



棒状腐败乳杆菌 Lc7 的生物学特性及益生作用

张素平^{1,2}, 林晓颖^{1,2}, 徐明超^{1,2}, 乔蕾², 杨晶^{2,3}, 孙晖², 张桂²,
刘丽云^{2,3*}, 徐建国^{1,2,3*}

1 南京医科大学公共卫生学院, 江苏 南京 211166

2 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所 传染病预防控制国家重点实验室, 北京 102206

3 中国医学科学院未知细菌发现和功能研究创新单元, 北京 102206

张素平, 林晓颖, 徐明超, 乔蕾, 杨晶, 孙晖, 张桂, 刘丽云, 徐建国. 棒状腐败乳杆菌 Lc7 的生物学特性及益生作用[J]. 微生物学报, 2023, 63(1): 319-332.

ZHANG Suping, LIN Xiaoying, XU Mingchao, QIAO Lei, YANG Jing, SUN Hui, ZHANG Gui, LIU Liyun, XU Jianguo. Biological characteristics and probiotic effect of *Loigolactobacillus coryniformis* Lc7[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(1): 319-332.

摘要: 【目的】对分离自健康成人粪便样本的棒状腐败乳杆菌(*Loigolactobacillus coryniformis*) Lc7 进行分类学鉴定和益生潜力评估。【方法】基于 16S rRNA 基因和基因组核心基因构建系统发育树, 对 Lc7 进行分类学鉴定; 通过耐酸和胆汁酸盐、粘附、抗氧化和抑菌实验, 以及溶血、明胶酶活性和抗菌药物敏感性实验, 评估 Lc7 的益生特性。同时, 构建小鼠溃疡性结肠炎模型, 评估 Lc7 的体内抗炎潜力。【结果】Lc7 鉴定为 *L. coryniformis*, 在酸和胆汁酸盐的连续作用下, Lc7 的存活率为 70.17%。Lc7 对 HT-29 细胞的粘附指数为 56.33 CFU/cell, 其自聚集和疏水性分别为 80%和 40%; Lc7 对福氏志贺菌和鼠伤寒沙门菌等 7 个常见致病菌均有较强的抑制能力; 对 1,1-二苯基-2-苦基肼(1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl, DPPH)和羟自由基(hydroxyl radicals, ·OH)的清除率分别为 91.70%和 48.53%; Lc7 无溶血现象和明胶酶活性, 对选取的大多数抗生素均敏感。在小鼠结肠炎实验中, Lc7 干预组小鼠结肠长度明显长于模型组($P<0.01$), 结肠病理明显改善($P<0.01$), 并且降低了血清促炎细胞因子 TNF- α 和 IL-1 β 的浓度, 升高了抗炎细胞因子 IL-10 的浓度($P<0.01$)。【结论】Lc7 具有益生特性和体内抗炎潜力, 可作为益生菌株进行开发和应用。

关键词: 棒状腐败乳杆菌; 分类学鉴定; 益生菌; 抗炎

资助项目: 国家重点研发计划(2019YFC1200505); 未知微生物发现和功能研究(2018RU010)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2019YFC1200505) and the Research Units of Discovery of Unknown Bacteria and Function (2018RU010).

*Corresponding authors. E-mail: LIU Liyun, liuliyun@icdc.cn; XU Jianguo, xujianguo@icdc.cn

Received: 2022-04-28; Accepted: 2022-07-05; Published online: 2022-07-11

Biological characteristics and probiotic effect of *Loigolactobacillus coryniformis* Lc7

ZHANG Suping^{1,2}, LIN Xiaoying^{1,2}, XU Mingchao^{1,2}, QIAO Lei², YANG Jing^{2,3}, SUN Hui², ZHANG Gui², LIU Liyun^{2,3*}, XU Jianguo^{1,2,3*}

1 School of Public Health, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, Jiangsu, China

2 State Key Laboratory for Communicable Disease Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Prevention and Control, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

3 Research Units of Discovery of Unknown Bacteria and Function, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 102206, China

Abstract: [Objective] To characterize the *Loigolactobacillus coryniformis* Lc7 isolated from feces of healthy adults and evaluate its probiotic effect. **[Methods]** Phylogenetic tree was constructed based on the 16S rRNA gene and the core genes of the genome for taxonomic identification of the strain. The tolerance to acid, bile salt tolerance, adhesion, antioxidant activity, and antibacterial activity were tested, and the hemolysis, gelatinase activity, and antimicrobial susceptibility of Lc7 were examined to evaluate the probiotic property. In addition, ulcerative colitis was induced in mice to assess the *in vivo* anti-inflammatory potential of the strain. **[Results]** Lc7 was identified as *L. coryniformis*. The survival rate of this strain was up to 70.17% at pH 3.0 and in the presence of 0.3% bile salt. The adhesion index of Lc7 to HT-29 cells was 56.33 CFU/cell while self-aggregation and hydrophobicity were 80% and 40%, respectively. Lc7 inhibited the growth of seven common pathogens including *Shigella flexneri* and *Salmonella typhimurium*. Moreover, it scavenged 91.70% and 48.53% of 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) and hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$), respectively. Lc7 showed no hemolysis or gelatinase activity and was sensitive to the antibiotics tested. In the experiment on colitis mice, Lc7 group had longer colons than the model group ($P < 0.01$). In addition, Lc7 alleviated colonic lesions ($P < 0.01$), decreased serum pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β , and increased serum anti-inflammatory cytokines IL-10 ($P < 0.01$). **[Conclusion]** Lc7 has probiotic and anti-inflammatory properties, which can be further developed as a probiotic.

Keywords: *Loigolactobacillus coryniformis*; taxonomic identification; probiotics; anti-inflammatory

棒状腐败乳杆菌 (*Loigolactobacillus coryniformis*)^[1]原名棒状乳杆菌 (*Lactobacillus coryniformis*)，后划归于腐败乳杆菌属 (*Loigolactobacillus*)^[2]，革兰氏染色为阳性，呈短小棒状，无芽孢。研究表明，*L. coryniformis* 可分泌胞外多糖^[3]、细菌素^[4-5]等多种生物活性成分，能够合成维生素 B₁₂ (钴胺素)^[6]等有机

物，因此其常用于食品和工业中防腐剂、保鲜剂的制备以及作为亚硝酸盐等有害化合物的降解物^[3-7]。

益生菌是指活的微生物，当摄取足够数量时，对宿主健康有益^[8]。棒状腐败乳杆菌作为一代益生菌，具有多种潜在的益生功能，如减肥^[9]、平衡肠道菌群^[4]和增强免疫^[10]等，已被广

泛应用于临床医疗。目前, 棒状腐败乳杆菌 MXJ32 已作为缓解结肠炎相关结直肠癌的功能性食品成分^[4]; 棒状腐败乳杆菌 CECT5711 作为食用益生菌, 不仅具有改善高脂饮食引起的炎症状态和预防肥胖所致血管病变的功效^[11], 还可通过抑制病原体粘附和增强免疫以改善健康儿童的肠道菌群^[10]等。

目前所报道的棒状腐败乳杆菌多分离自乳制品和发酵食品, 也有部分菌株分离自风干肉或鸡等家禽类, 尚未有从健康成人粪便样本分离到棒状腐败乳杆菌的研究, 同时缺少对其分类学鉴定、生物学特性和急性结肠炎益生作用的系统研究。因此, 本研究旨在对分离自健康成人粪便样本^[12]的棒状腐败乳杆菌 Lc7 进行生物学特性及益生作用研究, 初步了解其益生功能。

