

一株具降胆固醇功能的海洋源植物乳杆菌的筛选及其益生性能分析

万婧惊, 罗曼, 黄仕新, 王青华, 唐旭, 徐长安
(自然资源部第三海洋研究所, 福建厦门 361005)

摘要: 本文采用邻苯二甲醛法从喙鲸内脏中筛选分离出一株高效降胆固醇能力的乳酸菌 HJ-S2, 考察并研究了乳酸菌 HJ-S2 的体外益生性能。通过耐酸、耐胆盐测定菌株的益生作用, 研究了其对致病菌的抑菌作用及对人结肠癌细胞 HT-29 的粘附能力, 利用形态学、API50CH 和 16S rDNA 对菌株进行鉴定。乳酸菌 HJ-S2 体外降胆固醇能力达到 48.82%, 在 pH 值 3 的酸性环境中培养 3h 耐受率达到 82.73%, 在含 0.3% 的胆盐环境中培养 3h 耐受率达 80.62%。菌株代谢物对致病菌大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌均有一定的抑菌作用, 且菌株对人结肠癌细胞 HT-29 很强的粘附能力, 粘附细菌数为 132.52, 经鉴定为植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum*, 并命名为 HJ-S2 (CGMCC NO: 17720)。筛选得到的植物乳杆菌 HJ-S2 体外具有高效降胆固醇能力, 可进一步开发为功能性微生态制剂。

关键词: 海洋源植物乳杆菌; 喙鲸; 降胆固醇; 益生作用; 鉴定

文章编号: 1673-9078(2020)02-122-128

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.2.018

Screening of a Marine *Lactobacillus plantarum* with Cholesterol-lowering Effect

WAN Jing-liang, LUO Man, HUANG Shi-xin, WANG Qing-hua, TANG Xu, XU Chang-an
(Third Institute of Oceanography, Ministry of Natural Resources, Xiamen 361005, China)

Abstract: In this work, a strain of lactic acid bacteria HJ-S2 with high effective cholesterol-lowering was isolated from Beak Whale viscera using *o*-benzaldehyde method, and the probiotic performance of *Lactobacillus plantarum* HJ-S2 were investigated *in vitro*. Acid-resistant and cholestase-tolerant were carried out to detect the probiotic performance of the strain, and antibacterial effect on pathogenic bacteria and adhesion ability to human colon cancer cell HT-29 were also studied. Morphology, API50CH and 16S rDNA were used to identify the strain. The results showed that the cholesterol-lowering rate of this lactic acid bacteria HJ-S2 was 48.82% *in vitro*. Under being cultured for 3 h at pH 3 or in solvent containing 0.3% bile salt, the tolerance rate reached 82.73% and 80.62% respectively. The result of antibacterial analysis suggested metabolites of the strain HJ-S2 have certain inhibitory effect on *E.coli*, *S. aureus* and *Salmonella*. Analysis of adhesion to human colon cancer cell HT-29 of 132.52. The strain was identified as *Lactobacillus plantarum* and labeled as HJ-S2 (CGMCC NO: 17720). The *Lactobacillus plantarum* HJ-S2 has effective high cholesterol-lowering and can provide a reference for further micro-ecological agent development.

Key words: marine *Lactobacillus plantarum*; beaked whale; cholesterol lowering; probiotic; identification

随着人们生活水平不断提高, 高血压、冠心病、动脉硬化等心脑血管疾病的发病率逐年上升, 严重影

收稿日期: 2019-09-12

基金项目: 厦门市海洋经济创新发展示范项目(16GZY009SF05, 16GZP017SF06); 福建省海洋经济发展补助资金项目(FJHJF-L-2018-5); 自然资源部第三海洋研究所基本科研业务费项目(海三科 2017027); 烟台市海洋经济创新发展示范项目(YHXC-SW-L-201703)

作者简介: 万婧惊(1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 海洋微生物资源开发利用

通讯作者: 唐旭(1974-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 海洋微生物资源开发利用

响着人类的健康, 而血清胆固醇水平过高则是引起这一系列疾病的重要因素之一^[1]。流行病学和临床研究表明, 血清胆固醇水平和心脑血管疾病的发生呈明显正相关性, 血清胆固醇水平每高出正常水平 1 mmol, 导致心脑血管疾病的风险便增加约 35%^[2]。

乳酸菌(*Lactic acid bacteria*, LAB)是指一群发酵糖类产生大量乳酸的无芽孢, 革兰氏染色阳性细菌的总称, 为原核生物, 是公认的安全微生物。近些年的研究表明^[3], 定殖肠道中的有益乳酸菌群具有多种保健作用: 维持微生态平衡和肠道机能, 缓解乳糖不耐症, 增强机体免疫力, 改善肝功能, 降低血清胆固

