

乙醇降解菌种的筛选及其发酵乳产品解酒功效评价

刘威良¹, 毛瑞霞¹, 王雪峰^{1,2,*}, 姬 昱¹, 赵存朝¹, 魏光强¹, 黄艾祥¹

(1. 云南农业大学食品科学技术学院, 云南 昆明 650201; 2. 云南省畜产品加工工程技术研究中心, 云南 昆明 650201)

摘 要: 通过乙醇耐受度、乙醇降解能力测定, 从10株发酵性能良好的乳酸菌中筛选出乙醇降解效果好的菌种, 并评价此菌种生产的发酵乳产品的体内外解酒功效。结果表明, 筛选出1株具有高效乙醇降解能力的嗜酸乳杆菌, 用其复配发酵菌种生产的发酵乳产品在模拟胃、肠液消化条件下, 乙醇脱氢酶激活率分别为 $(36.87 \pm 1.58)\%$ 、 $(33.64 \pm 1.90)\%$, 2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)阳离子自由基清除能力(以谷胱甘肽当量计)分别为 $(1\ 293.72 \pm 4.12)$ 、 $(729.98 \pm 21.37) \mu\text{mol/mL}$, 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基清除能力(以谷胱甘肽当量计)分别为 (16.14 ± 0.12) 、 $(11.26 \pm 0.10) \mu\text{mol/mL}$; 大鼠灌胃不同剂量发酵乳均能降低血液中乙醇质量浓度, 高剂量组3 h后降为 51.62 mg/100 mL ($P < 0.001$), 并能不同程度降低血清中谷丙转氨酶、谷草转氨酶活性且呈剂量依赖性, 对乙醇所致肝损伤有较好的保护作用。研究为后续解酒功能性产品的研发提供科学依据。

关键词: 乙醇降解菌种; 发酵乳; 乙醇脱氢酶激活率; 自由基清除能力; 解酒护肝

Screening for Ethanol-Degrading Strains and Evaluation of Antialcoholic Efficacy of Fermented Milk Product with Them

LIU Weiliang¹, MAO Ruixia¹, WANG Xuefeng^{1,2,*}, JI Yu¹, ZHAO Cunchao¹, WEI Guangqiang¹, HUANG Aixiang¹

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

2. Yunnan Engineering Technology Research Center for Processing of Livestock Products, Kunming 650201, China)

Abstract: In this experiment, 10 strains of lactic acid bacteria with good fermentation performance were screened for their ethanol tolerance and ethanol degradation ability, aiming to find strains with high ethanol degradation ability. Then the selected strains were used to develop fermented milk, and its antialcoholic efficacy was evaluated. The results indicated that *Lactobacillus acidophilus* was found to be the best strain to degrade ethanol. Under simulated gastrointestinal digestion conditions, the activation rates of ethanol dehydrogenase (ADH) in fermented milk with *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus* and *Streptococcus thermophilus* (2:1:1) were $(36.87 \pm 1.58)\%$ and $(33.64 \pm 1.90)\%$, respectively; the 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical cation scavenging abilities (glutathione equivalent) were $(1\ 293.72 \pm 4.12)$ and $(729.98 \pm 21.37) \mu\text{mol/mL}$, and the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging abilities (glutathione equivalent) were (16.14 ± 0.12) and $(11.26 \pm 0.10) \mu\text{mol/mL}$, respectively. After intragastric administration of the fermented milk at different doses, blood alcohol levels in alcohol-drinking rats decreased, reaching 51.62 mg/100 mL at 3 h in the high dose group ($P < 0.001$). Additionally, the fermented milk reduced the serum activities of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) to different degrees in a dose-dependent way, and it had a potent protective effect on alcohol-induced liver injury. In summary, this study provides a scientific basis for developing antialcoholic products in the future.

Keywords: ethanol-degrading strains; fermented milk; activation rate of ethanol dehydrogenase; radical scavenging activity; liver protection

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190629-400

中图分类号: TS252.5

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2020) 02-0107-07

收稿日期: 2019-06-29

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目 (31960462); 云南省基础研究计划面上项目 (2019FB052);

云南省农业联合专项 (2018FG001-040); 云南省现代农业奶牛产业技术体系资助项目 (2019KJTX0014)

第一作者简介: 刘威良 (1987—) (ORCID: 0000-0001-9997-8321), 男, 博士研究生, 研究方向为保健食品功能因子及其作用机理。E-mail: lwl2046@126.com

*通信作者简介: 王雪峰 (1986—) (ORCID: 0000-0001-8175-8478), 男, 讲师, 硕士, 研究方向为食品蛋白质资源利用与乳品科学。E-mail: 364135728@qq.com

引文格式:

刘威良, 毛瑞霞, 王雪峰, 等. 乙醇降解菌种的筛选及其发酵乳产品解酒功效评价[J]. 食品科学, 2020, 41(2): 107-113.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190629-400. <http://www.spkx.net.cn>

LIU Weiliang, MAO Ruixia, WANG Xuefeng, et al. Screening for ethanol-degrading strains and evaluation of antialcoholic efficacy of fermented milk product with them[J]. Food Science, 2020, 41(2): 107-113. (in Chinese with English abstract)

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190629-400. <http://www.spkx.net.cn>

