



# 新生儿源植物乳杆菌 HLPL03 的环境耐受性及其代谢功能低聚糖的生物学活性

李金梅<sup>1</sup>, 刘雯婷<sup>2</sup>, 卢金林<sup>1</sup>, 魏华<sup>1,3</sup>, 张志鸿<sup>1,3\*</sup>

1 南昌大学食品科学与资源挖掘全国重点实验室, 江西 南昌 330047

2 南昌大学第二附属医院妇产科, 江西 南昌 330008

3 南昌大学中德联合研究院, 江西 南昌 330047

李金梅, 刘雯婷, 卢金林, 魏华, 张志鸿. 新生儿源植物乳杆菌 HLPL03 的环境耐受性及其代谢功能低聚糖的生物学活性[J]. 微生物学报, 2023, 63(11): 4258-4270.

LI Jinmei, LIU Wenting, LU Jinlin, WEI Hua, ZHANG Zhihong. Newborn-derived *Lactiplantibacillus plantarum* HLPL03: environmental tolerance and metabolism of functional oligosaccharides[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(11): 4258-4270.

**摘要:** 【目的】解析健康新生儿胎便中植物乳杆菌 HLPL03 的益生功能, 评价其环境耐受性及代谢功能低聚糖的生物学活性。【方法】通过耐受胃肠道条件、过氧化氢和抗生素试验, 评估植物乳杆菌 HLPL03 对极端环境的耐受性; 利用改良培养基, 评价植物乳杆菌 HLPL03 代谢功能低聚糖的能力; 同时, 探究功能低聚糖对植物乳杆菌 HLPL03 抑菌活性、疏水性和黏附能力的影响。【结果】植物乳杆菌 HLPL03 在 pH 2.5 条件下培养 3 h 后, 活菌数仍在  $10^4$  CFU/mL 以上; 在 0.30% 胆盐中培养 6 h 后, 活菌数接近  $10^7$  CFU/mL; 在 1.0 mmol/L  $H_2O_2$  强氧化剂条件下培养 6 h, 活菌数显著升高 ( $P < 0.001$ ); 除低聚木糖外, 植物乳杆菌 HLPL03 能代谢多种功能低聚糖, 并对常见食源性致病菌具有较强的抑制能力; 棉子糖是改善植物乳杆菌 HLPL03 生物学活性的最佳低聚糖, 其能提高菌株表面疏水性达 36.1%, 且促进菌株在 Caco-2 细胞上的黏附率由 16.78% 提高至 42.11%。【结论】健康新生儿源植物乳杆菌 HLPL03 具有良好的抗环境胁迫能力, 且其生物学活性能被棉子糖等功能低聚糖有效促进, 可作为特色乳酸菌进行研究和开发。

**关键词:** 新生儿; 植物乳杆菌; 耐受性; 功能低聚糖; 抑菌; 黏附

资助项目: 国家自然科学基金(32101915); 江西省自然科学基金(20212BAB215033, 20224BAB205005)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32101915) and the Jiangxi Provincial Natural Science Foundation (20212BAB215033, 20224BAB205005).

\*Corresponding author. E-mail: azhangzhihong@163.com

Received: 2023-03-20; Accepted: 2023-06-01; Published online: 2023-06-05

# Newborn-derived *Lactiplantibacillus plantarum* HLPL03: environmental tolerance and metabolism of functional oligosaccharides

LI Jinmei<sup>1</sup>, LIU Wenting<sup>2</sup>, LU Jinlin<sup>1</sup>, WEI Hua<sup>1,3</sup>, ZHANG Zhihong<sup>1,3\*</sup>

1 State Key Laboratory of Food Science and Resources, Nanchang University, Nanchang 330047, Jiangxi, China

2 Department of Obstetrics and Gynecology, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330008, Jiangxi, China

3 Jiangxi-OAI Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330047, Jiangxi, China

**Abstract:** [Objective] To analyze the probiotic functions of *Lactiplantibacillus plantarum* HLPL03 derived from the stool of healthy newborns and evaluate the environmental tolerance and metabolism of functional oligosaccharides of this strain. [Methods] The tolerance of *L. plantarum* HLPL03 to extreme conditions was evaluated by treatments with the gastrointestinal environment, hydrogen peroxide, and antibiotics. The modified media were used to evaluate the metabolism of functional oligosaccharides by *L. plantarum* HLPL03. Furthermore, the effects of functional oligosaccharides on the antibacterial activities, hydrophobicity, and adhesion of *L. plantarum* HLPL03 were investigated. [Results] The viable count was above  $10^4$  CFU/mL when *L. plantarum* HLPL03 was cultured at pH 2.5 for 3 h and close to  $10^7$  CFU/mL after the strain was cultured in 0.30% bile salt for 6 h. The viable count increased significantly when *L. plantarum* HLPL03 was cultured with 1.0 mmol/L  $H_2O_2$  for 6 h ( $P < 0.001$ ). *L. plantarum* HLPL03 metabolized different functional oligosaccharides (except xylooligosaccharides) and inhibited common food-borne pathogens. Raffinose was the best oligosaccharide to improve the biological activity of *L. plantarum* HLPL03. It enhanced the surface hydrophobicity of the strain by 36.1% and increased the adhesion rate of the strain on Caco-2 cells from 16.78% to 42.11%. [Conclusion] *L. plantarum* HLPL03 from healthy newborns has good resistance to environmental stress, with the biological activities effectively promoted by functional oligosaccharides such as raffinose, serving as characteristic lactic acid bacteria for research and development.

**Keywords:** newborn; *Lactiplantibacillus plantarum*; tolerance; functional oligosaccharides; antibacterial; adhesion

肠道微生物作为人体最大的“免疫器官”，维持着机体的免疫平衡及预防免疫疾病，同时其还能维护肠上皮的完整性，防止病原微生物入侵<sup>[1]</sup>。新生婴儿肠道微生物主要来源于母体产道、皮肤及乳汁等<sup>[2]</sup>，早期定殖在新生儿肠道的微生物可能容易稳定下来，并对肠道菌群形成和

机体生长发育发挥极其重要的作用，这些微生物主要包括乳酸杆菌、双歧杆菌、链球菌、肠球菌、丙酸杆菌和葡萄球菌等<sup>[3-4]</sup>。虽然新生儿肠道乳酸菌组成比例偏低，但却是机体不可或缺的微生物<sup>[5]</sup>，因此探究早期定殖肠道的乳酸菌功能具有重要意义。

植物乳杆菌是一类常见的乳酸菌，具有良好的生态适应性和代谢适应性，广泛存在于发酵食品、肉类和哺乳动物胃肠道<sup>[6]</sup>。体外试验表明，植物乳杆菌在肠道中可通过代谢产生一些有机酸、细菌素等，抑制病原微生物繁殖，并能调节肠道微生物群<sup>[7]</sup>；此外，还能够通过黏附肠上皮并促进黏蛋白的表达，增强肠道屏障功能<sup>[8]</sup>。有临床研究表明，植物乳杆菌 P-8 可以通过改善肠道菌群平衡辅助治疗溃疡性结肠炎<sup>[9]</sup>；植物乳杆菌 ZY08 可通过增加高脂血症金仓鼠肠道短链脂肪酸(short chain fatty acids, SCFAs)含量，改善高脂血症<sup>[10]</sup>；植物乳杆菌 HAC01 通过调节小鼠肝脏中的葡萄糖代谢缓解高血糖和二型糖尿病<sup>[11]</sup>。此外，植物乳杆菌还能将食物中的复杂碳水化合物代谢为易吸收的小分子物质，促进机体的健康<sup>[12]</sup>。

