苦荞蛋白对肠道有害菌生长抑制机理研究

李恩伟
（山西省食品工业研究所，山西太原 030024）

摘　要：本文以水溶性苦荞蛋白为研究对象，利用体外模拟发酵，通过对苦荞蛋白作用下小鼠粪便发酵液中 pH、短链脂肪酸（乙酸、丙酸、丁酸、乳酸）的含量以及有害菌（肠球菌、肠杆菌、产气荚膜梭菌）的数量进行测定，对苦荞蛋白抑制肠道有害菌群生长机理进行了初步研究。结果表明：添加不同浓度的苦荞蛋白与对照组相比，均可以有效降低有害菌的数量，其中高剂量组分别使肠球菌、肠杆菌和产气荚膜梭菌减少了 65%、72% 和 78%（32 h）；同时，不同剂量组的苦荞蛋白使小鼠粪便发酵液 pH 分别下降了 35%、39%、40%（32 h）。此外，高剂量组的苦荞蛋白较对照组分别使乙酸、丙酸、丁酸及乳酸的浓度增加了 8.94、33.77、27.34、25.55 倍（32 h）。综上所述，苦荞蛋白能够提高肠道中短链脂肪酸含量，从而降低肠道环境的 pH，抑制肠道有害菌（肠球菌、肠杆菌、产气荚膜梭菌）的生长。

关键词：苦荞蛋白，体外模拟，抑制，pH，短链脂肪酸（SCFAs）

Effect of tartary buckwheat protein on the growth of harmful bacteria in intestinal

LI En-wei
（Shanxi Food Industrial Research Institue，Taiyuan 030024，China）

Abstract：In this paper，water-soluble buckwheat protein was used as the research object，and the pH and the quantity of short-chain fatty acids（acetic acid，propionic acid，butyric acid，lactic acid）and harmful bacteria（*Enterococcus*，*Enterobacteriaceae* and *Clostridium perfringens*）were determined by simulated *in vitro* fermentation.The mechanism of buckwheat protein inhibition of intestinal harmful flora growth was investigated.The results showed that the addition of different concentrations of buckwheat protein could reduce the number of harmful bacteria compared with the control group.The high dose group reduced the quantity of *Enterococcus*，*Enterobacter* and *Clostridium perfringens* by 65%，72% and 78%（32 h）.The tartary buckwheat protein in different dosage groups decreased the pH of the fecal fermentation broth by 35%，39% and 40%（32 h），respectively.In addition，the concentration of acetic acid，propionic acid，butyric acid and lactic acid in high dose group were increased by 8.94，33.77，27.34 and 25.55 times（32 h），respectively，compared with the control group.In summary，tartary buckwheat protein can improve the intestinal short-chain fatty acid content，thereby reducing the intestinal environment pH，inhibit intestinal harmful bacteria（*Enterococci*，*Enterobacteriaceae*，*Clostridium perfringens*）growth.

Key words：tartary buckwheat protein；*in vitro* simulation；inhibition；pH；short-chain fatty acids（SCFAs）
中图分类号：TS201.4　　**文献标识码**：A　　**文 章 编 号**：1002-0306（2017）15-0306-05
doi：10.13386/j.issn1002-0306.2017.15.057

苦荞（*Fagopyrum tataricum* Gaertn.）是蓼科荞麦属一年生双子叶草本植物，含有丰富的蛋白质（高达 10%~15%）、淀粉、纤维素、黄酮类物质等多种营养素[1-2]，特别是苦荞蛋白具有较高的生理活性，且富含 18 种氨基酸，其中人体所需的 8 种必需氨基酸组成合理、比例均衡，其氨基酸组成符合 WHO/FAO 推荐标准[3-4]。研究发现，苦荞蛋白具有降低血液胆固醇、抑制脂肪蓄积、抑制大肠癌发生、抑制结石形成、增强人体免疫力以及抗衰老等多种生理功能[5]。但由于苦荞蛋白难以消化，在胃肠道中吸收利用率较低，可到达肠道，因此可作为肠道菌群的发酵底物[6]。

