

具有降胆固醇功能的罗伊氏乳杆菌的筛选及其益生作用

余萍, 矫艳平*, 张春宇, 赵迪, 宋佳, 王婷婷, 江枫
(汉臣氏(沈阳)儿童制品有限公司, 辽宁沈阳 110000)

摘要: 为获得具有较强降胆固醇功能的益生菌株, 试验从内蒙古呼伦贝尔满洲里通达牧场制作的奶豆腐中筛选分离菌株, 并采用邻苯二甲醛法测定菌株降胆固醇的能力, 从中选出降胆固醇能力强的菌株, 通过形态学鉴定、生理生化及 16S rDNA 对菌株进行鉴定, 并测定了其耐受酸、胆盐和胃肠液的能力。结果筛选分离出 5 株具有降胆固醇功能的菌株, 其中一株菌对胆固醇降解能力最强, 降解率达 50.60%, 经鉴定此菌株为罗伊氏乳杆菌 (*Lactobacillus reuteri*), 将其命名为 HCS02-001 (CGMCC No. 19746); 经对酸、胆盐及胃肠液的耐受试验, 该菌株在 pH 3.0 和 pH 2.0 的环境中培养 17 h 后存活率分别为 86.80% 和 85.52%; 在 0.30%、0.50% 的胆盐浓度环境中培养 17 h 后存活率分别为 97.42% 和 95.17%; 在人工胃液中作用 3 h, 存活率为 96.74%; 在人工肠液中作用 4 h, 存活率高达 98.41%。该研究筛选出了一株具有较好降胆固醇功能的罗伊氏乳杆菌 (*Lactobacillus reuteri*), 其具有较强的耐受酸、胆盐环境和胃肠液的能力, 对关于降胆固醇功能方面的产品研究开发具有重要意义。

关键词: 降胆固醇; 罗伊氏乳杆菌; 筛选; 鉴定; 益生作用

文章编号: 1673-9078(2021)11-106-113

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.11.0403

Screening for Cholesterol-lowering *Lactobacillus reuteri* Strains and Analyzing Their Probiotic Effectiveness

YU Ping, JIAO Yanping*, ZHANG Chunyu, ZHAO Di, SONG Jia, WANG Tingting, JIANG Feng
(High Change (Shenyang) Baby Product Co. Ltd., Shenyang 110000, China)

Abstract: To obtain probiotic strains with significant cholesterol-lowering performance, strains were isolated from quark produced at the Litongda Pasture in Manzhouli, Inner Mongolia. The cholesterol-lowering ability of each strain was determined by the o-phthalaldehyde method, and the strains with strong cholesterol-lowering abilities were selected. The strains were identified based on the morphology, physiology, biochemistry, and 16S rDNA sequences, and their tolerance for acids, bile salts, and gastrointestinal juice was determined. Finally, five cholesterol-lowering strains were obtained, and one of them showed the best ability to lower the cholesterol level, with a degradation rate of 50.60%. This strain was identified as *Lactobacillus reuteri*, and named as HCS02-001 (CGMCC No. 19746). The results of the various tolerance tests were as follows. When the strain was cultured at pH 3.0 and pH 2.0 for 17 h, the final survival rates were 86.80% and 85.52%, respectively. Similarly, the survival rates were 97.42% and 95.17% after the strain was cultured for 17 h in 0.3% and 0.5% bile salts, respectively. In addition, the survival rates were as high as 96.74% and 98.41% after three hours of treatment in artificial gastric juice and four hours of treatment in artificial intestinal juice, respectively. In summary, a strain of *Lactobacillus reuteri* with good cholesterol-lowering performance and showing high tolerance for acids, bile salts, and gastrointestinal juices, had been identified. These findings are of great relevance to the research and development of cholesterol-lowering products.

Key words: cholesterol-lowering performance; *Lactobacillus reuteri*; screening; identification; probiotic effectiveness

引文格式:

余萍, 矫艳平, 张春宇, 等. 具有降胆固醇功能的罗伊氏乳杆菌的筛选及其益生作用[J]. 现代食品科技, 2021, 37(11): 106-113

YU Ping, JIAO Yanping, ZHANG Chunyu, et al. Screening for cholesterol-lowering *Lactobacillus reuteri* strains and analyzing their probiotic effectiveness [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(11): 106-113

收稿日期: 2021-04-13

作者简介: 余萍 (1982-), 女, 高级工程师, 研究方向: 益生菌制剂, E-mail: 80794613@qq.com

通讯作者: 矫艳平 (1989-), 女, 工程师, 研究方向: 益生菌制剂, E-mail: jiaoyanping12@163.com

近年来,随着人们生活水平的不断提高,膳食结构的改变、缺乏运动及不良生活习惯的影响,血脂异常的人群明显增加^[1]。血脂异常主要包括甘油三酯、低密度脂蛋白、胆固醇其中一种或多种水平升高。血清中过高的胆固醇是引起动脉粥样硬化、冠心病等心脑血管疾病重要因素之一^[2,3]。人体血清胆固醇含量比正常水平每升高 1 mmol,人体患冠心病的危险就会增加约 35%^[4]。因此降低血清胆固醇是人们预防心血管疾病的有效措施之一。然而,相关药物价格高且副作用大,利用天然食物或微生物来降低血清胆固醇成为人们研究的热潮^[5]。

