

粉葛多糖促植物乳杆菌 P9 生长代谢及 发酵液抗氧化活性研究

侯恒威¹, 陈冲², 欧阳辉¹, 刘建兵², 罗权¹, 刘睿颖¹,
陈美庆¹, 李琼^{1*}, 朱卫丰^{1*}

(1. 江西中医药大学, 现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004; 2. 华润江中科研中心, 南昌 330103)

摘要: **目的** 探究粉葛多糖(*Puerariae thomsonii* Radix polysaccharide, PRP)对植物乳杆菌 P9 的促生长代谢作用, 评价其益生作用。**方法** 配制不同质量分数的 PRP 液体培养基并接种 P9, 检测发酵液 OD₆₀₀ 值和 pH, 考察 PRP 对 P9 增殖的影响及 P9 产酸能力。采用高效液相色谱法、高效液相色谱-质谱法、紫外分光光度计进一步分析添加 PRP 后, P9 发酵液中有有机酸、糖类代谢产物变化及其抗氧化活性。**结果** 添加 PRP 后, P9 发酵液 OD₆₀₀ 升高, pH 下降, MRS+3.0% PRP 组达到极值, OD₆₀₀ 为 3.25, pH 为 3.56, 表明 PRP 能促进 P9 生长且产生了更多的酸性代谢产物, 有机酸测定进一步表明草酸、柠檬酸、苹果酸、琥珀酸、乳酸、甲酸、丙酸均升高, 且产生了蜜二糖、水苏糖、棉子糖 3 种有益的糖类降解物。抗氧化活性结果表明, MRS+3.0% PRP 组 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 自由基清除率和羟基自由基清除率最高, 分别为 60.88% 和 97.41%, 较 MRS 组分别提高 9.29%、29.84%; 各组别总还原能力与 PRP 质量分数呈正比, 表明添加 PRP 后, P9 发酵液抗氧化活性增强。**结论** 综上推测 PRP 具有益生作用, 经与 P9 培养后, 发酵液抗氧化活性增强, 为 PRP 作为益生元的开发提供参考。

关键词: 植物乳杆菌 P9; 粉葛多糖; 益生元; 代谢产物; 抗氧化活性

Study on the growth and metabolism of *Lactobacillus plantarum* P9 promoted by *Puerariae thomsonii* Radix polysaccharide and antioxidant activity of fermentation broth

HOU Heng-Wei¹, CHEN Chong², OUYANG Hui¹, LIU Jian-Bing², LUO Quan¹,
LIU Rui-Ying¹, CHEN Mei-Qing¹, LI Qiong^{1*}, ZHU Wei-Feng^{1*}

(1. Key Laboratory of Modern Preparation of Chinese Medicine, Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 2. China Resources Jiangzhong Research Center, Nanchang 330103, China)

基金项目: 江西省科技厅揭榜挂帅项目(20223BBG71002)、江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ201256)、江西省卫生健康委科技计划项目(SKJP220219543)、江西省 2021 年度研究生创新专项资金项目(YC2021-S511)、江西中医药大学校级科技创新团队发展计划项目(CXTD-22004)

Fund: Supported by the Jiangxi Provincial Science and Technology Department Unveiled the List of Hanging Projects (20223BBG71002), the Science and Technology Research Project of Education Department of Jiangxi Province (GJJ201256), the Science and Technology Project of Jiangxi Provincial Health Commission (SKJP220219543), the Jiangxi Province 2021 Postgraduate Innovation Special Fund Project (YC2021-S511), and the Jiangxi University of Chinese Medicine Science and Technology Innovation Team Development Program (CXTD-22004)

*通信作者: 李琼, 博士研究生, 主要研究方向为中药药效物质基础。E-mail: jzliqiong@163.com

朱卫丰, 博士, 教授, 主要研究方向为中药新剂型与新技术。E-mail: zwf0322@126.com

*Corresponding author: LI Qiong, Ph.D Students, Jiangxi University of Chinese Medicine, No.818, Yunwan Road, Nanchang 330004, China. E-mail: jzliqiong@163.com

ZHU Wei-Feng, Ph.D, Professor, Jiangxi University of Chinese Medicine, No.818, Yunwan Road, Nanchang 330004, China. E-mail: zwf0322@126.com

ABSTRACT: Objective To investigate the pro-growth and metabolic effects of *Puerariae thomsonii* Radix polysaccharide (PRP) on *Lactobacillus plantarum* P9 and evaluate its probiotic effect. **Methods** Different mass fractions of PRP liquid medium were prepared and inoculated with P9, OD₆₀₀ value and pH of fermentation solution were determined to investigate the effect of PRP on the proliferation of P9 and the ability of P9 to produce acid. The organic acids, sugar metabolites and antioxidant activities in the P9 fermentation broth were further analyzed by high performance liquid chromatography, high performance liquid chromatography-mass spectrometry and ultraviolet spectrophotometer after the addition of PRP. **Results** The OD₆₀₀ of P9 fermentation broth increased and the pH decreased after the addition of PRP, and the extreme value was reached in the MRS+3.0% PRP group with OD₆₀₀ of 3.25 and pH of 3.56, indicating that PRP could promote the growth of P9 and produced more acidic metabolites. The organic acid assay further showed that oxalic acid, citric acid, malic acid, succinic acid, lactic acid, formic acid, and propionic acid were elevated, and 3 kinds of beneficial sugar degradation products, namely melibiose, stachyose and raffinose were produced. The results of antioxidant activity showed that 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging rate and hydroxyl radical scavenging rate were the highest in the MRS+3.0% PRP group with 60.88% and 97.41%, respectively, which were 9.29% and 29.84% higher than the MRS group. The total reducing ability of each group was proportional to the mass fraction of PRP, indicating that the antioxidant activity of P9 fermentation broth was enhanced by the addition of PRP. **Conclusion** It is speculated that PRP has potential prebiotic effect and the antioxidant activity of the fermentation broth has been enhanced after incubation with P9, which provides a reference for the development of PRP as prebiotics.

