

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55(8):1001-1009; 4 August 2015
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi:10.13343/j.cnki.wsxb.20140585

浆水中降胆固醇乳酸菌的筛选及其功能特性

李雪萍¹, 李建宏¹, 李敏权^{1*}, 孟宪刚²

¹甘肃农业大学草业学院, 甘肃 兰州 730070

²兰州交通大学化学与生物工程学院, 甘肃 兰州 730070

摘要: 【目的】获取高降胆固醇菌种并明确其功能特性。【方法】以浆水为实验材料, 利用高降胆固醇培养基筛选出降胆固醇的乳酸菌, 并研究高降胆固醇菌株的耐酸、耐盐等功能特性, 而后采用生理生化特性鉴定和 16S rDNA 分子生物学鉴定结合的方法鉴定高降胆固醇菌株的种属。【结果】所分离的乳酸菌都有一定的降胆固醇能力, 其中有 4 株菌对培养物中胆固醇的降解率大于 75%, 经鉴定发现有乳酸乳球菌乳亚种 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) 1 株, 乳酪短杆菌 (*Brevibacterium casei*) 2 株, 棉籽糖乳球菌 (*Lactococcus raffinolactis*) 1 株。【结论】从浆水中筛选出 4 株高降胆固醇乳酸菌, 且其功能性质良好, 有进一步开发利用价值。

关键词: 浆水, 胆固醇, 乳酸菌

中图分类号: Q935 **文章编号:** 0001-6209(2015)08-1001-09

胆固醇是一种广泛存在于动物细胞膜中的环戊烷多氢菲的衍生物, 因其最早在胆石中发现而得名^[1]。通常状况下, 胆固醇在体内具有重要的生理功能, 但是, 由于现代人类生活方式和饮食结构的改变, 过多的胆固醇摄入体内对人体却有较大危害。血清中高胆固醇含量是诱发心脑血管疾病的重要因素^[2], 而心脑血管疾病成为我国患病人群的主要死因^[3], 也成了威胁全球人类健康的主要疾病^[4]; 而据一项研究表明, 人体血清中的胆固醇浓度每下降 1%, 其心脑血管疾病的发病率就下降约 2%–3%^[5]。根据世界卫生组织 2011 年的估计, 到 2020 年, 高胆固醇引起的疾病将占到疾病死亡人数的 40%^[6]。目前, 临床上治疗高胆固醇血症主要有

药物治疗和饮食控制两种方式, 饮食控制需要长期严格限制饮食, 大多数患者都难以做到; 而药物治疗虽有一定的效果, 却存在毒副作用, 如常见的他汀类药物可引起骨骼肌毒性^[7], 或诱发转氨酶升高, 损伤肝功能^[8]。因此, 寻找到一种安全可靠的降低食物中及人体血清胆固醇的方法就成为摆在众多科研工作者面前的一个问题。

浆水是我国西北地区特有的一种发酵食品, 由蔬菜加面汤发酵而成, 其汤汁酸爽可口, 深受广大西北人民的喜爱, 经初步研究发现, 浆水中含有大量的乳酸菌^[9], 可以说, 浆水本身就是一个十分宝贵的乳酸菌资源库。有研究表明, 乳酸菌不仅能降解食物中的胆固醇, 而且可以降低人体血清中胆固醇的

* 通信作者。E-mail: lmq@gsau.edu.cn

作者简介: 李雪萍 (1989 -), 女, 甘肃庆阳人, 博士研究生, 研究方向为食品微生物学。E-mail: lixueping0322@126.com

收稿日期: 2014-12-09; 修回日期: 2015-01-26

浓度^[10-11],如 Danieloson 等从猪肠道中分离出的嗜酸乳菌能降低猪血清胆固醇^[12]; Mathara 等从发酵乳中分离出的部分乳杆菌有体外降胆固醇作用^[13],再如 Zeng 等从酸菜汁中分离出的赫内氏乳杆菌在体外实验中胆固醇的移除率达 43.95%^[14]。由此可见,筛选具有降解胆固醇能力的益生乳酸菌,将其应用于食品加工,对于食品工业的发展将有极大的推动作用;此外,运用含乳酸菌的保健食品控制血清胆固醇浓度,从而降低心脑血管疾病的发生率,提高人体健康,将是保健食品领域的重点发展方向之一。而浆水中乳酸菌对胆固醇的降解作用还鲜见报道,本文报道了西北浆水中乳酸菌对胆固醇降解能力的研究成果。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料:分别从西北 5 个地区取样,取样时参考当地食用习惯,在浆水处于风味最佳的阶段时取样,取得样品后,储存于无菌容器,低温运输至实验室,立即分离,样品分别采自:甘肃省兰州市安宁区孔家崖菜市场市售、甘肃省甘南藏族自治州临潭县新城镇红崖村、宁夏回族自治区中卫市沙坡头区滨河镇商业南街、甘肃省庆阳市环县木钵镇吴家墩村、甘肃省天水市秦安县市售。

1.1.2 实验仪器与药品:PHS-3C 型数显酸度计(杭州奥立龙仪器有限公司);SANYO CO₂ INCUBATOR (SANYO Electric Biomedical Co. Ltd.);SPX 型智能生化培养箱(宁波东南仪器有限公司制造);台式离心机 Centrifuge 5418R(德国 Eppendorf 公司);PCR 仪 MyCycler(美国 Bio-Rad 生命医学产品公司);电泳仪 HE-420(上海天能科技有限公司);凝胶成像仪 2500(上海天能科技有限公司);紫外分光光度计 Nano Drop 2000(美国 Thermo Fisher 科技公司);各型加样枪(德国 Eppendorf 公司);Sorvall legend RT 离心机(美国 Kendro 实验室产品公司)。牛胆盐、邻苯二甲醛(上海中秦化学试剂有限公司);胆固醇(上海中秦化学试剂有限公司);药敏纸片(杭州微生物试剂有限公司);CTAB、EDTA、Trise-饱和酚(美国 Sigma 公司);琼脂糖(生工 BBI 生物工程股份有限公司);其他常规药品均为分析纯。

