

泡菜中植物乳杆菌的筛选 及益生活性研究

段超, 万翠香*

(南昌大学食品科学国家重点实验, 江西南昌 330047)

摘要:从民间自制泡菜中筛选乳酸菌。根据菌落形态, 革兰氏染色和溶钙透明圈, 分离得到17株乳酸菌菌株, 用16S rDNA测序鉴定分离菌株, 并测试了其耐酸和耐胆盐能力。结果表明, 筛选菌株中WHLP-01、WHLP-02、WHLP-03和WHPE-02四株菌株可以在pH=2.0的环境下生存2 h; WHLP-01与WHLP-02两株菌株可以在0.3%胆盐浓度下存活; 其中菌株WHLP-01属植物乳杆菌, 其对常见的8株致病菌均有明显的抑制效果和降胆固醇能力, 可以作为微生态制剂的候选菌株深入研究。

关键词:泡菜, 乳杆菌, 益生活性, 16S rDNA

Probiotic activity of a strain of *Lactobacillus plantarum* isolated from local pickles

DUAN Chao, WAN Cui-xiang*

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: In this study, 17 stains were selected from the Chinese traditional fermented food by colonial morphology, gram staining and soluble calcium transparent circle. 16S rDNA sequencing technology was used to confirm their taxonomy status. Their ability of acid resistant and bile salt resistant were tested. Four strains, WHLP-01, WHLP-02, WHLP-03 and WHPE-02, could survived under the environment of pH 2 for two hours. The bile resistance experiment results showed that the WHLP-01 and WHLP-02 strains could survived under ambient of 0.3% bile salt concentration. In addition, it was found that *Lactobacillus plantarum* WHLP-01 had a significant inhibitory effect on the eight common pathogens, and had a good ability to reduce cholesterol. Further studies should be performed on as micro ecological agents.

Key words: pickle; *Lactobacillus*; probiotic activity; 16S rDNA

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)24-0201-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.24.035

乳酸菌(Lactic acid bacteria, LAB)泛指那些以乳酸为主要代谢产物的兼性厌氧菌^[1], 存在于人体胃肠道、阴道。乳杆菌(*Lactobacillus* spp.)是LAB中具有重要生理功能的一个类别^[2], Savage等^[3]对人的肠胃环境内微生物菌群进行分析, 发现乳杆菌(*Lactobacillus* spp.)为主要肠道微生物之一。乳杆菌可以在肠道中发酵, 产生乳酸、过氧化氢与抗菌素等, 对预防和治疗胃肠道疾病有明显效果^[4]; 降低人体摄入胆固醇的量^[5]; 维持阴道低pH环境, 阻止外源病原体的入侵; 起到预防癌症、延缓衰老等益生作用^[6]。作为人体和动物肠道的正常菌群, 乳杆菌在维持肠道的微生态平衡和调节其代谢方面发挥着重要作用^[7]。

作为益生菌活菌制剂的商业开发菌株, 耐酸、耐

胆盐以及拮抗致病菌的能力是首要前提。目前, 一些应用于益生菌产品的菌株存在耐酸、耐胆盐能力弱的特点, 影响了其在机体肠道内发挥益生作用^[8]; 现阶段, 益生菌的研究与筛选主要以产胞外多糖的双歧杆菌^[9]与可发酵乳制品的干酪乳杆菌^[10]为主, 传统发酵食品制作用的植物乳杆菌研究较少。

为此, 本文从民间自制泡菜汁中对乳酸菌进行了分离筛选, 获得了一株植物乳杆菌, 对其耐酸耐胆盐特性、抑菌能力以及降低胆固醇的功能进行了初步探索。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

样本 从江西南昌和宜春地区的民间自制发酵泡菜中分别抽取样本1份和4份, 每份100 g, 采用常

收稿日期: 2015-03-31

作者简介: 段超(1988-), 男, 硕士, 主要从事益生菌及其相关功能方面的研究, E-mail: duanchao4623@163.com。

* 通讯作者: 万翠香(1977-), 女, 博士, 副教授, 主要从事益生菌功能基因与功能蛋白的方面的研究, E-mail: Cuixiangwan@neu.edu.cn。

基金项目: 江西省教育厅(GJJ13098)。

规手段分离筛选获得疑似乳酸菌17株;蛋白胨、牛肉膏、酵母粉、葡萄糖、磷酸氢二钾、乙酸钠、柠檬酸二铵、硫酸镁、硫酸锰、吐温80、琼脂、碳酸钙等MRS配制原料 英国OXIOD;固体胆固醇 山浦化工;PCR Mix 日本TaKaRa;硫酸铁铵 西陇化工。

