

# 具有降胆固醇能力的人源乳酸菌筛选

陈大卫, 郭飞翔, 顾瑞霞, 邹东昊, 赵海晴

(扬州大学食品科学与工程学院, 江苏省乳品生物技术与安全控制重点实验室, 江苏扬州 225127)

**摘要:** 分离筛选出长寿人群肠道中具有益生功能的乳酸菌, 并研究其体外降解胆固醇能力。结果表明分离获得的 80 株乳酸菌中, 9 株菌在模拟胃液中培养 3 h 的存活率较高, 分别为 26.60%、24.30%、22.50%、16.72%、46.61%、16.10%、19.80%、19.60%、17.80%, 在 0.30%、0.50% 及 1.00% 的胆盐培养基中存活率最高的菌株为 o2, 存活率分别为 21.31%、13.35% 及 12.43%; 9 株菌对氨苄青霉素、青霉素 G、氯霉素敏感, 对四环素、利福平、环丙沙星敏感或中度敏感; 9 株菌对三株致病菌均有抑制作用, 其中 V9、o2 分别对沙门氏菌、金黄色葡萄球菌抑制能力较强, 抑菌圈直径分别为 12.00 mm、11.40 mm, 9 株菌对大肠杆菌的抑制作用普遍较强, 抑菌圈直径均大于 7.00 mm; 9 株菌中 f10、o2、T1 及 V9 的胆固醇降解率较高, 分别为 45.85%、40.76%、41.70%、42.87%, 经生理生化试验及 16S rDNA 测序鉴定分别为屎肠球菌、食窦魏斯氏菌、干酪乳杆菌及发酵乳杆菌, 是良好的辅助降血脂候选菌株。

**关键词:** 筛选; 长寿人群; 功能; 乳酸菌; 胆固醇

文章编号: 1673-9078(2014)3-114-120

## Screening of Cholesterol-reducing *Lactic acid bacteria* from Human Origin

CHEN Da-wei, GUO Fei-xiang, GU Rui-xia, ZOU Dong-hao, ZHAO Hai-qing

(Jiangsu Province Key Laboratory of Dairy Biological Technology and Safety Control, College of Food Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China)

**Abstract:** *Lactic acid bacteria* (LAB) with probiotic were isolated and screened from intestinal tract of longevity crowd, and the ability of cholesterol-reducing *in vitro* were investigated. The results showed that nine of eighty strains had high survival rates in simulated gastric juice for 3 hours, being of 26.60%, 24.30%, 22.50%, 16.72%, 46.61%, 16.10%, 19.80%, 19.60% and 17.80%, respectively. The survival rates of o2 were the highest, which were 21.31%, 13.35%, 12.43% respectively in 0.3%, 0.5% and 1.0% bile salt. Nine strains were sensitive to ampicillin, penicillin G, chloramphenicol, and sensitive or moderately sensitive to tetracycline, rifampicin and ciprofloxacin. They had bacteriostatic activity against *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The bacteriostatic activities of V9 and o2 to *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* were higher. The inhibition diameters were 12.00 mm and 11.40 mm respectively, and all the nine strains had high bacteriostatic activity to *Escherichia coli*, with the inhibition diameters of more than 7.0 mm. The cholesterol-reducing rates of f10, o2, T1 and V9 were 45.85%, 40.76%, 41.70%, 42.87%, respectively, higher than other strains, which were identified as *Enterococcus faecium*, *Weissella Cibaria*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus fermentum* by physiological and biochemical test as well as 16srDNA sequence alignment. These strains could be good candidate probiotics strains for auxiliary hypolipidemic.

**Key words:** screen; longevity crowd; function; *Lactic acid bacteria*; cholesterol

人体肠道中栖息着大约 1000 多种共生微生物<sup>[1]</sup>, 对促进食物的消化、抵御外来致病菌的侵入以及促进肠道发育等方面起着重要的作用<sup>[2]</sup>。乳酸菌是人体肠道中重要的益生菌, 其数量和组成对维持宿主的微生态平衡和提高免疫系统功能起着至关重要的作用<sup>[3-4]</sup>。

收稿日期: 2013-09-24

基金项目: 江苏高校优势学科建设工程资助项目; 国家科技支撑计划项目 (2013BAD18B12); 江苏省科技支撑项目 (BE2011383); 江苏省高校自然科学基金重大项目 (12KJA550003); 国家自然科学基金青年基金项目 (31201393); 作者简介: 陈大卫 (1986-), 男, 在读博士生, 研究方向为乳品科学  
通讯作者: 顾瑞霞 (1963-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为乳酸菌及其发酵制品

有研究发现, 长寿人群肠道内双歧杆菌、乳杆菌等乳酸菌要多于普通人群<sup>[5]</sup>, 表明肠道内的乳酸菌对人体的健康长寿有一定的促进作用; 同时肠道菌群结构失调也会导致肥胖、糖尿病、冠心病等慢性病的发生<sup>[6-7]</sup>, 而通过补充乳酸菌等益生菌制剂来调节肠道微生物菌群结构从而预防和治疗疾病将是未来发展的一个热点。

