延长, 菌株 HCS03-001 的存活率呈下降趋势, 当牛胆盐含量达到 1.5 g/L 时, 处理 3 h 后活菌数对数值较 0 h 虽显著下降($P<0.05$), 但存活率仍能达到 88.82%, 说明该菌株耐胆盐能力较强, 有利于其在宿主肠道中的定植, 其对胆盐的耐受能力可能是由于该菌株在生长繁殖过程中产生胆盐水解酶来降低胆盐对自身细胞的危害或其表层蛋白对细胞的保护作用等^[29]。

表 5 菌株 HCS03-001 的耐胆盐试验结果(n=3)
Table 5 Results of bile salt tolerance tests of strain HCS03-001(n=3)

时间(h)	处理方式及存活率							
	0.3 g/L(lg CFU/mL)	存活率(%)	0.5 g/L(lg CFU/mL)	存活率(%)	1.0 g/L(lg CFU/mL)	存活率(%)	1.5 g/L(lg CFU/mL)	存活率(%)
0	9.38±0.03	—	9.35±0.02	—	9.40±0.04	—	9.13±0.03	—
1	9.23±0.02	98.40	8.97±0.02	95.94	8.89±0.05	94.57	8.78±0.02	96.17
2	9.07±0.04	96.70	8.83±0.01	94.44	8.74±0.02	92.98	8.62±0.02	94.41
3	8.89±0.05	94.78	8.69±0.03	92.94	8.32±0.03*	88.51	8.11±0.04*	88.82

2.6 抑菌功能性试验结果

2.6 抑菌功能性试验结果

乳酸菌能够产生有机酸、过氧化氢等代谢产物、分泌细菌素, 具有抑制致病菌生长及减少腐败菌毒素产生的作用, 因此抑菌功能是乳酸菌重要的益生特性^[30]。试验选取大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌、鼠伤寒沙门氏菌、福氏志贺氏菌、单增李斯特菌、牙龈卟啉单胞菌、变异链球菌为指示菌, 结果见表 6 所示。植物乳杆菌 HCS03-001 发酵上清液对肠道致病菌及口腔致病菌(牙龈卟啉单胞菌和变异链球菌)均有一定程度的抑制作用, 其中对变异链球菌的抑菌圈直径最大, 显著高于其他菌株($P<0.05$); 对大肠埃希氏菌 ATCC25922 与金黄色葡萄球菌 ATCC12598 的抑菌圈直径与周钦育等^[31]所测 LGG 抑菌圈直径接近。

2.7 通便功效试验结果

2.7.1 小肠运动试验 经口灌胃给予造模药物盐酸洛哌丁胺, 建立小鼠小肠便秘模型, 给予植物乳杆菌 HCS03-001 灌胃 21 d, 试验结果见表 7, 与空白对照组(75.59%)相比, 模型对照组小鼠的小肠墨汁推进率(32.38%)显著降低($P<0.05$), 说明小鼠便秘模型构建成功。与模型对照组相比, 受试物在 1.5 和 3.0 g/kg 的剂量下, 小鼠的小肠墨汁推进率均显著提高($P<0.05$), 分别为 49.08%、52.05%, 说明植物乳杆菌 HCS03-001 对盐酸洛哌丁胺造模的小鼠便秘模型有一定的通便效果。

2.7.2 排便粒数、排便时间试验 经口灌胃给予造模药物盐酸洛哌丁胺, 建立小鼠便秘模型, 以植物乳杆菌 HCS03-001 为受试物, 考察实验动物 6 h 内排黑便粒数与首次排黑便时间。试验结果见表 8, 与空白对照组相比, 模型对照组的 6 h 内排黑便粒数显著

表 6 植物乳杆菌 HCS03-001 抑菌特性试验结果
Table 6 Experimental results of antimicrobial properties of *Lactobacillus plantarum* HCS03-001

