

人体肠道益生菌体外降胆固醇活性研究

赵佳锐¹ 范晓兵² 杭晓敏² 王一鸣¹ 杨 虹^{1*}

(¹ 上海交通大学生命科学技术学院 上海 200240)

(² 上海交大昂立股份有限公司生物医药研究所 上海 200030)

摘 要: 从健康儿童和青年人肠道分离并鉴定了 21 株乳杆菌和双歧杆菌, 连同 6 株实验室保藏菌株进行了体外降胆固醇、耐酸及耐胆汁盐实验。结果表明, 所有实验菌株都能从培养基中去除胆固醇, 5 株去除率可达 40% 以上, 同时去除效力也较高。胆汁盐耐受性和耐酸性具有菌株特异性。菌株 Bm26 同时具有较高降胆固醇能力和耐胆汁盐及耐酸性能。

关键词: 益生菌, 胆固醇, 胆汁盐, 耐酸性能

中图分类号: Q938 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2005)06-0920-05

总胆固醇水平每升高 1mmol/L, 冠心病死亡的几率就会增加 35%。APCSC (The Asia Pacific Cohort Studies Collaboration, 亚太群组协作研究组织) 近期完成的一项历时 5 年的调查表明, 亚洲各国人群的胆固醇水平正在升高, 世界上心血管疾病约有一半发生在亚太地区^[1]。我国卫生部于 2004 年 10 月发布的《中国居民营养与健康现状》报告指出, 我国成人血脂异常患病率为 18.6%, 估计全国血脂异常现患人数 1.6 亿, 高胆固醇血症 2.9%, 高甘油三酯血症 11.9%, 高密度脂蛋白血症 7.4%, 另有 3.9% 的人血胆固醇边缘升高^[2]。由此可见, 心血管疾病对亚洲包括我国人群的健康构成重大威胁。欧美国家对益生菌的降血脂功能的研究和优良菌种的选育水平相对较高, 而我国这方面的研究刚刚起步, 来自人体肠道的益生菌的降胆固醇研究还未见报道, 机理研究更是空白。本研究的目的在于筛选来源于健康人体的安全性高的益生菌菌株并研究其潜在的降胆固醇活性, 为进一步的机理研究和临床研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器: GENbox 厌氧培养系统 (bioMérieux), 显微镜 OLYMPUS BH-2, PE2400 扩增仪 (Applied Biosystems), ABI 373A 自动 DNA 测序仪, 分光光度计 Spectroquant NOVA60 (MERCK), 溶菌酶、蛋白酶 K、Taq 聚合酶 (上海申能博彩生物科技有限

公司)。可溶性胆固醇 (Sigma), 0.3% 牛胆汁 (Sigma) 的改良 MRS 肉汤培养基 (MRS 肉汤添加 0.2% 巯基乙酸钠, Sigma), 双歧杆菌培养基: TPY 琼脂; 乳杆菌培养基: 改良 MC 琼脂 (上海市疾病预防控制中心)。

1.1.2 实验菌株: 选用了本实验室分离筛选的乳杆菌和双歧杆菌 21 株, 其中 8 株获自健康儿童肠道, 13 株获自健康青年肠道。另外选用 6 株实验室保藏菌株 (上海交大昂立股份有限公司生物医药研究所提供), 同时进行实验。具体信息见表 1。所有菌株均冷冻保藏, 使用前经 37℃ 厌氧 (使用厌氧盒及试剂: GENbox Jar 2.5L; GENbox anaer bioMérieux sa 69280 Marcy l'Etoile-France) 培养 24h, 连续转接 3 次, 方用于实验。

1.2 菌株分离和鉴定

用选择性培养基平板涂布法 (双歧杆菌: TPY 琼脂; 乳杆菌: 改良 MC 琼脂; 上海市疾病预防控制中心) 从健康青年人和儿童粪便中分离得到菌株, 经革兰氏染色为阳性且镜检形态特征符合乳杆菌或双歧杆菌的菌株, 提取其细菌总 DNA, 分别用双歧杆菌或乳杆菌特异引物 (Im3/Im26^[3]; L159/L67^[4]) 进行 16S rDNA PCR 扩增, 对得到约 1500bp 的双歧杆菌 PCR 片段或约 600bp 的乳杆菌 PCR 片段的菌株, 可初步确定为双歧杆菌或乳杆菌。并对 16S rDNA PCR 片段测序, 经 BLAST 在 GenBank 中找到最近的系统发育关系, 进一步确定为双歧杆菌或乳杆菌, 并