益生菌是一类能够定植于宿主肠道内,并能够产生对肠道有害微生物具有抑制作用的乳酸、细菌素及过氧化氢等物质而促进宿主肠道健康的活性微生物的总称,目前被广泛应用于食品和医药领域^[6,7]。以乳酸菌为代表的益生菌是人体不可缺少的有益菌,乳酸菌是一类能够发酵糖类产生乳酸的革兰氏染色阳性无芽孢的细菌,常见的主要有双歧杆菌属和乳杆菌属^[8]。相关研究发现,益生乳酸菌不仅具有维持肠道微生态平衡的作用,有些菌株还具有抗氧化、降胆固醇、调节机体免疫等特殊保健功能^[9-11]。获得具有降胆固醇功能的菌株并能够用于高胆固醇血症的微生物制剂、保健食品的开发,对降低血清胆固醇的治疗具有重要意义。

本研究从奶豆腐样品中分离出 5 株乳杆菌,从中筛选出一株具有降胆固醇能力强的罗伊氏乳杆菌 (*Lactobacillus reuteri*),并对其耐酸、耐胆盐及耐胃肠液方面进行了研究,为进一步开发降胆固醇功能方面的产品应用提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 样品

筛菌样品采样于内蒙古呼伦贝尔满洲里通达牧场制作的奶豆腐,无菌操作取样寄送至本实验室,并于 -20 °C 条件保存备用。

1.1.2 培养基

MRS 培养基: 蛋白胨 10 g/L、牛肉粉 3 g/L、酵母粉 4 g/L、磷酸氢二钾 2 g/L、柠檬酸 2 g/L、乙酸钠 5 g/L、葡萄糖 20 g/L、七水合硫酸镁 0.58 g/L、四水合硫酸锰 0.25 g/L、吐温-80 0.6 g/L、番茄汁 10 mL/L、琼脂粉 20 g/L, pH 调至 6.5; 115 °C, 30 min 灭菌。

改良 MRS 培养基: MRS 培养基中添加碳酸钙 10 g/L、中性红 0.05 g (1%浓度 5 mL), 调 pH 至 5.5; 115 °C, 30 min 灭菌。

高胆固醇培养基 (MRS-CHOL): MRS 培养基中添加巯基乙酸钠 2 g/L、牛胆盐 (进口) 3 g/L、胆固醇 0.1 g/L, pH 调至 6.5; 115 °C, 30 min 灭菌。

1.1.3 主要试剂及仪器

主要试剂: 胆固醇 (C8667 Sigma)、牛胆盐 (TLC Sigma), 西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司; PBS 缓冲溶液 (20X), 生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 无水乙醇 (分析纯), 天津市永大化学试剂有限公司; 冰乙酸 (分析纯 AR)、邻苯二甲醛 (化学纯 CP)、浓硫酸 (分析纯 AR), 中国医药集团有限公司; 硫代乙醇酸钠 (巯基乙酸钠) (分析纯 AR), 上海麦克林生化科技有限公司; 氢氧化钾 (分析纯), 天津市瑞金特化学品有限公司; 正己烷 (分析纯 AR), 天津市恒兴化学试剂制造有限公司。

主要仪器: SW-CJ-2D 双人单面净化工作台, 苏州净化设备有限公司; DHP-500BS 电热恒温培养箱, 北京市永光明医疗仪器厂; LDZX-50KBS 立式压力蒸汽灭菌器, 上海申安医疗器械厂; XSP-10CA 生物显微镜, 上海佑科仪器仪表有限公司; DZKW-S-8 电热恒温水浴锅, 北京市永光明医疗仪器有限公司; SCIENTZ-II D 超声波细胞粉碎机, 宁波新芝生物科技有限公司; Multiskan FC 酶标仪, 美国赛默飞世尔科技有限公司; TGL-16M 低温高速离心机, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; LAI-3DT 厌氧工作站, 上海龙跃仪器设备有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株的分离纯化

取适量样品加入到灭菌的缓冲蛋白胨水培养基中, 混匀后放入 37 °C 培养箱中培养 24~48 h; 然后取 500 μL 培养液加入到 4.5 mL 改良 MRS 培养基中振荡混匀, 用生理盐水进行从 10⁻²~10⁻⁶ 稀释度依次十倍梯度稀释, 每个稀释度分别吸取 100 μL 加入到改良 MRS 固体平板培养基上, 用涂布棒进行涂布, 每个稀释度做两个平板涂布, 然后将平板倒置放入自封袋中, 其中一个再装入厌氧袋中, 均置于入 37 °C 培养箱培养 48 h。

挑取具有目的菌株典型特征 (观察形态、大小、色泽、及其透明度等)、菌落较大、活性较强的单菌落, 于改良 MRS 固体培养基上进行划线纯化培养, 37 °C 培养 24~48 h, 如此反复 2~3 次, 直到划线平皿中菌落特征一致; 将纯化菌株进行革兰氏染色, 显微镜观察及过氧化氢实验, 将革兰氏染色阳性及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 降胆固醇功能性测定

