蜂粮中 *Lactobacillus kunkeei* 的益生特性研究

章璐婷， 李瑾萌， 王一丁， 雍 彬， 谢 洁， 邵欢欢， 赵金星， 马沁沁*

（四川师范大学 生命科学学院，四川 成都 610101）

摘要：蜂粮是植物花粉、蜂蜜和蜜蜂唾液的发酵混合物，是营养丰富的天然食材。作者从蜂粮中分离到 61 株乳酸杆菌，经 16S rRNA 基因测序，鉴定为 *Lactobacillus kunkeei*。首先，用邻苯二甲醛法对 61 株 *L. kunkeei* 进行胆固醇去除能力检测，其中 5 株菌胆固醇去除能力均大于 15%，菌株 B35 对胆固醇的去除率达到(29.07±1.30)%。随后，对这 5 株 *L. kunkeei* 进行酸耐受性、胆盐耐受性、抗生素耐药性及抑菌等益生特性进行研究。耐酸实验和耐胆盐实验结果表明，5 株 *L. kunkeei* 均具有良好的耐酸性和胆盐耐受性。药敏试验结果表明，5 株 *L. kunkeei* 对 4 种临床常用抗生素(红霉素、克林霉素、庆大霉素、万古霉素)均敏感。通过琼脂扩散法抑菌实验，发现 5 株 *L. kunkeei* 对大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌均有一定的抑菌作用。B35 菌株的细胞黏附性能良好，对 Caco-2 细胞的黏附率达到 3.32%。从蜂粮中分离到 5 株具有良好益生特性的菌株，其中菌株 B35 的益生特性最佳，为益生菌的开发与利用提供了新的菌种资源。

关键词：蜂粮；*Lactobacillus kunkeei*；降胆固醇；益生特性

中图分类号：S 896　**文章编号**：1673-1689(2021)01-0028-08　**DOI**：10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.01.004

Probiotic Characteristics of *Lactobacillus kunkeei* Strains from Bee Bread

ZHANG Luting， *LI Jinmeng*， *WANG Yiding*， *YONG Bin*， *XIE Jie*，
SHAO Huanhuan， *ZHAO Jinxing*， *MA Qinqin**

（College of Life Sciences, Sichuan Normal University, Chengdu 610101,China）

Abstract: Bee bread, a fermented mixture of plant pollen, honey and bee saliva, is a natural and nutritious food. A total of 61 strains of *Lactobacillus* were isolated from the bee bread and identified as *Lactobacillus kunkeei* by 16S rRNA gene sequencing. The activity of 61 strains of *L. kunkeei* to degradate cholesterol was detected by ortho-phthalaldehyde (OPA) method. The degradation rates of 5 strains among them were higher than 15%, and the cholesterol degradation rate of B35 reached (29.07 ±1.30)% . The 5 *L. kunkeei* strains were further studied to investigate their probiotic characteristics including acid resistance, bile salt tolerance, antibiotic resistance and bacteriostatic activities. Their acid and bile salt resistance tests showed that 5 strains of *L. kunkeei* had good acid and bile salt tolerance. The antibiotic susceptibility test results showed that the 5 *L. kunkeei* strains were sensitive to four clinically significant antibiotics including erythromycin, kanamycin, norfloxacin and vancomycin. The antibacterial activity to gram-positive and gram-negative of 5 *L.*

收稿日期：2019-10-09

基金项目：国家自然科学基金项目(31800158)；四川省科技计划项目(2020YJ0380)；四川省教育厅重点项目(16ZA0050)。

* **通信作者**：马沁沁(1978—)，女，博士，副教授，主要从事应用微生物学研究。E-mail：qqma@sicnu.edu.cn

kunkeei strains was tested by agar diffusion method. All the 5 strains inhibited the growth of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The adhesion rate of strain B35 to Caco-2 cells in vitro was 3.32%. In this study, 5 *L. kunkeei* strains isolated from bee bread showed good probiotic performance, of which strain B35 had the best probiotic properties. This study offers new bacteria sources for the development and utilization of probiotics.

Keywords: bee bread, *Lactobacillus kunkeei*, cholesterol lowering, probiotic characteristics

据世界卫生组织统计,全球 50%以上的死亡是缺血性心脏病等疾病引起的[1]。研究表明,动脉粥样硬化(atherosclerosis,AS)是缺血性心脏病的主要原因,而高胆固醇血症是动脉粥样硬化的致病因素[2]。据报道,血脂和胆固醇水平仅降低 1%,患缺血性心脏病的风险就可降低 2%~3%[3]。目前,主要的降血脂药物有阿托伐他汀、辛伐他汀、瑞舒伐他汀等。这些药物几乎都有副作用,如便秘、腹痛、胃肠胀气、过敏反应综合征等,且用药成本较高[4-5]。早在 1970 年,Mann 和 Spoerry 就发现摄入用野生乳酸杆菌发酵的乳制品后,人体血清胆固醇水平降低[6]。乳酸杆菌可以调节人体的胃肠道菌群,具有降低血脂和降低心血管疾病发病率的作用,且没有副作用。

