

降胆固醇乳酸菌的筛选及其益生元干预生长作用分析

玛丽娜·库尔曼¹, 巩燕妮², 包洪涛³, 包怡红^{1,4}

(1. 东北林业大学林学院, 黑龙江哈尔滨 150040) (2. 黑龙江省完达山乳业股份有限公司, 黑龙江哈尔滨 150090)

(3. 黑龙江省轻工科学研究院, 黑龙江哈尔滨 150090)

(4. 黑龙江省森林食品资源利用重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150040)

摘要: 本研究从传统自然发酵的酵素饮品中分离筛选出一株高效降胆固醇菌株, 该菌株具有较好的胆盐耐受性和耐酸能力。在 pH 3 的酸性环境下, 耐酸率为 71.53%, 该菌株能够长时间耐受胆盐环境, 培养 16 h 的胆盐耐受率为 42.09%。以二甲苯为吸附剂, 疏水率为 35.91%, 有较好的黏附特性; 益生元不仅能够促进菌株生长, 而且可显著提高降胆固醇能力。4 种益生元中乳果糖促进生物量增加幅度最大, 培养至 16 h 时生物量达到最高。乳果糖对菌株产酸性能影响最显著, pH 值可降至 3.56, 胆固醇去除率达 41.10%。该菌株对菊粉的利用率低, 说明菌株对不同益生元具有选择性代谢。菌株经形态学观察和 16S rDNA 鉴定为副干酪乳杆菌, 并命名为 *Lactobacillus paracasei* S0940。本研究为进一步研究体内降脂能力以及开发功能性乳酸菌食品提供理论依据。

关键词: 传统酵素; 胆固醇; 生长; 益生元; 鉴定

文章篇号: 1673-9078(2020)04-164-171

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.4.022

Screening of Cholesterol-Lowering Lactic Acid Bacteria and the Effects of Prebiotics on Their Growth

Malina·KUERMAN¹, GONG Yan-ni², BAO Hong-tao³, BAO Yi-hong^{1,4}

(1.School of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China) (2.Heilongjiang Wondersun Dairy Limited

Liability Company, Harbin 150090, China) (3.Heilongjiang Academy of Light Industry, Heilongjiang, Harbin 150010,

China) (4.Key Laboratory of Forest Food Resources Utilization of Heilongjiang Province, Harbin 150040, China)

Abstract: In this study, a highly effective cholesterol-lowering strain was isolated from traditional naturally fermented drinks with high bile salt and acid tolerance. In the acid environment with a pH of 3, the acid resistance rate was 71.53%. The strain could tolerate bile salt for a long time with the tolerance rate of 42.09% after exposure for 16 h. With xylene as the adsorbent, the hydrophobicity of the strain was 35.91%, indicating good adhesion characteristics. The prebiotics not only promoted the growth of the strain, but also improved significantly the cholesterol-lowering ability. Among the four prebiotics, lactulose promoted the greatest increase of the biomass, and the biomass reached the highest level after 16 h. Lactulose exerted the greatest effect on the acid production, with the pH value decreasing to 3.56 and cholesterol removal rate reaching 41.10%. Inulin was poorly utilized by the strain, indicating that the strain exhibited selective metabolism to different prebiotics. Based on morphological observations, the strain was identified *Lactobacillus paracasei*, named *Lactobacillus paracasei* S0940. This study provides a theoretical basis for further study of cholesterol-lowering ability *in vivo* and the development of lactic acid bacteria-containing functional foods.

Key words: traditional enzyme; cholesterol; growth; prebiotic; identification

引文格式:

玛丽娜·库尔曼, 巩燕妮, 包洪涛, 等. 降胆固醇乳酸菌的筛选及益生元干预生长作用分析[J]. 现代食品科技, 2020, 36(4): 164-171

Malina·Kuerman, GONG Yan-ni, BAO Hong-tao, et al. Screening of cholesterol-lowering lactic acid bacteria and the effects of prebiotics on their growth [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(4): 164-171

收稿日期: 2019-09-27

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2017YFC1601901; 2018YFD0401101)

作者简介: 玛丽娜·库尔曼 (1992-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 功能性食品

通讯作者: 包怡红 (1970-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 林下资源精深加工及功能性食品

我国社会经济快速发展,人们的生活水平得到提高,人的平均寿命延长,随之而来的人口老龄化问题也日益凸显。由于老年人的基础代谢下降,生理功能和免疫功能衰退,三高、冠心病等多种慢性疾病的发生率快速上升^[1],其中高胆固醇是发生冠心病的危险因素之一^[2,3]。目前,通常用他汀类药物进行治疗高胆固醇症等疾病,但毒副作用大,易造成头痛、肌痛等不适反应^[4,5]。

越来越多的益生菌被用于食品工业,不仅能够促进健康,而且能够改善食品属性。益生菌能够预防和防治多种胃肠道疾病,植物乳杆菌 B411 对食源性病原体呈现出较高的抑制率^[6]; Shehata^[7]等从 Boza 中分离的乳酸乳球菌 B037 具有较高的降胆固醇能力及良好的益生特性; Nami^[8]等从酸奶中分离出高效降胆固醇的植物乳杆菌 YS5。益生元被定义为具有健康益处,能够被宿主选择性利用的底物^[9],常见的益生元有菊粉、低聚果糖、半乳糖和乳果糖等^[10]。Adebola^[11]等研究了菊粉、乳果糖和乳糖酸对乳酸菌的促生长作用。近年来,益生元作为食品原料的用途也逐渐增加,乳清饮料中添加低聚糖,能够改善流变学特性、功能性以及产生良好的风味^[12]。Balthazar^[13]等研究表明,羊乳冰激淋中添加菊粉和干酪乳杆菌不仅提高功能特性,而且能够延长冰激淋的贮藏期。