由于外源益生菌的生长环境与人体胃肠道的环境相差甚远, 因而许多学者认为理想的益生菌最好来自于人体自身的胃肠道, 而益生菌必须能够耐受胃肠道中胃酸和胆汁等一系列不良环境而活着才能发挥其益生作用<sup>[8]</sup>, 同时它们代谢产生的活性物质能抑制肠

道内致病菌的生长<sup>[9]</sup>, 从而调节肠道微生物的平衡; 胃肠道中的细菌通过抗生素抗性基因的水平转移<sup>[10-11]</sup>给临床医学带来了严重难题, 因此需要选用耐药性较低的菌株作为益生菌的候选菌株; 大量研究还表明<sup>[12-14]</sup>, 乳酸菌能够降低血清中的胆固醇水平, 相对于通过药物降低血清中的胆固醇具有较低的副作用。有研究发现, 宿主和肠道菌之间存在着特异性相互选择的关系, 当菌株的来源和使用对象一致时, 就会增强菌株对宿主益生功效的特异性和针对性<sup>[15]</sup>, 同时来源于宿主本身的菌株也具有较高的安全性, 所以本文研究了分离自长寿人群肠道乳酸菌的耐酸、耐胆盐、药敏、抑菌及降胆固醇等体外益生功能特性, 以期筛选出具有降胆固醇特性的人源乳酸菌菌株, 为益生菌的开发利用奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 仪器与药品

所有抗生素均为自意大利 BBI 公司; 胃蛋白酶, 北京索莱宝科技有限公司; 胆盐, 美国 Difco 公司; DNA 提取试剂盒, 上海生工生物工程公司; 大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌, 中国微生物菌种保藏中心; 胆固醇、胆盐、无水乙醇、三氯化铁、盐酸、硫酸铁铵均为国药集团化学试剂有限公司; 革兰氏染色液, 北京陆桥科技有限公司。

全自动灭菌锅 (JF-SX-500), 日本 TOMY 公司; 厌氧工作站 (bugbox), 英国 Ruskinn 公司; 超净工作台 (SW-CJ-1F), 苏州净化设备有限公司; Bioscreen 全自动微生物生长曲线分析仪, 芬兰 Bioscreen 公司; 高速冷冻离心机 (Legend mach1.6R), 美国塞默飞世尔科技有限公司; 生物显微镜 (Olympus CX41), 日本 Olympus 公司; 紫外分光光度计 (UV-2550), 日本岛津公司; 梯度 PCR, 美国 ABI 公司; 凝胶成像系统 (Infinity 3026), 法国 Vilber Lourmat 公司; 水平电泳槽 (HE-120), 上海天能仪器设备有限公司。

#### 1.1.2 试剂及培养基的制备

模拟胃液: NaCl 0.5%、胃蛋白酶 0.3%, 用 1.00 mol/L 的盐酸调 pH 至 3.0, 0.22  $\mu\text{m}$  滤器过滤除菌, 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱冷藏备用。

胆盐培养基: 称取一定量的胆盐于 MRS 液体培养基中, 使其胆盐浓度 ( $m/V$ ) 为 0.3%、0.5%、1.0%, 121  $^{\circ}\text{C}$  灭菌 15 min, 冷却备用。

抗生素溶液: 按照文献<sup>[16]</sup>的方法将氨苄青霉素、青霉素 G、四环素、氯霉素、环丙沙星和利福平 6 种

抗生素配制成 5120  $\mu\text{g/mL}$  的贮存液, 过滤除菌后的抗生素溶液避光冷冻保存, 保存时间不超过 1 周。

抗生素培养基: MRS 液体培养基灭菌冷却至 45~50  $^{\circ}\text{C}$  后, 分别加入氨苄青霉素、青霉素 G、四环素、氯霉素、环丙沙星和利福平贮存液; 在前期试验的基础上发现, 筛选的乳酸菌在六种抗生素浓度都为 64.00  $\mu\text{g/mL}$  的 MRS 培养基中无法存活, 所以试验研究了乳酸菌在不同抗生素浓度的 MRS 培养基中的耐药性, 培养基中抗生素的系列浓度依次为: 1.00、2.00、4.00、8.00、16.00、32.00、64.00  $\mu\text{g/mL}$ 。

胆固醇培养基: 胆固醇 0.10 g、吐温-80 1.0 mL、蔗糖酯 0.10 g、冰乙酸 5.0 mL, 冰浴超声破碎备用。将上述制备的胆固醇胶束溶液加入到 MRS 液体培养基中, 并调整 pH 至 6.50 $\pm$ 0.20, 121  $^{\circ}\text{C}$  灭菌 15 min, 冷却备用; 有研究表明高浓度的胆固醇会抑制乳酸菌的胆固醇降解能力, 同时结合文献<sup>[14]</sup>及国标<sup>[17]</sup>的方法将培养基中胆固醇的终浓度调至 0.10 mg/mL。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 乳酸菌的分离