1 材料与方法

1.1 实验菌株及实验动物

实验菌株: Lc7、乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*) L235、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*) ATCC 49619、肠集聚性大肠埃希菌(enteroaggregative *Escherichia coli*, EAEC) CICC 24186、肠出血性大肠杆菌(Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC) ATCC 43895、鼠伤寒沙门菌(*Salococcus Tytaomicron*) ATCC 14028、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC 25923、单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes* EGD-e) ATCC BAA-679、猪链球菌(*Streptococcus suis*) ATCC 43765 和福氏 2a 志贺菌(*Shigella flexneri* 2a str.) 301, 以上菌株均保存在本实验室或购自美国模式菌种保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC)和中国工业微生物菌种保藏管理中心(China Center of Industrial Culture Collection, CICC)。

实验动物: 无特定病原体级 (specific pathogen free, SPF) 6 周龄雌性 C57BL/6N 小鼠 [(16±2) g], 购自北京维通利华实验动物技术有限公司。本研究已通过中国疾病预防控制中心实验动物福利伦理委员会批准。

1.2 主要试剂

De Man Rogosa Sharpe (MRS)培养基、MH 肉汤-阳离子调节(cation-adjusted mueller-hinton broth, CAMHB)培养基和 E-test 条, Oxoid 公司; 胆汁酸盐、磷酸盐缓冲液(1×) (phosphate buffered saline, PBS), 北京索莱宝科技有限公司; 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼[1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical 2,2-diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl) hydrazyl, DPPH], Sigma-Aldrich 公司; 葡聚糖硫酸钠盐(dextran sulfate sodium salt, DSS), MP Biomedicals 公司; 酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素(interleukin-1 β , IL-1 β)及白细胞介素(IL-10), R&D SYSTEM 公司。

1.3 Lc7 的培养条件

本研究所涉实验菌株 Lc7 均培养至对数生长期, 所用培养基为 MRS+5% (质量体积分数) 脱纤维羊血琼脂培养基或 MRS 液体培养基, 培养条件为 37 °C 孵箱, 培养时间为 24 h, 本研究菌悬液均由 PBS 调配。

1.4 Lc7 分类学鉴定^[13-22]

将活化后的 Lc7 三区划线接种于琼脂培养基培养 24 h, 观察菌株形态。粗提取菌落核酸并将纯化扩增后的 Lc7 16S rRNA 基因 PCR 扩增产物送至睿博兴科生物技术有限公司进行测序, 所得序列提交至 EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>) 和 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行同源性比对; 使用 Wizard[®] Genomic DNA Purification 试

剂盒提取菌株基因组核酸送至北京诺禾致源科技股份有限公司, 基于 Illumina HiSeq TM2000 平台测得原始序列, 过滤接头序列及低质量数据后, 使用 SOAPdenovo2、SPAdes 和 ABySS 软件进行组装^[13-15], 最后使用 CISA 软件进行整合得到基因组框架图^[16]。

选取同源性较高乳杆菌菌种的 16S rRNA 基因序列(相似度 >94%), 以嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) DSM 20079^T 为进化外群^[17], 应用 MEGA 10 软件, 基于邻接法(neighbor-joining, NJ)算法, 抽样 1 000 次构建 NJ 系统进化树; 获取 NCBI 数据库 *L. coryniformis* 及其亚种基因组序列用于进一步鉴定, 将上述基因组和 Lc7 基因组提交至 Kpistas Lab Genome Matrix 网站(<http://enve-omics.ce.gatech.edu/g-matrix/>)计算基因组核苷酸一致性(average nucleotide identity, ANI)和氨基酸一致性(amino acid identity, AAI), 通过 Genome-to-Genome Distance Calculator (GGDC) 网站(<http://ggdc.dsmz.de/ggdc.php/>)计算 DNA-DNA hybridization (DDH)值, 使用 prodigal 软件对上述基因组进行基因预测^[18], 参照 Niu 等^[19]的方法, 使用 CD-HIT^[20]、MAFFT^[21]及 FastTree^[22]软件构建基于基因组核心基因的系统进化树, 以确定 Lc7 的具体分类学位置。

1.5 Lc7 体外益生评估

乳酸乳球菌是乳酸菌中的模式菌株, 被认为安全的食品级微生物^[23], 故选择本实验室分离自中国健康成人粪便样本的 L235^[12]作为益生评估实验的阳性对照菌株。通过耐酸和胆汁酸盐、粘附、抗氧化、抑菌、溶血和明胶酶活性及抗菌药物敏感性系列实验进行 Lc7 的体外益生评估。

1.5.1 酸和胆汁酸盐耐受性实验^[24]

参照 Ebrahimi 等^[24]的研究, 略作修改。将

10^8 CFU/mL Lc7 菌悬液接种于 pH 3.0 的 MRS 液体培养基孵育 1.5 h 后, 4 °C、4 000 r/min 离心 10 min 得到菌体, 使用 PBS 清洗菌体 3 次后, 加入含 0.3% (质量体积分数)胆汁酸盐的 MRS 液体培养基中继续孵育 1.5 h。培养液梯度稀释后, 滴板培养计数, 计算 0 h 活菌总数(N_0)和 3 h 活菌总数(N_1), 根据公式(1)计算存活率。

$$\text{存活率(\%)} = \log \text{CFU } N_1 / \log \text{CFU } N_0 \quad (1)$$

1.5.2 粘附相关实验^[25-27]

主要为自聚集和疏水性以及对人结肠腺癌细胞系 HT-29 细胞的粘附作用。

(1) 自聚集能力^[25]: 将 Lc7 调至麦氏浊度 1.0 (OD_0 , 约 10^6 CFU/mL), 培养 24 h 后, 测定其麦氏浊度记为 OD_1 , 根据公式 2 计算自聚集能力。自聚集能力分为 3 个等级: 16%–35%, 低等; 35%–50%, 中等; >50%, 高等。

(2) 菌株表面疏水性^[26]: 将 Lc7 调至麦氏浊度 1.0 (OD_0), 加入等体积的二甲苯, 剧烈混匀 2 min, 孵育 1 h 后除去有机相, 测定其水相麦氏浊度记为 OD_1 , 根据公式(2)计算 Lc7 表面疏水性。

$$\text{自聚集/疏水性(\%)} = [(OD_0 - OD_1) / OD_0] \times 100 \quad (2)$$

(3) 对 HT-29 细胞的粘附作用: 参照 Hojjati 等^[26]的研究方法, 略有修改。即将 1×10^5 CFU/mL HT-29 细胞接种于 24 孔培养板(内置玻璃盖玻片)培养过夜后, 洗细胞 3 次, 分别加入 1×10^7 CFU/mL Lc7 和 L235 菌悬液, 不加菌液的孔设为对照组。在 37 °C、5% CO_2 培养箱中培养 3 h 后, 洗细胞 3 次, 然后甲醇固定、吉姆萨染色和封片。在光学正置显微镜 1 000 倍视野下观察菌株 Lc7 粘附情况, 计算粘附指数(adhesive index), 即随机从显微镜下选择 10 个视野计算 HT-29 细胞粘附的平均细菌数, 粘附指数 <1 为弱粘附, <50 为中等粘附, >50 为强

粘附。

1.5.3 抗氧化实验^[27-28]