1.1.3 培养基^[15]:MRS 固体、液体培养基;MRS-碳酸钙培养基(含 2% 的碳酸钙),MRS 高胆固醇培养基。

1.2 乳酸菌的初筛

具有降解胆固醇能力的菌株都可以合成胆盐水解酶,该酶水解胆盐产生游离的胆酸,因此就可以根据碳酸钙培养基表面是否出现透明圈来初步筛选具有降解胆固醇能力的菌株,且降解能力与透明圈的大小成正比^[16]。将浆水样本稀释到合适的浓度梯度(稀释度以培养基表面长出较为稀疏的单菌落为度),涂布于 MRS-碳酸钙培养基上,37 °C 培养 24 - 48 h,挑取有溶钙圈的单菌落,划线法纯化,挑选在平板上的菌落形态一致并且显微镜下的细胞形态一致的单菌落,备用。

1.3 高胆固醇培养基的制备及胆固醇标准曲线的测定

MRS 液体培养基中添加 0.2% (W/V) 的牛胆盐和 0.2% 的巯基乙酸钠,灭菌;配制浓度为 0.01 g/mL 的胆固醇溶液,过滤除菌,并按 2% (V/V) 的量加入上述已灭菌的培养基中,胆固醇标准曲线的测定及绘制参考田建军等的方法^[15]。

1.4 高降胆固醇乳酸菌的体外筛选

将 1.2 中筛选出的菌株接种于高胆固醇培养基中,分别在 0、12、24、72 h 用邻苯二甲醛法测定 OD 值,根据标准曲线计算胆固醇浓度和降解率,筛选出降解率相对较高的菌株进行后续实验。

1.5 高降胆固醇乳酸菌生长曲线的测定与绘制

将高降胆固醇各菌株发酵液以 10% 的接种量,各菌种经过 24 h 的增菌培养,并连续活化 3 代后接入 MRS 培养基中,从 0 h 开始,每 4 h 取发酵液涂布平板,每个菌株每个时间点做 5 个重复,37 °C 培养 24 h 数菌落,求平均值及浓度的对数,做生长曲线。

1.6 高降胆固醇乳酸菌耐盐性质

将高降胆固醇各菌株发酵液以 10% 的接种量接种于含 2%、4%、5%、6%、8%、10% 氯化钠的 MRS 培养基中,37 °C 静置培养,每 2 h 在 600 nm 下测其 OD 值,记录数据,测至 24 h,绘图分析。

1.7 高降胆固醇乳酸菌耐酸性

将高降胆固醇各菌株发酵液以 10% 的接种量分别接入 pH1.5、2.5、3.5、4.5 的 MRS 培养基中,37 °C 静置培养,每 2 h 在 600 nm 下测其 OD 值,测至 24 h,记录数据,绘图分析。

1.8 高降胆固醇乳酸菌耐胆盐性质

将高降胆固醇各菌株发酵液以 10% 的接种量分别接入胆盐含量为 0.1%、0.2%、0.3% 的 MRS 培养基中, 37 °C 静置培养, 每 2 h 在 600 nm 下测其 OD 值, 测至 24 h, 记录数据, 绘图分析。

1.9 高降胆固醇乳酸菌药敏特性

将各高降胆固醇菌株增菌培养菌液与 45 °C 左右的 MRS 培养基迅速混匀, 倒入灭菌的培养皿内。待培养基凝固后, 贴放各标准药敏纸片, 包括氨苄青霉素、四环素、庆大霉素、罗红霉素、头孢拉定, 放入 37 °C 恒温箱中培养 24 h, 测量并记录抑菌圈的直径, 绘图分析数据。

1.10 高降胆固醇乳酸菌抑菌性质

将大肠杆菌和金黄色葡萄球菌菌种活化, 增菌培养, 各取 1 mL 涂布在 MRS 培养基平板上。将灭菌的牛津杯放入培养基平板上, 分别吸取各高降胆固醇菌株的发酵液、发酵上清液、灭菌发酵液 50 μL 注入牛津杯中, 于 37 °C 恒温培养 24 h, 测量抑菌圈的大小, 记录绘图并分析数据。

1.11 高降胆固醇乳酸菌生理生化特征

将各菌株进行革兰氏染色、接触酶反应试验、淀粉水解试验、明胶液化试验、石蕊牛奶试验、糖发酵试验、硫化氢产生试验、吲哚产生试验和乙酰甲基甲醇 (V-P) 试验, 并准确观察并记录实验结果。

1.12 高降胆固醇乳酸菌的 16S rRNA 分子生物学鉴定

将各菌株的 DNA 用细菌基因组 DNA 提取试剂盒 (离心柱型) 提取; 用琼脂糖凝胶电泳法和紫外分光光度法检测分析 DNA 的纯度及浓度; 扩增引物为细菌 16S rDNA 扩增通用引物 27F-1492R 序列分别为: 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 1492R: 5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3', 由北京华大基因研究中心合成。

扩增反应体系为 (25 μL): 10 × buffer 缓冲液 2.5 μL, Mg²⁺ (10 mmol/L) 1.5 μL, dNTP (25 mmol/L) 0.5 μL, PCR 引物 (20 μmol/L) 各 0.5 μL, Taq DNA 聚合酶 (5 U/μL) 0.25 μL, 模板 DNA (25 ng/μL) 2.0 μL; 无菌双蒸水稀释至 25 μL。PCR 反应程序为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 60 s, 72 °C 30 s, 40 个循环; 72 °C 10 min。采用琼脂糖凝胶电泳法完成扩增产物的检测。将扩增出的产物的测序直接交北京华大基因研究中心完成。

