

乳酸菌发酵云参酵素的工艺优化及其功能研究*

叶朋飞¹, 罗 程¹, 黄丝艳¹, 胡 亮¹, 郭文清¹, 李 瑶¹, 程燕东², 林秋叶^{1**}

(1. 云南农业大学 食品科学技术学院, 云南 昆明 650201;

2. 云南农业大学 动物科学技术学院, 云南 昆明 650201)

摘要:【目的】以云参为主要原料, 制备具有保健功效的酵素产品。【方法】采用单宁酶、纤维素酶和果胶酶酶解云参得到酶解液, 以酶解率为衡量指标, 确定 3 种酶复合酶解云参的最佳工艺; 接种植物乳杆菌 ST 发酵云参酶解液, 以感官评价为衡量指标, 优化发酵工艺; 采用酸碱滴定法、福林酚法、DPPH 自由基清除率和琼脂打孔扩散法检测云参酵素的可滴定酸含量、蛋白酶活性、抗氧化活性和抑菌活性; 云参酵素与人肠上皮细胞 HT-29 预孵育后, 采用 qRT-PCR 检测 *IL8*、*NFKB1* 和 *NFKB2* 基因的 mRNA 表达量。【结果】3 种酶等体积混合后, 在料液比(g:mL) 1:8, 加酶量 0.6%, pH 5, 酶解温度 50 °C 时酶解 180 min, 酶解率最高(38.6%); 植物乳杆菌 ST 发酵云参酵素的最佳工艺为: 蔗糖添加量为 8%, 植物乳杆菌 ST 接种量为 1×10^5 CFU/mL, 37 °C 厌氧发酵 20 h; 与发酵前相比, 云参酵素中可滴定酸含量、蛋白酶活性和 DPPH 自由基清除能力显著提高 17.42% ($P < 0.05$)、63.75% ($P < 0.05$) 和 36.57% ($P < 0.05$); 云参酵素对大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 和福氏志贺氏菌 (*Shigella flexneri*) 有较强的抑制作用; 云参酵素预孵育显著降低了肿瘤坏死因子- α 诱导人肠上皮细胞 HT-29 的炎症基因 *IL8*、*NFKB1* 和 *NFKB2* mRNA 表达水平。【结论】该云参酵素能有效去除云参臭味, 口感独特, 蛋白酶活性和抗氧化功能显著提升, 具有显著的抑菌活性和抗炎作用。

关键词: 云参; 酵素; 植物乳杆菌; 功能活性

中图分类号: R 284.2; TS 201.3

文献标识码: A

文章编号: 1004-390X (2019) 05-0896-10

Optimization and Functional Study on *Codonopsis bulleyana* Forrest ex Diels Ferment with Lactic Acid Bacteria

YE Pengfei¹, LUO Cheng¹, HUANG Siyan¹, HU Liang¹, GUO Wenqing¹,

LI Yao¹, CHENG Yandong², LIN Qiuye¹

(1. College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

2. College of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: [Purpose] The aim of this study was to produce *Codonopsis bulleyana* Forrest ex Diels (CBF) ferment with potential health benefits. [Method] The enzymatic hydrolysate was obtained by enzymatic hydrolysis of CBF with three combined enzymes of tannase, cellulase and pectinase. The optimal technique for enzymatic hydrolysis of CBF was determined by enzymatic hydrolysis rate; the optimal preparation process of CBF ferment with *Lactobacillus plantarum* ST was evaluated through sensory analysis. The acid-base titration method, the forinol method, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl

收稿日期: 2019-03-05

修回日期: 2019-05-08

网络首发时间: 2019-09-27 10:47:01

*基金项目: 国家自然科学基金项目(31760448); 云南省应用基础研究面上项目(2017FB064)。

作者简介: 叶朋飞(1992—), 男, 云南富源人, 在读硕士研究生, 主要从事乳酸菌资源发掘与利用研究。E-mail: 1910851367@qq.com

**通信作者 Corresponding author: 林秋叶(1979—), 女, 黑龙江伊春人, 博士, 教授, 主要从事乳酸菌资源发掘与利用研究。E-mail: linqiuye@126.com

网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20190926.1632.002.html>



(DPPH) free radical scavenging rate, agar perforation diffusion method and qRT-PCR were used to determine the titratable acid, protease activity, antioxidant capacity, antimicrobial activity and immunomodulatory effect of CBF ferment, respectively. [Results] The highest enzymatic hydrolysis rate (38.6%) was observed when mixed three enzymes at a ratio of 1 : 1 : 1 was used, the ratio of solid to liquid (g : mL) was 1 : 8, the amount of enzyme was 0.6%, pH 5, and the enzymatic hydrolysis temperature was 50 °C for 180 min. The optimal processing of fermented CBF with *L. plantarum* ST was found as follows: sucrose added at 8% (m/m), initial inoculation of 10^5 CFU/mL, temperature of 37 °C, 20 h of fermentation under anaerobic condition. The titratable acid content, protease activity and DPPH free radical scavenging capacity of CBF ferment were significantly increased by 17.42% ($P < 0.05$), 63.75% ($P < 0.05$) and 36.57% ($P < 0.05$), respectively. The inhibitory effect of CBF ferment on *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Shigella flexneri* was significantly stronger. In addition, CBF ferment significantly reduced tumor necrosis factor (TNF)- α -induced expression of inflammatory genes including *IL8*, *NFKB1* and *NFKB2* in HT-29 human intestinal epithelial cells. [Conclusion] The CBF ferment does not have unpleasant odor of CBF and unique taste, with significantly increased protease activity and antioxidant activity. Furthermore, CBF has the combined function of probiotics and active ingredients of CBF as evidenced by significant antibacterial activity and immunomodulation potential.