(1) DPPH 清除率测定: 将 10^7 CFU/mL Lc7 在 MRS 培养液培养 24 h 后, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 、4 000 r/min 离心 10 min, 收集发酵上清液。样品组(A_s): 2 mL Lc7 发酵上清液和 2 mL 0.000 4 mol/L DPPH 溶液; 空白组(A_b): 将 A_s 组 DPPH 溶液更换为无水乙醇; 对照组(A_p): 将 A_s 组发酵上清液更换为 MRS 液体培养基, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 避光孵育 30 min。测量 517 nm 处的吸光度值 A , 通过公式(3)计算 DPPH 清除率。

$$\text{DPPH 清除率}(\%)=[1-(A_s-A_b)/A_p]\times 100 \quad (3)$$

(2) $\cdot\text{OH}$ 清除率测定: 通过 Fenton 反应体系^[28]测定 Lc7 对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力。即对照组(A_p): 1 mL 亮绿(0.000 435 mol/L)、1 mL FeSO_4 (0.002 5 mol/L)、1 mL H_2O_2 (3.0%, 质量体积分数)、1 mL dd H_2O 和 1 mL PBS; 空白组(A_b): 将 A_p 组中 H_2O_2 更换为 dd H_2O ; 样品组(A_s): 将 A_p 组中 dd H_2O 更换为 Lc7 菌悬液。 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 避光孵育 30 min 后, 4 000 r/min 离心 3 min。测量 525 nm 处的吸光度值 A , 通过公式(4)计算 $\cdot\text{OH}$ 清除率。

$$\cdot\text{OH 清除率}(\%)=[(A_s-A_p)/(A_b-A_p)]\times 100 \quad (4)$$

1.5.4 抑菌实验(点滴法)^[29]

选择常见病原菌肠集聚性大肠埃希菌、肠出血性大肠杆菌、鼠伤寒沙门菌、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特菌、猪链球菌和福氏 2a 志贺菌作为本研究致病菌。将对数生长期的致病菌和 Lc7 调至 10^8 CFU/mL, 并用棉签蘸取致病菌菌悬液均匀涂布于 MRS 琼脂培养基表面, 随后取 15 μL Lc7 菌悬液接种于培养基表面培养 24 h 后测量抑菌圈大小(抑菌圈以距离菌落边缘的距离计量)。抑菌能力判读标准: (+) 10 mm–15 mm; (++) 15 mm–22 mm; (+++) >22 mm。

1.5.5 溶血实验^[30]

Lc7 在 MRS 血琼脂培养基培养 24 h 后, 观察是否出现溶血现象: α -溶血(菌落周围出现草绿色区域)、 β -溶血(菌落周围出现透明区域)和 γ -溶血(不会引起溶血)。

1.5.6 明胶酶活性实验^[31-32]

将 10 μL 10^8 CFU/mL Lc7 菌悬液接种于 MRS+3% (质量体积分数)明胶琼脂培养基表面孵育 24 h。随后将饱和硫酸铵均匀平铺至培养基表面, 观察菌落周围是否出现透明的晕圈。*S. aureus* 25923 作为明胶酶阳性对照。

1.5.7 抗菌药物敏感性实验

本研究使用抗生素浓度梯度法(*E-test*)法进行抗菌药物敏感性实验。采用临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Association, CLSI)所制定抗菌药物敏感性测试性能标准(2018 版)^[33]选取乳杆菌推荐抗菌药物。选取肺炎链球菌 49619 作为质量控制菌株。将麦氏浊度 0.5 ($OD_{0.5}$)的 Lc7 菌悬液均匀涂布于 CAMHB+5% (质量体积分数)脱纤维马血培养基表面(达托霉素在此培养基基础上加入 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 钙粉), 并将 *E-test* 条置于培养基表面, 培养 24 h 后读取最小抑制浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)值。

1.6 Lc7 体内安全性及抗炎功能评价

本实验参照 Bian 等^[34]的研究, 略有修改。 -7 d – 7 d , Lc7 干预组(DSS+Lc7 组)和模型组(DSS 组)小鼠每天分别灌胃 0.2 mL Lc7 菌悬液(约 10^8 CFU/只)和 PBS (1 \times)溶液。 0 d – 7 d , DSS 组和 Lc7 干预组饮用 3% (质量体积分数)DSS。第 8 天, 对小鼠进行眼球取血, 收集血清, 使用 ELISA 试剂盒检测炎症细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-10 浓度。分离结肠后, 观察结肠表型和测量长度, 拍照记录, 随后用 4% 多聚甲醛固定远端结肠组织以进行 H&E 染色,

每份结肠随机选取 10 个视野进行组织病理学评分, 组织学评分(histological activity index, HAI)标准参照 Delday 等的研究^[35]。

1.7 数据统计与分析

应用 SPSS 25.0 进行数据统计分析, 数值结果以均数±标准差或均数±标准误表示, 使用单因素方差分析进行整体比较, 使用 Dunnett 方法进行多组间比较, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义; 使用 GraphPad Prism 8.4.2 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 Lc7 鉴定为棒状腐败乳杆菌

Lc7 菌落呈乳白色, 不透明, 表面光滑, 边缘规则, 革兰氏染色阳性。16S rRNA 基因序列比对结果显示, 同源性最高菌株为棒状腐败乳杆菌 DSM 20001^T (100%)和棒状腐败乳杆菌棒状亚种 KCTC 3167^T (99.93%)。16S rRNA 基因系统进化分析显示 Lc7 与棒状腐败乳杆菌 DSM 20001^T 进化关系最近(图 1A)。为进一步明