肠道菌群被认为是机体的一个重要“器官”，其组成和数量在维持人体健康中起重要作用，且主要由益生菌和有害菌（条件致病菌和病原菌）组成[7]。而有害菌是肠道中的非优势菌群，其在肠道中只占较少的比例，其中肠球菌、肠杆菌以及产气荚膜梭菌等是肠道中主要的有害菌，它们能够将食物中的一些成分变为多种腐败物质（如：胺、吲哚、酚类）、有毒及致癌物质（如：微生物毒素、硝基化合物）等，从而引起某些肠道疾病的发生[8-10]。研究发现，花生蛋白对肠球菌、肠杆菌、产气荚膜梭菌的生长具有明显的抑制作用[11]。目前，对于苦荞蛋白的研究主要集中在降低胆固醇、调节血脂以及其对益生菌增殖作用等方面，而对于其在肠道有害菌方面的研究则鲜有报道。

因此，本文以苦荞蛋白为研究对象，通过模拟结

收稿日期：2017-01-05
作者简介：李恩伟（1962-），男，本科，研究方向：食品工程，E-mail：sxfood@126.com。

肠发酵进行体外培养,从苦荞蛋白对肠道有害菌(肠球菌、肠杆菌、产气荚膜梭菌)的生长的抑制影响、小鼠粪便发酵液 pH 以及短链脂肪酸(乙酸、丙酸、丁酸、乳酸)的含量三个方面研究其对肠道有害菌生长及抑制作用的机理。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

黑丰 1 号苦荞 购于山西省左云县;SPF 级 C57BL/6 小鼠 45 只 购于上海斯莱克实验动物有限公司;*L*-半胱氨酸盐酸盐、胆盐、维生素 K_1、氯高铁血红素、刃天青、胃蛋白酶(≥3000 U/g)、胰酶(≥4000 U/g)、猪胆汁粉,均为 BR 级 购于上海宝曼生物科技有限公司;伊红美蓝琼脂(EMB)、胰月示-亚硫酸盐-环丝氨酸琼脂基础、胆汁七叶苷叠氮钠、*D*-环丝氨酸、50% 卵黄乳液 购于青岛海博生物技术有限公司;乙酸、丙酸、丁酸、乳酸,均为色谱纯 购于上海麦克林生化科技有限公司;酪蛋白、葡萄糖、蛋白胨、酵母膏,均为 AR 级 购于国药集团化学试剂(上海)有限公司;其他试剂均为分析纯。

体外模拟基础培养基的制备(1 L):参考 Mao Sheng-yong 等人[12]的方法,并略作修改。

PBS:磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffered Saline),分别配制 0.01 mol/L 和 0.1 mol/L、pH7.0 的 PBS。其中将配制好的 PBS(0.1 mol/L,pH7.0)经高压灭菌后,置于厌氧培养箱中 37 ℃过夜,用于稀释肠道内容物。

GCMS-TQ8040 气相色谱质谱联用仪 日本岛津公司;YQX-II 厌氧培养箱 上海龙跃仪器设备有限公司;3-18K 高速冷冻离心机 Sigma 仪器有限公司;冷冻干燥机 北京博医康实验仪器有限公司;SW-CJ-IFD垂直洁净工作台 苏州安泰空气技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 实验小鼠分组 SPF 级 C57BL/6 小鼠购买后于 SPF 级动物房内单笼饲养,饲养温度(25 ±1.0) ℃,湿度 50% ±1.0% RH,并喂食 2 周以适应环境。在此期间,自由进食和饮水(饮用水 121 ℃、20 min 灭菌,基础饲料和垫料紫外照射 30 min 杀菌)。然后,将小鼠随机分为五组,空白对照组喂食基础饲料,酪蛋白组喂食酪蛋白添加量 1 mg/mL 的饲料,其余三组小鼠按苦荞蛋白添加量 1、3、5 mg/mL将小鼠分为低、中、高剂量组。