醇, 增强免疫功能以及抗肿瘤等作用。越来越多研究表明, 乳酸菌可以改善体内脂质代谢, 降低血清胆固醇含量。Oh 等^[4]通过体外试验展示了从传统发酵小米酒中分离所得乳酸菌作为益生菌制剂用于在发酵工业的中的潜在用途。Kim 等^[5]通过动物实验表明乳酸菌能显著降低高血脂症大鼠的血清胆固醇水平, 李昵等^[6]、蒲博等^[7]、丁苗等^[8]通过一系列研究证实了乳酸菌在体内的降解胆固醇功能。

针对一系列心脑血管疾病, 筛选出具有降胆固醇效果的益生菌, 用于调节血脂水平, 预防心脑血管疾病成为近几年研究热点。目前大部分研究报道主要集中在陆源益生菌株, 唐雅茹等^[9]、曾小群等^[10]、香卫钦等^[11]、潘道东等^[12]筛选出的高效降胆固醇乳酸菌株来源于发酵乳、新鲜牛粪、萝卜干、成人粪便、市售乳制品等陆地来源, 而海洋来源的益生菌株鲜有报道。本文从深海来源样品中筛选获得了一株具有高效降胆固醇潜力的乳酸菌株, 并对其进行鉴定, 通过耐酸、耐胆盐测定菌株的益生作用, 研究了其对致病菌的抑菌特性及对人结肠癌细胞 HT-29 的粘附能力, 为后期开发降胆固醇微生态制剂提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

筛选目标菌的样品取自 2015 年 8 月搁浅于长乐海滩的喙鲸的肠道内含物。无菌操作取样送至本实验室 -20 °C 保存备用。鼠李糖乳杆菌 LGG (ATCC7469), 购自广东环凯微生物科技有限公司。HT-29 细胞由中国科学院干细胞库提供。大肠杆菌和金黄色葡萄球菌由本实验室提供, 沙门式菌由中国海洋微生物菌种保藏管理中心 MCCC 提供。

1.1.2 培养基

LB 培养基, MRS 培养基, MRS-CHOL 培养基(1 L): 称取 MRS 培养基 54 g, 胆固醇 1.0 g, 吐温 20 mL, 牛胆盐 3.0 g。将 1.0 g 胆固醇置于 20 mL 吐温 80 中加热至沸腾后使其溶解, 随后趁热缓慢倒入培养基中, 呈胶束溶液状态, 此培养基的颜色呈不透明的淡黄色。配制好的培养基 121 °C 灭菌 20 min 后趁热将试管晃动或上下颠倒振荡, 以使该胶状物完全溶解, 置于室温中自然冷却, 放置备用。

1.1.3 主要试剂及仪器

实验试剂: 人结肠癌细胞 HT-29, 中国科学院上海生命科学研究院; 胆固醇 30% 过氧化氢溶液, 国药集团化学试剂有限公司; DMEM 营养液, Gibco 公司;

胎牛血清, 浙江天杭生物科技有限公司; 牛胆盐, 广东环凯有限公司; 巯基乙酸钠(分析纯), 阿拉丁试剂有限公司; 邻苯二甲醛, 麦克林试剂公司; 吐温 80 冰乙酸、浓硫酸, 西陇化工股份有限公司; API 50 CHL 试剂条, 法国梅里埃公司; 革兰氏染色试剂盒, 青岛海博生物有限公司; 细菌基因总 DNA 试剂盒, 天根生化科技有限公司。

实验仪器: Spectramax M5 酶标仪, 美国 Molecular Devices 公司; 热电 3111 二氧化碳培养箱, 美国 Thermo 有限公司; 恒温培养箱, 宁波莱福科技有限公司; SW-CJ-1FD 超净工作台, 苏州净化设备有限公司; GR85DF 高压蒸汽灭菌锅, 致微(ZEALWAY)仪器有限公司; DYY-6D 电泳仪, 北京六一生物科技有限公司; pH 计, 赛多利斯(科学)仪器有限公司; 恒温摇床, 苏州培英实验设备有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 乳酸菌的分离纯化

取适量样品混合无菌水研磨均匀, 吸取 1 mL 研磨液转移至含 9.0 mL 的 0.9% 灭菌生理盐水的试管中, 震荡摇匀。用灭菌生理盐水梯度稀释, 从 10^{-1} 到 10^{-6} , 每个稀释梯度吸取 0.15 mL 涂布于 MRS (含碳酸钙) 平板培养基上, 置于 37 °C 恒温厌氧培养 36~72 h。根据菌落的颜色、大小、光泽、透明程度等, 挑取有透明圈的单菌落并于 MRS 平板上进行划线纯化 3 次, 记录菌落形态特征。将纯化菌株进行革兰氏染色、油镜和过氧化氢酶实验, 凡是革兰氏染色阳性, 过氧化氢酶阴性的菌株定为疑似乳酸菌, 将纯化后菌株接种于 MRS 斜面培养基上培养, 4 °C 保存备用。