饮酒过量或饮酒不当会造成乙醇在体内代谢产生许多有害物质及大量自由基, 给人体造成很大伤害, 长期饮酒不仅会造成大脑功能障碍和意识障碍, 还会形成慢性乙醇中毒^[1-3]。饮酒带来最大伤害的是肝脏, 因为乙醇进入人体后90%以上是由肝脏代谢, 而肝脏所产生的代谢产物及酒造成肝细胞代谢紊乱, 是引起乙醇性肝损伤的主要原因^[4-6]。我国古代著名医药学家李时珍所著的《本草纲目》中记载有: “凡酒醉不醒之人, 用生葛根捣汁饮, 方可解‘酒毒’”, 可见葛根中含有一些解酒功效成分, 具有一定的开发利用价值^[7]。现代市售的解酒、醒酒产品发挥其功效多是基于该类产品在人体服用后能够影响乙醇代谢或抑制乙醇吸收^[8-9], 但不能直接降解体内乙醇。很多醒酒药并没有实质的醒酒作用, 只是起到安慰镇定、缓解头痛等作用, 有些醒酒药虽具有一定解酒、醒酒功效, 但也会伴随着不同的副作用, 对人体健康不利。

微生物生长过程需要碳水化合物, 若其可以利用乙醇作为碳源之一, 就能起到降解乙醇的作用, 但对于这方面的研究报道较少。因此, 本实验以前期确定的10株发酵性能良好、食用安全的乳酸菌为出发菌种, 通过乙醇耐受度、乙醇降解能力测定, 筛选出具有较强乙醇降解能力的菌种, 并以此菌种与瑞士乳杆菌、嗜热链球菌互配, 用牛奶、新鲜葛根、蔗糖为原料生产一种解酒发酵乳产品; 进一步在体外模拟胃、肠液消化条件下分析该发酵乳产品对乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase, ADH)活性及抗氧化活性的影响, 结合体内动物灌胃实验构建大鼠急性乙醇致肝损伤模型^[10], 检测大鼠血液中乙醇含量及其对血清中谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)和谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)活性的影响, 分析该发酵乳产品对肝细胞的保护作用, 为后续解酒功能性产品的研发提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

实验动物: SD雄性大鼠40只(体质量180~250 g), 动物许可证号SCXK(滇)2016-0002, 购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司。

白酒(红星二锅头, 乙醇体积分数为56%)、鲜牛乳、新鲜葛根, 均为市售; 实验菌株: 嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus* CICC6063)、瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus* CICC6064)、植物乳杆菌(*L. plantarum* CICC6002)、植物乳杆菌植物亚种(*L. plantarum* subsp. *plantarum* CICC6005)、干酪乳杆菌(*L. casei* CICC6065)、副干酪乳杆菌(*L. paracasei* CICC6068)、嗜酸乳杆菌(*L. acidophilus* CICC6091)、鼠李糖乳杆菌(*L. rhamnosus* CICC6001)、类干酪乳杆菌(*L. paracasei* CICC6227)、德氏乳杆菌保加利亚亚种(*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CICC6064), 均购于中国工业微生物菌种保藏中心。

L-谷光甘肽 北京北纳创联生物技术有限公司; 1,1-联苯基-2-苦基肼基(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)、2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS) 上海源叶生物科技有限公司; 海王金樽片 海王健康科技发展有限公司; ADH 美国Sigma公司; MRS改良培养基、营养肉汤 广东环凯微生物科技有限公司; ALT测定试剂盒、AST测定试剂盒 南京建成科技有限公司。

1.2 仪器与设备

URA14M0018型分光光度计 上海翱艺仪器有限公司; TGL20M型高速冷冻离心机 湖南湘立科学仪器有限公司; SVJ-358型智能商用型酸奶机 北京世纪阳光科技发展有限公司; SW-CJ-IF型单人双面超净无菌操作台 苏州江东精密仪器有限公司; HPX-9272ME型恒温培养箱 上海博讯实业有限公司; ZQLY-180S型振荡培养箱 上海知楚仪器有限公司; TRACE 1300型气相色谱仪、Tri Plus 300型顶空进样器、Multiskan Go型酶联免疫检测仪 美国Thermo公司; GMSX-280型压力蒸汽灭菌器 北京市永光明医疗仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 菌种活化

分别取适量乳酸菌菌株冻干粉接种于10 mL灭菌MRS肉汤培养基中, 旋涡混匀, 恒温培养箱中37℃培养24 h, 得到1代菌悬液。按10%的接种量将1代菌悬液再接种于MRS肉汤培养基中, 37℃恒温培养18 h, 得到2代菌悬液。重复上述步骤, 37℃恒温培养12 h, 得到3代菌悬液, 4℃保存备用。

1.3.2 菌种驯化

将活化好的乳酸菌悬液接种到牛乳中进行驯化增殖,依次调整菌种接种量为8%、6%、4%、2%,40℃恒温培养至凝乳,需保证菌种活力能在4 h内凝乳。

1.3.3 乙醇耐受菌种的筛选

将稀释到适宜稀释度的10株乳酸菌分别取0.1 mL接种于添加量为0%、10%、15%、20%无水乙醇的灭菌MRS改良培养基中^[11-12],每组3个平行,用摇珠进行涂布,于37℃厌氧培养12 h。参照GB 4789.35—2010《食品微生物学检验 乳酸菌检验》进行乳酸菌总数测定,以活菌数为指标,筛选得到乙醇耐受菌种。

1.3.4 乙醇降解菌种的筛选

1.3.4.1 溶液配制

乙醇标准液:精密吸取无水乙醇适量,加入蒸馏水中,配成体积分数1%、2%、3%、4%、5%的乙醇标准液;重铬酸钾-硫酸溶液:取重铬酸钾1 g溶于25 mL水中,边搅拌边缓慢加入4 mL浓硫酸;乙醇富集培养液:取3%乙醇耐受菌液加入50 mL灭菌MRS改良培养基的三角瓶中,于厌氧培养箱中37℃恒温培养8 h,使培养基中乙醇耐受菌充分富集,同时以MRS培养液为溶剂,分别配制20%、40%乙醇体积分数的MRS乙醇培养液,现配现用。

