

降胆固醇和耐酸耐胆盐益生菌的筛选研究

贺珊珊¹, 鲍志宁², 林伟锋¹, 夏枫耿²

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640) (2. 广州市微生物研究所, 广东广州 510663)

摘要: 本研究通过含有胆固醇胶束的 MRS-胆固醇液体培养基从五株益生菌中筛选出降胆固醇能力较强的益生菌, 接着对筛选出的益生菌进行耐酸、耐胆盐试验。结果表明, 五株益生菌都有降胆固醇的功能, 其中干酪乳杆菌 LCA-1、鼠李糖乳杆菌 LR-D 和植物乳杆菌 LP-C 的胆固醇降解率较高, 分别为 25.26%、22.18% 和 20.03%; LR-D 能够短时耐受低 pH 值环境, 在 pH 2.5 的发酵液中培养 2 h 的存活率能够达到 14.39%, 但是耐胆盐能力较差; LP-C 能够长时间耐受低 pH 值的环境, 具有较强的胆盐耐受能力, 在高胆盐环境 (0.5%) 中培养 2 h 的存活率高达 133.75%, 培养 24 h 的活菌数仍保持在 1.13×10^5 cfu/mL, 此时其余两株菌的活菌未检出, 说明 LP-C 能够耐受高胆盐环境。植物乳杆菌 LP-C 具有较高的胆固醇去除率, 能够耐受低 pH 值和高胆盐环境。因此, 可用于进一步研究与开发。

关键词: 筛选; 益生菌; 胆固醇; 耐酸耐胆盐特性

文章编号: 1673-9078(2019)08-198-206

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.8.029

Screening of Cholesterol-reducing Probiotics and Its Acid and Bile Salt Tolerance

HE Shan-shan¹, BAO Zhi-ning², LIN Wei-feng¹, XIA Feng-geng²

(1. School of Food Sciences and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Guangzhou Microbiology Research Institute, Guangzhou 510063, China)

Abstract: In this study, probiotics with strong cholesterol-lowering ability were screened from five probiotics by using MRS-cholesterol liquid medium containing cholesterol micelles, and the selected probiotics were tested for their acid and bile tolerance. The results demonstrated that all the five strains exhibited cholesterol-lowering function, with the *Lactobacillus casei* (LCA-1), *Lactobacillus rhamnosus* (LR-D) and *Lactobacillus plantarum* (LP-C) having higher cholesterol degradation rates (as 25.26%, 22.18% and 20.03% respectively). LR-D could tolerate a low pH environment for a short time period but exhibited poor bile salt tolerance, with a survival rate of 14.39% after a 2 h culture in the fermentation broth at pH 2.5. LP-C could tolerate a low acid environment for a long time period and exhibited strong bile salt tolerance, with a survival rate of 133.75% and the viable cell number of 1.13×10^5 cfu/mL after being cultured in high bile salt medium (0.5%) for 2 h and 24 h, respectively. In these cases, the other two strains remained undetected. These results indicated that LP-C could tolerate the high bile salt environment. LP-C possessed a high cholesterol-removing rate and could withstand a low pH and high bile salt environment. Therefore, this probiotic can be used for further research and development.

Key words: screen; probiotics; cholesterol; acid and bile salt resistance

近 30 年来, 中国人群的血脂水平逐步升高, 血脂异常患病率明显增加^[1], 血脂主要是由甘油三酯及胆固醇组成。胆固醇是身体组织的重要组成部分, 过高的胆固醇摄入已经成为诱发冠心病、动脉粥样硬化、脑中风等心脑血管疾病的重要因素^[2,3]。研究表明, 成人血清总胆固醇 (total cholesterol, TC) 平均为 4.50 mmol/L^[4], 人体血清胆固醇每高出正常水平 1 mmol,

收稿日期: 2019-01-14

基金项目: 广州市科技计划项目 (201806010070)

作者简介: 贺珊珊 (1992-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品生物技术

通讯作者: 林伟锋 (1970-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 食品生物技术

心血管疾病的风险便增加约 35%^[5]。人群血清胆固醇水平的升高将导致 2010~2030 年期间我国心血管病事件约增加 920 万^[6], 因此如何降低人体的血清胆固醇水平成为人们关注焦点。

2001 年, 世界粮农组织 (FAO) 和世界卫生组织 (WHO) 将益生菌定义为通过摄取适当的量、对食用者的身体健康能发挥有效作用的活菌。20 世纪 70 年代, 科学家们通过研究饮用发酵乳制品的非洲 Massi 人和新生儿血清胆固醇以及调查常饮酸乳的美国人等, 发现益生菌具有降低人体血清胆固醇的作用^[7-9]。Gilliland^[10]对肠道乳杆菌的降胆固醇作用进行了研

究,提出了益生菌在生长过程中通过降解胆盐促进胆固醇的分解代谢从而降低胆固醇含量的观点。Gilliland^[11]等证实菌体对胆固醇有吸收作用。Frank^[12]提出共沉淀作用去除胆固醇,胆固醇的溶解度取决于胆盐的溶解度,而胆盐转化成游离胆酸后容易吸附到膳食成分和菌体上,因其溶解度下降而使胆固醇共沉淀析出。张佳程^[13]利用胆固醇含量较高的奶油来筛选降低胆固醇能力强的株。21世纪之后,涌现出大量关于益生菌降胆固醇的研究,综合国内外的研究,降胆固醇益生菌种类主要集中在乳杆菌属,如嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)^[14,15],干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)^[16,17],布氏乳杆菌(*Lactobacillus buchneri*)^[18],唾液乳杆菌(*Lactobacillus salivarius*)^[19,20],鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*)^[21],植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)^[15,22-24],罗伊氏乳杆菌(*L. reuteri*)^[25,26],保加利亚乳杆菌(*Lactobacillus bulgaricus*)^[27]等。通过对降胆固醇的研究,已有许多的降胆固醇益生菌被人们发现并应用于生活中。本实验选用 MRS-胆固醇培养基对广东省种质资源库中的五株益生菌进行降胆固醇能力筛选,并对筛选出的菌株进行耐酸、耐胆盐实验,找出最优菌株,为进一步开发相关产品提供技术依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