功能性低聚糖是肠道微生物可获得性碳水化合物 (microbiota-accessible carbohydrate, MAC)，由 2–10 个单糖通过  $\alpha$  或  $\beta$  糖苷键聚合而成，不易被人体消化酶分解，可到达大肠，成为乳酸菌发酵底物<sup>[13]</sup>。常见的功能低聚糖主要有低聚半乳糖、低聚果糖、低聚异麦芽糖、低聚木糖和棉子糖等。据报道，功能低聚糖可选择性促进特定乳酸菌(如双歧杆菌、植物乳杆菌等)在肠道代谢繁殖，维护菌群稳态，促进肠道健康<sup>[14]</sup>；其还能调节肠道 SCFAs 合成、清除肠道病原体及有害物质、维持肠道屏障的完整性和改善肠道免疫系统等功效<sup>[15–18]</sup>。

本项目以健康新生婴儿胎便源植物乳杆菌 HLPL03 为研究对象，在评价其环境耐受性和生物学活性的基础上，解析功能低聚糖对其体外发酵、抑菌和黏附性能的促进效应。本研究将为新生婴儿源植物乳杆菌 HLPL03 益生特性鉴定和功能开发奠定基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 菌株和试剂

植物乳杆菌 HLPL03 分离自健康新生婴儿胎便，本研究涉及的大肠埃希氏杆菌 O157: H7、单核细胞增生李斯特菌 CMCC54007、金黄色葡萄球菌 CMCC26003、鼠伤寒沙门氏菌 ATCC13311 和蜡样芽孢杆菌 HN001 等均保存于食品科学与资源挖掘全国重点实验室。

LB 培养基实验室配制；MRS 培养基、DMEM (Dulbecco's modified eagle medium)培养基、胃蛋白酶、胰蛋白酶、牛胆盐，北京索莱宝生物科技有限公司；抗生素(用于试纸扩散法)，浙江省温州市康泰生物科技有限公司；低聚半乳糖、低聚果糖、低聚木糖、低聚异麦芽糖和棉子糖，上海源叶生物科技有限公司；其他化学试剂均为国产分析纯。

### 1.2 仪器和设备

YXQ-LS-50A 型立式压力蒸汽灭菌锅，上海博迅医疗生物仪器有限公司；Anaerobic IV型多功能厌氧培养箱，GeneScience 公司；H1650-W 型台式离心机，长沙湘仪离心机仪器有限公司；ZHWHY-2102C 型恒温培养箱，上海智城分析仪器制造有限公司；PHS-3E pH 计，上海伟业仪器厂；电子天平，Sartorius 公司；Synergy UV 型超纯水仪，江西鼎技科学仪器有限公司；Multiskan GO 型多功能酶标仪，Thermo Fisher Scientific 公司。

### 1.3 培养基及试剂的配制

Basal MRS (BMRS)培养基<sup>[19]</sup>：称取 10.0 g 蛋白胨，5.0 g 牛肉浸粉，5.0 g 酵母提取物，3.0 g 氯化铵，4.0 g 磷酸氢二钾，2.6 g 磷酸二氢钾，0.102 g 硫酸镁，0.05 g 四水硫酸锰，0.5 g 半胱氨酸盐酸盐和 1.0 g 吐温-80，加蒸馏水定容至 800 mL，121 °C 高压灭菌 15 min。

LB 培养基: 称取氯化钠 10 g, 胰蛋白胨 10 g 和酵母提取物 5 g, 加蒸馏水定容至 1 000 mL, 121 °C 高压灭菌 15 min。

配制 2.5% (质量体积分数)葡萄糖、低聚半乳糖、低聚果糖、低聚木糖、低聚异麦芽糖和棉子糖储备液, 121 °C 高压灭菌 15 min, 用于配制改良培养基。

人工胃液: 称取 1 g 胃蛋白酶, 加水定容至 100 mL, 分别调节 pH 值至 2.0、2.5 和 3.0, 再用 0.22 μm 无菌微孔滤膜过滤除菌备用。

人工肠液: 称取 0.65 g 磷酸二氢钾, 加 5 mL 蒸馏水使其溶解, 用 10 mol/L 氢氧化钾溶液调 pH 值至 7.4, 再加 1 g 胰蛋白酶, 用蒸馏水定容至 100 mL, 再用 0.22 μm 无菌微孔滤膜过滤除菌备用。

#### 1.4 耐酸耐胆盐能力评价

将培养至稳定期的植物乳杆菌 HLPL03 发酵液以 1%的接种量接种至 pH 值分别为 2.5 和 3.5 的 MRS 培养基中, 37 °C 厌氧培养, 分别于 0 h 和 3 h 取样并进行活菌计数。同样将植物乳杆菌接种至牛胆盐含量分别为 0.15%和 0.30%的 MRS 培养基中, 分别于 0、3 和 6 h 取样并进行活菌计数。活菌计数方法为平板菌落计数法, 即对菌悬液进行 10 倍梯度稀释后在固体琼脂平板上涂布, 37 °C 条件下厌氧培养 24 h, 计算菌落数并确定菌悬液的活菌数。

#### 1.5 耐过氧化氢能力

根据文献[20]报道的方法, 将培养至稳定期的植物乳杆菌发酵液以 1%的接种量接种至过氧化氢浓度分别为 0.6 mmol/L 和 1.0 mmol/L 的 MRS 培养基中, 37 °C 厌氧培养, 分别于 0、3 和 6 h 取样并进行活菌计数。

#### 1.6 耐模拟人工胃肠液能力

根据 Maragkoudakis 等<sup>[21]</sup>报道的方法, 将培养至稳定期的植物乳杆菌发酵液以 1%的接种量

接种至不同 pH 的人工胃液中, 37 °C 厌氧培养, 分别于 0、1、2 和 3 h 取样进行活菌计数, 计算其存活率(survival rate,  $S_r$ )。其中, 无菌水为空白对照, 按照公式(1)计算存活率。

$$S_r (\%) = \frac{\lg N_t}{\lg N_0} \times 100 \quad \text{公式(1)}$$

式中:  $N_t$  为植物乳杆菌在人工胃液处理  $t$  h 后的活菌数/(CFU/mL);  $N_0$  为 0 h 植物乳杆菌的活菌数/(CFU/mL)。

根据前期文献[22], 将培养至稳定期的植物乳杆菌发酵液以 1%的接种量接种至人工肠液中, 37 °C 厌氧培养, 分别于 0、2、4、6 和 8 h 取样进行活菌计数。其中, 无菌水为空白对照。