乳酸杆菌是一种通常被认为安全(generally recognized as safe,GRAS)的菌株[10]。因此,寻找乳酸杆菌菌源并筛选出合适的菌种显得尤为重要。蜂粮是植物花粉、蜂蜜和蜜蜂唾液的发酵混合物,可食用。蜜蜂采集的花粉与少量蜂蜜和唾液混合,在蜂巢中发生化学变化,形成具有营养价值的蜂粮产品[7]。也有研究表明,乳酸杆菌广泛分布于蜜蜂肠道,对蜂粮发酵起重要作用[8]。蜂粮部分发酵,易被生物体吸收,因此具有更好的消化率和更丰富的化学成分,能补充人体缺乏的维生素,并有助于消除体内各种毒素[9]。因此,作者拟从蜂粮中分离筛选出具有优良益生特性的降胆固醇乳酸杆菌菌株,为益生菌开发提供新的菌种资源。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 蜂粮 蜂粮取自四川省成都市龙泉驿区同安镇。

1.1.2 主要试剂 邻苯二甲醛、红霉素、卡那霉素、万古霉素、诺氟沙星:Sigma-Aldrich 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司产品;胆固醇:成都市科隆化学品有限公司产品;牛胆盐:北京奥博星生物技术有限责任公司产品;冰醋酸、浓硫酸、无水乙醇、正己烷均为分析纯:国药集团化学试剂有限公司产品;D3350-01 Bacterial DNA Kit:Omega Bio-Tek 公司产品;2×Taq Master mix:天根生化科技(北京)有限公司产品。

1.1.3 培养基 MRS 肉汤、MRS 琼脂、TSB 肉汤:广东环凯微生物科技有限公司产品;Iso-Sensitest 肉汤:赛默飞世尔科技公司产品;MRS-CHOL 培养基:0.1 g/L 胆固醇,0.24 g/L 牛胆盐,0.12 g/L 蔗糖酯,1.2 mL/L 吐温 80,充分混匀后,用玻璃棒碾碎后加入 5 mL/L 冰醋酸,混合液 40 ℃超声处理 20 min,0.45 μm 滤膜过滤处理后迅速加入 1 L MRS 肉汤,同时迅速搅拌,形成均匀稳定的胶体溶液[11];MRS-$CaCO_3$ 固体培养基:MRS 琼脂,2 g/dL $CaCO_3$。

1.1.4 仪器与设备 PowerCycler SL 96 Gradient PCR 自动系列分析仪:安捷伦科技(中国)有限公司产品;YZB/GER 1841-2014 台式高速离心机:赛默飞世尔(中国)有限公司产品;AR224CN 电子天平:奥豪斯仪器(上海)有限公司产品;HZQ-211C 落地恒温培养箱:上海一恒科学仪器有限公司产品;Anoxomat Mark Ⅱ 厌氧培养装置:荷兰 MART 微生物公司产品;WD-12 氮吹仪:杭州奥盛仪器有限公司产品;WFJ7200 可见分光光度计:尤尼柯(上海)仪器有限公司产品。

1.1.5 菌株 大肠埃希氏菌(*Escherichia coli* ATCC 25922)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* ATCC 29213):四川大学生命科学学院生物资源与生态环境教育部重点实验室馈赠。

1.2 方法

1.2.1 乳酸杆菌的分离与鉴定 取蜂粮样品 25 g 溶于 200 mL 无菌生理盐水,充分混匀,用无菌生理盐水进行 10 倍梯度稀释,吸取 10^{-3}、10^{-4} 稀释液倾注于 MRS-$CaCO_3$ 固体培养基中,充分混匀,37 ℃培

养 48 h。挑取具有溶钙圈的单菌落划线于 MRS 琼脂上纯化。将 3 次纯化后的单菌落进行革兰氏染色,观察细胞特征,挑选革兰氏阳性,杆状菌株进行后续研究。挑取单菌落接种于 MRS 肉汤,加体积分数 50%甘油保存于-20 ℃。

将筛选得到的纯菌株 37 ℃培养 48 h,离心收集菌体细胞,用 D3350-01 E.Z.N.A. Bacterial DNA Kit 提取细菌总 DNA。用细菌通用引物 27F (5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′) 和 1492R (5′-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3′) 扩增细菌 16S rRNA 基因,扩增产物送成都擎科梓熙生物技术有限公司测序,测序结果在 NCBI(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/) 进行 Blastn 比对。基于 61 株菌株 16S rRNA 基因序列,用 MEGA 6.06 构建系统发育树[12],分别采用邻接法 (neighbour-joining,NJ) 及最大似然法 (maximum likelihood,ML)。将 *Lactobacillus plantarum*(AP018405)[13],*Lactobacillus delbrueckii*(CP013610)[14],*Lactobacillus acidophilus* (CP010432)[15],*Lactobacillus kunkeei* (KX926549),*Lactobacillus kunkeei*(MG496059),*Lactobacillus kunkeei*(KY496852)作为参考菌株,将 *Enterococcus faecalis* (CP030044)作为外类群。