将如皋长寿乡采集的人群粪便样品经梯度稀释后, 采用 MRS 固体培养基<sup>[18]</sup>、LBS 固体培养基<sup>[18]</sup>分离样品中的乳酸菌, 于厌氧工作站中 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 48 h, 挑取平板上的典型菌落后划线分离得到纯菌落。挑取各平板上的纯菌落于 MRS 液体培养基中, 37  $^{\circ}\text{C}$  厌氧培养 24 h, 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱冷藏备用或冻干保藏。

#### 1.2.2 乳酸菌的鉴定

对分离到的乳酸菌进行革兰氏染色, 在生物显微镜下观察菌体形态, 并进行运动性及产酸、产气、过氧化氢酶等生理生化鉴定<sup>[19]</sup>。利用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取乳酸菌的基因组 DNA, 根据文献<sup>[14]</sup>的方法, 将提取的乳酸菌基因组 DNA 作为 16S rDNA-PCR 的模板进行 PCR 扩增, 电泳检测扩增产物后, 送至上海生工生物工程技术有限公司进行测序, 将测序结果通过 BLAST 程序与 GenBank 基因库进行在线比对以得出结果。

#### 1.2.3 乳酸菌的培养与处理

将保藏的乳酸菌活化后, 按 3% 的接种量接种到 MRS 液体培养基中, 37  $^{\circ}\text{C}$  厌氧培养 24 h 后, 12000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 用灭菌的双蒸水将菌体洗涤两次后悬浮, 并用分光光度计测其菌体浊度, 使其 OD<sub>560 nm</sub> 为 1.00, 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱冷藏备用。

#### 1.2.4 致病菌的培养与处理

大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌以 3% 的接种量接种到液体 LB 培养基中, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h, 利

用平板计数法测定其活菌数, 用灭菌的培养基调节其活菌浓度, 使其活菌数在  $10^7$  CFU/mL,  $4\text{ }^\circ\text{C}$  冷藏备用。

### 1.2.5 乳酸菌耐酸耐胆盐能力的测定

由于人体胃液的pH值通常为3.0左右, 小肠中胆盐含量为0.03~0.30%之间, 所以本文研究了乳酸菌在pH为3.0及胆盐浓度为0.3%、0.5%、1.0%的环境下耐酸耐胆盐能力。

#### 1.2.5.1 耐酸能力的测定

将活化好的乳酸菌制成菌悬液, 取1.0 mL的菌悬液接种至9.0 mL的pH 3.0人工胃液,  $37\text{ }^\circ\text{C}$  厌氧培养3 h, 分别在0 h和3 h平板计数法测定活菌数, 计算其存活率(%)<sup>[14]</sup>。

$$\text{存活率}(\%) = \frac{\text{3 h的活菌数}}{\text{0 h的活菌数}} \times 100\%$$

#### 1.2.5.2 耐胆盐能力的测定

将活化好的乳酸菌按3%的接种量分别接种至含0.0%(即空白)、0.3%、0.5%及1.0%胆盐的MRS培养基中,  $37\text{ }^\circ\text{C}$  厌氧培养, 分别在0 h和3 h平板计数法测定活菌数, 计算其存活率(%)<sup>[14]</sup>。

$$\text{存活率}(\%) = \frac{\text{3 h的活菌数}}{\text{0 h的活菌数}} \times 100\%$$

### 1.2.6 抗生素敏感试验

按照文献<sup>[20]</sup>的方法, 采用微量肉汤稀释法测定乳酸菌对抗生素的最低抑制浓度(MIC)。

将抗生素溶液按比例加入到MRS培养基中, 使其浓度依次为: 0.00、1.00、2.00、4.00、8.00、16.00、32.00、64.00  $\mu\text{g/mL}$ 。取活化好的乳酸菌按3%的接种量接种于含有不同抗生素浓度的MRS培养基中, 震荡混匀后分别吸取300  $\mu\text{L}$  菌液于 $10 \times 10$ 孔的无菌微孔板中, 置于Bioscreen全自动微生物生长曲线分析仪中 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 培养24 h, 通过测量 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 来观察其生长情况, 每组实验重复三次。

### 1.2.7 乳酸菌抑菌能力的测定

采用牛津杯法<sup>[21]</sup>检测乳酸菌的抑菌能力。

### 1.2.8 乳酸菌降解胆固醇能力的测定

将活化好的乳酸菌按3%的接种量接种至MRS胆固醇培养基中,  $37\text{ }^\circ\text{C}$ 培养24 h后, 取培养液0.2 mL, 加入1.0 mL无水乙醇振荡混匀1 min, 再加入3.8 mL无水乙醇振荡混匀1 min, 静置5 min后再次振荡混匀, 4000 r/min离心10 min, 取2.0 mL上清液用于胆固醇的测定, 以未接菌的胆固醇培养基作为对照。胆固醇的测定采用硫酸铁铵比色法, 参照GB/T 5009.128-2003食品中胆固醇的测定方法<sup>[17]</sup>, 测定其 $\text{OD}_{560\text{nm}}$ 值, 胆固醇的降解率按下式计算:

$$LE = \frac{\text{OD}_{\text{对照}} - \text{OD}_{\text{接菌}}}{\text{OD}_{\text{对照}}} \times 100\%$$

