

六堡茶提取物对高脂小鼠肠道菌群的影响研究

赵园园, 黄丽, 韦保耀*, 滕建文, 夏宁

(广西大学轻工与食品工程学院, 广西南宁 530004)

摘要:将六堡茶提取物与高脂小鼠粪便进行体外发酵培养,比较正常对照组和体外发酵组的菌群变化情况,探讨六堡茶对高脂小鼠肠道菌群的影响。结果显示,随着发酵时间的延长,总厌氧菌的数量与发酵0 h比较呈现显著增长趋势,且在发酵至24 h,总厌氧菌的数量明显超过了正常对照组,而总需氧菌数量在发酵36 h后,才发生显著性变化,较0 h明显降低了8.4%,并显著低于正常对照组水平。其中,双歧杆菌、乳酸杆菌、拟杆菌和肠球菌的数量在发酵36 h后,与正常对照组相比无显著性差异,均趋向于正常对照组水平,而大肠杆菌的数量虽呈降低趋势,但仍高于正常对照组。研究表明,六堡茶提取物能够促进高脂小鼠肠道菌群中厌氧菌的生长,并抑制需氧菌的繁殖,调节高脂饮食引起的小鼠肠道菌群紊乱。

关键词:六堡茶提取物,体外发酵,肠道菌群,高脂血症

Effect of Liupao tea extract on fecal microbiota in hyperlipidemic mice

ZHAO Yuan-yuan, HUANG Li, WEI Bao-yao*, TENG Jian-wen, XIA Ning

(College of Light Industry and Food Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China)

Abstract: The Liupao tea extract were cultured with fecal *in vitro* to investigate the effects of Liupao tea extract on intestinal flora in hyperlipidemia mice. The results showed that the number of total anaerobic increased significantly compared with normal group with the extension of the fermentation time. While the number of total aerobic changed significantly after fermentation 36 h and significantly decreased 8.4% compared with fermentation 0 h. Among them, the number of *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Bacteroides* and *Enterococci* showed no significant difference compared with normal group after fermentation 36 h, and tended to the normal group level. While the number of *E. coli* had shown a decreasing trend, but still higher than the normal group level. The study indicated that the Liupao tea extract could promote anaerobic and inhibit aerobic bacteria in fat mice intestinal flora, regulate disorder of intestinal flora in high-fat diet-induced mice.

Key words: Liupao tea extract; fermentation *in vitro*; intestinal flora; hyperlipemia

中图分类号: TS272.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)21-0364-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.21.067

人体肠道内微生物种类繁多,这些菌群与宿主的健康息息相关^[1]。越来越多的研究表明,肠道菌群与血脂之间有千丝万缕的联系,高脂血症能够影响肠道菌群的结构,使肠道正常菌群系统紊乱,双歧杆菌、乳酸菌等有益菌数量降低^[2-3]。

研究证明茶叶具有改善肠道菌群结构、辅助降血脂的功效。然而研究发现,随着茶的摄入,其功能性物质在胃肠道较稳定,大约有90%~95%的成分未被小肠吸收,而是进入结肠,经过肠道微生物代谢后被吸收入血,进而发挥作用^[4]。吴香兰^[5]、金莉莎^[6]的研究表明茶叶对常见致病菌和肠道有害菌的抑制效果明显,并且能够有效调节肠杆菌、肠球菌、双歧

杆菌和乳杆菌的数量,具有恢复肠道微生态平衡的作用。Tzounis等人通过体外发酵模型对多酚单体对肠道菌群的影响进行了研究,发现加入儿茶素后双歧杆菌的数量显著增加,而大肠杆菌和梭菌属被抑制^[7]。这些研究均表明茶叶的功能性组分能够调节肠道菌群,但未能与某些疾病引起的肠道菌群变化联系起来,对茶叶如何通过肠道菌群发挥其生理功能的研究尚不多见,因此对于茶叶的保健功能作用机制阐述不够全面。

