

自然发酵面团中分离的发酵乳杆菌对 高脂饮食小鼠的降血脂作用

李慧¹, 李晓琳^{1*}, 李金龙², 李保玲¹, 刘文君¹, 史新芮¹

(1. 哈尔滨体育学院运动人体科学学院, 黑龙江哈尔滨 150001)

(2. 东北农业大学动物医学学院, 黑龙江哈尔滨 150001)

摘要: 该研究从哈尔滨周边地区农户家的自然发酵面团中分离纯化乳酸菌, 分别评价分离菌株的耐酸耐胆盐及抑菌特性, 并利用溶血性试验和抗生素敏感试验评估其安全性。以邻苯二甲醛法对乳酸菌菌株的降胆固醇能力进行体外分析, 并利用高脂模型小鼠研究其体内降胆固醇功能。结果共分离得到 16 株乳酸菌, 其中发酵乳杆菌 FD-8 在酸性和胆盐条件下存活率可达 80.21% 和 75.98%, 对致病性大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和鼠伤寒沙门氏菌均有一定的抑菌作用且安全性良好。FD-8 菌株的体外降解胆固醇率达到 85.66%, 体内饲喂 FD-8 菌株 5 w 后能明显降低高脂饮食小鼠的体质量和肝脏指数, 改善高脂饮食诱导的小鼠血清及肝脏中总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇和甘油三酯水平的改变, 达到降血脂的目的。该研究从自然发酵面团中分离到的发酵乳杆菌 FD-8 具备良好的耐酸、耐胆盐和抑菌特性, 能够在体内外发挥降胆固醇作用, 同时无溶血性且对某些抗生素表现一定的敏感性, 对于进一步开发降胆固醇产品具有重要意义。

关键词: 乳酸菌; 降胆固醇作用; 益生作用; 高脂饮食小鼠

文章编号: 1673-9078(2022)09-52-59

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.9.1283

Lipid-lowering Effect of *Lactobacillus fermentum* Isolated from Naturally Fermented Dough in Mice Fed a High-fat Diet

LI Hui¹, LI Xiaolin^{1*}, LI Jinlong², LI Baoling¹, LIU Wenjun¹, SHI Xinrui¹

(1. Harbin Sport University, Department of Human Movement Science, Harbin 150001, China)

(2. Northeast Agricultural University, College of Veterinary Medicine, Harbin 150001, China)

Abstract: Lactic acid bacteria (LAB) were isolated and purified from naturally fermented dough obtained from farmers in the areas surrounding Harbin. The tolerance capacities of LAB were evaluated under acidic pH and bile salt conditions. The antimicrobial capacities of the isolated strains were evaluated using a bacteriostatic test, and the safety of LAB was evaluated using hemolytic and antibiotic sensitivity tests. The cholesterol-lowering ability of the isolates was further analyzed using the ortho-phthalaldehyde method *in vitro*, and the cholesterol-lowering function was studied using a high-fat diet mouse model. The results showed that a total of 16 LAB strains were isolated, among which the survival rate of *Lactobacillus fermentum* FD-8 was 80.21% and 75.98% under acidic and bile salt conditions, respectively. FD-8 had certain bacteriostatic activity and good safety against pathogenic *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Salmonella typhimurium*. The cholesterol degradation rate of FD-8 reached 85.66% *in vitro*. FD-8 intervention in the high-fat diet mouse model showed that after feeding FD-8 for 5 weeks *in vivo*, this strain could significantly reduce the body weight and liver indexes to alleviate obesity in the mice. FD-8 also significantly regulated the variations induced by the high-fat diet in TC, TG, and LDL levels in the serum and liver of the mice, and

引文格式:

李慧, 李晓琳, 李金龙, 等. 自然发酵面团中分离的发酵乳杆菌对高脂饮食小鼠的降血脂作用[J]. 现代食品科技, 2022, 38(9): 52-59

LI Hui, LI Xiaolin, LI Jinlong, et al. Lipid-lowering effect of *Lactobacillus fermentum* isolated from naturally fermented dough in mice fed a high-fat diet [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(9): 52-59

收稿日期: 2021-11-16

基金项目: 黑龙江省省属高等学校基本科研业务费科研项目(2020KYWF-FC04); 哈尔滨体育学院科研实验室(平台)专项项目(LAB2021-10)

作者简介: 李慧(1986-), 女, 博士研究生, 研究方向: 益生菌功能研究及运动干预与慢性疾病防治生物机制, E-mail: 54441761@qq.com

通讯作者: 李晓琳(1978-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 益生菌功能研究及运动干预与慢性疾病防治生物机制, E-mail: 13936305962@163.com

thus achieved the goal of reducing blood lipid levels. To summarize, the results indicated that *L. fermentum* FD-8 isolated from naturally fermented dough has good tolerance to acid and bile salts as well as good antibacterial property, and can play a role in cholesterol-lowering *in vitro* and *in vivo*, which is of great significance for the development of cholesterol-lowering products in the future.