1.13 系统发育树的构建

以 GenBank 中相似度超过 99% 的序列做对比, 运用 Clustal X 1.83 及 MEGA 5.3 软件以 N-J 邻接法构建系统发育树。

2 结果和分析

2.1 乳酸菌的初筛结果

结合革兰氏染色结果和菌落形态观察结果, 选取了溶钙圈大而明显、革兰氏阳性、菌落为乳白色、湿润、圆形的 17 株菌株进行后续研究。

2.2 胆固醇标准曲线

以胆固醇质量浓度 (μg/mL) 为横坐标, 吸光度 (A_{550nm}) 为纵坐标绘制曲线, 回归方程为

$$Y = 0.003862857142857143X + 0.0004285714285714389, R^2 = 0.995 \text{ (曲线估计为 } 0.995, \text{ 直线估计为 } 0.998)。$$

2.3 胆固醇的降解率

如图 1 所示, 实验菌株都有一定的降解胆固醇的能力, 且整体呈现随培养时间延长降解率增高的趋势。但是, 不同菌株其降解率差别较大, 如菌株 L14 在 72 h 时降解率在 25% 以下, 而菌株 M2 达到了 90% 以上, 相差 3 倍多。本研究选取最终降解率超过 75% 的 4 株菌进行后续研究, 其中, M2 的最终降解率高达 92.28%, 高于前人的报道^[17]。

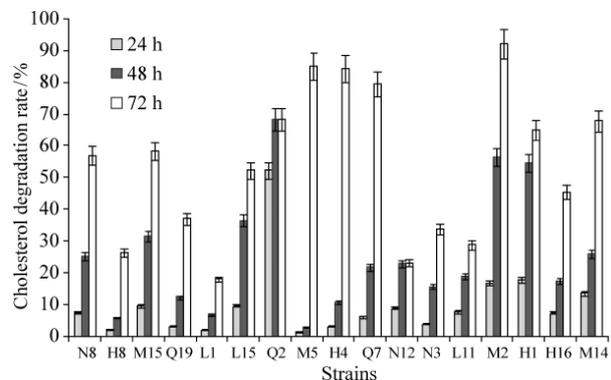


图 1. 各菌株胆固醇降解率

Figure 1. The cholesterol-degrading rate of the strains.

2.4 高降胆固醇菌株的生长曲线

如图 2 所示, 不同菌株生长曲线各不相同, 但总体呈现较为相近的生长规律, 对数增长期为 0 - 20 h, 稳定期为 20 - 32 h, 32 h 后进入衰亡期。

2.5 高降胆固醇菌株的耐盐性质

由图 3 可知, 各实验菌株的耐盐能力有差别, 总

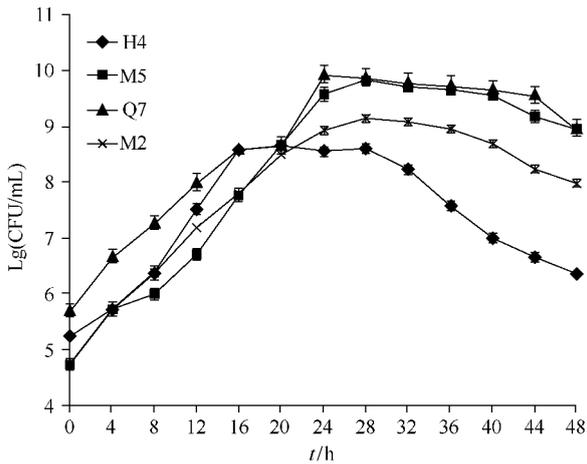


图 2. 降胆固醇菌株的生长曲线

Figure 2. Growth curve of the cholesterol-degrading strains.