恒温培养箱 上海智城分析仪器制造有限公司;台式离心机 美国Thermo公司;高温蒸汽压力灭菌锅 上海博讯公司;台式高速冷冻离心机 德国Eppendorf公司;电子pH计 上海伟业仪器厂;电子天平 德国Sartorius公司;721分光光度计 上海第三分析仪器厂;PCR仪 德国Eppendorf公司;DNA水平电泳槽 北京六一仪器公司。

1.2 实验方法

1.2.1 培养基配制 MRS液体培养基:参照文献[11]方法配制。MRS固体培养基:参照文献[14]方法配制,加入2%琼脂。碳酸钙MRS固体培养基:参照文献[14]方法配制,加入2%琼脂与2%碳酸钙。胆固醇MRS液体培养基:参照文献[15]方法配制。

1.2.2 菌株的筛选

1.2.2.1 初筛 取泡菜样本5~10 g,加入盛有20 mL蒸馏水的50 mL离心管中,室温振荡过夜。取培养液1 mL,用无菌生理盐水做10倍梯度稀释,至 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} ,每个梯度取0.1 mL均匀涂布于MRS平板中,于37 °C厌氧培养箱中培养24 h;选取合适梯度生长平板挑取菌落形态特征不同的菌落,经过两次划线分离纯化,获得36株初筛菌株。

1.2.2.2 复筛 将初筛获得的菌株接种于碳酸钙MRS固体培养基;在37 °C培养箱中培养24 h;选取具有明显融钙圈的菌落,对其进行3次平板划线纯化分离培养,获得17株复筛的菌株,并进行革兰氏染色镜检观察。

1.2.3 菌株分子生物学鉴定 用接种环从接种有复筛菌株的MRS固体培养基上挑取纯化单菌落菌样进行菌落PCR反应。

PCR引物选用16S rDNA通用引物27F和1492R(27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'和1492R:5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3')^[12],进行PCR反应;按照无菌H₂O 4.0 μL、PCR Mix 5.0 μL、上下游引物各0.5 μL配制10 μL反应液体系;按照94 °C预变性5 min;94 °C变性0.5 min,52 °C复性0.5 min,72 °C延伸1 min,30个循环;72 °C延伸5 min设置PCR反应条件。

反应完成后,用0.5×TAE缓冲液配制1%琼脂糖凝胶,取PCR产物5 μL进行琼脂糖凝胶电泳,140 mA电泳30 min,然后于GelDoc XR凝胶成像系统下观察成像结果;将PCR产物送上海生工测序分析扩增序列。

1.2.4 菌株耐酸性的测定^[13] 用4 mol/L的HCl溶液,分别将3组MRS液体培养基的pH调节至2、3、4,pH为6.7的MRS培养基作为对照组,一起用于复筛菌株耐酸测试。

将筛选菌株接入普通MRS液体培养基中,37 °C进行厌氧培养24 h,获得不同菌株的种子液;以3% (v/v)接种量接入不同pH的MRS液体培养基中,37 °C

厌氧培养,培养2 h后取样100 μL,以无菌PBS做10倍梯度稀释,至 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 梯度浓度,每个梯度取100 μL分别均匀涂布于MRS平板中,厌氧培养24 h后计算活菌数。

1.2.5 菌株耐胆盐能力测定^[15] 取3组MRS液体培养基,分别加入质量分数为0.1%、0.2%、0.3%的牛胆盐,于115 °C灭菌20 min后成为实验组。未加入胆盐的MRS液体培养基作为对照组。

以3% (v/v)接种量将种子液接入不同胆盐质量分数的MRS液体培养基中,于37 °C厌氧培养,培养2 h后取样100 μL,用无菌PBS做10倍梯度稀释,至5个梯度浓度为 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} ,每个梯度取100 μL分别均匀涂布于MRS平板中,厌氧培养24 h,取合适稀释梯度生长平板观察,以活菌计数法计算活菌数。

1.2.6 抑菌活性测定^[14] 选用实验室保藏的标准菌株,包括单核增生李斯特菌(CMCC 54007),大肠杆菌O157:H7,蜡样芽孢杆菌(ATCC 14579),鼠伤寒沙门氏菌(ATCC 13311),金黄色葡萄球菌(CMCC 26003),阪崎肠杆菌(ATCC 51329),宋内氏志贺菌(ATCC 25931)和铜绿假单胞菌(CMCC 10104)8株致病菌为指示菌,将复筛获得的优良菌株作为供试菌株。选用牛津杯法对其培养液进行抑菌活性测试。根据抑菌圈直径大小,评价其抑菌效果^[15]。