1.3.4.2 乙醇标准曲线绘制

向试管中分别加入0%、10%、20%、30%、40%、50%的乙醇标准液0.1 mL,每个试管中加入重铬酸钾-硫酸溶液1.0 mL,充分摇匀,盖好盖子;将试管置于沸水浴中10 min,使重铬酸钾-硫酸溶液充分氧化;取出试管,于610 nm波长处测定重铬酸钾-硫酸溶液的吸光度。以乙醇体积分数为横坐标,吸光度为纵坐标,制作乙醇标准曲线($y=0.162x+0.0023$, $R^2=0.9974$),根据标准曲线计算乙醇体积分数。

1.3.4.3 乙醇降解能力测定

参照高慧^[13]的方法,分别取不同体积分数乙醇培养液5 mL于试管内,将筛选到的菌株200 μ L接种于培养液内,混匀静置,37℃厌氧培养24 h。以不加菌液的MRS乙醇培养液作为对照,利用重铬酸钾-硫酸法测定乙醇残留量,分析各菌种的乙醇降解能力。

1.3.5 解酒发酵乳生产工艺流程

选用生产酸奶及发酵乳常用的基础菌种嗜热链球菌、瑞士乳杆菌与最佳的乙醇降解菌种嗜酸乳杆菌复配为发酵菌种,分别发酵牛乳和葛根液,再进行调配得到解酒发酵乳,具体流程如下:

生牛乳→预热至65℃→均质(6~8 MPa)→杀菌(85℃、15 min)→冷却至45℃→
接种(嗜酸乳杆菌-瑞士乳杆菌-嗜热链球菌2:1:1,添加量3%)→
灌装→发酵(42℃、8 h)→冷藏→发酵乳
葛根发酵液(3.71%添加量) } 解酒发酵乳
↑
新鲜葛根→护色处理→打浆→杀菌→接种(同一菌种组合,添加量3%)→发酵(30℃、30 h)

1.3.6 解酒发酵乳体外功能活性分析

1.3.6.1 体外模拟胃、肠液消化条件^[14-15]

人工模拟肠液的配制:称取 KH_2PO_4 6.85 g,加蒸馏水500 mL使其溶解,用0.4 g/100 mL NaOH溶液调节pH值至6.8,加水稀释,然后加入1 g/100 mL的胰蛋白酶,加水使其充分溶解,定容至1 L,混匀备用。

人工模拟胃液的配制:用蒸馏水稀释23.4 mL浓盐酸至100 mL(pH 2.0),从中取稀盐酸16.4 mL,然后加入1 g/100 mL的胃蛋白酶,加水使其充分溶解,定容至1 L,混匀备用。

1.3.6.2 解酒发酵乳对ADH活性的影响

取1 mL解酒发酵乳于含有9 mL模拟胃液的试管中,涡旋混匀,37℃保温2 h后,沸水浴加热10 min以终止反应,取反应液测定消化前后的ADH激活率;同样以1:9体积比将解酒发酵乳加入至模拟肠液中,于37℃恒温水浴中避光模拟消化2 h,迅速冷却,然后再将样液于4℃、6 000 r/min离心15 min,取上清液测定消化前后的ADH激活率,以加入等量蒸馏水为空白对照组。

1.3.6.3 解酒发酵乳的体外抗氧化活性

按照1.3.6.2节样品处理方法,通过测定DPPH自由基清除能力、ABTS阳离子自由基清除能力,分析模拟胃、肠液消化条件下解酒发酵乳的体外抗氧化活性。

1.3.7 解酒发酵乳体内功能活性分析

1.3.7.1 解酒发酵乳对醉酒大鼠体内乙醇含量的影响

雄性大鼠40只,随机分为4组,每组8只,分为对照组、海王金樽组、低剂量组、中剂量组、高剂量组,确保各组老鼠体重质量无显著性差异($P>0.05$)。各组大鼠禁食16 h后,用16 mL/kg剂量的白酒进行灌胃。以翻正反射消失为醉酒指标,达到醉酒状态后进行解酒发酵乳灌胃,低、中、高剂量组的解酒发酵乳灌胃量分别为1.5、3、6 mL/kg,对照组以灌胃生理盐水为空白对照、灌胃解酒药物海王金樽为阳性对照。灌胃后,灌酒1 h采用大鼠眼内眦取血(用定量毛细管吸取一定体积血液),灌入解酒发酵乳后1、2、3 h分别取全血,采用顶空气相色谱法^[16-17]测定乙醇含量,分析解酒发酵乳对醉酒大鼠体内乙醇的降解能力。

1.3.7.2 解酒发酵乳对醉酒大鼠肝损伤的保护作用

取雄性大鼠40只,分组及灌胃方法同1.3.7.1节,分别于60、120、180 min后取全血,分离血清,按ALT、AST检测试剂盒说明书要求,分别在510 nm波长处使用酶标仪检测。在特定条件下,1 min内转化1 μ mol底物或者1 μ mol有关基团所需酶量为1个酶活性单位(U),以此测定血清中的ALT、AST活性^[18-19],分析解酒发酵乳对醉酒大鼠肝损伤的保护能力。