Key words: lactic acid bacteria; cholesterol-lowering effect; probiotic function; high-fat diet mice

近年来,人们生活水平不断提高,随着生活方式和饮食结构的改变,胆固醇过量引起的心脑血管疾病已经严重危害到人体健康^[1]。目前国内外降低人体胆固醇的主要方式是药物治疗,但其存在副作用多及费用高的弊端^[2]。因此,需要探寻更加安全、高效的方法来减轻胆固醇过高导致的心脑血管疾病对人类的危害。

乳酸菌作为人体肠道中的正常菌群,具有抑制病原菌、调节肠道菌群、免疫和抗肿瘤等活性,对机体有着重要的益生作用^[3-5]。19世纪70年代,研究者发现经常饮用由乳杆菌发酵的乳制品的美国人及非洲马赛人体内血清胆固醇水平普遍较低^[6],这为探索降低胆固醇水平的新策略提供了方向。现有研究已经证实,乳酸菌及其发酵制品具有降低血清胆固醇的能力^[7,8]。因此,筛选能够降胆固醇的乳酸菌,进一步应用于研发具有降胆固醇功能的益生菌产品具有重要意义。

乳酸菌作为天然菌群广泛应用于食品发酵,其应用于面团发酵能够增强面团的流变特性,改善面团的质构特性,更重要的是增加面团中淀粉和蛋白质的利用率,提高面团的营养价值^[9,10]。尽管自然发酵面团用于发酵传统面食可以追溯到13世纪,但其中作为影响发酵面食品质最主要因素的乳酸菌的具体功能并没有得到很好的研究。本研究以自然发酵面团中分离出的乳酸菌为研究对象,筛选出了一株体外降胆固醇效果最佳的发酵乳杆菌,该菌株同时具有耐酸耐胆盐和抑制致病菌的特性,进一步采用高脂模型小鼠研究该菌株在体内的降血脂功能,以期将来降胆固醇益生菌制品的研制和生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

20个自然发酵面团分别收集自黑龙江省哈尔滨市周边不同农户家庭。大肠杆菌 O157 (882364株)、金黄色葡萄球菌 CGMCC 1.291 及鼠伤寒沙门氏菌 S50333 均为本实验室保藏菌株。MRS 培养基和乳酸菌生化鉴定试剂盒,购自青岛高科园海博生物技术有限公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒,购自天根生化科技(北京)有限公司;胆固醇和牛胆盐均购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;血清总胆固醇(TC)、肝脏 TC、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆

固醇(HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)含量测定试剂盒,购自南京建成生物工程研究所。

实验动物和饲料:8周龄雄性 C57BL/6J 小鼠购于辽宁长生生物技术有限公司,普通饲料和高胆固醇饲料购自北京科澳协力有限责任公司,高胆固醇饲料组成如下(质量分数):基础饲料 83.7%、猪油 10%、蔗糖 5%、胆固醇 1%和胆盐 0.3%。

1.2 主要仪器

PCR 仪, TaKaRa 公司;小型离心机, Eppendorf 公司; pH 计, 上海精密科学仪器有限公司;显微镜, 日本奥林巴斯公司;电热恒温培养箱, 北京市永光明医疗仪器厂;超微量紫外分光光度计, 德国 Implen 公司;超净工作台, 苏州净化设备有限公司。

1.3 乳酸菌的分离鉴定

采用平板涂布法,将 20 g 自然发酵面团用生理盐水溶解后取 500 μ L 加入 4.5 mL MRS 培养基中,进行 10 倍体积梯度稀释,各取 100 μ L $10^5 \sim 10^7$ 的稀释液涂布于 MRS 平板,分别于 37 $^{\circ}$ C 培养 24~48 h,挑取不同形态的单菌落,连续划线分离纯化,直至获得大小、形态一致的菌落。参照《乳酸细菌分类鉴定及试验方法》对菌株进行革兰氏染色观察细胞形态、并利用过氧化氢酶接触试验、乳酸菌生化鉴定试剂盒鉴定生化特性^[11]。然后,利用试剂盒提取乳酸菌的基因组 DNA,设计合成引物序列如下: 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACT T-3')^[12],利用 PCR 扩增 16S rRNA 序列,将扩增结果使用 BLAST 与 GenBank 数据库中序列进行对比分析。

1.4 乳酸菌益生特性分析

1.4.1 乳酸菌耐酸耐胆盐评价

用 1 mol/L HCl 调节 MRS 培养基的 pH 值至 3.0 和 6.5,将 100 μ L 过夜培养的乳酸菌加入 5 mL 不同 pH 的 MRS 培养基中,37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h,测定 OD_{600 nm} 值^[13]。配置含 0.3%胆盐的 MRS 培养基,以不含胆盐的 MRS 培养基作为对照,两种培养基各接种 1%的乳酸菌,37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h,测定 OD_{600 nm} 值。生长速率计算方法见公式(1)^[14]。

$$G = \frac{A_1}{A_2} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

G —生长率, %;

A_1 —无胆盐培养基 $OD_{600\text{nm}}$ 值;