1.2.2 邻苯二甲醛法测定体外降胆固醇能力

1) 绘制标准曲线 用无水乙醇配制质量浓度为 0.1 g/L 的胆固醇标准液。准确吸取 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 标准液于 25 mL 带塞试管中,加无水乙醇定容至 1 mL。加入 4 mL 邻苯二甲醛溶液,涡旋混匀,室温静置 10 min 后加入 2 mL 浓 H_2SO_4,涡旋混匀,室温静置 10 min 待其显色完全,测定 $A_{550\ nm}$,相同条件下不加胆固醇标准液的样品作为对照。

2)样品处理和检测 以体积分数 5%接种量接种 0.5 麦氏比浊度菌悬液于 30 mL MRS-CHOL 培养基中,37 ℃、120 r/min 震荡,培养 24 h 后,取 1 mL 培养液,8 000 r/min 离心 5 min,取 0.5 mL 上清液于 25 mL 带塞试管中,加质量分数 50% KOH 溶液 2 mL 及体积分数 95%无水乙醇 3 mL,涡旋混匀,60 ℃水浴 10 min 后立即冰水浴处理 5 min,同时加入 5 mL 正己烷,涡旋混匀 30 s,加入 3 mL 蒸馏水,盖上塞子,充分涡旋混匀。取 3 mL 正己烷于干净的试管中,60 ℃ 氮气吹干溶剂后,加入 4 mL 邻苯二甲醛溶液彻底混匀,再加入 2 mL 浓 H_2SO_4 溶液,立即涡旋混匀,室温放置 10 min 待反应充分,再加入少量浓 H_2SO_4 于 10~90 min 内测定 $A_{550\ nm}$。对照组接种同样体积分数的 MRS 肉汤并做相同处理,每组 3 个平行[16]。

$$胆固醇去除率(\%)=(C_{对照}-C_{样品})/C_{对照}\times100\% \quad (1)$$

式中:$C_{对照}$为未接种菌株的 MRS-CHOL 培养基中胆固醇的质量浓度,(μg/mL);$C_{样品}$为发酵液上清液中胆固醇的质量浓度,(μg/mL)。

筛选出具有胆固醇降解活性的菌株进行后续益生特性研究。

1.2.3 耐酸实验 将筛选的菌株传代培养 3 次,取 37 ℃培养 48 h 后 1 mL 的发酵液 10 000 r/min 离心 7 min,收集菌体,用 pH 6.4 的无菌 PBS 溶液洗涤两次,分别用 1 mL pH 为 2.0、3.0、6.4 的 PBS 进行重悬,转移至 9 mL 对应酸度的 PBS 溶液中,37 ℃厌氧培养,分别在 0、1、2、3 h 取样,采用平板计数法检测活菌数,每组 3 个平行[17]。

$$耐酸存活率(\%)=M_t/M_0\times100\% \quad (2)$$

式中:M_t 为所筛菌株经过 pH 为 2.0 或 3.0 的 MRS 肉汤分别处理 0、1、2、3 h 后的活菌数;M_0 为所筛菌株经过 pH=6.4 的 MRS 肉汤分别处理 0、1、2、3 h 后的活菌数。

1.2.4 胆盐耐受实验 以体积分数 10%接种量接种 0.5 麦氏比浊度菌悬液于质量分数 0.3%胆盐,pH 3.0 的 MRS 肉汤培养基中,37 ℃厌氧培养[3]。分别在 0、3、5 h 取样,采用平板计数法检测活菌数,每组 3 个平行[18,9]。

$$耐胆盐存活率(\%)=N_t/N_0\times100\% \quad (3)$$

式中:N_t 为所筛菌株经过 pH 3、胆盐质量分数为 0.3%的 MRS 肉汤处理 3、5 h 后的活菌数;N_0 为所筛菌株经过 pH 3、胆盐质量分数为 0.3%的 MRS 肉汤处理 0 h 后的活菌数[20]。

1.2.5 微量肉汤法测定 *L. kunkeei* 菌株最低抑菌浓度 先在无菌 96 孔板第 1—11 列孔中加入 100 μL 无菌 Iso-Sensitest 肉汤培养基,然后在第 1 列孔中加入质量浓度为 16 μg/mL 的抗生素溶液 100 μL,逐次倍比稀释至第 11 列 (终质量浓度分别为 8、4、2、1、0.5、0.25、0.125 μg/mL),每孔抗生素终体积为 100 μL。每孔依次加入 0.5 麦氏比浊度菌悬液 100 μL,使终体积为 200 μL。以 200 μL/孔的无菌 ISO 肉汤作为阴性对照,200 μL/孔菌液作为阳性对照,37 ℃静置培养 18 h,用酶标仪检测 $A_{600\ nm}$(每组3