六堡茶属黑茶类,因其独特的品质,成为广西梧州地理标志产品。经实验证明,六堡茶具有降血脂的功效^[8],但其作用机理还未见报道;因此本研究通

收稿日期:2015-02-13

作者简介:赵园园(1988-),女,在读硕士,研究方向:天然产物活性成分功能性研究,E-mail:619992508@qq.com。

*通讯作者:韦保耀(1963-),男,博士,教授,研究方向:天然产物化学成分分离及化学结构研究,E-mail:273417261@qq.com。

基金项目:广西自然科学基金(2012GXNSFBA053024)。

表1 肠道菌群计数用培养基、培养条件
Table 1 Medium, culture conditions for gut flora

菌群	培养基 ^[11]	培养条件	稀释倍数
双歧杆菌(Bif)	BBL培养基	(36±1)℃, 48 h, 厌氧培养	10 ⁻⁶ 、10 ⁻⁷ 、10 ⁻⁸
乳酸杆菌(Lac)	MRS培养基	(36±1)℃, 48 h, 厌氧培养	10 ⁻⁶ 、10 ⁻⁷ 、10 ⁻⁸
拟杆菌(Bac)	BBE培养基	(36±1)℃, 48 h, 厌氧培养	10 ⁻⁶ 、10 ⁻⁷ 、10 ⁻⁸
肠球菌(Ent)	叠氮钠-结晶紫-七叶苷琼脂培养基	(36±1)℃, 48 h	10 ⁻⁶ 、10 ⁻⁷ 、10 ⁻⁸
大肠杆菌(E.coli)	EMB培养基	(36±1)℃, 24 h	10 ⁻⁶ 、10 ⁻⁷ 、10 ⁻⁸
总需氧菌(Totle aerobe)	PCA培养基	(36±1)℃, 48 h	10 ⁻⁶ 、10 ⁻⁷ 、10 ⁻⁸
总厌氧菌(Totle anaerobe)	GAM培养基	(36±1)℃, 48 h, 厌氧培养	10 ⁻⁶ 、10 ⁻⁷ 、10 ⁻⁸

过体外培养的方法将六堡茶提取物与小鼠粪便进行体外发酵,对发酵后的肠道菌群的结构进行分析,研究六堡茶提取物对高脂小鼠的肠道菌群的调整作用,为探讨六堡茶的降血脂机理提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

六堡茶 梧州中茶茶厂,产品批号为:6918;实验小鼠 选择日龄相同的 SPF 级昆明种健康小鼠,雌雄各半,体重为(20±2)g,广西医科大学动物实验中心实验,许可证号为 SCXK 桂 2009-0002;基础饲料与高脂饲料 广西医科大学动物实验中心;血清总胆固醇(TC)检测试剂盒(批号:140104)、血清甘油三酯(TG)检测试剂盒(批号:140301)、血清高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)检测试剂盒(批号:140407) 长春汇力生物技术有限责任公司。

RE-5205 型旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂;SHB-III 型循环水式多用真空泵 郑州长城科工贸有限公司;HHS 型电热恒温水浴锅 上海博迅实业有限公司医疗设备厂;YFD-2000 型真空冷冻干燥机 西安德派生物科技有限公司;YQX-III 型厌氧培养箱 上海龙跃仪器设备有限公司;722 型可见分光光度计 上海分析仪器三厂,HF-800A 型半自动化生化分析仪 上海舒康仪器技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 六堡茶提取物的制备 称取粉碎后的茶叶 10 g,加入 70% 乙醇在 80℃ 下水浴回流浸提 3 次(固液比分别为 1:10、1:8 和 1:6),合并浸提液,离心,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后收集滤液,旋转蒸发,冻干得六堡茶提取物 3.18 g,其茶多酚含量占冻干物质含量的 10.3%。

1.2.2 实验小鼠造模和粪便的采集 将 20 只小鼠编号,随机分为 2 组,各 10 只,一组为正常对照组,一组为高脂模型组。两组均给予基础饲料,适应性喂养 6 d,取尾血,测定 TC、TG、HDL-C 水平。比较正常对照组和高脂模型组 TC、TG、HDL-C 差异均无显著性后,正常组给予基础饲料,高脂组给予高脂饲料,喂养 30 d 后,取尾血,测定 TC、TG、HDL-C 水平。粪便采集:造模成功后,分别采集正常组和高脂组小鼠的粪便于无菌 EP 管中,低温保存,用于后续分析。