1.2.7 菌株降胆固醇能力测试^[16] 胆固醇含量的测定参照GB/T 15206-1994食品中胆固醇的测定方法——硫酸铁铵法,将测试菌在MRS液体培养基中活化后,按照2% (v/v)的接种比接种至加有100 mg/L胆固醇的MRS液体培养基中,在37 °C厌氧培养24 h。于降解培养0、8、16和24 h四个时间点分别取样,使用酶标仪于560 nm处测定其吸光度,记为A₁;以未接种的含有胆固醇的MRS培养基作为标准组A₀。

$$\text{胆固醇降解率}(\%) = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100$$

1.2.8 数据处理 采用SPSS 17.0统计软件对实验数据进行统计分析,做t检验,所有实验均重复3次,实验数据采用平均值±标准差表示。将实验所得数据由Prism 6软件处理、分析,绘制成相关表格与柱状图;使用MEGA 5软件包将4株标准菌株序列与实验筛选的17株菌株16S rDNA测定序列以Clustal W进行序列比对后,运用Neighbor-Joining软件绘制系统发育树。

2 结果与分析

2.1 菌株筛选结果

2.1.1 菌株革兰氏染色镜检结果 从5份酸菜样本中分离获得36株初筛菌株,经过复筛,获得17株疑似乳酸菌,其菌落、菌体形态观察结果特征描述如表1,部分典型分离株的菌体形态特征如图1所示。从表1中可以看到,筛选的17株菌的菌落均呈乳白色,带光泽;菌体形态包括短杆、长杆和球状,其中WHLP-01,WHLP-02,WHLP-03,WHLP-04,WHLP-05,WHLS-01和WHLS-02形态较为接近,为杆菌;WHPP-01,WHPP-02,WHPP-03,WHPP-04,WHPP-05,WHPP-06,WHPP-07,WHPE-01和WHPE-02的形态相似,为球状菌。它们在MRS固体培养基上生长的菌落饱满、湿润、有光泽,符合乳酸菌的形态特征。

表1 菌落形态观察与融钙圈

Table 1 Results of colony morphology and diameter of dissolved calcium carbonate in MRS solid plate of 17 isolates

筛选菌株	菌落形态	菌体形态	融钙圈直径(cm)
WHLP-01	乳白色,湿润,边缘光滑整齐	长杆状	1.9
WHLP-02	乳白色,湿润,边缘光滑整齐	短杆状	1.9
WHLP-03	乳白色,湿润,边缘光滑整齐	长杆状	1.9
WHLP-04	乳白色,湿润,边缘光滑整齐	长杆状	1.8
WHLP-05	乳白色,湿润,边缘光滑整齐	长杆状	1.9
WHLS-01	乳白色,边缘光滑整齐,质地湿润	长杆状或短杆状	2.0
WHLS-02	乳白色,边缘光滑整齐,质地湿润	长杆状或短杆状	1.4
WHPP-01	乳白色,圆形突起,有光泽	球状	1.5
WHPP-02	乳白色,圆形突起,有光泽	球状	2.0
WHPP-03	乳白色,圆形突起,有光泽	球状	1.8
WHPP-04	乳白色,圆形突起,有光泽	球状	1.8
WHPP-05	乳白色,圆形突起,有光泽	球状	1.6
WHPP-06	乳白色,圆形突起,有光泽	球状	1.3
WHPP-07	乳白色,边缘光滑整齐,质地湿润	球状	2.2
WHPE-01	乳白色,圆形突起,有光泽	球状	1.7
WHPE-02	乳白色,边缘光滑整齐,质地湿润	球状	1.9
WHWC-01	乳白色,圆形突起,有光泽	球状	1.4

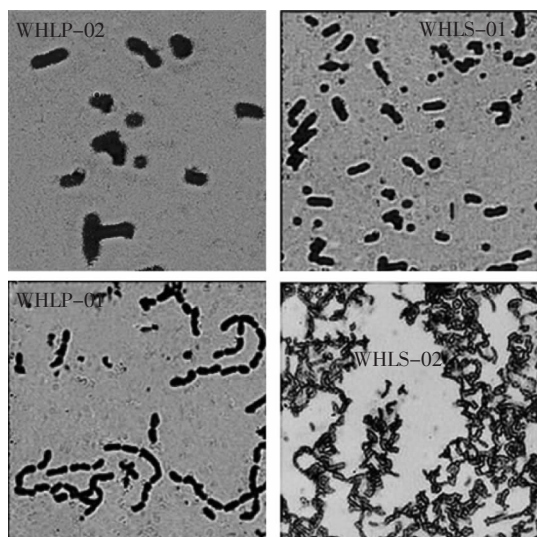


图1 部分筛选菌株革兰氏染色镜检图(×100)

