



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110179124 A

(43)申请公布日 2019.08.30

(21)申请号 201910612967.8

C12N 1/20(2006.01)

(22)申请日 2019.07.09

C12R 1/23(2006.01)

(83)生物保藏信息

CGMCCNo.11506 2015.10.15

(71)申请人 河北一然生物科技有限公司

地址 050000 河北省石家庄市正定高新技术  
产业开发区北区邦秀东路16号

(72)发明人 赵林森 孙新凯 路江浩 张欢欢

李云旭 杨美景 鄢梦洁 霍文敏

赵星 贾晓蒙

(74)专利代理机构 石家庄元汇专利代理事务所

(特殊普通合伙) 13115

代理人 李彤晓

(51)Int.Cl.

A23L 33/135(2016.01)

权利要求书1页 说明书6页 附图1页

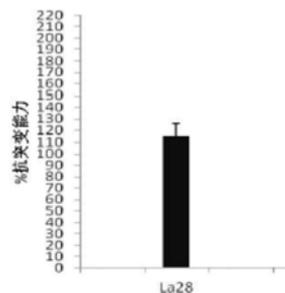
(54)发明名称

嗜酸乳杆菌La28在吸附有害物质中的应用

(57)摘要

嗜酸乳杆菌La28在吸附有害物质中的应用,属于益生菌的技术领域,涉及一种具有免疫调节功能和抗过敏功能的食品中用的嗜酸乳杆菌La28,对于苯并芘、丙烯酰胺、重金属铅、重金属镉有良好的吸附作用。

丙烯酰胺的Ames test



1. 嗜酸乳杆菌La28在吸附有害物质中的应用。
2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在於,嗜酸乳杆菌La28用于吸附苯并芘。
3. 根据权利要求1所述的应用,其特征在於,嗜酸乳杆菌La28用于吸附丙烯酰胺。
4. 根据权利要求1所述的应用,其特征在於,嗜酸乳杆菌La28用于吸附重金属铅。
5. 根据权利要求1所述的应用,其特征在於,嗜酸乳杆菌La28用于吸附重金属镉。
6. 根据权利要求1所述的应用,其特征在於,嗜酸乳杆菌La28为活菌,和/或灭活的嗜酸乳杆菌La28。
7. 根据权利要求6所述的应用,其特征在於,灭活的嗜酸乳杆菌La28为灭活温度100-110℃,灭活时间10-30min所得。
8. 根据权利要求1所述的应用,其特征在於,吸附用嗜酸乳杆菌La28的用量是 $1 \times 10^9$ CFU/mL,吸附时间是1-4h。

## 嗜酸乳杆菌La28在吸附有害物质中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于益生菌的技术领域,涉及一种具有免疫调节功能和抗过敏功能的食品中用的嗜酸乳杆菌La28,具体涉及上述嗜酸乳杆菌La28在吸附有害物质中的应用,用于吸附苯并芘、丙烯酰胺、重金属铅、重金属镉。

### 背景技术

[0002] 苯并芘是在煤焦油中发现的具有式C<sub>20</sub>H<sub>12</sub>的多环芳烃。该化合物是苯并芘之一,由与芘稠合的苯环形成,是在300°C (572°F)和600°C (1,112°F)之间的温度下不完全燃烧的结果。已知BaP产前暴露于大鼠会影响啮齿动物模型中的学习和记忆,怀孕的大鼠吃BaP对其后代的大脑功能有负面影响。BaP对白细胞的数量有影响,抑制其中一些白细胞分化为巨噬细胞,这是人体对抗感染的第一道防线。在对雄性大鼠的实验中,已显示亚慢性暴露于吸入的BaP通常会降低睾丸和附睾的功能,同时降低性类固醇 / 睾酮的产生和精子的产生。BaP的代谢产物具有致突变性和高度致癌性,被IARC列为第1组致癌物。

[0003] 丙烯酰胺(AA)是低分子量,高度水溶性的有机化合物。它尤其用作工业化学品和聚丙烯酰胺的生产。2002年,当人们发现当某些食物的制备温度通常高于120°C且水分含量低时,AA就会产生,这引起了人们对AA暴露极大的关注。它至少部分地由于某些氨基酸(例如天冬酰胺)和还原糖之间的美拉德反应而形成。然而,还提出了几种其他途径和前体来促进AA形成。AA形成在许多烘焙或油炸富含碳水化合物的食物中,包括炸薯条,薯片,面包,饼干和咖啡。AA已知还存在于香烟烟雾中。口服摄入后,AA从胃肠道吸收并分配到所有器官。AA被广泛代谢,主要通过谷胱甘肽结合,但也通过环氧化成缩水甘油酰胺(GA)。GA的形成被认为代表AA的遗传毒性和致癌性的途径。神经毒性,对雄性生殖的不利影响,发育毒性和致癌性被确定为实验动物研究中AA毒性的可能关键终点。