#### 1.7 抗生素敏感性

选用 K-B 药敏纸片扩散法对植物乳杆菌耐药性进行评价<sup>[23]</sup>。取活化好的植物乳杆菌原液用接种环均匀划线于固体培养基表面, 用无菌镊子将含抗生素的药敏纸片放置于平板表面, 37 °C 厌氧培养 24 h, 再用精确度为 0.01 mm 的游标卡尺测量抑菌圈直径并记录, 每种抗生素进行 3 个平行。

#### 1.8 植物乳杆菌 HLPL03 发酵上清的抑菌能力

根据文献[24]报道的方法, 将活化好的植物乳杆菌以 1%的接种量接种至 MRS 培养基中, 培养 24 h 取发酵菌液, 于 12 000 r/min 离心 5 min, 再经 0.22 μm 滤膜过滤得上清。用接种环蘸取培养至稳定期的大肠埃希氏杆菌、单核细胞增生李斯特菌、金黄色葡萄球菌、鼠伤寒沙门氏菌和蜡样芽孢杆菌菌液分别在 LB 平板上均匀划线, 将牛津杯(直径 7.8 mm)均匀放置平板上轻轻按压, 进行 3 个平行。接着加入 200 μL 上清至牛津杯中, 轻轻将平板移至 37 °C 恒温培养箱中培养 12 h, 测定抑菌圈大小。

## 1.9 不同功能低聚糖对植物乳杆菌 HLPL03 代谢影响

在 BMRS 培养基中添加 2.5% (质量体积分数) 无菌功能低聚糖或者葡萄糖储备液, 使其终浓度为 0.5% (质量体积分数), 获得不同改良 MRS 培养基, 葡萄糖组作为对照组。根据文献[25]报道的方法, 取 10  $\mu$ L 活化好的植物乳杆菌菌悬液加入到含有溴甲酚紫指示剂的不同糖类培养基中(200  $\mu$ L), 37  $^{\circ}$ C 下培养 24 和 48 h, 通过产酸可导致指示剂变为黄色作为标准来判断其是否可利用相应的碳水化合物。同时, 将活化好的植物乳杆菌以 1% 的接种量接种至含不同功能低聚糖(低聚半乳糖、低聚果糖、低聚木糖、低聚异麦芽糖和棉子糖)的改良 MRS 培养基中, 置于 37  $^{\circ}$ C 培养箱中培养, 每隔 3 h 测定  $OD_{600}$  和 pH 值。

## 1.10 不同功能低聚糖对植物乳杆菌 HLPL03 发酵上清抑菌能力的影响

将活化好的植物乳杆菌以 1% 的接种量接种至改良后的不同 MRS 培养基中, 置于 37  $^{\circ}$ C 培养箱中厌氧培养, 取 24 h 的发酵菌液, 于 12 000 r/min 离心 5 min, 再经 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤得上清。在 LB 平板上用接种环分别蘸取培养至稳定期的大肠埃希氏杆菌( $1.7 \times 10^9$  CFU/mL)、蜡样芽孢杆菌( $1.8 \times 10^8$  CFU/mL)和鼠伤寒沙门氏菌( $1.2 \times 10^9$  CFU/mL)菌液均匀划线, 将牛津杯均匀放置平板上轻轻按压, 设置 3 个平行。在牛津杯中加入 200  $\mu$ L 上清, 轻轻将平板移至 37  $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 12 h, 测定抑菌圈大小。

## 1.11 棉子糖对植物乳杆菌 HLPL03 疏水性的影响

根据 1.9 和 1.10 的试验结果, 选择最利于菌株发酵的功能低聚糖作为生长碳源, 结合 Hernandez 等<sup>[26]</sup>报道的方法并稍加改进, 将活化好的植物乳杆菌以 1% 的接种量接种至含该低聚糖的改良 MRS 培养基中, 以葡萄糖作为对照。

将培养至稳定期的植物乳杆菌在 6 000 r/min 下离心 5 min 收集菌体细胞, 并用无菌磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)洗涤 2 次。随后, 将获得的菌体细胞用无菌 PBS 重悬至  $10^8$  CFU/mL ( $A_0$ )。然后取 1 mL 二甲苯加入至 3 mL 调整好浓度的菌体细胞悬液中, 混合后再涡旋振荡 1 min, 37  $^{\circ}$ C 下静置 1 h, 待水相和有机相重新分离, 小心吸取水相, 测定其吸光度记为  $A_1$ 。按照公式(2)计算疏水性。

$$\text{疏水性}(\%) = (1 - A_1/A_0) \times 100 \quad \text{公式(2)}$$

## 1.12 棉子糖对植物乳杆菌 HLPL03 黏附能力的影响

根据文献[27]报道的方法, 首先调整 6 孔板中 Caco-2 细胞浓度约为  $2.5 \times 10^5$  CFU/mL, 待细胞长至单层时, 用 Hanks 缓冲液洗涤 2 次。将培养至稳定期的菌体在 6 000 r/min 下离心 5 min, 收集菌体沉淀并洗涤 2 次。向 6 孔板每孔中加 2 mL 用不含双抗的 DMEM 培养基重悬的菌悬液( $10^8$  CFU/mL), 37  $^{\circ}$ C 孵育 2 h。弃除上层培养液, 洗涤 2 次, 用胰蛋白酶进行消化, 再添加不含双抗的 DMEM 培养基吹打细胞至完全脱落, 经梯度稀释后进行菌落计数。黏附率以黏附于细胞上的菌落数与初始菌落总数之比表示。

## 1.13 数据处理

试验均重复 3 次, 采用 GraphPad Prism 7.0 软件进行统计分析, 各组总体均数采用单/双因素方差分析(one/two-way ANOVA)进行显著性比较, 其中  $P < 0.05$ , 表示差异显著。

# 2 结果与分析

## 2.1 新生儿源植物乳杆菌 HLPL03 耐受极端酸和胆盐环境

乳酸菌发挥益生作用的前提是能顺利通过胃的酸性环境及十二指肠高胆盐环境, 以活菌的状态到达肠道部位。由图 1A 可以看出, 植物乳

杆菌 HLPL03 在 pH 值 3.5 培养基中培养 3 h 后, 活菌数几乎不受影响; 而当 pH 值降为 2.5 时, 生长受到抑制( $P < 0.001$ ), 活菌数由  $1.41 \times 10^7$  CFU/mL 降至  $2.87 \times 10^4$  CFU/mL。肠道胆盐含量在 0.03%–0.30% 范围内波动, 从图 1B 可以看到, 当培养基中胆盐含量为 0.15% 时, 植物乳杆菌 HLPL03 生长不受影响; 当胆盐含量升为 0.30%

时, 3 h 后活菌数从  $1.76 \times 10^7$  CFU/mL 下降到  $7 \times 10^6$  CFU/mL。综上所述, pH 2.5 或 0.30% 胆盐会降低植物乳杆菌 HLPL03 的活性, 但依然保持较高活性; 而 pH 3.5 或 0.15% 胆盐几乎不影响菌株活性, 说明该菌株具有通过胃肠道环境的潜力, 与鲁曦等<sup>[28]</sup>发现婴儿粪便中罗伊氏乳杆菌能耐受酸和胆盐的结果相似。