1.2.2 苦荞蛋白的制备 参考郭晓娜等人[13]的方法并略作修改。苦荞籽粒粉碎后过筛,脱脂 24 h;取 100 g 脱脂苦荞粉以料液比 1∶10 用 0.01 mol/L,pH7.0的 PBS 溶解,在磁力搅拌器上搅拌 2 h;在 4 ℃条件下,4000 r/min 离心 30 min,并向上清液中加入 $(NH_4)_2SO_4$ 使其浓度为 40%,搅拌 60 min;在 4 ℃条件下,10000 r/min 离心 15 min,并向上清液中加入 $(NH_4)_2SO_4$ 使其浓度为 80%,搅拌 60 min;在 4 ℃条件下,10000 r/min 离心 15 min,弃上清,沉淀用少量去离子水复溶;然后将其加入到透析袋中进行透析 48 h(每 4 h 换水一次),透析后进行冻干(-70 ℃,24 h),冻干粉保存备用。

1.2.3 苦荞蛋白含量的测定 参照国标 GB 50095-2010 中凯氏定氮法进行样品测定。

1.2.4 肠胃道环境模拟 体外消化:参考 Mills 等人[14]的方法并略作修改。具体如下:分别称取 5.0 g 苦荞蛋白,将 pH 调节到 2.0 ±0.05(此时胃蛋白酶的活性最高),加入 2.5 mL 溶解在0.1 mol/L盐酸中的胃蛋白酶溶液(0.108 g/mL),经 37 ℃恒温水浴震荡 2 h;经过模拟胃部条件消化后,再用6 mol/L NaOH 将溶液的 pH 调节到 6.8 ±0.05(此时胰酶活性最高),加入 12.5 mL溶解在 0.5 mol/L Na_2CO_3 中的胰酶胆汁溶液(胰酶和胆汁浓度分别为 4.5 mg/mL 和 28 mg/mL),37 ℃恒温水浴震荡 2 h;进一步模拟食物在肠道中的消化。充分混匀后,将混合液置于透析袋进行透析,并于 37 ℃,在10 mmol/L NaCl 溶液中进行透析过夜,结束后,再次更换 NaCl 溶液并继续透析 2 h,最后将截留消化液进行冷冻干燥,于 4 ℃冰箱保存用于体外模拟肠道发酵实验。上述步骤以酪蛋白(Casein)作为对照以及用无菌水代替苦荞蛋白作为空白对照。

1.2.5 体外发酵液的制备 体外发酵:参考 Estibaliz 等人[15]的方法,并略作修改。向无菌发酵瓶中加入 90 mL 基础培养基并于厌氧工作站中 37 ℃进行预还原(12 h)。1 L 基础培养基中含有:2 g 葡萄糖,2 g 蛋白胨,2 g 酵母膏,0.1 g NaCl,0.04 g K_2HPO_4,0.04 g KH_2PO_4,0.01 g $MgSO_4·7H_2O$,0.01 g $CaCl_2·6H_2O$,2 g $NaHCO_3$,0.5 g *L*-半胱氨酸盐酸盐,0.5 g 胆盐,10 mL 维生素 K_1,2 mL 吐温-80 和 1 mL 氯高铁血红素溶液,将以上成分溶解后调节基础培养基 pH 至 7.0(±0.05),最后加入 4 mL 0.025%(w/v)刃天青溶液并灭菌。

收集小鼠新鲜粪便(尽量保持无菌状态),收集后立即用预还原的磷酸盐缓冲溶液(PBS,0.1 mol/L,pH7.0)稀释 10 倍,并在涡旋振荡器上充分振荡 3 min,使之彻底匀浆化,500 r/min 离心 2 min,分别迅速取上清液 10 mL 到 90 mL 预还原基础培养基中,再加入低(0.2 g)、中(0.4 g)、高剂量组(0.8 g)经胃肠模拟环境处理后的苦荞蛋白水解样品 BWPH(酪蛋白消化冻干样品 PC 作为对照组,无菌水代替苦荞蛋白的消化冻干产物 CK 作为空白对照)充分混匀;在厌氧培养箱中 37 ℃发酵 32 h,并在发酵的第 0、8、16、32 h 取样。

1.2.6 苦荞蛋白对三种有害菌生长的影响 在发酵的第 0、8、16、32 h,分别取小鼠粪便发酵液并对其中的肠球菌、肠杆菌、产气荚膜杆菌进行计数,发酵液用含有 5 g/L 蛋白胨的稀释液进行 10 倍梯度法稀释(10^{-1}~10^{-7}),选择合适稀释度的样品(100 μL)并分别涂布于各选择性培养基上进行培养(培养基、培养方法及条件,见表 1),以上操作均在厌氧培养箱中进行,从取样至涂板完成所用时间控制在 3 h 内。每毫升小鼠粪便发酵液的菌落数用菌落形成单位的以 10 为底的对数值(lg CFU/mL)表示。