1.2.2 降胆固醇功能性初筛

采用邻苯二甲醛法^[13]对待测菌株进行降胆固醇能力的筛选。

从 1.2.1 中分离纯化得到的疑似乳酸菌斜面培养基中挑取单菌落于 MRS 液体培养基中活化, 连续活化 2 次后, 按 2% 接种量接种到 MRS-CHOL 培养基中, 于 37 °C 厌氧培养 24 h 后, 取 1 mL 发酵菌液, 离心 (8000 r/min, 10 min) 后取上清液, 采用邻苯二甲醛法测定上清液中胆固醇含量, 按公式 (1) 计算降胆固醇率。重复实验 3 次求平均值。

$$\text{降胆固醇率}/\% = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中: A_0 为未接种菌株培养上清液 550 nm 波长处吸光度在标准曲线中对应的胆固醇质量浓度; A_1 为分离菌株发酵后培养上清液 550 nm 波长处吸光度在标准曲线中对应的胆固醇质量浓度。

1.2.3 降胆固醇乳酸菌的鉴定分析

1.2.3.1 乳酸菌的形态学鉴定

菌株 HJ-S2 在 MRS 琼脂培养基 37 °C、48 h 培养后, 观察菌株的平板上形态。挑取单个菌落进行革兰氏染色, 在油镜下 100×10 倍数下观察菌体形态。

1.2.3.2 API 50CH 碳水化合物发酵鉴定

挑取保存于平板上 2~3 个菌落混合于 API50 CH 培养基中, 制得浑浊度相当于 2 McFarland 的菌悬浮液, 将此菌悬浮液依次加入 API50 CH 试剂条的孔中, 用甘油覆盖保持厌氧环境, 底盘加入 10 mL 水使其保持湿润的气体环境, 后将试剂条浮于水上, 于恒温培养箱 37 °C 培养 48 h。将结果输入梅里埃系统测定软件, 通过归纳菌株可以发酵的糖种类确定其归属种类。

1.2.3.3 16S rDNA 序列分析法鉴定

采用细菌基因组总 DNA 试剂盒(天根)提取目的细菌的基因组。以提取的乳酸菌 DNA 作模板, 选择通用引物进行 PCR 扩增, 菌株的 16S rDNA PCR 的扩增正向引物为 27F: 5-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3, 反向引物为 1492R: 5-GGTTACCTTGTTAGGACTT-3, 扩增体系为 25 μL。PCR 反应程序如下: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 2 min, 进行 25 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保温。将扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳分离, 有清晰明显的条带。供试菌株 PCR 产物委托上海生工有限公司测序鉴定, 测序结果进行 BLAST 在线分析, 与 GenBank 等数据库中标准菌株对应序列同源性对比后用 Mega 7.0 软件构建系统发育进化树完成乳酸菌的分子鉴定。

1.2.4 菌株的耐酸性实验

用 1 mol/L 盐酸将 MRS 液体培养基的 pH 值分别调为 2.0、3.0、4.0、5.0, 121 °C 灭菌 15 min。将二次活化后的菌液按 2% (V/V) 接种量分别接种于上述 MRS 培养基和普通液体 MRS (pH 6.4) 培养基中, 于 37 °C 恒温培养, 分别在 1 h、2 h、3 h 后取样, 采用稀释涂布平板法测定活菌数, 以 log cfu/mL 记, 测定耐受率, 实验重复 3 次, 以接种了菌液的普通液体 MRS (pH 6.4) 培养基作对照组, 实验重复 3 次。按公式 (2) 计算菌株的耐酸性。

$$\text{耐受率} (\%) = \frac{B_1}{B_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中: B_1 、 B_0 分别为实验组和对照组的活菌数。

1.2.5 菌株的耐胆盐性实验

配置含有 0.3% 胆盐的 MRS 液体培养基, 将二次活化的菌液按 2% (V/V) 接种量分别接种于含有 0.3% 高胆盐 MRS 液体培养基和不加胆盐的 MRS 培养基

中, 于 37 °C 恒温培养, 分别在 1 h、2 h、3 h 取样测定, 采用稀释涂布平板法测定活菌数, 以 log cfu/mL 记, 测定耐受率, 以不加胆盐的 MRS 培养基为对照组, 实验重复 3 次, 按公式 (3) 计算菌株的耐盐性。

$$\text{耐受率} (\%) = \frac{C_1}{C_0} \times 100\% \quad (3)$$

式中: C_1 、 C_0 分别为实验组和对照组的活菌数。

1.2.6 菌株对致病菌的抑菌作用

将连续活化 2 次后的菌株 6000 r/min 离心 10 min, 取上清液经细菌过滤器过滤(滤膜直径为 220 nm), 收集滤液即为乳酸菌代谢产物。菌体沉淀用无菌生理盐水洗涤 3 次再稀释成原菌液浓度。将指示菌致病大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌培养物活化后稀释至 10^8 cfu/mL 后按 1% 的添加量分别混合于 50 °C 的 LB 琼脂培养基中倒平板, 待琼脂凝固后进行打孔, 向孔中加入 100 μL 所筛选菌的发酵液和菌体稀释液, 37 °C 培养 24 h, 测定抑菌圈直径。根据抑菌圈直径大小评价其抑菌效果, 每组实验重复 3 次求平均值。