1.2.3 体外发酵方法 参考文献[9],取高脂小鼠粪便 1 g,加入到 4 mL 已灭菌的生理盐水中,在涡旋混

合器上混合均匀,过滤。取 1 mL 滤液与 10 mL 厌氧培养液混合,制成肠菌培养液,在肠菌培养液中加入 10 mg 六堡茶提取物,混合均匀,在 37℃ 下进行厌氧培养 0、6、12、24、36 h。实验重复三次,以上操作均在无菌环境下进行。

1.3 分析方法

1.3.1 血脂水平测定 利用自动化生化分析仪和分光光度计,按测定试剂盒使用说明书进行检测。

1.3.2 茶多酚含量的测定 参考文献[10],测定茶多酚的含量,称取 0.1 g 冻干样品,用蒸馏水溶解,转移至 100 mL 容量瓶中,用水定容至刻度,摇匀,待测。

没食子酸工作液的制备:称取 0.110 g ± 0.001 g 没食子酸,于 100 mL 容量瓶中溶解并定容至刻度,摇匀。用移液管分别移取 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 的上述溶液于 100 mL 容量瓶中,分别用蒸馏水定容至刻度,摇匀,浓度分别为 10、20、30、40、50 μg/mL。

测定:用移液管分别移取没食子酸工作液、水(空白对照)及测试液各 1.0 mL 于刻度试管内,在每个试管内分别加入 5.0 mL 的福林酚试剂,摇匀。反应 3~8 min 内,加入 4.0 mL 7.5% Na₂CO₃ 溶液,加水定容至刻度、摇匀。室温下放置 60 min,用 10 mm 比色皿,在 765 nm 波长条件下用分光光度计测定吸光度。

1.3.3 微生物的培养与计数

1.3.3.1 正常对照组小鼠粪便菌群培养 按照 1.2.3 所述,将正常对照组小鼠粪便制成肠菌培养液后,取 1 mL 培养液,用灭菌生理盐水递 10 倍稀释,涂布,培养,平板计数法进行计数。培养条件见表 1。

1.3.3.2 发酵组小鼠粪便菌群培养 分别在培养 0、6、12、24、36 h 后取 1 mL 培养液,如 1.3.3.1 所述操作,平板计数法进行计数。

1.4 数据分析

采用 spss19.0 分析软件对所得数据进行统计分析,分析方法采用单因素 t 检验法, $p < 0.01$ 表示极显著。各组数据均以 $\bar{X} \pm S$ 表示。

2 结果与分析

2.1 小鼠高脂血症模型的建立

具体结果见表 2。

从表 2 可以看出,适应期时,高脂模型组小鼠血脂水平与正常对照组比较,无显著性差异。造模 30 d 后,高脂组小鼠的血清 TG 和 TC 含量分别为

表2 正常对照组与高脂组小鼠血脂水平含量的变化($\bar{X} \pm S$, mmol/L)

Table 2 Changes in mice lipid levels of normal control group and fat group($\bar{X} \pm S$, mmol/L)

组别		TG	TC	HDL-C
适应期	正常对照组	0.71 ± 0.05	2.76 ± 0.20	1.18 ± 0.03
	高脂模型组	0.70 ± 0.11	2.74 ± 0.08	1.16 ± 0.12
造模期	正常对照组	0.72 ± 0.01	2.73 ± 0.13	1.16 ± 0.14
	高脂模型组	3.72 ± 0.02**	7.11 ± 0.13**	0.54 ± 0.04**

注: **表示与正常对照组比较血脂水平差异极显著 $p < 0.01$ 。

表3 小鼠粪便菌群计数结果(\log_{10} CFU·mL⁻¹, $\bar{X} \pm S$)