基金项目: 上海交大-昂立 SARS 基金资助项目

* 通讯作者。Tel: 86-21-54743343; Fax: 86-21-54743348; E-mail: hongyang@sjtu.edu.cn

作者简介: 赵佳锐 (1980 -), 女, 黑龙江人, 硕士研究生, 主要从事肠道益生菌的研究。E-mail: jerriss_zhao@yahoo.com.cn

收稿日期: 2005-03-18, 修回日期: 2005-07-04

表 1 益生菌去除培养基中的胆固醇实验结果

Table 1 Cholesterol removal rate and removal effectiveness of strains of probiotics from media

Strains of probiotics ¹	Accession No. ⁵	pH	OD ₆₂₀ /u	G ⁶ /mg	S ⁶ (μg/mL)	R ⁶ /%	E1 ⁶ [μg(mL·u)]	E2 ⁶ [μg(mL·mg)]
Uninoculated control		6.00	—	—	144.71	—	—	—
<i>B. pseudocatenulatum</i> Bf1 ²	AY766404	4.25	2.702	11.8	91.57	36.72	19.67	4.50
<i>B. Longum</i> Ba2 ²	AY766409	4.77	1.878	9.5	110.20	23.85	18.38	3.63
<i>B. pseudocatenulatum</i> Bf4 ²	AY766405	4.22	2.865	12.8	100.78	30.35	15.33	3.44
<i>B. adolescentis</i> Bf5 ²	AY766413	4.75	1.959	7.5	133.53	7.72	5.71	1.50
<i>B. pseudocatenulatum</i> Bm21 ²	AY766406	4.24	2.794	15.5	113.53	21.54	11.16	2.01
<i>B. Longum</i> Bm26 ²	AY766410	4.05	2.926	14.1	87.84	39.30	19.43	4.04
<i>L. brevis</i> Bm29 ²	AY766411	4.21	2.739	13.2	81.57	43.63	23.05	4.78
<i>L. brevis</i> LM1 ²	AY766417	4.44	2.608	12.4	79.02	45.39	25.18	5.30
<i>L. plantarum</i> Ls31 ³	AY851751	5.06	1.893	8.1	103.53	28.46	21.76	5.10
<i>L. plantarum</i> Ls52 ³	AY851752	4.12	2.987	13.1	90.00	37.80	18.32	4.19
<i>L. acidophilus</i> LA3 ⁴	NA	4.25	2.381	10.5	94.12	34.96	21.24	4.83
<i>L. acidophilus</i> LA4 ⁴	NA	4.26	2.379	8.6	92.55	36.04	21.92	6.06
<i>L. gallinatum</i> LA8 ⁴	NA	5.50	0.300	3.0	120.98	16.40	79.17	7.91
<i>L. acidophilus</i> LA11 ⁴	NA	4.33	2.437	8.7	90.20	37.67	22.37	6.27
<i>L. plantarum</i> LP-Onlly ⁴	AY590777	4.64	2.074	8.8	82.55	42.95	29.96	7.06
<i>L. plantarum</i> LB10 ⁴	AY590771	5.04	1.821	8.6	93.33	35.50	28.22	6.00
<i>L. plantarum</i> Xc3 ³	AY851753	4.15	2.818	13.3	81.18	43.90	22.54	4.76
<i>L. plantarum</i> Yc1 ³	AY851754	4.95	2.047	8.8	101.96	29.54	20.88	4.84
<i>L. pentosus</i> Yc2 ³	AY851755	5.34	0.634	5.0	113.53	21.54	49.15	6.28
<i>L. suntoryeus</i> Yc4 ³	AY851756	4.84	2.191	7.7	103.14	28.73	18.97	5.42
<i>L. plantarum</i> Zc1 ³	AY851757	4.79	2.254	9.5	84.51	41.60	26.71	6.36
<i>L. suntoryeus</i> Zc2 ³	AY851758	5.17	0.731	4.4	110.39	23.71	46.94	7.80
<i>L. acidophilus</i> Xt1 ³	AY851759	4.82	2.164	9.9	87.06	39.84	26.64	5.80
<i>L. ruminis</i> Yt3 ³	AY851760	4.83	2.256	8.8	100.20	30.76	19.73	5.04
<i>L. plantarum</i> Zt1 ³	AY851761	4.82	2.234	8.1	99.80	31.03	20.10	5.54
<i>L. ruminis</i> Zt3 ³	AY851762	4.85	2.159	8.9	95.69	33.88	22.71	5.49
<i>L. ruminis</i> Zt4 ³	AY851763	4.83	2.173	9.0	97.84	32.38	21.57	5.21