Keywords: *Codonopsis bulleyana* Forrest ex Diels (CBF); ferment; *Lactobacillus plantarum*; functional activity

云参, 俗名臭参、臭药, 又名蓝花臭参、胡毛洋参, 为桔梗科党参属管钟党参 (*Codonopsis bulleyana* Forrest ex Diels, CBF) 的根, 圆柱状或纺锤形, 有黄白色乳汁, 具有特殊臭味, 是云南民间很早就广为应用并有文字记载的具有药用和食用价值的植物根系之一, 是中国西南地区特有的植物物种^[1]。

云参富含氨基酸、维生素和矿物元素, 且营养均衡, 其根部所含维生素 B 与其他食、药用根茎类植物相比, 含量高出了 3 ~ 84 倍, 且含有黄酮香豆素、挥发油、糖、氨基酸、蛋白质、生物碱、有机酸、鞣质、酚类、树脂和少量皂苷等成分^[2]。《云南中草药》和《云南植物志》均有详细记载: “臭参性味甘, 微苦, 补气血, 通经络, 治疗体虚、跌打损伤、风醒麻木”; 现代生物研究表明: 云参无毒副作用, 具有加强胃肠蠕动、抗贫血、抗疲劳和增强机体免疫等生理功能^[3-4]。民间云参主要作为滋补品, 与肉、鸡和排骨炖服, 具有补气生血、通经络、健脾益肺和助消化等作用, 在云南具有悠久的食用历史^[5]。但因其地域独特性和自身气味的特殊性, 云参主要以鲜销为主, 加工产业链短、产品单一、附加值

低, 无法充分发挥其药用价值, 经济收益较低。

随着生活压力增大和饮食结构不合理等因素, 部分现代城市居民人体内源性酶减少、营养不均衡而呈现亚健康状态。研究表明: 酵素食品可以有效调整机体酶系, 促进营养平衡, 作为一种养生食品越来越受到认可和推崇^[6]。因此, 本研究以云参为主要原料, 研发能脱除臭味、口感独特, 集益生菌与活性成分于一体, 具有蛋白酶活性和抗氧化功效的云参酵素产品, 对于延长云参加工产业链、增加附加值, 提高云参产业经济效益具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

云参购自昆明寻甸; 植物乳杆菌 ST 由本实验室自主分离得到, 该菌株的 16S rDNA 序列已提交于 GenBank, 基因序列号为 KX078316.1; RPMI-1640、青霉素和链霉素双抗和胎牛血清购自 BI 公司; 重组人 TNF- α 购自 Peprotech 公司; MTT 购自 Sigma 公司; 纤维素酶、果胶酶、单宁酶购自美仑试剂公司; NaOH、苯二甲酸氢钾 ($\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$)、酚酞指示剂、邻苯二甲酸氢钾、

L-酪氨酸、三氯乙酸、碳酸钠购自国药集团化学试剂有限公司；总 RNA 提取试剂盒、荧光定量试剂盒购自天根生化科技有限公司；引物由上海捷瑞生物科技有限公司合成。

紫外分光光度计购自上海元析仪器有限公司；雷磁 PHS-3C pH 计；Queue 二氧化碳培养箱；微生物培养箱购自上海福玛实验设备有限公司；Bio-RadiCycler 荧光定量 PCR 仪。

1.2 方法

1.2.1 工艺流程

新鲜云参→干燥→磨粉→干燥云参粉→溶解→调 pH→酶解 (果胶酶、纤维素酶和单宁酶)→过滤→调配→均质→杀菌→接种→发酵→云参酵素成品。

1.2.2 云参发酵基液的制备

(1) 酶解单因素试验

根据预实验，初步确定料液比 (g : mL) 1 : 8、pH 4.5、单酶添加量 0.5%、酶解温度 50 ℃ 和酶解时间 180 min 5 个因素，以酶解率为指标，进行单因素试验。

称取质量为 m_1 (本试验 $m_1=50$ g) 的云参干燥粉进行酶解，将酶解产物进行离心，取沉淀样

品，进行干燥处理 (与制备云参干燥粉条件相同) 后称重 (m_2)，根据如下公式计算酶解率。

$$\text{酶解率} = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100\%$$

(2) 正交试验确定复合酶酶解云参最佳工艺条件

结合单因素试验结果，选取对酶解率影响较大的 4 个因素，采用 Design Expert 软件设计 4 因素 $L_9(3^4)$ 正交试验方案，进行正交试验，优化云参酶解条件。

1.2.3 植物乳杆菌 ST 发酵云参酵素工艺优化

(1) 植物乳杆菌 ST 发酵云参单因素试验

根据预试验，在酶解最适 pH 环境下，初步确定蔗糖添加量 7%、最适接种量 1×10^5 CFU/mL、发酵温度 37 ℃ 和发酵时间 25 h 4 个因素，以感官评分为指标 (感官评分标准如表 1 所示，感官评分小组由随机 10 人组成)，进行单因素试验。

(2) 植物乳杆菌 ST 发酵云参酵素正交试验

结合单因素试验结果，选取对发酵影响较大的 4 个因素，采用 Design Expert 软件设计 4 因素 $L_9(3^4)$ 正交试验方案，进行正交试验，优化云参酵素发酵条件。

表 1 云参酵素感官评定标准
Tab. 1 Sensory evaluation standard of CBF

项目 (分值) project (point value)	感官指标 (分值) sensory index (score)		
色泽 color (20)	亮棕色或亮浅棕色 (15~20)	暗棕色 (10~14)	黑色 (1~9)
香气 aroma (30)	清香味，淡酒香味，无刺鼻气味 (30~20)	稍有臭味，酒味明显，无刺鼻气味 (19~10)	臭味明显，酒味浓烈，气味刺鼻 (1~9)
味 taste (30)	口感适合，酸甜适中，爽口，无异味 (30~20)	口感较好，酸甜比例不合适，无异味 (19~10)	口感差，过酸或过甜，有异味 (1~9)
组织状态 texture (20)	无悬浮、沉淀和混浊现象 (15~20)	摇动有少量悬浮和沉淀物 (10~14)	摇动过度混浊 (1~9)

1.2.4 云参酵素功能性指标测定

(1) 可滴定酸测定

参照国标 GB/T 12456—2008 中的酸碱滴定法检测云参酵素中的可滴定酸含量。

(2) 蛋白酶活性检测

参照 SB/T 10317—1999 方法中的蛋白酶活性检测方法检测云参酵素中的蛋白酶活性。

(3) DPPH 自由基清除能力的测定

根据 HE 等^[7]的方法进行 DPPH 自由基清除能力的测定，将 1 mL 样品加入 1 mL 0.2 mmol/L DPPH 乙醇溶液中，将混合物振荡摇匀，于室温下避光静置 30 min，在 517 nm 处测定吸光值，