指示菌名称	指示菌类型	抑菌圈直径(mm)
大肠埃希氏菌 ATCC25922	G ⁻	18.87±0.09 ^c
金黄色葡萄球菌 ATCC12598	G ⁺	21.59±0.16 ^d
鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028	G ⁻	17.22±0.12 ^c
单增李斯特菌 ATCC19115	G ⁺	14.4±0.08 ^b
福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572	G ⁻	22.09±0.05 ^d
牙龈卟啉单胞菌 ATCC33277	G ⁻	11.24±0.17 ^a
变异链球菌 GIM1.530	G ⁺	25.97±0.09 ^e

注: 不同字母表示差异显著($P<0.05$), 表 7、表 8 同。

表7 小肠运动试验结果
Table 7 Results of intestinal motility test

剂量分组(g/kg)	动物数(只)	给样体积(mL/kg)	墨汁推进率(%)
空白对照	10		75.59±8.09 ^c
模型对照	10	10	32.38±5.67 ^a
1.5	10		49.08±7.57 ^b
3.0	10		52.05±10.05 ^b

降低($P<0.05$),首次排黑便时间显著增加($P<0.05$),说明小鼠便秘模型构建成功。经过服用受试物后,1.5和3.0 g/kg剂量组的6 h排黑便粒数显著高于模型对照组($P<0.05$),首次排黑便时间显著短于模型对照组($P<0.05$),说明植物乳杆菌 HCS03-001 对盐酸洛哌丁胺的便秘模型有较好的排便效果。

表8 排便粒数、排便时间试验结果
Table 8 Defecation particle number and defecation time

剂量分组(g/kg)	动物数(只)	给样体积(mL/kg)	6 h排黑便粒数	首次排黑便时间(min)
空白对照	10		4.2±2.7 ^c	204.0±29.8 ^a
模型对照	10	10	1.1±0.6 ^a	304.5±22.8 ^c
1.5	10		2.2±1.1 ^b	271.0±33.7 ^b
3.0	10		2.9±1.4 ^b	249.0±21.8 ^b

3 结论

通过对植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) HCS03-001的安全性评价,该菌株在溶血性实验中表现为不溶血,无致病性;耐药实验中,对青霉素(PEN)、氨苄西林(AM)、亚胺培南(IP)、美罗培南(MP)、利奈唑胺(LZ)、达托霉素(DPC)敏感,对红霉素(EM)中敏,对万古霉素(VA)耐药;在急性经口毒性实验中,小鼠精神状况较好,进食稳定,各内脏器官无异常,无中毒情况发生。在益生特性评价试验中,该菌株对酸及胆盐环境的耐受性良好,对肠道主要革兰氏阳性与革兰氏阴性致病菌及口腔致病菌(牙龈卟啉单胞菌和变异链球菌)均有抑制作用,对小鼠的盐酸洛哌丁胺的便秘模型有较好的促排便效果。综上,植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) HCS03-001具有良好的安全性及益生特性,为进一步生产应用提供了理论基础。

参考文献

[1] CHAN C W, MCCULLEY S J, MACMILLAN R D. Autologous fat transfer—a review of the literature with a focus on breast cancer surgery[J]. *Journal of Plastic Reconstructive and Aesthetic Surgery*, 2008, 61(12): 1438–1448.

[2] AZNAR E, BUENDIA B, GARCIA-PEIYELA E, et al. Community-acquired urinary tract infection caused by vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* clinical isolate[J]. *Revista Espanolade Quimioterapia*, 2004, 17(3): 263–265.

[3] BESSELINK M G, SANTVOORT H C, BUSKENS E, et al. Probiotic prophylaxis in predicted severe acute pancreatitis: A randomised, double-blind, placebo-controlled trial[J]. *Lancet*, 2008, 371(9613): 651–659.

[4] 曹承旭,郭晶晶,乌日娜,等.植物乳杆菌的生理功能和组学研究进展[J].*乳业科学与技术*,2018,41(1):33–39. [CAO C X, GUO J J, WU R N, et al. Advances in understanding the physiological function and omics of *Lactobacillus plantarum*[J]. *Journal of Dairy Science and Technology*, 2018, 41(1): 33–39.]