1.2.7 苦荞蛋白对发酵液 pH 的影响 在发酵的第 0、8、16、32 h,分别取不同样品小鼠粪便发酵液,用

表 1 肠道主要菌群培养计数方法

Table 1 Cultivation and counting methods of the main intestinal flora

肠道菌群	培养基	培养条件	时间(h)
肠球菌	胆汁七叶苷叠氮钠	(37±1)℃、需氧	24~48
肠杆菌	伊红美蓝琼脂(EMB)	(37±1)℃、需氧	24~48
产气荚膜梭菌	胰月示-亚硫酸盐-环丝氨酸琼脂基础	(37±1)℃、厌氧	48~96

pH 计测定其 pH。

1.2.8 苦荞蛋白对短链脂肪酸的影响 短链脂肪酸(SCFAs)是肠道微生物发酵不被人体胃肠道吸收的食物成分而生成的代谢产物，主要包括甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、乳酸、延胡索酸和一些相应的支链脂肪酸。其中乙酸、丙酸、丁酸及乳酸占90%以上，具有重要的生理功能[16]。为进一步研究苦荞蛋白对肠道有害菌群生长抑制作用的机理，实验对小鼠粪便发酵液中短链脂肪酸(SCFAs)的浓度变化进行分析。

在发酵的第 0、8、16、32 h，分别取不同样品小鼠粪便发酵液，采用气质联用(GC-MS-MS)法测定其中短链脂肪酸(SCFAs，包括乙酸、丙酸、丁酸、乳酸)的含量。

气质分析条件：毛细管柱(Rtx-5MS，30 m×0.25 mm×0.25 μm)；柱温：35 ℃保持 1 min，以 10 ℃/min的速度升温至 100 ℃，保持 1 min，再以 20 ℃/min的速度升温至 250 ℃，保持 3 min；进样口温度：250 ℃；离子源温度：220 ℃；接口温度：260 ℃；分流方式及分流比：分流进样和 10∶1；载气：He，流速：1 mL/min；溶剂延迟 1.5 min。GC 分析时进样量：1 μL[17]。

发酵液样品的处理参考 Fenster 等人[18]的方法，并略作修改。

1.2.9 数据分析 采用 SPSS 20.0 软件进行 ANOVA(LSD 检验)，检验水准=0.05 进行显著性分析；每组数据均作 3 个平行样，结果以平均值±标准差表示，并运用 origin 9.0 软件进行作图。

2 结果与分析

2.1 苦荞蛋白对三种有害菌生长的抑制作用

由图 1 可知，不同实验组中肠球菌、肠杆菌及产气荚膜梭菌的数量均呈先上升后下降的趋势，其中，中(MD)、高(HD)剂量组的苦荞蛋白在发酵 8 h 时达到最大值，而空白组(CK)、酪蛋白组(PC)及低(LD)剂量组的苦荞蛋白在 16 h 时达到最大值。另外，在发酵至 32 h 时，不同剂量组的苦荞蛋白中肠球菌、肠杆菌及产气荚膜梭菌的数量均显著低于 CK 和 PC 组($p<0.05$)，且上述三种有害菌群的数量随苦荞蛋白浓度的增加而显著性降低($p<0.05$)，同时，酪蛋白组中肠球菌、肠杆菌及产气荚膜梭菌的数量与空白对照组之间无显著性差异($p>0.05$)。培养至 32 h 时，低、中、高剂量的苦荞蛋白组较空白对照组，肠球菌减少了 50%、57%、65%，肠杆菌减少了 13%、52%、72%，产气荚膜梭菌减少了 66%、73%、78%；而酪蛋白却使其分别减少了 5%、7%、4%。研究结果表明，苦荞蛋白能够显著地抑制肠道有害菌(肠球菌、肠杆菌及产气荚膜梭菌)的生长，与文献[19]报道的结论一致。