1.3.8 测定方法

1.3.8.1 ADH激活率测定

采用瓦勒-霍赫法^[20-21]测定ADH活性。吸取焦磷酸钠缓冲液1.5 mL、 NAD^+ 1.0 mL、乙醇溶液0.5 mL和样品

0.1 mL相混合, 25 ℃加盖温浴5 min后, 立即加入ADH溶液0.1 mL并摇匀, 用分光光度计测定340 nm波长处的吸光度, 以后每隔10 s读数一次, 连续测定5 min。以不加样品的反应组为空白对照, 以吸光度对时间作曲线图, 取反应液最初组分, 计算在340 nm波长处吸光度每10 s的增加值, 再根据NADH在340 nm波长处的摩尔消光系数为6.2, 计算酶活性。ADH活性以每分钟NADH生成物质的量(nmol)表示, ADH激活率计算如式(1)所示:

$$\text{ADH激活率/\%} = \frac{\text{空白对照组酶活性} - \text{加样组酶活性}}{\text{空白对照组酶活性}} \times 100 \quad (1)$$

1.3.8.2 DPPH自由基清除能力测定

参照曾丽等^[23]方法, 分别吸取处理方式不同的解酒发酵乳的等量上清液, 加入31 μg/mL DPPH溶液, 充分振摇后, 室温下暗处放置0.5 h, 于517 nm波长处测定吸光度。以谷胱甘肽为标准样品, 绘制标准曲线回归方程为 $y=0.0171x+0.3186$ (6.4~38.4 μg/mL, $R^2=0.9925$); y 为DPPH自由基清除率, x 为谷胱甘肽质量浓度(μg/mL)。DPPH自由基清除率计算如式(2)所示:

$$\text{DPPH自由基清除率/\%} = \frac{A_1 - A_2}{A_3 - A_4} \times 100 \quad (2)$$

式中: A_1 为实验组吸光度; A_2 为样品干扰实验吸光度(调零); A_3 为DPPH-甲醇溶液吸光度; A_4 为蒸馏水吸光度(调零)。

1.3.8.3 ABTS阳离子自由基清除能力测定

参照黄佳琦^[23]、Agrawal^[24]等方法并进行修改。分别吸取处理方式不同的解酒发酵乳的等量上清液, 加入ABTS稀释工作液3.8 mL, 室温下反应6 min, 于734 nm波长处测定吸光度。以谷胱甘肽为标准样品, 绘制标准曲线回归方程为 $y=0.0109x+0.0576$ (9.6~57.6 μg/mL, $R^2=0.9926$); y 为ABTS阳离子自由基清除率, x 为谷胱甘肽质量浓度(μg/mL)。ABTS阳离子自由基清除率计算如式(3)所示:

$$\text{ABTS阳离子自由基清除率/\%} = \frac{A_1 - A_2}{A_3 - A_4} \times 100 \quad (3)$$

式中: A_1 为实验组吸光度; A_2 为样品干扰实验吸光度(调零); A_3 为ABTS工作液吸光度; A_4 为蒸馏水吸光度(调零)。

1.3.8.4 大鼠全血中乙醇含量测定

采用顶空气相色谱法^[14-15], 利用TRACE 1300型气相色谱仪检测全血中乙醇含量, 外标法定量。

色谱条件: PEG-20 M色谱柱, 汽化室温度230 ℃, 检测室温度230 ℃, 色谱柱温70 ℃, 氮气流速20 mL/min, 氢气流速30 mL/min, 空气流速100 mL/min。

顶空条件: 样品室温度70 ℃, 管路温度90 ℃, 阀路温度90 ℃, 载气压力120.0 kPa, 吹扫压力220.0 kPa。

标准曲线制作: 分别取0、0.1、0.2、0.4、0.8 mL的乙醇标准储备液(200 mg/100 mL)于10 mL顶空瓶中,

加入空白组血液至1 mL, 配制成质量浓度为0、20、40、80、160 mg/100 mL, 混匀后置于顶空装置中70 ℃恒温30 min, 自动进样上层气体1 mL, 以保留时间定性, 以峰面积定量, 以乙醇质量浓度(mg/100 mL)为横坐标, 峰面积(mV)为纵坐标绘制标准曲线。

1.4 数据统计分析

采用Excel 2003软件进行数据处理分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计学差异分析方法采用ANOVA的Tukey方法, $P < 0.05$, 差异显著。

2 结果与分析

2.1 乙醇降解菌种的筛选

2.1.1 乙醇耐受菌筛选

表1 10株乳酸菌在不同乙醇体积分数下培养12 h的活菌数变化
Table 1 Changes in viable cell count of 10 *Lactobacillus* strains cultured at different ethanol concentrations for 12 h

菌株名称	活菌数(lg(CFU/mL))			
	接种量	0%乙醇	15%乙醇	20%乙醇
嗜热链球菌	6.22±0.01	1.37±0.13	0.82±0.01*	0.29±0.02**
瑞士乳杆菌	6.07±0.03	1.22±0.24	0.97±0.03*	0.38±0.02**
植物乳杆菌	7.09±0.06	1.36±0.30	0.89±0.06**	0.12±0.05***
植物乳杆菌植物亚种	7.23±0.02	1.32±0.12	1.03±0.02*	0.25±0.04**
干酪乳杆菌	7.24±0.03	1.09±0.02	0.74±0.03*	0.33±0.05**
副干酪乳杆菌	6.98±0.01	0.91±0.19	1.19±0.04*	0.85±0.08
嗜酸乳杆菌	6.39±0.04	1.02±0.23	1.28±0.01*	0.98±0.07
鼠李糖乳杆菌	6.03±0.03	1.35±0.13	1.22±0.01*	0.89±0.02*
类干酪乳杆菌	6.45±0.07	0.42±0.22	0.86±0.03**	0.18±0.02*
德氏乳杆菌保加利亚亚种	6.12±0.02	1.63±0.17	1.01±0.06**	0.32±0.05***