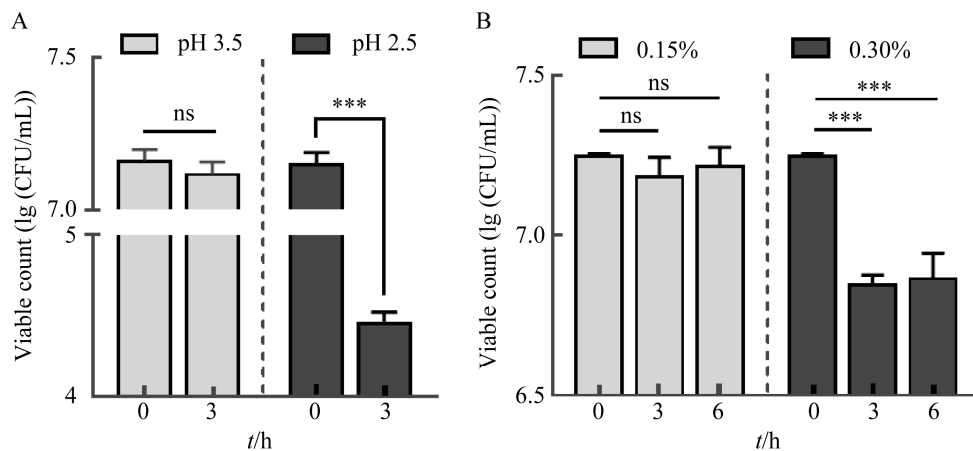


图 1 植物乳杆菌 HLPL03 耐受酸和胆盐环境能力

Figure 1 Tolerance of *Lactiplantibacillus plantarum* HLPL03 to acid and bile salt environment. Values represent  $\bar{x} \pm s$ . \*\*\*:  $P < 0.001$ . A: The number of viable bacteria of *L. plantarum* HLPL03 after culturing at pH 2.5 or pH 3.5 for 3 h. B: The number of viable bacteria of *L. plantarum* HLPL03 after culturing at 0.15% or 0.30% bile salt for 6 h. ns: No significant difference.

## 2.2 植物乳杆菌 HLPL03 的抗氧化能力

生物体时刻进行着氧化还原反应, 当活性氧水平升高, 氧化还原平衡会受到破坏。本研究选用强氧化剂过氧化氢来评价植物乳杆菌 HLPL03 的抗氧化能力, 由图 2 可知, 植物乳杆菌 HLPL03 在含 0.6 mmol/L 和 1.0 mmol/L 过氧化氢的 MRS 培养基中活菌数随时间的延长而显著升高, 培养 3 h 后, 活菌数分别由  $1.16 \times 10^7$  CFU/mL 升为  $3.8 \times 10^7$  CFU/mL 和  $3.1 \times 10^7$  CFU/mL ( $P < 0.01$ ); 培养 6 h 后, 活菌数则达到  $5.27 \times 10^8$  CFU/mL 和  $4.95 \times 10^8$  CFU/mL。因此, 植物乳杆菌 HLPL03 在过氧化氢条件下生长良好, 说明其具有较强的抗氧化能力。

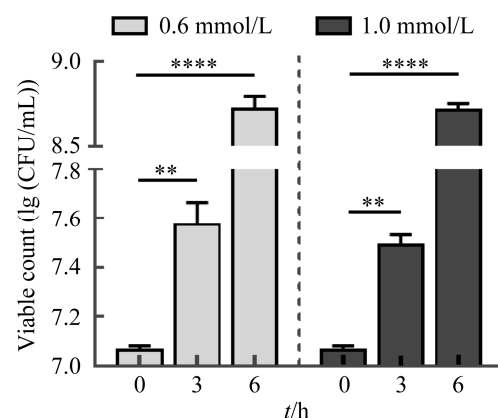


图 2 植物乳杆菌 HLPL03 对过氧化氢的耐受能力  
Figure 2 Tolerance of *Lactiplantibacillus plantarum* HLPL03 to hydrogen peroxide. Values represent mean  $\pm$  SD. \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ . The number of viable bacteria of *L. plantarum* HLPL03 after culturing at 0.6 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or 1.0 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 6 h.

### 2.3 胃肠液对植物乳杆菌 HLPL03 的影响

人体消化液中的胃蛋白酶和胰蛋白酶可以分解食物中蛋白质,也会破坏微生物的蛋白质成分,从而对微生物的生长有一定的抑制作用。植物乳杆菌 HLPL03 在人工胃肠液中的存活率如图 3 所示,植物乳杆菌 HLPL03 在 pH 3.0 胃液中的存活率几乎不受孵育时间的影响,在空白对照组中,存活率得到提高,而 pH 2.0–2.5 的胃液中,存活率能维持约 100% 达 2 h,在第

3 小时存活率明显下降,且与对照组存在显著差异( $P < 0.0001$ ),但均保持在 95% 以上(图 3A)。该结果表明菌株耐受胃液的能力高于 Wang 等<sup>[29]</sup>报道存活率为 82.78% 的乳酸菌。另外,植物乳杆菌 HLPL03 在人工肠液中培养 8 h,活菌数呈先微弱上升再下降趋势,最后维持高于初始水平的活菌数,并与空白组没有显著性差异,说明菌株具有良好的耐受肠液的能力(图 3B)。

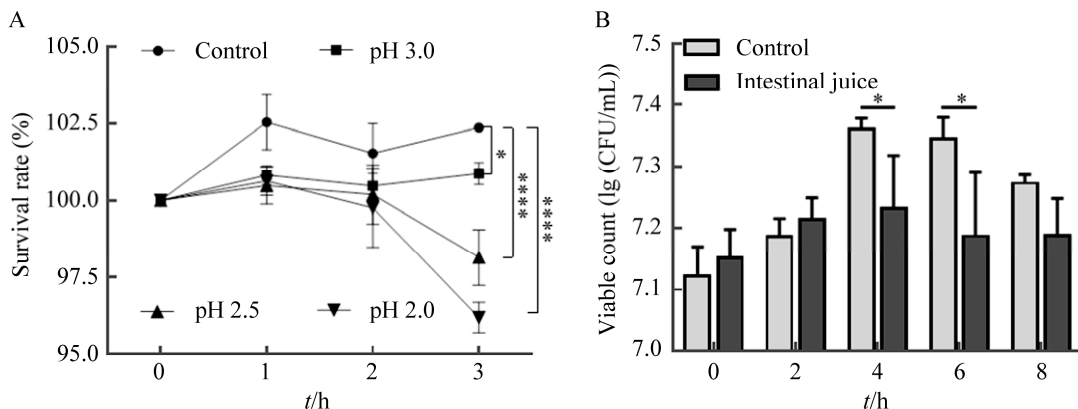


图 3 人工胃液和肠液对植物乳杆菌 HLPL03 的影响

Figure 3 The effect of artificial gastric juice and intestinal juice on *Lactiplantibacillus plantarum* HLPL03. Values represent  $\bar{x} \pm s$ . \*:  $P < 0.05$ ; \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ . A: The survival rate of *L. plantarum* HLPL03 at pH 2.0, pH 2.5, and pH 3.0 artificial gastric juice with a blank control group. B: The number of viable bacteria of *L. plantarum* HLPL03 at artificial intestinal juice and blank control group for 8 h.