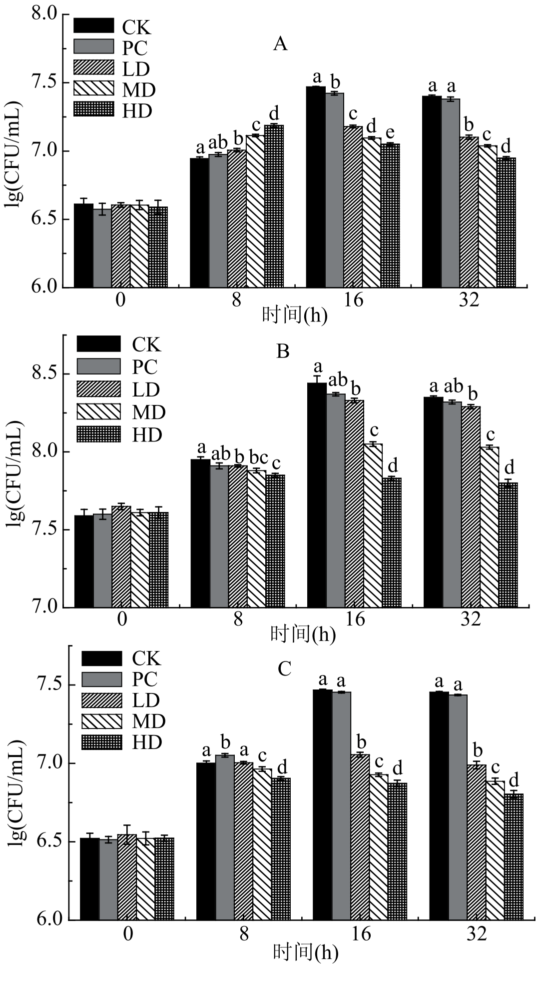

图 1 苦荞蛋白体外发酵对三种肠道有害菌生长的影响

Fig.1 Effects of *in vitro* fermentation of different tartary buckwheat protein on numbers of three kinds intestinal harmful bacteria

注：CK：空白对照组；PC：酪蛋白组；LD：低剂量苦荞蛋白组；MD：中剂量苦荞蛋白组；HD：高剂量苦荞蛋白组；A：肠球菌；B：肠杆菌；C：产气荚膜梭菌，图 2、图 3 同。

2.2 苦荞蛋白对小鼠粪便发酵液 pH 的影响

由图 2 可知，各实验组 pH 变化趋势均呈下降趋势，而对照组(CK)却呈先下降后上升的趋势，这可能是由于随着培养时间的增加，其菌群发生变化，使产酸菌群减少或氨类物质增多而导致；另外，当培养至 32 h 时，其中 PC 组 pH 由 7.21 降到 4.72，LD 组 pH 由 7.18 降到 4.68，MD 组 pH 由 7.09 降到 4.35，HD 组 pH 由 7.17 降到 4.33，各组 pH 下降程度高低为 HD＞MD＞LD＞PC＞CK。酪蛋白组和不同剂量组的苦荞蛋白组发酵液中的 pH 均低于空白对照组，且

与其之间均具有显著性差异（$p<0.05$）。在培养结束时，不同剂量组的苦荞蛋白组的发酵液 pH 与肠道中三种有害菌（肠球菌、肠杆菌、产气荚膜梭菌）数量之间存在正相关关系，即发酵液 pH 越低，肠球菌、肠杆菌及产气荚膜梭菌的数量越少。由此说明，有害菌生长受到抑制可能是由于肠道菌群发酵苦荞蛋白而产生短链脂肪酸等酸性物质，从而使肠道环境 pH 降低，这对于预防和治疗肠道疾病具有重要意义[20]。

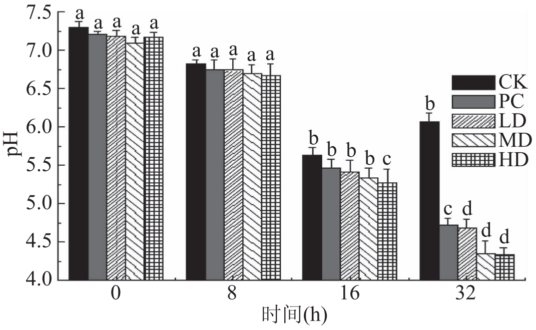

图 2　苦荞蛋白体外发酵对 pH 的影响
Fig.2　Effects of *in vitro* fermentation of different tartary buckwheat protein on pH