### 1.2.9 数据统计与处理

采用SPSS 17.0、SAS 9.2、Clustal X及MEGA 4.1软件对实验数据进行统计和分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 乳酸菌的分离

从如皋长寿乡采集样品61份, 经分离获得1008株菌株, 通过生理生化鉴定将950株确定为乳酸菌, 随机挑取80株乳酸菌(长寿组、老年组、中年组、青年组各为20株)用于益生功能特性及体外降胆固醇的研究, 如表1。

表1 乳酸菌的分离

人群	菌株
长寿组 (>90岁)	d5、d9、f6、f10、f11、o2、o7、V9、w1、w4、w5、w6、w11、w12、ac6、ac9、ac11、双ac5、af3、双f2
老年组 (60~89岁)	b5、b7、b15、c5、c9、g5、g16、双g3、M9、双M5、q3、Q23、ad7、ad15、双ad6、双ad8、aL2、aL3、aL7、双at5
中年组 (45~59岁)	k2、k5、i6、i12、p7、双p5、R5、R6、双R8、x5、ab5、ab6、ab8、ab12、ae6、ae10、ae16、ao5、ao9、ao10、ao12、双ao7
青年组 (<44岁)	h5、h8、双J9、T1、T4、aa1、aa10、ag8、ag12、ai2、ai7、ai12、双ai9、aj7、aj8、aj11、aj13、双ao7、ap7、ap15

### 2.2 乳酸菌的耐酸耐胆盐能力

表2 乳酸菌的耐酸耐胆盐能力 (n=3 x±sd)

菌株	胆盐/%			
	pH 3.0	0.30	0.50	1.00
f10	26.60±2.65 <sup>b</sup>	15.95±0.09 <sup>b</sup>	7.72±0.04 <sup>b</sup>	5.60±0.07 <sup>cd</sup>
k2	24.30±1.15 <sup>b</sup>	12.42±0.20 <sup>b</sup>	8.13±0.06 <sup>b</sup>	7.12±0.12 <sup>bc</sup>
o2	22.50±2.53 <sup>bc</sup>	21.31±0.12 <sup>a</sup>	13.35±0.03 <sup>a</sup>	12.43±1.23 <sup>a</sup>
Q23	16.72±0.79 <sup>d</sup>	6.53±0.13 <sup>c</sup>	5.80±0.24 <sup>b</sup>	4.12±0.26 <sup>de</sup>
T1	46.61±3.78 <sup>a</sup>	15.10±0.03 <sup>b</sup>	8.10±0.03 <sup>b</sup>	5.30±0.07 <sup>cd</sup>
T4	16.10±7.99 <sup>d</sup>	6.62±0.14 <sup>c</sup>	5.66±0.25 <sup>b</sup>	5.05±0.18 <sup>cde</sup>
V9	19.80±2.58 <sup>cd</sup>	7.61±0.01 <sup>c</sup>	6.93±0.02 <sup>b</sup>	5.82±0.01 <sup>cd</sup>
双ao7	19.60±1.99 <sup>cd</sup>	14.50±0.46 <sup>b</sup>	8.82±0.80 <sup>b</sup>	8.75±1.32 <sup>b</sup>
双M5	17.80±1.24 <sup>cd</sup>	6.15±0.13 <sup>c</sup>	5.51±0.04 <sup>b</sup>	3.63±0.03 <sup>e</sup>

注: 同列比较, 不同字母表示数据存在显著差异(P<0.05)。

将80株乳酸菌菌悬液接种于模拟胃液中, 于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 厌氧培养3 h, 累计有9株乳酸菌的存活率大于16.00%,

如表2；将9株耐酸能力较强的乳酸菌接种至含胆盐的MRS培养基中，于37℃厌氧培养3h，通过平板计数法来检测其对胆盐的存活率，结果如表2。

有研究表明<sup>[22]</sup>，乳酸菌能在较低的pH条件下生存，是因为其细胞质中的pH值保持在一个适宜的水平，F1F0-ATP酶在维持乳酸菌胞内适宜的pH值起到至关重要的作用<sup>[23]</sup>，而人体肠道中存在的低pH环境也增加了F1F0-ATP酶的活性<sup>[24]</sup>，所以不同年龄肠道中pH值的差异可能会导致分离到的乳酸菌耐酸能力的差异。试验乳酸菌的耐胆盐能力高于酸驼乳中乳酸菌的耐胆盐能力<sup>[25]</sup>，较低于酸马奶中乳酸菌的耐胆盐能力<sup>[14]</sup>，可能是由于不同来源菌株的胆盐水解酶活性的差异所致<sup>[26]</sup>。