1.2.2.1 胆固醇标准曲线的绘制

制备 1 mg/mL 胆固醇溶液：称取 0.1 g 胆固醇，用无水乙醇定容至 100 mL，用 0.22 μm 有机滤膜过滤除菌后 4 $^{\circ}\text{C}$ 储藏备用。

胆固醇标准溶液配制：分别吸取 50、100、150、200、250、300 μL 1 mg/mL 胆固醇溶液于 10 mL 干净的容量瓶中，用无水乙醇定容，配成 5、10、15、20、25、30 $\mu\text{g/mL}$ 的标准溶液。

吸取胆固醇标准溶液 4 mL 于 50 mL 离心管中，用 60 $^{\circ}\text{C}$ 下氮气吹干仪通氮气流吹干溶剂，加入 4 mL 邻苯二甲醛溶液，震荡，静置 10 min 后，加入 2 mL 浓硫酸，混匀，显色 10 min，用不加胆固醇标准溶液的邻苯二甲醛和浓硫酸为空白调零，测定 550 nm 处的吸光值。以胆固醇浓度 ($\mu\text{g/mL}$) 为横坐标， ΔOD_{550} 为纵坐标，绘制胆固醇标准曲线 (图 1)。

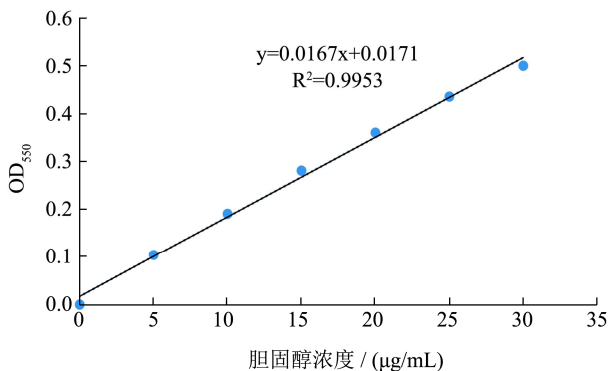


图 1 胆固醇标准曲线

Fig.1 Cholesterol standard curve

1.2.2.2 试验菌株的制备

将 1.2.1 中分离纯化的菌株划线分离出单菌落，挑取单菌落接种于 5 mL MRS 液体培养基中，37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 20 h 后，再次转接至 100 mL MRS 液体培养基中，37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 17 h，4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.2.3 降胆固醇能力的测定

采用邻苯二甲醛比色法^[12,13]来测定菌株的降胆固醇能力。取 1.2.2.2 培养后的菌液按 10 g/L 接种量接种于 50 mL 高胆固醇培养基中，37 $^{\circ}\text{C}$ 厌氧培养 24 h，然后以 8000 r/min 的转速 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min，收集上清液，通过邻苯二甲醛法测定上清液中胆固醇含量。以未接种菌株培养液的高胆固醇培养基做对照。按下面公式 (1) 计算降胆固醇率。重复实验 3 次求平均值。

$$\text{胆固醇去除率}/\% = \frac{C_0 - C}{C_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中：

C_0 ——未接种培养液离心上清液中胆固醇实测浓度， $\mu\text{g/mL}$ ；

C ——接种后发酵液离心上清液中胆固醇实测浓度， $\mu\text{g/mL}$ 。

1.2.3 降胆固醇功能菌株的鉴定

1.2.3.1 形态学特征鉴定

将菌株 HCS02-001 接种至 MRS 琼脂培养基 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h，观察菌株形态。并挑取单个菌落进行革兰氏染色，在生物显微镜下观察菌体形态。

1.2.3.2 生理生化及 16S rDNA 鉴定

菌种生理生化特征鉴定及 16S rDNA 鉴定委托中国科学院微生物研究所完成。

1.2.4 耐酸性试验

将活化三次的菌液按照 10% 的接种量分别接种于空白对照、pH 2.0 和 pH 3.0 的 MRS 培养基中。37 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养，于 17 h 取样，用灭菌的生理盐水进行系列 10 倍稀释，分别取适宜稀释度的菌液 1000 μL 进行活菌计数操作，每个稀释度 2 次重复，37 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 36-48 h 后计数。耐酸试验菌株存活率计算方法按公式 (2) 计算。

$$\text{试验菌株耐酸存活率}(\%) = \frac{\lg(\text{CFU } N_1)}{\lg(\text{CFU } N_0)} \times 100\% \quad (2)$$

式中：

N_1 ——不同 pH 条件培养后取样计数测得的活菌数；

N_0 ——空白对照试验测得的活菌数。

1.2.5 耐胆盐试验

将活化三次的菌液按照 10% 的接种量分别接种于不同胆盐浓度 0.3%、0.5% 的 MRS 液体培养基中，37 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养，于 17 h 取样，用灭菌的生理盐水进行系列 10 倍稀释，分别取适宜稀释度的菌液 1000 μL 进行活菌计数操作，每个稀释度 2 次重复，37 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 36-48 h 后计数。耐胆盐试验菌株存活率计算方法见公式 (3)。

$$\text{试验菌株耐胆盐存活率}(\%) = \frac{\lg(\text{CFU } N_2)}{\lg(\text{CFU } N_0)} \times 100\% \quad (3)$$