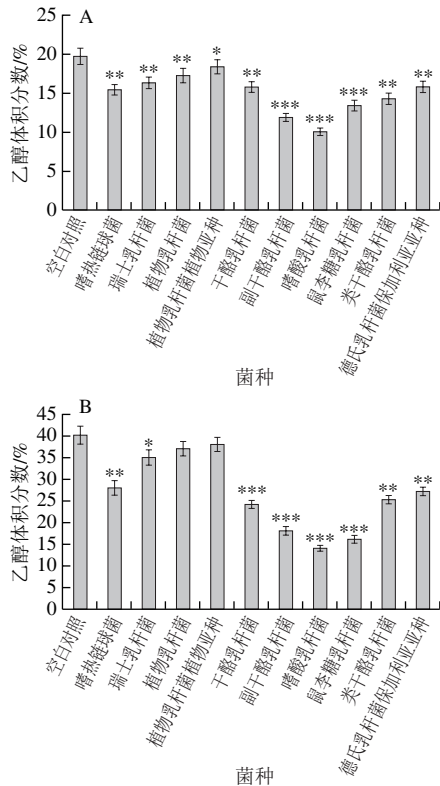
注: 与对照组(0%乙醇)比较, *, 差异显著($P < 0.05$), **, 差异极显著($P < 0.01$), ***, 差异高度显著($P < 0.001$)。

实验前期通过发酵性能测定选取嗜热链球菌、瑞士乳杆菌、植物乳杆菌等10株发酵性能良好且食用安全的菌株, 在15%、20%乙醇体积分数下测定其对乙醇的耐受度。由表1可知, 副干酪乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、嗜酸乳杆菌3株菌相比其他7株乳酸菌, 在2种乙醇体积分数下的活菌数较多, 其中以嗜酸乳杆菌的存活数最多, 可能是3株菌自身带有相关乙醇耐受基因^[25-26], 在含有乙醇的环境下依然能够较好的生长, 具有较好的乙醇耐受能力。

2.1.2 乙醇降解菌筛选

通过乙醇耐受度测定得到1株乙醇耐受效果最明显的菌种嗜酸乳杆菌。由图1可知, 在20%乙醇体积分数下, 嗜酸乳杆菌乙醇降解效果最好, 培养24 h后乙醇为10%左右, 副干酪乳杆菌、鼠李糖乳杆菌次之, 其他菌株变化不明显; 在40%乙醇体积分数下, 嗜酸乳杆菌的乙醇降解效果也是最好, 培养24 h后乙醇降为15%左右, 副干酪乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、干酪乳杆菌次之, 降解效果均没有嗜酸乳杆菌明显。由此表明, 在20%、40%乙醇体积分数下, 嗜酸乳杆菌能够有效利用乙醇作为碳源

之一,从而发挥降解乙醇的作用^[27]。因此,最终选取嗜酸乳杆菌作为最佳的乙醇降解菌种。



与空白对照组比较,*.差异显著($P<0.05$),**.差异极显著($P<0.01$),***.差异高度显著($P<0.001$)。图2、3同。

图1 20% (A) 和40% (B) 乙醇体积分数下菌种的降解效果

Fig.1 Ethanol degradation ability of 10 strains at 20% (A) and 40% (B) ethanol concentration

2.2 解酒发酵乳的体内外功效评价

2.2.1 解酒发酵乳在体外模拟胃、肠液消化条件下对ADH活性的影响

表2 模拟胃、肠液消化条件下ADH激活率测定

Table 2 ADH activation rates of fermented milks in simulated gastrointestinal tract

发酵乳种类	ADH激活率/%		
	模拟前	模拟胃液	模拟肠液
样品1	21.40±1.09	24.06±1.01	24.19±1.08
样品2	26.50±0.45*	31.11±0.97*	29.13±0.53*
样品3	31.89±0.28**	36.87±1.58**	33.64±1.90**

注:样品1以嗜热链球菌、瑞士乳杆菌为发酵菌种;样品2以嗜热链球菌、瑞士乳杆菌、嗜酸乳杆菌为发酵菌种;样品3以嗜热链球菌、瑞士乳杆菌、嗜酸乳杆菌为发酵菌种,并添加葛根发酵液。与样品1相比,*.差异显著($P<0.05$),**.差异极显著($P<0.01$)。表3同。

由表2可知,用不同菌株组合进行发酵的发酵乳,体外模拟胃、肠液消化条件前后ADH激活率差异均显著。其中,添加乙醇降解菌的发酵乳(样品2、样品3)在模拟胃、肠液消化条件前后ADH激活率比不加该菌种的发酵乳(样品1)得到明显提高($P<0.05$),说明发酵乳

中乙醇降解菌的存在能够有效提高ADH的活性。发酵乳中葛根发酵液的加入对ADH激活率的提高效果明显,可能是葛根发酵过程中促进了有效成分葛根素的释放^[28],其与乙醇降解菌相结合能够更加有效地增强ADH活性。

2.2.2 解酒发酵乳在体外模拟胃、肠液消化条件下对自由基清除能力的影响

表3 模拟胃、肠液消化条件下自由基清除能力

Table 3 Free radical scavenging capacities of fermented milks in simulated gastrointestinal tract