嗜酸乳杆菌(编号为 GW-1-1201-0103-06,以下简称 LAC-D);鼠李糖乳杆菌(编号为 GW-1-1201-1808-05,以下简称 LR-D);干酪乳杆菌(编号为 GW-1-1201-0301-06,以下简称 LCA-1);植物乳杆菌(编号为 GW-1-1201-1612-04,以下简称 LP-C);罗伊氏乳杆菌(编号为 GW-1-1201-1805-01,以下简称 LSY-1),五株益生菌均来自广东省微生物种质资源库。

1.1.2 培养基^[28]

MRS 液体培养基, MRS 固体培养基, MRS-胆固醇培养基(MRS-C), 121 °C 灭菌 20 min。

1.1.3 主要试剂

胆固醇(分析纯);邻苯二甲醛(分析纯);无水乙醇(分析纯);Tween-80(化学纯);牛胆盐;蔗糖脂肪酸酯。

1.1.4 主要仪器

隔水式恒温培养箱,上海福玛实验设备有限公司;752N 型紫外可见分光光度计,上海精密科学仪器有限

公司;手提式压力蒸汽灭菌器,合肥华泰医疗设备有限公司;雷磁 pH 计,上海仪电科学仪器股份有限公司;JB-2 恒温磁力搅拌器,常州澳华仪器有限公司;苏州 SW-CJ-2G 型双人单面净化工作台,苏州净化设备有限公司等。

1.2 实验方法

1.2.1 降胆固醇试验

1.2.1.1 MRS-胆固醇培养基^[29]

1.2.1.2 胆固醇的测定^[30]

1.2.1.3 胆固醇标准曲线的测定

制备邻苯二甲醛溶液:准确称量 0.05 g 邻苯二甲醛试剂,用冰乙酸溶解并定容 100 mL,备用。

制备胆固醇标准储备液(1.0 mg/mL):准确称量 0.10 g 胆固醇,用无水乙醇定容 100 mL,4 °C 冷藏备用。

制备胆固醇稀释液(0.10 mg/mL):用移液管移取 5 mL 胆固醇标准储备液于 50 mL 容量瓶中,用无水乙醇定容至刻度,备用。

分别吸取 0.20、0.30、0.40、0.45、0.55、0.60、0.65、0.70、0.80、0.85、0.90、1.00、1.10、1.20 mL 胆固醇稀释液于试管中,加冰乙酸至 2 mL,接着加入 4 mL 邻苯二甲醛溶液,室温放置 10 min,冷水浴中缓慢加入 4 mL 浓硫酸,涡旋混匀,自然冷却,静置 10 min,在 20 min 内测定 550 nm 处的吸光度值。

1.2.1.4 胆固醇标准曲线

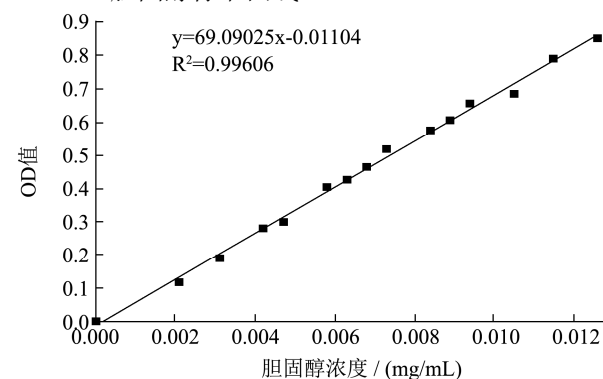


图1 胆固醇标准曲线

Fig.1 Standard curve of cholesterol

以胆固醇质量浓度(mg/mL)为横坐标,550 nm 下的吸光度值为纵坐标,作标准曲线,得图 1。如图所示,所得到的拟合直线方程为: $y = 69.09025x - 0.01104$ 。该试验使用的胆固醇测定方法是经典的方法,该法的胆固醇含量在 400 mg 以内时和光密度呈良好的线性关系。该拟合直线方程的 $R^2 = 0.99606$, 有较高的拟合度,说明此直线方程可以作为标准曲线。

1.2.1.5 益生菌降胆固醇试验

无菌条件下接种各菌株,使得 MRS-胆固醇培养基中的初始活菌数保持在 1×10^8 cfu/mL,于 37 °C 恒温培养,培养 0 h、24 h、72 h 取样计活菌数,测定 pH 值、滴定酸度和上清液中的胆固醇含量。

活菌数的测定参考文献^[31]; 滴定酸度用电位滴定法测定^[32]; pH 用 pHS-25 型酸度计测定^[33]。

$$\text{胆固醇去除率}(\%) = \frac{\text{OD}_{\text{对照}} - \text{OD}_{\text{发酵}}}{\text{OD}_{\text{对照}}} \times 100\%$$

其中: $\text{OD}_{\text{对照}}$ 是指空白对照组中的胆固醇 OD 值; $\text{OD}_{\text{发酵}}$ 是指实验组发酵不同时间的发酵上清液中胆固醇的 OD 值。

1.2.2 耐酸试验

用浓度为 0.1 mol/L 的 HCl 将 MRS 液体培养基 pH 值分别调为 2.0、2.5、3.0、3.5; 121 °C 灭菌 20 min。冷却,无菌条件下接种菌株,使得培养基中的初始活菌数保持在 1×10^8 cfu/mL,于 37 °C 恒温培养,培养 0 h、2 h、8 h、24 h 取样计活菌数,测定 pH 值和滴定酸度。

$$\text{菌株存活率}(\%) = \frac{\text{培养}n\text{小时发酵液中活菌数}}{\text{培养}0\text{h发酵液中初始活菌数}} \times 100\%$$

其中: n 代表 2 h、8 h 和 24 h。

1.2.3 耐胆盐试验

用牛胆盐将 MRS 液体培养基的胆汁盐质量分数,分别调为 0.1%、0.3%、0.5%, 121 °C 灭菌 20 min。无菌条件下接种菌株,使得培养基中的初始活菌数保持在 1×10^8 cfu/mL,于 37 °C 恒温培养,培养 0 h、2 h、8 h、24 h 取样计活菌数,测定 pH 值和滴定酸度。

