

文章编号:1004-7271(2004)02-0180-04
·研究简报·

降胆固醇乳酸菌的初步筛选

Screening of the cholesterol-reducing lactic acid bacteria

赵丽珺, 齐凤兰, 陈有容

(上海水产大学食品学院, 上海 200090)

ZHAO Li-jun, QI Feng-lan, CHEN You-rong

(College of Food Science, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

关键词: 乳酸菌; 降胆固醇; 筛选; 生物学特性

Key words: lactic acid bacteria; cholesterol-reducing; screening; biological properties

中图分类号: TS252.1 文献标识码: A

早在 1963 年, Shaper 等^[1]发现非洲 Samburu 和 Masai 族的人由于大量饮用由乳杆菌发酵的乳制品, 其体内血清胆固醇的含量均较低。而后国内外大量研究也证实, 不同种类的乳酸菌具有降低胆固醇的效果, 服用乳酸菌及其相关制品可以降低人体血清胆固醇水平, 降低心血管病发病率。因此筛选降胆固醇能力较强的乳酸菌并将其应用于食品加工中具有重要的现实意义。本试验是在前人大量研究的基础上, 从发酵实验室保存的 4 株乳酸菌中筛选出一株降胆固醇能力较高的菌种, 并在体外对这株菌耐受体内不良环境的能力进行考察。

1 材料和方法

1.1 菌种来源

乳酸菌 SFU-1 ~ SFU-4 由上海水产大学发酵实验室保藏提供, 用 MRS 液体培养基在 37℃ 下培养 14h 后在 4℃ 条件下贮存备用。

1.2 培养基制备

MRS 液体培养基(根据需要可加 0.3% 牛胆汁), 121℃ 灭菌 15min, 冷却备用。

1.3 菌种初筛

在无菌操作台中, 向灭好菌的 MRS-broth 加入一定量的鸡蛋黄(由于有蛋壳的保护, 可认为鸡蛋黄无菌, 且鸡蛋黄中胆固醇含量高达 28.5mg/g ^[2], 同时蛋黄中富含的卵磷脂是一种很好的乳化剂, 使得蛋黄能以微细液滴的形式均匀分散于培养基中, 形成稳定均匀的乳油液体系。)作为胆固醇源, 混合均匀。无菌分装到小三角烧瓶中, 接种, 37℃ 连续培养 24h, 每隔 4h 取样测定胆固醇降低率。取 3mL 培养液, 在 3000r/min 下离心 20min, 取上清液按照磷硫铁比色法^[3]测定上清液中胆固醇含量。胆固醇降低率按

收稿日期: 2003-12-24

作者简介: 赵丽珺(1979-)女, 广西南宁市人, 硕士研究生, 专业方向为食品微生物。Tel: 021-65710324, E-mail: Lankanzhao@hotmail.com

通讯作者: 齐凤兰(1954-)女, 河北张家口人, 副教授, 研究方向为食品微生物与生物技术。Tel: 021-65710324

照以下公式计算：

$$\text{胆固醇降低率}(\%) = [(C_{\text{对照}} - C_t) / C_{\text{对照}}] \times 100$$

其中 $C_{\text{对照}}$ 为未接种乳酸菌的培养基中胆固醇浓度, C_t 为培养 t 时间后胆固醇浓度。

1.4 菌种复筛

方法同菌种初筛,只是 MRS-broth 中加入 0.3% 牛胆汁。

1.5 耐酸试验

用 1mol/L HCl 调节 MRS-broth pH 值为 2 和 3,并与对照组 (pH 值 6.9 ± 0.1) 分别接种 5% 乳酸菌种后,在 37°C 下培养 6h,每隔 1h 取样,平板活菌计数法测定活菌数。