KEY WORDS: *Lactobacillus plantarum* P9; *Puerariae thomsonii* Radix polysaccharide; prebiotics; metabolite; antioxidant activity

0 引言

益生菌和益生元都是有益于人体健康的物质^[1]。国际对益生菌和益生元的共识定义已发表, 益生菌是活的微生物, 当给予足够的量时, 可以给宿主带来健康益处。益生元是宿主微生物选择性利用的底物^[2-3]。一方面, 益生元可促进益生菌产生更多的有益代谢产物, 如有机酸和短链脂肪酸, 为益生菌创造良好的内环境, 保持肠道菌群平衡。另一方面, 益生菌可代谢益生元产生一些有益的次级代谢产物。深入研究益生菌与益生元的互作关系是急需探索的科学前沿。

植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)属于乳杆菌属的一种, 是人体肠道内常见的有益菌, 收录于《可用于食品的菌种名单》, 在食品中应用非常广泛^[4]。目前植物乳杆菌广泛应用于食品发酵, 技术成熟。如植物乳杆菌 DSM 9843 用于植物性饮料发酵^[5]。植物乳杆菌区别于其他乳酸菌的是其极易存活且能大量增殖, 植物乳杆菌属于兼性厌氧菌, 在 37℃左右即可正常生长。首先, 植物乳杆菌可维持肠道内菌群平衡进而维持人体健康^[6], PANIGRAHI 等^[7]发现基于植物乳杆菌 ATCC 菌株 202195 与低聚果糖联合口服可使其在出生第一周的新生儿肠道内定殖 4 个月, 并可有效预防发展中国家很大比例新生儿败血症。胡梦莹等^[8]发现植物乳杆菌 P-8 能够提高小鼠抗氧化能力, 降低

血清炎症水平, 调节肠道菌群组成。其次, 植物乳杆菌菌株还可维持慢性营养不良期间幼鼠的生长^[9]。植物乳杆菌本身还可大量产酸, 进而抑制致病菌^[10]。综上, 植物乳杆菌具有良好的生理特性和益生功能, 选用植物乳杆菌进行研究具有代表性。

粉葛是豆科植物甘葛藤(*Pueraria thomsonii* Benth.)的干燥根, 为药食同源物质。葛多糖(*Puerariae thomsonii* Radix polysaccharide, PRP)是粉葛中的主要水溶性成分之一。现代研究表明, 多糖是一类益生元, 能够调节肠道菌群结构, 维持机体健康。多糖是由大于 10 个单糖组成的生物大分子^[11], 人体摄入的多糖丰度的波动, 加上这些分子之间的巨大化学变化, 可以为肠道菌群的增殖创造一个动态和多样化的环境^[12]。多数多糖不能被人类基因组编码的酶降解, 但是肠道菌群可编码大量的碳水化合物活性酶, 将多糖分解为次生代谢产物或发酵产物进而调节肠道菌群^[13]。课题组前期研究表明, PRP 能调节肠道菌群, 改善酒精性脂肪肝小鼠的炎症和脂质过氧化^[14]。但体外细胞实验发现, PRP 对 RAW.264.7 无抗炎活性^[15]。由此推测, PRP 可能是与肠道菌群互作发挥生物活性。为此, 本研究以课题组前期研究制得 PRP 为益生元代表, 以植物乳杆菌 P9 为益生菌代表进行益生菌和益生元的互作研究, 探究 PRP 促植物乳杆菌 P9 生长代谢能力及发酵液抗氧化活性, 为多糖与益生菌互作研究提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

PRP 依据课题组前期研究制得, 制备方法来源于专利《一种葛根多糖及其制备方法和用途》^[16], 平均分子量为 1.09×10^5 Da, 单糖组成以葡萄糖为主, 还具有少量的木糖、果糖、半乳糖; 总糖质量分数 71.68%, 蛋白质量分数为 4.92%^[14]; 植物乳杆菌 P9 [(*Lactobacillus plantarum* P9), 华润江中科研中心专利菌株(2019108004003)]。

MRS 肉汤培养基(青岛高科技工业园海博生物技术有限公司); 甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、乳酸、草酸、柠檬酸、琥珀酸、苹果酸标准品(色谱纯, 上海安谱实验科技股份有限公司); 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)、1,10-菲罗啉、过氧化氢、铁氰化钾、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、NaCl、KCl、 Na_2HPO_4 、 KH_2PO_4 (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 2-氯-L-苯丙氨酸(纯度>98%, 上海麦克林生化科技有限公司)。

1.2 仪器与设备

ZQZY-85BN 振荡培养箱(上海知楚仪器有限公司); HH-4 水浴锅(常州国华电器有限公司); HFsafe1500LC 生物安全柜(上海力申科学仪器有限公司); LDZF-50L-III 立式灭菌锅(上海申安医疗器械厂); DM3000 生物显微镜(德国 Leica 公司); FE28-standard pH 计、UV-1800 紫外分光光度计(瑞士 METTLER 公司); Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); Aminex HPX-87H 色谱柱(300 mm×7.8 mm, 9 μm)(美国 BIO-RAD 公司); Triple-TOF 5600+高分辨质谱仪(美国 AB Sciex 公司); LC-30A 超高效液相色谱仪(日本岛津公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 P9 发酵液的 OD₆₀₀ 值与 pH 测定

配制 PRP 质量分数分别为 1.0%、2.0%、3.0% 的 MRS 培养基, 分别记为 MRS+1.0% PRP、MRS+2.0% PRP、MRS+3.0% PRP 组, 另配制不含 PRP 的 MRS 培养基作为空白对照组, MRS 培养基由 10.0 g/L 蛋白胨、8.0 g/L 牛肉粉、4.0 g/L 酵母粉、20.0 g/L 葡萄糖、2.0 g/L 磷酸氢二钾、2.0 g/L 柠檬酸氢二铵、5.0 g/L 乙酸钠、0.2 g/L 硫酸镁、0.04 g/L 硫酸锰、1.0 g/L 吐温 80 组成。