A_2 —对照培养基 $OD_{600\text{nm}}$ 值。

上述试验对每个菌株进行 3 个重复。

1.4.2 乳酸菌抑菌能力分析

利用牛津杯试验分析乳酸菌对致病菌的抑菌能力^[15]。将 15 mL 1.5% (m/V) 琼脂培养基倒在平板上并凝固, 放置好 6 mm 牛津杯。在 45~50 °C 条件下, 将每株病原菌按照 1% 比例接种于 15 mL 0.8% (m/V) 的琼脂培养基中, 混匀。倾倒入上层琼脂培养基并凝固, 取出牛津杯后将 100 μL 乳酸菌培养物加入空孔中。将平板在室温下静置, 然后在 37 °C 下孵育 18~24 h 后用游标卡尺测量平板上的抑菌环直径。

1.5 乳酸菌安全性评估

1.5.1 溶血性试验

将活化两次后的乳酸菌菌株于哥伦比亚绵阳血琼脂平板上划线, 37 °C 培养 24~48 h, 拍照记录菌落周围形态, 以金黄色葡萄球菌做为阳性对照。

1.5.2 抗生素敏感试验

采用 Kirby-Bauer 纸片扩散试验对所有分离的乳酸菌进行药敏试验^[16]。分别选择如下抗生素: 红霉素 (15 μg)、链霉素 (10 μg)、氯霉素 (30 μg)、庆大霉素 (10 μg)、克林霉素 (2 μg) 和氨苄青霉素 (10 μg), 在 37 °C 条件下培养 24 h, 然后测量抑菌圈的直径, 使用临床和实验室标准协会的指导原则 (CLSI 2014) 对乳酸菌的抗性进行分析。

1.6 乳酸菌体外降胆固醇能力测定

参照 Liu 等^[17]的方法绘制胆固醇标准曲线并测定乳酸菌的 OD 值, 对乳酸菌的体外降胆固醇能力进行评价。

1.6.1 胆固醇标准曲线的绘制

用无水乙醇溶解胆固醇配置成 0.1 mg/mL 的胆固醇标准液。按照胆固醇终浓度分别为 0、0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0 mg/mL 取适量标准液用无水乙醇补齐总体积至 2 mL, 再缓慢加入等体积的显色剂 (硫酸铁铵), 充分振荡混匀后室温静置 30 min, 测定 $OD_{560\text{nm}}$ 值并绘制标准曲线。

1.6.2 乳酸菌 OD 值的测定

将乳酸菌菌株活化两次后 6 000 r/min 离心 10 min, 用无菌 PBS 洗涤菌体后制成菌悬液, 按照 2% 的接种量接种至新鲜配制的降胆固醇筛选培养基

(MRS-CHOL 培养基) 中, 于 37 °C 培养 48 h, 取 0.2 mL 培养液加入到 4.8 mL 无水乙醇中振荡混匀, 5 000 r/min 离心 10 min, 取上清液测定 $OD_{560\text{nm}}$ 值, 以邻苯二甲醛比色法测定胆固醇含量, 同时以未接菌的 MRS-CHOL 培养基作为对照。

$$D = \frac{A_3 - A_4}{A_3} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

D —胆固醇去除率, %;

A_3 —未接菌上清液 $OD_{560\text{nm}}$ 值;

A_4 —接菌后上清液 $OD_{560\text{nm}}$ 值。

1.7 乳酸菌对高脂饮食小鼠的影响

1.7.1 小鼠分组和灌喂方法

选取 8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠 50 只适应性喂养 1 w 后, 按表 1 饲喂方式分为 5 组, 连续喂食 5 w。将活化后的乳酸菌菌株 FD-8, 用生理盐水洗涤 2 次并将菌体浓度分别调整至 10^{10} 、 10^8 和 10^6 CFU/mL, 用于小鼠灌喂试验, 每天现用现配。

表 1 小鼠分组及饲喂方式

Table 1 Grouping of the mice and feeding method

分组	数量/只	日常饮食	灌喂
正常对照组	10	正常饮食+水	0.9%生理盐水
高脂模型组	10	高脂饮食+水	0.9%生理盐水
高浓度乳酸菌组	10	高脂饮食+水	10^{10} CFU/mL FD-8
中浓度乳酸菌组	10	高脂饮食+水	10^8 CFU/mL FD-8
低浓度乳酸菌组	10	高脂饮食+水	10^6 CFU/mL FD-8

1.7.2 小鼠体质量增加量、摄食量及饲料利用率测定

灌喂开始后每天固定时间记录小鼠摄食量, 每周同一时间称量小鼠体质量, 计算小鼠的饲料利用率, 见公式 (3)。

$$S = \frac{M_{\text{增}}}{M_{\text{食}}} \times 100\% \quad (3)$$

式中:

S —饲料利用率, %;

$M_{\text{增}}$ —小鼠质量增加量, g;

$M_{\text{食}}$ —摄食量, g。

1.7.3 小鼠脏器指数的测定

小鼠灌喂 5 w 后禁食 12 h, 处死后立即摘除心脏、肝脏、脾脏和肾脏, 生理盐水清洗后用滤纸吸净水分, 将分离到的各器官进行称重, 按公式 (4) 计算脏器指数。

$$F = \frac{M_{\text{脏}}}{M} \quad (4)$$

式中:

F —脏器指数, mg/g;