个平行)[21]。测量结果根据美国临床和实验室标准协会(clinical and laboratory standards institute,CLSI)颁布的《乳酸菌种类-微量肉汤稀释法敏感性试验信息及解释标准》[22]判定和分析。

1.2.6 琼脂扩散法测定乳酸杆菌抑菌特性 挑取菌斑,接种于 5 mL MRS 肉汤,37 ℃、120 r/min 摇床培养 48 h。取乳酸杆菌发酵液 10 000 r/min 离心 10 min 得上清液,将上清液立即过滤(0.22 μm)除菌体细胞,4 ℃冷藏待用。以体积分数 0.1%接种量分别将大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)ATCC 25922、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)ATCC 29213 与 LB 琼脂混匀后倾倒于平皿中待凝,平皿中事先放好已灭菌的牛津杯,待琼脂凝固后,轻轻取出牛津杯在形成的琼脂孔中分别加入 100 μL 除菌后的发酵上清液,37 ℃厌氧培养 24 h 后测量抑菌圈的直径(mm),每组 3 个平行[18,23]。

1.2.7 乳酸杆菌黏附细胞系 Caco-2 实验 将 Caco-2 细胞培养于补充有质量分数 10%胎牛血清,1% 双抗(青霉素、链霉素浓度各为 100 U/mL)及 1%谷氨酰胺的 DMEM 营养液中,在 CO_2 体积分数 5% 的环境中 37 ℃培养。24 h 后传代一次,调整 Caco-2 浓度为 5×10^5 个/mL。转入 6 孔板,每孔 1 mL。37 ℃培养至单层细胞,弃去培养液,无菌 PBS 缓冲液清洗 3 次,加入 1 ml 乳酸杆菌悬液和 1 mL DMEM 原液在 CO_2 体积分数 5%的环境中 37 ℃培养 2 h,无菌 PBS 清洗 3 次,用体积分数 10%甲醛固定 2 h,无菌 PBS 清洗 3 次,进行革兰氏染色后用光学显微镜用油镜观察,随机选 20 个视野记录黏附的总菌数和细胞数,其比值为每个细胞黏附的细菌数。每孔做 4~5 个平行,重复 3 次。同时进行不加菌的阴性对照[24]。

2 结果与分析

2.1 16S rRNA 基因同源性鉴定

将测序结果进行 Blastn 比对,61 株菌株的部分 16S rRNA 基因序列与 *Lactobacillus kunkeei* 的 16S rRNA 序列的同源性达到 99%以上。通过 NJ 及 ML 算法构建的菌株系统进化树拓扑结构基本一致。如图 1 所示,ML 树显示所有菌株均属同一类群,均为 *Lactobacillus kunkeei*。作为蜜蜂常见的有机共生体,*L. kunkeei* 是最主要的乳酸杆菌菌种,也是蜂房花粉的优势菌种[27],能够特异性附着于上皮细胞表面[28-29]。本研究中蜂粮样品采自夏季,可能是分离菌种单一的主要原因。

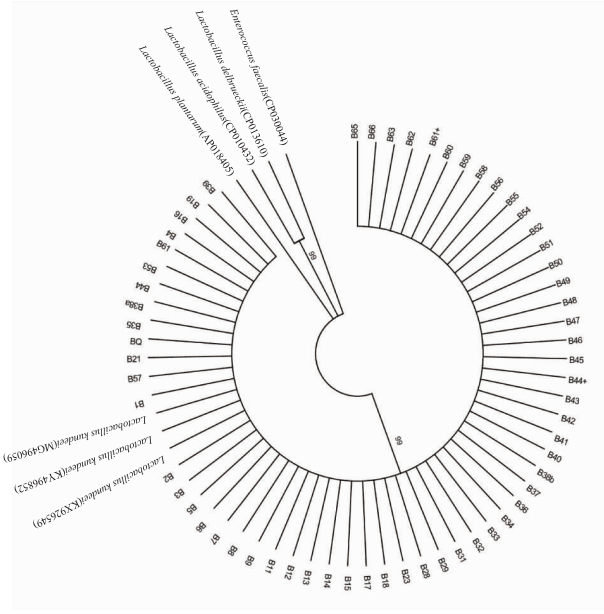


图 1 61 株 *L.kunkeei* 的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of 61 *L.kunkeei* strains

2.2 体外降胆固醇活性分析

高胆固醇血症是目前威胁人类健康的重大问题,乳酸杆菌具有去除胆固醇和降低血脂的作用。通过邻苯二甲醛法检测 61 株 *L. kunkeei* 的胆固醇去除能力,发现其中 5 株菌(B6,B23,B28,B35,B45)胆固醇去除率为 15.87%~29.07%(图 2),B6 和 B35、B45 对降胆固醇的去除率均高于 25%,其中 B35 去除胆固醇的能力最强,达到(29.07±1.30)%,该结果优于 Ley 和 Bosch 等在相同条件下检测的 *L. bulagaricus* 和 *L. plantarum* 的降解率[30-31]。该结果表明,B35 菌株具有较高的胆固醇降解作用,但目前降解机制尚不明确,有待进一步研究。