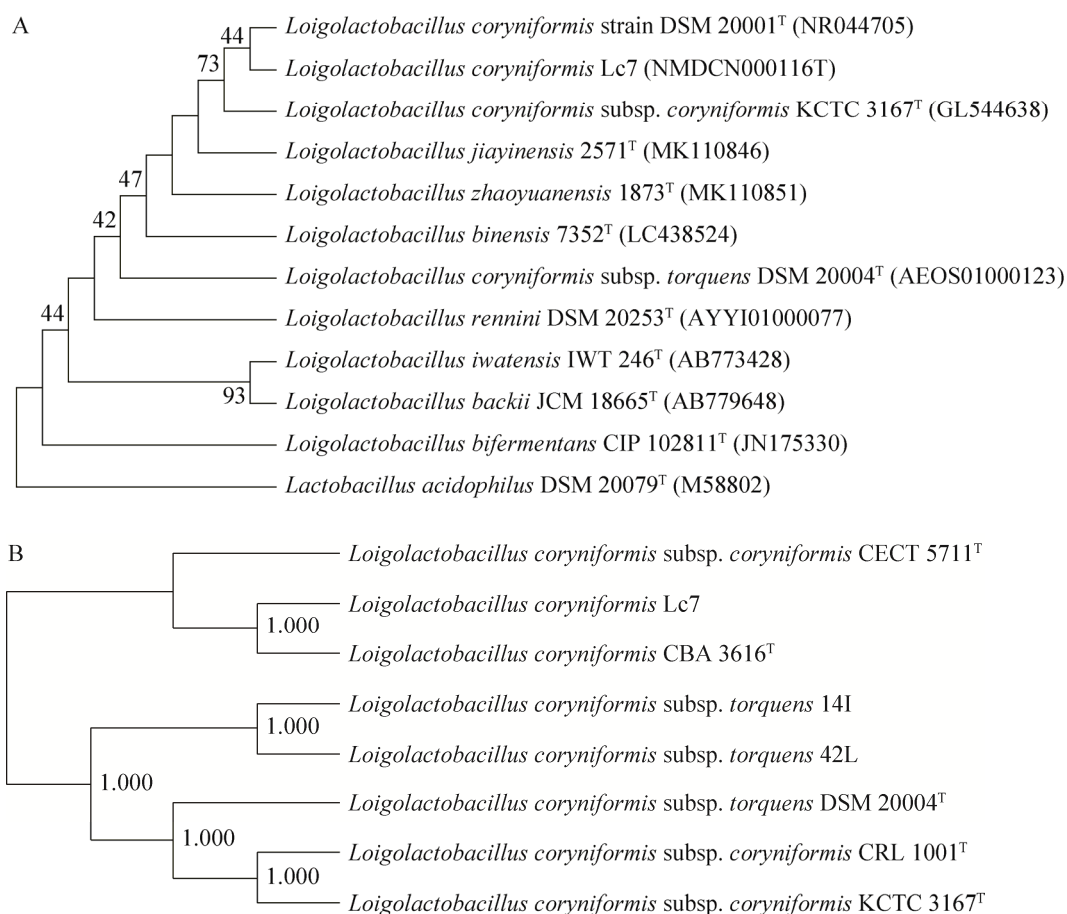


图 1 16S rRNA 基因及基因组核心基因系统发育进化树

Figure 1 Phylogenetic tree of 16S rRNA gene and genome core genes. A: The phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequence in the genus *Loigolactobacillus*, *Lac. acidophilus* strain DSM 20079^T as an outgroup. B: The phylogenetic tree of the intraspecific genome system of *L. coryniformis*. Numbers in parentheses represent the NCBI reference sequence, superscript T indicates the strains are type strains, bootstrap values are shown at branch points based on 1 000 resampled data sets.

确其分类学归属, 基于棒状腐败乳杆菌种和亚种基因组 1 911 个核心基因进行系统进化分析, 结果显示 Lc7 与棒状腐败乳杆菌 CBA 3616^T 聚属于同一进化分支(图 1B); 此外, DDH、ANI 和 AAI 值均显示, 棒状腐败乳杆菌 CBA 3616^T 与 Lc7 基因组相似性最高(DDH 85.40%, ANI 99.02%, AAI 98.65%), 且高于菌种间鉴定阈值(DDH 70%, ANI 96%, AAI 95%) (表 1)。综上所述, 将 Lc7 鉴定为棒状腐败乳杆菌。

2.2 Lc7 体外益生评估

2.2.1 Lc7 具有良好的耐酸和胆汁酸盐能力

Lc7 在低酸(pH 3.0)和 0.3% (质量体积分数)胆汁酸盐的连续作用下, 存活率为 70.17% (表 2), 表明 Lc7 具有高的耐酸和胆汁酸盐能力。

2.2.2 Lc7 具有较强的粘附性

Lc7 培养 24 h 后自聚集能力平均为 80%, 属于高自聚集; 在有机溶剂二甲苯中, Lc7 表面疏水性平均为 40%, 接近阳性对照菌株 L235。通过吉姆萨染色及显微镜下观察计数, Lc7 可粘附于 HT29 细胞, 其粘附指数为 56.33 CFU/cell,

属于强粘附(表 2)。上述结果表明 Lc7 具有较强的粘附性。

2.2.3 Lc7 具有较好的抗氧化能力

Lc7 发酵上清液中 DPPH 和菌悬液中·OH 清除率分别为 91.70%和 48.53% (表 2), 其 DPPH 清除率远高于干酪乳酪杆菌 BD-II (27.12%–43.99%)^[28], ·OH 清除率高于棒状腐败乳杆菌 NA-3 (37.77%)^[3]。说明 Lc7 具有高水平的 DPPH 清除能力和中等水平的·OH 清除能力, 因此认为 Lc7 具有较好的抗氧化作用。

2.2.4 Lc7 具有较强的抑菌作用

Lc7 对选取的 7 株常见病原菌均有较强的抑制作用。其中对福氏 2a 志贺菌 301 和鼠伤寒沙门菌 14028 的抑制作用最强; Lc7 对革兰阴性致病菌的抑制作用强于革兰阳性菌, 与棒状腐败乳杆菌 SZD 的研究结果相符^[36](表 3)。

2.2.5 Lc7 无溶血现象

细菌在生长过程中若产生溶血素, 则会使红细胞破裂, 血平板上会出现透明或半透明的溶血环。结果显示 Lc7 无溶血现象(γ 溶血, 图 2A)。

表 1 比较 Lc7 与其种内菌株基因组的 DDH、ANI、AAI

Table 1 DDH, ANI and AAI of genome were compared between Lc7 and intraspecific other strains

Strains	DDH (%)	ANI (%)	AAI (%)
<i>L. coryniformis</i> CBA 3616 ^T	85.40	99.02	98.65
<i>L. coryniformis</i> subsp. <i>coryniformis</i> CRL 1001 ^T	77.70	98.19	96.91
<i>L. coryniformis</i> subsp. <i>coryniformis</i> KCTC 3167 ^T	75.90	98.26	97.95
<i>L. coryniformis</i> subsp. <i>coryniformis</i> CECT 5711 ^T	75.30	98.22	97.85
<i>L. coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i> 42L	74.60	98.04	97.83
<i>L. coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i> 14I	74.30	98.04	97.85
<i>L. coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i> DSM 20004 ^T	66.20	97.59	96.86

DDH: DNA-DNA hybridization; ANI: Average nucleotide identity; AAI: Amino acid identity.

表 2 评估 Lc7 酸和胆汁酸盐耐受性、粘附作用和抗氧化能力

Table 2 Acid and bile salt tolerance, adhesion and antioxidant capacity of Lc7 (%)

Strains	Tolerability ^a	Auto-aggregation	Hydrophobicity	Adhesive index ^b	DPPH	Hydroxyl radicals
Lc7	70.17±3.35	80.00±0.00	40.00±0.07	56.33±25.33	91.70±0.86	48.53±1.10
L235	88.40±1.52	70.00±0.00	47.00±0.06	81.50±33.73	93.26±0.77	49.74±2.51

L235 as a positive control; ^a: Continuous acidic (pH 3.0 for 1.5 h) and 0.3% (M/V) bile salt (pH 6.0 for 1.5 h) treatments; ^b: Unit is CFU/cell.

表3 Lc7对病原菌的抑制作用

Table 3 Antimicrobial activity against pathogens of Lc7

Strains	EAEC 24186 ^a	EHEC 43895 ^a	<i>S. tytaomicron</i> 14028 ^a	<i>S. flexneri</i> 2a str. 301 ^a	<i>S. aureus</i> 25923 ^b	<i>L. monocytogenes</i> EGD-e BAA-679 ^b	<i>S. suis</i> 43765 ^b
Lc7	+	+	++	+++	+	+	+
L235	+	+	++	+++	+	+	++

L235 as a positive control; ^a: Gram-negative bacteria and ^b: Gram-positive bacteria; The corresponding relationship between the symbol and the diameter is: +: 10 mm–15 mm inhibition zone; ++: 15 mm–22 mm inhibition zone; +++: ≥22 mm inhibition zone.



图2 Lc7溶血和明胶酶活性检测

Figure 2 Haemolytic and gelatinase activity of Lc7. A: γ hemolysis of Lc7; B, C: Gelatinase activity of Lc7 and *S. aureus* 25923 (positive control), respectively.