$M_{\text{脏}}$ —各脏器质量, mg;

M —小鼠处死前质量, g。

1.7.4 小鼠血液样品的采集与测定

小鼠饲养 5 w 后, 眼眶静脉丛采血, 常规方法分离血清, 用试剂盒检测小鼠血清中的 TC、TG、LDL-C 和 HDL-C 含量。

1.7.5 肝脏 TC、TG 含量的测定

精确称量 0.1 g 肝脏组织, 添加到 9 倍体积的生理盐水中, 将肝脏组织充分匀浆后, 于 4 °C, 3 000 r/min

离心 10 min, 取上清液测定肝脏的 TC 和 TG 水平。

1.8 统计学分析

实验数据按照平均值±标准误差表示。通过 Graph Prism 7.0 对数据进行统计分析, $p < 0.05$, 差异显著; $p < 0.01$, 差异极显著。

2 结果与讨论

2.1 乳酸菌的分离及鉴定结果

表 2 乳酸菌分离株的种属及耐酸耐胆盐情况

Table 2 The acid and bile salt tolerance of the lactic acid bacteria isolates of various species

菌株编号	种属	在 pH 3.0 条件下存活率/%	在 0.3%胆盐条件下存活率/%
FD-3	戊糖片球菌	52.15±1.24 ^b	63.74±2.17 ^b
FD-4	植物乳杆菌	69.37±3.02 ^c	66.17±1.26 ^b
FD-6	乳酸片球菌	42.98±1.81 ^a	55.24±1.04 ^a
FD-8	发酵乳杆菌	80.21±2.36 ^d	75.98±1.41 ^d
FD-11	发酵乳杆菌	77.85±1.29 ^d	69.50±0.94 ^c
FD-13	植物乳杆菌	81.75±2.55 ^d	77.26±2.63 ^d

注: 同列字母不同表示差异显著 ($p < 0.05$), 下同。

自然发酵面团中含有多个菌种^[18]。但研究显示, 其中的细菌组成相对简单, 主要以乳酸菌和酵母菌为主^[19]。本研究将自然发酵面团稀释液涂布平板, 挑取形态不同的菌落, 经革兰氏染色和生化鉴定筛选出 16 株革兰氏阳性、过氧化氢酶阴性、有典型形态和生化特性的乳酸菌, 经 16S rRNA 测序比对, 这 16 株菌株中有植物乳杆菌 5 株、发酵乳杆菌 5 株、戊糖片球菌 3 株、乳酸片球菌 2 株和短乳杆菌 1 株, 说明乳杆菌是自然发酵面团在自然发酵过程中的优势菌种。乳酸菌进入人体发挥益生作用的必须条件之一是能耐受胃酸环境以及肠道的高浓度胆盐环境, 这也是乳酸菌菌株应用于医药或者商业用途的重要限制性因素之一^[20]。对分离得到的 16 株乳酸菌进一步进行耐酸耐胆盐分析, 结果如表 2 所示, 以 30%存活率为界限, 其中 6 株乳酸菌对酸性及胆盐环境均有良好的耐受能力, 且不同菌株之间有一定的差异, 在酸性条件下的存活率在 42.98%~81.75%之间, 而在胆盐条件下的存活率在 55.24%~77.26%之间, 进一步选取这 6 株符合条件的候选菌株开展后续试验。

2.2 乳酸菌分离株的益生特性

随着对抗生素耐药性的普遍关注, 乳酸菌对病原菌的抑菌活性也受到了广泛的关注, 成为评价其益生特性的重要指标之一^[21]。从表 3 乳酸菌体外抑菌试验结果显示, 6 株乳酸菌均对大肠杆菌和金黄色葡萄球

菌有抑制作用, 其中发酵乳杆菌 FD-13 对大肠杆菌的抑菌作用最强, FD-8 对金黄色葡萄球菌的抑菌作用最强, 二者的抑菌圈直径均大于 15 mm。除 FD-4 以外的 5 株菌株对鼠伤寒沙门氏菌均有抑制作用, FD-8 对其抑制作用最强, 抑菌圈直径约 14.69 mm。以上结果表明, 本研究筛选得到的 6 株乳酸菌对革兰氏阴性和革兰氏阳性病原菌均具备不同程度的抗菌活性, 其中菌株 FD-8 和 FD-13 的抑菌活性最强。

表 3 乳酸菌对致病菌的抑制作用

Table 3 The inhibitory effects of selected lactic acid bacteria strains against pathogenic microorganisms

菌株编号	抑菌圈直径/mm		
	金黄色葡萄球菌	鼠伤寒沙门氏菌	大肠杆菌
FD-3	12.27±0.28 ^a	12.85±0.42 ^a	11.74±0.24 ^a
FD-4	11.89±0.33 ^a	-	12.08±0.07 ^a
FD-6	14.32±0.15 ^c	14.08±0.28 ^b	13.97±0.37 ^b
FD-8	15.17±0.20 ^d	14.69±0.36 ^c	14.85±0.29 ^c
FD-11	13.02±0.18 ^b	13.48±0.34 ^b	14.22±0.12 ^b
FD-13	14.77±0.37 ^c	13.76±0.14 ^b	15.85±0.37 ^d