培养基分装于试管中, 每管装量 10.00 mL, 每组 3 管。121℃ 灭菌 15 min, 冷却, 备用。取适量植物乳杆菌菌粉接种于固体培养基上于 37℃ 进行活化传代, 最终按体积分数为 1.00% 接种量接种至试管中, 37℃ 恒温培养箱中培养 0、3、6、9、12、24、48 h, 取样测定 OD₆₀₀ 值和 pH。

1.3.2 P9 发酵液中有机酸含量测定

将 PRP 质量分数进一步细化为 0、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%。按 1.3.1 方法培养后, 取不同含量 PRP

的 P9 发酵液 1.00 mL, 每样 3 份作为平行对照, 用流动相(5 mmol/L 硫酸水溶液)稀释 10 倍, 涡旋混匀后, 12000 r/min 离心 10 min, 上清液过 0.22 μm 滤膜, 移入 1.50 mL 色谱进样瓶中备用。同时制备有机酸标准品, 基于高效液相色谱法, 采用外标法检测样品中有机酸含量, 色谱条件为: 安捷伦 1260 高效液相色谱仪接 BIO-RAD Aminex HPX-87H (300 mm×7.8 mm, 9 μm) 色谱柱, 流动相为 5 mmol/L 硫酸水溶液, 流速为 0.60 mL/min, 柱温 45℃, 紫外检测器检测波长为 210 nm。

1.3.3 P9 发酵液糖类差异代谢产物分析

(1) 样本处理

参考 RAO 等^[17]的方法并加以修改, 取 1.3.2 中不同 PRP 含量的 P9 发酵液 1.0 mL 在 4℃, 12000 r/min 条件下离心 15 min 后取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜, 于 -80℃ 保存备用。使用移液枪精准移取样品 50.00 μL, 加入 200.00 μL 内标(2-氯-L-苯丙氨酸, 106 μg/mL), 涡旋 30 s。静置后于离心机 12000 r/min, 4℃, 离心 15 min, 取上清液进样。

质控样品(quality control, QC): 每个样本中移取 50.00 μL, 加入 1.40 mL 内标, 涡旋混匀, 上述方法操作。

(2) 色谱和质谱条件

流动相: 体积分数 0.01% 甲酸水-乙腈溶液; 进样体积: 1.00 μL; 流速: 0.35 mL/min; 柱温: 40℃; 梯度洗脱: 0 min, 5% B; 0~2 min, 10% B; 2~6 min, 15% B; 6~8 min, 20% B; 8~13 min, 30% B; 13~21 min, 55% B; 21~23 min, 95% B; 23~23.01 min, 5% B; 23.01~25 min, 5% B。

1.3.4 P9 发酵液抗氧化能力测定

(1) DPPH 自由基清除率测定

参考马晓娟等^[18]方法并加以修改: 取 1.3.2 中的样品, 经 5000 r/min 离心 10 min 后取上清液, 稀释 100 倍后取 1.00 mL 样品溶液, 加入等体积 DPPH 溶液避光反应 30 min 后进行再次离心, 取上清液于 517 nm 处测定 OD 值。用等体积磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)代替样品溶液作为对照, 等体积 PBS 和无水乙醇作为空白调零。实验重复 3 次。按照公式(1)计算 DPPH 自由基清除率:

$$\text{DPPH 自由基清除率}/\% = (1 - A_1/A_2) \times 100\% \quad (1)$$

式中: A_1 为 P9 发酵液样品组吸光度; A_2 为对照组吸光度。

(2) 羟基自由基清除率测定

参考李万丛等^[19]的方法并加以修改: 取 1.3.2 中样品悬液稀释 10 倍, 先加入 0.5 mL 的 1,10-菲罗啉(2.5 mmol/L)、0.5 mL PBS (pH 7.4)、0.5 mL FeSO_4 (2.5 mmol/L), 混匀后加入 0.5 mL H_2O_2 (20 mmol/L), 37℃ 中水浴 90 min, 在 536 nm 处测 OD 值。将 0.5 mL 样品悬液替换为 0.5 mL PBS 作为空白, 将 0.5 mL H_2O_2 替换为 0.5 mL 蒸馏水为对照组。实验重复 3 次。按照公式(2)计算羟基自由基清除率:

$$\text{羟基自由基清除率}/\% = (A_1 - A_0)/(A_2 - A_0) \times 100\% \quad (2)$$

式中: A_0 为空白组吸光度; A_1 为 P9 发酵液样品组吸光度; A_2

为对照组吸光度。

(3)总还原能力测定

参考刘玉洁等^[20]方法并加以修改:取 1.3.2 中的样品 0.5 mL,加入 0.5 mL 铁氰化钾(10 g/L)、0.5 mL PBS (pH 6.6),混匀后于 50°C 水浴 20 min。在冰浴中急速冷却,加入 0.5 mL 三氯乙酸(100 g/L),在 3000 r/min 条件下进行离心 10 min,取上清 1 mL,再加入 1 mL FeCl₃(1.0 g/L),10 min 后在 700 nm 处测定 OD 值。样品替换为蒸馏水作为对照组,实验重复 3 次。

1.4 数据分析

将质谱所得原始数据导入 Progenesis QI 软件(2.4 版)进行数据处理,包括峰检测、匹配和比对。然后将标准化数据导入 EZinfo 软件(3.0 版)以进行偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least-squares discrimination analysis, OPLS-DA)识别。基于 OPLS-DA 分析投影的重要性变量(variable importance in projection, VIP)、S 曲线和单向方差分析(one-way analysis of variance, ANOVA)揭示和识别组间变量的差异代谢物。筛选 VIP>1、差异倍数 Fold Change ≥2 且 ANOVA 的 $P<0.05$ 的候选代谢物,并通过大规模数据库对代谢物进一步鉴定,公共数据库包括 HUMAN METABOLOME DATABASE、Chemspider。最后,使用 UPLC-Q-TOF-MS 中的 MassLynx 软件提取原始二级碎片信息以准确地匹配 MS/MS 碎片。