2.2.6 Lc7无明胶酶活性

细菌生长过程中若产生明胶酶，则明胶被水解，菌落周围出现透明光晕，结果显示 Lc7 为明胶酶阴性(图 2B)，阳性对照金黄色葡萄球菌 25923 为明胶酶阳性(图 2C)。

2.2.7 Lc7具有良好的抗菌药物敏感性

研究表明乳杆菌对于万古霉素天然耐药^[37],

Lc7 对本次选取的 9 种抗菌药物中的 8 种表现为敏感，仅对万古霉素表现为耐药(表 4)，因此认为 Lc7 具有良好的抗菌药物敏感性。

2.3 Lc7体内安全性及抗炎功能评价

2.3.1 喂食 Lc7对实验小鼠安全

构建小鼠结肠炎模型前(即-7 d-0 d)，对于干预组小鼠每日 Lc7 菌液灌胃。结果显示各组小

表4 用 E-test 试纸条检测 Lc7 的抗菌药物敏感性

Table 4 Antibiotic susceptibilities of Lc7 by E-test strips

Antimicrobial class	Antimicrobial agent	Lc7	<i>S. pneumoniae</i> 49619
Penicillins	Penicillin	S	S
	Ampicillin	S	S
Carbapenems	Imipenem	S	S
	Meropenem	S	S
Lipopeptides	Daptomycin	S	S
Macrolides	Erythromycin	S	S
Lincosamides	Clindamycin	S	S
Oxazolidinones	Linezolid	S	S
Glycopeptides	Vancomycin	R	S

S. Pneumoniae 49619 as a quality control (QC) strain; R: resistant, S: susceptible.

鼠每日体重稳定增长, 对照组、模型组和干预组平均体重增长量分别为(0.99±0.12) g、(0.87±0.18) g 和(0.80±0.09) g, 无明显差异($P>0.05$); 各组小鼠粪便呈颗粒状, 毛发光亮顺滑, 活动性及精神等生理状态良好。说明 Lc7 未对小鼠产生毒性作用。

2.3.2 Lc7 具有抗炎作用, 主要表现为以下方面

(1) Lc7 干预可改善结肠炎小鼠粪便性状:

对照组每日粪便正常, 呈颗粒状; 模型组在第 2 天粪便松软; 第 3 天粪便呈轻微潜血状; 第 5 天直至实验结束为(黑)血便, 呈血水状。干预组第 3 天粪便松软; 第 5 天粪便呈轻微潜血状; 第 6 天直至实验结束为血便, 部分呈现血水状, 说明 Lc7 在一定程度上改善了结肠炎小鼠的粪便性状。

(2) Lc7 干预可改善结肠炎小鼠结肠表型:

在结肠炎模型中, 疾病的严重程度通常与肠道炎症导致的结肠长度缩短有关^[38]。结果显示对照组小鼠结肠弹性较好, 肠内粪便呈颗粒状; 模型组小鼠结肠弹性较差, 肠内无粪便且明显水肿, 长度较对照组明显缩短($P<0.001$); 干预组小鼠结肠弹性较好, 肠内粪便呈颗粒状且无明显水肿, 长度明显长于模型组($P<0.01$), 说明 Lc7 在一定程度上改善了结肠炎小鼠的结肠表型及长度(图 3A、3B)。

(3) Lc7 干预可缓解小鼠结肠炎症损伤, 降低结肠病理学评分: 对照组结肠组织各层结构清晰, 黏膜上皮完整; 肠腺数量丰富, 排列规则; 细胞形态正常, 未见明显的炎性改变。模型组结肠组织可见大范围溃疡, 黏膜上皮脱落, 肠腺坏死消失被增生结缔组织取代(黑色箭头), 伴较多淋巴细胞浸润(红色箭头); 侵及黏膜下层, 可见散在淋巴细胞浸润(黄色箭头); 少量肠腺扩张, 腔内可见嗜碱性絮状物

(棕色箭头); 黏膜下层可见水肿, 结缔组织排列疏松(蓝色箭头)。干预组结肠组织结构未见明显异常, 未见明显的炎性改变或偶见固有层底部散在淋巴细胞浸润(红色箭头)(图 3C)。

结肠组织病理学分析可验证肠道损伤是否由 DSS 引起。DSS 诱导的组织病理学损伤一般为中度-重度, 即(2-4 级)。对照组: 100%的视野无病理表现(0 级); 模型组: 56.67%的视野得分较高(2-4 级), 只有 43.33%的视野无病理表现(0 级), 与对照组相比, 有统计学差异($P<0.001$); 而干预组小鼠结肠 75.56%的视野无病理表现(0 级), 只有 24.44%的视野有较高的病理表现(2-4 级), 与模型组相比, 干预组小鼠组织病理学评分显著降低(0 级, $P<0.001$; 2 级, $P<0.05$; 3 和 4 级, $P<0.01$) (图 3D)。上述结果表明小鼠肠炎模型构建成功, Lc7 可以减轻小鼠结肠炎的病理症状, 对小鼠的结肠炎有保护作用。

(4) Lc7 可调节结肠炎小鼠血清炎症因子表达: 研究表明 IBD 主要破坏抗炎细胞因子 IL-10 和其他细胞因子之间的平衡^[31], TNF- α 表达水平升高是 DSS 诱导结肠炎的标志^[39]。结果显示模型组升高了血清促炎细胞因子 TNF- α 和 IL-1 β 的浓度($P<0.01$); 相较于模型组, 干预组显著降低了血清促炎细胞因子 TNF- α 和 IL-1 β 的浓度($P<0.05$)及升高了抗炎细胞因子 IL-10 的浓度($P<0.01$), 说明本研究成功诱导结肠炎, 同时 Lc7 能够通过调节炎症细胞因子表达改善炎症反应, 故认为 Lc7 具有一定的抗炎作用(图 4)。