注: -表示乳酸菌株对致病菌未产生抑制作用。

2.3 乳酸菌的安全性评价

在应用安全方面, 传统的乳酸菌菌种已有很长的历史, 由于大多数乳酸菌菌种是从食品或健康动物肠道内分离出来的, 因此被认为是没有致病可能性的食

品级安全微生物^[22]。但对通过不同方法得到的乳酸菌菌株在应用前做严格的安全性检测仍是十分必要的。溶血试验的结果显示，培养基上的金黄色葡萄球菌周

围出现了透明溶血环（图 1g），为 β -溶血，6 株乳酸菌菌株未产生溶菌环（图 1a~1f）。6 株分离菌株对常见的几种抗生素均表现一定的敏感性（表 4）。

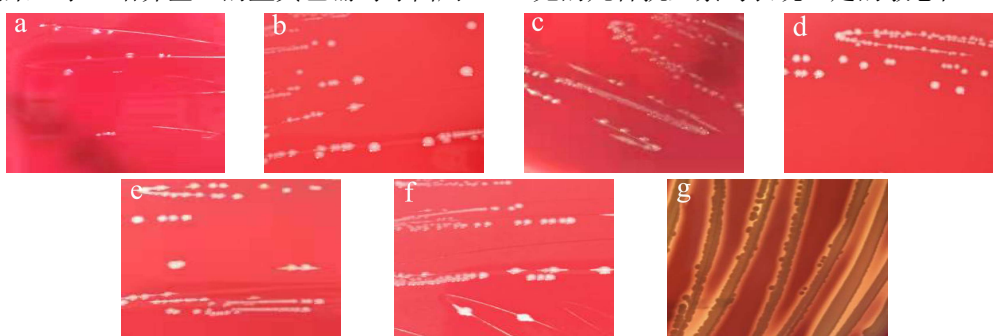


图 1 乳酸菌的溶血性 (2×)

Fig.1 The hemolytic activity of six lactic acid bacteria (2×)

注: a: FD-3; b: FD-4; c: FD-6; d: FD-8; e: FD-11; f: FD-13; g: 金黄色葡萄球菌。

表 4 乳酸菌的抗生素敏感性

Table 4 Antibiotic sensitivity of lactic acid bacteria

菌株编号	红霉素	链霉素	氯霉素	庆大霉素	克林霉素	氨苄青霉素
FD-3	S	S	I	R	R	S
FD-4	S	S	R	R	R	S
FD-6	I	R	S	I	R	S
FD-8	S	S	S	R	R	S
FD-11	I	S	R	R	S	S
FD-13	S	R	S	I	S	S

注: 抗生素敏感性: 耐药 (R), 敏感 (S) 和 中度 (I)。

2.4 体外筛选降胆固醇的乳酸菌

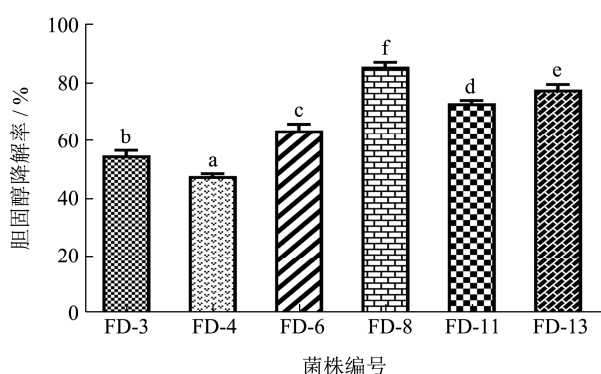


图 2 乳酸菌的体外降胆固醇率测定

Fig.2 Determination of cholesterol-lower in grate of lactic acid bacteria *in vitro*

国内针对乳酸菌降胆固醇作用及机理研究的起步比国外同行晚，且大多局限于体外试验^[23,24]。测定乳酸菌菌株在高胆固醇培养基中培养后发酵液上清中胆固醇的减少量是确定乳酸菌是否具有降胆固醇特性的主要方法^[25]。为了比较上述 6 株乳酸菌分离株的降胆固醇能力，本试验利用该方法测定候选乳酸菌的胆固醇降解率，首先以胆固醇浓度为横坐标，吸光度为纵

坐标，绘制标准曲线，其中胆固醇浓度在 0~1 mg/mL 的范围内，吸光度与胆固醇浓度呈良好的线性关系。图 2 表示利用邻苯二甲醛比色法测得的 6 株乳酸菌的体外胆固醇降解率。结果显示，所有乳酸菌的体外胆固醇降解率都达到 45%以上，其中乳酸菌 FD-8 对胆固醇降解率最高 (85.66%)，而乳酸菌 FD-4 的胆固醇降解率最低 (47.66%)，因此选择 FD-8 菌株开展下一步的体内试验。