### 2.4 植物乳杆菌 HLPL03 对不同抗生素的敏感性

乳酸菌对某些抗生素具有耐药性,可以使得在利用该类抗生素治疗疾病时乳酸菌不会被一同杀灭,但是有些具有抗生素抗性基因的益生菌被食用后可能向人体内其他细菌或致病菌转移其抗性基因,从而对人体健康产生潜在风险<sup>[30]</sup>。植物乳杆菌 HLPL03 对 13 种抗生素的敏感性如表 1 所示,其对万古霉素、链霉素和环丙沙星表现出耐药,对其他 10 种抗生素表现出敏感。本研究结果与汤伟等<sup>[31]</sup>分离自泡菜中的消化乳杆菌对链霉素耐药性较强的结果相似。乳酸菌对氨基糖苷类抗生素(链霉素、庆大霉素)耐药原因之一

表 1 植物乳杆菌 HLPL03 对不同抗生素的敏感性  
Table 1 Sensitivity of *Lactiplantibacillus plantarum* HLPL03 to different antibiotics

Antibiotic designation	Antibiotic content	Sensitive type
Penicillin	10 U	S
Gentamicin	10 $\mu\text{g}$	S
Erythromycin	15 $\mu\text{g}$	S
Tetracycline	30 $\mu\text{g}$	S
Clindamycin	2 $\mu\text{g}$	S
Vancomycin	30 $\mu\text{g}$	R
Amoxicillin	10 $\mu\text{g}$	S
Ampicillin	10 $\mu\text{g}$	S
Cefoperazone	75 $\mu\text{g}$	S
Chloramphenicol	30 $\mu\text{g}$	S
Streptomycin	10 $\mu\text{g}$	R
Ciprofloxacin	5 $\mu\text{g}$	R
Rifampin	5 $\mu\text{g}$	S

R and S represent resistant and sensitive, respectively.

是产生的氨基糖苷类钝化酶使此抗生素灭活<sup>[32]</sup>。综上所述,植物乳杆菌 HLPL03 对多种抗生素具有敏感性,应用于食品领域不存在相关安全问题。

### 2.5 植物乳杆菌 HLPL03 代谢上清液的抑菌能力

以大肠埃希氏杆菌、单核细胞增生李斯特菌、金黄色葡萄球菌、鼠伤寒沙门氏菌和蜡样芽孢杆菌为指示菌来评价植物乳杆菌 HLPL03 代谢上清的抑菌活性。结果如图 4 所示,植物乳杆菌 HLPL03 对 5 株常见食源性致病菌的生长均有抑制能力,抑菌圈均在 7.8 mm 以上,其中对单核细胞增生李斯特菌的抑菌能力最大,抑菌圈达 23 mm,显著高于其他 4 株的抑菌圈( $P<0.05$ ),其中对金黄色葡萄球菌的抑制能力最小,抑菌圈为 15 mm。乳酸菌的抑菌能力强弱一定程度上反映其在宿主肠胃道中抵御有害致病菌侵袭的能力,抑菌能力强的乳酸菌应用于食品中时,通常能抑制腐败菌的繁殖,有助于延长商品货架期<sup>[33]</sup>。

### 2.6 植物乳杆菌 HLPL03 代谢不同功能低聚糖的差异性

乳酸菌利用碳水化合物进行代谢,产生酸性

终产物,经染色后颜色会变为黄色。图 5A 为植物乳杆菌 HLPL03 利用 5 种功能低聚糖及葡萄糖

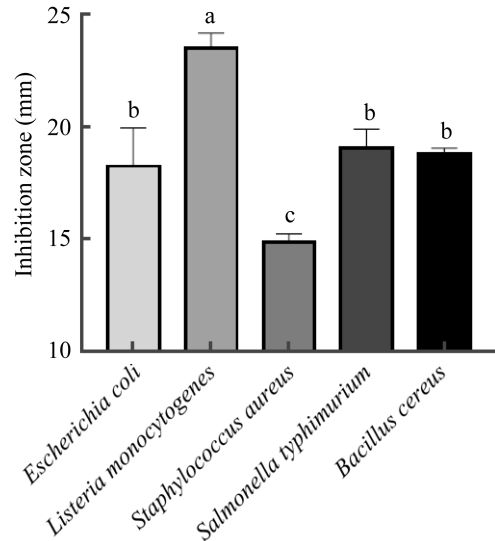


图 4 植物乳杆菌 HLPL03 对不同食源致病菌的抑制能力

Figure 4 The inhibition of *Lactiplantibacillus plantarum* HLPL03 on different food-borne pathogens. Values represent mean±SD. Different letters represent significant differences,  $P<0.05$ . Different food-borne pathogens include *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, and *Bacillus cereus*.

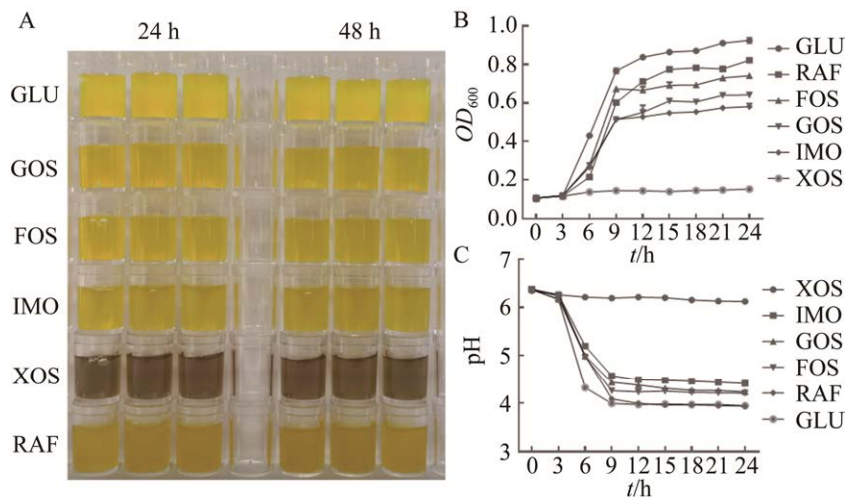


图 5 植物乳杆菌 HLPL03 利用不同功能低聚糖的代谢情况

Figure 5 The change of fermentation of *Lactiplantibacillus plantarum* HLPL03 in modified media with different functional oligosaccharides. A: Different colors in modified media with different functional oligosaccharides when *L. plantarum* HLPL03 fermented at 24 and 48 h. Yellow indicates that *L. plantarum* HLPL03 can metabolize these functional oligosaccharides, and brown indicates that it cannot metabolize the carbohydrate. B: The growth curves of *L. plantarum* HLPL03 in modified media with different functional oligosaccharides during 24 h. C: Variation of pH in modified media with different functional oligosaccharides during 24 h. GLU: Glucose; GOS: Galactose-oligosaccharide; FOS: Fructo-oligosaccharides; IMO: Isomaltose; XOS: Xylo-oligosaccharide; RAF: Raffinose.