实验数据用平均值±标准偏差表示。采用 GraphPad Prism 8.0 进行 ANOVA,并用 Turkey 检验进行多重比较, $P<0.05$ 表示具有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 PRP 对植物乳杆菌 P9 生长的影响

植物乳杆菌的生长情况,可以通过发酵液的 OD₆₀₀ 来进行监测,OD₆₀₀ 值上升说明 P9 浓度增大。pH 可以反映培养过程酸碱度变化情况,体现其产酸能力。多糖可作为益

生元促进益生菌的增殖^[21]。由图 1 可知,随着培养时间延长,MRS、MRS+1.0% PRP、MRS+2.0% PRP、MRS+3.0% PRP 4 组的 OD₆₀₀ 值均呈上升趋势,pH 均呈下降趋势,12 h 时,P9 发酵液的 OD₆₀₀ 值明显升高、pH 明显降低,在 24 h 到 48 h 整体变化趋于平缓,说明 P9 达到生长平稳期。此外,OD₆₀₀ 值和 pH 的改变与 PRP 质量分数呈剂量关系,如:MRS+3.0% PRP 的 OD₆₀₀ 值在 48 h 最大,为 3.25,pH 在 24 h 最低,为 3.56(图 1)。以上结果表明,添加 PRP,可显著促进 P9 的生长,在 PRP 含量为 3.0% 时对 P9 促生长作用最强,且 P9 能利用并代谢 PRP 产生更多的酸性代谢产物。CAO 等^[22]发现,甘露寡糖可以在体外促进植物乳杆菌 ATCC14917 增殖,细胞密度随培养时间的增加而增加,培养上清液 pH 降低,与本文研究一致。

2.2 PRP 对植物乳杆菌 P9 有机酸产生量影响

有机酸是益生菌的重要代谢产物,乳酸菌可发酵产生乳酸、琥珀酸、苹果酸、甲酸、丙酸等有机酸,在食品发酵领域,有机酸一方面可赋予发酵液更好的风味^[23],另一方面也具有抑制致病菌、调节肠道菌群、增强肠道屏障、促进动物生长和调节免疫等功能^[24]。植物乳杆菌属于乳酸菌的一种,能够大量产酸^[8]。有机酸含量测定结果如图 2 所示。

与空白对照组比较,含 PRP 的 P9 发酵液中草酸、柠檬酸、苹果酸、琥珀酸、乳酸、甲酸的含量均随着 PRP 质量分数增加而逐渐升高,在 PRP 含量为 3.0% 时含量达到最大值。其中乳酸的含量远高于其他有机酸,说明 P9 可利用 PRP 并促进自身产酸,与 pH 随着发酵时间延长而降低,且在 PRP 含量为 3.0% 时达到最低相一致。MRS+3.0% PRP 组有机酸含量最高原因是其促 P9 生长最显著,可产生大量植物乳杆菌,进而生成有机酸含量最高。另外,丙酸含量在添加 0.5% PRP 及 1.0% PRP 的发酵液中未出现显著升高,反而有所降低,当 PRP 质量分数达到 1.5% 后,其含量随着 PRP 质量分数增加呈上升趋势。丙酸含量下降可能是因为丙酸峰附近的杂峰影响,该杂峰不是 RPP 添加所产生,

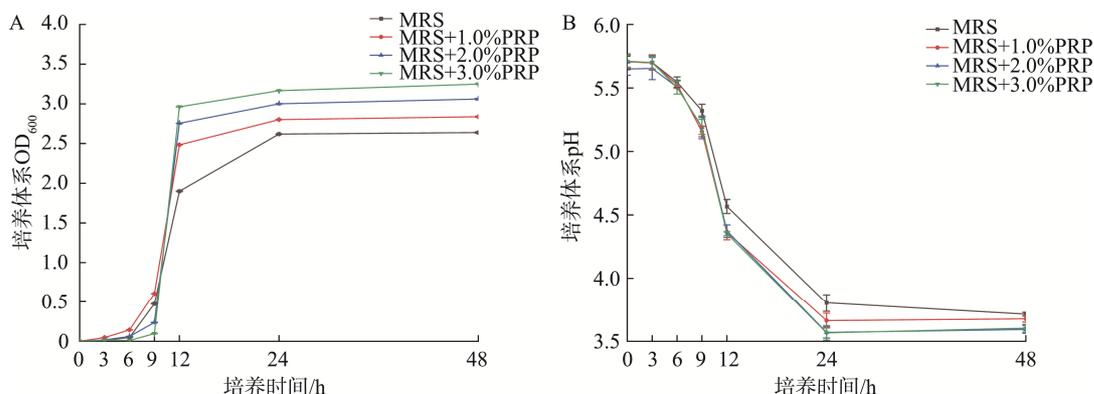
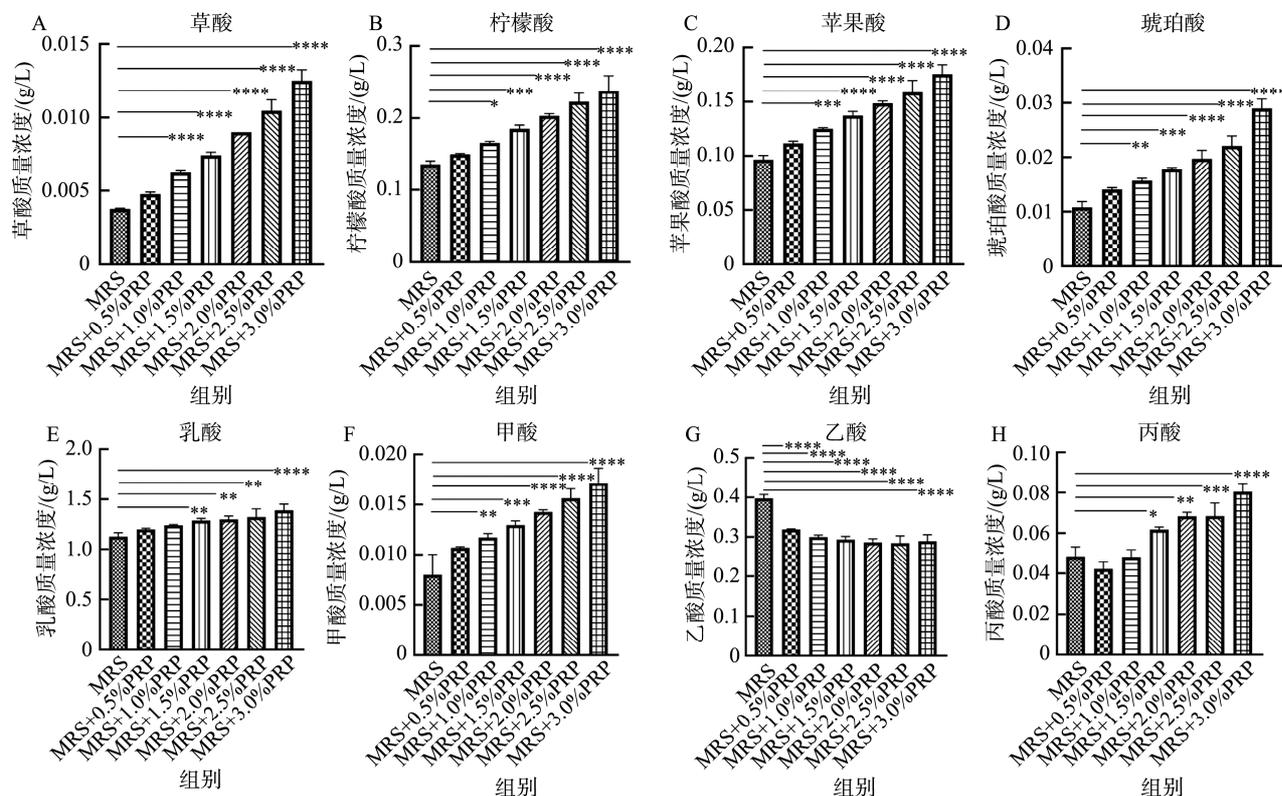