1.3 数据处理分析

采用 Origin 9.0 对试验数据进行作图。数据结果以平均数±标准差表示,采用 SPSS 19.0 统计软件中的独立样本 *t* 检验进行数据分析。

2 结果与讨论

2.1 降胆固醇益生菌的研究

2.1.1 五株益生菌发酵特性的研究

将五株益生菌在 MRS-胆固醇培养基中培养 72 小时,测定发酵液中的 pH 值、滴定酸度和活菌数,结果见表 1。

表 1 五株益生菌在胆固醇培养基中的发酵参数

Table 1 Fermentation parameters of five probiotics in cholesterol medium

菌株	发酵 0 h			发酵 24 h		
	pH	滴定酸度	活菌数/($\times 10^8$ cfu/mL)	pH	滴定酸度	活菌数/($\times 10^8$ cfu/mL)
LAC-D	5.5±0.02 ^c	41.29±0.97 ^a	1.43±0.07 ^a	3.88±0.02 ^c	193.37±0.43 ^b	6.07±1.25 ^{cd}
LR-D	5.79±0.0 ^b	32.98±0.92 ^c	0.41±0.02 ^b	4.02±0.03 ^b	148.60±0.46 ^d	59.67±8.89 ^a
LCA-1	5.99±0.0 ^a	29.74±0.49 ^d	1.21±0.14 ^a	3.92±0.03 ^c	181.80±0.90 ^c	24.83±0.65 ^b
LP-C	5.49±0.0 ^c	41.41±0.40 ^a	1.16±0.36 ^a	3.68±0.03 ^d	200.60±0.59 ^a	11.57±0.51 ^c
LSY-1	5.78±0.02 ^b	35.63±0.45 ^b	0.46±0.04 ^b	4.65±0.02 ^a	89.61±0.66 ^e	2.33±0.15 ^d
菌株	发酵 72 h					
	pH	滴定酸度	活菌数/($\times 10^8$ cfu/mL)			
LAC-D	3.95±0.01 ^b	198.12±0.96 ^c	0.20±0.02 ^c			
LR-D	3.98±0.02 ^b	169.71±0.90 ^d	2.50±0.26 ^a			
LCA-1	3.88±0.03 ^c	203.75±0.93 ^a	0.07±0.01 ^c			
LP-C	3.78±0.01 ^d	200.65±0.77 ^b	0.16±0.02 ^c			
LSY-1	4.10±0.05 ^a	158.77±0.39 ^e	2.05±0.26 ^b			

注: 同列比较, 不同字母表示数据存在显著差异 ($p < 0.05$)。表 2~4 同。

由表 1 可知, 5 株菌的 pH 随发酵时间段延长而降低。0 h~24 h 之间 pH 值的降低速度较快, 24 h 以后降低速度变慢或保持不变, 发酵液中的 pH 值降低至 3.8 左右便不再下降, 而五株菌株发酵液中的滴定酸度随发酵时间段延长而增加, 菌株 LAC-D、LP-C 的滴定酸度值在 24 h 已经达到最高值, 此时的活菌数也达到最高。培养 24 h 以后, 五株菌株的滴定酸度均趋于平缓, 活菌数呈下降趋势, 说明发酵液中没有新的活菌产生。培养 72 h 各发酵液的 pH 值由小到大排列依次

为: LP-C < LCA-1 < LAC-D < LR-D < LYS-1; 滴定酸度值由小到大排序依次为: LYS-1 < LR-D < LAC-D < LP-C < LCA-1, 其中菌株 LSY-1 和 LR-D 的滴定酸度值相差不大, 菌株 LP-C、LAC-D 和 LCA-1 的滴定酸度值相差不大; 各发酵液活菌数由小到大排列依次为: LP-C < LCA-1 < LAC-D < LYS-1 < LR-D。益生菌在 MRS-胆固醇培养基发酵过程中, pH 值和滴定酸度值呈负相关的关系, 发酵液中 pH 值越低, 滴定酸度值越高, 活菌数相应越低, 故发酵产酸抑制益生菌生长。

2.1.2 五株益生菌降胆固醇实验结果

将五株菌株接种于胆固醇-MRS 培养基中，于 37 °C 培养 24 h、72 h，测定发酵上清液中的胆固醇含量，结果如图 2、图 3。

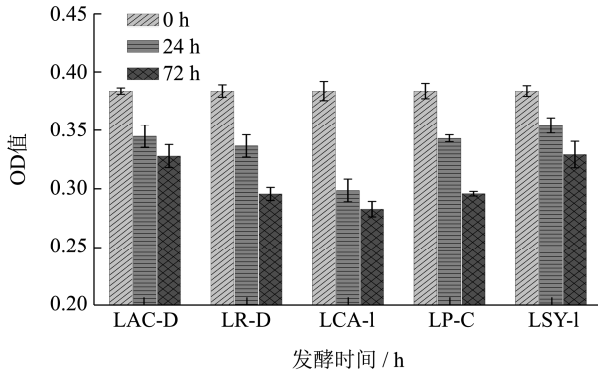


图 2 五株益生菌发酵上清液中胆固醇的 OD 值变化

Fig.2 Changes of OD value of cholesterol in the fermentation supernatant of five probiotics

如图 2 所示，各菌株发酵液发酵上清液在培养 0 h~24 h 的 OD 值下降较快，培养 24 h 的发酵液中活菌数最高，24 h~72 h 的 OD 值降低较慢，培养 72 h 的发酵液中的活菌数降低，说明益生菌吸收胆固醇的能力高度依赖于它们的生长情况^[34,35]。