Table 3 Results of the number of intestinal flora in mice(\log_{10} CFU·mL⁻¹, $\bar{X} \pm S$)

组别	总厌氧菌	总需氧菌	双歧杆菌	乳酸菌	拟杆菌	肠球菌	大肠杆菌	
正常对照组	8.43 ± 0.01	7.06 ± 0.05	8.26 ± 0.02	8.40 ± 0.03	7.57 ± 0.14	7.94 ± 0.10	8.05 ± 0.04	
体外 发酵组	0 h	6.35 ± 0.05**	8.56 ± 0.02**	7.47 ± 0.12**	7.18 ± 0.10**	6.74 ± 0.04**	7.23 ± 0.05**	9.42 ± 0.08**
	6 h	6.78 ± 0.04**##	8.50 ± 0.02**	7.62 ± 0.04**	7.46 ± 0.03**##	6.87 ± 0.02**	7.29 ± 0.01**	9.34 ± 0.03**
	12 h	7.90 ± 0.03**##	8.44 ± 0.02**##	7.67 ± 0.02**##	7.68 ± 0.02**##	7.00 ± 0.03**##	7.33 ± 0.03**	9.27 ± 0.04**
	24 h	8.61 ± 0.04**##	8.42 ± 0.07**##	7.78 ± 0.03**##	7.76 ± 0.05**##	7.25 ± 0.06**##	7.55 ± 0.09**##	9.13 ± 0.03**##
	36 h	8.71 ± 0.02**##	7.84 ± 0.02**##	8.03 ± 0.04**##	8.21 ± 0.06**##	7.66 ± 0.11**##	7.78 ± 0.08**##	8.39 ± 0.07**##

注: **表示与正常对照组比较, 差异性极显著($p < 0.01$); ##表示与发酵0 h比较差异性极显著($p < 0.01$)。

3.72 mmol/L和7.11 mmol/L, HDL-C为0.54 mmol/L, 高脂组与正常对照组比较, TG和TC的含量显著性升高, 而HDL-C含量显著性降低($p < 0.01$)。与国家食药总局颁布的评价方法^[12]中描述一致。因此结果表明高脂血症模型建立成功。

2.2 六堡茶对高脂血症小鼠肠道菌群的影响

菌群计数结果如表3所示。

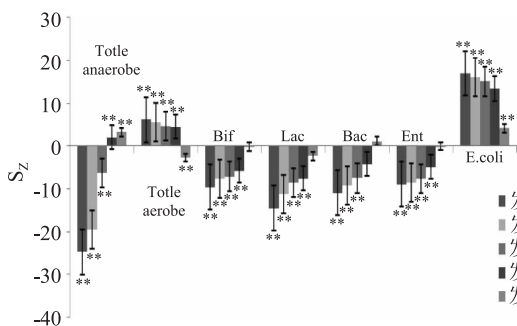


图1 发酵不同时间各菌群数量相对于正常对照组菌群变化情况

Fig.1 Changes of the number of bacterium of

fermentation different time relative to normal control group

注: $S_A = (Q_A - Q_{A0}) / Q_{A0} \times 100\%$; $S_Z = (Q_A - Q_Z) / Q_Z \times 100\%$ 。 S_A : 发酵不同时间各菌群数相对于发酵0 h 菌群数的变化率; Q_A : 发酵不同时间各菌群数量; Q_{A0} : 发酵0 h 菌群数量; S_Z : 发酵不同时间各菌群数相对于正常对照组菌群数的变化率; Q_Z : 正常对照组菌群数量。

2.2.1 高脂小鼠肠道菌群失调验证 由图1可以看出, 发酵0 h的总厌氧菌、双歧杆菌、乳酸菌、拟杆菌和肠球菌的数量与正常对照组比较, 分别降低了24.7%、9.6%、14.5%、10.9%、8.9%, 而需氧菌和大肠杆菌的数量与正常对照组比较分别升高了6.2%、17%, 与正常对照组差异性显著。已有研究证明, 高脂血症可引起小鼠肠道菌群系统发生紊乱^[2-3, 13], 因