式中：

N_2 ——不同胆盐浓度条件培养后取样计数测得的活菌数；

N_0 ——空白对照试验测得的活菌数。

1.2.6 模拟胃液试验

配制人工胃液：取稀盐酸 16.4 mL，加蒸馏水 800 mL；加入胃蛋白酶 10 g (1%， m/V)，摇匀后用蒸馏水稀释至 1000 mL，调节 pH 值至 2.0，0.22 μm 有机滤膜过滤除菌。

将活化三次的菌液振荡摇匀，取 10 mL 菌悬液进行 5 $^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 (5000 $\times g$, 10 min, 5 $^{\circ}\text{C}$)，获得菌泥，用 PBS 缓冲液冲洗 2 次，获得的菌泥重悬于 10 mL 人工胃液中，37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下消化 3 h，分别于 0 h，3 h 取样测活菌数。模拟胃液试验菌株存活率计算方法见公式 (4)。

$$\text{试验菌株模拟胃液试验存活率 (\%)} = \frac{\lg(\text{CFU } N_3)}{\lg(\text{CFU } N')} \times 100\% \quad (4)$$

式中:

N_3 ——模拟胃液中作用 3 h 后取样计数测得的活菌数;

N' ——0 h 取样测得的活菌数。

1.2.7 模拟肠液试验

配制人工肠液: 用 0.1 mol/L 的氢氧化钠溶液将 PBS 缓冲液 pH 调节至 8.0 后灭菌, 再加入 1.0 g/L 的胰蛋白酶使其溶解, 0.22 μm 有机滤膜过滤除菌。

将活化三次的菌液震荡摇匀, 取 10 mL 菌悬液进行 5 $^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 (5000 \times g, 10 min, 5 $^{\circ}\text{C}$), 获得菌泥, 用 PBS 缓冲液冲洗 2 次, 获得的菌泥重悬于 10 mL 人工肠液中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养, 并于 0 h、2 h、4 h 取样测活菌数。模拟肠液试验菌株存活率计算方法见公式 (5)。

$$\text{试验菌株模拟肠液试验存活率 (\%)} = \frac{\lg(\text{CFU } N_4)}{\lg(\text{CFU } N'')} \times 100\% \quad (5)$$

式中:

N_4 ——人工肠液中作用不同时间点取样计数测得的活菌数;

N'' ——0 h 取样测得的活菌数。

1.2.8 数据处理

每个试验重复 3 次平行测定, 数据采用 SPSS 19.0 软件和 Excel 软件进行数据分析, 当 $p < 0.05$ 时, 差异被认为是有意义的, 结果表示为平均值 \pm 标准差。

2 结果与分析

2.1 菌株降胆固醇能力筛选结果

将从样品中分离纯化后的菌株分别按照降胆固醇功能测定方法测定后, 筛选出 5 株具有降胆固醇能力的菌株, 结果见表 1。5 株菌均为革兰氏染色阳性、球状或杆状, 过氧化氢酶阴性, 初步判断为乳酸菌。通过邻苯二甲醛比色法测定胆固醇含量, 结果发现菌株 HCS02-001 的胆固醇降解率最高, 达到 50.6%, 其余 4 株菌的胆固醇降解率在 10%~30% 之间。近些年关于

表 1 菌株筛选结果

Table 1 Results of strain screening

菌株编号	菌落形态	细胞形状	胆固醇降解率/%
HCS200203	圆形, 乳白色, 表面光滑	杆状	21.52 \pm 0.75
HCS200204	白色, 圆形凸起, 表面光滑, 边缘整齐	短粗杆状	19.81 \pm 0.66
HCS200205	圆形凸起, 边缘规则, 白色, 表面光滑	杆状	28.22 \pm 0.33
HCS200206	圆形, 乳白色, 无光泽	球状	14.94 \pm 0.63
HCS02-001	圆形, 白色, 表面光滑	杆状	50.60 \pm 0.54

降胆固醇的益生菌的研究中, 发现多种不同水平的胆固醇降解能力的菌株, 包括嗜酸乳杆菌、植物乳杆菌和罗伊氏乳杆菌等多个菌种^[14-19]。如王今雨等人从传统发酵乳制品中分离出一株胆固醇降解率 32.87% 的植物乳杆菌^[20], 唐雅茹等人从传统发酵食品中筛选出了一株胆固醇降解率 55.71% 的植物乳杆菌^[21], 李尧等人从传统自然发酵食品中筛选分离出 30 株具有降胆固醇功能的乳酸菌菌株, 降解率最高为 37.15%^[22]等, 关于降胆固醇功能菌株的现有研究中, 菌株 HCS02-001 的胆固醇降解能力处于较高水平, 具有较高的开发价值, 故选择菌株 HCS02-001 进行菌种鉴定及益生作用研究。