### 2.3 乳酸菌对抗生素的敏感性

将9株乳酸菌分别接种于含有不同浓度抗生素的MRS培养基的无菌微孔板中，37℃培养，通过测量OD600nm值来观察其生长情况。根据美国临床和实验室标准化研究所（CLSI）制定的《抗菌药物敏感性试验执行标准》（2010年版）判定抗生素对乳酸菌的最低抑制浓度及其敏感性（MIC），结果如表3所示。

表3 乳酸菌药敏性测定

Table 3 Drug sensitivity of LAB

菌株	敏感度 MIC/(μg/mL)					
	细胞壁抑制剂		蛋白质抑制剂		核酸抑制剂	
	氨苄青霉素	青霉素G	氯霉素	四环素	利福平	环丙沙星
f10	1 S	1 S	8 S	1 S	2 I	2 I
k2	4 S	2 S	4 S	4 S	2 I	2 I
o2	4 S	2 S	4 S	4 S	2 I	2 I
Q23	2 S	1 S	4 S	2 S	2 I	2 I
T1	4 S	2 S	4 S	4 S	1 S	2 I
T4	1 S	1 S	1 S	2 S	2 I	1 S
V9	1 S	2 S	4 S	8 I	1 S	2 I
双 ao7	1 S	2 S	2 S	2 S	1 S	2 I
双 M5	1 S	1 S	1 S	1 S	1 S	2 I

注：S：敏感；I：中度敏感；R：耐药。

抗生素通过抑制微生物细胞壁、蛋白质以及核酸的合成来抑制它们的生长，由表3可以发现，9株乳酸菌对6种抗生素都有一定的敏感性，对细胞壁抑制剂氨苄青霉素、青霉素G的MIC较低，均敏感；对蛋白质抑制剂氯霉素、四环素的MIC也较低，除了V9对四环素中度敏感外，其他也均为敏感；大部分试验菌株对核酸抑制剂利福平、环丙沙星为中度敏感；来源于长寿人群的菌株f10、o2、V9对蛋白质抑制剂的MIC较大于其他组的MIC，而来源于老年组的菌株双M5、Q23

对细胞壁抑制剂的MIC较低于其他组的MIC。

试验菌株对6种抗生素的MIC较低于其他来源乳酸菌的MIC<sup>[27]</sup>，可能由于菌株是从较少服用抗生素的长寿人群中获得，因此减少了与抗生素的接触机会，使其体内的乳酸菌对抗生素也具有较高的敏感性，同时也有可能是由于乳酸菌耐药性基因的不同所致<sup>[11]</sup>。

### 2.4 乳酸菌的抑菌活性

取乳酸菌培养液于牛津杯中，3~4℃冰箱扩散24h后，在37℃中培养24h，测量其抑菌圈直径，结果如表4。

表4 乳酸菌对三种致病菌的抑制作用 (n=3 x±sd)

Table 4 The inhibition effects of LAB on three pathogenic bacteria (n=3 x±sd)

菌株	抑菌圈直径/mm		
	大肠杆菌	沙门氏菌	金黄色葡萄球菌
f10	7.00±0.92 <sup>a</sup>	6.40±0.87 <sup>a</sup>	6.60±0.81 <sup>a</sup>
k2	9.00±0.35 <sup>bc</sup>	7.70±0.95 <sup>a</sup>	6.50±0.89 <sup>a</sup>
o2	8.40±0.70 <sup>ab</sup>	7.50±0.71 <sup>a</sup>	11.40±0.85 <sup>b</sup>
Q23	9.70±1.31 <sup>bc</sup>	7.90±1.26 <sup>a</sup>	6.80±1.20 <sup>a</sup>
T1	10.50±0.94 <sup>c</sup>	7.40±0.89 <sup>a</sup>	8.20±0.83 <sup>a</sup>
T4	8.20±0.95 <sup>ab</sup>	8.10±0.90 <sup>a</sup>	7.60±0.84 <sup>a</sup>
V9	8.30±0.72 <sup>ab</sup>	12.00±0.67 <sup>b</sup>	7.00±0.61 <sup>a</sup>
双 ao7	12.70±1.12 <sup>d</sup>	6.70±1.07 <sup>a</sup>	8.50±1.01 <sup>a</sup>
双 M5	10.20±1.30 <sup>c</sup>	11.30±1.25 <sup>b</sup>	7.20±1.19 <sup>a</sup>

注：同列比较，不同字母表示数据存在显著差异(P<0.05)。

由表4可以看出，9株乳酸菌对致病菌有较强的抑制作用，双ao7对大肠杆菌的抑制能力显著的高于其他菌株(P<0.05)，抑菌圈直径为12.70mm；V9、双M5对沙门氏菌的抑制能力显著的高于其他菌株(P<0.05)，抑菌圈直径为12.00mm、11.30mm；o2对金黄色葡萄球菌的抑制能力显著的高于其他菌株(P<0.05)，抑菌圈直径为11.40mm；试验菌株对大肠杆菌的抑制作用普遍较强，抑菌圈直径均大于7.00mm。乳酸菌代谢产生的细菌素、有机酸、过氧化氢等抑菌产物均能单独或共同地抑制致病菌的生长<sup>[9,28]</sup>，从人体肠道中分离的乳酸菌代谢产生的这些化合物的分子量及生物化学性质的不同使其抑菌能力也存在一定的差异<sup>[28]</sup>。