发酵乳种类	模拟前		模拟胃液		模拟肠液	
	ABTS阳离子自由基	DPPH自由基	ABTS阳离子自由基	DPPH自由基	ABTS阳离子自由基	DPPH自由基
样品1	837.55±1.26	12.43±0.04	647.30±4.52	7.32±0.23	321.32±11.77	3.55±0.22
样品2	1 053.29±3.26*	13.50±0.12*	727.44±3.59*	11.29±0.08*	376.38±7.54*	6.44±0.32*
样品3	1 574.76±2.35***	18.32±0.05**	1 293.72±4.12***	16.14±0.12**	729.98±21.37**	11.26±0.10**

由表3可知,不同菌株组合发酵生产的发酵乳样品,在体外模拟胃、肠液消化条件前后自由基清除能力变化显著,但发酵过程可能产生的一些非有机抗氧化成分造成了ABTS阳离子自由基清除率、DPPH自由基清除率差距较大(ABTS适用于亲脂抗氧化剂和亲水抗氧化剂测定,DPPH仅适用于有机自由基抗氧化剂测定)。其中,添加乙醇降解菌的发酵乳(样品2、样品3)在模拟胃、肠液消化条件前后ABTS阳离子自由基清除能力、DPPH自由基清除能力比不加该菌种的发酵乳(样品1)都得到明显提高,可能是乙醇降解菌能够有效降解乳蛋白产生了活性小肽,从而提高了发酵乳的自由基清除能力^[29]。葛根发酵液的加入对提高发酵乳的自由基清除能力效果明显,说明葛根中存在抗氧化活性成分,其与乙醇降解菌相结合使发酵乳在模拟胃、肠液消化条件下的ABTS阳离子自由基清除能力为(1 293.72±4.12)、(729.98±21.37) $\mu\text{mol/mL}$; DPPH自由基清除能力达到(16.14±0.12)、(11.26±0.10) $\mu\text{mol/mL}$ 。

2.2.3 解酒发酵乳对醉酒大鼠体内乙醇含量的影响

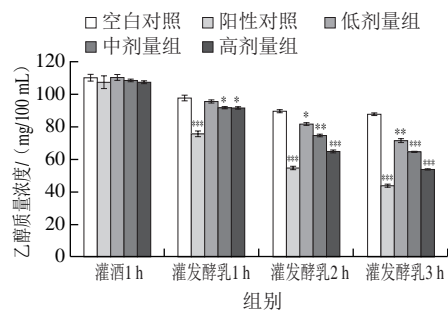


图2 灌入解酒发酵乳前后大鼠血液中乙醇含量变化

Fig.2 Change in blood alcohol concentration of alcohol-drinking rats at different times after oral administration of fermented milk

大鼠灌酒1 h后基本达到醉酒状态,如图2所示,此时血液中乙醇含量高,而后缓慢下降,3 h仍具有较高质

量浓度, 达到87.63 mg/100 mL。但灌入解酒发酵乳后, 低、中、高剂量组的大鼠血液中乙醇含量均出现下降, 尤其是中、高剂量组血液中乙醇含量在3个时间段下降均显著, 阳性对照组后3个时间段乙醇含量下降均为高度显著 ($P<0.001$)。其中, 高剂量组在灌胃1 h后大鼠血液中乙醇含量仍较高, 随后2个时间段其血液乙醇含量迅速下降, 3 h后血液中乙醇质量浓度降为51.62 mg/100 mL, 要远低于空白对照组、略高于阳性对照组, 差异性高度显著 ($P<0.001$)。所有组别在灌胃解酒发酵乳后1 h内大鼠血液中乙醇含量变化较小, 而后出现迅速下降的主要原因是灌胃解酒发酵乳后, 激活ADH活性需要一定的时间, 这段时间体内代谢能力较弱, ADH激活后乙醇代谢能力迅速提升^[30], 同时发酵乳中的嗜酸乳杆菌具有高效降解乙醇的能力, 从而使血液中乙醇含量迅速下降。此研究结果与王洁等^[31]关于葛根、葛花、枳椇子混合物对小鼠急性乙醇中毒醒酒的作用结果较为一致, 可能都是因其有效成分促进了血液中乙醇代谢或直接降解乙醇而发挥解酒效果。

2.2.4 解酒发酵乳对醉酒大鼠肝损伤的保护作用

血清酶学中对ALT和AST的检查是诊断肝损伤的重要指标, 肝细胞发生实质性损害时, 细胞膜通透性改变, 胞内的ALT和AST释放至血液中, 导致血中酶活性偏高^[32]。正常肝脏组织中转氨酶含量是血液的100倍, 当肝脏出现实质性损伤时, 若出现1%的肝细胞坏死状况, 血清中的转氨酶活性即提高数倍, 所以AST和ALT活性是考察肝损伤的敏感性指标^[33]。

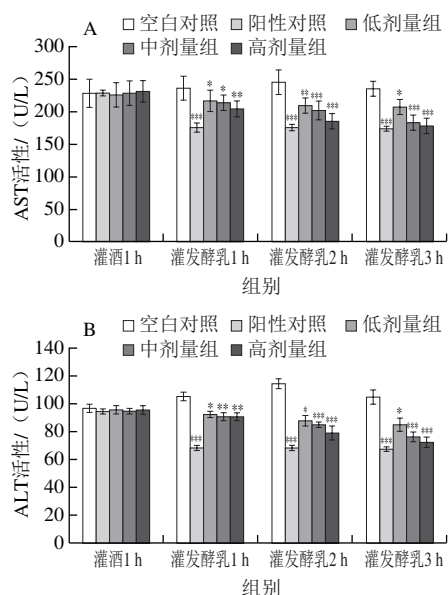


图3 灌入解酒发酵乳前后大鼠血清中AST (A)、ALT (B) 活性变化
Fig. 3 Changes in serum AST (A) and ALT (B) activity in rats at different times after oral administration of fermented milk