2.2 降胆固醇功能菌株的鉴定结果

2.2.1 菌株的形态学鉴定

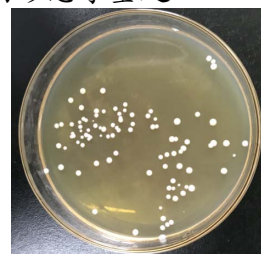


图 2 菌株 HCS02-001 的菌落形态

Fig.2 Colony morphology of strain HCS02-001

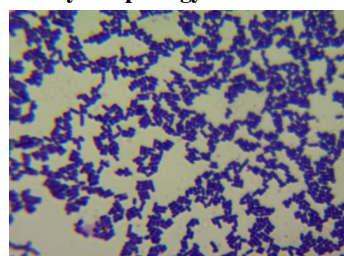


图 3 菌株 HCS02-001 的菌体形态 (16 \times 100)

Fig.3 Morphology of strain HCS02-001

将菌株 HCS02-001 接种至 MRS 琼脂培养基 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h 后观察菌株形态, 结果见图 2。单菌落直径约 1~3 mm, 圆形, 颜色呈白色, 菌落表面光滑, 水润, 不凸起。挑取单个菌落进行革兰氏染色并在生物显微镜下观察菌体形态, 结果如图 3 所示, 革兰氏染色阳性, 短杆状, 长宽比大约为 4:1, 单个或成对出现。

2.2.2 生理生化及 16S rDNA 鉴定结果

菌株 HCS02-001 生理生化鉴定结果见表 2。根据菌种的细胞形态、生理生化特征、16S rDNA 基因序列等实验数据综合分析,参考《伯杰氏系统细菌学手册》^[23]、以及 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 有关研究论文,并通过在美

国生物工程信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI) 查阅国际相关的基因库,将本文的罗伊氏乳杆菌 CGMCC No. 19746 的 16S rDNA 序列与 GenBank 提交菌株序列相似性比较(见表 3),鉴定菌种 HCS02-001 为罗伊氏乳杆菌(*Lactobacillus reuteri*)。16S rRNA 基因序列测定结果见图 4 所示。

表 2 菌株 HCS02-001 生理生化实验结果

Table 2 Physiological and biochemical test results of strain HCS02-001

实验项目	结果	实验项目	结果	实验项目	结果
氧化酶	-	接触酶	-	菊糖	-
甘油	-	肌醇	-	松三糖	-
赤藓醇	-	甘露醇	-	棉子糖	+
D-阿拉伯糖	-	山梨醇	-	淀粉	-
L-阿拉伯糖	+	β -甲基-D-甘露糖甙	-	糖原	-
D-核糖	-	β -甲基-D-葡萄糖甙	-	木糖醇	-
D-木糖	-	N-乙酰-葡糖胺	-	龙胆二糖	-
L-木糖	-	苦杏仁甙	-	D-松二糖	-
阿东醇	-	熊果甙	-	D-来苏糖	-
β -甲基-D-木糖甙	-	七叶灵	-	D-塔格糖	-
D-半乳糖	+	水杨苷	-	D-岩藻糖	-
D-葡萄糖	+	纤维二糖	-	L-岩藻糖	-
D-果糖	+	麦芽糖	+	D-阿拉伯糖醇	-
D-甘露糖	-	乳糖	+	L-阿拉伯糖醇	-
L-山梨糖	-	蜜二糖	+	葡萄糖酸盐	-
L-鼠李糖	-	蔗糖	+	2-酮基-葡萄糖酸盐	-
卫茅醇	-	海藻糖	-		

```

ATACATGCAA GTCGTACGCA CTGGCCCAAC TGATTGATGG TGCTTGACC TGATTGACGA
TGGATCACCA GTGAGTGGCG GACGGGTGAG TAACACGTAG GTAACCTGCC CCGGAGCGGG
GGATAACATT TGGAAACAGA TGCTAATACC GCATAACAAC AAAAGCCACA TGGCTTTTGC
TTGAAAGATG GCTTTGGCTA TCACTCTGGG ATGACCTGCG GGTGCATTAG CTAGTTGGTA
AGGTAACGGC TTACCAAGGC GATGATGCAT AGCCGAGTTG AGAGACTGAT CGGCCACAAT
GGAAGTGA CACGGTCCAT ACTCCTACGG GAGGCAGCAG TAGGGAATCT TCCACAATGG
GCGCAAGCCT GATGGAGCAA CACCGGTGA GTGAAGAAGG GTTTCGGCTC GTAAAGCTCT
GTTGTTGGAG AAGAACGTGC GTGAGAGTAA CTGTTACACG AGTGACGGTA TCCAACCAGA
AAGTCACGGC TAACTACGTG CCAGCAGCCG CGGTAATACG TAGGTGGCAA GCGTTATCCG
GATTTATTGG GCGTAAAGCG AGCGCAGGCG GTTGCTTAGG TCTGATGTGA AAGCCTTTCG
GCTTAACCGA AGAAGTGCAT CGGAAACCGG GCGACTTGAG TGCAGAAGAG GACAGTGGAA
CTCCATGTGT AGCGGTGGAA TGCGTAGATA TATGGAAGAA CACCAGTGGC GAAGGCGGCT
GTCTGGTCTG CAACTGACGC TGAGGCTCGA AAGCATGGGT AGCGAACAGG ATTAGATACC
CTGGTAGTCC ATGCCGTAAG CGATGAGTGC TAGGTGTTGG AGGGTTTCCG CCCTTCAGTG
CCGGAGCTAA CGCATTAAGC ACTCCGCTG GGGAGTACGA CCGCAAGGTT GAAACTCAAA
GGAATTGACG GGGGCCCGCA CAAGCGGTGG AGCATGTGGT TTAATTCGAA GCTACGCGAA
GAACCTTACC AGGTCTTGAC ATCTTGCCT AACCTTAGAG ATAAGGCGTT CCCTTCGGGG
ACGCAATGAC AGGTGGTGCA TGGTCGTCGT CAGCTCGTGT CGTGAGATGT TGGGTTAAGT
CCCGCAACGA GCGCAACCCT TGTTACTAGT TGCCAGCATT AAGTTGGGCA CTCTAGTGAG
ACTGCCGGTG ACAAAACCGA GGAAGGTGGG GACGACGTA GATCATCATG CCCCTTATGA
CCTGGGCTAC ACACGTGCTA CAATGGACGG TACAACGAGT CGCAAGCTCG CGAGAGTAAG
CTAATCTCTT AAAGCCGTTT TCAGTTCGGA CTGTAGGCTG CAACTCGCCT ACACGAAGTC
GGAATCGCTA GTAATCGCGG ATCAGCATGC CGCGGTGAAT ACGTTCCCGG GCCTTGATA
CACCGCCCGT CACACCATGG GAGTTTGTA CGCCCAAAGT CGGTGGCCTA ACCTTTATGG
AGGGAGCCGC CTAAGCGGA CATAG
    
```