本研究从传统自然发酵的酵素饮品中筛选具有降胆固醇的菌株,对菌株的体外降胆固醇能力、胆盐耐受性、耐酸性以及疏水性进行评估,并研究益生元菊粉、乳果糖、低聚半乳糖和水苏糖对其生物量、pH 及胆固醇去除率的影响,确定益生元和益生菌的最佳组合,为新型功能性食品的开发提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原料及试剂

传统果蔬酵素,样品由具有多年制作并饮用的家庭提供,黑龙江省哈尔滨市;胆固醇(分析纯),购于上海蓝季生物公司;邻苯二甲醛(分析纯),购于上海化学试剂采购供应五联化工厂;二甲苯(分析纯),天津市东丽区天大化学试剂场;菊粉,纯度 ≥ 99.5 g/100 g;乳果糖,纯度 ≥ 99.8 g/100 g;低聚半乳糖,纯度 ≥ 99.8 g/100 g;水苏糖,纯度 ≥ 99.8 g/100 g。试验中所用其他试剂均为分析纯。

1.1.2 培养基

MRS-CHOL 培养基: MRS 液体培养基中添加质量浓度为 100 μ g/mL 胆固醇和 0.3%胆盐, 121 $^{\circ}$ C 灭菌

20 min。

1.1.3 主要仪器

YXQ-LS-50A 立式压力蒸汽灭菌器,上海东亚压力容器制造有限公司; DH6000A 恒温培养箱,天津市泰斯特仪器有限公司; 722 型可见分光光度计,上海光谱仪器有限公司; PHS-3E pH 计,上海仪电科学仪器股份有限公司; H/T20MM 台式高速离心机,湖南赫西仪器装备有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株的分离、纯化

采用平板涂布法,将 0.5 mL 样品,加入装有 4.5 mL 无菌水的试管中,稀释至 10^{-5} 、 10^{-6} 和 10^{-7} ,分别取 0.1 mL 涂布于 MRS 固体培养基, 37 $^{\circ}$ C 恒温培养 48 h,取典型的单菌落,连续划线分离纯化, 4 $^{\circ}$ C 菌种斜面保存。

1.2.2 降胆固醇菌株的筛选

将菌株置于 MRS 液体培养基中过夜培养后 5000 g/min 离心 10 min,用无菌 PBS 溶液洗涤菌体并调为 10^8 cfu/mL,按 5%的接种量接种至新鲜配制的 MRS-CHOL 培养基, 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h,灭菌离心,取上清液以邻苯二甲醛比色法^[14]于 $A_{550\text{ nm}}$ 测吸光度。依公式(1)计算胆固醇去除率:

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

式中: A 为未接菌的培养基上清液在 550 nm 波长处的 OD 值; B 为接菌的培养基上清液在 550 nm 波长处的 OD 值。

1.2.3 菌株胆盐耐受性研究

参考吴慧昊^[15]等方法,略有修改,筛选出的降胆固醇菌株进行过夜培养后,用无菌 PBS 溶液洗涤菌体并将浓度调为 10^8 cfu/mL,按 3% (V/V) 接种量接种于含有 0.2% (m/V) 胆盐的 MRS 液体培养基中,不加胆盐的 MRS 液体培养基为对照组。37 $^{\circ}$ C 培养 16 h,测各组菌液的 $OD_{600\text{ nm}}$ 值。依公式(2)计算出菌株的胆盐耐受性:

$$\text{胆盐耐受率} \% = \frac{\text{实验组 } OD_{600\text{ nm}}}{\text{对照组 } OD_{600\text{ nm}}} \times 100\% \quad (2)$$

1.2.4 菌株耐酸性研究

参考李利^[16]等方法,略有修改,将菌株置于 MRS 液体培养基中过夜培养,制备浓度为 10^8 cfu/mL 的菌悬液。按 3%的接种量分别接种至 pH 值为 3.0、6.0 的 MRS 液体培养基中, pH 值为 6.0 的 MRS 液体培养基为对照组, 37 $^{\circ}$ C 培养 16 h 后取样,测定 $OD_{600\text{ nm}}$ 值。依公式(3)计算出菌株的耐酸性:

$$\text{耐酸率}\% = \frac{\text{实验组OD}_{600\text{nm}}}{\text{对照组OD}_{600\text{nm}}} \times 100\% \quad (3)$$

1.2.5 疏水性研究

采用菌株对碳氢化合物的吸附法^[17], 将菌株按 5% 接种量接种于液体培养基中, 37 °C 培养 16 h, 离心 (5000 r/min, 15 min), 收集菌体, 以无菌的磷酸缓冲液 (pH 6.8) 洗涤 2 次, 将菌体以缓冲液悬浮。缓冲液作为空白对照, 用缓冲液调整菌体浓度至 OD_{600nm}=1, 取 4 mL 调整浓度后的菌液, 加入 0.8 mL 二甲苯, 涡旋振荡, 静置分层, 取下层水相在 600 nm 处测其吸光度 A。依公式 (4) 计算菌株的疏水率:

$$\text{疏水率}\% = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100\% \quad (4)$$