[0004] 重金属镉和铅会对环境和人体健康产生危害,表现为慢性中毒、致癌、致畸、致免疫功能损害等等。

[0005] 如何有效的吸附上述有害物质,减少其危害是目前我们研发的重点。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种嗜酸乳杆菌La28在吸附有害物质中的应用,用于吸附苯并芘、丙烯酰胺、重金属铅、重金属镉。嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)La28的保藏编号是CGMCC No.11506,保藏单位为:中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号,中国科学院微生物研究所,保藏日期2015年10月15日。

[0007] 本发明为实现其目的采用的技术方案是:

[0008] 嗜酸乳杆菌La28在吸附有害物质中的应用。

[0009] 嗜酸乳杆菌La28用于吸附苯并芘。

[0010] 嗜酸乳杆菌La28用于吸附丙烯酰胺。

- [0011] 嗜酸乳杆菌La28用于吸附重金属铅。
- [0012] 嗜酸乳杆菌La28用于吸附重金属镉。
- [0013] 嗜酸乳杆菌La28为活菌,和/或灭活的嗜酸乳杆菌La28。
- [0014] 灭活的嗜酸乳杆菌La28为灭活温度100-110℃,灭活时间10-30min所得。
- [0015] 吸附用嗜酸乳杆菌La28的用量是 $1 \times 10^9$ CFU/mL,吸附时间是1-4h。
- [0016] 本发明的有益效果是:
- [0017] 活菌La28吸附苯并芘的吸附率达 $56.36 \pm 8.36\%$ ,灭活的La28吸附苯并芘的吸附率达 $58.32 \pm 10.64\%$ ;活菌La28吸附重金属铅的吸附率达 $61.73 \pm 0\%$ ,灭活的La28吸附重金属铅的吸附率达 $34.885 \pm 10.395\%$ ;活菌La28 吸附重金属镉的吸附率达 $56 \pm 6.4\%$ ,灭活的La28吸附重金属镉的吸附率达 $28.8 \pm 14.4\%$ ;活菌La28吸附重丙酰胺的吸附率达 $52.1 \pm 11\%$ ,灭活的 La28吸附丙酰胺的吸附率达 $36 \pm 6.5\%$ 。
- [0018] 本发明La28的细胞壁组成对结合重金属起着关键性的作用。嗜酸乳杆菌La28细胞壁主要由细胞质膜、肽聚糖、镶嵌在肽聚糖层的磷壁酸、蛋白、多糖和S层蛋白组成。S层蛋白拥有大量的羟基、羧基、胺基、磷酸基等带负电荷的官能团,可以与带正电的金属离子结合。嗜酸乳杆菌La28肽聚糖含量决定着对重金属的吸附能力强弱。
- [0019] 吸附苯并芘原理:嗜酸乳杆菌La28细胞壁上的肽聚糖具有粘附作用,苯并芘属于疏水性物质,活性嗜酸乳杆菌La28具有对苯并芘的吸附作用,当嗜酸乳杆菌La28被灭活,但是不破坏细胞壁的成分时,具有较强的吸附作用。
- [0020] 吸附丙酰胺原理:由嗜酸乳杆菌La28在发酵过程中所产生的有机酸抑制了丙酰胺的合成。