2.5 乳酸菌 FD-8 对高脂饮食小鼠的影响

2.5.1 乳酸菌 FD-8 对高脂饮食小鼠各项指标的影响

如表 5 所示，在试验进行 5 w 后，对照组小鼠的最终体质量平均为 33.26 g，而高脂模型组小鼠的平均体质量明显增高达到 38.59 g ($p < 0.05$)，说明成功建立了小鼠的高脂模型。不同浓度乳酸菌 FD-8 饲喂组小鼠的体质量、摄食量、饲料利用率与对照组相比无显著差异 ($p > 0.05$)。灌喂不同浓度乳酸菌 FD-8 的小鼠平均体质量分别为 33.01、33.72 和 34.08 g，显著低于高脂模型组小鼠 ($p < 0.05$)，说明 FD-8 对高脂小鼠体质量增加具有明显抑制作用，其中高剂量的 FD-8

对体质量抑制作用更大。同时, 整个试验过程中, 各组小鼠均未出现异常表现和非正常死亡现象, 表明乳酸菌 FD-8 饲喂对小鼠不会产生不良影响。

2.5.2 乳酸菌 FD-8 对高脂饮食小鼠脏器指数的影响

从表 6 中可以看出, 饲喂高脂饲料 5 w 后, 高脂模型组小鼠的肝脏指数为 5.63 mg/g, 比对照组小鼠的肝脏指数 4.89 mg/g 显著升高了 0.74 mg/g ($p < 0.05$),

表 5 小鼠的体质量增加量、摄食量和饲料利用率

Table 5 Body weight, total food intake, and food efficiency of mice in different groups

分组	初始体质量/g	最终体质量/g	增重/g	总摄食量/g	饲料利用率/%
正常对照组	26.97±0.67 ^a	33.26±1.01 ^a	6.29±0.79 ^a	198.32±4.19 ^a	3.17±1.13 ^a
高脂模型组	26.22±1.12 ^a	38.59±0.89 ^b	12.37±0.58 ^b	221.05±3.67 ^b	5.59±0.75 ^b
高浓度乳酸菌组	26.45±0.71 ^a	33.01±0.85 ^a	6.56±0.85 ^a	204.59±4.52 ^a	3.21±1.22 ^a
中浓度乳酸菌组	26.68±0.60 ^a	33.72±1.55 ^a	7.04±0.41 ^a	201.62±4.91 ^a	3.49±0.95 ^a
低浓度乳酸菌组	26.72±0.59 ^a	34.08±1.43 ^a	7.36±1.02 ^a	200.93±3.17 ^a	3.66±1.41 ^a

表 6 各组小鼠的脏器指数

Table 6 Organ indices of mice in each group (mg/g)

分组	心脏指数	肝脏指数	脾脏指数	肾脏指数
正常对照组	0.48±0.03 ^a	4.89±0.15 ^b	0.25±0.03 ^a	1.45±0.08 ^a
高脂模型组	0.46±0.01 ^a	5.63±0.16 ^a	0.24±0.02 ^a	1.41±0.05 ^a
高浓度乳酸菌组	0.49±0.02 ^a	4.75±0.19 ^b	0.23±0.01 ^a	1.40±0.07 ^a
中浓度乳酸菌组	0.47±0.01 ^a	4.98±0.12 ^b	0.23±0.01 ^a	1.46±0.06 ^a
低浓度乳酸菌组	0.45±0.01 ^a	5.52±0.15 ^a	0.21±0.02 ^a	1.42±0.03 ^a

表 7 小鼠血清总胆固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白和低密度脂蛋白含量

Table 7 TC, TG, HDL-C, and LDL-C contents in serum of mice in different groups (mmol/L)

分组	总胆固醇	甘油三酯	高密度脂蛋白	低密度脂蛋白
正常对照组	2.98±0.51 ^b	1.02±0.37 ^c	2.25±0.36 ^a	0.64±0.07 ^b
高脂模型组	4.57±0.29 ^a	1.88±0.23 ^a	2.26±0.53 ^a	1.35±0.05 ^a
高浓度乳酸菌组	3.16±0.63 ^b	1.26±0.54 ^b	2.18±0.76 ^a	0.60±0.02 ^b
中浓度乳酸菌组	3.09±0.49 ^b	1.27±0.46 ^{ab}	2.21±0.44 ^a	0.73±0.03 ^b
低浓度乳酸菌组	3.12±0.32 ^b	1.30±0.22 ^{ab}	2.23±0.36 ^a	0.75±0.06 ^b

2.5.3 乳酸菌 FD-8 对高脂饮食小鼠血脂水平的影响

TC 是衡量脂代谢的重要指标, 代表了血清中含有的胆固醇总和^[26], 而 TG 由长链脂肪酸和甘油组成, 主要存在于心脏和肝脏, 是引起人体病变的重要因素之一^[27]。LDL-C 作为含胆固醇的脂蛋白是内源性胆固醇的载体, LDL-C 浓度越高, 冠心病的发病率就越高^[28]。本试验中, 不同浓度乳酸菌饲喂组小鼠的 TC、TG 和 LDL-C 含量均显著低于高脂模型组 ($p < 0.05$), 表明乳酸菌 FD-8 具有抑制血清中 TC、TG 和 LDL-C 含量增加的作用, 其中高浓度 FD-8 饲喂组的效果更明显, TG 含量为 1.26 mmol/L, LDL-C 含量为 0.60 mmol/L, 均是各组中最低的 (表 7)。对于 HDL-C