式中: A₀ 为菌液与二甲苯混匀前在 600 nm 波长处测得的吸光度; A 为菌液与二甲苯混匀后在 600 nm 波长处测得的吸光度。

1.2.6 菌株生长分析

以 3% 的接种量将菌株分别接种于添加菊粉、低聚半乳糖、乳果糖和水苏糖的 MRS 培养基中, 其中益生元以 1% 的添加量取代葡萄糖, 以不添加益生元的基础 MRS 培养基为阴性对照, 37 °C 摇床培养 24 h, 每隔 4 h 取样测 OD_{600nm} 值和 pH 值。

1.2.7 益生元对菌株降胆固醇能力的影响

分别添加 1% 的菊粉、低聚半乳糖、乳果糖和水苏糖的培养基中加入最终浓度为 100 μg/mL 的胆固醇和 0.3% 的胆盐, 将菌株以 5% 的接种量接种至上述培养基中, 37 °C 培养 24 h, 每隔 3 h 取样离心 (5000 r/min, 15 min), 取上清液, 根据 1.2.2 的方法测定胆固醇去除率。

1.2.8 16S rDNA 序列测定与系统发育分析

以 Ezup 柱细菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取基因组, 采用通用引物 (7F, 1540R): 7F: 5'-CAGAGTTTGATCCTGGCT-3' 和 1540R: 5'-AGGAGGTGATCCAGCC GCA-3' 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为: DNA 模板 0.5 μL, 10×Buffer 2.5 μL, dNTP 1 μL, 上下游引物各 0.5 μL, 总体积 25 μL。反应条件: 预变性: 94 °C、4 min; 变性: 94 °C、45 s; 退火: 55 °C、45 s; 延伸: 72 °C、1 min, 30 个循环; 4 °C 终止反应。PCR 产物由上海生工生物股份有限公司进行序列测序。将得到的测序采用 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 中的数据进行比对确定其属种, 并利用 MEGA 5.0 构建系统发育树。

1.3 数据处理

本实验数据为平均值±标准偏差 (Mean±SD), 使

用 Origin 9.0 软件进行数据统计分析。采用 SPSS 20.0 的单因素方差分析和 Dunnett 的多重比较检验确定各实验均值之间的显著性差异 (p<0.05), 用 MEGA 5.0 构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 降胆固醇菌株的筛选结果

从传统酵素中分离出 12 株乳酸菌并分别编号为 M1-M12, 对 12 株菌的降胆固醇能力进行测定, 由图 1 可以看出, 各菌株降胆固醇能力差异较明显, 陈大卫^[18]等筛选出的 9 株乳酸菌的胆固醇去除率也呈现出不同。本研究中菌株 M-6、M-8 和 M-11 的降胆固醇能力显著高于其他九株菌, 胆固醇去除率分别为 25.92%、25.43% 和 28.44%, 也高于韦云路^[19]等的研究动物双歧杆菌 LPL-RH (23.8%)。菌株 M-2、M-7、M-10、M-12 次之, 这四株菌之间差异不显著 (p>0.05), 但显著高于其余 5 株菌, 剩余菌株的胆固醇去除率均低于 20%, 其中菌株 M-5 的胆固醇去除率最低, 为 8.03%。因此, 筛选出菌株 M-2、M-6、M-7、M-8、M-10、M-11 和 M-12 进行后续研究。

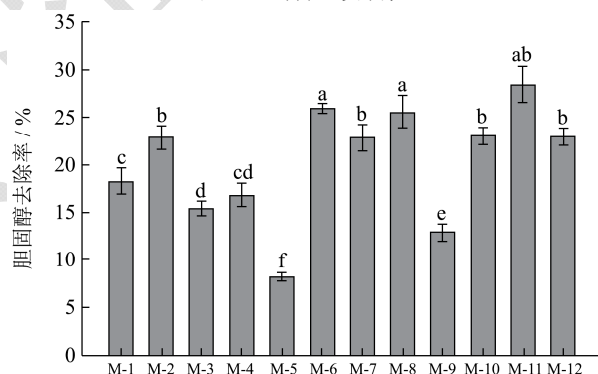


图1 降胆固醇菌株的筛选

Fig.1 Screening of cholesterol-lowering strains

注: 小写字母不同表示差异显著 (p<0.05)。

2.2 菌株胆盐耐受性分析结果

人体小肠胆盐含量在 0.03%~0.3% 范围内, 益生菌黏附于肠道发挥益生特性, 就必须经受肠道的高盐环境^[1]。由图 2 可以看出, 菌株 M-8 在含 0.2% 的胆盐环境中生长最好, 胆盐耐受率可达 42.09%, 显著高于其余 6 株菌, 也高于黄燕燕^[20]等从开菲尔粒和泡菜水中分离的乳酸杆菌耐受率 (35.48%)。菌株 M-10 胆盐耐受率次之, 为 21.90%, 菌株 M-2 和 M-12, 耐受率分别为 18.10%、17.36%, 但显著低于菌株 M-8 (p<0.05)。菌株 M-6 和 M-11 的生长抑制程度均较高, 二者的胆盐耐受率接近, 分别为 8.49%、9.46%, 差异不显著