2.3 耐酸特性研究分析

筛选作为益生菌的乳酸杆菌前提条件是能在一定时间内耐受胃液的酸度,人体胃液的酸度主要随饮食结构的变化而变化,空腹状态下胃液 pH 值为 0.8~0.9,进食过程中,pH 值范围变化较大,达到 1.8~5.0,通常情况维持在 3.0,食物在胃中停留时间一般为 1~3 h[32]。当用 pH 3.0 的 PBS 处理 3 h 后,5 株 *L. kunkeei* 均表现为生长,存活率分别为(72.55±0.11)%、(77.70±0.15)%、(81.39±0.33)%、(84.59±

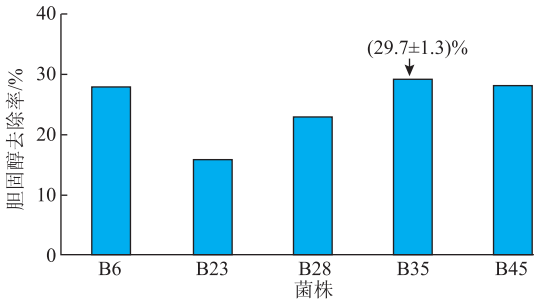


图 2　5 株 *L. kunkeei* 胆固醇去除率(*n*=3)

Fig. 2　Cholesterol assimilation rate of 5 strains of *L. kunkeei*(*n*=3)

0.12)%、(88.43±0.15)%(图 3)。说明 5 株 *L. kunkeei* 都能很好地耐受胃液的酸性条件。该结果优于 Tulumoglu 等从 Tulum 奶酪中分离的植物乳酸杆菌对酸性条件的耐受[17]。当用 pH=2 的 PBS 缓冲液处理 3 h 后，除 B35 外，其余菌株存活率显著降低(P<0.05)。B35 在 3 h 后的存活率达到 (35.71±0.11)%。实验结果表明,5 株 *L. kunkeei* 能耐受餐后胃环境的酸度,顺利进入肠道,发挥益生功能,其中 B35 的耐酸能力最强。

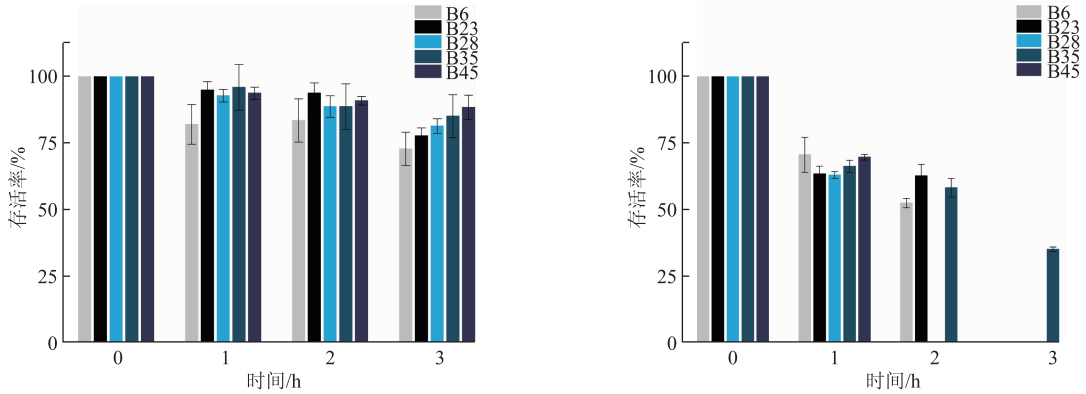


图 3　在酸性条件下 5 株 *L. kunkeei* 的存活率

Fig. 3　Survival rate of 5 *L. kunkeei* strains under acidic condition

2.4　胆盐耐受性分析

在生物体内,胆盐作为一种生物清洁剂,通过其乳化和水解脂质的能力使其在脂肪的消化中起着十分重要的作用[33],是否能在一定时间内耐受高胆盐浓度是作为益生菌的乳酸杆菌在肠道中生存和增殖的前提条件[31]。以在酸性(pH 3.0)厌氧条件,在质量分数 0.3%的胆盐条件下菌株存活率评价菌株胆盐耐活性。如图 4 所示,所筛选的 5 株菌都具有一定胆盐耐受能力。在此高胆盐质量分数下处理 5 h 后,5 株菌的存活率菌均超过 50%,其中 B35 存活率达到(57.27±2.30)%,这与 Anandharaj 的结果相近[3]。说明所筛选的 5 株 *L. kunkeei* 能够在小肠内存活并发挥益生性能。