¹ Identification based on sequence homology of the 16S rDNA bacterial gene ; ^{2,3} the strains isolated from healthy children and youth feces by our laboratory , respectively ; ⁴ the strains of probiotics preserved in Onlly lab ; ⁵ The Accession No. applied to GENEBANK based on sequence of the 16S rDNA bacterial gene ; ⁶ G : Dry weight of cells ; S : Concentration of cholesterol in the spent broth ; R : Removal rate ; E : Removal effectiveness.

申请得到了 GenBank 的接受序列号(Accession No.) (表 1)。

1.3 胆固醇的测定

采用 OPA 法(*o*-phthaladehyde 邻苯二甲醛法)^[5]。

1.4 体外降胆固醇实验

实验菌株 1% 接种于 5mL 含 100μg/mL 可溶性胆固醇和 0.3% 牛胆汁的改良 MRS 肉汤培养基中 , 37℃ 厌氧培养 24h。测定终 pH 和 A₆₂₀ 吸光度 (Spectroquant NOVA60 ,MERCK ,下同)。4000r/min 离心 10min ,上清液用于测定胆固醇含量 ,菌泥烘干称重。未接种的改良 MRS 肉汤作为对照也测定胆固醇浓度。以下公式用于计算胆固醇去除率和去除效力 :

$$\text{菌株对胆固醇的去除率 } R = (B - S) / B \times 100 \% ;$$
$$\text{去除效力 } E1 = (B - S) / OD ;$$
$$\text{去除效力 } E2 = (B - S) / G ;$$
$$B \text{ : 未接种的培养基中胆固醇浓度 } \mu\text{g/mL} ;$$
$$S \text{ : 发酵上清中胆固醇浓度 } \mu\text{g/mL} ;$$
$$OD \text{ : 发酵 24h 后 } A_{620} \text{ 吸光度 } u ;$$
$$G \text{ : 发酵 24h 后菌泥干重 } \mu\text{g}。$$

1.5 耐胆汁盐实验

吸光度法 :菌株按 1% 分别接入含 0 ,0.2% , 0.3% 0.4%(W/V)牛胆汁的改良 MRS 肉汤培养基中 ,37℃ 厌氧培养 24h ,每 2h 测 A₆₂₀ ,到吸光度超出初始值 0.3u 以上或达到 24h 为止 ,做生长曲线 ,比较迟滞期(LT ,吸光度增长达到 0.3u 以上所需要的时间与在不含牛胆汁的改良 MRS 培养基中生长达到 0.3u 所需的时间之差) ,判断耐胆汁盐能力的大小。

1.6 耐酸性能实验

吸光度法 :按 10%(V/V)接种量接种至用浓盐酸调节 pH2.0 的改良 MRS 肉汤培养基中 ,37℃ 厌氧静置 2h ,期间按以下时间间隔(0min ,60min ,120min) 分别取 0.5mL 接种于 4.5mL MRS 肉汤培养基中 ,使最终接种浓度为 1%。37℃ 厌氧培养 24h ,每 2h 测 A₆₂₀ ,到吸光度超出初始值 0.3 单位以上或达到 24h 为止。做生长曲线 ,比较迟滞期(LT ,吸光度增长达到 0.3u 以上所需要的时间与在未调节 pH 的改良 MRS 培养基中生长吸光度达到 0.3u 以上所需的时间之差) ,判断耐低 pH 能力的大小。