2.3　苦荞蛋白对短链脂肪酸的影响分析

由图 3 可知，不同剂量的苦荞蛋白均能促进乙酸、丙酸、丁酸、乳酸的生成，且随着培养时间的延长，4 种短链脂肪酸的浓度均显著性增加（$p<0.05$），可能是由于肠道菌群将苦荞蛋白作为发酵底物产生短链脂肪酸等有机酸。当培养至 32 h 时，中、高剂量的苦荞蛋白组（MD、HD）较 0 h 使乙酸浓度增加了 7.29、8.94 倍，丙酸浓度增加了 25.47、33.77 倍，丁酸浓度增加了 23.60、27.34 倍，乳酸浓度增加了 22.61、25.55 倍（酪蛋白组（PC）使其浓度分别增加了 6.73、27.60、22.93、20.70 倍），此结果与方建东等[21]研究结论一致。在培养结束时，不同剂量组的苦荞蛋白中乙酸、丙酸、丁酸及乳酸与对照组之间均具有显著性差异（$p<0.05$），且中、高剂量组的苦荞蛋白对短链脂肪酸（乙酸、丁酸、乳酸）的促进作用显著高于酪蛋白，即苦荞蛋白对短链脂肪酸的促进作用优于酪蛋白，且高剂量组较低剂量组效果更加显著，其原因可能是苦荞蛋白和酪蛋白均能够被肠道菌群发酵，而且苦荞蛋白更有利于被肠道菌群发酵产生乙酸、丙酸、丁酸、乳酸。当培养结束时，图 3 中各组中短链脂肪酸的浓度可能与图 2 中相对应的 pH 相关，即短链脂肪酸浓度越高，其对应的 pH 越低，从而表明 pH 的降低可能是通过发酵代谢产生的短链脂肪酸所引起的。

3　结论

本文初步研究了苦荞蛋白对肠道中三种有害菌（肠球菌、肠杆菌、产气荚膜梭菌）生长的抑制作用及其机理。结果表明，苦荞蛋白对肠道中肠球菌、肠杆菌及产气荚膜梭菌的生长均具有抑制作用且高于酪蛋白，其中，高剂量的苦荞蛋白（HD）对三种菌的抑制作用最强，较空白对照组（CK）分别减少了 65%、72% 和 78%（32 h）。不同剂量的苦荞蛋白可显著性地促进乙酸、丙酸、丁酸、乳酸浓度的增加，且中、高剂量组的苦荞蛋白对其促进作用显著高于酪蛋白（$p<0.05$），其中，高剂量组的苦荞蛋白较对照组分别使乙酸、丙酸、丁酸及乳酸的浓度增加了 8.94、33.77、27.34、25.55 倍（32 h）。而产生的短链脂肪酸进一步使肠道 pH 降低，且不同剂量苦荞蛋白组的 pH 均低于酪蛋白（高剂量组苦荞蛋白的 pH 为 4.33，而酪蛋白组为 4.68）。从而证明了苦荞蛋白对肠道有害菌的生长具有抑制作用，且这种抑制作用是通过促进