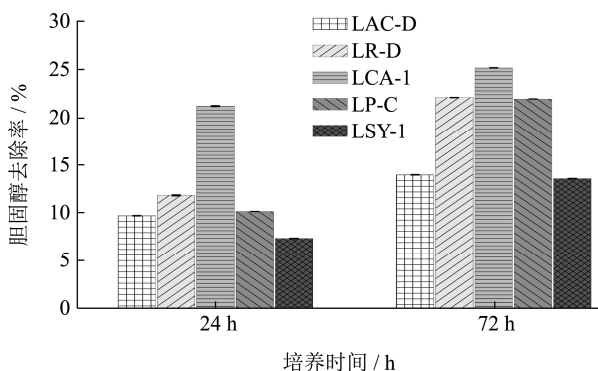


图 3 菌株降胆固醇效果的比较

Fig.3 Comparison of cholesterol-reducing effects of strains

如图 3 所示，五株益生菌的胆固醇去除率随着培养时间的延长而增加。发酵 24 h 时，菌株降胆固醇效果由大到小依次排序：LCA-1>LR-D>LAC-D>LP-C>LSY-1，只有菌株 LCA-1 的胆固醇去除率高于 20%。当发酵 72 h 时，菌株降胆固醇效果由大到小依次排序：LCA-1>LR-D>LP-C>LAC-D>LSY-1，其中菌株 LR-D、LP-C 和 LCA-1 的胆固醇去除率高于 20%，说明五株益生菌发酵液降胆固醇效果随着发酵时间延长而升高。

如图 3、表 1 所示，菌株 LP-C 在培养 24 h 时的活菌高达 10^9 cfu/mL，72 h 后低至 10^6 cfu/mL，降低了三个数量级，但是胆固醇去除率较高，当培养 24 h 时，发酵液中菌株基本处于快速增长末期，培养 72 h 时，

活菌数快速降低。Kimoto 等人在排除共沉淀作用的情况下，发现生长中的细菌去除的胆固醇显著多于热杀死细菌，且培养基及细胞各组分中的胆固醇总量等于最初加入培养体系中的胆固醇量^[35]。因此，死亡菌体在降胆固醇过程中发挥重要作用。菌株 LAC-D 在培养 24 h 时的胆固醇去除率为 9.79%，培养 72 h 时的胆固醇去除率为 14.06%，活菌数由 6.07×10^8 cfu/mL 降低至 2.0×10^7 cfu/mL，降低了约一个数量级。有研究表明，吸收到细胞内部的胆固醇并没有被降解，细胞吸收的胆固醇会重新析出^[36]，因此 LAC-D 降胆固醇的机理可能是 LAC-D 细胞对胆固醇的吸附作用发挥主要作用。菌株 LCA-1 培养 24 h 时的滴定酸度值为 181.80 °T，培养 72 h 时的滴定酸度值为 203.75 °T，增加了约 12.07%，而活菌数在此期间降低了约三个数量级，说明菌株 LCA-1 的活菌数在 24 h~72 h 之间某一个时间点达到最大值，稳定存在一段时间之后呈下降趋势。当菌株活菌下降后，菌株的胆固醇去除率并没有降低，菌株 LCA-1 降胆固醇机理可能是吸收和共沉淀共同作用的结果，且共沉淀作用大于吸收作用^[37]。研究表明^[38]，分泌的胆盐水解酶能特异性水解结合胆盐，将结合胆盐转化为游离胆汁酸和氨基酸，解离出的游离胆汁酸与胆固醇形成复合物共沉淀，从而降低胆固醇含量。当培养 24 h~72 h，菌株 LR-D 的胆固醇去除率、滴定酸度值随着时间的延长而增加，活菌数降低约一个数量级，机理同菌株 LCA-1。菌株 LSY-1 的胆固醇去除率、滴定酸度值随着时间的延长而增加，活菌数基本不变，说明菌株 LSY-1 能够在 MRS-胆固醇培养基中长时间发酵。

综上，比较了五株益生菌降胆固醇能力，并分析了各菌株在含胆固醇培养基中的发酵特性，五株菌株均有降胆固醇的能力，但其能力大小具有菌株差异性。其中 LCA-1、LR-D 和 LP-C 的胆固醇去除率均高于 20%，降胆固醇能力较高，因此将 LCA-1、LR-D 和 LP-C 作为候选菌株作进一步实验。

2.2 降胆固醇益生菌耐酸、耐胆盐的研究

2.2.1 三株降胆固醇菌株不同处理条件下的培养结果分析

2.2.1.1 菌株 LCA-1 在不同处理条件下的结果

由图 4、表 2 可知，菌株 LCA-1 在 pH 2.5、pH 3.0 以及 0.3%胆盐、0.5%胆盐的发酵液中的 pH 值基本不变，活菌数降低，所测的滴定酸度为培养基中固有的滴定酸度值，发酵过程中基本没有活菌产生，因此活菌数降低较快。在 pH 3.5 的酸性培养基和胆盐浓度为 0.1%的 MRS 培养基中，两者发酵液的 pH 值略微降低，

滴定酸度值缓慢上升,活菌数降低较慢,说明发酵期间有新的活菌产生,新产生的活菌低于死亡的菌体,造成发酵液中的活菌数整体上呈下降趋势。实验进一步说明,LCA-1不能耐受pH 2.5、0.3%胆盐和0.5%胆盐环境,但能够短时间耐受pH 3.0的酸性环境,菌株LCA-1能够在pH 3.5和0.1%胆盐的环境中生长,生长速度较慢。

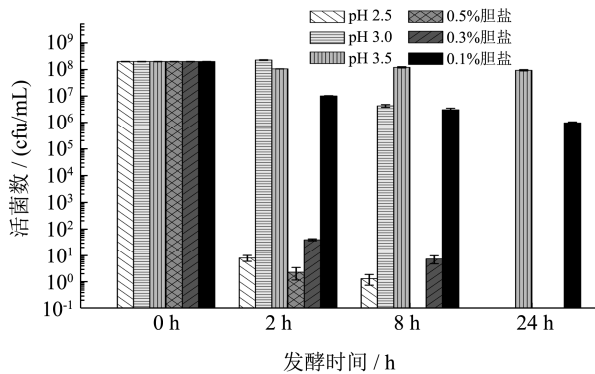


图4 菌株LCA-1在不同处理条件下发酵不同时间的活菌数变化

Fig.4 Changes in viable counts of strain LCA-1 under different treatment conditions at different times