2.5　抗生素耐受性分析

备选益生菌的菌株首要要求是对人体绝对安全,不能具有潜在可转移的抗生素耐药基因[34]。根据 CLSI《乳酸菌种类-微量肉汤稀释法敏感性试验信息及解释标准》[22],5 株菌对 4 种临床常用抗生素都

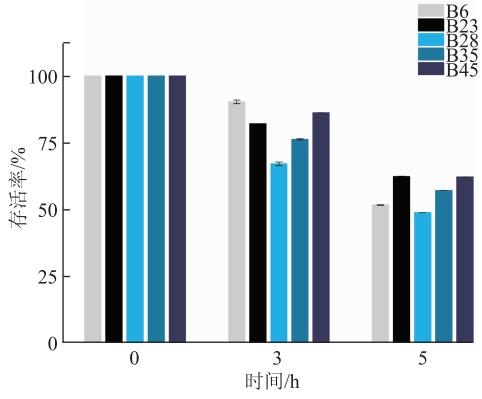


图 4　5 株 *L. kunkeei* 的胆盐耐受性(*n*=3)

Fig. 4　Bile salt tolerance of 5 strains of *L. kunkeei*(*n*=3)

高度敏感(表 1)。乳酸杆菌通常被认为对万古霉素有耐药性[35],而本研究中所有菌株均对万古霉素敏感。所有菌株分离于四川地区的蜂粮,Fei-li Xu 等[36]及 Qinqin Ma[37]等分别在我国市售乳制品和四川地区泡菜中发现对万古霉素敏感的乳酸杆菌。这可能

表 1　5 株 *L. kunkeei* 对抗生素的最低抑菌质量浓度

Table 1　Minimum inhibitory concentration of antibiotics for 5 *L. kunkeei* strains

抗生素	质量浓度/(μg/mL)				
	B6	B23	B28	B35	B45
红霉素	≤0.125	≤0.125	≤0.125	0.25	≤0.125
克林霉素	≤0.125	≤0.125	≤0.125	≤0.125	≤0.125
庆大霉素	0.250	0.250	≤0.125	0.250	0.250
万古霉素	1	≤0.125	0.25	1	0.5

是由于地区特异性造成的,其原因尚不明确。上述结果表明,5 株 *L. kunkeei* 对受试抗生素敏感,携带相应耐药基因风险很低,可作为益生菌菌种使用。

2.6　抑菌活性分析

以抑菌圈直径评价 *L. kunkeei* 抑菌活性,结果见表 2。5 株 *L. kunkeei* 发酵液对常见革兰氏阴性(*E. coli*,ATCC 25922)和革兰氏阳性病原菌(*S. aureus*,ATCC 29213)的生长均有不同程度的抑制。B6、B23、B28 及 B35 对 *E. coli* 及 *S. aureus* 抑菌作用效果无显著性差异(P>0.05),而 B45 的抑菌能力偏弱(P<0.05)。B6、B23、B28 及 B35 发酵液有广谱抑菌性,这与陈秀金等人的研究结果一致[38]。这 4 株 *L. kunkeei* 具有良好的抑菌活性,可以在肠道内抑制致病菌的生长,具备构建健康的肠道菌群,调节肠道微环境的潜力。

表 2　5 株 *L. kunkeei* 对常见致病菌抑菌活性(n=3)

Table 2　Bacteriostatic activities of 5 *L. kunkeei* strains to *E. coli* and *S. aureus* (n=3)

致病菌	*d*/mm				
	B6	B23	B28	B35	B45
E. coli	14±1	20±3	19±2	17±1	13±1
S. aureus	13±2	16±2	17±1	16±2	13±1

2.7　Caco-2 细胞黏附特性

选择胆固醇降解能力及对酸与胆盐耐受性都最强的 B35 进行体外黏附 Caco-2 细胞能力的测定。B35 的初始浓度 1.616×10^8 CFU/mL。与 Caco-2 细胞作用后,B35 的浓度分别为 5.36×10^6 CFU/mL。B35 的黏附率为 3.32%,与占萌等[24]对乳酸杆菌的黏附性测定结果相比较,B35 的黏附性低于商用嗜酸乳杆菌 NCFM 的黏附性,但明显高于鼠李糖乳杆菌。表明 B35 可在肠道定殖,且不会由于长期定植而造成肠道微生物系统的紊乱。

3　结　语

作者自蜂粮种分离到 61 株菌株,从中筛选到 5 株具有较强降解胆固醇能力的菌株,其中 B35 菌株降胆固醇能力最强。乳酸杆菌进入肠道需经过胃的低 pH 环境和肠道的高胆盐环境,通过对酸耐受、胆盐耐受、抗生素耐受、抑菌活性等益生特性的检测,发现 B35 菌株性能最佳,可作为良好的益生菌菌种资源。下一步将对 B35 进行体内实验,探索其在体内的降解胆固醇效果,并对其降解胆固醇的机制进行进一步研究。

参考文献:

[1] WHO,The top 10 causes of death[EB/OL]. https://www.who.int/zh/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death.