($p>0.05$)。

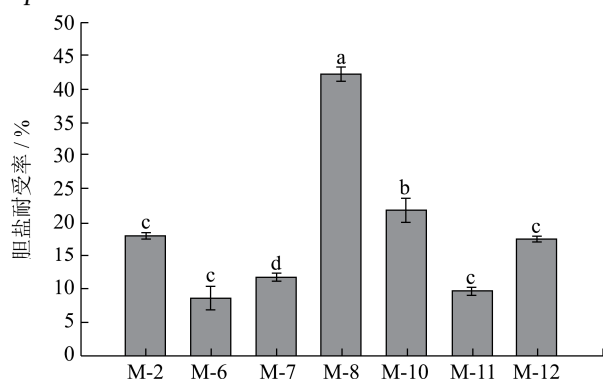


图2 菌株的胆盐耐受性

Fig.2 Bile tolerance of strains

注：小写字母不同表示差异显著 ($p<0.05$)。

2.3 菌株耐酸性分析结果

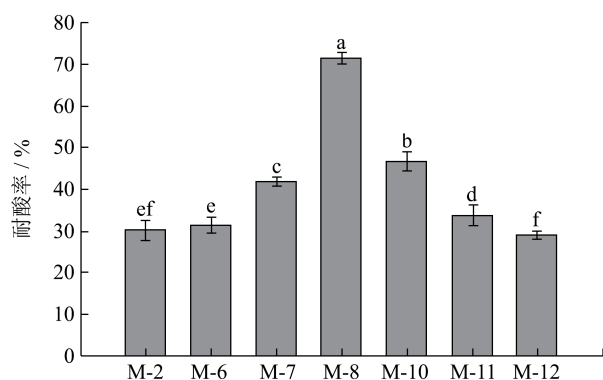


图3 菌株的耐酸性

Fig.3 Acid resistance of strains

注：小写字母不同表示差异显著 ($p<0.05$)。

耐酸性是益生菌的重要特征之一，益生菌制剂或其他功能性食品中的益生菌必须具有一定的耐酸能力，才能顺利通过胃酸屏障对人体起到促进健康的作用。胃液的酸度和胃蛋白酶的作用对菌株的生存影响较大，胃液的pH通常范围为2.5~3.5^[21]。由图3可以看出，菌株均能够在pH 3.0的酸性环境下生长，表明这7株菌对酸具有较好的耐受能力。Wang^[22]等从发酵芥菜中分离的乳酸菌同样能够在pH 3.0的环境下存活。7株菌间耐酸性差异较为明显，耐酸率从29.06%~71.53%不等，其中耐酸率在40%以上的菌株有3株，分别是菌株M-7、M-8和M-10。王婉^[23]等从东北酸菜中分离的菌株在pH 3的环境下存活率差异大，介于25.3%~99.1%之间。菌株M-8的耐酸能力最强，耐酸率为71.53%，显著高于李利^[16]等从酸奶中分离出的植物乳杆菌SN1、SN2耐酸性。其次是菌株M-10和M-7，耐酸率分别46.75%、41.92%，二者的差异显著 ($p<0.05$)。菌株M-2和M-6呈现出相似的耐酸能力，耐酸率分别为30.31%、31.51%。7株菌的

耐酸能力强弱顺序如下：M-8>M-10>M-7>M-11>M-6>M-2>M-12，其中菌株M-12的耐酸能力相对较弱，耐酸率为29.06%，可能是由于低酸环境使菌体细胞很难维持胞内pH的稳定，从而导致生长缓慢。

2.4 菌株疏水性试验结果

疏水性是菌株黏附于肠道的主要条件之一，菌株的黏附特性分为物理化学因素引起的非特异性黏附和菌株表面的脂磷壁酸、肽聚糖等引起的特异性黏附^[24]。菌株的黏附过程与疏水作用、静电作用等有关，疏水性越强，菌株黏附能力越强^[25]。本研究以菌株在水相和二甲苯相中的疏水分配为依据，比较了菌株疏水性。由图4可以看出，不同菌株的疏水性有所不同。7株菌中，菌株M-7、M-8和M-10的疏水率均大于25%，呈现出良好的疏水能力。Wadström^[26]等测定了野生型乳酸菌表面疏水性及其对肠上皮细胞的黏附能力，发现疏水性高的菌株具有较高的黏附能力，这一结果证实疏水性能作为筛选高黏附性菌株的指标。菌株M-8的疏水率最高，为35.91%，高于占萌^[27]等研究的耐久肠球菌KLDS 6.0933表面疏水性(30.00%)，表明菌株M-8具有较高的黏附力。菌株M-7和M-10疏水率分别为28.02%、26.17%，二者的差异不显著 ($p>0.05$)。菌株M-2和M-6具有相似疏水能力，但疏水率均低于20%。菌株M-12的疏水能力相对较弱，疏水率仅为12.38%。

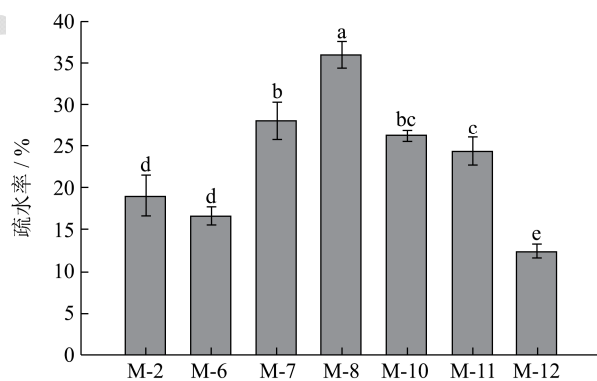


图4 菌株的疏水性

Fig.4 Hydrophobicity property of strains

注：小写字母不同表示差异显著 ($p<0.05$)。

2.5 益生元对菌株体外生长的影响

通过对7株菌的降胆固醇能力以及益生特性的测定结果分析，与其他菌株相比，菌株M-8不仅具有较高的降胆固醇能力，而且呈现出良好的益生特性，在胆盐中能够良好生长，耐酸性、胆盐耐受性显著高于其他菌株 ($p<0.05$)，疏水能力较好，因此，筛选出菌株M-8进行下一步的研究。