### 2.5 乳酸菌体外降解胆固醇能力比较

将活化好的乳酸菌按3%的接种量接种至含胆固醇的液体培养基中，37℃厌氧培养24h后，4000r/min离心10min，取上清液用于胆固醇的测定，结果如图1。

从图1可以发现，试验的9株乳酸菌都能够降解培

培养基中的胆固醇，其中来源于长寿老人肠道的菌株 f10、o2、V9 和青年人肠道的菌株 T1 的胆固醇降解率显著高于来源于中年和青年人肠道菌株的胆固醇降解率 ( $P < 0.05$ )，分别为 45.50%、40.76%、41.70%、42.87%；结合乳酸菌耐胆盐的试验结果表明，试验乳酸菌对胆固醇的降解率与其耐胆盐能力没有明显的相关性。

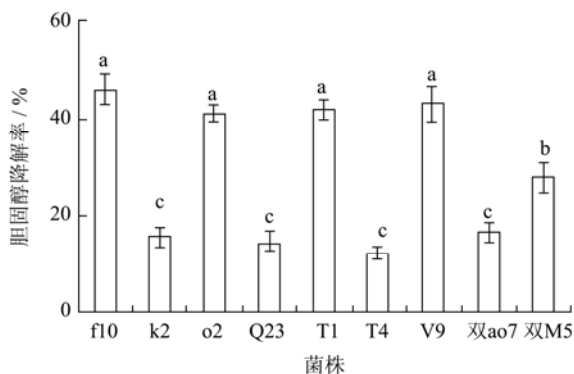


图1 乳酸菌对胆固醇的降解率

Fig.1 The cholesterol-lowering rate of LAB

注：不同字母表示数据存在显著差异 ( $P < 0.05$ )。

可能由于年轻人自身体内的胆固醇消耗大，因而肠道内胆固醇积累的较少，所以供乳酸菌降解的也较少，使得年轻人肠道分离的乳酸菌胆固醇降解率相对较低；而由于长寿老人自身的胆固醇消耗较小，过多的胆固醇需要在体内分解，所以其肠道内的乳酸菌能够降解过多的胆固醇，使得来源于长寿老人肠道的乳酸菌胆固醇降解率较高，乳酸菌对胆固醇的降解能力与其来源是否有一定的相关性还需要进一步研究。

## 2.6 乳酸菌的鉴定

对胆固醇降解率较高的四株乳酸菌 f10、o2、T1、V9 进行鉴定，在具体的实际应用中，可以使用微胶囊法<sup>[29]</sup>来改善菌株耐胆盐能力较低等问题。

### 2.6.1 乳酸菌的生理生化试验

根据生理生化的鉴定结果，参照伯杰氏鉴定手册（第八版）<sup>[19]</sup>初步鉴定发现，T1 及 V9 分别为干酪乳杆菌、发酵乳杆菌，f10 为屎肠球菌，o2 为魏斯氏菌属，菌株的生理生化性质见表 5。

### 2.6.2 乳酸菌的 16S rDNA 鉴定

分别以菌株 f10、o2、V9 及 T1 的基因组 DNA 为模板，采用通用的 16S rDNA 引物<sup>[14]</sup>进行 PCR 扩增，得到约 1500 bp 的特异性扩增产物，电泳检测扩增产物后，送至上海生工生物工程技术有限公司进行测序。用软件 Clustal X 和 MEGA 4.1 将测序得到的序列与 GenBank 数据库中的序列进行相似性分析（表 6）及系统发育树分析（图 2）。结果表明，f10 与屎肠球菌（*Enterococcus faecium*）、V9 与发酵乳杆菌

（*Lactobacillus fermentum*）的同源性达到 99%；o2 与食窦魏斯氏菌（*Weissella. Cibaria*）、T1 与干酪乳杆菌（*Lactobacillus casei*）的同源性达到 100%。

表5 乳酸菌的生理生化特征

Table 5 Physiological and biochemical characteristics of LAB

项目	f10	o2	T1	V9
细胞形态	球状	短杆状	杆状	杆状
革兰氏染色	+	+	+	+
接触酶	-	-	-	-
运动性试验	-	-	-	-
硝酸盐还原试验	-	-	-	-
明胶液化试验	-	-	-	-
吲哚试验	-	-	-	-
产 H <sub>2</sub> S 试验	-	-	-	-
15 °C	+	+	+	+
45 °C	+	-	+	+
葡萄糖	+	+	+	+
乳糖	+	+	+	+
甘露醇	+	-	+	-
麦芽糖	+	+	+	+
纤维二糖	+	+	+	-
棉籽糖	-	-	-	+
阿拉伯糖	+	-	-	-
木糖	-	-	-	-
果糖	-	+	+	+
山梨醇	-	-	+	-
鉴定结果	屎肠球菌	魏斯氏菌属	干酪乳杆菌	发酵乳杆菌

