

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
51(4):561-565; 4 April 2011
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

植物乳杆菌 LpT1 和 LpT2 体外降胆固醇机制

于平, 孙海森, 励建荣*, 汪晓辉, 陆海霞

浙江工商大学食品与生物工程学院, 杭州 310035

摘要:【目的】初步探讨植物乳杆菌 LpT1 和 LpT2 的体外降胆固醇机制。【方法】以 MRS、MRS + CH、MRS + CH + S 和 MRS + CH + N 四种培养基为基础, 接种植物乳杆菌 LpT1 和 LpT2 进行培养, 通过分析比较培养基上清液、菌体沉淀和菌体细胞内部胆固醇含量以及接种和未接种两种情况下清液、沉淀和细胞内胆固醇总量变化, 推测植物乳杆菌体外降胆固醇机制。【结果】乳酸菌体外降胆固醇存在非代谢和代谢降解两条途径, 非代谢途径与共沉淀作用和菌体吸收有关。代谢降解是由于植物乳杆菌在生长过程中产生了特殊的酶系, 从而将胆固醇降解成其他物质, 导致其含量降低。【结论】研究结果为进一步研究植物乳杆菌体外降胆固醇的机制奠定了良好基础。

关键词: 植物乳杆菌, 降胆固醇, 机制

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011)04-0561-05

动脉粥样硬化、冠心病等心脑血管疾病已严重威胁着人类健康, 血清中高胆固醇含量被认为是诱发此类疾病的重要危险因素, 因此降低血清胆固醇水平直接关系到人类的健康, 也是当前研究工作的热点之一。20 世纪 70 年代科学家先后通过对饮用发酵乳制品的非洲 Massi 人和新生儿血清胆固醇的研究以及对常饮酸乳的美国人的调查等发现^[1-3], 乳酸菌具有降低人体血清胆固醇的作用。目前很多乳酸菌具有降低胆固醇的作用已得到了体内及体外大量实验的支持, 但其作用机制至今尚无定论, 主要有以下三种观点: (1) 乳酸菌细胞直接吸收胆固醇; (2) 乳酸菌的胆盐水解酶活性使胆盐由结合态转变为脱结合态, 与胆固醇发生共沉淀; (3) 鉴于乳酸菌降低胆固醇效果受多种因素影响, 还存在一些其他

理论^[4-7]。在以前研究中我们从泡菜中分离得到 2 株有效降胆固醇的植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) LpT1 和 LpT2, 其胆固醇降解率分别达 49.11% 和 50.03%^[8]。本文旨在通过体外实验初步探讨其降胆固醇的机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株: 植物乳杆菌 LpT1 和 LpT2, 从海宁光明蔬菜有限公司生产的泡菜中分离, 由浙江工商大学食品与生物工程学院微生物实验室保藏。

1.1.2 培养基: MRS 培养基 (购自 Merck Chemicals Ltd)。

1.1.3 主要试剂和仪器: 可溶性胆固醇、牛磺胆酸

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划重点项目——“功能性食品的研制和开发”之“食品功能因子高效分离与制备关键技术的研究” (2006BAD27B03)

* 通信作者。Tel/Fax: + 86-571-88056656; E-mail: lijianrong@mail.hzic.edu.cn

作者简介: 于平 (1974-), 男, 山东诸城人, 博士, 教授, 主要研究方向是食品生物技术。E-mail: yup9202@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-11-01; **修回日期:** 2011-01-08

钠:Sigma 公司;牛胆盐:杭州微生物试剂有限公司;邻苯二甲醛:上海化学试剂厂。HBPX220 PCR 自动系列分析仪:Hybaid Co. Ltd;A1100 高效液相色谱仪:Agilent Technologies;全能台式高速冷冻离心机:Biofuge Stratos; UV22550 UV2Visible Spectro photometer:Shimadzu Corporation; YQX2 II 型厌氧培养箱:上海博泰实验设备有限公司。

1.2 试验菌株处理

取 20 μL -70°C 保藏的降胆固醇菌种 LpT1 和 LpT2 分别接种到 5 mL 灭菌的 MRS 培养基中, 37°C 静置培养 12 h, 如此活化 3 次。按 2% 的接种量接到 100 mL MRS 培养基中, 37°C 静置培养 24 h, 离心, 弃上清液, 收集菌体沉淀。