## 附图说明

- [0021] 图1是实施例5嗜酸乳杆菌La28在丙酰胺Ames test中抗突变能力图。

## 具体实施方式

- [0022] 下面结合具体实施例对本发明作进一步的说明。
- [0023] 1、吸附苯并芘的试验
- [0024] 1.1、苯并芘标液的制备
- [0025] 苯并芘溶液的配制:将苯并芘固体溶于二甲基亚砷中配成10mg/mL的贮备液,然后用水稀释至苯并芘浓度为100 $\mu$ g/mL的工作液。分别配置浓度为5 $\mu$ g/mL、10 $\mu$ g/mL、15 $\mu$ g/mL、20 $\mu$ g/mL、25 $\mu$ g/mL的苯并芘标准液,用液相测定苯并芘的峰面积。
- [0026] 1.2、嗜酸乳杆菌La28吸附苯并芘实验方案
- [0027] 取3%的菌液接入到10mL的改良MRS中(改良MRS:胰蛋白胨10g、磷酸氢二钾2g、葡萄糖20g、无水醋酸钠3g、牛肉浸膏10g、柠檬酸三铵 2g、酵母浸膏5g、七水硫酸镁0.2g、吐温-80 1mL、L-半胱氨酸0.5g水 1000mL),连续活化3代,至菌达到稳定期。离心(6000r, 10min)发酵液取菌体,用超纯水洗涤2次,以超纯水为调配菌液浓度,制备 $10^9$ cfu/mL 的菌悬液,备用。将培养好的嗜酸乳杆菌La28离心(6000r/min, 5min),收集菌体,无菌生理盐水洗涤两次,调整菌浓为 $10^9$ cfu/mL(灭活菌株经过适当温度、时间灭活,如100℃灭活10min)。离心去掉上清液,将菌体重悬于苯并芘浓度为10 $\mu$ g/mL的溶液中,37℃培养4h,离心(6000r/

min, 5min), 收集上清, 将上清液加入500 $\mu$ L氯仿萃取, 取有机相-20 $^{\circ}$ C保存, 检测。用HPLC检测苯并芘含量, 实验以不含乳杆菌的苯并芘溶液作为空白对照, 进行相同处理, 每个样品3次组平行, 重复实验3次。

[0028] 1.3、嗜酸乳杆菌La28吸附苯并芘结果

[0029] 表1活菌与灭活菌株对苯并芘的吸附率

[0030]

菌株	吸附率%
活菌La28	56.36 $\pm$ 8.36
灭活La28	58.32 $\pm$ 10.64

[0031] 1.4、吸附苯并芘的结果分析

[0032] 活菌和灭活的嗜酸乳杆菌La28均对苯并芘有吸附作用, 对苯并芘的效果良好, 灭活的嗜酸乳杆菌La28, 会使嗜酸乳杆菌La28的细胞壁打开, 苯并芘是疏水性物质, 当嗜酸乳杆菌La28细胞壁打开后, 不破坏肽聚糖结构, 吸附效果会加强。本申请的灭活处理可以减少对肽聚糖结构破坏, 从而使灭活的嗜酸乳杆菌La28对苯并芘的吸附效果与活菌嗜酸乳杆菌La28 相当, 甚至会比活菌的吸附率还高。

[0033] 1.5、模拟胃肠道处理菌株苯并芘的吸附

[0034] 取3%的菌液接入到10mL的改良MRS中, 连续活化3代, 至菌达到稳定期。离心(6000r, 10min) 发酵液取菌体, 用超纯水洗涤2次, 以超纯水为调配菌液浓度, 制备10<sup>9</sup>cfu/mL的菌悬液(灭活菌株经过适当温度、时间灭活, 如100 $^{\circ}$ C灭活10min), 备用。将菌液在pH2.5的酸环境和1%胃蛋白酶下处理, 37 $^{\circ}$ C恒温培养箱静置培养2h, 然后离心取菌体, 弃去上清液, 洗涤2次。将上述菌体加入到含有0.3%的猪胆盐和1%胰蛋白酶溶液中, 并加入10 $\mu$ g/mL的苯并芘, 在37 $^{\circ}$ C的恒温培养箱下吸附4h。离心取上清, 将上清液加入1mL氯仿萃取, 取有机相-20 $^{\circ}$ C保存, 检测。用HPLC检测苯并芘含量, 实验以不含乳杆菌的苯并芘溶液作为空白对照, 进行相同处理, 每个样品3次组平行, 重复实验3次。

[0035] 表2模拟胃肠道环境处理菌株对苯并芘的吸附率

[0036]

菌株	吸附率%
活菌La28	43.975 $\pm$ 7.225
灭活La28	18.64 $\pm$ 7.85

[0037] 1.6、模拟胃肠道处理菌株苯并芘的吸附结果分析

[0038] ①经胃肠环境处理的活菌和灭活菌株的吸附率均下降;