体来说, M2 和 Q7 在 2% 和 4% 盐浓度下能正常生长, 但在更高盐浓度下, 其生长受到了抑制; 菌株 M5 和 H4 为不耐盐菌株。

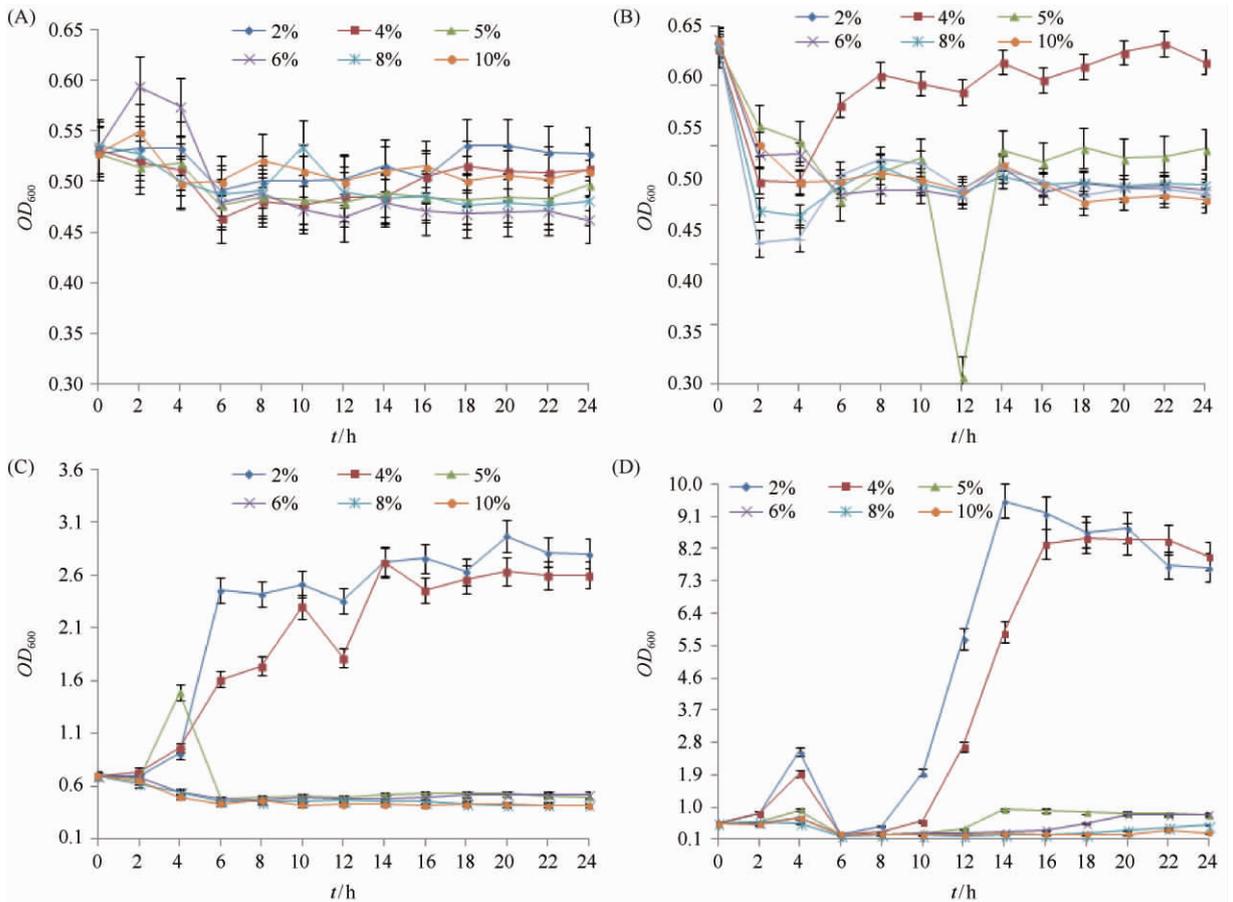


图 3. 不同盐浓度下各菌株的生长状况

Figure 3. The strains growth condition with different salt concentration. A: Strain M5; B: Strain H4; C: Strain Q7; D: Strain M2.

2.6 高降胆固醇菌株的耐酸性

由图 4 可知, 不同实验菌株均表现出一定程度的耐酸能力, 且 pH 越高, 菌株生长状况越好, 从侧面反应了适宜的 pH 对于菌株正常生长的重要意义。但是, 不同菌株对酸的耐受能力差别较大, 菌株 Q7 除在 pH1.5 时生长受到抑制之外, 在其他各梯度 pH 下生长均良好; 其他菌株虽然有一定的耐酸能力, 但是在 pH1.5 和 pH2.5 的酸度环境中, 不是菌体浓度下降, 就是生长受到抑制, 或者是所需要的适应期较长。

2.7 高降胆固醇菌株的耐胆盐性质

由图 5 可知, 菌株 M2 和 Q7 均具有良好的胆盐耐受能力, 它们在各浓度胆盐内都能生长, 且胆盐浓度越低生长状况越好, H4 和 M5 虽可耐受胆盐, 但是其延滞期太长, 实际应用价值不高。