Fig.1 Results of partial type isolates under microscopy by gram-staining(×100)

2.1.2 碳酸钙融钙圈测定结果 本文选用碳酸钙培养基进行复筛,便于在筛选过程中判断菌株是否拥有产酸能力与对菌株产酸能力的强弱进行直观的比较。

17株菌的产酸能力测定结果如表1所示,部分菌株融钙圈效果如图2所示。结果表明,菌株WHPP-07产酸能力最强,融钙圈直径达到2.2 cm;而菌株WHPP-06产酸能力相对较弱;结合革兰氏染色结果分析,WHLP-01、WHLP-02、WHLP-03和WHPE-02四株杆菌菌株具有较好的产酸能力,融钙圈直径都达到1.9 cm。

2.2 筛选菌株16S rDNA测序和同源性分析结果

17株的16S rDNA序列测序,部分PCR结果如图3,测序结果经BLAST软件比对^[7],其归属如表2所示。

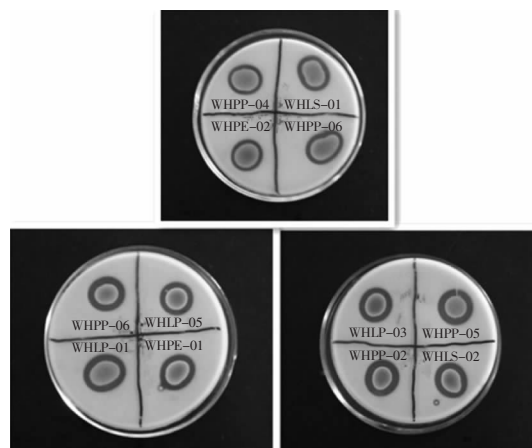


图2 部分菌株在碳酸钙MRS中的融钙圈

Fig.2 Dissolved rings of calcium carbonate in MRS solid plate by isolates

从表2中可以看到,筛选菌株的16S rDNA序列与基因库中对应编号的菌株的序列相似度均在98%以上(除WHPP-01,相似度97%),分离株可鉴别为植物乳杆菌(*L. plantarum*);乳酸杆菌(*Lactobacillus* spp.);微小片球菌(*P. parvulus*);戊糖片球菌(*P. pentosaceus*);耐乙醇片球菌(*P. ethanolidurans*);食蜜魏斯氏菌(*W. cibaria*);戊糖乳杆菌(*L. pentosus*)和清酒乳杆菌(*L. sakei*)。

在标准菌株网站(<http://www.straininfo.net/>)中选出4株相关种属的代表菌株*Lactobacillus plantarum* JCM 1149(T)、*Lactobacillus sakei* subsp carnosus CCUG 31331(T)、*Pediococcus pentosaceus* dsm 20336(T)和*Weissella cibaria* KACC 11862(T),使用MEGA 5软件包将4株标准菌株序列与实验筛选的17株菌株16S rDNA测定序列以Clustal W进行序列比对后,运

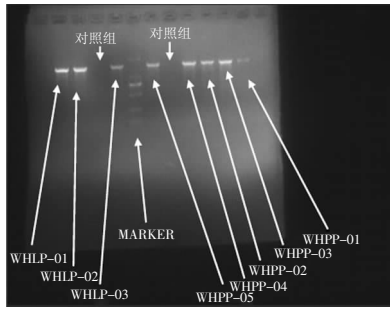


图3 部分菌株PCR结果图

Fig.3 The PCR result of some strains

注:泳道1~11分别为WHLPO1、WHLPO2、对照组、WHLPO3、Marker、WHPP05、对照组、WHPP04、WHPP02、WHPP03、WHPP01。

表2 筛选菌株16S rDNA测序及其同源性比对结果

Table 2 Results of 16S rDNA sequencing and homology analysis for screening strains