1.3 胆盐对菌株胆固醇去除的影响

在 MRS 培养基中加入一定量的可溶性胆固醇, 记为 MRS + CH 培养基; 在 MRS + CH 培养基中加入 2% 的牛磺胆酸钠, 记为 MRS + CH + S 培养基; 在 MRS + CH 培养基中加入 2% 牛胆盐, 记为 MRS + CH + N 培养基; 然后分别取等量的 20 μL 菌株沉淀, 加到 5 mL 上述所配置的培养基中, 37°C 培养 24 h, $1800 \times g$ 离心 10 min, 分别测定上清液中胆固醇的含量, 以未接种的 MRS 培养基为对照。

1.4 菌体吸附胆固醇的比较

将得到的菌体沉淀, 用 2 mL 去离子水洗涤菌体沉淀, $1800 \times g$ 离心 10 min, 测定洗涤液中胆固醇的含量。菌泥再加入 2 mL 去离子水, 置于冰浴中用超声波破碎仪将细胞破碎, $1800 \times g$ 离心 10 min, 测定上清液中胆固醇的含量。

1.5 胆固醇含量的检测方法^[9]

采用邻苯二甲醛法测定胆固醇含量。取 1 mL 样品, 加入 3 mL 95% 乙醇和 2 mL 50% (w/v) 氢氧化钾, 旋涡振荡混匀。于 60°C 下恒温水浴 10 min, 冷却后加入 5 mL 正己烷, 旋涡振荡萃取 1-2 min, 加入 2 mL 蒸馏水, 振荡均匀, 静置分层。取 2 mL 上层正己烷, 60°C 水浴氮气吹干, 加 4 mL 0.5 mg/mL (w/v) 邻苯二甲醛溶液(用冰醋酸定容)和 2 mL 浓硫酸, 显色反应 20 min, 于 553 nm 处测定吸光度值。

1.6 数据分析

采用 Origin8.0 和 Excel 软件画图, 用 SPSS 14.0 进行方差分析、显著性检验和 t -检验。

2 结果

2.1 培养基中胆盐存在与否对菌株降胆固醇能力的影响

接种菌株后测定的培养基上清液中胆固醇含量见表 1, 根据以同一个菌株不同培养基上清液胆固醇含量配对, 同一培养基接种不同菌株的上清液胆固醇浓度配对进行 t -检验, 分析培养基中加入不同胆盐对菌株降胆固醇能力的影响及不同菌株之间的显著差异, SPSS 配对 t -检验结果见表 2。由表 2 可知, 在培养基中加入牛磺胆酸钠, 第 4 组 $p = 0.501 > 0.05$, 第 5 组 $p = 0.104 > 0.05$, 两组都没有显著性差异, 说明培养基中牛磺胆酸钠的存在对菌株降胆固醇特性没有影响。而第 1 组在不加牛磺胆酸钠时, 不同菌株的降胆固醇活性存在差异 ($p < 0.05$), 然而第 2 组也没有显著差异, 说明胆盐的存在可能影响了菌株的生长^[8], 而菌株的生长和降胆固醇活性存在一定的正相关性。该结果与 Don^[10] 报道的结果有些差异, 他们认为胆盐的存在能提高菌体细胞的通透性, 使得更多的胆固醇被吸收进菌体细胞内部去, 从而使培养基中的胆固醇浓度更低; 但与 Usman 等^[11] 报道的结果相似, 他们研究认为加氏乳杆菌菌株的耐胆盐活性和降解牛磺胆酸钠以及降胆固醇活性之间都不具有相关性, 造成这些差异的原因一方面是由于菌株的差异, 另一方面很有可能是菌株降胆固醇的机制存在本质区别。另外第 6 组和第 7 组 $p < 0.05$, 说明培养基中牛胆盐存在使菌株降胆固醇活性出现比较明显差异, 这为我们提供了另一个解释: 牛磺胆酸钠为结合型胆盐, 而牛胆盐为游离胆酸与结合型胆盐混合物, 出现降胆固醇活性差异, 说明胆盐结合状态会影响菌株的降胆固醇作用。Klaver^[12] 等研究者提出细菌从培养基中去除胆固醇是游离胆酸和胆固醇在 pH 低于 5.5 时共沉淀结果, 乳酸菌通过水解结合型胆盐转变为游离胆酸, 因后者溶解度降低与胆固醇发生共沉淀作用, 所以需要菌株沉淀中胆固醇含量进行测定, 进一步探讨共沉淀作用。