如图3所示, 与空白对照组相比, 大鼠灌酒1 h后分别灌入低、中、高剂量的解酒发酵乳, 在3个时间段大鼠

血清中AST和ALT活性均显著降低, 且呈现剂量依赖性, 阳性对照组后3个时间段血清中AST和ALT活性均高度显著 ($P<0.001$)。其中, 中、高剂量组分别在2、3 h后大鼠血清中AST和ALT活性出现明显下降 ($P<0.001$), 尤其在3 h远低于空白对照组、略高于阳性对照组, 可能是因为解酒发酵乳中的乙醇降解菌和葛根素发生了协同作用, 有效缓解大鼠肝细胞发生实质性损害, 从而抑制了胞内ALT和AST的释放^[34]。由此表明, 解酒发酵乳对乙醇致肝损伤有较好的保护作用, 降低动物血清中AST和ALT活性, 可有效预防肝细胞因乙醇过度刺激导致的坏死。

3 结论

过量饮酒会使乙醇在人体内代谢产生有害物质及大量自由基, 为缓解过量饮酒对人体造成的伤害, 本实验以前期确定的10株发酵性能良好、食用安全的乳酸菌为出发菌种, 通过乙醇耐受度、乙醇降解能力测定, 筛选出具有高效乙醇降解能力的嗜酸乳杆菌, 并以此菌种与瑞士乳杆菌、嗜热链球菌互配, 用牛奶、新鲜葛根、蔗糖为原料生产出一种解酒发酵乳产品。该发酵乳产品在体外模拟胃、肠液消化条件下, 能使ADH激活率分别达到 (36.87 ± 1.58) %、(33.64 ± 1.90) %, ABTS阳离子自由基清除能力分别为 ($1\ 293.72 \pm 4.12$)、(729.98 ± 21.37) $\mu\text{mol/mL}$, DPPH自由基清除能力分别为 (16.14 ± 0.12)、(11.26 ± 0.10) $\mu\text{mol/mL}$; 大鼠体内灌胃不同剂量的解酒发酵乳均能降低血液中乙醇含量, 尤其是高剂量组3 h后降为51.62 mg/100 mL ($P<0.001$), 并能不同程度地降低大鼠血清中ALT和AST活性且呈剂量依赖性, 对乙醇所致肝损伤有较好的保护作用。该研究可为后续解酒功能性产品的研发提供一定的科学依据。

参考文献:

- CARINA F B, CHARLES P, THOMAS B. Harmful use of alcohol: a shadow over sub-saharan Africa in need of workable solutions[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2017, 14(4): 346-347. DOI:10.3390/ijerph14040346.
- IPARRAGUIRRE J. Socioeconomic determinants of risk of harmful alcohol drinking among people aged 50 or over in England[J]. BMJ Open, 2015, 5(7): e007684. DOI:10.1136/bmjopen-2015-007684.
- ROSSITER S, THOMPSON J, HESTER R. Improving control over the impulse for reward: sensitivity of harmful alcohol drinkers to delayed reward but not immediate punishment[J]. Drug and Alcohol Dependence, 2012, 125(1/2): 89-94. DOI:10.1016/j.drugalcdep.2012.03.017.
- SHUVENDRA S, ANNAYYA A, RICARDO R, et al. In vivo acute on chronic ethanol effects in liver: a mouse model exhibiting exacerbated injury, altered metabolic and epigenetic responses[J]. Biomolecules, 2015, 5(4): 3280-3294. DOI:10.3390/biom5043280.
- AROOR A R, RESTREPO R J, KHARBANDA K K, et al. Epigenetic histone modifications in a clinically relevant rat model of chronic