图 4 16S rRNA 基因序列测定结果

Fig.4 Results of 16S rRNA gene sequencing

表3 菌株 HCS02-001 的 16S rDNA 序列同源性分析

Table 3 16S rDNA sequence homology analysis of strain

HCS02-001	
菌株	同源性/%
<i>Lactobacillus reuteri</i> strain KLDS 1.0730	99.66
<i>Lactobacillus reuteri</i> strain KLDS 1.0736	99.59
<i>Lactobacillus gasseri</i> strain DMBCT6	99.66
<i>Lactobacillus reuteri</i> strain LQ2	99.66
<i>Lactobacillus reuteri</i> strain KLDS 1.0735	99.46
<i>Lactobacillus reuteri</i> strain FD3	99.59
<i>Lactobacillus reuteri</i> strain IMAU10037	99.46
<i>Lactobacillus reuteri</i> strain KLDS 1.0737	99.52
<i>Lactobacillus reuteri</i> strain SKB1241	99.39
<i>Lactobacillus reuteri</i> partial strain s8	99.66

2.3 耐酸性试验结果

益生菌经口服进入人体内须经过胃才到达肠道发挥益生作用,因此必须具有耐受强酸环境的能力。空腹时人体正常胃液 pH 为 2.0 以下,进食后 pH 能达到 3.0 左右^[24-26]。因此本试验选定 pH 3.5、pH 3.0、pH 2.5、pH 2.0、pH 1.5 进行检验菌株 HCS02-001 的耐酸性能力。由表 4 可知,菌株 HCS02-001 生长状况良好,活菌数随着 pH 降低虽有所下降,但 pH 2.0 和 pH 1.5 时菌株存活率仍可达到 85.52%和 58.58%,该菌株具有很好的耐受酸环境的能力,能够耐受胃环境进入肠道。

表4 罗伊氏乳杆菌 HCS02-001 耐酸性试验结果

Table 4 Acid resistance test results of *Lactobacillus reuteri*

HCS02-001		
pH	活菌对数值/(log CFU/mL)	存活率/%
对照	9.32±0.01	-
3.5	8.75±0.02	93.88
3.0	8.09±0.06	86.80
2.5	7.99±0.01	85.72
2.0	7.97±0.01	85.52
1.5	5.46±0.05	58.58

2.4 耐胆盐试验结果

人体肠道胆盐浓度通常维持在 0.03%~0.30%范围左右,益生菌的耐胆盐能力是保证其在肠道存活的先决条件^[27,28]。本试验选用 0.30%、0.50%、1.00%、1.50% 的胆盐浓度考察菌株的耐胆盐能力,结果见表 5。菌株 HCS02-001 在四个胆盐浓度条件下培养 17 h 菌株存活率均在 90%以上,说明该菌株具有较强的耐胆盐能力,能够在肠道内存活发挥作用。

表5 罗伊氏乳杆菌 HCS02-001 耐胆盐试验结果

Table 5 Bile salt resistance test of *Lactobacillus reuteri*

HCS02-001		
胆盐浓度/%	活菌对数值/(log CFU/mL)	存活率/%
对照	9.32±0.02	-
0.30	9.08±0.09	97.42
0.50	8.87±0.09	95.17
1.00	8.68±0.02	93.13
1.50	8.47±0.11	90.88

2.5 模拟胃液试验结果

益生菌进入人体内经过胃环境时,胃蛋白酶原在胃液的酸性环境下被激活而杀死进入胃内的菌体,因此,益生菌不仅需要具有耐酸的能力,还需要能够耐受胃蛋白酶的作用才能存活^[24]。本试验将菌株 HCS02-001 置于人工胃液中作用 3 h,结果见表 6,经过人工胃液作用后存活率达到 96.74%,说明其具有较强的耐受胃液的能力,可以较高的活性通过胃环境进入肠道。