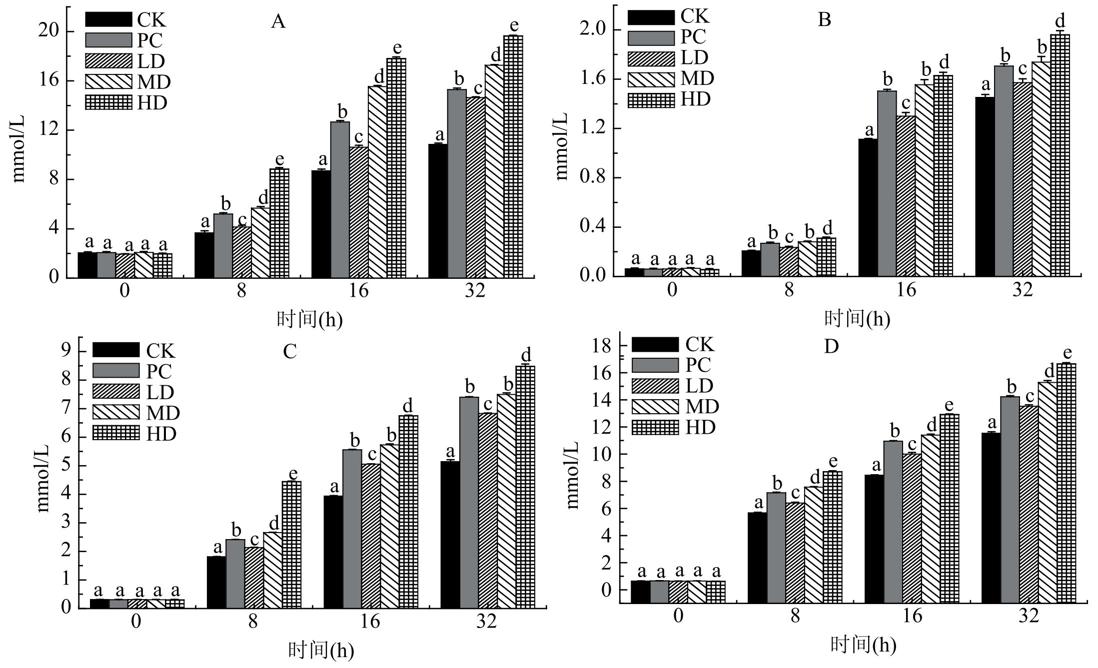

图 3　苦荞蛋白体外发酵对短链脂肪酸的影响
Fig.3　Effects of *in vitro* fermentation of different tartary buckwheat protein on SCFAs
注：A：乙酸；B：丙酸；C：丁酸；D：乳酸。

肠道中短链脂肪酸的产生,进而降低肠道的 pH。

综上所述,苦荞蛋白是可能通过促进乙酸、丙酸、丁酸等短链脂肪酸的生成,从而降低肠道的 pH 来抑制肠道有害菌(肠球菌、肠杆菌及产气荚膜梭菌的)的生长。

参考文献

[1]侯雪梅,袁仲.荞麦的营养保健功能与开发利用[J].农产品加工(学刊),2014,(01):73-75.

[2] Wang Xu, Feng Bo, Xu Zhibin, et al. Identification and characterization of granule bound starch synthase I(GBSSI) gene of tartary buckwheat(Fagopyrum tataricum Gaertn.)[J]. Gene, 2014,534(2):229-235.

[3]王飞.苦荞麦营养保健酸奶的研制及品质分析[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2008,12-13.

[4]曹丽霞.荞麦分离蛋白-葡聚糖共价复合物的制备及乳化性研究[D].无锡:江南大学,2014,23-24.

[5]Adebola O, Corcoran O, Morgan W. Synbiotics: the impact of potential prebiotics inulin, lactulose and lactobionic acid on the survival and growth of Lactobacilli probiotics[J]. Journal of Functional Foods,2014,10(3):75-84.

[6]Kayashita J, Shimaoka I, Nakajoh M, et al. Consumption of buckwheat protein lowers plasma cholesterol and raises fecal neutral sterols in cholesterol-fed rats because of its low digestibility[J]. Journal of Nutrition,1997,127(7):1395-1400.

[7]李瑞,廖振林,方祥,等.抗性淀粉对 HFA 小鼠道菌群的影响[J].中国微生态学杂志,2013,25(7):762-765.

[8] Ishibashi N, Shimamura S. Bifidobacteria. Research and development in Japan[J]. Food Technology,1993,6:126-135.

[9]王尤丽.低聚半乳糖调节小鼠肠道菌群的作[D].郑州:郑州大学,2012,42-43.

[10]熊德鑫.微生态制剂[J].江西科学,1990,1(52):161.

[11]陈贵堂,赵霖,鲍善芬,等.不同植物蛋白质对大鼠肠道菌群的影响[J].中国食品学报,2006,6(1):238-242.