- ethanol-binge-mediated liver injury[J]. *Hepatology International*, 2014, 8: 421-430. DOI:10.1007/s12072-014-9546-4.
- [6] KIM S H, PARK O, ZHENG M, et al. Interleukin-22 treatment ameliorates alcoholic liver injury in a murine model of chronic-binge ethanol feeding: role of signal transducer and activator of transcription 3[J]. *Hepatology*, 2010, 52(4): 1291-1300. DOI:10.1002/hep.23837.
- [7] 王恒禹, 刘玥, 沈孝坤, 等. 葛根的解酒作用及应用[J]. *中国医疗前沿*, 2012, 7(20): 7-9. DOI:10.3969/j.issn.1673-5552.2012.20.0005.
- [8] NEMTSOV A V. Alcohol-related harm and alcohol consumption in Moscow before, during and after a major anti-alcohol campaign[J]. *Addiction*, 2015, 93(10): 1501-1510. DOI:10.1046/j.1360-0443.1998.931015016.x.
- [9] SZCZEPANSKA R, HARDING S, GRUPP L A. Effect of bestatin, an aminopeptidase inhibitor, on alcohol intake in alcohol-preferring rats[J]. *Alcoholism Clinical and Experimental Research*, 1996, 20(3): 561-565. DOI:10.1111/j.1530-0277.1996.tb01093.x.
- [10] ROJIN T S, SHETTY S, HOLLA R. Hepatoprotective effect of mussaenda erythrophylla and aegle marmelos in ethanol induced rat hepatotoxicity model[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 13(10): 13183-13202. DOI:10.3390/ijms131013183.
- [11] 李宗亮. 乙醇降解菌的筛选、16S rDNA鉴定以及培养基优化和生长特性研究[D]. 杭州: 浙江师范大学, 2011.
- [12] 陆晨晨, 李宗亮, 李盈靓, 等. 一株乙醇降解菌株的筛选、鉴定及其培养条件的优化[J]. *酿酒科技*, 2011(6): 17-20.
- [13] 高慧. 快速解酒厌氧微生物的筛选鉴定及其解酒能力研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2016.
- [14] 张宇, 李玉珍, 肖怀秋, 等. 体外人胃肠模拟系统在食物消化行为研究中的应用进展[J]. *中国酿造*, 2017, 36(7): 153-156. DOI:10.11882/j.issn.0254-5071.2017.07.033.
- [15] 刘亚, 王雨, 陈莹莹, 等. MOF-5吸附姜黄素及在胃肠中的消化研究[J]. *食品科学技术学报*, 2017, 35(5): 46-52.
- [16] 龚源, 吴杰. 顶空气相色谱法测定生脉注射液中乙醇残留量[J]. *中国医院用药评价与分析*, 2018, 18(2): 208-210.
- [17] 金君, 戴家佳, 杜彦斌, 等. 人体内血醇浓度变化及其影响因素分析[J]. *中国法医学杂志*, 2018, 1: 58-61. DOI:10.13618/j.issn.1001-5728.2018.01.014.
- [18] HAMZA A A. Ameliorative effects of *Moringa oleifera* Lam. seed extract on liver fibrosis in rats[J]. *Food & Chemical Toxicology*, 2010, 48(1): 345-355. DOI:10.1016/j.fct.2009.10.022.
- [19] 左正宇, 邵洋, 刘杨, 等. 虾青素对肝脂代谢与昼夜节律的调节作用[J]. *食品科学*, 2019, 40(3): 174-181. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20171127-328.
- [20] YAMAZAKI T, NAKJIMA Y, NIIHO Y, et al. Pharmacological studies on puerariae flos III: protective effects of kakkalide on ethanol-induced lethality and acute hepatic injury in mice[J]. *Journal of Pharmacy & Pharmacology*, 2011, 49(8): 831-833. DOI:10.1111/j.2042-7158.1997.tb06122.x.
- [21] 高名利. 玉米肽葛花异黄酮及其复合物对乙醇脱氢酶活性的影响[D]. 吉林: 吉林农业大学, 2012.
- [22] 曾丽, 李诚, 彭海鑫, 等. 酸奶中超氧化物歧化酶对模拟胃肠道消化液的稳定性[J]. *食品科学*, 2014, 35(9): 274-278. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201409054.
- [23] 黄佳琦, 杨士花, 初雅洁, 等. 老黑谷米色素的提取工艺优化及体外抗氧化活性分析[J]. *食品科学*, 2016, 37(2): 19-24. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201602004.
- [24] AGRAWAL H, JOSHI R, GUPTA M. Isolation and characterisation of enzymatic hydrolysed peptides with antioxidant activities from green tender sorghum[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2017, 84: 608-616. DOI:10.1016/j.lwt.2017.06.036.
- [25] SWINNEN S, SCHAERLAECEN K, PAIS T, et al. Identification of novel causative genes determining the complex trait of high ethanol tolerance in yeast using pooled-segregant whole-genome sequence analysis[J]. *Genome Research*, 2012, 22(5): 975-984. DOI:10.1101/gr.131698.111.
- [26] KITICHANTAROPAS Y, BOONCHIRD C, SUGIYAMA M, et al. Cellular mechanisms contributing to multiple stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* strains with potential use in high-temperature ethanol fermentation[J]. *AMB Express*, 2016, 6(1): 107. DOI:10.11-86/s13568-016-0285-x.
- [27] SANCHEZ Z, ELENA, FERNANDE L, et al. *In vitro* evaluation of "horchata" co-products as carbon source for probiotic bacteria growth[J]. *Food and Bioproducts Processing*, 2013, 91(3): 279-286. DOI:10.1016/j.fbp.2012.11.003.
- [28] 陈亚霞, 赵红岩. 黑曲霉鲜曲生产葛根素的工艺[J]. *农产品加工(下半月)*, 2015(19): 32-33; 36. DOI:10.3969/j.issn.1671-9646(X).2015.10.009.
- [29] 康连虎, 卞宝国, 李吕木, 等. 发酵小麦制酒精残渣中寡肽的抗氧化及免疫活性[J]. *食品科学*, 2016, 37(5): 180-185. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201605032.
- [30] 李文哲, 芦洁, 孙晓宇, 等. 几种中药提取物和药物对乙醇脱氢酶活性影响的研究[J]. *中药材*, 2006, 29(8): 816-818. DOI:10.3321/j.issn.1001-4454.2006.08.027.
- [31] 王洁, 周璐, 潘晓薇, 等. 葛根、葛花、枳椇子混合物对小鼠急性酒精中毒醒酒作用的研究[J]. *药学实践杂志*, 2017, 35(5): 398-401. DOI:10.3969/j.issn.1006-0111.2017.05.003.
- [32] PERFUMI M, MASSI M, GUERRA M C, et al. Effect of *Pueraria lobata* (wild) on ethanol intake of alcohol-preferring rats[J]. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 1998, 12(S1): S35-S38. DOI:10.1002/(SICI)1099-1573(1998)12:1%2B3.0.CO;2-2.
- [33] 谭珍媛, 黄兴振, 梁秋云, 等. 葛花醒酒护肝方水提取物对醉酒小鼠的解酒护肝作用研究及其急性毒性初步评价[J]. *广西中医药大学学报*, 2017, 20(4): 5-8.
- [34] ZHAO Z G, ZHANG L L, NIU C Y, et al. Exogenous normal lymph reduces liver injury induced by lipopolysaccharides in rats[J]. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2014, 47(2): 128-134. DOI:10.1590/1414-431X20133280.