3 讨论

益生菌候选菌株的必备前提条件是具备良好的生物安全性能。溶血素是一种常见的毒力因子, 可致宿主贫血和水肿, 与细菌致病性相

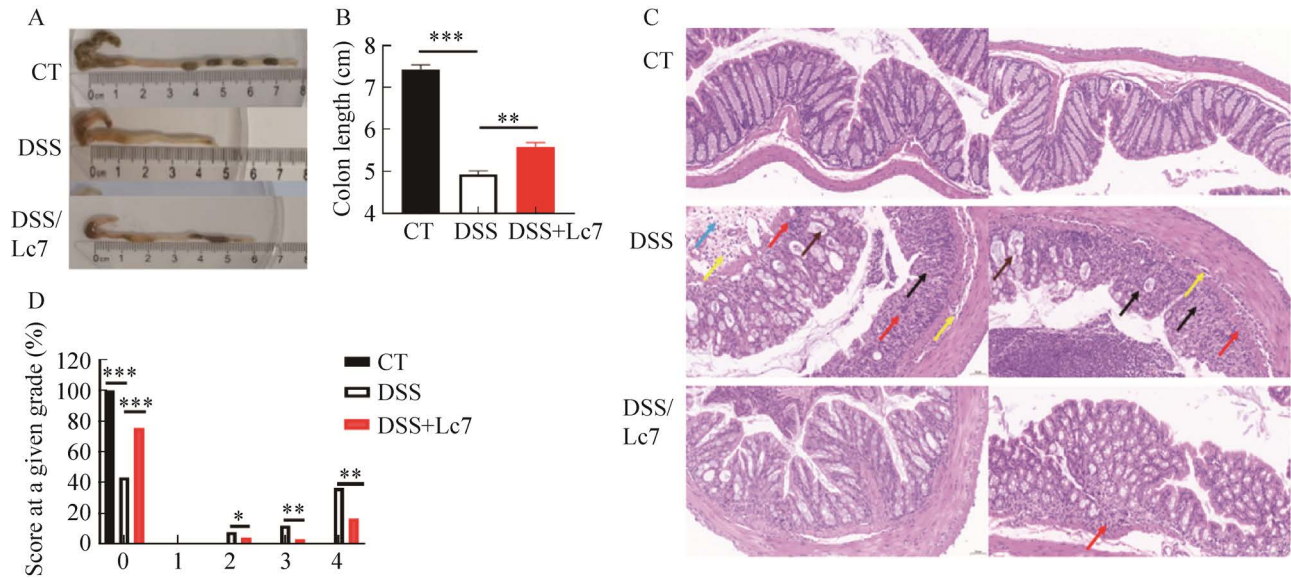


图 3 Lc7 对 DSS 诱导的结肠炎小鼠结肠的变化

Figure 3 Administration of Lc7 protected C57BL/6J mice from acute DSS-induced colitis. Values represent mean±SD; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$. A, B: Colon length changes in the DSS-induced colitis treated with Lc7 or PBS for 7 days. C: Representative images of H&E stained sections of colons from indicated groups. CT: Normal control group, no pathology; DSS: DSS-induced colitis group, moderate to severe histopathological damage; DSS/Lc7: DSS-induced colitis mice dosed with Lc7 group, slight histopathological damage. Black arrows: A large-scale ulcer can be seen in the intestinal tissue, the mucosal epithelium falls off, the intestinal gland necrosis disappears and is replaced by proliferative connective tissue; Red arrows: Lymphocytic infiltration; Yellow arrow: Inflammatory cellular infiltrate in mucosal epithelium; Brown arrows: A part of intestinal glands were dilated and basophilic flocs had been seen in the gland cavity; Blue arrow: Submucosa edema, loose connective tissue arrangement, bar=50 μm . D: Histopathology scores showed Lc7 treatment of DSS-induced colitis significantly increased the percentage fields of view with 0 score (no pathology) and significantly decreased the percentage fields of view at score 2–4 (moderate to severe pathology).

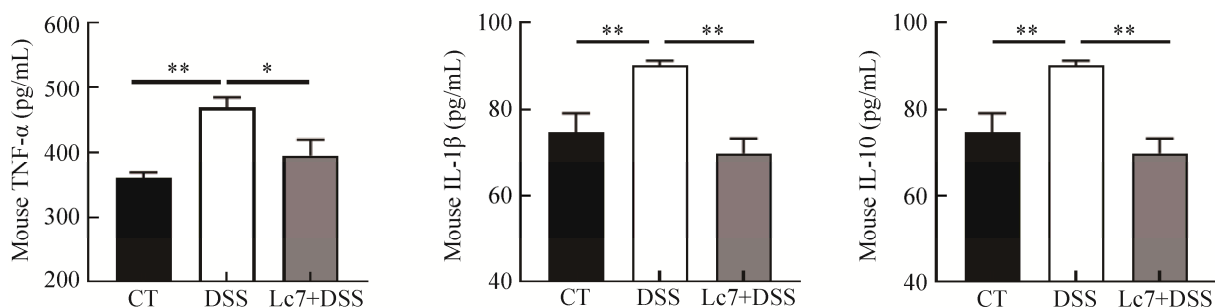


图 4 Lc7 对 DSS 诱导的结肠炎小鼠血清中炎症性细胞因子表达的调节作用

Figure 4 Lc7 regulated inflammatory cytokine secretion in serum of DSS induced colitis mice. IL-1 β , TNF- α and IL-10 secretion in serum of mice were analyzed by commercial ELISA kit. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; Values: Mean±SEM.

关; 明胶酶是能够降解IV型胶原的一种特异基质水解酶, 能够破坏基底膜, 其活性与细菌致病性和肿瘤细胞侵袭及转移密切相关, 在人类多种恶性肿瘤中都有过表达的现象^[40]; 抗生素的长期滥用导致抗生素污染日益严重, 残留在食物、环境和牲畜的抗生素和耐药细菌最终可能通过食物链转移到人体, 产生潜在的安全隐患^[23]。本研究显示 Lc7 无溶血现象和明胶酶活性, 除对万古霉素天然耐药外, 对本研究选取的其他抗菌药物均敏感; 进一步用 Lc7 对小鼠灌胃, 没有出现小鼠的体重减轻、病态和死亡现象; 综上, 说明 Lc7 具备较好的生物安全条件。

益生菌对胃肠道环境中酸和胆汁酸盐的耐受能力很大程度上决定其是否可以在肠道存活^[41], Lc7 在 pH 3.0 和 0.3% (质量体积分数) 胆汁酸盐环境下, 具有高的生存率, 该特性确保其在胃肠道环境存活的可能。细胞表面疏水性和自聚集特性是益生菌细胞表面特性的指示性参数, 与益生菌对上皮细胞粘附能力相关^[37]; 自聚集可阻止致病菌的粘附, 增加微生物定殖在胃肠道的能力^[42]。Lc7 具有高的自聚集性和中等表面疏水性, 以及对 HT-29 细胞的高粘附性, 保证其在肠道定殖的可能性, 从而竞争性抑制病原菌的定殖。

机体正常状态下, 自由基的产生和清除处于动态平衡, 但由于各种原因导致机体氧自由基活性升高或者机体清除氧自由基的能力下降时, 机体就会出现氧化应激, 导致肠道组织损伤^[38]。研究表明益生菌抗氧化能力与 DPPH 清除率呈正相关, 常用于体外抗氧化性评价; $\cdot\text{OH}$ 是一种对机体危害作用最大的活性氧自由基, 其清除率是反应抗氧化能力的重要指标。本研究显示 Lc7 具有高 DPPH 清除率和中等强度的 $\cdot\text{OH}$ 清除率, 说明 Lc7 能在一定程度上缓解氧化应激, 防止肠道黏膜损伤和病原微生物的

侵入。

研究表明, 棒状腐败乳杆菌可产生有机酸和细菌素等抗菌活性物质来抑制腐败微生物和致病微生物的生长^[5,36,43-44]。例如棒状腐败乳杆菌 SZD 可通过产生乳酸抑制金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌等致病菌的生长^[36]; 棒状腐败乳杆菌 FZU63 可产生细菌素乳糖素 63 抑制腐败希瓦菌等腐败微生物的生长^[43]; 棒状腐败乳杆菌 XN8 可通过产生细菌素 XN8-C 抑制耐药性食源性致病菌的生长^[44]; 棒状腐败乳杆菌 BCH-4 可通过产生乳酸和柠檬酸以及 12-羟基十二烷酸等有机酸抑制黄曲霉菌等真菌的生长^[5]等。本研究显示 Lc7 对选取的 7 种常见病原菌均有较强的抑制作用, 其抑制革兰氏阴性和革兰氏阳性致病菌生长的能力与相关报道结果一致^[36,44], 且 Lc7 在 MRS 液体培养基培养 24 h 后, 上清液的 pH 值由初始的 6.12 降为 3.53, 说明 Lc7 可以产生酸性物质, 故 Lc7 的抑菌功能可能与其产生酸性物质有关。