1.7 统计学分析

所有实验均重复 3 次 ,结果取平均值。计算菌株生长与去除率、去除效力的相关系数 r 以及去除率与耐胆汁盐迟滞时间、耐酸迟滞时间的相关系数 r ,判断相关性。

2 结果和讨论

2.1 体外降胆固醇实验

表 1 显示了菌株对培养基中胆固醇的去除率和去除效力。所有实验菌株或多或少都有体外去除胆固醇的能力 ,去除率在 7.72% ~ 45.39% 之间 ,平均去除率为 32.41% ,14 株去除率高于平均值。其中 Bm29、LM1、LP-Onlly、Xc3、Zc1 等 5 株菌去除率可达到 40% 以上 ,12 株去除率介于 30% ~ 40% 之间 ,其余 10 株去除率低于 30% ,Bf5 去除率仅有 7.72%。乳杆菌和双歧杆菌的不同种乃至不同菌株 ,对胆固醇的去除率没有明显的相关性 ,是菌株特异的。文献 [6] 中 3 株乳酸菌的去除率介于 30% ~ 35% 之间 ,文献 [7] 中研究的干酪乳杆菌 KM-16 的去除率达到 51.9%。本实验的结果符合常规 ,且有 5 株去除率

超过了 40% ,比较理想。

去除效力是归一化的结果 ,用去除率与生长情况比较 ,表示单位细菌生长能够去除的胆固醇量。两种计算方法基本统一 ,存在的差异可能是由于菌泥烘干后质量轻 ,称量过程中容易出现误差所致。LA8、Yc2、Zc2 等 3 株菌去除效力较高 ,Bf5 去除效力最低。去除率和生长情况同时影响去除效力。LA8、Yc2 和 Zc2 去除效力高并非由于去除了较多的胆固醇 ,而是基于同等条件下生长状况不如其它菌株旺盛 , OD_{620} 都不超过 1.0。如果在体内作用 ,生长缓慢会影响菌株在体内的定植 ,故不能作为筛选的最佳结果。而 Bf5 生长状况良好 ,去除率和去除效力却均最低 ,说明这株菌去除胆固醇的能力差。胆固醇去除率高的 Bm29、LM1、LP-Onlly、Xc3、Zc1 这 5 株菌 ,去除效力 1 也都达到了 $20\mu\text{g}(\text{mL}\cdot\text{u})$ 以上 ,且生长良好 ,可以作为有潜力的菌株考虑。

2.2 耐胆汁盐实验

由于人体肠道内含胆汁盐的环境 ,以及细菌需要存在胆盐的条件下才能吸收胆固醇^[8] ,所以益生菌必须具有对胆汁盐的耐受性。表 2 显示了菌株对

表 2 胆汁盐对益生菌生长的影响

Table 2 Effect of bile salt on growth rate of strains of probiotics

Strains of probiotics	Control*	0.2% oxgall		0.3% oxgall		0.4% oxgall	
	0.3u (h)	0.3u (h)	LT(h)*	0.3u (h)	LT(h)	0.3u (h)	LT(h)
<i>B. pseudocatenulatum</i> Bf1	5.13	4.88	-0.25	4.88	-0.35	4.78	-0.25
<i>B. Longum</i> Ba2	6.30	6.58	0.28	6.94	0.64	6.66	0.36
<i>B. pseudocatenulatum</i> Bf4	6.13	5.48	-0.65	5.36	-0.77	5.10	-1.03
<i>B. adolescentis</i> Bf5	8.16	8.44	0.28	9.21	1.05	8.54	0.38
<i>B. pseudocatenulatum</i> Bm21	6.52	8.34	1.82	8.28	1.76	8.20	1.68
<i>B. Longum</i> Bm26	10.03	11.01	0.98	11.20	1.17	11.67	1.64
<i>L. brevis</i> Bm29	21.46	> 24	> 2.54	> 24	> 2.54	> 24	> 2.54
<i>L. brevis</i> LM1	6.75	7.06	0.31	7.64	0.89	8.06	1.31
<i>L. plantarum</i> Ls31	5.19	4.91	-0.28	5.35	0.16	5.27	0.08
<i>L. plantarum</i> Ls52	5.94	6.03	0.09	6.26	0.32	6.40	0.46
<i>L. acidophilus</i> LA3	8.46	9.02	0.56	9.90	1.44	9.40	0.94
<i>L. acidophilus</i> LA4	8.44	9.14	0.70	10.04	1.60	9.71	1.27
<i>L. gallinatum</i> LA8	9.70	22.83	13.13	18.14	8.44	> 24	> 14.30
<i>L. acidophilus</i> LA11	8.14	9.09	0.95	9.82	1.72	9.36	1.24
<i>L. plantarum</i> LP - Onlly	8.21	9.31	1.10	9.59	1.38	9.02	0.81
<i>L. plantarum</i> LB10	9.92	13.34	3.42	13.46	3.54	13.42	3.50
<i>L. plantarum</i> Xc3	6.13	5.63	-0.50	5.48	-0.66	5.62	-0.51
<i>L. plantarum</i> Yc1	6.00	5.48	-0.52	6.00	0.00	5.18	-0.82
<i>L. pentosus</i> Yc2	7.01	7.20	0.19	7.23	0.22	7.03	0.02
<i>L. suntoryeus</i> Yc4	5.87	5.40	-0.47	5.51	-0.36	5.67	-0.20
<i>L. plantarum</i> Zc1	6.17	6.02	-0.15	5.38	-0.79	5.63	-0.54
<i>L. suntoryeus</i> Zc2	10.48	17.47	6.99	18.10	7.62	17.82	7.34
<i>L. acidophilus</i> Xt1	6.09	5.58	-0.49	5.63	-0.44	5.13	-1.04
<i>L. ruminis</i> Yt3	4.70	5.52	0.82	6.53	1.83	5.08	0.38
<i>L. plantarum</i> Zt1	6.17	6.14	-0.03	6.62	0.45	6.43	0.26
<i>L. ruminis</i> Zt3	5.91	6.04	0.13	6.42	0.51	6.13	0.22
<i>L. ruminis</i> Zt4	6.05	6.35	0.30	6.59	0.54	6.34	0.29