[5] MARAGKOUAKIS P A, MOUNTZOURIS K C, ROSU C, et al. Feed supplementation of *Lactobacillus plantarum* PCA 236 modulates gut microbiota and milk fatty acid composition in dairy goats—a preliminary study[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, 141(1): 109–116.

[6] DONG H, ROWLAND I, YAQOOB P. Comparative effects of six probiotic strains on immune function *in vitro*[J]. *The British Journal of nutrition*, 2012, 108(3): 459–470.

[7] LI X, WANG N, YIN B, et al. Effects of *Lactobacillus plantarum* CCFM0236 on hyperglycaemia and insulin resistance in high-fat and streptozotocin-induced type 2 diabetic mice[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2016, 121(6): 1727–1736.

[8] LI X, WANG N, YIN B, et al. *Lactobacillus plantarum* X1 with α -glucosidase inhibitory activity ameliorates type 2 diabetes in mice[J]. *Rsc Advances*, 2016, 6(68): 63536–63547.

[9] LIU Y, ZENG S, LEU Y, et al. Antihypertensive effect of a combination of uracil and glycerol derived from *Lactobacillus plantarum* strain TWK10-fermented soy milk[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(33): 7333–7342.

[10] NEJATI F, RIZZELLO C G, DI CAGNO R, et al. Manufacture of a functional fermented milk enriched of Angiotensin-I converting enzyme(ACE)-inhibitory peptides and γ -amino butyric acid (GABA)[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2013, 51(1): 183–189.

[11] 朱广素,王刚,王园园,等.植物乳杆菌通过调节肠道短链脂肪酸缓解代谢综合征[J].*食品科学*,2019,40(13):102–109. [ZHU G S, WANG G, WANG Y Y, et al. *Lactobacillus plantarum* alleviates metabolic syndrome by modulating intestinal short-chain fatty acid levels[J]. *Food Science*, 2019, 40(13): 102–109.]

[12] LIU J, HU D, CHEN Y, et al. Strain-specific propensities of *Lactobacillus plantarum* for prevention of *Salmonella* infection[J]. *Food & Function*, 2018, 9(7): 3673–3682.

[13] CAMPANA R, VAN S H, BAFFONE W. Strain-specific probiotic properties of lactic acid bacteria and their interference with human intestinal pathogens invasion[J]. *Gut Pathogens*, 2017, 9(1): 12.

[14] EKMEKCIU I, FIEBIGER U, STINGL K, et al. Amelioration of intestinal and systemic sequelae of murine *Campylobacter jejuni* infection by probiotic VSL#3 treatment[J]. *Gut Pathogens*, 2017, 9(1): 17.

[15] 王刚,贺禹丰,陈晓华,等.乳酸菌生物学特性与其拮抗空肠弯曲杆菌在小鼠肠道定植能力的分析[J].*食品与发酵工业*,2017,43(8):73–80. [WANG G, HE Y F, CHEN Q H, et al. Biological characteristics of lactic acid bacteria and its antagonistic effect on *Campylobacter jejuni* colonization in intestinal tract of mice[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2017, 43(8): 73–80.]

[16] 易若琨, 霁宇, 王强, 等. 植物乳杆菌 YS-1 对活性炭诱导小鼠便秘的预防作用[J]. *食品科学*, 2017, 38(17): 238–243. [YI R