1.2.7 菌株对 HT-29 细胞的粘附能力测定

在含有 8 mL DMEM 营养液、1% 双抗 (100 μg/mL 青霉素及链霉素)、10% (V/V) 胎牛血清的十二孔板上接种 HT-29 细胞, 置于 5% CO_2 -95% 空气的培养箱中 37 °C 培养, 隔日传代一次; 细胞形成单层细胞后, 加入 0.25% 胰酶溶液 0.5 mL, 以使充分浸润, 消化时间约为 1~3 min, 肉眼观察瓶壁半透明的细胞层, 当见到出现针孔空隙时, 弃去胰酶溶液, 并加入 1 mL DMEM 细胞培养液 (含 10% 胎牛血清、1% 双抗) 终止消化; 然后用 DMEM 营养液将细胞浓度稀释调整至 2×10^5 cell/mL, 并将其分装于含有 DMEM 营养液且底部放有无菌盖玻片的 12 孔组织培养板中, 每孔 1 mL, 于 5% CO_2 -95% 空气的培养箱中 37 °C 静置培养, 隔天换液一次使其长成致密单层细胞; 将试验菌株在 MRS 液体培养基中 37 °C 培养 24 h, 连续活化培养三代后, 离心收集菌体, 用无菌 PBS 缓冲液洗涤菌体, 并制成含菌数为 10^9 /mL 的菌悬液; 在含有细胞悬浮液的孔板中, 每孔加入 0.5 mL 菌悬液, 每株菌均设三重, 5% CO_2 -95% 的空气环境中 37 °C 培养 1.5 h, 同时设空白对照组 (无细胞悬液仅有菌悬液混合液) 及阳性对照 (细胞悬液与鼠李糖李杆菌 LGG 混合); 培养结束后, 用无菌 PBS 缓冲液洗菌 3 遍, 洗去未结合的菌体, 然后利用 10% (V/V) 的甲醛溶液固定 2 h, 无菌 PBS 缓冲液洗 3 遍; 取出盖玻片自然干燥, 革兰氏染色, 显微镜下油镜 (1000×) 观察。随机选取 20 个视野记录其中的细胞数和粘附菌体数量, 用每个细胞上黏附的菌体数, 代表菌体的黏附能力。

1.3 数据统计分析

采用 Excel 2013 软件分析数据，每个试验重复 3 次，采用统计学软件 SPASS 19.0 软件进行差异显著性分析，当 $p < 0.05$ 时，差异被认为是有意义的，结果表

示为平均值±标准差，采用 Origin 8.0 软件制图。

2 结果与讨论

2.1 菌株的降胆固醇能力筛选结果

表 1 菌株的筛选结果

Table 1 Screening results of strains

菌株编号	菌落形态	油镜下形态	降解率/%
HJ-F1	透明，小，圆形，光泽	杆状	30.61±0.42
HJ-S2	白色，中等大小，略有光泽	杆状	48.82±0.21
HJ-W33	透明，小，点状，有光泽	球状	40.69±0.31
HJ-W64	淡黄色，中等大小，圆形，有光泽	球状	10.42±0.13
HJ-W35	透明，小，点状，光泽	杆状	25.93±0.15
HJ-C12	乳白色，小，圆形，无光泽	球状	18.62±0.07
HJ-W36	透明，小，点状，光泽	球状	30.72±0.05
HJ-W67	乳白色，中等大小，圆形无光泽	球状	24.81±0.08
HJ-W69	乳黄色，中等大小，圆形，光泽	球状	28.71±0.91
HJ-10	黄色，小，圆形，无光泽	球状	40.78±0.21

按 1.2.2 方法从喙鲸内脏中筛选出具有降胆固醇能力的菌株 10 株，结果如表 1 所示。此 10 株菌为革兰氏染色阳性、球状或杆状、过氧化氢酶试验阴性的细菌，初步判定为乳酸菌属。采用邻苯二甲醛法，测定所筛选 10 株乳酸菌胆固醇降解率。其中降解率小于 20% 有两株菌，降解率在 20%~30% 间有五株菌，降解率高于在 40% 以上有三株菌，编号为 HJ-S2, HJ-W33, HJ-10, 体外胆固醇降解率分别为 48.82%、40.69%、40.78%，其中 HJ-S2 的降解率高于范颖等^[14]、郭晶晶等^[15]、Shehata 等^[16]分离获得的乳酸菌，具有较高的后续开发价值。