每个样品测定 3 次。DPPH 自由基清除率计算公式如下：

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_{\text{样}}}{A_0}\right) \times 100\%$$

式中， $A_{\text{样}}$ 为加入样品反应后的 DPPH 自由基吸光度值； A_0 为未加样品的 DPPH 自由基吸光度值。

(4) 抑菌活性测定

参照王辉等^[8]的方法测定云参酵素原液、植物乳杆菌 ST (1×10^8 CFU/mL) 和酵素上清液的抑菌活性，以 0.3 mg/mL 庆大霉素做阳性对照。福氏志贺氏菌 (*Shigella flexneri*) CMCC(B)51592 购自广东环凯生物技术有限公司；大肠杆菌 (*Es-*

cherichia coli) CMCC44825、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) CMCC(B)50115 由云南省动物营养与饲料重点实验室提供,调整致病菌浓度为 1×10^8 CFU/mL,取 100 μ L 致病菌菌液至 20 mL LB 琼脂培养基中,制备指示菌平板。

(5) 云参酵素对人肠上皮细胞 HT-29 的抗炎作用测定

参考文献[9]设计试验。细胞预处理:按 1.5×10^6 个/孔将 HT-29 人 IECs 接种到 6 孔细胞培养板中,在 2 mL 含有胎牛血清和双抗的 RPMI-1640 完全培养基中,37 $^{\circ}$ C, 5% CO_2 培养箱培养 48 h,再将预处理细胞分为 4 个试验组:

①对照组:将预处理细胞换成 2 mL RPMI-1640 培养基继续培养 21 h。

②炎症组:将预处理细胞换成 2 mL RPMI-1640 培养基继续培养 18 h 后,添加 10 μ L 10 μ g/mL 促炎剂 TNF- α (终质量浓度 50 ng/mL), 37 $^{\circ}$ C, 5% CO_2 培养箱培养 3 h。

③云参酵素处理组:将预处理细胞换成 2 mL 用无双抗、无血清的 RPMI-1640 培养基按体积比 1 : 40 稀释的云参酵素,共同孵育 18 h 后,添加 10 μ L 促炎剂 TNF- α (终质量浓度 50 ng/mL), 37 $^{\circ}$ C, 5% CO_2 培养箱培养 3 h。

④植物乳杆菌 ST 处理组:将预处理细胞换成 2 mL 用 RPMI-1640 (无双抗、无血清) 培养基按体积比 1 : 40 稀释的 1×10^8 CFU/mL 的植物乳杆菌 ST (云参酵素产品中植物乳杆菌 ST 为 1×10^8 CFU/mL), 共同孵育 18 h 后,添加 10 μ L 10 μ g/mL 促炎剂 TNF- α (终质量浓度 50 ng/mL), 37 $^{\circ}$ C, 5% CO_2 培养箱培养 3 h。

各试验组按上述处理后,采用 MTT 法检测细胞活力;提取细胞总 RNA, qRT-PCR 检测 *IL8*、*NFKB1*、*NFKB2* 基因相对表达量。

1.2.5 数据统计与分析

每组试验设置 3 个重复,数据用 SPSS 18.0 软件进行单因素方差分析,差异显著者进行 Duncan's 多重比较。结果用“平均值 $\pm$ 标准差”表示,显著水平设置为 $P=0.05$ 。

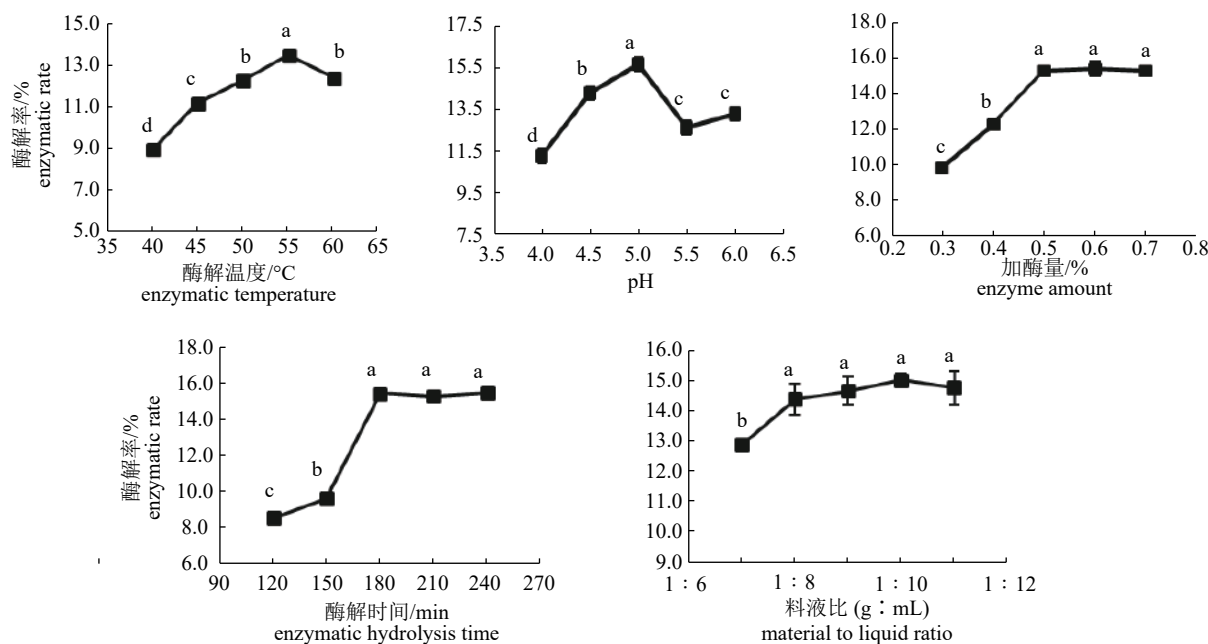
2 结果与分析

2.1 云参发酵基液的制备

2.1.1 单酶最适酶解工艺的确定

(1) 果胶酶酶解云参单因素试验

如图 1 所示:果胶酶的最佳酶解条件为料液比(g : mL) 1 : 9、pH 5.0、加酶量 0.5%、55 $^{\circ}$ C 酶解 180 min。



注:不同字母表示数据间差异显著 ($P < 0.05$);下同。

Note: Different letters indicate significant difference between the data ($P < 0.05$); the same as below.