[0039] ②胃肠环境处理的环境下, 活菌的吸附率大于灭活菌株的吸附率。

[0040] 灭活菌在经过胃酸和胆汁的环境中, 肽聚糖的结构遭到了破坏, 而活菌经胃酸和胆汁的处理下, 肽聚糖成分保存的比较完整, 所以活菌的吸附率较高。

[0041] 实施例2吸附重金属铅的试验

[0042] 2.1嗜酸乳杆菌La28吸附重金属铅的试验方案

[0043] 将培养嗜酸乳杆菌La28至稳定期, 离心(5000r/min, 5min), 调整活菌数为10<sup>9</sup>cfu/mL(灭活菌株经过适当温度、时间灭活, 如100 $^{\circ}$ C灭活10min), 用生理盐水(0.85%)洗涤3次, 加入到初始浓度为50mg/L的铅溶液重悬, 置于37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中静置4h, 随后离心(6000r/

min,5min),吸取上清液,用原子吸收法测定铅的浓度,计算菌株对铅的吸附率,计算公式如下:

$$[0044] \quad \text{吸附率}(\%) = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100\%$$

[0045] 其中 $A_0$ 代表初始铅的浓度; $A_1$ 代表吸附后溶液铅的浓度。

[0046] 2.2嗜酸乳杆菌La28对重金属铅的吸附效果

[0047] 表3嗜酸乳杆菌La28对重金属铅的吸附率

[0048]

菌株	吸附率%
活菌La28	61.73±0
灭活La28	34.885±10.395

[0049] 2.3嗜酸乳杆菌La28吸附重金属铅结果分析

[0050] 活菌La28和灭活菌株La28均对重金属铅有吸附作用,活菌La28比灭活菌株La28的吸附率高,分析原因是灭活菌株破坏了细胞壁上的官能团,导致对重金属铅的吸附率降低。

[0051] 实施例3嗜酸乳杆菌La28吸附重金属镉的试验

[0052] 3.1嗜酸乳杆菌La28吸附重金属镉试验方案

[0053] 将培养乳酸菌至稳定期,离心(5000r/min,5min),调整活菌数为 $10^9$ cfu/mL(灭活菌株经过适当温度、时间灭活,如100℃灭活10min),用生理盐水(0.85%)洗涤3次,加入到初始浓度为50mg/L的镉溶液重悬,置于37℃恒温培养箱中静置1h,随后离心(6000r/min,5min),吸取上清液,用原子吸收法测定镉的浓度,计算菌株对镉的吸附率,计算公式如下:

$$[0054] \quad \text{吸附率}(\%) = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100\%$$

[0055] 其中 $A_0$ 代表初始镉的浓度; $A_1$ 代表吸附后溶液镉的浓度。

[0056] 3.2嗜酸乳杆菌La28对重金属镉的吸附效果

[0057] 表4嗜酸乳杆菌La28对重金属镉的吸附率

[0058]

菌株	吸附率%
活菌La28	56±6.4
灭活La28	28.8±14.4

[0059] 3.3嗜酸乳杆菌La28吸附重金属镉结果分析

[0060] 活菌La28和灭活菌株La28均对重金属镉有吸附作用,活菌La28比灭活菌株La28的吸附率高。

[0061] 实施例4嗜酸乳杆菌La28吸附丙烯酰胺的试验

[0062] 4.1菌种的活化及菌悬液配制

[0063] 将试验用的嗜酸乳杆菌La28接种在MRS培养基中于37℃培养24 h,并连续活化两次,培养时间为8~12h。再将乳酸菌以3%的接种量于MRS培养基中37℃培养过夜,通过离心(8000g,5min,4℃)收集沉淀,并用无菌去离子水洗涤两次,然后将其悬浮在50ml无菌去离子水中,得到活菌菌悬液。最后,选取一半悬浮液在121℃下灭活15min,得到高压灭活菌的细菌悬浮液。两种悬浮液分别用于后续试验。

[0064] 4.2丙烯酰胺结合试验

[0065] 分别在900μL活菌和灭活组菌悬液中加入100μLAA(6μg/mL)溶液,37℃培养4h。离

心(8000g,5min,4℃)收集上清液,备用。

[0066] 4.3高效液相色谱法测定乳酸菌对丙烯酸胺吸附率

[0067] 采用高效液相色谱法(安捷伦),色谱柱为:C18(150mm×4.6mm,5μm)以5%甲醇为流动相,紫外线检测器参数设置为205nm,流速为1 mL/min,注射体积为20μL。测定所回收上清液中丙烯酸胺的含量。以没有添加菌悬液的AA工作液作为空白对照。乳酸菌对丙烯酸胺的吸附率(P%)用下列方程式计算:

[0068]  $P\% = [(A_0 - A) \div A_0] \times 100$

[0069] 其中A<sub>0</sub>代表空白样液中丙烯酸胺的含量,A代表加入丙烯酸胺的菌悬液经离心收集的上清液中。

[0070] 4.4嗜酸乳杆菌La28对丙烯酸胺的吸附率

[0071] 表5

[0072]

菌株	吸附率%
活菌La28	52.1±11
灭活La28	36±6.5

[0073] 4.5嗜酸乳杆菌La28吸附丙烯酸胺结果分析

[0074] 活菌La28和灭活菌株La28均对丙烯酸胺有吸附作用,活菌La28比灭活菌株La28的吸附率高。

[0075] 实施例5嗜酸乳杆菌La28抗突变活性的试验

[0076] 5.1抗突变测试的细菌

[0077] 将益生菌培养的溶液在4℃下以5000g离心15分钟,用无菌水洗涤两次,并将细胞重悬于浓度为5mg/mL的丙烯酸胺溶液中。在150rpm下震荡吸附2h,4℃下以5000g离心15分钟,上清过滤器,用于之后的实验。丙烯酸胺浓度为5mg/mL,这是肝内CYP2E1酶饱和代谢量。

[0078] 5.2艾姆斯测试

[0079] 将嗜酸乳杆菌La28和丙烯酸胺上清液与2mL顶部琼脂(用0.6%(w/v)琼脂和0.5%(w/v)NaCl制备用于Ames测定的顶部(覆盖)琼脂,并补充0.5mL-组氨酸(Sigma-Aldrich)和0.5mM d-生物素)混合。然后将混合物轻轻混合,最后倒在含有最少量葡萄糖的平板上琼脂(葡萄糖2%w/v加琼脂1.5%w/v)。当顶层琼脂凝固后,将平板在37℃倒置培养48小时,计数HIS<sup>+</sup>回复菌落。

[0080] 5.3抗突变活性

[0081] 与对照(即用诱变剂和不含益生菌制备的平板)相比,测量益生菌的抗突变活性,计算作为测试平板(即用益生菌处理的每种诱变剂溶液制备的平板)上的减少的菌落数量。计算如下:每个测定一式三份进行,抗突变活性表示为抑制百分比。

[0082] 抑制率(%) =  $[(A - B) / (A - C)] \times 100\%$

[0083] 在此表达式中:A=通过丙烯酸胺(阳性对照)引起的his<sup>+</sup>回复体的数量,B=嗜酸乳杆菌La28和丙烯酸胺处理后的his<sup>+</sup>回复数量,C=自发回复菌落数。

[0084] 实验结果参见图1,由图1可以看出在丙烯酸胺的Ames test中,La28抗突变率为115%,具有良好的抗突变能力,可作为优秀的产品菌株来进行相关产品的开发。

[0085] 实施例6吸附苯并芘条件的选择

[0086] 根据灭活温度、时间、吸附时间做实验选择最优的实验条件。灭活温度的确定：80℃、100℃、121℃；灭活时间的确定：10min、20min、30min；吸附时间的确定：1h、2h、4h。采取的实验计划：

[0087] 表6

[0088]

试验组	灭活温度℃	灭活时间min	吸附时间h	吸附率%
1	80	10	1	87.12
2	80	20	2	76.64
3	80	30	4	83.92
4	100	10	2	84.88
5	100	20	4	88.08
6	100	30	1	80.56
7	115	10	4	83.92
8	115	20	1	75.52
9	115	30	2	77.68

[0089] 分析得到最佳的吸附条件：灭活温度100℃、灭活时间10min、吸附时间4h。影响因素比较：吸附时间>灭活温度>灭活时间。

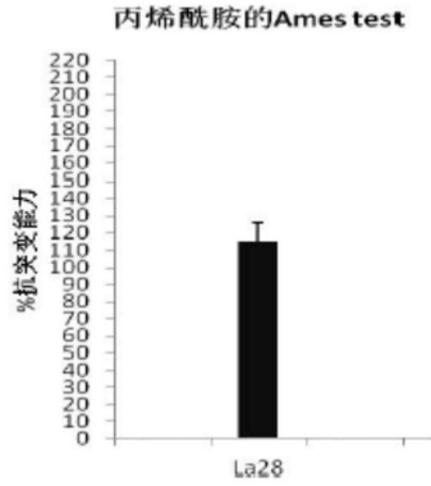


图1