表6 罗伊氏乳杆菌 HCS02-001 模拟胃液试验结果

Table 6 Results of simulated gastric juice test for *Lactobacillus reuteri* HCS02-001

时间/h	活菌对数值/(log CFU/mL)	存活率/%
0	9.50±0.10	-
3	9.19±0.07	96.74

2.6 模拟肠液试验结果

益生菌进入肠道后必须具有能够耐受肠液的能力才能保持较高的存活性发挥其益生作用,本试验中罗伊氏乳杆菌 HCS02-001 菌泥在人工肠液中 37 °C 条件下培养 4 h 后,结果如表 7 所示,菌株存活率为 98.41%,该菌株对肠液具有很强的耐受能力。

表7 罗伊氏乳杆菌 HCS02-001 模拟肠液试验结果

Table 7 Results of simulated intestinal fluid test of *Lactobacillus reuteri* HCS02-001

时间/h	活菌对数值/(log CFU/mL)	存活率/%
0	9.45±0.27	-
2	9.42±0.33	99.68
4	9.30±0.28	98.41

3 结论

本试验从内蒙古呼伦贝尔满洲里通达牧场制作的奶豆腐样品中分离筛选出 5 株具有胆固醇降解能力的乳酸菌,其中菌株 HCS02-001 的降解能力最强,降解率达 50.60%,其余 4 株菌的胆固醇降解率均在

10%~30%之间。菌株 HCS02-001 降胆固醇能力在现有研究中处于较高水平, 因此对菌株 HCS02-001 进行鉴定和益生功能的测定。通过对其进行形态学鉴定、生理生化鉴定和 16S rDNA 鉴定确定菌株 HCS02-001 为罗伊氏乳杆菌。在酸耐受试验及模拟胃液试验结果中可以看出, 菌株 HCS02-001 的耐胃酸环境能力较强, 能够以较高的存活性通过胃环境进入肠道。胆盐耐受及模拟肠液试验表明, 菌株 HCS02-001 具有很强的耐受胆盐及肠液的能力, 能够在肠道中以较高的活性发挥作用。罗伊氏乳杆菌 HCS02-001 胆固醇降解能力较强, 且具有良好的耐逆环境能力, 具有较高的进一步开发应用价值。

参考文献

- [1] 中国成人血脂异常防治指南修订联合委员会. 中国成人血脂异常防治指南(2016年修订版)[J]. 中国循环杂志, 2016, 16(10): 15-35
Joint committee for revision of Chinese guidelines on prevention and treatment of dyslipidemia in adults. Chinese guidelines on prevention and treatment of dyslipidemia in adults (2016 Revision) [J]. Chinese Journal of Circulation, 2016, 16(10): 15-35
- [2] Martoni C, Bhathena J, Urbanska A M, et al. Microencapsulated bile salt hydrolase producing *Lactobacillus reuteri* for oral targeted delivery in the gastrointestinal tract [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 81(2): 225-233
- [3] Ridker P M. Evaluating novel cardiovascular risk factors: can we better predict heart attacks [J]. Annals of Internal Medicine, 1999, 130(11): 933-937
- [4] 郭翔. 降胆固醇益生乳酸菌筛选及其功能机理的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2009
GUO Xiang. Screening and functional mechanism of cholesterol-lowering probiotic [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2009
- [5] Gao Y, Li D, Liu S, et al. Probiotic potential of *L. sake* C2 isolated from traditional Chinese fermented cabbage [J]. Eur Food Res Technol, 2012, 234(1): 45-51
- [6] Reid G. Probiotics: definition, scope and mechanisms of action [J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2016, 30: 17-25
- [7] 许宁宁, 余梓涵, 刁世童, 等. 益生菌在代谢综合征中的潜在作用及研究进展[J]. 重庆医学, 2019, 13(8): 2297-2300
XU Ningning, YU Zihan, DIAO Shitong, et al. Potential role of probiotics in metabolic syndrome and its study advances [J]. Chongqing Medicine, 2019, 13(8): 2297-2300
- [8] 郭均. 降胆固醇乳酸菌的筛选及其体内降胆固醇作用[D]. 广州: 华南理工大学, 2016
GUO Jun. The screening of *Lactobacillus* with cholesterol-lowering ability and its application *in vivo* [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2016
- [9] 陈忠秀, 李嘉文, 赵扬, 等. 益生菌的应用现状和发展前景[J]. 中国微生态学杂志, 2016, 28(4): 493-496
CHEN Zhongxiu, LI Jiawen, ZHAO Yang, et al. Probiotics: current application status and development prospect [J]. Chinese Microecology Journal, 2016, 28(4): 493-496
- [10] Nissen L, Chingwaru W, Sgorbati B, et al. Gut health promoting activity of new putative probiotic/protective *Lactobacillus* spp. strains: a functional study in the small intestinal cell model [J]. Int J Food Microbiol, 2009, 135: 288-294
- [11] 肖仔君, 钟瑞敏, 陈惠音, 等. 植物乳杆菌的生理功能与应用[J]. 中国食品添加剂, 2005, 2: 87-89
XIAO Zijun, ZHONG Ruimin, CHEN Huiyin, et al. Application and physiological function of *L. plantarum* [J]. China Food Additives, 2005, 2: 87-89
- [12] Gilliland S E, Nelson C R, Maxwell C. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus* [J]. Appl Environ Microbiol, 1985, 49(2): 377-381
- [13] 鲍志宁, 贺珊珊, 林伟锋. 一种胆固醇浓度的测定方法: 中国, 2018112126193[P]. 2018-10-18
BAO Zhining, HE Shanshan, LIN Weifeng. A method for determination of cholesterol concentration: China, 2018112126193 [P]. 2018-10-18
- [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 Sihan, DANG Fangfang, et al. Screening and study on activity in the simulated gastrointestinal conditions 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, 45(2): 15-24
GUO Jingjing, ZHANG Pengfei, CAO Chengxu, et al. Screening and identification of cholesterol-lowering lactic acid bacteria from naturally fermented soybean paste and its effect on serum cholesterol of rats [J]. Food and Fermentation Industry, 2019, 45(2): 15-24
- [16] Shehata M G, El Sohaimy S A, El-Sahn M A, et al. Screening of isolated potential probiotic lactic acid bacteria for