图 1 果胶酶酶解云参单因素试验结果

Fig. 1 Results of single factor experiment on pectinase enzymatic hydrolysis of CBF

(2) 纤维素酶酶解云参单因素试验

如图 2 所示: 纤维素酶的最佳酶解条件为料液比 (g : mL) 1 : 8、pH 5.0、加酶量 0.6%、50 ℃ 酶解 180 min。

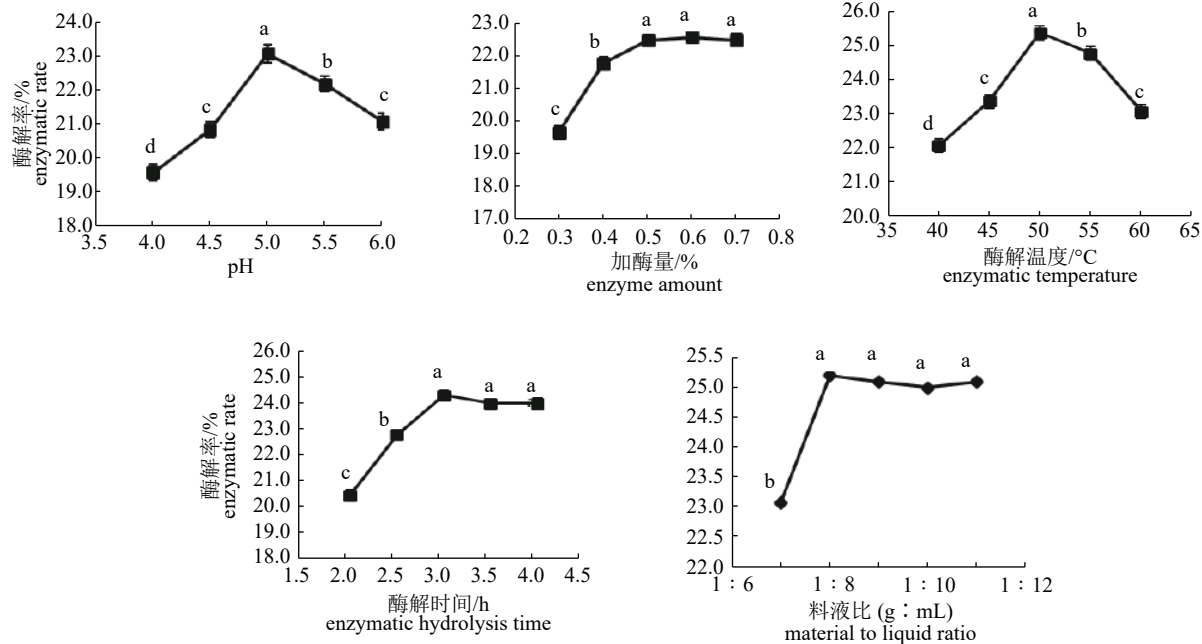


图 2 纤维素酶酶解云参单因素试验结果

Fig. 2 Results of single factor experiment on cellulase enzymatic hydrolysis of CBF

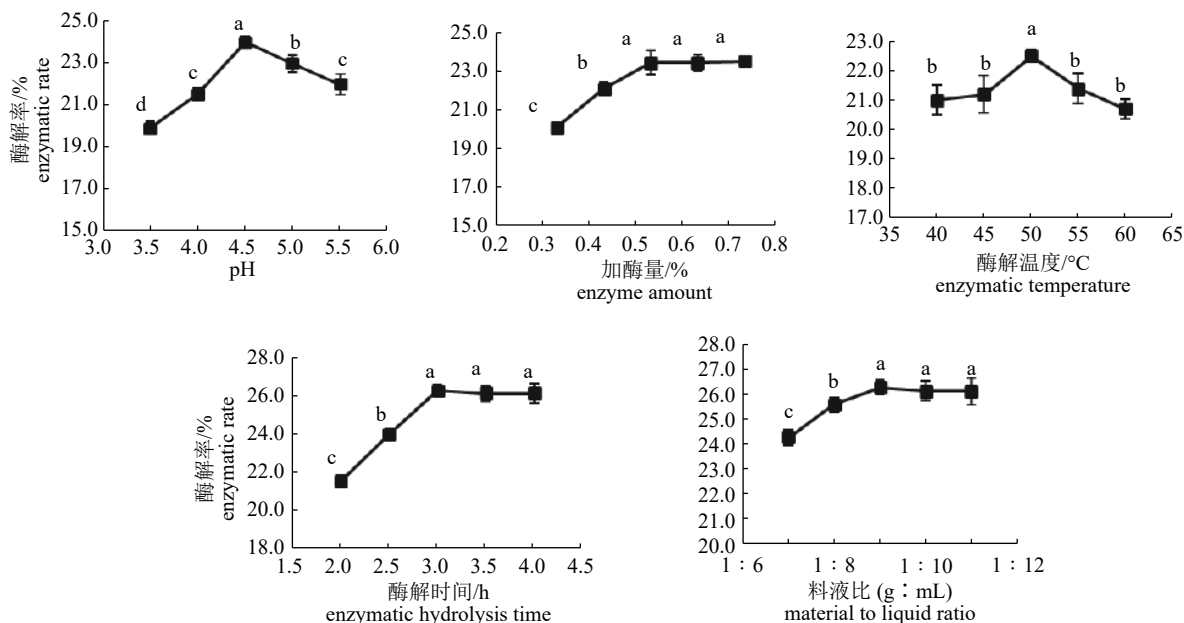


图 3 单宁酶酶解云参单因素试验结果

Fig. 3 Results of single factor experiment on tannase enzymatic hydrolysis of CBF

2.1.2 正交试验确定复合酶酶解云参最佳工艺条件

上述单因素试验结果表明: 果胶酶、纤维素酶、单宁酶 3 种酶的酶解条件比较接近, 且最佳

(3) 单宁酶酶解云参单因素试验

如图 3 所示: 单宁酶的最佳酶解条件为料液比 (g : mL) 1 : 9、pH 4.5、加酶量 0.5%、50 ℃ 酶解 180 min。

酶解时间均为 180 min。因此, 将果胶酶、纤维素酶和单宁酶等比例混合对云参溶液中进行复合酶协同反应, 可提高云参酶解率, 节省反应周

期,降低经济成本。确定料液比 (A)、加酶量 (B)、酶解 pH (C) 和酶解温度 (D)4 个因素,进行 4 因素 3 水平的正交试验,因素水平表见表 2,正交试验结果见表 3。