2.5.1 菌株生物量的变化

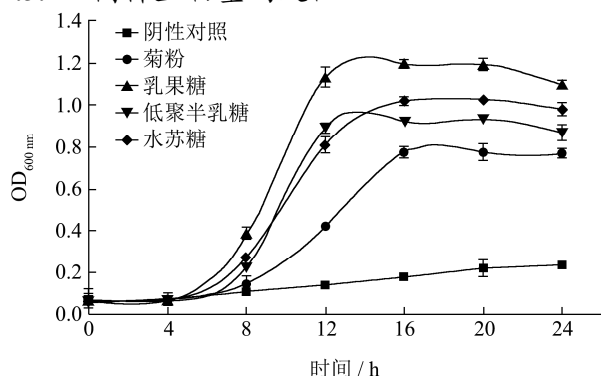


图5 益生元对菌株生物量变化曲线的影响

Fig.5 The impacts of prebiotics on the biomass curves of strains

由图5可以看出,将不同益生元添加到培养基时,菌株 M-8 的生物量均有不同程度的增加,在所有时间段的吸光度均高于阴性对照组。其中,添加乳果糖时,菌株 M-8 的生物量增加幅度最大,OD_{600 nm}值提高了4.14倍。其次是水苏糖,OD_{600 nm}值提高了3.40倍。培养的前4 h,益生元组和阴性对照组中,吸光度都没有明显的提高,这与刘露^[28]等研究结果一致。培养4 h后,益生元组均开始有明显的增长趋势,并且乳果糖组的吸光度比其他组同时间的吸光度高,说明乳果糖对菌株的增殖效果最为显著。Ziar^[29]等研究益生元对乳源乳酸菌生长的影响时,结果表明乳果糖对乳酸菌生长影响最大。菌株对不同的益生元表现出选择性代谢,这可能与多种因素有关,如代谢特性、应变依赖性等^[30]。与其他益生元组相比,菌株 M-8 在乳果糖发酵液中较快的进入稳定期。在添加菊粉组中,培养20 h时,OD_{600 nm}值仅0.774,吸光度变化较小,表明菌株 M-8 生长迟缓,其原因可能是菌株缺乏菊粉代谢所需的酶机制。Adebola^[31]等也得到了类似的结果,筛选出的嗜酸乳杆菌 NCTC 1723、保加利亚乳杆菌 NCTC 12712 和短乳杆菌 NCIMB 11973 均不能利用菊粉。

2.5.2 pH 值的变化

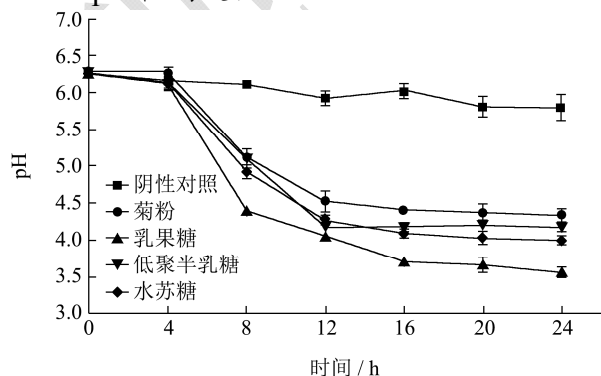


图6 益生元对菌株体外生长发酵液 pH 值的影响

Fig.6 The impacts of prebiotics on the pH of strains fermentation broth in vitro

在培养0、4、8、12、16、20、24 h时,测定菌液的 pH 值。由图6可以看出,随着时间的延长,益生元组和阴性对照组的 pH 值以不同幅度呈现下降趋势。尤其是添加乳果糖的发酵液,与初始 pH 值相比,培养24 h后 pH 下降幅度最明显,下降了2.68。水苏糖和低聚果糖次之, pH 值分别下降了2.25、2.09,而阴性对照组发酵液 pH 的变化幅度最小, pH 值下降了0.47。益生元组发酵液 pH 值在培养4 h时有一个转折点,培养的前4 h时,发酵液 pH 值均没有明显变化,培养4 h后呈现下降趋势,表明益生元可促进菌体较快的进入对数生长期。刘露^[32]等研究山药低聚糖对嗜热链球菌体外增殖的影响时发现培养4 h后,发酵液 pH 值呈显著下降趋势,与本研究结果相似。添加菊粉的发酵液中,菌株 M-8 的发酵产酸量较低,因此, pH 变化趋势较缓慢。与图5相比较,发酵液 pH 值的变化规律和菌株 M-8 生物量变化规律具有一定的相似性,可能是由于菌体生长繁殖,发酵益生元产酸,从而使发酵液 pH 值发生变化。夏晓风^[33]等研究低聚糖对嗜热链球菌生长的影响,也得出相似的结果。

2.6 益生元对菌株降胆固醇能力的影响

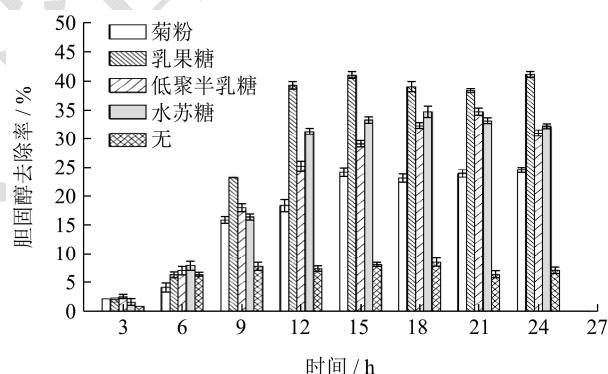


图7 益生元对菌株体外降胆固醇能力的影响

Fig.7 The impacts of prebiotics on the cholesterol-lowering abilities of strains in vitro