图 1 PRP 对 P9 发酵液各时间点 OD₆₀₀ 值(A)和 pH (B)变化的影响

Fig.1 Effects of PRP on OD₆₀₀ value (A) and pH (B) of P9 fermentation broth at different time points



注: 与 MRS 空白对照组比较: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$, 下同。

图 2 PRP 对 P9 有机酸产生量的影响

Fig.2 Effects of PRP on the production of organic acids in P9

在前期加入较少量 RPP 后丙酸增加不明显, 还会被杂峰影响, 进而导致在 0.5% PRP 及 1.0% PRP 发酵液中含量降低。乙酸含量随着 PRP 的质量分数增加而逐渐降低。这可能是因为加入 PRP 后的样本在乙酸出峰位置附近会产生其他峰, 该峰可能是 PRP 的发酵产物, 随着 PRP 质量分数增加, 峰形变大, 对乙酸峰造成影响。综上所述, PRP 能够显著促进 P9 产酸。周印等^[25]发现植物乳杆菌发酵梨浆后, 乳酸、柠檬酸、苹果酸、草酸变为优势有机酸, 乳酸增加, 与本研究结果一致。

2.3 植物乳杆菌 P9 利用 PRP 后降解产物分析

植物乳杆菌 P9 可利用 PRP, 将其代谢分解为一些次级代谢物。本研究通过 OPLS-DA 模型, 根据 $VIP > 1$ 、差异倍数 $Fold\ Change \geq 2$ 和 $P < 0.05$ 筛选显著差异代谢物, 共筛选出 51 个糖类差异代谢物。其中, 蜜二糖、水苏糖、棉子糖丰度显著增加(图 3)。蜜二糖由一个半乳糖和一个葡萄糖部分组成, 可促进肠道部分有益菌如双歧杆菌等生长^[26]。水苏糖是天然存在的一种四糖, 是一种可以显著提高人体

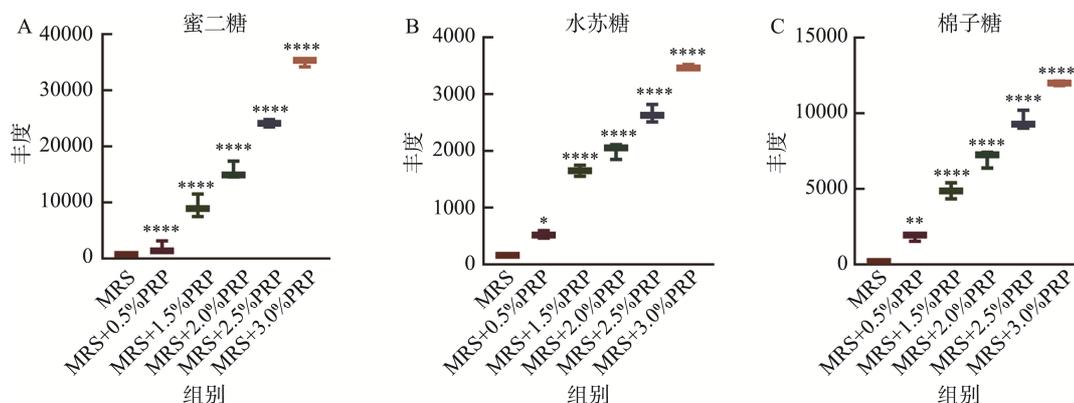


图 3 P9 代谢 PRP 后糖类代谢物的生成情况

Fig.3 Production status of sugar metabolites after metabolism of PRP by P9

肠道有益菌群增殖的功能性低聚糖^[27]。棉子糖由半乳糖、果糖和葡萄糖结合而成,它也被称为蜜三糖,可以促进有益菌生长、调节肠道菌群等^[28]。由图 3 可知,这 3 个多糖降解产物随着 PRP 含量的增加整体呈现上调趋势,其原因是 PRP 含量越高,产生植物乳杆菌数量越多,对 PRP 的分解作用越强。综上,P9 可代谢 PRP 产生小分子糖类代谢物,进而为 P9 提供可直接利用碳源,促进 P9 增殖及产酸。