- K, QIAN Y, WANG Q, et al. Preventive effect of *Lactobacillus plantarum* YS-1 on activated carbon-induced constipation in mice[J]. *Food Science*, 2017, 38(17): 238-243.]
- [17] NEMOTO M, KUDA T, EDA M, et al. Protective effects of Mekabu aqueous solution fermented by *Lactobacillus plantarum* Sanriku-SU7 on human enterocyte-like HT-29-luc cells and DSS-induced murine IBD model[J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2017, 9(1): 48-55.
- [18] 王尔胤. 具有缓解结肠直肠癌功能的乳酸菌的筛选与机制研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2017. [WANG E Y. The screening of *Lactobacillus* which can suppress colorectal cancer and the research of its mechanism[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2017.]
- [19] LIU W H, CHUANG H L, HUANG Y T, et al. Alteration of behavior and monoamine levels attributable to *Lactobacillus plantarum* PSI28 in germ-free mice[J]. *Behavioural Brain Research*, 2016, 298(Pt B): 202-209.
- [20] DHALIWAL J, SINGH D P, SINGH S, et al. *Lactobacillus plantarum* MTCC 9510 supplementation protects from chronic unpredictable and sleep deprivation-induced behaviour, biochemical and selected gut microbial aberrations in mice[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2018, 125(1): 257-269.
- [21] AYMERICH T, MARTIN B, GARRIGA M, et al. Microbial quality and direct PCR identification of lactic acid bacteria and non-pathogenic staphylococci from artisanal low-acid sausages[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(8): 4583-4594.
- [22] 武万强, 王琳琳, 赵建新, 等. 植物乳杆菌生理特性及益生功能研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(1): 1-13. [WU W Q, WANG L L, ZHAO J X, et al. Research progress on physiological characteristics and probiotic function of *Lactobacillus plantarum* [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2019, 45(1): 1-13.]
- [23] 张丹青. 潜在应用乳酸菌安全性的初步评价 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2016. [ZHANG D Q. Preliminary safety assessment of lactic acid bacteria strains for potential use in industrial[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2016.]
- [24] 郑柳青, 刘冬梅, 张馨月等. 鼠李糖乳杆菌 LR-ZB1107-01 的安全性评价及其益生特性初步研究 [J]. *食品工业科技*, 2020, 41(11): 111-116. [ZHENG L Q, LIU D M, ZHANG X Y, et al. Assessment of safety and probiotic characteristics of *Lactobacillus rhamnosus* ZB1107-01[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(11): 111-116.]
- [25] 黄丽. 植物乳杆菌 C88 的抗氧化作用及安全性评价 [D]. 长春: 东北师范大学, 2012. [HUANG L. Antioxidative activity and safety assessment of *Lactobacillus plantarum* C88[D]. Changchun: Northeast Normal University, 2012.]
- [26] 朱振军, 黄国宏, 梁晓琳, 等. 罗伊氏乳杆菌的益生特性及安全性分析 [J]. *现代食品科技*, 2016, 32(6): 315-320. [ZHU Z J, HUANG G H, LIANG X L, et al. Analysis of probiotic properties and safety of *Lactobacillus reuteri*[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2016, 32(6): 315-320.]
- [27] PEREIRA D, GIBSON G R. Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(9): 4689-4693.
- [28] 田原, 季子非, 郭浩南, 等. 副干酪乳杆菌 L1 的安全性及益生性评价 [J]. *食品工业科技*, 2019, 40(12): 120-126. [TIAN Y, JI Z F, GUO H N, et al. Safety and probiotic evaluation of *Lactobacillus paracasei* L1 [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(12): 120-126.]
- [29] PATEL A K, SINGHANIA R R, PANDEY A, et al. Probiotic bile salt hydrolase: Current developments and perspectives[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2010, 162(1): 166-180.
- [30] SAHAR K, MOHAMMAD R, HOSNA H, et al. Isolation and identification of probiotic *Lactobacillus* from local dairy and evaluating their antagonistic effect on pathogens[J]. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 2017, 7(3): 137.
- [31] 周钦育, 许喜林, 赵珊, 等. 婴儿肠道源格氏乳杆菌的安全性评价及益生特性研究 [J]. *食品科学*, 2020, 42(16): 61-68. [ZHOU Q Y, XU X L, ZHAO S, et al. Safety evaluation and probiotic properties of *Lactobacillus gasseri* isolated from intestinal tract of infants[J]. *Food Science*, 2020, 42(16): 61-68.]