2.8 高降胆固醇菌株的药敏特性

由图 6 我们可以清楚的看到, 所有实验菌株均属于多重耐药性菌株, 不同菌株对不同抗生素敏感

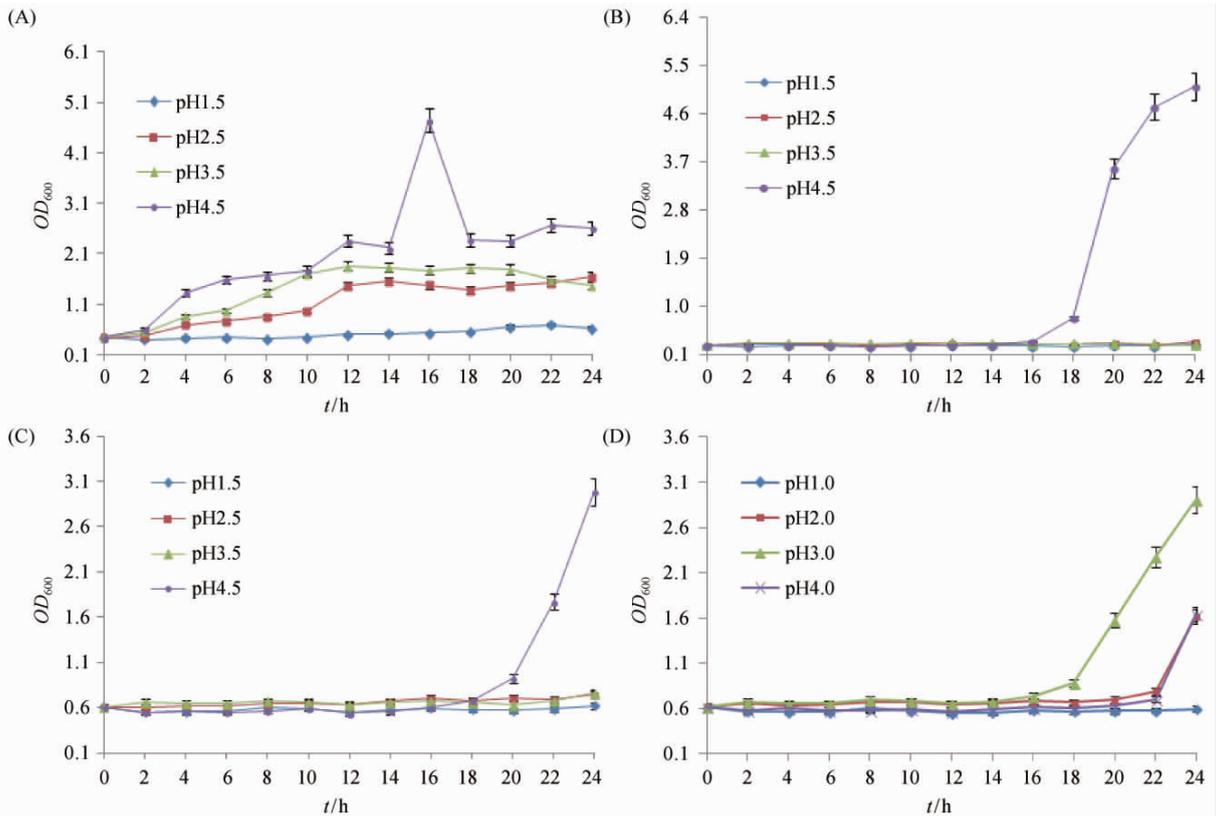


图 4. 不同酸浓度下各菌株的生长状况

Figure 4. The strains growth condition with different acid concentration. A: Strain Q7; B: Strain M2; C: Strain H4; D: Strain M5.

程度不同,同一菌株对不同抗生素的敏感程度也不同,菌株 Q7 和 M2 的先锋霉素、四环素、庆大霉素、氨苄西林和罗红霉素的药敏纸片周围均没有抑菌圈(药敏纸片的直径为 6 mm),说明这 3 株菌对 5 种抗生素都有耐药性,属于多重耐药菌株,H4 和 M5 除对先锋霉素敏感之外,对其他 4 种抗生素有一定的敏感性,但其抑菌圈的大小都在耐药性抑菌圈大小范围内,且耐受 4 种抗生素,所以属于多重耐药性菌株。

2.9 高降胆固醇菌株的抑菌性质

由图 7 可知,每株菌的发酵液、发酵上清液、灭菌发酵液对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制作用

都不相同,抑菌能力最强的是菌株 M2 的发酵液和灭菌发酵液;另外,从整体来看,各实验菌株的发酵液、发酵上清液对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌都有一定的抑制作用,说明菌种在生长过程中产生了一些抑菌物质。

2.10 高降胆固醇各菌株的生理生化特性

根据表 1 生理生化实验结果,查阅《伯杰细菌鉴定手册》^[18] 以及《常见细菌系统鉴定手册》^[19] 得到结果,M2 属乳球菌属 (*Lactococcus*),M5 和 H4 为乳酪短杆菌 (*Brevibacterium casei*),Q7 为棉籽糖乳球菌 (*Lactococcus raffinolactis*)。

表 1. 各菌株的生理生化特性

Table 1. The strains physiological and biochemical characterization

| Strains | Contact enzyme | Starch hydrolysis | Gelatin liquefaction | Litmus milk | V-P test | Sugar fermentation | | | | | Indole produce | H ₂ S produce |
|---------|----------------|-------------------|----------------------|-------------|----------|--------------------|-----------|---------|---------|---------|----------------|--------------------------|
| | | | | | | Glucose | Galactose | Sucrose | Maltose | Lactose | | |
| M2 | - | - | - | SN* | - | + | - | - | + | + | - | - |
| M5 | + | + | + | SD** | + | + | - | - | - | - | - | - |
| H4 | + | + | + | SD | + | + | - | - | - | - | - | - |
| Q7 | - | - | - | SD | + | + | - | - | - | + | - | - |

* : SN means acid coagulation; ** : SD means acid peptonized.