[2] YANG S H,DU Y,LI X L,et al. Triglyceride to high-density lipoprotein cholesterol ratio and cardiovascular events in diabetics with coronary artery disease[J]. **American Journal of the Medical Sciences**,2017,354(2):117-124.

[3] ANANDHARAJ M,SIVASANKARI B. Isolation of potential probiotic *Lactobacillus oris* HMI68 from mother's milk with cholesterol-reducing property[J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering**,2014,118(2):153-159.

[4] LANGSJOEN P H,LANGSJOEN J O,LANGSJOEN A M,et al. Treatment of statin adverse effects with supplemental coenzyme

Q 10 and statin drug discontinuation[J]. **BioFactors**,2005,25(1 - 4):147-152.
[5] HOU R M,GOLDBERG A C. Lowering low-density lipoprotein cholesterol:statins,ezetimibe,bile acid sequestrants,and combinations:comparative efficacy and safety[J]. **Endocrinology and Metabolism Clinics**,2009,38(1):79-97.
[6] BOSCH M,FUENTES M C,AUDIVERT S,et al. *Lactobacillus plantarum* CECT 7527,7528 and 7529:probiotic candidates to reduce cholesterol levels[J]. **Journal of the Science of Food and Agriculture**,2014,94(4):803-809.
[7] SOBRAL F,CALHELHA R C,BARROS L,et al. Flavonoid composition and antitumor activity of bee bread collected in northeast portugal[J]. **Molecules**,2017,22(2):248.
[8] VASQUEZ A,OLOFSSON T C. The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread [J]. **Journal of Apicultural Research**,2009,48(3):189-195.
[9] KIELISZEK M,PIWOWAREK K,KOT A M,et al. Pollen and bee bread as new health-oriented products:a review[J]. **Trends in Food Science & Technology**,2018,71:170-180.
[10] BORRIELLO S P,HAMMES W P,HOLZAPFEL W,et al. Safety of probiotics that contain *Lactobacilli* or *Bifidobacteria*[J]. **Clinical Infectious Diseases**,2003,36(6):775-780.
[11] 刘长建,姜波,安晓雯,等. 菠菜中降胆固醇乳酸菌的筛选及鉴定[J]. 食品与生物技术学报,2010,29(6):937-940.
[12] TAMURA K,STECHER G,PETERSON D,et al. MEGA6:molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. **Molecular Biology and Evolution**,2012,30(12):2725-2729.
[13] NODA M,SHIRAGA M,KUMAGAI T,et al. Characterization of the SN35N strain-specific exopolysaccharide encoded in the whole circular genome of a plant-derived *Lactobacillus plantarum*[J]. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**,2018,41(4),536-545.
[14] YANG L,CHEN Y,LI Z W,et al. Complete genome sequence of *Lactobacillus acidophilus* MN-BM-F01 [J]. **Genome Announcements**,2016,4(1):699-714.
[15] IARTCHOUK O,KOZYAVKIN S,KARAMYCHEV V,et al. Complete genome sequence of *Lactobacillus acidophilus* FSI4,isolated from yogurt[J]. **Genome Announcements**,2015,3(2):1028-1039.
[16] RUDEL L L,MORRIS M D. Determination of cholesterol using o-phthalaldehyde[J]. **Journal of Lipid Research**,1973,14(3):364-366.
[17] TULUMOGLU S,YUKSEKDAG Z N,BEYATLI Y,et al. Probiotic properties of *Lactobacilli* species isolated from children's feces[J]. **Anaerobe**,2013,24:36-42.
[18] TULUMOGLU S,KAYA H,SIMSEK O. Probiotic characteristics of *Lactobacillus* fermentum strains isolated from tulum cheese [J]. **Anaerobe**,2014,30:120-125.
[19] LI Q,LIU X,DONG M,et al. Adhesion and probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* isolated from Chinese traditional fermented soybean paste[J]. **Global Advanced Research Journal of Food Science and Technology**,2015,4(1):1-9.
[20] 王今雨,满朝新,杨相宜,等. 植物乳杆菌 NDC 75017 的降胆固醇作用[J]. 食品科学,2013,34(3):243-247.
[21] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). M07-A9 Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically—ninth edition[S]. Wayne,PA,USA,2012.
[22] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). M45-A2 Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria;Approved Guideline—Second Edition[S]. Wayne:2010.
[23] 于志会,李常营. 酸菜来源植物乳杆菌耐受性和吸收胆固醇能力[J]. 吉林农业科技学院学报,2011,20(2):4-6.
[24] 占萌,李柏良,王成凤,等. 15 株乳酸菌的表面性质及其黏附能力[J]. 食品工业科技,2018,39(24):128-133.
[25] EDWARDS C G,HAAG K M,COLLINS M D,et al. *Lactobacillus kunkeei* sp. nov.:a spoilage organism associated with grape juice fermentations[J]. **Journal of Applied Microbiology**,1998,84(5):698-702.
[26] NEVELING D P,ENDO A,DICKS L M. Fructophilic *Lactobacillus kunkeei* and *Lactobacillus brevis* isolated from fresh flowers,bees and bee-hives[J]. **Current microbiology**,2012,65:507-515.
[27] ANDERSON K E,CARROLL M J,SHEEHAN T I M,et al. Hive-stored pollen of honey bees:many lines of evidence are consistent with pollen preservation,not nutrient conversion[J]. **Molecular ecology**,2014,23(23):5904-5917.
[28] DJUKIC M,POEHLEIN A,STRAU B J,et al. High quality draft genome of *Lactobacillus kunkeei* EFB6,isolated from a german european foulbrood outbreak of honeybees[J]. **Standards in Genomic Sciences**,2015,10(1):1-9.