1.6 耐 0.3% 胆汁试验

以 5% 的乳酸菌接种量接种在含有 0.3% 胆汁的 MRS-broth 中,37°C 下连续培养 10h,每隔 1h 取样平板活菌计数法测定其活菌数。

1.7 耐盐试验

以 5% 的接种量接种在含有不同 NaCl 浓度 (0%、2%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%) 的 MRS-broth 中,37°C 下培养 10h 后取出,在 600nm 下测定其 OD 值。

2 结果

2.1 菌种筛选

比较了 4 株乳酸菌在 MRS 液体培养基 (不添加胆汁和含胆汁) 中降胆固醇的能力,其结果如表 1 所示。

结果表明,4 株乳酸菌在含有胆汁和不含胆汁的培养基中均有降胆固醇的能力,但其能力大小因菌种的不同而有所不同。在不含胆汁的培养基中 SFU-1 和 SFU-2 的胆固醇降低率较高,分别为 49.19% 和 51.28%。而在有胆汁存在的条件下,4 株菌胆固醇降低率均有所降低。其中 SFU-1 降低幅度最大,胆固醇降低率仍保持在 48% 以上。因此 SFU-1 作为候选菌株作进一步研究。

2.2 耐酸试验

如图 1 所示,在培养 6h 过程中, pH2 的条件下, SFU-1 的生长均受到了明显抑制,在 1h 内还能维持一定的水平,1h 以后,活菌数迅速下降,3h 后活菌数降至 10 以下。与对照相比,在 pH 3 的环境中,6h 内,活菌数虽然有所下降,但仍可维持较高的一个水平。

2.3 耐 0.3% 胆汁试验

本试验考察了 SFU-1 耐 0.3% 胆汁的能力,结果如图 2 所示。在 0.3% 胆汁存在下, SFU-1 仍能生长,尤其在前 4 个小时,菌体生长迅速,在第 3 个小时左右达到最大值,4h 以后,菌体开始死亡,活菌数缓慢下降。

表 1 4 株乳酸菌降胆固醇能力的比较

Tab.1 Comparison of the highest cholesterol-reducing rate between 4 strains in 24 hours

菌株	胆固醇降低率 (%)	
	初筛	复筛
SFU-1	49.19	48.35
SFU-2	51.28	26.28
SFU-3	35.30	34.94
SFU-4	40.65	23.33

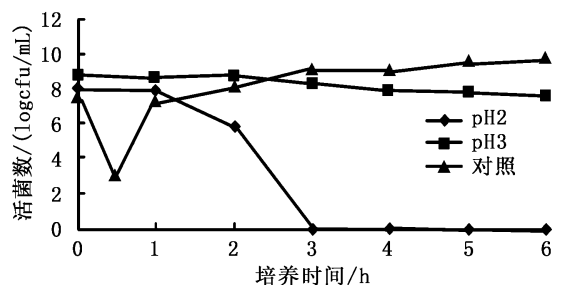


图 1 SFU-1 耐酸能力

Fig.1 Acid tolerance of SFU-1

▲对照 (pH6.9 ± 0.1) ■pH3 ◆pH2

2.4 耐盐试验

一般乳酸菌 BL 和 ST 在 2% NaCl 作用下就受到明显的抑制^[1]。本实验中(如图 3),当 NaCl 浓度为 5%时, SFU-1 在 600nm 下的吸光值约为空白时的一半,在 NaCl 浓度大于 7% 时才有明显的抑制作用,NaCl 浓度达到 10% 时 SFU-1 的生长几乎受到完全抑制。