表明高脂饲料中的胆固醇有一部分在肝脏组织内沉积下来而没有得到完全代谢, 导致肝脏的质量增加^[25]; 高剂量和中剂量乳酸菌饲喂组小鼠的肝脏指数分别为 4.75 mg/g 和 4.98 mg/g, 显著低于高脂模型组小鼠 ($p < 0.05$), 这说明灌喂一定剂量乳酸菌 FD-8 可以减少脂类在小鼠肝脏内的沉积; 而心脏、脾脏和肾脏的指数无显著差异 ($p > 0.05$)。

含量来说, 各组之间小鼠的 HDL-C 含量没有显著差异 ($p > 0.05$), 表明灌喂乳酸菌 FD-8 对血清 HDL-C 含量没有明显作用。已有研究表明, 乳酸菌可以降低血清 TC、TG 和 LDL-C 含量, 而对 HDL-C 的作用较小^[29], 这与我们试验的结果相一致。

2.5.4 乳酸菌 FD-8 对高脂饮食小鼠肝脏脂质水平的影响

肝脏是脂质代谢的重要器官, 高脂饮食会引起肝损伤。因此, 为了进一步研究发酵乳杆菌 FD-8 对高脂饮食小鼠肝脏的影响, 测定了肝脏中 TC 和 TG 的含量。与预期的结果一致的是, 试验进行 5 w 后, 高脂模型组小鼠肝脏中 TC 和 TG 含量分别达到 0.13 mmol/g 和 2.86 mmol/g, 显著高于对照组小鼠

0.08 mmol/g 和 1.63 mmol/g ($p < 0.05$); 乳酸菌灌喂后小鼠的肝脏中 TC 和 TG 含量则显著降低 ($p < 0.05$), 高浓度乳酸菌组的小鼠 TC 含量降至 0.07 mmol/g, TG 含量降至 1.15 mmol/g, 说明灌喂乳酸菌 FD-8 可以促进体内胆固醇代谢, 减少胆固醇在高脂小鼠肝脏中的存积 (见表 8)。

表 8 小鼠肝脏总胆固醇和甘油三酯含量

Table 8 TC and TG contents in livers of mice in different groups (mmol/g)

分组	肝脏总胆固醇	肝脏甘油三酯
正常对照组	0.05±0.01 ^b	1.23±0.11 ^b
高脂模型组	0.13±0.03 ^a	2.86±0.26 ^a
高浓度乳酸菌组	0.07±0.02 ^b	1.15±0.23 ^b
中浓度乳酸菌组	0.07±0.02 ^b	1.19±0.09 ^b
低浓度乳酸菌组	0.08±0.04 ^b	1.23±0.31 ^b

3 结论

自然发酵面团是一种有着悠久应用历史的传统面食发酵剂, 而乳酸菌构成了其主要菌种。本研究从哈尔滨周边农户家的自然发酵面团中分离得到一株发酵乳杆菌 FD-8, 经分析该菌株具备良好的耐酸、耐胆盐及抑菌活性, 同时无溶血性且对某些抗生素具备一定敏感性, 更重要的是能够发挥体外降胆固醇作用和降低高脂饮食小鼠血脂的作用, 为进一步开发降胆固醇功能性乳酸菌制品及其他功能性食品提供了理论依据。

参考文献

- [1] Hassan A, Din A U, Zhu Y, et al. Updates in understanding the hypocholesterolemia effect of probiotics on atherosclerosis [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2019, 103(15): 5993-6006
- [2] 和生辉, 潘志远, 韩妮, 等. 利用培养组学技术分离鉴定体外降解胆固醇肠道细菌及其功能评价[J]. 生物工程学报, 2021, 37(11): 3734-3744
HE Shenghui, PAN Zhiyuan, HAN Ni, et al. Isolation and identification of intestinal bacteria degrading cholesterol *in vitro* and evaluation of their functions by culturomics [J]. Chin J Biotech, 2021, 37(11): 3734-3744
- [3] Niibo M, Shirouchi B, Umegatani M, et al. Probiotic *Lactobacillus gasseri* SBT2055 improves insulin secretion in a diabetic rat model [J]. Journal of Dairy Science, 2019, 102: 997-1006
- [4] Miller L E, Ouwehand A C, Ibarra A. Effects of probiotic-containing products on stool frequency and intestinal transit in constipated adults: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. Annals of Gastroenterology, 2017, 30: 629-639
- [5] Jager R, Purpura M, Farmer S, et al. Probiotic *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 improves protein absorption and utilization [J]. Probiot Antimicrob Proteins, 2018, 10: 611-615
- [6] Mann G V. Studies of a surfactant and cholesteremia in the Maasai [J]. American Journal of Clinical Nutrition, 1974, 27(5): 464-469
- [7] 万婧, 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
- [8] Khare A, Gaur S. Cholesterol-lowering effects of *Lactobacillus* species [J]. Current Microbiology, 2020, 77(4): 638-644
- [9] Argyri A A, Zoumpopoulou G, Karatzas K A G, et al. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by *in vitro* tests [J]. Food Microbiol, 2013, 33: 282-291
- [10] 李晓红. 自然发酵面团中乳酸菌菌株的分离与鉴定[J]. 保鲜与加工, 2013, 13(4): 45-47
LI Xiaohong. Isolation and identification of lactic acid bacteria from nature fermented dough [J]. Storage and Process, 2013, 13(4): 45-47
- [11] 贺珊珊. 降胆固醇益生菌菌株及活性的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2020
HE Shanshan. Study on the strain and activity of cholesterol-lowering probiotics [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2020
- [12] Hou Q, Bai X, Li W, et al. Design of primers for evaluation of lactic acid bacteria populations in complex biological samples [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 2045
- [13] Dowarah R, Verma A K, Agarwal N, et al. Selection and characterization of probiotic lactic acid bacteria and its impact on growth, nutrient digestibility, health and antioxidant status in weaned piglets [J]. PLoS ONE, 2018, 13: e0192978
- [14] Nami Y, Vaseghi Bakhshayesh R, Mohammadzadeh Jalaly H, et al. Probiotic properties of *Enterococcus* isolated from artisanal dairy products [J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 300