[29] RANGBERG A,MATHIESEN G,AMDAM G V,et al. The paratransgenic potential of *Lactobacillus kunkeei* in the honey bee Apis mellifera[J]. **Beneficial Microbes**,2015,6(4):513-523.

[30] BOSCH M,FUENTES MC,AUDIVERT S,et al. *Lactobacillus plantarum* CECT 7527,7528 and 7529:probiotic candidates to reduce cholesterol levels[J]. **Journal of the Science of Food and Agriculture**,2014,94(4):803-809.

[31] LYE H S,RAHMAT-ALI G R,LIONG M T. Mechanisms of cholesterol removal by *Lactobacilli* under conditions that mimic the human gastrointestinal tract[J]. **International Dairy Journal**,2010,20(3):169-175.

[32] BEGLEY M,HILL C,GAHAN C G. Bile salt hydrolase activity in probiotics[J]. **Applied and Environmental Microbiology**,2006,72(3):1729-1738.

[33] 敖晓琳,蒲彪,蔡义民,等. 发酵乳杆菌及其益生特性研究进展[J]. 食品与生物技术学报,2015,34(2):121-127.

[34] ARASU M V,JUNG M W,ILAVENIL S,et al. Characterization,phylogenetic affiliation and probiotic properties of high cell density *Lactobacillus* strains recovered from silage[J]. **Journal of the Science of Food and Agriculture**,2014,94(12):2429-2440.

[35] KLEIN G,HALLMANN C,CASAS I A,et al. Exclusion of vanA,vanB and vanC type glycopeptide resistance in strains of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus rhamnosus* used as probiotics by polymerase chain reaction and hybridization methods[J]. **Journal of Applied Microbiology**,2000,89(5):815-824.

[36] XU F L,GUO Y C,WANG H X,et al. PFGE genotyping and antibiotic resistance of *Lactobacillus* distributed strains in the fermented dairy products[J]. **Annals of Microbiology**,2012,62(1):255-262.

[37] MA Q Q,FU Y,SUN H H,et al. Antimicrobial resistance of *Lactobacillus* spp. from fermented foods and human gut[J]. **LWT – Food Science and Technology**,2017,86(8):201-208.

[38] 陈秀金,马丽苹,曹力,等. 地衣腌菜中产广谱细菌素乳酸菌的筛选与鉴定[J]. 食品与生物技术学报,2016,35(1):42-47.

科　技　信　息

中国科学技术大学采用小龙虾壳辅助重质生物油制备高性能超级电容器电极材料

中国科学技术大学工程科学学院热科学和能源工程系朱锡锋教授研究团队提出“废弃生物质制备高性能超级电容器电极材料”的新方法,采用农林废弃物热解获得的重质生物油(HB)和厨余垃圾中的小龙虾壳,通过简单的合成即可制备高性能超级电容器的电极材料。该研究成果近期以 “Synthesis of 3D-interconnected hierarchical porous carbon from heavy fraction of bio-oil using crayfish shell as the biological template for high-performance supercapacitors”为论文标题发表在国际知名期刊 *Carbon* 上。

该项成果基于生物模板-碱活化的方法,以小龙虾壳为辅助材料,从重质生物油中成功合成了具有超高比表面积(3 095 m^2/g)、高孔容(1.66 cm^3/g)的分层多孔碳(HPCs);同时还研究了活化温度对分层多孔碳(HPCs)杂原子含量的影响,并对获得高性能超级电容器电极材料的工艺条件进行了优化。所制备的分层多孔碳(HPCs)在组装的超级电容器性能测试中表现出宽工作电压和高能量密度,与现有电极材料的性能相比,具有明显的优势,可用于包括电动汽车在内的许多应用领域。

该项成果为从农林废弃物和厨余垃圾等废弃生物质资源中获取高附加值产品开辟了一条新途径。

[信息来源]中国科学技术大学. 中国科大实现小龙虾壳辅助重质生物油制备高性能超级电容器电极材料 [EB/OL]. (2020-12-22). http://news.ustc.edu.cn/info/1055/73430.htm