此实验结果符合这一结论。

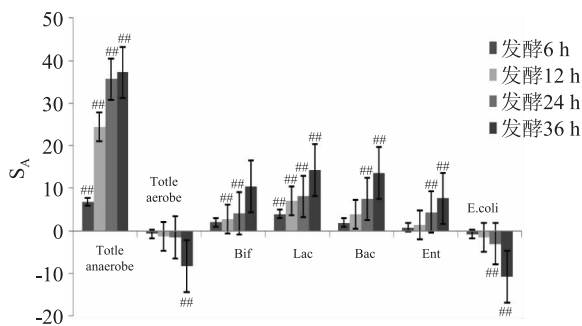


图2 发酵不同时间各菌群数量相对于发酵0 h 菌群变化情况

Fig.2 Changes of the number of bacterium of fermentation different time relative to fermentation 0h group

2.2.2 六堡茶提取物对高脂小鼠肠道菌群数量的影响 由图2可见, 随着发酵时间的延长, 总厌氧菌的数量与发酵0 h比较呈现显著增长趋势, 且在发酵至24 h, 总厌氧菌的数量明显超过了正常对照组(图1), 而总需氧菌数量在发酵36 h后, 才发生显著性变化, 较0 h明显降低了8.4%, 并显著低于正常对照组水平(图1)。结果表明, 六堡茶提取物能促进高脂小鼠粪便菌群中厌氧菌的生长, 并抑制需氧菌的繁殖, 随着发酵时间的延长, 总需氧菌和总厌氧菌数量逐渐趋向于正常小鼠的肠道菌群数量。

双歧杆菌的变化情况: 由图2可知, 六堡茶提取物与高脂小鼠粪便进行发酵至6 h与12 h时, 双歧杆菌数量变化不明显, 发酵至24 h后, 双歧杆菌数量较0 h明显增加了4.1%, 继续发酵至36 h后, 双歧杆菌数量较0 h显著增加了10.4%, 但仍高于正常对照组水平。

乳酸杆菌的变化情况: 由图2可知, 随着发酵时间的延长, 乳酸杆菌的数量呈显著增加趋势, 发酵至36 h, 乳酸杆菌的数量与正常对照组相比无显著性差

异(图1),由此可见,发酵至36 h后,乳酸杆菌的数量趋向于正常对照组水平。

拟杆菌的变化情况:由图2可知,发酵6 h与24 h,拟杆菌的数量变化不明显,发酵至24 h后,拟杆菌数量显著增加,较0 h明显增加了9.2%,继续发酵至36 h,拟杆菌数量较0 h显著增加了10.9%,且在发酵24 h,拟杆菌的数量与正常对照组相比无显著性差异(图1),由此可见,发酵至24 h,拟杆菌的数量趋向于正常对照组水平。

肠球菌的变化情况:由图2可知,肠球菌数量的变化情况与拟杆菌相似,呈逐渐增加趋势,发酵至36 h,肠球菌的数量与正常对照组相比无显著性差异(图1)。

大肠杆菌的变化情况:由图2可知,发酵至24 h,大肠杆菌的数量与0 h相比明显降低了3.1%,继续发酵至36 h,大肠杆菌的数量较0 h显著降低了10.9%,但仍高于正常对照组水平(图1)。