2.4 植物乳杆菌 P9 发酵液抗氧化活性分析

人体内的氧化损伤等疾病,与氧化应激对脂质、DNA 和蛋白质的改变有关^[29]。植物乳杆菌与部分中药多糖都具有抗氧化活性^[30-31],前文发现 PRP 可促进 P9 增殖及产酸,两者发酵后能否产生抗氧化活性成分进而增强抗氧化活性需要进一步研究。发酵液 DPPH 自由基清除率、羟基自由基清除率和总还原能力结果如图 4 所示。

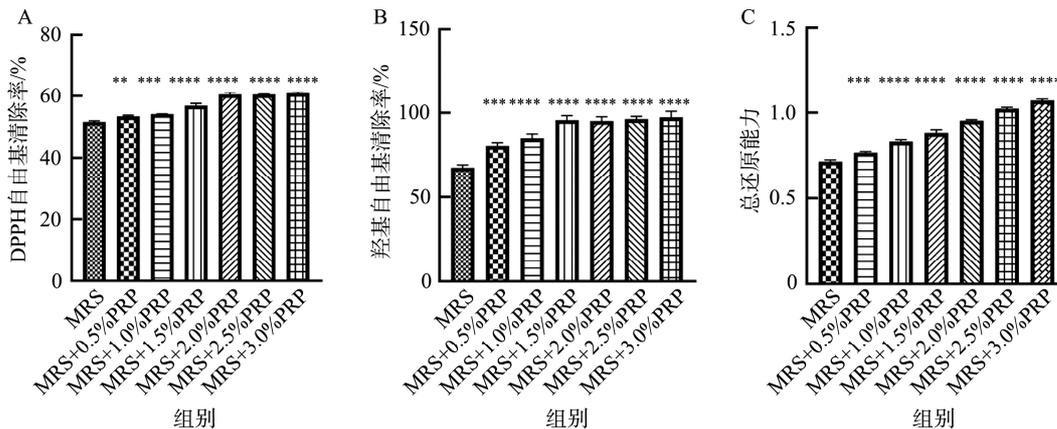


图 4 P9 发酵液抗氧化能力结果

Fig.4 Results of antioxidant capacity of P9 fermentation broth

DPPH 自由基清除率和羟基自由基清除率整体均随着 PRP 质量分数增加而增大,PRP 质量分数为 2.0%时,DPPH 自由基清除率达到 60.50%,PRP 质量分数为 1.5%,羟基自由基清除率达到 95.72%,随后整体趋于平缓,MRS+3.0% PRP 组的 DPPH 自由基清除率和羟基自由基清除率分别为 60.88%和 97.41%,相较 MRS 组分别提高了 9.29%和 29.84%。随着 PRP 质量分数的增加,发酵液在 700 nm 处 OD 值逐渐升高,总还原能力逐渐增强,在 MRS+3.0% PRP 组达到最大值 1.07,总还原能力与加入 PRP 质量分数成正比。综合上述 3 个指标可知,在加入 PRP 后,发酵液整体抗氧化能力增强,这可能与植物乳杆菌 P9 产生的胞外多糖有关。方晟等^[32]发现金佛手酵素发酵过程中 DPPH 自由基清除率与琥珀酸含量呈正相关;羟基自由基清除率与乳酸和乙酸含量也呈正相关。这说明发酵过程中产生的有机酸也具有一定抗氧化作用。贾庆超等^[33]发现水苏糖也可提高黑枸杞风味酸奶抗氧化活性,进一步佐证本研究的结果。

3 讨论与结论

益生元通常被用来调节肠道菌群进而维持机体健康^[1]。益生元在促进益生菌增殖的同时,也会促进益生菌代谢产物如短链脂肪酸、有机酸等生成。本研究首先采用添加 PRP 的 MRS 肉汤培养基研究 PRP 对植物乳杆菌 P9 的促生长及代谢能力,评价 PRP 的益生作用。考察多糖对益生菌的作

用通常采用两种方法。一种方法是碳源添加法,以 MRS 培养基为基础,在 MRS 培养基中加入一定浓度的多糖;另一种方法是碳源替代法,用多糖代替 MRS 培养基中的葡萄糖。本研究前期开展的预实验采用碳源替代法,将 PRP 作为唯一碳源替代 MRS 培养基中葡萄糖来研究对 P9 促生长作用,发现 PRP 组的活菌数低于 MRS 组。而采用碳源添加法,即在 MRS 的基础上加入 PRP 后,P9 的增殖显著高于 MRS 空白对照组。推测这可能是多糖为大分子物质,而益生菌在生长初期需要小分子的葡萄糖作为速效源来快速生长。本研究结果显示,PRP 能促进植物乳杆菌 P9 的生长,且产生了更多酸性代谢产物。推测植物乳杆菌 P9 在 MRS 肉汤培养基上生长达到一定数量后可利用 PRP 进一步生长。

大量研究证明,益生菌可产生细菌素和酸来创造酸性环境抑制病菌生长^[10]。本研究基于培养体系 pH 降低,对样品有机酸及代谢产物进行分析,发现培养液中草酸、柠檬酸、苹果酸、琥珀酸、乳酸、甲酸、丙酸含量随着 PRP 质量分数增加而升高。在对发酵液代谢物的鉴定分析中发现,PRP 的降解物质有蜜二糖、水苏糖、棉子糖,且其丰度随 PRP 质量分数增加而上升,但本研究未对其进行定量分析,后续可进一步分析上述糖类降解物的含量。

植物乳杆菌发酵不仅可以改善风味,还可产生多种具有抗氧化活性的代谢物^[34]。本研究中 PRP 的加入使 P9 发酵液的抗氧化活性明显增强。目前已有研究证明有机酸及水苏糖等物质具有一定抗氧化活性,但对具体抗氧化活性成分仍需进一步鉴定。综上,PRP 具有益生作用,可促进