表 1 接种菌株后各种培养基上清液中胆固醇的含量

strain	MRS + CH	MRS + CH + S
<i>L. plantarum</i> LpT1	0.055 \pm 0.007	0.063 \pm 0.009
<i>L. plantarum</i> LpT2	0.033 \pm 0.009	0.057 \pm 0.012

表 2 培养基上清液中胆固醇含量成组配对 *t*-检验结果Table 2 Results of paired samples *t*-test of cholesterol concentration in different broth supernatant

pairs	<i>t</i> -Value	df	<i>p</i>	
Pair 1	LpT1_MRS + CH-LpT2_MRS + CH	25.702	2	0.002*
Pair 2	LpT1_MRS + CH + S-LpT2_MRS + CH + S	0.846	2	0.487
Pair 3	LpT1_MRS + CH + N-LpT2_MRS + CH + N	0.814	2	0.501
Pair 4	LpT1_MRS + CH-LpT1_MRS + CH + S	-0.815	2	0.501
Pair 5	LpT2_MRS + CH-LpT2_MRS + CH + S	-2.859	2	0.104
Pair 6	LpT1_MRS + CH-LpT1_MRS + CH + N	-4.619	2	0.044*
Pair 7	LpT2_MRS + CH-LpT2_MRS + CH + N	-8.200	2	0.015*
Pair 8	LpT1_MRS + CH + S-LpT1_MRS + CH + N	-0.041	2	0.971
Pair 9	LpT2_MRS + CH + S-LpT2_MRS + CH + N	-0.567	2	0.628

* Statistically significant at 95% of confidence level ($p < 0.05$).

2.2 菌体沉淀和细胞内胆固醇含量比较

菌体沉淀中胆固醇含量见表 3, 其成组配对 *t*-检验结果见表 4。从 *t*-检验结果可知, 菌株 LpT1 在不同培养基中培养后, 菌体沉淀胆固醇含量存在显著差异。但从其平均值来考察, 每一组胆固醇含量都比较少, 只有含有牛磺胆酸钠的接种植

物乳杆菌 LpT1 的菌体沉淀中, 胆固醇含量较高, 为 0.023 mg。比较上清、沉淀和细胞中胆固醇含量的比例, 结果显示(图 1), 上清中胆固醇含量比较低的, 相应沉淀和细胞中的胆固醇含量就相对较高, 说明上清液中胆固醇含量的降低与共沉淀作用和菌体吸收有关。

表 3 菌体沉淀中胆固醇含量

Table 3 Cholesterol concentration in different deposit (MEAN \pm SD)

strain	MRS + CH	MRS + CH + S	MRS + CH + N
<i>L. plantarum</i> LpT1	0.01 \pm 0.004	0.023 \pm 0.001	0.01 \pm 0.003
<i>L. plantarum</i> LpT2	0.004 \pm 0.003	0.008 \pm 0.000	0.01 \pm 0.003

表 4 菌体沉淀中胆固醇含量成组配对 *t*-检验结果Table 4 Results of paired samples *t*-test of cholesterol concentration in different deposit

pairs	<i>t</i> -Value	df	<i>p</i>	
Pair 1	LpT1_MRS + CH-LpT2_MRS + CH	1.533	2	0.265
Pair 2	LpT1_MRS + CH + S-LpT2_MRS + CH + S	16.630	2	0.004*
Pair 3	LpT1_MRS + CH + N-LpT2_MRS + CH + N	0.102	2	0.928
Pair 4	LpT1_MRS + CH-LpT1_MRS + CH + S	-4.914	2	0.039*
Pair 5	LpT2_MRS + CH-LpT2_MRS + CH + S	-2.750	2	0.111
Pair 6	LpT1_MRS + CH-LpT1_MRS + CH + N	-0.078	2	0.945
Pair 7	LpT2_MRS + CH-LpT2_MRS + CH + N	-1.955	2	0.190
Pair 8	LpT1_MRS + CH + S-LpT1_MRS + CH + N	5.429	2	0.032*
Pair 9	LpT2_MRS + CH + S - LpT2_MRS + CH + N	-1.147	2	0.370

* Statistically significant at 95% of confidence level ($p < 0.05$).