表 2 正交试验设计因素与水平				
Tab. 2 Orthogonal experimental design factors and levels				
水平 level	A 料液比 (g : mL) material to liquid ratio	B 加酶量/% enzyme amount	C pH	D 酶解温度/℃ enzymatic temperature
1	1 : 8	0.5	4.5	45
2	1 : 9	0.6	5.0	50
3	1 : 10	0.7	5.5	55

由表 3 可知:对云参酶解率影响因素顺序为 $B > C > D > A$ 。即主要因素是加酶量,次主要因素是 pH,酶解温度和料液比为次要因素。最优复合酶解工艺组合为 $A_1B_2C_2D_2$,即料液比 (g : mL) 为 1 : 8,加酶量为 0.6%,pH 为 5,酶解温度 50 ℃ 时酶解率最高 (38.6%)。

2.2 植物乳杆菌发酵工艺优化

2.2.1 植物乳杆菌发酵单因素试验结果

通过单因素试验确定了植物乳杆菌 ST 发酵云参酵素的工艺条件,结果图 4 所示。植物乳杆菌 ST 发酵云参酵素的工艺条件为:在 37 ℃ 条

表 3 $L_9(3^4)$ 正交表
Tab. 3 $L_9(3^4)$ orthogonal table

处理号 processing No.	因素 factor				酶解率/% enzymatic hydrolysis rate
	A	B	C	D	
1	3	3	2	1	37.60
2	2	1	2	3	36.90
3	1	3	3	3	36.70
4	2	2	3	1	37.50
5	3	1	3	2	36.40
6	3	2	1	3	37.00
7	2	3	1	2	37.90
8	1	2	2	2	38.60
9	1	1	1	1	34.60
$\bar{k}_1$	36.60	35.96	36.30	36.60	
$\bar{k}_2$	37.40	37.70	37.70	37.60	
$\bar{k}_3$	37.00	37.40	36.80	36.80	
R	0.80	1.74	1.20	1.00	

件下,蔗糖添加量为 8%,植物乳杆菌 ST 接种量为 1×10^5 CFU/mL,厌氧发酵 20 h。

2.2.2 植物乳杆菌发酵正交试验结果

根据单因素的试验结果,确定蔗糖添加量、植物乳杆菌接种量、发酵温度和发酵时间 4 个因素,进行 4 因素 3 水平的正交试验,因素水平见表 4,正交试验结果见表 5。

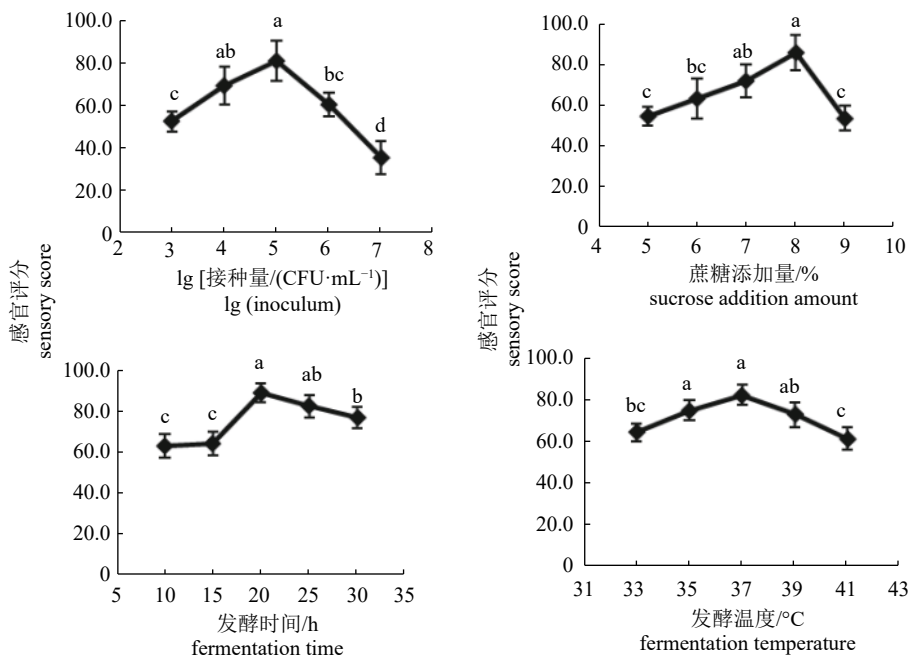


图 4 植物乳杆菌发酵工艺单因素试验结果

Fig. 4 Single factor experiment results of *L. plantarum* fermentation process

表 4 正交试验设计因素与水平
Tab. 4 Orthogonal experimental design factors and levels

水平 level	A	B	C	D
	接种量/ (CFU·mL ⁻¹) inoculum	蔗糖添加量/% sucrose addition amount	发酵温度/℃ fermentation temperature	发酵时间/h fermentation time
1	10 ⁴	7	33	20
2	10 ⁵	8	35	25
3	10 ⁶	9	37	30

表 5 L₉(3⁴) 正交表
Tab. 5 L₉(3⁴) orthogonal table

处理号 processing No.	因素 factor				感官评分 sensory score
	A	B	C	D	
1	1	3	3	3	72.00
2	1	1	1	1	74.80
3	2	1	2	3	80.80
4	3	3	2	1	75.40
5	3	1	3	2	69.00
6	3	2	1	3	67.60
7	2	3	1	2	82.40
8	1	2	2	2	74.40
9	2	2	3	1	85.00
$\bar{k}_1$	73.73	74.87	74.93	78.40	
$\bar{k}_2$	82.73	75.67	76.87	75.27	
$\bar{k}_3$	70.67	76.60	75.33	73.47	
R	12.06	1.73	1.94	4.93	

表 6 云参酵素抗氧化活性、蛋白酶活性和可滴定酸检测结果
Tab. 6 Antioxidant activity, protease activity and titratable acid detection results of CBF

发酵阶段 fermentation stage	蛋白酶活性/(U·g ⁻¹) protease activity	可滴定酸/% titratable acid content	DPPH 自由基清除率/% DPPH free radical scavenging rate
发酵前 before fermentation	2 400±12 a	0.80±0.02 a	52.50±0.05 a
发酵后 after fermentation	2 818±18 b	1.31±0.01 b	71.70±0.07 b

注：同一列肩标字母不同者表示差异显著 ($P < 0.05$)。
Note: Differences in the same column of shoulder letters indicate significant differences ($P < 0.05$); the same as below.