3 讨论

3.1 乳酸菌降胆固醇能力

乳酸菌降胆固醇的机理目前尚不清楚,目前主要有两种观点(1)乳酸菌细胞直接吸收胆固醇。该理论仅仅是在纯培养条件下得到了证实,尚未经过动物及人体实验研究,所以人们推测,由于细菌细胞吸收了肠道中的胆固醇,可能会减少机体对胆固醇的吸收,从而导致体内血清中胆固醇的含量降低^[4]。(2)共沉淀理论,这个降胆固醇效果包括两方面:一是胆固醇溶解度取决于胆盐的溶解度,胆盐水解后因溶解度下降使胆固醇也一同沉淀下来,因此认为胆盐水解酶催化产生的脱结合胆盐是降低胆固醇含量的直接因素^[7];另一方面,胆固醇是胆酸合成的前体,在乳酸菌胆盐脱氢酶的作用下,胆盐由结合态变成脱结合态沉淀下来,从而启动了胆固醇合成的反馈调节机制,使胆固醇转变成胆酸,从而可以使体内血清中的胆固醇水平降低^[4-6]。目前科学家们普遍倾向于乳酸菌降胆固醇是这两种机理共同作用的结果。本实验初筛中,由于培养基中没有加入胆汁,没有明显的共沉淀作用,所以这里胆固醇的降低极可能是由于乳酸菌吸收胆固醇的结果。复筛中,这四株乳酸菌并未出现文献中关于胆汁加入可能提高乳酸菌降胆固醇能力的现象^[4,8]。一些文献认为在酸性条件下,胆汁和胆固醇可能形成复合物沉淀,并且加入的胆汁有提高乳酸菌细胞膜通透性的作用,可以增强乳酸菌的吸附作用。在这 4 株菌的测试中,降低率变低的原因可能由于胆汁对乳酸菌生长的抑制作用,使活菌数减少,虽然细胞膜的通透性可能提高并且可能会出现共轭沉淀,但降低胆固醇的乳酸菌个数减少,其绝对总和降低率受到了影响,也就是说在本实验中起降胆固醇作用的主要还是活菌体,而不是死菌体或代谢产物。总之,菌体细胞对胆固醇的吸收因胆盐浓度、胆盐种类、菌株的不同而表现出明显的差异。

3.2 乳酸菌耐受体内不良环境的能力

乳酸菌进入人体肠道后,必然要受到胆汁、胃酸、高渗透压的影响。只有能耐受这些不良环境的乳酸菌才能在体内存活。

人体内胆汁浓度约为 0.3%~0.5%,胆汁是由肝脏分泌的并贮藏在胆囊中的,消化时再分泌出十二指肠,它对脂肪的消化吸收都具有重要的作用。胆汁的主要成分是胆盐,肝肠循环是胆盐代谢的重要环节,胆盐进入肠道后与肠道中的微生物相互作用,一方面抑制微生物的生长,另一方面又要在微生物分泌的酶的作用下经历复杂的细菌转化^[9]。由试验结果看来 SFU-1 具有一定的耐胆汁能力。人体的纯净胃酸的 pH 值是 0.9~1.5,一般空腹时胃液的 pH 值小于 2,而在饭后的 pH 值一般大于 3,一般食物在胃中停留时间在 2~4h^[9]。这使得乳酸菌 SFU-1 很可能有较多的活菌进入肠道吸收食物中的胆固醇,从而减少人体对胆固醇的吸收。当然考虑到乳酸菌 SFU-1 的耐酸能力,在研发活菌产品时,此类产品还是