2.2.1.2 菌株LR-D在不同处理条件下的结果

对比图5、和图4,菌株LR-D在发酵培养基中的活菌数整体上高于LCA-1,说明LR-D的耐酸、耐胆盐能力较LCA-1强。由表3可知,菌株LR-D能够短时间内(2h)耐受的pH为2.5的高酸性环境,培养24h时,LR-D没有全部被杀死,此时的活菌数为

1.01×10^4 cfu/mL,与初始活菌(1.07×10^8 cfu/mL)相比降低了四个数量级。菌株LR-D在0.5%胆盐的发酵液中发酵不同时间的pH值、滴定酸度值基本不变,活菌数显著降低,培养2h降低了四个数量级,8h的活菌数降低至173 cfu/mL,24h后发酵液中的活菌数未检出。在0.3%胆盐的环境中,发酵液中的pH值和滴定酸度值基本不变,当培养2h时,LR-D的活菌数降低显著,而2h后的活菌数降低较慢,可能是部分LR-D菌株能够耐受0.3%胆盐。LR-D能够耐受pH 3.0、pH 3.5和0.1%的胆盐环境,并能在发酵液中稳定生长,耐受pH 2.5和0.3%胆盐的能力较弱,0.5%胆盐耐受力最弱。因此,通过研究菌株的发酵特性更能表现菌株LR-D在不同处理条件下的耐受能力。

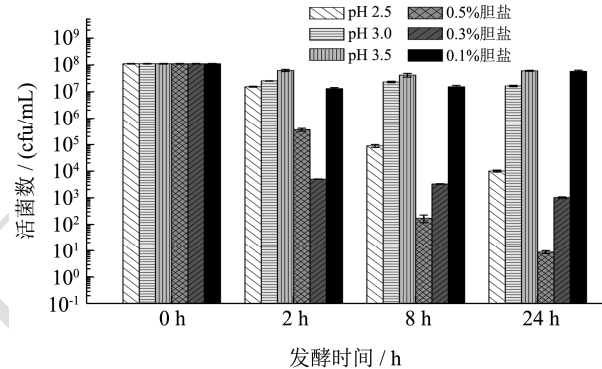


图5 菌株LR-D在不同处理条件下发酵不同时间的活菌数变化

Fig.5 Changes in viable counts of strain LR-D at different fermentation times under different treatment conditions

表2 菌株LCA-1在不同处理条件下的发酵参数

Table 2 Fermentation parameters of strain LCA-1 under different treatment conditions

不同处理条件	0 h		2 h	
	pH 值	滴定酸度值	pH 值	滴定酸度值
pH 2.5	2.68±0.01 ^e	153.29±0.43 ^a	2.68±0.01 ^e	151.32±0.42 ^a
pH 3.0	3.06±0.01 ^d	138.55±0.48 ^b	3.08±0.01 ^d	115.38±0.44 ^b
pH 3.5	3.67±0.02 ^c	115.25±0.51 ^b	3.66±0.02 ^c	114.64±0.43 ^b
0.5%胆盐	5.99±0.01 ^a	27.78±0.38 ^c	5.98±0.01 ^a	27.80±0.19 ^d
0.3%胆盐	5.99±0.01 ^a	26.65±0.32 ^d	5.98±0.01 ^a	30.24±0.10 ^c
0.1%胆盐	5.91±0.01 ^b	27.93±0.25 ^c	5.89±0.01 ^b	21.05±0.23 ^e
不同处理条件	8 h		24 h	
	pH 值	滴定酸度值	pH 值	滴定酸度值
pH 2.5	2.68±0.01 ^e	141.80±0.38 ^a	2.68±0.00 ^e	144.73±0.47 ^a
pH 3.0	3.07±0.02 ^d	133.43±0.51 ^b	3.07±0.02 ^d	133.08±0.18 ^b
pH 3.5	3.64±0.01 ^c	115.38±0.28 ^b	3.51±0.01 ^c	122.50±0.45 ^b
0.5%胆盐	5.98±0.01 ^b	27.21±0.36 ^c	5.99±0.01 ^b	27.58±0.40 ^c
0.3%胆盐	5.98±0.01 ^a	27.32±0.26 ^c	5.97±0.01 ^a	25.71±0.38 ^d
0.1%胆盐	5.89±0.01 ^a	27.58±0.43 ^c	5.85±0.01 ^a	27.68±0.12 ^c

表3 菌株 LR-D 在不同处理条件下的发酵参数

Table 3 Fermentation parameters of strain LR-D under different treatment conditions

不同处理条件	0 h		2 h	
	pH 值	滴定酸度值	pH 值	滴定酸度值
pH 2.5	2.55±0.01 ^e	145.67±0.23 ^a	2.58±0.03 ^e	147.56±0.23 ^a
pH 3.0	3.02±0.01 ^d	130.22±0.20 ^b	3.01±0.01 ^d	129.60±1.18 ^b
pH 3.5	3.52±0.01 ^c	112.43±0.28 ^b	3.52±0.01 ^c	107.85±1.21 ^b
0.5%胆盐	6.05±0.01 ^a	23.78±0.05 ^d	6.03±0.02 ^a	23.85±0.07 ^d
0.3%胆盐	6.04±0.01 ^a	21.81±0.47 ^e	6.02±0.01 ^a	22.58±0.13 ^d
0.1%胆盐	5.88±0.01 ^b	30.48±0.75 ^c	5.88±0.01 ^b	30.32±0.27 ^c
不同处理条件	8 h		24 h	
	pH 值	滴定酸度值	pH 值	滴定酸度值
pH 2.5	2.59±0.01 ^e	145.71±0.07 ^a	2.61±0.01 ^e	146.75±0.59 ^a
pH 3.0	3.09±0.01 ^d	132.14±0.49 ^b	3.08±0.01 ^d	129.44±0.51 ^b
pH 3.5	3.48±0.01 ^c	108.02±0.16 ^b	3.39±0.02 ^c	119.18±1.29 ^b
0.5%胆盐	6.03±0.02 ^a	23.67±0.24 ^d	6.05±0.01 ^a	22.63±0.23 ^d
0.3%胆盐	6.03±0.01 ^a	23.63±0.32 ^d	6.02±0.01 ^a	22.74±0.59 ^d
0.1%胆盐	5.85±0.01 ^b	35.66±0.49 ^c	5.23±0.03 ^b	40.81±0.28 ^c