表 7 云参酵素抑菌性试验结果
Tab. 7 Antimicrobial activity of CBF

样品 sample	抑菌圈直径/mm diameters of inhibition zone		
	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. flexneri</i>
庆大霉素 gentamicin	13.97±1.57 b	15.40±1.06 b	14.33±1.21 b
植物乳杆菌 ST <i>L. plantarum</i> ST	9.24±1.23 c	9.28±1.02 c	5.82±0.92 c
云参发酵基液 CBF base	—	—	—
云参酵素 CBF	33.40±2.80 a	29.67±1.29 a	27.33±3.16 a
云参酵素上清液 liquid supernatant of CBF	34.35±1.84 a	27.80±1.40 a	25.47±2.91 a

注：“—”表示无抑菌作用。
Note: “—” indicates no inhibition zone.

由表 5 可知：对植物乳杆菌发酵云参酵素的影响因素顺序为 $A > D > C > B$ 。即主要因素是接种量，次主要因素是发酵时间，发酵温度和蔗糖添加量为次要因素。最优组合为 $A_2B_2C_3D_1$ ，即接种量为 1×10^5 CFU/mL，蔗糖添加量为 8%，发酵温度为 37 ℃，发酵时间为 20 h，可按此发酵工艺进行云参酵素的制备。

2.3 云参酵素功能性指标测定
2.3.1 云参酵素的抗氧化活性、蛋白酶活性和可滴定酸检测结果

由表 6 可知：与发酵前相比，云参酵素中可滴定酸含量、蛋白酶活性和 DPPH 自由基清除能力显著提高 17.42%、63.75% 和 36.57%，生物学功能显著增加。

2.3.2 云参酵素抑菌性试验结果
由表 7 可知：云参发酵基液对 3 种致病菌均无抑制作用，云参酵素原液、酵素上清液和植物乳杆菌 ST 均能抑制 3 种致病菌的增殖，其中云参酵素原液和酵素上清液的抑菌活性最强，抑制作用显著优于庆大霉素 (0.3 mg/mL, $P < 0.05$)；云参酵素和酵素上清液对 3 种致病菌的抑制作用无明显差异，其抑菌活性均显著高于植物乳杆菌 ST ($P < 0.05$)。

2.3.3 云参酵素对人肠上皮细胞 HT-29 的抗炎作用

如图 5 所示: 与 $\text{TNF-}\alpha$ 诱导组相比, 云参酵素和植物乳杆菌 ST 均能显著抑制促炎因子白介素-8 (interleukin-8, IL-8) 和 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 信号通路关键基因 *NFKB1* 的 mRNA 表达水平, 且云参酵素的抑制效果显著优于植物乳杆菌 ST ($P < 0.05$); 云参酵素显著抑制了 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 信号通路关键基因 *NFKB2* 的 mRNA 表达水平 ($P < 0.05$), 而植物乳杆菌 ST 显著增加了 *NFKB2* 的 mRNA 表达水平 ($P < 0.05$)。如图 6 所示不同处理组间 HT-29 细胞活力无显著差异。综上所述, 云参酵素对 $\text{TNF-}\alpha$ 诱导的人肠上皮细胞具有抗炎作用。

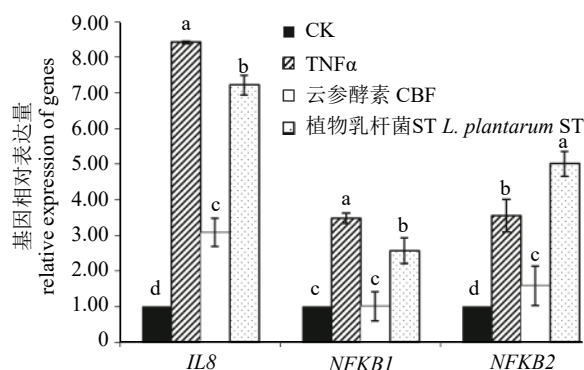


图 5 云参酵素对 $\text{TNF-}\alpha$ 诱导人肠上皮细胞 HT-29 中 IL8 和 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 信号通路关键基因表达的影响

Fig. 5 Effects of CBF on expression of IL8 and key genes of $\text{NF-}\kappa\text{B}$ signaling pathway induced by $\text{TNF-}\alpha$ in HT-29 human intestinal epithelial cells

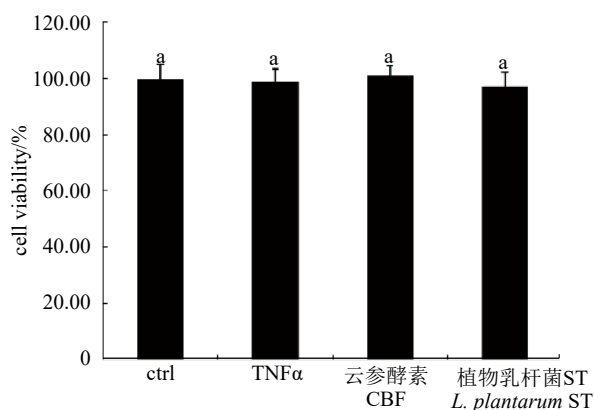


图 6 云参酵素对 $\text{TNF-}\alpha$ 诱导人肠上皮细胞 HT-29 细胞活力的影响

Fig. 6 Effects of CBF on the viability of HT-29 human intestinal epithelial cells induced by $\text{TNF-}\alpha$