初筛菌编号	基因库相似菌株编号	基因库相似菌株种属	相似度 (%)
WHLP-01	GU125615.1	<i>L. plantarum</i>	98%
WHL-01	HQ259237.1	<i>Lactobacillus</i> sp	98%
WHLP-02	AB617649.1	<i>L. plantarum</i>	98%
WHPP-01	KC336484.1	<i>P. parvulus</i>	97%
WHPP-02	EU626013.1	<i>P. pentosaceus</i>	98%
WHLP-03	NC004567.2	<i>L. plantarum</i>	98%
WHPE-01	GU125483.1	<i>P. ethanolidurans</i>	99%
WHPE-02	GU125440.1	<i>P. ethanolidurans</i>	99%
WHPP-07	JX232608.1	<i>P. pentosaceus</i>	98%
WHPP-03	CP006854.1	<i>P. pentosaceus</i>	98%
WHPP-04	AB904769.1	<i>P. pentosaceus</i>	98%
WHPP-05	HM130536.1	<i>P. pentosaceus</i>	98%
WHPP-06	KF048926.1	<i>P. pentosaceus</i>	98%
WHWC-01	AB761300.1	<i>W. cibaria</i>	98%
WHLP-04	AB548877.1	<i>L. pentosus</i>	98%
WHLP-05	KC815025.1	<i>L. plantarum</i>	99%
WHL-02	NC007576.1	<i>L. sakei</i>	99%

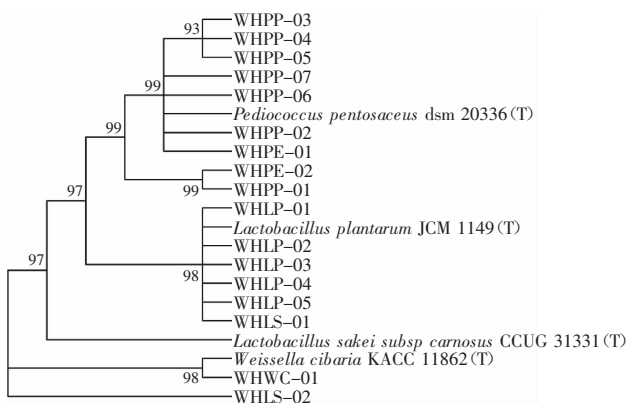


图4 17株筛选菌株的系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree of 17 strains isolated based on 16S rDNA

用Neighbor-Joining软件绘制系统发育树,进行亲缘

性分析^[8],结果如图4。

从图4中可以看出,菌株WHPP-03、WHPP-04和WHPP-05之间有着较近的亲缘性,相似度达到93%;而WHPP-02、WHPP-06、WHPP-07和WHPE-01相似度达到99%;WHPP-01与WHPE-02相似度达到99%。以上菌株均与片球菌标准株*Pediococcus pentosaceus* dsm 20336 (T)有着较高的亲缘性,相似性达到99%;菌株WHLP-01、WHLP-02、WHLP-03、WHLP-04、WHLP-05和WHL-01之间有着较高的亲缘性,且与植物乳杆菌标准株*Lactobacillus plantarum* JCM 1149 (T)之间的相似性达到98%;菌株WHWC-01与食窦魏斯氏菌标准株*Weissella cibaria* KACC 11862 (T)之间相似性达到98%;菌株WHL-02与清酒乳杆菌标准株*Lactobacillus sakei subsp carnosus* CCUG 31331 (T)之间相似性达到97%。

2.3 耐酸实验结果

17株筛选菌株的耐酸实验结果表明17株菌株中,只有WHLP-01、WHLP-02、WHLP-03和WHPE-02四株菌株能在pH2.0的环境下生存,且时间达2 h(图5)。一般正常人的胃液pH在2~3,以上结果提示,该4株筛选菌株具有在胃部酸性环境下存活的能力,可望成为益生菌剂的候选菌株。

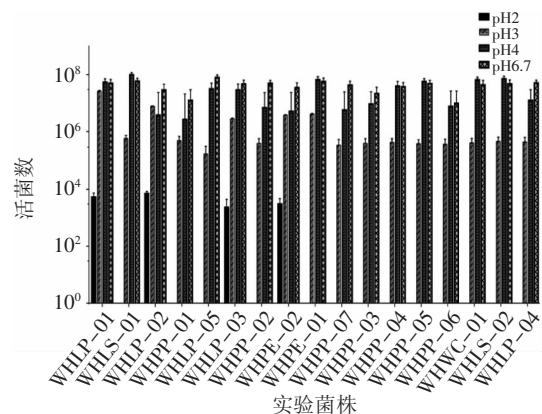


图5 不同酸性pH对筛选菌株的生长影响

Fig.5 The effects of different acid pH on the growing of the strains isolated

2.4 耐胆盐实验结果

在耐酸实验基础上, WHLP-01、WHLP-02、WHLP-03和WHPE-02等4株菌进行了耐胆盐实验,结果如图6所示。

从图6中可知,菌株WHLP-01与菌株WHLP-02在0.3%胆盐浓度下仍然能够生长,而菌株WHLP-03和菌株WHPE-02只能在0.2%及以下的胆盐浓度生长。