μm，圆端直杆状，单个，成对或成短链状。



图 1 菌株 HJ-S2 的菌落形态

Fig.1 Colony morphology of strain HJ-S2

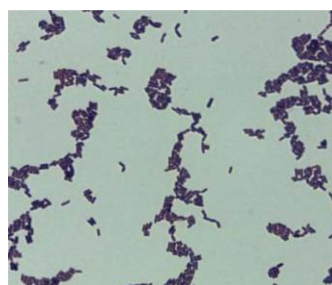


图 2 菌株 HJ-S2 的菌体形态

Fig.2 Thallus morphology of strain HJ-S2

2.2 降胆固醇乳酸菌的鉴定

2.2.1 菌株的形态学鉴定

菌株 HJ-S2 在 MRS 琼脂培养基 37 °C、48 h 培养后，观察菌株的平板上形态，结果如图 1 所示，该菌株菌落直径 0.5~2 mm，颜色为乳白色，菌落湿润，边缘整齐，呈圆形突起。菌株进行革兰氏染色后于显微镜油镜下观察细菌形态特征，结果如图 2 所示，其为无芽孢的革兰氏阳性杆菌，宽 0.9~1.2 μm，长 3.0~8.0

2.2.2 菌株 API 50 CH 碳水化合物发酵鉴定

表 2 乳酸菌 HJ-S2 API 50 CH 鉴定结果

Table 2 The API 50 CH result of strain HJ-S2

碳水化合物	HJ-S2	碳水化合物	HJ-S2	碳水化合物	HJ-S2	碳水化合物	HJ-S2	碳水化合物	HJ-S2
S 甘露醇	+	D-葡萄糖	+	山梨醇	-	D-麦芽糖	+	木糖醇	-
赤藻糖醇	-	D-果糖	+	甲基-D-吡喃甘露糖苷	-	D-乳糖	-	D-龙胆二糖	+
D-阿拉伯糖	-	D-甘露糖	+	甲基-D-吡喃葡萄糖苷	-	D-蜜二糖	-	D-土伦糖	+

转下页

接上页

L-阿拉伯糖	+	L-山梨糖	-	N-乙酰-葡糖胺	-	D-蔗糖	+	D-来苏糖	-
D-核糖	+	L-鼠李糖	-	苦杏仁甙	+	D-海藻糖	+	D-塔格糖	-
D-木糖	-	卫茅醇	-	ARBULIN	+	菊糖	-	D-岩藻糖	-
L-木糖	-	肌醇	-	七叶灵柠檬酸铁铵	+	D-松三糖	+	L-岩藻糖	-
D-侧金盏花醇 I	-	甘露醇	-	2-酮基-葡萄糖酸盐	-	D-棉子糖	-	D-阿拉伯糖	-
葡萄糖酸钾	+	D-纤维二糖	+	5-酮基-葡萄糖酸盐	+	淀粉	+	L-阿拉伯糖	-
D-半乳糖	+	水杨苷	+	甲基-βD-吡喃木糖苷	-	糖原	+		

注：+为阳性；-为阴性。

按 1.2.3.2 利用 API50 CH 碳水化合物发酵对 HJ-S2 菌株进行鉴定。结果如表 2 所示，将 49 种碳水化合物发酵结果输入 API 数据库进行比对分析，该菌株鉴定为植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)，将其命名为植物乳杆菌 HJ-S2。

2.2.3 菌株 16S rDNA 鉴定结果

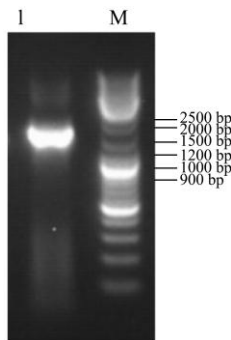


图 3 菌株 HJ-S2 的 PCR 产物电泳图

Fig.3 Electrophoretograms of PCR products of strain HJ-S2

注：M 为 DNA Marker；泳道 1 为 HJ-S2。

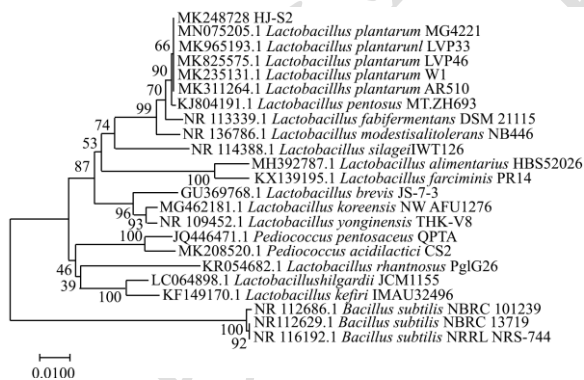


图 4 菌株 HJ-S2 的系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree of strain HJ-S2