由图7可以看出,菌株 M-8 在益生元组和阴性对照组中的降胆固醇能力不同,随着时间的延长,菌株胆固醇去除率呈现上升趋势。尤其乳果糖,与初始胆固醇去除率相比,培养15 h时,菌株 M-8 胆固醇去除率呈现最大值,为41.10%。其次是水苏糖,菌株 M-8 在培养18 h时胆固醇去除率较高,为34.71%。阴性对照组中,菌株的降胆固醇能力最弱,变化趋势平缓,胆固醇去除率最大值仅为8.40%。培养0~12 h时,胆固醇去除率幅度较大,12 h以后保持一段较平稳状态。Kimoto^[34]等测定了嗜酸乳杆菌生物量及胆固醇去除率变化,发现在6~18 h之间,菌株降胆固醇能力变化较大,在18~24 h时处于较平稳状态。培养24 h时,

对阴性对照组相比, 各益生元组中菌株的胆固醇去除率提高了 2.50~4.86 倍。Ziar^[29]等研究表明, 与阴性对照组相比, 益生元组显著地提高了乳酸菌的降胆固醇能力, 约为 1.5~10 倍。与图 5 相比较, 菌株降胆固醇能力变化趋势与生物量变化趋势相似, 表明益生元不仅对菌株有促生长作用, 而且能够显著提高降胆固醇能力。与秦翠丽^[35]等研究结果相似。贺珊珊^[36]等研究结果也证实了益生菌的降胆固醇能力依赖于它们的生长情况。

2.7 菌株 M-8 的鉴定

2.7.1 菌株 M-8 的形态特征

从传统酵素中共分离得 12 株菌 (M1~M12), 从中筛选得到一株具有较高降胆固醇能力以及良好益生特性的菌株 M-8。如图 8 所示, 该菌菌落形态为圆形、乳白色、表面光滑、边缘整齐、不透明的小菌落。活化菌株镜检时, 革兰氏染色后呈蓝紫色, 为革兰氏阳性菌。细胞结构均一, 呈短杆状, 成对或链状排列, 均无芽孢和鞭毛。

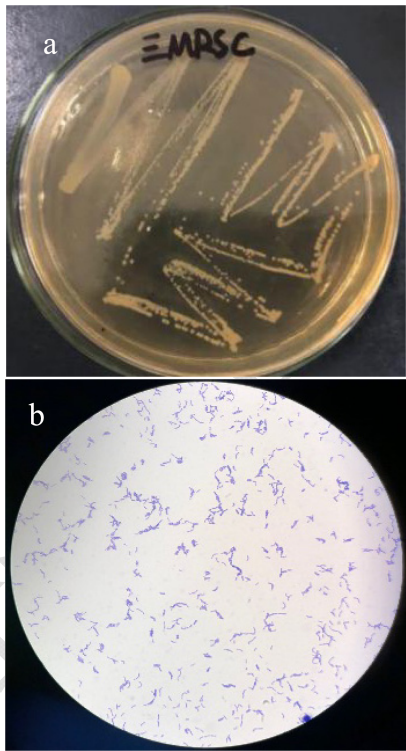


图 8 筛选菌株的形态

Fig.8 The morphology of strains

2.7.2 16S rDNA 分子生物学鉴定

表 1 16S rDNA 序列分析结果

Table 1 16S rDNA sequence analysis results

菌株	参考序列	BLAST 结果	同源性/%
M-8	NR_025880.1	<i>L. paracasei</i> strain	100

提取菌株 M-8 的基因组 DNA 后, 以 16S rDNA 通用引物进行 PCR 扩增, 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物, 扩增产物序列长度在 1500 bp 左右。登陆 NCBI 网站, 对测序结果进行 BLAST 序列比对, 由表 1 可以看出, 菌株 M-8 与 *L. paracasei* strain 的 16S rDNA 同源性达 100%, 为进一步确定菌株的分类学地位, 利用 MEGA 5.0 软件构建系统发育树, 见图 9。

由系统发育树可知, 菌株 M-8 和相对应的模式菌株处于同一个小分支, 由此可以判定菌株 M-8 为副干酪乳杆菌, 并将其命名为 *Lactobacillus paracasei* S0940。