植物乳杆菌 P9 增殖。本研究为 PRP 作为食品功能因子进行开发和利用提供理论支持。

参考文献

- [1] SANDERS ME, MERENSTEIN DJ, REID G, *et al.* Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: From biology to the clinic [J]. *Nat Rev Gastro Hepatol*, 2019, 16(10): 605–616.
- [2] SALMINEN S, COLLADO MC, ENDO A, *et al.* The international scientific association of probiotics and prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics [J]. *Nat Rev Gastro Hepatol*, 2021, 18(9): 649–667.
- [3] DONG LN, WANG M, GUO J, *et al.* Role of intestinal microbiota and metabolites in inflammatory bowel disease [J]. *Chin Med J*, 2019, 132(13): 1610–1614.
- [4] SEDDIK HA, BENDALI F, GANCEL F, *et al.* *Lactobacillus plantarum* and its probiotic and food potentialities [J]. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 2017, 9(2): 111–122.
- [5] CANAVIRI PP, JANNY RJ, HÅKANSSON Å. Safeguarding of quinoa beverage production by fermentation with *Lactobacillus plantarum* DSM 9843 [J]. *Int J Food Microbiol*, 2020, 324: 108630.
- [6] 唐田, 沈真如, 石璐, 等. 植物乳杆菌 P9 对小鼠功能性便秘的作用及机制[J]. *食品科学*, 2023, 44(9): 123–130.
TANG T, SHEN ZR, SHI L, *et al.* Effect and mechanism of *Lactiplantibacillus plantarum* P9 on functional constipation in mice [J]. *Food Sci*, 2023, 44(9): 123–130.
- [7] PANIGRAHI P, PARIDA S, NANDA NC, *et al.* A randomized synbiotic trial to prevent sepsis among infants in rural India [J]. *Nature*, 2017, 548(7668): 407–412.
- [8] 胡梦莹, 徐浩原, 韩金鹏, 等. 植物乳杆菌 P-8 对小鼠肠道菌群及抗氧化抗炎能力的研究[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(17): 64–70.
HU MY, XU HY, HAN JP, *et al.* Effects of *Lactobacillus plantarum* P-8 on intestinal microflora, antioxidant and anti-inflammatory capacity in mice [J]. *Food Ferment Ind*, 2022, 48(17): 64–70.
- [9] SCHWARZER M, MAKKI K, STORELLI G, *et al.* *Lactobacillus plantarum* strain maintains growth of infant mice during chronic undernutrition [J]. *Science*. 2016, 351(6275): 854–857.
- [10] 孔祥丽, 吴昕雨, 许晓曦. 植物乳杆菌代谢产物抑菌机制与应用研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(8): 3131–3140.
KONG XL, WU XY, XU XX. Research progress on metabolites and bacteriostasis mechanism of *Lactobacillus plantarum* [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(8): 3131–3140.
- [11] ZHOU SY, HUANG GL. Preparation, structure and activity of polysaccharide phosphate esters [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 144: 112332.
- [12] KOROPATKIN NM, CAMERON EA, MARTENS EC. How glycan metabolism shapes the human gut microbiota [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2012, 10(5): 323–335.
- [13] BALAKRISHNAN M, FLOCH MH. Prebiotics, probiotics and digestive health [J]. *Curr Opin Clin Nutr*, 2012, 15(6): 580–585.
- [14] LI Q, LIU WJ, FENG YL, *et al.* Radix *Puerariae thomsonii* polysaccharide (RPP) improves inflammation and lipid peroxidation in alcohol and high-fat diet mice by regulating gut microbiota [J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 209(Pt A): 858–870.
- [15] 张壮, 李琼, 黄丽萍, 等. 粉葛与葛根多糖对脂多糖诱导 RAW264.7 细胞的抗炎作用[J]. *现代食品科技*, 2022, 38(7): 1–10.
ZHANG Z, LI Q, HUANG LP, *et al.* Anti-inflammatory effect of *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi and *P. thomsonii* Benth polysaccharide on LPS-induced RAW264.7 cells [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2022, 38(7): 1–10.
- [16] 欧阳辉, 管咏梅, 朱卫丰, 等. 一种葛根多糖提取物及其提取方法和应用: 中国, CN112898446B[P]. 2021-11-30.
OUYANG H, GUAN YM, ZHU WF, *et al.* Extraction method and application of pueraria polysaccharide: China, CN112898446B [P]. 2021-11-30
- [17] RAO YF, WEN Q, LIU R, *et al.* PL-S2, a homogeneous polysaccharide from *Radix Puerariae lobatae*, attenuates hyperlipidemia via farnesoid X receptor (FXR) pathway-modulated bile acid metabolism [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 165(Pt B): 1694–1705.
- [18] 马晓娟, 谢有发, 倪彩新, 等. 植物乳杆菌 P9 发酵对枸杞浆品质的影响[J/OL]. *食品与发酵工业*: 1–8. [2023-06-05]. DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.033071
MA XJ, XIE YF, NI CX, *et al.* Effect of *Lactobacillus plantarum* P9 fermentation on the quality of *Lycium barbarum* pulp [J/OL]. *Food Ferment Ind*: 1–8. [2023-06-05]. DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.033071
- [19] 李万丛, 艾芷伊, 游颖, 等. 酿酒酵母 CCTCCM 2016373 发酵对人参多糖组分及抗氧化能力的影响[J]. *食品科学*, 2019, 44(8): 1–5.
LI WC, AI ZY, YOU Y, *et al.* Effects of *Saccharomyces cerevisiae* CCTCCM 2016373 fermentation on the composition and antioxidant capacity of ginseng polysaccharides [J]. *Food Sci Technol*, 2019, 44(8): 1–5.
- [20] 刘玉洁, 董丽婷, 罗灿, 等. 枯草芽孢杆菌 LY-05 发酵玉竹产水溶性多糖工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(3): 212–221.
LIU YJ, DONG LT, LUO C, *et al.* Optimization of fermentation process for water-soluble polysaccharides and antioxidant activity of *Polygonatum odoratum* fermented by *Bacillus subtilis* LY-05 [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2022, 43(3): 212–221
- [21] 白聪豪, 符珍, 林莹. 辣木叶多糖对益生菌生长及耐受性的影响[J]. *食品科学*, 2020, 45(9): 7–13.
BAI CH, FU Z, LIN Y. Effect of moringa leaf polysaccharide on proliferation and tolerance capability of probiotics [J]. *Food Sci Technol*, 2020, 45(9): 7–13.
- [22] CAO P, WU LY, WU Z, *et al.* Effects of oligosaccharides on the fermentation properties of *Lactobacillus plantarum* [J]. *J Dairy Sci*, 2019, 102(4): 2863–2872.
- [23] 李维妮, 张宇翔, 魏建平, 等. 益生菌发酵苹果汁工艺优化及有机酸的变化[J]. *食品科学*, 2017, 38(22): 80–87
LI WN, ZHANG YX, WEI JP, *et al.* Optimization of fermentation of apple