按 1.2.3.3 方法，采用提取菌株 HJ-S2 的基因组 DNA 为模板，对菌株 HJ-S2 的 PCR 产物电泳条带进行分析。结果如图 3 所示，菌株 PCR 产物大小为 1.5 Kb 左右，符合 16S rRNA 序列长度，与理论值相吻合。选用通用引物 (27F, 1492R) 进行 16S rDNA 的扩增，扩增后的 PCR 产物测序结果与已知标准菌株的对应序列进行同源性对比，BLAST 结果显示该菌株序列与

登录号 LC379973.1、CP0237771.1 及 MH779888.1 等植物乳杆菌的 16S rDNA 基因组序列相似性均为 100%。将此菌株序列上传至 NCBI 系统，得到菌株的登录号为 MK248728。BLAST 比对鉴定结果也证实了菌株 HJ-S2 为植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum*，并采用 MEGA 7.0 软件构建了其系统发育树，结果如图 4 所示。

2.3 菌株的耐酸性实验

益生菌在体内主要定殖在肠道部位，经口服进入体内须经过胃才能到达肠道，因此必须耐受强酸的胃环境。进食前后胃液的 pH 值有较大变化，空腹时人体正常胃液 pH 值在 0.9~1.5，进食后由于食物的中和作用，pH 值上升至 3 或更高一些，但在消化过程中随着胃酸的分泌，胃液 pH 值又下降至 0.9~1.5。由于进食种类不同，食物在胃中的消化停留时间也各有不同，一般食物在胃中停留 2~4 h^[17]。

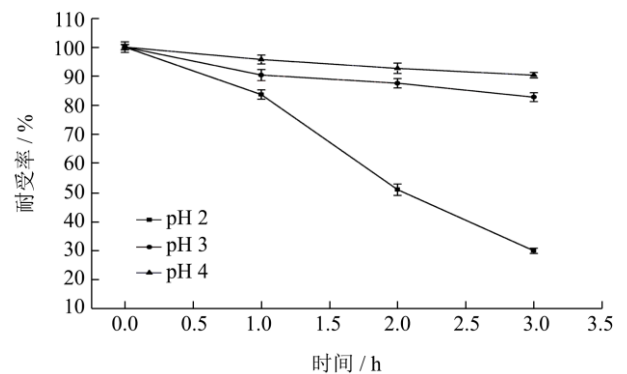


图 5 菌株 HJ-S2 酸耐受性

Fig.5 Tolerance of strain HJ-S2 to acid

将菌株 HJ-S2 接种于 pH 分别为 2.0、3.0、4.0 的酸性 MRS 液体培养基中检测其对胃酸的耐受性，以正常 MRS 培养基 (pH 6.4) 作为对照。结果如图 5 所示，乳酸菌 HJ-S2 的酸耐受率随着 pH 的降低而减少，但都能存活 3 h 以上，具有较好的耐受性。正常 MRS 培养基的生长情况相比，菌株 HJ-S2 在 pH 为 2 的酸性培养基培养 1 h 后菌株耐受率急速下降，在 3 h 后降到 29.61%。在 pH 3 和 pH 4 的环境中，菌株生长状况

良好, 优于 pH 2 环境而略低于正常 MRS (pH 6.4) 培养基环境, 耐受率分别达到 82.73%、90.31%。说明该菌株 HJ-S2 对低 pH 的酸性环境有很好的耐受性, 能够耐受部分胃环境并进入肠道。

2.4 菌株的耐胆盐性实验

人体肠道的胆盐浓度通常维持在 0.03%~0.3% 范围内波动, 且消化时间一般为 3 h^[18], 研究表明适当胆盐浓度下会促进乳酸菌对胆固醇的吸收^[19], 因此测定菌株高浓度胆盐耐受性是衡量菌株能否在肠道存活并发挥重要作用的重要依据。

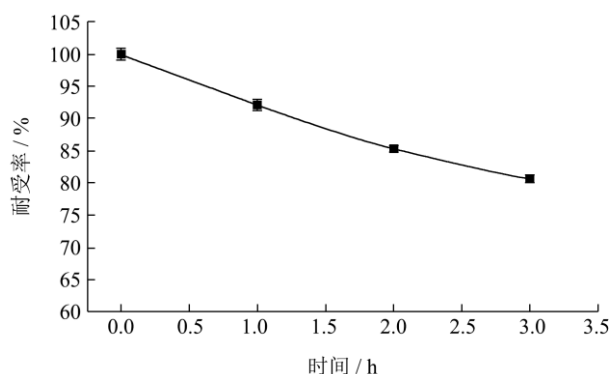


图 6 菌株 HJ-S2 胆盐耐受性

Fig.6 Tolerance of strain HJ-S2 to bile salt

选用 0.30% 的胆盐培养基, 以未添加胆盐的 MRS 培养基作为对照, 37 °C 培养 3 h, 分别在 1 h、2 h、3 h 取样测定发酵液 OD₆₀₀, 计算菌株的胆盐耐受性。结果如图 6 所示, 菌株 HJ-S2 在 0.30% 的胆盐培养基下培养 3 h 的存活率降为 80.62%, 说明该菌株对胆盐具有较强的耐受性, 为该菌能在肠道内存活并发挥作用提供了生存保障。