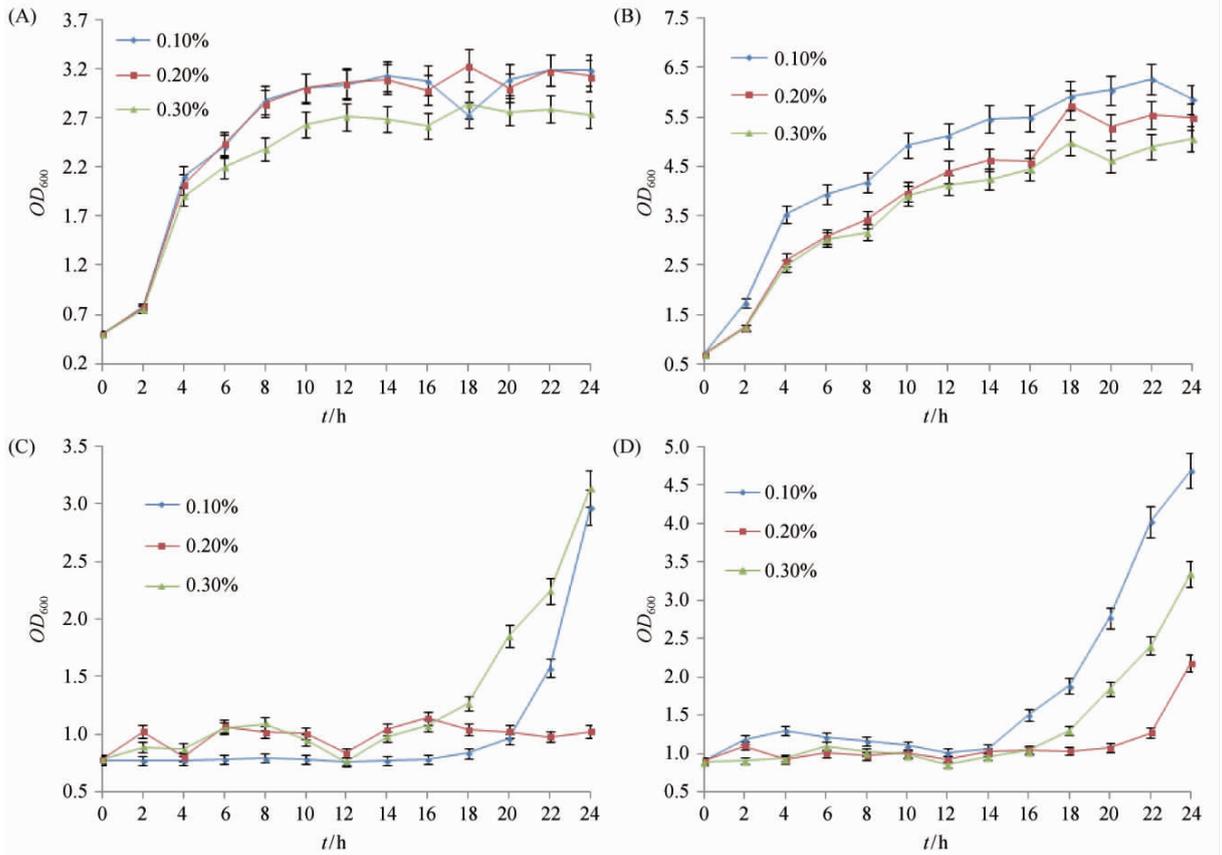


图 5. 不同胆盐浓度下各菌株的生长状况

Figure 5. The strains growth condition with different bile salts concentration. A: Strain Q7; B: Strain M2; C: Strain H4; D: Strain M5.

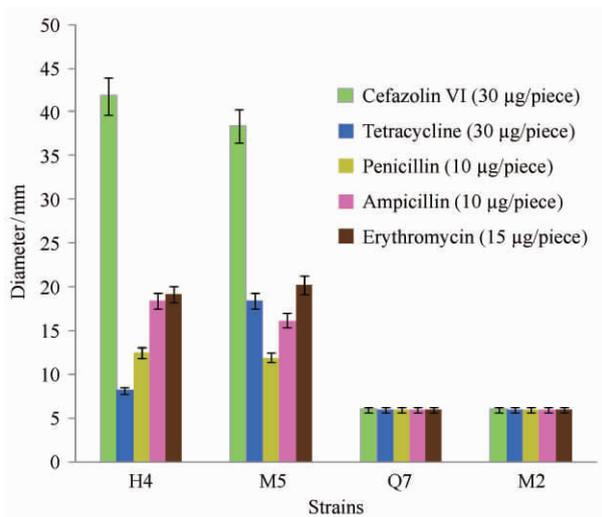


图 6. 各菌株的药敏特性

Figure 6. The strains drug sensitive features.

2.11 高降胆固醇各菌株的 16S rRNA 分子生物学鉴定

2.11.1 DNA 提取及 16S rDNA 扩增结果: 经检

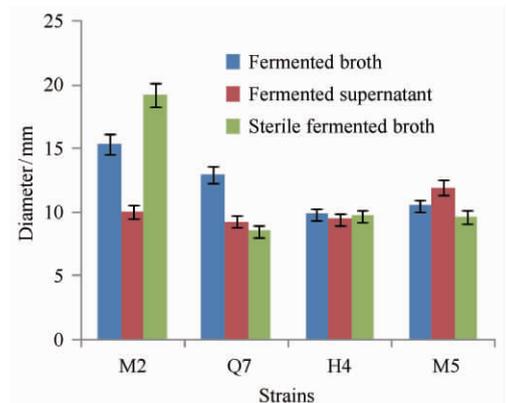


图 7. 各菌株的抑菌特性

Figure 7. The strains antibacterial features.

测,基因组 DNA 大小约为 23 kb,且加样口无亮光,带型完整,无拖尾现象。通过紫外分光光度计测定 OD_{260} 和 OD_{280} ,并计算出 OD_{260}/OD_{280} 的值在 1.8 - 2.0,计算得 DNA 浓度为 40 - 80 ng/L,并结合电泳图谱得出所提 DNA 纯度较高,RNA 和蛋白质含量

较少,无降解。综上,表明所提 DNA 完整性好,纯度高,符合后续研究要求。

通过选用原核生物通用引物进行 PCR 扩增反应,扩增出菌株的 16S rDNA 区序列,目的片段在 1000 - 2000 bp 之间,与预期在 1400 bp 左右相一致,条带清晰明亮,没有出现弥散带和其他杂带,完

整性较好。

2.11.2 鉴定结果:以生理生化鉴定结果为参照,在 GanBank 中比对可得 4 株菌种属,如表 2 和图 8 所示:M2 为乳酸乳球菌乳亚种 (*L. lactis* subsp. *lactis*)、M5 和 H4 为乳酪短杆菌 (*B. casei*)、Q7 为棉籽糖乳球菌 (*L. raffinolactis*)。

表 2. 各菌株鉴定结果

Table 2. Identification results of the strains

| Strains | Physiological and biochemical identification | Molecular identification | Similarity / % | Login ID |
|---------|--|---------------------------------------|----------------|------------|
| M2 | <i>Lactococcus</i> | <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> | 100 | JQ953697.1 |
| M5 | <i>B. casei</i> | <i>B. casei</i> | 100 | JF951998.2 |
| H4 | <i>B. casei</i> | <i>B. casei</i> | 99 | JF951998.2 |
| Q7 | <i>L. raffinolactis</i> | <i>L. raffinolactis</i> | 100 | KC951926.1 |