* Control means the time required for the cultures to reach absorbance at 620nm (A_{620}) by 0.3 units in the media without oxgall ; LT , Lag Time means the differences between times required for the cultures to reach absorbance at 620nm (A_{620}) by 0.3 units in the media supplemented with 0.2% , 0.3% , 0.4% oxgall and control time.

3 种浓度胆汁盐的耐受性 ,对照为菌株在不加胆汁盐的改良 MRS 肉汤中生长达到 0.3u 所需要的时间 ,菌株间差异很大 ,从 4.70h 至 21.46h 不等。迟滞时间(LT)表示菌株在含胆汁盐的培养基中生长吸光度(OD_{620})达到 0.3u 所需时间与对照之差 ,正数为生长延迟 ,负数为生长促进。表中显示为负数的值几乎都小于 1h ,可能是实验过程中不可能完全同时测量吸光度 ,而非促进生长。受胆汁盐抑制最严重的 4 株菌依次是 LA8 ,Zc2 ,Lp6010 ,Bm29 ,其余 23 株对 0.4% 牛胆汁的迟滞时间不超过 2h。5 株菌去除率达到 40% 以上的菌中 ,LM1 ,Xc3 ,Zc1 等 3 株有较高的胆汁盐耐受性。

胆汁盐的浓度与细菌生长之间没有明显相关性 ,并非浓度越高抑制越强烈 ,也没有显示出 3 种浓度中哪一种最利于细菌生长。文献中提到提高胆汁盐的浓度使菌种的生长速率下降 ,但胆固醇的去除率随之提高^[9]。实验结果表明 ,不同菌株对胆汁盐的耐受性不同 ,但具有更高胆盐耐受性的细菌并不一定能够吸收更多的胆固醇 ,与国外的研究吻合^[5,8,10]。

2.3 耐酸性能实验

表 3 显示了不同菌株对低 pH 的耐受性 ,对照为菌株不经酸化在正常改良 MRS 肉汤中生长达到吸光度(OD_{620})0.3u 所需要的时间 ,从 4.14 ~ 15.24h 不等。迟滞时间(LT)表示菌株经酸化以后转接至正常 pH 培养基中生长达到吸光度(OD_{620})0.3u 所需时间与对照之差 ,正数为生长延迟 ,负数为生长促进。由表可见 ,酸对细菌的抑制作用明显。耐酸能力最强的 3 株菌依次为 LA3、LA4 和 LA11 ,全部为嗜酸乳杆菌 ,120min 酸化后迟滞时间低于 5h。20 株菌在 120min 酸化后迟滞时间超过 10h。Ba2、Bm29、Lp6010 和 Bm26 经 120min 酸化后迟滞的时间在 5 ~ 10h 之间 ,但 Bm29 对照本身生长缓慢。