2.5 菌株对致病菌的抑菌作用

表 3 菌株 HJ-S2 的抑菌活性

Table 3 Antimicrobial activity of strain HJ-S2

植物乳杆菌 HJ-S2	抑菌圈大小/mm		
	大肠杆菌 <i>E.coli</i>	金黄色葡萄 球菌 <i>S.areas</i>	沙门氏菌 <i>Salmonella</i>
菌体上清	17.75±0.52	14.09±0.14	13.59±0.21
菌体稀释液	16.53±0.31	12.40±0.61	13.81±0.43

植物乳杆菌 HJ-S2 对三种致病菌的抑菌作用结果如表 3 所示。菌体上清对 *E.coli*、*S.areas* 和 *Salmonella* 的抑菌圈直径分别为 17.75 mm、14.09 mm 和 13.59 mm, 菌体稀释液对 *E.coli*、*S.areas* 和 *Salmonella* 的抑菌圈分别为 16.53 mm、12.40 mm 和 13.81 mm, 二者对致病菌大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌都有显著的抑制作用。对大肠杆菌的抑菌效果最好, 其

次是金黄色葡萄球菌和沙门氏菌。菌体上清的抑制作用略高于菌体稀释液, 说明其抗菌作用和菌株分泌的代谢产物有关, 植物乳杆菌 HJ-S2 在生长过程中可能产生了一些抑菌物质, 如乳酸、细菌素和类细菌素等, 对致病菌起到了抑制作用。

2.6 菌株对 HT-29 细胞的粘附能力测定

益生菌在宿主的胃肠道保持一定的数量才能发挥益生作用^[20], 且前提是必须能黏附在上皮细胞或肠黏膜表面^[21], 因此, 对肠上皮细胞的黏附能力已经成为筛选、评价益生菌益生特性的重要指标之一。有研究指出, 乳杆菌对肠道的黏附能力与其表面蛋白、上皮粘液及其自身性能等有重要联系^[22]。人结肠癌细胞 HT-29 常被用作检测细胞粘附能力的模型细胞, 本文选用人结肠癌细胞系 HT-29 细胞进行黏附试验, 结果如表 4 所示。不同菌株对 HT-29 细胞的黏附能力不同。菌株 HJ-S2 与细胞共培养时大量菌体粘附在细胞边缘上, 黏附细菌数为 132.52±5.42, 是阳性对照鼠李糖乳杆菌 LGG 的 3.62 倍。表明菌株 HJ-S2 具有较强的肠道定植能力, 为其发挥肠道益生作用提供了物质基础。

表 4 菌株 HJ-S2 的黏附率

Table 4 The adhere rates of stain HJ-S2

菌株	黏附细菌数
HJ-S2	132.52±0.42
LGG	36.60±0.21

3 结论

本文测定了分离自喙鲸内脏 10 株乳酸菌的降胆固醇能力, 其中 3 株胆固醇降解率在 40% 以上, 降解能力最高的是菌株 HJ-S2 达到 48.82%。经形态学鉴定、API50CH、16S rDNA 鉴定确定菌株 HJ-S2 为植物乳杆菌。菌株 HJ-S2 酸耐受试验表明具有较强的耐酸能力, pH 2.0 处理 3 h 后, 仍具有一定的活菌数, 而在 pH 3.0 的酸环境中耐受率达到 82.73%, 这能够保证足够数量的活菌体顺利通过胃酸环境到达肠内。胆盐耐受试验可以看出, 菌株 HJ-S2 抗胆盐能力较好, 在 0.3% 胆盐环境中耐受率达到 80.62%, 说明到达小肠部位的菌体绝大多数能够耐受住胆酸环境存活生长。菌株分泌物对三种致病菌均有一定的抑菌作用, 对大肠杆菌的抑菌效果最好。此外菌株 HJ-S2 对人结肠癌细胞 HT-29 的粘附能力也很强, 粘附细菌数为 132.52, 是 LGG 鼠李糖乳杆菌的 3.62 倍, 说明该菌株在肠内的定植能力强。近几年的研究报道中, 已分离鉴定出具有不同程度降胆固醇作用的陆源嗜酸乳杆菌、植物乳

杆菌^[23]等多个菌株,而本文筛选获得的海洋源植物乳杆菌 HJ-S2 是一株安全高效降胆固醇的益生菌株,可减少肠壁对胆固醇的吸收,具有较高的进一步应用开发价值。