目前, 部分益生菌已被证实具有预防或治疗炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD) 等自身免疫性疾病的功能^[45], 如植物乳杆菌和地衣芽孢杆菌可以改善结肠炎小鼠的炎症反应^[39,45]。然而目前对于棒状腐败乳杆菌的研究局限于调节肠道微环境、减轻炎症和肠道屏障损伤等方面^[4], 对急性结肠炎益生作用的系统研究较少。本研究构建了小鼠急性结肠炎模型, 结果显示 Lc7 能够改善结肠炎小鼠结肠表型及病理损伤, 调节血清中炎症细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-10 的表达, 减轻 DSS 诱导的小鼠结肠炎症状。综合 Lc7 的系列体外益生评估, 认为 Lc7 可能通过对抗肠腔内入侵的病原体, 竞争性抑制病原菌在肠道中的定植和存活, 进而创造安全的肠道环境, 减少致病菌对 DNA 的损伤, 维持肠道氧化还原平衡状态, 调节免疫

系统, 缓解肠道炎症和损伤, 增强宿主的防御能力, 但具体作用机制有待进一步研究。

4 结论

劣质益生菌补充剂可能会引发一系列安全问题^[46], 因此筛选优质益生菌成为研究热点。综上所述, 健康成人粪便分离到的棒状腐败乳杆菌 Lc7 具有生物安全性和良好的益生潜力, 可作为益生菌株进行开发和应用。

参考文献

- [1] 乳杆菌属分类学地位变迁后菌种名称英解汉译检索表(一)[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(15): 318-324.
A key to the English-Chinese translation of the names of *Lactobacillus* after the change of its taxonomic status (I)[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(15): 318-324 (in Chinese).
- [2] ZHENG JS, WITTOUCK S, SALVETTI E, FRANZ CMAP, HARRIS HMB, MATTARELLI P, O'TOOLE PW, POT B, VANDAMME P, WALTER J, WATANABE K, WUYTS S, FELIS GE, GÄNZLE MG, LEBEER S. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2020, 70(4): 2782-2858.
- [3] XU XQ, PENG Q, ZHANG YW, TIAN DD, ZHANG PB, HUANG Y, MA L, QIAO Y, SHI B. A novel exopolysaccharide produced by *Lactobacillus coryniformis* NA-3 exhibits antioxidant and biofilm-inhibiting properties *in vitro*[J]. Food & Nutrition Research, 2020, 64: 10.29219.
- [4] WANG T, ZHANG LS, WANG PP, LIU YL, WANG GT, SHAN YY, YI YL, ZHOU Y, LIU BF, WANG X, LÜ X. *Lactobacillus coryniformis* MXJ32 administration ameliorates azoxymethane/dextran sulfate sodium-induced colitis-associated colorectal cancer via reshaping intestinal microenvironment and alleviating inflammatory response[J]. European Journal of Nutrition, 2022, 61(1): 85-99.
- [5] BUKHARI SA, SALMAN M, NUMAN M, JAVED MR, ZUBAIR M, MUSTAFA G. Characterization of antifungal metabolites produced by *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus coryniformis* isolated from rice rinsed water[J]. Molecular Biology Reports, 2020, 47(3): 1871-1881.
- [6] TORRES AC, VANNINI V, BONACINA J, FONT G, SAAVEDRA L, TARANTO MP. Cobalamin production by *Lactobacillus coryniformis*: biochemical identification of the synthesized corrinoid and genomic analysis of the biosynthetic cluster[J]. BMC Microbiology, 2016, 16(1): 240.
- [7] FANG F, FENG TT, DU GC, CHEN J. Evaluation of the impact on food safety of a *Lactobacillus coryniformis* strain from pickled vegetables with degradation activity against nitrite and other undesirable compounds[J]. Food Additives & Contaminants: Part A, 2016, 33(4): 623-630.
- [8] HILL C, GUARNER F, REID G, GIBSON GR, MERENSTEIN DJ, POT B, MORELLI L, CANANI RB, FLINT HJ, SALMINEN S, CALDER PC, SANDERS ME. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic[J]. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 2014, 11(8): 506-514.
- [9] SONG W, SONG C, LI L, WANG TY, HU JH, ZHU LN, YUE TL. *Lactobacillus* alleviated obesity induced by high-fat diet in mice[J]. Journal of Food Science, 2021, 86(12): 5439-5451.
- [10] LARA-VILLOSLADA F, SIERRA S, BOZA J, XAUS J, OLIVARES M. Beneficial effects of consumption of a dairy product containing two probiotic strains, *Lactobacillus coryniformis* CECT5711 and *Lactobacillus gasseri* CECT5714 in healthy children[J]. Nutricion Hospitalaria, 2007, 22(4): 496-502.
- [11] TORAL M, GÓMEZ-GUZMÁN M, JIMÉNEZ R, ROMERO M, SÁNCHEZ M, UTRILLA MP, GARRIDO-MESA N, RODRÍGUEZ-CABEZAS ME, OLIVARES M, GÁLVEZ J, DUARTE J. The probiotic *Lactobacillus coryniformis* CECT5711 reduces the vascular pro-oxidant and pro-inflammatory status in obese mice[J]. Clinical science: London, England: 1979, 2014, 127(1): 33-45.
- [12] YANG J, PU J, LU S, BAI X, WU Y, JIN D, CHENG Y, ZHANG G, ZHU W, LUO X, ROSSELLÓ-MÓRA R, XU J. Species-level analysis of human gut microbiota with metataxonomics[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 2029.
- [13] LUO RB, LIU BH, XIE YL, LI ZY, HUANG WH, YUAN JY, HE GZ, CHEN YX, PAN Q, LIU YJ, TANG JB, WU GX, ZHANG H, SHI YJ, LIU Y, YU C,