菌株的耐酸能力与去除胆固醇的能力之间没有相关性。LM1 虽然对胆固醇的去除率最高 ,但耐酸能力差 ,如果直接作为食品添加剂或口服药 ,不能够抵抗胃酸 ,所以不能作为继续研究的候选菌株。Xc3 和 Zc1 的耐酸能力也不强。来源于人体肠道的细菌中 ,Ba2 ,Bm26 ,Yc2 和 Zc2 的耐酸性相对较好 ,但 Ba2 ,Yc2 和 Zc2 对胆固醇的去除率都不高 ,仅 Bm26

表 3 酸化对益生菌生长的影响

Table 3 Effect of acid on growth rate of strains of probiotics

Strains of probiotics	Control *	Acidification for 0min		Acidification for 60min		Acidification for 120min	
	0.3u (h)	0.3u (h)	LT(h)*	0.3u (h)	LT(h)	0.3u (h)	LT(h)
<i>B. pseudocatenulatum</i> Bf1	4.28	6.39	2.11	11.33	7.05	> 24	> 19.72
<i>B. Longum</i> Ba2	5.35	6.84	1.49	10.59	5.24	12.85	7.50
<i>B. pseudocatenulatum</i> Bf4	4.39	10.47	6.08	22.48	18.09	> 24	> 17.35
<i>B. adolescentis</i> Bf5	6.65	8.23	1.58	18.76	12.11	> 24	> 17.35
<i>B. pseudocatenulatum</i> Bm21	5.60	5.49	-0.11	> 24	> 18.40	> 24	> 18.40
<i>B. Longum</i> Bm26	7.51	19.13	11.62	14.33	6.82	17.08	9.57
<i>L. brevis</i> Bm29	15.24	> 24	> 8.58	> 24	> 8.58	> 24	> 8.58
<i>L. brevis</i> LM1	5.62	16.69	11.07	> 24	> 18.38	> 24	> 18.38
<i>L. plantarum</i> Ls31	4.14	9.49	5.35	21.06	16.92	> 24	> 19.86
<i>L. plantarum</i> Ls52	4.38	9.58	5.20	19.61	15.23	> 24	> 19.62
<i>L. acidophilus</i> LA3	5.97	6.56	0.59	6.59	0.62	8.18	2.21
<i>L. acidophilus</i> LA4	5.59	6.77	1.18	6.71	1.12	8.33	2.74
<i>L. gallinatum</i> LA8	8.03	10.15	2.12	14.08	6.05	23.49	15.46
<i>L. acidophilus</i> LA11	5.92	7.21	1.29	8.17	2.25	9.09	3.17
<i>L. plantarum</i> LP-Onlly	7.16	8.41	1.25	16.50	9.34	> 24	> 16.84
<i>L. plantarum</i> LB10	8.55	10.83	2.28	12.37	3.82	13.93	5.38
<i>L. plantarum</i> Xc3	4.66	11.25	6.59	22.52	17.88	> 24	> 19.34
<i>L. plantarum</i> Yc1	4.81	7.54	2.73	20.52	15.71	> 24	> 19.19
<i>L. pentosus</i> Yc2	5.13	10.54	5.41	12.10	6.97	16.55	11.42
<i>L. suntoryeus</i> Yc4	4.64	11.65	7.01	21.95	17.31	> 24	> 19.36
<i>L. plantarum</i> Zc1	4.81	11.65	6.84	17.62	12.81	> 24	> 19.19
<i>L. suntoryeus</i> Zc2	7.51	10.74	3.23	13.63	6.12	18.57	11.06
<i>L. acidophilus</i> Xt1	4.72	11.66	6.94	19.22	14.50	> 24	> 19.28
<i>L. ruminis</i> Yt3	4.56	12.20	7.64	20.14	15.58	> 24	> 19.44
<i>L. plantarum</i> Zt1	5.18	12.17	6.99	22.54	17.36	> 24	> 18.82
<i>L. ruminis</i> Zt3	5.12	11.71	6.59	> 24	> 18.82	> 24	18.82
<i>L. ruminis</i> Zt4	4.87	11.87	7.00	22.96	18.09	> 24	> 19.13

* Control means the time required for the cultures to reach absorbance at 620nm(A_{620})by 0.3 units in the media(pH 6.0);LT ,Lag Time means the difference between times required for the cultures ,treated with pH2.0 media for 0min ,60min ,120min ,to reach absorbance at 620nm(A_{620})by 0.3 units and control time.