结果表明,六堡茶提取物能够促进高脂小鼠肠道中双歧杆菌、乳酸杆菌、拟杆菌和肠球菌的生长,并在一定程度上抑制大肠杆菌的生长繁殖。

3 结论与讨论

正常人体肠道中的细菌约400~500种,主要有拟杆菌属、乳杆菌属、梭菌属、大肠埃希菌属和双歧杆菌属等,其中约99%为厌氧菌。有研究表明,高脂饮食可使大鼠肠道乳酸菌和双歧杆菌明显降低^[13]。丰富的碳水化合物及膳食纤维能够促进肠道厌氧菌的生长,而由于高脂饮食中脂类成分较多,使大肠菌群的养料来源减少,导致大肠杆菌等有害菌群快速生长,可能成为大肠菌群失衡的原因。而肠道菌群失调同时也会加重脂质代谢紊乱。研究发现,双歧杆菌、乳酸杆菌、肠球菌、拟杆菌中均可产生胆汁酸水解酶(BSH酶),此酶可把结合胆汁酸转变成游离胆汁酸,影响胆汁酸的肠肝循环,促使肝脏利用胆固醇合成胆汁酸增加,使血中的胆固醇更多的被转化,实现降低血胆固醇的作用^[14-20]。双歧杆菌、乳酸杆菌、肠球菌和拟杆菌普遍存在于肠道中,其数量的减少可以削弱血中胆固醇被转化利用的过程,使血脂升高。

茶叶具有改善肠道菌群结构功效,其功能已经得到广泛的认同。吴香兰以茯砖茶、青砖茶、千两茶和六堡茶四种具有代表性的黑茶为研究对象,研究其抑菌效果和对肠道菌群结构的影响,研究表明四种茶叶对常见致病菌和肠道有害菌的抑制效果明显,而对肠道有益菌群双歧杆菌和乳酸菌的生长具有促进作用,且六堡茶抑菌效果相对较好^[5]。茶叶可分为绿茶、黄茶、黑茶、白茶、青茶、红茶六大类。金莉莎也对六大茶类茶叶-石门银峰、君山银针、大红袍、白毫银针、信阳红和茯砖的保健功能进行了研究,建立肠道菌群失衡模型,探讨六种茶叶对肠道菌群的调整作用,结果表明大红袍、茯砖和信阳红能够有效调节肠杆菌、肠球菌、双歧杆菌和乳杆菌的数量,具有恢复肠道微生态平衡的作用^[6]。

本实验通过建立高脂血症小鼠模型,采集小鼠粪便,将六堡茶提取物与高脂小鼠粪便进行发酵培

养,探讨六堡茶提取物对高脂血症小鼠肠道菌群的影响。结果显示,加入六堡茶提取物与高脂小鼠粪便进行发酵培养后,各菌群结构发生明显变化。随着发酵时间的延长,总厌氧菌的数量与发酵0 h比较呈现显著增长趋势,且在发酵至24 h,总厌氧菌的数量明显超过了正常对照组,而总需氧菌数量在发酵36 h后,才发生显著性变化,较0 h明显降低了8.4%,并显著低于正常对照组水平。其中,双歧杆菌、乳酸杆菌、拟杆菌和肠球菌的数量在发酵36 h后,与正常对照组相比无显著性差异,均趋向于正常对照组水平,而大肠杆菌的数量虽呈降低趋势,但仍高于正常对照组。研究结果表明,六堡茶提取物能够促进高脂小鼠肠道菌群中厌氧菌的生长,并抑制需氧菌的繁殖,调节高脂饮食引起的小鼠肠道菌群紊乱。

参考文献

- [1] Eckburg PB, Bik E M, Bernstein C N, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora[J]. *Science*, 2005, 308(5728): 1635-1638.
- [2] 任婷婷. 从高脂血症大鼠模型大、小肠菌群改变探讨肠道菌群与高脂血症的关系[D]. 长沙: 中南大学, 2005.
- [3] 张翼. 膳食诱导肥胖大鼠的肠道菌群结构研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2009.
- [4] Victor R. Preedy. *Tea in Health and Disease Prevention* [M]. London, UK: Academic Press, 2013: 399-483.
- [5] 吴香兰. 黑茶改善胃肠道功能的实验研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2013.
- [6] 金莉莎. 茶对肠道功能调节作用的研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2012.
- [7] Tzounis X, Vulevic J, Kuhnle G, et al. Flavanol monomer-induced changes to the human faecal microflora[J]. *British Journal of Nutrition*, 2008(99): 782-792.
- [8] 彭静静. 六堡茶的降血脂功能性研究[D]. 南宁: 广西大学, 2012.
- [9] Luis Condezo-Hoyos, Indira P Mohanty, Giuliana D Noratto. Assessing non-digestible compounds in apple cultivars and their potential as modulators of obese faecal microbiota *in vitro* [J]. *Food Chemistry*, 2014(161): 208-215.
- [10] 高玉萍, 涂云飞, 杨秀芳, 等. 茶多酚制品中多酚含量测定方法比较研究[J]. *中国茶叶加工*, 2013(3): 28-32.
- [11] 中华人民共和国卫生部. 保健食品检验与评价技术规范[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003.
- [12] 国家食品药品监督管理局. 《辅助降血脂功能评价方法》.
- [13] 徐仁应, 万燕萍, 方启宇, 等. 高脂饮食对大鼠肠道益生菌和肝脂肪含量的影响[J]. *营养学报*, 2011(33): 367-375.
- [14] Pallavi Bhangea, N Sridevi Deu S Bhange, et al. Immobilization of bile salt hydrolase enzyme on mesoporous SBA-15 for co-precipitation of cholesterol[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2014(63): 218-224.
- [15] Fatemeh Miremadia, Mutamed Ayyashb, Frank Sherkat. Cholesterol reduction mechanisms and fatty acid composition of