表4 菌株 LP-C 在不同处理条件下的发酵参数

Table 4 Fermentation parameters of strain LP-C under different treatment conditions

不同处理条件	0 h		2 h	
	pH 值	滴定酸度值	pH 值	滴定酸度值
pH 2.5	2.57±0.02 ^f	145.88±0.36 ^a	2.61±0.01 ^f	145.88±1.56 ^a
pH 3.0	3.01±0.01 ^e	128.23±0.39 ^b	3.03±0.01 ^e	130.03±0.58 ^b
pH 3.5	3.47±0.01 ^d	113.71±0.45 ^b	3.46±0.01 ^d	109.00±0.22 ^b
0.5%胆盐	6.05±0.01 ^a	23.52±0.15 ^d	6.04±0.01 ^a	23.58±0.05 ^d
0.3%胆盐	5.99±0.01 ^b	22.56±0.71 ^d	5.92±0.01 ^b	23.74±0.52 ^d
0.1%胆盐	5.83±0.01 ^c	31.80±0.36 ^c	5.71±0.01 ^c	34.67±0.37 ^c
不同处理条件	8 h		24 h	
	pH 值	滴定酸度值	pH 值	滴定酸度值
pH 2.5	2.64±0.01 ^f	147.13±1.03 ^a	2.68±0.02 ^f	145.77±0.84 ^a
pH 3.0	3.10±0.02 ^e	131.75±0.50 ^b	3.03±0.01 ^e	134.17±0.66 ^b
pH 3.5	3.34±0.01 ^d	118.18±0.51 ^b	3.15±0.01 ^d	150.69±1.97 ^b
0.5%胆盐	6.00±0.01 ^a	23.96±0.26 ^e	5.99±0.01 ^a	23.51±0.26 ^e
0.3%胆盐	5.87±0.02 ^b	26.44±0.26 ^d	5.85±0.01 ^b	25.62±0.24 ^d
0.1%胆盐	5.06±0.02 ^c	47.60±0.67 ^c	4.75±0.02 ^c	62.20±0.47 ^c

2.2.1.3 菌株 LP-C 在不同处理条件下的结果

对比图 4、图 5 和图 6, LP-C 在不同处理条件下的活菌数明显高于 LCA-1 和 LR-D。由图 6、表 4 可知, pH 2.5、pH 3.0 和 0.5%胆盐、0.3%胆盐的发酵培养基中的 pH 值、滴定酸度值基本不变, 当发酵液的 pH 值为 2.5 时, LP-C 发酵 2 h 的活菌数降至 0.91×10^5 cfu/mL, 与初始活菌数 (1.14×10^8 cfu/mL) 相比降低了约三个数量级, 24 h 时的活菌数为 5.14×10^3 cfu/mL, 降低了约两个数量级, 菌株 LP-C 耐受 pH 2.5 的低 pH

值的能力比 LR-D 弱, 但是 LP-C 能够长时间耐受高酸性环境。培养 8 h 后, 在含有 0.5%、0.3%胆盐的发酵液中 LP-C 的活菌数高于 1.0×10^6 cfu/mL, 说明 LP-C 能够耐受高胆盐的环境。

2.2.2 三株降胆固醇菌株的耐酸能力分析

将三株降胆固醇菌株置于 pH 值分别为 2.5、3.0 和 3.5 的 MRS 液体培养基中培养 2 h、8 h 和 24 h, 计算不同处理条件下不同发酵时间的活菌存活率。由表 5 可知, 菌株 LCA-1 不耐受 pH 2.5, 能够短时间内耐

受 pH 3.0, 且短时耐受能力最强。菌株 LP-D 能够短时间内耐受 pH 2.5, 且短时耐受能力最强; 同时, 菌株 LR-D 能够耐受 pH 3.0 的酸性条件。菌株 LP-C 能够长时间耐受 pH 2.5 的高酸性环境, 三株菌株中, LP-C 的耐酸性能最好。LPC 在 pH 3.0 的酸性条件下培养 2 h、8 h 的活菌存活率分别为 64.73%、81.40%, 均高于陈大卫等人^[39]的 9 株在 pH 值为 3.0 的模拟胃液中 37 °C 厌氧培养 3 h 的存活率 (介于 16.10%~46.61% 之间)。

2.2.3 三株降胆固醇菌株的胆盐耐受能力分析

降胆固醇菌株在胆盐浓度分别为 0.1%、0.3% 和 0.5% 的 MRS 培养基中培养 2 h、8 h 和 24 h, 计算不同处理条件下各菌株的活菌存活率。如表 6 可知, 三株菌株均能耐受 0.1% 的胆盐环境, 其中 LP-C 耐受 0.1% 胆盐的能力最高。菌株 LCA-1、LR-D 基本不能

耐受 0.3% 和 0.5% 的胆盐环境, LP-C 能够长时间耐受 0.5% 的高胆盐环境, 说明三株益生菌中, 菌株 LP-C 的胆盐耐受能力最好。

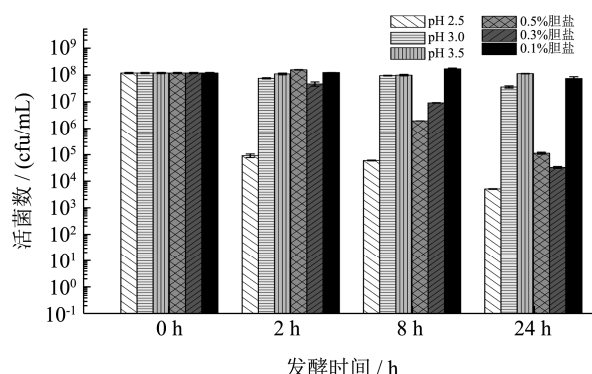


图 6 菌株 LP-C 在不同处理条件下发酵不同时间的活菌数变化
Fig.6 Changes in viable counts of strain LP-C under different treatment conditions at different times