3 讨论

益生菌是指一类摄入足够量对宿主机体健康有益的活性微生物总称^[10]。大量研究证实: 其具有促进机体营养物质的消化吸收、预防、治疗疾病和抑制病原菌增殖等益生特性^[11]。随着人们生活水平的不断提高和健康意识的不断增强, 益生菌产品及含益生菌的食品越来越受到人们的关注。目前益生菌的主要种类包括乳酸菌、芽孢杆菌和酵母菌等, 其中乳酸菌是益生菌的主要种类。乳酸菌是一类能利用碳水化合物产生大量乳酸的革兰氏阳性菌的总称。近年来研究发现: 乳酸菌具有维持胃肠道菌群平衡、促进营养物质的吸收、降低胆固醇、防治腹泻和溃疡、提高机体免疫力等多种益生功能^[12]。但目前乳酸菌产品主要为发酵动物源性产品, 如酸奶、奶酪等, 其含有高胆固醇且易发生乳糖不耐症。因此, 应用自主知识产权的菌株开发具有保健功能和生物学功效的植物源性产品前景广阔。

云参产于中国云南、四川和西藏, 是西南地区特有的药食两用植物, 具有补气血、通经络和助消化等功效, 在云南具有悠久的食用历史。本研究以云参为原料, 首先采用果胶酶、纤维素酶和单宁酶 3 种复合酶酶解云参, 制备发酵基液, 在此基础上接种植物乳杆菌生产云参酵素。纤维素酶和果胶酶能将植物中的果胶质、纤维素、半纤维素和木质素分解成植物乳杆菌可利用的单糖或寡糖, 单宁酶能将植物中的鞣酸、单宁和蛋白质水解, 使产品澄清和除去涩味。MARTINS 等^[13]用单宁酶、果胶酶加纤维素酶和 3 种酶的混合物处理红色葡萄果渣、白色葡萄果渣以及混合葡萄果渣, 检测产品的抗氧化活性及多酚水解情况, 结果显示单宁酶在增加葡萄果渣中的总多酚中是最有效的, 果胶酶加纤维素酶增加了红色葡萄果渣中的儿茶素含量, 3 种酶复合增加了白色葡萄果渣中的原花青素 B2, 单宁酶处理葡萄果渣在增加抗氧化活性方面最有效; 纤维素酶和果胶酶的组合是用于橙皮中多糖酶促水解的最有效系统^[14]; 单宁酶可以显著提高牛蒡提取物中总蛋白和总多酚含量^[15]。本研究应用单因素和正交试验设计研究了果胶酶、纤维素酶和单宁酶对云参的酶解情况并得到了最优酶解条件: 3 种酶等体积混合后, 在料液比 (g : mL) 1 : 8, 加酶量 0.6%,

pH 5, 酶解温度 50 ℃ 时酶解 180 min, 酶解率最高 (38.6%)。

植物乳杆菌是同型乳酸发酵菌, 其产酸能力很强, 在发酵过程中酸度增长迅速, 最终达到较高水平。赵珊等^[16]选用植物乳杆菌 DMDL 9010 发酵胡萝卜和木瓜混合果蔬汁, 正交试验表明: 混合发酵果蔬汁最优发酵条件为接种量 6%(v/v)、34 ℃ 发酵 18 h, 此条件下生产的活菌型与灭菌型混合发酵果蔬汁抗氧化性能良好, 活菌型果蔬汁 DPPH 自由基清除率可达 41.20%。本研究以感官评分为衡量指标, 根据正交试验结果得出植物乳杆菌 ST 发酵云参酵素的最佳工艺条件为蔗糖添加量为 8%, 植物乳杆菌 ST 接种量为 1×10^5 CFU/mL, 37 ℃ 厌氧发酵 20 h。

酵素是指以一种或多种新鲜蔬菜、水果、菌菇、药食同源中草药等为原料, 经多种有益菌发酵而成的功能性产品^[17]。目前酵素的评价指标主要包括蛋白酶活性、抗氧化活性、可滴定酸含量和抑菌活性等。蛋白酶是酵素的主要功效酶, 它能够催化蛋白质水解生成多肽及小分子氨基酸^[18]; DPPH 自由基是一种以氮原子为中心能稳定存在的自由基, 通过检测样品对 DPPH 自由基的清除能力表示其抗氧化性的强弱^[19]; 可滴定酸则是植物品质的重要构成成分之一, 是产品风味品质的重要因素; 同时酵素本身可以抑制致病菌生长, 增强机体免疫功能^[20]。云参酵素产品的可滴定酸含量、蛋白酶活性、DPPH 自由基清除能力和抑菌活性与发酵前相比显著提高; 其中, DPPH 自由基清除能力强于葡萄酵素^[21]、蛋白酶活性强于蓝莓果渣酵素^[22]、可滴定酸含量大于苹果皮渣酵素^[23]、抑菌活性显著强于 0.3 mg/mL 庆大霉素。NF- κ B 信号通路可调控多种参与炎症反应的细胞因子、黏附因子和蛋白酶类基因的转录过程, 以应答多种胞外信号刺激, 产生免疫、炎症和应激反应。NFKB1 和 NFKB2 基因是 B 细胞内 κ 轻链多肽基因增强子的核因子 1 和 B 细胞内 κ 轻链多肽基因增强子的核因子 2, 属于 NF- κ B/Rel 转录因子家族, 被上游信号激活后可与 DNA 的 κ B 位置结合, 激活炎症基因的表达^[24]。IL-8 属于促炎细胞因子, 可以趋化炎症细胞并释放炎性递质诱导炎症反应, 是主要炎症标志物^[25]。本课题组研究发现: 嗜热链球菌和瑞士乳杆菌发酵豆奶显著

降低了 TNF- α 诱导的 HT-29 中 IL-8 和 NF- κ B 信号通路关键基因 NFKB1、NFKB2 的 mRNA 表达水平^[26], 与本研究结果相似。云参酵素可显著抑制 TNF- α 诱导的人肠上皮细胞 HT-29 中炎症因子 IL-8 和 NF- κ B 信号通路关键基因的 mRNA 表达水平。云参酵素还能有效去除云参臭味, 口感独特, 蛋白酶活性和抗氧化功能显著提升, 集益生菌功能与云参活性成分于一体, 具有显著的抑菌活性和抗炎作用。

[参考文献]