注：“+”90%菌株为阳性；“-”90%菌株为阴性。

表6 乳酸菌分离菌株的相似性分析

Table 6 Similarity analysis of the isolated LAB

菌株	亲缘关系最近的菌株	相似性
f10	屎肠球菌( <i>Enterococcus faecium</i> )	99%
o2	食窦魏斯氏菌( <i>Weissella. cibaria</i> )	100%
T1	干酪乳杆菌( <i>Lactobacillus casei</i> )	100%
V9	发酵乳杆菌( <i>Lactobacillus fermentum</i> )	99%

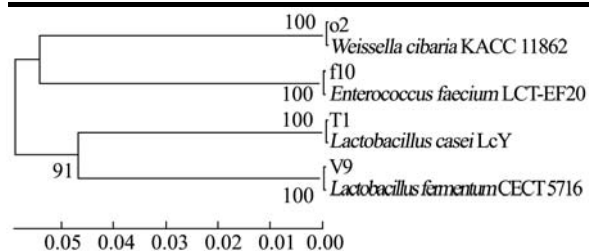


图2 16S rDNA基因序列的乳酸菌系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of LAB based on 16S rDNA sequence

结合生理生化试验的结果，可将菌株 f10、o2、

T1 及 V9 分别鉴定为屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*)、食窦魏斯氏菌 (*Weissella. Cibaria*)、干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*) 和发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*)。

### 3 结论

从如皋长寿乡人群粪便中分离获得的80株乳酸菌中, 9株乳酸菌在模拟胃液中有一定的耐受性, 并在0.30%、0.50%、1.00%的胆盐条件下存活率较高, 其中T1、o2的耐酸、耐胆盐能力较强; 9株乳酸菌对试验的6种抗生素敏感或中度敏感, 对抗生素的MIC较低于其他来源乳酸菌的MIC; 9株乳酸菌对沙门氏菌、金黄色葡萄球菌有一定的抑制作用, 对大肠杆菌的抑制作用普遍较强; 菌株f10、o2、T1及V9的胆固醇降解率都高于40.00%, 经鉴定分别为屎肠球菌、食窦魏斯氏菌、干酪乳杆菌、发酵乳杆菌, 可作为潜在的辅助降血脂候选菌株进行进一步研究。

### 参考文献

- [1] Peris-Bondia F, Latorre A, Artacho A, et al. The active human gut microbiota differs from the total microbiota [J]. Public Library of Science One, 2011, 6(7): 1-10
- [2] Stecher B, Hardt W D. The role of microbiota in infectious disease [J]. Trends in Microbiology, 2008, 16(3): 107-114
- [3] Liping Zhao, Jian Shen. Whole-body systems approaches for gut microbiota-targeted, preventive health care [J]. Journal of Biotechnology, 2010, 149(3): 183-190
- [4] 胡旭,王涛,王沥,等.肠道共生微生物与健康 and 疾病[J].中国微生物学杂志,2012,24(12):1134-1139  
Hu X, Wang T, Wang L, et al. Relationship between Human Intestinal Symbiotic Microbes and Health and Disease [J]. Chinese Journal of Microecology, 2012, 24(12): 1134-1139
- [5] Komai M, Nanno M. Intestinal microflora and longevity [M]. Functions of fermented milk. Elsevier Applied Science, London, UK. 1992
- [6] Turnbaugh P J, Hamady M, Yatsunenko T, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins [J]. Nature, 2009, 457: 480-484
- [7] Andreasen A S, Larsen N, Pedersen-Skovsgaard T, et al. Effects of *Lactobacillus acidophilus* NCFM on insulin sensitivity and the systemic inflammatory response in human subjects [J]. British Journal of Nutrition, 2010, 104: 1831-1838
- [8] Maria S, Gunnar M, Rangne F, et al. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties [J]. Journal of Biotechnology, 2001, 84(3): 197-215
- [9] 麦热姆妮萨·艾麦尔,乌斯满·依米提,多力坤.麦麦提优素莆等.具有高效抑菌活性的肠道乳酸菌的筛选[J].食品工业科技,2012,33(24):210-214  
Maramnisa A, W Yimit, A dolkun, et al. Selection of High-efficient Antibacterial Intestinal Lactic Acid Bacteria [J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(24): 210-214
- [10] Netherwood T R, Bowden P, Harrosin A G, et al. Gene Transfer in The Gastrointestinal Tract [J]. Applied & Environmental Microbiology, 1999, 65: 5139-5141
- [11] Charteris W P, Kelly P M, Morelli L, et al. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species [J]. Journal of Food Protection, 1998, 61: 1636-1643
- [12] Ataie J A, Larijani B, Majd H A, et al. Cholesterol-lowering effect of probiotic yogurt in comparison with ordinary yogurt in mildly to moderately hypercholesterolemic subjects [J]. Annals of Nutrition and Metabolism, 2009, 54(1): 22-27
- [13] Jones M L, Martoni C J, Parent M, et al. Cholesterol-lowering efficacy of a microencapsulated bile salt hydrolase-active *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242 yoghurt formulation in hypercholesterolaemic adults [J]. British Journal of Nutrition, 2012, 107(10): 1505-1513
- [14] 王俊国.降胆固醇益生乳杆菌的筛选及其降胆固醇作用的研究[D].内蒙古农业大学,2008  
Wang Jun-Guo. Screening of cholesterol removal Properties of *Lactobacillus* and Study the correlation of Its Cholesterol-lowering Effects Between in Vitro and in Vivo [D]. Inner Mongolia Agricultural University, 2008
- [15] 高权新,吴天星,王进波.肠道微生物与寄主的共生关系研究进展[J].动物营养学报,2010,22(3):519-526  
Gao Quan-xin, Wu Tian-Xing, Wang Jin-bo. Advance in Research on Symbiotic Relationship between Gut Microbiota and Host [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2010, 22(3): 519-526
- [16] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. CLSI document M100-S20 [S]. Wayne, P A: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010
- [17] GB/T 5009. 128-2003. 食品中胆固醇的测定方法[S].北京:中国标准出版社,2003:135-138  
GB/T 5009. 128-2003. Method for Determination of Cholesterol in Foods [S]. Beijing: Standards Press of China, 2003: 135-138