表 5 三株菌株的耐酸能力

Table 5 Acid resistance of three strains (n=3, x±sd)

菌株	pH 2.5			pH 3.0		
	2 h	8 h	24 h	2 h	8 h	24 h
LCA-1	0 ^b	0 ^c	0 ^b	113.5±3.04 ^a	2.14±0.25 ^c	0 ^c
LR-D	14.39±0.52 ^a	0.08±0.01 ^a	0 ^a	23.65±0.38 ^c	21.63±1.44 ^b	15.42±0.91 ^b
LP-C	0.08±0.01 ^b	0.05±0.01 ^b	0.01±0.01 ^a	64.73±3.13 ^b	81.40±2.54 ^a	30.95±2.73 ^a

菌株	pH 3.5		
	2 h	8 h	24 h
LCA-1	53.08±0.38 ^b	60.50±3.28 ^b	46.83±2.52 ^c
LR-D	57.69±5.35 ^b	38.94±6.25 ^c	56.25±2.40 ^b
LP-C	93.75±6.74 ^a	84.82±5.35 ^a	96.43±1.79 ^a

注: 菌株耐酸能力用菌株存活率 (%) 表示; “0”表示未检出; 同列比较, 不同字母表示数据存在显著差异 (p<0.05)。下表同。

表 6 三株菌株的耐胆盐能力

Table 6 Biliary salt tolerance of three strains (n=3, x±sd)

菌株	0.5% 胆盐			0.3% 胆盐		
	2 h	8 h	24 h	2 h	8 h	24 h
LCA-1	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b
LR-D	0.35±0.04 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b
LP-C	113.75±2.42 ^a	1.70±0.01 ^a	0.1±0.01 ^a	40.18±7.14 ^a	7.95±0.18 ^a	0.03±0.01 ^a

菌株	0.1% 胆盐		
	2 h	8 h	24 h
LCA-1	5.07±0.16 ^c	1.53±0.23 ^c	0.49±0.03 ^b
LR-D	12.34±1.15 ^b	14.39±1.69 ^b	53.53±5.30 ^a
LP-C	105.95±0.52 ^a	144.35±10.35 ^a	63.39±10.29 ^a

3 结论

3.1 在进行降胆固醇益生菌的筛选实验时, 筛选出的益生菌除了具备降胆固醇的功能以外, 同时还必须具有益生菌所共有的优良特性, 因此本试验要求筛选的

菌株除具有降胆固醇活性以外, 还必须具备能适应人体肠道特殊环境的活性, 包括耐胃酸性, 耐胆盐活性, 因此需同时考查以上几点, 避免筛选到的菌株具备降胆固醇功能但不具备其他性能或者是具备其他性能而不具备降胆固醇功能的结果。

3.2 五株菌株均具有降胆固醇能力,培养 72 h 的胆固醇去除率分别为 25.26%、22.18%、22.03%、14.06% 和 13.66%, 菌株 LR-D、LCA-1 和 LP-C 的降胆固醇能力均高于 20%, 因此将这三株用于进一步实验。正常人的胃液 pH 值在 1.5~4.5 之间,菌株 LP-C 和 LR-D 可以耐受 pH 2.5 的酸性环境 2 h, 可以保证一定数量的活菌体顺利通过胃酸环境到达小肠。菌株 LP-C 能够耐受低 pH 值环境, 菌株 LR-D 能够短时间内耐受 pH 2.5 的低 pH 值环境, 培养 8 h 时 LR-D 的活菌数未检测出, 而 LPC 在 pH 2.5 的高酸性环境中培养 8 h 的活菌数为 9.1×10^4 cfu/mL, 说明 LP-C 耐受高酸性环境能力强于 LR-D。其次, 菌株 LP-C 的胆盐能力最好, 能够耐受 0.5% 高胆盐环境, 菌株 LR-D 耐胆盐能力不及 LP-C。菌株 LR-D 和 LP-C 耐酸、耐胆盐能力较好, 菌株 LP-C 在高酸 (pH 2.5)、高胆盐 (0.5%) 环境下培养 24 h 后的活菌存活率较高, 相比之下 LP-C 更加有利于在小肠中定植。有研究表明植物乳杆菌具有稳定的降解胆固醇的能力^[40], 与本实验结果相符, 故植物乳杆菌 LP-C 可以用于进一步研究与开发。

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 salthydrolase 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 predictheart attacks? [J]. Annals of Internal Medicine, 1999, 130(11): 933-937
- [4] 林晓斐. 中国居民营养与慢性病状况报告 (2015 年) 发布 [J]. 中医药管理杂志, 2015, 13: 89-89
Lin Xiao-fei. The Report on the Status of Nutrition and chronic diseases of chinese residents (2015) [J]. Journal of Traditional Chinese Medicine Management, 2015, 13: 89- 89
- [5] Manson J E, Tostesonh, Ridker P M, et al. The primary prevention of myocardial infarction [J]. The New England Journal of Medicine, 1992, 326(21): 1406-1416
- [6] Moran A, Gu D, Zhao D, et al. Future cardiovascular disease in china: Markov model and risk factor scenario projections from the coronary heart disease policy model-china [J]. Circ Cardiovasc Qual Outcomes, 2010, 3(3): 243-252
- [7] Mann G V. Studies of a surfactant and cholesteremia in the Maasai [J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 1974, 27(5): 464-473
- [8] Mann G V. A factor in yogurt which lowers cholesteremia in man [J]. Atherosclerosis, 1977, 26(3): 335-340
- [9] Hepner G, Fried R, St J S, et al. hypocholesterolemic effect of yogurt and milk [J]. American Journal of Clinical Nutrition, 1979, 32(1): 19-24
- [10] Gilliland S E, Speck M L. Deconjugation of bile acids by intestinal *Lactobacilli* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1977, 33(1): 15-18
- [11] Gilliland S E, Nelson C R, Maxwell C. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus* [J]. Appl Environ Microbiol, 1985, 49(2): 377-381
- [12] Klaver F A, Van D M R. The assumed assimilation of cholesterol by *Lactobacilli* and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-deconjugating activity [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(4): 1120-1124
- [13] 张佳程, 骆承庠. 乳酸菌对食品中胆固醇脱除作用的研究-乳酸菌菌种 (株) 的筛选 [J]. 食品科学, 1998, 19(3): 20-22
ZHANG Jia-cheng, LUO Cheng-xiang. Study on the removal of cholesterol from food by lactic acid bacteria-screening of lactic acid bacteria [J]. Food Science, 1998, 19(3): 20-22
- [14] Pato U, Surono I S. Bile and acid tolerance of lactic acid bacteria isolated from tempoyak and their probiotic potential [J]. International Journal of Agricultural Technology, 2013, 9(7): 1849-1862
- [15] Chiu Ch, Lu T Y, Tseng Y Y, et al. The effects of Lactobacillus-fermented milk on lipid metabolism in hamsters fed on high-cholesterol diet [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 71(2): 238-245
- [16] 郭春锋. 人源性益生菌降胆固醇机制及影响因素研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2011
GUO Chun-feng. Study on cholesterol-lowering mechanism and influencing factors of human probiotics [D]. Harbin: Institute of Technology, 2011
- [17] Liong M T, Shah N P. Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of *Lactobacilli* strains [J]. Journal of Dairy Science, 2005, 88(1): 55-66
- [18] Sridevi N, Vishwe P, Prabhune A. hypocholesteremic effect of bile salthydrolase from *Lactobacillus buchmeri* ATCC 4005