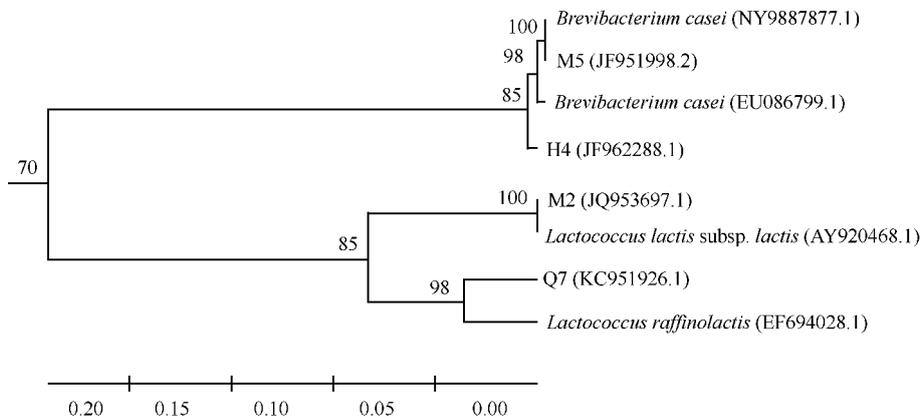


图 8. 所分离菌株分子系统进化树

Figure 8. Phylogenetic tree of the isolate strains. M5, H4, M2, Q7 stand for the experimental strains. The serial numbers in the brackets are registered from GenBank. The length of branches indicate evolutionary distance. The data at branch, e. g. 70, 85 etc, are confidence coefficient. The line segment below act as genetic distance scale, and the numbers on the scale show genetic distance.

3 讨论

与其他发酵食品相比,前人对西北特有的发酵食品——浆水的研究报道较少^[20],尤其是在功能菌株方面,尚未见诸报道。本研究首次对浆水中降解胆固醇的菌株进行了较为系统的研究,得出了一些较为明确的结果,发现浆水中分离的乳酸菌都有一定的降胆固醇能力,一些菌株综合特性优良,具有工业开发的前途。这一结果印证了浆水卓越的功效和进一步开发利用的潜力。此外,实验中发现的一些现象也值得思考,还有如益生菌抗药性等问题也需要做进一步的讨论和深层次的研究。

(1) 如文中所述,本研究所筛选 4 株菌的生长曲线与微生物的典型生长曲线相比,均未表现出明

显的延滞期,其原因可能是本研究中接种量较大(10%),且均经过增菌培养和 3 次活化,以及种子培养液和实验培养液配方相同,因此微生物适应新环境所需时间较短,在所选取时间范围内没有测到明显的延滞期。

(2) 人体正常胃液的 pH 在 1.5 - 2.5 之间波动,在如此低的 pH 条件下,大部分微生物都难以存活,因此如果口服乳酸菌,需考虑其通过胃液后的存活率。故本研究着重研究了菌株的耐酸能力,如结果所示,菌株 Q7 耐酸能力较强,能够适应胃液的酸环境。除此之外,乳酸菌等益生菌要定殖到人体肠道,就必须对胆盐有一定的耐受能力,且其耐受能力直接决定该菌株在肠道中的存活时间长短,在本研究中,菌株 M2 和 Q7 耐胆盐能力较强,可以耐受人体肠道的胆盐(浓度 0.03% - 0.30% 之间)。综合考

虑,菌株 Q7 是非常具有开发潜力的微生物资源,但其他经过适应期仍能生长的菌株,也可以成为工业菌种驯化的材料。

(3) 抗生素是 20 世纪人类最伟大的发现之一,在治疗细菌引起的感染性疾病方面具有无可替代的作用。近些年来,学者研究发现某些益生菌对抗生素产生了耐药性,目前对这一问题的认识还存在分歧,大部分学者都持担忧态度,因为一旦益生菌带有了耐药基因,不仅在某些特殊情况下可能发生耐药基因的传递,引起有害菌的大量繁殖而无药可用;还可能在进入肠道后,在发挥一定益生作用的同时,无限制的繁殖,“反客为主”,造成内生菌群的混乱^[21]。但另一方面,如果益生菌具备了一定耐药性,就可以在在一定程度上抵御抗生素对肠道菌群的破坏,减轻抗生素的副作用^[22-23]。本研究中的几株菌都有不同程度的耐药性,关于其利弊的分析还需要更多的研究论证,但一般认为,如果环境中抗生素的选择压力不大,对益生菌耐药基因的传递是没有必要忧虑的^[24]。