代谢的颜色反应结果,黄色表示植物乳杆菌 HLPL03 可利用葡萄糖、低聚半乳糖、低聚果糖、低聚异麦芽糖和棉子糖进行代谢,棕色表示其不能利用低聚木糖进行代谢,说明该菌株没有低聚木糖相关的代谢酶。图 5B 生长曲线也证实了植物乳杆菌 HLPL03 不能利用低聚木糖,同时不同功能低聚糖促进菌株代谢能力有差异,强弱依次为棉子糖、低聚果糖、低聚半乳糖和低聚异麦芽糖,但均不及葡萄糖,这可能是因为葡萄糖是单糖,相比功能低聚糖,更容易被吸收;另外,植物乳杆菌 HLPL03 利用不同碳水化合物代谢的

上清 pH 变化也反映菌株代谢碳水化合物的差异(图 5C),结果一致。

## 2.7 不同功能低聚糖对植物乳杆菌 HLPL03 代谢上清的抑菌能力影响

由于植物乳杆菌 HLPL03 代谢不同功能低聚糖具有差异性,进一步探究 4 种可被代谢的功能低聚糖对其发酵上清抑菌活性的影响,结果如图 6 所示,发酵上清对大肠埃希氏杆菌、蜡样芽孢杆菌和鼠伤寒沙门氏菌均有抑菌能力(图 6A),其中蜡样芽孢杆菌组的抑菌圈大于 10 mm,而菌株利用棉子糖和低聚果糖代谢后

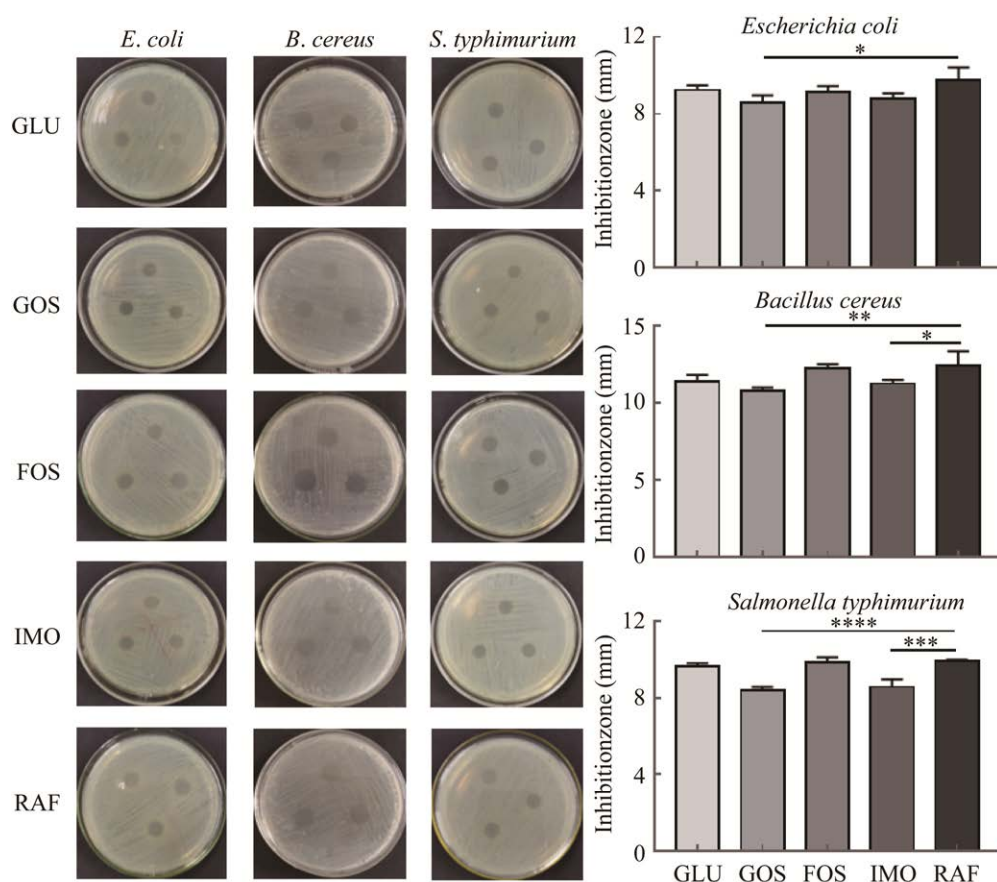


图 6 植物乳杆菌 HLPL03 利用不同功能性低聚糖代谢的上清抑菌能力

Figure 6 Inhibition of *Lactiplantibacillus plantarum* HLPL03 fermented supernatant with different functional oligosaccharides against pathogens. Values represent  $\bar{x} \pm s$ . \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ . *L. plantarum* HLPL03 was fermented in modified media with different functional oligosaccharides. The inhibition zone of the different supernatant on *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, and *Salmonella typhimurium* was determined. GLU: Glucose; GOS: Galactose oligosaccharide; FOS: Fructo-oligosaccharides; IMO: Isomaltose; RAF: Raffinose.

的上清抑制效果较好,鼠伤寒沙门氏菌具有类似的效果,而大肠埃希氏杆菌组只有棉子糖的效果最好( $P<0.05$ )。综上所述,棉子糖作为代谢碳源时,植物乳杆菌 HLPL03 的代谢上清液抑菌能力最好。

## 2.8 棉子糖改善植物乳杆菌 HLPL03 疏水性及细胞黏附能力

乳酸菌利用不同碳水化合物代谢后,表面疏水性会发生变化,而疏水性的强弱与菌株在肠上皮细胞上的黏附能力正相关,乳酸菌的高疏水性有利于其在肠道中存活<sup>[34]</sup>。其中疏水性大于 60% 的菌株为高度疏水,疏水性位于 40%–60% 之间是中度疏水菌,疏水性低于 40% 时的菌株亲水。从图 7A 可以看出,植物乳杆菌 HLPL03 在棉子糖中的疏水性显著高于在葡萄糖中,在棉子糖中的疏水性达到 65% 左右,属于高度疏水,而在葡萄糖中的疏水性低于 30%,属于亲水。另外,植物乳杆菌 HLPL03 利用葡萄糖和棉子糖代谢后在 Caco-2 细胞上的黏附能力与菌株的疏水性结

果一致,利用棉子糖代谢后的黏附能力显著高于葡萄糖(图 7B,  $P<0.05$ )。这可能是因为棉子糖改变了植物乳杆菌的表面疏水性和生长性能,进而提高了菌株黏附能力,该结果与 Celebioglu 等<sup>[35]</sup>发现棉子糖对嗜酸乳杆菌 NCFM 在 HT-29 细胞上的黏附促进作用一致。综上所述,棉子糖能够提升植物乳杆菌 HLPL03 的疏水性及黏附性能。

## 3 讨论与结论

新生儿肠道菌群尚不稳定,早期定殖的微生物对新生儿的免疫系统发育、机体代谢调节和抑制病原微生物繁殖等发挥重要作用<sup>[36]</sup>。因此,筛选并挖掘新生儿体内乳酸菌的潜在功效具有现实意义。