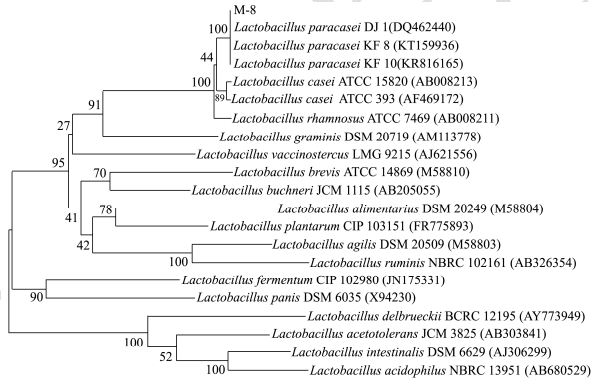


图 9 菌株 M-8 16S rDNA 序列构建的系统发育树

Fig.9 Phylogenetic tree of M-8 strain based on the 16S rDNA sequence

注: 发育树节点的数字表示 Bootstrap 值, 括号中的数字为序列登录号。

3 结论

本研究通过对乳酸菌的耐酸性、胆盐耐受性、疏水性以及降胆固醇能力的测定, 从传统酵素中分离筛选得到一株既具有良好益生特性又能够高效降胆固醇的菌株 M-8, 经形态学和 16S rDNA 分子生物学鉴定后, 命名为 *Lactobacillus paracasei* S0940。添加益生元强化碳源培养该菌株时, 发现乳糖对其生长和降胆固醇能力影响最为显著; 胆固醇去除率达 41.10%。目前已报道的乳酸菌降胆固醇机制主要有: 乳酸菌菌体细胞膜的吸附作用; 乳酸菌产生的胆盐水解酶将结合型胆盐转化为游离胆盐, 并与胆固醇结合排除体外^[37,38]; 乳酸菌发酵产生的短链脂肪酸、蛋白质等代谢产物参与胆固醇的分解作用^[39]。此外, 益生元对乳酸菌的体外降胆固醇作用机制还与其单糖组成、聚合度以及糖苷键位置等分子结构有关, 这方面的研究有待进一步展开。

参考文献

- [1] 赵晴.匹伐他汀联合依折麦布对老年人高胆固醇血症及动脉硬化疗效的研究[D].保定:河北大学,2019
ZHAO Qing. Efficacy of pivalastatin combined with ezetimibe in the treatment of elderly patients with hypercholesterolemia and carotid atherosclerosis [D]. Baoding: Hebei University, 2019
- [2] 孔令阁.瑞舒伐他汀治疗老年冠心病患者高胆固醇血症的临床研究[J].全科口腔医学电子杂志,2019,6(23):167-168
KONG Ling-ge. Clinical study on rosuvastatin in the treatment of elderly patients with coronary heart disease hypercholesterolemia [J]. Electronic Journal of General Stomatology, 2019, 6(23): 167-168
- [3] Aloglu H Ş, Özer E D, Öner Z. Assimilation of cholesterol and probiotic characterisation of yeast strains isolated from raw milk and fermented foods [J]. International Journal of Dairy Technology, 2016, 69(1): 63-70
- [4] Mancini G B, Baker S, Bergeron J, et al. Diagnosis, prevention, and management of statin adverse effects and intolerance: Canadian consensus working group update [J]. The Canadian Journal of Cardiology, 2016, 32(7): 35-65
- [5] Edel A L, Rodriguezleyva D, Maddaford T G, et al. Dietary flaxseed independently lowers circulating cholesterol and lowers it beyond the effects of cholesterol-lowering medications alone inpatients with peripheral artery disease [J]. Journal of Nutrition, 2015, 145(4): 749-757
- [6] Fayemi O E, Buys E M. Effect of *Lactobacillus plantarum* on the survival of acid-tolerant non-O157 Shiga toxin-producing *E.coli* (STEC) strains in fermented goat's milk [J]. International Journal of Dairy Technology, 2017, 70(3): 399-406
- [7] Shehata M G, 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 Science, 2016, 61(1): 65-75
- [8] Nami Y, Bakhshayesh R V, Manafi M, et al. Hypocholesterolaemic activity of a novel autochthonous potential probiotic *Lactobacillus plantarum* YS5 isolated from yogurt [J]. LWT-Food Science and Technology, 2019, 111: 876-882
- [9] Gibson G R, Hutkins R, Sanders M E, et al. The international scientific association for probiotics and prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics [J]. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 2017, 14: 491-502
- [10] Walton G E, Swann J R, Gibson G R. The Prokaryotes [M]. Switzerland: Springer, 2013: 25-43
- [11] Adebola O O, Corcoran O, Morgan W A. Synbiotics: The impact of potential prebiotics inulin lactulose and lactobionic acid on the survival and growth of lactobacilli probiotics [J]. Journal of Functional Foods, 2014, 10: 75-84
- [12] Souza F P, Balthazar C F, Guimarães J T, et al. The addition of xyloligosaccharide in strawberry-flavored whey beverage [J]. LWT-Food Science and Technology, 2019, 109: 118-122
- [13] Balthazar C F, Silva H L A, Esmerino E A, et al. The addition of inulin and *Lactobacillus casei* 01 in sheep milk ice cream [J]. Food Chemistry, 2018, 246: 464-472
- [14] Pan D D, Zeng X Q, Yan Y T. Characterization of *Lactobacillus fermentum* SM-7 isolated from koumiss, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2010, 91(3): 512-518
- [15] 吴慧昊, 牛锋, 钟琦, 等. 高效降胆固醇降甘油三酯乳酸菌的分离鉴定和功能分析[J]. 食品工业科技, 2019, 40(14): 157-162
WU Hui-hao, NIU Feng, ZHONG Qi, et al. Separation, identification and functional analysis of cholesterol-lowering and triglycerid-lowering lactic acid bacteria [J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(14): 157-162
- [16] 李利, 孔丽, 张宁, 等. 耐酸耐胆盐乳酸菌的鉴定及筛选[J]. 食品科学, 2015, 36(21): 123-128
LI Li, KONG Li, ZHANG Ning, et al. Identification and selection of lactic acid bacteria resistant to acid and bile salt [J]. Food Science, 2015, 36(21): 123-128
- [17] Kotzamanidis C, Kourelis A, Litopoulou-Tzanetaki E, et al. Evaluation of adhesion capacity, cell surface traits and immunomodulatory activity of presumptive probiotic *Lactobacillus strains* [J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 140: 154-163
- [18] 陈大卫, 郭飞翔, 顾瑞霞, 等. 具有降胆固醇能力的人源乳酸菌筛选[J]. 现代食品科技, 2014, 30(3): 114-120
CHEN Da-wei, GUO Fei-xiang, GU Rui-xia, et al. Screening of cholesterol-reducing lactic acid bacteria from human origin [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(3): 114-120
- [19] 韦云路, 刘义, 王瑶, 等. 3株益生菌体外降胆固醇能力及体内降血脂效果评价[J]. 食品科学, 2017, 38(23): 129-134
WEI Yun-lu, LIU Yi, WANG Yao, et al. Cholesterol-lowering ability *in vitro* and hypolipidemic effect