dissociation, aggregation, and the secondary and tertiary structures of a thaumatin-like protein with a high polyphenol oxidase activity induced by high pressure CO₂ [J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2014, 23: 68-78.

[56] Liu W, Liu J, Liu C, et al. Activation and conformational changes of mushroom polyphenoloxidase by high pressure microfluidization treatment [J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2009, 10(2): 142-147.

[57] Shi C, Dai Y, Liu Q, et al. The FT-IR spectrometric analysis of the changes of polyphenol oxidase II secondary structure [J]. *Journal of Molecular Structure*, 2003, 644(1): 139-144.

[58] 刘野, 张超, 赵晓燕, 等. 高压二氧化碳和超高压对多酚氧化酶和果胶甲酯酶结构的影响 [J]. *食品科学*, 2011, 32(11): 83-87.

[59] 宋丽军, 张丽, 肖建, 等. SCCO₂ 处理对 PPO 分子特性及构象的影响 [J]. *食品与机械*, 2010, 26(5): 6-9.

[60] Sun N K, Song K B. Effect of nonthermal treatment on the molecular properties of mushroom polyphenoloxidase [J]. *Journal*

of Food Science, 2003, 68(5): 1639-1643.

[61] Ellman G L. Tissue sulfhydryl groups [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1959, 82(1): 70-77.

[62] Iametti S, Transidico P, Bonomi F, et al. Molecular modifications of β -lactoglobulin upon exposure to high pressure [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997, 45(1): 23-29.

[63] 刘建华, 瞬时高压作用对多酚氧化酶活性与构象影响的研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2007.

[64] Zhang H, Li L, Tatsumi E, et al. Influence of high pressure on conformational changes of soybean glycinin [J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2003, 4(3): 269-275.

[65] 傅容湛, 董发昕, 边六交. 荧光相图法研究豚诱导牛血清白蛋白的去折叠过程 [J]. *分析测试学报*, 2007, 25(6): 19-22.

[66] Ioniță E, Aprodu I, Stănciuc N, et al. Advances in structure-function relationships of tyrosinase from *Agaricus bisporus* - Investigation on heat-induced conformational changes [J]. *Food Chemistry*, 2014, 156: 129-136.

(上接第 367 页)

cellular membranes of probiotic Lactobacilli and Bifidobacteria [J]. *Journal of Functional Foods*, 2014(9): 295-305.

[16] Guijie Li. Intestinal Probiotics: Interactions with Bile Salts and Reduction of Cholesterol [J]. *Procedia Environmental Sciences*, 2012(12): 1180-1186.

[17] 岳婷婷, 侯红漫. 胆盐水解酶的研究现状 [J]. *中国乳品工业*, 2010(38): 33-37.

(上接第 393 页)

[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2010, 81(3): 560-566.

[41] 曹露. 鱿鱼墨多糖对环磷酰胺所致小鼠肠道黏膜上皮细胞损伤的保护作用研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013.