本研究借助前期从健康新生儿胎便中筛选出的一株植物乳杆菌 HLPL03 为研究对象,对其环境耐受性进行评价,发现其对环境胁迫具有较强的抗逆性,在强酸性(pH 2.5)环境中 3 h 后活菌数仍在  $10^4$  CFU/mL 以上,在高胆盐(0.30%)环境中 6 h 后活菌数只下降了 1 个数量级,在强氧化(1.0 mmol/L  $H_2O_2$ )环境中 6 h 后活菌数上升 1 个数量级。同时解析了功能低聚糖对植物乳杆菌 HLPL03 发酵、抑菌及黏附性能的影响,确定了其不能代谢低聚木糖,而棉子糖是促进其生物活性的最有效功能低聚糖,其促进菌株在 Caco-2 细胞上的黏附率由 16.78% 提高至 42.11%。因此,从健康婴儿初便中分离得到的植物乳杆菌 HLPL03 具有耐受人体胃肠道环境,在肠道定殖并发挥益生活性的潜力。本研究将为系统评价植物乳杆菌 HLPL03 在宿主体内的功能提供科学依据,同时为特色乳酸菌资源开发应用奠定基础。

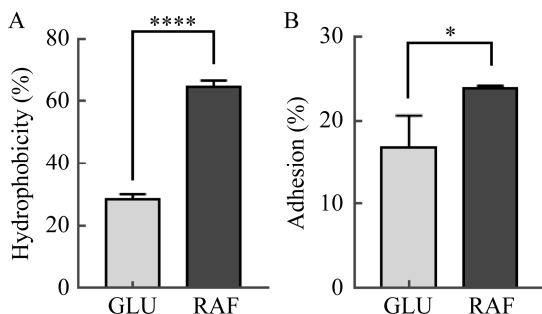


图 7 植物乳杆菌 HLPL03 在葡萄糖和棉子糖中的疏水性和对 Caco-2 细胞的黏附力

Figure 7 Hydrophobicity of *Lactiplantibacillus plantarum* HLPL03 and its adhesion on Caco-2 cells in glucose and raffinose. Values represent  $\bar{x} \pm s$ . \*:  $P<0.05$ ; \*\*\*\*:  $P<0.0001$ . A: Hydrophobicity of *L. plantarum* HLPL03 in medium containing glucose and raffinose, respectively. B: Adhesion of *L. plantarum* HLPL03 cultured in medium with glucose or raffinose. GLU: Glucose; RAF: Raffinose.

## 参考文献

- [1] KUZIEL GA, RAKOFF-NAHOUM S. The gut microbiome[J]. *Current Biology: CB*, 2022, 32(6): R257-R264.
- [2] COLLADO MC, RAUTAVA S, AAKKO J, ISOLAURI E, SALMINEN S. Human gut colonisation may be initiated *in utero* by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 23129.
- [3] LAURSEN MF, SAKANAKA M, von BURG N, MÖRBE U, ANDERSEN D, MOLL JM, PEKMEZ CT, RIVOLLIER A, MICHAELSEN KF, MØLGAARD C, LIND MV, DRAGSTED LO, KATAYAMA T, FRANSEN HL, VINGGAARD AM, BAHL MI, BRIX S, AGACE W, LICHT TR, ROAGER HM. *Bifidobacterium* species associated with breastfeeding produce aromatic lactic acids in the infant gut[J]. *Nature Microbiology*, 2021, 6(11): 1367-1382.
- [4] MOSSAVI S, SEPEHRI S, ROBERTSON B, BODE L, GORUK S, FIELD CJ, LIX LM, de SOUZA RJ, BECKER AB, MANDHANE PJ, TURVEY SE, SUBBARAO P, MORAES TJ, LEFEBVRE DL, SEARS MR, KHAFIPOUR E, AZAD MB. Composition and variation of the human milk microbiota are influenced by maternal and early-life factors[J]. *Cell Host and Microbe*, 2019, 25(2): 324-335.e4.
- [5] 周彦宏, 李虹甫, 陈思涵, 林官根, 刘昕宇, 满朝新, 徐红华, 姜毓君. 婴儿肠道菌群中乳酸菌的分离鉴定及其多样性分析[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(19): 96-100, 108.
- ZHOU YH, LI HF, CHEN SH, LIN GG, LIU XY, MAN CX, XU HH, JIANG YJ. Identifying and analyzing the diversity of lactic acid bacteria in infant gut microbiome[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(19): 96-100, 108 (in Chinese).
- [6] SIEZEN RJ, TZENEVA VA, CASTIONI A, WELS M, PHAN HTK, RADEMAKER JLW, STARRENBURG MJC, KLEEREBEZEM M, MOLENAAR D, van HYLCKAMA VLIEG JET. Phenotypic and genomic diversity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from various environmental niches[J]. *Environmental Microbiology*, 2010, 12(3): 758-773.
- [7] ENGELHARDT T, SZAKMÁR K, KISKÓ G, MOHÁCSI-FARKAS C, REICHART O. Combined effect of NaCl and low temperature on antilisterial bacteriocin production of *Lactobacillus plantarum* ST202Ch[J]. *LWT*, 2018, 89: 104-109.
- [8] WANG J, JI HF, WANG SX, LIU H, ZHANG W, ZHANG DY, WANG YM. Probiotic *Lactobacillus plantarum* promotes intestinal barrier function by strengthening the epithelium and modulating gut microbiota[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1953.
- [9] CHEN P, XU HY, TANG H, ZHAO FY, YANG CC, KWOK LY, CONG CL, WU YF, ZHANG WY, ZHOU XF, ZHANG HP. Modulation of gut mucosal microbiota as a mechanism of probiotics-based adjunctive therapy for ulcerative colitis[J]. *Microbial Biotechnology*, 2020, 13(6): 2032-2043.
- [10] YANG DT, LYU WT, HU ZY, GAO JT, ZHENG ZY, WANG WJ, FIRRMAN J, REN DX. Probiotic effects of *Lactobacillus fermentum* ZJUIDS06 and *Lactobacillus plantarum* ZY08 on hypercholesteremic golden hamsters[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2021, 8: 705763.
- [11] LEE YS, LEE D, PARK GS, KO SH, PARK J, LEE YK, KANG J. *Lactobacillus plantarum* HAC01 ameliorates type 2 diabetes in high-fat diet and streptozotocin-induced diabetic mice in association with modulating the gut microbiota[J]. *Food & Function*, 2021, 12(14): 6363-6373.
- [12] CUI YH, WANG MH, ZHENG YK, MIAO K, QU XJ. The carbohydrate metabolism of *Lactiplantibacillus plantarum*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(24): 13452.
- [13] ZHANG N, JIN ML, WANG KM, ZHANG ZH, SHAH NP, WEI H. Functional oligosaccharide fermentation in the gut: improving intestinal health and its determinant factors-a review[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2022, 284: 119043.
- [14] LI AL, NI WW, LI Y, ZHANG X, YANG JJ, MA XY, JIA XD, LI C, LIU LB. Effect of 2'-fucosyllactose supplementation on intestinal flora in mice with intestinal inflammatory diseases[J]. *International Dairy Journal*, 2020, 110: 104797.
- [15] ASADPOOR M, ITHAKISIOU GN, HENRICKS PAJ, PIETERS R, FOLKERTS G, BRABER S. Non-digestible oligosaccharides and short chain fatty