- cholesterol lowering property and bile salt hydrolase activity [J]. *Annals of Agricultural Sciences*, 2016, 61(1): S057017831630001X
- [17] 万婧倩,罗曼,黄仕新,等.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[J].*现代食品科技*,2020,36(2):122-128
WAN Jingqiong, LUO Man, HUANG Shixin, et al. Screening of a marine *Lactobacillus plantarum* with cholesterol-lowering effect [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2020, 36(2): 122-128
- [18] 齐炳理,张兴昌,孙婷,等.植物乳杆菌发酵乳对高脂血症大鼠血脂的影响[J].*食品研究与开发*,2015,36(20):17-19
QI Bingli, ZHANG Xingchang, SUN Ting, et al. Effect of milk product fermented by *Lactobacillus plantarum* on blood lipids in hyperlipidemia rat [J]. *Food Research and Development*, 2015, 36(20): 17-19
- [19] Fuentes M C, Lajo T, Carrión J M, et al. Cholesterol-lowering efficacy of *Lactobacillus plantarum* CECT 7527, 7528 and 7529 in hypercholesterolaemic adults [J]. *British Journal of Nutrition*, 2013, 109(10): 1866-1872
- [20] 王今雨,满朝新,杨相宜,等.植物乳杆菌 NDC75017 的降胆固醇作用[J].*食品科学*,2013,34(3):243-247
WANG Jinyu, MAN Chaoxin, YANG Xiangyi, et al. Cholesterol-lowering capability of probiotic *Lactobacillus plantarum* NDC75017 [J]. *Food Science*, 2013, 34(3): 243-247
- [21] 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):142-152
TANG Yaru, YU Shangfu, GUO Lidong, et al. Screening and study on probiotic characteristics of a cholesterol - lowering lactobacillus [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2016, 37(1): 142-152
- [22] 李尧,张羽竹,张利,等.分离自传统自然发酵食品中降胆固醇乳酸菌的筛选与评价[J].*中国食品学报*,2019,19(6):212-221
LI Yao, ZHANG Yuzhu, ZHANG Li, et al. The screening and evaluation of cholesterol-lowering lactic acid bacteria isolated from traditional naturally fermented food [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2019, 19(6): 212-221
- [23] George M Garrity, Julia A Bell, Timothy G Lilburn. Taxonomic Outline of the Prokaryotes [M]. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Second edition. 2004.5
- [24] Vázquez J. Human physiology [J]. *American Biology Teacher*, 2006, 68(3): 169
- [25] Pereira D, Gibson G R. Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68: 4689-4693
- [26] Huey S L, Min T L. Mechanisms of cholesterol removal by lactobacilli under conditions that mimic the human gastrointestinal tract [J]. *International Dairy Journal*, 2010, 20: 169-175
- [27] Ted R Johnson, Christine L Case. Laboratory experiments in microbiology [J]. *Pearson Schweiz Ag*, 1995, 519(1-2): 158-167
- [28] Kullak-Ublick G A, Stieger B, Meier P J. Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease [J]. *Gastroenterology*, 2004, 126(1): 322-342

(上接第 13 页)

- [21] Lu X, Liu J, Zhang N, et al. Ripened Pu-erh tea extract protects mice from obesity by modulating gut microbiota composition [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67: 6978-6994
- [22] Wolf P G, Biswas A, Morales S E, et al. H₂ metabolism is widespread and diverse among human colonic microbes [J]. *Gut Microbes*, 2016, 7(3): 235-245
- [23] De Vos P, Garrity GM, Jones D, et al. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Second Edition): Volume Three-the Firmicutes* [M]. New York: Springer-Verlag New York, 2009
- [24] Goodfellow M, Kämpfer P, Busse H J, et al. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Second Edition): Volume Five - the Actinobacteria* [M]. New York: Springer-Verlag New York, 2009