[42] 左涛, 李学敏, 曹露, 等. 鱿鱼墨多糖改善小鼠肠黏膜免疫及作用机制的研究 [J]. *中国药理学通报*, 2013(08): 1168-1173.

[43] 闵诗刚, 王光, 钟杰平, 等. 乌贼墨多糖对大鼠外周血及血液中抗氧化能力影响 [J]. *食品研究与开发*, 2011(01): 123-125.

[44] Zhong J, Wang G, Shang J, et al. Protective effects of squid ink extract towards hemopoietic injuries induced by cyclophosphamide [J]. *Marine drugs*, 2009, 7(1): 9-18.

[45] 乐小炎, 刘华忠. 乌贼墨多糖对环磷酰胺导致的精子损伤及生育能力的保护作用 [C]: 2013 年中国水产学会学术年会, 中国安徽合肥, 2013.

[46] 董汝晶. 多糖提取方法的研究进展 [J]. *农产品加工(学刊)*, 2014(08): 46-48.

[47] 丁国芳, 黄芳芳, 杨最素, 等. 乌贼墨酶解肽提取方法及其抗肿瘤活性 (英文) [J]. *中国天然药物*, 2011(02): 151-155.

[48] 郑玉寅. 乌贼墨聚糖抗前列腺癌活性研究及产品研发 [D]. 舟山: 浙江海洋学院, 2012.

[49] Y T, H U, K H, et al. Novel fucose-rich glycosaminoglycans from squid ink bearing repeating unit of trisaccharide structure (-6GalNAc alpha 1-3GlcA beta 1-3Fuc alpha 1-) n. [J]. *Biochemical and biophysical research communications*, 1994, 198

[18] 王俊国, 孟和毕力格, 包秋华, 等. 具有胆盐水解酶活性的乳酸菌对高脂血症大鼠的血脂调节作用 [J]. *食品科学*, 2013(34): 257-226.

[19] 李云梅. 长双歧杆菌 NCC2705 胆盐水解酶基因 (BSH) 的克隆表达及其特性研究 [D]. 西安: 西北农林科技大学, 2012.

[20] 王继超. 胆盐水解酶的分离纯化及酶学性质的研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江大学, 2010.

(2): 560-567

[50] 郑玉寅, 杨永芳, 丁国芳, 等. 乌贼墨聚糖的制备工艺与体外抗前列腺癌研究 [J]. *时珍国医国药*, 2012(01): 111-113.

[51] Pushpamali W A, Nikapitiya C, Zoysa M D, et al. Isolation and purification of an anticoagulant from fermented red seaweed *Lomentaria catenata* [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2008, 73(2): 274-279.

[52] 王曦. 乌贼墨聚糖的抗肿瘤作用 [D]. 上海: 第二军医大学, 2005.

[53] Ding G, Huang F, Yang Z, et al. Anticancer Activity of an oligopeptide isolated from Hydrolysates of Sepia Ink [J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2011, 9(2): 151-155.

[54] Huang F, Yang Z, Yu D, et al. Sepia ink oligopeptide induces apoptosis in prostate cancer cell lines via caspase-3 activation and elevation of Bax/Bcl-2 ratio [J]. *Marine drugs*, 2012, 10(10): 2153-2165.

[55] Palumbo A, DiSchia M, Misuraca G, et al. A new dopachrome-rearranging enzyme from the ejected ink of the cuttlefish *Sepia officinalis*. [J]. *Biochemical Journal*, 1994, 299(Pt 3): 839-844

[56] 郑校光, 戚晓玉, 周培根, 等. 乌贼墨中多酚氧化酶分离及纯化 [J]. *上海水产大学学报*, 2001(02): 154-157.

[57] 江津津, 戚晓玉, 周培根. 乌贼墨多酚氧化酶的部分特性 [J]. *上海水产大学学报*, 2002(04): 353-356.

[58] 郑小东, 杨建敏, 王海艳, 等. 金乌贼墨汁营养成分分析及评价 [J]. *动物学杂志*, 2003(04): 32-35.