[12] Mao Shengyong, Zhu Weiyun. Effects of six flavonoid compounds addition on short-chain fatty acids production and human fecal microbial community change during *in vitro* fermentation[J]. African Journal of Microbiology Research,2011,5(26):4484-4491.

[13]郭晓娜.苦荞麦蛋白质的分离纯化及功能特性研究[D].无锡:江南大学,2006,59-60.

[14]Mills D, Tuohy K, Booth J, et al. Dietary glycated protein modulates the colonic microbiota towards a more detrimental composition in ulcerative colitis patients and non-ulcerative colitis subjects[J]. Journal of Applied Microbiology, 2008, 105(3):706-714.

[15] Estibaliz O, Mountzouris K, Glenn R, et al. *In vitro* fermentability of dextran, oligodextran and maltodextrin by human gut bacteria[J]. British Journal of Nutrition, 2000, 83(3): 247-255.

[16]陈燕,曹郁生,刘晓华.短链脂肪酸与肠道菌群[J].江西科学,2006,24(1):38-41.

[17]孙晓红,王娅芳,穆秋月等.不同膳食模式及添加大豆低聚糖对肠道短链脂肪酸的影响[J].营养学报,2007,29(3):268-270.

[18]Fenster K, Rankin S, Steele J. Accumulation of short chain ethyl esters by esterases of lactic acid bacteria under conditions simulating ripening parmesan cheese[J]. Journal of Dairy Science,2003,86(9):2818-2825.

[19]申瑞玲,张静雯,党雪雅,等.苦荞粉对小鼠肠道菌群的影响[J].食品与机械,2012,28(1):38-41.

[20]Wang X, Gibson G. Effects of the *in vitro* fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine[J]. Journal of Applied Bacteriology, 1993, 75(4): 373-380.

[21]方建东.抗性淀粉对小鼠肠道菌群的影响以及作用机制研究[D].杭州:浙江工商大学,2014,29-35.

(上接第 305 页)

[16]丁孝良,王伟卓.坤复康胶囊对慢性盆腔炎模型大鼠的 TNF-α、IL-2 的影响[J].陕西中医,2009,30(3):354-355.

[17]雷庆林,林志彬.灵芝多糖对老年小鼠脾细胞 DNA 多聚酶 α 活性及免疫功能的影响[J].药学学报,1993,28(8):577-582.

[18]裘军,李维亮,左克源,等.人工蛹虫草子实体对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响[J].中国药师,2007,10(1):8-10.

[19]刘翠平,吴正钧.干酪乳杆菌 LC2W 胞外多糖的体外免疫活性研究[J].现代食品科技,2013,29(4):715-718.

[20]刘佳.硒化乳酸菌胞外多糖免疫功能机制研究[D].宁波:宁波大学,2013:43-44.

[21]顾笑梅,王富生,孔健,等.乳酸菌 Z222 产胞外多糖(EPS Ⅰ)对免疫细胞功能的影响[J].中华微生物学和免疫学杂志,2003,23(6):442-445.

[22] Raymond C R, Wilkie B N. Th-1/Th-2 type cytokine profiles of pig T-cells cultured with antigen-treated monocyte-derived dendriticcells[J]. Vaccine,2004,22(8):1016-1023.

[23]Mosmann T R, Cherwinski H, Bond M W, et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins[J]. The Journal of Immunology,1986,136(7):2348-2357.

[24]吴广枫,王姣斐,李平兰.改性双歧杆菌胞外多糖体外免疫活性研究[J].食品科技,2011(2):2-4.

[25]郑乃珍,郑小香,潘晓丽,等.猴头菇多糖协同 ConA 对小鼠脾细胞分泌 Th1,Th2 细胞因子及基因表达的影响[J].中国兽医学报,2016,36(5):795-800.

[26]Gerber S A, Sedlacek A L, Cron K R, et al. IFN-γ mediates the antitumor effects of radiation therapy in a murine colon tumor[J]. The American Journal of Pathology, 2013, 182(6): 2345-2354.

[27]Ni C, Wu P, Zhu X, et al. IFN-γ selectively exerts pro-apoptotic effects on tumor-initiating label-retaining colon cancer cells[J]. Cancer letters,2013,336(1):174-184.