- [1] 刘品华, 徐星星, 李丽丽, 等. 臭参地上部分黄酮提取、分离及抗油脂氧化性的研究[J]. 食品科技, 2018, 43(02): 241. DOI: 10.13684/j.cnki.spkj.2018.02.045.
- [2] 刘品华, 刘明研, 张鸭关, 等. 臭参营养成分的研究[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2015, 30(3): 418. DOI: 10.16211/j.issn.1004-390X(n).2015.03.016.
- [3] 陈子珺, 李云森, 韦群辉, 等. 臭参对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠化疗增效减毒及免疫功能的影响[J]. 中成药, 2012, 34(10): 1848. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1528.2012.10.002.
- [4] 陈子珺, 李云森, 周吉燕, 等. 臭参不同部位提取物对气虚与血虚动物模型的影响[J]. 中药材, 2009, 32(11): 1731. DOI: 10.13863/j.issn1001-4454.2009.11.032.
- [5] 陈业高, 魏均嫻, 梁宁珈. 新鲜云参根的挥发性成分[J]. 中国中药杂志, 1993, 18(8): 492.
- [6] 杨婧娟, 李娜, 赵声兰. 一种酵素的配方优化研究[J]. 中国酿造, 2016, 35(1): 95. DOI: 10.11882/j.issn.0254-5071.2016.01.021.
- [7] HE Z M, WANG X H, LI G F, et al. Antioxidant activity of prebiotic ginseng polysaccharides combined with potential probiotic, *Lactobacillus plantarum*, C88[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2015, 50(7): 1673. DOI: 10.1111/ijfs.12824.
- [8] 王辉, 马秀敏, 张鹰. 青梅酵素的生物活性及体外抑菌作用[J]. 食品工业科技, 2018, 39(12): 39. DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2018.12.008.
- [9] 田芮佼. 云南传统发酵食品中乳酸菌的分离鉴定及益生特性研究[D]. 昆明: 云南农业大学, 2015.
- [10] BALCÁZAR J L, DE BLAS I, RUIZ Z I, et al. The role of probiotics in aquaculture[J]. Veterinary Microbiology, 2006, 114(3/4): 173. DOI: 10.1016/j.vetmic.2006.01.009.
- [11] 陈颀, 余艳, 包显颖, 等. 益生菌的作用机制及其应用[J]. 畜牧与兽医, 2017, 49(4): 116.
- [12] 曹振辉, 刘永仕, 潘洪彬, 等. 乳酸菌的益生功能及作用机制研究进展[J]. 食品工业科技, 2015, 36(24): 366. DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.24.072.
- [13] MARTINS I M, ROBERTO B S, BLUMBERG J B, et al. Enzymatic biotransformation of polyphenolics increases antioxidant activity of red and white grape pomace[J]. Food Research International, 2016, 89: 533. DOI: 10.1016/j.foodres.2016.09.009.
- [14] GROHMANN K, BALDWIN E A. Hydrolysis of or-

- ange peel with pectinase and cellulase enzymes[J]. *Bio-technology Letters*, 1992, 14(12): 1169. DOI: [10.1007/bf01027023](https://doi.org/10.1007/bf01027023).
- [15] 王君, 张新, 张志萌, 等. 单宁酶处理对牛蒡提取物中抗氧化活性的影响[J]. *食品科技*, 2018, 43(5): 228. DOI: [10.13684/j.cnki.spkj.2018.05.041](https://doi.org/10.13684/j.cnki.spkj.2018.05.041).
- [16] 赵珊, 李清兰, 黄燕燕, 等. 胡萝卜木瓜混合发酵果蔬汁的制备及其抗氧化性能研究[J]. *食品科技*, 2019, 44(1): 146. DOI: [10.13684/j.cnki.spkj.2019.01.026](https://doi.org/10.13684/j.cnki.spkj.2019.01.026).
- [17] 毛建卫, 吴元锋, 方晟. 微生物酵素研究进展[J]. *发酵科技通讯*, 2010, 39(3): 42. DOI: [10.16774/j.cnki.issn.1674-2214.2010.03.009](https://doi.org/10.16774/j.cnki.issn.1674-2214.2010.03.009).
- [18] 李雪, 蔡丹, 沈月, 等. 微生物来源蛋白酶的研究进展[J]. *食品科技*, 2019, 44(1): 32. DOI: [10.13684/j.cnki.spkj.2019.01.006](https://doi.org/10.13684/j.cnki.spkj.2019.01.006).
- [19] 陈芳甜. 观赏海棠果抗氧化活性的研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2012.
- [20] 李占东, 王丁, 李皓. 酵素主要功能及其行业展望[J]. *食品工业*, 2019, 40(1): 301.
- [21] 蒋增良, 刘晓庆, 王珍珍, 等. 葡萄酵素有机酸分析及其体外抗氧化性能[J]. *中国食品学报*, 2017, 17(5): 255. DOI: [10.16429/j.1009-7848.2017.05.033](https://doi.org/10.16429/j.1009-7848.2017.05.033).
- [22] 杨培青, 李斌, 颜廷才, 等. 蓝莓果渣酵素发酵工艺优化[J]. *食品科学*, 2016, 37(23): 205. DOI: [10.7506/spkx1002-6630-201623034](https://doi.org/10.7506/spkx1002-6630-201623034).
- [23] 郭俊花, 许先猛, 马欣, 等. 利用苹果皮渣发酵制备天然酵素工艺优化及其对苹果品质的影响[J]. *江苏农业科学*, 2018, 46(1): 97. DOI: [10.15889/j.issn.1002-1302.2018.01.026](https://doi.org/10.15889/j.issn.1002-1302.2018.01.026).
- [24] MITCHELL S, VARGAS J, HOFFMANN A. Signaling via the NF κ B system[J]. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 2016, 8(3): 227. DOI: [10.1002/wsbm.1331](https://doi.org/10.1002/wsbm.1331).
- [25] SHARMA A, SATYAM A, SHARMA J B, et al. Leptin, IL-10 and inflammatory markers (TNF- α , IL-6 and IL-8) in pre-eclamptic, normotensive pregnant and healthy non-pregnant women[J]. *American Journal of Reproductive Immunology*, 2010, 58(1): 21. DOI: [10.1111/j.1600-0897.2007.00486.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2007.00486.x).
- [26] LIN Q Y, MATHIEU O, TOMPKINS T A, et al. Modulation of the TNF α -induced gene expression profile of intestinal epithelial cells by soy fermented with lactic acid bacteria[J]. *Journal of Functional Foods*, 2016, 23: 400. DOI: [10.1016/j.jff.2016.02.047](https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.02.047).

责任编辑: 何承刚