参考文献

- [1] 柳翰凌,周雨霞,乌尼,等.乳制品中具有降胆固醇功能乳酸菌的体外筛选[J].乳业科学与技术,2006,28(1):9-11
LIU Han-ling, ZHOU Yu-xia, WU Ni, et al. *In vitro* screening of cholesterol-removed LAB from dairy products [J]. Dairy Science and Technology, 2006, 28(1): 9-11
- [2] Tosteson H, Ridker P M. The primary prevention of myocardial infarction [J]. European Journal of Haematology, 2010, 25(S38): 38-44
- [3] Liong M, Shah N. Optimization of cholesterol removal, growth and fermentation patterns of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4962 in the presence of mannitol, fructo-oligosaccharide and inulin: A response surface methodology approach [J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 98(5): 1115-1126
- [4] Oh Y J, Jung D S. Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus* and *Pediococcus* strains isolated from Omegisool, a traditionally fermented millet? alcoholic beverage in Korea [J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 63(1): 437-444
- [5] Kim S J, Park S H, Sin H S, et al. Hypocholesterolemic effects of probiotic mixture on diet-induced hypercholesterolemic rats [J]. Nutrients, 2017, 9(3): 293
- [6] 李呢,苏国成,周常义,等.降胆固醇乳酸菌的应用及其机理研究进展[J].中国微生态学杂志, 2012,24(5):460-465
LI Ni, SU Guo-cheng, ZHOU Chang-yi, et al. Application and mechanism of cholesterol-lowering *Lactobacillus* [J]. Chinese Journal of Microecology, 2012, 24(5): 460-465
- [7] 蒲博,张驰翔,王周,等.乳酸菌降胆固醇作用及其机理的研究进展[J].中国酿造,2014,33(7):5-9
PU Bo, ZHANG Chi-xiang, WANG Zhou, et al. Progress on cholesterol-lowering effect and mechanism of lactic acid bacteria [J]. Chinese Brewing, 2014, 33(7): 5-9
- [8] 丁苗,刘洋,葛平珍,等.发酵酸肉中降胆固醇乳酸菌的筛选、鉴定及降胆固醇作用[J].食品科学, 2014,35(19):203-207
DING Miao, LIU Yang, GE Ping-zhen, et al. Screening and identification and cholesterol-lowering lactic acid bacteria from fermented sour meat [J]. Food Science, 2014, 35(19): 203-207
- [9] 唐雅茹,于上富,国立东,等.一株降胆固醇乳杆菌的筛选及其益生作用的研究[J].食品工业科技,2016,37(1):142-144
TANG Ya-ru, YU Shang-fu, GUO Li-dong, et al. Screening and study on probiotic characteristics of a cholesterol-lowering *Lactobacillus* [J]. Food Industry Science and Technology, 2016, 37(1): 142-144
- [10] 曾小群,潘道东,杨瑶,等.一株高效降解胆固醇乳酸菌的筛选鉴定及其益生潜能初探[J].食品科学,2009,30(21):241-245
ZENG Xiao-qun, PAN Dao-dong, YANG-Yao, et al. A high cholesterol-reducing lactic acid bacterial strain: Screening, identification, and probiotic potential evaluation [J]. Food Science, 2009, 30(21): 241-245
- [11] 香卫钦,于舒宁,张耀林,等.一株能降解胆固醇的乳酸菌的选育[J].生物技术,2001,11(5):9-10
XIANG Wei-qin, YU Shu-ning, ZHANG Yao-lin, et al. Degrading of cholesterol by a strain of lactic acid bacteria [J]. Biotechnology, 2001, 11(5): 9-10
- [12] 潘道东,张德珍.降胆固醇乳酸菌的筛选及其降胆固醇活性研究[J].食品科学,2005,26(6):233-237
PAN Dao-dong, ZHANG De-zhen. Screening of cholesterol-reducing lactic acid bacteria and its activity in cholesterol-reducing [J]. Food Science, 2005, 26(6): 233-237
- [13] Gopal P K, Prasad J, Smart J, et al. *In vitro* adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli* [J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 67(3): 207-216
- [14] 范颖,陈思涵,党芳芳,等.一株降胆固醇乳酸菌的筛选及其在模拟消化环境活性的研究[J].中国乳品工业,2018,46(9):4-7
FAN Ying, CHEN Si-han, DANG Fang-fang, et al. Screening and study on activity in simulated gastrointestinal condition of a cholesterol-lowering lactic acid bacteria [J]. China dairy industry, 2018, 46(9): 4-7
- [15] 郭晶晶,张鹏飞,曹承旭,等.自然发酵豆酱中降胆固醇乳酸菌的筛选鉴定及对大鼠血清胆固醇的影响[J].食品与发酵工业,2019:1-12
GUO Jing-jing, ZHANG Peng-fei, CAO Cheng-xu, et al. Screening and identification of cholesterol-lowering lactic acid bacteria in naturally fermented soybean paste and its effect on serum cholesterol in rats [J]. Food and Fermentation industry, 2019: 1-12