综合耐酸和耐胆盐实验结果与统计学分析,菌株WHLP-01兼有较强的耐酸和耐胆盐性能,比WHLP-02出色。为此,作为下一步抑菌实验的菌株。

2.5 菌株WHLP-01抑菌实验结果

植物乳杆菌WHLP-01对8株常见的标准指示菌的体外抑菌实验^[9],结果如表3所示。

从表3中可知,WHLP-01对8株指示菌均有明显

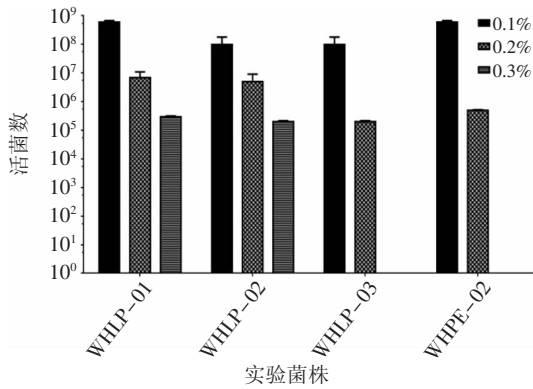


图6 不同胆盐浓度对筛选菌株的生长影响

Fig.6 The effects of bile salt concentration on the growing of the 4 strains isolated

表3 菌株WHP-01培养液对常见致病菌的抑制效果 (n=3)

Table 3 The inhibitory effect of WHP-01 broth against common pathogenic bacteria (n=3)

指示菌	抑菌圈直径(mm)
大肠杆菌(O157:H7)	15.0±0.23
单核增生李斯特菌(CMCC 54007)	21.0±0.32
宋内氏志贺菌(ATCC 25931)	15.0±0.11
沙门氏菌(ATCC 13311)	15.0±0.16
金黄色葡萄球菌(CMCC 26003)	16.0±0.21
铜绿假单胞杆菌(CMCC 10104)	16.0±0.29
阪崎肠杆菌(ATCC 51329)	17.0±0.31
蜡样芽孢杆菌(ATCC 14579)	14.0±0.19

的抑制作用;对单增李斯特菌(CMCC 54007)的抑菌能力最强,对蜡样芽孢杆菌的抑菌能力最弱。由此可见,WHP-01对常见的革兰氏阴性与阳性致病菌均有良好的抑制作用。

2.6 菌株WHP-01降胆固醇实验结果

降低食品和人体血清中的胆固醇含量是乳酸菌益生功能研究的热点之一^[20]。为此,本文测试了WHP-01的降胆固醇的能力,结果如图7所示。

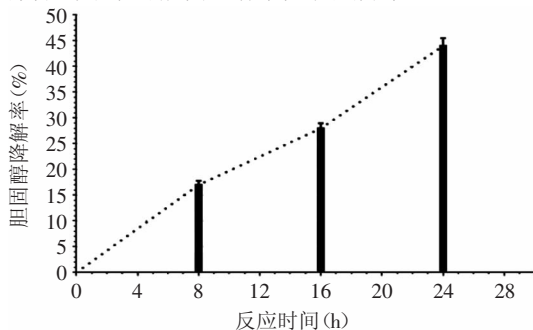


图7 不同培养时间对菌株WHP-01降解胆固醇效果的影响

Fig.7 Cholesterol degradation efficiencies at different cultured time

从图7中可知,菌株WHP-01对胆固醇有着明显的降解效果,其效果随时间呈现上升趋势,最高降解率可达44%。

3 结论

本研究从民间泡菜汁中分离获得17株产酸菌株,通过形态学观察、生理生化分析和16S rDNA分子鉴定其归属。采用低pH环境下的耐受性实验,从17株菌株中筛选出3株植物乳杆菌(WHLP-01、WHLP-02和WHLP-03)和1株耐乙醇片球菌WHPE-02;进而通过高胆盐耐受性实验,选出具有优秀耐胆盐能力的菌株植物乳杆菌WHLP-01与植物乳杆菌WHLP-02;在将WHLP-01与WHLP-02的耐酸、耐胆盐数据进行统计学分析后,优选出兼具耐低pH值与高胆盐能力的植物乳杆菌WHLP-01。菌株WHLP-01对大肠杆菌O157:H7、单增李斯特菌、金黄色葡萄球菌等8株致病菌具有较好的抑菌效果;其在24 h可将胆固醇含量降低44%,与其他降胆固醇益生菌相比,降胆固醇能力较强^[21]。综上所述,植物乳杆菌WHLP-01具有作为益生菌候选菌株的潜能,其功能作用尚需进一步的研究来发掘。