- juice by probiotics and organic acids evolution during fermentation [J]. Food Sci, 2017, 38(22): 80–87.
- [24] 兰冬雪, 瞿茜楠, 黄天, 等. 益生菌活性代谢产物的研究及应用进展[J]. 食品工业科技, 2022, 43(24): 11–20.
LAN DX, QU XN, HUANG T, *et al.* Research and application progress of the active metabolites of probiotics [J]. Sci Technol Food Ind, 2022, 43(24): 11–20.
- [25] 周印, 刘梦阳, 赵婧琦, 等. 植物乳杆菌发酵梨原果汁饮料的研究[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(8): 105–111.
ZHOU Y, LIU MY, ZHAO JQ, *et al.* Study on the fermentation of pear juice by *Lactobacillus plantarum* [J]. Food Res Dev, 2020, 41(8): 105–111.
- [26] ADAMBERG K, ADAMBERG S, ERNITS K, *et al.* Composition and metabolism of fecal microbiota from normal and overweight children are differentially affected by melibiose, raffinose and raffinose-derived fructans [J]. Anaerobe, 2018, 52: 100–110.
- [27] 李伟, 王嘉炜, 孟令媛, 等. 水苏糖及其应用和对肠道菌群作用的研究进展[J]. 中国微生物学杂志, 2017, 29(9): 1110–1113, 1117.
LI W, WANG JW, MENG LY, *et al.* Application and effects of stachyose on enterobacteria: Research progress [J]. Chin J Microecol, 2017, 29(9): 1110–1113, 1117.
- [28] 廖培龙, 李欢, 陈剑, 等. 大豆益生元与肠道菌群相互作用及其对健康影响的研究进展[J/OL]. 食品科学: 1–17. [2023-06-05]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20221229.1858.006.html>
LIAO PL, LI H, CHEN J, *et al.* Research progress on the interaction between soybean prebiotics and gut microbiota and their effects on health [J/OL]. Food Sci: 1–17. [2023-06-05]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20221229.1858.006.html>
- [29] 李娅兰, 白皓天, 梁霄, 等. 红花中抗氧化活性成分及其作用机制的研究进展[J]. 现代药物与临床, 2022, 37(8): 1879–1885.
LI YL, BAI HT, LIANG X, *et al.* Research progress on antioxidant active components in *Carthami flos* and its mechanism [J]. Drugs Clin, 2022, 37(8): 1879–1885.
- [30] 邹思博, 赵明伟, 纪超凡, 等. 自然发酵东北酸菜中抗氧化乳酸菌的筛选及其益生性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(1): 42–50.
ZOU SB, ZHAO MW, JI CF, *et al.* Screening of high antioxidant activity lactic acid bacteria in traditional fermented Suancai of northeast China and its prebiotic studies [J]. J Food Saf Qual, 2023, 14(1): 42–50.
- [31] 段晨晨, 赵文晓, 吕琴, 等. 药食同源类中药多糖在功能性保健食品方面的药理作用研究进展[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2022, 24(10): 3844–3850.
DUAN CC, ZHAO WX, LV Q, *et al.* Research progress on pharmacological effects of medicinal and edible polysaccharides in functional health foods [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med-World Sci Technol, 2022, 24(10): 3844–3850.
- [32] 方晟, 陈俊逸, 周瑾, 等. 金佛手酵素发酵过程中有机酸及其体外抗氧化性能分析[J]. 食品工业科技, 2020, 41(10): 68–74.
FANG S, CHEN JD, ZHOU J, *et al.* Analysis of organic acids and antioxidant activity *in vitro* of citrus medica Jiaosu during fermentation process [J]. Sci Technol Food Ind, 2020, 41(10): 68–74.
- [33] 贾庆超, 李望铭, 韩亚飞. 黑枸杞风味酸奶发酵条件优化及低聚果糖和水苏糖对其品质的影响[J]. 中国酿造, 2023, 42(3): 187–193.
JIA QC, LI WM, HAN YF. Optimization for fermentation conditions of black wolfberry flavored yoghurt and the effects of fructooligosaccharide and stachyose on its quality [J]. China Brew, 2023, 42(3): 187–193.
- [34] YANG X, ZHOU J, FAN L, *et al.* Antioxidant properties of a vegetable-fruit beverage fermented with two *Lactobacillus plantarum* strains [J]. Food Sci Biotechnol, 2018, 27(6): 1719–1726.

(责任编辑: 郑丽 张晓寒)

作者简介



侯恒威, 硕士研究生, 主要研究方向为中药药效物质基础。
E-mail: 761332236@qq.com



李琼, 博士研究生, 主要研究方向为中药药效物质基础。
E-mail: jzliqiong@163.com



朱卫丰, 博士, 教授, 主要研究方向为中药新剂型与新技术。
E-mail: zwf0322@126.com