- [J]. Food Research International, 2009, 42(4): 516-520
- [19] 毕洁.胆盐水解酶提高乳酸菌胆盐耐受能力的酶学与生理学机制研究[D].无锡:江南大学,2016
BI Jie. Enzymatic and physiological mechanisms of bile salt hydrolase to improve the tolerance of lactic acid bacteria bile salts [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2016
- [20] Xu F, Guo F, hu X J, et al. Crystal structure of bile salt hydrolase from *Lactobacillus salivarius* [J]. Acta Crystallographica, 2016, 72(5): 376-381
- [21] 姜华.降胆固醇功能乳酸菌的筛选及其特性的研究[D].南京:南京农业大学,2010
JIANG Hua. Screening and characteristics of cholesterol-lowering lactic acid bacteria [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2010
- [22] 李贵节.降胆固醇乳杆菌的综合评价及 BSH 酶活研究[D].上海:上海交通大学,2008
LI Gui-jie. Comprehensive evaluation of lactobacillus cholerae and study of BSH enzyme activity [D]. Shanghai :Shanghai Jiao Tong University, 2008
- [23] 胡梦坤,岳喜庆.植物乳杆菌 LP1103 的筛选及其降胆固醇作用机理的研究[J].食品科学,2008,29(6):226-229
HU Meng-kun, YUE Xi-qing. Screening of *Lactobacillus plantarum* LP1103 and its mechanism of cholesterol reduction [J]. Food Science, 2008, 29(6): 226-229
- [24] Duary R K, Batish V K, Grover S. Relative gene expression of bile salt hydrolase and surface proteins in two putative indigenous *Lactobacillus plantarum* strains under *in vitro* gut conditions [J]. Molecular Biology Reports, 2012, 39(3): 2541-2552
- [25] 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
- [26] Singh T P, Malik R K, Katkamwar S G, et al. hypocholesterolemic effects of *Lactobacillus reuteri* LR6 in rats fed on high-cholesterol diet [J]. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 2015, 66(1): 71-75
- [27] Kumar R, Dahiya J S, Singh D, et al. Biotransformation of cholesterol using *Lactobacillus bulgaricus* in a glucose-controlled bioreactor [J]. Bioresource Technology, 2001, 78(2): 209-211
- [28] 彭兴兴.乳酸菌发酵南瓜浆的研究[D].广州:华南理工大学, 2016
PENG Xing-xing. Study on fermentation of pumpkin pulp by lactic acid bacteria [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2016
- [29] 贺珊珊,鲍志宁,林伟锋,夏枫耿.一种含有胆固醇胶束的培养基溶液的制备方法:中国,CN108795767A[P]. 2018-11-13
HE Shan-shan, BAO Zhi-ning, LIN Wei-feng, XIA Feng-geng. Preparation of a medium containing cholesterol micelles: China, CN108795767A [P], 2018-11-13
- [30] 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 Zhi-ning, HE Shan-shan, LIN Wei-feng. A method for determination of cholesterol concentration: China, 201811212619.3 [P], 2018-10-18
- [31] 凌代文.乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M].北京:中国轻工业出版社,1999
LING Dai-wen. Classification and Identification of Lactic Acid Bacteria and Experimental Methods [M]. Beijing: China Light Industry Press, 1999
- [32] 张水华.食品分析[M].北京:中国轻工业出版社,2012
ZHANG Shui-hua. Food Analysis [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2012
- [33] 王永华.食品分析.第2版[M].北京:中国轻工业出版社,2010
WANG Yong-hua. Food Analysis. 2nd ed [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2010
- [34] Dora I A P, Glenn R G. Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifido bacteria isolated from the human gut [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(9): 4689-4693
- [35] Kimotoh, Ohmomo S, Okamoto T. Cholesterol removal from media by lactococci [J]. Journal of Dairy Science, 2002, 85(12): 3182-3188
- [36] 王一鸣,范小兵,杭晓敏,等.体外去除胆固醇菌株的筛选及其作用机理研究[J].微生物学通报, 2006,33(6):43-47
WANG Yi-ming, FAN Xiao-bing, HANG Xiao-min, et al. Screening and mechanism of cholesterol removal *in vitro* [J]. Microbiology China, 2006, 33(6): 43-47
- [37] 纪旭,侯红漫,王秀玲,等.干酪乳杆菌 GL-B 体外降胆固醇的作用机理[J].中国乳品工业,2010,38(4):10-12,25
JI Xu, HOU hong-man, WANG Xiu-ling, et al. Mechanism of cholesterol lowering in *Lactobacillus casei* GL-B *in vitro* [J]. China Dairy Industry, 2010, 38(4): 10-12, 25

(下转第 219 页)