- [15] Muhammad Z, Ramzan R, Abdelazez A, et al. Assessment of the antimicrobial potentiality and functionality of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from the conventional inner Mongolian fermented cheese against foodborne pathogens [J]. Pathogens, 2019, 8: E71
- [16] Adetoye A, Pinloche E, Adeniyi B A, et al. Characterization and antisalmonella activities of lactic acid bacteria isolated from cattle faeces [J]. BMC Microbiology, 2018, 18: 96
- [17] Liu Y F, Zhao F C, Liu J Y. Selection of cholesterol-lowering *Lactobacillus* and its effects on rats fed with high-cholesterol diet [J]. Current Microbiology, 2017, 74(5): 623-631
- [18] 张楚楚.自然发酵面团细菌菌群结构对馒头挥发性风味物质影响的研究[D].无锡:江南大学,2017
ZHANG Chuchu. Study of effects of bacterial community structure of the SFD on volatile flavour compounds in CSB [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2017
- [19] Sharma K, Attri S, Goel G. Selection and evaluation of probiotic and functional characteristics of autochthonous lactic acid bacteria isolated from fermented wheat flour dough babroo [J]. Probiotics Antimicrob Proteins, 2019, 11(3): 774-784
- [20] Huang Y, Adams MC. *In vitro* assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria [J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 91(3): 253-260
- [21] Lee J S, Chung M J, Seo J G. *In vitro* evaluation of antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Clostridium difficile* [J]. Toxicology Research, 2013, 29: 99-106
- [22] Kullisaar T, Zilmer M, Mikelsaar M, et al. Two antioxidative *Lactobacilli* strains as promising probiotics [J]. International Journal of Food Microbiology, 2002, 72(3): 215-224
- [23] 热孜姑丽·库尔班,潘庆珉,申彤,等.新疆阿勒泰地区传统酸驼乳中益生乳酸菌的体外筛选[J].食品科技,2021,46(7):48-54
RAZIGUL Kurban, PAN Qingmin, SHEN Tong, et al. *In vitro* screening of Lactic acid bacteria with probiotic properties from spontaneously fermented camel milk in Altay, Xinjiang [J]. Food Science and Technology, 2021, 46(7): 48-54
- [24] 黄燕燕,郭均,黎恒希,等.降胆固醇乳酸菌的体外筛选及其降胆固醇机理探讨[J].食品科学,2018,39(6):88-94
HUANG Yanyan, GUO Jun, LI Hengxi, et al. *In vitro* screening of lactic acid bacteria for cholesterol-lowering activity and the underlying mechanism [J]. Food Science, 2018, 39(6): 88-94
- [25] 李杰.降胆固醇乳酸菌的筛选及其对高脂模型大鼠的影响[D].太原:山西大学,2020
LI Jie. Screening of cholesterol-lowering lactic acid bacteria and its effect on high-fat model rats [D]. Taiyuan: Shanxi University, 2020
- [26] Kou L, Du M, Zhang C, et al. The hypoglycemic, hypolipidemic, and anti-diabetic nephritic activities of zeaxanthin in diet-streptozotocin-induced diabetic sprague-dawley rats [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2017, 182(3): 944-955
- [27] 余萍,娇艳平,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 of a strain of cholesterol-lowering *Lactobacillus reuteri* and its probiotics [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(11): 106-113
- [28] 常青,郑宝东,张怡,等.生姜抗性淀粉对高脂血症大鼠降血脂作用和胆汁酸代谢的影响[J].食品科学,2022,7:147-157
CHANG Qing, ZHENG Baodong, ZHANG Yi, et al. Effect of ginger resistant starch on hypolipidemic effect and bile acid metabolism in hyperlipidemia rats [J]. Food Science, 2022, 7: 147-157
- [29] 玛丽娜·库尔曼.降胆固醇益生菌的筛选鉴定及降血脂功能研究[D].哈尔滨:东北林业大学,2020
Malina·KUERMAN. Screening and identification of the cholesterol-lowering probiotics and blood lipid reduction [D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2020