- acids as therapeutic targets against enterotoxin-producing bacteria and their toxins[J]. *Toxins*, 2021, 13(3): 175.
- [16] CHENG YJ, YEUNG CY. Recent advance in infant nutrition: human milk oligosaccharides[J]. *Pediatrics & Neonatology*, 2021, 62(4): 347-353.
- [17] LEE JM, JANG WJ, LEE EW, KONG IS.  $\beta$ -glucooligosaccharides derived from barley  $\beta$ -glucan promote growth of lactic acid bacteria and enhance nisin Z secretion by *Lactococcus lactis*[J]. *LWT*, 2020, 122: 109014.
- [18] MA Y, PENG X, YANG JY, GIOVANNI V, WANG C. Impacts of functional oligosaccharide on intestinal immune modulation in immunosuppressive mice[J]. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2020, 27(1): 233-241.
- [19] 张娜, 占英, 孟迎平, 李一娟, 陶雪莹, 魏华, 张志鸿. 功能低聚糖对植物乳杆菌 ZDY2013 发酵乳发酵特性及冷藏效果的影响[J]. *现代食品科技*, 2021, 37(11): 34-42.
- ZHANG N, ZHAN Y, MENG YP, LI YJ, TAO XY, WEI H, ZHANG ZH. Effects of functional oligosaccharides on fermentation characteristics and cold storage of fermented milk using *Lactobacillus plantarum* ZDY2013[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2021, 37(11): 34-42 (in Chinese).
- [20] SHI YJ, CUI XY, GU SS, YAN X, LI R, XIA S, CHEN HY, GE JW. Antioxidative and probiotic activities of lactic acid bacteria isolated from traditional artisanal milk cheese from Northeast China[J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2019, 11(4): 1086-1099.
- [21] MARAGKOUidakis PA, Zoumpopoulou G, MIARIS C, KALANTZOPOULOS G, POT B, TSAKALIDOU E. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products[J]. *International Dairy Journal*, 2006, 16(3): 189-199.
- [22] LIM JH, YOON SM, TAN PL, YANG S, KIM SH, PARK HJ. Probiotic properties of *Lactobacillus Plantarum* LRCC5193, a plant-origin lactic acid bacterium isolated from kimchi and its use in chocolates[J]. *Journal of Food Science*, 2018, 83(11): 2802-2811.
- [23] 李一娟, 邵开生, 张娜, 孟迎平, 陶雪莹, 周颖钰, 魏华, 张志鸿. 产 reuterin 罗伊氏乳杆菌的定向筛选及其生物学特性[J]. *食品科学*, 2021, 42(14): 32-38.
- LI YJ, SHAO KS, ZHANG N, MENG YP, TAO XY, ZHOU YY, WEI H, ZHANG ZH. Directional screening for reuterin-producing *Lactobacillus reuteri* and its biological characteristics[J]. *Food Science*, 2021, 42(14): 32-38 (in Chinese).
- [24] LEI S, ZHAO RX, SUN JL, RAN JJ, RUAN XL, ZHU Y. Partial purification and characterization of a broad-spectrum bacteriocin produced by a *Lactobacillus plantarum* zrx03 isolated from infant's feces[J]. *Food Science & Nutrition*, 2020, 8(5): 2214-2222.
- [25] YIN QQ, ZHENG QH. Isolation and identification of the dominant *Lactobacillus* in gut and faeces of pigs using carbohydrate fermentation and 16S rDNA analysis[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2005, 99(1): 68-71.
- [26] HERNANDEZ-HERNANDEZ O, MUTHAIYAN A, MORENO FJ, MONTILLA A, SANZ ML, RICKE SC. Effect of prebiotic carbohydrates on the growth and tolerance of *Lactobacillus*[J]. *Food Microbiology*, 2012, 30(2): 355-361.
- [27] Dell'ANNO M, GIROMINI C, REGGI S, CAVALLERI M, MOSCATELLI A, ONELLI E, REBUCCI R, SUNDARAM TS, CORANELLI S, SPALLETTA A, BALDI A, ROSSI L. Evaluation of adhesive characteristics of *L. plantarum* and *L. reuteri* isolated from weaned piglets[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(8): 1587.
- [28] 鲁曦, 马雨哲, 李国花, 张明新, 赵馨, 刘佩肖, 卫飞鹏. 健康婴儿粪便样本中罗伊氏乳杆菌的分离鉴定与体外益生特性初步研究[J]. *陕西科技大学学报*, 2022, 40(3): 59-65.
- LU X, MA YZ, LI GH, ZHANG MX, ZHAO X, LIU PX, WEI FP. Isolation and identification of *Lactobacillus reuteri* from stool samples of healthy infants and preliminary study on its probiotic properties *in vitro*[J]. *Journal of Shaanxi University of Science & Technology*, 2022, 40(3): 59-65 (in Chinese).
- [29] WANG HY, LI L. Comprehensive evaluation of probiotic property, hypoglycemic ability and antioxidant activity of lactic acid bacteria[J]. *Foods*, 2022, 11(9): 1363.
- [30] 李红叶, 姜帅铭, 赵永平, 张家超. 植物乳杆菌 HNU082 抗生素抗性与相关基因的关系[J]. *食品工*

- 业科技, 2019, 40(6): 6-12.
- LI HY, JIANG SM, ZHAO YP, ZHANG JC. Relationship between antibiotic resistance and related genes in *Lactobacillus plantarum* HNU082[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(6): 6-12 (in Chinese).
- [31] 汤伟, 胡维, 王菁蕊, 王金菊, 王艳萍. 消化乳杆菌泡菜分离株 W369 的鉴定及其益生功能[J]. *微生物学报*, 2016, 56(6): 932-942.
- TANG W, HU W, WANG JR, WANG JJ, WANG YP. Identification of a new probiotic *Lactobacillus alimentarius* W369 from Chinese traditional pickles[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(6): 932-942 (in Chinese).
- [32] 吴佳慧, 刘鹏宇. 氨基糖苷类抗生素的发展历程[J]. *中国抗生素杂志*, 2019, 44(11): 1275-1282.
- WU JH, LIU PY. The past and present of aminoglycoside antibiotics[J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2019, 44(11): 1275-1282 (in Chinese).
- [33] LUZ C, D'OPAZO V, MAÑES J, MECA G. Antifungal activity and shelf life extension of loaf bread produced with sourdough fermented by *Lactobacillus* strains[J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2019, 43(10): 1-8.
- [34] HERNÁNDEZ-ALCÁNTARA AM, WACHER C, LLAMAS MG, LÓPEZ P, PÉREZ-CHABELA ML. Probiotic properties and stress response of thermotolerant lactic acid bacteria isolated from cooked meat products[J]. *LWT*, 2018, 91: 249-257.
- [35] CELEBIOGLU HU, OLESEN SV, PREHN K, LAHTINEN SJ, BRIX S, HACHEM MA, SVENSSON B. Mucin- and carbohydrate-stimulated adhesion and subproteome changes of the probiotic bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM[J]. *Journal of Proteomics*, 2017, 163: 102-110.
- [36] SANIDAD KZ, ZENG MY. Neonatal gut microbiome and immunity[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2020, 56: 30-37.