- WANG B, LU Y, HAN CL, CHEUNG DW, et al. SOAPdenovo2: an empirically improved memory-efficient short-read *de novo* assembler[J]. *GigaScience*, 2012, 1(1): 18.
- [14] PRJIBELSKI A, ANTIPOV D, MELESHKO D, LAPIDUS A, KOROBAYNIKOV A. Using SPAdes *de novo* assembler[J]. *Current Protocols in Bioinformatics*, 2020, 70(1): e102.
- [15] JACKMAN SD, VANDERVALK BP, MOHAMADI H, CHU J, YEO S, HAMMOND SA, JAHESH G, KHAN H, COOMBE L, WARREN RL, BIROL I. ABYSS 2.0: resource-efficient assembly of large genomes using a Bloom filter[J]. *Genome Research*, 2017, 27(5): 768-777.
- [16] LIN SH, LIAO YC. CISA: contig integrator for sequence assembly of bacterial genomes[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e60843.
- [17] TOHNO M, KITAHARA M, IRISAWA T, MASUDA T, UEGAKI R, OHKUMA M, TAJIMA K. Description of *Lactobacillus iwatensis* sp. nov., isolated from orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) silage, and *Lactobacillus backii* sp. nov.[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2013, 63(Pt_10): 3854-3860.
- [18] HYATT D, CHEN GL, LOCASCIO PF, LAND ML, LARIMER FW, HAUSER LJ. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification[J]. *BMC Bioinformatics*, 2010, 11: 119.
- [19] NIU LN, HU SK, LU S, LAI XH, YANG J, JIN D, RAO LY, LU G, XU JG. Isolation and characterization of *Streptococcus respiraculi* sp. nov. from *Marmota himalayana* (Himalayan marmot) respiratory tract[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2018, 68(6): 2082-2087.
- [20] FU LM, NIU BF, ZHU ZW, WU ST, LI WZ. CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data[J]. *Bioinformatics: Oxford, England*, 2012, 28(23): 3150-3152.
- [21] KATO H, STANDLEY DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(4): 772-780.
- [22] PRICE MN, DEHAL PS, ARKIN AP. FastTree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2009, 26(7): 1641-1650.
- [23] ZHU DL, LIU FL, XU HJ, BAI YL, ZHANG XM, SARIS PEJ, QIAO MQ. Isolation of strong constitutive promoters from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* N₈[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2015, 362(16): fnv107.
- [24] EBRAHIMI M, SADEGHI A, RAHIMI D, PURABDOLAH H, SHAHRYARI S. Postbiotic and anti-aflatoxigenic capabilities of *Lactobacillus kunkeei* as the potential probiotic LAB isolated from the natural honey[J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2021, 13(2): 343-355.
- [25] HAN Q, KONG BH, CHEN Q, SUN FD, ZHANG H. *In vitro* comparison of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Harbin dry sausages and selected probiotics[J]. *Journal of Functional Foods*, 2017, 32: 391-400.
- [26] HOJJATI M, BEHABAHANI BA, FALAH F. Aggregation, adherence, anti-adhesion and antagonistic activity properties relating to surface charge of probiotic *Lactobacillus brevis* gp104 against *Staphylococcus aureus*[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2020, 147: 104420.
- [27] BAI L, XIA SL, LAN RT, LIU LY, YE CY, WANG YT, JIN D, CUI ZG, JING HQ, XIONG YW, BAI XM, SUN H, ZHANG J, WANG L, XU JG. Isolation and characterization of cytotoxic, aggregative *Citrobacter freundii*[J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e33054.
- [28] CHEN P, ZHANG QX, DANG H, LIU XM, TIAN FW, ZHAO JX, CHEN YQ, ZHANG H, CHEN W. Screening for potential new probiotic based on probiotic properties and α -glucosidase inhibitory activity[J]. *Food Control*, 2014, 35(1): 65-72.
- [29] 徐洪涛. 类植物乳杆菌所产活性物质 LPX-600 的研究[D]. 大连: 大连理工大学硕士学位论文, 2006.
- XU HT. Studied of antimicrobiol substance LPX-600 produced by *Lactobacillus paraplantarum* X-600[D]. Dalian: Master's Thesis of Dalian University of Technology, 2006 (in Chinese).
- [30] ANGMO K, KUMARI A, SAVITRI, BHALLA TC. Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2016, 66: 428-435.
- [31] RIBEIRO SC, COELHO MC, TODOROV SD, FRANCO BDGM, DAPKEVICIUS MLE, SILVA CCG. Technological properties of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from Pico cheese an artisanal cow's milk cheese[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2014, 116(3): 573-585.
- [32] ZHANG F, LI Y, WANG XL, WANG SP, BI DR. The impact of *Lactobacillus plantarum* on the gut microbiota of mice with DSS-induced colitis[J]. *BioMed Research International*, 2019, 2019: 3921315.

- [33] JORGENSEN J, CLINICAL. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; approved guideline M45. Wayne, PA 19087 USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.
- [34] BIAN XY, WU WR, YANG LY, LV LX, WANG Q, LI YT, YE JZ, FANG DQ, WU JJ, JIANG XW, SHI D, LI LJ. Administration of *Akkermansia muciniphila* ameliorates dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in mice[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 2259.
- [35] DELDAY M, MULDER I, LOGAN ET, GRANT G. *Bacteroides thetaiotaomicron* ameliorates colon inflammation in preclinical models of Crohn's disease[J]. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2019, 25(1): 85-96.
- [36] 姚纲, 张健鹏, 胡红焱, 梁慧. 棒状乳杆菌 SZD 菌株发酵液抑菌活性的初步研究[J]. *国外医药: 抗生素分册*, 2014, 35(5): 221-222, 238.
- YAO G, ZHANG JP, HU HY, LIANG H. Liquid antibacterial activity preliminary study of *Lactobacillus rod SZD* fermentation[J]. *World Notes on Antibiotics*, 2014, 35(5): 221-222, 238 (in Chinese).
- [37] GROVER S, RAJPUT Y, DUARY R, BATISH V. Assessing the adhesion of putative indigenous probiotic lactobacilli to human colonic epithelial cells[J]. *The Indian Journal of Medical Research*, 2011, 134(5): 664.
- [38] WIRTZ S, POPP V, KINDERMANN M, GERLACH K, WEIGMANN B, FICHTNER-FEIGL S, NEURATH MF. Chemically induced mouse models of acute and chronic intestinal inflammation[J]. *Nature Protocols*, 2017, 12(7): 1295-1309.
- [39] LIU L, LIU YL, LIU GX, CHEN X, YANG K, YANG YX, XIE Q, GAN HK, HUANG XL, GAN HT. Curcumin ameliorates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis by blocking STAT3 signaling pathway[J]. *International Immunopharmacology*, 2013, 17(2): 314-320.
- [40] 杨明, 侯敢, 黄迪南. 明胶酶与恶性肿瘤[J]. *现代肿瘤医学*, 2008, 16(1): 130-133.
- YANG M, HOU G, HUANG DN. Gelatinase and malignant tumor[J]. *Journal of Modern Oncology*, 2008, 16(1): 130-133 (in Chinese).
- [41] DAVOREN MJ, LIU J, CASTELLANOS J, RODRÍGUEZ-MALAVÉ NI, SCHIESTL RH. A novel probiotic, *Lactobacillus johnsonii* 456, resists acid and can persist in the human gut beyond the initial ingestion period[J]. *Gut Microbes*, 2019, 10(4): 458-480.
- [42] THAO TTP, THOA LTK, NGOC LMT, LAN TTP, PHUONG TV, TRUONG HTH, KHOO KS, MANICKAM S, HOA TT, TRAM NDQ, SHOW PL, HUY ND. Characterization halotolerant lactic acid bacteria *Pediococcus pentosaceus* HN10 and *in vivo* evaluation for bacterial pathogens inhibition[J]. *Chemical Engineering and Processing-Process Intensification*, 2021, 168: 108576.
- [43] HAN JZ, MENG XJ, SHEN H, LUO WB, YAO SY, YANG J, ZHU QX, TIAN YQ, WANG SY. Purification, molecular characterization of Lactocin 63 produced by *Lactobacillus coryniformis* FZU63 and its antimicrobial mode of action against *Shewanella putrefaciens*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(18): 6921-6930.
- [44] 党静. 杨凌浆水中棒状乳杆菌 XN8 细菌素的分离纯化及其特性研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2014.
- DANG J. Urification and characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus coryniformis* XN8 Isolated from Jiangshui[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2014 (in Chinese).
- [45] LI Y, LIU M, ZHOU J, HOU B, SU X, LIU Z, YUAN J, LI M. *Bacillus licheniformis* Zhengchangsheng® attenuates DSS-induced colitis and modulates the gut microbiota in mice[J]. *Beneficial Microbes*, 2019, 10(5): 543-553.
- [46] COHEN PA. Probiotic safety-No guarantees[J]. *JAMA Internal Medicine*, 2018, 178(12): 1577-1578.