- in vivo* of three probiotic strains [J]. Food Science, 2017, 38(23): 129-134
- [20] 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 Yan-yan, GUO Jun, LI Heng-xi, 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
- [21] Han Q, Kong B H, Chen Q, et al. *In vitro* comparison of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Harbin dry sausages and selected probiotics [J]. Journal of Functional Foods, 2017, 32: 391-400
- [22] Wang S C, Chang C K, Chan S C, et al. Effects of lactic acid bacteria isolated from fermented mustard on lowering cholesterol [J]. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2014, 4(7): 523-528
- [23] 王婉,卢佳音,焦月华,等.东北酸菜中乳酸菌的分离鉴定与耐酸性菌株的筛选[J].食品科学,2019,40(10):99-105
WANG Wan, LU Jia-yin, JIAO Yue-hua, et al. Isolation, identification and screening of acid tolerant lactic acid bacteria from Chinese sauerkraut [J]. Food Science, 2019, 40(10): 99-105
- [24] Holzapfel W H, Haberer P, Snel J, et al. Overview of gut flora and probiotics [J]. International Journal of Food Microbiology, 1998, 41(2): 85-101
- [25] 陈孝勇,李键,赵欣,等.传统发酵牦牛酸乳中益生性乳酸菌的体外筛选[J].食品与发酵工业,2016,42(4):85-90
CHEN Xiao-yong, LI Jian, ZHAO Xin, et al. *In vitro* screening of lactic acid bacteria with probiotic properties from traditional fermented yak yogurt [J]. Food and Fermentation Industries, 2016, 42(4): 85-90
- [26] Wadström T, Andersson K, Sydow M, et al. Surface properties of lactobacilli isolated from the small intestine of pigs [J]. Applied Microbiology, 1987, 62(6): 513-520
- [27] 占萌,李柏良,王成凤,等.15株乳酸菌的表面性质及其黏附能力[J].食品工业科技,2018,39(24):122-127
ZHAN Meng, LI Bai-liang, WANG Cheng-feng, et al. Surface properties and adhesion ability of 15 lactic acid bacteria [J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(24): 122-127
- [28] 刘露,张雁,池建伟,等.山药低聚糖对2种双歧杆菌的体外促生长作用[J].食品科学,2017,38(6):130-135
LIU Lu, ZHANG Yan, CHI Jian-wei, et al. Promoting effects of oligosaccharides from Chinese yam on the growth of two species of bifidobacteria *in vitro* [J]. Food Science, 2017, 38(6): 130-135
- [29] Ziar H, Gérard P, Riazi A. Effect of prebiotic carbohydrates on growth, bile survival and cholesterol uptake abilities of dairy-related bacteria [J]. Journal of Science Food Agriculture, 2014, 94: 1184-1190
- [30] Zhang F, Hang X M, Fan X B, et al. Selection and optimization procedure of synbiotic for cholesterol removal [J]. Anaerobe, 2007, 13: 185-192
- [31] Adebola O O, Corcoran O, Morgan W A. Synbiotics: The impact of potential prebiotics inulin lactulose and lactobionic acid on the survival and growth of lactobacilli probiotics [J]. Journal of Functional Foods, 2014, 10: 75-84
- [32] 刘露,张雁,邓媛元,等.山药低聚糖体外调节乳酸菌生长的作用[J].中国食品学报,2017,17(10):37-43
LIU Lu, ZHANG Yan, DENG Yuan-yuan, et al. Regulation functions to lactobacillus *in vitro* by oligosaccharides from Chinese yam [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2017, 17(10): 37-43
- [33] 夏晓凤,王虎飞,吴晓玉.6种常用低聚糖对嗜热链球菌体外生长的影响[J].食品与生物技术学报,2016,35(3):310-317
XIA Xiao-feng, WANG Hu-fei, WU Xiao-yu. Effects of six commonly used oligosaccharides on the growth of *Streptococcus thermophilus in vitro* [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2016, 35 (3): 310-317
- [34] Kimoto H, Ohmomo S, Okamoto T. Cholesterol removal from media by lactococci [J]. Journal of Dairy Science, 2002, 85: 3182-3188
- [35] 秦翠丽,刘文静,王德舜,等.降胆固醇益生元组合的体外筛选[J].食品研究与开发,2012,33(10):166-169
QIN Cui-li, LIU Wen-jing, WANG De-shun, et al. Selection procedure of synbiotic combination for cholesterol removal *in vitro* [J]. Food Research and Development, 2012, 33(10): 166-169
- [36] 贺珊珊,鲍志宁,林伟锋,等.降胆固醇和耐酸耐胆盐益生菌的筛选研究[J].现代食品科技,2019,35(8):198-219
HE Shan-shan, BAO Zhi-ning, LIN Wei-feng, et al. Screening of cholesterol-reducing probiotics and its acid and bile salt tolerance [J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 35(8): 198-219
- [37] Klaver F A, Van der Meer 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