2.3 培养基中胆固醇代谢降解

由图 2 可知, 将上清液、沉淀和细胞内胆固醇含量汇总并与未接种前加入的胆固醇总量相比, 发现两者并不相等, 尤其是 LpT2 + MRS + CH 组, 总胆固醇含量为 0.045 mg/mL, 大大低于未接种前加入的胆固醇含量 0.1 mg/mL, 而且其他一些组也出现了部分胆固醇“消失”, 这与 Liang^[13]报道的结果一致, 他们发现干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*) 不同菌株在含胆固醇培养基中生长时, 培养基中脂肪酸含量, 尤其是软脂酸和硬脂酸含量, 发生了明显改变, 这可

能是菌体利用培养基中胆固醇并将其转化的结果。

3 讨论

从本研究结果可以看出: 乳酸菌体外降胆固醇主要存在着非代谢降解和代谢降解两条途径。非代谢途径导致胆固醇含量降低与共沉淀作用和菌体吸收有关, 两者共同作用导致胆固醇在培养基和菌体中分布情况发生了变化, 引起培养基上清液中胆固醇减少。代谢降解可能是由于植物乳杆菌在生长过程中

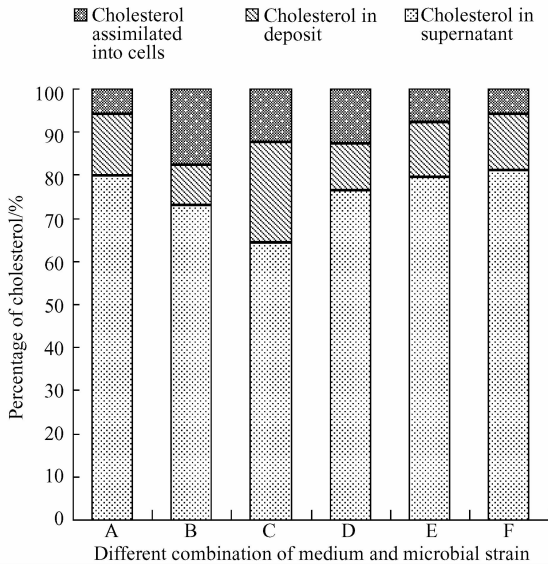


图1 胆固醇在上清液、沉淀和细胞内分布的比例

Fig. 1 Percentage of cholesterol in supernatant, deposit and cells. A: LpT1 + MRS + CH; B: LpT2 + MRS + CH; C: LpT1 + MRS + CH + S; D: LpT2 + MRS + CH + S; E: LpT1 + MRS + CH + N; F: LpT2 + MRS + CH + N.

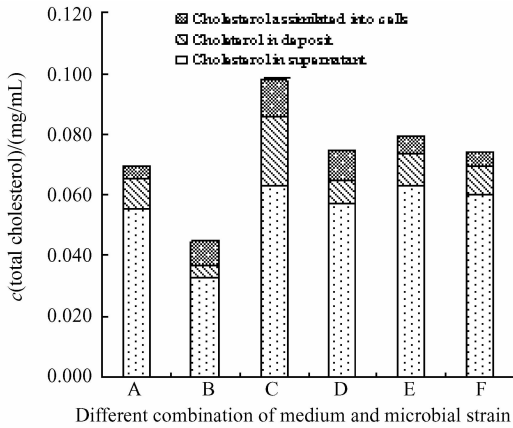


图2 上清液、沉淀和细胞内胆固醇总量

Fig. 2 The total content of cholesterol in supernatant, deposit and cells. A: LpT1 + MRS + CH; B: LpT2 + MRS + CH; C: LpT1 + MRS + CH + S; D: LpT2 + MRS + CH + S; E: LpT1 + MRS + CH + N; F: LpT2 + MRS + CH + N.