- [18] 王友湘,陈庆森,阎亚丽.用于乳酸菌分离鉴定的几种培养基的筛选及应用[J].食品科学,2007,28(9):374-377  
Wang You-xiang, Chen Qing-sen, Yan Ya-li. Screen and Application of A Few Culture Media in Isolation and Identification Lactobacillus [J]. Food Science, 2007, 28(9): 374-377
- [19] 布坎南 R E, 吉布斯 N E. 伯杰氏细菌鉴定手册[M].第8版.中国科学院微生物研究所译.北京:科学出版社,1984  
Buchanan R E, Gibbs N E. Bergey Bacterial Identification Manual [M]. 8th Edition. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing: Science Press, 1984
- [20] Lambert R J, Pearson J. Susceptibility testing: accurate and reproducible minimum inhibitory concentration(MIC) and non-inhibitory concentration(NIC) values [J]. Journal of Applied Microbiology, 2000, 88: 784-790
- [21] 刘冬梅,李理,杨晓泉,等.用牛津杯法测定益生菌的抑菌活力[J].食品研究与开发,2006,27(3):110-111  
Liu Dong-mei, LiLi, Yang Xiao-quan, et al. Determination of Antimicrobial Activity of Probiotic by Assay System [J]. Food Research and Development, 2006, 27(3): 110-111
- [22] Kobayashi H. A Proton-Translocating ATPase Regulates pH of the Bacterial Cytoplasm [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1985, 260(1): 72-76
- [23] Suzuki T, Kobayashi H. Regulation of the Cytoplasmic pH by a Proton-translocating ATPase in Streptococcus faecalis (faecium): A Computer Simulation [J]. European Journal of Biochemistry, 1989, 180(2): 467-471
- [24] Kobayashi H, Suzuki T, Unemoto T. Streptococcal Cytoplasmic pH is Regulated by Changes in Amount and Activity of a Proton-translocating ATPase [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1986, 261(2): 627-630
- [25] 朱晓莹,买日艳姆古丽,努尔古丽·热合曼,等.酸驼乳中优势乳酸菌的胃肠道耐受特性研究[J].食品研究与开发, 2012, 33(12):183-186  
Zhu Xiao-ying, Maryamgul, Nurgul·Rahman, et al. Study on the Tolerance to Gastrointestinal Tract of the Dominant Lactic Acid Bacteria in Traditional Fermented Camel Milk-Shubat [J]. Food Research and Development, 2012, 33(12): 183-186
- [26] Bustos A Y, Saavedra L, de Valdez GF, et al. Relationship between bile salt hydrolase activity, changes in the internal pH and tolerance to bile acids in lactic acid bacteria [J]. Biotechnology Letters, 2012, 34(8): 1511-1518
- [27] 潘露.中国传统发酵食品中乳酸菌的耐药性评估及功能性菌株筛选[D].江南大学,2011  
Pan Lu. Antibiotic Resistance Assessment and Function Strain Screening of Lactic Acid Bacteria From Chinese Fermented Foods [D]. Jiangnan University, 2011
- [28] Mustafa A M, Hassan Z, Mohd N H, et al. Evaluation on Antibacterial Activity of Lactobacillus acidophilus Strains Isolated from Honey [J]. American Journal of Applied Sciences, 2012, 9(6): 807-817
- [29] Chávarri M, Marañón I, Ares R, et al. Microen-capsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions [J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 142(1): 185-189