参考文献

- [1] 布坎南RE,吉本斯NE. 伯杰氏细菌鉴定手册[M]. 1984.
- [2] 王传彬,王永坤. 动物源乳杆菌筛选及生物特性参数测定[J]. 江苏农学院学报,1997,18(1):1-5.
- [3] 凌代之. 东秀珠[J]. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法,1999.
- [4] Van Baarlen P, Wells JM, Kleerebezem M. Regulation of intestinal homeostasis and immunity with probiotic *Lactobacilli*[J]. Trends in immunology,2013,34(5):208-215.
- [5] Bujalance C, Jiménez-Valera M, Moreno E, et al. Lack of correlation between *in vitro* antibiosis and *in vivo* protection against enteropathogenic bacteria by probiotic *Lactobacilli* [J]. Research in microbiology,2014,165(1):14-20.
- [6] Castillo NA,Perdigón G,De Leblanc A M. Oral administration of a probiotic *Lactobacillus* modulates cytokine production and TLR expression improving the immune response against *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* infection in mice[J]. BMC microbiology,2011,11(1):177.
- [7] Witkin SS, Linhares IM, Giraldo P. Bacterial flora of the female genital tract: function and immune regulation[J]. Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology,2007,21(3):347-354.
- [8] Barrangou R,Altermann E,Hutkins R,et al. Functional and comparative genomic analyses of an operon involved in fructo-oligosaccharide utilization by *Lactobacillus acidophilus* [J]. Proceedings of the National Academy of Science,2003,100(15):8957-8962.
- [9] 李佳琪,张春蕾,王洁,等. 乳酸菌胞外多糖的分离筛选方法研究进展[J]. 中外食品工业,2014(3):1-3.
- [10] 于微,高学军,马春丽,等. 干酪乳杆菌产细菌素的生物学特性分析[J]. 安徽农业科学,2014,42(32):11542-11543.
- [11] 张颖,张萍. 用改良MRS培养基检测啤酒中乳酸菌的方法[J]. 安徽大学学报:自然科学版,1999,23(4):104-106.
- [12] Kaboré D, Sawadogo-Lingani H, Dicko MH, et al. Acid resistance,bile tolerance and antimicrobial properties of dominant lactic acid bacteria isolated from traditional "maari" baobab (下转第221页)

槲皮苷得率平均值为5.06 mg/g、槲皮素的得率平均值为2.17 mg/g,考虑到实际操作的可行性,修正得出金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮素的提取工艺为:超声功率340 W,提取时间60 min,乙醇浓度60%、料液比0.1 g:15 mL、提取温度50 ℃,在此条件下对提取工艺条件进行3次平行实验,金丝桃苷平均得率为4.97 mg/g, RSD=0.20%,异槲皮苷平均得率为4.84 mg/g, RSD=2.07%,槲皮素平均得率为2.02 mg/g, RSD=4.46%,模型预测理论值分别为5.10 mg/g、5.06 mg/g、2.17 mg/g,实际平均得率分别达到理论预测值的97.5%、95.7%、93.1%,相对误差分别为2.5%、4.5%、6.9%。实验表明实验值和响应面预测值吻合较好,说明该模型优化黄蜀葵花中三种黄酮的提取工艺是可靠的。

3 结论

本实验基于单因素考察,经过响应面分析法对黄蜀葵花中金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮素的提取工艺优化,由Design-Expert 8.0.6软件进行Box-Behnken中心组合设计分析,得到金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮素的提取工艺参数是超声功率340 W,提取时间60 min,乙醇浓度60%。三次工艺验证得到黄蜀葵花中金丝桃苷平均得率为4.97 mg/g, RSD=0.20%;异槲皮苷得率为4.84 mg/g, RSD=2.07%;槲皮素得率为2.02 mg/g, RSD=4.46%,与文献[5]中金丝桃苷含量:0.334%~1.030%,异槲皮苷含量:0.162%~0.468%,槲皮素含量:0.019%~0.068%相比较,金丝桃苷、异槲皮苷的提取基本一致,槲皮素含量较高。因此本提取工艺提取率高、操作简便、溶剂环保等优点,可为开发黄蜀葵花系列保健产品和工业化提取提供理论参考。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典2010版一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:287.
- [2] 周正华,杜安全,王先荣. 黄蜀葵花中黄酮类成分的含量测定[J]. 中药材,2004,27(11):835-836.