产生了特殊酶系,从而将胆固醇降解成其他物质,导致其总量降低。为了进一步提供更明确的证据,可综合运用代谢组学和蛋白组学方法,更深入、全面的分析胆固醇代谢网络,从代谢水平全面阐明其降解机制,目前相关研究正在进行中。本研究结论如下:

(1) 植物乳杆菌 LpT1 和 LpT2 在含有结合型胆盐牛磺胆酸钠培养基中降解胆固醇的活性与未含有牛磺胆酸钠培养基中降解胆固醇的活性没有显著差异。

(2) 植物乳杆菌 LpT2 在含有游离胆酸与结合型胆盐的牛胆盐培养基中与未含有牛胆盐培养基的降胆固醇活性存在显著差异,而植物乳杆菌 LpT1 没有显著差异,说明降胆固醇存在菌株差异。

(3) 植物乳杆菌体外降胆固醇机制除共沉淀和吸收作用等非代谢途径外,还存在着复杂的代谢降解机制。

参考文献

- [1] Grunewald KK. Sera cholesterol levels in rats fed skim milk fermentation by *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Food Science*, 1982, 47(2):2078-2079.
- [2] 刘丽莉,夏延斌,唐青春. 降胆固醇的乳酸菌筛选研究. *食品科学 (Food Science)*, 2004, 25(7):59-62.
- [3] 赵佳锐,范晓兵,杭晓敏,王一鸣,杨虹. 人体肠道益生菌体外降胆固醇活性研究. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2005, 45(6):920-924.
- [4] 赵佳锐,杨虹. 益生菌降解胆固醇的作用及机理研究进展. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2005, 45(2):315-319.
- [5] Mann GV. A factor in yogurt which lowers cholesterolemia in man. *Arteriosclerosis*, 1977, 26:335-340.
- [6] Małgorzata Z. The influence of cholesterol and biomass concentration on the uptake of cholesterol by *Lactobacillus* from MRS broth. *Acta scientiarum polonorum*, 2007, 6(2):29-40.
- [7] Ahme S, Noback S, Jeppsson B, Adlerberth I, Wold AE, Molin G. The normal *Lactobacillus* flora of healthy human rectal and oral mucosa. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 85:88-94.
- [8] 汪晓辉,于平,励建荣. 泡菜、传统腊肠中降胆固醇乳酸菌的筛选及鉴定. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 49(11):1438-1444.
- [9] Rudel LL, Morris MD. Determination of cholesterol using o-phthalaldehyde. *Journal of Lipid Research*, 1973, 14:364-366.
- [10] Don DO, Kim SH, Gilliland SE. Incorporation of cholesterol into the cell membrane of *Lactobacillus acidophilus* ATCC43121. *Journal of Dairy Science*, 1997, 80:3107-3113.
- [11] Usman AH. Bile tolerance, taurocholate deconjugation and binding of cholesterol by *Lactobacillus gasseri* strains. *Journal of Dairy Science*, 1999, 82:243-248.
- [12] Klaver FAK, Van DMR. The assumed assimilation of

cholesterol by *Lactobacilli* and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt deconjugation activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59:1120-1124.

[13] Liang MT, Shah NP. Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of *Lactobacilli* Strains. *Journal of Dairy Science*, 2005, 88:55-66.

Cholesterol-degrading by *Lactobacillus plantarum* LpT1 and LpT2 *in vitro*

Ping Yu, Haisen Sun, Jianrong Li^{*}, Xiaohui Wang, Haixia Lu

College of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310035, China

Abstract: [**Objective**] To explore the mechanism of cholesterol-degrading by *Lactobacillus plantarum* LpT1 and LpT2 *in vitro*. [**Methods**] After *Lactobacillus plantarum* LpT1 and LpT2 being inoculated and cultured in the medium MRS, MRS + CH, MRS + CH + S and MRS + CH + N, the cholesterol content in supernatant, deposit and cells, and the total cholesterol content before and after inoculation were determined and compared to primarily predict the mechanism of cholesterol-degrading by *L. plantarum*. [**Results**] The mechanism of cholesterol-degrading by *L. plantarum* LpT1 and LpT2 *in vitro* involved in metabolic and non-metabolic pathway. Non-metabolic pathway was related to co-precipitation and cell absorption. Metabolic pathway was due to the production of the special enzymes during the growth of *L. plantarum* which made the cholesterol degrade to be other materials and caused its content reduction. [**Conclusion**] *L. plantarum* has shown its ability to degrade cholesterol *in vitro*.

Keywords: *Lactobacillus plantarum*, cholesterol-degrading, mechanism

(本文责编:王晋芳)