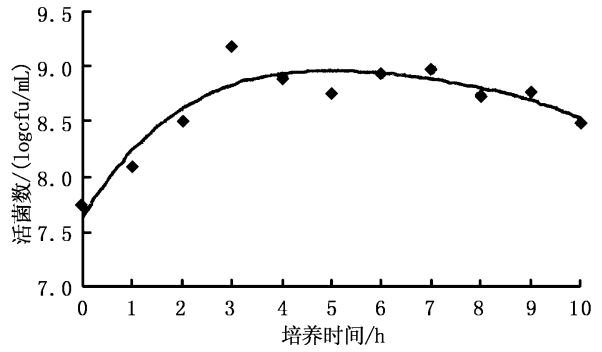


图2 SFU-1 耐 0.3% 胆汁能力

Fig.2 0.3% gall tolerance of SFU-1

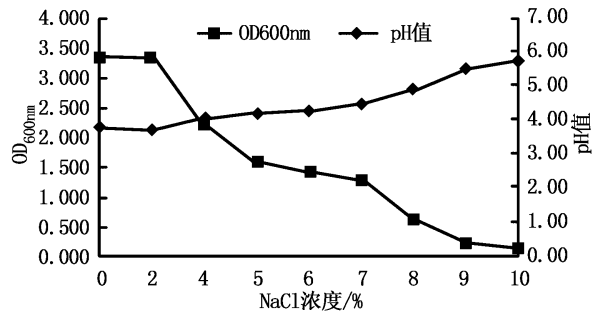


图3 SFU-1 耐盐能力

Fig.3 NaCl tolerance of SFU-1

应建议消费者在饭后服用而不要空腹服用或者应给予一定的保护剂如制成冻干粉或外包碱溶性胶囊会更好。食盐具有抑制不耐盐微生物活动,改善制品风味的作用。2%~3%的食盐溶液,其渗透压力约为11~18个大气压,而微生物细胞液的渗透压一般为3~16个大气压。当环境渗透压大于微生物的细胞液的渗透压,细胞内的水分流向细胞外,使细胞脱水导致质壁分离,从而抑制微生物细胞的生理代谢活动,使其停止生长或死亡。本实验中 SFU-1 在 2% 的食盐浓度下没有受到明显抑制,生长良好。SFU-1 的这种生理特性与冉艳红等^[10]报导乳酸菌具有类似的情况。冉艳红等的实验表明,泡菜汁中所生长乳酸菌在大于 2% 的食盐浓度中生长受抑制,但在 2% 食盐浓度中经过短时间的适应即迅速生长。

总的说来, SFU-1 无论胆盐存在与否都表现出较高的胆固醇降低能力,而 SFU-1 耐酸、耐胆汁的研究表明,该菌株具有较好的耐受体内不良环境的能力,同时 SFU-1 具有较强的耐盐能力,因此可以考虑开发保健蔬菜和其他活菌保健品。

参考文献：

- [1] Dora I A Pereira , Glenn R Gibson . Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut[J]. Applied and Environmental Microbiology , 2002 , 68(9) : 4689 - 4693 .
- [2] 中国营养学会 . 中国居民膳食营养素参考摄入量[M]. 北京 : 中国轻工业出版社 , 2001 .
- [3] 宁正祥 . 食品成分分析手册[M]. 北京 : 中国轻工业出版社 , 1998 . 176 - 177 .
- [4] 韩俊华 , 盛晓甘 , 董彩凤 . 乳酸菌降低胆固醇作用研究现状[J]. 中国乳品工业 , 2002 , 30(3) : 16 - 20 .
- [5] Derek K Walker , Stanley E Gilliland . Relationships among bile tolerance , bile salt deconjugation , and assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*[J]. Journal of Dairy Science , 1993 , 76(4) : 956 - 961 .
- [6] Gilliland S E , Nelson C R , Maxwell C . Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*[J]. Applied and Environmental Microbiology , 1985 , 49 : 377 - 381 .
- [7] Klaver F A K , van der Meer R . The assumed assimilation of cholesterol of *Lactobacilli* and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt deconjugation activity[J]. Applied and Environmental Microbiology , 1993 , 59 : 1120 - 1124 .
- [8] Meei-Yn Lin , Tseng-Wei Chen . Reduction of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus* in culture Broth[J]. Journal of food drug Analysis , 2000 , 8(2) : 97 - 102 .
- [9] 上海第一医学院 . 人体生理学[M]. 北京 : 人民卫生出版社 , 1978 .
- [10] 冉艳红 , 黄雪松 . 自然发酵泡菜汁中主要成分的变化[J]. 中国调味品 , 2002 (8) : 17 - 21 .
- [11] 杜连祥 . 乳酸菌及其发酵制品生产技术[M]. 天津 : 天津科学技术出版社 , 1999 .