- [3] 石芸,池玉梅,谈献和,等. 黄蜀葵花HPLC指纹图谱及金丝桃苷、槲皮素含量测定研究[J]. 西北药学杂志,2011,26(6):399-402.
- [4] 林萍,易宏伟,张斐. 金丝桃苷药理作用研究进展[J]. 中国现代中药,2012,14(10):23-26.
- [5] 陆林玲,钱大玮,郭建明,等. 一测多评法测定黄蜀葵花中7个黄酮类成分[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志),2013,33(12):2080-2087.
- [6] Wu LL, Yang XB, Huang ZM, et al. *In vivo* and *in vitro* antiviral activity of hyperoside extracted from *Ablemoschus manihot*(L.) medik[J]. Acta Pharmacol Sin,2007,28(3):404-409.
- [7] Guo A, Liu QC, Hua W, et al. Hepatoprotective evaluation of the total flavonoids extracted from flowers of *Abelmoschus manihot*(L.) Medic:*In vitro* and *in vivo* studies[J]. Journal of Ethnopharmacology,2013,146:794-802.
- [8] Zhang L, Li P, Xing CY, et al. Efficacy and Safety of *Abelmoschus manihot* for Primary Glomerular Disease:A Prospective, Multicenter Randomized Controlled Clinical Trial[J]. American Journal of Kidney Diseases,2014,64(1):57-65.
- [9] 张利斌,张晓庆,李玉平. 异槲皮苷抗抑郁作用实验研究[J]. 药学实践杂志,2011,29(4):272-273.
- [10] 张志琴,朱双雪. 槲皮素的药理活性与临床应用研究进展[J]. 药学研究,2013,32(7):401-403.
- [11] 王雪梅,洪峰,张健. 超声波法提取黄蜀葵花中天然防晒剂的研究[J]. 安徽大学学报:自然科学版,2005,29(4):70-74.
- [12] 钱平,刘志辉. 常温浸泡法提取黄蜀葵花总黄酮的研究[J]. 现代中药研究与实践,2010,24(5):52-54.
- [13] 郑文丽. 黄蜀葵花提取纯化及制剂工艺研究[D]. 石家庄:河北医科大学中医学院,2014:6-19.
- [14] 张华潭,郑文丽,魏艳婷,等. 大孔树脂纯化黄蜀葵花总黄酮的工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(1):28-31.
- [15] 黄运红,高兴强,黎伟伟,等. 超声波提取脐橙皮黄酮类化合物的工艺研究[J]. 食品科学,2009,30(16):102-105.
- [16] 董彩文,刘长虹. 黄秋葵食用胶的制备及应用研究进展[J]. 安徽农业科学,2008,36(13):5687-5688.

(上接第205页)

- seeds fermented condiment[J]. African Journal of Biotechnology, 2014,11(5):1197-1206.
- [13] 周雨霞,王志峰,柳翰凌,等. 传统乳制品中潜在益生植物乳杆菌的体外筛选[J]. 中国乳品工业,2006,34(2):19-21.
- [14] Temmerman R, Pot B, Huys G, et al. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products[J]. International Journal of Food Microbiology 2003,81(1):1-10.
- [15] Manley KJ, Fraenkel MB, Mayall BC, et al. Probiotic treatment of vancomycin-resistant enterococci: a randomised controlled trial[J]. Medical Journal of Australia, 2007,186(9):454-457.
- [16] 徐晶雪,邹积宏,袁杰利. 降胆固醇乳酸菌的筛选及应用的进展[J]. 中国微生态学杂志,2009,21(6):570-571.
- [17] Ruzgar E, Erciyas K. Clustering based distributed phylogenetic

- tree construction[J]. Expert Systems with Applications, 2012,39(1):89-98.
- [18] Chen C, Ai L, Zhou F, et al. Complete nucleotide sequence of plasmid pST-III from *Lactobacillus plantarum* ST-III[J]. Plasmid, 2012,67(3):236-244.
- [19] Amortegui J, Rodríguez-López A, Rodríguez D, et al. Characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* LE5 and LE27 isolated from ensiled Corn[J]. Applied biochemistry and biotechnology, 2014,172(7):3374-3389.
- [20] Ha CG, Cho JK, Lee CH, et al. Cholesterol lowering effect of *Lactobacillus plantarum* isolated from human feces[J]. Journal of microbiology and biotechnology, 2006,16(8):1201-1209.
- [21] 黄玉军,梁文星,刘冬,等. 长寿人群肠道具有降胆固醇特性益生菌的筛选[J]. 中国乳品工业,2013,41(12):13-16.