的胆固醇去除率达到了 39.30% 相对较高。

2.4 降胆固醇能力、耐胆汁盐能力和耐酸能力的相关性分析

相关性分析表明,菌株的生长与胆固醇去除率和胆固醇去除效力 r_1 , r_2 的相关系数分别为 0.519, -0.80和 -0.70,说明去除率和去除效力与生长情况有关,但并不依赖于细菌的生长。胆固醇去除率与耐胆汁盐能力(0.4%胆汁盐迟滞时间)的相关系数为 -0.14,去除率与耐酸能力(60min 酸化迟滞时间)的相关系数为 0.04,表明胆固醇去除能力与耐胆汁盐能力、耐酸能力之间均没有明显相关性,胆固醇去除能力是菌株特异的。

3 结论

27 株实验菌株均能够去除培养基中的胆固醇,其中 5 株去除率达到了 40% 以上,且去除效力较高。实验中菌株的胆固醇去除能力、胆汁盐耐受性和低 pH 耐受性均菌株特异。细菌的生长与胆固醇去除率和去除效力均没有明显相关性,胆固醇去除能力与耐胆汁盐能力、耐酸能力之间也均没有明显相关性。菌株 Bm26 对胆汁盐和酸性的耐受性都相对较强,对 0.4% 牛胆汁的迟滞时间低于 2h,经 pH2 120min 酸化后迟滞时间低于 10h,且胆固醇去除率可达到 39.30%,可以作为起始菌株进行优化,进行进一步的机理研究和应用研究。

参 考 文 献

- [1] 亚洲面临心脏病的威胁《人民日报》,2004 年 09 月 16 日,第十五版。
- [2] 中国居民营养与健康现状,中华人民共和国卫生部,科学技术部,国家统计局,2004.10.20.
- [3] Reetta M S, Elaine E V, Antoon D L A, et al. Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and DGGE. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**(2): 504–513.
- [4] Hans G H J H, Erwin G Z, Elaine E V, et al. Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**(1): 114–123.
- [5] Gilliland S E, Nelson C R, Maxwell C. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol*, 1985, **49**: 377–381.
- [6] 香卫钦,于舒宁,张耀林,等.一株能降解胆固醇的乳酸菌的选育. *生物技术*, 2001, **11**(5): 9–10.
- [7] 肖琳琳,董明盛.西藏干酪乳酸菌降胆固醇特性研究. *食品科学*, 2003, **24**: 142–145.
- [8] Dambekodi P C, Gilliland S E. Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of *Bifidobacterium longum*. *J Dairy Sci*, 1998, **81**: 1818–1824.
- [9] Pereira D I A, McCartney A L, Gibson G R. An in vitro study of the probiotic potential of a bile-salt-hydrolyzing *Lactobacillus fermentum* strain, and determination of its cholesterol-lowering properties. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**: 4743–4752.
- [10] Pereira D I A, Gibson G R. Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**: 4689–4693.

An in vitro study of cholesterol-lowering properties of probiotics isolated from the human feces

ZHAO Jia-rui¹ FAN Xiao-bing² HANG Xiao-min² WANG Yi-ming¹ YANG Hong¹

(¹ College of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

(² Shanghai Jiao Da Onlly Co., Ltd, Shanghai 200030, China)

Abstract: 21 strains of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, isolated from feces of healthy youth and children feces and identified by molecular biological methods, together with 6 strains of probiotics preserved in Onlly lab were studied in the experiments, including removal cholesterol from media, bile-tolerance and acid-tolerance. The results demonstrated that all strains could remove cholesterol from media and removal rates of 5 strains were more than 40%. Meanwhile these 5 strains had high removal effectiveness. The bile-tolerance and acid-tolerance were varied from strain to strain. Among 27 strains, Bm26 demonstrated higher ability of removal cholesterol, bile-tolerance and acid-tolerance than other strains.

Key words: Probiotic, Cholesterol, Bile salts, Acid-tolerance

* Corresponding author. Tel: 86-21-54743343; Fax: 86-21-54743348; E-mail: hongyang@sjtu.edu.cn