参考文献

- [1] Mcnamara JR, Warnick GR, Cooper GR. A brief history of lipid and lipoprotein measurements and their contribution to clinical chemistry. *International Journal of Clinical Chemistry*, 2006, 369(2): 158-167.
- [2] Manson JE, Tosteson H, Ridker PM, Satterfield S, Hebert P, O' Connor GT, Buring JE, Hennekens CH. The primary prevention of myocardial infarction. *The New England Journal of Medicine*, 1992, 326(21): 1406-1416.
- [3] He J, Gu D, Wu X, Reynolds K, Duan X, Yao C, Wang J, Chen CS, Chen J, Wildman RP, Klatz MJ, Whelton PK. Major causes of death among men and women in China. *The New England Journal of Medicine*, 2005, 353(11): 1124-1134.
- [4] WHO. The World health report 2002: Reducing risks, promoting healthy life. Geneva: World Health Organization, 2002: 1-248.
- [5] Anderson JW, Gilliland SE. Effect of fermented milk (yogurt) containing *Lactobacillus acidophilus* L1 on serum cholesterol in hypercholesterolemic humans. *Journal of the American College of Nutrition*, 1999, 18(1): 43-50.
- [6] Visseren FL. Cost-effectiveness of lipid lowering therapy. *Netherlands Heart Journal*, 2011, 19(2): 59-60.
- [7] Beltowski J, Wójcicka G, Jamroz-Wisniewska A. Adverse effects of statins-mechanisms and consequences. *Current Drug Safety*, 2009, 4(3): 209-228.
- [8] Ballantyne CM, Blazing MA, King TR, Brady WE, Palmisano J. Efficacy and safety of ezetimibe co-administered with simvastatin compared with atorvastatin in adults with hypercholesterolemia. *The American Journal of Cardiology*, 2004, 93(12): 1487-1494.
- [9] Zhang Y, Wang Y, Chen X, Zhao P. Isolation and initiative identification of microorganism from traditional fermentative food-jiangshui. *Food Science*, 2007, 28(1): 219-222. (in Chinese)
张轶, 王玉丽, 陈晓前, 赵萍. 传统发酵食品-浆水中微生物的分离与初步鉴定. *食品科学*, 2007, 28(1): 219-222.
- [10] Jeun J, Kim S, Cho SY, Jun HJ, Park HJ, Seo JG, Chung MJ, Lee SJ. Hypocholesterolemic effects of *Lactobacillus plantarum* KCT3928 by increased bile acid excretion in C57BL/6 mice. *Nutrition*, 2009, 26(3): 321-330.
- [11] Wang Y, Xu N, Xi A, Ahmed Z, Zhang B, Bai X. Effects of *Lactobacillus plantarum* MA2 isolated from tibet kefir on lipid metabolism and intestinal microflora of rats fed on high-cholesterol diet. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2009, 84(2): 341-347.
- [12] Danielson AD, Lewis AJ, Whalen PJ. Anticholesteremic property of *Lactobacillus acidophilus* yogurt fed to mature boars. *Journal of Animal Sciences*, 1989, 67(4): 966-974.
- [13] Mathara JM, Schillinger U, Guigas C, Franz C, Kutima PM, Mbugua SK, Shin HK, Holzapfel WH. Functional characteristics of *Lactobacillus* spp. from traditional maasai fermented milk products in Kenya. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 126(1-2): 57-64.
- [14] Zeng X, Pan D, Guo Y. The probiotic properties of *Lactobacillus buchneri* P2. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 108(6): 2059-2066.
- [15] 田建军. 高效降胆固醇乳酸菌的筛选及在发酵乳中的应用. 内蒙古大学硕士学位论文, 2006.
- [16] Wang Y, Liu H, Li P, Wang Y, Xiong L. Isolation and identification of lactic acid bacteria producing bile salt hydrolase and study on mechanism of reducing cholesterol. *Food Science*, 2006, 27(10): 215-218. (in Chinese)
王玉文, 刘慧, 李平兰, 王延祥, 熊利霞. 产胆盐水解酶乳酸菌的分离、鉴定及降解胆固醇机理的初步研究. *食品科学*, 2006, 27(10): 215-218.

- [17] 姜华. 降胆固醇功能乳酸菌的筛选及其功能特性的研究. 南京农业大学硕士学位论文, 2010.
- [18] Buchanan RE, Gibbons NE. 伯杰细菌鉴定手册. 中国农科院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组译. 第8版. 北京: 科学出版社, 1984.
- [19] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [20] Li X, Li J, Meng X, Zheng N, Xie J. Isolation and identification of microorganisms from Jiangshui. *Food Science*, 2014, 35 (23) : 35-40. (in Chinese)
李雪萍, 李建宏, 孟宪刚, 郑楠, 谢佳佳. 浆水中微生物的分离与鉴定. *食品科学*, 2014, 35 (23) : 35-40.
- [21] Zhang H, Huang S, Li F, Zhou H, Feng W, Li X, Luo L. Progress in studies of antibiotic resistance among probiotics fermented foods. *Food and Fermentation Industries*, 2009 (7) : 119-122. (in Chinese)
张宏梅, 黄绍松, 李发俊, 周汉基, 冯伟冲, 李小欢, 骆麟虎. 发酵食品中益生菌对抗生素耐药性的研究进展. *食品与发酵工业*, 2009 (7) : 119-122.
- [22] Liang M, Zhang B, Zhao Z, Han J. Study on antibiotic resistance of probiotic *Lactobacillus*. *Hebei Journal of Industrial Science and Technology*, 2011 (4) : 250-253. (in Chinese)
梁萌萌, 张柏林, 赵紫华, 韩俊华. 几株益生乳杆菌耐药性的研究. *河北工业科技*, 2011 (4) : 250-253.
- [23] 李少英. 奶牛源性双歧杆菌和乳杆菌的分离鉴定及耐药性研究. 内蒙古农业大学博士学位论文, 2008.
- [24] 汪晓辉. 降胆固醇乳酸菌的筛选、鉴定及降解机制的研究. 浙江工商大学硕士学位论文, 2010.

Screening and functional properties of cholesterol-degrading lactic acid bacteria from Jiangshui

Xueping Li¹, Jianhong Li¹, Minquan Li^{1*}, Xiangang Meng²

¹ College of Pratacultural Science, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu Province, China

² College of Chemistry and Bioengineering Sciences, Lanzhou Jiaotong University, Lanzhou 730070, Gansu Province, China

Abstract: [Objective] We intended to obtain and characterize lactic acid bacteria with high capacity of cholesterol-degrading. [Methods] We chose Jiangshui as the experimental material, screened lactic acid bacteria by the culture medium with high cholesterol, and studied other features of lactic acid bacteria like salt-tolerant, acid resistance, then identified the species of lactic acid bacteria by combining physiological and biochemical methods and 16S rDNA sequence. [Results] All lactic acid bacteria isolated had the capacity of cholesterol-degrading to some extent. There were 4 strains had high cholesterol-degrading rate (>75%). Four strains were *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, two were *Brevibacterium casei*, and one was *Lactococcus raffinolactis*. [Conclusion] Cholesterol-degrading lactic acid bacteria were screened from Jiangshui, with application potential for cholesterol degradation.

Keywords: Jiangshui, cholesterol, lactic acid bacteria

(本文责编: 李磊, 王晋芳)

* Corresponding author. E-mail: lmq@gsau.edu.cn

Received: 9 December 2014 / Revised: 26 January 2015